(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111423488 B
(45)授权公告日 2024.08.16

(21)申请号 202010257856.2
(22)申请日 2012.08.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111423488 A
(43)申请公布日 2020.07.17
(30)优先权数据
61/575,349 2011.08.19 US
61/666,240 2012.06.29 US
(62)分案原申请数据
201210398359.X 2012.08.20
(73)专利权人 EMD密理博公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 N·比安 C·吉莱斯皮
M·T·斯通 M·科兹洛夫 J·陈
M·瓦克
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 张晓威
(51)Int.Cl.
C07K 1/16(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)
C07K 1/20(2006.01)
C07K 1/22(2006.01)
(56)对比文件
EP 1577319 A1,2005.09.21
WO 2008025747 A1,2008.03.06
审查员 周振威

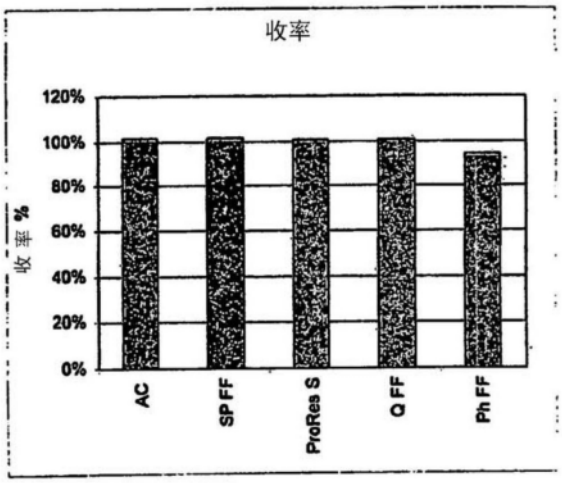
权利要求书2页 说明书40页 附图18页

(54)发明名称

在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多种杂质的水平的方法

(57)摘要

本发明涉及在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多种杂质的水平的方法。具体而言，本发明涉及降低含有所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质水平的方法，所述方法包括以下步骤：(i)通过沉淀、絮凝、结晶、与可溶性小分子或聚合物配体结合、或与悬浮色谱介质结合来从所述样品中分离所述所关注的蛋白质，从而得到含有所述所关注的蛋白质的蛋白相；(ii)通过将所述蛋白相溶解于合适的缓冲液中来复水所述蛋白质；(iii)使所述复水的蛋白质以流通模式与含碳材料接触；(iv)得到所述样品的第一洗出液；(v)使所述第一洗出液与阴离子交换色谱介质接触；以及(vi)得到所述样品的第二洗出液，其中相对于不进行步骤(iii)时所述一种或多种杂质的水平，所述第二洗出液含有较低水平的所述一种或多种杂质。



CN 111423488 B

1.降低含有所关注的蛋白质的样品中的杂质水平的方法,所述方法包括以下步骤:

(i)通过与悬浮阳离子交换色谱介质结合来从所述样品中分离所述所关注的蛋白质,从而得到含有所述所关注的蛋白质的蛋白相;

(ii)通过将所述蛋白相溶解于合适的缓冲液中来复水所述蛋白质;

(iii)使所述复水的蛋白质以流通模式与含碳材料接触,从而除去所述杂质;

(iv)得到所述样品的第一洗出液;

(v)使所述第一洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及

(vi)得到所述样品的第二洗出液,其中相对于不进行步骤(iii)时所述杂质的水平,所述第二洗出液含有更低水平的所述杂质;

其中所述所关注的蛋白质是单克隆抗体;

其中所述杂质是宿主细胞蛋白(HCP)和DNA;以及

其中所述含碳材料是活性碳。

2.权利要求1的方法,其中两个或更多个步骤以流通模式进行。

3.权利要求1的方法,其中将所述含碳材料填充入柱、筒或囊中。

4.权利要求1的方法,其中将所述含碳材料浸入多孔材料中。

5.权利要求1的方法,其中将所述含碳材料与选自亲和介质、阴离子交换色谱(AEX)介质、阳离子交换色谱(CEX)介质、疏水作用色谱(HIC)介质和混合模式介质中的一种或多种介质混合。

6.权利要求1的方法,其中所述样品包含细胞培养料。

7.用于从含有所关注的蛋白质和杂质的蛋白A洗出液中纯化所关注的蛋白质的纯化方法,所述方法包括:

(i)使包含所关注的蛋白质和杂质的样品与含有蛋白A的色谱柱接触;

(ii)得到所述样品的第一洗出液,其为所述蛋白A洗出液;

(iii)使所述第一洗出液以流通模式与含碳材料接触;

(iv)得到所述样品的第二洗出液;

(v)使所述第二洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及

(vi)得到所述样品的第三洗出液,

其中相对于所述第一洗出液未与所述含碳材料接触时的所述杂质的水平,所述第三洗出液含有更低或降低水平的所述杂质;

其中所述所关注的蛋白质是单克隆抗体;

其中所述蛋白A洗出液中的所述杂质是宿主细胞蛋白(HCP)和DNA;以及

其中所述含碳材料是活性碳。

8.权利要求7的方法,其中所述杂质是HCP,并且在进行权利要求7的方法后HCP的水平少于所述洗出液中的水平的30%。

9.权利要求7的方法,其中一个或多个步骤以流通模式进行。

10.权利要求7的方法,其中将所述含碳材料填充入柱、筒或囊中。

11.权利要求7的方法,其中将所述含碳材料浸入多孔材料中。

12.权利要求7的方法,其中将所述含碳材料与选自亲和介质、阴离子交换色谱(AEX)介质、阳离子交换色谱(CEX)介质、疏水作用色谱(HIC)介质和混合模式介质中的一种或多种

介质混合。

在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多种杂质的水平的方法

[0001] 本申请是2012年8月20日提交的发明名称为“在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多种杂质的水平的方法”的中国专利申请201610090272.4的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求申请日为2011年8月19日的美国临时专利申请61/575,349和申请日为2012年6月29日的美国临时专利申请61/666,240的优先权,其各自整体援引加入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及改进的色谱方法和在蛋白质纯化过程中降低一种或多种杂质水平的方法。

背景技术

[0005] 色谱法在生物材料如单克隆抗体的纯化中是主要的纯化技术。

[0006] 通常使用的色谱方法包括亲和色谱介质、离子交换色谱介质、疏水作用、亲水相互作用、尺寸排阻和混合模式(如不同色谱相互作用的组合)色谱法中的一种或多种。例如,为了纯化单克隆抗体,典型的纯化方法包括最初的蛋白A亲和俘获(capture)步骤和随后的一个或多个离子交换精制步骤,其目的是降低一种或多种杂质如宿主细胞蛋白(HCP)的水平。此外,还可以使用其它色谱技术,如结合和洗脱(bind and elute)疏水作用色谱法(HIC);流通(flow-through)疏水作用色谱法(FTHIC);流通阴离子交换色谱法(AEX);使用阳离子交换树脂、阴离子交换树脂或疏水作用树脂的弱分配色谱法;混合模式色谱技术如结合和洗脱弱阳离子和阴离子交换、结合和洗脱疏水和离子交换相互作用以及流通疏水和离子交换混合模式相互作用(FTMM),其均可使用诸如Capto™ Adhere、Capto™ MMC、HEA Hypercel™、PPA Hypercel™的树脂。另外,疏水性电荷诱导(HCI)色谱法与其它一起以及不同技术的组合可用于精制。

[0007] 虽然色谱法在较小规模的蛋白质纯化提供了许多优势,但在大规模下,色谱柱的填充不仅花费高强度的劳动和时间而且还昂贵。另外,色谱柱中的污垢是普遍问题,导致使用者必须处理掉柱,这是不希望的,特别是由于色谱树脂的高成本。

[0008] 最近,工业上有明显的趋势去尝试和减少蛋白质纯化方法中的步骤数。同样,使用生物反应器获得更高表达滴度的技术的应用在工业中有上升的趋势。这两种趋势的结合导致更多产物被装载到柱上,由此导致相当贵的色谱介质上增加的负荷和较低的产物纯度,这两点都是不希望的。

发明内容

[0009] 本发明至少部分地基于以下令人惊讶的和出乎预料的发现:某些材料(如含碳材料例如活性碳(activated carbon))可以流通模式掺入到色谱柱基蛋白质纯化方法中,导致色谱柱负荷的减少,以及随之而来的色谱柱寿命的增加。

[0010] 进一步地,本发明基于以下令人惊讶的和出乎预料的发现:含碳物质(如活性碳)可以用于俘获色谱步骤的上游或下游以降低一种或多种杂质的水平。在本发明方法的一些实施方案中,使样品在阳离子交换(CEX)色谱步骤前与含碳材料接触。在其它实施方案中,在样品与含碳材料接触前使用阳离子交换(CEX)色谱步骤。在另外的实施方案中,使样品在蛋白A亲和俘获步骤后与含碳材料接触。或者,可以在所述样品与含碳材料接触后使用蛋白A亲和色谱步骤。在某些实施方案中,可在蛋白A亲和俘获步骤后进行阴离子交换(AEX)流通色谱步骤,并且进行或不进行CEX色谱结合/洗脱步骤。在其它实施方案中,可以在非亲和俘获步骤(如使用CEX结合和洗脱色谱法作为俘获步骤)后使用含碳材料,并且随后进行AEX色谱步骤。

[0011] 进一步地,本发明提供色谱基蛋白质纯化方法,其包括比通常的方法更少的步骤。

[0012] 根据本发明的一个方面,提供减少一个或多个色谱柱上的负荷的方法。在一些实施方案中,这样的方法包括在包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与一个或多个含有亲和介质、AEX介质、CEX介质、HIC介质或混合模式介质的色谱柱接触之前使所述样品以流通模式与以下之一接触,从而减少所述一个或多个色谱柱上的所述负荷:(i)含碳材料;(ii)含碳材料和CEX介质的组合;(iii)含碳材料和AEX介质的组合;(iv)含碳材料和混合模式介质的组合;(v)含碳材料和HIC介质的组合,以及(vi)含碳材料和CEX、AEX和混合模式介质的组合。

[0013] 根据本发明方法的另一方面,提供降低含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中的一种或多种杂质水平的方法,其中所述方法包括以下步骤:(i)在使所关注的蛋白质与一个或多个含有亲和介质、AEX介质、CEX介质、HIC介质或混合模式介质的色谱柱结合的条件下,使含有所述所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与所述柱接触;(ii)得到所述样品的第一洗出液;(iii)使所述第一洗出液以流通模式与以下之一接触:(a)含碳材料;和(b)含碳材料与CEX介质、AEX介质、混合模式介质和HIC介质中的一种或多种的组合;以及(iv)得到所述样品的第二洗出液;其中相对于所述第一洗出液中的所述一种或多种杂质的水平,所述第二洗出液含有较低或降低水平的所述一种或多种杂质。

[0014] 在另一方面,提供降低包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中的所述一种或多种杂质水平的方法,其中所述方法包括以下步骤:(i)使所述包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与含有亲和介质的色谱柱接触;(ii)得到所述样品的第一洗出液;(iii)使所述第一洗出液以流通模式与含碳材料接触;(iv)得到所述样品的第二洗出液;(v)使所述第二洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及(vi)得到所述样品的第三洗出液,其中相对于所述第一洗出液未与所述含碳材料接触时的所述一种或多种杂质的水平,所述第三洗出液含有较低或降低水平的所述一种或多种杂质。

[0015] 在一些实施方案中,这样的方法包括在亲和俘获步骤之后和使样品与阴离子交换色谱介质(在一些实施方案中是膜吸附剂)接触之前的CEX结合和洗脱色谱步骤。在一些实施方案中,本发明的方法避免了进一步色谱步骤(如在亲和俘获步骤后使用的结合和洗脱CEX色谱步骤)的需要。示例性的可商购获得的阴离子交换色谱介质是膜吸附剂如ChromaSorb™(MILLIPORE CORPORATION,Billerica,MA,USA)、Mustang Q(PALL CORPORATION,Port Washington,NY,USA)、SartobindQ(SARTORIUS STEDIM,Germany)以及珠介质(bead medium)如Q Sepharose FF(GE HEALTHCARE,Philadelphia,PA,USA)。

[0016] 在一些实施方案中,本发明的方法使用非柱基(non-columnbased)色谱步骤。

[0017] 在另一个方面,提供降低包含所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质水平的方法,所述方法包括以下步骤:(i)得到含有所述所关注的蛋白质的蛋白相;(ii)使用合适的缓冲液来复水所述含有所述所关注的蛋白质的蛋白相,从而得到复水的蛋白质溶液;(iii)使所述复水的蛋白质溶液以流通模式与含碳材料接触;(iv)得到包含所述所关注的蛋白质的第一洗出液;(v)使所述第一洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及(vi)得到包含所述所关注的蛋白质的第二洗出液,其中相对于当步骤(iii)中复水的蛋白质溶液不与所述含碳材料接触时所述一种或多种杂质的水平,所述第二洗出液含有较低的或降低的水平的所述一种或多种杂质。

[0018] 在一些实施方案中,这样的方法避免了任何结合和洗脱色谱步骤(如结合和洗脱亲和色谱或CEX色谱步骤)的需要。

[0019] 在一些本发明的方法中,使用一种或多种选自沉淀、絮凝、结晶、柱色谱法、使用可溶性小分子、使用聚合物配体、或使用悬浮色谱介质的方法得到蛋白相。

[0020] 在一些实施方案中,将含碳材料和AEX介质、CEX介质、HIC介质和混合介质中的一种或多种组合需要混合所述含碳材料和一种或多种这样的介质。在另一些实施方案中,将含碳材料和AEX介质、CEX介质、HIC介质和混合介质中的一种或多种组合需要在组合中按序使用不同的材料。

[0021] 在依照本发明方法的各种实施方案中,所述亲和介质选自蛋白A或蛋白G。

[0022] 在一些实施方案中,所关注的蛋白质是抗体或含有Fc区的蛋白质。在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在另一些实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。

[0023] 在一些实施方案中,所述样品包含细胞培养料(cell culture feed)。

[0024] 在一些实施方案中,所述样品是澄清的细胞培养料。

[0025] 在一些实施方案中,所述澄清的细胞培养料是通过深层过滤(depth filtration)和/或离心得到的。

[0026] 在一些实施方案中,所述澄清的细胞培养料是通过用盐、酸、聚合物或刺激反应(stimulus responsive)聚合物沉淀得到的。

[0027] 在各种实施方案中,本发明的方法中使用的含碳材料是活性碳。在一些实施方案中,活性碳包括活性炭(activated charcoal)。

[0028] 在一些实施方案中,含碳材料和CEX介质、AEX介质、混合模式介质和HIC介质中的一种或多种的组合包括活性碳和CEX树脂、AEX树脂、混合模式树脂和HIC树脂中的一种或多种的混合物。在一些实施方案中,将这样的混合物填充入色谱柱中。在另一些实施方案中,将这样的混合物填充入盘中。在另一些实施方案中,将这样的混合物填充入仓(pod)、筒(cartridge)或囊(capsule)中。

[0029] 在一些实施方案中,将活性碳填充入色谱柱中。在另一些实施方案中,将活性碳填充入密封的一次性装置如Millistalk+®Pod中。在另一些实施方案中,将活性碳填充入筒或囊中。

[0030] 在一些实施方案中,将活性碳浸入(impregnate)多孔材料中,如将活性碳掺入到多孔纤维介质中。所述多孔材料可以容纳在柱、盘、Millistalk+®Pod、筒或囊中。在一些实施方案中,将活性碳填充入纤维素介质中。

[0031] 在一具体实施方案中,所述AEX介质是具有涂层表面的膜,所述表面涂层包含一种或多种聚合伯胺或其共聚物。

[0032] 在一些实施方案中,在包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品经亲和俘获步骤之前使所述样品与活性碳接触。在另一些实施方案中,在亲和俘获步骤之后使样品与活性碳接触。

[0033] 在本发明的不同方法中,使用应用活性碳的方法所造成的所关注的蛋白质的收率的损失为少于总蛋白量的20%。换句话说,本发明的方法导致80%或更高的所关注的蛋白质的收率(总蛋白量为100%)。在又一实施方案中,使用应用活性炭的方法所造成的所关注的蛋白质的收率的损失为少于10%。换句话说,本发明的方法导致90%或更高的所关注的蛋白质的收率(以总蛋白量为100%)。

[0034] 在一具体实施方案中,活性碳用作从样品(如洗出液,例如从流通纯化步骤前进行的结合和洗脱色谱俘获工艺步骤中回收的蛋白A洗出液)中纯化靶分子(如含有Fc区的蛋白质或抗体)的方法中的流通纯化工艺步骤或单元操作的一部分。如在图19中所示,在这样的流通纯化工艺步骤或单元操作中,来自结合和洗脱色谱步骤(如蛋白A亲和柱)的洗出液先后流经活性碳、AEX介质、CEX介质和病毒过滤器。在一些实施方案中,在AEX步骤和CEX步骤之间进行溶液改变(如pH改变),其中所述溶液使用在线静态混合器(in-line static mixer)和/或缓冲罐(surge tank)。在一些实施方案中,如本文描述的使用活性碳的流通纯化工艺步骤或单元操作是纯化靶分子的连续过程的一部分,其中所述流通纯化步骤与所述流通纯化工艺步骤的上游工艺步骤(如结合和洗脱色谱俘获步骤)和下游工艺步骤(如配制(formulation)步骤)相流通,因此使液体样品能够连续流经该过程。

[0035] 在一具体实施方案中,完整的流通纯化工艺步骤或单元操作采用单个制动器(skid)(即控制或监控装置)。

附图说明

[0036] 图1描述了表明对于所评价的多种可商购获得的吸附介质中的每一种,在添加有多克隆IgG的零位(null)CHO-S料的流通洗出液中测量IgG收率的实验结果的柱状图,所述吸附介质即活性碳(AC);琼脂糖阳离子交换树脂SP Sepharose™ Fastflow(SPFF);聚合物阳离子交换树脂ProRes™-S;琼脂糖阴离子交换树脂Q Sepharose™(QFF);和琼脂糖HIC树脂Phenyl Sepharose™ 6Fastflow(ph FF)。如图1所示,除了显示高达约5%的IgG收率损失的HIC树脂外,证明所有其它筛查的介质没有可检测到的收率损失。

[0037] 图2描述了表明对于所评价的多种可商购获得的吸附介质中的每一种以及未处理的澄清料,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中测量UV 280nm活性物质的量的实验结果的柱状图,所述吸附介质即活性碳、Nuchar®RGC、(AC)、SPFF、ProRes™-S、QFF和ph FF。如图2所示,与其它吸附介质相比,活性碳显著降低了有色物质的量。

[0038] 图3描述了表明对于以上所列的多种可商购获得的吸附介质中的每一种以及未处理的澄清料,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白(HCP)浓度的实验结果的柱状图。用Cygnus CHO-CM HCP ELISA试剂盒测量HCP浓度(ng/mL)。如图3所证明,所有筛查的介质(包括活性碳)在一定程度上除去HCP。然而,阳离子树脂SPFF和ProRes™-S除去HSP效率最高。

[0039] 图4描述了表明对于以上所列的每种介质以及未处理的澄清料,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中测量DNA浓度的实验结果的柱状图。使用PicoGreen测定测量DNA浓度(μg/mL)。如图4所证明,每种介质在一定程度上除去DNA。然而,阴离子交换介质除去HSP效率最高,其次是活性碳。

[0040] 图5描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的以上所列的所评价的每种介质(以每10CV,至多100CV的载料量),在添加有多克隆IgG和鲱鱼精DNA的零位CHO-S料的流通洗出液中测量IgG浓度的实验结果的x-y散布图。在x轴显示柱体积(CV),并且在y轴显示IgG浓度(mg/mL)。所有所评价的介质(包括AC、SPFF、ProRes™-S和QFF)在装载多达100CV的未处理的澄清料时显示没有显著的IgG损失。

[0041] 图6描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的所评价的每种介质(以每10CV,至多100CV的载料量),在添加有多克隆IgG和鲱鱼精DNA的零位CHO-S料的流通洗出液中测量UV活性物质峰面积(与对应于UV活性物质的量)的实验结果的x-y散布图。在x轴显示柱体积(CV),并且在y轴显示蛋白A分析柱流通中的UV活性物质峰面积。在所有所评价的材料中,AC除去多于70%的整个100CV的UV活性物质;QFF除去约10%的整个100CV的UV活性物质;并且两种阳离子交换树脂SPFF和ProRes™-S除去最少量的UV活性物质。

[0042] 图7描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的以上所列的所评价的每种介质(以每10CV,至多100CV的载料量),在添加有多克隆IgG和鲱鱼精DNA的零位CHO-S料的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白(HCP)浓度的实验结果的x-y散布图。在x轴显示柱体积(CV),并且在y轴显示HCP浓度(ng/mL)。SPFF和ProRes™-S除去整个100CV中最多的HCP。QFF除去一些HCP但很快通过。对于这种具有高浓度DNA的特定培养物,活性碳除去最少量的HCP。

[0043] 图8描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的所评价且以上所列的每种介质(以每10CV,至多100CV的载料量),在添加有多克隆IgG和鲱鱼精DNA的零位CHO-S料的流通洗出液中测量DNA浓度的实验结果的x-y散布图。在x轴显示柱体积(CV),并且在y轴显示DNA浓度(μg/mL)。但每种被评价的介质(包括AC、SPFF、ProRes™-S和QFF)在不同程度上除去整个100CV中的DNA。

[0044] 图9是可用于去除杂质的操作的不同示例型模式的示意图。左侧的程序框图描述了将未处理的澄清料先后装载到含有AC的柱以及含有SPFF、ProRes™-S或QFF介质的柱中的代表性试验。中间的程序框图描述了将未处理的澄清料先后装载到含有AC的柱以及含有SPFF或ProRes™-S然后QFF的柱中的代表性试验。右间的程序框图描述了将未处理的澄清料装载到含有1:1(v/v)AC和SPFF混合物、或1:1(v/v)AC和ProRes™-S混合物、或1:1:1(v/v/v)AC和ProRes™-S和QFF混合物的柱中的代表性试验。

[0045] 图10描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图9所示的每种材料组合,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中的UV活性物质峰面积(对应于UV活性物质的量)的柱状图。活性碳和含有活性碳的混合物显著减少了UV活性物质。在活性碳和阴离子交换树脂都在一个方法中使用的情况下,无论是按序使用还是作为混合物使用,都除去更多的UV活性物质,这证明了不同材料间的协同效应。

[0046] 图11描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图9所示的每种材料组合,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中宿主细胞蛋白(HCP)浓度的柱状图。所有的材料在一定程度上除去HCP;然而,当活性碳与诸如SPFF或ProRes™-S的阳离子树脂或与诸

如QFF的阴离子树脂在方法中一起使用时,无论是与树脂按序使用或与树脂作为混合物使用,除去HCP效率都是最高,这证明了不同材料间的协同效应。

[0047] 图12描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图9所示的每种材料组合,在添加有多克隆IgG的零位CHO-S料的流通洗出液中DNA浓度的柱状图。所有的材料在一定程度上除去HCP;然而,当活性碳与QFF按序使用或与QFF作为混合物使用时,与其它所评价的材料和组合相比,DNA去除更加有效。

[0048] 图13描述了表明对于每种所评价的材料(即AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1(v/v/v)AC/SPFF/QFF混合物和1:1:1(v/v/v)PhFF/SPFF/QFF混合物),在蛋白A柱洗脱合并液(elution pool)的流通洗出液中测量IgG收率的试验结果的柱状图。所评价的不同材料的流通洗出液的料是使用Prosep Ultra Plus蛋白A树脂从添加有多克隆IgG的零位CHO-S料产生的蛋白A柱洗脱合并液。所有筛查的材料显示高于80％的收率。

[0049] 图14描述了表明对于每种所评价的材料(即AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1(v/v/v)AC/SPFF/QFF混合物和1:1:1(v/v/v)PhFF/SPFF/QFF混合物),在蛋白A柱洗脱合并液的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白(HCP)浓度的试验结果的柱状图。不同评价材料的流通洗出液的供应是使用Prosep Ultra Plus蛋白A树脂从添加有多克隆IgG的零位CHO-S料产生的蛋白A柱洗脱合并液。所有材料或材料组合从蛋白A洗脱合并液除去一定量的HCP;然而,在单独使用时,活性碳和阳离子交换树脂更为有效。在作为混合物使用时,AC/SPFF/QFF和PhFF/SPFF/QFF比任何单独成分除去更多的HCP。在单独使用时,QFF和PhFF除去最少量的HCP。

[0050] 图15描述了表明对于每种所评价的材料(即AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1AC/SPFF/QFF混合物和1:1:1PhFF/SPFF/QFF混合物),在蛋白A柱洗脱合并液的流通洗出液中测量DNA浓度的试验结果的柱状图。不同评价材料的流通洗出液的供应是使用Prosep Ultra Plus蛋白A树脂从添加有多克隆IgG的零位CHO-S料产生的蛋白A柱洗脱合并液。所有材料或材料组合从蛋白A洗脱合并液中除去一定量的DNA,其中树脂混合物AC/SPFF/QFF和PhFF/SPFF/QFF表现出比任意单独成分微小的优势。

