



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107188960 A

(43)申请公布日 2017. 09. 22

(21)申请号 201710418825.9

C07K 1/22(2006.01)

(22)申请日 2010.08.05

C07K 1/18(2006.01)

(30)优先权数据

61/273,709 2009.08.07 US

(62)分案原申请数据

201080035153.X 2010.08.05

(71)申请人 EMD密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 N·索伊斯 J·D·哈伯德 Y·张

J·海姆齐克

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

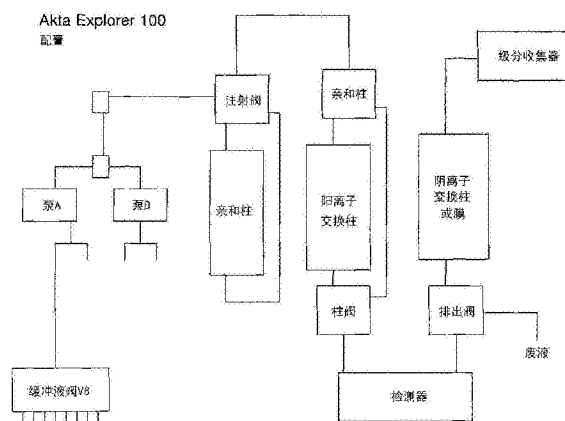
权利要求书1页 说明书35页 附图7页

(54)发明名称

从样品的一或多种杂质中纯化靶蛋白的方法

(57)摘要

本发明至少部分地涉及蛋白质纯化的改进方法。具体地,本发明至少部分地涉及用于从包括含Fc区域的蛋白质和一或多种杂质的组合物中纯化含Fc区域的蛋白质的方法,其中所述方法不需要存储罐和/或缓冲液交换步骤。



1. 用于从样品的一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白的试剂盒,所述试剂盒包含:亲和色谱介质、阳离子交换色谱介质、阴离子交换色谱介质、pH低于4.0且电导率为5-50mS的缓冲液和一或多种洗脱缓冲液,以及无需存储罐和/或缓冲液交换步骤而使用所述试剂盒的说明书,所述说明书显示使用所述亲和色谱介质、阳离子交换色谱介质、阴离子交换色谱介质、pH低于4.0且电导率为5-50mS的缓冲液和一或多种洗脱缓冲液的顺序和条件。

2. 权利要求1的试剂盒,其中一或多种介质装在柱中。

3. 权利要求2的试剂盒,其中所述柱是一次性的。

从样品的一或多种杂质中纯化靶蛋白的方法

[0001] 本发明是申请日为2010年8月5日,申请号为201080035153.X,标题为“从样品的一或多种杂质中纯化靶蛋白的方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2009年8月7日提交的美国临时专利申请第61/273,709号的优先权权益,其全部内容援引加入本申请。

技术领域

[0004] 本发明至少部分涉及蛋白质纯化方法。具体地,本发明至少部分涉及用于从包含靶蛋白和一或多种杂质的组合物中纯化靶蛋白的方法,所述靶蛋白为例如含Fc区域的蛋白质,如抗体或其片段和抗体样分子,如免疫粘附素。

背景技术

[0005] 生物技术和制药工厂越来越认识到对诸如包括抗体在内的治疗性蛋白等蛋白质进行高效和经济的大规模纯化的重要性。通常,蛋白质纯化的方法极其烦琐且昂贵,并包括许多不同的步骤。例如,通常使用细胞培养法来制备蛋白质,例如通过插入含目标蛋白基因的重组质粒,使用工程化的哺乳动物细胞或细菌细胞系来制备目标蛋白。通常,要面对的巨大挑战是如何将所希望的蛋白质从加入到细胞的培养基组分和细胞本身的副产物以及可能存在的任何其它杂质中分离。当欲将治疗性蛋白用于人且必须经过食品和药品管理局许可时,这类分离就特别的重要。

[0006] 通常,目前所用的纯化方法包括至少以下步骤:细胞裂解以回收细胞内蛋白或在分泌蛋白的情况下从培养基中回收蛋白质;通过差示离心或过滤去除细胞碎屑以获得含目标蛋白的净化样品;在多步骤工艺中使用各种色谱介质以从样品的各种杂质中分离目标蛋白。

[0007] 常用的色谱法包括亲和色谱介质、离子交换色谱介质、疏水性相互作用、亲水性相互作用、尺寸排阻和混合模式(即多种色谱法的组合)中的一或多种。例如,对于单克隆抗体的纯化,已描述了许多方法,大部分方法包括起始的蛋白A亲和捕获步骤,和随后的一或多种离子交换精制步骤(polishing steps)。而且,可使用其它色谱技术,例如:结合和洗脱疏水性相互作用色谱(HIC);流过式疏水性相互作用色谱(FTHIC);混合式色谱技术,如结合和洗脱弱阳离子和阴离子交换(Abx)、结合和洗脱疏水性和离子交换相互作用、和流过式疏水性和离子交换混合式相互作用(FTMM),它们均可使用诸如Capto Adhere、Capto MMC、HEA Hypercel、PPA Hypercel等树脂。此外,可使用疏水性电荷诱导(HCI)色谱以及其它技术和多种技术的组合来进行精制。通常,包括能提供额外正交的病毒去除步骤的阴离子交换步骤对精制步骤很重要。

[0008] 如上所述,虽然已描述了涉及各种色谱步骤组合的蛋白质纯化方法,但这些方法需要在每个色谱步骤之间使用存储罐(holding tank)和/或缓冲液交换步骤。通常,将靶蛋白洗脱入存储罐,在存储罐中调节缓冲液/溶液条件,以使它们适用于下一个色谱步骤(称

为缓冲液交换)。在被上样至下一个色谱介质或过滤膜之前,通常根据需要来调节存储罐中缓冲液的条件,如pH、盐等。

发明内容

[0009] 本发明至少部分涉及从一或多种杂质中纯化或分离目标蛋白的改进方法,其中所述方法不需要各个色谱步骤之间的存储罐和/或缓冲液交换步骤。

[0010] 在各个实施方式中,本发明提供了通过强力模板纯化含Fc区域的蛋白质(如单克隆抗体和类似蛋白),而避免了中间的存储罐或缓冲液交换步骤。因此,可将所述纯化方法称为“连续方法”。所述方法包括使用适合的条件和色谱介质来实现连续的、无存储罐的方法。

[0011] 在本发明的一些实施方式中,提供了从样品的一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白的方法,其中所述方法包括以下步骤:(a)使所述样品接触亲和色谱介质;(b)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述亲和介质洗脱;(c)使洗脱液接触阳离子交换色谱介质;(d)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述阳离子交换色谱介质洗脱;(e)使洗脱液接触阴离子交换色谱介质;和(f)回收所述含Fc区域的靶蛋白,其中所述方法在步骤(b)和(c)之间以及步骤(d)和(e)之间不需要存储罐。

[0012] 在本发明其它实施方式中,提供了从样品的一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白的方法,其中所述方法包括以下步骤:(a)使所述样品接触亲和色谱介质;(b)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述亲和介质洗脱;(c)使洗脱液接触阳离子交换色谱介质;(d)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述阳离子交换色谱介质洗脱;(e)使洗脱液接触阴离子交换色谱介质;和(f)回收所述含Fc区域的靶蛋白,其中所述方法在步骤(b)和(c)之间以及步骤(d)和(e)之间不需要缓冲液交换步骤。

[0013] 在本发明其它实施方式中,提供了从样品的一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白的方法,其中所述方法包括以下步骤:(a)使所述样品接触亲和色谱介质;(b)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述亲和介质洗脱;(c)使洗脱液接触阳离子交换色谱介质;(d)将所述含Fc区域的靶蛋白从所述阳离子交换色谱介质洗脱;(e)使洗脱液接触阴离子交换色谱介质;和(f)回收所述含Fc区域的靶蛋白,其中所述方法在步骤(b)和(c)之间以及步骤(d)和(e)之间不需要存储罐和缓冲液交换步骤。

[0014] 在所要求保护发明的方法的一些实施方式中,所述方法进一步包括在步骤(a)和(b)之间的预洗脱步骤。在多个实施方式中,所述预洗脱步骤包括使步骤(a)的亲和色谱介质接触阳离子交换色谱缓冲液。

[0015] 在多个实施方式中,所要求保护的方法可用于从一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白。此类含Fc区域的靶蛋白包括但不限于抗体、免疫粘附分子和Fc融合蛋白、以及它们的含Fc的片段。在具体实施方式中,含Fc区域的靶蛋白为单克隆抗体。

[0016] 在多个实施方式中,使用pH 2.0-4.0的缓冲液将含Fc区域的靶蛋白从亲和介质中洗脱。

[0017] 在一些实施方式中,步骤(d)包括使用pH 5.0-9.0的缓冲液。在其它实施方式中,步骤(d)包括使用pH 6.0-8.0的缓冲液。

[0018] 在一些实施方式中,本发明方法中的亲和色谱介质步骤包括使用蛋白A或其功能

性变体。

[0019] 在一些实施方式中,本发明的方法进一步包括在步骤(c)和(d)之间的病毒灭活步骤。在一些实施方式中,所述病毒灭活步骤包括使所述阳离子交换色谱介质与pH小于4.0的缓冲液接触适合于病毒灭活的一段时间。所述时间通常为15至60分钟。

[0020] 本发明还提供了用于从样品的一或多种杂质中纯化含Fc区域的靶蛋白的试剂盒。在一些实施方式中,这类试剂盒包括以下一或多种:亲和色谱柱、阳离子交换色谱柱、阴离子交换色谱柱和一或多种洗脱缓冲液以及试剂盒使用说明书。

[0021] 在一些实施方式中,试剂盒中所包括的一或多种色谱柱是一次性的。

附图说明

[0022] 图1描述了在多种pH条件下将样品上样至阳离子交换柱的色谱图。

[0023] 图2描述了SDS-PAGE实验的结果,其中样品在非还原性条件下分析,如实施例3所详述。全部泳道中的优势带表示IgG。完整的IgG在约175kDa处可见。150kDa、100kDa、75kDa、40kDa和20kDa处的其它带来自部分还原的IgG、未组装的IgG或IgG片段。

[0024] 图3示意性描述了修改的Akta(即色谱工作站或系统),其显示用于在线(in-line)三步法的柱管道装置(plumbing)。

[0025] 图4描述了将蛋白A亲和介质直接上样至阳离子交换柱上的色谱图。

[0026] 图5描述了将蛋白A亲和捕获步骤的2个循环产物上样至单个在线阳离子交换柱上的色谱图。

[0027] 图6描述了将蛋白A亲和捕获步骤的4个循环产物上样至单个在线阳离子交换柱上的色谱图。

[0028] 图7描述了SDS-PAGE实验的结果,如实施例4-7所详述。全部泳道中的优势带表示IgG。样品在还原性和非还原性条件下分析。完整的IgG在约175kDa处可见。150kDa、100kDa、75kDa、40kDa和20kDa处的其它带来自部分还原的IgG、未组装的IgG或IgG片段。

具体实施方式

[0029] 本发明至少部分提供了用于从含靶蛋白和一或多种杂质的样品中纯化靶蛋白的新型且改进的方法,其中所述方法特别不需要形成常规蛋白质纯化方法的一部分的通常在各个色谱步骤之间进行的存储罐和/或缓冲液交换步骤。

[0030] 本文所述的方法比现有技术所述那些方法更有创造性且更有效,因为本发明的方法减少了方法限制,并提供了用于一次性或部分一次性方法的模板,在所述方法中液体处理是很复杂的。此方法可适用于任何蛋白A结合多肽(如包含Fc区域),例如单克隆抗体和含Fc区域的片段、免疫粘附分子和Fc融合蛋白。在一些实施方式中,方法条件取决于被纯化的靶分子的pI值,此pI值可由本领域技术人员很容易地确定。本文所述的缓冲液对pI大于8.0的诸如单克隆抗体等含Fc区域的蛋白质效果最佳。然而,基于现有技术的教导和本发明,可很容易优化本发明方法以用于pI小于8.0的蛋白质。

[0031] I. 定义

[0032] 为了更容易地理解本发明,首先定义一些术语。另外的定义列于整个发明详述中。

[0033] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或“抗体”(在本文中可互换地使用)指具有特异性结合抗

原的能力并具有由两条重链和两条轻链组成的四条多肽链基本结构的蛋白质,其中所述链通过例如链间二硫键被稳定化。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在本文中可互换地使用)指具有特异性结合抗原的能力并具有由一条重链和一条轻链组成的二条多肽链结构的蛋白质,其中所述链通过例如链间肽接头被稳定化。术语“结构域”指重链或轻链多肽的球形区域,其包括例如通过 β -折叠和/或链内二硫键稳定化的肽环(例如包含3-4个肽环)。本文中将结构域进一步称作“恒定的”或“可变的”,在“恒定”结构域的情况下是根据各类成员的结构域中相对缺少序列变异,或者在“可变”结构域的情况下是根据各类成员的结构域中的显著变异。在本领域中,抗体或多肽“结构域”常常被互换地称作抗体或多肽“区”。抗体轻链的“恒定”结构域被互换地称作“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”结构域被互换地称作“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”结构域被互换地称作“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”结构域被互换地称作“重链可变区”、“重链可变结构域”、“VH”区或“VH”结构域。

[0034] 免疫球蛋白或抗体可以是单克隆的或多克隆的,并可以单体或多聚体形式存在,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,只要它们保持或被修饰以包括配体特异性结合结构域。术语“片段”指抗体或抗体链的部分,其包含少于完整或完全的抗体或抗体链的氨基酸残基。可通过对完整或完全的抗体或抗体链进行化学或酶处理获得片段。还可通过重组方式获得片段。当通过重组方式获得片段时,片段可单独表达或作为称作融合蛋白的较大蛋白质的部分表达。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。

[0035] 通常,免疫球蛋白或抗体直接抗目标“抗原”。优选地,抗原为生物学上重要的多肽,且将抗体施用至患病或紊乱的哺乳动物可在此哺乳动物中产生疗效。然而,也希望直接抗非多肽抗原(如肿瘤相关的糖脂抗原,参见美国专利5,091,178)的抗体。当抗原为多肽时,其可为跨膜分子(如受体)或配体,如生长因子。

