



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111423509 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201910024941.1

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2019.01.10

C07K 1/22 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111423509 A

(56) 对比文件

WO 2006059904 A1, 2006.06.08

WO 2004041863 A2, 2004.05.21

(43) 申请公布日 2020.07.17

审查员 郝攀

(73) 专利权人 瑞阳(苏州)生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号生物纳米园B1楼609单元

(72) 发明人 万云超 郜鹏 周加义 何志娟

郭树华

(74) 专利代理机构 北京精金石知识产权代理有

限公司 11470

代理人 张黎

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲层析纯化方法

(57) 摘要

本发明属于蛋白纯化领域,尤其涉及一种抗人血清白蛋白(HSA)单域抗体及其融合蛋白的亲层析纯化方法。其包括:将HSA与亲和介质混合,偶联反应,制得HSA亲和层析介质;将待纯化的样品通过预先用平衡缓冲液平衡好的HSA亲和层析介质;然后用清洗缓冲液清洗结合了样品的亲和层析介质;再用洗脱缓冲液将抗HSA单域抗体或其融合蛋白从层析介质上洗脱,收集洗脱峰得到洗脱样品;最后用中和缓冲液调节洗脱样品至中性即得。本发明方法获得的抗HSA单域抗体及其融合蛋白的纯度达95%以上,且能让此类单域抗体及其融合蛋白保持良好的成药性及稳定性。

1. 一种抗HSA单域抗体或其融合蛋白的亲层析纯化方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,亲和层析介质的制备:

将HSA与亲和介质混合,偶联反应,制得HSA亲和层析介质;

步骤2,用步骤1制得的HSA亲和层析介质对待纯化的样品进行纯化:

平衡:用平衡缓冲液平衡步骤1制得的HSA亲和层析介质;

上样:将待纯化的样品通过平衡好的亲和层析介质,使样品与亲和层析介质结合;

清洗:用清洗缓冲液清洗结合了样品的亲和层析介质;

洗脱:用洗脱缓冲液将抗HSA单域抗体或其融合蛋白从亲和层析介质上洗脱下来,收集洗脱峰得到洗脱样品;

中和:用中和缓冲液调节洗脱样品至中性,即得;

所述抗HSA单域抗体的重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:4-6所示的HCDR。

2. 根据权利要求1所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述步骤2中待纯化的样品为表达了抗HSA单域抗体或包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液。

3. 根据权利要求1所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述步骤1中的亲和介质选自交联琼脂糖、纤维素、硝化纤维素、丙烯酰胺聚合物、聚醚砜或脱乙酰壳多糖。

4. 根据权利要求1所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述平衡缓冲液为包含磷酸盐或Tris的缓冲液;所述清洗缓冲液为包含磷酸盐、Tris或硼酸的缓冲液;所述洗脱缓冲液为包含磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或铵盐的缓冲液;所述中和缓冲液为包含Tris或精氨酸的缓冲液。

5. 根据权利要求4所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述平衡缓冲液为包含PB和NaCl的缓冲液;所述清洗缓冲液为包含PB和NaCl的缓冲液;所述洗脱缓冲液为包含醋酸-醋酸钠的缓冲液;所述中和缓冲液为包含Tris-HCl的缓冲液。

6. 根据权利要求4所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述平衡缓冲液的pH值为6.0-8.5;所述清洗缓冲液的pH值为6.0-8.5;所述洗脱缓冲液的pH值为2.5-9.0;所述中和缓冲液的pH值为6.5-9.0。

7. 根据权利要求2所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述表达了包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液的制备方法如下:

将具有治疗功能的多肽分子与抗HSA单域抗体通过柔性连接子串联,合成融合蛋白基因片段并插入至载体得到重组质粒,将重组质粒导入表达宿主细胞进行表达得到表达了包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液。

8. 根据权利要求7所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述宿主细胞为细菌、酵母菌、丝状真菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞或植物细胞。

9. 根据权利要求1所述的亲和层析纯化方法,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示。

抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲层析纯化方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白纯化领域,尤其涉及到一种抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲层析纯化方法。

背景技术

[0002] 人血清白蛋白(HSA)作为人体血液中最大单一组分蛋白,以其长达20天的半衰期及无酶学和免疫学活性,近年来被广泛应用于改善蛋白质药物长效的载体。但随着血清白蛋白融合技术研究的深入,出现一系列融合蛋白产量低、稳定性差、本身分子量大进而影响融合蛋白的生物活性等不足之处。在蛋白工程技术飞速发展的今天,寻求更合适的蛋白质长效平台载体成为趋势。

[0003] 抗HSA单域抗体除具有一般单域抗体的高亲和、热稳定性好、分子量小、特异性强等优点外,还具有与HSA结合后延长蛋白质半衰期、不影响融合蛋白空间组位及生物学活性等优势,以其作为长效蛋白质平台载体,具有良好、广阔的应用前景。目前常规用于延长靶标蛋白半衰期的技术手段有PEG修饰、Fc融合、HSA融合、其它大分子蛋白或蛋白伴侣融合等。这些方法虽然在一定程度上延长了靶标蛋白在机体内的稳定性,但各自的缺点也尤为突出,比如PEG修饰会因为修饰程度不同,而带来分子均一性很差,且修饰后分子量偏大;Fc融合会因为Fc自身的糖基化修饰、Fc介导细胞毒及补体激活作用、Fc可能影响靶标蛋白活性、二聚体存在形式等,带来一系列分子量偏大、毒副作用、活性降低等问题;HSA融合会降低靶标蛋白活性、HSA在发酵过程中会出现降解和聚合现象,进而带来靶标蛋白生物活性降低、分子量偏大、融合蛋白样品稳定性差、毒副作用等缺点;其它大分子蛋白或蛋白伴侣也存在影响靶标蛋白生物活性、稳定性差等缺点。而采用与抗HSA的单域抗体进行融合,不仅可以通过抗HSA单域抗体与HSA结合来延长靶标蛋白半衰期;而且该单域抗体分子量较小,融合后不会使融合蛋白分子偏大、样品稳定性好、也不会影响靶标蛋白的生物活性、更不会带来毒副作用;再者该单域抗体融合蛋白可选择的表达体系更宽,生产更容易。

