

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103159824 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201310048754.X

(22) 申请日 2013.02.06

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号
1310

(72) 发明人 阎锡蕴 王飞 冯静 杨东玲
卢迪 宋丽娜

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书11页 附图7页

(54) 发明名称

一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统及其在
无菌无热原蛋白质药物制备上的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种全封闭管路化的蛋白质纯化
系统和一种基于该纯化系统的纯化无菌无热原人
源化抗 CD146 单克隆抗体的方法。

1. 一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统,其特征在于至少包括以下模块:

微滤模块,所述微滤模块包括中空纤维柱、补液池、循环流通池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通池下部的另一个接口与所述补液池的一个接口密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力,在连接所述循环流通池和所述补液池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述补液池到所述循环流通池的动力;

至少一个蛋白质层析模块,所述至少一个蛋白质层析模块中的每一个包括蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;和

超滤模块,所述超滤模块包括中空纤维柱、循环流通/成品收集池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通/成品收集池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通/成品收集池的另一个接口作为所述超滤模块的入口,所述中空纤维柱的滤出接口与所述废液收集池密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力;

其中,所述微滤模块与所述至少一个蛋白质层析模块中的第一个之间通过滤出收集/待纯化样品池连接,所述滤出收集/待纯化样品池的一个接口与所述微滤模块的中空纤维柱的滤出接口密闭连接而另一个接口与所述至少一个蛋白质层析模块中的第一个的层析系统的入口多通阀密闭连接;

当所述至少一个蛋白质层析模块的数目大于1时,所述至少一个蛋白质层析模块之间通过纯化样品收集/待纯化样品池连接,所述纯化样品收集/待纯化样品池的一个接口与前一个蛋白质层析模块的出口多通阀密闭连接而另一个接口与后一个蛋白质层析模块的出口多通阀密闭连接;并且

所述至少一个蛋白质层析模块中的最后一个与所述超滤模块之间通过纯化样品收集/待超滤样品池连接,所述纯化样品收集/待超滤样品池的一个接口与所述至少一个蛋白质层析模块中的最后一个的出口多通阀密闭连接,而另一个接口与所述超滤模块的入口密闭连接,在连接所述超滤模块的入口和所述纯化样品收集/待超滤样品池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述纯化样品收集/待超滤样品池到所述超滤模块的入口的动力;

并且其中,在所述补液池、循环流通池、洗脱液池、平衡液池、废液收集池、循环流通/成品收集池、滤出收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待超滤样品池上预留有洗消液口。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质纯化系统,其中所述微滤模块中的中空纤维柱的微滤孔径为0.22-0.45 μm 。

3. 根据权利要求1所述的蛋白质纯化系统,其中所述至少一个蛋白质层析模块的所述蛋白层析柱中的层析介质包括:亲和层析介质、离子交换层析介质、疏水层析介质、凝胶过滤层析介质、反向层析介质和/或混合机制层析介质。

4. 一种利用权利要求 1 所述的蛋白质纯化系统纯化蛋白质的方法,所述方法包括以下步骤:

洗消处理步骤,利用洗消液通过所述各个池上预留的洗消液口对所述各个池进行洗涤消毒处理。

微滤步骤,利用所述微滤模块中的中空纤维柱,以切向流滤过的方式,除去液态培养表达物中的大颗粒和可能损害层析介质的杂质;

层析步骤,利用所述至少一个蛋白质层析模块的蛋白层析柱中的层析介质在相适应的缓冲液条件下,对经过所述微滤步骤的样品进行层析纯化;和

超滤浓缩和/或缓冲液置换步骤,利用所述超滤模块中的中空纤维柱,以截留方式对通过所述层析步骤获得的样品进行浓缩,和/或置换到所述样品可稳定保存的缓冲液体系中,最终获得蛋白质成品。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述超滤模块中的中空纤维柱的截留分子量小于目标蛋白分子量的一半,中空纤维膜面积与批次处理原液体积成正比。

6. 一种用于纯化抗 CD146 单克隆抗体的全封闭管路化系统,所述系统包括:

微滤模块,所述微滤模块包括孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的中空纤维柱、补液池、循环流通池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通池下部的另一个接口与所述补液池的一个接口密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力,在连接所述循环流通池和所述补液池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述补液池到所述循环流通池的动力;

捕获层析模块,所述捕获层析模块包括填充有 Protein A 配基亲和层析介质的蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;

凝胶过滤层析模块,所述凝胶过滤层析模块包括填充有 Superdex 200 凝胶过滤层析介质的蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;和

超滤模块,所述超滤模块包括截留分子量为 50kD 的中空纤维柱、循环流通/成品收集池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通/成品收集池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通/成品收集池的另一个接口作为所述超滤模块的入口,所述中空纤维柱的滤出接口与所述废液收集池密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力;

其中,所述微滤模块与所述捕获层析模块之间通过滤出收集/待纯化样品池连接,所述滤出收集/待纯化样品池的一个接口与所述微滤模块的中空纤维柱的滤出接口密闭连接而另一个接口与所述捕获层析模块的层析系统的入口多通阀密闭连接;

所述捕获层析模块与所述凝胶过滤层析模块之间通过纯化样品收集 / 待纯化样品池连接,所述纯化样品收集 / 待纯化样品池的一个接口与所述捕获层析模块的出口多通阀密闭连接而另一个接口与所述凝胶过滤层析模块的入口多通阀密闭连接;并且

所述凝胶过滤层析模块与所述超滤模块之间通过纯化样品收集 / 待超滤样品池连接,所述纯化样品收集 / 待超滤样品池的一个接口与所述凝胶过滤层析模块的出口多通阀密闭连接,而另一个接口与所述超滤模块的入口密闭连接,在连接所述超滤模块的入口和所述纯化样品收集 / 待超滤样品池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述纯化样品收集 / 待超滤样品池到所述超滤模块的入口的动力;

并且其中,在所述补液池、循环流通池、洗脱液池、平衡液池、废液收集池、循环流通 / 成品收集池、滤出收集 / 待纯化样品池、纯化样品收集 / 待纯化样品池、纯化样品收集 / 待超滤样品池上预留有洗消液体口。

7. 一种利用权利要求 6 所述的系统纯化抗 CD146 单克隆抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

洗消处理步骤,利用洗消液通过所述各个池上预留的洗消液口对所述各个池进行洗涤消毒处理。

微滤步骤,利用所述微滤模块中的孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的中空纤维柱,以切向流滤过的方式,除去液态培养表达物中的大颗粒和可能损害层析介质的杂质;

亲和层析步骤,利用所述捕获层析模块的填充有 Protein A 配基亲和层析介质的蛋白层析柱在相适应的缓冲液条件下,对经过所述微滤步骤的样品进行亲和层析纯化;

凝胶过滤层析步骤,利用所述凝胶过滤层析模块的填充有 Superdex200 凝胶过滤层析介质的蛋白层析柱在相适应的缓冲液条件下,对经过所述亲和层析步骤的样品进行凝胶过滤层析纯化;和

超滤浓缩和 / 或缓冲液置换步骤,利用所述超滤模块中的截留分子量为 50kD 的中空纤维柱,以截留方式对通过所述凝胶过滤层析步骤获得的样品进行浓缩,和 / 或进行缓冲液置换。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述洗消处理步骤中的洗消液是经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤的 500-1000mM 氢氧化钠溶液。

一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统及其在无菌无热原蛋白质药物制备上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质纯化领域。具体地说,本发明涉及一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统和一种基于该纯化系统的纯化无菌无热原人源化抗 CD146 单克隆抗体的方法。

背景技术

[0002] 蛋白质药物,相对于传统化学药物,具有特异性强、毒性低,生物学功能明确、有利于临床应用等优点。在蛋白质药物开发过程中,如何将其从成份复杂的表达体系中分离纯化出来,成为一个重要并且不可规避的环节。

[0003] 传统的蛋白质纯化方法,在样品的预处理、层析纯化和剂型工艺等阶段,有许多环节不得不在敞口环境下操作,使样品直接暴露于空气当中,从而大大增加了染菌和混入其他污染物的几率。而无菌、无热原及各项残留指标符合临床标准的蛋白质药物制备,是临床前及临床研究和批量生产中必须实现的。

[0004] 为了获得合格的蛋白质药物,国内外普遍采用在 GMP 或准 GMP 洁净环境下进行蛋白质药物的纯化制备这一策略,来排除空气中的悬浮颗粒及菌落所带来的污染。当然,建造 GMP 或者准 GMP 的环境,对于临床阶段及上市后大规模生产的蛋白质药物是必要并且必需的。但是,对于处在临床前研究阶段的药物,这将是一笔不小的开支和负担,往往限制了具有潜在治疗价值的蛋白质药物从实验室研究向临床研究的转化。

