



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104610422 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201410849296. 4

C07K 1/22(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 03. 10

C07K 16/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

B01D 15/08(2006. 01)

60/660437 2005. 03. 11 US

(62) 分案原申请数据

200680016391. X 2006. 03. 10

(71) 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 P. 布朗 J. 科夫曼 R. 戈达瓦蒂

T. 艾斯科拉 B. D. 凯利 S. 文努姆

S. 孙 T. 于 J. E. 布恩

M. B. 斯威策

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 石克虎

(51) Int. Cl.

C07K 1/16(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

C07K 1/20(2006. 01)

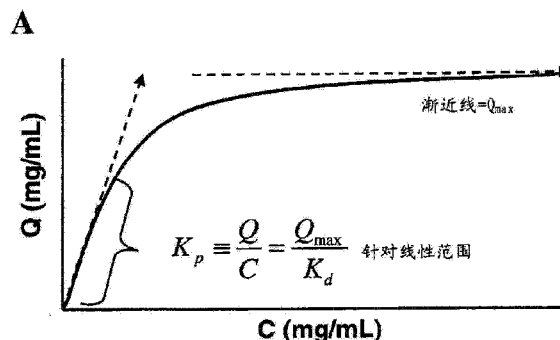
权利要求书2页 说明书36页 附图10页

(54) 发明名称

弱分配层析的方法

(57) 摘要

本发明涉及弱分配层析的方法。具体地,本发明涉及使用弱分配层析从含有一种或多种混杂物的负载流体中纯化产物的方法。进一步的,本发明涉及由操作条件限定的弱分配层析的方法,所述操作条件使得介质结合至少 1mg 产物/mL 介质,或作为选择,由至少 0.1 的分配系数限定。



1. 一种从负载流体回收纯化的产物的方法,包括步骤:

使所述负载流体在操作条件下通过介质以获得柱流出物,所述操作条件使得所述介质结合 1 到 70mg 产物 /mL 介质并且由 0.3 到 20 的分配系数限定 ;和

在负载循环和任何基本上等度的洗涤期间从所述柱流出物中回收所述纯化的产物,其中所述介质选自由带电离子交换介质、羟基磷灰石树脂、疏水性相互作用层析树脂和固定的金属亲和层析树脂构成的组。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述负载流体是从蛋白 A 柱洗脱的含产物流体。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 10mg 产物 /mL 介质。

4. 权利要求 1 到 3 的任一项的方法,其中所述纯化的产物是选自由融合蛋白、含 Fc 的蛋白、免疫缀合物、细胞因子、白细胞介素、激素和治疗性酶构成的组的蛋白质。

5. 权利要求 1 到 4 的任一项的方法,其中所述负载流体进一步包含磷酸盐、钙、精氨酸、甘氨酸、HEPES 和反配体的至少一种。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述反配体是咪唑。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 5mg 产物 /mL 介质。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 20mg 产物 /mL 介质。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 30mg 产物 /mL 介质。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 40mg 产物 /mL 介质。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述操作条件使得所述介质结合至少 50mg 产物 /mL 介质。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述分配系数的值在 0.5 到 5 的范围内。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述分配系数的值在 0.5 到 1.5 的范围内。

14. 权利要求 4 的方法,其中所述含有 Fc 的蛋白是抗体。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述介质包括带电离子交换树脂。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述带电离子交换介质包括阴离子交换树脂。

17. 权利要求 15 的方法,其中所述带电离子交换介质包括阳离子交换树脂。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述介质包括疏水性相互作用层析树脂。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述介质包括羟基磷灰石树脂。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述介质包括固定的金属亲和层析树脂。

21. 权利要求 1 到 4 的任一项的方法,其中所述负载流体包含选自由宿主细胞蛋白质、核酸、产物变体、内毒素、蛋白 A 和病毒,或其任意组合构成的组的一种或多种混杂物。

22. 权利要求 1 到 4 任一项的方法,其中所述负载流体是使用洗脱缓冲液从蛋白 A 柱洗脱的含产物流体,所述含产物流体的 pH 值和导电率使用中和缓冲液来调节,所述中和缓冲液产生不超过 20mM 的所述含产物流体的离子强度。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述洗脱缓冲液包含具有 pKa 2 到 5 的带电阴离子基团的分子。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述洗脱缓冲液进一步包含具有 pKa 6.5 到 10 的带电阻离子基团的分子。

25. 权利要求 22 的方法,其中所述洗脱缓冲液包含为 pH 在 4 到 9 之间的两性离子的分子。

26. 权利要求 22 的方法,其中所述两性离子选自由甘氨酸 ;1,4-哌嗪二-(乙烷磺酸) ;

双甘氨酸 ; 环戊烷四 -1, 2, 3, 4- 羧酸 ; N, N- 二 (2- 羟乙基) -2- 氨基乙烷磺酸 ; 2-(N- 吗啉代) 丙烷 - 磺酸 ; N- 三 (羟甲基) 甲基 -2- 氨基乙烷磺酸 ; N-2- 羟基乙基哌嗪 -N' -2- 乙烷磺酸 ; 4-(2- 羟乙基) -1- 哌嗪丙烷磺酸 ; N- 三 (羟甲基) 甲基甘氨酸 ; 甘氨酸酰胺 ; N, N- 二 (2- 羟乙基) 甘氨酸 ; N- 三 (羟甲基) 甲基 -2- 氨基丙烷磺酸 ; 和 N- 双甘氨酸构成的组。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述两性离子是甘氨酸。

28. 权利要求 1 到 4 的任一项的方法, 其中所述产物以至少 100mg 产物 /mL 介质的浓度负载到所述介质上。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述产物以至少 500mg 产物 /mL 介质的浓度负载到所述介质上。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述产物以至少 1000mg 产物 /mL 介质的浓度负载到所述介质上。

31. 权利要求 1 到 4 的任一项的方法, 其中在所述负载流体中的产物浓度是至少 1mg 产物 /mL 负载流体。

32. 权利要求 31 的方法, 其中在所述负载流体中的产物浓度是至少 10mg 产物 /mL 负载流体。

33. 权利要求 32 的方法, 其中在所述负载流体中的产物浓度是至少 100mg 产物 /mL 负载流体。

弱分配层析的方法

[0001] 本发明是申请日为 2006 年 3 月 10 日的中国专利申请 2006 8001 6391.X 的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及从包括一种或多种混杂物的负载流体中回收纯化的产物的方法。在本发明的某些实施方式中,所述方法包括使负载流体在操作条件下通过介质,所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质,并在负载循环和任何基本上等度的洗涤期间在柱流出物中回收纯化的产物。在本发明的其他实施方式中,所述方法包括使负载在由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件下通过介质。

技术背景

[0003] 在生物技术工业中,商业规模的蛋白质纯化是开发用于治疗 and 诊断目的的重组蛋白的重要挑战。与收率、纯度和处理量有关的问题困扰着制造部门。随着重组蛋白技术的出现,目标蛋白质可以使用被工程化以表达编码蛋白质的基因的培育的真核或原核宿主细胞系来生产。然而,从宿主细胞培养过程产生的结果是期望的蛋白质与混杂物的混合物,所述混合物不是来自所述蛋白质本身,例如蛋白质变体,就是来自宿主细胞,例如宿主细胞蛋白质。期望的重组蛋白质用于药物应用的用途视能够从这些混合物可靠地回收足够水平的蛋白质而定。

[0004] 常规的蛋白质纯化方法被设计以根据大小、电荷、溶解度的差异和疏水性的程度从混合物中分离目标蛋白质。这些方法包括层析方法,例如亲和层析、离子交换层析、尺寸排阻层析、疏水性相互作用层析、固定的金属亲和层析和羟基磷灰石层析。这些方法常常采用分离介质,其被设计以选择性地吸附目标蛋白或混合物。在结合-洗脱模式中,期望的蛋白质选择性地结合分离介质,通过不同的溶剂从介质上差别地洗脱。在流通(flow-through)模式中,混合物特异性地结合分离介质,而目标蛋白质不结合,因而容许期望的蛋白质在“流通”中回收。

[0005] 用于蛋白质,例如抗体的纯化的当前方法包括两个或多个层析步骤。例如,蛋白质纯化方案中的第一步常常涉及亲和层析步骤,其利用目标蛋白质和固定的捕获试剂之间的特异性相互作用。蛋白 A 吸附剂对于含有 Fc 区域的蛋白质,例如抗体的亲和性捕获是特别有用的。然而,使用蛋白 A 层析用于蛋白质纯化的缺点包括蛋白 A 捕获试剂的漏出,导致洗脱的蛋白质产物的污染。此外,亲和性捕获不能从目标蛋白质中分离出蛋白质变体,例如蛋白质的聚集形式。

[0006] 研究人员已经使用了结合洗脱方法、流通方法和置换方法努力来回收没有混杂物的蛋白质,所述混合物产自培养过程和产自纯化步骤本身里可能的前期步骤。在亲和性捕获步骤之后使用结合-洗脱步骤作为典型的第二步来纯化蛋白质的类型的实例包括:美国专利 4,983,722,描述了从混合物还原蛋白 A 的结合-洗脱离子交换方法;美国专利 5,429,746,描述了从包括蛋白 A 混杂物的混合物中纯化 IgG 抗体的结合-洗脱疏水性相互

作用层析方法；以及美国专利 5,644,036,描述了获得纯化的 IgG 抗体制品的三步骤过程,包括蛋白 A 步骤、结合-洗脱离子交换步骤和尺寸排阻步骤。其他类型在亲和层析步骤之后使用流通步骤。例如,PCT 公开 W0 04/076485 描述了从通过蛋白 A 层析步骤纯化的抗体中除去漏出的蛋白 A、随后是流通离子交换步骤的方法。PCT 公开 W0 03/059935 描述了纯化样品中的蛋白质的方法,包括使样品经历亲和层析步骤之后的流通羟基磷灰石层析步骤。

[0007] 其他类型使用了单精炼步骤纯化方案来避免与先前的纯化步骤相关的难题。例如,美国专利 6,177,548 描述了用于从生物样品除去聚集物的单步骤流通离子交换方法,其中样品的 pH 值被调节到低于生物样品的等电点 0.2 对数值 (log)。美国专利 5,451,662 描述了单步骤结合-洗脱离子交换法,其中粗蛋白混合物的 pH 值被调节到要分离的蛋白质级分的等电点范围之间的点值。PCT 公开 W0 05/044856 描述了使用羟基磷灰石层析用于从抗体制品除去高分子量聚集物的单步骤置换方法。

[0008] 然而,就通过量、收率和产品纯度的所有要求来说,现有技术中常规的从结合-洗脱或流通方法都不能满足生物技术工业的需要。在其他的因素中,结合-洗脱方法和置换方法受到用于期望蛋白质的分离介质的容量极限的限制。另一方面,流通方法确实比结合-洗脱方法容许更高的负载挑战,但受到用于混杂物的分离介质的容量的限制。使用流通方法,不生产物与柱的实质上的结合;任何实质上的产物结合被看作消极地影响产物回收率。仍然需要以高处理量回收纯化的蛋白质的方法,其满足为治疗和诊断应用所需的纯度和收率的要求。此外,商业性制造过程增加了可靠的、坚实的和成本有效的纯化方案的需求。

发明内容

[0009] 本发明涉及从包括一种或多种混杂物的负载流体回收纯化的产物的方法,通过使负载流体在操作条件下通过介质,所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物/mL 介质,并在负载循环和任何基本上等度的洗涤期间在柱流出物中回收纯化的产物。在其他实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 5mg 产物/mL 介质,在另一个实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 10mg 产物/mL 介质。在其他实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 20、30、40、50 或 60mg 产物/mL 介质。

[0010] 本发明还涉及从包括一种或多种混杂物的负载流体回收纯化的产物的方法,通过使负载流体在操作条件下通过介质,所述操作条件由至少 0.1 的分配系数限定,并在负载循环和任何基本上等度的洗涤期间在柱流出物中回收纯化的产物。在一个实施方式中,所述分配系数在约 0.2 到约 20.0 的范围内。在另一个实施方式中,所述分配系数在约 0.2 到约 10.0 的范围内。在另一个实施方式中,所述分配系数在约 1.0 到约 5.0 的范围内。在另一个实施方式中,所述分配系数在约 0.5 到约 5.0 的范围内。在其他的实施方式中,所述分配系数在约 0.5 到约 1.5 的范围内。

[0011] 本发明还涉及从包括一种或多种混杂物的负载流体回收纯化的产物的方法,通过使负载流体在操作条件下通过介质,所述操作条件使得所述介质结合至少 1 到约 70mg 产物/mL 介质并且由 0.3 到 20 的分配系数限定,并在负载循环和任何基本上等度的洗涤期间在柱流出物中回收纯化的产物。

[0012] 本发明还提供了在筛选步骤中鉴定操作条件,所述操作条件引起介质结合至少

1mg 产物 /mL 介质, 或作为选择, 由至少 0.1 的分配系数限定。所述筛选步骤可以采用分批结合研究或柱结合研究, 例如梯度洗脱研究或等度洗脱研究。

[0013] 取决于媒介的选择, 操作条件包括 pH 水平、离子强度、盐浓度、赋形剂浓度 (例如, 磷酸盐浓度、钙浓度、精氨酸浓度、甘氨酸浓度和 HEPES 浓度), 和反配体水平 (例如, 咪唑浓度)。

[0014] 所述介质可以是任何类型的层析树脂或分离介质, 包括带电离子交换介质, 例如阴离子交换介质或阳离子交换介质, 疏水性相互作用层析树脂、羟基磷灰石树脂或固定的金属亲和层析树脂。

[0015] 可以使用本发明回收的纯化的产物包括融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子、白细胞介素、激素和治疗性酶。

[0016] 可以使用本发明除去的混杂物包括宿主细胞蛋白质、核酸、产物变体、内毒素、蛋白 A 和病毒。

[0017] 在一个实施方式中, 所述介质除去负载流体中至少 99.9% 的混杂物, 所述负载流体包括宿主细胞蛋白质、核酸、产物变体、内毒素和蛋白 A。

[0018] 在另一个实施方式中, 在纯化的产物中产物变体的浓度不超过约 2%。

[0019] 在其他实施方式中, 所述介质上的负载可以是至少 500mg 或至少 1000mg 产物 /mL 介质的负载挑战。

[0020] 在本发明的一个方面, 纯化的产物从包括一种或多种混杂物的负载流体中回收, 通过使所述负载流体在包括 pH 值水平和离子强度的操作条件下通过带电离子交换介质, 所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质, 或作为选择, 在由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件下通过带电离子交换介质。

[0021] 在本发明的另一个方面, 纯化的产物从包括一种或多种混杂物的负载流体中回收, 通过使所述负载流体在包括 pH 值水平、离子强度和盐浓度的操作条件下通过疏水性相互作用层析树脂, 所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质, 或作为选择, 在由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件下通过疏水性相互作用层析树脂。

[0022] 在本发明的另一个方面, 纯化的产物从包括一种或多种混杂物的负载流体中回收, 通过使所述负载流体在包括 pH 值水平、离子强度、磷酸盐浓度、钙浓度、精氨酸浓度、甘氨酸浓度、HEPES 浓度和咪唑浓度的操作条件下通过羟基磷灰石层析树脂, 所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质, 或作为选择, 在由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件下通过羟基磷灰石层析树脂。

[0023] 在本发明的又一个方面, 纯化的产物从包括一种或多种混杂物的负载流体中回收, 通过使所述负载流体在包括反配体水平和 pH 值水平的操作条件下通过固定的金属亲和层析树脂, 所述操作条件使得所述介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质, 或作为选择, 在由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件下通过固定的金属亲和层析树脂。

[0024] 本发明的方法可以任选的组合一种或多种纯化步骤。可选择的步骤可以在进行本发明的方法之前或之后进行。例如, 本发明的方法可以任选的与作为起始步骤的蛋白 A 层析步骤组合。

[0025] 在本发明的一个实施方式中, 使用低离子强度的洗脱缓冲液从蛋白 A 柱上洗脱含产物流体; 使用中和缓冲液调节含产物流体的 pH 值和导电率, 所述中和缓冲液产生所述含

产物流体的不超过 20mM 的离子强度,产生负载流体;以及所述负载流体在本发明的操作条件下通过阴离子交换介质。

[0026] 在某些实施方式中,所述洗脱缓冲液包含具有 6.5-10pKa 的带阳离子基团的分子。在其他实施方式中,所述洗脱缓冲液进一步包含具有 2-5pKa 的带阴离子基团的分子。在某些实施方式中,所述洗脱缓冲液包含是 pH 在 7 和 9 之间的两性离子的分子。

[0027] 本发明还提供了由本发明的方法制备的纯化的产物,包括纯化的蛋白质和抗体。

[0028] 本发明的其他目的和益处将在随后的说明书中部分地阐述,在某种程度上根据说明书将变得更为明显,或可以从本发明的实践中习得。通过特别在附随的权利要求中指出的元素和组合的方式,将实现和达到本发明的目的和益处。

[0029] 需要理解的是,以上的一般性说明和随后的详细说明都仅是示范性的和说明性的,而不是对所要求权利的本发明的限制。

[0030] 附随的图画,合并到本说明书中并作为本说明书的一部分,与说明书一同用来解释本发明的原理。

附图说明

[0031] 附图 1 显示了 (A) 分配系数和产物吸附等温线之间的关系;以及 (B) 与树脂结合的产物的吸附等温线,针对三种操作模式:结合-洗脱模式,弱分配模式,和流通模式。

[0032] 附图 2 显示了 (A) 离子交换层析中三种操作模式的分配区:结合-洗脱模式、弱分配模式和流通模式;以及 (B) 在羟基磷灰石中三种操作模式的分配区。

[0033] 附图 3 显示了三种操作模式的示意性层析:结合-洗脱模式、弱分配模式和流通模式。

[0034] 附图 4 显示了弱分配和流通层析之间的比较。

[0035] 附图 5 显示了 (A) 作为 K_p 的函数的典型的杂质去除曲线;以及 (B) 作为负载挑战和 K_p 的函数的回收率。

[0036] 附图 6 显示了弱分配层析步骤发展的典型进展,包括 1) 高处理量筛选来确定 K_p , 2) 低负载挑战运行,3) 高挑战容量运行,以及 4) 最佳的弱分配层析运行。

[0037] 附图 7 显示了 K_p vs. pH 和来自低浓度数据集的总氯化物浓度的等高线图,如实施例 1.1 所描述。

[0038] 附图 8 显示了作为分配系数、 K_p 的函数的蛋白 A 去除,如实施例 1.1 所描述的。对数去除值随 K_p 升高。流通模式由短划线的方框“FT”标出,弱分配模式由短划线的方框“WP”标出。

[0039] 附图 9 显示了 $\log_{10}K_p$ vs. pH 和总氯化物浓度对数值的等高线图,如实施例 2.1 所描述。

[0040] 附图 10 显示了 (A) 对于 Mab-AAB,在离子交换层析中作为 K_p 的函数的宿主细胞蛋白穿透曲线;以及 (B) 对于 Mab-AAB,在离子交换层析中作为 K_p 的函数的蛋白 A 穿透。

[0041] 附图 11 显示了,对于 Mab-MYA,在羟基磷灰石中弱分配层析的最佳的操作范围。这个实施例中的最佳 K_p 是 1.5 和 20 之间。

[0042] 附图 12 显示了,对于 Mab-A5T4,在羟基磷灰石中弱分配层析的最佳的操作范围。这个实施例中的最佳 K_p 是 2 和 20 之间。

[0043] 附图 13 显示了,对于 Mab-MYO,在羟基磷灰石中弱分配层析的最佳的操作范围。这个实施例中的最佳 K_p 是 5 和 20 之间。

具体实施方式

[0044] A. 限定

[0045] 为了更容易地理解本发明,首先限定一些术语。其他的限定在整个详细说明中阐述。

[0046] 术语“流通模式”是指一种产物制品分离技术,其中在制品中含有的至少一种产物预期流动通过层析树脂或介质,而至少一种可能的杂质或混杂物与层析树脂或介质结合。一般地,流通模式的产物分配系数低于 0.1,结合的产物浓度是 <1mg/mL。“流通模式”是等度操作。

[0047] 术语“结合-洗脱模式”是指一种产物制品分离技术,其中制品中含有的至少一种产物与层析树脂或介质结合。一般地,结合-洗脱模式的产物分配系数大于 20,结合的产物浓度在 1-20mg/mL 之间。在这种模式中结合的产物在洗脱阶段期间被洗脱。