[0004] 现有的常规抗HSA单域抗体融合蛋白的纯化过程依赖于标签肽段,通常通过添加组氨酸标签以利于后期用镍柱亲和层析纯化抗HSA单域抗体融合蛋白。但标签肽段的存在不仅标签自身会影响抗HSA单域抗体融合蛋白的成药性,而且在纯化过程中会引入Ni等重金属,增加工艺及分析的难度,更加影响抗体融合蛋白的成药性,限制了此类蛋白的应用;而无标签蛋白的纯化需经多步纯化才能实现,整个纯化实验操作周期会延长,这样不仅对蛋白本身理化稳定性有一定的挑战,且最终得率低,增加工艺的复杂性和生产成本。因此寻找一种专一性好,产品纯度高,样品吸附量大,且不影响单域抗体融合蛋白成药性的纯化方法是目前本领域中迫切需要解决的问题。基于此,我们开发了一种以HSA为配基的亲层析介质,改进了纯化工艺,并将其应用于抗HSA单域抗体及其融合蛋白的纯化制备,取得了很好的效果。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术中存在的问题,提供一种抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲亲和层析纯化方法,该纯化方法以HSA为配基,利用HSA-抗HSA单域抗体特异性结合进行亲和层析,摆脱了对其他纯化标签的依赖,及非标签蛋白纯化带来的困难,改进了纯化工艺,显著提高了蛋白的纯度,且保证了此类单域抗体及其融合蛋白的成药性以及亲和层析过程中的稳定性。

[0006] 如本文所用,除非特别指出,则“约”是指 $\pm 10\%$ 范围内。

[0007] 具体而言,本发明中的抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲亲和层析纯化方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤1,亲和层析介质的制备:

[0009] (1) 活化:以活化缓冲液洗涤活化亲和介质;

[0010] (2) 偶联:将HSA与亲和介质混合,偶联反应,制得HSA亲和层析介质;

[0011] (3) 洗涤I:用偶联缓冲液洗涤未偶联的HSA;

[0012] (4) 封闭:用封闭缓冲液封闭HSA亲和层析介质;

[0013] (5) 洗涤II:用洗涤缓冲液A洗涤非特异性结合的HSA;

[0014] (6) 洗涤III:用洗涤缓冲液B洗涤非特异性结合的HSA;

[0015] 进一步的,所述活化缓冲液的pH为2.5-9.0;优选为pH 2.5-9.0的包含HCl或NaOH的缓冲液;优选为pH 2.5-3.5的包含HCl的缓冲液或pH 7.0-9.0的包含NaOH的缓冲液;优选为pH 2.8-3.3的含约1mM HCl的缓冲液;更优选为pH 3.0的含约1mM HCl的缓冲液;

[0016] 进一步的,所述亲和介质选自交联琼脂糖、纤维素、硝化纤维素、丙烯酰胺聚合物、聚醚砜或脱乙酰壳多糖;优选为琼脂糖4B或纤维素;

[0017] 进一步的,所述偶联缓冲液的pH为7.0-9.0;优选为pH 7.5-9.0的包含 NaHCO_3 或磷酸盐的缓冲液;优选为pH 7.5-9.0的包含0.1M NaHCO_3 ,0.5M NaCl或0.1M PB,EDTA的缓冲液;优选为pH 7.8-8.3的含约0.1M NaHCO_3 ,0.5M NaCl的缓冲液;更优选为pH 8.0的含约0.1M NaHCO_3 ,0.5M NaCl的缓冲液;

[0018] 进一步的,所述封闭缓冲液的pH为7.0-9.0,且封闭条件为:室温封闭2h或者4℃封闭过夜;优选为pH 7.0-8.5的包含Tris或乙醇胺的缓冲液;更优选为pH 7.0-8.5包含约0.1M Tris-HCl或1M乙醇胺的缓冲液;优选为pH 7.7-8.3的包含约0.1M Tris-HCl或1M乙醇胺的缓冲液;更优选为pH 8.0的含约0.1M Tris-HCl或1M乙醇胺的缓冲液;

[0019] 进一步的,所述洗涤缓冲液A的pH为3.0-6.0;优选为pH 3.5-4.5的包含约0.1M HAc/NaAc,0.5M NaCl的缓冲液;优选为pH 3.8-4.3的包含约0.1M HAc/NaAc,0.5M NaCl的缓冲液;更优选为pH 4.0的包含约0.1M HAc/NaAc,0.5M NaCl的缓冲液;

[0020] 进一步的,所述洗涤缓冲液B的pH为7.0-9.0;优选为pH 7.5-8.5的包含约0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl的缓冲液;优选为pH 7.7-8.3的包含约0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl的缓冲液;更优选为pH 8.0的包含约0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl的缓冲液。

[0021] 步骤2,用亲和层析介质对待纯化的样品进行纯化

[0022] (1) 平衡:用平衡缓冲液平衡装有步骤1制得的HSA亲和层析介质;

[0023] (2) 上样:将待纯化的样品通过平衡好的亲和层析介质,使样品与亲和层析介质结合;