[0005] 抗体药物,作为当前蛋白质药物中最重要的一类,以其高度的特异性、安全性和有效性,成为国际药物市场上一大类新型治疗剂。至 2011 年 10 月,全球共有 36 个治疗性抗体药物获得批准上市。其中,美国及欧盟批准了 32 个(包括日本 1 个),中国批准了 3 个,德国批准了 1 个。这些抗体药物广泛覆盖了肿瘤、炎症、自身免疫性疾病等多种适应症。当前,抗体药物开发策略中,新药物靶点的发现和降低抗体免疫原性,成为了两个研究热点。

[0006] CD146,又名 MUC18, Me1-CAM/MCAM,是一种属于免疫球蛋白超家族的细胞黏附分子。CD146 胞外有五个免疫球蛋白样结构域(V-V-C2-C2-C2),并被高度糖基化,介导钙离子非依赖的细胞间相互黏附。CD146 最早发现是黑色素瘤的标志分子,参与黑色素瘤的转移及恶化。CD146 在黑色素肿瘤中的异常高表达增强了肿瘤细胞之间的黏附,并对于肿瘤的侵袭和转移非常重要。研究表明,CD146 的表达与黑色素瘤细胞的转移能力直接相关,而在不表达 CD146 的黑色素瘤细胞中过量表达 CD146 可以显著增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力。此外,CD146 也表达在少量的正常组织中,比如平滑肌,血管内皮和滋养层等。

[0007] 抗人 CD146 抗体在动物实验中表现出了很强的抑制肿瘤生长的治疗效果。据报道, Mills 等开发的抗 CD146 全人抗体, ABX-MA1 在裸鼠模型中显著地抑制黑色素瘤的生长、侵袭以及向肺部的转移。另外,如发明专利 ZL 991075862 所述,本课题组开发的抗 CD146 鼠单克隆抗体 AA98 具有抑制肿瘤血管生成的作用,并在多种裸鼠荷瘤实验中明显抑制肿瘤的生长。进一步的研究还揭示了 AA98 的抑制肿瘤血管生成的机制是通过抑制 MAPK 磷酸化以及 NF B 活化实现的。以上结果表明,CD146 是个非常有潜力的抗肿瘤及血管新生

相关疾病的药物新靶点。因此,人源化的 CD146 单克隆抗体的纯化制备工艺开发,成为了将其推向临床首当其冲的问题。

发明内容

[0008] 本发明的目的是,为解决临床前研究阶段建立 GMP 或准 GMP 环境投入高、风险大的难题,提供一种蛋白质纯化系统,该系统在普通生化实验室环境下,就可以纯化获得无菌无热原及各项残留符合临床指标的蛋白质药物,从而大大降低临床前研究阶段的投入和风险。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供了一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统。通过该系统,实现了在普通实验室环境下,从样品的预处理到粗纯化、精纯化以至浓缩剂型工艺的全过程封闭操作,达到了中试规模制备无菌无热原蛋白质药物的目的。

[0010] 本发明实现全封闭管路化系统的具体技术方案,其特征是:首先,分别建立微滤、蛋白质层析、超滤三类全封闭纯化模块;然后,按照目标蛋白质的纯化工艺路线,依次串联组装为全封闭管路化系统;一般蛋白质的纯化工艺,遵从的是从微滤到蛋白质层析再到超滤的顺序,但也不排除在多步骤层析工艺中,插入一个或者多个超滤浓缩或置换缓冲液的步骤;其中,所述的蛋白质层析模块,根据不同目标蛋白的不同层析工艺路线,还可以扩展为 2 个或若干个装填有相同或不同层析介质的模块。所述的层析介质包括:亲和层析介质、离子交换层析介质、疏水层析介质、凝胶过滤层析介质、反向层析介质或 / 和混合机制层析介质。所述的微滤和超滤模块,由蠕动泵提供动力,以驱使液体在模块内及向下一模块流动。所述的蛋白质层析模块,由其中的层析系统泵提供动力驱使液体在模块内及向下一模块流动;并由层析系统的缓冲液阀和出口阀控制缓冲液和样品的流路及流向。所述微滤、蛋白质层析和超滤模块,通过各模块中储液袋上预留的洗消液体口,定期泵入洗消液进行系统清洗消毒,消除可能存在的内毒素等杂质残留,以保持全封闭管路化系统的清洁,确保蛋白质纯化过程中不会引入外源的污染或多次使用之间的交叉污染。

[0011] 同时,本发明还利用所述全封闭管路化蛋白质纯化系统,开发了普适于多种药物蛋白质的,从液态培养表达物中分离纯化药物蛋白质的制备工艺。适用于该纯化工艺的药物蛋白质,应可溶性表达于液态基质中。该纯化工艺具体实施步骤如下:1. 微滤澄清步骤,使用中空纤维柱,以切向流滤过的方式,除去液态培养表达物中的大颗粒、可能损害层析介质的杂质。所述中空纤维柱微滤孔径为 0.22-0.45 μm ,中空纤维膜面积与批次处理样品体积成正比。2. 层析纯化步骤,使用层析介质在相适应的缓冲液条件下,对微滤澄清后的样品进行纯化;大多数药物蛋白质的层析步骤为 1 步捕获层析和后续的 1 至多步精细层析纯化;其中所涉及的层析介质可以为亲和层析介质、离子交换层析介质、疏水层析介质、凝胶过滤层析介质、反向层析介质或 / 和混合机制层析介质;经层析纯化步骤后,获得纯度大于 95%、内毒素、宿主蛋白残留和 Protein A 残留等指标符合临床质量标准原液。3. 超滤浓缩及缓冲液置换步骤,使用中空纤维柱,以截留方式使层析纯化步骤获得的药物蛋白原液获得浓缩,并置换到可稳定保存的缓冲液体系中,最终获得药物蛋白质成品。所述中空纤维柱截留分子量应小于目标蛋白分子量的一半为宜,中空纤维膜面积与批次处理原液体积成正比。

[0012] 此外,在所述全封闭管路化蛋白质纯化系统和药物蛋白质制备工艺基础上,本发

明还开发了人源化抗 CD146 单克隆抗体的纯化制备工艺。所述的人源化抗 CD146 单克隆抗体,由 CHO 细胞经无血清培养体系连续灌流悬浮培养,表达于培养上清中。为获得符合临床质量标准的人源化抗 CD146 单克隆抗体,本发明所述纯化制备工艺采用了四步法的纯化方法:首先,将含有目标抗体的培养上清,经由无菌无热原处理的硅胶管,从细胞培养袋泵入本发明所述的全封闭管路化蛋白质纯化系统,经微滤模块的 0.45 μm 中空纤维柱过滤,获得澄清的培养上清。然后,澄清的培养上清进入蛋白质亲和捕获层析纯化模块,在中性条件下上柱,经以 Protein A 为配基的亲和层析介质分离纯化,酸性条件下洗脱,在洗脱组分中获得粗纯化抗体。随后,粗纯化抗体进入蛋白质凝胶过滤精细层析纯化模块,经过 Superdex200 凝胶过滤层析介质的分离,在洗脱组分中获得纯度大于 95%、内毒素、宿主蛋白残留和 Protein A 残留等指标符合临床质量标准的抗体原液。最后,抗体原液进入超滤浓缩及缓冲液置换模块,经 50kD 截留分子量的中空纤维柱超滤浓缩并置换缓冲液体系,最终获得人源化抗 CD146 单克隆抗体成品。

[0013] 本发明的创新点在于:(1) 研制了一套全封闭管路化的蛋白质纯化系统,实现了在普通实验室环境下即可纯化制备符合临床质量标准的蛋白质药物;本发明在部分程度上替代了,必须通过建立耗资巨大的 GMP 车间,才能实现药物级别蛋白质制备的传统方法。(2) 所述蛋白质纯化系统具有模块化、灵活多变、易于扩展的特点,可以广泛适用于多种蛋白质药物的纯化制备。(3) 开发了一种中试规模纯化制备符合临床要求的人源化抗 CD146 单克隆抗体的工艺。该工艺过程设计合理,仅通过亲和-凝胶过滤两步层析,即获得纯度大于 95% 的纯品抗体;此外,该工艺过程衔接紧密,无任何敞口操作过程,从质量和产能上满足了所述抗体临床前研究各项实验的需求。