[0051] 图16是表明对于单克隆抗体溶液(其中所述溶液是使用蛋白A色谱法从澄清细胞培养物俘获到的(被称为蛋白A洗出液),并且随后进行三个单独的流通纯化组列(train))的各流分,测量相对于产物(即单克隆抗体)的HCP浓度(ppm)的实验结果的示意图。第一组列使用0.2mL的由5层组成的ChromaSorb™阴离子交换膜装置;第二组列使用1mL HD Nuchar活性碳填充柱;并且第三组列先后使用1mL活性碳柱和0.2mL的ChromaSorb™阴离子交换膜。从各纯化组列收集洗出液的十个10mL流分,并且分析所选流分的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。示意图的X轴描述了从活性碳柱中收集10mL (柱体积(CV))洗出液流分的终点。示意图的Y轴描述了对于活性碳洗出液的各流分,相对于产物(即单克隆抗体)的HCP浓度(ppm)。该示意图显示了单独或与阴离子交换介质组合使用活性碳来流通处理亲和俘获洗出液对于从单克隆抗体溶液中除去杂质有预料不到的效果。

[0052] 图17是表明对于单克隆抗体溶液(其中所述溶液是使用阳离子交换(CEX)色谱法(被称为CEX洗出液)从澄清细胞培养物俘获到的,并且随后使用1mL HD Nuchar活性碳填充柱进行纯化)的各流分,测量相对于产物(即单克隆抗体)的HCP浓度(ppm)的实验结果的示意图。收集七个10mL的洗出液流分,分析其宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。示意图的X轴描

述了从活性碳柱中收集10mL(洗脱体积(mL))洗出液流分的终点。示意图的Y轴描述了各流分相对于产物(即单克隆抗体)的HCP浓度(ppm)。该示意图证明活性碳可用于从多种不同的蛋白质溶液中除去杂质。

[0053] 图18是表明对于单克隆抗体溶液(其中所述溶液是使用配备有蛋白A柱的三柱连续多色谱色谱(CMC)系统从澄清细胞培养物获得的,并且随后先后使用填充到柱中的HD Nuchar活性碳和阴离子交换色谱装置(如ChromaSorb™)纯化)的各流分,测量相对于产物(即单克隆抗体,MAb II)的HCP浓度(ppm)的实验结果的示意图。示意图的X轴描述了流分收集的终点,以阴离子交换装置的每单位柱体积装载的抗体重量(kg/L)测量。示意图的Y轴描述了各流分相对于产物(即单克隆抗体)的HCP浓度(ppm)。该示意图证明尽管单独使用时活性碳和ChromaSorb™都除去极大量的HCP,但当组合使用时,它们增加了起始溶液的纯度(从1,370ppm HCP到低于10ppm)。

[0054] 图19表明了如本文所述的连接的流通纯化工艺步骤的示意图。含有活性碳的装置与阴离子交换装置直接连接。来自阴离子交换装置的流出物经过静态混合器(在此处加入酸溶液以降低pH),然后经过阳离子交换流通装置和病毒过滤器。

[0055] 图20是描述测量经过阴离子交换装置(即ChromaSorb™)后的HCP的实验结果的示意图。Y轴表示HCP浓度(ppm)且X轴表示AEX载样量(kg/L)。

[0056] 图21是描述在流通纯化工艺步骤中测量作为病毒过滤装置装载功能的MAb聚集物的去除的实验结果的示意图。X轴表示病毒过滤载样量(kg/m^2)且Y轴表示病毒过滤后样品中的MAb聚集物的百分数。

[0057] 图22是描述测量深层过滤、活性碳和病毒过滤后的压力分布的实验结果的示意图。Y轴表示压力(psi)且X轴表示时间(小时)。

具体实施方式

[0058] 本发明提供用于从含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中纯化所述所关注的蛋白质的新的和改进的方法。

[0059] 活性碳已被用于水纯化过程。另外,活性碳已被用于从血清白蛋白中除去小分子杂质如脂肪酸和胆红素(参见例如Chen等人,J.Biol.Chem.,242:173-181(1967);Nakano等人,Anal Biochem.,129:64-71(1983);Nikolaev等人,Int.J.Art.Org.,14:179-185(1991))。活性碳也已被用于在植物病毒纯化过程中除去色素以及宿主蛋白、蛋白酶和核糖核酸酶(参见例如Price,Am.J.Botany,33:45-54(1946);Corbett,Virology,15:8-15(1961);McLeana等人,Virology,31:585-591(1967))。

[0060] 因此,通常活性碳被报道为与溶液中的分子(如水样品中的杂质)非特异性结合。

[0061] 本发明至少部分地基于以下出乎预料的和令人惊讶的发现:活性碳可选择性地除去蛋白质杂质和DNA群体,从而用于通过细胞中的重组表达产生的蛋白质的纯化。

[0062] 如本文的实施例所证明,活性碳可用于在蛋白质纯化过程中选择性除去宿主细胞蛋白(HCP)和DNA杂质而不显著影响靶蛋白的收率。进一步地,如本文所述的实施例所证明,当活性碳以流通模式用于蛋白质纯化过程时(无论是单独使用或与一种或多种不同类型的色谱介质混合使用),其导致含有蛋白质的样品中的一种或多种杂质的水平显著降低以及减少下游色谱柱的负担。进一步地,在某些实例中,活性碳减少了纯化过程中可能使用的步

骤数,从而降低了全部操作成本并节省了时间。进一步地,如本文所述的实施例所证明,活性碳可以在俘获步骤前或后使用,从而降低含有所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质的水平。

[0063] 在本文描述的一些实施方案中,活性碳用于纯化靶分子的整个方法的流通纯化步骤中,其中所述整个方法以及所述流通纯化步骤均以连续的方式进行。

[0064] 为了使本发明的内容更加容易理解,首先对某些术语进行定义。阐述的附加定义贯穿详述部分。

[0065] I.定义

[0066] 本文使用的术语“含碳材料”是指任何由碳组成的或含有碳的物质。在一些实施方案中,所要求保护发明的方法中使用的含碳材料是活性碳或活化碳。在一些实施方案中,活性碳包括活性炭。在一些实施方案中,将活性碳掺入纤维素介质中。

[0067] 在本文中互换使用的术语“活性碳”或“活化碳”是指已经过增强其孔结构的过程的含碳材料。活性碳是具有非常高的表面积的多孔固体。它们可以来自多种来源包括煤、木材、椰子壳、坚果壳和泥炭。可以使用包括在受控气氛下加热的物理活化或使用强酸、碱或氧化剂的化学活化,从这些材料制备活性碳。活化过程产生具有高表面积的多孔结构,所述高表面积使活性碳具有高度杂质去除的能力。可改变活化方法以控制表面的酸度。

[0068] 典型的活化方法包括使碳源经历热过程(如使用氧化气体)或化学过程(如使用磷酸或金属盐如氯化锌),所述碳源例如树脂废料、煤、煤焦炭、石油焦炭、褐煤、聚合材料以及木质纤维素材料包括纸浆和纸、来自纸浆生产的残渣、木材(如木屑、锯屑和木粉)、坚果壳(如杏仁壳和椰子壳)、谷粒(kernel)和水果核(如橄榄核和樱桃核)。用磷酸(H_3PO_4)化学活化木材基碳的实例公开于美国专利Re.31,093中,其导致碳的脱色和气体吸附能力的改进。同样,美国专利5,162,286教导了木材基材料的磷酸活化,所述木材基材料密度特别大并且含有相对高(30%)的木素含量,如坚果壳、水果核和谷粒。在美国专利5,204,310中还讨论了作为制备高活性和高密度碳的步骤的木质纤维素材料的磷酸活化。本段中所列的这些专利中各自的教导整体援引加入本文。

[0069] 相对于大多其它吸附材料,活性碳被认为使用相对弱的范德华力或伦敦色散力与分子相互作用。典型的商业活性碳产品表现出至少300m^2/g的表面积(通过本领域公知的基于氮吸附的Brunauer-Emmett-Teller(“BET”)方法测定)。

[0070] 虽然活性碳或活化碳之前已用于纯化液体或气体的方法,但它之前还未用于从一种或多种蛋白质杂质中纯化重组表达蛋白的方法。

[0071] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或“IgG”或“抗体”(在本文中互换使用)是指具有由两条重链和两条轻链组成的基本四-多肽链结构的蛋白质,所述链通过例如具有特异性结合抗原能力的链间二硫键而被稳定化。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在本文中互换使用)是指具有由重链和轻链组成的二-多肽链结构的蛋白质,所述链通过例如具有特异性结合抗原能力的链间肽连接基而被稳定化。术语“结构域(domain)”是指通过例如β-折叠片和/或链间二硫键而被稳定化的包含肽环(peptide loop)(如包含3-4个肽环)的重链或轻链多肽的球状区域。本文中的结构域进一步被称为“恒定的”或“可变的”,基于在“恒定的”结构域的情况下的不同类成员结构域中相对缺少组列变化,或在“可变的”结构域的情况下的不同类成员结构域中显著的变化。在本领域中抗体或多肽“结构域”通常被互换称为抗体

或多肽“区”。抗体轻链的“恒定的”结构域被互换称为“轻链恒定区”、“轻链恒定结构域”、“CL”区或“CL”结构域。抗体重链的“恒定的”结构域被互换称为“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“CH”区或“CH”结构域。抗体轻链的“可变的”结构域被互换称为“轻链可变区”、“轻链可变结构域”、“VL”区或“VL”结构域。抗体重链的“可变的”结构域被互换称为“重链可变区”、“重链可变结构域”、“VH”区或“VH”结构域。

[0072] 免疫球蛋白或抗体可以是单克隆的或多克隆的,并且可以单体形式或聚合物形式存在,例如以五聚体形式存在的IgM抗体和/或以单体、二聚体或多聚体形式存在的IgA抗体。免疫球蛋白或抗体也可以包括多特异性抗体(如双特异性抗体)和抗体片段(只要它们保留或被修饰成包含配体特异性结合结构域)。术语抗体的“片段”或“功能片段”是指抗体的部分或局部或包含比完整的或全部的抗体或抗体链少的氨基酸残基的抗体链。可以通过化学处理或酶处理完整的或全部的抗体或抗体链得到片段。也可以通过重组方法得到片段。当重组生产时,可以单独或作为被称作融合蛋白的较大蛋白质的一部分表达片段。示例性的片段包括Fab、Fab’、F(ab’)2、Fc和/或Fv片段。示例性的融合蛋白包括Fc融合蛋白。

[0073] 在一具体实施方案中,本发明的方法用于纯化抗体片段,所述抗体片段是含有Fc区的片段。

[0074] 术语“Fc区”和“含有Fc区的蛋白质”意指所述蛋白含有免疫球蛋白重链和/或轻链恒定区或结构域(之前定义的CH和CL区)。含有“Fc区”的蛋白质可具有免疫球蛋白恒定结构域的效应物功能。“Fc区”如CH_2/CH_3区可与亲和配体如蛋白A或其功能性变体选择性结合。在一些实施方案中,含有Fc区的蛋白质与蛋白A或其功能性衍生物、变体或片段特异性结合。在另一些实施方案中,含有Fc区的蛋白质与蛋白G或蛋白L或它们的功能性衍生物、变体或片段特异性结合。

[0075] 如以上讨论的,在一些实施方案中,靶蛋白是含有Fc区的蛋白,如免疫球蛋白。在一些实施方案中,含有Fc区的蛋白质是包含与另一多肽或其片段融合的免疫球蛋白的Fc区的重组蛋白质。

[0076] 通常,免疫球蛋白或抗体针对所关注的“抗原”。优选地,所述抗原是生物学上重要的多肽,并且向患有疾病或病症的哺乳动物给药抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。

[0077] 在本文中互换使用的术语“单克隆抗体”或“Mab”是指得自实质上同种抗体的种群的抗体,即除了可能以较少量存在的可能自然发生的突变,该种群中的各抗体是一样的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单独的抗原基(antigenic site)。此外,相对于通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂,每个单克隆抗体针对抗原上单个决定子。修饰语“单克隆”表明作为从实质上同种抗体种群得到的抗体的特征,并且其不被解释为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如,本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人,Natrue 256:495(1975)记载的杂交瘤方法制备,或可以通过重组DNA方法(参见例如美国专利4,816,567)制备。也可以使用Clackson等人,Natrue 352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1991)中记载的方法,从噬菌体抗体库中分离“单克隆抗体”。

[0078] 单克隆抗体可以进一步包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物质或属于特定抗体类或亚类的抗体的相应组列相同或同源,而链的剩余部分与来自另一物质或属于另一抗体类或亚类的抗体的相应组列相同或同源)以及这样抗

体的片段,只要它们表现出期望的生物学活性(美国专利4,816,567;以及Morrison等人,Proc.Natl.Acid.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。

[0079] 在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。包含氨基酸残基的高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”(即轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1990))的氨基酸残基和/或那些来自“高变环(hypervariable loop)”(即轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))的残基。“框架”或“FR”残基是那些不同于本文定义的高变区残基的可变结构域残基。

[0080] 非人(如鼠)抗体的“人源化”形式是含有来自非人免疫球蛋白的最小组列的嵌合抗体。在大多数部分,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体(recipient antibody)),其中所述受者的高变区残基被具有所需的特异性、亲和性和能力的来自非人物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区残基(供体抗体)替代。在一些实例中,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。另外,人源化抗体可以包含在受者抗体或在供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体会包含实质上至少一个(通常为两个)可变结构域的全部,其中所有的或实质上所有的高变环对应于那些非人免疫球蛋白,并且所有的或实质上所有的FR区是那些人的免疫球蛋白组列的FR区。人源化抗体可以包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的部分。进一步的细节参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。

[0081] 在本文中互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”是指任意长度的聚合形式的核苷酸(无论是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸)。这些术语包括单链、双链或三链DNA,基因组DNA,cDNA,RNA,DNA-RNA杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然的、通过化学或生物学方法修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的骨架可以包含糖和磷酸基团(如可通常在RNA或DNA中发现),或修饰的或替代的糖或磷酸基团。另外,可以通过合成互补链并在适宜条件下将该链复性(anneal),或者通过使用DNA聚合酶用适宜的引物从头合成互补链,来从化学合成的单链多核苷酸产物得到双链多核苷酸。核酸分子可以有多种形式,如基因或基因片段、一个或多个外显子、一个或多个内含子、mRNA、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、分离的任意组列的DNA、分离的任意组列的RNA、核酸探针以及引物。多核苷酸可以包括修饰核苷酸如甲基化核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶(uracyl)、其它糖和诸如氟代核糖(fluororibose)和硫代酸酯(thioate)的连接基,以及核苷酸分支。本文使用的“DNA”或“核苷酸组列”不仅包括碱基A、T、C和G,还包括任何它们的类似物或这些碱基的修饰形式如甲基化核苷酸、核苷酸间修饰如不带电的键和硫代酸酯、糖类似物的使用,以及修饰和/或备选的骨架结构如聚酰胺。

[0082] 本文使用的术语“溶液”、“混合物”或“样品”是指所关注的蛋白质或靶蛋白(例如含有Fc区的蛋白质如抗体)和一种或多种杂质的混合物。在一些实施方案中,将所述样品在经历本发明的方法前进行澄清步骤。在一些实施方案中,所述样品包括细胞培养料,例如来

自哺乳动物细胞培养(如CHO细胞)的料。然而,样品还包括用于产生所关注的蛋白质的非哺乳动物表达系统。

[0083] 本文使用的术语“非哺乳动物表达系统”是指所有用于产生治疗蛋白质的宿主细胞或生物体,其中所述宿主细胞或生物体是非哺乳动物来源。非哺乳动物表达系统的非限制性实例是大肠杆菌(E.coli)和毕赤酵母(Pichia pastoris)。

[0084] 本文使用的术语“UV活性物质”是指如通过UV分光光度计所监测的,澄清细胞培养物在经历蛋白A分析柱后的流通流分的组合物。在一些实施方案中,所述UV分光光度计监测280nm的流分。该流分通常由杂质(如染料(例如pH指示剂)、宿主细胞蛋白质、DNA和其它需要从该流分中除去的细胞培养基成分)组成,还包含所关注的蛋白质(如抗体)。手动或通过预设算法积分流通杂质峰,并且用于定量总杂质水平。

[0085] 本文使用的术语“多肽”通常是指具有多于约10个氨基酸的肽或蛋白质。在本文中互换使用的术语“所关注的蛋白质”或“靶蛋白”是指欲通过本发明的方法从一种或多种杂质中纯化的蛋白质或多肽(包括但不限于含有Fc的蛋白质如抗体)。

[0086] 多肽的实例包括例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状腺激素;脂蛋白;α-1-抗胰蛋白酶;胰岛素α-链;胰岛素β-链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;促黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子如因子VIIIC、因子IX、组织因子和维勒布兰德因子;抗凝血因子如蛋白C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活剂,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);蛙皮素(combesin);凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子-α和-β;脑啡肽酶;RANTES(调节正常表达和分泌的T细胞的激活);人巨噬细胞炎性蛋白质(MIP-1-α);血清白蛋白如人血清白蛋白;缪勒管抑制物质(Muellerian-inhibiting substance);松弛素α-链;松弛素β-链;松弛素原(prorelaxin);小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白如β-内酰胺酶;DNase;IgE;细胞毒性T-淋巴细胞关联抗原(CTLA)(如CTLA-4);抑制素;激活素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或神经生长因子如NGF-β;血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子如αFGF和βFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF)如TGF-α和TGF-β,包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4或TGF-β5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I);胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP);CD蛋白质如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34和CD40;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素如干扰素-α、-β和-γ;集落刺激因子(CSF),如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白介素(IL),如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白(surface membrane protein);衰变加速因子;病毒抗原,例如艾滋病毒包膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,如HER2、HER3或HER4受体;以及任意上述所列的多肽的片段和/或变体。另外,本发明的蛋白质或多肽是与任意上述所列的多肽特异性结合的抗体、其片段或变体。

[0087] 在本文中互换使用的术语“污染物”、“杂质”和“残留物(debris)”是指任意外源的或不要的(objectionable)分子,包括生物大分子,如DNA、RNA、一种或多种宿主细胞蛋白(HCP)、内毒素、脂质和一种或多种添加剂,其可能存在于含有使用本发明的方法从一种或多种外来的或不要的分子中分离的靶蛋白的样品中。另外,这样的污染物可以包括任何可

能在纯化方法之前发生的步骤中使用或产生的试剂,如当使用蛋白A亲和色谱步骤的情况下沥出的(leached)蛋白A。

[0088] 互换使用的术语“中国仓鼠卵巢细胞蛋白”和“CHOP”是指来自中国仓鼠卵巢(“CHO”)细胞培养物的宿主细胞蛋白(“HCP”)的混合物。HCP或CHOP通常作为包含所关注的蛋白质(如在CHO细胞中表达的抗体或免疫粘附素)的细胞培养基或裂解液(如收集的细胞培养液(“HCCF”))中的杂质而存在。在包含所关注的蛋白质的混合物中存在的CHOP的量提供了所关注蛋白质纯度的量度。HCP或CHOP包括但不限于由宿主细胞(如CHO宿主细胞)表达的所关注蛋白质。通常,以相对于蛋白质混合物中所关注的蛋白质的量的百万分数表示所述混合物中的CHOP的量。可以理解的是,当宿主细胞是另一种细胞类型(如除了CHO外的哺乳动物细胞、大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或植物细胞)时,HCP是指在宿主细胞裂解液中发现的除靶蛋白之外的蛋白质。

[0089] 在本文中互换使用的术语“百万分之…”或“ppm”是指通过本发明方法纯化的靶蛋白的纯度的量度。单位ppm是指所关注的蛋白质(毫克/毫升)中HCP或CHOP的量(纳克/毫克)(即,CHOP ppm＝(CHOP ng/ml)/(所关注的蛋白质mg/ml),其中所述蛋白质是溶液的形式)。

[0090] 在本文中互换使用的术语“纯化”、“分开”或“分离”是指从含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的组合物或样品中提高所关注的多肽或蛋白质或靶蛋白的纯度。通常,通过从所述组合物中(全部或部分地)除去至少一种杂质来提高所关注的蛋白质的纯度。“纯化步骤”可以是导致“同质”组合物或样品的整个纯化方法的一部分,本文使用的组合物或样品是指在含有所关注的蛋白质的组合物中含有少于100ppmHCP,或者少于90ppm、少于80ppm、少于70ppm、少于60ppm、少于50ppm、少于40ppm、少于30ppm、少于20ppm、少于10ppm、少于5ppm或少于3ppm的HCP的组合物或样品。

[0091] 本文使用的术语“蛋白相”是指相对于样品中靶蛋白的初始浓度,靶蛋白浓度实质上增加的样品中的部分。浓缩方法可以包括在固相多孔或非多孔支持物上的蛋白质吸附;在液体-空气或液体-气体界面的蛋白质吸附;在两种不混溶或部分混溶的液体间界面的蛋白质吸附;作为纯的成分或作为含有一种或多种分子或聚合物的复合制剂的结果的蛋白质沉淀;或使用蛋白质结晶。

[0092] 本文使用的术语“液相”是指相对于样品中蛋白质的初始浓度,靶蛋白浓度实质上降低的样品中的部分。可以与如上述定义的蛋白相同时产生液相。

[0093] 在本文中互换使用的术语“流通过程”、“流通模式”和“流通色谱法”是指产品分离技术,其中样品中的至少一种产物意图流经色谱树脂或介质,而至少一种潜在成分与所述色谱树脂或介质结合。

[0094] 意图流经的样品通常被称为“流动相”。“流通模式”通常是等度操作(即期间流动相的成分不变的色谱方法)。用于流通的介质通常用含有靶蛋白分子的相同缓冲液预平衡。纯化后,可以使用另外量的相同缓冲液冲洗介质以增加产品的回收。在一些实施方案中,“流通模式”的流动相是含有所关注产物的细胞培养料。在一些实例中,调节料的pH或导电率以使用流通方法最大限度地除去杂质。

[0095] 在本发明的方法以及如本文所列的实施例中所述的一些实施方案中,所述方法使用以流通模式进行的阴离子交换步骤。

[0096] 在本文中互换使用的术语“结合和洗脱方式”和“结合和洗脱过程”是指其中样品

中含有的至少一种产品与色谱树脂或介质结合并随后被洗脱的产品分离技术。

[0097] 术语“色谱法”是指任意种类的将所关注的分析物(如含有Fc区的蛋白质如免疫球蛋白)与存在于混合物中或结合和洗脱过程中的其它分子分离的技术,其中作为混合物中各分子在流动相影响下流经固定介质的速率不同的结果,将所关注的分析物与其它分子分离。

[0098] 在本文中互换使用的术语“色谱树脂”或“色谱介质”是指任意种类的多孔或非多孔固相,其将所关注的分析物(如含有Fc区的蛋白质如免疫球蛋白质)与存在于混合物中或结合和洗脱过程中的其它分子分离。通常,作为混合物中各分子在流动相影响下流经固定的固相的速率不同的结果,将所关注的分析物与其它分子分离。非限制性实例包括具有阳离子、阴离子、HIC或混合模式表面修饰的树脂;具有阳离子、阴离子、HIC或混合模式表面修饰的膜;具有阳离子、阴离子、HIC或混合模式表面修饰的织造或非织造纤维;以及具有阳离子、阴离子、HIC或混合模式表面修饰的整料(monolith)。

[0099] 本文使用的术语“亲和分离”或“亲和纯化”是指包括使含有靶分析物(如含有Fc区的蛋白质如免疫球蛋白)的样品与已知与所述靶分析物结合的亲和介质(如其上携带已知与所述分析物结合的亲和配体(例如蛋白A或其变体)的固体支持物)接触的任意纯化或测定技术。

[0100] 在本文中互换使用的术语“亲和色谱法”和“蛋白质亲和色谱法”是指其中将靶蛋白(如含有Fc区的所关注的蛋白质或抗体)与对所述靶蛋白具有特异性的配体特异性结合的蛋白质分离技术。在一些实施方案中,这样的配体是蛋白A或蛋白G或它们的功能性变体,其与色谱固相材料共价连接,并且当溶液接触色谱固相材料时容易接近溶液中的靶蛋白。在色谱步骤过程中,靶蛋白通常保留其对配体的特异性结合亲和力,而混合物中的其它溶质和/或蛋白质不与配体可测地或特异性地结合。靶蛋白与固定配体的结合允许污染蛋白质(contaminating protein)或蛋白质杂质通过色谱介质,而靶蛋白保持与固相材料上的固定配体特异性结合。随后在适宜的条件(如低pH、高pH、高盐、竞争配体等)下以活性形式从固定配体上移出该特异性结合的靶蛋白,并且随不含早些时候允许通过色谱柱的污染蛋白质或蛋白质杂质的洗脱缓冲液通过色谱柱。任意成分均可用作用于纯化其各自的特异性结合蛋白质(如抗体)的配体。然而,在本发明的各种方法中,蛋白A用作用于含有Fc区的靶蛋白或抗体的配体。本领域技术人员可以容易地确定从配体(如蛋白A)中洗脱靶蛋白(如含有Fc区的蛋白质)的条件。在一些实施方案中,蛋白G或功能性变体可用作配体,在一些实施方案中,在pH范围5-9下使用诸如蛋白A的配体与含有Fc区的靶蛋白结合,将该配体/靶蛋白结合物清洗或再平衡,随后用pH约为4或低于4的缓冲液洗脱。