- [0024] (3) 清洗:用清洗缓冲液清洗结合了样品的亲和层析介质;
- [0025] (4) 洗脱:用洗脱缓冲液将抗HSA单域抗体或其融合蛋白从亲和层析介质上洗脱下来,收集洗脱峰得到洗脱样品;
- [0026] (5) 中和:用中和缓冲液调节洗脱样品至中性,即得;
- [0027] 进一步的,所述平衡缓冲液为包含磷酸盐或Tris的缓冲液;进一步的,所述平衡缓冲液为pH 6.0-8.5的包含磷酸盐或Tris-HCl的缓冲液;优选为pH 7.0-8.5的包含磷酸盐或Tris-HCl的缓冲液;优选为pH 7.3-8.5的包含PB的缓冲液;更优选为pH 7.3的包含约10mM PB,130mM NaCl的缓冲液;
- [0028] 进一步的,所述清洗缓冲液为包含磷酸盐、Tris或硼酸的缓冲液;进一步的,所述清洗缓冲液为pH 6.0-8.5的包含磷酸盐、Tris或硼酸的缓冲液;优选为pH6.6-8.4的包含磷酸盐或Tris-HCl的缓冲液;更优选为pH 8.3的包含约20mM PB,1M NaCl的缓冲液;
- [0029] 进一步的,所述洗脱缓冲液为包含磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或铵盐的缓冲液;进一步的,所述洗脱缓冲液为pH 2.5-9.0的包含磷酸盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或铵盐的缓冲液;进一步的,所述洗脱缓冲液可以是pH 2.5-3.5的包含HAc/NaAc、柠檬酸-磷酸氢钠或柠檬酸-柠檬酸钠的缓冲液;优选为pH 2.6-3.3的含约20mM HAc/NaAc的缓冲液;更优选为pH 3.0的含约20mM HAc/NaAc的缓冲液;进一步的,所述洗脱缓冲液还可以是pH 5.0-9.0的高pH盐洗脱液;优选为包含不低于1M的单价盐或3-5M的多价盐洗脱液;更优选为包含约2M镁盐或约4-5M钠盐的洗脱缓冲液;
- [0030] 进一步的,所述中和缓冲液为包含Tris或精氨酸的缓冲液;进一步的,所述中和缓冲液为pH 6.5-9.0的包含Tris或精氨酸的缓冲液;优选为pH 7.0-9.0的包含Tris-HCl的缓冲液;优选为pH 7.2-8.3的包含约1M Tris-HCl的缓冲液;更优选为pH 8.0的包含约1M Tris-HCl的缓冲液;
- [0031] 进一步的,本发明所述的亲和层析纯化可以在本领域常规的设备中进行;优选为层析柱中进行;
- [0032] 进一步的,所述平衡的方法为:用pH 6.0-8.5的平衡缓冲液平衡装有步骤1制得的HSA亲和层析介质的层析柱,以20-60cm/h流速平衡3-15个柱体积;
- [0033] 进一步的,所述上样的方法为:将20-80mL待纯化的样品以20-60cm/h流速通过平衡好的亲和层析柱;
- [0034] 进一步的,所述清洗的方法为:用pH 6.0-8.5的清洗缓冲液以20-60cm/h的流速清洗层析柱,用量为层析柱体积的3-15倍;
- [0035] 进一步的,所述洗脱的方法为:用pH 2.5-9.0的洗脱缓冲液以10-30cm/h的流速将抗HSA单域抗体或其融合蛋白从层析柱上洗脱下来,并收集洗脱峰得到洗脱样品,洗脱缓冲液用量为层析柱体积的3-15倍;
- [0036] 进一步的,所述中和的方法为:用pH 6.5-9.0的中和缓冲液调节洗脱样品至中性,即得;
- [0037] 进一步的,上述待纯化的样品为表达了抗HSA单域抗体或包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液;
- [0038] 进一步的,所述表达了包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液的制备方法如下:

[0039] 将具有治疗功能的多肽分子与抗HSA单域抗体通过柔性连接子串联,并插入至载体得到重组质粒,将重组质粒导入表达宿主细胞进行表达得到表达了包含抗HSA单域抗体的融合蛋白的细胞或培养液;

[0040] 进一步的,将具有治疗功能的多肽分子与抗HSA单域抗体以(GnS)_m柔性连接子串联,(注:n=0,1,2,3,4,……;m=0,1,2,3,4,……);

[0041] 进一步的,所述宿主细胞为细菌、酵母菌、丝状真菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞或植物细胞;

[0042] 进一步的,表达条件可根据所选宿主进行优化;

[0043] 进一步的,所述抗HSA单域抗体的重链可变区包含氨基酸序列为SEQ ID NO:1-3所示的HCDR或SEQ ID NO:4-6所示的HCDR;

[0044] 进一步的,所述重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示;

[0045] 进一步的,所述抗HSA单域抗体为“同一申请人于2018年11月6日申请的专利申请号为CN2018113141932,名称为抗人血清白蛋白单域抗体的制备及其用途;以及同一申请人于2018年11月6日申请的专利申请号为CN2018113141773,名称为一种新型抗人血清白蛋白抗体片段、制备方法和应用”专利中所述的单域抗体;

[0046] 进一步的,所述的各种缓冲液的配置方法参考《分子克隆》第二版,附录B:分子克隆中使用的试剂与缓冲液的配置;上海科学出版社,1993;

[0047] 进一步的,通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的抗HSA单域抗体或其融合蛋白的纯度进行分析,所述检测分析的条件均采用常规条件。

[0048] 和现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0049] (1)本发明提供了一种抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲层析纯化方法,通过改进纯化工艺,减少影响分子成药性因素的引入和简化工艺步骤,增加了目标蛋白的最终收率,获得了高纯度蛋白样品。

[0050] (2)降低了生产成本和工艺风险,且保证了此类单域抗体及其融合蛋白的成药性以及亲层析过程中的稳定性,有利于此类蛋白生物药在治疗中的有益效果。

附图说明

[0051] 图1为实施例1中纯化后的样品的SDS-PAGE分析图,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E”为纯化后的蛋白样品。

[0052] 图2为实施例2中纯化后的样品的SDS-PAGE分析图,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E”为纯化后的蛋白样品。

