



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102272146 A

(43) 申请公布日 2011.12.07

(21) 申请号 201080004831.6

代理人 李进 林森

(22) 申请日 2010.01.11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 1/32 (2006.01)

0900032-4 2009.01.13 SE

B01D 15/08 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

B01D 21/01 (2006.01)

2011.07.12

C07K 16/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2010/050017 2010.01.11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/082894 EN 2010.07.22

(71) 申请人 通用电气健康护理生物科学股份公
司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 J·范阿尔斯廷 J·沙纳加尔

R·霍尔思 K·莱基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用带负电的聚合物沉淀生物分子

(57) 摘要

本发明涉及分离生物分子的方法。更详细地讲,本发明涉及在如下条件下分离抗体 (mAbs) 和包含抗体片段 (Fabs) 的相关蛋白质的方法,其中所述抗体和相关蛋白质具有正电性和相对疏水性并且将与带负电的聚合物反应以形成会沉淀的聚合物-蛋白质复合物。所述分离可使用诸如具有各种分子量的聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖聚合物的低廉且生物相容的带负电的聚合物作为沉淀剂来实现。其在比较高的聚合物浓度(例如 10%)及高盐浓度(> 50mM)和导电率(例如 > 10mS/cm)下在宽 pH 范围内发生。

1. 一种分离生物分子的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (a) 提供含有所述生物分子的水性样品;
 - (b) 在盐存在下混合所述水性样品与带负电的聚合物,在一定条件下混合以使得所述聚合物选择性复合所述生物分子并使其絮凝以形成包含所述生物分子的沉淀物的混合物;
 - (c) 从所述水性液体中分离所述生物分子沉淀物;和
 - (d) 使所述生物分子再悬浮于再悬浮缓冲液中。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述生物分子为蛋白质,其包括激素或多克隆抗体或单克隆抗体或抗体衍生蛋白质。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体为 IgG 抗体。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述生物分子为抗体片段 (Fab)。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述带负电的聚合物为聚丙烯酸 (PAA)。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述 PAA 具有大于 5kD 的分子量和大于 3% (w/v) 的浓度。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述聚合物为羧甲基-葡聚糖 (CMD) 或其它羧基改性的聚合物或其它多元酸或其它生物降解的多元酸聚合物。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述盐选自磷酸钠、NaCl、柠檬酸钠和硫酸钠。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述盐的浓度大于 50mM。
10. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中所述混合物的 pH 在 5-9 范围内。
11. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中所述混合物的 pH 为约 pH7。
12. 权利要求 1 的方法,其中所述水性样品选自来自原核或真核表达系统、病毒培养系统、全血、澄清血液、重组牛奶、重组植物溶液的澄清发酵产物和含有所关注的生物分子的任何其它水性样品。
13. 权利要求 12 的方法,其中澄清或其它初期样品纯化分离步骤通过在多种缓冲剂或盐存在下在包括由一种或两种水溶性聚合物形成的水性多相分离体系的一种或多种水性多相分离体系中离心分离或分配来进行。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述分离包括:
 - (a) 离心分离所述混合物以形成所述沉淀物和所述水性液体;和
 - (b) 从所述沉淀物除去所述水性液体。
15. 权利要求 1 的方法,其中所述分离包括过滤所述混合物以从所述水性流体中分离所述复合物。
16. 权利要求 1 的方法,其中使所述沉淀的生物分子再悬浮于具有 3-9 的 pH 的水性缓冲液或水中。
17. 权利要求 5-7 中任一项的方法,其中所述沉淀物中的残留 PAA 或其它多元酸在步骤 (d) 之后通过清洗除去。
18. 权利要求 5-7 中任一项的方法,其中所述沉淀物中的残留 PAA 或其它多元酸在步骤 (d) 之后通过水性多相体系除去。
19. 权利要求 5-7 中任一项的方法,其中所述沉淀物中的残留 PAA 或其它多元酸在步骤 (d) 之后通过使其流过色谱或过滤或其它(整体)捕获介质而除去,所述介质显著吸附所述生物分子,但不吸附所述 PAA 或其它多元酸。

20. 权利要求 5-7 中任一项的方法,其中所述沉淀物中的残留 PAA 或其它多元酸在步骤 (d) 之后通过使其流过色谱或过滤或其它(整体)尺寸排阻介质而除去,在所述介质中 PAA 或其它多元酸具有与所述生物分子不同的流动速率或阻碍程度。

21. 权利要求 1 的方法,其进一步包括一个或多个额外纯化步骤,其可包括其它水相分配或沉淀步骤。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述额外纯化步骤包括使用多峰阳离子交换剂;蛋白质 A 亲和柱、疏水性相互作用柱和阳离子交换的色谱法。

23. Capto MMC 和相关捕获介质的用途,它们经设计与高导电性溶液一起使用以在低稀释度下纯化由权利要求 1 的方法产生的含生物分子的溶液。

24. 权利要求 1 的方法用以分离稳定形式的生物医药的用途,所述稳定形式的生物医药用于储存一段时间,诸如数天、数周、数月或数年。

25. 权利要求 1 的方法在配制步骤中与聚合物的或其它赋形剂一起用以使生物医药达到某一浓度或不溶解状态的用途。

26. 权利要求 25 的用途,其中所述聚合物包括可生物降解的多元酸,诸如 CM- 葡聚糖。

27. 权利要求 25 和 26 中任一项的用途,其中所述聚合物的或其它赋形剂对所述配制提供助剂性能。

用带负电的聚合物沉淀生物分子

发明领域

[0001] 本发明涉及分离生物分子的方法。更详细地讲,本发明涉及通过聚合物-蛋白质复合物形成和沉淀分离具有商业利益的抗体和其它蛋白质的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 来自诸如牛奶和血浆的各种澄清进料的蛋白质的加工通常以超大规模进行。生物医药生产者现在通常讨论以 100Kg 规模生产诸如单克隆抗体 (mAbs) 的生物医药。这意味着即使在高 mAb 滴度 (10g/L) 下,可能也需要处理 10000 升的发酵量。具有改进的容量和高流动能力的色谱介质可适合使用现有的直径为 1.5-2 米的大柱来处理所述装载量。然而,所述柱特别是在它们被污染物弄脏的情况下可能难以工作,且经所述柱处理大量物质所耗的时间还将带来调度 (scheduling) 和其它挑战。另外,所述方法将不能处理与未来生物医药生产或加工蛋白质为食品添加剂、工业催化剂等相关的可能甚至更大的量。因此,完全理解在色谱或相关下游操作之前应该引入迅速、成本有效的减少处理量 (和污染物) 的操作。这在处理来自细菌或诸如血液、重组牛奶或重组植物的其它复杂进料物流来源的进料时尤其如此。

[0004] 正在调查研究各种新的成本有效的初级回收方法。所述方法可以单独使用或在发酵之后引入以增强现有的靶纯化工艺。理想的是,所用方法将容易地对接现有工艺 (过滤、抗病毒和色谱) 而不引起工艺物流的过度稀释或污染。所关注的方法包括结合沉淀或过滤使用的水性聚合物相分配和 (靶或污染物) 絮凝 (参见下文提到的参考文献)。由用亲和或带电的配体改性的聚合物诱发的靶蛋白絮凝 (在本文中可与沉淀互换使用) 因为其在概念上类似于通常用以纯化蛋白质的色谱方法而具有吸引力。另外,用带电配体改性的聚合物比用亲和配体改性的聚合物价格低廉。

[0005] 其他人在使澄清进料沉淀方面的近期工作包括使用钙和磷酸盐诱发的絮凝 (例如 US20070066806 A1) 或通过包括聚 (乙二醇) 的不带电的聚合物 (例如 W02008100578 A2) 或诸如聚乙烯基磺酸的带负电的聚合物 (见下文) 帮助的所述絮凝。一些工作还组合了污染物絮凝与过滤 (例如 US20080193981 A1、W02008079302 A2)。在一些情况下,絮凝能够实现选择度 (参见 US20080193981 A1, 还有 2008 年 3 月 2 日的 Judy Glynn, BioPharm International)。

[0006] Genentech 的专利申请 (US20080193981 A1) 使用聚乙烯基磺酸和聚丙烯酸 (PAA) 来絮凝。以较低导电率 (小于 6mS/cm) 和相当低的抗体浓度的状况工作的体系似乎面临再溶解所得复合物 (即稀释进料物流) 的挑战,且在良好 (> 95%) DNA 减少并保持靶蛋白单体到集料比的情况下仅实现了约 60% 的 HCP 减少、< 90% 的靶 mAb 回收率。在本工作中,值得注意的是:a. (参考 [0128] 和图 10)“在 pH 7 和 1.5mS/cm 下,直到 PAA 具有大于 35,000 的 MW 才实现了完全沉淀”和 b. (参考 [0129] 和图 33)“在 pH7 和 12mS/cm 下 (用聚苯乙烯磺酸,PSS),直到使用具有大于 220,000 (220kDa) 的 MW 的 PSS 才实现了完全沉淀”。以上作者还调查研究了与带净负电的靶蛋白相互作用的一些带正电的聚合物。

[0007] 其它小组设法使常带净负电 (酸性) 的宿主细胞蛋白质与重组蛋白质进料中的

其它污染物复合并使用过滤来从靶蛋白中分离所述复合的污染物（例如，Judy. Glynn, Biopharm International, 2008 年 3 月 2 日；A. Venkiteshwaran, P. Heider, L. Teyseyre, G. Belfort, Selective precipitation-assisted recovery of immunoglobulins from bovine serum using controlled-fouling crossflow membrane microfiltration（使用控制污染的错流膜微量过滤从牛血清选择性沉淀辅助回收免疫球蛋白），Biotechnology and Bioengineering, 2008 年 5 月 6 日在 Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bit.21964 中在线发表）。然而，所述方法没有提供在工艺早期可为极其重要的靶浓缩（处理量减少）。

[0008] 如果考虑其中富含靶蛋白的溶液通过聚合物滴定旨在形成不溶性蛋白质聚合物复合物的情形，则与上述研究相关的一些限制会更加透彻，所述复合物依赖于具有与多于一种蛋白质相互作用的多于一种聚合物以便形成互连的复合物。随着聚合物浓度相对于靶蛋白浓度增加，预期有靶最初过量（且可溶解）的情形，其转向靶和聚合物处于类似浓度或相反处于可形成复合物的比率的比率的情形，和最后聚合物过量使复合物解离的情形。在大多数情况下，如上述 Genentech 申请中所示，可能需要低离子强度来促进强烈的蛋白质-聚合物相互作用。天然聚合物 MW（正如蛋白质 MW 一样）在复合物形成中将起复杂的作用，因为较大尺寸的聚合物在空间意义上可促进复合物形成，但因降低聚合物摩尔浓度和扩散速率而对抗复合物形成。

[0009] 关于以上论述，需要提到六点。第一，复合物形成和相关现象（凝聚相形成、沉淀物形成）为复杂的动态过程，其包括聚合物、蛋白质、盐和水在富含复合物（蛋白质-聚合物和相关水）的液态区和富含未复合组分的液态区之间分配。因而，包括蛋白质相对溶解度（疏水性）和盐相关霍夫迈斯特 (Hoffmeister) 系列效应（参见 L. A. Moreira, M. **Boström**, B. W. Ninham, E. C. Biscaia, F. W. Tavares, Hoffmeister effects: Why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choices of background salt solution, Colloids and Surfaces A (霍夫迈斯特效应: 蛋白质电荷、pH 滴定和蛋白质沉淀为何依赖于本底盐溶液、胶体和表面 A 的选择), 282-283, (2006) 457-563) 以及分配效应（参见 H.-O. Johansson, G. **Karlström**, F. Tjerneld, C. A. Haynes, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems (用于在水性两相体系中的相分离和分配的驱动力). J. Chromatography B, 711 (1998) 3-17) 的熵因素可起重要作用。第二，需要低导电率来产生靶捕获（即复合物形成）的操作意味着无用地稀释工艺进料物流，这在较大规模操作中在经济方面可能不可行。第三，需要 pH 和低蛋白质浓度的特定条件来实现靶释放（即，复合物离解）的操作还可以导致需要调节 pH 和稀释工艺物流。第四，在再溶解时，特定靶释放条件和靶浓度可能限制可与其成本有效地联合的其它下游分离方法。第五，用较高 MW 的聚合物最佳工作的操作更难以整合到工艺中，这是由于与溶液粘度增加、可溶性污染聚合物去除和高 MW 的聚合物更容易非特异性地弄脏色谱、过滤器、泵及其它工艺物流表面相关的挑战。第六，如果以复合物形式储存超过数小时的任何显著时间，必须谨慎了解在与靶蛋白的改变（或保护其以免改变）相关的特殊因素下形成的复合物的性质，和在加工期间蛋白质以复合物形式储存任何时间之后靶蛋白释放的容易性。

[0010] 因此，仍然需要分离抗体及其它生物分子使其达到高纯度水平的方法，所述方法

节省时间和成本,同时规模可以调整且有效。关于复合物形成、絮凝、沉淀或相关方法,可以列出与这些基本未满足的要求相关的一些所要特征。所述方法将用具有比较高的盐浓度(例如 150mM NaCl)、中性 pH 和与许多上游蛋白质进料相关的高蛋白质浓度的溶液来工作。其还将用诸如澄清发酵进料的多种不同溶液来工作。其将提供良好的靶选择性和处理量减少,使得其可在上游使用。这包括消除诸如(常带负电的)病毒、细菌、细胞碎片、毒素和核酸污染物的污染物。所述方法将以允许良好捕获并简便释放的方式以显著回收率结合诸如抗体或抗体片段的靶。释放将不需要过度稀释或改变 pH 且将使靶处于允许与多种其它分离方法、特别是本发明方法所共有的分离方法简便整合的浓度和各种溶液中。即使在高蛋白质浓度下,所述方法也将起作用,当然,不包括加入如下物质:其去除需要增加新单元操作或显著改进现有单元操作来除去所加污染物。

