



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94191402.X

[51]Int.CI⁶

G01N 30/02

[43]公开日 1996年3月20日

[22]申请日 94.1.24

[30]优先权

[32]93.1.26 [33]US[31]08/009,034

[86]国际申请 PCT/US94/00850 94.1.24

[87]国际公布 WO94/17403 英 94.8.4

[85]进入国家阶段日期 95.9.7

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 J·P·张

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

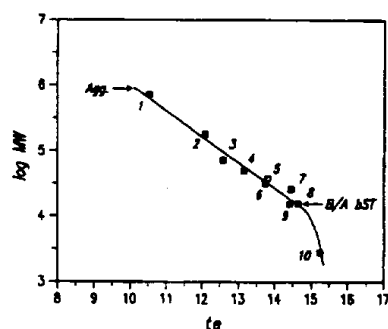
代理人 谭明胜 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 牛生长激素的非变性能测定

[57]摘要

描述了一种测定牛生长激素效能的方法。通过以平均粒子直径约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶作为固定相,以对牛生长激素试样非变性的 pH 值约为 8 到约 12 的缓冲水溶液作为流动相的粒度排阻 HPLC 测量牛生长激素试样中的生物活性牛生长激素蛋白的水平。根据所测生物活性牛生长激素蛋白的水平来测定牛生长激素试样的效能。该方法可便利、准确和精密地测量 bST 样品的效能。



1. 牛生长激素蛋白	660,000
2. 牛血清白蛋白	166,000
3. BSA	66,000
4. 卵清蛋白	43,000
5. B-乳球蛋白	35,000
6. 碳酸酐酶	29,000
7. α -酪蛋白酶原	23,000
8. α -乳清蛋白	14,200
9. 胰凝乳蛋白酶	13,700
10. 胰凝乳蛋白酶 A	2,531

权 利 要 求 书

1. 一种测定牛生长激素的效能的方法, 其中包括:

通过以平均粒子直径约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素试样非变性的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 测量牛生长激素试样中的生物活性牛生长激素蛋白的水平; 以及

根据测得的生物活性牛生长激素蛋白水平测定牛生长激素试样的效能。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中所说的缓冲水溶液为碳酸氢盐缓冲溶液。

4. 根据权利要求 3 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

5. 根据权利要求 4 的方法, 其中所说的测定包括在牛生长激素对照试样的 RRA 效能值与粒度排阻 HPLC 数据相关的校准曲线上标绘上述生物活性 bST 蛋白的测量水平。

6. 根据根据权利要求 4 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

7. 根据权利要求 4 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

8. 根据权利要求 6 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

10. 根据权利要求 6 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

11. 根据权利要求 6 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

14. 一种从牛生长激素中分离生物活性牛生长激素部分的方法, 其中包括:

通过以平均粒子大小约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素非变性的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 从牛生长激素中分离生物活性牛生长激素部分。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的缓冲水溶液为碳酸氢盐缓冲溶液。

16. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

17. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

18. 根据权利要求 16 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

19. 根据权利要求 16 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

20. 根据权利要求 16 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

21. 根据权利要求 18 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

22. 根据权利要求 20 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

24. 一种处理疏松重组体牛生长激素, 从在疏松重组体牛生长激素中含有的非生物活性牛生长激素非共价可溶性聚集体中分离生物活性的牛生长激素蛋白的方法, 其中包括:

将疏松重组体牛生长激素通过以平均粒子大小约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素非变性的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 层析, 以便从非生物活性的牛生长激素非共价可溶性聚集体中分离生物活性牛生长激素。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所说的缓冲水溶液是碳酸氢盐缓冲溶液。

26. 根据权利要求 24 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 是在约 800 到约 1000psi 的压力下进行的。

28. 根据权利要求 26 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

29. 根据权利要求 26 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

30. 根据权利要求 27 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

说明书

牛生长激素的非变性效能的测定

背景技术

本发明一般地涉及牛生长激素 (bST)。更具体地讲, 本发明涉及以适于提供 bST 效能测定的方式从 bST 中分离生物活性 bST 蛋白部分的非变性方法。

近来重组 DNA 技术促进了 bST 的大规模生产。重组体微生物如重组体大肠杆菌在其细胞质内产生 bST 不溶粒。已知作为折射体成包涵体的这些不溶粒含有聚集的变性 bST。这些折射体被回收并常用变性剂如盐酸胍, 十二烷基硫酸钠或脲处理。变性剂将不适当地折叠的 bST 分子解开并使其增溶。之后, bST 分子恢复形成适当地折叠的、生物活性的 bST 单体蛋白。

但是, 由于这些变性和恢复步骤的效能差, 也生成了某些不适当地折叠的聚集体及非生物活性的 bST 聚集体。因此, 所得 bST 疏松材料既含生物活性的 bST 单体也含非生物活性的 bST 聚集体。因此, 在质量控制中建立一种测定 bST 效能的方法是非常重要的。

从前, bST 效能由大鼠体重增加法评定。实质上, 检测服用 bST 试样的大鼠体重的增加, 并由此数据得到表示 bST 效能的数值。但是, 该测定不能用于常规分析中精确定量地表示 bST。bST 效能也可由放射受体分析法 (RRA) 来测定。但 RRA 过于耗时。而且, RRA 精确度低, 因而通常要作数个实验, 将其结果平均而

得到 bST 效能值。

反相高效液相层析 (RPHPLC) 已被用于蛋白质的测定, 但是, 大部分已使用过的 RPHPLC 法都不适于 bST 效能的测量, 这是由于在其流动相中使用可使 bST 变性的酸性介质和有机溶剂。

使用含十二烷基硫酸钠或盐酸胍作为流动相的粒度排阻 (size exclusion) 高效液相层析 (“粒度排阻 HPLC”) 以前已被用于 bST 的测定。但是, 由于其流动相使 bST 变性, 因而该方法不是生物效能测定法。

因此, 需要一种便利的、准确的和精密的非变性的测定 bST 的生物效能的方法。本发明致力于这些需要。

发明概要

本发明的一个优选方案提供了一种测定牛生长激素试样的效能的方法。该方法包括通过以具有大约 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 平均粒径的亲水多孔聚合物凝胶作为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素试样是非变性的缓冲水溶液作为流动相的粒度排阻 HPLC 测量牛生长激素试样中生物活性的牛生长激素蛋白的水平。牛生长激素试样的效能可根据该试样中所测的生物活性牛生长激素蛋白的水平而测定。

本发明的另一优选方案提供了一种将生物活性的牛生长激素部分从牛生长激素中分离的方法。该方法包括通过以具有大约 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 平均粒子大小的亲水多孔聚合物凝胶作为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素是非变性的缓冲水溶液作为流动相的粒度排阻 HPLC 从牛生长激素中分离生物活性的牛生长激素部分。

本发明的另一优选方案提供了一种处理疏松重组体牛生长激素,从疏松重组体牛生长激素中含有的非生物活性牛生长激素非共价可溶聚集体中分离生物活性的牛生长激素蛋白的方法。该方法包括将疏松重组体牛生长激素进行经过以具有大约 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 平均粒子大小的亲水性多孔聚合物凝胶作为固定相,以 pH 值约为 8 到 12 的、对牛生长激素是非变性的缓冲水溶液作为流动相的粒度排阻 HPLC 的步骤,以便从非生物活性牛生长激素非共价可溶聚集体中分离生物活性的牛生长激素。

本发明提供了实现从非生物活性 bST 形式中便利分离生物活性 bST 蛋白的方法。该方法也很好地适用于 bST 样品的效能的便利的、准确和精密的测定。另外,使用本发明的方法首次实现了 bST 非共价可溶聚集体的分离和广泛的检定。本发明另外的目的、特征和优点将由本文的描述而明显地看出。

附图的说明

图 1A 为用下文实施例所述的方法的生物活性 bST 参比标准的粒度排阻 HPLC 色谱图。

图 1B 到 1E 为用下文实施例所述的方法的疏松重组体 bST 材料的粒度排阻 HPLC 色谱图,并证明疏松材料中存在 bST 可溶聚集体。

图 2A 为表示碳酸氢盐缓冲液浓度对用下文实施例所述的方法的生物活性 bST 蛋白部分的粒度排阻 HPLC 的保留时间的影响的曲线图。

图 2B 为表示在下文实施例所述条件下碳酸氢盐缓冲液浓度对生物活性 bST 蛋白部分的粒度排阻 HPLC 峰面积响应值的影响

响的曲线图。

图 3A 为表示流动相 pH 值的变化对用下文实施例所述的方法的生物活性 bST 蛋白部分的粒度排阻 HPLC 的洗脱时间的影响的曲线图。

图 3B 为表示流动相 pH 值的变化对用下文实施例所述的方法的生物活性 bST 蛋白部分的粒度排阻 HPLC 峰面积响应值的影响的曲线图。

图 4 为表示在下文实施例所述条件下数批不同的 bST 疏松重组体的放射性受体测定效能值 (IU/mg) 与粒度排阻 HPLC 测量的生物活性 bST 蛋白水平间相关性的曲线图。

图 5 为在下文实施例所述条件下标准品蛋白质和生物活性 bST 蛋白 (“B/A bST”) 以及 bST 可溶聚集体 (“Agg.”) 的 log MW 对洗脱时间的粒度排阻 HPLC 校准曲线。

图 6 为表示在下文实施例所述条件下碳酸氢铵浓度对生物活性 bST 蛋白部分 (“B/A bST”) 和对包括 bST 可溶性聚集体的部分 (“Agg.”) 的粒度排阻 HPLC 峰面积响应值影响的曲线图。

