



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732253 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280040383. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 03

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/575, 376 2011. 08. 19 US

61/666, 287 2012. 06. 29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 02. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/049501 2012. 08. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/028334 EN 2013. 02. 28

(71) 申请人 EMD 密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·贾比尔 W·莫亚 A·波蒂

A·杜邦 M·T·斯通 M·科兹洛夫

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 彭丽丹 过晓东

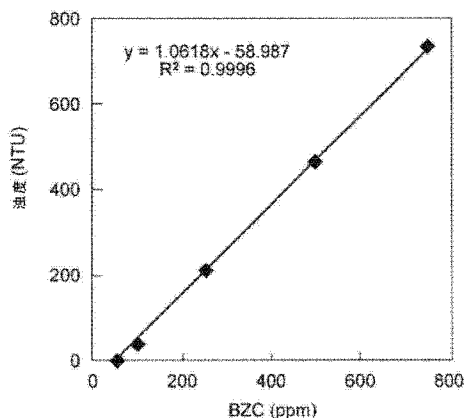
权利要求书3页 说明书25页 附图13页

(54) 发明名称

小分子在纯化生物分子的方法中的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于纯化生物分子的新颖和改进的方法。具体而言,本发明涉及蛋白质纯化的方法,其使用小分子,所述小分子包括至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团,或者包括至少一个非极性基团和至少一个阴离子基团。



1. 一种将样品中的目标生物分子与一种或多种不溶性杂质分离的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 提供包含感兴趣的生物分子和一种或多种不溶性杂质的样品;

(ii) 将所述样品与包含至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团的小分子接触,所述小分子的量足以形成包含所述一种或多种不溶性杂质的沉淀物;和

(iii) 从样品中去除所述沉淀物,从而将目标分子与一种或多种不溶性杂质分离。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述非极性基团是芳香族的。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述非极性基团是脂肪族的。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种不溶性杂质选自全细胞和细胞碎片。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述小分子选自单烷基三甲基铵盐、单烷基二甲基苄基铵盐、二烷基二甲基铵盐、杂芳基铵盐、多取代季铵盐和双季铵盐。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述单烷基三甲基铵盐选自十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基氯化铵、烷基三甲基氯化铵、烷基芳基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基二甲基-2-苯氧乙基溴化铵、十六烷基胺氯化物、十六烷基胺溴化物、十二烷基胺、十二烷基氯化物、十六烷基二甲基乙基溴化铵和十六烷基二甲基乙基氯化铵。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述单烷基二甲基苄基铵盐选自烷基二甲基苄基氯化铵和苄索氯铵。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述二烷基二甲基铵盐选自溴化度米芬、二癸基二甲基氯化铵、二癸基二甲基溴化铵、辛基十二烷基二甲基氯化铵和辛基十二烷基二甲基溴化铵。

9. 权利要求 6 的方法,其中所述杂芳基铵盐选自鲸蜡基吡啶氯化物、鲸蜡基吡啶溴化物、十六烷基吡啶溴化物、十六烷基吡啶氯化物、1-[3-氯烯丙基]-3,5,7-三氮杂-1-氮鎓金刚烷的顺式异构体、烷基异喹啉溴化物、和烷基二甲基萘甲基氯化铵。

10. 权利要求 6 的方法,其中所述多取代季铵盐选自烷基二甲基苄基糖精铵和烷基二甲基乙基苄基铵环己基氨基磺酸盐。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述小分子是苄索氯铵。

12. 权利要求 1 的方法,其中在步骤(ii)中添加的小分子的量为 0.01-2.0%wt/vol。

13. 权利要求 1 的方法,其中在步骤(ii)中所述小分子以浓度为 1-200mg/ml 的溶液的形式添加。

14. 权利要求 1 的方法,其中一种或多种不溶性杂质的沉淀是在 pH2-9 下进行的。

15. 权利要求 1 的方法,其中在步骤(iii)中所述沉淀物的去除包括使用过滤。

16. 权利要求 1 的方法,其中在步骤(iii)中所述沉淀物的去除包括使用离心。

17. 权利要求 1 的方法,其还包括在去除沉淀物后,从含有目标生物分子的样品中去除残留量的小分子的步骤。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述去除残留量的小分子的步骤包括使样品与聚阴离子接触。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述去除残留量的小分子的步骤包括使样品与吸附剂材料接触。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述去除残留量的小分子的步骤包括使样品与活性炭接

触。

21. 由包含目标分子以及一种或多种可溶性杂质的样品中纯化目标生物分子的方法，所述方法包括以下步骤：

(i) 使所述样品与包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子接触，所述小分子的量足以形成包含目标分子的沉淀物；和

(ii) 回收所述沉淀物，从而使目标生物分子与所述一种或多种可溶性杂质分离。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述非极性基团是芳香族的。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述非极性基团是脂肪族的。

24. 权利要求 21 的方法，其中在步骤(i) 前，先使所述样品经历澄清步骤。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述澄清步骤包括使用过滤。

26. 权利要求 24 的方法，其中所述澄清步骤包括使用离心。

27. 权利要求 24 的方法，其中所述澄清步骤包括使样品与包含至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团的小分子接触。

28. 权利要求 21 的方法，其中所述小分子选自蝶呤衍生物、利尿酸、非诺贝酸、甲灭酸、霉酚酸、氨甲环酸、唑来膦酸、乙酰水杨酸、对氨基苯肿酸、头孢噻吩、甲氯灭酸、ibuprofine、萘普生、梭链孢酸、萘啶酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、噻洛芬酸、尼氟灭酸、反式-2-羟基肉桂酸、3-苯基丙酸、丙磺舒、氯拉卓酸、二十碳五烯酸、4-乙酰氨基苯甲酸、酮洛芬、维甲酸、腺苷酸基琥珀酸、萘-2,6-二磺酸、他米巴罗汀、etodolacetodolic acid、和苄基青霉素酸。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述蝶呤衍生物选自叶酸和蝶酸。

30. 权利要求 21 的方法，其中所述小分子是叶酸或其衍生物。

31. 权利要求 21 的方法，其中所述小分子是染料分子。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述染料分子是苋菜红或硝基红。

33. 权利要求 21 的方法，其中添加所述小分子至浓度为 0.001%-5.0%。

34. 权利要求 21 的方法，其中在添加小分子之前，先调节样品的 pH。

35. 权利要求 21 的方法，其中所述沉淀在 pH2-9 下进行。

36. 权利要求 21 的方法，其中存在于所述沉淀物中的目标生物分子的量为样品中的起始目标生物分子的量的至少 50%，或至少 60%，或至少 70%，或至少 80%，或至少 90%，或大于 90%。

37. 权利要求 21 的方法，其中所述沉淀物中的杂质水平小于样品中存在的起始杂质水平的 50%，或小于 40%，或小于 30%，或小于 20%，或小于 15%，或小于 10%，或小于 5%。

38. 权利要求 21 的方法，其还包括在适当的缓冲剂中溶解所述包含目标生物分子的沉淀物的步骤。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述缓冲剂包含 4.5-10 的 pH。

40. 权利要求 21 的方法，其还包括一个或多个色谱步骤。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述一个或多个色谱步骤选自离子交换色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、和混合型色谱。

42. 权利要求 1 的方法，其中所述目标生物分子选自重组蛋白、抗体或其功能性片段、含 CH2/CH3 区域的蛋白和免疫粘附分子。

43. 权利要求 21 的方法,其中所述目标生物分子选自重组蛋白、抗体或其功能性片段、含 CH2/CH3 区域的蛋白和免疫粘附分子。

44. 权利要求 42 的方法,其中所述抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体和多样特异性抗体。

45. 权利要求 1 的方法,其中所述目标生物分子是通过在哺乳动物细胞中表达而产生的。

46. 权利要求 1 的方法,其中所述目标生物分子是通过在非哺乳动物细胞中表达而产生的。

47. 权利要求 21 的方法,其中所述目标生物分子是通过在哺乳动物细胞中表达而产生的。

48. 权利要求 21 的方法,其中所述目标生物分子是通过在非哺乳动物细胞中表达而产生的。

49. 纯化样品中的抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 提供包含抗体和一种或多种不溶性杂质的样品;

(ii) 将所述样品与包含至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团的小分子接触,所述小分子的量足以形成包含所述一种或多种不溶性杂质的沉淀物和包含所述抗体的液相;和

(iii) 使所述液相经历至少一个色谱步骤,从而纯化所述抗体。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述小分子是使用一个或多个静态混合器添加到样品中的。

51. 权利要求 49 的方法,其中所述至少一个色谱步骤是亲和色谱步骤。

小分子在纯化生物分子的方法中的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求 2011 年 8 月 19 日提交的美国临时专利申请号 61/575, 376, 以及 2012 年 6 月 29 日提交的美国临时专利申请号 61/666, 287 的优先权, 其各自的全部内容在此援引加入。

技术领域

[0003] 本发明涉及纯化生物分子的新颖的改善的方法。特别地, 本发明涉及用小分子纯化蛋白质的方法。

背景技术

[0004] 制造生物分子如蛋白质和特别是重组治疗蛋白的通用方法典型地包括两个主要步骤: (1) 蛋白质在宿主细胞中的表达, 和 (2) 蛋白质的纯化。第一步骤通常包括在生物反应器中生长期望的宿主细胞, 以便于感兴趣的蛋白质的表达。一旦蛋白质在期望的水平上表达, 就从宿主细胞中移出并收获蛋白质。典型地通过过滤或离心从含有蛋白质的流体中去除悬浮物质, 如细胞、细胞碎片、脂类和其他不溶物质, 得到在溶液中含有感兴趣的蛋白质以及各种可溶解杂质的澄清流体。

[0005] 第二步骤通常包括对收获的蛋白质的纯化, 以去除可溶解杂质。可溶解杂质的实例包括宿主细胞蛋白 (通常称为 HCP, 其是非期望或目标蛋白质的细胞蛋白)、核酸、内毒素、病毒、蛋白质变体和蛋白质聚集体。

[0006] 该纯化典型地包括若干色谱步骤, 其可以包括以下的一个或多个: 结合和洗脱疏水作用色谱 (HIC); 流通疏水作用色谱 (FTHIC); 混合型色谱技术, 例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型相互作用 (FTMM), 该两者都可以使用树脂, 如 Capto Adhere、Capto MMC、HEA Hypercel、PPA Hypercel。

[0007] 近年来, 已经研究了纯化蛋白质的其他可选方法, 一种方法包括絮凝技术。在该技术中, 将可溶性聚合电解质添加到非澄清的细胞培养培养基流体中, 以捕获悬浮物质和部分可溶解杂质, 从而形成絮凝剂, 随后将所述絮凝剂通过过滤或离心从蛋白质溶液中去除。

[0008] 或者, 可以将可溶性聚合电解质添加到澄清的细胞培养培养基流体中, 以捕获感兴趣的蛋白质, 从而形成絮凝剂, 使其沉淀, 随后可以与剩余的溶液中分离。通常洗涤絮凝剂以去除疏松附着的杂质。而后, 溶液的离子强度的上升引起目标蛋白质从聚合电解质中离异, 随后导致聚合电解质再溶解到含有蛋白质的溶液中。

[0009] 该絮凝技术的主要缺陷在于, 其需要使用聚合物, 所述聚合物可能会与目标蛋白质在一起、会有毒和 / 或不易于从患者身体中清除, 该聚合物在一次性应用上是昂贵的, 并且不是现成的, 因为其通常需要合成。

发明内容

[0010] 本发明提供改善的纯化生物分子的方法,其中该方法使用低毒、易于操作和现成的材料。另外,在一些实施方案中,本发明的方法避免了对使用昂贵试剂和色谱步骤的需要,例如蛋白质 A 亲和色谱。

[0011] 本发明涉及在含有生物材料的液流中使用特定的能够结合感兴趣的生物分子如目标分子,例如单克隆抗体(该过程被称为“捕获”)的小分子,以及结合可溶性或不溶性杂质例如宿主细胞蛋白质、DNA、病毒、全细胞、细胞碎片、内毒素等的小分子的方法,以纯化目标蛋白质或将目标蛋白质与杂质分离。在一些实施方案中,在此描述的方法在从含有感兴趣的蛋白质的样品中去除不溶性杂质(该过程被称为“澄清”)是特别有用的。

[0012] 在一些实施方案中,本发明涉及一种使样品中的一种或多种不溶性杂质与目标生物分子分离的方法;该方法包括以下步骤:(i) 提供包含目标生物分子和一种或多种不溶性杂质的样品;(ii) 使所述样品与包含至少一种阳离子基团和至少一种非极性基团的小分子接触,所述小分子的量足以形成包含所述一种或多种不溶性杂质的沉淀物;和(iii) 从样品中去除所述沉淀物,从而使一种或多种不溶性杂质与目标分子分离。

[0013] 在一些实施方案中,本发明涉及一种纯化样品中的抗体的方法;该方法包括如下步骤:(i) 提供包含抗体和一种或多种不溶性杂质的样品;(ii) 使所述样品与包含至少一种阳离子基团和至少一种非极性基团的小分子接触,所述小分子的量足以形成包含所述一种或多种不溶性杂质的沉淀物和包含所述抗体的液相;和(iii) 使所述液相经历至少一个色谱步骤,从而纯化目标抗体。

[0014] 在一些实施方案中,所述至少一个色谱步骤是亲和色谱步骤。在一个特别实施方案中,所述亲和色谱步骤包括使用蛋白质 A 基亲和配体。

[0015] 在一些实施方案中,所述小分子包含芳香非极性基团。在其他实施方案中,所述小分子包含脂肪非极性基团。

[0016] 在一些实施方案中,所述一种或多种不溶性杂质是细胞。在一些实施方案中,包含至少一种阳离子基团和至少一种非极性基团的小分子选自单烷基三甲基铵盐(非限制实例包括十六烷基三甲基溴化铵或氯化铵、十四烷基三甲基溴化铵或氯化铵、烷基三甲基氯化铵、烷基芳基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵或氯化铵、十二烷基二甲基-2-苯氧乙基溴化铵、十六烷基氯化胺或溴化胺、十二烷基胺或氯化物、和十六烷基二甲基乙基溴化铵或氯化铵)、单烷基二甲基苄基铵盐(非限制实例包括烷基二甲基苄基氯化铵和苄索氯铵)、二烷基二甲基铵盐(非限制实例包括溴化度米芬、二癸基二甲基氯化铵或溴化铵和辛基十二烷基二甲基氯化铵或溴化铵)、杂芳基铵盐(非限制性实例包括十六烷基吡啶卤化物(氯化物或溴化物)和十六烷基吡啶溴化物或氯化物、1-[3-氯烷基]-3,5,7-三氮杂-1-氮鎓氯化金刚烷的顺式异构体、烷基异喹啉溴化物、和烷基二甲基萘甲基氯化铵)、多取代季铵盐、(非限制实例包括烷基二甲基苄基糖精铵和烷基二甲基乙基苄基铵环己基氨基磺酸盐)、和双季铵盐(非限制实例包括 1,10-双(2-甲基-4-氨基喹啉氯化物)-癸烷、1,6-双{1-甲基-3-(2,2,6-三甲基环己基)-丙基二甲基氯化铵}己烷或曲比铵氯化物、和 Buckman Brochures 的被称为 CDQ 的双季铵盐)。

[0017] 在一个特别实施方案中,所述小分子是苄索氯铵。

[0018] 在根据本发明的方法的一些实施方案中,将 0.01-2.0%wt/vol 的小分子添加到样品中,以沉淀一种或多种不溶性杂质。在一些实施方案中,在用于蛋白质纯化过程中的澄清

步骤期间,使用所述小分子。在一些实施方案中,这样的过程是连续过程。

[0019] 在一些实施方案中,在蛋白质纯化过程的澄清步骤期间,使用一个或多个在此描述的小分子,其中所述小分子可以直接添加到含有细胞培养基的生物反应器中以沉淀一种或多种杂质。在其他实施方案中,在纯化过程中的一个或多个其他过程步骤中,使用一个或多个在此描述的小分子,如在实施例中所描述的。

[0020] 在一些实施方案中,添加的小分子的量是以浓度为 1-200mg/ml 的溶液的形式。

[0021] 在一些实施方案中,沉淀步骤在 pH2-9 下进行。

[0022] 在一些实施方案中,通过过滤(例如深层过滤)从样品中去除沉淀物。在其他实施方案中,通过离心从样品中去除沉淀物。

[0023] 在一些实施方案中,使目标生物分子与一种或多种不溶性杂质分离的方法还包含从样品中去除残余量的小分子的步骤。在一些实施方案中,该步骤包括使回收的溶液与聚阴离子或吸附剂材料接触,以去除残余量的小分子。在一个特别实施方案中,该步骤使用活性炭去除残余量的小分子。

[0024] 本发明还包括从包含目标分子以及一种或多种可溶解杂质的样品中纯化目标生物分子的方法,其中该方法包括以下步骤:(i)使所述样品与包含至少一种阴离子基团和至少一种非极性基团的小分子接触,所述小分子的量足以形成包含目标分子的沉淀物;和(ii)回收所述沉淀物,从而使目标生物分子与一种或多种可溶解杂质分离。

[0025] 在一些实施方案中,所述小分子包含芳香非极性基团。在其他实施方案中,所述小分子包含脂肪非极性基团。

[0026] 在一些实施方案中,在样品与包含至少一种阴离子基团和至少一种非极性基团的小分子接触之前,先将样品经历澄清步骤。示例性澄清技术包括,但不限于,过滤和离心。

[0027] 在一些实施方案中,通过使样品经历如上所讨论的包含至少一种阳离子基团和至少一种非极性基团的小分子,达到澄清。

[0028] 包含至少一种阴离子基团和至少一种非极性基团的示例性小分子包括,但不限于,药学相关化合物,如蝶呤衍生物(例如叶酸、蝶呤)、利尿酸、非诺贝酸、甲芬那酸、霉酚酸、氨甲环酸、唑来膦酸、乙酰水杨酸、氨苯砷酸、头孢噻吩、甲氯芬那酸、ibuprofine、萘普生、梭链孢酸、萘啶酸、鹅脱氧胆酸、乌索脱氧胆酸、噻洛芬酸、尼氟酸、反式-2-羟基肉桂酸、3-苯丙酸、丙磺舒、氯拉卓酸、二十碳五烯酸、4-乙酰氨基苯甲酸、酮基布洛芬、维甲酸、腺苷酸基琥珀酸、萘-2,6-二磺酸、他米巴罗汀、etodolacetodolic acid 和苄基青霉素酸(参见,例如, DrugBank3.0 :a comprehensive resource for research on drugs. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djombou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. Nucleic Acids Res. 2011年1月 ;39(Database issue):D1035-41. PMID:21059682)。

[0029] 在一个特别实施方案中,包含至少一种阴离子基团和至少一种非极性基团(例如芳香基团)的小分子是叶酸或其衍生物。

[0030] 在一些实施方案中,包含至少一种阴离子基团和至少一种非极性基团的小分子是染料分子。示例性染料包括,但不限于,苋菜红和硝基红。

[0031] 在一些实施方案中,添加小分子至浓度为 0.001%-5.0%。

[0032] 在一些实施方案中,在添加小分子之前,先调节样品的 pH。

[0033] 在一些实施方案中,在 pH2-9 下进行沉淀步骤。

[0034] 在一些实施方案中,用根据本发明的方法使存在于样品中的至少 50%,或至少 60%,或至少 70%,或至少 80%,或至少 90%或超过 90%量的初始目标生物分子(例如目标蛋白质)沉淀。

