



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712673 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201180006652. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 01. 21

C07K 1/22(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

10151416. 4 2010. 01. 22 EP

10171975. 5 2010. 08. 05 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/050817 2011. 01. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/089212 DE 2011. 07. 28

(71) 申请人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 德国英格海姆

(72) 发明人 C. 埃克曼 D. 安布罗修斯

F. 诺希尔佛 T. 拉思詹

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 邹宗亮

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 5 页

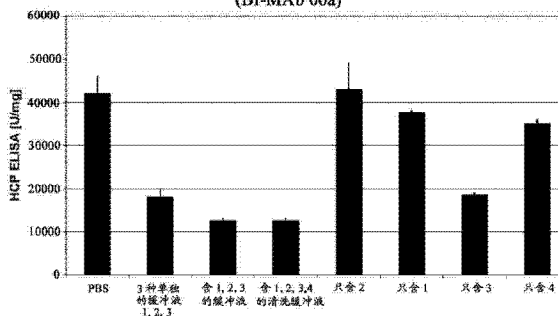
(54) 发明名称

用于纯化含 FC 的蛋白的色谱方法

(57) 摘要

本发明涉及一种去除杂质的方法,具体为利用新的清洗缓冲液通过 A 蛋白色谱的方法从细胞培养上清液中除去宿主细胞蛋白 (HCP) 和 DNA 的方法。

通过多种清洗缓冲液除去 HCP (BI-MAb 06a)



1. 通过 A 蛋白色谱从含有包含免疫球蛋白的 Fc 域的蛋白（靶蛋白）的组合中去除杂质的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 在其中靶蛋白结合至固定相的条件下,将含该靶蛋白的流动相上样至含 A 蛋白的固定相;

b. 施用 pH 在 4 至 8 之间的清洗缓冲液作为流动相,其含有以下成分:

i. 精氨酸,其浓度为 0.1-1mol/l,

ii. 氯化钠,其浓度为 0.2 至 2mol/l,

iii. 选自异丙醇、正丙醇和乙醇的醇,其浓度为 5-30%(w/v),和

iv. 聚乙烯吡咯烷酮或去污剂,其浓度为 0.05-2%(w/v);

c. 在其中靶蛋白从固定相洗脱的条件下,使用洗脱缓冲液作为流动相。

2. 权利要求 1 的方法,其特征在于所述精氨酸在所述清洗缓冲液中的浓度为 0.4-0.6mol/l。

3. 前述权利要求中任一项的方法,其特征在于所述氯化钠在所述清洗缓冲液中的浓度为 0.9-1.1mol/l。

4. 前述权利要求中任一项的方法,其特征在于在所述清洗缓冲液中所述醇为异丙醇,且其浓度为 10-20%(w/v)。

5. 前述权利要求中任一项的方法,其特征在于聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的浓度为 0.1-2%(w/v)。

6. 前述权利要求中任一项的方法,其特征在于所述去污剂为聚氧乙烯-脱水山梨糖醇-单月桂酸酯,且其浓度为 0.05-2%(w/v)。

7. 前述权利要求中任一项的方法,其特征在于所述清洗缓冲液的 pH 为 5 至 8。

8. 前述任一权利要求的方法,其特征在于所述杂质为宿主细胞蛋白 (HCP)。

9. 用于亲和性色谱的清洗缓冲液,其 pH 为 4 至 8,其包含:

i. 精氨酸,其浓度为 0.1-1mol/l,

ii. 氯化钠,其浓度为 0.2 至 2mol/l,

iii. 选自异丙醇、正丙醇和乙醇的醇,其浓度为 5-30%(v/v),和

iv. 聚乙烯吡咯烷酮或去污剂,其浓度为 0.05-2%(w/v)。

10. 权利要求 9 的清洗缓冲液,其 pH 为 5 至 8。

## 用于纯化含 FC 的蛋白的色谱方法

[0001] 本发明涉及纯化蛋白的色谱方法和用于所述方法的试剂。

[0002] 生物分子（例如蛋白、多核苷酸、多糖等）作为药物、诊断试剂、食品添加剂、去污剂、研究试剂和很多其他应用方面的商业价值越来越重要。所述生物分子（例如蛋白）的需求已不能一般地通过从天然来源物质分离分子得以满足，而是需要使用生物技术生产方法。

[0003] 蛋白的生物技术制备通常开始于分离编码所需蛋白的 DNA 及其克隆至合适的表达载体中。将所述表达载体转染至合适的原核或真核表达细胞并且随后选择所转染的细胞之后，在发酵器中培养所转染的细胞，使所需蛋白得以表达。然后收集该细胞或培养上清液，后处理并纯化其中所含的蛋白。

[0004] 在真核表达系统的情况下，即当使用哺乳动物细胞（例如 CHO 或 NS0 细胞）培养时，例如，在过去 15 年里，在表达步骤中可以获得的细胞培养或细胞培养上清液中的所需蛋白的浓度提高了 100 倍。而在同一时期，在后续蛋白纯化步骤中所使用的色谱材料的结合能力仅提高了 3 倍。基于此原因，亟需改进、优化生物分子（特别是蛋白）的纯化方法，使之能够在工业规模下进行。

[0005] 在生物制药方面，例如将蛋白用作药物（例如治疗性抗体），除了产品的产率之外，杂质的分离也十分关键。可将杂质分为方法依赖的和产物依赖的杂质。方法依赖的杂质含有宿主细胞的成分，例如蛋白（宿主细胞蛋白，HCP）和核酸，其来自细胞培养（例如培养基成分）或后处理（例如盐或溶解的色谱配体）。产物依赖的杂质为所述产物的具有不同性质的分子变体，包括简化形式（例如前体和水解分解产物）以及修饰形式（例如通过脱氨化、错误糖基化或二硫桥的错误连接而形成）。所述产物依赖的分子变体还包括聚合物和聚集物。其他杂质为污染物，是指不直接属于生产方法的所有其他化学、生化或微生物来源的物质。污染物例如为在细胞培养中不希望得到的病毒。

[0006] 在生物制药之中，杂质会导致安全方面的担忧。如果治疗性蛋白通过注射或输注直接进入血液（这是生物制药中经常出现的情况），那么这种担忧将更强烈。因此，宿主细胞成分可导致变态反应或免疫病理学作用。此外，杂质还可导致所给药的蛋白出现不希望的免疫原性，即其可能使患者对该治疗剂产生不希望的免疫应答，甚至可能产生危及生命的过敏性休克。因此，需要合适的纯化方法，以便通过该方法使不希望的物质降低至不显著的水平。

[0007] 另一方面，生物制药中也不可忽视经济方面。因此，所使用的生产和纯化方法不应危害由此制备的生物制药产品的经济价值。此外，建立新的纯化方法的时间量度也很重要：除了对成本的影响之外，方法的开发需要与药物的临床前和临床研究相一致。因此，例如，一些临床前试验和所有临床试验只有在生物药物具有足够的纯度和足够的量之时才能开始。

[0008] 以下标准方法由四个基本步骤组成，其可能作为研发能够在工业规模进行的抗体纯化方法的起点：第一步中分离靶蛋白、浓缩并稳定化（“捕获”）。第二步中将病毒除去，第三步中进行纯化，将主要的杂质（例如核酸、其他蛋白和内毒素）除去。最后一步除去任