[0101] 虽然亲和色谱法对于结合所关注的蛋白质是特异性的,但使用诸如蛋白A和蛋白G的配体的亲和色谱法往往相当昂贵并且色谱柱被非特异性物质(如一种或多种杂质)快速污染,导致工业上的巨大问题。本发明的方法提供通过使用通过从样品中除去一种或多种非特异性物质来减少色谱柱的负荷,从而降低整体费用并增加柱的使用寿命的材料(如活性碳)解决该问题的方法。另外,一些本发明的方法导致亲和色谱步骤后更少色谱步骤的使用,从而提高整体方法的效率。

[0102] 在重组生产的蛋白质的多步骤纯化中,通常在方法的早期将靶蛋白与存在于细胞培养液中的多种不同的可溶性杂质分离是有益的。可以通过靶蛋白的色谱俘获或非色谱分

离来实现该分离。

[0103] 本文使用的色谱“俘获”步骤包括将靶蛋白与恰好位于所收集的通过细菌发酵或细胞培养表达产生的原料的下游的色谱介质的结合。通常,将所收集的料澄清,然而也可以从未澄清的料实现俘获。该步骤的主要功能是使用最小量的可能的树脂从溶液中结合靶蛋白,但允许杂质流过。随后将靶蛋白洗脱入显著较小体积的缓冲液中以供进一步的下游处理。选择具有动态结合能力、回质(mass recovery)和靶的生物学活性保持的最佳组合的色谱介质。对于含有Fc结合区的抗体,通常使用亲和色谱介质,如那些基于蛋白A或蛋白G的亲和色谱介质。

[0104] 用于俘获的色谱介质选自多孔树脂、膜、整料、织造或非织造多孔材料。

[0105] 靶蛋白的非色谱分离可以通过一种或多种以下的步骤实现:在固相多孔或非多孔支持物上的蛋白质吸附;在液体-空气或液体-气体界面的蛋白质吸附;在两种不混溶或部分混溶的液体界面间的蛋白质吸附;作为纯的成分或作为含有一种或多种分子或聚合物的复合制剂的结果的蛋白质沉淀;或使用蛋白质结晶。

[0106] 术语“离子交换”和“离子交换色谱法”是指其中混合物中所关注的溶质或分析物(如含有Fc区的靶蛋白)与通过例如共价连接与固相离子交换材料连接的带电化合物相互作用,从而所述所关注的溶质或分析物与多于或少于所述混合物中的溶质杂质或污染物的所述带电化合物非特异性地相互作用的色谱方法。该混合物中污染物溶质从离子交换材料柱上的洗脱比所关注的溶质快或慢,或相对于所关注的溶质与树脂结合或从树脂中排除。“离子交换色谱法”特别包括阳离子交换、阴离子交换和混合模式离子交换色谱法。例如,阳离子色谱法可以结合靶分子(如含有Fc区的靶蛋白)随后进行洗脱(阳离子交换结合和洗脱色谱法或“CIEX”),或者可以主要结合杂质而使靶蛋白“流经”该柱(阳离子交换流通色谱法FT-CIEX)。阴离子交换色谱法可以结合靶分子(如含有Fc区的靶蛋白)随后进行洗脱,或者可以主要结合杂质而使靶蛋白“流经”该柱。在一些实施方案中并且如本文所列的实施例证明,阴离子交换色谱步骤以流通模式进行。在一具体实施方案中,阴离子交换色谱步骤采用包括多孔基质和基质上的多孔涂层的多孔吸附介质,其中所述涂层含有一种或多种聚合伯胺或其共聚物。

[0107] 本文使用的术语“混合模式色谱法”或“多模式色谱法”是指采用携带至少两种不同类型的官能团(各自能够与所关注的分子相互作用)的色谱固相的方法。混合模式色谱介质的实例是Capto™ Adhere(GE Healthcare),其是AEX混合模式树脂。混合模式色谱法通常使用具有多于一种的与靶蛋白和/或杂质相互作用模式的配体。该配体通常包含至少两个不同的但协同的位点,其与待结合的物质相互作用。例如,这些位点之一可以与所关注的物质具有电荷-电荷类型相互作用,而其它位点可以与所关注的物质具有电子受体-供体类型相互作用和/或疏水和/或亲水相互作用。电子供体-受体类型相互作用包括氢键合、π-π、阳离子-π、电荷转移、偶极-偶极和诱导偶极相互作用。一般而言,基于相互作用总和的不同,靶蛋白和一种或多种杂质可以在一定范围的条件下分离。

[0108] 本文使用的术语“疏水作用色谱法”或“HIC”是指基于分子的疏水性(即它们从水溶液中吸附至疏水表面的能力)分离分子的方法。HIC通常不同于反相(RP)色谱法,其区别在于特殊设计的HIC树脂(相对于RP树脂通常具有较低疏水性或疏水配体密度)。

[0109] HIC色谱法通常依赖溶质分子表面疏水基团的不同。这些疏水基团倾向于与不溶

基质表面上的疏水基团结合。由于HIC使用比反相液体色谱法更高极性、更少变性的环境，其更普遍用于蛋白质纯化(通常与离子交换或凝胶过滤色谱法组合使用)。

[0110] 术语“离子交换树脂”、“离子交换介质”和“离子交换材料”是指带负电(即阳离子交换树脂)或带正电(即阴离子交换树脂)的固相。可以通过将一种或多种带电配体附着在固相上(例如通过共价键或非共价涂层或吸附)来提供电荷。或者，或附加地，电荷可以是所述固相的固有特性。

[0111] 本文使用的术语“CEX”、“阳离子交换介质”、“阳离子交换树脂”和“阳离子交换材料”是指其带负电荷并且因此具有用于与经过或通过固相的水溶液中的阳离子交换的游离阳离子的固相。附着至固相上以形成阳离子交换树脂的负电荷配体可以是例如羧酸盐或磺酸盐。可商购获得的阳离子交换树脂包括羧甲基纤维、固定在琼脂糖(如来自Pharmacia的SP-SEPHAROSE FAST FLOW™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™)上的磺丙基(SP)和固定在琼脂糖(如来自Pharmacia的S-SEPHAROSE FAST FLOW™)上的磺酰基。

[0112] 本文使用的术语“混合模式介质”、“混合模式树脂”和“混合模式离子交换树脂”是指用阳离子基团、阴离子基团和疏水基团共价修饰的固相。可商购获得的混合模式离子交换树脂是BAKERBOND ABX™(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)，其含有弱阳离子交换基团、低浓度的阴离子交换基团以及附着在硅胶固相支持基质上的疏水配体。

[0113] 本文使用的术语“HIC介质”或“HIC树脂”或“HIC材料”是指用于HIC分离的色谱材料。HIC介质通常来自用疏水配体(例如短脂族或芳族基团)修饰的多孔色谱树脂。HIC介质的实例包括Butyl Sepharose FF和Phenyl Sepharose FF，两者均可以从GE Healthcare商购获得。商购HIC树脂的其它实例包括Fractogel® Phenyl和Fractogel® Propyl(MERCK KGA, Darmstadt,Germany)、Butyl Sepharose®和Phenyl Sepharose® (GE HEALTHCARE)。

[0114] 本文使用的术语“AEX”、“阴离子交换介质”、“阴离子交换树脂”和“阴离子交换材料”是指带有正电荷(如具有附着于其上的一种或多种带正电的配体，例如伯氨基、仲氨基、叔氨基或季氨基)的固相。商购阴离子交换树脂包括DEAE cellose、QAE SEPHADEX™和FAST SEPHAROSE™(PHARMACIA)。

[0115] 术语“蛋白A”和“ProA”在本文中可互换使用，并且包括从其天生来源回收的蛋白A、(如通过肽合成或通过重组技术)合成生产的蛋白A、以及它们的保留结合具有CH_2/CH_3区(如Fc区)蛋白质的能力的变体。蛋白A可商购自Repligen,GE Healthcare and Lonza。蛋白A通常固定在固相支持材料上。术语“ProA”也指含有与蛋白A共价连接的色谱固相支持基质的亲和色谱树脂或柱。

[0116] 可以通过对于小鼠IgG2a或人IgG1的Fc区的结合常数(至少$K=10^{-8}M$，优选$K=10^{-9}M$)表征本发明方法中使用的蛋白A功能性衍生物、片段或变体。符合这样的结合常数值的相互作用在本发明上下文中被称为“高亲和性结合”。优选地，这样的蛋白A的功能性衍生物或变体包括至少部分的野生型蛋白A的功能性IgG结合结构域(选自天然结构域E、D、A、B、C)或其保留IgG结合功能性的工程突变体(engineered mutant)。

[0117] 本发明的“污染物蛋白A”是任意类型的如上述定义的蛋白A或其功能衍生物的功能性IgG结合产物，其在从蛋白A亲和色谱柱中洗脱结合的抗体时得到。这样的污染物蛋白A物质可以来自例如肽键水解(其很可能通过(特别是工业生产中的)酶作用发生)。当进行粗纯化时，蛋白A色谱法被用作下游处理的早期步骤，新鲜的产物溶液仍然具有相当大的蛋白

酶活性。细胞培养肉汤中的濒死细胞或在初始离心或过滤步骤中破裂的细胞很可能释放游离的蛋白酶;为了调节的目的,相对于生物化学研究实践,通常不在下游处理之前或在下游处理过程中用蛋白酶抑制剂补充细胞培养肉汤。实例是苯甲基磺酰氯(PMSF)或e-己酸。这样的化学试剂在生物制药的生产中作为添加剂是不期望的。更加可能的是,取决于蛋白质折叠的三级结构,蛋白A的重组功能性衍生物或片段比野生型蛋白A的蛋白酶抗性更低。一旦减少结合结构域的总数,则连接各IgG结合结构域的氨基酸片段可能被暴露。结构域间的接触可能促进结构域折叠的稳定性。也可能由于抗体结合时诱导的构型改变,蛋白A或其所述功能性衍生物的抗体结合影响或促进了蛋白酶作用的易感性。

[0118] 将分子与色谱树脂“结合”意味着在适宜条件(pH/导电率)下将分子暴露于色谱树脂,使得通过配体-蛋白质相互作用将所述分子可逆地固定在色谱树脂之中或之上。非限制性实例包括所述分子和离子交换材料的一个或多个带电基团间的离子相互作用以及蛋白A和免疫球蛋白间的生物特异性相互作用。

[0119] 术语“清洗缓冲液”或“平衡缓冲液”在本文中可互换使用,是指在洗脱所关注的多肽分子前用于清洗或再平衡色谱树脂的缓冲液。在一些情况下,清洗缓冲液和上样缓冲液可以相同。“清洗”色谱介质意味着包括使适宜的缓冲液通过或经过所述介质。

[0120] “洗脱缓冲液”用于从固相上洗脱靶蛋白。洗脱缓冲液的导电率和/或pH通常使得靶蛋白从色谱树脂上洗脱下来。

[0121] 从色谱树脂上“洗脱”分子(如所关注的多肽或杂质)意味着通过改变溶液条件而从中除去分子,使得缓冲液与所关注的分子竞争与色谱树脂结合。非限制性实例是通过改变离子交换材料周围的缓冲液的离子强度来从离子交换树脂上洗脱分子,使得所述缓冲液与所述分子竞争所述离子交换材料上的带电位点。

[0122] 本文使用的术语“洗出液”是指经由洗脱得到的含有所关注的分子的溶液,以及作为流通纯化结果得到的含有所关注的靶蛋白的流通流分。在一些实施方案中,术语“洗出液”是指从结合和洗脱色谱步骤(如蛋白A亲和色谱步骤)得到的洗脱合并液。在一些实施方案中,在具有或没有中间的病毒失活步骤的情况下,来自蛋白A亲和色谱步骤的洗出液流入使用活性碳的流通纯化过程。

[0123] 术语“固相”或“多孔基质”或“基质(base matrix)”是指一种或多种带电配体可粘附于其上的非水性材料。所述固相可以是纯化柱、多孔的或非多孔的离散颗粒的间断相、膜、织造或非织造纤维、整料或过滤器等。用于形成固相的材料的实例包括多糖(如琼脂糖和纤维素);和其它机械稳定的基质如二氧化硅(如定孔玻璃)、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醚(polyvinyl ether)、尼龙、高分子量聚乙烯(HDPE)、聚醚砜、陶瓷和任意上述物质的衍生物。

[0124] “缓冲液”是通过其酸-碱结合物组分的作用抵抗pH改变的溶液。可以根据例如Buffers.A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy,D.,ed.Calbiochem Corporation(1975)中描述的缓冲液的期望pH使用不同的缓冲液。在本发明的方法的一些步骤中,缓冲液具有2.0至4.0,或2.8至3.8的pH。在本发明的其它步骤中,缓冲液具有5.0至9.0的pH。在本发明的其它步骤中,缓冲液具有4.0至6.5的pH。在本发明的方法的其它步骤中,缓冲液具有低于4.0的pH。控制pH在该范围的缓冲液的非限制性实例包括MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和铵

缓冲液,以及这些的组合。

[0125] 术语“导电率”是指水溶液在两个电极间传导电流的能力。在溶液中,电流通过离子转运流动。因此,随着水溶液中存在的离子量的增加,溶液会具有更高的导电率。导电率的测量单位是毫西每厘米(mS/cm或mS),并且可以使用商购的电导仪(如Orion出售的)测量。可以通过改变溶液中的离子浓度而改变其导电率。例如,可以改变溶液中的缓冲剂浓度和/或盐(如NaCl或KCl)浓度以达到期望的导电率。优选地,改变不同缓冲液中的盐浓度以实现如以下实施例中的期望导电率。

[0126] 多肽的“pI”或“等电点”是指多肽的正电荷与其负电荷平衡时的pH。可以从氨基酸残基或多肽上附着的碳水化合物的唾液酸残基的净电荷计算pI,或可以通过等电聚焦测定pI。

[0127] 本文使用的“滤液”是指样品通过介质的部分。

[0128] 本文使用的“保留物(retenate)”是指基本被介质保留的样品部分。

[0129] 本文使用的术语“澄清”是指通过除去悬浮颗粒来降低含有蛋白质的溶液的(如在NTU中测定的)浊度的过程。澄清可以通过多种方法实现,包括分批和连续离心、深层过滤、正常和正切流动过滤以及沉淀(包括用小分子或聚合物质进行凝絮),或这些方法的任意组合。

[0130] 短语“减少色谱柱的负荷”是指对含有蛋白质的样品的处理或加工,其中所述处理或加工导致减少了色谱柱的污垢,蛋白质样品随后被装载在所述色谱柱上。在典型的色谱试验中,可能有非洗出液质或杂质留在固定相上,从而导致色谱柱的污垢。该问题在放大规模时进一步加剧,其中由于存在的杂质水平增加导致柱污垢程度增加。柱污垢还导致通常相当昂贵的柱寿命的显著减少。本发明的方法提供改进的方法用于显著减少色谱柱的负荷,从而增加柱的寿命并导致蛋白质收率提高。本发明的方法导致在将样品装载到色谱柱前除去显著量的杂质,从而减少柱的负荷。典型的杂质包括宿主细胞蛋白、DNA、脂肪酸(来自细胞碎片)、染料分子、消泡剂等。

[0131] 在本文中互换使用的术语“工艺步骤”或“单元操作”是指在纯化过程中使用一种或多种方法或装置以实现特定的结果。可以在本文描述的方法或系统中使用的工艺步骤或单元操作的实例包括但不限于澄清、结合和洗脱色谱俘获、病毒灭活、流通纯化和配制。应理解,每种工艺步骤或单元操作均可使用多于一个步骤或方法或装置以实现该工艺步骤或单元操作的预期结果。例如,在一些实施方案中,如本文描述的流通纯化步骤可以使用多于一个步骤或方法或装置以实现该工艺步骤或单元操作,其中至少一个这样的步骤包括活性碳。在一些实施方案中,用于进行工艺步骤或单元操作的一种或多种装置是一次使用的或一次性的,并且可以在不需要在方法中替换任何其它装置或甚至停止方法运行的情况下被移除和/或替换。

[0132] 本文使用的术语“合并液罐(pool tank)”是指其通常在多个工艺步骤间使用并且具有能够收集来自工艺步骤的整个体积的产品的尺寸/容积的任何容器、器皿、贮液器(reservoir)、罐或袋。合并液罐可用于保持或储存或处理来自工艺步骤的整个体积的溶液状态的产品。在一些实施方案中,本文描述的方法避免了使用一个或多个合并液罐的需要。

[0133] 本文使用的术语“缓冲罐”是指在多个工艺步骤间或一个工艺步骤中(如当单独的工艺步骤包括多于一个步骤时)使用的任何容器、器皿或袋;其中来自一个步骤的产物流经

缓冲罐进入下一个步骤。因此,缓冲罐不同于合并液罐,在于它不意图保留或收集来自某步骤的整个体积的产物;但能够使产物从一个步骤连续流到下一个步骤。在一些实施方案中,本文描述的方法或系统中的两个步骤间或一个步骤中使用的缓冲罐的容积不超过来自工艺步骤的产物的总体积的25%。在另一个实施方案中,缓冲罐的容积不超过来自工艺步骤的产物的总体积的10%。在一些其它实施方案中,缓冲罐的容积小于生物反应器中细胞培养物的整个体积的35%、或小于30%、或小于25%、或小于20%、或小于15%、或小于10%,其构成欲从中纯化靶分子的原料。在一些实施方案中,在先后使用活性碳、AEX色谱法、CEX色谱法和病毒过滤的流通纯化工艺步骤中使用缓冲罐,其中所述缓冲罐用于在AEX色谱步骤之后进行溶液的改变。

[0134] 本文使用的术语“连续方法”是指用于纯化靶分子的方法,其包括两个或更多个工艺步骤(或单元操作),使得来自一个工艺步骤的产物直接流入该方法中下一个工艺步骤而没有中断,并且其中所述两个或更多个工艺步骤可以在它们的至少一部分持续时间同时进行。换言之,连续方法避免了在纯化过程中在进行下一工艺步骤前完成工艺步骤的需要。术语“连续方法”还用于一个工艺步骤中的多个步骤,在该情况中,在进行包括多个步骤的工艺步骤期间,样品连续流经该工艺步骤中必须进行的多个步骤。因此,在一些实施方案中,以连续方式进行使用活性碳的流通纯化步骤,其中来自先于流通纯化步骤的结合和洗脱色谱步骤(如蛋白A色谱俘获步骤)的洗出液先后流入(填充入纤维素介质中的)活性碳步骤、AEX色谱步骤、CEX色谱步骤以及病毒过滤步骤。

[0135] 术语“静态混合器”是指用于混合两种流体材料(通常是液体)的装置。该装置通常由在圆柱状(管)壳(housing)中所含的混合器元件(也被称为非移动元件)组成。当液流流经静止混合器时,所述非移动元件将所述材料连续混合。完全混合取决于许多变量,包括流体的特性、管的内径、混合元件的数目和它们的设计等。在本文描述的一些实施方案中,在本文描述的方法中(如在AEX色谱步骤和CEX色谱步骤之间)使用一个或多个静止混合器。

[0136] 本发明进一步通过以下实施例进行说明,所述实施例不应解释为限制性的。所有在本申请全文中引用的参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图援引加入本文。

[0137] II.用于本发明的方法中的示例性含碳材料

[0138] 在本发明的方法中,特定的含碳材料如活性碳被用于蛋白质的纯化。活性碳可被描述成具有非常高的表面积的多孔固体。在一些实施方案中,活性碳包括活性炭。活性碳可以来自多种来源,包括但不限于煤、木材、椰子壳、坚果壳和泥炭。可通过使用包括在受控气氛下加热的物理活化或使用强酸、碱或氧化剂的化学活化,从这些材料制备活性碳。活化过程产生有高表面积的多孔结构,所述高表面积使活性碳具有更高的杂质去除的能力。可改变活化过程以控制表面的酸度。

[0139] 活性碳可以从多种不同的商业途径得到并且具有多种级别和形式。活性碳的一些商业提供者包括诸如MeadWestVaco Corp.,Richmond,VA,USA;Norit Americas Inc.,Marshall,TX,USA;Calgon Carbon Corp.,Pittsburgh,PA,USA的公司。

[0140] 活性碳的两种主要的形式是粉状和颗粒状的。粉状活性碳含有小(通常直径小于1mm)的颗粒,并且最常用于液体的纯化。颗粒状活性碳有较大的粒度并因而具有较小的表面积,所以其优选用于气体纯化,其中扩散速度更快。

[0141] 在消费者应用(如水、食品、饮料和药物的纯化)中使用活性碳的安全性的重要考

虑是可提取化合物的减少和控制。意图供饮用水和食品接触应用的活性碳通常依照安全标准ANSI/NSF Standard 61(其覆盖所有加入水中的间接添加剂)制备。同样,ASTM标准测试方法D6385描述了通过灰化测定活性碳中的酸可提取成分,并且可以用于研究和将来自活性碳的可提取物水平降到最小。

[0142] 多种活性碳类型对于各种应用是可获得的。例如,MeadWestVaco Corp.提供至少12种类型的粉状活性碳,它们的容量、表面酸度、对靶分子的孔易接近性(pore accessibility)以及预期应用不同。通常期望将活性碳的容量最大化以用于杂质的去除。

[0143] 在本文所述的一些实施方案中,活性碳被掺入到纤维素介质中。

[0144] III.常规流通纯化方法

[0145] 最常见的流通纯化方法显然依赖于所关注的靶蛋白和欲除去的杂质间不同的表面相互作用。例如,单克隆抗体的常规AEX流通纯化依赖于大多数抗体的等电点高于其它蛋白质和核酸并且通常高于7的事实。由此,在低于被纯化抗体的pI的pH下进行AEX流通纯化方法,以确保固定相和抗体具有相同的电荷并且从而所述抗体流经介质而没有与表面显著结合。另一方面,许多蛋白质杂质核酸及内毒素具有低于抗体的pI,其通常低于7,并且因此它们与AEX介质的表面结合。

[0146] 像大多数离子交换色谱过程一样,AEX流通纯化通常对溶液的导电率敏感并且通常在较高盐度时效果较低。在一典型的单克隆抗体纯化方法中,AEX流通纯化有时被称为在一个或多个结合和洗脱柱色谱步骤后的“精制步骤”。

[0147] 两种最常用的工艺模板如下所示:

[0148] 1)蛋白A俘获→CEX结合和洗脱纯化及浓缩→稀释→AEX流通

[0149] 2)蛋白A俘获→AEX流通→CEX结合和洗脱纯化及浓缩

[0150] 除了这些常用的工艺模板外,有时也使用其它纯化方案,包括CEX俘获及使用混合模式的和无机的结合和洗脱树脂(如Ceramic Hydroxyapatite,CHT)。一般而言,流通纯化的目的是除去痕量水平的杂质,而使用结合和洗脱步骤进行纯化的主体。然而,从主要使用结合和洗脱步骤到流通纯化过程的转变可以是非常节省成本的解决办法,其节省时间、试剂及操作成本。因此,本文所述的方法提供对于常规方法的可行的解决方法,其中它们更加节省成本的并且降低整体的制造和操作成本。

[0151] 在本文所述的一些实施方案中,提供改进的流通纯化方法,其使得流通纯化能够以连续方式进行。

[0152] IV.纯化过程中含碳材料的使用

[0153] 如以上讨论的,本发明提供使用活性碳的新的和改进的纯化方法。活性碳可以直接加入到纯化步骤中,并且可以随后通过沉淀或过滤除去;或者可以使溶液或气体通过含有活性碳的装置。活性碳可以独立地填充如合适的装置中或可以与其它增强其机械、流动或分离性质的物质混合。例如,活性碳可被掺入到含有纤维素的湿法铺设纤维介质中,随后密封入一次性装置(如得自Millipore Corporation的Millistak+®Pod CR,或得自Pall Corporation,Port Washington,NY,USA的Seitz®AKS Filter Media)中。活性碳的另一种形式是活性碳块(block),其中活性碳通过与热塑性粉末一起压制而被掺入到多孔整料中。与色谱介质类似,颗粒形式的活性碳也可被填充到柱中,或其可被填充入合适的装置中。通常公认活性碳介质用于脱色、小分子杂质的去除等。例如,得自Pall Corporation的数个等级

的活性碳介质可以基于靶杂质的分子量进行选择。提供三种分子量范围:200-400、400-1,000和400-1,500道尔顿,后面的最大。然而,任何商购的活性碳介质均未被描述用于从生物样品中选择性除去分子量为2000至200,000道尔顿的更大的杂质。