[0035] 在一些实施方案中,在如上所述用小分子沉淀之后,少于 50%,或少于 40%,或少于 30%,或少于 20%,或少于 15%,或少于 10%,或少于 5%的初始杂质水平保留在包含感兴趣的目标生物分子的沉淀物中。然而,在一些情况下,更高的杂质水平可以与目标生物分子一起沉淀。

[0036] 在一些实施方案中,如在此所述用小分子沉淀目标生物分子之后,在 pH4.5-10 的缓冲液中溶解沉淀物。

[0037] 在一些实施方案中,使用一个或多个静态混合器添加一种或多种小分子到样品中。

[0038] 在一些实施方案中,在沉淀目标生物分子之后,使目标生物分子经历进一步的色谱步骤,所述色谱步骤选自离子交换色谱、疏水作用色谱、亲和色谱和混合型色谱。

[0039] 示例性目标生物分子包括,但不限于,重组蛋白、单克隆抗体和功能性片段、人源化抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、多样特异性抗体、免疫粘附分子和含 CH₂/CH₃ 区域的蛋白。目标生物分子可以在哺乳动物表达系统(例如 CHO 细胞)或非哺乳动物表达系统(例如细菌、酵母或昆虫细胞)中表达。在此描述的方法可以用于使用哺乳动物表达系统表达的蛋白质以及非哺乳动物表达系统表达的蛋白质的情况中。

附图说明

[0040] 图 1 描述了用于定量溶液中 BZC 的量的校正曲线。所述校正曲线源自浊度分析,其中已知量的 BZC 和四氟硼酸钠混合形成沉淀物。x 轴指 BZC 在溶液中的起始浓度(ppm),y 轴指在添加了已知量的四氟硼酸盐后,溶液中产生的浊度(NTU)。该分析的检测限为溶液中 100mg/L 或 100ppm 的 BZC。

[0041] 图 2 描述的图证明了静态结合试验的结果,用于测定活性炭对溶液中的 BZC 的结合能力。x 轴指添加的活性炭的质量(g),y 轴指在与活性炭混合 10 分钟后,溶液中剩余的 BZC 的浓度(mg/L)。如所证明的,0.1g 活性炭足以降低溶液中的 BZC 的起始量(25mg)至未检出水平(即,小于 100mg/L)。

[0042] 图 3 描述了代表最优化研究结果的图,其中发现实现目标生物分子(例如,单克隆抗体 MAb 分子)的最大回收以及最大杂质清除的 BZC 最佳浓度为 4g/L。x 轴指添加到要澄清的给料中的 BZC 的浓度(mg/ml)。y 轴指由于对 BZC 进行澄清过程,从给料中去除的 HCP 的百分数(%) (条)。第二 y 轴指在澄清过程后,保留在给料中的 MAb 的百分数(%) (用菱形表示)。

[0043] 图 4 描述的图代表溶液 pH 对用叶酸对 MAb 的沉淀效率的影响的调查结果。更碱性的溶液 pH 导致沉淀溶液中 90% 或更多的 MAb 所需要更高的叶酸对 MAb 质量比。x 轴指添加到给料中的叶酸对 MAb 质量比(mg/mg)。y 轴指用叶酸沉淀后,溶液中剩余的 MAb 的百分数(%)。菱形、方块、三角和圆圈分别指在 pH4.5、5.0、5.5 和 6.0 下的结合。虚线作为指导标准。

[0044] 图 5 描述了用于定量溶液中叶酸的量的校正曲线。所述校正曲线源自 350nm 处, 已知浓度的叶酸溶液的吸光度测量。x 轴指溶液中的叶酸的起始浓度 (mg/ml), y 轴指叶酸溶液在 350nm 处的吸光度 (任意单位)。该分析的检测限为溶液中 10mg/L 或 10ppm 的叶酸。

[0045] 图 6 描述的图代表结合等温试验的结果, 用于测定活性炭结合溶液中的叶酸的能力。x 轴指在与活性炭混合 10 分钟后, 溶液中剩余叶酸的浓度 (mg/ml), y 轴指在混合 10 分钟后, 每添加的活性炭质量所结合的叶酸的质量 (mg)。一克活性炭足以去除 225mg 叶酸。

[0046] 图 7 描述的图代表在结合 pH4.5 下, 用硝基红染料沉淀 MAb 的效率的研究试验的结果。需要至少 0.8 的硝基红 /MAb 比以使 MAb 完全沉淀。x 轴指添加到给料中的叶酸对 MAb 质量比 (mg/mg)。y 轴指在用硝基红沉淀后, 溶液中剩余的 MAb 的比例。

[0047] 图 8 描述的图证明了结合 pH 对硝基红沉淀的 MAb 的洗脱回收的影响。在更高的 pH 下结合导致更好的洗脱回收。x 轴描述了样品和溶液的测试环境。MAb 被称为“Mab04”; 上清液被称为“Sup”; 洗脱液被称为“Elu”, 数字 3.9、4.45、和 4.9 指硝基红结合和沉淀 MAb 的溶液 pH。y 轴指在沉淀后 (即在 Sup 中) 或在洗脱后 (即在 Elu 中), 溶液中剩余的 MAb 的百分数 (%)。

[0048] 图 9 描述了弱阳离子交换色谱, 用于评价给料中 (标注为纯 IgG 的轨迹) 和洗脱样品形式苋菜红染料分子处理的给料中 (标注为苋菜红洗脱 1 和 2) 的电荷变量。x 轴指时间 (分钟), y 轴指给料和洗脱样品在 280nm 下的吸光度。苋菜红 1 和 2 是重复试验的洗脱样品。该实验用于显示用苋菜红染料分子的沉淀过程的可重复性。

[0049] 图 10 描述的图证明了剪切对用叶酸形成的沉淀物的平均粒径的影响。x 轴指通过改变中空纤维装置内侧的流速产生的剪切速率 (Sec^{-1}), y 轴指沉淀物的平均粒径 (微米), 由 Malvern 仪器测量。三角、方块和菱形符号分别指溶液 pH4、5 和 5.5, 其中硝基红结合和沉淀 MAb。颗粒在更低的 pH 下表现为更紧密和对剪切更有抗性。

[0050] 图 11a 说明了用于在完全再循环模型中操作的中空纤维 TFF 系统的 Flux 对 TMP 测量的装置。使用的给料是通过在 pH4.5 下以 1:1 的质量比混合叶酸和澄清给料产生的, 以形成沉淀物。使用泵将沉淀物递送到中空纤维装置中。

[0051] 图 11b 描述了使用 0.2 μm 膜在 3 种不同的剪切速率和 0.85g/L MAb 浓度下的叶酸-MAb 沉淀物的通量对 TMP 曲线。进行该实验以测定操作 TFF 系统的最佳条件。x 轴指使用的通量 (LMH), y 轴指测量的跨膜压力 (Psi)。实心的三角、菱形和方形符号分别指 850、1700 和 3400 Sec^{-1} 的剪切速率。空心符号指系统是稳态的直到该点, 超过该点, 可以观察到 TMP 随时间而增加, 表明膜污染。从 Flux 对 TMP 曲线可以推出, 最佳剪切和流动速率分别为 1700 S^{-1} 和 190LMH。

[0052] 图 11c 描述的图代表使用 0.2 μm 膜在 3 种不同的剪切速率和 0.85g/LMAb 浓度下的叶酸-MAb 沉淀物的单程浓缩因子对通量的关系。进行该实验以测定在最佳操作条件下可以达到的最大浓缩因子。x 轴指使用的通量 (LMH), y 轴指浓缩因子。实心的三角、菱形和方形符号分别指 850、1700 和 3400 Sec^{-1} 的剪切速率。空心符号指系统是稳态的直到该点, 超过该点, 可以观察到 TMP 随时间而增加, 表明膜污染。从通量对 CF 曲线可以推出, 最佳剪切和流动速率分别为 1700 S^{-1} 和 190LMH, 最大浓缩因子为 2.5X。

[0053] 图 12a 描述的图代表使用 0.2 μm 膜在 3 种不同的剪切速率和 4.3g/LMAb 浓度下的叶酸-MAb 沉淀物的通量对 TMP 曲线。进行该实验以测定操作具有更高的沉淀物起始量

的 TFF 系统的最佳条件。x 轴指使用的通量(LMH), y 轴指测量的跨膜压力(Psi)。实心的三角、菱形和方块符号分别指 850、1700 和 3400Sec⁻¹ 的剪切速率。空心符号指系统是稳态的直到该点,超过该点,可以观察到 TMP 随时间而增加,表明膜污染。从通量对 TMP 曲线可以推出,最佳剪切和流动速率分别为 1700S⁻¹ 和 170LMH。

[0054] 图 12b 描述的图代表使用 0.2 μm 膜在 3 种不同的剪切速率和 4.3g/LMAb 浓度下的叶酸-MAb 沉淀物的单程浓缩因子对通量的关系。进行该实验以测定在最佳操作条件下可以达到的最大浓缩因子。x 轴指使用的通量(LMH), y 轴指浓缩因子。实心的三角、菱形和方形符号分别指 850、1700 和 3400Sec⁻¹ 的剪切速率。空心符号指系统是稳态的直到该点,超过该点,可以观察到 TMP 随时间而增加,表明膜污染。从通量对 CF 曲线可以推出,在最佳剪切和流动速率分别为 1700S⁻¹ 和 170LMH 下,最大浓缩因子为 2.2X。

[0055] 图 13 说明了用于连续浓缩和用中空纤维模块洗涤固体的装置。结合步骤包括两个阶段(即,两个中空纤维模块),其中将沉淀物浓缩至~4x,而洗涤步骤包括三个阶段(即,三个中空纤维模块),其中以逆流模式洗涤浓缩的沉淀物。

具体实施方式

[0056] 本发明至少部分基于,在纯化感兴趣的生物分子的过程中使用特定类型的小分子的发现,其中所述过程去除了一个或多个步骤,从而减少了总体操作成本和时间。

[0057] 而且,本发明提供使用小分子的方法,所述小分子是现成的,并且如果其以治疗分子结束,那么相对于在本领域内的类似方式中使用的其他试剂,其毒性较低。另外,在此描述的方法中所用的小分子使高密度给料的加工成为可能,并且是可处理的。

[0058] 为了使本公开可以更易于理解,首先定义一些术语。贯穿详细说明,列出了其他定义。

[0059] I. 定义

[0060] 在此使用的术语“小分子”,指低分子量化合物,不是聚合物。术语包含分子量小于约 10000 道尔顿,或小于约 9000 道尔顿,或小于约 8000 道尔顿,或小于约 7000 道尔顿,或小于约 6000 道尔顿,或小于约 5000 道尔顿,或小于约 4000 道尔顿,或小于约 3000 道尔顿,或小于约 2000 道尔顿,或小于约 1000 道尔顿,或小于约 900 道尔顿,或小于约 800 道尔顿的分子。小分子包括,但不限于,有机的、无机的、合成的或天然的化合物。在各种在此描述的实施方案中,小分子用于一种或者多种杂质的沉淀(即,澄清),或用于目标生物分子的沉淀(即,捕获)。在一些实施方案中,在本发明的方法中使用的小分子用于结合和沉淀杂质(例如,不溶性杂质)。所述小分子通常是非极性和阳离子的。在其他实施方案中,在本发明的方法中使用的小分子用于结合和沉淀目标生物分子(例如,蛋白质产品)。所述小分子通常是非极性和阴离子的。

[0061] 在此可替换使用的术语“疏水的”或“非极性”,指化合物或化学基团或实体几乎没有或没有对水的亲和性。在一些实施方案中,本发明使用天然非极性或疏水的小分子。在一些实施方案中,非极性化学基团或实体是芳香性的。在其他实施方案中,非极性化学基团或实体是脂肪族的。

[0062] 在此使用的术语“阴离子的”指含有净负电荷的化合物或化学基团或实体。

[0063] 在此使用的术语“阳离子的”指含有净正电荷的化合物或化学基团或实体。

[0064] 在此使用的术语“芳香性的”指化合物或分子中的化学基团或实体中分子的至少一部分含有单键和多重键的共轭系统。

[0065] 在此使用的术语“脂肪族的”指化合物或分子中的化学基团或实体中分子的至少一部分含有无环结构或环状非芳香性结构。

[0066] 在此可替换使用的术语“目标生物分子”、“目标蛋白质”、“感兴趣的蛋白质”、或“感兴趣的产品”，通常指感兴趣的多肽或产品，期望从一个或多个不期望的实体中将所述多肽或产品纯化或分离，该不期望的实体例如为一种或多种可溶和 / 或不可溶杂质，其可以存在于含有多肽或感兴趣的产品的样品中。在此可替换使用的术语“目标生物分子”、“感兴趣的蛋白质”、“期望的产品”以及“目标蛋白质”通常指治疗蛋白或多肽，包括但不限于，待使用在此描述的方法纯化的抗体。

[0067] 在此可以替换使用的术语“多肽”或“蛋白质”，通常指具有超过约十个氨基酸的肽和蛋白质。在一些实施方案中，在此描述的小分子用于将蛋白质或多肽与一种或多种存在于样品中的不期望的实体分离。在一些实施方案中，所述一种或多种实体是一种或多种可以与要纯化的蛋白质或多肽一起存在于样品中的杂质。如上所讨论的，在根据在此描述的方法的一些实施方案中，使用包含至少一个非极性基团和至少一个阴离子基团的小分子沉淀在包含目标生物分子的样品中的一种或多种杂质(例如，不溶性杂质)。在一些实施方案中，不溶性杂质是全细胞。

[0068] 在根据在此描述的方法的其他实施方案中，包含至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团的小分子用于从包含目标生物分子和一种或多种杂质(例如，可溶性杂质)的样品中沉淀目标生物分子。杂质(可溶和不可溶的)的实例包括，例如，宿主细胞蛋白、内毒素、DNA、病毒、全细胞、细胞碎片和细胞培养添加剂等。

[0069] 在一些实施方案中，用在此描述的方法纯化的蛋白质或多肽是哺乳类蛋白质，例如，治疗蛋白或可以用于治疗的蛋白。示例性蛋白质包括，但不限于，例如，肾素；生长激素，包括人类生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；促甲状腺素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰岛素 A-链；胰岛素 B-链；胰岛素原；促卵泡激素；降血钙素；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、和血浆血管性血友病因子；抗凝血因子，如蛋白质 C；心房利钠因子；肺表面活性剂；纤溶酶原激活剂，如尿激酶或人尿或组织类型纤溶酶原激活剂(t-PA)；蛙皮素；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子- α 和 - β ；脑啡肽酶；RANTES(调节激活正常 T 细胞表达和分泌)；人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白，如人血清白蛋白；缪勒管激素(Muellerian)抑制物质；松弛素 A-链；松弛素 B-链；松弛素原；小鼠促性腺素相关肽；微生物蛋白，如 β -内酰胺酶；脱氧核糖核酸酶；免疫球蛋白 E；细胞毒素 T-淋巴细胞相关抗原(CTLA)，如 CTLA-4；抑制素；激活素；血管内皮生长因子(VEGF)；荷尔蒙或生长因子受体；蛋白质 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 ；血小板源生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子，如 α -FGF 和 β -FGF；表皮生长因子(EGF)；转移生长因子(TGF)，如 TGF- α 和 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、或 TGF- β 5；类胰岛素生长因子 -I 和 -II(IGF-I 和 IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I)，类胰岛素生长因子结合蛋白质(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；抗毒素；骨形态生成蛋

白 (BMP) ;干扰素,如干扰素- α 、 β 、和 γ ;菌落刺激因子 (CSF),例如,M-CSF、GM-CSF、和 G-CSF ;白介素 (IL),例如,IL-1 至 IL-10 ;超氧化物歧化酶 ;T 细胞受体 ;表面膜蛋白 ;衰变加速因子 ;病毒抗体,如 AIDS 包膜蛋白 ;转运蛋白 ;归巢受体 ;地址素 ;调节蛋白 ;整合素,如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、和 ICAM、VLA-4 以及 VCAM ;肿瘤相关抗原,如 HER2、HER3 或 HER4 受体 ;以及任何上述所列的多肽的片段和 / 或变体。

[0070] 另外,在一些实施方案中,使用在此描述的方法纯化的蛋白质或多肽是抗体、功能性片段或其变体。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质是含有免疫球蛋白的 Fc 区域的重组蛋白。

[0071] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或“IgG”或“抗体”(在此可替换使用)指一种蛋白质,其具有碱性四肽链结构,由两个重链和两个轻链构成,所述链例如通过链间的二硫键稳定,其具有特异结合抗原的能力。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在此可替换使用)指一种蛋白质,其具有二肽链结构,由一个重链和一个轻链构成,所述链例如通过链间的肽键稳定,其具有特异结合抗原的能力。术语“结构域”指包含肽循环(peptide loop)的重链或轻链多肽(例如包含 3-4 个肽循环)的球状区域,其例如通过 β -折叠片和 / 或链内二硫键稳定。结构域在此还被称为“恒定的”或“可变的”,这基于在“恒定的”结构域情况下,各种类型成分的结构域中的序列变异性的相对缺乏,以及在“可变的”结构域情况下,各种类型成分的结构域中的显著变异。抗体或多肽“结构域”通常在本领域中可以替换地指抗体或多肽“区域”。抗体轻链的“恒定”结构域可替换地指“轻链恒定区域”、“轻链恒定结构域”、“CL”区域或“CL”结构域。抗体重链的“恒定”结构域可替换地指“重链恒定区域”、“重链恒定结构域”、“CH”区域或“CH”结构域。抗体轻链的“可变”结构域可替换地指“轻链可变区域”、“轻链可变结构域”、“VL”区域或“VL”结构域。抗体重链的“可变”结构域可替换地指“重链可变区域”、“重链可变结构域”、“VH”区域或“VH”结构域。

[0072] 免疫球蛋白或抗体可以是单克隆(被称为“MAb”)或多克隆的,可以以单体或聚合形式存在,例如,以五聚物形式存在的 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(例如,双特异性抗体),和抗体片段,只要其保留,或被修改以包含配体特异性结合结构域。术语“片段”指一部分抗体或抗体链,其包含比完整抗体或抗体链更少的氨基酸残基。片段可以通过完整抗体或抗体链的化学或酶处理得到。片段还可以通过重组方式得到。当重组生产时,片段可以单独表达,或作为被称为融合蛋白的更大蛋白的一部分表达。示例性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc 和 / 或 Fv 片段。示例性融合蛋白包括 Fc 融合蛋白。

[0073] 通常,免疫球蛋白或抗体指向感兴趣的“抗原”。优选地,抗原是生物学上重要的多肽,对遭受疾病或失调的哺乳动物的抗体给药可以对该哺乳动物产生治疗利益。然而,抗体指向非多肽抗原(如肿瘤相关糖脂类抗原,参见 U. S. 专利 5,091,178)也是需要关注的。如果抗原是多肽,其可以是跨膜分子(例如受体)或配体如生长因子。

[0074] 在此使用的术语“单克隆抗体”或“MAb”指从基本上单一性的抗体的种群中得到的抗体,即,包含种群的个体抗体是完全相同的,除了可少量存在的可能天然发生的突变。单克隆抗体具有高度特异性,指向单一抗原位置。而且,与传统的典型包括指向不同决定簇(表位)的不同抗体的(多克隆)抗体制剂相反,每个单克隆抗体指向抗原上的单独的决定簇。修饰语“单克隆的”表示从基本上单一性的抗体的种群中得到的抗体特征,不被解释为

需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler 等人在 Nature256:495(1975) 上首次描述的杂种细胞法制成,或可以通过重组 DNA 法(参见,例如, U. S. 专利号 4, 816, 567) 制成。“单克隆抗体”还可以使用例如 Clackson 等人在 Nature352:624-628(1991) 中,以及 Marks 等人在 J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 中描述的技术,从噬菌体抗体中分离。

