



(10) 授权公告号 CN 112867729 B

(45) 授权公告日 2024.11.15

(21) 申请号 201980068304.2

(22) 申请日 2019.10.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112867729 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(30) 优先权数据
18201032.2 2018.10.17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/078139 2019.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/079108 EN 2020.04.23

(73) 专利权人 德国杰特贝林生物制品有限公司
地址 德国马尔堡

(72) 发明人 A·科尔尼洛娃 H·N·维尔卡

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 谭玮

(51) Int.Cl.
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

(56) 对比文件
US 5030578 A, 1991.07.09
纪德铭. 人C1酯酶抑制剂制备工艺及检测方法的优化. 武汉生物制品研究所. 2021, 第2卷(第1期), 1-80.

审查员 王鹏

权利要求书2页 说明书16页 附图11页

(54) 发明名称

用于纯化C1-INH的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于纯化C1-酯酶抑制剂(C1-INH), 且更特别的C1-INH浓缩物的方法。

1. 使用疏水相互作用色谱法用于纯化C1-INH的方法,其包括以下步骤:
 - (i) 在其中C1-INH结合到固定相的第一条件下,将含有溶解在其中的C1-INH的溶液装载在包含固定相的疏水相互作用色谱柱上,
 - (ii) 应用第二条件,以便借助于流动相洗脱C1-INH,
其特征在于
- 第一条件是流动相包含第一浓度的抗离子盐,所述抗离子盐是硫酸铵,所述第一浓度在1至2M之间,其中C1-INH结合到固定相,和
- 第二条件是流动相包含第二浓度的抗离子盐,所述抗离子盐是硫酸铵,所述第二浓度低于第一浓度,其中C1-INH被洗脱,
其中所述C1-INH是从血浆中衍生的C1-INH,且
其中所述固定相是被苯基取代的选自以下基质物质中的一种或多种:琼脂糖,交联琼脂糖,亲水聚合物。
2. 根据权利要求1的方法,其中借助于浓度梯度或借助于梯级洗脱实现从第一浓度到第二浓度的转变。
3. 根据权利要求1的方法,其中所述亲水聚合物是聚甲基丙烯酸酯。
4. 根据权利要求1的方法,其中所述固定相是被苯基取代的交联琼脂糖。
5. 根据权利要求2的方法,其中所述亲水聚合物是聚甲基丙烯酸酯。
6. 根据权利要求1的方法,其中所述固定相是苯基取代的**Sepharose®**凝胶。
7. 根据权利要求1的方法,其中所述第一浓度高于在1.1M至1.4M的范围中的浓度X,并且其中所述第二浓度低于浓度X。
8. 根据权利要求7的方法,其中所述第一浓度高于在155至180mg/ml硫酸铵的范围中的浓度X。
9. 根据权利要求7的方法,其中所述第一浓度在1.2M至1.3M的范围中。
10. 根据权利要求7的方法,其中所述第一浓度高于在160至174mg/ml硫酸铵的范围中的浓度X。
11. 根据权利要求1的方法,其中所述第一浓度高于在0.9M至1.0M的范围中的浓度X,并且其中所述第二浓度低于浓度X。
12. 根据权利要求11的方法,其中所述第一浓度高于在124至131mg/ml的范围中的浓度X。
13. 根据权利要求1的方法,其中所述固定相是GE医疗出售的**Phenyl-HP®**或Capto-Phenyl **ImpRes®**或东曹出售的**Phenyl-650M®**或**Phenyl-600M®**。
14. 根据权利要求4的方法,其中所述第一浓度高于在1.1M至1.4M的范围中的浓度X,并且其中所述第二浓度低于浓度X。
15. 根据权利要求14的方法,所述第一浓度高于在155至180mg/ml硫酸铵的范围中的浓度X。
16. 根据权利要求13的方法,所述第一浓度在1.2M至1.3M的范围中。
17. 根据权利要求13的方法,所述第一浓度高于在160至174mg/ml硫酸铵的范围中的浓度X。

18. 根据权利要求1至17中任一项的方法,其中所述第一浓度在1.3M至1.6M之间。
19. 根据权利要求18的方法,所述第一浓度在1.3M至1.4M之间。
20. 根据权利要求18的方法,所述第一浓度为1.32M。
21. 根据权利要求1至17和19至20中任一项的方法,其中所述血浆是人血浆。
22. 根据权利要求1至17和19至20中任一项中任一项的方法,其中通过涉及用沉淀剂分步沉淀的方法获得用作起始物料的C1-INH浓缩物。
23. 根据权利要求22的方法,其中所述分步沉淀确实涉及C1-INH的沉淀,并且其中所述C1-INH被溶解在含有低于C1-INH的沉淀所需的浓度的所述沉淀剂的溶液中。
24. 根据权利要求22的方法,其中所述分步沉淀不涉及C1-INH的沉淀,并且其中所述C1-INH被包含在含有低于C1-INH的沉淀所需的浓度的所述沉淀剂的上清液内。
25. 根据权利要求1至17、19至20和23至24中任一项的方法,其中在6至9的范围中的pH进行所述方法。
26. 根据权利要求1至17、19至20和23至24中任一项的方法,其中在6.8至8.5的范围中的pH进行所述方法。
27. 根据权利要求1至17、19至20和23至24中任一项的方法,其中在7至7.5的范围中的pH进行所述方法。
28. 根据权利要求1至17、19至20和23至24中任一项的方法,其中在7.2的pH进行所述方法。
29. 根据权利要求1至17、19至20和23至24中任一项的方法,其中所述第二浓度在0.0和1.4M之间。

用于纯化C1-INH的方法

[0001] 本发明涉及用于纯化C1-酯酶抑制剂(C1-INH),且更特别的C1-INH浓缩物的方法。

[0002] C1-INH(补体激活途径的蛋白质)是存在于血浆中蛋白酶的抑制剂,其通过与活化的C1r和C1s形成共价复合物来控制C1-活化。它还“控制”重要的凝血酶,诸如血浆前激肽释放酶,因子XI和XII,以及纤维蛋白溶酶。

[0003] C1-INH缺乏(deficiency)例如与遗传性血管性水肿(HAE)有关,所述遗传性血管性水肿(HAE)是由缺乏C1-INH(I型HAE)或C1-INH活性降低(II型HAE)引起的。C1-INH缺乏也可能是由C1-INH的消耗引起的(所述C1-INH的消耗是由于当诸如在心肺机中血液接触表面时产生的酶的中和),以及在引发凝血级联的疾病过程中,诸如出现在慢性、特别是风湿性障碍的情况下的免疫复合物。当前,在预防或治疗急性HAE中必须将C1-INH蛋白替代视为金标准。对于市售的人血浆衍生的C1-INH特别是如此,据报道其具有比在转基因兔中生产的与人C1-INH蛋白不相同的市售重组C1-INH更自然的功能(Feussner等人,Transfusion 2014Oct;54(10):2566-73)。已经考虑的其他治疗应用包括C1-INH在预防,降低和/或治疗缺血再灌注损伤中的用途(参见WO 2007/073186)。

[0004] 从人血浆中分离和/或纯化C1-INH是已知的,但是或多或少是昂贵的,并且特别是最经常是非常耗时的方法。许多现有技术的方法(诸如例如在Haupt等人, Eur.J.Biochem.1970;17:254-261;Reboul等人,FEBS Letters 1977;79(1):45-50中描述的方法)太复杂,与收率不足有关,和/或花费太长时间以致不能适应技术规模。其他现有技术方法(诸如例如Vogelaar等人.Vox Sang 1974;26:118-127描述的方法)具有其他缺点。

[0005] 提出的用于从血浆中产生C1-INH的不同方法包括各种分离方法,诸如亲和色谱法,阳离子交换色谱法,阴离子交换色谱法,凝胶过滤,沉淀和疏水相互作用色谱法。单独使用这些方法中的任一种通常不足以充分地纯化C1-INH,且特别是C1-INH浓缩物,因此在现有技术中已经提出了它们的各种组合。

[0006] EP 0 698 616 B描述了使用阴离子交换色谱法,接着是阳离子交换色谱法。EP 0 101 935 B描述了沉淀步骤和以负模式的疏水相互作用色谱法的组合,以约20%的收率得到90%纯的C1-INH制备物(preparation)。US 5 030 578描述了PEG沉淀和穿过木菠萝凝集素(jacalin)-琼脂糖的色谱法以及以负模式的疏水相互作用色谱法。WO 01/46219描述了涉及第一和第二阴离子交换的方法。

[0007] 如今,有四种市售的C1-INH浓缩物用于治疗血管性水肿,其中三种是血浆衍生的。这些血浆衍生的C1-INH浓缩物中的一种以商标**Berinert**[®]出售。这些C1-INH浓缩物是根据不同的专有方法制备的,其中制备**Berinert**[®]的方法涉及疏水相互作用色谱法(HIC)的步骤,但以负模式进行(参见在Feussner等人,Transfusion 2014Oct;54(10):2566-73中)。

[0008] 更一般地说,HIC基于分子的疏水性分离分子,并且被用于纯化蛋白质,同时保持生物活性。在高盐缓冲液中,将分子(且特别是除去(disposing of)疏水和亲水区域的蛋白质)应用到HIC柱上。缓冲液中的盐降低样品溶质的溶剂化。随着溶剂化的减少,变得暴露的疏水区域被介质吸附,或被固定相保留和/或被结合到固定相。分子越疏水,促进结合所需的盐就越少。然后通常使用递减的盐梯度从柱中洗脱样品,以便增加疏水性。关于分子通过

首先将分子结合到固定相然后洗脱它以使用HIC的这种模式在下文中将被称为“正模式”。

[0009] 然而,在C1-INH的特定情况下,尚未以这种方式使用HIC,即,未以“正”或“结合”模式使用HIC。这是因为在C1-INH的情况下,已经描述了HIC利用C1-INH的显著亲水性。其中其他蛋白质被保留在(疏水)柱上,而C1-INH被保留在流动相中。在下文中,使用HIC纯化C1-INH的这种现有技术将被称为“负”或“流动通过(flow through)”模式。以流动通过模式的HIC是现有技术如何使用HIC用于纯化C1-INH。发明人不知道以不同方式使用HIC用于纯化C1-INH的任何描述。例如,流动通过被描述为EP 0 101 935的发明的核心。US 5 030 578也描述了在C1-INH不被柱保留(流动通过模式)的条件下的HIC,参考Nilsson和Wiman, *Biochimica et Biophysica Acta* 1982;705(2):271-276在该上下文中也描述了以流动通过模式的HIC。且最近,Kumar等人, *J. Bioprocess Biotech* 2014;4(6) (DOI:10.4172/2155-9821.1000174) 也描述了C1-INH的中间纯化步骤,其涉及以流动通过或负模式的HIC:作者认为0.8M硫酸铵浓度是在流动通过级分中得到纯化的C1-INH并将它从其他血浆蛋白中分离的最佳条件。如此获得的C1-INH浓缩物需要进一步纯化。

[0010] 根据上述现有技术,可以以不同的方式获得用于HIC纯化C1-INH的起始物料(starting material),涉及诸如低温沉淀,离子交换色谱法,分步沉淀和/或其组合的步骤,其中已知分步沉淀被用在技术或工业规模上,即在**Berinert®**的制备中(其中硫酸铵沉淀在HIC之前,参见Feussner等人, *Transfusion* 2014Oct;54(10):2566-73)。根据EP 0 101 935,使用液体硫酸铵作为沉淀剂进行分步沉淀,直到溶液包含60%硫酸铵。此后,将沉淀的C1-INH用含有沉淀剂(在这种情况下为硫酸铵)的水溶液以C1-INH不沉淀的浓度溶解。尽管此方法已经达到技术规模,但是它仍需要重要的资源,例如:以时间、空间和物质的形式。

