(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110831966 A
(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201880045994.5
(22)申请日 2018.05.09
(30)优先权数据
62/503977 2017.05.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2018/050506 2018.05.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/207184 EN 2018.11.15
(71)申请人 阿里埃勒科学创新有限公司
地址 以色列阿里埃勒
申请人 耶达研究及发展有限公司
(72)发明人 G.派特乔尼克 I.N.N.纳姆布西里 M.谢夫斯 A.霍华德 M.(M.)科恩
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 初明明 黄希贵
(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/06(2006.01)
C07K 16/36(2006.01)

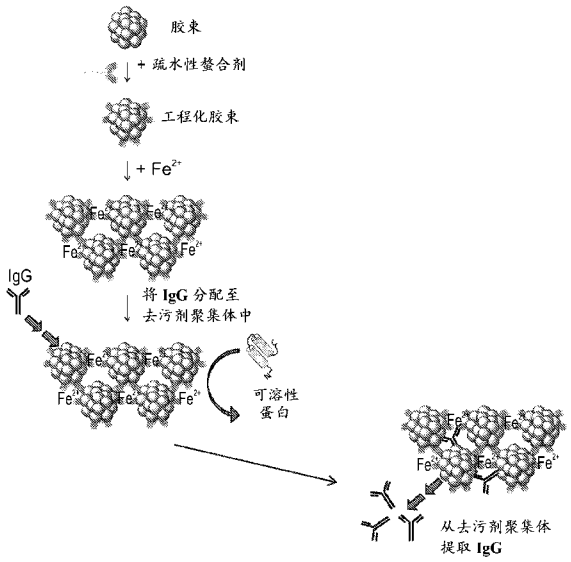
权利要求书2页 说明书23页 附图17页

(54)发明名称

纯化抗体的方法

(57)摘要

公开了一种分离抗体的方法。所述方法包括使疏水性螯合剂、非离子型去污剂和金属离子接触，以产生包含所述疏水性螯合剂、所述去污剂和所述金属离子的聚集体；和在使得所述抗体能够分配至所述聚集体中的条件下使所述聚集体与包含所述抗体的培养基接触。还公开了用于分离所述抗体的试剂盒。



CN 110831966 A

1.一种分离抗体的方法,所述方法包括:

(a) 使疏水性螯合剂、非离子型去污剂和金属离子接触,以产生包含所述疏水性螯合剂、所述去污剂和所述金属离子的聚集体;和

(b) 在使得所述抗体能够分配至所述聚集体中的条件下使所述聚集体与包含所述抗体的培养基接触,从而分离所述抗体。

2.一种试剂盒,其包含疏水性螯合剂、非离子型去污剂、pH在3-6之间的缓冲液和金属离子。

3.一种试剂盒,其包含疏水性螯合剂、聚山梨酯表面活性剂和金属离子。

4.权利要求1的方法,其中所述培养基包含细胞裂解物。

5.权利要求4的方法,其中所述细胞裂解物为全细胞裂解物。

6.权利要求1的方法,其中所述培养基包括杂交瘤培养基。

7.权利要求1或6的方法,其中所述培养基包含血清白蛋白。

8.权利要求4的方法,其中所述细胞裂解物没有大于约2微米的细胞器。

9.权利要求1的方法,其中步骤(b)的所述条件包括盐水平低于100 mM。

10.权利要求1的方法,其进一步包括在步骤(b)后增溶所述抗体。

11.权利要求10的方法,其中所述增溶用pH在3-6之间的缓冲液进行。

12.权利要求10的方法,其中所述增溶用pH在3.8-4之间的缓冲液进行。

13.权利要求11的方法,其中所述缓冲液进一步包含盐。

14.权利要求3的试剂盒,其进一步包含pH在3-6之间的缓冲液。

15.权利要求2、11或14中任何一项的试剂盒或方法,其中所述缓冲液为羧酸缓冲液。

16.权利要求2、11或14中任何一项的试剂盒或方法,其中所述缓冲液包含氨基酸。

17.权利要求11、14或15的试剂盒或方法,其中所述羧酸缓冲液选自异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸和乙酸钠。

18.权利要求1或2的方法或试剂盒,其中所述非离子型去污剂为聚山梨酯表面活性剂。

19.权利要求3或18的方法或试剂盒,其中所述聚山梨酯表面活性剂选自聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60和聚山梨酯80。

20.权利要求1-3中任何一项的方法或试剂盒,其中所述疏水性螯合剂包含8-羟基喹啉。

21.权利要求1-3中任何一项的方法或试剂盒,其中所述疏水性螯合剂包括菲咯啉。

22.权利要求21的方法或试剂盒,其中所述菲咯啉选自N-(1,10-菲咯啉-5-基)甲酰胺(Phen-C1)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)乙酰胺(Phen-C2)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丙酰胺(Phen-C3)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丁酰胺(Phen-C4)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)戊酰胺(Phen-C5)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)庚酰胺(Phen-C7)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)壬酰胺(Phen-C9)和N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)。

23.权利要求21的方法或试剂盒,其中所述菲咯啉选自红菲咯啉、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)和N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)。

24.权利要求23的方法或试剂盒,其中所述菲咯啉为红菲咯啉。

25.权利要求1-3中任何一项的方法或试剂盒，其中所述金属离子为二价金属离子。

26.权利要求25的方法或试剂盒，其中所述二价金属离子选自Zn^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}和Co^{2+}。

27.权利要求26的方法或试剂盒，其中所述二价金属离子选自Zn^{2+}和Fe^{2+}。

28.权利要求1的方法，其中所述疏水性螯合剂以约0.1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于所述水溶液中。

29.权利要求1的方法，其中所述金属离子以约0.1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于所述水溶液中。

30.权利要求4的方法，其中所述细胞裂解物来源于细菌细胞。

31.权利要求4的方法，其中所述细胞裂解物来源于哺乳动物细胞。

32.权利要求31的方法，其中所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

33.权利要求1的方法，其中所述抗体为人源化抗体。

34.权利要求1的方法，其中所述抗体为重组抗体。

35.权利要求1的方法，其中所述抗体选自IgA、IgD、IgE、IgM和IgG。

36.权利要求35的方法，其中所述IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

纯化抗体的方法

[0001] 发明领域和背景

本发明在其一些实施方案中涉及用于纯化抗体的方法和试剂盒。

[0002] 单克隆抗体(mAb)为目前最常用作治疗剂的重组蛋白;其为2012年美国最大的生物制品销售类别。其表达水平从每升低至毫克到几克浓度的显著增加以及其中一些将需要的几百千克到吨的数量,对能够有效地从复杂混合物中捕获mAb的工业纯化方法提出持续的挑战。这通常经ProA色谱作为初始捕获步骤来实现,通常导致高回收率(~95%)、纯度(>95%),同时去除大部分宿主DNA、病毒污染物和浸出的ProA。

[0003] 这些卓越的特征使ProA色谱成为抗体制造的金标准。然而,由于ProA树脂相对于非亲和性聚合物载体(例如离子交换剂)成本高昂,因此有动机开发更经济的替代品。当考虑到目前和未来的全球生物技术需求(即每年许多吨纯化的mAb)时,这种动机进一步证明是合理的,所述需求代表数百种正在开发的不同治疗性mAb,所有这些mAb目的在于靶向各种癌症、自身免疫和炎性障碍。

[0004] 有人认为,ProA以及色谱策略的使用通常代表mAb工业纯化的固有“生产力瓶颈”,其可占总制造成本的高达80%,因此使得不需要以下的任何抗体捕获方法成为对于未来制药需求的有吸引力的备选方法:(a) ProA作为配体和/或(b) 色谱法作为主要捕获步骤。

[0005] 背景技术包括Patchornick et al., Bioconjugate Chemistry, 2013, Volume 24, 1270-1275页; Guse et al., *J. Chromatogr A.* (1994) 661, 13-23; Manske et al., *J. Immunol Methods* (1997) 2008, 65-73; Follman and Fahrner *J. Chromatogr A.* (2004) 1024, 79-85和Ghosh and Wang, *J. Chromatogr A.* (2006) 1107, 104-109。

[0006] 发明概述

发现了抗体纯化的新概念。人类免疫球蛋白G (hIgG)和小鼠IgG几乎定量(通过密度测定为~95%)分配至非离子型去污剂、金属离子和疏水性螯合剂的聚集体中,而大部分(通过密度测定为> 85%)非IgG蛋白(即杂质)被拒绝。该过程为高度特异性的,因为其依赖于螯合剂和金属的存在。可提取吸附或包埋在聚集体内的抗体而不会伴随发生聚集体的溶解并导致更纯的IgG制备物(通过密度测定为~95%)。该过程的总产率包括:Ig分配和提取范围在~40-46%之间(通过密度测定)。圆二色性光谱(CD)证明保持了提取的hIgG的二级结构。

[0007] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种分离抗体的方法,方法包括:

(a) 使疏水性螯合剂、非离子型去污剂和金属离子接触,以产生包含疏水性螯合剂、所述去污剂和金属离子的聚集体;和

(b) 在使得抗体能够分配至聚集体中的条件下使聚集体与包含抗体的培养基接触,从而分离抗体。

[0008] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种试剂盒,其包含疏水性螯合剂、非离子型去污剂、pH在3-6之间的缓冲液和金属离子。

[0009] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种试剂盒,其包含疏水性螯合剂、聚山梨酯表面活性剂和金属离子。

[0010] 根据本发明的一些实施方案,培养基包含细胞裂解物。

[0011] 根据本发明的一些实施方案，细胞裂解物为全细胞裂解物。

[0012] 根据本发明的一些实施方案，细胞裂解物没有大于约2微米的细胞器。

[0013] 根据本发明的一些实施方案，步骤(b)的条件包括盐水平低于100 mM。

[0014] 根据本发明的一些实施方案，方法进一步包括在步骤(b)后增溶抗体。

[0015] 根据本发明的一些实施方案，增溶用pH在3-6之间的缓冲液进行。

[0016] 根据本发明的一些实施方案，增溶用pH在3.8-4之间的缓冲液进行。

[0017] 根据本发明的一些实施方案，缓冲液进一步包含盐。

[0018] 根据本发明的一些实施方案，试剂盒进一步包含pH在3-6之间的缓冲液。

[0019] 根据本发明的一些实施方案，缓冲液为羧酸缓冲液。

[0020] 根据本发明的一些实施方案，羧酸缓冲液选自异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸和乙酸钠。

[0021] 根据本发明的一些实施方案，缓冲液包含氨基酸。

[0022] 根据本发明的一些实施方案，非离子型去污剂为聚山梨酯表面活性剂。

[0023] 根据本发明的一些实施方案，聚山梨酯表面活性剂选自聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60和聚山梨酯80。

[0024] 根据本发明的一些实施方案，疏水性螯合剂包含8-羟基喹啉。

[0025] 根据本发明的一些实施方案，疏水性螯合剂包括菲咯啉。

[0026] 根据本发明的一些实施方案，菲咯啉选自N-(1,10-菲咯啉-5-基)甲酰胺(Phen-C1)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)乙酰胺(Phen-C2)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丙酰胺(Phen-C3)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丁酰胺(Phen-C4)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)戊酰胺(Phen-C5)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)庚酰胺(Phen-C7)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)壬酰胺(Phen-C9)和N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)。

[0027] 根据本发明的一些实施方案，菲咯啉选自红菲咯啉、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)和N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)。

[0028] 根据本发明的一些实施方案，菲咯啉为红菲咯啉。

[0029] 根据本发明的一些实施方案，金属离子为二价金属离子。

[0030] 根据本发明的一些实施方案，二价金属离子选自Zn^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}和Co^{2+}。

[0031] 根据本发明的一些实施方案，二价金属离子选自Zn^{2+}和Fe^{2+}。

[0032] 根据本发明的一些实施方案，疏水性螯合剂以约0.1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于水溶液中。

[0033] 根据本发明的一些实施方案，培养基包括杂交瘤培养基。

[0034] 根据本发明的一些实施方案，培养基包含血清白蛋白。

[0035] 根据本发明的一些实施方案，金属离子以约0.1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于水溶液中。

[0036] 根据本发明的一些实施方案，细胞裂解物来源于细菌细胞。

[0037] 根据本发明的一些实施方案，细胞裂解物来源于哺乳动物细胞。

[0038] 根据本发明的一些实施方案，哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0039] 根据本发明的一些实施方案，抗体为人源化抗体。

[0040] 根据本发明的一些实施方案，抗体为重组抗体。

[0041] 根据本发明的一些实施方案，抗体选自IgA、IgD、IgE、IgM和IgG。

[0042] 根据本发明的一些实施方案，IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0043] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明实施方案的实践或测试，但以下描述示例性的方法和/或材料。在冲突的情况下，以专利说明书(包括定义)为准。另外，材料、方法和实施例仅为说明性的，并不旨在必然为限制性的。

[0044] 附图简述

本文仅通过实施例并参考附图描述了本发明的一些实施方案。现具体地详细参考附图，要强调的是，所示的细节以实例的方式进行和出于对本发明实施方案的说明性讨论的目的。在这方面，结合附图进行的描述对于本领域的技术人员显而易见的是可如何实践本发明的实施方案。

[0045] 图1为根据本发明实施方案的本文公开的方法的示意图。与疏水性螯合剂一起温育后，将由非离子型去污剂组成的胶束转化为工程化胶束，并在存在Fe^{2+}离子的情况下进行特异性团簇，从而形成由[金属:螯合剂]络合物互连的胶束聚集体。抗体分配至胶束聚集体中，而其他亲水性更高的蛋白则不会。在保持去污剂聚集体完整的确定条件下完成目标IgG的进一步提取。

[0046] 图2A-D为说明光学显微术和低温TEM分析效果的照片。光学显微术:A. Tween-20胶束经[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]红色络合物缀合。B. 如A但是在没有Fe^{2+}的情况下的对照实验。低温TEM:C. Tween-20胶束经[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物缀合。D. 仅含Tween-20胶束(黑点)的对照实验。

[0047] 图3A-C为说明SDS-PAGE分析结果的照片。A. 工艺可行性以及与金属和螯合剂的依赖关系。泳道1:大肠杆菌裂解物;泳道2:目标hIgG;泳道3:在存在[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物的情况下的沉淀组成;泳道4-5:如泳道3但分别没有螯合剂和金属;泳道6:在没有任何添加蛋白的情况下的Tween-20聚集体。泳道3中的星号标记没有任何蛋白的染色的Tween-20聚集体。凝胶被考马斯染色。B. 离子强度对hIgG纯化的影响。泳道3-8的hIgG纯化在指定NaCl浓度下进行。C. 离子强度对小鼠IgG纯化的影响。泳道3-8如B中。

[0048] 图4A-C说明在存在不同二价金属阳离子的情况下的工艺效率:泳道1:大肠杆菌裂解物;泳道2:目标hIgG;泳道3:在存在[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物的情况下的沉淀组成;泳道4-5:如泳道3但分别存在Zn^{2+}和Ni^{2+}。B. 在存在合成的1,10-菲咯啉衍生物的情况下的工艺效率。泳道1:大肠杆菌裂解物;泳道2:目标hIgG;泳道3-6:在分别存在红菲咯啉、Phen-C10、Phen-C8和Phen-C6的情况下的沉淀组成。C. 所用螯合剂的化学结构。凝胶被考马斯染色。

[0049] 图5A-B为常用的大规模mAb纯化工艺(A)和利用Tween-20聚集体的备选路线(B)的示意图。UF和DF分别代表超滤和渗滤。

[0050] 图6A-C说明SDS-PAGE和CD分析。A. 从Tween-20聚集体提取hIgG。泳道1:大肠杆菌裂解物;泳道2:目标hIgG;泳道3-8:用指定缓冲液和盐浓度温育之后的上清液组成。B. 如A

但存在小鼠IgG。凝胶被考马斯染色。C. 在20 mM NaCl中存在50 mM AcOH (pH 4.6)的情况下从Tween-20聚集体提取的hIgG的CD分析。

[0051] 图7A-D说明BSA对无血清培养基中的人类和小鼠IgG纯化的影响。A. 人类IgG(hIgG)捕获:泳道1:hIgG和BSA;泳道2-10:如实验中所述,在将Tween-20聚集体与hIgG (1 mg/ml)和指定浓度的BSA一起在无血清培养基中温育之后获得的沉淀组成。B:如实验中所述,将在凝胶A-I (泳道2-10)中产生的相应沉淀与50 mM异亮氨酸在pH 3.8下一起温育之后的上清液组成。C和D如A中所述但存在小鼠IgG。字母:H和L分别代表目标抗体的还原的重链和轻链。字母A指向去污剂聚集体泳带。凝胶被考马斯染色。