图 7 为表示在下文实施例所述条件下流动相 pH 值对生物活性 bST 蛋白部分 (“B/A bST”) 和对包括 bST 可溶性聚集体的部分 (“Agg.”) 的粒度排阻 HPLC 峰面积影响的曲线图。

图 8 为表示在下文实施例所述条件下离心对生物活性 bST 蛋白部分 (“B/A bST”) 和包括 bST 可溶性聚集体的部分 (“Agg.”) 的粒度排阻 HPLC 峰面积影响的曲线图。

优选实施方案的说明

为了有助于进一步理解本发明的原理，这里给出其优选实施方案作为参考并将使用特殊的语言描述之。不过，显然这不是为了限制本发明的范围，对于与本发明有关的领域的技术人员来说通常可以完成这里所述的本发明原理的改进、进一步修改和应用。

如上所述，本发明的优选实施方案涉及从牛生长激素中分离生物活性牛生长激素部分的方法。这里使用的“牛生长激素”指具有天然牛生长激素性质的天然或合成来源的物质。牛生长激素可以从牛的适当的腺组织，例如垂体腺中提取；或者，现已充分建立起了通过使用遗传改进微生物如杆菌合成牛生长激素和其他此类物质。通常可便利地，甚至优选地使用该方法生产改进的牛生长激素，即该物质结构上不同于天然存在的生长激素，但它保留了天然存在的生长激素的生物活性。例如，改进的牛生长激素可在多肽链的一端或两端含有一个或多个另外的氨基酸。其他的改进对本领域技术人员来说容易理解。因此，本申请文件使用的术语牛生长激素既可以是天然存在的牛生长激素，也可以是具有天然存在的牛生长激素的生物性质的、结构相同或不同的、作合成方法制备的牛生长激素。

本发明优选地使用通过重组 DNA 技术生产的 bST (“重组体 bST”)。典型地，重组体 bST 通过将含重组体 bST 的包含体进行分离、变性和加溶而得到。然后，将此 bST 复原生成生物活性 bST 蛋白。在变性/复原步骤过程中，非生物活性的 bST 非共价聚集体与所需的生物活性 bST 蛋白一起生成。通过超滤作用可从加溶的包含体中除去胶体和某些分子量很大的杂质。但是，大量的非生

物活性 bST 非共价聚集体通常和生物活性 bST 蛋白一起通过超滤器。结果是，最后得到的疏松重组体 bST 既含生物活性 bST 蛋白也含非生物活性 bST 可溶聚集体。本发明的方法可用来处理这种疏松重组体 bST，使生物活性 bST 蛋白从非生物活性 bST 非共价可溶聚集体中分离。另外，这种分离可以以被用于提供疏松 bST 的效能的便利的、准确和精密的测定的方式来实现。

重组体 bST 的两个例子是叫作 somidobove 和 sometribove 的化合物。本发明特别优选地使用这两种重组体 bST。

本发明的方法使用以亲水性多孔聚合物凝胶作为固定相的粒度排阻 HPLC。本发明优选地使用平均粒径约 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ ，更优选约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的多孔凝胶。一般地，凝胶的平均孔径为约 100 到 200 埃，本发明优选平均孔径为约 150 埃的凝胶。另一方面，本发明所用的多孔凝胶优选具有的排阻限平均分子量大于 bST 非共价可溶聚集体分子量，例如约 10^6 或更大，更优选约 10^7 或更大。

本发明中使用的流动相为 pH 值约 8 到约 12 的、不使 bST 试样变性的缓冲水溶液。一般地，流动相中的缓冲液可包括任何有效浓度，只要流动相的离子强度保持足够低，以避免使蛋白从 bST 试样中盐析即可。碳酸氢盐 (HCO_3^-) 缓冲水溶液，例如碳酸氢铵水溶液，为优选的流动相。所需碳酸氢盐缓冲液的浓度小于约 0.7M，更优选约 0.1 到约 0.4M 的范围。流动相的 pH 值更优选约 9 到约 11，最优选约 9 到约 10。

固定相被填充在常规 HPLC 柱上，该柱是常规粒度排阻 HPLC 装置的元件。例如，粒度排阻 HPLC 装置一般包括泵、缓冲

水溶液储蓄器、紫外(UV)吸收检测器和流份收集装置。

欲用本发明的方法处理的 bST 试样优选地在与作为流动相所用的相同的缓冲水溶液中再生。试样中 bST 的浓度宜为每毫升约 0.05 到约 2 毫克(mg/mL)。更优选地, 试样中 bST 的浓度约为 0.1mg/mL 到约 1mg/mL。

粒度排阻 HPLC 柱的压力提供一个适于按本发明进行分离的流速。当然, 达到适当流速所需的压力取决于固定相的粒子大小。在优选的本发明方法中, 用于粒度排阻 HPLC 的压力及其导致的流速应在约 30 分钟内完全洗脱掉生物活性 bST 蛋白部分, 以便于测定。在这一点上, 典型的柱压约为 500 到约 1500psi, 更典型约 800 到约 1000psi。

在申请人工作的另一方面, 使用上述非变性粒度排阻 HPLC 法, 将高分子量的 bST 可溶聚集体分离并广泛地检定。在图 1B 和 1C 中, 开始于大约 9 分钟的峰漂移含这些高分子量 bST 可溶聚集体。根据粒度排阻 HPLC 的测定(图 5), 这些 bST 可溶聚集体的分子量大于 660, 000。根据放射性受体测定法的测定, bST 可溶性聚集体无生物活性。

这种 bST 可溶性聚集体在溶液中的物质也已被检定。bST 可溶性聚集体在 pH 值大于约 8.5、小于约 12 的非变性缓冲水溶液中基本溶解(图 1D、1E 和 7)。在此 pH 值范围之外, 该可溶性聚集体从非变性缓冲水溶液中沉淀出。高盐浓度也可导致 bST 可溶性聚集体沉淀(图 6)。例如, 碳酸氢盐浓度大于约 0.7M 时就能观察到 bST 可溶性聚集体的盐析。另外, 在 16, 000 倍重力(“16, 000g”)下离心时, bST 可溶性聚集体可在 0.2M 碳酸氢盐缓冲溶液(pH

9) 中保持 30 分钟或更长(图 8)。变性剂如十二烷基硫酸钠和脲能使 bST 可溶性聚集体变性为单体 bST。bST 可溶性聚集体的这些特性及其他特性将在下文实施例中进一步讨论。

为了有助于进一步理解本发明, 下面提供具体的实施例。显然, 实质上这些实施例是用于说明而非限制。

实施例

化学药品和试剂

所有试剂都为分析试剂级的, 使用时无需进一步纯化。水由 Millipore Milli-Q 水纯化系统得到。bST 参照标准和重组体 bST 疏松材料(somidobove)来自 Eli Lilly and Company。

粒度排阻 HPLC 层析条件

一种具有很多亲水基的(凝胶为交联的羟基化的聚醚), 具有约 $10\mu\text{m}$ 平均粒度的刚性多孔聚合物凝胶(商品名, Beckman SpheroGel TSK 3000PW 柱 ($600\times 7.5\text{mm}$, I. D.)) 被用于这些实施例中。除非另外指出, 这里所述的分离用的流动相为用 NaOH 调节 pH 值到 9 的 0.2M 碳酸氢铵。除非另外指出, 所有分离都在室温及 $0.5\text{mL}/\text{min}$ 的流速(相应的压力范围为约 800 到 1000psi) 下完成。试样注射体积为 $20\mu\text{L}$ 。大多数分离使用具有 911+ 光电二极管排列探测仪和 WISP 721 自动进样器的 Waters 625 LC 装置进行。但是, 精度和线性研究在由 Model 126 溶剂输送装置, Model 166 可变波长探测仪, 和 Model 507 自动进样器组成的 Beckman System - Gold HPLC 装置上进行。

试样的制备

将试样和标准物配制在流动相中。除非另外指出, 所有 bST

试样制成浓度为 1mg/mL bST。为最大限度地减少不溶解，将等分的流动相加入到 bST 中并将试样溶液在室温下放置 30 分钟。然后，将试样溶液轻摇 5 至 10 分钟。注射前将试样溶液用 Acrodisc 0.45 μ m 过滤器过滤。

bST 试样的粒度排阻 HPLC 结果

图 1A 为生物活性重组体 bST 蛋白参比标准物的粒度排阻 HPLC 色谱图，其中仅有一个含生物活性 bST 蛋白的单主峰。除流速为 1mL/min 外，图 1A 的色谱图由上述方法得到。图 1B 和 1C 为不同批的重组体 bST 疏松材料的粒度排阻 HPLC 色谱图。观察到它们之间具有良好的基线分辨的两个强峰。色谱的第一个洗脱峰 (~9 分钟) 含高分子量的 bST 可溶性聚集体，第二个洗脱峰 (~13 分钟) 为生物活性 bST 蛋白。

图 1D 和 1E 为与用于制备图 1C 色谱图的相同疏松重组体 bST 的试样的粒度排阻色谱图。图 1D 为流动相 pH 值为 11.3 时的单一色谱图。与图 1B 一样也观察到两个强峰。使用 pH 值范围为 7.9 到 12.2 时的流动相展开图 1E 的叠加色谱图。在所研究的较低和较高的 pH 值下的减小的峰面积响应值显示减小的 bST 可溶性聚集体的溶解度。更有利的是，本发明方法是使用在使 bST 可溶性聚集体的溶解度较高的 pH 值下的流动相进行的，例如，在约 9 到约 12 之间的 pH 值下进行。

