

公告本

101年2月(第)修正(第)正本

發明專利說明書

(本) P.1-39

中文說明書替換本(101年2月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：095112938

※ 申請日期：95.04.11

※IPC 分類：C07K 1/30

C12N 9/14

一、發明名稱：(中文/英文)

利用陽離子界面活性劑之蛋白質純化

PURIFICATION OF PROTEINS WITH CATIONIC SURFACTANT

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商沙凡特藥品公司

SAVIENT PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中文/英文)

達夫 肯納

KANNER, DOV

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國東邦史威克區第一塔中心

ONE TOWER CENTER, EAST BRUNSWICK, NEW JERSEY 08816

U. S. A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 米兒 費雪
FISCHER, MEIR
2. 伊利亞胡 哈洛棚
HAROSH, ELIYAHU

國 籍：(中文/英文)

1. 以色列 ISRAEL
2. 以色列 ISRAEL

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2005年04月11日；60/670,520

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種用於自包含目標蛋白質及污染蛋白質之混合物純化目標蛋白質之方法，該方法包含以下步驟：將該混合物暴露於有效量之陽離子界面活性劑，使得污染蛋白質優先沉澱；及回收目標蛋白質。亦提供根據本發明方法純化之蛋白質。

六、英文發明摘要：

The subject invention provides a method for purifying a target protein from a mixture comprising the target protein and contaminating protein, comprising the steps of exposing the mixture to an effective amount of a cationic surfactant such that the contaminating protein is preferentially precipitated and recovering the target protein. Proteins purified according to the method of the invention are also provided.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於利用界面活性劑純化蛋白質之領域。

【先前技術】

生物學巨分子(尤其蛋白質)之產生通常涉及基於物理特性及物理化學特性之提高純度之步驟。在該等方法步驟中所遇到之困難包括(但不限於)確定能夠分離可溶性與不溶性分子之條件、所要分子在處理步驟後的相對低回收、生物學活性在該方法中之損失及蛋白質對諸如pH值之方法步驟條件的敏感性。

在處理生物學巨分子之過程中已使用界面活性劑。陽離子界面活性劑為一公認亞類之界面活性劑且包括兩性銨化合物。兩性銨化合物包含具有通式 QN^+ 之四級銨化合物及具有通式 RNH_3^+ 之石蠟鏈一級銨化合物。兩種類型之兩性銨化合物皆包括具有較佳地至少六個碳原子之長脂鏈的長鏈銨界面活性劑(Scott (1960) Methods Biochem. Anal. 8:145-197, 其全文以引用的方式併入本文中)。已知長鏈四級銨界面活性劑與生物學巨分子相互作用。該等長鏈四級銨化合物在氮原子上具有由具有6-20個碳原子之直鏈烷基鏈組成之至少一取代基。此類化合物中最著名之代表為苯甲煙銨鹽(氯化物及溴化物)、氯化十六基吡啶吡啶、乙酸地喹銨(dequalinium acetate)、溴化十六基二甲基銨(CTAB)及氯化十六基吡啶吡啶(CPCI)及苜索氯銨。四級銨界面活性劑包括鹽, 諸如十六基吡啶吡啶鹽(例如氯化十六基吡啶吡啶(CPC))、硬脂醯胺甲基吡啶吡啶鹽、十二基吡啶吡啶鹽、

鹽胺甲基吡啶鹽、十二基吡啶鹽、十六基喹鎂(quinolynium)鹽、十二基胺基丙酸甲酯鹽、十二基胺基丙酸金屬鹽、十二基二甲基甜菜鹼、硬脂鹽基二甲基甜菜鹼、十二基二羥乙基甜菜鹼及苜蓿素鎂鹽。烷基吡啶鹽包含硬脂鹽基三甲基鎂鹽、氯化烷基二甲基苄基鎂及氯化二氯苄基二甲基烷基鎂。

已知陽離子界面活性劑用於純化生物學巨分子之用途包括：1)溶解聚集體，包括蛋白質聚集體；2)溶離與層析管柱結合之生物學巨分子；及3)沉澱聚陰離子，諸如玻璃醛酸(HA)、核酸及肝素(及與聚陰離子共沉澱之分子)。

陽離子界面活性劑已用於溶解蛋白質聚集體。Otta及Bertini((1975) *Acta Physiol. Latinoam.* 25:451-457，其全文以引用之方式併入本文中)證明可用四級鎂界面活性劑Hyamine 2389溶解來自齧齒動物肝臟過氧化體(peroxizome)之活性尿酸酶。已發現增加鎂界面活性劑之濃度導致增加尿酸酶(基於酶活性)及總蛋白質之溶解，以致不增加尿酸酶蛋白質關於總蛋白質之量的相對量。換言之，關於總蛋白質，並未選擇性溶解尿酸酶蛋白質且當以陽離子界面活性劑溶解時，該尿酸酶蛋白質在總蛋白質中不會構成較高百分比。因此，在此過程中，由於四級鎂界面活性劑溶解作用，尿酸酶純度相對於總蛋白質含量顯然不會增加。

在另一研究中，Truscoe((1967) *Enzymologia* 33:1 19-32，其全文以引用的方式併入本文中)檢測了陽離子、陰離子及

中性清潔劑面板對來自牛腎粉末之尿酸氧化酶(尿酸酶)的萃取功效。雖然發現中性及陰離子清潔劑增加可溶性尿酸氧化酶活性,但亦發現當陽離子清潔劑(例如四級銨鹽)之濃度增加時,其降低總酶活性。作者總結為陽離子清潔劑並不適用於純化牛腎尿酸氧化酶。

在美國專利第4,797,474號、美國專利第4,992,531號、美國專利第4,966,963號及美國專利第5,008,377號中描述以陽離子界面活性劑溶解來自大腸桿菌(*E. coli*)包涵體或細胞之重組蛋白質、豬生長激素、甲硫胺鹽基豬生長激素、傳染性囊病病毒蛋白質、B-半乳糖苷酶融合蛋白質,各案之全文以引用的方式併入本文中。使用包括氯化十六基三甲基銨、混合氯化正烷基二甲基苯甲基銨、CPC、氯化N,N-二甲基-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯氧基]乙氧基]乙基]苯甲烷銨、溴化十四基三甲基銨、溴化十二基三甲基銨、溴化十六基三甲基銨之四級銨化合物來完成鹼性條件下之溶解。該等申請案提及在各溶解過程之後,離心該等溶液且在各情形下觀察到極少顆粒物至沒有顆粒物。此觀察暗示大多數或所有蛋白質均溶解,與目標蛋白質之溶解選擇性無關。未顯示經回收蛋白質之純度。美國專利第5,929,231號(其全文以引用之方式併入本文中)描述含澱粉之顆粒及聚集體的氯化十六基吡啶(CPC)崩解。因此,此先前技術係關於用於常規、非特異性溶解顆粒狀生物學巨分子之陽離子界面活性劑之用途。該等先前技術方法並未揭示用陽離子界面活性劑來增加所要目標蛋白質關於總蛋白

質的純度。

亦已將陽離子界面活性劑用於溶離吸附於陽離子交換樹脂或含鋁佐劑之生物學巨分子(Antonopoulos等人，(1961) *Biochim. Biophys. Acta* 54:213-226; Embery (1976) *J. Biol. Buccale* 4:229-236; 及 Rinella等人，(1998) *J. Colloid Interface Sci.* 197:48-56，各案之全文以引用之方式併入本文中)。美國專利第4,169,764號(其全文以引用之方式併入本文中)描述使用各種陽離子界面活性劑溶液自羧甲基纖維素管柱溶離尿酸酶。此等作者聲明較佳使用四取代銨鹽，其中一烷基為具有高達20個碳原子之高碳烷基且其他基團為高達6個碳原子之低碳烷基。該等陽離子界面活性劑之用途能夠自黏附生物學巨分子之固體基質移除生物學巨分子。

相反地，將陽離子界面活性劑注入諸如由耐綸構成之過濾器的過濾器中能夠固定多醣或核酸(Maccari及 Volpi (2002) *Electrophoresis* 23:3270-3277; Benitz等人，(1990) 美國專利第4,945,086號；Macfarlane (1991) 美國專利第5,010,183號，各案之全文以引用的方式併入本文中)。該現象顯然係歸因於能夠沉澱聚陰離子之陽離子界面活性劑與聚陰離子的相互作用。

已良好確定在所界定條件下，包含通式 QN^+ 之四級銨化合物及具通式 RNH_3^+ 之石蠟鏈一級銨化合物的兩性銨化合物可沉澱聚陰離子(在以下文獻中作出綜述：Scott (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 18:428-429; Scott (1960) *Methods Biochem. Anal.* 8:145-197; Laurent等人，(1960) *Biochim.*

Biophys. Acta 42:476-485; Scott (1961) Biochem. J. 81:418-424; Pearce及Mathieson (1967) Can. J. Biochemistry 45:1565-1576; Lee (1973) Fukushima J. Med. Sci. 19:33-39; Balazs, (1979)美國專利第4,141,973號；Takemoto等人，(1982)美國專利第4,312,979；Rosenberg (1981) 美國專利第4,301,153號；Takemoto等人，(1984)美國專利第4,425,431號；d'Hinterland等人，(1984)美國專利第4,460,575號；Kozma等人(2000) Mol. Cell. Biochem. 203:103-112，各文獻之全文以引用的方式併入本文中)。該沉澱作用取決於具有高聚陰離子電荷密度及高分子量之沉澱種類(Saito (1955) Kolloid-Z 143:66，其全文以引用的方式併入本文中)。鹽之存在可干擾或逆轉經陽離子界面活性劑誘發之聚陰離子沉澱。

此外，在鹼性pH值條件下，可有差別地自含有蛋白質污染物之溶液中沉澱聚陰離子。在該等情形下，非化學性地結合於聚陰離子之蛋白質將仍存在於溶液中，而聚陰離子及其他結合於聚陰離子之分子將沉澱。舉例而言，聚陰離子(諸如多醣及核酸)之沉澱伴隨諸如與聚陰離子相互作用之蛋白聚糖及蛋白質之分子的共沉澱(Blumberg及Ogston (1958) Biochem. J. 68:183-188; Matsumura等人，(1963) Biochim. Biophys. Acta 69: 574-576; Serafini-Fracassini等人(1967) Biochem. J. 105:569-575; Smith等人(1984) J. Biol. Chem. 259:11046-11051; Fuks 及Vlodavsky, (1994)美國專利第5,362,641號；Hascall及Heinegard, (1974) J. Biol.