[0036] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本相同的抗体群获得的抗体,即包括单个抗体的群是相同的,区别为可能有少量的天然存在的突变。单克隆抗体是高度特异的,直接抗单个抗原位点。而且,相比于通常包括直接抗不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂,每个单克隆抗体直接抗抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”表示从基本相同抗体群获得的抗体的特征,其不应理解为以任何特别方法来限制抗体的制备。例如,本发明所用的单克隆抗体可通过由Kohler et al., Nature 256:495 (1975) 首先描述杂交瘤方法制备,或通过重组DNA方法制备(参见如美国专利4,816,567)。“单克隆抗体”也可使用Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 和Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 中所述的技术从噬菌体抗体库中分离。

[0037] 单克隆抗体可进一步包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而链剩余部分与源自其它物种或属于其它抗体类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,以及这类抗体的片段,只要它们显示出所希望的生物学活性(美国专利4,816,567;和Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

[0038] 本文所用术语“高可变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高可变区包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(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 et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), 和/或来自“高可变环”的那些残基(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))。“框架”或“FR”残基为除了本文定义的高可变区残基外的那些可变结构域残基。

[0039] 非人(如鼠)抗体的“人源化”形式为包含源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。人源化抗体的大部分为人免疫球蛋白(受体抗体), 其中受体的高可变区残基被具有所需特异性、亲和性和容量的来自诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类等非人物种的高可变区残基替代。在一些实例中, 人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被对应的非人残基替代。而且, 人源化抗体可包括在受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能。通常, 人源化抗体将包括基本上全部的至少一个、通常两个可变结构域, 其中全部或基本上全部高可变环对应于非人免疫球蛋白的那些高可变环, 且全部或基本上全部FR区对应于人免疫球蛋白的那些FR区。人源化抗体可包括至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc), 其通常为人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)。详见Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 和Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

[0040] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”是指任何长度的核苷酸(核糖核酸或脱氧核糖核酸)的聚合形式。这些术语包括单链、双链或三链DNA、基因组DNA、cDNA、RNA、DNA-RNA杂合体、或包含嘌呤和嘧啶碱基、或其它天然、化学或生化修饰的非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的主链可包括糖和磷酸基团(通常存在于RNA或DNA中)、或修饰或取代的糖或磷酸基团。此外, 双链多核苷酸可获得自化学合成的单链多核苷酸产物, 通过合成互补链并将链在合适条件下退火, 或者通过使用DNA聚合酶和适合引物从头合成互补链。核酸分子可采用多种不同形式, 例如基因或基因片段、一个或多个外显子、一个或多个内含子、mRNA、cDNA、重组多核苷酸、支化多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包括修改的核苷酸, 如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物、uracyl、其它糖和连接基团, 如氟核糖和thioate、以及核苷酸分支。如本文所用, “DNA”或“核苷酸序列”不但包括碱基A、T、C和G, 而且包括这些碱基的任何类似物或修饰形式, 如甲基化的核苷酸、核苷酸间修饰, 如不带电荷的连接键和thioate、糖类似物的使用、和修饰的和/或其它主链结构, 如聚酰胺。在具体实施方式中, 核酸分子包括编码SpA变体的核苷酸序列。

[0041] 如本文所用, 术语“免疫粘附素”是指这样的抗体样分子, 其将异源“粘附”蛋白(如受体、配体或酶)的“结合结构域”与免疫球蛋白恒定结构域的效应器功能结合。在结构上, 免疫粘附素包括除抗体的抗原识别和结合位点(抗原结合位点)外的(即“异源的”)粘附素氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合, 所述粘附素氨基酸序列具有所希望的结合特异性。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列优选源自 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链, 因为

包括这些区域的免疫粘附素可通过蛋白A色谱纯化(Lindmark et al., J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。

[0042] “抗体-免疫粘附素嵌合物”包括将抗体的至少一个结构域(如Fc区域)与至少一个免疫粘附素分子结合的分子。示例性的抗体-免疫粘附素嵌合物为双特异性CD4-IgG嵌合物,如Berg et al.,PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991)和Chamow et al.,J.Immunol.153:4268 (1994)所述。

[0043] 术语“Fc区域”和“含Fc区域的蛋白质”是指蛋白质包含免疫球蛋白的重链和/或轻链恒定区或结构域(在前定义的CH和CL区)。包含“Fc区”的蛋白质可具有免疫球蛋白恒定结构域的效应器功能。诸如CH₂/CH₃区等“Fc区”可选择性结合诸如蛋白A等亲和配体或其功能性变体。在一些实施方式中,含Fc区域的蛋白特异性结合蛋白A或其功能性衍生物、变体或片段。在一些实施方式中,含Fc区域的蛋白特异性结合蛋白G或蛋白L、或其功能性衍生物、变体或片段。

[0044] 本文所用的术语“配体结合结构域”是指任何天然的细胞表面受体或其任何区域或衍生物,其保持至少与对应天然受体的定性配体结合。在所要求保护的本发明的一些实施方式中,配体结合结构域与Fc区融合。在具体实施方式中,配体的受体源自具有细胞外结构域的细胞表面多肽,其与免疫球蛋白超基因家族的成员同源。通常,如文中定义,只要受体包括Fc区或与Fc区融合,任何受体均可用在本发明的方法中。不是免疫球蛋白超基因家族成员,但也落入此定义的其它受体为细胞因子的受体,且特别是具有酪氨酸激酶活性的受体(受体酪氨酸激酶)、促红细胞生成素和神经生长因子受体超家族的成员、和细胞粘附分子,如(E-、L-和P-选择素)。

[0045] 术语“受体结合结构域”是指受体的任何天然配体,包括细胞粘附分子,或保持至少与对应天然配体的定性受体结合能力的此类天然配体的任何区域或衍生物。其中,此定义具体包括来自上述受体的配体的结合序列。在一些实施方式中,如文中定义,受体结合结构域包含Fc区或与Fc区融合。

[0046] 本文中待纯化的“组合物”、“溶液”或“样品”包括靶蛋白(如含Fc区的蛋白质)和一种或多种杂质。组合物或样品可被“部分纯化”(即已经历一个或多个纯化步骤,如通过本文所述的非亲和色谱),或可从产生多肽的宿主细胞或生物体直接获得(如组合物可包括收集的细胞培养液)。

[0047] 如本文所用,术语“多肽”通常是指大于约10个氨基酸的肽和蛋白质。本文可互换使用的术语“目标蛋白”和“靶蛋白”是指这样的蛋白质或多肽,其包括但不限于含Fc区域的蛋白质,如待通过本发明方法从蛋白质混合物和任选地存在的其它材料如细胞碎屑等中纯化的抗体。

[0048] 如上所述,在一些实施方式中,靶蛋白为含Fc区域的蛋白质,如免疫球蛋白。在一些实施方式中,含Fc区域的蛋白质为包括与另一多肽或其片段融合的免疫球蛋白的Fc区域的重组蛋白。示例性多肽包括例如肾素;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;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白;α-1抗胰蛋白酶;胰岛素α链;胰岛素的β链;胰岛素原;卵泡刺激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子如凝血因子VIIIc、凝血因子IX、组织因子和von Willebrands因子;抗凝血因子,如蛋白C;心钠素;肺表面活性物质;纤维蛋白溶酶原活化剂,如尿激酶或人尿或组织型纤维蛋白溶酶原活化剂(t-

PA); 铃蟾肽; 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T细胞表达和分泌的激活); 人巨噬细胞炎性蛋白 (MIP-1- α); 血清白蛋白, 如人血清白蛋白; Muellerian抑制物质; 松弛素 α 链, 松弛素 β 链; 松弛素原 (prorelaxin); 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淋巴细胞相关抗原 (CTLA) (如CTLA-4); 抑制素; 激活素; 血管内皮生长因子 (VEGF); 激素或生长因子的受体; 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 ; 血小板衍生的生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子, 如 α FGF和 β FGF; 表皮生长因子 (EGF); 转化生长因子 (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; 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, 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; 白细胞介素 (ILs), 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; 病毒抗原, 如AIDS包膜部分; 转运蛋白; 归巢受体; 地址素; 调节蛋白; 整合素, 如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM; 肿瘤相关抗原, 如HER2、HER3或HER4受体; 以上所列多肽中任一的片段和/或变体。此外, 本发明的蛋白质或多肽为特异结合以上所列多肽中任一的抗体、其片段或变体。

[0049] 术语“酸性变体”为比靶蛋白酸性更强的靶蛋白的变体 (通过阳离子交换色谱测定)。酸性变体的实例为去酰胺化的变体。

[0050] 文中可交换使用的术语“污染物”、“杂质”和“碎屑”是指可存在于包括含Fc的靶蛋白的样品中的任何外源的或不希望的分子, 包括生物大分子, 如DNA、RNA、一或多种宿主细胞蛋白、内毒素、脂质和一或多种添加剂, 所述含Fc的靶蛋白通过使用本发明的方法从一或多种外源的或不希望的分子中分离。另外, 此类污染物可包括在纯化方法之前进行的步骤中使用的任何试剂。

[0051] 文中可互换使用的术语“中国仓鼠卵巢细胞蛋白”和“CHOP”是指源自中国仓鼠卵巢 (“CHO”) 细胞培养物的宿主细胞蛋白 (“HCP”) 的混合物。HCP或CHOP通常作为杂质存在于细胞培养基或裂解物 (如收集的细胞培养液 (“HCCF”)), 其包含诸如抗体或免疫粘附素等在CHO细胞中表达的目标蛋白) 中。包含目标蛋白的混合物中的CHOP量为目标蛋白纯度提供了测量标准。HCP或CHOP包括但不限于在诸如CHO宿主细胞等宿主细胞中表达的目标蛋白。通常, 蛋白混合物中CHOP量表示为相对于混合物中目标蛋白量的百万分率 (parts per million)。应理解当宿主细胞为诸如除CHO外的哺乳动物细胞、大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或植物细胞等另一细胞类型时, HCP是指在宿主细胞裂解物中除靶蛋白外的蛋白。

[0052] 文中可互换使用的术语“百万分率”或“ppm”是指通过本发明方法纯化的靶蛋白的纯度测量标准。单位ppm是指每毫克/毫升目标蛋白中以纳克/毫升计的HCP或CHOP的量, 即 $\text{CHOP ppm} = (\text{CHOP ng/ml}) / (\text{目标蛋白mg/ml})$, 其中所述蛋白在溶液中。当所述蛋白被干燥时 (例如通过冻干), ppm是指 $(\text{CHOP ng}) / (\text{目标蛋白mg})$ 。

[0053] 文中可互换使用的术语“纯化”、“分开”或“分离”是指增加来自包含多肽和一或多种杂质的组合物或样品中的多肽或目标蛋白或靶蛋白的纯度。通常, 靶蛋白的纯度通过从组合物中去除 (完全或部分) 至少一种杂质来增加。“纯化步骤”可为导致“均质”组合物或样

品的整个纯化方法的一部分,所述“均质”组合物或样品用在本文中是指在包含目标蛋白的组合物中,组合物或样品包含小于100ppm的HCP,或者小于90ppm、小于80ppm、小于70ppm、小于60ppm、小于50ppm、小于40ppm、小于30ppm、小于20ppm、小于10ppm、小于5ppm或小于3ppm的HCP。

[0054] 文中可互换使用的术语“流过方法”、“流过模式”和“流过式色谱”是指产物分离技术,其中意图使样品中所含的至少一种产物(如含Fc区域的蛋白)以及一或多种污染物流过色谱树脂或介质,而至少一种可能的污染物或杂质与色谱树脂或介质结合。“流过模式”通常为恒定的操作(即期间不改变流动相的组成的色谱方法)。

[0055] 在根据所要求保护的方法和文中实施例所述的一些实施方式中,本方法使用以流过模式进行的阴离子交换色谱步骤。

[0056] 文中可互换使用的术语“结合和洗脱模式”和“结合和洗脱方法”是指产物分离技术,其中样品中所含的至少一种产物(如含Fc区域的蛋白)结合色谱树脂或介质并随后被洗脱。

[0057] 文中可互换使用的术语“存储罐”、“储集罐”和“中间罐”是指可用于收集处理步骤输出物(如来自柱的洗脱液)的任何容器、罐或袋。在大多数常规方法中,使用一个或多个中间容器来调节来自一个处理步骤输出物的条件/性质,以使其适用于随后的处理步骤。例如,在将收集物(pool)上样到随后的色谱柱或步骤前,需要调节来自色谱柱或步骤(如包含蛋白靶和杂质)的洗脱液的pH和/或电导率。在本发明方法的多个实施方式中,不需要存储罐。因此,在所要求保护的方法的多个实施方式中,此方法提供了从一或多种杂质中纯化靶蛋白的改进方法,而无需在常规纯化方法中常用的存储罐。

[0058] 如本文所用,术语“连续方法”是指含Fc区域的蛋白的纯化方法,其无需使用存储罐和/或缓冲液交换步骤。因此,所要求保护的发明的连续方法优于现有技术中常用的常规纯化方法,因为本发明的方法可显著节约时间和资源。

[0059] 本文使用的术语“缓冲液交换步骤”是指在线溶液条件调整,其通常在很多常规方法中是使用如上所述的存储罐的另一选择。在典型的缓冲液交换步骤中,可使用在试管或混合容器、过滤仪器或设备中混合溶液,在转移期间将两种溶液混合或滴定。例如,溶液可能需要通过将此溶液与另一种较低电导率溶液混合来稀释以降低电导率。缓冲液交换在诸如渗滤、超滤等过滤装置帮助的情况下完成。在所要求保护的发明的一些实施方式中,此方法提供了无需缓冲液交换步骤的纯化蛋白的改进方法。

[0060] 在一些其它实施方式中,所要求保护的发明的方法无需存储罐以及缓冲液交换步骤。

[0061] 术语“色谱”是指将目标分析物(如含Fc区域的蛋白,如免疫球蛋白)与混合物中存在的其它分子分离的任何类型的技术。通常,由于混合物中个体分子在移动相影响下迁移通过固定介质速率的差异,或在结合和洗脱工艺中,将目标分析物与其它分子分离。

[0062] 术语“色谱树脂”或“色谱介质”在文中可互换使用,且是指将目标分析物(如含Fc区域的蛋白,如免疫球蛋白)与混合物中存在的其它分子分离的任何类型的固定相。通常,由于混合物中个体分子在移动相影响下迁移通过固定固体相速率的差异,或在结合和洗脱工艺中,将目标分析物与其它分子分离。非限定性实例包括阳离子交换树脂、亲和树脂、阴离子交换树脂、阴离子交换膜、疏水交换树脂和离子交换整料(monoliths)。

