(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119075384 A
(43)申请公布日 2024.12.06

(21)申请号 202411089079.X

(22)申请日 2022.07.11

(30)优先权数据
63/203,198 2021.07.12 US

(62)分案原申请数据
202280047909.5 2022.07.11

(71)申请人 唐纳森公司
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 周锦翔 G·坦普尔斯 郭斌

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275
专利代理师 王维绮

(51)Int.Cl.
B01D 15/36(2006.01)
B01D 15/38(2006.01)
B01D 15/32(2006.01)
B01J 47/12(2017.01)
B01J 39/26(2006.01)
B01J 41/20(2006.01)
B01J 20/28(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)

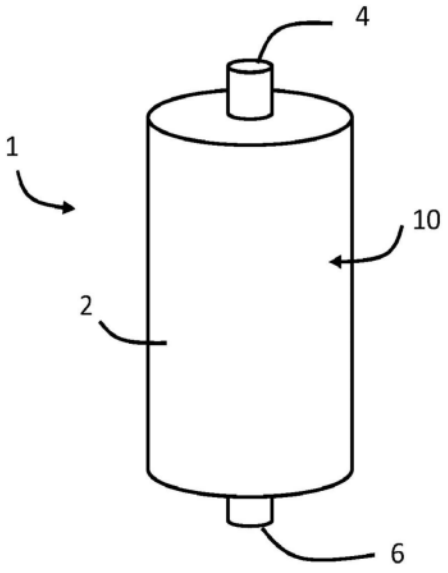
权利要求书1页 说明书27页 附图14页

(54)发明名称

核苷酸和核苷酸组分的分离介质和使用其的纯化方法

(57)摘要

分离介质包括膜和固定在膜上的多种配体，所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、疏水相互作用配体、或其组合。分离介质可以是多峰的。分离介质可以被配置成用于从反应混合物中分离包括核酸、核苷酸、核苷、核碱基、或其类似物或衍生物的靶分子。分离介质可以被配置成与有机溶剂一起使用。分离装置包括分离介质。包括核酸、核苷酸、核苷、核碱基、或其类似物和衍生物的材料可以使用分离装置高速纯化。



CN 119075384 A

1.一种分离介质,其包括:

膜;和

固定在所述膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。

2.如权利要求1所述的分离介质,其中,所述分离介质被配置成用于从反应混合物中分离包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物和类似物、及其组合的靶分子。

3.如权利要求1或2所述的分离介质,其中,所述分离介质被配置成与有机溶剂一起使用。

4.如权利要求1至3中任一项所述的分离介质,其中,所述多种配体包括阴离子交换配体,所述阴离子交换配体包含在相邻胺之间包含1至18个碳的脂肪族二胺或三胺。

5.如权利要求1至4中任一项所述的分离介质,其中,所述多种配体包括阳离子交换配体,所述阳离子交换配体包括氨基羧酸、氨基磺酸、或其组合。

6.如权利要求1至5中任一项所述的分离介质,其中,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、和疏水相互作用配体中的两种或更多种。

7.如权利要求1至6中任一项所述的分离介质,其中,所述多种配体包括具有阳离子交换官能团和亲硫官能团的配体。

8.如权利要求7所述的分离介质,其中,所述多种配体包括巯基苯甲酸、巯基磺酸、其盐、或其组合,优选地其中所述多种配体包括3-巯基-1-丙磺酸钠。

9.一种分离装置,其包括:

壳体;和

设置在所述壳体内的分离介质,所述分离介质包括:

膜;和

固定在所述膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、疏水相互作用配体、或其组合。

10.一种纯化靶分子的方法,所述方法包括:

使包含所述靶分子的溶液通过膜色谱装置,

所述靶分子包括核酸、核苷酸、核苷、核碱基、或其类似物或衍生物,并且

所述膜色谱装置包括:

壳体;和

设置在所述壳体内的分离介质,所述分离介质包括:

膜;和

固定在所述膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。

核苷酸和核苷酸组分的分离介质和使用其的纯化方法

技术领域

[0001] 本披露涉及可用于从溶液、悬浮液或分散体中分离生物分子和离子如核苷酸、核苷或核碱基的分离介质。本披露的分离介质可用于膜色谱法中的分离。本披露进一步涉及制造和使用分离介质的方法。

优先权申请

[0002] 本申请要求于2021年7月12日提交的美国临时申请号63/203,198的权益,该申请的披露通过援引以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 核苷酸、核苷及其类似物在治疗中的使用是一个快速增长的工业领域。随着核酸治疗的发展及其生产规模的扩大,需要改善的分离和纯化方法。

发明内容

[0004] 披露了可用于从溶液、悬浮液或分散体中分离靶分子的分离介质。靶分子可以是包括核苷酸或核苷的生物分子或离子。本披露的分离介质可用于膜色谱法中的分离。本披露进一步涉及制造和使用分离介质的方法。

[0005] 根据实施例,分离介质包括膜;和固定在膜上的多种配体。多种配体可以包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。分离介质可以被配置成用于从反应混合物中分离包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物和类似物、及其组合的靶分子。分离介质可以被配置成与有机溶剂一起使用。

[0006] 多种配体可以包括阴离子交换配体,这些阴离子交换配体包含在相邻胺之间包含1至18个碳的脂肪族二胺或三胺。阴离子交换配体可以包括N,N-二甲基乙二胺、N,N-二甲基丙二胺、N,N-二甲基丙烯二胺、N,N-二乙基丙二胺、或其组合。

[0007] 多种配体可以包括阳离子交换配体,这些阳离子交换配体包括氨基羧酸、氨基磺酸、或其组合。阳离子交换配体可以包括氨基苯甲酸、氨基二乙酸、氨基丙酸、3-氨基-1-丙磺酸、3-氨基-1-乙磺酸、或其组合。

[0008] 多种配体可以包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、和疏水相互作用配体中的两种或更多种。多种配体可以包括具有阳离子交换官能团和亲硫官能团的配体。多种配体可以包括巯基苯甲酸、巯基磺酸、其盐、或其组合。优选地,多种配体可以包括3-巯基-1-丙磺酸钠。

[0009] 一种分离装置可以包括:壳体;和设置在壳体内的分离介质。分离介质可以包括膜和固定在膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。壳体可以包括盒或柱。分离介质可以被配置成用于从反应混合物中分离包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合的靶分子。分离介质可以被配置成与有机溶剂一起使用。

[0010] 纯化靶分子的方法可以包括:使包含靶分子的溶液通过膜色谱装置。靶分子可以

包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合。膜色谱装置可以包括壳体;和设置在壳体内的分离介质。分离介质可以包括膜和固定在膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。壳体可以包括盒或柱。分离介质可以被配置成用于从反应混合物中分离包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合的靶分子。分离介质可以被配置成与有机溶剂一起使用。

[0011] 可以在合成核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合之后从包含反应混合物的溶液中纯化靶分子。溶液可以包含有机溶剂。溶液在膜色谱装置中的停留时间可以是60秒或更短。

附图说明

[0012] 图1A是根据实施例的分离介质的示意图。

[0013] 图1B是包括图1A的分离介质的分离装置的示意性透视图。

[0014] 图2是来自实例3的动态结合容量数据的图形表示。

[0015] 图3A-3C是来自实例4的数据的图形表示。

[0016] 图4是来自实例4的动态结合容量和压力数据的图形表示。

[0017] 图5A和5B是来自实例5的结合-洗脱数据的图形表示。

[0018] 图6A是来自实例6的色谱图。

[0019] 图6B是来自实例6的$DBC_{10\%}$和回收率数据的图形表示。

[0020] 图7A是来自实例7的动态结合容量数据的图形表示。

[0021] 图7B是来自实例7的色谱图。

[0022] 图8A示出来自实例8的叠加色谱图。

[0023] 图8B是来自实例8的样品的薄层色谱板。

[0024] 图9A-9C是来自实例9的结合-洗脱数据的图形表示。

[0025] 图9D是来自实例9的色谱图的比较。

[0026] 图10是来自实例10的数据的图形表示。

定义

[0027] 除非另外规定,否则本文使用的所有科学和技术术语均具有本领域常用的含义。本文提供的定义是为了有助于理解本文中频繁使用的某些术语,并且不意味着限制本披露的范围。

[0028] 除非另外指明,否则术语“聚合物”和“聚合物材料”包括有机均聚物、共聚物,例如像嵌段、接枝、无规和交替共聚物、三元共聚物等、以及其共混物和改性物。此外,除非另外特别限制,否则术语“聚合物”应当包括材料的所有可能的几何构型。这些构型包括全同立构、间同立构和无规立构的对称性。

[0029] 术语“芳香族环”在本披露中用于指有机化合物的共轭环系统。芳香族环可以仅包含碳原子,或者可以包含一个或多个杂原子,如氧、氮、或硫。

[0030] 术语“烷基化的”在本披露中用于描述这样的化合物:所述化合物进行反应以烷基取代化合物的氢原子或负电荷,使得烷基与化合物共价键合。

[0031] 术语“烷基”在本披露中用于描述作为烷烃自由基的一价基团,其包括直链、支链、

环状和双环烷基基团及其组合,包括未取代的和取代的烷基基团两者。除非另外指明,否则烷基基团典型地含有从1至30个碳原子。在一些实施例中,烷基基团包含1至20个碳原子、1至10个碳原子、1至6个碳原子、1至4个碳原子、或1至3个碳原子。烷基基团的实例包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、异丁基、叔丁基、异丙基、正辛基、正庚基、乙基己基、环戊基、环己基、环庚基等。

[0032] 如本文所用的术语“核酸”和/或“寡核苷酸”是指含有至少两个单链或双链形式的核苷酸(例如,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物,并且包括DNA和RNA。“核苷酸”包括糖、碱基(有时称为核碱基)和连接基团。在一些实施例中,糖可以是天然脱氧核糖或天然核糖(例如,分别为DNA和RNA)。核苷酸通过连接基团连接在一起以形成寡核苷酸。在一些实施例中,连接基团可以是磷酸酯基团。共价键合的连接基团的聚合物可以称为主链。“核苷”在其他方面类似于核苷酸,不同的是核苷不包含连接基团,如磷酸酯基团。“碱基”或“核碱基”包括嘌呤和嘧啶,其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷,以及嘌呤和嘧啶的天然类似物和合成衍生物,其包括放置新反应性基团如胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物的修饰。核苷酸包括修饰的或类似的核碱基、修饰的或类似的糖、和/或修饰的或类似的连接基团。修饰的核碱基、修饰的糖和/或修饰的连接基团可以是非规范/化学修饰的核碱基、糖和/或连接基团,其可以是合成的、天然存在的和/或非天然存在的,并且其具有与参考核酸相似的结合特性。此类类似物和/或修饰的碱基、糖和/或连接基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性-膦酸甲酯、2’-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNA)、和肽-核酸(PNA)。

[0033] 脱氧核糖寡核苷酸由称为脱氧核糖的5-碳糖组成,该脱氧核糖在该糖的5’和3’碳处共价接合至磷酸酯以形成交替的非支化聚合物。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、预缩合DNA、PCR产物、载体、表达盒、嵌合序列、染色体DNA、或这些组的衍生物和组合的形式。核糖寡核苷酸由类似的重复结构组成,其中5-碳糖是核糖。因此,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可以指由天然存在的碱基、糖和糖间(主链)连接键组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。

[0034] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还可以包括包含非天然存在的单体或其部分的聚合物或寡聚物,其功能类似。由于例如增强的细胞摄取、降低的免疫原性和在核酸酶存在下增加的稳定性的特性,此类修饰的或取代的寡核苷酸通常优于天然形式。应当理解,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还可以包括包含脱氧和核糖核苷酸组合或其变体与主链修饰组合的聚合物或寡聚物,如本文所述的那些。

[0035] 本文所述的多核苷酸和寡核苷酸可以包括一种或多种核苷酸变体,包括一种或多种非标准核苷酸、一种或多种非天然核苷酸、一种或多种核苷酸类似物和/或修饰的核苷酸。修饰的核苷酸的实例包括二氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、β-D-半乳糖基辫苷(beta-D-galactosylqueuosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、β-D-甘露糖基辫苷、5’-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸

(v)、怀丁氧苷、假尿嘧啶、辫苷、2-巯基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w、2,6-二氨基嘌呤等。在一些情况下,核苷酸可以在其磷酸酯部分中包括修饰,包括对三磷酸酯部分的修饰。此类修饰的非限制性实例包括更长的磷酸酯链(例如,具有4、5、6、7、8、9、10或更多个磷酸酯部分的磷酸酯链)和用硫醇部分的修饰(例如,α-硫代三磷酸酯和β-硫代三磷酸酯)。

[0036] 本文所述的多核苷酸或寡核苷酸可以在碱基部分(例如,在典型地可与互补核苷酸形成氢键的一个或多个原子处和/或在典型地不能与互补核苷酸形成氢键的一个或多个原子处)、糖部分或连接基团(例如,主链)处被修饰。主链修饰可以包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯、和二氨基磷酸酯连接键。硫代磷酸酯连接键用硫原子取代磷酸酯主链中的非桥氧,并且延迟寡核苷酸的核酸酶降解。二氨基磷酸酯连接键(N3'→P5')阻止核酸酶识别和降解。代替主链结构中的磷,主链修饰还可以包括肽键(例如,由肽核酸中的肽键连接的N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元),或连接基团,包括氨基甲酸酯、酰胺、以及线性和环状烃基。具有修饰的主链的寡核苷酸综述于Micklefield,Curr.Med.Chem.[当代药物化学],8(10):1157-79,2001和Lyer等人,Curr.Opin.Mol.Ther.[分子治疗学的当前观点],1(3):344-358,1999中。本文所述的核酸分子可以含有糖部分,该糖部分包括天然存在的核苷酸中存在的核糖或脱氧核糖,或修饰的糖部分或糖类似物。修饰的糖部分包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-氨基乙基、2'-氟、N3'→P5'氨基磷酸酯、2'二甲基氨基氧基乙氧基、2'2'二甲基氨基乙氧基乙氧基、2'-胍鎓、2'-O-胍鎓乙基、氨基甲酸酯修饰的糖、和双环修饰的糖。2'-O-甲基或2'-O-甲氧基乙基修饰促进寡核苷酸中的A-形式或RNA样构象,增加对RNA的结合亲和力,并且具有增强的核酸酶抗性。修饰的糖部分还可以包括具有额外的桥键(例如,连接锁核酸中的核糖的2'-O和4'-C原子的亚甲基桥)或糖类似物如吗啉环(例如,在吗啉代二氨基磷酸酯中)。

[0037] 除非另外指明,否则特定的核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个所选(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.[核酸研究],19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子和细胞探针],8:91-98(1994))。

[0038] 本披露的方法涵盖分离的或基本上纯化的核苷酸、核苷、核酸分子和含有这些分子的组合物的分离和/或纯化。如本文所用,"分离的"或"基本纯化的"DNA分子或RNA分子是脱离其天然环境而存在的DNA分子或RNA分子。分离的DNA分子或RNA分子可以以纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境中,例如像转基因宿主细胞。例如,"分离的"或"纯化的"核酸分子或其生物活性部分当通过重组技术产生时基本上不含其他细胞材料或培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。在一个实施例中,"分离的"核酸不含在该核酸所来源的生物体的基因组DNA中天然侧接核酸的序列(即,位于核酸的5'和3'端的序列)。

[0039] 如本文所用的术语"药物组合物"及其语法等同物可以指待施用于受试者(例如,有需要的人)的包含治疗有效量的活性药物成分以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、

载体和/或治疗剂的混合物或溶液。

[0040] 术语“亲液剂(kosmotrope)”通常用于表示通过稳定水-水相互作用而增加水的有序度的溶质。亲液剂可以是离子的或非离子的。相反,术语“离液剂(chaotrope)”通常用于表示通过破坏水-水相互作用的稳定性而降低水的有序度的溶质。离液剂可以是离子的或非离子的。

[0041] 如本文所用的术语“基本上”具有与“显著”相同的含义,并且可以理解为用至少约90%、至少约95%或至少约98%来修饰随后的术语。术语“基本上不含”特定化合物意指本发明的组合物包含小于1,000份/百万份(ppm)的所述化合物。术语“基本上不含”特定化合物意指本发明的组合物包含小于100份/百万份(ppm)的所述化合物。术语“完全不含”特定化合物意指本发明的组合物含有小于20份/十亿份(ppb)的所述化合物。在上述短语的上下文中,本发明的组合物含有小于上述量的化合物,无论该化合物本身是以未反应的形式存在还是已经与一种或多种其他材料反应。

[0042] 如本文所用的术语“非基本上”具有与“非显著”相同的含义,并且可以理解为具有“基本上”的相反含义,即,以不超过25%、不超过10%、不超过5%或不超过2%修饰随后的术语。

[0043] 术语“约”此处与数值结合使用是为了包含本领域技术人员所预期的测量值的正常变化,并且应当理解为具有与“大致”相同的含义且涵盖典型的误差范围,比如所述值的±5%。

[0044] 比如“一个”、“一种”和“所述”等术语不旨在仅指单数实体,而是包括可以使用特定实例进行说明的一般类别。

[0045] 术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述”与术语“至少一个/种”可互换使用。清单之前的短语“……中的至少一个/种”和“包括……中的至少一个/种”是指所述清单中的任何一个项以及所述清单中的两个或更多个项的任何组合。

[0046] 如本文所用,术语“或”通常以其包括“和/或”的通常意义使用,除非上下文另外明确指出。术语“和/或”意指所列出的要素中的一个或全部或者所列出的要素中的任何两个或更多个的组合。

[0047] 通过端点叙述数值范围包括归入所述范围内的所有数(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等,或者10或更小包括10、9.4、7.6、5、4.3、2.9、1.62、0.3等)。在值范围为“最高达”或“至少”特定值的情况下,这个值包含在所述范围内。

[0048] 如本文所用,“具有(have/having)”、“包含(include/including)”、“包括(comprise/comprising)”等以开放式意义使用,并且一般意指“包括但不限于”。应当理解,术语“基本上由……组成”、“由……组成”等被包含在“包括(comprising)”等中。如本文所用,当涉及组合物、产品、方法等时,“基本上由……组成”是指组合物、产品、方法等的组成部分限于所列举的组成部分和不会实质性影响组合物、产品、方法等的(多个)基本特性和新颖特性的任何其他组成部分。

[0049] 词语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下可以提供某些益处的实施例。然而,在相同的或其他情况下,其他实施例也可以是优选的。此外,对一个或多个优选实施例的叙述并不暗示其他实施例不是可用的并且不旨在将其他实施例排除在包括权利要求的本披露的范围之外。

[0050] 为了清楚起见,在此提到的任何方向如“顶部”、“底部”、“左”、“右”、“上部”、“下部”以及其他方向和取向在本文中参考附图进行描述,并且不是限制实际的装置或系统或使用该装置或系统。如本文所述的装置或系统可以以多个方向和取向来使用。

具体实施方式

[0051] 本披露涉及可用于从溶液、悬浮液或分散体中分离靶分子的分离介质。靶分子可以是生物分子或离子,包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合。本披露的分离介质可用于膜色谱法中的分离。本披露进一步涉及制造和使用分离介质的方法。

[0052] 基因和细胞治疗行业由于其治疗各种破坏性疾病的巨大潜力而迅速转向商业化进程。质粒DNA(pDNA)是生产广泛用于基因和细胞治疗的病毒载体、蛋白质和mRNA的关键组分。对于高容量、高质量的pDNA生产存在突然和迫切的需求。但是pDNA生产已经成为该行业的瓶颈,因为pDNA生产的规模化并不简单。目前,合格的合同制造商有很长的等待名单和大量的积压订单,以满足高需求。与许多其他生物制剂生产方案一样,pDNA生产中涉及多个步骤和单元操作。

