



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102977182 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201210398359.X

行.

(22) 申请日 2012.08.20

WO 2011090720 A2, 2011.07.28, 全文.

EP 1577319 A1, 2005.09.21, 权利要求 1, 6.

(30) 优先权数据

61/575,349 2011.08.19 US

61/666,240 2012.06.29 US

审查员 劳芳

(73) 专利权人 EMD 密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 N·比安 C·吉莱斯皮 M·T·斯通

M·科兹洛夫 J·陈 M·瓦克

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 安琪 张晓威

(51) Int. Cl.

C07K 1/18(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

(56) 对比文件

EP 1577319 A1, 2005.09.21, 权利要求 1, 6.

WO 2008025747 A1, 2008.03.06, 说明书第 9
页第 1-6 行, 第 8 页第 3-9 行, 第 7 页第 10-18

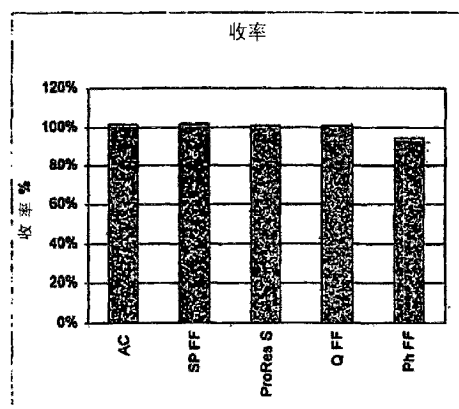
权利要求书1页 说明书42页 附图18页

(54) 发明名称

在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多
种杂质水平的方法

(57) 摘要

本发明涉及在蛋白质纯化过程中降低样品中
的一种或多种杂质水平的方法。本发明提供新的
和改进的蛋白质纯化方法,其引入某些类型的含
碳材料并且导致在对所需要的蛋白质产品的收率
没有不利影响的情况下有效地且选择性地去除某
些不需要的杂质。



1. 用于从蛋白 A 洗出液中纯化抗体的流通方法,其包括下述步骤:
 - (i) 使回收自蛋白 A 色谱柱的所述洗出液与活性碳接触,从而除去宿主细胞蛋白(HCP);
 - (ii) 使来自步骤(i)的流通样品与阴离子交换色谱介质接触;
 - (iii) 使来自步骤(ii)的流通样品与阳离子交换色谱介质接触;以及
 - (iv) 得到来自步骤(iii)的包含所述抗体的流通样品,其中所述洗出液连续流经步骤(i)-(iii),并且其中步骤(i)之后的所述流通样品中的 HCP 的水平小于在步骤(i)开始时在所述洗出液中的水平。
2. 权利要求1的流通方法,其还包括对来自步骤(iii)的所述流通样品进行病毒过滤。
3. 权利要求1的流通方法,其还包括在步骤(ii)和步骤(iii)之间使用在线静态混合器和/或缓冲罐来改变 pH。
4. 权利要求1的流通方法,其中所述方法使用单个制动器。
5. 权利要求1的流通方法,其中来自所述蛋白 A 色谱柱的所述洗出液在与活性碳接触前经过病毒灭活。

在蛋白质纯化过程中降低样品中的一种或多种杂质水平的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求申请日为 2011 年 8 月 19 日的美国临时专利申请 61/575,349 和申请日为 2012 年 6 月 29 日的美国临时专利申请 61/666,240 的优先权,其各自整体援引加入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及改进的色谱方法和在蛋白质纯化过程中降低一种或多种杂质水平的方法。

[0004] 背景

[0005] 色谱法在生物材料如单克隆抗体的纯化中是主要的纯化技术。

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

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

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

[0009] 发明概述

[0010] 本发明至少部分地基于以下令人惊讶的和出乎预料的发现:某些材料(如含碳材料例如活性碳(activated carbon))可以流通模式掺入到色谱柱基蛋白质纯化方法中,导致色谱柱负荷的减少,以及随之而来的色谱柱寿命的增加。

[0011] 进一步地,本发明基于以下令人惊讶的和出乎预料的发现:含碳物质(如活性碳)可以用于俘获色谱步骤的上游或下游以降低一种或多种杂质的水平。在本发明方法的一些实施方案中,使样品在阳离子交换(CEX)色谱步骤前与含碳材料接触。在其它实施方案

中,在样品与含碳材料接触前使用阳离子交换 (CEX) 色谱步骤。在另外的实施方案中,使样品在蛋白 A 亲和俘获步骤后与含碳材料接触。或者,可以在所述样品与含碳材料接触后使用蛋白 A 亲和色谱步骤。在某些实施方案中,可在蛋白 A 亲和俘获步骤后进行阴离子交换 (AEX) 流通色谱步骤,并且进行或不进行 CEX 色谱结合 / 洗脱步骤。在其它实施方案中,可以在非亲和俘获步骤 (如使用 CEX 结合和洗脱色谱法作为俘获步骤) 后使用含碳材料,并且随后进行 AEX 色谱步骤。

[0012] 进一步地,本发明提供色谱基蛋白质纯化方法,其包括比通常的方法更少的步骤。

[0013] 根据本发明的一个方面,提供减少一个或多个色谱柱上的负荷的方法。在一些实施方案中,这样的方法包括在包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与一个或多个含有亲和介质、AEX 介质、CEX 介质、HIC 介质或混合模式介质的色谱柱接触之前使所述样品以流通模式与以下之一接触,从而减少所述一个或多个色谱柱上的所述负荷:(i) 含碳材料;(ii) 含碳材料和 CEX 介质的组合;(iii) 含碳材料和 AEX 介质的组合;(iv) 含碳材料和混合模式介质的组合;(v) 含碳材料和 HIC 介质的组合,以及 (vi) 含碳材料和 CEX、AEX 和混合模式介质的组合。

[0014] 根据本发明方法的另一方面,提供降低含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中的一种或多种杂质水平的方法,其中所述方法包括以下步骤:(i) 在使所关注的蛋白质与一个或多个含有亲和介质、AEX 介质、CEX 介质、HIC 介质或混合模式介质的色谱柱结合的条件下,使含有所述所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与所述柱接触;(ii) 得到所述样品的第一洗出液;(iii) 使所述第一洗出液以流通模式与以下之一接触:(a) 含碳材料;和 (b) 含碳材料与 CEX 介质、AEX 介质、混合模式介质和 HIC 介质中的一种或多种的组合;以及 (iv) 得到所述样品的第二洗出液;其中相对于所述第一洗出液中的所述一种或多种杂质的水平,所述第二洗出液含有较低或降低水平的所述一种或多种杂质。

[0015] 在另一方面,提供降低包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中的所述一种或多种杂质水平的方法,其中所述方法包括以下步骤:(i) 使所述包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品与含有亲和介质的色谱柱接触;(ii) 得到所述样品的第一洗出液;(iii) 使所述第一洗出液以流通模式与含碳材料接触;(iv) 得到所述样品的第二洗出液;(v) 使所述第二洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及 (vi) 得到所述样品的第三洗出液,其中相对于所述第一洗出液未与所述含碳材料接触时的所述一种或多种杂质的水平,所述第三洗出液含有较低或降低水平的所述一种或多种杂质。

[0016] 在一些实施方案中,这样的方法包括在亲和俘获步骤之后和使样品与阴离子交换色谱介质 (在一些实施方案中是膜吸附剂) 接触之前的 CEX 结合和洗脱色谱步骤。在一些实施方案中,本发明的方法避免了进一步色谱步骤 (如在亲和俘获步骤后使用的结合和洗脱 CEX 色谱步骤) 的需要。示例性的可商购获得的阴离子交换色谱介质是膜吸附剂如 ChromaSorb™ (MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, USA)、Mustang Q (PALL CORPORATION, Port Washington, NY, USA)、Sartobind Q (SARTORIUS STEDIM, Germany) 以及珠介质 (bead medium) 如 Q Sepharose FF (GE HEALTHCARE, Philadelphia, PA, USA)。

[0017] 在一些实施方案中,本发明的方法使用非柱基 (non-column based) 色谱步骤。

[0018] 在另一个方面,提供降低包含所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质水平的方法,所述方法包括以下步骤:(i) 得到含有所述所关注的蛋白质的蛋白相;(ii) 使用合

适的缓冲液来复水所述含有所述所关注的蛋白质的蛋白相,从而得到复水的蛋白质溶液;(iii)使所述复水的蛋白质溶液以流通模式与含碳材料接触;(iv)得到包含所述所关注的蛋白质的第一洗出液;(v)使所述第一洗出液与阴离子交换色谱介质接触;以及(vi)得到包含所述所关注的蛋白质的第二洗出液,其中相对于当步骤(iii)中复水的蛋白质溶液不与所述含碳材料接触时所述一种或多种杂质的水平,所述第二洗出液含有较低的或降低的水平的所述一种或多种杂质。

[0019] 在一些实施方案中,这样的方法避免了任何结合和洗脱色谱步骤(如结合和洗脱亲和色谱或 CEX 色谱步骤)的需要。

[0020] 在一些本发明的方法中,使用一种或多种选自沉淀、絮凝、结晶、柱色谱法、使用可溶性小分子、使用聚合物配体、或使用悬浮色谱介质的方法得到蛋白相。

[0021] 在一些实施方案中,将含碳材料和 AEX 介质、CEX 介质、HIC 介质和混合介质中的一种或多种组合需要混合所述含碳材料和一种或多种这样的介质。在另一些实施方案中,将含碳材料和 AEX 介质、CEX 介质、HIC 介质和混合介质中的一种或多种组合需要在组合中按序使用不同的材料。

[0022] 在依照本发明方法的各种实施方案中,所述亲和介质选自蛋白 A 或蛋白 G。

[0023] 在一些实施方案中,所关注的蛋白质是抗体或含有 Fc 区的蛋白质。在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在另一些实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。

[0024] 在一些实施方案中,所述样品包含细胞培养料(cell culture feed)。

[0025] 在一些实施方案中,所述样品是澄清的细胞培养料。

[0026] 在一些实施方案中,所述澄清的细胞培养料是通过深层过滤(depth filtration)和/或离心得到的。

[0027] 在一些实施方案中,所述澄清的细胞培养料是通过用盐、酸、聚合物或刺激反应(stimulus responsive)聚合物沉淀得到的。

[0028] 在各种实施方案中,本发明的方法中使用的含碳材料是活性碳。在一些实施方案中,活性碳包括活性炭(activated charcoal)。

[0029] 在一些实施方案中,含碳材料和 CEX 介质、AEX 介质、混合模式介质和 HIC 介质中的一种或多种的组合包括活性碳和 CEX 树脂、AEX 树脂、混合模式树脂和 HIC 树脂中的一种或多种的混合物。在一些实施方案中,将这样的混合物填充入色谱柱中。在另一些实施方案中,将这样的混合物填充入盘中。在另一些实施方案中,将这样的混合物填充入仓(pod)、筒(cartridge)或囊(capsule)中。

[0030] 在一些实施方案中,将活性碳填充入色谱柱中。在另一些实施方案中,将活性碳填充入密封的一次性装置如 Millistalk+® Pod 中。在另一些实施方案中,将活性碳填充入筒或囊中。

[0031] 在一些实施方案中,将活性碳浸入(impregnate)多孔材料中,如将活性碳掺入到多孔纤维介质中。所述多孔材料可以容纳在柱、盘、Millistalk+® Pod、筒或囊中。在一些实施方案中,将活性碳填充入纤维素介质中。

[0032] 在一具体实施方案中,所述 AEX 介质是具有涂层表面的膜,所述表面涂层包含一种或多种聚合伯胺或其共聚物。

[0033] 在一些实施方案中,在包含所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品经亲和俘获

步骤之前使所述样品与活性碳接触。在另一些实施方案中,在亲和俘获步骤之后使样品与活性碳接触。

[0034] 在本发明的不同方法中,使用应用活性碳的方法所造成的所关注的蛋白质的收率的损失为少于总蛋白量的 20%。换句话说,本发明的方法导致 80%或更高的所关注的蛋白质的收率(总蛋白量为 100%)。在又一实施方案中,使用应用活性炭的方法所造成的所关注的蛋白质的收率的损失为少于 10%。换句话说,本发明的方法导致 90%或更高的所关注的蛋白质的收率(以总蛋白量为 100%)。

[0035] 在一具体实施方案中,活性碳用作从样品(如洗出液,例如从流通纯化步骤前进行的结合和洗脱色谱俘获工艺步骤中回收的蛋白 A 洗出液)中纯化靶分子(如含有 Fc 区的蛋白质或抗体)的方法中的流通纯化工艺步骤或单元操作的一部分。如在图 19 中所示,在这样的流通纯化工艺步骤或单元操作中,来自结合和洗脱色谱步骤(如蛋白 A 亲和柱)的洗出液先后流经活性碳、AEX 介质、CEX 介质和病毒过滤器。在一些实施方案中,在 AEX 步骤和 CEX 步骤之间进行溶液改变(如 pH 改变),其中所述溶液使用在线静态混合器(in-line static mixer)和/或缓冲罐(surge tank)。在一些实施方案中,如本文描述的使用活性碳的流通纯化工艺步骤或单元操作是纯化靶分子的连续过程的一部分,其中所述流通纯化步骤与所述流通纯化工艺步骤的上游工艺步骤(如结合和洗脱色谱俘获步骤)和下游工艺步骤(如配制(formulation)步骤)相流通,因此使液体样品能够连续流经该过程。

[0036] 在一具体实施方案中,完整的流通纯化工艺步骤或单元操作采用单个制动器(skid)(即控制或监控装置)。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1 描述了表明对于所评价的多种可商购获得的吸附介质中的每一种,在添加有多克隆 IgG 的零位(null)CHO-S 料的流通洗出液中测量 IgG 收率的实验结果的柱状图,所述吸附介质即活性碳(AC);琼脂糖阳离子交换树脂 SP Sepharose™ Fastflow(SPFF);聚合物阳离子交换树脂 ProRes™-S;琼脂糖阴离子交换树脂 QSepharose™(QFF);和琼脂糖 HIC 树脂 Phenyl Sepharose™ 6Fastflow(ph FF)。如图 1 所示,除了显示高达约 5%的 IgG 收率损失的 HIC 树脂外,证明所有其它筛查的介质没有可检测到的收率损失。

[0039] 图 2 描述了表明对于所评价的多种可商购获得的吸附介质中的每一种以及未处理的澄清料,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量 UV 280nm 活性物质的量的实验结果的柱状图,所述吸附介质即活性碳、Nuchar® RGC、(AC)、SPFF、ProRes™-S、QFF 和 ph FF。如图 2 所示,与其它吸附介质相比,活性碳显著降低了有色物质的量。

[0040] 图 3 描述了表明对于以上所列的多种可商购获得的吸附介质中的每一种以及未处理的澄清料,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白(HCP)浓度的实验结果的柱状图。用 Cygnus CHO-CM HCP ELISA 试剂盒测量 HCP 浓度(ng/mL)。如图 3 所证明,所有筛查的介质(包括活性碳)在一定程度上除去 HCP。然而,阳离子树脂 SPFF 和 ProRes™-S 除去 HSP 效率最高。

[0041] 图 4 描述了表明对于以上所列的每种介质以及未处理的澄清料,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量 DNA 浓度的实验结果的柱状图。使用 PicoGreen 测定测量 DNA 浓度(μ g/mL)。如图 4 所证明,每种介质在一定程度上除去 DNA。然而,阴离

子交换介质除去 HSP 效率最高,其次是活性碳。

[0042] 图 5 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的以上所列的所评价的每种介质(以每 10CV,至多 100CV 的载料量),在添加有多克隆 IgG 和鲑鱼精 DNA 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量 IgG 浓度的实验结果的 x-y 散布图。在 x 轴显示柱体积 (CV),并且在 y 轴显示 IgG 浓度 (mg/mL)。所有所评价的介质(包括 AC、SPFF、ProRes™-S 和 QFF)在装载多达 100CV 的未处理的澄清料时显示没有显著的 IgG 损失。

[0043] 图 6 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的所评价的每种介质(以每 10CV,至多 100CV 的载料量),在添加有多克隆 IgG 和鲑鱼精 DNA 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量 UV 活性物质峰面积(与对应于 UV 活性物质的量)的实验结果的 x-y 散布图。在 x 轴显示柱体积 (CV),并且在 y 轴显示蛋白 A 分析柱流通中的 UV 活性物质峰面积。在所有所评价的材料中,AC 除去多于 70% 的整个 100CV 的 UV 活性物质;QFF 除去约 10% 的整个 100CV 的 UV 活性物质;并且两种阳离子交换树脂 SPFF 和 ProRes™-S 除去最少量的 UV 活性物质。

[0044] 图 7 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的以上所列的所评价的每种介质(以每 10CV,至多 100CV 的载料量),在添加有多克隆 IgG 和鲑鱼精 DNA 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白 (HCP) 浓度的实验结果的 x-y 散布图。在 x 轴显示柱体积 (CV),并且在 y 轴显示 HCP 浓度 (ng/mL)。SPFF 和 ProRes™-S 除去整个 100CV 中最多的 HCP。QFF 除去一些 HCP 但很快通过。对于这种具有高浓度 DNA 的特定培养物,活性碳除去最少量的 HCP。

[0045] 图 8 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的所评价且以上所列的每种介质(以每 10CV,至多 100CV 的载料量),在添加有多克隆 IgG 和鲑鱼精 DNA 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中测量 DNA 浓度的实验结果的 x-y 散布图。在 x 轴显示柱体积 (CV),并且在 y 轴显示 DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。但每种被评价的介质(包括 AC、SPFF、ProRes™-S 和 QFF)在不同程度上除去整个 100CV 中的 DNA。

[0046] 图 9 是可用于去除杂质的操作的不同示例型模式的示意图。左侧的程序框图描述了将未处理的澄清料先后装载到含有 AC 的柱以及含有 SPFF、ProRes™-S 或 QFF 介质的柱中的代表性试验。中间的程序框图描述了将未处理的澄清料先后装载到含有 AC 的柱以及含有 SPFF 或 ProRes™-S 然后 QFF 的柱中的代表性试验。右间的程序框图描述了将未处理的澄清料装载到含有 1 : 1 (v/v) AC 和 SPFF 混合物、或 1 : 1 (v/v) AC 和 ProRes™-S 混合物、或 1 : 1 : 1 (v/v/v) AC 和 ProRes™-S 和 QFF 混合物的柱中的代表性试验。

[0047] 图 10 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图 9 所示的每种材料组合,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中的 UV 活性物质峰面积(对应于 UV 活性物质的量)的柱状图。活性碳和含有活性碳的混合物显著减少了 UV 活性物质。在活性碳和阴离子交换树脂都在一个方法中使用,无论是按序使用还是作为混合物使用,都除去更多的 UV 活性物质,这证明了不同材料间的协同效应。

[0048] 图 11 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图 9 所示的每种材料组合,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中宿主细胞蛋白 (HCP) 浓度的柱状图。所有的材料在一定程度上除去 HCP;然而,当活性碳与诸如 SPFF 或 ProRes™-S 的阳离子树脂或与诸如 QFF 的阴离子树脂在方法中一起使用时,无论是与树脂按序使用或与树脂作为混合物使用,除去 HCP 效率都是最高,这证明了不同材料间的协同效应。

[0049] 图 12 描述了表明对于包括未处理的澄清料在内的图 9 所示的每种材料组合,在添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料的流通洗出液中 DNA 浓度的柱状图。所有的材料在一定程度上除去 HCP;然而,当活性碳与 QFF 按序使用或与 QFF 作为混合物使用时,与其它所评价的材料和组合相比,DNA 去除更加有效。

[0050] 图 13 描述了表明对于每种所评价的材料(即 AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1(v/v/v)AC/SPFF/QFF 混合物和 1:1:1(v/v/v)PhFF/SPFF/QFF 混合物),在蛋白 A 柱洗脱合并液(elution pool)的流通洗出液中测量 IgG 收率的试验结果的柱状图。所评价的不同材料的流通洗出液的料是使用 Prosep Ultra Plus 蛋白 A 树脂从添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料产生的蛋白 A 柱洗脱合并液。所有筛查的材料显示高于 80% 的收率。

[0051] 图 14 描述了表明对于每种所评价的材料(即 AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1(v/v/v)AC/SPFF/QFF 混合物和 1:1:1(v/v/v)PhFF/SPFF/QFF 混合物),在蛋白 A 柱洗脱合并液的流通洗出液中测量宿主细胞蛋白(HCP)浓度的试验结果的柱状图。不同评价材料的流通洗出液的供应是使用 Prosep Ultra Plus 蛋白 A 树脂从添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料产生的蛋白 A 柱洗脱合并液。所有材料或材料组合从蛋白 A 洗脱合并液除去一定量的 HCP;然而,在单独使用时,活性碳和阳离子交换树脂更为有效。在作为混合物使用时,AC/SPFF/QFF 和 PhFF/SPFF/QFF 比任何单独成分除去更多的 HCP。在单独使用时,QFF 和 PhFF 除去最少量的 HCP。

[0052] 图 15 描述了表明对于每种所评价的材料(即 AC、SPFF、QFF、phFF)以及两种材料组合(1:1:1AC/SPFF/QFF 混合物和 1:1:1PhFF/SPFF/QFF 混合物),在蛋白 A 柱洗脱合并液的流通洗出液中测量 DNA 浓度的试验结果的柱状图。不同评价材料的流通洗出液的供应是使用 Prosep Ultra Plus 蛋白 A 树脂从添加有多克隆 IgG 的零位 CHO-S 料产生的蛋白 A 柱洗脱合并液。所有材料或材料组合从蛋白 A 洗脱合并液中除去一定量的 DNA,其中树脂混合物 AC/SPFF/QFF 和 PhFF/SPFF/QFF 表现出比任意单独成分微小的优势。

[0053] 图 16 是表明对于单克隆抗体溶液(其中所述溶液是使用蛋白 A 色谱法从澄清细胞培养物俘获到的(被称为蛋白 A 洗出液),并且随后进行三个单独的流通纯化组列(train))的各流分,测量相对于产物(即单克隆抗体)的 HCP 浓度(ppm)的实验结果的示意图。第一组列使用 0.2mL 的由 5 层组成的 ChromaSorb™阴离子交换膜装置;第二组列使用 1mL HD Nuchar 活性碳填充柱;并且第三组列先后使用 1mL 活性碳柱和 0.2mL 的 ChromaSorb™阴离子交换膜。从各纯化组列收集洗出液的十个 10mL 流分,并且分析所选流分的宿主细胞蛋白(HCP)和 IgG 浓度。示意图的 X 轴描述了从活性碳柱中收集 10mL(柱体积(CV))洗出液流分的终点。示意图的 Y 轴描述了对于活性碳洗出液各流分,相对于产物(即单克隆抗体)的 HCP 浓度(ppm)。该示意图显示了单独或与阴离子交换介质组合使用活性碳来流通处理亲和俘获洗出液对于从单克隆抗体溶液中除去杂质有预料不到的效果。

[0054] 图 17 是表明对于单克隆抗体溶液(其中所述溶液是使用阳离子交换(CEX)色谱法(被称为 CEX 洗出液)从澄清细胞培养物俘获到的,并且随后使用 1mL HDNuchar 活性碳填充柱进行纯化)的各流分,测量相对于产物(即单克隆抗体)的 HCP 浓度(ppm)的实验结果的示意图。收集七个 10mL 的洗出液流分,分析其宿主细胞蛋白(HCP)和 IgG 浓度。示意图的 X 轴描述了从活性碳柱中收集 10mL(洗脱体积(mL))洗出液流分的终点。示意图的