Chem. 249:4232-4241, 4242-4249及4250-4256; Heinegard及Hascall, (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165: 427-441; Moreno等人(1988)美國專利第4,753,796號; Lee等人, (1992) J. Cell Biol. 116: 545-557; Varelas等人(1995) Arch. Biochem. Biophys. 321: 21-30, 各文獻之全文以引用的方式併入本文中)。

蛋白質之等電點(或pI)為該蛋白質具有相等數目之正電荷及負電荷之pH值。在具有接近於(尤其低於)蛋白質等電點之pH值的溶液條件下, 蛋白質可與強酸性聚陰離子(諸如肝素)形成穩定鹽。在促進該等聚陰離子沉澱之條件下, 與該等聚陰離子錯合之蛋白質亦沉澱(LB Jaques (1943) Biochem. J. 37:189-195; AS Jones (1953) Biochim. Biophys. Acta 10:607-612; JE Scott (1955) Chem and Ind 168-169; 美國專利第3,931,399號(Bohn等人, 1976)及美國專利第4,297,344號(Schwinn等人, 1981), 各文獻之全文以引用的方式併入本文中)。

美國專利第4,421,650號、美國專利第5,633,227號及Smith等人((1984) J. Biol. Chem. 259:11046-11051, 其全文以引用的方式併入本文中)描述藉由以陽離子界面活性劑及硫酸銨(其能夠解離聚陰離子-陽離子界面活性劑錯合物)相繼進行處理來純化聚陰離子及隨後使用疏水相互作用層析進行分離。歐洲專利公開案EP055188(其全文以引用之方式併入本文中)描述陽離子界面活性劑能自脂多醣分離RTX毒素。然而, 在藉由內毒素活性檢定所定量之脂多醣的量中

並不存在質量平衡。已證明藉由與陽離子化合物之強相互作用來中和內毒素活性(Cooper JF (1990) J Parenter Sci Technol 44:13-5, 其全文以引用之方式併入本文中)。因此, 在EP055188中, 藉由形成界面活性劑-脂多醣錯合物來中和此活性可能導致在以經增加量之陽離子界面活性劑處理之後在沉澱物中缺乏內毒素活性。

以上所提及之方法需要中間聚陰離子、固體載體或包含具有由能夠使用陽離子界面活性劑純化可溶性蛋白質之陽離子界面活性劑所引起之選擇溶解性的蛋白質之聚集體。因此, 先前技術並未提供藉由使蛋白質與優先沉澱除目標蛋白質以外的蛋白質(意即, 污染蛋白質)之有效量陽離子界面活性劑接觸來純化目標蛋白質之方法, 尤其當在中間聚陰離子、固體載體或蛋白質聚集體不存在下進行該接觸時。熟習此項技術者通常遇到可溶性蛋白質之混合物且並無純化所要蛋白質之簡便、有效的方法。本文所描述之純化蛋白質之新穎方法能夠藉由使用優先沉澱除目標蛋白質以外的蛋白質之陽離子界面活性劑有效純化目標蛋白質。較佳地, 污染蛋白質之沉澱係絕對的且該沉澱不取決於聚陰離子、固體載體或包含污染蛋白質及其他分子之聚集體的存在。

【發明內容】

本發明提供一種自包含目標蛋白質及污染蛋白質之混合物純化目標蛋白質之方法, 其包含以下步驟: 將該混合物暴露於有效量之陽離子界面活性劑, 以致優先地沉澱污染

蛋白質及回收目標蛋白質。

【實施方式】

蛋白質為兩性電解質，其具有正電荷及負電荷。溶液之pH值及與蛋白質相互作用之帶電荷分子影響該蛋白質之淨電荷。當蛋白質之淨電荷為中性(等電點)時，在蛋白質之間可發生強相互作用。當溶液之pH值低於蛋白質之等電點時，該蛋白質具有淨正電荷，且在陽離子分子(包括其他蛋白質)之間可存在靜電排斥。

本發明之一目的為提供一種用於自包含目標蛋白質及污染蛋白質之混合物之溶液中純化經溶解之目標蛋白質的方法，該方法包含將該經溶解之混合物與有效量之陽離子界面活性劑接觸及回收該目標蛋白質。陽離子界面活性劑為帶有正電荷之表面活性分子。一般而言，該等化合物亦具有至少一非極性脂族基團。較佳地，目標蛋白質具有大於7之等電點。在一特定實施例中，溶液之pH值約與目標蛋白質之等電點相同。在一較佳實施例中，溶液之pH值低於目標蛋白質之等電點。在一特定實施例中，當溶液之pH值高於目標蛋白質之等電點時，該溶液之pH值在該目標蛋白質之等電點的1-2個pH單位中。在一特定實施例中，當溶液之pH值高於目標蛋白質之等電點時，該溶液之pH值在該目標蛋白質之等電點的1個pH單位中。

在一特定實施例中，優先沉澱污染蛋白質，由此增加殘留於溶液中由目標蛋白質所代表之蛋白質比例。舉例而言，自其中目標蛋白質占溶液中總蛋白質之20%的目標蛋

白質與污染蛋白質之溶液起始，吾人可使用所提供之方法純化目標蛋白質以獲得其中目標蛋白質為溶液中剩餘總蛋白質之30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、95%或更多的溶液。

如本文所使用，術語"優先沉澱"意謂沉澱蛋白質或蛋白質之群組至超過另一蛋白質或蛋白質之群組的程度。舉例而言，在目標蛋白質與污染蛋白質之混合物之情形下，相對於目標蛋白質優先沉澱污染蛋白質，此時20%或更多的污染蛋白質沉澱，而低於20%之目標蛋白質沉澱。較佳地，沉澱高百分比之污染蛋白質，而沉澱低百分比之目標蛋白質。在較佳實施例中，30%或更多污染蛋白質沉澱，而低於30%之目標蛋白質沉澱；40%或更多污染蛋白質沉澱，而低於40%之目標蛋白質沉澱；50%或更多污染蛋白質沉澱，而低於50%之目標蛋白質沉澱；60%或更多污染蛋白質沉澱，而低於60%之目標蛋白質沉澱；70%或更多污染蛋白質沉澱，而低於70%之目標蛋白質沉澱；80%或更多污染蛋白質沉澱，而低於80%之目標蛋白質沉澱；90%或更多污染蛋白質沉澱，而低於90%之目標蛋白質沉澱；95%或更多污染蛋白質沉澱，而低於95%之目標蛋白質沉澱。較佳地，沉澱小百分比之目標蛋白質沉澱。例如，低於60%、低於50%、低於40%、低於30%、低於20%、低於10%、低於5%或低於1%之目標蛋白質沉澱。

在一特定實施例中，在進行本發明之純化方法以前，溶液中蛋白質之總量(目標蛋白質加污染蛋白質)為0.1至10

mg/ml。在特定實施例中，在進行本發明之純化方法以前，溶液中蛋白質之總量為0.1至3 mg/ml、0.3至2 mg/ml、0.5至2 mg/ml、0.5至1 mg/ml、1至2 mg/ml或約1 mg/ml。

在特定實施例中，污染蛋白質之優先沉澱係絕對的且不取決於(或大體上不取決於)聚陰離子之存在。在另一實施例中，污染蛋白質之優先沉澱係絕對的且不取決於(或大體上不取決於)固體載體之存在。在另一實施例中，污染蛋白質之優先沉澱並不取決於(或大體上不取決於)在污染蛋白質與其他分子之間的聚集體之存在。優先沉澱污染蛋白質並不取決於或大體上不取決於(例如)移除時分別地不影響或大體上不影響污染蛋白質之優先沉澱的組份(例如，聚陰離子、固體載體或污染蛋白質及其他分子之聚集體)。移除一組份之非實質性影響之實例將為當該組份存在時及當其不存在時，皆優先沉澱污染蛋白質。另一實例將為當該組份存在時及當其不存在時，該等污染蛋白質優先沉澱至相同程度。較佳地，在不存在或大體上不存在該組份時，污染蛋白質之沉澱量與存在該組份時所沉澱之量相同或大體上相同。

在另一實施例中，在不存在聚陰離子或不存在實質量之聚陰離子情形下進行該方法。在另一實施例中，在不存在固體載體或不存在實質量固體載體之情形下進行該方法。在另一實施例中，在於污染蛋白質與其他分子之間不存在聚集體或於污染蛋白質與其他分子之間不存在實質量聚集體之情形下進行該方法。較佳地，在由以下各物組成之群

中的兩個或三個組員不存在或不存在實質量之情形下進行該方法：聚陰離子；固體載體；及污染蛋白質與其他分子之間的聚集體。

一旦提供本發明之方法，則對於熟習此項技術者而言，常規選擇所用之特定界面活性劑及以下條件：例如pH值、溫度、鹽分、陽離子界面活性劑濃度、總蛋白質濃度，在該等情形下完成該程序以增加純化特定目標蛋白質之效率。舉例而言，可對比在不同pH值及界面活性劑濃度下所進行之純化以建立最佳純化條件。在以下實例部分提供該程序之實例。在一特定實施例中，選擇溶液之pH值，以致在大體上並未降低所回收之目標蛋白質的量之情形下使該pH值儘可能高。

本發明之進一步目的為提供一種基於目標蛋白質之溶解性來確定能夠有效純化目標蛋白質之條件的方法，如藉由陽離子界面活性劑來影響目標蛋白質溶解性。

有效量之陽離子界面活性劑為導致優先沉澱污染蛋白質之界面活性劑的量。在特定實施例中，有效量之界面活性劑沉澱40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%之污染蛋白質。

在本發明之一實施例中，將陽離子界面活性劑添加至0.001至5.0%之濃度，較佳地將陽離子界面活性劑添加至0.01%至0.5%之濃度，且更佳地將陽離子界面活性劑添加至0.03%至0.2%之濃度。在特定實施例中，將陽離子界面活性劑添加至0.01%至0.1%、0.01%至0.075%、0.01%至0.05%或

0.01%至0.03%之濃度。

在本發明之一實施例中，當陽離子界面活性劑為兩性銨化合物時，完成上述方法。

在一較佳實施例中，在優先沉澱污染蛋白質之後將經溶解之目標蛋白質經受進一步處理。該進一步處理可包括額外純化步驟、活性或濃度檢定、透析、層析(例如，HPLC、尺寸排阻層析)、電泳、透析等。

如本文所使用，兩性銨化合物包含具有陽性組份及通式 QN^+ 或 RNH_3^+ 之非極性組份之化合物。Q表示該氮為四級銨(其與四個可相互鍵結或不可相互鍵結之有機基團共價鍵結)。當有機基團相互鍵結時，其可形成環脂化合物或芳族化合物，取決於在形成環結構的組份之間的鍵之電子組態。當所選之兩性銨化合物具有通式 RNH_3^+ 時，該化合物為其中R為脂族基團之一級銨。脂族基團通常為開鏈有機基團。

在本發明之一實施例中，所選擇之兩性銨化合物可與鹵化合物形成鹽。通常地，鹵化物鹽係指包含氟化物離子、氯化物離子、溴化物離子及碘化物離子之彼等鹽。

在本發明之一實施例中，兩性銨化合物具有至少一個具有6-20個碳原子之脂鏈，較佳地，該兩性銨化合物具有至少一個具有8-18個碳原子之脂鏈。

在本發明之一實施例中，所選擇之兩性銨化合物選自由以下各物組成之群：十六基吡啶鹽、硬脂醯胺甲基吡啶鹽、十二基吡啶鹽、十六基喹鎂鹽、十二基胺基丙酸甲酯鹽、

十二基胺基丙酸金屬鹽、十二基二甲基甜菜鹼、硬脂醯基二甲基甜菜鹼、十二基二羥乙基甜菜鹼及苜蓿素銨鹽。

可使用之兩性銨化合物包括(但不限於)氯化十六基吡啶、乙酸地喹銨、氯化十六基吡啶、氯化十六基三甲基銨、經混合之氯化正烷基二甲基苄甲基銨、氯化十六基吡啶(CPC)、氯化N,N-二甲基-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯氧基]乙氧基]乙基]苄甲烷銨、氯化烷基二甲基苄甲基銨及氯化二氯苄甲基二甲基烷基銨、溴化十四基三甲基銨、溴化十二基三甲基銨、溴化十六基三甲基銨、十二基二甲基甜菜鹼、硬脂醯基二甲基甜菜鹼及十二基二羥乙基甜菜鹼。

在本發明之一實施例中，該兩性銨化合物為十六基吡啶鹽，諸如氯化十六基吡啶。

在本發明之一實施例中，含有所要蛋白質之混合物進一步包含細胞組份，諸如源自微生物(例如細菌，諸如大腸桿菌)之細胞組份。

在本發明之一實施例中，該等細胞組份為一或多種蛋白質。

在本發明之一實施例中，目標蛋白質可為重組蛋白質，例如酶。

可使用本發明之方法來純化多種蛋白質。該等蛋白質可包括(但不限於)抗體、尿酸酶、干擾素- β 、水蛭因子X抑制劑、酸性去氧核糖核酸酶II、彈性蛋白酶、溶菌酶、木瓜蛋白酶、過氧化酶、胰腺核糖核酸酶、胰蛋白酶原、胰蛋白