何痕量的污染物 (“精处理 (polishing)”)。

[0009] 除了过滤和沉淀步骤, (柱) 色谱方法也很重要。因此, 捕获常常通过包括亲和性色谱纯化的步骤。据此, 其中可使用很多已知的柱色谱方法和色谱材料。

[0010] 亲和性色谱基质, 下文也称为亲和性基质, 在多种物质的工业纯化中用作固定相。通过固定配体的手段, 可能特异地富集和纯化对所用具体配体具有一定亲和性的物质。对于抗体 (免疫球蛋白) 的工业纯化, 特别是单克隆抗体的纯化, 已证实将固定化 A 蛋白用作初始纯化步骤是有效的。A 蛋白为金黄色葡萄球菌的约 41kDA 的蛋白, 其以高亲和性 (对于人 IgG 为  $10^{-8}\text{M}$ - $10^{-12}\text{M}$ ) 结合至免疫球蛋白的 Fc 区的  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  域。在 A 蛋白色谱中, 来自流动相的具有 A 蛋白结合 Fc 区的免疫球蛋白或融合蛋白特异地结合至 A 蛋白配体 (其共价结合至载体 (例如琼脂糖凝胶))。来自金黄色葡萄球菌的 A 蛋白 (野生型 A 蛋白) 和遗传学修饰的重组 A (rec. A 蛋白) 蛋白通过非共价作用与抗体的恒定区 (Fc 片段) 相互作用。这种特异性相互作用可用于有效地从抗体中分离杂质。通过改变 pH 可特意停止抗体和 A 蛋白配体之间的相互作用, 且该抗体可从固定相得以释放或洗脱。

[0011] 若在装柱后清洗固定相, 则亲和性色谱的有效性可增加。这种清洗是指使用从固定相洗脱杂质 (而不是目标产物) 的流动相。在使用 A 蛋白基质对抗体进行亲和性色谱的情况下, 已使用含有精氨酸、异丙醇、NaCl 或去污剂的清洗缓冲液 (WO2008031020、WO2007109163、WO2007081906、WO2003066662, Millipore Tech Brief TB1026EN00), 但没有将这些成分组合至单一的清洗缓冲液中。这些成分中的两种 (盐和去污剂) 的组合 (所述去污剂即聚合物 (例如聚乙二醇、聚丙二醇和由其组成的共聚物)) 公开于美国专利 6, 870, 034B2 中。

[0012] 发明概述

[0013] 已令人惊讶地发现, 与分别逐个使用相同成分相比, 在 A 蛋白色谱中将这些成分的具体组合用在单一清洗缓冲液中导致待纯化的靶蛋白具有更高纯度。另外, 本发明的清洗缓冲液适用于在标准基质上进行抗体纯化, 并且省去优化步骤使该方法研发被缩短。

[0014] 本发明涉及一种通过 A 蛋白色谱从含有包含免疫球蛋白的 Fc 域的蛋白 (靶蛋白) 的组合物中去除杂质的方法, 其包括以下步骤:

[0015] a. 在其中靶蛋白结合至固定相的条件下, 将含靶蛋白的流动相上样至含 A 蛋白的固定相;

[0016] b. 施用 pH 在 4 至 8 之间的清洗缓冲液作为流动相, 其含有以下添加剂:

[0017] i. 精氨酸, 其浓度为 0.1-1mol/l,

[0018] ii. 氯化钠, 其浓度为 0.2 至 2mol/l,

[0019] iii. 选自异丙醇、正丙醇和乙醇的醇, 其浓度为 5-30% (w/v), 和

[0020] iv. 聚乙烯吡咯烷酮和 / 或去污剂, 其浓度为 0.05-2% (w/v);

[0021] c. 在其中靶蛋白从固定相洗脱的条件下, 使用洗脱缓冲液作为流动相。

[0022] 在另一方面中, 所述清洗缓冲液 pH 为 4.5 至 8。在另一方面中, 所述清洗缓冲液 pH 为 5 至 8。在另一方面中, 所述清洗缓冲液 pH 为 6 至 8。

[0023] 优选地, 所述精氨酸在所述清洗缓冲液中的浓度为 0.4-0.6mol/l, 特别是 0.5mol/l。所述氯化钠在所述清洗缓冲液中的浓度优选为 0.9-1.1mol/l, 特别是 1mol/l。在所述清洗缓冲液中所用的醇优选为异丙醇, 其浓度为 10-20% (v/v), 特别是 15% (v/v)。

[0024] 优选使用聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 其浓度为 0.1-2% (w/v), 特别是 0.25% (w/v)。此外 / 或者, 可使用聚氧乙烯-脱水山梨糖醇-单月桂酸酯 (Polysorbat 20, Polysorbat 80), 其浓度为 0.05-2% (w/v)。

[0025] 在另一方面中, 本发明涉及用于亲和性色谱的清洗缓冲液, 其 pH 为 4 至 8, 其包含:

[0026] i. 精氨酸, 其浓度为 0.1-1mol/l,

[0027] ii. 氯化钠, 其浓度为 0.2 至 2mol/l,

[0028] iii. 选自异丙醇、正丙醇和乙醇的醇, 其浓度为 5-30% (v/v), 和

[0029] iv. 聚乙烯吡咯烷酮或去污剂, 其浓度为 0.05-2% (w/v)。

#### 附图说明

[0030] 图 1 显示用不同组合和不同组成的清洗缓冲液清洗之后, 亲和性色谱的洗脱液中的产率 (1a)、混浊度 (1b)、单体含量 (1c) 和 HCP 的量 (1d), 以抗体 BI-MAb 06a 为例。X 轴的数值是指实施例中向清洗缓冲液中具体加入的添加剂。

[0031] 图 2 显示用不同组合和不同组成的清洗缓冲液清洗之后, 亲和性色谱的洗脱液中的产率 (2a), 混浊度 (2b), 单体含量 (2c) 和 HCP 的量 (2d), 以抗体 BI-MAb 1003a 为例。X 轴的数值是指实施例中向清洗缓冲液中具体加入的添加剂。

[0032] 图 3 比较了用不同组合和不同组成的清洗缓冲液清洗之后, 亲和性色谱的洗脱液中的 HCP 的量, 以抗体 BI-MAb 07c 为例。X 轴的数值是指实施例中向清洗缓冲液中具体加入的添加剂。

[0033] 图 4 比较了用不同组合和不同组成的清洗缓冲液清洗之后, 亲和性色谱的洗脱液中的 HCP 的量, 以抗体 BI-MAb 1001b 为例。X 轴的数值是指实施例中向清洗缓冲液中具体加入的添加剂。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明涉及去除杂质的方法, 具体为从细胞培养中得到的蛋白组合物中除去宿主细胞蛋白 (HOP) 和 DNA 的方法, 其中在所述细胞培养中重组地或内生地表达蛋白。具体地, 本发明涉及纯化或浓缩蛋白 (靶蛋白) 的方法, 所述靶蛋白通过配体的方式可逆地固定于固定相上, 且因此适于亲和性色谱。