[0052] 图8A-E说明提取缓冲液效率、圆二色性分析和DLS分析。A. 缓冲液组成对hIgG提取的影响。泳道1:hIgG和BSA;泳道2:如实验中所述,在将Tween-20聚集体与hIgG (1 mg/ml)和BSA (0.5 mg/ml)一起在无血清培养基中温育之后获得的沉淀组成;泳道3-9:如实验中所述,在用含有指定氨基酸的缓冲液(pH 3.8)从泳道2所示条件下产生的沉淀提取hIgG之后的上清液组成。字母:H和L分别代表目标抗体的还原的重链和轻链。字母A指向去污剂聚集体泳带。凝胶被考马斯染色。B-C. 相对于未经受任何纯化的相同IgG作为对照(黑线),经受用Tween-20聚集体纯化和用指定缓冲液(pH 3.8)提取的人类和小鼠IgG (虚线)的动态光散射(DLS)分析。D. 以下的圆二色性(CD)吸收:对照(未经处理的) hIgG-直线相对于纯化的hIgG-虚线。E. 如D但用小鼠IgG。

[0053] 图9A-B:提取的IgG的ELISA分析。使源自兔(裸)或绵羊(生物素化)的多克隆抗BSA IgG经受所呈现的纯化方法,并用指定氨基酸缓冲液(50 mM) (pH 3.8)在32℃下从Tween-20聚集体提取(5分钟)。这些纯化的Ab结合BSA上其靶表位的能力如材料和方法中所述通过ELISA测定确定。呈现的数据至少依赖于12次独立实验。

[0054] 图10A-B. 用Tween-20聚集体纯化IgM。A. IgM捕获的特异性。泳道1:hIgG;泳道2:BSA;泳道3:牛多克隆IgM;泳道4:IgM + BSA混合物(使用总量);泳道5:在将IgM + BSA混合物与[Tween-20:batho:Fe2+]聚集体一起温育并去除上清液之后的沉淀组成。星号指向染色的Tween-20聚集体;泳道6-7:如泳道5但分别仅不存在螯合剂(batho)或仅不存在金属(Fe2+);泳道8:由以下组成的沉淀:没有任何添加蛋白的[Tween-20:batho:Fe2+]聚集体。B. IgM提取。泳道1:hIgG;泳道2:牛多克隆IgM;泳道3:在将IgM与[Tween-20:batho:Fe2+]聚集体一起温育并去除上清液之后的沉淀组成。星号指向染色的Tween-20聚集体;泳道4-7:在将含有IgM的Tween-20沉淀与指定浓度的尿素一起在pH 3下温育之后的上清液组成。两种凝胶均被考马斯染色。

[0055] 本发明具体实施方案的描述

本发明在其一些实施方案中涉及用于纯化抗体的方法和试剂盒。特别是,方法涉及没有使用常用配体蛋白A (ProA)而进行抗体捕获的备选路线。

[0056] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前,应当理解,本发明其应用不一定限于以下描述所述或通过实施例举例说明的细节。本发明能够具有其他实施方案,或者能够以各种方式实践或实施。

[0057] 抗体的纯化一般地使用蛋白A (ProA)色谱作为初始捕获步骤。然而,proA色谱非常昂贵,产生“生产力瓶颈”。

[0058] 因此,本发明人寻找了用于纯化IgG的备选方法。尽管抗体为高度亲水性的,但本

发明人令人惊讶地发现，一般地用于分离疏水性蛋白的缀合的Tween-20 (聚山梨酯20)胶束也可用作用于分离抗体的常用ProA柱的备选方法。其实验结果表明，由非离子型去污剂Tween-20组成的胶束可在存在疏水性[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]红色络合物的情况下特异性缀合，导致形成颗粒状红色沉淀(图2A)。发现胶束缀合为高度特异性的，因为在不存在金属(图2B)或螯合剂(未显示)的情况下不会发生。用低温TEM分析红色聚集体表明，[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物导致各种聚集形式，其中一些的大小达到100 nm (图2C)，而在不存在络合物的情况下，胶束分散体表现为单分散性(图2D)。这些结果为[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物诱导胶束团簇的能力提供了直接证据。

[0059] 为了证明IgG纯化，将目标人类IgG在大肠杆菌裂解物(用作人工污染背景)中的混合物加入到预先形成的Tween-20聚集体中。温育5分钟之后，将混合物离心并弃去上清液中存在的杂质。通过SDS-PAGE分析沉淀，揭示存在还原的重链和轻链(图3A泳道3)。此外，系统中存在的绝大部分杂质(图3A泳道1)在沉淀(图3A泳道3)中不存在，这与以下假设一致：除IgG以外的水溶性蛋白(平均比IgG具有更大极性)不会与Tween-20聚集体缔合，而抗体分子会缔合。

[0060] 为了证明工艺的普遍性，本发明人还用多克隆小鼠IgG研究了IgG分配行为的依赖关系(图3C)，并发现了非常相似的模式。来自不同生物学来源(人类和小鼠)的IgG有效地分配至Tween-20聚集体中的事实表明，本纯化策略可能与目标IgG的特定氨基酸序列无关。这继而可避免为每种治疗性单克隆抗体开发特定纯化方案的需要，从而可实现标准化纯化平台。

[0061] 两种示例性缓冲液系统(NaOAc pH 4.6和Gly pH 4)证明了其从Tween-20聚集体提取hIgG和小鼠IgG，同时显著抑制聚集体溶解和伴随发生疏水性杂质提取的能力(图6A-B)。用圆二色性(CD)研究了hIgG二级结构的保持(图6C)。CD分析表明，纯化的hIgG的二级结构未发生明显变化(图6C)。

[0062] 还显示出其他缓冲液系统能够从Tween-20聚集体中提取hIgG和小鼠IgG-参见图8A。

[0063] 在进一步简化本发明实践的同时，本发明人表明该纯化策略也可用于从杂交瘤无血清培养基纯化抗体(图7A-D)。

[0064] 本发明人的抗体在纯化后保持活性(参见图9A-B)。

[0065] 另外，本发明人表明，纯化方案不仅对单体抗体(IgG)有效，而且对五聚抗体(IgM)有效 - 参见图10A-B。

[0066] 此处呈现的提纯策略具有一些固有优点：(A) 降低原料成本；(B) 不涉及由于配体变性导致的较低纯化产率，因为不包括特异性配体。(C) 亲和柱的有限容量(目前为30 gr/L)不适用于目前技术，因为其不依赖于使用柱和亲和树脂；和(D) 速度-目前使用的大规模抗体纯化工艺需要1-2天。可能的是，去除一个(或两个)色谱步骤将明显缩短总纯化时间，从而助于生产效率。

[0067] 因此，本发明的第一方面提供一种分离抗体的方法，方法包括：

(a) 使疏水性螯合剂、非离子型去污剂和金属离子接触，以产生包含疏水性螯合剂、去污剂和金属离子的聚集体；和

(b) 在使得抗体能够分配至聚集体中的条件下使聚集体与包含抗体的培养基接触，从

而分离抗体。

[0068] 本发明使用的术语“抗体”包括能够与抗原表位结合的完整分子及其功能片段(比如Fab、F(ab')$_2$、Fv、scFv、dsFv或单结构域分子(比如VH和VL))。

[0069] 本发明考虑的合适抗体片段包括免疫球蛋白轻链(本文称为“轻链”)的互补决定区(CDR)、免疫球蛋白重链(本文称为“重链”)的互补决定区、轻链的可变区、重链的可变区、轻链、重链、Fd片段以及包含轻链和重链两者的基本上整个可变区的抗体片段,比如Fv、单链Fv (scFv)、二硫键稳定的Fv (dsFv)、Fab、Fab'和F(ab')$_2$。

[0070] 本文使用的术语“互补决定区”或“CDR”可互换使用,是指在重链和轻链多肽的可变区内存在的抗原结合区。通常,抗体在每个VH中包含3个CDR (CDR H1或H1;CDR H2或H2;和CDR H3或H3),和在每个VL中包含3个CDR (CDR L1或L1;CDR L2或L2;和CDR L3或L3)。

[0071] 组成可变区或CDR的特定抗体中氨基酸残基的身份可使用本领域众所周知的方法来确定,并且包括以下方法:比如Kabat等定义的序列变异性(参见例如Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.)、Chothia等定义的结构环区的位置(参见例如Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989.)、使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(现为Accelrys™, 参见Martin et al., 1989, Proc. Natl Acad Sci USA. 86:9268; 和网址www(dot)bioinf-org(dot)uk/abs)在Kabat和Chothia之间达成的折衷方案、通过接触定义(参见MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996)定义的可用复杂晶体结构和“构象定义”(参见例如Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166, 2008)。

[0072] 本文使用的“可变区”和“CDR”可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的可变区和CDR。

[0073] 包含轻链和重链两者的全部或基本上全部可变区的功能性抗体片段定义如下:

(i) Fv,定义为由轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)组成的表示为两条链的基因工程片段;

(ii) 单链(“scFv”),包含通过合适的多肽接头作为基因融合的单链分子连接的轻链可变区和重链可变区的基因工程单链分子;

(iii) 二硫键稳定的Fv (“dsFv”),包含通过基因工程二硫键连接的轻链可变区和重链可变区的基因工程抗体;

(iv) Fab,含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段,其可通过用酶木瓜蛋白酶处理完整抗体以产生完整轻链和重链的Fd片段(由其可变及CH1结构域组成)来获得;

(v) Fab',含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段,其可通过用酶胃蛋白酶处理完整抗体,随后还原来获得(每个抗体分子获得两个Fab'片段);

(vi) F(ab')2,含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段,其可通过用酶胃蛋白酶处理完整抗体来获得(即通过两个二硫键结合在一起的Fab'片段的二聚体);和

(vii) 单结构域抗体或纳米抗体由对抗原表现出足够亲和力的单个VH或VL结构域组成。

[0074] 在一个实施方案中,抗体为多克隆抗体。

[0075] 在另一个实施方案中,抗体为单克隆抗体。

[0076] 在仍然另一个实施方案中,抗体为重组抗体。

[0077] 在仍然另一个实施方案中,抗体为人源化抗体。

[0078] 在仍然其他实施方案中,抗体为IgA、IgD、IgE和IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。

[0079] 在仍然其他实施方案中,抗体为IgM。

[0080] 产生多克隆和单克隆抗体及其片段的方法为本领域众所周知的(参见例如Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 通过参考结合至本文中)。

[0081] 本发明一些实施方案的抗体片段可通过抗体的蛋白水解或者通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养或其他蛋白表达系统)中表达编码片段的DNA来制备。抗体片段可经常规方法通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体来获得。例如,抗体片段可通过用胃蛋白酶酶促裂解抗体,以提供表示为F(ab')2的5S片段来产生。该片段可使用硫醇还原剂来进一步裂解,和任选地使用用于由二硫键裂解产生的巯基的保护基,以产生3.5S Fab'单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶促裂解直接产生两个单价Fab'片段和一个Fc片段。

[0082] 这些方法例如由Goldenberg的美国专利第4036945和4331647号以及其中包含的参考文献描述,所述专利特此通过参考以其全部结合。也请参见Porter, R.R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]。也可使用裂解抗体的其他方法,比如分离重链以形成单价轻-重链片段,进一步裂解片段或其他酶促、化学或基因技术,只要片段与完整抗体识别的抗原结合即可。

[0083] Fv片段包含VH和VL链的缔合。如Inbar等所述,这种缔合可为非共价的[Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]。或者,可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学物质(比如戊二醛)交联。优选地,Fv片段包含通过肽接头连接的VH和VL链。这些单链抗原结合蛋白(sFv)通过构建包含经寡核苷酸连接的编码VH和VL结构域的DNA序列的结构基因来制备。将结构基因插入表达载体,随后将其引入到宿主细胞(比如大肠杆菌)中。重组宿主细胞合成具有桥接两个V结构域的接头肽的单个多肽链。用于产生sFv的方法例如由[Whitlow and Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993); 和美国专利第4946778号描述,其特此通过参考以其全部结合。

[0084] 抗体片段的另一种形式为编码单个互补决定区(CDR)的肽。CDR肽("最小识别单位")可通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得。这种基因例如通过使用聚合酶链反应从产生抗体的细胞的RNA合成可变区来制备。参见例如Larrick and Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)]。

[0085] 非人类(例如鼠)抗体的人源化形式为含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(比如Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$或抗体的其他抗原结合子序列)的嵌合分子。

[0086] 人源化抗体包括人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人类物种(供体抗体) (比如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基取代。在一些情况下,人类免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人类

残基取代。

[0087] 人源化抗体还可包含在受体抗体或导入的CDR或框架序列中均不存在的残基。通常，人源化抗体将包含至少一个(和一般地两个)可变结构域的基本上全部，其中所有或基本上所有CDR区对应于非人类免疫球蛋白的那些，和所有或基本上所有FR区为人类免疫球蛋白共有序列的那些。最佳地，人源化抗体还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc)，一般地为人类免疫球蛋白的恒定区[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 和Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

[0088] 用于使非人类抗体人源化的方法为本领域众所周知的。通常，人源化抗体具有从非人类来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常称为导入残基，其一般地取自导入可变结构域。人源化基本上可按照Winter及同事的方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]，通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人类抗体的相应序列来进行。因此，这种人源化抗体为嵌合抗体(美国专利第4816,567号)，其中基本上少于完整的人类可变结构域已被来自非人类物种的相应序列取代。实际上，人源化抗体一般地为人类抗体，其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。人类抗体也可使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生[Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]。Cole等和Boerner等的技术也可用于制备人类单克隆抗体(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)和Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]。

[0089] 类似地，可通过将人类免疫球蛋白基因座引入到转基因动物(例如其中内源性免疫球蛋白基因已部分或完全灭活的小鼠)中来制备人类抗体。攻击后，观察到人类抗体产生，其在所有方面均与在人类中所见非常相似，包括基因重排、组装和抗体库。该方法描述于例如美国专利第5545807、5545806、5569825、5625126、5633425、5661016号以及以下科学公开中:Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); 和Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995)。

[0090] 当使用重组技术时，抗体可在细胞内、周质空间产生，或者直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生，作为第一步，可例如通过离心或超滤去除宿主细胞或裂解细胞的颗粒碎片。当抗体被分泌到培养基中时，可首先使用可市售的蛋白浓缩过滤器(例如Amicon™或Millipore Pellicon™超滤单元)浓缩来自这种表达系统的上清液。

[0091] 可通过多种方法进行细胞裂解，包括机械剪切、渗透休克或酶处理。这种破坏将细胞的全部内容物释放到匀浆中，并且另外产生由于其体积小而难以去除的亚细胞碎片。这些通常通过差速离心或通过过滤去除。当分泌抗体时，通常首先使用可市售的蛋白浓缩过滤器(例如Amicon™或Millipore Pellicon™超滤单元)浓缩来自这种表达系统的上清液。当抗体被分泌到培养基中时，重组宿主细胞也可例如通过切向流过滤从细胞培养基分离。

[0092] 本文使用的术语“细胞裂解物”是指包含抗体的细胞生物材料的水溶液，其中细胞

材料的大部分细胞已被破坏并释放其内部组分。

[0093] 在一个实施方案中,细胞裂解物从全细胞制备。

[0094] 在全细胞裂解物的情况下,应当意识到,在细胞膜破裂后,可处理细胞裂解物以去除大于约2微米的细胞器(例如细胞核)。因此,例如可将全细胞裂解物离心以从细胞裂解物沉淀出细胞核。示例性的离心条件包括以500-1000 xg离心1-5分钟(例如以985 xg离心2分钟)。

[0095] 可从表达抗体的任何细胞制备细胞裂解物。细胞可为真核的(例如哺乳动物、植物、真菌)或原核的(细菌)。

[0096] 在一个实施方案中,细胞将抗体分泌到其细胞质中。

[0097] 可将细胞基因修饰以表达抗体。在另一个实施方案中,细胞未经基因修饰。

[0098] 考虑的示例性细胞包括(但不限于)革兰氏阴性细菌细胞,比如大肠杆菌;革兰氏阳性细菌细胞,比如短小芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和乳杆菌(例如玉米/干酪乳杆菌(*Lactobacillus zeae/casei*)或副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*));酵母细胞,比如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*);丝状真菌,比如木霉属(*Trichoderma*)和曲霉属(*Aspergillus*);昆虫细胞;哺乳动物细胞,包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和植物细胞。

[0099] 在一个实施方案中,细胞已被永生化并且为细胞系的一部分 - 例如杂交瘤。如所述,通过使包含抗体的培养基与非离子型去污剂、疏水性螯合剂和金属离子的聚集体接触来进行本发明该方面的分离方法。