[0053] 越来越多地利用核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合来制备药物组合物。衍生化可以包括例如氟化、糖替代、添加各种功能部分、或许多其他已知的或新的修饰。此类衍生化可以被设计成通过改善药代动力学、运输、改变前药状态或利用患病组织特有的酶促途径的上调,将核苷、核苷酸或核碱基转化或修饰成用于核酸治疗的关键结构单元,或更耐受或更有效的药物。此类药物组合物可用于多种情况,包括HIV/AIDS治疗和癌症治疗。此类类似物通常利用由HIV或产生癌症的细胞上调的途径,或者包括诱导错配或其他复制/翻译错误、阻止分裂、和/或诱导细胞死亡的类似物。

[0054] 另外,随着核酸治疗的兴起,正在寻求另外的取代和修饰,以通过改善稳定性或降低或上调免疫原性特性来提高治疗的耐受性。例如,对胞苷和尿苷碱基的修饰可以包括5-碘胞苷-5’-三磷酸酯、5-甲基胞苷-5’-三磷酸酯、2-巯基胞苷-5’-三磷酸酯、6-氮胞苷-5’-三磷酸酯、5-溴胞苷-5’-三磷酸酯、5-氨基烯丙基胞苷-5’-三磷酸酯、假异胞苷-5’-三磷酸酯、N^4-甲基胞苷-5’-三磷酸酯、5-羧基胞苷-5’-三磷酸酯、5-甲酰胞苷-5’-三磷酸酯、5-羟甲基胞苷-5’-三磷酸酯、5-羟基胞苷-5’-三磷酸酯、5-甲氧基胞苷-5’-三磷酸酯、噻吩并胞苷-5’-三磷酸酯、5-溴-2’-脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、5-丙炔基-2’脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、5-碘-2’-脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、5-甲基-2’-脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、2’-脱氧-P-核苷-5’-三磷酸酯、5-羟基-2’脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、2-硫代-2’-脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、5-氨基烯丙基-2’-脱氧胞苷-5’-三磷酸酯、假尿苷-5’-三磷酸酯、2’-O-甲基假尿苷-5’-三磷酸酯、N^1-甲基假尿苷-5’-三磷酸酯、N^1-乙基假尿苷-5’-三磷酸酯、N^1-甲基-2’-O-甲基假尿苷-5’-三磷酸酯、N^1-甲氧基甲基假尿苷-5’-三磷酸酯、N^1-丙基假尿苷-5’-三磷酸酯、或其未磷酸化的碱基。可以对胸苷和胍碱基进行类似的修饰。

[0055] 传统上,下游纯化成本昂贵、缓慢且难以规模化。典型的核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合的纯化系列包括各种步骤,如过滤、超滤、和利用一种或多种类型的色谱柱的各种色谱分离。用于核苷酸、核苷、核碱基或核酸纯化的典型色谱柱可以具有树脂的填充床柱,其被配置为例如尺寸排阻色谱法或反相色谱法。几十年来,基于树脂的色谱柱一直是用于纯化生物制剂的黄金标准。然而,大体积的柱色谱法可能非常慢。已知树脂

柱需要长的停留时间以充分发挥功能。

[0056] 根据实施例,分离介质包括功能化基材。功能化基材可以是功能化膜。与树脂柱相比,膜吸附器在较短的柱停留时间内表现良好,有可能为生物制剂提供快速分离。本披露提供了适合分离和纯化各种核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合的膜。可以使用本披露的膜分离的感兴趣的化合物在此统称为靶分子,无论它们是处于带电(离子化)状态还是不带电状态。靶分子可以存在于溶液、悬浮液或分散体中。为了简单起见,含有靶分子的液体在此称为溶液。液体可以是反应混合物。例如,液体可以是用于制备或合成靶分子(例如,核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、及其组合)的反应混合物。分离介质可以被配置成用于从反应混合物中纯化靶分子。分离介质可以被配置成用于从起始材料、中间体和其他反应产物中分离靶分子。反应混合物还可以包含溶剂,如水、有机溶剂、或其组合,以及溶解在溶剂中的可溶性组分。分离介质可以被配置成与有机溶剂一起使用。分离介质可以被配置成从包含有机溶剂的溶液中分离或纯化靶分子。

[0057] 本披露的功能化基材包含一个或多个与靶分子相互作用的官能团。在一些实施例中,官能团对靶分子具有亲和力,并且可以与靶分子结合或减慢它们穿过或沿着膜的转移。

[0058] 根据实施例,靶分子包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物或类似物、或其组合。核苷酸和核苷包含核碱基作为其结构单元。通常,本披露提供了用于纯化核碱基/核苷/核苷酸的膜和方法,这些核碱基/核苷/核苷酸包括天然核碱基/核苷/核苷酸、修饰的核碱基/核苷/核苷酸、核碱基/核苷/核苷酸类似物等。

[0059] DNA中的四种核碱基(腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T))和另外的碱基(尿嘧啶(U))具有独特的特性,可以利用这些特性来增强纯化序列,该纯化序列包括疏水组分、芳香族组分、氢键供体和受体、和/或可以诱导带有电荷的基团。但是核碱基/核苷/核苷酸的修饰可能改变这些特性中的一些。例如,为了分离,具有胺基的化合物可以有意或无意地被试剂如叔丁氧基羰基保护基团(BOC)保护。在合成中使用保护基团以暂时掩蔽官能团的化学特征,因为官能团会干扰其他反应。受保护的胺会受到空间位阻,并且会少一个氢键供体位点,并且因此会阻碍标准的杂化规则,然而值得注意的是,可能存在可能受或可能不受受保护的胺基影响的替代配对构型。通常,此类具有受保护基团的碱基难以用在药物生产环境中用于纯化此类核碱基类似物的传统化学分离技术如硅胶色谱法、液-液萃取、液/固萃取、蒸馏(由于常见保护基团的吸入危险,通常不安全)分离。

[0060] 根据实施例,本披露提供了利用杂交和基于杂交的纯化方法来纯化核苷/核苷酸及其类似物和衍生物的功能化基材(例如,功能化膜)。例如,基于利用杂交的方法如沃森克里克碱基配对(Watson crick base pairing),可以有效地纯化单一核苷、核苷酸或寡核苷酸。

[0061] 在一些实施例中,沃森克里克碱基配对的采用提供了靶分子的高度特异性纯化。在一个实施例中,可以将核苷酸、核苷或寡核苷酸固定在基材上以提供配体,并且然后可以用于捕获其互补碱基。例如,可以将腺嘌呤(A)或其衍生物固定在基材上以产生功能化基材。腺嘌呤功能化基材可以用于捕获胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)及其衍生物。可以将胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)或其衍生物固定到支持物上以捕获腺嘌呤(A)及其衍生物。可以将胞嘧啶(C)固定以捕获鸟嘌呤(G)及其衍生物,反之亦然。

[0062] 用作分离介质的基础材料的基材可以是任何合适的材料。在一些实施例中,基材

是或包括膜、树脂、整料、水凝胶、织造纤维基材、非织造纤维基材、或其组合。在一个实施例中，功能化基材是或包括膜。在一个实施例中，功能化基材是或包括织造或非织造纤维基材。在与配体反应前，可以修饰基材以包含反应性化学部分。这在非反应性基材如ePTFE的情况下可能特别有用。修饰可以包括例如等离子体处理、浸涂聚(乙烯醇)、电晕处理等。

[0063] 非织造基材(例如，纤网)典型地通过熔喷、湿法成网、熔融纺丝、溶液纺丝、气流成网、或静电纺丝来产生。非织造纤网另外可以通过后处理步骤如压延、压花、针刺或水刺进行处理。非织造基材还可以含有对生物分子具有低结合亲和力的结构树脂。此类树脂典型地用于增加非织造纤网的强度。许多非织造基材包括纤维浆料和纤维材料的混合物。用于制造非织造基材和织造基材的纤维可以包括玻璃、聚丙烯、聚酰胺、聚酯、纤维素材料等、及其组合。纤维可以具有0.1μm或更大、1μm或更大、2μm或更大、或3μm或更大的平均纤维尺寸。纤维可以具有100μm或更小、50μm或更小、25μm或更小、10μm或更小、或8μm或更小的平均纤维尺寸。平均纤维尺寸可以在从0.1μm至50μm、或从1μm至25μm的范围内。通过毛细管流动孔隙率仪测量的平均孔径可以是1μm或更大、2μm或更大、或3μm或更大。平均孔径可以是100μm或更小、50μm或更小、25μm或更小、10μm或更小、或8μm或更小。合适的非织造基材的平均孔径可以在从0.1μm至50μm、从1μm至10μm、或从3μm至8μm的范围内。织造基材的平均孔径可以略大于非织造基材，并且可以在从1μm至100μm的范围内。纤维基材的基重可以是1gsm(克/平方米)或更大、10gsm或更大、或20gsm或更大。纤维基材的基重可以是200gsm或更小或80gsm或更小。纤维基材的基重可以在1gsm至200gsm、或从20gsm至80gsm的范围内。

[0064] 根据实施例，基材是或包括膜。膜应理解为在所有维度上都具有连续的聚合材料通道的材料片材。膜材料的实例包括聚烯烃、聚醚砜、聚(四氟乙烯)、尼龙、玻璃纤维、水凝胶、聚乙烯醇、天然聚合物如纤维素、纤维素酯、乙酸纤维素、再生纤维素、纤维素纳米纤维、纤维素衍生物、琼脂糖、壳聚糖、聚乙烯、聚酯、聚砜、膨体聚四氟乙烯(ePTFE)、聚偏二氟乙烯、聚酰胺(尼龙)、聚丙烯腈、聚碳酸酯、及其组合。

[0065] 根据实施例，有用的膜具有如通过毛细管流动孔隙率仪测量的10μm或更小、5μm或更小、2μm或更小、1μm或更小、0.45μm或更小、或0.2μm或更小的平均孔径。膜可以具有0.1μm或更大、0.2μm或更大、0.45μm或更大、0.7μm或更大、或1μm或更大的平均孔径。膜可以具有范围从约0.1μm至10.0μm、0.1μm至0.2μm、0.1μm至0.45μm、0.1μm至1μm、0.1μm至2μm、0.2μm至0.45、0.2μm至1μm、0.2μm至2μm、0.2μm至10μm、0.45μm至1μm、0.45μm至2μm、0.45μm至10μm、1μm至2μm、或1μm至5μm的平均孔径。膜可以具有500μm或更大、250μm或更大、100μm或更大、80μm或更大、50μm或更大、或30μm或更大的厚度。膜可以具有2500μm或更小、1000μm或更小、500μm或更小、250μm或更小、或100μm或更小的厚度。膜的厚度可以在30μm至500μm、50μm至500μm、80μm至500μm、100μm至500μm、250μm至500μm、30μm至250μm、50μm至250μm、80μm至250μm、100μm至2500μm、30μm至100μm、50μm至100μm、或80μm至100μm的范围内。

[0066] 膜可以堆叠成多层布置以增加对于给定应用的容量。在一个实施例中，膜的堆叠布置具有70μm或更大、250μm或更大、或500μm或更大的厚度。膜的堆叠布置可以具有10,000μm或更小、7,500μm或更小、5,000μm或更小、4,000μm或更小、3,000μm或更小、2,500μm或更小、2,000μm或更小、1,000μm或更小、750μm或更小、500μm或更小、400μm或更小、或300μm或更小的厚度。膜的堆叠布置可以具有范围为从70μm至10,000μm、70μm至100μm、70μm至200μm、70μm至300μm、70μm至400μm、70μm至500μm、70μm至750μm、70μm至1,000μm、70μm至2,000μ

m、70μm至3,000μm、70μm至4,000μm、70μm至5,000μm、250μm至300μm、250μm至400μm、250μm至500μm、250μm至750μm、250μm至1,000μm、250μm至2,000μm、250μm至3,000μm、250μm至4,000μm、250μm至5,000μm、500μm至1,000μm、500μm至2,000μm、500μm至3,000μm、500μm至4,000μm、或500μm或5,000μm的厚度。

[0067] 在一个优选的实施例中,该膜是再生纤维素膜,其具有在0.2μm与5.0μm之间的孔径、在70μm与2,000μm之间的厚度,堆叠布置的厚度大约为70μm至10,000μm。

[0068] 该基材可以是微滤膜。微滤膜典型地通过相转化方法或膨胀方法产生。用于制备膜的典型材料包括PES、尼龙、PVDF、乙酸纤维素、再生纤维素、聚丙烯、和膨体PTFE。

[0069] 在一些情况下,膜不能耐受宽范围的有机溶剂。可以选择膜和配体,使得膜不溶于分离或纯化过程中使用的溶剂。

[0070] 在靶分子是核苷酸或修饰的核苷酸的实施例中,可以在纯化过程中将溶剂、盐或其他添加剂添加到含有靶分子的溶液中,以充分筛选相关磷酸酯基团的任何排斥,从而允许杂交发生。可以使用不同的溶剂或低电导率缓冲液,通过靶标与配体之间的电荷排斥从固定的碱基洗脱靶分子。合适的溶剂包括例如甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈、DMSO和DMF等。在一些实施例中,将乙醇、异丙醇或乙腈添加到溶液中。在纯化过程中,合适的溶剂可以以按溶液的重量计5wt-%或更大、10wt-%或更大、20wt-%或更大、30wt-%或更大、40wt-%或更大、50wt-%或更大、60wt-%或更大、70wt-%或更大、80wt-%或更大或90wt-%或更大的量使用。合适的溶剂可以以按溶液的重量计90wt-%或更少、80wt-%或更少、70wt-%或更少、60wt-%或更少、50wt-%或更少、40wt-%或更少、30wt-%或更少或20wt-%或更少的量使用。溶剂可以以按溶液的重量计范围从10wt-%至90wt-%、20wt-%至80wt-%、30wt-%至70wt-%或10wt-%至50wt-%的量使用。

[0071] 可以包含在溶液中的合适的盐包括例如氯化钠、氯化钾、氯化锂、氯化铷、氯化钙、氯化镁、氯化铯、三羟甲基氨基甲烷(tris base)、磷酸钠、磷酸钾和硫酸铵等。在一些实施例中,将氯化钠、氯化钾、硫酸铵、氯化钙、氯化钾或氯化镁添加到溶液中。合适的盐可以以按溶液的重量计2wt-%或更大、5wt-%或更大、10wt-%或更大、15wt-%或更大、或20wt-%或更大的量添加。合适的盐可以以按溶液的重量计20wt-%或更少、25wt-%或更少、或30wt-%或更少的量添加。盐可以以按溶液的重量计范围从2wt-%至30wt-%或5wt-%至25wt-%、或5wt-%至20wt-%的量添加。

[0072] 在靶分子是核苷/核碱基或修饰的核苷/核碱基的一些实施例(与核苷酸或修饰的核苷酸相反)中,静电排斥成为影响较小的因素,因为核苷不含磷酸酯基团,并且因此减轻磷酸酯-磷酸酯排斥的技术变得不太相关。

[0073] 如果靶分子包括对涉及氢键合或空间位阻位置的基团的修饰,则可以使用功能化基材(例如,功能化膜)分离出未修饰的基团和修饰的基团,因为修饰的基团在结合时表现不同,其结合方式可以用于捕获修饰的分子并使未修饰的分子流过,或捕获未修饰的分子并使修饰的分子流过。在洗脱过程中可以使用氢键合竞争添加剂或溶剂。氢键合竞争添加剂和溶剂的实例包括乙腈、醇、水、糖、及其组合。

[0074] 在许多实施例中,靶分子存在于水溶液中。然而,在一些实施例中,即使在多种溶剂的非水环境中,A/T、A/U和C/G之间的氢键仍然有效。此类溶剂的实例包括醇、乙腈、及其组合。因此,在一些实施例中,靶分子存在于包含有机溶剂如一种或多种醇或乙腈的溶液

中。在一些此类实施例中,溶液包含水和有机溶剂。大部分溶液可以是水。可替代地,大部分溶液可以由有机溶剂组成。在一些实施例中,溶液是非水性的,例如由有机溶剂组成。

[0075] 在一些实施例中,靶分子包括降低靶分子(例如,核苷或核苷酸)的水溶性的修饰。在此类实施例中,可以采用水性缓冲液-有机溶剂混合物来帮助将靶分子保持在溶液中(尤其是对于疏水性修饰)以提高工艺生产率。

[0076] 根据实施例,可以使用分离介质(功能化基材)以快流速纯化靶分子。例如,分离介质可以用于在2分钟或更短、1分钟(60秒)或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间下纯化靶分子。尽管对于停留时间没有所希望的下限,但在实践中停留时间为1秒或更长。分离介质可以被布置为膜色谱柱、膜色谱盒、或其他膜色谱装置。分离介质的片材10示意性地在图1A中示出。分离介质的片材10可以提供在图1B所示的分离装置1(例如,色谱柱)中。分离装置1包括具有入口4和出口6的壳体2,以便于流过该装置。分离装置(例如,膜色谱柱、膜色谱盒或其他膜色谱装置)可以提供2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间。根据实施例,使用基于膜的纯化装置可以显著提高生产率。

[0077] 过程生产率可以使用下面的等式来定义。在分母中,V_{tot}是在包括装载、冲洗、洗脱和再生步骤的整个过程中,通过分离介质(例如,柱或盒)的溶液的总体积。BV是色谱介质床体积(对应于分离介质基材的体积),并且τ是停留时间。装载体积与色谱柱介质的动态结合容量成比例。因此,过程生产率随着结合容量的增加和停留时间的减少而增加。

$$\text{生产率} = \frac{\text{捕获的药物}}{\text{时间成本}} = \frac{\text{装载体积} \times \text{药物浓度} \times \text{产率}}{\left(\frac{V_{tot}}{BV}\right) \times \tau}$$

[0078] 根据另一个实施例,分离介质包括阳离子交换基材。这种基材可以用于基于阳离子交换的色谱法以纯化靶分子(例如,核苷、核苷酸、核碱基、或其类似物或衍生物)。阳离子交换采用靶向带正电的靶分子的带负电的官能团。

[0079] 阳离子交换配体可以通过功能柄缀合至基材。功能柄可以与基材共价键合。在一些实施例中,阳离子交换配体由双官能分子制备。官能团之一可以充当功能柄。通常,配体(包括阳离子交换配体)可以具有以下通式(I)

Fh-Sp-Sg (I)

[0080] 其中Fh是功能柄,Sp是间隔基,并且Sg是功能分离基团,例如阳离子交换分离基团。功能柄允许配体(例如,阳离子交换配体)缀合至基材。

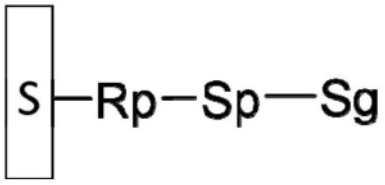
[0081] 阳离子交换分离基团是允许分离核酸、核苷酸、核苷酸的多种组分中的一种、其类似物、或其衍生物的官能团。在实施例中,阳离子交换分离基团可以包括一个阳离子交换分离部分或两个阳离子交换分离部分。

