



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712691 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080044790. 3

C07K 1/34 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 06

C07K 1/36 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/231, 811 2009. 08. 06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/044760 2010. 08. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02011/031397 EN 2011. 03. 17

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·梅塔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 16/06 (2006. 01)

C07K 1/18 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 4 页

(54) 发明名称

蛋白质纯化中提高病毒去除的方法

(57) 摘要

本发明涉及蛋白质纯化领域。特别是本发明涉及通过在预过滤工艺中组合使用内毒素去除和阳离子交换基质,增加病毒滤器的过滤容量的方法。

1. 在蛋白质纯化过程中改善病毒滤器过滤容量的方法,包括在通过所述病毒滤器前,同时或以任意顺序使待纯化的包含蛋白质的组合物进行阳离子交换步骤和内毒素去除步骤。

2. 权利要求 1 的方法,其中病毒滤器的孔径在直径约 15 和约 100nm 之间。

3. 权利要求 2 的方法,其中病毒滤器的孔径在直径约 15 和约 30nm 之间。

4. 权利要求 3 的方法,其中病毒滤器的孔径是约 20nm。

5. 权利要求 3 或权利要求 4 的方法,其中待去除的病毒是细小病毒。

6. 权利要求 5 的方法,其中细小病毒的直径在约 18 和约 26nm 之间。

7. 权利要求 1 的方法,其中蛋白质是抗体或抗体片段。

8. 权利要求 7 的方法,其中蛋白质是重组抗体或抗体片段。

9. 权利要求 8 的方法,其中重组抗体或抗体片段是在哺乳动物宿主细胞中生产的。

10. 权利要求 9 的方法,其中哺乳动物宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

11. 权利要求 1 的方法,其中待纯化的包含蛋白质的组合物在病毒过滤前,首先进行阳离子交换步骤,再进行内毒素去除步骤。

12. 权利要求 1 的方法,其中待纯化的包含蛋白质的组合物在病毒过滤前,首先进行内毒素去除步骤,再进行阳离子交换步骤。

13. 权利要求 1 的方法,其中待纯化的包含蛋白质的组合物在病毒过滤前,同步进行内毒素去除步骤和阳离子交换步骤。

14. 权利要求 11 的方法,其中在所述内毒素去除步骤后直接进行病毒过滤。

15. 权利要求 12 的方法,其中在所述阳离子交换步骤后直接进行病毒过滤。

16. 权利要求 13 的方法,其中在所述同步的内毒素去除和阳离子交换步骤后直接进行病毒过滤。

17. 权利要求 1 的方法,其中在约 4 和约 10 之间的 pH 下实施病毒过滤。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述组合物中的蛋白质浓度是约 1-40g/L。

19. 权利要求 8 的方法,其中所述抗体针对选自 HER1 (EGFR)、HER2、HER3、HER4、VEGF、CD20、CD22、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4、VCAM、IL-17A 和 / 或 F、IgE、DR5、CD40、Apo2L/TRAIL、EGFL7、NRP1、促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 和因子 D 的一种或多种抗原。

20. 权利要求 8 的方法,其中抗体选自抗雌激素受体抗体、抗孕酮受体抗体、抗 p53 抗体、抗组织蛋白酶 D 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 E- 钙黏着蛋白抗体、抗 CA125 抗体、抗 CA15-3 抗体、抗 CA19-9 抗体、抗 c-erbB-2 抗体、抗 P- 糖蛋白抗体、抗 CEA 抗体、抗成视网膜细胞瘤蛋白抗体、抗 ras 癌基因蛋白质抗体、抗 Lewis X 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗 PCNA 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD5 抗体、抗 CD7 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD9/p24 抗体、抗 CD10 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD13 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD15 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD31 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD34 抗体、抗 CD35 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD41 抗体、抗 LCA/CD45 抗体、抗 CD45R0 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CD39 抗体、抗 CD100 抗体、抗 CD95/Fas 抗体、抗 CD99 抗体、抗 CD106 抗体、抗泛素抗体、抗 CD71 抗体、抗 c-myc 抗体、抗细胞角蛋白抗体、抗波形蛋白抗体、抗 HPV 蛋白抗体、抗 κ 轻链抗体、抗 λ 轻链抗体、抗黑素体抗体、抗前列腺特异性抗原抗体、抗 S-100 抗体、抗 tau 抗原抗体、抗纤维蛋白抗体、抗角蛋白抗体和抗 Tn- 抗原抗体。

蛋白质纯化中提高病毒去除的方法

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明属于蛋白质纯化的领域。特别是本发明涉及通过在预过滤工艺中组合使用内毒素去除和阳离子交换基质,增加病毒滤器的过滤容量的方法。

[0003] 相关技术的描述

[0004] 由于能够进行正确的蛋白质折叠和翻译后修饰(例如糖基化(Chu 和 Robinson Current Opinion in Biotechnology 12:180 - 187, 2001))的能力,哺乳动物细胞系已成为重组蛋白质生产技术的主要选择。然而,也已知这些细胞系含有逆转录病毒样颗粒(Lieber 等人, Science 182:56 - 59, 1973; Lubiniecki 等人, Dev Biol Stand 70:187 - 191, 1989), 并存在潜在的外来病毒污染的风险(Garnick, Dev Biol Stand. Basel:Karger 93:21 - 29, 1998)。虽然生物制药产业生产的重组蛋白质药物具有良好的安全性记录,但是也有由血液和源自血浆的血液产品造成的病毒感染发生(Brown, Dev. Biol. Stand. 81, 1993; Thomas, Lancet 343:1583-1584, 1994)。为了减少在重组蛋白质生产过程中病毒污染的风险,设计下游的纯化工艺包括去除内源性和外来病毒的加工步骤。通过若干提供从原料流(process feed stream)中失活病毒或去除病毒的加工步骤的组合,获得充分的病毒清除。使用例如在低 pH 下孵育、热和去垢剂处理的技术实现病毒失活,同时通常使用层析和过滤实施病毒去除(Curtis 等人, Biotechnology and Bioengineering 84(2):179 - 186, 2003)。

[0005] 与基于物理化学性质(例如净电荷)去除病毒的层析基质不同,病毒过滤通过尺寸排阻去除病毒,因此被认为是更强效的技术。迄今为止,在源自哺乳动物细胞培养物的生物治疗剂的下游纯化过程中使用病毒过滤限于去除逆转录病毒(80-100nm 直径),这是因为缺少标称孔径小于 60nm 的高通量膜的结果。

[0006] 近期在膜技术中的进步使得能够生产标称孔径 20nm 的高通量膜。这些病毒滤器滞留细小病毒(18-26nm 直径),允许通过大至 160kD 的蛋白质(~8nm),例如单克隆抗体(mAb)。

[0007] 高选择性和高通量的细小病毒滤器是通过在微孔底物上覆盖一层薄的滞留膜层获得的。该薄的滞留层允许非常精细的分离蛋白质和病毒,但也易于被加工原料流中的杂质结垢,导致较低的过滤容量和流动。病毒滤器结垢归因于污染物,例如蛋白质聚集体和变性的蛋白质。Bohonak 和 Zydney (Bohonak and Zydney, Journal of Membrane Science 254(1-2):71-79, 2005) 展示了滤器容量的丧失可能是由于滤饼形成或孔阻塞。其他近期的报道(Bolton 等人, Biotechnol. Appl. Biochem. 43:55-63, 2006; Levy 等人, Filtration in the Biopharmaceutical Industry. (Meltzer, T. H. 和 Jornitz, M. W. 编著) 第 619-646 页, Marcel Dekker, New York, 1998) 将滤器结垢的可能原因归因于孔壁对杂质的吸附。一些出版物(Bolton 等人, Biotechnology and Applied Biochemistry 42:133-142, 2005; Hirasaki 等人, Polymer Journal 26(11):1244-1256, 1994; Omar 和 Kempf, Transfusion 42(8):1005-1010, 2002) 也证实过滤容量的降低或孔的堵塞可以使病

毒滞留减少若干数量级,影响单位操作的耐用性(robustness)。

[0008] 因而,大量的近期研究关注了鉴别预滤器(pre-filter),所述预滤器用于从加工原料流中去除污垢以最小化病毒滤器的污垢和保证高容量、高通量和耐用的病毒滞留。Bolton 等人(Bolton 等人,2006)实施了充分的研究,涉及测试若干种膜作为预滤器,并证实使用 Viresolve™ 深度滤膜作为预滤器,能够使正常流量的细小病毒(NFP)膜的容量增加几乎一个数量级。Brown 等人(Brown 等人,2008, Use of Charged Membranes to Identify Soluble Protein Foulants in order to Facilitate Parvovirus Filtration. IBC's 20th Antibody Development and Production, San Diego, CA)评估了强阳离子交换膜吸附剂作为细小病毒滞留过滤器的预滤器,并展示了可以使 11 种不同的 mAb 流的病毒过滤容量增加若干倍。作者假设阳离子交换膜吸附剂通过竞争性吸附,从原料流中去除了大分子量(~600-1500kD)的蛋白质聚集物,阻止病毒滤器堵塞。美国专利号 7,118,675 (Siwak 等人)描述了这样的工艺,所述工艺利用电荷修饰的膜从蛋白质溶液中去除蛋白质聚集物,防止病毒滤器结垢。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明是基于,至少部分地基于这样的实验发现,即细小病毒滤器的结垢可以由除文献提及以外的杂质导致的,需要更综合的预过滤溶液来改善病毒过滤容量。因此,本发明提供了新的预过滤溶液,其性能显著优于文献中提及的最佳预过滤方法(阳离子交换膜吸附剂)。

[0011] 在一个方面,本发明涉及在蛋白质纯化过程中改善病毒滤器过滤容量的方法,包括在通过所述病毒滤器前,以任意顺序对包含待纯化的蛋白质的组合物进行阳离子交换步骤和内毒素去除步骤。

[0012] 在一个实施方案中,病毒滤器的孔径在约 15 和约 100nm 直径之间。

[0013] 在另一个实施方案中,病毒滤器的孔径在约 15 和约 30nm 直径之间。

[0014] 在仍然另一个实施方案中,病毒滤器的孔径是约 20nm。

[0015] 在进一步的实施方案中,待去除的病毒是细小病毒。

[0016] 在仍然进一步的实施方案中,细小病毒的直径在约 18 和约 26nm 之间。

[0017] 在不同的实施方案中,蛋白质是抗体或抗体片段,例如通过重组 DNA 技术生产的抗体,或其片段。

[0018] 在另一个实施方案中,抗体是治疗性抗体。

[0019] 在仍然另一个实施方案中,重组抗体或抗体片段是在哺乳动物宿主细胞中生产的,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0020] 在进一步的实施方案中,待纯化的包含蛋白质的组合物在病毒过滤前,首先进行阳离子交换步骤,再进行内毒素去除步骤。

