

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95118030

※ 申請日期：95.5.19

※IPC 分類：C07K 16/00, 1/8 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

G⁰¹N³⁰/34 (2006.01)

純化抗體之方法

METHOD FOR THE PURIFICATION OF ANTIBODIES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納

KLAUSNER, FRIDOLIN

2. 丹尼斯 史崔柏

STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號

124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 羅伯托 佛肯斯丹

FALKENSTEIN, ROBERTO

2. 伯卡 柯柏

KOLB, BURKARD

3. 馬利亞 賽伯

SEBALD, MARIA

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY

2. 德國 GERMANY

3. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2005年05月25日；05011302.6

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於多肽純化之領域。本文描述一種以離子交換樹脂純化免疫球蛋白之新穎方法。同時提供一種用於快速測定純化條件之方法。

【先前技術】

蛋白質，尤其是免疫球蛋白在如今之醫學領域中扮演著重要的作用。對於人類應用而言，每一種醫藥物質均須滿足不同之標準。為確保生物藥劑對人類核酸之安全性，尤其須移除可引起嚴重危害之病毒及宿主細胞蛋白質。為符合質量管理規格標準，在製造製程之後須進行一或多個純化步驟。其中，純度、產量及產率在測定適當純化方法中扮演著重要作用。

已建立完善之不同方法且廣泛用於蛋白質純化，諸如微生物蛋白質之親和力層析法(例如，蛋白質A或蛋白質G親和力層析法)、離子交換層析法(例如，陽離子交換(羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合模式交換)、嗜硫吸附(例如，以 β -巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水性交互作用或芳族吸附層析法(例如，以苯基-瓊脂糖、氮雜親砂性樹脂或間胺基苯基硼酸)、金屬螯合劑親和力層析法(例如，以Ni(II)-及Cu(II)-親和力材料)、尺寸排阻層析法及電泳方法(諸如凝膠電泳法、毛細電泳法)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

Necina, R.等人, Biotechnol. Bioeng. 60(1998)689-698報導了藉由展現高電荷密度之離子交換介質直接自細胞培養上清液捕獲人類單株抗體。在WO 89/05157中,報導了一種藉由直接使細胞培養基接受陽離子交換處理來純化產物免疫球蛋白之方法。Danielsson, A.等人, J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88描述了對於來自小鼠腹水之單株IgG抗體的單步驟純化。

Raweerith, R.等人(J. Immun. Meth. 282(2003)63-72)使用方法組合,意即辛酸沉澱與離子交換層析法,作為用於分離胃蛋白酶消化之馬抗蛇毒素F(ab')₂抗體之方法。在WO 2003/102132中,報導了用於純化蛋白質之非親和力純化步驟與高效切向流式過濾之組合。在WO 92/19973中報導了兩種親和力層析步驟之組合。

Follman, D.K.及Fahrner, R.L.報導了使用三個層析步驟而不使用蛋白質A之抗體純化方法的因子篩檢(J. Chrom. A 1024 (2004) 79-85)。Mhatre, R.等人(J. Chrom. A 707 (1995) 225-231)探索了藉由陽離子交換層析法及pH梯度溶離來純化抗體Fab片段。

WO 94/00561報導了人類單株抗恆河猴抗體及產生其之細胞株。WO 2004/024866中報導了一種藉由離子交換層析法純化多肽之方法,其中使用梯度洗滌以自一或多種污染物解析感興趣之多肽。Schwarz, A.等人(Laborpraxis 21 (1997) 62-66)報導了以CM-HyperD管柱純化單株抗體。

WO 2004/076485報導了一種藉由蛋白質A及離子交換層

析法純化抗體之方法。在EP 0 530 447中報導了一種用於藉由三個層析步驟之組合純化IgG單株抗體之方法。US 4,983,722中報導了自抗體製劑移除蛋白質A。

WO 95/16037報導了藉由蛋白質A陽離子交換層析法進行自雜種融合瘤純化抗EGF-R/抗CD3雙特異性單株抗體。在EP 1 084 136中報導了藉由使用離子交換層析法將抗體單體自其多聚體中分離。US 5,429,746係關於應用疏水性交互作用層析法組合層析法以純化抗體分子蛋白質。

【發明內容】

因此，本發明之目標在於提供另一種用於純化重組產生之免疫球蛋白及分離單體及多聚體免疫球蛋白物種之方法。

本發明提供一種純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含以下步驟：

- a)提供包含免疫球蛋白、緩衝物質及視情況之鹽之溶液；
- b)在免疫球蛋白結合至弱離子交換材料之條件下使該溶液與該弱離子交換材料相接觸；
- c)藉由使用包含緩衝物質及鹽之溶液經單一步驟自該弱離子交換材料回收免疫球蛋白。

本發明進一步提供一種測定用於以單一步驟純化方法自離子交換層析材料溶離多肽之鹽濃度的方法，其包含以下兩個步驟：

- a)步驟1，其包含以下子步驟：

- a1)提供包含多肽、緩衝物質及視情況之鹽之溶液；
- a2)在多肽結合至離子交換材料之條件下使含有該多肽之第一等分溶液與該離子交換材料相接觸；
- a3)藉由使用包含緩衝物質及鹽之溶液自離子交換材料回收多肽，藉此線性增加鹽之濃度；
- a4)測定多肽之第一餾份開始自離子交換管柱溶離時該鹽之起始濃度；

b)步驟2，其包含以下子步驟：

- b1)在多肽結合至離子交換材料之條件下使含有該多肽之第二等分溶液與該離子交換材料相接觸；
- b2)藉由使用三步驟之溶離方法自該離子交換材料回收多肽，藉此

i)第一溶離步驟中之鹽濃度計算為

步驟a4)中測定之鹽之起始濃度與該鹽分子式中
表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積

與

緩衝鹽之濃度與該緩衝鹽分子式中表示之不同於
氫之單價陽離子總數之乘積的總和；

ii)第二溶離步驟之鹽濃度為第一溶離步驟之鹽濃
度與1.25至1.35之間之因子的乘積；

iii)第三溶離步驟之鹽濃度為第一溶離步驟之鹽濃
度與1.50至1.70之間之因子的乘積；

藉此步驟ii)及iii)中之因子如下判定：當起始濃度在
10 mM與40 mM之間時，該等因子分別為1.35與1.70，

當起始濃度在 40 mM 與 70 mM 之間時，該等因子分別為 1.30 與 1.60，且當起始濃度大於 70 mM 時，該等因子分別為 1.25 與 1.50。

b3) 判定多肽在步驟 b2) 之三步驟溶離方法中之哪一步驟自離子交換管柱溶離，藉此測定用於以單一步驟純化方法自離子交換層析材料溶離多肽之鹽的濃度。

在該申請案中根據以下定義使用該等術語：

如該申請案所用之術語"離子交換樹脂"或"離子交換材料"表示具有共價結合之帶電取代基的固定高分子量基質。對於所有電中性而言，無共價結合之抗衡離子與其結合。"離子交換材料"具有將其未經共價結合之抗衡離子與周圍溶液中之類似帶電離子進行交換之能力。視其可交換抗衡離子之電荷而定，"離子交換樹脂"稱為陽離子交換樹脂或陰離子交換樹脂。視帶電基團(取代基)之性質而定，"離子交換樹脂"稱為(例如在陽離子交換樹脂之情況下)磺酸樹脂(S)或羧甲基樹脂(CM)。視帶電基團/取代基之化學性質而定，"離子交換樹脂"可視共價結合帶電取代基之強度而額外分為強或弱離子交換樹脂。例如，強陽離子交換樹脂具有磺酸基作為帶電取代基，弱陽離子交換樹脂具有羧基(較佳為羧甲基)作為帶電取代基，且弱陰離子交換樹脂具有二乙胺基乙基作為帶電取代基。

陽離子交換樹脂可以不同名稱購自多個公司，諸如 Bio-Rex、Macro-Prep CM(購自 Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA)、弱陽離子交換劑 WCX 2(購自

Ciphergen, Fremont, CA, USA)、Dowex® MAC-3(購自Dow化學品公司-液體分離, Midland, MI, USA)、Mustang C(購自Pall Corporation, East Hills, NY, USA)、纖維素CM-23、CM-32、CM-52、hyper-D及partisphere(購自Whatman plc, Brentford, UK)、Amberlite® IRC 76、IRC 747、IRC 748、GT 73(購自Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany)、CM 1500、CM 3000(購自BioChrom Labs, Terre Haute, IN, USA)及CM-Sepharose™ Fast Flow(購自GE Healthcare-Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)。

弱離子交換材料之帶電取代基較佳為至少約90%之羧酸基團，大於90%之羧酸基團，或大於95%之羧酸基團。

在本申請案中可交替使用之術語"單步驟溶離"及"單步驟梯度溶離"表示一種方法，其中例如引起溶離(意即結合化合物自材料溶解)之物質的濃度立即增加或降低，意即在單一步驟中直接自起始值/含量達到最終值/含量。

"多肽"為一種由肽鍵連接之胺基酸殘基之聚合物，不管其為天然產生或合成產生。少於約20個胺基酸殘基之多肽稱為"肽"。

"蛋白質"為包含一或多個多肽鏈之巨分子或多於100個胺基酸殘基之多肽鏈。蛋白質亦可包含非肽組份，諸如碳水化合物基團。碳水化合物及其他非肽取代基可藉由於其中產生蛋白質之細胞而添加至蛋白質中，且視細胞類型而

改變。在本文中根據其胺基酸主鏈結構來定義蛋白質；通常不指定諸如碳水化合物基團之取代基，但其仍可存在。

在本申請案中可交替使用之術語"抗體"及"免疫球蛋白"包含至少兩個輕多肽鏈及兩個重多肽鏈。每一重及輕多肽鏈均含有可變區(通常為多肽鏈之胺基末端部分)，其含有結合結構域以供與抗原交互作用。每一重及輕多肽鏈亦均包含多肽鏈之恆定區(通常為羧基末端部分)，其可調節抗體與宿主組織或包括免疫系統之各種細胞、典型補體系統之某些吞噬細胞及第一組份(C1q)之因子的結合。輕及重多肽鏈一般為完整鏈，其每一者基本上由可變區(意即V_L或V_H)及完整恆定區(意即，在輕多肽鏈之情況下為C_L，或在重多肽鏈之情況下為C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}且視情況之C_{H4})組成。根據本發明之抗體的可變區可接枝至其他同型之恆定區。例如，編碼1-同型重鏈可變區之聚核苷酸可接枝至編碼另一重鏈種類(或子類)之恆定區的聚核苷酸。

如本文所用之術語"抗體"或"免疫球蛋白"係指由一或多種大體上由抗體基因編碼之多肽組成之蛋白質。所識別之抗體基因包括不同之恆定區基因以及大量抗體可變區基因。抗體可以多種形式存在，例如包括Fv、Fab及F(ab)₂以及單鏈(例如，Huston, J.S.等人，PNAS USA 85 (1988) 5879-5883；Bird等人，Science 242 (1988) 423-426；及一般而言，Hood等人，Immunology, Benjamin N.Y., 第2版(1984)及Hunkapiller及Hood，Nature 323 (1986) 15-16)。在一實施例中，根據本發明之抗體包含單株抗體及其片

段，例如經分離之重鏈或輕鏈，或僅由恆定區及其片段組成之重鏈或輕鏈。

熟習此項技術者已知通用之層析方法及其使用。例如參見，Chromatography，第5版，A部分：Fundamentals and Techniques，Heftmann, E.(編)，Elsevier Science Publishing Company，New York，(1992)；Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences，Deyl, Z.(編)，Elsevier Science BV，Amsterdam，The Netherlands，(1998)；Chromatography Today，Poole，C. F.，及Poole，S. K.，Elsevier Science Publishing Company，New York，(1991)；Scopes，Protein Purification：Principles and Practice (1982)；Sambrook，J.等人(編)，Molecular Cloning：A Laboratory Manual，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，1989；或Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel，F. M.等人(編)，John Wiley & Sons, Inc.，New York。

本發明提供一種用於純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含以下步驟：

- a)提供包含免疫球蛋白、緩衝物質及視情況之鹽之溶液；
- b)在免疫球蛋白結合至弱離子交換材料之條件下使該溶液與該弱離子交換材料相接觸；
- c)藉由使用包含緩衝物質及鹽之溶液經單一步驟自該弱

離子交換材料回收免疫球蛋白。

免疫球蛋白之純化方法通常包含多步驟層析部分。在第一步驟中，藉由親和力層析法，例如以蛋白質A將非免疫球蛋白多肽及蛋白質自免疫球蛋白餾份中分離出來。之後可進行離子交換層析法以分離個別免疫球蛋白種類並移除痕量蛋白質A，其已自第一管柱共溶離。最後，需要第三層析步驟以自多聚體及相同種類之片段分離免疫球蛋白單體。有時聚集體的量較大(5%或更大)，且不可能在第三純化步驟中將其有效分離，因此需要進一步之純化步驟。

在重組產生特異性免疫球蛋白中，可無需用於分離不同免疫球蛋白種類之分離步驟。因此，對於重組產生之免疫球蛋白的總純化方法可減少至兩個層析步驟。

改良性蛋白質A溶離液通常經陽離子交換材料層析處理，其pH值低於各自免疫球蛋白之等電點。

在本發明之時，在吾人之實驗室中可獲得足量之抗IL-1R抗體(WO 2005/023872)及Herceptin®(抗-HER2抗體(WO 99/57134))，且因此本發明例示為該兩種免疫球蛋白。同樣，本發明通常以免疫球蛋白來實踐。該例示性描述僅作為實例且非用於限制本發明。提供該等實例以助於理解本發明，其真實範疇陳述於附加之申請專利範圍中。

本發明描述一種用於自聚集體及其片段分離免疫球蛋白單體以及耗盡其他多肽雜質之純化方法。由實驗可見，該純化可藉由使用弱離子交換樹脂，較佳藉由使用弱陽離子交換樹脂來達成。如由強與弱離子交換材料之比較所例

示，弱離子交換材料提供對於單體與聚集體形式之免疫球蛋白的分離(參見實例1及2及實例9及12)。

在本發明之一實施例中，緩衝材料(物質)之pH值為pH 3.0至pH 10.0，較佳為pH 3.0至pH 7.0，更佳為pH 4.0至pH 6.0且最佳為pH 4.5至pH 5.5。

在一實施例中，pH值在單一步驟中保持恆定，意即在單一步驟中維持相同值。

本發明之另一較佳項目在於本發明之方法可應用於在pH 6.0至pH 14之pH範圍內具有6.0或更高($pI \geq 6.0$)之等電點(pI)且因此具有淨正電荷之免疫球蛋白。

本發明之較佳實施例為純化IgG或IgE種類之免疫球蛋白。

在本發明之較佳實施例中使用弱陽離子交換材料。

如例示，較佳採用濃度範圍介於5 mM至100 mM之間之緩衝材料。

為自弱離子交換材料回收結合免疫球蛋白，增加緩衝液/溶液之電導率。此可藉由增加緩衝鹽濃度或藉由向緩衝溶液中添加其他鹽(所謂溶離鹽)來實現。較佳溶離鹽為檸檬酸鈉、氯化鈉、硫酸鈉、磷酸鈉、氯化鉀、硫酸鉀、磷酸鉀，以及檸檬酸及磷酸之其他鹽，以及該等組份之任何混合物。尤其較佳為檸檬酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及其混合物。