[0053] 图3为实施例3中纯化后的样品的SDS-PAGE分析图,其中“M”为蛋白分子量标记,“s”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E4”为纯化后的蛋白样品。

[0054] 图4为对比例1中纯化后的样品的SDS-PAGE分析图,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E3”为纯化后的蛋白样品。

[0055] 图5为对比例2中纯化后的样品的SDS-PAGE分析图,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E2”为纯化后的蛋白样品。

具体实施方式

[0056] 以下非限制性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面的理解本发明,但不以任何方式限制本发明。下述内容仅仅是对本申请要求保护的范围的示例性说明,本领域技术人员可以根据所公开的内容对本申请的发明作出多种改变和修饰,而其也应当属于本申请要求保护的范围之内。

[0057] 下面以具体实施例的方式对本发明作进一步的说明。本发明实施例中所使用的各种化学试剂如无特殊说明均通过常规商业途径获得。

[0058] 实施例1采用本发明的方法对抗HSA单域抗体进行纯化

[0059] (1) 亲和层析介质的制备

[0060] ①活化:称取一定量的Sepharose 4B干粉,按1:20 (w/v) 的比例加入一定体积的1mM HCl, pH 3.0的缓冲液,混匀后,400xg室温离心5min,弃上清;重复上述溶胀实验步骤一次;此时介质体积会溶胀至所称取干粉量的3.5倍;

[0061] ②偶联:向上述介质中按干粉1:5 (w/v) 的比例加入0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH 8.3的缓冲液,再按5-10mg HSA/mL介质的比例加入HSA,低转速下,于室温孵育1h或4℃孵育过夜;400xg室温离心5min,弃上清;

[0062] ③洗涤I:用5-10倍介质体积的0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH 8.3的缓冲液洗涤未结合的HSA蛋白;400xg室温离心5min,弃上清;

[0063] ④封闭:加入5-10倍介质体积的0.1M Tris-HCl, pH 8.0缓冲液,室温封闭2h或4℃封闭过夜;400xg室温离心5min,弃上清;

[0064] ⑤洗涤II:以5-10倍介质体积的0.1M HAc/NaAc, 0.5M NaCl, pH 4.0缓冲液洗涤,400x g室温离心5min,弃上清;

[0065] ⑥洗涤III:以5-10倍介质体积的0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0缓冲液洗涤,400x g室温离心5min,弃上清;

[0066] 以5-10倍介质体积的dd H₂O洗涤3次,400x g室温离心5min,弃上清;填料保存于20%乙醇(4℃),备用。

[0067] (2) 抗HSA单域抗体的制备

[0068] 按以下方法制备抗HSA的单域抗体,具体为:

[0069] ①抗HSA单域抗体文库的构建:将HSA与弗氏佐剂混合后免疫两只新疆双峰骆驼,每周一次共免疫七次。免疫结束后提取骆驼外周血细胞分离淋巴细胞干冰冷冻送至南京杰克赛斯生物科技有限公司进行单域抗体片段的提取分离。单域抗体片段提取分离的步骤为:提取总RNA,逆转录合成cDNA后利用巢式PCR扩增单域抗体片段,限制性内切酶酶切后连接进入噬菌体展示载体,电转进入感受态细胞。成功构建了两个独立的抗HSA的单域抗体噬菌体展示文库。通过梯度稀释文库涂于平板上计算单克隆数以测定库容,所得两个文库的大小均为约10⁸。从每个文库中随机挑取24颗单克隆进行菌落PCR检测,所建文库空载率均小于5%。

[0070] ②抗HSA单域抗体的筛选过程:将HSA偶联在酶标板上包被过夜,封闭液封闭后加入噬菌体文库, PBST多次洗涤后用TEA洗脱液将与HSA特异结合的噬菌体解离,并用来感染对数生长期的大肠杆菌细胞,扩大培养噬菌体用于下一轮筛选。每个文库经过三轮Bio-panning后均获得大于500倍的富集,达到了利用噬菌体展示技术筛选抗体库中结合HSA特

异性抗体的目的。

[0071] ③用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆:从两文库中随机选取600个单菌落接种培养,生长至对数期后,IPTG诱导表达,离心收集菌体后利用渗透冲击法从周质中获得粗提抗体,加入已包被HSA的酶标板中孵育,PBST洗板后分别以mouse Anti-HA tag抗体为一抗,羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体(goat anti-mouse alkaline phosphatase conjugate)为二抗结合,加入碱性磷酸酶显色并读取吸光度值,将OD值大于对照孔3倍以上的样品孔判定为阳性对照孔。将所有阳性克隆培养,提取质粒并进行测序,获得多个单域抗体序列,其中一条命名为NB22,其氨基酸序列如序列表中SEQ ID:9所示。

[0072] ④单域抗体在宿主菌大肠杆菌中的表达:根据前面获得的单域抗体NB22的氨基酸序列,经大肠杆菌密码子优化后合成基因片段并连入pET-22表达载体,将该质粒转化至BL-21感受态菌株(Bio-Rad)表达。将转化后的BL-21阳性克隆菌株接种到LB培养基培养至OD₆₀₀达到0.7左右,随后加入IPTG(终浓度1mM)于28℃、220rpm进行诱导表达过夜。离心(8000×g,15min,4℃)收集菌体细胞,获得待纯化的抗HSA单域抗体NB22的样品。

[0073] (3)抗HSA单域抗体的亲和层析纯化

[0074] 亲和层析介质:(1)中偶联有HSA的Sepharose 4B:HSA-conjugated Sepharose 4B

[0075] 待纯化的样品:(2)中收集的表达了抗HSA单域抗体NB22的菌体细胞

[0076] 按以下步骤对待纯化的样品进行亲和层析纯化:

[0077] ①平衡:将亲和层析柱接入纯化系统,用pH 7.0含10mM PB,130mM NaCl的平衡缓冲液平衡装有HSA的层析柱,以30cm/h流速平衡5个柱体积;