图 1B 和 1C 批样的其他粒度排阻 HPLC 色谱图在相同的条件下得到，只是用了不同的非变性流动相 (0.05M 硼酸盐缓冲溶液)。所得的这些色谱图与图谱 1B 和 1C 的色谱图相似，具有两个强峰并在其间具有良好的基线分辨。因此，按照本发明，其他非变

性缓冲水溶液也易于用 粒度排阻HPLC 分离。

改变粒度排阻 HPLC 条件

研究了改变碳酸氢铵浓度对粒度排阻 HPLC 中生物活性 bST 蛋白部分的洗脱时间的影响。一系列实验证明, 根据碳酸氢铵溶液的变化, 生物活性bST 蛋白给出一条典型的粒度排阻 HPLC 曲线 (图 2A)。可以观察到, 当碳酸氢铵浓度在约 0.1M 到约 0.4M 范围时, 洗脱时间只有轻微的变化。当碳酸氢铵浓度大于约 0.4M 时, 洗脱时间增加较快。另外, 当盐(碳酸氢铵) 浓度增加到约 0.7M 以上时, bST 峰面积明显地减小(图 2B)。因此, 本发明优选的粒度排阻 HPLC 方法使用流动相中碳酸氢盐浓度低于约 0.7M 来进行。

流动相 pH 值的变化对生物活性 bST 蛋白部分粒度排阻 HPLC 洗脱时间和峰面积的响应值的影响也进行了研究。在约 7.5 到约 10.5 的范围内增加 0.2 M 碳酸氢铵流动相的 pH 值对 bST 洗脱时间无影响; 但是, 在相同的 pH 值范围内, 峰面积响应值略有增大(图 3A、3B)。

此项研究中发现, 最有利的粒度排阻 HPLC 流速为约 0.5mL/min。0.3mL/min 的流速也是适用的, 并且是等效的, 但要几乎两倍的操作时间。在 1mL/min 的流速下, 生物活性 bST 蛋白峰与空隙峰重叠。

bST 试样的非变性

为了证明本发明的方法对 bST 是非变性的, 将参比标准物 (见图 1A) 中的生物活性 bST 蛋白部分收集并通过 RRA 测定其生物活性。结果表明在流动相中收集的生物活性 bST 蛋白组分保

持了与经粒度排阻 HPLC 处理前的母体溶液相同的生物活性。

在数个不同批量的重组体疏松 bST 的实验中,证实了通过本发明粒度排阻 HPLC 法测定的生物活性 bST 蛋白水平与通过 RRA 测定的效能数据(I. U. /mg) 之间有很强的联系。由粒度排阻 HPLC 法和 RRA 所得数据的线性回归曲线如图 4 所示。数据的相关系数是 0.845。这些结果清楚地证实,本发明的粒度排阻 HPLC 法可用于 bST 疏松材料的效能值的测定。也就是,本发明粒度排阻 HPLC 法可用于测定未知效能的 bST 试样中的生物活性 bST 蛋白的水平(例如,以峰面积百分率表示)。然后,可将测定的试样中的生物活性 bST 蛋白水平,给制成与图 4 相似的已校准曲线,包括对 bST 对照组用 RRA 和粒度排阻 HPLC 测定的数据。RRA 数据与通过其他方法,如已知的大鼠重量增加法,得到的生物效能数据密切相关。因此,粒度排阻 HPLC 结果可与通过其他已知 bST 生物效能测定法得到的数据具有同样的联系。

方法的线性和精确度

本发明粒度排阻 HPLC 法的线性可通过在流动相中制备各种浓度的生物活性 bST 蛋白参比标准物而测定。将 bST 浓度范围为 0.1 到 1mg/mL 的标准溶液用粒度排阻 HPLC 处理三次,并对所得数据作线性回归分析。不同的三天中使用不同的三根柱子得到的线性的可重复性如表 1 所示。相关系数的范围为从 0.9998 到 1.000,平均相对标准误差(R. S. D)为 1.36%。

表 1

斜度	306600	301200	311400
R.S.D. %	0.60	1.51	0.77
Y - 截距	-3940	-2050	-3270
相关系数	1.0000	0.9998	0.9999

本发明粒度排阻 HPLC 法的精确度可在三天内使用两套不同的 HPLC 装置、三根不同系列号的柱子、以及三批不同量的 bST 疏松材料来评定。如表 2 所示的所得数据, 证明所测的生物活性 bST 蛋白的 R. S. D. 值小于 2.8%, 洗脱时间的可重复性为 R. S. D. 值小于 0.18%。

表 2

批	天	Beckman 装置				Waters 装置			
		n	%bST	%RSD	te	%RSD	%bST	%RSD	te
001	1	3	83.5	0.70	851	0.12	83.8	2.67	827
	2	3	81.7	1.27	831	0.09	83.7	0.91	846
	3	3	82.7	0.75	822	0.10			
002	1	3	87.1	2.23	849	0.18	86.1	2.80	824
	2	3	86.1	2.72	830	0.06	86.7	2.56	850
	3	3	88.9	1.34	824	0.10			
003	1	3	44.9	0.47	853	0.08	44.5	2.40	827
	2	3	46.3	1.14	837	0.13	46.9	1.32	854
	3	3	46.8	0.75	829	0.10			

n = 重复次数

te = 保留时间(以秒计)

RSD = 相对标准误差

通过向两批不同的 bST 疏松材料中以两种不同的浓度加入生物活性 bST 蛋白参比标准物可进行 bST 回收率的研究。在该实

验中得到的回收率的范围为101 - 104% (表 3)。

表 3

试样	加入的参 比标准物 (mg)	实测值 (mg)	n	回收率 (%)	RSD (%)
003A	0.186	0.191	3	102.5%	0.34
003A	0.465	0.471	3	101.2%	0.58
003B	0.186	0.193	3	103.8%	0.90
003B	0.465	0.472	3	101.4%	0.72

n = 重复次数

RSD = 相对标准误差

上述结果证明, 本发明粒度排阻 HPLC 法可精确而精密地测定 bST 疏松材料中的 bST 效能。

bST 可溶性聚集体的特性

如上所示, 在约 13 分钟处的峰表示生物活性 bST 蛋白部分, 而在约 9分钟处的峰表示 bST 可溶性聚集体部分(图 1B - 1E)。在另外的工作中, 粒度排阻 HPLC 法中光电二极管阵列探测器测出的 UV 光谱证明, 生物活性 bST 蛋白部分与 bST 可溶性聚集体部分具有相似的 UV 曲线。bST 可溶性聚集体在 250 - 270nm 处有一个 UV 光谱变化, 可能是由于聚集后芳香氨基酸环境变化所致。

bST 可溶性聚集体的分子量可通过粒度排阻 HPLC 作校准曲线而测量。结果如图 6 所示。bST 可溶性聚集体由于被排斥在柱体积外而洗脱, 它的分子量(MW)超过 660, 000 (甲状腺球蛋白 thyroglobulin 的 MW)。

为了进一步检定 bST 可溶性聚集体, 将疏松的 bST 溶于

0.4M 碳酸氢铵(pH 9)中,使其成为5mg/mL溶液。于16,000g离心后,在除流动相为0.4M 碳酸氢铵溶液外的上述标准粒度排阻HPLC条件下处理上清液,该分离步骤中得到的两个组分,生物活性bST蛋白和bST可溶性聚集体,被收集于单独的流份中。将每个收集的流份再次用色谱法分析以证实其洗脱时间和纯度。结果证明甚至离心后,bST聚集体仍留在溶液中。

可进行实验证实bST可溶性聚集体是以非共价键键合的。如果bST可溶性聚集体是非价键键合的蛋白,那么它可在变性剂如洗涤剂、高浓度脲和盐酸脲溶液存在下离解成单体。为了证实之,将收集到的bST可溶性聚集体流份与2%十二烷基硫酸钠(SDS)的1:1混合物用包括du pont 250柱的装置和含1%SDS的0.4M碳酸氢盐流动相进行层析。正如所预期的那样,解离的蛋白的色谱曲线和UV色谱与相同实验条件下得到的SDS单体的相同。同样的实验可证明,bST可溶性聚集体也可被3M脲所解离。

溶液中bST可溶性聚集体的其他性质也已被研究。溶液中盐的浓度可强烈地影响bST可溶性聚集体的溶解度。如图6中所示,除了在制备的试样和流动相中的碳酸氢铵浓度变化外,在上述条件下进行的粒度排阻HPLC所示,由于蛋白的盐析作用,增加碳酸氢盐浓度可敏锐地降低可溶性聚集体的溶解度。同样,碳酸氢盐缓冲溶液pH值对bST可溶性聚集体的溶解度的影响也进行了研究。当pH值小于8.5及pH大于12.5时,bST可溶性聚集体从0.2M碳酸氢盐溶液中沉淀出。从pH 8.5开始,bST可溶性聚集体的溶解度随pH值的增加而增加,在pH 9.5时达到最大(图7)。

可溶性聚集体在碳酸氢盐溶液中的稳定性也被研究。分离出的 bST 可溶性聚集体溶液可在 4°C 稳定两天，在室温稳定 9 小时以上(通过在上述时间内测量粒度排阻 HPLC 峰面积而测定)。另外，当在 16,000g 离心时，bST 可溶性聚集体可在溶液中至少保持 30 分钟(图 8)。

整个发明在前述中已被详细地说明和描述，上述内容本质上应被看作是说明性的而非限制性的，显然，已被描述的仅仅是优选方案，而在本发明的精神实质内的所有变化和改良都应该被保护。