[0011] 人血浆通常难以实现以足够的量来满足现存需求。因此,最重要的是实现用更有效,且特别是耗时更少的方法,以帮助确保其最佳使用。因此,本发明旨在提供使用疏水相互作用色谱法用于纯化C1-INH的更有效且耗时更少的方法。

[0012] 通过使用疏水相互作用色谱法(HIC)用于纯化C1-INH的方法解决了上述问题,该方法包括以下步骤:

[0013] (i) 在其中C1-INH结合到固定相的第一条件下,将含有溶解在其中的C1-INH的溶液装载在包含固定相的疏水作用色谱柱上,

[0014] (ii) 应用第二条件,以便借助于流动相洗脱C1-INH。

[0015] 鉴于现有技术,相当令人惊讶地是,发明人已经发现,在HIC中将C1-INH结合到固定相能够节约相当大量的时间和物质。首先,以正或结合模式使用的HIC柱可能以比流动通过或负模式使用以纯化C1-INH的实质上相同体积的HIC柱实质上更大量装载含有C1-INH的起始物料(发明人发现多达约4倍(更多))。因此,需要较少的固定相物质,导致节约了柱物质和空间,并且当然需要较少的要运行通过柱的含有C1-INH的水溶液的体积。可替代地,可以将较大体积的含C1-INH的起始物料装载在现存尺寸的柱上,引起节省时间的方法。其次,结合C1-INH能够在从柱上洗脱C1-INH之前洗涤结合的C1-INH。第三,与以流动通过或负模式的HIC相比,以结合模式或正模式的HIC能够使用高流速,并因此以快得多的时间纯化C1-INH,其中C1-INH与HIC柱的固定相相互作用却不结合到固定相,即,需要时间用于以缓慢的流速沿着相对长的柱分离。

[0016] 除此之外,发明人已经发现,当用通过使用硫酸铵分步沉淀获得的溶液工作时,在根据本发明以结合或正模式使用HIC纯化之前借助于分步沉淀的初始物料(initial material)浓缩变得不必要,所述初始物料浓缩包括使用60%硫酸铵沉淀C1-INH并在包含沉淀剂硫酸铵的水溶液中溶解C1-INH。为了有效的C1-INH纯化,需要此初始物料浓缩步骤用于以负模式的现有技术HIC使用。然而,根据本发明,在没有质量损失的情况下可以直接使用较早的沉淀步骤的仅包含40%硫酸铵的滤液,这通过在另外建立且易于理解的方法中节省甚至更多的时间、物质和空间而又导致了更有效的制备方法。

[0017] 本发明使用“含有溶解在其中的C1-INH的溶液”,而不是C1-INH从中沉淀的溶液。换句话说,这指必须选择第一条件,以避免蛋白质沉淀的出现。

[0018] 在本发明的上下文中,“结合”到固定相应被理解为指在不影响C1-INH的结构完整性的情况下被固定相吸附或被保留在固定相上,优选不通过共价键或化学吸附,而是通过物理吸附。

[0019] 所述固定相是基质物质,诸如例如琼脂糖,交联琼脂糖(以各种商品名出售,诸如**Sepharose®**),亲水聚合物,例如聚甲基丙烯酸酯,其被诸如以下的疏水配体分别取代

[0020] -直链烷基,例如乙基,丁基,辛基,

[0021] -分枝的烷基(ramified alkyl),例如叔丁基

[0022] -芳基,例如苯基,或

[0023] -环烷基,例如己基

[0024] 优选的基质物质是被丁基或苯基取代的那些,更优选被丁基或苯基,最优选被苯基取代的交联琼脂糖。基质物质可以以各种形式存在,诸如珠,或者以棒、膜、丸粒等形式存在。还已知以珠形式用于包括HIC的各种类型的色谱法的交联琼脂糖,其商品名是**Sepharose®**,其中各种级别和化学是可得的。基质物质的特别优选类型是Phenyl **Sepharoses®**。市售基质物质的示例是以以下名称出售的疏水相互作用色谱法介质:全部由GE医疗(GE Healthcare)出售的Capto™ Octyl, Capto™ Butyl, Capto™ Phenyl(高取代(sub)), Octyl **Sepharose®**4Fast Flow, Butyl **Sepharose®**4Fast Flow, Butyl-S **Sepharose®**6Fast Flow, Phenyl **Sepharose®**6Fast **Flow®**(低取代), Phenyl **Sepharose®**6Fast **Flow®**(高取代), Butyl **Sepharose®**High Performance, HiScreen™ Capto™ Butyl HP, Phenyl Sepharose High **Performance®**;都由BIO-RAD出售的Macro-Prep **Methyl®**, Macro-Prep **t-Butyl®**;或全部由东曹(Tosoh)出售的**Toyopearl®** Ether-650S, **Toyopearl®** Ether-650M, **Toyopearl®** PPG-600M®, **Toyopearl®** Phenyl-650S, **Toyopearl®** Phenyl-650M, **Toyopearl®** Phenyl-650C, **Toyopearl®** Phenyl-600M, **Toyopearl®** Butyl-650S, **Toyopearl®** Butyl-650M, **Toyopearl®** Butyl-650C, **Toyopearl®** Butyl-600M, **Toyopearl®** SuperButyl-550C, **Toyopearl®** Hexyl-650C, **TSKgel®** Ether-5PW(20), **TSKgel®** Ether-5PW(30), **TSKgel®** Phenyl-5PW(20), **TSKgel®** Phenyl-5PW(30)。在上述市售基质物质中,Phenyl **Sepharose®**6Fast Flow(低取代)和HiScreen™ Capto™ Butyl HP是特别优选的,其中

前者比后者更优选。

[0025] 第一条件是促进C1-INH的疏水部分结合到固定相的条件,优选在存在下述的条件下或通过向含有C1-INH的溶液中添加一种或多种特定盐。

[0026] 第二条件是允许用于从固定相洗脱C1-INH并因此在洗脱液中收集纯化的C1-INH的条件。存在几种类型的洗脱,例如,用包含逐步减少的盐浓度,连续减少的盐浓度的洗脱缓冲液洗脱,使用pH梯度洗脱,使用温度梯度洗脱,或其组合。还存在其他类型的洗脱,其中使用极性比水小的溶剂作为洗脱缓冲液,例如,包含乙醇、PEG、2-丙醇等的水溶液。也可以使用钙螯合化合物(诸如EDTA,柠檬酸盐,丙二酸盐等)的梯度作为洗脱缓冲液。

[0027] 优选地,第一条件是流动相包含第一浓度的抗离液盐(anti-chaotropic salt),优选硫酸钠或硫酸铵,最优选硫酸铵,在此条件下C1-INH结合到固定相,且第二条件是流动相包含以第二浓度的抗离液盐,优选硫酸钠或硫酸铵,最优选硫酸铵,在此条件下C1-INH洗脱。硫酸铵,且特别是硫酸铵为在HIC中常用的、可靠的、和特别是公认的抗离液盐,且因此是优选的。

[0028] 可以被添加的硫酸铵的浓度取决于样品的蛋白质浓度。蛋白质浓度越高,样品中可能的硫酸铵浓度越低,即,蛋白质沉淀开始出现的硫酸铵浓度越低。样品稀释使其可能添加更大量的硫酸铵。当使用硫酸铵作为抗离液盐时,最佳蛋白质浓度在0.1至3mg/mL蛋白质的范围中。当使用除硫酸铵以外的抗离液盐时,可以应用其它浓度范围。

[0029] 可以借助于浓度梯度或借助于梯级洗脱(step elution)实现从第一浓度到第二浓度的转变,其中优选梯级洗脱,因为梯级洗脱具有节省时间的优点并且在大规模制备方法中更易于实施。如本文所使用的梯级洗脱意指从第一浓度到第二浓度的突然转变,而不是如在浓度梯度中的连续转变(其中浓度逐渐被降低)。

[0030] 具体的第一和第二浓度取决于环境,即所使用的固定相的类型、pH、盐等。不希望受限于以下数字(其仅作为示例),例如,第一浓度可以位于1至2M之间的某处,且第二浓度低于第一浓度,例如在0.0和1.4M之间。

[0031] 当使用苯基取代的**Sepharose®**凝胶(诸如GE医疗的Phenyl **Sepharose®** 6Fast Flow(低取代))作为固定相,并使用硫酸铵作为离液盐时,第一浓度优选高于在约1.1M至约1.4M的范围中的浓度X(例如,高于在约155至约180mg/ml硫酸铵的范围中的浓度X),优选高于在约1.2M至约1.3M的范围中的浓度X(例如,高于在约160至约174mg/ml的范围中的浓度X),并且第二浓度低于浓度X。

[0032] 当使用丁基取代的**Sepharose®**凝胶(诸如GE医疗的HiScreen™ Capto™ Butyl HP)作为固定相,并使用硫酸铵作为离液盐时,第一浓度优选高于在约0.9M至约1.0M的范围中的浓度X(例如,在约124至约131mg/ml的范围中的浓度X),并且优选硫酸铵的第二浓度低于浓度X。

[0033] 当使用由GE医疗出售的**Phenyl-HP®**或Capto Phenyl **ImpRes®**或由东曹出售的**Phenyl-650M®**或**Phenyl-600M®**作为固定相,并使用硫酸铵作为离液盐时,第一浓度优选高于在约0.9M至约1.0M的范围中的浓度X(例如,在约124至约131mg/ml的范围中的浓度X),并且优选硫酸铵的第二浓度低于浓度X。

[0034] 当使用不同的硫酸铵浓度作为第一条件和第二条件时,优选第一浓度为约181mg/

ml (1.37M), 和/或第二浓度低至足以从固定相中洗脱C1-INH。

[0035] 尽管可以用不同的含有C1-INH的起始物料进行本发明,但优选的是通过涉及用沉淀剂分步沉淀的方法获得用作起始物料的C1-INH浓缩物。

[0036] 当通过涉及用沉淀剂分步沉淀的方法获得用作起始物料的C1-INH浓缩物时,分步沉淀可以 (i) 涉及C1-INH的沉淀并将沉淀的C1-INH溶解在含有低于C1-INH的沉淀所需的浓度的沉淀剂的溶液中,或者 (ii) 通过提供其中C1-INH被包含在含有低于C1-INH的沉淀所需的浓度的用于分步沉淀的沉淀剂的上清液中的起始物料,不涉及C1-INH的沉淀,其中替代方案 (ii) 是优选的。

[0037] 优选地,在6至9,优选6.8至8.5,更优选7至7.5的范围中的pH,和甚至更优选在约7.2的pH进行根据本发明的方法。

[0038] 尽管原则上根据本发明的发明方法也可以被用于纯化以不同方式生产的C1-INH,但是优选的是,用重组C1-INH、转基因C1-INH或从血浆、优选人血浆中衍生的C1-INH进行该方法。

[0039] 可以以柱或以分批形式进行根据本发明的方法。

[0040] 在下文中,将借助于附图和实施例更详细地描述本发明,其中附图描绘了以下内容:

[0041] 图1:在正常装载(“单装载”)下以流动通过或负模式进行的HIC的色谱图;

[0042] 图2:在比现有技术中使用的装载更高的装载(“双装载”)下以流动通过或负模式进行的HIC的色谱图;

[0043] 图3:各种HIC实验的洗脱液级分样品的电泳凝胶,包括根据现有技术的实验、比较实施例和根据本发明的实验;

[0044] 图4:各种HIC实验的洗脱液级分样品的电泳凝胶,以比较在根据现有技术的HIC中的单和双装载;