Y 轴描述了各流分相对于产物（即单克隆抗体）的 HCP 浓度（ppm）。该示意图证明活性炭可用于从多种不同的蛋白质溶液中除去杂质。

[0055] 图 18 是表明对于单克隆抗体溶液（其中所述溶液是使用配备有蛋白 A 柱的三柱连续多色谱色谱（CMC）系统从澄清细胞培养物获得的，并且随后先后使用填充到柱中的 HD Nuchar 活性炭和阴离子交换色谱装置（如 ChromaSorb™）纯化）的各流分，测量相对于产物（即单克隆抗体，MAb II）的 HCP 浓度（ppm）的实验结果的示意图。示意图的 X 轴描述了流分收集的终点，以阴离子交换装置的每单位柱体积装载的抗体重量（kg/L）测量。示意图的 Y 轴描述了各流分相对于产物（即单克隆抗体）的 HCP 浓度（ppm）。该示意图证明尽管单独使用时活性炭和 ChromaSorb™都除去极大量的 HCP，但当组合使用时，它们增加了起始溶液的纯度（从 1,370ppm HCP 到低于 10ppm）。

[0056] 图 19 表明了如本文所述的连接的流通纯化工艺步骤的示意图。含有活性炭的装置与阴离子交换装置直接连接。来自阴离子交换装置的流出物经过静态混合器（在此处加入酸溶液以降低 pH），然后经过阳离子交换流通装置和病毒过滤器。

[0057] 图 20 是描述测量经过阴离子交换装置（即 ChromaSorb™）后的 HCP 的实验结果的示意图。Y 轴表示 HCP 浓度（ppm）且 X 轴表示 AEX 载样量（kg/L）。

[0058] 图 21 是描述在流通纯化工艺步骤中测量作为病毒过滤装置装载功能的 MAb 聚集物的去除的实验结果的示意图。X 轴表示病毒过滤载样量（kg/m²）且 Y 轴表示病毒过滤后样品中的 MAb 聚集物的百分数。

[0059] 图 22 是描述测量深层过滤、活性炭和病毒过滤后的压力分布的实验结果的示意图。Y 轴表示压力（psi）且 X 轴表示时间（小时）。

[0060] 详述

[0061] 本发明提供用于从含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的样品中纯化所述所关注的蛋白质的新的和改进的方法。

[0062] 活性炭已被用于水纯化过程。另外，活性炭已被用于从血清白蛋白中除去小分子杂质如脂肪酸和胆红素（参见例如 Chen 等人，J. Biol. Chem.，242:173-181(1967)；Nakano 等人，Anal Biochem.，129:64-71(1983)；Nikolaev 等人，Int. J. Art. Org.，14:179-185(1991)）。活性炭也已被用于在植物病毒纯化过程中除去色素以及宿主蛋白、蛋白酶和核糖核酸酶（参见例如 Price，Am. J. Botany，33:45-54(1946)；Corbett，Virology，15:8-15(1961)；McLeana 等人，Virology，31:585-591(1967)）。

[0063] 因此，通常活性炭被报道为与溶液中的分子（如水样品中的杂质）非特异性结合。

[0064] 本发明至少部分地基于以下出乎预料的和令人惊讶的发现：活性炭可选择性地除去蛋白质杂质和 DNA 群体，从而用于通过细胞中的重组表达产生的蛋白质的纯化。

[0065] 如本文的实施例所证明，活性炭可用于在蛋白质纯化过程中选择性除去宿主细胞蛋白（HCP）和 DNA 杂质而不显著影响靶蛋白的收率。进一步地，如本文所述的实施例所证明，当活性炭以流通模式用于蛋白质纯化过程时（无论是单独使用或与一种或多种不同类型的色谱介质混合使用），其导致含有蛋白质的样品中的一种或多种杂质的水平显著降低以及减少下游色谱柱的负担。进一步地，在某些实例中，活性炭减少了纯化过程中可能使用的步骤数，从而降低了全部操作成本并节省了时间。进一步地，如本文所述的实施例所证明，活性炭可以在俘获步骤前或后使用，从而降低含有所关注的蛋白质的样品中的一种或

多种杂质的水平。

[0066] 在本文描述的一些实施方案中,活性碳用于纯化靶分子的整个方法的流通纯化步骤中,其中所述整个方法以及所述流通纯化步骤均以连续的方式进行。

[0067] 为了使本发明的内容更加容易理解,首先对某些术语进行定义。阐述的附加定义贯穿详述部分。

[0068] I. 定义

[0069] 本文使用的术语“含碳材料”是指任何由碳组成的或含有碳的物质。在一些实施方案中,所要求保护发明的方法中使用的含碳材料是活性碳或活化石。在一些实施方案中,活性碳包括活性炭。在一些实施方案中,将活性碳掺入纤维素介质中。

[0070] 在本文中互换使用的术语“活性碳”或“活化石”是指已经过增强其孔结构的过程的含碳材料。活性碳是具有非常高的表面积的多孔固体。它们可以来自多种来源包括煤、木材、椰子壳、坚果壳和泥炭。可以使用包括在受控气氛下加热的物理活化或使用强酸、碱或氧化剂的化学活化,从这些材料制备活性碳。活化过程产生具有高表面积的多孔结构,所述高表面积使活性碳具有高度杂质去除的能力。可改变活化方法以控制表面的酸度。

[0071] 典型的活化方法包括使碳源经历热过程(如使用氧化气体)或化学过程(如使用磷酸或金属盐如氯化锌),所述碳源例如树脂废料、煤、煤焦炭、石油焦炭、褐煤、聚合材料以及木质纤维素材料包括纸浆和纸、来自纸浆生产的残渣、木材(如木屑、锯屑和木粉)、坚果壳(如杏仁壳和椰子壳)、谷粒(kernel)和水果核(如橄榄核和樱桃核)。用磷酸(H_3PO_4)化学活化木材基碳的实例公开于美国专利 Re. 31, 093 中,其导致碳的脱色和气体吸附能力的改进。同样,美国专利 5, 162, 286 教导了木材基材料的磷酸活化,所述木材基材料密度特别大并且含有相对高(30%)的木素含量,如坚果壳、水果核和谷粒。在美国专利 5, 204, 310 中还讨论了作为制备高活性和高密度碳的步骤的木质纤维素材料的磷酸活化。本段中所列的这些专利中各自的教导整体援引加入本文。

[0072] 相对于大多其它吸附材料,活性碳被认为使用相对弱的范德华力或伦敦色散力与分子相互作用。典型的商业活性碳产品表现出至少 $300m^2/g$ 的表面积(通过本领域公知的基于氮吸附的 Brunauer-Emmett-Teller (“BET”) 方法测定)。

[0073] 虽然活性碳或活化石之前已用于纯化液体或气体的方法,但它之前还未用于从一种或多种蛋白质杂质中纯化重组表达蛋白的方法。

[0074] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或“IgG”或“抗体”(在本文中互换使用)是指具有由两条重链和两条轻链组成的基本四-多肽链结构的蛋白质,所述链通过例如具有特异性结合抗原能力的链间二硫键而被稳定化。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在本文中互换使用)是指具有由重链和轻链组成的二-多肽链结构的蛋白质,所述链通过例如具有特异性结合抗原能力的链间肽连接基而被稳定化。术语“结构域(domain)”是指通过例如 β -折叠片和/或链间二硫键而被稳定化的包含肽环(peptide loop)(如包含 3-4 个肽环)的重链或轻链多肽的球状区域。本文中的结构域进一步被称为“恒定的”或“可变的”,基于在“恒定的”结构域的情况下的不同类成员结构域中相对缺少组列变化,或在“可变的”结构域的情况下的不同类成员结构域中显著的变化。在本领域中抗体或多肽“结构域”通常被互换称为抗体或多肽“区”。抗体轻链的“恒定的”结构域被互换称为“轻链恒定区”、“轻链恒定结构域”、“CL”区或“CL”结构域。抗体重链的“恒定的”结构域被互换称为“重链恒

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

[0075] 免疫球蛋白或抗体可以是单克隆的或多克隆的,并且可以单体形式或聚合物形式存在,例如以五聚体形式存在的 IgM 抗体和 / 或以单体、二聚体或多聚体形式存在的 IgA 抗体。免疫球蛋白或抗体也可以包括多特异性抗体(如双特异性抗体)和抗体片段(只要它们保留或被修饰成包含配体特异性结合结构域)。术语抗体的“片段”或“功能片段”是指抗体的部分或局部或包含比完整的或全部的抗体或抗体链少的氨基酸残基的抗体链。可以通过化学处理或酶处理完整的或全部的抗体或抗体链得到片段。也可以通过重组方法得到片段。当重组生产时,可以单独或作为被称作融合蛋白的较大蛋白质的一部分表达片段。示例性的片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc 和 / 或 Fv 片段。示例性的融合蛋白包括 Fc 融合蛋白。

[0076] 在一具体实施方案中,本发明的方法用于纯化抗体片段,所述抗体片段是含有 Fc 区的片段。

[0077] 术语“Fc 区”和“含有 Fc 区的蛋白质”意指所述蛋白含有免疫球蛋白重链和 / 或轻链恒定区或结构域(之前定义的 CH 和 CL 区)。含有“Fc 区”的蛋白质可具有免疫球蛋白恒定结构域的效应物功能。“Fc 区”如 CH₂/CH₃区可与亲和配体如蛋白 A 或其功能性变体选择性结合。在一些实施方案中,含有 Fc 区的蛋白质与蛋白 A 或其功能性衍生物、变体或片段特异性结合。在另一些实施方案中,含有 Fc 区的蛋白质与蛋白 G 或蛋白 L 或它们的功能性衍生物、变体或片段特异性结合。

[0078] 如以上讨论的,在一些实施方案中,靶蛋白是含有 Fc 区的蛋白,如免疫球蛋白。在一些实施方案中,含有 Fc 区的蛋白质是包含与另一多肽或其片段融合的免疫球蛋白的 Fc 区的重组蛋白质。

[0079] 通常,免疫球蛋白或抗体针对所关注的“抗原”。优选地,所述抗原是生物学上重要的多肽,并且向患有疾病或病症的哺乳动物给药抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。

[0080] 在本文中互换使用的术语“单克隆抗体”或“Mab”是指得自实质上同种抗体的种群的抗体,即除了可能以较少量存在的可能自然发生的突变,该种群中的各抗体是一样的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单独的抗原基(antigenic site)。此外,相对于通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂,每个单克隆抗体针对抗原上单个决定子。修饰语“单克隆”表明作为从实质上同种抗体种群得到的抗体的特征,并且其不被解释为需要通过任何特定的方法产生抗体。例如,本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由 Kohler 等人,Nature 256:495(1975)记载的杂交瘤方法制备,或可以通过重组 DNA 方法(参见例如美国专利 4,816,567)制备。也可以使用 Clackson 等人,Nature 352:624-628(1991)和 Marks 等人,J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)中记载的方法,从噬菌体抗体库中分离“单克隆抗体”。

[0081] 单克隆抗体可以进一步包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和 / 或轻链的一部分与来自特定物质或属于特定抗体类或亚类的抗体的相应组列相同或同源,而链的剩余部分与来自另一物质或属于另一抗体类或亚类的抗体的相应组列相同或同源)以及这样抗体的片段,只要它们表现出期望的生物学活性(美国专利 4,816,567;以及 Morrison

等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :6851-6855(1984))。

[0082] 在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。包含氨基酸残基的高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”(即轻链可变结构域中的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3) 以及重链可变结构域中的残基 31-35(H1)、50-65(H2) 和 95-102(H3);Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1990)) 的氨基酸残基和/或那些来自“高变环(hypervariable loop)”(即轻链可变结构域中的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3) 以及重链可变结构域中的残基 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3);Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196 :901-917(1987)) 的残基。“框架”或“FR”残基是那些不同于本文定义的高变区残基的可变结构域残基。

[0083] 非人(如鼠)抗体的“人源化”形式是含有来自非人免疫球蛋白的最小组列的嵌合抗体。在大多数部分,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体(recipient antibody)),其中所述受者的高变区残基被具有所需的特异性、亲和性和能力的来自非人物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区残基(供体抗体)替代。在一些实例中,人免疫球蛋白的 Fv 框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。另外,人源化抗体可以包含在受者抗体或在供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体会包含实质上至少一个(通常为两个)可变结构域的全部,其中所有的或实质上所有的高变环对应于那些非人免疫球蛋白,并且所有的或实质上所有的 FR 区是那些人的免疫球蛋白组列的 FR 区。人源化抗体可以包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的部分。进一步的细节参见 Jones 等人, *Nature* 321 :522-525(1986);Riechmann 等人, *Nature* 332 :323-329(1988);和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 :593-596(1992)。

[0084] 在本文中互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”是指任意长度的聚合形式的核苷酸(无论是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸)。这些术语包括单链、双链或三链 DNA,基因组 DNA, cDNA, RNA, DNA-RNA 杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然的、通过化学或生物学方法修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的骨架可以包含糖和磷酸基团(如可通常在 RNA 或 DNA 中发现),或修饰的或替代的糖或磷酸基团。另外,可以通过合成互补链并在适宜条件下将该链复性(anneal),或者通过使用 DNA 聚合酶用适宜的引物从头合成互补链,来从化学合成的单链多核苷酸产物得到双链多核苷酸。核酸分子可以有多种形式,如基因或基因片段、一个或多个外显子、一个或多个内含子、mRNA、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、分离的任意组列的 DNA、分离的任意组列的 RNA、核酸探针以及引物。多核苷酸可以包括修饰核苷酸如甲基化核苷酸和核苷酸类似物、尿嘧啶(uracyl)、其它糖和诸如氟代核糖(fluororibose)和硫代酸酯(thioate)的连接基,以及核苷酸分支。本文使用的“DNA”或“核苷酸组列”不仅包括碱基 A、T、C 和 G,还包括任何它们的类似物或这些碱基的修饰形式如甲基化核苷酸、核苷酸间修饰如不带电的键和硫代酸酯、糖类似物的使用,以及修饰和/或备选的骨架结构如聚酰胺。

[0085] 本文使用的术语“溶液”、“混合物”或“样品”是指所关注的蛋白质或靶蛋白(例如含有 Fc 区的蛋白质如抗体)和一种或多种杂质的混合物。在一些实施方案中,将所述样品在经历本发明的方法前进行澄清步骤。在一些实施方案中,所述样品包括细胞培养料,例如来自哺乳动物细胞培养(如 CHO 细胞)的料。然而,样品还包括用于产生所关注的蛋白

质的非哺乳动物表达系统。

[0086] 本文使用的术语“非哺乳动物表达系统”是指所有用于产生治疗蛋白质的宿主细胞或生物体,其中所述宿主细胞或生物体是非哺乳动物来源。非哺乳动物表达系统的非限制性实例是大肠杆菌 (*E. coli*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。

[0087] 本文使用的术语“UV 活性物质”是指如通过 UV 分光光度计所监测的,澄清细胞培养物在经历蛋白 A 分析柱后的流通流分的组合物。在一些实施方案中,所述 UV 分光光度计监测 280nm 的流分。该流分通常由杂质(如染料(例如 pH 指示剂)、宿主细胞蛋白质、DNA 和其它需要从该流分中除去的细胞培养基成分)组成,还包含所关注的蛋白质(如抗体)。手动或通过预设算法积分流通杂质峰,并且用于定量总杂质水平。

[0088] 本文使用的术语“多肽”通常是指具有多于约 10 个氨基酸的肽或蛋白质。在本文中互换使用的术语“所关注的蛋白质”或“靶蛋白”是指欲通过本发明的方法从一种或多种杂质中纯化的蛋白质或多肽(包括但不限于含有 Fc 的蛋白质如抗体)。

[0089] 多肽的实例包括例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 α -链;胰岛素 β -链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;促黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子如因子 VIIIc、因子 IX、组织因子和维勒布兰德因子;抗凝血因子如蛋白 C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活剂,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);蛙皮素(combesin);凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和 - β ;脑啡肽酶;RANTES(调节正常表达和分泌的 T 细胞的激活);人巨噬细胞炎性蛋白质 MIP-1- α);血清白蛋白如人血清白蛋白;缪勒管抑制物质(Muellerian-inhibiting substance);松弛素 α -链;松弛素 β -链;松弛素原(prorelaxin);小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白如 β -内酰胺酶;DNase;IgE;细胞毒性 T-淋巴细胞关联抗原(CTLA)(如 CTLA-4);抑制素;激活素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;蛋白 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子 -3、-4、-5 或 -6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6),或神经生长因子如 NGF- β ;血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子如 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 蛋白质如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34 和 CD40;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素如干扰素 - α 、- β 和 - γ ;集落刺激因子(CSF),如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF;白介素(IL),如 IL-1 至 IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白(surface membrane protein);衰变加速因子;病毒抗原,例如艾滋病毒包膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM;肿瘤相关抗原,如 HER2、HER3 或 HER4 受体;以及任意上述所列的多肽的片段和/或变体。另外,本发明的蛋白质或多肽是与任意上述所列的多肽特异性结合的抗体、其片段或变体。

[0090] 在本文中互换使用的术语“污染物”、“杂质”和“残留物(debris)”是指任意外源的或不要的(objectionable)分子,包括生物大分子,如 DNA、RNA、一种或多种宿主细胞蛋白(HCP)、内毒素、脂质和一种或多种添加剂,其可能存在于含有使用本发明的方法从一种或多种外来的或不要的分子中分离的靶蛋白的样品中。另外,这样的污染物可以包括任何

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

[0091] 互换使用的术语“中国仓鼠卵巢细胞蛋白”和“CHOP”是指来自中国仓鼠卵巢(“CHO”)细胞培养物的宿主细胞蛋白(“HCP”)的混合物。HCP 或 CHOP 通常作为包含所关注的蛋白质(如在 CHO 细胞中表达的抗体或免疫粘附素)的细胞培养基或裂解液(如收集的细胞培养液(“HCCF”))中的杂质而存在。在包含所关注的蛋白质的混合物中存在的 CHOP 的量提供了所关注蛋白质纯度的量度。HCP 或 CHOP 包括但不限于由宿主细胞(如 CHO 宿主细胞)表达的所关注蛋白质。通常,以相对于蛋白质混合物中所关注的蛋白质的量的百万分数表示所述混合物中的 CHOP 的量。可以理解的是,当宿主细胞是另一种细胞类型(如除了 CHO 外的哺乳动物细胞、大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或植物细胞)时,HCP 是指在宿主细胞裂解液中发现的除靶蛋白之外的蛋白质。

[0092] 在本文中互换使用的术语“百万分之…”或“ppm”是指通过本发明方法纯化的靶蛋白的纯度的量度。单位 ppm 是指所关注的蛋白质(毫克/毫升)中 HCP 或 CHOP 的量(纳克/毫克)(即, $\text{CHOP ppm} = (\text{CHOP ng/ml}) / (\text{所关注的蛋白质 mg/ml})$,其中所述蛋白质是溶液的形式)。

[0093] 在本文中互换使用的术语“纯化”、“分开”或“分离”是指从含有所关注的蛋白质和一种或多种杂质的组合物或样品中提高所关注的多肽或蛋白质或靶蛋白的纯度。通常,通过从所述组合物中(全部或部分地)除去至少一种杂质来提高所关注的蛋白质的纯度。“纯化步骤”可以是导致“同质”组合物或样品的整个纯化方法的一部分,本文使用的组合物或样品是指在含有所关注的蛋白质的组合物中含有少于 100ppm HCP,或者少于 90ppm、少于 80ppm、少于 70ppm、少于 60ppm、少于 50ppm、少于 40ppm、少于 30ppm、少于 20ppm、少于 10ppm、少于 5ppm 或少于 3ppm 的 HCP 的组合物或样品。

[0094] 本文使用的术语“蛋白相”是指相对于样品中靶蛋白的初始浓度,靶蛋白浓度实质上增加的样品中的部分。浓缩方法可以包括在固相多孔或非多孔支持物上的蛋白质吸附;在液体-空气或液体-气体界面的蛋白质吸附;在两种不混溶或部分混溶的液体间界面的蛋白质吸附;作为纯的成分或作为含有一种或多种分子或聚合物的复合制剂的结果的蛋白质沉淀;或使用蛋白质结晶。

[0095] 本文使用的术语“液相”是指相对于样品中蛋白质的初始浓度,靶蛋白浓度实质上降低的样品中的部分。可以与如上述定义的蛋白相同时产生液相。

[0096] 在本文中互换使用的术语“流通过程”、“流通模式”和“流通色谱法”是指产品分离技术,其中样品中的至少一种产物意图流经色谱树脂或介质,而至少一种潜在成分与所述色谱树脂或介质结合。

[0097] 意图流经的样品通常被称为“流动相”。“流通模式”通常是等度操作(即期间流动相的成分不变的色谱方法)。用于流通的介质通常用含有靶蛋白分子的相同缓冲液预平衡。纯化后,可以使用另外量的相同缓冲液冲洗介质以增加产品的回收。在一些实施方案中,“流通模式”的流动相是含有所关注产物的细胞培养料。在一些实例中,调节料的 pH 或导电率以使用流通方法最大限度地除去杂质。

[0098] 在本发明的方法以及如本文所列的实施例所述的一些实施方案中,所述方法使用以流通模式进行的阴离子交换步骤。

[0099] 在本文中互换使用的术语“结合和洗脱方式”和“结合和洗脱过程”是指其中样品中含有的至少一种产品与色谱树脂或介质结合并随后被洗脱的产品分离技术。

[0100] 术语“色谱法”是指任意种类的将所关注的分析物（如含有 Fc 区的蛋白质如免疫球蛋白）与存在于混合物中或结合和洗脱过程中的其它分子分离的技术，其中作为混合物中各分子在流动相影响下流经固定介质的速率不同的结果，将所关注的分析物与其它分子分离。

[0101] 在本文中互换使用的术语“色谱树脂”或“色谱介质”是指任意种类的多孔或非多孔固相，其将所关注的分析物（如含有 Fc 区的蛋白质如免疫球蛋白）与存在于混合物中或结合和洗脱过程中的其它分子分离。通常，作为混合物中各分子在流动相影响下流经固定的固相的速率不同的结果，将所关注的分析物与其它分子分离。非限制性实例包括具有阳离子、阴离子、HIC 或混合模式表面修饰的树脂；具有阳离子、阴离子、HIC 或混合模式表面修饰的膜；具有阳离子、阴离子、HIC 或混合模式表面修饰的织造或非织造纤维；以及具有阳离子、阴离子、HIC 或混合模式表面修饰的整料（monolith）。

[0102] 本文使用的术语“亲和分离”或“亲和纯化”是指包括使含有靶分析物（如含有 Fc 区的蛋白质如免疫球蛋白）的样品与已知与所述靶分析物结合的亲和介质（如其上携带已知与所述分析物结合的亲和配体（例如蛋白 A 或其变体）的固体支持物）接触的任意纯化或测定技术。

[0103] 在本文中互换使用的术语“亲和色谱法”和“蛋白质亲和色谱法”是指其中将靶蛋白（如含有 Fc 区的所关注的蛋白质或抗体）与对所述靶蛋白具有特异性的配体特异性结合的蛋白质分离技术。在一些实施方案中，这样的配体是蛋白 A 或蛋白 G 或它们的功能性变体，其与色谱固相材料共价连接，并且当溶液接触色谱固相材料时容易接近溶液中的靶蛋白。在色谱步骤过程中，靶蛋白通常保留其对配体的特异性结合亲和力，而混合物中的其它溶质和 / 或蛋白质不与配体可测地或特异性地结合。靶蛋白与固定配体的结合允许污染蛋白质（contaminating protein）或蛋白质杂质通过色谱介质，而靶蛋白保持与固相材料上的固定配体特异性结合。随后在适宜的条件（如低 pH、高 pH、高盐、竞争配体等）下以活性形式从固定配体上移出该特异性结合的靶蛋白，并且随不含早些时候允许通过色谱柱的污染蛋白质或蛋白质杂质的洗脱缓冲液通过色谱柱。任意成分均可用作作用于纯化其各自的特异性结合蛋白质（如抗体）的配体。然而，在本发明的各种方法中，蛋白 A 用作含有 Fc 区的靶蛋白或抗体的配体。本领域技术人员可以容易地确定从配体（如蛋白 A）中洗脱靶蛋白（如含有 Fc 区的蛋白质）的条件。在一些实施方案中，蛋白 G 或功能性变体可用作配体，在一些实施方案中，在 pH 范围 5-9 下使用诸如蛋白 A 的配体与含有 Fc 区的靶蛋白结合，将该配体 / 靶蛋白结合物清洗或再平衡，随后用 pH 约为 4 或低于 4 的缓冲液洗脱。