酶、細胞色素c、埃拉布毒素(erabutoxin)、金黃色葡萄球菌腸毒素C1及單胺氧化酶A及在鹼性條件下帶正電荷之其他蛋白質。

在本發明之一實施例中，目標蛋白質可為抗體、受體、酶、傳送蛋白質、激素或其片斷或共軛物，例如與第二蛋白質或化學物或毒素共軛。

抗體包括(但不限於)單株抗體、人化抗體、嵌合抗體、單鏈抗體、雙特異性抗體、Fab片斷、F(ab')₂片斷、藉由Fab表現庫所產生之片斷、抗遺傳型(anti-Id)抗體及上述抗體中之任何抗體的抗原決定部位結合片斷，但其限制條件為在純化條件下，該抗體帶有正電荷。

為製備單株抗體，可使用藉由連續培養細胞株來提供抗體分子產生之任何技術。該等技術包括(但不限於)Kohler及Milstein之融合瘤技術(1975, Nature 256, 495-497; 及美國專利第4,376,110號)、人B-cell融合瘤技術(Kozbor等人, 1983, Immunology Today 4, 72; Cole等人, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030)及產生人單株抗體之EBV融合瘤技術(Cole等人, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁)。

該等抗體可用作純系及因此重組表現個別重鏈及輕鏈之基礎。可在相同細胞中重組表現兩條鏈，或可在分別表現及純化之後在活體外將兩條鏈組合。編碼所要重鏈或輕鏈或編碼包含所要重鏈或輕鏈可變域的分之核酸(例如，位於載體上)可轉染至表現相異抗體重鏈或輕鏈或包含抗體

重鏈或輕鏈之分子的細胞中，以用於表現多聚體蛋白質。或者，可視情況在不存在互補輕鏈或輕鏈可變區之情形下表現及使用包含其可變區或其CDR之重鏈或分子。在其他實施例中，可修飾該等抗體及蛋白質之N或C末端，例如，藉由C末端醯胺化作用或N-末端乙酸化作用進行修飾。

嵌合抗體為其中不同部分來自不同動物種類之分子，諸如具有來自鼠科mAb之可變區及人免疫球蛋白恆定區的彼等分子。(例如，參見Cabilly等人，美國專利第4,816,567號；及Boss等人，美國專利第5,816,397號)。產生嵌合抗體之技術包括剪接來自具有合適抗原特異性的小鼠抗體分子之基因及剪接來自具有合適生物學活性的人抗體分子之基因(例如，參見Morrison等人，1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger等人，1984, Nature 312, 604-608; Takeda等人，1985, Nature 314, 452-454)。

人化抗體為來自具有一或多個來自非人種類之互補判定區(CDR)及來自人免疫球蛋白分子之構架區的非人種類之抗體分子。例如，在Queen, 美國專利第5,585,089號及Winter, 美國專利第5,225,539號中描述產生人化抗體之技術。精確定義構架區及CDR之範圍(參見"Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E.等人，U.S. Department of Health and Human Services (1983))。

藉由經由胺基酸橋連接Fv區之重鏈片斷與輕鏈片斷來形成單鏈抗體，其導致單鏈多肽。例如，在下列文獻中描述用於產生單鏈抗體之技術：美國專利4,946,778；Bird, 1988,

Science 242, 423-426; Huston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; 及 Ward等人, 1989, Nature 334, 544-546。

雙特異性抗體為識別兩種類型靶之基因工程抗體, 例如下列靶: (1)特異性抗原決定部位; 及(2)"觸發"分子, 例如位於骨髓細胞上之Fc受體。可藉由化學結合技術、融合瘤技術或重組分子生物學技術來製備該等雙特異性抗體。

抗體片斷包括(但不限於): 可藉由胃蛋白酶消化抗體分子而產生之 $F(ab')_2$ 片斷; 及可藉由減少 $F(ab')_2$ 片斷之二硫橋而產生之 $F(ab')$ 片斷。或者, 可構建Fab表現庫(Huse等人, 1989, Science 246, 1275-1281)以允許快速且簡便地識別具有所要特異性之單株Fab片斷。

在本發明之一實施例中, 該蛋白質為尿酸酶。

在本發明之另一實施例中, 該尿酸酶為哺乳動物尿酸酶。

在本發明之另一實施例中, 該哺乳動物尿酸酶為變體哺乳動物尿酸酶。

在本發明之另一實施例中, 該哺乳動物尿酸酶為豬尿酸酶。

在本發明之另一實施例中, 該變體豬尿酸酶指定為PKS Δ N尿酸酶。

在本發明之另一實施例中, 該蛋白質為抗體。

在本發明之另一實施例中, 該抗體為單鏈抗體。

在本發明之另一實施例中, 該蛋白質為干擾素。

在本發明之另一實施例中, 干擾素為干擾素- β 。在一特

定實施例中，干擾素為干擾素- β 1b。下列文獻描述利用重組DNA技術來產生 β -干擾素之各種方法：Nagola, S.等人，Nature, 284:316 (1980)；Goeddel, D. V.等人，Nature, 287:411 (1980)；Yelverton, E.等人，Nuc. Acid Res., 9:731 (1981)、Streuli, M.等人，Proc. Nat'l Acad. Sci.(U.S.) 78:2848 (1981)；1981年5月6日公開之歐洲專利申請案第28033號；1981年7月15日公開之歐洲專利申請案第321134號；1981年8月26日公開之歐洲專利申請案第34307號；及1981年7月1日頒予之Belgian專利第837379號。在美國專利第4,450,103、4,315,852、4,343,735及4,343,736號及Derynck等人，Nature (1980) 287:193-197及Scandella與Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971)中描述回收及純化細菌所產生之IFN之程序。

在一特定實施例中，目標蛋白質為水蛭因子Xa。可藉由熟習此項技術者已知之任何方法來產生水蛭因子Xa，諸如在美国專利第6,211,341號及國際專利公開案第WO 94/23735號中所描述之方法。

在本發明之一實施例中，在約1分鐘與約48小時之間、更佳地約10分鐘至約24小時、約30分鐘至約12小時、約30分鐘至約8小時、約30分鐘至約6小時、約30分鐘至約4小時、約30分鐘至約2小時、約30分鐘至約1小時或約1至約2小時之間進行此接觸。

在本發明之一實施例中，在約4°C至約36°C、更佳地約4°C至約26°C之溫度下進行此接觸。

本發明亦提供使陽離子界面活性劑作為單一試劑用於純化在鹼性條件下具有大於7之等電點之蛋白質的用途。

本發明亦提供在鹼性條件下藉由向混合物中添加氯化十六基吡啶而自此混合物中純化之尿酸酶。

在本發明之一實施例中，藉由包含處理細菌細胞以表現DNA且產生尿酸酶及回收尿酸酶之方法，自包含編碼尿酸酶的DNA之細菌細胞獲得此尿酸酶。

在本發明之一實施例中，自細菌細胞中之沉澱物回收尿酸酶。

本發明亦提供經純化之尿酸酶以用於製備尿酸酶聚合物共軛物。

本發明亦提供可藉由一方法獲得之具有大於7的等電點之經純化蛋白質，該方法包含：在使得蛋白質帶有正電荷或具有正電荷區域之條件下，將含有此蛋白質之混合物與有效量之陽離子界面活性劑接觸；及回收此蛋白質。

本發明亦提供將十六基吡啶鹽用於純化具有大於7之等電點的蛋白質之用途。

就pH值而言，在某些實施例中，在使得目標蛋白質帶有正電荷之條件下將混合物與有效量之陽離子界面活性劑接觸，pH值將隨目標蛋白質之性質變化而變化。然而，pH值較佳地在pH 7與pH 11之間；較佳之範圍在約pH 7與pH 10之間、pH 7與pH 9之間、pH 8與pH 11之間、pH 8與pH 10之間或pH 8與pH 9之間。

實例

陳述以下實例以輔助理解本發明，但不欲且不應視為以任何方式限制本發明之範圍。

實例1.CPC用於純化重組哺乳動物尿酸酶之用途

1.1 先前技術

醫藥級尿酸酶必須基本上不含非尿酸酶蛋白質。在大腸桿菌中所產生之哺乳動物尿酸酶(等電點8.67)在細胞內聚集於與稱作包涵體(IB)之細胞器相似的沉澱物中，此等包涵體可易於分離以進一步純化。與IB含有混雜/異常摺疊表現的蛋白質之傳統觀點相反，該等IB類似物含有以沉澱形式正確折疊之尿酸酶。將尿酸酶IB類似物成份暴露於鹼性pH值(例如約pH 9-11)會再溶解經沉澱之蛋白質。經溶解之IB類似物成份中的尿酸酶含量為約40-60%且要求大範圍純化以獲得均一尿酸酶製劑。在本文中，吾人證明以可藉由諸多方法評價之CPC來純化尿酸酶及其他蛋白質。舉例而言，可藉由測定比活性、電泳後出現之條帶數目及SDS-PAGE凝膠斑點以及在尺寸排阻HPLC之後出現於層析圖中的峰之數目及大小來評估哺乳動物尿酸酶純度。

1.2 材料及方法

1.2.1 50 mM NaHCO_3 緩衝液(pH 10.3)

藉由將 NaHCO_3 溶解至50 mM最終濃度來製備該緩衝液。將pH值調節至10.2-10.4。依據開始之pH值，可使用0.1 M HCl或1 N NaOH調節pH值。

1.2.2 10% CPC 溶液

藉由將CPC溶解於蒸餾水中至10 g/100 ml最終濃度來製

備 10% CPC。

1.2.3 重組豬尿酸酶表現

以大腸桿菌 K-12 株 W3110 F⁻ 表現重組哺乳動物尿酸酶 (尿酸氧化酶)，如杜克大學 (Duke University) 之國際專利申請案 WO00/08196 及美國專利臨時申請案第 60/095,489 號中所描述，該案之全文以引用的方式併入本文中。

1.2.4 培養及收穫產生尿酸酶之細菌

於 37°C 下，在含有酪蛋白水解物、酵母萃取物、鹽、葡萄糖及氮之生長培養基中培養細菌。

在培養之後，藉由離心來收穫聚集有尿酸酶之細菌且以水洗滌以移除剩餘培養基。

1.2.5 細胞破裂及回收

將收穫之細胞顆粒物懸浮於 50 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 及 10 mM EDTA 中且將最終體積調至近似於 20 倍乾細胞重量 (DCW)。在攪拌同時，將溶菌酶以 2000-3000 單位/ml 之濃度添加於此經懸浮之顆粒物中且於 4-8°C 下培育 16-20 小時。

藉由高剪切混合及隨後藉由超聲波處理來處理此細胞溶胞物。以等體積去離子水稀釋此懸浮液且將其離心。以去離子水 (w/w) 稀釋且離心含有尿酸酶包涵體之顆粒物以進一步移除雜質。保存自此最後洗滌步驟獲得之顆粒物以用於進一步處理，且拋棄上清液。

1.2.6 溶解

將此包涵體 (IB) 顆粒物懸浮於 50 mM NaHCO₃ 緩衝液 (pH 10.3±0.1) 中。於 25±2°C 之溫度下培育此懸浮液歷經約 0.5-2

小時以允許溶解源自IB之尿酸酶。

1.2.7 CPC處理

在用力混合下將10%CPC溶液以等分試樣添加於均質化IB(pH 10.3)中，以獲得所要CPC濃度。將此樣品如指示培育1至24小時，在此期間形成沉澱薄片。於12,000 x g下離心此樣品15分鐘。分離顆粒物與上清液，且以50 mM NaHCO₃緩衝液(pH 10.3)懸浮此顆粒物至起始體積。測定各溶離份之酶活性，且濃縮及透析該等溶離份以移除剩餘CPC。

1.2.8蛋白質檢定

使用改良Bradford方法(Macart及Gerbaut (1982) Clin Chim Acta 122:93-101)來測定經處理及未經處理IB樣品之等分試樣的蛋白質含量。

1.2.9尿酸酶檢定

1.2.9.1酶活性

藉由UV方法來量測尿酸酶活性(Fridovich, I. (1965) The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines. J Biol Chem, 240, 2491-2494；藉由結合1 mg/ml BSA將此方法改良)。藉由量測由尿酸氧化為尿囊素所引起之292 nm吸光度降低而在雙重複樣品中測定酶反應速率。一活性單位係定義為於25°C下，在指定條件下每分鐘氧化1微莫耳尿酸所需要之尿酸酶之量。以每毫克蛋白質之活性單位來表示尿酸酶效能(U/mg)。