[0082] 间隔基将功能柄与阳离子交换分离基团分开。间隔基可以具有允许功能柄和/或阳离子交换分离基团按预期发挥作用的长度和/或组成。

[0083] 功能柄可以包括可以与基材上的化学部分发生反应以形成共价键的任何反应性官能团。功能柄与基材反应性部分(基材上的反应性部分)的反应导致阳离子交换配体共价连接至基材,也称为缀合的阳离子交换配体。缀合的阳离子交换配体可以展示在基材上,以允许分离核酸、核苷酸、核苷酸的多种组分中的一种、其类似物、或其衍生物。

[0084] 功能柄的反应性官能团的特性是从基材反应性部分的特性得知的,也就是说,反应性功能手柄和基材反应性部分必须相容,才能发生反应以形成共价键。示例性基材反应性部分和/或示例性反应性官能团包括胺;醇;活化的醇,如甲苯磺酰基保护的醇(例如,甲苯磺酰氯);环氧化物;异氰酸酯;烯烃;炔烃;环烯烃;环辛炔;硫醇;二硫化物;叠氮化物;硫代异氰酸酯;N-羟基琥珀酰亚胺;马来酰亚胺;以及活化的酯和/或羧酸,包括使用碳二亚胺化合物(N,N'-二环己基碳二亚胺、N,N'-二异丙基碳二亚胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和1-环己基-(2-吗啉代乙基)碳二亚胺活化的酯或羧酸,甲基-对甲苯磺酸酯。本领域技术人员将理解哪些反应性功能柄和基材反应性部分是相容的。

[0085] 当与基材缀合时,缀合的阳离子交换配体可以具有通式(II):



(II)

[0086] 其中S是基材,Rp是功能柄与基材反应性部分之间的反应产物,Sp是间隔基,并且Sg是分离基团。在一些实施例中,Rp可以是第二分离基团,其促进核酸、核苷酸、核苷酸的多种组分中的一种、其类似物、或其衍生物的分离。在Rp不是分离基团并且第一分离基团(例如,Sg)包括单个分离部分的一些实施例中,缀合的配体是单峰配体,如阳离子交换单峰配体。分离基团可以是酸、羧酸、磺酸、磷酸、羧酸酯、磺酸酯、或磷酸酯。在Rp不是分离基团并且第一分离基团(例如,Sg)包括两个分离部分的一些实施例中,缀合的配体是双峰配体,如缀合的阳离子交换双峰配体。在Rp是第二分离基团并且第一分离基团(例如,Sg)包括单个分离部分的一些实施例中,缀合的配体是双峰配体,如缀合的阳离子交换双峰配体。在Rp是第二分离基团并且第一分离基团(例如,Sg)包括两个分离部分(例如,第一分离部分和第二分离部分)的一些实施例中,缀合的配体是三峰配体,如缀合的阳离子交换三峰配体。

[0087] 反应产物的特性取决于反应性官能团和基材反应性部分的特性。反应产物的实例包括但不限于酯、醚、硫醚、酰胺、胺(例如,伯胺、仲胺、叔胺)、烯烃、脲、氨基甲酸酯、碳酸酯、硫脲、和三唑。

[0088] 在一些实施例中,分离基团(Sg)可以包括单个分离部分。

[0089] 在一些实施例中,分离基团(Sg)可以包括两个分离部分,并具有通式(III)

$$Sm1\text{-}Sp_2\text{-}Sm2 \quad (III)$$

[0090] 其中Sm1是第一分离部分,Sp2是间隔基,并且Sm2是第二分离部分。第一分离部分和第二分离部分可以是酸、羧酸、磺酸、磷酸、羧酸酯、磺酸酯、或磷酸酯。间隔基(Sp/Sp2)可以是长度为C1至C18、C1至C10、C1至C6、C1至C4、C1至C3、或C2至C4的碳链,其可选地沿碳链被一个或多个醚、酯、苄基、苯基或酰胺取代。包括两个分离部分的分离基团的实例包括氨基苯甲酸、氨基二乙酸、氨基丙酸、3-氨基-1-丙磺酸、和3-氨基-1-乙基磺酸。阳离子交换基材可以通过以下制备:首先使基础基材(例如,膜或非织造基材)经受(例如,浸渍)连接基活化剂和催化剂的溶液,然后使基材经受(例如,浸渍)含有配体和可选的催化剂的溶液,并且最后将基材浸渍在淬火缓冲溶液中以钝化未反应的连接基。在一个示例性实施例中,连接基活化剂是或包括N,N-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC),并且催化剂包括三乙胺(TEA)。

[0091] 在靶分子是核碱基/核苷或修饰的核碱基/核苷的实施例中,可以将合适的溶剂、

盐或其他添加剂添加到含有靶分子的溶液中,以允许靶分子溶解或维持其稳定性,或实现希望水平的结合和选择性。

[0092] 在纯化过程中使用的合适的盐包括例如氯化钠、氯化钾、氯化锂、氯化铷、氯化钙、氯化镁、氯化铯、三羟甲基氨基甲烷、磷酸钠、磷酸钾和硫酸铵等。在一些实施例中,将氯化钠、氯化钾、硫酸铵、氯化钙、氯化钾或氯化镁添加到溶液中。合适的盐可以以1mM或更大、5mM或更大、或10mM或更大、或20mM或更大的量添加。合适的盐可以以100mM或更少、50mM或更少、或30mM或更少的量添加。盐可以以范围从1mM至100mM、1mM至50mM、5mM至30mM、或5mM至20mM的量添加。

[0093] 在纯化过程中使用的合适溶剂包括例如甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈、DMSO和DMF等。在一些实施例中,将乙醇、异丙醇或乙腈添加到溶液中。合适的溶剂可以以5wt-%或更大、10wt-%或更大、20wt-%或更大、30wt-%或更大、40wt-%或更大、50wt-%或更大、60wt-%或更大、70wt-%或更大、80wt-%或更大或90wt-%或更大的量添加。合适的溶剂可以以90wt-%或更少、80wt-%或更少、70wt-%或更少、60wt-%或更少、50wt-%或更少、40wt-%或更少、30wt-%或更少或20wt-%或更少的量添加。溶剂可以以范围从10wt-%至90wt-%、20wt-%至80wt-%、30wt-%至70wt-%或10wt-%至50wt-%的量添加。

[0094] 可以使用不同的溶剂或较高电导率缓冲液,通过靶标与配体之间的电荷排斥从固定的碱基洗脱靶分子。

[0095] 胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)碱基在嘧啶环的4位含有可质子化的伯胺。该胺的电荷状态可以被质子化成正电荷,然后其可以使用阳离子交换色谱(CEX)基材(例如,膜)提供选择性。其他核碱基电荷状态也可以通过控制溶液的pH来控制。例如,在胞嘧啶的4位的胺的pKa是约4.45。对于鸟嘌呤,2位的胺的pKa是约12.3,9位的胺是约9.2,并且1位的酰胺是约3.3。胸苷中的酰胺的pKa是约9.96。腺苷中的胺的pKa是约3.5。可以将溶液的pH调节至低于核碱基的pKa,以使胺质子化并利用阳离子交换色谱法。

[0096] 当使用阳离子交换色谱法分离或纯化靶分子时,可以监测和控制溶液的pH,使其保持低于靶分子的pKa,以维持分子处于质子化状态。也可以将pH维持高于阈值以避免靶标分解。pH阈值可能因分子而异。例如,使用BOC来保护反应性基团,这些基团可以在强酸性条件如二噁烷中的4M HCl或乙酸中的1M HCl下脱保护。

[0097] 在一些实施例中,可以保护靶分子上的醇和/或羟基基团免受合成攻击,以允许胺的靶向缀合。典型地可以使用酸溶液去除保护基团。在纯化过程中,可能希望监测和控制溶液的酸度,以将pH维持高于脱保护(通常用三氯乙酸或盐酸进行)的pH。另一方面,为了诱导或维持靶分子的质子化以便利用阳离子交换分离,可以将溶液的pH维持低于靶分子的pKa。

[0098] 与阳离子交换配体偶联的分子可以例如通过提高电导率、筛选CEX色谱介质与靶分子之间的静电吸引来洗脱。在一个实施例中,可以通过改变pH使其高于靶分子中胺的pKa,在靶分子中形成中性电荷,从而减少电荷相互作用并诱导洗脱来进行洗脱。不同的靶分子(或靶分子和其他分子)可以使用线性梯度洗脱或使用分步等度洗脱来洗脱。

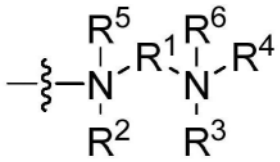
[0099] 用于制备阳离子交换色谱(CEX)基材的基材可以是任何合适的材料。在一些实施例中,功能化基材是或包括膜、树脂、整料、水凝胶、织造纤维基材、非织造纤维基材、或其组合。在一个实施例中,功能化基材是或包括膜。在一个实施例中,功能化基材是或包括织造或非织造纤维基材。合适的膜和非织造纤维基材在本披露的其他地方讨论。

[0100] 根据实施例,阳离子交换基材可以用于以快流速纯化靶分子。例如,阳离子交换基材可以用于在2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间下纯化靶分子。尽管对于停留时间没有所希望的下限,但在实践中停留时间为1秒或更长。阳离子交换基材可以被布置为膜色谱柱、膜色谱盒、或其他膜色谱装置。膜色谱柱、膜色谱盒或其他膜色谱装置可以提供2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间。根据实施例,使用基于膜的纯化装置可以显著提高生产率。

[0101] 在一些实施例中,分离介质包括阴离子交换基材。这种基材可以用于基于阴离子交换的色谱法以纯化靶分子(例如,核苷、核苷酸、核碱基、或其类似物或衍生物)。阴离子交换采用靶向带负电的靶分子的带正电的官能团。

[0102] 阴离子交换配体可以通过功能柄缀合至基材。功能柄可以与基材共价键合。在一些实施例中,阴离子交换配体由双官能、三官能或其他多官能分子制备。官能团之一可以充当功能柄。功能柄可以如以上关于式(I)所述。缀合的阴离子交换配体可以包含如以上关于式(II)所述的反应产物Rp和间隔基Sp。缀合的阴离子交换配体进一步包含分离基团Sg。

[0103] 可以布置在分离介质基材上的合适的阴离子交换配体的实例包括伯胺、仲胺、叔胺和季胺。合适的胺可以是二胺、三胺和多胺。二胺通常由下式表示:



。

[0104] 在一些实施例中,R^1是1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳的脂肪族碳链。在季胺中,R^2、R^3、R^4、R^5和R^6中的每一个单独地选自长度为1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳的脂肪族直链、支链或环状的取代或未取代的碳链。在叔胺中,R^5和R^6不存在,并且R^2、R^3和R^4与季胺中的相同。在仲胺中,R^5和R^6不存在,R^2和R^3是H,并且R^4与季胺中的相同。在伯胺中,R^5和R^6不存在,并且R^2、R^3和R^4是H。在一些实施例中,二胺的氮具有不同的取代水平。例如,一种胺可以是仲胺,并且一种胺可以是伯胺、叔胺或季胺。合适的三胺和多胺可以具有类似的结构,该结构具有三个(三胺)或更多个胺基。

[0105] 伯胺的实例包括亚甲基二胺、乙二胺、丙二胺、丁二胺(腐胺)、戊胺、或通过胺之一共价连接的在末端胺之间具有1-18个碳原子的任何脂肪族二胺。此类配体可以由通过胺之一共价连接的多胺如乙二胺、二亚乙基三胺、三亚乙基四胺制备。

[0106] 仲胺的实例可以包括固定到基材上的任何上述伯胺,其被如上所述的另外的R基团取代。在使用二胺的情况下,还可以通过与基材的共价相互作用将两种胺偶联至基材来形成仲胺。具有配体结构的含有仲胺的配体也可以被固定,如线性聚乙烯亚胺、亚精胺、或精胺。此外,含有非末端伯胺的基团(例如,3-氨基戊烷)也可以缀合至基材以产生仲胺。

[0107] 合适的叔胺的实例包括N,N-二甲基乙二胺、N,N-二甲基丙二胺、N,N-二乙基丙二胺或在一个或两个胺上具有范围从一至六个碳的脂肪族碳基团取代的任何脂肪族二胺,其中在末端胺之间的R^1具有2-18个碳。

[0108] 季胺的实例包括任何上述伯胺,其已经经历季铵化反应,产生了永久正电荷。此类反应可以用烷基基团如甲基碘或芳基基团如苄基碘进行。季胺可以进一步包括任何上述伯胺,其已经经历季铵化反应,产生了永久正电荷。此类反应可以描述为门舒特金反应

(Menshutkin reaction),该反应使用烷基卤以与叔胺反应形成季铵盐。此类反应可以用不同长度的含烷基基团如丁基溴或芳基基团如苄基氯或其组合进行。另外,含有季胺的化合物可以被直接固定。

[0109] 除了胺基之外,配体还可以包含另外的官能团。配体可以包含在胺与任何其他官能团之间的连接基,该连接基的长度为1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳。

[0110] 阴离子交换基材可以通过以下制备:首先使基础基材(例如,膜或非织造基材)经受(例如,浸渍)连接基活化剂和催化剂的溶液,然后使基材经受(例如,浸渍)含有配体和可选的催化剂的溶液,并且最后使基材经受(例如,浸渍)缓冲溶液。在一个示例性实施例中,连接基活化剂是或包括N,N-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC),并且催化剂包括三乙胺(TEA)。

[0111] 在一个示例性实施例中,阴离子交换基材以三步法制备。第一步骤包括使基础基材经受(例如,浸渍)连接基活化剂和催化剂的溶液。这可以包括在溶剂中的从0.1mg/mL至120mg/mL的DSC和5μL/mL至100μL/mL的TEA。溶剂可以包括DMSO、乙腈、四氢呋喃(THF)、二甲基甲酰胺(DMF)、六甲基磷酰胺、环丁砜、或任何其他使基材(例如,膜)溶胀的溶剂/溶液。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至1,800分钟。例如,可以在40℃下将直径为47mm且厚度为70μm的膜浸泡在溶解在10mL DMSO中的300mg DSC、139μL TEA中16小时。

[0112] 在该示例性实施例中,第二步骤包括使基材经受(例如,浸渍)含有配体和可选的催化剂的溶液。这可以包括在溶剂中的从约1μL/mL至100μL/mL、<100μL/mL、<75μL/mL、<50μL/mL、<20μL/mL、<10μL/mL、1μL/mL至10μL/mL、1μL/mL至20μL/mL、1μL/mL至50μL/mL、1μL/mL至75μL/mL、1μL/mL至100μL/mL、10μL/mL至20μL/mL、10μL/mL至50μL/mL、10μL/mL至75μL/mL、10μL/mL至100μL/mL、20μL/mL至50μL/mL、20μL/mL至75μL/mL、20μL/mL至100μL/mL、50μL/mL至75μL/mL、或50μL/mL至100μL/mL的DMEDA。溶剂可以是DMSO或另一种有机溶剂如乙腈、THF、DMF、六甲基磷酰胺、环丁砜、或任何其他使基材溶胀的溶剂/溶液。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至24小时。例如,可以在室温下将膜置于15μL/mL的DMEDA在DMSO中的溶液中30分钟。

[0113] 在该示例性实施例中,第三步骤包括使来自步骤2的基材经受(例如,浸渍)缓冲溶液。这可以包括pH 7.0-10.0的0.05M至4M Tris。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至24小时。例如,将膜置于1M Tris pH8.0中16小时。

[0114] 在一些实施例中,根据US20200188859A1(Zhou等人)中描述的方法1制备阴离子交换基材。

[0115] 在靶分子是核苷酸或修饰的核苷酸的实施例中,可以将溶剂、盐或其他添加剂添加到含有靶分子的溶液中,以允许靶分子溶解或维持其稳定性,或实现希望水平的结合和选择性。

[0116] 在纯化过程中使用的合适的盐包括例如氯化钠、氯化钾、氯化锂、氯化铷、氯化钙、氯化镁、氯化铯、三羟甲基氨基甲烷、磷酸钠、磷酸钾和硫酸铵等。在一些实施例中,将氯化钠、氯化钾、硫酸铵、氯化钙、氯化钾或氯化镁添加到溶液中。合适的盐可以以1mM或更大、5mM或更大、或10mM或更大、或20mM或更大的量添加。合适的盐可以以100mM或更少、50mM或更少、或30mM或更少的量添加。盐可以以范围从1mM至100mM、1mM至50mM、5mM至30mM、或5mM至20mM的量添加。

[0117] 在纯化过程中使用的合适溶剂包括例如甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈、DMSO和DMF等。在一些实施例中,将乙醇、异丙醇或乙腈添加到溶液中。合适的溶剂可以以5wt-%或更大、10wt-%或更大、20wt-%或更大、30wt-%或更大、40wt-%或更大、50wt-%或更大、60wt-%或更大、70wt-%或更大、80wt-%或更大或90wt-%或更大的量添加。合适的溶剂可以以90wt-%或更少、80wt-%或更少、70wt-%或更少、60wt-%或更少、50wt-%或更少、40wt-%或更少、30wt-%或更少或20wt-%或更少的量添加。溶剂可以以范围从10wt-%至90wt-%、20wt-%至80wt-%、30wt-%至70wt-%、或10wt-%至50wt-%的量添加。

[0118] 可以使用不同的溶剂或较高电导率缓冲液,通过靶标与配体之间的电荷排斥从固定的碱基洗脱靶分子。

[0119] 根据实施例,调节含有靶标的进料溶液的pH以维持靶分子带正电,该pH通常高于这种分子的pKa。另一方面,将进料溶液的pH维持低于阴离子交换膜配体的pKa,从而维持其阳性状态。例如,如果使用弱阴离子交换膜从进料溶液中捕获单磷酸腺苷,则可以将进料溶液的pH调节至3至7的范围。

[0120] 在一些实施例中,分离介质包括具有诱导与靶分子、杂质或两者的疏水相互作用的官能团的基材。这种基材可以用于疏水作用色谱法(HIC)以纯化靶分子(例如,核苷、核苷酸、核碱基、或其类似物或衍生物)。疏水相互作用色谱法采用与靶分子上的疏水基团相互作用的疏水官能团。疏水相互作用利用了靶分子与可能的杂质之间的疏水性差异。核碱基含有疏水环,这些疏水环可以通过与基材上的HIC配体相互作用来利用。

[0121] 在一个实施例中,此类配体包含具有三个或更多个碳的脂肪族链(通常使用的长度包括丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、和十二烷基)、苄基、苯基、苯酚、吡啶、硼酸基团、支化聚合物如聚丙二醇,和含硫的亲硫配体如丙硫醇、2-丁硫醇、3,6-二氧杂-1,8-辛二硫醇、辛硫醇、苄硫醇、2-巯基吡啶、苯硫酚、1,2-乙二硫醇、1,4-苯二甲硫醇、2-苯基乙硫醇等、及其组合。疏水相互作用配体可以通过如以上关于式(I)所述的功能柄与基材缀合。

[0122] 在一些实施例中,靶分子是核碱基或修饰的核碱基、核苷或修饰的核苷、或核苷酸或修饰的核苷酸。可以将溶剂、盐或其他添加剂添加到含有靶分子的溶液中,以允许通过配体和靶两者上存在的疏水基团的相互作用而发生结合。在一些实施例中,将亲液盐添加到溶液中。在一些情况下,可以将亲液盐和离液盐的组合添加到溶液中。例如,可以使用亲液阴离子和离液阳离子的混合物。在一些实施例中,增加亲液盐的比例和/或降低离液盐的比例。亲液盐被称为降低非极性物质在水溶液中的溶解度的盐,而离液盐增加其溶解度。在一些实施例中,可以增加溶液中有机溶剂的比例。在其他实施例中,可以降低溶液中有机溶剂的比例。在其他实施例中,也可以使用亲液组分、离液组分和/或有机溶剂的改变的组合。