[0100] 用于培养产生抗体的细胞的细胞培养基的实例包括杂交瘤培养基 - 例如无血清杂交瘤培养基。这种培养基可易于从公司比如Gibco、Thermo Fisher Scientific和Sigma-Aldrich获得。

[0101] 在一个实施方案中,培养基包含血清白蛋白,比如马血清白蛋白(HAS)或牛血清白蛋白(BSA)。

[0102] 优选地,血清白蛋白以小于0.5 mg/ml的浓度存在,例如在0.1-0.5 mg/ml之间。

[0103] 在该步骤之前,可任选地澄清培养基。

[0104] 本文使用的术语“澄清的”是指已经历固液分离步骤(包括离心、微滤和深度过滤中的一种或多种)以去除宿主细胞和/或细胞碎片的样品(即细胞悬液)。澄清的发酵液可为细胞培养上清液。澄清有时称为初步或初始回收步骤,并且一般地在任何色谱或类似步骤之前进行。

[0105] 术语“非离子型去污剂”是指包含非荷电的亲水性头基的去污剂。一些非离子型去污剂基于聚氧乙烯或糖苷。前者的常见实例包括Tween、Triton和Brij系列。这些材料也称为乙氧基化物或聚乙二醇化物及其代谢物壬基酚。糖苷具有糖作为其非荷电亲水性头基。实例包括辛基硫代葡萄糖苷和麦芽糖苷。HEGA和MEGA系列去污剂相似,具有糖醇作为头基。

[0106] 根据一个特定实施方案,非离子型去污剂为聚山梨酯表面活性剂。这种的实例包括(但不限于)聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60和聚山梨酯80。

[0107] 在一个实施方案中，非离子型去污剂为聚山梨酯20。

[0108] 本发明考虑的其他示例性非离子型去污剂包括属于普卢兰尼克家族的那些(例如F-68和F-127)。

[0109] 本文使用的术语“螯合剂”是指通过在多齿配体和单个中心原子之间形成或存在两个或更多个单独的配位键而结合来自溶液的金属离子的化合物。本发明该方面的螯合剂能够螯合用于分离的金属离子。优选地，螯合剂静电地(非共价地)与金属离子结合。根据一个特定实施方案，螯合剂能够以2:1或更大的螯合剂与金属的比率螯合金属离子。

[0110] 螯合剂的疏水性使得其能够分配至非离子型去污剂的聚集体中。在一个实施方案中，螯合剂能够嵌入到非离子型去污剂的聚集体中。

[0111] 在一个实施方案中，疏水性螯合剂包含至少8个碳(例如在链中或在环中)，并且不包含荷电基团。

[0112] 在一些实施方案中，疏水性螯合剂为8-羟基喹啉或其衍生物。8-羟基喹啉的示例性衍生物包括(但不限于)2-甲基-8-羟基喹啉(CH3-HQ)、5,7-二氯-2-甲基-8-羟基喹啉(Cl2-CH3-HQ)、5,7-二溴-8-羟基喹啉(Br2-HQ)、5-磺基-7-碘-8-羟基喹啉(ferron)和5-磺基-8-羟基喹啉(SO3H-HQ)。

[0113] 在一些实施方案中，疏水性螯合剂包括菲咯啉，例如1,10-菲咯啉。也可考虑未被亲水性取代基取代的其他菲咯啉类。

[0114] 示例性的疏水性菲咯啉包括(但不限于)红菲咯啉和N-(1,10-菲咯啉-5-基)烷基酰胺，烷基的长度为1-10个碳原子。示例性的N-(1,10-菲咯啉-5-基)烷基酰胺化合物包括N-(1,10-菲咯啉-5-基)甲酰胺(Phen-C1)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)乙酰胺(Phen-C2)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丙酰胺(Phen-C3)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)丁酰胺(Phen-C4)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)戊酰胺(Phen-C5)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)庚酰胺(Phen-C7)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)壬酰胺(Phen-C9)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)。

[0115] 在一些这种实施方案中，菲咯啉选自红菲咯啉、N-(1,10-菲咯啉-5-基)己酰胺(Phen-C6)、N-(1,10-菲咯啉-5-基)癸酰胺(Phen-C10)和N-(1,10-菲咯啉-5-基)辛酰胺(Phen-C8)。

[0116] 全文中，“烷基酰胺”描述-NH-C(=O)-R，其中R为烷基。

[0117] 术语“烷基”描述包括直链和支链基团的饱和脂肪族烃。优选地，烷基的长度为1-20个碳原子。每当本文说明数值范围例如“1-20”时，这意味着基团(在这种情况下为烷基)可含有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等，直至并包括20个碳原子。更优选地，烷基为具有1-10个碳原子的中等大小的烷基。烷基可为取代或未取代的。取代的烷基可具有一个或多个取代基，其中每个取代基可独立地为例如烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基和杂芳基。另外的取代基可包括例如羟基烷基、三卤代烷基、杂脂环族、胺、卤化物、磺酸酯、亚砜、膦酸酯、羟基、烷氧基、芳氧基、硫羟基、硫烷氧基、硫芳氧基、氰基、硝基、偶氮基、磺酰胺、C-羧酸酯、O-羧酸酯、N-硫代氨基甲酸酯、O-硫代氨基甲酸酯、脲、硫脲、N-氨基甲酸酯、O-氨基甲酸酯、C-酰胺、N-酰胺、脒基、胍和肼，只要保持螯合剂的功能性即可。

[0118] 在一些实施方案中，菲咯啉为Phen-C10或Phen-C8。

[0119] 疏水性螯合剂的另外实例包括酸性有机磷螯合剂，例如DEHPA、EHEHPA和DTMPPA；

中性有机磷螯合剂(例如TBP和三正辛基氧化膦(TOPO))、双官能有机磷螯合剂(例如CMPO和N,N,N',N'-四辛基-3-氧杂mentane二酰胺(TOGDA));碱性螯合剂,例如三正辛胺(TOA)和三辛基甲基氯化铵。也可使用本领域技术人员已知的其他螯合剂,包括羟基肟类(例如5,8-二乙基-7-羟基-6-十二烷肟和2-羟基-5-壬基苯乙酮肟)、冠醚类(例如二叔丁基-二环己基-18-冠-6)和二硫代缩氨基脲。

[0120] 根据一些实施方案,疏水性螯合剂以约0.1%-约10% (v/v),比如约0.5%-约10% (v/v)、约1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于水溶液中,比如约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%的20 mM螯合剂溶液。

[0121] 在一些实施方案中,金属离子为二价金属离子。

[0122] 在一些实施方案中,二价金属离子选自Zn^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}和Co^{2}+。优选地,二价金属离子为Zn^{2+}或Fe^{2+}。

[0123] 在一些实施方案中,金属离子以约0.1%-约10% (v/v)范围内的浓度存在于水溶液中,比如约0.5%-约10% (v/v)、约1%-约10% (v/v)、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%的50 mM金属离子溶液。

[0124] 温育条件使得形成包含金属离子、疏水性螯合剂和非离子型去污剂的聚集体。

[0125] 因此,例如聚集体的产生一般地在约0℃-约25℃,和更优选地约4℃-约25℃的温度下进行。本发明该方面的聚集体一般地在10-500 nM、10-200 nM、1-100 mM或10-100 mM之间。

[0126] 聚集体中的盐(例如NaCl)浓度一般地低于100 mM,和更优选地低于50 mM。在一个实施方案中,盐浓度低于40 mM、低于30 mM、低于20 mM、低于10 mM或者甚至低于5 mM。示例性的范围包括20-100 mM、20-50 mM、0-50 mM、0-40 mM、0-30 mM、0-25 mM、0-20 mM。在一个特定实施方案中,盐浓度为约25 mM。

[0127] 在一些实施方案中,使非离子型去污剂与疏水性螯合剂接触在与金属离子接触之前进行。

[0128] 在其他实施方案中,使非离子型去污剂与疏水性螯合剂接触同与金属离子接触同时进行。

[0129] 在仍然其他的实施方案中,疏水性螯合剂首先与金属离子接触,并然后与非离子型去污剂接触。一旦形成聚集体,就使其在使得抗体(存在于细胞裂解物中)能够分配至聚集体中的条件下与细胞裂解物接触。

[0130] 一旦发生这种情况(数秒到数小时-例如5分钟到1小时),尽管在一些情况下(例如在大型络合物的情况下)离心不必要或者可使用非常温和的离心(这样使得溶液更致密,例如以13K的速度离心1-5分钟),但通过离心(例如超速离心)可促进络合物的沉淀。

[0131] 沉淀后,抗体可从沉淀的络合物中释放,即增溶。

[0132] 最初,可洗涤沉淀 - 例如以低盐溶液(例如低于50 mM,例如20 mM NaCl溶液)洗涤。

[0133] 可用pH在3-6之间,和更优选地在3.8-5之间的缓冲液进行提取。在一个实施方案中,缓冲液为羧酸缓冲液,其实例包括(但不限于)乙酸钠和柠檬酸钠。乙酸钠的示例性pH为约pH 4.6。

[0134] 在另一个实施方案中,缓冲液包含氨基酸。在一个实施方案中,缓冲液包含单一氨

基酸。在另一个实施方案中，缓冲液包含至少两种氨基酸。

[0135] 在一个实施方案中，氨基酸为一种可以竞争以下的氨基酸：(i) 抗体侧链与去污剂聚集体之间的疏水相互作用(例如缬氨酸或异亮氨酸)；(ii) 抗体侧链与去污剂聚集体之间的离子和/或H键相互作用(例如天冬氨酸、谷氨酸或精氨酸)；或(iii) 抗体侧链与去污剂聚集体之间的金属螯合相互作用(例如组氨酸)。

[0136] 在一个特定实施方案中，氨基酸缓冲液为甘氨酸、缬氨酸或异亮氨酸。在另一个实施方案中，氨基酸缓冲液为异亮氨酸。

[0137] 氨基酸缓冲液的示例性pH为约pH 3.8或pH 4。

[0138] 可将样品加热一段时间以增强提取效果 - 例如(1-60分钟)、1分钟、5分钟、10分钟。选择温度使得其不影响所提取抗体的活性和不引起去污剂聚集体经历溶解。示例性的温度在25-35℃之间。根据一个特定实施方案，将样品在32℃下加热5分钟。

[0139] 为了提高所释放抗体的纯度，可将盐加入到缓冲液中(例如在5-50 mM NaCl或10-20 mM NaCl之间)。为了增加从络合的沉淀释放的抗体的量，本发明人考虑使用不含盐的缓冲液。然而，应当意识到，然后所释放抗体的纯度可能会受到损害。

[0140] 根据分离和任选地增溶的抗体的预期用途，可使与之结合的蛋白(膜或胞质)或物质经受进一步的纯化步骤。这可通过使用本领域众所周知的多种生化方法来进行。实例包括(但不限于)在疏水相互作用色谱上(例如在苯基琼脂糖上)分级分离、乙醇沉淀、等电聚焦、反相HPLC、硅胶色谱、肝素琼脂糖色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析、病毒灭活(例如病毒过滤)和超滤。

[0141] 另外纯化步骤(及其可进行的顺序)的实例概述于图5B中。

[0142] 阴离子交换色谱为一种使用含有荷正电基团(比如二乙基氨基乙基(DEAE))的离子交换树脂，基于物质的电荷进行分离的方法。在溶液中，树脂被荷正电的反荷离子(阳离子)包覆。阴离子交换树脂将与荷负电的分子结合，置换反荷离子。

[0143] 阳离子交换色谱为一种使用含有荷负电基团(比如羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸根(P)和磺酸根(S))的离子交换树脂，基于物质的电荷进行分离的方法。在溶液中，树脂被荷负电的反荷离子(阴离子)包覆。阳离子交换树脂将与荷正电的分子结合，置换反荷离子。

[0144] 本文使用的短语“病毒灭活”是指特定样品中外来包膜病毒活性的降低(“灭活”)。包膜病毒活性的这种降低可为约3个对数减少因子(LRF)，优选地为约4 LRF，更优选地为约5 LRF，甚至更优选地为约6 LRF的量级。

[0145] 可使用多种病毒灭活方法中的任何一种或多种，包括热灭活(巴氏灭菌)、pH灭活、溶剂/去污剂处理、UV和γ射线辐照以及添加某些化学灭活剂，比如β-丙内酯或者例如如美国专利第4534972号中的菲咯啉铜，其全部讲授通过参考结合至本文中。

[0146] pH病毒灭活的方法包括(但不限于)将混合物在低pH下温育一段时间，并随后中和pH。在某些实施方案中，将混合物在约2-5之间的pH下，优选地在约3-4之间的pH下，和更优选地在约3.6的pH下温育。

[0147] 样品混合物的pH可通过任何合适的酸来降低，包括(但不限于)柠檬酸、乙酸、辛酸或其他合适的酸。pH水平的选择很大程度上取决于抗体产物的稳定性特征和缓冲液组分。

已知低pH病毒灭活期间目标抗体的质量受pH和低pH温育持续时间的影响。在某些实施方案中，低pH温育持续时间将为0.5小时-2小时，优选地为0.5小时-1.5小时，和更优选地持续时间为约1小时。除蛋白浓度之外，病毒灭活还取决于这些相同的参数，这可能会限制高浓度下的灭活。

[0148] 因此，可选择蛋白浓度、pH和灭活持续时间的适当参数，以实现所期望的病毒灭活水平。

[0149] 在某些实施方案中，进行病毒过滤。这可经使用合适的过滤器来实现。合适过滤器的非限制性实例为来自Pall Corporation的Ultipor DV50™过滤器。在某些实施方案中，将备选过滤器用于病毒灭活，比如(但不限于)Sartorius过滤器、Viresolve™过滤器(Millipore, Billerica, Mass.)；Zeta Plus VR™过滤器(CUNO; Meriden, Conn.)；和Planova™过滤器(Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, 111.)。

[0150] 超滤详细描述于：Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman and A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996)；以及Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)中。优选的过滤方法为切向流过滤，如Millipore目录中标题为“Pharmaceutical Process Filtration Catalogue”第177-202页(Bedford, Mass., 1995/96)中所述。超滤通常认为意指使用孔径使得能够转移平均大小为50 kDa (例如)或更小的蛋白的过滤器进行过滤。通过采用具有这种小孔径的过滤器，可通过使样品缓冲液渗透通过过滤器而将抗体保留在过滤器后面来减少样品的体积。

[0151] 渗滤为一种使用超滤器去除和交换盐、糖和非水性溶剂，与结合的物类分离，去除低分子量物质和/或引起离子和/或pH环境快速变化的方法。通过以近似等于超滤速率的速率向要超滤的溶液中添加溶剂，可最有效地去除微量溶质。这从溶液中以恒定体积洗涤微量物类，有效地纯化保留的抗体。在本发明的某些实施方案中，任选地在进一步色谱或其他纯化步骤之前，采用渗滤步骤来交换与本发明结合使用的各种缓冲液，以及从抗体中去除杂质。

[0152] 在一个实施方案中，将分离出的抗体结晶。

[0153] 本文使用的术语“结晶”是指目标分子的固化，以形成其原子的规则重复的内部排列，并且经常形成外平面。

[0154] 可将本领域已知的几种结晶方法应用于样品，以促进目标分子的结晶。结晶方法的实例包括(但不限于)自由界面扩散法[Salemme, F. R. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151:533-539]、悬滴或坐滴法中的蒸气扩散(McPherson, A. (1982) Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley and Son, New York, pp 82-127)和液体透析(Bailey, K. (1940) Nature 145:934-935)。

[0155] 目前，悬滴法为用于从溶液中生长大分子晶体最常用的方法，这种方法尤其适合于产生蛋白晶体。一般地，将含有蛋白溶液的液滴点在盖玻片上，并悬于密闭的室内，该室含有具有较高浓度的沉淀剂的储器。随着时间的推移，液滴中的溶液通过从液滴中扩散水蒸气与储器平衡，从而缓慢增加液滴内的蛋白和沉淀剂的浓度，进而导致蛋白沉淀或结晶。

[0156] 在另一个实施方案中，使蛋白经受2D凝胶电泳。

[0157] 用于纯化抗体的试剂可作为试剂盒提供。

[0158] 因此，本发明的仍然另一方面提供一种用于纯化蛋白的试剂盒，其包含疏水性螯合剂、金属离子、非离子型去污剂和pH在3-6之间的缓冲液。

[0159] 这些组分已在上文进行了描述。

[0160] 在备选配置中，试剂盒可包含疏水性螯合剂、聚山梨酯表面活性剂和金属离子。

[0161] 疏水性螯合剂优选地包装在与金属离子分开的容器中。

[0162] 试剂盒还可包含蛋白酶抑制剂。

[0163] 蛋白酶抑制剂包括丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂。

[0164] 在一个实施方案中，试剂盒包含至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种蛋白酶抑制剂。