[0075] 单克隆抗体还可包括“嵌合体”抗体(免疫球蛋白类),其中一部份重链和 / 或轻链与抗体中的序列一致或同源,所述抗体源自特别的物种或属于特别的抗体类或亚类,同时剩余的链与源自另一个物种或属于另一个抗体类或亚类的抗体,以及所述抗体的片段中的序列一致或同源,只要其显示期望的生物活性(U. S. 专利号 4, 816, 567 ;以及 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855(1984))。

[0076] 在此使用的术语“高变区”指承担抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包含源自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,轻链可变域中的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3),以及重链可变域中的 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. (1991)), 和 / 或源自“高变循环”的那些残基(即,轻链可变域中的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3), 以及重链可变域中的 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3) ;Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。“框架”或“FR”残基是除了在此定义的高变区残基外的其他那些可变域残基。

[0077] 非人类(例如鼠科)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有最低的源自非人类免疫球蛋白的序列。对于绝大部分,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的高变区残基被非人类物种的高变区残基(供体抗体)代替,如小鼠、大鼠、兔或具有期望的特异性、亲和力、和能力的非人类灵长动物。在一些情况中,人类免疫球蛋白的 Fv 框架区域(FR)残基被相应的非人类残基代替。而且,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行该修饰以进一步确定抗体性能。通常,人源化抗体将基本上包含至少一种,典型地为两种可变域,其中所有或基本上所有的高变循环对应于非人类免疫球蛋白的那些,而所有或基本上所有的 FR 区域是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还包含至少一部份免疫球蛋白恒定区域(Fc),典型地是人类免疫球蛋白的那些。进一步详细说明参见 Jones 等人, Nature321:522-525(1986) ;Riechmann 等人, Nature332:323-329(1988), 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0078] 在一些实施方案中,使用在此描述的小分子分离或纯化的抗体是治疗抗体。示例性治疗抗体包括,例如,曲妥单抗 (HERCEPTIN[™], Genentech, Inc., Carter 等人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289; U. S. Pat. No. 5, 725, 856) ; 抗 CD20 抗体, 如嵌合体抗 CD20 “C2B8” U. S. Pat. No. 5, 736, 137) ; 利妥昔单抗 (RITUXAN[™])、ocrelizumab、2H7 抗体的嵌合体或人源化变体 (U. S. Pat. No. 5, 721, 108; W004/056312) 或托斯莫单抗 (BEXXAR. [™]) ; 抗 IL-8 (St John 等人 (1993) Chest, 103:932, 和 W095/23865) ; 抗 VEGF 抗体, 包括人源化和 / 或亲和力成熟的抗 VEGF 抗体, 如人源化抗 VEGF 抗体 huA4. 6. 1 贝伐单抗 (AVASTIN[™], Genentech, Inc., Kim 等人 (1992) Growth Factors7:53-64, W096/300 46, W098/45331) ; 抗 PSCA 抗体 (W001/40309) ; 抗 CD40 抗体, 包括 S2C6 和其人源化变

体 (W000/75348); 抗 CD11a (U. S. Pat. No. 5, 622, 700; W098/23761; Steppe 等人 (1991) *Transplant Intl.* 4:3-7; Hourmant 等人 (1994) *Transplantation* 58:377-380); 抗 IgE (Presta 等人 (1993) *J. Immunol.* 151:2623-2632; W095/19181); 抗 CD18 (U. S. Pat. No. 5, 622, 700; W097/26912); 抗 IgE, 包括 E25、E26 和 E27 (U. S. Pat. No. 5, 714, 338; U. S. Pat. No. 5, 091, 313; W093/04173; U. S. Pat. No. 5, 714, 338); 抗 Apo-2 受体抗体 (W098/51793); 抗 TNF- α 抗体, 包括 cA2 (REMICADE™)、CDP571 和 MAK-195 (U. S. Pat. No. 5, 672, 347; Lorenz 等人 (1996) *J. Immunol.* 156(4):1646-1653; Dhainaut 等人 (1995) *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469); 抗组织因子 (TF) (EP0420937B1); 抗人类 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素 (W098/06248); 抗 EGFR, 嵌合的或人源化的 225 抗体 (W096/40210); 抗 CD3 抗体, 如 OKT3 (U. S. Pat. No. 4, 515, 893); 抗 CD25 或抗 tac 抗体, 如 CHI-621SIMULECT™ 和 ZENAPAX™ (U. S. Pat. No. 5, 693, 762); 抗 CD4 抗体, 如 cM-7412 抗体 (Choy 等人 (1996) *Arthritis Rheum* 39(1):52-56); 抗 CD52 抗体, 如 CAMPATH-1H (Riechmann 等人 (1988) *Nature* 332:323-337); 抗 Fc 受体抗体, 如指向 Fc γ RI 的 M22 抗体, 如在 Graziano 等人 (1995) *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 中; 抗癌胚抗原 (CEA) 抗体, 如 hMN-14 (Sharkey 等人 (1995) *Cancer Res.* 55(23Suppl):5935s-5945s; 指向乳房上皮细胞的抗体, 包括 huBrE-3、hu-Mc3 和 CHL6 (Ceriani 等人 (1995) *Cancer Res.* 55(23):5852s-5856s; 和 Richman 等人 (1995) *Cancer Res.* 55(23Suppl):5916s-5920s); 与克隆结肠癌细胞结合的抗体, 如 C242 (Litton 等人 (1996) *Eur. J. Immunol.* 26(1):1-9); 抗 CD38 抗体, 等。AT13/5 (Ellis 等人 (1995) *J. Immunol.* 155(2):925-937); 抗 CD33 抗体, 如 Hu M195 (Jurcic 等人 (1995) *Cancer Res.* 55(23Suppl):5908s-5910s 和 CMA-676 或 CDP771); 抗 CD22 抗体, 如 LL2 或 LymphoCide (Juweid 等人 (1995) *Cancer Res.* 55(23Suppl):5899s-5907s); 抗 EpCAM 抗体, 如 17-1A (PANOREX™); 抗 GpIIb/IIIa 抗体, 如阿昔单抗或 c7E3Fab (REOPRO™); 抗 RSV 抗体, 如 MEDI-493 (SYNAGIS™); 抗 CMV 抗体, 如 PROTOVIR™; 抗 HIV 抗体, 如 PRO542; 抗肝炎抗体, 如抗 Hep B 抗体 OSTAVIR™; 抗 CA125 抗体 OvaRex; 抗个体基因型 GD3 表位抗体 BEC2; 抗 $\alpha v \beta 3$ 抗体 VITAXIN™; 抗人类肾细胞癌抗体, 如 ch-G250; ING-1; 抗人类 17-1A 抗体 (3622W94); 抗人类大肠肿瘤抗体 (A33); 指向 GD3 神经节苷脂的抗人类黑色素瘤抗体 R24; 抗人类鳞状细胞癌 (SF-25); 和抗人类白血球抗原 (HLA) 抗体, 如 Smart ID10 和抗 HLA DR 抗体 Oncolym (Lym-1)。

[0079] 在此可以替换使用的术语“污染物”、“杂质”、和“碎片”指任何异质的或不良的材料, 包括生物大分子, 如 DNA、RNA、一种或多种宿主细胞蛋白 (HCP 或 CHOP)、全细胞、细胞碎片和细胞片段、内毒素、病毒、脂质和一种或多种添加剂, 其可以存在于含有感兴趣的蛋白质或多肽 (例如, 抗体) 的样品中, 所述感兴趣的蛋白质或多肽使用在此描述的非极性带电荷小分子与一种或多种异质的或不良的分子分离。

[0080] 在根据在此描述的方法的一些实施方案中, 包含至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团的小分子与感兴趣的蛋白质一起存在于样品中的不溶性杂质 (例如全细胞) 结合并使其沉淀, 从而将感兴趣的蛋白质与所述杂质分离。在根据在此描述的方法的其他实施方案中, 包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子与感兴趣的蛋白质结合并使其沉淀, 从而将其与一种或多种杂质 (例如, 可溶性杂质) 分离。

[0081] 在此使用的术语“不溶性杂质”指存在于含有目标生物分子的样品中的任何不期

望或不良的实体,其中所述实体是悬浮颗粒或固体。示例性不溶性杂质包括全细胞、细胞片段和细胞碎片。

[0082] 在此使用的术语“可溶性杂质”指存在于含有目标生物分子的样品中的任何不期望或不良的实体,其中所述实体不是不可溶解的杂质。示例性可溶性杂质包括宿主细胞蛋白、DNA、RNA、病毒、内毒素、细胞培养介质组分、脂类等。

[0083] 在此使用的术语“组合物”、“溶液”或“样品”指目标生物分子或要纯化的感兴趣的产品与一种或多种不期望的实体或杂质的混合物。在一些实施方案中,样品包含含有生物材料的流,例如给料或细胞培养介质,目标生物分子或期望的产品分泌到其中。在一些实施方案中,样品包含目标生物分子(例如,治疗蛋白或抗体)与一种或多种可溶性和/或不溶性杂质(例如,宿主细胞蛋白、DNA、RNA、脂类、细胞培养添加剂、内毒素、全细胞和细胞碎片)。在一些实施方案中,样品包含目标生物分子,所述目标生物分子分泌到细胞培养介质中。通过沉淀一种或多种杂质,或者通过沉淀目标分子,可以将目标生物分子与一种或多种不期望的实体或杂质分离。

[0084] 在一些实施方案中,根据本发明的小分子与目标生物分子或产品(例如,目标蛋白质或多肽)结合,其中小分子包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团。该过程可以称为“捕获”。包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的示例性小分子包括,但不限于,蝶呤衍生物(例如叶酸、蝶呤)、利尿酸、非诺贝酸、甲灭酸、霉酚酸、氨甲环酸、唑来膦酸、乙酰水杨酸、对氨基苯磺酸、头孢噻吩、甲氯灭酸、ibuprofene、萘普生、梭链孢酸、萘啶酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、噻洛芬酸、尼氟灭酸、反式-2-羟基肉桂酸、3-苯基丙酸、丙磺舒、氯拉卓酸、二十碳五烯酸、4-乙酰氨基苯甲酸、酮洛芬、维甲酸、腺苷酸基琥珀酸、萘-2,6-二磺酸、他米巴罗汀、etodolacetodolic acid、和苄基青霉素酸。

[0085] 包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的其他示例性小分子包括,但不限于,染料分子,例如苋菜红和硝基红。

[0086] 在其他实施方案中,将感兴趣的生物分子与一种或多种杂质分离的方法使用的小分子与所述一种或多种杂质(例如,不溶性杂质)结合。该方法可以称为“澄清”。在一些实施方案中,所述小分子包括至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团。可用于澄清的示例性小分子包括,但不限于,单烷基三甲基铵盐(非限制性实例包括十六烷基三甲基溴化铵或氯化铵、十四烷基三甲基溴化铵或氯化铵、烷基三甲基氯化铵、烷基芳基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵或氯化铵、十二烷基二甲基-2-苯氧乙基溴化铵、十六烷基胺氯化物或溴化物、十二烷基胺或氯化物、和十六烷基二甲基乙基溴化铵或氯化铵)、单烷基二甲基苄基铵盐(非限制性实例包括烷基二甲基苄基氯化铵和苄索氯铵)、二烷基二甲基铵盐(非限制性实例包括溴化度米芬、二(十二烷基)二甲基卤化铵(溴化物或氯化物盐)、和辛基十二烷基二甲基氯化铵或溴化铵)、杂芳基铵盐(非限制性实例包括十六烷基吡啶卤化物(卤化物或溴化物盐)和十六烷基吡啶溴化物或氯化物、顺式异构体1-[3-氯丙烯基]-3,5,7-三氮杂-1-氮鎓金刚烷、烷基异喹啉溴化物、和烷基二甲基萘基甲基氯化铵)、多取代季铵盐、(非限制性实例包括烷基二甲基苄基糖精铵和烷基二甲基乙基苄基铵环己基氨基磺酸盐)、以及双季铵盐(非限制性实例包括1,10-双(2-甲基-4-氨基喹啉氯化物)-癸烷、1,6-双{1-甲基-3-(2,2,6-三甲基环己基)-丙基二甲基氯化铵}己烷或曲比氯铵、和产自Buckman Brochures的被称为CDQ的双季铵盐)。

[0087] 在此使用的术语“沉淀物”、“沉淀”指结合(例如,与感兴趣的生物分子的复合物)或未结合小分子从水性和/或可溶性状态变到非水性和/或不溶性状态。沉淀物也被称为固体或固相。

[0088] 在此可替换使用的术语“中国仓鼠卵巢细胞蛋白”和“CHOP”指源自中国仓鼠卵巢(“CHO”)细胞培养基的宿主细胞蛋白(“HCP”)混合物。HCP或CHOP通常作为可溶性杂质存在于细胞培养介质或溶菌产物中(例如,含有感兴趣的蛋白质或多肽(例如在CHO细胞中表达的抗体或免疫粘附素)的收获的细胞培养流体)。通常,存在于包含感兴趣的蛋白质的混合物中的CHOP的量提供了对感兴趣的蛋白质的纯度的量度。典型地,相对于在混合物中的感兴趣的蛋白质的量,在蛋白质混合物中的CHOP的量以ppm表示。

[0089] 要理解的是,在宿主细胞是另一种哺乳动物细胞类型、大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、或植物细胞的情况下,HCP指在宿主细胞的溶菌产物中发现的蛋白质,而不是目标蛋白质。

[0090] 在此使用的术语“细胞培养添加剂”指一种分子(例如,非蛋白质添加剂),其被添加到细胞培养过程中,以促进或改善细胞培养或发酵过程。在根据本发明的一些实施方案中,在此所述的小分子与一种或多种细胞培养添加剂结合并使其沉淀。示例性细胞培养添加剂包括消泡剂、抗生素、染料和营养素。

[0091] 在此可替换使用的术语“份每百万”或“ppm”指使用在此所述的小分子纯化的期望的目标分子(例如,目标蛋白质或抗体)的纯度的量度。因此,该量度可以用于测量在纯化过程后存在的目标分子的量,或者用于测量不期望的实体的量。

[0092] 在使用在此描述的小分子从包含目标生物分子和一种或多种杂质的组合物或样品中纯化目标生物分子(如感兴趣的多肽或蛋白质)的上下文中,术语“纯化”和“分离”在此可替换使用。在一些实施方案中,目标生物分子在样品中的纯度通过使用在此描述的包含至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团的小分子从样品中(完全或部分)去除一种或多种不溶性杂质(例如全细胞和细胞碎片)而提升。在另一个实施方案中,目标生物分子在样品中的纯度通过从样品中的一种或多种可溶性杂质中沉淀出目标生物分子而提升,例如通过使用包含阴离子基团和非极性基团的小分子。

[0093] 在一些实施方案中,纯化过程另外使用一个或多个“色谱步骤”。典型地,如果必要,在使用在此描述的小分子将目标生物分子与一种或多种不期望的实体分离之后,可进行这些步骤。

[0094] 在一些实施方案中,使用在此描述的小分子分离或纯化感兴趣的多肽或蛋白质的“纯化步骤”,可以是得到“均一”或“纯”组合物或样品的全部纯化方法的一部分,术语“均一”或“纯”组合物或样品在此用于指在包含感兴趣的蛋白质的组合物中包含低于100ppm HCP,或者低于90ppm,低于80ppm,低于70ppm,低于60ppm,低于50ppm,低于40ppm,低于30ppm,低于20ppm,低于10ppm,低于5ppm,或低于3ppm的HCP的组合物或样品。

[0095] 在此使用的术语“澄清”或“澄清步骤”通常指在生物分子的纯化中的一个或多个起始步骤。澄清步骤通常包括使用一个或多个步骤去除全细胞和/或细胞碎片,所述一个或多个步骤包括以下任何一种或各种组合:例如,离心和深层过滤、沉降、絮凝和沉淀。澄清步骤通常涉及去除一种或多种不期望的实体,并且通常是在涉及捕获期望的目标分子的步骤之前进行。澄清的另一个关键方面是去除样品中的可能导致纯化过程中的无菌过滤器污

染的不溶性组分,从而使整个纯化过程更经济。在一些实施方案中,本发明提供对通常使用例如深层过滤和离心的传统澄清的改进(例如,对下游使用的过滤器面积的需求更少)。

[0096] 在此使用的术语“色谱法”指从存在于混合物中的其他分子中分离感兴趣的分析物(例如目标生物分子)的任何类型的技术。通常,感兴趣的分析物与其他分子分离是混合物的单个分子在流动相的影响下穿过固定介质迁移的速率的差别的结果,或者在接合和洗脱过程中的差别的结果。

[0097] 术语“色谱树脂”或“色谱介质”在此可以替换使用,指将感兴趣的分析物(例如目标生物分子)与存在于混合物中的其他分子分离的任何类型的相(例如固相)。通常,感兴趣的分析物与其他分子分离是混合物的单个分子在流动相的影响下穿过固体固定相迁移的速率的差别的结果,或者在接合和洗脱过程中的差别的结果。各种类型的色谱介质的实例包括,例如,阳离子交换树脂、亲和树脂、阴离子交换树脂、阴离子交换薄膜、疏水作用树脂和离子交换整体柱。

[0098] 在此使用的术语“捕获步骤”或“捕获”通常指在适合沉淀目标生物分子的前提下,用于以一定量将目标生物分子与小分子结合的方法。典型地,目标分子随后通过将沉淀物复原到适合的缓冲剂中来回收。在根据在此描述的方法的一些实施方案中,使用包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子捕获目标生物分子,所述非极性基团可以是芳香或脂肪族的。

[0099] 在此可替换使用的术语“过程步骤”或“单元操作”指使用一个或多个方法或者装置以达成纯化步骤中的特定结果。纯化过程中的一个或多个过程步骤或单元操作可以使用一个或多个本发明的小分子。可以用于在此描述的过程中的过程步骤或单元操作的实例包括,但不限于,澄清、结合和洗脱色谱法、病毒灭活、流通纯化和配制。在一些实施方案中,一个或多个用于实施过程步骤或单元操作的装置是一次性装置,可以去除和/或替换而无须在过程中替换任何其他装置,或甚至无须停止过程运行。在一些实施方案中,在纯化过程的澄清步骤期间,使用一种或多种小分子去除一种或多种杂质。

[0100] 在此使用的术语“缓冲槽”指任何容器或袋,其用于过程步骤之间或用于一个过程步骤中(例如,当一个过程步骤包含超过一个步骤时);其中,一个步骤的输出物流进缓冲槽,并继续到下一个步骤。因此,缓冲槽不同于水池槽,因为其不用于容纳或收集来自于一个步骤的全部输出物;而是可以使一个步骤的输出物能够连续流到下一个步骤,因为液体可以泵入或泵出缓冲槽。在一些实施方案中,在此描述的过程或系统中,在两个过程步骤之间或在一个过程步骤中使用的缓冲槽的体积不大于一个过程步骤的输出物的全部体积的25%。在另一个实施方案中,缓冲槽的体积不大于一个过程步骤的输出物的全部体积的10%。在一些其他实施方案中,缓冲槽的体积小于生物反应器中的细胞培养基的全部体积的35%,或小于30%,或小于25%,或小于20%,或小于15%,或小于10%,所述细胞培养基构成要纯化目标分子的起始材料。

