(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102858797 B
(45)授权公告日 2016.05.11

(21)申请号 201180017726.0

(22)申请日 2011.03.30

(30)优先权数据
10158522.2 2010.03.30 EP
61/282,894 2010.04.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.10.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2011/054920 2011.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/121031 EN 2011.10.06

(73)专利权人 奥克塔法马股份有限公司
地址 瑞士拉亨

(72)发明人 古斯塔夫·吉尔加姆 斯特凡·温厄马亚·蒂迈尔

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务所(普通合伙) 11363
代理人 郭放 张文

(51)Int.Cl.
C07K 14/475(2006.01)
C07K 14/52(2006.01)
C07K 14/535(2006.01)
C07K 14/575(2006.01)
B01D 15/36(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)

(56)对比文件
WO 2008073620A ,2008.06.19,
WO 2008073620A ,2008.06.19,
RAO DASARI VENKATA KRISHNA.A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in Escherichia coli and its characterization.<BIOTECHNOLOGY AND APPLLIED BIOCHEMISTRY>.2008,

审查员 唐慧

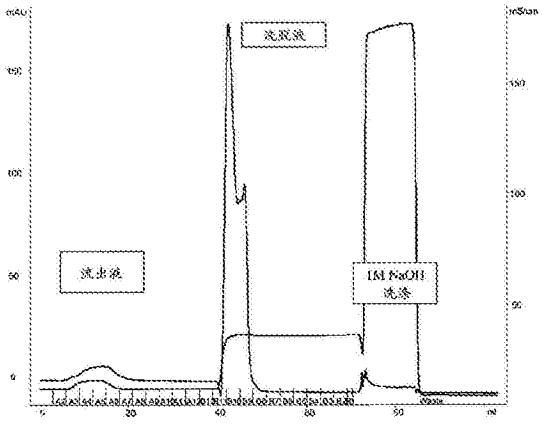
权利要求书2页 说明书19页 附图10页

(54)发明名称

纯化生长因子蛋白的方法

(57)摘要

一种在使用色谱的纯化顺序中纯化生长因子蛋白的方法,特征在于:- 至少一种色谱用多元树脂进行;- 所述生长因子蛋白在 pH 4 到 6.2 之间时结合至所述多元树脂,并且所述生长因子蛋白在 pH > 6.3 下洗脱,并且生长因子蛋白的洗脱通过向洗脱缓冲液加入精氨酸和/或 NaCl 来改进。- 多元树脂步骤随后是酵母源性亲和配体树脂步骤,这导致产物纯度> 90%。



CN 102858797 B

1. 一种以使用色谱的纯化顺序纯化粒细胞克隆刺激因子 G-CSF 的方法，其特征在于：

- 至少一种色谱使用多元树脂进行，所述多元树脂为 Capto MMC 或者偶联至 Capto MP 碱性基质的基于酵母源性 Fab 片段的亲和配体

- 所述 G-CSF 在 pH 4 到 6.2 之间时结合至所述多元树脂，和

- 所述 G-CSF 在 pH ＞ 6.3 下洗脱。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述多元树脂包含结合于基质的部分并且该部分能够通过离子相互作用和其它类型的相互作用而与混合物中的 G-CSF 结合，所述其它类型的相互作用选自氢键和疏水相互作用。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述酵母源性亲和配体是针对 G-CSF 的酵母源性 F_{ab} 片段。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中包含 G-CSF 的混合物是溶液。

5. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 G-CSF 是重组 G-CSF。

6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 G-CSF 通过 pH 改变＞ pH 6.3 来洗脱。

7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中洗脱通过改变 pH 或通过含有氨基酸的洗脱试剂来进行，所述氨基酸具有碱性侧链和 / 或在洗脱缓冲液中具有高离子强度。

8. 权利要求 7 的方法，其中洗脱试剂的浓度在 0.1M 至 2.0M 的范围内。

9. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 G-CSF 在 pH 4.0 至 pH 6.0 下结合至所述多元树脂，并且所述 G-CSF 在 pH ≥ 6.5 从所述多元树脂上洗脱。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述 G-CSF 在 pH 7.0 下从所述多元树脂上洗脱。

11. 权利要求 1 或 2 的方法，其中使用这样的缓冲物质，其包含柠檬酸钠，乙酸钠，HEPES。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述缓冲物质选自柠檬酸钠，组氨酸，2-(4-(2- 羟乙基)-1- 哌嗪基)- 乙磺酸，2-(N- 吗啉基) 乙磺酸，Tris 碱和乙酸钠。

13. 权利要求 11 的方法，其中在 pH 4 至 pH 8 的范围内使用所述的缓冲物质。

14. 权利要求 1 或 2 的方法，其中在所用的任何缓冲液中存在非离子去污剂。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述非离子去污剂选自聚山梨醇酯和 Pluronic F68。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯 20、40、60 或 80。

17. 权利要求 7 的方法，其中具有碱性侧链的氨基酸是精氨酸、赖氨酸和 / 或组氨酸。

18. 权利要求 1 或 2 的方法，其中使用这样的缓冲液，其包含 0.1M-2M 氯化钠或 0.1M-2M 精氨酸单盐酸，可以在 G-CSF 洗脱之前在 pH 4.0-6.0 范围的洗涤步骤。

19. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于在 G-CSF 释放之前向多元树脂施加洗涤缓冲液，以洗去污染物而保留 G-CSF，其特征在于所述洗涤缓冲液包含具有碱性侧链的氨基酸和 / 或根据 Hofmeister 系列选择的盐。

20. 权利要求 1 或 2 的方法，包含下列步骤：

- 基于化学的失活步骤以封装病毒；

- 阳离子交换器；

- 病原体过滤移除步骤，使用平均孔尺寸约 20nm；

- 缓冲液交换和 / 或浓缩步骤；

- 尺寸排阻色谱树脂。

21. 权利要求 20 的方法，其特征在于所述基于化学的失活步骤为使用 EP-A-131740 中

公开的三正丁基磷酸酯和 Triton X-100 的溶剂 / 去污剂失活。

22. 权利要求 20 的方法，其特征在于所述阳离子交换器为 SP Sepharose 或 Resource S。

23. 权利要求 20 的方法，其特征在于所述病原体过滤移除步骤使用 Planova 20N。

24. 权利要求 20 的方法，其特征在于所述缓冲液交换和 / 或浓缩步骤使用截断 1-5kDa 的超滤。

25. 权利要求 20 的方法，其特征在于所述尺寸排阻色谱树脂为 Superdex 75。

26. 权利要求 20 的方法，其特征在于从亲和色谱树脂获得的产物的纯度大于 90％。

27. 根据权利要求 26 的方法，其特征在于进行另外的色谱步骤，所述另外的色谱步骤选自尺寸排阻、阴离子交换、阳离子交换、疏水相互作用和固定化金属亲和色谱，其特征在于终产物的纯度大于 99％。

28. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于所述纯化顺序进一步包含病原体移除 / 失活步骤，所述病原体移除 / 失活步骤包含基于化学的失活步骤，基于尺寸的移除步骤，色谱步骤或其组合，所述步骤基于针对要移除的病原体的不同生理学特性。

纯化生长因子蛋白的方法

[0001] 本发明涉及使用色谱纯化生长因子蛋白的方法。

[0002] 从天然来源的原料中纯化蛋白是一种挑战，因为感兴趣的蛋白通常仅以痕量存在并伴随以其它生物聚合物例如脂质、蛋白或者甚至细胞片段。另外感兴趣的蛋白往往与生物学功能相关联，所述生物学功能经常在其纯化方法步骤中丧失。

[0003] 纯化生物聚合物例如蛋白质的方法的库是很大的。除了沉淀方法，基于多种材料的色谱方法也是已知的。所述材料常常用化学部分修饰，例如有机离子、阳离子例如质子化氨或部分或完全烷基化的氨。这样的材料用作阴离子交换剂。但是阳离子交换剂也可用于基于感兴趣的蛋白的物理特性的纯化方法，所述物理特性例如性状、分子量和尤其是其电荷。可选地或联合地使用亲和色谱法。

[0004] 本领域已知传统离子交换色谱树脂(例如 SP-，CM-，Q- 或 DEAE 琼脂糖 FF 离子交换色谱树脂)的一个缺点是蛋白质与树脂的连接仅能在相对低盐浓度(电导率，渗透压浓度等)内，典型地在 0.01-0.15M 的盐(NaCl 等)浓度范围内发生。在某些应用中存在能够利用相对温和的纯化条件的需求，其中离子交换色谱步骤施加于所述蛋白，并在有所增加的离子强度下直接(没有进一步稀释)施加至色谱树脂。增加的离子强度对蛋白溶液中的蛋白稳定性有显著优势；尤其在粗品蛋白制备中，像在收获重组制备的蛋白产物或在血浆源性产物中，其中潜在的蛋白酶存在于溶液中，其可以负向影响目标蛋白。由于蛋白酶经常在生理条件下最好地工作(像在大多细胞系统中的情况)，即大约 pH 7 和盐浓度为大约 0.15M。

[0005] 可以通过改变工作条件例如通过加入盐和 / 或改变 pH 来抑制蛋白酶，然而，这些参数都对传统的离子色谱步骤的性能是很重要的，并且从而经常不可能组合使用。需要提供这样的纯化方法，在所述方法的过程中可以使用使蛋白酶的影响最小化的条件。

[0006] WO-A2-2008/073620 公开了一种多肽生产方法，所述多肽在昆虫细胞中用杆状病毒表达系统生产。在一个实例中，所述昆虫细胞培养物在补充了脂质混合物之后立即感染(例如，一小时之后感染)。从所述昆虫细胞培养物中用这样的方法分离多肽：在纯化过程的早期利用阴离子交换或混合式色谱。该方法步骤用于移除源自昆虫细胞的多糖内切酶和蛋白酶并从而减少期望多肽由于酶降解而带来的损失。在另一个实例中，将混合式色谱与染料配体亲和色谱以连续流方式组合以允许昆虫细胞培养物液体的快速处理和捕获多肽。在又一个实例中，用这样的方法从昆虫细胞培养物液体中分离多肽：在制备基本上不含多糖内切酶和蛋白水解活性的多肽溶液的单一操作单元中将中空纤维过滤、混合式色谱和染料配体亲和组合。再进一步的实例中，所述分离的多肽是具有昆虫特定糖基化方式的糖肽，其任选地用糖基转移酶和修饰的核苷酸糖连接至修饰基团，例如聚合物(例如，PEG)。

[0007] WO-A2-2009/063069 公开了一种纯化肽的方法，特别地但不排他地，涉及从肽溶液中移除外毒素的方法，包含用于所述方法的反应物的试剂盒和通过所述方法获得的纯化的肽。

[0008] Dasari Venkata Krishna Rao 等人公开了一种纯化方法，其使用一种为促进 rhG-CSF (重组人粒细胞克隆 - 刺激因子)的产量而发展的过程控制策略。在该研究中达到了≥ 99% 的纯度和 2.18g/l 的总产量。纯化期间产物的分析表明去污剂移除了 72% 的 LPS

(脂多糖)和98%的HCP(宿主细胞蛋白)而不移除核酸。半胱氨酸浓度是蛋白再折叠的关键参数。评估了SEC(尺寸排阻色谱)柱中的基底高度和HETP(高度等效理论板)值并研究了其对拆分的效果。发现SEC期间的公式化对增加产物产量和节约时间和过程成本是至关重要的。

[0009] Quan Bai等用强阴离子交换色谱(SAX)研究了在大肠杆菌中表达的重组人粒细胞巨噬细胞克隆刺激因子(rhGM-CSF)的纯化和复性。用SAX分别研究了流动相中pH值、GSH/GSSG的浓度比和尿素浓度对rhGM-CSF的纯化和复性的影响。结果显示上述三个因子对rhGM-CSF的复性效率和质量回收具有显著影响。流动相中加入GSH/GSSG能提高rhGM-CSF中正确的二硫键的形成从而增加其复性产量。另外,为了用SAX增加rhGM-CSF的质量回收,将低浓度的尿素加入流动相中以防止变性蛋白聚集。在优化条件下,仅通过一个步骤在30分钟内使rhGM-CSF复性同时在SAX柱上纯化。

[0010] ShellyA.Pizarro报告了一种血管内皮生长因子(VEGF165),这是一种在体内诱导血管生成和血管渗透性有效的促细胞分裂原,并证明了对加速创伤愈合的治疗应用的潜力。该报告中描述的方法涉及能够生产大约9g的rh VEGF每升的培养基的细菌表达系统和蛋白质折叠和三个色谱步骤的下游纯化方法,之后为药物物质的制剂化。使用了高细胞密度(HCD)补料分批发酵方法以在原生质包含体中生产rhVEGF。从细胞溶解物中收获包含体并使之经历单一步骤的蛋白溶解和重折叠操作以提取rhVEGF用于纯化。在发展包括重折叠和色谱期间的全部回收收率为30±6%。在实验室和大尺度示范性方法中宿主细胞混杂物均被常规地清除至低于目标水平。重折叠和纯化的rhVEGF的结构通过质谱来确认。N-端测序、胰蛋白酶肽作图以及产物变体通过多重HPLC化验来分析。