[0048] 术语“弱分配模式”是指一种产物制品分离技术,其中制品中含有的至少一种产物以及至少一种杂质或混杂物,都与层析树脂或介质结合。在弱分配模式中产物的结合是至少 1mg 产物/mL 层析树脂或介质。一般地,弱分配模式的产物分配系数是至少 0.1。“弱分配模式”是等度操作。

[0049] 术语“分配系数”(K_p)是指在特定的 pH 值和溶液组成条件下吸附到树脂上的产物浓度(Q)与溶液中的产物浓度(c)的平衡比。分配系数 K_p 还与如附图 1 所示的产物吸附等温线相关。分配系数 K_p 相应于极低溶液浓度下产物吸附等温线的斜率。它与最大容量相关,如下:

$$[0050] \quad K_p = \frac{Q}{C} = \frac{Q_{max}}{k_d}$$

[0051] 其中 Q_{max} 是用于产物的树脂的最大容量, k_d 是“树脂-产物”相互作用的离解常数。分配系数一般使用分批结合技术来测量,但是也可以使用其他技术,例如等度层析。

[0052] 术语“结合的产物”(Q)是指当在料流中平衡时与树脂结合的产物量。

[0053] 术语“抗体”是指任何免疫球蛋白或其片段,并且涵盖任何包含抗原结合位点的多肽。这个术语包括,但不限于,多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、人类的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂交的、突变的、移植的和体外产生的抗体。术语“抗体”还包括抗体片段,例如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持了抗原结合功能的其他抗体片段。一般地,这种片段将包含抗原结合结构域。

[0054] 在本发明的某些实施方式中,所述抗体是包含 C_H2/C_H3 区域并因而能由蛋白 A 层析纯化的抗体。术语“C_H2/C_H3 区域”是指在免疫球蛋白分子 Fc 区域中与蛋白 A 相互作用的那些氨基酸残基。在某些实施方式中,C_H2/C_H3 区域包括完整的 C_H2 区域和随后的完整 C_H3 区域,在其他实施方式中,包括免疫球蛋白的 Fc 区。含有 C_H2/C_H3 区域的蛋白质的实例包括抗体、免疫粘附素以及包含与 C_H2/C_H3 区域融合或缀合的目标蛋白质的融合蛋白。

[0055] 术语“负载”是指任何含有产物的负载材料,所述产物来源于澄清的细胞培养物或发酵条件培养基,或来自层析步骤的部分纯化的中间物。术语“负载流体”是指含有负载材

料的流体,用于在本发明的操作条件下通过介质。

[0056] 术语“混杂物”是指除了目标蛋白质以外、也存在于要纯化目标蛋白质的样品中的任何外源的或不需要的分子,包括生物学大分子,例如 DNA、RNA 或蛋白质。混杂物包括,例如,蛋白质变体,如聚集的蛋白质,高分子量种类、低分子量种类和片段,以及脱酰氨基的种类;来自分泌要纯化的蛋白质(宿主细胞蛋白质)的宿主细胞的其他蛋白质;作为用于亲和和层析的吸附剂的部分、在先前的纯化步骤期间可能漏出到样品中的蛋白质,例如蛋白 A;内毒素;以及病毒。

[0057] 术语“基本上等度的洗涤”是指就组成或 pH 值而言仅稍微不同于负载流体的溶液。

[0058] 术语“柱流出物”是指在负载循环期间、或在施加负载的期间流出介质或柱的液体。

[0059] 术语“负载挑战”是指按照每单位体积树脂的产物的质量单位来测量的、在层析步骤的负载循环中负载到柱上的、或在分批结合中施加到树脂上的产物的总质量。

[0060] 术语“对数去除值”(LRV)是指纯化步骤中负载中的混杂物质量与产物库中混杂物质量的比例的对数(底数 10)。

[0061] 术语“等度层析”是指使用在目标时期期间不改变强度(strength)的溶剂的层析柱的操作。

[0062] B. 方法的说明

[0063] 本发明提供了从含有一种或多种混杂物的负载流体中回收纯化的产物的方法。本发明应用于治疗和诊断目的的蛋白质的大规模制备。

[0064] 1. 弱分配模式

[0065] 申请人令人惊讶地发现,通过按照处于常规的结合-洗脱和流通层析模式之间区域的一种层析模式操作,可以获得高度的混杂物降低以及高产物负载挑战和产物回收。申请人将这种中间的产物结合模式命名为“弱分配模式”。

[0066] 在弱分配模式中,含有目标产物和一种或多种混杂物的负载流体通过层析介质,产物和混杂物都与介质结合。然而,与产物相比,混杂物与介质更紧密地结合,随着负载的继续,未结合的产物通过介质,并在柱流出物中被回收。任选的,介质随后在等度条件下洗涤来从介质回收其他弱结合的产物,来自任何基本上等度洗涤的纯化产物与在负载循环期间来自柱流出物的纯化产物集中在一起。

[0067] 根据本发明,弱分配模式由操作条件限定,其使所述介质结合至少 1mg 产物/mL 介质。在一个实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 5mg 产物/mL 介质。在另一个实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 10mg 产物/mL 介质。在另一个实施方式中,所述操作条件使得所述介质结合至少 20mg 产物/mL 介质。

[0068] 在本发明的某些实施方式中,结合到介质上的总产物质量是负载到介质上的总产物质量的至少 10%。在某些实施方式中,结合到介质上的总产物质量是负载到介质上的总产物质量的至少 20%。在其他实施方式中,结合到介质上的总产物质量是负载到介质上的总产物质量的至少 30%。

[0069] 根据本发明,弱分配模式还由至少 0.1 的分配系数限定。在某些实施方式中,在弱分配模式下操作包括在由约 0.2 到约 20.0 的范围内的分配系数限定的条件下操作。在某

些实施方式中,在弱分配模式下操作包括在由约 0.2 到约 10.0 的范围内的分配系数限定的条件下操作。在其他实施方式中,在弱分配模式下操作包括在由约 1.0 到约 5.0 的范围内的分配系数限定的条件下操作。在其他实施方式中,在弱分配模式下操作包括在由约 0.5 到约 5.0 的范围内的分配系数限定的条件下操作。在又一个实施方式中,在弱分配模式下操作包括在由约 0.5 到约 1.5 的范围内的分配系数限定的条件下操作。

[0070] 在本发明的至少一个实施方式中,提供了弱分配模式操作条件,其使得所述介质结合至少 1 到约 70mg 产物 /mL 介质,并且其由 0.3 到 20 的分配系数限定。

[0071] 附图 1 显示了结合-洗脱、流通和弱分配模式的产物吸附等温线,与结合-洗脱和流通模式相比,弱分配模式的产物结合清楚地居于中间。由于产物分配系数 (K_p) 的值是吸附的产物浓度与溶液中的产物浓度的比值,弱分配模式的 K_p 值也处于结合-洗脱和流通模式的值之间。

[0072] 附图 2A 描绘了作为离子强度的函数的结合-洗脱、弱分配和流通模式的分配区域,显示了 K_{imp} 在弱分配模式中高于流通模式中。在弱分配模式的更严格的结合条件下,可以实现比流通模式更高的产物容量,而杂质更强烈地结合,并且高于结合-洗脱模式,而与杂质相比产物结合非常微弱,并且不占用大部分的树脂容量。在更严格的结合条件下杂质分配系数 (K_{imp}) 更高,与流通模式的产物库相比,在弱分配模式的产物库中产生更低浓度的残余杂质。作为磷酸盐和 NaCl 浓度的函数的、羟基磷灰石中的流通、弱分配和结合-洗脱区域在附图 2B 中示出。

[0073] 表 A 概况了三种结合模式:结合-洗脱 (B-E)、弱分配 (WP) 和流通 (FT) 之间的特征差异。

[0074]

	FT	WP	B-E
K_p	<0.1	0.1-20	>20
负载挑战限制	杂质 10-50mg 产物/mL (典型的) 但实际取决于负载纯度	杂质 50-500mg 产物/mL (典型的) 但实际取决于负载纯度	产物+杂质 < 100 mg 产物/mL

[0075]

负载体积	中等, 对于稀释混合物 10-20CV	非常高, 对于稀释混合物 高达 50 CV	较低, 除了混合物之外 产物结合 5-20 CV
负载洗脱液中 的[产物]	等于大部分负载的负载 浓度	起始滞后, 然后等于大部 分负载的负载浓度	<负载浓度的 5%
残余[混合物]	低	非常低	取决于洗脱条件、床 体积和容量
产物结合 (Q)	< 1 mg/mL	< 10-20 mg/mL	> 10-20 mg/mL
操作范围	相对宽阔的条件范围	中度的、在 FT 和 B-E 模式 之间的操作范围	对于负载是严格的结 合条件, 宽阔的洗脱 条件范围
移动相 (一种 或多种)	等度的	等度的	引发洗脱的负载之后 缓冲液组成变化

[0076] 弱分配模式也可以在它们的层析谱上不同于结合-洗脱和流通模式, 如附图 3 所示。首先, 流通和弱分配模式的层析谱看起来相当类似, 产物在等度条件下在柱流出物和洗涤馏分中回收。然而, 精细的、但重要的区别存在于层析谱中, 其可以用于区分这些模式, 如附图 4 所示。与流通模式相比, 弱分配模式的起始穿透曲线中存在延迟 (>0.1 柱体积或 CV)。在弱分配模式中存在更慢的冲洗曲线。可以存在含有产物的小的列带 (strip) 峰 (其相应于洗涤阶段之后仍然结合 10-50% 负载产物浓度的树脂), 其可以通过在负载循环期间回收柱流出物之后在等度条件下在负载之后施加 1-5CV 的洗涤来从树脂中回收。

[0077] 附图 5A 显示了各种水平的产物分配系数值的杂质 LRV 中的一般趋势。杂质 LRV 在相应于流通操作的 K_p 条件下是相对低的。在提高 K_p 的条件下的操作在杂质穿透之前显著地提高柱流出物级分中的 LRV。如实施例所示, 与相应于标准的流通条件的那些相比, 更高 K_p 值下的操作改善了杂质 LRV 多达 2 对数值。

[0078] 提高 K_p 一般增加了与树脂结合的产物以及杂质。在较高 K_p 下杂质的更强结合导致杂质穿透之前柱流出物级分中更大的 LRV。然而, 在杂质穿透点处的负载挑战随着 K_p 提高而降低, 因为产物开始与杂质竞争树脂上的结合位点, 如附图 5A 中高 K_p 曲线所示意性表示的。因而, 弱分配区域相应于操作范围, 其为给定的分离平衡了杂质 LRV 的改善和柱容量需求。

[0079] 弱分配层析的 K_p 上限还取决于如附图 5B 所示的柱负载挑战。在流通条件的边界值处, 分配系数对于产物回收率没有影响。在高 K_p 值处产物回收率开始降低, 此时等度洗涤条件在以合理的洗涤体积数从柱上洗下结合的产物方面不是有效的。由于无效冲洗的产物损失程度对于负载挑战以及负载中杂质的性质和比例是敏感的。因而, WP 区域的下限由杂质去除的需求决定, 而给定的负载挑战的上限由产物回收率或容量的约束决定。

[0080] 在本发明的一个或多个实施方式中, 最佳的弱分配条件可以使用以下的实验系列

来鉴定,如附图 6 所示:

[0081] (i) 进行 HTS 筛选(或标准的分批结合实验)来确定作为操作条件的函数的产物分配系数 K_p 。从这些实验鉴定相应于弱分配区域 ($0.1 < K_p < 20$) 的操作范围。

[0082] (ii) 优选的,在鉴定弱分配区域之后,可以以同用于标准流通操作类似的负载挑战(大约 50mg/mL)在小规模柱上进行探测运行。根据来自这些实验的杂质去除和产物回收值可以进一步精调弱分配操作范围。

[0083] (iii) 更优选的,然后可以为弱分配区域内的少数 K_p 条件产生杂质穿透数据。根据这些结果,选择弱分配区域中的最佳分配系数,其以可接受的负载挑战提供了最高的杂质去除。

[0084] (iv) 然后可以在最佳 K_p 条件下最优选地进行弱分配层析运行,并进一步按需要来精调负载挑战和洗涤体积以获得最佳的回收和杂质去除。

[0085] 本领域的技术人员可以使用这些原则或其变体来容易地确定弱分配层析步骤,其以相比标准流通或结合/洗脱模式的柱操作相当的或更高的负载挑战提供了增强的杂质去除。以上讨论的一般性框架,如果有的话,具有细微的调整,可以用于开发离子交换、疏水性相互作用、羟基磷灰石或组合了这些相互作用中的任一或所有元素的多模式系统中的纯化步骤。

[0086] 2. 分离技术

[0087] 弱分配模式可以与任何用于从混合物分离产物的层析树脂或介质组合使用。在一个实施方式中,所述介质是带电离子交换介质。离子交换是一种根据净电荷来分离的层析形式。作为目标带电产物和平衡离子之间对离子交换介质上的带相反电荷的配体基团竞争的结果,发生分子的分离。在产物和离子交换介质之间的结合相互作用取决于产物的净电荷。净电荷取决于 pH 值和介质的离子强度,其影响目标产物分子的暴露表面上的氨基酸和其他成分的不同电荷性质。

[0088] 可以用于本发明的离子交换树脂包括阴离子交换树脂和阳离子交换树脂。阴离子交换树脂可以采用取代基,例如二乙氨基乙基 (DEAE)、三甲基氨基乙基 (TMAE)、季氨基乙基 (QAE) 和季胺 (Q) 基团。阳离子交换可以采用取代基,例如羧甲基 (CM)、磺乙基 (SE)、磺丙基 (SP)、磷酸根 (P) 和磺酸根 (S)。纤维素离子交换树脂,例如 DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32 和 CM-52 可以从 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U. K 获得。基于 Sephadex 的和交联的离子交换剂也是已知的。例如,DEAE-、QAE-、CM- 和 SP-Sephadex,以及 DEAE-、Q-、CM- 和 S-Sepharose,以及 Sepharose 都可以从 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 获得。进一步的,DEAE 和 CM 衍生的乙二醇-异丁烯酸酯共聚物,例如 TOYOPEARL™DEAE-650S 或 M 以及 TOYOPEARL™CM-650S 或 M 可以从 Toso Haas Co., Philadelphia, PA 获得。

[0089] 在本发明的某些实施方式中,弱分配模式与疏水性相互作用层析 (HIC) 树脂使用用于产物纯化。HIC 是根据疏水性来分离分子的技术。一般地,高盐缓冲液中的样品分子被负载到 HIC 树脂上。缓冲液中的盐与水分子相互作用来降低分子在溶液中的溶解,从而暴露样品分子中的疏水性区域,其因而由 HIC 介质吸附。分子的疏水性越高,需要越少的盐来促进结合。在产物分子和 HIC 介质之间的结合相互作用因而取决于一些条件,例如介质的 pH 值、离子强度和盐浓度。

[0090] 可以用于本发明的各种商业上可获得的 HIC 树脂包括包含连结了疏水性配

体（例如，烷基或芳基基团）的基础基质（例如，交联的琼脂糖或合成的共聚材料）的树脂。实例包括 Phenyl SEPHAROSE™6FAST FLOW™(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden) ; Phenyl SEPHAROSE™High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden) ; Octyl SEPHAROSE™High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden) ; Fractogel™EMD Propyl 或 FRACTOGEL™EMD Phenyl (E. Merck, Germany) ; MACRO-PREP™Methyl 或 MACRO-PREP™t-Butyl Supports (Bio-Rad, CA) ; WP HI-Propyl (C₃)™ (J. T. Baker, NJ) ; 以及 TOYOPEARL™醚、苯基或丁基 (TosoHaas, PA)。

[0091] 在本发明的其他实施方式中，弱分配模式与羟基磷灰石层析使用用于产物纯化。羟基磷灰石层析是一种技术，其利用了式 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 的不溶的羟基化的磷酸钙作为基质和配体。功能基团由带正电的钙离子对 (C-位点) 和带负电的磷酸根基团的簇 (P-位点) 组成。产物和羟基磷灰石介质之间的结合相互作用取决于一些条件，例如介质的 pH 值、离子强度和赋形剂浓度，例如磷酸根浓度、钙浓度、精氨酸浓度、甘氨酸浓度和 HEPES 浓度。各种羟基磷灰石层析树脂是商业上可获得的，可以用于本发明。

[0092] 在本发明的进一步的实施方式中，弱分配模式与固定的金属亲和层析 (IMAC) 树脂使用用于产物纯化。IMAC 是基于固定在树脂上的螯合的过渡金属离子与标靶的目标产物上组氨酸残基的咪唑侧链之间的相互作用。作为标靶的目标产物和 IMAC 树脂上金属基团的反配体之间的竞争的结果，发生了分子的分离。在产物和带有金属的 IMAC 介质之间结合相互作用取决于一些条件，例如介质的反配体水平，例如咪唑浓度，以及离子强度。各种 IMAC 树脂是商业上可获得的，可以用于本发明。

[0093] 3. 用于纯化的产物

[0094] 本发明可以用于各种目标产物的大规模纯化，包括天然出现的蛋白质、融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子、白细胞介素、激素和治疗性酶。在一个实施方式中，经历纯化的蛋白质可以包括一个或多个恒定抗体免疫球蛋白结构域。在一个实施方式中，蛋白质还可以包含单或多可变抗体免疫球蛋白结构域。在另一个实施方式中，含有 Fc 的蛋白质可以包含抗体。蛋白质可以来自各种来源，包括培养的重组原核或真核宿主细胞系。

[0095] 本发明的抗体制品可以从许多来源分离，包括但不限于，免疫动物的血清、腹腔积液、杂交或骨髓瘤上清液、来自培养表达抗体分子的重组细胞的或来自抗体生产细胞的所有细胞提取物的条件培养基。在本发明的一个实施方式中，纯化来自多种抗体生产重组细胞系的条件培养基的抗体。虽然可以预期在各种的抗体产物之中存在细胞系与细胞系的一些偏差，根据在此公开的，本领域普通技术人员的能力范围内的是调整此处的发明来适合特定的抗体蛋白质和生产细胞系组合。

[0096] 仅为了说明的目的，本发明被用于 IgG 同种型的几种抗体的纯化。更具体地，本发明被用于人源化的抗 Aβ 单克隆抗体、抗 GDF8 抗体和人源化的抗 -IL-13 单克隆抗体的纯化。

[0097] 4. 负载条件和容量

[0098] 在将含有产物和混杂物的流体负载到介质上之前，可能必需的是通过找到引起介质结合至少 1mg 产物 /mL 介质的操作条件来鉴定弱分配的区域。在一个实施方式中，发现的所述操作条件使得所述介质结合至少 5mg 产物 /mL 介质。在另一个实施方式中，发现的

所述操作条件使得所述介质结合至少 10mg 产物 /mL 介质。在其他实施方式中,发现的所述操作条件使得所述介质结合至少 20mg 产物 /mL 介质。做为选择,通过找到由至少 0.1 的分配系数限定的操作条件来鉴定弱分配区域。在某些实施方式中,发现的操作条件是由约 0.2 到约 20.0 的范围内的分配系数限定的。在其他实施方式中,发现的操作条件是由约 0.2 到约 10.0 的范围内的分配系数限定的。在又一个实施方式中,发现的操作条件是由约 1.0 到约 5.0 的范围内、约 0.5 到约 5.0 的范围内或约 0.5 到约 1.5 的范围内的分配系数限定的。在其他实施方式中,所述弱分配区域是通过找到使得所述介质结合至少 1 到约 70mg 产物 /mL 介质、并且由 0.3 到 20 的分配系数所限定的操作条件来鉴定的。

[0099] 本领域技术人员将认识到,合适的操作条件将取决于为纯化产品所选择的介质的选择。在某些实施方式中,操作条件包括 pH 值水平和离子强度。在其他实施方式中,操作条件进一步包括盐浓度。在又一个实施方式中,操作条件进一步包括赋形剂水平,例如磷酸盐浓度和钙浓度。在某些实施方式中,所述操作条件包括反配体水平,例如咪唑浓度,以及 pH 值水平。