1 mM尿酸於292 nm下在1公分路徑長度中之消光係數為

12.2。因此，每毫升反應混合物氧化1微莫耳尿酸引起12.2 mA₂₉₂之吸光度降低。隨時間出現之吸光度改變(ΔA₂₉₂/分鐘)源自此曲線之線性部分。隨後如下計算尿酸酶活性：

$$\text{活性 (U/ml)} = \frac{\Delta A_{292\text{nm}}(\text{AU/min}) \times \text{DF} \times V_{\text{RM}}}{V_{\text{S}} \times 12.2}$$

其中：DF=稀釋因子；

V_{RM}=反應混合物之總體積(μl)；

V_S=在反應混合物中所使用之經稀釋樣品之體積(μl)。

1.2.9.2 使用 Superdex 200 進行 HPLC 分析

根據藉由使用 Superdex 200 管柱進行 HPLC 所獲得之溶離曲線來定量原生尿酸酶以及(若可能)污染物之量及相對百分比。將尿酸酶溶液之雙重複樣品注入此管柱中。自動計算各峰之面積及總面積之百分比且將其歸納於鄰近表格中。

1.2.10. SDS-PAGE 分析

以 15% SDS-PAGE 凝膠來分離含有約 20 μg 蛋白質/路徑之樣品中的蛋白質。以庫馬斯(Coomassie)亮藍來染色所得之凝膠。

1.3. 結果

在表 1 及圖 1 中示出 CPC(0.005-0.075%)處理(1-24 小時)對在上清液中回收之尿酸酶活性之影響及該尿酸酶之純度。在 CPC 處理(pH 10.3)之前，蛋白質濃度為 1.95 mg/ml，且比酶活性為 3.4-4.67 U/mg。在圖 1B 中示出之結果顯示在各培

育期間，上清液之蛋白質濃度隨CPC濃度增加而降低。在小於0.04% CPC時，觀察到對蛋白質濃度造成相對微小之影響。濃度為0.04%至0.075%之CPC可將蛋白質濃度降低至約50%之起始濃度。

與CPC對總蛋白質濃度之影響相反，總可溶性尿酸酶活性並未受漸增之CPC濃度及培育時間顯著影響(圖1A)。在各培育期間，比酶活性(圖1C)隨著介於0.04%-0.075%範圍內之CPC濃度變化而持續增加。此增加為特異性移除非尿酸酶蛋白質之結果。由於最終經純化之酶的比酶活性近似為9 U/mg，藉由CPC沉澱來移除大部分污染蛋白質。事實上，所進行之HPLC及SDS-PAGE分析可支持該結論。

表1.CPC暴露對於尿酸酶比活性及純度之影響

培育時間 (小時)	[CPC] (%)	尿酸酶活 性(U/ml)	[蛋白質] (mg/ml)	尿酸酶比活 性(U/mg)
1	0(載量)	6.63	1.95	3.4
1	0.005	7.1	1.8	3.9
1	0.01	6.63	1.75	3.7
1	0.02	6.63	1.75	3.7
1	0.04	6.4	1.47	4.35
1	0.06	5.9	0.95	6.2
1	0.075	6.4	0.9	7.1
4	0.005	8.61	1.7	5.06
4	0.01	8.36	1.66	5.04
4	0.02	8.36	1.6	5.04
4	0.04	7.38	1.32	5.59
4	0.06	6.4	0.9	7.1
4	0.075	6.9	0.82	8.4
24	0.005	8.8	1.9	4.66

24	0.01	7.9	1.9	4.14
24	0.02	7.9	1.9	4.14
24	0.04	7.3	1.5	4.9
24	0.06	6.9	0.97	7.1
24	0.075	6.6	0.9	7.4
24	0(載量)	9.1	1.95	4.67

1.4.CPC增加尿酸酶純度之證實

如在1.3部分中所描述，分離及溶解含有尿酸酶之IB。在CPC處理之前及在過濾經CPC沉澱之蛋白質以後，分析可溶性材料之樣品。

1.4.1.在以0.075% CPC處理之後對非尿酸酶蛋白質進行之HPLC分析

經溶解之IB之HPLC分析顯示尿酸酶相關峰(滯留時間(RT)為約25.5分鐘)包含約46%之粗IB樣品蛋白質(圖2A)，其數據如下所示：

表 2A

編號	RT	面積	高度	濃度 I	BC
1	15.01	2358734	63671	15.788	FWD
2	15.10	315443	63515	2.111	FWD
3	15.18	436417	62665	2.921	FWD
4	15.30	285062	62077	1.908	FWD
5	15.45	434310	62122	2.907	FWD
6	15.49	2800622	62094	18.746	FWD
7	21.80	1375688	10369	9.208	FWD
8	25.53	6933862	70529	46.411	FWD
		14940138	457042	100.000	

在CPC處理之後，該尿酸酶相關峰增加至近似92%之蛋白質(圖2B)，如下表2B所示，且伴隨在RT 15-22分鐘之間所

溶離之污染物的顯著降低(圖 2A)。

表 2B

編號	RT	面積	高度	濃度 I	BC
1	15.34	48627	580	0.942	FWD
2	21.80	377396	3941	7.315	FWD
3	25.50	4733378	56069	91.743	FWD
		5159401	60590	100.000	

尿酸酶峰面積近似為圖 2A 中尿酸酶峰面積之 70%。因此，該等結果顯示當以 CPC 處理時，移除非尿酸酶蛋白質導致尿酸酶純度加倍。

1.4.2.0.075% CPC 對酶活性之影響

結果(在表 3 中示出)顯示在處理過程中保持尿酸酶活性之質量平衡。發現 CPC 暴露會沉澱溶液中所有蛋白質之 60%。大於 85% 之酶活性保留於溶液中，因此移除外源蛋白質會提供所產生上清液的比活性之超過 110% 增加。如同在大多數純化方法中，一些所要活性保留於顆粒物中。在此情形下，僅 17.6% 之起始活性保留於顆粒物中(且為達成分析目的，使用 50 mM 碳酸氫鈉(7 mSi, pH 10.3)萃取之)，其為總量之相對微小部分。

表 3. CPC 處理對尿酸酶活性之影響

樣品	總活性 (U)	活性 (U/ml)	[蛋白質](mg/ml)	比活性 (U/mg)	經回收之活性(%)
CPC 之前	490	4.9	2	2.46	100
CPC 處理之後	418	4.18	0.8	5.2	85.3
CPC 處理之後的顆粒物	86	0.8	-	-	17.6

1.4.3. 以 0.075% CPC 處理之後進行 SDS-PAGE 分析

藉由 SDS-PAGE 方法來分析暴露於 CPC 之前的粗尿酸酶樣品，以及在分離可溶材料與不溶材料之後、在 CPC 處理後、離心分離該等溶離份之後及離心後使所獲得之顆粒物復水之後獲得的後續溶離份之樣品，該等樣品含有等量蛋白質。結果(參見圖 3)展示在 CPC 處理之前存在污染蛋白質。在 CPC 處理之後，顆粒物含有大多數污染蛋白質，而上清液含有在單一主要蛋白質帶中所獲得之尿酸酶。

實例 2. CPC 對純化單鏈抗體(scFv)之影響

2.1. 材料及方法

2.1.1. 緩衝液

2.1.1.1. 包涵體溶解緩衝液

溶解緩衝液含有 6 M 尿素、50 mM Tris、1 mM EDTA 及 0.1 M 半胱胺酸。將此緩衝液之 pH 值滴定至 8.5。

2.1.1.2. 折疊緩衝液

折疊緩衝液含有 1 M 尿素、0.25 mM NaCl、1 mM EDTA 及 0.1 M 半胱胺酸。將此緩衝液之 pH 值滴定至 10.0。

2.1.2. 在細菌中表現 scFv 抗體

如 PCT 公開案 WO02/059264 所描述(其全文以引用之方式併入本文中)，在以編碼在羧基末端具有半胱胺酸-離胺酸-丙胺酸-離胺酸之 scFv 的載體之大腸桿菌中表現 scFv 抗體 (pI 8.9)。

2.1.3. 培養及收穫產生 scFv 抗體之細菌

在基本培養基中 (pH 7.2) 培養含有 scFv 之細菌細胞且在誘導前五個小時內補充 L-精胺酸至最終濃度為 0.5%。藉由

限制培養基中葡萄糖之量來誘導表現scFv。藉由超濾自培養基中收穫含scFv之細菌細胞。

2.1.4.細胞破裂及包涵體回收

將收穫之細胞顆粒物懸浮於50 mM Tris緩衝液(pH 8.0)及10 mM EDTA中且將最終體積調至近似20倍乾細胞重量(DCW)。在攪拌之同時，將濃度為2000-3000單位/ml之溶菌酶添加於此經懸浮之顆粒物中，隨後於4℃下培育16-20小時。

隨後藉由高剪切混合及隨後藉由超聲波處理來處理細胞溶胞物。藉由於10,000 x g下離心來回收含有scFv抗體之包涵體。以去離子水(w/w)將此顆粒物稀釋近似十六倍且離心以進一步移除雜質。保存自該最後洗滌步驟所獲得之顆粒物以用於進一步處理。

2.1.5.溶解及再折疊

將富含IB之顆粒物懸浮於包涵體溶解緩衝液(參見上文)中，於室溫下培育5小時，且於活體外在基於精胺酸/氧化性麩胱甘肽之溶液中再折疊。在再折疊之後，藉由相對於含有尿素/磷酸鹽之緩衝液進行切向流式過濾來透析及濃縮此蛋白質。

2.1.6.CPC處理

將10%CPC溶液添加於scFv再折疊混合物中至最終濃度為0.02%，且於室溫下培育1-2小時之後，藉由過濾來移除沉澱物。此上清液含有scFv抗體。

2.2.結果

2.2.1. CPC濃度對可回收scFv抗體之影響

表 4B 指示 CPC(pH 7.5 或 10) 對 scFv 抗體純度及回收之影響。在 CPC 處理之前，IB 蛋白質之初始量為 73 mg，如藉由 Superdex 75 HPLC 分析所測定，其含有 15.87 mg scFv 抗體。含有 scFv 抗體之峰的滯留時間(RT)近似為 20.6 分鐘（圖 4A），其數據如下表 4A 所示：

表 4A

	峰名稱	RT	面積	%面積
1	Y1	20.572	4118280	100.00

結果顯示總蛋白質之回收一般地隨 CPC 濃度增加而降低，且當 CPC 濃度 < 0.03% 時，scFv 抗體回收保持 > 80%。相對於在 pH 10 下移除污染蛋白質，在 pH 7.5 下可實現污染蛋白質之更有效移除。因此，藉由以 0.01 至 0.03% CPC 處理可純化 scFv 抗體。

表 4B. CPC 處理對 scFv 抗體回收及純度之影響

處理可溶性 IB	總蛋白質(mg)	藉由 HPLC 回收之總 scFv(mg)	純化因子	藉由 HPLC 回收之 scFv(%)
對照樣品(CPC 處理之前)	73	15.87		100
0.01% CPC (pH 10)	64	15.66	1.13	98.68
0.01% CPC (pH 7.5)	50.76	14.97	1.36	94.33
0.015% CPC (pH 10)	54	14.49	1.23	91.30
0.015% CPC (pH 7.5)	39.96	14.22	1.64	89.60
0.02% CPC (pH 10)	43	13.35	1.43	84.12
0.02% CPC (pH 7.5)	37.8	13.02	1.58	82.04
0.03% CPC (pH 10)	35	11.12	1.46	70.07
0.03% CPC (pH 7.5)	37.8	12.47	1.52	78.58