说明书附图

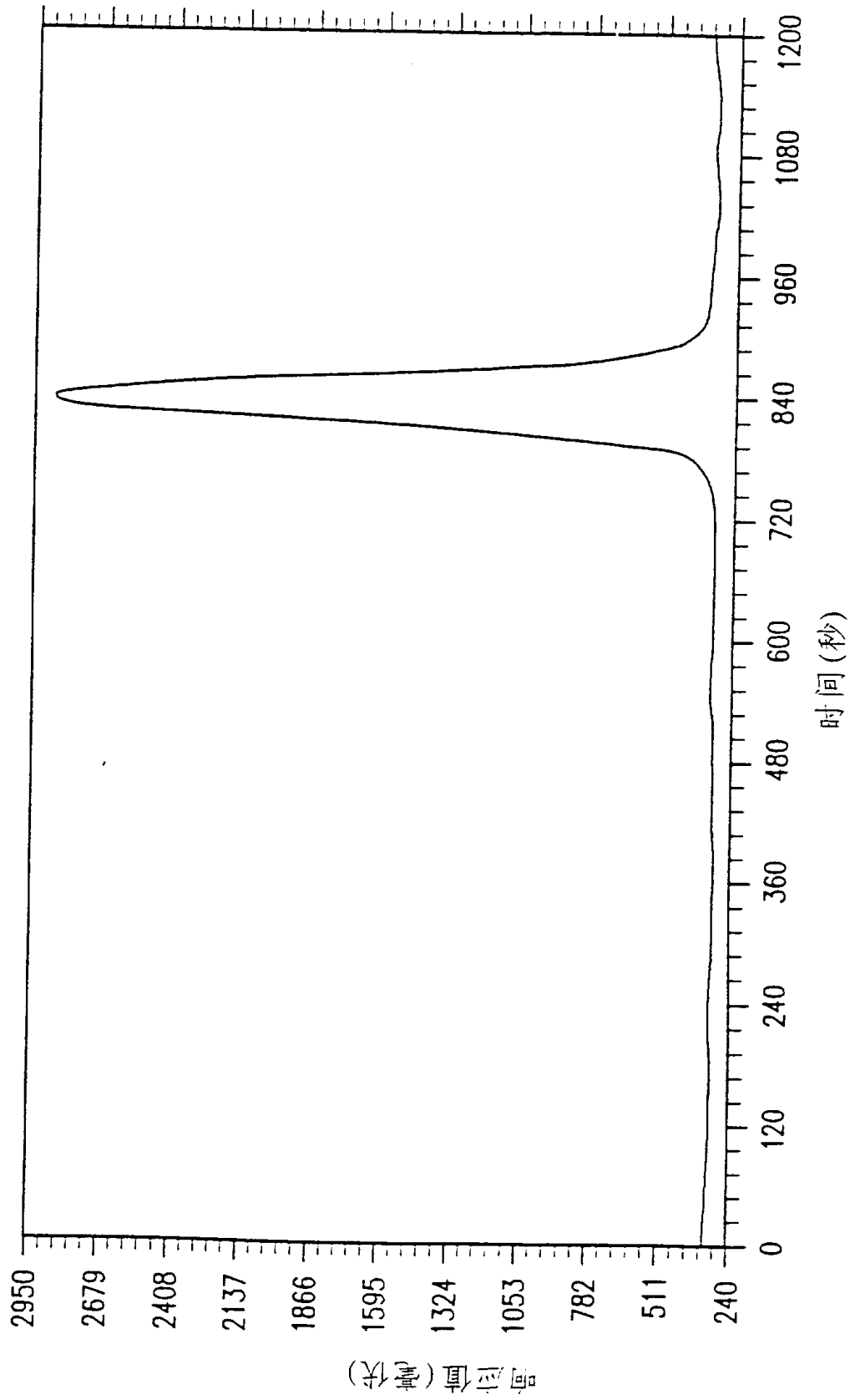


图 1A

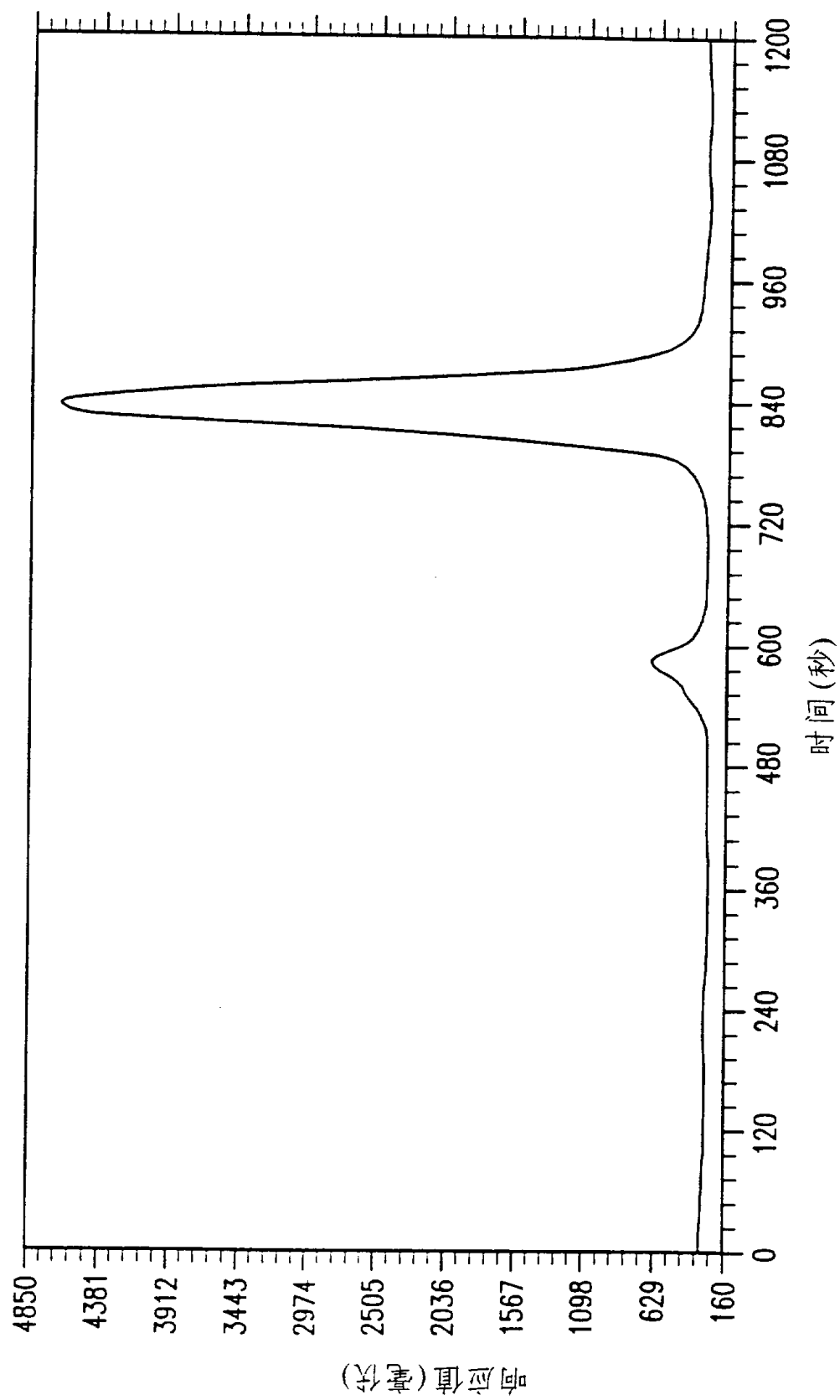


图 1B

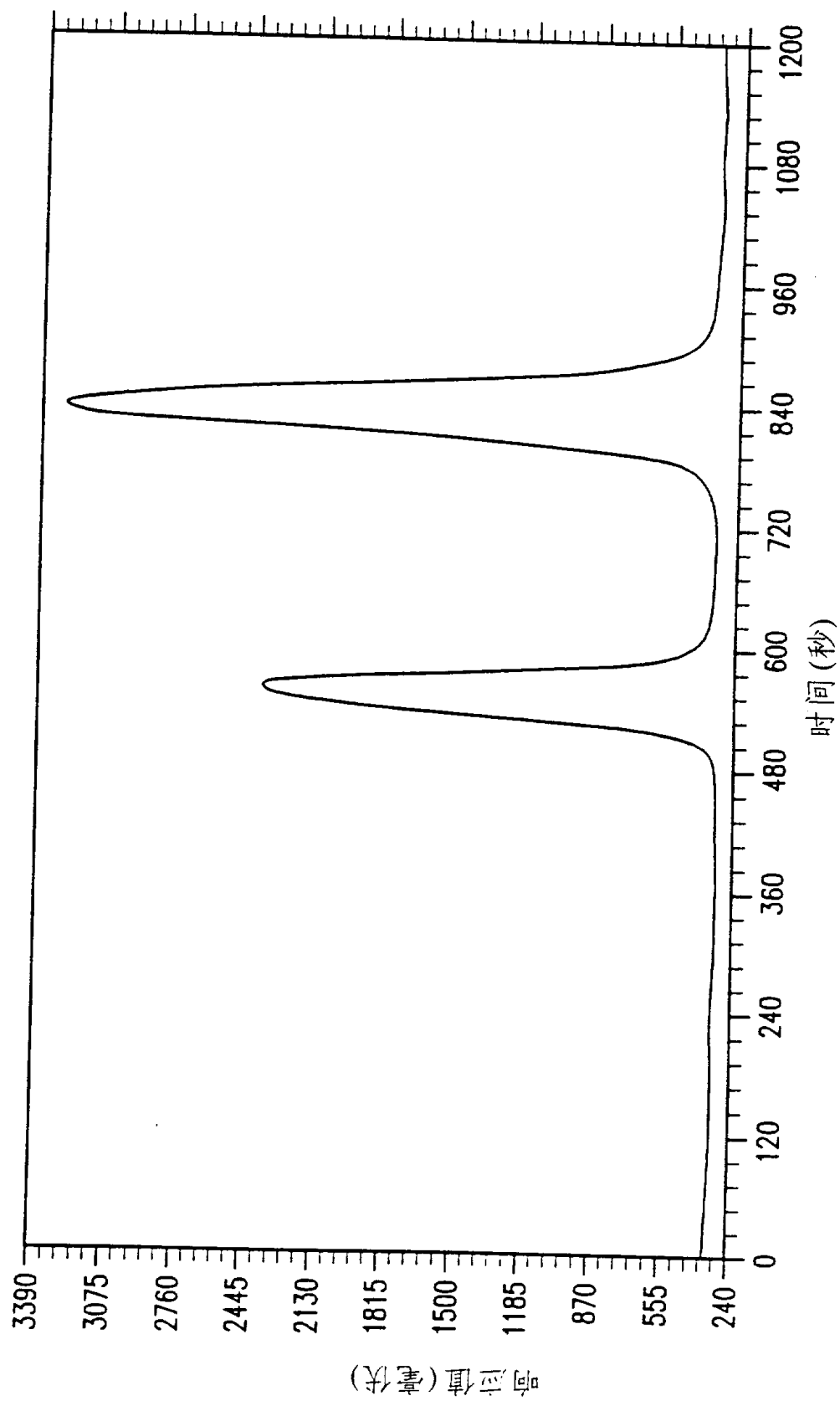