[0021] 在仍然进一步的实施方案中,包含待纯化的蛋白质的组合物在病毒过滤前,首先进行内毒素去除步骤,再进行阳离子交换步骤。

[0022] 在另一个实施方案中,包含待纯化的蛋白质的组合物在病毒过滤前,同时进行阳离子交换步骤和内毒素去除步骤,将两种介质共同保持在单个模块中。

[0023] 在仍然另一个实施方案中,在内毒素去除步骤后直接进行病毒过滤。

[0024] 在进一步的实施方案中,在阳离子交换步骤后直接进行病毒过滤。

[0025] 在不同的实施方案中,在约 4 和约 10 之间的 pH 下实施病毒过滤。

[0026] 在另一个实施方案中,在待纯化的组合物中的蛋白质浓度是约 1-40g/L。

[0027] 在仍然另一个实施方案中,待纯化的抗体是针对选自 HER1 (EGFR)、HER2、HER3、HER4、VEGF、CD20、CD22、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4、VCAM、IL-17A 和 / 或 F、IgE、DR5、CD40、Apo2L/TRAIL、EGFL7、NRP1、促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 和因子 D 的一种或多种抗原的。

[0028] 在进一步的实施方案中,抗体选自抗雌激素受体抗体、抗孕酮受体抗体、抗 p53 抗体、抗组织蛋白酶 D 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 E- 钙黏着蛋白抗体、抗 CA125 抗体、抗 CA15-3 抗体、抗 CA19-9 抗体、抗 c-erbB-2 抗体、抗 P- 糖蛋白抗体、抗 CEA 抗体、抗成视网膜细胞瘤蛋白抗体、抗 ras 癌基因蛋白质抗体、抗 Lewis X 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗 PCNA 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD5 抗体、抗 CD7 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD9/p24 抗体、抗 CD10 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD13 抗体、抗 CD14 抗体、抗 CD15 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD31 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD34 抗体、抗 CD35 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD41 抗体、抗 LCA/CD45 抗体、抗 CD45RO 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CD39 抗体、抗 CD100 抗体、抗 CD95/Fas 抗体、抗 CD99 抗体、抗 CD106 抗体、抗泛素抗体、抗 CD71 抗体、抗 c-myc 抗体、抗细胞角蛋白抗体、抗波形蛋白抗体、抗 HPV 蛋白抗体、抗 κ 轻链抗体、抗 λ 轻链抗体、抗黑素体抗体、抗前列腺特异性抗原抗体、抗 S-100 抗体、抗 tau 抗原抗体、抗纤维蛋白抗体、抗角蛋白抗体和抗 Tn- 抗原抗体。

附图简介

[0029] 图 1 :用于病毒过滤研究的实验设置的示意图。

[0030] 图 2 :无菌和深度滤膜对 Viresolve Pro 细小病毒滞留滤器的容量的效应。实验是在 pH5.5 和 8.5mS/cm 电导下实施的。mAb 浓度是约 13g/L。

[0031] 图 3(a)和(b):阳离子交换和内毒素去除膜吸附剂作为预滤器,对 Viresolve Pro 细小病毒滤器的容量的效应。3(a)和 3(b)中的数据是用 mAb1 分别在 pH5.0 和 6.5 下产生的。

[0032] 图 4(a)和(b):同时包含阳离子交换和内毒素去除膜吸附剂的新型预过滤链,对 Viresolve Pro 细小病毒滞留滤器的容量的效应。4(a)和 4(b)中的数据分别是在 pH5.0 和 6.5 下用 MAb1 产生的。

[0033] 图 5 :同时包含阳离子交换和内毒素去除膜吸附剂的新型预过滤链与阳离子交换预过滤基质相比较,对使用 MAb2 的细小病毒滞留滤器的容量的效应。

[0034] 优选实施方案的详细描述

[0035] I. 定义

[0036] “蛋白质”意指链长度足以产生更高水平的三级和 / 或四级结构的氨基酸序列。因而,蛋白质区别于“肽”,肽也是基于氨基酸的分子,但不具有所述结构。典型的,本文中使用的蛋白质具有至少约 15-20kD, 优选至少约 20kD 的分子量。

[0037] 涵盖在本文定义中的蛋白质的实例包含哺乳动物蛋白,例如 CD4、整联蛋白及其亚基、例如 beta7、生长激素,包含人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状腺素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A-链;胰岛素 B-链;胰岛素原;卵

泡刺激素；降钙素；促黄体生成素；胰高血糖素；凝血因子例如因子 VIIIc、因子 IX、组织因子和血管性假性血友病因子(von Willebrands factor)；抗凝血因子例如蛋白 C；心钠素；肺表面活性剂；血纤维蛋白溶酶原激活剂，例如尿激酶或组织型血纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA，例如 **Activase[®]**、**TNKase[®]**、**Retevase[®]**)；bombazine；凝血酶；肿瘤坏死因子- α 和 - β ；脑啡肽酶；RANTES (调节正常激活的 T 细胞表达和分泌)；人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α)；血清白蛋白例如人血清白蛋白；米勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance)；小鼠促性腺激素相关肽；DNA 酶；抑制素；激动素；血管内皮生长因子(VEGF)；IgE、激素或生长因子的受体；整联蛋白；蛋白 A 或 D；类风湿因子；神经营养因子，例如骨来源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子 -3、-4、-5 或 -6 (NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6)，或者神经生长因子，例如 NGF- β ；血小板来源的生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子，例如 aFGF 和 bFGF；表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)，例如 TGF- α 和 TGF- β ，包含 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰岛素样生长因子 -I 和 -II (IGF-I 和 IGF-II)；des(1-3)-IGF-I (脑 IGF-I)；胰岛素样生长因子结合蛋白；其他的 CD 蛋白，例如 CD3、CD8、CD19 和 CD20；促红细胞生成素(EPO)；血小板生成素(TPO)；骨诱导因子；免疫毒素；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素，例如干扰素 - α 、- β 和 - γ ；集落刺激因子(CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF；白介素(IL)，例如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；T- 细胞受体；表面膜蛋白；衰变加速因子(DAF)；病毒抗原，例如 AIDS 衣壳的一部分；转运蛋白；归巢受体；地址素(addressin)；调控蛋白；整联蛋白，例如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM；肿瘤相关抗原，例如 HER1 (EGFR)、HER2、HER3 或 HER4 受体；Apo2L/TRAIL；以及任何上述列举的多肽的片段；以及与其结合的免疫粘附素和抗体；和任何上述列举的蛋白质的生物学活性片段或变体；

[0038] 如本文定义的，定义“蛋白质”中具体包含了治疗性抗体和免疫粘附素，包含但不限于一种或多种下列抗原的抗体：HER1 (EGFR)、HER2、HER3、HER4、VEGF、CD20、CD22、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4、VCAM、IL-17A 和 / 或 F、IgE、DR5、CD40、Apo2L/TRAIL、EGFL7、NRP1、促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 和因子 D，及其片段。

[0039] 其他示例性抗体包含但不限于选自抗 - 雌激素受体抗体、抗 - 孕酮受体抗体、抗 - p53 抗体、抗 - 组织蛋白酶 D 抗体、抗 - Bcl-2 抗体、抗 - E- 钙黏着蛋白抗体、抗 - CA125 抗体、抗 - CA15-3 抗体、抗 - CA19-9 抗体、抗 - c-erbB-2 抗体、抗 - P- 糖蛋白抗体、抗 - CEA 抗体、抗 - 成视网膜细胞瘤蛋白抗体、抗 - ras 癌基因蛋白质抗体、抗 - Lewis X 抗体、抗 - Ki-67 抗体、抗 - PCNA 抗体、抗 - CD3 抗体、抗 - CD4 抗体、抗 - CD5 抗体、抗 - CD7 抗体、抗 - CD8 抗体、抗 - CD9/p24 抗体、抗 - CD10 抗体、抗 - CD11c 抗体、抗 - CD13 抗体、抗 - CD14 抗体、抗 - CD15 抗体、抗 - CD19 抗体、抗 - CD23 抗体、抗 - CD30 抗体、抗 - CD31 抗体、抗 - CD33 抗体、抗 - CD34 抗体、抗 - CD35 抗体、抗 - CD38 抗体、抗 - CD41 抗体、抗 - LCA/CD45 抗体、抗 - CD45RO 抗体、抗 - CD45RA 抗体、抗 - CD39 抗体、抗 - CD100 抗体、抗 - CD95/Fas 抗体、抗 - CD99 抗体、抗 - CD106 抗体、抗 - 泛素抗体、抗 - CD71 抗体、抗 - c-myc 抗体、抗 - 细胞角蛋白抗体、抗 - 波形蛋白抗体、抗 - HPV 蛋白抗体、抗 - κ 轻链抗体、抗 - λ 轻链抗体、抗 - 黑素体抗体、抗 - 前列腺特异性抗原抗体、抗 - S-100 抗体、抗 - tau 抗原抗体、抗 - 纤维蛋白抗体、抗 - 角蛋白抗体和抗 - Tn- 抗原抗体。

[0040] “分离的”蛋白，例如抗体，是已经从它的天然环境的组分中鉴别、分离和 / 或回收

的蛋白。其天然环境的污染组分是干扰蛋白质(例如抗体)的诊断或治疗用途的材料,可包含酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质的溶质。在优选的实施方案中,蛋白质(例如抗体)可以被纯化至:(1)由 Lowry 方法确定的,达到按重量计大于 95%,最优选按重量计大于 99%,(2)使用离心杯式测序仪,达到足以获得 N 端或中间的氨基酸序列的至少 15 个残基的程度;或者(3)在使用考马斯亮蓝或优选银染的还原或非还原条件下,达到 SDS-PAGE 均质。

[0041] 蛋白质优选是基本纯的,理想的是基本均质的(即,不含污染性蛋白质)。“基本纯的”蛋白质意指基于组合的总重量,包含按重量计至少约 90% 的蛋白质的组合物,优选包含按重量计至少约 95% 的蛋白质。

[0042] “基本均质的”蛋白质意指基于组合物的总重量,包含按重量计至少约 99% 的蛋白质的组合物。

[0043] 术语“抗体”以最广的含义使用,具体覆盖了单克隆抗体(包含具有免疫球蛋白 Fc 区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、双特异性抗体、双抗体和单链分子,以及抗体片段(例如, Fab、F(ab')₂ 和 Fv)。

[0044] 基础的 4 条链的抗体单位是异四聚体糖蛋白,包含两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)。IgM 抗体由 5 个这种基础的异四聚体单位以及称为 J 链的额外多肽组成,含有 10 个抗原结合位点,而 IgA 抗体包含 2-5 个这种基础的 4 条链单位,可以与 J 链组合而聚合形成多价的组合物(assembly)。在 IgG 的情况下,4 条链单位一般约 150,000 道尔顿。每条 L 链都通过一个共价的二硫键与 H 链连接,而两条 H 链则通过一个或多个二硫键彼此连接,二硫键数取决于 H 链同种型。每条 H 和 L 链也具有规律安排的链内二硫键。每条 H 链的 N 端都具有可变结构域(V_H),对于 α 和 γ 链的情况,每条在可变结构域之后接 3 个恒定结构域(C_H),而对于 μ 和 ε 同种型的情况,在可变结构域之后具有四个 C_H 结构域。每条 L 链的 N 端都具有可变结构域(V_L),可变结构域的另一端后接恒定结构域。V_L 与 V_H 配对,C_L 与重链的第一恒定结构域(C_{H1})配对。特定的氨基酸残基被认为形成轻链和重链可变结构域之间的交界。成对的 V_H 和 V_L 共同形成单个抗原结合位点。关于不同类型抗体的结构和性质,参见例如 Basic and Clinical Immunology,第 8 版, Daniel P. Sties, Abba I. Terr 和 Tristram G. Parslow (编著), Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 页和第 6 章。

