



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106552561 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 26

(21) 申请号 201510621843.8
 (22) 申请日 2015.09.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106552561 A
 (43) 申请公布日 2017.04.05
 (73) 专利权人 苏州英诺凯生物医药科技有限公司
 地址 215200 江苏省苏州市吴江经济开发区庞杨路8号展华科技楼4楼
 (72) 发明人 刘向晖 黄迎庆 陈胜胜 王文龙
 (51) Int. Cl.
 B01J 13/02 (2006.01)
 G01N 33/543 (2006.01)
 G01N 33/531 (2006.01)

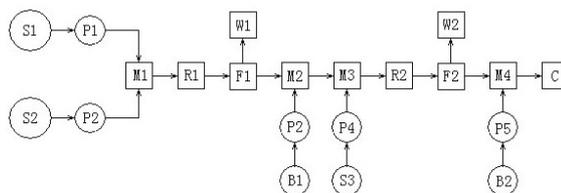
(56) 对比文件
 CN 104897904 A, 2015.09.09
 CN 103736528 A, 2014.04.23
 CN 101769928 A, 2010.07.07
 CN 102847494 A, 2013.01.02
 WO 2015139022 A1, 2015.09.17
 Wanyu Chen et al..Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies.《journal of the royal society interface》.2013,1-8.

审查员 方瑞

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称
 一种抗体(或抗原)包被微球的连续化制备方法

(57) 摘要
 本发明提供了一种在高通量微通道连续流的反应器中制备抗体包被微球生产工艺。本发明利用微通道反应器制备抗体包被微球适用于多种颗粒表面包被多种大分子的过程,包括物理吸附包被和化学偶联包被反应。两种方法都可以按照相应步骤进行,并且可以根据具体的工艺要求减少模块,或添加新的功能模块。与现有工艺相比,本发明提供的制备方法,具有反应条件精确控制、原料利用率高、产品质量可控、操作简单等特点,能安全、环保、高效地生产抗体包被微球。



1. 一种抗体或者抗原包被微球的连续化制备方法,其特征在于将抗体或者抗原、缩合剂、微球通过微通道连续流反应器进行混合、反应、纯化和换液,最终得到包被了抗体或者抗原的微球;所述的微通道连续流反应器由计量泵、混合模块、反应模块、过滤模块和收集模块组成,反应中所需的物料为微球、缩合剂、抗体或者抗原、缓冲液A、缓冲液B以及缓冲液C;通过流量控制改变微球、缩合剂、抗体或者抗原的摩尔比例;经由各自计量泵同步进入混合模块进行混合,混合温度由外部换热器控制;具体步骤为:

(1)、通过流量控制摩尔比,将微球与缩合剂在缓冲液A的环境下,在第一混合模块中混合,再在第一反应模块中发生反应后,通入第一过滤模块除去杂质;

(2)、随后缓冲液B通过计量泵打入第二混合模块,与经步骤(1)处理的微球混合;

(3)、含抗体或者抗原的缓冲液B溶液经计量泵打入第三混合模块与步骤(2)活化的微球混合,紧接着在第二反应模块反应,随后通入第二过滤模块除去多余的抗体或者抗原,和多余杂质;

(4)、流出液在第四混合模块与缓冲液C混合,混合液最后在收集模块收集;

所述微球的直径为50纳米至2000纳米;所述微球在缓冲溶液中的浓度为0.1mg/mL至50mg/mL;所述缩合剂在缓冲溶液中的浓度为1至10mg/mL;所述的微通道连续流反应器流速为0.01~5mL/min;所述抗体或者抗原包被微球的过程在微通道连续流反应器中进行,微通道的直径为50到500微米;包被过程的温度条件为4~50℃;抗体或者抗原与微球的质量百分比为0.1%~10%;包被过程中的抗体或者抗原为可用于免疫诊断的各种抗体或者抗原,它们的浓度为0.05~50mg/mL;

所述缓冲液A、缓冲液B以及缓冲液C分别可选自:磷酸盐缓冲体系、硼酸盐缓冲体系、醋酸盐缓冲体系、柠檬酸磷酸盐缓冲体系、碳酸盐缓冲体系、2-吗啉代乙磺酸缓冲体系(MES)或羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲体系(HEPES);所述磷酸盐缓冲体系是PBS缓冲液或PB缓冲液。

2. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,包被过程使用的缩合剂包括但不限于1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、1,3-二环己基碳二亚胺(DCC),戊二醛(glutaraldehyde)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、高碘酸钠(NaIO_4)或马来酰亚胺。

3. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,包被过程中的微球直径为50~2000纳米,微球材质为胶乳,或带磁性的胶乳,或金颗粒,或银颗粒,或量子点颗粒;

微球表面带有羧基、氨基、羟基、巯基、氯亚甲基中的一种或者几种活性基团,或没有带有活性修饰基团;

微球在缓冲溶液中的浓度为0.1mg/mL至50mg/mL。

4. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,包被过程中的微球直径为50~2000纳米,微球材质为聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚苯乙烯和聚丙烯酸组成的共聚物(PS/PAA)、聚苯乙烯和聚甲基丙烯酸甲酯组成的共聚物(PS/PMMA)胶乳;

微球表面带有羧基、氨基、羟基、巯基、氯亚甲基中的一种或者几种活性基团,或没有带有活性修饰基团;

微球在缓冲溶液中的浓度为0.1mg/mL至50mg/mL。

5. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,微通道连续流反应器中的过滤模块采用了透析膜或者中空纤维膜,其孔径范围下限为截留分子量50KD,上限为孔径0.2 μm 。

一种抗体(或抗原)包被微球的连续化制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药的研发和生产工艺领域,具体涉及体外诊断试剂生产工艺中胶乳或磁性微球(磁珠)的抗体(或者抗原)或其它蛋白的包被过程,更具体的是涉及在高通量微通道连续流的微通道反应器中用不同抗体、抗原、或其它大分子包被各类胶乳微球、磁珠、或金属纳米颗粒的工艺过程。

背景技术

[0002] 免疫诊断是体外诊断的一种常见形式。它的本质是利用免疫反应中抗体抗原的特异性结合来定量或者定性地分析待测样品中的抗原或者抗体的含量,从而做出临床诊断。许多常见的免疫诊断试剂包含由抗体或者抗原包被的胶乳微球(或者磁性微球、金属纳米颗粒等),这些微球常被称为固定相。在免疫诊断中,这些微球一般用来捕捉待测样品中相关抗原或者抗体。将抗体或者抗原包被(吸附)到微球上的过程可以分为两类。一种叫做物理吸附法,基本过程是将抗体或者抗原与要包被的微球在合适的缓冲体系中混合,利用抗体或者抗原等大分子与微球表面的相互作用力产生吸附,从而将大分子固定在微球表面,实现微球包被的过程。另一种方法叫做化学吸附法,基本过程是利用微球表面的一些活性基团(例如羧基、氨基、羟基、巯基等)与抗体或者抗原等大分子上的相应基团(氨基、羧基、巯基等)在一定的条件下反应形成化学键,从而将大分子固定在微球表面,实现抗体或者抗原在微球表面的吸附。这两种方法本质上都是固相(微球)和水相(抗体或者抗原的溶液)的反应。在实验室小规模,常使用涡旋混合。较大规模的生产中,一般采用磁力搅拌、搅拌桨搅拌、机械搅拌等方式进行两相的混合。在这种操作条件下,两相之间完全均匀的混合很不容易实现,每个微球周围的微环境可能会有很大的差异,这直接导致了包被后的微球之间的差异大、包被反应生产上的各批次之间的产品差异大、抗体(或者抗原)的利用率不高等问题。

[0003] 包被后的纳米颗粒微球常需要去除溶液中游离的抗原、抗体、蛋白等大分子。离心分离和膜分离是最常见的处理工艺。在离心分离中,常需要通过高速离心机将悬浮在溶液中的颗粒沉降下来,然后再重新将微球悬浮在不含抗体或抗原分子的溶液中。这类离心重悬的操作,一般需要高速离心设备,成本高,耗时长,生产效率低,在实际生产中不利于生产放大。

[0004] 膜分离一般需用截流孔径处于微球颗粒大小和大分子分子尺寸之间的滤膜,通过膜来截流尺寸较大的微球,同时让尺寸相对较小的抗体、抗原等分子通过过滤膜。这种使用膜分离技术纯化微球常使用切向流过滤操作的模式。

[0005] 目前,无论离心技术还是切向流过滤技术,都使用批次操作,不可避免的产生批间差。需要对现有技术作出改进,提供一种全新方法,以提高生产效率同时保证产品批内和批间的差异小。

[0006] 目前为止,没有文献报道用微通道连续流的方式实现抗体或者抗原包被微球的工艺。本发明提供一种在微通道反应器内以连续流的方式用抗体或者抗原包被微球的生产工