图 1C

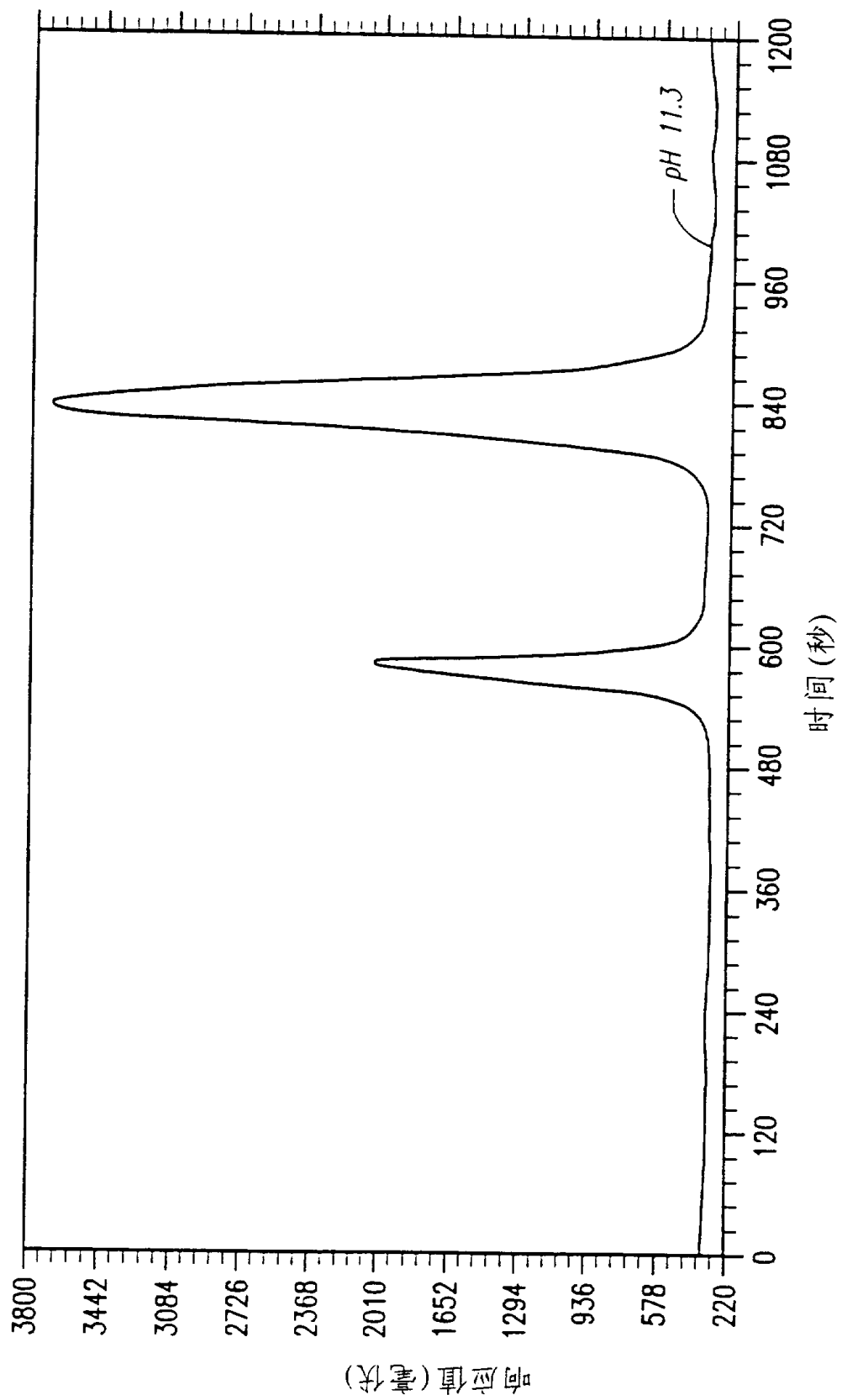


图 1D

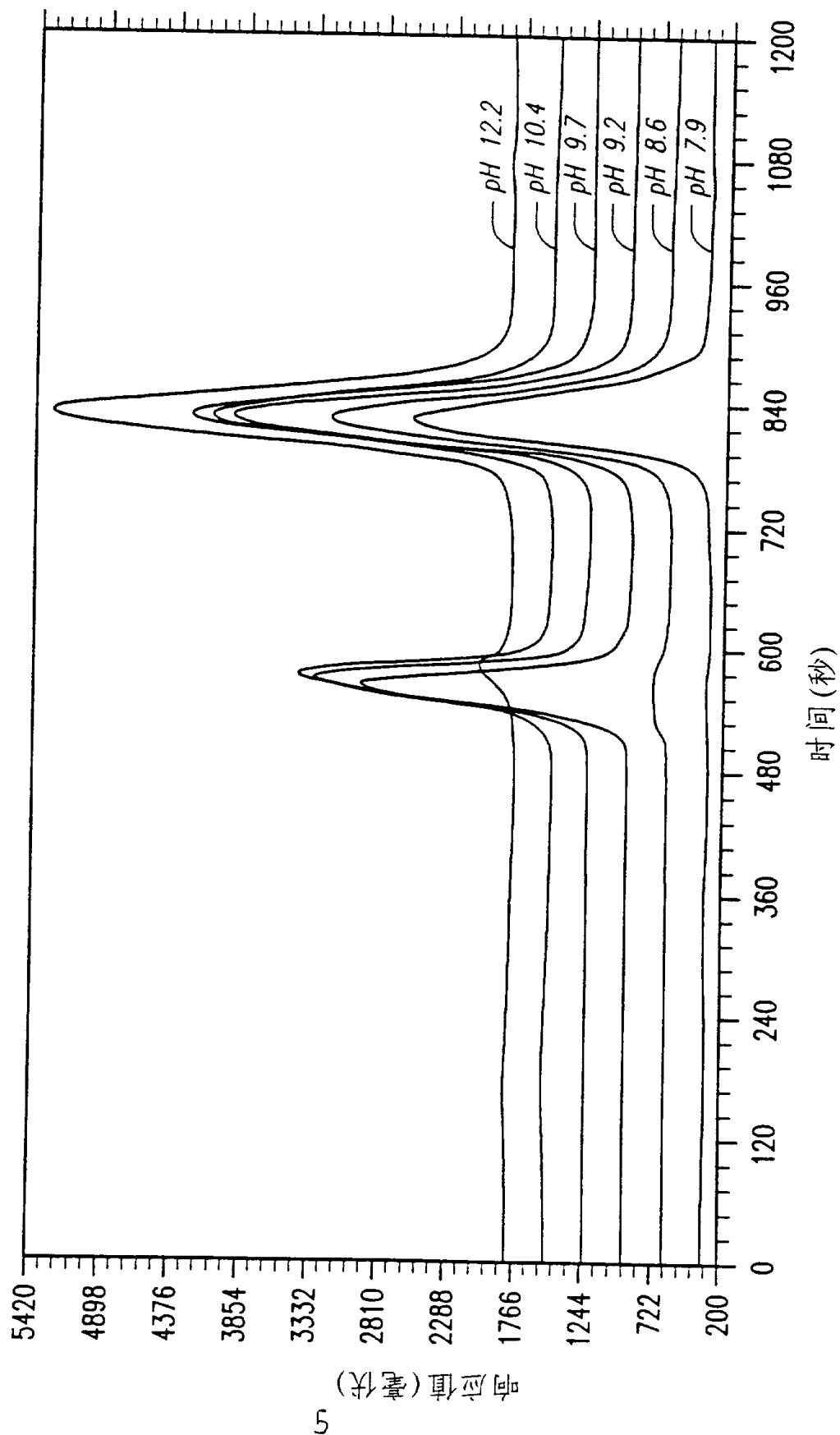


图 1E

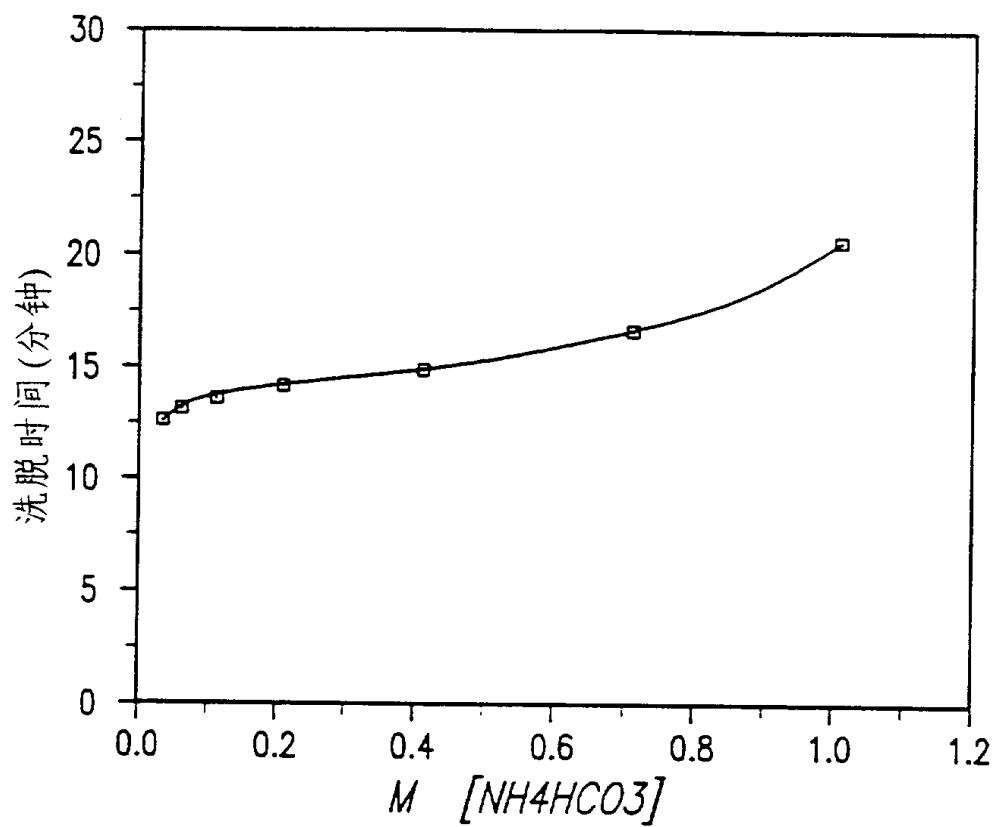