[0101] 在此使用的术语“连续过程”指用于纯化目标分子的过程,其包括两个或多个过程步骤(或单元操作),以使在过程中,一个过程步骤的输出物直接流进下一个过程步骤,不会中断,并且其中两个或多个过程步骤可以同时至少一部分时间。换句话说,在连续过程的情况下,如在此所述,没必要在下一个过程步骤开始之前完成一个过程步骤,而是一部分样品总是通过过程步骤。术语“连续过程”还适用于一个过程步骤中的步骤,在该情况下,

在包括多个步骤的过程步骤进行期间,样品连续流过多个进行过程步骤所必须的步骤。在一些实施方案中,在此描述的分子用于以连续模式进行的纯化过程中,这样,一个步骤的输出物流进下一步骤而不会中断,其中两个步骤同时进行至少一部分时间。在一个特别的实施方案中,使用小分子进行澄清,如在此描述的,在该过程步骤后,含有目标分子的输出物直接流到下一步骤中(例如,亲和色谱步骤)。在一些实施方案中,离心或过滤可以在纯化后和亲和色谱前使用。

[0102] 术语“静态混合器”指用于混合两种流体材料,典型地为液体的装置。该装置通常由在圆柱形(管状)外壳中含有的混合器元件构成。总体系统设计融入了用于将两种流体流递送到静态混合器中的方法。随着液流通过混合器,非运动元件持续混合材料。完全的混合依赖许多变量,包括流体的性能、管的内径、混合器元件的数量和其设计等。在此描述的一些实施方案中,在整个纯化过程中都使用一个或多个静态混合器。在一个特别实施方案中,可以使用静态混合器将一个或多个小分子与样品给料流混合。因此,在一些实施方案中,以连续方式,例如使用静态混合器,将一个或多个小分子添加到样品给料流中。

[0103] II. 包含至少一个非极性基团和至少一个阴离子基团的示例性小分子

[0104] 在一些实施方案中,本发明涉及将样品中的目标生物分子与一种或多种不溶性杂质分离的方法,并使用包括至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团的小分子,该小分子与一种或多种杂质(例如,不溶性杂质)结合并使其沉淀,从而从目标生物分子与所述杂质分离。非极性基团可以是芳香族或脂肪族的。

[0105] 具有至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团的小分子的非限制性实例包括,但不限于,单烷基三甲基铵盐(例如,十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基氯化铵、烷基三甲基氯化铵、烷基芳基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基二甲基-2-苯氧乙基溴化铵、十六烷基胺氯化物、十六烷基胺溴化物、十二烷基胺、十二烷基氯化物、十六烷基二甲基乙基溴化铵和十六烷基二甲基乙基氯化铵),单烷基二甲基苄基铵盐(例如,烷基二甲基苄基氯化铵和苄索氯铵),二烷基二甲基铵盐(例如溴化度米芬、二癸基二甲基氯化铵、二癸基二甲基溴化铵、辛基十二烷基二甲基氯化铵和辛基十二烷基二甲基溴化铵),杂芳基铵盐(例如,鲸蜡基吡啶氯化物、鲸蜡基吡啶溴化物、十六烷基吡啶溴化物、十六烷基吡啶氯化物、1-[3-氯烯丙基]-3,5,7-三氮杂-1-氮鎓金刚烷的顺式异构体、烷基异喹啉溴化物、和烷基二甲基萘甲基氯化铵),多取代季铵盐(例如,烷基二甲基苄基糖精铵、和烷基二甲基乙基苄基铵环己基氨基磺酸盐)和双季铵盐(例如,1,10-双(2-甲基-4-氨基喹啉氯化物)-癸烷、1,6-双{1-甲基-3-(2,2,6-三甲基环己基)-丙基二甲基氯化铵}己烷或曲比氯铵、和 Buckman Brochures 的被称为 CDQ 的双季铵盐)。

[0106] 在一个特别实施方案中,包含非极性基团和阳离子基团的小分子是苄索氯铵(BZC)。

[0107] 在一些实施方案中,在纯化过程的澄清过程步骤期间使用该小分子。

[0108] III. 包含至少一个非极性基团和至少一个阴离子基团的示例性小分子

[0109] 在一些实施方案中,本发明涉及从包含目标分子以及一种或多种杂质(例如,可溶性杂质)的样品中纯化目标生物分子的方法,其中所述方法使用包括至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子。所述非极性基团可以是芳香族或脂肪族的。在一些实施

方案中,小分子包含芳香族非极性基团。在其他实施方案中,小分子包括脂肪族非极性基团。

[0110] 包含至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的示例性小分子包括,但不限于,蝶呤衍生物(例如叶酸、蝶酸)、利尿酸、非诺贝酸、甲灭酸、霉酚酸、氨甲环酸、唑来膦酸、乙酰水杨酸、对氨基苯肿酸、头孢噻吩酸、甲氯灭酸、ibuprofine、萘普生、梭链孢酸、萘啶酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、噻洛芬酸、尼氟灭酸、反式-2-羟基肉桂酸、3-苯基丙酸、丙磺舒、氯拉卓酸、二十碳五烯酸、4-乙酰氨基苯甲酸、酮洛芬、维甲酸、腺苷酸基琥珀酸、萘-2,6-二磺酸、他米巴罗汀、etodolacetodolic acid、和苄基青霉素酸。

[0111] 在一个特别实施方案中,包括至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子是叶酸或其衍生物。

[0112] 本发明还包括特定的染料分子,其可以用于目标生物分子的结合和沉淀。实例包括,但不限于,苋菜红和硝基红。

[0113] IV. 使用小分子纯化蛋白质的方法

[0114] 在本发明涵盖的各种方法中,在蛋白质纯化过程的一个或多个阶段添加小分子,从而沉淀一种或多种杂质,或沉淀目标生物分子。

[0115] 一个所述示例性过程包括,将含有目标生物分子和一种或多种杂质的细胞培养给与适当量的包括至少一个非极性基团和至少一个阳离子基团的小分子(例如,0.4wt%的BZC)接触,从而沉淀一种或多种杂质(例如,不溶性杂质)。样品的固相(即,含有沉淀物)可以通过深层过滤或离心去除。而后,剩余的含有目标生物分子的样品可以经历随后的纯化步骤(例如,一个或多个色谱步骤)。

[0116] 在根据本发明的另一个示例性过程中,在蛋白质纯化过程的一个或多个步骤中添加小分子,其中所述小分子本身与目标生物分子结合并沉淀。该小分子包括至少一个非极性基团和至少一个阴离子基团。

[0117] 通常,细胞培养给料在与包括至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子接触之前,先经历澄清步骤。所述澄清步骤用于去除不溶性杂质。例如,在此描述的示例性方法中,将含有目标分子和一种或多种可溶性杂质的澄清的细胞培养给与适当量的包括阴离子基团和非极性基团的小分子接触(例如,1:1质量比的叶酸)。样品随后经历pH条件的改变,从而易于目标生物分子的沉淀(例如,使用醋酸改变pH至pH5.0)。随后用适当的缓冲剂(例如,0.1M精氨酸,pH5.0)洗涤含有目标生物分子的沉淀物,再然后用适当的缓冲剂(0.1M硫胺素,pH7.0)重新溶解目标生物分子。在具有重新溶解的目标生物分子的溶液中,任何残余量的小分子(例如,叶酸)随后可以使用适当的方式(例如,活性炭)去除。含有目标生物分子的溶液通常经历额外的磨光步骤,以回收显著纯的目标生物分子样品。

[0118] 在根据本发明的一些其他实施方案中,在同一蛋白质纯化过程的不同步骤中,使用不同类型的小分子(例如,结合一种或多种杂质的那些与结合目标生物分子的那些)。例如,包括至少一个阳离子基团和至少一个非极性基团的小分子(例如,BZC)可以在澄清步骤中使用,以去除一种或多种不溶性杂质,而同样的样品中的目标生物分子随后可以用包括至少一个阴离子基团和至少一个非极性基团的小分子(例如,叶酸)沉淀。

[0119] 如上所述,在含有目标生物分子的样品中残留量的小分子随后可以使用适当的材料例如活性炭去除。样品通常经历另外的色谱步骤或非色谱步骤,以达到期望的产品纯度

水平。

[0120] 在一些实施方案中,在此描述的一种或多种小分子用于以连续模式进行的纯化过程中。在该纯化过程中,可以使用若干步骤,包括,但不限于,例如,在生物反应器中培养表达蛋白的细胞;对细胞培养基进行澄清,这可以使用一种或多种在此描述的小分子,并任选使用深层过滤器;将澄清的细胞培养基转移到结合和洗脱色谱捕获步骤(例如,蛋白质 A 亲和色谱);使蛋白质 A 洗脱液经历病毒灭活(例如,使用一个或多个静态混合器和 / 或缓冲槽);使病毒灭活的输出物经历流通纯化过程,这使用两种或多种选自活性炭、阴离子交换色谱介质、阳离子交换色谱介质和病毒过滤介质的基质;以及用渗滤 / 浓缩和无菌过滤配制蛋白质。所述过程的其他细节可以在,例如,与此同时提交的参考号 P12/107 的共同未决申请中发现,其全部内容在此并入作为参考。

[0121] 本发明通过以下实施例进一步解释说明,所述实施例不应被解释为对本发明的限制。本申请至始至终引用的所有参考、专利和出版的专利申请,以及附图,在此并入作为参考。

[0122] 实施例

[0123] 实施例 1 :表达细胞培养基流体(CCF)的制备

[0124] 在一个代表性试验中,表达单克隆 IgG₁ 的源自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系的细胞在 10L 生物反应器(NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)中生长到 13×10^6 细胞 / 毫升的密度,并在 <50% 存活率下收获。通过蛋白质 AHPLC 在 0.85-1.8mg/mL 的范围内测定抗体滴度。使用 ELISA (CYGNUS#F550) 发现宿主细胞蛋白(HCP)的水平为 350000-425000ng/mL。未澄清的细胞培养基的 pH 为 pH7.2。

[0125] 实施例 2 :表达澄清的细胞培养基流体(CCF)的制备

[0126] 通过在 4000rpm 下离心 2min,随后通过 $5 \mu\text{m}$ 和 $0.2 \mu\text{m}$ Durapore® 过滤器过滤,使实施例 1 的给料澄清。

[0127] 实施例 3 :未表达的细胞培养基流体(CCF)的制备

[0128] 在另一个试验中,源自非 IgG 表达中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系的细胞在 10L 生物反应器(NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)中生长到 13×10^6 细胞 / 毫升的密度,并在 <50% 存活率下收获。使用 ELISA (CYGNUS#F550) 发现宿主细胞蛋白(HCP)的水平为 66000-177000ng/mL。未澄清的细胞培养基的 pH 为 pH7.2。

[0129] 实施例 4 :未表达澄清的细胞培养基流体(CCF)的制备

[0130] 通过在 4000rpm 下离心 2min,随后通过 $5 \mu\text{m}$ 和 $0.2 \mu\text{m}$ Durapore® 过滤器过滤,使实施例 3 的给料澄清。

[0131] 实施例 5 :澄清的具有 IgG 加标的细胞培养基流体(CCF)的制备

[0132] 使用 Prosep ultra plus(EMD Millipore) 蛋白质 A 树脂纯化的纯 IgG₁ 对实施例 4 的给料进行加标。使用蛋白质 A HPLC (Agilent Technologies) 测定的 IgG 的最终浓度为 $\sim 1\text{g/L}$ 。

[0133] 实施例 6 :苄索氯铵(BZC)溶液的制备

[0134] 通过在室温下连续搅拌 30min,将 100g 溶解在 1L 去离子水中,以制备 100g/L 苄索氯铵(BZC) ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich) 溶液。

[0135] 实施例 7 :十六烷基三甲基溴化铵溶液的制备

[0136] 通过将 40g 溶解在 1L 磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,制备 40g/L 十六烷基三甲基溴化铵 HTAB($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) 溶液。

[0137] 实施例 8 :四氟硼酸钠溶液的制备

[0138] 通过在室温下连续搅拌 30min,将 5g 溶解在 1L 去离子水中,以制备 5g/L 四氟硼酸钠(98%, Sigma-Aldrich) 溶液。

[0139] 实施例 9 :叶酸溶液的制备

[0140] 通过在室温下连续搅拌 60min,将 80g 溶解在 1L 的 0.4M 氢氧化钠中,制备 80g/L 的叶酸 FA($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich) 溶液。最终溶液的 pH 为约 8。而后通过 0.2 μm Durapore® 过滤器过滤溶液,以去除任何剩余的未溶解固体。溶液的颜色为深棕色。

[0141] 实施例 10 :苋菜红溶液的制备

[0142] 通过在室温下连续搅拌 30min,将 50g 溶解在 1L 的 20mM 的 pH4.5 的醋酸钠中,以制备 50g/L 的苋菜红($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) 溶液。最终溶液的 pH 为约 4.5。然后通过 0.2 μm Durapore® 过滤器过滤溶液,以去除任何剩余的未溶解固体。溶液的颜色为深红色。

[0143] 实施例 11 :硝基红溶液的制备

[0144] 通过在室温下连续搅拌 30min,将 50g 溶解在 1L 的 20mM 的 pH4.0 的醋酸钠中,以制备 50g/L 的硝基红(4-氨基-5-羟基-3-(4-硝基苯基偶氮)-2,7-萘二磺酸二钠盐($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)) 溶液。最终溶液的 pH 为约 4.0。而后通过 0.2 μm Durapore® 过滤器过滤溶液,去除任何剩余的未溶解固体。溶液的颜色为深红色。

[0145] 实施例 12 :产生检测溶液中的 BZC 的校正曲线

[0146] 在此描述的代表性试验中,使用浊度分析产生校正曲线,用于检测溶液中的 BZC 的量。

[0147] 通过用实施例 6 中描述的储备溶液开始进行系列稀释,制备在去离子水中的 750、500、250、100、和 50mg/L 的一系列 BZC 溶液。向 5ml 每个稀释的 BZC 溶液中,添加实施例 8 的溶液 5ml,在室温下连续搅拌 10min。搅拌时,溶液变得浑浊,这是由于 BZC 和四氟硼酸钠之间的络合。使用 2100p 浊度计(HACH Company, Colo, USA) 测量溶液的浊度,并用于产生校正曲线,如图 1 所示。

[0148] 该分析的检测限为 100mg/L BZC 溶液。使用校正曲线对 BZC 澄清给料中的 BZC 的残留量进行定量。

[0149] 实施例 13 :从溶液中去除 BZC

[0150] 在此描述的代表性试验中,特定材料(即,活性炭)显示了可用于从溶液中去除 BZC。这样的材料可用于去除含有目标生物分子的样品中的 BZC,随后用 BZC 沉淀不溶性杂质。

[0151] 通过将 0.25ml 实施例 6 的溶液与 4.75ml 去离子水混合制备的 5ml BZC 溶液(5mg/ml),与 0.05、0.1、0.15 和 0.2g 活性炭(NUCHER SA-20, Meadwestvaco, Covington, VA) 在室温下混合 10min。而后通过离心(4000rpm, 2min) 收集活性炭,上清液通过 5 和 0.2 μm Millex® 过滤器过滤,该过滤器购自 Millipore Corporation of Billerica, Mass.

使用实施例 12 概述的浊度分析,测定活性炭处理后在溶液中剩余的 BZC 的量。

[0152] 如图 2 所示,0.1g 活性炭足以将溶液中的 25mg BZC 减少到未检出水平(小于 100mg/L)。该信息随后用于评价适于从 BZC 澄清的细胞培养基介质中去除残留量的 BZC 的活性炭的量。

[0153] 实施例 14 :细胞培养介质的澄清以及随后使用 BZC 澄清 HCP

[0154] 在此描述的代表性试验中,使用 BZC 从含有感兴趣的目标生物分子的样品中去除不溶性杂质,所述感兴趣的目标生物分子是 IgG1 单克隆抗体(MAb)分子。在使用 BZC 澄清之后,如在此所述,可以使用活性炭从样品中去除残留量的 BZC。

[0155] 将 1.6ml 实施例 6 的 BZC 添加到 40ml 实施例 1 的未澄清给料中(1.8g/L IgG1),室温下混合 10 分钟,以结合并沉淀杂质。而后通过离心(4000rpm,1min)从沉淀中分离上清液。

[0156] 为了测定溶液中剩余的 BZC 的残留量,将 5ml 上清液样品与 5ml 四氟硼酸钠溶液(实施例 8)在室温下混合 10 分钟。在 2100p 浊度计(HACH Company, Colo, USA)上测量得到的浊度相当于 512mg/L 残留 BZC (使用实施例 12 的校正曲线)。

[0157] 通过添加 1.2g 活性炭(NUCHER SA-20, Meadwestvaco, Covington, VA)并在室温下连续搅拌 5min,从剩余的 36ml 上清液中去除溶液中残留的 BZC。添加的活性炭的量超过根据实施例 13 需要的量(即,0.072g 活性炭),以降低溶液中残留的 BZC 的浓度至低于检测限。由于介质组分也可与活性炭结合,活性炭必须过量添加,使得活性炭具有一些剩余的能力以结合溶液中残留的 BZC。而后通过离心(4000rpm,2min)收集活性炭,上清液通过 0.2 μ Durapore® 过滤器过滤。

[0158] 在这些条件下,回收~90%的起始流体中存在的 IgG,去除 94%的 HCP,溶液中残留的 BZC 低于检测限。

[0159] 实施例 15 :使用 BZC 澄清优化杂质清除

[0160] 在此描述的代表性试验中,测定了用于目标生物分子(即,单克隆抗体(MAb)分子)的最大回收以及最大杂质清除的 BZC 的最佳浓度。

[0161] 将 0.8、1.6、2.4ml 实施例 6 的 BZC 添加到 40ml 实施例 1 的未澄清给料中(1.8g/L IgG₁),室温下混合 10 分钟,以结合并沉淀杂质。而后通过离心(4000rpm,1min)收集沉淀,并通过添加 1.2g 活性炭(NUCHER SA-20, Meadwestvaco, Covington, VA),和在室温下连续搅拌 5min,以进一步纯化上清液以去除过量的残留 BZC。而后通过离心(4000rpm,2min)收集活性炭,上清液通过 5 和 0.2 μ Millex® 过滤器(购自 Millipore Corporation of Billerica, Mass)过滤。测定最佳 BZC 浓度为~4g/L (1.6ml 实施例 6 的 BZC),其达到~90%的 HCP 清除和~94%的 MAb 回收。

[0162] 如图 3 所示,可以使用~4g/L BZC 去除绝大多数杂质,而不影响 MAb 回收。

[0163] 实施例 16 :沉淀 MAb 所需叶酸的量的鉴别

[0164] 在此描述的代表性试验中,测定了有效 MAb 沉淀(90%或更多)所需的叶酸的量。

[0165] 4.75ml 实施例 2 的给料(1.1g/L IgG₁)与不同体积的实施例 9 的叶酸以及去离子水混合,如表 1 所述。用 3M 醋酸(Fisher Scientific)并在室温下连续混合 10min,调节溶液的 pH 至 4.5、5.0、5.5 和 6.0。当达到适当的叶酸对 MAb 比例时,分散的固体悬浮液形式的沉淀立即形成,这是叶酸与 MAb 络合的结果。而后通过离心(4000rpm,1min)收集沉淀

物,上清液通过 0.2 μ Durapore® 过滤器过滤。

[0166] 如图 4 所示,以 >90% 效率结合并沉淀 IgG₁ 所需叶酸的量随着溶液的 pH 上升而增加。

[0167] 表 1.