2.3. CPC 增加 scFv 抗體純度之證實

2.3.1.以CPC處理之後對scFv回收進行HPLC分析

再折疊蛋白質之HPLC分析顯示scFv抗體相關峰(滯留時間(RT)為約20.6分鐘)包含總蛋白質之約22.7%蛋白質(圖4B)，如表4C所示：

表 4C

	RT	面積	%面積
1	13.400	2538259	77.31
2	20.553	745048	22.69

圖4C之層析圖(如下表4D所示)顯示以0.02%CPC處理之後，上清液之scFv抗體相關峰包含近似75.9%之所注入總蛋白質，純化倍數為3.3。因此，CPC處理自scFv抗體溶液中移除了蛋白質雜質。

表 4D

	峰名稱	RT	面積	%面積
1		13.498	394554	21.77
2		16.867	42019	2.32
3	Y1	20.691	1375981	15.91

2.3.2.以CPC處理之後對scFv回收進行SDS-PAGE分析

結果(參見圖5)顯示在CPC處理之前，樣品含有顯著量之多種蛋白質。類似地，在CPC處理之後，顆粒物含有多種蛋白質。相反，在CPC處理之後，上清液含有一種主要蛋白質帶，其為scFv抗體之蛋白質帶。

實例3.CPC對純化重組干擾素- β 之影響

藉由已知方法在大腸桿菌中表現干擾素- β (IFN- β ,pI

8.5-8.9)。下列文獻描述使用重組DNA技術來產生 β -干擾素之各種方法：Nagola, S.等人，Nature, 284:316 (1980)；Goeddel, D. V.等人，Nature, 287:411 (1980)；Yelverton, E.等人，Nuc. Acid Res., 9:731 (1981)；Streuli, M.等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. (U.S.), 78:2848 (1981)；1981年5月6日公開之歐洲專利申請案第28033號；1981年7月15日公開之歐洲專利申請案第321134號；1981年8月26日公開之歐洲專利申請案第34307號；及1981年7月1日頒予之比利時專利第837379號。下列文獻描述用於回收及純化細菌所產生之IFN的程序：美國專利第4,450,103號、4,315,852號、4,343,735號及4,343,736號；及Derynck等人，Nature (1980) 287:193-197；及Scandella及Kornberg, Biochemistry, 10:4447 (1971)。分離及溶解含有干擾素- β 之包涵體。

以CPC處理所得溶液。在圖6中展示之結果顯示在CPC處理之後，所存在之污染蛋白質的含量顯著降低。在CPC處理之後，干擾素- β 之實際量(峰下面積)並無顯著變化。

表5概述CPC處理之影響。總蛋白質(Bradford)降低40%，UV吸光度降低約40%，但IFN- β 之量保持不變。

表 5

樣品及處理	蛋白質 (mg/ml)	O.D A ₂₈₀	IFN- β 含量 (mg/ml) ^a	SEC概況
對照樣品(蛋白質 折疊後， 並無CPC, 1049-31)	0.51	1.55	0.069	R.T. 13 ^b 分 鐘之峰 為總面積 之15%
測試(蛋白質折疊)	0.3	1.0	0.069	R.T. 13 ^b 分

後且以0.05%CPC處理，1049-31)				鐘之峰 為總面積 之7.34%
------------------------	--	--	--	-----------------------

^a藉由 Vydac C4管柱定量；

^bSEC概況含有若干峰。當以CPC處理時，第13分鐘(R.T.為13分鐘)溶離之峰降低且對應於高分子量蛋白質及其變異體溶離出之區域。

實例4.CPC對純化因子Xa抑制劑之影響

使用CPC來純化水蛭因子Xa抑制劑。如美國專利第6,211,341號及國際專利公開案第WO94/23735號所描述，可產生水蛭因子Xa抑制劑(FxaI, pI 8.4-9.1)。在分離含有FXaI之包涵體(IB)以後，如在實例1中所描述自IB大體上純化此FXaI。在溶解IB顆粒物之後，以10%CPC溶液培育此製劑。隨後，於12,000 x g下離心此混合物15分鐘。分離顆粒物與上清液。以50 mM NaHCO₃緩衝液懸浮顆粒物至初始體積。分別濃縮及透析顆粒物及上清液以移除剩餘CPC。檢定蛋白質含量及活性且發現FXaI為上清液之優勢組份且大體上不存在於顆粒物中。結果顯示CPC處理會提高回收效率及經回收FXaI之純度。

實例5.藉由CPC來純化羧肽酶B(CPB)

將自表現CPB之純系獲得之等量包涵體溶解於8 M尿素中，pH 9.5(對照樣品及測試)。在國際專利公開案第WO 96/23064號及美國專利第5,948,668號中描述CPB之產生。以CPC 0.11%處理測試樣品且在再折疊之前藉由過濾來澄清測試樣品。藉由以1:8之比例將此等溶液稀釋於再折疊緩衝

液中來進行對照樣品及測試樣品之再折疊。於周圍溫度下，以內切蛋白酶(endoproteinase)處理隔夜之後，將等量對照及測試溶液裝入DEAE瓊脂糖管柱中。洗滌此管柱且隨後以溶於20 mM Tris緩衝液(pH 8)中之60 mM氯化鈉溶離活性酶。

表 6

處理步驟	參數	處理	
		對照樣品	0.11% CPC
澄清之後溶解於8 M尿素中	總A ₂₈₀	960	494
	蛋白質含量 (mg)*	490	272
	pH值	9.5	9.5
	酶活性(單位)	無活性 (**)	無活性 (**)
26.5 mg再折疊蛋白質之後層析 (DEAE MP)	蛋白質含量 (mg)*	5.67	8.41
	酶活性(單位)	258	4043
	比活性(單位 /mg)	98	481

(*)藉由Bradford方法進行蛋白質測定。

(**)在再折疊之前，該蛋白質並無活性。

表 6 中指示之結果展示經CPC處理之材料之總OD降低49.5%且總蛋白質含量降低44.5%。令人關注地，在經CPC處理之樣品中所回收之總酶活性增加79%，表明CPC移除部分地抑制活性酶之生成的組份。

本文引用之所有文獻之全文以引用的方式併入本文中且為達成所有目的，該引用的程度就如同已特定地及個別地指定將各個公開案、專利或專利申請案之整體以引用的方

式併入一般。

在不背離本發明之精神及範圍之情形下可對本發明做出多種更改及變化，熟習此項技術者顯然瞭解。僅以實例之方式提供本文所描述之特定實施例，且僅藉由所附申請專利範圍之條款及該等申請專利範圍所主張之等價物的全部範圍來限制本發明。

【圖式簡單說明】

圖1描述CPC濃度對尿酸酶活性及純度之影響。

在所示之CPC處理及離心分離之後，量測來自經溶解之大腸桿菌包涵體之哺乳動物尿酸酶的蛋白質濃度(A)及酶活性(B)。以該等值之比率(活性/蛋白質濃度)來計算各分離株之比活性(C)。

圖2描述自包涵體製備之粗哺乳動物尿酸酶的尺寸排阻HPLC層析分析及以0.075% CPC處理後之尺寸排阻HPLC層析分析。

分析尺寸排阻HPLC概況：A.未經CPC處理之經溶解大腸桿菌包涵體；及B.CPC(0.075%)沉澱及過濾後之上清液。在鄰近表中概述各峰之面積及佔總面積之百分比。

圖3描述經CPC處理之尿酸酶之SDS-PAGE(15%凝膠)分析。

如在實例1中所描述來製備含有尿酸酶之樣品。將各方法步驟之樣品等分如下：路徑1-經溶解之IB；路徑2-CPC處理後之上清液；路徑3-CPC處理後之顆粒物。

圖4描述以0.02% CPC處理後之粗scFv抗體之尺寸排阻

HPLC分析。

分析尺寸排阻HPLC概況：A.參考標準BTG-271 scFv抗體；B.經溶解之包涵體；及C.再折疊及CPC(0.02%)沉澱及過濾後之上清液。在鄰近表中歸納各峰之面積及占總面積之百分比。

圖5描述經CPC處理之scFv抗體的SDS-PAGE(15%凝膠)分析。

以如下次序指示來自各方法步驟的含有scFv抗體之樣品及標準：路徑1-分子量標準；路徑2-經溶解之IB；路徑3-經再折疊之蛋白質；路徑4-CPC顆粒物；路徑5-CPC處理後之上清液。

圖6描述在以CPC處理之前及之後，干擾素- β 的HPLC凝膠過濾層析。

A.CPC處理之前；

B.CPC處理之後。

將200 μ l之0.1 mg/ml干擾素- β 之溶液裝入該管柱中。

十、申請專利範圍：

P1-5

1. 一種純化目標蛋白質之方法，該方法包含：
 - a. 獲得包含經溶解之目標蛋白質、一或多種經溶解之污染蛋白質及鹼性緩衝液之混合物的溶液，其中該目標蛋白質具有正電荷且在鹼性pH下具有大於7之等電點，且該一或多種污染蛋白質具有聚陰離子電荷；
 - b. 使包含該經溶解之目標蛋白質、該一或多種經溶解之污染蛋白質及鹼性緩衝液之混合物的溶液與有效量之一或多種陽離子界面活性劑接觸，以優先沉澱該一或多種污染蛋白質，其中該一或多種陽離子界面活性劑為兩性銨化合物且其中該一或多種陽離子界面活性劑係以0.001%至5.0%之濃度添加，由此增加殘留於溶液中由目標蛋白質所代表之蛋白質比例；及
 - c. 回收該經溶解之目標蛋白質。
2. 如請求項1之方法，其中該兩性銨化合物係選自由以下各物組成之群：通式 QN^+ 之四級銨化合物，其中Q表示該氮為與四個可相互鍵結或不可相互鍵結之有機基團共價鍵結；通式 RNH_3^+ 之一級銨化合物，其中R為脂族基團；及其鹽。
3. 如請求項2之方法，其中該兩性銨化合物係選自由以下各物組成之群：十六基吡啶鹽、硬脂醯胺-甲基吡啶鹽、十二基吡啶鹽、十六基喹鎂(quinolynium)鹽、十二基胺基丙酸甲酯鹽、十二基胺基丙酸金屬鹽、十二基二甲基甜菜鹼、硬脂醯基二甲基甜菜鹼、十二基二羥乙基甜菜鹼及

苳索鉍(benzethonium)鹽。

4. 如請求項3之方法，其中該兩性鉍化合物係選自氯化十六基吡啶(hexadecylpyridinium chloride)、乙酸地喹鉍(dequalinium acetate)、氯化十六基吡啶、氯化十六基三甲基鉍、混合氯化正烷基二甲基苳甲基鉍、氯化十六基吡啶(cetylpyridinium chloride)、氯化N,N-二甲基-N-[2-[2-[4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苳氧基]乙氧基]乙基]苳甲烷鉍、氯化烷基二甲基苳甲基鉍及氯化二氯苳甲基二甲基烷基鉍、溴化十四基三甲基鉍、溴化十二基三甲基鉍、溴化十六基三甲基鉍、十二基二甲基基甜菜鹼、硬脂醯基二甲基甜菜鹼及十二基二羥乙基甜菜鹼。
5. 如請求項3之方法，其中該兩性鉍化合物為十六基吡啶鹽。
6. 如請求項5之方法，其中該十六基吡啶鹽為鹵化物鹽。
7. 如請求項6之方法，其中該十六基吡啶鹵化物鹽為氯化十六基吡啶(cetylpyridinium chloride)。
8. 如請求項1之方法，其中該兩性鉍化合物具有至少一個具有6-20個碳原子之脂鏈。
9. 如請求項8之方法，其中該脂鏈具有8-18個碳原子。
10. 如請求項1之方法，其中該溶液進一步包含一或多種細胞組份。
11. 如請求項10之方法，其中該一或多種細胞組份源自微生物。
12. 如請求項11之方法，其中該微生物為細菌。
13. 如請求項12之方法，其中該細菌為大腸桿菌(E. coli)。
14. 如請求項10之方法，其中該一或多種細胞組份為一或多種