[0100] 筛选步骤可以用来鉴定弱分配模式的操作条件。这种筛选步骤可以包括分批结合研究或柱结合研究。柱结合研究可以包括梯度洗脱研究或等度洗脱研究。例如,本领域技术人员可以确定哪种缓冲液或盐适合于要纯化的特定蛋白质以及要鉴定的操作条件。然后,所选择的缓冲液或盐的最佳浓度可以通过,例如,使选择的缓冲液或盐的梯度运动通过已经施加了包含要纯化的产物和混杂物的负载流体的柱来确定。可以收集和分析柱的流出物的级分,来确定缓冲液或盐的浓度,在该浓度下产物结合是至少 1mg 产物 /mL 介质,或作为选择,在该浓度下产物的分配系数是至少 0.1。在本发明的某些实施方式中,在分批结合实验中使用三到六的相比(液体的体积比树脂的体积),测量 1 和 10mg/mL 负载挑战之间的分配系数。

[0101] 一旦确定了操作条件,可以相应地调节负载流体和 / 或介质的条件。例如,可以通过用溶液洗涤介质来将介质平衡,所述溶液将使得所述介质达到弱分配模式的必要操作条件。在弱分配模式的准备中,负载流体也可以是被交换成合适的缓冲液或负载缓冲液的缓冲液。负载缓冲液可以是与平衡缓冲液相同或不同的缓冲液。

[0102] 在一个实施方式中,负载流体的离子强度不超过 100mM。在另一个实施方式中,负载流体的离子强度不超过 50mM。在其他实施方式中,负载流体的离子强度不超过 25mM。在又一个实施方式中,负载流体的离子强度不超过 10mM。

[0103] 负载流体可以通过分离介质,所述分离介质被填充在床柱中、填充在含有固相基质的流化 / 膨胀床柱中,和 / 或以分批形式,其中固相基质与负载流体混合一定时间。在负载流体通过所述介质之后,任选的用一定体积的基本上等度的洗液来冲洗介质。纯化的产物可以从任何基本上等度的洗液获得,并与负载循环期间来自柱流出物的纯化的产物集中。在任选的洗涤步骤之后,介质可以任选的被脱除并再生。这个步骤一般有规律地进行,用以最小化杂物在固相的表面上的积累,和 / 或用以灭菌介质来避免微生物对产物的污染。

[0104] 使用弱分配模式,高负载浓度和负载体积是可能的。在一个实施方式中,负载流体中产物的浓度是至少 1mg 产物 /mL 负载流体,在另一个实施方式中,负载流体中的产物浓度是至少 5mg 个产物 /mL 负载流体,在另一个实施方式中,至少 50mg 产物 /mL 负载流体,在另

一个实施方式中,至少 100mg 产物 /mL 负载流体。纯化的产物可以从至多 50CV 的通过介质的负载流体中回收。

[0105] 使用弱分配模式,高负载挑战也是可能的。在一个实施方式中,介质上的负载可以是至少 10mg 产物 /mL 介质的负载挑战。在其他实施方式中,介质上的产物负载可以是至少 50mg 产物 /mL 介质。在某些实施方式中,介质上的产物负载可以是至少 100mg 产物 /mL 介质。在其他实施方式中,介质上的负载可以是至少 500mg 产物 /mL 介质的负载挑战。在又一个实施方式中,介质上的负载可以是至少 1000mg 产物 /mL 介质的负载挑战。

[0106] 5. 混杂物的去除

[0107] 弱分配模式已经显示了对于从产物制品除去所有种类的混杂物是有用的,包括宿主细胞蛋白质、核酸、产物变体,包括聚集的产品和高分子量种类,内毒素、病毒、和来自先前的纯化步骤的蛋白 A 杂质。

[0108] 在本发明的一个实施方式中,在纯化的产物的存在的宿主细胞蛋白质的浓度是不超过约 500ng 宿主细胞蛋白质 /mg 产物。在其他实施方式中,宿主细胞蛋白质的浓度可以被降低到不超过 250ng/mg 产物,在其他实施方式中,降低到不超过 100ng/mg 产物。在某些实施方式中,宿主细胞蛋白质的对数去除值是至少 1.0,在其他实施方式中,宿主细胞蛋白质的对数去除值是至少 2.0,在其他实施方式中,宿主细胞蛋白质的对数去除值是至少 3.0。

[0109] 在本发明的一个实施方式中,在纯化的产物的蛋白 A 的浓度是不超过约 100ng 蛋白 A/mg 产物。在某些实施方式中,蛋白 A 的浓度可以被降低到不超过 50ng/mg 产物,在其他实施方式中,降低到不超过 10ng/mg 产物。在某些实施方式中,蛋白 A 的对数去除值是至少 1.0,在其他实施方式中,蛋白 A 的对数去除值是至少 2.0,在其他实施方式中,蛋白 A 的对数去除值是至少 3.0。

[0110] 在本发明另一个实施方式中,从纯化的产物中除去病毒混杂物。在某些实施方式中,病毒的对数去除值是大于 1.0,在其他实施方式中,大于 2.0,在其他实施方式中,大于 3.0。

[0111] 在本发明的某些实施方式中,从纯化的产物除去核酸混杂物。在某些实施方式中,在纯化的产物中存在的核酸的数量可以被降低到不超过 1ng 核酸 /mg 产物。

[0112] 在其他实施方式中,在纯化的产物中蛋白质变体的浓度是不超过约 10%。在某些实施方式中,蛋白质变体的浓度被降低到不超过约 5%,在某些实施方式中,降低到不超过 2%,在某些实施方式中,降低到不超过 0.5%。

[0113] 在弱分配模式的严格结合条件下,分离介质除去至少 90%的宿主细胞蛋白质、核酸、蛋白质变体、内毒素和蛋白 A 混杂物。在某些实施方式中,所述介质除去至少 99%的混杂物,在其他实施方式中,所述介质除去至少 99.9%的混杂物。

[0114] 6. 其他的可选择的步骤

[0115] 本发明的纯化方法可以与其他蛋白质纯化步骤组合使用。在本发明的一个实施方式中,在弱分配步骤之前的一个或多个步骤可能是期望的,以降低负载挑战。在本发明的其他实施方式中,在弱分配步骤之后的一个或多个纯化步骤可能是期望的,以除去其他的杂质或混杂物。

[0116] 所描述的弱分配纯化步骤可以任选的与其他纯化步骤组合,包括但不限于,蛋白 A 层析、亲和层析、疏水性相互作用层析、固定的金属亲和层析、尺寸排阻层析、渗滤、超滤、病

毒去除过滤和 / 或离子交换层析。在弱分配步骤之前和 / 或之后的可选择的纯化步骤也可以以弱分配模式,或以其他模式,例如结合 - 洗脱模式或流通模式来操作。

[0117] 在一个实施方式中,在弱分配纯化步骤之前,收获物介质可以任选的通过蛋白 A 层析步骤初步纯化。例如,可以采用 PROSEP - A™ (Millipore, U. K.), 其由与受控有孔玻璃共价连结的蛋白 A 组成。其他有用的蛋白 A 制剂包括蛋白 A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、TOYOPEARL™650M 蛋白 A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA) 和 MABSELECT™柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0118] 7. 在串联的蛋白 A 层析和离子交换层析中使用的两性离子缓冲液

[0119] 在某些实施方式中,使用低离子强度的洗脱缓冲液从蛋白 A 柱上洗脱含产物流体。然后使用中和缓冲液调节含产物流体的 pH 值和导电率,所述中和缓冲液产生不超过 20mM 的离子强度的所述含产物流体。产生的负载流体然后通过弱分配模式的条件下操作的阴离子交换介质或羟基磷灰石介质。在某些实施方式中,所述负载流体通过阴离子交换介质而不需要渗滤。在某些实施方式中,使用中和缓冲液来调节含产物流体的 pH 值和导电率,所述中和缓冲液产生不超过 40mM 的离子强度的所述含产物流体。在其他实施方式中,使用中和缓冲液来调节含产物流体的 pH 值和导电率,所述中和缓冲液产生不超过 60mM 的离子强度的所述含产物流体。在又一个实施方式中,使用中和缓冲液来调节含产物流体的 pH 值和导电率,所述中和缓冲液产生不超过 80mM 的离子强度的所述含产物流体。

[0120] 可用于从蛋白 A 柱上的洗脱的缓冲液包括一些缓冲液,其包含具有 pKa 2-5 的带电阴离子基团的分子。这种洗脱缓冲液可以进一步包含具有 6.5-10 的 pKa 的带正电阳离子基团的分子。在一个实施方式中,所述洗脱缓冲液包含 pH 值在 4 和 9 之间的两性离子的分子,例如甘氨酸;1,4- 哌嗪二-(乙烷磺酸);双甘氨酸;环戊烷四-1,2,3,4- 羧酸;N,N-二(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸;2-(N-吗啉代)丙烷-磺酸;N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸;N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸;4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸;N-三(羟甲基)甲基甘氨酸;甘氨酸酰胺;N,N-二(2-羟乙基)甘氨酸;N-三(羟甲基)甲基-2-氨基丙烷磺酸;或 N-甘氨酸-甘氨酸。

[0121] 使用两性离子缓冲液洗脱蛋白 A 柱提供了在一定程度的中和时的低离子强度益处。缓冲液的低离子强度不会不利地影响随后的离子交换柱,包括羟基磷灰石柱的操作。高水平的离子强度将降低混杂物与离子交换柱的结合,其可能降低纯化的总效率。更低离子强度的溶液对于在离子交换柱上的负载是优选的,因为离子强度可以通过添加浓缩的盐溶液来容易地提高;降低溶液的离子强度是不容易的。令人惊讶地,存在着一些缓冲液,所述缓冲液具有低 pKa,其容许使用在蛋白 A 洗脱步骤中有用的低 pH 值水平,但也具有第二 pKa,其容许使用在离子交换层析中有用的更高的 pH 值水平;如果在适合的第二 pH 值下使用,这些缓冲液在蛋白 A 步骤之后的离子交换步骤的操作期间具有极少的有效电荷。

[0122] 具有与优选用于蛋白 A 的洗脱 pH 值相近的 pKa 的两性离子缓冲液(在 pH 2 和 5 之间,优选的在 2.5 和 4.0 之间)容许该缓冲液被使用来维持 pH 值接近缓冲液的 pI 并且用来洗脱柱。还具有接近随后的离子交换柱的操作的(pH 5.5 到 11)的 pKa 的两性离子缓冲液将容许缓冲液将 pH 值控制在这个 pH 范围内,以及控制在蛋白 A 洗脱 pH 值范围内。使用单个化合物用于在低 pH 值洗脱蛋白 A 柱以及用于维持在离子交换层析中有用的较高 pH 值,简化了两个步骤的操作,并且也简化了中和之后产物库的组成。

[0123] 在本发明的进一步的实施方式中,具有 pKa1 和 pKa2 的两性离子缓冲液可以在 pKa1 的一个 pH 单位内的 pH 值水平下洗脱蛋白 A 柱。进一步的,如果蛋白 A 库使用两性离子缓冲液的碱性溶液中和到 pKa2 的一个 pH 单位内的第二 pH 值,两性离子缓冲液将能够维持该溶液的 pH 值。如果第二 pH 值低于 pKa2 的,缓冲液保持了两性离子性,并且为溶液的总离子强度做出极少贡献。例如,浓度 x 的两性离子缓冲液在 pH 等于 pKa2 将仅贡献总离子强度 $x/2$ 。浓度 x 的两性离子缓冲液在该缓冲液 pKa2 以下一个 pH 单位将具有 x 的十分之一的离子强度。这种离子强度的降低对于离子交换层析的操作是非常有用的。

[0124] 具有对于蛋白 A 柱的洗脱有用的 pKa1 以及对于离子交换层析的操作有用的 pKa2 的缓冲液的存在不是显而易见的,因为通常没有报道这些缓冲液的 pKa1。缓冲液通常在靠近 pKa2 的 pH 值水平下使用,层析领域的技术人员不知道对于蛋白 A 柱的洗脱是有用的。进一步的,虽然这些缓冲液用于蛋白 A 层析柱洗脱的实用性没有被普遍认识到,但是同样没有认识到的是,这些两性离子缓冲液将具有作为用于蛋白 A 柱之后的离子交换柱缓冲液的其他实用性,因为它们为中和的蛋白 A 库贡献了较少的离子强度。

[0125] C. 实施例

[0126] 以下实施例仅为了说明性的目的来提供。

[0127] 实施例提供了使用三种不同单克隆抗体的三种层析模式(阴离子交换、疏水性相互作用和羟基磷灰石)。描述了四个独立的实验系列,各自代表了不同的层析模式和要纯化的单克隆抗体的配对。首先呈现了初步筛选研究,其确定了在各种溶液条件下的分配系数和/或与树脂结合的产物浓度,因而确定了弱分配(WP)和流通(FT)模式的操作区域。然后使用关于产物回收率和混杂物去除的数据概述了几项柱研究。产物回收率对于 WP 柱运行是非常好的,与相应的 FT 研究中的相比混杂物水平更低。与 FT 研究相比,对树脂使用了更高的负载挑战来进行 WP 运行。

[0128] 使用蛋白 A 酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量测试样品中的蛋白 A 残留物的水平。使用分析性尺寸排阻层析(SEC)分析来测量高分子量聚集物的数量。使用 HCP ELISA 来测量宿主细胞蛋白质(HCP)的水平。所有的筛选和柱研究在室温下进行。

[0129] 系列 1-使用 TMAE-HiCap(M) 的阴离子交换和 Mab-AAB

[0130] 实施例 1.1 高处理量筛选来确定 WP 和 FT 条件

[0131] 进行高处理量筛选(HTS)来鉴定使用 TMAE-HiCap(M) 介质对于 Mab-AAB 的弱分配和流通条件。这种筛选改变氯化钠的浓度和 pH 值来确定它们对 MAB-AAB 的结合程度的影响以及步骤相关的混杂物(蛋白 A 和 HCP)对 TMAE 介质的影响。

[0132] 50 μ L 的 TMAE HiCap 介质添加到 96 孔滤板的每个孔中。在由 50mM 甘氨酸和变动数量的 Tris 缓冲液(取决于中和到表 1.1.1 中指定的 pH 值所需的数量)和氯化钠(在表 1.1.2 中指定)制成的溶液中平衡每个孔。pH 值范围从 7.6 到 9.0,氯化钠范围从 0mM 到 80mM。

[0133] 用于每一排的缓冲溶液在自动化的移液系统(Tecan 100RST)上稀释。缓冲液的贮备溶液由用 HCl 酸化到 pH 值 3.0 的 500mM 甘氨酸制成,随后用 2M Tris 碱中和到表 1.1.1 中指定的 pH 值水平这种滴定产生了取决于缓冲液的 pH 值的 Tris 水平。在贮备缓冲液浓度的 1 到 10 倍稀释度下测量缓冲液 pH 值,其相应于由自动化移液系统产生的稀释度。作为甘氨酸酸化到 pH 3.0 的结果,缓冲液为最终溶液贡献了约 10mM 的离子强度。将两个负

载挑战做到树脂上:5mg/mL 来测量分配系数, K, 122mg/mL 来测量树脂除去混杂物和结合的产物的容量, Q, 使用与柱负载浓度近似相等的浓度的蛋白质溶液平衡。

[0134] 表 1. 1. 1: 每个孔中的缓冲液类型和 pH 值目标

[0135]

	所有的柱
A	50mM 甘氨酸、8.8mM Tris、pH7.6
B	50mM 甘氨酸、13.6mM Tris、pH7.8
C	50mM 甘氨酸、16.0mM Tris、pH8.0
D	50mM 甘氨酸、19.6mM Tris、pH8.2

[0136]

E	50mM 甘氨酸、28.4mM Tris、pH8.4
F	50mM 甘氨酸、37.2mM Tris、pH8.6
G	50mM 甘氨酸、64.0mM Tris、pH8.8
H	50mM 甘氨酸、100mM Tris、pH9.0

[0137] 表 1. 1. 2: 每个孔中的 NaCl 水平 (mM) 和蛋白质挑战 (mg/mL)

[0138]

所有列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
MAB-AAB (mg/mL)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

[0139] 在 HTS 实验的第一个阶段, 以 6 : 1 的相体积比 (300 μ L 溶液 : 50 μ L 树脂) 在表 1. 1. 1 和 1. 1. 2 描述的 NaCl 和 pH 值条件下平衡每个孔。将平板摇动 20 分钟, 容许达到平衡。然后通过离心所述滤板来除去溶液。这个平衡循环重复三次。

[0140] 在第二阶段, 每个孔中的树脂在合适的 NaCl 浓度和 pH 值下以 6 : 1 的体积比 (300 μ L 溶液 : 50 μ L 树脂) 用浓缩的 MAb-AAB 溶液挑战到 5mg/mL 树脂。注入了 300ppm 蛋白 A 的、在 1mM HEPES、10mM NaCl、pH 7.0 中 36mg/mL 的 Mab-AAB 溶液被用作贮备溶液。负载的板摇动 20 分钟, 容许树脂和溶液平衡。通过离心从滤板除去上清液, 并收集到收集板中。每个孔中的上清液中的蛋白质浓度通过 A280nm 处的吸光度来测定。

[0141] 在第三阶段, 通过添加在表 1. 1. 2 中列出的指定的 NaCl 和 pH 值条件的溶液来洗涤树脂。在摇动 20 分钟后除去上清液。在第四阶段, 添加 2M NaCl 来除去结合到树脂上的剩余蛋白质。使用从阶段 3 和 4 洗脱的质量以及阶段 2 的产物浓度, 为每个孔计算分配系数, 在表 1. 1. 3 中示出。作为 pH 值和氯化物的函数的分配系数的对数的等高线图在附图 7 中示出。

[0142] 表 1. 1. 3 MAB-AAB 的 96 孔 HTS 筛选的分配系数 (K)

[0143]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.22	0.32	0.35	0.17	0.24	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.17	0.16
B	0.37	0.36	0.38	0.25	0.24	0.08	0.28	0.26	0.22	0.24	0.18	0.16
C	0.63	0.48	0.47	0.27	0.15	0.20	0.31	0.28	0.26	0.20	0.23	0.16

D	1.24	1.12	0.68	0.36	0.30	0.17	0.42	0.39	0.34	0.23	0.23	0.18
E	3.24	1.89	1.05	0.59	0.35	0.15	0.68	0.58	0.41	0.29	0.21	0.18
F	8.37	3.37	1.56	0.61	0.31	0.32	0.87	0.74	0.51	0.32	0.25	0.21
G	18.36	9.49	3.16	0.82	0.49	0.34	0.91	0.88	0.69	0.39	0.24	0.20
H	125.73	23.79	6.58	1.23	0.58	0.43	1.18	1.02	0.78	0.42	0.27	0.24

[0144] 如表 1.1.3 中所示, K_p 值可以用于描述 MAB-AAB 以不同强度与 TMAE 介质结合的区域。这些区域在附图 7 中更清楚地示出。MAB-AAB 与 TMAE 介质结合的强度可以通过改变进入到流通 ($K \leq 0.1$)、弱分配 ($0.1 < K < 20$) 和结合区 ($K \geq 20$) 的 pH 值和氯化物浓度条件来操纵。

[0145] 将来自每个区域的所有孔的负载阶段的上清液进行采样并进行蛋白 A 分析。这些样品的分析结果在表 1.1.4 中概述。存在着一个 pH 值和导电率区域, 在此 TMAE 层析步骤提供了非常显著的蛋白 A 去除以及对于树脂的有限蛋白质损失。发现这个区域与分配系数值 K_p 紧密相关, 而不是任何特定的 pH 值或氯化物浓度 (参见附图 8)。

[0146] 表 1.1.4 来自 HTS 筛选的 MAB-AAB 结合数据的蛋白 A 对数去除值 (LRV)

[0147]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.11	1.89	2.12	1.85	1.22	1.00	1.63	1.02	1.00	0.92	0.85	1.02
B	2.79	2.37	2.42	1.96	1.23	1.13	1.77	1.81	1.22	0.85	0.94	1.52
C	> 3.05	> 3.03	2.74	2.16	1.37	1.11	2.25	2.15	1.96	1.16	1.06	0.95
D	> 3.41	> 2.98	> 3.06	2.50	1.94	1.18	3.39	3.11	2.57	1.41	1.02	0.89
E	> 2.87	> 2.93	> 3.01	> 2.95	2.13	1.75	> 3.09	3.27	3.09	1.66	1.89	0.99
F	> 2.64	> 2.89	> 2.99	> 3.11	2.29	1.82	> 3.07	> 3.11	> 3.15	2.19	1.24	0.84
G	> 2.33	> 2.58	> 2.89	> 3.07	2.41	2.14	> 3.09	> 3.11	> 3.14	2.80	1.46	0.85
H	> 1.63	> 2.36	> 2.76	> 3.01	2.86	2.37	> 2.98	> 3.05	> 3.15	3.16	3.45	0.85