[0045] 图5:根据本发明的另一HIC实验的洗脱液级分样品的电泳凝胶;

[0046] 图6:将样品电导率与沉淀剂浓度相关的标准曲线;

[0047] 图7-11:根据现有技术和根据本发明进行的HIC的各种色谱图。

[0048] 在本发明的上下文中,应用以下定义:

[0049] 在权利要求书中和在本发明的说明书中,“C1-INH”和“C1-INH浓缩物”同时被用于表示含有蛋白质C1-酯酶抑制剂的浓缩物和含有蛋白质C1-酯酶抑制剂的液体浓缩物。当提及技术背景和/或现有技术时,“C1-INH”也可以指这样的蛋白质,如例如在讨论C1-INH缺乏的上下文中的那些。

[0050] 在整个本申请/专利中

[0051] -“HIC”代表疏水相互作用色谱法;

[0052] -“负模式”或“流动通过模式”或“流动通过”HIC表示在C1-INH不结合到HIC柱的固定相的条件下进行HIC的方式;

[0053] -“结合模式”,“结合和洗脱”或“正模式”表示首先在C1-INH结合到HIC柱的固定相的条件下,然后在从HIC柱的固定相洗脱C1-INH的条件下进行的HIC;

[0054] -“结合到固定相”意指在不影响C1-INH的结构完整性的情况下被固定相吸附或被保留在固定相上,优选不通过共价键或化学吸附,而是通过物理吸附;

[0055] -“WFI”指“注射用水”；

[0056] -当使用苯基取代的**Sepharose®**作为色谱基质时,且当使用C1-INH浓缩物作为起始物料时,所述C1-INH浓缩物是通过分步沉淀和C1-INH的再溶解产生的(如在现有技术EP 0 101 935中所描述),“单装载”表示通常的装载,且在本上下文中更特别的是基本上最大的装载,在该装载下,当以流动通过模式进行时,借助于HIC的令人满意的C1-INH纯化出现,其中这样通常的“单装载”可能会取决于环境而变化,例如所使用的起始物料,所使用的色谱基质等,且其中这样通常的“单装载”具有约6至9,优选约7至8,且最优选约7.5mg蛋白质/ml色谱凝胶的数值;

[0057] -“双装载”表示双倍或2倍量的单装载,在本上下文中,更特别的是当以流动通过模式进行时在此装载借助于HIC的C1-Inh的纯化不再令人满意的装载;

[0058] -“浓度梯度”表示在溶液中所溶解的物质的浓度从较高浓度到较低浓度的逐渐变化,

[0059] -“梯级洗脱”指从第一到第二浓度的突然转变,而不是如在浓度梯度中那样连续转变(其中浓度逐渐被降低);

[0060] -除非另有说明,否则“%”指“重量%”;

[0061] -“沉淀剂”是触发蛋白质沉淀的试剂;沉淀剂还可以用作抗离液剂或盐;

[0062] -如本文所使用的“抗离液剂”或“抗离液盐”意指一种或多种能够使C1-INH在水溶液中如此疏水以至其将结合到固定相的盐;

[0063] -“洗脱液级分”表示从色谱柱中流出的流动相流的级分,而与其中所包含的特定分析物是(如在如本文所描述的正模式中)否(如在如本文所描述的负模式中)事先被结合到固定相或被固定相保留无关。

[0064] 在下文中,将通过参考附图更详细地解释本发明。

[0065] 图1和2分别是使用根据现有技术通过分步沉淀获得的C1-INH浓缩物,即使用被沉淀然后被再溶解作为起始物料的C1-INH的负模式HIC的色谱图。图1显示了如在现有技术中使用的“单装载”的色谱图,而图2显示了用于比较的“双装载”的色谱图。在色谱图中的第一个峰(分别在200ml洗脱液处开始)分别代表含有C1-INH的流动通过级分。从图1中可以看出,第一峰是相当尖的单峰,其基本上不与其他峰重叠,而从图2中可以看出,第一峰实际上由几个重叠峰组成。同样,第一重叠峰在其末端与随后的,比图1所示单装载实验中的单尖峰大得多的峰在更高的程度相重叠。这表明以流动通过或负模式使用HIC用于纯化C1-INH的“单装载”不能在有关于纯度方面的缺点下被加倍。因此,图1和2说明了在本发明上下文中“单装载”和“双装载”应理解为:单装载是含有C1-INH的起始物料的装载,其引起归因于C1-INH的基本上单峰,所述单峰基本上不与色谱图中的其他峰重叠,并因此能够在根据现有技术(即以流动通过或负模式)进行的HIC中获得基本上纯的C1-INH洗脱液,其中在其它基本上相同的条件下,相同起始物料的双装载不会引起归因于C1-INH的基本上不与色谱图中的其他峰重叠的基本上单峰,即其中与单装载相比,在关于所需的C1-INH洗脱液的纯度基本上没有质量损失的情况下,双装载不能够成比例增加。

[0066] 图3是来自HIC实验均使用C1-INH浓缩物作为起始物料的各种含有C1-INH的HIC洗脱液级分的样品的SDS-PAGE凝胶(Tris-甘氨酸凝胶,1.5mm厚,梯度8-16%,最大电压150V,运行时间:90min),如在现有技术EP 0 101 935中所描述的通过C1-INH的分步沉淀和再溶

解产生所述C1-INH浓缩物。为了允许用于更好的比较,装载在凝胶上的样品包含大约相同量的蛋白质。

[0067] 在图3中所代表的凝胶中,泳道3是用作起始物料的C1-INH浓缩物。可以看出,起始物料含有其他较高和较低分子量的蛋白质。泳道4是来自**Beriner**[®]制备方法(即来自根据现有技术的工业规模方法)的HIC的含有C1-INH的洗脱液级分。在泳道4中强度最高的条带是C1-INH,重量大约105kD。可以清楚地看出,在该级分中不能检测到高分子量组分。

[0068] 泳道5和7是以流动通过的HIC实验的含有C1-INH的洗脱液级分。泳道5的样品来自单装载实验,而泳道7的样品来自双装载实验。在起始物料(泳道3)中,在**Beriner**[®]生产样品(泳道4)中以及在分别的单装载和双装载流动通过样品(泳道5、7)中都可以检测到高分子量杂质。图3中的框突出显示了在泳道3、4、5、7中归因于高分子量杂质的条带。在泳道4和5中归因于高分子量杂质的条带相对弱,在泳道3和7中较为明显。从泳道7中可以清楚地看到,双装载洗脱液级分含有比在单装载洗脱液级分(参见泳道5)中和在来自**Beriner**[®]制备方法的洗脱液级分(参见泳道4)中检测到的更多的高分子量杂质。通过用来自不同血浆制剂的起始物料进行进一步的实验,证实了该发现,其结果被显示在下面进一步讨论的图4中。这清楚地显示,根据现有技术以流动通过或负模式进行HIC在没有质量损失的情况下关于能够纯化C1-INH浓缩物的柱的最大装载方面受到限制。在这些实验中所使用的单装载对应于7.5mg蛋白质/ml色谱凝胶的装载。

[0069] 在图3中的泳道6和8是根据本发明的HIC实验的含有C1-INH的洗脱液级分,即其中以结合和洗脱或正模式进行HIC。在图3中泳道6的洗脱液级分来自单装载实验,而在图3中泳道8的洗脱液级分来自双装载实验(使用15mg蛋白/ml色谱凝胶)。凝胶显示,当已经应用双装载到柱时,也不能在相应的洗脱液级分中检测到具有重量高于C1-INH的重量(即高于105kD)的杂质(参见在图3中的泳道8)。

[0070] 因此,在图3中的泳道6证明,根据本发明的HIC提供了可行的替代解决方案,以摆脱(get rid of)在C1-INH浓缩物中的高分子量杂质,从而产生了具有比现有技术更少的高分子量杂质的产物。无论如何,泳道8证明,与现有技术相比,根据本发明的HIC在基本上没有质量损失的情况下能够得到C1-INH浓缩物的纯化的柱的最大装载方面受到的限制较小。换句话说:发明人可以显示,通过使用根据本发明的正或结合模式,在没有纯化方面的缺点的情况下能够得到C1-INH浓缩物的纯化的柱的最大装载至少可以被加倍,否则当根据现有技术以负或流动通过模式使用HIC时,所述纯化方面的缺点是不可避免。

[0071] 图4是用来自根据现有技术的HIC实验(即以流动通过或负模式)使用C1-INH浓缩物作为起始物料的各种含有C1-INH的HIC洗脱液级分的样品的SDS-PAGE凝胶(Tris-甘氨酸凝胶,1.5mm厚,梯度8-16%,最大电压150V,运行时间:90分钟),如在现有技术EP 0 101 935中所描述的通过C1-INH的分步沉淀和再溶解产生所述C1-INH浓缩物。为了允许用于更好的比较,装载在凝胶上的样品包含大约相同量的蛋白质。在图4的凝胶中,泳道1是标记物,泳道6和9分别是来自不同负载量(charge)的**Beriner**[®]最终产品样品,而泳道10是典型起始物料样品。泳道2、4和7代表用单装载进行的HIC的洗脱液级分,而泳道3、5和8代表用双装载(即两倍量的含C1-INH的起始物料)进行的HIC的洗脱液级分。在每个样品中都检测到高分子量杂质,包括最终产品样品(参见在图4中的泳道6、9),其中很难在后者中检测到杂质。单和双装载样品的条带强度的比较表明,双装载样品比单装载样品含有更多的高

分子量杂质。换句话说,在图4中的凝胶提供了在根据现有技术的方法的局限性方面的进一步证据,该局限性是在允许用于纯化C1-INH浓缩物的最大装载方面的局限性。

[0072] 发明人相信,通过使用本发明能够在基本上没有质量损失的情况下纯化C1-INH浓缩物的柱的最大装载最终受到色谱基质的含有C1-INH的起始物料装载能力的限制,直到基质开始松开(loose)C1-INH。在Phenyl **Sepharose**[®]的情况下,发现当使用含有C1-INH的起始物料(由含有40%硫酸铵的沉淀级分的上清液或滤液组成)时,柱的装载量为单装载的约4倍或甚至4.4倍,所述单装载为以流动通过(根据现有技术)应用的含有C1-INH的起始物料(由再溶解的60%硫酸铵沉淀物组成)以能够得到纯化的C1-INH浓缩物的单装载。因此,在工业规模上,装载原则上不仅可以与现有技术相比被加倍,而且甚至可以是当前使用的装载的两倍多。这指由于本发明的确可以实现在柱体积和/或固定相物质方面的重要节约,并且在没有任何质量损失的情况下实现这些。

[0073] 发明人还发现,与以流动通过或负模式使用HIC相比,可以以高得多的流速进行根据本发明的方法以在没有任何质量损失的情况下得到所需的纯化的浓缩物。节约是相当重要的:虽然以目前在**Beriner**[®]方法中使用的规模运行的常规HIC通常花费42.6小时,但是当使用单装载时,可以在短短6小时内进行使用本发明的优化运行,削减了HIC方法步骤,并从而将整个方法时间削减了36.6小时。当使用双装载时,可以在6.6小时内进行运行,并且使用双装载的能力可以将整个方法时间削减多达78.6小时。