[0104] 虽然亲和色谱法对于结合所关注的蛋白质是特异性的，但使用诸如蛋白 A 和蛋白 G 的配体的亲和色谱法往往相当昂贵并且色谱柱被非特异性物质（如一种或多种杂质）快速污染，导致工业上的巨大问题。本发明的方法提供通过使用通过从样品中除去一种或多种非特异性物质来减少色谱柱的负荷，从而降低整体费用并增加柱的使用寿命的材料（如活性炭）解决该方法的问题。另外，一些本发明的方法导致亲和色谱步骤后更少色谱步骤的使用，从而提高整体方法的效率。

[0105] 在重组生产的蛋白质的多步骤纯化中，通常在方法的早期将靶蛋白与存在于细胞

培养液中的多种不同的可溶性杂质分离是有益的。可以通过靶蛋白的色谱俘获或非色谱分离来实现该分离。

[0106] 本文使用的色谱“俘获”步骤包括将靶蛋白与恰好位于所收集的通过细菌发酵或细胞培养表达产生的原料的下游的色谱介质的结合。通常,将所收集的料澄清,然而也可以从未澄清的料实现俘获。该步骤的主要功能是使用最小量的可能的树脂从溶液中结合靶蛋白,但允许杂质流过。随后将靶蛋白洗脱入显著较小体积的缓冲液中以供进一步的下游处理。选择具有动态结合能力、回质 (mass recovery) 和靶的生物学活性保持的最佳组合的色谱介质。对于含有 Fc 结合区的抗体,通常使用亲和色谱介质,如那些基于蛋白 A 或蛋白 G 的亲和色谱介质。

[0107] 用于俘获的色谱介质选自多孔树脂、膜、整料、织造或非织造多孔材料。

[0108] 靶蛋白的非色谱分离可以通过一种或多种以下的步骤实现:在固相多孔或非多孔支持物上的蛋白质吸附;在液体-空气或液体-气体界面的蛋白质吸附;在两种不混溶或部分混溶的液体界面间的蛋白质吸附;作为纯的成分或作为含有一种或多种分子或聚合物的复合制剂的结果的蛋白质沉淀;或使用蛋白质结晶。

[0109] 术语“离子交换”和“离子交换色谱法”是指其中混合物中所关注的溶质或分析物(如含有 Fc 区的靶蛋白)与通过例如共价连接与固相离子交换材料连接的带电化合物相互作用,从而所述所关注的溶质或分析物与多于或少于所述混合物中的溶质杂质或污染物的所述带电化合物非特异性地相互作用的色谱方法。该混合物中污染物溶质从离子交换材料柱上的洗脱比所关注的溶质快或慢,或相对于所关注的溶质与树脂结合或从树脂中排除。“离子交换色谱法”特别包括阳离子交换、阴离子交换和混合模式离子交换色谱法。例如,阳离子色谱法可以结合靶分子(如含有 Fc 区的靶蛋白)随后进行洗脱(阳离子交换结合和洗脱色谱法或“CIE”),或者可以主要结合杂质而使靶蛋白“流经”该柱(阳离子交换流通色谱法 FT-CIE)。阴离子交换色谱法可以结合靶分子(如含有 Fc 区的靶蛋白)随后进行洗脱,或者可以主要结合杂质而使靶蛋白“流经”该柱。在一些实施方案中并且如本文所列的实施例证明,阴离子交换色谱步骤以流通模式进行。在一具体实施方案中,阴离子交换色谱步骤采用包括多孔基质和基质上的多孔涂层的多孔吸附介质,其中所述涂层含有一种或多种聚合伯胺或其共聚物。

[0110] 本文使用的术语“混合模式色谱法”或“多模式色谱法”是指采用携带至少两种不同类型的官能团(各自能够与所关注的分子相互作用)的色谱固相的方法。混合模式色谱介质的实例是 Capto™ Adhere (GE Healthcare), 其是 AEX 混合模式树脂。混合模式色谱法通常使用具有多于一种的与靶蛋白和/或杂质相互作用模式的配体。该配体通常包含至少两个不同的但协同的位点,其有待结合的物质相互作用。例如,这些位点之一可以与所关注的物质具有电荷-电荷类型相互作用,而其它位点可以与所关注的物质具有电子受体-供体类型相互作用和/或疏水和/或亲水相互作用。电子供体-受体类型相互作用包括氢键合、 $\pi-\pi$ 、阳离子- π 、电荷转移、偶极-偶极和诱导偶极相互作用。一般而言,基于相互作用总和的不同,靶蛋白和一种或多种杂质可以在一定范围的条件下分离。

[0111] 本文使用的术语“疏水作用色谱法”或“HIC”是指基于分子的疏水性(即它们从水溶液中吸附至疏水表面的能力)分离分子的方法。HIC 通常不同于反相 (RP) 色谱法,其区别在于特殊设计的 HIC 树脂(相对于 RP 树脂通常具有较低疏水性或疏水配体密度)。

[0112] HIC 色谱法通常依赖溶质分子表面疏水基团的不同。这些疏水基团倾向于与不溶基质表面上的疏水基团结合。由于 HIC 使用比反相液体色谱法更高极性、更少变性的环境，其更普遍用于蛋白质纯化（通常与离子交换或凝胶过滤色谱法组合使用）。

[0113] 术语“离子交换树脂”、“离子交换介质”和“离子交换材料”是指带负电（即阳离子交换树脂）或带正电（即阴离子交换树脂）的固相。可以通过将一种或多种带电配体附着在固相上（例如通过共价键或非共价涂层或吸附）来提供电荷。或者，或附加地，电荷可以是所述固相的固有特性。

[0114] 本文使用的术语“CEX”、“阳离子交换介质”、“阳离子交换树脂”和“阳离子交换材料”是指其带负电荷并且因此具有用于与经过或通过固相的水溶液中的阳离子交换的游离阳离子的固相。附着至固相上以形成阳离子交换树脂的负电荷配体可以是例如羧酸盐或磺酸盐。可商购获得的阳离子交换树脂包括羧甲基纤维、固定在琼脂糖（如来自 Pharmacia 的 SP-SEPHAROSE FAST FLOW™或 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™）上的磺丙基（SP）和固定在琼脂糖（如来自 Pharmacia 的 S-SEPHAROSE FAST FLOW™）上的磺酰基。

[0115] 本文使用的术语“混合模式介质”、“混合模式树脂”和“混合模式离子交换树脂”是指用阳离子基团、阴离子基团和疏水基团共价修饰的固相。可商购获得的混合模式离子交换树脂是 BAKERBOND ABX™（J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.），其含有弱阳离子交换基团、低浓度的阴离子交换基团以及附着在硅胶固相支持基质上的疏水配体。

[0116] 本文使用的术语“HIC 介质”或“HIC 树脂”或“HIC 材料”是指用于 HIC 分离的色谱材料。HIC 介质通常来自用疏水配体（例如短脂族或芳族基团）修饰的多孔色谱树脂。HIC 介质的实例包括 Butyl Sepharose FF 和 Phenyl Sepharose FF，两者均可以从 GE Healthcare 商购获得。商购 HIC 树脂的其它实例包括 Fractogel® Phenyl 和 Fractogel® Propyl（MERCK KGA, Darmstadt, Germany）、Butyl Sepharose® 和 Phenyl Sepharose®（GE HEALTHCARE）。

[0117] 本文使用的术语“AEX”、“阴离子交换介质”、“阴离子交换树脂”和“阴离子交换材料”是指带有正电荷（如具有附着于其上的一种或多种带正电的配体，例如伯氨基、仲氨基、叔氨基或季氨基）的固相。商购阴离子交换树脂包括 DEAE cellulose、QAE SEPHADEX™和 FAST SEPHAROSE™（PHARMACIA）。

[0118] 术语“蛋白 A”和“ProA”在本文中可互换使用，并且包括从其天生来源回收的蛋白 A、（如通过肽合成或通过重组技术）合成生产的蛋白 A、以及它们的保留结合具有 CH₂/CH₃ 区（如 Fc 区）蛋白质的能力的变体。蛋白 A 可商购自 Repligen, GEHealthcare and Lonza。蛋白 A 通常固定在固相支持材料上。术语“ProA”也指含有与蛋白 A 共价连接的色谱固相支持基质的亲和和色谱树脂或柱。

[0119] 可以通过对于小鼠 IgG2a 或人 IgG1 的 Fc 区的结合常数（至少 $K = 10^8 M$ ，优选 $K = 10^9 M$ ）表征本发明方法中使用的蛋白 A 功能性衍生物、片段或变体。符合这样的结合常数值的作用在本发明上下文中被称为“高亲和性结合”。优选地，这样的蛋白 A 的功能性衍生物或变体包括至少部分的野生型蛋白 A 的功能性 IgG 结合结构域（选自天然结构域 E、D、A、B、C）或其保留 IgG 结合功能性的工程突变体（engineered mutant）。

[0120] 本发明的“污染物蛋白 A”是任意类型的如上述定义的蛋白 A 或其功能衍生物的功能性 IgG 结合产物，其在从蛋白 A 亲和色谱柱中洗脱结合的抗体时得到。这样的污染物蛋白

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

[0121] 将分子与色谱树脂“结合”意味着在适宜条件（pH/ 导电率）下将分子暴露于色谱树脂，使得通过配体 - 蛋白质相互作用将所述分子可逆地固定在色谱树脂之中或之上。非限制性实例包括所述分子和离子交换材料的一个或多个带电基团间的离子相互作用以及蛋白 A 和免疫球蛋白间的生物特异性相互作用。

[0122] 术语“清洗缓冲液”或“平衡缓冲液”在本文中可互换使用，是指在洗脱所关注的多肽分子前用于清洗或再平衡色谱树脂的缓冲液。在一些情况下，清洗缓冲液和上样缓冲液可以相同。“清洗”色谱介质意味着包括使适宜的缓冲液通过或经过所述介质。

[0123] “洗脱缓冲液”用于从固相上洗脱靶蛋白。洗脱缓冲液的导电率和 / 或 pH 通常使得靶蛋白从色谱树脂上洗脱下来。

[0124] 从色谱树脂上“洗脱”分子（如所关注的多肽或杂质）意味着通过改变溶液条件而从中除去分子，使得缓冲液与所关注的分子竞争与色谱树脂结合。非限制性实例是通过改变离子交换材料周围的缓冲液的离子强度来从离子交换树脂上洗脱分子，使得所述缓冲液与所述分子竞争所述离子交换材料上的带电位点。

[0125] 本文使用的术语“洗出液”是指经由洗脱得到的含有所关注的分子的溶液，以及作为流通纯化结果得到的含有所关注的靶蛋白的流通流分。在一些实施方案中，术语“洗出液”是指从结合和洗脱色谱步骤（如蛋白 A 亲和色谱步骤）得到的洗脱合并液。在一些实施方案中，在具有或没有中间的病毒失活步骤的情况下，来自蛋白 A 亲和色谱步骤的洗出液流入使用活性炭的流通纯化过程。

[0126] 术语“固相”或“多孔基质”或“基质（base matrix）”是指一种或多种带电配体可粘附于其上的非水性材料。所述固相可以是纯化柱、多孔的或非多孔的离散颗粒的间断相、膜、织造或非织造纤维、整料或过滤器等。用于形成固相的材料的实例包括多糖（如琼脂糖和纤维素）；和其它机械稳定的基质如二氧化硅（如定孔玻璃）、聚（苯乙烯二乙烯基）苯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醚（polyvinyl ether）、尼龙、高分子量聚乙烯（HDPE）、聚醚砜、陶瓷和任意上述物质的衍生物。

[0127] “缓冲液”是通过其酸 - 碱结合物组分的作用抵抗 pH 改变的溶液。可以根据例如 Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., e d. Calbiochem Corporation (1975) 中描述的缓冲液的期望 pH 使用不同的缓冲液。在本发明的方法的一些步骤中，缓冲液具有 2.0 至 4.0，或 2.8 至 3.8 的 pH。在本发明的其它步骤中，缓冲液具有 5.0 至 9.0 的 pH。在本发明的其它步骤中，缓冲液具有 4.0

至 6.5 的 pH。在本发明的方法的其它步骤中,缓冲液具有低于 4.0 的 pH。控制 pH 在该范围的缓冲液的非限制性实例包括 MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和铵缓冲液,以及这些的组合。

[0128] 术语“导电率”是指水溶液在两个电极间传导电流的能力。在溶液中,电流通过离子转运流动。因此,随着水溶液中存在的离子量的增加,溶液会具有更高的导电率。导电率的测量单位是毫西每厘米 (mS/cm 或 mS),并且可以使用商购的电导仪(如 Orion 出售的)测量。可以通过改变溶液中的离子浓度而改变其导电率。例如,可以改变溶液中的缓冲剂浓度和 / 或盐(如 NaCl 或 KCl)浓度以达到期望的导电率。优选地,改变不同缓冲液中的盐浓度以实现如以下实施例中的期望导电率。

[0129] 多肽的“pI”或“等电点”是指多肽的正电荷与其负电荷平衡时的 pH。可以从氨基酸残基或多肽上附着的碳水化合物的唾液酸残基的净电荷计算 pI,或可以通过等电聚焦测定 pI。

[0130] 本文使用的“滤液”是指样品通过介质的部分。

[0131] 本文使用的“保留物 (retentate)”是指基本被介质保留的样品部分。

[0132] 本文使用的术语“澄清”是指通过除去悬浮颗粒来降低含有蛋白质的溶液的(如在 NTU 中测定的)浊度的过程。澄清可以通过多种方法实现,包括分批和连续离心、深层过滤、正常和正切流动过滤以及沉淀(包括用小分子或聚合物物质进行凝絮),或这些方法的任意组合。

[0133] 短语“减少色谱柱的负荷”是指对含有蛋白质的样品的处理或加工,其中所述处理或加工导致减少了色谱柱的污垢,蛋白质样品随后被装载在所述色谱柱上。在典型的色谱试验中,可能有非洗出液质或杂质留在固定相上,从而导致色谱柱的污垢。该问题在放大规模时进一步加剧,其中由于存在的杂质水平增加导致柱污垢程度增加。柱污垢还导致通常相当昂贵的柱寿命的显著减少。本发明的方法提供改进的方法用于显著减少色谱柱的负荷,从而增加柱的寿命并导致蛋白质收率提高。本发明的方法导致在将样品装载到色谱柱前除去显著量的杂质,从而减少柱的负荷。典型的杂质包括宿主细胞蛋白、DNA、脂肪酸(来自细胞碎片)、染料分子、消泡剂等。

[0134] 在本文中互换使用的术语“工艺步骤”或“单元操作”是指在纯化过程中使用一种或多种方法或装置以实现特定的结果。可以在本文描述的方法或系统中使用的工艺步骤或单元操作的实例包括但不限于澄清、结合和洗脱色谱俘获、病毒灭活、流通纯化和配制。应理解,每种工艺步骤或单元操作均可使用多于一个步骤或方法或装置以实现该工艺步骤或单元操作的预期结果。例如,在一些实施方案中,如本文描述的流通纯化步骤可以使用多于一个步骤或方法或装置以实现该工艺步骤或单元操作,其中至少一个这样的步骤包括活性炭。在一些实施方案中,用于进行工艺步骤或单元操作的一种或多种装置是一次使用的或一次性的,并且可以在不需要在方法中替换任何其它装置或甚至停止方法运行的情况下被移除和 / 或替换。

[0135] 本文使用的术语“合并液罐 (pool tank)”是指其通常在多个工艺步骤间使用并且具有能够收集来自工艺步骤的整个体积的产品的尺寸 / 容积的任何容器、器皿、贮液器 (reservoir)、罐或袋。合并液罐可用于保持或储存或处理来自工艺步骤的整个体积的溶液状态的产品。在一些实施方案中,本文描述的方法避免了使用一个或多个合并液罐的需要。

[0136] 本文使用的术语“缓冲罐”是指在多个工艺步骤间或一个工艺步骤中（如当单独的工艺步骤包括多于一个步骤时）使用的任何容器、器皿或袋；其中来自一个步骤的产物流经缓冲罐进入下一个步骤。因此，缓冲罐不同于合并液罐，在于它不意图保留或收集来自某步骤的整个体积的产物；但能够使产物从一个步骤连续流到下一个步骤。在一些实施方案中，本文描述的方法或系统中的两个步骤间或一个步骤中使用的缓冲罐的容积不超过来自工艺步骤的产物的总体积的 25%。在另一个实施方案中，缓冲罐的容积不超过来自工艺步骤的产物的总体积的 10%。在一些其它实施方案中，缓冲罐的容积小于生物反应器中细胞培养物的整个体积的 35%、或小于 30%、或小于 25%、或小于 20%、或小于 15%、或小于 10%，其构成欲从中纯化靶分子的原料。在一些实施方案中，在先后使用活性炭、AEX 色谱法、CEX 色谱法和病毒过滤的流通纯化工工艺步骤中使用缓冲罐，其中所述缓冲罐用于在 AEX 色谱步骤之后进行溶液的改变。

[0137] 本文使用的术语“连续方法”是指用于纯化靶分子的方法，其包括两个或更多个工艺步骤（或单元操作），使得来自一个工艺步骤的产物直接流入该方法中下一个工艺步骤而没有中断，并且其中所述两个或更多个工艺步骤可以在它们的至少一部分持续时间同时进行。换言之，连续方法避免了在纯化过程中在进行下一工艺步骤前完成工艺步骤的需要。术语“连续方法”还用于一个工艺步骤中的多个步骤，在该情况中，在进行包括多个步骤的工艺步骤期间，样品连续流经该工艺步骤中必须进行的多个步骤。因此，在一些实施方案中，以连续方式进行使用活性炭的流通纯化步骤，其中来自先于流通纯化步骤的结合和洗脱色谱步骤（如蛋白 A 色谱俘获步骤）的洗出液先后流入（填充入纤维素介质中的）活性炭步骤、AEX 色谱步骤、CEX 色谱步骤以及病毒过滤步骤。

[0138] 术语“静态混合器”是指用于混合两种流体材料（通常是液体）的装置。该装置通常由在圆柱状（管）壳（housing）中所含的混合器元件（也被称为非移动元件）组成。当液流流经静止混合器时，所述非移动元件将所述材料连续混合。完全混合取决于许多变量，包括流体的特性、管的内径、混合元件的数目和它们的设计等。在本文描述的一些实施方案中，在本文描述的方法中（如在 AEX 色谱步骤和 CEX 色谱步骤之间）使用一个或多个静止混合器。

[0139] 本发明进一步通过以下实施例进行说明，所述实施例不应解释为限制性的。所有在本申请全文中引用的参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图援引加入本文。

[0140] II. 用于本发明的方法中的示例性含碳材料

[0141] 在本发明的方法中，特定的含碳材料如活性炭被用于蛋白质的纯化。活性炭可被描述成具有非常高的表面积的多孔固体。在一些实施方案中，活性炭包括活性炭。活性炭可以来自多种来源，包括但不限于煤、木材、椰子壳、坚果壳和泥炭。可通过使用包括在受控气氛下加热的物理活化或使用强酸、碱或氧化剂的化学活化，从这些材料制备活性炭。活化过程产生有高表面积的多孔结构，所述高表面积使活性炭具有更高的杂质去除的能力。可改变活化过程以控制表面的酸度。

[0142] 活性炭可以从多种不同的商业途径得到并且具有多种级别和形式。活性炭的一些商业提供者包括诸如 MeadWestVaco Corp., Richmond, VA, USA; Norit Americas Inc., Marshall, TX, USA; Calgon Carbon Corp., Pittsburgh, PA, USA 的公司。

[0143] 活性炭的两种主要的形式是粉状和颗粒状的。粉状活性炭含有小（通常直径小于

1mm) 的颗粒,并且最常用于液体的纯化。颗粒状活性炭有较大的粒度并因而具有较小的表面积,所以其优选用于气体纯化,其中扩散速度更快。

[0144] 在消费者应用(如水、食品、饮料和药物的纯化)中使用活性炭的安全性的重要考虑是可提取化合物的减少和控制。意图供饮用水和食品接触应用的活性炭通常依照安全标准 ANSI/NSF Standard 61(其覆盖所有加入水中的间接添加剂)制备。同样,ASTM 标准测试方法 D6385 描述了通过灰化测定活性炭中的酸可提取成分,并且可以用于研究和将来自活性炭的可提取物水平降到最小。

[0145] 多种活性炭类型对于各种应用是可获得的。例如, *MeadWestVaco Corp.* 提供至少 12 种类型的粉状活性炭,它们的容量、表面酸度、对靶分子的孔易接近性(pore accessibility)以及预期应用不同。通常期望将活性炭的容量最大化以用于杂质的去除。

[0146] 在本文所述的一些实施方案中,活性炭被掺入到纤维素介质中。

[0147] III. 常规流通纯化方法

[0148] 最常见的流通纯化方法显然依赖于所关注的靶蛋白和欲除去的杂质间不同的表面相互作用。例如,单克隆抗体的常规 AEX 流通纯化依赖于大多数抗体的等电点高于其它蛋白质和核酸并且通常高于 7 的事实。由此,在低于被纯化抗体的 pI 的 pH 下进行 AEX 流通纯化方法,以确保固定相和抗体具有相同的电荷并且从而所述抗体流经介质而没有与表面显著结合。另一方面,许多蛋白质杂质核酸及内毒素具有低于抗体的 pI,其通常低于 7,并且因此它们与 AEX 介质的表面结合。

[0149] 像大多数离子交换色谱过程一样, AEX 流通纯化通常对溶液的导电率敏感并且通常在较高盐度时效果较低。在一典型的单克隆抗体纯化方法中, AEX 流通纯化有时被称为在一个或多个结合和洗脱柱色谱步骤后的“精制步骤”。

[0150] 两种最常用的工艺模板如下所示:

[0151] 1) 蛋白 A 俘获→ CEX 结合和洗脱纯化及浓缩→稀释→ AEX 流通

[0152] 2) 蛋白 A 俘获→ AEX 流通→ CEX 结合和洗脱纯化及浓缩

[0153] 除了这些常用的工艺模板外,有时也使用其它纯化方案,包括 CEX 俘获及使用混合模式的和无机的结合和洗脱树脂(如 *Ceramic Hydroxyapatite*, CHT)。一般而言,流通纯化的目的是除去痕量水平的杂质,而使用结合和洗脱步骤进行纯化的主体。然而,从主要使用结合和洗脱步骤到流通纯化过程的转变可以是非常节省成本的解决办法,其节省时间、试剂及操作成本。因此,本文所述的方法提供对于常规方法的可行的解决方法,其中它们更加节省成本的并且降低整体的制造和操作成本。

