



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102123777 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 200980131763. 7

(22) 申请日 2009. 08. 11

(30) 优先权数据

102008037678. 7 2008. 08. 14 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 02. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/005825 2009. 08. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/017964 DE 2010. 02. 18

(73) 专利权人 德国赛多利斯生物技术公司

地址 德国哥廷根

(72) 发明人 K·凯勒 A·西弗斯 K·塔里奇

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

B01D 39/18 (2006. 01)

B01D 39/20 (2006. 01)

B01J 20/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 4859340 A, 1989. 08. 22, 权利要求 2.

CN 1048892 A, 1991. 01. 30, 摘要.

CN 1736543 A, 2006. 02. 22, 说明书第 5 页第 2 段、第 14 页第 4 段至第 16 页第 2 段、说明书第 10 页第 7 段、说明书第 17 页第 1 段.

GB 1483088 A, 1977. 08. 17, 实施例 1.

审查员 王义刚

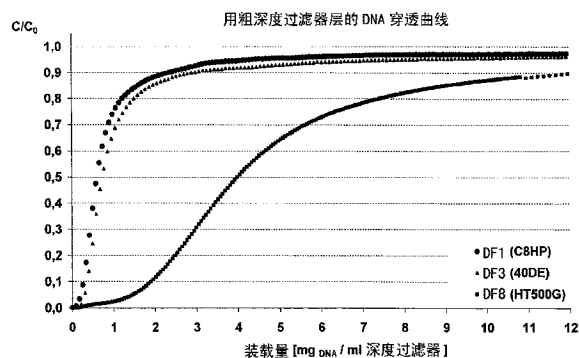
权利要求书3页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

具有无机层状双氢氧化物的深度过滤器层

(57) 摘要

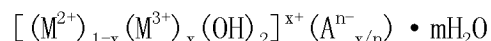
本发明涉及包含无机层状双氢氧化物的深度过滤器层,其生产方法,包含深度过滤器层的过滤设备,利用至少一种上述深度过滤器层从液体介质中的至少一种目标产物除去至少一种污染物的方法,以及深度过滤器层用于去除污染物的用途。所述深度过滤器层选择性滞留污染物如核酸,而生物工艺技术中的目标蛋白能够传送进入滤液。



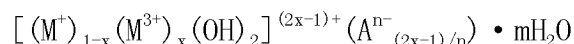
1. 一种深度过滤器层,其由以下组分生产:

纤维素纤维和 / 或其衍生物,其中所述纤维素纤维的衍生物为水溶性羧基烷基纤维素、用带铵离子的基团官能化的纤维素或者用氨基官能化的纤维素,

至少一种无机层状双氢氧化物,所述无机层状双氢氧化物选自天然和合成水滑石的组,其中所述至少一种无机层状双氢氧化物含有一价碱金属离子 M^+ 和 / 或二价碱土或过渡金属离子 M^{2+} 、三价主族或过渡金属离子 M^{3+} 、 $n=1-4$ 的 n 价阴离子 A^{n-} 和氢氧离子 OH^- ,所述无机层状双氢氧化物具有式



其中 $0.1 \leq x \leq 0.5$, $1 \leq n \leq 4$ 和 m 是包括 0 的有理数,或者式



其中 $0.1 \leq x \leq 0.5$, $1 \leq n \leq 4$ 和 m 是包括 0 的有理数,和

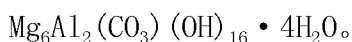
至少一种水溶性和带正电的有机湿强度剂,其选自聚酰胺 / 聚胺 - 表氯醇树脂、聚酰胺 - 表氯醇树脂、聚胺 - 表氯醇树脂或它们的混合物的组,

其中所述深度过滤器层由混合物生产,所述混合物包含按重量计含量为 10-65% 的所述至少一种无机层状双氢氧化物、按重量计含量为 30-80% 的所述纤维素纤维和 / 或其衍生物和按重量计含量为 0.5-10% 的所述有机湿强度剂,基于所述混合物总重量。

2. 根据权利要求 1 所述的深度过滤器层,其特征在于所述一价碱金属离子 M^+ 是单独或组合形式的 Li^+ 、 Na^+ ,所述二价碱土或过渡金属离子 M^{2+} 选自 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 或它们的组合的组,所述三价主族或过渡金属离子 M^{3+} 选自 B^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Ni^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{3+} 、 V^{3+} 、 Ti^{3+} 、 Sc^{3+} 、 In^{3+} 或它们的组合的组和所述 n 价阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 ClO_3^- 、 IO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 WO_4^{2-} 、 CrO_4^{2-} 、 $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 、 $[Fe(CN)_6]^{4-}$ 、 $[SiO(OH)_3]^-$ 、 $(PMo_{12}O_{40})^{3-}$ 、 $(PW_{12}O_{40})^{3-}$ 、酰基和芳基磺酸盐、 $[Ru(4,7-二苯基-1,10-菲咯啉二磺酸盐)_3]^{4-}$ 或它们的组合的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的深度过滤器层,其特征在于所述无机层状双氢氧化物含有结晶水。

4. 根据权利要求 1 所述的深度过滤器层,其特征在于所述无机层状双氢氧化物是水滑石



5. 根据权利要求 4 所述的深度过滤器层,其特征在于所述水滑石未被煅烧。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的深度过滤器层,其特征在于所述深度过滤器层通过进一步添加二氧化硅和 / 或其至少一种衍生物而生产,其中所述二氧化硅的衍生物选自用含有季铵离子的有机基团官能化的 SiO_2 。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的深度过滤器层,其特征在于所述深度过滤器层通过进一步添加硅藻土或珍珠岩或它们的混合物而生产。

8. 根据权利要求 6 所述的深度过滤器层,其特征在于所述二氧化硅和 / 或所述至少一种衍生物包括平均直径在 $0.5 \mu m$ 和 $100 \mu m$ 之间的颗粒。

9. 根据权利要求 7 所述的深度过滤器层,其特征在于所述硅藻土、珍珠岩或它们的混合物包含平均直径在 $0.5 \mu m$ 和 $100 \mu m$ 之间的颗粒。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的深度过滤器层,其特征在于所述至少一种无机层状双氢

氧化物包含平均直径在 $0.1\ \mu\text{m}$ 和 $500\ \mu\text{m}$ 之间的颗粒。

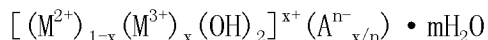
11. 根据权利要求 6 所述的深度过滤器层,其特征在於所述深度过滤器层由混合物生产,在所述混合物中,所述至少一种无机层状双氢氧化物和所述二氧化硅和 / 或所述其至少一种衍生物按重量计的含量为 20-75%,所述纤维素纤维和 / 或其衍生物按重量计的含量为 30-80% 和所述有机湿强度剂按重量计的含量为 0.5-10%,这些按重量计的含量合计达 100%。

12. 根据权利要求 7 所述的深度过滤器层,其特征在於所述深度过滤器层由混合物生产,在所述混合物中,所述至少一种无机层状双氢氧化物和所述硅藻土或所述珍珠岩或它们的混合物按重量计的含量为 20-75%,所述纤维素纤维和 / 或其衍生物按重量计的含量为 30-80% 和所述有机湿强度剂按重量计的含量为 0.5-10%,这些按重量计的含量合计达 100%。

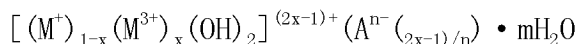
13. 一种生产根据前述权利要求任一项所述的深度过滤器层的方法,其包括以下步骤:

(1) 在至少一种液体介质中制备纤维素纤维和 / 或其衍生物,其中所述纤维素纤维的衍生物为水溶性羧基烷基纤维素、用带铵离子的基团官能化的纤维素或者用氨基官能化的纤维素,

(2) 添加至少一种无机层状双氢氧化物,所述无机层状双氢氧化物选自天然和合成水滑石的组,其中所述至少一种无机层状双氢氧化物含有一价碱金属离子 M^+ 和 / 或二价碱土或过渡金属离子 M^{2+} 、三价主族或过渡金属离子 M^{3+} 、 $n=1-4$ 的 n 价阴离子 A^{n-} 和氢氧离子 OH^- ,所述无机层状双氢氧化物具有式



其中 $0.1 \leq x \leq 0.5$, $1 \leq n \leq 4$ 和 m 是包括 0 的有理数,或者式



其中 $0.1 \leq x \leq 0.5$, $1 \leq n \leq 4$ 和 m 是包括 0 的有理数,

(3) 将至少一种有机湿强度剂添加到步骤 (2) 中得到的混合物,其中所述至少一种有机湿强度剂是水溶性和带正电的,其选自聚酰胺 / 聚胺 - 表氯醇树脂、聚酰胺 - 表氯醇树脂、聚胺 - 表氯醇树脂或它们的混合物的组,

(4) 将步骤 (3) 中得到的悬浮液施涂到载体上,

(5) 除去所述至少一种液体介质和

(6) 干燥步骤 (5) 中得到的深度过滤器层。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在於在步骤 (2) 中添加所述至少一种有机湿强度剂,并在步骤 (3) 中添加所述至少一种无机层状双氢氧化物。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在於在步骤 (1) 之后和在步骤 (2) 之前研磨所述纤维素纤维和 / 或其衍生物。

16. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在於在步骤 (6) 中在 100°C 至 250°C 下干燥所述深度过滤器层。

17. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在於在步骤 (4) 之前添加二氧化硅和 / 或其至少一种衍生物作为另外的组分,其中所述二氧化硅衍生物选自用含有季铵离子的有机基团官能化的 SiO_2 。

18. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在于在步骤 (2) 中将二氧化硅和 / 或其至少一种衍生物与所述至少一种无机层状双氢氧化物一起添加,其中所述二氧化硅衍生物选自用含有季铵离子的有机基团官能化的 SiO_2 。

19. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在于在步骤 (4) 之前添加硅藻土、珍珠岩或它们的混合物作为另外的组分。

20. 根据权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在于在步骤 (2) 中将硅藻土、珍珠岩或它们的混合物作为另外的组分与所述至少一种无机层状双氢氧化物一起添加。

21. 一种过滤设备,其含有至少一种根据权利要求 1 至 12 任一项所述的深度过滤器层。

22. 一种利用至少一种根据权利要求 1 至 12 任一项所述的深度过滤器层将液体介质中的至少一种目标产物与至少一种污染物分离的方法,其特征在于所述方法包括以下步骤:

(a) 将含有所述至少一种污染物和所述至少一种目标产物的所述液体介质与所述至少一种深度过滤器层接触,

(b) 通过所述至少一种深度过滤器层滞留所述至少一种污染物,和

(c) 得到含有所述至少一种目标产物和所述液体介质的滤液。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其特征在于在步骤 (c) 之后接着是进一步的步骤:

(d) 用所述液体介质和 / 或用冲洗介质洗涤所述深度过滤器层以便增加所述滤液中所述至少一种目标产物的含量。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法,其特征在于所述至少一种污染物选自核酸、细胞蛋白质、病毒、内毒素或它们的混合物的组。

25. 根据权利要求 22 或 23 所述的方法,其特征在于所述至少一种目标产物是蛋白质。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其特征在于所述蛋白质选自抗体、激素、酶、肽或它们的混合物的组。

27. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的深度过滤器层用于除去污染物的用途。

具有无机层状双氢氧化物的深度过滤器层

技术领域

[0001] 本发明涉及具有无机层状双氢氧化物 (inorganic layer double hydroxide) 的深度过滤器层 (depth filter layer), 其生产方法, 含有其的过滤设备, 利用至少一种上游深度过滤器层将液体介质中的至少一种目标产物与至少一种污染物分离的方法以及将深度过滤器层用于除去污染物的用途。其中, 为了从生产溶液中分离非所需生物组分, 使含有这些生物组分和所需目标产物的液体介质与根据本发明的深度过滤器层接触, 由此至少一种非所需生物组分被吸附结合到深度过滤器并因此从生产溶液除去。因此, 所需目标产物, 例如治疗性蛋白质应当能够以活性形式不受阻碍地通过深度过滤器。非所需的生物组分特别包括生物污染物, 如来自生产溶液的核酸、细胞蛋白质、病毒或内毒素。治疗性蛋白质的实例是抗体、激素、酶或肽。

背景技术

[0002] 大量治疗性、重组蛋白质基于细胞培养工艺, 该细胞培养工艺以小规模和大规模、工业规模在生物反应器或发酵罐中进行。细胞培养液含有在大量其它组分如完整细胞 (intact cells)、细胞碎片和较小细胞组分中的所需的蛋白, 必须以由许多组成步骤 (“下游工艺”) 组成的高成本工艺将目标蛋白与这些其它组分分离。深度过滤在细胞、细胞碎片和胶质组分的分离中起重要作用。

[0003] 基于纤维素纤维的深度过滤器尤其描述于以下专利中:

[0004] US 5, 232, 595 描述了由与硅藻土或珍珠岩组合的纤维材料如纤维素、聚烯烃、玻璃或者陶瓷组成的深度过滤器。

[0005] US 4, 676, 904 描述了由与硅藻土或珍珠岩组合的中性和带正电的纤维素纤维组成的深度过滤器层。

[0006] US 4, 007, 114 描述了用于分离 0.1-0.7 μm 大小的带负电的颗粒的由纤维素和玻璃纤维以及带正电的三聚氰胺-甲醛树脂组成的无颗粒过滤器介质。在 US 4, 007, 113 和 US 4, 321, 288 中描述了将硅藻土添加到该过滤器系统。

[0007] US 4, 305, 782 描述了一种过滤器系统, 其具有正 ζ 电位, 由纤维素纤维和 $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 复合物组成, 没有湿强度剂。用 US 4, 305, 782 中公开的过滤器系统从生物溶液除去大小在亚微米范围内的污染物的方法描述于 US 4, 366, 068 中。

[0008] 在 US 4, 309, 247 中描述了将未研磨和研磨的纤维素纤维的组合与 50 重量% 的粉末, 如硅藻土 / 珍珠岩以及带正电的三聚氰胺-甲醛树脂一起引入过滤器系统。

[0009] US 4, 282, 261 描述了通过由纤维素纤维、硅藻土和聚酰胺 / 聚胺-表氯醇树脂组成的过滤器系统从不稳定饮料除去悬浮物质的方法。

[0010] US 4, 859, 340 描述了由至少 50 重量% 含 SiO_2 的粉末如硅藻土, 纤维素纤维以及 1-3 重量% 的聚酰胺 / 聚胺-表氯醇树脂组成的深度过滤器层, 其中深度过滤器层表现出对来自液体的带负电的颗粒污染物增大的结合量。

[0011] 在 US 4, 981, 591 中描述了将一次和二次电荷载体 (charge carriers) 引入含有

纤维素纤维和硅藻土的深度过滤器元件。将聚酰胺 / 聚胺 - 表氯醇树脂吸附到深度过滤器元件表面作为一次电荷修饰剂 (primary charge modification agent), 并随后将具有伯胺和仲胺官能团的脂肪族多胺键合到一次电荷修饰剂的环氧基团作为二次电荷修饰剂。在 US 5,085,780 中描述了用公开于 US 4,981,591 的这些过滤器层从水性溶液除去阴离子污染物的工艺。

[0012] 根据目前工艺水平使用的深度过滤器层一方面用于分离大于过滤器孔径的颗粒 (筛孔效应), 另一方面, 小于过滤器孔径的颗粒通过吸附相互作用被深度过滤器保留 (retained)。目前为止, 纤维素类深度过滤器层已特别发现用于细胞培养液纯化的用途。在过去 10 年中, 细胞培养工艺中的细胞密度已从大约 10^5 个细胞 /ml 增加到远超过 10^7 个细胞 /ml。与此相关的是细胞活力显著地降低, 随着全面的细胞溶菌作用 (cell lysis), 导致细胞蛋白质和 DNA 浓度非常显著的增加。现代细胞培养工艺显示了超过 10^7 个细胞 /ml 的细胞密度和小于 50% 的活力, 它们能够导致 DNA 浓度达到 10^6 ppm (1g/l) (Tarrach et al., Pharmaceutical Technology Europe, 01.2008 年 4 月, 71-77)。这是关于分离非需要的组分如细胞、细胞碎片、胶质组分、细胞蛋白质、DNA 等的特殊深度过滤器需求增加的基本原因。同时, 必须确保成本集中 (cost-intensive) 的治疗性目标蛋白能够以活性形式不受阻碍地通过深度过滤器。因此, 对改善的深度过滤器层在更高量和 / 或更高污染物清除以及足够高的目标蛋白传送方面存在不断的需要。

[0013] 有关当局明确需要清除细胞培养 DNA, 这是因为它在人类发病机理方面对于患者代表一种危险。指导准则是 “Points to Consider in the Manufacturing and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use” (FDA CBER; 1997 年 2 月 28 日) 和 “Requirements for Biological Substances No. 50. Requirements for the Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” (WHO Technical Report Series No. 878, 1998)。关于工艺技术, 因为根据准则, 生物反应器 / 发酵罐下游的纯化工艺必须去除该 DNA 至检出限以下的含量, 所以高 DNA 浓度是一个问题。通常将色谱方法 (“捕获步骤” 中的蛋白质 A 和流动方式下的阴离子交换色谱法) 用于 DNA 清除。然而, 在起始 DNA 浓度大于 10^6 ppm 的情况下, 通过这些工艺进行充分的 DNA 清除在工艺技术和经济方面是不切实际的 (K. Tarrach, “Process Economy of Disposable Chromatography in Antibody Manufacturing” WIBio's BioProcess Technology 4th Annual Conference (Amsterdam, The Netherlands, 2007 年 4 月))。

[0014] 因此, 为了使下游工艺没有高的 DNA 和污染物浓度, 在起始处理 (workup) 步骤需要另外的步骤或改善的技术, 因为由于高传导性曲线 (conductivity profile), 色谱方法在这点上不足 (J. Nolan, EMD Pharmaceuticals, Downstream Technology Forum, Boston, Massachusetts, October 9th, 2007)。

[0015] 在原理上通过使用更大的深度过滤器面积或更大的过滤器体积提供这样的可能性, 并且发现多层深度过滤器在此特别有效, 因为通过使用更大的过滤器层高度 (一层铺设在另一层之上的 2 层过滤器层) 和由于与其相关的更高的滞留 (residence) 时间以及更大的结合量, 能够清除比单层深度过滤器更大的 DNA 量。

[0016] 从文献中, 目前已知仅有少量通过深度过滤器清除 DNA 的研究 (Review in: Yigzaw et al., Biotechnol. Prog. 2008, 22, 288-296; “Exploitation of the Adsorptive

Properties of Depth Filters for Host Cell Protein Removal during Monoclonal Antibody Purification”)。这些表明 DNA 结合通过疏水机制和电荷依赖机制两者发生。其中,过滤器的正表面电荷最重要,并通过利用带正电的结合剂 (binder) 来获得正表面电荷。结合剂含量对 DNA 滞留 (retention) 的影响由 Eschrich 等人研究并表明 DNA 滞留通过结合剂含量仅能增加到有限程度 (BioPharm, January 1997, 46-49)。另外,该方法具有重大缺陷,即,随着在深度过滤器中增加结合剂含量,在工艺中可提取组分的含量也增加。

[0017] 能够增加 DNA 清除而不同时增加可提取组分的深度过滤器代表了所希望的改进。同时,随着 DNA 清除的增加目标产物如治疗性蛋白质的清除必须不增加。在这点上,强调应当赋予 DNA 清除深度过滤器层以物理化学稳定性是重要的,该物理化学稳定性允许该 DNA 清除深度过滤器层在下游工艺中的色谱工艺前或后使用。同时, DNA 清除深度过滤器层的结合量应当位于细胞培养上清液的传导性曲线之内,以便能够可靠的清除所述的污染物。在第一纯化步骤之后的工艺开始时使用这样的深度过滤器层以减轻下游的负担、更成本集中的纯化步骤是可能和必要的。

[0018] 在 Angew. Chem. 2000, 112, 4207-4211 中,报道了作为 DNA-LDH 杂合物形式的无机、非细胞毒素载体的可溶性层状双氢氧化物 (LDH)。在此,带负电的 DNA 片段通过离子交换过程插入层状双氢氧化物的带正电的、水镁石类层的夹层空隙。通过该引入 (incorporation),防止 DNA 的降解并能够通过胞吞作用将 DNA-LDH 杂合物输送到哺乳动物细胞中。然后在细胞的细胞质中释放 DNA 用于进一步的工艺中。

[0019] 在 DE 102 37 517 A1 和 DE 102 37 518 A1 中,描述了利用粉末形式的层状双氢氧化物如煅烧的水滑石富集或清除生物分子。多孔层状双氢氧化物作为吸附剂起作用,这些吸附剂与结合剂如尤其是藻酸盐、壳聚糖、果胶和碳酸钙结合成为颗粒聚集体或成形体或者沉淀到载体如碳酸钙上。从而,得到在煅烧的水滑石和 DNA 之间以及在煅烧的水滑石和所需的目标蛋白之间的高结合量。发现平均粒径 (D50) 超过 $1\mu\text{m}$ 的水滑石特别有利于用作吸附剂。根据 DE 102 37 517 A1 和 DE 102 37 518 A1,用该吸附剂不能实现将目标蛋白与 DNA 选择性分离。