[0045] 基于恒定结构域的氨基酸序列,任何脊椎动物物种的 L 链都可归属于两个明确区别的类型之一,称为 κ 和 λ。基于其重链恒定结构域的氨基酸序列(C_H),可以将免疫球蛋白分为不同的类别或亚类。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,分别具有称为 α、δ、ε、γ 和 μ 的重链。基于 C_H 序列和功能上相对细微的差异,γ 和 μ 类进一步分为亚类,例如,人表达下列亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0046] 术语“可变”指这样的事实,即抗体之间的可变结构域的某些片段序列广泛不同。V 结构域介导抗原结合,定义特定抗体与其特定抗原的特异性。然而,变化并非均匀的分布在可变结构域整个区间。相反, V 区由被分隔的约 15-30 个氨基酸残基的称为框架区(FR)的相对不变区段(stretches)组成,所述框架区被长度分别为约 9-12 个氨基酸残基的称为“超变区”或者有时称为“互补决定区”(CDR)的高度变化的较短区域分隔。天然重链和轻链的可变结构域各包含 4 个 FR,大部分采用 β 片层构象,由 3 个超变区连接,超变区形成环状连接,在一些情况下部分形成 β 片层结构。每条链的超变区通过 FR 紧密连接在一起,并与另一条链的高变区负责形成抗体的抗原结合位点(参见 Kabat 等人, Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合, 但表现出各种效应子功能, 例如参与抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

[0047] 当用于本文中时, 术语“超变区” (也已知为“互补决定区”或 CDR) 指抗体的在 V 区结构域内的氨基酸残基 (通常是 3 个或 4 个高度序列变化的短区域), 所述氨基酸残基形成抗原结合位点, 并且是抗原特异性的主要决定因素。有至少两种方法鉴别 CDR 残基: (1) 基于交叉物种序列变异性的方法 (即, Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991)); 和 (2) 基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法 (Chothia, C. 等人, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。然而, 如果两种残基鉴别技术定义重叠而非相同的区域, 则可以组合其以定义混合的 (hybrid) CDR。

[0048] 术语“单克隆抗体”在本文中指从基本均质的抗体群体中获得的抗体, 即, 群体包含的各个抗体是相同, 除了可能以极小量存在的潜在天然发生的突变。单克隆抗体是高度特异的, 针对单一的抗原位点。此外, 与常规 (多克隆) 抗体制品相反, 每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇, 所述常规 (多克隆) 抗体制品典型的包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体。除特异性以外, 单克隆抗体的优势还在于它们是通过杂交瘤培养物合成的, 不被其他免疫球蛋白污染。定语“单克隆”表示抗体的特征是从基本均质的抗体群体获得的, 而不视为需要通过任何特定的方法来生产抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制造的, 所述方法首次描述在 Kohler 等人, Nature, 256:495 (1975) 中, 或者可以通过重组 DNA 方法制造的 (参见例如美国专利号 4, 816, 567)。“单克隆抗体”还可以是使用例如 Clackson 等人, Nature, 352:624-628 (1991) 和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 中描述的技术, 从噬菌体抗体文库中分离的。

[0049] 本文中的单克隆抗体具体包含“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 其中一部分重链和 / 或轻链与源自特定物种的抗体或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 同时, 链的剩余部分与源自另一种物种的抗体或属于另一种抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 以及此类抗体的片段, 只要所述片段表现出理想的生物学活性 (美国专利号 4, 816, 567; Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。

[0050] “完整的”抗体是这样的抗体, 所述抗体包含抗原结合位点和 CL, 并至少包含重链结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。

[0051] “抗体片段”包含完整抗体的一部分, 优选完整抗体的抗原结合和 / 或可变区。抗体片段的实例包含 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体 (参见美国专利号 5, 641, 870, 实施例 2; Zapata 等人, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]); 单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0052] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段, 称为“Fab”片段, 和剩余的“Fc”片段, 该名称反映了易于结晶的能力。Fab 片段由完整的 L 链与 H 链的可变区结构域 (V_H) 和一条重链的第一恒定结构域 (C_{H1}) 组成。每个 Fab 片段相对于抗原结合都是单价的, 即, 具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生单个大的 $F(ab')_2$ 片段, 所述 $F(ab')_2$ 片段大致对应于具有不同的抗原结合活性的两个由二硫键连接的 Fab 片段, 仍然能够与抗原交联。Fab' 片段与 Fab 片段不同, 在 C_{H1} 结构域的羧基端具有若干额外的残基, 包含一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对 Fab' 的命名, 所述 Fab' 中的恒定

结构域的半胱氨酸残基具有游离的巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初作为之间具有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0053] Fc 片段包含通过二硫键保持在一起的两条 H 链的羧基端部分。抗体的效应子功能由 Fc 区中的序列决定, 该区也被某些细胞类型上发现的 Fc 受体 (FcR) 识别。

[0054] “Fv” 是最小抗体片段, 含有完整的抗原识别和结合位点。该片段由紧密而非共价关联的一条重链和一条轻链可变区结构域的二聚体组成。这两个结构域的折叠发出 6 个超变环 (H 链和 L 链各 3 个环), 提供用于抗原结合和产生抗体的抗原结合特异性的氨基酸残基。然而, 即使单个可变结构域 (或者仅包含 3 个对抗原特异性 CDR 的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 虽然比完整结合位点的亲和力低。

[0055] “单链 Fv” 也缩写为 “sFv” 或 “scFv”, 是包含连接成单条多肽链的 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。优选的, sFv 多肽进一步包含在 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头, 所述接头使 sFv 能够形成用于抗原结合的理想结构。关于 sFv 的综述, 参见 Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编著, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。

[0056] 术语“二价体”指如下制备的小抗体片段, 通过在 V_H 和 V_L 结构域之间用短接头 (约 5-10 个残基) 构建 sFv 片段 (见上述章节), 以实现链间而非链内配对的 V 结构域, 从而获得二价片段, 即, 具有 2 个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交换的 (crossover)”sFv 片段的异二聚体, 其中 2 个抗体的 V_H 和 V_L 结构域是存在于不同的多肽链上的。双抗体更详细的描述在例如 EP 404, 097 ; WO 93/11161 ; Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) 中。

[0057] “结合”分子靶或目标抗原的抗体是能够以足够的亲和力结合抗原的抗体, 使所述抗体有效的靶向表达抗原的细胞。

[0058] “特异性结合”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽上的表位的抗体是在基本不结合任何其他多肽或多肽表位的条件下, 结合该特定多肽或该特定多肽上的表位的抗体。在此实施方案中, 抗体与上述其他多肽或多肽表位结合的程度低于与靶多肽或表位结合的 10%, 根据荧光激活的细胞分选 (FACS) 分析或放射免疫沉淀 (RIA) 所确定的。

[0059] “人源化”形式的非人 (例如, 小鼠) 抗体是大部分是人序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合序列), 含有源自非人免疫球蛋白的最少序列。在大多数情况下, 人源化抗体是这样的人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自受体的超变区 (也是 CDR) 的残基被具有理想的特异性、亲和力和能力的、来自非人物种 (供体抗体) 的超变区的残基替代, 非人物种例如是小鼠、大鼠或兔。在一些例子中, 人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基被相应的非人残基替代。此外, “人源化抗体”在本文还包含在受体抗体或供体抗体中都未发现的残基。进行这些修饰是进一步改善和优化抗体的性能。最佳的人源化抗体还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区 (Fc), 典型的是人免疫球蛋白的。关于更多细节, 参见 Jones 等人, *Nature*, 321:522-525 (1986) ; Reichmann 等人, *Nature*, 332:323-329 (1988) ; 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

[0060] 抗体的“效应子功能”指归因于抗体的 Fc 区 (天然序列的 Fc 区或氨基酸序列变体的 Fc 区) 的那些生物学活性, 并随抗体同种型而改变。抗体效应子功能的实例包含 : C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 ; Fc 受体结合 ; 抗体 - 依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ; 吞噬作

用；细胞表面受体(例如，B 细胞受体)的下调；和 B 细胞激活。

[0061] “抗体-依赖性细胞介导的细胞毒性”或 ADCC 指一类细胞毒性，其中分泌型 Ig 结合到存在于某些细胞毒性细胞(例如，天然杀伤细胞(NK)、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上的 Fc 受体(FcR)上，使这些细胞毒性效应子细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞，之后用细胞毒素杀死靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞，并且是通过该机制杀死靶细胞所需的。介导 ADCC 的初级细胞，NK 细胞，只表达 Fc γ RIII，而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**:457-92(1991) 的第 464 页的表 3 中概括了造血细胞上的 Fc 表达。为了评估目标分子的 ADCC 活性，实施体外的 ACDD 测定，例如美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中描述的。此类测定的有效的效应子细胞包含外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可选的或额外的，可以在体内评估目标分子的 ADCC 活性，例如，在 Clynes 等人, *PNAS USA* **95**:652-656(1998) 公开的动物模型中。

[0062] “Fc 受体”或“FcR”描述了与抗体的 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。此外，优选的 FcR 是结合 IgG 抗体(γ 受体)的受体，包含 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体，包含这些受体的等位变体和备选的剪切形式，Fc γ RII 受体包含 Fc γ RIIA (“激活型受体”)和 Fc γ RIIB (“抑制型受体”)，具有相似的氨基酸序列，区别主要在于其胞质结构域中。激活型受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸类激活基序(ITAM)。抑制型受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸类抑制基序(ITIM)(参见 **M. Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* **15**:203-234(1997))。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**:457-92(1991)；Capel 等人, *Immunomethods* **4**:25-34(1994)；和 de Haas 等人, *J. Lab. Clin. Med.* **126**:330-41(1995)中综述了 FcR。其他 FcR，包含未来鉴别的 FcR，都涵盖在本文的术语“FcR”中。术语还包含新生儿受体 FcRn，其负责将母体 IgG 转移到胎儿中(Guyer 等人, *J. Immunol.* **117**:587(1976) 和 Kim 等人, *J. Immunol.* **24**:249(1994))。

[0063] “人效应子细胞”是表达一种或多种 FcR 并执行效应子功能的白细胞。优选的，细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包含外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞，其中 PBMC 和 MNK 细胞是优选的。可以从天然来源(例如，血液)中分离效应子细胞。

[0064] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体的条件下，靶细胞的裂解。经典补体通路的激活是由补体系统的第一组分(C1q)与结合其相应抗原的(恰当亚类的)抗体结合起来起始的。为了评估补体激活，可以实施 CDC 测定，例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* **202**:163(1996) 中描述的。