[0148] 实验 1.2 流通条件下的柱运行

[0149] 以流通 (FT) 模式进行以下实验, 其中 Mab-AAB 仅非常微弱地与柱相互作用。使用 110mg/ml 和 200mg/ml 树脂的负载挑战进行两个运行。

[0150] 对于在系列 1 实验中描述的所有 TMAE (HiCapM) 阴离子交换层析运行, 使用以下条件 (除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0151] 操作流速 -150-300cm/hr

[0152] 平衡液 1-50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 (5 倍柱体积)

[0153] 平衡液 2- 如指定的, 大约等于负载 pH 值和氯化物含量

[0154] 负载后洗涤液 - 如指定的, 大约相当于负载 pH 值和氯化物含量

[0155] 脱除缓冲液 -50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 (5 倍柱体积)

[0156] Mabselect 蛋白 A 层析

[0157] 使用连接到 Millipore K-prime 400 层析系统的 MabSelect 柱 (2, 389mL) 在中试规模纯化含有单克隆抗体的培养物。用 5 倍柱体积的 50mM Tris/150mM NaCl, pH 7.5 以 300cm/hr 的流速平衡 Mabselect 蛋白 A 柱。然后以大约 40mg 产物 /ml 树脂的负载来负载柱。之后是 1M NaCl、50mM Tris, pH 7.5 中的 5CV 洗液, 以及含有 10mM Tris、75mM NaCl pH 7.5 的洗液的洗涤。然后使用 50mM 甘氨酸、75mM NaCl, pH 3.0 来洗脱柱。使用 2M Tris pH 8.5 将产物库中和到 pH 7.6。中和的峰具有大约 90mM 的氯化物浓度。

[0158] TMAE HiCap(M) 层析

[0159] 中和的蛋白 A 库进一步在具有平衡、负载和 pH 7.5、50mM Tris 和 75mM 氯化钠的

洗涤溶液的 TMAE 步骤上纯化。使用 5 倍柱体积的洗液。用于这两项研究的柱尺寸和负载挑战是：运行 1：7.0cm 直径 × 20.6cm 床高度（体积 -793mL），负载浓度 11.9mg/mL，运行 2：7.0cm 直径 × 13cm 床高度（体积 -500mL），负载浓度 17.6mg/mL。

[0160] 这些负载条件处于流通 (FT) 区域中（表 1.2.1）。分批结合研究被用于测量分配系数 (Kp)，通过使用 UV 吸光度通过柱列带中的蛋白质测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的等度洗脱，测定结合的产物的这种方法一般低估了在负载期间结合的产物数量。测量负载和产物库中蛋白 A、HCP 和 HMW 的水平，计算去除的程度。结果在表 1.2.1 中示出。存在着不良的蛋白 A 和 HMW 去除，和 HCP 水平的中度降低。

[0161] 表 1.2.1：流通条件下 HCP、蛋白 A 和 HMW 的去除

[0162]

运行	负载挑战 (mg/mL)	分配系数 (Kp)	结合的产物 (mg/ml 树脂)	HCP (LRV)	蛋白 A (LRV)	HMW (倍) (Fold)	回收率 (%)
1	110	0.17	1.4	2.3	0.1	-	96
2	200	0.17	3.3	2.0	<0.1	1.5	96

[0163] * 混杂物水平是 38.5ppm ProA 和 51,943ppm HCP (运行 1), 8.8ppm ProA 和 25,398ppm HCP (运行 2)。

[0164] 实施例 1.3 在弱分配条件下的柱运行（高产物挑战）

[0165] TMAE (HiCapM) 阴离子交换层析

[0166] 基本上如实施例 1.2 中描述的进行几个 Mabselect Protein A 运行来产生用于这些运行的负载材料。来自蛋白 A 步骤的部分纯化的抗体库进一步在 TMAE 柱上纯化。TMAE 柱上的负载是处于 50mM Tris, pH 8.2 中。柱直径是 0.5cm, 床高度是 10cm 床高度（体积 -2.0mL）。以 27.7mg/mL 的负载浓度将柱挑战到 500mg/mL 树脂的负载。

[0167] 用含有 50mM Tris、2M NaCl、pH 7.5 的 5 倍柱体积的溶液平衡柱，随后是包含 50mM Tris、pH 8.2 溶液的另一个平衡步骤。然后用来自上述步骤的中和的蛋白 A 峰将柱负载到 500mg 产物 /mL 树脂，从负载循环期间的柱流出物以及一定柱体积的洗涤级分中回收产物。

[0168] 这些负载条件处于弱分配区域内。分批结合研究被用于测量分配系数 (Kp)，产物在高蛋白浓度下结合。在 pH 8.2 处，12mM 的近似的氯化物含量，分配系数 Kp 估计是 1.9（根据对来自 HTS 筛选的数据集的内插值）。

[0169] 在代表大约 250、375 和 500mg/ml 树脂的负载挑战的负载阶段期间，在三个级分中测量 HCP 和蛋白 A 水平。实验 1.3 的结果在表 1.3.1 中示出。这些结果表明，在弱分配模式中可以实现非常高的产物挑战，而没有混杂物的穿透。实现了 HCP 和蛋白 A 的极好的降低，以及 HMW 含量的 50% 降低。与表 1.2.1 中的流通模式的操作结果相比，在弱分配模式中混杂物的去除好得多。

[0170] 表 1.3.1：500mg/mL TMAE 负载挑战的 HCP、Protein A 和 HMW 的去除

[0171]

	早期级分 (250mg/ml)	中间级分 (375mg/ml)	晚期级分 (500mg/ml)	终产物库 (ppm)
残余的 HCP ppm (ng/mg 产物)	<7.6	<7.6	<7.6	<7.6
HCP 对数去除 值 (LRV)	>3.5	>3.5	>3.5	>3.5

[0172]

残余的蛋白 A ppm (ng/mg 产物)	0.3	没有测定	0.1	0.6
蛋白 A 对数去除 值 (LRV)	2.9	没有测定	2.3	2.5
HMW	没有测定	没有测定	没有测定	2 倍去除

[0173] * 负载中的混杂物质是 25,398ppm 的 HCP、99.5ppm 的蛋白 A 和 2.3% HMW。

[0174] 实施例 1.4 在弱分配条件下的柱运行 (健全性 (robustness) 研究)

[0175] 为了进一步确认在弱分配区域内 TMAE 柱的性能,设计了改变负载中的 pH 值和 NaCl 浓度来测试过程健全性的几个运行试验。在 250mg/mL 树脂的负载挑战下进行所有运行试验。基本上如实施例 1.2 中描述的进行几个 Mabselect 蛋白 A 运行试验来产生用于这些运行试验的负载材料。在这些运行试验中改变的唯一因素是蛋白 A 洗脱中的氯化钠浓度,其被改变来匹配特定实验的 TMAE 负载中的 NaCl 浓度。用平衡液 2 缓冲液平衡柱,并用具有与负载大致相同的 pH 值和氯化钠含量的洗涤缓冲液洗涤。

[0176] 这些负载条件处于弱分配区域内。分批结合研究被用于测量分配系数 (Kp)。通过表 1.4.1 所列的分配系数来对运行试验分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物,范围 7.8-25.3mg/mL。这些实验的蛋白 A、HCP 和 HMW 结果也在表 1.4.1 中呈现。发现在覆盖 13.5-38.8mM 总氯化物和 pH 值 7.8-8.4 的操作范围中,所有混杂物的去除是健全的。

[0177] 表 1.4.1:对于弱分配模式中 HCP、Protein A 和 HMW 去除的过程健全性研究

[0178]

NaCl 浓度 (mM)	K _p	结合的产物 (mg/mL)	pH	负载中的 HCP (ppm)	负载中的蛋白 A (ppm)	HCP (LRV)	蛋白 A (LRV)	HMW (倍)	回收率 (%)
38.8	0.26	9.4	7.8	26,391	493.5	3.7	1.8	2.0	92
13.5	0.41	7.9	7.8	12,821	69.2	3.3	>1.9	1.8	87
27.4	0.50	8	8.0	23,465	252	3.6	2.2	3.2	91
18.5	0.73	7.8	8.0	21,626	308	3.7	>3.2	2.9	90
23.5	0.80	9.5	8.1	18,004	343	3.2	>3.2	3.5	94
27.7	0.86	9.5	8.2	24,821	280	3.6	>3.2	2.6	99
18.5	1.48	10	8.2	17,669	252	3.7	>3.1	3.9	95
22.0	5.35	25.3	8.4	29,293	533	3.6	>2.9	2.3	90

[0179] * 混杂物水平是 38.5ppm ProA 和 51,943ppm HCP (运行 1), 8.8ppm ProA 和 25,398ppm HCP (运行 2)。

[0180] + 包括来自 NaCl、缓冲液和滴定剂的 Cl⁻ 离子贡献

[0181] 总结

[0182] 根据这项研究,可以看出蛋白 A 去除 (LRV) 随着 K_p 强烈地变化,而 HCP LRV 在 0.26 或以上的所有 K_p 值下是极好的,但在 K_p = 0.17 时大大降低 (在流通条件下)。甚至在降低的负载挑战之下,与弱分配条件相比,流通条件的宿主细胞蛋白质去除要低超过一个对数。对于树脂和单克隆抗体的这种组合,这些弱分配条件的结合的产物范围从 7.8-25mg/mL。分配系数在 0.41 < K_p < 5.4 之间似乎是最佳的。看起来实施例 1.2 的条件 K_p = 0.17 和 1.4-3.3mg/mL 的结合产物处不是最佳的。

[0183] 系列 2-使用 TMAE-HiCapM 的阴离子交换和 Mab-IMA

[0184] 实施例 2.1 高处理量筛选来确定 WP 和 FT 条件

[0185] 进行高处理量筛选 (HTS) 来鉴定使用 TMAE-HiCap (M) 介质对于 Mab-IMA 的弱分配和流通条件。这种筛选改变氯化钠的浓度和 pH 值来确定它们对 Mab-IMA 的结合程度的影响以及步骤相关的混杂物 (蛋白 A 和 HCP) 对 TMAE 介质的影响。将 100 μL 的 TMAE HiCap 介质添加到 96 孔滤板的每个孔中。在由不远离缓冲液 pKa 超过 1 个 pH 值单位的 25mM 缓冲液 (表 2.1.1) 和合适水平的氯化钠 (表 2.1.2) 组成的溶液中平衡每个孔。pH 值浓度范围从 7.00 到 8.75,氯化钠浓度范围从 1mM 到 190mM。

[0186] 使用 12M HCl 将所有缓冲液滴定到目标 pH 值。作为不同的缓冲液种类需要不同水平的滴定剂的结果,取决于对孔使用的缓冲液,氯化物浓度在孔与孔之间是不同的。滴定缓冲液到目标 pH 值所需的 Cl⁻ 的数量使用 Henderson-Hasselbach 方程式来计算,并增加到由 NaCl 和负载材料中的数量所贡献的总 Cl⁻ 中。在该实验中为每个孔计算的 Cl⁻ 水平在表 2.1.3 中列出。

[0187] 表 2.1.1: 每个孔中的缓冲液类型和 pH 值目标

[0188]

	所有的柱
A	乙醇胺 (pH = 8.75)
B	Tris (pH = 8.5)
C	Tris (pH = 8.25)
D	Tris (pH = 8.0)
E	Tris (pH = 7.75)
F	Tris (pH = 7.5)
G	Bis-Tris (pH = 7.25)

H	Bis-Tris(pH = 7.0)
---	--------------------

[0189] 表 2.1.2 :每个孔中的 NaCl 水平 (mM)

[0190]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
所有列	1	5	10	15	25	35	50	75	100	125	150	190

[0191] 表 2.1.3 :每个孔中的 Cl⁻ 水平 (mM)

[0192]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	22	26	31	36	46	56	71	96	121	146	171	211
B	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
C	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200
D	15	19	24	29	39	49	64	89	114	139	164	204
E	18	22	27	32	42	52	67	92	117	142	167	207
F	21	25	30	35	45	55	70	95	120	145	170	210
G	8	12	17	22	32	42	57	82	107	132	157	197
H	11	15	20	25	35	45	60	85	110	135	160	200

[0193] 在 HTS 实验的第一个阶段,以 3 : 1 的相体积比 (300 μ L 溶液 : 100 μ L 树脂) 在表 2.1.1 和 2.1.2 描述的 NaCl 和 pH 值条件下平衡每个孔。将平板摇动 20 分钟,容许达到平衡。然后通过离心所述滤板来除去溶液。这个平衡循环重复三次。

[0194] 在第二阶段,每个孔中的树脂在合适的 NaCl 浓度和 pH 值下以 3 : 1 的体积比 (300 μ L 溶液 : 100 μ L 树脂) 用浓缩的 MAb-IMA 溶液挑战到 3mg/mL 树脂。具有 300ppm 蛋白 A 的、在 1mM Mes、15mM NaCl、pH 6.5 中 30mg/mL 的 Mab-IMA 溶液被用作贮备溶液。负载的板摇动 20 分钟,容许树脂和溶液平衡。通过离心从滤板除去上清液,并收集到收集板中。每个孔中的上清液中的蛋白质浓度通过 A280nm 处的吸光度来测定。蛋白 A 和 / 或 HCP 水平中的任何下降表明有助于纯化的条件。

[0195] 在第三阶段,通过添加在表 2.1.2 中列出的指定的 NaCl 和 pH 值条件的溶液来洗涤树脂。在摇动 20 分钟后除去上清液。在第四阶段,添加 2M NaCl 来除去结合到树脂上的剩余蛋白质。使用从阶段 3&4 洗脱的质量以及阶段 2 的产物浓度,为每个孔计算分配系数,在表 2.1.4 中示出。作为 pH 值和氯化物的函数的分配系数的对数的等高线图在附图 9 中示出。

[0196] 表 2.1.4 MAB-IMA 的 96 孔 HTS 筛选的分配系数 (K_p)

[0197]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	34.5	20.2	11.4	7.2	3.5	1.8	0.8	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2
B	97.1	42.4	19.3	9.9	4.3	2.2	1.0	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2
C	14.8	9.4	5.8	4.2	2.0	1.1	0.5	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
D	1.8	1.6	1.3	1.0	0.7	0.5	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
E	0.7	0.7	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
F	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
G	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

[0198] 如表 2.1.4 中所示, K_p 值可以用于描述 MAB-IMA 以不同强度与 TMAE 介质结合的区域。这些区域在附图 9 中更清楚地示出。MAB-IMA 与 TMAE 介质结合的程度可以通过改变进入流通 (K_p ≤ 0.1)、弱分配 (0.1 < K_p < 20) 和结合区 (K_p ≥ 20) 的 pH 值和氯化物浓度

条件来操纵。

[0199] 来自每个区域的几个孔的负载阶段的上清液进行采样并进行蛋白 A 分析。负载具有 300ppm 的蛋白 A。这些样品的分析结果在表 2.1.5 中概述。存在着一个 pH 值和导电率区域,在此 TMAE 层析步骤提供了非常显著的蛋白 A 去除以及对于树脂的有限蛋白质损失。发现这个区域与分配系数值 Kp 紧密相关,而不是任何特定的 pH 值或氯化物浓度。

[0200] 表 2.1.5 来自 HTS 筛选的蛋白 A 残留水平和 MAB-IMA 结合数据

[0201]

pH	Cl- (mM)	Kp(预测)	蛋 白 A(ppm)
8.5	12	42.4	<28 -BLOQ
8.5	32	4.3	<7 -BLOQ
8.25	35	2.0	<5 -BLOQ
8.25	45	1.13	<4 -BLOQ
8.0	39	0.7	<4 -BLOQ
8.25	60	0.5	<4 -BLOQ
7.75	42	0.4	<4 -BLOQ
7.5	45	0.3	35
8.0	64	0.3	63
8.25	110	0.3	190
7.25	32	0.2	90
8.0	89	0.2	177
8.75	121	0.3	217
7.75	92	0.2	187
7.5	120	0.2	219
7.25	107	0.2	224

[0202] 预测的 Kp 值来自与 HTS 筛选的响应表面拟合,和基于此回归模型的 Kp 的随后预测。

[0203] 实施例 2.2 使用 TMAE-HiCapM 和 Mab-IMA 在 FT 条件下的柱运行

[0204] 以流通 (FT) 模式进行以下实验,其中 Mab-IMA 仅非常微弱地与柱相互作用。进行四个运行,产物挑战 109-275mg/ml 树脂。

[0205] TMAE(HiCap M)阴离子交换层析

[0206] 对于在实验 2 系列中描述的所有 TMAE(HiCapM) 阴离子交换层析步骤,使用以下条件(除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0207] 操作流速 -150-300cm/hr

[0208] 平衡液 1-50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 或 8.0(5 倍柱体积)

[0209] 平衡液 2-75mM NaCl、50mM Tris、pH 7.5(运行 3 和 4 含有 50mM 甘氨酸)

[0210] 负载后洗涤液 -75mM NaCl、50mM Tris、pH 7.5(运行 3 和 4 含有 50mM 甘氨酸)

[0211] 脱除缓冲液 -50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 或 8.0(5 倍柱体积)

[0212] 基本上如实施例 1.2 中描述的进行几个 Mabselect Protein A 运行来产生用于这些运行的负载材料。来自先前描述的蛋白 A 步骤的部分纯化的抗体库以流通 (FT) 模式在阴离子交换步骤中进一步纯化。柱直径范围 1.0-3.2cm,柱高度是 7.2-8.5cm。

[0213] 用含有 50mM Tris、2M NaCl、pH 7.5 的 5 倍柱体积的溶液平衡柱,随后是包含 50mM Tris、pH 7.5 溶液的另一个平衡步骤。然后用所述部分纯化的蛋白 A 峰将柱负载到 109mg/mL 和 275mg/mL 之间,从负载循环期间的柱流出物以及洗涤级分的一定柱体积中回收产物。

[0214] 这些负载条件处于流通 (FT) 区域中。实施例 2.1 中描述的高处理量筛选估计了在这些 pH 值和氯化物浓度条件下分配系数 (Kp) 的值。通过表 2.2.1 所列的分配系数对运行试验分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的等度洗脱,测定结合的产物的这种方法一般低估了结合产物总量。这些实验的蛋白 A、HCP, HMW 去除结果也在表 2.2.1 中呈现。存在着相对不良和可变的 HCP 去除,没有蛋白 A 和产物变体 (HMW 和 LMW 种类) 的去除。

[0215] 表 2.2.1 :在 FT 模式中 HCP、蛋白 A 和 HMW 和 LMW 的去除

[0216]

Kp	结合的产物 (mg/mL)	pH	Cl ⁻ (mM)	负载挑战 (mg/mL)	负载中的蛋白 A (ppm)	负载中的 HCP (ppm)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (倍)	LMW (倍)	回收率 (%)
0.1	0.5	6.5	83	150	ND	4166	1.8	ND	1	1.1	>95%
0.2	0.8	7.0	83	275	25	1575	0.6	<0.1	1	1	>95%
0.2	ND	7.3	83	109	24	3117	2.4	<0.1	1	1	>95%
0.3	0.3	7.5	83	167	ND	4572	1.8	ND	1	1	>95%

[0217] ND = 没有测定

[0218] 实验 2.3- 对于 Mab-IMA 在弱分配条件下的柱运行

[0219] 以下柱实验在由 HTS 筛选 (实验 2.1) 鉴定的条件下在弱分配模式中进行。对来自部分地纯化的蛋白 A 库的 TMAE 柱进行七个运行。

[0220] TMAE HiCap(M)层析谱

[0221] 来自基本上与先前描述的相同的蛋白 A 步骤运行的部分纯化的抗体在如下所述的 pH 值和氯化物含量的弱分配 (WP) 条件下在 TMAE 步骤上被进一步纯化。柱直径范围 0.5 到 3.2cm, 柱高度是 9.4-9.5cm。

[0222] 用含有 50mM Tris、2M NaCl、pH 7.5 或 8.0 的 5 倍柱体积的溶液平衡柱,随后是包含 50mM 甘氨酸、50mM Tris、pH 7.5 或 8.0 溶液的另一个平衡步骤。然后用所述部分纯化的蛋白 A 峰将柱负载到 124mg/mL 和 303mg/mL 之间,从负载循环期间的柱流出物以及洗涤级分的一定柱体积中回收产物。这个实验的结果在表 2.3.1 中示出。