[0020] JP 2006-026566 A 描述了膜状材料 (其由有机聚合物颗粒、水滑石和基于纸或塑料膜的过滤材料组成),其用于吸附气体,用于家庭领域内的除臭,用于食物保鲜以及驱虫剂。JP 2003-047647 A 描述了水滑石、金属氧化物、(甲基)丙烯酸衍生物和有机聚硅氧烷的除臭组合物。WO 2005/014160A1 描述了基于含纤维素或木质素的纸以及无机层状双氢氧化物的多孔材料。DE 295 20 817 U1 描述了从纤维素纤维和湿强度剂生产的纸。DE 100 44 218 A1 描述了湿强度处理的深度过滤器,其中的纤维素纤维用亲水性聚异氰酸酯处理。

[0021] 在目前工艺水平下,不知道任何关于利用水滑石或利用深度过滤器层来选择性和充分高地清除非所需的生物分子如 DNA 同时与目标蛋白不结合的情况。

发明内容

[0022] 本发明的目的是提供小规模和大规模、工业规模的稳定且廉价的深度过滤器层,其能够特别高和快速的从液体介质中清除非所需的生物污染物如核酸,同时所需的目标产物如治疗性蛋白质能够以活性形式不受阻碍地通过深度过滤器。另外,还应当提供根据本发明的深度过滤器层的应用,从生产溶液分离生物污染物的方法和含有根据本发明的深度

过滤器层的过滤设备。

[0023] 这个问题通过提供根据权利要求 1 所述的深度过滤器层、根据权利要求 18 所述的生产深度过滤器层的方法,通过使用根据权利要求 32 所述的根据本发明的深度过滤器层,通过提供根据权利要求 27 所述的将污染物与目标产物分离的方法以及通过提供根据权利要求 26 所述的含有根据权利要求 1 所述的深度过滤器层的过滤设备来解决。

[0024] 目标产物应当理解为意指通过上游生产工艺得到的所有产物。它们包括生物分子如蛋白质、肽、多肽或激素。特别地,目标产物理解为意指治疗性蛋白质。

[0025] 本文中,核酸应当理解为意指所有天然存在的核酸如核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA),特别是源自真核、原核和病毒来源的基因组以及表观基因组的 DNA,并相当特别的是具有超过 15 个碱基对链长度的核酸。

[0026] 污染物应当理解为意指不同于目标分子并包含于生产溶液的所有物质,特别是整个细胞和细胞聚集体、细胞碎片、胶质组分和大分子生物分子,并且在后者的情况下,特别是指选自由核酸、宿主细胞蛋白质、脂多糖、脂质、糖类等的组中的那些生物分子。术语生产溶液包括其中目标分子是通过生物生产者(发酵方法),特别是来自真核和原核生物体以及细胞的组中的生物生产者来生产的那些溶液。另外,它包括源自于发酵液的那些溶液,特别是通过分离工艺如离心、预过滤、渗透工艺或者稀释或引入化学药品等来生产的那些溶液。

[0027] 令人惊讶地发现,根据本发明,含无机层状双氢氧化物,特别是水滑石的深度过滤器层选择性结合生物组分,其中发生非所需生物污染物如 DNA 的特别高的清除,而所需的目标蛋白能够不受阻碍地通过深度过滤器。目前工艺水平的深度过滤器仅清除可忽略量的 DNA 而目标蛋白大量不受阻碍地通过深度过滤器。目前工艺水平的水滑石粉末(没有处理到深度过滤器层中)既所希望地清除 DNA 又非所需地清除目标蛋白。

[0028] 与目前工艺水平相比,用根据本发明的深度过滤器层,实现高达 10 倍的 DNA 高清除(比较后面的表 3,“50% DBT”,例如 DF4 对 DF7),而没有所需的目标蛋白结合到深度过滤器上。这种表现是令人惊讶的,因为例如水滑石作为粉末没有选择性;生物污染物如 DNA 以及所需的目标蛋白在很大程度上都结合,这使得不可能使用粉末本身用于纯化细胞培养液。仅仅通过根据本发明的例如将水滑石粉末处理到具有纤维素纤维、任选的硅藻土和带正电的湿强度剂的深度过滤器层中的工艺,就实现了这种从生产溶液分离生物组分的高度选择性。显然,这种令人惊讶和有益的表现是基于水滑石和带电湿强度剂的复合结构之间的相互作用。

附图说明

[0029] 图 1 至 6 示出在下文中更详细说明的穿透曲线。

具体实施方式

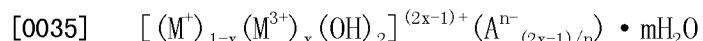
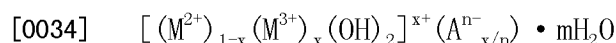
[0030] 本文中,根据本发明的湿强度剂应当理解为意指在深度过滤器生产工艺中添加至水性悬浮液以增加湿态深度过滤器的拉伸强度、耐折强度、破裂强度和耐磨强度的所有水溶性合成树脂。本文中,使用具有反应基团的聚合或多官能化合物,所述聚合或多官能化合物在干燥条件下仅与纤维素和无机粉末的羧基和/或 OH 基反应,并从而使过滤器组分彼此

桥接。湿强度剂的最重要组是表氯醇树脂、三聚氰胺-甲醛树脂 (MF)、脲甲醛树脂 (UF)、乙二醛-聚丙烯酰胺树脂以及异氰酸酯树脂。带正电的湿强度剂优选包括聚胺-表氯醇树脂、聚酰胺-表氯醇树脂和聚酰胺-聚胺-表氯醇树脂,如 Kymene®、Nadavin®或 Polycup®,其中作为反应基团的具有张力环四元环结构的阳离子氮杂环丁烷鎓 (azetidinium) 基团能够同质交联 (homo-crosslinking) 和共交联。使用根据本发明的含有例如水滑石的深度过滤器层,第一次能够提供除了分离常规细胞和细胞碎片以及除去胶质组分之外,还同时从细胞培养液除去大量 DNA 的深度过滤器层。因此,根据本发明的例如含水滑石的深度过滤器层产生在降低污染物浓度方面改善质量的滤液,这有利地导致随后和有时昂贵的“下游工艺”中的纯化步骤,即下游中用于目标分子处理的多步骤工艺的简化。根据本发明的深度过滤器层的物理化学稳定性因此能够使深度过滤器在下游工艺的色谱法步骤之前以及色谱法步骤之后均用于细胞培养液的过滤。从而,得到在细胞培养上清液的传导性曲线中的高 DNA 结合量。

[0031] 正如上述部分所述,根据本发明的深度过滤器层由纤维素纤维和/或其衍生物、至少一种无机层状双氢氧化物和至少一种有机湿强度剂制成。

[0032] 根据本发明,使用从木材(硬木材或软木材)或棉花原始获得的纤维素纤维和/或其衍生物。优选使用来自木材并特别优选来自软木材的纤维素纤维。可以使用不同长度(长和短纤维纤维素)的纤维素纤维的混合物以及纯短或纯长纤维纤维素,其中纤维长度位于 0.1mm 至 7mm 之间,并且纤维宽度在 5 μm 至 30 μm 之间,优选在 10 μm 至 30 μm 之间。在过滤器中,纤维素形成三维网络,其确保高机械稳定性和高流速。在三维网络的空腔以及无机粉末中,存在短纤维纤维素,所述短纤维纤维素还用作填料并有助于过滤器表面的平滑。在优选实施方案中,将专用短纤维纤维素用作纤维素纤维。还可使用纤维素纤维的衍生物,水溶性羧基烷基纤维素是优选的。水溶性羧基烷基纤维素中特别优选羧甲基纤维素(CMC)。CMC 在用于生产根据本发明的深度过滤器层的混合物中的重量比为 0.1 至 10% 之间,优选在 0.3 至 2.0% 之间,更优选在 0.4 至 1.5% 之间和最优选在 0.5 至 1.0% 之间。CMC 与表氯醇树脂组合导致改善的干态强度和湿态强度。另外,作为纤维素的衍生物,可使用阳离子改性的纤维素,如用带铵离子的基团,优选三甲基铵丙基纤维素氯化物(trimethylammoniumpropylcellulose chloride)和 2-羟基-三甲基铵丙基纤维素氯化物官能化的或者用氨基、优选烷基胺官能化的纤维素。

[0033] 如 F. Cavani 等人在 Catalysis Today 1991, 11(2), 173-301 中所描述的,根据本发明的深度过滤器层的无机层状双氢氧化物优选选自天然和合成水滑石和水滑石类化合物的组。在这方面,可特别参考第 176 至 191 页,其公开的内容包含于此作为参考。水滑石具有在夹层空隙内具有可交换的阴离子的阳离子层结构。根据本发明,对于上述的天然和合成水滑石和水滑石类化合物,例如可以给出下式用于说明:



[0036] 本文中, x 可以取 0 至 1 的值,优选 $0.1 \leq x \leq 0.5$ 和更优选 $0.2 \leq x \leq 0.33$ 。n 可以取 1 至 4 的值,和 m 根据结晶水的量而变化并且是包括 0 的有理数。在适当化合物中结晶水的最大可能量可通过描述于上述资料的第 189 和 190 页的各种方法测量。另外,对于上述天然和合成的水滑石以及水滑石类化合物还可以规定例如不仅含有 M^+ 而且含有 M^{2+}

的化合物。对于这些情况,同样可参考上述资料。

[0037] 根据本发明,优选将水滑石 $\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{16} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 用作天然或合成的、未被煅烧的产物。通常,使用的层状双氢氧化物由一价、二价和三价金属阳离子 M^+ 、 M^{2+} 和 M^{3+} , 氢氧化物阴离子 OH^- 和另外的一价至四价阴离子 A^{n-} ($n = 1, 2, 3, 4$) 以及如果需要的结晶水组成。此处 M^+ 是一价碱金属离子如 Li^+ 或 Na^+ , M^{2+} 是二价碱土或过渡金属离子如 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Ca^{2+} , M^{3+} 是三价主族或过渡金属离子如 B^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Ni^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{3+} 、 V^{3+} 、 Ti^{3+} 、 Sc^{3+} 或 In^{3+} , A^{n-} 是阴离子如 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 OH^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 ClO_3^- 、 IO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 WO_4^{2-} 、 CrO_4^{2-} 、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 、 $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$ 、杂多酸、有机酸或有机金属配合物。此处杂多酸的实例是 $(\text{PMo}_{12}\text{O}_{40})^{3-}$ 和 $(\text{PW}_{12}\text{O}_{40})^{3-}$, 有机酸的实例是脂肪酸、草酸、琥珀酸、丙二酸、癸二酸、1,12-十二烷二羧酸,酰基和芳基磺酸盐以及氯肉桂酸,和有机金属配合物的实例是 $[\text{Ru}(4,7\text{-二苯基-1,10-菲咯啉二磺酸盐})_3]^{4+}$ 。此处 M^{2+} 与 M^{3+} 的摩尔比最大为 2.5 : 1, 优选最大为 2.3 : 1 并特别优选最大为 2.1 : 1。 M^{2+} 与 M^{3+} 的重量比(以氧化物 MO 与 M_2O_3 的重量比计算)最大为 2.2 : 1, 优选最大为 2.0 : 1 并特别优选最大为 1.85 : 1。最优选使用由镁和铝阳离子和作为阴离子的碳酸盐组成的合成、未被煅烧的水滑石。在实际的实例中,使用来自 Südchemie AG 的碱式碳酸铝镁 Syntal® 696, 其中氧化物 MgO 与 Al_2O_3 的重量比等于 1.625。无机层状双氢氧化物颗粒的直径在 0.1 μm 至 500 μm 之间, 优选在 0.3 至 300 μm 之间和特别优选在 0.5 至 100 μm 之间。使用的水滑石具有超过 15 m^2/g , 优选超过 25 m^2/g 和特别优选超过 35 m^2/g 的布鲁厄-埃米特-特勒 (Brunauer-Emmet-Teller) (BET) 表面积。在特别的实际的实例中,使用 BET 表面积为 50 m^2/g 或 54 m^2/g 的水滑石粉末。如下所述测定此处的 BET 表面积。

