



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102686738 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201080038989. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 09. 01

C12P 21/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/238, 867 2009. 09. 01 US

61/253, 438 2009. 10. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/047448 2010. 09. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02011/028753 EN 2011. 03. 10

(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·布朗 C·J·多德

A·N·拉达莫汉

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

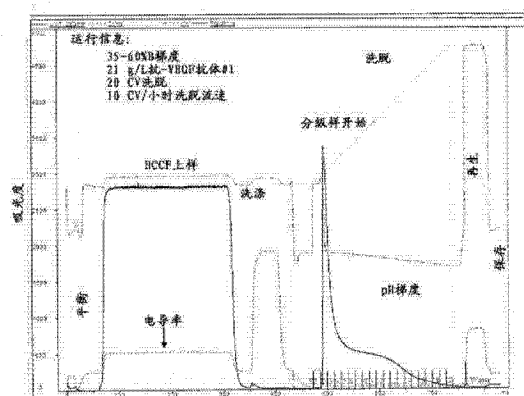
权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 21 页

(54) 发明名称

通过改进的 A 蛋白洗脱增强的蛋白质纯化

(57) 摘要

本发明提供用于纯化包含 C_α2/C_α3 区的多肽的方法,其包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于低 pH 的 pH 梯度洗脱。



1. 用于纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽的方法,其包括使所述多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.2。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.3。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.6。
5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述 pH 梯度终止于 3.0 或 3.0 以上。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述 pH 梯度终止于约 3.7。
7. 权利要求 1 的方法,其中从所述多肽分离了宿主细胞杂质。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述宿主细胞杂质是中国仓鼠卵巢蛋白质 (CHOP)。
9. 权利要求 1 的方法,其中从所述多肽分离了聚集体。
10. 权利要求 1 的方法,其中从所述多肽分离了病毒滤器结垢物。
11. 权利要求 1 的方法,其中从所述多肽分离了病毒颗粒或病毒样颗粒。
12. 权利要求 1 的方法,其中从所述多肽分离了碱性多肽变体。
13. 权利要求 1 的方法,其中所述 C_H2/C_H3 区包含免疫球蛋白的 Fc 区。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述多肽是抗体。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体或抗体片段。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述多肽是免疫黏附素。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化的多肽具有至少约 98% 单体的纯度。
18. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化的多肽具有至少约 99% 单体的纯度。
19. 权利要求 1 的方法,其中宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 20%,其中所述分级洗脱法包括使所述多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。
20. 权利要求 1 的方法,其中宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 60%,其中所述分级洗脱法包括使所述多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。
21. 权利要求 19 或 20 的方法,其中所述纯化的多肽是多肽单体。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述 A 蛋白是修饰或未修饰的 A 蛋白配体。
23. 权利要求 1 的方法,其中所述纯化是制造规模的方法。
24. 权利要求 1 的方法,其中所述 A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂或 A 蛋白层析吸着剂。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述 A 蛋白层析吸着剂是膜或整料。
26. 权利要求 24 的方法,其中所述 A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂,且其中所述多肽的纯化级分包含约 12 个 A 蛋白柱体积或少于约 12 个 A 蛋白柱体积。
27. 权利要求 1 的方法,其进一步包括对所述多肽进行病毒过滤步骤。
28. 权利要求 1 的方法,其进一步包括对所述多肽进行离子交换层析步骤。
29. 权利要求 28 的方法,其中所述离子交换层析步骤在权利要求 1 的 pH 梯度纯化步骤后连续进行。
30. 权利要求 1 的方法,其中所述方法不包括进一步的纯化步骤来去除聚集体。
31. 权利要求 1 的方法,其中所述方法不包括进一步的纯化步骤来去除病毒滤器结垢

物。

32. 用于纯化包含 C_{H2}/C_{H3} 区的多肽的方法,其包括以下步骤:

(a) 使所述多肽与 A 蛋白结合;和

(b) 用洗脱缓冲液以起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱所述多肽,其中所述洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液,且其中通过调节各 pH 缓冲液在所述洗脱缓冲液中的百分比来形成所述 pH 梯度。

33. 权利要求 32 的方法,其中所述高 pH 缓冲液为约 pH 5.0,且其中所述低 pH 缓冲液为约 pH 2.7。

34. 权利要求 32 的方法,其中低 pH 缓冲液的百分比起始于约 35%。

35. 权利要求 34 的方法,其中含有约 35% 低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 16.25mM 乙酸盐和约 8.75mM 甲酸盐。

36. 权利要求 32 的方法,其中低 pH 缓冲液的百分比起始于约 25%。

37. 权利要求 36 的方法,其中含有约 25% 低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 18.75mM 乙酸盐和 6.25mM 甲酸盐。

38. 权利要求 32 的方法,其中低 pH 缓冲液的百分比起始于约 40%。

39. 权利要求 38 的方法,其中含有约 40% 低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 15mM 乙酸盐和 10mM 甲酸盐。

40. 权利要求 32 的方法,其中以起始于约 14g/L 的上样密度上样所述多肽。

41. 权利要求 32 的方法,其中所述 A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂或 A 蛋白层析吸着剂。

42. 权利要求 41 的方法,其中所述 A 蛋白层析吸着剂是膜或整料。

43. 权利要求 41 的方法,其中所述 A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂,且其中所述多肽具有从约 5 个柱体积 / 小时至约 25 个柱体积 / 小时的范围内的洗脱流速。

44. 权利要求 32 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.2。

45. 权利要求 32 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.3。

46. 权利要求 32 的方法,其中所述 pH 梯度起始于约 pH 4.6。

47. 权利要求 32 和 44-46 中任一项的方法,其中所述 pH 梯度终止于 3.0 或 3.0 以上。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述 pH 梯度终止于约 pH 3.7。

49. 权利要求 32 的方法,其中从所述多肽分离了宿主细胞杂质。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述宿主细胞杂质是中国仓鼠卵巢蛋白质 (CHOP)。

51. 权利要求 32 的方法,其中从所述多肽分离了聚集体。

52. 权利要求 32 的方法,其中从所述多肽分离了病毒滤器结垢物。

53. 权利要求 32 的方法,其中从所述多肽分离了病毒颗粒或病毒样颗粒。

54. 权利要求 32 的方法,其中从所述多肽分离了碱性多肽变体。

55. 权利要求 32 的方法,其中所述 C_{H2}/C_{H3} 区包含免疫球蛋白的 Fc 区。

56. 权利要求 32 的方法,其中所述多肽是抗体。

57. 权利要求 56 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体或抗体片段。

58. 权利要求 32 的方法,其中所述多肽是免疫黏附素。

59. 权利要求 32 的方法,其中所述多肽具有至少约 98% 单体的纯度。

60. 权利要求 32 的方法,其中所述多肽具有至少约 99%单体的纯度。

61. 权利要求 32 的方法,其中宿主细胞杂质与所述纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 20%,其中所述分级洗脱法包括使所述多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。

62. 权利要求 32 的方法,其中宿主细胞杂质与所述纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 60%,其中所述分级洗脱法包括使所述多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。

63. 权利要求 61 或 62 的方法,其中所述纯化的多肽是多肽单体。

64. 权利要求 32 的方法,其中所述 A 蛋白是修饰或未修饰的 A 蛋白配体。

65. 权利要求 32 的方法,其中所述纯化是制造规模的方法。

66. 权利要求 41 的方法,其中所述 A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂,且其中所述多肽的纯化级分包含约 12 个 A 蛋白柱体积或少于约 12 个 A 蛋白柱体积。

67. 权利要求 32 的方法,其进一步包括对所述多肽进行病毒过滤步骤。

68. 权利要求 32 的方法,其进一步包括对所述多肽进行离子交换层析步骤。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述离子交换层析步骤在步骤 (b) 之后连续运行。

70. 权利要求 32 的方法,其中所述方法不包括进一步的纯化步骤来去除聚集体。

71. 权利要求 32 的方法,其中所述方法不包括进一步的纯化步骤来去除病毒滤器结垢物。

通过改进的 A 蛋白洗脱增强的蛋白质纯化

相关申请的交互引用

[0001] 本申请要求 2009 年 9 月 1 日提交的美国临时专利申请号 61/238,867 和 2009 年 10 月 20 日提交的美国临时专利申请号 61/253,438 的优先权,该美国临时专利申请在此以其整体引入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及用于纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽的方法,其包括使多肽与 A 蛋白结合,并用 pH 梯度洗脱。

背景技术

[0003] 蛋白质的大规模、经济纯化是生物技术产业越来越重要的问题。一般而言,使用通过插入包含该蛋白质的基因的重组质粒改造为产生目的蛋白质的哺乳动物或细菌细胞系,通过细胞培养产生蛋白质。由于所使用的细胞系是活生物,必须用包含糖、氨基酸和通常补充自动物血清制剂的生长因子的复合生长培养基饲养。从饲养细胞的化合物的混合物及从细胞自身的副产物分离希望的蛋白质至足以用作人用药物的纯度提出了艰巨的挑战。

[0004] 用于从细胞碎片纯化蛋白质的方法最初依赖于蛋白质的表达部位。可以使一些蛋白质直接从细胞分泌进入周围的生长培养基中;其他蛋白质在细胞内产生。对于后一类蛋白质,纯化方法的第一步涉及细胞的裂解,其可通过包括机械剪切、渗透压休克或酶处理的多种方法来进行。这种破裂使细胞的全部内含物释放入匀浆中,此外还产生由于其小尺寸而难以去除的亚细胞片段。一般通过差速离心或通过过滤来去除这些。虽然规模较小,但由于细胞在蛋白质产生过程中的自然死亡和胞内宿主细胞蛋白质的释放,直接分泌的蛋白质也产生了同样的问题。

[0005] 一旦获得了包含目的蛋白质的澄清溶液,即通常用不同层析技术的组合尝试从细胞产生的其他蛋白质分离它。通常将利用待纯化的蛋白质与固定化捕获剂之间的特异性相互作用的亲和层析用于一些蛋白质(例如用作人用药物的蛋白质)。A 蛋白是用于包含 Fc 区的蛋白质,如抗体的亲和层析的有用吸附剂。A 蛋白是来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 41kD 的细胞壁蛋白质,其以高亲和力(对人 IgG 为约 10⁻⁸M)与抗体的 Fc 区结合。但是,由于蛋白质趋于聚集或错折叠,希望的蛋白质(即单体)通常从这些亲和柱与其他杂质(如蛋白质聚集体、细胞自身的副产物(即宿主细胞杂质)或病毒滤器结垢物(virus filter foulant))共纯化。

[0006] 已发展了其他技术来基于它们的电荷、疏水程度或大小进一步分离这些杂质和蛋白质混合物,如离子交换层析、疏水作用层析或大小排阻层析。对于这些技术中的每一种,可获得几种不同的层析树脂或吸着剂,允许精确地使纯化方案适应所涉及的具体蛋白质。这些分离方法中的每一种的实质是:可以使蛋白质以不同速率在长固相(例如柱)中向下移动,达到随它们进一步向下通过固相而增加的物理分离,或选择性附着至分离介质,然后通过不同溶剂差异洗脱。但是,这些方法中的每一种需要额外的缓冲液、树脂或吸着剂和其

他资源进行进一步的纯化,这反过来导致更长的处理时间和更高的成本。因此,需要用于纯化蛋白质单体的更有效和经济的方法。

[0007] 美国专利申请号 12/008,160 中描述了用 A 蛋白柱从聚集体、多聚体和修饰蛋白质纯化多肽和用 pH 梯度洗脱系统洗脱的方法。

[0008] 本文中引用的所有出版物、专利和专利申请在此为了所有目的以相同的程度以其整体引入作为本文中的参考,就如同具体和单独地说明这样引入每一单个出版物、专利和专利申请作为参考一样。

发明概述

[0009] 本发明提供通过使多肽与 A 蛋白结合并用起始于低 pH 的 pH 梯度洗脱来纯化包含 C_α2/C_α3 区的多肽的方法。这些纯化方法提供了达到更好地从包括宿主细胞杂质、病毒滤器结垢物、病毒或病毒样颗粒、碱性多肽变体和多肽聚集体的多种杂质连续分离多肽或非聚集体,以及希望的多肽单体在纯化级分 / 库 (pool) 中更高的纯度的优势。可以用多种 A 蛋白层析树脂和层析吸着剂来完成这些方法。还可以在制造规模和商业方法中使用这些方法,且可以便于除柱层析外的备选下游纯化技术的利用。

[0010] 在一方面,本发明提供用于纯化包含 C_α2/C_α3 区的多肽的方法,其包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱。

[0011] 在另一方面,本发明提供用于纯化包含 C_α2/C_α3 区的多肽的方法,其包括以下步骤:(a) 使多肽与 A 蛋白结合;和 (b) 用洗脱缓冲液以起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱多肽,其中洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液,且其中通过调节各 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比来形成 pH 梯度。

[0012] 在一些实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.2。在其他实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.3。在一些实施方案中,pH 梯度起始于约 4.6。在一些实施方案中,pH 梯度终止于 3.0 或 3.0 以上。在一些实施方案中,pH 梯度终止于约 3.7。

[0013] 在一些实施方案中,高 pH 缓冲液为约 pH 5.0,且其中低 pH 缓冲液为约 pH 2.7。

[0014] 在一些实施方案中,低 pH 缓冲液的百分比起始于约 35%。在一些实施方案中,含有约 35%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 16.25mM 乙酸盐和约 8.75mM 甲酸盐。在其他实施方案中,低 pH 缓冲液的百分比起始于约 25%。在一些实施方案中,含有约 25%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 18.75mM 乙酸盐和约 6.25mM 甲酸盐。在一些实施方案中,低 pH 缓冲液的百分比起始于约 40%。在一些实施方案中,含有约 40%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液包含约 15mM 乙酸盐和约 10mM 甲酸盐。

[0015] 在一些实施方案中,以起始于约 14g/L 的上样密度上样多肽。在一些实施方案中,以从约 14g/L 至约 45g/L 的范围内的上样密度上样多肽。

[0016] 在一些实施方案中,A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂或 A 蛋白层析吸着剂。在一些实施方案中,A 蛋白层析吸着剂是膜或整料 (monolith)。

[0017] 在一些实施方案中,A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂,且其中多肽具有从约 5 个柱体积 / 小时至约 25 个柱体积 / 小时的范围内的洗脱流速。

[0018] 在一些实施方案中,A 蛋白是 A 蛋白柱层析树脂,且其中多肽的纯化级分包含约或少于约 12 个 A 蛋白柱体积。

[0019] 在一些实施方案中,从多肽分离宿主细胞杂质。在一些实施方案中,宿主细胞杂质

是中国仓鼠卵巢蛋白质 (CHOP)。

[0020] 在一些实施方案中,从多肽分离聚集体。在其他实施方案中,从多肽分离病毒滤器结垢物。

[0021] 在一些实施方案中,从多肽分离病毒颗粒或病毒样颗粒。在其他实施方案中,从多肽分离碱性多肽变体。

[0022] 在一些实施方案中, C_H2/C_H3 区包含免疫球蛋白的 Fc 区。

[0023] 在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体或抗体片段。

[0024] 在其他实施方案中,多肽是免疫黏附素 (immunoadhesion)。

[0025] 在一些实施方案中,多肽具有至少约 98% 单体的纯度。在其他实施方案中,多肽具有至少约 99% 单体的纯度。

[0026] 在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比未纯化的多肽中的比值低至少约 75%、低约 80%、低约 85%、低约 90%、低约 95%、低约 96%、低约 97%、低约 98% 或低约 99%。

[0027] 在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 20%,其中分级洗脱法包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 60%,其中分级洗脱法包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。

[0028] 在一些实施方案中,纯化的多肽具有少于约 15000 颗粒 /ml 的病毒颗粒或病毒样颗粒计数。在一些实施方案中,纯化的多肽具有少于约 12500 颗粒 /ml、少于约 10000 颗粒 /ml、少于约 7500 颗粒 /ml、少于约 5000 颗粒 /ml、少于约 2500 颗粒 /ml、少于约 1500 颗粒 /ml、少于约 1000 颗粒 /ml、少于约 750 颗粒 /ml、少于约 500 颗粒 /ml、少于约 250 颗粒 /ml、少于约 100 颗粒 /ml 或少于约 50 颗粒 /ml 的病毒颗粒或病毒样颗粒计数。在一些实施方案中,病毒样颗粒是反转率病毒样颗粒。