[0123] 可以添加到含有靶分子的溶液中的亲液盐的实例包括硫酸铵、磷酸铵、磷酸钾、硫酸钠、氯化钠、及其组合。合适的亲液盐可以以0.1M或更大、0.5M或更大、或1.0M或更大、或2.0M或更大的量添加。合适的亲液盐可以以6.0M或更少、5.0M或更少、或4.0M或更少的量添加。亲液盐可以以范围从0.1M至6M、0.5M至2.5M、或0.5M至3.0M的量添加。

[0124] 可以存在于溶液中的离液盐的实例包括氯化钠、氯化钙、氯化镁及其组合。在一些实施例中,离液盐的量维持在1M或更少、0.5M或更少、或0.1M或更少。在一些实施例中,溶液不含或基本上不含离液盐。

[0125] 在纯化过程中使用的合适溶剂包括例如甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈、DMSO和DMF等。在一些实施例中，将乙醇、异丙醇或乙腈添加到溶液中。合适的溶剂可以以5wt-％或更大、10wt-％或更大、20wt-％或更大、30wt-％或更大、40wt-％或更大、50wt-％或更大、60wt-％或更大、70wt-％或更大、80wt-％或更大或90wt-％或更大的量添加。合适的溶剂可以以90wt-％或更少、80wt-％或更少、70wt-％或更少、60wt-％或更少、50wt-％或更少、40wt-％或更少、30wt-％或更少或20wt-％或更少的量添加。溶剂可以以范围从10wt-％至90wt-％、20wt-％至80wt-％、30wt-％至70wt-％或10wt-％至50wt-％的量添加。

[0126] 可以使用不同的溶剂或低电导率缓冲液，通过靶标与配体之间的电荷排斥从固定的碱基洗脱靶分子。

[0127] 用于制备疏水相互作用色谱(HIC)基材的基材可以是任何合适的材料。在一些实施例中，疏水相互作用色谱(HIC)基材是或包括膜、树脂、整料、水凝胶和纤维等。在一个实施例中，疏水作用色谱(HIC)基材是或包括膜。在一个实施例中，疏水相互作用色谱(HIC)基材是或包括非织造纤维基材。

[0128] 根据实施例，疏水相互作用基材可以用于以快流速纯化靶分子。例如，疏水相互作用基材可以用于在2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间下纯化靶分子。尽管对于停留时间没有所希望的下限，但在实践中停留时间为1秒或更长。疏水相互作用基材可以被布置为膜色谱柱、膜色谱盒、或其他膜色谱装置。膜色谱柱、膜色谱盒或其他膜色谱装置可以提供2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间。根据实施例，使用基于膜的纯化装置可以显著提高生产率。

[0129] 在一些实施例中，分离介质包括多峰介质。多峰介质是在基材上包含两种或更多种类型的配体或官能团的介质。多峰介质可以增强配体与靶分子之间的相互作用。在一些实施例中，多峰介质包含离子交换配体或官能团和一种其他类型的配体或官能团。在一些此类实施例中，多峰介质包含阳离子交换配体和至少一种其他类型的官能团。在一些实施例中，多峰介质包含阴离子交换配体和至少一种其他类型的官能团。该至少一种其他类型的官能团可以是与阳离子或阴离子交换基团相同的配体的一部分，或者可以在单独的配体中。例如，除了阳离子交换配体或阴离子交换配体之外，多峰介质还可以包含疏水相互作用基团、氢键合基团、亲硫基团、或其组合。在一个实施例中，多峰介质包含阳离子交换配体和疏水相互作用基团的组合。在一个实施例中，多峰介质包含阳离子交换配体和氢键合基团的组合。在一个实施例中，多峰介质包含阳离子交换配体和亲硫基团的组合。多峰介质还可以包含三种或更多种类型的官能团。多峰介质可以用于分离或纯化核苷酸、核苷、核碱基、及其类似物和衍生物。

[0130] 根据示例性实施例，多峰介质包含含有阳离子交换配体和亲水配体的配体。

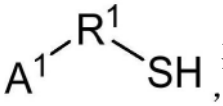
[0131] 根据示例性实施例，多峰介质包含含有阳离子交换配体和疏水相互作用配体的配体。

[0132] 根据示例性实施例，多峰介质包含含有阴离子交换配体和亲水配体的配体。

[0133] 根据示例性实施例，多峰介质包括含有阴离子交换配体和疏水相互作用配体的配体。

[0134] 在一些实例中，多峰介质包含阳离子交换配体，这些阳离子交换配体还包含亲硫官能团。可以布置在分离介质基材上的合适的亲硫阳离子交换配体的实例包括巯基羧酸及

其盐。亲硫阳离子交换配体可以由下式表示：

[0135] ，其中R^1是间隔基团。R^1可以是取代的或未取代的脂肪族或芳香族基团，其含有1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳。R^1可以是直链、支链或环状的。A^1是羧酸(可选地缀合至芳香族基团，例如在苯甲酸或苄基位置)或磺酸酯基团。

[0136] 合适的亲硫阳离子交换配体的实例包括巯基苯甲酸(例如，2-巯基苯甲酸或4-巯基苯甲酸)和巯基磺酸及其盐如3-巯基-1-丙磺酸钠。配体可以包含在含硫官能团与其他(例如，酸)官能团之间的连接基，该连接基的长度为1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳。

[0137] 亲硫阳离子交换基材可以通过以下制备：首先使基础基材(例如，膜或非织造基材)经受(例如，浸渍)连接基活化剂和催化剂的溶液，然后使基材经受(例如，浸渍)含有配体和可选的催化剂的溶液，并且最后将基材浸渍在缓冲溶液中。在一个示例性实施例中，连接基活化剂是或包括N,N-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC)，并且催化剂包括三乙胺(TEA)。

[0138] 在一个示例性实施例中，亲硫阳离子交换基材以三步法制备。第一步骤包括使基础基材经受(例如，浸渍)连接基活化剂和催化剂的溶液。这可以包括在溶剂中的从0.1mg/mL至120mg/mL的DSC和5μL/mL至100μL/mL的TEA。溶剂可以包括DMSO、乙腈、四氢呋喃(THF)、二甲基甲酰胺(DMF)、六甲基磷酰胺、环丁砜、或任何其他使基材(例如，膜)溶胀的溶剂/溶液。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至1,800分钟。例如，可以在40℃下将直径为47mm且厚度为70μm的膜浸泡在溶解在10mL DMSO中的300mg DSC、139μL TEA中16小时。

[0139] 在该示例性实施例中，第二步骤包括使基材经受(例如，浸渍)含有配体和可选的催化剂的溶液。这可以包括在溶剂中的从约0.1mg/mL至150mg/mL、从1mg/mL至100mg/mL、或从10mg/mL至50mg/mL的3-巯基-1-丙磺酸钠。溶剂可以是DMSO或另一种有机溶剂如乙腈、THF、DMF、六甲基磷酰胺、环丁砜、或任何其他使基材溶胀的溶剂/溶液。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至24小时。例如，可以在40℃下将膜置于溶解在10mL DMSO中的300mg 3-巯基-1-丙磺酸钠、1mL TEA的溶液中16小时。

[0140] 在该示例性实施例中，第三步骤包括使来自步骤2的基材经受(例如，浸渍)缓冲溶液。这可以包括pH 7.0-10.0的0.05M至4M Tris。该经受可以在约10℃至60℃之间的温度下进行约1分钟至24小时。例如，将膜置于1M三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)pH 8.0中16小时。

[0141] 在一些实施例中，所希望的靶标是核碱基或修饰的核碱基、核苷或修饰的核苷、或核苷酸或修饰的核苷酸。可以将合适的溶剂、盐或其他添加剂添加到溶液中，以允许靶分子溶解或维持其稳定性，或实现希望水平的结合和选择性。

[0142] 在纯化过程中使用的合适的盐包括例如氯化钠、氯化钾、氯化锂、氯化铷、氯化钙、氯化镁、氯化铯、三羟甲基氨基甲烷、磷酸钠、磷酸钾和硫酸铵等。在一些实施例中，将氯化钠、氯化钾、硫酸铵、氯化钙、氯化钾或氯化镁添加到溶液中。合适的盐可以以1mM或更大、5mM或更大、或10mM或更大、或20mM或更大的量添加。合适的盐可以以100mM或更少、50mM或更少、或30mM或更少的量添加。盐可以以范围从1mM至100mM、1mM至50mM、5mM至30mM、或5mM至20mM的量添加。

[0143] 在纯化过程中使用的合适溶剂包括例如甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈、DMSO和DMF等。在一些实施例中,将乙醇、异丙醇或乙腈添加到溶液中。合适的溶剂可以以5wt-%或更大、10wt-%或更大、20wt-%或更大、30wt-%或更大、40wt-%或更大、50wt-%或更大、60wt-%或更大、70wt-%或更大、80wt-%或更大或90wt-%或更大的量添加。合适的溶剂可以以90wt-%或更少、80wt-%或更少、70wt-%或更少、60wt-%或更少、50wt-%或更少、40wt-%或更少、30wt-%或更少或20wt-%或更少的量添加。溶剂可以以范围从10wt-%至90wt-%、20wt-%至80wt-%、30wt-%至70wt-%或10wt-%至50wt-%的量添加。

[0144] 可以使用不同的溶剂或较高电导率缓冲液,通过靶标与配体之间的电荷排斥从固定的碱基洗脱靶分子。

[0145] 当使用多峰介质阳离子交换色谱法分离或纯化靶分子时,可以监测和控制溶液的pH,使其保持低于靶分子的pKa,以维持分子处于质子化状态。也可以将pH维持高于阈值以防止靶标分解,并且高于多峰配体的pKa以维持配体带负电。对于胞苷和吉西他滨(具有或不具有受保护的醇),合适的pH范围的实例包括pH1至3。

[0146] 与多峰介质的阳离子交换配体偶联的分子可以例如通过提高电导率、筛选阳离子交换配体与靶分子之间的静电吸引来洗脱。在一个实施例中,可以通过改变pH使其高于靶分子中胺的pKa,在靶分子中形成中性电荷,从而减少电荷相互作用并诱导洗脱来进行洗脱。不同的靶分子(或靶分子和其他分子)可以使用线性梯度洗脱或使用分步等度洗脱来洗脱。

[0147] 当使用多峰介质阴离子交换色谱法分离或纯化靶分子时,可以监测和控制溶液的pH,使其保持高于靶分子的pKa,以维持分子处于去质子化状态。也可以将pH维持低于阈值以防止靶标分解,并且也低于多峰配体的pKa以维持配体带正电。对于单磷酸腺苷纯化,合适的pH范围的实例包括pH 3至10。

[0148] 与多峰介质的阴离子交换配体偶联的分子可以例如通过提高电导率、筛选阳离子交换配体与靶分子之间的静电吸引来洗脱。在一个实施例中,可以通过改变pH使其低于靶分子的pKa以减少电荷相互作用并诱导洗脱来进行洗脱。不同的靶分子(或靶分子和其他分子)可以使用线性梯度洗脱或使用分步等度洗脱来洗脱。

[0149] 用于制备多峰介质的基材可以是任何合适的材料。在一些实施例中,多峰介质是或包括膜、树脂、整料、水凝胶和纤维等。在一个实施例中,多峰介质是或包括膜。在一个实施例中,多峰介质是或包括非织造纤维基材。

[0150] 根据实施例,多峰介质可以用于以快流速纯化靶分子。例如,多峰介质可以用于在2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间下纯化靶分子。停留时间在某种程度上取决于分离装置的尺寸,并且在小型装置中,停留时间可以低至1秒或更短。尽管对于停留时间没有所希望的下限,但在实践中停留时间为0.1秒或更长。多峰介质可以被布置为膜色谱柱、膜色谱盒、或其他膜色谱装置。膜色谱柱、膜色谱盒或其他膜色谱装置可以提供2分钟或更短、1分钟或更短、30秒或更短、10秒或更短、或6秒或更短的停留时间。根据实施例,使用基于膜的纯化装置可以显著提高生产率。

示例性实施例

[0151] 以下是根据本披露的示例性实施例的非限制性列表。

[0152] 实施例1是一种分离介质,其包括:膜;和固定在所述膜上的多种配体,所述多种配

体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。

[0153] 实施例2是如实施例1所述的分离介质,其中所述分离介质被配置成用于从反应混合物中分离包括核苷酸、核苷、核碱基、其衍生物和类似物、及其组合的靶分子。

[0154] 实施例3是如实施例1或2所述的分离介质,其中所述分离介质被配置成与有机溶剂一起使用。

[0155] 实施例4是如实施例1至3中任一项所述的分离介质,其中所述多种配体包括阴离子交换配体,所述阴离子交换配体包含在相邻胺之间包含1至18个碳的脂肪族二胺或三胺。

[0156] 实施例5是如实施例4所述的分离介质,其中所述阴离子交换配体包括N,N-二甲基乙二胺、N,N-二甲基丙二胺、N,N-二甲基丙烯二胺、N,N-二乙基丙二胺、或其组合。

[0157] 实施例6是如实施例1至5中任一项所述的分离介质,其中所述多种配体包括阳离子交换配体,所述阳离子交换配体包括氨基羧酸、氨基磺酸、或其组合。

[0158] 实施例7是如实施例6所述的分离介质,其中所述阳离子交换配体包括氨基苯甲酸、氨基二乙酸、氨基丙酸、3-氨基-1-丙磺酸、3-氨基-1-乙基磺酸、或其组合,所述阳离子交换配体包含在氨基基团与酸或磺酸酯基团之间的长度为1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳的间隔基。

[0159] 实施例8是如实施例1至7中任一项所述的分离介质,其中所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、和疏水相互作用配体中的两种或更多种。

[0160] 实施例9是如实施例1至8中任一项所述的分离介质,其中多个配体包括具有阳离子交换官能团和亲硫官能团的配体。

[0161] 实施例10是如实施例9所述的分离介质,其中所述多种配体包括巯基苯甲酸、巯基磺酸、其盐、或其组合,优选地其中所述多种配体包括3-巯基-1-丙磺酸钠。

[0162] 实施例11是如实施例1至10所述的分离介质,其中所述多种配体由具有式(I)的配体形成:

Fh-Sp-Sg (I)

其中Fh是功能柄,Sp是间隔基,并且Sg是功能分离基团,

其中功能柄选自胺;醇;活化的醇;环氧化物;异氰酸酯;烯烃;炔烃;环烯烃;环辛炔;硫醇;二硫化物;叠氮化物;硫代异氰酸酯;N-羟基琥珀酰亚胺;马来酰亚胺;活化的酯;和活化的羧酸,

其中所述间隔基是长度为C1至C18、C1至C10、C1至C6、C1至C4、C1至C3、或C2至C4的碳链,其可选地沿碳链被一个或多个醚、酯、苄基、苯基、或酰胺取代,并且

其中所述功能分离基团是阳离子交换分离基团、阴离子交换分离基团、疏水分离基团、或亲硫分离基团。

[0163] 实施例12是如实施例11所述的分离介质,其中所述功能分离基团包括酸、羧酸、磺酸、磷酸、羧酸酯、磺酸酯、或磷酸酯。

[0164] 实施例13是如实施例11所述的分离介质,其中所述功能分离基团包括伯胺、仲胺、叔胺、季胺、或其组合,并且可选地其中功能柄包括仲胺、叔胺、或季胺,并且其中相邻的胺被1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、1至4个碳、或2至4个碳的脂肪族碳链分开。

[0165] 实施例14是如实施例11所述的分离介质,其中所述功能分离基团包含具有两个或更多个碳的脂肪族链(可选地丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、和十二烷基)、苄基、苯基、苯酚、吡啶、硼酸、支化聚合物(可选地聚丙二醇)、含硫的亲硫配体(可选地丙硫醇、2-丁硫醇、3,6-二氧杂-1,8-辛二硫醇、辛硫醇、苄硫醇、2-巯基吡啶、苯硫酚、1,2-乙二硫醇、1,4-苯二甲硫醇、或2-苯基乙硫醇)、或其组合。

[0166] 实施例15是如实施例11所述的分离介质,其中功能柄包括硫醇,并且功能分离基团包括酸、羧酸、磺酸、磷酸、羧酸酯、磺酸酯、或磷酸酯。

[0167] 实施例16是一种分离装置,其包括:壳体;和设置在所述壳体内的分离介质,所述分离介质包括:膜;和固定在所述膜上的多种配体,所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。

[0168] 实施例17是如实施例16所述的分离装置,其中所述壳体包括盒或柱。

[0169] 实施例18是如实施例16或17所述的分离装置,其中所述分离介质被配置成用于从反应混合物中分离包括核碱基的靶分子。

[0170] 实施例19是如实施例16至18中任一项所述的分离装置,其中所述分离介质被配置成与有机溶剂一起使用。

[0171] 实施例20是如实施例16至19中任一项所述的分离装置,其中所述多种配体包括阴离子交换配体,所述阴离子交换配体包含在相邻胺之间包含1至18个碳的脂肪族二胺或三胺。

[0172] 实施例21是如实施例20所述的分离装置,其中所述阴离子交换配体包括N,N-二甲基乙二胺、N,N-二甲基丙二胺、N,N-二甲基丙烯二胺、N,N-二乙基丙二胺、或其组合。

[0173] 实施例22是如实施例16至21中任一项所述的分离装置,其中所述多种配体包括阳离子交换配体,所述阳离子交换配体包括氨基羧酸、氨基磺酸、或其组合。

[0174] 实施例23是如实施例22所述的分离装置,其中所述阳离子交换配体包括氨基苯甲酸、氨基二乙酸、氨基丙酸、3-氨基-1-丙磺酸、3-氨基-1-乙基磺酸、或其组合,所述阳离子交换配体包含在氨基基团与酸或磺酸酯基团之间的长度为1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、或2至4个碳的间隔基。

[0175] 实施例24是如实施例16至23中任一项所述的分离装置,其中所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、亲水配体、和疏水相互作用配体中的两种或更多种。

[0176] 实施例25是如实施例16至24中任一项所述的分离装置,其中所述多种配体包括具有阳离子交换官能团和亲硫官能团的配体。

[0177] 实施例26是如实施例25所述的分离装置,其中所述多种配体包括巯基苯甲酸、巯基磺酸、其盐、或其组合,优选地其中所述多种配体包括3-巯基-1-丙磺酸钠。

[0178] 实施例27是如实施例16至26所述的分离装置,其中所述多种配体由具有式(I)的配体形成:

Fh-Sp-Sg (I)

其中Fh是功能柄,Sp是间隔基,并且Sg是功能分离基团,

其中功能柄选自胺;醇;活化的醇;环氧化物;异氰酸酯;烯烃;炔烃;环烯烃;环辛炔;硫醇;二硫化物;叠氮化物;硫代异氰酸酯;N-羟基琥珀酰亚胺;马来酰亚胺;活化的酯;

和活化的羧酸，

其中所述间隔基是长度为C1至C18、C1至C10、C1至C6、C1至C4、C1至C3、或C2至C4的碳链，其可选地沿碳链被一个或多个醚、酯、苄基、苯基、或酰胺取代，并且