[0011] Kimberly A.Kaleas公开了混合式色谱树脂作为用于挑战给料的纯化工具越来越流行,并公开了用Capto MMC从碱性给料中选择性捕获重组人血管内皮生长因子(rhVEGF)工业化应用的发展。Capto MMC树脂包含这样的配体,其具有参与与蛋白的离子、疏水和氢键作用的潜力并与高交联琼脂糖珠基体偶联。VEGF是涉及血管生成的关键生长因子并具有对创伤愈合的治疗性应用。它在大肠杆菌中以包含体表达。从细胞溶解物中收获固体,溶解rhVEGF并在pH 9.8下在尿素和氧化还原试剂存在下溶解和重折叠。Capto MMC的独特的混合模式特性使得能够以最小的负载条件捕获该碱性蛋白,并以＞95%收率向下游过程传递浓缩池同时使宿主细胞蛋白含量降低至＜1.2%。该研究探索了负载条件和保留时间对动态结合容量的影响以及最佳纯化性能的洗脱条件的开发。在评价各种洗脱缓冲液之后,L-精氨酸HCl显示出可作为rhVEGF从Capto MMC解吸附的有效洗脱试剂,因为它成功中断了树脂和rhVEGF之间的多重相互作用。实验室尺度的成果产生了成功地以商业化制造尺度实施的坚固的色谱步骤。

[0012] 本发明的一个目的是通过提供新的方法来避免现有技术中生长因子蛋白的纯化方法的缺点。根据本发明,该目的通过以使用色谱的纯化顺序纯化选自以下的生长因子的方法来实现:克隆刺激因子(CSF)例如G-CAF(粒细胞克隆刺激因子)或粒细胞-巨噬细胞CSF(GM-CSF)、白介素3(IL-3)、肝细胞生长因子、表皮生长因子和成纤维细胞生长因子(酸性),其中:

[0013] -至少一个色谱用多元树脂(multimodal resin)来进行

[0014] -将所述生长因子蛋白在pH 4-6.2下结合至多元树脂,和

[0015] -将所述生长因子蛋白在 pH ＞ 6.3 下从多元树脂上洗脱。

[0016] 本发明提供了这样的方法，其中蛋白酶的影响可以被便利地最小化。使得可以在潜在存在能够降解目标蛋白的蛋白酶的情况下在粗蛋白样品中添加盐和 / 或改变 pH，并可以在没有任何进一步的测量的情况下处理蛋白溶液并将目标蛋白结合至混合式色谱树脂并从而提供在粗样品中浓缩和纯化目标蛋白的优化步骤，使得适合于用针对目标蛋白的特定亲和色谱步骤进行进一步的下游纯化，其在下游处理期间具有减少的蛋白酶和 / 或 DNA 含量。这对纯化期间避免目标蛋白的降解具有特别的重要性，使得多元色谱的组合作为粗蛋白溶液中的捕获步骤。

[0017] 在一个实施方式里，多元树脂色谱与酵母源性亲和配体色谱步骤组合。使用酵母源性亲和配体的色谱步骤特别适合于高收率和不改变分子完整性(降解等)的目标蛋白纯化。

[0018] 所述生长因子蛋白是克隆刺激因子(CSF)例如 G-CSF (粒细胞克隆刺激因子)。这是造血调节糖蛋白中的一员，造血调节糖蛋白涉及来自干细胞的造血细胞的生长和分化。生长因子蛋白是粒细胞 - 巨噬细胞 CSF (GM-CSF)、白介素 3 (IL-3)、肝细胞生长因子、表皮生长因子和成纤维细胞生长因子(酸性)。生长因子蛋白全部显示 IP ≤ 6。在本发明进一步的实施方式里，所述多元树脂包含结合基质的部分并且该部分能通过离子相互作用和其它类型的相互作用例如氢键、疏水和亲硫相互作用而与基质中的生长因子蛋白结合。

[0019] 在本发明进一步的实施方式里，所述亲和配体是酵母源性的针对生长因子蛋白的 F_{ab}片段。

[0020] 在本发明进一步的实施方式里，执行所述多元树脂步骤以从粗蛋白溶液中捕获生长因子蛋白随后将获得的多元色谱树脂洗脱液进行酵母源性的亲和配体色谱步骤，并且在将来自所述亲和色谱步骤的生长因子蛋白的洗脱之后，实现与蛋白和 DNA 有关的大于大约 90% 的纯度。

[0021] 在本发明的另外一个实施方式里，所述多元树脂步骤和酵母源性亲和配体色谱步骤与其它色谱纯化步骤组合以实现最终生长因子蛋白产物纯度大于 99%。

[0022] 在本发明的另外一个实施方式里，包含生长因子蛋白的混合物是溶液。

[0023] 在本发明的又另一个实施方式里，生长因子蛋白是重组生长因子蛋白。

[0024] 在本发明的又另一个实施方式里，生长因子蛋白是在潜在地包含能降解产物的蛋白酶的粗蛋白溶液中。

[0025] 在另一个实施方式里通过 pH 改变＞ pH 6.3 将生长因子蛋白洗脱。

[0026] 在本发明进一步的实施方式里用包含具有碱性侧链和 / 或高离子强度的氨基酸的洗脱试剂来进行洗脱。可选地或组合地，可以通过 pH 改变来进行所述洗脱。通过用例如氢氧化钠或乙酸来调节洗脱缓冲液的 pH 至期望的 pH 并且然后将缓冲液应用于多元树脂来执行 pH 改变，并且可以通过在应用于多元树脂之前向洗脱缓冲液组合物加入盐来执行离子强度调节，例如包括在 Hofmeister 系列中的盐，例如氯化钠和氯化钾。

[0027] 根据本发明，洗脱试剂的浓度特别在从大约 0.1M 到大约 2M 的范围。

[0028] 根据本发明的另一个实施方式，生长因子蛋白在约 pH 6.0 下结合至多元树脂，而生长因子蛋白在约 pH 6.5 或更高特别是在约 pH 7.0 下从多元树脂上洗脱。

[0029] 在本发明的进一步的实施方式里，使用这样的缓冲物质，其优选包含选自以下的

物质中的至少一种：柠檬酸钠、组氨酸、2-(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪基)-乙磺酸(HEPES)、2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)、Tris碱和乙酸钠，特别在约pH 4至约pH 8的范围内。

[0030] 在本发明的方法里在使用的任何缓冲液里可以存在一种非离子去污剂，该非离子去污剂特别选自聚山梨醇酯(聚山梨醇酯20,40,60,80)和Pluronic F68。

[0031] 在本发明的方法的进一步的实施方式里，所述氨基酸可以选自具有碱性侧链的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；有机盐可以选自KCl和NaCl。

[0032] 在本发明的另一个实施方式里，在从多元树脂洗脱生长因子蛋白之前，在pH约pH4至约pH 6的范围内执行洗涤步骤，其特征在于洗涤缓冲液包括洗涤试剂，所述洗涤试剂包含具有碱性侧链和/或高离子强度的氨基酸，可以通过在应用于多元树脂之前向洗涤缓冲液组合物加入盐来执行离子强度的调节，例如包括在Hofmeister系列中的盐，例如氯化钠和氯化钾。

[0033] 根据本发明，洗涤试剂的浓度特别在约0.1M至约2M的范围。

[0034] 在生长因子蛋白被释放之前向多元树脂施加洗涤缓冲液以洗去污染物(蛋白酶，DNA等)并保留生长因子蛋白是有利的。

[0035] 特别地，在pH 6-8时带正电荷的氨基酸的浓度在洗涤缓冲液中在pH＜6.3下以最多2M的量存在。典型地，在洗涤缓冲液中精氨酸的量在0.1-1.0M的范围，特别是0.5M。

[0036] 在pH≥6.3的洗脱缓冲液中精氨酸的量典型地在0.1至2M的范围，特别是0.5M。

[0037] 在pH≥6.3的洗脱缓冲液中，包含在0.1-2.0M范围的氯化钠，特别是在0.1至1M的范围。

[0038] 在pH＜6.3的洗涤缓冲液中，包含在0.1-2.0M范围的氯化钠，特别是在0.1至1M的范围。

[0039] 非离子去污剂的量典型地在0.001至1%的范围，特别在多元色谱的缓冲液中为0.02%。

[0040] 根据本发明可以使用的多元色谱树脂可以包含以下部分中的至少一种：

[0041] a. 带正电荷的N-苯甲基-N-甲基乙醇胺配体，

[0042] b. 带负电荷的2-(苯甲酰胺)丁酸配体，

[0043] c. 苯丙基配体，

[0044] d.N-己基配体，

[0045] e.4-巯基-乙基-吡啶配体，

[0046] f.3-((3-甲基-5-((四氢呋喃-2-基甲基)-氨基)-苯基)-氨基)-苯甲酸配体或其组合。

[0047] 特别地，根据本发明使用的多元色谱选自下列商业上可获得的树脂：HEPHypercel™;PPA Hypercel™;Capto Adhere™;Capto MMC™;MEP Hypercel™。

[0048] 在本发明的另一个实施方式里，纯化顺序可以进一步包含病原体移除/失活步骤，其包含基于化学的失活步骤，基于尺寸的移除步骤，色谱步骤或其组合，所述步骤基于针对待移除的病原体的不同的物理性质。

[0049] 在本发明的方法的一个具体的实施方式里，纯化顺序进一步包含如下步骤：

[0050] 1. 阳离子多元树脂例如Capto MMC；

[0051] 2. 基于化学的失活步骤以封装病毒，尤其是使用EP-A-131740中公开的三正丁基

磷酸酯和 Triton X-100 的溶剂 / 去污剂失活 ;

[0052] 3. 基于酵母中表达的配体的亲和树脂 ;

[0053] 4. 阳离子交换剂例如 SP Sepharose 或 Resource S ;

[0054] 5. 病原体过滤移除步骤,使用平均孔尺寸约 20nm 例如 Planova 20N ;

[0055] 6. 缓冲液交换和 / 或浓缩步骤,例如用大约截断 1-5kDa 的超滤 ;

[0056] 7. 尺寸排阻色谱树脂例如 Superdex 75。

[0057] 附图简述

[0058] 图 1 显示了在 pH 4.0 下以 Capto MMC 柱用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0059] 图 2 显示了在 pH 4.0 下以 Capto MMC 柱用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0060] 图 3 显示了在 pH 4.0 下以 Capto MMC 柱用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0061] 图 4 显示了在起始材料 pH 4.0 下以 Capto MMC 柱用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0062] 图 5 显示了在 pH 4.0 下以 Capto MMC 柱用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0063] 图 6 显示了在 pH 5.0 下以 Capto MMC 柱用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0064] 图 7 显示了在 pH 5.5 下以 Capto MMC 柱用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0065] 图 8 显示了在 pH 6.0 下以 Capto MMC 柱用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0066] 图 9 显示了在 pH 6.5 下以 Capto MMC 柱用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。

[0067] 图 10a 和 10b 显示了在起始和来自 Capto MMC 洗脱液中的蛋白分离和银染色的 SDS-PAGE。

[0068] 图 11 显示了来自无细胞上清液的 G-CSF 的色谱图。

[0069] 图 12 显示了考马斯蓝染色的 SDS-PAGE,其显示了亲和色谱步骤后的洗脱液。

[0070] 图 13 显示了银染色的 SDS-PAGE,其显示起始材料、流过液和亲和色谱步骤之后的洗脱液。

[0071] 本发明进一步通过下述非限制性实施例来描述,其通过 G-CSF 纯化来示例。

实施例

[0072] 分析方法的描述

[0073] 通过 G-CSF 特异性 ELISA 确定 G-CSF 含量

[0074] 酶联免疫吸附分析(ELISA)的原理是蛋白质(抗原)通过其特异性结合至针对该蛋白的抗体来定量。G-CSF 的定量通过使用基于 G-CSF Duo Set ELISA(R&D Systems,Cat No DY214)的多层 ELISA 来执行。作为标定标准使用了大肠杆菌源性的重组人 G-CSF (R&D systems,Cat No.214-CS-005,0.015 - 1ng/ml)。捕获抗体(鼠抗 - 人 G-CSF)结合至 96 孔微滴定板的孔。在捕获 G-CSF 抗原和洗涤步骤之后,将生物素化的探测抗体(山羊抗 - 人 G-CSF)结合至 G-CSF 抗原。在第二洗涤步骤之后,施加连接至辣根过氧化物酶的链霉抗生物素蛋白(Streptavidin-HRP),其结合至生物素化的探测抗体。为了定量,在过氧化氢存在下加入过氧化物酶底物四甲联苯胺(TMB)并显示出蓝色。在用磺酸停止反应滞后,形成稳定的黄色染料。黄色染料的浓度与结合的过氧化物的量成正比,从而与 G-CSF 抗原的量成比例。染料浓度以 450nm 处的光度来测量。未知样品中的 G-CSF 浓度根据重组人 G-CSF 标准曲线来计算,所述标准曲线通常给出线性相关系数(r)> 0.99。