[0029] 在一些实施方案中,纯化的多肽具有至少约 4LRV (病毒的 $\log_{10}$ 减少) 的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具有从约 4LRV 至约 8LRV 的范围内的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具有从约 4LRV 至约 7LRV 的范围内的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具有约 5LRV、约 6LRV、约 7LRV 或约 8LRV 的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,病毒样颗粒是反转录病毒样颗粒。

[0030] 在一些实施方案中,纯化的多肽是多肽单体。

[0031] 在一些实施方案中,A 蛋白是修饰或未修饰的 A 蛋白配体。

[0032] 在一些实施方案中,纯化是制造规模的方法。

[0033] 在本发明的任意方面的一些实施方案中,纯化方法进一步包括对多肽进行病毒过滤步骤或离子交换层析步骤。在一些实施方案中,在纯化步骤后进行离子交换层析步骤运行。

[0034] 在本发明的任意方面的一些实施方案中,纯化方法不包括进一步的纯化步骤来去除聚集体。

[0035] 在本发明的任意方面的一些实施方案中,纯化方法不包括进一步的纯化步骤来去除病毒滤器结垢物。

[0036] 在本发明的任意方面的一些实施方案中,纯化方法不包括进一步的纯化步骤来去除碱性多肽变体。在本发明的任意方面的一些实施方案中,纯化方法不包括进一步的纯化步骤来去除酸性多肽变体。

[0037] 在另一方面,本发明提供通过本文中所述的方法纯化的多肽产物。

附图简述

[0038] 图 1 显示 pH 分级梯度层析谱:x 轴从开始 A 蛋白运行起以 mL 表示,y 轴是吸光度(mAU)。还显示了分级梯度洗脱的 UV 280 轨迹的不同形状——大峰处于洗脱起始时,然后在更低 pH 下减少至稳定高度并逐渐变细。

[0039] 图 2 显示分级分离抗 -VEGF 抗体 #1 的 SEC(大小排阻层析)结果。X 轴是在 SEC 柱上的滞留时间(分钟),Y 轴是归一化 UV 吸光度(mAU)。随着级分编号增加(即 pH 随着梯度洗脱进程降低),HMWS(高分子量种类)和二聚体峰(滞留时间分别为约 12.5 分钟和 13.5 分钟)也增加,而单体峰减少(滞留时间为 16 分钟)。通过所有峰(例如 HMWS、二聚体和单体)的积分来定量来自这些曲线的结果,作为百分比比较分开的相对峰面积(例如,将总面积设为 100%,样品的 SEC 积分图可以给出百分比,如“31% HMWS、36%二聚体和 33%单体”)。

[0040] 图 3 显示抗 -VEGF 抗体 #1 的 SEC 积分结果图。此图显示,前 9 个洗脱级分的单体水平高,四个级分为 100%,而二聚体和 HMWS 水平在洗脱中更迟成峰。此测定结果表明,pH 分级梯度从抗 -VEGF 抗体 #1 的单体分离了聚集体。

[0041] 图 4A 显示多种蛋白质分子(抗 -CD20 抗体、抗 -VEGF 抗体 #2、抗 -MUC16 和抗 -CD4 抗体)的 SEC 积分图。pH 分级梯度成功地在抗 -CD20 抗体、抗 -VEGF 抗体 #2、抗 -MUC 16 和抗 -CD4 抗体中从聚集体分离了单体。

[0042] 图 4B 显示通过细菌(大肠杆菌)宿主细胞发酵产生的脱糖基化(aglycosylated)单臂抗 -Met 抗体的 SEC 积分图。pH 分级梯度成功地在脱糖基化单臂抗 -Met 抗体中从聚集体分离了单体。

[0043] 图 5 显示抗 -CD20 抗体标准分级洗脱(对照;在 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱蛋白质而无 pH 梯度)和 pH 分级梯度洗脱间的并列比较。左图上的抗 -CD20 抗体和 CHOP 洗脱图以 ppm(百万分之几;用来标准化杂质对产物量的测量结果的单位)显示每个级分的 CHOP 水平。右图上的抗 -CD20 抗体和聚集体洗脱图显示通过梯度洗脱的每个级分的 SEC 峰积分值。左图和右图中的垂直线都代表所含级分的模拟混合,其将产生具有该图底部表格中所示特征的 pH 梯度洗脱库。

[0044] 图 6 显示抗 -VEGF 抗体 #1 的 CHOP 分离。以 ppm 或 ng/mL 表示每个级分的 CHOP 水平。

[0045] 图 7 显示抗 -MUC 16 抗体的 CHOP 分离。以 ppm 或 ng/mL 表示每个级分的 CHOP 水平。

[0046] 图 8 是 MABSELECT™、MABSELECT SURE™、**PROSEP®** Va、**PROSEP®** Ultra Plus 和 **POROS®** MABCAPTURE™ A A 蛋白树脂层析谱叠加图。

[0047] 图 9 是 Pareto Plot,显示起始% B(起始 pH 和洗脱梯度的斜率)是决定聚集体分

离效率中影响最大的参数,然后是上样密度和滞留时间。

[0048] 图 10 是参数起始 % B、上样密度和起始 % B、总洗脱长度和滞留时间的相互作用图。

[0049] 图 11 是 pH 分级梯度洗脱的示例性制造运行。

[0050] 图 12 显示使用两种大小的阳离子交换膜和三种大小的阴离子交换膜的下游离子交换膜研究的结果。coin 和 nano 单位在膜层数上都是制造的代表,而 **ACRODISC**[®] 单位具有减少的层数,但其是所使用的典型小试规模模型。

[0051] 图 13 显示 4.1L 柱(中试规模)和 28mL 小试规模柱运行间的 SEC 积分结果比较。

[0052] 图 14 是抗 -VEGF 抗体 #1 的 **VIRESOLVE**[®] Pro 通透性衰退图,就便于 **VIRESOLVE**[®] Pro 细小病毒滤器上更大的质量流通量比较 A 蛋白 pH 分级梯度和 A 蛋白标准分级。使用 A 蛋白 pH 分级梯度在 **VIRESOLVE**[®] Pro 上具有约 6 倍的质量流通量增加。

[0053] 图 15 显示 A 蛋白全 pH 梯度洗脱层析谱,显示全 pH 梯度在 21g/L 上样密度下的实际 AKTA UNICORN[™] 层析软件轨迹。梯度起始时的最初的高 UV 250 峰缺失,表明洗脱起始时的 pH 高于从 A 蛋白柱洗脱产物所需的 pH。

[0054] 图 16 是 pH 5.0-2.7pH 梯度试验 (0-100% B) AKTA 层析谱,表明抗 -VEGF 抗体 #1 在 pH 4.6-3.6 的范围内作为离散的峰洗脱。

[0055] 图 17 是全部 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱级分的离子交换变体测定峰积分,表明碱性多肽变体在分级梯度洗脱的尾部分离。

[0056] 图 18 是每个级分的来自 QPCR(定量聚合酶链反应)分析的 RVLP(反转录病毒样颗粒)颗粒计数对抗 -VEGF 抗体 #1 产物洗脱作图。大部分 RVLP 在几乎不生产物洗脱的梯度晚期洗脱。

[0057] 图 19 是抗 -VEGF 抗体 #1 的 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱中各级分的 LRV(病毒的 log10 减少)。

[0058] 图 20 显示级分的模拟库的累积 LRV,显示如果略去更迟的级分,则可以在 A 蛋白库中达到更高的 LRV。

发明详述

[0059] 本发明提供通过使多肽与 A 蛋白结合并用起始于低 pH 的 pH 梯度洗脱来纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽的方法。本发明人已作出了惊人的发现,用低 pH 的 pH 梯度从 A 蛋白洗脱包含 C_H2/C_H3 区的多肽可以提供多肽从包括宿主细胞杂质、病毒滤器结垢物、病毒或病毒样颗粒、碱性多肽变体和 / 或多肽聚集体的多种杂质的更好的连续分离,以及达到希望的多肽单体在纯化级分 / 库中的更高的纯度或百分比。因此,本发明具有显著优势。本发明人还发现,可以用多种 A 蛋白层析树脂和层析吸着剂来完成这些方法,且这些方法可以用于制造规模和商业方法,并可以便于除柱层析外的备选下游纯化技术(例如膜吸附器)的利用。

[0060] 因此,在本发明的一个方面,提供用于纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽的方法,其包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱。

[0061] 在本发明的另一方面,提供用于纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽的方法,其包括以下步

骤:(a)使多肽与A蛋白结合;和(b)用洗脱缓冲液以起始于5.0或5.0以下的pH梯度洗脱多肽,其中洗脱缓冲液包含高pH缓冲液和低pH缓冲液,且其中通过调节各pH缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比来形成pH梯度。

[0062] 还在本发明的另一方面,提供通过本文中所述的方法纯化的多肽。

[0063] 除非另有说明,本发明的实施将利用本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。这类技术充分阐述于文献中,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993-1998)J.Wiley和Sons;Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons, 1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach(D.Catty编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995)。

定义

[0064] 应理解,本文中的目的多肽是包含 C_H2/C_H3 区,并因此适于通过A蛋白纯化的多肽。在本文中使用时,术语“ C_H2/C_H3 区”指免疫球蛋白分子的Fc区中与A蛋白相互作用的那些氨基酸残基。在一些实施方案中, C_H2/C_H3 区包含完整的 C_H2 区,后随完整的 C_H3 区,且最优选包含免疫球蛋白的Fc区。包含 C_H2/C_H3 区的蛋白质的实例包含抗体、免疫黏附素和含有与 C_H2/C_H3 区融合或缀合的目的蛋白质的融合蛋白质。

[0065] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任意长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性的或分支的,它可以包含修饰氨基酸,且它可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖经天然修饰或通过间插修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任意其他操作或修饰,如与标记成分缀合。同样包含于该定义内的是例如含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等),以及本领域已知的其他修饰的多肽。

[0066] 本文中使用的术语“纯化的多肽”或“纯化的蛋白质”是来自本文中所述的使用pH梯度法的A蛋白亲和层析的洗脱产物。纯化的多肽/蛋白质优选主要包含多肽单体。

[0067] 本文中使用的术语“未纯化的多肽”、“未纯化的蛋白质”或“蛋白质上样”是A蛋

白亲和层析纯化步骤之前的上样物质或起始物质中的多肽或蛋白质。

[0068] 本文中使用的术语“杂质”是不同于希望的多肽单体产物的物质。杂质包括但不限于多肽变体（例如酸性或碱性多肽变体）、多肽片段、希望的多肽单体的聚集体或衍生物、另一多肽、脂质、核酸、内毒素、宿主细胞杂质或病毒滤器结垢物。

[0069] 本文中使用的术语“单体”指包含 C_{H2}/C_{H3} 区的多肽的单个单位。例如，在抗体的情况下，单体由两条重链和两条轻链组成；在单臂抗体的情况下，单体由一条重链和一条轻链组成。

[0070] 本文中使用的术语“碱性多肽变体”或“碱性变体”指目的多肽的变体，其比目的多肽更具碱性的（例如通过阳离子交换层析测定）。

[0071] 本文中使用的术语“酸性多肽变体”或“酸性变体”指目的多肽的变体，其比目的多肽更具酸性的（例如通过阴离子交换层析测定）。

[0072] 本文中使用的术语“聚集体”指包含 C_{H2}/C_{H3} 区的多肽或多肽片段的任意多聚体。例如，聚集体可以是二聚体、三聚体、四聚体或大于四聚体的多聚体等。

[0073] 本文中使用的术语“宿主细胞杂质”指由宿主细胞系、细胞培养液或细胞培养物引入的任意蛋白质污染物或副产物。实例包括但不限于中国仓鼠卵巢蛋白质（CHOP）、大肠杆菌（*E. coli.*）蛋白质、酵母蛋白质、猿猴 COS 蛋白质或骨髓瘤细胞蛋白质（例如 NS0 蛋白质（衍生自 BALB/c 小鼠的小鼠血小板瘤（plasmacytoma）细胞）。

[0074] 本文中使用的术语“病毒滤器结垢物”指具有类似于或大于细小病毒滤器的孔径分布的流体直径的任意大分子量颗粒或高分子量种类（HMWS）。病毒滤器结垢物包括但不限于可溶性高分子量多肽聚集体和宿主细胞杂质（例如 CHOP）的可溶性和 / 或不可溶性聚集体。

[0075] “宿主细胞”包括可以作为或已作为用于掺入多核苷酸插入片段来产生多肽的一个或多个载体的受体的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包含单个宿主细胞的后代，由于自然突变、偶然突变或故意突变，后代可以并非必定与最初的亲本细胞完全相同（在形态学上或在基因组 DNA 互补物（complement）上）。

[0076] 本文中使用的“固相”指 A 蛋白可以附着的非水性基质。

[0077] “缓冲液”是通过其酸碱共轭成分的作用抵抗 pH 变化的缓冲溶液。可以取决于例如希望的缓冲液 pH 利用的多种缓冲液描述于 Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D. 编辑 Calbiochem Corporation(1975) 中。

[0078] 本文中的“平衡缓冲液”是用来为上样目的蛋白质准备固相（具有固定化的 A 蛋白）的缓冲液。

[0079] 本文中用“洗涤缓冲液”来指上样之后和洗脱目的蛋白质之前流过固相（具有固定化的 A 蛋白）的缓冲液。

[0080] 术语“抗体”以最广泛的含义使用，且明确涵盖单克隆抗体（包含全长单克隆抗体）、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗体片段，只要它们保留了本文中定义的 C_{H2}/C_{H3} 区或修饰为包含本文中定义的 C_{H2}/C_{H3} 区。

[0081] “抗体片段”包含全长抗体的部分，一般是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包含 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；单链抗体分子；双抗体；线性抗体；和从抗体片段形

成的多特异性抗体。本文中使用的抗体片段包含 C_H2/C_H3 区。

[0082] 本文中使用的术语“单克隆抗体”指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即包含各个抗体的群体除可以小量存在的可能的天然存在的突变之外是同一的。单克隆抗体高度特异,抗单个抗原部位。此外,与通常包含抗不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂不同,每个单克隆抗体抗抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”表示获自基本上同质的抗体群体的抗体的特性,而不解释为需要通过任意特定方法产生抗体。例如,待按照本发明使用的单克隆抗体可以通过最先由 Kohler 等, *Nature* 256:495(1975) 描述的杂交瘤法产生,或者可以通过重组 DNA 法(见例如美国专利号 4,816,567)产生。还可以用例如 Clackson 等, *Nature* 352:624-628(1991) 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991) 中所述的技术从噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0083] 本文中的单克隆抗体明确包含“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中部分重链和/或轻链与衍生自特定物种的抗体中对应的序列同一或同源,或者隶属于特定抗体种类或亚类,而链的其余部分与衍生自另一物种的抗体中对应的序列同一或同源,或者隶属于另一抗体种类或亚类,以及这类抗体的片段,只要它们显示希望的生物活性(美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

[0084] 在本文中使用时,术语“高变区”指抗体的氨基酸残基,其负责抗原结合。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即轻链可变结构域中的残基 24-34(L1)、50-56(L2) 和 89-97(L3) 及重链可变结构域中的 31-35(H1)、50-65(H2) 和 95-102(H3); Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基(即轻链可变结构域中的残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3) 及重链可变结构域中的 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))。“构架”或“FR”残基是除本文中定义的高变区残基外的那些可变结构域残基。

[0085] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其包含最少的衍生自非人免疫球蛋白的序列。大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中通过具有希望的特异性、亲和力和容量的来自非人物种(供体抗体),如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基取代受体的高变区残基。在一些情况下,通过对应的非人残基取代人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体或供体抗体中的残基。产生这些修饰来进一步改进抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个,且通常为两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,且全部或基本上全部 FR 区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的详情见 Jones 等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0086] 本文中使用的术语“免疫黏附素”指抗体样分子,其将异源“黏附素”蛋白质(例如受体、配体或酶)的“结合结构域”与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能组合。在结构上,免疫黏附素包含不同于抗体的抗原识别和结合部位(抗原结合部位)(即“异源的”)的具有希望的结合特异性的黏附素氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合。免疫黏

附素中的免疫球蛋白恒定结构域优选衍生自 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链,因为可以通过 A 蛋白层析纯化包含这些区域的免疫黏附素 (Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62 :1-13(1983))。