[0154] 本发明至少部分地基于以下令人惊讶的发现:活性碳能够选择性地结合不期望的杂质(如HCP和DNA),同时表现出可忽略不计的与靶蛋白的结合。

[0155] 本发明还认识到与所有吸附材料相似,活性碳的吸附能力并非无限的这一事实。例如,在CHO-S料的情况中,当HCP和DNA以如实施例1中所示的典型料中观测到的浓度存在时,活性碳表现出有效地除去这些物质。然而,如实施例2中所示,发现添加DNA至鲜有的高水平抑制活性碳的HCP去除效率。

[0156] 在靶蛋白俘获步骤之前或之后,活性碳也可以在除去可能存在于靶蛋白溶液中的细胞培养基的潜在成分中高度有益。细胞培养基中的典型成分包括表面活性剂(如Pluronic® F68)、胰岛素、抗生素、甲氨蝶呤和止泡剂。由于存在这些成分中的一些会被携带入纯化的靶蛋白的风险,在蛋白纯化组列中加入能够除去这些成分的步骤是有利的。如进一步被本文的实施例所证明,活性碳可用于纯化过程中以除去这样的成分。

[0157] 以下是掺入活性碳作为一个或多个中间步骤(其通过下划线显示在下表I中)的蛋白质纯化方法的实例。应理解可以使用这些方法的许多变体。

[0158] 表I

[0159]

	第1步	第2步	第3步	第4步	第5步
方法A	提供澄清的细胞培养液	流经<u>活性碳</u>	用亲和介质结合和洗脱	用CEX介质结合和洗脱	流经AEX介质
方法B	提供澄清的细胞培养液	用亲和介质结合和洗脱	流经<u>活性碳</u>	用CEX介质结合和洗脱	流经AEX介质
方法C	提供澄清的细胞培养液	用亲和介质结合和洗脱	用CEX介质结合和洗脱	流经<u>活性碳</u>	流经AEX介质
方法D	提供澄清的细胞培养液	用亲和介质结合和洗脱	用CEX介质结合和洗脱	流经AEX介质	流经<u>活性碳</u>
方法E	提供澄清的细胞培养液	用亲和介质结合和洗脱	流经<u>活性碳</u>	流经AEX介质	
方法F	提供澄清的细胞培养液	用CEX介质结合和洗脱	流经<u>活性碳</u>	流经AEX介质	
方法G	提供澄清的细胞培养液	用亲和介质结合和洗脱	流经<u>活性碳</u>	流经AEX介质	流经CEX介质

[0160] 通常,在上表中,用亲和介质结合和洗脱和/或用CEX介质结合和洗脱步骤可以以下三种模式中的任一种操作:(1)分批模式,其中将靶蛋白上样到介质上,停止上样,清洗和洗脱介质,并收集合并液;(2)半连续模式,其中连续进行上样,而洗脱是间歇的(如在连续多柱色谱法的情况下);以及(3)完全连续模式,其中上样和洗脱二者均连续进行。

[0161] 在一些实施方案中,在上表中描述的一种或多种方法中,如本文描述的,病毒灭活步骤可以在结合和洗脱步骤后以及使洗出液经历流通纯化步骤前进行。

[0162] 应理解,本文描述的和上表中的方法可以进一步使用额外的步骤以及在线或经缓冲罐改变溶液状态的步骤。在本文所述的一些实施方案中,方法包括以下步骤:澄清;用蛋白A亲和介质结合和洗脱;在线病毒灭活;以下流通纯化:先后经活性碳、流通AEX介质、使用在线静止混合器和/或缓冲罐改变溶液、流通CEX介质和病毒过滤;和配制。

[0163] V.<u>检验降低水平的一种或多种杂质</u>

[0164] 本发明提供了用于降低含有所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质水平的方法。蛋白质样品中所含的来自生物源的典型的杂质包括宿主细胞蛋白(HCP)和核酸(DNA)。当宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)时,HCP通常被称作CHO HCP或CHOP。使用对HCP的抗体的免疫学方法如Western Blot和ELISA常用于检测这些杂质。也经常使用微量滴定板免疫酶测定(ELISA)以提供高分析灵敏度。这样的测定是使用简单、客观且高效的用于测量纯化过程中的一种或多种杂质水平的工具。

[0165] 一些用于测定HCP的ELISA试剂盒是可以从诸如Cygnus Technologies of Southport,NC,USA的卖家商购获得的。一些这样的试剂盒在它们倾向于与实质上所有可能污染产品的HCP反应而与使用的纯化过程无关的意义上是“广义的”。在一些实施方案中,商购试剂盒可以用于检测样品中的一种或多种杂质的水平。

[0166] 本发明进一步通过以下实施例进行说明,所述实施例不应解释为限制性的。所有在本申请全文中引用的参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图援引加入本文。

[0167] 实施例

[0168] 实施例1.评价用于以流通模式去除杂质的各种材料

[0169] 在该实验中,评价不同材料从澄清的CHO料中除去杂质的能力。测试表II中所示的材料以流通模式的杂质去除。磷酸盐缓冲液(PBS,10mM磷酸盐,pH 7.4)用作平衡和清洗缓冲液。

[0170] 表II

[0171]

材料	缩写	描述	卖家/目录号
活性碳	AC	RGC 80	MeadWestVado
SP sepharose FastFlow	SP FF	琼脂糖阳离子交换色谱(CIEX)树脂	GE Healthcare
ProRes™-S	ProRes™-S	聚合物阳离子交换色谱(CIEX)树脂	Millipore Corporation
Q sepharose FastFlow	Q FF	琼脂糖阴离子交换色谱(AIEX)树脂	GE Healthcare
Phenyl Sepharose FastFlow	Ph FF	琼脂糖疏水作用色谱(HIC)树脂	GE Healthcare

[0172] 使用重力流通(FT)检测方法来检测树脂杂质的去除。使1ml每种表II中所列的材料(1ml)沉降,并填充入5ml的一次性色谱柱(Evergreen Scientific,LA,CA)中。用5倍柱体积(CV)的平衡缓冲液(PBS)平衡该柱,用20CV的料上样,并再用5CV的清洗缓冲液(PBS)清洗。收集流通洗出液流分。使用添加有多克隆IgG(约2.6mg/ml,SeraCare)的未处理的澄清零位CHO-S料。

[0173] 检测流通洗出液和相应料的IgG收率、UV活性物质(280nm)去除、HCP去除和DNA去除。依照卖家的说明使用Poros Protein A2.1mm×30mm分析柱(LIFE TECHNOLOGIES,Palo Alto,CA)在Waters Alliance HPLC(Milford,MA)上定量IgG收率。使用非保留物质的峰面积(其显示为蛋白A色谱图的流通峰)定量280nm下的UV活性物质。使用CHO-CM HCP ELISA试剂盒(CYGNUS TECHNOLOGIES,Southport,NC)检测宿主细胞蛋白。使用Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent(LIFE TECHNOLOGIES,Foster City,CA)检测DNA。所有的检测依据制造商的使用说明进行。结果描述在图1-4中。

[0174] 如图1所示,除了HIC树脂显示约5%的IgG收率损失,所有其它筛查的介质即活性

碳、SPFF、ProRes™-S和QFF证明没有可检测到的收率损失。

[0175] 进一步地,如图2、3和4所示,活性碳导致280nm处UV活性物质水平的显著降低。所述UV活性物质包括pH指示剂、一些种类的HCP、DNA和一些残存细胞培养基成分。在使用多克隆IgG的情况下,该流分还包括蛋白A不结合的IgG3群体。尽管包括活性碳在内的所有材料均表现出一定程度的HCP去除,但两种具有阳离子交换功能的材料Sepharose FastFlow和ProRes™-S除去最多的HCP。对于DNA去除,尽管不令人惊讶地发现阴离子交换树脂、Q FastFlow显著的DNA去除,但出乎预料地发现活性碳以相似的能力除去DNA。所有其它材料以较低的程度去除DNA。

[0176] 该实施例的数据证明活性碳以及具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料可在不同程度上以流通模式从CHO料中去除杂质(HCP、DNA和UV活性物质)而没有显著的收率损失。

[0177] 实施例2.流通杂质去除能力

[0178] 在一代表性的实验中,评价每单位体积不同的材料去除的杂质量。通过添加商购鲱鱼精DNA来增加CHO-S料中的DNA水平,以了解DNA和HCP间吸附竞争的效果。用于评价杂质去除的材料列于下表III中。

[0179] 表III

[0180]

材料	缩写	描述	卖家/目录号
活性碳	AC	活性碳	MeadWestVado RGC 80
SP sepharose FastFlow	SP FF	阳离子交换色谱(CIEX)树脂，琼脂糖基质	GE Healthcare, Cat# 17-0729-01
ProRes™-S	ProRes™-S	阳离子交换色谱(CIEX)树脂，聚合物基质	Millipore Corporation
Q sepharose FastFlow	Q FF	阴离子交换色谱(AIEX)树脂，琼脂糖基质	GE Healthcare, Cat# 17-0510-01

[0181] 将列于表III中的每种材料填充入Omnifit柱(内径0.66cm)中。在BioCad(APPLIED BIOSYSTEMS,Palo Alto,CA)上,用5CV PBS平衡该柱,用100CV的添加有多克隆IgG和鲱鱼精DNA的零位未处理澄清CHO-S料上样,并且用20倍柱体积的PBS清洗。以每10倍柱体积收集上样步骤中的流通洗出液流分。使用如实施例1中描述的同样的方法检测流通洗出液流分和相应的料的IgG收率、UV活性物质、HCP和DNA去除。

[0182] 如图5所示,所有筛查的材料显示在超过100倍柱体积料上样时没有显著的IgG收率损失。如图6所示,活性碳去除整个100CV中最多的UV活性物质。阴离子交换材料也在一定程度上去除整个100CV的UV活性物质。此外,如图7所示,阴离子交换树脂、Q FastFlow的HCP去除能力受到限制,这是由于其穿过了早期流分。然而,阳离子交换材料Q FastFlow和ProRes™-S除去整个100倍柱体积的显著量的HCP。在该具有高DNA浓度(即额外的195μg/mL)的具体实验中,与无DNA添加的料相比,活性碳去除较少的HCP。例如,在用不添加DNA的原始零位CHO-S料的相似实验中,活性碳去除整个100CV中接近20%的HCP(数据未显示)。这证明了DNA和HCP对于活性碳吸附的一定程度上的竞争。此外,如图8所示,所有材料均在一定程度上去除DNA。

[0183] 该实施例的数据证明活性碳以及具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料可在不同程度上以流通模式从CHO细胞料中去除超过100倍柱体积的杂质(HCP、DNA

和UV活性物质)而没有显著的收率损失。

[0184] 实施例3.不同材料的组合对杂质去除的效果

[0185] 在另一实验中,评价图9中所述的工作流程中所示的材料的不同组合的杂质去除。使材料(1ml)沉降,并填充入5ml的一次性色谱柱中。用5倍柱体积(CV)的PBS平衡该柱,用20CV的料上样,并用5CV的PBS清洗。

[0186] 将流通洗出液流分进一步上样到下一个所选介质的一次性色谱柱(如图9左侧描述的两个工作流程所示)中。分析该工作流程中最后的流通洗出液。在其中料流经介质混合物的右侧描述的工作流程的情况下,直接分析洗出液。用添加有来自SeraCare的多克隆IgG(约2.5mg/ml)的非表达CHO-S料制备料。使用如以上实施例1中描述的同样的方法,检测流通洗出液流分和相应的料的IgG收率、UV活性物质、HCP和DNA去除。结果显示在图10-12中。

[0187] 如图10所示,活性碳和含有活性碳的混合物显著降低了UV活性物质的水平。此外,尽管所有材料均显示出一定程度上的HCP去除,但与阳离子树脂组合的活性碳混合物显示出最有效的HCP去除,如图11所示。同样,如图12所示,尽管所有材料均在一定程度上去除DNA,但活性碳和阴离子交换树脂的组合显示出最有效的DNA去除。

[0188] 该实施例的数据证明了与任何单独成分相比,活性碳和具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料的组合可更有效地以流通模式从CHO料中去除杂质(HCP、DNA和UV活性物质)。

[0189] 实施例4.蛋白A洗脱合并液的杂质去除

[0190] 在另一个实验中,使用标准重力流通测试方法来研究蛋白A后合并液(post Protein A pool)中的杂质去除。评价实施例1中筛查的材料即活性碳、阳离子交换树脂(SP FF和ProRes™-S)、阴离子交换树脂、QFF和HIC树脂、Phenyl FastFlow以及这些材料的不同组合。使活性碳或树脂材料(1ml)沉降,并填充入来自Evergreen的一次性色谱柱中。每个柱用5CV的PBS平衡,用20CV的培养料上样,并用5CV的PBS清洗。在上样步骤中收集流通洗出液流分。使用的料是调节pH至7.0后的蛋白A(ProSepUltra Plus)洗脱合并液(约3.2mg/ml的IgG)。用于蛋白A柱的料是添加有多克隆IgG的非表达CHO-S。

[0191] 评价流通洗出液流分和蛋白A洗脱合并液的IgG收率、UV活性物质去除、HCP去除和DNA去除。所有的测验如实施例1描述的进行,除了在HCP的情况时使用CHO-3G HCP ELISA试剂盒(CYGNUS TECHNOLOGIES,Southport,NC)。

[0192] 如图13所示,所有筛查的材料产生约85%或更高的收率。活性碳、阳离子交换树脂、SP FastFlow作为单一材料去除最多的HCP。不同材料的混合物提供最高的HCP去除,如图14中所示。图15描述了所有材料去除显著量的DNA的事实,这部分由于料中的低水平。总体上,与单一材料相比,多种材料的混合物通常在杂质去除上更有效。

[0193] 该实施例的数据证明活性碳和具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料以及这些材料的混合物可在不同程度上以流通模式从产生自CHO料的蛋白A洗脱合并液中去除杂质(HCP、DNA和UV活性物质)。

[0194] 实施例5.用于评价活性碳的MAb纯化性能的代表性的亲和基(蛋白A)俘获的MAb料的制备

[0195] 使用CHO细胞系培养物产生被称为MAb I的部分纯化的单克隆抗体,用作代表性亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体料以评价活性碳纯化蛋白质的性能。首先使用深层过滤介质(作

为Millistak+® POD过滤器(MILLIPORE CORPORATION,Billerica,MA,USA)获得)澄清直接来自生物反应器的细胞培养物。细胞培养液经连续的两个过滤器DOHC和XOHC过滤至终浊度<10NTU,并且随后使用MilliporeExpress®SHC capsule过滤器无菌过滤。

[0196] 将来自Millipore Corporation,Billerica,MA,USA的丙烯酸Quick-Scale® 14cm ID柱用Millipore ProSep-vA高容量蛋白A介质填充至约3.2L的柱床体积。使用以PBS流动填料和振动的组合填充该柱。所有的色谱步骤在使用波长280nm下的UV吸收检测的Millipore K-Prime 40-I系统上进行。该柱用于MAb I纯化至少5个循环并在4℃下贮存在PBS中。使用该柱之前,将该柱用至少2倍柱体积(CV)的pH 1.5-1.7的0.15M磷酸冲洗,之后用PBS平衡直至pH稳定(至少3CV)。通常,在澄清后的那天,将无菌过滤澄清的细胞培养物以至少5分钟的停留时间(即以500-600mL min^{-1}的流速)装载到蛋白A柱中。将该柱装载以确保没有超过该柱的最大容量(其被限定为每升介质30g的MAb I)。

[0197] 在该柱上样之后,用PBS以同样的停留时间冲洗该柱直至UV记录线达到基线(通常在3CV内)。随后将该柱用含有0.5M NaCl的20mM的乙酸钠(pH 6)清洗至少3倍CV,但不超过5倍CV。随后使用改变为20mM乙酸(pH3.0)的步骤洗脱产物,其中手动进行洗脱峰的俘获以减少洗脱峰的稀释。将洗出液在室温(20-25℃)下温育至少30分钟至最多1.5小时。温育后,使用2M的Tris碱(pH 10或更高)将洗脱合并液的pH滴定至pH 5±0.2。洗脱合并液的初始pH通常接近pH 4.0,并且需要至少添加5%体积的Tris碱溶液。在滴定洗脱合并液过程中观察到明显的沉淀。在洗脱合并液的无菌过滤前使用MilliporeMillistak+®XOHC实验室级POD进行沉淀的去除,其中至少需要两个0.027m^2的POD来清除整个洗脱合并液的沉淀。在深层过滤后,使用Millipore Express Plus Stericup过滤器单元无菌过滤洗出液,并且在4℃下贮存直至使用。

[0198] 实施例6.<u>用于评价活性碳的MAb纯化性能的代表性的非亲和基(阳离子交换)俘获的MAb料的制备</u>

[0199] 使用CHO细胞系培养物产生被称为MAb I的部分纯化的单克隆抗体,用作代表性非亲和(阳离子交换)俘获单克隆抗体料以检测活性碳纯化蛋白质的性能。按照实施例5中讨论的制备MAb I澄清细胞培养液。细胞培养液经连续的两个过滤器DOHC和XOHC过滤至终浊度<10NTU,并且随后使用MilliporeExpress®SHC capsule过滤器无菌过滤。

[0200] 将来自Millipore Corporation,Billerica,MA,USA的22cmID玻璃Vantage®实验室用柱用阳离子交换(CEX)介质Fractogen® SO_3^-(M)填充。使用PBS在Äkta® Explorer 100(GE HEALTHCARE,Uppsala,Sweden)上以约1000cm hr^{-1}的表面线速度(superficial linear velocity)填充该柱。在填充或所有后续柱运行过程中,通过该柱的压降保持在低于3bar。该柱的床压缩为约15%,具有75mL的填充床体积。使用PBS作为运行缓冲液,在100cmhr^{-1}的表面线速度下使用500μL的25mM Tris,1M NaCl,3%(v/v)丙酮(pH 6.9)的脉冲注射测量该柱的填充效率。在计算系统死体积后用丙酮峰使用标准方法计算相当于理论塔板的高度(HETP),并计算为0.053cm(具有1.3的峰不对称),表明该柱被充分填充。NaCl峰显示较大水平的峰拖尾,但这可能与盐离子与介质的相互作用有关并且不代表柱的效率。

[0201] 在首次使用该柱之前,进行无蛋白上样的完全空白运行以降低和/或消除任何相关溶液与基质之间的相互作用。在上样之前,使用20mM的乙酸钠(pH5)平衡该柱至少5倍CV。将该柱用含有MAb I的澄清细胞培养物(用冰醋酸使pH降低至pH 5)上样。当降低细胞培养

物的pH时,经常观察到沉淀并且使用离心和深层过滤(使用Millistak+®X0HC实验室级POD)的组合除去沉淀。

[0202] 在上样之前使用Millipore Express Plus Stericup过滤器单元将上样溶液无菌过滤。使用10min的停留时间以最大化该柱的容量(约每升介质45g MAb I)的努力将经无菌过滤的载样上样到该柱中,同时最小化通过柱的压降。上样之后,用5倍CV的平衡缓冲液冲洗该柱。然后将该柱用20mM乙酸钠、0.1M NaCl pH 5.0缓冲液清洗5倍CV。用改变为20mM乙酸钠、0.25MNaCl(pH6.0)的步骤将从该柱上的洗脱进行至少5倍CV。将洗出液分级,并且将峰流分集中并在4℃下贮存以供进一步使用。随后用20mM乙酸钠、1M NaCl(pH 6.0)清洗该柱以除去强结合蛋白质,确定其主要是宿主细胞蛋白(HCP)。随后用0.5N NaOH在相当于30分钟停留时间的减慢的流速下将该柱清洗5倍CV。随后用5倍CV的平衡缓冲液清洗该柱并贮存在室温(20-25℃)以供将来使用。

[0203] 实施例7.通过流通处理亲和俘获的MAb洗出液来评价不同吸附剂

[0204] 在流通应用中对比活性碳与几种常用于蛋白质纯化的不同商购吸附介质(包括阴离子交换(ChromaSorb™)、阳离子交换(HiTrap SP FF、HiTrap CM FF)和疏水作用(HiTrap Phenyl FF、HiTrap Butyl FF)化学)的亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液的纯化,以证明活性碳独特的和出乎预料的从蛋白质溶液中除去杂质的效率。

[0205] 依据实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。将该MAb I洗出液使用Tris碱(2M)从约pH5调节到pH 7,并且通过0.22微米Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0206] Nuchar HD和HD Nuchar活性碳在在本文中互换使用,并且是指得自MeadWestVaco Corporation,Richmond,VA,USA的粉状活性碳的等级。将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到1mL的填充柱体积。在不同大小的装置中,使用(用得自Millipore Corporation,Billerica,MA,USA的聚烯丙胺修饰的)额定0.65微米的聚乙烯膜制造0.2mL ChromaSorb膜装置。将膜切割成25mm的圆盘;将5个圆盘堆叠并密封入与商购自Millipore Corporation的OptiScale 25一次性囊过滤器(capsule filter)装置相同类型的过模制(overmolded)聚丙烯装置中。该装置包括排气口以避免气塞,并具有有效的3.5cm^2过滤面积和0.2mL的容积。

[0207] 1mL预填充色谱柱HisTrap SP FF、HiTrap CM FF、HiTrap Phenyl FF(高载量(high sub))和HiTrap Butyl FF购自GE Healthcare,Pittsburge,PA,USA,并且在使用前用缓冲溶液(Tirs-HCl缓冲液,25mM,pH7)平衡。组装六个流通纯化组列:a)活性碳、b)ChromaSorb、c)HiTrap SP FF、d)HiTrip CM FF、e)Hitrap Phenyl FF和f)HiTrap Butyl FF。随后,96mL的MAb I蛋白A洗出液以0.25mL/min的流速通过每个设备。通过纯化组列后,分析溶液中的宿主细胞蛋白(HCP)、IgG浓度和残存蛋白A。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒,依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。使用商购自MeridianLife Sciences,Saco,ME,USA的ELISA试剂盒(Kit COZ51-188)进行蛋白A分析。结果汇总在表IV。

[0208] 结果显示活性碳除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(log reduction value,LRV)是0.87。活性碳对HCP的LRV值显著高于检测的商购介质(阴离子交

换、阳离子交换、疏水作用介质),商购介质对HCP的LVP为0.19至0.35。来自亲和俘获步骤的残存的蛋白A同样被活性碳有效去除至低于可检测限度。观测到去除任意显著量的残存蛋白A的仅有的商购介质是阴离子交换介质(ChromaSorb™),其还降低残存蛋白A浓度至低于可检测限度。尽管具有较高量的杂质去除,活性碳仍具有极好的单克隆抗体产物(MAb I)回收率(96%),其与观察到的所检测的其它商购介质的产物回收率(82-100%)相似。

[0209] 表IV

[0210]

流通吸附剂	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV	蛋白 A (ng/mL)	蛋白 A (ppm)
未处理(对照)	7.18	NA	869	121	NA	4.61	0.62
活性碳	6.88	96%	112	16	0.87	ND	ND
ChromaSorb	5.92	82%	320	54	0.35	ND	ND
HiTrap SP FF	6.09	85%	364	60	0.31	2.95	0.48
HiTrap CM FF	6.28	87%	463	74	0.22	2.72	0.43
HiTrap Phenyl FF	6.89	96%	385	56	0.33	3.21	0.47
HiTrap Butyl FF	7.21	100%	563	78	0.19	4.25	0.59

[0211] ND—未检测到

[0212] NA—不适用

[0213] 实施例8.用活性碳和/或阴离子交换介质对MAb的亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0214] 检测单独或与阴离子交换介质组合的活性碳从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0215] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0216] Nuchar RGC和RGC Nuchar活性碳在在本文中互换使用,并且是指得自MeadWestVaco Corporation,Richmond,VA,USA的粉状活性碳的等级。在一代表性的实验中,将ChromaSorb™膜的7mm直径圆形部分(5μL)和/或10mg的RGC Nuchar活性碳与25mM的Tris-HCl缓冲液(pH7)一起加入到1.5mL的离心管中,以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,将1mL体积的MAb I蛋白A洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的1.5mL离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应18小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。

[0217] 使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。一个此类实验的结果汇总在表V。

[0218] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换介质(ChromaSorb)的组合除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是1.43。单独的活性碳和阴离子交换介质对HCP的LRV分别是1.21和0.36。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有极好的单克隆抗体产物回收率,分别是95%和95%。

[0219] 表V

[0220]

吸附介质	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
对照(无添加)	6.92	NA	1748	252	NA
活性碳	6.58	95%	102	16	1.21
ChromaSorb	6.74	97%	743	110	0.36
活性碳和 ChromaSorb	6.58	95%	62	9	1.43

[0221] NA—不适用

[0222] 实施例9.用活性碳和/或阴离子交换介质对MAb的亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0223] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳从含有不同于MAb I的单克隆抗体(被称为MAb II)的亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明单独和与阴离子交换介质组合的活性碳提供可用于纯化多种不同单克隆抗体的独特的和出乎预料有效的方法。

[0224] 依照实施例5制备另一种部分纯化的MAb II亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH5调节至pH7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb II蛋白A洗出液。