[0011] 多年来,常将生物医药发酵、纯化和研磨(polishing)/配制看作是单独的工艺领域。其主要原因在于它们通常涉及到与各领域中的靶浓度大量测量有关的不同操作和规模,其中,发酵可能处于 1mg/mL,通过亲和或离子交换纯化使浓度升高到可能 30mg/mL,研磨配制步骤使液态或固态形式的靶达到 100-200mg/mL 的任何浓度。这些区别变得模糊,因为抗体及其它生物医药在发酵进料中可达到 30mg/mL 且在离子交换色谱法中可达到 100mg/L 或更高。配制常包括组合蛋白质或其它生物医药与诸如聚合物(如 Dextrans™、聚(乙二醇)或 Polysorbates™(聚乙氧基烯脱水山梨醇和月桂酸酯)和氧乙烯或氧丙烯的各种市售共聚合物或嵌段共聚合物(如 Tergitols™ 或 Pluronic™)的赋形剂。许多赋形剂也可为带电的,包括使用诸如白蛋白的其它蛋白质(即,带电的两亲性生物聚合物)。除了在储存期间使生物医药稳定之外,还需在不诱发聚集的情况下保持高浓度并允许在体内迅速溶解并吸收。考虑到以上所述,很自然的是,用生物相容的聚合物定位抗体或其它靶蛋白在溶液或不溶性复合物中的任何分配或沉淀方法不仅对于生物医药的纯化、而且对于其配制和储存都将是有益的。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及分离生物分子的方法。更详细地讲,本发明涉及在如下条件下分离抗体(mAbs)和包含抗体片段(Fabs)的相关蛋白质的方法,其中所述抗体和相关蛋白质具有正电性和相对疏水性并且将与带负电的聚合物反应以形成沉淀的聚合物-蛋白质复合物。

[0014] 因此,在一个实施方案中,本发明提供分离生物分子的方法,其包括以下步骤:(a)提供含有所述生物分子的水性样品;(b)在盐存在下在一定条件下混合所述水性样品与带负电的聚合物以使得所述聚合物选择性复合所述生物分子并使其絮凝以形成包含所述生物分子的沉淀物的混合物;(c)从所述水性液体中分离所述生物分子沉淀物;和(d)使所述生物分子再悬浮在再悬浮缓冲液中。

[0015] 所述分离可使用诸如具有各种分子量的聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖聚合物的低廉且生物相容的带负电的聚合物作为沉淀剂来实现。其在比较高的聚合物浓度(例如 10%)及高盐浓度(> 50mM)和导电率(例如 > 10mS/cm)下在宽 pH 范围(在 5-9 之间,取决于多种因素)内发生。因为所述方法以过量聚合物的状况起作用,所以其对溶液蛋白质浓度不是非常敏感。大多数聚合物和盐没有保留在沉淀剂中,而是“分配”到上清液中,在此可使它们再循环。诸如宿主细胞蛋白质、核酸(和据推测其它带负电的污染物,诸如病毒、细菌、毒素)的污染物趋于从聚合物-靶蛋白复合物中排除。在各种研究中,90+% mAb 在沉

淀物中回收,95+% HCP 和 DNA 在上清液中回收

[0016] 所述方法显示出用多种复合物溶液顺利执行,所述复合物溶液含有处于高浓度(例如 10g/L)和导电率的靶和其它蛋白质。这些溶液包括诸如澄清发酵进料的溶液和来自水性聚合物相分配的含靶相。所述沉淀物富含靶蛋白质且在低稀释度下容易地溶解于各种水溶液中。而这些溶液可以但不需要具有低 pH。这允许直接将所述方法与各种其它分离和下游加工方法和操作整合。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1:在室温和不同盐条件下在 pH 7 下 Gammanorm 人类多克隆抗体 (GN) 在含有 10% (w/w) NaPAA 8000 的溶液中的聚合物蛋白质复合物的形成和沉淀。

[0019] 图 2:随着图 1 中的盐条件而变的抗体回收率。

[0020] 图 3:随着关于图 1 中的条件的缓冲液导电率 (mS/cm) 而变的抗体回收率。应注意,缓冲液导电率不包括聚合物的贡献。

[0021] 图 4:在室温和不同盐条件下在 pH 7 下 Gammanorm 人类多克隆抗体 (GN) 在含有 10% (w/w) NaPAA 15000 的溶液中的聚合物蛋白质复合物的形成和沉淀。

[0022] 图 5:随着图 4 中的盐条件而变的抗体回收率。

[0023] 图 6:随着关于图 4 中的条件的缓冲液导电率 (mS/cm) 而变的抗体回收率。应注意,缓冲液导电率不包括聚合物的贡献。

[0024] 图 7:对于图 1-3 中的 NaPAA 8000 相关实验的 K (沉淀的 Ab/ 未沉淀的 Ab 的比率) 和对数 (Ln)K 对导电率 (mS/cm) 的曲线图。对于与图 4-6 相关的结果也得到了类似直接关系 (数据未示出)。

[0025] 图 8:通过水性聚合物两相体系 (A2P) 分配澄清的来自实际中国仓鼠卵巢 (Chinese Hamster Ovary, CHO) 细胞发酵进料的再悬浮的 mAb 沉淀物在 Capto™ MMC 多峰阳离子交换色谱介质 (GE Healthcare) 上的色谱。

[0026] 图 9:根据图 8 的所施用部分和收集部分的 SDS PAGE。条带 1:分子量标记;条带 2:WAVE 51 进料;条带 3:Wave 51 进料 ATPS;条带 4:上清液;条带 5:在 pH 5.5 下的再悬浮的沉淀物;条带 6:A1 部分;条带 7:A2 部分;条带 8:A3 部分;条带 9:A4 部分;条带 10:A1-4 部分;条带 11:A6 部分,洗脱液;条带 12:分子量标记。

[0027] 图 10:基于分配、沉淀和色谱的蛋白质的三步初级纯化方案的概述。在第一步骤中,至少 95% 的所关注的蛋白质 (mAb) 分配到所要相中。发酵液也变得非常澄清。在第二步骤中,回收至少 90% 的蛋白质,且 HCP 和 DNA 减少至少 95% 而且病毒和毒素含量明显减少。

[0028] 发明详述

[0029] 一方面,本发明涉及从含有生物分子和杂质的水性样品中分离生物分子的方法。具体地说,据发现带负电的含羧基聚合物可从不同水溶液中选择性地复合并絮凝 (在本文中称为沉淀) 诸如抗体的带正电的生物分子。

[0030] 所述方法可适于多种水性样品。所述样品包括但不限于:来自原核或真核表达系统、血液、重组牛奶、重组植物溶液的发酵产物和含有所关注的生物分子的任何其它水性样品。所述样品优选不含细胞且更优选澄清化以除去任何固体污染物。这通过采用任何可行的方法,例如通过过滤或离心分离来实现。澄清化也可以通过水相分配法实现。

[0031] 所述方法适于浓缩和分离抗体。本文使用的术语“抗体”是指任何重组或天然存在的完整抗体，例如抗体包括抗原结合可变区以及轻链恒定域 (CL) 和重链恒定域。该术语还涵盖抗体片段或包括抗体片段的分子，所述抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 和 Fc 片段。术语“抗体”具体涵盖融合蛋白，诸如 Fc 融合蛋白、肽抗体及其它嵌合抗体。术语“抗体”具体涵盖单克隆抗体和多克隆抗体两者。在各种实施方案中，抗体可为 IgG 抗体，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。虽然在下文举例说明了抗体的分离，但是预计所述方法对于可显示出净正电荷的许多其它蛋白质或生物分子的分离同样有效。

[0032] 将包含所关注的生物分子的液体样品的 pH 调节到处于或低于靶生物分子的 pI，或者如果存在多于一种靶生物分子，诸如在多克隆抗体靶样品的情况下，则调节到处于或低于最低 pI 靶分子的 pI。生物分子的 pI 可使用本领域普通技术人员已知的测定 pI 的各种方法之一来容易地测定。在一个优选的实施方案中，所述 pI 通过对包含生物分子的样品进行毛细管等电聚焦 (cIEF) 并测量 pI 来测定。pH 的调节可以任何方便的方式进行，例如通过向水性样品中加入酸性溶液等分试样，直到样品的 pH 落在可接受的 pH 范围。优选实现并保持 5-9、诸如约中性 (pH 7) 的样品 pH。

[0033] 与调节样品的 pH 同时或在其之后，可将带负电的含羧基聚合物与样品混合以使生物分子选择性复合并絮凝。在合适的 pH 和盐条件下，形成含有所关注的生物分子的絮凝物。所述聚合物合适地为多羧酸 (PCA) 聚合物。本领域技术人员容易地理解对于有效复合物形成选择合适的 PCA 聚合物类型和取代度 (羧基化) 的原理。其它聚合物也会起到良好作用。这些聚合物包括 CM 纤维素或 CM 淀粉以及含有类似于丙烯酸的单体的聚合物。当然，所述聚合物可经设计以显示出进一步增强其在所述方法中的用途的其它性质 (例如大小、在一定条件下的溶解性、磁性)。

[0034] 优选具有大于 5,000 的分子量的高度羧化的聚丙烯酸 (PAA) 用以实现选择性抗体复合。用具有较低相对羧化程度 (取代度 1.4) 的较高 MW 的羧甲基葡聚糖 (CMD) 也得到了类似结果。加到水性样品中的聚合物的浓度优选为 3% (w/v)-30% (w/v)，例如 5% (w/v)、10% (w/v) 或 15% (w/v)。

[0035] 在优选的实施方案中，含有所述生物分子的絮凝物 (沉淀物) 在聚合物存在下在约中性 pH 和比较高的导电率 (例如 > 50mM 磷酸钠) 下形成。在最优选的实施方案中，所述聚合物为 PAA (MW > 5000) 或 CMD (MW 10000 和 40000，取代 2.26 和 3.24mmol/g)。

[0036] 任选存在一种或多种盐且其帮助沉淀工艺。所述盐之一为磷酸钠。通常一种盐必须使导电率升高到高于发生沉淀的阈值 (例如常为 5mS/cm)。预期存在一些盐的特定 (例如霍夫迈斯特型) 效应，但操作者具有选择盐的一些自由。或者，所述盐可为氯化钠、柠檬酸钠或硫酸钠或钾或其它盐或所述盐的混合物。盐和聚合物可以固态加入，这可能需要用于溶解并混合试剂的额外平衡时间。盐和聚合物也可以一种或多种液体浓缩物的形式加入或在一些情况下以固态加入。

[0037] 水性样品、聚合物和盐的混合物视加入形式 (见上文)、混合 (如果进行的话) 和体积而培养 15 分钟-24 小时的时间。然而，通常，如果在适当混合下加入液体浓缩物，则对于大多数应用来说 30 分钟的时间将足够。显然，分离复合物和悬浮液 (上清液) 的时间将取决于用以分离它们的方法。用于小体积 (最高达试管大小) 的自发复合物形成和沉降的数小时与用于经受过滤或离心分离的大体积的类似时间相对。培养时长可随着待分离的生

物分子而改变且可通过针对给定条件组（例如聚合物浓度、重量等）改变培养时间、测量各培养期沉淀的生物分子的量和选择提供最佳或所要分离程度的培养期来优化。

[0038] 经过培养期,可将混合物连续混合、每隔一定间隔混合、仅以所要次数混合或根本不混合。在不需要混合时,但本领域技术人员将认识到,在本发明的实践中,在形成沉淀物的过程中可能需要混合。

[0039] 培养可在被认为有助于沉淀物形成的任何温度下进行。例如,培养可在 2°C -8°C 的温度下或在室温下进行。常将发酵样品冷却到室温或较低温度以降低在进一步处理期间的蛋白酶活性。实际上,本发明的一个优势在于能够在室温下进行培养步骤,而不需要保持混合物冷冻或甚至调整到特定温度。

[0040] 絮凝物一旦形成,则可通过采用任何方便的方法将混合物分离成沉淀物和液相。在一个实施方案中,将混合物离心分离。在该实施方案中,沉淀物在容器的底部收集,而液相含有大部分杂质。在离心分离之后,例如通过滗去或抽吸而除去液相。

[0041] 在另一实施方案中,混合物可通过过滤来分离。

[0042] 在从液体样品中分离沉淀物之后,可任选用缓冲液洗涤沉淀物。任选洗涤步骤的目标可为从沉淀物中除去残留液体组分。所述任选洗涤可包括使洗涤缓冲液与沉淀物简单接触,随后通过抽吸或滗去缓冲液而除去洗涤缓冲液。

[0043] 沉淀物可容易地再悬浮(即再溶解)在包括水或缓冲溶液的水溶液中。对再悬浮溶液的该相对自由的选择在提供较低程度稀释靶和只关心保持靶天然活性并优化进一步分离步骤时最佳选择缓冲液方面有利。优选再悬浮缓冲液为低离子强度溶液且具有 4.0-9.0 的 pH。再悬浮缓冲液的一个实例为 pH 5.0 的乙酸钠缓冲液。