[0063] 本文所用的术语“亲和分离”或“亲和纯化”是指任何纯化或测定技术,所述技术包括使含靶分析物(如含Fc区域的蛋白,如免疫球蛋白)的样品接触已知可结合此靶分析物的亲和介质(如将其携带至已知可结合诸如蛋白A或其变体等分析物的亲和配体的固体支持物)。

[0064] 文中可互换使用的术语“亲和色谱”和“蛋白质亲和色谱”是指蛋白分离技术,其中靶蛋白(如含Fc区域的目标蛋白或抗体)特异地结合该靶蛋白的特异性配体。此类配体通常被称为生物特异性配体。在一些实施方式中,生物特异性配体(如蛋白A或其功能性变体)共价连接色谱固相材料,且当溶液接触色谱固相材料时可接近溶液中的靶蛋白。靶蛋白通常在色谱步骤期间保持其对生物特异性配体的特异性结合亲和力,而混合物中的其它溶质和/或蛋白不强力或特异性地结合所述配体。靶蛋白与固定配体的结合会使污染的蛋白或蛋白杂质通过色谱介质,而靶蛋白保持与固定相材料上固定化配体的特异性结合。特异性结合的靶蛋白随后在适合的条件(如低pH、高pH、高盐、竞争性配体等)以活性形式从固定化配体移除,并随着洗脱缓冲液一起通过色谱柱,此靶蛋白不含已提前通过柱的污染蛋白或蛋白杂质。可将任何组分用作纯化其各自特异性结合蛋白如抗体的配体。然而,在本发明的多个方法中,蛋白A被用作含Fc区域的靶蛋白的配体。本领域技术人员很容易确定用于从靶蛋白(如含Fc区域的蛋白)的生物特异性配体(如蛋白A)中洗脱的条件。在一些实施方式中,蛋白G或蛋白L或其功能性变体可被用作生物特异性配体。在一些实施方式中,在pH 5-9的范围下使用生物特异性配体如蛋白A,以与含Fc区域的蛋白结合,清洗或再平衡生物特异性配体/靶蛋白缀合物,随后用含至少一种盐的pH约4或小于4的缓冲液洗脱。

[0065] 术语“离子交换”和“离子交换色谱”是指这样的色谱方法,其中混合物中的目标溶质或分析物(如含Fc区域的靶蛋白)与连接(如通过共价连接)至固相离子交换材料上的带电荷化合物相互作用,使得与混合物中溶质杂质或污染物相比,目标溶质或分析物与带电荷化合物发生更强或更弱的非特异性相互作用。混合物中污染的溶质比目标溶质更快或更慢地从离子交换材料柱中洗脱,或者相对于目标溶质与树脂结合,或者相对于目标溶质被树脂排斥。“离子交换色谱”具体包括阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、和混合模式的离子交换色谱。例如,阳离子交换色谱可结合靶分子(如含Fc区域的靶蛋白)并随后进行洗脱(阳离子交换结合和洗脱色谱或“CIE”),或可主要结合杂质,而靶分子“流过”柱(阳离子交换流过色谱FT-CIE)。阴离子交换色谱可结合靶分子(如含Fc区域的靶蛋白)并随后进行洗脱,或可主要结合杂质,而靶分子“流过”柱。在一些实施方式和本文所述实施例中,阴离子交换色谱步骤以流过模式进行。

[0066] 短语“离子交换材料”是指带负电荷(即阳离子交换树脂)或带正电荷(即阴离子交换树脂)的固相。电荷可通过将一或多种带电荷的配体经由如共价连接与固相相连来提供。或者或此外,电荷可为固相的固有性质(如对于氧化硅而言,其整体带有负电)。

[0067] “阳离子交换树脂”是指带负电荷的固相,因此其具有游离的阳离子以用于与通过或穿过固相的水溶液中的阳离子进行交换。与固相连接形成阳离子交换树脂的带负电荷的配体可为如羧酸盐或磺酸盐。可商购的阳离子交换树脂包括羧甲基纤维素、固定在琼脂糖上的磺丙基(SP)(如SP-SEPHAROSE FAST FLOW™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™,来自Pharmacia)、和固定在琼脂糖上的磺酰(如S-SEPHAROSE FAST FLOW™,来自Pharmacia)。

[0068] “混合模式的离子交换树脂”是指被阳离子、阴离子和疏水部分共价改性的固相。

可商购的混合模式的离子交换树脂为BAKERBOND ABX™(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.),其包含弱阳离子交换基团、低浓度阴离子交换基团和与硅胶固相支持基质连接的疏水配体。

[0069] 文中所用的术语“阴离子交换树脂”是指这样的固相,其带正电荷,如具有与其相连的一个或多个带正电荷的配体,如季氨基基团(quaternary amino group)。可商购的阴离子树脂包括DEAE纤维素、QAE SEPHADEX™和FAST Q SEPHAROSE™(Pharmacia)。

[0070] 术语“蛋白A”或“ProA”可互换地使用,且包括从其天然来源回收的蛋白A、合成产生的蛋白A(例如通过肽合成或通过重组技术)、和其保留了结合具有CH₂/CH₃区域(例如Fc区域)的蛋白质的能力的变体。蛋白A可商购自Repligen、Pharmacia和Fermatech。蛋白A通常固定在固相支持材料上。术语“ProA”也指亲和和色谱树脂或包含共价连接蛋白A的色谱固体支持基质的柱。

[0071] 本发明方法中所用的蛋白A的功能性衍生物、片段或变体可表征为对鼠IgG2a或人IgG1的Fc区域至少 $K=10^{-8}$ M且优选 $K=10^{-9}$ M的结合常数。符合此结合常数值的作用在文中被称为“高亲和力结合”。优选地,蛋白A的此功能性衍生物或变体包括野生型蛋白A功能性IgG结合结构域的至少一部分,其选自天然结构域E、D、A、B、C或其仍保持IgG结合功能性的工程化突变体。

[0072] 此外,经工程化以允许单点连接的蛋白A衍生物或变体也可被用在所要求保护的方法的亲和色谱步骤中。单点连接通常是指蛋白部分经由单个共价键与蛋白A亲和色谱的色谱支持材料相连。此类单点连接也可通过利用适合的反应性残基来进行,所述反应性残基位于暴露的氨基酸位置,即在环中、接近N或C端、或在蛋白折叠的外围上。适合的反应性基团为例如巯基或氨基官能团。

[0073] 本发明中“污染物蛋白A”为蛋白A的任何类型的功能性IgG结合产物,或通过洗脱结合抗体从蛋白A亲和色谱柱中获得的定义如上的其功能性衍生物。此类污染物蛋白A物质可由如肽键的水解导致,特别是工业生产中所述肽键的水解很可能通过酶作用的方式而发生。蛋白A色谱作为下游方法的早期步骤,而此时粗纯化的新鲜产物溶液仍具有显著的蛋白酶活性。细胞培养液中的死亡细胞或在初始离心或过滤步骤中被破碎的细胞很可能已释放出蛋白酶;相比于生化研究实践,通常无法出于调整目的而在下游工艺之前或期间向细胞培养液中添加蛋白酶抑制剂。实例为苯基甲基磺酰氯(PMSF)或ε-己酸。此类化学试剂为生物制药生产中不希望的添加剂。还有的可能是,根据蛋白折叠的三级结构,蛋白A的重组功能性衍生物或片段的蛋白酶抗性低于野生型蛋白。一旦结合结构域的总数降低,则会暴露连接单个IgG结合结构域的氨基酸区段。结构域间接触可能有助于结构域折叠的稳定性。也可能是由于基于抗体结合诱导的构象改变,蛋白A或其所述功能性衍生物的抗体的结合影响或促进对蛋白酶作用的敏感性。而且,野生型或全长蛋白A或其功能化的工程化片段可能表现不同。

[0074] 将分子与色谱树脂“结合”是指在适合条件(pH/电导率)下使分子暴露于色谱树脂,使得分子通过配体-蛋白相互作用被可逆地固定在色谱树脂之中或之上。非限定性实例包括分子和带电荷基团或离子交换材料的带电荷基团之间的离子相互作用,以及蛋白A和免疫球蛋白之间的生物特异性相互作用。

[0075] 文中所用术语“特异性结合”,如为描述靶蛋白(如含Fc区域的蛋白)和与固体支持

物结合的配体(如与固相基质或树脂结合的蛋白A)之间的相互作用,是指目标蛋白通过结合位点处的蛋白质和配体结构的互补性,以及结合位点处的静电力、氢键、疏水力和/或范德华力的组合作用与配体的常规可逆性结合。通常,空间互补性越大,结合位点处的其它力越强,蛋白质与其各自配体的结合特异性就越强。特异性结合的非限定性实例包括抗体-抗原结合、酶-底物结合、酶-辅因子结合、金属离子螯合、DNA结合、蛋白-DNA结合、调节性蛋白-蛋白相互作用等。理想地,在亲和色谱中,特异性结合在自由溶液中以约 10^{-4} 至 10^{-8} M的亲和力发生。

[0076] 文中所用术语“非特异性结合”,如为描述目标分子(如本文所述的靶蛋白)和与固体支持物结合的配体或其它化合物(如与固相基质或树脂结合的蛋白A)之间的相互作用,是指目标蛋白通过结合位点处的静电力、氢键、疏水力和/或范德华力与固体支持物上的配体或化合物的结合,但缺少增强非结构力作用的结构互补性。非特异性相互作用的实例包括但不限于静电力、疏水力和范德华力以及氢键。

[0077] “盐”是由酸和碱的相互作用形成的化合物。可用在本文所用缓冲液中的各种盐包括但不限于乙酸盐(如乙酸钠)、柠檬酸盐(如柠檬酸钠)、氯化物(如氯化钠)、硫酸盐(如硫酸钠)或钾盐。

[0078] 如本文所用,术语“溶剂”是指能够溶解或分散一或多种其它底物以提供溶液的液体物质。溶剂包括水性溶剂和有机溶剂,其中有用的有机溶剂包括非极性溶剂、乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈、己二醇、丙二醇和2,2-硫二甘醇。

[0079] 术语“去污剂”是指离子和非离子表面活性剂,如聚山梨酸酯(如聚山梨酸酯20或80);泊洛沙姆(如泊洛沙姆188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油烯基-或硬脂基-硫代甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油烯基-或硬脂基-肌氨酸;亚油烯基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基(lauroamidopropyl)-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基(palmidopropyl)-,或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(如月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-,棕榈酰胺丙基-,或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;钠甲基椰油基-,或二钠甲基油烯基-牛磺酸;和MONAQUAT™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)。有用的去污剂为聚山梨酸酯,如聚山梨酸酯20(TWEEN20®)或聚山梨酸酯80(TWEEN80®)。

[0080] 文中所用术语“聚合物”是指通过两种或多种单体的共价键形成的分子,其中单体不是氨基酸残基。聚合物的实例包括聚乙二醇、聚丙二醇和共聚物(如Pluronic, PF68等)。有用的聚合物为聚乙二醇(PEG),如PEG 400和PEG 8000。

[0081] “固相”或“多孔基底”或“基质”是指一或多种带电荷的配体可附着的非水性基质。固相可为纯化柱、离散颗粒的不连续相、膜、整料或过滤器等。形成固相的材料实例包括多糖(如琼脂糖和纤维素);和其它机械性稳定的基质,如氧化硅(如可控孔径玻璃)、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚丙烯酰胺、陶瓷颗粒和上述任何一种的衍生物。

[0082] “缓冲液”为通过其酸-碱共轭组分的作用抵抗pH变化的溶液。可根据如缓冲液的所需pH使用的各种缓冲液描述在Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)中。在所要求保护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范围内的pH。在所要求保护发明的其它步骤中,缓冲液具有5.0至9.0范围内的pH。在所要求保护发明的其

它步骤中,缓冲液具有4.0至6.5范围内的pH。在所要求保护发明的方法的一些步骤中,缓冲液具有小于4.0的pH。将pH控制在此范围内的缓冲液的非限定性实例包括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它们的组合。

[0083] 术语“阳离子交换缓冲液”是指平衡缓冲液,其具有的pH和电导率使得靶分子(如免疫球蛋白)结合阳离子交换材料。

[0084] “上样缓冲液”为这样的缓冲液,其用于将包含目标靶分子(如含Fc区域的靶蛋白)和一或多种杂质的样品或组合物上样至色谱柱(如亲和柱或离子交换柱)。上样缓冲液具有这样的电导率和/或pH,其使得目标分子(和通常一或多种杂质)结合色谱树脂,或其使得目标蛋白流过柱,而杂质与树脂结合。

[0085] “中间缓冲液”用于在洗脱目标多肽分子前,将一或多种杂质从色谱树脂中洗脱。中间缓冲液的电导率和/或pH使得一或多种杂质从离子交换树脂中洗脱,而不洗脱显著量的目标多肽。

[0086] 术语“清洗缓冲液”或“平衡缓冲液”可在文中互换使用,其是指在洗脱目标多肽分子前,用于清洗或再平衡色谱柱的缓冲液。在一些情况中,清洗缓冲液和上样缓冲液可以相同。

[0087] “洗脱缓冲液”用于将靶蛋白从固相中洗脱。洗脱缓冲液的电导率和/或pH通常使得靶蛋白从色谱树脂中洗脱。

[0088] “再生缓冲液”可用于再生色谱树脂,使得其可以重新使用。再生缓冲液具有从色谱树脂去除基本上全部杂质和靶蛋白所需的电导率和/或pH。

[0089] 术语“电导率”是指水溶液在两电极间传导电流的能力。在溶液中,电流通过离子传输流动。因此,随着水溶液中离子含量的增加,溶液将具有更高的电导率。电导率的测量单位为毫西门子/厘米(mS/cm或mS),且可使用如Orion销售的电导计来测量。溶液的电导率可通过改变其中的离子浓度来改变。例如,可改变溶液中缓冲剂的浓度和/或盐(如NaCl或KCl)的浓度,以实现所需的电导率。优选地,修改各种缓冲液的盐浓度以实现以下实施例中所需的电导率。

[0090] 多肽的“pI”或“等电点”是指多肽的正电荷平衡其负电荷时的pH。pI可从多肽所连接的碳水化合物的氨基酸残基或唾液酸残基的净电荷计算,或可通过等电聚焦来确定。

[0091] “清洗”色谱介质是指使适合的缓冲液通过或穿过介质。

[0092] 从色谱树脂“洗脱”分子(如目标多肽或杂质)是指通过改变溶液条件使得缓冲液与目标分子竞争色谱树脂上的配体位点,从而从色谱树脂上去除此分子。非限定性实例是通过改变离子交换材料周围缓冲液的离子强度,使得缓冲液与分子竞争离子交换材料上的带电荷位点,从而将分子从离子交换树脂上洗脱。