[0014] 归纳起来,本发明提供以下各项。

[0015] 1. 一种全封闭管路化的蛋白质纯化系统,其特征在于至少包括以下模块:

[0016] 微滤模块,所述微滤模块包括中空纤维柱、补液池、循环流通池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通池下部的另一个接口与所述补液池的一个接口密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力,在连接所述循环流通池和所述补液池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述补液池到所述循环流通池的动力;

[0017] 至少一个蛋白质层析模块,所述至少一个蛋白质层析模块中的每一个包括蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;和

[0018] 超滤模块,所述超滤模块包括中空纤维柱、循环流通/成品收集池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通/成品收集池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通/成品收集池的另一个接口作为所述超滤模块的入口,所述中空纤维柱的滤出接口与所述废液收集池密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力;

[0019] 其中,所述微滤模块与所述至少一个蛋白质层析模块中的第一个之间通过滤出收集/待纯化样品池连接,所述滤出收集/待纯化样品池的一个接口与所述微滤模块的中空纤维柱的滤出接口密闭连接而另一个接口与所述至少一个蛋白质层析模块中的第一个的层析系统的入口多通阀密闭连接;

[0020] 当所述至少一个蛋白质层析模块的数目大于 1 时,所述至少一个蛋白质层析模块之间通过纯化样品收集/待纯化样品池连接,所述纯化样品收集/待纯化样品池的一个接口与前一个蛋白质层析模块的出口多通阀密闭连接而另一个接口与后一个蛋白质层析模块的出口多通阀密闭连接;并且

[0021] 所述至少一个蛋白质层析模块中的最后一个与所述超滤模块之间通过纯化样品收集/待超滤样品池连接,所述纯化样品收集/待超滤样品池的一个接口与所述至少一个蛋白质层析模块中的最后一个的出口多通阀密闭连接,而另一个接口与所述超滤模块的入口密闭连接,在连接所述超滤模块的入口和所述纯化样品收集/待超滤样品池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述纯化样品收集/待超滤样品池到所述超滤模块的入口的动力;

[0022] 并且其中,在所述补液池、循环流通池、洗脱液池、平衡液池、废液收集池、循环流通/成品收集池、滤出收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待超滤样品池上预留有洗消液口。

[0023] 2. 根据第 1 项所述的蛋白质纯化系统,其中所述微滤模块中的中空纤维柱的微滤孔径为 0.22-0.45 μm 。

[0024] 3. 根据第 1 项所述的蛋白质纯化系统,其中所述至少一个蛋白质层析模块的所述蛋白层析柱中的层析介质包括:亲和层析介质、离子交换层析介质、疏水层析介质、凝胶过滤层析介质、反向层析介质或/和混合机制层析介质。

[0025] 4. 一种利用第 1 项所述的蛋白质纯化系统纯化蛋白质的方法,所述方法包括以下步骤:

[0026] 洗消处理步骤,利用洗消液通过所述各个池上预留的洗消液口对所述各个池进行洗涤消毒处理。

[0027] 微滤步骤,利用所述微滤模块中的中空纤维柱,以切向流滤过的方式,除去液态培养表达物中的大颗粒和可能损害层析介质的杂质;

[0028] 层析步骤,利用所述至少一个蛋白质层析模块的蛋白层析柱中的层析介质在相对应的缓冲液条件下,对经过所述微滤步骤的样品进行层析纯化;和

[0029] 超滤浓缩和/或缓冲液置换步骤,利用所述超滤模块中的中空纤维柱,以截留方式对通过所述层析步骤获得的样品进行浓缩,和/或置换到所述样品可稳定保存的缓冲液体系中,最终获得蛋白质成品。

[0030] 5. 根据第 4 项所述的方法,其中所述超滤模块中的中空纤维柱的截留分子量小于目标蛋白分子量的一半,中空纤维膜面积与批次处理原液体积成正比。

[0031] 6. 一种用于纯化抗 CD146 单克隆抗体的全封闭管路化系统,所述系统包括:

[0032] 微滤模块,所述微滤模块包括孔径为 0.45 μm 的中空纤维柱、补液池、循环流通池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通池下部的另一个接口与所述补液池的一个接口密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处

设置蠕动泵以提供循环动力,在连接所述循环流通池和所述补液池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述补液池到所述循环流通池的动力;

[0033] 捕获层析模块,所述捕获层析模块包括填充有 Protein A 配基亲和层析介质的蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;

[0034] 凝胶过滤层析模块,所述凝胶过滤层析模块包括填充有 Superdex200 凝胶过滤层析介质的蛋白层析柱、层析系统、洗脱液池、平衡液池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述洗脱液池和所述平衡液池通过所述层析系统的入口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,所述废液收集池通过所述层析系统的出口多通阀与所述蛋白层析柱密闭连接,该模块由所述层析系统提供动力;和

[0035] 超滤模块,所述超滤模块包括截留分子量为 50kD 的中空纤维柱、循环流通/成品收集池、废液收集池和实现密闭连接所需的相应的接头、接头卡箍和导管,所述中空纤维柱的上端和下端分别与所述循环流通/成品收集池的上下各一个接口密闭连接,所述循环流通/成品收集池的另一个接口作为所述超滤模块的入口,所述中空纤维柱的滤出接口与所述废液收集池密闭连接,在连接所述中空纤维柱下端和所述循环流通池下端的导管处设置蠕动泵以提供循环动力;

[0036] 其中,所述微滤模块与所述捕获层析模块之间通过滤出收集/待纯化样品池连接,所述滤出收集/待纯化样品池的一个接口与所述微滤模块的中空纤维柱的滤出接口密闭连接而另一个接口与所述捕获层析模块的层析系统的入口多通阀密闭连接;

[0037] 所述捕获层析模块与所述凝胶过滤层析模块之间通过纯化样品收集/待纯化样品池连接,所述纯化样品收集/待纯化样品池的一个接口与所述捕获层析模块的出口多通阀密闭连接而另一个接口与所述凝胶过滤层析模块的入口多通阀密闭连接;并且

[0038] 所述凝胶过滤层析模块与所述超滤模块之间通过纯化样品收集/待超滤样品池连接,所述纯化样品收集/待超滤样品池的一个接口与所述凝胶过滤层析模块的出口多通阀密闭连接,而另一个接口与所述超滤模块的入口密闭连接,在连接所述超滤模块的入口和所述纯化样品收集/待超滤样品池的导管处设置蠕动泵以提供液体从所述纯化样品收集/待超滤样品池到所述超滤模块的入口的动力;

[0039] 并且其中,在所述补液池、循环流通池、洗脱液池、平衡液池、废液收集池、循环流通/成品收集池、滤出收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待纯化样品池、纯化样品收集/待超滤样品池上预留有洗消液体口。

[0040] 7. 一种利用第 6 项所述的系统纯化抗 CD146 单克隆抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0041] 洗消处理步骤,利用洗消液通过所述各个池上预留的洗消液口对所述各个池进行洗涤消毒处理。

[0042] 微滤步骤,利用所述微滤模块中的孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的中空纤维柱,以切向流滤过的方式,除去液态培养表达物中的大颗粒和可能损害层析介质的杂质;

[0043] 亲和层析步骤,利用所述捕获层析模块的填充有 Protein A 配基亲和层析介质的

蛋白层析柱在相适应的缓冲液条件下,对经过所述微滤步骤的样品进行亲和层析纯化;

[0044] 凝胶过滤层析步骤,利用所述凝胶过滤层析模块的填充有 Superdex200 凝胶过滤层析介质的蛋白层析柱在相适应的缓冲液条件下,对经过所述亲和层析步骤的样品进行凝胶过滤层析纯化;和

[0045] 超滤浓缩和/或缓冲液置换步骤,利用所述超滤模块中的截留分子量为 50kD 的中空纤维柱,以截留方式对通过所述凝胶过滤层析步骤获得的样品进行浓缩,和/或进行缓冲液置换。

[0046] 8. 根据第 7 项所述的方法,其中所述洗消处理步骤中的洗消液是经 0.45 μ m 滤膜过滤的 500-1000mM 氢氧化钠溶液。

[0047] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0048] 图 1 为本发明基于通用药物蛋白质纯化工艺的全封闭管路化蛋白质纯化系统装配示意图。

[0049] 图 2 为本发明的蛋白质纯化系统中微滤模块组成装配示意图。

[0050] 图 3 为本发明的蛋白质纯化系统中蛋白质层析模块组成装配示意图。

[0051] 图 4 为本发明的蛋白质纯化系统中超滤模块组成装配示意图。

[0052] 图 5 为本发明基于人源化抗 CD146 单克隆抗体中试规模无菌无热原制备工艺的全封闭管路化蛋白质纯化系统装配示意图。

[0053] 图 6 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行亲和层析的层析图谱。

[0054] 图 7 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行亲和层析后的还原 SDS-PAGE 图。