图 2A

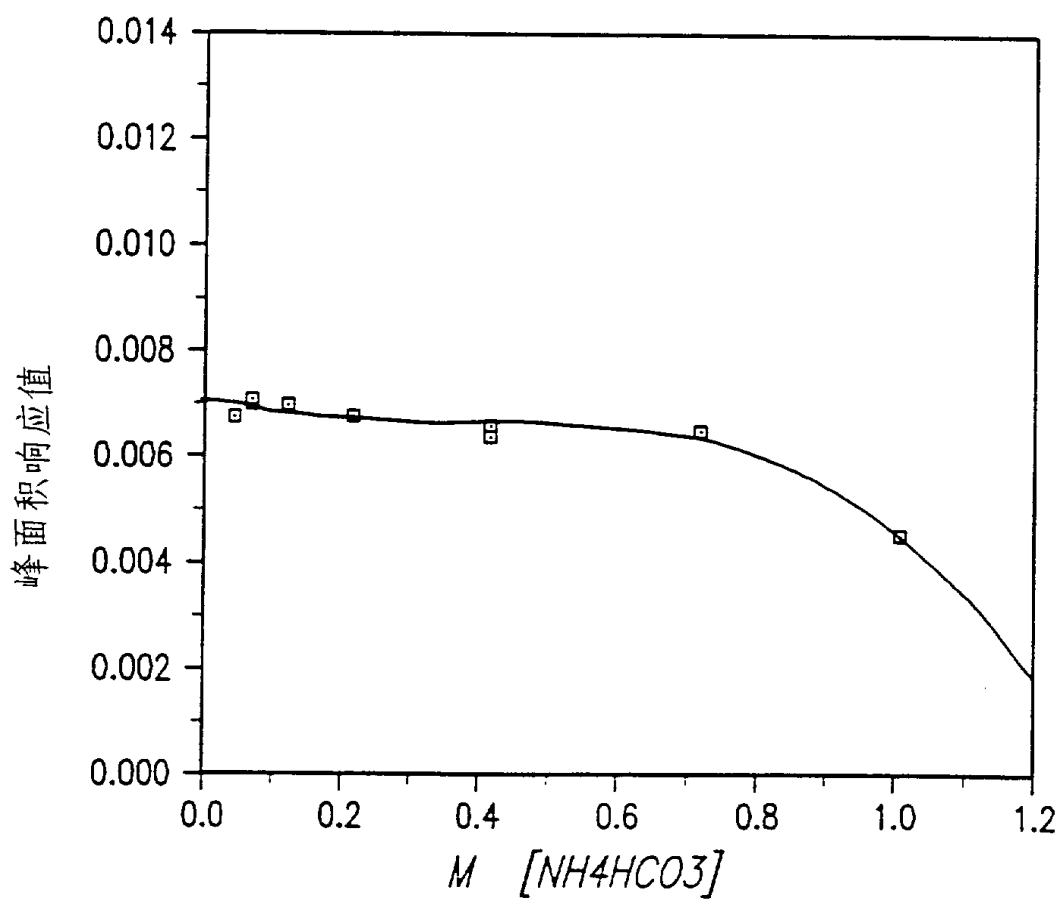


图 2B

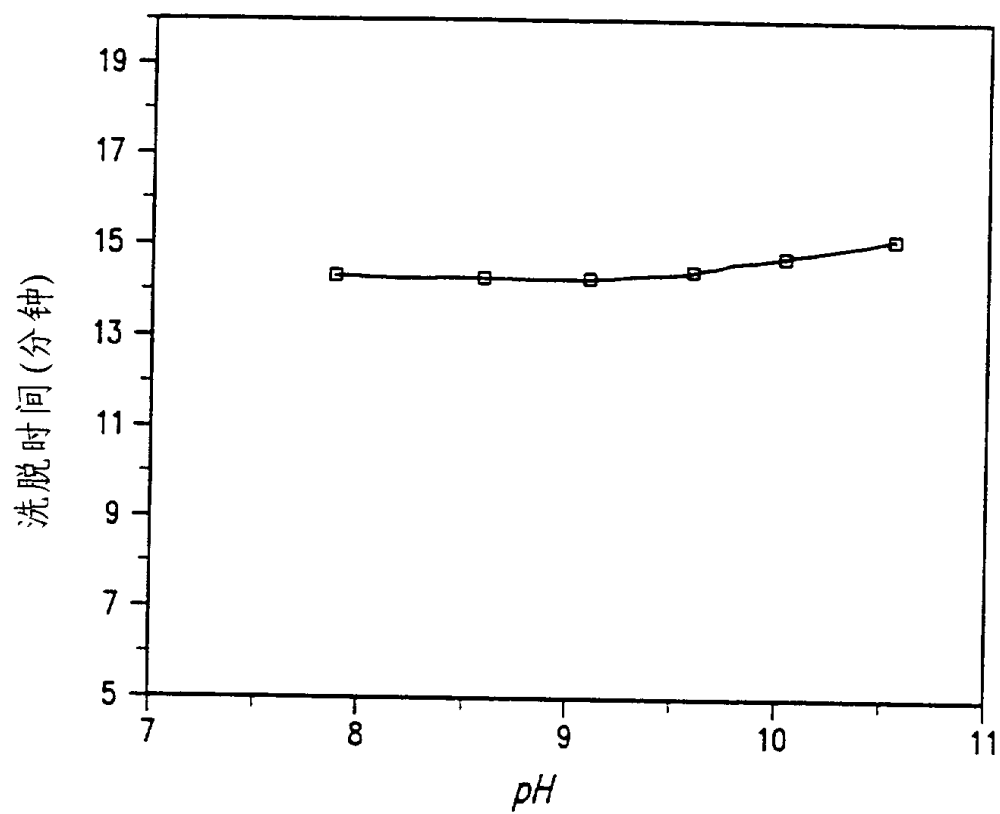


图 3A

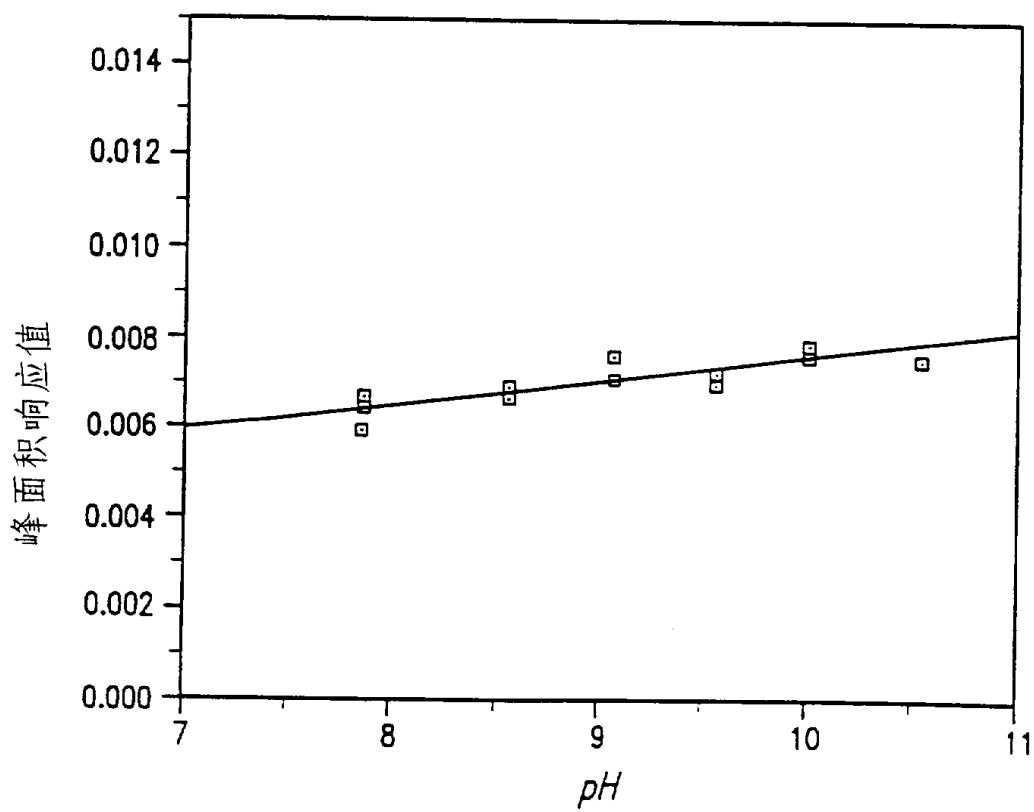