引起溶離之鹽的濃度較佳介於5 mM與500 mM之間，更佳介於5 mM與400 mM之間，且尤其較佳介於5 mM與250

mM之間。

本發明之另一較佳實施例為引起溶離之鹽同時作為緩衝物質之用途，尤其為檸檬酸及其鹽或磷酸及其鹽。

本發明之方法較佳為層析或分批方法，尤其較佳為包含分批溶離之方法。

本發明之另一較佳實施例在於純化為單一步驟之純化方法。

"單一步驟"表示一種方法，其中一或多種條件，例如pH、離子強度、鹽濃度及/或層析流動自起始值突然變為最終值，意即該等條件與線性變化相比為增量變化，意即逐步變化。

本發明之又一較佳實施例在於該方法包含在該方法步驟a)之前藉由蛋白質A親和力層析法純化免疫球蛋白之額外步驟。

本發明進一步提供一種測定用於以單一步驟純化方法自離子交換層析材料溶離多肽之鹽濃度的方法，其包含以下兩個步驟：

a)步驟1，其包含以下子步驟：

a1)提供包含多肽、緩衝物質及視情況之鹽之溶液；

a2)在多肽結合至離子交換材料之條件下使含有該多肽之第一等分溶液與該離子交換材料相接觸；

a3)藉由使用包含緩衝物質及鹽之溶液自離子交換材料回收多肽，藉此線性增加鹽之濃度；

a4)測定多肽之第一餾份開始自離子交換管柱溶離時該

鹽之起始濃度；

b)步驟2，其包含以下子步驟：

b1)在多肽結合至離子交換材料之條件下使含有該多肽之第二等分溶液與該離子交換材料相接觸；

b2)藉由使用三步驟之溶離方法自該離子交換材料回收多肽，藉此

i)第一溶離步驟中之鹽濃度計算為

步驟a4)中測定之鹽之起始濃度與該鹽分子式中
表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積

與

緩衝鹽之濃度與該緩衝鹽分子式中表示之不同於
氫之單價陽離子總數之乘積的總和；

ii)第二溶離步驟之鹽濃度為第一溶離步驟之鹽濃
度與1.25至1.35之間之因子的乘積；

iii)第三溶離步驟之鹽濃度為第一溶離步驟之鹽濃
度與1.50至1.70之間之因子的乘積；

藉此步驟ii)及iii)中之因子如下判定：當起始濃度在
10 mM與40 mM之間時，該等因子分別為1.35與1.70，
當起始濃度在40 mM與70 mM之間時，該等因子分別
為1.30與1.60，且當起始濃度大於70 mM時，該等因
子分別為1.25與1.50；

b3)判定多肽在步驟b2)之三步驟溶離方法中之哪一子
步驟自離子交換管柱溶離，藉此測定用於以單一步驟
純化方法自離子交換層析材料溶離多肽之鹽的濃度。

步驟b2)之因子界定了已由實驗所測定之範圍。該等值非絕對值，而僅為目標值。可維持10%之偏差。

本發明描述一種測定用於以單一步驟之用於自其他蛋白質材料純化多肽之純化方法自離子交換層析材料溶離多肽之鹽濃度的方法。

自離子交換樹脂開始溶離多肽(較佳為免疫球蛋白)之濃度為三步驟溶離方法之第二最優化步驟b)提供了基礎。用於溶離步驟之近似緩衝液/鹽濃度計算如下：

- 第一溶離步驟之鹽濃度等於

第一被加數，由線性增加之鹽梯度所測定之自離子交換管柱開始溶離之鹽濃度與引起溶離之鹽分子式中表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積，

與

第二被加數，緩衝鹽之濃度與該緩衝鹽分子式中表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積的總和；

- 第二溶離步驟之鹽濃度等於第一溶離步驟之鹽濃度與1.25至1.35之間之因子的乘積；
- 第三溶離步驟之鹽濃度等於第一溶離步驟之鹽濃度與1.50至1.70之間之因子的乘積。

濃度計算步驟中所包括之因子說明了濃度水平之間之間隔且視起始濃度來調節。當起始濃度較小時，意即介於10 mM與40 mM之間時，該等因子分別為1.35及1.70，當為介於40 mM與70 mM之間之中等起始濃度時，該等因子分別為1.30及1.60，且當為大於70 mM之高起始濃度時，該等

因子分別為1.25及1.50。該等因子界定了已由實驗所測定之範圍。該等值非絕對值，而僅為目標值。可維持10%之偏差。

在計算中須考慮緩衝鹽，因為如實例3中所概述，自離子交換樹脂溶離蛋白質可藉由在層析期間改變緩衝鹽濃度來實現。若緩衝鹽濃度在層析期間保持恆定或與引起溶離之鹽之起始濃度相比較小，則在計算期間可忽略以降低複雜性。

在一實施例中，引起溶離之鹽非緩衝鹽，且步驟b2i)之鹽濃度為由步驟a4)中之線性增加鹽梯度所測定之自離子交換管柱開始溶離之鹽濃度與引起溶離之鹽分子式中表示之不同於氫之單價陽離子總數的乘積。

將基於實例4以抗IL-1R抗體來例示計算。如實例3所測定，當起始濃度為由10 mM之緩衝液濃度及5 mM來自線性梯度之貢獻組成之15 mM檸檬酸鈉時，該三個步驟計算如下：

- 步驟一之目標濃度計算為30 mM($5\text{ mM} \times 2 + 10\text{ mM} \times 2$)

檸檬酸鈉

詳言之：5 mM(起始濃度)乘以2(檸檬酸為三價酸，採用二鈉鹽形式；因此分子式中存在兩個不同於氫之單價陽離子)加上10 mM(緩衝鹽濃度)乘以2(檸檬酸為三價酸，採用二鈉鹽形式；因此分子式中存在兩個不同於氫之單價陽離子)

- 步驟二之目標濃度計算為40.5 mM($30\text{ mM} \times 1.35$)檸檬酸鈉

詳言之：30 mM檸檬酸鈉為步驟一之濃度，將其乘以1.35(起始濃度為15 mM，因此選擇因子1.35)

- 步驟三之目標濃度計算為51 mM($30\text{ mM} \times 1.70$)檸檬酸鈉

詳言之：30 mM檸檬酸鈉為步驟一之濃度，將其乘以1.70(起始濃度為15 mM，因此選擇因子1.70)

由實驗可見，在一較佳實施例中，藉由使用弱離子交換材料，尤其較佳使用弱陽離子交換材料來達成該純化。

本發明之一較佳實施例在於多肽為免疫球蛋白，尤其較佳為IgG或IgE種類之免疫球蛋白。

在本發明之一實施例中，緩衝材料(物質)之pH值為pH 3.0至pH 10.0，較佳為pH 3.0至pH 7.0，更佳為pH 4.0至pH 6.0且最佳為pH 4.5至pH 5.5。

本發明之另一較佳項目在於本發明之方法可應用於在pH 6.0至pH 14之pH範圍內具有6.0或更高($pI \geq 6.0$)之等電點(pI)且因此具有淨正電荷之免疫球蛋白。

如例示，較佳採用濃度範圍介於5 mM至100 mM之間之緩衝材料。

為自離子交換材料回收結合免疫球蛋白，增加緩衝液/溶液之電導率。此可藉由增加緩衝鹽濃度或藉由向緩衝溶液中添加其他鹽(所謂溶離鹽)來實現。較佳溶離鹽為檸檬酸鈉、氯化鈉、硫酸鈉、磷酸鈉、氯化鉀、硫酸鉀、磷酸

鉀，以及檸檬酸及磷酸之其他鹽，以及該等組份之任何混合物。尤其較佳為檸檬酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及其任何混合物。

引起溶離之鹽的濃度較佳介於5 mM與500 mM之間，更佳介於5 mM與400 mM之間，且尤其較佳介於5 mM與250 mM之間。

本發明之另一較佳實施例為引起溶離之鹽同時作為緩衝物質之用途，尤其為檸檬酸及其鹽或磷酸及其鹽。

本發明之方法較佳為層析或分批方法，尤其較佳為包含分批溶離之方法。

本發明之另一較佳實施例在於純化為單一步驟之純化方法。

本發明之又一較佳實施例在於該方法包含在該方法步驟a)之前藉由蛋白質A親和力層析法純化免疫球蛋白之額外步驟。

【實施方式】

提供如下實例及圖示以助於理解本發明，其真實範疇陳述於附加申請專利範圍中。應瞭解，在不偏離本發明之精神下，可對所陳述之程序進行修正。

實驗部分

材料：

將IgG4免疫球蛋白抗IL-1R抗體(下文稱為免疫球蛋白，WO 2005/023872)於第一步驟中以蛋白質A親和力層析法純化。在酸性條件下(10 mM檸檬酸鈉緩衝液，pH值 3.0 ± 0.5)

進行自蛋白質A管柱之溶離。在過濾步驟之前，將含有免疫球蛋白之餾份的pH值以濃縮(例如，1 M)pH 9.0之緩衝溶液(例如，三-羥甲基-胺基-甲烷(TRIS)或磷酸鹽緩衝液)調節至pH 5.0。蛋白質A溶離液為蛋白質濃度介於5 mg/ml與15 mg/ml之間之溶液且以檸檬酸鈉緩衝。該材料在下文稱為改良性蛋白質A溶離液，其經製備以負載於陽離子交換樹脂上。

實例1

在該比較性實例中描述一種以強陽離子交換樹脂及單一步驟溶離進行之離子交換層析法。

層析條件：

樹脂： SP-瓊脂糖

流動速率： 160 cm/h

平衡： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

負載： 最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌步驟： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

溶離： 含有100 mM氯化鈉之25 mM檸檬酸鈉緩衝液，
調節至pH 5.0

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有強陽離子交換樹脂(SP-瓊脂糖)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟溶離方法溶離，藉此保持pH值恆定且藉由添加氯化鈉改變(增加)電導率。

圖1中呈現抗IL-1R抗體於強陽離子交換樹脂SP-瓊脂糖

上之陽離子交換層析之溶離層析圖。溶離為以氯化鈉進行之單一步驟替代溶離，其不改變層析系統之pH值。單體及聚集體免疫球蛋白分子未經分離，且因此以此方法，不可藉由與負載材料相比降低溶離液中之聚集體含量而獲得純化。

實例 2

在該實例中描述一種以弱陽離子交換樹脂及單一步驟溶離進行之離子交換層析法。

為達成單體與聚集體形式免疫球蛋白之分離，採用弱陽離子交換樹脂。使用該種樹脂，藉由分佈溶離增加電導率伴隨有該樹脂上之特定pH轉變(即使當溶離緩衝液之pH保持恆定時)。該效應使得便於區分(例如)單體免疫球蛋白與聚集體形式。此外，其他雜質，如痕量宿主細胞蛋白質或蛋白質A，可自單體平均餾份有效分離而無顯著產率損失。

層析條件：

樹脂： CM-Toyopearl

流動速率： 160 cm/h

平衡： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

負載： 最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

溶離： 含有100 mM氯化鈉之25 mM檸檬酸鈉緩衝液，
調節至pH 5.0

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂

(CM-Toyopearl)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟溶離方法溶離，藉此保持移動相中之pH值恆定且藉由添加氯化鈉改變電導率。

圖2中呈現以與實例1中相同之層析條件，但此次使用弱陽離子交換樹脂(CM-Toyopearl)之溶離概況。此時出現第二峰，其為主峰之肩峰。此分離行為不同於強陽離子交換樹脂(諸如SP-瓊脂糖)之分離行為。對對應於主峰及第二肩峰之餾份的分析顯示，在肩峰餾份中存在顯著量之聚集體。在主峰餾份中無可偵測之聚集體(亦參見圖9a至c)。

實例3

層析法之最優化-第一步驟：線性濃度梯度

為最優化弱陽離子交換材料上之陽離子交換層析，實施由三個步驟組成之最優化程序：

第一步驟為使用緩衝鹽檸檬酸鈉之線性濃度梯度之層析法。同樣，亦可能保持緩衝鹽之濃度恆定且可能混合引起免疫球蛋白溶離之鹽濃度的線性增加。在兩種情況下，溶液的電導率增加，而移動相之pH值不改變。例如，適用於溶離之鹽為氯化鈉、硫酸鈉、磷酸鈉、氯化鉀、硫酸鉀、磷酸鉀，檸檬酸及其鹽以及該等組份之混合物。因此，調節所應用之濃度為10 mM至500 mM，以將電導率設定為介於約1 milli S/cm至約50 milli S/cm之範圍內。

層析條件：

樹脂： CM-Toyopearl

流動速率： 160 cm/h

平衡： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

負載： 最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌： 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

溶離： 線性梯度；自調節至pH 5.0之10 mM檸檬酸鈉緩衝液至調節至pH 5.0之100 mM檸檬酸鈉緩衝液

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂(CM-Toyopearl)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以線性梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之pH值恆定。緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度經40管柱體積自10 mM線性增加至100 mM。在達到最終檸檬酸鈉濃度之後，繼續溶離額外之40管柱體積。

圖3中呈現抗IL-1R抗體之線性緩衝液梯度溶離之層析圖。單體及聚集體形式之免疫球蛋白溶離為半分離峰，於15 mM檸檬酸鈉之濃度起始且於55 mM檸檬酸鈉之濃度結束。

自陽離子交換樹脂回收結合免疫球蛋白取決於所應用溶液之電導率。因此，認為在回收步驟期間，溶離溶液中所存在緩衝鹽之陽離子須實現自陽離子交換樹脂溶離免疫球蛋白。移動相之電導率以及離子強度由溶液中之離子總數來實現。因此，在此須考慮所採用緩衝鹽及所採用引起溶離之鹽的一個分子式中不同於氫之單價陽離子的數目。

實例 4

層析法之最優化-第二步驟：三步驟濃度梯度溶離

如實例 3 中所測定，自離子交換樹脂開始溶離免疫球蛋白之濃度為第二最優化步驟(三步驟溶離方法)提供了基礎。用於分佈溶離之近似緩衝液/鹽濃度計算如下：

- 第一溶離步驟之鹽濃度等於
第一被加數，如以線性增加鹽梯度所測定之自離子交換管柱開始溶離時之鹽濃度與引起溶離之鹽分子式中所表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積，
與
- 第二被加數，緩衝鹽之濃度與該緩衝鹽分子式中所表示之不同於氫之單價陽離子總數之乘積的總和；
- 第二溶離步驟之鹽濃度等於第一溶離步驟之鹽濃度與 1.25 至 1.35 之間之因子的乘積；
- 第三溶離步驟之鹽濃度等於第一溶離步驟之鹽濃度與 1.50 至 1.70 之間之因子的乘積。

濃度計算步驟中所包括之因子說明了濃度水平之間之隔且視起始濃度來調節。當起始濃度較小時，意即介於 10 mM 與 40 mM 之間時，該等因子分別為 1.35 及 1.70，當為介於 40 mM 與 70 mM 之間之中等起始濃度時，該等因子分別為 1.30 及 1.60，且當為大於 70 mM 之高起始濃度時，該等因子分別為 1.25 及 1.50。

該等因子界定了已由實驗所測定之範圍。該等值非絕對值，而僅為目標值。可維持 10% 之偏差。

在計算中須考慮緩衝鹽，因為如實例3中所概述，自離子交換樹脂溶離蛋白質可能可藉由在層析期間改變緩衝鹽濃度來實現。若緩衝鹽濃度在層析期間保持恆定或與起始濃度相比較小($\leq$ 鹽濃度之15%)，則在計算期間可忽略以降低複雜性。

如實例3所測定，當起始濃度為由10 mM之緩衝液濃度及5 mM來自線性梯度之貢獻組成之15 mM檸檬酸鈉時，該三個步驟可計算如下：

- 步驟1之目標濃度計算為30 mM($5 \text{ mM} \times 2 + 10 \text{ mM} \times 2$)檸檬酸鈉

詳言之：5 mM(起始濃度)乘以2(檸檬酸為三價酸，採用二鈉鹽形式；因此分子式中存在兩個不同於氫之單價陽離子)加上10 mM(緩衝鹽濃度)乘以2(檸檬酸為三價酸，採用二鈉鹽形式；因此分子式中存在兩個不同於氫之單價陽離子)

- 步驟2之目標濃度計算為40.5 mM($30 \text{ mM} \times 1.35$)檸檬酸鈉

詳言之：30 mM檸檬酸鈉為步驟1之濃度，將其乘以1.35(起始濃度為15 mM，因此選擇因子1.35)

- 步驟3之目標濃度計算為51 mM($30 \text{ mM} \times 1.70$)檸檬酸鈉

詳言之：30 mM檸檬酸鈉為步驟1之濃度，將其乘以1.70(起始濃度為15 mM，因此選擇因子1.70)

