

Cellufinet™ MAX DexS-VirS

这是一种新型色谱树脂，含有右旋糖酐硫酸盐聚合物配体，作为仿肝素物，用以捕获和纯化病毒与病毒样颗粒 (VLP)。

右旋糖酐硫酸酯是天然多糖右旋糖酐的合成衍生物，具有与肝素相似的生物活性。例如，右旋糖酐硫酸酯选择性地抑制 HIV-1 在活体内的复制或快速结合肝素辅因子 II。右旋糖酐硫酸酯还用于制备阳离子交换色谱树脂。JNC 公司开发了一种新型色谱树脂——Cellufine MAX DexS-VirS，该树脂结合高分子量的葡聚糖硫酸盐聚合物用于病毒和病毒样颗粒 (VLP) 的捕获与纯化。这种新型树脂是基于晶体状高度交联稳定的纤维素基珠体，非常适合大规模的生物制药生产。这种新型珠体结构具有耐碱性在线清洗的特点，能够在高流量模式下以最小的背压操作。表 1 概况了这种新型病毒和病毒样颗粒 (VLP) 亲和树脂的性能。

表 1. Cellufine MAX DexS-VirS 的性质

性质	
珠体基质	高交联纤维素体
粒径	平均 90 微米 (40-130 微米)
配体	高分子葡聚糖硫酸盐聚合物
在位清洗	0.5 M NaOH
溶菌酶吸附容量	> 56 mg/ml
操作压力	< 0.3 MPa

吸附在 Cellufine MAX DexS-VirS 树脂上的模型蛋白

JNC 研究了一系列与肝素模拟树脂结合的模型蛋白，并与 Cellufine 硫酸盐及葡聚糖硫酸盐包覆交联琼脂糖珠体进行了比较。图 1 为 DOE 实验等值线图，图 2 为不同树脂的 10% DBC 比较。

图 1. 乳铁蛋白与 Cellufine MAX DexS-VirS 结合的等高线图分析

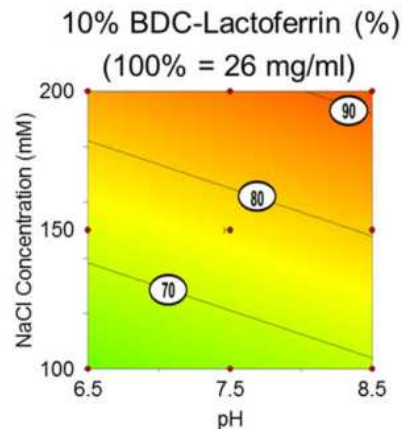
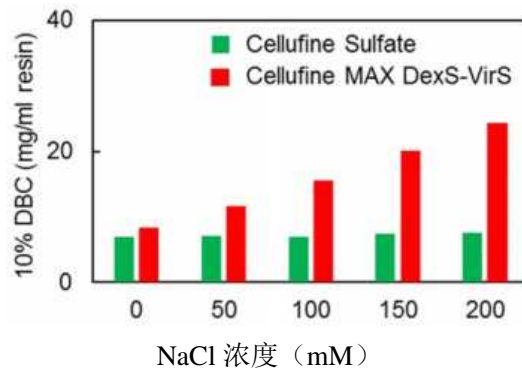
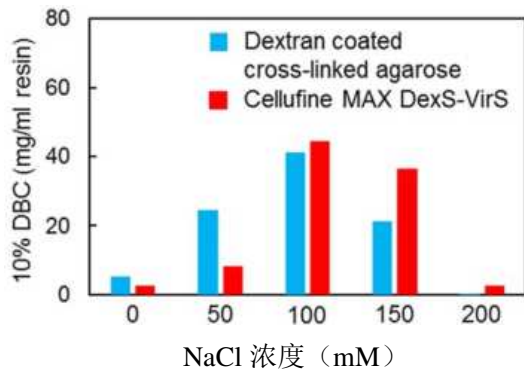


图 2. 乳铁蛋白与 Cellufine MAX DexS-VirS 及 Cellufine 硫酸盐的动态结合载量



在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速，停留时间为 4 分钟，测量动态结合载量。在 50mM Tris HCl 缓冲液,pH 7.5 + 0、50mM、100mM、150mM 和 200mM NaCl 中，以 2mg /ml 的速度加样溶菌酶。我们在 pH 为 5.0 的醋酸盐缓冲液中，在一定的盐浓度范围内，对多克隆免疫球蛋白 (IgG) 的结合进行了研究。下面的图 3 概括动态结合载量数据。

图 3. 多克隆免疫球蛋白 G 结合 Cellufine MAX DexS-VirS 及葡聚糖硫酸盐包覆交联琼脂糖珠体的动态结合载量



在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速, 停留时间为 4 分钟, 测量动态结合载量。在 10mM Tris HCl 缓冲液, pH5.0 + 0、50mM、100mM、150mM 和 200mM NaCl 中, 以 2mg /ml 的速度加样多克隆免疫球蛋白 G。