图 3B

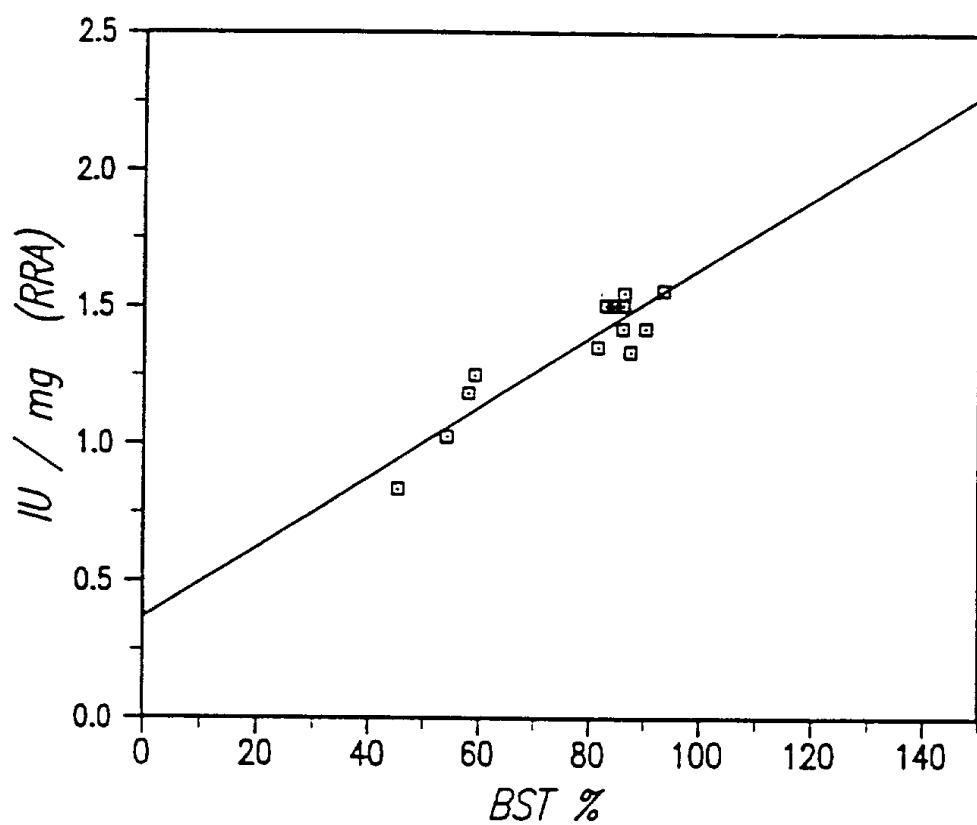


图 4

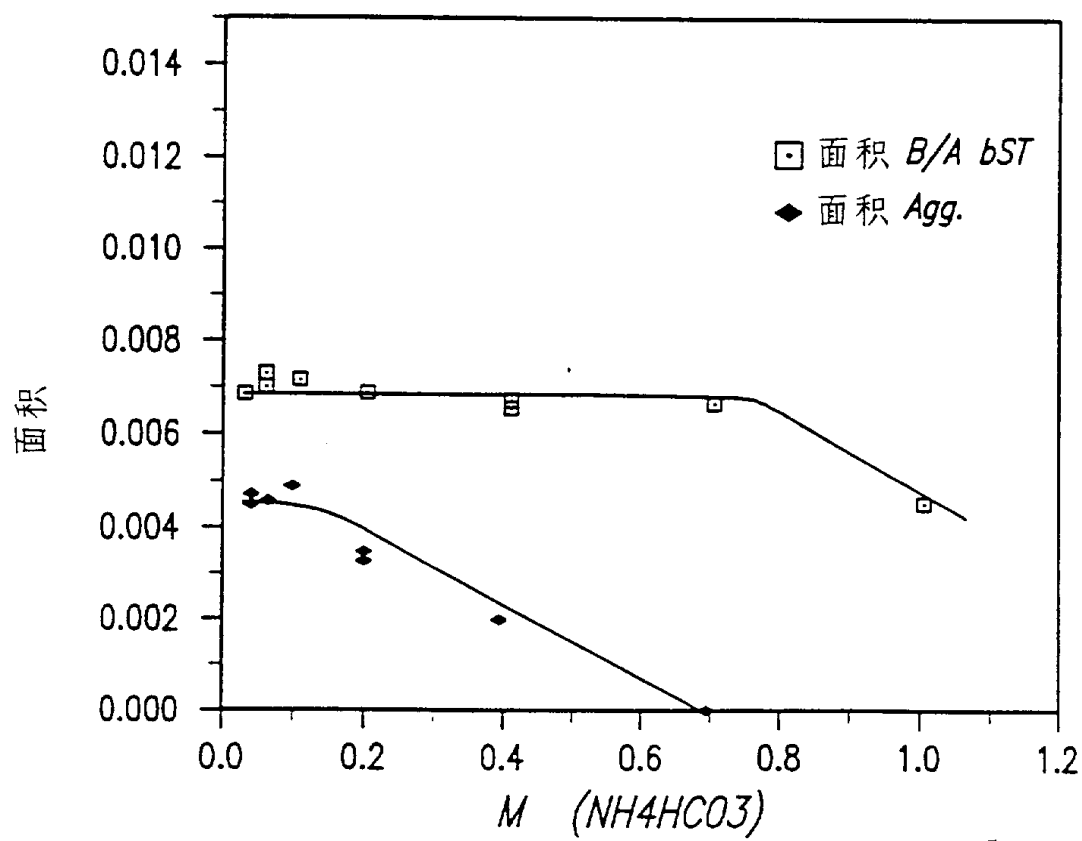
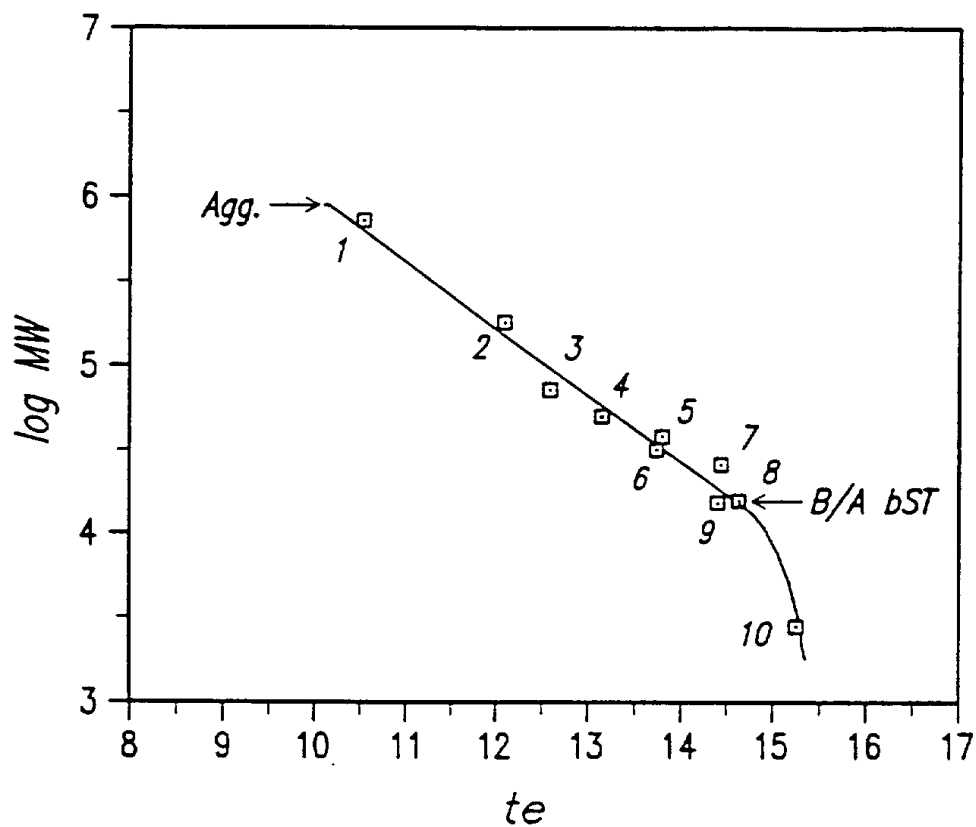