[0154] 在本文所述的一些实施方案中,提供改进的流通纯化方法,其使得流通纯化能够以连续方式进行。

[0155] IV. 纯化过程中含碳材料的使用

[0156] 如以上讨论的,本发明提供使用活性炭的新的和改进的纯化方法。活性炭可以直接加入到纯化步骤中,并且可以随后通过沉淀或过滤除去;或者可以使溶液或气体通过含有活性炭的装置。活性炭可以独立地填充如合适的装置中或可以与其它增强其机械、流动或分离性质的物质混合。例如,活性炭可被掺入到含有纤维素的湿法铺设纤维介质中,随后密封入一饮性装置(如得自 *Millipore Corporation* 的 **Millistak+®** Pod CR,或得自 *Pall Corporation*, Port Washington, NY, USA 的 **Seitz®** AKS Filter Media) 中。活性炭的另一种

形式是活性碳块 (block), 其中活性碳通过与热塑性粉末一起压制而被掺入到多孔整料中。与色谱介质类似, 颗粒形式的活性碳也可被填充到柱中, 或其可被填充入合适的装置中。通常公认活性碳介质用于脱色、小分子杂质的去除等。例如, 得自 Pall Corporation 的数个等级的活性碳介质可以基于靶杂质的分子量进行选择。提供三种分子量范围: 200-400、400-1,000 和 400-1,500 道尔顿, 后面的最大。然而, 任何商购的活性碳介质均未被描述用于从生物样品中选择性除去分子量为 2000 至 200,000 道尔顿的更大的杂质。

[0157] 本发明至少部分地基于以下令人惊讶的发现: 活性碳能够选择性地结合不期望的杂质 (如 HCP 和 DNA), 同时表现出可忽略不计的与靶蛋白的结合。

[0158] 本发明还认识到与所有吸附材料相似, 活性碳的吸附能力并非无限的这一事实。例如, 在 CHO-S 料的情况中, 当 HCP 和 DNA 以如实施例 1 中所示的典型料中观测到的浓度存在时, 活性碳表现出有效地除去这些物质。然而, 如实施例 2 中所示, 发现添加 DNA 至鲜有的高水平抑制活性碳的 HCP 去除效率。

[0159] 在靶蛋白俘获步骤之前或之后, 活性碳也可以在除去可能存在于靶蛋白溶液中的细胞培养基的潜在成分中高度有益。细胞培养基中的典型成分包括表面活性剂 (如 Pluronic® F68)、胰岛素、抗生素、甲氨蝶呤和止泡剂。由于存在这些成分中的一些会被携带入纯化的靶蛋白的风险, 在蛋白纯化组列中加入能够除去这些成分的步骤是有利的。如进一步被本文的实施例所证明, 活性碳可用于纯化过程中以除去这样的成分。

[0160] 以下是掺入活性碳作为一个或多个中间步骤 (其通过下划线显示在下表 I 中) 的蛋白质纯化方法的实例。应理解可以使用这些方法的许多变体。

[0161] 表 I

[0162]

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

[0163] 通常, 在上表中, 用亲和介质结合和洗脱和 / 或用 CEX 介质结合和洗脱步骤可以以下三种模式中的任一种操作: (1) 分批模式, 其中将靶蛋白上样到介质上, 停止上样, 清洗和洗脱介质, 并收集合并液; (2) 半连续模式, 其中连续进行上样, 而洗脱是间歇的 (如在连续多柱色谱法的情况下); 以及 (3) 完全连续模式, 其中上样和洗脱二者均连续进行。

[0164] 在一些实施方案中, 在上表中描述的一种或多种方法中, 如本文描述的, 病毒灭活

步骤可以在结合和洗脱步骤后以及使洗出液经历流通纯化步骤前进行。

[0165] 应理解,本文描述的和上表中的方法可以进一步使用额外的步骤以及在线或经缓冲罐改变溶液状态的步骤。在本文所述的一些实施方案中,方法包括以下步骤:澄清;用蛋白 A 亲和介质结合和洗脱;在线病毒灭活;以下流通纯化:先后经活性碳、流通 AEX 介质、使用在线静止混合器和 / 或缓冲罐改变溶液、流通 CEX 介质和病毒过滤;和配制。

[0166] V. 检验降低水平的一种或多种杂质

[0167] 本发明提供了用于降低含有所关注的蛋白质的样品中的一种或多种杂质水平的方法。蛋白质样品中所含的来自生物源的典型的杂质包括宿主细胞蛋白 (HCP) 和核酸 (DNA)。当宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 时, HCP 通常被称作 CHO HCP 或 CHOP。使用对 HCP 的抗体的免疫学方法如 Western Blot 和 ELISA 常用于检测这些杂质。也经常使用微量滴定板免疫酶测定 (ELISA) 以提供高分析灵敏度。这样的测定是使用简单、客观且高效的用于测量纯化过程中的一种或多种杂质水平的工具。

[0168] 一些用于测定 HCP 的 ELISA 试剂盒是可以从诸如 Cygnus Technologies of Southport, NC, USA 的卖家商购获得的。一些这样的试剂盒在它们倾向于与实质上所有可能污染产品的 HCP 反应而与使用的纯化过程无关的意义上是“广义的”。在一些实施方案中,商购试剂盒可以用于检测样品中的一种或多种杂质的水平。

[0169] 本发明进一步通过以下实施例进行说明,所述实施例不应解释为限制性的。所有在本申请全文中引用的参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图援引加入本文。

实施例

[0170] 实施例 1. 评价用于以流通模式去除杂质的各种材料

[0171] 在该实验中,评价不同材料从澄清的 CHO 料中除去杂质的能力。测试表 II 中所示的材料以流通模式的杂质去除。磷酸盐缓冲液 (PBS, 10mM 磷酸盐, pH 7.4) 用作平衡和清洗缓冲液。

[0172] 表 II

[0173]

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

[0174] 使用重力流通 (FT) 检测方法检测树脂杂质的去除。使 1ml 每种表 II 中所列的材料 (1ml) 沉降,并填充入 5ml 的一次性色谱柱 (Evergreen Scientific, LA, CA) 中。用 5 倍柱体积 (CV) 的平衡缓冲液 (PBS) 平衡该柱,用 20CV 的料上样,并再用 5CV 的清洗缓冲液 (PBS) 清洗。收集流通洗出液流分。使用添加有多克隆 IgG (约 2.6mg/ml, SeraCare) 的未

处理的澄清零位 CHO-S 料。

[0175] 检测流通洗出液和相应料的 IgG 收率、UV 活性物质 (280nm) 去除、HCP 去除和 DNA 去除。依照卖家的说明使用 Poros Protein A 2.1mm×30mm 分析柱 (LIFETECHNOLOGIES, Palo Alto, CA) 在 Waters Alliance HPLC (Milford, MA) 上定量 IgG 收率。使用非保留物质的峰面积 (其显示为蛋白 A 色谱图的流通峰) 定量 280nm 下的 UV 活性物质。使用 CHO-CM HCP ELISA 试剂盒 (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC) 检测宿主细胞蛋白。使用 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (LIFE TECHNOLOGIES, Foster City, CA) 检测 DNA。所有的检测依据制造商的使用说明进行。结果描述在图 1-4 中。

[0176] 如图 1 所示,除了 HIC 树脂显示约 5% 的 IgG 收率损失,所有其它筛查的介质即活性炭、SPFF、ProRes™-S 和 QFF 证明没有可检测到的收率损失。

[0177] 进一步地,如图 2、3 和 4 所示,活性炭导致 280nm 处 UV 活性物质水平的显著降低。所述 UV 活性物质包括 pH 指示剂、一些种类的 HCP、DNA 和一些残存细胞培养基成分。在使用多克隆 IgG 的情况下,该流分还包括蛋白 A 不结合的 IgG3 群体。尽管包括活性炭在内的所有材料均表现出一定程度的 HCP 去除,但两种具有阳离子交换功能材料 Sepharose FastFlow 和 ProRes™-S 除去最多的 HCP。对于 DNA 去除,尽管不令人惊讶地发现阴离子交换树脂、Q FastFlow 显著的 DNA 去除,但出乎预料地发现活性炭以相似的能力除去 DNA。所有其它材料以较低的程度去除 DNA。

[0178] 该实施例的数据证明活性炭以及具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料可在不同程度上以流通模式从 CHO 料中去除杂质 (HCP、DNA 和 UV 活性物质) 而没有显著的收率损失。

[0179] 实施例 2. 流通杂质去除能力

[0180] 在一代表性的实验中,评价每单位体积不同的材料去除的杂质量。通过添加商购鲑鱼精 DNA 来增加 CHO-S 料中的 DNA 水平,以了解 DNA 和 HCP 间吸附竞争的效果。用于评价杂质去除的材料列于下表 III 中。

[0181] 表 III

[0182]

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

[0183] 将列于表 III 中的每种材料填充入 Omnifit 柱 (内径 0.66cm) 中。在 BioCad (APPLIED BIOSYSTEMS, Palo Alto, CA) 上,用 5CV PBS 平衡该柱,用 100CV 的添加有多克隆 IgG 和鲑鱼精 DNA 的零位未处理澄清 CHO-S 料上样,并且用 20 倍柱体积的 PBS 清洗。以每 10 倍柱体积收集上样步骤中的流通洗出液流分。使用如实施例 1 中描述的同样的方法检测流通洗出液流分和相应的料的 IgG 收率、UV 活性物质、HCP 和 DNA 去除。

[0184] 如图 5 所示,所有筛查的材料显示在超过 100 倍柱体积料上样时没有显著的 IgG 收率损失。如图 6 所示,活性碳去除整个 100CV 中最多的 UV 活性物质。阴离子交换材料也在一定程度上去除整个 100CV 的 UV 活性物质。此外,如图 7 所示,阴离子交换树脂、Q FastFlow 的 HCP 去除能力受到限制,这是由于其穿过了早期流分。然而,阳离子交换材料 Q FastFlow 和 ProRes™-S 除去整个 100 倍柱体积的显著量的 HCP。在该具有高 DNA 浓度(即额外的 195 $\mu\text{g/mL}$)的具体实验中,与无 DNA 添加的料相比,活性碳去除较少的 HCP。例如,在用不添加 DNA 的原始零位 CHO-S 料的相似实验中,活性碳去除整个 100CV 中接近 20% 的 HCP(数据未显示)。这证明了 DNA 和 HCP 对于活性碳吸附的一定程度上的竞争。此外,如图 8 所示,所有材料均在一定程度上去除 DNA。

[0185] 该实施例的数据证明活性碳以及具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料可在不同程度上以流通模式从 CHO 细胞料中去除超过 100 倍柱体积的杂质(HCP、DNA 和 UV 活性物质)而没有显著的收率损失。

[0186] 实施例 3. 不同材料的组合对杂质去除的效果

[0187] 在另一实验中,评价图 9 中所述的工作流程中所示的材料的不同组合的杂质去除。使材料(1ml)沉降,并填充入 5ml 的一次性色谱柱中。用 5 倍柱体积(CV)的 PBS 平衡该柱,用 20CV 的料上样,并用 5CV 的 PBS 清洗。

[0188] 将流通洗出液流分进一步上样到下一个所选介质的一次性色谱柱(如图 9 左侧描述的两个工作流程所示)中。分析该工作流程中最后的流通洗出液。在其中料流经介质混合物的右侧描述的工作流程的情况下,直接分析洗出液。用添加有来自 SeraCare 的多克隆 IgG(约 2.5mg/ml)的非表达 CHO-S 料制备料。使用如以上实施例 1 中描述的同样的方法,检测流通洗出液流分和相应的料的 IgG 收率、UV 活性物质、HCP 和 DNA 去除。结果显示在图 10-12 中。

[0189] 如图 10 所示,活性碳和含有活性碳的混合物显著降低了 UV 活性物质的水平。此外,尽管所有材料均显示出一定程度上的 HCP 去除,但与阳离子树脂组合的活性碳混合物显示出最有效的 HCP 去除,如图 11 所示。同样,如图 12 所示,尽管所有材料均在一定程度上去除 DNA,但活性碳和阴离子交换树脂的组合显示出最有效的 DNA 去除。

[0190] 该实施例的数据证明了与任何单独成分相比,活性碳和具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料组合可更有效地以流通模式从 CHO 料中去除杂质(HCP、DNA 和 UV 活性物质)。

[0191] 实施例 4. 蛋白 A 洗脱合并液的杂质去除

[0192] 在另一个实验中,使用标准重力流通测试方法来研究蛋白 A 后合并液(post Protein A pool)中的杂质去除。评价实施例 1 中筛查的材料即活性碳、阳离子交换树脂(SP FF 和 ProRes™-S)、阴离子交换树脂、QFF 和 HIC 树脂、Phenyl FastFlow 以及这些材料的不同组合。使活性碳或树脂材料(1ml)沉降,并填充入来自 Evergreen 的一次性色谱柱中。每个柱用 5CV 的 PBS 平衡,用 20CV 的培养料上样,并用 5CV 的 PBS 清洗。在上样步骤中收集流通洗出液流分。使用的料是调节 pH 至 7.0 后的蛋白 A(ProSep Ultra Plus)洗脱合并液(约 3.2mg/ml 的 IgG)。用于蛋白 A 柱的料是添加有多克隆 IgG 的非表达 CHO-S。

[0193] 评价流通洗出液流分和蛋白 A 洗脱合并液的 IgG 收率、UV 活性物质去除、HCP 去除和 DNA 去除。所有的测验如实施例 1 描述的进行,除了在 HCP 的情况时使用 CHO-3G HCP

ELISA 试剂盒 (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC)。

[0194] 如图 13 所示,所有筛查的材料产生约 85%或更高的收率。活性炭、阳离子交换树脂、SP FastFlow 作为单一材料去除最多的 HCP。不同材料的混合物提供最高的 HCP 去除,如图 14 中所示。图 15 描述了所有材料去除显著量的 DNA 的事实,这部分由于料中的低水平。总体上,与单一材料相比,多种材料的混合物通常在杂质去除上更有效。

[0195] 该实施例的数据证明活性炭和具有阳离子交换、阴离子交换和疏水作用官能团的材料以及这些材料的混合物可在不同程度上以流通模式从产生自 CHO 料的蛋白 A 洗脱合并液中去杂质 (HCP、DNA 和 UV 活性物质)。

[0196] 实施例 5. 用于评价活性炭的 MAb 纯化性能的代表性的亲和基 (蛋白 A) 俘获的 MAb 料的制备

[0197] 使用 CHO 细胞系培养物产生被称为 MAb I 的部分纯化的单克隆抗体,用作代表性亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体料以评价活性炭纯化蛋白质的性能。首先使用深层过滤介质 (作为 Millistak⁺® POD 过滤器 (MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, USA) 获得) 澄清直接来自生物反应器的细胞培养物。细胞培养液经连续的两个过滤器 DOHC 和 X0HC 过滤至终浊度 < 10NTU, 并且随后使用 Millipore Express® SHC capsule 过滤器无菌过滤。

[0198] 将来自 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA 的丙烯酸 Quick-Scale® 14cmID 柱用 Millipore ProSep-vA 高容量蛋白 A 介质填充至约 3.2L 的柱床体积。使用以 PBS 流动填料和振动的组合填充该柱。所有的色谱步骤在使用波长 280nm 下的 UV 吸收检测的 Millipore K-Prime 40-I 系统上进行。该柱用于 MAb I 纯化至少 5 个循环并在 4℃ 下贮存在 PBS 中。使用该柱之前,将该柱用至少 2 倍柱体积 (CV) 的 pH 1.5-1.7 的 0.15M 磷酸冲洗,之后用 PBS 平衡直至 pH 稳定 (至少 3CV)。通常,在澄清后的那天,将无菌过滤澄清的细胞培养物以至少 5 分钟的停留时间 (即以 500-600mL min⁻¹ 的流速) 装载到蛋白 A 柱中。将该柱装载以确保没有超过该柱的最大容量 (其被限定为每升介质 30g 的 MAb I)。

[0199] 在该柱上样之后,用 PBS 以同样的停留时间冲洗该柱直至 UV 记录线达到基线 (通常在 3CV 内)。随后将该柱用含有 0.5MNaCl 的 20mM 的乙酸钠 (pH 6) 清洗至少 3 倍 CV, 但不超过 5 倍 CV。随后使用改变为 20mM 乙酸 (pH 3.0) 的步骤洗脱产物,其中手动进行洗脱峰的俘获以减少洗脱峰的稀释。将洗出液在室温 (20-25℃) 下温育至少 30 分钟至最多 1.5 小时。温育后,使用 2M 的 Tris 碱 (pH 10 或更高) 将洗脱合并液的 pH 滴定至 pH 5±0.2。洗脱合并液的初始 pH 通常接近 pH 4.0, 并且需要至少添加 5% 体积的 Tris 碱溶液。在滴定洗脱合并液过程中观察到明显的沉淀。在洗脱合并液的无菌过滤前使用 Millipore Millistak⁺® X0HC 实验室级 POD 进行沉淀的去除,其中至少需要两个 0.027m² 的 POD 来清除整个洗脱合并液的沉淀。在深层过滤后,使用 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元无菌过滤洗出液,并且在 4℃ 下贮存直至使用。

[0200] 实施例 6. 用于评价活性炭的 MAb 纯化性能的代表性的非亲和基 (阳离子交换) 俘获的 MAb 料的制备

[0201] 使用 CHO 细胞系培养物产生被称为 MAb I 的部分纯化的单克隆抗体,用作代表性非亲和 (阳离子交换) 俘获单克隆抗体料以检测活性炭纯化蛋白质的性能。按照实施例 5 中讨论的制备 MAb I 澄清细胞培养液。细胞培养液经连续的两个过滤器 DOHC 和 X0HC 过滤至终浊度 < 10NTU, 并且随后使用 Millipore Express® SHCcapsule 过滤器无菌过滤。

[0202] 将来自 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA 的 22cm ID 玻璃 Vantage® 实验室用柱用阳离子交换 (CEX) 介质 Fractogen® SO₃ (M) 填充。使用 PBS 在 Äkta® Explorer 100 (GE HEALTHCARE, Uppsala, Sweden) 上以约 1000cm hr⁻¹ 的表面线速度 (superficial linear velocity) 填充该柱。在填充或所有后续柱运行过程中, 通过该柱的压降保持在低于 3bar。该柱的床压缩为约 15%, 具有 75mL 的填充床体积。使用 PBS 作为运行缓冲液, 在 100cm hr⁻¹ 的表面线速度下使用 500 μL 的 25mM Tris, 1M NaCl, 3% (v/v) 丙酮 (pH 6.9) 的脉冲注射测量该柱的填充效率。在计算系统死体积后用丙酮峰使用标准方法计算相当于理论塔板的高度 (HETP), 并计算为 0.053cm (具有 1.3 的峰不对称), 表明该柱被充分填充。NaCl 峰显示较大水平的峰拖尾, 但这可能与盐离子与介质的相互作用有关并且不代表柱的效率。

[0203] 在首次使用该柱之前, 进行无蛋白上样的完全空白运行以降低和 / 或消除任何相关溶液与基质之间的相互作用。在上样之前, 使用 20mM 的乙酸钠 (pH 5) 平衡该柱至少 5 倍 CV。将该柱用含有 MAb I 的澄清细胞培养物 (用冰醋酸使 pH 降低至 pH 5) 上样。当降低细胞培养物的 pH 时, 经常观察到沉淀并且使用离心和深层过滤 (使用 Millistak⁺® X0HC 实验室级 POD) 的组合除去沉淀。

[0204] 在上样之前使用 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元将上样溶液无菌过滤。使用 10min 的停留时间以最大化该柱的容量 (约每升介质 45g MAb I) 的努力将经无菌过滤的载样上样到该柱中, 同时最小化通过柱的压降。上样之后, 用 5 倍 CV 的平衡缓冲液冲洗该柱。然后将该柱用 20mM 乙酸钠、0.1M NaCl pH 5.0 缓冲液清洗 5 倍 CV。用改变为 20mM 乙酸钠、0.25M NaCl (pH 6.0) 的步骤将从该柱上的洗脱进行至少 5 倍 CV。将洗出液分级, 并且将峰流分集中并在 4°C 下贮存以供进一步使用。随后用 20mM 乙酸钠、1M NaCl (pH 6.0) 清洗该柱以除去强结合蛋白质, 确定其主要是宿主细胞蛋白 (HCP)。随后用 0.5N NaOH 在相当于 30 分钟停留时间的减慢的流速下将该柱清洗 5 倍 CV。随后用 5 倍 CV 的平衡缓冲液清洗该柱并贮存在室温 (20-25°C) 以供将来使用。

[0205] 实施例 7. 通过流通处理亲和俘获的 MAb 洗出液来评价不同吸附剂

[0206] 在流通应用中对活性碳与几种常用于蛋白质纯化的不同商购吸附介质 (包括阴离子交换 (ChromaSorb™)、阳离子交换 (HiTrap SP FF、HiTrap CM FF) 和疏水作用 (HiTrap Phenyl FF、HiTrap Butyl FF) 化学) 的亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液的纯化, 以证明活性碳独特的和出乎预料的从蛋白质溶液中除去杂质的效率。

[0207] 依据实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。将该 MAb I 洗出液使用 Tris 碱 (2M) 从约 pH 5 调节到 pH 7, 并且通过 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0208] Nuchar HD 和 HD Nuchar 活性碳在本文中互换使用, 并且是指得自 MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, USA 的粉状活性碳的等级。将玻璃 Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 1mL 的填充柱体积。在不同大小的装置中, 使用 (用得自 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA 的聚烯丙胺修饰的) 额定 0.65 微米的聚乙烯膜制造 0.2mL ChromaSorb 膜装置。将膜切割成 25mm 的圆盘; 将 5 个圆盘堆叠并密封入与商购自 Millipore Corporation 的 OptiScale 25 一次性囊过滤器 (capsule filter) 装置相同类型的过模制 (overmolded) 聚丙烯装置中。该装置

包括排气口以避免气塞,并具有有效的 3.5cm²过滤面积和 0.2mL 的容积。

[0209] 1mL 预填充色谱柱 HisTrap SP FF、HiTrap CM FF、HiTrap Phenyl FF(高载量 (high sub)) 和 HiTrap Butyl FF 购自 GE Healthcare, Pittsburg, PA, USA, 并且在使用前用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡。组装六个流通纯化组列: a) 活性炭、b) ChromaSorb、c) HiTrap SP FF、d) HiTrap CM FF、e) HiTrap Phenyl FF 和 f) HiTrap Butyl FF。随后, 96mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液以 0.25mL/min 的流速通过每个设备。通过纯化组列后, 分析溶液中的宿主细胞蛋白 (HCP)、IgG 浓度和残存蛋白 A。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒, 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。使用商购自 Meridian Life Sciences, Saco, ME, USA 的 ELISA 试剂盒 (Kit C0Z51-188) 进行蛋白 A 分析。结果汇总在表 IV。

[0210] 结果显示活性炭除去了最大量的杂质, 宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (log reduction value, LRV) 是 0.87。活性炭对 HCP 的 LRV 值显著高于检测的商购介质 (阴离子交换、阳离子交换、疏水作用介质), 商购介质对 HCP 的 LRV 为 0.19 至 0.35。来自亲和俘获步骤的残存的蛋白 A 同样被活性炭有效去除至低于可检测限度。观测到去除任意显著量的残存蛋白 A 的仅有的商购介质是阴离子交换介质 (ChromaSorb™), 其还降低残存蛋白 A 浓度至低于可检测限度。尽管具有较高量的杂质去除, 活性炭仍具有极好的单克隆抗体产物 (MAb I) 回收率 (96%), 其与观察到的所检测的其它商购介质的产物回收率 (82-100%) 相似。

[0211] 表 IV

[0212]

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

[0213] ND- 检测到

[0214] NA- 不适用

[0215] 实施例 8. 用活性炭和 / 或阴离子交换介质对 MAb 的亲亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0216] 检测单独或与阴离子交换介质组合的活性炭从亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0217] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0218] Nuchar RGC 和 RGC Nuchar 活性炭在本文中互换使用, 并且是指得自 MeadWestVaco Corporation, Richmond, VA, USA 的粉状活性炭的等级。在一代表性的实验