[0036] 所述靶蛋白尤其可以是免疫球蛋白或含免疫球蛋白的 Fc 域且能结合至 A 蛋白的蛋白。在一个优选的实施方案中, 其为由免疫球蛋白重链和轻链各两条组成的免疫球蛋白。抗体由两条相同的重链 (H) 和两条相同的轻链 (L) 组成, 其通过共价二硫桥连接在一起形成 Y 形结构。所述轻链各由一个可变域和一个恒定域组成, 分别用 VL 和 CL 表示。另一方面, 所述重链根据免疫球蛋白的不同各具有一个可变域和三至四个恒定域, 其分别类似地称为 VH 和 CH1、CH2、CH3。轻链和重链的可变域形成抗原结合位点。CH2 域含形成补体系统结合位点的糖链。CH3 域含 Fc 受体结合位点。

[0037] A 蛋白通过与重链相互作用结合至免疫球蛋白的 Fc 域。对人 IgG1、IgG2 和 IgG2a 和鼠 IgG2b 的结合亲和性最高。其以中等的亲和性结合至人 IgM、IgA、IgE 以及鼠 IgG3 和 IgG1。

[0038] 然而, 其不与人 IgG3、IgD 或鼠免疫球蛋白 IgM、IgA 和 IgE 反应。

[0039] 本发明方法可适用的靶蛋白是所有那些具有 Fc 域的蛋白,例如免疫球蛋白。免疫球蛋白可为表达于杂交瘤细胞或重组宿主细胞中的多克隆或单克隆抗体。所述抗体可通过免疫动物特别是哺乳动物(包括转基因动物,例如表达人免疫球蛋白的小鼠)而原始制备。然而,合适的靶蛋白还包括融合蛋白,其中已将任何所需蛋白和免疫球蛋白的 Fc 域融合。

[0040] 出于本发明的目的的 A 蛋白基质为亲和性色谱基质,其含有固定的蛋白作为配体。它们包括含有野生型 A 蛋白作为配体的亲和性基质,所述野生型 A 蛋白例如来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。A 蛋白的描述尤其可见于:Lofdahl, S. 等人,1983 (Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist J (1983); Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera: J Immunol Methods 1983 Aug 12 ;62(1) :1-13.) 和 Lindmark 等人,1983 (Lindmark, R., Thoren-Tolling, K., Sjoquist J(1983); Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera: J Immunol Methods 1983 Aug 12 ;62(1) :1-13)。此外,本发明还涉及用重组方法所制备的 A 蛋白作为配体的基质。重组 A 蛋白例如公开于 Duggleby C. J. 和 Jones, S. A., 1983 (Duggleby, C. J. and Jones, S. A. (1983), Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* protein A gene in *Escherichia coli*. Nucl. Acid. Res. 1983 May 25 ;11(10) :3065-76) 或 Li, R. 等人,1998 (Li, R. Dowd, V., Stewart, D. J., Burton, S. J. Lowe, C. R., Design, Synthesis and application of a protein A mimetic. Nat. Biotechnol. 1998 Feb ;16(2) :190-5) 中,且为本领域所已知。

[0041] 所述 A 蛋白可偶联至多种载体材料,例如琼脂糖、多糖、葡聚糖、硅胶和玻璃珠。合适的载体材料的非限定性清单可见于 Harlow, E. 和 Lane, D. 1999。一种由基于琼脂糖的材料形成的载体材料是常用的,即本领域技术人员公知的由 Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden 生产的“琼脂糖凝胶 (sepharoses)”。A 蛋白琼脂糖凝胶的具体实例可见于该公司于 2001 年编写的主题为“Affinity Chromatography”的手册。另外,其他 A 蛋白色谱基质是本领域技术人员已知的,例如 MabSelect (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、STREAMLINE™ rProtein A (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、Poros A (Millipore, Durham, England)。本发明的方法包括用相应基质处理,所述基质的清单通过例示的方式给出,而并非穷举。

[0042] 配体的偶联通常通过将游离氨基、羧基或巯基经溴化氰活化、NHS 活化或者将硫醇偶联至所述载体基质而进行。关于这一主题,参考例如“Affinity Chromatography”手册, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, 2001。

[0043] 在特别优选的实施方案中,将聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, 也已知为聚乙烯吡咯酮或聚乙烯酮, CAS :9003-39-8) 用于本发明的清洗缓冲液中。聚乙烯吡咯烷酮为由 N- 乙烯基吡咯烷酮单体单元组成的水溶性聚合物。然而,其也可溶解于其他极性溶剂中。PVP 为吸湿性无定形粉末,其为白色至淡黄色。标准市售聚合物具有约 2500 至 2,500,000 道尔顿的摩尔质量。

[0044] 在本发明的清洗缓冲液中除 PVP 外还可使用去污剂,或使用去污剂代替 PVP。去污剂为表面活性剂和两亲性分子,其可形成胶束,即去污剂分子的聚集物,其中亲水性头部向外朝向水性溶剂。

[0045] 用于本发明目的的去污剂为非离子性和离子性物质。然而,优选非离子性去污剂,

例如聚乙二醇醚（型号 NP-40, Tergitol NP40, CAS :127087-87-0）、PEG-烷基醚聚氧乙烯(23)月桂基醚(CAS :9002-92-0)、PEG-脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇-单月桂酸酯(Polysorbat 20, CAS :9005-64-5)或聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇-单油酸酯(Polysorbat 80, CAS :9005-65-6)、烷基苯基-PEG-醚,例如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton-X-100, CAS :9002-93-1)或PEO-PP0嵌段共聚物(Poloxamer 衍生物),例如聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物(Pluronic F 68, Lutrol F 68, Poloxamer188, CAS :9003-11-6 或 Poloxamer 407, Pluronic F 127, Lutrol F 127, CAS :9003-11-6)。

[0046] 清洗和洗脱缓冲液的 pH 值取决于整体系统,且因此通常针对各系统独立地确定和优化。

[0047] 在一个方面中,所述清洗缓冲液 pH 为 4 至 8。本领域技术人员熟知,蛋白在何种 pH 下从柱上洗脱下来取决于很多因素。这些因素尤其可包括在结合、清洗和洗脱中所用的缓冲液系统、杂质的存在、基质颗粒的几何形状、亲和性配体偶合至色谱基质的性质。特别是蛋白的特异性具有决定性影响。

[0048] 在一些情况下,可能存在以下组合,其使所述蛋白从亲和性配体部分或全部洗脱甚至可以在 pH 大于 4 时发生。这种情况下,且若损失蛋白是不可接受的,那么所述清洗缓冲液必须具有更高的 pH。本领域技术人员清楚,在这种情况下必须相应调节所述清洗缓冲液的 pH。然而在更多的情况下,蛋白和 A 蛋白亲和性配体之间的结合将仅在 pH 低于 4 的情况下解除。

[0049] 在另一方面中,所述清洗缓冲液 pH 为 4.5 至 8。在另一方面中,所述清洗缓冲液 pH 为 5 至 8。在另一方面中,所述清洗缓冲液 pH 为 6 至 8。

[0050] 在一个典型的实施方案中,本发明可按如下进行,例如:

[0051] A 蛋白色谱通常是第一个纯化步骤。可直接将不含细胞的细胞培养上清液加入柱中,或首先可通过超滤膜(所谓的 UF/DF 系统)制备浓缩液。

[0052] 所述 A 蛋白柱首先用磷酸盐缓冲液(PBS)平衡,其在物理化学性质上大致与装柱液(charging pool)相一致。所述装柱液由来自细胞培养物的上清液组成,所述细胞培养物含待纯化的产物以及所讨论的哺乳动物细胞(例如 CHO 或 NS0 细胞)生长所必需的其他介质成分。将所述来自细胞培养物的不含细胞的上清液或其浓缩物装至所述 A 蛋白柱上。然后将所述靶蛋白结合至柱上的 A 蛋白结合位点。然后用平衡缓冲液冲洗该柱,直到未结合的介质成分和细胞产物被洗脱。可在平衡缓冲液之后加入或在装柱之后直接加入所公开的清洗缓冲液。清洗缓冲液的量取决于规模,且因此其以相应于色谱柱尺寸的量给出。

[0053] 通常,清洗缓冲液的体积为色谱柱体积的大约 2 至 5 倍(2-5 柱床体积(BV))。加入所述清洗缓冲液后,该柱可再次用平衡缓冲液或用另一缓冲液处理,使得所述清洗缓冲液的任何成分均不随产物洗脱出来。本文所用的缓冲液必须具有低于所述清洗缓冲液但高于洗脱缓冲液的 pH,且该 pH 类似于缓冲盐和组合物中洗脱缓冲液的 pH。将 pH 低于 4 的缓冲液用于洗脱,且该缓冲液可例如含有乙酸盐或柠檬酸盐作为其主要成分。洗脱缓冲液可含有乙酸盐,其浓度为 10mM 至 200mM,优选 20mM 至 100mM,最优选 50mM 至 100mM;或可含有柠檬酸盐,其浓度为 10 至 200mM,优选 20 至 100mM。两种缓冲液的 pH 应在上述 pH 范围内,即低于 4,优选 3 至 4,特别优选 3.4 至 3.6。另外,还可存在添加剂,例如精氨酸或 PVP。此外,可使用甘氨酸缓冲液,其浓度为 10 至 200mM,优选 25 至 100mM,其 pH 为 2 至 3.5;或可

使用适于减少抗体的 Fc 域和所述 A 蛋白结合的其他缓冲液。然后可以用以下方法再对所述洗脱液进行后处理,例如中和或在低 pH 下培育。

## 实施例

[0054] 可用来自不同细胞系 (CHO 和 NSO) 的多种蛋白进行实验,所述细胞系在不同基质中发酵,且其 Fc 部分属于不同 IgG 亚型 (IgG1、IgG2、IgG4)。

[0055] 进行起始于标准品的试验系列,其中仅改变所述清洗缓冲液。或者引入不含任一添加剂的平衡缓冲液,使用只含一种添加剂的清洗缓冲液,依次加入若干种不同的各含一种添加剂的缓冲液,或者使用含若干种添加剂的组的清洗缓冲液。

[0056] 所施用的蛋白溶液总是与各自的蛋白相同。

[0057] 在各试验中测量了所述洗脱液中的杂质。通过在这些实验之间进行比较,确定了使所述洗脱液中具有最小可能量的各杂质的清洗缓冲液。在一些实验中也测量了产率、混浊度和单体含量。

[0058] 色谱

[0059] 使用自动化 ÄKTA -FPLC Model 900 系统 (GE Healthcare) 进行色谱实验。将四种不同产物用于该实验。所述产物中,将不含细胞的培养上清液或浓缩的培养上清液用作起始原料,用 50kD Omega 膜 (Pa11) 将该制品浓缩 10 倍,然后用 PBS 渗滤 3 次。

[0060] 所用的柱体积为 1ml 至 8ml,且含有 MabSelect 或 MabSelect Xtra (GE Healthcare) 中的一种色谱凝胶。

[0061] 缓冲液

[0062] 在所有实验中,将含 10mM 磷酸盐、5mM 氯化钾和 140mM 氯化钠的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 用作平衡缓冲液。

[0063] 所有所述清洗缓冲液均基于含有以下的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) :

[0064] 8mmol/L 磷酸一氢钠 (sodium monohydrogen phosphate),

[0065] 1.5mmol/L 磷酸氢钾 (potassium hydrogen phosphate),

[0066] 2.7mM 氯化钾,和

[0067] 140mM 氯化钠。

[0068] 将以下物质单独或以多种组合 (如图中所指出) 用作添加剂 :

[0069] (1) 860mmol/L 氯化钠 (总含量 1mol/L 氯化钠)

[0070] (2) 0.25%(w/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)

[0071] (3) 15%(V/V) 异丙醇

[0072] (4) 0.5mol/L 的 L-精氨酸

[0073] 对于洗脱,根据产物的不同使用不同的缓冲液,其具有不同的乙酸盐浓度和 pH。使用以下浓度 :

[0074] BI-Mab 06a :100mM 乙酸盐, pH 3.4

[0075] BI-Mab 1003a :50mM 乙酸盐, pH 3.4

[0076] BI-Mab 1001b :50mM 乙酸盐, pH 3.4

[0077] BI-Mab 07c :50mM 乙酸盐, pH 3.6

[0078] 分析



- [0079] 比较这些实验的洗脱液中的杂质含量,并确定产率。
- [0080] 为确定细胞成分的量,使用普通的夹心式 ELISA,且宿主细胞蛋白作为经验参数进行测定。对于该分析,使用多克隆检测抗体。
- [0081] 单体含量使用 Agilent Series HPLC 1200(Waters) 系统确定,且根据蛋白选用 TSK 3000SW 或 TSK 3000SWXL 柱 (TosoH)。该等梯度方法用 pH 7.0 的 Tris 缓冲液以 1ml/分钟的流速进行操作。
- [0082] 通过阈方法测定 DNA(Kung, V. T. 等人, Picogram Quantitation of Total DNA Using DNA-Binding Proteins in a Silicon Sensor-Based System, Anal. Biochem. 1990, 187, 220-227)。
- [0083] 使用 Phast 系统 (GE Healthcare) 进行 SDS-PAGE。使用 Phast SDS 凝胶 (4%-15%, GE) 分离样品。使用 Heukeshoven 银染法进行染色 (Heukeshoven, Dernick 1988, Electrophoresis 9(1), 第 28-32 页)。
- [0084] 为了测定上柱和洗脱液中抗体的量,使用 PA 2-1001-00A 蛋白柱 (Applied BioSystems) 和 Agilent Series 1200HPLC 系统 (Waters)。在 PBS 缓冲液系统中经 pH 7.4 至 pH 2.8 的梯度进行结合和洗脱,使用外部校正曲线来评估所测抗体。
- [0085] 用生产商的混浊度标准校正后,用 2100AN Turbidimeter (Hach) 测量混浊度。
- [0086] 结果
- [0087] 用 IgG1 亚型抗体 BI-MAb 06a 进行实验
- [0088] 结果显示所述清洗对产率、单体、混浊度和宿主细胞蛋白 (HCP) 具有显著作用。
- [0089] 在产率、单体含量和 HCP 去除的质量标准中,在用含全部四种添加剂的缓冲液清洗之后,所述洗脱液显示了最佳的数值。另外,添加剂的组合,无论是 0.86mol/L 氯化钠、0.25%(w/V) PVP 和 15%(V/V) 异丙醇的三种成分的组合,还是全部四种添加剂 0.86mol/L 氯化钠、0.25%(w/V) PVP、15%(V/V) 异丙醇和 0.5mol/L 精氨酸的组合,均使得混浊度大幅下降。
- [0090] 用 IgG1 亚型抗体 BI-MAb 1003a 进行实验
- [0091] 最佳的 HCP 去除通过含全部四种添加成分的清洗缓冲液实现。类似地,含氯化钠、PVP 和异丙醇的组的清洗缓冲液也得到了较好的值。用单独含有四种成分之一的缓冲液清洗,得到了较多的 HCP。
- [0092] 混浊度的结果也是如此,缓冲液中所述清洗物质的组合得到较好的结果。
- [0093] 用 IgG4 亚型抗体 BI-MAb 07c 进行实验
- [0094] 与来自组合的清洗缓冲液的试验的洗脱液相比,来自单一清洗缓冲液的试验的洗脱液含有更高浓度的 HCP。
- [0095] 用 IgG2 亚型抗体 BI-MAb 1001b 进行实验
- [0096] 与来自组合的清洗缓冲液的试验的洗脱液相比,来自单一清洗缓冲液的试验的洗脱液含有更高浓度的 HCP。
- [0097] 这四个实验显示,将四种添加剂(氯化钠、PVP、异丙醇和精氨酸)组合于单一清洗缓冲液中,具有超越单独使用添加剂的清洗缓冲液的优势,所述优势体现在洗脱液中宿主细胞蛋白 (HCP) 的含量上。
- [0098] 所公开的清洗缓冲液的使用也显示,洗脱液的混浊度显著地下降。单体的量和产