艺。微通道连续流反应器能够有效地精密控制微球周围的局部环境,保证微球包被反应的一致性,提高抗体吸附的效率,加快抗体包被的过程,同时不再需要离心等不易于工艺放大的操作。

[0007] 微通量反应器由直通道型结构型的特种功能模块组成。其安全操作的温度范围为 0°C - 100°C ,安全操作压力范围为 0 - 10bar ,微通道直径范围为 $50\mu\text{m}$ - $500\mu\text{m}$ 。微通量反应器的模块化和微型化使得抗体(抗原)包被微球的工艺效率和稳定性大幅提高。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种在高通量微通道连续流的反应器中制备抗体包被微球生产工艺。与现有工艺相比,本发明提供的制备方法,具有反应条件精确控制、原料利用率高、产品质量可控、操作简单等特点,能安全、环保、高效地生产抗体包被微球。

[0009] 本发明利用微通道反应器制备抗体包被微球适用于多种颗粒表面包被多种大分子的过程,包括物理吸附包被和化学偶联包被反应。两种方法都可以按照下述步骤进行,并且可以根据具体的工艺要求减少模块,或添加新的功能模块:

[0010] (1) 反应中所需的物料为微球、缩合剂、抗体、缓冲液A、缓冲液B以及缓冲液C。通过流量控制改变微球、缩合剂、抗体的摩尔比例;经由各自计量泵同步进入增强模块进行混合,混合温度由外部换热器控制。

[0011] (2) 通过流量控制摩尔比,微球与缩合剂在模块M1中经混合并在R1中发生反应后,通入过滤模块F1除去杂质。

[0012] (3) 随后缓冲液B1通过计量泵打入模块M2,与活化的微球混合。

[0013] (4) 抗体的B1溶液经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2反应,随后通入过滤模块F2除去多余的抗体和杂质。

[0014] (5) 流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。

[0015] (6) 上述微球的直径为 50 纳米至 2000 纳米。

[0016] (7) 上述微球在缓冲溶液中的浓度为 $0.1\text{mg}/\text{mL}$ 至 $50\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0017] (8) 上述缩合剂在缓冲溶液中的浓度为 0 至 $10\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0018] (9) 上述抗体在缓冲溶液中的浓度为 $0.05\text{mg}/\text{mL}$ 至 $50\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0019] (10) 上述包被的温度范围为 4 至 50°C 。

[0020] (11) 上述反应的流速为 0.01 至 $2\text{ml}/\text{min}$ 。

[0021] (12) 上述反应纯化过滤膜孔径为 50KD 至 $0.2\mu\text{m}$ 。

[0022] (13) 本发明与现有技术相比有以下主要特点:

[0023] (a) 采用微通道连续流反应器,反应时间从传统的数小时缩短到几十秒到几分钟,反应效率明显提高。

[0024] (b) 原料在微通道中接触良好,温度精确控制,未反应物和杂质在反应系统中过滤除去,大大提高了纯化效率。

[0025] (c) 从进料、预热、混合以及反应过程全程为连续流,反应条件温和、安全,生产效率高,产品质量可控。

[0026] (d) 本专利的微流道连续流反应器,可以只为部分关键步骤适用,比如只为其中某些反应步骤使用,其它步骤可以采取传统操作。

[0027] 实施方式

[0028] 以下结合实施例对本发明作进一步具体描述。根据下述实施方法,可以更好地理解本发明。但是,这里所描述的实施例仅是本发明的部分实施例,而不是全部的实施例。实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。基于本发明的实施例,本领域的技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,都属于本发明专利的知识产权保护范围。以下图例为微通道连续流反应器的模块化示意图。

附图说明

[0029] 图1为一个微通道连续流反应器的模块化示意图1;

[0030] 图2为另一个微通道连续流反应器的模块化示意图2。

[0031] S1:微球的Buffer A溶液; S2:缩合剂(化学吸附法)或者抗体/抗原(物理吸附法)的Buffer A溶液;S3:抗体的Buffer B

[0032] B1:Buffer B;B2:Buffer C

[0033] P1,P2,P3,P4,P5为计量泵

[0034] M1:预混模块1;M2:预混模块2;M3:预混模块3;M4:预混模块4

[0035] R1:反应模块1;R2:反应模块2

[0036] F1:过滤模块1;F2:过滤模块2

[0037] W1:废液收集模块1;W2:废液收集模块2

[0038] C:产品收集模块

[0039] 实施例1

[0040] 参照图1 本发明的工业流程,按照下述步骤:(1)先将S1中微球的Buffer A溶液以及缩合剂的Buffer A溶液经过P1、P2计量泵,按照一定的配比打入混合模块M1进行混合;(2)然后在R1中发生反应后,通入过滤模块F1除去杂质,(3)随后缓冲液B1通过计量泵打入模块M2,与活化的微球混合,(4)抗体的B1溶液经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2反应,(5)随后通入过滤模块F2除去多余的抗体和杂质,(6)流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。这个实施例描述了一般性的化学吸附法包被微球的过程。