[0038] 根据本发明的深度过滤器层可以只包括无机层状材料也可以包括无机层状材料和基于 SiO_2 的颗粒和 / 或至少一种其衍生物的混合物作为无机粉末。作为基于 SiO_2 的颗粒, 优选使用多孔硅藻土和 / 或合成硅胶, 任选地与珍珠岩组合。特别优选使用硅藻土, 任选地与珍珠岩组合, 最优选天然硅藻土。天然硅藻土未被煅烧。基于 SiO_2 的颗粒的衍生物包括基于 SiO_2 的所有阴离子交换材料, 如用含有季铵离子的有机基团官能化的 SiO_2 , 特别优选三甲基铵丙基氯化物官能化的 SiO_2 。基于 SiO_2 的颗粒的平均粒径在 0.5 μm 和 100 μm 之间, 优选 2 μm 和 40 μm 之间, 相当优选 4 μm 和 20 μm 之间。在实际的实例中, 使用具有 8 μm 平均粒径的硅藻土。

[0039] 优选只使用水滑石或水滑石和硅藻土的混合物作为无机粉末。此处特别优选只有水滑石或水滑石按重量计的含量大于硅藻土按重量计的含量的水滑石和硅藻土的混合物。在根据本发明的深度过滤器 7 (HT900) 的实际实例中, 仅使用水滑石, 并在另外的实际实例中, 水滑石按重量计的含量优选至少 1.7 倍, 特别优选至少两倍于硅藻土按重量计的含量。

[0040] 使用的基于其它组分的无机粉末按重量计的含量在 10% 至 75% 之间, 优选 20% 至 70% 之间, 和特别优选为 30% 至 65% 之间。深度过滤器层中水滑石的含量越高, 根据本发明的深度过滤器的 DNA 结合量越高。

[0041] 作为湿强度剂, 根据本发明, 使用来自以下组中的水溶性树脂: 表氯醇树脂、三聚氰胺-甲醛树脂、脲甲醛树脂、乙二醛-聚丙烯酰胺树脂、异氰酸酯树脂及它们的混合物。优选的是带正电的表氯醇树脂, 并且特别优选的是聚酰胺 / 聚胺-表氯醇树脂、聚胺-表氯醇

树脂和聚酰胺-表氯醇树脂,如 **Kymene[®]**、**Nadavin[®]**或**Polycup[®]**。在实际的实例中,使用来自Hercules的 **Kymene[®]**作为湿强度剂。当在生产工艺中将树脂与根据本发明的深度过滤器层的其它组分接触时,在湿强度剂的反应性氮杂环丁烷鎗基团或其它表氯醇类基团和纤维素纤维以及无机粉末(由无机层状双氢氧化物和任选的基于SiO₂的颗粒如天然硅藻土或合成硅胶组成)的羧基和/或羟基之间发生聚合物桥接,然而主要只在过滤器生产的随后干燥工艺中发生随着共价键如酯键以及非共价键的形成的化学交联。只有通过这种反应,在维持正电荷的使用过程中深度过滤器才能保持其湿态强度。基于添加的其它过滤器组分的湿强度剂按重量计的含量在0.5%至10%之间,优选1%至5%之间。在实际的实例中,使用2%的湿强度剂。

[0042] 根据优选实施方案,本发明提供深度过滤器,其由以下生产:

[0043] 纤维素纤维和/或其衍生物,

[0044] 至少一种无机层状双氢氧化物和

[0045] 至少一种有机湿强度剂,

[0046] 其中深度过滤器层由混合物生产,该混合物中至少一种无机层状双氢氧化物按重量计的含量为10-65%,纤维素纤维和/或其衍生物按重量计的含量为30-80%和有机湿强度剂按重量计的含量为0.5-10%,和所述按重量计的含量之和达到100%。

[0047] 根据本发明的深度过滤器层的生产优选通过以下方法来实现,该方法包括以下步骤:

[0048] (1) 在至少一种液体介质中制备纤维素纤维和/或其衍生物,

[0049] (2) 添加至少一种无机层状双氢氧化物,

[0050] (3) 将至少一种有机湿强度剂添加到步骤(2)中得到的混合物,

[0051] (4) 将步骤(3)中得到的悬浮液施涂到载体上,

[0052] (5) 除去至少一种液体介质和

[0053] (6) 干燥步骤(5)中得到的深度过滤器层。

[0054] 根据优选实施方案,将纤维素纤维添加到水中并用研磨机研磨至所需的细度(fineness)。纤维素纤维的研磨程度以及使用的无机粉末的粒径和过滤器中的粉末含量主要决定了深度过滤器的过滤分辨率(filtration resolution)。还可以在添加无机层状双氢氧化物之后,即在步骤(2)之后或添加湿强度剂之后,即步骤(3)之后来进行纤维素纤维的研磨。

[0055] 本文中,过滤分辨率应当理解为意指来自溶液的不同大小组分的分离。对于比过滤器层孔径小的那些颗粒,深度过滤也可以有效。因此,用深度过滤器,过滤效果并没有如基于绝对滞留率的膜的情况中那样由给出的孔径表示。此处,过滤分辨率的表征而是由规定条件下的水渗透性的状况来确定。

[0056] 添加无机粉末后,纤维素纤维和无机粉末的水悬浮液的总固体含量为大约4%。根据本发明可在添加无机粉末前或后进行湿强度剂的添加。将得到的悬浮液例如施涂到筛分容器(sieving vessel),例如通过应用表面真空除去水,根据优选实施方案在此期间浓缩的悬浮液同时通过超行程辊(overtravelling rollers)均质化并使得到的过滤器表面平滑。优选通过辊将湿深度过滤器层压缩至所需的过滤器厚度并优选在干燥炉内在大约

100-250℃的可变可调温度区域内干燥。在此期间中,可用升温曲线或在恒温下进行干燥。优选运行温度曲线,相当优选具有不同温度区域的温度曲线。根据本发明的深度过滤器层的厚度优选在 1 至 8mm 之间,特别优选 2 至 6mm 之间。在实际的实例中该厚度在 3.0mm 至 4.5mm 之间。通过测量 47mm 直径的根据本发明的深度过滤器在 1bar 压差下 100ml 蒸馏水需要的以单位 [s] 表示的时间得到作为根据本发明的深度过滤器的过滤分辨率量度的水流速 (water flow)。也经常将水流速表示为具有单位 [升/(m²_{过滤器}·分钟)] 的水流速率。优选在厚度为约 4mm 下具有水流速率为 20 至 2000l/(m²min) 的根据本发明的深度过滤器层。

[0057] 根据本发明另外的优选实施方案,在上述步骤 (4) 之前可添加二氧化硅和 / 或其至少一种衍生物作为另外的组分。可选地, 根据本发明,在步骤 (2) 中可将二氧化硅和 / 或其至少一种衍生物与至少一种无机层状双氢氧化物一起添加。

[0058] 根据本发明另外的优选实施方案,在上述步骤 (4) 之前可添加硅藻土和 / 或珍珠岩作为另外的组分。可选地,根据本发明,在步骤 (2) 中可将硅藻土和 / 或珍珠岩与至少一种无机层状双氢氧化物一起添加。

[0059] 根据本发明的深度过滤器层用于从液体介质中除去颗粒、胶质和溶解组分的过滤工艺中。本文中待分离组分优选为非所需的生物污染物。特别优选的待分离组分包括来自细胞培养液的污染物,如细胞、细胞碎片、胶质组分、细胞蛋白质、DNA、病毒和内毒素。本文中的分离包括这样的分离,即从液体介质分离至少一种非所需的生物污染物,而仍包含于液体介质的目标产物能够以活性形式不受阻碍地通过深度过滤器层。目标产物应当理解为意指通过上游生产工艺得到的所有产物。优选目标产物包括生物分子。特别优选地,将目标产物理解为意指蛋白质、肽、多肽或激素。特别地,将目标产物理解为意指治疗性蛋白质。本文中,将液体介质理解为意指能够使待分离组分与深度过滤器接触的所有介质。本文中它们特别是溶液、悬浮液、分散液、乳液或胶体溶液形式的水性或含水的介质。其中可使用常规的所有液体介质,如生物和生物技术溶液,医学溶液,来自食品、饮品、动物饲料和工业垃圾的溶液和来自化学工业的溶液。优选地,将根据本发明的深度过滤器层用于来自生物、生物技术和制药工业以及来自饮食工业的液体介质的过滤。特别优选地,将深度过滤器层用于生物和生物技术溶液的过滤。在实际的实例中,将深度过滤器层用于细胞培养液以及含 DNA 和含蛋白质的生物溶液的过滤。本文中,可通过尺寸排阻、通过吸附机制、通过离子交换工艺和 / 或插层反应 (intercalation) 进行从待过滤液体介质除去待分离组分。

[0060] 如果需要,根据工艺,新式深度过滤器层必须在其使用前通过冲洗工艺,如用水或用含缓冲液的溶液预冲洗来制备。如果需要,根据工艺待过滤液体介质也必须在其使用前,如通过预过滤或离心来制备。

[0061] 为了适当地利用深度过滤器层,本发明进一步提供含有上述特征的深度过滤器层的过滤设备。根据本发明的过滤设备优选包含金属或特别优选塑料或类似材料的过滤器外壳,其能够使过滤设备和至少一种上述特征的深度过滤器层廉价的一次性使用。

[0062] 另外,提供一种方法,其用于将液体介质中的至少一种目标产物与至少一种生物污染物分离,该方法包括以下步骤:

[0063] (a) 将含有至少一种污染物和至少一种目标产物的液体介质与至少一种根据本发明的深度过滤器层接触,

- [0064] (b) 通过至少一种深度过滤器层滞留至少一种污染物和
- [0065] (c) 得到含有至少一种目标产物和液体介质的滤液。
- [0066] 作为另外的步骤 (d), 在另外的优选实施方案中, 可以在步骤 (c) 之后用液体介质和 / 或用冲洗介质洗涤深度过滤器层以增加滤液中至少一种目标产物的含量。
- [0067] 根据本发明的工艺可以是独立的工艺或可以是包含有其后进一步的纯化步骤的更复杂工艺的一部分。
- [0068] 最后, 本发明提供上述特征深度过滤器层用于除去污染物的用途。
- [0069] 参考实施例中所所述的实施方案在下面的描述中将更详细地说明本发明及另外由其产生的优点。

实施例

[0070] 分析方法的描述

[0071] 静态的 DNA 和蛋白质结合

[0072] 为了测定无机粉末的静态结合量, 将在蒸馏水中的粉末的规定的悬浮液制备为含量为 50mg 无机粉末 /ml 蒸馏水。将悬浮液分成 10ml 塑料离心管中的 1ml 等份。向等份中进一步添加 3.5ml 蒸馏水和 0.5ml 10× 浓缩的 PBS 缓冲液 (在水中的 2.4g KH_2PO_4 /l, 14.4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /l, 80g NaCl /l, 2g KCl /l), 将其混合并温育 10 分钟。摇动以平衡。离心后除去上清液。平衡过的粉末用 2.5ml DNA 测试溶液或蛋白质测试溶液在室温摇动下温育 3 小时。作为测试溶液, 使用溶解于 1× 浓缩 PBS 缓冲液中浓度为 1mg/ml 的鲑鱼精 DNA (钠盐, 尺寸分布 500-1000 个碱基对, 产品编号 54653, Biomol) 或多克隆人 IgG 混合物 (Cytoglobin®/Bayer Vital, D-Leverkusen)。接下来, 离心后, 基于标准系列光度测定上清液的 DNA 或蛋白质浓度。

[0073] 无机粉末和深度过滤器材料的 BET 测定

[0074] 利用 Gemini BET 系统 (Micromeritics) 进行通过布鲁厄 - 埃米特 - 特勒 (BET) 方法的材料吸附表面的测定。为了制备, 用样品填充约 25% 的玻璃样品管并在真空 120℃ 下加热 2 小时以干燥。得到的干燥样品的重量基于来自空样品管的重量差来测定。为了测定 BET 表面积, 将样品管以设置的安装方式固定于 Gemini BET 系统中。与用液氮冷却的空参比管相比较进行测定。通过启动设备的软件通过在 200mm Hg/min 的抽气速度下记录 11 个测定点和假设氮气的以下物理性质, 进行测定和评价: 浓度: 0.0015468, 非理想因子: 0.000062, 分子横截面积: 0.162nm²。

[0075] 动态的 DNA 和蛋白质结合

[0076] 对深度过滤器层的动态结合量的测定是利用直径为 47mm 和有效过滤器面积为 13.2cm² 的圆形压盘 (pressed discs) 以流动方式在流速为 4.3ml/min 的恒定流下进行的。压盘放置于不锈钢过滤外壳中 (Sartorius Stedim Biotech GmbH), 用 200ml 反渗透 (RO) 水, 然后用 60ml 1× 浓缩的 PBS 缓冲液预冲洗, 然后用 DNA 或蛋白质测定溶液彻底冲洗。作为测试溶液, 使用溶解于 1× 浓缩 PBS 缓冲液的浓度为 0.5mg/ml 的鲑鱼精 DNA (钠盐, 尺寸分布为 500-1000 个碱基对, 产品编号 54653, Biomol) 或浓度为 1mg/ml 的多克隆人 IgG 混合物 (Cytoglobin®/Bayer Vital, Leverkusen)。另外, 作为测试溶液, 使用 DNA 和 IgG 的混合物。向其添加溶解于 1× 浓缩 PBS 缓冲液的浓度为 0.5mg/ml 的鲑鱼精 DNA (Na

盐,尺寸分布为 500-1000 个碱基对,产品编号 54653,Biomol) 并同时添加浓度为 1mg/ml 的多克隆、人 IgG 混合物 (Cytoglobin®/Bayer Vital,Leverkusen)。通过在线光度计分别在 260nm 和在 280nm 处记录滤液的消光值,由此利用标准系列测定浓度。利用 DNA 和多克隆、人 IgG 混合物的混合物,利用下式 $A \times [260\text{nm 的消光}] - B \times [280\text{nm 的消光}]$ 计算 DNA 的浓度,并用下式 $C \times [280\text{nm 的消光}] - D \times [260\text{nm 的消光}]$ 计算 IgG 的浓度。如 K. L. Manchester, BioTechniques 20(6)1996,968-970 中所述,由 DNA 以及多克隆、人 IgG 混合物的消光系数计算系数 A-D 作为特定的仪器常数。通过测定整个过滤过程中的 50% 动态穿透 (DBT) 和累积传送的累积结合进行穿透曲线的评价。将 50% DBT 理解为意指基于使用的 DNA 或 IgG 浓度,达到滤液流中 50% 的浓度水平。

[0077] 水流速

[0078] 为了测量水流速,将直径为 47mm 的圆形深度过滤器压盘放入 200ml 容量的过滤器支座 (holder) (Sartorius Stedim Biotech GmbH SM 16249) 并用 100ml 水在 1bar 分压下预冲洗。然后用秒表测定 1bar 分压下以 [s] 计的 100ml 水的流动时间。假设有效过滤面积为 12.57cm^2 用下式计算水流速率:水流速率 $[1/\text{m}^2 \text{ min}] = 0.1[1]/(12.57 \times 10^{-4}[\text{m}^2] \times \text{时间}[\text{min}])$ 。

[0079] 重量测定、厚度测量和密度测定

[0080] 利用对应于 17.35cm^2 过滤器面积具有 47mm 直径的圆形压盘进行深度过滤器层的重量、厚度和密度的测定。

[0081] 用试验物质监测天平 (test material-monitored balance) (Sartorius LP 3200D) 用 1mg 精度测定重量。

[0082] 用来自 Hahn & Kolb (精度 0.01mm) 的厚度测量装置进行深度过滤器样品平均厚度的测定。在四个边缘点和压盘中间测量厚度。计算平均厚度作为五个测量点的平均值。

[0083] 由厚度和重量测定值,根据下式计算密度:

[0084] 密度 $[\text{g}/\text{cm}^3] = \text{重量}[\text{g}]/(17.35\text{cm}^2 \times \text{厚度}[\text{cm}])$ 。

[0085] (A) 使用的深度过滤器

[0086] 深度过滤器 1:C8HP (Sartorius Stedim Biotech GmbH)

[0087] 深度过滤器 2:S5P (Sartorius Stedim Biotech GmbH)

[0088] 深度过滤器 3:40DE (Millipore Corp.)

[0089] 深度过滤器 4:75DE (Millipore Corp.)

[0090] 深度过滤器 5:HT500,根据本发明,按照 (B)

[0091] 深度过滤器 6:HT750,根据本发明,按照 (B)

[0092] 深度过滤器 7:HT900,根据本发明,按照 (B)

[0093] 深度过滤器 8:HT500G,根据本发明,按照 (B)

[0094] (B) 根据本发明的深度过滤器的组成

[0095] 深度过滤器 5 (HT500):

[0096] 37.5 重量%的纤维素纤维 (Weyerhaeuser Tyee)、0.5 重量%的羧甲基纤维素、38 重量%的水滑石 Syntal® 696 ($0.8\mu\text{m}$ - $25\mu\text{m}$)、22 重量%的硅藻土 SA3、2 重量%的 Kymene®。

[0097] 深度过滤器 6 (HT750):

[0098] 32.5 重量%的纤维素纤维 (Weyerhaeuser Tyee)、0.5 重量%的羧甲基纤维

素、45 重量%的水滑石 Syntal® 696 (0.8 μm -25 μm)、20 重量%的硅藻土 SA3、2 重量%的 Kymene®。

[0099] 深度过滤器 7 (HT900) :

[0100] 34.5 重量%的纤维素纤维 (Weyerhaeuser Tyee)、0.5 重量%的羧甲基纤维素、63 重量%的水滑石 Syntal® 696 (0.8 μm -25 μm)、2 重量%的 Kymene®。

[0101] 深度过滤器 8 (HT500G) :

[0102] 27.5 重量%的纤维素纤维 (Weyerhaeuser Tyee)、0.5 重量%的羧甲基纤维素、55 重量%的水滑石 Syntal® 696 (1 μm -278 μm)、15 重量%的硅藻土 SA3、2 重量%的 Kymene®。

[0103]

(C) 水滑石粉末 Syntal® 696 的表征

[0104] 测量静态系统中鲑鱼精 DNA : (钠盐, 尺寸分布 500-1000 个碱基对, 产品编号 54653, Biomol) 的结合和多克隆人 IgG 混合物 (Cytoglobin®/Bayer Vital, D-Leverkusen) 的结合。详细步骤描述于上述“分析方法”部分。

[0105] 表 1

[0106]

无机粉末 (粒径分布[μm])	BET 表面积 [m^2/g]	DNA 结合 [%]	IgG 结合 [%]
硅藻土 SA3	32	3	60
水滑石 Syntal® 696 (0.8 μm -25 μm)	50	61	34
水滑石 Syntal® 696 (1 μm -278 μm)	54	71	24

[0107] 硅藻土几乎不结合 DNA。水滑石表现出高的 DNA 结合。缺点是, 两种粉末均大量结合目标蛋白 IgG。

[0108] (D) 深度过滤器的表征

[0109] 如上述“分析方法”部分所述进行深度过滤器的水流速、厚度、重量、密度和 BET 表面积的测定。

[0110] 表 2

[0111]

深度过滤器	DF1 (C8HP)	DF2 (S5P)	DF3 (40DE)	DF4 (75DE)
水流速 (100 ml/1 bar)[s]	4.7	54	6.0	74
厚度 [mm]	4.2	4.2	3.7	3.4
重量[g] Ø 47mm 17.35 cm ²	1.9	2.9	2.0	2.6
密度 [g/cm ³]	0.26	0.40	0.31	0.44
BET 表面积 [m ² /cm ³ 深度过滤器] [m ² /g 深度过滤器]	1.2 4.7	5.7 14.3		4.0 9.1

[0112]

深度过滤器	DF5 (HT500)	DF6 (HT750)	DF7 (HT900)	DF8 (HT500G)
水流速 (100 ml/1 bar)[s]	67	65	90	7.7
厚度 [mm]	3.4	3.7	3.4	4.1
重量[g] Ø 47mm 17.35 cm ²	2.6	2.9	2.8	2.9
密度 [g/cm ³]	0.43	0.45	0.48	0.41
BET 表面积 [m ² /cm ³ 深度过滤器] [m ² /g 深度过滤器]	9.6 22.2	11.3 25.4	13.8 28.8	13.3 32.5