率也增加 (BI-MAb 06a), 或至少保持在相同的水平 (BI-MAb 1003a)。

[0099] 所公开的清洗缓冲液因此适于显著改进蛋白的生产方法。清洗缓冲液组合的引入去除了可能需要另外的纯化步骤才能除去的杂质。

### 通过多种清洗缓冲液除去 HCP (BI-MAb 06a)

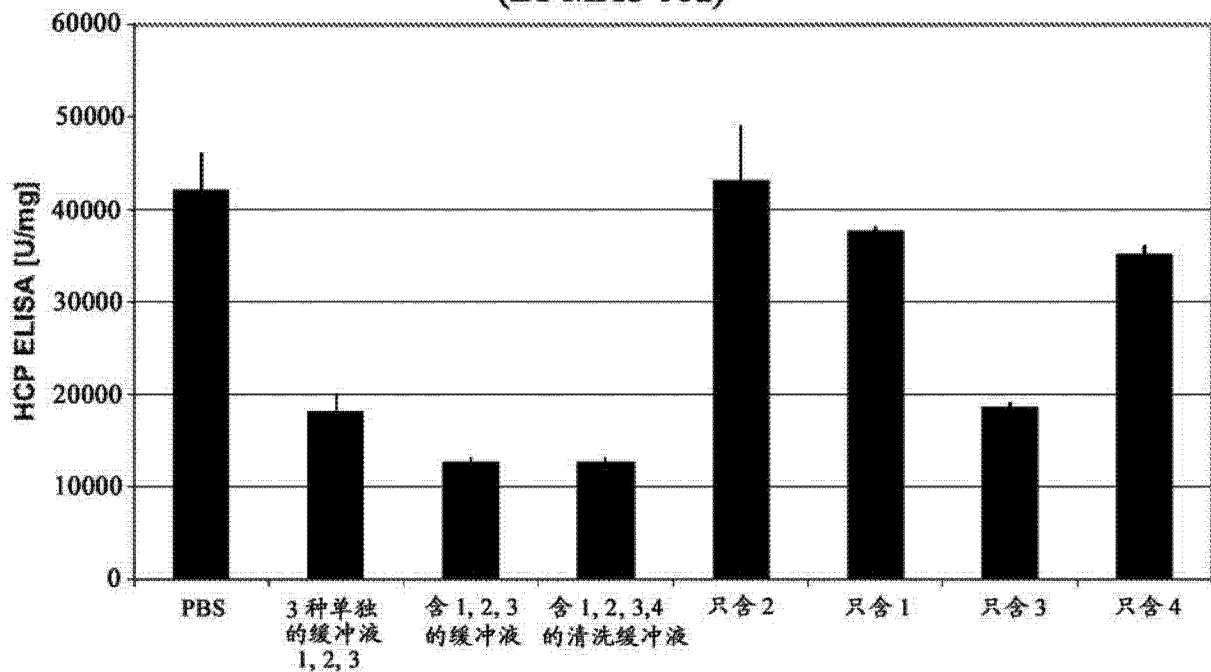


图 1a

### 多种清洗缓冲液的洗脱液中的产率 (BI-MAb 06a)

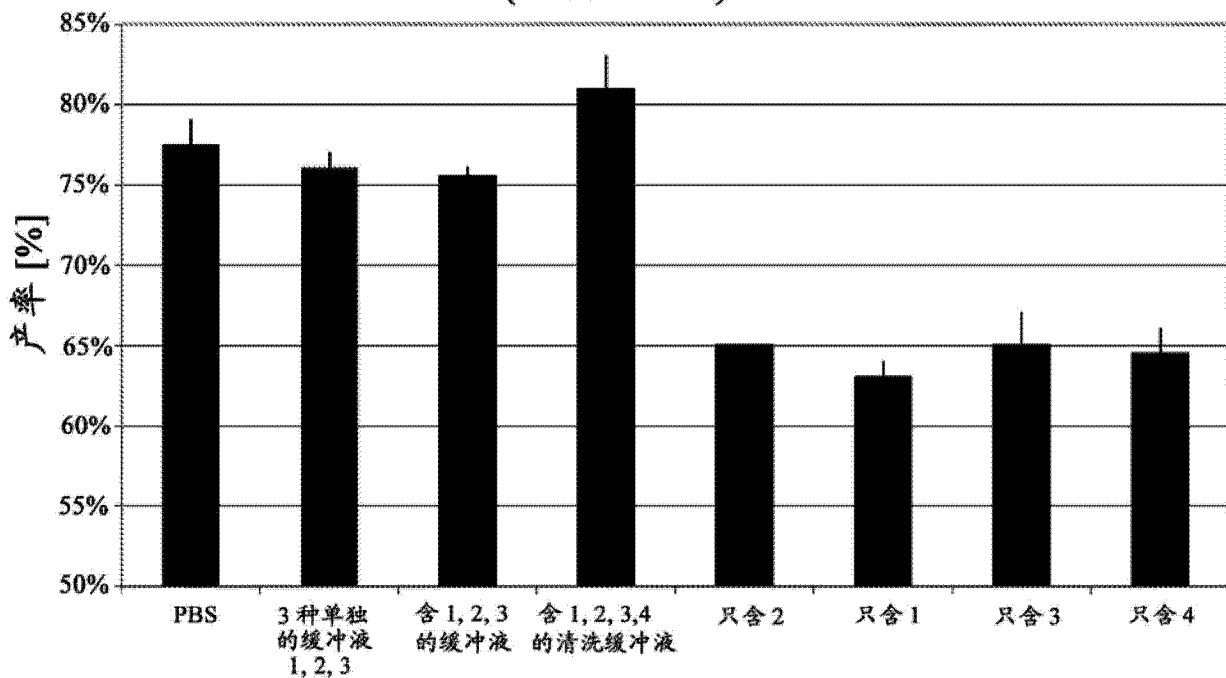


图 1b

多种清洗缓冲液的洗脱液中的混浊度  
(BI-MAb 06a)