[0041] 实施例2

[0042] 参照图2 本发明的工业流程,按照下述步骤:(1)先将S1中微球的Buffer A溶液以及抗体(或者抗原)的Buffer A溶液经过P1、P2计量泵,按照一定的配比打入混合模块M1进行混合;(2)然后在R1中发生反应后,通入过滤模块F1除去杂质,(3)流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。这个实施例描述了一般性的物理吸附法包被微球的过程。

[0043] 实施例3

[0044] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0045] (2)在直径为200 μ m的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(200 nm)的缓冲溶液(15mg/mL,流速1mL/min)和缩合剂EDC的缓冲溶剂(5mg/mL,流速1mL/min)在混合单

元M1混合(温度25度),在R1中停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F1(温度25度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(1mL/min)混合。之后,NGAL抗体的B1溶液(5mg/mL, 1mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F2(温度25度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为100ng/mL,检测范围为100~5000ng/mL。

[0046] 实施例4

[0047] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0048] (2)在直径为50 μ m的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(50 nm)的缓冲溶液(0.1mg/mL,流速0.5mL/min)和缩合剂EDC的缓冲溶剂(1mg/mL,流速0.5mL/min)在混合单元M1混合(温度4度),在R1中停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F1(温度4度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(0.5mL/min)混合。之后,NGAL抗体的B1溶液(0.05mg/mL, 0.5mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留3000秒(温度4度),然后通入过滤单元F2(温度4度),停留时间320秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为220ng/mL,检测范围为220~7000ng/mL。

[0049] 实施例5

[0050] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0051] (2)在直径为500 μ m的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(1000 nm)的缓冲溶液(50mg/mL,流速2mL/min)和缩合剂EDC的缓冲溶剂(10mg/mL,流速2mL/min)在混合单元M1混合(温度37度),在R1中停留300秒(温度37度),然后通入过滤单元F1(温度37度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(2mL/min)混合。之后,NGAL抗体的B1溶液(10mg/mL, 2mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留300秒(温度37度),然后通入过滤单元F2(温度37度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为20ng/mL,检测范围为20~3000ng/mL。

[0052] 实施例6

[0053] (1)所用装置:参照图2 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0054] (2)在直径为200 μ m的微通道反应器中,表面没有活性基团修饰的聚苯乙烯(PS)微球(200nm)的缓冲溶液(15mg/mL,流速1mL/min)和CRP抗体的缓冲溶剂(5mg/mL,流速1mL/min)在混合单元M1混合(温度25度),在R1中停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F1(温度25度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为0.2mg/mL,检测范围为0.2~250mg/mL。

[0055] 实施例7

[0056] (1)所用装置:参照图2 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与

反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0057] (2)在直径为50 μ m的微通道反应器中,表面没有活性基团修饰的聚苯乙烯(PS)微球(50nm)的缓冲溶液(0.1mg/mL,流速0.5mL/min)和CRP抗体的缓冲溶剂(0.05mg/mL,流速0.5mL/min)在混合单元M1混合(温度4度),在R1中停留300秒(温度4度),然后通入过滤单元F1(温度4度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为5mg/mL,检测范围为5~300mg/mL。

[0058] 实施例8

[0059] (1)所用装置:参照图2 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0060] (2)在直径为2000 μ m的微通道反应器中,表面没有活性基团修饰的聚苯乙烯(PS)微球(1000nm)的缓冲溶液(50mg/mL,流速2mL/min)和CRP抗体的缓冲溶剂(10mg/mL,流速2mL/min)在混合单元M1混合(温度37度),在R1中停留300秒(温度37度),然后通入过滤单元F1(温度37度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为0.01mg/mL,检测范围为0.01~100mg/mL。

[0061] 实施例9

[0062] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0063] (2)在直径为200 μ m的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(200 nm)的缓冲溶液(15mg/mL,流速1mL/min)和缩合剂DCC的缓冲溶剂(5mg/mL,流速1mL/min)在混合单元M1混合(温度25度),在R1中停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F1(温度25度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(1mL/min)混合。之后,MA抗体的B1溶液(5mg/mL,1mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F2(温度25度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为2mg/mL,检测范围为10~400mg/mL。