蛋白質。

15. 如請求項1之方法，其中該目標蛋白質為重組蛋白質。
16. 如請求項15之方法，其中該重組蛋白質為酶。
17. 如請求項15之方法，其中該目標蛋白質係選自由以下各物組成之群：抗體、尿酸酶、干擾素- β 、因子X抑制劑、酸性去氧核糖核酸酶II、彈性蛋白酶、溶菌酶、木瓜蛋白酶、過氧化酶、胰腺核糖核酸酶、胰蛋白酶原、胰蛋白酶、細胞色素c、埃拉布毒素(erabutoxin)、金黃色葡萄球菌腸毒素C1、干擾素及單胺氧化酶A。
18. 如請求項17之方法，其中該目標蛋白質為尿酸酶。
19. 如請求項18之方法，其中該尿酸酶為哺乳動物尿酸酶。
20. 如請求項19之方法，其中該哺乳動物尿酸酶為豬尿酸酶。
21. 如請求項15之方法，其中該目標蛋白質為抗體。
22. 如請求項21之方法，其中該抗體為單鏈抗體。
23. 如請求項15之方法，其中該目標蛋白質為干擾素。
24. 如請求項23之方法，其中該干擾素為干擾素- β 。
25. 如請求項1之方法，其中該一或多種陽離子界面活性劑以0.01%至0.5%之濃度添加。
26. 如請求項25之方法，其中該一或多種陽離子界面活性劑以0.03%至0.2%之濃度添加。
27. 如請求項1之方法，其中該接觸進行5分鐘至48小時。
28. 如請求項27之方法，其中該接觸進行10分鐘至24小時。
29. 如請求項1之方法，其中該接觸於4°C至36°C之溫度下進行。

30. 如請求項29之方法，其中該接觸於4℃至26℃之溫度下進行。
31. 如請求項1之方法，其中該溶液不含聚陰離子。
32. 如請求項1之方法，其中該溶液不含選自由基質及管柱所組成之群之固體載體。
33. 如請求項1之方法，其中該溶液不含該等污染蛋白質之聚集體。
34. 如請求項1之方法，其中該溶液不含聚陰離子、選自由基質及管柱所組成之群之固體載體及該等污染蛋白質之聚集體。
35. 如請求項31、32、33或34之方法，其中該陽離子界面活性劑為十六基吡啶鹽。
36. 如請求項35之方法，其中該十六基吡啶鹽為氯化十六基吡啶。
37. 如請求項19之方法，其中該尿酸酶係來自細菌細胞，其中該細菌細胞包含編碼尿酸酶之DNA，且表現該DNA以產生尿酸酶。
38. 如請求項37之方法，其中該目標蛋白質係回收自藉由該細菌細胞所產生之包涵體。
39. 一種用於純化經溶解之目標蛋白質之方法，其包含以下步驟：
 - a. 獲得包含經溶解之目標蛋白質、一或多種經溶解之污染蛋白質及鹼性緩衝液之混合物的溶液，其中該目標蛋白質係具有正電荷且在鹼性pH下具有大於7之等電點，且

該一或多種污染蛋白質具有聚陰離子電荷；

b. 使該包含經溶解之目標蛋白質、一或多種經溶解之污染蛋白質及鹼性緩衝液的溶液與有效量之一或多種陽離子界面活性劑接觸，以優先沉澱該一或多種污染蛋白質，其中該一或多種陽離子界面活性劑為兩性銨化合物且其中該一或多種陽離子界面活性劑係以0.001%至5.0%之濃度添加；及

c. 回收該經溶解之目標蛋白質。

40. 一種增加蛋白質溶液中之目標蛋白質重量百分比之方法，其包含以下步驟：

a. 獲得複數種蛋白質之溶液，其中溶液中之蛋白質包含該目標蛋白質、

一或多種污染蛋白質及鹼性緩衝液，且該目標蛋白質之重量為該溶液中之總蛋白質重量的第一重量百分比，其中該目標蛋白質具有正電荷且在鹼性pH下具有大於7之等電點，且該一或多種污染蛋白質具有聚陰離子電荷；及

b. 使該溶液與有效量之一或多種陽離子界面活性劑接觸，以優先沉澱該等污染蛋白質，其中該一或多種陽離子界面活性劑為兩性銨化合物且其中該一或多種陽離子界面活性劑係以0.001%至5.0%之濃度添加；