層析條件：

樹脂：CM-Toyopearl

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

負載：最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

溶離：步驟1：34 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

步驟2：44 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

步驟3：54 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.0

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂(CM-Toyopearl)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以分步梯度溶離方法(=其中溶離鹽之濃度自起始值/水平逐步改變至最終值/水平之方法)溶離，藉此保持移動相中之pH值恆定。將緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度在第一步驟中自起始條件之10 mM增加至34 mM，在第二步驟中增加至44 mM，且在最終步驟中增加至54 mM。每次增加鹽濃度之後，使10管柱體積之溶離緩衝液在下一步驟之前通過該管柱。在達到最終檸檬酸鈉濃度之後，繼續溶離額外10管柱體積。

圖4中呈現三步驟梯度溶離抗IL-1R抗體之溶離概況。單體免疫球蛋白在第一步驟餾份中溶離且聚集體在第二步驟餾份中溶離。

實例5

層析法之最優化-第三步驟：以氯化鈉進行之單一步驟溶離

最優化程序之最終步驟改為單一步驟溶離方法(=其中溶離鹽濃度自起始值立即改變為最終值之方法)。為此目的，層析法之pH自5.0增加至5.5。該pH轉變改良了自蛋白質A之分離，此係由於蛋白質A具有低於5.5之等電點。此外，溶離鹽自檸檬酸鈉改為氯化鈉，檸檬酸鈉進一步用作緩衝鹽。在進行此層析之後，已以該等餾份進行額外分析(DNA、宿主細胞蛋白質、蛋白質A含量及以LC-MS進行之糖基化圖案)。

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉，調節至pH 5.5

負載：最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉，調節至pH 5.5

溶離：含有150 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉，調節至pH 5.5

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂(CM-瓊脂糖)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟梯度溶離方法(=其中溶離鹽之濃度自起始值立即改變至最終值之方法)溶離，藉此保持移動相中之pH值恆定。將緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度保持恆定且混合150 mM氯化鈉。在鹽濃度增加之後，使15管柱體

積之溶離緩衝液通過該管柱以溶離結合免疫球蛋白。

圖5中呈現了以氯化鈉進行之單一步驟溶離的溶離層析圖。單一步驟梯度層析法實現了主要單體餾份與聚集體/蛋白質A餾份之解析。單體免疫球蛋白之產率大於80%。產率甚至可能大於95%。

實例6

以強陽離子交換樹脂(SP-瓊脂糖快速流)與以弱陽離子交換樹脂(CM-瓊脂糖快速流)進行之分離的比較

對強SP-瓊脂糖快速流交換劑與CM-瓊脂糖快速流進行比較。根據實例5進行兩次重複實驗(在圖6a及b中僅展示來自每一管柱之一者)並進行額外分析(DNA、宿主細胞蛋白質、蛋白質A含量，及以LC-MS進行之糖基化圖案)。

分析方法：

尺寸排阻層析法：樹脂：TSK 3000(Tosohaas)

管柱：300 x 7.8 mm

流動速率：0.5 ml/min

緩衝液：含有250 mM氯化鉀之200 mM磷酸鉀，調節至pH 7.0

DNA-臨限系統：例如參見Merrick, H.及Hawltischek, G.,
Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403

蛋白質A ELISA：將微量滴定盤之孔塗覆以衍生自雞之多株蛋白質A-IgG。結合之後，藉由以樣本緩衝液洗滌而移除未反應抗體。對於蛋白質A結合而言，向孔中添加界定之

樣本體積。樣本中存在之蛋白質A由雞抗體結合且滯留於盤之孔中。培育之後移除樣本溶液且洗滌各孔。之後添加雞衍生之多株抗蛋白質A-IgG生物素共軛物及抗生蛋白鏈菌素過氧化酶共軛物以供偵測。在進一步洗滌步驟之後，添加基質溶液，導致形成有色反應產物。顏色之強度與樣本中之蛋白質A含量成比例。在界定時間之後，停止反應且量測吸光度。

宿主細胞蛋白質(HCP)ELISA：

將微量滴定盤之孔壁塗覆以血清白蛋白與抗生蛋白鏈菌素之混合物。將山羊衍生之抗HCP多株抗體結合至該微量滴定盤之孔壁。在洗滌步驟之後，以不同濃度之HCP校正序列及樣本溶液培育微量滴定盤之不同孔。培育之後，藉由以緩衝溶液洗滌而移除未結合之樣本材料。為進行偵測，以抗體過氧化酶共軛物培育各孔以偵測結合宿主細胞蛋白質。藉由以ABTS培育且於405 nm下偵測來偵測固定之過氧化酶活性。

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖；SP-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

負載：最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

溶離：含有150 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉緩衝液，
調節至pH 5.5

在圖6a及6b中呈現弱與強陽離子交換樹脂之溶離層析圖之比較。使用弱陽離子交換樹脂(圖6a)達成了單體抗IL-1R抗體自其他雜質之分離。在相同條件下，以強陽離子交換樹脂(圖6b)不可能分離。收集並分析對應於該等峰之餾份。列於表1中之分析結果顯示，以弱陽離子交換樹脂，聚集體及其他雜質可自免疫球蛋白製劑有效耗盡。

表1呈現之資料顯示，以弱陽離子交換樹脂可能將單體抗IL-1R抗體自聚集體形式抗體分離。此外，可耗盡DNA雜質及蛋白質A雜質。

表1：溶離液之分析：SP-瓊脂糖與CM-瓊脂糖之比較，呈現兩種不同分離之結果

分析物	改良性蛋白質A溶離液	SP-瓊脂糖溶離液		CM-瓊脂糖溶離液			
		單一峰		峰1		峰2	
蛋白質A之量	介於20與50 ng/mg之間	31 ng/mg	26 ng/mg	7.5 ng/mg	11 ng/mg	1638 ng/mg	550 ng/mg
HCP	介於20與120 ng/mg之間	3.88 ng/mg	3.98 ng/mg	3.13 ng/mg	3.27 ng/mg	946 ng/mg	1424 ng/mg
DNA	介於2800與3500 pg/mg之間	36 pg/mg	16 pg/mg	157 pg/mg	131 pg/mg	1918 pg/mg	1222 pg/mg
聚集體	存在	存在	存在	不存在	不存在	大量存在	大量存在
質量分析	SP-與CM-瓊脂糖之間未發現差異						

實例 7

比較性實例-不同電導率下之溶離

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至 pH 5.5

負載：最大 20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至 pH 5.5

溶離：含有 100 mM、150 mM或 200 mM氯化鈉之 10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至 pH 5.5

將改良性蛋白質 A 溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂 (CM-瓊脂糖) 之層析管柱。在 160 cm/h 之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液 (10 管柱體積) 洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之 pH 值恆定。將緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度保持恆定且在三次不同操作中分別與 100 mM、150 mM 及 200 mM 氯化鈉混合。在鹽濃度增加之後，使 15 管柱體積之溶離緩衝液通過該管柱以溶離結合免疫球蛋白。該等溶離層析圖顯示於圖 7a 至 c 中。

使用 150 mM 氯化鈉及 200 mM 氯化鈉作為溶離鹽濃度已獲得良好分離。

實例 8

比較性實例-不同 pH 值下之溶離

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

負載：最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

溶離：含有150 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉緩衝液，
調節至pH 4.0或6.0

將改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂(CM-瓊脂糖)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之pH值分別恆定為pH 4.0或6.0。將緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度保持恆定且與150 mM氯化鈉混合。在鹽濃度增加之後，使15管柱體積之溶離緩衝液通過該管柱以溶離結合免疫球蛋白。該等溶離層析圖顯示於圖8a及b中。

在pH 4.0下，該免疫球蛋白形成聚集體之趨勢增加。但CM-瓊脂糖可將此較大量聚集體分離為兩個峰。

實例9

以強陽離子交換樹脂(SP-瓊脂糖)層析分離單株抗HER-2抗體(WO 99/57134)

下文以Herceptin®(單株抗HER-2抗體)進一步例示本發明。

以陽離子交換層析法於SP-瓊脂糖(強陽離子交換樹脂)上進行Herceptin®之純化。在本發明之標準條件下，意即例

如以氯化鈉進行之分步溶離，未實現單體與聚集體形式抗體之分離(圖 10)。

層析條件：

樹脂： SP-瓊脂糖

流動速率： 160 cm/h

平衡： 25 mM 2-嗎啉基乙磺酸、50 mM 氯化鈉，調節至 pH 5.6

負載： 最大 20 g 蛋白質/L 凝膠基質

洗滌： 25 mM 2-嗎啉基乙磺酸、50 mM 氯化鈉，調節至 pH 5.6

溶離： 25 mM 2-嗎啉基乙磺酸、95 mM 氯化鈉，調節至 pH 5.6

將單株抗 HER-2 抗體(下文稱為 Herceptin®)在第一步驟中以蛋白質 A 親和力層析法純化。在酸性條件下(10 mM 檸檬酸鈉緩衝液，pH 值為 3.0 ± 0.5)進行自蛋白質 A 管柱之溶離。在過濾步驟之前，將含有抗體之餾份的 pH 值以濃三-羥甲基-胺基-甲烷(TRIS)緩衝液調節至 pH 5.6。蛋白質 A 溶離液為蛋白質濃度在 5 mg/ml 與 15 mg/ml 之間之溶液且以檸檬酸鈉緩衝。

將改良性蛋白質 A 溶離液應用於含有強陽離子交換樹脂(SP-瓊脂糖)之層析管柱。在 160 cm/h 之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10 管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟溶離方法溶離，藉此保持 pH 值恆定且藉由(逐步)增加氯化鈉濃度而改變電導率。該溶離層

析圖顯示於圖 10 中。

未達成單體與聚集體形式抗體之分離。

實例 10

層析法之最優化-第一步驟：線性濃度梯度

為改良兩種餾份之分離，已根據以抗 IL-1R 抗體概述之程序最優化分離條件。

與抗 IL-1R 抗體最優化方法相比，使用線性梯度之(溶離)鹽，意即氯化鈉，代替梯度緩衝物質。圖 11 中呈現對應於最優化程序第一步驟之線性氯化鈉梯度溶離之層析圖。分析證實，主峰尾部富集聚集體形式之抗體。

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM 檸檬酸鈉緩衝液，調節至 pH 5.5

負載：最大 20 g 蛋白質/L 凝膠基質

洗滌：10 mM 檸檬酸鈉緩衝液，調節至 pH 5.5

溶離：線性梯度；自調節至 pH 5.5 之 10 mM 檸檬酸鈉緩衝液至調節至 pH 5.5 之含有 400 mM 氯化鈉之 10 mM 檸檬酸鈉緩衝液

將如實例 9 所述之改良性蛋白質 A 溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂 (CM-瓊脂糖) 之層析管柱。在 160 cm/h 之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液 (10 管柱體積) 洗滌。將結合免疫球蛋白以線性梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之 pH 值及緩衝鹽濃度恆定。溶離鹽

氯化鈉之濃度經40管柱體積自0 mM線性增加至400 mM。該溶離層析圖顯示於圖11中。

以弱陽離子交換樹脂取代強陽離子交換樹脂導致第二峰分離為第一主峰之肩峰。該觀察類似於在抗IL-1R抗體情況下之觀察。在80 mM之氯化鈉濃度下，免疫球蛋白開始自管柱溶離。

實例 11

層析法之最優化-第二步驟：三步驟濃度梯度溶離

如實例10中所測定且自圖11呈現之層析圖得到之免疫球蛋白開始溶離之起始濃度為80 mM之氯化鈉。為計算第二最優化步驟之三個濃縮步驟，可忽略緩衝液濃度，因其較低且在層析期間保持恆定。

氯化鈉之起始濃度為80 mM且氯化鈉在其分子式中具有一不同於氫之陽離子。因此，三步驟溶離之濃度分別計算為80 mM、100 mM(= 80 mM乘以1.25)及120 mM(= 80 mM乘以1.50)氯化鈉。

層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

平衡：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

負載：最大20 g蛋白質/L凝膠基質

洗滌：10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

溶離：步驟1：含有80 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

步驟2：含有100 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

步驟3：含有120 mM氯化鈉之10 mM檸檬酸鈉緩衝液，調節至pH 5.5

將如實例9所述之改良性蛋白質A溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂(CM-瓊脂糖)之層析管柱。在160 cm/h之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液(10管柱體積)洗滌。將結合免疫球蛋白以分步梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之pH值及緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度恆定。將溶離鹽氯化鈉之濃度在第一步驟中自起始條件之0 mM增加至80 mM，在第二步驟中增加至100 mM，且在最終步驟中增加至120 mM。在鹽濃度每次增加之後，使含有指定氯化鈉濃度之10管柱體積之溶離緩衝液在下一濃縮步驟之前通過該管柱。在達到最終檸檬酸鈉濃度之後，繼續溶離額外之10管柱體積。該溶離層析圖顯示於圖12中。

在第三步驟溶離方法中，在氯化鈉濃度為80 mM之步驟中溶離單體抗體。尺寸排阻分析證實，僅溶離單體抗體。在氯化鈉濃度於第二步驟中增加至100 mM之後，溶離聚集體形式(圖12)。

實例12

層析法之最優化-第三步驟：以氯化鈉進行之單一步驟溶離
層析條件：

樹脂：CM-瓊脂糖；SP-瓊脂糖

流動速率：160 cm/h

- 平衡： 10 mM檸檬酸鈉，調節至 pH 5.5
- 負載： 最大 20 g蛋白質/L凝膠基質
- 洗滌： 10 mM檸檬酸鈉，調節至 pH 5.5
- 溶離： 含有 80 mM氯化鈉之 10 mM檸檬酸鈉，調節至 pH 5.5

將如實例 9 所述之改良性蛋白質 A 溶離液應用於含有弱陽離子交換樹脂 (CM-瓊脂糖) 之層析管柱。在 160 cm/h 之流動速率下之負載步驟之後，將管柱以平衡緩衝液 (10 管柱體積) 洗滌。將結合免疫球蛋白以單一步驟梯度溶離方法溶離，藉此保持移動相中之 pH 值及緩衝鹽之濃度恆定。緩衝鹽檸檬酸鈉之濃度保持恆定且與 80 mM 氯化鈉混合。在鹽濃度增加之後，使 15 管柱體積之含有氯化鈉之溶離緩衝液通過該管柱以溶離單體形式之結合抗 HER-2 抗體。為確定單體與聚集體形式抗體之分離，對 120 mM 之氯化鈉濃度進行第二步驟，此步驟對於製備單體抗體並非必要。在該第二次增加之後，聚集體形式之抗體自管柱溶離。該溶離層析圖顯示於圖 13 中。

若以強陽離子交換樹脂進行相同方法，則觀察到單體抗體之顯著損失 (與弱陽離子交換管柱上之 95% 或更大相比，產率僅為約 60%)，儘管可見單體與聚集體形式抗體之分離 (圖 14)。

將適用於在弱陽離子交換材料上分離之條件應用於強陽離子交換樹脂 SP-瓊脂糖係無益的。即使兩種馏份可分離，但單體抗體之產率降低至 60% 或甚至更低。

表 2：溶離液之分析：SP-瓊脂糖與CM-瓊脂糖之比較，呈現兩種不同分離之結果

分析物	改良性蛋白質A溶離液	SP-瓊脂糖		CM-瓊脂糖			
		峰1	峰2	峰1		峰2	
蛋白質A之量	17 ng/mg	< 3.9 ng/mg	5.7 ng/mg	< 3.9 ng/mg	< 3.9 ng/mg	32.2 ng/mg	39.7 ng/mg
HCP	3243 ng/mg	49.0 ng/mg	183.4 ng/mg	107.5 ng/mg	126.2 ng/mg	1247 ng/mg	988 ng/mg
DNA	1615 pg/mg	830 pg/mg	2635 pg/mg	319 pg/mg	682 pg/mg	10554 pg/mg	< 9300 pg/mg
聚集體(SEC)	0.97 %	0 %	32 %	0 %	0 %	15.2 %	23.0 %

【圖式簡單說明】

圖 1 抗 IL-1R 抗體自強陽離子交換樹脂 SP-瓊脂糖之單一步驟溶離；單體及聚集體形式之受體抗體未分離且溶離為一峰。

圖 2 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-Toyopearl 之單一步驟溶離；單體及聚集體形式之受體抗體經部分分離且溶離為一包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及蛋白質 A 之第二峰。