其中所述功能分离基团是阳离子交换分离基团、阴离子交换分离基团、疏水分离基团、或亲硫分离基团。

[0179] 实施例28是如实施例27所述的分离装置，其中功能分离基团包括酸、磺酸、或磷酸酯。

[0180] 实施例29是如实施例27所述的分离装置，其中功能分离基团包括伯胺、仲胺、叔胺、季胺、或其组合，并且可选地其中功能柄包括仲胺、叔胺、或季胺，并且其中相邻的胺被1至18个碳、1至10个碳、1至6个碳、1至4个碳、或2至4个碳的脂肪族碳链分开。

[0181] 实施例30是如实施例27所述的分离装置，其中功能分离基团包含具有两个或更多个碳的脂肪族链(可选地丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、和十二烷基)、苄基、苯基、苯酚、吡啶、硼酸、支化聚合物(可选地聚丙二醇)、含硫的亲硫配体(可选地丙硫醇、2-丁硫醇、3,6-二氧杂-1,8-辛二硫醇、辛硫醇、苄硫醇、2-巯基吡啶、苯硫酚、1,2-乙二硫醇、1,4-苯二甲硫醇、或2-苯基乙硫醇)、或其组合。

[0182] 实施例31是如实施例27所述的分离装置，其中功能柄包括硫醇，并且功能分离基团包括酸、磺酸、或磷酸酯。

[0183] 实施例32是一种纯化靶分子的方法，该方法包括：使包含靶分子的溶液通过膜色谱装置，该靶分子包括核酸、核苷酸、核苷、核碱基、或其类似物或衍生物，并且膜色谱装置包括：壳体；和设置在所述壳体内的分离介质，所述分离介质包括：膜；和固定在所述膜上的多种配体，所述多种配体包括阴离子交换配体、阳离子交换配体、亲硫配体、疏水相互作用配体、亲水配体、或其组合。

[0184] 实施例33是如实施例32所述的方法，其中在合成靶分子之后，从包含反应混合物的溶液中纯化靶分子。

[0185] 实施例34是如实施例32或33所述的方法，其中所述分离介质包括阴离子交换膜。

[0186] 实施例35是如实施例32至34中任一项所述的方法，其中所述溶液在膜色谱装置中的停留时间是60秒或更短。

[0187] 实施例36是如实施例32至35中任一项所述的方法，其中所述靶分子是核苷酸或核酸。

[0188] 实施例37是如实施例32至36中任一项所述的方法，其中所述分离介质包括亲硫阳离子交换膜。

[0189] 实施例38是如实施例32至37中任一项所述的方法，其中所述亲硫阳离子交换膜包含具有亲硫官能团的阳离子交换配体。

[0190] 实施例39是如实施例32至38中任一项所述的方法，其中所述溶液包含有机溶剂。

[0191] 实施例40是如实施例32至39中任一项所述的方法，其中所述多个配体包括具有阳离子交换官能团和亲硫官能团的配体。

[0192] 实施例41是如实施例32至40中任一项所述的方法，其中所述多种配体包括巯基苯甲酸、巯基磺酸、其盐、或其组合，优选地其中所述多种配体包括3-巯基-1-丙磺酸钠。

[0193] 实施例42是如实施例32至41中任一项所述的方法，其中所述分离介质是根据实施

例1至15中的任一项和/或所述分离装置是根据实施例16至31中的任一项。

实例

[0194] 这些实例仅用于说明的目的,并不意味着限制所附权利要求的范围。除非另有说明,否则实例和说明书其余部分中的所有份数、百分比、比率等均按重量计。

[0195] 测试各种类型分离膜的性能并相对于对照样品进行评价。

测试方法

[0196] 10%突破下的动态结合容量($DBC_{10\%}$)可以通过标准色谱法,例如使用Cytiva ÄKTApure快速蛋白质液相色谱法(FPLC)测定。首先,将所述分离介质装入壳体单元中。然后,将所包含的分离介质连接至FPLC。接着,使进料材料在一定的柱体积/分钟流速(CV/min)下通过分离介质,直到靶标的流出物浓度达到进料浓度的10%,如通过合适波长下的UV信号所测定的。最后,基于FPLC系统中的滞留体积和分离介质体积,如下计算$DBC_{10\%}$:

((达到10%突破的体积-滞留体积)×(进料浓度))/(分离介质的体积)=$DBC_{10\%}$,表示为mg靶材料/mL色谱介质。

样品测试

[0197] $DBC_{10\%}$使用如上所述的色谱法测定。完整的结合-洗脱色谱典型地包括四个步骤:

[0198] 步骤1-平衡:用缓冲液A平衡所含的分离介质。

[0199] 步骤2-装载:将装载材料注入/泵送通过分离介质,直到获得10%的突破。

[0200] 步骤3-洗涤:使用洗涤缓冲液洗涤介质。洗涤缓冲液可以是单一缓冲液或多种缓冲液,以洗掉一些杂质。洗涤缓冲液可以包括缓冲液A或不同的缓冲液B,或包含缓冲液A和/或B和/或另外的缓冲液(C、D、E、F等)的缓冲液组合,或缓冲液A和/或B和/或另外的缓冲液(C、D、E、F等)之间的梯度转换,或缓冲液A和/或B和/或另外的缓冲液(C、D、E、F等)的组合之间的梯度转换。

[0201] 步骤4-洗脱:缓冲液C用于从分离介质中洗脱装载的材料(如靶标和一些杂质)。洗脱缓冲液可以包括缓冲液C或不同的缓冲液B、或包含缓冲液C和/或B和/或另外的缓冲液(A、D、E、F等)的缓冲液组合、或缓冲液C和/或B和/或另外的缓冲液(A、D、E、F等)之间的梯度转换、或缓冲液C和/或B和/或另外的缓冲液(A、D、E、F等)的组合之间的梯度转换。

[0202] 可以收集洗脱液用于进一步分析。

[0203] 除了上述四个主要步骤之外,在一些情况下,还可以在重新开始循环之前进行汽提和/或原位清洁(CIP)步骤。

实例1-AEX膜的制备

[0204] 在40℃下,将直径为47mm且厚度为70μm的再生纤维素膜浸泡在溶解在10mL二甲亚砜(DMSO)中的300mg N,N-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)和139μL三乙胺(TEA)的溶液中16小时。随后在室温下将膜置于每mL DMSO含100μL N,N-二甲基乙二胺(DMEDA)的溶液中16小时。最后,将膜置于1MTris pH 8.0中16小时。

实例2-亲硫CEX膜的制备

[0205] 在40℃下,将直径为47mm且厚度为70μm的再生纤维素膜浸泡在300mg DSC和139μL TEA的溶液中16小时。在40℃下,将膜浸泡在溶解在10mL DMSO中的300mg 3-巯基丙磺酸钠和0.5mL TEA的溶液中16小时。最后,将膜置于200mM Tris pH 8.0中16小时。

实例3-分离介质的DBC

[0206] 在不同流速下测试亲硫CEX分离介质的动态结合容量。根据实例2制备分离膜。

[0207] 将四层24mm圆形分离膜装入微型柱(膜体积=0.1mL)中,并且连接至Cytiva ÄKTA Pure以测定动态结合容量。在此实例中,装载材料是在10mM磷酸pH 2.0中的0.8mg/mL胞苷。将胞苷溶液以如通过柱体积/分钟(CV/min)所确定的不同流速施加到膜上,直至10%的突破。$DBC_{10\%}$结果图示地呈现在图2中。

[0208] 从图2中可以看出,增加流速增加了胞苷的$DBC_{10\%}$。在110CV/min下,跨柱压力(ΔC)是0.06MPa,这表明流速的进一步增加是可能的。

实例4-用有机缓冲液体系分离胞苷

[0209] 测试在有机缓冲液体系中亲硫CEX分离介质分离胞苷的能力。根据实例2制备分离膜。使用以下两种可商购的产品作为比较样品:从马萨诸塞州马尔堡(Marlborough,MA)的思拓凡公司(Cytiva)可获得的HITRAP® SP HP阳离子交换色谱柱和从Natrix Separations公司可获得的NATRIFLO® HD-Sb柱。HITRAP® SP HP是基于树脂的强阳离子交换色谱柱产品,并且NATRIFLO® HD-Sb是用疏水相互作用基团增强的基于水凝胶的强阳离子交换柱产品。

[0210] 将八层24mm圆形分离膜装入聚丙烯柱壳体(膜体积=0.2mL)中,并且连接至Cytiva ÄKTA Pure用于结合-洗脱色谱分离过程。在确定的柱体积/分钟流速(CV/min)下装载胞苷直至10%的突破。在分离过程中使用表1所示的缓冲液列表。

表1.缓冲液列表。

步骤	缓冲液
平衡	5 mM 磷酸 pH 2.0，50% EtOH 水溶液
柱洗涤	50% EtOH 水溶液
洗脱	0.5 M NaCl pH 7，50% EtOH

[0211] 样品分离膜、树脂(HITRAP® SP HP)和水凝胶(NATRIX® HD-Sb)商业产品的色谱图分别在图3A、3B和3C中示出。操作参数和输出总结在表2中,包括流速、$DBC_{10\%}$和跨柱压力(ΔC)。

表2.操作参数。

样品	流速（CV/min）	DBC 10%（mg 胞苷/mL 色谱介质）	最高 ΔC 压力（MPa）
亲硫 CEX 膜	10	35.1	0.07
HITRAP® SP HP	0.5	17	0.07
NATRIFLO® HD-Sb	12.5	1.9	0.09

[0212] 在图4中比较了柱的结合容量。观察到,使用表1的有机缓冲液体系,分离膜的结合容量是树脂的结合容量的约2倍,并且是水凝胶的结合容量的约18倍。在相同的跨柱压力下,分离介质的流速是树脂的流速的至少20倍。

实例5-用水性缓冲液体系分离胞苷

[0213] 测试在水性缓冲液体系中CEX分离树脂分离胞苷的能力。分离树脂是从思拓凡公司购买的HITRAP® SP HP树脂。

[0214] 将1mL HITRAP® SP HP树脂连接至Cytiva ÄKTA Pure,在全水体系(具有范围从2.48至1.99的不同pH的20mM磷酸钠)中进行结合-洗脱色谱分离过程。

[0215] 溶解在pH为2.48或pH为1.99的20mM磷酸钠溶液中的胞苷的结合-洗脱曲线在图5A中示出。

[0216] 在pH 2.48下装载的初始循环导致在洗涤阶段的末端开始的增宽的双峰洗脱峰。使用pH为1.99的20mM磷酸钠的来自图5A的结合-洗脱曲线在图5B中示出。

[0217] 观察到,与在pH 2.48下的结合和洗脱循环中观察到的宽双峰相比,将装载pH从2.48降低至1.99能够将洗脱解析成单个尖锐的洗脱峰。据推测,胞苷上的质子化胺在酸性环境(降低的pH)中更普遍,这使得在更高的pH下,胞苷比去质子化的胞苷对CEX柱的吸附更强。虽然可以使用树脂进行纯化,但是与具有相同配体的膜相比,其流速明显较慢,并且因此导致整个过程的色谱生产率较低。

实例6-AEX的DBC和回收率

[0218] 根据实例1制备孔径为1μm的阴离子交换(AEX)分离介质。将八层24mm圆形AEX膜装入壳体单元(膜体积=0.2mL)并且连接至Cytiva ÄKTA pure以测定动态结合容量。在此实例中,装载材料是溶解在平衡缓冲液中的0.25mg/mL腺苷-5'-单磷酸酯(AMP,96.98%)。在不同的柱体积/分钟流速(CV/min)下装载AMP,直至达到10%的突破。分离过程中使用的缓冲液的列表在表3中示出。

表3.缓冲液列表。

步骤	缓冲液
平衡	20mM Tris pH 7
柱洗涤	去离子水
洗脱	1M NaCl

[0219] 色谱图叠加在图6A中示出。AEX分离介质的$DBC_{10\%}$和AMP回收率在图6B中示出。从图6B中可以看出,增加流速不会降低所述AEX分离介质的结合容量或AMP回收率。

实例7-在不同电导率的缓冲液条件下AEX的DBC

[0220] 将八层24mm圆形AEX膜装入壳体单元(膜体积=0.2mL)并且连接至Cytiva ÄKTA pure以测定动态结合容量。根据实例1制备膜。在此实例中,进料为在添加有0、100mM或200mM NaCl的平衡缓冲液中的0.25mg/mL AMP。在不同的柱体积/分钟流速(CV/min)下装载AMP,直至10%的突破,并且DBC在图3中示出。分离过程中使用的缓冲液的列表在表4中示出。

表4.缓冲液列表

步骤	缓冲液
平衡	20 mM Tris pH 7（具有 0、100 mM 或 200 mM NaCl）
柱洗涤	去离子水
洗脱	1 M NaCl

[0221] 在不同流速和盐条件下的$DBC_{10\%}$在图7A中示出。色谱图叠加在图7B中示出。从图3中可以看出,在每种缓冲液条件下,增加流速不会降低所述AEX分离介质的结合容量。然而,如图7B所示,增加的盐浓度显著降低了所述AEX分离介质的结合容量。在10CV/mL下,DBC从不添加盐时的38mg/mL降低到添加200mM NaCl后的2mg/mL。

实例8-在有机缓冲液体系中分离具有各种醇和胺保护的二氟取代的核苷衍生物中间体

[0222] 测试亲硫CEX分离介质从混合物中分离出具有去保护的胺的二氟取代的核苷衍生物中间体的能力,该混合物在有机溶剂中含有具有单-和/或二-保护的醇和/或保护的胺的组合的二氟取代的核苷衍生物和过量保护剂(用表3中列出的平衡缓冲液稀释50倍)。根据实例2制备分离膜。

[0223] 将八层24mm圆形分离膜装入膜壳体(膜体积=0.2mL)中,并且连接至CytivaÄKTA Pure用于结合-洗脱色谱分离过程。在确定的柱体积/分钟流速(CV/min)下装载含有在有机溶剂中具有单-和/或二-保护的醇和/或保护的胺的组合的二氟取代的核苷衍生物和过量保护剂的混合物的样品(用表3中列出的平衡缓冲液稀释50倍),直到达到10%的透过率。在分离过程中使用表5中列出的缓冲液。

表5.缓冲液列表。

缓冲液
5mM磷酸pH 2/50%EtOH水溶液
50%EtOH
0.5M NaCl pH 7/50%EtOH水溶液
30%异丙醇

[0224] 重复该过程10次,相应的色谱图叠加在图8A中。

[0225] 发现结合-洗脱纯化循环每次运行都是一致的。每第5次运行时取样,并且使用NANODROP™ Lite UV-Vis分光光度计(从赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific)可获得)通过在260nm下的UV吸光度评估浓度。发现产率与5.17%的变异系数一致。

[0226] 还采集进料和洗出液样品进行薄层色谱(TLC)分析。TLC板的照片在图8B中示出,进料样品在左侧,并且洗脱液样品在右侧。如图8B所示,粗进料(左)中代表具有单醇保护(下)、二醇保护(中)和三(上)保护的二氟取代的核苷衍生物的3种物质减少到洗脱液(右)中与进料中双保护物质带相同位置的单一富集双保护物质带,表明成功利用嘧啶上的胺侧基在部分有机溶剂体系中纯化CEX。三保护的物种在此是指具有二保护的醇和保护的胺的二氟取代的核苷衍生物。假设质子化的胺仅存在于未保护、单保护和二保护的醇的任何组

合中,在没有胺保护的情况下,质子化的胺对CEX柱的吸引力比具有保护的胺的其他变体更强。对于具有胺保护的分子,侧胺不能被质子化,并且因此通过CEX机制对柱的吸附要弱得多。

实例9-比较研究

[0227] 使用根据实例2制备的阳离子交换膜和HITRAP® SP HP阳离子交换树脂柱,测试从在有机溶剂中含有具有单-和/或二-保护的醇和/或保护的胺的组合的二氟取代的核苷衍生物和过量保护剂的混合物(用表3中列出的平衡缓冲液稀释50倍)中分离具有去保护的胺的二氟取代的核苷衍生物中间体。

[0228] 测试在1mL/min的流速下进行,并且该过程的时间为12分钟。将溶液在低电导率乙醇/磷酸盐混合物(低电导率)中稀释,并且将柱用1M NaCl(高电导率)洗脱。

[0229] 树脂柱具有1mL树脂体积,并且估计的结合容量为8mg/mL。预计每个循环的大规模停留时间为120分钟或更长。结合-洗脱数据在图9A中示出。

[0230] 膜柱具有0.1mL的介质体积,并且估计的结合容量为80mg/mL。预计每个循环的大规模停留时间为约24分钟。结合-洗脱数据在图9B中示出。

[0231] 来自两个柱的结合-洗脱数据叠加在图9C中

[0232] 虽然可以使用树脂进行纯化,但是与用膜进行的分离相比,其流速明显较慢,并且因此导致整个过程的色谱生产率较低。

[0233] 通过HPLC比较纯度,使用膜纯化得到的洗脱液纯度略高于使用树脂纯化得到的洗脱液纯度。HPLC色谱图在图9D中示出,其显示用树脂相对于膜进行的纯化的洗脱池的纯度。另外,观察到洗脱液的旋转蒸发从含有过量有机溶剂和保护剂的进料中产生靶向二氟取代的核苷衍生物(具有二保护的醇和未保护的胺)的晶体。含有过量有机溶剂和保护剂的未纯化的进料的旋转蒸发不会产生结晶产物,表明具有未保护的胺的所希望的靶向二氟取代的核苷衍生物与其他成分分离。

[0234] 可以通过增加有机溶剂组成并增加盐浓度来进行洗脱。这对于在下游干燥前的纯化或在低水条件下进行的后续合成步骤特别有利。使用有机溶剂可以更容易地去除和回收更大比例的溶剂,从而可能加速旋转蒸发步骤。此外,使用较少的盐增加了在后续纯化步骤中需要去除的较少物质。使用95%乙醇中的低至5%1M NaCl缓冲液(50mM终浓度)成功地进行了洗脱。

实例10-MCP的DBC

[0235] 测试在水性缓冲液体系中基于树脂的巯基吡啶(MCP)(Cytiva PlasmidSelect)分离胞苷的能力。将在20mM乙酸钠、3M硫酸铵pH 4.1中的浓度为0.3125mg/mL的胞苷施加到基于树脂的MCP(Cytiva PlasmidSelect)柱上,以通过在20mM Tris pH 7.0中洗脱来评估结合。

[0236] 进行了成功的结合和洗脱循环,观察到如图10所描绘的洗脱峰。预期由于纯化时间减少而增加的生产率将是使用基于膜的MCP进行类似纯化的结果。此外,假设这些和类似的条件也将适用于其他HIC柱。

[0237] 本文引用的所有参考文献和出版物均明确地通过援引以其整体并入本披露中,除非它们可能直接与本披露相矛盾。虽然本文已经说明并描述了具体实施例,但本领域的普通技术人员将理解,在不脱离本披露的范围的情况下,可以用多种替代和/或等效的实施方

式来代替所示出和描述的具体实施例。应当理解,本披露不旨在被本文所阐述的说明性实施例和实例过度限制,并且此类实例和实施例仅通过举例的方式呈现,而本披露的范围旨在仅由本文如下阐述的权利要求限制。