[0087] 本文中使用的术语“配体结合结构域”指任意天然的细胞表面受体或其至少保留了对应的天然受体的定性配体结合的任意区域或衍生物。在具体实施方案中,受体来自与免疫球蛋白超基因家族的成员同源的具有胞外域的细胞表面多肽。不是免疫球蛋白超基因家族的成员,但也为此定义明确涵盖的其他受体是细胞因子的受体,尤其是具有酪氨酸激酶活性的受体(受体酪氨酸激酶)、血细胞生成素和神经生长因子受体超家族的成员及细胞黏附分子,例如(E-、L-和P-)选择蛋白。

[0088] 用术语“受体结合结构域”来指受体的任意天然配体,包括细胞黏附分子,或这种天然配体的至少保留了对应的天然配体的定性受体结合能力的任意区域或衍生物。此定义明确包含来自上述受体的配体的结合序列等。

[0089] “抗体-免疫黏附素嵌合体”包含将抗体的至少一个结合结构域(如本文中定义)与至少一个免疫黏附素(如本申请中定义)组合的分子。示例性抗体-免疫黏附素嵌合体是 Berg 等, PNAS(USA) 88 :4723-4727(1991) 和 Chamow 等, J. Immunol. 153 :4268(1994) 中所述的双特异性 CD4-IgG 嵌合体。

[0090] 对于本文中的使用,除非清楚地另有说明,术语“该”、“一个”等的使用指一个或多个。

[0091] 本文中提到“约”某个值或参数时包括(和描述)指向该值或参数本身的实施方案。例如,提到“约 X”的描述包括“X”的描述。数字范围包含定义该范围的数字。

[0092] 应理解,本文中用语言“包含”描述实施方案时,也提供了以“由...组成”和/或“基本上由...组成”的方式描述的类似实施方案。

多肽的纯化

[0093] 本文中的方法涉及通过使用起始于低 pH 的 pH 梯度的 A 蛋白亲和层析来从一种或多种杂质纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽。在一方面,可以通过包括使多肽与 A 蛋白结合和用起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱的方法纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽。

[0094] 在另一方面,还可以通过包括以下步骤的方法来纯化包含 C_H2/C_H3 区的多肽:(a) 使多肽与 A 蛋白结合;和(b)用洗脱缓冲液以起始于 5.0 或 5.0 以下的 pH 梯度洗脱多肽,其中洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液,且其中通过调节各 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比来形成 pH 梯度。

[0095] A 蛋白可以是修饰或未修饰的 A 蛋白配体。本文中使用的“A 蛋白配体”涵盖天然 A 蛋白、合成产生的 A 蛋白(例如通过肽合成或通过重组技术)及其保留了结合具有 C_H2/C_H3 区的蛋白质的能力的变体。可以化学改造修饰的 A 蛋白配体为在高 pH 溶液中短时间稳定(例如 MABSELECT SURE™(GE Healthcare(Piscataway, NJ))、**POROS®** MABCAPTURE™ A(Applied Biosystems(Foster City CA))。本文中使用的术语“未修饰的 A 蛋白配体”涵盖类似于从天然来源回收的 A 蛋白的 A 蛋白配体。可以从 GE Healthcare(Piscataway, NJ) 或 Millipore(Billerica, MA) 购得未修饰的 A 蛋白配体,例如 MABSELECT™、PROSEP™ Va、PROSEP™ Ultra Plus。

[0096] 可以将 A 蛋白固定在固相上。固相可以是纯化柱、间断相或离散颗粒、膜或滤器。用于形成固相的物质的实例包含多糖(例如琼脂糖和纤维素)和其他机械稳定的基质,如

硅石（例如可控孔度玻璃）、聚（苯乙烯二乙烯）苯、聚丙烯酰胺、陶瓷颗粒和以上任一种的衍生物。

[0097] 用固定在固相上的 A 蛋白来纯化包含 $C_{\alpha}2/C_{\alpha}3$ 区的多肽。在一些实施方案中，固相是 A 蛋白柱树脂，其包含用于固定 A 蛋白的玻璃珠基树脂、硅石基树脂或琼脂糖基树脂。例如，固相是可控孔度玻璃柱或硅酸柱。有时，已在防止与柱的非特异性黏附的尝试中用试剂，如甘油包被了柱。PROSEP™ A 柱是用甘油包被的 A 蛋白可控孔度玻璃柱的实例。在其他实施方案中，固相是用于固定 A 蛋白的 A 蛋白层析吸着剂。A 蛋白层析吸着剂包括但不限于膜（例如 Sartorius (Goettingen, 德国)，SARTOBIND™ A 蛋白膜）或整料（例如 BIA Separations (Villach, 奥地利)，**CIM**® A 蛋白 HLD 整料）。

[0098] 可以用平衡缓冲液平衡用于 A 蛋白层析的固相，然后可以将包含多种杂质的未纯化的蛋白质（例如收获的细胞培养液）上样在平衡的固相上。可以用上样缓冲液上样多肽。方便地，用于平衡固相的平衡缓冲液可以与上样缓冲液相同，但这并非必需的。多肽流过固相时，多肽和多种杂质吸附至固定的 A 蛋白。可以用洗涤缓冲液来去除一些杂质，如宿主细胞杂质，但不去除目的多肽。

[0099] 平衡缓冲液优选是等渗的，且通常具有从约 6 至约 8 的范围内的 pH。例如，平衡缓冲液可以具有 25mM Tris、25mM NaCl、5mMEDTA 和 pH 7.1。

[0100] “上样缓冲液”指用来将含 $C_{\alpha}2/C_{\alpha}3$ 的蛋白质和污染物的混合物上样至固定了 A 蛋白的固相上的缓冲液。通常，平衡缓冲液和上样缓冲液是相同的。

[0101] 洗涤缓冲液可以用于洗脱细胞系杂质或其他多种杂质。洗涤缓冲液的电导率和/或 pH 是这样的，使得从 A 蛋白层析洗脱杂质，而不洗脱任意显著量的目的多肽。

[0102] 可以用单种洗脱缓冲液或洗脱缓冲液的组合以 pH 梯度洗脱与 A 蛋白结合的多肽。

[0103] 用“洗脱缓冲液”来从固定的 A 蛋白洗脱包含 $C_{\alpha}2/C_{\alpha}3$ 区的多肽。本文中使用的洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液，从而通过调节高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比来形成 pH 梯度。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有从约 3 至约 5 的范围内的 pH。本文中使用的 pH 值是在不存在多肽的情况下测量的。控制 pH 在此范围内的 pH 缓冲液的实例包括但不限于磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、甲酸和铵缓冲液，以及这些的组合。优选的这类缓冲液是乙酸盐和甲酸缓冲液。

[0104] 在一些实施方案中，pH 梯度起始于约 5.0。在一些实施方案中，pH 梯度起始于 5.0 以下。在一些实施方案中，pH 梯度起始于从约 5.0 至约 4.0 的范围。在一些实施方案中，pH 梯度起始于约 4.9、约 4.8、约 4.7、约 4.6、约 4.5、约 4.4、约 4.3、约 4.2、约 4.1 或约 4.0。在一些实施方案中，pH 梯度起始于约 4.98、约 4.96、约 4.94、约 4.92、约 4.90、约 4.88、约 4.86、约 4.84、约 4.82、约 4.80、约 4.78、约 4.76、约 4.74、约 4.72、约 4.70、约 4.68、约 4.66、约 4.64、约 4.62、约 4.60、约 4.58、约 4.56、约 4.54、约 4.52、约 4.50、约 4.48、约 4.46、约 4.44、约 4.42、约 4.40、约 4.38、约 4.36、约 4.34、约 4.32、约 4.30、约 4.28、约 4.24、约 4.22、约 4.20、约 4.18、约 4.16、约 4.14、约 4.12、约 4.10、约 4.08、约 4.06、约 4.04 或约 4.02。

[0105] 在一些实施方案中，pH 梯度终止于约 3.0。在一些实施方案中，pH 梯度终止于 3.0 以上。在一些实施方案中，pH 梯度终止于从约 3.0 至约 4.0 的范围。在一些实施方案中，pH 梯度终止于约 3.1、约 3.2、约 3.3、约 3.4、约 3.5、约 3.6、约 3.7、约 3.8 或约 3.9。在一

些实施方案中,pH 梯度终止于约 3.12、约 3.14、约 3.16、约 3.18、约 3.20、约 3.22、约 3.24、约 3.26、约 3.28、约 3.30、约 3.32、约 3.34、约 3.36、约 3.38、约 3.40、约 3.42、约 3.44、约 3.46、约 3.48、约 3.50、约 3.52、约 3.54、约 3.56、约 3.58、约 3.60、约 3.61、约 3.62、约 3.63、约 3.64、约 3.65、约 3.66、约 3.67、约 3.68、约 3.69、约 3.70、约 3.71、约 3.72、约 3.73、约 3.74、约 3.75、约 3.76、约 3.77、约 3.78、约 3.79、约 3.80、约 3.82、约 3.84、约 3.86、约 3.88、约 3.9、约 3.92、约 3.94、约 3.96 或约 3.98。

[0106] 在一些实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.2,终止于约 pH3.7。在一些实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.24,终止于约 pH 3.69。例如,可以用起始于约 pH 4.24,终止于约 pH 3.69 的 pH 梯度纯化抗-VEGF 抗体、抗-CD20 抗体、抗-MUC16 抗体、抗-CD4 抗体和单臂抗-Met 抗体。

[0107] 在其他实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.3,终止于约 pH3.7。在一些实施方案中,pH 梯度(即 pH 分级梯度)起始于约 pH 4.34,终止于约 pH 3.69。例如,可以用起始于约 pH 4.34,终止于约 pH 3.69 的 pH 梯度纯化抗-VEGF 抗体、抗-CD20 抗体、抗-MUC16 抗体、抗-CD4 抗体和单臂抗-Met 抗体。

[0108] 在一些实施方案中,pH 梯度起始于约 pH 4.6,终止于约 pH3.7。在一些实施方案中,pH 梯度(即 pH 全梯度)起始于约 pH 4.58,终止于约 pH 3.69。例如,可以用起始于约 pH 4.58,终止于约 pH 3.69 的 pH 梯度纯化抗-VEGF 抗体、抗-CD20 抗体、抗-MUC 16 抗体、抗-CD4 抗体和单臂抗-Met 抗体。

[0109] 洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液,通过调节各 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比来形成 pH 梯度。在一些实施方案中,高 pH 缓冲液是约 pH 5.0,低 pH 缓冲液是约 2.7。例如,高 pH 缓冲液可以是 25mM 乙酸盐和 pH 5.0,低 pH 缓冲液可以是 25mM 甲酸和 pH 2.7。

[0110] 调节低 pH 缓冲液的起始百分比可以优化和最大化纯化的多肽的纯度,以及包括聚集体、细胞系杂质、碱性多肽变体、病毒颗粒、病毒样颗粒和病毒滤器结垢物的杂质从多肽单体的连续分离。低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比可以起始于约 25%、约 30%、约 35%、约 40%或约 45%。

[0111] 在一些实施方案中,低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比可以起始于约 25%。在一些实施方案中,含有约 25%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.5-4.6 下包含约 19mM 乙酸盐、约 6mM 甲酸盐和约 1140 缓冲液电导率。例如,含有约 25%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.58 下包含 18.75mM 乙酸盐、6.25mM 甲酸盐和 1141uS/cm 缓冲液电导率。

[0112] 在一些实施方案中,低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比可以起始于约 35%。在一些实施方案中,含有约 35%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.3-4.4 下包含约 16mM 乙酸盐、约 9mM 甲酸盐和约 1040 缓冲液电导率。例如,含有约 35%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.34 下包含 16.25mM 乙酸盐、8.75mM 甲酸盐和 1039uS/cm 缓冲液电导率。

[0113] 在一些实施方案中,低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比可以起始于约 40%。在一些实施方案中,含有约 40%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.2-4.3 下包含约 15mM 乙酸盐、约 10mM 甲酸盐和约 974 缓冲液电导率。例如,含有约 40%低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 4.24 下包含 15mM 乙酸盐、10mM 甲酸盐和 974uS/cm 缓冲液电导率。

[0114] 在一些实施方案中,低 pH 缓冲液在洗脱缓冲液中的百分比可以终止于约 60%。在

一些实施方案中,含有约 60% 低 pH 缓冲液的洗脱缓冲液在 pH 3.6-3.7 下包含约 10mM 乙酸盐、约 15mM 甲酸盐和约 763 缓冲液电导率。例如, pH 梯度终点的低 pH 缓冲液可以是 pH 3.69 下的 10mM 乙酸盐、15mM 甲酸盐、763uS/cm 缓冲液电导率。

[0115] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有从约 1200uS/cm 至约 500uS/cm 的范围内的缓冲液电导率。在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有从约 1150uS/cm 至约 700uS/cm 的范围内的缓冲液电导率。在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有约 1145uS/cm、约 1141uS/cm、约 1130uS/cm、约 1120uS/cm、约 1110uS/cm、约 1000uS/cm、约 1039uS/cm、约 1000uS/cm、约 974uS/cm、约 900uS/cm、约 800uS/cm、约 763uS/cm 或约 700uS/cm 的缓冲液电导率。

[0116] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液的组成是约 9-20mM 乙酸盐和 5-15mM 甲酸盐。在一些实施方案中,洗脱(缓冲液)的组成是约 10-19mM 乙酸盐和 6-16mM 甲酸盐。

[0117] 调节多肽的上样密度也可以优化和最大化纯化的多肽的纯度,以及包括聚集体、细胞系杂质、碱性多肽变体、病毒颗粒、病毒样颗粒和病毒滤器结垢物的杂质从多肽单体的分离。

[0118] 术语“负载密度”或“上样密度”是每升层析树脂的纯化的多肽(g)的密度,或每升膜/滤器体积(L)的纯化的多肽的密度。以 g/L 测量上样密度。

[0119] 在一些实施方案中,以起始于 14g/L 或 14g/L 以上的上样密度上样多肽。在一些实施方案中,以从约 14g/L 至约 45g/L 或从约 14g/L 至约 70g/L 的范围内的上样密度上样多肽。在一些实施方案中,以约 15g/L、约 17g/L、约 19g/L、约 21g/L、约 23g/L、约 25g/L、约 26g/L、约 27g/L、约 28g/L、约 29g/L、约 31g/L、约 33g/L、约 35g/L、约 37g/L、约 39g/L、约 41g/L、约 43g/L、约 45g/L、约 50g/L、约 55g/L、约 60g/L、约 65g/L 或约 70g/L 的上样密度上样多肽。

[0120] 调节多肽洗脱滞留时间(或洗脱流速)也可以优化和最大化多肽纯度及杂质从多肽单体的连续分离。在增加的上样密度下,多肽洗脱滞留时间在 pH 梯度有效分级分离聚集体的能力中发挥更大的作用。在一些实施方案中,多肽具有从约 5 个柱体积/小时至约 35 个柱体积/小时的范围内的洗脱流速。在一些实施方案中,多肽具有从约 5 个柱体积/小时至约 25 个柱体积/小时的范围内的洗脱流速。在一些实施方案中,多肽具有约 5 个柱体积/小时、约 7.5 个柱体积/小时、约 10 个柱体积/小时、约 12.5 个柱体积/小时、约 15 个柱体积/小时、约 17.5 个柱体积/小时、约 20 个柱体积/小时、约 22.5 个柱体积/小时、约 25 个柱体积/小时、约 27.5 个柱体积/小时、约 30 个柱体积/小时、约 32.5 个柱体积/小时或约 35 个柱体积/小时的洗脱流速。

[0121] 用本文中所述的方法纯化的多肽具有至少约 75% 未纯化的多肽、80% 未纯化的多肽、85% 未纯化的多肽、90% 未纯化的多肽、95% 未纯化的多肽、96% 未纯化的多肽、97% 未纯化的多肽、98% 未纯化的多肽或 99% 未纯化的多肽中任意种的产率。

[0122] 产率是所收集的纯化的多肽的总量与本文中所述的 A 蛋白亲和层析纯化之前的未纯化的多肽相比,通常表示为未纯化的多肽的百分比。

[0123] 在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比未纯化的多肽中的比值低至少约 75%、低约 80%、低约 85%、低约 90%、低约 95%、低约 96%、低约 97%、低约 98% 或低约 99%。