[0165] 蛋白酶抑制剂的实例包括(但不限于) AEBSF、苯丁抑制素、E-64、胃酶抑素A、膦酰二肽、亮抑酶肽和抑肽酶。

[0166] 蛋白酶抑制剂可单独或在单一容器中(即作为混合物)包装。

[0167] 蛋白酶抑制剂混合物可市售获得，例如购自Sigma Aldrich。

[0168] 优选地，本发明该方面的试剂盒的容器包含标签。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可由多种材料(比如玻璃或塑料)形成。

[0169] 另外，还可添加其他添加剂，比如稳定剂、缓冲液、阻滞剂等。

[0170] 预期在从本申请开始成熟的专利有效期期间，将开发许多相关的疏水性螯合剂，并且术语疏水性螯合剂的范围旨在先验地包括所有这些新技术。

[0171] 本文使用的术语“约”是指±10 %。

[0172] 术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有(having)”及其变化形式意指“包括(including)但不限于”。

[0173] 术语“由...组成”意指“包括且限于”。

[0174] 术语“基本上由……组成”意指所述组合物、方法或结构可包括另外的成分、步骤和/或部分，但前提是另外的成分、步骤和/或部分不会实质性地改变所要求保护的组合物、方法或结构的基础和新颖特征。

[0175] 本文使用的单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代物，除非上下文另外明确指出。例如，术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物，包括其混合物。

[0176] 在整个本申请中，本发明的各种实施方案可以范围格式呈现。应当理解，范围格式的描述仅是为了方便和简洁，而不应解释为对本发明范围的不灵活的限制。因此，应认为范围的描述已具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如，对范围(比如1-6)的描述应视为已具体公开了子范围(比如1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等)以及该范围内的单个数字(例如1、2、3、4、5和6)。无论范围的广度如何，这都适用。

[0177] 本文使用的术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术和程序，包括(但不限于)化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员已知或从已知的方式、手段、技术和程序易于开发的那些方式、手段、技术和程序。

[0178] 应当意识到，为清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。相反，为简洁起见，在单个实施方案的上下文中描述的本发

明的各种特征，也可单独地或以任何合适的亚组合或合适时在本发明的任何其他所述实施方案中提供。在各实施方案的上下文中描述的某些特征不应认为是那些实施方案的必要特征，除非该实施方案在没有那些要素时不起作用。

[0179] 如上文所述以及如以下权利要求部分所要求保护的本发明的各实施方案和方面在以下实施例中得到实验支持。

实施例

[0180] 现参考以下实施例，这些实施例与以上描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施方案。

[0181] 通常，本文所用的命名法和本发明所用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。这种技术在文献中有详尽解释。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 如美国专利第4666828、4683202、4801531、5192659和5272057号所述的方法学;“Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8^{th} Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测定在专利和科学文献中有广泛描述，参见例如美国专利第3791932、3839153、3850752、3850578、3853987、3867517、3879262、3901654、3935074、3984533、3996345、4034074、4098876、4879219、5011771和5281521号; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M.J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984)和“Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996);其全部通过参考结合，如同本文完整阐述一样。整个本文档中提供了其他一般参考文献。认为其中的程序为本领域众所周知的，并且为读者方便而提供。其中包含的所有信息均通过参考结合至本文中。

[0182] 实施例1

材料和方法

材料:Tween-20 (聚山梨酯20)、小鼠IgG、红菲咯啉、NaCl、$FeSO_4$、$ZnCl_2$、$NiBr_2$得自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。人类IgG得自LeeBiosolutions - St. Louis, Missouri, USA。

[0183] Tween-20聚集体的制备:通过混合等体积的介质A和B获得Tween-20聚集体:通过伴随剧烈涡旋将10 μL疏水性螯合剂红菲咯啉(20 mM在甲醇中)添加到90 μL 0.25 mM Tween-20中至最终体积为100 μL制备介质A。然后伴随剧烈涡旋将等体积的介质B (由20 mM NaCl中的1 mM $FeSO_4$组成)添加到介质A中。

[0184] 用Tween-20聚集体纯化hIgG和小鼠IgG:将含有大肠杆菌裂解物(5 μL)和目标IgG (5 μL)的混合物添加到预先形成的Tween-20聚集体中,并在室温(或4℃)下温育5分钟。进行离心(13K,2分钟),弃去上清液,并用100 μL冷的20 mM NaCl短暂洗涤沉淀。在存在样品缓冲液的情况下将沉淀溶解并通过SDS-PAGE分析。

[0185] 从Tween-20聚集体提取IgG:如所述产生含有目标IgG的Tween-20沉淀,并进一步与50 μL的以下任何一种一起温育:50 mM NaOAc (pH 4.6)/20 mM NaCl或50 mM Gly (pH 4)/20 mM NaCl。在室温(或4℃)下5-10分钟之后,将样品中和,加载到凝胶上或通过CD分析。

[0186] 光学显微术:使用配备有Olympus U-TV1X-2数码相机的Olympus CX-40光学显微镜获取图像。

[0187] 低温TEM分析:以受控环境玻璃化系统(CEVS)制备了用于低温TEM的样品(10 μl),并在25℃和饱和下平衡。在以120 kV操作的FEI T12 G^2 TEM中检查玻璃化的样品。如前所述,在低剂量条件下记录图像[27, 28]。用ImageJ (imagej(dot)nih(dot)gov)软件对低温TEM图像进行测量。

[0188] 圆二色性(CD)光谱:使用Chirascan CD光谱仪(Applied Photophysics)使如上所述从Tween-20聚集体提取的抗体经受CD分析。CD光谱报告椭圆率θ,其与左右圆偏振光的吸光度差成比例[θ= 3300°(AL - AR)20],为波长的函数。使用1 × 1 cm光程的石英比色皿。在20℃下以1 nm步长用1 nm的带宽分辨率记录CD光谱。通过减去相应缓冲液的参考光谱来校正CD光谱的基线失真。

[0189] 密度测定:使用EZQuant程序将考马斯染色凝胶中存在的泳带进行量化。

[0190] 结果

Tween-20胶束的缀合:将疏水性螯合剂(红菲咯啉)添加到含有Tween-20胶束的水溶液中,随后在水相中添加Fe^{2+}离子用作介质。在室温下温育几分钟之后,观察到呈红色颗粒状沉淀形式的相分离(图2A)。在不存在Fe^{2+}的情况下进行的对照实验导致细长的微晶-大概由疏水性螯合剂(红菲咯啉)组成(图2B)。在仅不存在螯合剂或既不存在螯合剂又不存在金属的情况下进行的另外对照不引起任何相分离(即液滴清楚,未显示)。用低温TEM分析所得红色聚集体表明,去污剂和金属(图2C中的暗点)产生了具有不规则形状和大小的浓缩聚集体(图2C),而在对照实验中,没有[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]疏水性络合物,胶束均匀分布,并且未观察到相分离(图2D)。

[0191] 工艺特异性和与低离子强度的依赖关系:将hIgG与缀合的Tween-20胶束(即

Tween-20聚集体)一起短暂温育(5分钟),随后短暂的离心步骤(13K,2分钟)导致浓缩的红色沉淀,使得能够有效去除上清液。沉淀的SDS-PAGE分析表明,其含有还原的重链和轻链(图3A泳道3)。此外,系统中存在的大部分杂质(根据密度测定为> 85%)在沉淀中不存在(比较图3A中的泳道1和3)。在仅不存在螯合剂或仅不存在金属的情况下的对照实验导致还原的重链和轻链的量显著减少(分别为图3A泳道4-5)。不含蛋白(即杂质或IgG)的Tween-20聚集体也被考马斯染色(图3A泳道6),并迁移至泳道3中凝胶前部观察到的泳带(参见星号)。

[0192] 离子强度的影响如图3B所示。已经发现,在相对低的盐浓度(例如20 mM NaCl)下hIgG捕获是有效的(图3B泳道3-4),而在较高盐浓度(50-500 mM)下,工艺效率逐渐受到抑制(图3B泳道5-8)。发现随着离子强度的增加,重链和轻链两者的减少也适用于代表去污剂聚集体的泳带(图3B泳道4-8)。当目标IgG来自小鼠时,也观察到类似的结果和总体强度趋势(图3C)。

[0193] 对其他金属和疏水性螯合剂的适用性:还研究了另外两种已知平行结合3个红菲咯啉部分的离子(即Zn^{2+}和Ni^{2+})。用Zn^{2+}获得的结果与用Fe^{2+}发现的结果非常相似,而与Fe^{2+}或Zn^{2+}相比较,Ni^{2+}离子导致产率较低(图4A泳道3-5)。发现螯合剂疏水性部分的变化具有深远影响。使用3种合成的1,10-菲咯啉类似物(含有6、8或10碳链而不是在市售的红菲咯啉中的两个苯基) (图4C),表明工艺的产率显著降低(图4B泳道3-6)。

[0194] 从Tween-20聚集体提取hIgG和小鼠IgG;CD分析:使用以下两种不同缓冲液系统,从Tween-20聚集体提取目标hIgG (或小鼠IgG):50 mM NaOAc (pH 4.6)或50 mM Gly (pH 4)。发现NaCl的存在极大地影响提取效率。在不存在NaCl的情况下,上清液含有抗体和去污剂聚集体以及两种测试缓冲液(图6A泳道3和6)。然而,添加10-20 mM NaCl会极大地抑制Tween-20聚集体的水溶性,并同时降低抗体浓度(图6A泳道4-5和7-8)。密度测定测量表明,当使用NaOAc (pH 4.6)或Gly (pH 4)时,工艺的总产率(即分配和提取)分别在~42-46%和~40-46%之间,聚集体的溶解最少(未显示)。

[0195] 小鼠IgG的总体趋势相似(图6B)。此处同样,NaCl的存在抑制Tween-20聚集体的水溶性,然而,提取产率比hIgG获得的产率差,并且NaOAc缓冲液的产率范围在28-15%之间,和Gly缓冲液的产率范围在22-13%之间(图6B)。

[0196] 从经受了Tween-20聚集体工艺的hIgG获得的CD光谱未显示纯化抗体的二级结构有任何显著变化(图6C)。

[0197] 讨论

该项研究探索了用缀合的Tween-20胶束作为常用ProA柱的备选方法纯化IgG的可能性。实验结果表明,由非离子型去污剂Tween-20 (聚山梨酯20)组成的胶束可在存在疏水性[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]红色络合物的情况下特异性缀合,导致形成颗粒状红色沉淀(图2A)。发现胶束缀合为高度特异性的,因为在不存在金属(图2B)或螯合剂(未显示)的情况下不会发生。在不存在Fe^{+2}的情况下,观察到疏水性螯合剂的晶体(图2B)。用低温TEM分析红色聚集体表明,[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物导致各种聚集形式,其中一些的大小达到100 nm (图2C),而在不存在络合物的情况下,胶束分散体表现为单分散性(图2D)。这些结果为[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物诱导胶束团簇的能力提供了直接证据。

[0198] 为了证明IgG纯化,将目标IgG在大肠杆菌裂解物(用作人工污染背景)中的混合物添加到预先形成的Tween-20聚集体中。温育5分钟之后,将混合物离心并弃去上清液中存在

的杂质。通过SDS-PAGE分析沉淀，揭示存在还原的重链和轻链(图3A泳道3)。这是Tween-20聚集体从复杂混合物中捕获hIgG的能力的第一个迹象。此外，系统中存在的绝大部分杂质(图3A泳道1)在沉淀中不存在(图3A泳道3)，这与以下假设一致：除IgG以外的水溶性蛋白(平均比IgG具有更大极性)不会与Tween-20聚集体缔合，而抗体分子会缔合。

[0199] 该工艺对螯合剂和金属的依赖关系如图3A的泳道4和5所示。在仅不存在螯合剂的情况下，对应于重链和轻链的泳带强度显著降低(图3A泳道4)。在仅不存在金属的情况下观察到类似结果(图3A泳道5)。两项研究结果均表明，当不存在金属或螯合剂时，不会产生hIgG自发分配进入其中的去污剂聚集体，这解释了工艺效率的显著降低(图3A泳道4-5)。泳道3的凝胶前部出现了意外泳带(参见图3A泳道3中的星号)。该泳带似乎来源于沉淀，但在大肠杆菌裂解物(图3A泳道1)或目标hIgG (图3A泳道2)中未出现。因此，其身份尚不清楚，直至没有蛋白的Tween-20聚集体加载到凝胶上(图3A泳道6)。发现这些聚集体被考马斯染料染色，并随着泳道3中观察到的泳带迁移。所有这些结果表明强制性需要[(红菲咯啉)$_3$:Fe^{2+}]络合物以及Tween-20聚集体捕获IgG的能力，而大部分非IgG蛋白保留在上清液中。

[0200] 在工艺优化期间，很明显的是离子强度对产率具有显著影响。在低离子强度(0-20 mM)下该工艺高度有效(图3B泳道4)，而在较高盐浓度下该工艺逐渐变得效率低下(图3B泳道5-8)。

[0201] 当比较对应于重链(或轻链)的泳带强度随盐浓度的变化时，可以清楚地看到这种趋势(图3B泳道4-8)。这种现象可通过分析不同盐浓度下去污剂聚集体的行为来解释。当添加20 mM NaCl时，Tween-20聚集体其水溶性最低(图3B泳道4)，而当存在500 mM NaCl时，其水溶性最高(图3B泳道8)。这种行为可解释为什么分别在低和高离子强度下获得高和低hIgG回收率。因此，发现了工艺功效(即hIgG捕获的产率)和Tween-20聚集体的水溶性之间的简单相关性。

[0202] 为了证明工艺的潜在普遍性，本发明人还用多克隆小鼠IgG研究了IgG分配行为的依赖关系(图3C)，并发现了非常相似的模式。来自不同生物学来源(人类和小鼠)的IgG有效地分配至Tween-20聚集体中的事实表明，我们的纯化策略可能与目标IgG的特定氨基酸序列无关。这继而可避免为每种治疗性单克隆抗体开发特定纯化方案的需要，从而可实现标准化纯化平台。用Zn^{2+}取代Fe^{2+}离子在纯度和产率方面产生了相似结果(图4A泳道4)，而使用Ni^{2+}离子似乎效率较低(图4A泳道5)。Zn^{2+}离子产生与Fe^{2+}所获得的相似结果的事实令人鼓舞，因为其扩大了可能组分的范围。然而，将商业螯合剂(红菲咯啉)更换为3种合成的1,10-菲咯啉类似物(含有6、8和10碳尾：Phen-C10、Phen-C8和Phen-C6)中的任何一种(图4C)，强调了红菲咯啉中两个苯基超过长烷基尾的优势。

[0203] 由于密度测定测量表明hIgG或小鼠IgG在Tween-20聚集体中的分配产率(在理想的盐条件下)基本上为定量的(~95%)，因此可以认为这种聚集体可以提供通常在治疗级mAb的大规模下游处理中使用的ProA柱(图5A)的可行备选方案。如果确实可从平衡中去除ProA柱并用Tween-20聚集体取代(图5B)，则可在IgG分配至聚集体中之后去除含有大部分杂质的上清液，将沉淀溶解，并使目标mAb然后经受两种常用的离子交换剂作为最终的精制步骤(图5B)。

[0204] 显然，去除3个传统色谱步骤之一(即ProA柱)预计促进mAb产生，并因此提高整个纯化工艺的成本效益。根据该原理，本发明人考虑了是否可去除三个色谱步骤中的两个，即

也去除离子交换之一，因为这将进一步提高生产效率。仅当可产生纯度明显高于图3A-C和4A-C所示的IgG制剂时才能考虑这一目标。因此，本发明人评价了将嵌入Tween-20聚集体中的IgG提取到新鲜缓冲溶液中，同时抑制去污剂聚集体的溶解和/或聚集体中也可能存在的疏水性实体的同时提取的可能性。

[0205] 两种缓冲液系统(NaOAc pH 4.6和Gly pH 4)证明了其从Tween-20聚集体提取hIgG和小鼠IgG，同时显著抑制聚集体溶解和伴随发生疏水性杂质提取的能力(图6A-B)。再次观察到NaCl浓度对Tween-20聚集体的水溶性的显著影响。当在没有添加NaCl的情况下将含有hIgG的沉淀与50 mM NaOAc (pH 4.6)一起温育时，上清液含有相对纯的IgG，而且含有大量溶解的Tween-20聚集体(图6A泳道3)。添加10 mM NaCl显著抑制去污剂聚集体的溶解性，但同时会降低上清液中hIgG的浓度(图6A泳道4)。进一步添加盐似乎完全消除了去污剂的溶解，但导致hIgG的回收率很低(图6A泳道5)。当缓冲液系统由Gly (pH 4)组成时，观察到回收率提高(图6A泳道8)。