[0078] ②上样:将30mL待纯化的样品以30cm/h流速通过平衡好的亲和层析柱;

[0079] ③清洗:用pH 7.5的含20mM PB,1M NaCl的清洗缓冲液以30cm/h的流速清洗层析柱,用量为层析柱体积的5倍;

[0080] ④洗脱:用pH 2.8含20mM HAc-NaAc的洗脱缓冲液以10cm/h的流速将抗HSA单域抗体NB22从层析柱上洗脱下来,并收集洗脱峰得到洗脱样品,洗脱缓冲液用量为层析柱体积的5倍;

[0081] ⑤中和:用pH 7.0含1MTris-HCl的中和缓冲液调节洗脱样品至中性,400x g 4℃离心10min,取上清,得到纯化后的蛋白;

[0082] (4)采用SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的蛋白样品进行检测

[0083] 通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对(3)中纯化前后的蛋白样品的纯度进行鉴定,实验结果如图1所示,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E”为纯化后的蛋白样品。经SEC确认纯化后的蛋白样品的纯度都能达到95%以上。结果显示:采用本发明提供的纯化方法能够对抗HSA单域抗体进行有效的纯化。

[0084] 实施例2采用本发明的方法对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行纯化

[0085] (1)亲和层析介质的制备

[0086] ①活化:称取一定量的纤维素微球(PGMA-OH)按1:1.6(w/v)的比例加入一定体积的丙酮和1:0.8(w/v)的比例加入一定体积的环氧氯丙烷,120rpm搅拌0.5h,再向体系中匀速滴加1mol/L NaOH 120mL。恒温水浴,反应温度恒定在30℃,搅拌速度120rpm,反应5h。反应结束后将料液转移至砂芯漏斗中抽干,分别使用95%乙醇,去离子水洗至中性,将产品抽干,用pH 8.5的缓冲液(0.1M PB+1mM EDTA)清洗三次,抽干备用;

[0087] ②偶联:向上述介质中按干粉1:2(w/v)的比例加入0.1MPB,0.1MEDTA,pH 8.5缓冲液,再按5-10mg HSA/mL介质的比例加入HSA,混合均匀后,置于三口反应器中,全程通入N₂,于37℃,120rpm下反应24h,抽干;

[0088] ③洗涤I:用5-10倍介质体积的0.1M PB,0.1M EDTA,pH 8.5缓冲液洗涤未结合的HSA蛋白,抽干;

[0089] ④封闭:加入5-10倍介质体积的1M乙醇胺,pH 8.0缓冲液,搅拌速度120rpm,37℃条件下反应4h,抽干;

[0090] ⑤洗涤II:以5-10倍介质体积的0.1HAc/NaAc,0.5M NaCl,pH 4.0缓冲液洗涤,抽干;

[0091] ⑥洗涤III:以5-10倍介质体积的0.1M硼酸-四硼酸钠,0.5M NaCl,pH8.0缓冲液洗涤,4砂芯漏斗中抽干;

[0092] 以5-10倍介质体积的dd H₂O洗涤3次,抽干;填料保存于20%乙醇(4℃),备用。

[0093] (2)融合蛋白的构建与表达

[0094] 将人胰高血糖素样肽-1(7-37)(GLP-1,7-37)与抗HSA单域抗体NB22(按照实施例1中所述的方法制得)以(G4S)2柔性连接子串联,将序列经酵母密码子优化后合成重组蛋白基因片段并连入毕赤酵母表达载体pPIC9K,并将重组质粒电转化进入毕赤酵母GS115菌株中进行重组蛋白的表达,具体的方法是:将包含外源基因的pPIC9K载体用Sal I限制性内切酶进行线性化后,与毕赤酵母GS115感受态细胞按比例混合后使用电转仪进行电转化,将转化后细胞涂MD平板,30℃培养3天;将MD平板上的菌落用无菌水洗下来,转移至G418浓度分别为0.5,1.0,2.0,4.0mg/mL的YPD板上进行高拷贝筛选,30℃培养3天,分别挑不同G418浓度平板上的菌落进行表达鉴定,选取表达量最高的菌株进行放大培养表达,得到表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞。

[0095] (3)GLP-1-NB22融合蛋白的亲亲和层析纯化

[0096] 亲和层析介质:(1)中偶联有HSA的PGMA-OH:HSA-conjugated PGMA-OH

[0097] 待纯化的样品:(2)中表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞

[0098] 按以下步骤对GLP-1-NB22融合蛋白进行亲和层析纯化:

[0099] ①平衡:将亲和层析柱接入纯化系统,用pH 7.5含10mM Tri-HCl,130mM NaCl的平衡缓冲液平衡装有HSA的层析柱,以50cm/h的流速平衡10个柱体积;

[0100] ②上样:将50mL待纯化的样品以50cm/h的流速通过平衡好的亲和层析柱;

[0101] ③清洗:用pH 8.0含20mMPBS,1M NaCl的清洗缓冲液以50cm/h的流速清洗层析柱,用量为层析柱体积的10倍;

[0102] ④洗脱:用pH 3.0含20mM柠檬酸-柠檬酸钠的洗脱缓冲液以20cm/h的流速将融合蛋白GLP-1-NB22从层析柱上洗脱下来,并收集洗脱峰得到洗脱样品,洗脱缓冲液用量为层析柱体积的10倍;

[0103] ⑤中和:用pH 8.0含1M Tris-HCl的中和缓冲液调节洗脱样品至中性,400xg4℃离心10min,取上清,得到纯化后的蛋白;

[0104] (4)采用SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的蛋白样品进行检测

[0105] 通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对(3)中纯化前后的蛋白样品的纯度进行鉴定,实验结果如图1所示,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E”为纯

