(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118641770 A
(43)申请公布日 2024.09.13

(21)申请号 202410751862.1
(22)申请日 2019.08.16
(30)优先权数据
62/719,323 2018.08.17 US
(62)分案原申请数据
201980063053.9 2019.08.16
(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国
(72)发明人 M•佩龙 A•罗德里格斯
A•塔斯蒂安 H•巴克
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 陈晓娜
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 30/88(2006.01)

权利要求书4页 说明书21页 附图9页

(54)发明名称

用于测定多聚体蛋白质的量和纯度的方法和色谱系统

(57)摘要

本发明涉及用于评估样品中多聚体蛋白质的量和/或纯度的色谱系统和方法,其中所述色谱系统包括经由开关阀连接的两种不同的亲和色谱层析基质。

CN 118641770 A

1.一种用于定量样品中异二聚体抗体的量和纯度的方法,所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体杂质和第二同二聚体抗体杂质的混合物,其中所述异二聚体抗体和所述第一同二聚体抗体杂质与第一亲和基质结合,所述第二同二聚体抗体杂质与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消,并且与第一同二聚体抗体杂质相比,所述异二聚体抗体具有较低的对第一亲和基质的亲和力,

所述方法包括下述步骤:

a.在其中所述异二聚体抗体和所述第一同二聚体抗体杂质结合至第一亲和基质的条件下,将样品施加到色谱系统中的第一亲和基质,其中所述色谱系统包括第一亲和基质、第二亲和基质、开关阀和检测器,并且其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质;

b.使用第一流动相洗涤第一亲和基质,所述第一流动相包含具有约pH 5.6至约pH 7.4的离液剂,所述开关阀处在使得流过物直接施加到第二亲和基质的位置,其中所述流过物中的第二同二聚体抗体杂质结合至第二亲和基质,并且所述异二聚体抗体和第一同二聚体抗体杂质保留在第一亲和基质上;

c.切换开关阀以使第一亲和基质与第二亲和基质断开并使第一亲和基质与检测器直接连接,然后使用第二流动相从第一亲和基质洗脱所述异二聚体抗体,所述第二流动相包含具有约pH 4.3至约pH 5.0的离液剂,而第一同二聚体抗体杂质保留在第一亲和基质上,并测定洗脱的异二聚体抗体的量;

d.使用第三流动相从第一亲和基质洗脱所保留的第一同二聚体抗体杂质通过检测器,并测定洗脱的第一同二聚体抗体杂质的量,所述第三流动相包含具有约pH 2.0至约pH 2.8的离液剂;

e.将开关阀切换回到将第一亲和基质串行连接至第二亲和基质和将第二亲和基质串行连接至检测器,然后使用第三流动相从第二亲和基质洗脱第二同二聚体抗体杂质通过检测器,并且测定洗脱的第二同二聚体抗体杂质的量,以及

f.如在步骤c中定量样品中异二聚体抗体的量,并定量样品中异二聚体抗体的纯度,

其中异二聚体抗体的纯度通过异二聚体抗体的量与第一同二聚体抗体杂质、异二聚体抗体和第二同二聚体抗体杂质的量的总和的比率来确定。

2.根据权利要求1所述的方法,其中:

所述异二聚体抗体是包含一个未取代的重链和一个取代的重链的双特异性抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的重链的单特异性抗体,

所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个取代的重链的单特异性抗体,

所述未取代的重链与第一亲和基质和第二亲和基质二者结合,并且

所述取代的重链与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消。

3.根据权利要求1所述的方法,其中:

所述异二聚体抗体是包含一个未取代的CH3结构域和一个取代的CH3结构域的双特异性抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的CH3结构域的单特异性抗体,

所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个取代的CH3结构域的单特异性抗体,

所述未取代的CH3结构域与第一亲和基质和第二亲和基质二者结合,并且

所述取代的CH3结构域与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消。

4.根据权利要求3所述的方法,其中取代的CH3结构域包含H435R和Y436F氨基酸取代。

5.根据权利要求1所述的方法,其中:

所述异二聚体抗体是人IgG1、IgG2或IgG4抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是人IgG1、IgG2或IgG4抗体,以及

所述第二同二聚体抗体杂质是人IgG1、IgG2或IgG4抗体。

6.根据权利要求1所述的方法,其中第一亲和基质包含蛋白A,并且第二亲和基质包含蛋白G。

7.一种定量样品中异二聚体抗体的量和纯度的方法,所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体杂质和第二同二聚体抗体杂质的混合物,其中所述异二聚体抗体和所述第一同二聚体抗体杂质与第一亲和基质结合,所述第二同二聚体抗体杂质与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消,并且与第一同二聚体抗体杂质相比,所述异二聚体抗体具有较低的对第一亲和基质的亲和力,

其中所述异二聚体抗体是包含一个未取代的CH3结构域和一个H435R/Y436F取代的CH3结构域的双特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体,即FcFc*抗体;所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的CH3结构域的单特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体,即FcFc抗体;并且所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个H435R/Y436F取代的CH3结构域的单特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体,即Fc*Fc*抗体;其中Fc表示具有未取代的CH3结构域的重链,并且Fc*表示具有取代的CH3结构域的重链,

其中第一亲和基质包含蛋白A,即蛋白A亲和基质;并且第二亲和基质包含蛋白G,即蛋白G亲和基质;其中所述未取代的CH3结构域结合蛋白A亲和基质和蛋白G亲和基质二者,所述H435R/Y436F取代的CH3结构域结合蛋白G亲和基质而其与蛋白A亲和基质的结合被取消,

所述方法包括以下步骤:

a.在其中FcFc*抗体和FcFc抗体结合至蛋白A亲和基质的条件下,将样品施加到色谱系统中的蛋白A亲和基质,其中所述色谱系统包括蛋白A亲和基质、蛋白G亲和基质、开关阀和检测器,并且其中蛋白A亲和基质经由开关阀串行连接至蛋白G亲和基质;

b.使用第一流动相洗涤蛋白A亲和基质,所述第一流动相包含具有约pH 5.6至约pH 7.4的离液剂,所述开关阀处在使得流过物直接施加到蛋白G亲和基质的位置,其中所述流过物中的Fc*Fc*抗体结合至蛋白G亲和基质,并且FcFc*抗体和FcFc体抗体保留在蛋白A亲和基质上;

c.切换开关阀以使蛋白A亲和基质与蛋白G亲和基质断开并使蛋白A亲和基质与检测器直接连接,然后使用第二流动相从蛋白A亲和基质洗脱所述FcFc*抗体,所述第二流动相包含具有约pH 4.3至约pH 5.0的离液剂,而FcFc抗体保留在蛋白A亲和基质上,并测定洗脱的FcFc*抗体的量;

d.使用第三流动相从蛋白A亲和基质洗脱所保留的FcFc抗体通过检测器,并测定洗脱的FcFc抗体的量,所述第三流动相包含具有约pH 2.0至约pH 2.8的离液剂;

e.将开关阀切换回到将蛋白A亲和基质串行连接至蛋白G亲和基质和将蛋白G亲和基质串行连接至检测器,然后使用第三流动相从蛋白G亲和基质洗脱Fc*Fc*抗体通过所述检测器,并且测定洗脱的Fc*Fc*抗体的量,以及

f.如在步骤c中定量样品中异二聚体抗体的量,并定量样品中异二聚体抗体的纯度,其中异二聚体抗体的纯度通过FcFc*抗体的量与FcF抗体、FcFc*抗体和Fc*Fc*抗体的量的总和的比率来确定。

8.根据权利要求1或权利要求7所述的方法,其中:

所述异二聚体抗体是人IgG1或IgG4抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是人IgG1或IgG4抗体,以及

所述第二同二聚体抗体杂质是人IgG1或IgG4抗体。

9.根据权利要求1或权利要求7所述的方法,其中所述离液剂是选自LiCl、NaCl、KCl、$MgCl_2$和$CaCl_2$缓冲剂的盐缓冲剂。

10.一种色谱系统,其包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器,所述色谱系统用于定量样品中异二聚体抗体的量和纯度,所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体杂质和第二同二聚体抗体杂质的混合物,其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质,其中所述异二聚体抗体和第一同二聚体抗体杂质与第一亲和基质结合,第二同二聚体抗体杂质与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消,并且与第一同二聚体抗体杂质相比,所述异二聚体抗体具有较低的对第一亲和基质的亲和力,其中第一亲和基质包含蛋白A,即蛋白A亲和基质;并且第二亲和基质包含蛋白G,即蛋白G亲和基质;并且其中所述蛋白A亲和基质、所述蛋白G亲和基质和所述检测器各自通过开关阀连接,其中所述开关阀被设置处在允许下述的位置:

使用第一流动相洗涤蛋白A亲和基质,所述第一流动相包含具有约pH 5.6至约pH 7.4的离液剂;

使用第二流动相从蛋白A亲和基质洗脱所述异二聚体抗体,所述第二流动相包含具有约pH 4.3至约pH 5.0的离液剂;

使用第三流动相从蛋白A亲和基质洗脱所述第一同二聚体抗体杂质通过检测器,所述第三流动相包含具有约pH 2.0至约pH 2.8的离液剂;以及

使用第三流动相从所述蛋白G亲和基质洗脱所述第二同二聚体抗体杂质通过检测器。

11.根据权利要求10所述的色谱系统,其中:

所述异二聚体抗体是包含一个未取代的重链和一个取代的重链的双特异性抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的重链的单特异性抗体,

所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个取代的重链的单特异性抗体,

所述未取代的重链与第一亲和基质和第二亲和基质二者结合,并且

所述取代的重链与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消。

12.根据权利要求10所述的色谱系统,其中:

所述异二聚体抗体是包含一个未取代的CH3结构域和一个取代的CH3结构域的双特异性抗体,

所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的CH3结构域的单特异性抗体,

所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个取代的CH3结构域的单特异性抗体,

所述未取代的CH3结构域与第一亲和基质和第二亲和基质二者结合,并且

所述取代的CH3结构域与第二亲和基质结合但其与第一亲和基质的结合被取消。

13.根据权利要求10所述的色谱系统,其中:

所述异二聚体抗体是人IgG1、IgG2或IgG4抗体，

所述第一同二聚体抗体杂质是人IgG1、IgG2或IgG4抗体，以及

所述第二同二聚体抗体杂质是人IgG1、IgG2或IgG4抗体。

14.一种色谱系统，其包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器，所述色谱系统用于定量样品中异二聚体抗体的量和纯度，所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体杂质和第二同二聚体抗体杂质的混合物，其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质，其中所述异二聚体抗体是包含一个未取代的CH3结构域和一个H435R/Y436F取代的CH3结构域的双特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体，即FcFc*抗体；所述第一同二聚体抗体杂质是包含两个未取代的CH3结构域的单特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体，即FcFc抗体；并且所述第二同二聚体抗体杂质是包含两个H435R/Y436F取代的CH3结构域的单特异性人IgG1、IgG2或IgG4抗体，即Fc*Fc*抗体；其中Fc表示具有未取代的CH3结构域的重链，并且Fc*表示具有H435R/Y436F取代的CH3结构域的重链，

其中第一亲和基质包含蛋白A，即蛋白A亲和基质；并且第二亲和基质包含蛋白G，即蛋白G亲和基质；其中所述未取代的CH3结构域结合蛋白A亲和基质和蛋白G亲和基质二者，所述H435R/Y436F取代的CH3结构域结合蛋白G亲和基质而其与蛋白A亲和基质的结合被取消，并且其中所述蛋白A亲和基质、所述蛋白G亲和基质和所述检测器各自通过开关阀连接，其中所述开关阀被设置处在允许下述的位置：

使用第一流动相洗涤蛋白A亲和基质，所述第一流动相包含具有约pH 5.6至约pH 7.4的离液剂；

使用第二流动相从蛋白A亲和基质洗脱所述异二聚体抗体，所述第二流动相包含具有约pH 4.3至约pH 5.0的离液剂；

使用第三流动相从蛋白A亲和基质洗脱所述第一同二聚体抗体杂质通过检测器，所述第三流动相包含具有约pH 2.0至约pH 2.8的离液剂；以及

使用第三流动相从所述蛋白G亲和基质洗脱所述第二同二聚体抗体杂质通过检测器。

15.根据权利要求10或权利要求14所述的色谱系统，其中：

所述异二聚体抗体是人IgG1或IgG4抗体，

所述第一同二聚体抗体杂质是人IgG1或IgG4抗体，以及

所述第二同二聚体抗体杂质是人IgG1或IgG4抗体。

16.根据权利要求10或权利要求14所述的色谱系统，其中所述离液剂是选自LiCl、NaCl、KCl、$MgCl_2$和$CaCl_2$缓冲剂的盐缓冲剂。

17.根据权利要求10或权利要求14所述的色谱系统，其中所述检测器包括配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱。

用于测定多聚体蛋白质的量和纯度的方法和色谱系统

[0001] 本申请是分案申请,对应的母案申请的申请号为201980063053.9,申请日期为2019年8月16日,发明名称为“用于测定多聚体蛋白质的量和纯度的方法和色谱系统”。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于评估样品中多聚体蛋白质的量和/或纯度的色谱系统和方法,其中所述色谱系统包括经由开关阀连接的两个不同的亲和色谱基质。

背景技术

[0003] 双特异性抗体是可以同时且选择性地结合至相同或不同抗原上的两个不同类型的表位的抗体。多个靶标与单个分子的结合是一个有吸引力的治疗概念,尤其是在肿瘤学和自身免疫性疾病领域。最广泛使用的应用是在癌症免疫疗法中,其中双特异性抗体经工程化以同时结合细胞毒性细胞和靶标(如要被破坏的肿瘤细胞)。另外,靶向多于一个分子可用于规避对平行途径的调节并避免对治疗的抗性。结合或阻断途径中的多个靶标可能对阻止疾病有益,因为大多数病况在整个人体中都有复杂的多方面影响。