圖 3 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-Toyopearl 以 pH 5.0 之檸檬酸鈉的線性梯度溶離；單體及聚集體形式之受體抗體經部分分離且在 15 mM 之檸檬酸鈉起始濃度下溶離為包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及包含單體形式、聚集體形式免疫球蛋白及蛋白質 A 之混合物的第二峰。將該兩種餾份之 SEC 分析插入至離子交換層析圖。在主峰中不存在聚集體。相反，在第二峰中存在聚集形式之免疫球蛋白。

圖 4 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-Toyopearl 以 pH 5.0 之檸檬酸鈉的三步驟梯度溶離；單體及聚集體形式之受體抗體經部分分離且在 34 mM 之檸檬酸鈉濃度下溶離為包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及在 44 mM 之檸檬酸鈉濃度下溶離為包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及蛋白質 A 之第二峰。

圖 5 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 150 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離；單體及聚集體形式受體抗體經分離且溶離為包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及蛋白質 A 之第二峰。

圖 6a CM-瓊脂糖快速流上之溶離概況；兩峰可識別為：對應於單體抗 IL-1R 抗體之主峰，及主要含有聚集體及其他雜質之較小第二峰。

圖 6b SP-瓊脂糖快速流上抗 IL-1R 抗體之溶離概況；一峰可識別為含有單體免疫球蛋白、聚集體及其他未經該管柱分離之雜質。

圖 7a 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 100 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離。

圖 7b 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 150 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離。

圖 7c 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 200 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離。

圖 8a 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 150

mM之pH 4.0氯化鈉的單一步驟梯度溶離。

圖 8b 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 150 mM之pH 6.0氯化鈉的單一步驟梯度溶離。

圖 9a 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖之單一步驟溶離；起始物質之尺寸排阻層析法展示單體及聚集體兩種形式之免疫球蛋白。

圖 9b 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖之單一步驟溶離；單體及聚集體形式之受體抗體經部分分離且溶離為一包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及其他蛋白質之第二峰。在該圖中展示第一(主)峰之尺寸排阻層析法。自 SEC-管柱僅溶離一峰，其為單體免疫球蛋白。

圖 9c 抗 IL-1R 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖之單一步驟溶離；單體及聚集體形式之受體抗體經部分分離且溶離為一包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及其他蛋白質之第二峰。在該圖中展示第二峰之尺寸排阻層析法。在該層析圖中，至少可見三個峰，其等效於單體及聚集體形式之免疫球蛋白及其他蛋白質。

圖 10 抗 HER-2 抗體自強陽離子交換樹脂 SP-瓊脂糖之單一步驟溶離；單體及聚集體形式之抗體未經分離且溶離為一峰。

圖 11 抗 HER-2 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 pH 5.5 之檸檬酸鈉緩衝液中之氯化鈉的線性梯度溶離；單體

及聚集體形式之抗體經部分分離且以 80 mM 之氯化鈉起始濃度溶離為一包含單體形式免疫球蛋白之主峰；單體及聚集體形式與蛋白質 A 一起溶離為主峰尾部之混合物。

圖 12 抗 HER-2 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 pH 5.5 之檸檬酸鈉緩衝液中之氯化鈉的三步驟梯度溶離；單體及聚集體形式之抗體經分離且在 80 mM 之氯化鈉濃度下溶離為一包含單體形式免疫球蛋白之主峰，及在 100 mM 之氯化鈉濃度下溶離為包含單體及聚集體形式免疫球蛋白以及蛋白質 A 之第二峰。

圖 13 抗 HER-2 抗體自弱陽離子交換樹脂 CM-瓊脂糖以 80 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離；單體形式經溶離，而無聚集體形式；聚集體形式在第二氯化鈉步驟之後溶離至 120 mM 之第二界定峰。

圖 14 抗 HER-2 抗體自強陽離子交換樹脂 SP-瓊脂糖以 80 mM 之 pH 5.5 氯化鈉的單一步驟梯度溶離；獲得兩個峰：峰 1 僅含有單體 Herceptin®，峰 2 在第二氯化鈉步驟之後溶離至 120 mM，其含有大量單體 Herceptin® 及聚集體；單體形式 Herceptin® 之產率小於 60%。

五、中文發明摘要：

本發明描述一種藉由離子交換層析法純化免疫球蛋白之方法。該層析方法使用弱離子交換樹脂及單一步驟之溶離方法來純化免疫球蛋白。此外，本發明描述一種測定用於自離子交換樹脂以單一步驟溶離免疫球蛋白之鹽的濃度之方法。

六、英文發明摘要：

A method for the purification of immunoglobulins by ion exchange chromatography is described. The chromatographic method uses a weak ion exchange resin and a single step elution process for the purification of an immunoglobulin. Additionally a method for the determination of the salt concentration for the single step elution of an immunoglobulin from an ion exchange resin is described.