化后的蛋白样品。经SEC确认纯化后的蛋白样品的纯度都能达到95%以上。结果显示：采用本发明提供的纯化方法能够对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行有效的纯化。

[0106] 实施例3采用本发明的方法对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行纯化

[0107] (1) 亲和层析介质的制备

[0108] ①活化：称取一定量的PGMA-OH按1:1.6 (w/v) 的比例加入一定体积的丙酮和1:0.8 (w/v) 的比例加入一定体积的环氧氯丙烷，120rpm搅拌0.5h，再向体系中匀速滴加1mol/L NaOH 120mL。恒温水浴，反应温度恒定在30℃，搅拌速度120rpm，反应5h。反应结束后将料液转移至砂芯漏斗中抽干，分别使用95%乙醇，去离子水洗至中性，将产品抽干，用pH 8.5的缓冲液(0.1mPB+1mmEDTA)清洗三次，抽干备用；

[0109] ②偶联：向上述介质中按干粉1:2 (w/v) 的比例加入0.1MPB, 0.1MEDTA, pH 8.5缓冲液，再按5-10mg HSA/ml介质的比例加入HSA，混合均匀后，置于三口反应器中，全程通入N₂，于37℃，120rpm下反应24h，抽干；

[0110] ③洗涤I：用5-10倍介质体积的0.1M PB, 0.1M EDTA, pH 8.5缓冲液洗涤未结合的HSA蛋白，抽干；

[0111] ④封闭：加入5-10倍介质体积的1M乙醇胺，pH 8.0缓冲液。搅拌速度120rpm，37℃条件下反应4h，砂芯漏斗中抽干。

[0112] ⑤洗涤II：以5-10倍介质体积的0.1HAc/NaAc, 0.5M NaCl, pH 4.0缓冲液洗涤，抽干；

[0113] ⑥洗涤III：以5-10倍介质体积的0.1M硼酸-四硼酸钠, 0.5M NaCl, pH 8.0缓冲液洗涤，抽干；

[0114] 以5-10倍介质体积的dd H₂O洗涤3次，砂芯漏斗中抽干；填料保存于20%乙醇(4℃)，备用。

[0115] (2) 融合蛋白的构建与表达

[0116] 将人胰高血糖素样肽-1(7-37) (GLP-1, 7-37) 与抗HSA单域抗体NB22(按照实施例1中所述的方法制得)以(G4S)2柔性连接子串联，将序列经酵母密码子优化后合成重组蛋白基因片段并连入毕赤酵母表达载体pPIC9K，并将重组质粒电转化进入毕赤酵母GS115菌株中进行重组蛋白的表达，具体的方法是：将包含外源基因的pPIC9K载体用Sal I限制性内切酶进行线性化后，与毕赤酵母GS115感受态细胞按比例混合后使用电转仪进行电转化，将转化后细胞涂MD平板，30℃培养3天；将MD平板上的菌落用无菌水洗下来，转移至G418浓度分别为0.5, 1.0, 2.0, 4.0mg/mL的YPD板上进行高拷贝筛选，30℃培养3天，分别挑不同G418浓度平板上的菌落进行表达鉴定，选取表达量最高的菌株进行放大培养表达，得到表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞。

[0117] (3) GLP-1-NB22融合蛋白的亲和层析纯化

[0118] 亲和层析介质：(1) 中偶联有HSA的PGMA-OH:HSA-conjugated PGMA-OH

[0119] 待纯化的样品：(2) 中表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞

[0120] 按以下步骤对GLP-1-NB22融合蛋白进行亲和层析纯化：

[0121] ①平衡：将亲和层析柱接入纯化系统，用pH 8.0含10mM PB, 130mM NaCl的平衡缓冲液平衡装有HSA的层析柱，以60cm/h流速平衡12个柱体积；

[0122] ②上样：将60mL待纯化的样品以50cm/h流速通过平衡好的亲和层析柱；

[0123] ③清洗:用pH 8.0含10mM PB,130mM NaCl的清洗缓冲液以60cm/h的流速清洗层析柱,用量为层析柱体积的15倍;

[0124] ④洗脱:用pH 6.0含10mM PB,1.5M NaCl的洗脱缓冲液以30cm/h的流速将融合蛋白GLP-1-NB22从层析柱上洗脱下来,并按峰分管收集洗脱样品,洗脱缓冲液用量为层析柱体积的12倍;

[0125] ⑤中和:用pH 8.5含1M Tris-HCl的中和缓冲液调节洗脱样品至中性,400xg4℃离心10min,取上清,得到纯化后的蛋白;

[0126] (4) 采用SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的蛋白样品进行检测

[0127] 通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对(3)中纯化后的蛋白样品的纯度进行鉴定,实验结果如图1所示,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E4”为纯化后的不同收集管的蛋白样品。经SEC确认纯化后的蛋白样品的纯度都能达到95%以上。结果显示:采用本发明提供的纯化方法能够对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行有效的纯化。

[0128] 对比例1采用现有方法对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行纯化

[0129] (1) 样品的制备

[0130] 将人胰高血糖素样肽-1(7-37)(GLP-1,7-37)与抗HSA单域抗体NB22(按照实施例1中所述的方法制得)以(G4S)2柔性连接器串联,并在C端加6X组氨酸标签,合成融合蛋白基因片段,亚克隆至pPIC9K表达载体,并将重组质粒电转化进入毕赤酵母GS115菌株中进行重组蛋白的表达,具体的方法是:将包含外源基因的pPIC9K载体用Sac I限制性内切酶进行线性化,与毕赤酵母GS115感受态细胞混合后使用电转仪进行电转化,将转化后细胞涂MD平板,30℃培养3天,挑多个单克隆于3mL YPD培养基中,待OD₂₋₆时,离心,弃上清后加入3mL BMMY,并加1%的甲醇进行诱导,每24h加1%的甲醇,共诱导72h,收集发酵液上清。对有表达的酵母菌株用G418抗生素进行高拷贝筛选。将MD平板上的菌落用无菌水洗下来,转移至G418浓度分别为0.5,1.0,2.0,4.0mg/mL的YPD板上,30℃培养3天,挑最高浓度平板上的菌落进行表达鉴定,选取表达量最高的菌株进行放大培养表达,得到表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞。