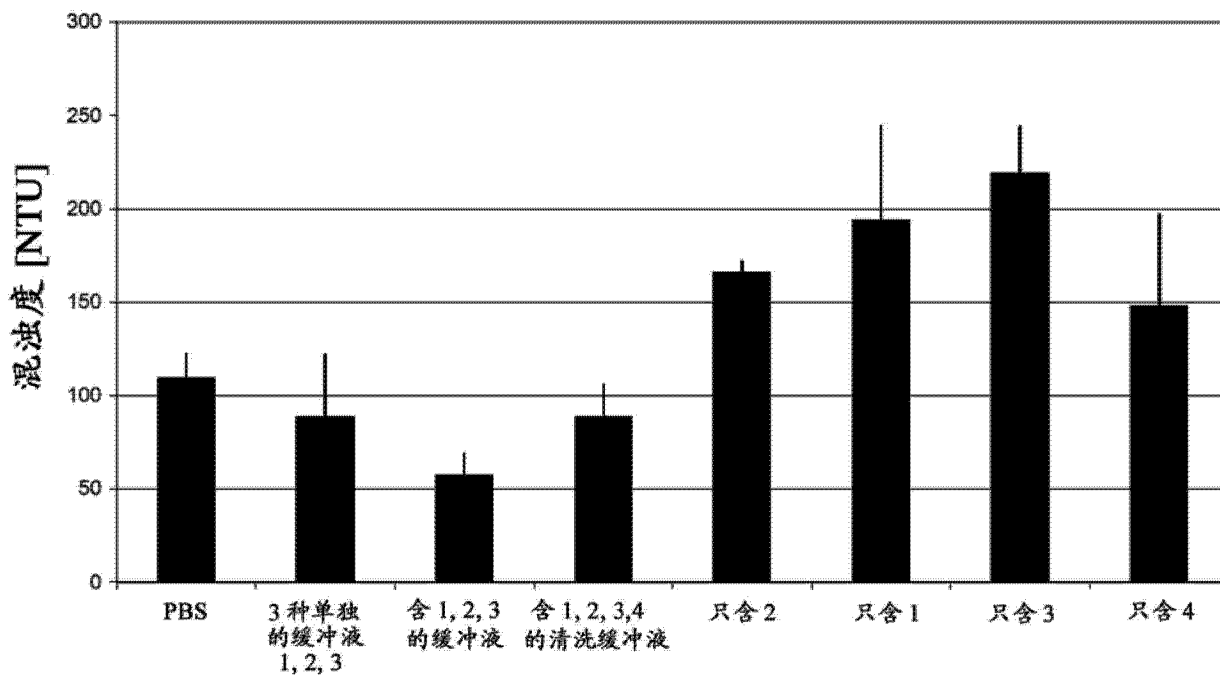


图 1c

多种清洗缓冲液的洗脱液中的单体含量  
(BI-MAb 06a)

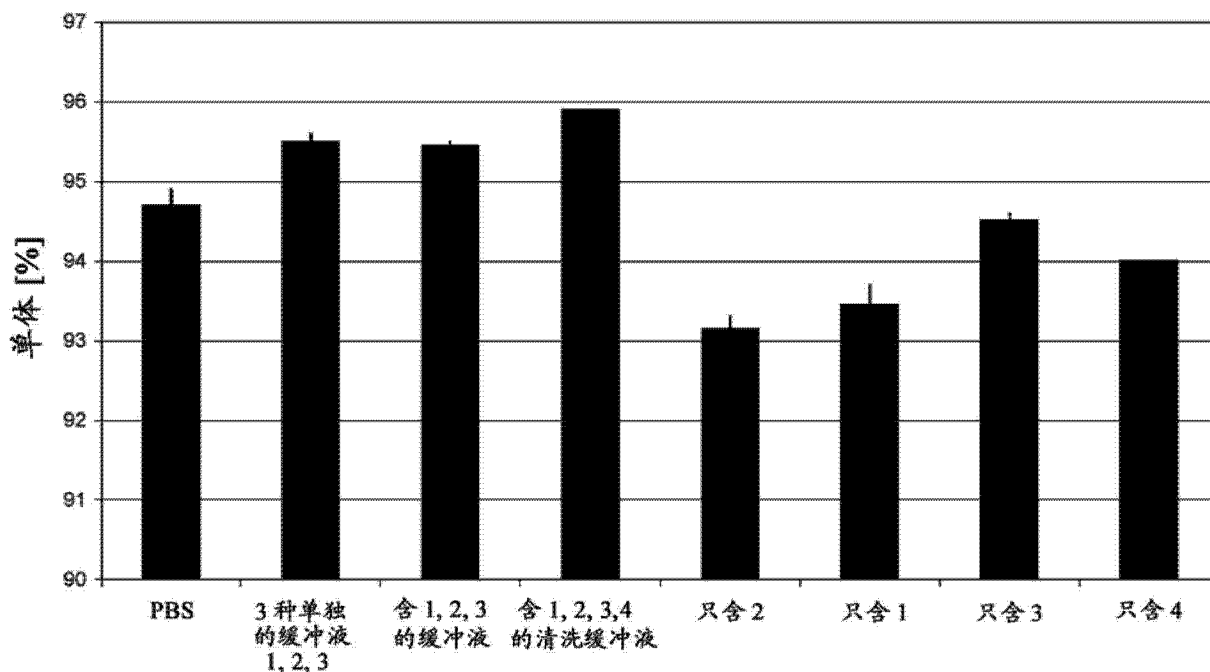


图 1d

多种清洗缓冲液的洗脱液中的混浊度  
(BI-MAb 1003a)