[0004] 已经提出了多种双特异性抗体形式,并且目前正在开发中。一种这样的形式基于具有改善的药代动力学特征和最小的免疫原性的标准的完全人IgG抗体(参见美国专利号8,586,713和WO2016/018740),如图1示意性所示。单个共同的轻链和两个不同的重链组合形成这样的双特异性。重链之一包含取代的Fc序列(下文称为“Fc*”),其由于在CH3结构域中的H435R/Y436F(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R/Y96F)取代而大大降低了Fc*与蛋白A的结合。Fc*和Fc重链和共同轻链的共表达的结果是,产生了三种产物:其中两种(FcFc和Fc*Fc*)相对于重链是同二聚体的,和其中一种(FcFc*)是所需的异二聚双特异性产物。由于与高亲和力FcFc重链同型二聚体或弱结合Fc*Fc*同二聚体相比,对Fc结合蛋白(例如蛋白A)具有中等结合亲和力,因此Fc*序列允许在市售亲和色谱柱上选择性纯化FcFc*双特异性产物。

[0005] 另一种抗体形式是在WO2013/166604中描述的所谓的“单臂”抗体,在图2A中示意性地显示。该异二聚抗体例如由例如两个不同的重链和仅一个轻链组成。在一个这样的实例中,与轻链偶联的重链包含Fc*序列,而没有轻链的重链包含常规的Fc序列。因此,初始反应混合物包含三种产物,两种同二聚体(FcFc和Fc*Fc*)和所需的异二聚体FcFc*产物,可以使用亲和色谱法对它们进行分离。

[0006] 另一个可能的抗体形式是具有C末端单链可变片段(ScFv)的抗体构建体,如在图2B中示意性地显示。这些抗体可以是单特异性或双特异性的,并且包含单个共同轻链和两个不同的重链。在一个实例中,一个重链具有Fc*序列并偶联至ScFv,而另一个重链具有天然Fc序列且无ScFv。在另一个实例中,具有ScFv构建体的重链具有天然Fc序列,而Fc*重链不具有ScFv。提供了另外的实例,其中取消了与亲和柱结合的另外的突变是具有Fc*突变的同一个链上的重链可变区(VH)的突变,如在U.S.9,493,563(VH3和Fc的突变描述为IMGT 3、5、7、20、22、26、27、79、81、84、84.2、85.1、86、90)中提供,其全部内容通过引用结合至本文

中。如以上实施方案中所述,可以使用差分结合亲和色谱法分离FcFc*异二聚体与FcFc和Fc*Fc*同二聚体的三组分混合物。

[0007] 在双特异性抗体的商业规模生产领域中需要评估抗体生产和纯化的各个阶段中异二聚体的相对和绝对的量和纯度。为此,需要异二聚体和两种同二聚体杂质之间的有效解析。而且,在细胞培养过程以及抗体的纯化过程中需要质量控制测量的速度和效率。本发明通过提供新颖的色谱系统和方法满足了这种和其他需求。

[0008] 提出前述讨论仅仅是为了更好地理解本领域面临的问题的性质,并且不应以任何方式解释为对现有技术的认可,也不应该将本文中任何参考文献的引用解释为认可该引用构成了本申请的“现有技术”。

发明内容

[0009] 下文描述本发明的各种非限制性方面和实施方案。

[0010] 本发明描述了一种包括开关阀的新型色谱系统和定量地评估样品中异二聚体级分的量和/或纯度的方法。

[0011] 在一个方面,本发明提供了一种用于定量样品中蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含蛋白质、第一蛋白质杂质和第二蛋白质杂质的混合物,其中蛋白质和第一杂质结合至第一亲和基质并且第二杂质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质,所述方法包括以下步骤:

[0012] a.将样品施加到包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器的色谱系统,其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质;

[0013] b.在第一组条件下将第二杂质从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质;

[0014] c.切换开关阀以绕过第二亲和基质,在第二组条件下洗脱蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

[0015] d.在第三组条件下洗脱第一杂质通过检测器并测定洗脱的第一杂质的量;

[0016] e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二杂质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

[0017] f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

[0018] 在一个实施方案中,蛋白质是多聚体蛋白质,例如抗体。在一个实施方案中,蛋白质是目的抗体,并且第一和第二蛋白质杂质是多聚体蛋白质,例如,在结构上可能与目的抗体相关或不相关的抗体。在一个实施方案中,蛋白质是双特异性抗体,即异二聚体蛋白质,第一蛋白质杂质是第一同二聚体蛋白质,并且第二蛋白质杂质是第二同二聚体蛋白质。在某些情况下,多聚体蛋白质的混合物由多个真核细胞产生,例如,在细胞培养中的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0019] 在一个实施方案中,与第一杂质相比,所述蛋白质具有较低的对第一亲和基质的亲和力。在一个实施方案中,蛋白质是异二聚蛋白质,第一蛋白质杂质是第一同二聚蛋白质,并且第二蛋白质杂质是第二同二聚蛋白质,异二聚蛋白质和第一同二聚蛋白质结合至第一亲和基质并且第二同二聚蛋白质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质。

[0020] 在一个实施方案中,蛋白质包含第一免疫球蛋白CH3结构域和第二免疫球蛋白CH3

结构域,其中所述第一和第二免疫球蛋白CH3结构域在它们对第一亲和基质的亲和力方面不同,并且其中样品包含混合物,所述混合物包含所述蛋白质、包含两个第一CH3结构域的蛋白质和包含两个第二CH3结构域的蛋白质。

[0021] 在一个实施方案中,第二CH3域包含H435R和Y436F(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R/Y96F)氨基酸取代。在另一实施方案中,第二CH3结构域包含H435R(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R)氨基酸取代。在一些实施方案中,第二CH3结构域包含H435R(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R)氨基酸取代并且显示出弱或不可检测到的与Fc结合配体的结合,所述Fc结合配体例如蛋白A、蛋白G、蛋白L或其衍生物。

[0022] 在一个实施方案中,蛋白质是抗体。在一个实施方案中,蛋白质是双特异性抗体。

[0023] 在一个实施方案中,第一亲和基质包括蛋白A并且第二亲和基质包括蛋白G。

[0024] 在一个实施方案中,第一组条件包括第一pH,第二组条件包括第二pH,并且第三组条件包括第三pH。在一个实施方案中,第二pH低于第一pH,并且第三pH低于第二pH。在一个实施方案中,第一pH是约pH 5.0至约pH 7.4,第二pH是约pH 4.3至约pH 5.6,并且第三pH是约pH 2.0至约pH 2.8。

[0025] 在一个实施方案中,第一组条件、第二组条件和第三组条件包括流动相改性剂。在一个实施方案中,流动相改性剂是选自LiCl、NaCl、KCl、$MgCl_2$和$CaCl_2$缓冲剂的盐缓冲剂。

[0026] 在另一方面中,提供一种用于定量样品中异二聚体蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含异二聚体蛋白质、第一同二聚体蛋白质和第二同二聚体蛋白质的混合物,其中异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至第一亲和基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质,所述方法包括以下步骤:

a.将所述样品施加到包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器的色谱系统,其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质;

b.在第一组条件下将第二同二聚体蛋白质从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质;

c.切换开关阀以绕过第二亲和基质,在第二组条件下洗脱异二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

d.在第三组条件下洗脱第一同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第一杂质的量;

e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

[0027] 在另一方面中,提供了一种用于定量样品中异二聚体蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含异二聚体蛋白质、第一同二聚体蛋白质和第二同二聚体蛋白质的混合物,其中异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至蛋白A基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至蛋白A基质而结合至蛋白G基质,所述方法包括以下步骤:

a.将样品施加到包含蛋白A基质、蛋白G基质和检测器的色谱系统,其中蛋白A基质经由开关阀串行连接至蛋白G基质;

b.在第一组条件下将第二同二聚体蛋白质从蛋白A基质洗脱至蛋白G基质;

c.切换开关阀以绕过蛋白G基质,在第二组条件下洗脱异二聚体蛋白质通过检测

器,并测定洗脱的蛋白质的量;

d.在第三组条件下洗脱第一同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第一杂质的量;

e.在第三组条件下从蛋白G亲和基质洗脱第二同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

[0028] 在一个实施方案中,异二聚体蛋白质包含FcFc*,第一同二聚体蛋白质包含FcFc,并且第二同二聚体蛋白质包含Fc*Fc*。

[0029] 在另一方面,提供了一种色谱系统,所述色谱系统包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器,其中第一亲和基质、第二亲和基质和检测器中的每一个都经由开关阀连接。

[0030] 在另一方面,提供了一种色谱系统,其包括:(i)蛋白A色谱柱,(ii)蛋白G色谱柱,和(iii)检测器,所述检测器包括配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱,其中蛋白A色谱柱、蛋白G色谱柱和检测器的每一个经由开关阀连接。

[0031] 在阅读本发明的以下详细描述(包括所附权利要求书)后,本领域技术人员将清楚了解本发明的这些和其他方面。

附图说明

[0032] 图1是适用于用本发明方法进行分离的双特异性抗体形式的示意图,基于标准完全人IgG抗体,其具有单个共有轻链和两个不同的重链,一个重链包含Fc*突变并且一个重链具有天然(Fc)序列。注意,绘制了一个代表性实例,并且Fc*突变可并入第一重链或第二重链中。

[0033] 图2A和2B显示了适用于按照本发明实施方案进行分离的两种另外的抗体形式的示意图:图2(A)显示了异二聚体“单臂”抗体,其由两个不同的重链和仅一个轻链组成,其中一个重链不包含Fab片段(例如,仅包含重链恒定结构域)。图2(B)显示了具有C末端单链可变片段(ScFv)的两个示例性抗体构建体。Fc*突变可并入第一或第二重链(恒定结构域)多肽中。

[0034] 图3描绘了效价色谱图,示例显示了根据本公开内容的方法并使用根据本公开内容实施方案的系统对双特异性抗体和单体杂质的混合物的分离。

[0035] 图4(A)和4(B)描述了根据本公开内容实施方案的示例性色谱系统的示意图。在图4(A)所示的一个示例性系统中,自动取样器连接至第一亲和基质(柱),第一亲和基质(柱)经由开关阀连接至第二亲和基质(柱)和检测器。在所示的配置中,开关阀定位成串行连接第一柱和第二柱,并且洗脱物流过第一柱到第二柱上,并随后通过检测器进行定量。在如图4(B)所示的另一个示例性系统中,自动取样器连接至第一亲和基质(柱),第一亲和基质(柱)经由开关阀连接至第二亲和基质(柱)。检测器以绕过(无柱)配置经由开关阀连接。在此,开关阀或者将第一柱连接至第二柱,第二柱进一步连接至检测器,或者绕过第二柱并将第一列直接连接至检测器。

[0036] 图5显示了根据本公开内容实施方案的双特异性抗体滴度/纯度设置。示意图描绘了溶剂脱气器、溶剂管理器、样品管理器、柱隔室管理器和检测器。

[0037] 图6描绘了根据本公开内容实施方案的示例性色谱系统。在系统的这个示例性柱

隔室中,样品移动通过包含第一亲和基质的多个串行连接的柱,接着是包含第二亲和基质的多个串行连接的柱。开关阀将第一组柱连接至第二组柱。

[0038] 图7表示根据本发明实施方案的示例性色谱系统的备选方案示意图。

具体实施方式

[0039] 本文公开了本发明的详细实施方案;然而,应当理解,所公开的实施方案仅仅是可以以各种形式实施的本发明的示例说明。此外,结合本发明的各种实施方案给出的每个实例旨在是示例说明性的而非限制性的。因此,本文所公开的具体结构和功能细节不应被解释为限制性的,而仅仅是用于教导本领域技术人员以各种方式应用本发明的代表性基础。

[0040] 除非另有规定,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文所描述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述了特定的方法和材料。

[0041] 在本说明书和所附权利要求书中,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数引用。因此,例如,对“方法”的引用包括一个或多个方法,和/或本文描述的类型的步骤和/或本领域技术人员在阅读本公开内容后将变得显而易见的那些。

[0042] 适用于用根据本发明的方法进行分离的蛋白质的非限制性实例可包括但不限于异二聚体抗体,例如,双特异性抗体、单臂抗体和ScFv抗体。双特异性抗体通常包含两个不同的重链,每个重链特异性结合不同的表位——在两个不同的分子上(例如,两个不同的抗原或一个抗原和一个T细胞受体)或在同一分子上(例如,在相同抗原上)。如果双特异性抗体能够选择性地结合两个不同的表位(第一表位和第二表位),则第一重链对于第一表位的亲和力通常比第一重链对于第二表位的亲和力低至少一到二或三或四个量级,反之亦然。双特异性抗体识别的表位可以在相同或不同的靶标上(例如,在相同或不同的蛋白质上)。例如,可以通过将识别相同抗原的不同表位的重链进行组合来制备双特异性抗体。例如,编码识别相同抗原的不同表位的重链可变序列的核酸序列可与编码不同重链恒定区的核酸序列融合,并且此类序列可在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达。典型的双特异性抗体有两个重链,每个重链有三个重链CDR,然后是(N末端到C末端)CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域,以及免疫球蛋白轻链,该轻链要么不赋予抗原结合特异性但可以与每个重链相缔合,要么可以与每个重链相缔合并能够结合由重链抗原结合区结合的一个或多个表位,或者能够与每个重链缔合并使一个或两个重链与一个或两个表位结合。