[0064] 实施例10

[0065] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0066] (2)在直径为50mm的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(50 nm)的缓冲溶液(0.1mg/mL,流速0.5mL/min)和缩合剂DCC的缓冲溶剂(1mg/mL,流速0.5mL/min)在混合单元M1混合(温度4度),在R1中停留300秒(温度25度),然后通入过滤单元F1(温度4度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(0.5mL/min)混合。之后,MA抗体的B1溶液(0.05mg/mL,0.5mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留4500秒(温度4度),然后通入过滤单元F2(温度4度),停留时间320秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为8mg/mL,检测范围为8~490mg/mL。

[0067] 实施例11

[0068] (1)所用装置:参照图1 确定微通道反应器连接模式,混合反应模块数根据流速与反应停留时间确定,换热介质为乙醇。

[0069] (2)在直径为500 μ m的微通道反应器中,表面有羧基的聚苯乙烯微球(2000 nm)的缓冲溶液(50mg/mL,流速2mL/min)和缩合剂DCC的缓冲溶剂(10mg/mL,流速2mL/min)在混合单元M1混合(温度37度),在R1中停留300秒(温度37度),然后通入过滤单元F1(温度37度),停留时间120秒,随后在模块M2中与缓冲液B1(2mL/min)混合。之后,NGAL抗体的B1溶液(10mg/mL, 2mL/min)经计量泵打入混合模块M3与活化的微球混合,紧接着在反应模块R2停留300秒(温度37度),然后通入过滤单元F2(温度37度),停留时间120秒,之后流出液在混合模块M4与缓冲液B2混合,混合液最后在收集模块C收集。所取得的试剂在日立7060生化仪上进行测试,其灵敏度为0.4mg/mL, 检测范围为0.4~100mg/mL。

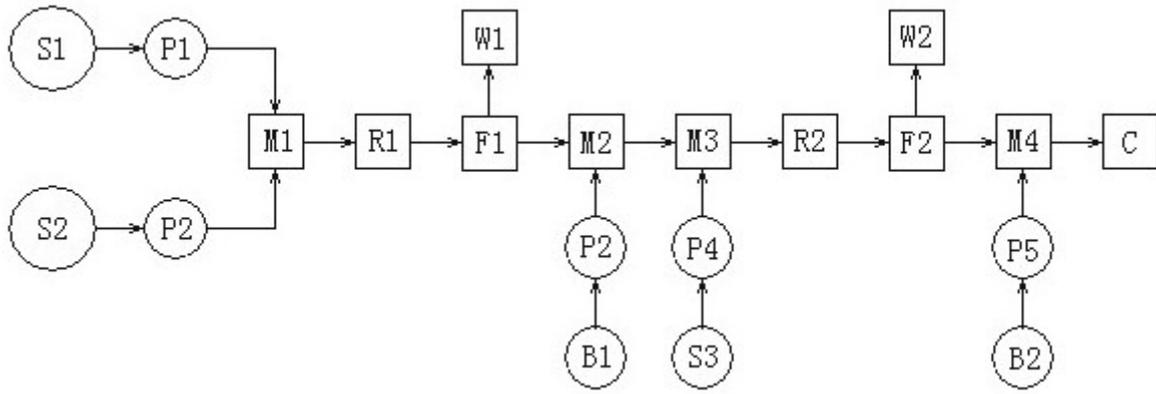


图1

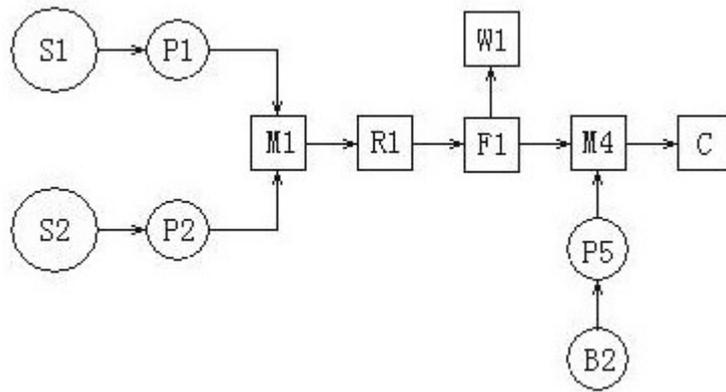


图2