[0075] 通过反相(RP)HPLC 确定 G-CSF 含量

[0076] RP-HPLC 包括基于蛋白质极性的蛋白质分离;通过溶质分子的非极性部分与 HPLC 柱的非极性固定相之间的疏水作用控制蛋白质分子的保留。装配 UV 检测器和 Jupiter C18,300A,5μm,4.6x 150mm 柱(Phenomenex,Cat.no.00F-4053-E0)的 HPLC 系统(Dionex Ultimate 3000)用于蛋白质测定。所述柱在 20±5℃下跑柱,用 0.1%(v/v)三氟乙酸(TFA)的水溶液(流动相 A)平衡。对于洗脱,以线性梯度(0-5 分钟 5%B,5-12 分钟 55%B,12-17 分钟 100%B,17-22 分钟 5%B)使用 0.1%(v/v)TFA 的乙腈溶液(流动相 B),流动速率为 1.0ml/分钟。上样量为 30μg 每注射,以总注射体积最大 100μL。通过测量 214nm 的 UV 吸光率来进行检测。来自 Ph.Eur 的 FilgrastimCRS 2.5-40μg(2.5-5-10-20-40μg)用于标准曲线。Filgrastim CRS 标样在水中预先稀释至 0.4mg/ml 以作为实验室用途(WFL)。根据需要,将所述样品在 WFL 中预先稀释至 30μg 的注射量。未知样品中的 G-CSF 含量根据 Filgrastim CRS 标准曲线来计算,其通常给出线性相关系数(r)>0.99。

[0077] 反相(RP)HPLC 确定纯度

[0078] 用于 RP-HPLC 确定纯度的方法和设备与确定 G-CSF 含量的方法等同。含 G-CSF 溶液的纯度[%]通过设置 G-CSF 峰的峰面积在总的峰面积的比例来计算。

[0079] SDS-PAGE 确定纯度和分子量分布

[0080] SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)包含基于蛋白质尺寸的蛋白质分离。在还原性条件下进行包含 G-CSF 的样品的纯度确定和分子量分布分析。为了该目的,使用 Tris-Tricine 梯度凝胶(10-20%,来自 Anamed,Cat No.TR12012)和 Tris-HCl 梯度凝胶(10-20%,来自 Biorad,Cat No.345-0043)。对于 Tris-Tricine 梯度凝胶,使用来自 BioRad(Cat No.161-0326;1.4-26.6kDa)的多肽 SDS-PAGE 分子量标样作为分子量标样;对于 Tris-HCl 梯度凝胶,使用来自 BioRad(Cat No.161-0373,10-250kDa)的精确加蛋白全蓝色标样。通过电泳分离的蛋白条带用银或考马斯蓝染色来显像。使用大肠杆菌源性重组人 G-CSF(未糖基化,R&D 系统,Cat No.214-CS-005)糖基化的、CHO 源的商业化产品粒细胞(Chugai)作为 G-CSF 参照(对照样品)。分子量和纯度的评价通过鉴定标样、参照(对照样品)和分析样品的外观来视觉上确定。

[0081] 重组 G-CSF

[0082] 含 G-CSF 的细胞悬浮液的制备和纯化。

[0083] 细胞

[0084] 所用的细胞系是人胚胎肾细胞 293(HEK293)的衍生物,其适合于无血清生长。该宿主 HEK293F,用携带编码 G-CSF 序列的 cDNA 的表达盒稳定转染。强启动子用于该表达盒。常规方法也描述于 EP1739179(**Schröder**等)。

[0085] 培养方法

[0086] 细胞在无血清培养基中在常规设备中根据本领域熟知的常规方法来培养,例如在 t-烧瓶、摇瓶和生物反应器中振荡或搅拌培养(一次性系统和方便的搅拌容器)以批量、批量补料、灌注或连续恒化器培养(Freshney,R I(2000),Culture of animal cells:a manual of basic technique,第四版,Wiley-Liss;Spier,R E ed(2000),Encyclopedia of cell technology,Wiley,New York;Enfors,S-O and **Häggström**,L(2000),Bioprocesstechnology:fundamentals and applications, **Högskoletryckeriet**,Royal

Institute of Technology, Stockholm ; Vinci, V A and Parekh, S R(2003), Handbook of industrial cell culture :mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, USA)。典型地，培养基的灌注用于在标准批量培养水平之外增加细胞数目和产物滴定度。产物收率和宿主细胞蛋白的量根据培养模式而不同：

[0087] ●产物滴定度典型地随细胞数目增加而增加

[0088] ●总蛋白质含量和 DNA 含量典型地随细胞数目增加而增加

[0089] ●总蛋白质含量和 DNA 含量还可以随培养持续时间增加而增加

[0090] ●批量培养积累蛋白质和 DNA ；不从外界加入任何东西，不移除任何东西

[0091] ●灌注过程冲洗细胞培养物，去除代谢物、蛋白质、DNA 和其它杂质 ；过滤器或细胞离心机典型地用于细胞保持。

[0092] 从细胞释放重组产物，细胞悬浮液或细胞悬浮液上清液为收获物。收获物的性质(如上文所述的产物滴定度和杂质）根据所用的培养方式而不同。

[0093] 细胞悬浮液用于一些下文描述的 G-CSF 样品。

[0094] 纯化方法

[0095] 重组产物从细胞释放，细胞悬浮液或细胞悬浮液上清液为收获物。应用的纯化包含 4 步的纯化。阳离子交换色谱（SP Sepharose Fast Flow(FF)）用于从细胞培养上清液中捕获 G-CSF 的步骤，然后是基于锌的固定化金属亲和色谱（IMAC）步骤（Zn-IDA 螯合的 Sepharose Fast Flow(FF)），用于优化的第二阳离子交换色谱步骤（Resource S）和作为最后步骤的尺寸排阻色谱步骤（Superdex75）。

[0096] 含 G-CSF 细胞培养物上清液的分离

[0097] 捕获步骤之前，上清液批次的 G-CSF 浓度 [mg/L] 用 G-CSF 特异性 ELISA 来确定以便核实总的 G-CSF 量 [mg]。（-80℃）在调节至 20±5℃的水浴中将冷冻的上清液解冻。之后将上清液在 4℃以 9000x g 离心 15 分钟，然后另外用 0.2μg 过滤单元过滤。将过滤后的上清液的 pH 用乙酸调节至 pH4.0。

[0098] 捕获步骤（SP Sepharose FF)

[0099] 用 10ml 的 SP Sepharose FF 材料填装 XK 16/20 柱（1 个柱体积（CV）=10ml）。SP Sepharose FF 树脂得自 GE Healthcare 公司（Cat No. 17-0729-01）。

[0100] 用 3CV 的平衡缓冲液（20nM 乙酸钠，100mM 氯化钠，0.02% 吐温 20，pH 4.0）执行平衡，之后以 2.5ml/ 分钟的流速加载起始材料。后继的洗涤步骤用同样的缓冲液和流速用 5CV 进行。

[0101] 用洗脱缓冲液进行洗脱，洗脱缓冲液含有 20mM 乙酸钠，1M 氯化钠，0.02% 吐温 20，pH4.0，使用从 0% 到 40% 洗脱缓冲液的线性梯度，在 8CV 之内，使用 2.5ml/ 分钟的流速，随后是以 100% 洗脱缓冲液以 5CV 洗脱的步骤。

[0102] 从线性梯度洗脱收集的洗脱液汇集物的 G-CSF 浓度通过 G-CSF 特异性 ELISA 来分析。

[0103] IMAC 步骤 (Zn-IDA 螯合 Sepharose FF)

[0104] 用 10ml 的以 2ml 0.2M $ZnCl_2$ 带电的螯合 Sepharose FF 填装 XK 16/20 柱（1 个柱体积（CV）=10ml）。螯合 Sepharose FF 树脂得自 GE Healthcare 公司（Cat No. 17-0575-01）。

[0105] 上样之前将 IMAC 柱负载（SP Sepharose FF）的 pH 用 NaOH 调节为 pH8.0。

[0106] 用 3CV 的平衡缓冲液(20nM 乙酸钠,150mM 氯化钠,pH 8.0)执行平衡,之后以 2ml/分钟的流速加载 SP Sepharose FF 洗脱液。后继的洗涤步骤用同样的缓冲液和流速用 2CV 进行。

[0107] 用洗脱缓冲液进行洗脱,洗脱缓冲液含有 20mMTris/HCl,150mM 氯化钠,pH4.0,使用从 0% 到 100% 洗脱缓冲液的线性梯度,在 3CV 之内,使用 1ml/ 分钟的流速。之后使用 100% 洗脱缓冲液的梯度延迟进行 4CV。

[0108] 从 100% 洗脱缓冲液洗脱中收集的洗脱液汇集物的 G-CSF 浓度通过 G-CSF 特异性 ELISA 来分析。

[0109] 优化步骤 (Resource S)

[0110] 用 5CV 的平衡缓冲液(20mM 乙酸钠,0.02% 吐温 -20,pH4.0)以 4ml/ 分钟的流速平衡来自 GE HEALTHCARE 公司(Cat No.17-1180-01)柱的预填装的 ResourceS 柱(CV=6ml)。纯化之前必须用乙酸将 IMAC 洗脱液调节 pH 至 4.0 并用平衡缓冲液稀释 5 倍。

[0111] 洗涤步骤用 10CV 的平衡缓冲液以 4ml/ 分钟的流速进行。

[0112] 用洗脱缓冲液进行洗脱,洗脱缓冲液含有 20mM 乙酸钠,1M 氯化钠,0.02% 吐温 -20,pH4.0,使用从 0% 到 100% 洗脱缓冲液的线性梯度,在 20CV 之内,使用 2ml/ 分钟的流速。

[0113] 通过 G-CSF 特异性 ELISA 来分析从用 50-85% 洗脱缓冲液的线性梯度洗脱中收集的洗脱液汇集物的 G-CSF 浓度。

[0114] 尺寸排阻色谱步骤(Superdex 75)

[0115] 对于尺寸排阻步骤,使用预填装的 Hiload 26/60Superdex 75Prep Grade 柱(GEHealthcare Cat No.17-1044-01, CV=320ml)。用 1CV 的缓冲液(20mM 乙酸钠,200mMNaCl,0.02% 吐温 20,pH6.5)平衡所述柱,随后以 2.5ml/ 分钟的流速加载 ResourceS 洗脱液,最大加载体积为 4%CV。

[0116] 洗脱液汇集物的 G-CSF 浓度通过 G-CSF 特异性 ELISA 和反相(RP)-HPLC 来分析。最终纯化级分的纯度通过使用 RP-HPLC、尺寸排阻(SE)-HPLC 和 SDS-PAGE 来分析,并典型地 > 95%。

[0117] 用 Capto MMC 树脂作为捕获步骤纯化 rhG-CSF

[0118] 实施例 1 (实验 1)

[0119] 起始材料

[0120] 在平衡缓冲液中稀释纯化过的 rhG-CSF 以降低总蛋白浓度并达到更方便的体积,之后加载于 Capto MMC 柱。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠,0.5M NaCl,0.02% 吐温 20,pH 4.0 中。

[0121] 色谱树脂与柱

[0122] Capto MMC,一种来自 GE HEALTHCARE 公司(cat no.17-5317)的混合式树脂,用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱(GE HEALTHCARE 公司)用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0123] 缓冲液

[0124] 平衡缓冲液 :20mM 乙酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH4.0

[0125] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.5M 精氨酸单盐酸,0.02% 聚山梨醇酯

80，pH 7.0。

[0126] 实验设置

[0127] 柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽出样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。如表 1 所示，在流出级分中没有发现 G-CSF。洗脱缓冲液含 0.5M 精氨酸单盐酸并将 pH 调节至 7.0。G-CSF 的回收率为 89%，洗脱谱是一个更浓缩的峰。洗脱之后用 1M NaOH 溶液适当地清洁柱。从柱的 1M NaOH 洗涤液中可以看到非常小的峰。色谱图显示在图 1。

[0128] 表 1.

[0129]

样品	体积 ml	rhG-CSF μg/ml	总 rhG-CSF μg	收率 %
起始材料	8.71	111	966.8	100
流过和平衡洗涤	18	0	0	0
洗脱液	12	72	864	89

[0130] 结论

[0131] 所有加载的 G-CSF 在 pH4.0 下结合至 Capto MMC。在三个柱体积中收集的洗脱级分获得了高收率（89%）。洗脱缓冲液具有 pH 7.0 并包括 0.5M 精氨酸单盐酸。

[0132] 图例图 1.