[0113] 动态系统中的 DNA 结合

[0114] 如上述“分析方法”部分所述进行动态系统中 DNA 结合的测定。

[0115] 表 3

[0116]

深度过滤器	50% DBT [mg _{DNA} /ml _{DF}]	50% DBT [mg _{DNA} /cm ² _{DF}]	DNA 结合 [mg _{DNA} /cm ² _{DF}]	DNA 结合 [%]
DF1 (C8HP)	0.61 (±0.01)	0.31 (±0.01)	0.65 (±0.01)	9
DF2 (S5P)	1.44(± 0.07)	0.76 (± 0.07)	1.32 (± 0.09)	19
DF3 (40DE)	0.75 (± 0.00)	0.36 (± 0.00)	0.78 (± 0.2)	10
DF4 (75DE)	0.69 (± 0.04)	0.29 (± 0.005)	0.60 (± 0.004)	8
DF5 (HT500)	5.34 (± 0.58)	2.36 (± 0.26)	2.97 (± 0.25)	41
DF6 (HT750)	6.10 (±0.05)	2.91 (±0.09)	3.53 (± 0.09)	48
DF7 (HT900)	7.74 (± 0.52)	3.48 (± 0.26)	3.96 (± 0.24)	53
DF8 (HT500G)	3.97 (±0.28)	2.37 (± 0.03)	2.71 (±0.25)	40

[0117] 动态系统中多克隆人 IgG 混合物的传送

[0118] 严格地如上述“分析方法”部分所述进行动态系统中 IgG 结合的测定。

[0119] 表 4

[0120]

深度过滤器	50%DBT [mg _{IgG} /ml _{DF}]	50% DBT [mg _{IgG} /cm ² _{DF}]	IgG 结合 [mg _{IgG} /cm ² _{DF}]	IgG 传 送 [%]
DF1 (C8HP)	1.45 (±0.03)	0.77 (± 0.00)	1.77 (± 0.05)	91
DF2 (S5P)	3.20 (±0.18)	1.62 (±0.11)	2.89 (± 0.06)	86
DF3 (40DE)	1.39 (± 0.03)	0.65 (±0.01)	1.2 (±0.03)	94
DF4 (75 DE)	2.35 (± 0.08)	1.06 (±0.04)	2.03 (±0.02)	90
DF5 (HT500)	5.54 (±0.40)	1.11 (±0.16)	2.62 (±0.11)	87
DF6 (HT750)	2.85 (±0.02)	1.29 (±0.00)	2.80 (±0.01)	86
DF7 (HT900)	2.22 (± 0.03)	1.00 (±0.05)	2.44 (±0.11)	89
DF8 (HT500G)	1.81 (±0.01)	1.00 (±0.05)	2.51 (±0.01)	88

[0121] 为了比较深度过滤器的特征,有必要按类似的水流时间将它们分组。以下,将水流时间小于 10 秒的深度过滤器分组为粗深度过滤器,和将水流时间大于 50 秒的深度过滤器指定为窄深度过滤器。本文中,水流时间基于直径为 47mm 的深度过滤器和 1bar 分压下的 100ml 蒸馏水。

[0122] 图 1 示出装载有鲑鱼精 DNA 的根据本发明的粗深度过滤器 DF8,和从目前工艺水平已知的粗深度过滤器 DF1 和 DF3 的穿透曲线。三种深度过滤器全部具有类似的水流时间,

并且比深度过滤器 DF2、DF4 和 DF5 至 DF7 粗。

[0123] 图 2 示出装载有鲑鱼精 DNA 的从目前工艺水平已知的窄深度过滤器 DF2 和 DF4 以及根据本发明的窄深度过滤器 DF5、DF6 和 DF7 的穿透曲线。五种深度过滤器全部具有类似的水流时间并且比深度过滤器 DF1、DF3 和 DF8 窄。

[0124] 图 3 示出装载有多克隆、人免疫球蛋白混合物 (IgG 混合物) 的从目前工艺水平已知的粗深度过滤器 DF1 和 DF3 和根据本发明的粗深度过滤器 DF8 的穿透曲线。

[0125] 图 4 示出装载有多克隆、人免疫球蛋白混合物的从目前工艺水平已知的窄深度过滤器 DF2 和 DF4 以及根据本发明的窄深度过滤器 DF5、DF6 和 DF7 的穿透曲线。

[0126] 图 5 示出装载有鲑鱼精 DNA 和多克隆、人免疫球蛋白的根据本发明的粗深度过滤器 DF8 以及从目前工艺水平已知的粗深度过滤器 DF1 和 DF3 的穿透曲线。

[0127] 图 6 示出装载有鲑鱼精 DNA 和多克隆、人免疫球蛋白的混合物的根据本发明的窄深度过滤器 DF5、DF6 和 DF7 以及从目前工艺水平已知的窄深度过滤器 DF2 和 DF4 的穿透曲线。

[0128] 利用根据本发明的深度过滤器层,与从溶液中清除 DNA 的目前工艺水平相比,能够达到高达 10 倍(表 3,“50% DBT”,如 DF4 对 DF7)。图 1 和 2 示出利用根据本发明的深度过滤器层,利用窄和粗的实施方案,两者只发生明显晚于利用目前工艺水平的深度过滤器层,即只在增加深度过滤器层含 DNA 溶液的装载量之后的 DNA 进入滤液的穿透。一方面,在表 3 实际实施例的延迟的 DNA 穿透中看出该优点(比较表中的“50% DBT”),另一方面,与来自目前工艺水平的深度过滤器相比,在利用根据本发明的深度过滤器的 DNA 穿透曲线的平坦形状(flattened shape)中还看出增加的 DNA 结合量。后者的性能具有如下的效果,即根据本发明的深度过滤器随着暴露时间的延长在其 DNA 清除量方面仍保持其优点(参见表 3 中的 DNA 结合值)。

[0129] 另外,与目前工艺水平相比,所需的目标蛋白,即多克隆人 IgG 混合物不更加强烈的结合到根据本发明的深度过滤器层(图 3 和 4)。因此,在粗和窄实施方案中的根据本发明的深度过滤器与根据目前工艺水平的深度过滤器相比,在 IgG 混合物的动态穿透以及穿透曲线的整体形状方面具有有益的性能。

[0130] 如上述“分析方法”部分所述,在磷酸盐缓冲的普通氯化钠溶液中含有目标蛋白和污染物的混合物目标的过滤中也看到了根据本发明的深度过滤器层的这些有益性能。图 5 和 6 示出由目标蛋白(多克隆、人 IgG 混合物)和污染物(鲑鱼精 DNA)组成的双组分混合物的穿透行为。用根据目前工艺水平的全部四种示例的深度过滤器, DNA 的穿透比 IgG 片段的穿透发生的早。因此,利用目前工艺水平的深度过滤器,不可能将目标蛋白与污染物选择性分离。另一方面,根据本发明的深度过滤器表现出相反的穿透行为。利用与根据目前工艺水平的深度过滤器相同的试验条件,目标蛋白的穿透明显发生在污染物 DNA 的穿透之前。因此,具有同样良好产物传送的滤液中 DNA 的明显减少只能通过根据本发明的深度过滤器得到(增加 10 倍;表 3,“50% DBT”)。图 5 示出粗深度过滤器层的穿透行为,图 6 示出窄深度过滤器层的穿透行为。根据本发明的深度过滤器层的上述优点对于两种比较是明显可识别的。因此通过根据本发明的深度过滤器有利分离污染 DNA 在这些过滤器开口(openness)变化的宽范围内得到保持。因此,可以使根据本发明的深度过滤器适应于待分离介质的颗粒分布并同时保持根据本发明的污染物的选择性分离。

[0131] 因此,利用根据本发明的含有例如水滑石的深度过滤器层,第一次可以提供选择性深度过滤器层,其除了从细胞培养液分离常规细胞和细胞碎片以及除去胶质组分之外,还同时除去大量 DNA,而目标产物能够以活性形式不受阻碍地通过深度过滤器。因此,根据本发明的含有例如水滑石的深度过滤器层产生在降低污染物浓度方面改善质量的滤液,这有利地导致“下游工艺”中随后和有时昂贵的纯化步骤的简化。从而,在“下游”工艺最后部分的成本集中步骤能够以明显更小的规模进行,这导致工艺费用方面的成本降低,而且还导致由于目标蛋白的较低产物损失引起的成本降低。同时,新式深度过滤器层的物理化学稳定性还允许在细胞培养液的“下游”处理中的色谱步骤前后使用,这是因为得到在细胞培养上清液的传导性曲线中的高 DNA 结合量。根据本发明的深度过滤器层在“下游”工艺的相关工艺窗口 (process window) 中的相关参数如 pH、温度、压力和流量方面表现出足够高的稳定性。能够将根据本发明的深度过滤器层非常简单的加工为一次性产品,其具有最大可能的安全性并避免交叉污染,因而可用于生物技术、医学和制药生产工艺中。可以非常有效地将无机层状双氢氧化物引入根据本发明的深度过滤器层中,并且利用适当调整的粒径分布,还能够生产不同开口或具有各种水流速的深度过滤器层。这允许根据待过滤的特殊生产溶液的需求情况更加灵活使用深度过滤器层。