[0044] 在以下实例中,用含有 < 5g/L 的抗体的样品溶液形成复合物通常产生 < 2% 体积(且常常 < 1%)的起始流体的絮凝剂。因此,沉淀获得 50-100x 浓度的所要生物分子。生物分子的回收率很高(约 90%),宿主细胞蛋白质和 DNA 二者的分离率也很高(都为约 95%)。与大多数污染物相比,高选择性可存在于相对高度带电、聚阳离子的、大表面积和抗体分子的相对链柔性中 - 与由聚羧酸酯对多硫酸化聚合物提供的更大链柔性联合。因而,所述复合物也可显示出降低的病毒、毒素及其它带负电污染物水平。对参与分离方法的特定抗原或配体没有诸如结合部位亲和性的抗体的特定性质。因此,预计其对于包括抗体片段的多种其它分子起作用。

[0045] 体积显著减少和复合物易于溶解(再悬浮)在各种溶液中支持当前絮凝方法与标准下游纯化工艺直接整合。因此,在沉淀物再悬浮之后,溶液中的再悬浮生物分子可通过诸如色谱法的一个或多个额外纯化步骤以生物分子或残留聚物流过或捕获的模式而进一步处理,从而进一步纯化所要生物分子。

[0046] 因此,在一个实施方案中,再悬浮的生物分子被捕获在亲和介质(例如蛋白质 A 介质)上。随后将靶生物分子洗脱并通过可能的阳离子交换(靶捕获)步骤或混合模式(靶流过、污染物捕获)步骤而进行研磨。

[0047] 在一个供选的实施方案中,将靶生物分子装载到阳离子交换介质上,所述聚物流过所述介质。在一个不同的实施方案中,使生物分子再悬浮在较高离子强度的溶液中,并直接装载到疏水性相互作用色谱柱、混合模式或亲和柱上。

[0048] 如上所述,沉淀物中的残留聚合物可通过使用捕获色谱介质清洗来除去。或者,所

述聚合物可通过其它方法、诸如通过水性多相体系的相分配来除去。

[0049] 另外,沉淀物中的残留聚合物可通过使其流过色谱或过滤或其它(整体)捕获介质而除去,所述介质显著吸附(捕获)靶而不是聚合物。或者,沉淀物中的残留聚合物可通过使其流过色谱或过滤或其它(整体)尺寸排阻介质而除去,所述介质对于聚合物具有与对靶不同的流动速率或阻碍程度。

[0050] 因此,进一步提供使用经设计与高导电性溶液一起使用的 Cpto MMC 和相关捕获介质来纯化通过上述方法生产的含靶溶液的方法。

[0051] 应注意到本发明的所有实施方案都可以任何规模使用。例如,本发明可适于大规模生物分子生产操作,其中生物分子从数十、数百或数千升细胞培养基中分离。在另一实施例中,本发明可以较小规模使用,例如在试验台上规模操作中使用,其中生物分子从体积为约数升的介质或甚至体积比 1 升少得多的介质中分离。

[0052] 用于新方法的容器可以固定或为一次性的,且可以各种明显的方式改进以增强靶回收率和液体上清液的去除。因为所述方法仅包括向含靶进料中加入聚合物和盐溶液,所以其可容易地以在线或连续加工模式(例如使用过滤而不是沉降或离心分离来分离复合物)进行。作为不依赖于固体载体的液体方法,其可以容易地采用高通量筛分(例如,在微量滴定盘上以毫升级的体积)来在允许使用最少的昂贵靶蛋白和进料的条件下优化诸如靶回收率和污染物去除的各种参数。

[0053] 所述方法的简单和实用性质提供了许多其它令人兴奋的可能性。例如,pH 依赖性提出可以使用 CO₂ 分压来改变碳酸盐缓冲溶液中的 pH,从而在其中复合物将形成或溶解的 pH 条件之间往复。沉淀后的再溶解步骤可与降低 pH 组合以实现残留病毒的杀死。另一可能性是组合沉淀与在聚合物-盐、聚合物-聚合物或热响应(逆热溶解性)聚合物两相体系中两相分配的水性聚合物。在后一体系中,聚合物将在浊点温度(T_c)下自结合且形成浮在富聚合物的相上的富水和(靶)蛋白质的相。在所述体系中分配能够在单位重力(即不使用离心分离)下实现进料的快速初始澄清化(除去细胞和细胞碎片)(2009 年 1 月 8 日提交的题为“Separation method using single polymer phase systems(使用单一聚合物相体系的分离方法)”的 James Van Alstine, Jamil Shanagar 和 Rolf Hjorth 的瑞典专利申请 0900014-2,其公开内容以引用的方式全部结合在本文中)和去除一些污染物。且在与重组或其它大规模富含蛋白质的进料相关的导电率(包括与血浆、血液或含重组植物靶的进料物流相关的那些)下正是如此。然而,其没有提供很多靶浓缩或 HCP 去除。因此,理想地是与本发明方法组合以产生易于插入至现有工艺或新工艺中的两步澄清化和纯化方案(表 1)。这包括经设计以完全用一次性部件工作的工艺。存在各种其它明显的可能性,诸如在如下容器中进行操作,其中靶和污染物在两个隔室之间自由移动,但复合的聚合物因通过末端共价键结合定位被保留,或通过允许靶穿过而具有比靶高得多的 MW 的聚合物不能穿过的过滤器来基于 MW 而操作。

[0054] 表 1. 水性聚合物相体系和单独使用或在分配操作之后使用的新聚合物沉淀方法的主要操作属性

[0055]

性质	传统 2 聚 合物相体 系	1 聚合物 + Hi 盐 体系	热响应聚 合物体系	新沉淀 方法	热 体 系 + 沉淀
1 技术上简单且实用的操作。	+	+	+	+	+
2 容易地整合含靶相与后面的操作和工艺。	+	-	+	+	+
3 快速(千 L/hr)加工。处理未来的装 载量(> 10KL, > 20%固体, > 10g/L 靶表达)	-	-	+	+	+
4 在不使聚合物和盐再循环时可承受 的价格(<< 10 欧元/L/步骤)。工艺节 约 > 估算的成本。	-	-	+	+	+
5 在较少预期变性或改变下, 靶(例如 IgG)的回收率 > 90%。	+	?	+	+	+
6 实现 1°澄清化 w/o 离心分离。	+	+	+	-	+
7 靶分配到含有很少(例如 1%)残留 聚合物的相中。	-	-	+	+	+
8 显著 HCP、DNA 和可能的其它污 染物(例如病毒)去除。	-	-	-	+	+
9 廉价的无毒试剂。在没有额外单元 操作时除去。	-	-	+	+	+
10 容易批准的操作/工艺。	+	+	+	+	+
11 能够通过 HTPD 优化, 易于改变规 模且便于建模。	+	+	+	+	+
12 适合不同发酵物, 例如真核 CHO 或细菌大肠杆菌细胞。	+	?	+	+	+

[0056] + = 是, - = 否, ? = 变化或未知, HTPD = 高流通量工艺发展, HCP = 宿主细胞蛋白质, KL = 1000 升

[0057] 图 10 采用了上述原理中的一些, 且基于下文提到的实验细节概述了基于分配、沉淀和色谱的蛋白质的三步初级纯化方案。整个工艺可使用一次性部件进行。在步骤 1 中, 发酵样品或重组细胞 (rCell) 或重组细菌 (rBacteria) (或含植物或动物相关的靶的溶液) 经受水性聚合物相分配以使细胞及其它颗粒碎屑的溶液澄清化。将含靶相 (在该实施例中, 来自基于一种聚合物两相体系热分离的环氧乙烷环氧丙烷或 EOPO 型聚合物的富水相) 分离且随后通过加入盐和 pH 和蛋白质复合聚合物 (在该实施例中, 对于带净正电的 mAb 蛋白质, PAA, 其易于与所述蛋白质复合) 来调整。接着是复合物形成和复合物分离 (通过沉

降、离心分离或过滤)。在该步骤中,上清液可经受另一轮沉淀以增强沉淀物中靶的回收率。随后可使复合物再溶解于新鲜缓冲液中。这可为低 pH(例如 pH 4)的缓冲液,作为抗病毒处理的一部分。在第三分离步骤中,含再溶解的靶蛋白的溶液经受亲和、混合模式、离子交换或诸如捕获色谱的其它基于分离的方法。这也可以通过尺寸排阻或与过滤、色谱、整体柱等相关的其它方法进行。

实施例

[0058] 仅出于说明目的提供了本发明的实施例,且不应将其视为以任何方式限制如由随附权利要求书限定的本发明。

[0059] 材料和所调查研究的装置:

[0060] 化学品:

[0061] GammaNorm(人类多克隆 IgG):165mg/ml, pI 约 7, Octapharma。

[0062] 聚丙烯酸钠盐(PAA):35% (w/w), MW = 15000;45% (w/w), MW = 8000;MW = 5100 和 MW = 2100,全部得自 Aldrich。

[0063] 羧甲基葡聚糖(CMD)0.39(2.26mmol/g)MW 40,000,得自 MeitoSangyo, Japan。

[0064] 羧甲基葡聚糖(CMD)1.39(3.24mmol/g)MW 40,000,得自 Meito Sangyo, Japan。

[0065] 葡聚糖硫酸酯(16-19%取代)MW 10,000、40,000、100,000 和 500,000),得自 P K Chemicals, Denmark。

[0066] Capto™ Q(17-5316-10)和 HiTrap Capto MMC 柱(11-0032-73)得自 GE Healthcare, Uppsala, Sweden。

[0067] 该研究中使用的所有其它化学品均为分析级且从 MERCK 购买。

[0068] 用于相体系配制的热响应聚合物

[0069] Breox 50A 1000(环氧乙烷和环氧丙烷的当量共聚物(EOP0)):Mw 3 900,参见下文。

[0070] 除非提及,否则 EOP0 聚合物是指 Breox 50A 1000,其为具有 3900 道尔顿的分子量(数均)的由 50%环氧乙烷和 50%环氧丙烷组成的无规共聚物。它经 FDA 批准用于一些应用中且从现在为 Cognis(www.cognis.com)的一部分的 International Specialty Chemicals (Southampton, UK) 获得。

[0071] 相体系

[0072] 在小规模研究中,两相体系(ATPS)溶液在 10ml Sarstedt 管(除非另作说明)中通过混合下文所列的适当量/体积的储备溶液来直接制备。各体系的最终体积通常为 5ml。将混合物涡动约 30 秒,随后在 40°C 下在水浴中放置约 15 分钟以便相形成。

[0073] 储备溶液:

[0074] EOP0, 20% (w/w):通过将 10g EOP0 溶解于 40g MQ 水中来制备。

[0075] EOP0, 40% (w/w):通过将 20g EOP0 溶解于 30g MQ 水中来制备。

[0076] NaP(磷酸钠, 0.8M):不同的 pH(pH 5、6、7、8)通过混合 0.8MNaH₂PO₄ 和 0.8M Na₂HPO₄ 来得到。

[0077] 柠檬酸钠(0.8M):pH 7 的储备溶液通过混合 0.8M 柠檬酸三钠和 0.8M 柠檬酸来制备。

[0078] NaCl (5M) :通过将 14.6g NaCl 溶解于 50ml MQ 水中来制备。

[0079] 实际进料样品 :

[0080] 实际进料 mAb P4 和 P5 和 Wave 51 从 GE Healthcare, Uppsala, Sweden 内部得到。它们为基于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的发酵物。

[0081] 沉淀实验

[0082] 储备溶液:

[0083] NaP (磷酸钠, 0.8M, pH 7) :通过混合 0.8M NaH_2PO_4 和 0.8M Na_2HPO_4 制备。

[0084] NaCl (5M) :通过将 146g NaCl 溶解于 500ml MilliQ 水中来制备。

[0085] 方法:

[0086] 制备聚合物溶液 :用于沉淀实验的聚合物和盐 / 缓冲溶液通过混合适当量 / 体积的聚合物与适当量 / 体积的所列储备溶液来制备。除非提及, 否则聚合物密度假定为 1。

[0087] 将所需量的聚合物和盐 / 缓冲溶液 (表 2) 混合并向其中加入抗体。随后将混合物保持在室温下约 3 小时 (以便复合并絮凝), 随后将其在 $3000 \times g$ 下离心分离 15 分钟。随后将上清液与沉淀物分离。将分离的沉淀物再悬浮在水或适当缓冲溶液中。

[0088] 电泳 :在正常操作条件下用 4-12% 梯度的聚丙烯酰胺和十二烷基硫酸钠 (SDS) 缓冲凝胶, 在 150V 下 1h, 用 Phast 体系 (GE Healthcare, Uppsala) 进行, 然后使用 Coomassie Blue[®] 染色 10 分钟。

[0089] 色谱法根据从 GE Healthcare, Uppsala, Sweden 购得的色谱介质供应商的建议进行。

[0090] 分析色谱

[0091] mAb 的蛋白质 A 亲和色谱测定 :蛋白质 A 相互作用对抗体捕获的选择性允许其用于分析目的, 以结合样品中的所有抗体, 同时使 90+% 的污染物穿过柱。mAb 的浓度使用 MabSelectSure 柱测量。将 $50 \mu\text{l}$ 样品施用到 1ml HiTrap MabSelectSure 柱。将洗脱液峰面积积分并分别乘以进料体积和水相体积。使用 ATPS 的提取回收率通过比较面积单位的总数来计算。MabSelectSure 步骤的 mAb 的回收率以同样方式计算。样品 : $50 \mu\text{l}$ 进料或水相, 柱 :1ml HiTrap MabSelectSure, 缓冲液 A :PBS, 缓冲液 B :100mM 柠檬酸钠, pH = 3.0, 流速 :1ml/min (150cm/h), 梯度 :0-100% B, 步骤。