[0055] 图 8 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行亲和层析后的 SEC HPLC 纯度分析图谱。

[0056] 图 9 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行凝胶过滤层析的层析图谱。

[0057] 图 10 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行凝胶过滤层析后的还原 SDS-PAGE 图。

[0058] 图 11 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行凝胶过滤层析后的 SEC HPLC 纯度分析图谱。

[0059] 图 12 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行超滤浓缩并置换缓冲液后的还原与非还原 SDS-PAGE 图。

[0060] 图 13 为利用本发明对人源化抗 CD146 单克隆抗体进行超滤浓缩并置换缓冲液后的 SEC HPLC 纯度分析图谱。

具体实施方式

[0061] 为了更全面地理解和应用本发明,下面将结合附图对本发明的实施例进行详细介绍

[0062] 实施例一:全封闭管路化蛋白质纯化系统的组成装配

[0063] 本发明所述全封闭管路化蛋白质纯化系统,针对可溶性分泌表达基因工程蛋白的

表达后分离纯化工艺,包含了分别执行微滤澄清、层析纯化、超滤浓缩和剂型等工艺步骤的硬件模块。本发明的技术关键点和创新点在于,将以往分离并半封闭操作的各工艺步骤及硬件,通过适当的连接工具组装成为一个可按顺序连续操作并全封闭的工艺及硬件体系。如图 1 所示,该纯化系统的组成装配包括以下具体内容:

[0064] 第一,本发明所述纯化系统中执行微滤工艺的硬件模块由 1 根 0.45 μm 孔径中空纤维柱 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、2 台蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司)、3 个带有 4 个 1/2 英寸接头和一个鲁尔接头的 ReadyToProcess™ 储液袋 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、若干 ReadyToMate™ 接头 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、若干接头卡箍 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.) 和若干硅胶管 (保定兰格恒流泵有限公司) 组成。如图 2 所示,该模块中各组件的装配方式为:在中空纤维柱上下两端接头位置分别套入一根 1 米长的 82# 硅胶管,两根硅胶管的另外一端分别插入一个 3/8 英寸 ReadyToMate™ 接头;中空纤维柱上下端硅胶管分别通过所配接头与作为循环流通池的储液袋上下的两个 1/2 英寸接头相连接,并由接头卡箍锁定密封,由此构成一个密闭循环体系,并在中空纤维柱下端硅胶管的中段放置一台蠕动泵提供循环动力;另取一根 1 米长 36# 硅胶管,在其两端均插入一个 1/4 英寸接头,然后一端与作为循环流通池的储液袋的一个 1/2 英寸接头相连接,另一端与作为补液流通池的储液袋的一个 1/2 英寸接头相连接,均由接头卡箍锁定密封,由此构成补液通路,并在该段硅胶管中段放置一台蠕动泵提供补液动力;再取一根 1 米长 36# 硅胶管,一端直接套入中空纤维柱的滤出接口上,另外一端插入一个 1/4 英寸接头,然后与作为滤出收集/待纯化样品池的衔接储液袋的一个 1/2 英寸接头相连接,由接头卡箍锁定密封,由此组装成具有两台蠕动泵,可完成连续不间断补液过滤的微滤模块。

[0065] 第二,本发明所述纯化系统中执行蛋白质层析工艺的硬件模块,由 1 套 AKTA Avant 层析系统 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.) 与若干带有 4 个 1/2 英寸接头和一个鲁尔接头的 ReadyToProcess™ 储液袋 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、1 个 **Reacon®** 储液桶 (Nalgen Corp.)、1 根层析柱及与纯化工艺相适应的层析介质 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、若干鲁尔接头 (北京捷联特科技有限公司) 和若干硅胶管 (保定兰格恒流泵有限公司) 组成。如图 3 所示,各组件装配方式为:作为待纯化样品池的储液袋、平衡缓冲液储液袋、洗脱缓冲液储液袋均通过各自的鲁尔接头分别与一根配有相应鲁尔接头的 16# 硅胶管相连接,每根硅胶可直接套于 AKTA Avant 层析系统入口八通阀相配套的进液硬管上,达到与层析系统封闭连接的目的;以同样方式,作为纯化样品池的储液袋和废液桶与系统出口八通阀相连接;装填有层析介质的层析柱上下两端分别通过系统配套接口与系统泵及出口八通阀相连接;由此,组装成为全封闭的蛋白质层析模块。

[0066] 第三,本发明所述纯化系统中执行超滤功能的硬件模块,由 1 根特定截留分子量中空纤维柱 (截留分子量根据目标蛋白质分子量而定)、2 台蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司)、2 个带有 4 个 1/2 英寸接头和一个鲁尔接头的 ReadyToProcess™ 储液袋 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、1 个 **Reacon®** 储液桶 (Nalgen Corp.)、若干 ReadyToMate™ 接头 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、若干接头卡箍 (GE healthcare Bio-Sciences Corp.)、若干鲁尔接头 (北京捷联特科技有限公司) 和若干硅胶管 (保定兰格恒流泵有限公司) 组成;各组件装配方式为:在中空纤维柱上下两端接头位置分别套入

一根 1 米长的 36# 硅胶管,两根硅胶管的另外一端分别插入一个 1/4 英寸 ReadyToMate™ 接头;中空纤维柱上下端硅胶管分别通过所配接头与作为循环流通池的储液袋上下的两个 1/2 英寸接头相连接,并由接头卡箍锁定密封,由此构成一个密闭循环体系,并在中空纤维柱下端硅胶管的中段放置一台蠕动泵提供循环动力;另取一根 1 米长 36# 硅胶管,在其两端均插入一个 1/4 英寸接头,然后一端与作为循环流通池的储液袋的一个 1/2 英寸接头相连接,另一端与作为待超滤样品池的储液袋的一个 1/2 英寸接头相连接,均由接头卡箍锁定密封,由此构成进液通路,并在该段硅胶管中段放置一台蠕动泵提供进液动力;再取一根两端均装配鲁尔接头的 16# 硅胶管,一端与作为循环流通池的储液袋的鲁尔接头相连接,一端与特制样品收集瓶上的鲁尔接头相连接;最后,取一根 1 米长 16# 硅胶管,一端直接套入中空纤维柱的滤出接口上,另外一端装配鲁尔接头,然后与废液桶相连接;由此,组装成为全封闭的超滤模块。

[0067] 第四,如图 1 所示,以微滤模块中作为滤出收集池的储液袋为衔接工具,将其作为捕获层析模块中的待纯化样品池,按照本实施例第二步所描述方式,装配连接于层析系统入口八通阀,实现微滤模块与捕获层析模块的封闭组装;然后,将捕获层析模块中作为纯化样品收集池的储液袋,作为精细层析模块 1 中的待纯化样品池,同样按照本实施例第二步所描述方式装配连接,实现捕获层析模块与精细层析模块 1 的封闭组装;以同样方式,精细层析模块 1 与精细层析模块 2,精细层析模块 2 与超滤模块,均以衔接储液袋介导的方式实现顺序串连全封闭组装。

[0068] 基于从液态培养表达物中分离纯化可溶性药物蛋白质的一般工艺,含有目标药物蛋白质的粗样品先经过微滤模块进行澄清,然后进入蛋白层析模块;蛋白质层析模块一般扩展为 1 步捕获层析模块和后续的 2 步精细层析纯化模块,根据具体药物蛋白质的具体理化性质,在亲和层析介质、离子交换层析介质、疏水层析介质、凝胶过滤层析介质、反向层析介质或混合机制层析介质中选择合适的层析介质进行搭配;经过三层析纯化的药物蛋白质,在纯度和各项残留指标上应可达到临床药物质量标准,如果有特殊蛋白质需要更多层析纯化步骤,相应的层析模块数量也可扩展为相应的个数;随后,纯品蛋白质进入超滤模块,进行浓缩和缓冲液置换,最终获得药物蛋白质成品。

[0069] 通过所述全封闭管路化系统,药物蛋白质从表达后到成品剂型的全部工艺,都在环境可控的全封闭系统内完成,排除了外源污染物的干扰,保证了药物蛋白质的质量可控;另外,后一模块可以即时处理前一模块的纯化产物,同时前一模块可以继续进行下一批次的纯化任务,由此达到整个系统各模块的同时工作,处理多批次的样品,大大提高了蛋白质纯化制备的效率,缩短了纯化制备周期,对于保持药物蛋白质的天然活性也大有益处。