[0074] 图5是来自HIC实验的含有C1-INH的洗脱液级分的SDS-PAGE凝胶(Tris-甘氨酸凝胶,1.5mm厚,梯度8-16%,最大电压150V,最大安培数35mA,运行时间:90min),其中起始物料是通过分步沉淀产生的沉淀物,其沉淀剂浓度低于沉淀C1-INH所需的浓度,即,在没有如在现有技术中沉淀C1-INH的情况下,即含有40%硫酸铵的沉淀级分的上清液或滤液。最强的条带还是C1-INH,在这里也无法检测到更高分子量的组分。这是显著的,因为40%硫酸铵沉淀物的上清液或滤液比如在现有技术中从60%硫酸铵沉淀物中产生的溶液包含更多的杂质。这也意味着根据本发明的方法具有额外的优点,使得能够在没有在进行HIC纯化之前在分步沉淀中沉淀C1-INH并且再溶解它的情况下进行现有技术的方法。

[0075] 因此,发明人还发现,所要求保护的方法通过省略在HIC之前的在分步沉淀中沉淀C1-INH以及再溶解C1-INH,可以甚至更削减方法时间。这样能够节省另外9.2个小时,因此否则需要所述另外9.2个小时。因此,根据本发明的方法能够节省甚至更多的方法时间,即当运行单装载时节省45.8小时,而当运行用双装载的方法时节省甚至多达97小时。

[0076] 如上所讨论,发明人相信,通过使用本发明,在基本上没有质量损失的情况下能够纯化C1-INH浓缩物的柱的最大装载仅受柱的含有C1-INH的起始物料结合能力的限制,并且因此,与现有技术相比,装载不仅可以被加倍,而且甚至可以是当前使用装载的两倍多。这意味着,由于本发明,原则上可以实现在没有质量损失的情况下在柱体积和/或固定相物质和/或时间方面的比上述讨论甚至更重要的节约,同时甚至在工业规模上同时可能获得纯度的改善。

[0077] 图6显示了样品电导率与沉淀剂浓度相关的标准曲线。使用抗离液盐作为沉淀剂,且主要是硫酸钠或硫酸铵,其中后者是优选的。在缓冲溶液中盐的浓度可以与其电导率相关,如在图6所显示,并在下面的实验部分中更详细地讨论。这样就能够对用于沉淀剂(更确切的说抗离液盐)浓度的相应的样品进行适当的分析。

[0078] 图7至图11是从根据现有技术和根据本发明的HIC中获得的色谱图,其中横坐标轴分别表示以ml为单位的离开柱的洗脱液体积,纵坐标左轴表示以mS/cm为单位的电导率,且纵坐标右轴表示以mAU为单位的吸光度。电导率可以借助于如上解释所确定的相关系数直接被联系到洗脱液的硫酸铵浓度。

[0079] 图7是由根据现有技术的HIC产生的色谱图。起始物料为血浆衍生的含有C1-INH的浓缩物,其是如在EP 0 101 935中所描述的通过分步沉淀和沉淀物的溶解来产生。硫酸铵浓度在一段时间内保持恒定在约106mg/ml。该浓度太低,无法通过固定相保留C1-INH。在约50ml洗脱液体积处看到含有C1-INH的峰。在500ml洗脱液体积周围,可以看到在初始硫酸铵浓度下,结合到柱的除C1-INH以外的蛋白质的梯级洗脱。当硫酸铵浓度突然减少时它发生。

[0080] 图8是由根据本发明的HIC产生的色谱图,其中借助于浓度梯度洗脱。起始物料为血浆衍生的含有C1-INH的浓缩物,其是如在EP 0101 935中所描述的通过分步沉淀和沉淀物的溶解来产生。初始硫酸铵浓度足够高,可以将C1-INH保留在固定相上,直到洗脱液的硫酸铵浓度被降低到略低于约160mg/ml。在约270ml洗脱液体积处看到归因于C1-INH的相应峰。

[0081] 图9是由根据本发明的HIC产生的色谱图,其中借助于浓度梯度洗脱。起始物料是血浆衍生的C1-INH浓缩物,其是从用40%硫酸铵分步沉淀的上清液或滤液中获得。溶液的初始硫酸铵浓度足够高,可以将C1-INH保留在固定相上,直到洗脱液的硫酸铵浓度被降低到略低于约160mg/ml。在约270ml洗脱液体积处看到归因于C1-INH的相应峰。

[0082] 图10是由根据本发明的HIC使用梯级洗脱而不是浓度梯度的色谱图。起始物料是血浆衍生的含有C1-INH的浓缩物,其是从用40%硫酸铵分步沉淀的滤液中获得。溶液的初始硫酸铵浓度足够高,可以将C1-INH保留在固定相上,直到洗脱液的硫酸铵浓度突然被降低。

[0083] 图11是由根据本发明的HIC产生的色谱图,其中借助于浓度梯度洗脱。起始物料是根据现有技术的**Beriner**[®]浓缩物。溶液的初始硫酸铵浓度足够高,可以将C1-INH保留在固定相上,直到洗脱液的硫酸铵浓度被降低到略低于约162mg/ml。在约670ml洗脱液体积处看到归因于C1-INH的相应峰。

[0084] 尽管发明人关注改善在前述现有技术中描述的**Beriner**[®]制备方法,但是明显的是,以正模式的HIC也有益于其他C1-INH纯化方法。换句话说,本发明显然不限于被用在EP 0 101 935中描述的方法中或在**Beriner**[®]制备方法中,而且还可以被用在旨在使用先前涉及以流动通过模式的HIC步骤的不同起始物料纯化C1-INH浓缩物的其他方法中,或甚至被用在在未来方法中,所述未来方法被设计以纯化任何来源的C1-INH浓缩物(例如从血浆中获得的浓缩物,或含有从转基因动物中获得的重组C1-INH的C1-INH浓缩物,或通过其他不同方法获得的C1-INH浓缩物)。

实施例

[0085] 物质与方法

[0086] I. 柱A

[0087] 所使用的物质:

[0088] -从血浆中衍生的C1-INH样品,分别为半纯化级分的形式;

[0089] -GE医疗的Phenyl **Sepharose**[®]6Fast Flow (低取代) (在20%乙醇中储存的市售芳香族疏水相互作用色谱法 (HIC) 树脂)

[0090] -硫酸铵缓冲液:

[0091] • 181mg/mL (175292mg/mL) 硫酸铵,

[0092] • 25mM Tris,

[0093] • pH 7.2±0.2

[0094] -tris缓冲液:

[0095] • 25mM Tris

[0096] • pH 7.2±0.2

[0097] -色谱柱,直径:1.6cm (**ÄktaAvant**, GE医疗)

[0098] -紫外分光光度计 (unicorn);

[0099] -电导率计。

[0100] 1. 装载HIC柱A:将储存在20%乙醇中的Phenyl **Sepharose**[®]凝胶用注射用水 (WFI) 洗涤三次。制备用WFI洗涤过的Phenyl **Sepharose**[®]凝胶的70%浆料,并将其放置在色谱柱中。使用WFI和150cm/h的线性流速,将凝胶填充到约18cm (20±5cm) 的凝胶床高度。然后通过注入2.5%的柱体积的5%丙酮 (v/v) 来测试该柱。如果不对称度为0.8-1.8,且理论塔板数≥2800,则通过柱测试。

[0101] 2. 样品制备:使待纯化的血浆C1-INH样品的硫酸铵浓度为181mg/mL (175-292mg/mL),且Tris含量为25mM。可以被添加的硫酸铵的浓度取决于样品的蛋白质浓度。蛋白质浓度越高,样品的可能的硫酸铵浓度越低,即,蛋白质沉淀开始出现时的硫酸铵浓度越低。稀释样品使得可能添加较大的硫酸铵。最佳蛋白质浓度在0.1至3mg/mL蛋白质的范围中。样品包含25mM Tris,用于调节pH。添加硫酸铵和Tris后,通过添加1M NaOH或1M HCl将样品的pH调节至7.2±0.2,并穿过0.45μm过滤器过滤。在测量蛋白质浓度之后,计算柱(在柱A的情况下)的装载,以达到至多30mg蛋白质/mL凝胶的装载。通过已知方法基于各自样品在280nm的光密度 (OD) 的测量确定蛋白质浓度。

[0102] 3. 柱的平衡:使用≥3柱体积的硫酸铵缓冲液以100cm/h的线性流速平衡柱。

[0103] 4. 将样品装载在柱上:将样品以100cm/h的线性流速装载在柱上。然后用≥3柱体积的硫酸铵缓冲液以相同的流速洗涤该柱。

[0104] 5. C1-抑制剂的洗脱:借助于硫酸铵缓冲液至Tris缓冲液的梯度,穿过20个柱体积以100cm/h的线性流速洗脱C1-INH。分级出 (fractioned) 完整的洗脱液,然后将未减少的单级分装载在Tris-甘氨酸-凝胶上并分析。使用条带模式,可以显示第一个峰是C1-INH。

[0105] 6. 柱再生:通过随后使用3柱体积的WFI,4柱体积的0.1M NaOH,3柱体积的WFI,以100cm/h的线性流速进行柱的再生。

[0106] II. 柱B

[0107] 所使用的物质:

[0108] -从血浆中衍生的C1-INH样品,分别为半纯化级分的形式;

[0109] -HiScreen[™] Capto[™] Butyl HP, GE医疗,代码28-9782-42;直径:0.77cm;凝胶床高度:10cm;凝胶体积:4.7ml

[0110] -硫酸铵缓冲液:

[0111] • 181mg/mL (131292mg/mL) 硫酸铵,

[0112] • 25mM Tris,

[0113] • pH 7.2±0.2

[0114] -tris缓冲液:

[0115] • 25mM Tris

[0116] • pH 7.2±0.2

[0117] -**ÄktaAvant**,GE医疗,Unicorn,紫外分光光度计,电导率计。

[0118] 1. 样品制备:使待纯化的血浆C1-INH样品的硫酸铵浓度为181mg/mL (131-292mg/mL),且Tris含量为25mM。可以被添加的硫酸铵的浓度取决于样品的蛋白质浓度。蛋白质浓度越高,样品的可能的硫酸铵浓度越低,即,蛋白质沉淀开始出现时的硫酸铵浓度越低。稀释样品使得可能添加较大量的硫酸铵。最佳蛋白质浓度在0.1至3mg/mL蛋白质的范围中。样品包含25mM Tris,用于调节pH。添加硫酸铵和Tris后,通过添加1M NaOH或1M HCl将样品的pH调节至7.2±0.2,并经0.45µm过滤器过滤。在测量蛋白质浓度之后,计算柱(在柱B的情况下)的装载,以达到7.5mg蛋白质/mL凝胶的装载,即仅用7.5mg蛋白质/ml色谱凝胶的装载测试柱B。通过已知方法基于各自样品在280nm的光密度(OD)的测量确定蛋白质浓度。

[0119] 2. 柱B的平衡,将样品装载在柱B上,以如上面描述的用于柱A的方式相同的方式使C1-INH的洗脱和柱再生起作用。

[0120] 计算方法:

[0121] 1. 确定用于洗脱C1-INH的硫酸铵浓度:在整个色谱运行中记录电导率、在280nm和610nm处的UV信号。这使发明人能够将电导率指定到在色谱图中的C1-INH峰。通过制备缓冲液稀释系列并测量相应的电导率来创建校准线。在下表1中显示测量结果,其中AS代表硫酸铵。

[0122] 表1

标准溶液		浓度	测量的电导率
AS 重量(mg)	溶液体积(ml)	g/l	mS/cm
10	61	164	154,7
10	60	167	155,8
10	58	172	158,8
10	59	169	158,0
10	62	161	152,9
10	63	159	151,1
10	81	123	125,2
10	77	130	128,9
10	76	132	130,5

[0123] 通过将电导率转换为硫酸铵浓度可以显示,所有C1-INH洗脱均在当使用柱A的Phenyl **Sepharose**®基质时在160mg/ml和174mg/ml之间的AS浓度下发生,且在当使用柱B的HiScreen™ Capto™ Butyl HP基质时在124和131mg/ml之间的AS浓度下发生。在图6中显示,相应的校准线允许用于基于电导率测量确定AS浓度。