[0092] 凝聚物等级的尺寸排阻测定 :二聚体和凝聚物 (以及 mAb 浓度) 使用 Superdex 200 5/150GL 凝胶过滤 (尺寸排阻色谱或 SEC) 柱测量。二聚体和单体峰的面积通过 UNICORN 软件自动积分。比较来自进料和水相的二聚体的总面积。样品 : $50 \mu\text{l}$ 进料或水相, 柱 :3ml Superdex200 5/150GL, 缓冲液 :PBS, 流速 :0.3ml/min (45cm/h)。

[0093] 在一次性 Wave 生物反应器中的较大规模的基于发酵和分配的澄清化

[0094] 实际进料 mAb 细胞培养物在 51CHO 细胞系 (内部供应) 中表达。培养持续时间为 18 天且培养容器为具有 20L 袋和 pH/Oxywell 的 WAVE 生物反应器系统 20/50。培养基为具有 5g/L 水解产物 UF8804 (微孔) 的 PowerCHO2 (Lonza) 且必要时供应有葡萄糖和谷氨酰胺。当细胞平均存活力低于 40% 时, 规定进料样品准备收获。在加入聚合物 - 盐溶液时使 WAVE 袋的内含物的温度稳定在 42°C 。

[0095] 水性聚合物两相体系通过将储备溶液混合物泵入到含有 9.5Kg mAb 进料的 WAVE 袋中直接制备。这为 3.6L 50% Breox EOP0 聚合物储备溶液、4.5L 800mM 磷酸钠 (NaP) pH 8

和 0.27L 5M NaCl 储备溶液,使得总共 8.37L 加到 9.5Kg 进料中。这得到 10% EOP0(w/w)、200mM 磷酸钠 pH 8.0 和 150mM NaCl 的近似最后浓度。在 40°C 下加入储备液,这允许进料和相体系混合物在 40°C 下迅速平衡。泵送聚合物混合物的时间为约 50 分钟。在使混合物在 WAVE 反应器上振荡约 15 分钟之后,使包括袋座架的 WAVE 袋与反应器脱离且随后放在在垂直位置具有长轴的实验室实验台上。这有助于目测相形成,以及允许袋管道孔口通向袋的底部和顶部。还调整了相高度使其与在甚至更大的工艺(参见上文论述)中可以预期的更加一致。在 5 分钟之后观察到两相体系形成且其在 30 分钟之后完成。在界面处形成细胞碎片层。随后通过从 WAVE 袋的上部插入管子将上部相转移到不同瓶子中,随后将 WAVE 袋连接到蠕动泵。随后使用连接到在垂直长轴放置时变成 WAVE 袋的底部拐角的管子将底部(聚合物)相转移到瓶子中。

[0096] 将从不同瓶子收集的上部相材料汇集(约 13.5L),随后使用连接到 6 英寸 ULTA HC 0.2 μm 过滤器的 6 英寸 ULTA 0.6 μm GF 过滤。在过滤 7 升物质之后,将 6 英寸 ULTA 0.6 μm GF 用新过滤器替换,因为压力增加到了 2.5 巴。将过滤的物质收集在 WAVE 袋中,随后保持在 4°C 下。

[0097] 在 ATPS 之后使用 MabSelect Sure 分析(参见上文)测量上部聚合物贫相部分中 mAb 的回收率。还分析了粗原料和 ATPS 实验之后回收的 mAb 的 mAb 回收率和宿主细胞蛋白质(HCP)数据。来自这些实验的结果表明 mAb 通过分配部分纯化,回收率 > 99%,显著除去了细胞碎片。用该体系没有实现 HCP 的明显减少,选择该体系来优化抗体回收率。

[0098] 其它测定

[0099] 宿主细胞蛋白质(HCP)测定通过商业酶联免疫分析法(Gyrolab)进行。

[0100] DNA 通过标准商业 PicoGreen 染料 DNA 分析法分析。

[0101] 实施例 1- 筛选用于抗体沉淀的聚合物

[0102] 预备研究(表 2)提出加入约 10% (w/w) 去质子化的聚丙烯酸(即聚丙烯酸钠)(下文可互换地标记为 NaPAA 或 PAA)来适当缓冲人类多克隆抗体溶液,引起由 Gammanorm 多克隆 Ig(Octapharma) 样品表示的大量人类抗体沉淀。所述效应也可以使用较高浓度(20% w/w)的较高 MW 的羧甲基改性的葡聚糖(CM 葡聚糖,Meito Sangyo, Japan)再现。值得注意的是 ≥ 50mM NaP 缓冲液对引发絮凝来说似乎是必需的。该缓冲液浓度类似于对于 NaPAA 与聚乙二醇(PEG)形成两相体系所需要的盐浓度且似乎与缓冲控制 pH 以抵消基于酸基的聚合物的影响的需要有关,以及对于 NaCl 或 NaP 盐以提供相形成的熵驱动力的任何需要。(关于论述,参见 H. O. Johansson 等,1998 和 L. A. Moreira 等,2006)。

[0103] 表 2. 使用不同聚合物和条件的抗体沉淀

[0104]

聚合物(MW kDa)和%(w/w)	盐(M)和 pH	IgG mg/ml ¹	沉淀
葡聚糖硫酸酯(500), 4%	0.1M NaP, pH 7	6mg/ml	否
(500), 10%	0.06M NaP, pH 7	4mg/ml	否
(100), 10%	0.2M NaP, 0.15M NaCl, pH 7	6mg/ml	否
(10), 10%	"	6mg/ml	否
(10), 10%	"	16mg/ml	否
(10), 20%	"	6mg/ml	否
(10), 10%	0.1M NaP, pH 7	6mg/ml	否
CM 葡聚糖 ² 0.39 sub, (40), 4%	0.2M NaP, 0.15M NaCl, pH 7	6mg/ml	否
1.39 sub, (40), 4%		6mg/ml	否
1.39 sub, (40), 20%		4.5mg/ml	是
NaPAA (8), 9%	0.2M NaP 0.15M NaCl, pH 7	2.5mg/ml	是
(8), 9%	0.1M NaP, pH 7	6mg/ml	是
(8), 9%	水, pH 约 7	6mg/ml	否
(8), 9%	0.1M NaP, pH 5 或 4	6mg/ml	否

[0105]

[0106] ¹IgG = 得自血浆的 Gammanorm™ 克隆人类 IgG (Octapharma)。

[0107] ²NormCM 葡聚糖 MW 40000 且取代度 0.39 或 1.39 (2.26 或 3.24mmol/g)。

[0108] 初步筛选的条件在表 2 中给出。在这些条件下, 将约 1 克的含 NaPAA 的溶液加到 4ml 具有约 75 微升或更多 Gammanorm 多克隆人类抗体 (165mg/ml) 的含缓冲剂的溶液中, 以在 5ml 总体系体积中获得 2.5-16mg/ml (g/L) 的抗体浓度。即使是在葡聚糖的 MW 升高到 100000 且浓度升高到 20%, 用硫酸化的葡聚糖也不可能诱发 Ab 絮凝。然而, 在上述研究中, 沉淀用来自小于 1 到超过 30mS/cm 的溶液的 NaPAA (MW 8000) 和甚至 6g/L 或更高的 mAb 浓度, 在最后浓度为 200mM 的磷酸钠 pH7 和 150mM 的 NaCl、高得多的聚合物浓度下发生。使沉淀物 (在这些研究中其通常显示代表小于 2% 的原始样品体积) 在 ≤ 1ml 的 100mM NaP, pH 5 中再悬浮导致复合物溶解, 样品体积减少约 10-20 倍 (即 10x-20x 倍浓度)。应注意到, 假定蛋白质和聚合物密度为约 1, 则 16g/L Ab 的抗体浓度将代表小于 2% 的样品体积。如果 (进一步推测) 抗体与等质量的聚合物和结合水组合, 则所得复合物仍将代表 < 6% 的总体系, 因此提供 > 16 倍的抗体浓度。

[0109] 实施例 2-PAA 聚合物 MW、缓冲剂和盐浓度对抗体沉淀的影响

[0110] Gammanorm(GN) 人类多克隆 IgG 抗体 (Ab) 用于进一步沉淀研究。使用多克隆抗体样品以保证与存在的大部分抗体有关的结果将涉及广泛的抗体,而不是仅涉及一种特定的单克隆抗体。将不同分子量的 PAA (NaPAA) 与不同缓冲剂和盐浓度组合 (参见表 3)。PAA 的最后浓度为 10% (w/w) 且各体系的体积为 5ml。结果表明,在这些条件下,用分子量高达 5000 的 PAA 聚合物实现很少沉淀。如果聚合物或盐浓度增加,所述沉淀是有可能的。当分子量升高到 8000 或 15000 且在高缓冲剂或 NaCl 盐浓度下,得到抗体的沉淀。然而,当体系中不包含缓冲剂和 NaCl 时,观察到少量沉淀。这指出用 PAA 聚合物使抗体沉淀需要比较高的缓冲剂浓度或高导电性。

[0111] 表 3. 使用不同 MW 的 PAA 聚合物和条件的抗体沉淀

[0112]

NaPAA MW	聚合物 (w/w)%	Ab (mg/ml)*	pH7 [NaP](mM)	[NaCl] (mM)	显著的 沉淀物
2100	10	5	100	150	-
5100	10	5	100	150	极少
8000	10	5	-	-	+
8000	10	5	-	150	+++
8000	10	5	100		+++
15000	10	5			+
15000	10	5	100		+++
15000	10	5		150	+++
15000	0	5		150	-
15000	10	5	50	200	+++
15000	10	5	50	300	+++
15000	10	5	0	300	+++

[0113] *150 微升 Gammanorm 浓缩物 (165mg/ml) 加到总共 5ml,最后为约 5g/L。

[0114] 备注 :- =无, + =一些, +++ =广泛复合物相关的沉淀物形成。

[0115] 实施例 3-PAA MW 和盐浓度对抗体沉淀和回收率的影响

[0116] 为了调查研究缓冲剂和盐浓度对沉淀和抗体回收率的影响,使用 8000 或 15000MW 的 NaPAA 以不同缓冲剂和盐浓度 (表 4 和 5) 制备 5ml 具有 5g/L 抗体的总体系。在从各管子中除去上清液之后,使沉淀物再悬浮在 1ml 水中且以分光光度法在 280nm 下监测各自的吸光度。这允许计算沉淀物和上清液中回收的抗体的量。表 4 和 5 及图 1-7 中的结果指出抗体的复合和回收率随缓冲盐浓度 (即导电率) 而增加。即使在这些相对小的规模和手动操作方法中,在 $\geq 200\text{mM}$ 的缓冲剂 / 盐总浓度下获得 80-90% 的回收率也是可能的。总回收率通常 $> 95\%$, 这提出即使在 100mM NaP、 100mM NaCl 下,实现双倍沉淀并保证沉淀物中有

> 90%的 mAb 也将是可能的。

[0117] 表 4- 使用 10% PAA 8000 的抗体的沉淀和回收。

[0118]

实验	NaP (mM)/NaCl (mM)	加入的 Ab (mg)	上清液中的 Ab (mg)	沉淀物中的 Ab (mg)	上清液中的 Ab (%)	沉淀物中的 Ab (%)	总 Ab 回收率
1	NaP 100/NaCl 0	25	11.62	13.4*	46	54*	100*
2	NaP 0/NaCl 100	25	11.36	13	45	52	97
3	NaP 100/NaCl 100	25	4.46	19.6	18	78	96
7	NaP 200/NaCl 0	25	3.75	20.1	15	81	96
8	NaP 200/NaCl 100	25	1.69	22	7	89	96

[0119] * 沉淀物再溶解于 100mM NaP pH4.5 中。重新计算的值（不是来自 AU 测定）。

[0120] 总回收率涉及在沉淀物和上清液中的 Ab。

[0121] 表 5- 使用 10% PAA 15000 的抗体的沉淀和回收。

[0122]

实验	NaP (mM)/NaCl (mM)	加入的 Ab (mg)	上清液中的 Ab (mg)	沉淀物中的 Ab (mg)	上清液中的 Ab (%)	沉淀物中的 Ab (%)	总 Ab 回收率
4	NaP 100/NaCl 0	25	10.76	12.7	43	51	94
5	NaP 0/NaCl 100	25	4.42	19.6	18	78	96
6	NaP 100/NaCl 100	25	2.51	21.5	10	86	96
9	NaP 200/NaCl 0	25	2.44	22.5*	10	90*	100*
10	NaP 200/NaCl 100	25	0.45	24.5*	2	98*	100*
11	NaP 50/NaCl 200	25	4.01	20.8	16	83	99
12	NaP 50/NaCl 300	25	1.05	21.2	4	85	89
13	NaP 0/NaCl 300	25	1.87	20.8	8	83	91

[0123] * 沉淀物再溶解于 100mM NaP pH4.5 中。重新计算的值（不是来自 AU 测定）。

[0124] 实施例 4- 使用羧甲基葡聚糖 (CMD) 的抗体沉淀

[0125] 进行该研究来证实其它聚合物能够以类似于聚丙烯酸的方式进行。试验聚合物与 PAA 完全不同,其不是以钠形式使用而是为来自天然细菌来源的羧甲基 (CM) 改性的多糖葡聚糖 (D) 并且不是 (在 PAA 的情况下) 其中酸基为单体结构的一部分的合成聚合物。针对多克隆 IgG Gammanorm 以 20% (w/w) 的浓度在 150mM NaCl 和 200mM NaP, pH 7 的溶液中的沉淀测试具有不同分子量 (10000 和 40000) 的两种 CMD 聚合物。结果表明抗体可以在这些条件下沉淀。然而,当不包括 NaP 缓冲剂和 NaCl 时,没有得到沉淀 (表 6)。