[0070] 实施例二:适用于人源化抗 CD146 单克隆抗体的全封闭管路化系统及中试规模无菌无热原纯化制备工艺

[0071] 图 5 是本发明所述,结合人源化抗 CD146 单克隆抗体纯化工艺的全封闭管路化蛋白质纯化系统装配示意图。如图所示,该系统按照工艺先后顺序,依次为基于孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的中空纤维柱的微滤模块、基于 Protein A 配基 (GE healthcare Bio-Sciences Corp. Product Code :17-5474-02) 亲和层析介质的捕获层析模块、基于 Superdex200 (GE healthcare Bio-Sciences Corp. Product Code :17-1043-01) 凝胶过滤层析介质的精细层析模块和基于 50kD 截留分子量中空纤维柱的超滤模块;以上各模块,以本发明实施例一中

所描述方式,装配组成全封闭管路化系统。CHO 细胞 (Invitrogen Corp. Cat. No. 11619-012) 经本领域技术人员已知的无血清连续灌注悬浮培养,获得含有本发明所述人源化抗 CD146 单克隆抗体的培养上清后,经过如下步骤进行纯化制备:

[0072] 1、全封闭管路化系统的清洗消毒无菌无热原处理。

[0073] 2、0.45 μm 孔径中空纤维柱过滤,获得澄清的培养上清。

[0074] 3、Protein A 抗体亲和层析,捕获培养上清中的目标抗体。

[0075] 4、Superdex200 凝胶过滤层析,获得纯品抗体单体。

[0076] 5、50kD 截留分子量中空纤维柱,超滤浓缩并置换缓冲液体系。

[0077] 6、质量检定,包括纯度分析、无菌、无热原、Protein A 残留、CHO 宿主蛋白残留等实验

[0078] 以下对上述步骤进行详细说明:

[0079] 1、洗消处理:

[0080] (1) 配制 500-1000mM 的氢氧化钠溶液,并经 0.45 μm 滤膜过滤除去悬浮杂质。

[0081] (2) 从各储液袋预留洗消口,泵入配制好的氢氧化钠溶液,至充满整个管路,并浸泡 2-8 小时。

[0082] (3) 从洗消口将 NaOH 溶液彻底泵出,并泵入无菌无热原超纯水,充满整个管路,浸泡清洗 15 分钟后彻底泵出。

[0083] (4) 重复超纯水清洗步骤 4 次,完成洗消处理,取第四次清洗水样进行无菌、无热原检定。

[0084] 2、过滤澄清:

[0085] (1) 将培养上清储液袋作为补液池连入微滤模块,接口过程喷淋 75% 医用酒精以控制环境。

[0086] (2) 以 2000-4000ml/min 恒定流速使培养上清循环流过 0.45 μm 孔径中空纤维柱微滤柱,滤出速度为 100-200ml/min。

[0087] (3) 澄清后的培养上清,流入封闭连接与中空纤维柱滤出口的滤出收集池中,细胞碎片等大颗粒杂质截留于循环流通池中。

[0088] 3、Protein A 亲和层析:

[0089] (1) 层析柱: XK50/20, 层析介质: MabSelect SuRe, 层析系统: AKTA Explorer100。

[0090] (2) 平衡缓冲液: 20-200mM 磷酸盐缓冲液、pH5-8; 洗脱缓冲液: 20-200mM 柠檬酸盐缓冲液、pH2-4。

[0091] (3) 使用平衡缓冲液将层析柱平衡 10 个柱体积,将过滤澄清后的培养上清直接上样;上样完成后,使用平衡缓冲液冲洗去未结合蛋白质;然后,使用洗脱缓冲液洗脱目标抗体;通过切换样品阀,洗脱后的目标抗体流入粗纯化样品储液袋,准备进行下一层析步骤的分离纯化。

[0092] 4、Superdex200 凝胶过滤层析:

[0093] (1) 层析柱: XK50/100, 层析介质: Superdex200, 层析系统: AKTAAvant150。

[0094] (2) 洗脱缓冲液: 20-200mM 磷酸盐缓冲液、pH5-8。

[0095] (3) 使用洗脱缓冲液将层析柱平衡 3 个柱体积,将粗纯化样品按照 1% -5% 柱体积上样;上样完成后,使用洗脱缓冲液进行洗脱,第二个洗脱峰为抗体单体;通过切换样品

阀,抗体单体流入精纯化样品储液袋,准备进入下一纯化步骤。

[0096] 5、超滤浓缩和缓冲液置换

[0097] (1) 根据精纯化样品中的抗体浓度及目标浓度,计算出相应的目标浓缩体积。

[0098] (2) 将抗体单体由精纯化样品储液袋泵入超滤循环流通池。

[0099] (3) 以 1000-2000ml/min 恒定流速循环流过 50kD 截留分子量中空纤维超滤柱,滤出速度为 10-50ml/min,滤出液流入密闭废液桶。

[0100] (4) 当循环流通池中液体体积达到目标体积后,通过纯化样品收集 / 待超滤样品池的预留接口,以完全封闭连接的方式,泵入 10 倍体积置换目标缓冲液,继续超滤浓缩至目标体积。

[0101] (5) 重复置换缓冲液 3 次,浓缩至目标体积后,由成品抗体药物出口泵入无菌无热原收集瓶,完成全部纯化步骤。

[0102] 6、质量检定:

[0103] (1) 无菌实验,按照中华人民共和国药典 2010 年版三部附录 89 页“无菌检查法”进行。细胞培养无菌实验结果应为阴性。

[0104] (2) 内毒素检测,按照中华人民共和国药典 2010 年版三部附录 95 页“细菌内毒素检查法”进行。细菌内毒素应 $< 0.3\text{EU}/\text{mg}$

[0105] (3) Protein A 残留检测,使用美国 Cygnus Technologies 公司 Protein A 残留量 ELISA 测定专用试剂盒。残留量应 $< 100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0106] (4) CHO 宿主蛋白残留检测,使用美国 Cygnus Technologies 公司 CHO 细胞蛋白残留量 ELISA 测定专用试剂盒。残留量应 $< 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0107] (5) 纯度分析,使用 SDS-PAGE 法与 SEC HPLC 法进行测定。纯度应 $> 95\%$ 。

[0108] 结果:

[0109] 1、系统清洗消毒:

[0110] 经检测,清洗消毒后的全封闭管路化蛋白纯化系统无细菌检出,无内毒素检出。

[0111] 2、亲和层析:

[0112] 图 5 为亲和层析的层析图谱,批次共上样 64.6L 过滤澄清后培养上清,低 pH 值洗脱获得 335 毫升粗纯化抗体。经纯度分析,图 6 为 SDS-PAGE、图 7 为 SEC HPLC,综合两种分析法表明,经过一步纯化,抗体纯度达到 90% 以上,其中抗体单体占约 72%,抗体聚体(主要为二聚体)占约 20%。

[0113] 3、凝胶过滤层析:

[0114] 图 8 为凝胶过滤层析的层析图谱,图中第一个峰为抗体聚体,第二个峰为抗体单体,两峰可以获得有效分离。收集纯品抗体单体进行纯度分析,图 9 为 SDS-PAGE、图 10 为 SEC HPLC,综合两种分析法表明,经过第二步纯化,抗体纯度达到 97.6%。

[0115] 4、成品抗体药物质量检定:

[0116] 经超滤浓缩并置换缓冲液后,获得成品抗体药物,取样进行检定。图 11 为还原与非还原 SDS-PAGE、图 12 为 SEC HPLC,综合两种分析法表明,抗体纯度达到 99.2%,远大于蛋白质药物纯度 95% 的临床标准。

[0117] 无菌实验结果表明无细菌生长。

[0118] 内毒素、Protein A、CHO 宿主蛋白残留检测表明均符合临床标准(表 1)

[0119] 表 1. 成品抗体药物各项残留定量检测结果

[0120]

日期	样品	抗体含量			纯度%	效价 (1mg/ml)	残留检测			
		Nanodrop (mg/ml)	BCA (mg/ml)	ELISA (mg/ml)			内毒素 (EU/ml)	内毒素 (EU/mg)	ProteinA (ng/ml)	HCP (ng/ml)
2011.11.24	浓缩后	4.757	5.257		99%		0.003	0.000631	无检出	无检出
2011.11.25	换冻干缓冲液后	6.824	7.158		99%		0.016	0.002345	1.081	无检出