[0133] 实验 1 ；在 Capto MMC 柱上 pH 4.0 使用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度（mAU）和电导率（mS/cm）表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。双峰作为一个级分收集。

[0134] 实施例 2（实验 2）

[0135] 起始材料

[0136] 纯化过的 rhG-CSF 在平衡缓冲液中稀释以降低总蛋白质浓度并达到更方便的体积，之后加载于 Capto MMC 柱。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠，0.5M NaCl，0.02% 吐温 20，pH 4.0 中。

[0137] 色谱树脂与柱

[0138] Capto MMC，一种来自 GE HEALTHCARE 公司（cat no.17-5317）的混合式树脂，用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱（GE HEALTHCARE 公司）用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0139] 缓冲液

[0140] 平衡缓冲液 ：20mM 乙酸钠，0.1M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH4.0

[0141] 洗脱缓冲液 ：20mM 柠檬酸钠，0.1M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH 7.0。

[0142] 实验设置

[0143] 柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。如表 2 所示，在流出级分中没有发现 G-CSF。洗脱缓冲液具有 7.0 的 pH。在洗脱的级分中发现超过 90%

的加载于 Capto MMC 柱的 G-CSF。洗脱峰宽于实验 1 中，实验 1 中洗脱缓冲液中包含精氨酸。洗脱体积为两倍。

[0144] 表 2.

[0145]

样品	体积 ml	rhG-CSF μg/ml	总 rhG-CSF μg	收率 %
起始材料	8.92	77.47	691	100
流过和平衡洗涤	30	0	0	0
洗脱液	24	26.07	626	90.5

[0146] 结论

[0147] 重组人 G-CSF（rhG-CSF)在 pH4 下结合至 Capto MMC 并且能够在 pH7 下在以柠檬酸钠缓冲的溶液中被洗脱。

[0148] 实施例 3（实验 3）

[0149] 起始材料

[0150] 将纯化过的 rhG-CSF 在平衡缓冲液中稀释以降低总蛋白浓度并达到更方便的体积，之后加载于 Capto MMC 柱。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠，0.5M NaCl，0.02% 吐温 20，pH 4.0 中。

[0151] 色谱树脂与柱

[0152] Capto MMC，一种来自 GE HEALTHCARE 公司（cat no.17-5317)的混合式树脂，用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱（GE HEALTHCARE 公司)用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0153] 缓冲液

[0154] 平衡缓冲液 :20mM 乙酸钠，0.1M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH4.0

[0155] 洗脱缓冲液 :20mM HEPES，0.3M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH 7.0。

[0156] 实验设置

[0157] 柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。如表 3 所示，在流出级分中没有发现 G-CSF。洗脱缓冲液具有 7.0 的 pH 并且 NaCl 浓度相比于实验 2 提高至 0.3M。在洗脱的级分中发现加载于 Capto MMC 柱上的全部 rhG-CSF。色谱图形状展示在图 2。获得了宽阔的洗脱峰，整个洗脱峰作为一个洗脱级分收集。

[0158] 表 3.

[0159]

样品	体积 ml	rhG-CSF μg/ml	总 rhG-CSF μg	收率 %
起始材料	8.8	71.2	627	100
流过和平衡洗涤	30	0	0	0
洗脱液	24	27.1	650	103.7

[0160] 结论

[0161] G-CSF（rhG-CSF）在 pH7 下结合至 Capto MMC 并且在 pH7 下当洗脱缓冲液中包含 0.3M NaCl 时被洗脱。洗脱体积很大，与洗脱缓冲液中包含精氨酸的情况相比的两倍的体积。这意味着 0.3M NaCl 对从 Capto MMC 树脂洗脱 G-CSF 不具有与 0.5M 精氨酸相同的洗脱效果。

[0162] 图例图 2.

[0163] 实验 3；在 Capto MMC 柱上 pH 4.0 使用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度（mAU）和电导率（mS/cm）表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.3MNaCl 的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。双峰作为一个级分收集。

[0164] 实施例 4（实验 4）

[0165] 起始材料

[0166] 将纯化过的 rhG-CSF 在平衡缓冲液中稀释以降低总蛋白浓度并达到更方便的体积，之后加载于 Capto MMC 柱。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠，0.5M NaCl，0.02% 吐温 20，pH 4.0 中。

[0167] 色谱树脂与柱

[0168] Capto MMC，一种来自 GE HEALTHCARE 公司（cat no.17-5317）的混合式树脂，用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱（GE HEALTHCARE 公司）用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0169] 缓冲液

[0170] 平衡缓冲液：20mM 乙酸钠，0.1M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH4.0

[0171] 洗脱缓冲液：20mM 柠檬酸钠，0.5M 精氨酸单盐酸，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH 4.0。

[0172] 实验设置

[0173] 柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。如表 4 所示，在流出级分中没有发现 rhG-CSF。将洗脱缓冲液改变为包含精氨酸且不含氯化钠并且 pH 为 4.0 的缓冲液。在洗脱的级分中未发现 rhG-CSF。

[0174] 表 4.

[0175]

样品	体积 ml	rhG-CSF μg/ml	总 rhG-CSF μg	收率 %
起始材料	9	69.4	625	100
流过和平衡洗涤	27	0	0	0
洗脱液	27	0	0	0

[0176] 结论

[0177] 仅向缓冲液加入 0.5M 精氨酸单盐酸而不改变 pH 的话不能从 Capto MMC 树脂洗脱 rhG-CSF。这可以作为洗涤步骤。

[0178] 实施例 5（实验 5）

[0179] 起始材料

[0180] 将纯化过的 rhG-CSF 在平衡缓冲液中稀释以降低总蛋白浓度并达到更方便的体

积，之后加载于 Capto MMC 柱。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠，0.5M NaCl，0.02% 吐温 20，pH 4.0 中。

[0181] 色谱树脂与柱

[0182] Capto MMC，一种来自 GE HEALTHCARE 公司（cat no.17-5317）的混合式树脂，用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱（GE HEALTHCARE 公司）用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0183] 缓冲液

[0184] 平衡缓冲液 :20mM 乙酸钠，0.1M NaCl，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH4.0

[0185] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠，0.1M NaCl，1M 精氨酸单盐酸，0.02% 聚山梨醇酯 80，pH 4.0。

[0186] 实验设置

[0187] 柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。该分析显示在这些缓冲液条件期间 rhG-CSF 结合至 Capto MMC。如表 5 所示，在流过级分中未发现 rhG-CSF。洗脱缓冲被液改变为包含精氨酸且不含氯化钠并且 pH 为 4.0 的缓冲液，与平衡缓冲液相同。在洗脱级分中未发现 rhG-CSF。这意味着更高的精氨酸浓度（1M）对 rhG-CSF 从 Capto MMC 柱上洗脱没有任何效果。但是如图 3 所示，当柱用包含 1M 精氨酸和 pH 4 的洗脱液洗脱时获得了一个峰。第二大峰是 1M NaOH 洗涤的结果。

[0188] 表 5.

[0189]

样品	体积 ml	rhG-CSF μg/ml	总 rhG-CSF μg	收率 %
起始材料	9.04	79.98	723	100
流过和平衡洗涤	18	0	0	0
洗脱液	9	0	0	0

[0190] 结论

[0191] 仅通过向缓冲液加入 1M 精氨酸单盐酸而不改变 pH 的话不能从 Capto MMC 树脂洗脱 rhG-CSF。这可以作为洗涤步骤。

[0192] 图例图 3.

[0193] 实验 5 ;在 Capto MMC 柱上 pH 4.0 使用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度（mAU）和电导率（mS/cm）表示在图中。柱用 pH4.0 的含 1M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。在洗脱的级分中获得了单一的峰。通过 1M NaOH 洗涤获得了大峰。

[0194] 实施例 6（实验 6，7，8，9，10，11）

[0195] 起始材料

[0196] 将纯化过的 rhG-CSF 在平衡缓冲液中稀释以降低总蛋白浓度并达到更方便的体积，之后加载于 Capto MMC 柱。也为了达到每个实验所需的 pH。在稀释之前将 rhG-CSF 溶于 20mM 乙酸钠，0.2M NaCl，0.02% 吐温 20，pH 6.5 中。

[0197] 色谱树脂与柱

[0198] Capto MMC,一种来自 GE HEALTHCARE 公司(cat no.17-5317)的混合式树脂,用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。Tricorn 5/150 柱(GE HEALTHCARE 公司)用 Capto MMC 树脂填装至床高为 15cm。Capto MMC 的柱体积为 3ml。

[0199] 缓冲液

[0200] 实验 6

[0201] 平衡缓冲液 :20mM 乙酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH4.0

[0202] 洗涤缓冲液 :20mM NaAc,1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH4.0

[0203] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0204] 实验 7

[0205] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH5.0

[0206] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0207] 实验 8

[0208] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH6.0

[0209] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0210] 实验 9

[0211] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH6.5

[0212] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0213] 实验 10

[0214] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH5.5

[0215] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0216] 实验 11

[0217] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH4.0

[0218] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.5M 精氨酸单盐酸,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0219] 实验设置

[0220] 每个实验分别如下进行。将纯化的 rgG-CSF 用待用的平衡缓冲液以约 1 对 20 的比例稀释。控制起始材料的 pH 并在所有实验中与平衡缓冲液相同而不调节。柱用平衡缓冲液平衡之后以 1ml/ 分钟的流速加载起始材料。之后用平衡缓冲液洗涤并然后用洗脱缓冲液洗脱柱。实验 6 中柱在洗脱之前还用含 1M NaCl 的缓冲液洗涤。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。

[0221] 如图 4 所示在实验 6 中在 1M NaCl 洗涤中未获得峰,这表明没有 rhG-CSF 从 CaptoMMC 柱上洗涤下来。如果使用乙酸钠缓冲液或柠檬酸钠缓冲液在 pH 4 下时,当 G-CSF

从 Capto MMC 柱独立地纯化时获得了相同的洗脱谱(实验 6 和实验 11)。

[0222] 表 6 展现了分析结果,其显示了 rhG-CSF 结合至 Capto MMC 的水平和获得的收率。

[0223] 表 6.

[0224]

实验序号	加载样品 pH	流过液中的 G-CSF %	洗脱液中的 G-CSF %	图
6	4.0	0	105	4
11	4.0	0	100	5
7	5.0	0	98	6
10	5.5	0	97	7
8	6.0	0	97	8
9	6.5	26.8	25.7	9

[0225] 表 6 的数据显示 G-CSF 在 pH 4 至 6 时结合至 Capto MMC 树脂而在流出液中没有任何材料的损失。但是在起始材料的 pH 为 6.5 时,在流出级分发现检测到的大量的 G-CSF。

[0226] Capto MMC 柱用设置为 pH 7 并含 0.5M 精氨酸的缓冲液洗脱。当材料在 pH4 至 6 时加载时 G-CSF 回收率很高,而当起始材料使用 pH 6.5 时洗脱液中的收率很低。

[0227] 在下面的色谱中(图 4,5 和 6)显示出当 rhG-CSF 在 pH 为 4 或 5 的缓冲液中时,其从 Capto MMC 柱洗脱下来是双峰。当起始材料的 pH 是 5.5,6.0 或 6.5 时获得了单峰(图 7,8 和 9)。如银染色 SDS-PAGE 所示(图 10A),来自实验 8 (pH6.0),实验 9 (pH6.5)和实验 10 (pH5.5)的洗脱液具有良好的单一条带。同时来自实验 6 (pH4.0)和实验 7 (pH5.0)的洗脱液在银染色 SDS-PAGE 中显示出多个条带(图 10 B)。

[0228] 结论

[0229] 这些实验的结果显示 rhG-CSF 能在 pH4.0,5.0,5.5,6.0 时结合 Capto MMC。在 pH6.5 时结合至 Capto MMC 的 rhG-CSF 结合更弱,并在流出级分发现 rhG-CSF,这种情况在 pH4 至 6 时没有。

[0230] 使用 pH5.5 至 6.5 时的洗脱谱更好,并且当在加载材料中使用这些 pH 时产物在 SDS-PAGE 中看起来更好。

[0231] 由于使用 pH6.5 时 G-CSF 在 Capto MMC 柱上的泄漏,在加载材料上优选使用 pH5.5 至 6.0。

[0232] 在所有实验中,结合的材料在 pH7 下洗脱,当洗脱缓冲液中包含 0.5M 精氨酸单盐酸时获得了更浓缩的峰。可以在 pH4 下进行 1M NaCl 洗涤而没有任何 G-CSF 的损失。

[0233] 图 4-10 图例

[0234] 图 4.

[0235] 实验 6 ;在 Capto MMC 柱上 pH 4.0 的起始材料使用乙酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。双峰作为一个级分收集。

[0236] 图 5.

[0237] 实验 11 ;在 Capto MMC 柱上 pH 4.0 使用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单

盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。双峰作为一个级分收集。

[0238] 图 6.

[0239] 实验 7 ;在 Capto MMC 柱上在 pH 5.0 下使用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了双峰。双峰作为一个级分收集。

[0240] 图 7.