图 6



1.	甲状腺球蛋白	660,000
2.	r-球蛋白	166,000
3.	BSA	66,000
4.	卵清蛋白	45,000
5.	B-乳球蛋白	35,000
6.	碳酸酐酶	29,000
7.	α -糜蛋白酶原	23,000
8.	α -乳清蛋白	14,200
9.	核糖核酸酶 A	13,700
10.	胰岛素链 A	2,531

图 5

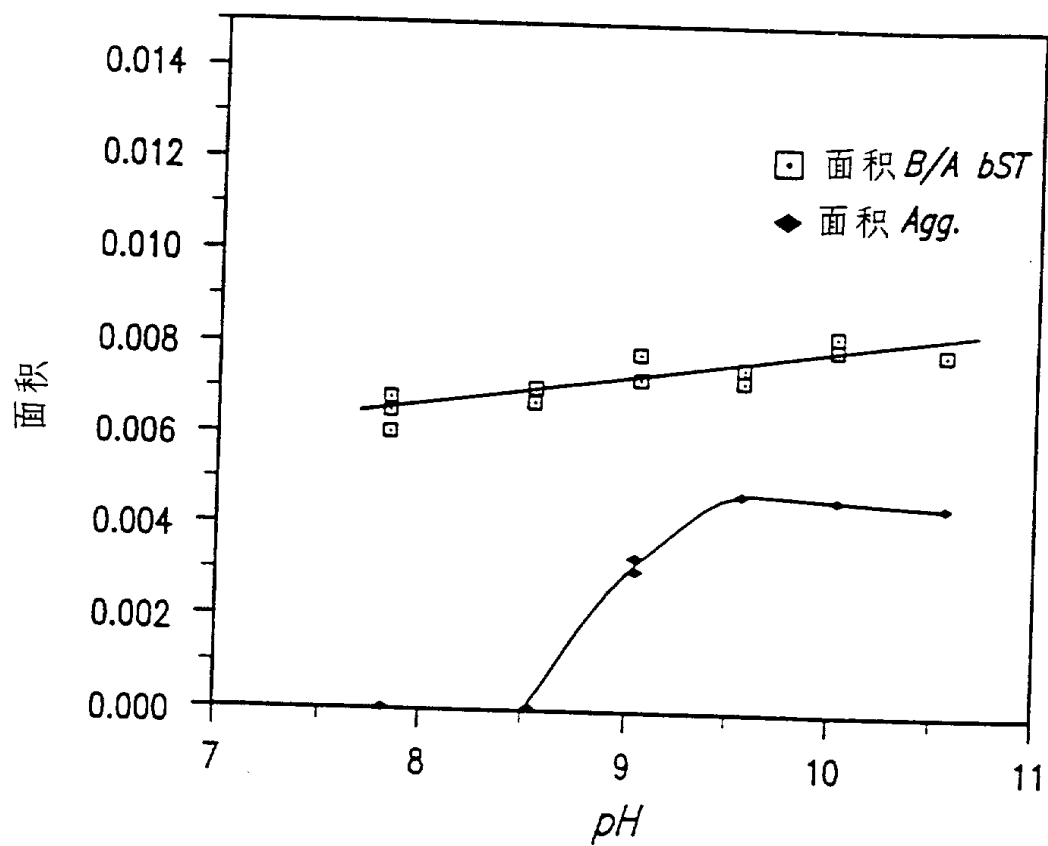


图 7

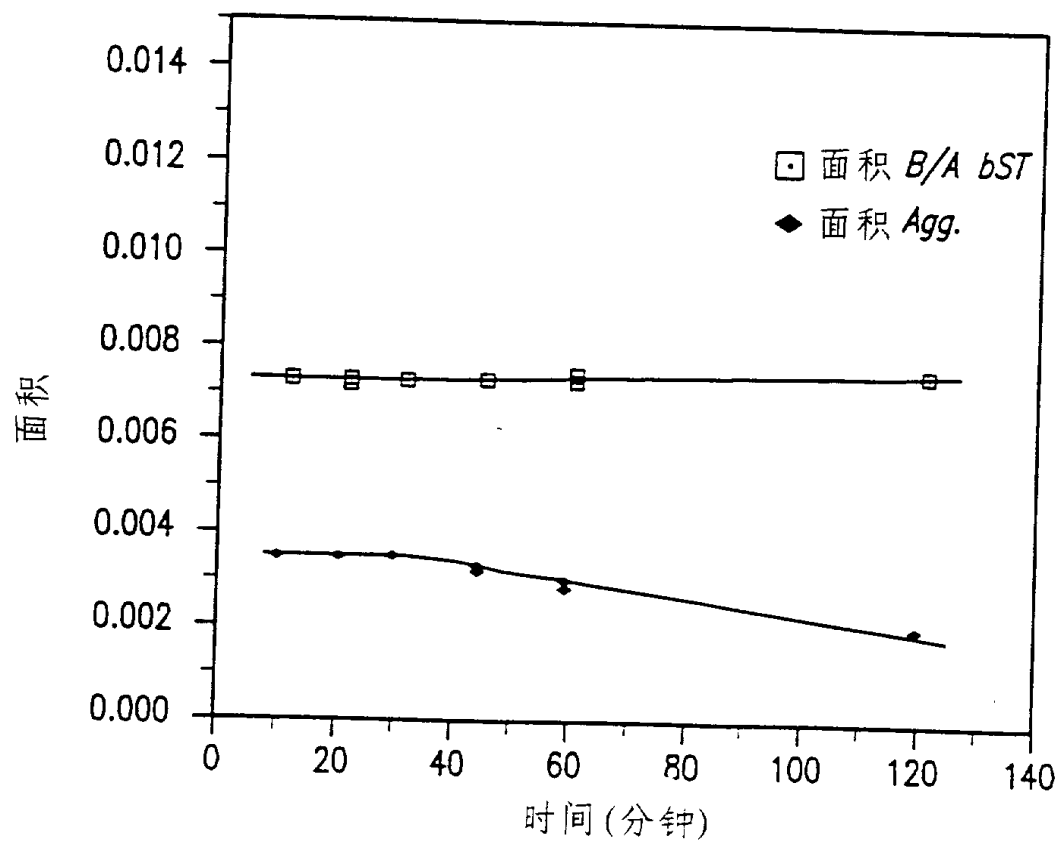


图 8

权 利 要 求 书

按照条约第 19 条的修改

1. 一种测定牛生长激素的效能的方法, 其中包括:

通过以平均粒子直径约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素试样非变性的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 测量牛生长激素试样中的生物活性牛生长激素蛋白的水平; 以及

根据测得的生物活性牛生长激素蛋白水平测定牛生长激素试样的效能。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中所说的缓冲水溶液为碳酸氢盐缓冲溶液。

4. 根据权利要求 3 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

5. 根据权利要求 4 的方法, 其中所说的测定包括在牛生长激素对照试样的 RRA 效能值与粒度排阻 HPLC 数据相关的校准曲线上标绘上述生物活性 bST 蛋白的测量水平。

6. 根据根据权利要求 4 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

7. 根据权利要求 4 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

8. 根据权利要求 6 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

10. 根据权利要求 6 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

11. 根据权利要求 6 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约 800 到约 1000psi 的压力下进行。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

14. 一种从牛生长激素试样中的非生物活性牛生长激素部分中分离生物活性牛生长激素部分的方法, 其中包括:

将牛生长激素通过以平均粒子大小约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 层析, 从非生物活性牛生长激素中分离生物活性牛生长激素部分, 上述流动相对牛生长激素是非变性的。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的缓冲水溶液为碳酸氢盐缓冲溶液。

16. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

17. 根据权利要求 14 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

18. 根据权利要求 16 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC

在约800 到约 1000psi 的压力下进行。

19. 根据权利要求 16 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

20. 根据权利要求 16 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

21. 根据权利要求 18 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

22. 根据权利要求 20 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC 在约800 到约 1000psi 的压力下进行。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。

24. 一种处理疏松重组体牛生长激素, 从在疏松重组体牛生长激素中含有的非生物活性牛生长激素非共价可溶性聚集体中分离生物活性的牛生长激素蛋白的方法, 其中包括:

将疏松重组体牛生长激素通过以平均粒子大小约为 $5\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的亲水性多孔聚合物凝胶为固定相, 以 pH 值约为 8 到约 12 的、对牛生长激素非变性的缓冲水溶液为流动相的粒度排阻 HPLC 层析, 以便从非生物活性的牛生长激素非共价可溶性聚集体中分离生物活性牛生长激素。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所说的缓冲水溶液是碳酸氢盐缓冲溶液。

26. 根据权利要求 24 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 $10\mu\text{m}$ 到约 $15\mu\text{m}$ 的平均粒子大小。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所说的粒度排阻 HPLC

是在约800 到约 1000psi 的压力下进行的。

28. 根据权利要求 26 的方法, 其中流动相的 pH 值约为 9 到约 11。

29. 根据权利要求 26 的方法, 其中流动相为浓度小于约 0.7M 的碳酸氢铵缓冲溶液。

30. 根据权利要求 27 的方法, 其中所说的亲水性多孔聚合物凝胶具有约 150 埃的平均孔径。