[0065] 术语“缀合”、“缀合的”和“缀合作用”指任何和所有形式的共价或非共价连接，包含但不限于直接的遗传或化学融合、通过接头或交联剂的偶联，和非共价关联，例如使用亮氨酸拉链。抗体缀合物具有与抗体或抗体片段连接的另一种实体，例如细胞毒性化合物、药物、组合物、化合物、放射性元素或可检测的标记。

[0066] “治疗”既指治疗性处理，又指预防或阻止性手段。需要治疗的包含已经患有功能障碍的，以及需要阻止功能障碍的。

[0067] 用于治疗目的的“哺乳动物”指任何分类为哺乳动物的动物，包含人、非人高等灵长类、家畜和农业动物，以及动物园、运动场或宠物动物，例如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、小鼠、猫等。优选的，哺乳动物是人。

[0068] “功能障碍”是任何从使用蛋白质治疗受益的适应症。包含慢性和急性的功能障碍或疾病,包含使哺乳动物易患所讨论的功能障碍的病理性适应症。

[0069] “治疗有效量”至少是使特定功能障碍产生可测量的改善或预防所需的最低浓度。已知蛋白质的治疗有效量是本领域普遍已知的,而下文发现的蛋白质的治疗有效量可以用落入本领域技术人员(例如普通医生)技能范围内的标准技术来确定。

[0070] II. 执行发明的模式

[0071] A. 蛋白质制备

[0072] 根据本发明,通过重组 DNA 技术生产蛋白质是本领域普遍已知的,即,通过培养用含有编码蛋白质的核酸的载体转化或转染的细胞。

[0073] 可以如下实现通过重组手段制备蛋白质,通过用表达或克隆载体转染或转化合适的宿主细胞,并在常规的营养基质中培养,所述营养基质适合诱导启动子、选择转化子或扩增编码理想序列的基因。本领域技术人员可以在不进行过度的实验的条件下,选择培养条件,例如基质、温度、pH 等。一般而言,使细胞培养物生产力最大化的原则、规程和实践技术可见于 Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler 编著 (IRL Press, 1991) 和 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press 中。转染的方法是本领域普通技术人员已知的,包含例如 CaPO_4 和 CaCl_2 转染、电穿孔、显微注射等。合适的技术也描述在 Sambrook 等人,见上文中。其他转染技术描述在 Shaw 等人, Gene 23:315 (1983); WO 89/05859; Graham 等人, Virology 52:456-457 (1978) 和 U. S. P. 4, 399, 216 中。

[0074] 可以将编码理想蛋白质的核酸插入到用于克隆或表达的可复制载体中。合适的载体是公众可获得的,并可采用质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种程序将恰当的核酸序列插入到载体中。一般而言,使用本领域已知的技术将 DNA 插入到恰当的限制性内切核酸酶位点中。载体组件一般包含但不限于信号序列、复制起点、一种或多种标志物基因和增强子元件、启动子和转录终止序列的一种或多种。含有一种或多种这些组件的合适载体的构建应用本领域技术人员已知的标准连接技术。

[0075] 可以从培养基或宿主细胞裂解液中回收蛋白质形式。如果是膜结合的,则可以使用合适的去垢剂或通过酶促切割从膜中释放。还可以通过多种物理或化学手段破坏用于表达的细胞,例如冻融循环、超声、机械破坏或细胞裂解剂。

[0076] 可以通过本领域已知的任何合适技术纯化蛋白质,例如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、逆向 HPLC、在硅石或阳离子交换树脂(例如 DEAE)上层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、使用蛋白 A 琼脂糖柱(例如 **Sephadex**[®] G-75)凝胶过滤来去除污染物,例如 IgG、和金属螯合柱结合表位标记的形式。

[0077] B. 抗体制备

[0078] 在本发明的一些实施方案中,选定的蛋白质是抗体。用于生产抗体(包含多克隆、单克隆、人源化、双特异性和异源缀合抗体)的技术如下。

[0079] (i) 多克隆抗体

[0080] 一般通过在动物中多次皮下(SC)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来产生多克隆抗体。有效的是将相关抗原与对待免疫的物种是免疫原性的蛋白质缀合,例如匙孔虫螅(limpet)血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可应用的佐剂的

实例包含弗氏完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂(单磷脂 A、合成的海藻糖 dicorynomycolate)。本领域技术人员可以在不进行过度实验的条件下选择免疫规程。

[0081] 一个月后,用弗氏完全佐剂中 1/5 至 1/10 初始量的肽或缀合物在多个位点皮下注射进行加强。7 至 14 天后,将动物放血,测定血清中的抗体滴度。加强动物直到滴度平台期。优选的,用相同抗原但与不同蛋白质缀合和 / 或通过不同交联剂缀合的缀合物加强动物。还在重组细胞培养物中作为蛋白质融合体制造缀合物。此外,凝聚剂例如明矾适合用于增强免疫应答。

[0082] (ii) 单克隆抗体

[0083] 单克隆抗体是从基本均质的抗体群体中获得的,即,包含单种抗体的群体是相同的,除了可能以极少量存在的潜在天然发生的突变以外。因而,定语“单克隆”表示抗体的特征不是不同抗体的混合物。

[0084] 例如,可以使用杂交瘤方法制造单克隆抗体,所述方法首次描述在 Kohler 等人, *Nature*, 256:495 (1975) 中,或者可以通过重组 DNA 方法制造的(美国专利号 4,816,567)。

[0085] 在杂交瘤方法中,如前所述免疫小鼠或其他恰当的宿主动物,例如仓鼠,引发生产或能够生产抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性的结合用于免疫的蛋白质。可选的,可在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,例如聚乙二醇,形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。

[0086] 免疫剂典型的包含待配制的蛋白质。一般而言,如果人来源细胞是理想的,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果非人哺乳动物来源细胞是理想的,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后,使用合适的融合试剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系融合,形成杂交瘤细胞。Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 第 59-103 页。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。将因此制备的杂交瘤细胞接种,并在合适的培养基中生长,所述培养基优选含有一种或多种抑制未融合的、亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基典型地将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT 培养基),所述物质阻止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0087] 优选的骨髓瘤细胞是有效融合、支持经选择的抗体生产细胞稳定高水平生产抗体的细胞,并且对培养基(例如 HAT 培养基)敏感。其中,优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤系,例如源自可获得自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的小鼠骨髓瘤系,和可获得自美国典型培养物收藏中心, Rockville, Maryland USA 的 SP-2 细胞的小鼠骨髓瘤系。也描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0088] 测定生长杂交瘤细胞的培养基中生产的针对抗原的单克隆抗体。优选的,通过免疫沉淀或体外结合测定(例如,放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)),来确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0089] 可以通过例如 Munson 等人, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980) 的 Scatchard 分析, 来确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0090] 在鉴别出生产具有理想的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 可以通过有限稀释程序亚克隆所述克隆, 并用标准方法(Goding, 见上文) 生长。用于该目的的合适培养基包含例如 DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水肿瘤在体内生长。

[0091] 免疫试剂典型地包含抗体所结合的表位蛋白。一般而言, 如果人来源细胞是理想的, 则使用外周血淋巴细胞(“PBL”), 或者如果非人哺乳动物细胞来源是理想的, 则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后, 使用合适的融合试剂(例如聚乙二醇) 将淋巴细胞与永生生化细胞系融合, 形成杂交瘤细胞。Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 第 59-103 页。

[0092] 永生生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞, 特别是啮齿类、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常, 使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以培养在合适的培养基中, 所述培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生生化细胞生长或存活物质。例如, 如果亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT), 则用于杂交瘤的培养基典型地将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT 培养基), 所述物质阻止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0093] 优选的永生生化细胞系是有效融合、支持经选择的抗体生产细胞稳定高水平表达抗体的细胞, 并且对培养基(例如 HAT 培养基) 敏感。优选的永生生化细胞系是小鼠骨髓瘤系, 其可获得自例如 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California 和美国典型培养物收藏中心, Rockville, Maryland。也描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体。Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001(1984); Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) 第 51-63 页。

[0094] 测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对配制的蛋白质的单克隆抗体的存在。优选的, 通过免疫沉淀或体外结合测定(例如, 放射免疫测定(RIA) 或酶联免疫吸附测定(ELISA)), 来确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。这样的测定和技术是本领域已知的。可以通过例如 Munson 和 Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980) 的 Scatchard 分析, 来确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0095] 在鉴别出理想的杂交瘤细胞后, 可以通过有限稀释程序亚克隆所述克隆, 并用标准方法(Goding, 见上文) 培养。用于该目的的合适培养基包含例如 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基或 RPMI-1640 培养基。可选的, 杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水在体内生长。

[0096] 通过常规的免疫球蛋白纯化程序, 例如蛋白 A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 从培养基、腹水或血清中合适地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0097] 使用常规程序可以任意地分离和测序编码单克隆抗体的 DNA (例如, 通过使用能够与编码小鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞作为此类 DNA 的优选来源发挥作用。一旦分离, DNA 可被置于表达载体中, 然后转染到宿主细胞内, 例如 *E. coli* 细胞、类人猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞, 或者不另外生产免疫球

蛋白的骨髓瘤细胞,以获得在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述文献包括Skerra等人,Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)和Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992)。

[0098] 在其他实施方案中,可以从使用McCafferty等人,Nature, 348:552-554(1990)所述技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体。Clackson等人,Nature, 352:624-628(1991)和Marks等人,J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)分别描述了使用噬菌体文库,分离小鼠和人抗体。后续出版物描述了通过链改组生产高亲和力(nM范围)的人抗体(Marks等人, Bio/Technology, 10:779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为对策构建非常大的噬菌体文库(Waterhouse等人, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))。因而,这些技术是传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行备选方案,用于单克隆抗体的分离。

[0099] 还可以修饰DNA,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列替代同源的小鼠序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)),或通过共价连接免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分的编码序列。

[0100] 典型的,用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定结构域,或者替代抗体的可变结构域的一个抗原结合位点,来产生嵌合的二价抗体,所述二价抗体包含具有对一种抗原的特异性的一个抗原结合位点,和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0101] 还可以使用合成蛋白质化学中已知的方法体外制备嵌合或杂合抗体,包括涉及交联剂的方法。例如,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫酯键构建免疫毒素。用于该目的合适试剂的实例包括硫醇亚胺(iminothiolate)和甲基-4-巯基丁酸盐(mercaptobutyrimidate)。

[0102] (iii) 人源化和人抗体

[0103] 用于配制方法的抗体可进一步包含人源化抗体或人抗体。非人(例如小鼠)抗体的人源化形式是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合亚序列),含有源自非人免疫球蛋白的最少序列。人源化抗体包含人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被具有理想的特异性、亲和力和能力的、来自非人物种(供体抗体)的CDR的残基替代,非人物种例如小鼠、大鼠或兔。在一些例子中,人免疫球蛋白的Fv框架区残基被相应的非人残基替代。人源化抗体还包含在受体抗体或输入的CDR或框架序列中都未发现的残基。一般而言,人源化抗体包含基本上完整的至少一个、通常两个可变结构域,所述可变结构域中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而所有或基本上所有的FR区对应于人免疫球蛋白的共有序列。人源化抗体最佳地还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),典型的是人免疫球蛋白的。Jones等人, Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人, Nature 332:323-329(1988)和Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0104] 用于人源化非人抗体的方法是本领域普遍已知的。一般而言,人源化抗体具有从非人来源导入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入的”残基,通常来自“输入的”可变结构域。人源化可以基本按Winter及同事Jones等人, Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人, Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen等人, Science 239:1534-1536(1988)的方法来实施,或通过用人抗体的相应序列取代啮齿类