[0043] 短语“含Fc的蛋白质”包括抗体、双特异性抗体、免疫粘附素和至少包含免疫球蛋白CH2和CH3区域的功能部分的其他结合蛋白质。“功能性部分”是指能够结合Fc受体(例如FcγR;或FcRn,即新生儿Fc受体)和/或能够参与补体激活的CH2和CH3区域。如果CH2和CH3区域包含缺失、取代和/或插入或者其他修饰,使得其不能结合任何Fc受体并且也不能激活补体,则CH2和CH3区域不起作用。

[0044] 含Fc的蛋白质可包含免疫球蛋白结构域中的修饰,包括其中影响结合蛋白质的一个或多个效应子功能的修饰(例如,影响FcγR结合、FcRn结合以及因此影响半衰期和/或CDC活性的修饰)。此类修饰包括但不限于以下修饰及其组合,参考免疫球蛋白恒定区的EU编号:238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、

280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307,308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438和439。

[0045] 例如,但并非限制性地,结合蛋白是含Fc的蛋白质并且表现出增强的血清半衰期(与没有所述修饰的相同含Fc的蛋白质相比)且在以下位置具有修饰:250(例如,E或Q);250和428(例如,L或F);252(例如,L/Y/F/W或T),254(例如,S或T)和256(例如,S/R/Q/E/D或T);或428和/或433(例如,L/R/SI/P/Q或K)处的修饰和/或434(例如,H/F或Y)处的修饰;或250和/或428处的修饰;或307或308(例如,308F,V308F)和434处的修饰。在另一实例中,修饰可以包括428L(例如,M428L)和434S(例如,N434S)修饰;428L、259I(例如,V259I)和308F(例如,V308F)修饰;433K(例如,H433K)和434(例如,434Y)修饰;252、254和256(例如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如,T250Q和M428L);307和/或308修饰(例如,308F或308P)。

[0046] 术语“星形取代”、“Fc*”和“HC*”包括任何分子、免疫球蛋白重链、Fc片段、含有Fc的分子等,其包含消除与细菌蛋白质的结合的突变,已知该细菌蛋白质结合免疫球蛋白的Fc结构域,所述细菌蛋白质例如蛋白A、蛋白G、蛋白L或其衍生物(例如参见Choe,W.等人2016,Materials 9,994,doi:10.3390/ma9120994中描述的SpA和SpA模拟亲和配体,该文献通过引用并入本文)。免疫球蛋白或其他含有Fc的蛋白质例如可以包含CH3结构域内的修饰序列,其大大减少与蛋白A的结合,如例如WO2016/018740和美国专利号8,586,713中所述。在整个说明书中,Fc结构域中的突变可被指定为“星形取代”或Fc*,以便于注意到二聚体的一个多肽包含突变,而另一个不包含突变。因此,Fc*Fc*表示同二聚体,其中两个单体都包含Fc*,并且FcFc*或Fc*Fc表示关于Fc*取代的异二聚体。术语FcFc*和Fc*Fc在本文中互换使用。

[0047] 短语“流动相改性剂”包括减少或破坏蛋白质之间非特异性(即非亲和)离子和其他非共价相互作用的影响的部分。“流动相改性剂”包括例如盐,第一族和第二族金属与醋酸根、碳酸氢根、碳酸根、卤素离子(例如氯离子或氟离子)、硝酸根、磷酸根或硫酸根的离子化合。“流动相改性剂”的非限制性示例说明列表包括醋酸铵、醋酸锂、醋酸钠和醋酸钾盐;碳酸氢钠和碳酸氢钾;碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾和碳酸铯;氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化铯和氯化镁;氟化钠和氟化钾;硝酸钠、硝酸钾和硝酸钙;磷酸钠和磷酸钾;以及硫酸钙和硫酸镁。

[0048] “流动相改性剂”还包括离液剂,其削弱或以其他方式干扰生物分子系统内的非共价力并增加熵。离液剂的非限制性实例包括丁醇、氯化钙、乙醇、氯化胍、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲和尿素。离液剂包括影响蛋白质溶解度的盐。更高离液性的阴离子包括例如氯离子、硝酸根、溴离子、氯酸根、碘离子、高氯酸根和硫氰酸根。更高离液性的阳离子包括例如锂、镁、钙和胍离子。

[0049] “流动相改性剂”包括那些影响离子或其他非共价相互作用的部分,在添加至pH梯度或步骤时,或在“流动相改性剂”中的蛋白A支持物的平衡和应用pH步骤或梯度时,导致同二聚体IgG和异二聚体IgG(例如,如本文描述的野生型人IgG和相同但其CH3结构域具有一个或多个修饰的IgG)洗脱之间的pH单位距离变宽。“流动相改性剂”的合适浓度可通过使用

相同的柱、pH步骤或梯度的浓度来确定,并且随着“流动相改性剂”浓度的增加,直到在给定的pH步骤或pH梯度处达到最大pH距离为止。“流动相改性剂”还可包括非极性改性剂,包括例如丙二醇、乙二醇等。

[0050] 亲和基质是固体支持物非水基质,其中亲和蛋白(例如蛋白A、蛋白G、蛋白L、蛋白Z或其重组衍生物)附着在该基质上(Choe,W.,等人,2016,同上文)。此类支持物包括琼脂糖、sepharose、玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、硝化纤维素、木炭、沙子、纤维素和任何其他合适的材料。这种材料在本领域中是众所周知的。任何合适的方法都可以用于将第二蛋白质固定到固体支持物。将蛋白质固定到合适固体支持物上的方法在本领域中是众所周知的。参见例如Ostrove,Guide to Protein Purification,Methods in Enzymology,182:357-371,1990。这种固体支持物,无论是否含有固定化的蛋白A,都可以从许多商业来源容易地获得,包括例如Vector Laboratory(Burlingame,Calif.)、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,Calif.)、BioRad(Hercules,Calif.)、Amersham Biosciences(GE Healthcare的分部,Uppsala,Sweden)、Pall(Port Washington,NY)和EMD-Millipore(Billerica,Mass.)。固定化至孔玻璃基质的蛋白A可作为PROSEP®-A(Millipore)市售可得。固相也可以是基于琼脂糖的基质。固定化在琼脂糖基质上的蛋白A市售可得,例如,作为MABSELECTTM(GE Amersham Biosciences)市售可得。含有免疫球蛋白-或Fc-结合蛋白的亲和柱可以通过将任何SpA或模拟SpA配体固定至固体支持物来制造。

[0051] 如本文所使用,“亲和层析”是一种色谱层析方法,它利用生物分子之间的特异的可逆相互作用,而不是生物分子的一般性质(如等电点、疏水性或尺寸),来影响色谱分离。“蛋白A亲和层析”或“蛋白A层析”是指利用蛋白A的IgG结合结构域对于免疫球蛋白分子的Fc部分的亲和力的特定亲和层析方法。该Fc部分包括人或动物免疫球蛋白恒定结构域CH2和CH3或与这些基本相似的免疫球蛋白结构域。

[0052] 蛋白A是由多种株系的金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)产生的细胞壁组分,其由单个多肽链组成。蛋白A基因产物由以串联方式附接在病原体细胞壁上的5个同源重复序列组成。这五个结构域为约58个氨基酸的长度,以EDABC表示,每个结构域均显示免疫球蛋白结合活性(Tashiro M&Montelione G T(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.,5(4):471-481)。五个同源的免疫球蛋白结合结构域折叠成三螺旋束。每个结构域能结合来自许多哺乳动物物种的蛋白质,最显著的是IgG(Hober S等人,(2007)J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.,848(1):40-47)。蛋白A结合大多数免疫球蛋白在Fc区域内的重链,但在人VH3家族的情形下也结合在Fab区域内的重链(Janson B等人,(1998)FEMS Immunol.Med.Microbiol.,20(1):69-78)。蛋白A结合来自包括人、小鼠、兔和豚鼠的不同物种的IgG,但不结合人IgG3(Hober S等人,(2007),出处同上)。人IgG3不能结合蛋白A可以通过人IgG3 Fc区域中的H435R和Y436F取代得到解释(EU编号,Jendeberg等人,(1997)J.Immunol.Methods,201(1):25-34)。除IgG外,蛋白A还与IgM和IgA相互作用。

[0053] 蛋白A以如此高亲和力结合抗体的能力是其在生物制药中产业化规模应用的驱动动力。用于生物制药中抗体生产的蛋白A通常在大肠杆菌(E.coli)中重组产生,并且与天然蛋白A基本相同地起作用(Liu H F等人,(2010)MAbs,2(5):480-499)。最常见的是,重组蛋白A结合至固定相色谱树脂,用于纯化抗体。最佳结合发生在pH8.2,虽然结合在中性或生理条件(pH 7.0-7.6)也很好。洗脱通常通过pH向酸性pH(甘氨酸-HC1,pH2.5-3.0)移动来实

现。这有效地解离大多数蛋白质-蛋白质和抗体-抗原结合相互作用,而不会永久地影响蛋白质结构。然而,一些抗体和蛋白质受到低pH的破坏,并且在某些情况下,最好在回收后立即中和,通过添加1/10体积的碱性缓冲液,例如1M Tris-HCl,pH 8.0,以最小化在低pH条件中持续的时间。

[0054] 存在各种市售可得的蛋白A色谱树脂。这些介质间主要差异是支持物基质类型、蛋白A配体修饰、孔径和粒径。这些因素的差异导致吸附剂的压缩性、化学和物理稳健性、扩散阻力和结合能力方面存在差异(Hober S等人,2007),出处同上)。蛋白A色谱树脂的实例包括但不限于来自GE Healthcare的MabSelect SuReTM蛋白A树脂和MabSelectTM蛋白A树脂、来自Bioload的EconoPac蛋白A柱、可从Applied Biosystems获得的rProA以及来自Thermo Fisher的POROS®A,如实施例所示。

[0055] 如本文所使用的,蛋白A包括来自金黄色葡萄球菌的细胞壁的天然蛋白、重组或合成方法产生的蛋白A以及保留结合Fc区域的能力的变体。工程化的蛋白A可以是例如Z结构域四聚体、Y结构域四聚体或缺乏D和E结构域的工程化的蛋白A。这些工程化的蛋白A的实例不能结合(或如果有的话,以非常低的亲和力结合)至免疫球蛋白的VH3结构域,但仍然可以结合至IgG1、IgG2和IgG4的CH3结构域。实际上,蛋白A层析法涉及使用固定化至固体支持物的蛋白A。参见Gagnon,Protein A Affinity Chromotography,Purification Tools for Monoclonal Antibodies,pp.155-198,Validated Biosystems,1996。

[0056] 蛋白G是从C群和G群链球菌(Streptococci)中分离出来的细菌细胞壁蛋白质。从不同链球菌中分离到的天然蛋白G的DNA测序鉴定了免疫球蛋白结合结构域以及用于白蛋白和细胞表面结合的位点。根据菌株的不同,免疫球蛋白结合区域和白蛋白结合区域由2-3个独立折叠单元组成(Tashiro M&Monteloine G T(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.,5(4):471-481)。来自G148株的蛋白G由3个白蛋白和免疫球蛋白结合结构域组成,分别表示为ABD1、ABD2和ABD3,以及C1、C2和C3(Olson A等,(1987)Eur.J.Biochem.,168(2):319-324)。表示为C1、C2和C3的每个免疫球蛋白结合结构域约55个残基并由约15个残基的接头分开。蛋白G免疫球蛋白结合结构域的所有实验解析的3D结构均显示高度致密的球状结构,无任何二硫键或紧密结合的辅基(Sauer-Eriksson AE等人,(1995)Structure,3(3):265-278;Derrick J P&Wigley D B(1992)Nature,359(6397):752-754;Derrick J P&Wigley D B(1994)J.Mol.Biol.,243(5):906-918;Lian L Y等人,(1994)Nat.Struct.Biol.,1(6):355-357)。该结构包括由两个通过α螺旋连接的反平行β发夹组成的四链β片层。

[0057] 与蛋白A相比,来自C群和G群的链球菌菌株显示出与包括IgG3在内的所有人IgG亚类的结合。蛋白G也结合至包括小鼠、兔和绵羊在内的几种动物IgG(Bjorck L&Kronvall G(1984)J.Immunol.,133(2):969-974;Akerstrom B等人,(1985)J.Immunol.,135(4):2589-2592;Akerstrom B&Bjorck L(1986)J.Biol.Chem.,261(22):10240-10247;Fahnestock S R等人,(1986)J.Bacteriol.,167(3):870-880)。因此,与蛋白A相比,蛋白G显示出对不同物种的亚类的更广泛结合谱。此外,蛋白G以高亲和力结合至IgG的Fab部分。链球菌蛋白G的结合结构域的结构已经单独(通过NMR,Lian L Y等人,(1994)出处同上)以及与IgG1Fab复合(通过x射线晶体学,Derrick J P&Wigley D B(1992)出处同上和Derrick J P&Wigley D B(1994)出处同上)进行了测定。所有实验解析的3D结构都显示出在IgG重链的CH1结构域内的结合。

[0058] 如本文所用的蛋白G可以是天然存在的或修饰的链球菌蛋白G,或者可以是工程化的蛋白G。工程化的蛋白G可以包含B1结构域(又名GB1)并且可以是缀合的或非缀合的。在另一实施方案中,第二亲和基质包含固定至固体基底的蛋白L配体及其衍生物。与蛋白A类似,在大肠杆菌中产生的重组蛋白G可用于纯化抗体。白蛋白和细胞表面结合结构域已从重组蛋白G中去除,以减少非特异性结合,并因此可用于从粗样品中分离IgG。与蛋白A类似,重组蛋白G结合至固定相色谱树脂,用于纯化抗体。最佳结合发生在pH 5,尽管结合在pH 7.0-7.2也很好;如同对于蛋白A,洗脱也通过pH向酸性pH(甘氨酸-HCl,pH 2.5-3.0)移动来实现。蛋白G色谱树脂的实例包括但不限于来自GE Healthcare的蛋白G Sepharose™4Fast Flow树脂和HiTrap™蛋白G HP柱。