[0241] 实验 10 ;在 Capto MMC 柱上在 pH 5.5 下使用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。通过洗脱获得了一个微小的不规整峰。

[0242] 图 8.

[0243] 实验 8 ;在 Capto MMC 柱上在 pH 6.0 下使用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。获得了一个浓缩的规整峰。

[0244] 图 9.

[0245] 实验 9 ;在 Capto MMC 柱上在 pH 6.5 下使用柠檬酸钠缓冲液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度(mAU)和电导率(mS/cm)表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。获得了一个浓缩的规整峰。

[0246] 图 10A 和图 10B

[0247] 实验 6,7,8,9,10 ;在起始材料和从 Capto MMC 实验的洗脱液中分离蛋白质,其中在起始材料中使用不同 pH 值。样品被还原(SDS 处理)并在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中分离。蛋白质通过银染色来可视化。

[0248] 实施例 7 (实验 12)

[0249] 起始材料

[0250] 在 KEK293 细胞中制备的重组人 G-CSF。移除细胞,无细胞上清液用作加载于 CaptoMMC 柱的起始材料。

[0251] 色谱树脂与柱

[0252] Capto MMC,一种来自 GE HEALTHCARE 公司(cat no.17-5317)的混合式树脂,用作 rhG-CSF 分子的捕获步骤。Capto MMC 是具有疏水和亲硫相互作用和氢键的弱阳离子树脂。将 XK16 柱(GE HEALTHCARE 公司)用 Capto MMC 树脂填装至床高为 13.5cm。Capto MMC 的柱体积(CV)为 27ml。

[0253] 缓冲液

[0254] 平衡缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH6.0

[0255] 洗脱缓冲液 :20mM 柠檬酸钠,0.1M NaCl,0.5M 精氨酸单盐酸,0.02% 聚山梨醇酯 80,pH 7.0。

[0256] 实验设置

[0257] 将无细胞上清液的 pH 调节至 6.0。柱用平衡缓冲液平衡后以 13.5ml/ 分钟的流速加载 pH 调节后的起始材料。随后用平衡缓冲液进行洗涤步骤,然后用洗脱缓冲液洗脱柱。抽取样品并通过 HPLC 方法分析 rhG-CSF。分析显示这些缓冲液条件下加载到柱上的所有 rhG-CSF 结合至 Capto MMC 树脂,在流出液级分中未发现 G-CSF。洗脱缓冲液包含 20mM 柠檬

酸钠，0.5M 精氨酸，0.1M NaCl 和 0.02% 聚山梨醇酯 80，并且 pH 为 7.0。结合至 Capto MMC 树脂的蛋白质的洗脱液得到一个主峰和较小的第二峰。加载至 CaptoMMC 柱的所有 G-CSF 发现于主峰，而在第二个小峰中未检测到 G-CSF（图 11）。

[0258] 结论

[0259] 在 pH6.0 时无细胞培养基中的重组人 G-CSF 结合至 Capto MMC 树脂。

[0260] 在流出级分未发现 G-CSF。

[0261] 结合材料通过改变 pH 至 7 并通过添加 0.5M 精氨酸以从 Capto MMC 树脂上洗脱并浓缩洗脱峰。

[0262] 图例图 11

[0263] 实验 12 ;在 Capto MMC 柱上在 pH 6.0 下使用柠檬酸钠缓冲液由无细胞上清液纯化 G-CSF 的色谱图。测量的 280nm 的吸光度（mAU）和电导率（mS/cm）表示在图中。柱用 pH7.0 的含 0.5M 精氨酸单盐酸的缓冲液洗脱。获得了双峰，但是仅在主峰中发现了 G-CSF。

[0264] 实施例 8

[0265] 柱和树脂

[0266] 用偶联至 Capto MP 基质的基于酵母源性的 Fab 片段的亲和配体来填装 Tricom 5/50 柱（GE HEALTHCARE 公司）。床高为大约 2cm，获得约 0.4ml 的树脂体积。亲和树脂原型（G-CSF8）从 BAC BV 获得。

[0267] 起始材料

[0268] 使用的起始材料是在 HEK293F 细胞中制备的含 G-CSF 的细胞上清液。

[0269] 缓冲液组合物：

[0270] 缓冲液 A（平衡缓冲液）

[0271] 0.3M NaCl，0.02M Na- 柠檬酸盐，0.02% 吐温 20，pH6.0，在 +25℃下电导率 32mS/cm

[0272] 缓冲液 B（洗脱缓冲液 I）

[0273] 0.3M NaCl，0.02M Na- 柠檬酸盐，0.02% 吐温 20，pH3.0，在 +25℃下电导率 32mS/cm.

[0274] 柱用平衡缓冲液 A 平衡，随后加载起始材料。之后用平衡缓冲液 A 洗涤树脂，随后用洗脱缓冲液 B 洗脱结合的 G-CSF。分析了起始材料和洗脱液中的 G-CSF 含量（表 7）。

[0275] 表 7. G-CSF 亲和树脂实验结果，用 pH3 洗脱

[0276]

样品	体积 (ml)	G-CSF (ug/ml)	G-CSF 总量 (ug)	收率 (%)
起始材料 (加载)	100	2	200	100
洗脱液 (缓冲液 B)	1.5	111	170	83

[0277] 图 12 显示了考马斯蓝染色的 SDS-PAGE，其显示亲和色谱步骤后的洗脱液。

[0278] 泳道 样品

[0279] 1 分子量标样

[0280] 2 洗脱液（实施例 8）

[0281] 实施例 8 结论

[0282] 当使用低 pH 缓冲液(pH 3)洗脱 G-CSF 时达到了极好的纯度和回收率。

[0283] 实施例 9

[0284] 柱和树脂

[0285] 用偶联至 Capto MP 碱性基质的基于酵母源性 Fab 片段的亲和配体填装 Tricom 5/50 柱(GE HEALTHCARE 公司)。床高为大约 2cm,获得约 0.4ml 的树脂体积。亲和树脂原型(G-CSF8)从 BAC BV 获得。

[0286] 起始材料

[0287] 使用的起始材料是得自 HEK293F 细胞的含 G-CSF 的细胞上清液。

[0288] 缓冲液组合物:

[0289] 缓冲液 A(平衡缓冲液)

[0290] 0.3M NaCl,0.02M Na- 柠檬酸盐,0.02% 吐温 20,pH6.0,在 +25℃下电导率 32mS/cm

[0291] 缓冲液 C(洗脱缓冲液 II)

[0292] 1.0M NaCl,0.02M Na- 柠檬酸盐,0.8MArg,0.02% 吐温 20,pH6.0,在 +25℃下电导率 89mS/cm。

[0293] 平衡和洗脱缓冲液不限于所提及的 pH、浓度和缓冲液类型、盐或去污剂。

[0294] 柱用平衡缓冲液 A 平衡,随后加载起始材料。之后用平衡缓冲液 A 洗涤树脂,随后用洗脱缓冲液 C 洗脱结合的 G-CSF。分析了起始材料和洗脱液中的 G-CSF 含量(表 8)。

[0295] 表 8.G-CSF 亲和树脂实验结果,用精氨酸洗脱

[0296]

样品	体积 (ml)	G-CSF (ug/ml)	G-CSF 总量 (ug)	收率 (%)
起始材料 (加载)	100	2	200	100
洗脱液 (缓冲液 B)	3.7	30	110	56

[0297] 实施例 9 结论

[0298] 可以用氯化钠和精氨酸的混合物从亲和柱上洗脱 G-CSF。

[0299] 实施例 10

[0300] 柱和树脂

[0301] 用偶联至 Capto MP 碱性基质的基于酵母源性 Fab 片段的亲和配体填装 Tricom 5/50 柱(GE HEALTHCARE 公司)。床高为大约 2cm,获得约 0.4ml 的树脂体积。亲和树脂原型(G-CSF8)从 BAC BV 获得。

[0302] 起始材料

[0303] 使用的起始材料是得自 HEK293F 细胞的含 G-CSF 的细胞上清液。

[0304] 缓冲液组合物:

[0305] 缓冲液 A(平衡缓冲液)

[0306] 0.3M NaCl,0.02M Na- 柠檬酸盐,0.02% 吐温 20,pH6.0,在 +25℃下电导率 32mS/cm

[0307] 缓冲液 D(洗脱缓冲液 III)

[0308] 2.0M MgCl2,0.02M Tris,0.02% 吐温 20,pH7.5,在 +25℃下电导率 144mS/cm。

[0309] 平衡和洗脱缓冲液不限于所提及的 pH、浓度和缓冲液类型、盐或去污剂。

[0310] 柱用平衡缓冲液 A 平衡，随后加载起始材料。之后用平衡缓冲液 A 洗涤树脂，随后用洗脱缓冲液 D 洗脱结合的 G-CSF。分析了起始材料和洗脱液中的 G-CSF 含量(表 9)。

[0311] 表 9. G-CSF 亲和树脂实验结果，用 MgCl2 洗脱

[0312]

样品	体积 (ml)	G-CSF (ug/ml)	G-CSF 总量 (ug)	收率 (%)
起始材料 (加载)	100	12	1200	100
洗脱液 (缓冲液 B)	2.5	390	970	81

[0313] 实施例 10 结论

[0314] 可以用 2M MgCl2 作为洗脱液从亲和柱上洗脱 G-CSF。

[0315] 实施例 11

[0316] 柱和树脂

[0317] 用偶联至 Capto MP 基质的三种不同的基于酵母源性 Fab 片段的亲和配体原型填装 Tricom 5/50 柱(GE HEALTHCARE 公司)。床高为大约 2cm，获得约 0.4ml 的树脂体积。亲和树脂原型(G-CSF2，G-CSF3 和 G-CSF6)从 BAC BV 获得。

[0318] 起始材料

[0319] 使用的起始材料是得自 HEK293F 细胞的含 G-CSF 的细胞上清液。

[0320] 缓冲液组合物：

[0321] 缓冲液 A (平衡缓冲液)

[0322] 0.3M NaCl，0.02M Na- 柠檬酸盐，0.02% 吐温 20，pH6.0，在 +25℃下电导率 32mS/cm

[0323] 缓冲液 B (洗脱缓冲液 I)

[0324] 0.3M NaCl，0.02M Na- 柠檬酸盐，0.02% 吐温 20，pH3.0，在 +25℃下电导率 32mS/cm。

[0325] 柱用平衡缓冲液 A 平衡，随后加载起始材料。之后用平衡缓冲液 A 洗涤树脂，随后用洗脱缓冲液 B 洗脱结合的 G-CSF。分析了起始材料、流出级分和洗脱液中的 G-CSF 含量(表 10)。

[0326] 表 10. G-CSF 亲和树脂实验结果，测试不同亲和配体原型，用 pH3 洗脱

[0327]

样品	体积 (ml)	G-CSF (ug/ml)	G-CSF 总量 (ug)	收率 (%)
配体 G-CSF2				
起始材料（加载）	100	10	1100	100
流出级分	112.5	4	500	45
洗脱液 (缓冲液 B)	2	290	570	57
配体 G-CSF3				
起始材料（加载）	100	11	1100	100
流出级分	112.5	0	0	0
洗脱液 (缓冲液 B)	2	510	1020	93
配体 G-CSF6				
起始材料（加载）	100	12	1200	100
流出级分	112.5	2	200	19
洗脱液 (缓冲液 B)	1.5	450	670	56

[0328] 图 13 显示了银染色的 SDS-PAGE，其显起始材料、示亲和色谱步骤后的流出液和洗脱液。

[0329] 图例：

[0330] 泳道 样品

[0331] 1G-CSF2 起始材料；2G-CSF2 流出液；3 空白；4G-CSF2 洗脱液；5. 空白；6G-CSF3 流出液；7 空白；8G-CSF3 洗脱液；9. 空白；10G-CSF6 流出液；11 空白；12G-CSF6 洗脱液

[0332] 实施例 11 结论

[0333] 不同的亲和配体原型提供了不同的 G-CSF 结合能力，通过测量在流出液中的 G-CSF 和用低 pH 作为洗脱液的洗脱液级分的不同回收率来展现。然而，如图 13 所示，所有亲和配体提供了在洗脱液中相同的优异的纯度性状。