[0223] 这些负载条件处于弱分配 (WP) 区域中。实施例 2.1 中描述的高处理量筛选提供了对分配系数 (Kp) 的值的估计。通过表 2.3.1 所列的分配系数来对运行试验分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的等度洗脱,测定结合的产物的这种方法一般低估了结合的产物总量。这些实验的蛋白 A、HCP、HMW 和 LMW 去除结果也在表 2.2.1 中呈现。存在着一致的和很高的 HCP 去除,极好的蛋白 A 去除,以及产物变体的有价值的降低 (HMW 和 LMW 种类)。

[0224] 表 2.2.1 和 2.3.1 中呈现的数据的比较证实了,在流通模式 (≤ 0.3 的 Kp 值) 的条件下 HCP、蛋白 A、HMW 和 LMW 的去除与在弱分配条件 (>0.3 的 Kp 值) 实现的相比要低得多,即使在负载挑战超过 300mg/mL 时。

[0225] 表 2.3.1 :弱分配条件下 HCP、蛋白 A、HMW 和 LMW 的去除 ND = 没有测定

[0226]

Kp	结合的产物 (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	负载挑战 (mg/mL)	负载中的蛋白 A (ppm)	负载中的 HCP (ppm)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (倍)	LMW (倍)	回收率 (%)
0.6	ND	7.5	14	303	72	754	1.9	1.6	1.3	1.5	>95%
0.7	ND	8.0	55	303	72	754	2.0	1.5	1.0	1.2	>95%
0.7	4	7.9	45	307	213	1852	2.6	2.4	ND	ND	>95%
1.0	5	8.1	45	302	222	1852	2.6	3.0	ND	ND	>95%
1.2	30	8.0	35	124	52	3320	2.8	>2.1	1.4	1.1	89%
1.7	ND	8.0	26	303	72	754	2.3	>2.6	1.1	1.8	>95%
1.7	9	8.1	31	310	ND	ND	ND	ND	ND	ND	90%
1.8	25	7.8	14	169	23	2462	3.0	>1.8	1.9	2.1	86%
5.2	9	8.0	17	303	72	754	2.0	>2.6	1.7	1.6	>95%
8.9	59	8.2	12	284	ND	ND	ND	ND	1.5	2.1	75%

[0227] 实验 2.4 :在中试和临床生产规模的弱分配柱运行的性能

[0228] 在弱分配区域中运行的 Mab-MA 纯化的 TMAE 过程被扩大规模到中试工厂和临床生产。含有单克隆抗体的培养物首先在中试中使用 3L 或 5LMabSelect 柱,和在临床生产中使用 28LMabSelect 柱来纯化。MabSelect 柱基本上如实验 1.2 中描述的操作。来自这些运行试验的中和的蛋白 A 峰库进一步在中试中在 1.5LTMAE 柱上以及在临床生产设施中在 7LTMAE 柱上进一步纯化。三个中试运行的结果和九个临床生产运行的结果分别在表 2.4.1 和 2.4.2 中概述。步骤性能在各个运行之间是一致的,具有很好的 HCP、蛋白 A 降低以及产物相关的 HMW 和 LMW 种类的良好去除。产物回收率在所有运行中 >87%。在中试运行期间与树脂结合的产物的估计根据在柱列带中的产物来获得,范围 6-14mg/mL 树脂。

[0229] 表 2.4.1 :在弱分配条件下中试规模运行的性能

[0230]

	Kp	结合的产物 (mg/mL)	pH	Cl- (mM)	负载挑战 (mg/mL)	HCP (LRV)	ProA (LRV)	HMW (倍)	LMW (倍)	回收率 (%)
运行1	1.7	14	8.1	31	253	3.4	>2.6	2.0	2.0	90
运行2	1.7	13	8.1	31	184	>3.6	>2.6	1.0	3.0	88
运行3	1.7	6	8.1	31	150	ND	>2.8	1.3	1.2	88

[0231] NO :没有测定

[0232] 表 2.4.2 :在弱分配条件下生产规模运行的性能

[0233]

	Kp	负载挑战 (mg/mL)	Cl- (mM)	pH	HCP* (LRV)	ProA* (LRV)	HMW (倍)	LMW (倍)	回收率 (%)
运行1	3.2	90	30	8.1	>2.2	≥0.8	2.5	3.0	90
运行2	2.5	180	29	8.0	>2.2	≥0.0	1.9	1.5	93
运行3	2.6	133	28	8.0	>2.3	≥1.0	2.5	1.8	95
运行4	2.6	174	29	8.0	>2.2	≥1.0	2.5	1.2	94
运行5	2.2	136	31	8.0	>2.0	≥0.9	2.3	1.7	102
运行6	3.8	146	27	8.1	>2.2	≥0.8	2.5	1.8	91
运行7	2.0	118	28	7.9	>2.2	≥1.0	1.6	1.6	96

[0234] *TMAE 峰库中的 HCP 和蛋白 A 水平低于定量的极限。

[0235] 总结

[0236] HTS 鉴定了 WP 和 FT 操作的条件。FT 模式仅提供了 HCP 和 LMW 种类中的中度的降低,在蛋白 A 残余或 HMW 种类中没有降低。WP 模式的操作改进了所有混杂物的去除而没有牺牲产物收率。加工步骤被扩大到中试工厂,三个运行一致性地操作,对于 HCP 和蛋白 A 具有非常高的 LRV,以及在 HMW 和 LMW 种类中良好的降低。

[0237] 系列 3-使用 TMAE-HiCapM 的阴离子交换和 Mab-AAB

[0238] 实施例 3.1- 高处理量筛选来确定 WP 和 FT 条件

[0239] 使用如实验 1.1 中描述的步骤来进行实验 3.1。

[0240] 实验 3.2- 在相应于变动的分配系数的条件下的柱容量运行

[0241] 在相应于由 HTS 筛选 (实验 3.1) 鉴定的一系列分配系数的条件下进行五个层析实验。TMAE 柱被负载到非常高的负载挑战 (>1000g/L) 来特别地强调在弱分配条件下 AEX 步骤的优越性能。

[0242] 使用以下条件用于在系列 3 中进行的 AEX 运行 (除了在单独的实验描述中注明的)。

[0243] 操作流速 -150-300cm/hr

[0244] 平衡液 1-50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 (5 倍柱体积)

[0245] 平衡液 2- 如指定的,大约相当于负载 pH 值和氯化物含量

[0246] 负载后洗涤液 - 如指定的,大约相当于负载 pH 值和氯化物含量

[0247] 脱除缓冲液 50mM Tris、2.0M NaCl、pH 7.5 (5 倍柱体积)

[0248] 使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 和随后 5 倍柱体积的平衡液 2 步骤来平衡柱。然后用调节到适合的平衡液 2 缓冲液的蛋白 A 峰库 (是指系列 1,实验 1.1) 将柱负载到 940 和 2144mg 产物 /ml 树脂之间。

[0249] 收集柱流出物级分,随后分析 HCP 和残余的蛋白 A 水平。这些实验中使用的负载条件相应于逐渐地提高的分配系数,其跨越了流通和弱分配 (WP) 区域。实施例 3.1 中描述的高处理量筛选提供了对分配系数 (Kp) 的值的估计。这个实施例中结合的产物的值根据在列带中洗脱的产物来计算。这些实验的结果在表 3.2.1 和附图 10A 和 10B 中示出。

[0250] 表 3.2.1- 在 WP 模式下非常高的负载挑战试验结果的概述

[0251]

	分配系数 Kp	操作条件	负载挑战 mg/ml	结合的产物 mg/mL*	回收率 %
运行 1	0.1	流通	1754	0	100
运行 2	0.23	弱分配	940	14.2	98.5
运行 3	0.8	弱分配	940	12.0	98.7
运行 4	0.8	弱分配	2144	23.0	98.9
运行 5	2.73	弱分配	960	12.6	98.7
运行 6	7	弱分配	1130	71.7	93.7

[0252] * 基于质量平衡计算。

[0253] 相应于 Kp 0.1 的运行的结合的产物的值接近零,如典型的流通操作所预期的。在弱分配区域中进行的实验的结合的产物值在所有情况下 >12.0mg/ml。实际上,相应于 Kp 7 的运行的结合的产物结合高达 71mg/ml。然而,在所有情况下,在组合的负载洗脱液和洗涤级分中的产物回收率是 >93%。

[0254] 作为负载挑战的函数的 HCP 和蛋白 A 去除在附图 10A 和 10B 中示出。如较早讨论的,HCP 去除随着条件从流通移动到弱分配而显著提高。流通条件下的操作提供了大约 1.5 对数值的 HCP 清除,而当在弱分配区域中在 Kp 7 下操作时在负载挑战 <450mg/ml 树脂时 HCP 对数去除值高达 3.8 对数值。在弱分配区域中的 Kp 0.8 时,高达 1000mg/ml 树脂的负载挑战获得了 2.8 对数值的 HCP 清除,在弱分配区域中在 Kp 2.7 时,高达 800mg/ml 树脂的负载挑战获得了 >3 对数值的 HCP 清除。

[0255] 与 HCP 中的情况一样,当我们从流通条件移动到弱分配条件时,蛋白 A 去除显著地提高。附图 10A 和 10B 中示出的结果也强调了该事实,将操作的 Kp 从流通提高到弱分配区域时,在杂质的穿透之前提高了所获得的 HCP 和蛋白 A 对数清除值,并提高了相应于穿透点的负载挑战。在杂质的穿透之前,Kp 的进一步增加提高了 HCP 和蛋白 A LRV。然而,由于结合的产物现在与杂质竞争结合位点,穿透点在相对较低的负载挑战时出现。尽管如此,在此呈现的运行的柱容量 即使对于高 Kp 运行也是非常高的。

[0256] 总结

[0257] 在这个实施例中,显示的是,通过在弱分配条件下和在超过 1000mg/ml 树脂的负载挑战下操作 AEX 步骤,可以显著地改善蛋白 A 和 HCP 去除。这个实施例突出了弱分配层析和在结合条件下的标准操作之间的一个根本差异。弱分配条件仅将产物结合的极限推高到杂质清除或被显著改善的点,而产物回收率和负载挑战保持很高。相应于结合条件的 Kp 值在 AEX 中是 >20 ;在这些条件下,产物和杂质之间的竞争效应非常强,导致与弱分配层析相比降低的容量。

[0258] 系列 4-使用 Phenyl Toyopearl 的疏水性相互作用和 Mab-AAB

[0259] 实验 4.1- 确定 WP 和 FT 条件的分批结合研究

[0260] 进行分批结合研究来鉴定使用来自 Tosoh Biosciences 的 Phenyl Toyopearl 介质对于 Mab-AAB 的弱分配和流通条件。调节产物与树脂的相互作用的强度的盐是 Na_2SO_4 ，其从 0.20 变动到 0.90M。溶液被缓冲控制在 pH 7.5。使用 45 μm 过滤板来孵育树脂和液体，并通过离心倾析出上清液。使用不同浓度的 Na_2SO_4 (0.2M 到 0.9M) 来制作八个 Tris/ Na_2SO_4 缓冲液。通过蛋白 A 层析部分纯化的 Mab-AAB 稀释到 Tris/ Na_2SO_4 溶液中到 0.87mg/ml 的终浓度。使用 300 μL 的缓冲液平衡 50 μl 的树脂，然后对于每个 Tris/ Na_2SO_4 条件倾析出上清液；重复这个平衡三次。在平衡之后，在相同的盐浓度和 pH 值下将倾析的树脂与产物混合，并柔和摇动地孵育 30 分钟。所有条件的负载挑战是 5.2mg 产物 /ml 树脂。然后将 UV 平板堆叠在滤板的底部来在离心时收集上清液。随后，将 300 μl 50mM Tris、pH 7.5 缓冲液施加到树脂上来脱除结合的产物。在 20 分钟的孵育之后，通过离心在独立的 UV 平板中收集列带。每个级分中的产物浓度通过 UV 吸光度和这种 MAB 的消光系数来测量。调节计算用于 29 μl (在通过独立的实验集确定) 体积的阶段 - 阶段继续试验 (carry over)。在每种盐条件下重复实验四次，报告平均的分配系数。

[0261] 表 4.2.1 概述了这个实验的分配系数。 Na_2SO_4 的最高浓度引起了强的产物结合，而在 0.40-0.55M 的范围内的盐浓度代表了弱分配条件。

[0262] 实验 4.2- 在弱分配、流通和结合条件下的柱运行 (高产物挑战研究)

[0263] 在流通、弱分配和强结合条件下进行柱运行。对于在系列 4 实验中描述的所有 Phenyl Toyopearl 疏水性相互作用层析运行，使用以下条件 (除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0264] 柱尺寸 : 直径 0.5cm, 床高度 9.5-10.5cm

[0265] 平衡液 -50mM Tris、pH 7.5, [Na_2SO_4] 大约等于负载

[0266] 负载 - 如以下指定的 [Na_2SO_4]

[0267] 洗涤 - [Na_2SO_4] 等于负载 (除以下注明的之外)

[0268] 脱除 -50mM Tris、pH 7.5

[0269] 使用两种不同的负载 : i) 来自与之前描述的那些基本上相同蛋白 A 步骤运行的部分纯化的抗体库, 或 ii) 来自 FT 模式操作的更纯的 TMAE Q Sepharose FF 产物库。

[0270] 实验 4.2.1 使用蛋白 A 峰库作为负载的柱运行

[0271] 进行在此讨论的实验来强调弱分配条件下 HIC 的优越性能。在变动的盐浓度下进行柱运行来覆盖相应于流通、弱分配和强结合条件的一系列分配系数。实验 4.1 中描述的分批结合筛选提供了对分配系数 (K_D) 的值的估计。用 5 倍体积的含有 50mM Tris、pH 7.5 和指定浓度的适合的 [Na_2SO_4] 的溶液来平衡柱子。蛋白 A 峰首先浓缩 10 倍, 随后在合适的盐浓度中稀释到 14.77mg/ml。在负载材料的宿主细胞蛋白质 (HCP) 和残余的蛋白 A 水平分别是 30911ppm 和 17.1ppm。所有的柱运行在 100mg/ml 树脂的负载挑战下进行。在负载循环级分期间在柱流出物中收集产物。在产物流通之后, 将与负载相同盐浓度的十倍柱体积的洗涤缓冲液施加到柱上, 随后是含有 50mM Tris、pH 7.5 的五倍体积的脱除缓冲液。负载洗脱液和洗涤样品中的 HCP 和蛋白 A 含量随后通过 ELISA 来分析。在负载洗脱液和洗涤级分中的组合的混杂物水平在表 4.2.1 中报告。

[0272] 运行通过分配系数来分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的逐渐脱附, 测定结合的产物的这种方法一般低估了在负

载期间结合的产物数量。

[0273] 表 4.2.1:在流通、弱分配和强结合条件下的混合物去除

[0274]

	Na ₂ SO ₄ 浓度	分配系数 Kp	操作 范围	结合的产物 (mg/mL)	产物回收率 (%)	蛋白 A 去除 (倍)	HCP 去除 (对数)
运行 1	0.10 M	<0.1	流通	0.6	94	0.9	0.3
运行 2	0.20 M	<0.1	流通	1.3	93	0.8	0.4
运行 3	0.40 M	0.9	弱分配	2.8	94	1.7	1.0
运行 4	0.45 M	2.0	弱分配	3.0	93	1.5	0.9
运行 5	0.50 M	4.3	弱分配	3.8	92	2.5	N/A
运行 6	0.55 M	9.9	弱分配	5.0	93	3.4	1.1
运行 7	0.80 M	>100	强结合	25	72	2.2	0.7
运行 8	0.90 M	>100	强结合	34	67	1.1	0.4

[0275] (分配系数 Kp 说明来自 50 微升树脂和 300 微升溶液的相体积比 6。)

[0276] 根据表 4.2.1 中呈现的数据明显的是,当我们从流通条件移动到弱分配条件时,对于杂质降低,HIC 步骤的性能显著地改善了,而产物回收率是相当的。在操作盐浓度中的进一步提高产生了相应于强结合条件的分配系数。根据表 4.2.1 中呈现的数据再一次清楚的是,当我们从弱分配移动到强结合条件时,对于杂质降低以及产物回收率,HIC 步骤性能都恶化了。因而这种分离的最佳的操作范围相应于弱分配层析的。在弱分配条件下,HIC 步骤提供了 HCP 的 1 个对数的降低和蛋白 A 的 3.4 倍的降低。在这个实施例中,在弱分配条件下的结合的产物水平在 2.8-5mg/ml 树脂之间。

[0277] 实验 4,2.2- 使用 Q-Sepharose 峰库作为负载的柱运行

[0278] 在这些实验集里使用 Q Sepharose FF 峰库来突出以下事实,在最佳的弱分配层析条件下的 HIC 步骤的性能可以用更清洁的进料来进一步改善。在这种情况下的负载材料含有 2880ppm 的 HCP,通过在 Q-Sepharose FF 柱上纯化蛋白 A 峰库来产生。进行两个实验来比较对于混合物去除的柱性能,一个在弱分配条件下,另一个在典型的流通条件下。Q-Sepharose 峰在 550mM Na₂SO₄中稀释到 3.27mg/ml,并负载到柱上到 100mg/ml 树脂的负载挑战用于在弱分配条件下操作。随后用含有与负载相同盐浓度的 10CV 的缓冲液洗涤柱,用 6CV 的 50mM Tris 缓冲液、pH 7.5 来脱除。在流通条件下进行第二实验。将负载在 200Na₂SO₄中调节到 3.03mg/ml,并负载到柱上到 90mg/ml 树脂的负载挑战。然后用含有与负载相同盐浓度的 6CV 的缓冲液洗涤柱,随后用 6CV 的 50mM Tris 缓冲液、pH 7.5 来脱除。在两个运行中,收集流通和洗涤级分用于回收率和混合物分析。这些运行的结果在表 4.2.2

中报告。

[0279] 表 4.2.2 :HIC 弱分配结果与流通结果的比较

[0280]

运行	Na ₂ SO ₄ 浓度	分配系数 (K _p)	操作模式	负载挑战 (mg/mL)	结合的产物 (mg/ml)	产物回收率	HCP LRV
1	0.55M	9.9	弱分配	100	3.0	94%	>2
2	0.20M	<0.1	流通	90	0.1	99%	<0.5

[0281] 在弱分配条件下的产物回收率数值与流通操作是相当的,也独立于这些实验中使用的进料。与流通操作相比,该步骤对于 HCP 去除的性能在弱分配条件下显著更高。

[0282] 两种进料的 HIC 步骤的 HCP LRV 在流通条件下是相当的(约 0.4-0.5LRV)。然而,在弱分配条件下进行的实验的 HCP LRV 值从使用蛋白 A 负载材料的 1LRV 提高到使用通过蛋白 A 和 Q Sepharose PF 柱纯化的负载材料的大于 2LRV。

[0283] 总结

[0284] 层析的另一种模式(HIC)显示了在弱分配模式中成功地运作。对于产物回收率和 HCP/蛋白 A 去除,显示了在弱分配条件下的 HIC 步骤的性能优于流通条件以及更紧密的结合条件下的操作。100mg/ml 树脂的高负载挑战容量在弱分配条件成功地进行,其中 >3mg/mL 的产物结合到树脂(即使负载浓度是 3.27mg/mL)。相应于最佳弱分配条件的分配系数似乎稍微高于阴离子交换层析的分配系数。

[0285] 系列 5-使用陶瓷的 I 型羟基磷灰石的羟基磷灰石和 Mab-MYA

[0286] 实施例 5.1- 高处理量筛选来确定 WP 和 FT 条件

[0287] 进行高处理量筛选(HTS)来鉴定使用陶瓷羟基磷灰石介质对于 Mab-MYA 的弱分配和流通条件。这个筛选改变氯化钠和磷酸钠的浓度来确定它们对 MAB-MYA 与羟基磷灰石介质的结合程度的影响。

[0288] 将 50 μL 陶瓷羟基磷灰石介质添加到 96 孔滤板的 30 个孔中。在由含 100mM 精氨酸、pH 7.2 的 100mM HEPES 缓冲液中适合的氯化钠和磷酸钠浓度组成的溶液中平衡每个孔。溶液中两种盐的浓度在表 5.1.1 和 5.1.2 中示出。每种条件进行两次。这些孔的每一个中的 MAB-MYA 负载挑战是 5.0mg/mL 树脂。

[0289] 表 5.1.1 :每个孔中的氯化钠水平 (mM)

[0290]