[0126] 表 6- 用 20% w/w 具有不同分子量的 CMD 的 Ab 沉淀。

[0127]

CMD MW	羧基 (mmol/g)	CMD (w/w) %	[羧基] (M)	Ab (g/ml)	pH 7 [NaP] (mM)	[NaCl] mM	沉淀形成
10000	CMD L-0.91 (2.66)	20	0.53	5	0 对照	0 对照	否
10000	CMD L-0.53 (1.65)	20	0.33	5	200	150	广泛
10000	CMD L-0.91 (2.66)	20	0.53	5	200	150	广泛
40000	CMD 0.93 (2.26)	20	0.45	5	200	150	广泛
40000	CMD 1.39 (3.24)	20	0.64	5	200	150	广泛

[0128] 实施例 5-CMD MW 和配体密度对抗体沉淀和回收率的影响

[0129] 为了调查研究 CMD 聚合物的分子量对在不同体系中的沉淀形成和 Gammanorm 抗体回收率的影响,研究在 1.2ml 具有 150mM NaCl、200mMNaP, pH 7 的体系中以 20% (w/w) 的具有两种不同 MW(10000 和 40000) 和接枝 CM 配体密度的 CMD 聚合物(表 7)。在从各管子中除去上清液之后,将沉淀物再悬浮在 1ml 水中,且通过分光光度计在 280nm 下监测各自的吸光度以允许估算上清液和沉淀的复合物中抗体的量。结果表明沉淀物中抗体的回收率随羧基浓度(取代度 × 聚合物浓度)而增加。即使在这些小体积下,其中预期因非特异性管壁吸附及其它现象而损失抗体,在 20% CMD 40000 和 3.24mmol/g 的羧基密度下也得到了 > 80% 的抗体回收率。在沉淀物中发现了高达 82% 的抗体,且样品甚至可以容易地再溶解于蒸馏水中。

[0130] 表 7:使用 20% 具有不同 MW 和配体密度的 CMD 实现的 Ab 的沉淀和回收。

[0131]

CMD MW	羧基 (mmol/g)	羧基 (M)	加入的 Ab (mg)*	上清液中的 Ab (mg)	沉淀物中的 Ab (mg)	上清液中的 Ab (%)	沉淀物中的 Ab (%)	总回收率
10000	CMD L-0.53 (1.65)	0.33	6.1	2.45	3.4	40	56	96
40000	CMD 0.93 (2.26)	0.45	6.1	0.65	4.22	10	69	79
10000	CMD L-0.91 (2.66)	0.53	6.1	1.55	4.06	25	66	91
40000	CMD 1.39 (3.24)	0.64	6.1	0.22	5.03	3.6	82	86

[0132] * 加到 1.2ml 样品中, 因此 6.1mg 得到约 5.1mg/ml。

[0133] 实施例 6- 用 PAA 和 CMD 使 mAb 从不同粗进料中沉淀

[0134] 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞发酵物中产生的不同单克隆 mAb 发酵进料 (称为 P4、P5 和 51) 使用离心分离以正常方式使细胞和细胞碎片澄清化。51 型样品在一次性 WAVE™ 生物反应器 (GE Healthcare, Uppsala) 中产生, 此后 51 型样品还被称为 WAVE 51。51 进料的对照样品在 40°C (即高于聚合物 Tc) 下在含有 Breox 50A 1000 热响应聚合物的水性聚合物两相体系中澄清化。更多信息参见上文的方法和材料。关于用 Breox 及诸如 Tergitol 和 Ucon 的其它“EOP0”聚合物形成的相体系的其它信息从例如 H. O. Johansson 等 1998 (上述) 的各种来源得到。已通过离心或水性聚合物两相分配澄清化的各种进料的样品在不同浓度的 PAA 和 CMD 聚合物下使用不同缓冲剂和 NaCl 浓度进行沉淀 (参见表 8)。在絮凝、离心辅助沉淀并从各管子中除去上清液之后, 将沉淀物再悬浮在水中并通过蛋白质 A 色谱分析 (上文方法中所述) 分析 mAb 含量。

[0135] 从这些实验中获得的结果表明:

[0136] ● 在体系中不包含缓冲剂和 NaCl 时, 没有发生 mAb 沉淀 (实验 2)。

[0137] ● 当 PAA 的浓度从 10% 降低到 3% 时, 即使在使用比较高的缓冲剂 NaP 和 NaCl 盐浓度时也没有发生 mAb 沉淀 (实验 3 和 3a)。

[0138] ● 即使在使用高浓度的 mAb 进料 (Wave 51 和 Wave 51 ATPS) 时, 用 10% PAA 和 20% CMD 体系使用高缓冲剂和 NaCl 浓度实现了 78-88% 的 mAb 沉淀物回收率 (实验 4 和 1d-1e)。然而, 当使用具有比较低的 mAb 浓度的不同进料 (P4 和 P5) 时, 沉淀物中 mAb 的回收率降低到 56-61% (实验 1 和 1b), 虽然后者可能只是归因于分析中抗体样品损失, 该损失由于产生体积远小于起始溶液的 1% 的样品的共沉淀的高浓度效应引起。

[0139] 表 8- 使用 PAA 15000 和 CMD 40000 (1.39) 和不同缓冲剂 / 盐条件从不同粗进料中的 mAb 的沉淀和回收

[0140]

编号	NaP/ NaCl (mM)	体积 (ml)	聚 合 物 (% w/w)	mAb 进料	加入 的 mAb (ml)	加入 的 mAb (mg)	沉 淀 物 中 的 mAb (mg)	上 清 液 中 的 mAb (mg)	沉 淀 物 中 的 mAb (%)	上 清 液 中 的 mAb (%)	总 回 收 率 (%)
1	200/150	5	10% PAA	P5	2.18	0.33	0.19	0.12	56	35	91
2	0/0	5	10% PAA	P5	2.18	0.33	0	0.32	0	95	95
3	200/150	5	3% PAA	P5	2.18	0.33	0	0.3	0	91	91
3a	200/150	5	3% PAA	P5	2.18	0.33	0	0.31	0	94	94
4	200/150	1.25	20% CMD	Wave 51	0.7	0.81	0.68	0.15	85	18	103
1b	200/150	5	10% PAA	P4	2.18	0.83	0.50	0.23	61	28	89
1d	200/150	5	10% PAA	Wave 51	2.18	2.51	2.21	0.27	88	11	99
1e	200/150	5	10% PAA	Wave 51 APTP	2.18	1.80	1.40	0.25	78	14	92

[0141] PAA是指NaPAA 15000,CMD是指CMD 40000(取代度1.39)。APTP是指在含有Breox EOPO聚合物的水性聚合物两相体系中的进料澄清化。

[0142] 宿主细胞蛋白质(HCP)含量通过使用Gyrolab系统(Gyros,Uppsala)的酶联免疫分析法分析(表9)。结果表明沉淀的mAb样品中HCP减少率为88-94%且大部分HCP保留在上清液中。结果还指出沉淀方法不仅对澄清进料中的抗体样品很好地起作用,而且对来自诸如含有热分离的Breox EOPO聚合物的两相体系的富蛋白质上部相的水性聚合物相体系相的抗体样品很好地起作用。在这方面,上部相中的残留EOPO聚合物似乎没有妨碍抗体沉淀。没有出乎意料的结果给出Breox聚合物的不带电性质。

[0143] 表9:对于用PAA 15000或CMD 40000(1.39)的体系的HCP数据。

[0144]

实验 编号	沉淀物 中的总 mAb (mg)	加入的总 HCP(进 料) (mg)	沉淀物中 回收的总 HCP (ng)	上清液 中的总 HCP (ng)	总 HCP 回收率 (%)	HCP减 少率 (%)	HCP (ppm)
4	0.681	23100	2700	13750	71	88	3964
1d	2.21	71940	6350	55000	85	91	2873
1e	1.80	47960	3000	33250	76	94	1660

[0145] 实施例 7- 在 10ml 规模下用 CMD 或 PAA 的 mAb 沉淀

[0146] 为了调查研究所述方法的准确性和可重复性,在 10ml 规模下重复表 8 中提供的一些实验。表 10 中提供的结果指出在比较高的 mAb 浓度(即 Wave 51 APTP 澄清化的进料)和导电率的条件下用 10% PAA 或 20% CMD 4000 体系在沉淀物中实现高水平的 mAb 回收率(76%和 99%)。表 11 显示沉淀的 mAbs 中 HCP 减少率 > 94%,大部分 HCP 保留在上清液中。这些结果类似于上文在 1.2-5ml 规模下得到的结果且显示所述方法的规模可调整性和实用性二者,以及其能够使用诸如微量滴定盘或小容量试管的低容量试验系统筛选。

[0147] 表 10:在 10ml 规模下使用 NaPAA 15000 或 CMD 40000 的 mAb 样品从通过 APTP 分配澄清化的粗进料中的沉淀并回收。

[0148]

实验编号	聚合物%	mAb	加入的 mAb (ml)	加入的 mAb (mg)	沉淀中的 mAb (mg)	上清液中的 mAb (mg)	沉淀中的 mAb (%)	上清液中的 mAb (%)	总回收率 (%)
4	20% CMD	Wave 51 APTP	4.5	3.84	3.82	0.02	99	<1%	99
1e	10% PAA	Wave 51 APTP	5.0	4.27	3.24	0.89	76	21	97

[0149] *10% NaPAA 15000 或 20% CMD 40000 (1.39) 和 150mM NaCl, 200mM NaP pH 7.0

[0150] 表 11- 与表 10 中的实验有关的宿主细胞蛋白质 (HCP) 数据

[0151]

实验/进料	沉淀中的总 mAb (mg)	加入的总 HCP (进料) (mg)	沉淀物中的总 HCP (mg)	上清液中的总 HCP (mg)	总 HCP 回收率 (%)	HCP 减少率 (%)	HCP (ppm)
4/Wave 51 APTP*	3.82	108	7.0	91	90	94	1832
1e/Wave 51 APTP	3.24	120	5.5	115	100	95	1700

[0152] ● 上述方法中所述的水性聚合物两相 (APTP) 体系。

[0153] 实施例 8- 在 20ml 规模下用 PAA 的 mAb 沉淀

[0154] 为了进一步测试规模可调整性和可重复性,在 200ml 规模下以双份平行处理基于 10% NaPAA 15000、150mM NaCl、200mM NaP pH 7 和通过热响应 APTP 体系分配(参见上文)澄清化的来自 Wave 生物反应器的 mAb 51 进料的沉淀体系(表 12)。在复合物形成和沉淀外加除去上清液之后,使各沉淀物再悬浮在 50ml 水中。在这种情况下,再悬浮体积较高,使

得可以进行进一步分析并且将一些样品冷冻储存以便进一步分析。通过调整盐浓度和 pH 使得抗体可结合到 Mabselect Sure 蛋白质 A 亲和柱（其允许分析 mAb 的存在量）来分析再悬浮溶液和上清液样品的 mAb 含量。上清液和沉淀物的蛋白质回收率提供于表 12 中。正如所料，在复合物中实现 > 86% 的近似 mAb 回收率。此外，剩余 mAb 显示是在上清液中，其中，例如，其可容易地进行第二沉淀步骤以增加纯化的 mAb 的量。注意到第二沉淀步骤可只是通过向上清液中加入少量 NaPAA 来将 NaPAA 含量升高回到 10% 来完成。在该实施例中，在沉淀物中见到约 86% 的 mAb 且在上清液中见到约 18% 的 mAb（由于标准误差，总共 104%）。如果我们假定最坏的情况且 82% mAb 处于沉淀物中 ($K = 82/18 = 4.6$) 且第二沉淀产生类似比率，则汇集来自第一步骤和第二步骤的沉淀物将产生约 97% 的以复合形式的 mAb。

[0155] 还应注意到，在上述实施例中，基于蛋白质 A 的 MabSelect Sure 亲和柱以正常方式进行且给出正常外观色谱图（未示出）。这提出着在蛋白质 A 型亲和捕获步骤上游（之前）可能包括沉淀或分配步骤、继之以沉淀步骤。所述步骤可包括使用填充或膨胀颗粒床或整体柱捕获过滤或捕获色谱。

[0156] 残留的中性 APTP 体系相关的聚合物可能不会消极地影响（即，可能具有极少影响或甚至积极影响）接下去的亲或离子交换色谱（US 20070213513 A1）。关于色谱的 mAb 样品中的残留 PAA（其通常仅占初始沉淀溶液中的 PAA 的小量百分比），应注意到，PAA 具有如蛋白质 A 管柱的净负电荷，因为蛋白质 A 类似物的 pI 为约 5。这与其相对小的 MW 一起将允许 PAA 以流过的方式穿过蛋白质 A 柱（或其它带负电的柱，诸如阳离子交换柱）。聚合物的较低 MW 也可以使其能够通过特定过滤步骤或只是通过在其它正常加工步骤期间的非特异性吸附而除去。

[0157] 表 12：200ml 规模的使用 10% PAA 15000 和 200mM NaP 缓冲剂和 150mM NaCl 使 mAb 从（APTP 体系澄清化）粗进料中沉淀和回收。

[0158]

实验编号	加入的 mAb (ml)	加入的 mAb (mg)	沉淀物中的 mAb (mg)	上清液中的 mAb (mg)	沉淀中的 mAb (%)	上清液中的 mAb (%)	总回收率(%)*
1	100	84.6	73.4	15.4	87	18	105
2	100	84.6	73	15	86	18	104