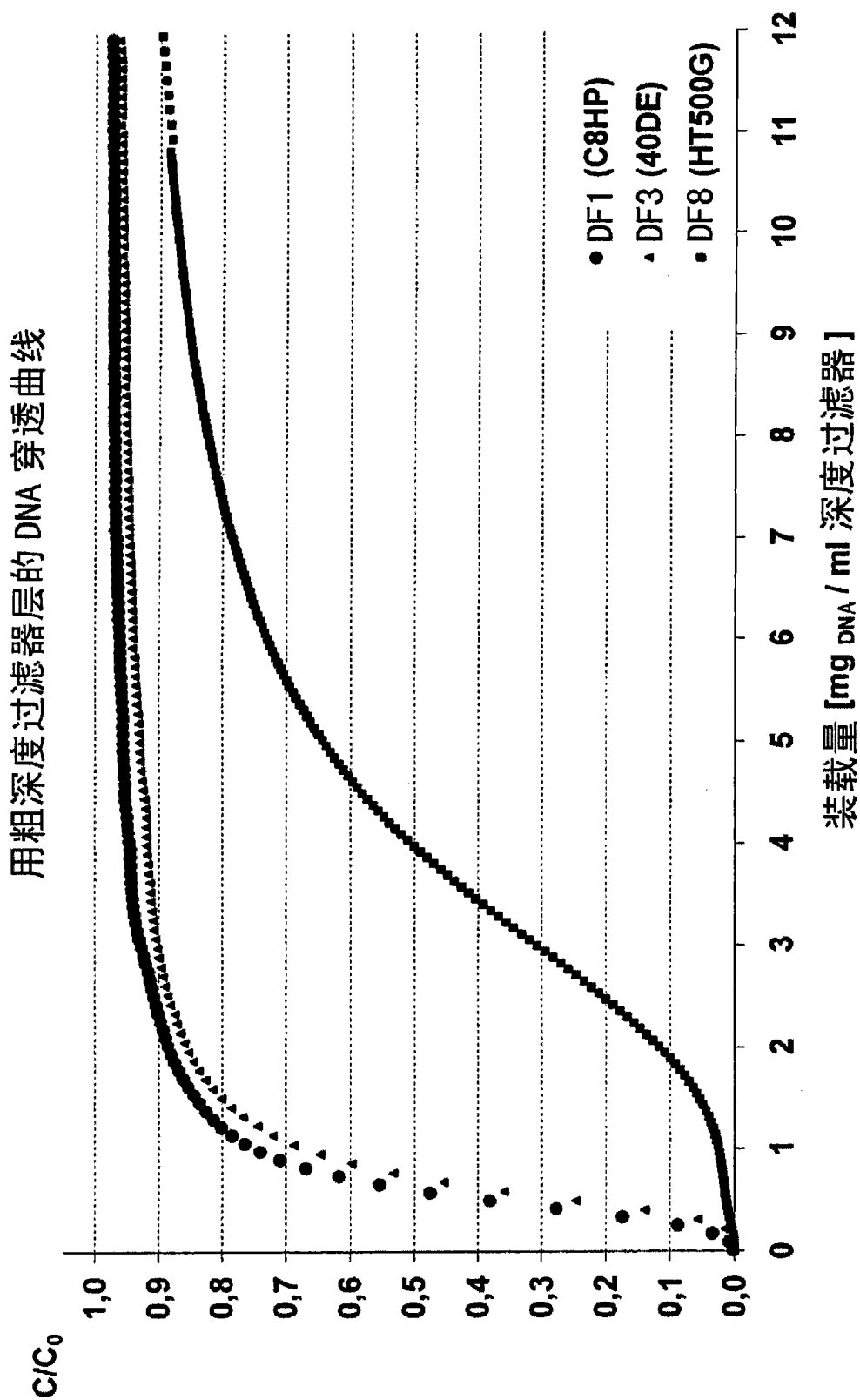


图 1

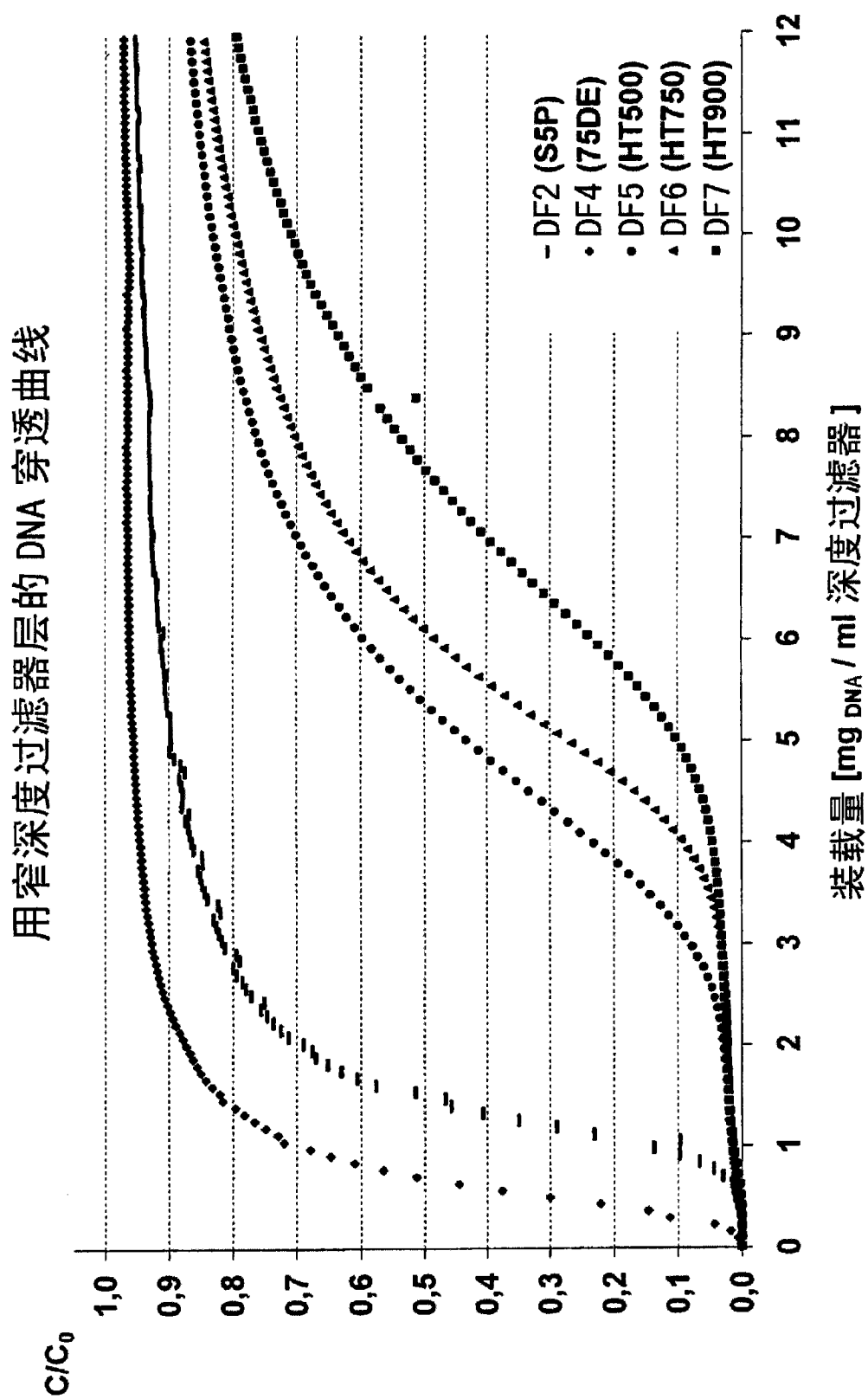


图 2

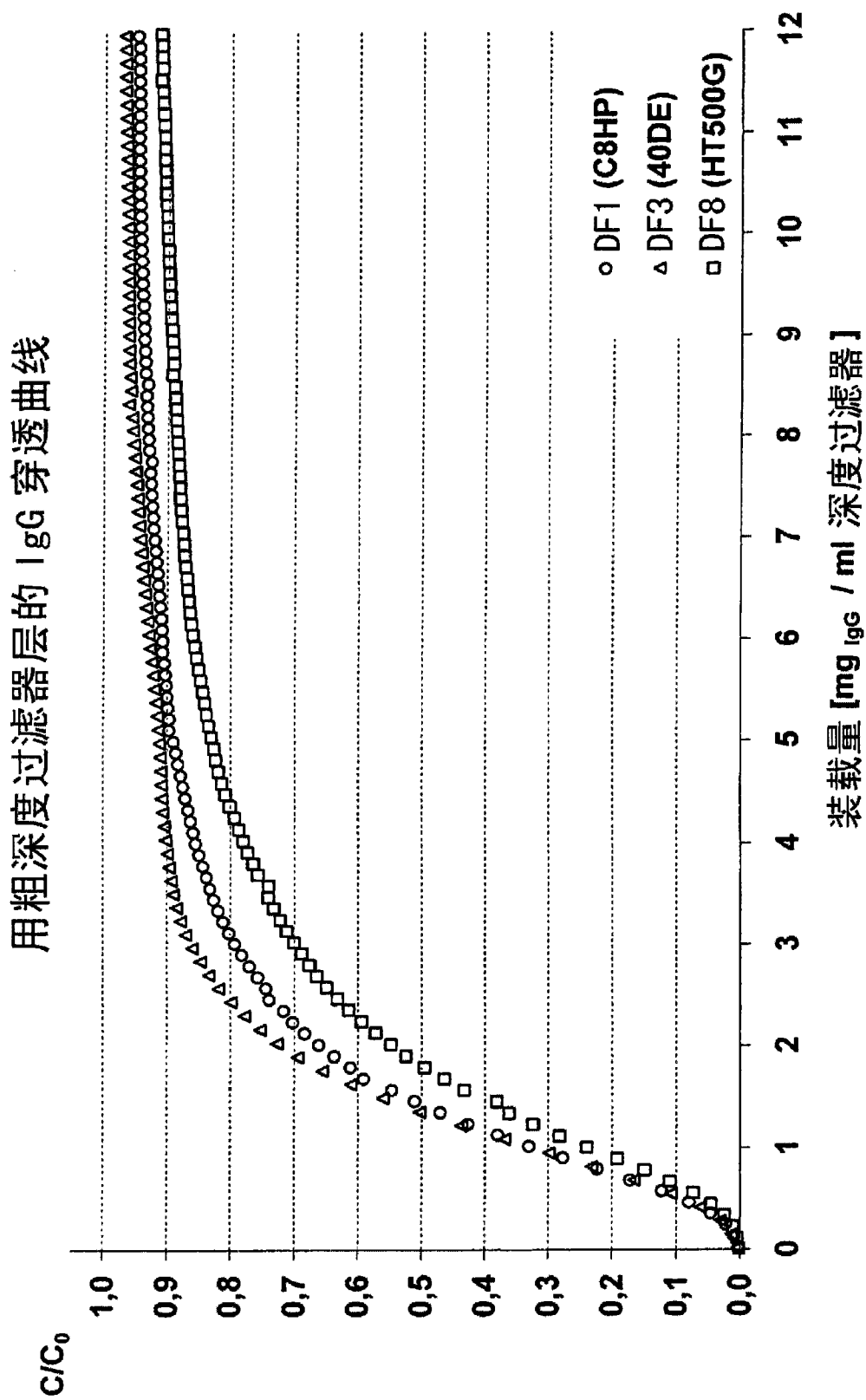


图 3