[0125] 2. 在没有沉淀的情况下确定最高的可能硫酸铵浓度:进行滴定以确定在没有蛋白

质沉淀的情况下C1-INH可能保留或结合到固定相的最高的可能硫酸铵浓度。在该实验中,将饱和硫酸铵添加到C1-INH样品中,直到沉淀发生。如此确定的在样品中最高可能硫酸铵浓度为292mg/mL。通过用相同浓度进行运行验证了这一点,其中可以显示C1-INH可以被结合到固定相,并随后从固定相中被洗脱(参见下表2,实验180619HW和图11)。

[0126] 3. 确定与根据现有技术的流动通过方法相比的最大蛋白质装载量:为了确定与根据现有技术的流动通过方法相比的最大蛋白质装载量,在结合条件下,用起始物料1装载Phenyl **Sepharose**[®]凝胶(柱A),直到可以在流动通过级分中在280nm处检测到UV信号。如此确定的蛋白质的量是当与使用起始物料1的在根据现有技术的流动通过方法中使用的7.5mg/ml的单装载相比的蛋白质的量的两倍多。使用起始物料2(40%硫酸铵沉淀物的滤液),这样确定的量是当与使用起始物料1(再溶解60%硫酸铵沉淀物)的在根据现有技术的流动通过方法中使用的7.5mg/ml的单装载相比的蛋白质的量的4倍多。

[0127] 此后,分别以流动通过模式(即,如在现有技术中)和以根据本发明的结合和洗脱模式进行分别用单和双装载的色谱运行。用所有四个运行的样品制得的tris甘氨酸凝胶的比较显示,从根据本发明的两个运行中取得的样品的C1-INH峰具有比从根据现有技术的运行中取得的样品的C1-INH峰更高的纯度,并且无论样品装载,并且在根据现有技术以流动通过模式运行的双装载中发现了最不纯的C1-INH峰。在上面讨论的图3中显示了这些结果。

[0128] 在下表2中显示了特定实验的数据。在上面讨论的图7至11中显示了与这些实验中的一些相对应的色谱图。

[0129] 表2列出了使用上述柱A(柱体积(CV)为36ml)或柱B(柱体积为4.7ml)和分别以下起始物料1-4中的一种,如在现有技术中(“流动通过”),根据本发明(“正模式”)进行的实验:

[0130] -与在现有技术EP 0 101 935中相同,即再溶解的60%硫酸铵(AS)沉淀物(=起始物料1);

[0131] -较早的40%AS沉淀物的滤液(=起始物料2),

[0132] -冻干的**Berinert**[®]产品(=起始物料3),

[0133] -使用起始物料1的两个HIC实验的合并的洗脱液(=起始物料4)。

[0134] 将各自的起始物料溶解在平衡缓冲液中。除非另有说明,否则借助于在特定量的柱体积(CV)时的浓度和/或pH梯度,或经由梯级洗脱进行洗脱。如上所描述进行C1-INH峰的检测。

[0135] 表2

[0136]

实验	色谱图	柱	起始物料	平衡缓冲液	洗脱	洗脱缓冲液	mS/cm 峰	g/L AS 峰	观察
180418HW-1		A	1	AS=106g/L pH=6	梯度 10 CV	AS=106g/L pH=8,5			流动通过
180418HW-2		A	1	AS=106g/L pH=8,5	梯度 10 CV	AS=106g/L pH=6			流动通过
180419HW-1	图 7	A	1	AS=106g/L pH=7,2	平衡缓冲液	AS=106g/L pH=7,2			流动通过
180419HW-2	图 8	A	1	AS=209g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=0g/L pH=7,2	151	160	正模式
180424HW-1	图 9	A	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=0g/L pH=7,2		160	正模式
180425HW-1		A	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 10 CV 然而 50cm/h	AS=0g/L pH=7,2	156	167	正模式

	180425HW-2	A	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2	159	171	正模式	
	180503HW	A	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=112g/L pH=7,2	158	169	正模式	
	180508HW-2	B	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=0g/L pH=7,2	125	124	正模式	
	180516HW-2	图 10	A	2	AS=181g/L pH=7,2	逐步 5 CV	AS=154g/L pH=7,2		正模式	
	180516HW-3	B	4	AS=181g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=0g/L pH=7,2	129	129	正模式	
	180528HW	B	2	AS=181g/L pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2	130	131	正模式	
[0137]	180619HW	图 11	A	3 (0,1 mg/ml)	AS=292g/L pH=7,2	梯度 10 CV	AS=0g/L pH=7,2	153	162	正模式
	180520HW	A	2 (4-倍装载)	AS=181g/L/ pH=7,2	装载	装载			装载 30 mg 蛋白质/ml 凝 胶	
	180626HW	A	1 (4-倍装载)	AS=181g/L/ pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2			柱过装载	
	180627HW	A	1 (2-倍装载)	AS=181g/L pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2	161	174	正模式	
	180628HW	A	1 (单装载)	AS=181g/L pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2	156	167	正模式	
	180627HW	A	1 (3-倍装载)	AS=181g/L pH=7,2	梯度 20 CV	AS=0g/L pH=7,2			柱过装载	

[0138] 从表2中可以看出,当使用柱A时观察到C1-INH洗脱峰的硫酸铵(AS)浓度在约160和约174mg/ml之间,而当使用柱B时在约124和约131mg/ml之间。可以进一步看出,当使用起始物料1时,柱A的装载量至少是单装载的两倍,即至少2x 7.5mg或15mg蛋白质/ml色谱凝胶,且当使用起始物料2时,柱A的装载量至少是单装载的4倍,即至少30mg蛋白质/ml色谱凝胶。

[0139] 表3描绘了进一步的实验,其中比较了许多不同的凝胶类型。在表3中所描述条件下,C1-INH确实结合到基质,并用不同的梯度被洗脱。

[0140] 表3

制造商	凝胶	模式	结合	洗脱
GE	Butyl HP	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 (zu) 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Capto Butyl	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Phenyl HP	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 200 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Octyl FF	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Butyl-S FF	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Capto Phenyl ImpRes	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 200 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Octyl-S FF	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
[0141] GE	Capto Phenyl 高取代	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Capto Butyl ImpRes	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	Butyl-600M	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	Phenyl-650M	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 200 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	Butyl-650M	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	PPG-600M	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	Phenyl-600M	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 200 到 0 g/L 硫酸铵梯度
东曹	TSKgel	结合和洗脱	181 g/L 硫酸铵	从 181 到 0 g/L 硫酸铵梯度
GE	Capto Phenyl 高取代	结合和洗脱	4 M 氯化钠	从 4 到 0 摩尔 氯化钠梯度

[0142] 在 SDS 凝胶 (数据未显示) 中, 分析了洗脱的 C1-INH 的纯度, 并且发现在表 4 中所示的 4 种凝胶类型提供了 C1-INH 从污染的蛋白质中的最佳分离。在随后的实验中, 使用在表 3 中所示的结合和洗脱条件, 比较了这 4 种凝胶类型之间的 C1-INH 收率, 并且发现来自 GE 医疗的 Phenyl-Hans-**Peter**[®] 和接着是来自东曹的 **Phenyl-650M**[®] 提供了最佳收率。

[0143] 表 4

制造商	凝胶	C1-INH 收率 %
GE	Phenyl HP	100 %
GE	Capto Phenyl ImpRes	93 %
东曹	Phenyl-650M	97 %