[0124] 在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比用除本发明的那些外的

一个或多个 pH 纯化步骤纯化的多肽中的比值低至少约 20%、低约 30%、低约 40%、低约 50%、低约 60% 或低约 70%。例如,在常规或典型分级 A 蛋白洗脱法中,通过使多肽与 A 蛋白结合并在无 pH 梯度的情况下在 pH 3.6 或 pH 3.6 以下洗脱多肽来纯化多肽。因此,在一些实施方案中,宿主细胞杂质与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 20%、低约 30%、低约 40%、低约 50%、低约 60% 或低约 70%,其中分级洗脱法包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。

[0125] 在一些实施方案中,病毒滤器结垢物与纯化的多肽的比值比未纯化的多肽中的比值低至少约 75%、低至少约 80%、低约 85%、低约 90%、低约 95%、低约 96%、低约 97%、低约 98% 或低约 99%。

[0126] 在一些实施方案中,病毒滤器结垢物与纯化的多肽的比值比用除本发明的那些外的一个或多个 pH 纯化步骤纯化的多肽中的比值低至少约 20%、低约 30%、低约 40%、低约 50%、低约 60% 或低约 70%。例如,在常规或典型分级 A 蛋白洗脱法中,通过使多肽与 A 蛋白结合并在无 pH 梯度的情况下在 pH 3.6 或 pH 3.6 以下洗脱多肽来纯化多肽。因此,在一些实施方案中,病毒滤器结垢物与纯化的多肽的比值比通过分级洗脱法纯化的多肽中的比值低至少约 20%、低约 30%、低约 40%、低约 50%、低约 60% 或低约 70%,其中分级洗脱法包括使多肽与 A 蛋白结合,并用起始于 3.6 或 3.6 以下的 pH 洗脱。

[0127] 在一些实施方案中,纯化的多肽具有少于约 15000 颗粒 /ml 的病毒颗粒或病毒样颗粒计数。在一些实施方案中,纯化的多肽具有少于约 12500 颗粒 /ml、少于约 10000 颗粒 /ml、少于约 7500 颗粒 /ml、少于约 5000 颗粒 /ml、少于约 2500 颗粒 /ml、少于约 1500 颗粒 /ml、少于约 1000 颗粒 /ml、少于约 750 颗粒 /ml、少于约 500 颗粒 /ml、少于约 250 颗粒 /ml、少于约 100 颗粒 /ml 或少于约 50 颗粒 /ml 的病毒颗粒或病毒样颗粒计数。在一些实施方案中,病毒样颗粒是反转录病毒样颗粒。

[0128] 本文中使用的术语“病毒颗粒”是由保护性蛋白质外壳(壳体)包围的核酸核组成的病毒体。“病毒样颗粒”是模拟相似的形态学特性、生物化学特性或其他特性的非感染性病毒。它们缺乏病毒生活史所必需的成分中的至少一种。病毒样颗粒的实例是不能复制的反转录病毒样颗粒。病毒颗粒或病毒样颗粒可以是内源的或外源的(外来的)。内源病毒颗粒或病毒样颗粒由宿主细胞系产生,存在于细胞和细胞培养液中,可以将其视为宿主细胞杂质。外源或外来病毒或病毒样颗粒并非衍生自宿主细胞系。

[0129] 在一些实施方案中,纯化的多肽具有至少约 4LRV(病毒的 log10 减少)的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具有从约 4LRV 至约 8LRV 的范围内的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具有从约 4LRV 至约 7LRV 的范围内的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,纯化的多肽具约 5LRV、约 6LRV、约 7LRV 或约 8LRV 的病毒或病毒样颗粒的病毒清除。在一些实施方案中,病毒样颗粒是反转录病毒样颗粒。

[0130] 本文中使用的 LRV 是未纯化的多肽中的 log10(总病毒)和纯化的多肽中的 log10(总病毒)之差。

[0131] 在一些实施方案中,纯化的多肽是多肽单体。

[0132] 在一些实施方案中,纯化的多肽级分包含约或少于约 20 个 A 蛋白柱体积。在一些实施方案中,纯化的多肽级分包含约或少于约 15 个 A 蛋白柱体积。在一些实施方案中,纯

化的多肽级分包含约或少于约 12 个 A 蛋白柱体积。在一些实施方案中,纯化的多肽级分包含约或少于约 11、约 10、约 9、约 8、约 7、约 6、约 5.5 或约 5.0 个 A 蛋白柱体积。

[0133] 在一些实施方案中,本文中所述的方法从希望的多肽单体产物去除本文中所述的杂质中的至少两种。例如,该方法去除聚集体和宿主细胞系杂质二者、聚集体和病毒滤器结垢物二者、聚集体和病毒颗粒二者、聚集体和病毒样颗粒二者、聚集体和碱性多肽变体二者,或宿主细胞系杂质和病毒颗粒二者等。在一些实施方案中,本文中所述的方法从希望的多肽单体产物去除本文中所述的杂质中的至少三种。例如,该方法去除聚集体、宿主细胞杂质和病毒滤器结垢物;或聚集体、宿主细胞杂质和病毒颗粒及碱性多肽变体等。在一些实施方案中,本文中所述的方法从希望的多肽单体产物去除本文中所述的杂质中的至少四种。例如,该方法去除聚集体、宿主细胞杂质、病毒滤器结垢物和病毒颗粒;或聚集体、宿主细胞杂质、病毒滤器结垢物和病毒样颗粒。在一些实施方案中,本文中所述的方法从希望的多肽单体产物去除本文中所述的杂质中的至少五种。例如,该方法去除聚集体、宿主细胞杂质、病毒滤器结垢物、病毒颗粒和病毒样颗粒等。在一些实施方案中,本文中所述的方法从希望的多肽产物去除所有杂质。

[0134] 在一些实施方案中,本文中所述的方法不包括进一步的纯化步骤来去除聚集体,纯化的多肽具有至少约 98%或约 99%单体的纯度。使用上文所述的 pH 梯度的 A 蛋白层析后无需通常在分开的离子交换层析步骤上进行的聚集体清除。

[0135] 在一些实施方案中,本文中所述的方法不包括进一步的纯化步骤来去除病毒滤器结垢物,纯化的多肽具有至少约 98%或约 99%单体的纯度。

[0136] 在一些实施方案中,纯化方法不包括进一步的纯化步骤来去除碱性或酸性多肽变体。

[0137] 可以在 A 蛋白层析步骤之前、A 蛋白层析步骤期间或 A 蛋白层析步骤之后对用本文中所述的方法的纯化的多肽进行其他纯化步骤。示例性其他纯化步骤包括但不限于羟基磷灰石层析;透析;用抗体来捕获蛋白质的亲和层析;疏水作用层析(HIC)(例如在 HIC 上分级分离);硫酸铵沉淀;聚乙二醇或聚乙二醇衍生物沉淀;阴离子或阳离子交换层析;乙醇沉淀;反相 HPLC;硅石上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;病毒过滤;凝胶过滤;和弱分配层析。

[0138] 在一些实施方案中,进一步对多肽进行病毒过滤步骤。例如,可以在使用本文中所述的 pH 梯度的 A 蛋白层析步骤之后将细小病毒滤器用于病毒过滤步骤。

[0139] 在一些实施方案中,进一步对多肽进行离子交换层析步骤。在一些实施方案中,离子交换层析步骤包括阳离子交换层析步骤。在一些实施方案中,离子交换层析步骤包括阴离子交换层析步骤。在一些实施方案中,离子交换层析步骤包括阳离子交换层析步骤和阴离子交换层析步骤。

[0140] 在一些实施方案中,在本文中所述的 A 蛋白层析步骤后连续进行离子交换层析步骤。例如,在本文中所述的 A 蛋白层析法之后,可以用阳离子和阴离子交换层析膜取代标准阳离子和/或阴离子交换层析柱来获得与无 pH 梯度的标准 A 蛋白层析后进行标准阳离子和阴离子交换柱层析步骤的方法所产生的纯度和产率相当的纯化的多肽。

[0141] 在一些实施方案中,本文中所述的方法是制造规模或商业方法。本文中使用的制造规模或商业方法指蛋白质/多肽的大规模纯化,例如每个纯化过程约 1kL 至约 25kL 发酵

规模蛋白质 / 多肽产物。

多肽

[0142] 待用本文中所述的方法纯化的多肽或蛋白质包括但不限于抗体、免疫黏附素、或与 C_H2/C_H3 区融合或缀合的多肽。下文讨论用于产生这类分子的技术。

抗体

[0143] 本发明的范围内的抗体包括但不限于：抗-CD20 抗体，如美国专利号 5,736,137 中的嵌合抗-CD20 “C2B8” (**RITUXAN[®]**)；抗-VEGF 抗体，包括人源化和 / 或亲和力成熟的抗-VEGF 抗体，如人源化抗-VEGF 抗体 huA4.6.1 **AVASTIN[®]** (Kim 等, Growth Factors, 7:53-64(1992)；国际公开号 WO 96/30046；和 1998 年 10 月 15 日公开的 WO 98/45331) 和 V3LA；抗-MUC16 抗体；抗-CD4 抗体，如 cM-7412 抗体 (Choy 等 Arthritis Rheum. 39(1):52-56(1996)) 和 Ibalizumab (TNX355) 抗体；抗-MET 抗体，如单臂 5D5 抗-C-Met 抗体；抗-HER2 抗体 Trastuzumab (**HERCEPTIN[®]**) (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289(1992)；美国专利号 5,725,856) 和人源化 2C4 (W001/00245, Adams 等)，美国专利号 5,721,108B1 中的 2H7 抗体的嵌合或人源化变体，或 Tositumomab (**BEXXAR[®]**)；抗-IL-8 抗体 (St John 等, Chest, 103:932(1993)；和国际公开号 WO 95/23865)；抗-前列腺干细胞抗原 (PSCA) 抗体 (W001/40309)；抗-CD40 抗体，包括 S2C6 及其人源化变体 (W000/75348)；抗-CD1 抗体 (美国专利号 5,622,700；WO 98/23761；Steppe 等, Transplant Intl. 4:3-7(1991)；和 Hourmant 等, Transplantation 58:377-380(1994))；抗-CD18 (1997 年 4 月 22 日授予的美国专利号 5,622,700，或 1997 年 7 月 31 日公开的 WO 97/26912 中)；抗-IgE 抗体 (包括 E25、E26 和 E27；1998 年 2 月 3 日授予的美国专利号 5,714,338 或 1992 年 2 月 25 日授予的美国专利号 5,091,313；1993 年 3 月 4 日公开的 WO 93/04173；或 1998 年 6 月 30 日提交的国际申请号 PCT/US98/13410；美国专利号 5,714,338；Presta 等, J. Immunol. 151:2623-2632(1993)；和国际公开号 WO 95/19181)；抗-Apo-2 受体抗体 (1998 年 11 月 19 日公开的 WO 98/51793)；抗-TNF- α 抗体，包括 cA2 (**REMICADE[®]**)、CDP571 和 MAK-195 (见 1997 年 9 月 30 日授予的美国专利号 5,672,347；Lorenz 等 J. Immunol. 156(4):1646-1653(1996)；和 Dhainaut 等 Crit. Care Med. 23(9):1461-1469(1995))；抗-组织因子 (TF) 抗体 (1994 年 11 月 9 日授予的欧洲专利号 0420937B1)；抗-人 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白抗体 (1998 年 2 月 19 日公开的 W098/06248)；抗-表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 (例如 1996 年 12 月 19 日公开的 WO 96/40210 中的嵌合或人源化 225 抗体)；抗-CD3 抗体，如 OKT3 (1985 年 5 月 7 日授予的美国专利号 4,515,893)；抗-CD25 或抗-Tac 抗体，如 CHI-621 (**SIMULECT[®]**) 和 **ZENAPAX[®]** (见 1997 年 12 月 2 日授予的美国专利号 5,693,762)；抗-CD52 抗体，如 CAMPATH-1H (Riechmann 等 Nature 332:323-337(1988))；抗-Fc 受体抗体，如 Graziano 等 J. Immunol. 155(10):4996-5002(1995) 中的抗 Fc γ RI 的 M22 抗体；抗-癌胚抗原 (CEA) 抗体，如 hMN-14 (Sharkey 等 Cancer Res. 55(23 增刊):5935s-5945s (1995))；抗乳腺上皮细胞的抗体，包括 huBrE-3、hu-Mc 3 和 CHL6 (Ceriani 等 Cancer Res. 55(23):5852s-5856s(1995)；和 Richman 等 Cancer Res. 55(23 增刊):5916s-5920s(1995))；与结肠癌细胞结合的抗体，如 C242 (Litton 等 Eur J Immunol. 26(1):1-9(1996))；抗-CD38

抗体,例如 AT 13/5(Ellis 等 J. Immunol. 155(2):925-937(1995));抗-CD33 抗体,如 Hu M195(Jurcic 等 Cancer Res 55(23 增刊):5908s-5910s(1995)) 和 CMA-676 或 CDP771;抗-CD22 抗体,如 LL2 或 LymphoCide(Juweid 等 Cancer Res 55(23 增刊):5899s-5907s(1995));抗-EpCAM 抗体,如 17-1A(**PANOREX[®]**);抗-GpIIb/IIIa 抗体,如 abciximab 或 c7E3Fab(**REOPRO[®]**);抗-RSV 抗体,如 MEDI-493(**SYNAGIS[®]**);抗-CMV 抗体,如**PROTOVIR[®]**;抗-HIV 抗体,如 PRO542;抗-肝炎抗体,如抗-HepB 抗体**OSTAVIR[®]**;抗-CA 125 抗体,如 OvaRex;抗-独特型 GD3 表位抗体 BEC2;抗- $\alpha v \beta 3$ 抗体,包括**VITAXIN[®]**;抗-人肾细胞癌抗体,如 ch-G250、ING-1;抗-人 17-1A 抗体(3622W94);抗-人结肠直肠肿瘤抗体(A33);抗 GD3 神经节苷脂的抗-人黑素瘤抗体 R24;抗-人鳞状细胞癌(SF-25)和抗-人白细胞抗原(HLA)抗体,如 Smart ID10 和抗-HLA DR 抗体 Oncolym(Lym-1)。

[0144] 除上文明确指出的抗体外,本领域技术人员可以例如用下文所述的技术产生抗目的抗原的抗体。

(i) 抗原选择和制备

[0145] 本文中的抗体抗目的抗原。优选地,抗原是生物学上重要的多肽,且对患有疾病或障碍的哺乳动物施用抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。但是,还考虑抗非多肽抗原(如肿瘤相关糖脂抗原;见美国专利号 5,091,178)的抗体。抗原是多肽时,它可以是跨膜分子(例如受体)或配体,如生长因子。示例性抗原包括下文(3)部分中所述的那些蛋白质。本发明所涵盖的抗体的示例性分子靶标包括 CD 蛋白质,如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22 和 CD34;ErbB 受体家族的成员,如 EGFR、HER2、HER3 或 HER4 受体;细胞黏附分子,如 LFA-1、Mac1、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM 和 $\alpha v / \beta 3$ 整合蛋白,包括其 α 或 β 亚基(例如抗-CD11a、抗-CD18 或抗-CD11b 抗体);生长因子,如 VEGF;IgE;血型抗原;flk2/flt3 受体;肥胖(OB)受体;mpl 受体;CTLA-4;C 蛋白;或本文中提到的任意其他抗原。

[0146] 可以用可选地与其他分子缀合的可溶性抗原或其片段作为免疫原来产生抗体。对于跨膜分子,如受体,可以用这些的片段(例如受体的胞外域)作为免疫原。备选地,可以用表达跨膜分子的细胞作为免疫原。这类细胞可以衍生自天然来源(例如癌细胞系)或者可以是已通过重组技术转化为表达跨膜分子的细胞。

[0147] 对本领域技术人员而言,用于制备抗体的其他抗原及其形式将是显而易见的。

(ii) 多克隆抗体

[0148] 优选通过相关抗原和佐剂的多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射在动物中产生多克隆抗体。使用双功能剂或衍生剂,例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中 R 和 R^1 是不同的烷基,使抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质,例如匙孔螯血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂缀合可以是有用的。

[0149] 通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与 3 体积的弗氏完全佐剂组合并在多个部位皮内注射溶液来针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。一个月后,在多个部位通过皮下注射用弗氏完全佐剂中的 1/5 至 {级分(1/10)} 最初