[0121] 最后应说明的是,以上实施例仅是结合实际技术方案对本发明的说明,而非对本发明具体实施范围的限制。本发明所涉及的技术领域的技术人员应该理解,在不脱离本发明所述全封闭、管路化及模块化等技术方案的构思和精神范围前提下,对本发明技术方案进行的任何修改、推演或等同替换,均应涵盖在本发明的专利保护范围内。

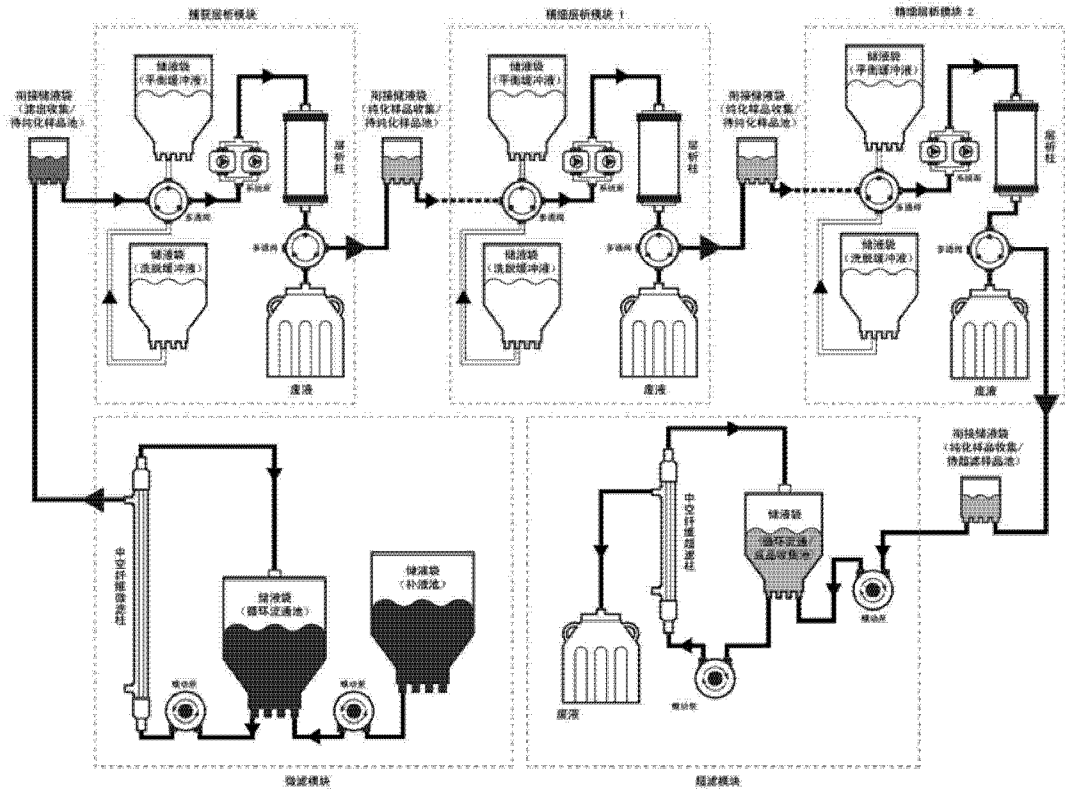


图 1

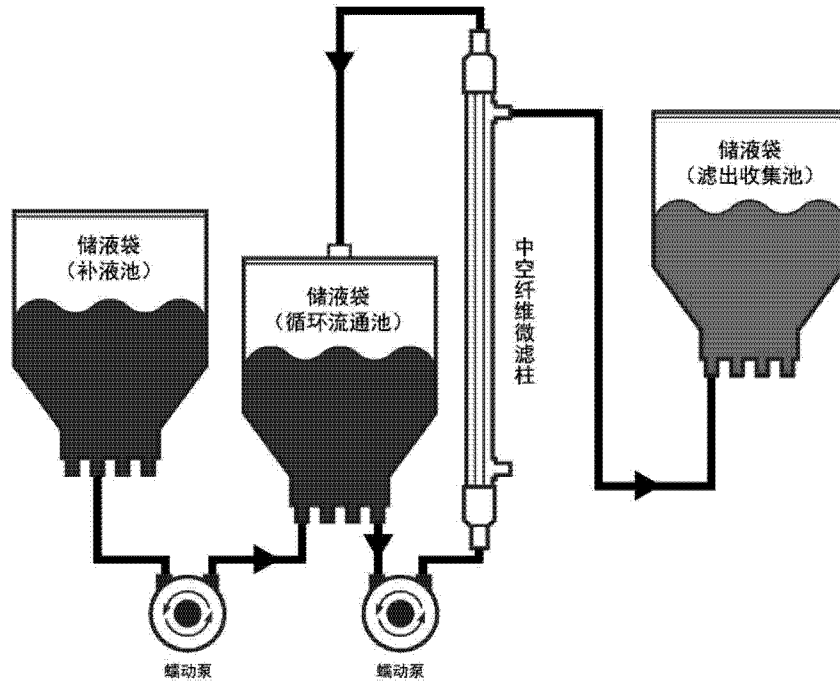


图 2

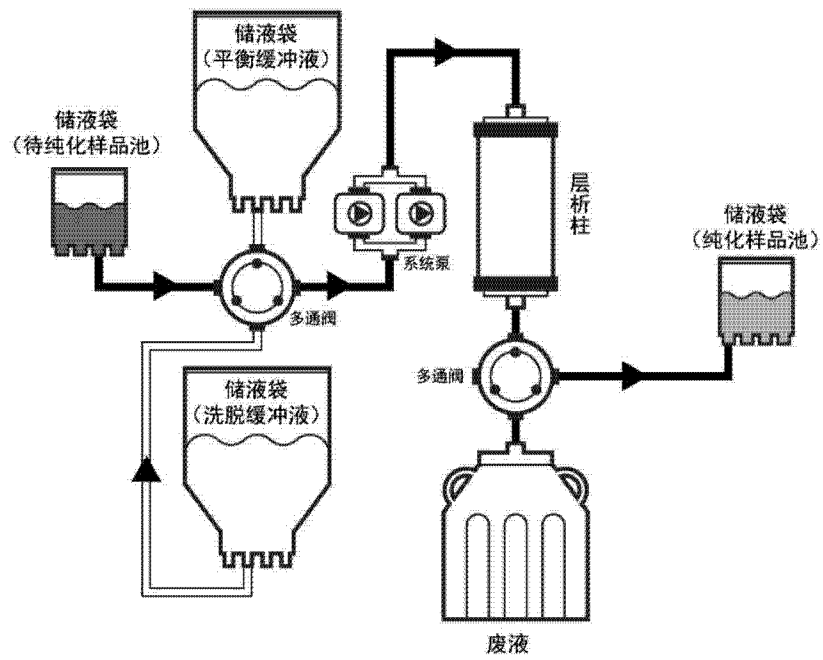


图 3

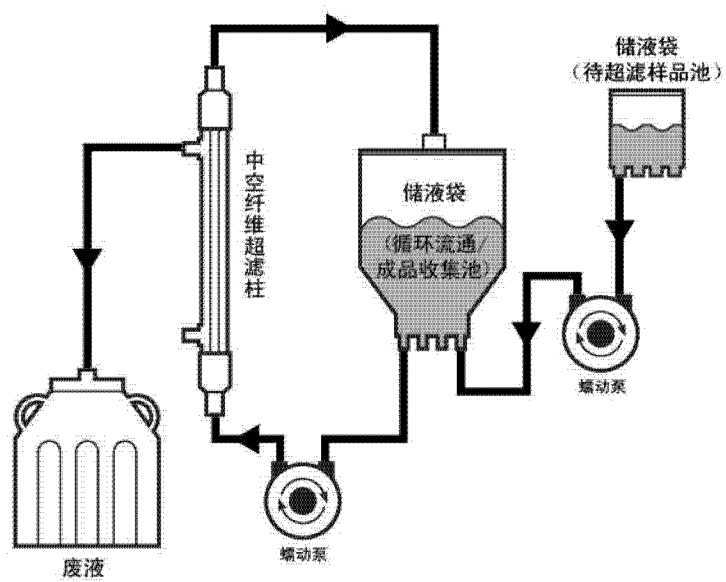


图 4

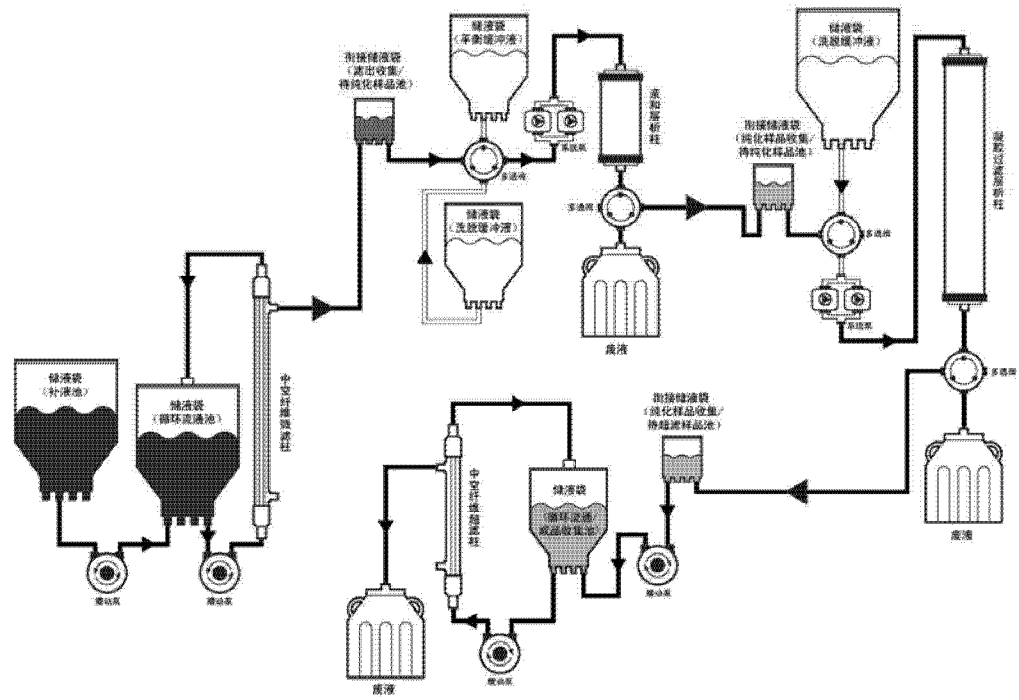


图 5

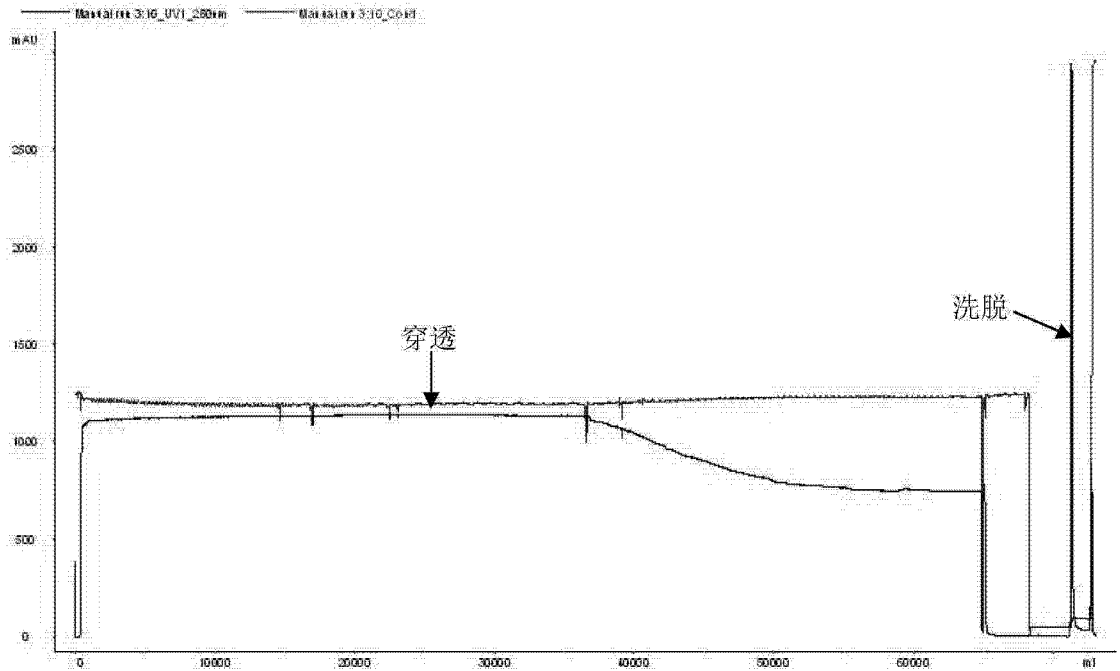