	叶酸 (ml)	去离子水
	0.0125	0.238
	0.0313	0.22
[0168]	0.0625	0.188
	0.094	0.156
	0.125	0.125
	0.188	0.063
	0.25	0

[0169] 实施例 17 :使用叶酸从澄清的细胞培养介质中捕获期望的 MAb 分子

[0170] 在此描述的代表性试验中,使用叶酸从澄清的 CHO 细胞培养基中捕获 MAb 分子。

[0171] 将 0.152ml 实施例 9 的叶酸和 0.098ml 去离子水添加到 4.75ml 实施例 2 的给料中(1.8g/L IgG₁)。使用 3M 醋酸并在室温下连续搅拌 10min,调节溶液的 pH 至 5.5。在添加酸后,分散的固体悬浮液的形式沉淀立即形成,这是叶酸与 MAb 络合的结果。而后通过离心(4000rpm,1min)收集沉淀物,并用 Fisher Scientific 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(25mM, pH6.0)洗涤,以去除松散结合的杂质。在 pH7.5 下,使用含有 0.5M NaCl 的 25mM 三羟甲基氨基甲烷缓冲液同时在室温下连续混合 10min 进行沉淀物的重新溶解和 IgG 的洗脱。通过添加沉淀叶酸的 50mM CaCl₂ (Fisher Scientific) 去除游离叶酸,而后用购自 Millipore Corporation of Billerica, Mass 的 5 和 0.2 μ m Millex® 过滤器过滤。而后在上清液流体中回收纯化的 MAb 分子。

[0172] 在这些条件下, >95% 的存在于原始流体中的 MAb 与叶酸结合,并且通过洗脱回收 88% 的 IgG。

[0173] 实施例 18 :含有叶酸捕获的 MAb 的溶液中的 HCP 水平

[0174] 在使用叶酸捕获 MAb 分子之后,如实施例 17 所述,测量含有 MAb 的样品中的 HCP 水平。使用 ELISA 化验装置(CYGNUS#F550)追踪产品(IgG)捕获过程的不同步骤中的宿主细胞蛋白(HCP)水平。HCP 的浓度从起始细胞培养流体中的 424306ng/ml 降至洗脱样品中的 146178ng/ml,从而证明 HCP 水平降低了 65%。

[0175] 实施例 19 :测定溶液中的叶酸浓度的校正曲线的产生

[0176] 在此描述的代表性试验中,产生校正曲线以随后对溶液中剩余的残留叶酸进行定量。

[0177] 通过实施例 9 的叶酸溶液的系列稀释,在去离子水中制备 0.01、0.025、0.05 和 0.075mg/ml 的叶酸标准溶液。使用分光光度计,在 350nm 处测量标准溶液的吸光度,如图 5 所示绘制标准曲线。

[0178] 实施例 20 :用活性炭去除叶酸

[0179] 在代表性试验中,证明了特定材料,例如活性炭,可以用于从溶液中去掉叶酸。

[0180] 通过实施例 9 的叶酸溶液的系列稀释,在 pH7 的 0.1M 盐酸硫胺素(Sigma)中制备 0.75、2.4、4.85、8.2 和 12.9mg/ml 的叶酸溶液。将溶液与 0.5g 活性炭(NUCHER SA-20, Meadwestvaco, Covington, VA)混合,在室温下连续搅拌 10min。而后通过离心(4000rpm, 2min)收集活性炭,上清液通过购自 Millipore Corporation of Billerica, Mass 的 5 和 0.2 μ Millex®过滤器过滤。通过在 350nm 处测定吸光度,并使用实施例 19 描述的校正曲线,测定溶液中剩余的叶酸的浓度。

[0181] 如图 6 所示,一克活性炭足以去除 225mg 叶酸。

[0182] 实施例 21 :用叶酸从 BZC 澄清的细胞培养介质中捕获期望的 MAb

[0183] 在此描述的代表性试验中,使用叶酸从代表性 BZC 澄清的细胞培养介质中沉淀 MAb。因此,使用 BZC 澄清,使用叶酸捕获。

[0184] 将实施例 9 的叶酸添加到 30ml 实施例 14 的澄清给料中(1.7g/LMAb)。用 3M 醋酸并在室温下连续搅拌 10min,调节溶液的 pH 至 5.2。在添加酸后,立即形成沉淀,这是叶酸与 MAb 络合的结果。而后通过离心(4000rpm, 1min)收集沉淀,并用精氨酸缓冲液(0.1M, pH5.0)洗涤以去除松散结合的杂质。在 pH6.75 下,使用 0.1M 盐酸硫胺素同时在室温下连续混合 10min 以 3.5ml 的体积进行沉淀的重新溶解和 MAb 的洗脱。通过添加 0.15g 活性炭(NUCHER SA-20, Meadwestvaco, Covington, VA)至 2ml 洗脱液中,并在室温下连续混合 10 分钟,进行游离叶酸的去除。而后通过离心(4000rpm, 2min)收集活性炭,上清液通过购自 Millipore Corporation of Billerica, Mass 的 5 和 0.2 μ Millex®过滤器过滤。而后在上清液流体中回收纯化的 IgG 分子。

[0185] 在这些条件下, >95% 的原始流体中存在的 IgG 与叶酸结合,洗脱时回收 88% 的 IgG, 去除 99.8% 的叶酸。

[0186] 实施例 22 :在含有要用叶酸捕获的期望的生物分子(MAb)的 BZC 澄清的溶液中测量 HCP 水平

[0187] 如实施例 21 所述实施本实验。使用 ELISA 化验装置追踪产品(MAb)捕获过程的不同步骤中的宿主细胞蛋白(HCP)的水平。

[0188] 在叶酸去除步骤后,HCP 的浓度从起始澄清的细胞培养流体中的 44247ng/ml 降低到洗脱样品中的 6500ng/ml,从而证明了 HCP 水平下降了 85%。洗脱液中的 HCP 的报道水平要考虑到起始给料体积为 30ml,而洗脱液体积为 3.5ml。

[0189] 实施例 23 :评价沉淀 MAb 所需的硝基红的量

[0190] 在代表性试验中,评价了另一个小分子(即,硝基红,其为染料)用于 MAb 分子的沉淀。测定了以超过 90% 的效率沉淀 MAb 所需的 MAb 对硝基红的质量比。

[0191] 用 3M 醋酸滴定实施例 5 的给料至 pH4.5。而后在室温下将 5ml 份的该溶液与不同体积的实施例 11 的硝基红混合 5 分钟,以在溶液中得到期望的硝基红对 MAb 的比率。在该实施例中研究的硝基红对 MAb 的比率为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0、和 3.0。而后将混合物在 3000rpm 下离心 1min。通过倾析去除上清液,使用蛋白质 A HPLC 分析 IgG。

[0192] 如图 7 所示,需要硝基红 /MAb 比达到 0.8 以完全沉淀 MAb。

[0193] 实施例 24 :关于硝基红沉淀的 MAb 的洗脱回收对结合 pH 的依赖性

[0194] 在代表性试验中,评价了洗脱后结合 pH 对 MAb 回收的影响。

[0195] 用 3M 的醋酸滴定实施例 5 中的 MAb 加标的 CCF 至 pH3.9、4.5、或 4.9。而后在室温下将实施例 11 的硝基红与 5ml 份的每个 pH 溶液混合 5 分钟,以得到 1:1 的期望的硝基红对 MAb 比例。将混合物在 3000rpm 下离心 1min。通过倾析去除上清液,并使上清液通过 Chromasorb(MILLIPORE) 以去除残留的硝基红。而后用蛋白质 A HPLC 分析溶液的 MAb。在所有的这 3 种情况下,在上清液中没有 MAb 残留,如图 8 所示。3 个不同的结合 pH 下的沉淀物在 20mM HEPES, pH8.0+150mM NaCl 中洗脱。洗脱液通过 Chromasorb(MILLIPORE) 去除残留的硝基红,并用蛋白质 A HPLC 分析 MAb。

[0196] 如图 8 所示,较低的结合 pH (pH3.9) 得到 55% 的洗脱回收率,而在 pH4.5 和 4.9 下结合,得到~100% 的收率。

[0197] 实施例 25 :在用苋菜红染料处理的收获的细胞培养基中 MAb 的回收和 HCP 的清除

[0198] 在该代表性试验中,使用另一种染料(苋菜红染料)小分子以从澄清的细胞培养介质中沉淀 MAb。

[0199] 用 3M 的醋酸滴定实施例 5 中的 MAb 加标的给料 CCF 至 pH4.5。用蛋白质 A HPLC 测量,MAb 加标的给料中的 MAb 浓度为 0.95mg/ml。用 ELISA (CYGNUS#F550) 测量,宿主细胞蛋白浓度为 186,000ng/ml。在室温下用 75 μ l 实施例 10 的 40mg/ml 苋菜红染料与 5ml 溶液混合 5 分钟,形成沉淀。将混合物在 3000rpm 下离心 1min。上清液通过倾析去除,并丢弃。沉淀物在 20mM HEPES, pH8.0+150mM NaCl 中重新溶解/洗脱。洗脱液用 4mg 活性炭每毫升洗脱液处理,以去除任何残留的苋菜红,用蛋白质 A HPLC 分析 MAb 回收,并用 ELISA 分析 HCP 水平。

[0200] 得到的 MAb 回收率为 96%,最终的 HCP 水平为 87,100ng/ml,从而证明 HCP 水平下降了~50%。

[0201] 实施例 26 :用苋菜红染料沉淀后的 MAb 电荷变体的分析

[0202] 在此描述的代表性试验中,在用苋菜红染料沉淀 MAb、洗涤沉淀以去除杂质以及洗脱 MAb 后,用弱阳离子交换色谱分析样品中 MAb 的带电变体的数量,并与起始给料中的带电 MAb 变体数量进行比较。该实验的目的是测定苋菜红染料与 MAb 的可溶性复合物是否存在于回收的 MAb 中,这是非常不期望的。

[0203] 用弱阳离子交换柱(WCX-10;Dionex Corp.)分析实施例 25 的洗脱液中的 MAb 电荷变体。在实验中使用的缓冲剂是 10mM 磷酸钠, pH6.0(缓冲剂 A)和 10mM 磷酸钠, pH6.0+500mM NaCl(缓冲剂 B)。使用以下梯度洗脱曲线:时间=0, 10% 缓冲剂 B; 时间=40min, 30% 缓冲剂 B; 时间=45min, 95% 缓冲剂 B; 时间=46min, 100% 缓冲剂 B。

[0204] 如图 9 所示,对于蛋白质 A 纯化的 MAb 和苋菜红纯化的 MAb,没有观察到带电变体的显著变化。

[0205] 实施例 27 :用叶酸形成的 MAb 沉淀的粒径分布以及剪切的影响

[0206] 使用小分子例如以上描述的那些,导致充分的纯化和 MAb 回收,几乎没有或没有对产品质量产生影响,除此之外,基于沉淀的过程还需要处理形成的沉淀的步骤。在此描述了分批和连续模式操作的基于中空纤维正切流动过滤 TFF 的实际技术,其能够在使用在此描述的小分子后,有效地处理沉淀。

[0207] 可以用于有效处理沉淀的一个适合的技术或步骤是基于过滤的技术,其依赖于要

被加工的固体的特征,例如压缩性、粒径、和剪切敏感性。例如,如果选择特定孔径的膜用于基于粒径测量的过程,那么确认在系统中的剪切速率的影响下(例如由于抽吸或其他机械应力)粒径不会变化是重要的。另一方面,小于预期的粒径可能会堵塞膜。

[0208] 如下所述,在不同结合 pH 下,在中空纤维切向流动过滤装置中评价了剪切速率对粒径分布的影响。

[0209] 实施例 2 的给料(30ml,0.85g/L)分成三等份,与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟。对于三等份中的两份(滴定至 pH4.0 和 5.0),叶酸对添加的 MAb 的比例为 1:1,而对于其中的一份(后来滴定至 pH5.5),叶酸对添加的 MAb 的比例为 1.5:1。用 3M 的醋酸将三等份的每份 10ml 的混合叶酸的给料滴定至 pH4.0、5.0 或者 5.5。在适当的缓冲剂中稀释沉淀至~10X(或者稀释到在仪器中得到足够的信号),以在 Malvern 粒径分析仪上读取测定粒径分布。对于 pH4.0 的沉淀,使用 20mM 的醋酸钠,pH4.0。对于 pH5.0 的沉淀,使用 20mM 的醋酸钠,pH5.0。对于 pH5.5 的沉淀,使用 20mM 的醋酸钠,pH5.5。另外,在进入 Malvern 仪器的测量室前,将稀释的沉淀通过中空纤维装置(0.2um Midget hoop, GE HEALTHCARE)。这样做是为了研究剪切对产生的沉淀的粒径分布的影响。改变通过中空纤维的流速,以产生不同程度的剪切度。在任何测量之前,需要 5min 的平衡时间。

[0210] 可以观察到,在较低 pH 下的沉淀(在此也被称为固相)的总百分数通常较低(pH4.0 - 11% 固体,pH5.0 - 14% 固体,和 pH5.5 - 16% 固体)。基于在悬桶离心机中 3000rpm 的离心旋转 1min,计算固体百分数。用于牛顿流体的管中的剪切速率(Y)可以使用下式测量: $\tau = 4Q / \pi r^3$,其中 Q 是体积流速,r 是管的半径。

[0211] 图 10 说明了在不同 pH 测试条件下,剪切对平均粒径的影响。粒径随着剪切速率增大而减小。有趣的是,在较低的结合 pH 下,颗粒更紧密,对剪切更具耐受性。对于随后的实验,选择 4.5 的结合 pH。

[0212] 实施例 28:对于使用叶酸产生的 MAb 沉淀,使用 0.2um 中空纤维膜在不同剪切速率下测量通量对跨膜压(TMP)

[0213] 进行该代表性试验,以测定稳定操作中空纤维切向流动过滤(TFF)系统所需的剪切速率和通量。在图 11a 所示的完全循环模式下建立 TFF 系统。

[0214] 实施例 2 的给料(200ml,0.85g/L)与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟,使叶酸对 MAb 的比率为 1:1。而后降低混合物的 pH 至 pH4.5。对于给定的给料流速(剪切速率),渗透流速(渗透通量)逐步上升。监控给料压力、渗余物压力、和渗透压 5min。使用 $TMP = (P_f + P_r) / 2 - P_p$ 计算跨膜压。如果在 5min 内没有观察到 TMP 变化,那么就认为系统处于稳态。在该研究中使用的膜是 0.2 μm 中空纤维膜,具有 38cm² 的膜面积(GEHEALTHCARE)。图 11b 显示了 3 种不同给料流速(剪切速率)下的通量对 TMP。还显示了(图 11c)作为通量的函数的单程浓缩因子(定义为 $CF = 1 / (1 - Q_p / Q_f)$)。Q_p 是渗透流速,Q_f 是给料流速。

[0215] 由图 11b 的通量-TMP 曲线可以推断,最佳剪切和流速分别为 1700S⁻¹ 和 190LMH。如图 11c 所示,在这些条件下,单程的最大浓缩因子为 2.5×。

[0216] 实施例 29:对于使用叶酸从 IgG 浓度为 4.3g/L 的细胞培养给料中产生的 MAb 沉淀,使用 0.2um 中空纤维膜在不同剪切速率下测量通量对跨膜压(TMP)

[0217] 对于具有较高 MAb 效价的给料,必须使用更多的沉淀剂(例如叶酸)。因此,更高的起始固体体积需要被加工。实施以下实验,以测定更高的固体含量对实施例 28 所述的 TFF

系统的性能的影响。

[0218] 将实施例 2 的给料(200ml)用纯 MAb 加标,以得到 4.3g/L 的 MAb 浓度。MAb 加标的给料与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟,从而使叶酸对 MAb 的比率为 1:1。而后降低混合物的 pH 至 pH4.5。在如图 11a 所示的完全循环模式下建立系统。对于给定的给料流速(剪切速率),渗透流速(渗透通量)逐步上升。监控给料压力、渗余物压力、和渗透压 5min。使用 $TMP=(P_f+P_r)/2-P_p$ 计算跨膜压。如果在 5min 内没有观察到 TMP 变化,那么就认为系统处于稳态。在该研究中使用的膜是 0.2 μ m 中空纤维膜,具有 38cm² 的膜面积(GE HEALTHCARE)。图 12a 显示了 3 种不同给料流速(剪切速率)下的通量对 TMP。还显示了(图 12b)作为通量的函数的浓缩因子(定义为 $CF=1/(1-Q_p/Q_f)$)。Q_p 是渗透流速,Q_f 是给料流速。

[0219] 由图 12a 中的通量-TMP 曲线可以推断,最佳剪切和流速分别为 1700S⁻¹ 和 174LMH。如图 12b 所示,在这些条件下,单程的最大浓缩因子为 2.2 \times 。这非常接近实施例 28 中在 1g/L 的 MAb 效价的情况下确定的操作条件,表明系统可以处理 MAb 效价的变化,因为其与固体量相关。

[0220] 实施例 30 :在用叶酸处理和用实施例 28 所述的 TFF 系统加工的收获的细胞培养基中的 MAb 回收率

[0221] 实施例 2 的给料(250ml,1.8g/L)与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟,从而使叶酸对 IgG 的比率达到 1:1。而后降低混合物的 pH 至 pH5.0。沉淀具有约 11% 的固含量。建立类似于图 11a (实施例 28) 所述的系统,除了渗透管道不再循环到给料,而是送至分离收集烧杯,用于 IgG 定量。通过控制渗透通量,在恒定跨膜压(TMP 保持在 0.4-0.5psi 间)下,将沉淀物浓缩 \sim 4.0X 至最终体积为 63ml。在浓缩阶段的平均通量为 75LMH。浓缩后,用 120ml 的 0.1M 精氨酸,pH5.0,洗涤固体。通过以与渗透流速(70LMH)相同的流速将洗涤缓冲剂泵入给料烧杯中完成洗涤。同时收集洗涤后的渗透液,用于 MAb 定量。而后通过使用 2M 三羟甲基氨基甲烷(pH10)增大 pH 至 7.0,使固体重新溶解/洗脱,并添加硫胺素使最终的硫胺素浓度达到 0.1M。在浓缩或洗涤期间,在渗透液中未观察到 MAb。所有 MAb 回收率为 87%,可以达到 \sim 3.0X 的浓缩。

[0222] 实施例 31 :在静态混合器中沉淀形成的动力学

[0223] 除了分批模式操作 TFF 系统外,还评价了连续模式操作的可行性。连续操作的一个必要条件是快速结合和沉淀动力学,从而可以使用管道混合器对 TFF 系统连续给料。以下代表性试验描述了使用静态混合器形成沉淀的动力学。

[0224] 实施例 2 的给料(50ml,0.85g/L)与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟,从而使叶酸对 IgG 的比率达到 1:1。而后以 10ml/min 的速率将该溶液抽吸通过具有 <5ml 的死体积的螺旋静态混合器(Cole Palmer)。在静态混合器之前,使用 T 型接头以 0.26ml/min 引入 3M 醋酸流。静态混合器中的驻留时间 <30sec。收集五份,每份 10ml,测量 pH,确定为约 4.5。这表明静态混合器允许稳态操作,pH 可以始终保持在期望的水平。而后将样品在 2500rpm 下离心 1min。而后使用蛋白质 A HPLC 分析上清液的 MAb 浓度。