[0059] 与蛋白A类似,在大肠杆菌中产生的重组蛋白G通常用于纯化抗体。白蛋白和细胞表面结合结构域已从重组蛋白G中去除以减少非特异性结合,并因此可用于从粗样品中分离IgG。与蛋白A类似,重组蛋白G结合至固定相色谱树脂,用于纯化抗体。最佳结合发生在pH 5,尽管结合在pH 7.0-7.2也很好;如同对于蛋白A,洗脱也通过pH向酸性pH(甘氨酸-HCl,pH 2.5-3.0)移动来实现。蛋白G色谱树脂的实例包括但不限于来自GE Healthcare的蛋白G SepharoseTM 4Fast Flow树脂和HiTrapTM蛋白G HP柱、可从Applied Biosystems获得的rProG以及来自Thermo Fisher的POROS®G,如实施例所示。

[0060] 其他蛋白质,例如蛋白L、M1蛋白和蛋白H,也可用于本发明的亲和色谱。蛋白L是一种免疫球蛋白结合蛋白,最初衍生自细菌大消化链球菌(Peptostreptococcus magnus),但现在通过重组产生(Bjorck L(1988)J.Immunol.,140(4):1194-1197;Kastern W等人,(1992)J.Biol.Chem.,267(18):12820-12825)。蛋白L具有通过κ轻链相互作用结合抗体的抗原结合位点而不干扰抗体的抗原结合位点的独特能力(Nilson B H et al.,(1993)J.Immunol.Methods,164(1):33-40)。这使得蛋白L能够比其他抗体结合蛋白结合更广泛的免疫球蛋白种类和亚类。蛋白L将结合至所有种类的免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA、IgE和IgD)。蛋白L也将结合至单链可变片段(scFv)和Fab片段(Nilson B H等人,(1993)出处同上;Bottomley S P等人,(1995)Bioseparation,5(6):359-367)。蛋白L结合人κI、III和IV亚类以及小鼠κI亚类的可变结构域(Nilson B H等人,(1992)出处同上)。蛋白L色谱树脂的实例包括但不限于实施例中使用的来自Genescript的蛋白L树脂。

[0061] M1蛋白和蛋白H是同时存在于某些化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)菌株表面的表面蛋白。蛋白H对IgG的Fc区域具有亲和力(Akesson P等人,(1990)Mol.Immunol.,27(6):523-531;Akesson P等人,(1994)Biochem.J.,300(Pt 3):877-886)。蛋白H结合至来自人、猴和兔的IgG的Fc区域(Akesson P等人,(1990),出处同上;Frick I M等人,(1995)EMBO J.,14(8):1674-1679)。也已知M蛋白结合纤维蛋白原(Kantor F S(1965)J Exp Med,121:849-859),并且先前的工作已经证明来自API菌株的M1蛋白也对白蛋白和多克隆IgG具有亲和力(Schmidt K H&Wadstrom T(1990)Zentralbl.Bakteriol.,273(2):216-228)。

[0062] 亲和色谱还包括可用于选择性结合并由此纯化抗体、抗体的片段或包含免疫球蛋白结构域和/或序列的嵌合融合蛋白的介质。抗体包括IgG、IgA、IgM、IgY、IgD和IgE型。抗体还包括单链抗体,例如骆驼抗体、工程化的骆驼抗体、单链抗体、单结构域抗体、纳米抗体等。抗体片段包括VH、VL、CL、CH序列。含有抗体序列的抗体片段和融合蛋白包括例如F(ab')3、F(ab')2、Fab、Fc、Fv、dsFv、(scFv)2、scFv、scAb、微抗体(minibody)、双特异抗体

(diabody)、三特异抗体(tribody)、四特异抗体(tetrabody)、Fc融合蛋白、陷阱分子等(参见Ayyar等人,Methods56(2012):116-129)。这种亲和色谱介质可包含选择性结合抗体、其片段和包含这些片段的融合蛋白的配体。这种配体包括抗体结合蛋白、细菌衍生受体、抗原、凝集素或针对靶分子的抗-抗体。需要纯化的抗体。例如,针对IgG-CH1、IgG-Fc、IgG-CH3、IgG1、LC-κ、LC-λ、IgG3/4、IgA、IgM等中的任何一种或多种的骆驼衍生亲和配体可用作亲和配体(作为CAPTURESELECT色谱树脂市售可得(Life Technologies,Inc.,Carlsbad,Calif))。

[0063] 描述了基于异二聚体对亲和试剂的不同亲和力易于从同型二聚体中回收异二聚体的技术。差异亲和力技术的第一个实例涉及使用来自两种不同动物物种的两个不同重链,其中一个重链不结合蛋白A(Lindhofer H等人,(1995)J Immunol.,155(1):219-225)。相同的作者还描述了两个不同的重链的使用,它们来源于两种不同的人免疫球蛋白同种型(IGHG1和IGHG3),其中一个重链不结合蛋白A(IGHG3;见美国专利号6,551,592,Lindhofer H等人)。后一种技术的变体已在WO10/151792(Davis S等人)中描述,并涉及使用Jendeberg等人(Jendeberg等人,(1997)J.Immunol.Methods,201(1):25-34)描述的两个氨基酸取代H435R/Y436F以大幅度降低异二聚体重链之一对蛋白A的亲和力。

[0064] 如本文所用,术语“检测器”包括色谱柱,其配备有检测和/或评估从色谱柱洗脱出的混合物的组分的装置。本领域已知两种一般类型的检测器:破坏性检测器和非破坏性检测器。破坏性检测器对柱洗脱物进行连续转化(燃烧、蒸发或与试剂混合),随后测量所得材料(等离子体、气溶胶或反应混合物)的某些物理性质。非破坏性检测器直接测量柱洗脱物的某些性质(如UV吸收),并由此提供用于进一步的回收分析。破坏性检测器的实例包括带电气溶胶检测器(CAD)、火焰离子化检测器(FID)、气溶胶基检测器(NQA)、火焰光度检测器(FPD)、原子发射检测器(AED)、氮磷检测器(NPD)、蒸发光散射检测器(ELSD)、质谱仪(MS)、电解电导检测器(ELCD)、召唤检测器(summon detector,SMSD)和mira检测器(MD)。非破坏性检测器的一个实例包括UV检测器,包括固定长度和可变长度的UV检测器,包括二极管阵列检测器(DAD)或光电二极管阵列(PDA)检测器。洗脱物的UV吸收可在单个或多个波长连续测量。非破坏性检测器的其他实例包括热导检测器(TCD)、荧光检测器(FLR)、电子捕获检测器、光离子化检测器(PID)和折射率检测器(RI或RID)。在一个实例中,可使用DAD/UV检测器来检测并定量从系统的柱隔室流出的洗脱物物质。双特异性FcFc*抗体、FcFc同二聚体和Fc*Fc*异二聚体选择性地从色谱系统中洗脱出,并且通过在280nM处的UV检测来选取信号。任何检测器可适于连接温度控制系统,例如具有冷却功能的温度控制流动池,以允许蛋白质物质的更好稳定性。

[0065] 本发明可设置为色谱系统的部分,例如市售可得的色谱系统,例如可从Shimadzu Corporation、Agilent Technologies、Waters Corporation等得到的HPLC系统。在一个非限制性实施方案中,该系统尤其包括溶剂和/或试剂保持单元、溶剂管理器/泵、样品管理器、柱隔室管理器和检测器单元。图5中描绘了一个非限制性实施方案。

[0066] 保持单元容纳在色谱应用中使用的溶剂和缓冲液,并且可选地包括溶剂脱气器。在一个实施方案中,溶剂和缓冲液在流入溶剂管理器之前通过溶剂脱气器。

[0067] 溶剂管理器负责溶剂输送,并且可包括计算机平台,该计算机平台可配置为满足根据每个特定实施方案的分析系统的需要,以改进分离和分辨率,并且可包括,例如,二元

或四元梯度模块。溶剂管理器可尤其控制HPLC系统的溶剂速率、缓冲液组成和压力界限等。

[0068] 样品管理器可任选性地包括温度控制单元,其能够在上样到柱之前改变温度(例如,冷却和/或加热),或保持样品温度恒定(例如,通过将样品冷却至恒定温度)。在一个实施方案中,样品被包含在样品管理器隔室中并且在等待注射时保持在4℃。样品被带进自动取样器,其中针直接进入队列中指示的样品。在一个实施方案中,自动取样器还包括用于处理注入的溶剂和/或样品溢出的压力调节器。然后,样品从自动取样器针移动到柱隔室。

[0069] 通过洗脱蛋白质通过检测器并使用本领域已知的计算方法来确定级分中蛋白质的量或数量。该系统还可以包括系统控制器单元或其他计算机辅助装置。

[0070] 纯度和/或质量控制分析通过分析和定量样品中存在的三种蛋白质种类的比率来执行。混合物中蛋白质的纯度可通过测定每种蛋白质级分的量和计算目的蛋白质的量与混合物中所有蛋白质的量总和的比率来计算。举例来说,在包含异二聚体蛋白质及两种或更多种蛋白质杂质的混合物中,异二聚体蛋白质的纯度可通过测定每种蛋白质级分的量并计算异二聚体蛋白质的量与异二聚体蛋白质和两种或更多种蛋白质杂质的量总和的比率来定量。

[0071] 度量双特异性纯度给出了双特异性抗体相比于总抗体量的百分比,如等式1所定义。举例来说,包含FcFc、FcFc*及Fc*Fc*的混合物中FcFc*的纯度可如下定量:

[0072] 等式1:对双特异性抗体的纯度的定量

$$\text{FcFc*的纯度} = \frac{\text{FcFc*的量}}{(\text{FcFc 的量} + \text{FcFc*的量} + \text{Fc*Fc*的量})}$$

[0073] 本文使用的开关阀、流量开关阀或流量控制阀是引导、改变或切断洗脱出色谱柱的流动路径的装置。开关阀可以是多通的,例如,双通、三通、四通等,即开关阀能够将流引导到两个、三个或更多不同的容器。容器可以是任何来源,例如色谱柱、亲和层析柱、检测器或废物处理箱。通过在不同位置之间切换开关阀来实现容器的更换。

[0074] 举例来说,在色谱系统中,开关阀可以串行或非串行方式连接第一亲和基质、第二亲和基质和检测器。在非限制性实施方案中,例如,如图5-7所示,开关阀可以将第一亲和基质串行连接至第二亲和基质。在该示例性系统中,一个开关阀位置将允许洗脱物从第一亲和基质流向第二亲和基质,并随后流向检测器。将开关阀切换到另一个位置将允许洗脱物从第一亲和基质直接流向检测器,绕过第二亲和基质。来自第二亲和基质的洗脱物可在与第一亲和基质接合或不接合的情况下流向检测器。第二亲和基质可以直接或不直接连接到自动取样器。在图4B中描绘的另一非限制性实施方案中,来自第一亲和基质的洗脱物能够绕过第二亲和基质直接流向检测器。

[0075] 在一个方面,本发明描述了一种通过利用包含开关阀的新型色谱系统定量地评估异二聚体级分的量和/或纯度的方法。

[0076] 在一个方面,本发明描述了一种用于定量样品中蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含蛋白质、第一蛋白质杂质和第二蛋白质杂质的混合物,其中所述蛋白质和第一杂质结合至第一亲和基质并且第二杂质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质,所述方法包括以下步骤:

[0077] a.将样品施加到包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器的色谱系统,其中第

一亲和基质经由开关阀串联至第二亲和基质;

[0078] b.在第一组条件下将第二杂质从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质;

[0079] c.切换开关阀以绕过第二亲和基质,在第二组条件下洗脱蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

[0080] d.在第三组条件下洗脱第一杂质通过检测器并测定洗脱的第一杂质的量;

[0081] e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二杂质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

[0082] f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

[0083] 在一个实施方案中,蛋白质是多聚体蛋白质,例如抗体。在一个实施方案中,蛋白质是目的抗体,并且第一和第二蛋白质杂质是多聚体蛋白质,例如,在结构上与目的抗体相关或不相关的抗体。在一个实施方案中,蛋白质是双特异性抗体,即异二聚体蛋白质,第一蛋白质杂质是第一同二聚体蛋白质并且第二蛋白质杂质是第二同二聚体蛋白质。在某些情况下,多聚体蛋白质的混合物由多个真核细胞产生,例如,在细胞培养中的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0084] 在一个实施方案中,与第一杂质相比,所述蛋白质具有较低的对第一亲和基质的亲和力。在一个实施方案中,蛋白质是异二聚体蛋白质,第一蛋白质杂质是第一同二聚体蛋白质,并且第二蛋白质杂质是第二同二聚体蛋白质,异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至所述第一亲和基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至所述第一亲和基质而结合至所述第二亲和基质。

[0085] 在一个实施方案中,蛋白质包含第一免疫球蛋白CH3结构域和第二免疫球蛋白CH3结构域,其中所述第一和第二免疫球蛋白CH3结构域在它们对第一亲和基质的亲和力方面不同,并且其中样品包含混合物,所述混合物包含所述蛋白质、包含两个第一CH3结构域的蛋白质和包含两个第二CH3结构域的蛋白质。

[0086] 在一个实施方案中,第二CH3结构域包含H435R和Y436F(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R/Y96F)氨基酸取代。