图 6

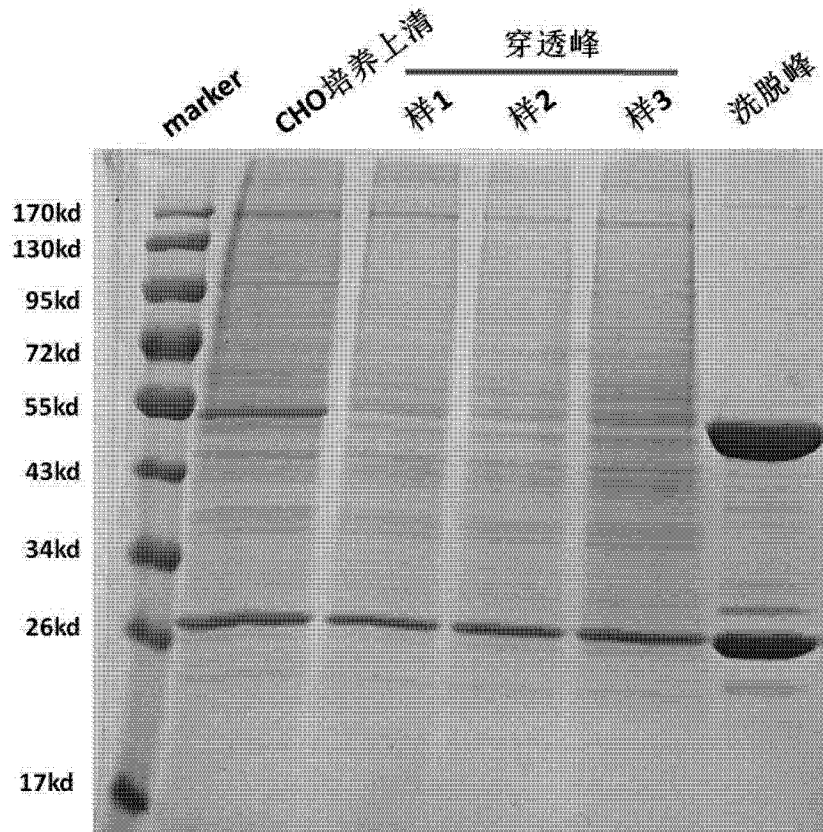
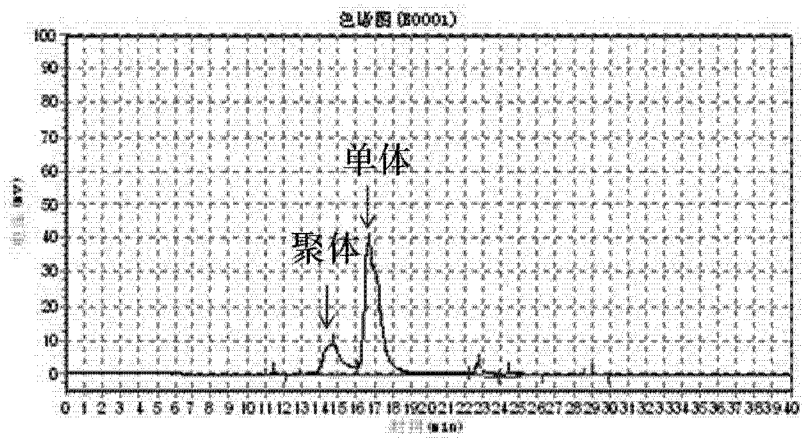


图 7



分析结果表

峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1		11.432	124.525	2909.300	0.0907
2		14.690	9134.136	669130.750	20.8648
3		16.690	38861.914	2374637.750	74.0459
4		22.790	5346.077	123865.070	3.8000
5		24.457	761.444	37036.802	1.1549
6		29.123	44.632	1399.400	0.0436
总计			52272.208	3206978.872	100.000