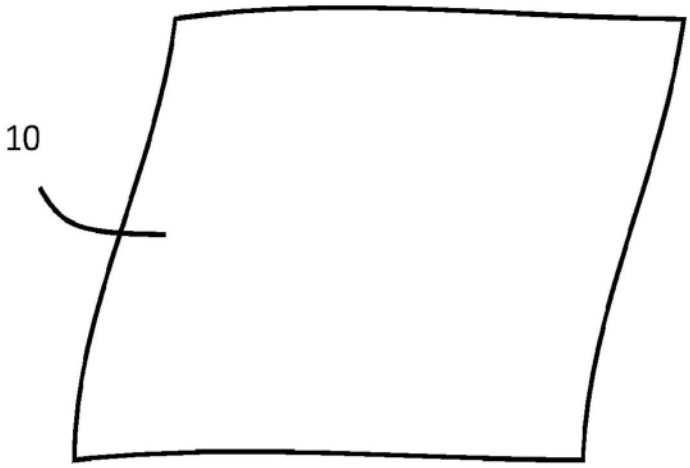


图1A

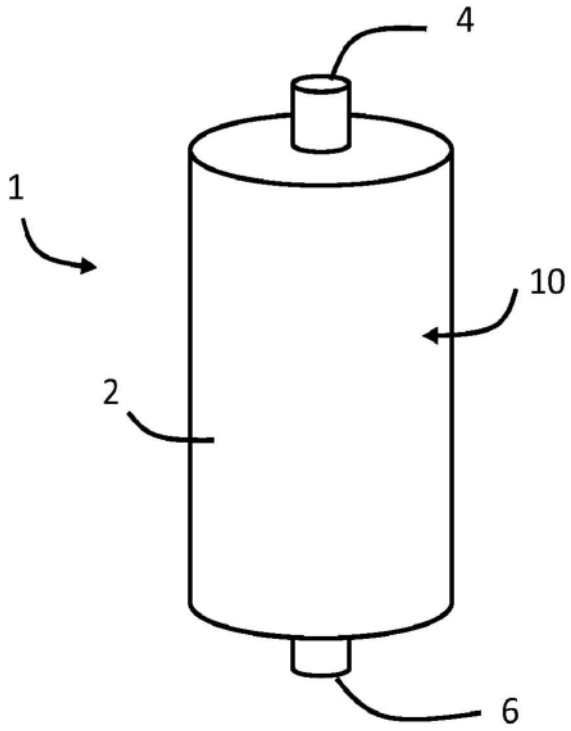


图1B

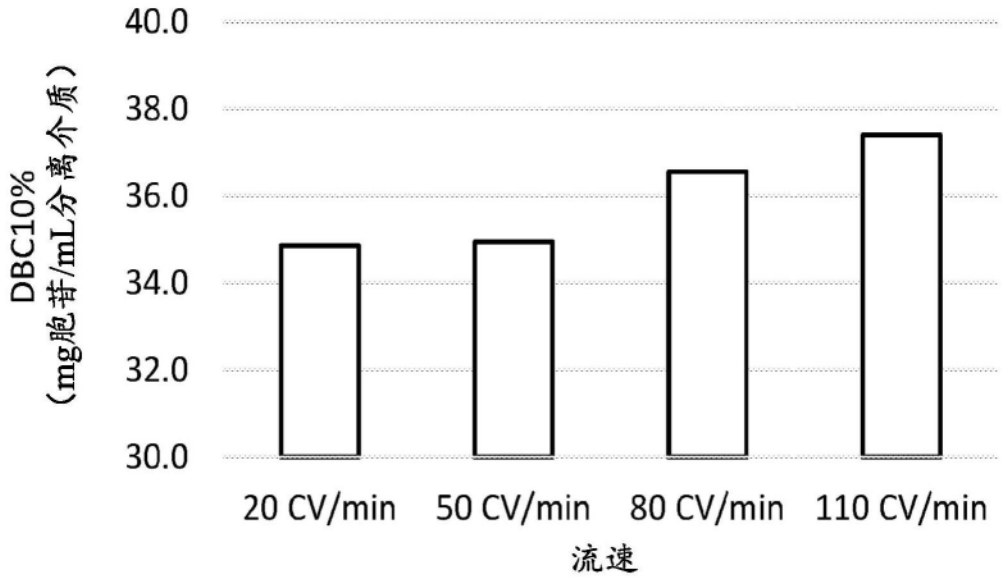

40.0
38.0
36.0
34.0
32.0
30.0
DBC10%
（mg胞苷/mL分离介质）
20 CV/min
50 CV/min
80 CV/min
110 CV/min
流速

图2

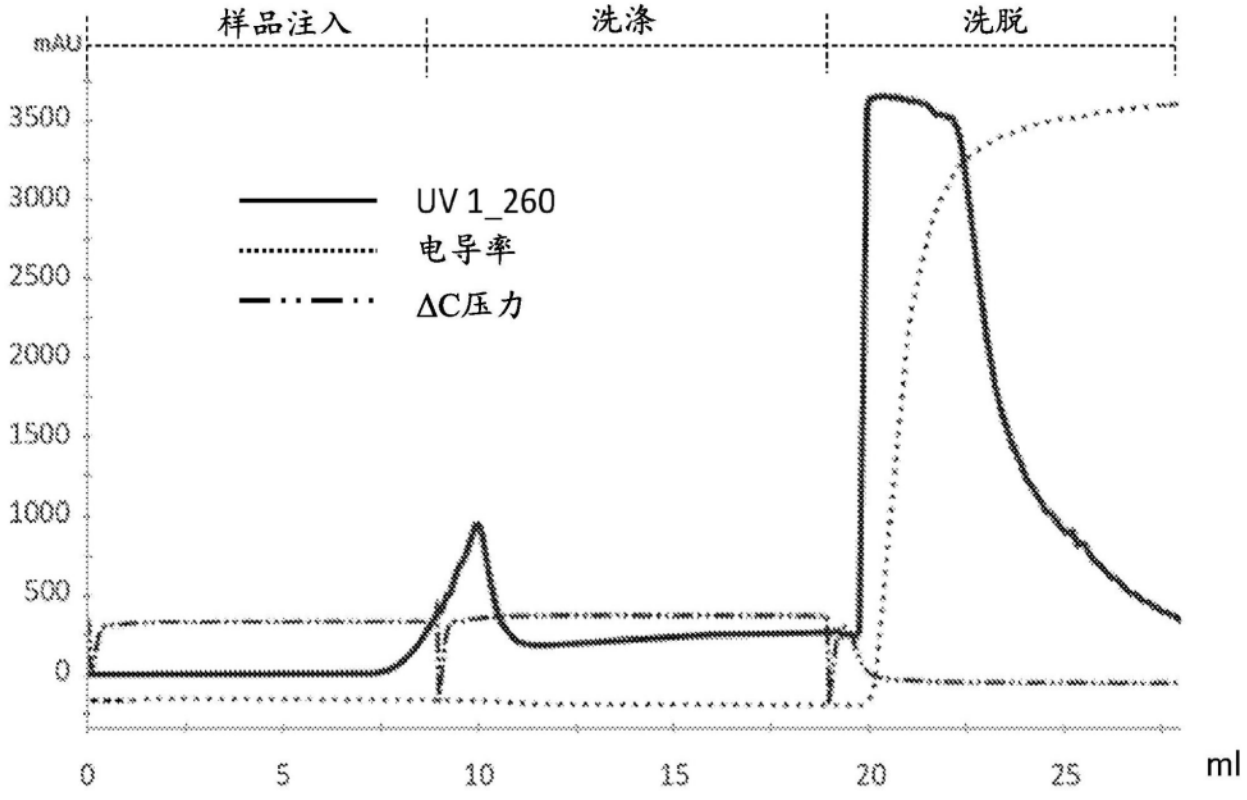

样品注入
洗涤
洗脱
mAU
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UV 1_260
电导率
ΔC压力
0
5
10
15
20
25
ml

图3A

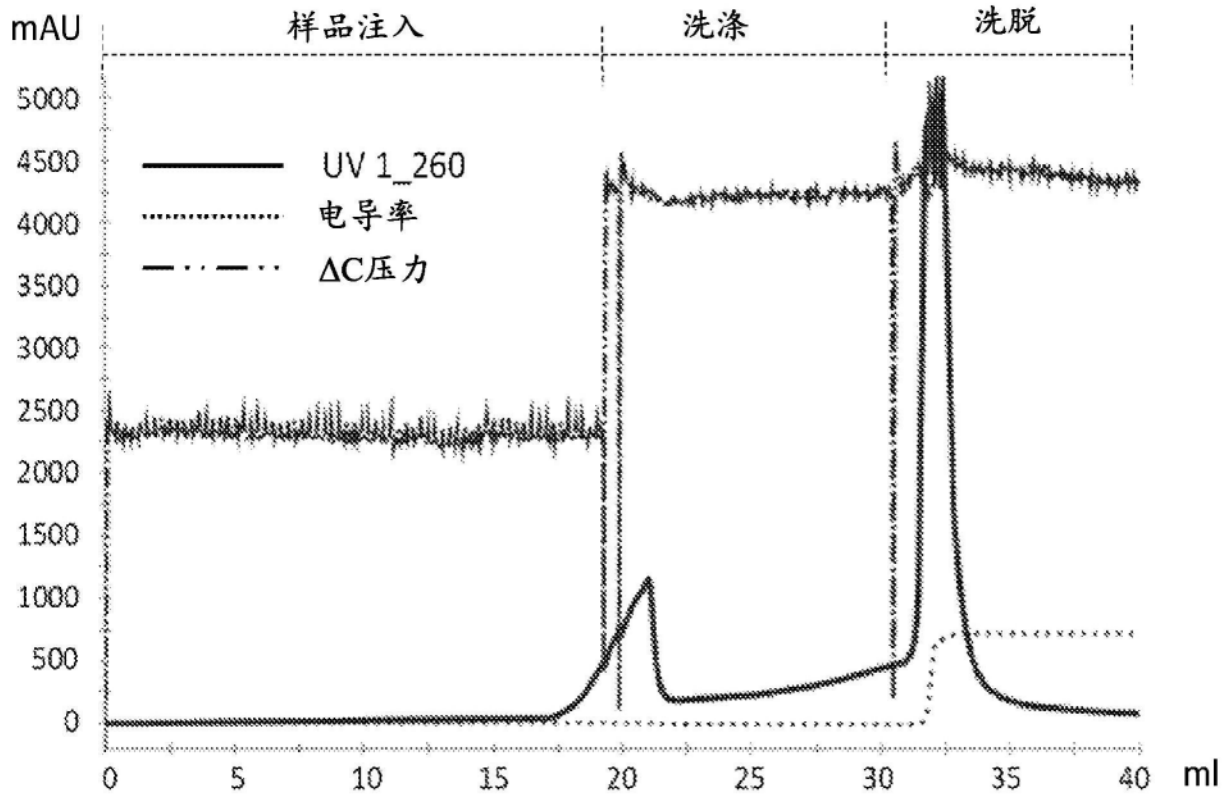

mAU
样品注入
洗涤
洗脱
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UV 1_260
电导率
ΔC压力
0
5
10
15
20
25
30
35
40
ml

图3B

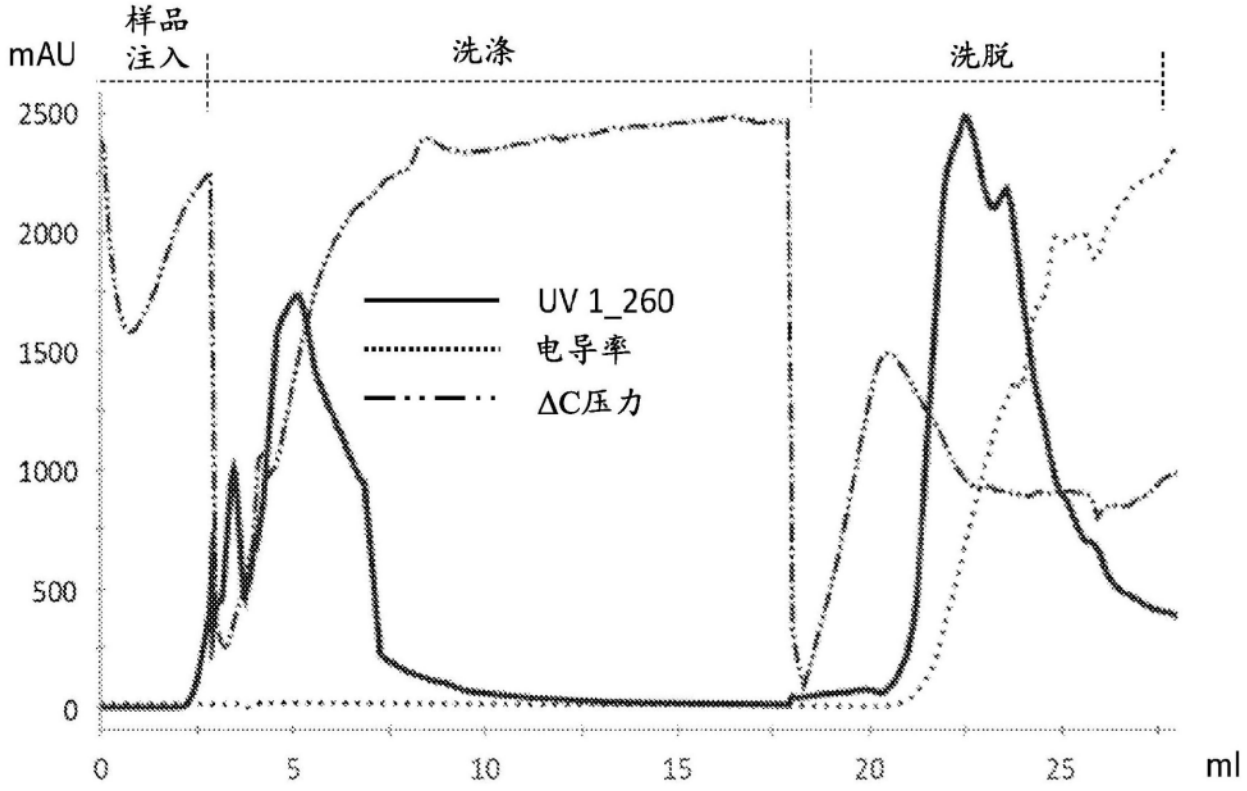

mAU
样品
注入
洗涤
洗脱
2500
2000
1500
1000
500
0
UV 1_260
电导率
ΔC压力
0
5
10
15
20
25
ml

图3C

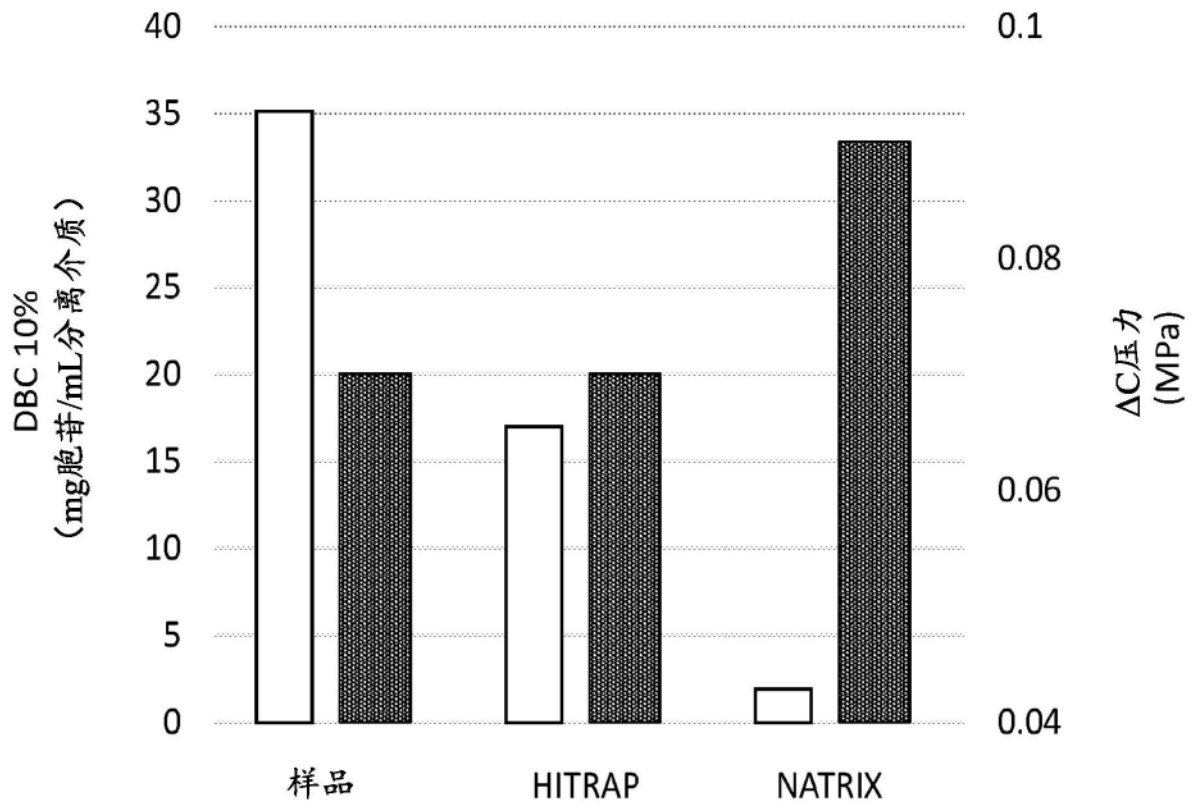

40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.1
0.08
0.06
0.04
DBC 10%
（mg胞苷/mL分离介质）
ΔC压力
(MPa)
样品
HITRAP
NATRIX

图4

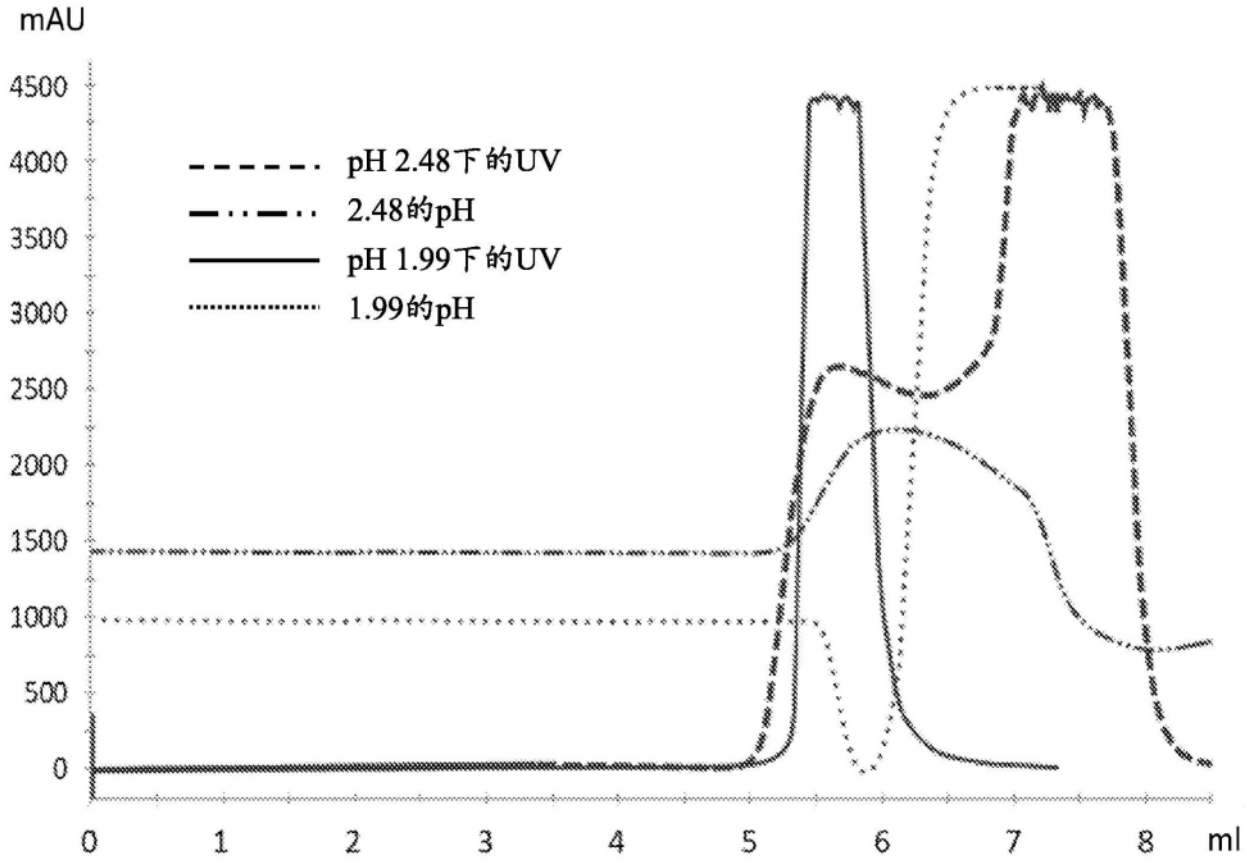

mAU
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
pH 2.48下的UV
2.48的pH
pH 1.99下的UV
1.99的pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ml