[0087] 在一个实施方案中,第一亲和基质包含固定在固体基底上的蛋白A配体及其衍生物。在某些情况下,基底是珠或颗粒,使得亲和基质是固定有蛋白A的多个颗粒。蛋白A可以是天然存在的或修饰的葡萄球菌蛋白A,或可以是工程化的蛋白A。工程化的蛋白A可以是例如Z结构域四聚体、Y结构域域四聚体或者缺少D和E结构域的工程化的蛋白A。这些工程化的蛋白A的实例不能结合(或如果有的话,以极低亲和力结合)至免疫球蛋白的VH3结构域,但仍然可以结合至IgG1、IgG2和IgG4的CH3结构域。

[0088] 在一个实施方案中,第二亲和基质包含固定在固体基底上的蛋白G配体及其衍生物。在某些情况下,基底是珠或颗粒,使得亲和基质是固定有蛋白G的多个颗粒。蛋白G可以是天然存在的或修饰的链球菌蛋白G,或可以是工程化的蛋白G。工程化的蛋白G可以包含B1结构域(又名GB1)并且可以是缀合的或非缀合的。在另一实施方案中,第二亲和基质包含固定在固体基底上的蛋白L配体及其衍生物。

[0089] 在一个实施方案中,洗脱条件可包括特定pH范围和包含流动相改性剂(例如,离液剂)的缓冲液。在一个实施方案中,用于洗脱第二杂质(例如,第二同二聚体蛋白质)的第一组洗脱条件包括第一pH。在一个实施方案中,用于洗脱蛋白质(例如,异二聚体蛋白质)的第

二组洗脱条件包括第二pH。在一个实施方案中,用于洗脱第一杂质(例如,第一同二聚体蛋白质)的第三组洗脱条件包括第三pH。在一个实施方案中,第二pH可低于第一pH。在一个实施方案中,第三pH可低于第二pH。在一个实施方案中,第二pH可低于第一pH,并且第三pH可低于第二pH。在另一实施方案中,第一pH可大于pH 5,或为约pH 5至约pH 8,或约pH 5.2至约pH 7.4,或pH 6.4。在一个实施方案中,第二pH可为约pH 3.5至约pH 6,或约3.8至约5.6。在一个实施方案中,第三pH可小于pH 4,或约pH 1.5至约pH 3.6,或约pH 2.0至约pH 2.8,或约pH 2.2。

[0090] 在一个实施方案中,第一、第二和第三组洗脱条件包括合适的缓冲液,例如柠檬酸盐、醋酸盐、4-吗啉乙磺酸(MES)、磷酸盐、琥珀酸盐等,以及它们的组合和混合物。在一个实施方案中,第一、第二和第三组洗脱条件包括离液剂。离液剂可以是盐,具有选自锂、镁、钙和胍的阳离子,以及选自氯离子、硝酸根、溴离子、氯酸根、碘离子、高氯酸根和硫氰酸根的阴离子。在一个特定实施方案中,离液剂为$CaCl_2$,例如250-500mM $CaCl_2$。在另一特定实施方案中,离液剂为$MgCl_2$,例如250-500mM $MgCl_2$。

[0091] 在一个实施方案中,异二聚体是双特异性抗体。这里,第一多肽包含能够结合至蛋白A的CH3结构域(“Fc”),并且第二多肽包含不能结合至蛋白A的CH3结构域(“Fc*”)。在某些情况下,第二多肽包含在其CH3结构域中的H435R/Y436F(通过EU编号系统;通过IMGT外显子编号系统是H95R/Y96F)取代(又称“Fc*”或“星形取代”)。因此,在一些实施方案中,第一同二聚体是具有两个未取代的CH3结构域(即FcFc)的单特异性抗体;第二同二聚体是具有两个H435R/Y436F取代的CH3结构域(即Fc*Fc*)的单特异性抗体;并且异二聚体是具有一个未取代的CH3结构域和一个H435R/Y436F取代的CH3结构域(即Fc*Fc)的双特异性抗体。

[0092] 在另一方面,本发明描述了一种用于定量样品中异二聚体蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含异二聚体蛋白质、第一同二聚体蛋白质和第二同二聚体蛋白质的混合物,其中异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至蛋白A基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至蛋白A基质而结合至蛋白G基质,所述方法包括以下步骤:

[0093] a.将样品施加到包括蛋白A基质、蛋白G基质和检测器的色谱系统,其中蛋白A基质经由开关阀串行连接至蛋白G基质;

[0094] b.在第一组条件下将第二同二聚体蛋白质从蛋白A基质洗脱至蛋白G基质;

[0095] c.切换开关阀以绕过蛋白G基质,在第二组条件下洗脱异二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

[0096] d.在第三组条件下洗脱第一同二聚体蛋白质通过检测器并测定洗脱的第一杂质的量;

[0097] e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

[0098] f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

[0099] 第一同二聚体和异二聚体与第二亲和基质的差异性结合可尤其通过改变通过亲和基质的溶液的pH和/或离子强度来操纵。向溶液中添加离液剂增强了从第二亲和基质洗脱每种二聚体种类到非重叠级分中,从而提高每种二聚体种类的纯度。在一个实施方案中,在具有第一pH的缓冲液中将第一同二聚体(例如Fc*Fc*)从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质。在一个实施方案中,在具有第二pH范围的缓冲液中将异二聚体(例如FcFc*异二聚体)

从第一亲和基质绕过第二亲和基质直接洗脱至检测器。在一个实施方案中,在具有第三pH范围的缓冲液中将第二同二聚体(例如FcFc)从第一亲和基质绕过第二亲和基质直接洗脱至检测器。在一个实施方案中,在具有第三pH的缓冲液中将第一同二聚体(例如Fc*Fc*)从第二亲和基质洗脱至检测器。这里,第一pH范围包括比第二pH范围更高的pH,并且第二pH范围包括比第三pH范围更高的pH。

[0100] 在一个实施方案中,用于洗脱第二杂质(例如,第二同二聚体蛋白质)的第一组洗脱条件包括第一pH。在一个实施方案中,用于洗脱蛋白质(例如,异二聚体蛋白质)的第二组洗脱条件包括第二pH。在一个实施方案中,用于洗脱第一杂质(例如,第一同二聚体蛋白质)的第三组洗脱条件包括第三pH。在一个实施方案中,第二pH可低于第一pH。在一个实施方案中,第三pH可低于第二pH。在一个实施方案中,第二pH可低于第一pH,并且第三pH可低于第二pH。在另一实施方案中,第一pH可大于pH 5,或为约pH 5至约pH 8,或约pH 5.2至约pH 7.4。在一个实施方案中,第二pH可为约pH 4至约pH 5,或约4.2至约5.0。在一个实施方案中,第三pH可小于pH 4,或约pH 2至约pH 3.6,或约pH 2.2至约pH 2.8。

[0101] 在一个方面,公开了一种用于测定样品中FcFc*蛋白质的量和/或纯度的方法,其中所述FcFc*蛋白质包含第一免疫球蛋白CH3结构域(Fc)、其片段和/或衍生物,以及第二免疫球蛋白CH3结构域(Fc*)、其片段和/或衍生物,其中所述所述第一和第二免疫球蛋白CH3结构域在它们对第一蛋白质亲和基质的亲和力方面不同,并且其中所述样品包含混合物,所述混合物包含所述FcFc*蛋白质、包含两个第一CH3结构域的蛋白质(FcFc蛋白质)和包含两个第二CH3结构域的蛋白质(Fc*Fc*蛋白质),所述方法包括以下步骤:

(a)在第一组条件下将样品施加到第一蛋白质亲和基质,其中所述FcFc*蛋白质和所述FcFc蛋白质结合至所述第一蛋白质亲和基质并且所述Fc*Fc*蛋白质基本上不结合至所述第一蛋白质亲和基质;

(b)在第一组条件下洗涤所述第一蛋白质亲和基质;

(c)在使Fc*Fc*蛋白质结合至所述第二蛋白质亲和基质的一组条件下,将来自步骤(a)的流过物和来自步骤(b)的洗涤物施加到第二蛋白质亲和基质;

(d)在与步骤(c)相同的一组条件下洗涤所述第二蛋白质亲和基质;

(e)从所述第二蛋白质亲和基质洗脱Fc*Fc*蛋白质并测定所述洗脱的Fc*Fc*蛋白质的量;

(f)在第二组条件下从所述第一蛋白质亲和基质洗脱剩余的结合的Fc*Fc*蛋白质,并确定所述洗脱的Fc*Fc*蛋白质的量;

(g)在第三组条件下洗脱结合至所述第一蛋白质亲和基质的FcFc*蛋白质,并确定所述洗脱的FcFc*蛋白质的量;

(h)在第四组条件下洗脱结合至所述第一蛋白质亲和基质的FcFc蛋白质,并确定所述洗脱的FcFc蛋白质的量,以及

(i)测定样品中FcFc*蛋白的量和/或纯度,

其中,步骤(d)和/或步骤(e)可与步骤(f)-(h)同时、在其之前或之后执行。

[0102] 在一个方面,公开了一种用于测定样品中双特异性抗体(例如,FcFc*抗体)的量和/或纯度的方法,其中所述FcFc*抗体包含第一免疫球蛋白重链(Fc)和第二免疫球蛋白重链(Fc*),其中所述第一和第二免疫球蛋白重链在它们对蛋白A的亲和力方面不同,并且其

中样品包含混合物,所述混合物包含所述FcFc*抗体、包含两个第一重链的抗体(FcFc抗体)和包含两个第二重链的抗体(Fc*Fc*抗体),所述方法包括以下步骤:

(a)在第一组条件下将样品施加给蛋白A亲和柱(蛋白A柱),其中所述FcFc*抗体和所述FcFc抗体结合至所述蛋白A柱,而所述Fc*Fc*抗体基本上不结合至所述蛋白A柱,并且其中蛋白A柱经由开关阀连接至蛋白G亲和柱(蛋白G柱),使得来自蛋白A柱的流过物可直接施加至蛋白G柱,该蛋白G柱进一步连接至HPLC柱;

(b)在第一组条件下洗涤所述蛋白A柱,其中开关阀处在使来自蛋白A柱的流过物直接施加到蛋白G柱的位置;

(c)在与步骤(b)相同的条件下洗涤蛋白G柱;

(d)从蛋白G柱中洗脱Fc*Fc*抗体并测定所述洗脱的Fc*Fc*抗体的量;

(e)将开关阀置于使蛋白A柱与蛋白G柱断开并使所述蛋白A柱与HPLC柱连接的位置;

(f)在第二组条件下从蛋白A柱上洗脱剩余的结合的Fc*Fc*抗体,并测定所述洗脱的Fc*Fc*抗体的量;

(g)在第三组条件下洗脱结合至所述蛋白A柱的FcFc*抗体,并测定所述洗脱的FcFc*抗体的量;

(h)在第四组条件下洗脱结合至所述蛋白A柱的FcFc抗体,并测定所述洗脱的FcFc抗体的量,以及

(i)测定样品中FcFc*蛋白的量和/或纯度,

其中,步骤(c)和/或步骤(d)可与步骤(e)-(h)同时、在其之前或之后执行。

[0103] 在另一方面,提供了用于纯化、分析和/或评估蛋白质的量和/或纯度的色谱系统。在一个实施方案中,色谱系统包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器,其中第一亲和基质、第二亲和基质和检测器中的每个经由开关阀连接。在一个实施方案中,第一亲和基质可以是蛋白质A色谱柱。在一个实施方案中,第二亲和基质可以是蛋白G或蛋白L色谱柱。

[0104] 在一个实施方案中,检测器可以是配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱。在一个实施方案中,第一亲和基质和第二亲和基质经由开关阀串行连接。在另一实施方案中,第一亲和基质、第二亲和基质和检测器都经由开关阀串行连接。在一个实施方案中,第一亲和基质和第二亲和基质经由开关阀串行连接,但检测器非串行连接至第一亲和基质和第二亲和基质。

[0105] 在一个实施方案中,提供了一种色谱系统,所述色谱系统包括:(i)蛋白A色谱柱,(ii)蛋白G色谱柱和(iii)检测器,所述检测器包括配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱,其中蛋白质A色谱柱、蛋白G色谱柱和检测器中的每个经由开关阀连接。

实施例

[0106] 以下实施例示例说明了本说明书的具体方面。这些实施例不应被解释为限制性的,因为实施例仅提供对实施方案及其各个方面的具体理解和实践。

[0107] 色谱实验使用符合执行本文所述方法所需配置的HPLC系统进行。InfinityLab Quick Change阀可从Agilent Technologies获得。合适阀的实例包括但不限于Agilent Quick Change Valve G4231A/C、G4232C/D、G4234A/C、G4236A/B和G4238A/B。适用于实施本发明的阀的非限制实例在万维网agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4232-

90009_ValveKit_TN_EN.pdf提供,还有Acquity UPLC系统,具有2D Technology Capabilities Guide,Revision A,Waters Corporation,2012,其中每一个都通过引用全部并入。

[0108] 实施例1

[0109] 包含两种污染性同二聚体的混合物中的双特异性抗体的纯度和量如下述测定(滴度色谱图如图1所示)。两种重链多肽(含IgG4 Fc-和IgG4-Fc*)和共有轻链多肽在CHO细胞中共表达。对包含所得同二聚体和异二聚体混合物的细胞上清液样品进行高速离心以消除蛋白质聚集体,并根据2016年2月4日公布的PCT公开号WO2016/018740(通过引用并入本文)中所述的纯化方法对上清液进行亲和色谱。将含有FcFc*异二聚体和任何杂质产物FcFc和Fc*Fc*同二聚体的纯化产物样品上样到处在含有0.5M NaCl的pH 6.4流动相中的3x 0.1mL POROS®A20μm蛋白A柱(rProA,从Applied Biosystems获得,#2-1001-00)。将蛋白A柱串行连接至2x 0.1mL POROS®G 20μm蛋白G柱(rProG,从Applied Biosystems获得,#2-1002-00)和标准UV检测器(流速为2.0mL/min,UV@280nm峰值检测),如图4A所示。