东曹	Phenyl-600M	94%
----	-------------	-----

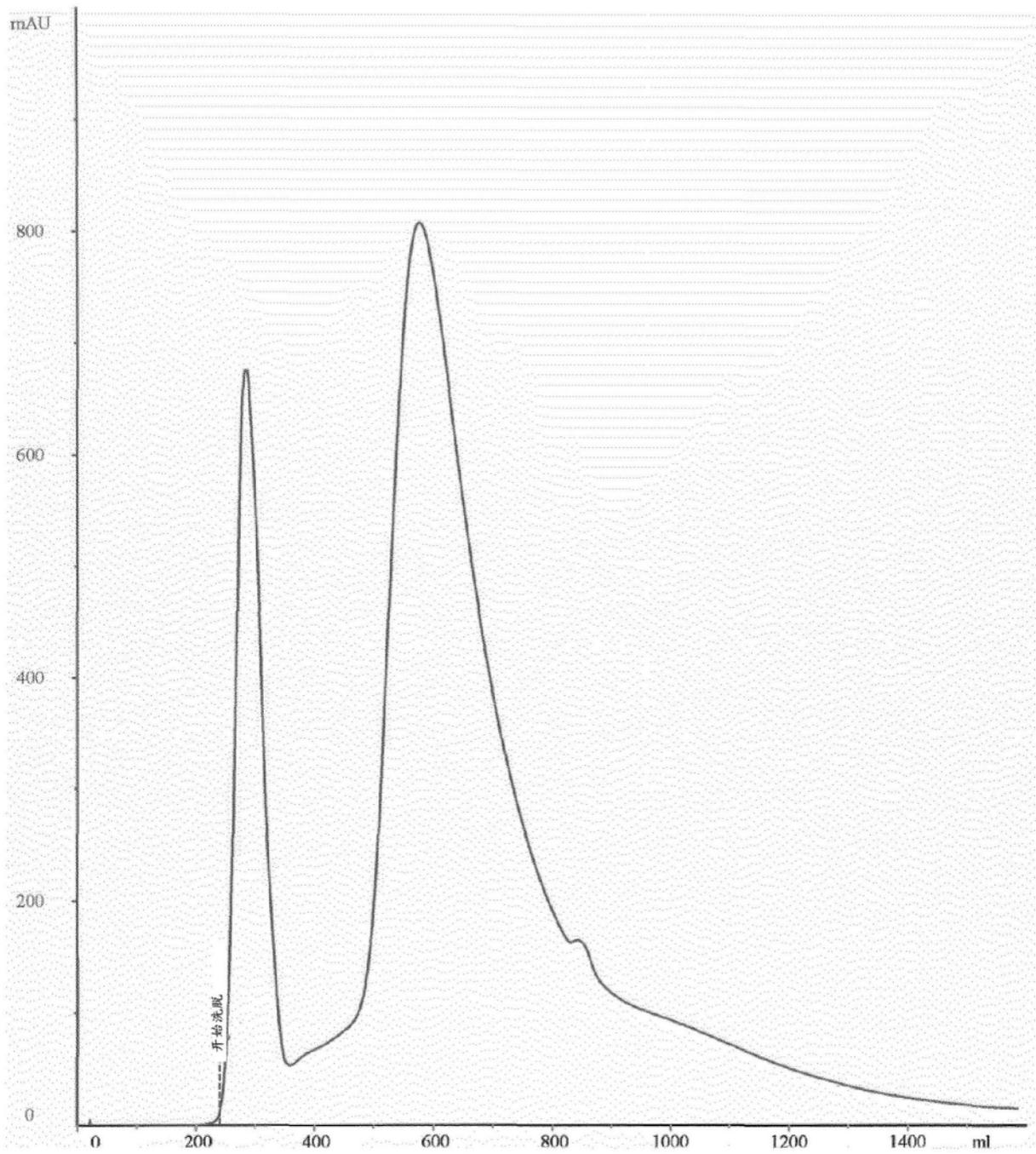


图1

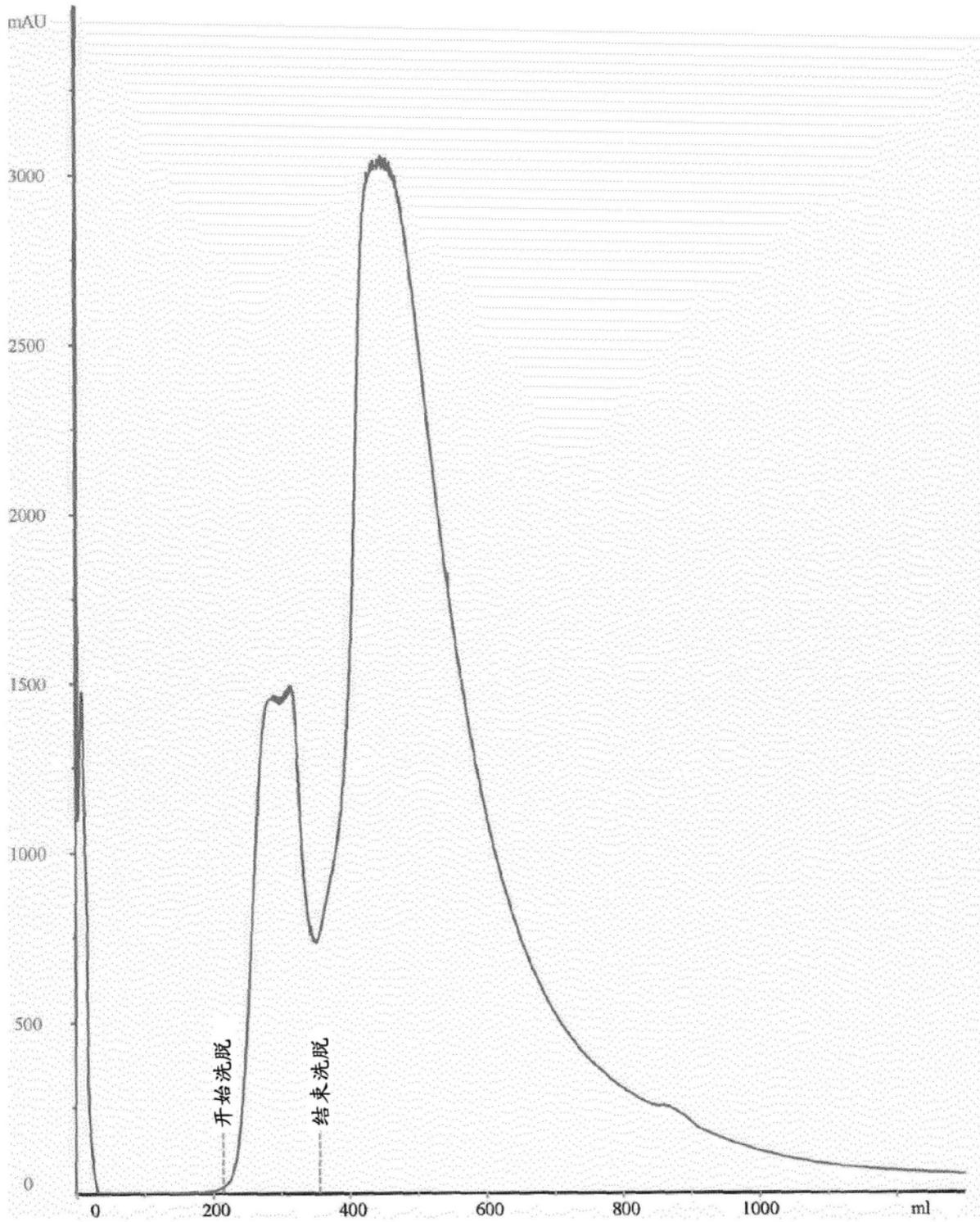


图2

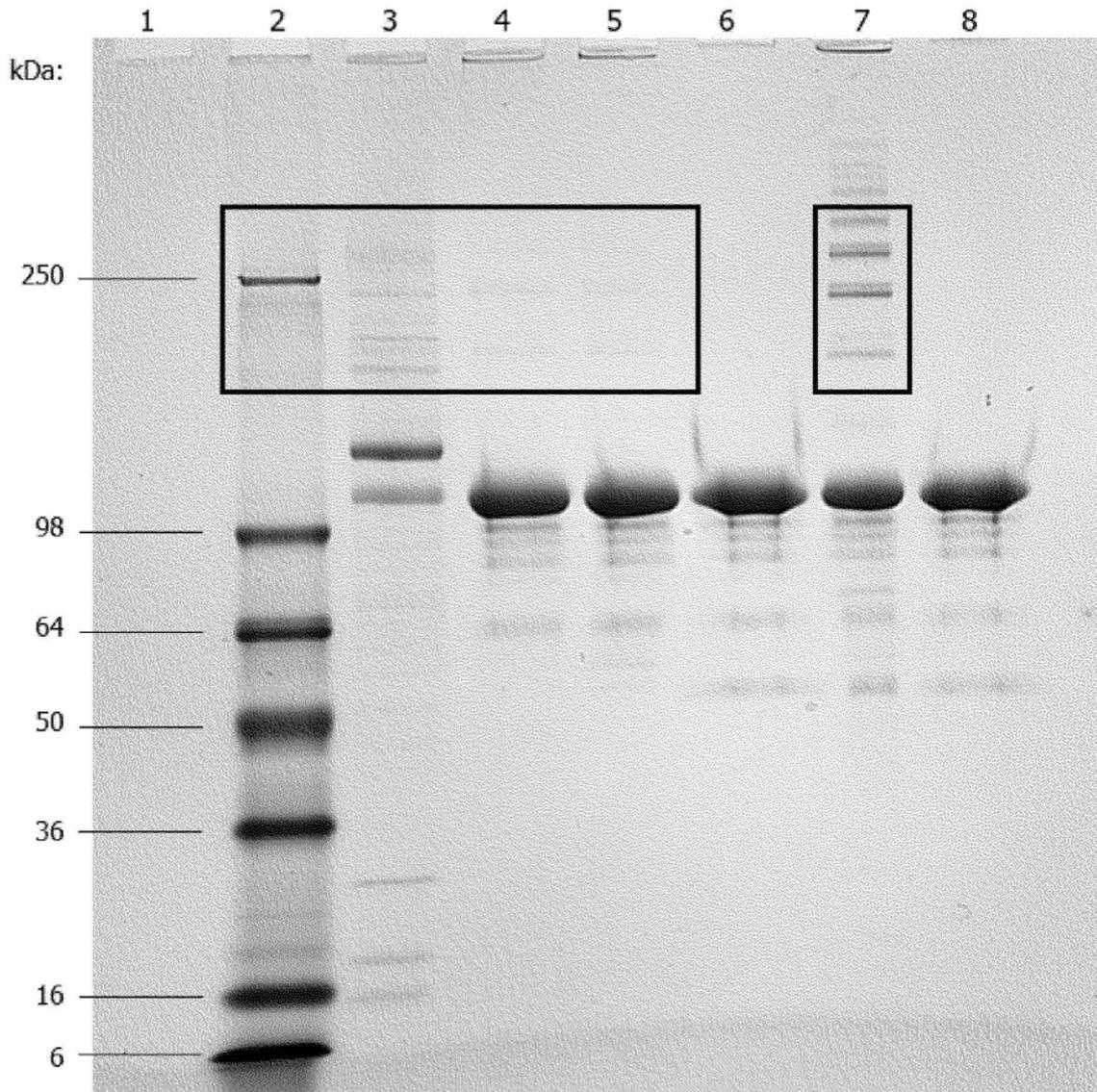


图3