	1	2	3	4
A	50	200	50	200
B	750	50	750	50
C	50	380	50	380
D	500	760	500	760
E	50	1140	50	1140
F	200	200	200	200
G	350	200	350	200
H	700		700	

[0291] 表 5.1.2 :每个孔中的磷酸钠水平 (mM)

[0292]

	1	2	3	4
A	5	20	5	20
B	5	30	5	30
C	8	30	8	30
D	8	30	8	30
E	10	30	10	30
F	10	50	10	50
G	10	100	10	100
H	10		10	

[0293] 在 HTS 实验的第一个阶段,以 6 : 1 的相体积比 (300 μ L 溶液 : 50 μ L 树脂) 在表 5.1.1 和 5.1.2 中描述的氯化钠和磷酸钠条件下平衡每个孔。将平板摇动 20 分钟,容许达到平衡。然后通过离心所述滤板来除去溶液。这个平衡循环重复三次。

[0294] 在第二阶段,每个孔中的树脂在合适的氯化钠和磷酸钠浓度下以 6 : 1 的体积比 (300 μ L 溶液 : 50 μ L 树脂) 用浓缩的 MAb-MYA 溶液挑战到适合的蛋白质负载挑战。使用 50mM NaCl、100mM HEPES、100mM 精氨酸、pH 7.2 中的 7.0mg/mL MAB-MYA 溶液作为贮备溶液。负载的板摇动 20 分钟,容许树脂和溶液平衡。通过离心从滤板除去上清液,并收集到收集板中。每个孔中的上清液中的蛋白质浓度通过 A280nm 处的吸光度来测定。

[0295] 在第三阶段,通过添加在表 5.1.1 和 5.1.2 中列出的指定的氯化钠和磷酸钠条件的溶液来洗涤树脂。在摇动 20 分钟后除去上清液。

[0296] 在第四阶段,添加由 100mM 磷酸钠、1M NaCl 组成 pH7.2 的缓冲液来除去与树脂结合的残留蛋白质。

[0297] 使用从阶段 4 洗脱的质量以及阶段 2 的产物浓度,为每个孔计算分配系数,在表 5.1.3 中示出。

[0298] 表 5.1.3 :MAB-MYO 的 96 孔 HTS 筛选的分配系数 (Kp)

[0299]

	1	2	3	4
A	49.3	2.3	50.5	2.4
B	3.5	6.0	4.1	6.0
C	31.6	0.4	34.7	0.3
D	2.9	0.1	3.3	0.1
E	28.1	0.0	28.3	0.0
F	7.2	0.5	7.7	0.4
G	3.5	0.0	3.1	0.0
H	1.1		1.1	

[0300] 如表 5.1.3 中所示,Kp 值可以用于描述 MAB-MYA 以不同强度与羟基磷灰石介质结合的区域。MAB-MYA 与陶瓷羟基磷灰石介质结合的程度可以通过改变进入流通 ($K \leq 0.1$)、弱分配 ($0.1 < K < 20$) 和结合区 ($K \geq 20$) 的氯化物和磷酸盐浓度的条件来操纵。

[0301] 实验 5.2- 在 WP 条件下的柱运行

[0302] 具体地进行在此讨论的实验来强调弱分配条件下 cHA 步骤的优越性能。因而在相应于由 HTS 筛选 (实验 5.1) 鉴定的一系列分配系数的条件下进行实验。进行十二个运行,产物负载挑战为 100mg/ml 树脂。

[0303] Mabselect 蛋白 A 层析

[0304] 使用 MabSelect 柱纯化含有单克隆抗体的培养物。用 5 倍柱体积的 50mM Tris/150mM NaCl,pH 7.5 以 300cm/hr 的流速平衡 Mabselect 蛋白 A 柱。然后以大约 40mg

产物 /ml 树脂的负载来负载该柱。之后是 1M 精氨酸、50mM Tris, pH 7.5 中的 10CV 洗液, 以及含有 10mM Tris、75mM NaCl pH 7.5 的洗液的 5CV 洗液。然后使用 100mM 精氨酸、50mM NaCl, pH 3.0 来洗脱柱。使用 2M HEPES pH 8.0 将产物库中和到 pH 7.2。

[0305] 陶瓷羟基磷灰石层析

[0306] 来自蛋白 A 步骤的部分纯化的抗体库进一步在羟基磷灰石上纯化。柱直径是 0.5cm, 柱高度是 10cm。

[0307] 对于在实验 5 系列中描述的所有羟基磷灰石层析步骤, 使用以下条件 (除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0308] 操作流速 -150-240cm/hr

[0309] 平衡液 1300mM 磷酸钠、1.0M NaCl、pH 6.8 (3 倍柱体积)

[0310] 平衡液 25-30mM 磷酸钠、50-760mM NaCl、100mM Arg、100mM HEPES pH 7.2 (5 倍柱体积)

[0311] 洗涤 5-30mM 磷酸钠 50-760mM NaCl、100mM Arg、100mM HEPES pH 7.2 (5-10 倍柱体积)

[0312] 使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 和随后另一个平衡液 2 步骤来平衡柱。然后用来自上述步骤的蛋白 A 峰 (调节到合适的平衡液 2 缓冲液) 将柱负载到 100mg 产物 /mL 树脂, 从负载循环期间的柱流出物以及一定柱体积的洗涤级分中回收产物。这些实验的结果在表 5.2.1 和附图 11 中示出。

[0313] 这些负载条件处于流通、弱分配 (WP) 和结合区域中。实施例 5.1 中描述的高处理量筛选估计了在这些氯化物和磷酸盐浓度条件下分配系数 (K_p) 和结合的产物 (mg/mL 树脂) 的值。结合的产物根据柱运行的产物穿透体积来测定。这些实验的 HCP 和蛋白 A 结果在表 5.2.1 和附图 11 中示出。

[0314] 表 5.2.1: 在流通、弱分配和结合条件下的 HCP 和蛋白 A 去除

[0315]

	分配系数 K_p	操作模式	Phos	NaCl	结合的 产物 (mg/mL)	产物 回收率 (%)	蛋白质 A 去除 (倍)	宿主细胞蛋白 (LRV)
运行1	0.0	流通	30	760	0	93	0	0.58
运行2	0.9	弱分配	30	200	3.0	96	NA	0.57
运行3	1.1	弱分配	10	700	3.2	94	1.7	0.9
运行4	1.7	弱分配	20	200	3.1	94	NA	0.83
运行5	3.0	弱分配	8	500	3.0	100	1.9	1.3
运行6	3.2	弱分配	10	350	3.6	94	2.1	1.5
运行7	3.7	弱分配	5	750	3.3	99	2.4	1.2
运行8	5.8	弱分配	30	50	10.7	95	2.1	1.2
运行9	7.3	弱分配	10	200	10.2	94	2.4	1.2
运行10	27.8	强结合	10	50	16.3	91	2.1	1.2
运行11	32.7	强结合	8	50	21.6	86	2.4	1.4
运行12	49.2	强结合	5	50	24.6	79	2.1	1.6

[0316] 根据表 5.2.1 和附图 11 中呈现的数据明显的是, 当我们从流通条件移动到弱分配条件时, 对于杂质降低, cHA 步骤的性能显著地改善了, 而产物回收率是相当的。在相应于分配系数进一步提高的条件下的操作 (即, 在结合区域操作) 对于杂质去除没有提供额外的益处。然而, 在强结合条件下在该步骤上产物回收率开始降低。因而这种分离的最佳的

操作范围相应于弱分配层析的操作范围。在这些条件下,在 100mg 产物 /ml 树脂的负载挑战下获得了 >2 对数的蛋白 A 降低和 >1.2 对数的宿主细胞蛋白质降低。在这个实施例中,在弱分配条件下的结合的产物水平在 3.0-10.2mg/ml 树脂之间。

[0317] 总结

[0318] 层析的第三种模式(羟基磷灰石)显示了在弱分配模式中成功地运作。蛋白 A 和 HCP 比产物抗体更紧密地结合陶瓷的树脂,在 WP 条件下强烈地保留。在 WP 区域中更高的 K_p 值有时在 10 和 20 之间,其仍然提供了良好的产物回收率(>90%)。更低的 K_p 水平得到了相应更高的回收率。

[0319] 在这个实施例中,显示的是,柱步骤的性能可以主要通过选择用于运行柱的分配系数来优化。羟基磷灰石中的分配系数是 pH 值、盐(类型和浓度)、磷酸盐和缓冲液成分的复杂的函数。一般地所有这些变量对于柱步骤的性能有影响。在此呈现的方法提供了改变任一种这些变量对柱性能的影响的关联的简单方法。与以前所做的相比,在这个实施例中呈现的统一的“分配系数”方法打开了在这种层析模式中以更广的操作空间来操作的可能性。最佳性能的弱分配条件可以使用如上所述的 HTS 方法容易地鉴定。

[0320] 系列 6-使用陶瓷的 I 型羟基磷灰石的羟基磷灰石和 Mab-A5T

[0321] 实施例 6.1- 高处理量筛选来确定 WP 和 FT 条件

[0322] 进行高处理量筛选(HTS)来鉴定使用陶瓷羟基磷灰石介质对于 Mab-A5T 的弱分配和流通条件。这个筛选改变 pH 值、氯化钠和磷酸钠的浓度来确定它们对 MAB-A5T 与羟基磷灰石介质的结合程度的影响。

[0323] 将 50 μL 陶瓷羟基磷灰石介质添加到 96 孔滤板的 30 个孔中。在由含 50mM 精氨酸、pH 7.0 或 pH 8.0 的 50mM HEPES 缓冲液中适合的氯化钠和磷酸钠浓度组成的溶液中平衡每个孔。溶液中两种盐的浓度在表 6.1.1 和 6.1.2 中示出。1-3 栏中所示的条件在 pH 7.0 下进行,4-6 栏在 pH 8.0 下进行。这些孔的每一个中的 MAB-A5T 负载挑战是 5.0mg/mL 树脂。

[0324] 表 6.1.1 :每个孔中的氯化钠水平 (mM)

[0325]

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	50	400	400	50	400	400
B	50	50	400	50	50	400
C	50	50		50	50	
D	100	50		100	50	
E	100	100		100	100	
F	100	100		100	100	
G	400	100		400	100	
H	400	400		400	400	

[0326] 表 6.1.2 :每个孔中的磷酸钠水平 (mM)

[0327]

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	2	32	8	2	32	8
B	8	2	32	8	2	32
C	32	8		32	8	
D	2	32		2	32	
E	8	2		8	2	
F	32	8		32	8	
G	2	32		2	32	
H	8	2		8	2	

[0328] 在 HTS 实验的第一个阶段,以 6:1 的相体积比 (300 μ L 溶液 :50 μ L 树脂) 在表 6.1.1 和 6.1.2 中描述的氯化钠、磷酸钠和 pH 值条件下平衡每个孔。将平板摇动 20 分钟,容许达到平衡。然后通过离心所述滤板来除去溶液。这个平衡循环重复三次。

[0329] 在第二阶段,每个孔中的树脂在合适的 pH 值和氯化钠和磷酸钠浓度下以 6:1 的体积比 (300 μ L 溶液 :50 μ L 树脂) 用浓缩的 MAb-A5T 溶液挑战到适合的蛋白质负载挑战。1mM HEPES、100mM NaCl、pH 7.0 中的 6.9mg/ml Mab-A5T 溶液用作贮备溶液。负载的板摇动 20 分钟,容许树脂和溶液平衡。通过离心从滤板除去上清液,并收集到收集板中。每个孔中的上清液中的蛋白质浓度通过 A280nm 处的吸光度来测定。

[0330] 在第三阶段,通过添加在表 6.1.1 和 6.1.2 中列出的指定的氯化钠、磷酸钠和 pH 值条件的溶液来洗涤树脂。在摇动 20 分钟后除去上清液。

[0331] 在第四阶段,添加包含 100mM 磷酸钠、1M NaCl 的 pH7.2 的缓冲液来除去与树脂结合的残留蛋白质。使用从阶段 4 洗脱的质量以及阶段 2 的产物浓度,为每个孔计算分配系数,在表 6.1.3 中示出。

[0332] 表 6.1.3 :MAB-A5T 的 HTS 筛选的分配系数 (Kp)

[0333]

	1	2	3	4	5	6
	pH 7.0			pH 8.0		
A	142.7	0.1	1.6	50.2	0.0	0.3
B	90.6	144.3	0.1	9.9	44.7	0.0
C	12.1	84.5		1.0	13.7	
D	90.5	10.4		22.2	1.1	
E	27.5	94.1		4.3	21.9	
F	2.5	28.0		0.3	4.3	
G	15.1	2.1		2.2	0.4	
H	1.2	15.1		0.4	2.0	

[0334] 如表 6.1.3 中所示,Kp 值可以用于鉴定 MAB-A5T 以不同强度与羟基磷灰石介质结合的区域。MAB-A5T 与陶瓷羟基磷灰石介质结合的强度可以通过改变进入到流通、弱分配和结合区的 NaCl、磷酸盐和 pH 值的条件来操纵。

[0335] 实验 6.2- 在 WP 条件下的柱运行

[0336] 进行实验来强调弱分配条件下 cHA 步骤的优越性能。因而在相应于由 HTS 筛选 (实验 6.1) 鉴定的一系列分配系数的条件下进行实验。进行八个运行,产物负载挑战 110mg/ml 树脂。

[0337] Mabselect 蛋白 A 层析

[0338] 使用 MabSelect 柱纯化含有单克隆抗体的培养物。用 5 倍柱体积的 50mM

Tris/150mM NaCl, pH 7.5 以 300cm/hr 的流速平衡 Mabselect 蛋白 A 柱。然后以大约 40mg 产物 /ml 树脂的负载挑战负载柱。之后是 1M NaCl、50mM Tris, pH 7.5 中的 5CV 洗涤, 以及含有 10mM Tris、75mM NaCl pH 7.5 的洗液的 5CV 洗涤。然后使用 100mM 精氨酸、50mM NaCl, pH 3.0 来洗脱柱。使用 2M HEPES pH 8.0 将产物库中和到 pH 7.2。

[0339] 陶瓷羟基磷灰石层析

[0340] 来自蛋白 A 步骤的部分纯化的抗体库进一步在羟基磷灰石上纯化。柱直径是 0.5cm, 柱高度是 10cm。

[0341] 对于在实验 6 系列中描述的所有羟基磷灰石层析步骤, 使用以下条件 (除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0342] 操作流速 -150-240cm/hr

[0343] 平衡液 1300mM 磷酸钠、1.0M NaCl、pH 6.8 (3 倍柱体积)

[0344] 平衡液 22-32mM 磷酸钠、50-400mM NaCl、5mM 咪唑、50mM 甘氨酸、10mM HEPES、pH 7.0 (5 倍柱体积)

[0345] 洗液与平衡液 2 相同

[0346] 使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 和随后另一个平衡液 2 步骤来平衡柱。然后用来自上述步骤的蛋白 A 峰 (调节到合适的平衡液 2 缓冲液) 将柱负载到 110mg 产物 /mL 树脂, 从负载循环期间的柱流出物以及一定柱体积的洗涤级分中回收产物。这些实验的结果在表 6.2.1 和附图 12 中示出。

[0347] 表 6.2.1: 在 cHA 树脂上 MAB-A5T 的分配系数和相应的操作范围

[0348]

	分配系数 Kp	结合的产物 mg/ml	操作模式	Phos mM	NaCl mM	pH
运行1	0.1	0	流通	32	400	7.0
运行2	0.7	1.6	弱分配	32	170	7.0
运行3	1.4	2.2	弱分配	32	120	7.0
运行4	2.1	1.6	弱分配	2	400	7.0
运行5	13.7	7.0	弱分配	8	50	8.0
运行6	22	6.7	弱分配	2	100	8.0
运行7	54	12.8	强结合	2	60	8.0
运行8	>100	16	强结合	2	50	7.0

[0349] 这些实验中操作条件相应于流通、弱分配 (WP) 区域和结合区域。试验 6.1 中描述的 HTS 实验估计了在这些 pH 值、氯化物和磷酸盐浓度条件下分配系数 (Kp) 的值。表 6.2.1 中的运行通过分配系数来分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的逐渐脱附, 测定结合的产物的这种方法一般低估了在负载期间结合的产物量。这些实验产生的 HCP 和产物相关的 HMW 去除以及产物回收率在附图 12 中示出。

[0350] 根据附图 12 中呈现的数据明显的是, 当我们从流通条件移动到弱分配条件时, 对于 HCP 和 HMW 降低, cHA 步骤的性能显著地改善了, 而产物回收率维持在 >80%。在相应于分配系数进一步提高的条件下的操作 (即, 在结合区域操作) 对于杂质去除没有提供额外的益处。然而, 在强结合条件下在该步骤上产物回收率开始降低。因而这种分离的最佳的操作范围相应于弱分配层析的范围。在这些条件下, 在 110mg 产物 /ml 树脂的负载挑战下获得了产物相关的 HMW 物质的 4 倍降低和 HCP 的 >1.4 的对数降低。在这个实施例中, 在弱

分配条件下的结合的产物水平在 1.6–6.7mg/ml 树脂之间。

[0351] 总结

[0352] 在弱分配层析下操作的羟基磷灰石中呈现的第二实施例显示了,提供了对于 HCP 和 HMW 降低以及产物回收率 (>80%) 的改善的性能。在早先的实施例中,步骤的性能可以通过选择用于运行柱的分配系数来优化。在此呈现的方法提供了将改变几种变量 (pH 值、盐、磷酸盐、咪唑、甘氨酸、HEPES, 等等) 中的任一种对柱性能的影响相关联的简单方法。最佳性能的弱分配条件可以使用在这个实施例中描述的 HTS 方法鉴定。与以前所做的相比,在此呈现的方法打开了在这种层析模式中以更广的操作空间来操作的可能性。这个实施例中最佳的 WP 区域相应于 2 和 20 之间的分配系数。

[0353] 系列 7-使用 I 型陶瓷羟基磷灰石的羟基磷灰石和 Mab-MYO

[0354] 实施例 7.1- 高处理量筛选来确定 FT、WP 和强结合条件

[0355] 进行高处理量筛选 (HTS) 来鉴定使用陶瓷羟基磷灰石介质对于 Mab-MYO 的流通、弱分配和结合条件。这个筛选改变 pH、精氨酸 / 甘氨酸、HEPES、磷酸钠和氯化钠的浓度来确定它们对 MAB-MYO 与羟基磷灰石介质的结合程度的影响。

[0356] 这个实施例中使用的 HTS 步骤与在系列 5 和系列 6 中描述的那些类似,在此不再讨论。来自与 HTS 数据拟合的响应曲面的预测的 K_p 值被用于挑选柱实验的具体条件。

[0357] 实验 7.2- 在 WP 条件下的柱运行

[0358] 在相应于由 HTS 试验鉴定的一系列分配系数的条件下进行在此讨论的实验。具体地进行这些实验来突出在弱分配条件下 cHA 步骤对于 HCP 和产物相关的 HMW 种类的去掉的优越性能。使用 55mg/ml 树脂的产物负载挑战来进行四个运行。这些实验中使用的负载挑战对于弱分配层析是低的,但对于流通操作是典型的。在这些实验中不进行尝试来优化弱分配层析的负载挑战。

[0359] 来自蛋白 A 步骤的部分纯化的抗体库被用于这些实验中。柱直径是 0.5cm, 柱高度是 10cm。

[0360] 对于在实验 7 系列中描述的所有羟基磷灰石层析步骤,使用以下条件 (除了在单独的实验说明中注明的之外)。

[0361] 操作流速 -150–240cm/hr

[0362] 平衡液 1300mM 磷酸钠、1.0M NaCl、pH 6.8(2–5 倍柱体积)

[0363] 平衡液 21–8mM 磷酸钠、50–1750mM NaCl、12–50mM Arg、20–50mM HEPES pH 7.0(5 倍柱体积)

[0364] 洗涤与平衡液 2 相同

[0365] 使用 2–5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 和随后 5 倍柱体积的平衡液 2 来平衡柱。然后用蛋白 A 峰 (调节到合适的平衡液 2 缓冲液) 将柱负载到 55mg 产物 /mL 树脂,从负载循环期间的柱流出物以及一定柱体积的洗涤级分中回收产物。这些实验的结果在表 7.2.1 和附图 13 中示出。

[0366] 表 7.2.1 :在 cHA 树脂上 MAB-MYO 的分配系数和相应的操作模式

[0367]