图 8

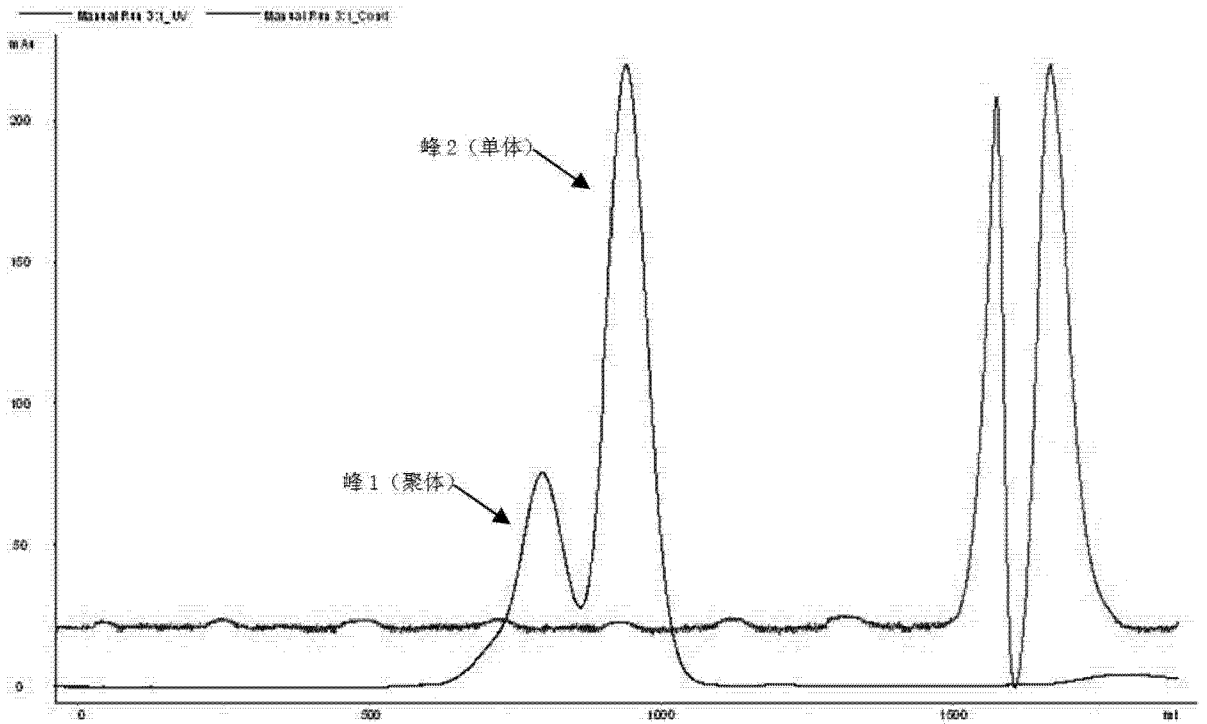


图 9

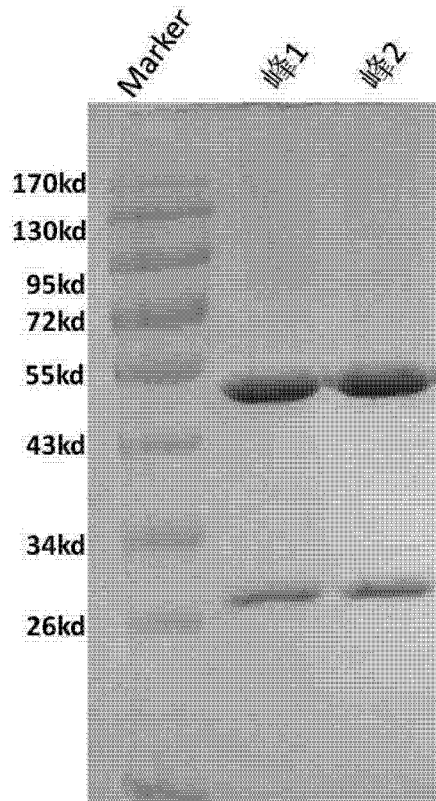
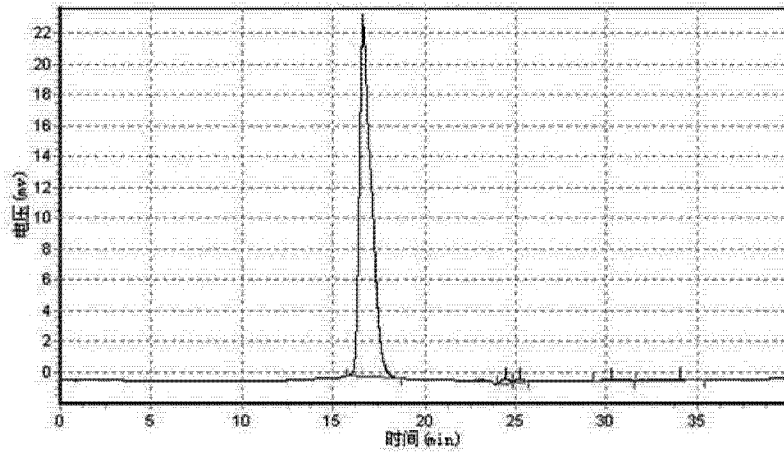


图 10



分析结果表

峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1		16.682	22709.330	1043880.125	97.5010
2		24.448	299.231	10583.200	0.9886
3		25.248	175.769	5459.869	0.5100
4		30.282	64.600	4797.100	0.4481
5		34.048	52.661	5915.300	0.5525
总计			23301.591	1070635.594	100.0000

图 11

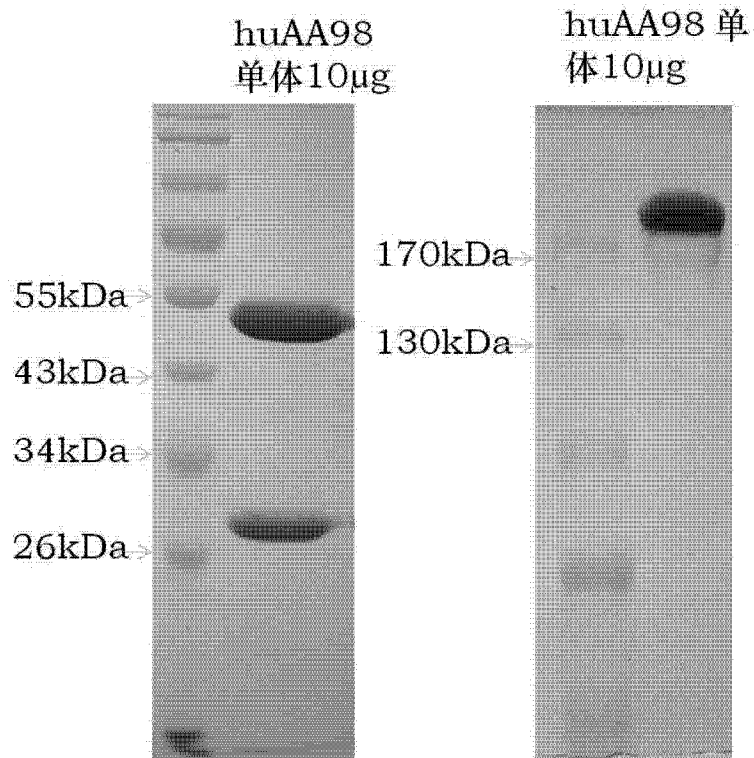
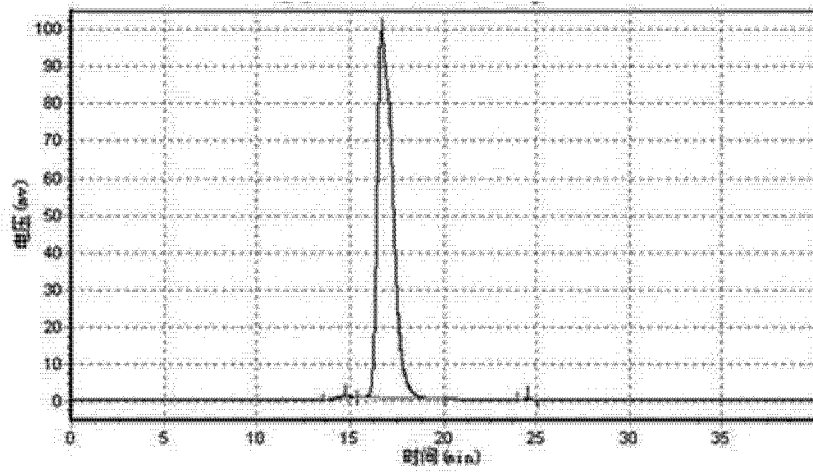


图 12



分析结果表

峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1		14.798	689.028	32483.301	0.5707
2		16.732	98795.391	5647146.000	99.2191
3		24.540	353.324	11963.100	0.2102
总计			99837.742	5691592.400	100.0000

图 13