[0093] 如本文所用,“滤液”是指通过过滤膜的样品部分。

[0094] 如本文所用,“滞留物”是指基本被过滤膜保留的样品部分。

[0095] 文中可交换使用的术语“病毒灭活”、“病毒清除”或“病毒减少”是指通过物理化学方法可导致病毒无法感染细胞或抑制病毒功能的任何方法。常规的病毒灭活方法包括但不限于低pH处理(如小于pH 4.5、小于4.0或小于3.8)、热处理、用表面活性剂和辐射(如紫外曝光)处理。在一些实施方式中,病毒灭活方法直接针对逆转录病毒。在具体实施方式中,使用低pH条件进行病毒灭活,因为此条件通常破坏病毒脂质包膜,以此灭活病毒。

[0096] 如本文所用,术语“低pH条件”是指水溶液或缓冲液的性质,其中溶液或缓冲液的pH低于正常操作条件,所述溶液或缓冲液通常用于包括含Fc区域的蛋白(如单克隆抗体或MAb)的样品在阳离子(CIEX)交换介质上的上样。例如,典型的CIEX上样条件高于pH 4.5,且通常为pH 5至6。在本发明的方法中,可使用低pH条件,如pH小于4.5。

[0097] 术语“预洗脱步骤”是指在洗脱前倒数第二步的色谱步骤,其中靶分子保持与柱结合,而在上样至下一个柱期间混合的缓冲液对目标产率或目标纯度没有负面影响。非限定性实例包括在适合于阳离子交换柱上样的缓冲液(如pH 5.4的乙酸钠或pH 5.0的柠檬酸钠)中平衡载有含Fc的蛋白的蛋白A柱,随后通过pH 3的乙酸钠将柱洗脱到阳离子交换柱上。

[0098] “切向流过滤”或“TFF”或“交叉流过滤”是指这样的过滤方法,其中样品混合物循环通过膜的上部,而所施加的压力引起某些溶质和小分子通过此膜。通常,溶液与过滤器膜平行流动。跨膜压力差引起流体或可过滤的溶质流过过滤器。这可以连续流工艺进行,因为溶液重复通过膜,而流过过滤器的流体被连续排入单独的环路。

[0099] “高效切向流过滤”或“HPTFF”是指在流量对跨膜压力曲线上,以在5%和100%跨膜压力之间的流量下进行的TFF(参见如美国专利第5,256,694号;美国专利第4,490,937号;和美国专利第6,054,051号)。

[0100] “孔径分布”基本上是指具有接近一些理论半径(r)的实际半径(R)的孔的数量,以概率密度函数表示(参见Zeman, L.J. and Zydney, A.L., *supra*, p. 299-301)。随着实际孔半径标准偏差的增加,孔径分布增加。变窄的孔径分布是因为孔对理论值的标准偏差减少。例如,当通过将带电荷的化合物加入到带电荷膜的较大孔中来降低一些较大孔的尺寸时,这就可以实现。液-液孔侵入的原理可用于测量孔径分布(参见R. van Reis and A.L. Zydney, *supra*, p. 2201)。根据此原理,通过混合来使诸如硫酸盐溶液和聚(乙二醇)等两种高度不混溶液体相接触,以实现平衡分隔。带测试的膜用其中一种液体涂覆,使得全部孔被填满。在排干进料通道后,将第二流体引入系统。第一流体随后被第二流体排出孔中,且流速作为反面膜压力的函数测定。所得结果提供了孔径分布的信息,且可与标称分子量截流(nominal molecular weight cutoff)相关联(参见R. van Reis and A.L. Zydney, *supra*, p. 2201)。

[0101] “官能团”的实例包括但不限于离子交换基团、生物亲和性或生物特异性基团、疏水基团、亲疏相互作用基团、螯合物或螯合基团、和靶化合物具有被称为 π - π 相互作用的基团、氢结合基团和亲水基团。

[0102] “配体”的实例包括但不限于离子交换基团、疏水相互作用基团、亲水相互作用基团、亲疏相互作用基团、金属亲和性基团、亲和性基团、生物亲和性基团和混合模式的基团(上述基团的组合)。本文可用的一些优选配体包括但不限于强阳离子交换基团,如磺丙基、磺酸;强阴离子交换基团,如三甲基氯化铵;弱阳离子交换基团,如羧酸;弱阴离子交换基团,如N,N-二乙胺基或DEAE;疏水相互作用基团,如苯基、丁基、丙基、己基;和亲和性基团,如蛋白A、蛋白G和蛋白L。

[0103] II. 亲和色谱步骤

[0104] 在本发明的多个实施方式中,本发明的方法包括将基于蛋白A的亲合性树脂应用于亲和色谱步骤中。蛋白A可为天然蛋白A(来自Staph. Aureus)、重组蛋白A或它们的功能性变体。可用在本发明方法中的蛋白A树脂的实例包括:ProSep-vA HC、ProSep Ultra Plus、

MabSelect、MabSelect SuRe和其它可商购的亲合性树脂。其它亲合性配体/树脂可用在本发明的方法中,如蛋白G和其它Fc结合蛋白(如单链骆驼抗体)。

[0105] 在本发明方法中,在亲和捕获步骤后,靶蛋白优选使用pH 2.0-4.0且优选pH 2.8-3.8洗脱。洗脱池体积需要足够大,以将靶蛋白从亲和柱中移除并成功上样至此工艺中的后续在线阳离子交换柱上。这些体积将根据亲和柱与阳离子交换柱的相对大小来改变。例如,如果亲和柱和阳离子交换柱大小相同,洗脱池将优选以1-5个柱体积(CV),最优选1.5-4CV被洗脱。亲和洗脱缓冲液的非限定性实例为乙酸、柠檬酸、磷酸盐或甘氨酸(glycine)。这些亲和洗脱缓冲液可通过额外的盐或添加剂来调整,以控制电导率或改进产物回收率。例如,额外的组分可包括降低聚集物形成的添加剂。添加剂的非限定性实例包括但不限于精氨酸、己二醇或聚乙二醇。

[0106] 在一些实施方式中,亲和捕获步骤为随后的离子交换步骤提供了良好的上样能力、产物回收率和杂质去除。

[0107] III. 离子交换色谱步骤

[0108] 在本文所述方法中,亲和步骤洗脱池被直接上样至阳离子交换柱上,因此无需使用存储罐/缓冲液交换步骤。阳离子交换柱可使用pH为3.0-7.0且电导率为2-20mS的缓冲液,最优选pH为4.5-6且电导率为2-16mS的缓冲液平衡。可用来自亲和柱的单次洗脱循环的每升树脂5-120g靶蛋白(g/L)或者用来自亲和柱的多个洗脱循环的5-120g/L靶蛋白对柱进行蛋白上样。在一些实施方式中,阳离子交换柱的总上样量为20-80g/L或40-60g/L。

[0109] 通过在上样后将阳离子交换柱再平衡至比亲和洗脱pH更高的pH,阳离子交换柱可上样一个或多个来自亲和捕获步骤的循环物。

[0110] 为了确定病毒在全部工艺中被去除,CIEX柱可与pH小于4.0(如<3.8)的缓冲液交换,以在上样后进行10-60分钟或15-45分钟的病毒灭活。或者,可在上样pH下对柱流过进行病毒去除的确定,这导致对于病毒流过和降低的pH病毒灭活均为累积的病毒去除。

[0111] 现已观察到某些靶蛋白在蛋白质上样或结合到柱期间或之后接触低pH条件能够影响靶蛋白的整体回收率。本发明提供了改进的纯化方法,其避免了由提高某些方法步骤的电导率而导致的回收损失。例如,从阳离子交换步骤(CIEX)的靶蛋白回收率可受到纯化方法期间的低pH缓冲液步骤(如常在低pH下实施的蛋白A洗脱步骤和病毒灭活步骤)的影响。在本发明方法的某些实施方式中,提供了改进的纯化方法,其采用了电导率提高的低pH缓冲液,从而改进了靶蛋白的整体回收。或者,低pH缓冲液的pH可略有增加(例如,使用pH 4.5vs.pH 3.5)。

[0112] 可通过,例如向蛋白A洗脱缓冲液或病毒灭活缓冲液添加盐来提高低pH缓冲液的电导率。可使用的盐可取决于所述缓冲液的pH,且可由本领域普通技术人员简单地确定。在一些实施方式中,所添加的盐量在25mM至500mM和100mM至250mM的范围。

[0113] 可通过本文所述的任意步骤和本领域已知的那些步骤或可由本领域普通技术人员简单确定的那些步骤完成阳离子交换柱的洗脱。例如,在一些实施方式中,可使用一个或多个pH步骤完成阳离子交换柱的洗脱,其中将所述洗脱液直接上样到流过模式中的阴离子交换介质上。洗脱pH变化还可包括缓冲液类型、缓冲液浓度和盐浓度的变化。用于本文所述阳离子交换步骤的洗脱pH的优选范围是约6.0至9.0或约7.0至8.0。

[0114] 还可仅使用提高的缓冲电导率完成阳离子交换柱的洗脱。洗脱电导率的优选范围

取决于pH和靶分子的等电点(pI)。通常,电导率变化在4mS至50mS或8mS至30mS范围时可有效洗脱。必须优化阳离子交换柱的洗脱以确保随后的阴离子交换流通步骤的性能。例如,在一些情况下,可通过使用具有低电导率的较高pH,例如pH 7.0的6mS缓冲液,或使用具有较高电导率的较低pH,例如,如pH 5.5的15mS缓冲液实现从阳离子交换步骤的有效洗脱。在这些情况下,应使用两种条件研究阴离子交换流过步骤的性能,且阳离子交换步骤下游的性能决定了用于阳离子交换的优选洗脱方法。

[0115] 在一些实施方式中,本发明的方法可适合地包括在所述方法的任意步骤之间和之后的病毒过滤步骤。在一些实施方式中,所述病毒过滤步骤采用预滤器,其可以为任意形式,包括但不限于膜、深层滤器、色谱柱或其组合。所述方法可包括在亲和捕获之前的使用膜、深层滤器、色谱柱或其组合的另外的净化或深层过滤。可在阴离子交换之后添加另外的精制步骤,包括但不限于HPTFF、FT-HIC、HIC等。

[0116] 通过以下实施例进一步举例说明本发明,这些实施例不应解释为限制性的。在本申请全文中引用的所有文献、专利和公布的专利申请的内容以及附图均通过援引加入本文。

[0117] 实施例

[0118] 实施例1:用于低pH上样的树脂的结合能力的比较

[0119] 使用以下方法比较了三种阳离子交换介质在表1中列出的条件(用于蛋白A亲和层析的典型洗脱条件)下的动态负载量。

[0120] 使用了具有以下特征的示例性阳离子交换介质:平均粒径为60 μ m,孔径大小在60-80nm之间,“S”配基密度在170-270 μ mol/mL树脂之间,并且具有压流性质,使得在20cm的床高下能够在2bar下达到>400cm/hr,且在3分钟停留时间的IgG负载量>50g/L的多孔单分散聚甲基丙烯酸酯树脂,将商业上来自Millipore Corporation的ProRes-STM,来自EMD Merck的Fractogel-S[®]和来自GE Healthcare的SP-Sepharose Fast Flow[®]装入omnifit柱(直径0.66cm,床高7cm)(Bio Chem Valve, Inc., Boontown, NJ)并检测对多克隆人 γ 球蛋白(IgG)的动态结合负载量。使用表1中的pH和电导率进行柱平衡,根据需要使用氯化钠调节电导率。使用在与平衡缓冲液相同的缓冲液中的蛋白质将所述蛋白质(5g/L)上样到柱上。使用在与3分钟停留时间一致的上样流速下5%贯流(breakthrough)的容量来表征动态结合负载量。

[0121] 表1:低pH下CIEX结合能力的总结

[0122]	结合缓冲液条件		ProRes-S TM (g/L)	Fractogel-S (g/L)	SP-Sepharose Fast Flow (g/L)
	pH	电导率(mS)			
	3.5	6	52	53	21
	3.8	6	53		18
[0123]	4.5	6	59		34
	5	6	56		54

[0124] 实施例2:在直接上样条件下使用模型进料的离子交换步骤的演示

[0125] 在代表性的试验中,使用模型蛋白进料演示在阳离子交换柱直接上样后的阴离子

交换步骤之后的蛋白质回收和纯化。

[0126] 使用以下混合物设计模型蛋白A洗脱池:50mM乙酸钠缓冲液pH 3.5,2.5g/L多克隆IgG,n-蛋白A 50-100ppm和来自非表达CHO细胞系的10%wt HCCF。使用50mM乙酸盐缓冲液(pH 3.5,5倍柱体积,CV)平衡装填了ProRes-S™的7cm x 0.66cm omnifit柱。以0.33CV/min将模型蛋白A洗脱池混合物(~20mL)上样到(~20mL)柱上。在蛋白质混合物上样后,使用3CV 100mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5)平衡树脂。在pH 5平衡后,依次使用一系列pH步骤进行柱洗脱,起始为2CV的50mM Tris,pH 8.0和0.3M NaCl,随后为2CV的50mM Tris,pH 8.0和0.4M NaCl,以及2CV的50mM Tris,pH 8.0和0.5M NaCl。将洗脱的体积直接上样到示例性阴离子交换树脂柱(例如,使用阴离子交换化学改性的ProRes-S™基础介质,如美国专利公布No.20090050566中的公开),所述阴离子交换树脂柱使用50mM Tris,pH 8.0和0.3M NaCl预平衡并设置为与上述阳离子交换柱串联和位于上述阳离子交换柱下游。收集对应于阳离子交换洗脱步骤的2CV馏分的流过物。适当地混合流过馏分以形成“色谱后池”并分析关键杂质,结果总结在表2中。

[0127] 表2:模型蛋白A洗脱池的离子交换(精制)纯化

	IgG 浓度 (g/L)	池体积 (mL)	HCP (ppm)	蛋白 A (ppm)	聚集物 (%)	产率 (%)
[0128] 模型蛋白 A 洗脱池	2.5	20	1746	63	3	
色谱后池	4	10	24	5	0*	80