	分配系数 K _p	操作模式	Arg mM	Hepes mM	Phos mM	NaCl mM	结合的产物 mg/ml
运行1	3.6	弱分配	50	20	8	300	5.1
运行2	4.2	弱分配	50	20	2	600	8.2
运行3	8.9*	弱分配	12	20	1	1750	9.5
运行4	>100	强结合	50	50	5	50	41.6

[0368] *最佳的 K_p 条件, 参见附图 13

[0369] 这些实验中的操作条件相应于流通、弱分配 (WP) 区域和结合区域。实施例 7.1 中描述的 HTS 实验估计了在这些 pH 值、氯化物, 磷酸盐、甘氨酸 / 精氨酸和 HEPES 浓度下分配系数 (K_p) 的值。表 7.2.1 中的运行通过分配系数来分级。通过使用 UV 吸光度测量柱列带中的蛋白质来测定结合的产物。由于在洗涤期间产物的逐渐脱附, 测定结合的产物的这种方法一般低估了在负载期间结合的产物量。这些实验产生的产物相关的高分子量 (HMW) 去除和产物回收率也在附图 13 中示出。

[0370] 根据附图 13 中呈现的数据明显的是, 当我们从流通条件移动到弱分配条件时, 对于 HMW 降低, cHA 步骤的性能显著地改善了, 而产物回收率 >80%。在相应于分配系数进一步提高的条件下的操作 (即, 在结合区域操作) 对于杂质去除没有提供额外的益处。然而, 在强结合条件下在该步骤上产物回收率开始降低。因而这种分离的最佳的操作范围相应于弱分配层析的范围。在这些条件下, 获得了 20 倍的产物相关的 HMW 种类的降低。在这个实施例中, 在弱分配条件下的结合的产物水平在 5.1-9.5mg/ml 树脂之间。

[0371] 总结

[0372] 在弱分配层析下操作的羟基磷灰石中呈现的第二实施例显示提供了关于 HMW 降低方面的改善性能, 具有良好的产物回收率 (>80%)。产物相关的 HMW 种类和 HMW 种类与产物抗体相比更紧密地结合陶瓷树脂, 在 WP 条件下强烈地保留。这个实施例中的 WP 区域相应于 8 和 20 之间的分配系数。

[0373] 在这个实施例中, 再一次显示的是, 柱步骤的性能可以主要通过选择用于运行柱的分配系数来优化。在此呈现的方法提供了改变几种 变量 (pH 值、盐、磷酸盐、精氨酸、HEPES, 等等) 中的任一种对柱性能产生的影响相关联的简单方法。最佳性能的弱分配条件可以使用在这个实施例中描述的 HTS 方法鉴定。与以前所做的相比, 在此呈现的方法打开了在这种层析模式中以更广的操作空间来操作的可能性。

[0374] 在此还值得注意的是, 弱分配层析的原理在不由电荷相互作用单独驱动的系统也能工作。在本申请中描述的一般方法可以成功地应用于复杂的系统, 例如 HIC 以及羟基磷灰石。例如, 除了操作 pH 值以外, 其他几种变量例如 NaCl、磷酸盐、精氨酸 / 甘氨酸、缓冲液种类以及树脂的类型都可以影响羟基磷灰石中的步骤性能。尽管如此, 人们可以通过进行使用单独的目标产物的简单分批结合实验来容易地鉴定 WP 窗口。

[0375] 系列 8-用于蛋白 A 洗脱的两性离子缓冲液和随后的离子交换步骤

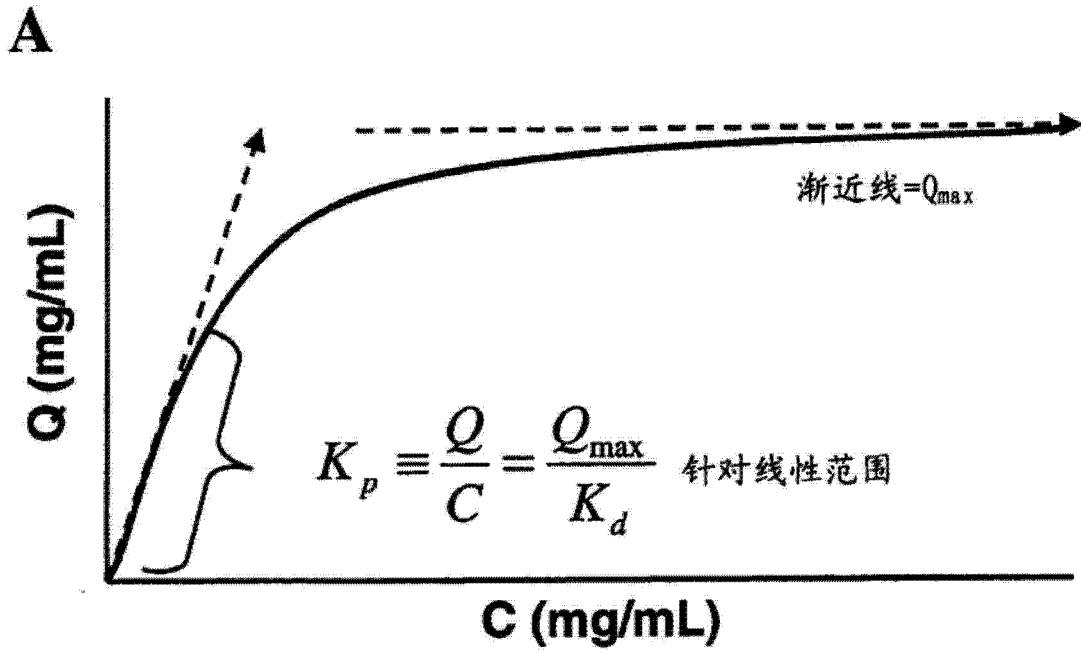
[0376] 使用 MabSelect 树脂纯化含有单克隆抗体的培养物。用 5 倍柱体积的 50mM Tris/150mM NaCl, pH 7.5 平衡 Mabselect 蛋白 A 柱。然后以大约 40mg 产物 /ml 树脂的负载负载柱。之后是 1M NaCl, 50mM Tris, pH 7.5 中的 5CV 洗涤, 以及含有 10mM Tris, 75mM NaCl pH 7.5 洗液的 5CV 洗涤。然后使用 30mM HEPES, pH 3.1 洗脱柱。产物库使用 1M HEPES pH 8.0 中和到 pH 7.2, 产生 55mM 的总 HEPES 浓度。在 pH 7.2, HEPES 对缓冲液贡献了 17mM

的离子强度。

[0377] 在此引用的所有参考文献在此为了所有目的通过将它们完全引用来合并在此,其程度与具体的或单独的指示为了所有目的通过将其完全引用来合并每个单独的出版物或专利或专利申请相同。通过引用合并在此的出版物和专利或专利申请与在说明书中含有的公开内容抵触时,本说明书意图是优于和 / 或高于任何这样的对立材料。

[0378] 在说明书和权利要求书中使用的所有表示成分数量、反应条件等的数字,都被理解为是在所有情况下用术语“约”所修饰的。因此,除非另有相反的陈述,在说明书和附随的权利要求中列出的数字参数是近似值,可以依据试图通过本发明获得的期望的性质而改变。至少,而不是作为将等效原则的应用限定到权利要求的范围的尝试,每个数字参数应被认为考虑了有效数字的数目和常规的舍入法。

[0379] 可以进行对本发明的许多修改和变化而不背离它的精神和范围,这对于本领域的技术人员是显而易见的。在此描述的具体实施方式仅通过举例来提供,无论如何不意味着是限制性的。意图是,说明书和实施例被认为仅是示范性的,本发明的真实范围和精神由以下的权利要求指明。



1B

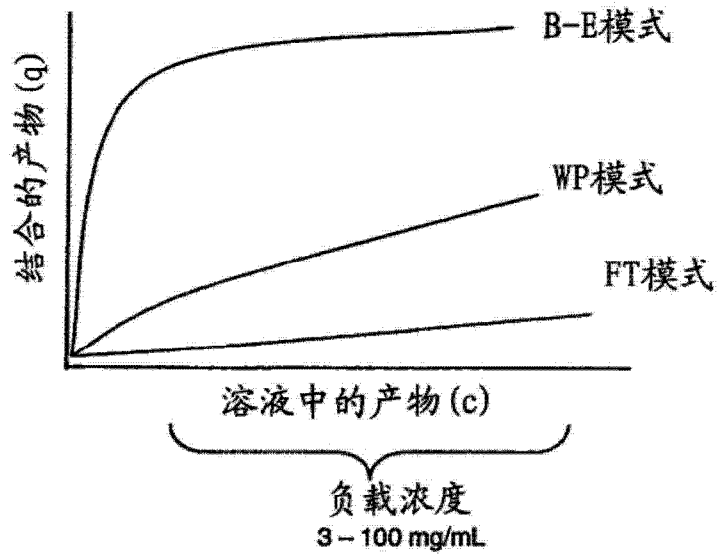
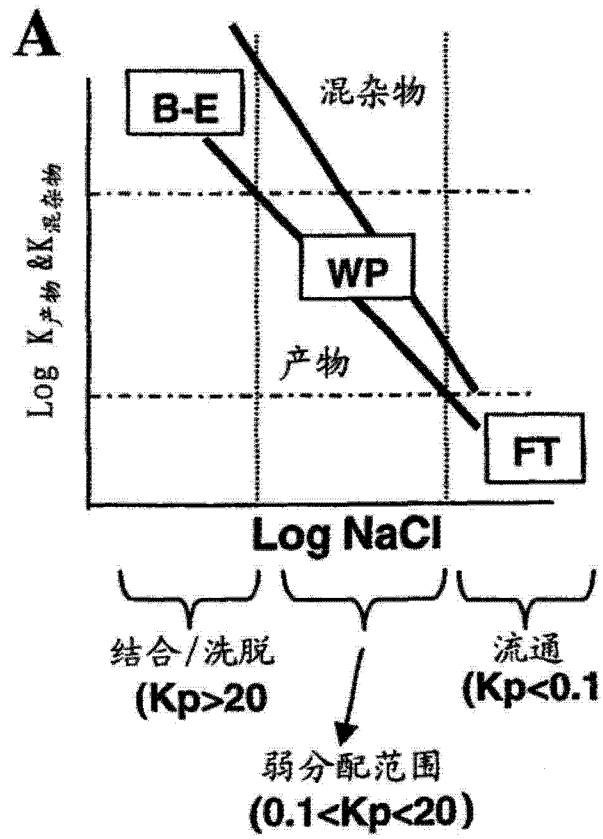


图 1



2B

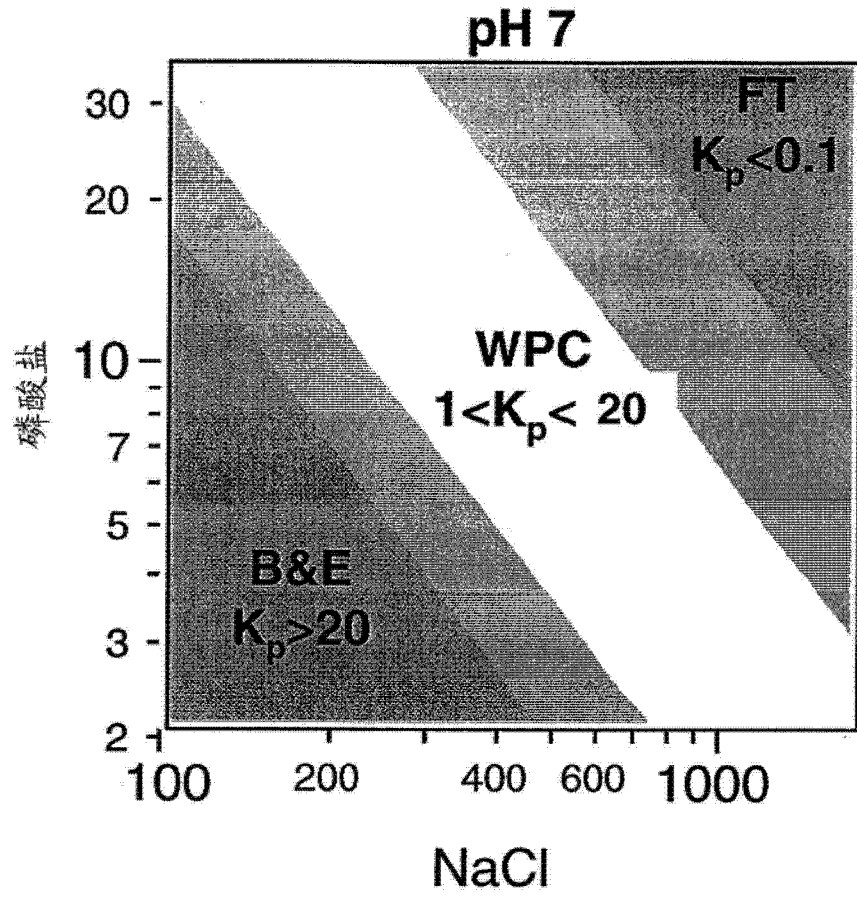


图 2

- 结合-洗脱 (B-E)
 - 高 $K_{Prod} > 20$
 - 容量限制: 树脂上的产物质量 (不是负载体积)
 - 在移动相中改变来洗脱产物

- 流通 (FT)
 - 非常低 $K_{Prod} < 0.1$
 - 容量限制: 混合物穿透和体积
 - 等度
 - 快速穿透、洗出的层析

- 弱分配 (WP)
 - 中间 $K_{Prod} 0.1 < K < 20$
 - 相对FT模式容量改善 (负载体积和质量)
 - 等度
 - 延迟的穿透、延滞的洗出