[0225] 将ChromaSorb膜的7mm直径圆形部分(5μL)和/或10mg的RGC Nuchar活性碳与25mM的Tris-HCl缓冲液(pH7)一起加入到1.5mL的离心管中,以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,将1mL体积的pH调节的MAb II蛋白A洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的1.5mL离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应18小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的ELISA试剂盒(目录号F550),依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表VI。

[0226] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从含有另一种单克隆抗体的溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换介质(ChromaSorb™)的组合除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是1.78。单独的活性碳和阴离子交换介质对HCP的LRV分别是1.08和0.64。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有好的单克隆抗体产物回收率,分别是87%和85%。

[0227] 表VI

[0228]

吸附介质	MAb II (mg/mL)	MAb II 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
对照(无添加)	18.19	NA	23418	1287	NA
活性碳	15.89	87%	4681	295	0.64
ChromaSorb	16.08	88%	1711	106	1.08
活性碳和 ChromaSorb	15.44	85%	329	21	1.78

[0229] NA—不适用

[0230] 实施例10.用活性碳和/或阴离子交换介质对MAb I的非亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0231] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳从非亲和(阳离子交换)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳提供用于杂质

去除的独特的和出乎预料有效的方法。相对于亲和(蛋白A)俘获洗出液,非亲和(阳离子交换)俘获洗出液含有显著更高水平的不同类型的杂质。活性碳用于纯化非亲和俘获洗出液的应用证明了该方法是普遍的并且可以用于纯化多种不同的蛋白质洗出液。

[0232] 在一单独的实验中,如实施例6所述制备部分纯化的MAb I CEX洗出液。将洗出液用缓冲液(Tris-HCl缓冲液、25mM、pH 7)稀释4倍,然后通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I CEX洗出液。

[0233] 将ChromaSorb膜的两个10mm直径圆形部分(19.6μL)和/或20mg的RGC Nuchar活性碳与25mM的Tris-HCl缓冲液(pH 7)一起加入到1.5mL的离心管中,以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,将1mL体积的MAb I CEX洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的1.5mL离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应18小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies Southport NC USA的目录号为F550的ELISA试剂盒,依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表VII。

[0234] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从使用非亲和(阳离子交换)色谱法从细胞培养物中俘获的单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。非亲和基(阳离子交换)的俘获介质比更加具有特异性的亲和基(蛋白A)俘获介质随同单克隆抗体一起与更多的杂质结合。因此,非亲和俘获洗出液含有显著较高水平的不同类型的杂质。活性碳和阴离子交换膜(ChromaSorb™)的组合除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是1.45。单独的活性碳和阴离子交换介质的HCP的LRV分别是1.20和0.55。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有好的单克隆抗体产物回收率,分别是95%和74%。

[0235] 表VII

[0236]

	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
对照	3.14	NA	64,254	20,463	NA
活性碳	2.99	95%	17,091	5,716	0.55
ChromaSorb	2.93	93%	3,817	1,303	1.20
活性碳和 ChromaSorb	2.32	74%	1,676	722	1.45

[0237] NA—不适用

[0238] 实施例11.在不同pH值下用活性碳对MAbI的亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0239] 检测活性碳在不同溶液pH下从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明活性碳在多种不同的溶液条件下有效。

[0240] 在单独的实验中,依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0241] 通过添加Tris碱(2M)或乙酸(3M)将MAb I蛋白A洗出液(20μL)的pH值调节到5、6、7或8。随后使用Millipore Express®0.22微米膜将所得到的pH调节过的MAb I蛋白A洗出液无菌过滤以去除任何浑浊。然后将RGC Nuchar活性碳(10mg)与25mM的Tris-HCl缓冲液(pH 7)一起加入到1.5mL的离心管中,以平衡活性碳。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,

将1mLpH调节的MAb I蛋白A洗出液加入到该管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应18小时。随后将管离心,并且移除并分析0.5mL上清液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表VIII。

[0242] 结果显示活性碳对于在宽的pH范围从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)对于pH 6、pH7和pH 8非常近似,为1.27至1.30不等。活性碳在pH 5下依然提供选择性的杂质去除,但HCP的RLV降至0.70。活性碳有着极好的单克隆抗体产物回收率,对于所有检测的pH条件为90％至95％。

[0243] 表VIII

[0244]

pH	MAb I (mg/mL) 对照	MAb I (mg/mL) A.C.后	MAb I 回收率	HCP (ng/mL) 对照	HCP (ng/mL) A.C.后	HCP (ppm) 对照	HCP (ppm) A.C.后	HCP 的 LRV
5	7.31	6.97	95%	5,505	1,048	753	150	0.70
6	7.26	6.88	95%	1,986	101	274	15	1.27
7	7.04	6.79	96%	1,889	91	268	13	1.30
8	8.63	7.76	90%	1,556	75	180	10	1.27

[0245] 实施例12.用活性碳和/或阴离子交换介质对MAb I的亲和俘获洗出液的流通处理

[0246] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳以流通应用方式从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证实单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳提供通常用于大规模蛋白质纯化的在流通条件下去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0247] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0248] 将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到1mL的填充柱体积。用缓冲液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。还使用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡如以上实施例7中所述制造的0.2mL的ChromaSorb装置。随后组装三个纯化组列。第一个由ChromaSorb装置组成,第二个由活性碳柱组成,而第三个由活性碳柱和接下来的ChromaSorb装置组成。100mL的MAb I蛋白A洗出液以0.25mL/min的流速通过每个装置。收集10个10mL的洗出液流分。分析混合的所有10个样品及所选的各流分的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表IX。

[0249] 如图16中所述和表IX中所总结的,结果显示用单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳流通处理亲和俘获洗出液对于从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换膜(ChromaSorb)的组合除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是1.95。单独的活性碳和阴离子交换介质对HCP的LRV分别是0.96和0.23。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有极好的单克隆抗体产物回收率,分别是96％和98％。

[0250] 表IX

[0251]

流通组列	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
未处理(对照)	9.21	NA	6,259	679	NA
仅 ChromaSorb	8.92	97%	3,538	397	0.23
仅活性碳	9.03	98%	1,330	148	0.96
活性碳然后 ChromaSorb	8.81	96%	67	8	1.95

[0252] NA—不适用

[0253] 实施例13.单独地或在活性碳处理后用多种阴离子交换介质流通处理MAb I的亲和俘获洗出液

[0254] 检测单独的或与多种不同的阴离子交换介质组合的活性碳从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证实活性碳可以与多种不同的阴离子交换介质组合。检测的商购阴离子交换介质包括伯胺(ChromaSorb)和季胺(Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF)。检测在膜(ChromaSorb、Sartobind Q、Mustang Q)上和树脂(HiTrap Q FF)上所负载的商购阴离子交换化学剂。

[0255] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0256] 将Glass Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到1mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。使用商购SartobindQ膜圆盘(SIGMA-ALDRICH,St.Louis,MO,USA)(0.26mL,3片)制造3层0.26mL的SartobindQ膜装置,并且如上述实施例7中所述,使用该装置的壳体和方法来制造0.2mL的ChromaSorb装置。0.18mL具有Mustang Q膜的Acrodisc®Units购自Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA。使用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡这些装置以及1mLHiTrapQ FF预填充柱(GE Healthcare,Pittsburge,PA,USA)和0.2mLChromaSorb装置。

[0257] 组装9个流通纯化组列:a)活性碳、b)ChromaSorb、c)活性碳然后ChromaSorb、d)Sartobind Q、e)活性碳然后Sartobind Q、f)Mustang Q、g)活性碳然后Mustang Q、h)HiTrap Q FF、i)活性碳然后HiTrap Q FF。96mL的MAb I蛋白A洗出液随后以0.25mL/min的流速通过每个装置。通过纯化组列后,分析溶液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照试剂盒使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表X。

[0258] 结果显示用活性碳与多种不同阴离子交换介质组合对亲和(蛋白A)俘获洗出液的流通处理对于杂质去除出乎预料地有效。对于单独的活性碳,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是0.91。单独的不同商购阴离子交换介质具有非常相似的HCP的LRV,为0.17至0.23。活性碳然后不同商购阴离子交换介质的组合具有高得多的HCP的LRV,为1.70至1.93。活性碳然后不同阴离子交换介质的组合有着极好的单克隆抗体产物回收率,为96%至97%。该数据证明了与多种不同商购阴离子交换介质组合的活性碳对于抗体纯化出乎预料地有效,所述阴离子交换介质包括伯胺(ChromaSorb)和季胺(Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF)。与支撑在膜(ChromaSorb、Sartobind Q、Mustang Q)上和树脂(HiTrap Q

FF)上的商购阴离子交换化学剂组合的活性碳有高度有效。

[0259] 表X

[0260]

AEX 介质	MAb I (mg/mL)		MAb I(回收率)		HCP(ng/mL)		HCP(ppm)		HCP 的 LRV	
	仅 AEX	AEX 随后 A.C.	仅AEX	AEX 随后 A.C.	仅 AEX	AEX 随后 A.C.	仅 AEX	AEX 随后 A.C.	仅 AEX	AEX 随后 A.C.
无 AEX 介质	NA	8.82	NA	96%	5,701	738	618	84	NA	0.91
ChromaSorb	9.20	8.89	100%	96%	3,660	70	398	8	0.23	1.93
Sartobind Q	9.26	8.99	100%	97%	4,103	98	443	11	0.19	1.80
Mustang Q	9.17	8.86	99%	96%	4,001	120	436	14	0.19	1.70
Q Fast Flow	9.20	8.76	100%	95%	4,245	81	462	9	0.17	1.86

[0261] NA—不适用

[0262] 实施例14.先后用活性碳和阴离子交换介质或先后用阴离子交换介质和活性碳流通处理MAb I的亲和俘获洗出液

[0263] 检测活性碳和阴离子交换介质对于从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中流通去除杂质的顺序以证实这两种吸附剂的顺序出乎预料地影响它们的有效性。该实验表明活性碳置于阴离子交换介质之前对于最大化该吸附剂组合从蛋白质溶液中去除杂质的能力是重要的。

[0264] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0265] 将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到1mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH7)平衡该柱。还使用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH7)平衡如以上实施例7中所述制造的0.2mL的ChromaSorb膜装置。组装两个流通组列。第一个具有活性碳柱然后ChromaSorb膜装置,而第二个具有相反的顺序即ChromaSorb膜装置然后活性碳柱。96mL的MAb I蛋白A洗出液以0.25mL/min的流速通过每个装置。通过纯化组列后,分析溶液中的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XI。

[0266] 结果显示出乎预料的结果,即活性碳和阴离子交换介质(ChromaSorb)的顺序对于亲和(蛋白A)俘获洗出液的流通纯化的有效性是重要的。当活性碳置于阴离子交换介质之前时,宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)是1.87。当阴离子交换介质置于活性碳之前时,HCP的LRV降至1.38。活性碳和阴离子交换介质的顺序对于抗体的回收没有影响,这两种吸附剂顺序的抗体回收都是97%。结果揭示了重要的认识,即将活性碳置于阴离子交换介质之前对于最大化这两种吸附剂的组合从蛋白质溶液中去除杂质的有效性是重要的。

[0267] 表XI

[0268]

流通组列	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
未处理(对照)	9.24	NA	4,986	540	NA
ChromaSorb 然后活性碳	8.95	97%	202	23	1.38
活性碳然后 ChromaSorb	8.95	97%	65	7	1.87

[0269] NA—不适用

[0270] 实施例15.用活性碳流通处理MAb I的非亲和俘获洗出液

[0271] 检测活性碳以流通应用方式从非亲和(阳离子交换)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明活性碳提供去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。相对于亲和(蛋白A)俘获洗出液,非亲和(阳离子交换)俘获洗出液含有显著更高水平的不同类型的杂质。活性碳用于纯化非亲和俘获洗出液的应用证明了该方法是普遍的并且可以用于纯化多种不同的蛋白质溶液。

[0272] 如实施例6所述制备部分纯化的MAb I CEX俘获洗出液。将洗出液用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH7)稀释4倍,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I CEX洗出液。

[0273] 将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到1mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。

[0274] 70mL的MAb I CEX洗出液以0.25mL/min的流速通过活性碳柱。收集7个10mL的洗出液流分。分析所有7个混合的样品以及所选的各流分的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的目录号为F550的ELISA试剂盒依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XII。

[0275] 如图16所示及下表XII中所总结,结果显示使用活性碳的流通纯化对于从非亲和(阳离子交换)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。非亲和基(阳离子交换)的俘获介质比更加具有特异性的亲和基(蛋白A)俘获介质随同单克隆抗体一起与更多的杂质结合。因此,非亲和俘获洗出液含有显著较高水平的不同类型的杂质。活性碳提供0.76的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV),并具有89%的单克隆抗体产物回收率。结果标明活性碳可用于从多种不同的蛋白质溶液中去除杂质。

[0276] 表XII

[0277]

流通组列	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
未处理(对照)	3.13	NA	66,269	21,172	NA
活性碳柱	2.79	89%	10,343	3,707	0.76

[0278] NA—不适用

[0279] 实施例16.用活性碳填充柱和活性碳-纤维素装置流通纯化MAb I的亲和俘获洗出液

[0280] 检测填充入柱或混合入纤维素层中的活性碳以流通应用方式从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明活性碳提供以不同形式去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0281] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0282] 将玻璃Omnifit色谱柱(15mm直径,100mm长)中装载600mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到2.4mL的填充柱体积。将商购自Millipore Corporation,Billerica,MA的Millistalk+Pod CR装置中的充满活性碳的纤维素层介质置于过模制的聚丙烯注射装置

(内部过滤面积25mm,4.6mL柱床体积,入口和出口配备有Luer连接器)中。

[0283] 用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱和活性碳-纤维素装置。组装两个流通组列。第一个具有活性碳柱,而第二个具有活性碳-纤维素装置。315mL的MAb I蛋白A洗出液随后以0.75mL/min的流速通过每个装置。在通过纯化组列后,分析溶液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的ELISA试剂盒(目录号为F550)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XIII。

[0284] 结果显示,当活性碳被填充入柱或混合入纤维素层时,使用活性碳的流通纯化对于从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。填充入柱中或混合入纤维素层中的活性碳都提供非常近似的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV),分别是0.95和0.97。它们同样有非常近似的单克隆抗体产物回收率,柱是91%且纤维素层是87%。这些结果表明当活性碳被混合入纤维素层时可有效用于从蛋白质溶液中去除杂质。

[0285] 表XIII

[0286]

流通组列	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
未处理(对照)	9.79	NA	6,229	642	NA
HD Nuchar 活性碳柱	8.92	91%	682	76	0.95
活性碳-纤维素装置	8.53	87%	620	73	0.97

[0287] NA—不适用

[0288] 实施例17.用两种其它类型活性碳流通纯化MAb I的亲和俘获洗出液

[0289] 检测两种其它类型商购活性碳以流通应用方式从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明多种不同的活性碳可用于从蛋白质溶液中去除杂质这一出乎预料的结果。

[0290] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0291] 将玻璃Omnifit色谱柱(5mm直径,100mm长)中装载125mg在水中成浆的Chemviron Pulsorb PGC活性碳(Chemviron Carbon,Feluy,Belgium)或Norit A Supra USP活性碳(Norit Americas Inc.,Marshall,Texas,USA)以得到0.24mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。组装两个流通组列。第一个具有Chemviron Pulsorb PGC活性碳柱,而第二个具有Norit A Supra USP活性碳柱。96mL的MAb I蛋白A洗出液以0.25mL/min的流速通过每个装置。通过纯化组列后,分析溶液的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的ELISA试剂盒(目录号F550)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XIV。

[0292] 结果显示,使用两种其它类型的活性碳的流通纯化对于从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。Chemviron Pulsorb PGC和Norit A Supra USP二者分别以0.40和0.48的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)去除杂质。它们也具有极好的单克隆抗体产物回收率,Chemviron Pulsorb PGC是100%且Norit A Supra USP是

100%。这些结果表明几种不同类型的活性碳可用于从蛋白溶液中去除杂质。

[0293] 表XIV

[0294]

流通组列	MAb I (mg/mL)	MAb I 回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 的 LRV
未处理(对照)	7.15	NA	1026	144	NA
Chemviron Pulsorb PGC	7.18	100%	409	57	0.40
Norit A Supra USP	7.17	100%	341	48	0.48

[0295] NA—不适用

[0296] 实施例18.MAb I的亲和俘获洗出液在不同缓冲液盐的存在下的流通纯化

[0297] 检测活性碳以流通应用方式从添加有多种不同盐的亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明活性碳提供了在许多不同的盐存在时去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。该研究表明该方法是普遍的,并且可以用于在多种不同缓冲液盐中的蛋白质纯化。

[0298] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。用Tris碱(2M)将MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤器单元过滤。此处的溶液是指MAb I蛋白A洗出液。

[0299] 将10mL含有300mM不同盐的水溶液加入到50mL的一部分MAb I蛋白A洗出液中,其中所述盐是硫酸铵、乙二胺四乙酸二钠盐脱水物(EDTA)、2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)、氯化钠、柠檬酸三钠脱水物、七水合磷酸氢二钠以及及Trizma®Pre-set结晶,pH 7.0(Tris-HCl)。

[0300] 将用10mL水稀释的溶液用作对照。用2M的Tris碱或3M的乙酸将掺入盐的蛋白A洗出液的pH调节回7。此处的溶液是指掺入盐的MAb I蛋白A洗出液。

[0301] 将玻璃Omnifit色谱柱(5mm直径,100mm长)中装载125mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到0.5mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。40mL的掺入盐的MAb I蛋白A洗出液随后以0.125mL/min的流速通过活性碳柱。通过该柱后,分析溶液中的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的ELISA试剂盒(目录号F550)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XV。

[0302] 结果显示,使用活性碳的亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液的流通纯化对于在多种不同盐添加物存在下去除杂质出乎预料地有效。在所有添加的盐的存在下,活性碳以0.63至1.00的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)去除杂质。它们还具有极好的单克隆抗体产物回收率,为92%至96%。这些结果表明活性碳可用于在多种不同盐缓冲液的存在下从蛋白质溶液中去除杂质。

[0303] 表XV

[0304]

掺入的盐	MAb I (mg/mL) A.C.前	MAb I (mg/mL) A.C.后	MAb I 回收率	HCP (ng/mL) A.C.前	HCP (ng/mL) A.C.后	HCP (ppm) A.C.前	HCP (ppm) A.C.后	HCP 的 LRV
仅水(对照)	7.33	6.86	94%	987	76	135	11	1.08
Tris	6.99	6.68	96%	1,194	119	171	18	0.98
氯化钠	6.58	6.33	96%	1,151	111	175	17	1.00
硫酸铵	6.93	6.66	96%	1,359	177	196	27	0.87
磷酸二钠	6.92	6.59	95%	1,293	153	187	23	0.90
柠檬酸钠	6.53	6.03	92%	1,351	241	207	40	0.71
EDTA	6.71	6.39	95%	1,304	293	194	46	0.63
MES	6.90	6.54	94%	1,110	132	161	20	0.90

[0305] 实施例19.蛋白A洗出液在pH 5和pH7下的流通纯化

[0306] 检测活性碳在两个不同pH条件下以流通应用方式从亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明活性碳提供在不同溶液pH条件下流通去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。该研究说明该方法是普遍的,并且可以用于在不同pH条件下的蛋白纯化。

[0307] 依照实施例5制备部分纯化的MAb I亲和(蛋白A)俘获洗出液。此处的溶液是指pH 5的MAb I蛋白A洗出液。

[0308] 用Tris碱(2M)将一部分依照实施例5制备的MAb I洗出液从约pH 5调节至pH 7,并且通过0.22微米的Millipore Express Plus Stericup过滤单元过滤。此处的溶液是指pH 7的MAb I蛋白A洗出液。

[0309] 将玻璃Omnifit色谱柱(15mm直径,100mm长)中装载1.25g在水中成浆的HD Nuchar活性碳以得到5mL的填充柱体积。用缓冲溶液(Tris-HCl缓冲液,25mM,pH 7)平衡该柱。随后500mL的pH 5的MAb I蛋白A洗出液或pH 7的MAb I蛋白A洗出液以1.25mL/min的流速通过活性碳柱。通过纯化组列后,分析溶液中的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的ELISA试剂盒(目录号F550)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果汇总在表XVI。

[0310] 结果显示,使用活性碳的亲和(蛋白A)俘获单克隆抗体洗出液的流通纯化对于在pH 5和pH 7二者的杂质去除出乎预料地有效。活性碳以0.85(在pH 5下)和1.15(在pH 7下)的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV)去除杂质。它们还具有极好的单克隆抗体产物回收率,在pH 5下是97%且在pH 7下是101%。这些结果表明活性碳可用于在不同pH条件下从蛋白质溶液中去除杂质。

[0311] 表XVI

[0312]

pH	MAb I (mg/mL)		MAb I 回收率	HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		HCP 的 LRV
	A.C.前	A.C.后		A.C.前	A.C.后	A.C.前	A.C.后	
5	9.22	8.98	97%	3,429	486	371	54	0.85
7	8.61	8.68	101%	1,774	124	206	14	1.15

[0313] 实施例20.使用连续色谱法制备的蛋白A洗出液的流通纯化

[0314] 该代表性实验证明活性碳和阴离子交换色谱装置可以用于纯化使用连续多柱色谱法(CMC)获得的蛋白A洗出液。

[0315] 在该实验中,如援引加入本文的共同未决的欧洲专利申请EP12002828.7中记载的,使用Prosep®Ultra Plus蛋白A树脂,通过三柱连续多柱色谱(CMC)方法纯化单克隆抗体(MAb II)。如在实施例12中描述的,汇集蛋白A洗出液,并先后通过活性碳装置和阴离子交换色谱装置(即ChromSorb™)进行处理。

[0316] 如图18中证明,如通过HCP浓度降低至低于10ppm所测量的,当使用活性碳和阴离子交换色谱装置的组合时,实现了单克隆抗体的成功纯化。

[0317] 实施例21.连接几个流通杂质去除步骤

[0318] 在该代表性的实验中,证实以流通模式连接几个杂质去除步骤作为单独的单元操作或工艺步骤操作的可能性,同时满足产物纯度和收率目标。

[0319] 在该实施例中,以流通模式连接各装置即活性碳装置、阴离子交换色谱装置(即ChromSorb™)、阳离子交换色谱装置和病毒过滤装置(即Viresolve®Pro)以进行操作。进一步

地,将在线静态混合器和/或缓冲罐置于阴离子交换色谱和阳离子交换色谱装置之间,以实现pH的改变。最后,在待纯化的样品是浑浊的情况下,将任选的深层过滤器置于活性碳装置的上游。

[0320] 图19显示了进行流通纯化工艺步骤的实验装置的示意图,其包括以下描述的装置。

[0321] 另外,这样的设备中还可包含必需的泵、阀、传感器等。

[0322] 将所有的装置在不同的条件下单独润湿,随后组装。根据制造商的使用说明润湿和预处理装置。简言之,用100L/m^2的水冲洗深层过滤器(A1HC级),然后用5倍柱体积的平衡缓冲液1(EB1;用1M的Tris碱(pH 11)调节到pH 7.5的蛋白A洗脱缓冲液)冲洗。将2.5mL活性碳如实施例12所述填充入2.5cm的Omnifit柱中,产生0.55kg/L抗体载量。用10倍CV的水冲洗该柱,随后用EB1平衡直至pH稳定在pH 7.5。将两个ChromaSorb装置(0.2mL和0.12mL)串联以得到4.3g/L的载量。将装置用水以12.5CV/min润湿至少10分钟,然后用5DV(装置容积)EB1润湿。使用带有12个元件的一次性螺旋静态混合器(Koflo Corporation,Cary,IL)进行在线pH调节。将用于聚集物去除的两个1.2mL的阳离子交换流通装置并联以除去聚集物。CEX装置上的MAb载量为约570mg/mL。这些装置先后用10DV水、5DV平衡缓冲液2(EB2;用1M乙酸调节至pH 5.0的EB1)润湿。将装置进一步用5DV(装置容积)EB2+1M NaCl处理,随后用5DV的EB2平衡。将3.1cm^2的Viresolve®Pro装置用水在30psi压力下润湿至少10min。随后每分钟监控流速直至连续3分钟流速维持恒定。在将所有装置润湿和平衡后,将它们如图19所示进行连接。EB1流经整个系统直至所有压力读数和pH读数稳定。平衡之后,该料通过流通组列。在运行过程中,在缓冲罐之前和Viresolve® Pro之后收集样品以监控IgG浓度和杂质水平(HCP、DNA、沥滤的PrA和聚集物)。在进料处理完后,将系统用3倍死体积的EB1冲洗以回收装置和管道中的蛋白质。

[0323] 连接的流通纯化过程的进料是MAb II的蛋白A洗出液,产自分批蛋白A方法。该MAb中天然水平的聚集物不超过1%,所以进行特别的操作以增加聚集物的水平。在温和搅拌下使用NaOH水溶液将溶液的pH升至11,并且维持1小时。随后用HCl水溶液在温和搅拌下将pH缓慢降低至pH 5。重复4次以上该pH循环。聚集物的终水平是约5%,通过SEC检测到主要由MAb二聚体和三聚体组成。随后在Tris-HCl缓冲液(pH 7.5,导电率约3mS/cm)中透析进料。