[0206] 密度测定测量表明，用NaOAc或Gly缓冲液的两步(即分配和提取)总产率在40-46%之间的范围内。这些数值代表其中没有证据表明上清液中存在胶束聚集体的条件。泳道8(例如)中提取的hIgG的纯度与泳道2相当。由于后者代表纯度> 99% (根据制造商)，这意味着在不进行色谱分离和不使用ProA的情况下，如果可进一步提高提取效率，可获得明显更高的纯度。这可能为去除目前采用的三个色谱步骤中的两个铺平道路。用小鼠IgG观察到提取效率较低(图6B)。然而，盐浓度对含小鼠IgG的Tween-20聚集体的水溶性的一般影响与用hIgG获得的相似。

[0207] 用圆二色性(CD)研究了hIgG二级结构的保持(图6C)。CD分析表明，纯化的hIgG的二级结构未发生明显变化(图6C)。

[0208] 结论

提出了两种无需使用ProA作为配体就能纯化IgG的潜在非色谱方法。尽管通过将抗体自发分配至Tween-20聚集体中随后进行聚集体溶解得到高产率和较低纯度，但在短提取步骤之后获得较低回收率和较高纯度。该策略似乎与目标抗体的特定序列无关，并因此可提供标准化的纯化平台。Tween-20聚集体的颗粒状结构预计使得能够过滤(例如)，从而可在连续纯化过程中实施该方法。

[0209] 实施例2

无血清培养基中人类和小鼠IgG的纯化

在存在大肠杆菌裂解物的情况下完成优化试验，为在杂交瘤无血清培养基中实施该方法铺平道路。在Tween-20沉淀中观察到hIgH和小鼠IgG两者(图7A和7C)。发现以高于0.5 mg/ml的浓度包含BSA或HSA (除目标IgG之外)逐渐抑制IgG结合，伴随发生聚集体内白蛋白浓度的增加(图7A和7C)。

[0210] 特别重要的发现是，可从含有50 mM异亮氨酸(pH 3.8)的Tween-20聚集体提取人类和小鼠IgG而没有明显的BSA共提取，也没有聚集体溶解(图7B和7D泳道3-4)。在较高的BSA浓度(≥0.5 mg/ml)下，在提取的IgG中观察到白蛋白(图7B和7D泳道5-10)。当将BSA替换为HSA时观察到相似的结果(未显示)。

[0211] 在最佳条件下，IgG捕获的产率在以下之间的范围内：80-90% (hIgG/BSA)、76-79%(小鼠IgG/BSA)、67-55% (hIgG/BSA)和75-78% (小鼠IgG/HSA)，如下文表1中概述的那样。

[0212] 表1 - 工艺效率

	IgG 捕获产率*	总产率 (IgG 捕获+提取)*
人类 IgG\BSA	77-85%	59-64%
人类 IgG\HSA	80-88%	58-64%
小鼠 IgG\BSA	80-87%	52-61%
小鼠 IgG\HSA	77-82%	50-54%

*数值的范围依赖于3-5个独立实验。

[0213] 两步过程(即IgG分配 + 提取)的总产率在54-63%之间的范围内,并且当使用BSA而不是HSA时效率更高。

[0214] 实施例3

提取缓冲液、圆二色性(CD)和动态光散射(DLS)

研究了由不同氨基酸组成的提取缓冲液(均在pH 3.8下)。用Gly、Val或Ile缓冲液可获得最高回收率(图8A泳道3-5),而发现Arg或His缓冲液的效率较低(图8A泳道6-7)。使用Asp或Glu缓冲液可促进部分聚集体溶解(图8A泳道8-9,参见凝胶前部的泳带)。

[0215] 当与较低温度(4-19℃,未显示)相比较时,在32℃下温育导致提取产率最高,并且似乎没有引起关注,因为据报道治疗性mAb在较高温度(例如37℃, pH 4.5)下和较长的温育时间(1-4天)会经历化学修饰。

[0216] 动态光散射(DLS)测量未显示纯化和对照IgG之间大小的任何变化,也没有显示大于IgG本身的颗粒存在(图8B和8C)。这些结果用3种提取缓冲液和两种IgG群体(人类和小鼠)重复进行的事实表明,可在没有伴随发生聚集体溶解的情况下实现IgG提取。

[0217] 经受用Tween-20聚集体纯化和用Gly缓冲液提取的hIgG的CD光谱与未纯化和提取(即对照hIgG)的CD光谱的比较表明,这两个光谱非常相似,代表了IgG的主要二级结构(即反平行β-折叠[18]),在-218 nm处具有负吸收[19]并且与先前报道[20]一致(图8D)。由于用小鼠IgG也获得了相似的光谱(图8E),意味着提出的纯化方法温和并保持了被测IgG的二级结构。

[0218] 实施例4

IgG特异性的保持(ELISA测定)

用两种类型识别BSA的多克隆抗体(绵羊和兔)研究了纯化过程结束时IgG特异性的保持。将这些Ab的每一种用Tween-20聚集体(含有HSA而不含BSA,以从系统中消除BSA)进行纯化,用7种研究缓冲液的每一种提取(一次一种),并且最后在ELISA测定中测试其结合其靶标BSA的能力。观察到的ELISA信号的差异(图9A-B)反映提取效率的差异,如用hIgG和小鼠IgG所观察到的。当提取缓冲液由Asp或Glu组成时获得的信号最高。这些研究结果与先前描述的一致,其中表明Asp和Glu缓冲液诱导部分聚集体溶解(图8A泳道8-9),导致IgG浓度更高,其直接解释了ELISA信号更强(图9A-B)。

[0219] 实施例5

用Tween-20聚集体纯化IgM

材料和方法

通过Tween-20聚集体捕获IgM:通过在室温下将0.1125 mM Tween-20、1 mM红菲咯啉、0.5 mM $FeSO_4$和10 mM NaCl一起温育10分钟来产生Tween-20聚集体。然后将IgM和BSA的混

合物(IgM/BSA)添加到新鲜制备的Tween-20聚集体中,并将该系统在室温下进一步温育10分钟。通过使多克隆IgM (Sigma - I8135)与BSA (Sigma - A2153)溶解于Ex-CELL培养基(Sigma - H4281)中来制备IgM/BSA混合物,其中IgM和BSA两者均为0.5 mg/ml。离心(13000 rpm,5分钟),去除上清液,用50 μl冷的20 mM NaCl洗涤所得沉淀,并通过SDS-PAGE分析沉淀的组成。

[0220] 从Tween-20聚集体中提取IgM

使含有捕获的IgM的沉淀经受酸性条件(50 mM异亮氨酸(pH 3)),并在32℃下温育30分钟。离心样品(13000 rpm,5分钟),并通过SDS-PAGE分析上清液(即提取物)的组成。

[0221] 结果

牛多克隆IgM抗体与由以下组成的Tween-20聚集体有效结合:Tween-20、疏水性螯合剂(红菲咯啉(batho))和Fe^{2+}离子。

[0222] 这一结论得到以下研究结果的支持:将Tween-20聚集体与混合物[IgM + BSA]一起进行短暂温育(5分钟),随后去除上清液,导致得到沉淀,其含有目标IgM的还原的重链和轻链(图10A泳道5)。工艺效率完全取决于螯合剂(batho)和金属(Fe2+)二者的存在,因为在其不存在的情况下,在Tween-20沉淀中未检测到IgM (分别为图10A泳道6-7)。

[0223] 这些结果可通过对IgM抗体吸附/结合的疏水性或半疏水性环境的需要来解释。因此,不存在螯合剂(batho)或不存在金属(Fe2+)可保持Tween-20胶束独立(即未缀合),并因此不存在用于IgM结合/分配的疏水性环境(图10A泳道6-7)。

[0224] 可从含有IgM的沉淀中提取IgM抗体而没有伴随发生沉淀(即Tween-20聚集体)的溶解。这通过将沉淀在酸性条件(50 mM异亮氨酸,pH 3)下于32℃下温育30分钟,并随后进行离心以从上清液去除不混溶的颗粒来实现。上清液的SDS-PAGE分析表明,上清液中存在还原的IgM重链和轻链而没有可检测量的Tween-20聚集体(图10B泳道4-7)。

[0225] 尽管本发明已连同其特定实施方案进行描述,但是显然许多备选方案、修改和变化对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求的精神和广泛范围内的所有这种备选方案、修改和变化。

[0226] 本说明书中提及的所有公开、专利和专利申请在本文中均通过参考以其全部结合至说明书中,至好像每个单独的公开、专利或专利申请具体和单独地表明通过参考结合至本文的相同程度。另外,在本申请中对任何参考文献的引用或标识均不应解释为承认这种参考文献可用作本发明的现有技术。在使用章节标题的程度上,不应将其解释为必然限制性的。

[0227] 参考文献

1. Aggarwal, R.S., What's fueling the biotech engine-2012 to 2013. Nat Biotechnol, 2014. 32(1): p. 32-9.

2. Wurm, F.M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol, 2004. 22(11): p. 1393-8.

3. Low, D., R. O'Leary, and N.S. Pujar, *Future of antibody purification.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 848(1): p. 48-63.

4. Gagnon, P., *Technology trends in antibody purification.* Journal of Chromatography A, 2012. 1221: p. 57-70.

5. *<Process scale antibody purification.pdf>.*

6. Shukla, A.A. and J. Thömmes, *Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins.* Trends in Biotechnology, 2010. 28(5): p. 253-261.

7. Azevedo, A.M., et al., *Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing.* Trends Biotechnol, 2009. 27(4): p. 240-7.

8. Roque, A.C., C.R. Lowe, and M.A. Taipa, *Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification.* Biotechnol Prog, 2004. 20(3): p. 639-54.

9. Wang, L., K.Z. Mah, and R. Ghosh, *Purification of human IgG using membrane based hybrid bioseparation technique and its variants: A comparative study.* Separation and Purification Technology, 2009. 66(2): p. 242-247.

10. Venkiteshwaran, A., et al., *Selective precipitation-assisted recovery of immunoglobulins from bovine serum using controlled-fouling crossflow membrane microfiltration.* Biotechnol Bioeng, 2008. 101(5): p. 957-66.

11. Kuczewski, M., et al., *A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line.* Biotechnol J, 2011. 6(1): p. 56-65.

12. McDonald, P., et al., *Selective antibody precipitation using polyelectrolytes: a novel approach to the purification of monoclonal antibodies.* Biotechnol Bioeng, 2009. 102(4): p. 1141-51.

13. Kumar, A., et al., *Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications.* Progress in Polymer Science, 2007. 32(10): p. 1205-1237.

14. Shukla, A.A., et al., *Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 848(1): p. 28-39.

15. van Reis, R. and A. Zydney, *Bioprocess membrane technology.* Journal of Membrane Science, 2007. 297(1-2): p. 16-50.

16. Kelley, B., *Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations.* Biotechnol Prog, 2007. 23(5): p. 995-1008.

17. Kelley, B., *Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads.* MAbs, 2009. 1(5): p. 443-52.

18. Guse, A.H., et al., *Purification and analytical characterization of an anti-CD4 monoclonal antibody for human therapy.* J Chromatogr A, 1994. 661(1-2): p. 13-23.

19. Manzke, O., et al., *Single-step purification of bispecific monoclonal antibodies for immunotherapeutic use by hydrophobic interaction*

chromatography. Journal of Immunological Methods, 1997. 208(1): p. 65-73.

20. Follman, D.K. and R.L. Fahrner, *Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A*. J Chromatogr A, 2004. 1024(1-2): p. 79-85.

21. Ghosh, R. and L. Wang, *Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography*. J Chromatogr A, 2006. 1107(1-2): p. 104-9.

22. Patchornik, G., et al., *Tethered non-ionic micelles: a matrix for enhanced solubilization of lipophilic compounds*. Soft Matter, 2012. 8(32): p. 8456-8463.

23. Patchornik, G., et al., *Purification of a membrane protein with conjugated engineered micelles*. Bioconjug Chem, 2013. 24(7): p. 1270-5.

24. Patchornik, G., et al., *Cryo-TEM structural analysis of conjugated nonionic engineered-micelles*. Soft Matter, 2014. 10(27): p. 4922-8.

25. Dutta, S., et al., *Engineered-membranes and engineered-micelles as efficient tools for purification of halorhodopsin and bacteriorhodopsin*. Analyst, 2015. 140(1): p. 204-12.

26. Martell, A.E. and R.M. Smith, *Critical stability constants*. 1974, New York: Plenum Press.

27. Danino, D., A. Bernheim-Groswasser, and Y. Talmon, *Digital cryogenic transmission electron microscopy: an advanced tool for direct imaging of complex fluids*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. 183-185: p. 113-122.

28. Danino, D., *Cryo-TEM of soft molecular assemblies*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2012. 17(6): p. 316-329.

29. Li, F., et al., *Cell culture processes for monoclonal antibody production*. MAbs, 2010. 2(5): p. 466-79.

30. Orellana, C.A., et al., *High-antibody-producing Chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis*. J Proteome Res, 2015. 14(2): p. 609-18。