中,将 ChromaSorb™膜的 7mm 直径圆形部分 (5 μ L) 和 / 或 10mg 的 RGCNuchar 活性碳与 25mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7) 一起加入到 1.5mL 的离心管中,以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,将 1mL 体积的 MAb I 蛋白 A 洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的 1.5mL 离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应 18 小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。

[0219] 使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。一个此类实验的结果汇总在表 V。

[0220] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换介质 (ChromaSorb) 的组合除去了最大量的杂质,宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 是 1.43。单独的活性碳和阴离子交换介质对 HCP 的 LRV 分别是 1.21 和 0.36。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有极好的单克隆抗体产物回收率,分别是 95% 和 95%。

[0221] 表 V

[0222]

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

[0223] NA- 不适用

[0224] 实施例 9. 用活性碳和 / 或阴离子交换介质对 MAb 的亲 and 俘获洗出液的静态浸泡处理

[0225] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳从含有不同于 MAb I 的单克隆抗体 (被称为 MAb II) 的亲 and (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质,以证明单独和与阴离子交换介质组合的活性碳提供可用于纯化多种不同单克隆抗体的独特的和出乎预料有效的方法。

[0226] 依照实施例 5 制备另一种部分纯化的 MAb II 亲 and (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7,并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb II 蛋白 A 洗出液。

[0227] 将 ChromaSorb 膜的 7mm 直径圆形部分 (5 μ L) 和 / 或 10mg 的 RGC Nuchar 活性碳与 25mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7) 一起加入到 1.5mL 的离心管中,以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后,将 1mL 体积的 pH 调节的 MAb II 蛋白 A 洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的 1.5mL 离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应 18 小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的 ELISA 试剂盒 (目录号 F550),依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 VI。

[0228] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从含有另一种单克隆抗体的溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换介质 (ChromaSorb™) 的组合除去了最大量的杂质, 宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 是 1.78。单独的活性碳和阴离子交换介质对 HCP 的 LRV 分别是 1.08 和 0.64。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有好的单克隆抗体产物回收率, 分别是 87% 和 85%。

[0229] 表 VI

[0230]

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

[0231] NA- 不适用

[0232] 实施例 10. 用活性碳和 / 或阴离子交换介质对 MAb I 的非亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0233] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳从非亲和 (阳离子交换) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳提供用于杂质去除的独特的和出乎预料有效的方法。相对于亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液, 非亲和 (阳离子交换) 俘获洗出液含有显著更高水平的不同类型的杂质。活性碳用于纯化非亲和俘获洗出液的应用证明了该方法是普遍的并且可以用于纯化多种不同的蛋白质洗出液。

[0234] 在一单独的实验中, 如实施例 6 所述制备部分纯化的 MAb I CEX 洗出液。将洗出液用缓冲液 (Tris-HCl 缓冲液、25mM、pH 7) 稀释 4 倍, 然后通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I CEX 洗出液。

[0235] 将 ChromaSorb 膜的两个 10mm 直径圆形部分 (19.6 μ L) 和 / 或 20mg 的 RGCNuchar 活性碳与 25mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7) 一起加入到 1.5mL 的离心管中, 以平衡吸附介质。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后, 将 1mL 体积的 MAb I CEX 洗出液加入到含有平衡后的吸附剂的 1.5mL 离心管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应 18 小时。随后将管离心并且分析上清液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒, 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 VII。

[0236] 结果显示单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳对于从使用非亲和 (阳离子交换) 色谱法从细胞培养物中俘获的单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。非亲和基 (阳离子交换) 的俘获介质比更加具有特异性的亲和基 (蛋白 A) 俘获介质随同单克隆抗体一起与更多的杂质结合。因此, 非亲和俘获洗出液含有显著较高水平的不同类型的杂质。活性碳和阴离子交换膜 (ChromaSorb™) 的组合除去了最大量的杂质, 宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 是 1.45。单独的活性碳和阴离子交换介质的 HCP 的 LRV 分别是 1.20 和 0.55。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有好的单克隆抗体产物回收率, 分

别是 95% 和 74%。

[0237] 表 VII

[0238]

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

[0239] NA- 不适用

[0240] 实施例 11. 在不同 pH 值下用活性炭对 MAb I 的亲和俘获洗出液的静态浸泡处理

[0241] 检测活性炭在不同溶液 pH 下从亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明活性炭在多种不同的溶液条件下有效。

[0242] 在单独的实验中, 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0243] 通过添加 Tris 碱 (2M) 或乙酸 (3M) 将 MAb I 蛋白 A 洗出液 (20 μ L) 的 pH 值调节到 5、6、7 或 8。随后使用 Millipore Express® 0.22 微米膜将所得到的 pH 调节过的 MAb I 蛋白 A 洗出液无菌过滤以去除任何浑浊。然后将 RGCNuchar 活性炭 (10mg) 与 25mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7) 一起加入到 1.5mL 的离心管中, 以平衡活性炭。将管离心并且移除平衡缓冲液上清液。随后, 将 1mL pH 调节的 MAb I 蛋白 A 洗出液加入到该管中。使吸附介质和洗出液在室温和轻度旋转下相互反应 18 小时。随后将管离心, 并且移除并分析 0.5mL 上清液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 VIII。

[0244] 结果显示活性炭对于在宽的 pH 范围从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 对于 pH 6、pH 7 和 pH 8 非常近似, 为 1.27 至 1.30 不等。活性炭在 pH 5 下依然提供选择性的杂质去除, 但 HCP 的 LRV 降至 0.70。活性炭有着极好的单克隆抗体产物回收率, 对于所有检测的 pH 条件为 90% 至 95%。

[0245] 表 VIII

[0246]

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

[0247] 实施例 12. 用活性炭和 / 或阴离子交换介质对 MAb I 的亲和俘获洗出液的流通处理

[0248] 检测单独的或与阴离子交换介质组合的活性碳以流通应用方式从亲和（蛋白 A）俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质，以证实单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳提供通常用于大规模蛋白质纯化的在流通条件下去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0249] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和（蛋白 A）俘获洗出液。用 Tris 碱（2M）将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7，并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0250] 将玻璃 Omnifit 色谱柱（10mm 直径，100mm 长）中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 1mL 的填充柱体积。用缓冲液（Tris-HCl 缓冲液，25mM，pH 7）平衡该柱。还使用缓冲溶液（Tris-HCl 缓冲液，25mM，pH 7）平衡如以上实施例 7 中所述制造的 0.2mL 的 ChromaSorb 装置。随后组装三个纯化组列。第一个由 ChromaSorb 装置组成，第二个由活性碳柱组成，而第三个由活性碳柱和接下来的 ChromaSorb 装置组成。100mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液以 0.25mL/min 的流速通过每个装置。收集 10 个 10mL 的洗出液流分。分析混合的所有 10 个样品及所选的各流分的宿主细胞蛋白（HCP）和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 IX。

[0251] 如图 16 中所述和表 IX 中所总结的，结果显示用单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳流通处理亲和和俘获洗出液对于从单克隆抗体溶液中除去杂质出乎预料地有效。活性碳和阴离子交换膜（ChromaSorb）的组合除去了最大量的杂质，宿主细胞蛋白（HCP）的对数减少值（LRV）是 1.95。单独的活性碳和阴离子交换介质对 HCP 的 LRV 分别是 0.96 和 0.23。单独的和与阴离子交换介质组合的活性碳均具有极好的单克隆抗体产物回收率，分别是 96% 和 98%。

[0252] 表 IX

[0253]

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

[0254] NA- 不适用

[0255] 实施例 13. 单独地或在活性碳处理后用多种阴离子交换介质流通处理 MAb I 的亲和和俘获洗出液

[0256] 检测单独的或与多种不同的阴离子交换介质组合的活性碳从亲和（蛋白 A）俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质，以证实活性碳可以与多种不同的阴离子交换介质组合。检测的商购阴离子交换介质包括伯胺（ChromaSorb）和季胺（Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF）。检测在膜（ChromaSorb、Sartobind Q、Mustang Q）上和树脂（HiTrap Q FF）上所负载的商购阴离子交换化学剂。

[0257] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和（蛋白 A）俘获洗出液。用 Tris 碱（2M）

将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0258] 将 Glass Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 1mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。使用商购 Sartobind Q 膜圆盘 (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) (0.26mL, 3 片) 制造 3 层 0.26mL 的 Sartobind Q 膜装置, 并且如上述实施例 7 中所述, 使用该装置的壳体和方法来制造 0.2mL 的 ChromaSorb 装置。0.18mL 具有 Mustang Q 膜的 **Acrodisc®** Units 购自 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA。使用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡这些装置以及 1mL HiTrap Q FF 预填充柱 (GE Healthcare, Pittsburg, PA, USA) 和 0.2mL ChromaSorb 装置。

[0259] 组装 9 个流通纯化组列: a) 活性碳、b) ChromaSorb、c) 活性碳然后 ChromaSorb、d) Sartobind Q、e) 活性碳然后 Sartobind Q、f) Mustang Q、g) 活性碳然后 Mustang Q、h) HiTrap Q FF、i) 活性碳然后 HiTrap Q FF。96mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液随后以 0.25mL/min 的流速通过每个装置。通过纯化组列后, 分析溶液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照试剂盒使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 **Poros®** A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 X。

[0260] 结果显示用活性碳与多种不同阴离子交换介质组合对亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液的流通处理对于杂质去除出乎预料地有效。对于单独的活性碳, 宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 是 0.91。单独的不同商购阴离子交换介质具有非常相似的 HCP 的 LRV, 为 0.17 至 0.23。活性碳然后不同商购阴离子交换介质的组合具有高得多的 HCP 的 LRV, 为 1.70 至 1.93。活性碳然后不同阴离子交换介质的组合有着极好的单克隆抗体产物回收率, 为 96% 至 97%。该数据证明了与多种不同商购阴离子交换介质组合的活性碳对于抗体纯化出乎预料地有效, 所述阴离子交换介质包括伯胺 (ChromoSorb) 和季胺 (Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF)。与支撑在膜 (ChromoSorb、Sartobind Q、Mustang Q) 上和树脂 (HiTrap Q FF) 上的商购阴离子交换化学剂组合的活性碳有高度有效。

[0261] 表 X

[0262]

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

[0263] NA- 不适用

[0264] 实施例 14. 先后用活性碳和阴离子交换介质或先后用阴离子交换介质和活性碳流通处理 MAb I 的亲和俘获洗出液

[0265] 检测活性碳和阴离子交换介质对于从亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中流

通去除杂质的顺序以证实这两种吸附剂的顺序出乎预料地影响它们的有效性。该实验表明活性碳置于阴离子交换介质之前对于最大化该吸附剂组合从蛋白质溶液中去除杂质的能力是重要的。

[0266] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0267] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 1mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。还使用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡如以上实施例 7 中所述制造的 0.2mL 的 ChromaSorb 膜装置。组装两个流通组列。第一个具有活性碳柱然后 ChromaSorb 膜装置, 而第二个具有相反的顺序即 ChromaSorb 膜装置然后活性碳柱。96mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液以 0.25mL/min 的流速通过每个装置。通过纯化组列后, 分析溶液中的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XI。

[0268] 结果显示出乎预料的结果, 即活性碳和阴离子交换介质 (ChromaSorb) 的顺序对于亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液的流通纯化的有效性是重要的。当活性碳置于阴离子交换介质之前时, 宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 是 1.87。当阴离子交换介质置于活性碳之前时, HCP 的 LRV 降至 1.38。活性碳和阴离子交换介质的顺序对于抗体的回收没有影响, 这两种吸附剂顺序的抗体回收都是 97%。结果揭示了重要的认识, 即将活性碳置于阴离子交换介质之前对于最大化这两种吸附剂的组合从蛋白质溶液中去除杂质的有效性是重要的。

[0269] 表 XI

[0270]

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

[0271] NA- 不适用

[0272] 实施例 15. 用活性碳流通处理 MAb I 的非亲和俘获洗出液

[0273] 检测活性碳以流通应用方式从非亲和 (阳离子交换) 俘获单克隆抗体洗出液中去杂质, 以证明活性碳提供去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。相对于亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液, 非亲和 (阳离子交换) 俘获洗出液含有显著更高水平的不同类型的杂质。活性碳用于纯化非亲和俘获洗出液的应用证明了该方法是普遍的并且可以用于纯化多种不同的蛋白质溶液。

[0274] 如实施例 6 所述制备部分纯化的 MAb I CEX 俘获洗出液。将洗出液用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 稀释 4 倍, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus

Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I CEX 洗出液。

[0275] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 1mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。

[0276] 70mL 的 MAb I CEX 洗出液以 0.25mL/min 的流速通过活性碳柱。收集 7 个 10mL 的洗出液流分。分析所有 7 个混合的样品以及所选的各流分的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的目录号为 F550 的 ELISA 试剂盒依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XII。

[0277] 如图 16 所示及下表 XII 中所总结, 结果显示使用活性碳的流通纯化对于从非亲和 (阳离子交换) 俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。非亲和基 (阳离子交换) 的俘获介质比更加具有特异性的亲和基 (蛋白 A) 俘获介质随同单克隆抗体一起与更多的杂质结合。因此, 非亲和俘获洗出液含有显著较高水平的不同类型的杂质。活性碳提供 0.76 的宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV), 并具有 89% 的单克隆抗体产物回收率。结果标明活性碳可用于从多种不同的蛋白质溶液中去除杂质。

[0278] 表 XII

[0279]

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

[0280] NA- 不适用

[0281] 实施例 16. 用活性碳填充柱和活性碳-纤维素装置流通纯化 MAb I 的亲和俘获洗出液

[0282] 检测填充入柱或混合入纤维素层中的活性碳以流通应用方式从亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明活性碳提供以不同形式去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。

[0283] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0284] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (15mm 直径, 100mm 长) 中装载 600mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 2.4mL 的填充柱体积。将商购自 Millipore Corporation, Billerica, MA 的 Millistalk+Pod CR 装置中的充满活性碳的纤维素层介质置于过模制的聚丙烯注射装置 (内部过滤面积 25mm, 4.6mL 柱床体积, 入口和出口配备有 Luer 连接器) 中。

[0285] 用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱和活性碳-纤维素装置。组装两个流通组列。第一个具有活性碳柱, 而第二个具有活性碳-纤维素装置。315mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液随后以 0.75mL/min 的流速通过每个装置。在通过纯化组列后, 分析溶液的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的 ELISA 试剂盒 (目录号为 F550) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有

Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XIII。

[0286] 结果显示,当活性碳被填充入柱或混合入纤维素层时,使用活性碳的流通纯化对于从亲和(蛋白 A)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。填充入柱中或混合入纤维素层中的活性碳都提供非常近似的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV),分别是 0.95 和 0.97。它们同样有非常近似的单克隆抗体产物回收率,柱是 91%且纤维素层是 87%。这些结果表明当活性碳被混合入纤维素层时可有效用于从蛋白质溶液中去除杂质。

[0287] 表 XIII

[0288]

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

[0289] NA- 不适用

[0290] 实施例 17. 用两种其它类型活性碳流通纯化 MAb I 的亲和俘获洗出液

[0291] 检测两种其它类型商购活性碳以流通应用方式从亲和(蛋白 A)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质,以证明多种不同的活性碳可用于从蛋白质溶液中去除杂质这一出乎预料的结果。

[0292] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和(蛋白 A)俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7,并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0293] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (5mm 直径,100mm 长) 中装载 125mg 在水中成浆的 Chemvicon Pulsorb PGC 活性碳 (Chemvicon Carbon, Feluy, Belgium) 或 Norit A Supra USP 活性碳 (Norit Americas Inc., Marshall, Texas, USA) 以得到 0.24mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。组装两个流通组列。第一个具有 Chemvicon Pulsorb PGC 活性碳柱,而第二个具有 Norit A Supra USP 活性碳柱。96mL 的 MAb I 蛋白 A 洗出液以 0.25mL/min 的流速通过每个装置。通过纯化组列后,分析溶液的宿主细胞蛋白(HCP)和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的 ELISA 试剂盒 (目录号 F550) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 **Poros® A** 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XIV。

[0294] 结果显示,使用两种其它类型的活性碳的流通纯化对于从亲和(蛋白 A)俘获单克隆抗体洗出液中除去杂质出乎预料地有效。Chemvicon Pulsorb PGC 和 Norit A Supra USP 二者分别以 0.40 和 0.48 的宿主细胞蛋白(HCP)的对数减少值(LRV) 去除杂质。它们也具有极好的单克隆抗体产物回收率, Chemvicon Pulsorb PGC 是 100%且 Norit A Supra USP 是 100%。这些结果表明几种不同类型的活性碳可用于从蛋白溶液中去除杂质。

[0295] 表 XIV

[0296]

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

[0297] NA- 不适用

[0298] 实施例 18. MAb I 的亲和俘获洗出液在不同缓冲液盐的存在下的流通纯化

[0299] 检测活性碳以流通应用方式从添加有多种不同盐的亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明活性碳提供了在许多不同的盐存在时去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。该研究表明该方法是普遍的, 并且可以用于在多种不同缓冲液盐中的蛋白质纯化。

[0300] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。用 Tris 碱 (2M) 将 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤器单元过滤。此处的溶液是指 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0301] 将 10mL 含有 300mM 不同盐的水溶液加入到 50mL 的一部分 MAb I 蛋白 A 洗出液中, 其中所述盐是硫酸铵、乙二胺四乙酸二钠盐脱水物 (EDTA)、2-(N- 吗啉基) 乙磺酸 (MES)、氯化钠、柠檬酸三钠脱水物、七水合磷酸氢二钠以及及 Trizma® Pre-set 结晶, pH 7.0 (Tris-HCl)。

[0302] 将用 10mL 水稀释的溶液用作对照。用 2M 的 Tris 碱或 3M 的乙酸将掺入盐的蛋白 A 洗出液的 pH 调节回 7。此处的溶液是指掺入盐的 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0303] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (5mm 直径, 100mm 长) 中装载 125mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 0.5mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。40mL 的掺入盐的 MAb I 蛋白 A 洗出液随后以 0.125mL/min 的流速通过活性碳柱。通过该柱后, 分析溶液中的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的 ELISA 试剂盒 (目录号 F550) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XV。

[0304] 结果显示, 使用活性碳的亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液的流通纯化对于在多种不同盐添加物存在下去除杂质出乎预料地有效。在所有添加的盐的存在下, 活性碳以 0.63 至 1.00 的宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 去除杂质。它们还具有极好的单克隆抗体产物回收率, 为 92% 至 96%。这些结果表明活性碳可用于在多种不同盐缓冲液的存在下从蛋白质溶液中去杂质。

[0305] 表 XV

[0306]

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

[0307] 实施例 19. 蛋白 A 洗出液在 pH 5 和 pH 7 下的流通纯化

[0308] 检测活性碳在两个不同 pH 条件下以流通应用方式从亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液中去除杂质, 以证明活性碳提供在不同溶液 pH 条件下流通去除杂质的独特的和出乎预料有效的方法。该研究说明该方法是普遍的, 并且可以用于在不同 pH 条件下的蛋白纯化。

[0309] 依照实施例 5 制备部分纯化的 MAb I 亲和 (蛋白 A) 俘获洗出液。此处的溶液是指 pH 5 的 MAb I 蛋白 A 洗出液。

[0310] 用 Tris 碱 (2M) 将一部分依照实施例 5 制备的 MAb I 洗出液从约 pH 5 调节至 pH 7, 并且通过 0.22 微米的 Millipore Express Plus Stericup 过滤单元过滤。此处的溶液是指 pH7 的 MAbI 蛋白 A 洗出液。

[0311] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (15mm 直径, 100mm 长) 中装载 1.25g 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳以得到 5mL 的填充柱体积。用缓冲溶液 (Tris-HCl 缓冲液, 25mM, pH 7) 平衡该柱。随后 500mL 的 pH 5 的 MAb I 蛋白 A 洗出液或 pH 7 的 MAbI 蛋白 A 洗出液以 1.25mL/min 的流速通过活性碳柱。通过纯化组列后, 分析溶液中的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的 ELISA 试剂盒 (目录号 F550) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果汇总在表 XVI。

[0312] 结果显示, 使用活性碳的亲和 (蛋白 A) 俘获单克隆抗体洗出液的流通纯化对于在 pH 5 和 pH 7 二者的杂质去除出乎预料地有效。活性碳以 0.85 (在 pH 5 下) 和 1.15 (在 pH 7 下) 的宿主细胞蛋白 (HCP) 的对数减少值 (LRV) 去除杂质。它们还具有极好的单克隆抗体产物回收率, 在 pH 5 下是 97% 且在 pH 7 下是 101%。这些结果表明活性碳可用于在不同 pH 条件下从蛋白质溶液中去除杂质。

[0313] 表 XVI

[0314]

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

[0315] 实施例 20. 使用连续色谱法制备的蛋白 A 洗出液的流通纯化

[0316] 该代表性实验证明活性碳和阴离子交换色谱装置可以用于纯化使用连续多柱色

谱法 (CMC) 获得的蛋白 A 洗出液。

[0317] 在该实验中,如援引加入本文的共同未决的欧洲专利申请 EP12002828.7 中记载的,使用 **Prosep® Ultra Plus** 蛋白 A 树脂,通过三柱连续多柱色谱 (CMC) 方法纯化单克隆抗体 (MAb II)。如在实施例 12 中描述的,汇集蛋白 A 洗出液,并先后通过活性碳装置和阴离子交换色谱装置 (即 **ChromSorb™**) 进行处理。

[0318] 如图 18 中证明,如通过 HCP 浓度降低至低于 10ppm 所测量的,当使用活性碳和阴离子交换色谱装置的组合时,实现了单克隆抗体的成功纯化。

[0319] 实施例 21. 连接几个流通杂质去除步骤

[0320] 在该代表性的实验中,证实以流通模式连接几个杂质去除步骤作为单独的单元操作或工艺步骤操作的可能性,同时满足产物纯度和收率目标。

[0321] 在该实施例中,以流通模式连接各装置即活性碳装置、阴离子交换色谱装置 (即 **ChromSorb™**)、阳离子交换色谱装置和病毒过滤装置 (即 **Viresolve® Pro**) 以进行操作。进一步地,将在线静态混合器和 / 或缓冲罐置于阴离子交换色谱和阳离子交换色谱装置之间,以实现 pH 的改变。最后,在待纯化的样品是浑浊的情况下,将任选的深层过滤器置于活性碳装置的上游。