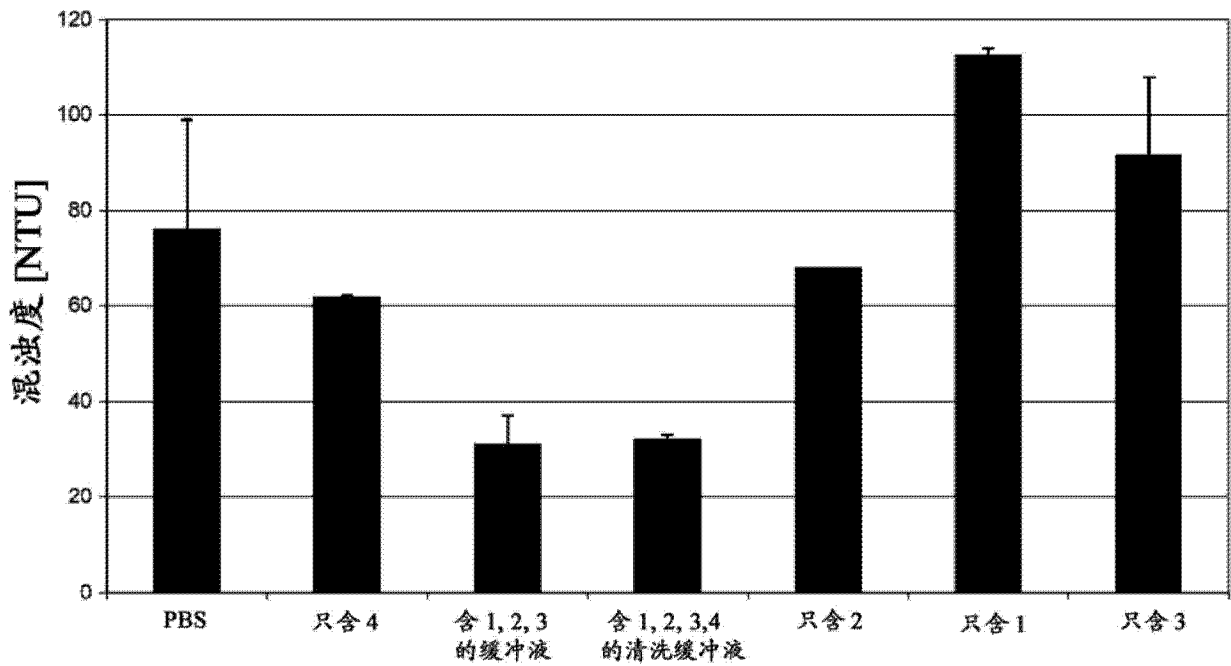


图 2a

通过多种清洗缓冲液去除 HCP  
(BI-MAb 1003a)

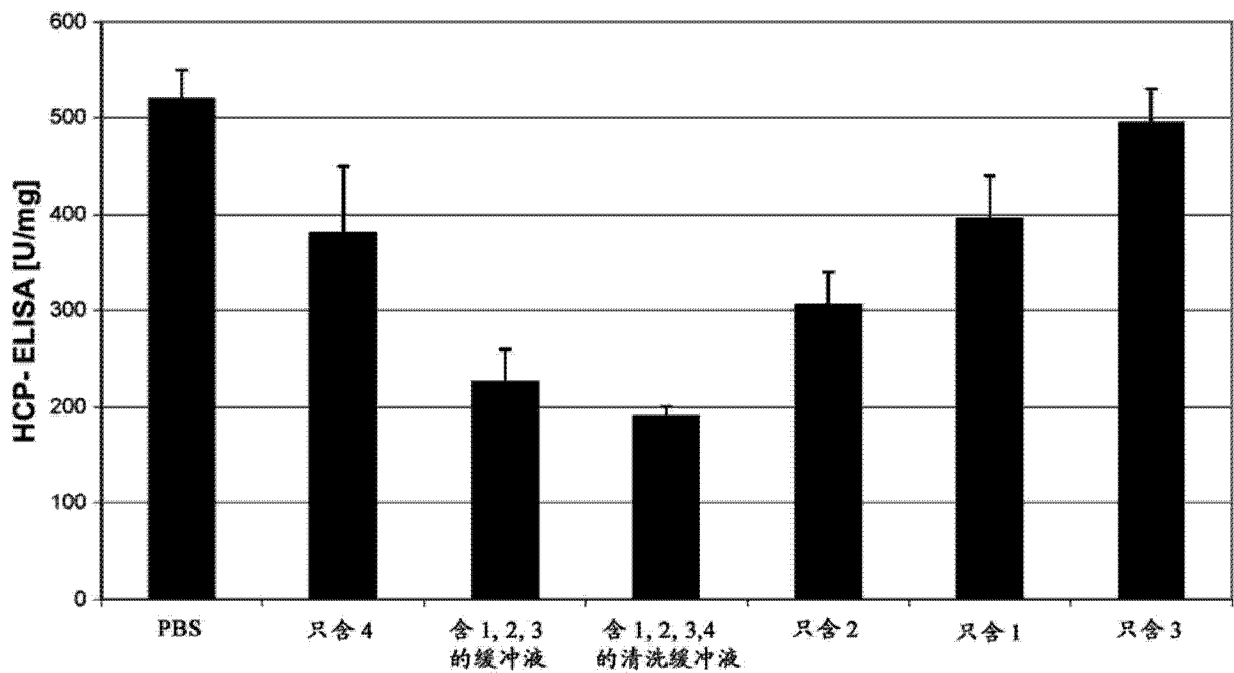


图 2b

多种清洗缓冲液的洗脱液中的单体含量  
(BI-MAb 1003a)

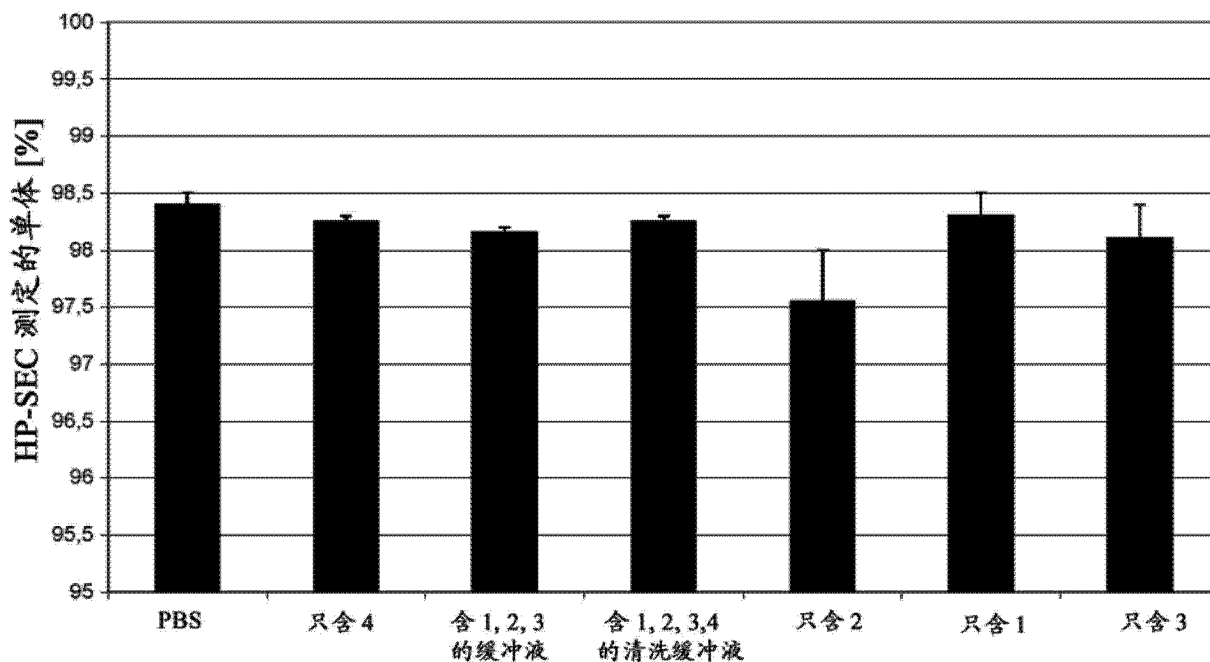


图 2c

多种清洗缓冲液所得的产率  
(BI-MAb 1003a)