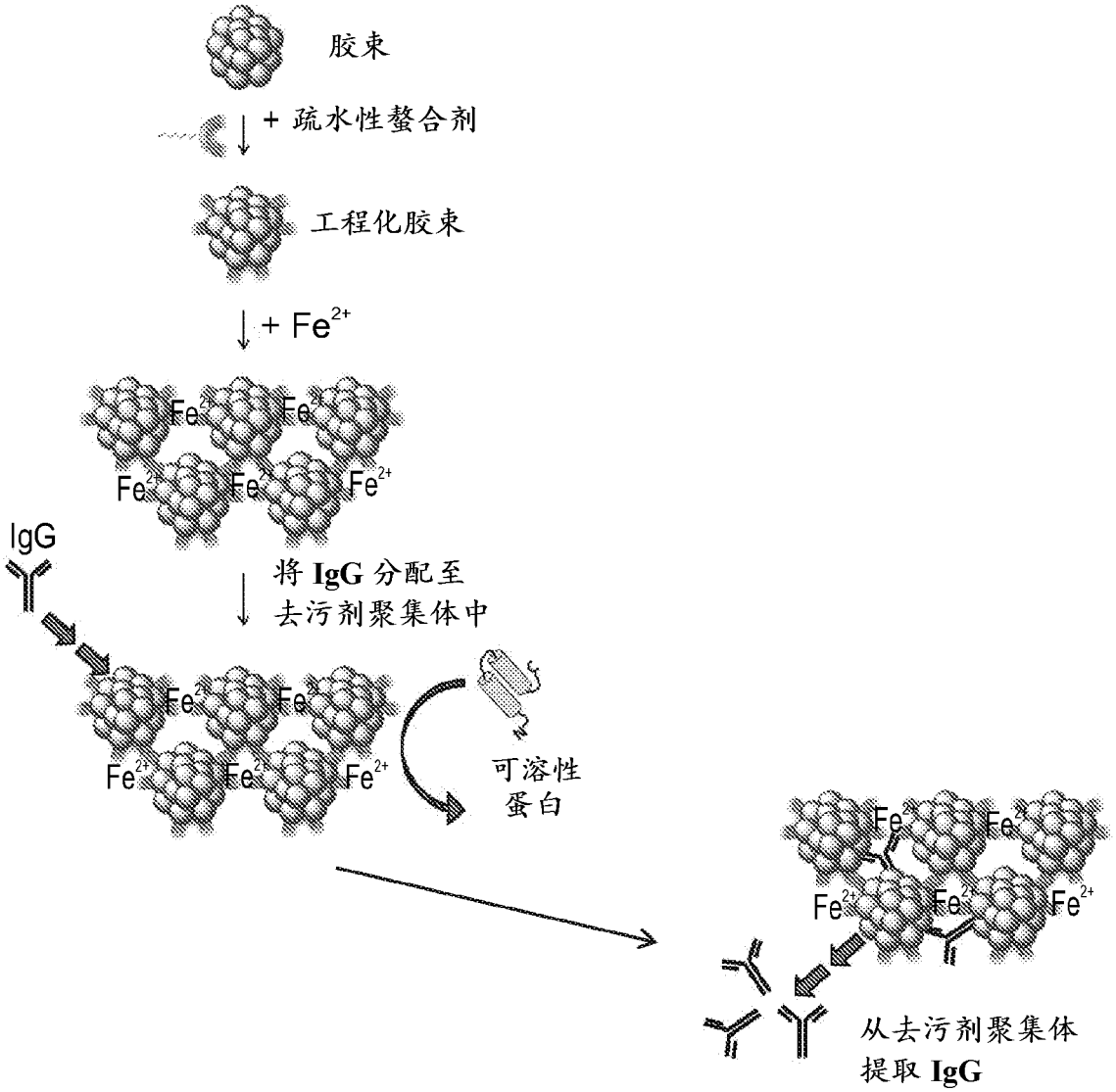

胶束
+ 疏水性螯合剂
工程化胶束
+ Fe^{2+}
IgG
将 IgG 分配至
去污剂聚集体中
可溶性
蛋白
从去污剂聚集体
提取 IgG

图 1

光学显微术：

A. [Tween-20:Fe^{2+}:batho]

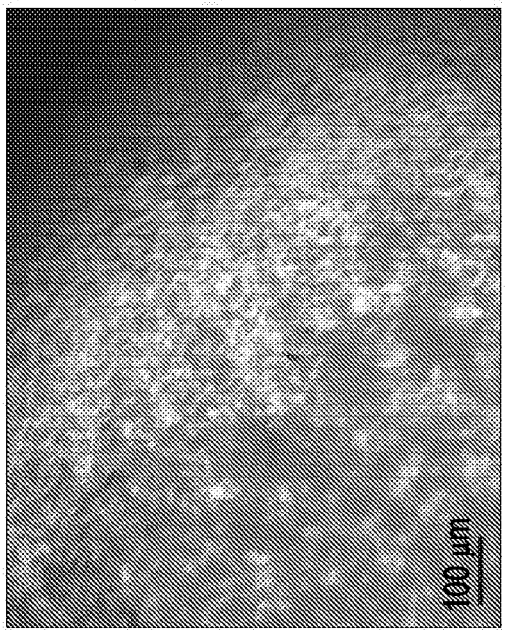


图 2A

B. [Tween-20:batho]

图 2B

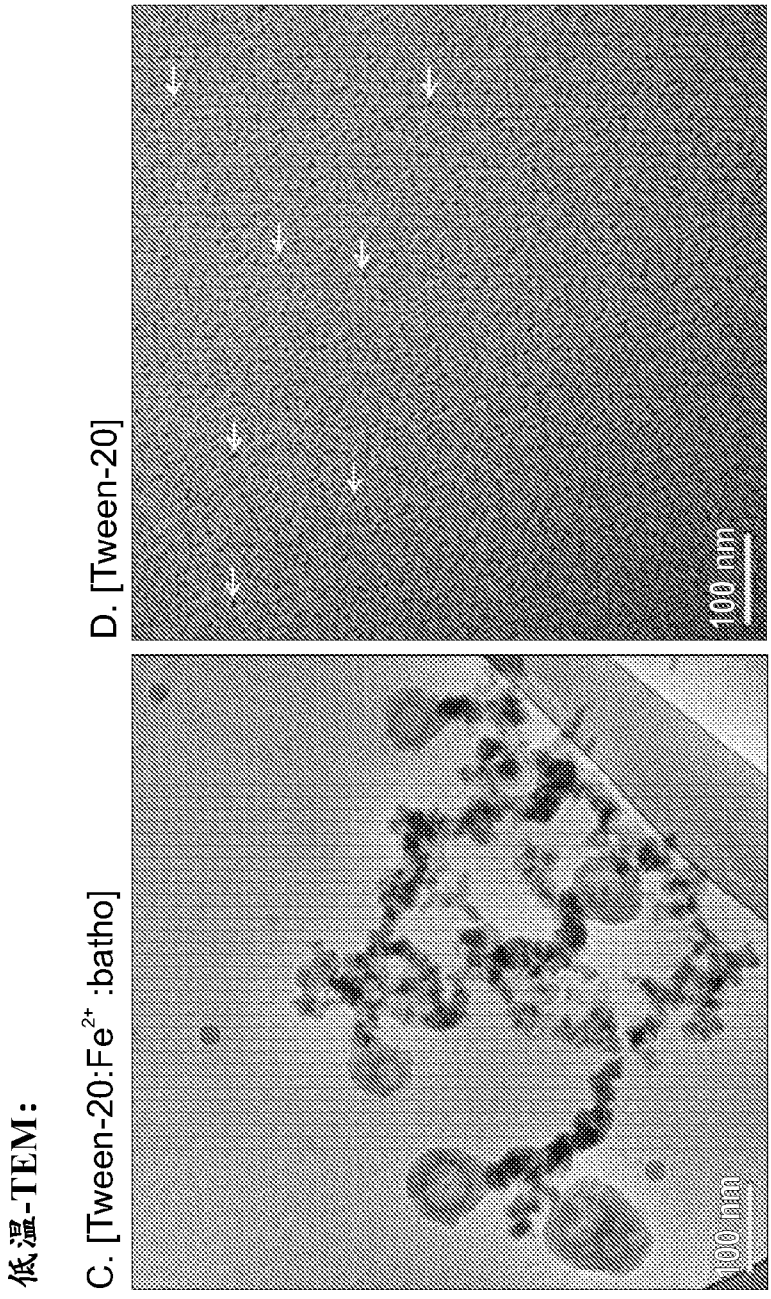


图 2C

图 2D

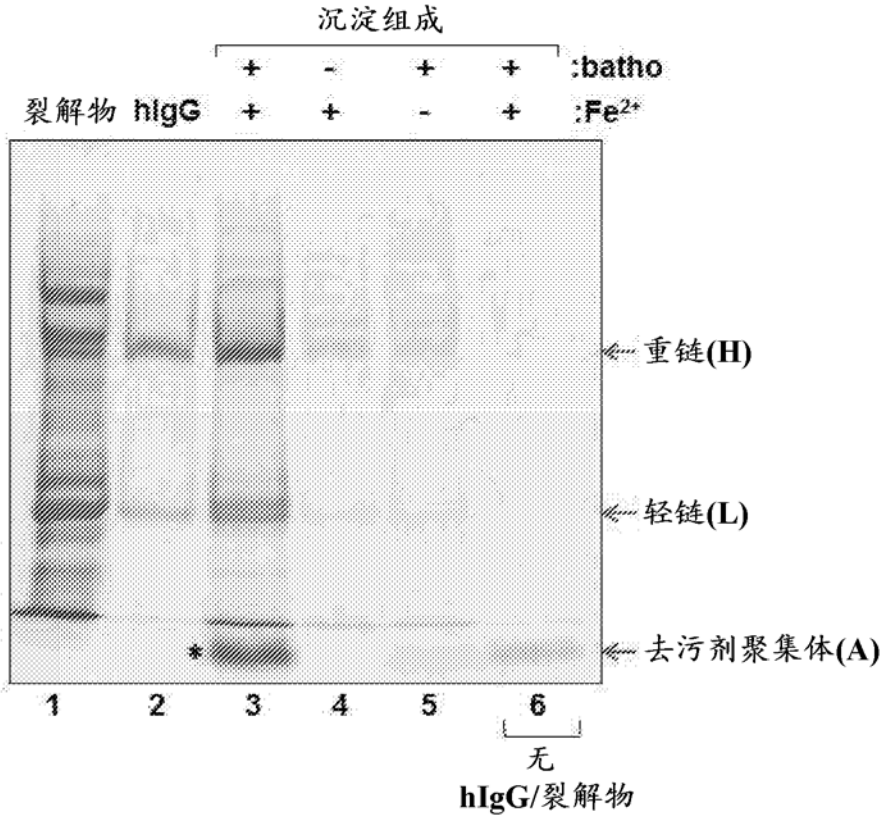

沉淀组成
+ - + + :batho
裂解物 hIgG + + - + :Fe2+
重链(H)
轻链(L)
去污剂聚集体(A)
*
1 2 3 4 5 6
无
hIgG/裂解物