[0324] 用于该运行过程的MAb进料的量是102mL的13.5mg/mL的MAb,流速为0.6mL/min。

[0325] 作为在ChromaSorb™后的时间函数的HCP突破点(HCP breakthrough)低于10ppm的上限(图20)。CEX装置将聚集物从5%降低至1.1%(图21)。连接方法的MAb II收率是92%。Viresolve®Pro装置的产量>3.7kg/m^2。

[0326] 因此,前述实施例证明了可成功地连接几个装置以流通模式操作,从而实现期望的产品纯度和收率目标。

[0327] 实施例22.<u>连接具有连续结合和洗脱色谱俘获步骤的流通纯化工艺步骤</u>

[0328] 在该代表性实验中,将如本文记载的流通纯化过程与先于流通纯化的连续结合和洗脱色谱俘获过程直接连接。

[0329] 在该实施例中,在分批补料生物反应器中产生CHO系单克隆抗体(MAb II)。使总量7L的细胞培养物接触刺激反应聚合物溶液以使最终刺激反应聚合物浓度为0.2%v/v。使细胞培养物混合约10分钟。加入175mL的2M的K_2HPO_4溶液并再混合10分钟。随后用2M Tris碱将

pH升至7.0并混合15分钟。随后将溶液以2L等分试样在4,500×g下离心10分钟,倾出上清被并保留。处理掉固体。汇合细胞培养物上清液,并随后在连续搅拌下与5M NaCl以1:10的比率以分批模式混合。在此时测量溶液的最终导电率,其为55±5mS/cm。将产生的更高NaCl浓度溶液通过0.22μm的Express过滤器无菌过滤。该无菌过滤后的溶液是用于蛋白A色谱法的上样材料。

[0330] 蛋白A俘获步骤由两个用在改进的Akata Explorer 100上的方法运行的蛋白A柱组成。蛋白A柱含有填充入1.6cm的ID Vantage-L(EMD Millipore)色谱柱中的10mL ProSep® Ultra Plus蛋白A介质,柱床高度为10.25cm和10.85cm。将这两个柱子用1×TBS、0.5M NaCl平衡5倍柱体积CV(所有的柱体积基于最小的柱)。在该运行全过程中,设置上样流速以具有约1分钟的上样停留时间。在初始上样的过程中,将这两个柱子串联放置,其中将第一个柱子的流出物直接上样到第二个柱子中直到达到特定的上样体积。在特定的上样体积通过柱子后,停止进料,并且两倍CV的平衡缓冲液通过第一个柱子到第二个柱子。随后放置第一个柱子以经历清洗、洗脱、清洁和再平衡,同时将第二个柱子作为第一个柱子被上样。第一个柱子再平衡之后,将该柱移至第二个位置与现在的第一个柱子串联。重复这一系列事件,每个柱子在初始的第一个位置的柱子被上样至设定容积后占据第一个位置。每个柱子总共上样7次。用流分收集器从每个柱子中收集洗出液,使用UV触发器控制洗脱和收集的开始时间以得到约3.5CV的恒定体积。

[0331] 流通纯化组列由6个主要装置组成:任选的深层过滤器(用于pH调节至pH 7.5后的沉淀去除);活性碳;ChromSorb™;用于在线pH调节的静态混合器和/或缓冲罐;用于聚集物去除的阳离子交换流通装置(CEX装置);和病毒过滤装置(即Viresolve® Pro)。

[0332] 图19说明了这些装置连接的顺序。

[0333] 将所有的装置在不同的条件下单独润湿,随后如图19所示的组装。根据制造商的使用说明或之前的描述润湿和预处理装置。简言之,用100L/m^2的水冲洗深层过滤器(A1HC),然后用5倍柱体积的平衡缓冲液1(EB1;用1M的Tris碱(pH 11)调节到pH 7.5的PrA洗脱缓冲液)冲洗。将10mL活性碳如实施例12所述填充入2.5cm的Omnifit柱中。用10倍CV的水冲洗该柱,随后用EB1平衡直至pH稳定在pH7.5。将1.2mL的ChromaSorb膜(7层)堆入47mm直径的Swinex装置中。将装置用水以12.5CV/min润湿至少10分钟,然后用5倍装置容积(DV)的EB1润湿。使用带有12个元件的一次性螺旋静态混合器(Koflo Corporation,Cary,IL)进行在线pH调节。将3层的阳离子交换色谱装置(0.12mL膜体积)先后用10DV水和5DV平衡缓冲液2(EB2;用1M乙酸调节至pH 5.0的EB1)润湿。将装置进一步用5DV的EB2+1M NaCl处理,随后用5DV的EB2平衡。将3.1cm^2的Viresolve® Pro装置用水在30psi压力下下润湿至少10min。随后每分钟监控流速直至连续3分钟流速维持恒定。在将所有装置润湿和平衡后,将它们如图19所示进行连接。EB1流经整个系统直至所有压力读数和pH读数稳定。平衡之后,该料(调节到pH 7.5的PrA洗出液)通过流通纯化组列。在运行过程中,在缓冲罐之前和Viresolve® Pro之后收集样品以监控IgG浓度和杂质水平(HCP、DNA、沥滤的PrA和聚集物)。在进料处理完后,将系统用3倍死体积的EB1冲洗以回收装置和管道中的蛋白质。

[0334] 图22显示在深层过滤、活性碳和Viresolve Pro前的压力读数。对于运行中的大部分,深层过滤器的压力维持不变,但在结尾升高表明蛋白A运行的结尾的蛋白A洗出液流分的一些沉淀。由于活性碳上游的深层过滤器,活性碳柱维持相当的保护以避免任何沉淀。

Viresolve Pro的压力随时间缓慢升高,但也低于操作最高限(50psi)。

[0335] Viresolve Pro合并液中最终的HCP<1ppm(表XVI)。洗脱流分中平均沥出的蛋白A是32ppm。在Viresolve® Pro合并液中沥出的蛋白A是4ppm。聚集物从1%下降到0.4%。下表XVII显示了当与连续结合和洗脱色谱工艺步骤连接时研究流通纯化性能的实验结果。

[0336] 表XVII

[0337]

流通纯化收率(%)	97.8%
从所有PrA洗出液至ViresolvePro合并液的平均HCP(ppm)	172→1.75
ViresolvePro合并液中的聚集物(%)	1→0.4%
ViresolvePro合并液中的沥出PrA(ppm)	32→4
ViresolvePro产量(kg/m^2)	>6.1
蛋白A后稀释因子(dilution factor post-ProteinA)	1.15×

[0338] 实施例23.使用活性碳去除细胞培养物成分杂质

[0339] 在该代表性的实验中,证明了活性碳除去可能经过蛋白A亲和俘获步骤仍保留的来自细胞培养物的潜在杂质。

[0340] 细胞培养基的常见成分胰岛素(一种哺乳动物细胞生长刺激物)通常以1-20mg/L的浓度存在于细胞培养基中。以1mg/mL将重组人胰岛素(EMD Millipore Corp.的Incelligent AF)溶于50mM Tris pH 7.0的缓冲液稀释,添加单克隆抗体MAb II至浓度7g/L。用HD Nuchar活性碳填充玻璃Omnifit柱。溶液以恒定速率0.25CV/min流过柱子,至总MAb II载样1kg/L。分析流通合并液的胰岛素和抗体浓度。为了分析,使用配备有HC18柱(Cadenza)的Agilent HPLC系统;溶剂A:0.1%TFA水溶液;溶剂B:0.1%TFA乙腈溶液;使用15分钟内5%-30%B的最佳梯度,通过UV A214吸光率检测胰岛素。首先,使用抗体存在下的胰岛素标准溶液绘制校正曲线。从活性碳柱的流出液中没有检测到胰岛素,表明活性碳在MAb存在下对胰岛素的容量超过240mg/g。

[0341] 实施例24.使用活性碳纤维素介质从MAb II的亲和俘获洗出液混浊溶液中流通去除杂质

[0342] 在该代表性的实验中,证明了活性碳去除来自微生物料的HCP的独特的和出乎预料的有效性。以1.5mg/mL在大肠杆菌裂解物溶液中掺入mAb单克隆抗体。用填充入柱中的活性碳在流通条件下处理该掺混料。

[0343] 通过离心收集来自大肠杆菌培养物的细胞。倾掉上清液,并通过剧烈震荡和搅拌将剩余的细胞颗粒悬浮于裂解缓冲液(25mM Tris,0.1mM EDTA,pH7)中。然后,添加0.4mL的一部分100mM PMSF在乙醇中的储备液。将悬浮液分成几部分(每部分约100mL),并用开3秒关4秒的方式超声5分钟。超声之后,将材料汇聚并在-80℃下贮存48小时。随后将溶液解冻并在4,500×g下离心2小时以除去裂解的细胞。使用Stericup-HV 0.45μm Durapore膜(1000mL,目录号SCHVU11RE,Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)过滤上清液。随后,通过Stericup-GP0.22μm Millipore Express Plus膜(1000mL,目录号SCGPU11RE,Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)过滤。过滤的裂解物随后与7.5mL 10m g/L的mAb溶液混合得到添加有1.5mL mAb的溶液。经测量,该溶液的pH是7.7。

[0344] 将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳(MeadWest Corporation,Richmond,VA,USA)以得到1mL的填充柱体积。用25mM的

Tris缓冲液(pH 7)平衡该柱。随后42mL的掺入mAb的大肠杆菌裂解物以0.25mL/min的流速通过活性碳柱,在活性碳柱中的停留时间为4分钟。提交对照和合并液样品用于分析宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。

[0345] 使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的大肠杆菌HCP ELISA试剂盒(目录号F410)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓度。结果显示活性碳对于选择性去除来自微生物料的HCP出乎预料地有效。裂解物中HCP的浓度从206,000ng/mL(133,00ppm)下降到119,000ng/mL(77,800ppm),而mAb起始浓度1.55g/L且回收浓度是1.53g/L,回收率是99%。该实施例证实了活性碳能够用于从非哺乳动物细胞中去除HCP。

[0346] 实施例25.用活性碳-纤维素介质和阴离子交换介质从MAb II的亲和俘获洗出液混浊溶液中去除杂质

[0347] 在该代表性的实验中,证明了单独的和与离子交换介质组合的活性碳对于在俘获步骤后去除来自微生物料的HCP具有独特的和出乎预料的有效性。

[0348] 在大肠杆菌裂解物溶液中以1.5mg/mL掺入mAb单克隆抗体,然后用蛋白A色谱法俘获。在流通条件下用填充入柱的活性碳及随后的ChromaSorb™ AEX膜处理俘获的料。

[0349] 通过离心回收来自大肠杆菌培养物的细胞。倾掉上清液,并通过剧烈震荡和搅拌将剩余的细胞颗粒悬浮于裂解缓冲液(25mM Tris,0.1mM EDTA,pH7)中。然后,添加0.4mL的一部分100mM PMSF在乙醇中的储备液。将悬浮液分成几部分(每部分约100mL),并用开3秒关4秒的方式超声5分钟。超声之后,将材料汇聚并在-80℃下贮存48小时。随后将溶液解冻并在4,500×g下离心2小时以除去裂解的细胞。使用Stericup-HV 0.45μm Durapore膜(1000mL,目录号SCHVU11RE,Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)过滤上清液。随后,通过Stericup-GP0.22μm Millipore Express Plus膜(1000mL,目录号SCGPU11RE,Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)过滤。过滤的裂解物随后与7.5mL10mg/L的mAb溶液混合得到添加有1.5mLmAb的溶液。经测量,该溶液的pH是7.7。随后用蛋白A色谱法俘获该掺混裂解液的mAb。然后在低pH下洗脱30mL俘获的mAb。通过滴加1M Tris将洗出液pH从3-4升至7,然后通过Stericup-GP 0.22μm Millipore Express Plus膜(250mL,目录号SCGPU02RE,Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)过滤。留出1mL经pH调节的洗出液用于分析。

[0350] 将玻璃Omnifit色谱柱(10mm直径,100mm长)中装载250mg在水中成浆的HD Nuchar活性碳(MeadWest Corporation,Richmond,VA,USA)以得到1mL的填充的柱体积。用25mM的Tris缓冲液(pH 7)平衡该柱。随后29mL的mAb的蛋白A色谱洗出液以0.2mL/min的流速通过活性碳柱,停留时间为4分钟。留出1mL经活性碳处理的洗出液用于分析。

[0351] 然后,依照说明书将0.08mL ChromaSorb™装置(EMD Millipore Corp.Billerica,MA,01821,USA)用水润湿,随后用25mM的Tris(pH 7)冲洗。然后27mL的活性碳处理的洗出液以0.5mL/min的流速通过ChromaSorb装置,停留时间为0.16分钟。留出1mL经活性碳和ChromaSorb处理的洗出液用于分析。

[0352] 用析每个样品的宿主细胞蛋白(HCP)和IgG浓度。使用商购自Cygnus Technologies,Southport,NC,USA的大肠杆菌HCP ELISA试剂盒(目录号F410)依照制造商的使用手册进行HCP分析。使用配备有Poros®A蛋白A分析柱的Agilent HPLC系统测量IgG浓

度。

[0353] 结果显示,单独的和与AEX膜组合的活性碳对于从微生物料的俘获洗出液中选择性去除HCP出乎预料地有效。活性碳将洗出液中的HCP浓度从86ng/mL(7ppm)降低至8ng/mL(0.7ppm),而mAb起始浓度是11.5g/L且回收浓度是11.2g/L,回收率是97%。经活性碳处理的洗出液的HCP浓度被ChromaSorb AEX膜进一步降低至3ng/mL(0.3ppm),总的mAb回收率是96%,终浓度是11.1g/L。该实验证实了单独的和与AEX膜组合的活性碳可用于在俘获步骤后从非哺乳动物细胞中去除HCP。

[0354] 结合援引加入本文的说明书中引用的参考文献的教导,最彻底地理解本发明。说明书中的实施方案对本发明的实施方案提供举例说明,并且不应被解释为限制其范围。本领域技术人员可以容易地了解本发明包括的许多其它的实施方案。所有的出版物和发明以它们的整体援引加入本文。当援引加入的材料与本发明说明书相矛盾或不一致时,以本发明说明书为准。本文对任何参考文献的引用并非承认这样的参考文献是本发明的现有技术。

[0355] 除非另外指明,本说明书(包括权利要求书)中使用的所有表示成分、细胞培养物、处理条件等的量的数值在所有情况中被理解为被术语“约”修饰。因此,除非另有相反指示,数值参数是近似值,并且可以取决于本发明所寻求的期望性质而改变。除非另外指明,在一系列要素前的术语“至少”被理解成是指该系列中的每个要素。本领域技术人员会认识到或能够仅使用常规试验确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同方式。这样的等同方式意图被所附权利要求涵盖。

[0356] 本领域技术人员会清楚,可在不脱离其精神和范围的情况下对本发明进行许多修改和改变。本文描述的具体实施方案仅以示例的方式提供,并且不意味着以任何形式的限制。这意味着说明书和实施例仅被视作是示例性的,而本发明的实际范围和精神由所附权利要求表明。

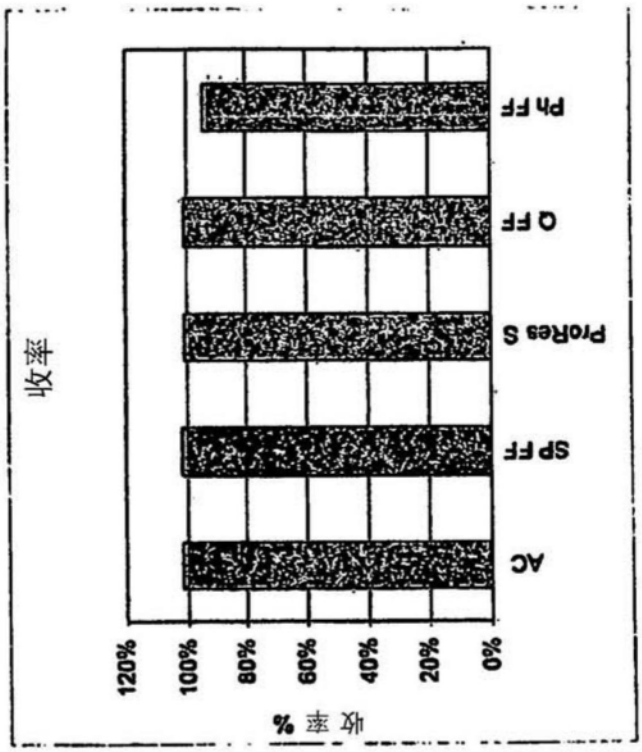


图1

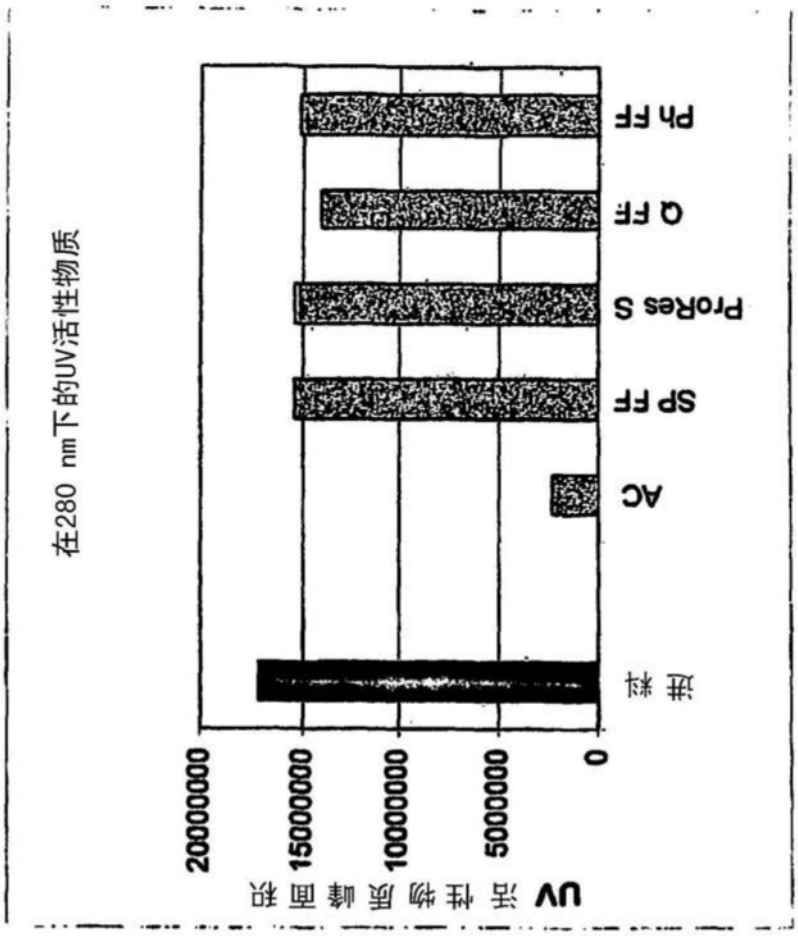

在280 nm下的UV活性物质
UV 活性物质峰面积
20000000
15000000
10000000
5000000
0
进料
AC
SP FF
ProRes S
Q FF
Ph FF

图2

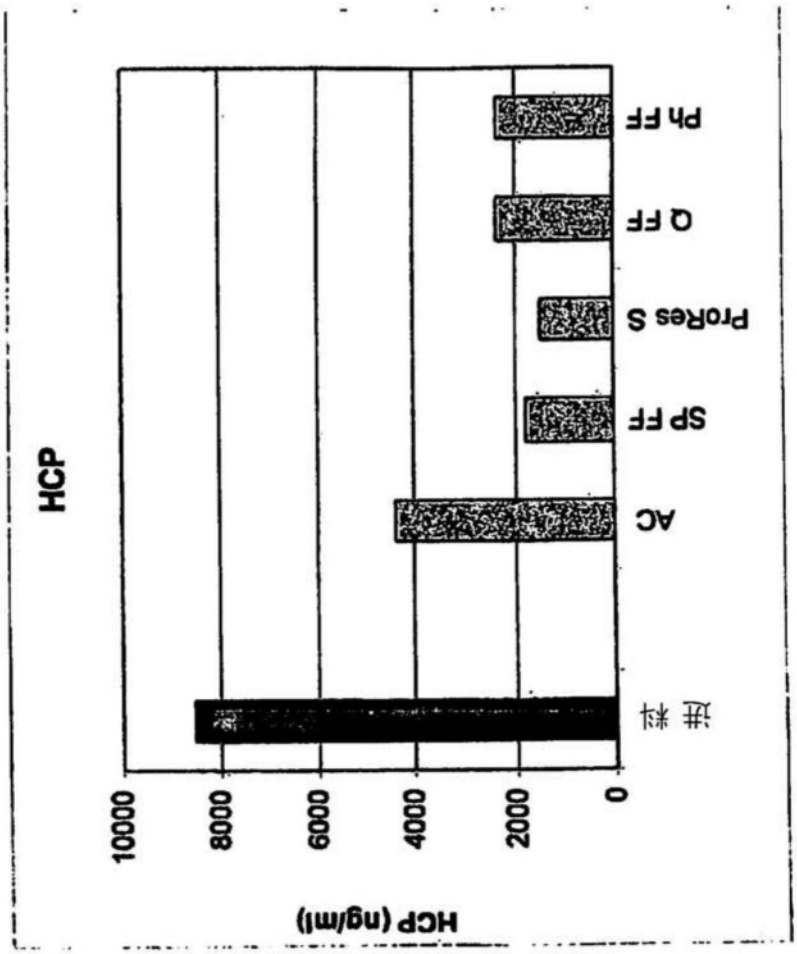

HCP
HCP (ng/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
进料
AC
SP FF
ProRes S
Q FF
Ph FF

图3

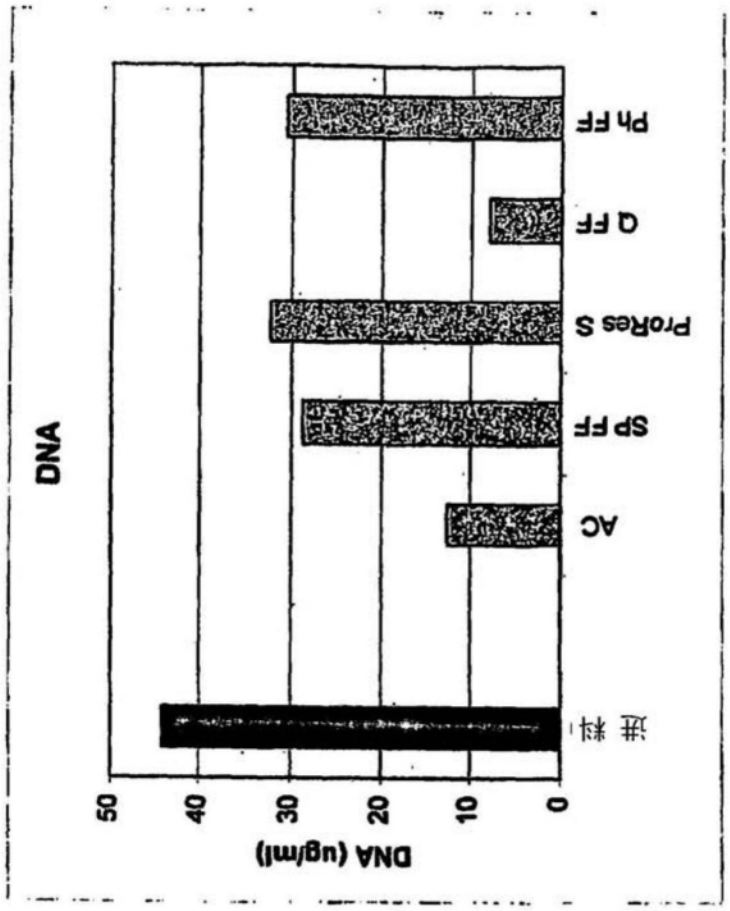


图4

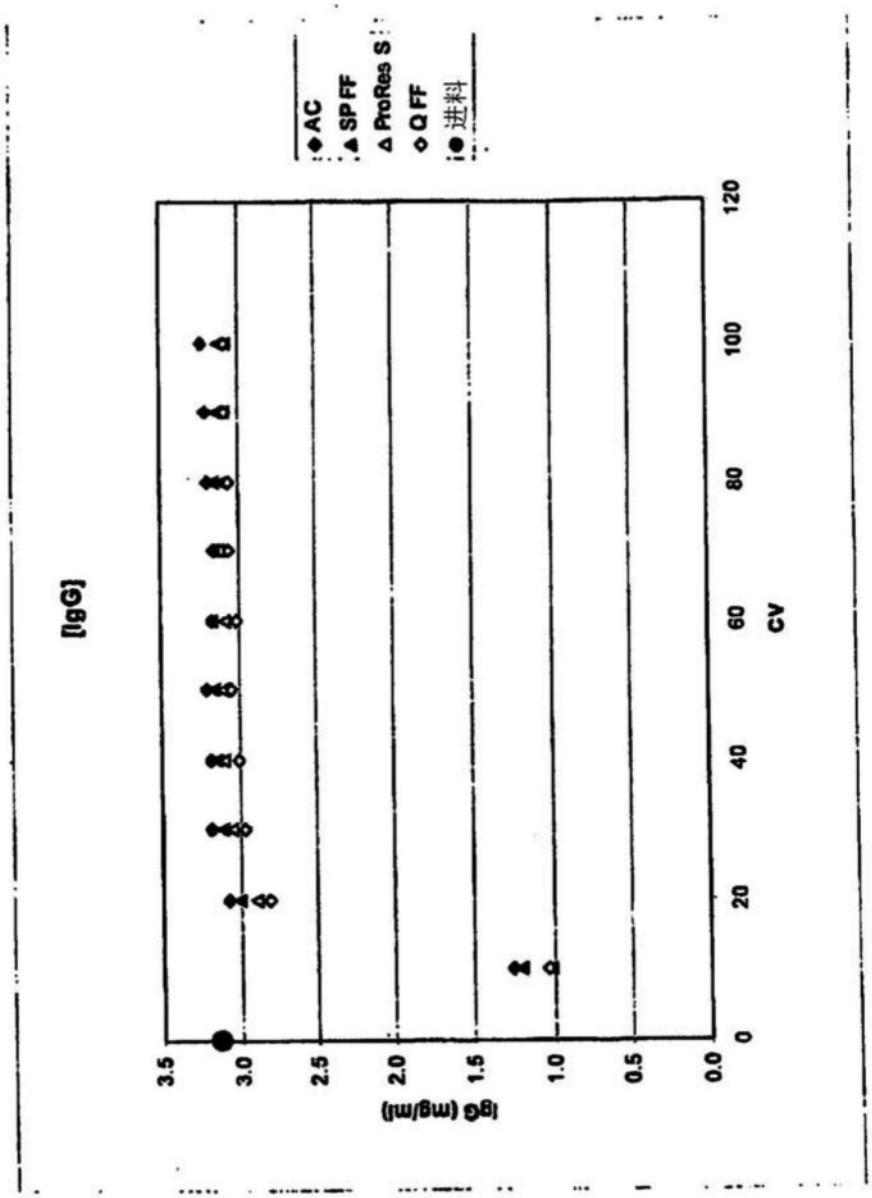

[IgG]
AC
SP FF
ProRes S
Q FF
进料
IgG (mg/ml)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
100
120
CV