十一、圖式：

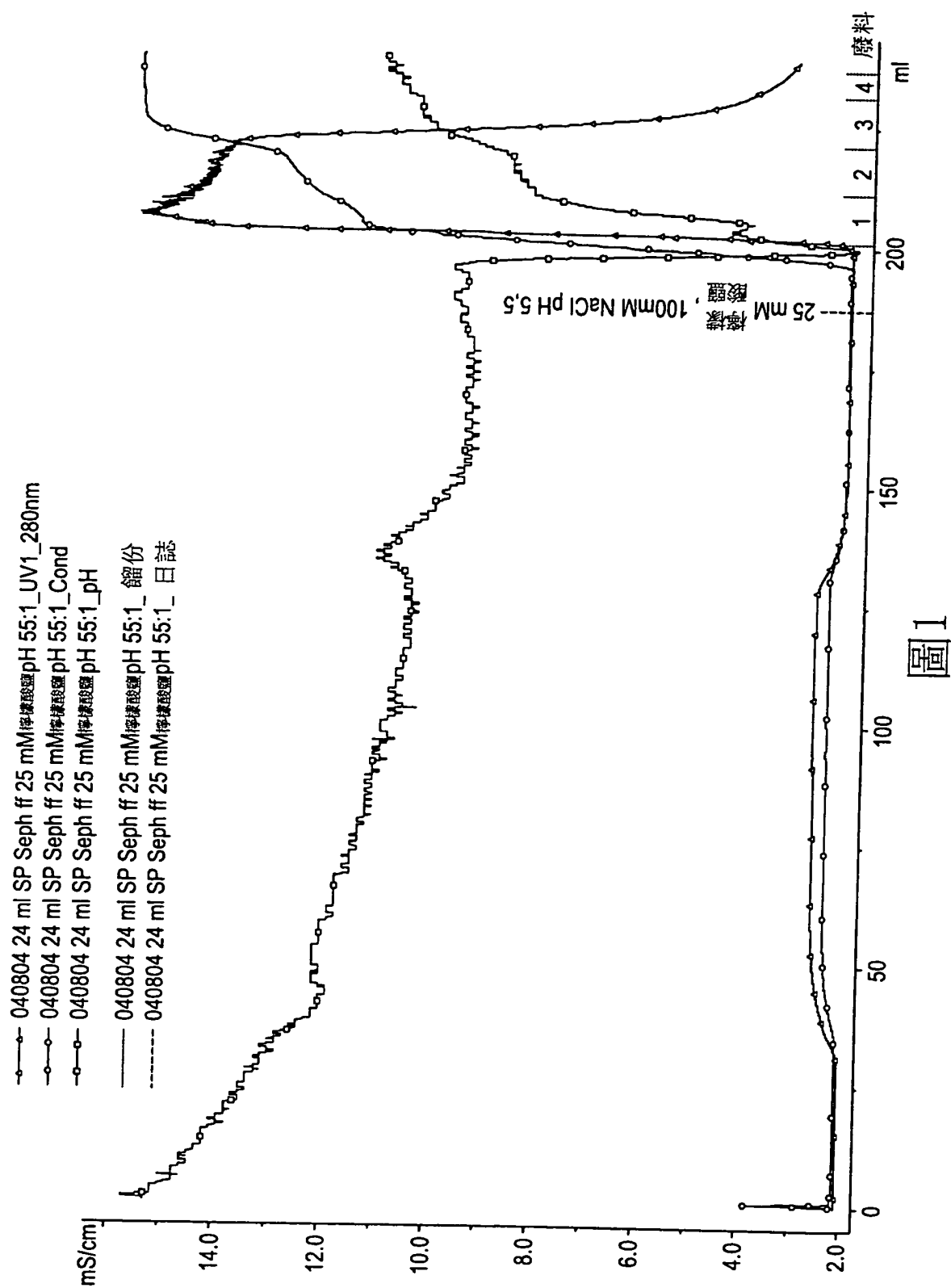


圖 1

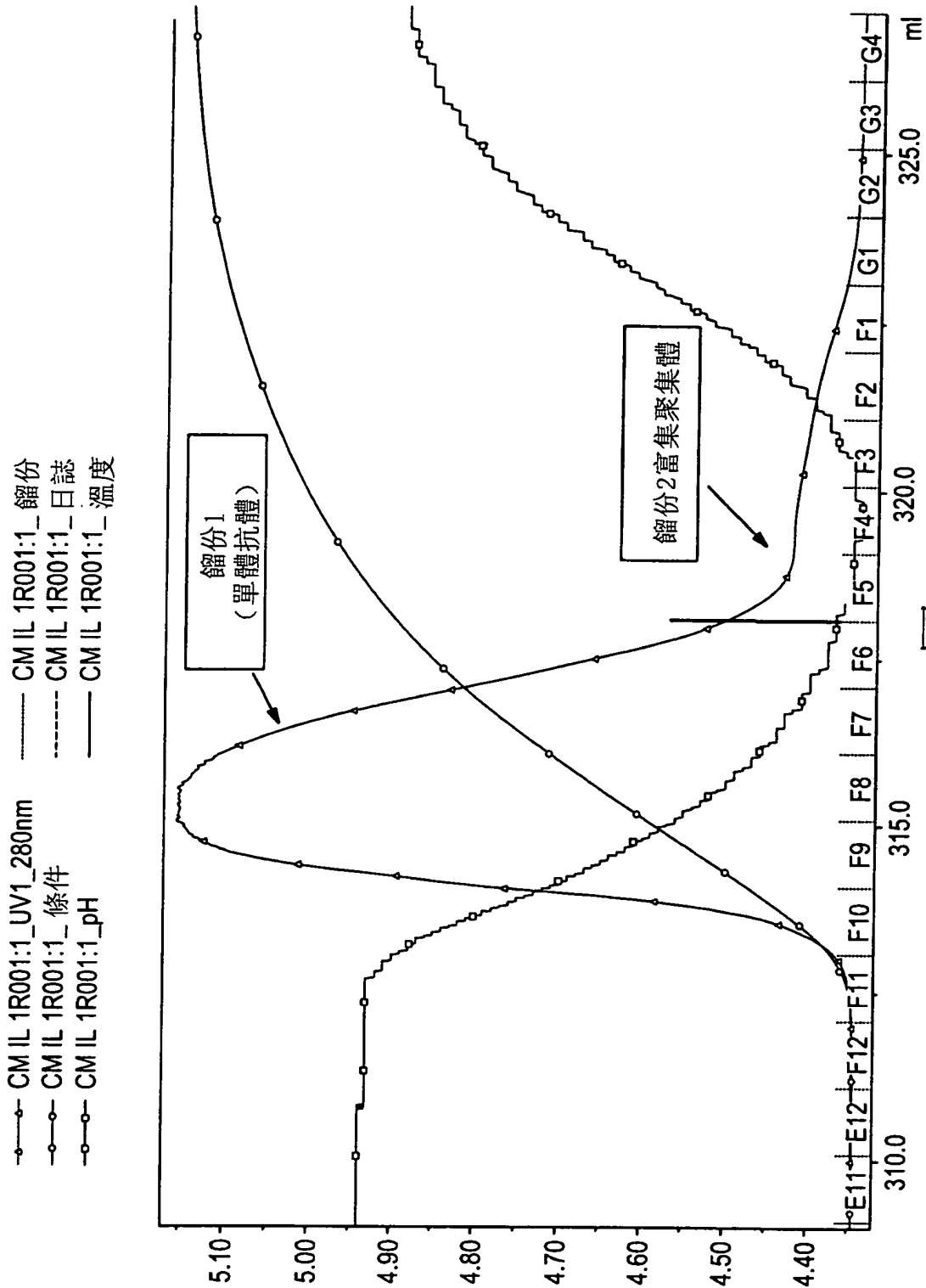


圖2

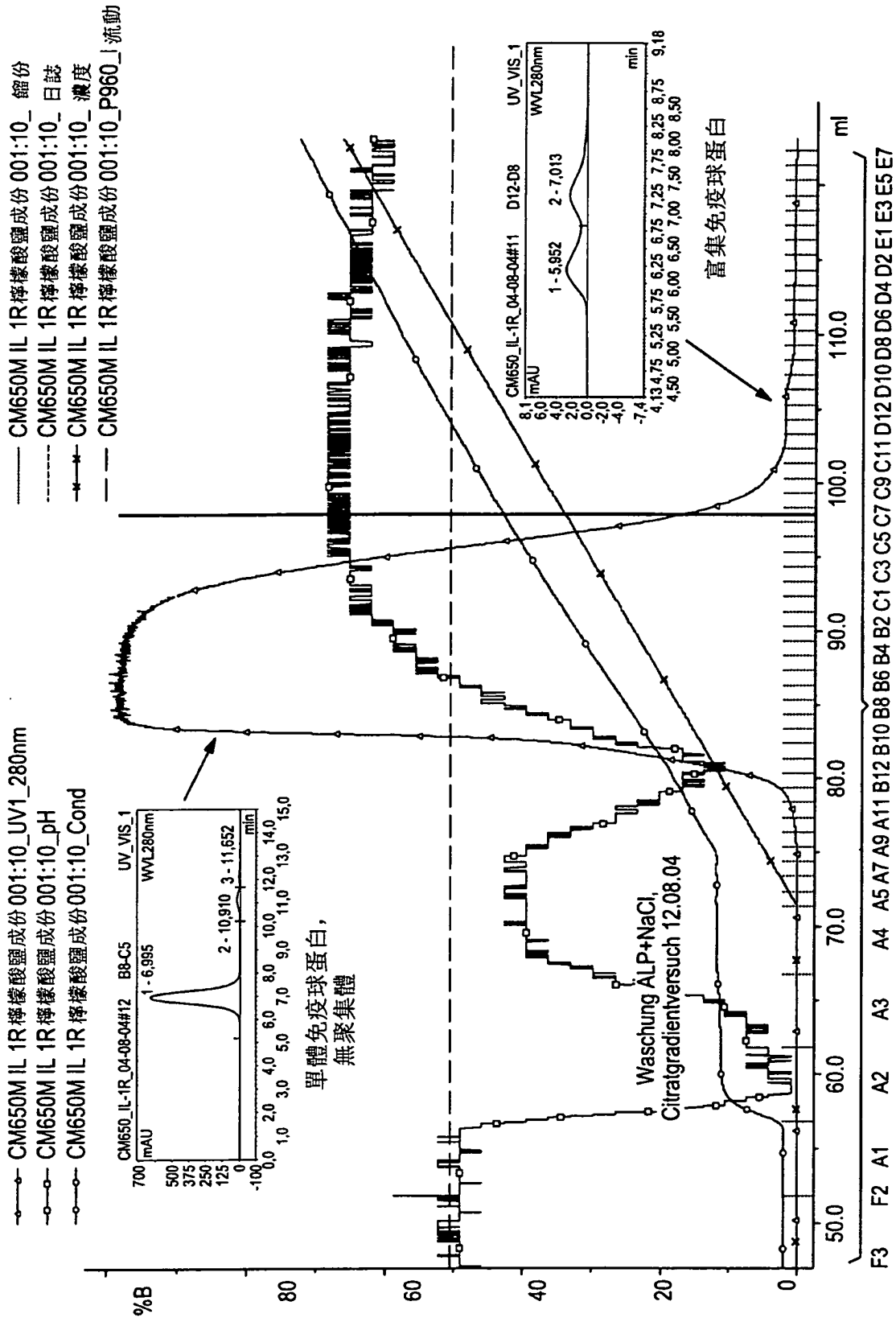


圖 3

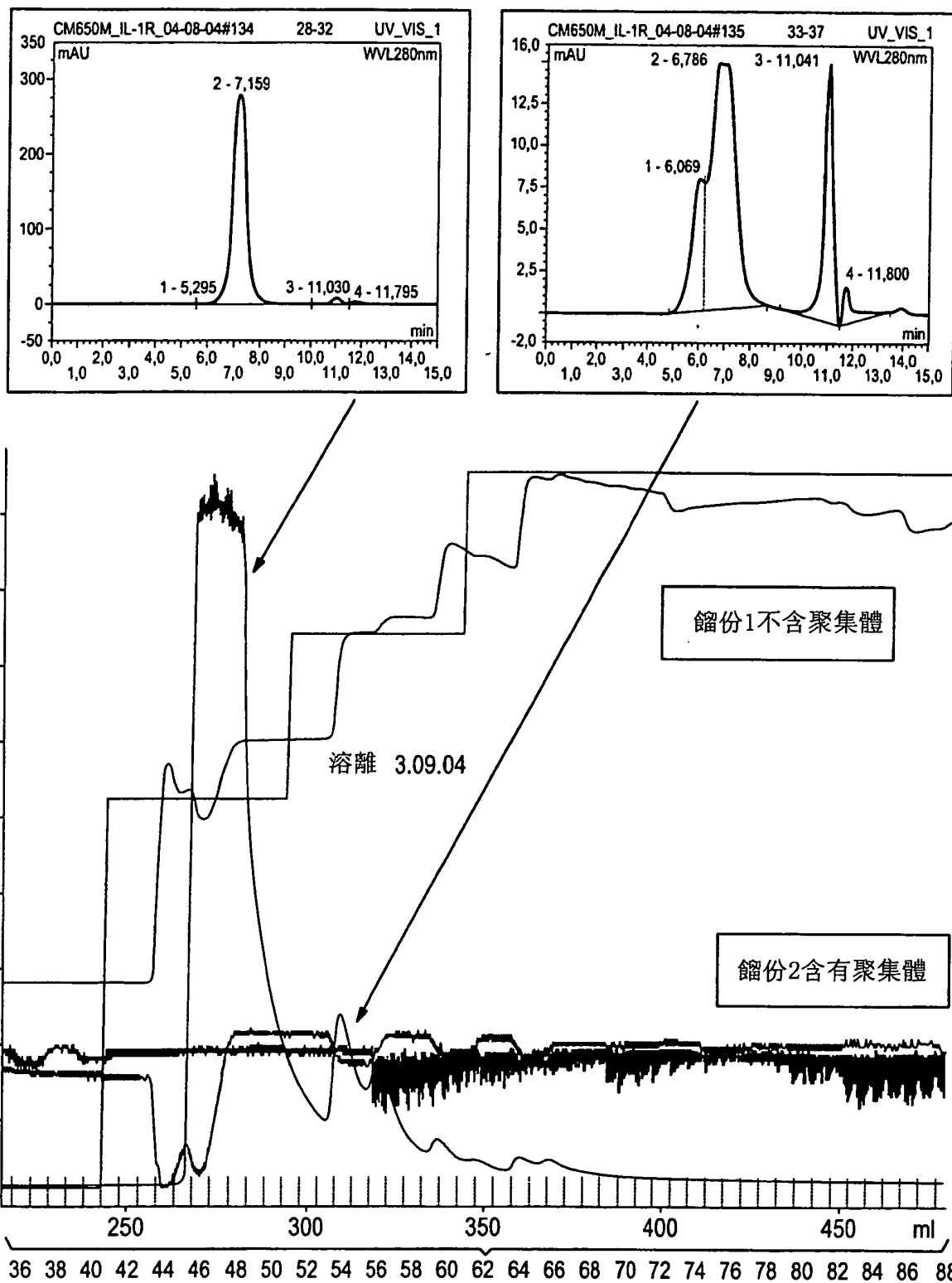


圖4

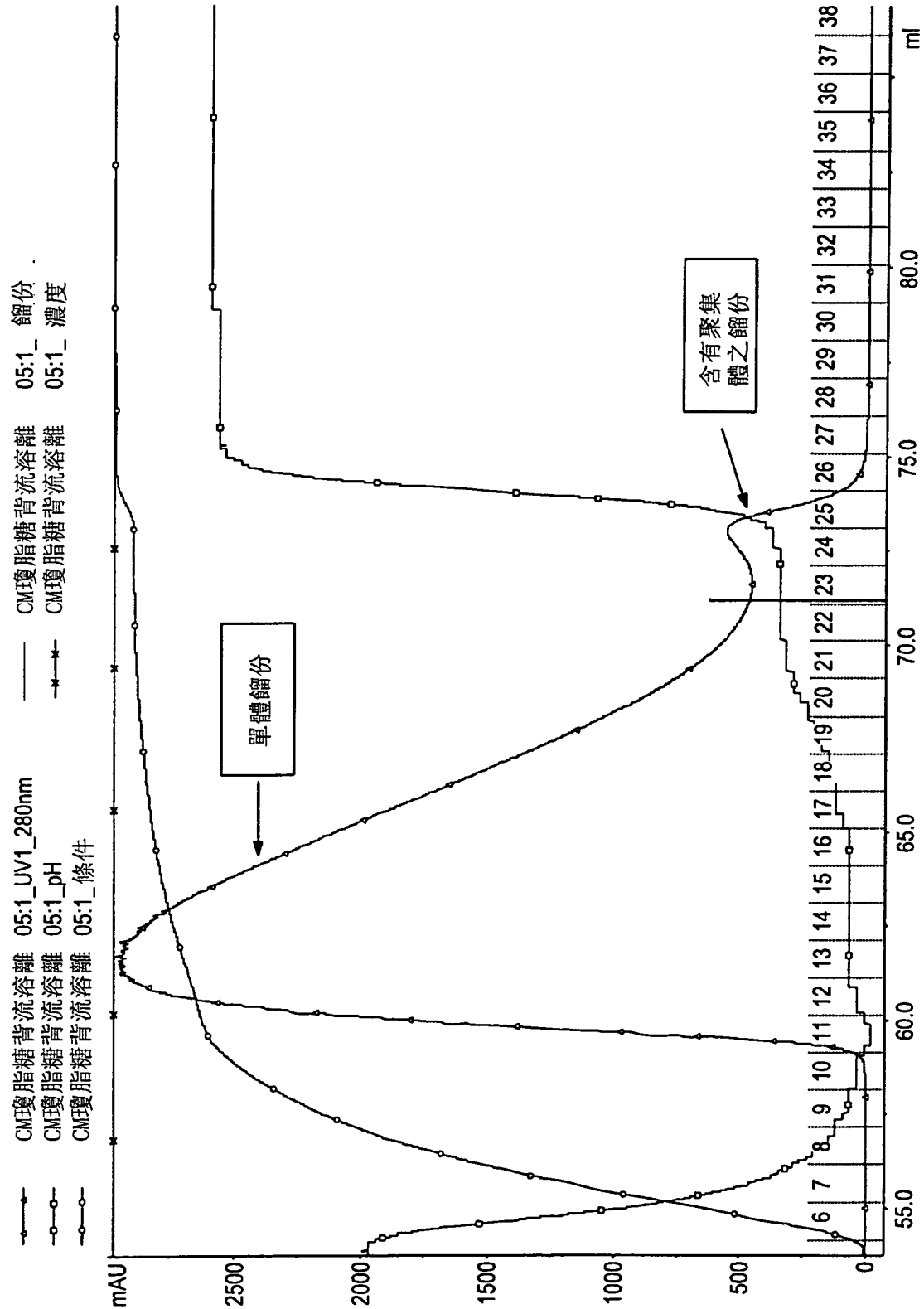


圖5

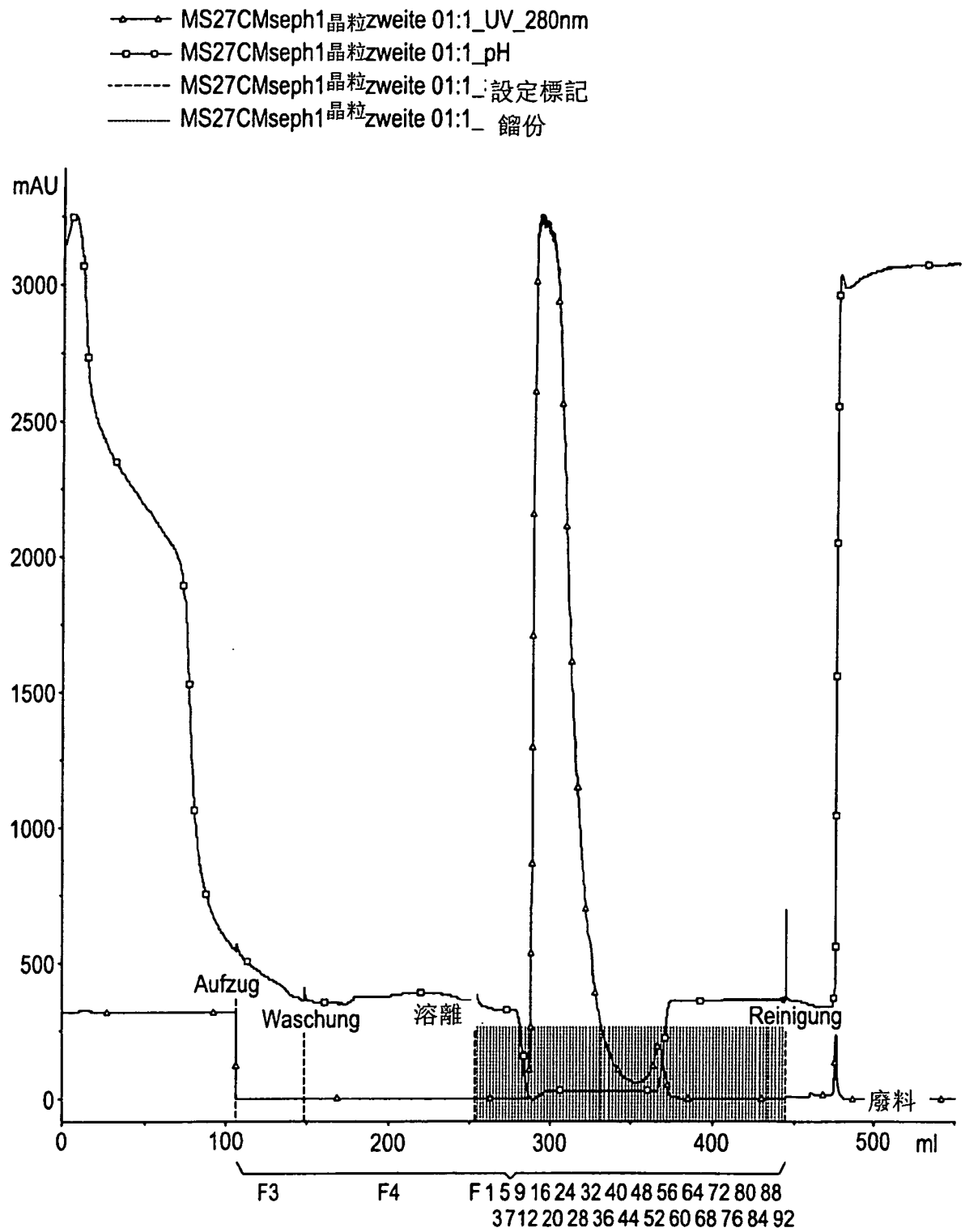


圖6a

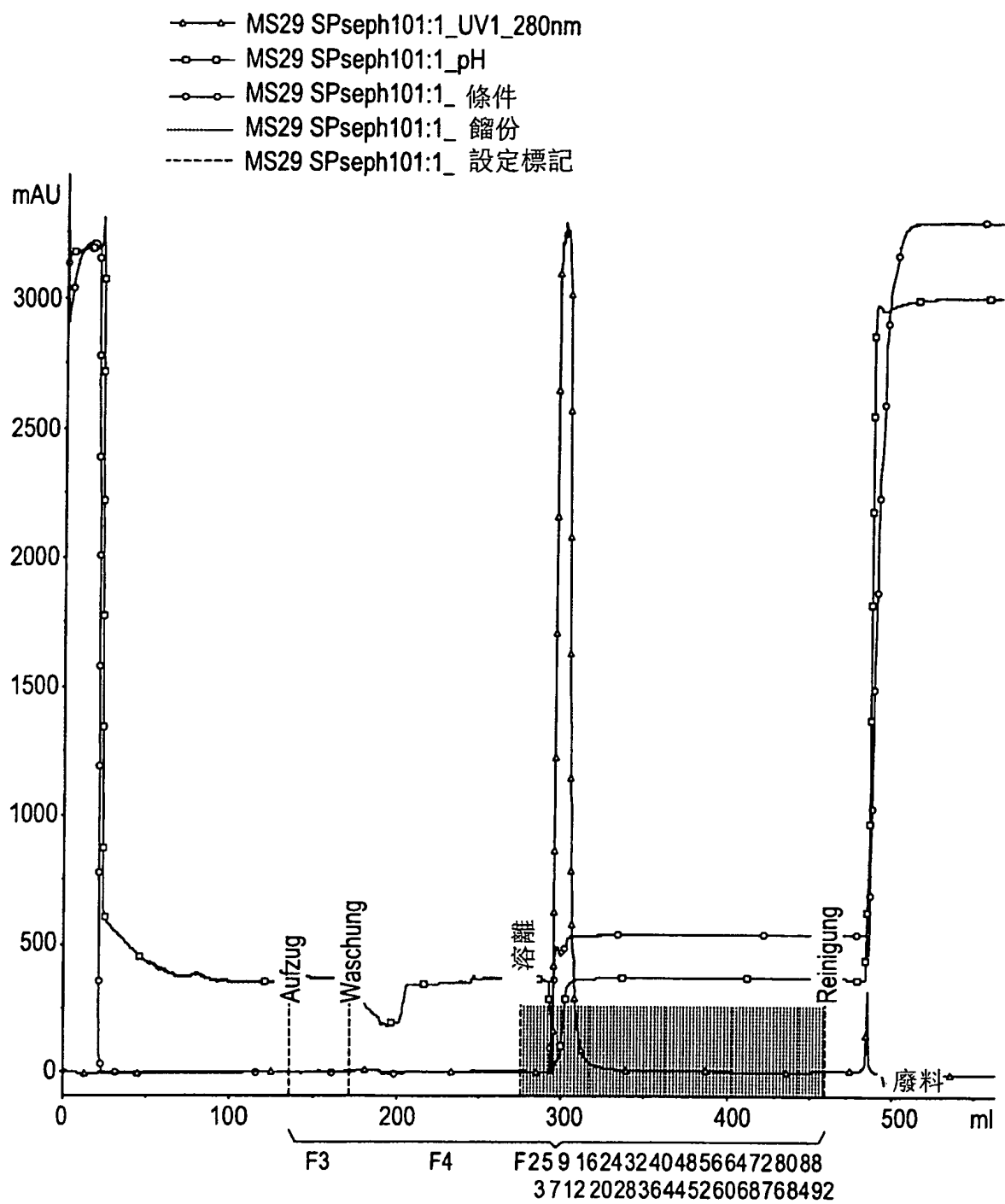


圖6b

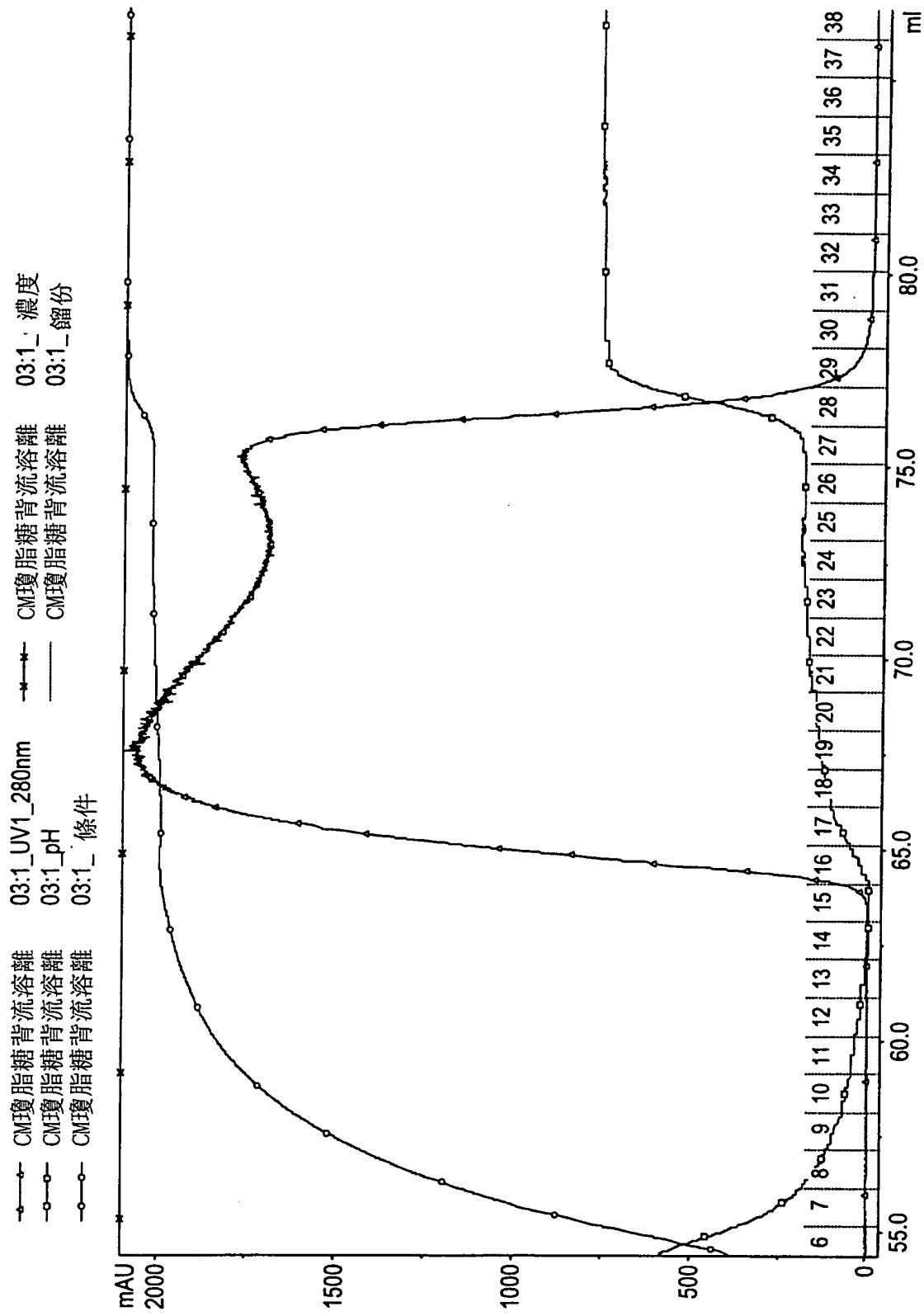


圖7a

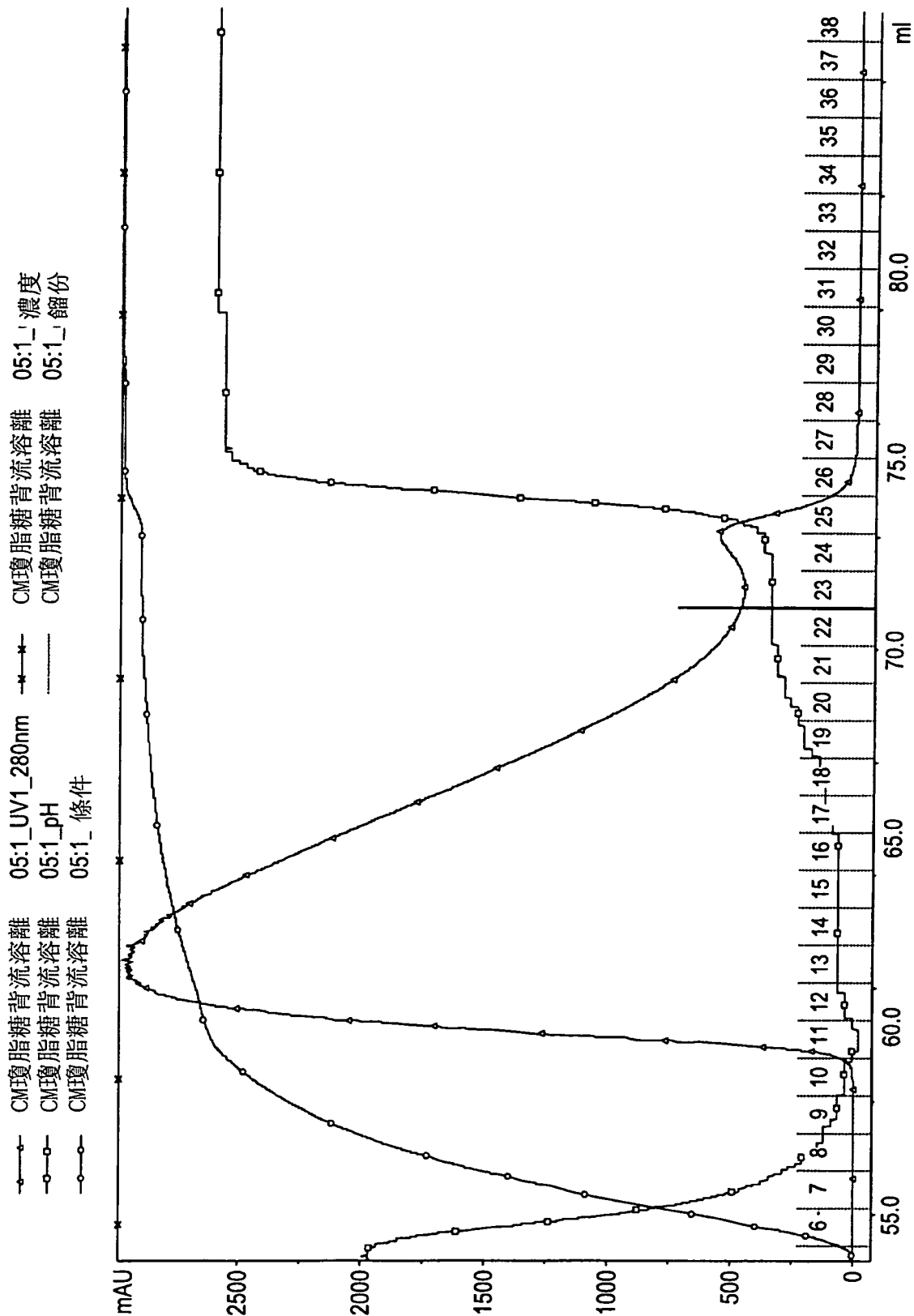


圖 7b

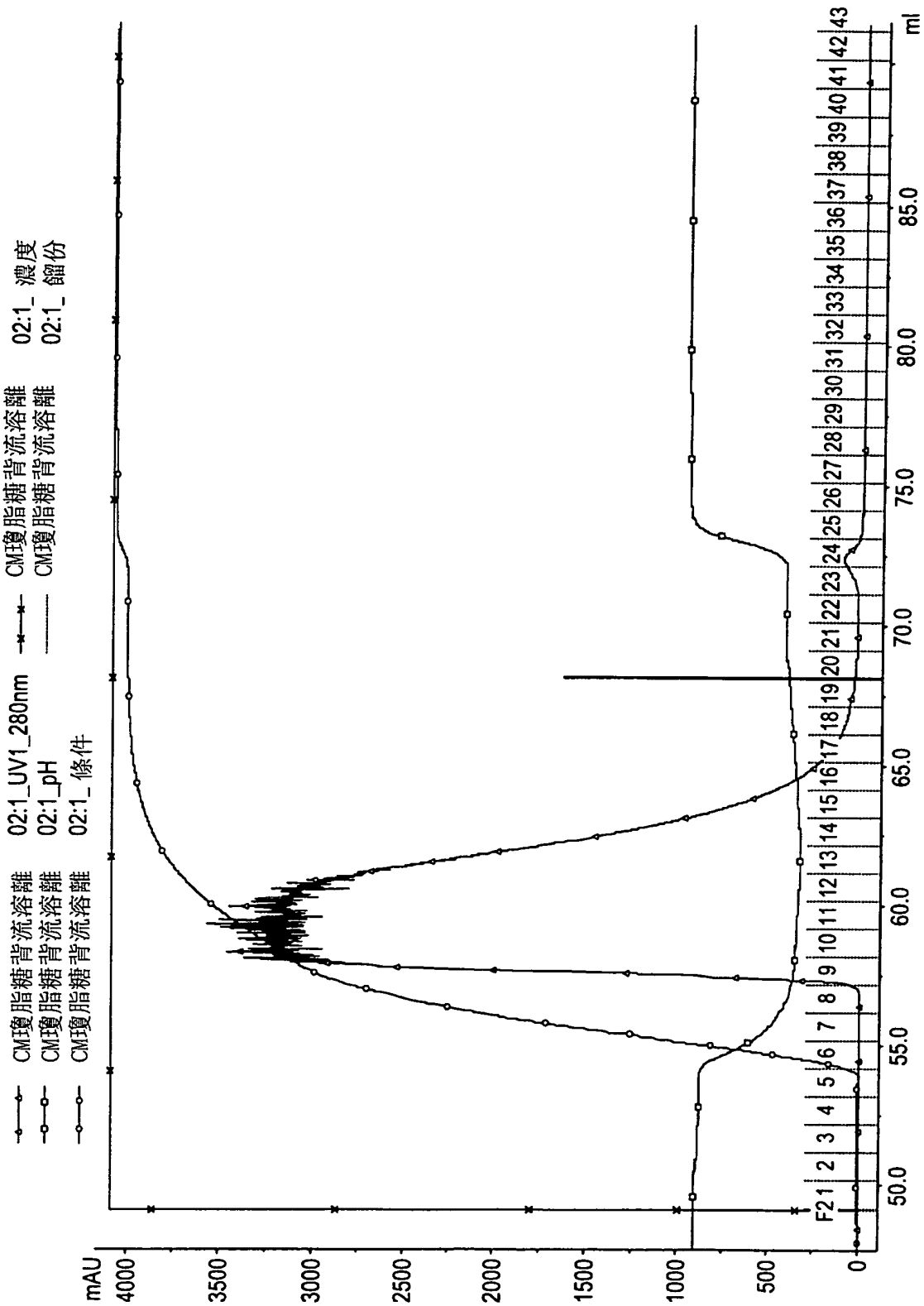