图5A

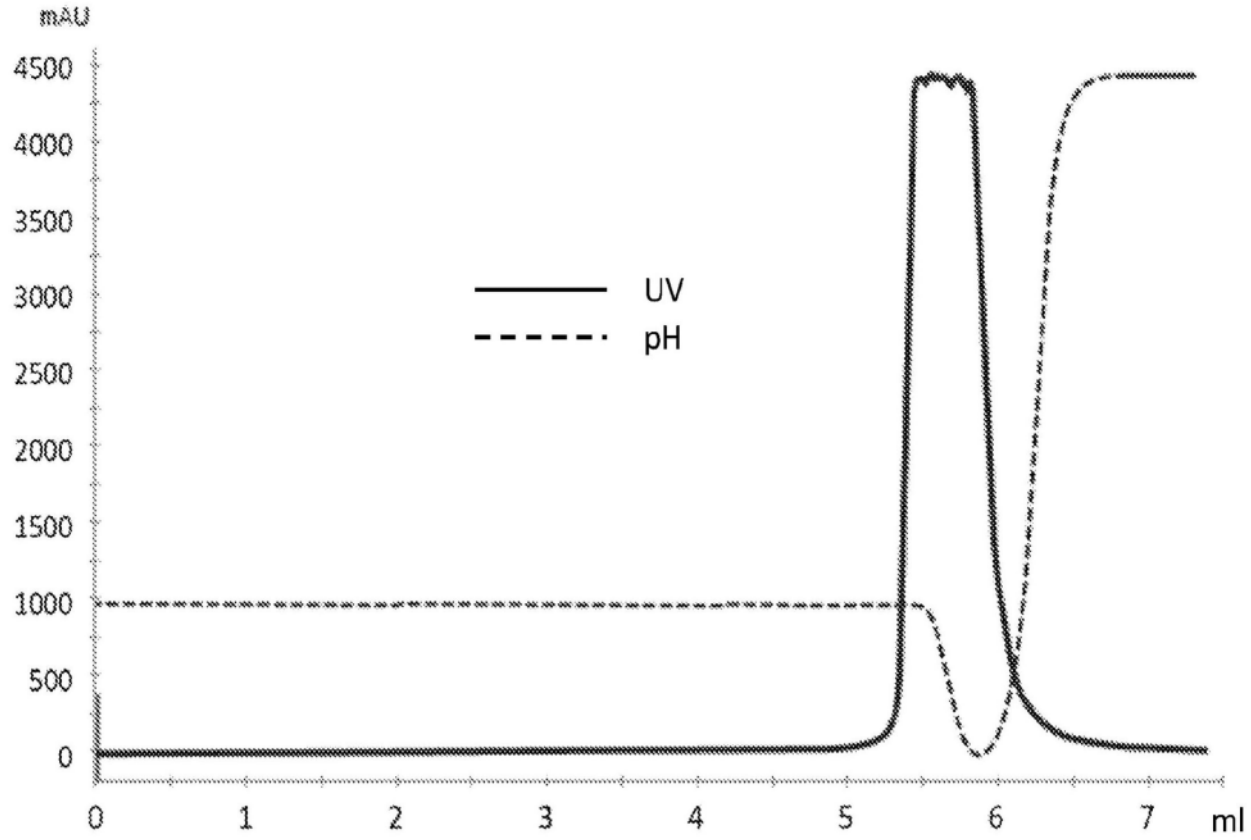

mAU
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UV
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
ml

图5B

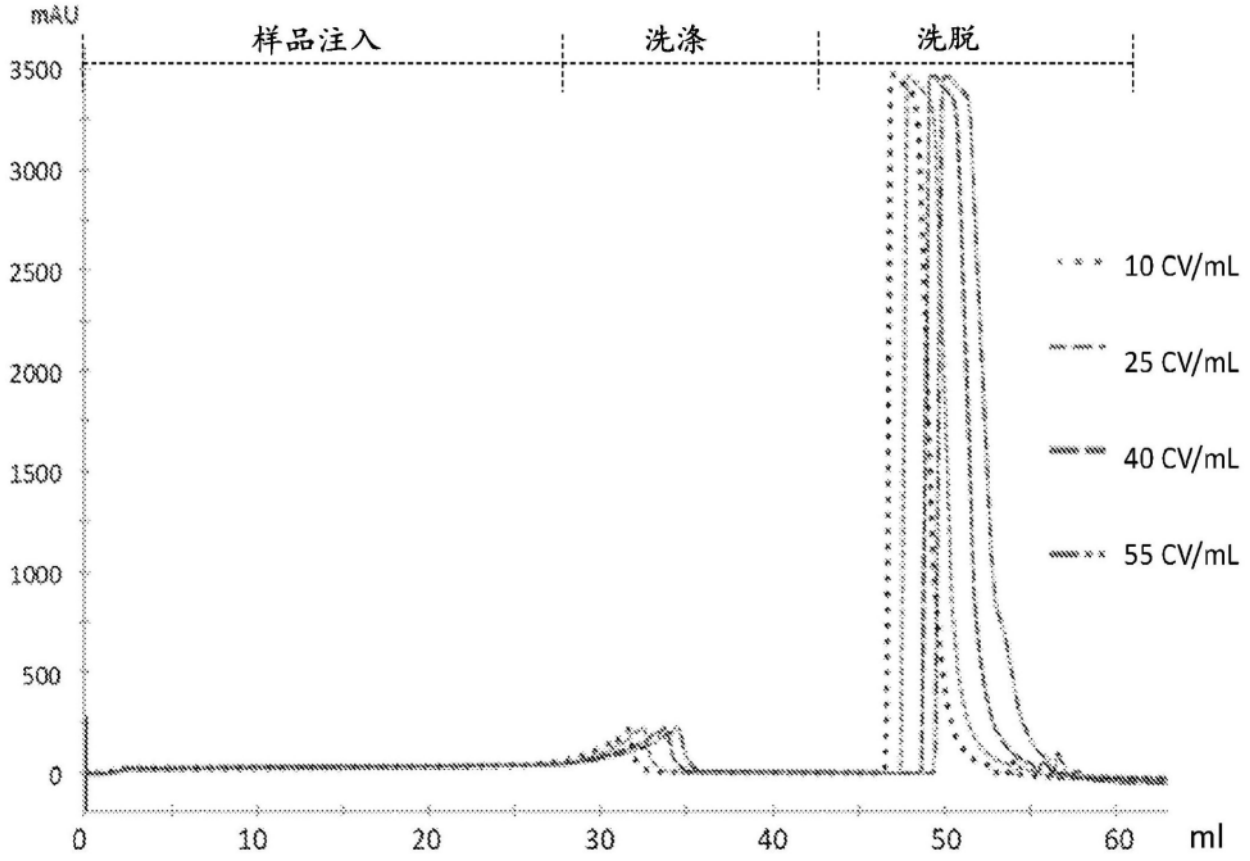

mAU
样品注入
洗涤
洗脱
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
ml
10 CV/mL
25 CV/mL
40 CV/mL
55 CV/mL

图6A

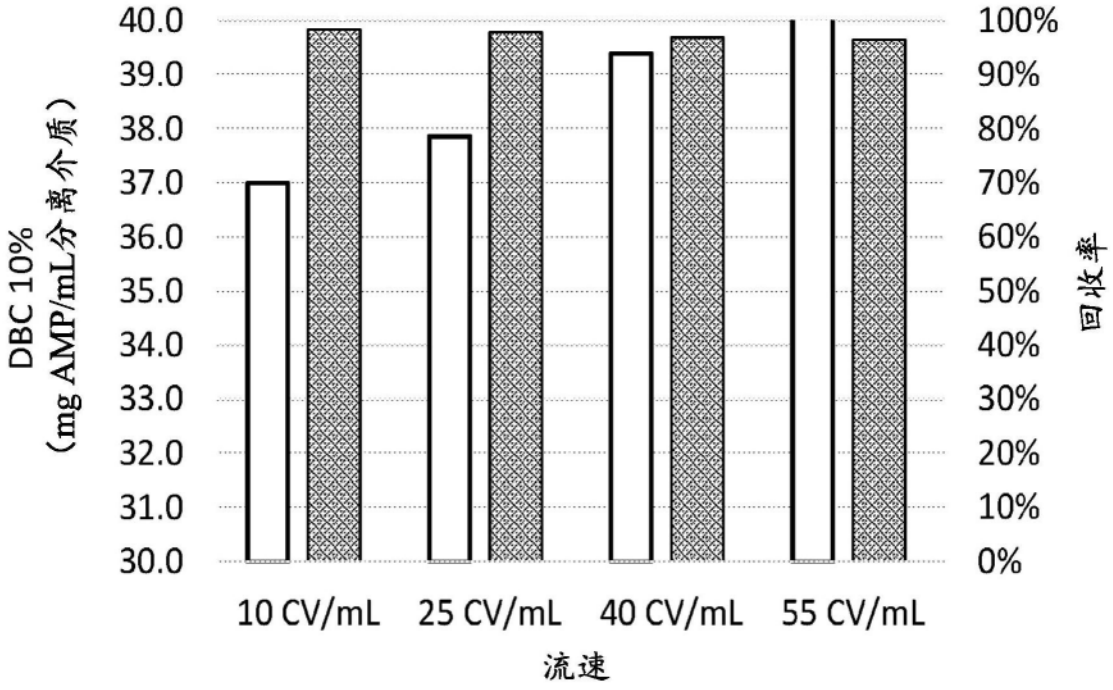

DBC 10%
（mg AMP/mL分离介质）
40.0
39.0
38.0
37.0
36.0
35.0
34.0
33.0
32.0
31.0
30.0
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
回收率
10 CV/mL
25 CV/mL
40 CV/mL
55 CV/mL
流速

图6B

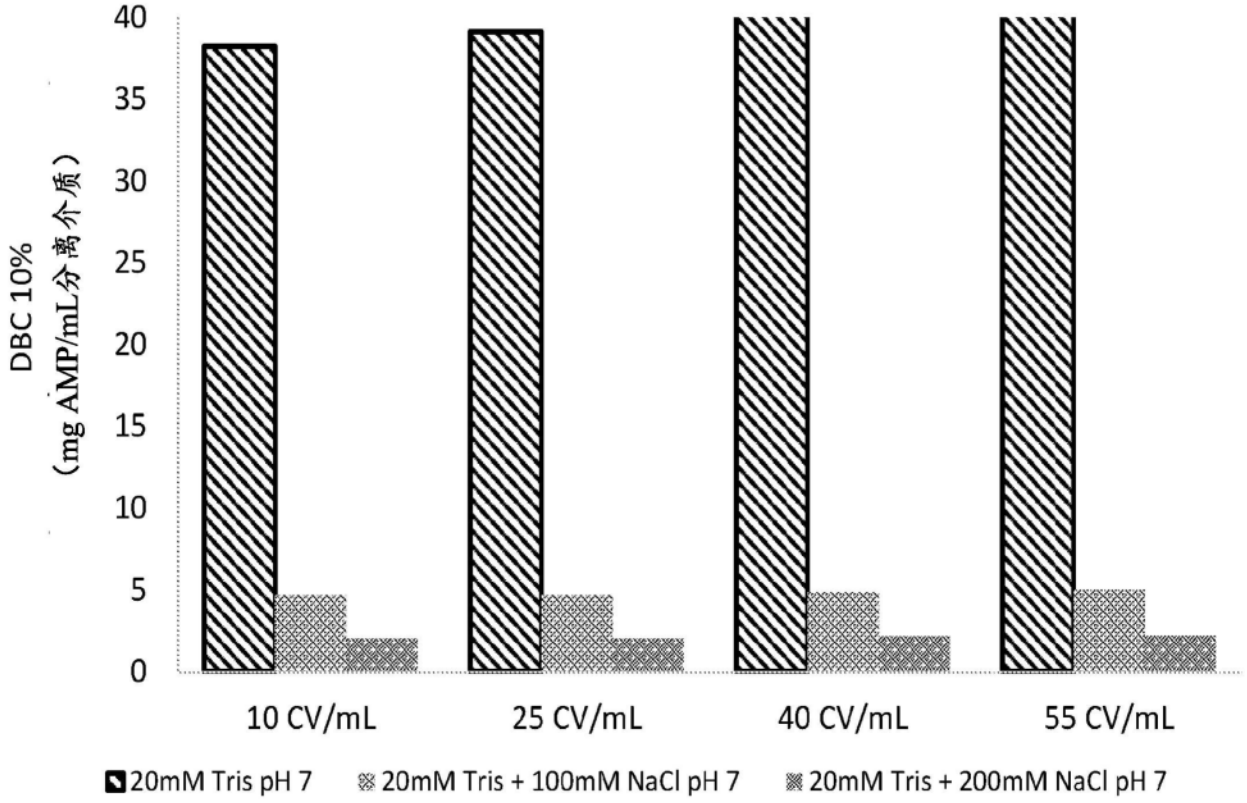

DBC 10%
(mg AMP/mL分离介质)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
10 CV/mL
25 CV/mL
40 CV/mL
55 CV/mL
20mM Tris pH 7
20mM Tris + 100mM NaCl pH 7
20mM Tris + 200mM NaCl pH 7

图7A

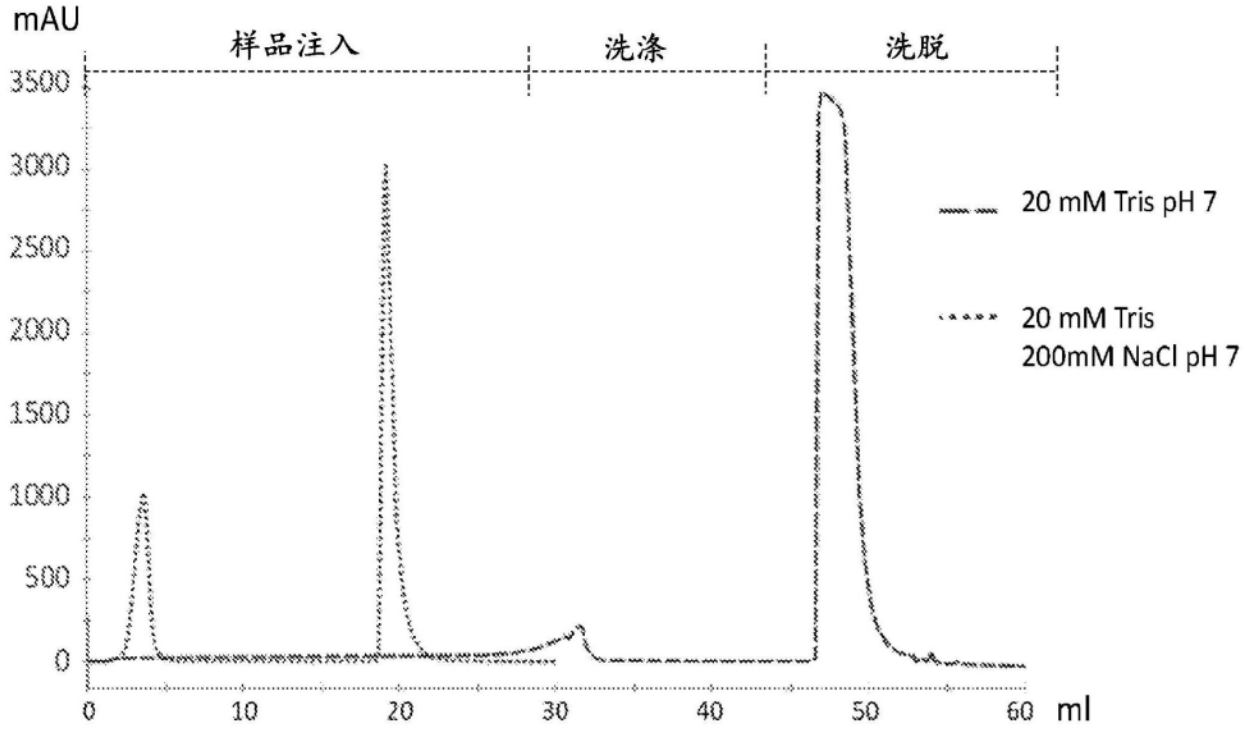

mAU
样品注入
洗涤
洗脱
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
ml
20 mM Tris pH 7
20 mM Tris
200mM NaCl pH 7