的 CDR 或 CDR 序列。相应的,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中基本上少于完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列取代。实践上,人源化抗体典型的是这样的人抗体,其中一些 CDR 残基以及可能一些 FR 残基被来自啮齿类抗体的类似位点的残基取代。

[0105] 选择用于制造人源化抗体中的轻链和重链的人可变结构域,对降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最适”方法,在已知的人可变结构域序列的整个文库中筛选啮齿类抗体的可变结构域序列。然后,接受与啮齿类序列最接近的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)。Sims 等人, *J. Immunol.*, 151:2296(1993); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987)。另一种方法使用特定框架,所述框架源自特定亚类的轻链或重链的所有人抗体的共同序列。相同的框架可用于若干不同的人源化抗体。Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta 等人, *J. Immunol.*, 151:2623(1993)。

[0106] 更重要的是人源化抗体保持了对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现该目标,根据优选的方法,通过使用亲代和人源化序列的三维模型,分析亲代序列和多种概念性人源化产物的方法,制备人源化抗体。三维的免疫球蛋白模型是公众可获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。提示并展现所选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些展示的检视允许分析残基在候选免疫球蛋白序列中发挥功能的可能角色,即分析残基影响候选免疫球蛋白结合它的抗原的能力。以此方式,可以从受体中选择和组合 FR 残基,并输入序列,使得获得理想的抗体特征,例如与靶抗原增加的亲和力。一般而言,CDR 残基直接且大部分实质上涉及影响抗原结合。

[0107] 可选的,可以生产这样的转基因动物,所述转基因动物在缺失内源性免疫球蛋白生产的条件下,基于免疫,能够生产全面的人抗体储库。例如,已描述了在嵌合和种系突变小鼠中纯合删除抗体重链连接区(J_H)基因,获得对内源性抗体生产的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到此类种系突变小鼠中,将导致基于抗原刺激的人抗体生产。参见例如 Jakobovits 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等人, *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggermann 等人, *Year in Immunol.*, 7:33(1993)。人抗体还可以源自噬菌体展示文库(Hoogenboom 等人, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991))。

[0108] 还可以使用各种本领域已知的技术生产人抗体,包含噬菌体展示文库。Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581(1991)。Cole 等人和 Boerner 等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页(1985)和 Boerner 等人, *J. Immunol.* 147(1):86-95(1991))。相似的,可以通过将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物中,来制造人抗体,所述转基因动物例如是内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠。基于刺激,观察到人抗体生产,其在所有方面密切的模拟了在人中所观察到的,包括基因重排、装配和抗体储库。该方法描述在例如美国专利号 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016 中,和下列科学出版物中: Marks 等人, *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg 等人, *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild 等人, *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996) 和

Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)。

[0109] (iv) 抗体依赖性酶介导的前药疗法(ADEPT)

[0110] 本发明的抗体还可用于 ADEPT, 通过将抗体与前药 - 激活的酶缀合, 所述酶将前药(例如肽基化疗剂, 参见 WO 81/01145) 转化为活性抗癌药物。参见例如 WO 88/07378 和美国专利号 4, 975, 278。

[0111] 用于 ADEPT 的免疫缀合物的酶组分包含任何能够作用于前药的酶, 所述作用方式使前药转化为更活性的细胞毒性形式。

[0112] 可用于本发明方法中的酶包括但不限于糖苷酶、葡萄糖氧化酶、人溶菌酶、人葡萄糖醛酸糖苷酶、用于将含磷酸的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含硫酸的前药转化为游离药物的芳香基硫酸酯酶; 用于将无毒的 5- 氟胞嘧啶转化为抗癌药 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶; 蛋白酶, 例如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶(例如羧肽酶 G2 和羧肽酶 A) 和组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B 和 L), 用于将含肽的前药转化为游离药物; D- 丙氨酰羧肽酶, 用于转化含 D- 氨基酸取代的前药; 碳水化合物切割酶, 例如用于将糖基化前药转化为游离药物的 β 半乳糖苷酶和神经氨酸苷酶; 用于将 β 内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 β 内酰胺酶; 和青霉素酰胺酶, 例如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶, 分别用于将胺氮衍生为苯氧乙酰或苯乙酰基的药物转化为游离药物。可选的, 具有酶活性的抗体, 在本领域中也已知为“抗体酶(abzymes)”, 可用于将本发明的前药转化为游离的活性药(参见例如, Massey, Nature 328:457-458(1987))。可以按本文所述制备抗体 - 抗体酶缀合物, 用于将抗体酶递送至肿瘤细胞群体。

[0113] 本发明的酶可以通过本领域普遍已知的技术与抗 IL-17 或抗 LIF 抗体共价结合, 例如使用上文所讨论的异双官能交联剂。可选的, 可以使用本领域普遍已知的重组 DNA 技术(参见例如 Neuberger 等人, Nature 312:604-608(1984)) 构建融合蛋白, 所述融合蛋白包括本发明抗体的至少抗原结合区, 与本发明的酶的至少功能活性部分连接。

[0114] (v) 双特异性和多特异性抗体

[0115] 双特异性抗体(BsAb) 是与至少两种不同的表位具有结合特异性的抗体。此类抗体可源自全长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

[0116] 制造双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产是基于共表达两种免疫球蛋白的重链 - 轻链对, 其中两条链具有不同的特异性。Millstein 等人, Nature, 305:537-539(1983)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机搭配, 这些杂交瘤(quadromas) 生产可能是 10 种不同的抗体分子的混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。纯化正确的分子是相当繁琐的, 通常通过亲和层析步骤进行, 而产物产量低。相似的程序公开在 WO 93/08829 中和 Traunecker 等人, EMBO J., 10:3655-3659(1991) 中。

[0117] 具有理想结合特异性的抗体可变结构域(抗体 - 抗原结合位点) 可以与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选是与免疫球蛋白重链恒定结构域融合, 包含至少部分的铰链区、CH2 和 CH3 区。优选的是在至少一个融合体中存在第一重链恒定区(CH1), 该区含有轻链结合必需的位点。将编码免疫球蛋白重链(以及需要时, 免疫球蛋白轻链) 融合体的 DNA 插入到不同的表达载体中, 共转染合适的宿主生物。关于产生双特异性抗体的进一步细节, 参见例如 Suresh 等人, Methods in Enzymology 121:210(1986)。

[0118] 根据不同的方法, 将具有所需结合特异性(抗体 - 抗原结合位点) 的抗体可变结构

域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合体优选是具有免疫球蛋白重链恒定区的,包括铰链的至少一部分、CH2 和 CH3 区。优选含有轻链结合必需位点的第一个重链恒定区(CH1)存在于至少一个融合体中。将编码免疫球蛋白重链融合体和视情况而定的免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体中,并且共同转染至合适的宿主生物体中。当构建中使用不等比例的三种多肽链以提供最佳产量时,这为调节实施方案中的三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而,当以相等的比例表达至少两种多肽导致高产量时,或者当比例不是特别重要时,可以将两种或所有三种多肽链的编码序列插入到一个表达载体中。

[0119] 根据 WO 96/27011 中描述的另一方法,可以改造成对抗体分子之间的界面,使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含抗体恒定结构域的至少一部分 CH3 区。在该方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替代第一抗体分子的界面中的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上创造补偿大侧链的相同或相似尺寸的“空洞”。这提供了用于增加异二聚体相对于其他不需要的副产物(例如,同二聚体)的产量的机制。

[0120] 在该方法的优选的实施方案中,双特异性抗体包含在一条臂上具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链,和在另一臂上的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)。发现该不对称的结构有利于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离理想的双特异性化合物,因为仅在一半的双特异性分子中存在的免疫球蛋白轻链提供了易于实施的分离方式。该方法公开在 1994 年 3 月 3 日公开的 WO 94/04690 中。关于产生双特异性抗体的其他细节,参见例如 Suresh 等人, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

[0121] 双特异性抗体包含交联的或“异源缀合的”抗体。例如,可以将异源缀合物中的一种抗体与抗生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如此类抗体已被提议用于将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(美国专利号 4,676,980),以及用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373)。可以使用任何方便的交联方法,制造异源缀合的抗体。合适的交联剂是本领域普遍已知的,公开在美国专利号 4,676,980 中,同时有多种交联技术。

[0122] 用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已描述在文献中。还可以使用下列技术生产不一定是双特异性的二价抗体片段。例如,可以在体外化学偶联从 *E. coli* 回收的 Fab' 片段,形成二价抗体。参见 Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)。

[0123] 双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。从抗体片段产生双特异性抗体的技术已描述在文献中。例如,可以使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan 等人, *Science* 229:81 (1985) 描述了这样的程序,其中完整的抗体被蛋白水解切割,产生 $F(ab')_2$ 片段。在存在二巯醇复合试剂亚砷酸钠的条件下,还原这些片段,稳定邻位的二巯基,阻止形成分子间二硫键。然后,将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸盐(TNB) 衍生物。然后,将一种 Fab' -TNB 衍生物再转化为 Fab' -TNB 衍生物,形成双特异性抗体。所生产的双特异性抗体可用作酶的选择性固定的试剂。

[0124] 可以从 *E. coli* 直接回收 Fab' 片段,并化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生产。每种 Fab' 片段从 *E. coli* 分别分泌,并在体外进行直接化学偶联,形成双特异性抗体。因而所形成的双特异性抗体能够结合过表达 ErbB2 受体的细胞和正常的人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞抗人乳腺肿瘤靶的裂解活性。

[0125] 还已经描述了用于直接从重组细胞培养物中制造和分离双价抗体片段的各种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生产二价异二聚体。Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合,将 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。在铰链区还原抗体同二聚体,形成单体,然后再氧化形成抗体异二聚体。Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 描述的“二价体”技术提供了制造双特异性/二价抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H),接头太短而不允许在同一链的两个结构域之间配对。因此,一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一片段的互补的 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv)二聚体,制造双特异性/二价抗体片段的另一对策。参见 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368(1994)。

[0126] 考虑了具有两个效价以上的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt 等人, *J. Immunol.* 147:60(1991)。

[0127] 示例性的双特异性抗体可以结合给定分子上的两种不同的表位。可选的,可以将抗蛋白质的臂与结合白细胞上的触发分子的臂组合,所述触发分子例如 T 细胞受体分子(如, CD2、CD3、CD28 或 B7)或 IgG 的 Fc 受体(Fc γ R),例如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII(CD16),使得细胞防御机制关注表达特定蛋白质的细胞。还可以使用双特异性抗体将细胞毒性剂定位于表达特定蛋白质的细胞。此类抗体具有蛋白质结合臂,和结合细胞毒性剂或放射性核素螯合剂(例如 EOTUBE、DPTA、DOTA 或 TETA)的臂。另一种目的双特异性抗体结合目的蛋白质,并进一步结合组织因子(TF)。