圖7C

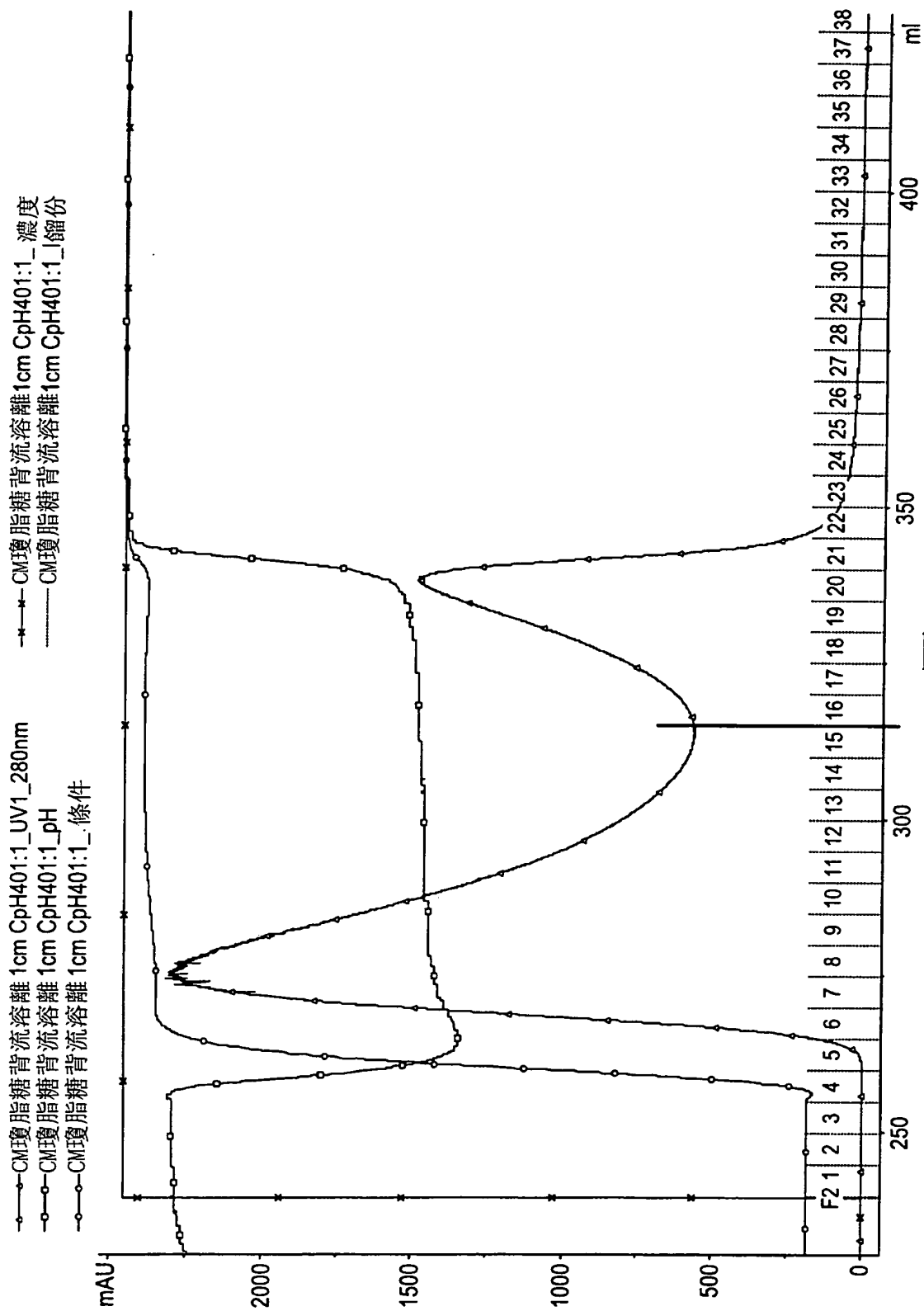


圖8a

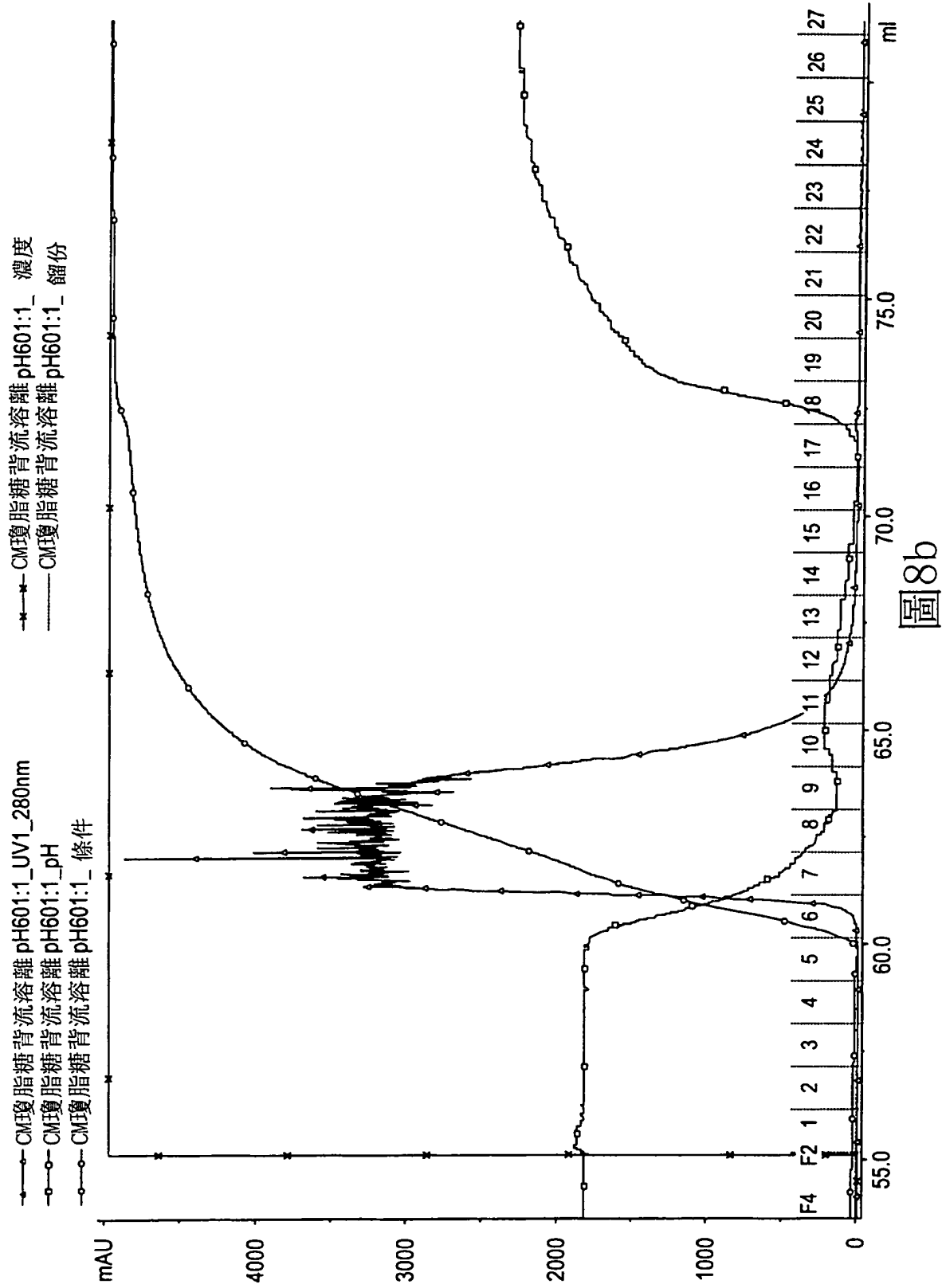


圖8b

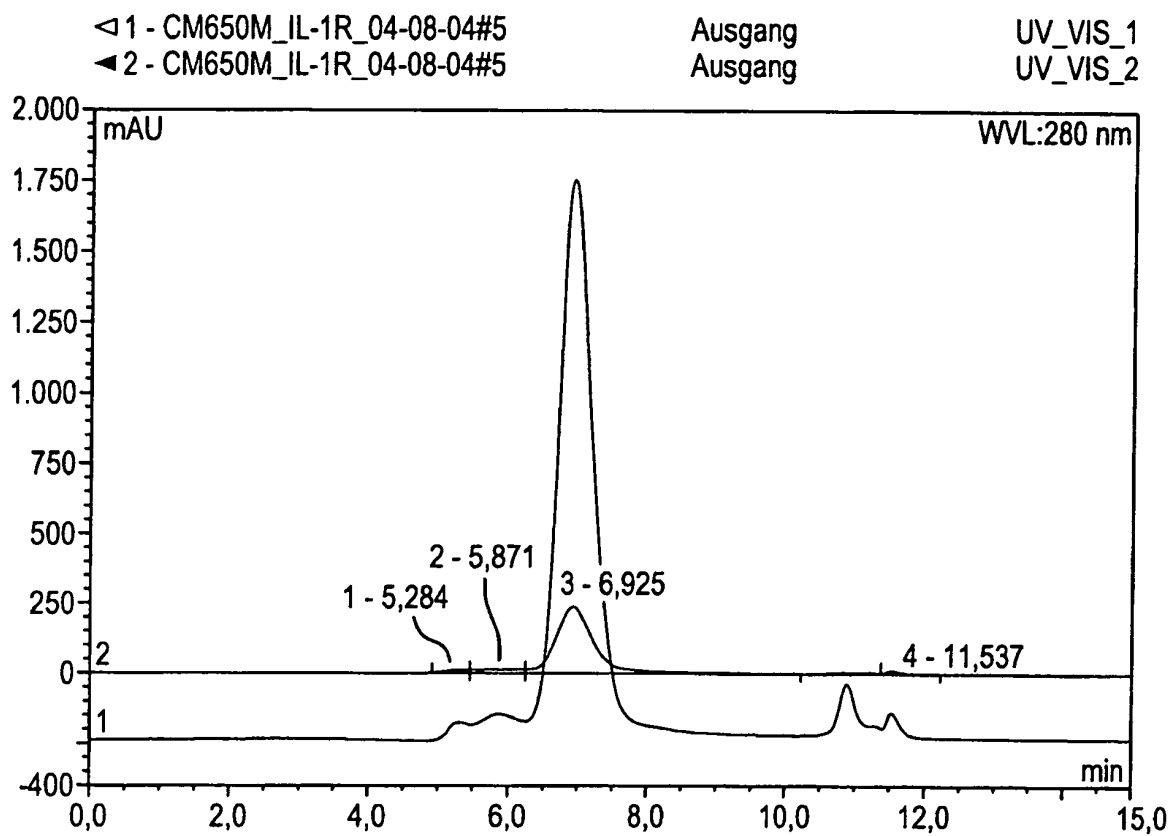


圖 9a

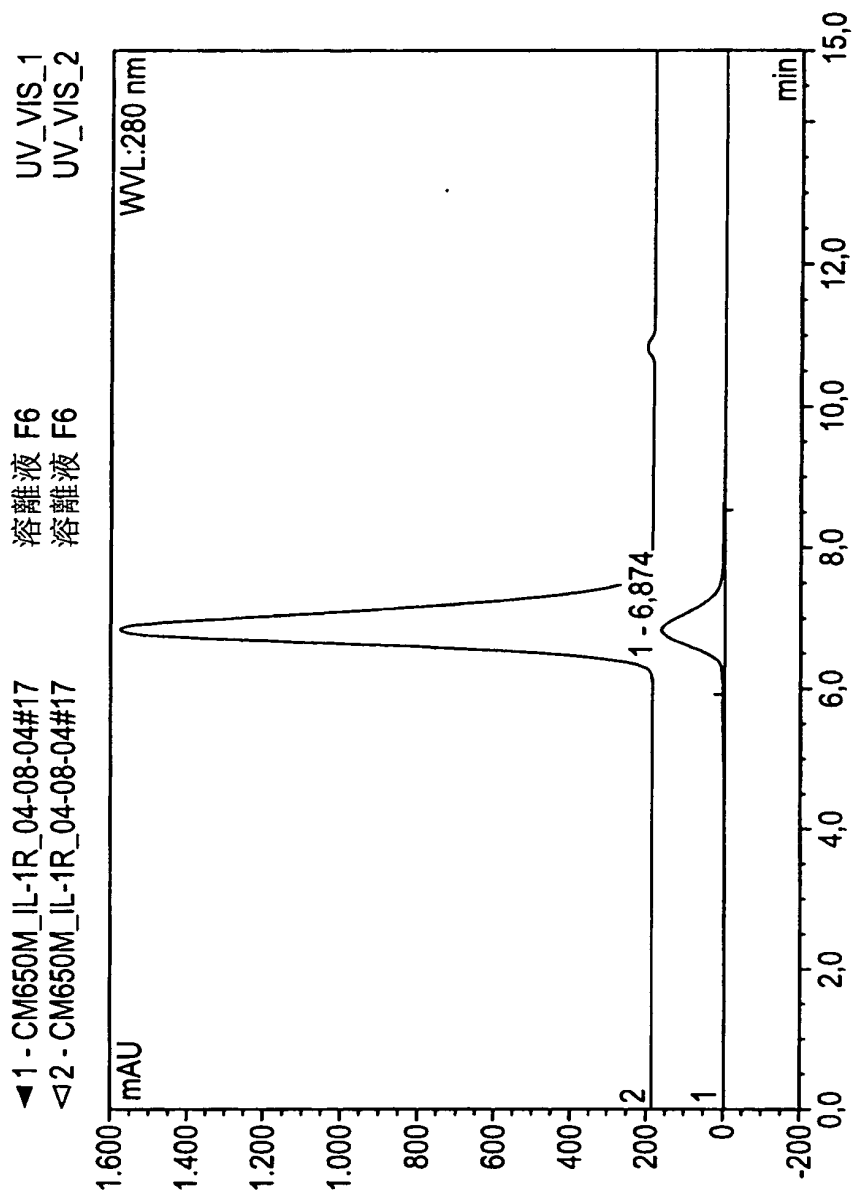


圖9b

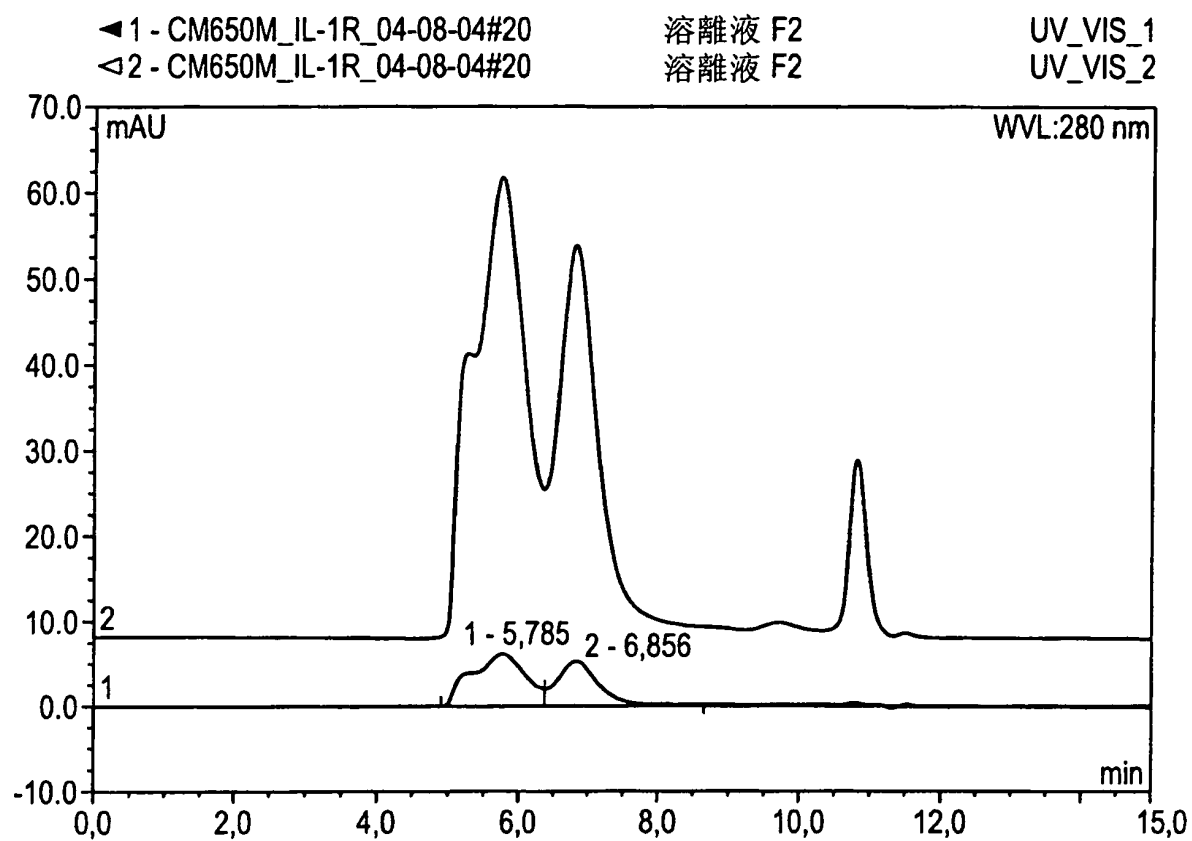


圖9c

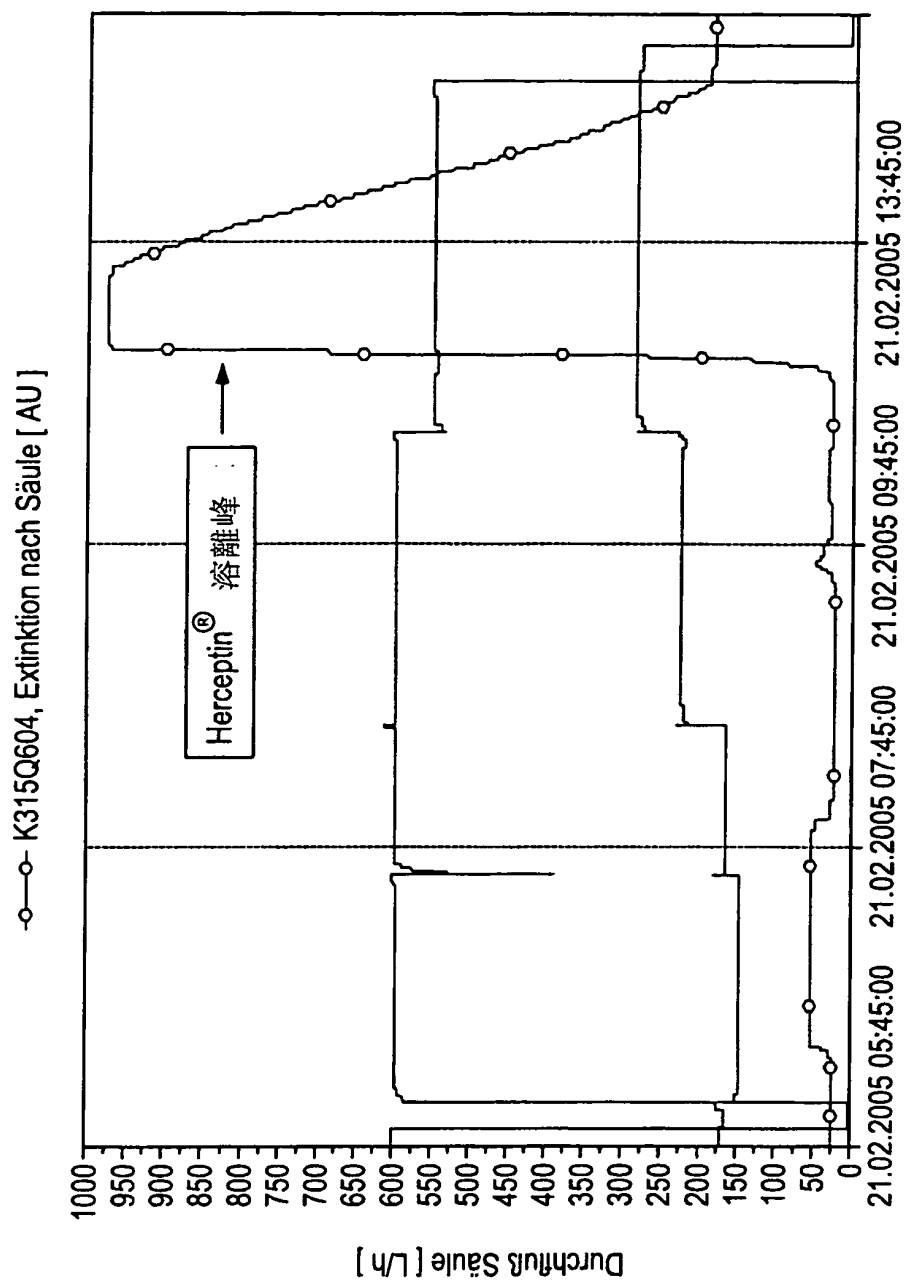


圖 10

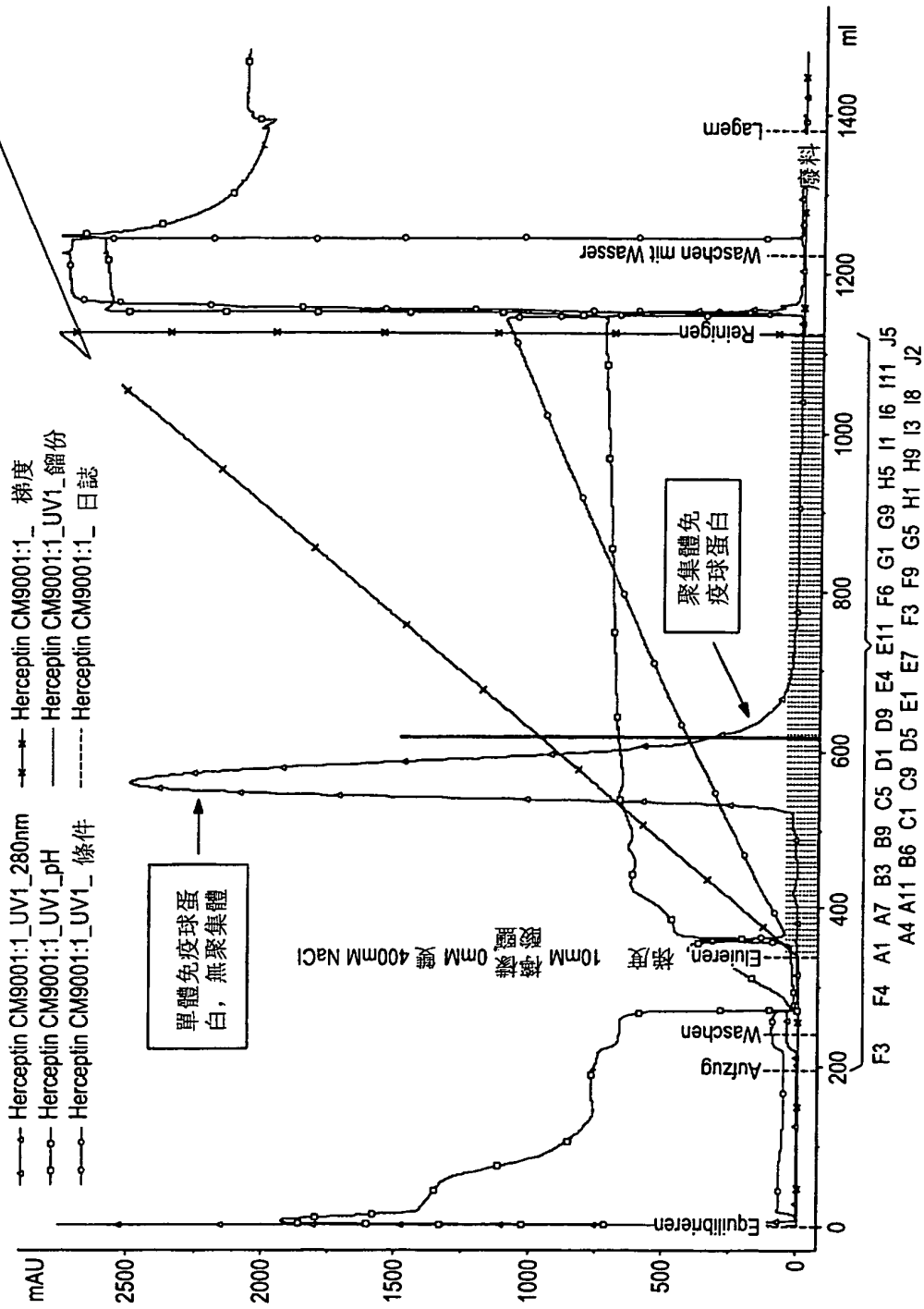


圖 11

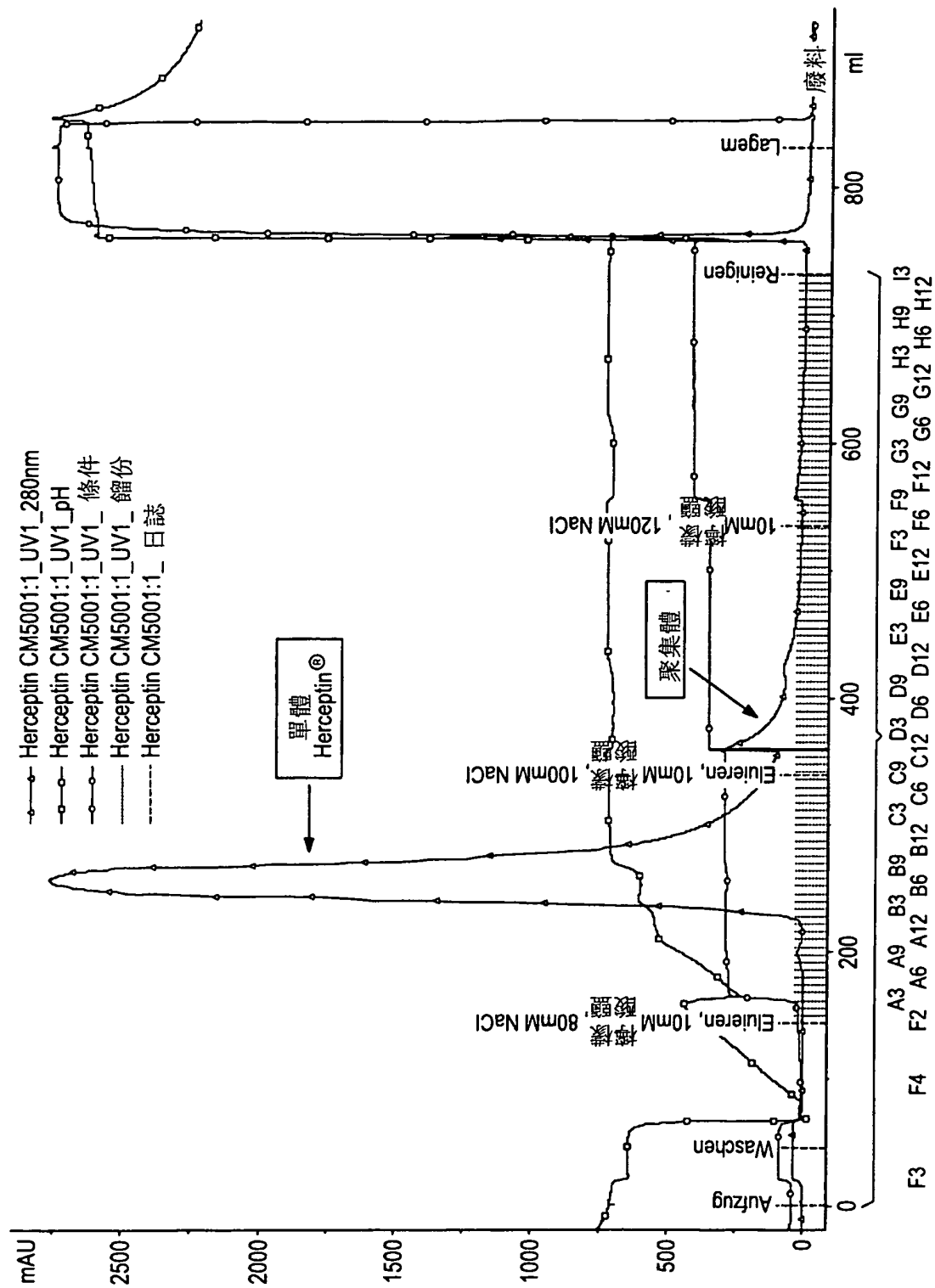


圖12

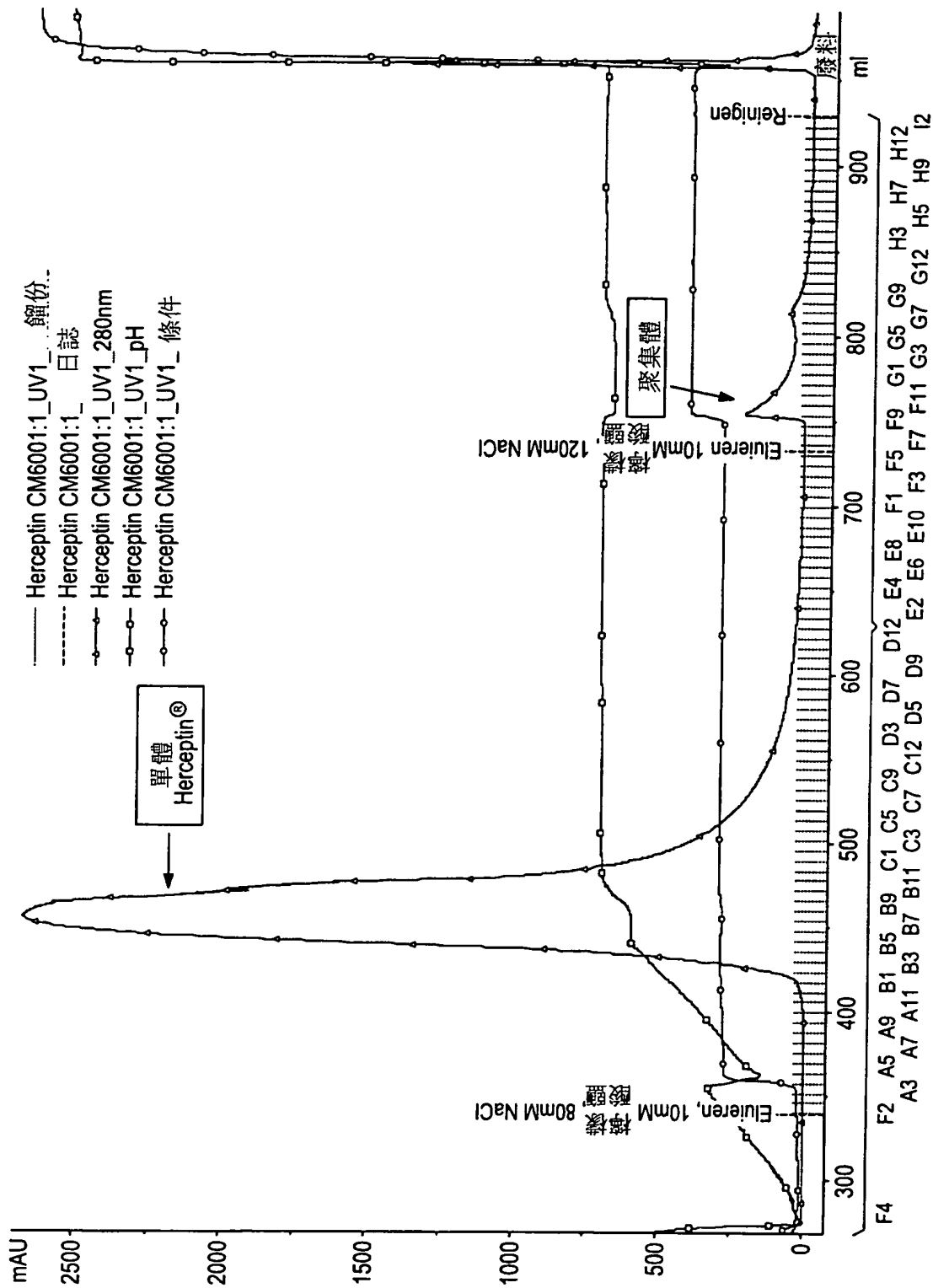


圖13