[0110] 应用一系列洗涤来去除过程相关的污染物,例如CHO DNA或宿主细胞蛋白(HCP)。使用含有0.5M $CaCl_2$的pH 5.6流动相洗脱混合物。由于Fc*Fc*同二聚体的两个蛋白A结合位点都从Fc区域删除了,因此该产物相关的杂质预期流过rProA到rProG上,而双特异性FcFc*和FcFc同二聚体预期保留在rProA上。

[0111] 然后切换开关阀使rProG离线,将rProA直接连接至检测器。然后使用含有0.5M氯化钙的pH 3.8-5.6(分子特异性)流动相将双特异性FcFc*抗体从rProA选择性洗脱至检测器,而FcFc杂质由于其相对于双特异性FcFc*抗体更强的结合而被保留。计算FcFc*的量。然后,用含0.5M氯化钙的pH 2.2流动相将FcFc杂质从rProA选择性洗脱至检测器,并计算FcFc的量。

[0112] 然后将开关阀切换回到串行连接rProG在线,将rProA连接至rProG,并将rProG连接至检测器。然后使用含有0.5M氯化钙的pH 2.2流动相将Fc*Fc*杂质洗脱至检测器,并计算Fc*Fc*的量。

[0113] 通过计算FcFc*级分与FcFc、FcFc*和Fc*Fc*级分总和的比率来确定FcFc*双特异性抗体的量和纯度。

[0114] 方法流速、洗涤时长、双特异性洗脱时长和方法洗脱步骤中的缓冲液C%是研究的连续因素,并认为可能对所有三种抗体种类的回收率产生影响。下表1显示了方法中研究的参数、它们的作用和值。

[0115] 表1:双特异性纯度稳健性因素

名称	作用	值
上样流速(mL/min)	连续	0.5-2.5
洗涤时长(CV)	连续	0-60
双特异性洗脱时长(CV)	连续	10-130
%C	连续	5-30
同种型	离散	IgG1*、IgG4*A、IgG4*B

[0116] 下表2显示了评估三种抗体样品:IgG*1、IgG4*A和IgG4*B的纯度和量的本发明方法的各种运行条件设置。

[0117] 表2:双特异性纯度稳健性运行条件

条件#	流速 (mL/min)	洗涤时长 (CV)	双特异性洗脱时长 (CV)	缓冲液 C%	同种型
1	0.5	0	10	5	IgG1*
2	0.5	0	10	17.5	IgG4* B
3	0.5	0	10	30	IgG4* A
4	0.5	0	130	5	IgG4* A
5	0.5	0	130	30	IgG1*
6	0.5	30	130	5	IgG4* B
7	0.5	60	10	5	IgG4* A
8	0.5	60	10	30	IgG1*
9	0.5	60	70	30	IgG4* B
10	0.5	60	130	5	IgG1*
11	0.5	60	130	30	IgG4* A
12	1.5	0	130	30	IgG4* B
13	1.5	30	10	5	IgG4* B
14	1.5	30	70	17.5	IgG4* A
15	1.5	60	130	5	IgG4* B
16	2.5	0	10	5	IgG4* A
17	2.5	0	10	30	IgG1*
18	2.5	0	70	5	IgG4* B
19	2.5	0	130	5	IgG1*
20	2.5	0	130	30	IgG4* A
21	2.5	30	10	30	IgG4* B
22	2.5	30	130	17.5	IgG4* B
23	2.5	60	10	5	IgG1*
24	2.5	60	10	17.5	IgG4* B
25	2.5	60	10	30	IgG4* A
26	2.5	60	130	5	IgG4* A
27	2.5	60	130	30	IgG1*

[0118] 由于在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对上述主题进行各种更改,因

此上述描述中包含的或所附权利要求书中定义的所有主题都旨在解释为本发明的描述性和举例说明性内容。根据上述教导,本发明的许多修改和变化是可能的。因此,本说明书旨在包含落入所附权利要求书的范围内的所有这样的备选方案、修改和变化。

[0119] 本文引用的所有专利、申请、出版物、试验方法、文献和其他材料在此通过引用将其全部并入,如同实际存在于本说明书中一样。

[0120] 本发明提供以下实施方案:

1.一种用于定量样品中蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含蛋白质、第一蛋白质杂质和第二蛋白质杂质的混合物,其中所述蛋白质和第一杂质结合至第一亲和基质并且第二杂质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质,所述方法包括以下步骤:

a.将样品施加到包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器的色谱系统,其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质;

b.在第一组条件下将第二杂质从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质;

c.切换开关阀以绕过第二亲和基质,在第二组条件下洗脱蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

d.在第三组条件下洗脱第一杂质通过检测器并测定洗脱的第一杂质的量;

e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二杂质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

2.根据实施方案1所述的方法,其中与第一杂质相比,所述蛋白质具有较低的对第一亲和基质的亲和力。

3.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中所述蛋白质是异二聚体蛋白质,第一蛋白质杂质是第一同二聚体蛋白质,并且第二蛋白质杂质是第二同二聚体蛋白质,其中所述异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至第一亲和基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质。

4.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中所述蛋白质包含第一免疫球蛋白CH3结构域和第二免疫球蛋白CH3结构域,其中所述第一和第二免疫球蛋白CH3结构域在它们对第一亲和基质的亲和力方面不同,并且其中所述样品包含混合物,所述混合物包含所述蛋白质、包含两个第一CH3结构域的蛋白质和包含两个第二CH3结构域的蛋白质。

5.根据实施方案4所述的方法,其中第二CH3结构域包含H435R和Y436F氨基酸取代。

6.根据实施方案1至5中任一项所述的方法,其中所述蛋白质是抗体。

7.根据实施方案6所述的方法,其中所述蛋白质是双特异性抗体。

8.根据实施方案1至7中任一项所述的方法,其中第一亲和基质包含蛋白A且第二亲和基质包含蛋白G。

9.根据实施方案1至8中任一项所述的方法,其中第一组条件包括第一pH,第二组条件包括第二pH,并且第三组条件包括第三pH。

10.根据实施方案9所述的方法,其中第二pH低于第一pH,并且第三pH低于第二pH。

11.根据实施方案9或10中任一项所述的方法,其中第一pH为约pH 5.0至约pH

7.4,第二pH为约pH 4.3至约pH 5.6,并且第三pH为约pH 2.0至约pH 2.8。

12.根据实施方案1至11中任一项所述的方法,其中第一组条件、第二组条件和第三组条件包括流动相改性剂。

13.根据实施方案12所述的方法,其中所述流动相改性剂是选自LiCl、NaCl、KCl、$MgCl_2$和$CaCl_2$缓冲剂的盐缓冲剂。

14.一种定量样品中异二聚体蛋白质的量和/或纯度的方法,所述样品包含异二聚体蛋白质、第一同二聚体蛋白质和第二同二聚体蛋白质的混合物,其中所述异二聚体蛋白质和第一同二聚体蛋白质结合至蛋白A基质并且第二同二聚体蛋白质基本上不结合至蛋白A基质而结合至蛋白G基质,所述方法包括以下步骤:

a.将样品施加到包括蛋白A基质、蛋白G基质和检测器的色谱系统,其中蛋白A基质经由开关阀串行连接至蛋白G基质;

b.在第一组条件下,将第二同二聚体蛋白质从蛋白A基质洗脱至蛋白G基质;

c.切换开关阀以绕过蛋白G基质,在第二组条件下洗脱异二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的蛋白质的量;

d.在第三组条件下洗脱第一同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第一杂质的量;

e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二同二聚体蛋白质通过检测器,并测定洗脱的第二杂质的量,以及

f.定量样品中蛋白质的量和/或纯度。

15.根据实施方案14所述的方法,其中所述异二聚体蛋白质包含FcFc*,第一同二聚体蛋白质包含FcFc,并且第二同二聚体蛋白质包含Fc*Fc*。

16.一种色谱系统,其包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器,其中第一亲和基质、第二亲和基质和检测器中的每一个经由开关阀连接。

17.一种色谱系统,其包括(i)蛋白A色谱柱、(ii)蛋白G色谱柱和(iii)检测器,所述检测器包括配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱,其中蛋白A色谱柱、蛋白G色谱柱和检测器中的每一个均经由开关阀连接。

[0121] 本发明还提供以下实施方案:

1.一种用于定量样品中异二聚体抗体的量的方法,所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体杂质和第二同二聚体抗体杂质的混合物,其中所述异二聚体抗体和第一杂质结合至第一亲和基质并且第二杂质基本上不结合至第一亲和基质而结合至第二亲和基质,并且其中与第一同二聚体抗体杂质相比,所述异二聚体抗体具有较低的对第一亲和基质的亲和力,所述方法包括以下步骤:

a.将样品施加到包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器的色谱系统,其中第一亲和基质经由开关阀串行连接至第二亲和基质;

b.在第一组条件下将第二杂质从第一亲和基质洗脱至第二亲和基质;

c.切换开关阀以绕过第二亲和基质,在第二组条件下洗脱异二聚体抗体通过检测器,并测定洗脱的异二聚体抗体的量;

d.在第三组条件下洗脱第一杂质通过检测器并测定洗脱的第一杂质的量;

e.在第三组条件下从第二亲和基质洗脱第二杂质通过检测器,并测定洗脱的第二

杂质的量,以及

f.定量样品中异二聚体抗体的量。

2.根据实施方案1所述的方法,其中所述异二聚体抗体包含第一免疫球蛋白CH3结构域和第二免疫球蛋白CH3结构域,其中所述第一和第二免疫球蛋白CH3结构域在它们对第一亲和基质的亲和力方面不同,并且其中所述样品包含混合物,所述混合物包含所述异二聚体抗体、包含两个第一CH3结构域的同二聚体抗体和包含两个第二CH3结构域的同二聚体抗体。

3.根据实施方案2所述的方法,其中第二CH3结构域包含H435R和Y436F氨基酸取代。

4.根据实施方案1所述的方法,其中所述异二聚体抗体是双特异性抗体。

5.根据实施方案1至4中任一项所述的方法,其中第一亲和基质包含蛋白A且第二亲和基质包含蛋白G。

6.根据实施方案1至5中任一项所述的方法,其中第一组条件包括第一pH,第二组条件包括第二pH,并且第三组条件包括第三pH。

7.根据实施方案6所述的方法,其中第二pH低于第一pH,并且第三pH低于第二pH。

8.根据实施方案6或7中任一项所述的方法,其中第一pH为约pH5.0至约pH 7.4,第二pH为约pH 4.3至约pH 5.6,并且第三pH为约pH2.0至约pH 2.8。

9.根据实施方案1至8中任一项所述的方法,其中第一组条件、第二组条件和第三组条件包括流动相改性剂。

10.根据实施方案9所述的方法,其中所述流动相改性剂是选自LiCl、NaCl、KCl、$MgCl_2$和$CaCl_2$缓冲剂的盐缓冲剂。

11.一种定量样品中异二聚体抗体的量的方法,所述样品包含异二聚体抗体、第一同二聚体抗体和第二同二聚体抗体的混合物,其中所述异二聚体抗体和第一同二聚体抗体结合至蛋白A基质并且第二同二聚体抗体基本上不结合至蛋白A基质而结合至蛋白G基质,所述方法包括以下步骤:

a.将样品施加到包括蛋白A基质、蛋白G基质和检测器的色谱系统,其中蛋白A基质经由开关阀串行连接至蛋白G基质;

b.在第一组条件下,将第二同二聚体抗体从蛋白A基质洗脱至蛋白G基质;

c.切换开关阀以绕过蛋白G基质,在第二组条件下洗脱异二聚体抗体通过检测器,并测定洗脱的异二聚体抗体的量;

d.在第三组条件下洗脱第一同二聚体抗体通过检测器,并测定洗脱的第一同二聚体抗体的量;

e.在第三组条件下从蛋白G基质洗脱第二同二聚体抗体通过检测器,并测定洗脱的第二同二聚体抗体的量,以及

f.定量样品中异二聚体抗体的量。

12.根据实施方案11所述的方法,其中所述异二聚体抗体包含FcFc*,第一同二聚体抗体包含FcFc,并且第二同二聚体抗体包含Fc*Fc*。

13.一种色谱系统,其包括第一亲和基质、第二亲和基质和检测器,其中第一亲和基质、第二亲和基质和检测器中的每一个经由开关阀连接。

14.一种色谱系统,其包括(i)蛋白A色谱柱、(ii)蛋白G色谱柱和(iii)检测器,所述检测器包括配备有UV检测器、电荷气溶胶检测器和/或质谱仪的HPLC柱,其中蛋白A色谱柱、蛋白G色谱柱和检测器中的每一个均经由开关阀连接。