[0128] (vi) 异源缀合的抗体

[0129] 异源缀合的抗体也落入本发明的范围内。异源缀合的抗体包含两个共价连接的抗体。此类抗体被提议例如将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(美国专利号 4,676,980),以及用于治疗 HIV 感染。WO 91/00360、WO92/200373 和 EP 03089。考虑使用任何合成蛋白质化学中已知的方法,在体外制备所述抗体,包含涉及交联剂的那些。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫酯键,构建免疫毒素。用于该目的合适试剂的实例包含硫醇亚胺(iminothiolate)和甲基-4-mercaptobutyrimidate,以及在例如美国专利号 4,676,980 中公开的。

[0130] C. 蛋白质纯化,包含抗体

[0131] 当在人以外来源的重组细胞中表达靶多肽时,靶多肽完全不含人来源的蛋白质或多肽。然而,必须从重组细胞蛋白质或多肽中纯化靶多肽,获得靶多肽基本均质的制品。作为第一步,通常离心培养基或裂解液,去除颗粒状的细胞残片。然后,分离膜和可溶的蛋白质级分。然后,从可溶的蛋白质级分中和从培养裂解液的膜级分中纯化靶多肽,这取决于靶多肽是否是膜结合的。下列程序是合适的纯化程序的示例:基于免疫亲和或离子交换柱分级;乙醇沉淀;逆相 HPLC;在硅石上或在阳离子交换树脂(例如 DEAE)上层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤;和蛋白 A 琼脂糖柱以去除污染物,例如 IgG。

[0132] 大多数公司目前使用三柱平台方法生产单克隆抗体(MAb),所述方法包含用于产物捕获的蛋白 A 亲和层析、后接流通(flow-through)模式的阴离子交换层析,抽提带负电荷的污染物,例如宿主细胞蛋白质(HCP)、内毒素、宿主 DNA 和泄露的蛋白 A,然后是滞留模

式的阳离子交换层析或疏水相互作用层析(HIC),以去除带正电荷的污染物类型,包含残余的 HCP 和产物聚集物。

[0133] 可能存在于蛋白质溶液中的病毒大于蛋白质本身。因而假设可以根据尺寸,通过过滤从蛋白质中去除病毒。

[0134] 病毒过滤可以去除较大的病毒,例如逆转录病毒(80-100nm 直径),通常使用标称孔径约 60nm 的高通量膜。由于具有 20nm 标称孔径的高通量膜也是可商购的,它可以通过过滤去除更小的病毒,例如细小病毒(18-26nm 直径),同时允许通过大至 160kD (~8nm) 的蛋白质,例如单克隆抗体。本发明主要意图是解决使用较小孔径的病毒去除滤器,而与此类较小病毒过滤相关的问题。

[0135] 典型的,可以在给定的下游工艺中若干节点中的任一个执行病毒过滤步骤。例如,在典型的单克隆抗体纯化工艺中,可以在低 pH 病毒失活步骤后,或者在中间的柱层析步骤后,或者在最终的柱层析步骤后进行病毒过滤。

[0136] 根据本发明,可以在下游工艺的任何阶段进行病毒过滤单元操作。在单克隆抗体的下游加工过程中的病毒过滤通常在亲和层析步骤(捕获步骤)或离子交换纯化步骤(精制步骤)后实施。

[0137] 图 1 中示例了在本文公开的实验中使用的实验设置。然而,应强调本发明不限于此。其他本领域普遍已知的装置也是适合的,并可用于本发明的方法中。

[0138] 在切向流病毒过滤中,蛋白质溶液通常大约以恒定的流速泵至滞留侧。在病毒去除滤器两侧产生的压力差使得蛋白质溶液渗透通过滤器,而病毒停留在滞留侧。

[0139] 在所谓的“法向流(normal-flow)”或“盲端(dead-end)”病毒过滤的情况下,可以使用切向病毒过滤中使用的相同的病毒滤器,但是周围的仪器和操作程序比切向流病毒过滤的情况下的更简单且更便宜。因而原则上,“法向流”过滤涉及在过滤前,将含大分子的溶液放置在压力容器中,并在压力源(合适的是氮(气)或空气)的帮助下压迫溶液通过病毒去除滤器。可选的,可以在滞留侧使用泵使液体以预定的流速滤过病毒去除滤器。

[0140] 滤器的灵敏程度(fineness)一般用孔径或滤器所停留分子的近似分子量(相对分子量)来表示,因而所述分子量被称为截留的。

[0141] 病毒滤器是本领域已知的,并由 Massachusetts, USA 的 Millipore 和日本的 Asahi Chemical Industry Co., Ltd. 等供应。合适的细小病毒滞留滤器包括 **Viresolve**[®] Pro (Millipore Corp., Billerica, MA)。**Viresolve**[®] Pro 膜具有不对称的双层结构,是用聚醚砜(PES)制造的。所述膜结构设计为停留尺寸大于 20nm 的病毒,同时允许分子量小于 180kDa 的蛋白质渗透通过膜。其他适合从蛋白质溶液中去除小病毒(包含细小病毒)的滤器包括 Novasip[™] DV20 和 DV50 病毒去除滤膜(Filter Capsule) (Pall Corp., East Hills, NY)、**Virosart**[®] CPV、Planova 20N(Asahi Kasei)和 BioEX(Asahi Kasei)。Novasip DV20 梯度膜滤器利用 Ultipor VF- 级 DV20 级折叠膜套管(pleated membrane cartridge)从多达 5-10 升的蛋白质溶液中去除细小病毒和其他小至 20nm 的病毒。Novasip DV50 级膜式滤器整合了 Ultipor VF DV50 级 **Ultipleat**[®] 膜套管,用于去除 40-50nm 和更大的病毒。供应的 Novasip Ultipor VF 膜式滤器是无菌的,还可以是 γ -照射过的。**Virosart**[®] CPV 利用双层的聚醚砜不对称膜,滞留超过 4log 的细小病毒和 6log 的逆转录病毒。

[0142] 对原料溶液的预过滤对过滤性能具有令人惊讶的影响。预过滤典型的目的是去除

可能导致病毒过滤器结垢的杂质和污染物,例如蛋白质聚集物、DNA 和其他痕量材料。

[0143] 根据本发明,可以通过预过滤步骤实现对病毒过滤器效率的显著增强,包括使用阳离子交换和内毒素去除基质。在上下文中,术语“媒介”或“基质”分别用于覆盖任何用于实施阳离子交换和内毒素去除步骤的手段。因而,术语“阳离子交换媒介”具体包含但不限于阳离子交换树脂、矩阵(matrices)、吸附剂等。术语“内毒素去除媒介”包含但不限于任何带正电的膜表面,包含例如层析的内毒素去除基质、内毒素亲和去除基质等。

[0144] 适用于本发明的预过滤步骤中的阳离子交换媒介包含但不限于**Mustang® S**、**Sartobind® S**、**Viresolve® Shield**、SPFF、SPXL、**Capto® S**、**Poros® 50HS**、**Fractogel® S**、**Hypercel® D**等,都是可商购的。

[0145] 适用于本发明的预过滤步骤中的内毒素去除基质包含但不限于**Mustang® E**、**Mustang® Q**、**Sartobind® Q**、**Chromasorb®**、**Possidyne®**、**Capto® Q**、QSFF、**Poros® Q**、**Fractogel® Q**等,都是可商购的。

[0146] 可以通过例如采用待处理的层析液(pool),并在包含内毒素去除和阳离子交换基质和细小病毒过滤器的过滤链(filtration train)上处理所述液,来实施预过滤步骤。内毒素去除和阳离子交换基质作为预过滤步骤发挥作用,细小病毒过滤器的容量不依赖于过滤链中该两个步骤的顺序。过滤链可以作为单个步骤连续工作,或者可以作为不同的操作单位来操作。例如,在一个实施方案中,首先将层析液通过内毒素去除基质,然后将收集到的液通过阳离子交换基质,之后用细小病毒过滤器过滤所述液。如上所述,在处理序列中应用阳离子交换基质和内毒素去除基质的顺序不影响细小病毒过滤容量。所述处理可以在宽 pH 范围下操作,例如在 4-10 的 pH 范围内,最佳过滤容量依赖于针对的杂质组成和产物属性。相似的,蛋白质浓度可以在大范围内变化,例如 1-40g/L,而不限制细小病毒过滤器的质量通量。

[0147] 通过参考下列实施例将更全面的理解本发明。但所述实施例不应被视为对本发明范围的限制。公开内容全文中的所有引用文献都通过引用明确整合到本文中。

实施例

[0148] 材料和方法

[0149] 1. 蛋白质溶液

[0150] 由于在单克隆抗体的下游加工过程中的病毒过滤是在亲和层析(捕获步骤)和离子交换步骤(精制(polishing)步骤)之后实施的,因此所有的过滤实验都是以商业上相关的待加工的离子交换(阳离子或阴离子交换)层析液进行实施的。mAb 浓度和阳离子交换液的电导与阴离子交换液的电导分别是 10mg/ml 和 10mS/cm,与 8mg/ml 和 4ms/cm。用新鲜的原料(在生产后 24 小时内使用),或用生产后冷冻在 -70°C 并在使用前在 4-8°C 解冻的原料来实施过滤实验。用新鲜的或冻融的原料获得的结果中未发现显著的差异。使用 UV-vis 分光光度计(NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)在 280nm 测量吸光值,确定蛋白质浓度。

[0151] 2. 膜

[0152] 用**Viresolve® Pro**(Millipore Corp.、Billerica、MA)细小病毒滞留过滤器实施过滤实验。**Viresolve® Pro**膜具有不对称的双层结构,是用聚醚砜(PES)制成的。所设

计的膜结构留下尺寸大于 20nm 的病毒,同时允许分子量小于 180kDa 的蛋白质渗透通过膜。在本研究中评估的 **Viresolve**[®] Pro 的预过滤包含 **Viresolve**[®] Optiscale 40 深度滤膜 (Millipore Corp., Billerica, MA)、Fluorodyne EX Mini 0.2 μm 无菌滤膜 (Pall Corp., East Hills, NY) 和 **Mustang**[®] 家族的膜吸附剂 (Pall Corp., East Hills, NY)。膜吸附剂是以完全封装的 **Acrodisc**[®] 单位,从销售商获得的。表 1 总结了本研究中使用的所有预过滤器的关键性质(官能团、柱床体积、孔径等)。

[0153] 表 1:预过滤器的关键性质

[0154]

预过滤器	用途	基质	官能团	柱床体积/ 表面积	孔径
Viresolve	深度滤膜	硅藻土	---	---	---
Flurodyne EX	无菌滤膜	聚醚砜	---	3.8 cm ²	0.2μm
Mustang [®] S	强阳离子 交换剂	聚醚砜	磺酸基	0.18 ml	0.8μm
Mustang [®] Q	强阴离子 交换剂	聚醚砜	季铵基	0.18 ml	0.8μm
Mustang [®] E	去除内毒 素	聚醚砜	聚乙烯 亚胺	0.12 ml	0.2μm