[0129] *无法检测

[0130] 实施例3:用于纯化包含Fc区域的蛋白质的分批模式方法

[0131] 在代表性的试验中,设计了用于纯化包含Fc区域的蛋白质(示例性单克隆抗体)的分批模式方法,其中所述方法使用蛋白A树脂,在不同pH条件下上样的阳离子交换树脂,和阴离子交换。所述方法如下文所述。此试验证明了可允许在亲和捕获后直接上样的离子交换步骤而无需存储罐或缓冲液交换步骤的条件。

[0132] 将表达IgG的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系在搅拌生物反应器中温育约10天。使用初级深层滤器(Millipore DOHC)取出细胞,随后使用二级深层滤器(Millipore XOHC)进行二次净化。使用以下程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0133] 亲和步骤采用ProSep®Ultra Plus Protein A介质(Millipore Corporation),柱尺寸如下:高=7cm;I.D.=1cm;柱体积=5.5mL。

[0134] 表3.1:用于亲和步骤步骤的程序

[0135]	步骤	缓冲液	停留时间(min)	CV
	平衡(EQ)	25mM Tris, 25mM NaCl, 0.05M EDTA, pH 8.0	3	5
	上样	HCCF	3	上样密度 40g/L
	EQ	25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, pH 8.0	3	3
	中间清洗	0.2M 柠檬酸盐, pH 5	3	3
	EQ	25mM Tris, 25mM NaCl, 0.05M EDTA, pH 8.0	3	3
	洗脱	0.1M 乙酸, pH 2.8	3	3
	再生	0.15M 磷酸, 约 pH 1.5	3	3
	EQ	25mM Tris, 25mM NaCl, 0.05M EDTA, pH 8.0	1	10

[0136] 阳离子交换色谱步骤采用ProRes-S™介质 (Millipore Corporation), 柱尺寸如下: 高=22cm; I.D.=0.66cm; 柱体积=7.53mL。

[0137] 表3.2:CIEX步骤的一般程序

[0138]	步骤	缓冲液	停留时间(min)	CV
	平衡(EQ)	0.025M MES, 50mM NaCl pH 5.6	3	2
	上样	调整的 ProA 池 (多 pH)	3	多种, ~20g/L
	EQ	0.025M MES, 50mM NaCl pH 5.6	3	3
[0139]	中间清洗	0.025M MES, 70mM NaCl pH 5.6	3	1
	EQ	0.025M MES, 50mM NaCl pH 5.6	3	3
	洗脱	0.025M MES, 500mM NaCl pH 5.6	3	>3, 收集 2mL 池
	剥除(Strip)	0.025M MES, 1M NaCl pH 5.6	3	3
	EQ	0.025M MES, 50mM NaCl pH 5.6	1.4	6

[0140] 阴离子交换色谱步骤采用ChromaSorb 0.08mL设备中的ChromaSorb®膜 (Millipore Corporation)。

[0141] 表3.3:FT-AIEX步骤的一般程序

[0142]

步骤	缓冲液	流速	体积或持续时间
预处理	0.5M NaOH	0.2mL/min	30min
平衡 (EQ)	25mM Tris, pH 8	1mL/min	控制pH至8.0
上样	pH 8.0调整/稀释的CEX洗脱	1mL/min	100mL/Nano

[0143] 独立地运行所述柱, 并调整来自每个步骤的池以模拟柱之间的潜在直接转移条件。将ProSep Ultra Plus装入上述柱中, 并按照表3.1中的步骤上样。

[0144] 在一系列pH值 (pH 3.42, pH 3.44, pH 3.46和pH 3.5) 下产生洗脱池, 收集并调整

pH以生成用于CIEX上样的具有一系列pH条件的池。使用表3.2中描述的程序(典型的色谱图参见图1),将pH调整至pH 3.41的池(本文称作样品1)、pH调整至pH3.75的池(本文称作样品2)、pH调整至pH 4的池(本文称作样品3)、pH调整至pH 4.3的池(本文称作样品4)和pH调整至pH 5.0的池(本文称作样品5)分别上样至阳离子交换柱(例如ProRes-S™)。收集来自阳离子交换步骤的洗脱池,并在上样到阴离子交换步骤(通流吸附器ChromaSorb)前,将pH调整至pH 8.0。在FT-AIEX步骤后收集终池,并分析纯度和产率。结果显示于下表3.4和表3.5中。ChromaSorb产率约100%,且如期地没有收到ProRes-S™的pH上样的影响。下表3.6中显示了中间池和终池的纯度。图2中显示了对应池的SDS PAGE凝胶分析。将进料2倍稀释,并使用Laemmli缓冲液将剩余的样品稀释20倍。

[0145] 表3.4:亲和捕获步骤的产率

[0146]	样品#	上样密度(mg/mL)	试验的产率%	ProA 洗脱池的 pH
	1	29.5	~100	3.42
[0147]	2	29.5	~100	3.44
	3	29.5	~100	3.46
	4	29.5	~100	3.50
	5	29.5	~100	3.50

[0148] 表3.5:CIEX步骤的产率

[0149]

样品#	用于CEX上样的调整pH	上样密度 (mg/mL)	体积 (mL)	试验的产率%
1	3.41	20	6	76.7
2	3.75	20	6	86.2
3	4	20	6	81.4
4	4.3	20	6	85.5
5	5	20	6	83.5

[0150] 表3.6:实施例3中描述的方法的中间池和终池纯度

[0151]

样品 #	池	SDS PAGE 道#	HCP (ppm)	Pro A (ppm)	聚集 物(%)	产率 (%)
	进料	2	9600	NA	N/A	NA
	蛋白 A 池	3	19	31	1	~ 100
1	CIEX 池(在 pH 3.4 上样)	4	3	4	0.5	77
2	CIEX 池(在 pH 3.75 上样)	5	5	5	0.2	86
3	CIEX 池(在 pH 4 上样)	6	6	4	0.5	81
4	CIEX 池(在 pH 4.3 上样)	7	5	5	0.4	85
5	CIEX 池(在 pH 5 上样)	8	6	5	0.2	83
1	终池(来自样品 1 的 ChromaSorb 池)	9	< 3*	<4*	NM	~ 100
5	终池(来自样品 5 的 ChromaSorb 池)	10	< 3*	6	NM	~ 100
平均总产率						82

[0152] *低于检测限, #参见下图2, NA=不适用, NM=未测量

[0153] 实施例4: 使用蛋白A树脂、阳离子交换树脂和阴离子交换树脂而无需存储罐和缓冲液交换步骤的纯化方法

[0154] 在另一个代表性的试验中, 涉及用于纯化包含Fc区域的蛋白, 例如单克隆抗体的改进方法, 所述方法采用蛋白A树脂、阳离子交换树脂和阴离子交换树脂, 而无需存储罐和缓冲液交换步骤。

[0155] 具体地, 根据实施例3中的描述制备净化的包含IgG的进料。使用下文列出的柱, 通过表4中描述的程序, 从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0156] 亲和步骤采用蛋白A树脂, ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation), 且所述柱具有以下的尺寸: 高=21cm; I.D.=0.66cm; 柱体积=7.5mL。

[0157] 所述阳离子交换色谱步骤采用ProRes-S介质 (Millipore Corporation) 并具有以下柱尺寸: 高=21cm; I.D.=0.66cm; 柱体积=7.5mL。

[0158] 所用的阴离子交换树脂是Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), 且柱尺寸如下: 高=7cm; I.D.=0.66cm; 柱体积=2.4mL。

[0159] 表4: 没有存储罐或缓冲液交换步骤的三步纯化方法的程序

[0160]

步骤	缓冲液	Pro A 柱	CIEX 柱	AIEX 柱	柱体积 (CV)*	停留时间 (min)
AIEX 平衡 (AIEX EQ)	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0 (AIEX EQ)	离线	离线	在线	3	3
CIEX 平衡 (CIEX EQ)	25mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4 (CIEX EQ)	离线	在线	离线	3	3
ProA 平衡 (ProA EQ)	磷酸盐缓冲液(PBS) pH 7.4	在线	离线	离线	5	2.3
ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
ProA 中间清洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
用 CIEX EQ 进行 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	3	4
CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3

[0161]

ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
CIEX 洗脱	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	在线	在线(收集产物池)	7	4
CIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	在线	离线	3	4
CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
AIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	离线	在线	3	3
AIEX EQ	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	离线	在线	3	3

[0162] *对于使用2个在线柱的步骤,使用CIEX柱体积来测定缓冲体积 (CV)

[0163] 在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统 (GE Healthcare) 上运行表4中描述的程序。所述柱如表4中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。这样可惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换。不期望受到理论束缚,预期色谱柱成为贮存产品的“存储罐”,同时将所述缓冲液转换成充当已经上样的柱的洗脱缓冲液和随后下游柱的上样缓冲液的缓冲

液。色谱显示在图4中。纯度和产率表征在表6中。

[0164] 实施例5:使用蛋白A树脂、阳离子交换树脂和阴离子交换膜纯化单克隆抗体而无需存储罐或缓冲液交换步骤的纯化方法

[0165] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表4中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0166] 所用的蛋白A树脂是具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0167] 所用的阳离子交换色谱介质是ProRes-S,且具有如下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0168] 所用的阴离子交换膜是ChromaSorb 0.08mL设备中的ChromaSorb (Millipore Corporation)。

[0169] 除了使用膜吸附剂代替树脂柱的AIEX步骤外,按照实施例4的描述运行上述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表4中所述的程序。所述柱如表4中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。因此,可惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换步骤。纯度和产率表征在表6中。

[0170] 实施例6:使用蛋白A树脂的多个循环、阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0171] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表5中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0172] 所用的蛋白A树脂是具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation):高=12cm;I.D.=0.66cm;柱体积=4.1mL。

[0173] 使用ProRes-S进行所述阳离子交换色谱,且具有如下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0174] 使用ChromaSorb (Millipore Corporation) 的阴离子交换膜与ChromaSorb 0.08mL设备一起使用。

[0175] 表5:用于没有存储罐或缓冲液交换步骤的三步纯化方法的程序

[0176]

方法 步骤 #	步骤	缓冲液	Pro A 柱	CIEX 柱	AIEX 柱	CV*	停留 时间 (min)
1	AIEX 平衡 (AIEX EQ)	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0 (AIEX EQ)	离线	离线	在线	3	3
2	CIEX 平衡 (CIEX EQ)	25mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4 (CIEX EQ)	离线	在线	离线	3	3
3	ProA 平衡 (ProA EQ)	磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7.4	在线	离线	离线	5	2.3
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
6	ProA 中间清 洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3

[0177]

7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	3	4
9	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
10	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
11	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
在蛋白 A 柱上运行第二循环							
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
6	ProA 中间清 洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	3	4
9	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
10	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
11	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
12	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
13	CIEX 洗脱	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	在线	在线 (收集产 品池)	7	4
14	CIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	在线	离线	3	4
15	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
16	AIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	离线	在线	3	3
17	AIEX EQ	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	离线	在线	3	3

[0178] *对于使用2个在线柱的步骤,使用CIEX柱体积来测定缓冲体积(CV)

[0179] 除了在阳离子交换柱上循环2次的蛋白A捕获步骤(重复步骤4-11)外,按照实施例5的描述运行上述柱。随后,将CIEX柱洗脱到代替树脂柱的膜吸附剂上。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表6中描述的程序。

[0180] 所述柱如表5中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。这样可纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换,从而提供更有效且改进的方法。图5中显示了在阳离子交换步骤上运行两个蛋白A亲和洗脱循环的色谱图。纯度和产率表征在表6中。

[0181] 实施例7:使用蛋白A树脂的多个循环、阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0182] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表5中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0183] 所用的蛋白A树脂是ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation)且具有如下柱尺寸:高=5cm;I.D.=0.66cm;柱体积=2mL。

[0184] 所述阳离子交换色谱步骤使用是ProRes-S介质 (Millipore Corporation)柱尺寸如下:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0185] 所用的阴离子交换膜是ChromaSorb 0.08mL设备中的ChromaSorb (Millipore Corporation)。

[0186] 除了在阳离子交换柱上循环总计4次的蛋白A捕获步骤(在阳离子洗脱前将步骤4-11连续运行4次)外,按照实施例6的描述运行上述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表6中所述的程序。所述柱如表6中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。

[0187] 因此,惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换步骤。图6中显示了在阳离子交换步骤上运行4个蛋白A亲和洗脱循环的色谱图。纯度和产率表征在表6中。

[0188] 表6:实施例4~7中所述方法的终池纯度

实施例	池	SDS PAGE 道#	HCP (ppm)	DNA 纯化系数**	产率(%)
	进料	2	9700	0.7ug/mL	NA
[0189]	实施例 4 终池	7, 8	< 3*	4	83
	实施例 5 终池	9, 10	< 3*	15	80
	实施例 6 终池	11	< 3*	9	71
[0190]	实施例 7 终池	12, 13	< 3*	7	71
	平均的方法总产率				76

[0191] *低于检测限;#参见下图7;NA=不适用;NM=未检测;**纯化系数=进料中的[DNA]/终池中的[DNA]报道纯化系数(上样ppm/终池ppm)的原因是DNA试验的限度

[0192] 实施例8:使用蛋白A树脂的单个循环、阳离子交换树脂和阴离子交换树脂的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0193] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表7中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0194] 所用的蛋白A树脂是ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation)且具有如下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0195] 所述阳离子交换色谱步骤使用ProRes-S介质 (Millipore Corporation)和以下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0196] 所用的阴离子交换树脂是Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare),具有如下柱尺寸:高=5cm;I.D.=1.1cm;柱体积=4.8mL。

[0197] 表7:用于没有存储罐或缓冲液交换步骤的三步纯化方法的程序

[0198]

方法 步骤 #	步骤	缓冲液	Pro A 柱	CIEX 柱	AIEX 柱	柱体积 (CV)*	停留 时间 (min)
1	AIEX 平衡 (AIEX EQ)	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0 (AIEX EQ)	离线	离线	在线	3	3
2	CIEX 平衡 (CIEX EQ)	25mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4 (CIEX EQ)	离线	在线	离线	3	3
3	ProA 平衡 (ProA EQ)	磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7.4	在线	离线	离线	5	2.3
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清 洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3

[0199]

6	ProA 中间清 洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	4	4
9	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
10	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
11	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
12	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
13	CIEX 洗脱	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	在线	在线(收集 产品池)	7	4
14	CIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	在线	离线	3	4
15	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
16	AIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	离线	在线	3	3
17	AIEX EQ	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	离线	在线	3	3

[0200] *对于使用2个在线柱的步骤,使用CIEX柱体积来测定缓冲体积 (CV)