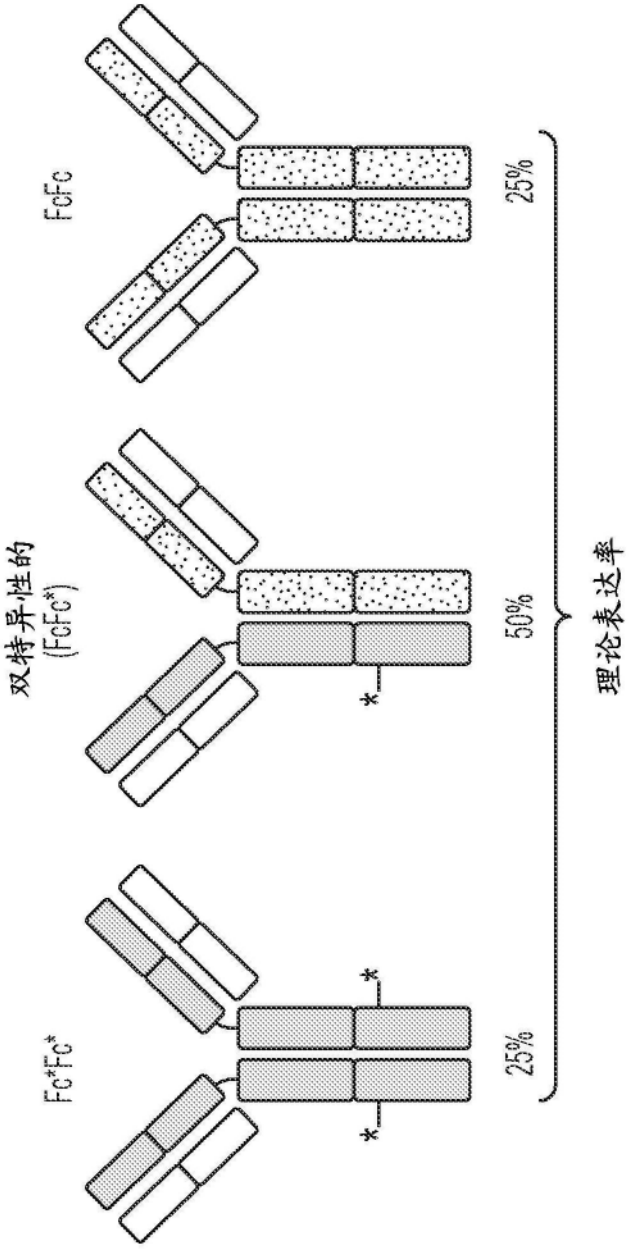

图1

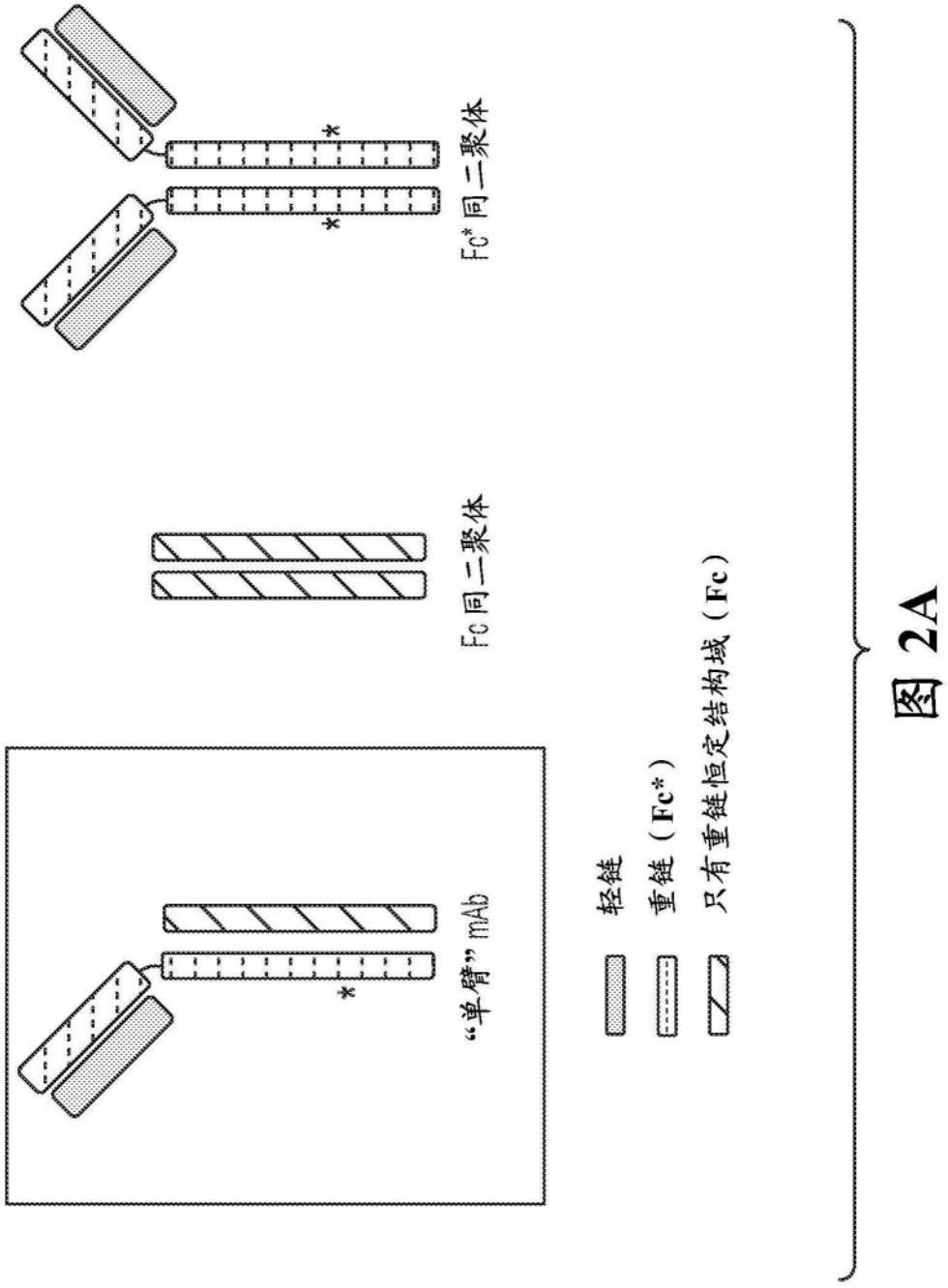

图2A

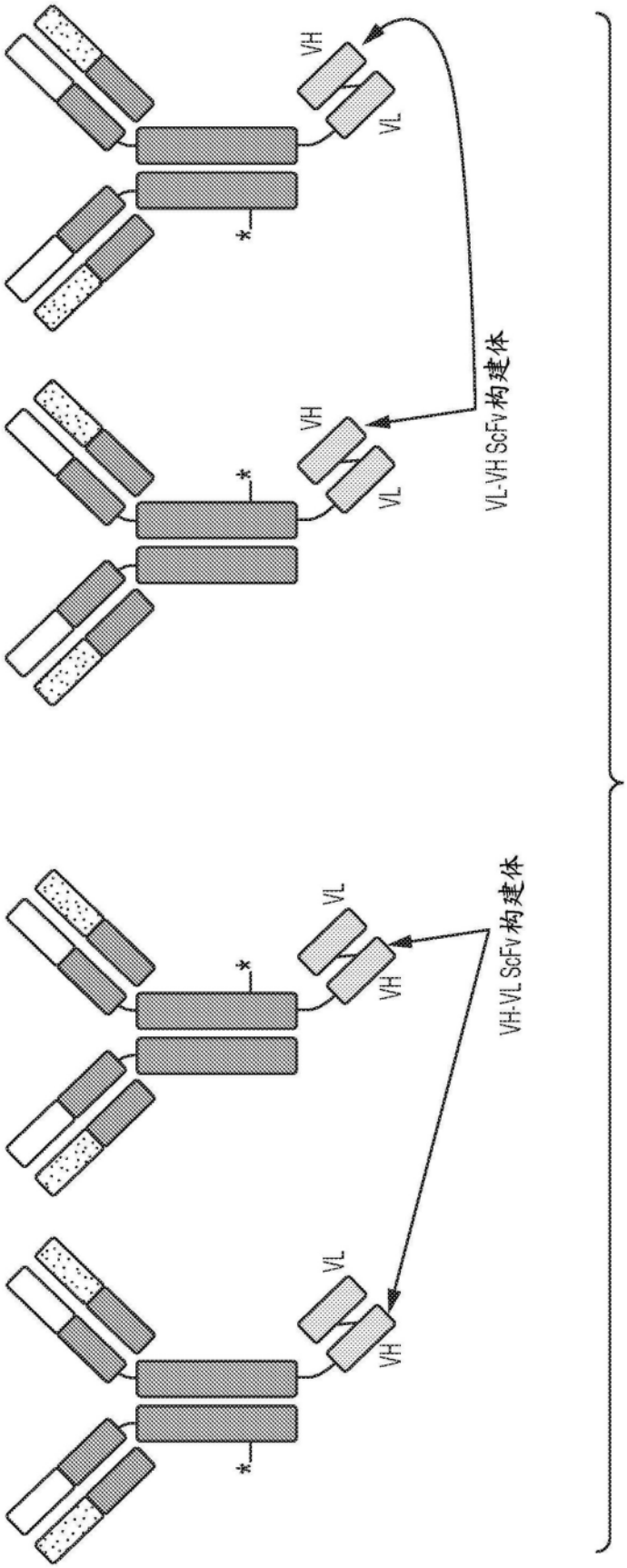

图 2B

图2B

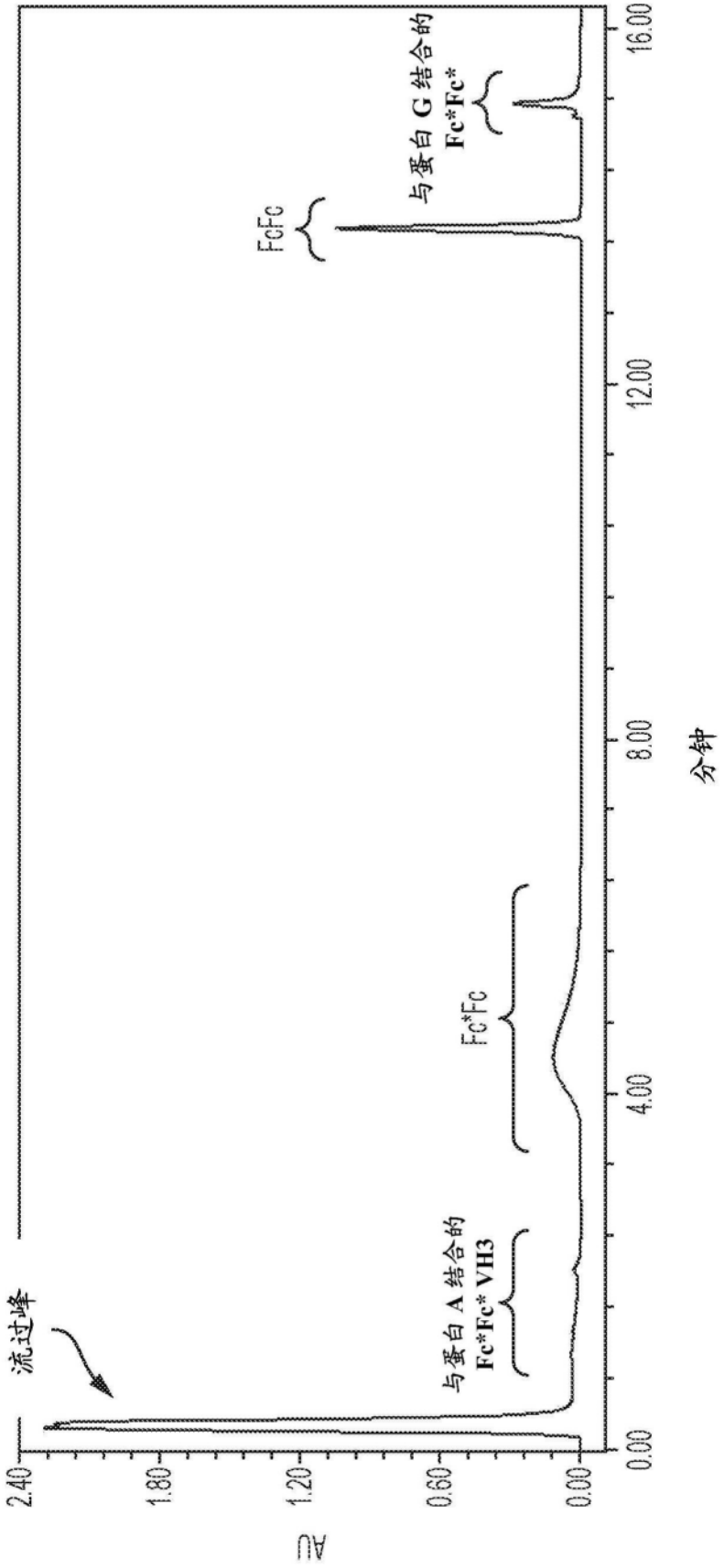
流过峰
与蛋白 A 结合的
Fc*Fc* VH3
Fc*Fc
FcFc
与蛋白 G 结合的
Fc*Fc*
2.40
1.80
1.20
0.60
0.00
AU
0.00
4.00
8.00
12.00
16.00
分钟