图5

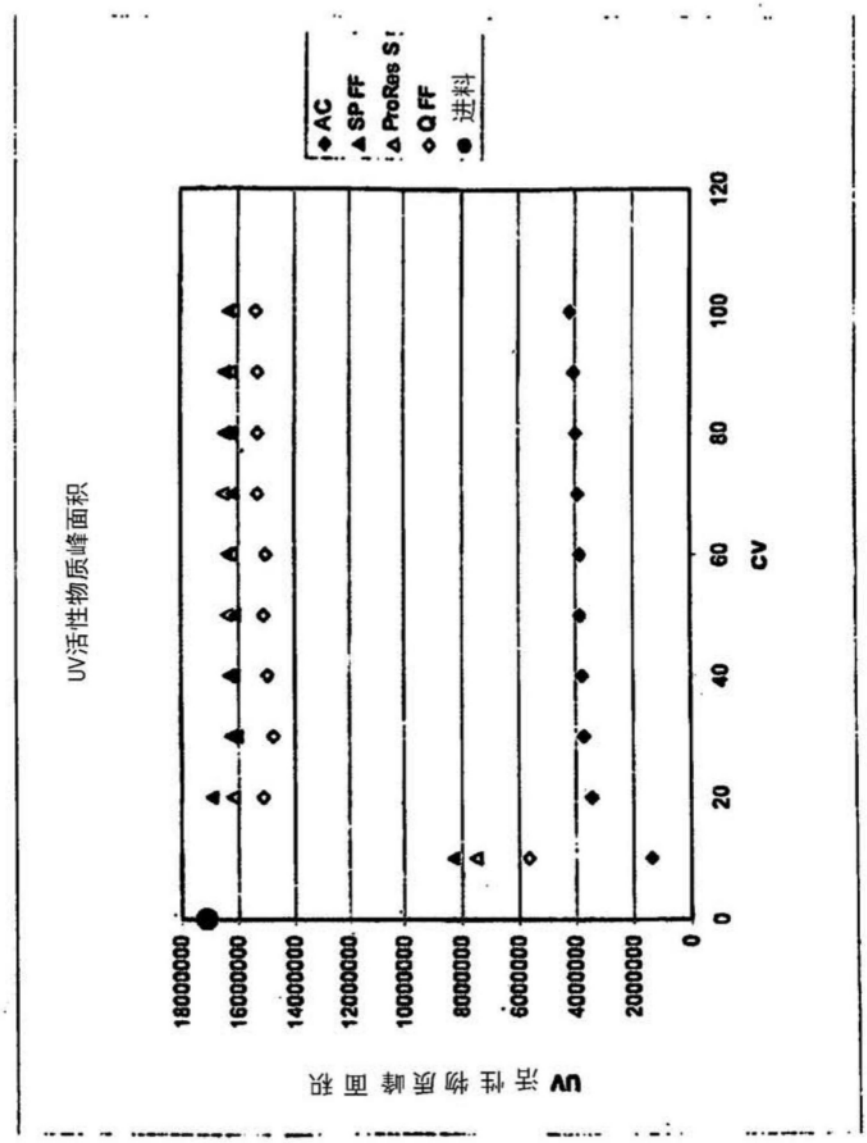

UV活性物质峰面积
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
0
20
40
60
80
100
120
CV
AC
SP FF
ProRes S
Q FF
进料
UV 活性物质峰面积

图6

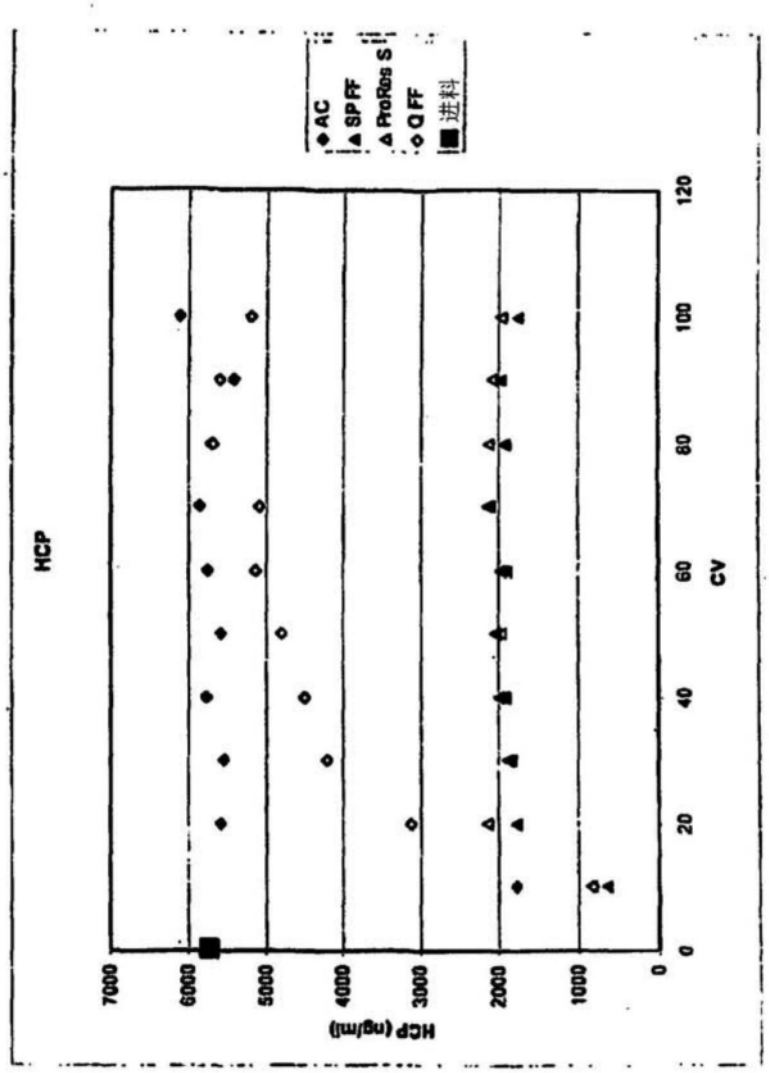

HCP
HCP (ng/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
120
CV
AC
SP FF
ProRos S
Q FF
进料

图7

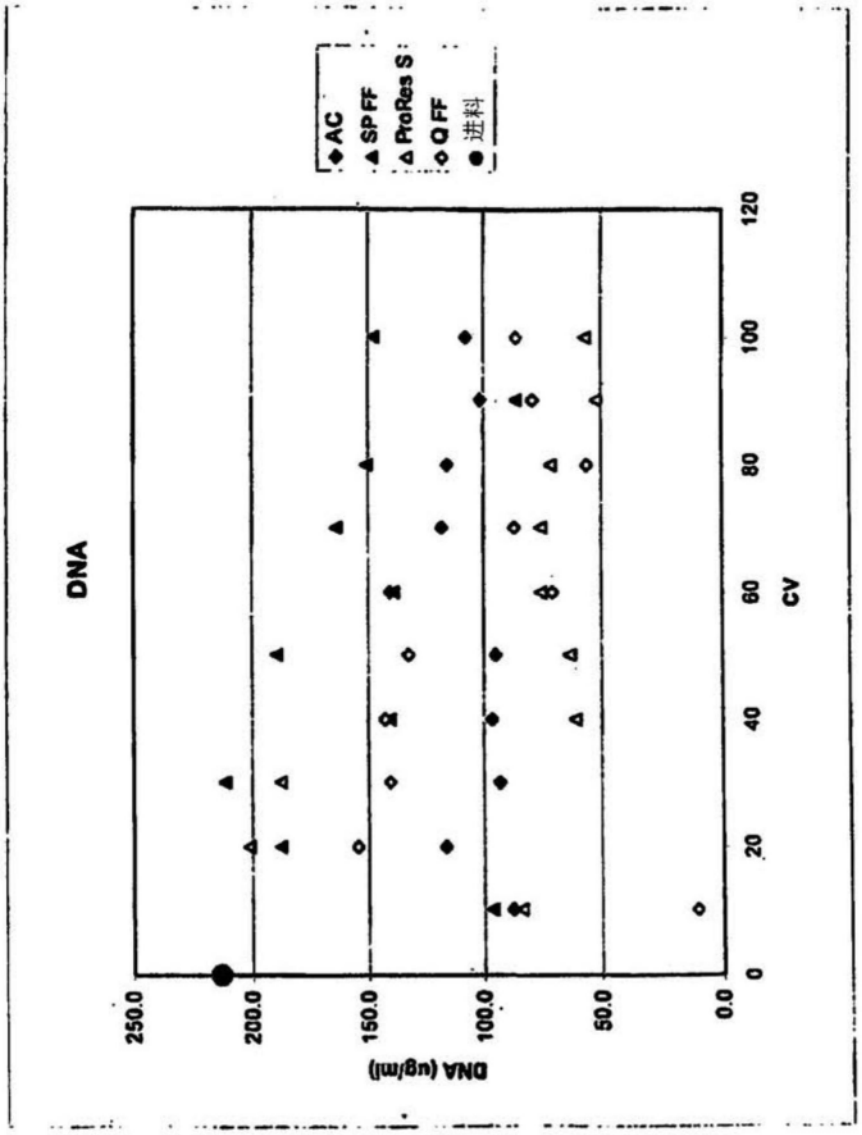

DNA
AC
SP FF
ProRes S
Q FF
进料
DNA (ug/ml)
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
0
20
40
60
80
100
120
CV

图8

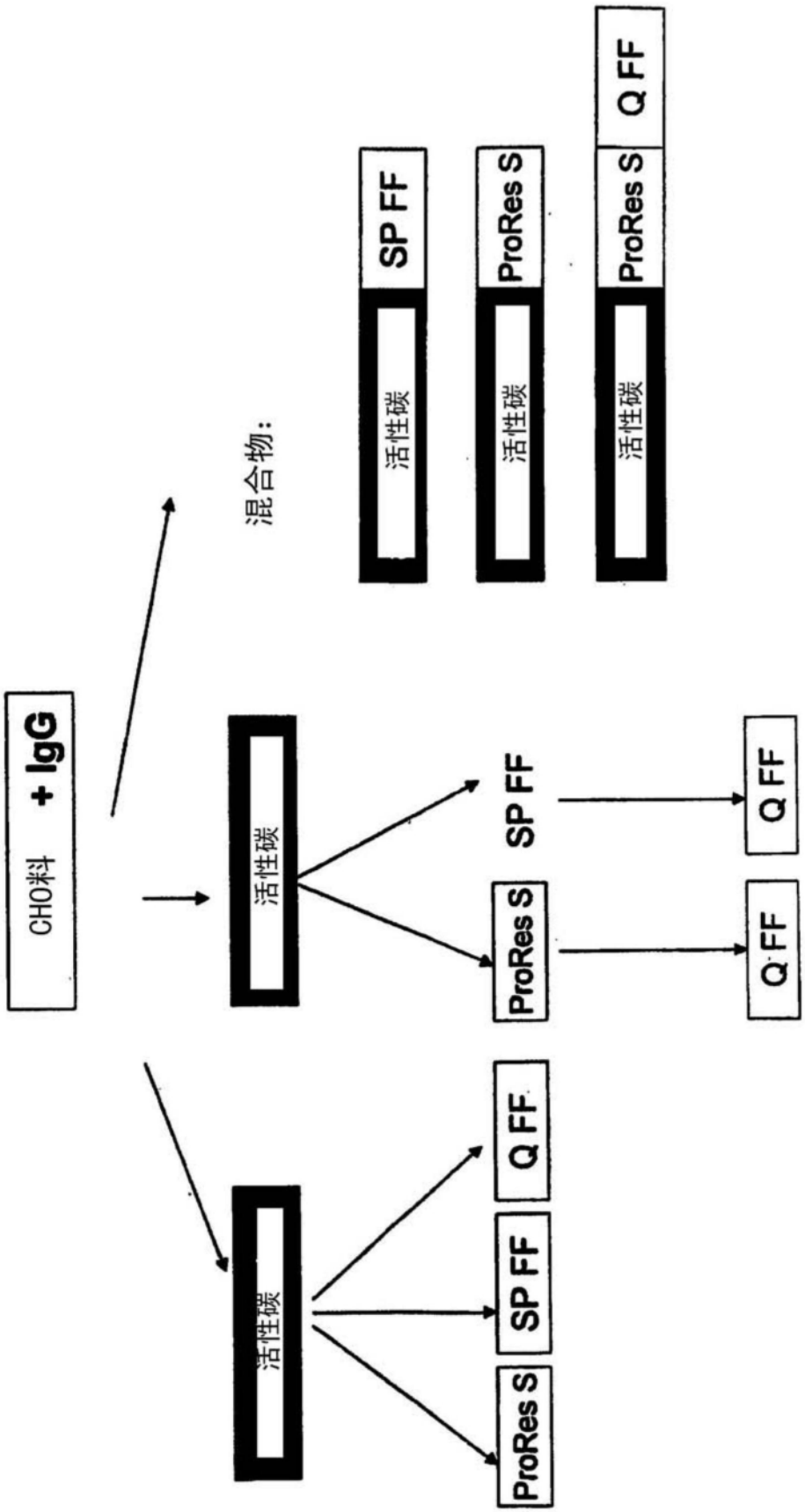

CHO料 + IgG
活性碳
ProRes S
SP FF
Q FF
混合物：
活性碳
SP FF
ProRes S
活性碳
ProRes S
Q FF
活性碳
ProRes S
Q FF

图9

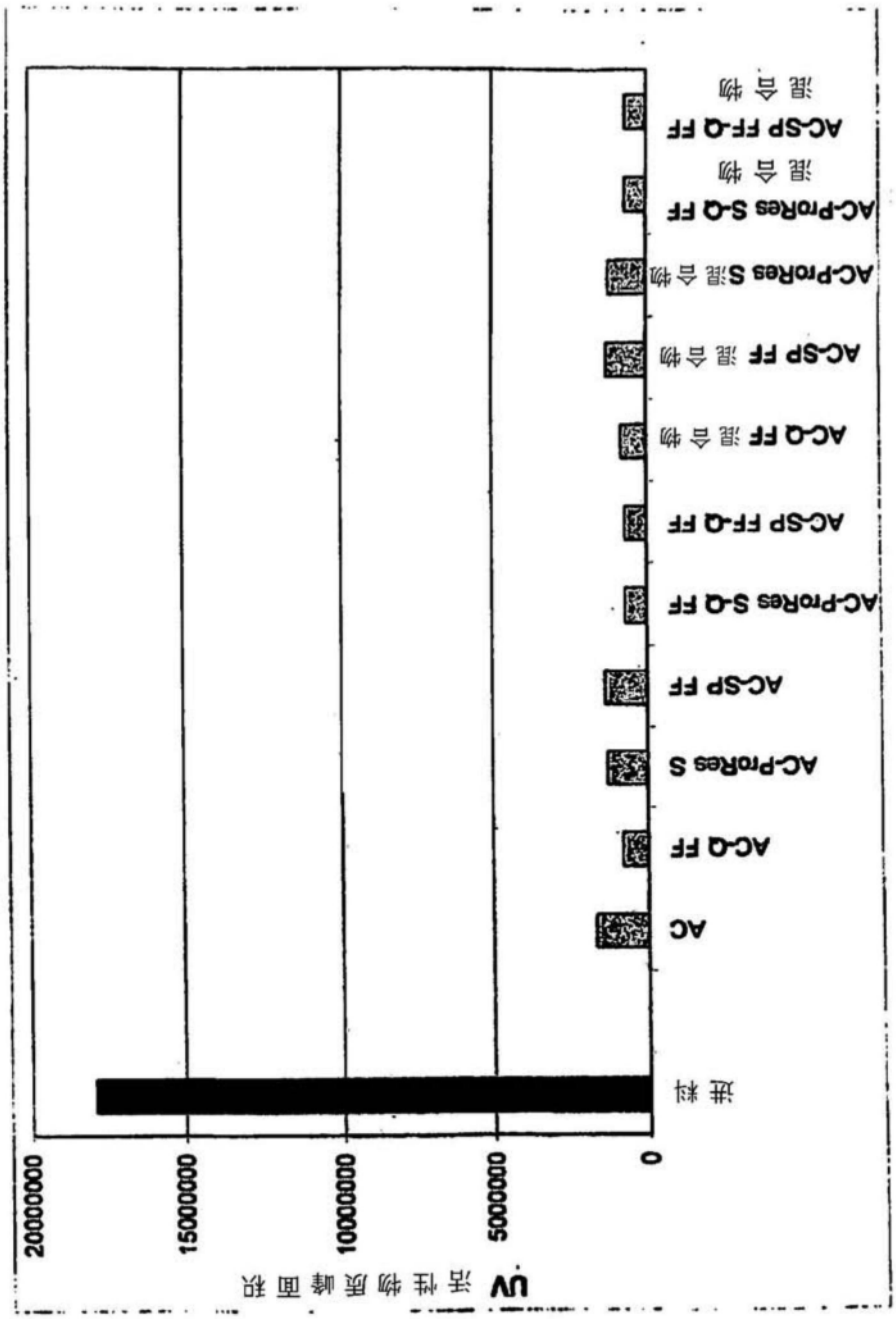

UV 活性物质峰面积
20000000
15000000
10000000
5000000
0
进料
AC
AC-Q FF
AC-ProRes S
AC-SP FF
AC-ProRes S-Q FF
AC-SP FF-Q FF
AC-Q FF 混合物
AC-SP FF 混合物
AC-ProRes S混合物
AC-ProRes S-Q FF
混合物
AC-SP FF-Q FF
混合物

图10

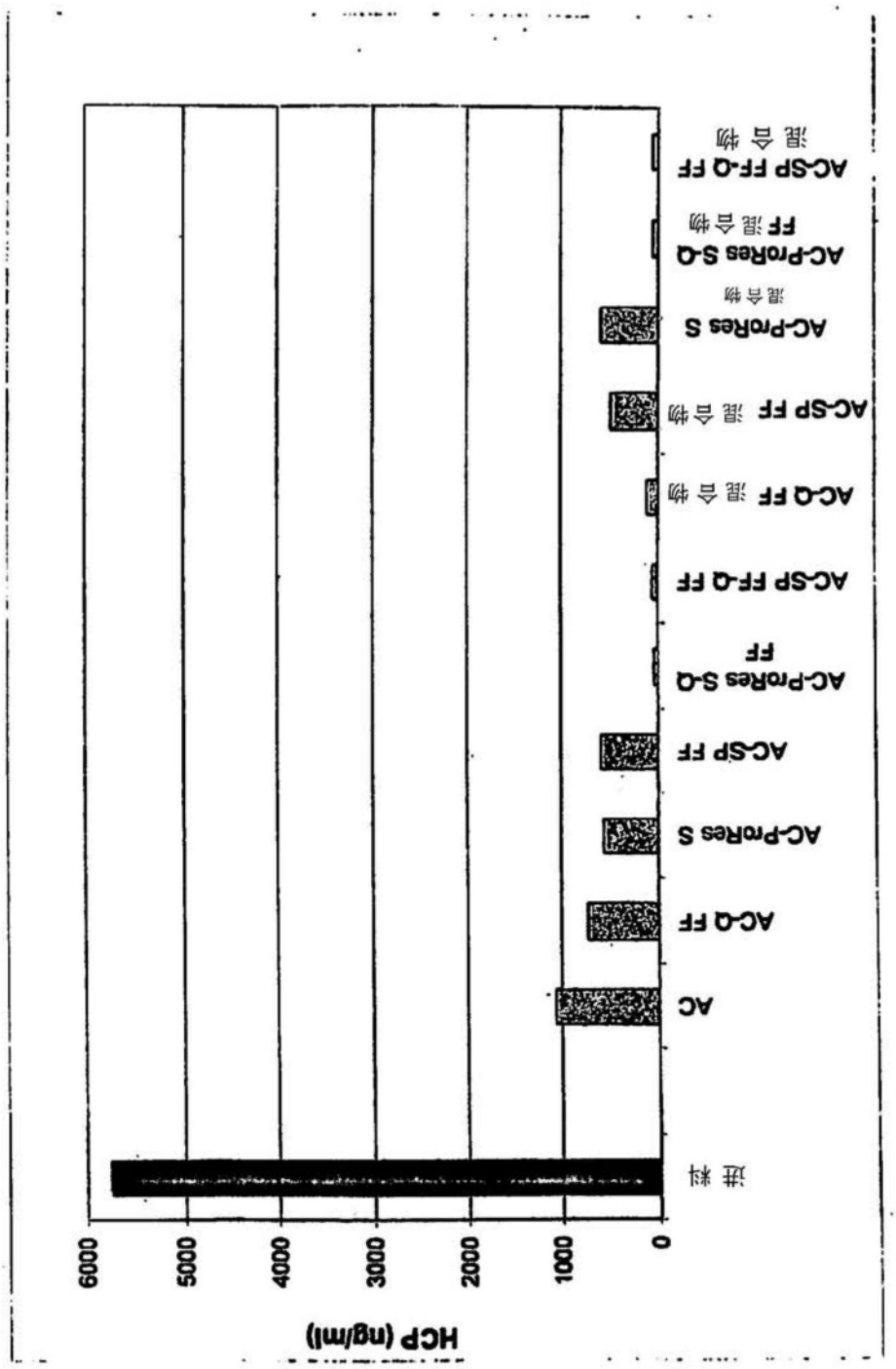

HCP (ng/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
进料
AC
AC-Q FF
AC-ProRes S
AC-SP FF
AC-ProRes S-Q FF
AC-SP FF-Q FF
AC-Q FF 混合物
AC-SP FF 混合物
AC-ProRes S 混合物
AC-ProRes S-Q FF 混合物
AC-SP FF-Q FF 混合物