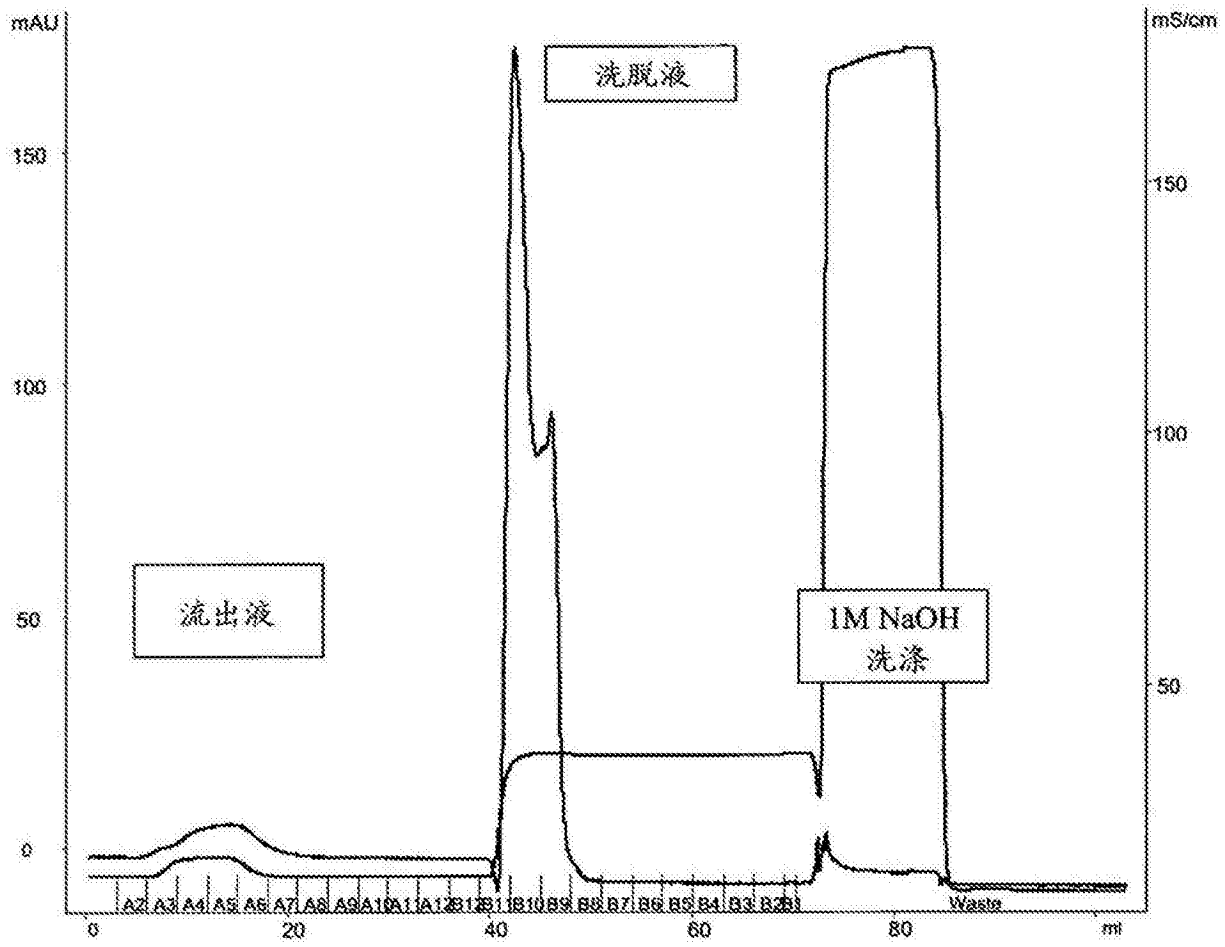

mAU
150
100
50
0
mS/cm
150
100
50
洗脱液
流出液
1M NaOH
洗涤
Waste
0
20
40
60
80
ml

图 1

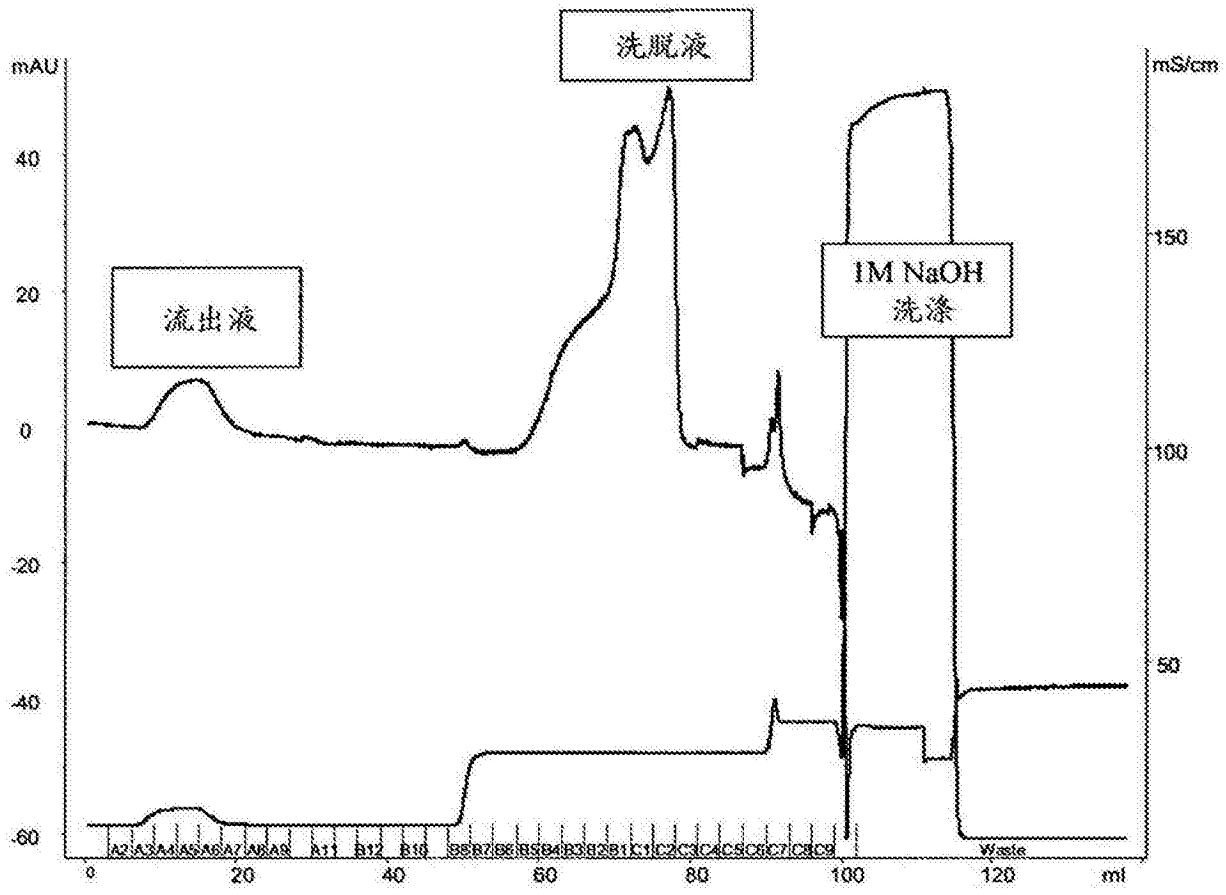

洗脱液
流出液
1M NaOH
洗涤
mAU
mS/cm
40
20
0
-20
-40
-60
150
100
50
0
20
40
60
80
100
120
ml
Waste

图 2

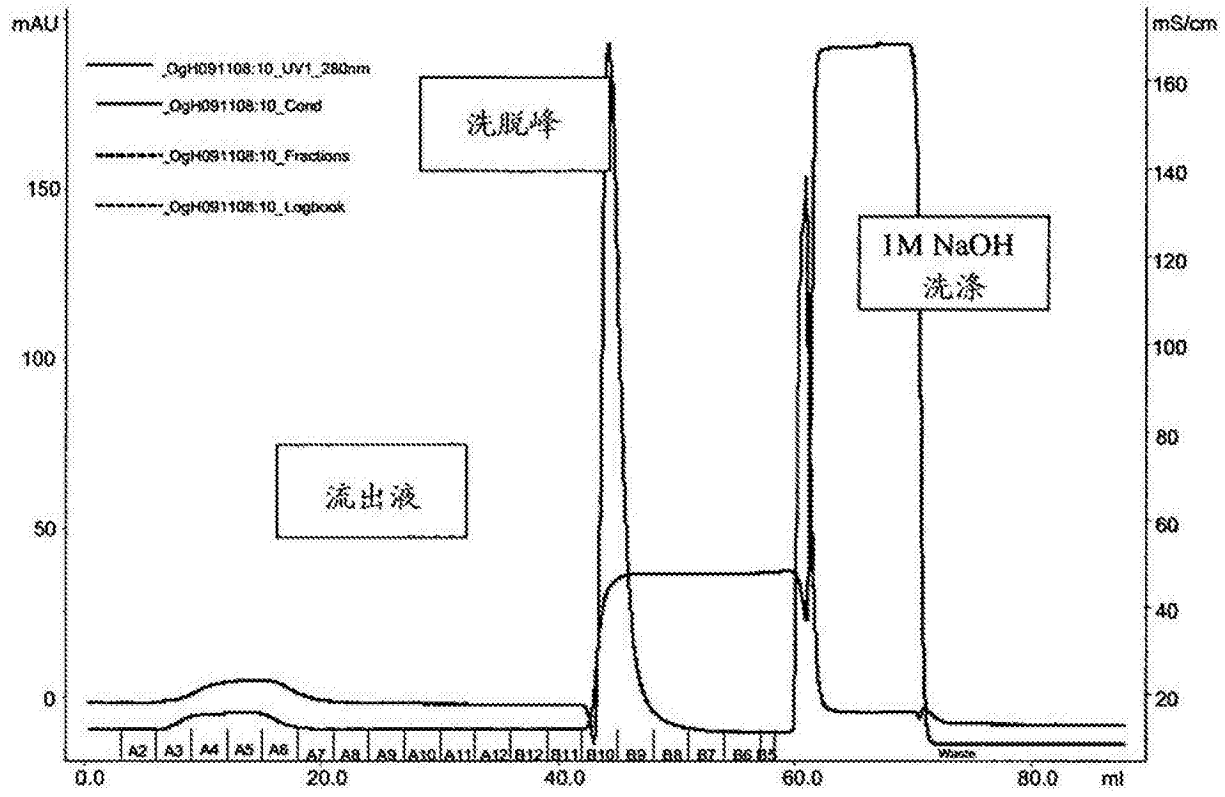

mAU
mS/cm
_OgH091108:10_UV1_280nm
_OgH091108:10_Cond
_OgH091108:10_Fractions
_OgH091108:10_Logbook
洗脱峰
1M NaOH
洗涤
流出液
150
100
50
0
160
140
120
100
80
60
40
20
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
ml

图 3

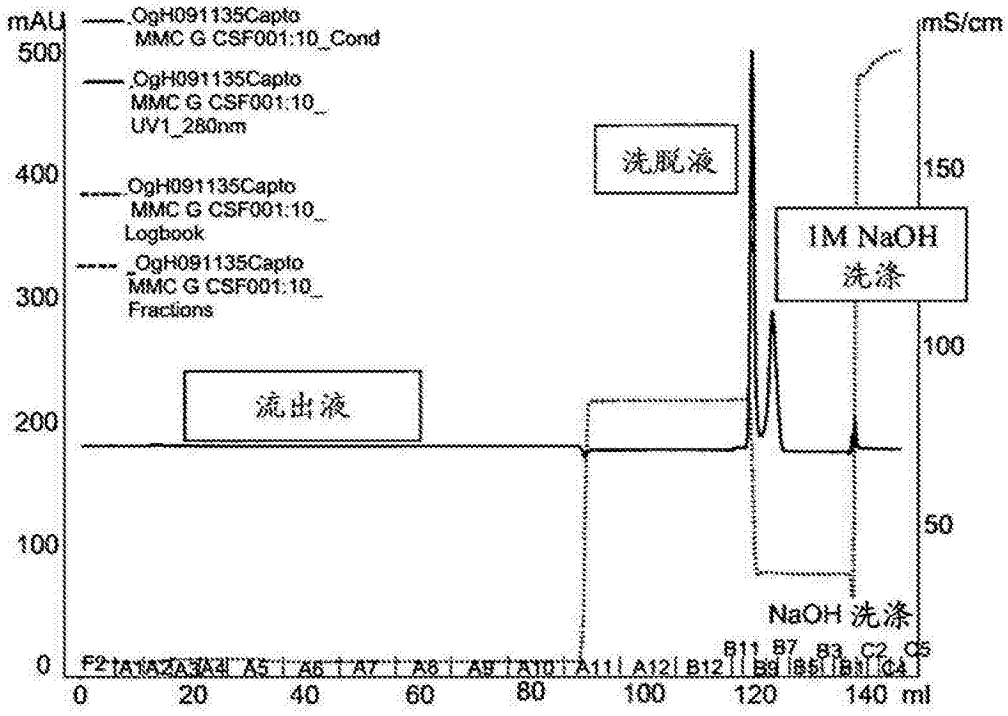

mAU
mS/cm
_OgH091135Capto MMC G CSF001:10_Cond
OgH091135Capto MMC G CSF001:10 UV1_280nm
OgH091135Capto MMC G CSF001:10 Logbook
OgH091135Capto MMC G CSF001:10 Fractions
洗脱液
1M NaOH
洗涤
流出液
NaOH 洗涤
500
400
300
200
100
0
150
100
50
0
20
40
60
80
100
120
140
ml