[0131] (2) 采用镍柱亲和层析对融合蛋白进行纯化

[0132] 使用渗透压法处理表达了融合蛋白GLP-1-NB22的菌体细胞以提取周质蛋白,获得抗体粗提液,保存于4℃。将周质蛋白粗提液用0.22μm滤膜过滤,上样进入PBS缓冲液平衡的镍柱(实验室填装),PBS+5%洗脱缓冲液(300mM咪唑)洗柱,并收集洗脱峰。在IPTG诱导表达后的样品中加入上样缓冲液,于沸水浴处理5min。

[0133] 检测:通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的蛋白样品的纯度进行鉴定,实验结果如图4所示,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E3”为纯化后的蛋白样品,经SEC确认纯度达到90%。

[0134] 对比例2采用现有方法对包含抗HSA单域抗体的融合蛋白进行纯化

[0135] 待纯化的样品:实施例2所制备的表达了GLP-1-NB22融合蛋白的菌体细胞

[0136] 纯化步骤:采用阳离子纯化方法,对样品进行纯化

[0137] ①平衡:将阳离子层析柱连接入纯化系统,用pH 6.0含10mM PBS的平衡缓冲液平衡装有Sepharose的层析柱,以60cm/h流速平衡12个柱体积;

[0138] ②上样:将60mL待纯化的样品以50cm/h流速通过平衡好的阳离子层析柱;

[0139] ③清洗:用pH 6.0含20mM PB的清洗缓冲液以60cm/h的流速清洗层析柱,用量为层析柱体积的12倍;

[0140] ④线性洗脱:以pH 6.0含20mM PB,1M NaCl的洗脱缓冲液作为B液,以30cm/h的流速,0-100%B液,20柱体积进行线性洗脱GLP-1-NB22融合蛋白,并收集洗脱峰得到纯化后的蛋白E1-E3;

[0141] 检测:通过SDS-PAGE和SEC-HPLC对纯化后的蛋白样品的纯度进行鉴定,实验结果图5所示,其中“M”为蛋白分子量标记,“S”为表达样品上清,“FT”为上样流穿,“E1-E2”为纯化后的蛋白样品,经SEC确认纯度达到90%。

[0142] 综上所述可知,采用本发明提供的纯化方法可以显著提高抗HSA单域抗体或其融合蛋白样品的纯度,且保证了此类单域抗体及其融合蛋白的成药性(无标签段)以及在亲和层析过程中的稳定性,有利于此类蛋白生物药在治疗中的有益效果。

[0143] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]		序列表		
[0002]	<110>	瑞阳(苏州)生物科技有限公司		
[0003]	<120>	抗HSA单域抗体及其融合蛋白的亲合层析纯化方法		
[0004]	<130>	20181207		
[0005]	<160>	10		
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0		
[0007]	<210>	1		
[0008]	<211>	5		
[0009]	<212>	PRT		
[0010]	<213>	Artificial sequence		
[0011]	<400>	1		
[0012]		Ser Ala Cys Met Ala		
[0013]	1		5	
[0014]	<210>	2		
[0015]	<211>	17		
[0016]	<212>	PRT		
[0017]	<213>	Artificial sequence		
[0018]	<400>	2		
[0019]		Thr Ile Tyr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[0020]	1		5	10 15
[0021]		Gly		
[0022]	<210>	3		
[0023]	<211>	18		
[0024]	<212>	PRT		
[0025]	<213>	Artificial sequence		
[0026]	<400>	3		
[0027]		Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Gly Ala Lys Tyr		
[0028]	1		5	10 15
[0029]		Asn Asn		
[0030]	<210>	4		
[0031]	<211>	5		
[0032]	<212>	PRT		
[0033]	<213>	Artificial sequence		
[0034]	<400>	4		
[0035]		Thr Thr Cys Met Ala		
[0036]	1		5	
[0037]	<210>	5		
[0038]	<211>	17		

[0039] <212> PRT
 [0040] <213> Artificial sequence
 [0041] <400> 5
 [0042] Thr Ile Thr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0043] 1 5 10 15
 [0044] Gly
 [0045] <210> 6
 [0046] <211> 18
 [0047] <212> PRT
 [0048] <213> Artificial sequence
 [0049] <400> 6
 [0050] Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Ser Thr Val Tyr
 [0051] 1 5 10 15
 [0052] Asn Tyr
 [0053] <210> 7
 [0054] <211> 127
 [0055] <212> PRT
 [0056] <213> Artificial sequence
 [0057] <400> 7
 [0058] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0059] 1 5 10 15
 [0060] Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Ala
 [0061] 20 25 30
 [0062] Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 [0063] 35 40 45
 [0064] Ala Thr Ile Tyr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0065] 50 55 60
 [0066] Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser His Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0067] 65 70 75 80
 [0068] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys
 [0069] 85 90 95
 [0070] Ala Ala Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Gly Ala
 [0071] 100 105 110
 [0072] Lys Tyr Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0073] 115 120 125
 [0074] <210> 8
 [0075] <211> 127
 [0076] <212> PRT
 [0077] <213> Artificial sequence