图 3A

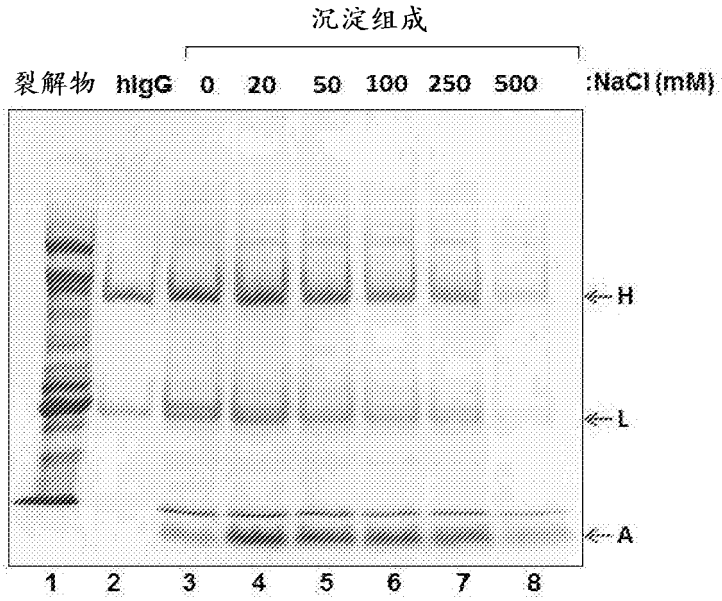

沉淀组成
裂解物 hIgG 0 20 50 100 250 500 :NaCl(mM)
H
L
A
1 2 3 4 5 6 7 8

图 3B

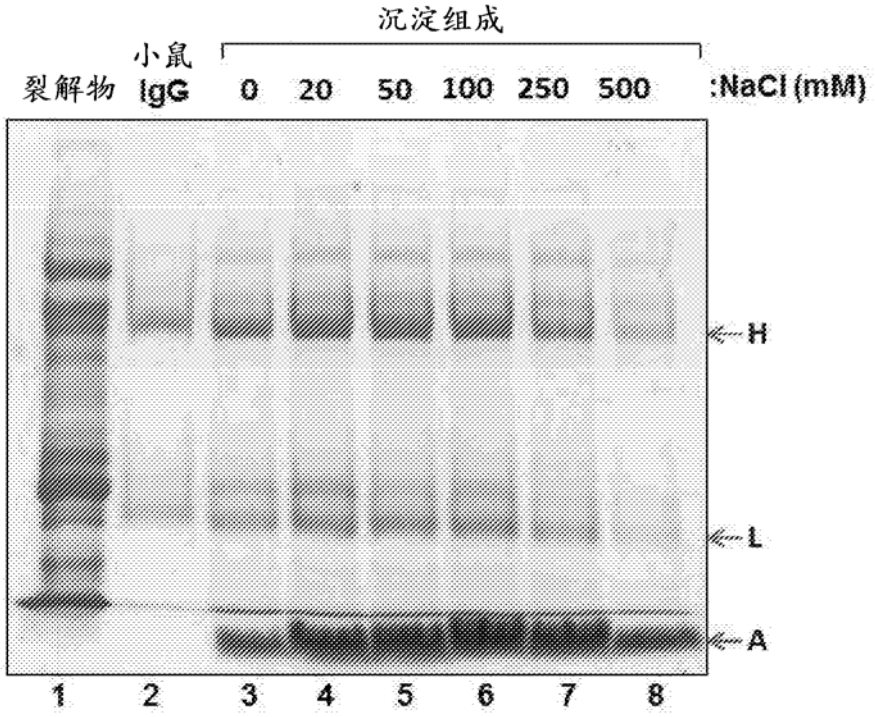

沉淀组成
小鼠
裂解物 IgG
0
20
50
100
250
500
:NaCl (mM)
H
L
A
1
2
3
4
5
6
7
8

图 3C

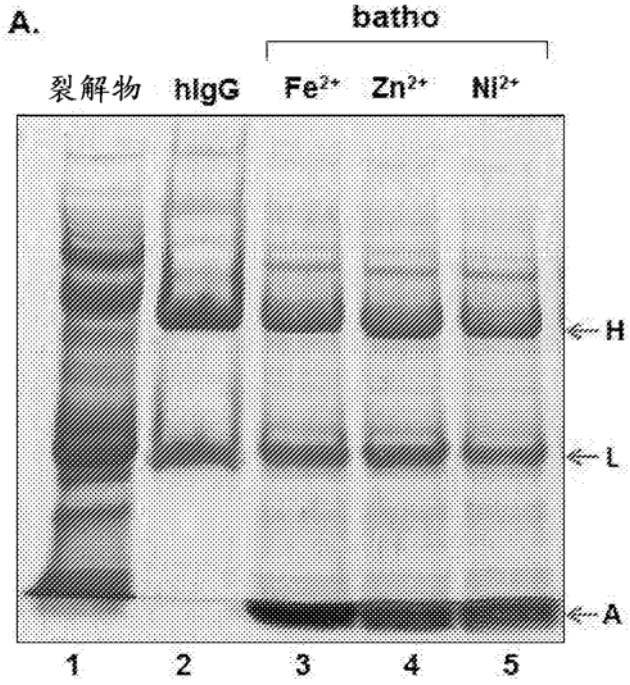

A.
batho
裂解物
hIgG
Fe2+
Zn2+
Ni2+
H
L
A
1
2
3
4
5

图 4A

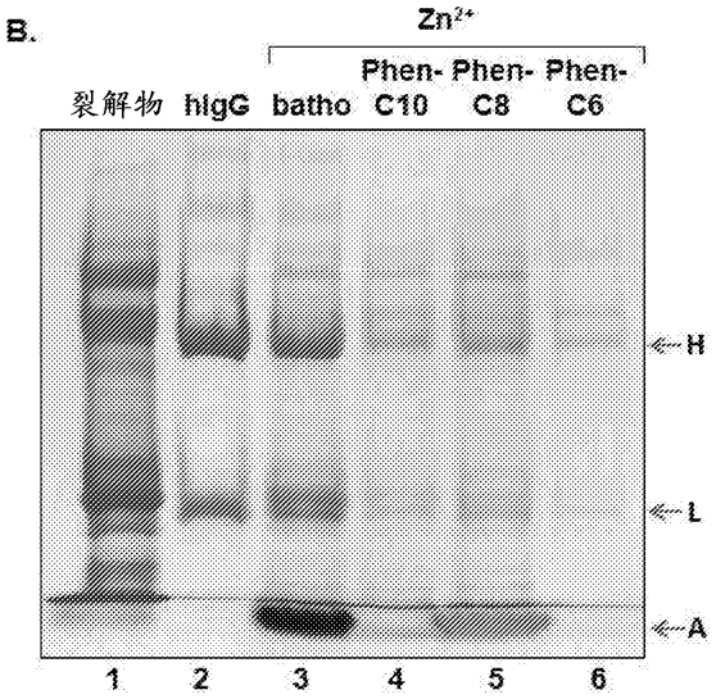

B.
Zn^{2+}
裂解物
hIgG
batho
Phen-C10
Phen-C8
Phen-C6
H
L
A
1
2
3
4
5
6

图 4B

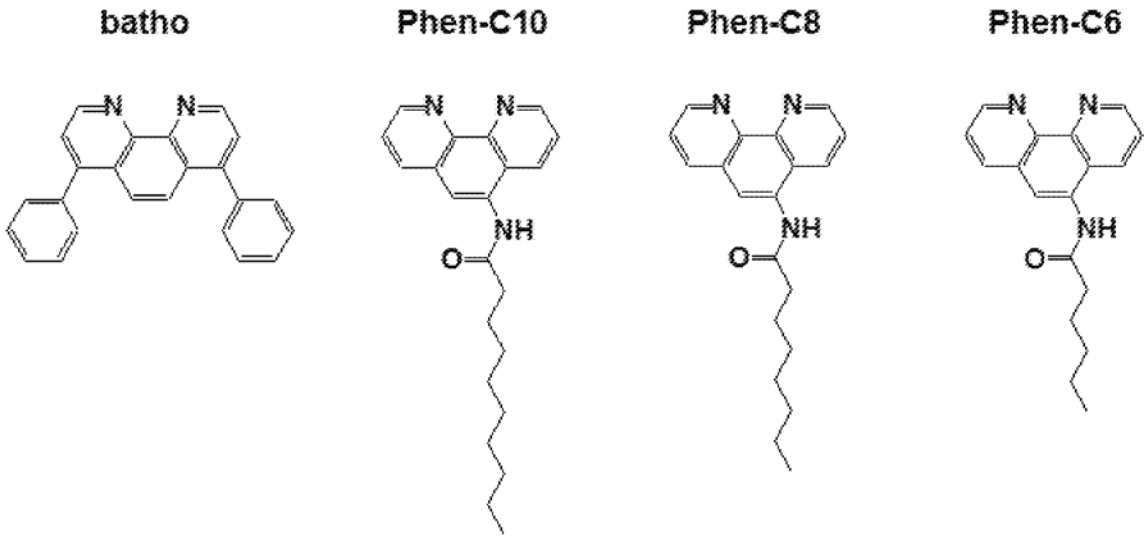

batho
Phen-C10
Phen-C8
Phen-C6
N
NH
O

图 4C

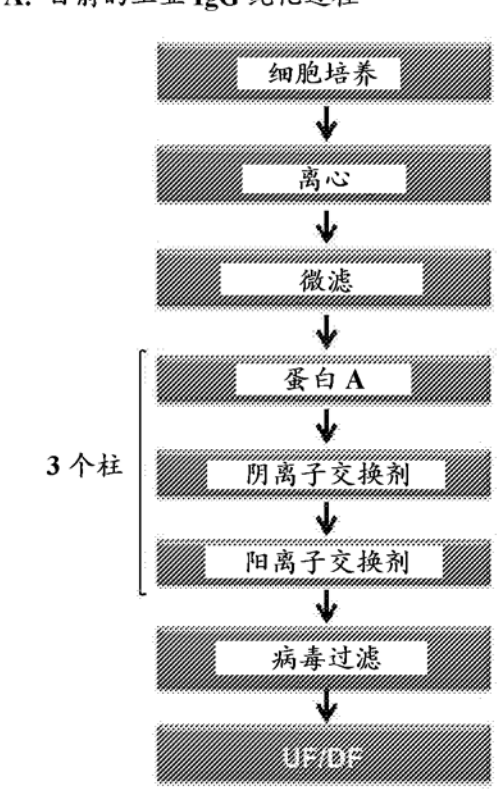


图 5A

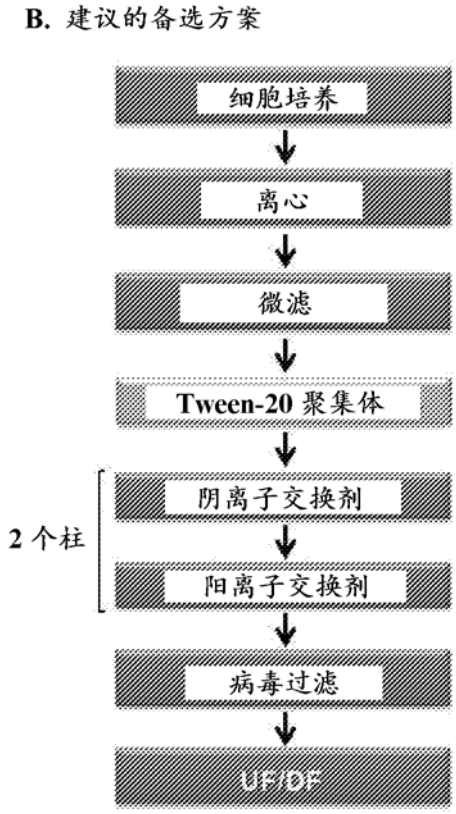

B. 建议的备选方案
细胞培养
离心
微滤
Tween-20 聚集体
2 个柱
阴离子交换剂
阳离子交换剂
病毒过滤
UF/DF

图 5B

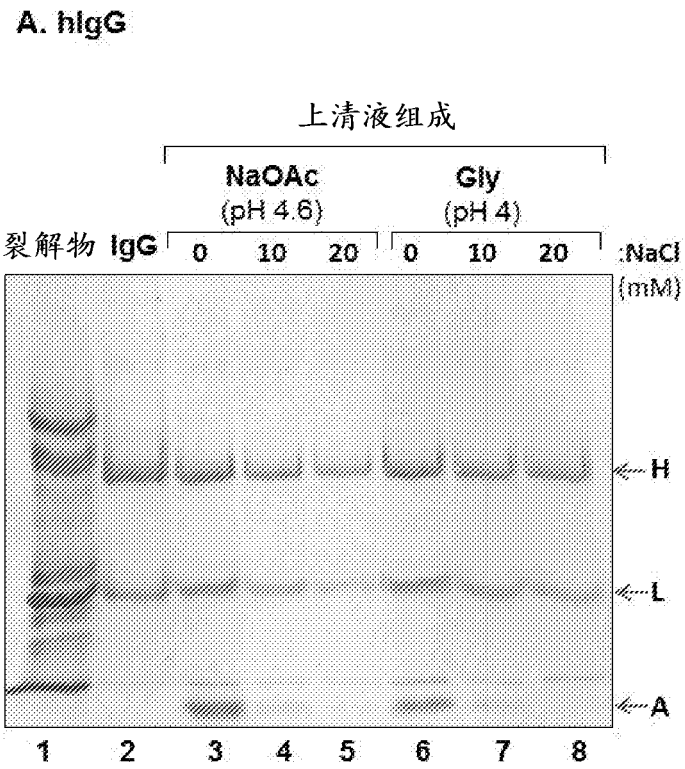

A. hIgG
上清液组成
NaOAc
(pH 4.6)
Gly
(pH 4)
裂解物 IgG
0
10
20
0
10
20
:NaCl
(mM)
H
L
A
1
2
3
4
5
6
7
8

图 6A

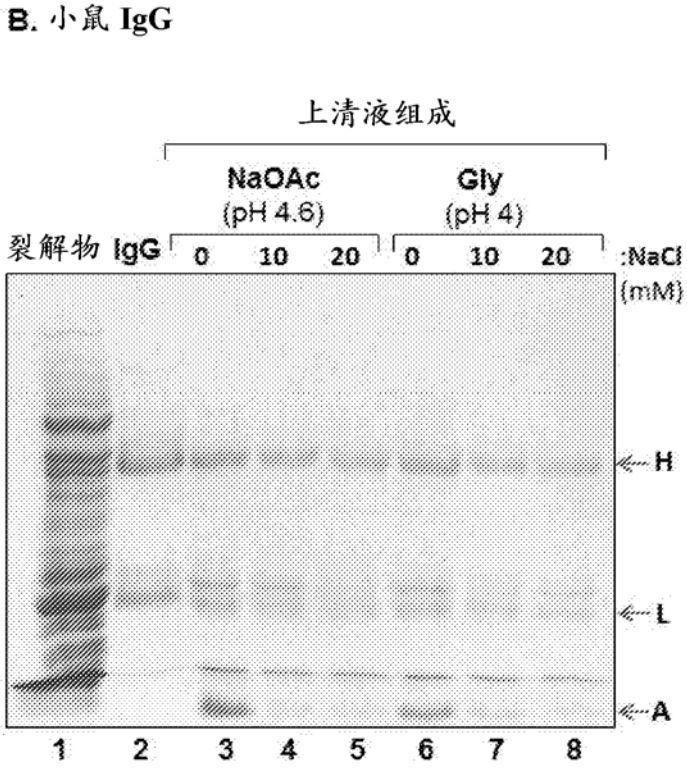

B. 小鼠 IgG
上清液组成
NaOAc
(pH 4.6)
Gly
(pH 4)
裂解物 IgG
0
10
20
0
10
20
:NaCl
(mM)
H
L
A
1
2
3
4
5
6
7
8

图 6B

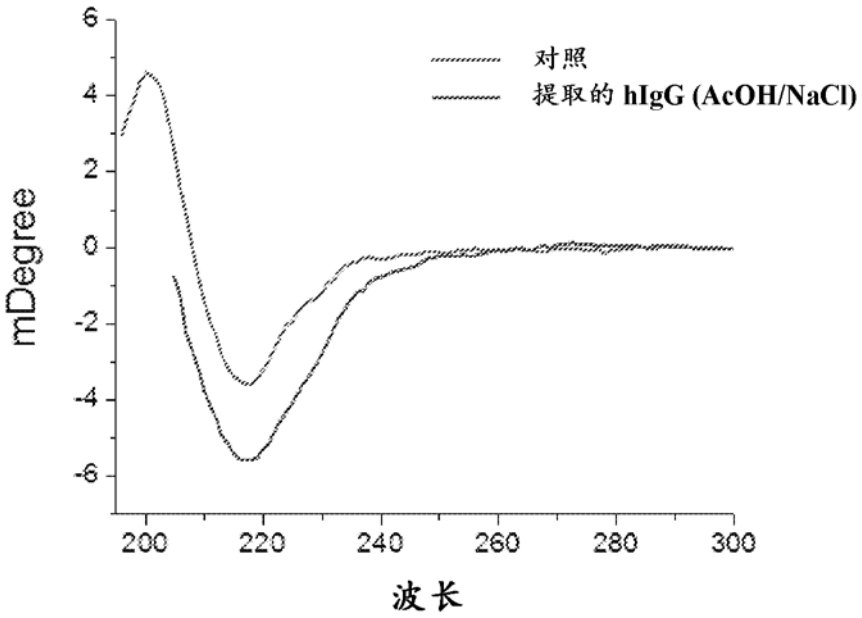

对照
提取的 hIgG (AcOH/NaCl)
mDegree
6
4
2
0
-2
-4
-6
200
220
240
260
280
300
波长

图 6C

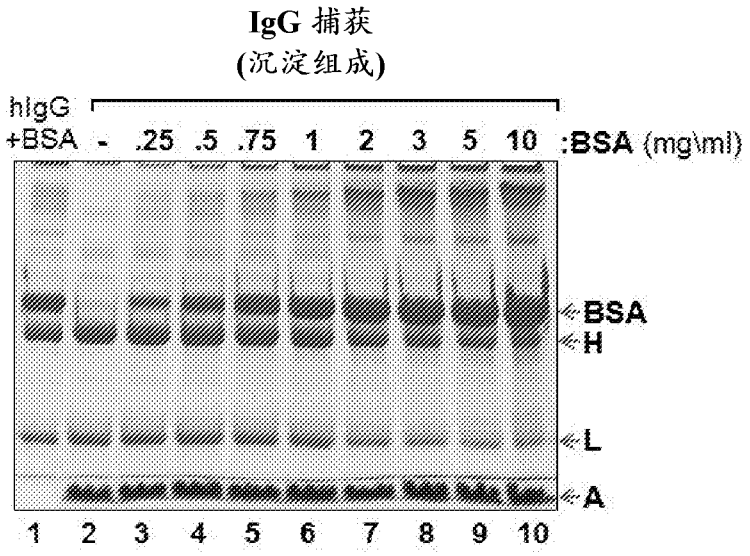

IgG 捕获
(沉淀组成)
hIgG
+BSA - .25 .5 .75 1 2 3 5 10 :BSA (mg\ml)
BSA
H
L
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 7A

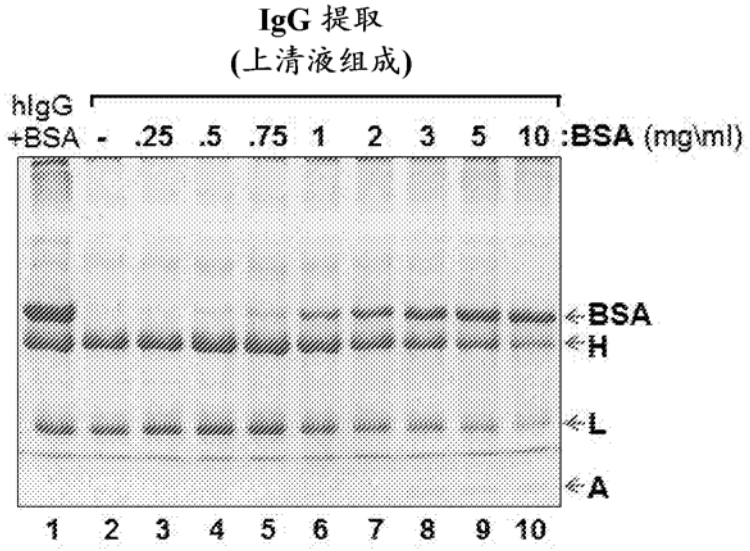

IgG 提取
(上清液组成)
hIgG
+BSA - .25 .5 .75 1 2 3 5 10 :BSA (mg\ml)
BSA
H
L
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 7B

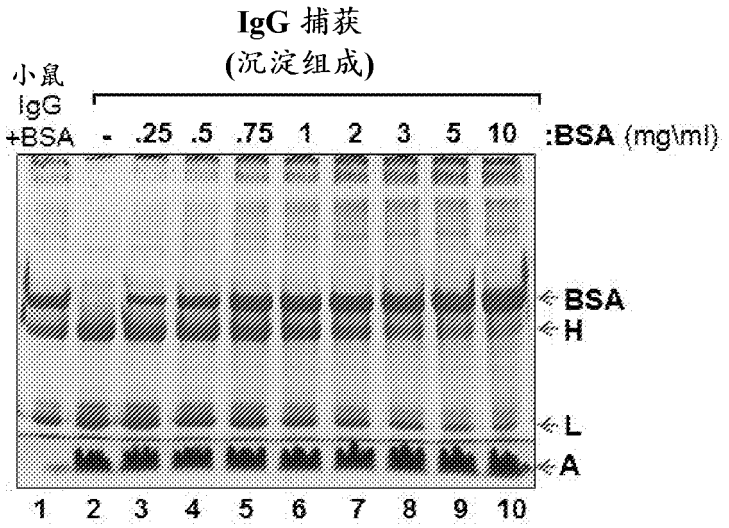

IgG 捕获
(沉淀组成)
小鼠
IgG
+BSA
- .25 .5 .75 1 2 3 5 10
:BSA (mg\ml)
BSA
H
L
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 7C

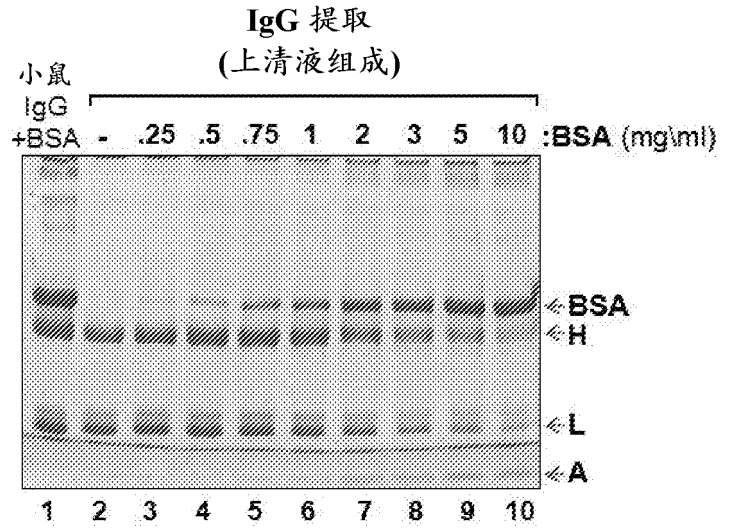

IgG 提取
(上清液组成)
小鼠
IgG
+BSA
- .25 .5 .75 1 2 3 5 10
:BSA (mg\ml)
BSA
H
L
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 7D

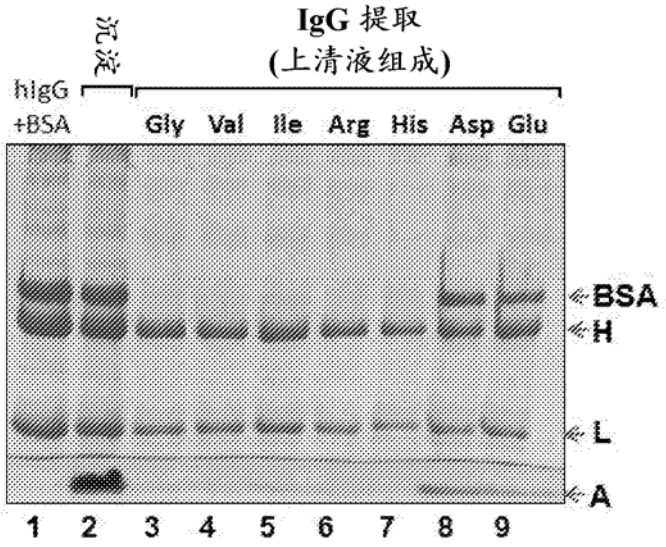

沉淀
IgG 提取
(上清液组成)
hIgG
+BSA
Gly
Val
Ile
Arg
His
Asp
Glu
BSA
H
L
A
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图 8A