[0159] * 假定这些值反映 $\leq 10\%$ 的误差。

[0160] 实施例 9- 再溶解的沉淀在 Capto MMC 柱上的色谱

[0161] 进行该实验以证实再悬浮的 mAb 沉淀物样品可在包括阳离子交换介质和混合模式介质的其它介质上处理。CaptoTM MMC 为市售用于生物加工的多峰阳离子交换介质（GE Healthcare, Uppsala）。关于其结构和用途的信息可经供应商通过邮件直接得到或经网络得到（即使用实验设计对 Capto MMC 优化洗脱条件，GE Healthcare 公开 11-0035-48。Capto MMC 数据文件，GE Healthcare 公开 11-0025-76）。其设计成在正常到高流速（在大柱中，

至少 600cm/h) 和正常到比较高的流动相盐浓度 (例如 5-50mS/cm) 下使用, 且对于加工再悬浮在极小体积溶液中的沉淀物样品 (其含有高浓度的靶蛋白 (以净正电状态) 外加残留盐和带负电的聚合物) 将显得理想。

[0162] 沉淀物使用来自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞发酵进料的实际进料样品 (mAb 5g/L) 产生, 所述样品已在一次性 Wave 生物反应器中发酵, 随后通过在同一一次性 Wave 生物反应器中经水性聚合物两相 (APTP) 分配澄清化。沉淀通过加入聚合物和盐以获得 10% (w/w) NaPAA15000、200mM NaP pH 7 和 150mM NaCl 来改变含有 mAb 的相 (其保持超过 90% 的经受 APTP 的初始 mAb) 而诱发。含有得自分配的约 90% 的 mAb 的沉淀物估算为小于总沉淀体系溶液体积的 2% (v/v)。将其溶解于 10 倍体积的用乙酸调节到 pH 5.5 的由 250mM NaCl 和 50mM 乙酸钠组成的缓冲液中。将约 17ml 样品以 0.5 毫升 / 分钟 (2 分钟停留时间) 施用到 Capto MMC 柱上, 其中使用填充有 Capto MMC 的 1mlHiTrap 柱。洗脱液 (缓冲液 B) 为 100mM NaP pH 7.6, 含有 1M NaCl。

[0163] 目标是使 mAb 结合在柱上且使大部分剩余 HCP 流过。结合的 mAb 随后将通过增加 pH 和盐浓度而从柱上洗脱。包括可能的一些污染物的任何残留蛋白质随后将在最高 pH 和盐浓度下洗脱。图 8 显示再悬浮沉淀物在 Capto MMC 柱上的色谱数据。将来自色谱实验的部分收集并分析 HCP 和 DNA 含量, 且将数据与粗进料和上清液及沉淀物的数据比较 (表 13)。对于纯度检验, 还进行了十二烷基硫酸钠、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS PAGE) 分析 (图 9)。

[0164] 图 8 中的色谱图显示洗脱液中的宽初始峰, 其显示显著量的 mAb 流过柱 (即, 初始吸附缓冲剂浓度或 mAb 的量对于所用的小柱来说太高)。SDS PAGE 证实了这个 (图 9)。然而, 如由在得到的色谱图中间的尖峰证实, 大量 (50% 或更多) mAb 显示由柱捕获 (参见表 13 和图 8 和 9)。据信带负电的 PAA 聚合物以流过的方式与带负电的 HCP 和可能的毒素、病毒及其它带负电的污染物 (未分析) 一起洗脱。吸附的污染物将在高 pH、高导电性洗涤步骤中 (部分) 除去。

[0165] 表 13 显示洗脱液 (A6 部分) 中 HCP 减少到约 800ppm。如由低于所用测定的检测极限的 DNA 含量水平所指出, 实现了 DNA 的明显减少。

[0166] 表 13: 来自在 Capto MMC 上以 200ml 规模的再溶解沉淀物、上清液和色谱的 HCP 和 DNA 数据。

[0167]

样品	mAb (mg)	mAb 回收率 (%)	总 DNA (ng)	DNA (ppm)	总 HCP (ng)	HCP (ppm)
进料 Wave 51 APTP			781522	35203	731000	32927
上清液					605200	27261

[0168]

再悬浮, pH 5.5	22.2		5244	236	34850	1570
汇集 A1-A4	7.6	34	5148	677	8700	1144
A6 部分	11.03	50		没有检测到	9000	815

[0169] 实施例 10- 抗体片段 (Fab) 的沉淀

[0170] 抗体片段 (Fabs) 的 MW 通常为母体 mAb 的三分之一, 但常显示出类似于母体 mAbs 的离子交换色谱特征和类似滴定曲线 (关于 MW 和残基数量, 例如, 对于 mAbs : C. Harinarayan, J. Mueller, A. Ljunglof, R. Fahrner, J. Van Alstine, R. van Reis, An Exclusion Mechanism in Ion Exchange Chromatography, Biotechnology and Bioengineering (离子交换色谱、生物技术和生物工程中的互斥机制) 95(2006) 775-787 ; 和 对于 Fabs : A. Ljunglof, K. M. Lacki, J. Mueller, C. Harinarayan, R. van Reis, R. Fahmer, J. M. Van Alstine, Ion Exchange Chromatography of Antibody Fragments, Biotechnology and Bioengineering (抗体片段的离子交换色谱、生物技术和生物工程) 96(2007) 515-524)。诸如 Fabs 的相对疏水性、电荷密度、pI 的类似性质显示它们将能够通过上文提到的方法被复合。然而, 对于聚合物相互作用具有减小的表面积且更大的扩散率的较小尺寸的 Fabs 显示它们在一些条件下可以比 mAbs 更低的程度复合。为了进行测试, 将 3g/L 的内部供应的 Fab 溶液与聚合物和盐组合以形成在 10% (w/w) NaPAA 15000、200mM 磷酸钠 pH7、150mM NaCl 下具有 0.6g/L Fab 的 5ml 体系。形成可见的沉淀物。UV 分析 (A280nm) 显示在这些条件下 20% 的 Fab 被复合。没有进行进一步的实验, 但通过上文提到的方法, 包括增加聚合物或盐的浓度、增加聚合物 MW、改变 pH、温度等, 将可以容易地显著增加该满意的效果。

[0171] 有益的是, 应注意到, 除了 Abs 和相关蛋白质之外, 一些其它蛋白质也可以经由该方法进行加工。所述蛋白质应该带净正电 (在所用的 pH 条件下) 且如有可能, 则提供一定程度的表面疏水性。如上文所提到, 蛋白质大小也将起作用。实例包括具有商业利益的若干蛋白质, 诸如血清白蛋白和胰凝乳蛋白酶以及胰岛素和若干其它激素。因此, Alves 等表明, 在 PEG 和盐外加 PEG 和葡聚糖体系中, 胰岛素趋于以高达 10 的分配系数促成上部相 (Jose G. L. F. Alves, Lucy D. A. Chumpitaz, Luiza H. M. da Silva, Telma T. Franco 和 Antonio J. A. Meirelles : Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems (乳清蛋白、牛血清蛋白和猪胰岛素在水性两相体系中的分配), Journal of Chromatography B, 743(2000) 235-239)。Fuentes 等近来研究了各种蛋白质与非共价吸附在色谱底物上的 CMD 聚合物的相互作用。他们注意到大肠杆菌 HCP 在 pH 5 下结合到 CMD 改性的基质上, 但在 pH 7 下没有结合到 CMD 改性的基质上, HCP 与聚合物涂覆表面的相互作用随着离子强度增加而降低, 且在 pH 7 下比较疏水的碱性蛋白胰凝乳蛋白酶 (pI 约 9) 直到向流动相中加入 > 200mM NaCl 才从聚合物释放。他们还注意到聚合物相互作用显示给予蛋白质一些结构稳定性, 这保留了其天然活性 (Manuel Fuentes, Benevides C. C. Pessela, Jorgette V. Maquiese, Claudia Ortiz, Rosa L. Segura,

Jose M. Palomo, Olga Abian, Rodrigo Torres, Cesar Mateo, Roberto Fernandez-Lafuente 和 J. M. Guisan, Reversible and Strong Immobilization of Proteins by Ionic Exchange on Supports Coated with Sulfate-Dextran (通过在涂覆有硫酸酯葡聚糖的载体上的离子交换使蛋白质可逆且稳固地固定), *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1134-1139)。

[0172] 本文提到的所有专利、专利公开案和其它发表的文献在此通过引用全文结合到本文中,引用的程度就如同已个别地及具体地将各文献通过引用结合到本文中一般。虽然描述了本发明的优选的说明性实施方案,但是本领域技术人员应理解本发明可不同于所述实施方案来实践,提供这些实施方案是出于举例说明的目的而不是为了限制。本发明仅受所附的权利要求书限制。