图3

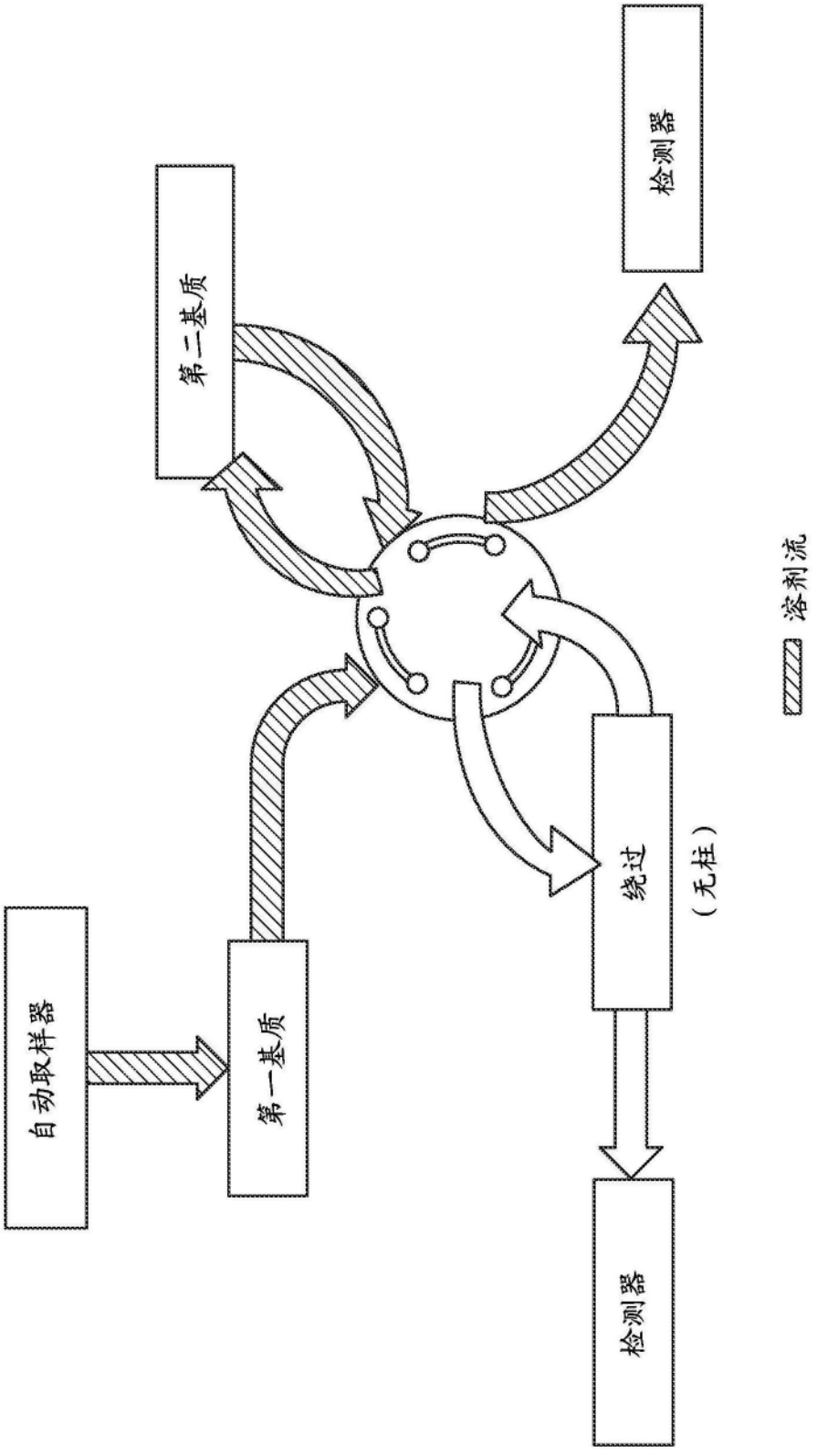

图4A

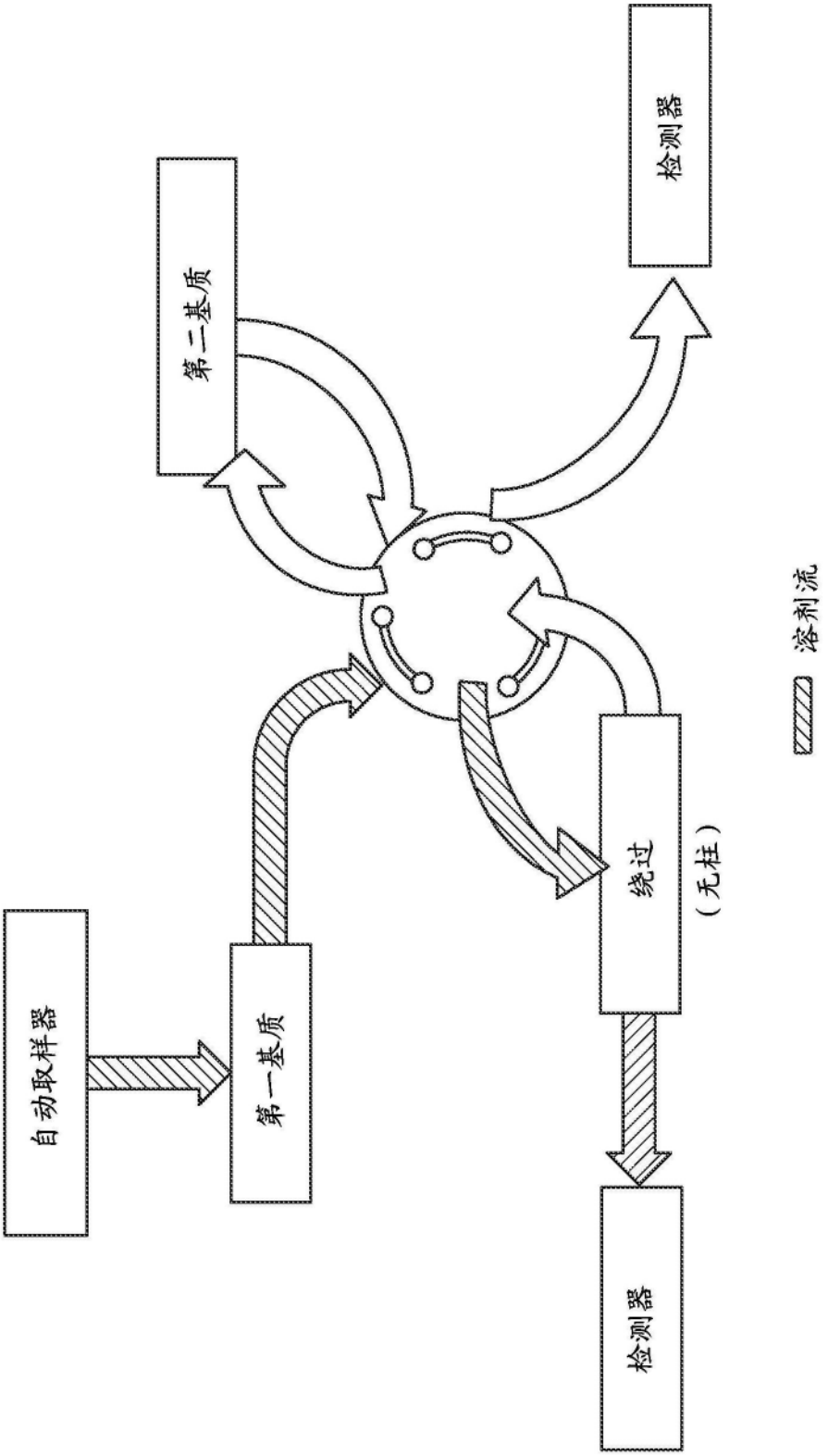

图4B

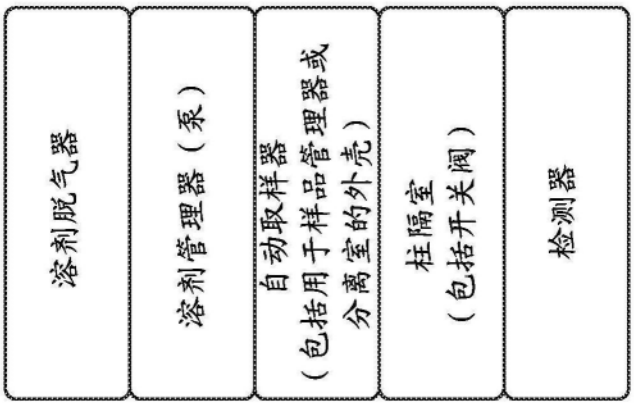

图5

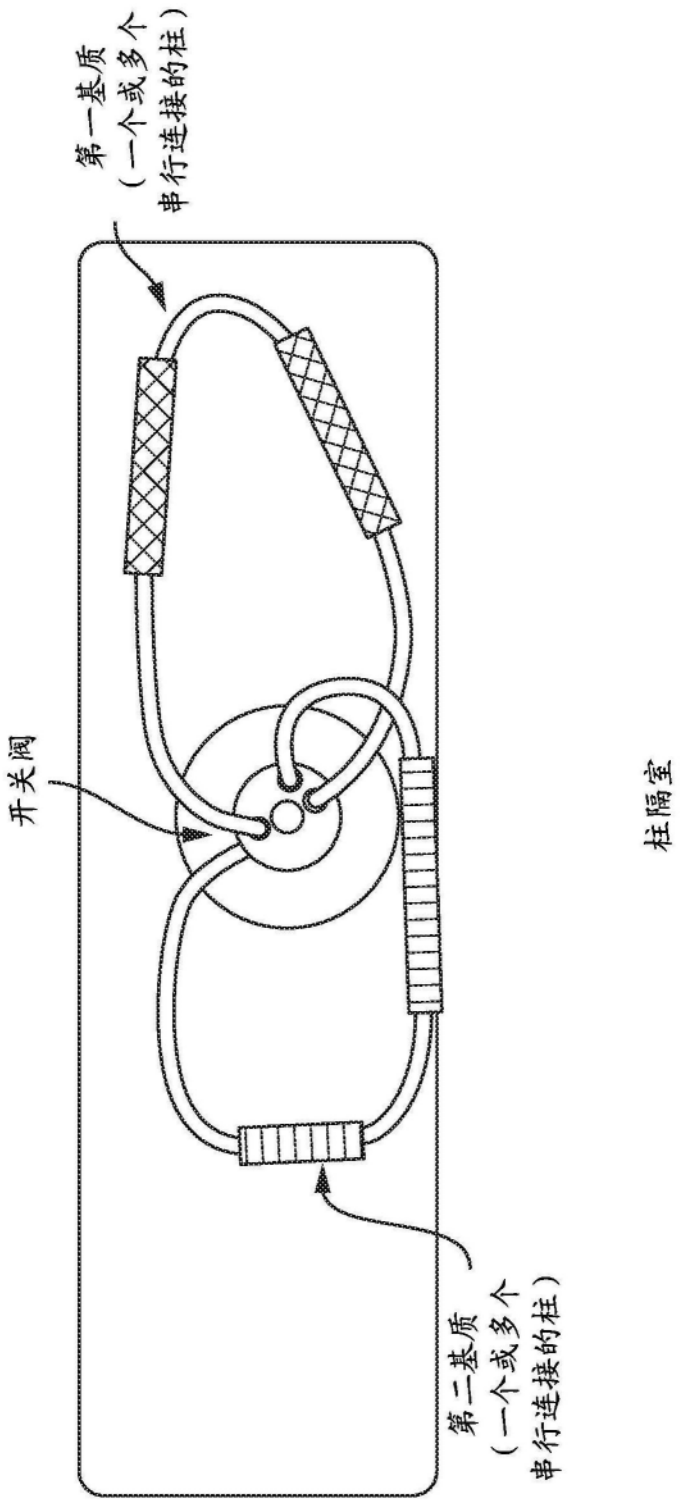

图6

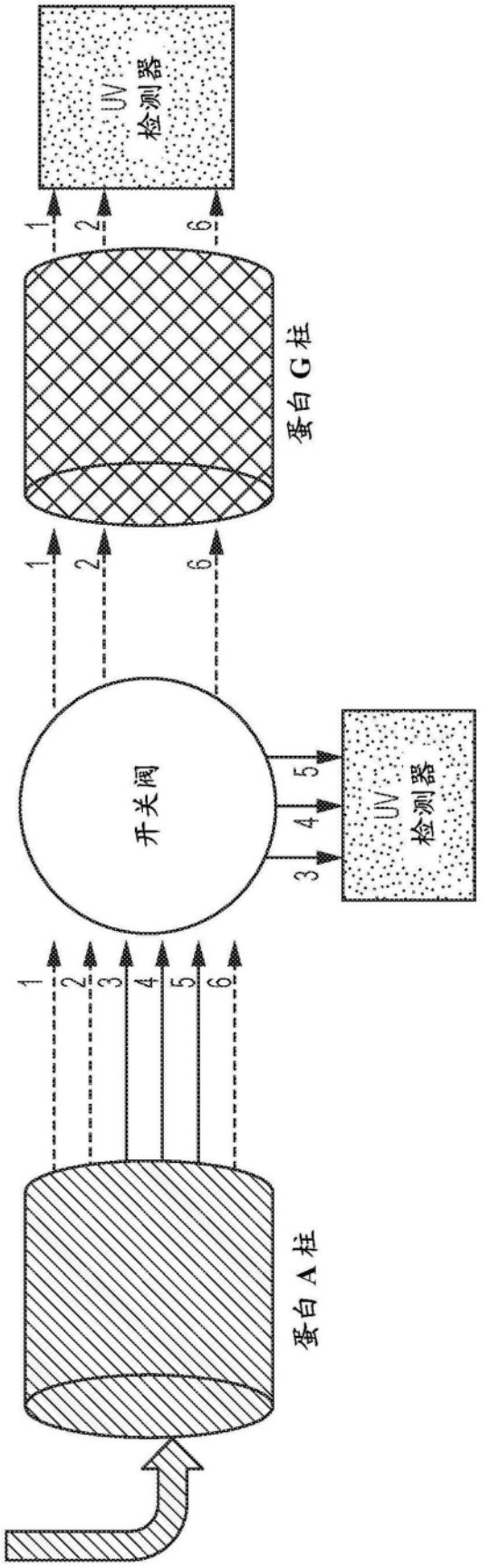

图7