其中步驟(b)之溶液中的目標蛋白質之重量為總蛋白質重量之第二重量百分比，且該第二百分比大於該第一百分比。

十一、圖式：

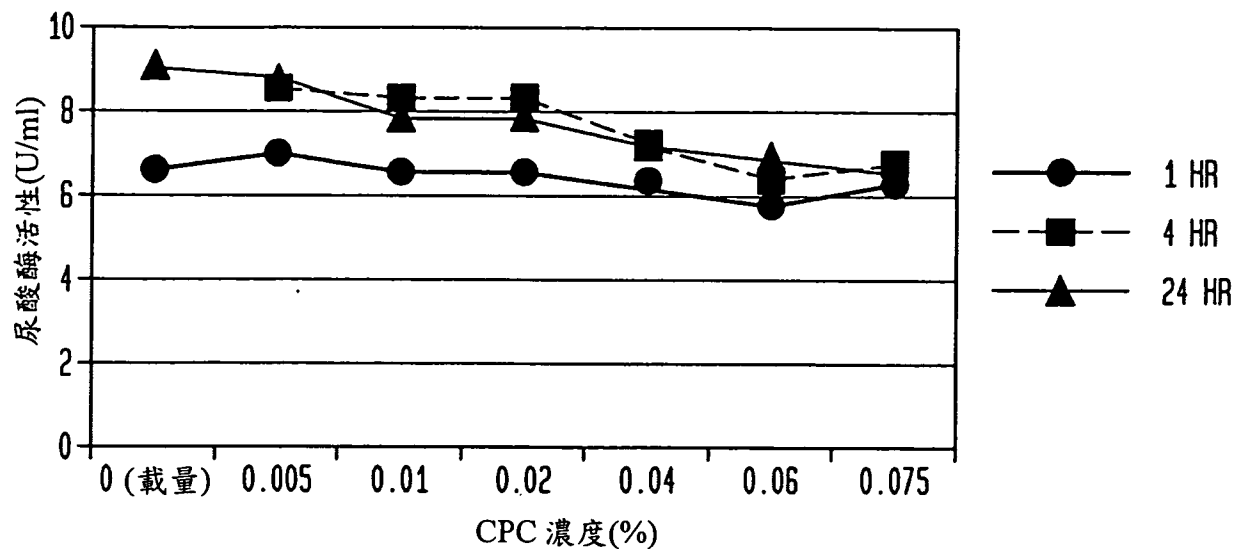


圖 1A

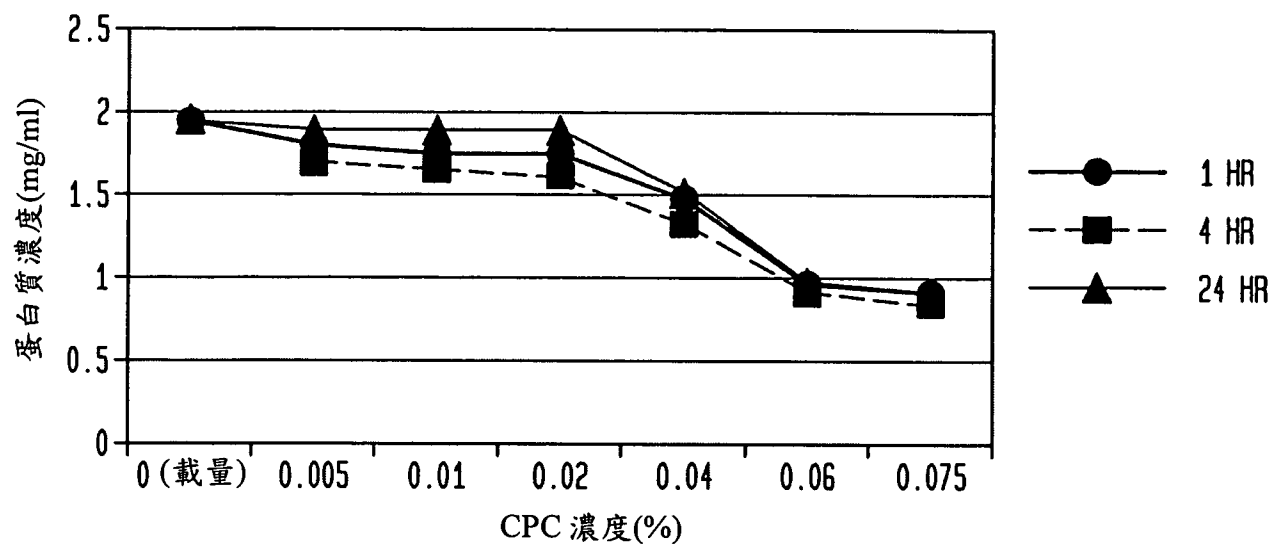


圖 1B

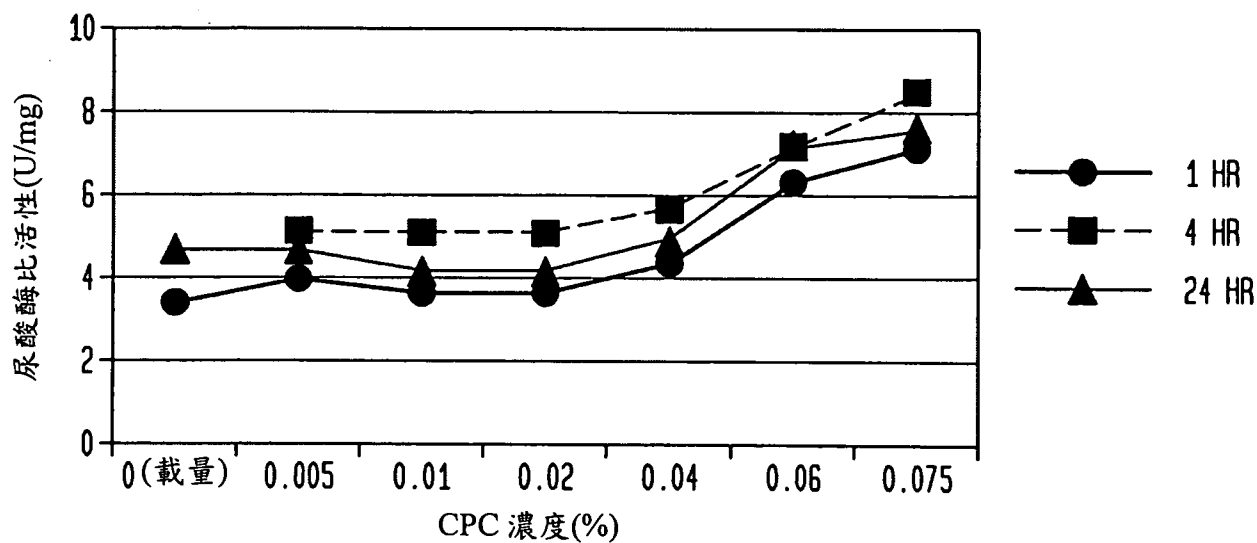


圖 1C

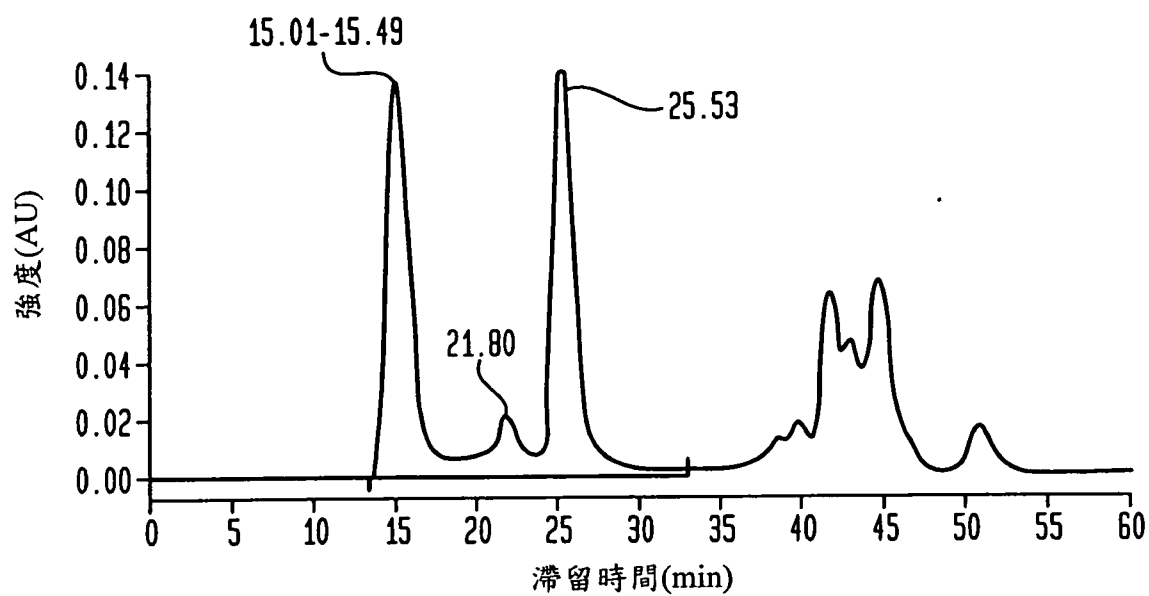


圖 2A

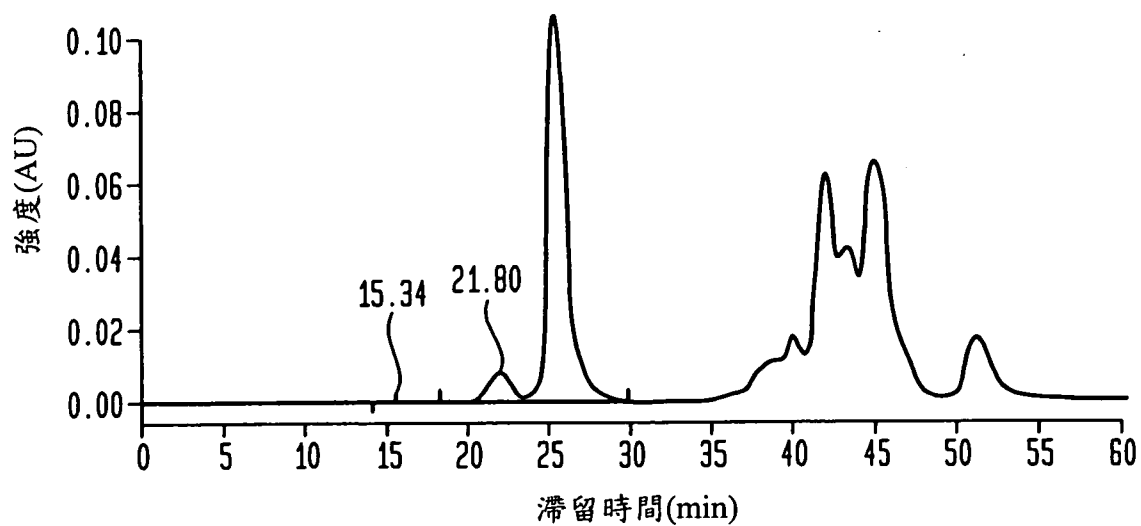


圖 2B