图 4

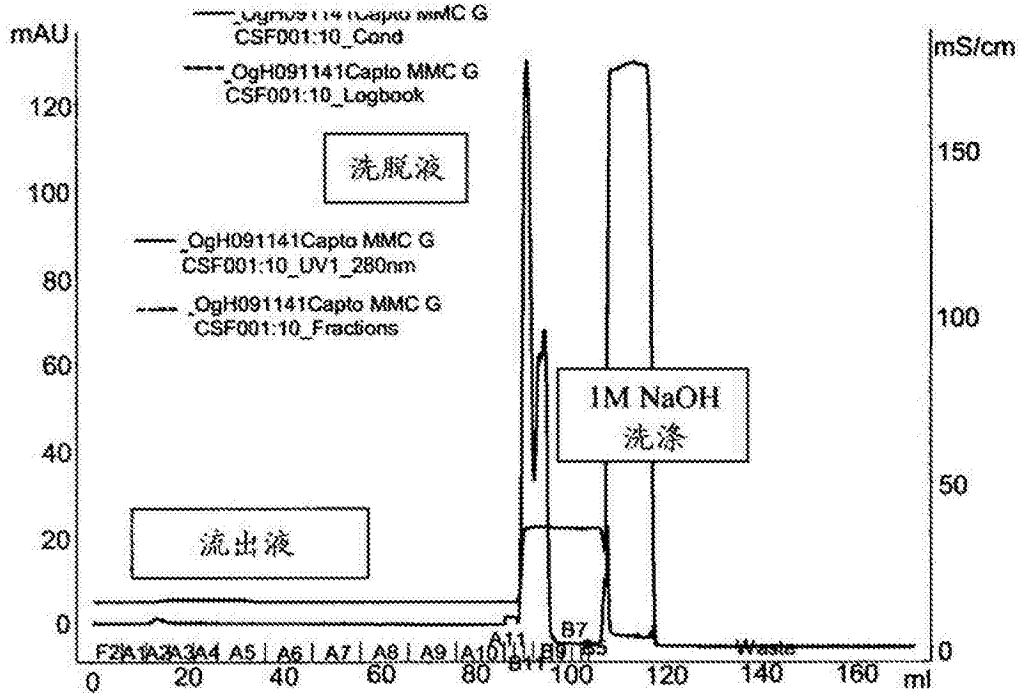

mAU
mS/cm
CSF001:10_Cond
_OgH091141Capto MMC G
CSF001:10_Logbook
洗脱液
_OgH091141Capto MMC G
CSF001:10_UV1_280nm
_OgH091141Capto MMC G
CSF001:10_Fractions
1M NaOH
洗涤
流出液
Waste
ml

图 5

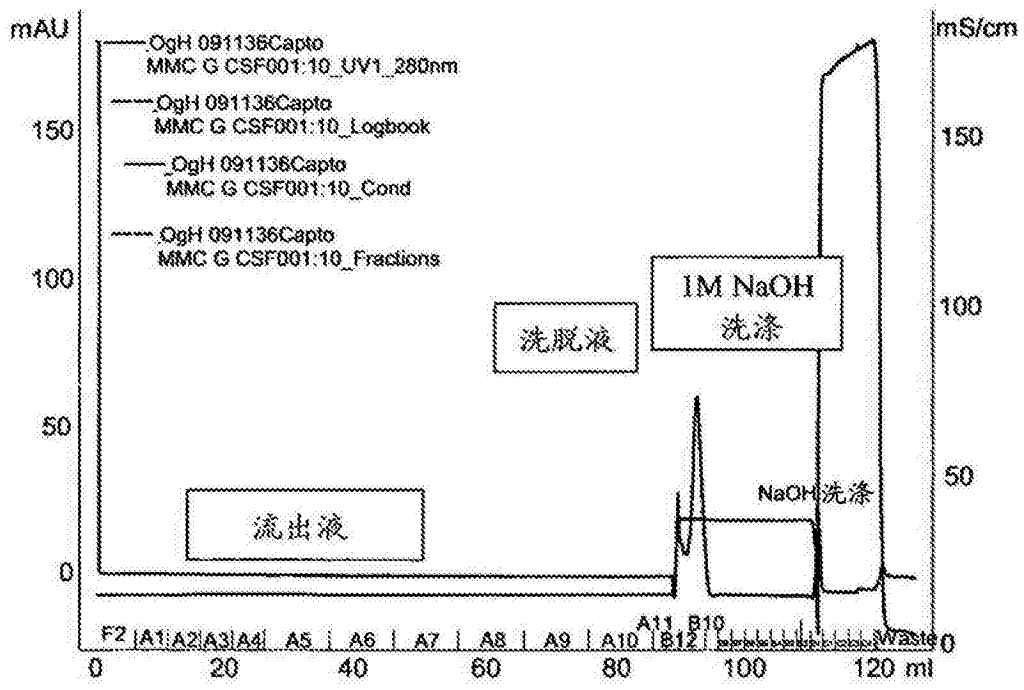

mAU
mS/cm
_OgH 091136Capto
MMC G CSF001:10_UV1_280nm
_OgH 091136Capto
MMC G CSF001:10_Logbook
_OgH 091136Capto
MMC G CSF001:10_Cond
_OgH 091136Capto
MMC G CSF001:10_Fractions
洗脱液
1M NaOH
洗涤
流出液
NaOH洗涤
Waste
120 ml

图 6

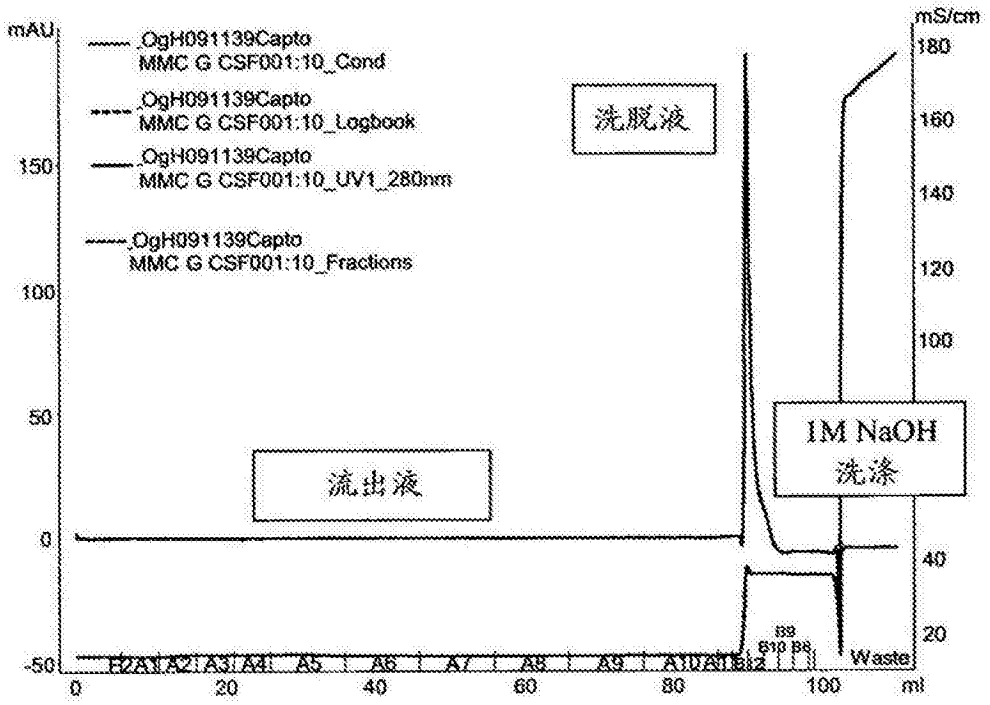

mAU
mS/cm
OgH091139Capto MMC G CSF001:10_Cond
OgH091139Capto MMC G CSF001:10_Logbook
OgH091139Capto MMC G CSF001:10_UV1_280nm
OgH091139Capto MMC G CSF001:10_Fractions
洗脱液
流出液
1M NaOH 洗涤
Waste
ml

图 7

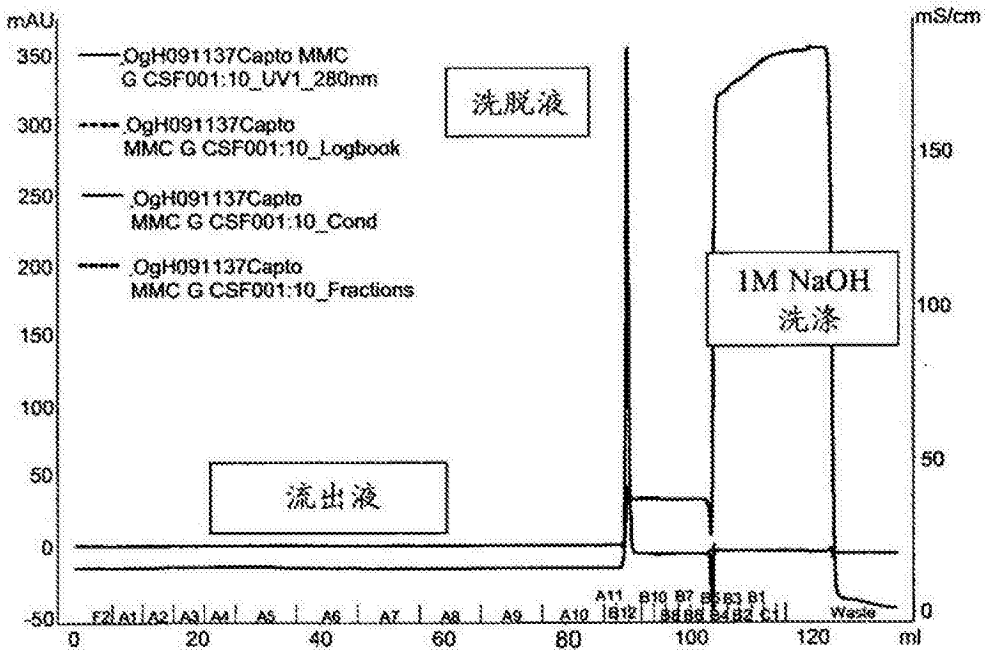

mAU
mS/cm
OgH091137Capto MMC G CSF001:10_UV1_280nm
OgH091137Capto MMC G CSF001:10_Logbook
OgH091137Capto MMC G CSF001:10_Cond
OgH091137Capto MMC G CSF001:10_Fractions
洗脱液
流出液
1M NaOH 洗涤
Waste
ml

图 8

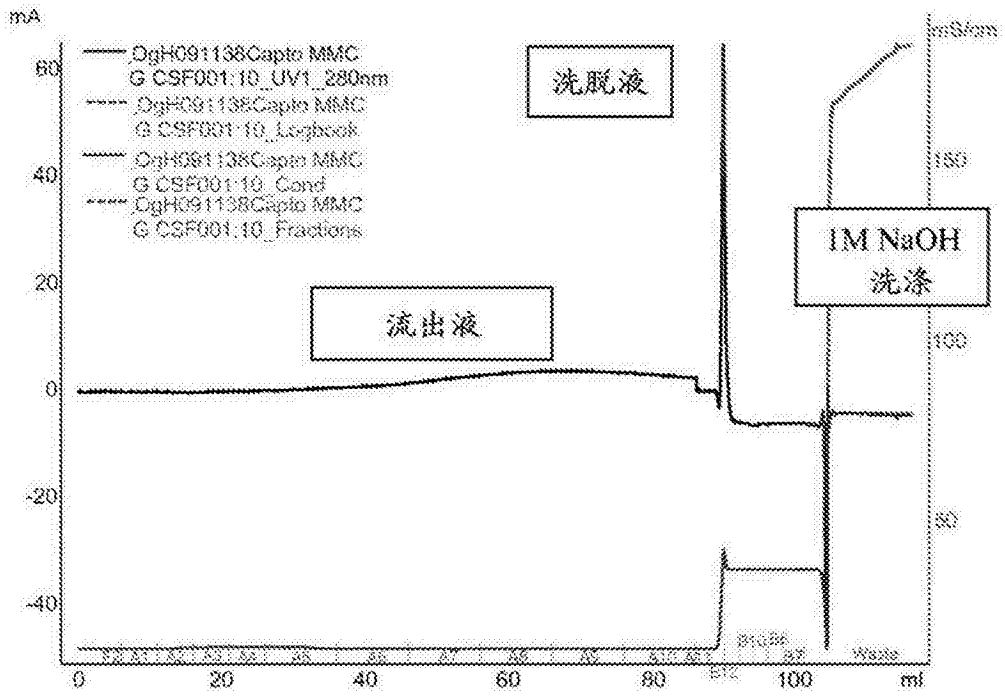

mA
60
40
20
0
-20
-40
DgH091138Capto MMC G CSF001:10_UV1_280nm
DgH091138Capto MMC G CSF001:10_Logbook
DgH091138Capto MMC G CSF001:10_Cond
DgH091138Capto MMC G CSF001:10_Fractions
洗脱液
流出液
1M NaOH
洗涤
mS/cm
150
100
50
Waste
0
20
40
60
80
100
ml