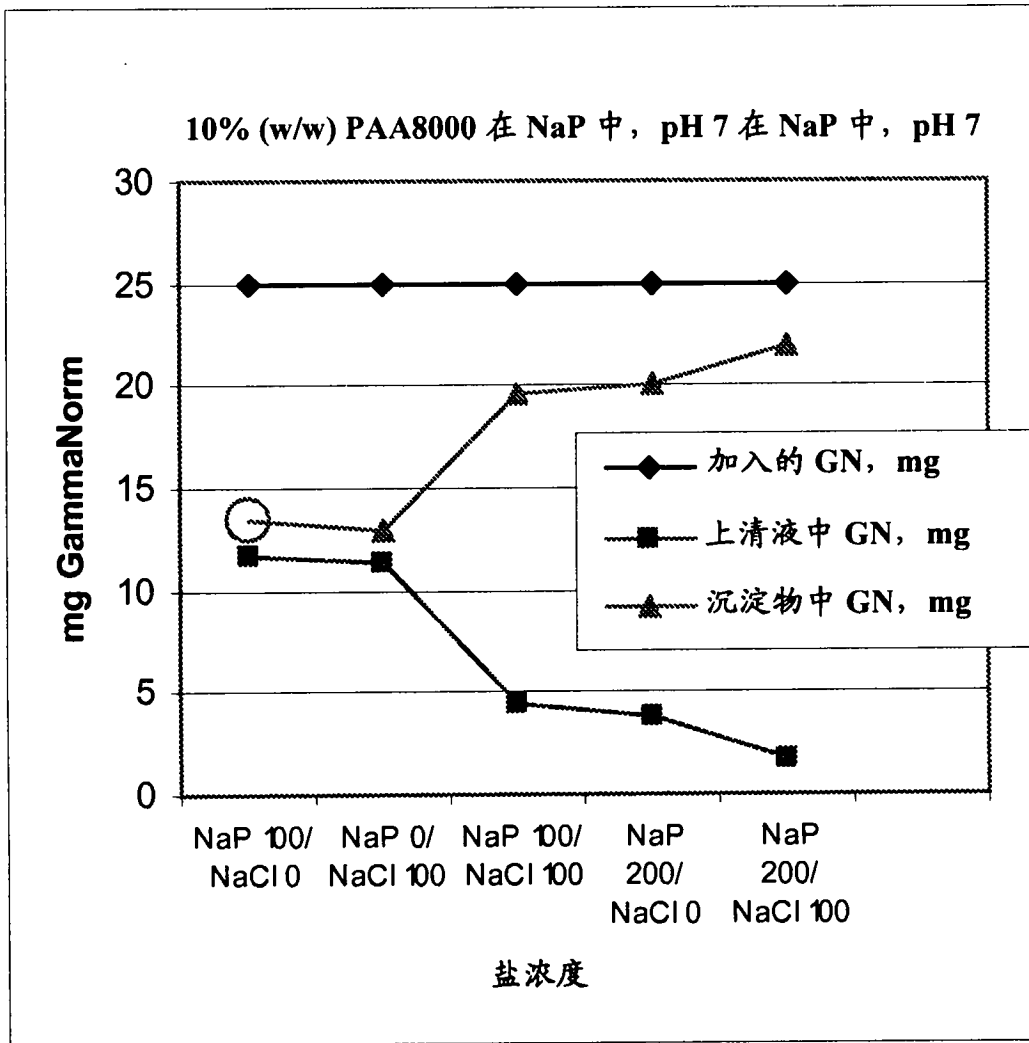


图 1

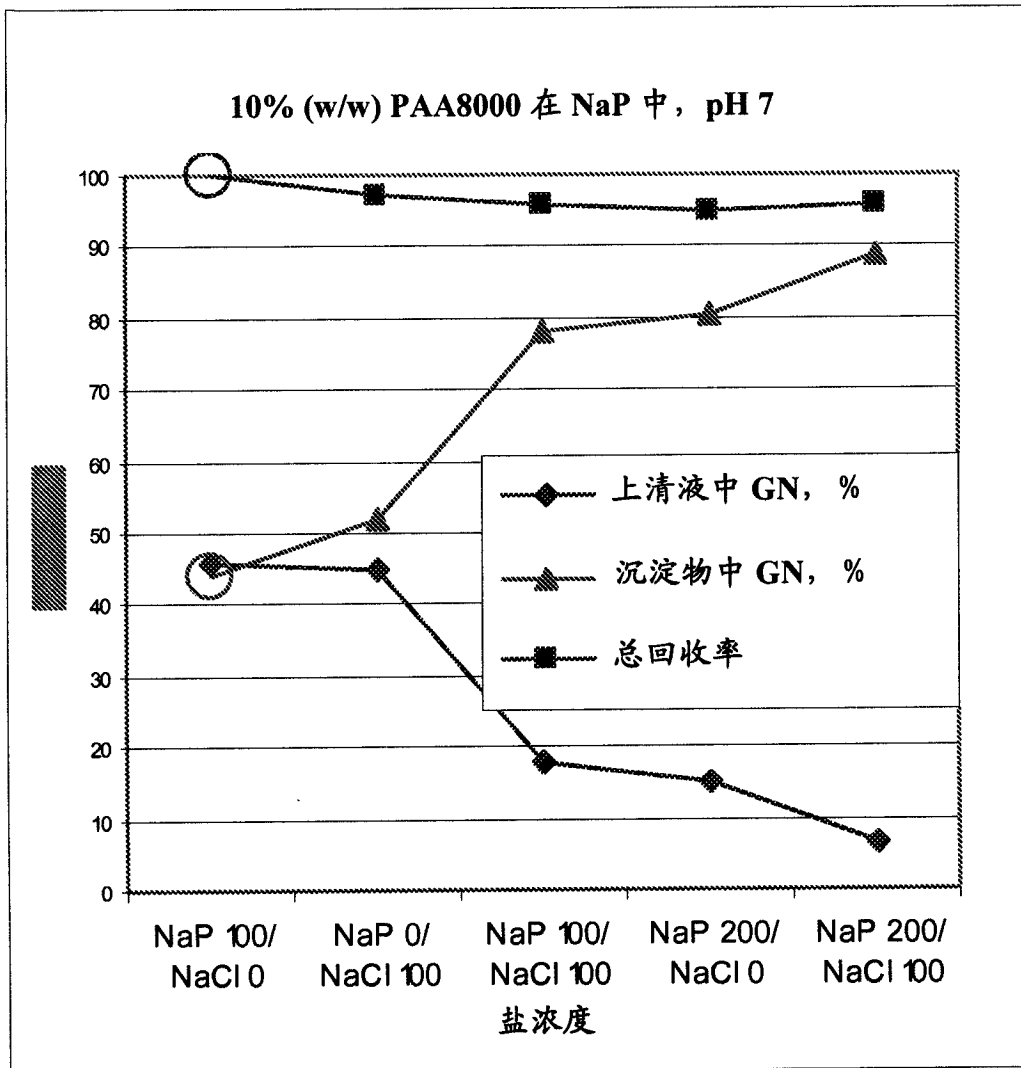


图 2

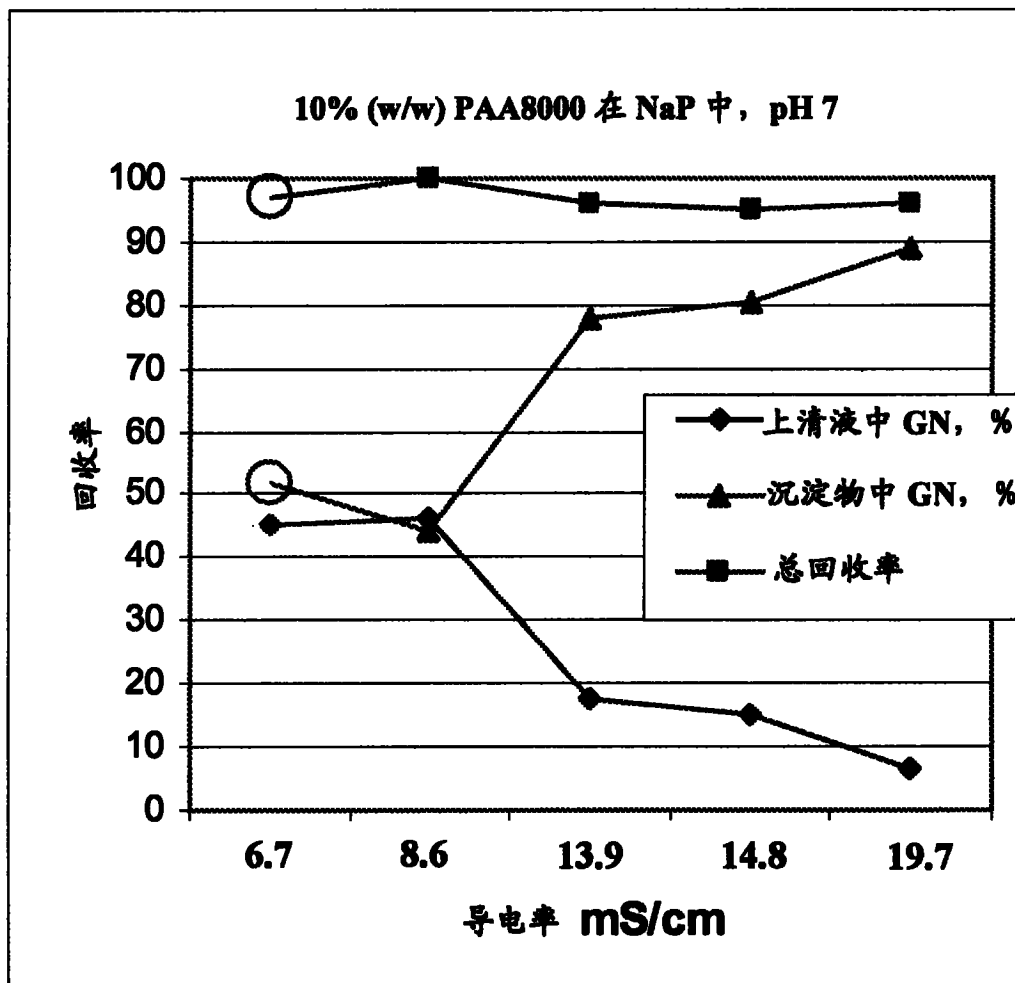


图 3

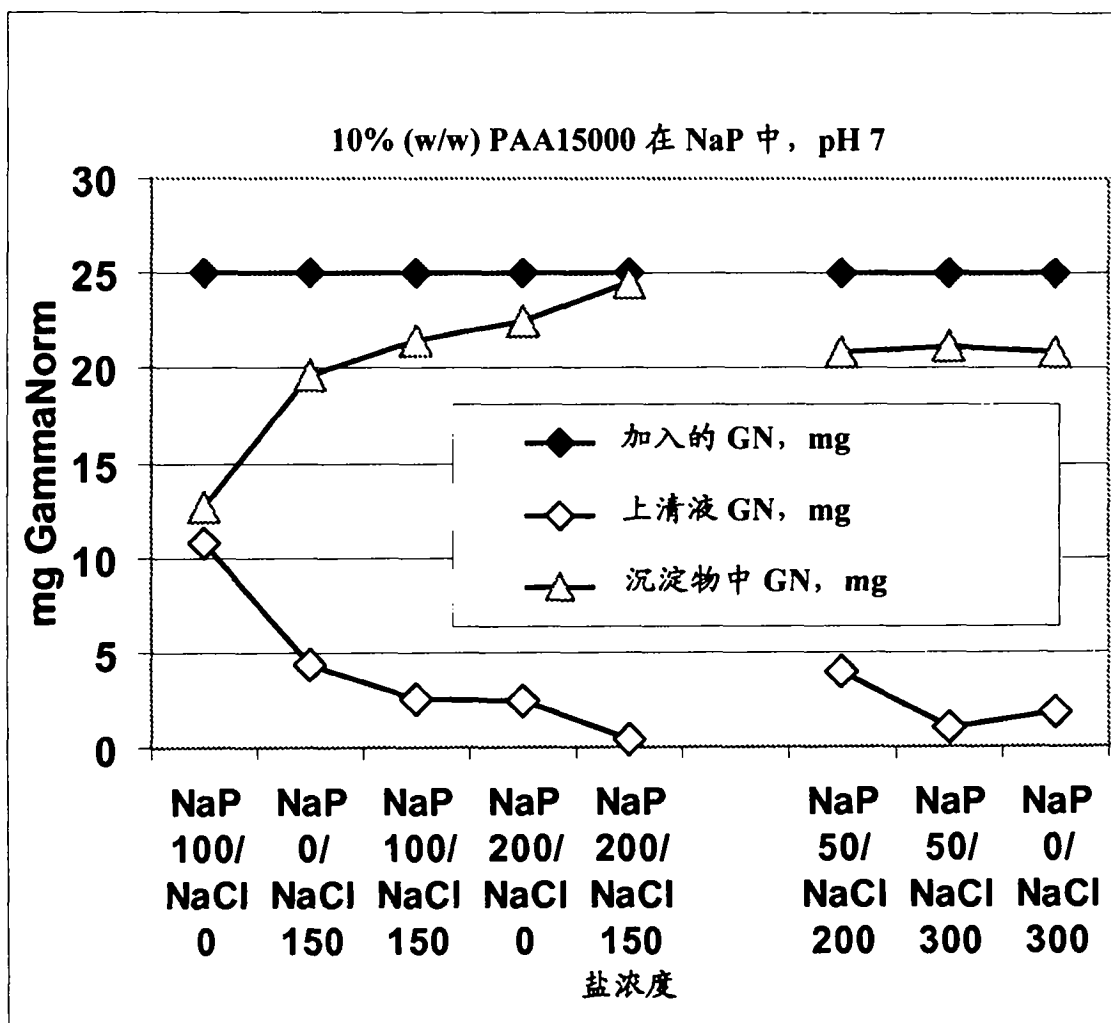


图 4

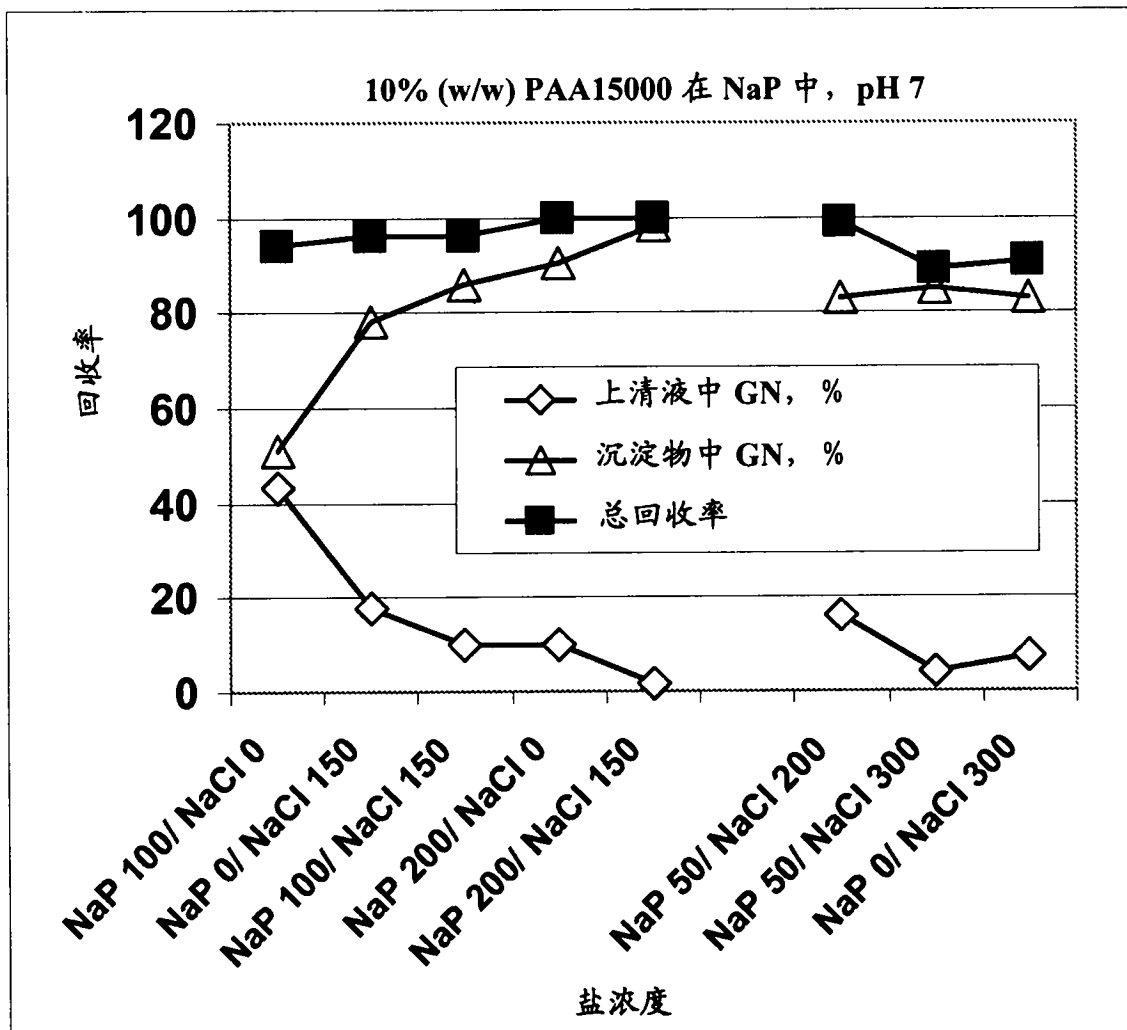


图 5