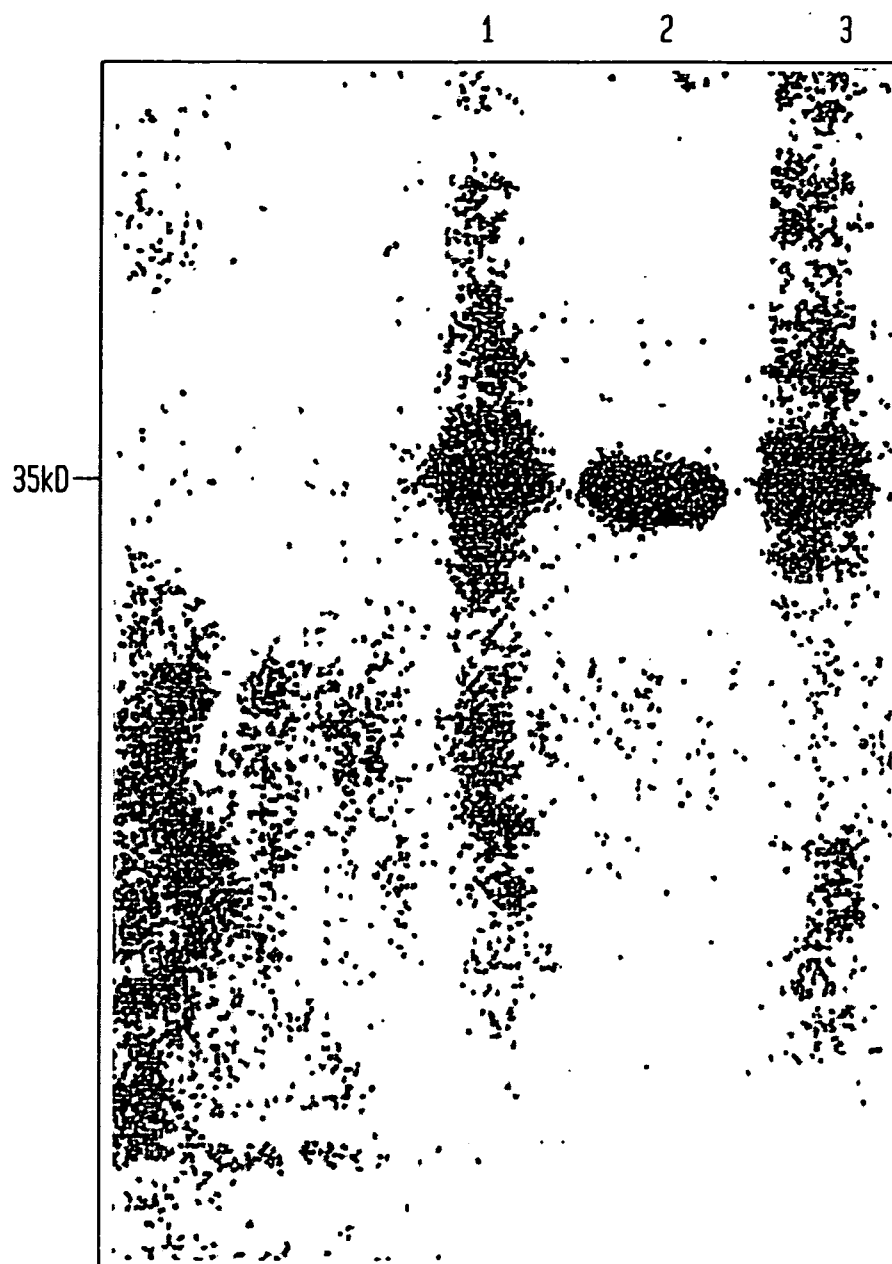


圖 3

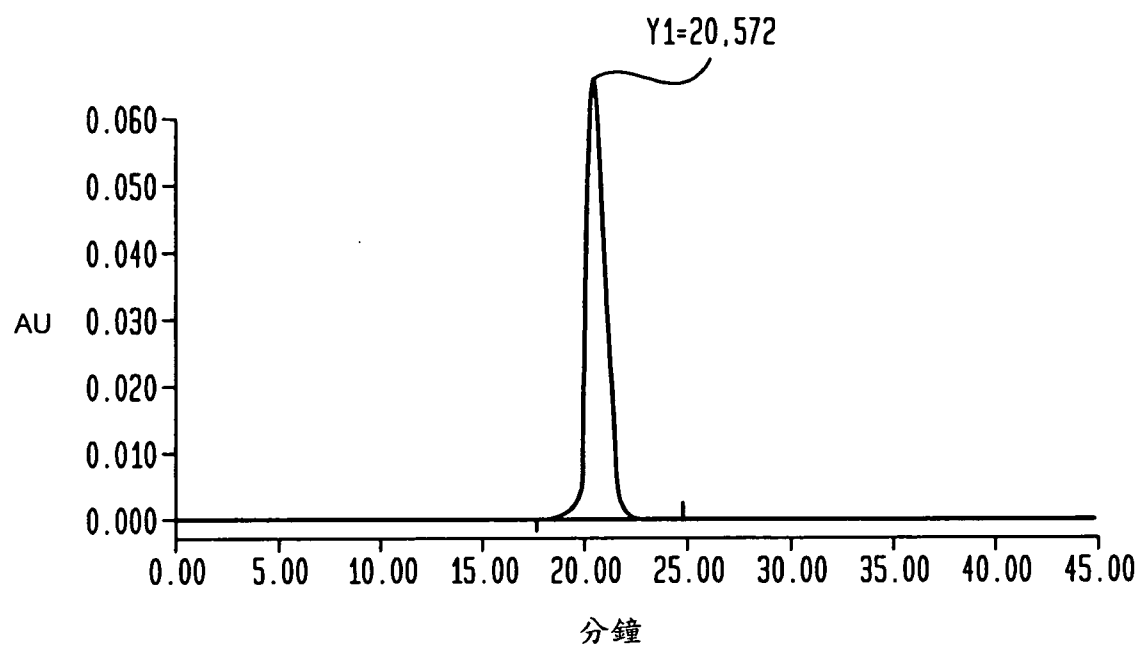


圖 4A

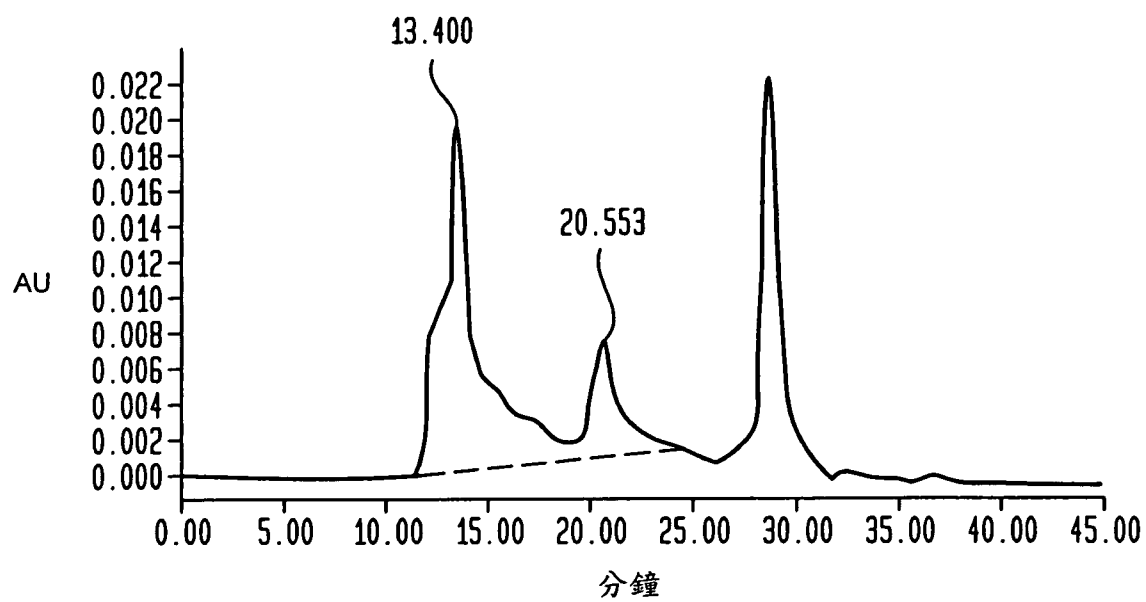


圖 4B

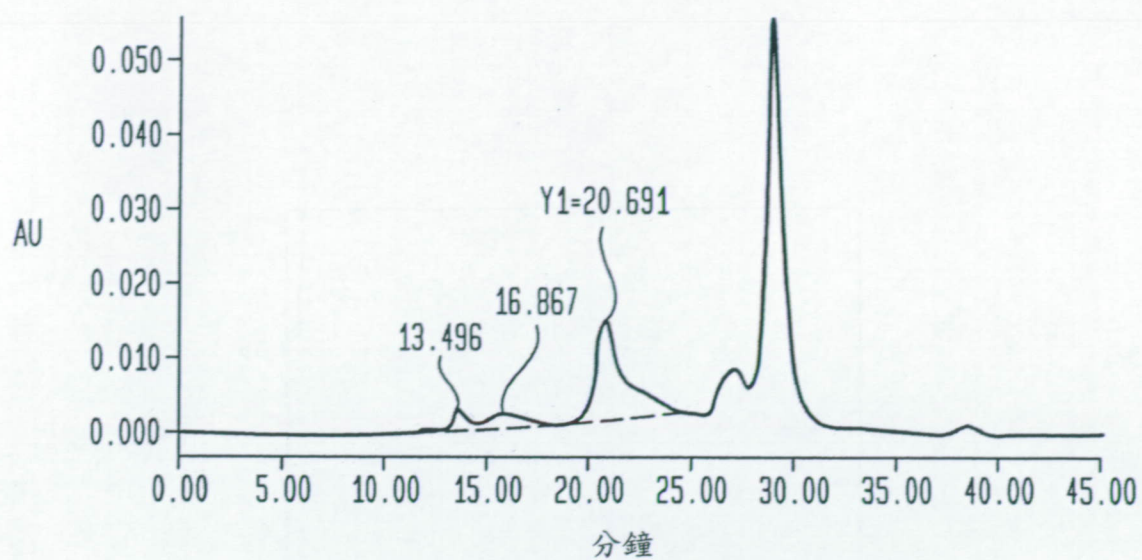


圖 4C

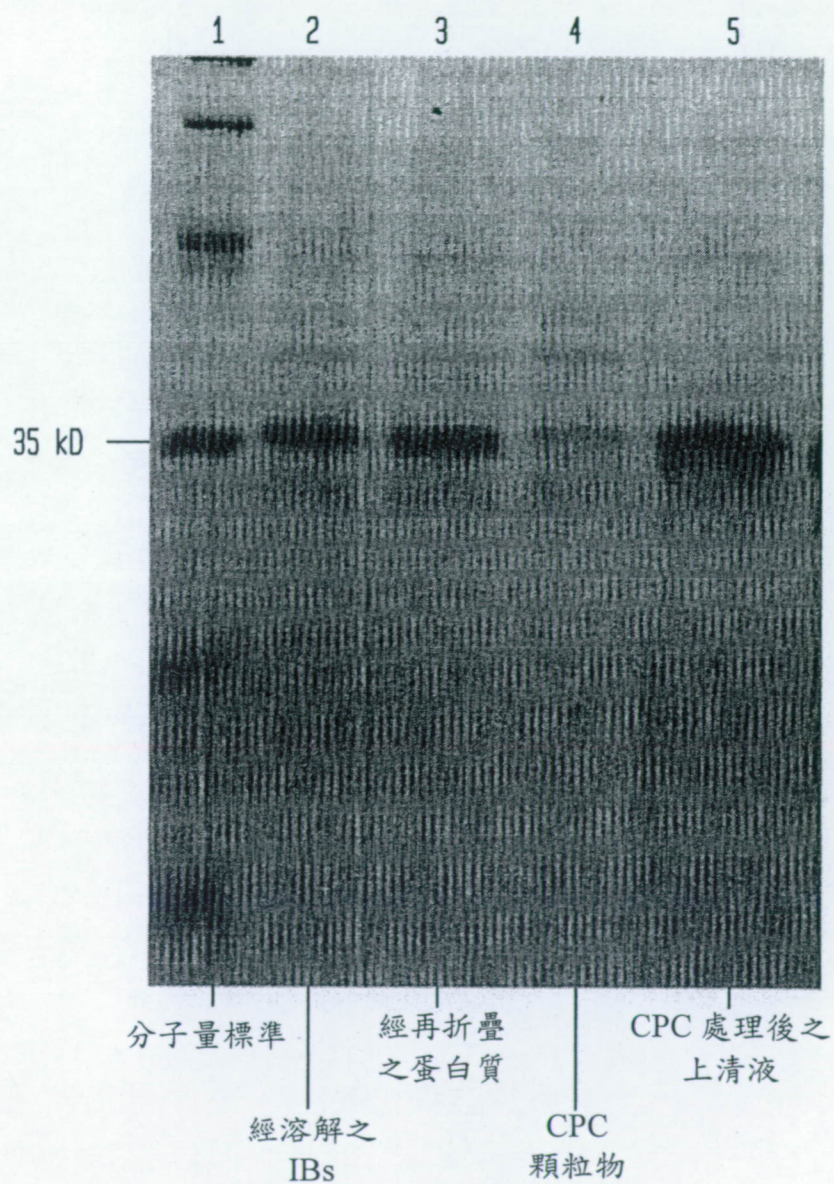


圖 5

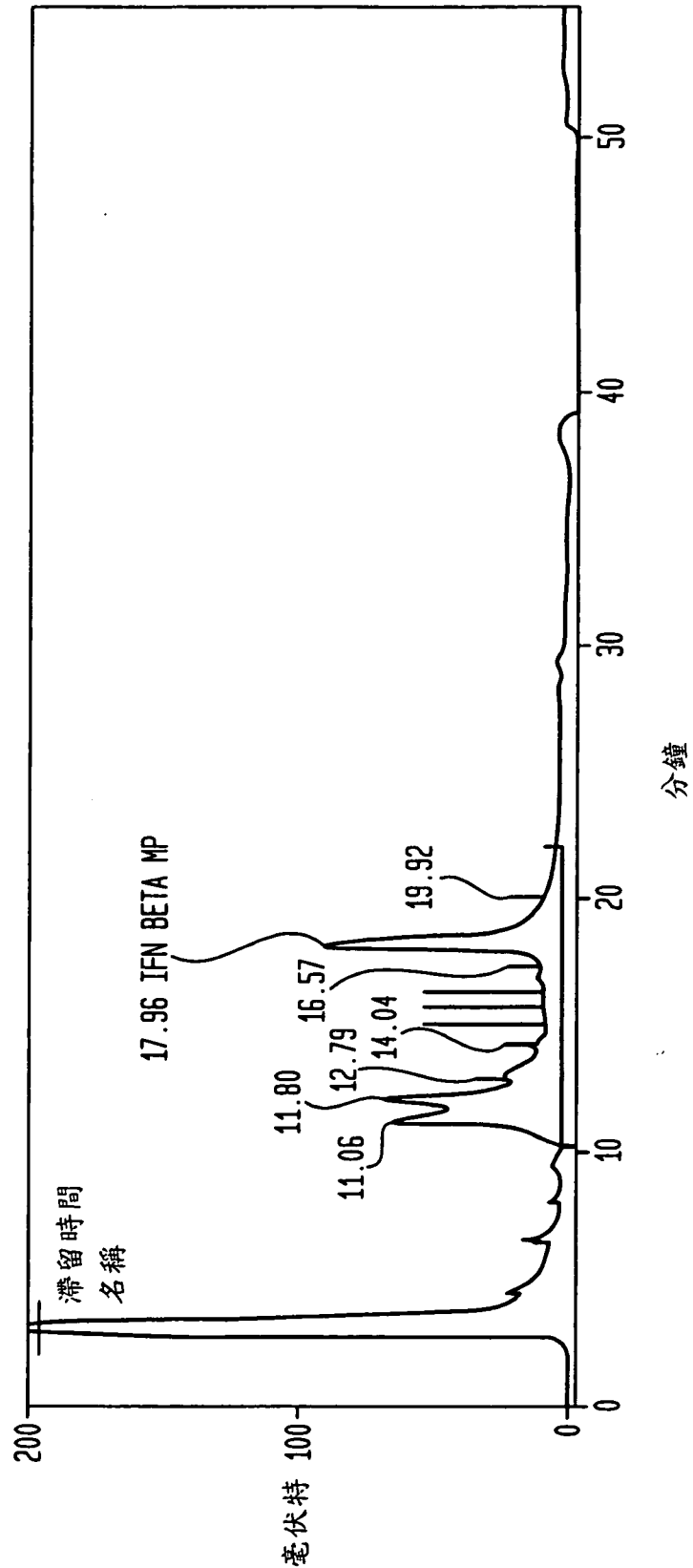


圖 6A

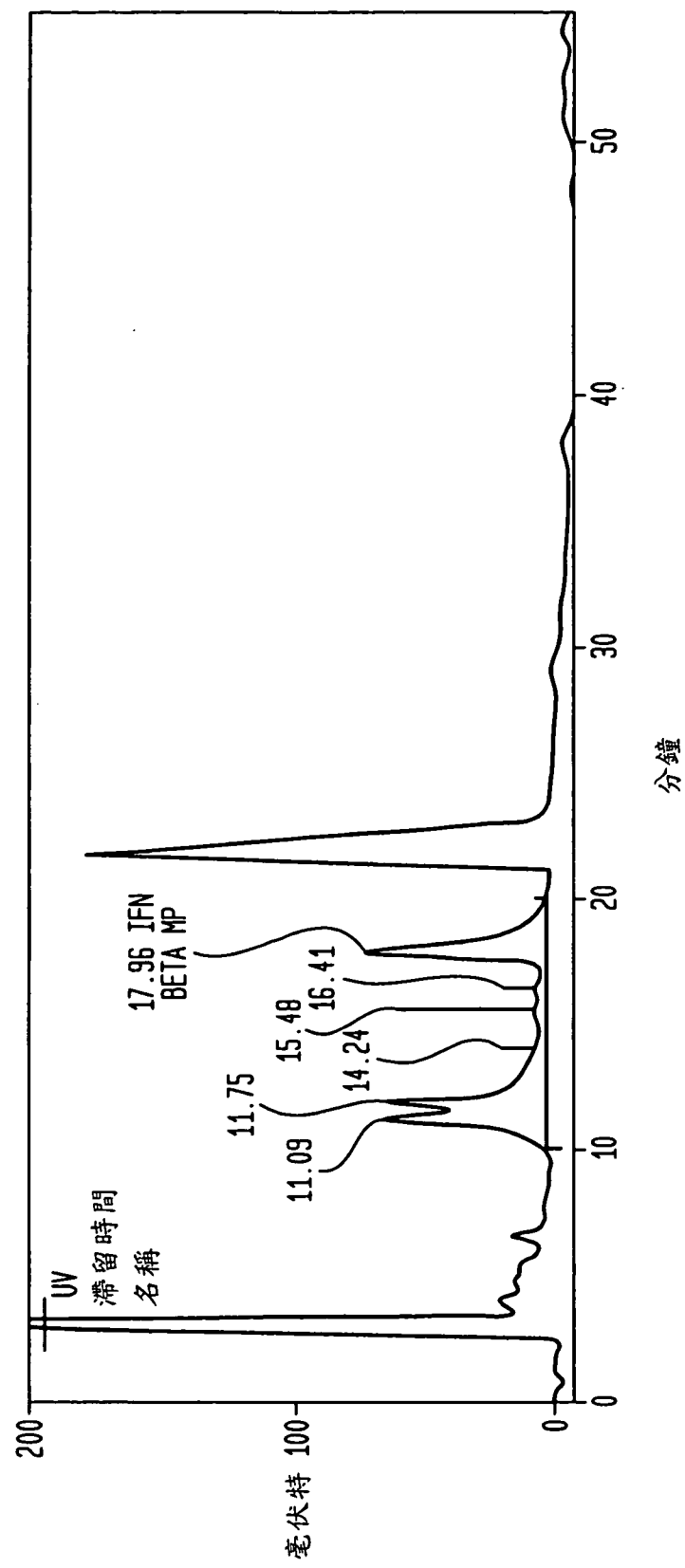


圖 6B