图 9

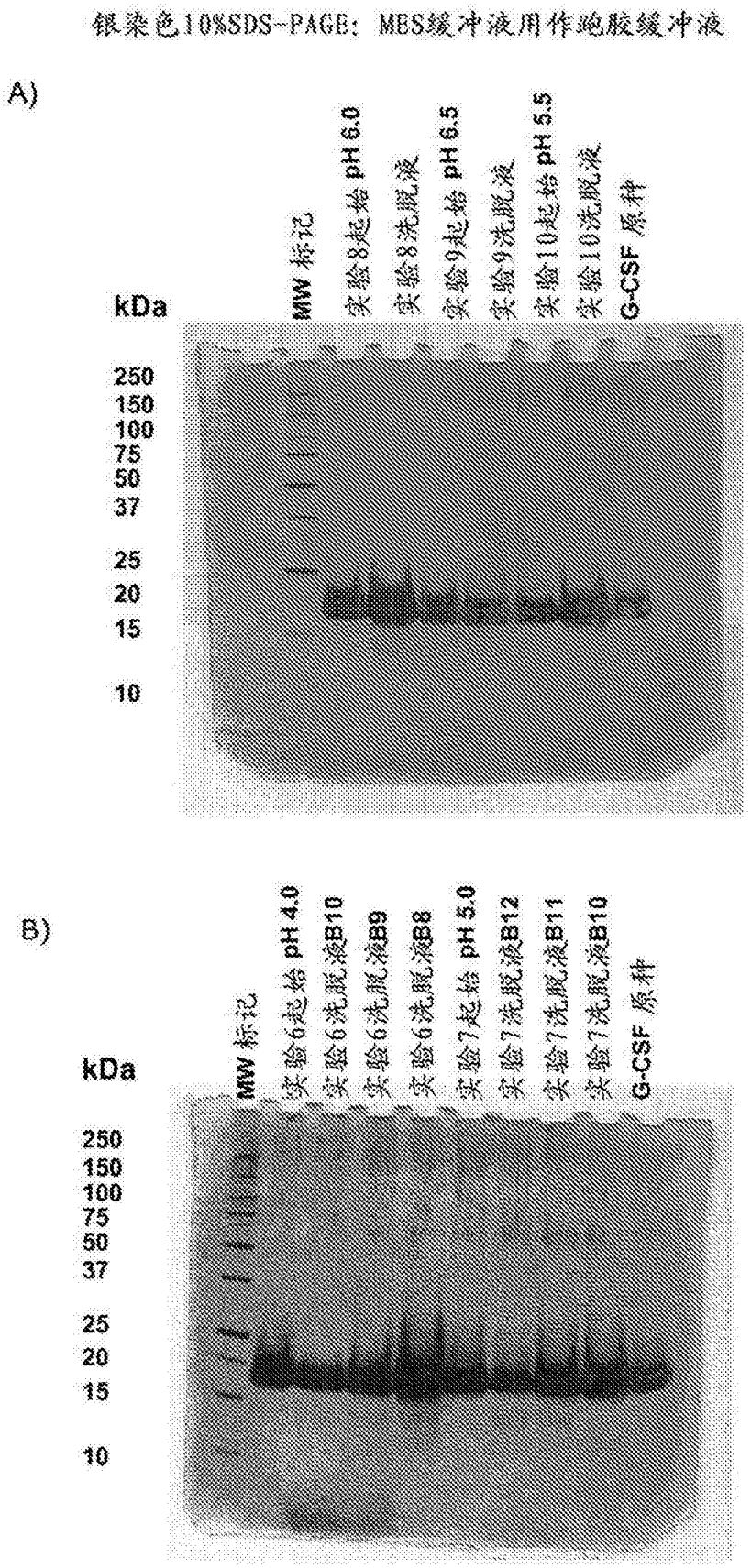

银染色10%SDS-PAGE：MES缓冲液用作跑胶缓冲液
A)
kDa
MW 标记
实验8起始 pH 6.0
实验8洗脱液
实验9起始 pH 6.5
实验9洗脱液
实验10起始 pH 5.5
实验10洗脱液
G-CSF 原种
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
B)
kDa
MW 标记
实验6起始 pH 4.0
实验6洗脱液B10
实验6洗脱液B9
实验6洗脱液B8
实验7起始 pH 5.0
实验7洗脱液B12
实验7洗脱液B11
实验7洗脱液B10
G-CSF 原种
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图 10

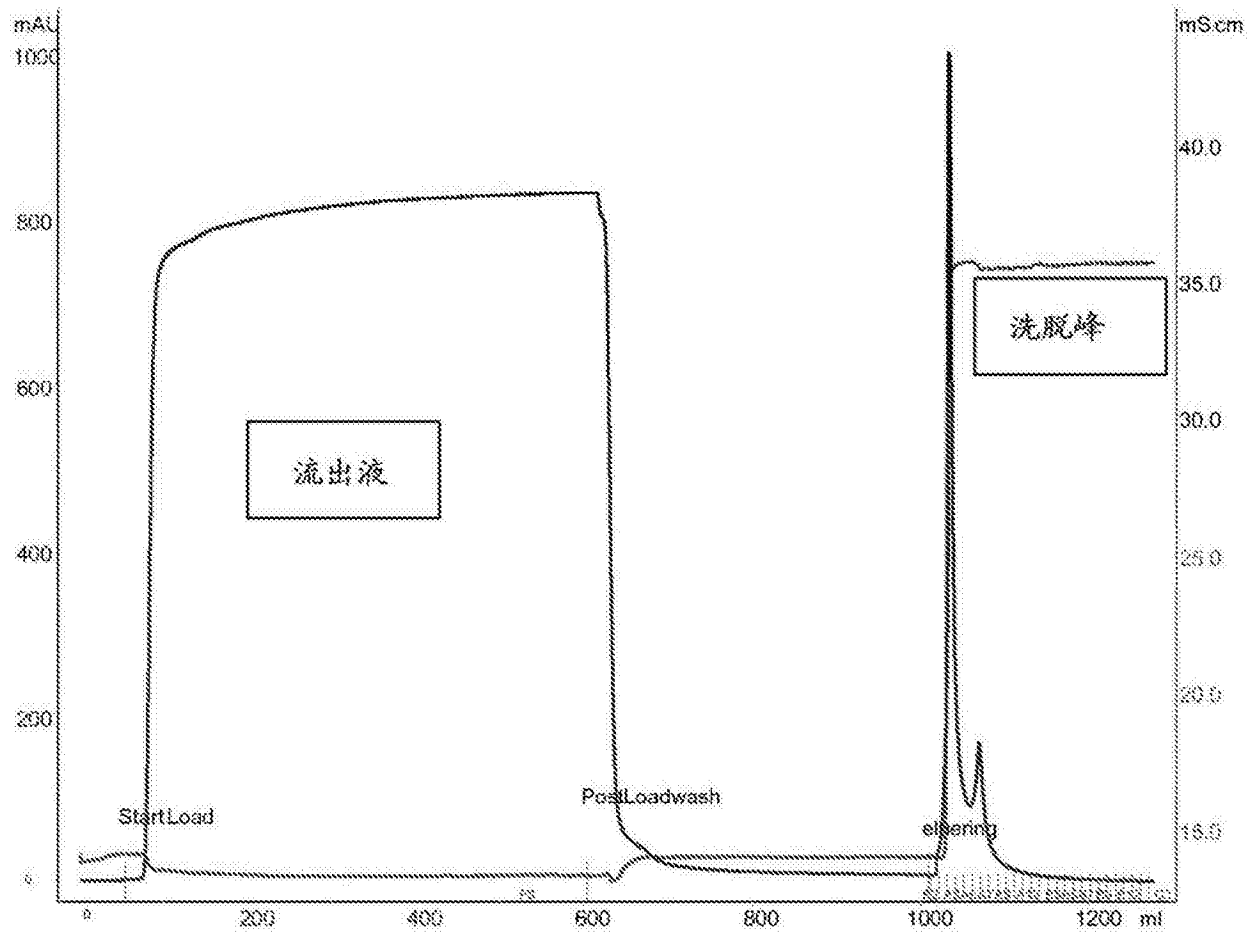

mAU
1000
800
600
400
200
0
mS/cm
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
流出液
洗脱峰
StartLoad
PostLoadwash
elearing
0
200
400
600
800
1000
1200
ml

图 11

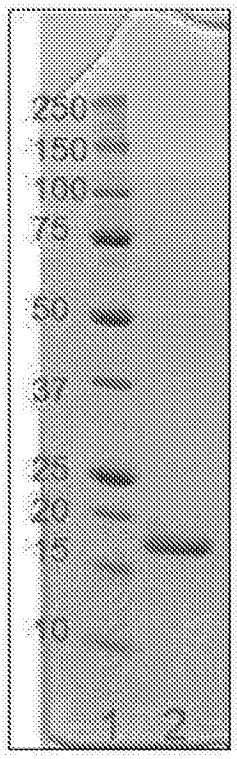


图 12

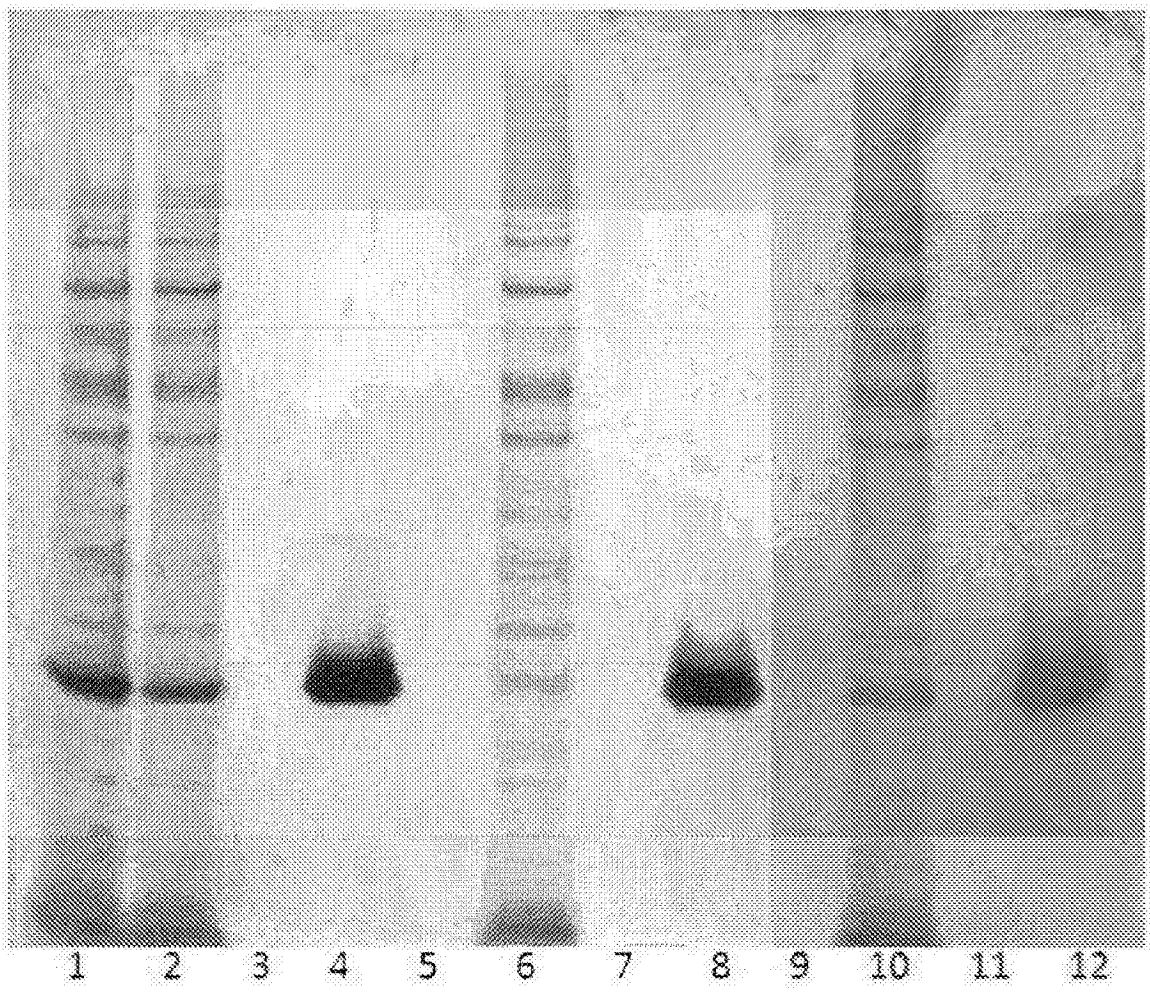


图 13