图7B

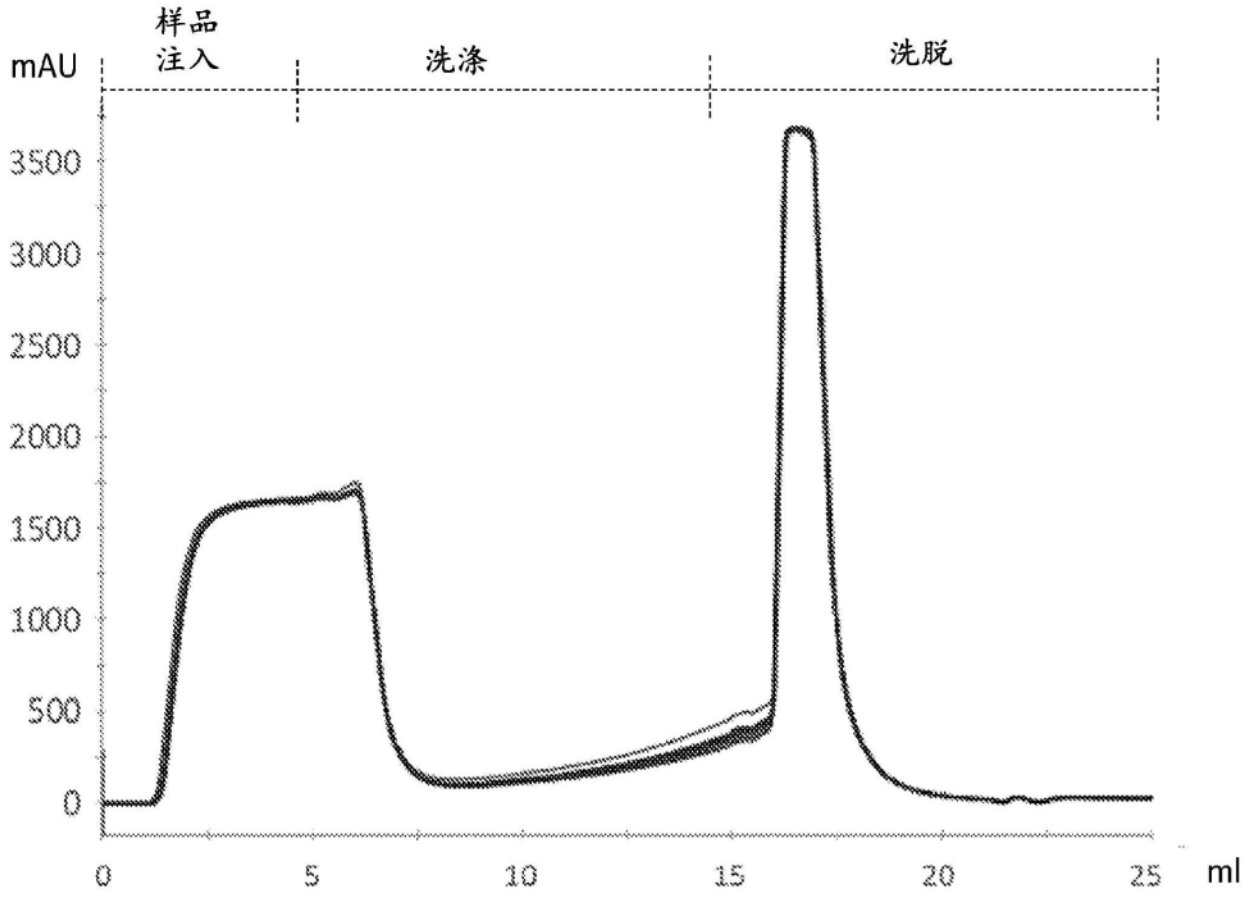

样品
注入
洗涤
洗脱
mAU
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
ml

图8A

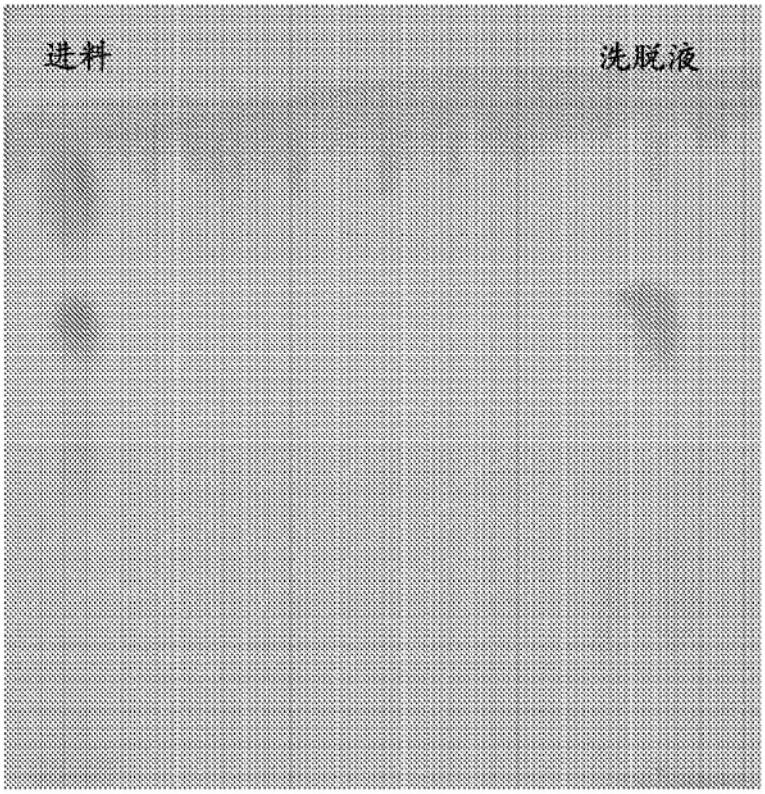


图8B

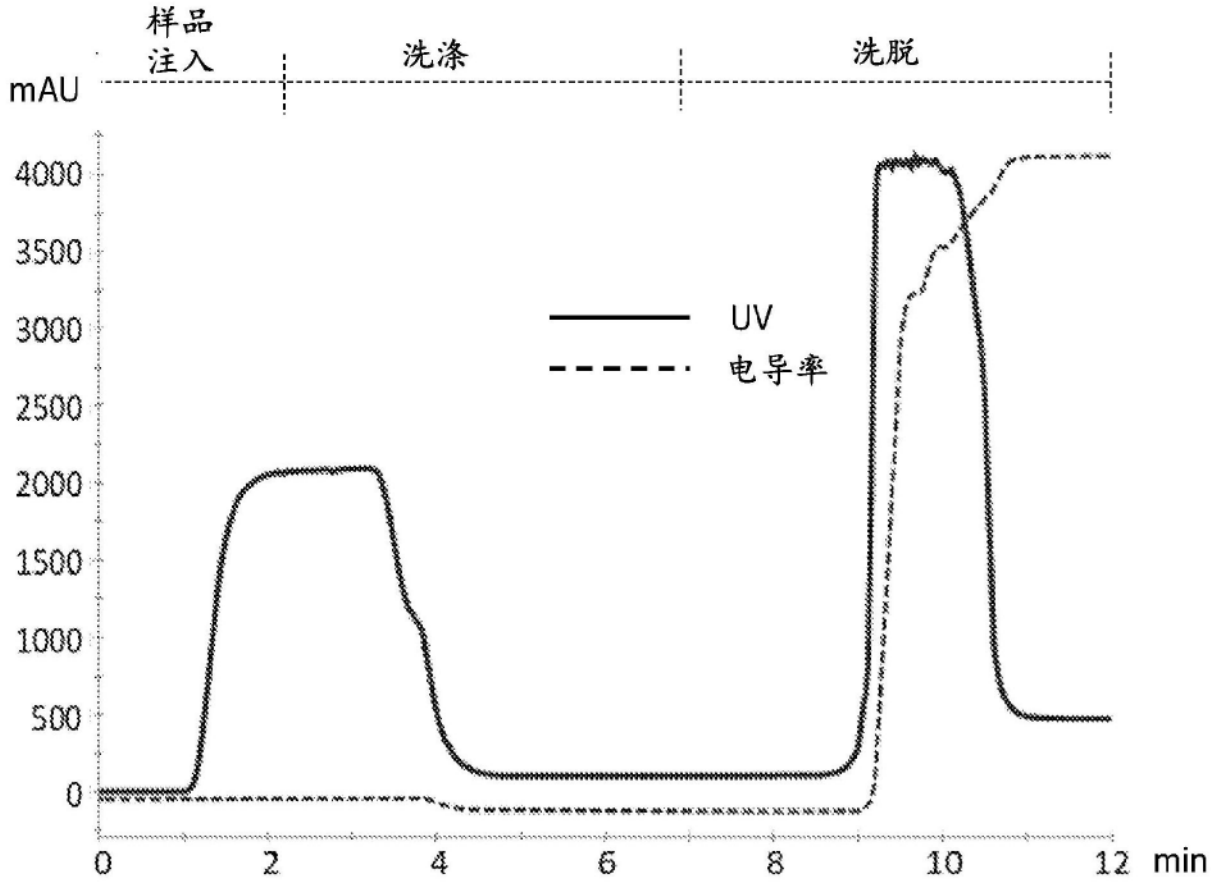

样品
注入
洗涤
洗脱
mAU
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UV
电导率
0
2
4
6
8
10
12
min

图9A

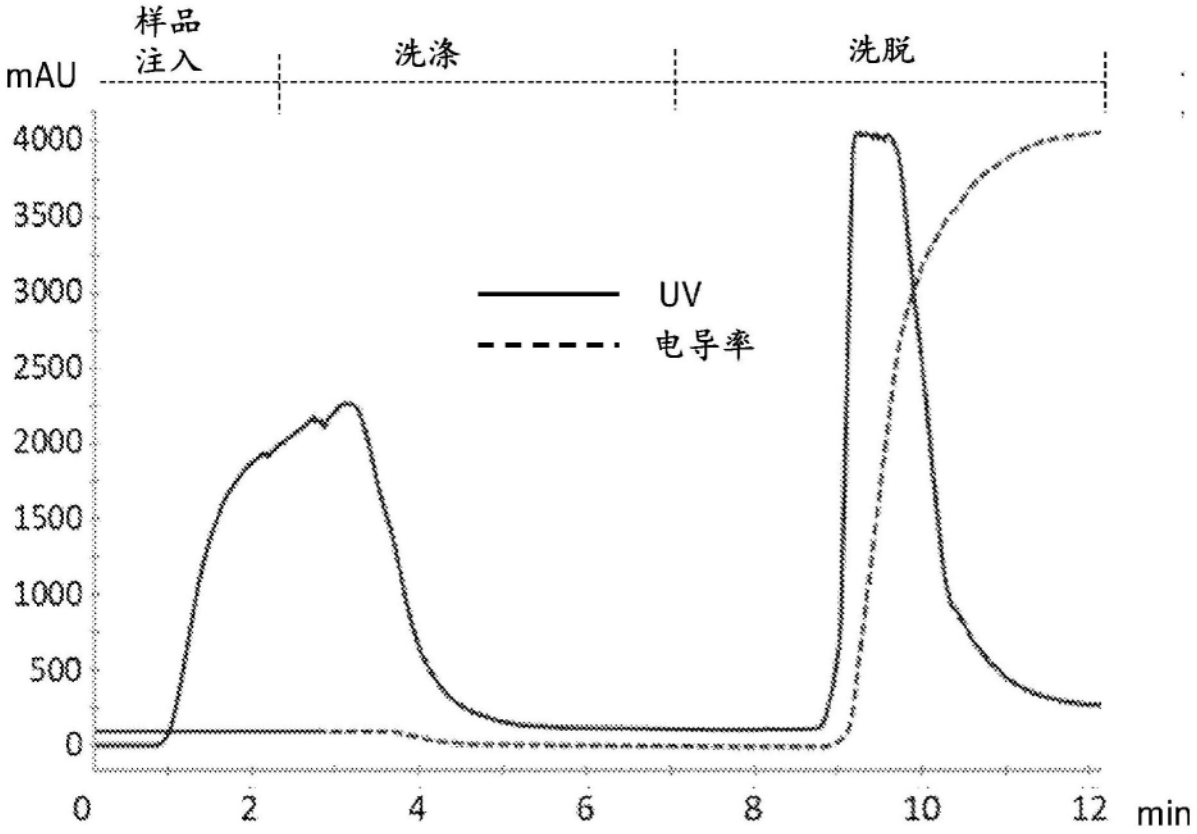

样品
注入
洗涤
洗脱
mAU
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UV
电导率
0
2
4
6
8
10
12
min

图9B

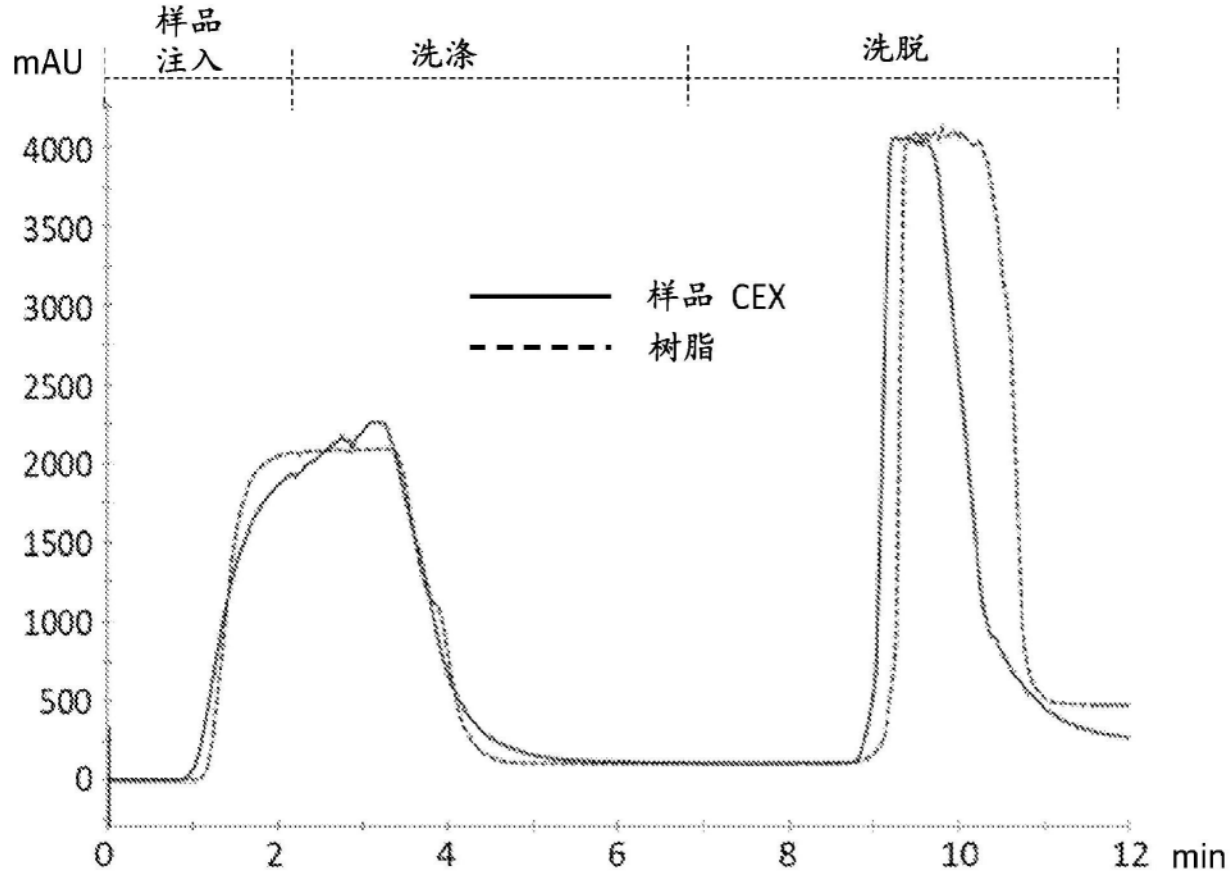

样品
注入
洗涤
洗脱
mAU
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
样品 CEX
树脂
0
2
4
6
8
10
12 min

图9C

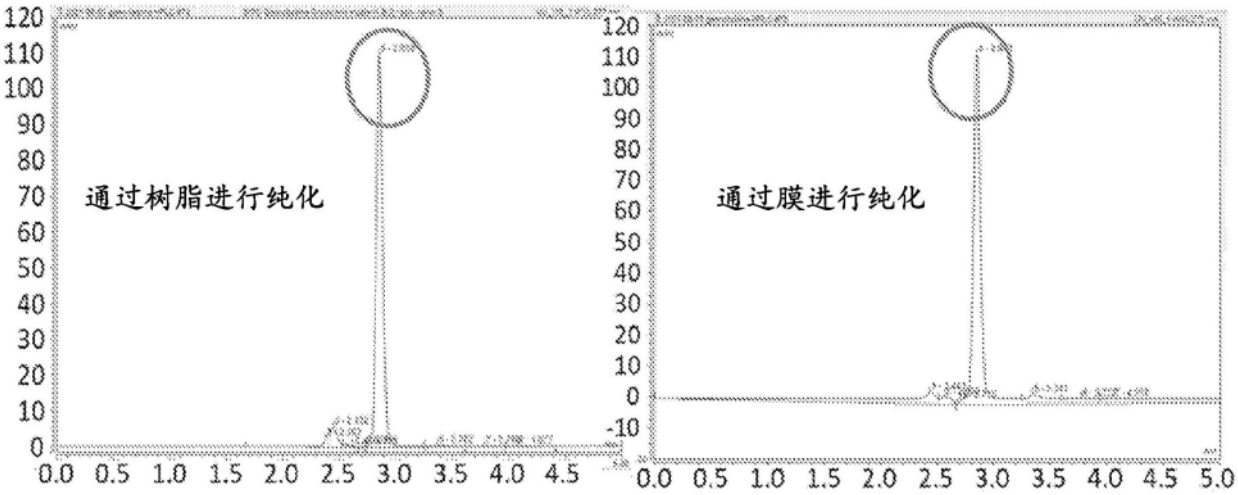

通过树脂进行纯化
通过膜进行纯化
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0

图9D

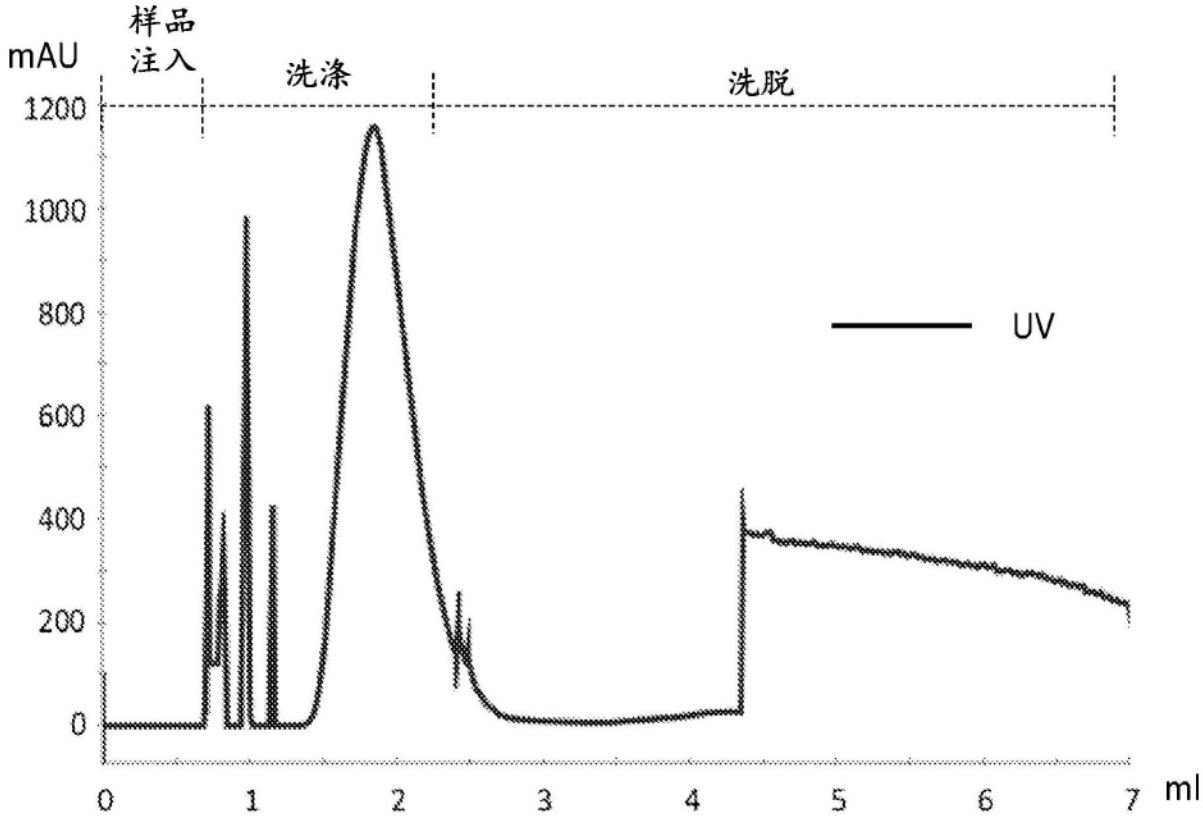


图10