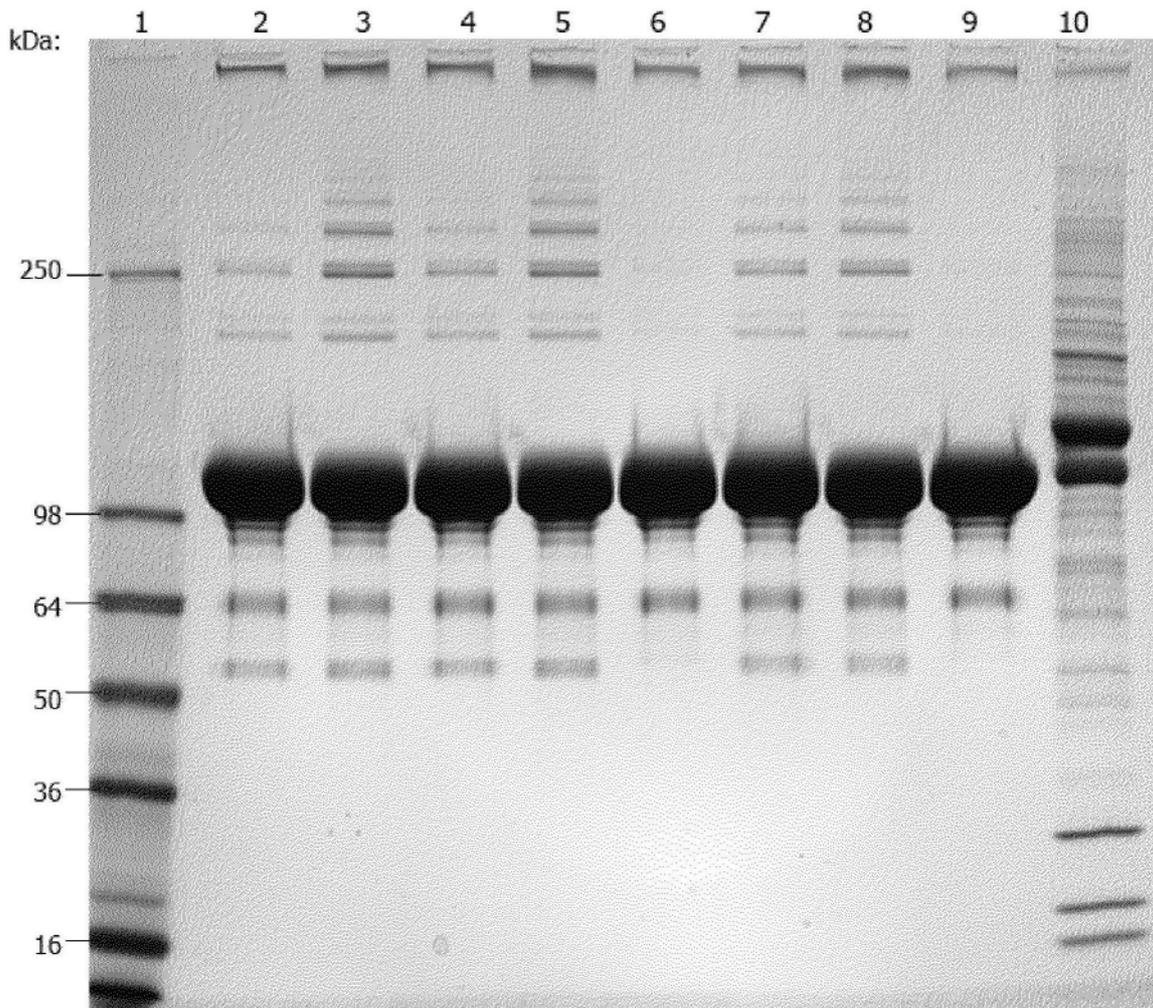


图4

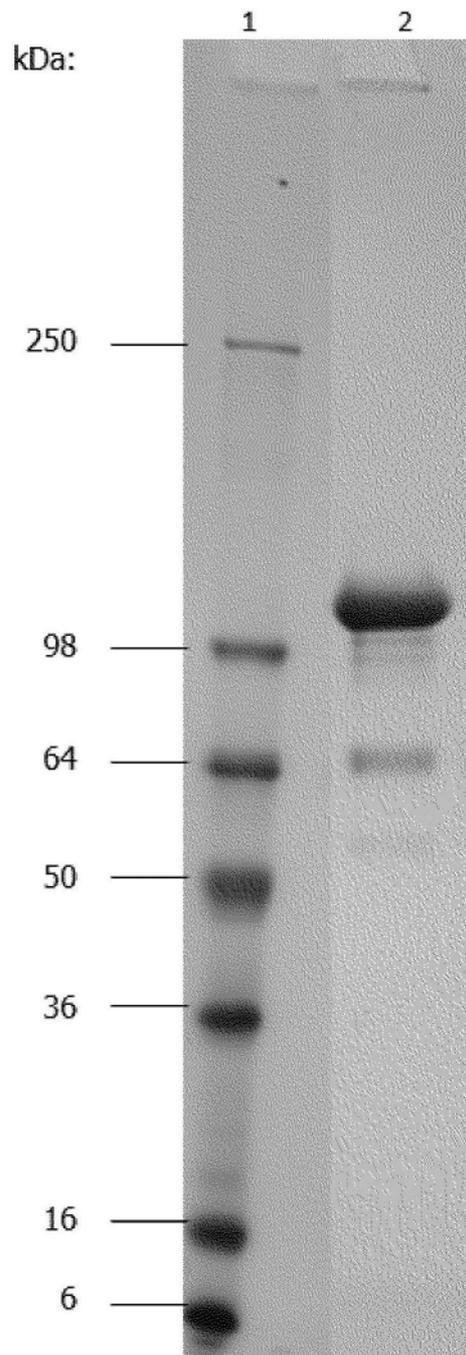


图5

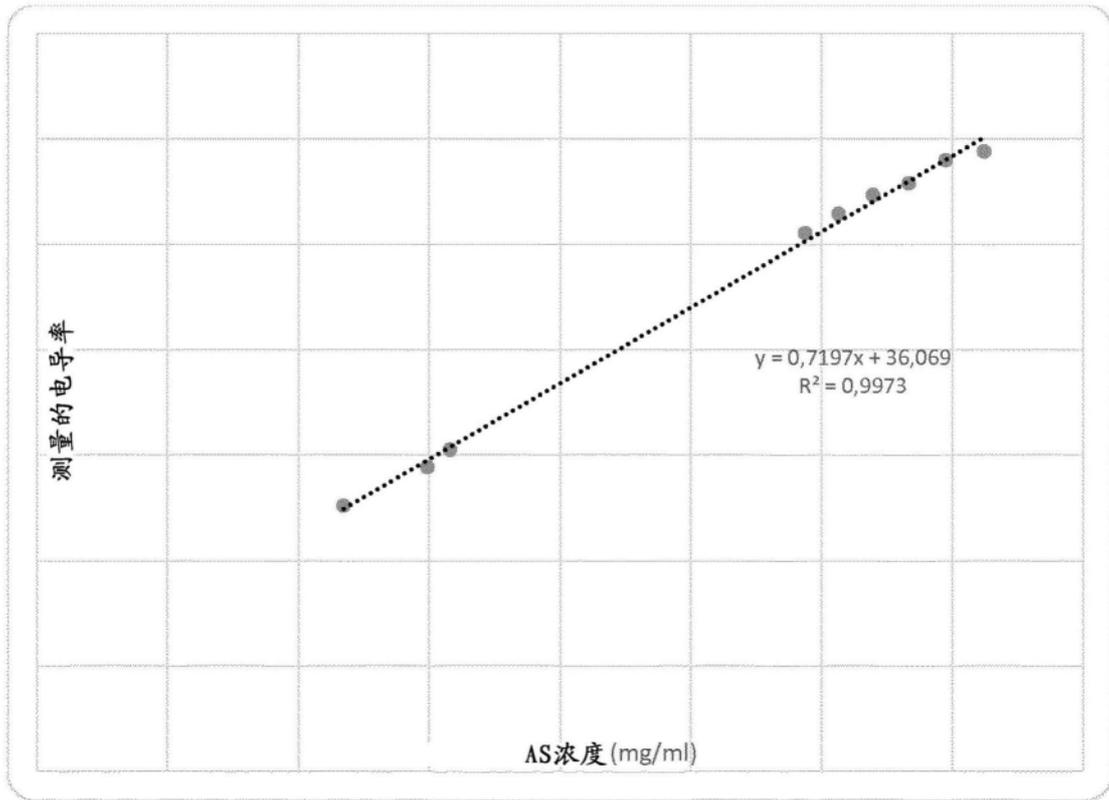


图6

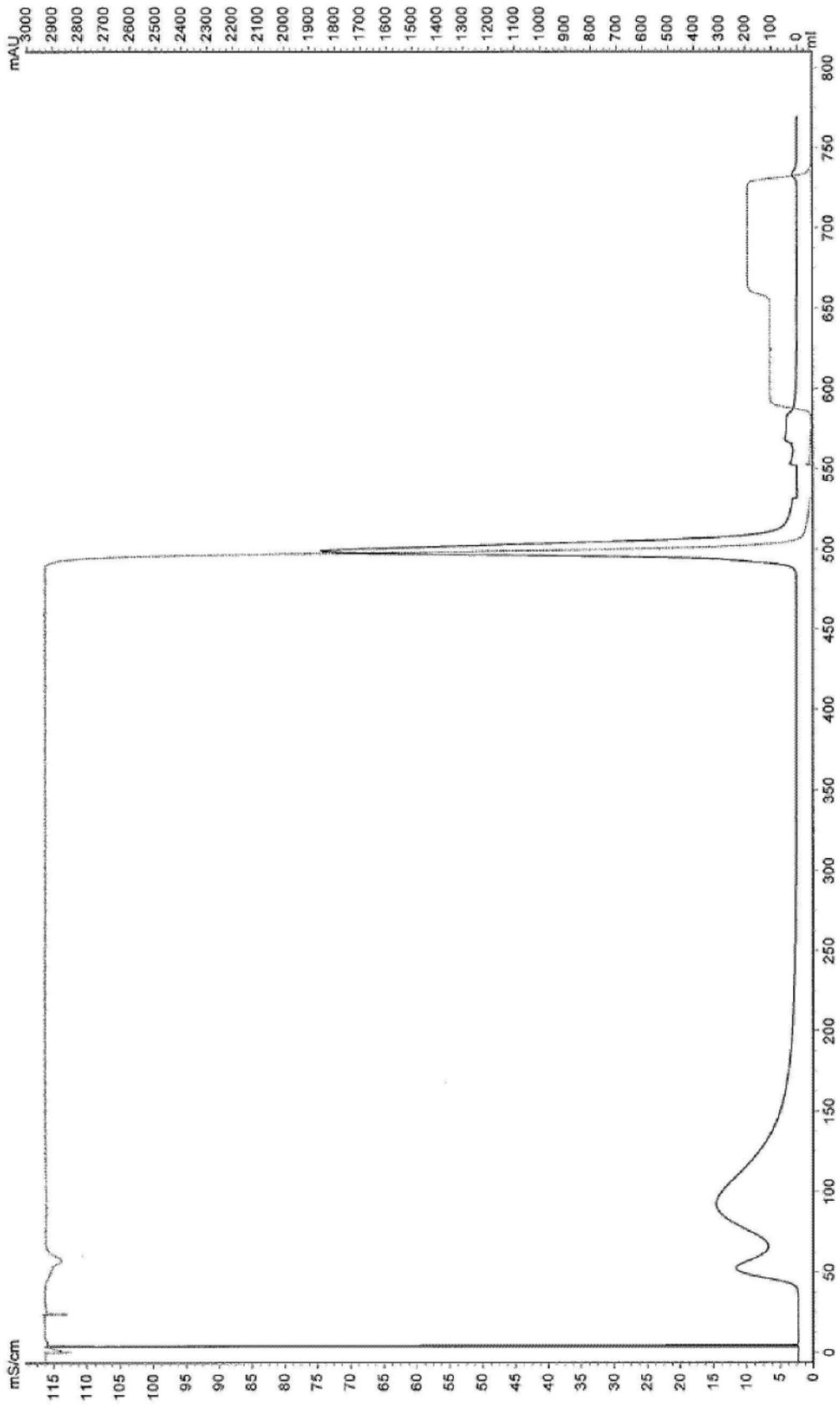


图7