[0201] 在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上,使用表7中描述的程序运行上述柱。

所述柱如表7中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。因此,纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换。

[0202] 纯度和产率表征在表9中。

[0203] 实施例9:使用蛋白A树脂的单个循环、阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环纯化单克隆抗体的方法

[0204] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表7中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0205] 所用的蛋白A树脂是具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0206] 所述阳离子交换色谱步骤使用ProRes-S介质 (Millipore Corporation) 和如下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0207] 使用以下阴离子交换膜:ChromaSorb 0.08mL设备中的ChromaSorb (Millipore Corporation)。

[0208] 按照上述实施例8中的描述运行所述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表7中所述的程序。所述柱如表7中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。

[0209] 因此,纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换步骤。纯度和产率表征在表9中。

[0210] 实施例10:使用蛋白A树脂的多个循环、阳离子交换树脂和混合模式树脂的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0211] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表8中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0212] 所用的蛋白A介质是具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus树脂 (Millipore Corporation):高=5cm;I.D.=0.66cm;柱体积=2mL。

[0213] 所用的阳离子交换色谱介质是ProRes-S (Millipore Corporation),具有如下柱尺寸:高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0214] 所用的阴离子交换色谱介质是使用Capto Adhere (GE Healthcare) 且具有如下柱尺寸的混合模式树脂:高=5cm;I.D.=0.66cm;柱体积=2mL。

[0215] 除了在阳离子交换柱上循环总计4次的蛋白A捕获步骤(在阳离子洗脱前将步骤4-11连续运行4次)外,按照实施例6的描述运行上述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表8中所述的程序。所述柱如表8中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。这样可惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换步骤。纯度和产率表征在表9中。

[0216] 表8:用于没有存储罐或缓冲液交换步骤的三步纯化方法的程序

方法 步骤 #	步骤	缓冲液	Pro A 柱	CIEX 柱	AIEX 柱	(CV)*	停留 时间 (min)
1	AIEX 平衡 (AIEX EQ)	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0 (AIEX EQ)	离线	离线	在线	3	3

[0217]

[0218]

2	CIEX 平衡 (CIEX EQ)	25mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4 (CIEX EQ)	离线	在线	离线	3	3
3	ProA 平衡 (ProA EQ)	磷酸盐缓冲液(PBS) pH 7.4	在线	离线	离线	5	2.3
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
6	ProA 中间清 洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	3	4
9	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
10	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
11	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
在蛋白 A 柱上运行第二、第三和第四循环							
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
6	ProA 中间清 洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	3	4
9	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
10	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
11	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3

[0219]

12	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
13	CIEX 洗脱	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	在线	在线 (收集产物池)	7	4
14	CIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	在线	离线	3	4
15	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
16	AIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	离线	在线	3	3
17	AIEX EQ	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	离线	在线	3	3

[0220] *对于使用2个在线柱的步骤,使用CIEX柱体积来测定缓冲体积(CV)

[0221] 实施例11:使用蛋白A树脂的单个循环、包括阴离子交换介质的阳离子交换树脂的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0222] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表7中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0223] 所用的蛋白A介质是具有如下柱尺寸的MabSelect®SuRe (GE Healthcare):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0224] 所用的阳离子交换色谱是具有如下柱尺寸的ProRes-S (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0225] 所用的阴离子交换膜是ChromaSorb 0.08mL设备的ChromaSorb (Millipore Corporation)。按照实施例8运行所述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表7中描述的程序。所述柱如表7中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。这样可纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换。纯度和产率表征在表9中。

[0226] 表9:实施例8~11中所述方法的终池纯度

[0227]

实施例	池	聚集物 (%)	HCP (ppm)	ProA (ppm)	DNA 纯化系数**	产率(%)
	进料	3.7	9700	NA	0.7ug/mL	NA
实施例 8	终池	1.7	< 3*	< 4*	NM	72
实施例 9	终池	2.3	< 3*	< 4*	13	83
实施例 10	终池	2.4	< 3*	< 4*	74	51#
实施例 11	终池	0.9	< 3*	NM	25	89

[0228] *低于检测限;NA=不适用;NM=未检测;**纯化系数=进料中的[DNA]/终池中的[DNA]报道纯化系数的原因是DNA试验的限度(上样ppm/终池ppm)#没有根据制造商的推荐优化用于此树脂的条件,可通过实施更接近于制造商推荐条件的分离改进产率。

[0229] 实施例12:使用蛋白A树脂的单个循环、没有低pH保持的阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0230] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表7中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0231] 所用的蛋白A树脂是具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0232] 所述阳离子交换色谱步骤使用具有如下柱尺寸的ProRes-S (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0233] 所述阴离子交换色谱步骤采用ChromaSorb 0.08mL设备的ChromaSorb (Millipore Corporation)。

[0234] 按照实施例8的描述运行上述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表7中描述的程序。所述柱如表7中所述的顺次单独或偶联(在线)运行。这样可惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换。纯度和产率表征在表11中。

[0235] 实施例13:使用蛋白A树脂的单个循环、包括30分钟的低pH保持的阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环纯化单克隆抗体的纯化方法

[0236] 根据实施例3中的描述制备包含净化IgG的进料。使用以下列出的柱,通过表10中所述的程序从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1。

[0237] 亲和步骤使用蛋白A树脂,具有如下柱尺寸的ProSep Ultra Plus (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;柱体积=7.5mL。

[0238] 所述阳离子交换色谱步骤使用具有如下柱尺寸的ProRes-S介质 (Millipore Corporation):高=21cm;I.D.=0.66cm;

[0239] 柱体积=7.5mL。

[0240] 所述阴离子交换色谱步骤使用ChromaSorb 0.08mL设备的ChromaSorb (Millipore Corporation)。

[0241] 表10:用于没有存储罐或缓冲液交换步骤的三步纯化方法的程序

[0242]

方法步骤#	步骤	缓冲液	Pro A 柱	CIEX 柱	AIEX 柱	柱体积 (CV)*	停留时间(min)
1	AIEX 平衡 (AIEX EQ)	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0 (AIEX EQ)	离线	离线	在线	3	3
2	CIEX 平衡 (CIEX EQ)	25mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4 (CIEX EQ)	离线	在线	离线	3	3
3	ProA 平衡 (ProA EQ)	磷酸盐缓冲液 (PBS) pH 7.4	在线	离线	离线	5	2.3
4	ProA 上样	HCCF	在线	离线	离线	600 mL	2.3
5	ProA EQ 清洗 1	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
6	ProA 中间清洗 2	0.2M 柠檬酸盐, pH 5.5	在线	离线	离线	3	2.3
7	使用 CIEX EQ 的 ProA 平衡	CIEX EQ	在线	离线	离线	3	4
8	ProA 洗脱	0.1M 乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5	在线	在线	离线	6	4
9	低 pH 保持	0.1M 乙酸盐, pH, 150mM NaCl, 3.6	离线	在线	离线	最小 0.5 (接触时间 = 30 分钟)	60 (降低流速)
10	CIEX 洗脱	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	在线	在线 (收集产品池)	7	4
11	CIEX 平衡	CIEX EQ	离线	在线	离线	4	2.3
12	ProA 再生	0.15 M 磷酸	在线	离线	离线	3	2.3
13	ProA EQ	PBS	在线	离线	离线	3	2.3
14	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4

[0243]	15	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
	16	CIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	在线	离线	3	4
	17	CIEX EQ	CIEX EQ	离线	在线	离线	3	4
	18	AIEX 再生	0.5 M NaOH	离线	离线	在线	3	3
	19	AIEX EQ	25mM Tris, 25mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.0	离线	离线	在线	3	3

[0244] *对于使用2个在线柱的步骤,使用CIEX柱体积来测定缓冲体积(CV)

[0245] 按照实施例10中的程序运行上述柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表10中描述的程序。因此,可惊人地纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换。纯度和产率表征在表11中。

[0246] 实施例14:使用蛋白A树脂的单个循环、包括1小时的低pH保持的阳离子交换树脂和阴离子交换膜的单个循环以纯化单克隆抗体的本发明方法的演示

[0247] 除了与实施例13中的30分钟相比,将低pH保持步骤的接触时间延长到1小时之外,使用表10中的程序运行实施例13中所述的柱。在具有图3所示管路配置的Akta开拓系统上运行表10中描述的程序。这样可纯化IgG产品而不使用存储罐或缓冲液交换步骤。纯度和产率表征在表11中。

[0248] 表11:具有低pH保持的本发明方法的产物回收和纯度

[0249]

实施例	池	聚集物(%)	HCP (ppm)	ProA (ppm)	产率(%)
	进料	2.4	300,000	NA	NA
实施例12	终池	1.4	<3*	<4*	78
实施例13	终池	1.3	<3*	<4*	72
实施例14	终池	1.4	<3*	<4*	73

[0250] 实施例15:使用蛋白A树脂的单个循环,收集池并掺入病毒,随后阳离子交换树脂的单个循环的纯化方法,包括通过低pH保持来在阳离子交换柱上灭活病毒

[0251] 根据实施例3中的描述制备净化的包含IgG的进料。与表3.1中描述的程序类似,使用ProSep Ultra Plus柱从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1,但平衡缓冲液为25mM Tris, 25mM NaCl, 0.05M EDTA, pH 7.0且洗脱缓冲液为100mM乙酸, 150mM NaCl, pH 3.5。将蛋白A柱洗脱液滴定至pH 4.0以接近从蛋白A至阳离子交换柱上的洗脱池的直接上样。向所述池中添加6.5Log X-MuLV (掺入5%,小鼠白血病病毒)的病毒掺入物。随后,在表12中所述的条件下通过ProRes-S阳离子交换柱运行所述池。通过传染性试验和使用标准方法的qPCR和本领域熟知的方案分析相关馏分的X-MuLV。低pH保持清洗和柱再生显示病毒传染性降低 $\geq 3.5\log$,且没有检测到活性病毒。产品洗脱池显示病毒传染性降低 $\geq 4.3\log$,且没有检测到活性病毒。因此,使用CIEX柱上的低pH保持的病毒灭活是将病毒活性降低至低于可检测水平的有效途径。为了主张更高的去除水平,需要改进病毒掺入策略和试验以改进分辨率。

[0252] 表12:用于病毒掺入试验的色谱步骤的缓冲条件

[0253]

色谱步骤	缓冲液	柱体积(CV)	停留时间 (分钟)	病毒浓度 (Log)
CIEX EQ	50mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4	4	3	
上样	将蛋白 A 池滴定至 pH 4	6 (上样密度 = 50mg/mL)	3	6.5
CIEX 清洗	50mM 乙酸钠, 150mM NaCl, pH 3.5	3	3	
低 pH 保持	50mM 乙酸钠, 150mM NaCl, pH 3.5	0.5 (步骤总时间 = 0.5hr)	60	≤ 2.8
CIEX 洗脱	50mM 乙酸钠, 175mM NaCl, pH 5.4	6*	3	≤ 2.2
柱再生	0.5M NaOH	3	3	≤ 2.2
CIEX EQ	50mM 乙酸钠, 25mM NaCl, pH 5.4	4	3	

[0254] *收集标准,收集2CV作为包含CIEX洗脱池的产品

[0255] 实施例16:通过优化阳离子交换低pH保持和/或蛋白A洗脱条件优化阳离子交换产物回收

[0256] 根据实施例3中的描述制备净化的包含IgG的进料。根据表3.1中描述的程序,使用ProSep Ultra Plus柱从收集的净化细胞培养液(HCCF)纯化IgG1,但平衡缓冲液为25mM Tris,25mM NaCl,0.05M EDTA,pH 7.0。将蛋白A洗脱池调整至pH 5和1.2g/L的最终浓度。使用一次性柱(Evergreen Scientific,Los Angeles CA)测量9个单独的0.5mL ProRes-S阳离子交换树脂样品,使用5CV的50mM乙酸钠缓冲液(pH 5,CIEX EQ缓冲液)平衡,并添加到单独的50mL塑料离心管中。通过添加25mL此前描述的蛋白A池上样ProRes-S树脂样品至40g/L。将蛋白质/树脂混合物混合旋转4小时。随后将ProRes-S树脂样品过滤到一次性色谱柱并使用5CV的CIEX EQ缓冲液清洗。随后,将树脂样品返回到50mL离心管,并加入一系列体积15mL的低pH清洗缓冲液(如表13中所示)以模拟低pH保持步骤或来自蛋白A柱的CIEX的直接上样的蛋白A洗脱上样条件。体积15mL的低pH清洗缓冲液为pH 3.5,并且由于添加表13中所述的氯化钠而包含不同的电导率。将所述样品旋转1.5小时,随后转移到一次性色谱柱。随后,使用CIEX EQ缓冲液清洗样品,并使用5mL的典型CIEX洗脱缓冲液;50mM乙酸钠中的200mM氯化钠,pH 5.4洗脱。使用1.38的消光系数,通过280nm的吸光度测定产品回收率。表13中报道了基于蛋白A池的产品回收率。意外的是,在接触低pH缓冲液后的产品回收对低pH缓冲液的电导率敏感。通过在可存在于低pH保持和蛋白A洗脱步骤中的低pH缓冲液中添加盐极大地改进了产品回收。

[0257] 表13:不同低pH保持或蛋白A洗脱缓冲液电导率的产品回收

[0258]

蛋白 A 池 上样条件	低 pH 保持缓冲条件	CIEX 洗脱缓冲条件	产品回收率 (%)
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 0 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	19
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 25 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	59
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 50 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	79
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 75 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	87
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 100 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	90

[0259]

乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 125 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	90
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 150 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	92
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 175 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	85
乙酸钠/Tris pH 5	乙酸钠, pH 3.5 和 200 mM 氯化钠	乙酸钠, pH 5.4 和 200 mM NaCl	86

[0260] 实施例17:通过优化蛋白A洗脱缓冲液电导率(CIEX上样缓冲液)和CIEX来优化阳离子交换多克隆IgG回收率

[0261] 使用以下混合物构建模型蛋白A洗脱池:使用三种不同的pH值:pH 3.5, pH 4和pH 4.5的50mM乙酸钠和2.5g/L多克隆IgG (PAb, SeraCare Life Sciences, Inc., Oceanside, CA)。在一次性色谱柱中,分别使用pH 3.5, pH 4和pH 4.5的50mM乙酸钠平衡3个单独的4.5mL ProRes-S树脂样品。随后,将树脂样品添加到相应的各pH相等的含PAb的模型进料中至40g/L的负载。使蛋白结合过夜,并以20rpm旋转样品。随后,使用10CV的pH相等的平衡缓冲液(50mM乙酸盐,分别为pH 3.5, pH 4 and pH 4.5)清洗树脂样品。