[0225] 在上清液中未观察到 MAb,表明在 30 秒内,MAb 完全沉淀。

[0226] 实施例 32 :以连续逆流模式使用中空纤维 TFF 浓缩和洗涤固体

[0227] 建立中空纤维切向流动过滤系统以连续模式操作,如图 13 所述。以下实验描述了所用的加工条件以及得到的 MAb 回收率。

[0228] 实施例 2 的给料 (2000ml, 1.8g/L) 与实施例 9 的叶酸在室温下混合 5 分钟, 从而使叶酸对 MAb 的比率达到 1:1。而后降低混合物的 pH 至 pH5.0。沉淀具有约 11% 的固含量。在 197LMH 的渗透通量下, 用两步将沉淀浓缩 4× 至最终体积达到 500ml。浓缩后, 用 314ml 的 25mM 醋酸钠 (pH5) 洗涤。洗涤以逆流设置进行, 将新鲜的洗涤缓冲剂泵入给料进入的最终中空纤维装置, 使用来自最终装置的渗透液作为早先装置的洗涤缓冲剂, 使用渗透液作为第一装置的洗涤缓冲剂。而后通过使用 2M 三羟甲基氨基甲烷 (pH10) 增大 pH 至 7.0, 使固体重新溶解 / 洗脱, 随后添加硫酸肼使最终的硫酸肼浓度达到 0.1M。总的 MAb 回收率为 74%。在浓缩或洗涤步骤中, 在渗透液中没有 MAb 损失。

[0229] 实施例 33 : 完全的 MAb 下游纯化过程, 其使用 BZC 澄清步骤, 叶酸捕获步骤, 和一个或多个用活性炭和阴离子交换膜色谱增大纯度的磨光步骤

[0230] 本实验的目的是证明单克隆抗体的整个下游纯化可以使用澄清和捕获步骤中的沉淀以及随后流通纯化步骤而实现。

[0231] 用三羟甲基氨基甲烷缓冲剂水溶液 (25mM, pH7.0) 稀释实施例 21 的给料 4 倍, 调节最终 pH 至 7.0。从 MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, USA 得到粉状活性炭, 作为 Nuchar HD 级。玻璃 Omnifit 色谱柱 (直径 10mm, 长 100mm) 载有悬浮在水中的 250mg 的 HD Nuchar 活性炭, 得到 1ml 的填充柱体积。用三羟甲基氨基甲烷缓冲剂水溶液 (25mM, pH7.0) 平衡柱。用 0.65 微米级由聚烯丙胺改性的聚乙烯膜在各种尺寸的装置中制造 0.2mL ChromaSorb 膜装置, 所述聚乙烯膜购自 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA。将膜切割成 25mm 的盘; 5 个盘堆叠并密封在超模压注塑聚丙烯装置中, 该注塑聚丙烯装置与购自 Millipore Corporation 的 OptiScale25 一次性胶囊过滤器装置的类型相同。装置包括通气孔, 以防止气体密封, 并具有 3.5cm² 的有效过滤面积和 0.2mL 的体积。

[0232] 将稀释的单克隆抗体给料以 0.1ml/min 的恒定流速抽吸通过活性炭柱, 得到 200ml 的流通池 (200 柱体积)。该池的一部分流过 0.2mL ChromaSorb 装置, 得到 8ml 流通池 (40 柱体积)。样品的纯度列于表 2。

[0233] 抗体的最终纯度为约 14ppm 的 HCP, 表明在此描述的模板是可行的和有竞争性的下游纯化过程, 达到可接受的纯度以及单克隆抗体回收目标。

[0234] 表 2

[0235]

样品	HCP (ppm)	MAb 浓度 (g/L)	累积的 MAb 收率 (%)
叶酸洗脱液(实施例 Y)	4508	4.38	100
活性炭流通	401	4.00	91
ChromaSorb 流通	14	3.57	81

[0236] 实施例 34 : 细胞培养介质的澄清以及随后使用 HTAB 澄清 HCP

[0237] 用纯 MAb 给实施例 3 的给料 (200ml) 加标, 得到的 MAb 浓度为 4.8g/L。给料中的 HCP 浓度为约 179,000ng/ml。将 2ml 实施例 7 的 HTAB 添加到 38ml 上述给料中, 在室温下混合 10 分钟, 以结合并沉淀不溶性杂质, 如细胞和细胞碎片, 以及可溶性杂质, 如宿主细胞

蛋白、核酸等。而后通过离心(4000rpm, 1min)收集沉淀,通过 0.2 μ Durapore®过滤器过滤上清液。在这些条件下,100%的存在于原始流体中的 MAb 被回收,95%的 HCP 被去除。

[0238] 本说明书根据说明书中引用的参考的教导得到最彻底的理解,所述参考在此并入作为参考。说明书中的实施方案提供在本发明中的实施方案的说明,不应解释为限制其范围。本领域技术人员容易认可,许多其他实施方案被涵盖在本发明中。所有出版物和发明以其全部并入作为参考。就作为参考并入的材料与本说明书矛盾或不一致而言,本说明书将取代任何该材料。在此的任何参考的引用不承认所述参考是本发明的在先工艺。

[0239] 除非另外指明,在本说明书中使用的成分、细胞培养基、处理条件、等等的所有数字表达量,包括权利要求中的,被理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此,除非另外相反指明,数字参数为近似值,并可以依据本发明追求得到的期望的性质而变化。除非另外指明,在一系列元素前的术语“至少”被理解为指代系列中的每一个元素。本领域技术人员认可,或可以确定仅仅使用常规实验,许多在此描述的本发明的特定实施方案的等价物。所述等价物也涵盖在所附权利要求中。

[0240] 可以对本发明进行许多修改和变化而不背离其精神和范围,这是本领域技术人员明白的。在此描述的特定实施方案仅以实施例的形式提供,不意味着任何方式的限制。说明书和实施例的意图仅被认为是示例性的,本发明的真实范围和精神通过所附权利要求指明。