用 Cellufine MAX DexS-VirS 捕获灭活的流感病毒

利用硫酸右旋糖酐对交联琼脂糖的亲合性, 从尿囊和细胞培养样品 (参见文献 1) 中分离纯化出高纯度的灭活流感病毒。

表 2. 利用 Cellufine MAX DexS-VirS 回收灭活的流感病毒颗粒

A 组. Cellufine 硫酸盐

步骤	HA		血清总蛋白			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
上样	153,600	100	4.8	100	31.3	18.5	100	120.6
流穿	9,080	5.9	3.2	67.2	356.5	-	-	-
洗脱 1	69,920	45.5	0.2	4.1	2.8	2.0	10.7	28.3
洗脱 2	35,120	22.9	0.09	1.8	2.5	0.8	4.1	21.8
总回收 (率)	114,120	74.3	3.5	73.1	30.8	-	-	-

B 组. 包覆葡聚糖的交联琼脂糖

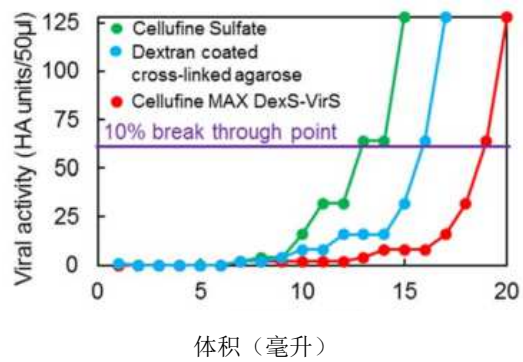
步骤	HA		血清总蛋白			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
上样	204,800	100	7.6	100	17.1	24.9	100	121.4
流穿	21,620	10.6	4.2	54.5	192.1	-	-	-
洗脱 1	122,560	59.8	0.4	5.0	3.1	1.6	6.2	12.7
洗脱 2	37,280	18.2	0.12	1.5	3.1	1.5	6.1	41
总回收 (率)	181,460	88.6	4.7	61.0	25.6	-	-	-

Ref. 1, Data file 28-9616-49 AA. Capto DeVirS, GE Healthcare Bio-Sciences AB

在纯化流程中捕获灭活流感病毒

(A/duck/Hokkaido/Vac-2/2007 H7N7) 并洗脱, 以测定 10% 动态结合载量。本研究采用 5 mm 内径×2.5 cm 长(0.49 mL 体积) 色谱柱在 10 mM 磷酸钠中, 120 mM NaCl 缓冲液, pH 7.4 中以 0.2 mL/min 的流速 (60 厘米/小时, 停留时间 2.5 分钟) 进行。通过测定在收集馏分中的 HA 病毒活性, 估计病毒吸附流穿量。其结果概述如下方图 4 和表 2 中。

图 4. 使用 Cellufine MAX DexS-VirS 捕获灭活流感病毒的 10% 动态结合载量



C 组. Cellufine MAX DexS-VirS

步骤	HA		Total protein			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
上样	204,800	100	6.4	100	31.3	24.7	100	120.6
流穿	7,760	3.8	4.1	64.2	530.7			
洗脱 1	139,520	68.1	0.4	5.9	2.7	3.0	12.0	21.3
洗脱 2	64,160	31.3	0.1	1.5	1.5	3.4	13.9	53
总回收（率）	211,440	103.2	4.6	71.6	21.7			

论述

乳铁蛋白显示，在最高 200mm NaCl，最大 pH 8.5 时上样，与 MAX DexS-VirS 结合的 10% 动态结合载量 > 20 mg/ml。在相同条件下，Cellufine 硫酸盐载量仅为 < 10mg/ml。在这两种情况下，它们的载量都随着 NaCl 的增加而下降。多克隆免疫球蛋白 G 在 pH 为 5.0 时表现出盐依赖的结合。灭活的流感病毒颗粒比 Cellufine 硫酸盐和覆有葡聚糖的琼脂糖的保留度增加(+55%)。

综上所述，右旋糖酐硫酸酯包覆的 Cellufine MAX DexS-VirS，与工业标准的 Cellufine 硫酸盐相比，对病毒的结合能力显著提高。

在病毒和病毒样颗粒（VLP）捕获和纯化过程中使用的其他纤维素产品

Cellufine ET clean (多聚赖氨酸) 能在生理 pH、离子强度为 $p = 0.02 - 1.0$ 和 $0 - 25^{\circ}\text{C}$ 时从细胞产物溶液中去除了毒素。

ET Clean S (2000 MWt. 截留孔径)

ET Clean L (> 2×10^6 MWt. 截留孔径)

CellufineGH-25 脱盐介质——基于多孔、球形、高度交联的纤维素颗粒。明显的 3kDa 排阻限允许蛋白质在孔隙体积中通过色谱柱，同时阻止内部孔隙中分子量较小的溶质。

说明	数量	产品编号
Cellufine MAX DexS-VirS	5x1 毫升微型柱	21800-51
	1x5 毫升微型柱	21800-15
	10 毫升	21800
	50 毫升	21801
	500 毫升	21802
	5 升	21803
	10 升	21804

JNC CORPORATION 公司

生命化学事业部

日本东京都千代田区大手町 2 丁目 2-1，邮政编码 100-8105

电话+ 81-3-3243-6150，传真+ 81-3-3234-6219

电子邮件: cellufine@jnc-corp.co.jp

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>