[0262] 随后,使用所述样品在pH相等的平衡缓冲液中形成10%v/v的珠悬液。将树脂调成浆,并将10uL树脂(100uL浆)分配到96孔滤板中(1um亲水PVDF膜, Millipore Corp.)。使用多孔板过滤系统(Millipore Corporation)去除浆中多余的低pH缓冲液,从而分离出10uL负载了PAb的ProRes-S树脂。向孔中添加一系列系统缓冲条件(30个单独的条件,每孔200uL),对每种PAb上样pH进行一式三份。将所述板振荡1小时,并测量280nm的吸光度。将所述吸光度与IgG回收率相关联,并报道在表14中。意外的是,产品回收率在大范围洗脱条件中对完成上样的pH敏感。

[0263] 尽管此试验是树脂的静态负载,所述趋势同样是优化连续型方法时的重要考虑因素。蛋白A洗脱缓冲液的pH决定了目标分子,例如IgG的pH条件范围,将在连续处理期间阳离子交换树脂的上样过程发生。表14表明将CIEX上样pH值保持在从诸如蛋白A的亲和柱发生

蛋白质洗脱的最高可能pH值可提供最高的产物回收率。

[0264] 表14:不同蛋白A洗脱缓冲液电导率的产品回收率

缓冲条件	pH	NaCl 浓度(mM)	pH 3.5 上样的 PAb 回收率(%)	pH 4 上样的 PAb 回收率(%)	pH 4.5 上样的 PAb 回收率(%)
1	6	0	5	5	5
2	6.5	0	5	7	8
3	7	0	5	14	21
4	7.5	0	5	23	35
5	8	0	5	27	43
6	6	50	5	6	7
7	6.5	50	5	16	29
8	7	50	5	29	52
9	7.5	50	6	44	60
10	8	50	6	42	66
11	6	100	5	8	13
12	6.5	100	5	26	40
13	7	100	5	38	65
14	7.5	100	6	44	72
15	8	100	6	49	78
16	6	150	5	14	27
17	6.5	150	5	33	49
18	7	150	5	44	63
19	7.5	150	6	51	75
20	8	150	6	54	75
21	6	200	5	19	37
22	6.5	200	5	31	58
23	7	200	5	48	71
24	7.5	200	6	52	76
25	8	200	6	54	83
26	6	250	5	26	41
27	6.5	250	5	37	62
28	7	250	5	45	67
29	7.5	250	6	48	83
30	8	250	6	49	87

[0266] 实施例18:产物池纯度的表征

[0267] 在本文所述的实施例中,使用体积排阻色谱/HPLC测定IgG聚集物的水平。在1mL/min流速下,使用0.2M磷酸钠的缓冲液(pH 7)操作Zorbax GF450 (Agilent cat 884973-902,S/N USMX006417)柱。注射样品,并将停留时间与已知的标准品进行比较。

[0268] 或者,使用分析型蛋白A柱测量溶液中IgG的水平。使用PBS平衡多孔A/20蛋白A柱(Applied Biosystems),使用0.1M甘氨酸(pH 2.0)洗脱,并使用6M盐酸胍清洗。使用一系列不同注射体积的多克隆IgG(Seracare)产生IgG标准曲线。注射样品并从标准曲线确定IgG浓度。

[0269] 通过在280nm的UV吸收测量洗脱池以确定IgG浓度和产率。还使用商业酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒分析洗脱池的CHOP浓度(除表11外,所有HCP数据均使用CHO HCP ELISA试剂盒F015,HCP 3G ELISA,F550;Cygnus Technologies Inc.,Southport,N.C.)。使用标准pico green试验和作为标准品的鲑鱼精DNA确定DNA浓度。使用ELISA试剂盒(OEM concepts),使用n-蛋白A作为标准品测定蛋白A浓度。通过使用2x Laemmli缓冲液将样品稀释2倍进行SDS-PAGE,随后,如果适合,在非还原和还原条件下进行分析。以每道10uL样品对凝胶上样,并使用gel code blue(Thermofisher 24592)染色。

[0270] 根据本说明书中引用的文献的教导可最全面地理解本说明书,这些文献通过援引加入本文。本说明书中的实施方案提供了本发明的实施方案的说明并且不应被解释为限制其范围。本领域技术人员容易地意识到本发明包括许多其他实施方案。所有出版物和发明以其整体通过援引加入本文。对于通过援引加入的材料与本说明书相悖或不一致的情况,以本说明书代替任何此类材料。本文中任何文献引用不是承认这些文献是本发明的现有技术。

[0271] 除非另外指明,用于包括权利要求在内的本说明书中的表示成分、细胞培养、处理条件等的所有数字应理解为均受到术语“约”的修饰。因此,除非另外相反地说明,数字参数是近似值并可根据本发明所寻求获得的期望性质而变化。除非另外说明,出现在一系列要素之前的术语“至少”应理解为指该系列中的每一要素。本领域技术人员会理解或仅用常规实验就能确定本文所述的发明的特定实施方案的许多等同。以下的权利要求包括这些等同。

[0272] 尽管指明本文宽范围的数值范围和参数为大约的值,但具体实施例中的数值范围尽可能的精确。而且,本文的全部范围应被理解为包括其中所含的全部子范围。例如,“1至10”的范围包括最小值1和最大值10之间的任何和全部子范围并且包括1和10,也就是说,此范围包括最小值大于或等于1且最大值小于或等于10的任何和全部子范围,如5.5至10。

[0273] 在不偏离本发明的精神和范围的条件下可对其进行许多修改和变化,修改和变化对本领域技术人员也是显而易见的。本文所述的特定实施方案仅以举例方式提供并无意具有任何限制性。本说明书和实施例仅应看做是示例性的,本发明的真正范围和精神由以下的权利要求指明。