[0322] 图 19 显示了进行流通纯化工艺步骤的实验装置的示意图,其包括以下描述的装置。

[0323] 另外,这样的设备中还可包含必需的泵、阀、传感器等。

[0324] 将所有的装置在不同的条件下单独润湿,随后组装。根据制造商的使用说明润湿和预处理装置。简言之,用 100L/m² 的水冲洗深层过滤器 (A1HC 级),然后用 5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 (EB1 ;用 1M 的 Tris 碱 (pH 11) 调节到 pH 7.5 的蛋白 A 洗脱缓冲液) 冲洗。将 2.5mL 活性碳如实施例 12 所述填充入 2.5cm 的 Omnifit 柱中,产生 0.55kg/L 抗体载量。用 10 倍 CV 的水冲洗该柱,随后用 EB1 平衡直至 pH 稳定在 pH 7.5。将两个 ChromaSorb 装置 (0.2mL 和 0.12mL) 串联以得到 4.3g/L 的载量。将装置用水以 12.5CV/min 润湿至少 10 分钟,然后用 5DV (装置容积) EB1 润湿。使用带有 12 个元件的一次性螺旋静态混合器 (Koflo Corporation, Cary, IL) 进行在线 pH 调节。将用于聚集物去除的两个 1.2mL 的阳离子交换流通装置并联以除去聚集物。CEX 装置上的 MAb 载量为约 570mg/mL。这些装置先后用 10DV 水、5DV 平衡缓冲液 2 (EB2 ;用 1M 乙酸调节至 pH 5.0 的 EB1) 润湿。将装置进一步用 5DV (装置容积) EB2+1MNaCl 处理,随后用 5DV 的 EB2 平衡。将 3.1cm² 的 **Viresolve® Pro** 装置用水在 30psi 压力下润湿至少 10min。随后每分钟监控流速直至连续 3 分钟流速维持恒定。在将所有装置润湿和平衡后,将它们如图 19 所示进行连接。EB 1 流经整个系统直至所有压力读数和 pH 读数稳定。平衡之后,该料通过流通组列。在运行过程中,在缓冲罐之前和 **Viresolve® Pro** 之后收集样品以监控 IgG 浓度和杂质水平 (HCP、DNA、沥滤的 PrA 和聚集物)。在进料处理完后,将系统用 3 倍死体积的 EB1 冲洗以回收装置和管道中的蛋白质。

[0325] 连接的流通纯化过程的进料是 MAb II 的蛋白 A 洗出液,产自分批蛋白 A 方法。该 MAb 中天然水平的聚集物不超过 1%,所以进行特别的操作以增加聚集物的水平。在温和搅拌下使用 NaOH 水溶液将溶液的 pH 升至 11,并且维持 1 小时。随后用 HCl 水溶液在温和搅拌下将 pH 缓慢降低至 pH 5。重复 4 次以上该 pH 循环。聚集物的终水平是约 5%,通过 SEC 检测到主要由 MAb 二聚体和三聚体组成。随后在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 导电率约 3mS/

cm) 中透析进料。

[0326] 用于该运行过程的 MAb 进料的量是 102mL 的 13.5mg/mL 的 MAb, 流速为 0.6mL/min。

[0327] 作为在 ChromaSorb™ 后的时间函数的 HCP 突破点 (HCP breakthrough) 低于 10ppm 的上限 (图 20)。CEX 装置将聚集物从 5% 降低至 1.1% (图 21)。连接方法的 MAb II 收率是 92%。**Viresolve® Pro** 装置的产量 > 3.7kg/m²。

[0328] 因此, 前述实施例证明了可成功地连接几个装置以流通模式操作, 从而实现期望的产品纯度和收率目标。

[0329] 实施例 22. 连接具有连续结合和洗脱色谱俘获步骤的流通纯化工艺步骤

[0330] 在该代表性实验中, 将如本文记载的流通纯化过程与先于流通纯化的连续结合和洗脱色谱俘获过程直接连接。

[0331] 在该实施例中, 在分批补料生物反应器中产生 CHO 系单克隆抗体 (MAb II)。使总量 7L 的细胞培养物接触刺激反应聚合物溶液以使最终刺激反应聚合物浓度为 0.2% v/v。使细胞培养物混合约 10 分钟。加入 175mL 的 2M 的 K₂HP0₄ 溶液并再混合 10 分钟。随后用 2M Tris 碱将 pH 升至 7.0 并混合 15 分钟。随后将溶液以 2L 等分试样在 4,500×g 下离心 10 分钟, 倾出上清液并保留。处理掉固体。汇合细胞培养物上清液, 并随后在连续搅拌下与 5M NaCl 以 1 : 10 的比率以分批模式混合。在此时测量溶液的最终导电率, 其为 55±5mS/cm。将产生的更高 NaCl 浓度溶液通过 0.22 μm 的 Express 过滤器无菌过滤。该无菌过滤后的溶液是用于蛋白 A 色谱法的上样材料。

[0332] 蛋白 A 俘获步骤由两个用在改进的 Akata Explorer 100 上的方法运行的蛋白 A 柱组成。蛋白 A 柱含有填充入 1.6cm 的 ID Vantage-L (EMD Millipore) 色谱柱中的 10mL **ProSep® Ultra Plus** 蛋白 A 介质, 柱床高度为 10.25cm 和 10.85cm。将这两个柱子用 1×TBS、0.5M NaCl 平衡 5 倍柱体积 CV (所有的柱体积基于最小的柱)。在该运行全过程中, 设置上样流速以具有约 1 分钟的上样停留时间。在初始上样的过程中, 将这两个柱子串联放置, 其中将第一个柱子的流出物直接上样到第二个柱子中直到达到特定的上样体积。在特定的上样体积通过柱子后, 停止进料, 并且两倍 CV 的平衡缓冲液通过第一个柱子到第二个柱子。随后放置第一个柱子以经历清洗、洗脱、清洁和再平衡, 同时将第二个柱子作为第一个柱子被上样。第一个柱子再平衡之后, 将该柱移至第二个位置与现在的第一个柱子串联。重复这一系列事件, 每个柱子在初始的第一个位置的柱子被上样至设定容积后占据第一个位置。每个柱子总共上样 7 次。用流分收集器从每个柱子中收集洗出液, 使用 UV 触发器控制洗脱和收集的开始时间以得到约 3.5CV 的恒定体积。

[0333] 流通纯化组列由 6 个主要装置组成: 任选的深层过滤器 (用于 pH 调节至 pH 7.5 后的沉淀去除); 活性炭; ChromaSorb™; 用于在线 pH 调节的静态混合器和 / 或缓冲罐; 用于聚集物去除的阳离子交换流通装置 (CEX 装置); 和病毒过滤装置 (即 **Viresolve® Pro**)。

[0334] 图 19 说明了这些装置连接的顺序。

[0335] 将所有的装置在不同的条件下单独润湿, 随后如图 19 所示的组装。根据制造商的使用说明或之前的描述润湿和预处理装置。简言之, 用 100L/m² 的水冲洗深层过滤器 (A1HC), 然后用 5 倍柱体积的平衡缓冲液 1 (EB1; 用 1M 的 Tris 碱 (pH 11) 调节到 pH 7.5 的 PrA 洗脱缓冲液) 冲洗。将 10mL 活性炭如实施例 12 所述填充入 2.5cm 的 Omnifit 柱中。用 10 倍 CV 的水冲洗该柱, 随后用 EB1 平衡直至 pH 稳定在 pH 7.5。将 1.2mL 的 ChromaSorb 膜

(7 层) 堆入 47mm 直径的 Swinex 装置中。将装置用水以 12.5CV/min 润湿至少 10 分钟, 然后用 5 倍装置容积 (DV) 的 EB1 润湿。使用带有 12 个元件的一次性螺旋静态混合器 (Koflo Corporation, Cary, IL) 进行在线 pH 调节。将 3 层的阳离子交换色谱装置 (0.12mL 膜体积) 先后用 10DV 水和 5DV 平衡缓冲液 2 (EB2; 用 1M 乙酸调节至 pH 5.0 的 EB1) 润湿。将装置进一步用 5DV 的 EB2+1MNaCl 处理, 随后用 5DV 的 EB2 平衡。将 3.1cm² 的 Viresolve® Pro 装置用水在 30psi 压力下润湿至少 10min。随后每分钟监控流速直至连续 3 分钟流速维持恒定。在将所有装置润湿和平衡后, 将它们如图 19 所示进行连接。EB 1 流经整个系统直至所有压力读数和 pH 读数稳定。平衡之后, 该料 (调节到 pH7.5 的 PrA 洗出液) 通过流通纯化组列。在运行过程中, 在缓冲罐之前和 Viresolve® Pro 之后收集样品以监控 IgG 浓度和杂质水平 (HCP、DNA、沥滤的 PrA 和聚集物)。在进料处理完后, 将系统用 3 倍死体积的 EB1 冲洗以回收装置和管道中的蛋白质。

[0336] 图 22 显示在深层过滤、活性炭和 Viresolve Pro 前的压力读数。对于运行中的大部分, 深层过滤器的压力维持不变, 但在结尾升高表明蛋白 A 运行的结尾的蛋白 A 洗出液流分的一些沉淀。由于活性炭上游的深层过滤器, 活性炭柱维持相当的保护以避免任何沉淀。Viresolve Pro 的压力随时间缓慢升高, 但也低于操作最高限 (50psi)。

[0337] Viresolve Pro 合并液中最终的 HCP < 1ppm (表 XVI)。洗脱流分中平均沥出的蛋白 A 是 32ppm。在 Viresolve® Pro 合并液中沥出的蛋白 A 是 4ppm。聚集物从 1% 下降到 0.4%。下表 XVII 显示了当与连续结合和洗脱色谱工艺步骤连接时研究流通纯化性能的实验结果。

[0338] 表 XVII

[0339]

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

[0340] 实施例 23. 使用活性炭去除细胞培养物成分杂质

[0341] 在该代表性的实验中, 证明了活性炭除去可能经过蛋白 A 亲和俘获步骤仍保留的来自细胞培养物的潜在杂质。

[0342] 细胞培养基的常见成分胰岛素 (一种哺乳动物细胞生长刺激物) 通常以 1-20mg/L 的浓度存在于细胞培养基中。以 1mg/mL 将重组人胰岛素 (EMD Millipore Corp. 的 IncelligentAF) 溶于 50mM Tris pH 7.0 的缓冲液稀释, 添加单克隆抗体 MAbII 至浓度 7g/L。用 HD Nuchar 活性炭填充玻璃 Omnifit 柱。溶液以恒定速率 0.25CV/min 流过柱子, 至总 MAb II 载样 1kg/L。分析流通合并液的胰岛素和抗体浓度。为了分析, 使用配备有 HC18

柱 (Cadenza) 的 Agilent HPLC 系统 ; 溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液 ; 溶剂 B : 0.1% TFA 乙腈溶液 ; 使用 15 分钟内 5% -30% B 的最佳梯度, 通过 UV A214 吸光率检测胰岛素。首先, 使用抗体存在下的胰岛素标准溶液绘制校正曲线。从活性碳柱的流出液中没有检测到胰岛素, 表明活性碳在 MAb 存在下对胰岛素的容量超过 240mg/g。

[0343] 实施例 24. 使用活性碳纤维素介质从 MAb II 的亲和俘获洗出液混浊溶液中流通去除杂质

[0344] 在该代表性的实验中, 证明了活性碳去除来自微生物料的 HCP 的独特的和出乎预料的有效性。以 1.5mg/mL 在大肠杆菌裂解物溶液中掺入 mAb 单克隆抗体。用填充入柱中的活性碳在流通条件下处理该掺混料。

[0345] 通过离心收集来自大肠杆菌培养物的细胞。倾掉上清液, 并通过剧烈震荡和搅拌将剩余的细胞颗粒悬浮于裂解缓冲液 (25mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7) 中。然后, 添加 0.4mL 的一部分 100mM PMSF 在乙醇中的储备液。将悬浮液分成几部分 (每部分约 100mL), 并用开 3 秒关 4 秒的方式超声 5 分钟。超声之后, 将材料汇聚并在 -80℃ 下贮存 48 小时。随后将溶液解冻并在 4,500×g 下离心 2 小时以除去裂解的细胞。使用 Stericup-HV 0.45 μm Durapore 膜 (1000mL, 目录号 SCHVU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 过滤上清液。随后, 通过 Stericup-GP0.22 μm Millipore Express Plus 膜 (1000mL, 目录号 SCGPU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 过滤。过滤的裂解物随后与 7.5mL 10m g/L 的 mAb 溶液混合得到添加有 1.5mL mAb 的溶液。经测量, 该溶液的 pH 是 7.7。

[0346] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性碳 (MeadWest Corporation, Richmond, VA, USA) 以得到 1mL 的填充柱体积。用 25mM 的 Tris 缓冲液 (pH 7) 平衡该柱。随后 42mL 的掺入 mAb 的大肠杆菌裂解物以 0.25mL/min 的流速通过活性碳柱, 在活性碳柱中的停留时间为 4 分钟。提交对照和合并液样品用于分析宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。

[0347] 使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的大肠杆菌 HCP ELISA 试剂盒 (目录号 F410) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。结果显示活性碳对于选择性去除来自微生物料的 HCP 出乎预料地有效。裂解物中 HCP 的浓度从 206,000ng/mL (133,000ppm) 下降到 119,000ng/mL (77,800ppm), 而 mAb 起始浓度 1.55g/L 且回收浓度是 1.53g/L, 回收率是 99%。该实施例证实了活性碳能够用于从非哺乳动物细胞中去除 HCP。

[0348] 实施例 25. 用活性碳 - 纤维素介质和阴离子交换介质从 MAb II 的亲和俘获洗出液混浊溶液中去除杂质

[0349] 在该代表性的实验中, 证明了单独的和与离子交换介质组合的活性碳对于在俘获步骤后去除来自微生物料的 HCP 具有独特的和出乎预料的有效性。

[0350] 在大肠杆菌裂解物溶液中以 1.5mg/mL 掺入 mAb 单克隆抗体, 然后用蛋白 A 色谱法俘获。在流通条件下用填充入柱的活性碳及随后的 ChromaSorb™ AEX 膜处理俘获的料。

[0351] 通过离心回收来自大肠杆菌培养物的细胞。倾掉上清液, 并通过剧烈震荡和搅拌将剩余的细胞颗粒悬浮于裂解缓冲液 (25mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 7) 中。然后, 添加 0.4mL 的一部分 100mM PMSF 在乙醇中的储备液。将悬浮液分成几部分 (每部分约 100mL), 并用开 3 秒关 4 秒的方式超声 5 分钟。超声之后, 将材料汇聚并在 -80℃ 下贮存 48 小时。随后

将溶液解冻并在 $4,500\times g$ 下离心 2 小时以除去裂解的细胞。使用 Stericup-HV $0.45\mu m$ Durapore 膜 (1000mL, 目录号 SCHVU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 过滤上清液。随后, 通过 Stericup-GP $0.22\mu m$ Millipore Express Plus 膜 (1000mL, 目录号 SCGPU11RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 过滤。过滤的裂解物随后与 7.5mL 10mg/L 的 mAb 溶液混合得到添加有 1.5mL mAb 的溶液。经测量, 该溶液的 pH 是 7.7。随后用蛋白 A 色谱法俘获该掺混裂解液的 mAb。然后在低 pH 下洗脱 30mL 俘获的 mAb。通过滴加 1M Tris 将洗出液 pH 从 3-4 升至 7, 然后通过 Stericup-GP $0.22\mu m$ Millipore Express Plus 膜 (250mL, 目录号 SCGPU02RE, Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 过滤。留出 1mL 经 pH 调节的洗出液用于分析。

[0352] 将玻璃 Omnifit 色谱柱 (10mm 直径, 100mm 长) 中装载 250mg 在水中成浆的 HD Nuchar 活性炭 (MeadWest Corporation, Richmond, VA, USA) 以得到 1mL 的填充的柱体积。用 25mM 的 Tris 缓冲液 (pH7) 平衡该柱。随后 29mL 的 mAb 的蛋白 A 色谱洗出液以 $0.2\text{mL}/\text{min}$ 的流速通过活性炭柱, 停留时间为 4 分钟。留出 1mL 经活性炭处理的洗出液用于分析。

[0353] 然后, 依照说明书将 0.08mL ChromaSorb™ 装置 (EMD Millipore Corp. Billerica, MA, 01821, USA) 用水润湿, 随后用 25mM 的 Tris (pH 7) 冲洗。然后 27mL 的活性炭处理的洗出液以 $0.5\text{mL}/\text{min}$ 的流速通过 ChromaSorb 装置, 停留时间为 0.16 分钟。留出 1mL 经活性炭和 ChromaSorb 处理的洗出液用于分析。

[0354] 用析每个样品的宿主细胞蛋白 (HCP) 和 IgG 浓度。使用商购自 Cygnus Technologies, Southport, NC, USA 的大肠杆菌 HCP ELISA 试剂盒 (目录号 F410) 依照制造商的使用手册进行 HCP 分析。使用配备有 Poros® A 蛋白 A 分析柱的 Agilent HPLC 系统测量 IgG 浓度。

[0355] 结果显示, 单独的和与 AEX 膜组合的活性炭对于从微生物料的俘获洗出液中选择性去除 HCP 出乎预料地有效。活性炭将洗出液中的 HCP 浓度从 86ng/mL (7ppm) 降低至 8ng/mL (0.7ppm), 而 mAb 起始浓度是 11.5g/L 且回收浓度是 11.2g/L, 回收率是 97%。经活性炭处理的洗出液的 HCP 浓度被 ChromaSorb AEX 膜进一步降低至 3ng/mL (0.3ppm), 总的 mAb 回收率是 96%, 终浓度是 11.1g/L。该实验证实了单独的和与 AEX 膜组合的活性炭可用于在俘获步骤后从非哺乳动物细胞中去除 HCP。

[0356] 结合援引加入本文的说明书中引用的参考文献的教导, 最彻底地理解本发明。说明书中的实施方案对本发明的实施方案提供举例说明, 并且不应被解释为限制其范围。本领域技术人员可以容易地了解本发明包括的许多其它的实施方案。所有的出版物和发明以它们的整体援引加入本文。当援引加入的材料与本发明说明书相矛盾或不一致时, 以本发明说明书为准。本文对任何参考文献的引用并非承认这样的参考文献是本发明的现有技术。

[0357] 除非另外指明, 本说明书 (包括权利要求书) 中使用的所有表示成分、细胞培养物、处理条件等的量的数值在所有情况中被理解为被术语“约”修饰。因此, 除非另有相反指示, 数值参数是近似值, 并且可以取决于本发明所寻求的期望性质而改变。除非另外指明, 在一系列要素前的术语“至少”被理解成是指该系列中的每个要素。本领域技术人员会认识到或能够仅使用常规试验确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同方式。这样的等同方式意图被所附权利要求涵盖。

[0358] 本领域技术人员会清楚,可在不脱离其精神和范围的情况下对本发明进行许多修改和改变。本文描述的具体实施方案仅以示例的方式提供,并且不意味着以任何形式的限制。这意味着说明书和实施例仅被视作是示例性的,而本发明的实际范围和精神由所附权利要求表明。