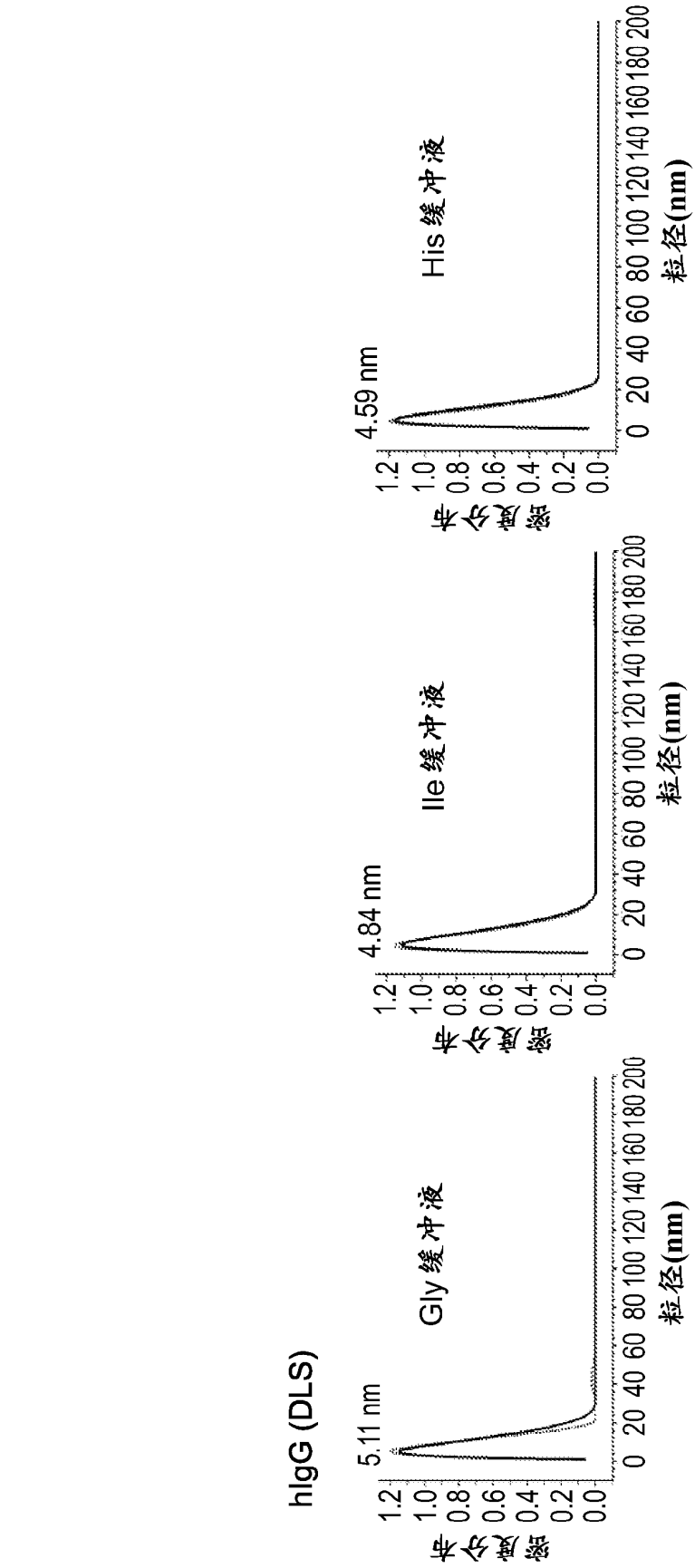

hIgG (DLS)
5.11 nm
Gly 缓冲液
4.84 nm
Ile 缓冲液
4.59 nm
His 缓冲液
强度分布
粒径(nm)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200

图 8B

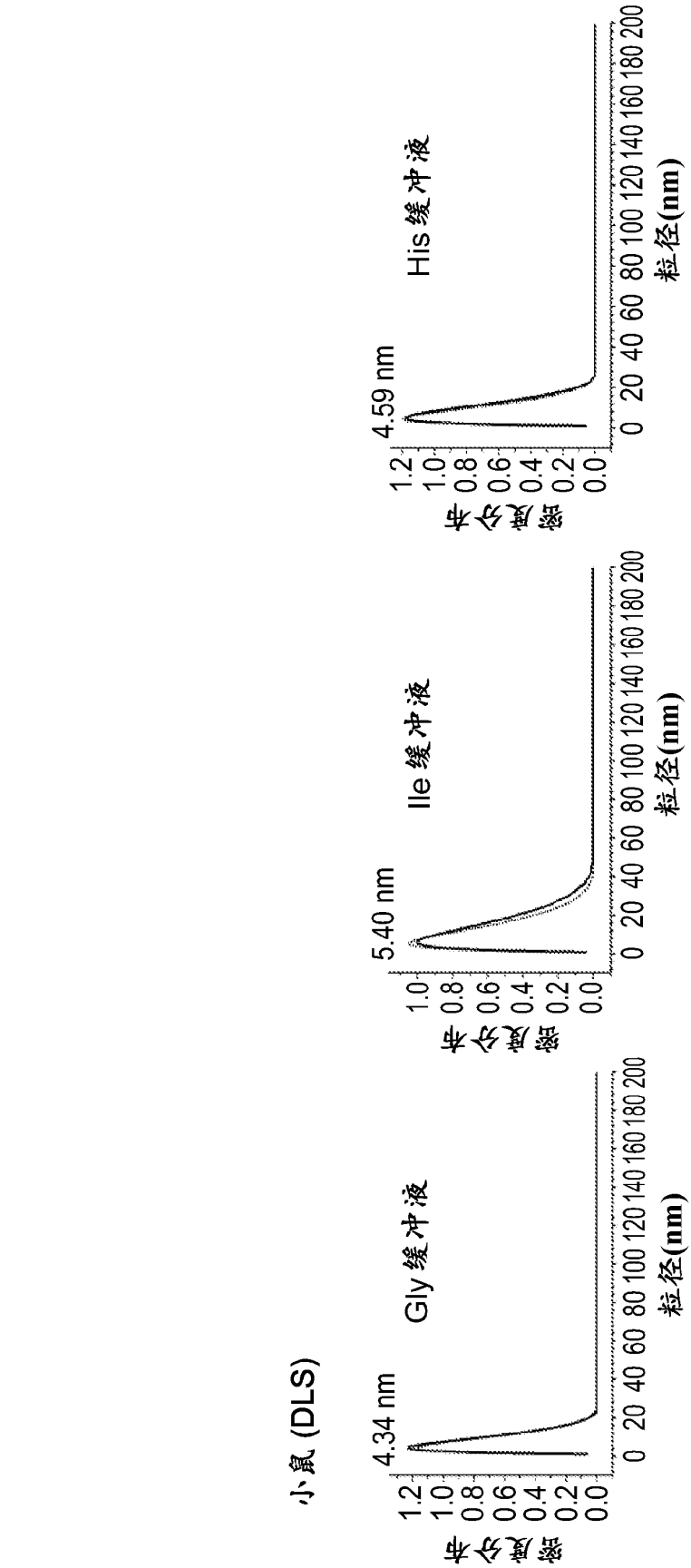

小鼠 (DLS)
4.34 nm
Gly 缓冲液
5.40 nm
Ile 缓冲液
4.59 nm
His 缓冲液
密度分布
粒径(nm)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200

图 8C

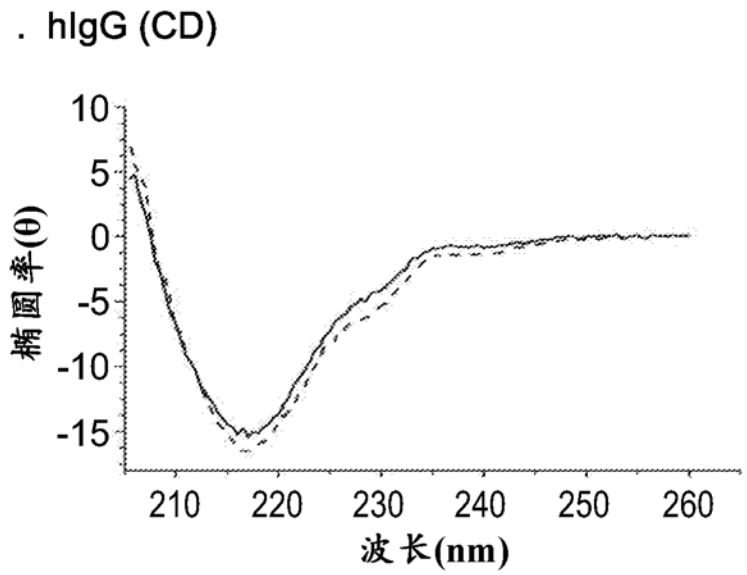

. hIgG (CD)
10
5
0
-5
-10
-15
椭圆率(θ)
210
220
230
240
250
260
波长(nm)

图 8D

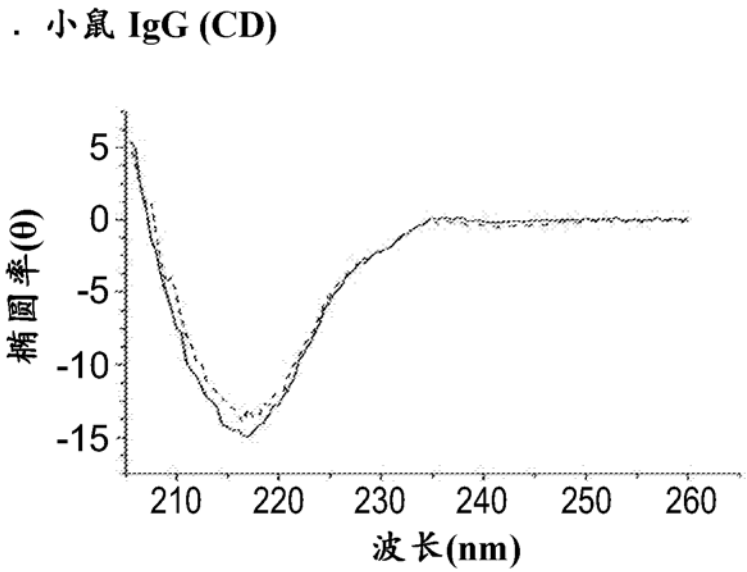

. 小鼠 IgG (CD)
5
0
-5
-10
-15
椭圆率(θ)
210
220
230
240
250
260
波长(nm)

图 8E

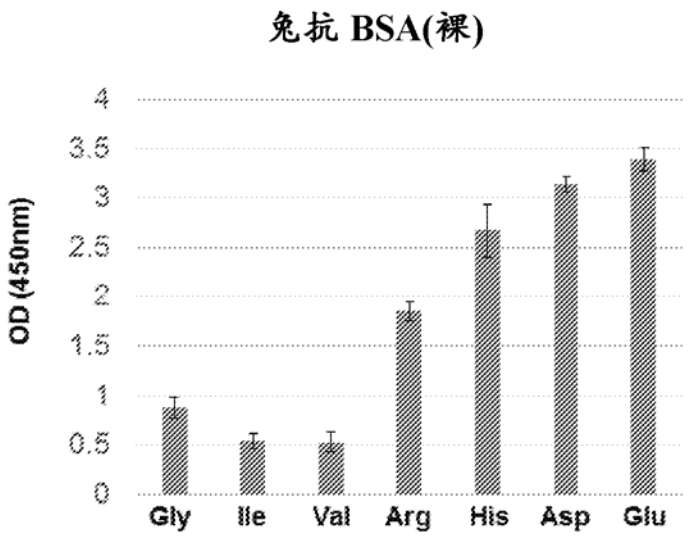

兔抗 BSA(裸)
OD (450nm)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Gly
Ile
Val
Arg
His
Asp
Glu

图 9A

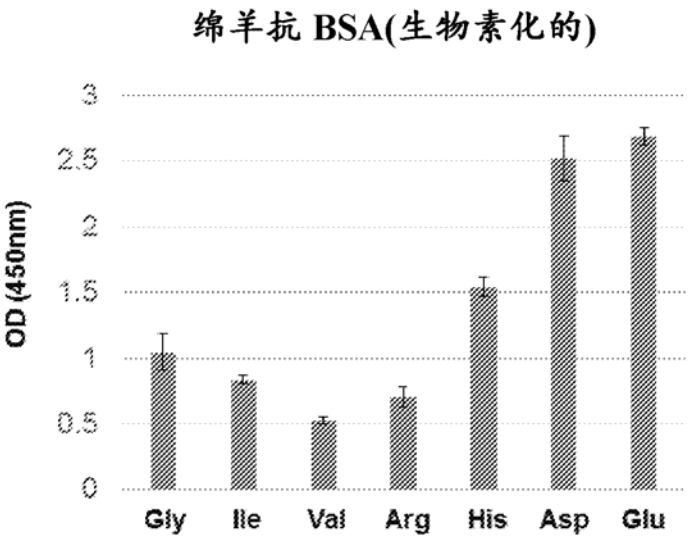

绵羊抗 BSA(生物素化的)
OD (450nm)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Gly
Ile
Val
Arg
His
Asp
Glu

图 9B

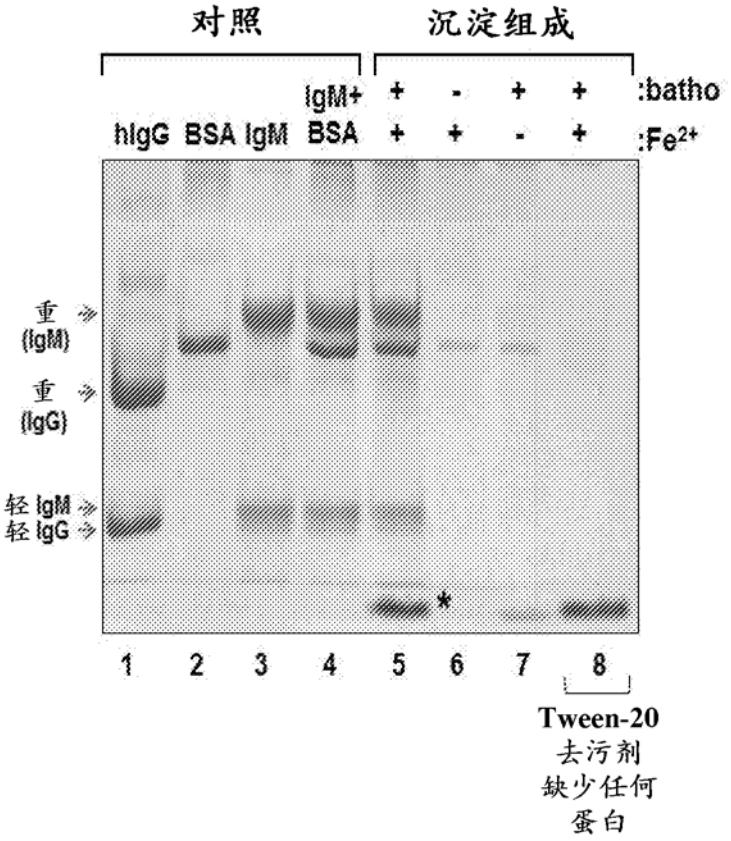

对照
沉淀组成
IgM+ + - + + :batho
hIgG BSA IgM BSA + + - + :Fe2+
重 (IgM)
重 (IgG)
轻 IgM
轻 IgG
*
1 2 3 4 5 6 7 8
Tween-20
去污剂
缺少任何
蛋白

图 10A

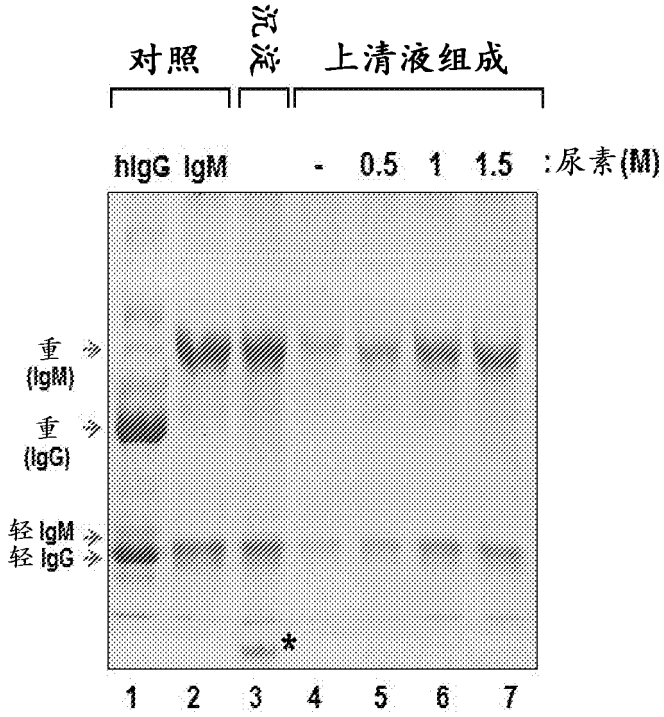

对照
沉淀
上清液组成
hIgG IgM - 0.5 1 1.5 :尿素(M)
重 (IgM)
重 (IgG)
轻 IgM
轻 IgG
*
1 2 3 4 5 6 7

图 10B