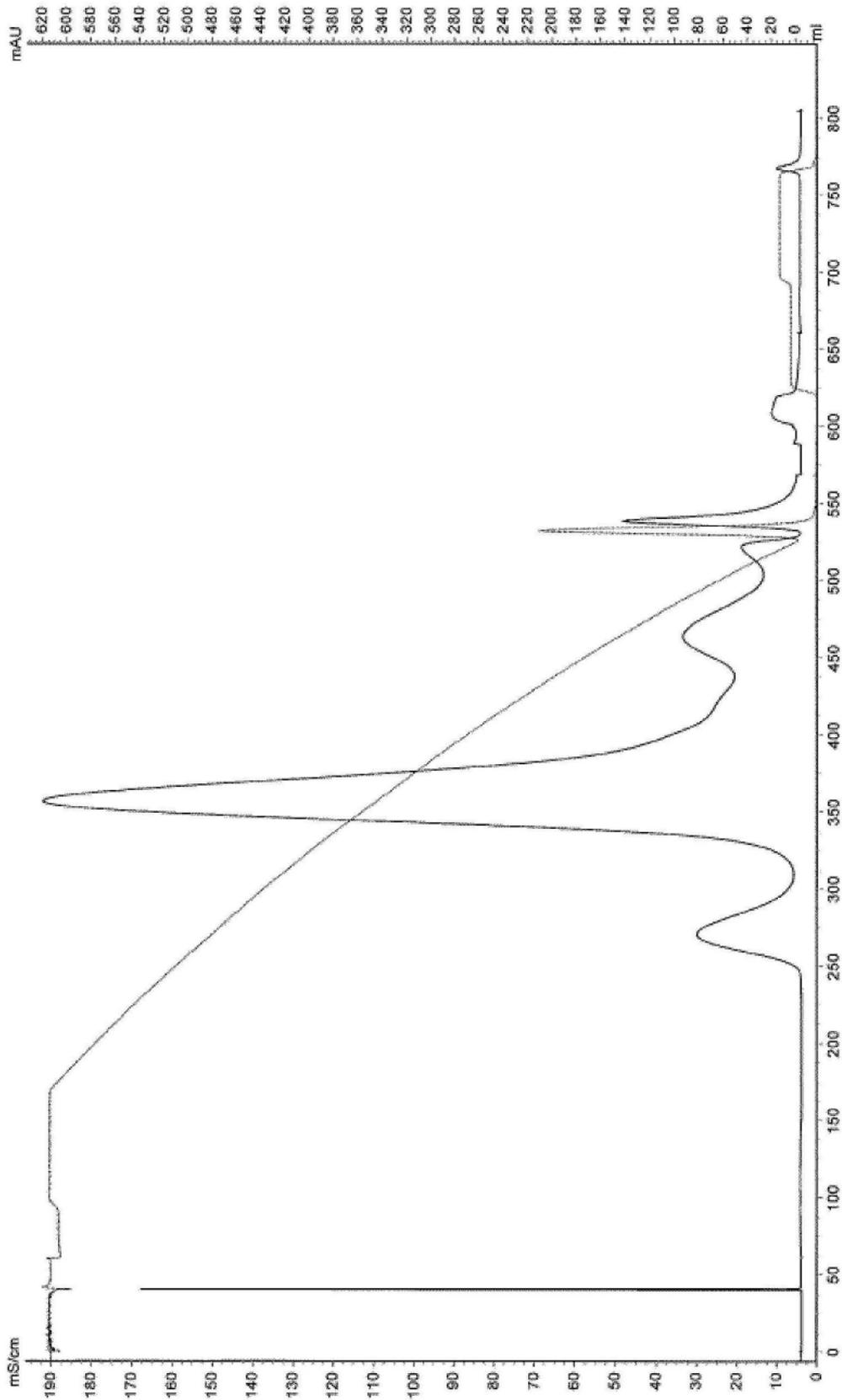


图8

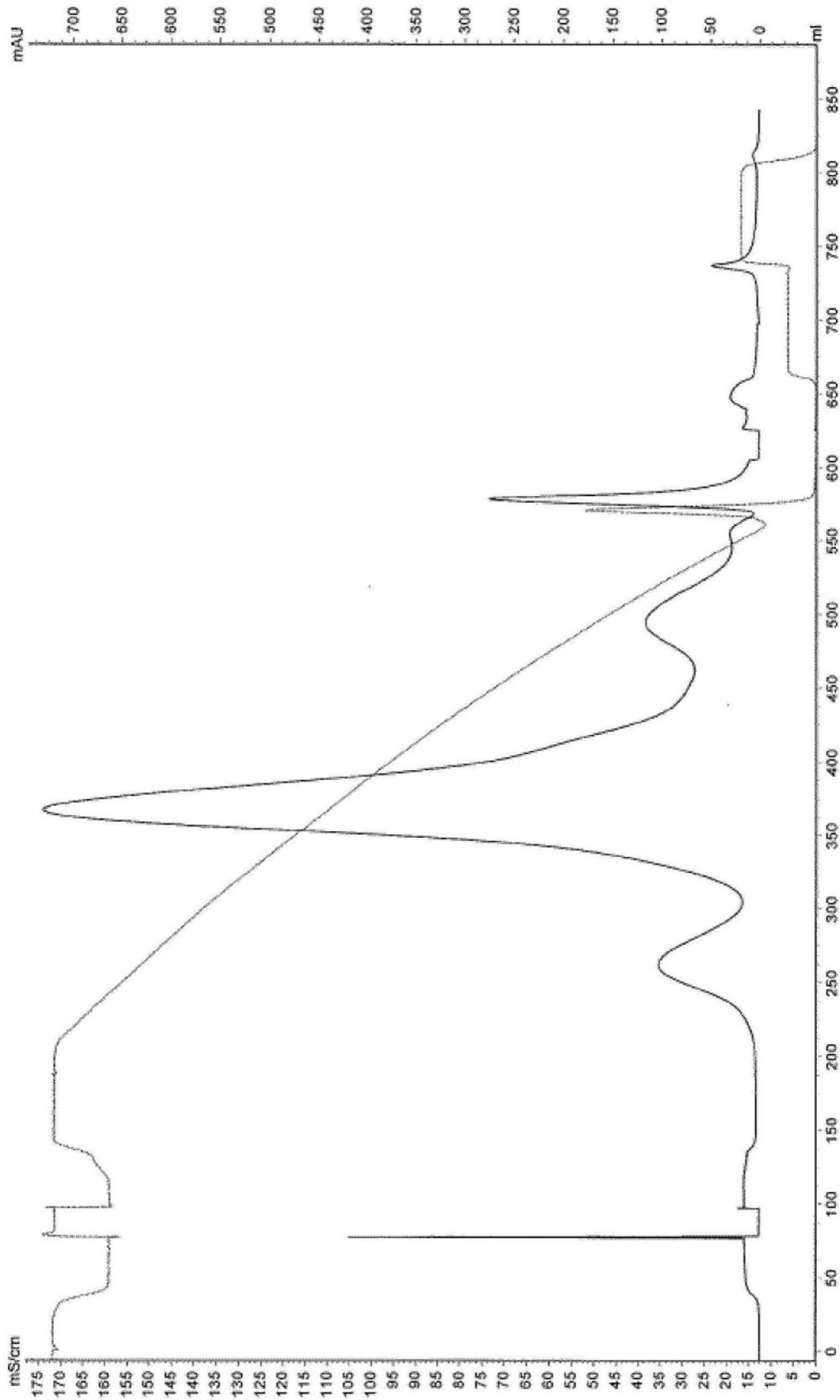


图9

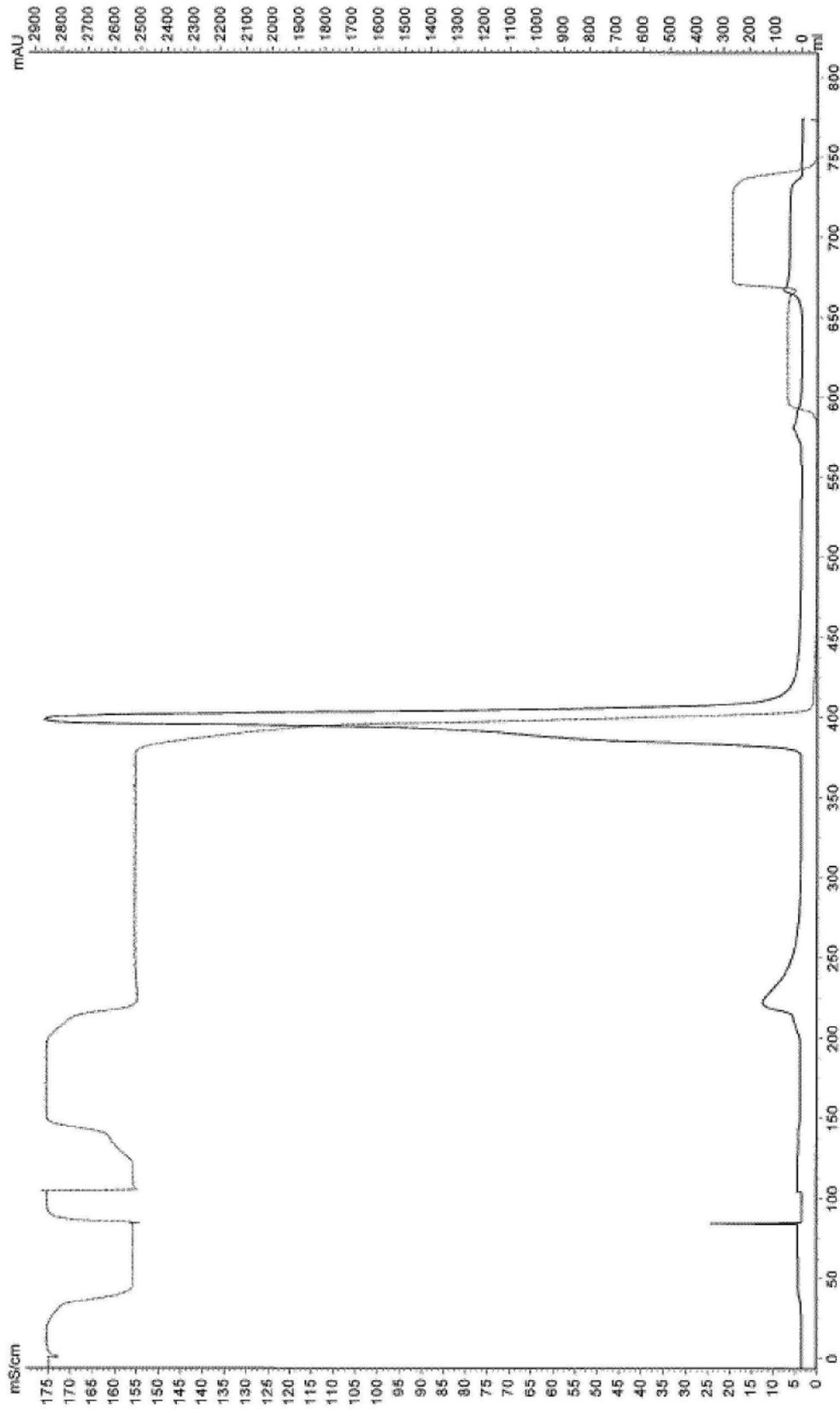


图10

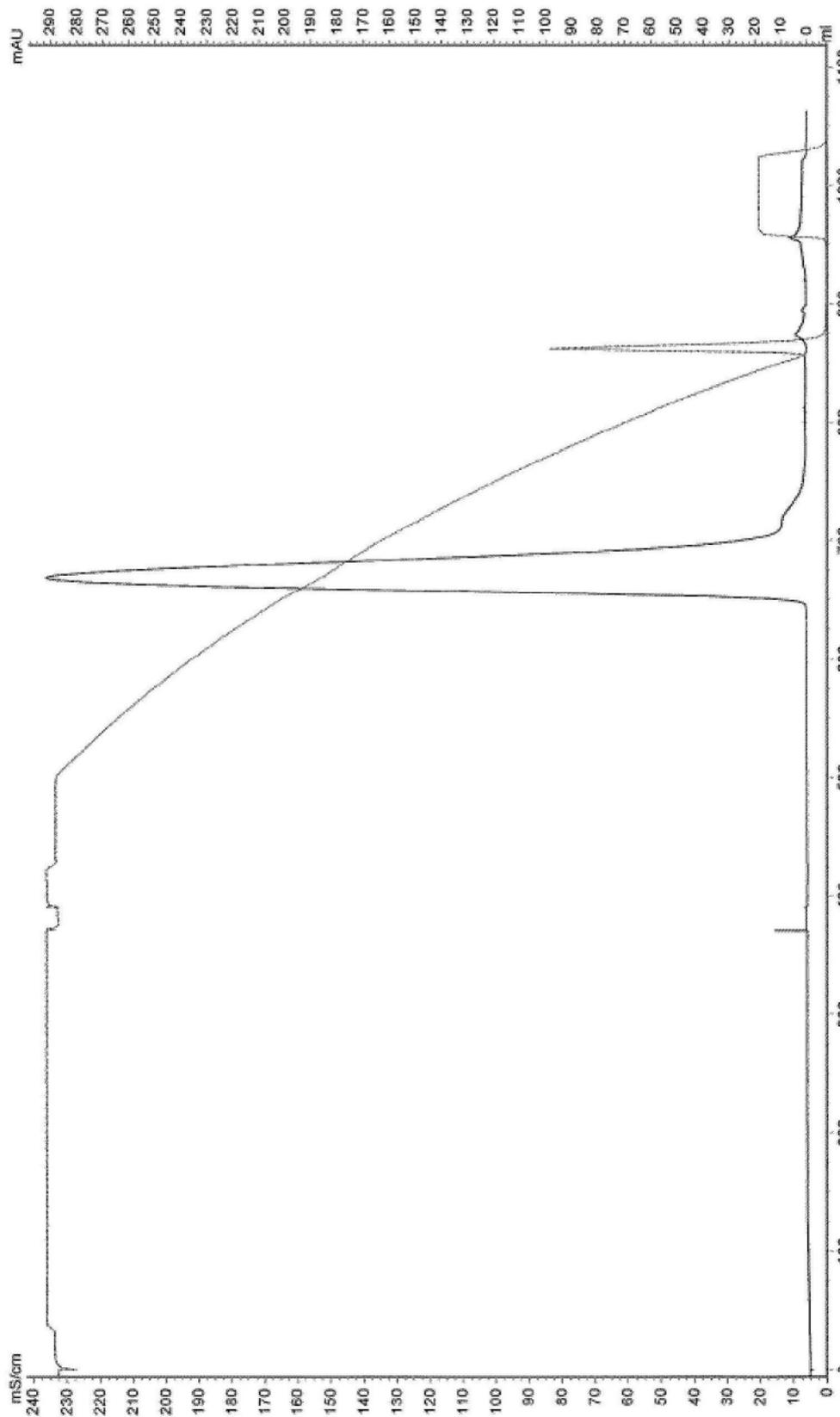


图11