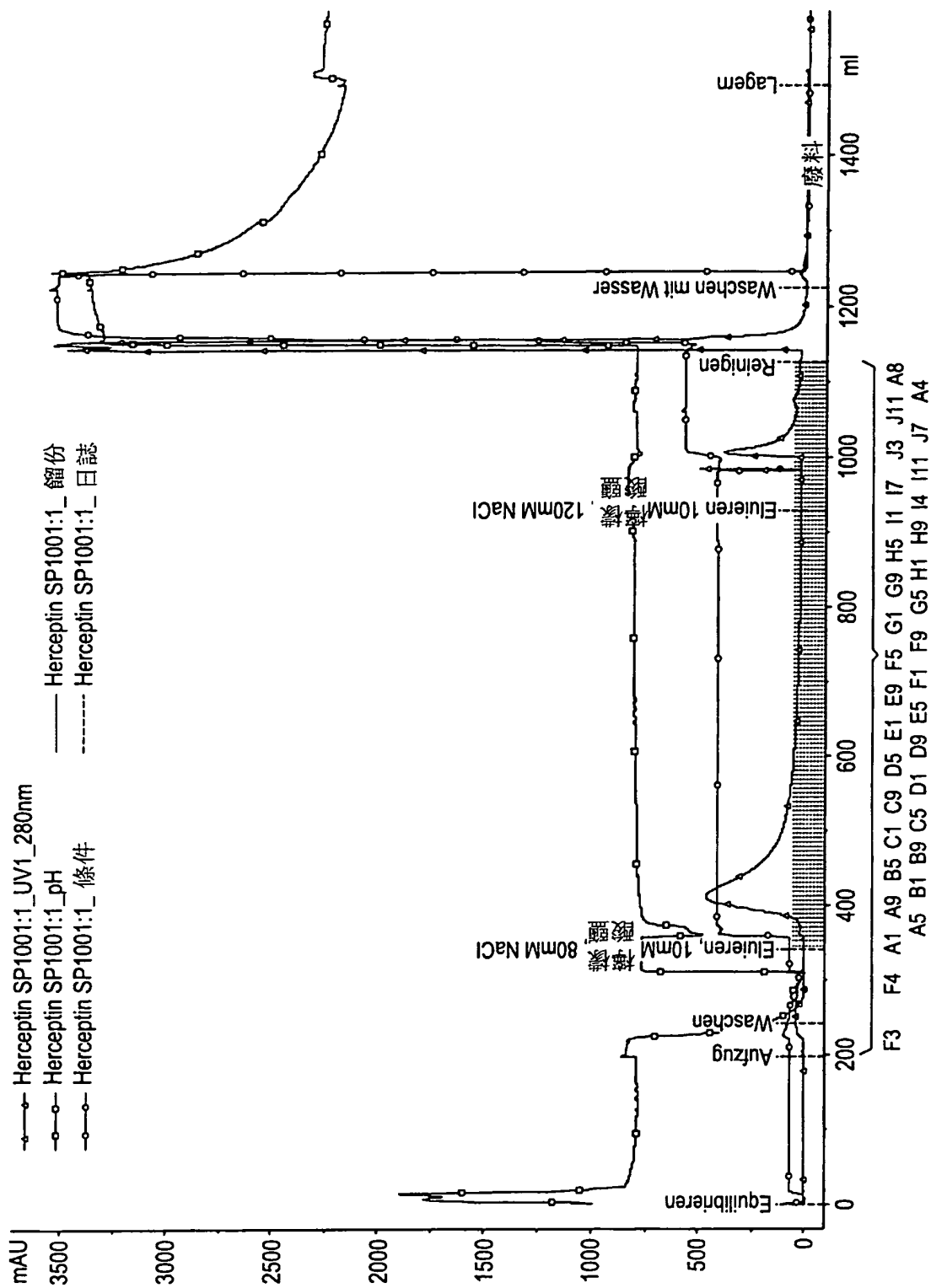


圖 14

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

98年8月10日(夏)三

十、申請專利範圍：

1. 一種從聚集體及片段純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含：
 - a) 提供包含免疫球蛋白及 pH 3.0 至 10.0 之緩衝物質之溶液；
 - b) 在該免疫球蛋白結合至弱陽離子交換材料之條件下，使該溶液與該弱離子交換材料相接觸；及
 - c) 藉由使用包含 pH 3.0 至 10.0 之緩衝物質及鹽之溶液，經單一步驟自該弱陽離子交換材料回收該單體免疫球蛋白；其中該鹽具有介於 5 至 500 mM 間之濃度且係選自由檸檬酸鈉、氯化鈉、硫酸鈉、氯化鉀、硫酸鉀、磷酸鉀、檸檬酸及磷酸鹽及該等組份之任何混合物所組成之群；且其中該單一步驟表示一種方法，其中一或多種層析條件自起始值突然變為最終值。
2. 如請求項 1 之方法，其特徵在於該緩衝物質係檸檬酸或其鹽、或磷酸或其鹽。
3. 如請求項 1 之方法，其特徵在於該方法係層析或分批次方法。
4. 如請求項 1 之方法，其特徵在於該免疫球蛋白係 G 類或 E 類免疫球蛋白之成員。
5. 如請求項 1 之方法，其特徵在於該回收步驟 c) 中之該溶液具有 pH 3.0 至 pH 7.0 之 pH 值。
6. 如請求項 1 至 5 中任一項之方法，其特徵在於該陽離子交

換物質係於低於該免疫球蛋白之等電點之pH值下處理。

7. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於pH值在該單一步驟中保持恆定。
8. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於該免疫球蛋白具有6.0或更高($pI \geq 6.0$)之等電點(pI)。
9. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於步驟(c)中引起溶離之鹽同時為緩衝物質。