量的抗原或缀合物加强动物。7 至 14 天后,对动物进行采血,并针对抗体效价测定血清。加强动物,直至效价平台。优选地,用相同抗原,但与不同蛋白质和 / 或通过不同交联试剂缀合的缀合物加强动物。还可以在重组细胞培养物中作为蛋白质融合产生缀合物。另外,适宜用聚集剂,如明矾来增强免疫应答。

(iii) 单克隆抗体

[0150] 可以用最先由 Kohler 等, Nature, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤法产生单克隆抗体,或者可以通过重组 DNA 法(美国专利号 4,816,567)产生。

[0151] 在杂交瘤法中,按上文所述免疫小鼠或其他适当的宿主动物,如仓鼠或猕猴来引出产生或能够产生将特异性结合用来进行免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。备选地,可以在体外免疫淋巴细胞。然后用适宜的融合剂,如聚乙二醇使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合来形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0152] 将这样制备的杂交瘤细胞接种和培养在适宜的培养基中,该培养基优选包含抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞的生长。

[0153] 优选的骨髓瘤细胞是有效融合、通过所选择的产抗体细胞稳定高水平产生抗体和对诸如 HAT 培养基的培养基敏感的那些。在这些中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,如可从 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. 美国获得的衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些,及可从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection,) Rockville, Md. USA 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。还已针对人单克隆抗体的产生描述了人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤 (heteromyeloma) 细胞系 (Kozbor, J. Immunol., 133 :3001 (1984) ;Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0154] 针对抗抗原的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。优选地,通过免疫沉淀法或通过体外结合测定,如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0155] 鉴定出产生具有希望的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释法亚克隆克隆,并通过标准方法培养 (Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, 59-103 页, (Academic Press, 1986))。为了此目的,适宜的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,可以在动物中作为腹水瘤体内培养杂交瘤细胞。

[0156] 通过常规免疫球蛋白纯化方法,例如 A 蛋白-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析来从培养基、腹水或血清适宜地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。优选地,使用本文中所述的使用 pH 梯度的 A 蛋白亲和层析法。

[0157] 编码单克隆抗体的 DNA 易于用常规方法分离和测序(例如通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可作为这种 DNA 的优选来源。一旦分离,即将 DNA 放置入表达载体中,然后将表达载体转染入否则将不产生免疫球蛋白蛋白质的诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓

瘤细胞的宿主细胞中,以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的表达。

[0158] 还可以例如通过用人重链恒定结构域和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列(美国专利号 4,816,567;Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接来修饰 DNA。

[0159] 通常,这类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定结构域,或者它们取代抗体的一个抗原结合部位的可变结构域,以产生包含对抗原具有特异性的一个抗原结合部位和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合部位的嵌合二价抗体。

[0160] 可以从用 McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554(1990) 中所述的技术产生的抗体噬菌体文库分离单克隆抗体。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 分别描述了用噬菌体文库分离鼠抗体和人抗体。后续出版物描述了通过链改组产生高亲和力(nM 范围)人抗体(Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为用于构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统杂交瘤技术的可行备选方案。

(iv) 人源化抗体和人抗体

[0161] 人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。可以基本上按照 Winter 及其同事的方法(Jones 等., *Nature*, 321:522-525(1986);Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988);Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988)),通过用啮齿类动物的一个或多个 CDR 序列取代对应的人抗体序列来进行人源化。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中已通过对应的来自非人物种的序列取代了基本上少于完整的人可变结构域。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中来自啮齿类动物抗体中类似位点的残基取代了一些 CDR 残基,且可能取代了一些 FR 残基。

[0162] 待用于产生人源化抗体的轻链和重链二者的人可变结构域的选择对降低免疫原性非常重要。按照所谓的“最佳适合”法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿类动物抗体的可变结构域的序列。然后接受与啮齿类动物的序列最接近的人序列作为人源化抗体的 FR(Sims 等, *J. Immunol.*, 151:2296(1993))。另一种方法使用衍生自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定构架。相同的构架可以用于几种不同的人源化抗体(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992);Presta 等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

[0163] 保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物特性人源化抗体也很重要。为了达到此目的,按照优选方法,通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可得,并为本领域技术人员所熟悉。说明和显示所选择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也可得。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体序列和输入序列选择和组合 FR 残基,使得达到希望的抗体特征,如增加的对一种或多种靶抗原的亲和力。一般而言,CDR 残基直接且最实质地涉及影响抗原结合。

[0164] 备选地,现在可能产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的所有组成成分。例如,已描述了抗体重链连接区(JH)基因在嵌合和种系突变体小鼠中的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移入这类种系突变体小鼠将导致抗原攻击时产生人抗体。见例如 Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362 :255-258(1993); Bruggermann 等, *Year in Immuno.*, 7 :33(1993); 和 Duchosal 等 *Nature* 355 :258(1992)。人抗体还可以衍生自噬菌体展示文库(Hoogenboom 等, *J. Mol. Biol.*, 227 :381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597(1991); Vaughan 等 *Nature Biotech* 14 :309(1996))。

(v) 抗体片段

[0165] 已为抗体片段的产生发展了多种技术。通常,经完整抗体的蛋白水解消化衍生这些片段(见例如 Morimoto 等 *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24 :107-117(1992) 和 Brennan 等, *Science*, 229 :81(1985))。但是,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,抗体片段可以分离自上文讨论的抗体噬菌体文库。备选地,可以从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段,并化学偶联来形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等, *Bio/Technology* 10 :163-167(1992))。按照另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离 F(ab')₂ 片段。还可以分离单链 Fv 片段(scFv)。见 W093/16185。对本领域技术人员而言,用于产生抗体片段的其他技术将是显而易见的。

(vi) 多特异性抗体

[0166] 多特异性抗体对至少两种不同抗原具有结合特异性。虽然这类分子通常将仅结合两种抗原(即双特异性抗体, BsAbs),但在本文中使用时,此表述涵盖了具有额外的特异性的抗体,如三特异性抗体。

[0167] 用于产生双特异性抗体的方法为本领域已知。全长双特异性抗体的传统产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein 等, *Nature*, 305 :537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadromas))产生 10 种不同抗体分子的可能的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤来进行)非常麻烦,且产物产率低。类似的方法公开于 W0 93/08829 中和 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10 :3655-3659(1991) 中。

[0168] 按照 W096/27011 中所述的另一种方法,可以改造抗体分子对间的界面来最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比。优选的界面包含抗体恒定结构域的至少部分 C_H3 结构域。在此方法中,用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生与一个或多个大的侧链相同或相似大小的补偿“空洞”。这提供了增加异二聚体的产率超过其他不想要的终产物,如同二聚体的机制。

[0169] 双特异性抗体包含交联抗体或“异缀合物”抗体。例如,异缀合物中的抗体中的一种可以与抗生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如,已提出这类抗体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),并用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、

WO 92/200373 和 EP 03089)。可以用任意方便的交联方法产生异缀合物抗体。适宜的交联剂为本领域公知,并连同许多交联技术一起公开于美国专利号 4,676,980 中。

[0170] 还已在文献中描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以用化学连接制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science*, 229 :81 (1985) 描述了蛋白酶解切割完整抗体来产生 $F(ab')_2$ 片段的方法。在存在二巯基络合剂亚砷酸钠的情况下还原这些片段,以稳定邻位二巯基和防止分子间二硫化物形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸盐 (TNB) 衍生物。然后通过用巯基乙胺还原来将 $Fab' - TNB$ 衍生物中的一个再转化为 $Fab' -$ 巯基,并与等摩尔量的其他 $Fab' - TNB$ 衍生物混合来形成双特异性抗体。可以将产生的双特异性抗体用作选择性固定酶的物质。

[0171] 最近的进展已便于从大肠杆菌直接回收 $Fab' - SH$ 片段,其可以化学偶联来形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992) 描述了完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。各 Fab' 片段分开地从大肠杆菌分泌,并在体外经受定向化学偶联来形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能够与过量表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞结合,以及触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳腺癌靶标的裂解活性。

[0172] 还已描述了直接从重组细胞培养物产生和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148 (5) : 1547-1553 (1992)。通过基因融合将来自 Fos 和 Jun 蛋白质的亮氨酸拉链肽连接至两种不同抗体的 Fab' 部分。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。还可以利用此方法来产生抗体同二聚体。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 6444-6448 (1993) 所述的“双抗体”技术提供了产生双特异性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),该接头太短而不允许相同链上的两个结构域间配对。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部位。还已报道了通过单链 Fv (sFv) 二聚体的使用来产生双特异性抗体片段的另一策略。见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152 :5368 (1994)。备选地,抗体可以是 Zapata 等 *Protein Eng.* 8 (10) :1057-1062 (1995) 中所述的“线性抗体”。简言之,这些抗体包含一对串联 Fd 区段 ($V_H - C_H1 - V_H$ 和 V_L),其形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0173] 考虑超过二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt 等 *J. Immunol.* 147 : 60 (1991)。

免疫黏附素

[0174] 最简单和最直接的免疫黏附素设计将黏附素的一个或多个结合结构域 (例如受体的胞外域 (ECD)) 与免疫球蛋白重链的铰合部和 Fc 区组合。通常,在制备本发明的免疫黏附素时,将编码黏附素结合结构域的核酸在 C 端与编码免疫球蛋白恒定结构域序列 N 端的核酸融合,但 N 端融合也是可能的。

[0175] 通常,在这类融合中,所编码的嵌合多肽将至少保留免疫球蛋白重链恒定区的具有功能活性的铰合部、 C_H2 和 C_H3 结构域。还对恒定结构域的 Fc 部分的 C 端,或紧接着重链的 C_H1 或轻链的对应区域的 N 端产生融合。产生融合的精确定位点并不关键;具体的位点是公知的,且可以对其进行选择,以优化免疫黏附素的生物活性、分泌或结合特征。

[0176] 在一些实施方案中,使黏附素序列与免疫球蛋白 G1 ($Ig G1$) 的 Fc 结构域的 N 端融

合。可能使整个重链恒定区与黏附素序列融合。但是,优选地,将起始于恰好处于在化学上定义 IgG Fc 的木瓜蛋白酶切割位点(即残基 216,以重链恒定区的第一残基为 114)或其他免疫球蛋白的类似位点上游的铰链区中的序列用于融合。在一些实施方案中,使黏附素氨基酸序列与 IgG 重链的 (a) 铰链区和 / 或 C_H2 和 C_H3 或 (b) C_H1、铰合部、C_H2 和 C_H3 结构域融合。

[0177] 对于双特异性免疫黏附素,将免疫黏附素组装为多聚体,尤其是组装为异二聚体或异四聚体。一般而言,这些组装的免疫球蛋白将具有已知的单元结构。基本的四链结构单元是 IgG、IgD 和 IgE 的存在形式。四链单元在分子量免疫球蛋白中是重复的;IgM 一般作为通过二硫键保持在一起的四个基本单元的五聚体存在。IgA 珠蛋白和有时 IgG 珠蛋白也可以以多聚体形式存在于血清中。在多聚体的情况下,四个单元中的每一个可以是相同的或不同的。

[0178] 本文范围内的多种示例性组装免疫黏附素图示如下:

- (a) AC_L-AC_L;
- (b) AC_H-(AC_H、AC_L-AC_H、AC_L-V_HC_H 或 V_LC_L-AC_H);
- (c) AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H、AC_L-V_HC_H、V_LC_L-AC_H 或 V_LC_L-V_HC_H);
- (d) AC_L-V_HC_H-(AC_H 或 AC_L-V_HC_H 或 V_LC_L-AC_H);
- (e) V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_H C_H 或 V_LC_L-AC_H);和
- (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂;

其中每个 A 代表相同或不同的黏附素氨基酸序列;

V_L 是免疫球蛋白轻链可变结构域;

V_H 是免疫球蛋白重链可变结构域;

C_L 是免疫球蛋白轻链恒定结构域;

C_H 是免疫球蛋白重链恒定结构域;

n 是大于 1 的整数;

Y 表示共价交联剂的残基。

[0179] 为了简洁,前述结构仅显示关键特征;它们未显示免疫球蛋白的连接(J)结构域或其他结构域,也不显示二硫键。但是,在这类结构域为结合活性所需时,将它们构建为存在于其在免疫球蛋白分子中占据的常规位置中。

[0180] 备选地,可以在免疫球蛋白重链和轻链序列之间插入黏附素序列,以便获得包含嵌合重链的免疫球蛋白。在此实施方案中,使黏附素序列在铰合部和 CH₂ 结构域之间、或在 CH₂ 和 CH₃ 结构域之间与免疫球蛋白的每个臂中的免疫球蛋白重链的 3' 端融合。Hoogenboom 等, Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991) 已报道了类似的构建体。

[0181] 虽然本发明的免疫黏附素中不需要存在免疫球蛋白轻链,但免疫球蛋白轻链可以与黏附素-免疫球蛋白重链融合多肽共价结合,或直接与黏附素融合而存在。在前一种情况下,通常使编码免疫球蛋白轻链的 DNA 与编码黏附素-免疫球蛋白重链融合蛋白质的 DNA 共表达。分泌时,杂合重链和轻链将共价结合,以提供包含两个二硫键连接的免疫球蛋白重链-轻链对的免疫球蛋白样结构。适合用于制备这类结构的方法例如公开于 1989 年 3 月 28 日授予的美国专利号 4,816,567 中。

[0182] 通过使编码黏附素部分的 cDNA 序列符合读框地与免疫球蛋白 cDNA 序列融合最方

便地构建免疫黏附素。但是,也可以使用与基因组免疫球蛋白片段的融合(见例如 Aruffo 等, Cell, 61:1303-1313(1990);和 Stamenkovic 等, Cell, 66:1133-1144(1991))。后一种类型的融合需要存在用于表达的 Ig 调节序列。可以根据公开的序列,通过杂交或通过聚合酶链反应(PCR)技术从衍生自脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 文库分离编码 IgG 重链恒定区的 cDNA。将编码免疫黏附素的“黏附素”部分和免疫球蛋白部分的 cDNA 串联插入在选择的宿主细胞中指导有效表达的质粒载体中。

其他包含 C_H2/C_H3 区的多肽

[0183] 待纯化的多肽是与 CH2/CH3 区融合或缀合的多肽。可以产生这类多肽,以增加蛋白质的血清半衰期和/或便于通过 A 蛋白亲和层析纯化。可以这样缀合的生物学上重要的蛋白质的实例包含:肾素;生长激素,包括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;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A 链;胰岛素 B 链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,如因子 VIIIC、因子 IX、组织因子和 von Willebrands 因子;抗凝血因子,如 C 蛋白;心房钠尿肽;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(正常 T 细胞表达和分泌的活性调节蛋白(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted));人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,如人血清白蛋白;Muellerian 抑制物质;松弛素 A 链;松弛素 B 链;松弛素原;小鼠促性腺激素结合肽;微生物蛋白质,如 β -内酰胺酶;DNA 酶;IgE;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原(CTLA),如 CTLA-4;抑制素;激活蛋白;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;A 或 D 蛋白;类风湿因子;神经营养因子,如骨衍生神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5 或 -6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6)或神经生长因子,如 NGF- β ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,如 aFGF 和 bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),如 TGF- α 和 TGF- β ,包括 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;CD 蛋白质,如 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD20;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF;白细胞介素(IL),例如 IL-1 至 IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白质;衰变加速因子;病毒抗原,例如 AIDS 包膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM;肿瘤相关抗原,如 EGFR、HER2、HER3 或 HER4 受体;和上列多肽中任意种的片段。

多肽的表达

[0184] 一般用重组技术产生待用本文中所述的方法纯化的多肽。还可以通过肽合成(或其他合成手段)产生或从天然来源分离多肽。

[0185] 为了重组产生多肽,分离编码它的核酸并插入可复制载体进行进一步克隆(DNA 的扩增)或进行表达。用常规方法(例如,多肽是抗体时,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序编码多肽的 DNA。许多载体是可得。载体成分一般包括但不限于以下中的一个或多个:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列(例如,如美国专利号 5,534,615 中所

述,其在此明确引用作为参考)。

[0186] 用于克隆或表达本文的载体中的 DNA 的适宜的宿主细胞是原核生物、酵母或高等真核生物细胞。适合用于此目的的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属 (*Escherichia*),例如大肠杆菌;肠杆菌属 (*Enterobacter*);欧文氏菌属 (*Erwinia*);克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*);变形杆菌属 (*Proteus*);沙门氏菌属 (*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*);沙雷氏菌属 (*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*);和志贺氏菌属 (*Shigella*);以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如 1989 年 4 月 12 日公开的 DD 266,710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P);假单胞菌属 (*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*);和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些实例是说明性的而不是限制性的。