[0155] 3. 实验设置

[0156] 用图 1 显示的定制装置实施过滤实验。将装载材料(即,待加工的 mAb 液)置于装载储液槽中,并通过由不同的预过滤器和可商购的细小病毒过滤器组合构成的过滤链过滤。在所有的过滤实验中,使用恒定过滤流速(P_{max})方法。压力传感器置于每个滤器的上游,并与 Millidaq 或 Netdaq 系统偶联,记录作为时间或质量通量的函数的不同压力数据。将细小病毒过滤器的滤液收集在储液槽中,所述储液槽保持在装载室上,以记录作为时间函数的质量通量。

[0157] 结果和讨论

[0158] 在哺乳动物细胞培养物中表达的 mAb 的下游纯化典型的利用离心和深度滤膜作为去除细胞和细胞碎片的第一步,之后再亲和层析进行 mAb 捕获和去除宿主细胞蛋白质(HCP),之后再行阳离子交换层析、病毒过滤和阴离子交换层析,进一步去除杂质,例如聚集物、病毒、泄露的蛋白 A 和 HCP。该研究中的大部分实验都是用阳离子交换液实施的,以阳离子交换层析作为第二个层析步骤。

[0159] 图 2 显示使用治疗性 mAb 原料流和不同的预过滤器,在 200L/m²/hr 的恒流、Viresolve Pro 两侧不同压力下的实验数据。X 轴代表每平方米病毒过滤器装载的 mAb 质量。

Y 轴代表作为质量通量的函数的病毒滤器两侧不同压力。数据清楚地表示,相比无菌滤膜,深度滤膜在病毒过滤容量上提供了若干数量级的增加。Bolton 等人(Bolton 等人, Appl. Biochem. 43:55-63、2006)作出了相似的观察结果,当其评估 Viresolve Prefilter™——一种深度滤膜基质——作为多克隆 IgG 溶液的 NFP 细小病毒滞留滤器(Millipore Corp.)的预滤器时。作者将容量的增加归因于由于疏水性相互作用导致污垢物——变性蛋白质——的选择性吸附。

[0160] 虽然深度滤膜传统上已成功的用于澄清细胞培养液,然而当在下游捕获步骤使用时,例如作为细小病毒滞留滤器的预过滤器,仍有相当一些值得额外考虑的限制。

[0161] (a) 深度滤膜不是碱稳定的,阻止了在安装后对处理链进行消毒处理,导致开放式加工和潜在的生物负荷生长。

[0162] (b) 深度滤膜的组成包含硅藻土作为关键组分,硅藻土一般是食品级的,存在质量关注。

[0163] (c) 硅藻土一般是天然来源——缺少明确定义的化学方法——因而可以具有批次变化。

[0164] (d) 深度滤膜还倾向于泄露金属、 β 聚糖和其他杂质,需要使用下游操作证实和验证这些杂质的清除。

[0165] 上述限制对加工进程施加了额外的负担,因而需要设计深度滤膜下游的操作单位来提供可泄漏物的适当清除。然而,即使满足了所需的泄漏物清除,也需要考虑这样的原因,即特定批次的深度滤膜可能具有明显高于方法能够清除的泄漏物,因为关键组分是源自天然的,换言之,它们缺乏明确定义的化学合成方法。

[0166] 因而,对于开发不存在这些限制的预滤器具有明显的兴趣。如上所述,Brown 等人(Brown 等人, IBC's 20th Antibody Development and Production, San Diego, CA, 2008) 近期显示,一种带强负电荷的离子交换剂 Mustang S 当用作预滤器时,可以使细小病毒滞留滤器的容量增加数倍。因而进行实验评估不同预过滤基质对 **Viresolve®** Pro 的效应。在 pH5.0 和 6.5 的实验数据显示在图 3 (a) 和 (b) 中。数据显示尽管在 pH5.0, 阳离子交换基质表现出比内毒素去除吸附剂略微的优势,该优势在 pH6.5 下消失。虽然用两种基质的整体容量都高于用无菌滤器的(图 2);但仍然明显短缺在生产规模成功进行单位操作所需的容量。

[0167] 基于这样的假设,即阳离子交换和内毒素去除基质都可以去除两种不同的污垢物;所述污垢物两者都可导致滤器结垢,用新的预过滤链设计实验,所述预过滤链同时包括阳离子交换和内毒素去除基质。实验结果显示在图 4(a) 和 (b) 中,分别在 pH5.0 和 pH6.5 下完成。数据清楚地表示,两种基质的组合明显优于每种基质本身。例如,在 pH5.0, 在 20psi 压力差异下,阳离子交换和内毒素去除基质的组合提供了大于一个数量级的容量改善。在 pH6.5 也可见相似的倾向,但整体容量低于在 pH5.0 所获得的。这可能是由于在较低 pH 下更有效的去除了杂质。

[0168] 图 5 中显示了使用 mAb2 的实验结果。与图 4 中的数据一致,同时含有内毒素去除基质和阳离子交换基质的新型预过滤链实质上增加了容量,提示内毒素去除基质和阳离子交换基质协同作用,去除两种不同类型的污垢物。

[0169] 结论

[0170] 大部分之前的工作关注于使用深度滤膜或阳离子交换膜吸附剂作为预滤器,来增加细小病毒滞留滤器的容量。虽然深度滤膜提供了强有力的增加病毒过滤容量的机制,但与之相关的限制(例如泄漏物)限制它们应用于下游纯化序列中的特定阶段。阳离子交换膜吸附剂可以增加一些单克隆抗体(mAb)原料流的细小病毒滤器容量,但根据本研究中的数据可见,它们不是可以普遍应用的,提示可能存在多种污垢物,需要解决所述污垢物以进一步改善细小病毒去除滤器的性能。

[0171] 如上述实验结果所证实的,本发明强调两个方面——(1)当用于预过滤时,内毒素去除基质自身可以有效增加细小病毒滤器的容量,和(2)在预过滤链中偶联内毒素去除和阳离子交换基质可以提供增加若干倍的细小病毒过滤容量,降低原料消耗和在生产规模促进成功的病毒过滤操作。

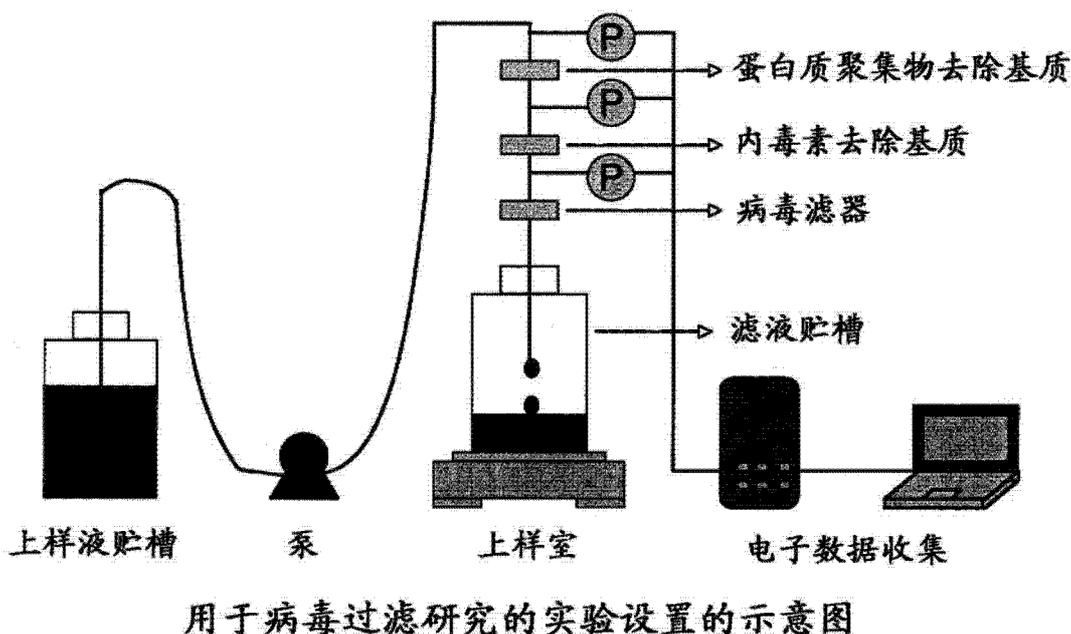
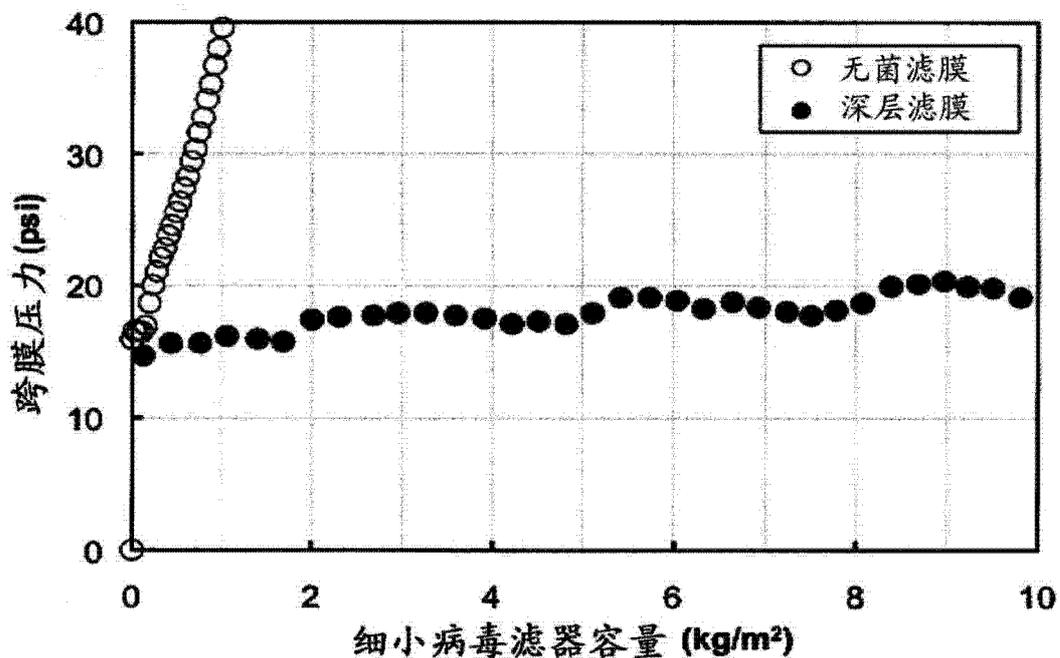
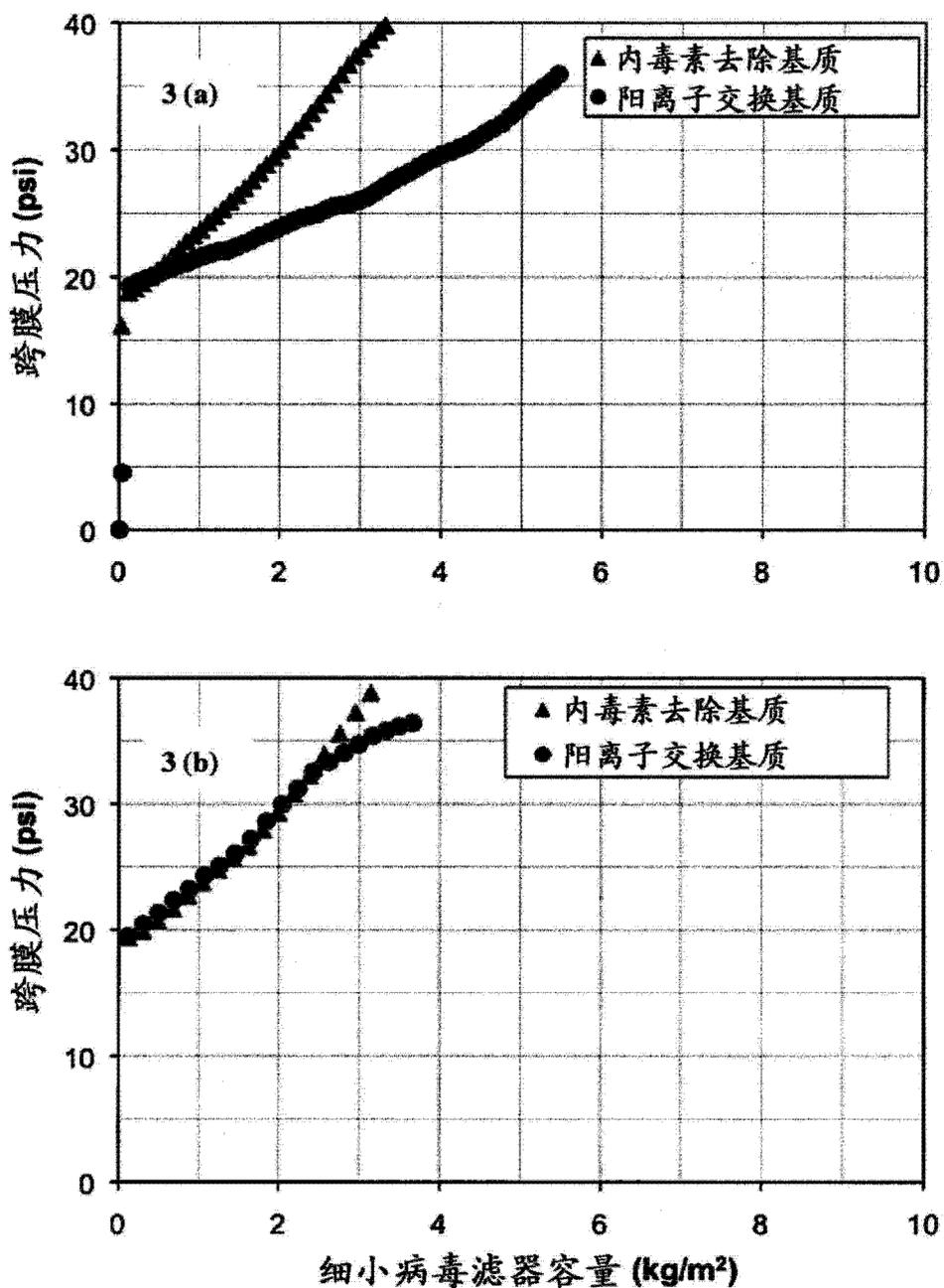