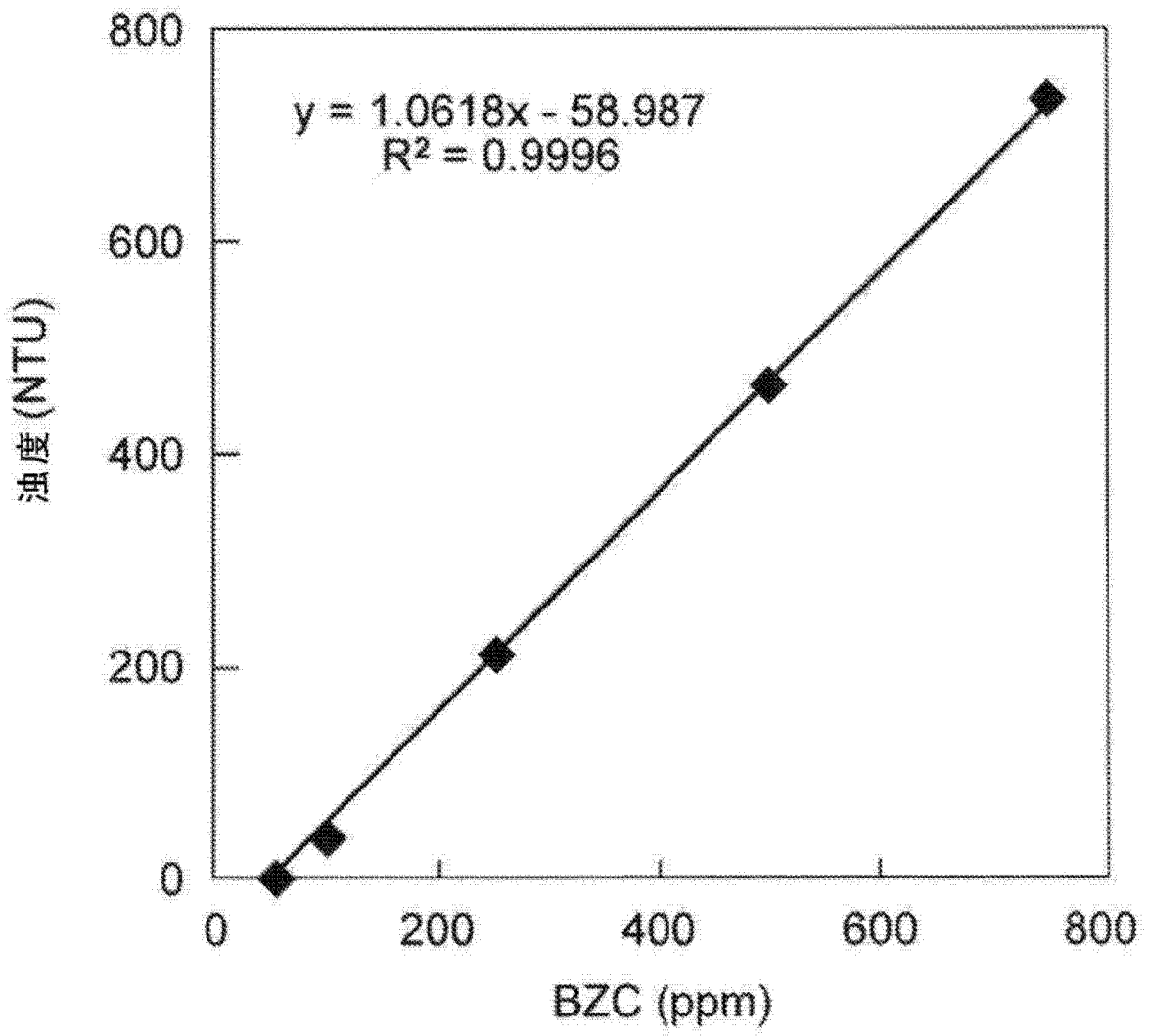


图 1

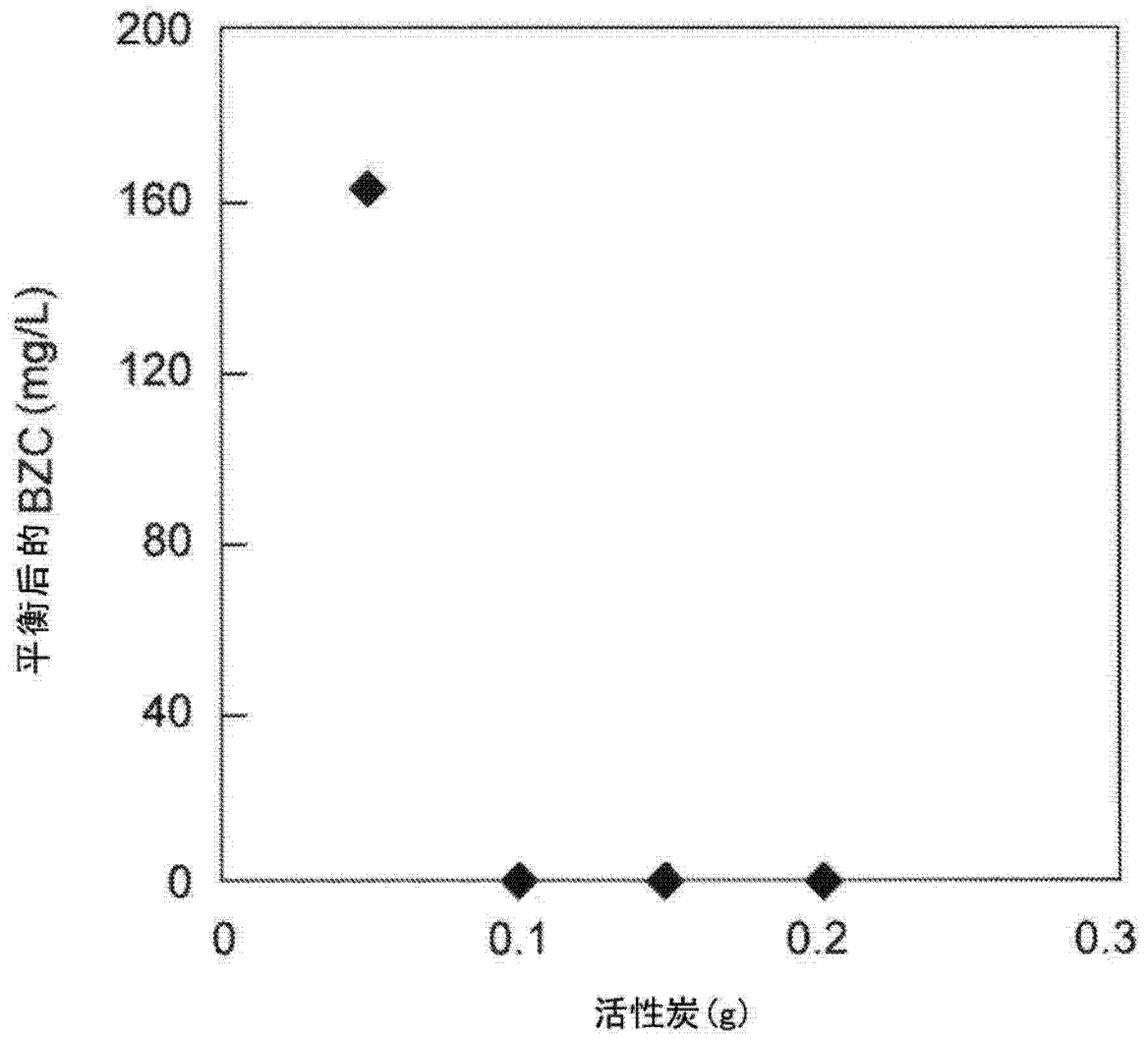


图 2

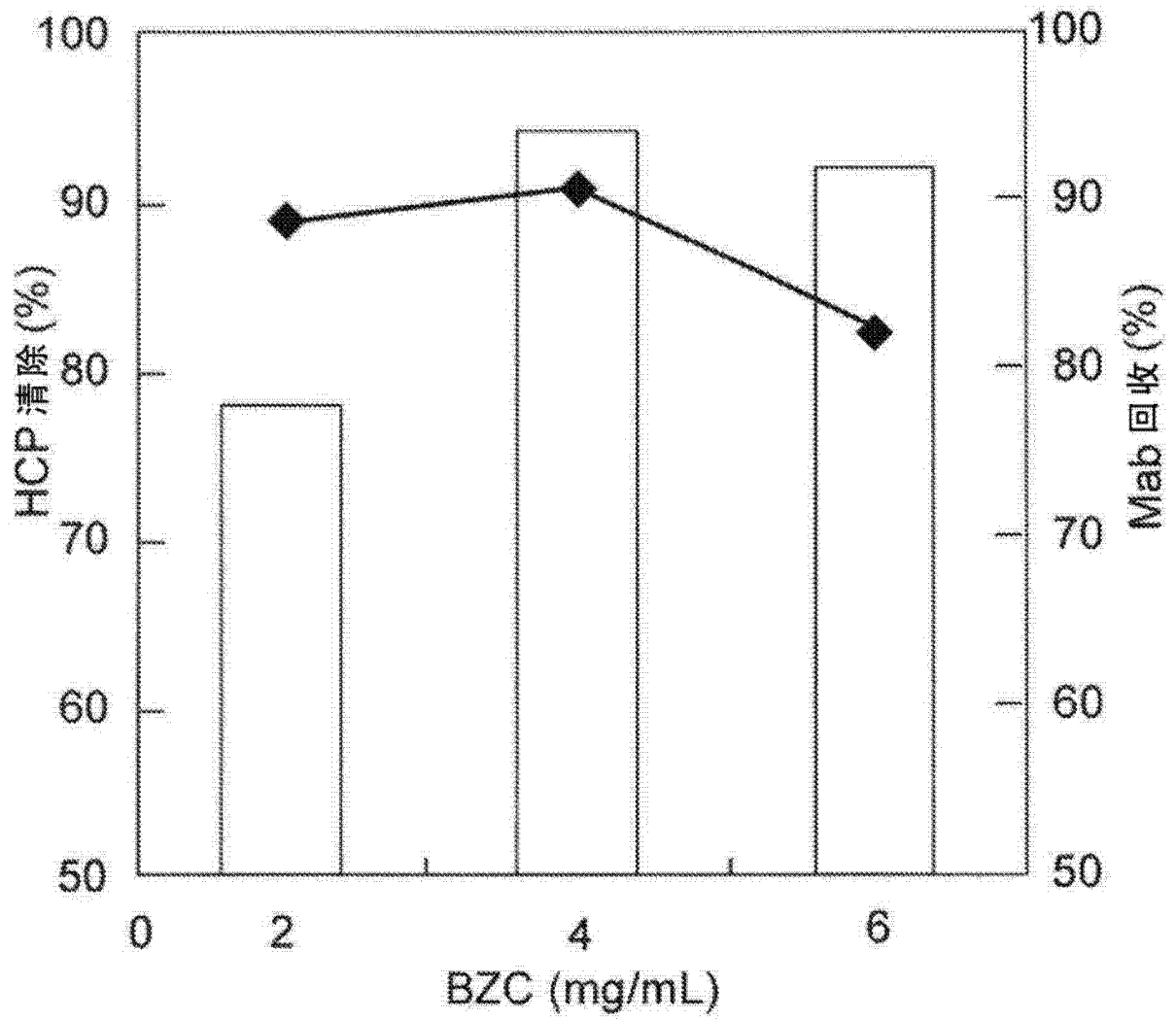


图 3

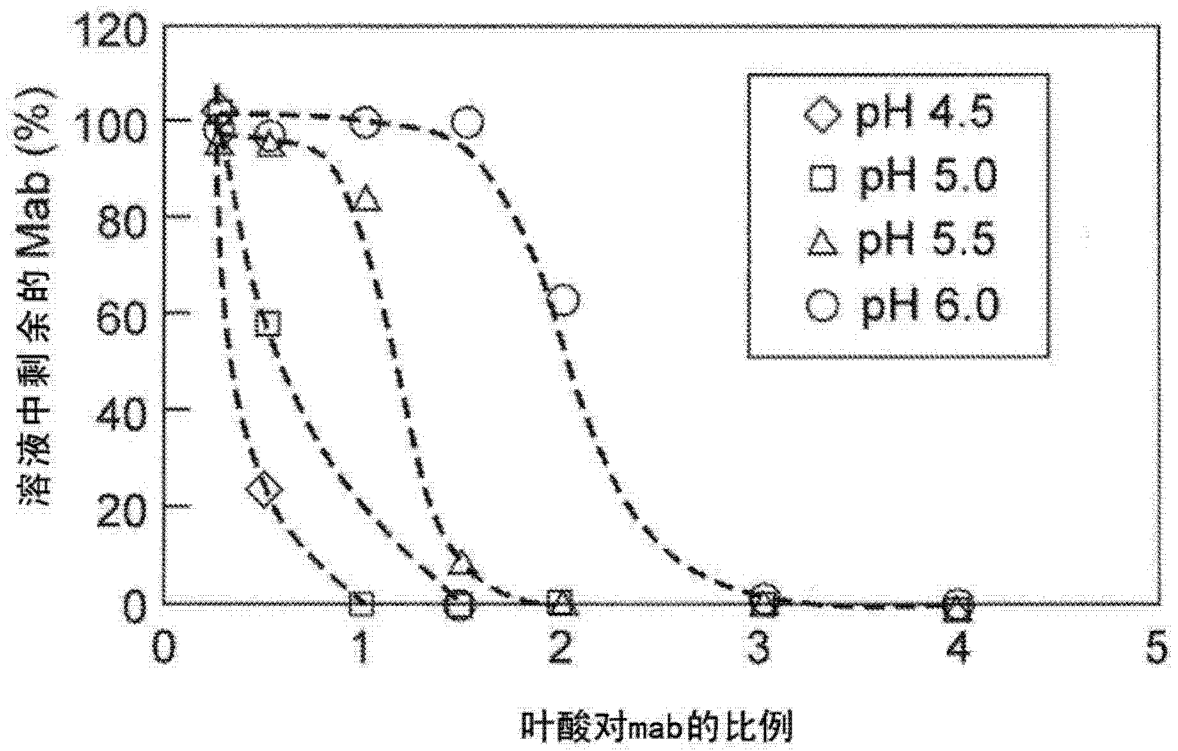


图 4

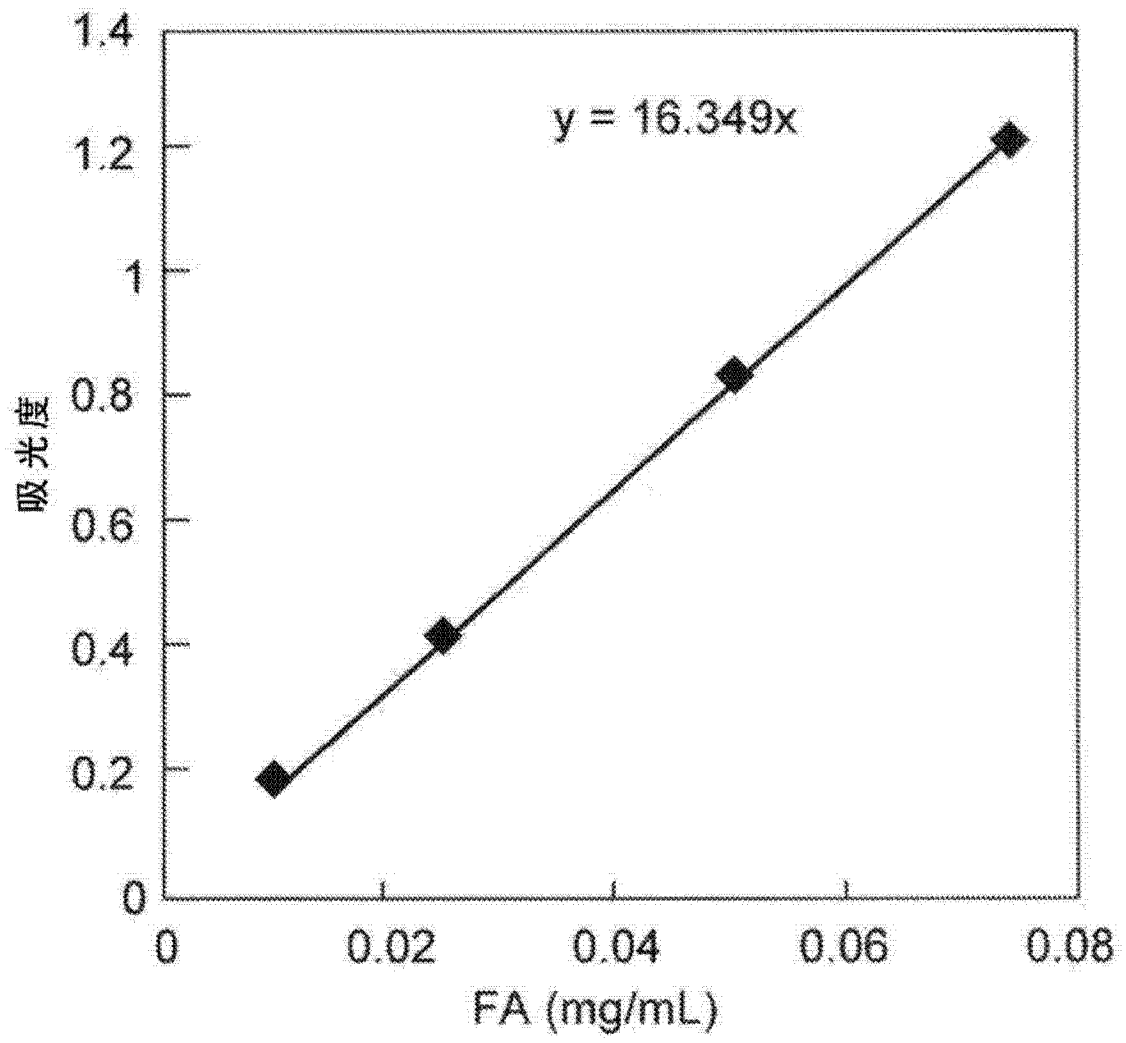


图 5

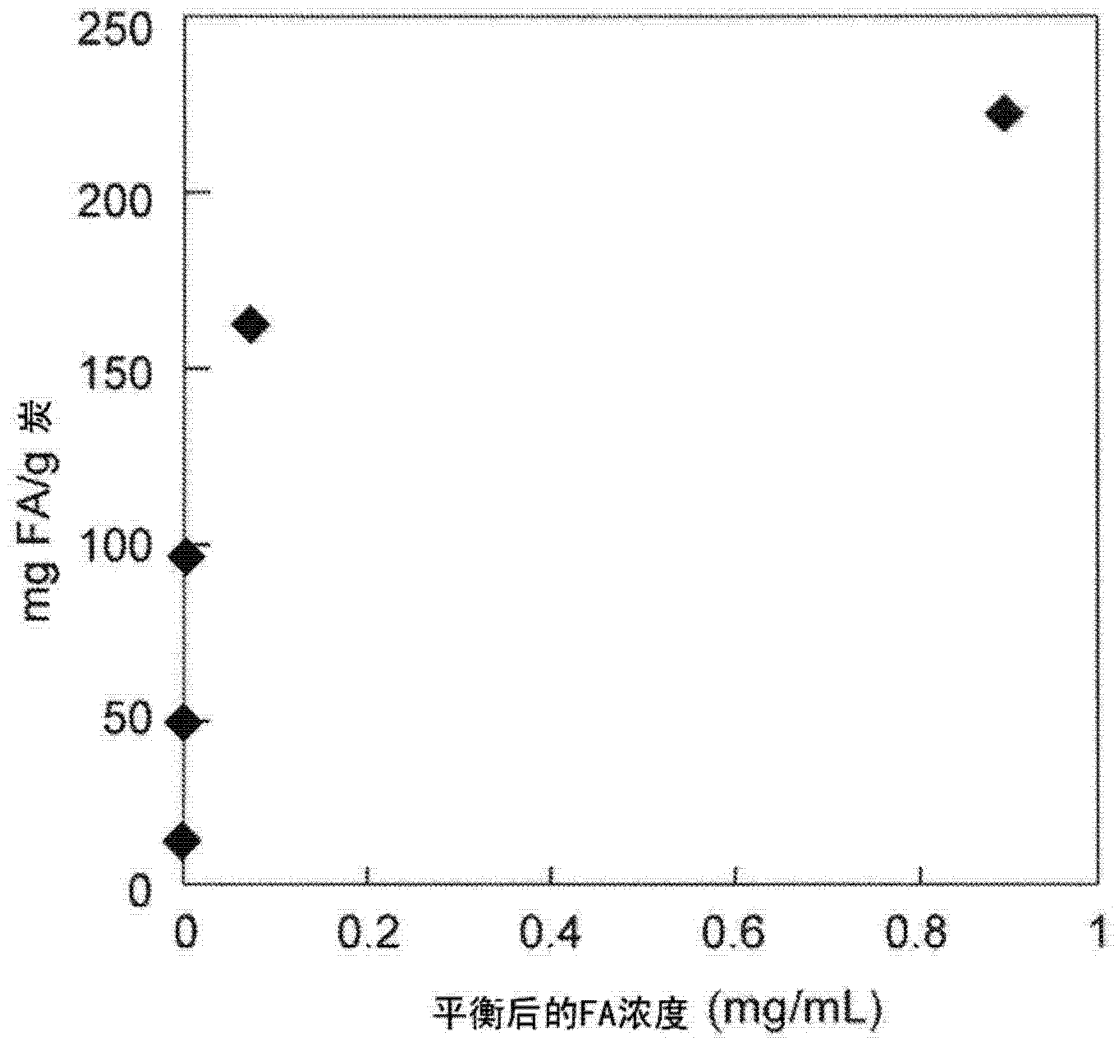


图 6

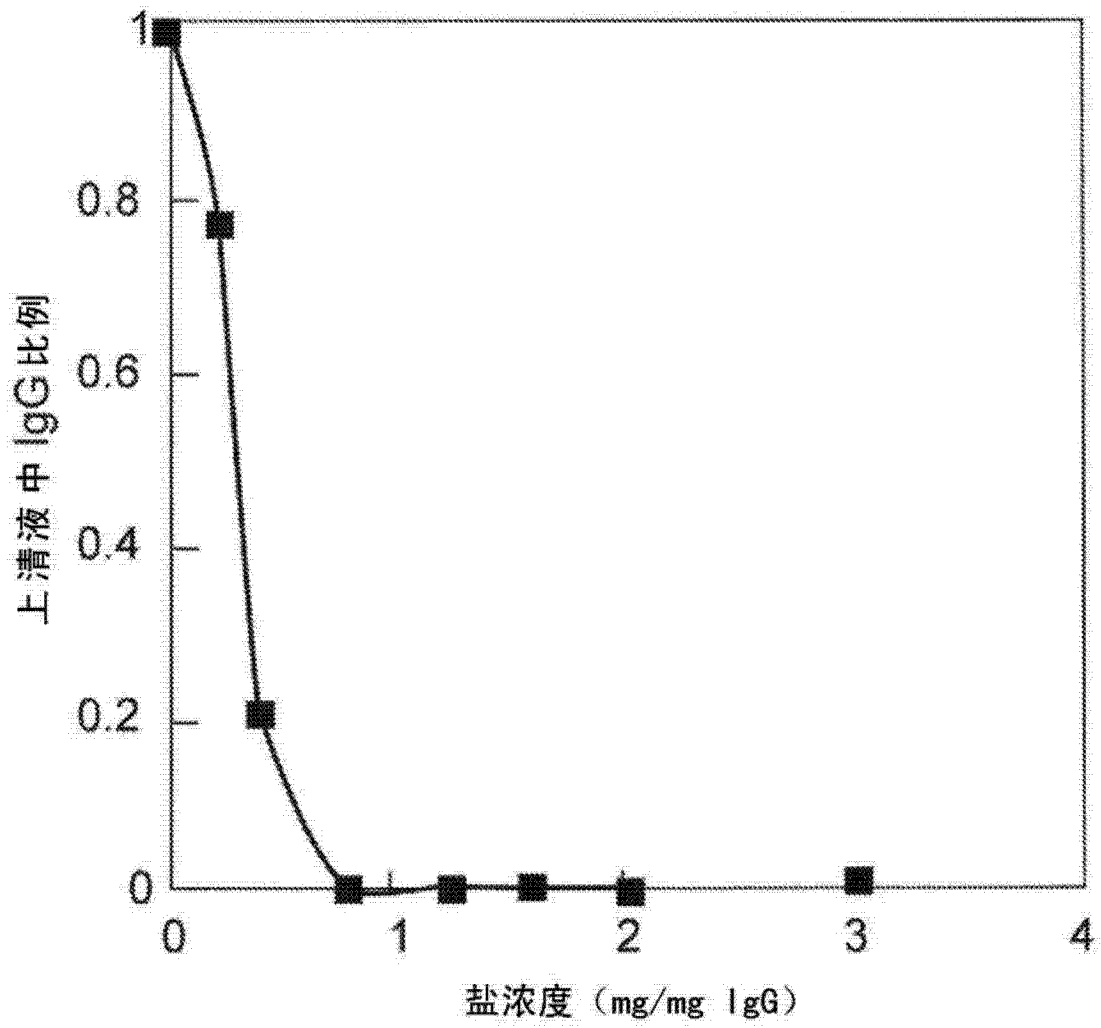


图 7

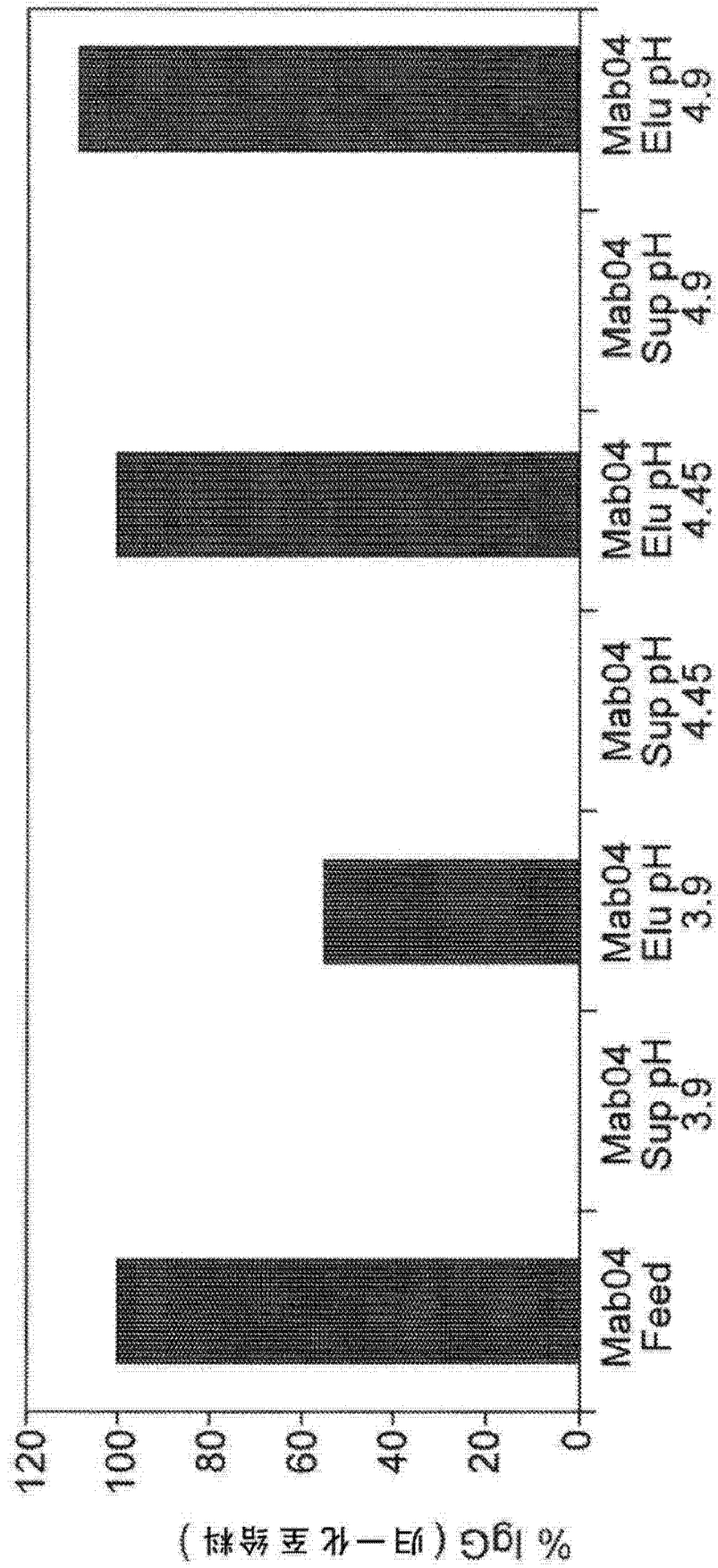


图 8