[0187] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是用于编码多肽的载体的适宜的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或常见的面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。但是,许多其他属、物种和菌株通常可得且在本文中有用,如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、瓦尔提克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*);耶氏酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属 (*Candida*);里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*),如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,例如脉孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0188] 适合用于表达糖基化多肽的宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定了来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的宿主的多种杆状病毒毒株和变体及对应的容纳昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒毒株是公开可得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 毒株,且可以按照本发明将这类病毒用作本文中的病毒,尤其是用于转染草地夜蛾细胞。还可以将棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物用作宿主。

[0189] 但是,对脊椎动物细胞的兴趣一直是最大的,且培养的脊椎动物细胞的繁殖(组织培养)已成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括但不限于 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞 (COS-7, ATCC CRL1651);人胚肾细胞 (293 或针对在悬浮培养物中生长亚克隆的 293 细胞, Graham 等, J. Gen Virol. 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL10);中国仓鼠卵巢细胞 /DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));小鼠支持细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70);

非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ;人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2) ;犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ;buffalo 大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL1442) ;人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ;人肝细胞 (Hep G2, HB 8065) ;小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51) ;TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68(1982)) ;MRC 5 细胞 ;FS4 细胞 ;和人肝癌细胞 (Hep G2) 。

[0190] 用上述用于多肽产生的表达载体或克隆载体转化宿主细胞,并培养在根据诱导启动子、选择转化体或扩增编码希望的序列的基因的适当改进的常规营养培养基中。

[0191] 可以在多种培养基中培养用来产生用于本发明的方法中的多肽的宿主细胞。诸如 Ham ' s F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和 Dulbecco ' s Modified Eagle ' s Medium (DMEM, Sigma) 的市售培养基适合用于培养宿主细胞。此外,可以将 Ham 等, Meth. Enz. 58 :44 (1979) ;Barnes 等, Anal. Biochem. 102 :255 (1980) ;美国专利号 4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655 或 5,122,469 ;WO 90/03430 ;WO 87/00195 ;或美国专利号 Re. 30,985 中所述的任意培养基用作宿主细胞的培养基。可以根据需要向任意这些培养基中补充激素和 / 或其他生长因子 (例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液 (如 HEPES)、核苷酸 (如腺苷和胸苷)、抗生素 (如 GENTAMYCINTM 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围内的终浓度存在的无机化合物) 和葡萄糖或等同的能量来源。还可以按本领域技术人员已知的适当浓度包含任意其他必需的补充物。培养条件,如温度、pH 等是之前用于选择用于表达的宿主细胞的那些,且对普通技术人员而言将是显而易见的。

[0192] 使用重组技术时,多肽可以在胞内、在周质间隙中产生,或这直接分泌进入培养基中。如果多肽在胞内产生,作为第一步骤,例如通过离心或超滤去除宿主细胞或裂解细胞 (例如源自匀浆) 颗粒碎片。多肽分泌进入培养基中时,一般首先用市售蛋白质浓缩滤器,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元浓缩来自这类表达系统的上清。

包括含有多肽的药物制剂的组合物

[0193] 本发明还包含组合物,如药物制剂。药物制剂,其包含通过本发明的方法纯化的多肽,该多肽可选地与异源分子缀合,该药物制剂可以通过将具有希望的纯度的多肽与可选的可药用载体、赋形剂或稳定剂 (Remington ' s Pharmaceutical Sciences 第 21 版 (2005)) 混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备。

[0194] 通过本文中所述的方法纯化的包含 C_α2/C_α3 区的多肽产物可以具有希望的至少约 98% 单体或至少约 99% 单体的纯度。

[0195] “可药用”载体、赋形剂或稳定剂在所利用的剂量和浓度下对受体无毒,且包含缓冲液,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂 (如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苯索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物 (例如 Zn-蛋白质络合物);和 / 或非离子型表面活性剂,如 TWEENTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇 (PEG)。

[0196] 本文中的制剂还可以包含所治疗的具体适应症所需的一种以上活性化合物，尤其是彼此无不利影响的具有互补活性的那些。这类分子适宜以对预期目的有效的量组合存在。

[0197] 活性成分还可以包载在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊中，例如在胶体药物递送系统中（例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊（nanocapsule））或在粗滴乳状液中分别为羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-（甲基丙烯酸甲酯）微囊。这类技术公开于 Remington’s Pharmaceutical Sciences 第 21 版（2005）中。

[0198] 待用于体内施用的制剂必需无菌。这易于由滤过无菌滤膜来实现。

[0199] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜的实例包含含有多肽变体的固体疏水聚合物的半透性基质，该基质是成形物品，例如膜或微囊的形式。缓释基质的实例包含聚酯、水凝胶（例如聚（甲基丙烯酸-2-羟乙酯）或聚（乙烯醇）、聚交酯（美国专利号 3,773,919）、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林（leuprolide acetate）组成的可注射微球）和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0200] 然后将按照本文中所公开纯化的多肽，或包含该多肽和可药用载体的组合物用于就这类多肽和组合物已知的多种诊断、治疗或其他用途。例如，可以通过对哺乳动物施用治疗有效量的多肽来用多肽在哺乳动物中治疗障碍。

[0201] 提供以下实施例来说明本发明，而非限制本发明。

实施例

[0202] 应理解，本文中所述的实施例和实施方案只是为了说明的目的，将向本领域技术人员暗示其指引下的多种修改或改变，这些修改和改变也将包含于本申请的精神和范围之内。

实施例 1 :pH 梯度洗脱 A 蛋白层析

[0203] 用 pH 分级梯度洗脱法在 A 蛋白层析柱上纯化了 6 种不同的包含 C_H2/C_H3 区的蛋白质：抗-VEGF 抗体 #1、抗-CD20 抗体、抗-VEGF 抗体 #2、抗-MUC16 抗体、抗-CD4 抗体和单臂抗-Met 抗体。该方法概述于表 1 中。

表 1

运行阶段	细节
柱平衡	Tris 缓冲液, pH 7
蛋白质上样	预过滤的 HCCF, 14-37 g/L
洗涤	多种缓冲液
pH 分级梯度洗脱	pH 梯度: 35-60%B; A: 乙酸盐, pH 5.0/B: 甲酸盐, pH 2.7
柱再生	NaOH
柱保存	甲醇和乙酸盐保存缓冲液

实验流程

[0204] 用表 1 中所列的蛋白质上样和缓冲液组成 /pH 参数创建了 Unicorn 方法文件。通

过 GE Healthcare AKTA (GE Healthcare) Explorer FPLC (快速蛋白质液相层析) 系统执行此文件。FPLC 是模拟制造纯化方法的由塑料管道和泵制成的小试规模仪器。FPLC 通过使用两个泵 (A 泵和 B 泵) 系统以程序化改变的比例混合两种缓冲液来产生 “pH 梯度”, 其中保持流速, 改变由各泵递送的流量的百分比。在 Unicorn 程序中指定的是设定体积 (柱体积数) 内一个对另一个的 “% B”。

[0205] 在柱平衡阶段, 从表 1 中所列的保存溶液中取出柱, 并为上样蛋白质物质作准备。在蛋白质上样阶段, 用 0.2 微米孔径真空滤器预过滤 HCCF (收获细胞培养液), 并上样在 A 蛋白柱 (MABSELECT™、MABSELECT SURE™、**POROS**® MABCAPTURE™ A、**PROSEP**® Va 或 **PROSEP**® Ultra Plus) 上。按 14-37g/L 的范围内的密度上样蛋白质。大多数运行按 21g/L 进行。在洗涤 1 阶段, 用洗涤 1 缓冲液来将 AKTA 管道中的任意上样残留物推至柱上。在洗涤 2 阶段, 通过洗涤 2 缓冲液去除诸如 CHOP (中国仓鼠卵巢蛋白质) 的杂质。在洗涤 3 阶段, 用洗涤 3 缓冲液从柱去除洗涤 2 缓冲液和结合的杂质来为洗脱阶段作准备。在 pH 分级梯度洗脱阶段, 用通过两个泵系统精确操作两种不同 pH 的 pH 缓冲液形成的梯度来逐渐从按百分比设定的两种缓冲液的一种 pH 混合物移动至另一混合物。“35-60% B” 的洗脱参数与约 4.3-3.7 的 pH 梯度范围相关。更具体而言, 35% B 对应于 4.34 的洗脱缓冲液 pH, 16.25mM 乙酸盐、8.75mM 甲酸盐的缓冲液组成, 及 1039uS/cm 的缓冲液电导率。60% B 对应于 3.69 的洗脱缓冲液 pH, 10mM 乙酸盐和 15mM 甲酸盐的缓冲液组成, 及 763uS/cm 的缓冲液电导率。在大多数运行的此洗脱阶段期间, 在整个洗脱过程中收集级分, 并用大小排阻 HPLC 测定进行测定, 以测定单体对大小变体 (HMWS (高分子量种类)、二聚体或片段) 的洗脱行为。还针对选择的运行对这些级分进行了 CHOP 测定, 并用 NanoDrop UV 分光光度计 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE) 针对蛋白质浓度测量了所有级分。在再生阶段, 用再生缓冲液来洗去任意紧密结合的杂质或残余产物, 以最小化运行之间的样品遗留。在保存阶段, 将 A 蛋白柱从再生缓冲液取出, 并保存在设计用于在闲置时间内保持柱完整性的溶液中。

[0206] 分别以 CV 和厘米 / 小时测量阶段长度和流速。由于压力的考虑, 以厘米 / 小时度量流速 (用以 cm / 小时表示的流速除以以 cm 表示的柱床高度来得出柱体积 / 小时, 其也是标准单位)。

[0207] 通过 AKTA (GE Healthcare) FPLC 纯化系统及其所附 Unicorn 软件包来收集和分析层析谱。进行 A 柱纯化运行后, 评估和检查了 UV 吸光度、pH 和电导率 (以及其他测量值或程序指令 / 日志) 的轨迹。

a. 大小排阻层析 (SEC) 测定

[0208] 在 Agilent 1200 系列 HPLC (Agilent Technologies, USA, part G1329A) 上运行分析型大小排阻层析 (SEC) 测定, 并用来测定所收集的样品的高分子量种类 (HMWS)、二聚体、单体和片段的相对水平。使用 14.24mL TSK G3000SWXL, 7.8mmD × 300mmH (Tosoh Bioscience, 东京, 日本, part 08541) 柱。用磷酸钾 / 氯化钾 HPLC 运行缓冲液将各样品稀释至约 0.5g/L 抗体, 或者修改样品注射来标准化上样至测定柱的质量。在 Agilent HPLC 1.5mL 玻璃管中制备所有样品。以 0.5mL / 分钟的流速运行 30 分钟。调整样品注射, 使得每个样品上样约 25ng 抗体。随各样品集运行包含样品各自的背景缓冲液的空白。用 ChemStation (Agilent Technologies) 软件手动或用 **CHROMELEON**® (DIONEX,

Sunnyvale, CA) 软件自动分析 UV 280nm 吸光度曲线来分开积分峰,以针对样品获得种类的百分比值。可以用从此测定获得的百分比值乘以级分的浓度 (mg/mL) 来获得样品中各大小变体种类的实际浓度或质量 (例如, SEC 结果: 4% HMWS、3% 二聚体、92% 单体、1% 片段; 样品浓度: 2g/L; 样品体积: 10mL; 1.84g/L 单体, 样品中总计 18.4mg 单体)。

b. CHOP 测定

[0209] 将来自所选择的运行的样品提交至测定组来定量 CHOP 的水平, 该测定组进行标准和经验证的酶联免疫吸附测定 (ELISA)。将亲和纯化的山羊抗-CHOP 抗体固定在微量滴定板孔上。在孔中孵育包含 CHOP 的样品、标准品和对照的稀释液, 然后用缀合辣根过氧化物酶的山羊抗-CHOP 抗体孵育。用邻苯二胺二氢氯化物检测辣根过氧化物酶活性。通过在酶标仪中在 492nm 下读取吸光度来定量 CHOP。用计算机曲线拟合程序来产生标准曲线并自动计算样品浓度。ELISA 的测定范围通常为 5ng/ml 至 320ng/ml。将结果标准化为 ppm 进行库比较。

结果

[0210] 分级梯度的洗脱形状显示于图 1 中。在 pH 下降的末端洗脱了所有蛋白质。更大部分的蛋白质更快地从柱洗脱, 但足够的蛋白质保留在柱上, 并在梯度过程中洗脱。在更低 pH 下, 发生希望的产物 (约 pH 4.6 至 3.7 的洗脱范围, 具有轻微分子对分子的变异) 和不希望的聚集体 (约 pH 3.9 至 3.5 的洗脱范围) 间的分离。

[0211] 在所测试的全部 6 种蛋白质分子 (抗-VEGF 抗体 #1、抗-CD20 抗体、抗-VEGF 抗体 #2、抗-MUC16 抗体、抗-CD4 抗体和单臂抗-Met 抗体) 中, 在最初的梯度级分中观察到了高百分比 (~100%) 的单体, 而梯度的尾端部分包含更高水平的聚集种类 (>50%)。这些 SEC 结果显示于图 2-4B 中。由于此组测试分子涵盖了更大种类的蛋白质分子 (例如嵌合抗体、thioMab (因用半胱氨酸取代一个氨基酸残基而具有点突变的重组单克隆抗体)、IgG4 和由大肠杆菌产生的抗体片段), 此 pH 分级梯度法暗示对所有包含 C_H2/C_H3 区的多肽/蛋白质 (例如 Fc 区) 的广泛的适用性。

实施例 2: 使用标准分级洗脱和 pH 分级梯度洗脱的抗-CD20 抗体、抗-VEGF 抗体 #1 和抗-MUC16 抗体在 A 蛋白层析柱上的 CHOP 分离

[0212] 使用实施例 1 中所述的 pH 分级梯度洗脱蛋白质的方法, 测量了以 mg/mL 表示的每个级分的抗-CD20 抗体水平 (来自台面离线 UV 280 吸光度, 其示踪在图 1A 中的抗-VEGF 抗体 #1 层析谱上所见的分级梯度洗脱阶段的在线 AKTA/Unicorn UV 280 读数) 和以 ppm 表示的每个级分的 CHOP 水平。如在图 5 的左图中所见 (抗-CD20 抗体和 CHOP 洗脱), 与 CHOP 的量相比, pH 分级梯度洗脱在较低 pH 下的更迟的级分包含非常少的抗-CD20 抗体。来自与抗-CD20 抗体分级梯度 pH 洗脱同时进行的对照运行的数据显示在图 5 中的表格的上行。除蛋白质洗脱阶段期间不使用 pH 分级梯度, 而在 pH 3.6 或 pH 3.6 以下洗脱蛋白质外, 对照运行使用与表 1 中所述相同的条件。下行显示使用 pH 分级梯度的抗-CD20 抗体产率的小但可接受的减少。(注意: 预期此产率损失由聚集体去除引起; 用包含上样在柱上的产物总量中的聚集体的 HCCF 效价值计算产率)。与对照库相比, 观察到了少约 5% 的聚集体和一半的 CHOP 水平。结果确立了使用 pH 分级梯度洗脱增加纯度的意外益处。

[0213] 还用实施例 1 中所述的 pH 分级梯度法进行了抗-VEGF 抗体 #1 和抗-MUC16 抗体二者的 CHOP 分离。与在抗-CD20 抗体 CHOP 图中观察到的图式相似, 与抗-VEGF 抗体的洗脱

成比例,在pH梯度的末端洗脱更多的CHOP,表明pH分级梯度洗脱分离了此蛋白质分子以及抗-CD20抗体的宿主细胞杂质。见图6。对于抗-MUC 16抗体中的CHOP分离,与在抗-VEGF抗体#1中观察到的洗脱图式相比,此抗体具有更高的CHOP水平。见图7。因此,可以通过使用上文所述的pH分级梯度法来从抗-MUC16抗体分级分离显著量的CHOP。