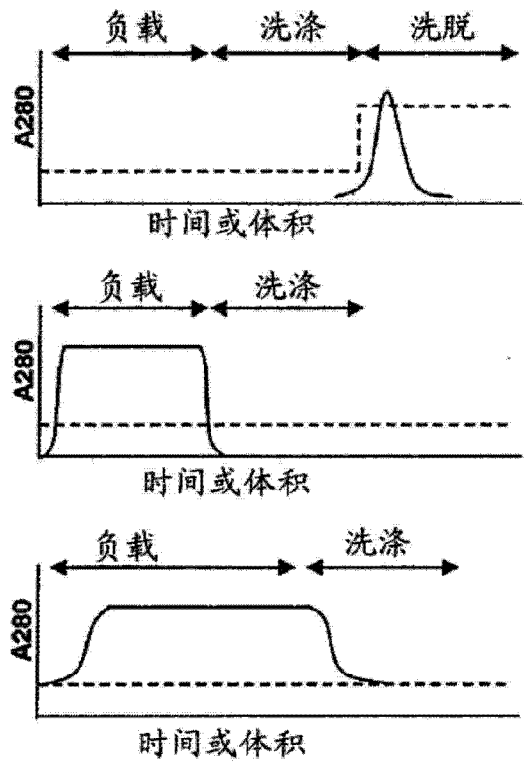


图 3

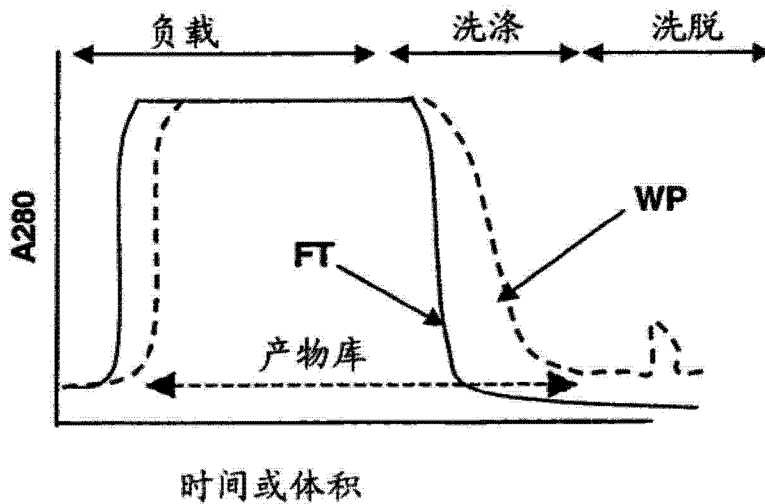


图 4

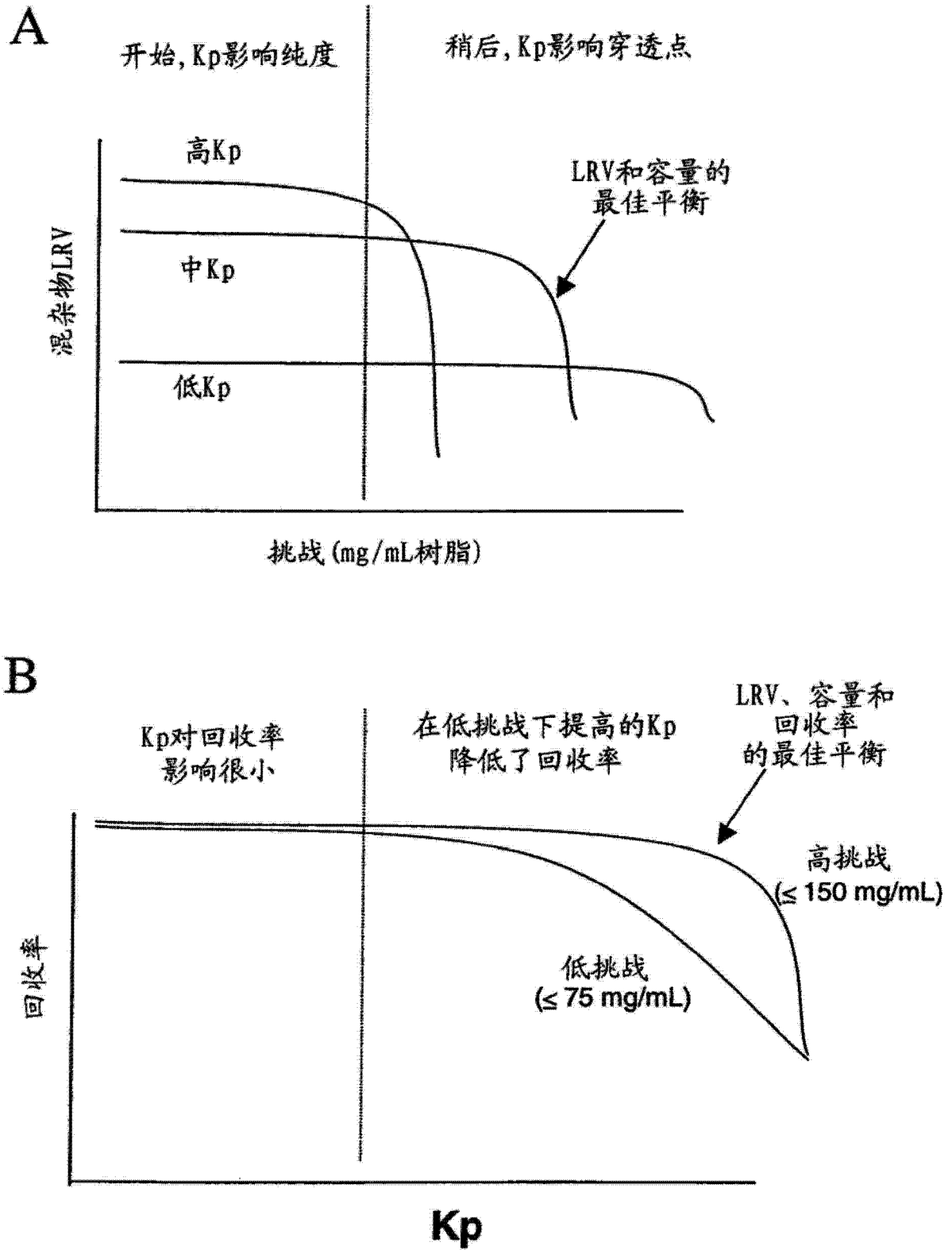


图 5

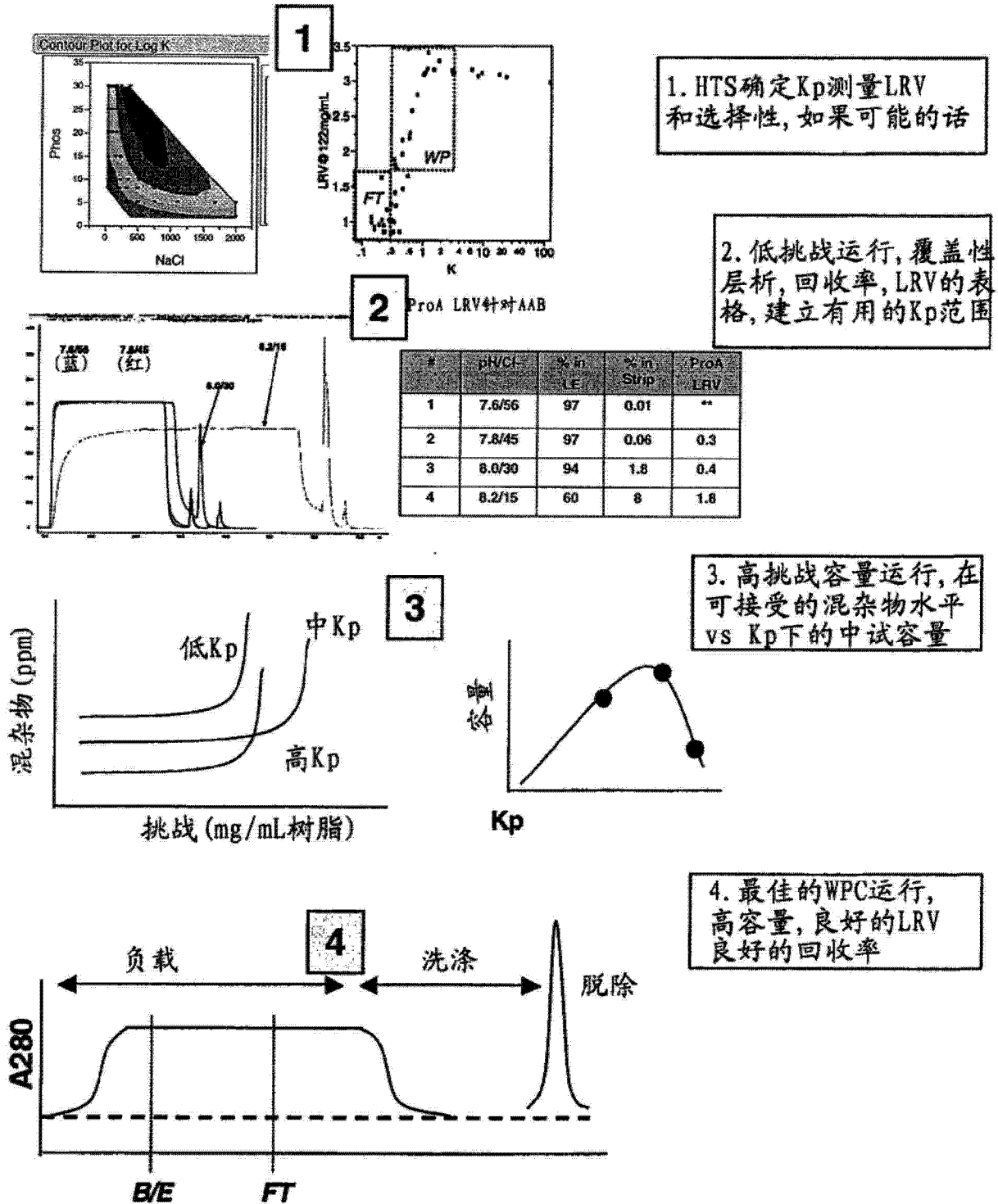


图 6

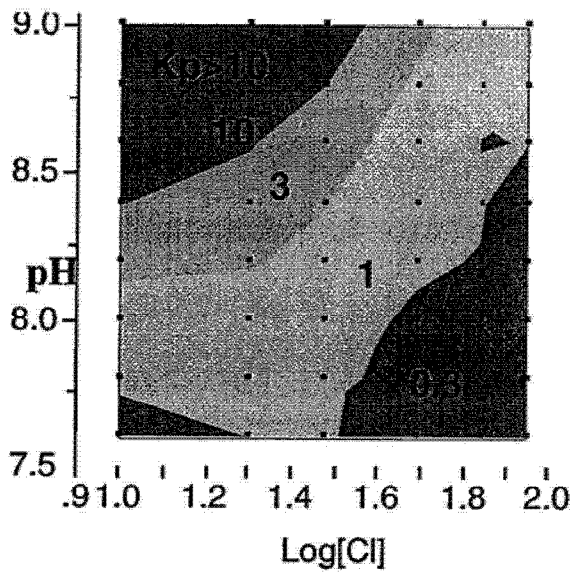


图 7

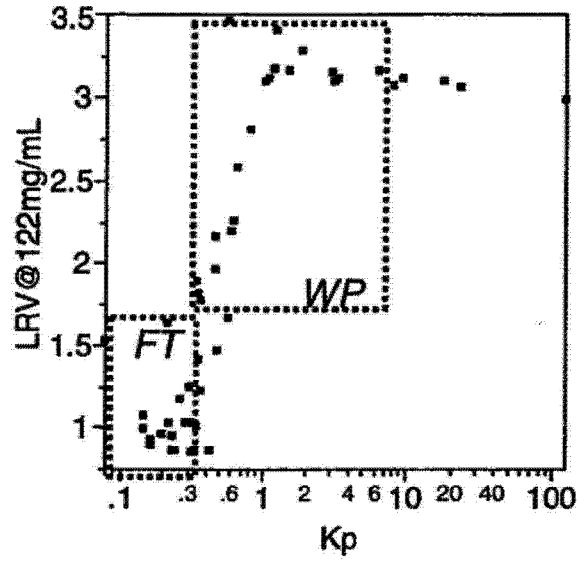


图 8

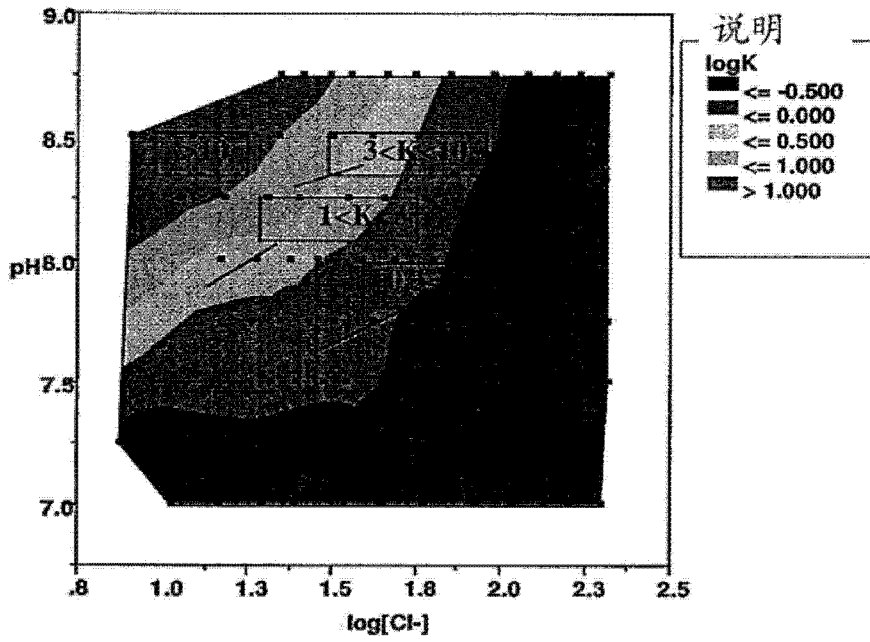


图 9

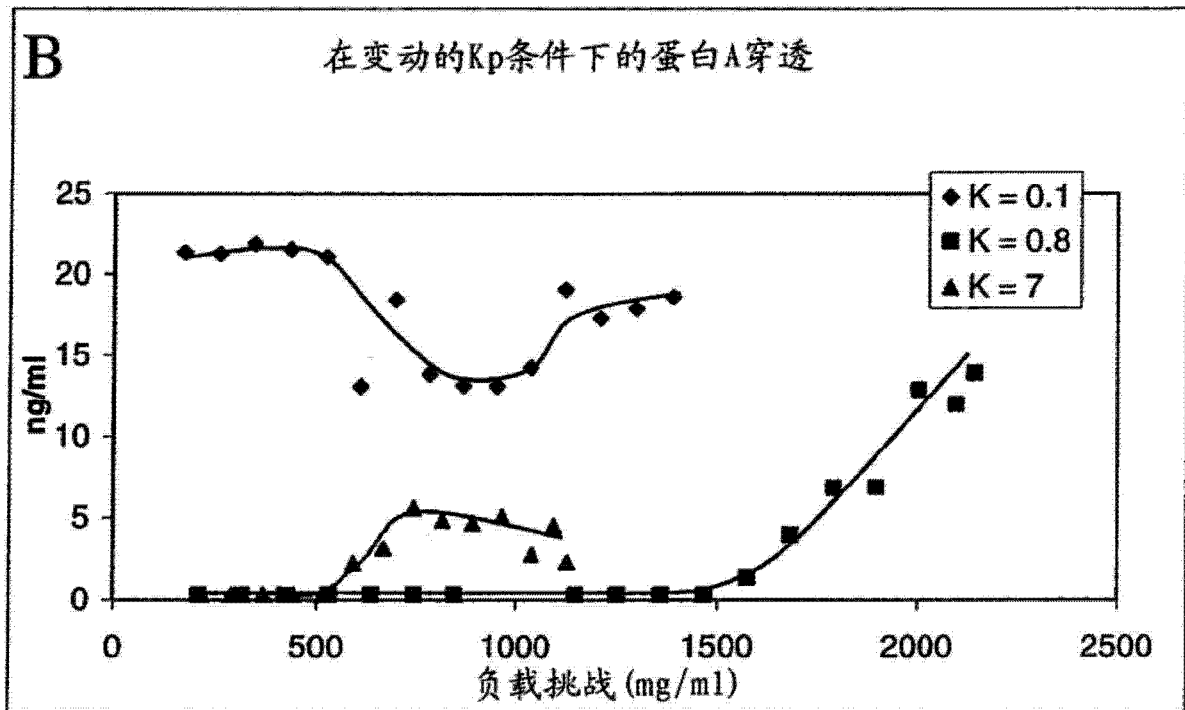
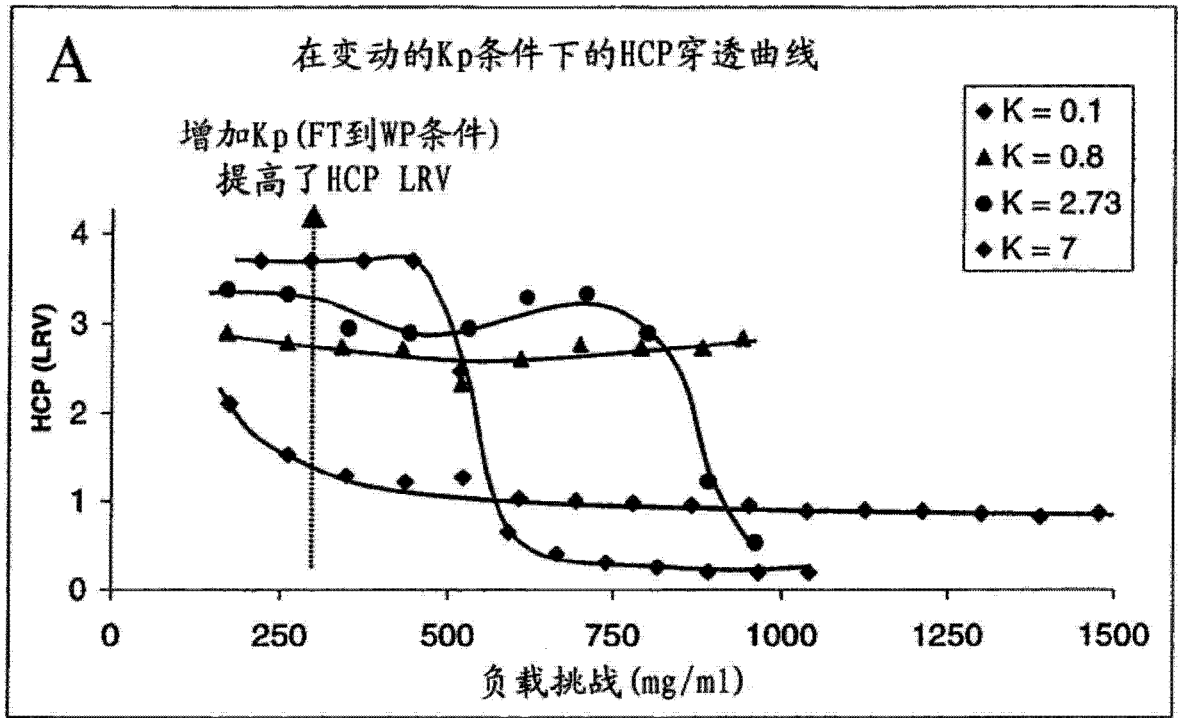


图 10

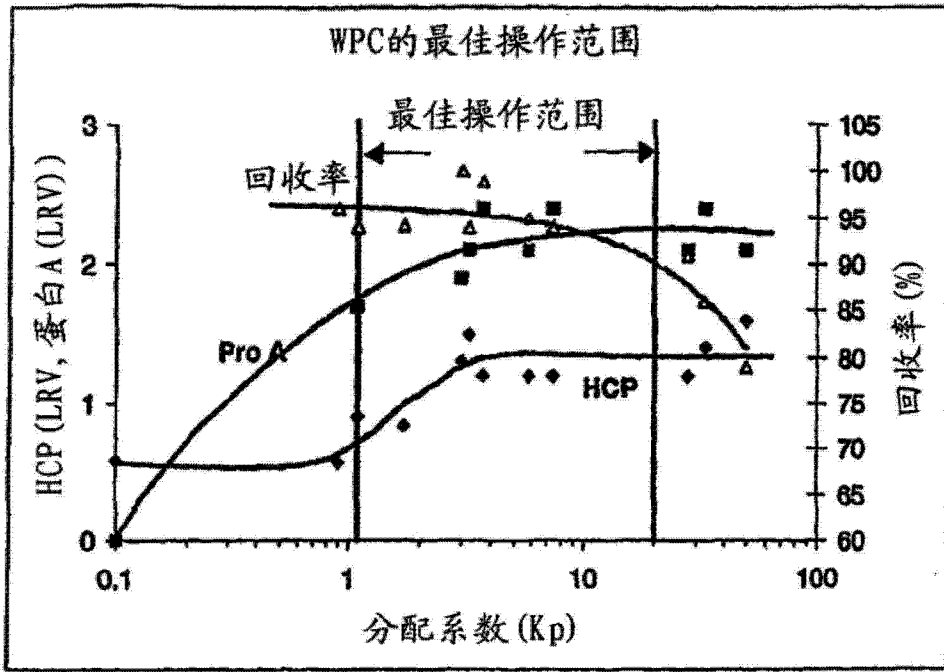


图 11

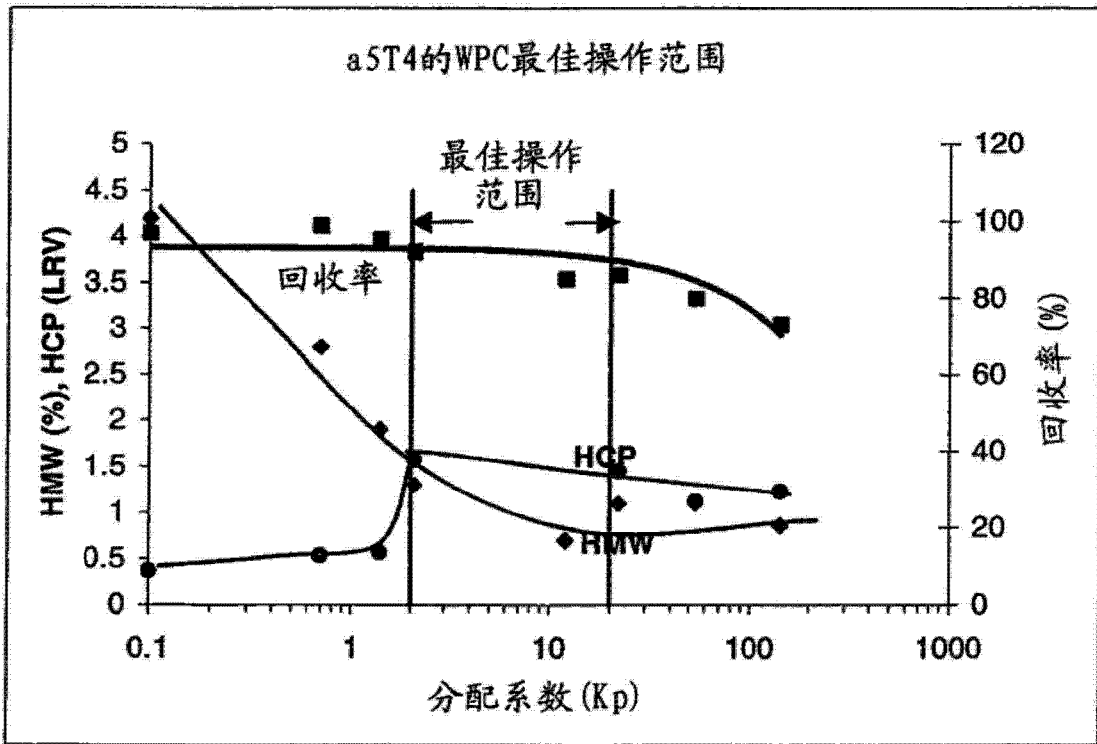


图 12

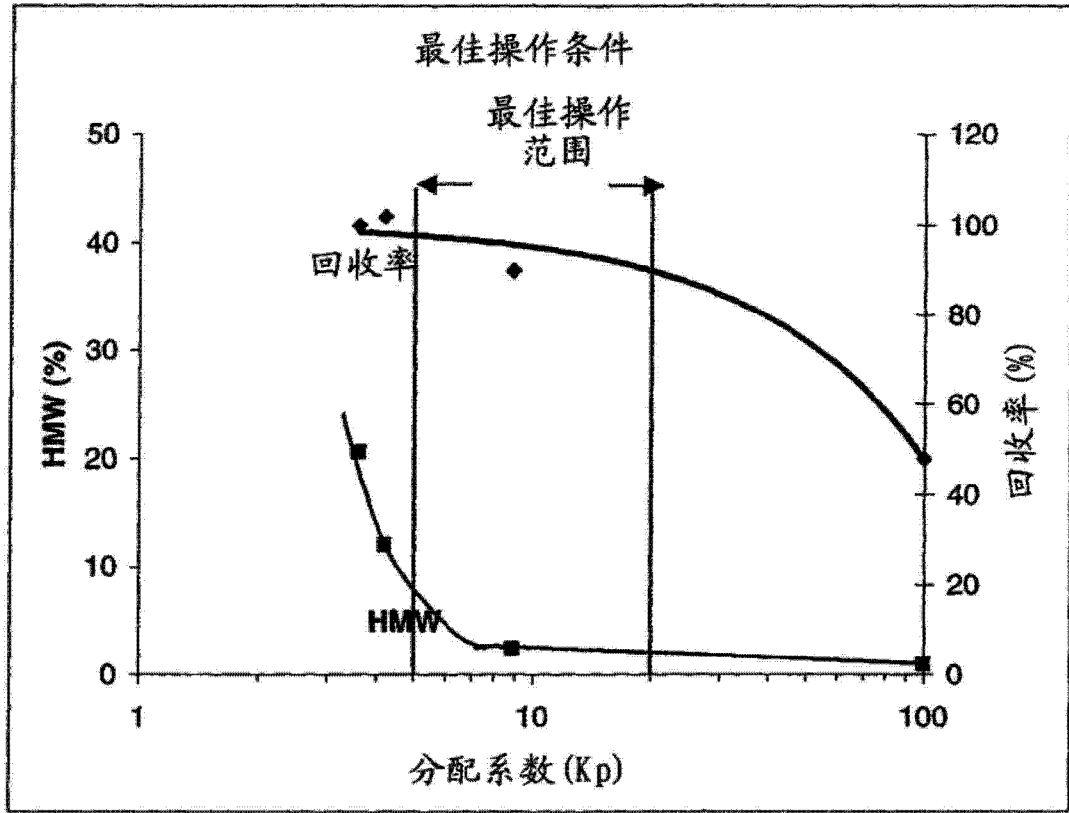


图 13

Abstract

This invention relates to a method of weak partitioning chromatography. In particular, this invention relates to methods of using weak partitioning chromatography for the purification of a product from a load fluid containing one or more impurities. Further, the invention relates to methods of weak partitioning chromatography defined by operating conditions which cause a medium to bind at least 1 mg of product per mL of medium, or alternatively, defined by a partition coefficient of at least 0.1.