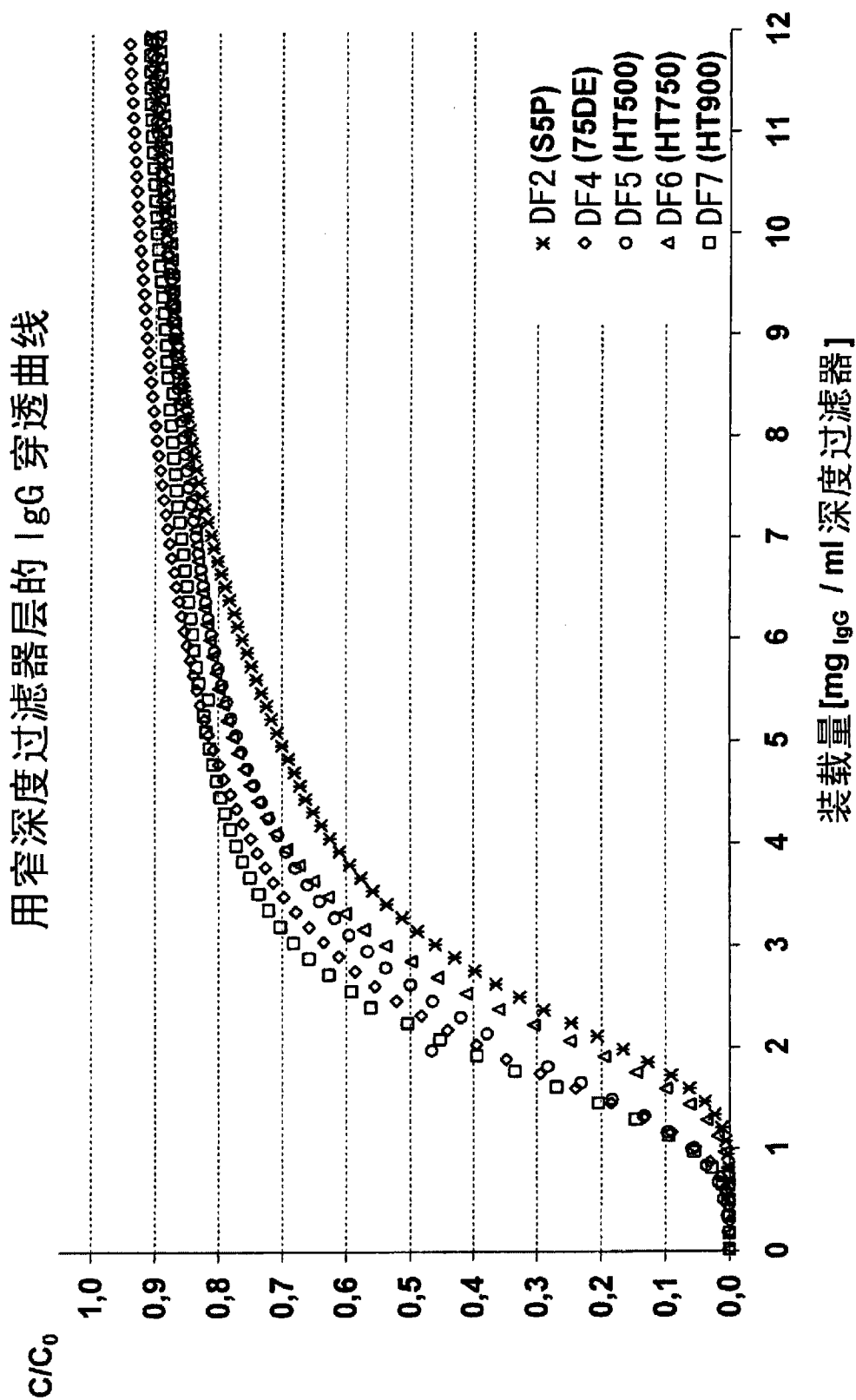


图 4

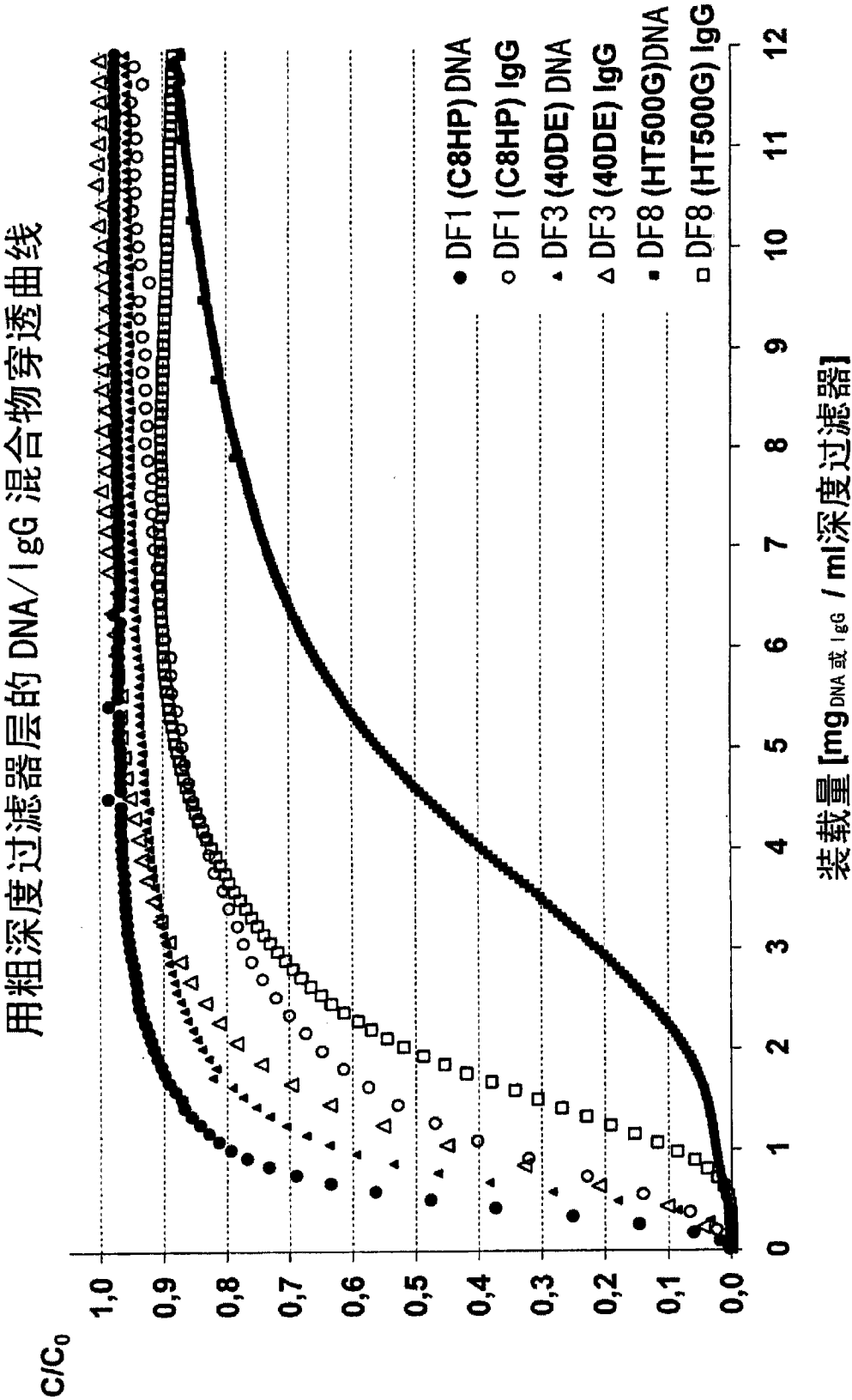


图 5

用窄深度过滤器的DNA/IgG混合物穿透曲线

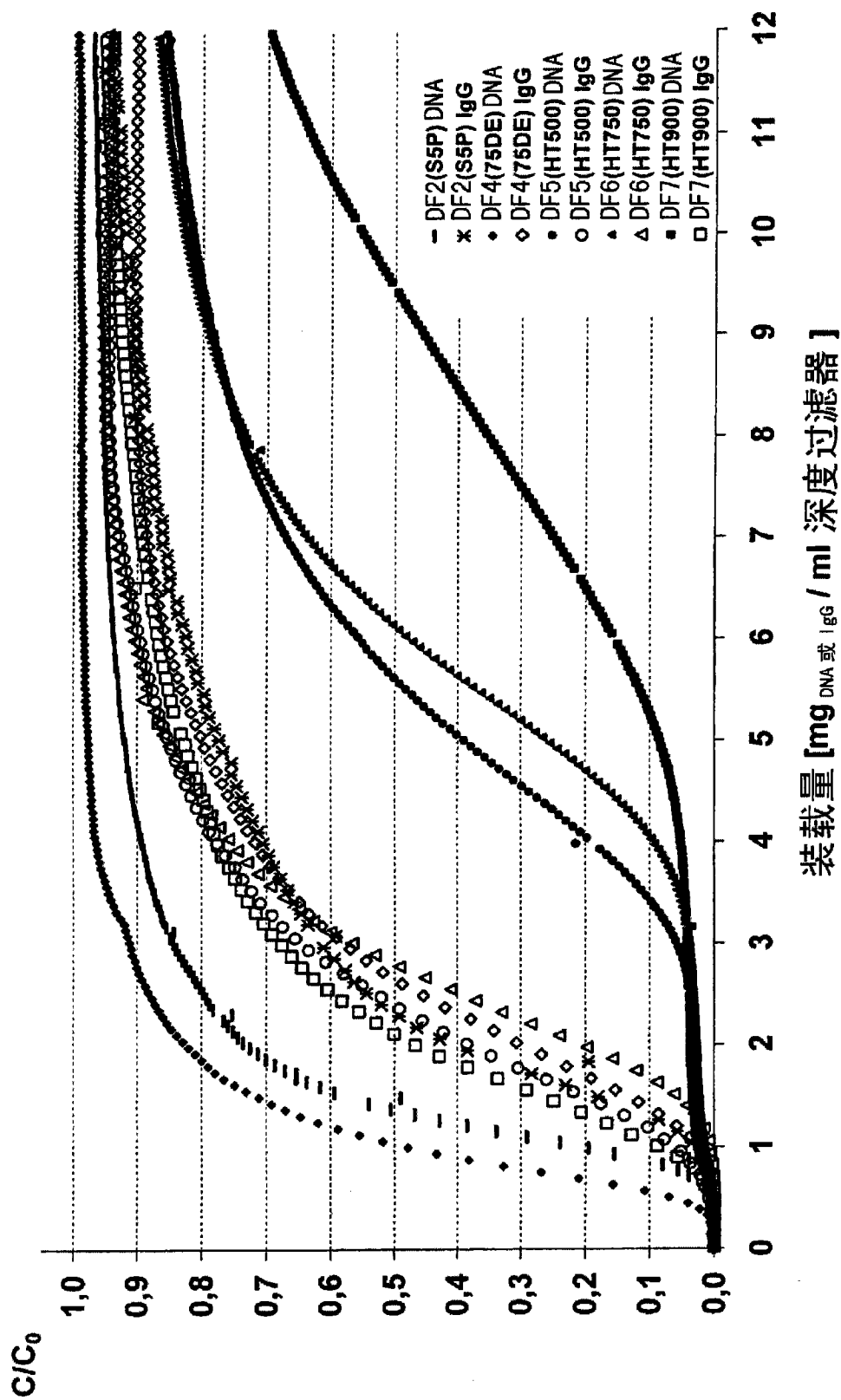


图 6