实施例3:使用pH梯度洗脱A蛋白层析的病毒颗粒清除

[0214] 使用实施例1中所述的pH分级梯度洗脱A蛋白层析的方法,测量了抗-VEGF抗体#1的病毒颗粒清除。

分级梯度pH洗脱A蛋白层析

[0215] 所有阶段和缓冲液与实施例1中所使用的那些相同。用定量聚合酶链反应测定针对反转录病毒样颗粒计数测试了级分。

a. 反转录病毒样颗粒定量聚合酶链反应(RVLP QPCR)测定

[0216] RVLP内源病毒颗粒测定是实时定量PCR测定。用Qiagen EZ1(Qiagen,Valencia,CA)从样品提取病毒RNA。样品量为0.4mL(未稀释和1:10稀释的HCCF,未稀释的A蛋白库)。通过包含具有已知的CHO反转录病毒颗粒效价的参考标准HCCF样品来确认提取效率。通过用0.2单位/mL DNase I在升高的温度下处理提取洗脱物30分钟,通过DNA酶消化来去除基因组DNA。然后75°C热失活DNA酶15分钟。通过测定无反转录酶的样品来确认反转录病毒DNA的缺乏。

[0217] 按De Wit等(Biologicals,28(3):137-48(2000))中所述进行测量CHO反转录病毒基因组的实时定量PCR测定,但使用附近区域的新探针。还更新和改进了试剂和方法。设计引物和探针序列来从CHO C型反转录病毒基因组扩增高度保守的pol区中的片段。每个反转录病毒样颗粒包含两个基因组RNA分子。寡核苷酸探针和引物订购自Applied Biosystems(Foster City,CA)和Invitrogen(Carlsbad,CA)。病毒清除表示为log10减少值或LRV,其是蛋白质(HCCF)上样中的log10(总病毒)和产物库中的log10(总病毒)之差。总病毒获自样品中的病毒效价(颗粒/mL或nU/mL)和样品体积(mL)。图18显示取自pH分级梯度洗脱的各级分的内源病毒样颗粒计数。一些病毒在梯度开始时在大峰中洗脱,但更大部分的病毒在洗脱的尾端洗脱。因此,就病毒清除而言,从产物分离这些RVLP可以有利于pH分级梯度或全梯度洗脱A蛋白层析的综合效率。图19显示各级分的LRV,与HCCF上样比较。该图基于使用来自图18的值的计算。在更迟的聚集体富集洗脱级分中观察到了LRV的大幅减少。中间洗脱的更高多肽单体的级分中LRV高(希望的效应)。

实施例4:使用pH梯度洗脱A蛋白层析的碱性多肽清除

[0218] 使用实施例1中所述的pH分级梯度洗脱A蛋白层析的方法,测量了抗-VEGF抗体#1的碱性多肽变体(或碱性变体)清除。

分级梯度pH洗脱A蛋白层析

[0219] 所有阶段和缓冲液与实施例1中所使用的那些相同。对级分进行了离子交换变体测定。

a. 离子交换变体测定

[0220] 在Agilent 1200系列HPLC(Agilent Technologies, USA, part G1329A)上运行了分析型离子交换层析(IEC)测定,并用来针对所收集的抗-VEGF抗体#1样品测定了主峰与酸性和碱性带电荷变体的相对水平。在上升的温度的条件下以ACES[N-(2-乙酰氨

基)-2-氨基乙磺酸]和NaCl的梯度使用Dionex ProPac WCX-10, 4.6×250mm(Dionex 产品号 054993) 柱。样品制备包括更换样品缓冲液至 IEC 流动相中,然后用羧肽酶 (CpB) 热消化 20 分钟。将每个样品的约 50ug 抗-VEGF 抗体 #1 注射入柱中。用 ChemStation(Agilent Technologies) 软件获得并积分 UV280nm 轨迹。针对整个梯度的离子交换变体组成趋势分析了酸性、碱性和主峰种类中的每一类的级分百分比。图 17 显示 20 个 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱级分的离子交换变体测定峰积分的结果。存在于级分中的碱性变体的百分比在 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱的尾部中显著增加。梯度洗脱的此尾部是与实施例 1 和 2 中所述的观察到增加的 CHOP 和聚集体分离相同的部分。

实施例 5:使用多种 A 蛋白层析柱的 pH 分级梯度洗脱

[0221] 针对上文所述的 pH 分级梯度洗脱法测试了 MABSELECT SURE™ 和 MABSELECT™ 树脂二者。虽然名称相似,但这两种 A 蛋白树脂结合了不同的亲和配体。MABSELECT™ 具有天然 A 蛋白配体,其结合抗体的 Fc 部分。MABSELECT SURE™ 具有修饰形式的 A 蛋白,已在化学上将其改变为在高 pH 溶液中短时间稳定。叠加的 AKTA 洗脱图显示,两种 A 蛋白树脂的洗脱轨迹极其相似。如通过图 8 中 MabSelect 的 SEC 积分图可见,使用这中树脂达到了相当的聚集体分离。针对聚集体分离成功测试的其他树脂是 **PROSEP® Va**、**PROSEP® Ultra Plus** 和 **POROS® MABCAPTURE™A**。因此,可以将多种亲和树脂(例如 MABSELECT™、MABSELECT SURE™、**PROSEP® Va**、**PROSEP® Ultra Plus** 和 **POROS® MABCAPTURE™**)用于 pH 分级梯度洗脱法中来分级分离杂质。

实施例 6:使用 pH 梯度洗脱法的多个参数的实验设计 (DOE)

[0222] 在表 2 中所示的范围内,用 35 个运行的统计设计研究,针对抗-VEGF 抗体 #1 探究了在大多数层析方法中重要的多种参数。“洗脱起始% B”参数影响洗脱阶段的起始 pH(其在决定洗脱曲线的形状中起主要作用。起始% B 越高,起始洗脱 pH 越低,第一级分中从柱洗脱的蛋白质越多),以及总体梯度的斜率。在设计用于阐明主效应以及相互作用的分次析因研究中同时改变参数。所有运行都在洗脱期间分级分离,且针对所有级分测定了聚集体和浓度。用内推计算来测定将精确产生 85% 产率(分级产率目标的下限)的库的模拟库单体水平,并用这些值来比较各运行参数集在从聚集体有效分离单体中的有效性。

表 2DOE 参数范围

参数	低	目标	高
上样密度	19	28	37
床高	14cm	22cm	30cm
洗脱流速	140cm/ 小时	210cm/ 小时	350cm/ 小时
洗脱长度	15CV	20CV	25CV
洗脱起始% B(pH) *	25(4.6)	35(4.3)	45(4.2)

*所有洗脱都终止于 60% B(pH 3.7)

实验流程

[0223] 用 Unicorn 软件检查除柱床高度（其需要填充多种柱）外的所有参数改变。在所有洗脱的整个过程中收集 CV 级分，用 HPLC SEC（如上文所述）测定，并测量蛋白质浓度（在 NanoDrop UV 分光光度计上测量的 UV280 吸光度）。为了最好地标准化结果进行比较，编译来自多个级分集的数据，并用计算来内推来自各运行的库的总产率和 SEC 图。

[0224] 利用 **JMP**[®] (SAS、Cary、NC) 软件包来产生分次析因参数探究运行计划。由于其高产率、高单体水平和低库大小，从该集中选择了运行之一作为“示例性制造运行”（图 11）。

结果

[0225] DOE 结果的 Pareto plot 显示，“起始 % B”是决定聚集体分离中影响最大的参数，然后是上样密度（越低越好）和滞留时间（通过用受控的床高（cm/CV）参数除以流速（cm/小时）参数来计算小时 / CV 的滞留时间）。因此，起始 % B 越低，洗脱起始 pH 越高，聚集体分离越有效；上样密度越低，聚集体分离越有效；滞留时间越高，聚集体分离越有效。见图 9。此外，来自此研究的相互作用图显示，存在参数上样密度参数和起始 % B 参数之间的相互作用，以及滞留时间和上样密度之间相互作用。在增加的上样密度下，起始 % B 比在更低上样密度下进行的运行对 85% 产率模拟库的单体水平具有更大影响。此外，增加的上样密度、滞留时间在梯度更有效地分级分离聚集体的能力中发挥更大的作用。pH 分级梯度法必须在洗脱期间用更低的流速来达到高产物流通量。见图 10。图 11 显示，来自此运行的库在 10CV 以下（例如 5.4CV 或 6CV），但传递少于 1% 的聚集体，大于 85% 的产率。

[0226] 除主效应（图 9 中的 Pareto plot）、相互作用（图 10）和示例性制造运行（图 11）外，观察到总洗脱长度对聚集体分离无影响，但可以操作其来减少库大小，以产生仍然具有高纯度和高产率，但在较小体积中的库（其是制造规模优选的）。另外，pH 分级梯度的使用产生了具有与全梯度产生的纯度几乎相当的纯度的更低的库体积（见实施例 8）。还发现 pH 分级梯度在包括上样密度和流速的更小改变的几个方法改变中稳健，以及完全不受床高影响。

实施例 7：pH 分级梯度 A 蛋白层析后使用离子交换膜层析的蛋白质纯化

[0227] 为了确定是否可以从纯化方法去除下游柱层析或用膜取代下游柱层析，将抗 -VEGF 抗体 #1 上的 A 蛋白 pH 分级梯度的小试规模循环（用少于 1% 聚集体和高产率的库）上样至下游荷电膜上。**MUSTANG**[®] S 膜（Pa11 公司）和 **MUSTANG**[®] Q 膜（Pa11 公司）分别代表阳离子交换膜和阴离子交换膜。通过膜与典型的下游柱方法相比达到相同的总体纯度和产率的能力来测量成功。

实验流程

[0228] 用于确定 S 和 / 或 Q 膜上的 CHOP 和聚集体清除的最适上样条件的参数取自之前使用表 3A 和 3B 中的 A 蛋白标准分级库的关于 S 和 / 或 Q 膜上的 CHOP 清除的最适上样条件的研究。在这些之前的研究中，使用 A 蛋白标准分级库时显示了有希望的结果（对照组，不使用 pH 梯度，而在 pH 3.6 或 pH 3.6 以下洗脱蛋白质）；但是，此方法具有略高于希望值的 CHOP 水平，且不从该方法清除任何聚集体。在这些之前的研究中，已将膜上样至 5kg/L 膜，并已针对杂质去除发现了最适上样条件。将这些相同的条件用于 A 蛋白分级梯度洗脱库，以 CHOP 和聚集体为主要杂质来比较不同的 A 蛋白库在这些膜上的表现。

表 3A：之前用于确定 S 或 Q 膜上的 CHOP 清除的最适上样条件的参数

滤器	MUSTANG [®] S 或 Q ACRODISC [®]
滤器大小	0.18 mL
上样	抗-VEGF 抗体#1 A 蛋白分级库
上样密度	5 kg/L 膜
流速	4 mL/分钟 (1333 mV/小时, 112 cm/小时)
测定	CHOP ELISA

表 3B :之前用于确定通过系列运行 S 和 Q 膜是否可以达到正交杂质清除的参数。

最佳 MUSTANG [®] S 库 (A 蛋白分级库作为上样)	pH 5-6, 3 mS/cm 上样; 140 ppm CHOP
最佳 MUSTANG [®] Q 库 (A 蛋白分级库作为上样)	pH 8-9, <4 mS/cm 上样; 30 ppm CHOP
最佳 MUSTANG [®] Q 库 (最佳 MUSTANG S 库作为上样)	pH 8-9, 2.5 mS/cm 上样; 15-20 ppm CHOP

[0229] 在最初的研究中,调节 A 蛋白标准分级洗脱库至特定 pH 和电导率,并使其通过与 AKTA[™] FPLC 纯化系统连接的实验室规模的阳离子(MUSTANG[®] S)和阴离子(MUSTANG[®] Q)交换膜单元。维持流速,检查压力轨迹来显示淤积/通透性衰退。在多种上样密度下收集级分,并针对 CHOP (ELISA) 和抗体浓度 (NanoDrop UV 分光光度计上的 UV 280 吸光度) 进行测定。在多种上样密度下比较这些测定的结果,以发现用于最终 CHOP 清除的最适上样条件。在随后的研究中,将 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱库调节至最初实验中发现的最适条件。从此,在下游膜清除 CHOP 和其他杂质,同时保持高产率和低聚集体水平的能力中将分级梯度洗脱库的性能与标准 A 蛋白分级洗脱的性能相比较。还用两种大小的阳离子交换膜和三种大小的阴离子交换膜来测试了结果的可重复性和可放大性。

结果

[0230] 用 A 蛋白分级库作为阳离子至阴离子交换膜纯化系列的上样时,对于上样至 5kg/L 膜的膜,所获得的最低 CHOP 水平为 15-20ppm。由于膜不清除聚集体,此杂质的水平在最终库中不可接受地高。相反,将 A 蛋白 pH 分级梯度洗脱库上样至这些相同的膜上时,最终库中 CHOP 水平为 0-15ppm,且聚集体水平仍然低,显示对总体方法的益处。

[0231] 此外,所测试的离子交换膜的三种组合中的每一种的最终库产生高产率和高纯度的最终库。在所有情况下,通过 pH 调节和膜处理保持低聚集体水平,CHOP 水平也低于在之前的对照研究中所见的水平,显示用更低聚集体的 A 蛋白库作为进料的意外的 CHOP 减少益处。见图 12。因此,用离子交换层析膜取代通常的离子交换层析柱消除了对许多典型的柱层析缓冲液的需要和其他消耗时间/制造空间的不便。更重要地,由于这些荷电膜以超载模式(即上样通过膜至高上样密度,无需洗涤或洗脱步骤来产生高度纯化的库)使用,膜允许 pH 梯度 A 蛋白层析步骤下游的连续纯化方法。

[0232] 还显示中试规模 (4.1L) 和 28mL 小试规模间的 SEC 积分图极其相似,表明可以成功放大 A 蛋白 pH 分级梯度,且可以将任意小规模结果视为大规模性能的指示。见图 13。这

些结果显示 pH 分级梯度洗脱 A 蛋白层析的可重复性和可放大性的意外益处。

实施例 8: **VIRESOLVE**[®] Pro 细小病毒滤器运行

A. **VIRESOLVE**[®] Pro 通透性衰退比较

[0233] 就便于细小病毒滤器 (**VIRESOLVE**[®] Pro, Millipore, Inc.) 上更大的质量流量, 将 A 蛋白 pH 分级梯度与 A 蛋白标准分级 (对照组, 不使用 pH 梯度, 而在 pH 3.6 或 pH 3.6 以下洗脱蛋白质) 相比较。在 **VIRESOLVE**[®] Pro 细小病毒滤器上运行前, 用常见 HCCF 进料以标准流通模式在 QSFF (Q Sepharose Fast Flow (阴离子交换柱; GE Healthcare)) 上运行 A 蛋白 pH 分级梯度和 A 蛋白标准分级对照二者。测试了几个 **VIRESOLVE**[®] Pro 运行条件: 1) SHC 无菌预过滤器在线的 A 蛋白标准分级洗脱库; 2) 阳离子交换 (CEX) 膜吸附器作为在线预过滤器的 A 蛋白标准分级洗脱; 3) 具有 SHC 预过滤器 (不带电荷的 0.2 微米无菌级滤器) 的 A 蛋白 pH 分级梯度库; 和 4) CEX 膜吸附器作为在线预过滤器的 A 蛋白 pH 分级梯度库。重复运行一些库。在利用一组蠕动泵、天平和压力传感器来将数据报告入电子数据表中的过滤设置上运行 **VIRESOLVE**[®] Pro。

[0234] 具有 SHC 无菌滤器在线的 pH 分级梯度库表现得与具有阳离子交换膜的分级库相似, 都显示 **VIRESOLVE**[®] Pro 上可能的质量流通量的约 6 倍的增加。见图 14。因此, 此结果显示 A 蛋白 pH 分级梯度在无 CEX 膜预过滤器辅助的情况下去除 **VIRESOLVE**[®] Pro 滤器结垢物的意外益处。此外, **VIRESOLVE**[®] Pro 性能得益于 CEX 膜吸附器与 A 蛋白 pH 分级梯度库的组合, 与 **VIRESOLVE**[®] Pro 上具有 SHC 的 A 蛋白标准分级洗脱库运行相比, 导致可能的质量流通量的意外的约 18 倍的增加。