图 1



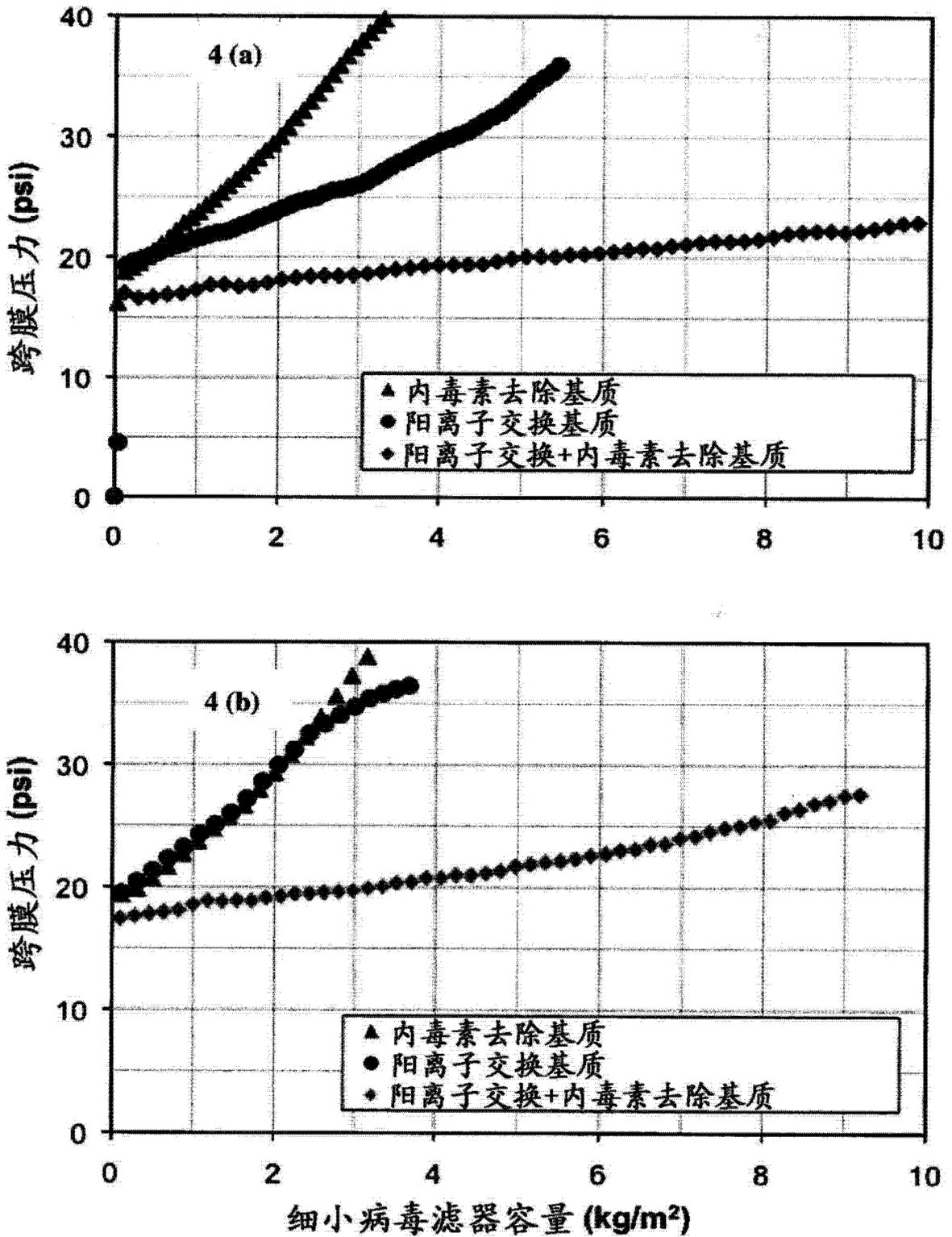
无菌和深层滤膜对细小病毒滞留滤器的容量的效应。
实验是在pH 5.5和8.5 mS/cm电导下实施的。mAb浓度是约13 g/L。

图 2



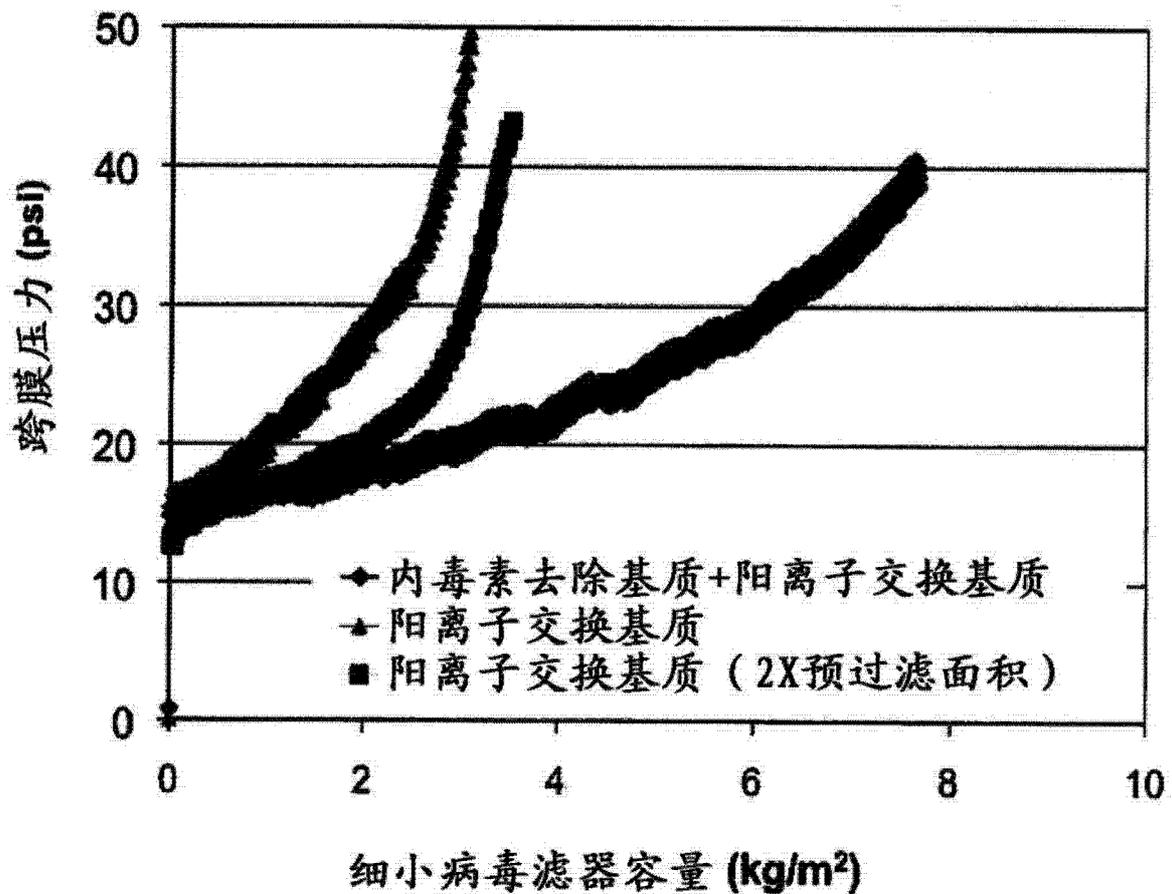
3(a)和3(b): 阳离子交换和内毒素去除基质作为预过滤步骤, 对细小病毒滞留滤器的容量的效应。3(a)和3(b)中的数据是用Mab1分别在pH5.0和6.5下产生的。

图3



4 (a) 和 4 (b): 同时包含阳离子交换和内毒素去除基质的新型预过滤链, 对细小病毒滞留滤器的容量的效应。
 4 (a) 和 4 (b) 中的数据是分别在 pH 5.0 和 6.5 下用 mAb1 产生的。

图 4



同时包含阳离子交换和内毒素去除基质的新型预过滤链与阳离子交换预过滤基质相比较,对细小病毒滞留滤器的容量的效应,用MAB2进行。

图5