[0078] <400> 8
 [0079] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0080] 1 5 10 15
 [0081] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Ala
 [0082] 20 25 30
 [0083] Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 [0084] 35 40 45
 [0085] Ala Thr Ile Tyr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0086] 50 55 60
 [0087] Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0088] 65 70 75 80
 [0089] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0090] 85 90 95
 [0091] Ala Ala Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Gly Ala
 [0092] 100 105 110
 [0093] Lys Tyr Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0094] 115 120 125
 [0095] <210> 9
 [0096] <211> 127
 [0097] <212> PRT
 [0098] <213> Artificial sequence
 [0099] <400> 9
 [0100] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0101] 1 5 10 15
 [0102] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Thr
 [0103] 20 25 30
 [0104] Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 [0105] 35 40 45
 [0106] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0107] 50 55 60
 [0108] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0109] 65 70 75 80
 [0110] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 [0111] 85 90 95
 [0112] Ala Ala Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Ser Thr
 [0113] 100 105 110
 [0114] Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0115] 115 120 125
 [0116] <210> 10

[0117] <211> 127
 [0118] <212> PRT
 [0119] <213> Artificial sequence
 [0120] <400> 10
 [0121] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0122] 1 5 10 15
 [0123] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Thr
 [0124] 20 25 30
 [0125] Cys Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
 [0126] 35 40 45
 [0127] Ala Thr Ile Thr Thr Gly Gly Thr Tyr Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0128] 50 55 60
 [0129] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0130] 65 70 75 80
 [0131] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0132] 85 90 95
 [0133] Ala Ala Asp Ala Ser Trp Gly Cys Arg Leu Ser Gly Ser Trp Ser Thr
 [0134] 100 105 110
 [0135] Val Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0136] 115 120 125

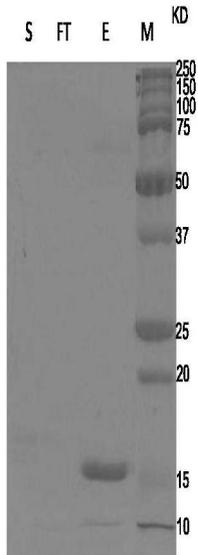


图1

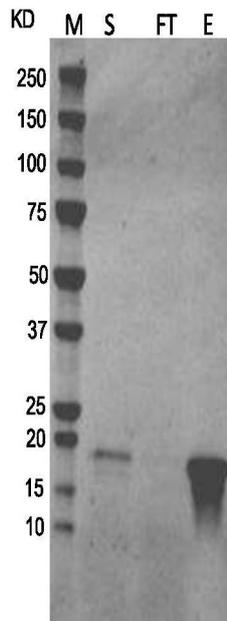


图2

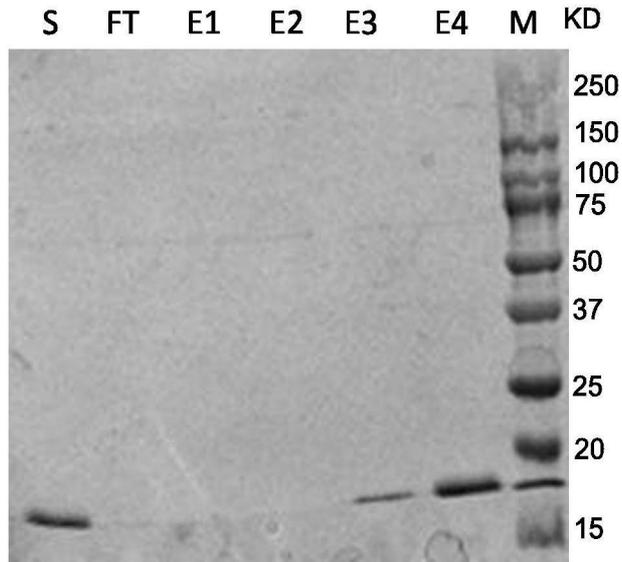


图3

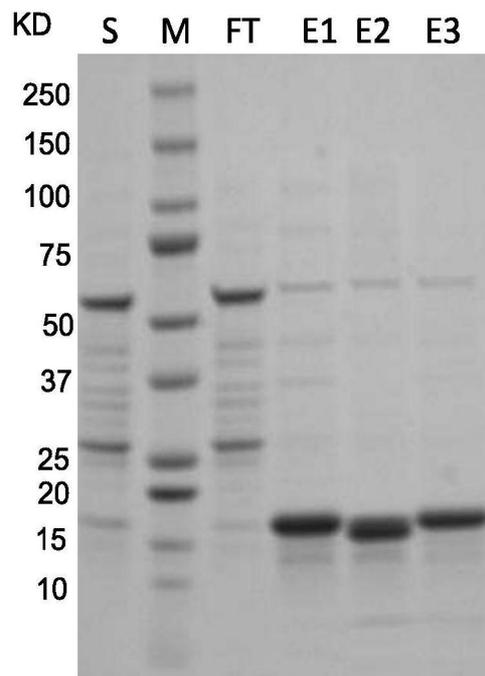


图4

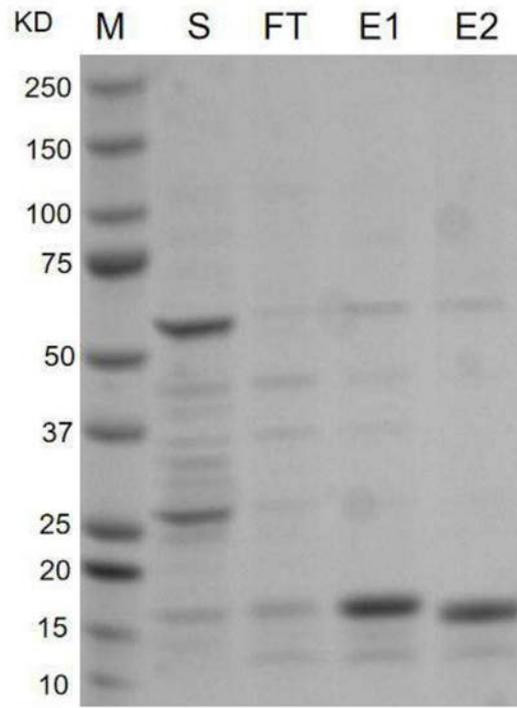


图5