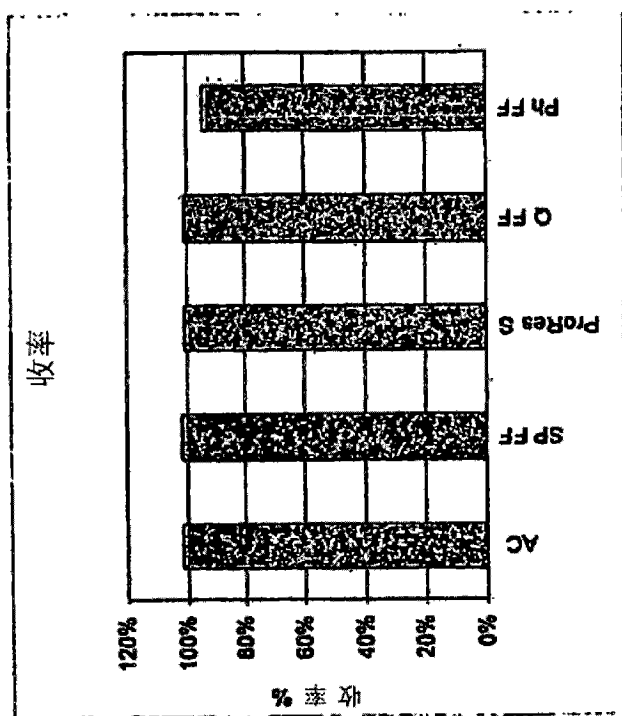


图 1

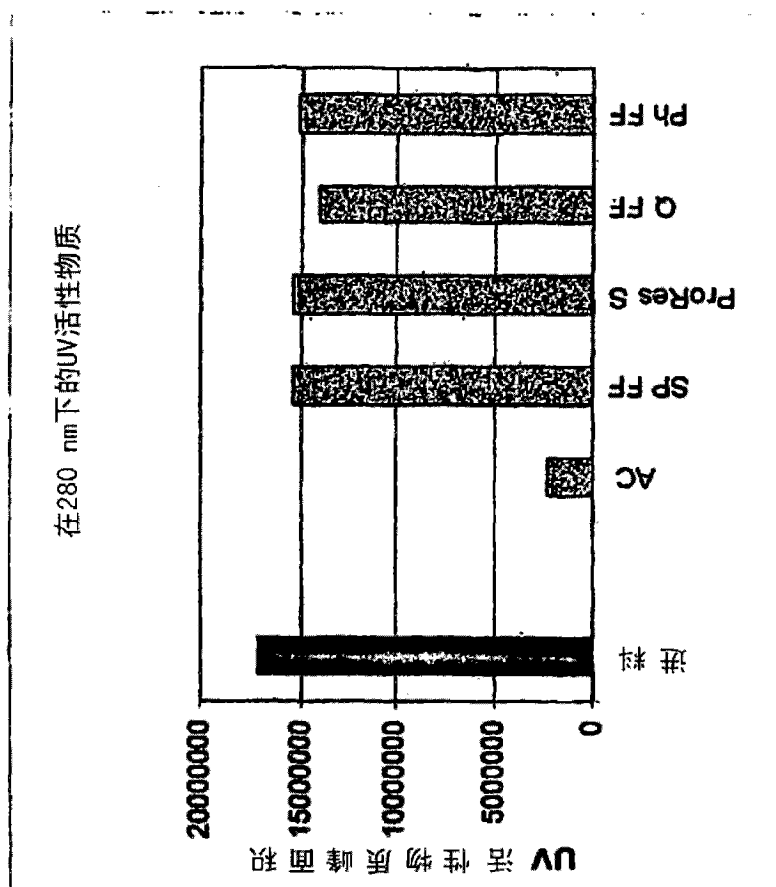


图 2

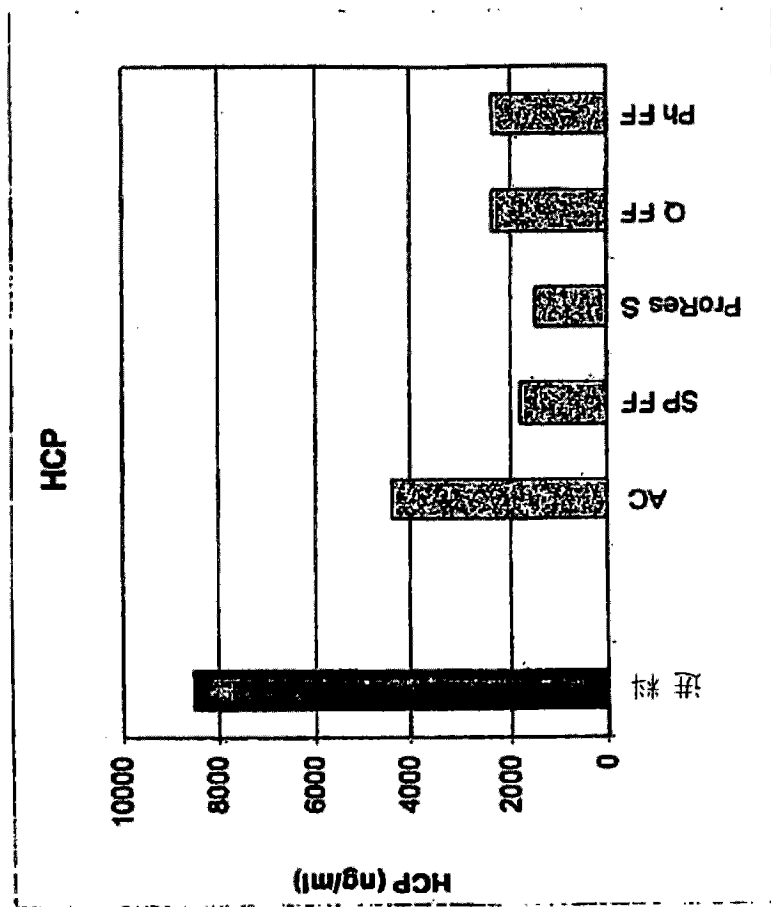


图 3

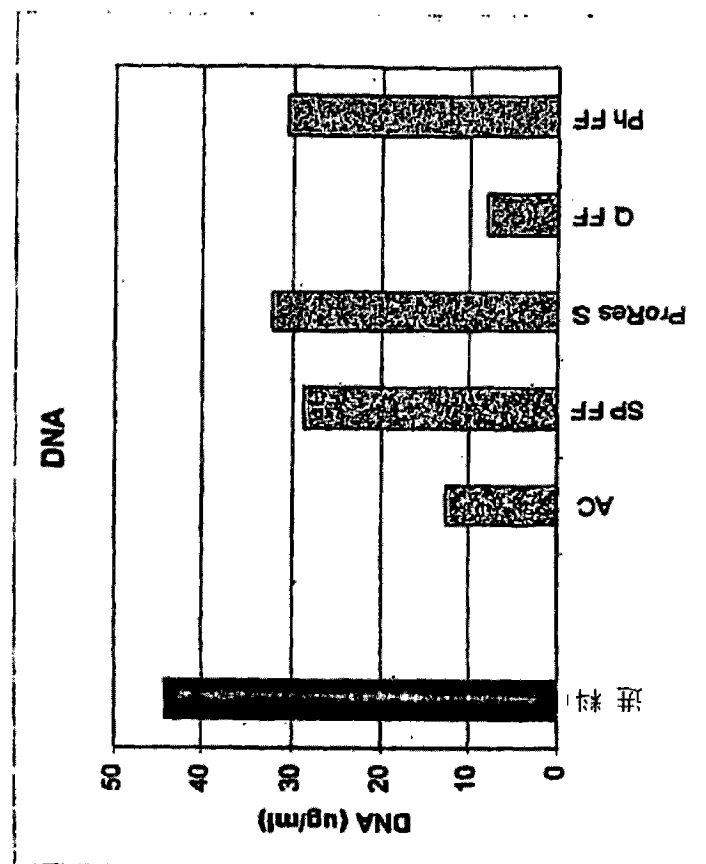


图 4

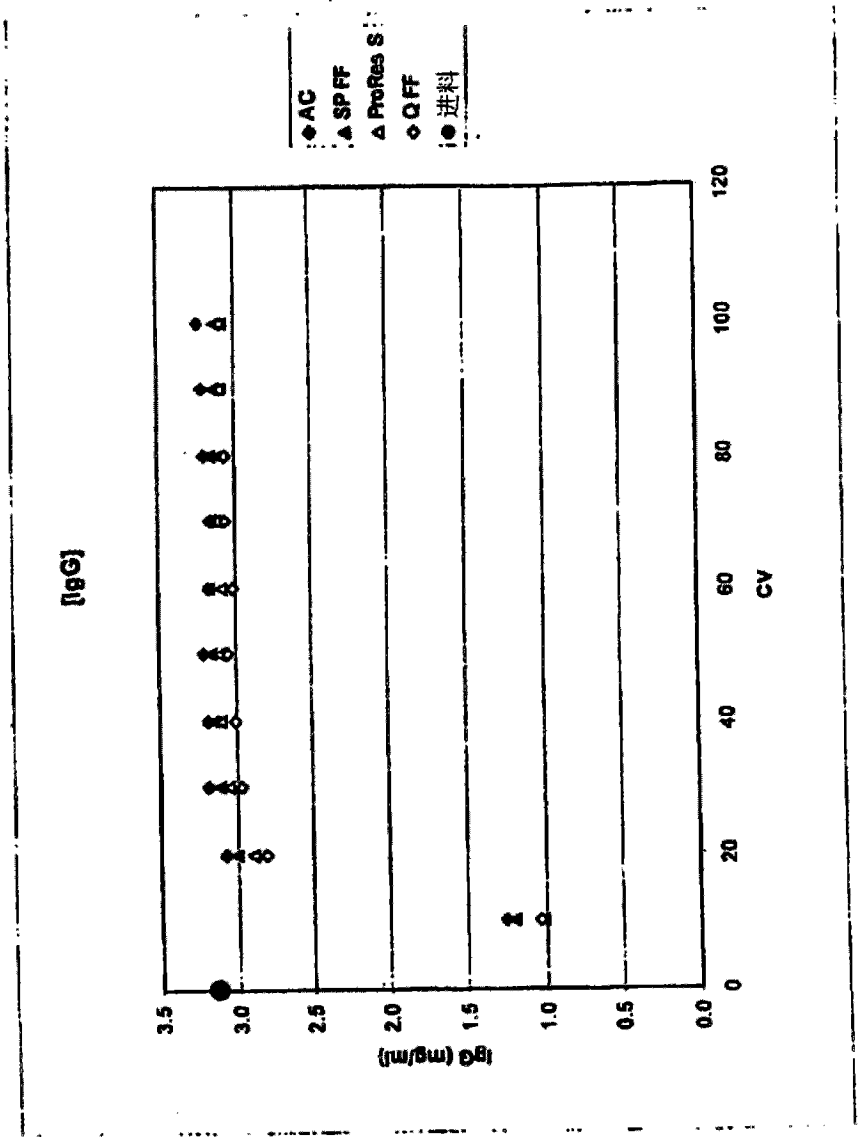


图 5

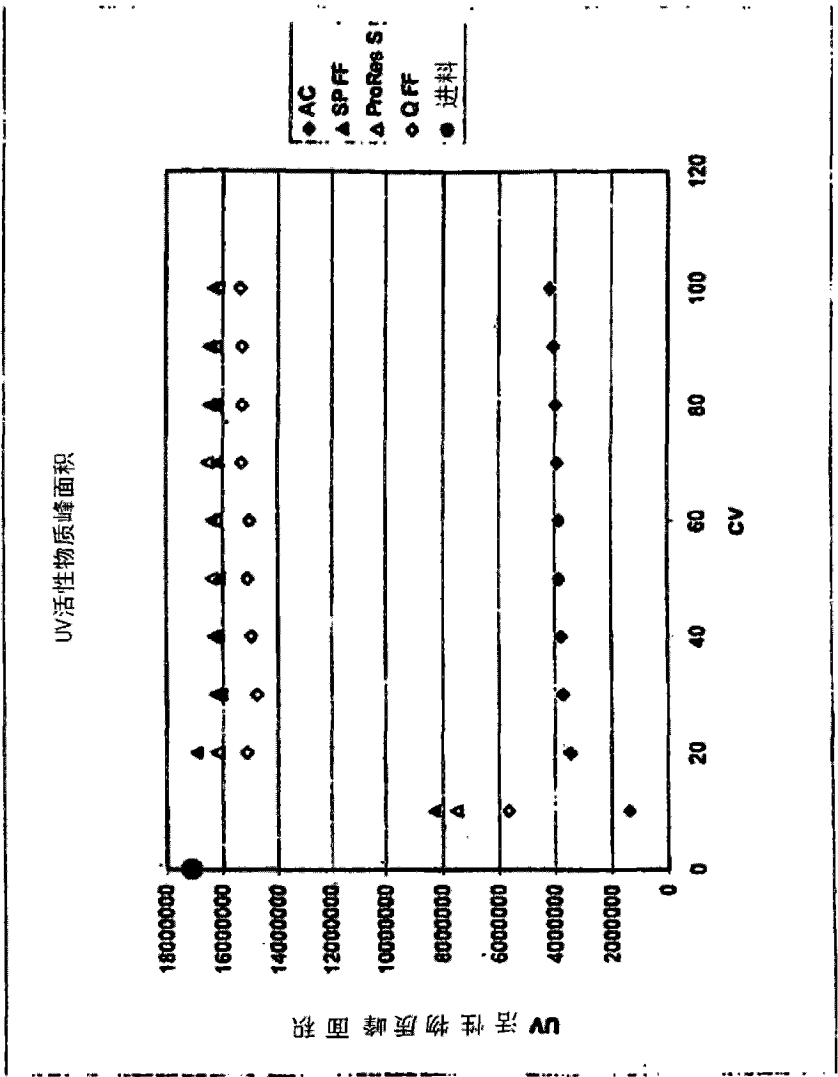


图 6

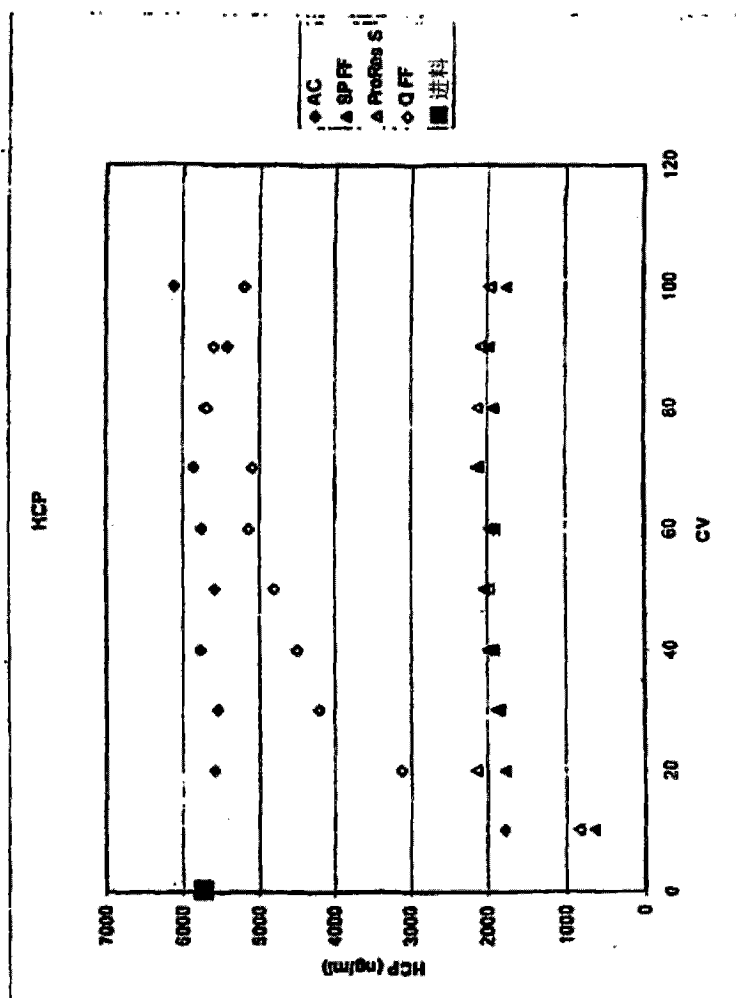


图 7

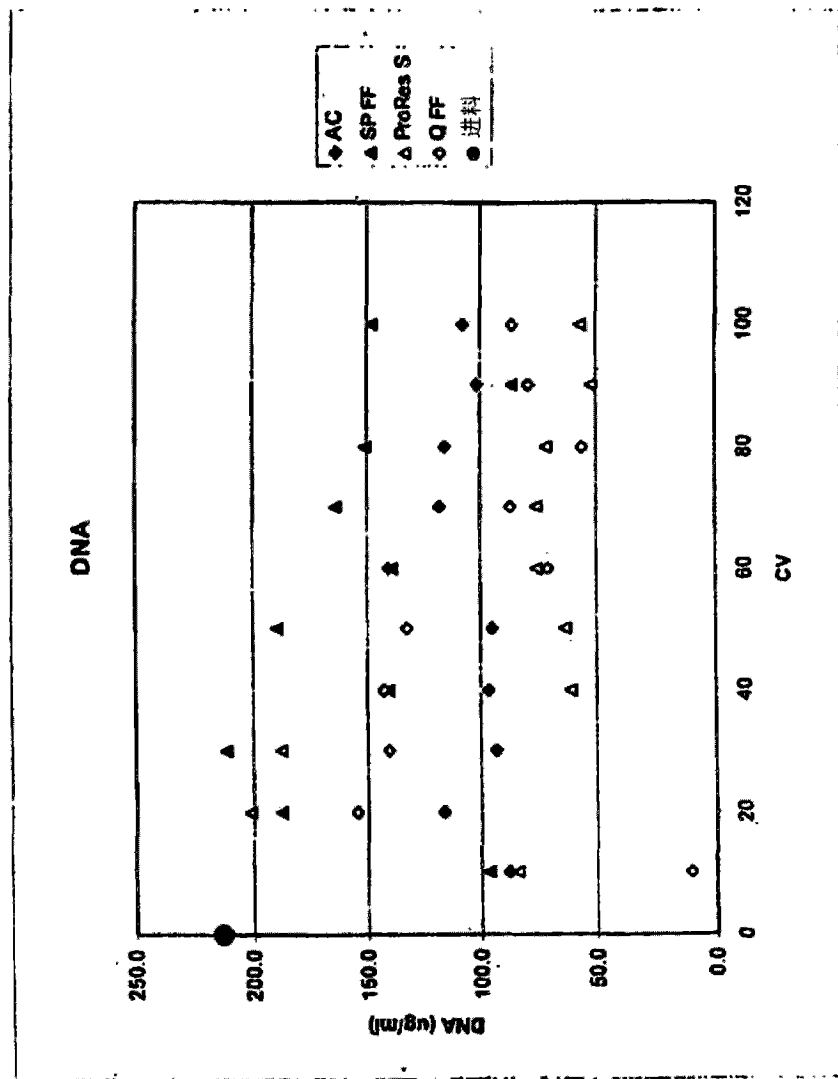


图 8

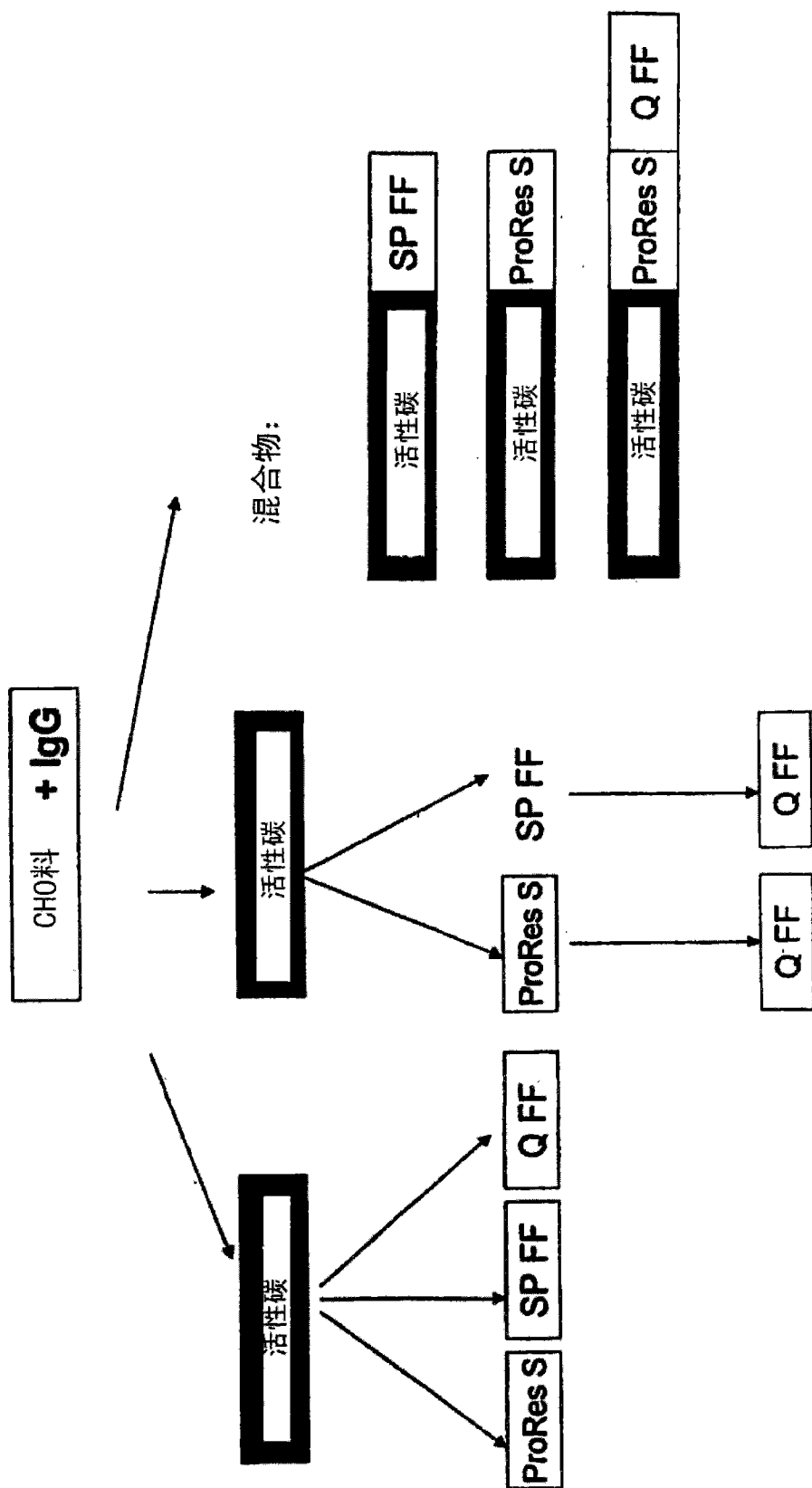


图 9

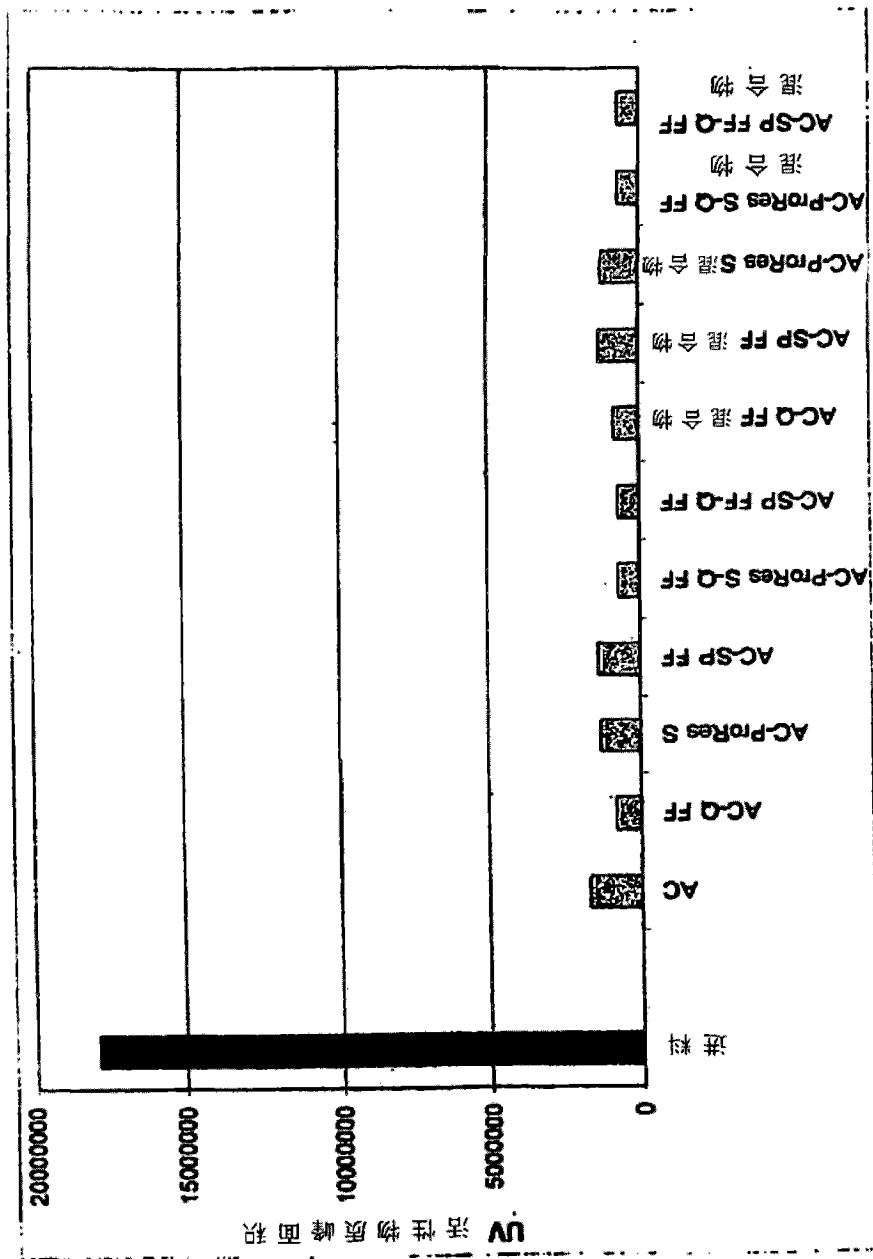


图 10

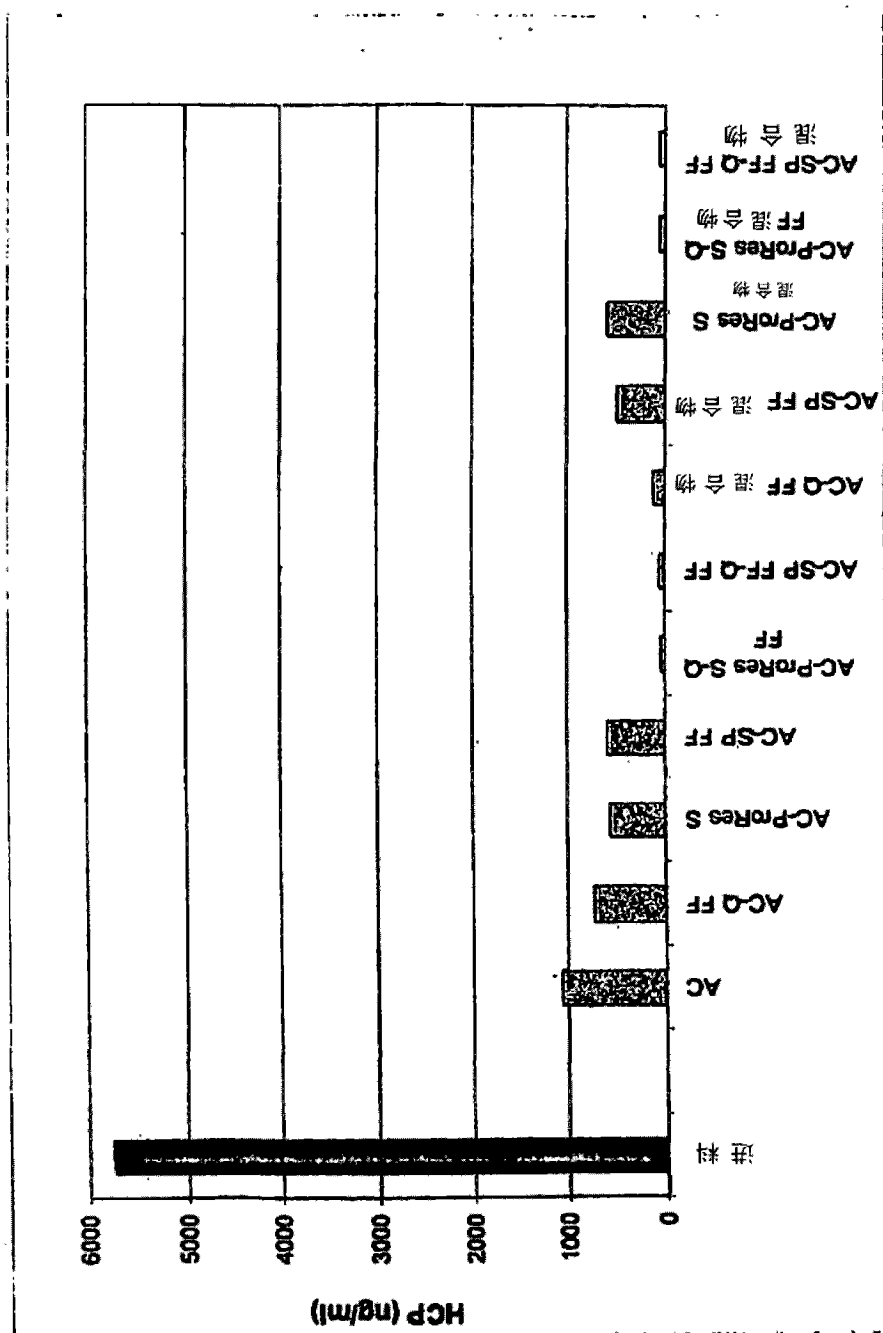


图 11