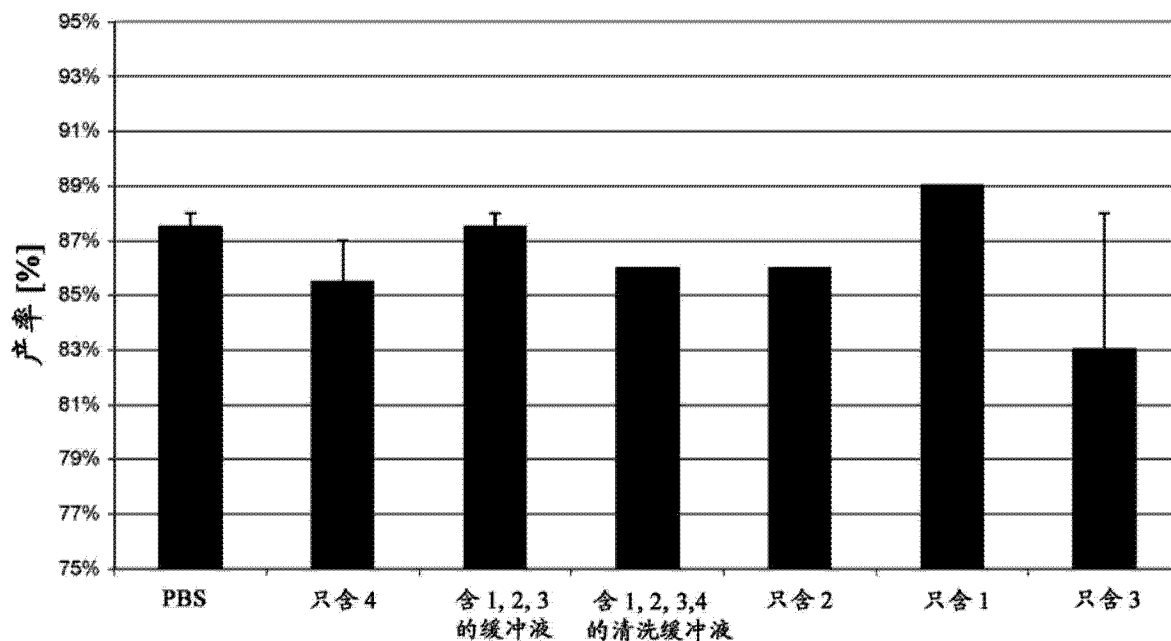


图 2d

通过多种清洗缓冲液去除 HCP  
(BI-MAb 07c)

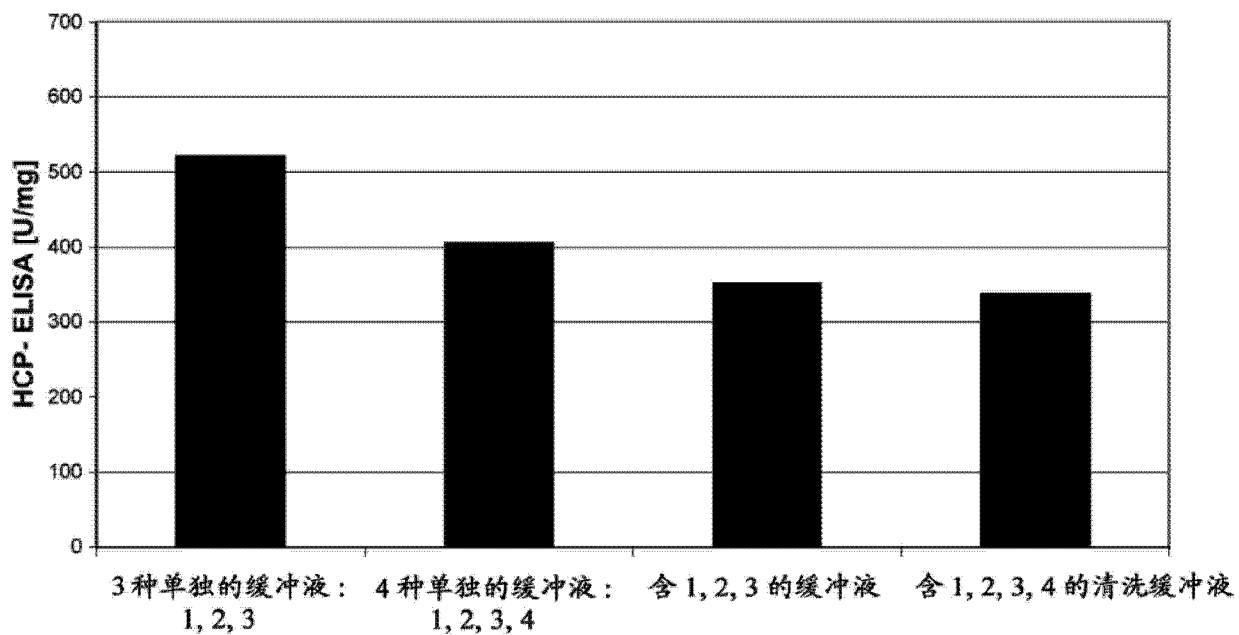


图 3

通过多种清洗缓冲液去除 HCP  
(BI-MAb 1001b)

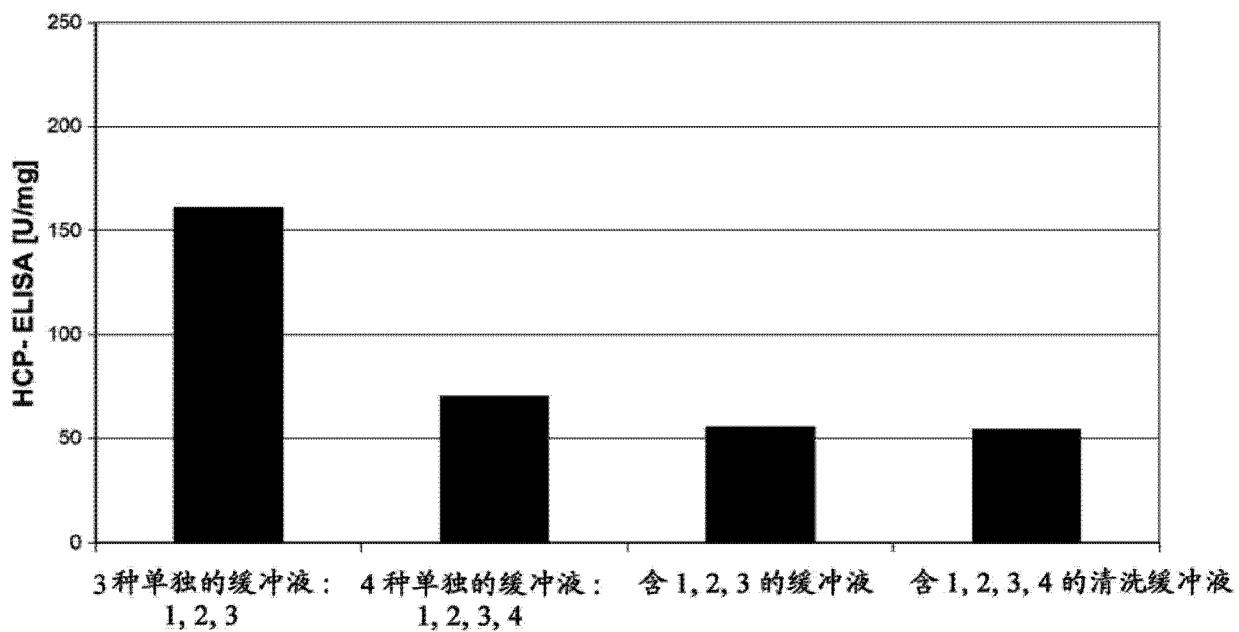


图 4