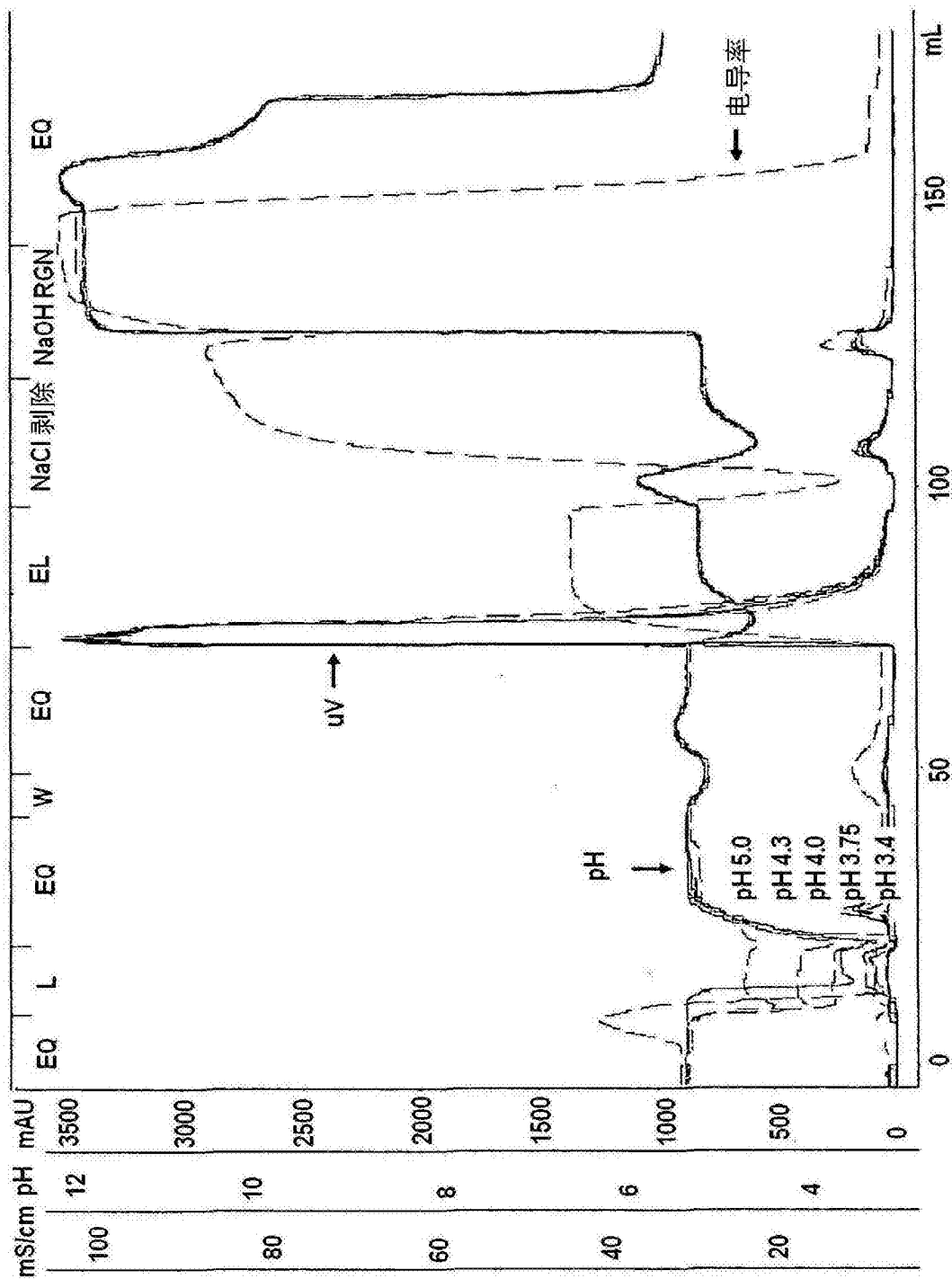


图1

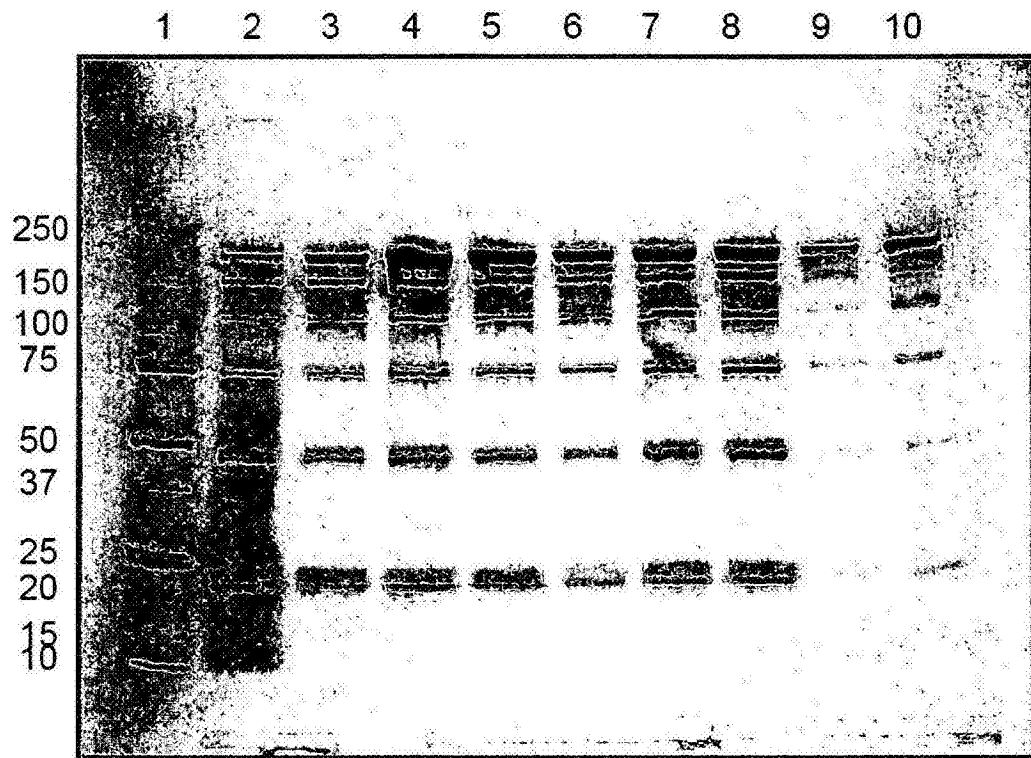


图2

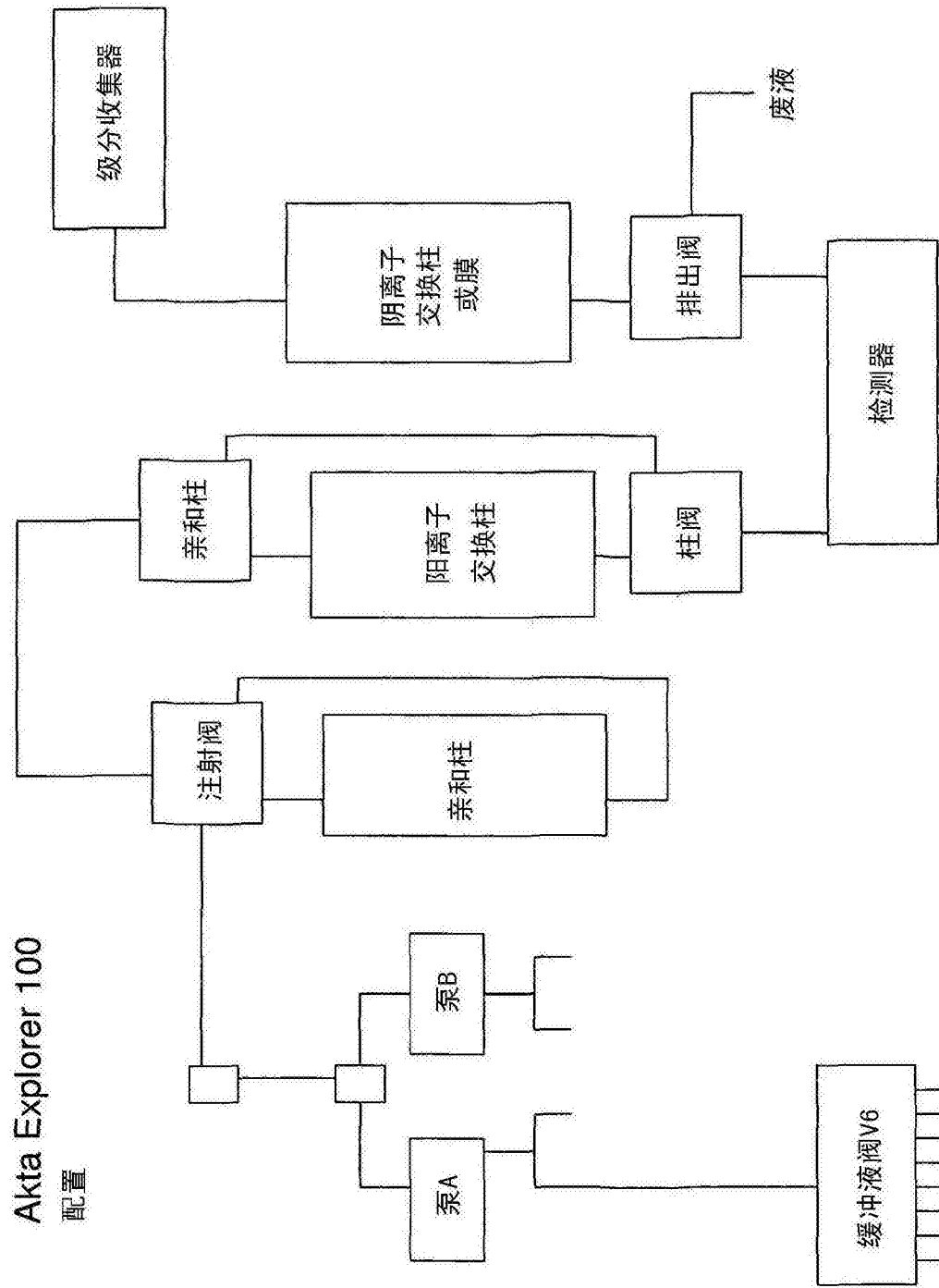
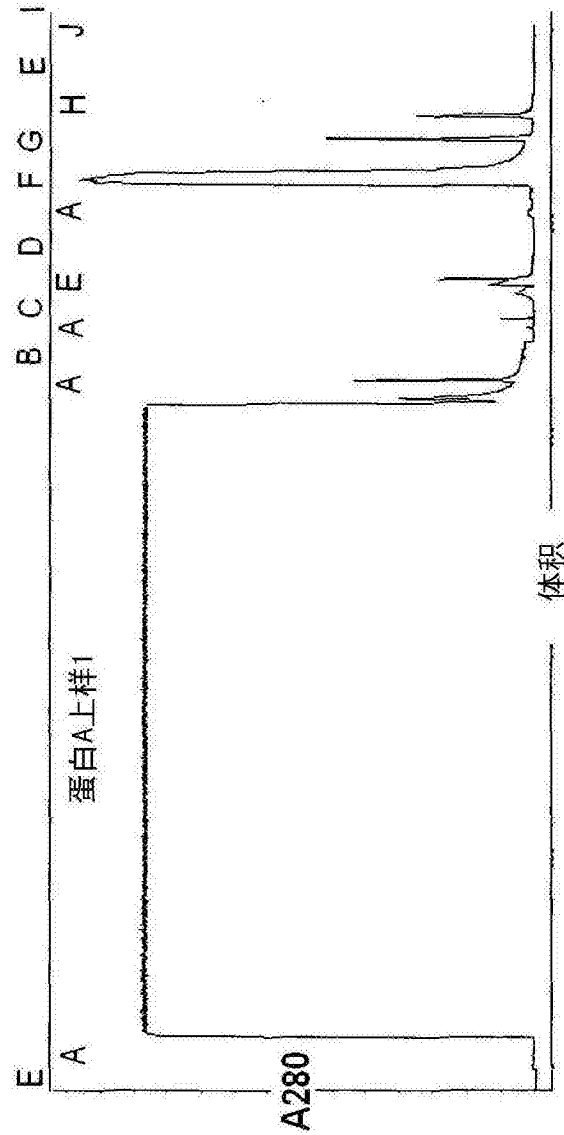
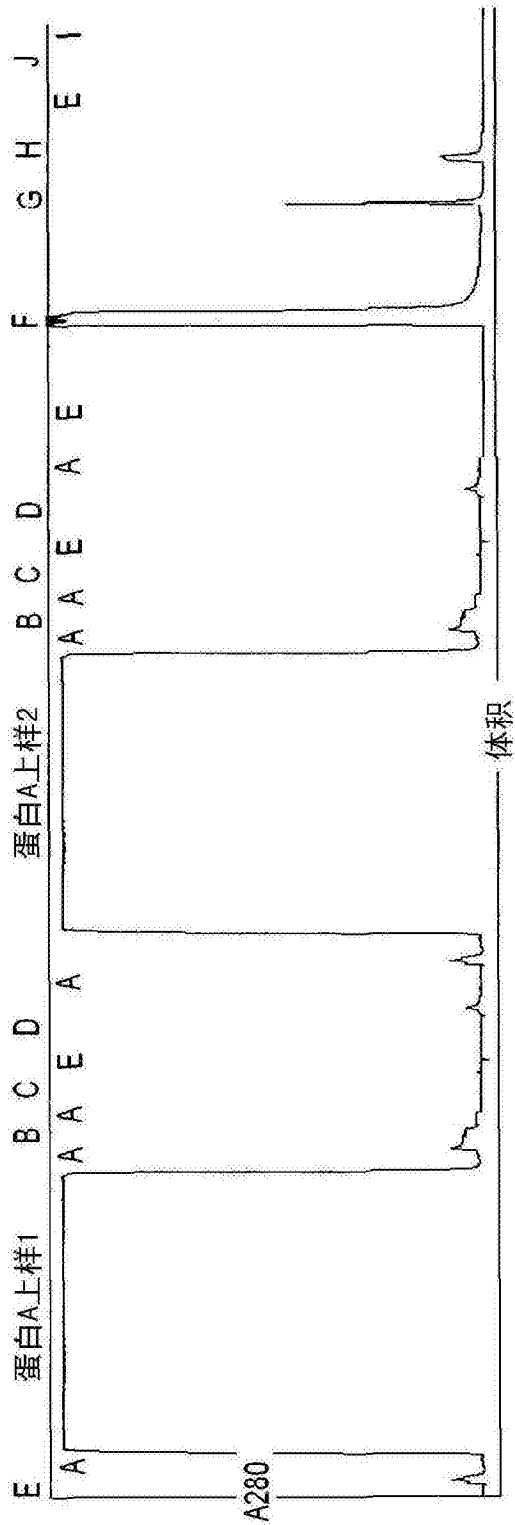


图3



- A=蛋白A平衡
 - B=蛋白A中间清洗
 - C=蛋白A洗脱
 - D=蛋白A再生
 - E=阳离子交换平衡
 - F=阳离子交换洗脱
 - G=阳离子交换NaCl剥除
 - H=阳离子交换NaOH再生
 - I=阴离子交换平衡
 - J=阴离子交换再生
- *为了便于标出关键步骤，一些步骤没有在图标出

图4



A=蛋白A平衡
B=蛋白A中间清洗
C=蛋白A洗脱
D=蛋白A再生
E=阳离子交换平衡
F=阳离子交换洗脱
G=阳离子交换NaCl剥除
H=阳离子交换NaOH再生
I=阴离子交换平衡
J=阴离子交换再生
*为了便于标出关键步骤，一些步骤没有在图标出

图5

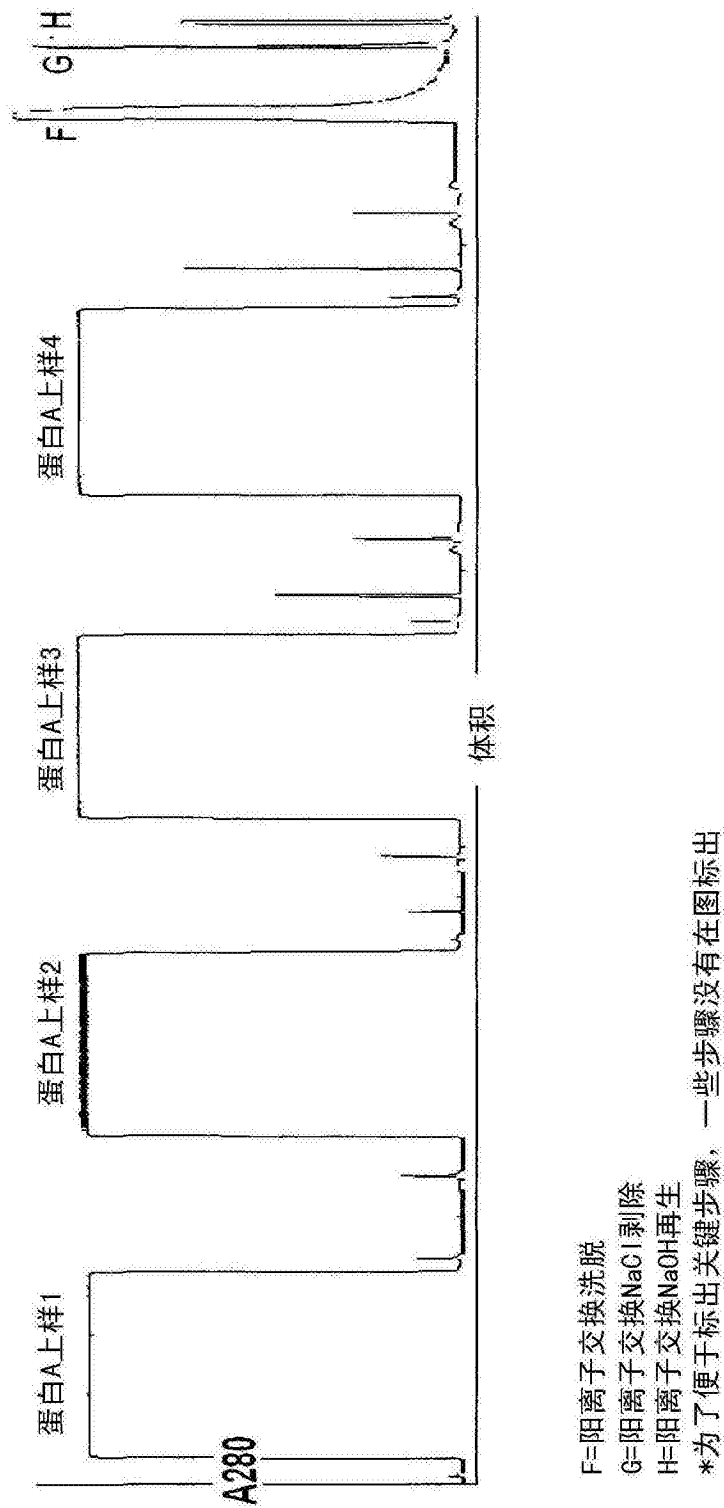


图6

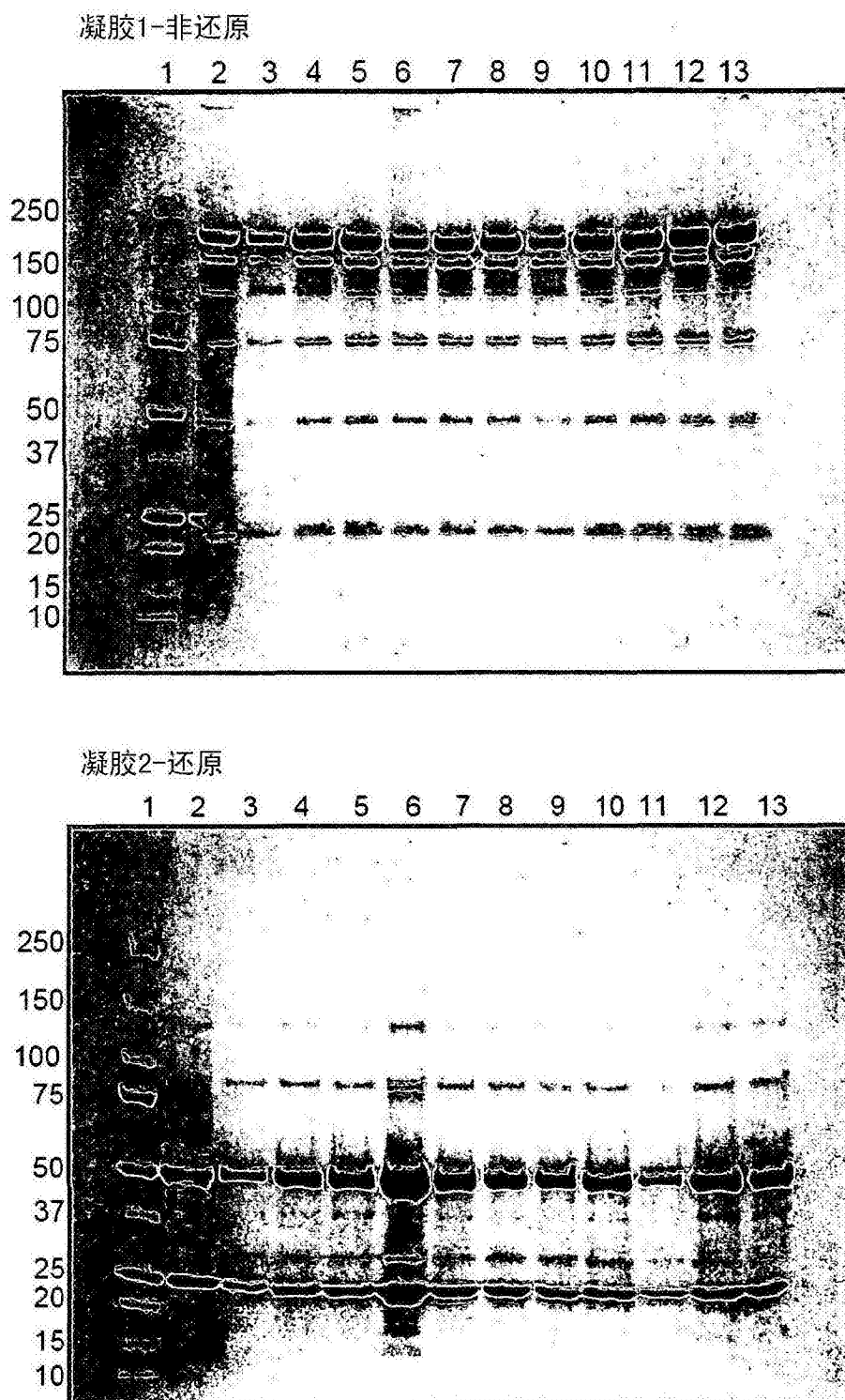


图7