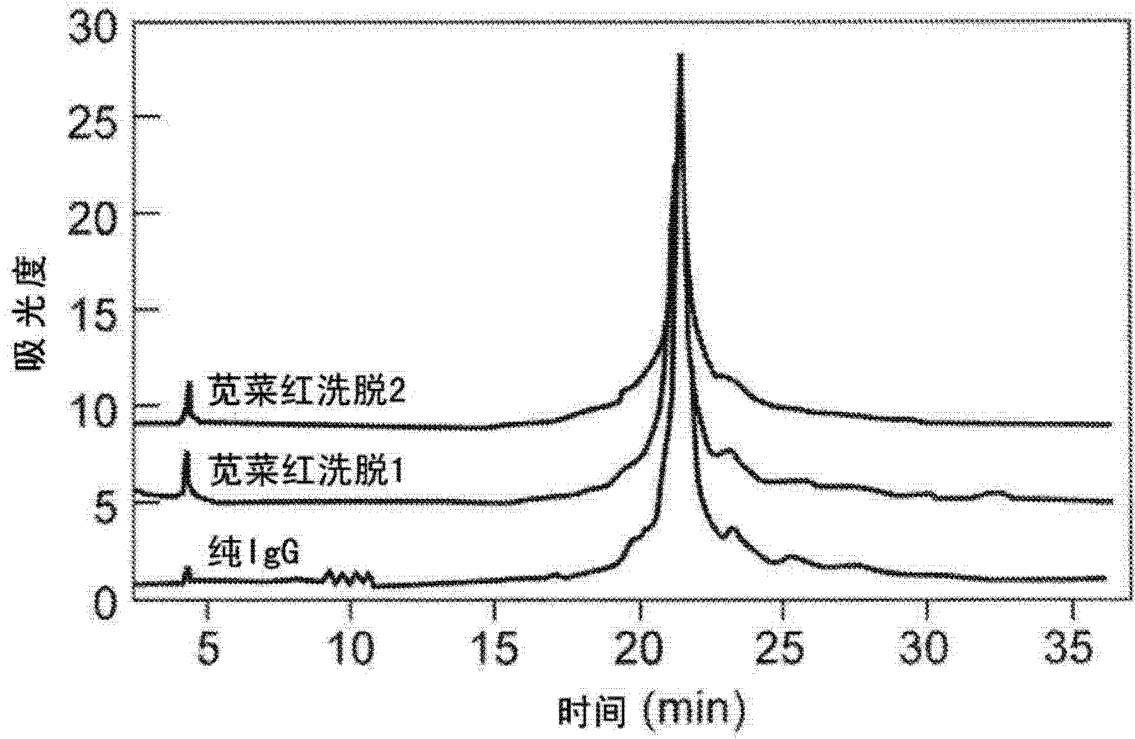


图 9

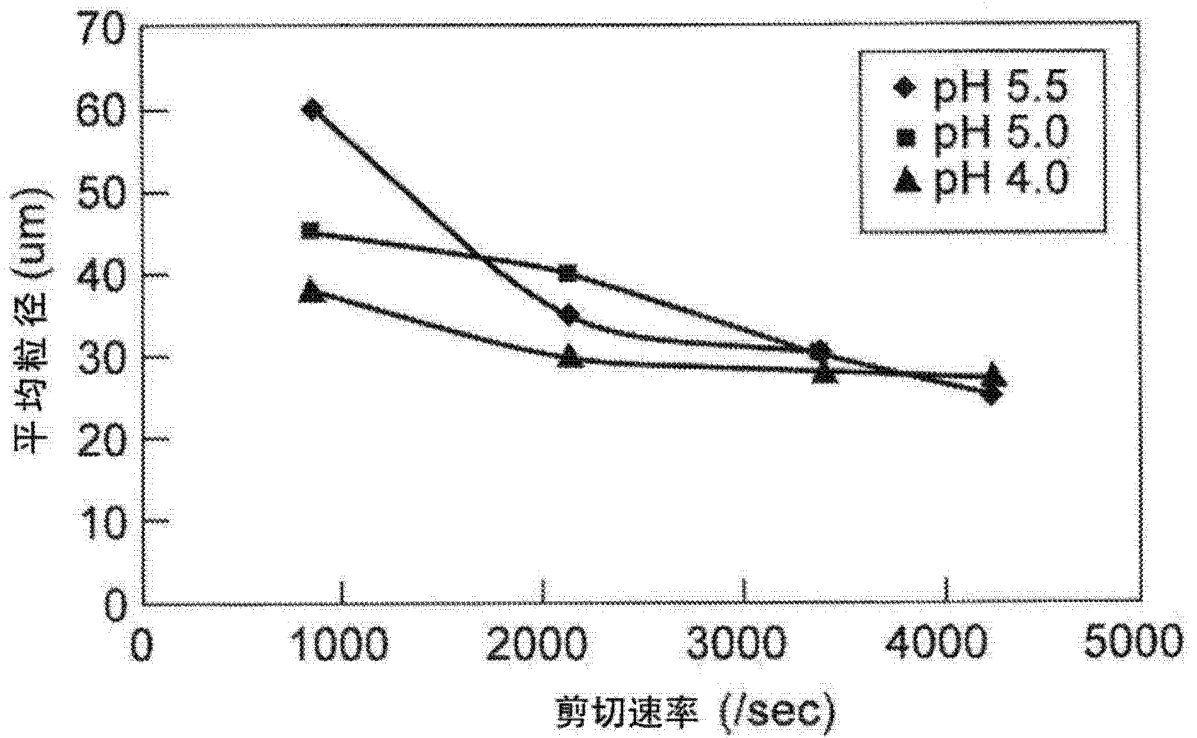


图 10

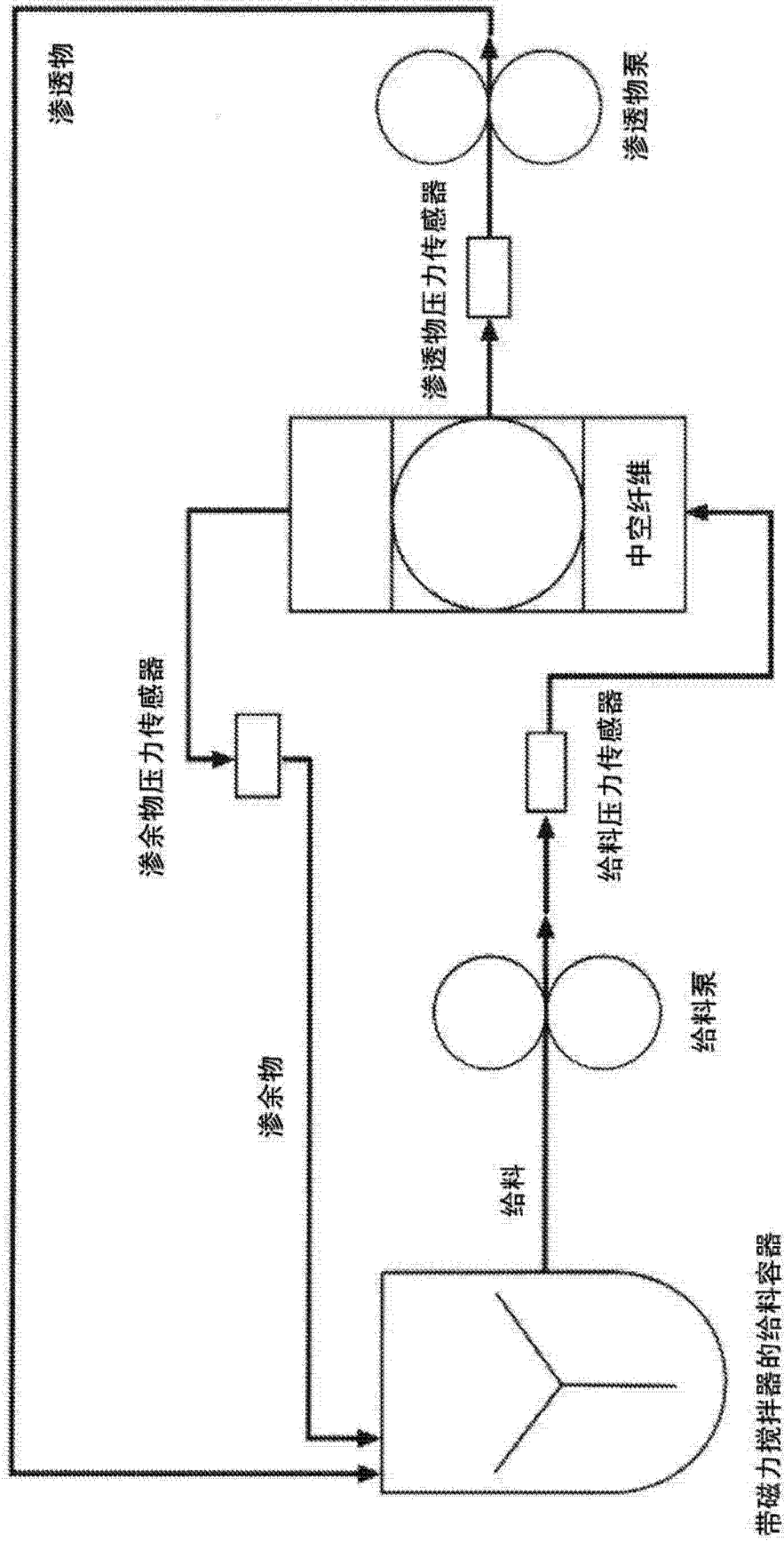


图 11a

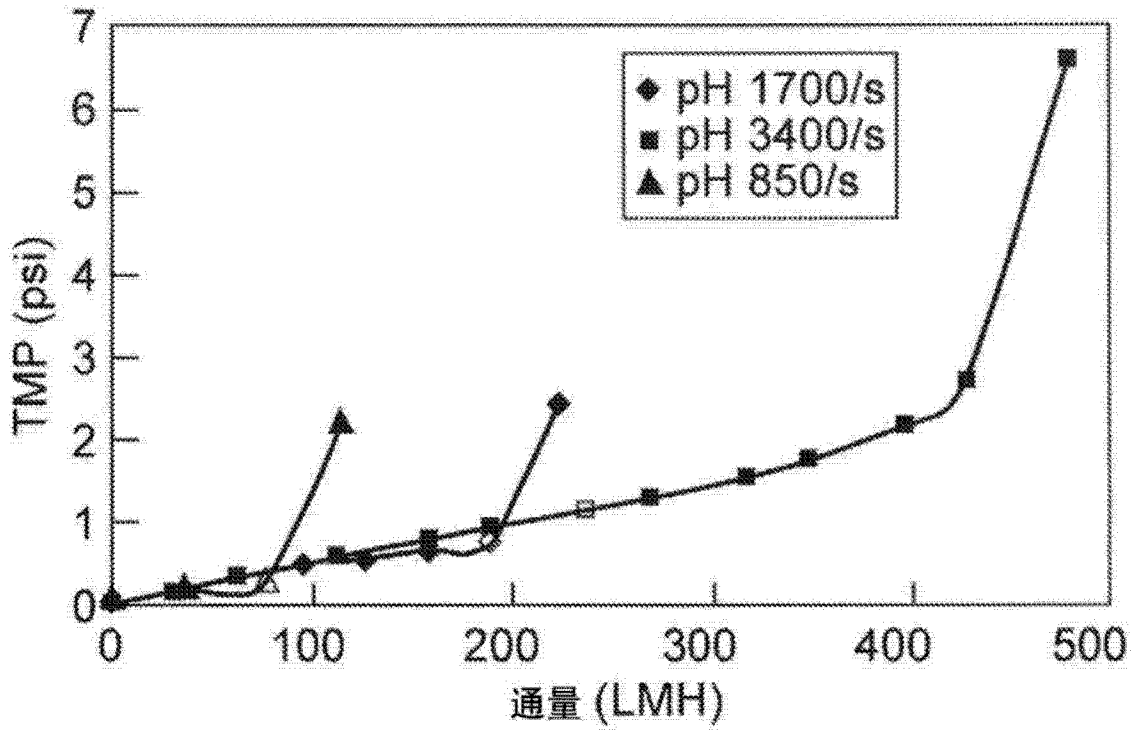


图 11b

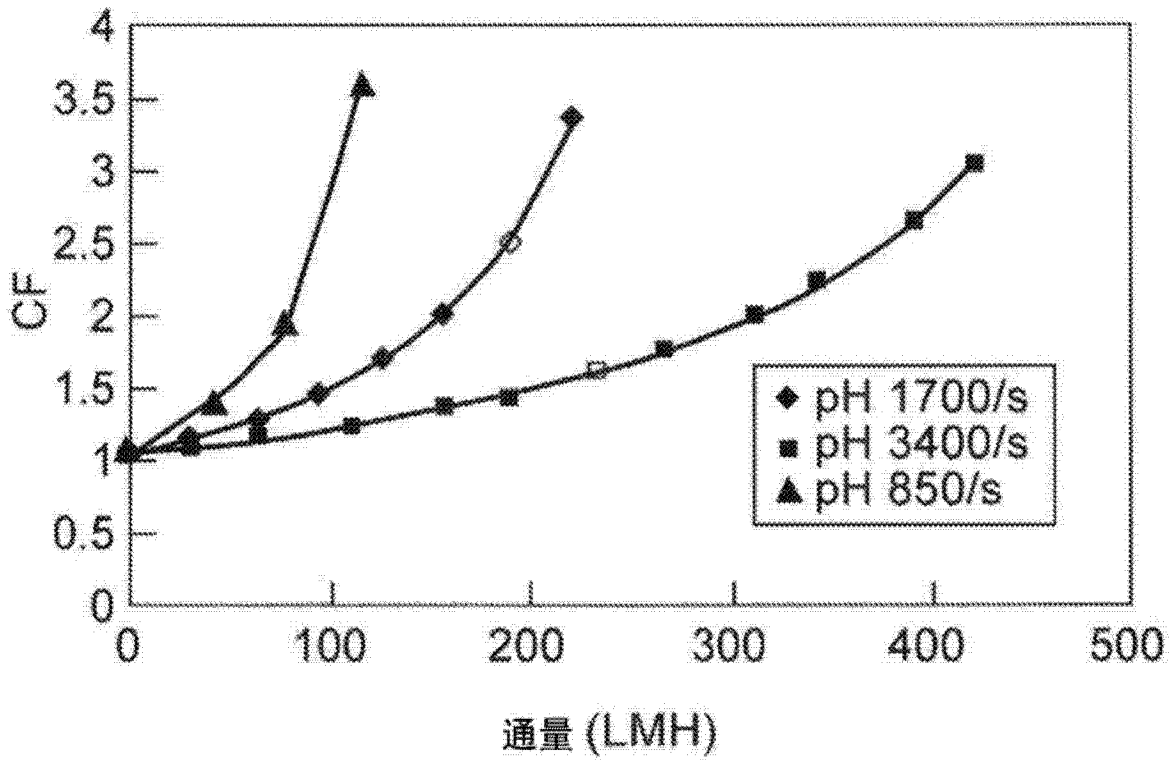


图 11c

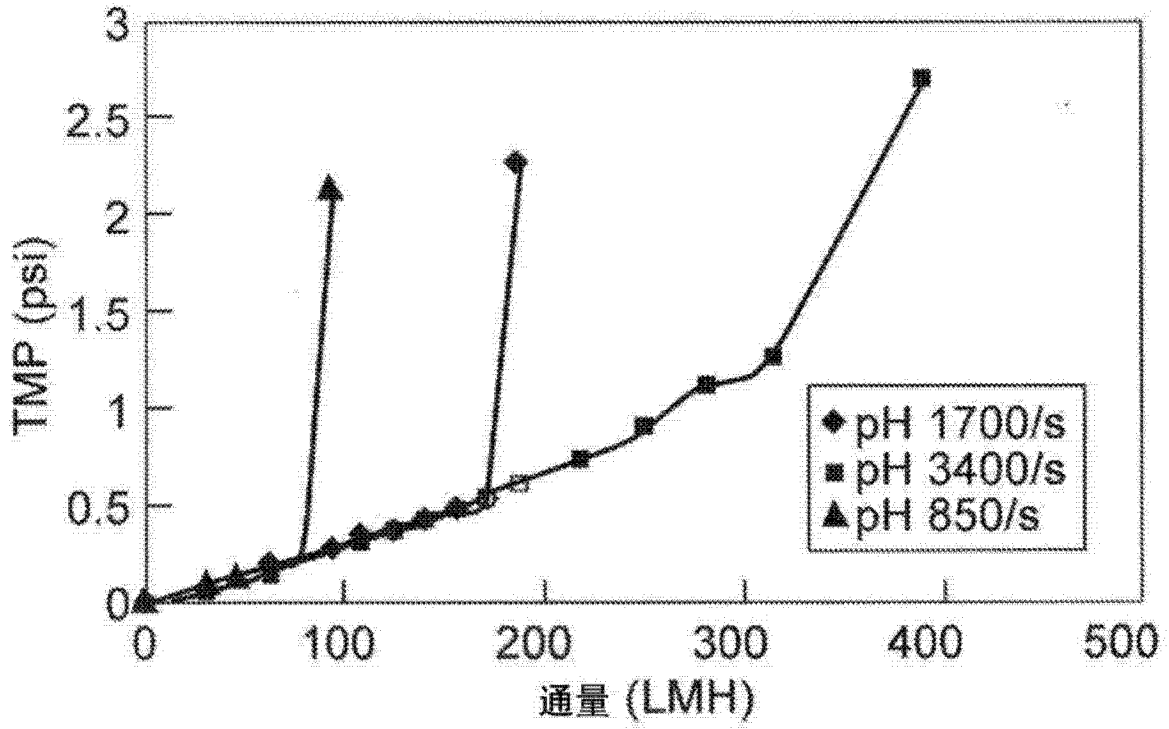


图 12a

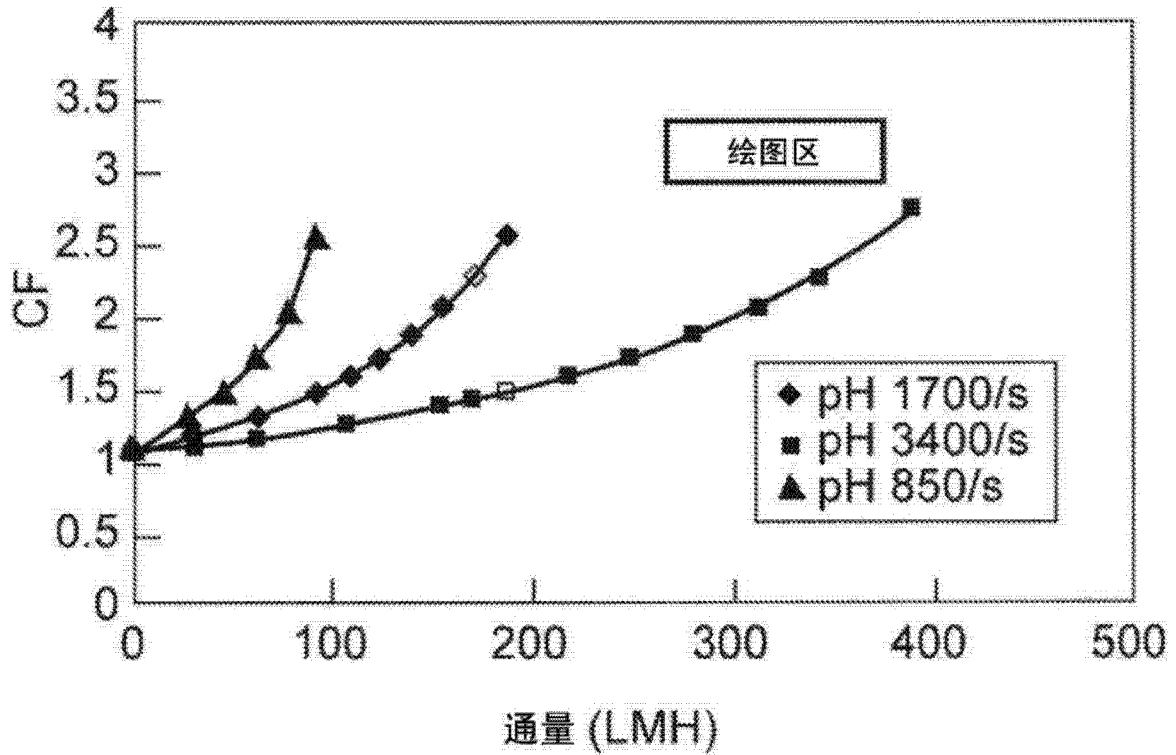


图 12b

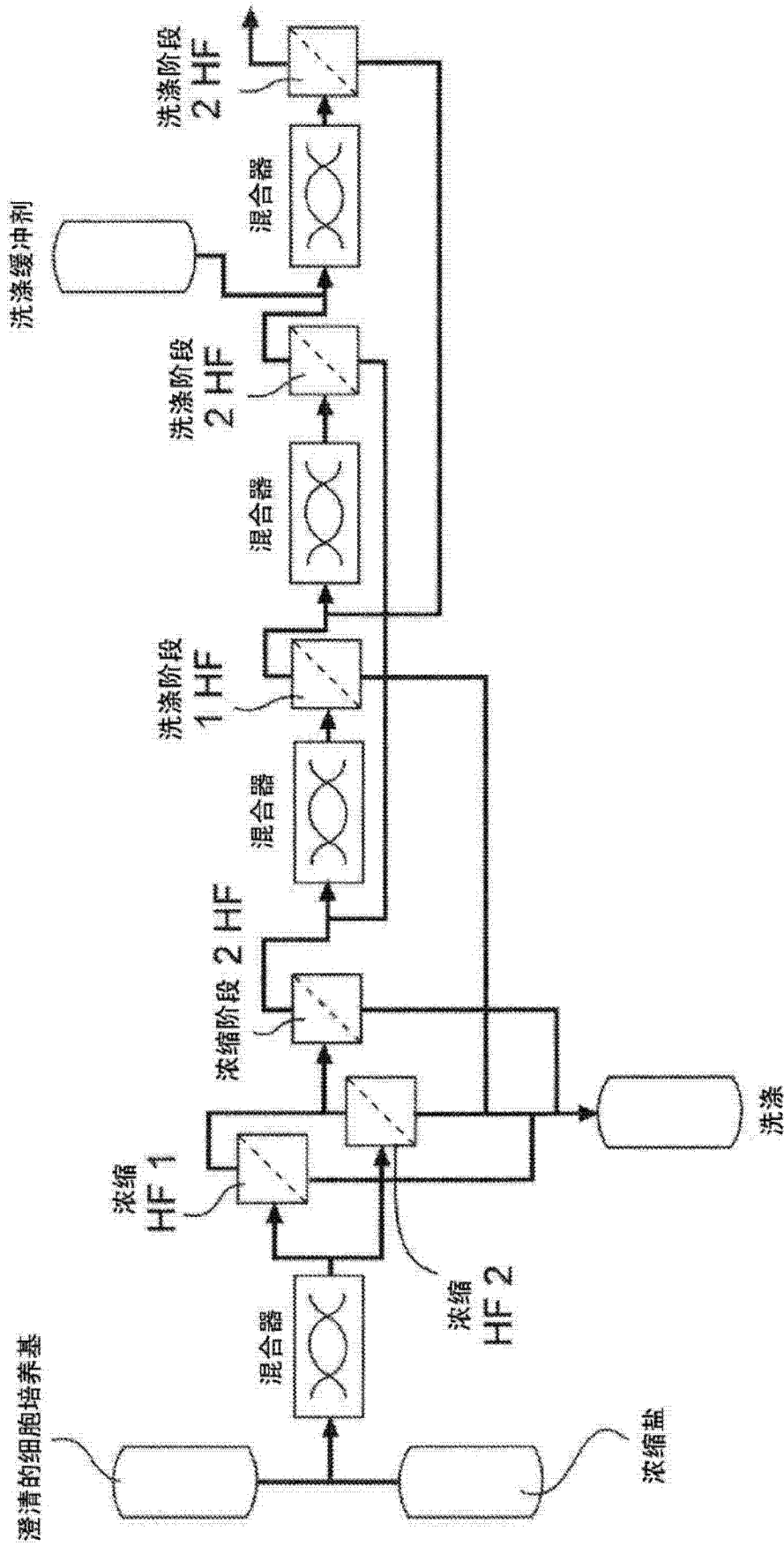


图 13