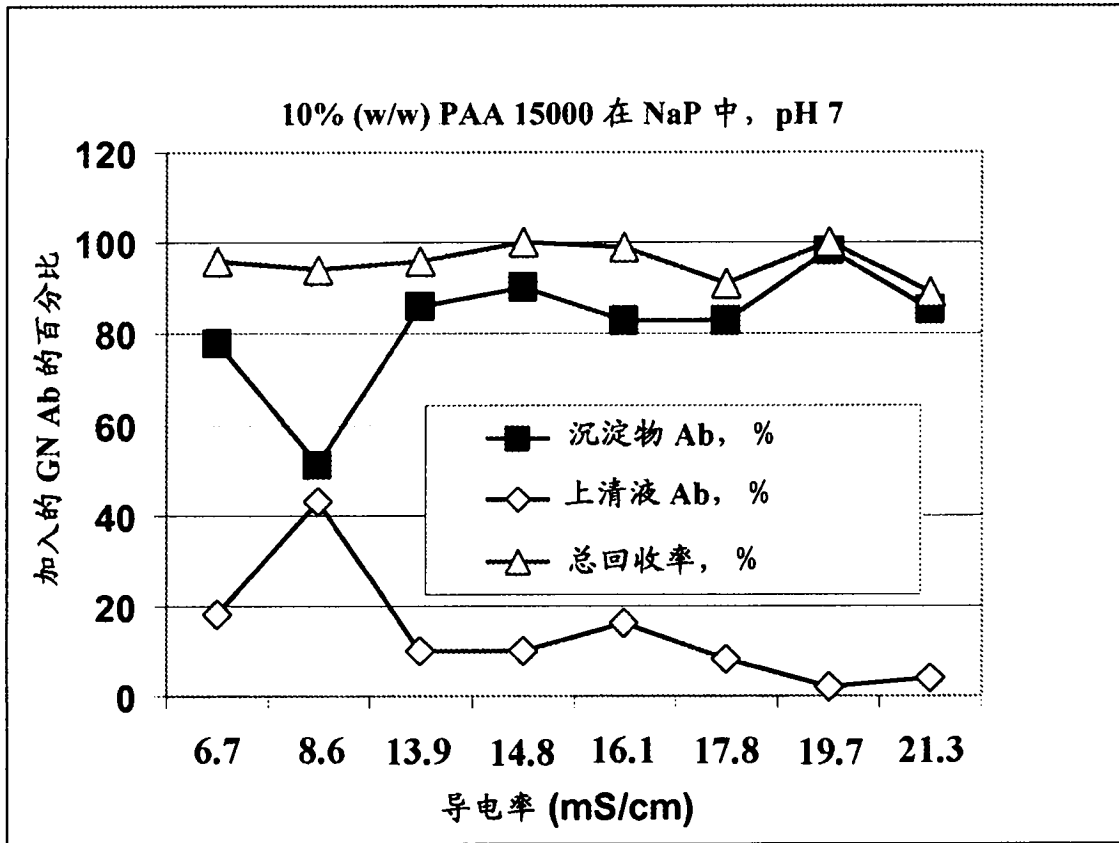


图 6

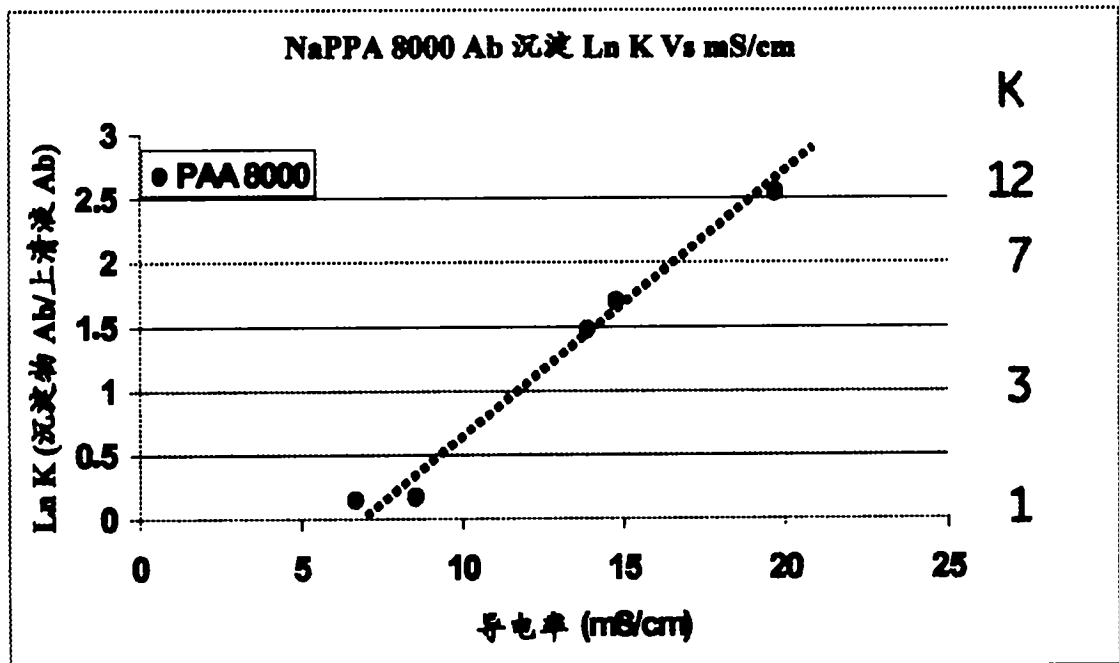


图 7

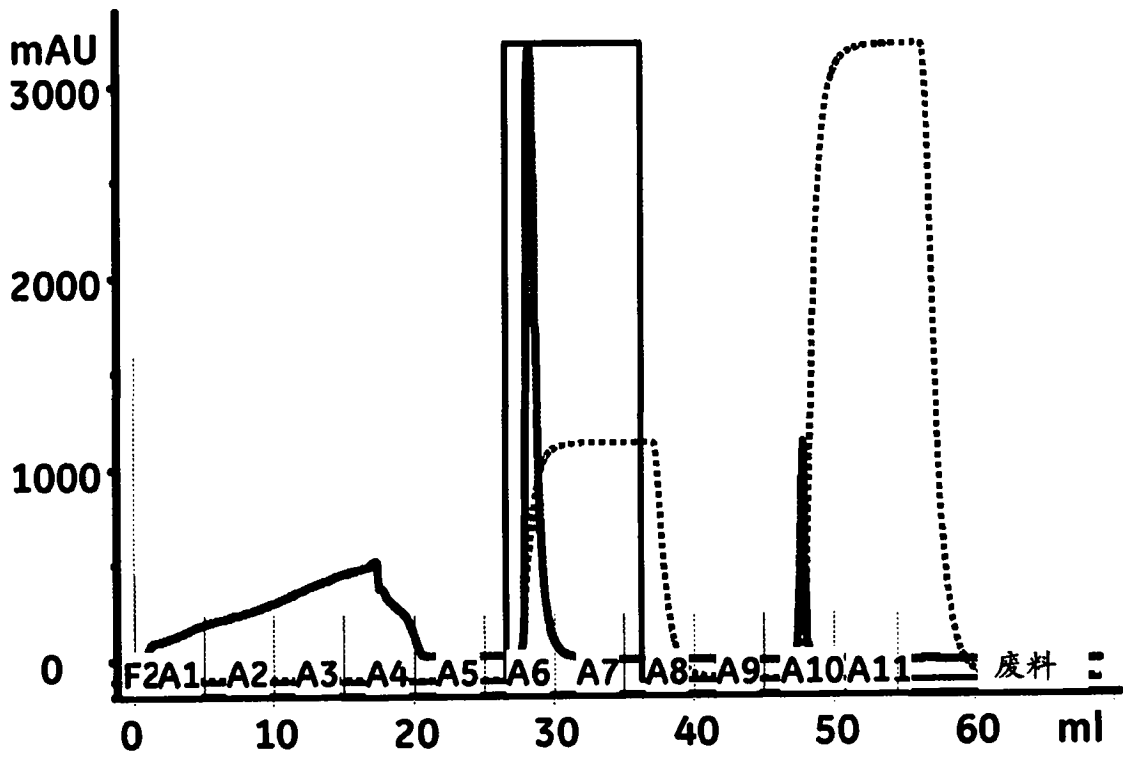


图 8

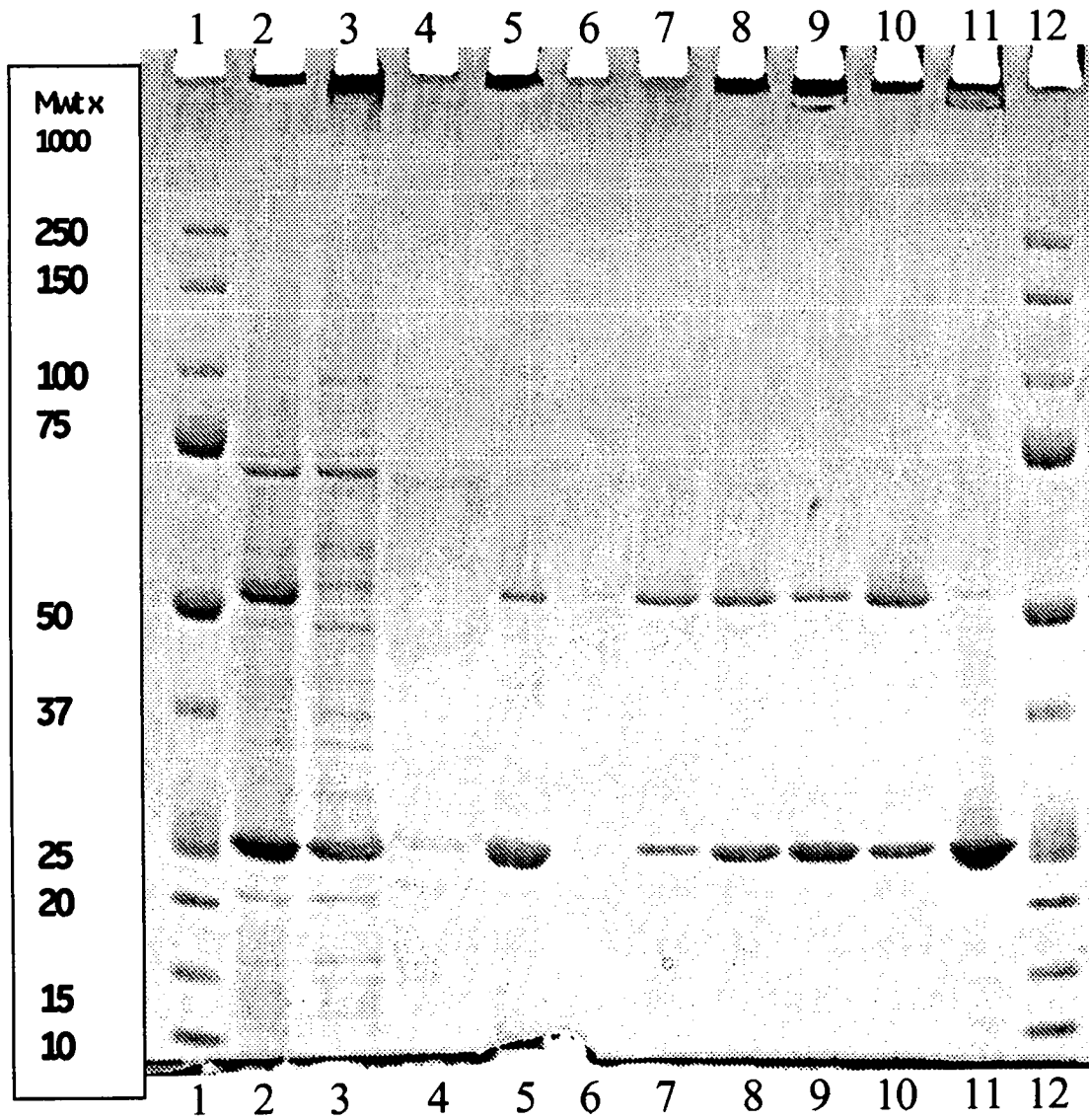


图9

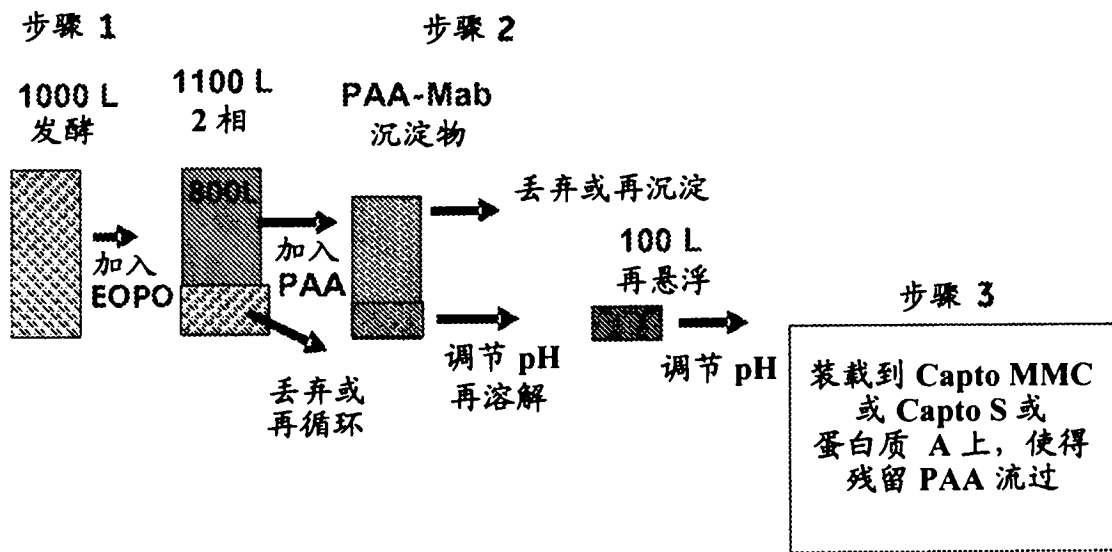


图 10