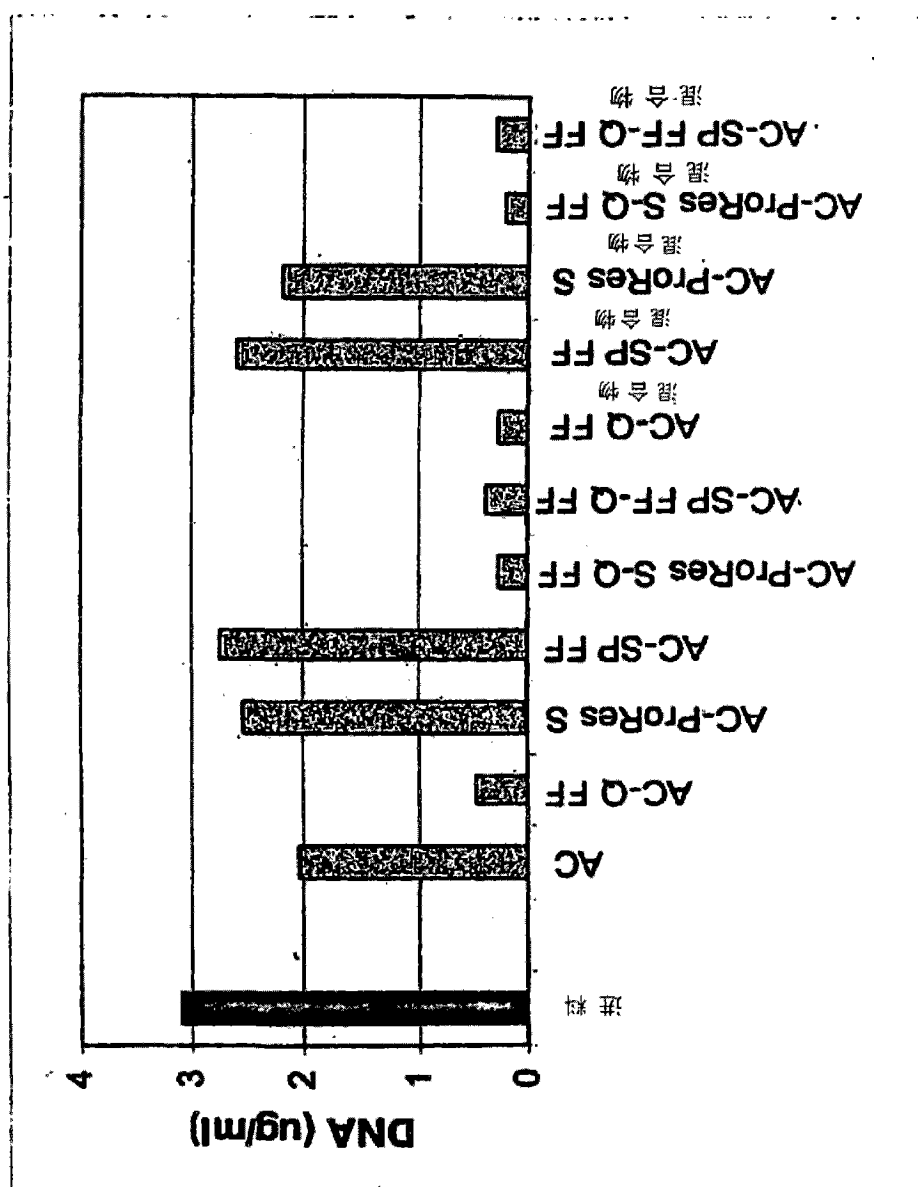


图 12

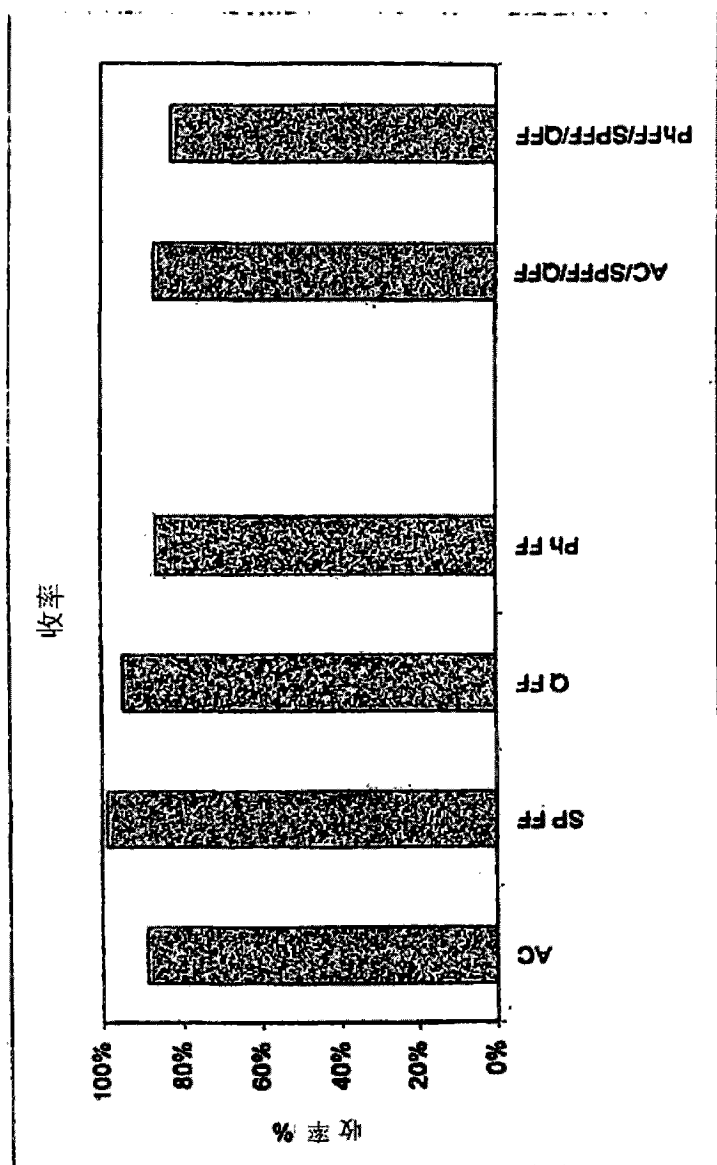


图 13

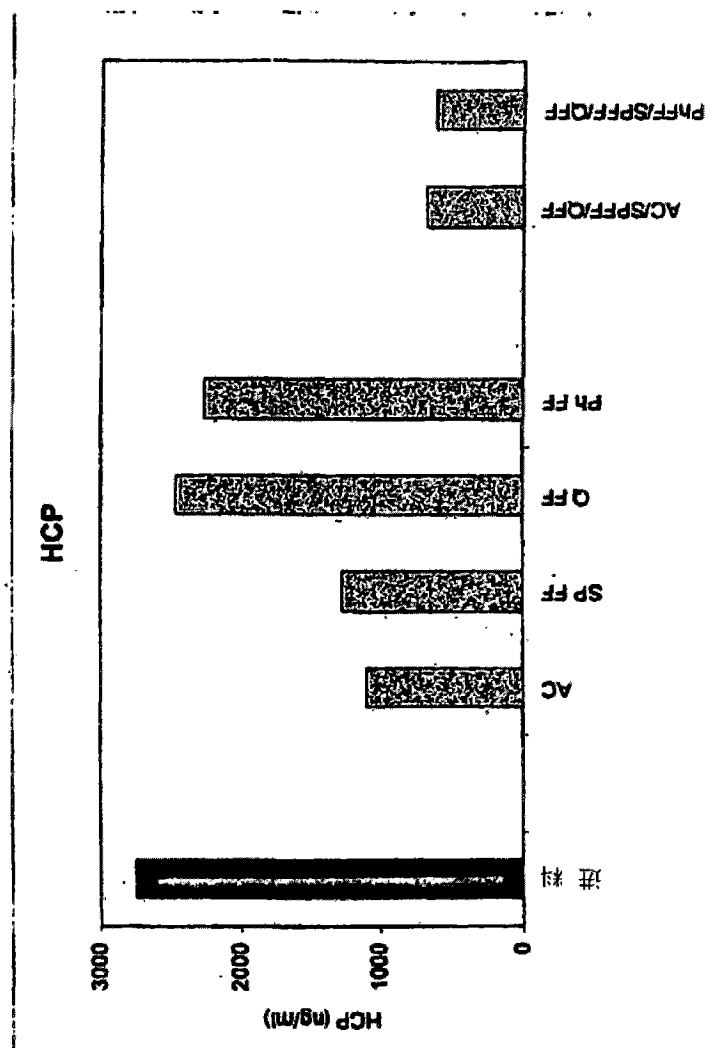


图 14

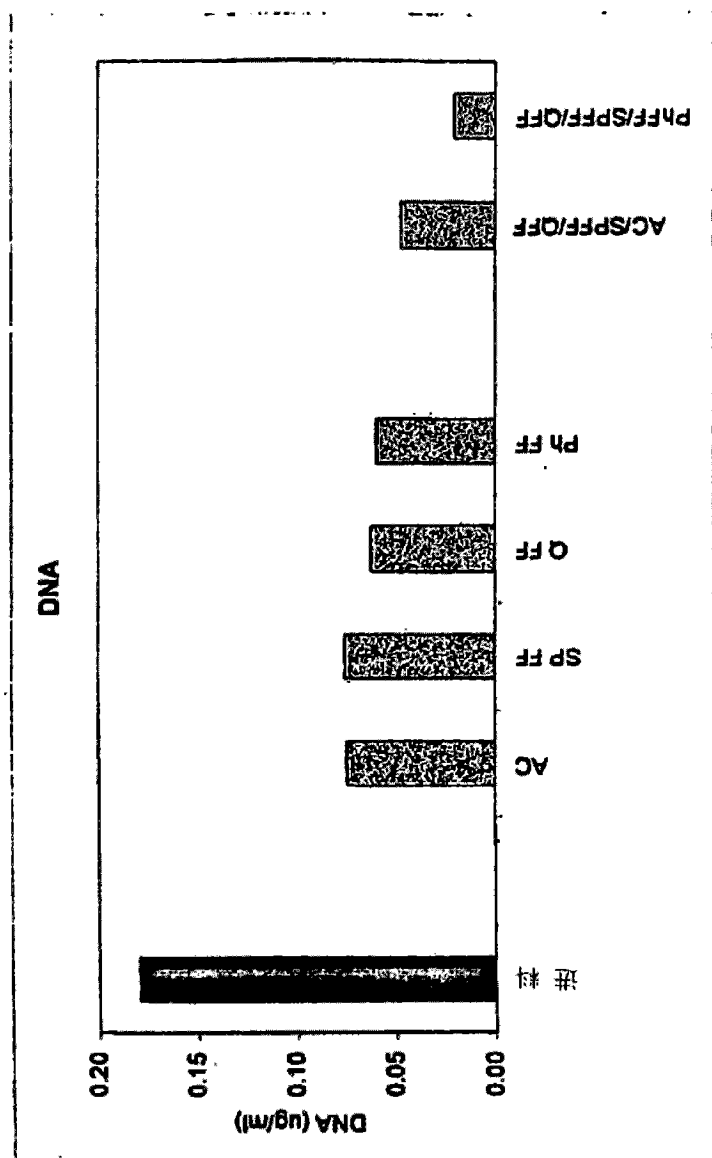


图 15

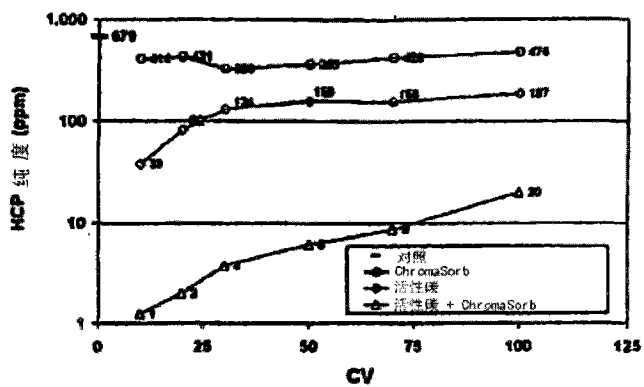


图 16

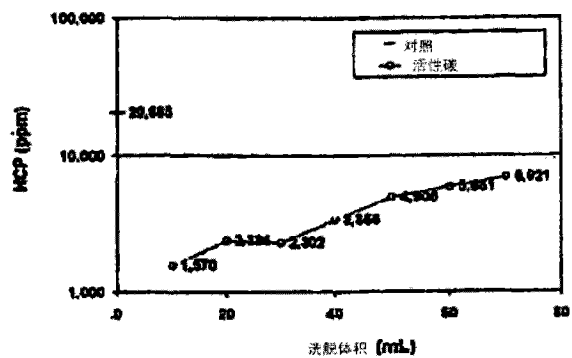


图 17

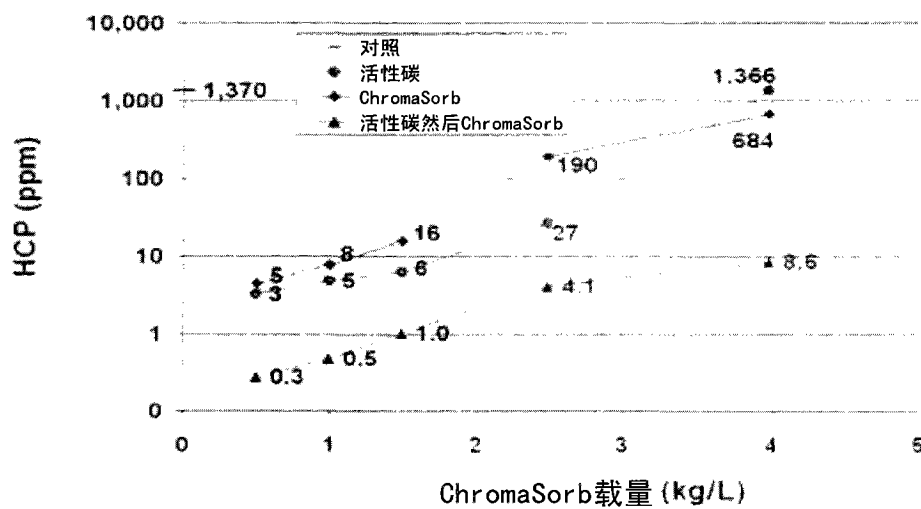


图 18

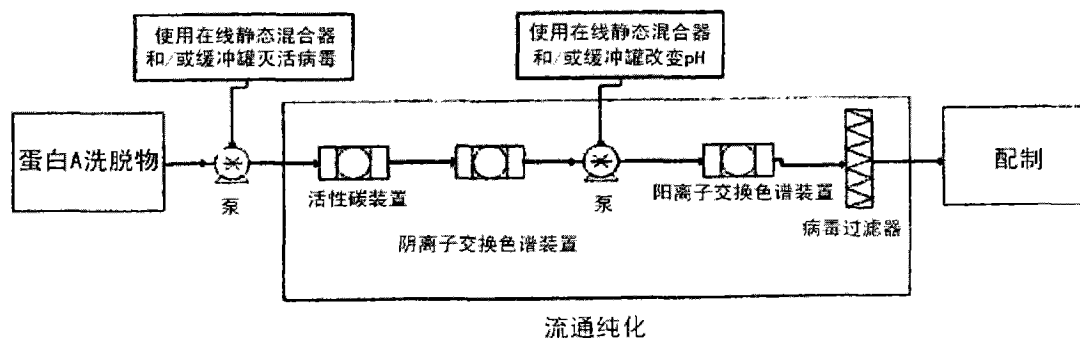


图 19

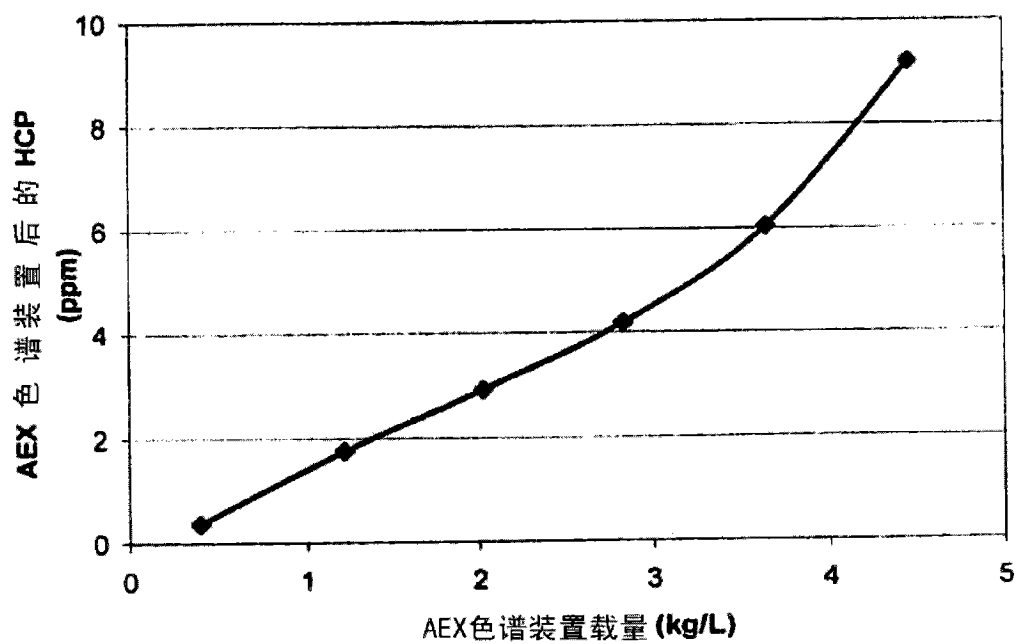


图 20

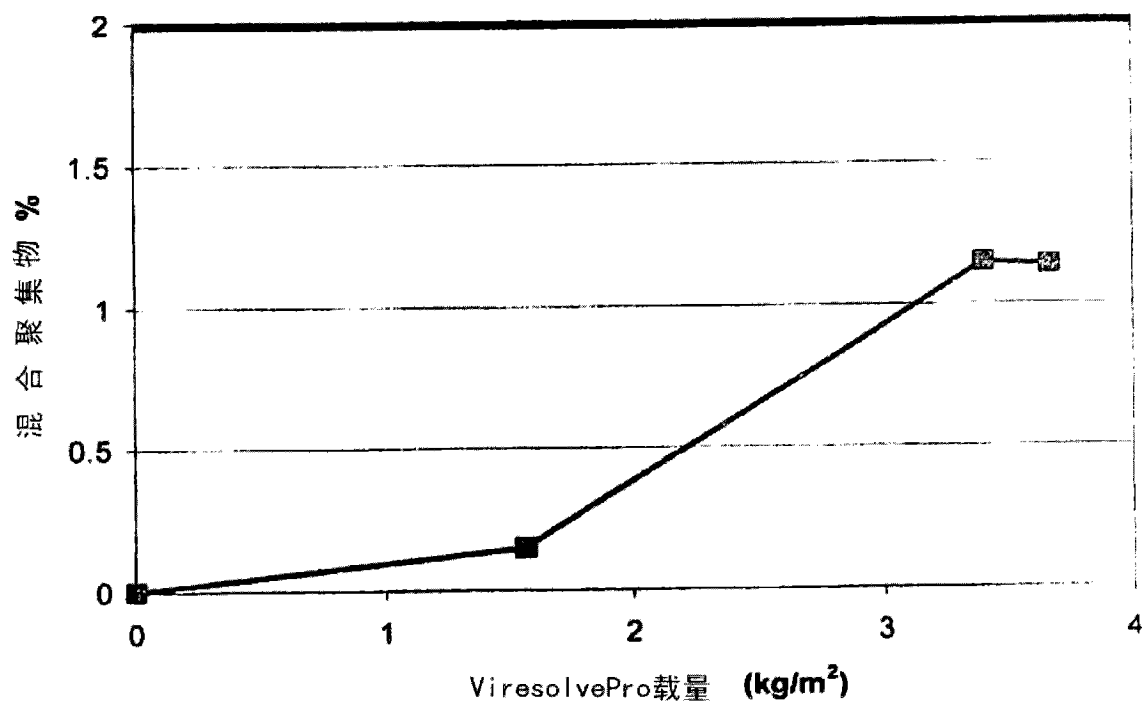


图 21

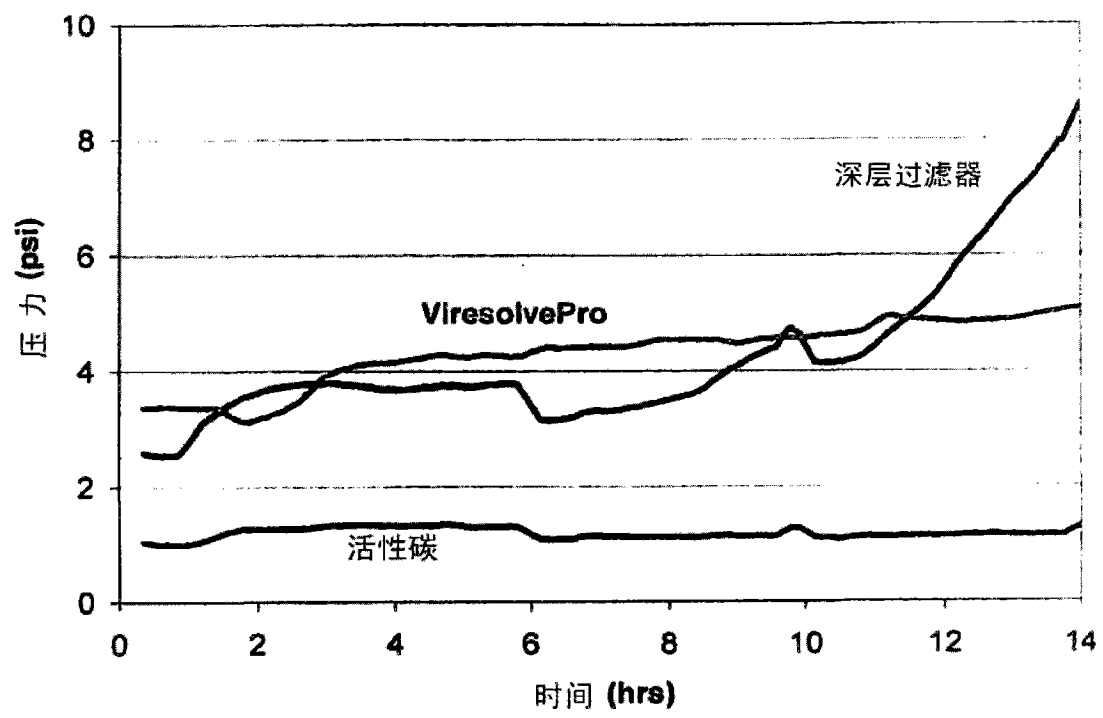


图 22