图11

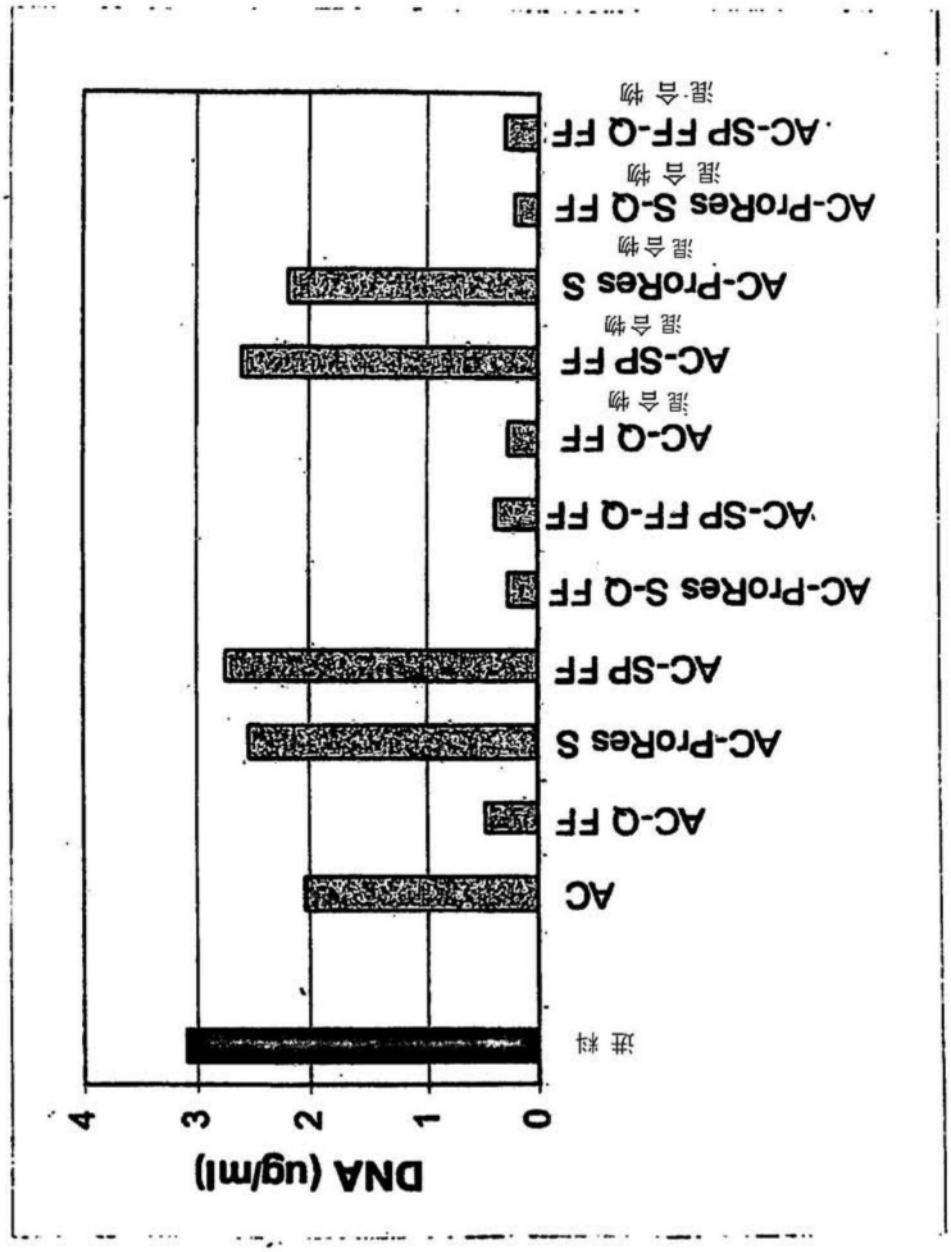

DNA (ug/ml)
0
1
2
3
4
进料
AC
AC-Q FF
AC-ProRes S
AC-SP FF
AC-ProRes S-Q FF
AC-SP FF-Q FF
AC-Q FF
混合物
AC-SP FF
混合物
AC-ProRes S
混合物
AC-ProRes S-Q FF
混合物
AC-SP FF-Q FF
混合物

图12

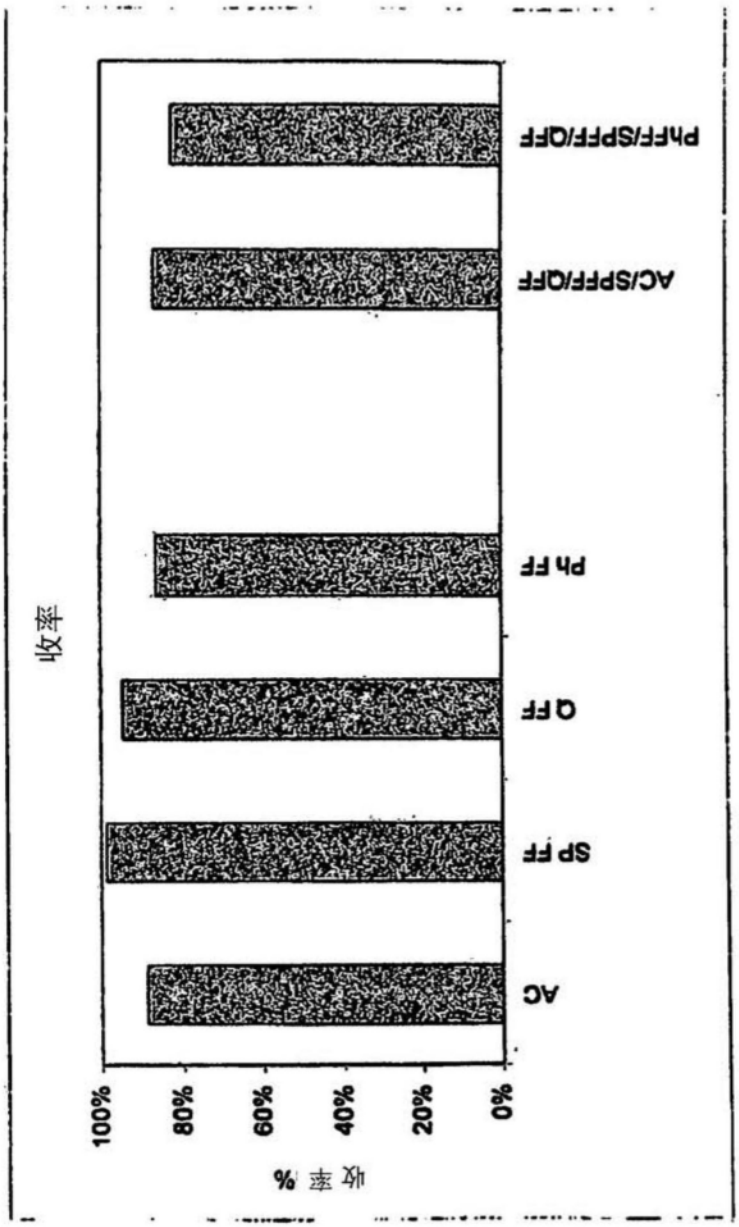


图13

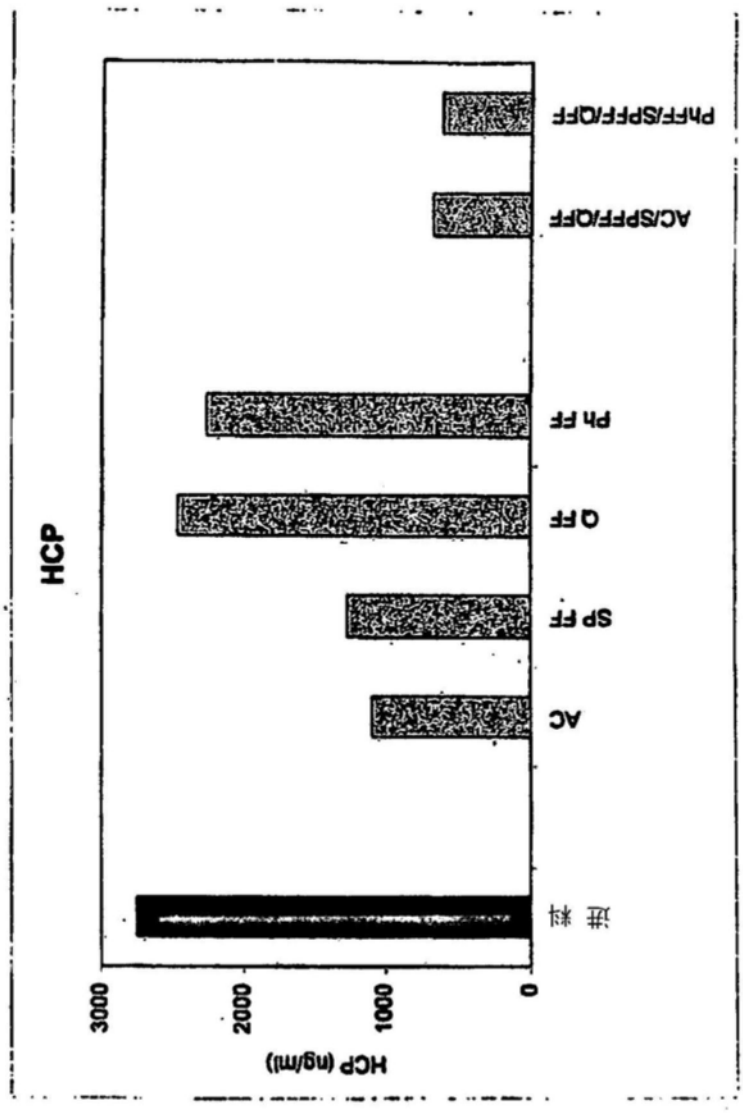

HCP
HCP (ng/ml)
3000
2000
1000
0
进料
AC
SP FF
Q FF
Ph FF
AC/SPFF/QFF
PhFF/SPFF/QFF

图14

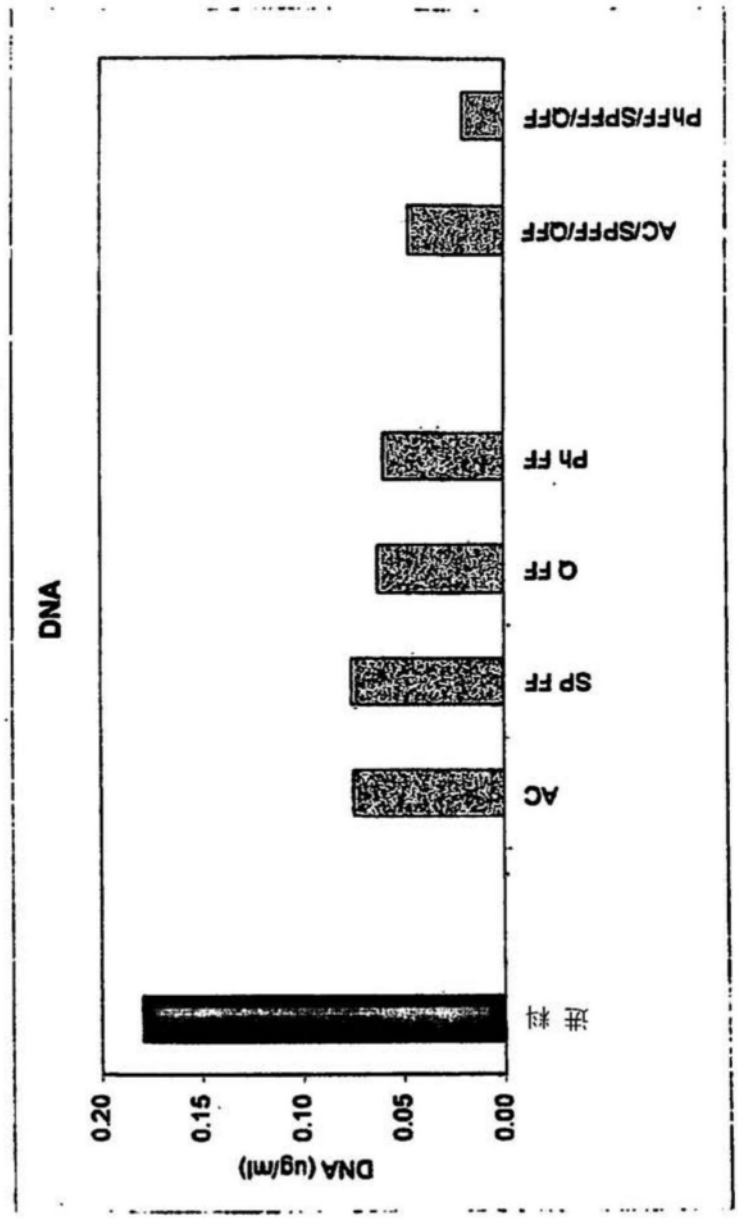

DNA
DNA (ug/ml)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
进料
AC
SP FF
Q FF
Ph FF
AC/SPFF/QFF
PhFF/SPFF/QFF

图15

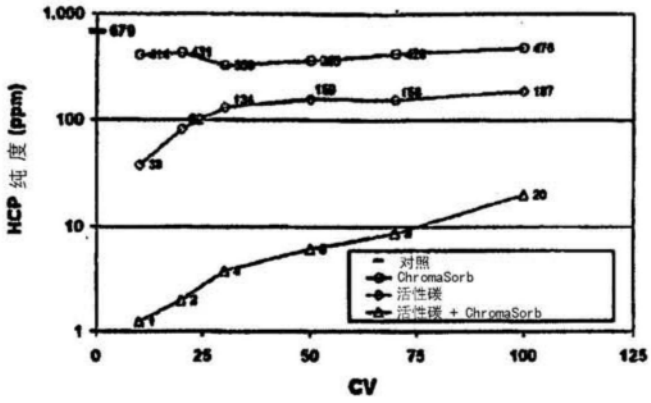

HCP 纯度 (ppm)
CV
对照
ChromaSorb
活性碳
活性碳 + ChromaSorb

图16

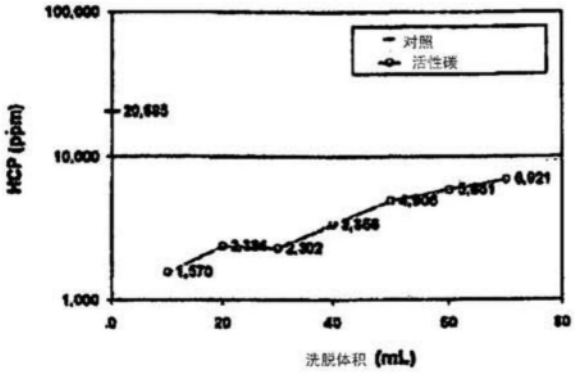

HCP (ppm)
洗脱体积 (mL)
对照
活性碳
20,685
1,370
2,302
6,921

图17

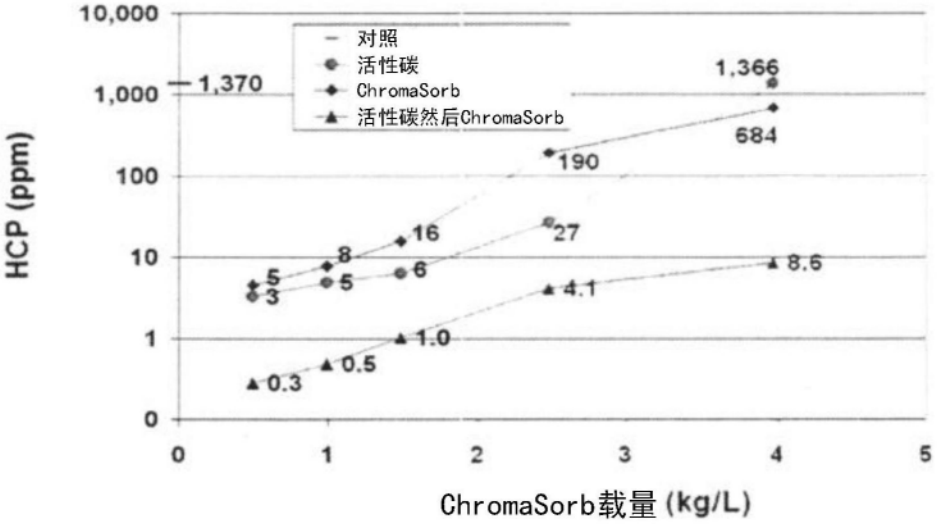

HCP (ppm)
ChromaSorb载量 (kg/L)
对照
活性碳
ChromaSorb
活性碳然后ChromaSorb
1,370
1,366
684
190
27
16
8
6
5
3
4.1
8.6
1.0
0.5
0.3

图18

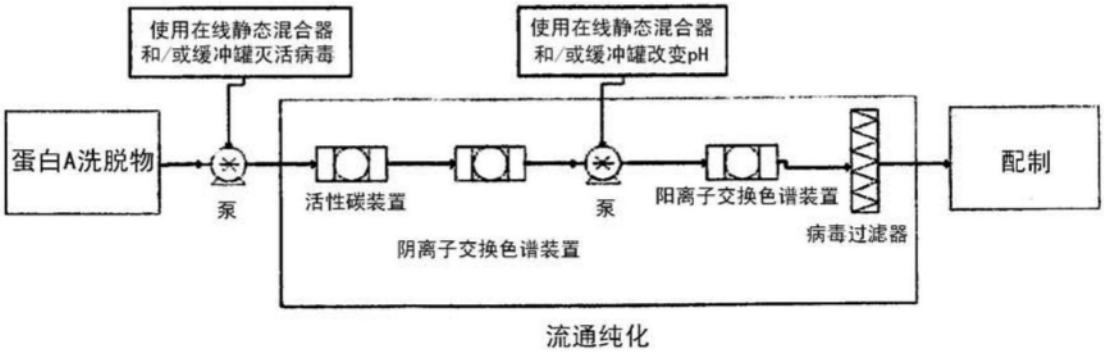

使用在线静态混合器
和/或缓冲罐灭活病毒
使用在线静态混合器
和/或缓冲罐改变pH
蛋白A洗脱物
泵
活性碳装置
泵
阳离子交换色谱装置
病毒过滤器
阴离子交换色谱装置
配制
流通纯化

图19

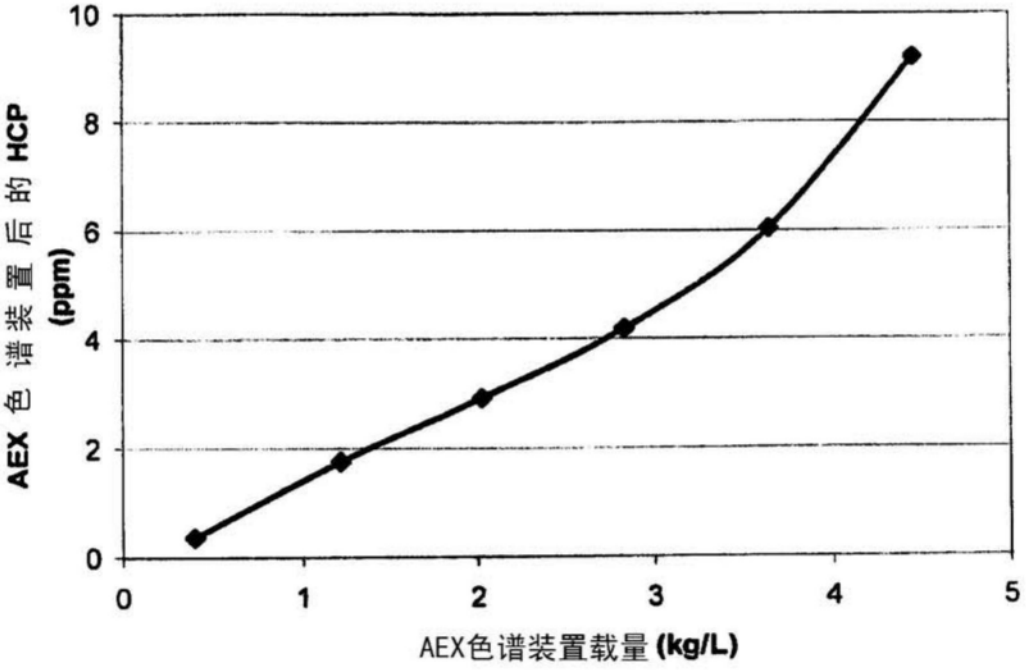

AEX 色谱装置后的 HCP (ppm)
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
AEX色谱装置载量 (kg/L)

图20

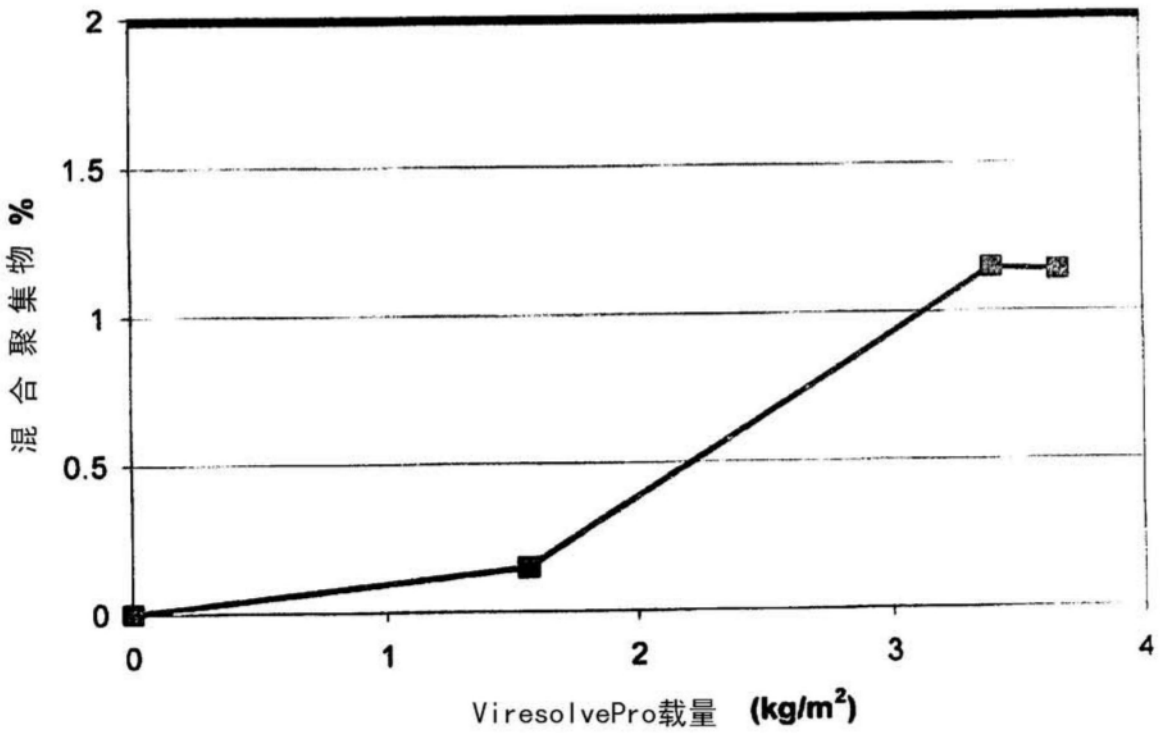

2
1.5
1
0.5
0
混合聚集物 %
0
1
2
3
4
ViresolvePro载量 (kg/m²)

图21

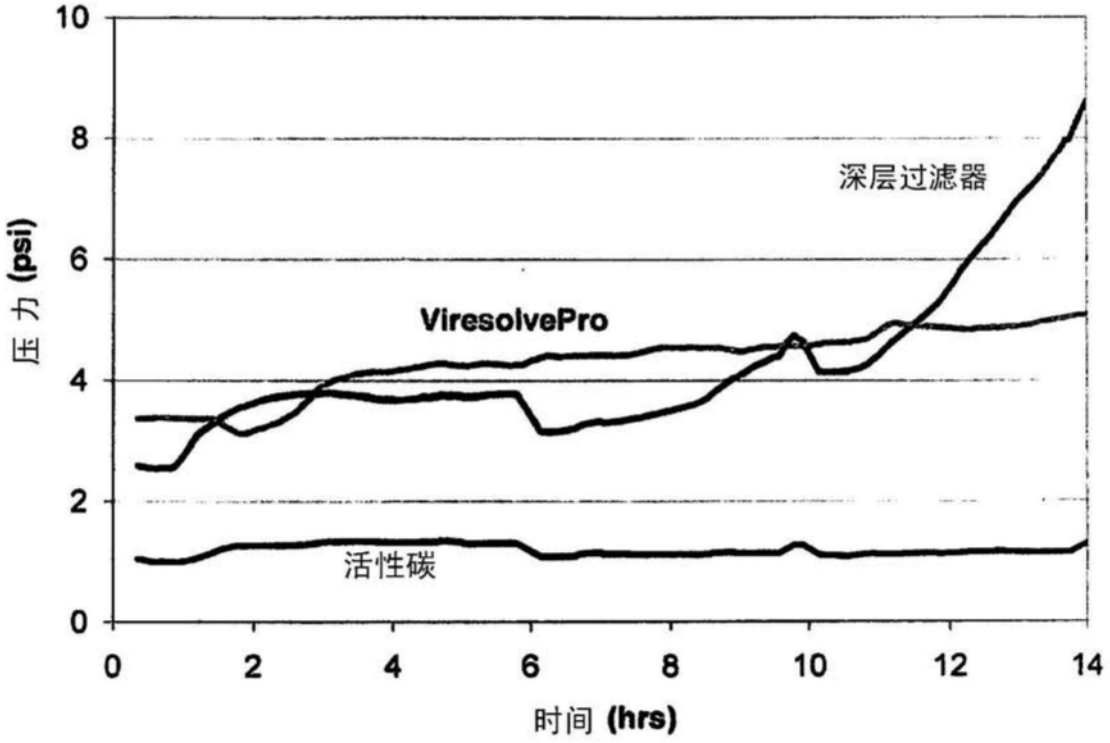

10
8
6
4
2
0
压力 (psi)
深层过滤器
ViresolvePro
活性碳
0
2
4
6
8
10
12
14
时间 (hrs)

图22