B. **VIRESOLVE**[®] Pro CHOP 和 SEC 实验

[0235] 在 **VIRESOLVE**[®] Pro 运行序列期间的不同点取样, 并针对 CHOP 和 SEC 进行测定。SHC 在线的 A 蛋白标准分级序列具有很低的 CHOP 水平, 但仍包含聚集体。通过不同的方法步骤, A 蛋白 pH 分级梯度实验中聚集体水平仍然低, 并产生聚集体少于 1% 的最终库。此结果是通过标准分级库递送的库上的显著改善。此外, pH 分级梯度 SHC- **VIRESOLVE**[®] Pro 库的 CHOP 水平与具有阳离子交换膜的标准分级运行中的水平相当。该水平略低于来自具有 SHC 的标准分级的那些。见表 4A 和 4B。这些结果显示, 与标准分级库相比, pH 分级梯度法不仅产生更高的质量流量, 还产生相当的或更好的纯度。

表 4A

HCCF 上样 CHOP: 1,000,000 ppm	A 蛋白分级洗脱					
	实验 1			实验 2		
	CHOP ppm	单体	聚集体	CHOP ppm	单体	聚集体
A 蛋白库				1090	95.39	4.61
QSFF 上样	1000	94.01	5.99	1080	94.04	5.96
QSFF 库	9	95.53	4.47	14	95.28	4.72
Vpro 上样	9	95.48	4.52			
Vpro 库 (SHC)	8	95.52	4.48	12	95.29	4.71
Vpro 库 (CEX 膜)	3	95.52	4.48	6	95.43	4.57

表 4B

HCCF 上样 CHOP: 1,000,000 ppm	A 蛋白 pH 分级梯度洗脱					
	实验 1			实验 2		
	CHOP ppm	单体	聚集体	CHOP ppm	单体	聚集体
A 蛋白库	800	99.28	0.72	920	99.42	0.58
QSFF 上样	850	98.70	1.30			
Vpro 上样	5	99.29	0.71			
Vpro 库 (SHC)	7	99.27	0.73	6	99.32	0.68
Vpro 库 (CEX 膜)				< 4	99.33	0.67

实施例 9 :A 蛋白上的 A 蛋白全 pH 梯度洗脱

[0236] 还测试了 A 蛋白全 pH 梯度洗脱。除在梯度起始时将用于 pH 分级梯度中的 35-60% B 减少至 25-60% (其产生更高的 pH 起始梯度 (起始于约 pH 4.6, 终止于约 pH 3.7)) 外, 所有阶段和缓冲液与实施例 1 中所述的 pH 分级梯度法中使用的那些相同。25% B 对应于 4.58 的洗脱缓冲液 pH, 18.75mM 乙酸盐和 6.25mM 甲酸盐的缓冲液组成, 及 1141uS/cm 的缓冲液电导率。60% B 对应于 3.69 的洗脱缓冲液 pH, 10mM 乙酸盐和 15mM 甲酸盐的缓冲液组成, 及 763uS/cm 的缓冲液电导率。见表 5。

表 5

运行阶段	细节
柱平衡	Tris 缓冲液, pH 7
蛋白质上样	预过滤的 HCCF, 14-37g/L
洗涤	多种缓冲液
pH 全梯度洗脱	pH 梯度 :25-60% B ;A :乙酸盐, pH 5.0/B :甲酸盐, pH 2.7
柱再生	NaOH
柱保存	苕醇和乙酸盐保存缓冲液

[0237] 全梯度的洗脱形状显示于图 15 中。在 pH 下降的末端洗脱了所有产物。除抗体洗脱开始于更高 pH 外, 全 pH 梯度的层析谱在所有阶段中都与 pH 分级梯度相同。最初的高 UV 280 峰在梯度起始时的缺乏产生了梯度开始时更低浓度的级分, 更多蛋白质分布在洗脱阶段的其余部分。这允许更大地分离在更高 pH 下比单体优先洗脱的种类。因此, 与 pH 分级梯度相比, 此技术在清除在更低 pH 下从希望的产物分离的杂质 (即用分级梯度分离的聚集体和 CHOP) 上可以同等地有效, 唯一的缺点是最终库体积 (梯度起始时较低的级分浓度转变为对将更多级分混合在一起来达到希望产率的模拟库的需要)。此全梯度的 SEC 轨迹和积分还显示聚集体在更低 pH 下从单体的分离, 表明 pH 分级梯度的益处和适用性也可以扩展至全梯度。

实施例 10 :A 蛋白研究上的聚集体形成

[0238] 为了确保低 pH 或 pH 分级梯度洗脱的尾端期间不形成聚集体, A 蛋白 pH 分级梯度技术确实从聚集体分离了单体, 而不引起聚集体的形成, 在具有或不具有 HCCF 成分的情况下用纯化的物质来显示在 A 蛋白上处理未增加进料的聚集体水平。见表 6。

表 6

A 蛋白上 样物质	抗-VEGF 抗体#1 HCCF (~pH 7.3)	调节至 pH 7.3 的 A 蛋白 pH 分级梯度库	50/50 混合物: HCCF 流通+A 蛋白 pH 分级梯度库
上样单体	未知*	98.88%	未知*
乙酸分级 洗脱单体	95.03%	99.06%	99.16%

* SEC 单体测定未用于 HCCF

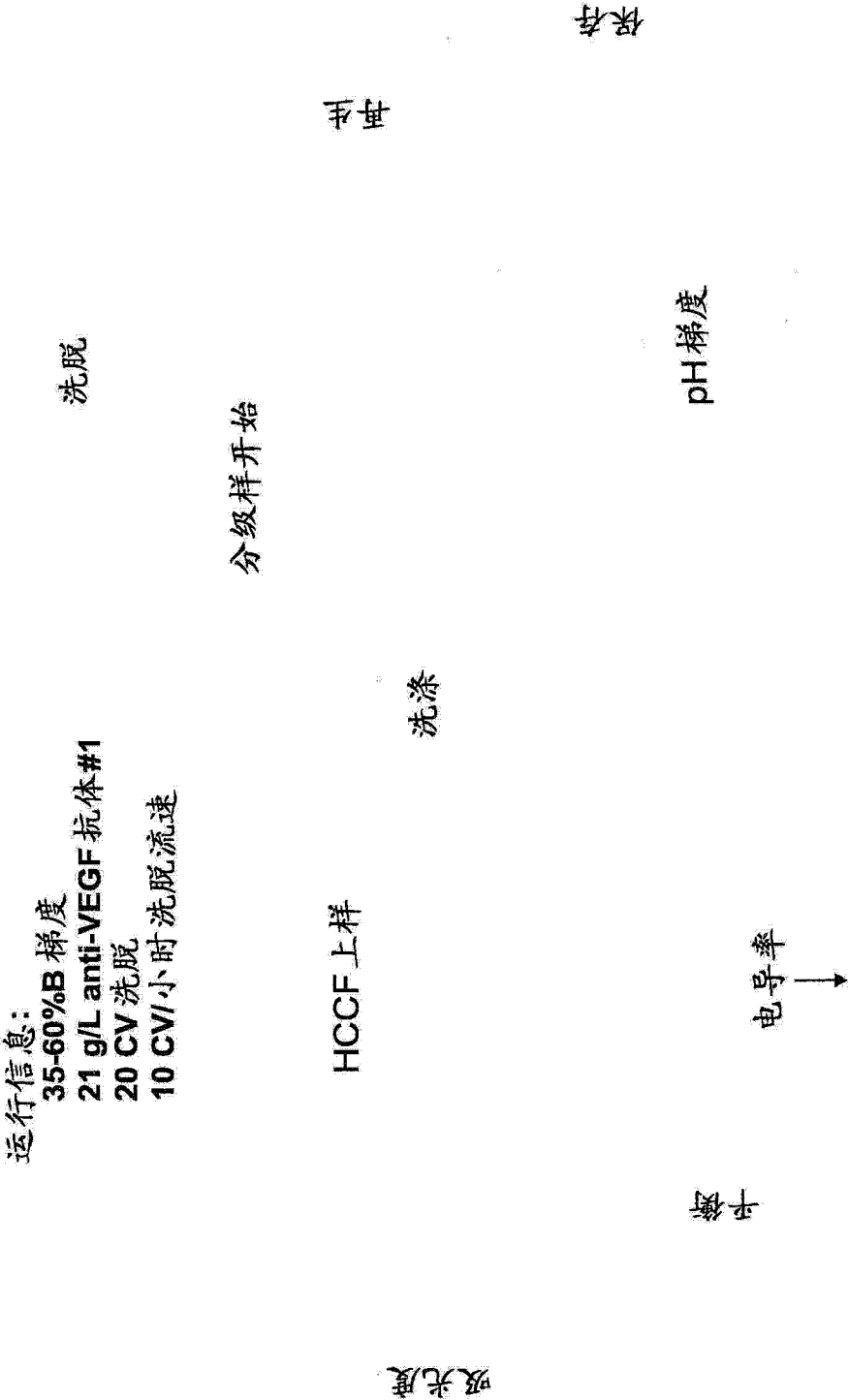


图 1

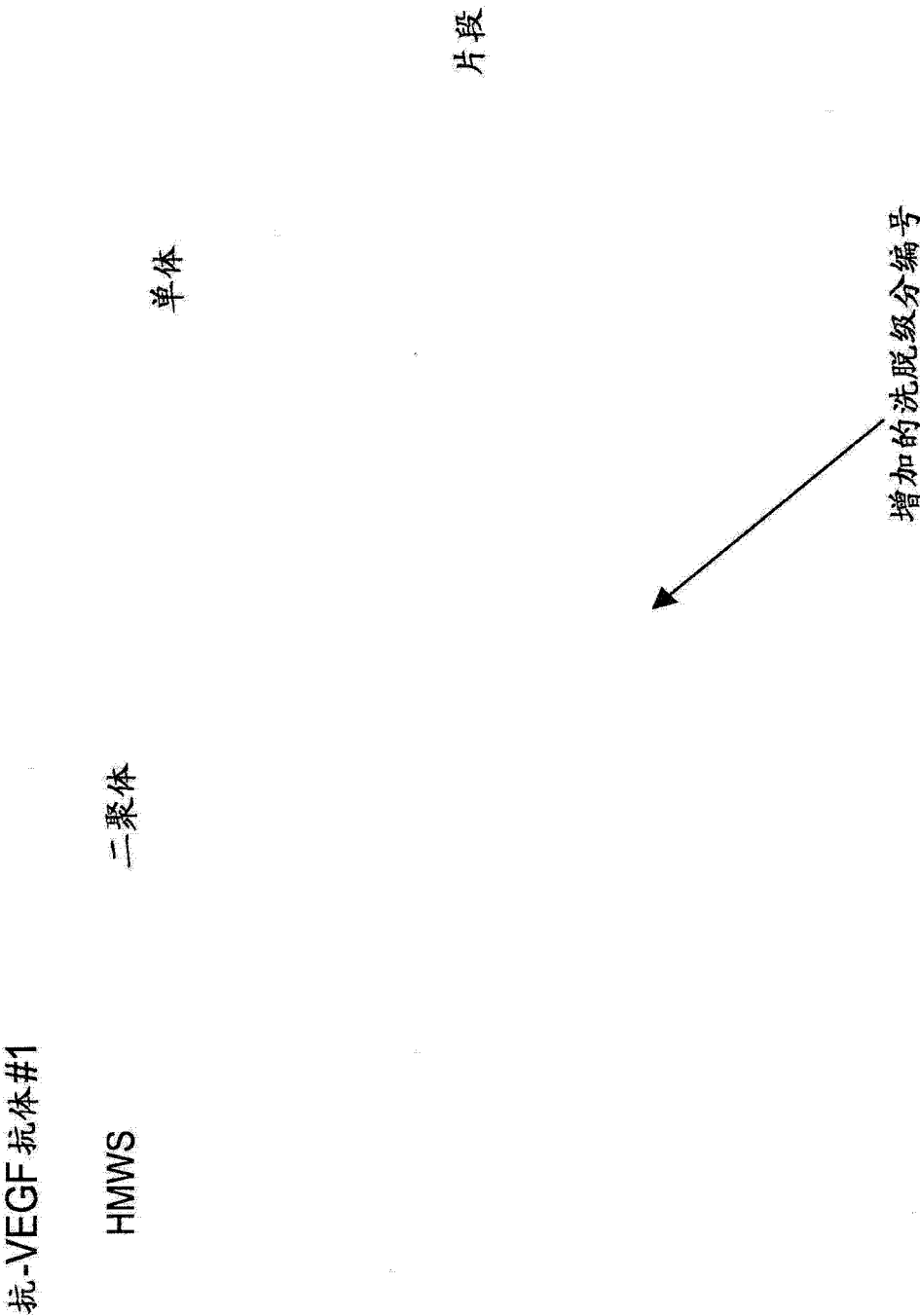


图 2

抗-VEGF抗体#1

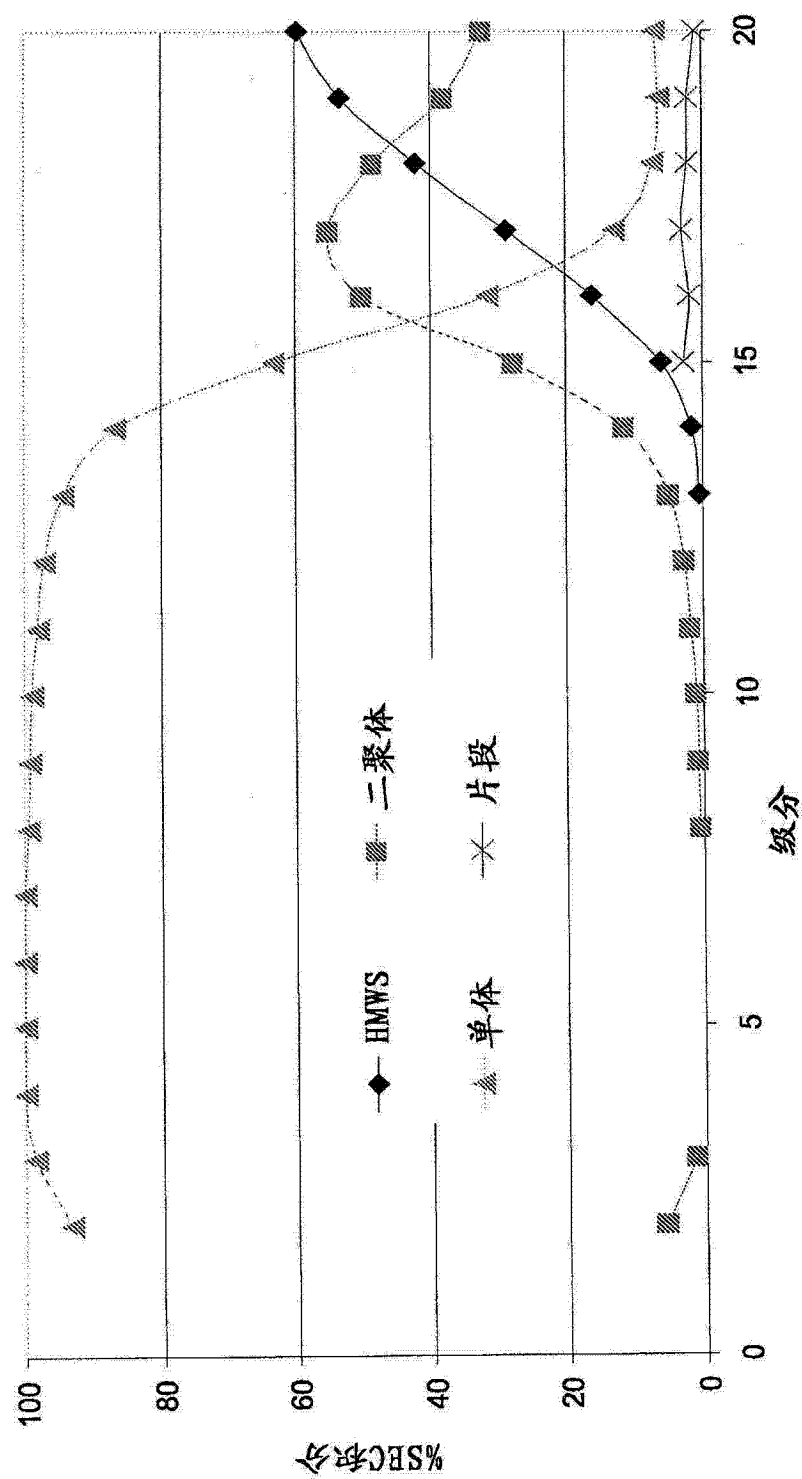


图 3

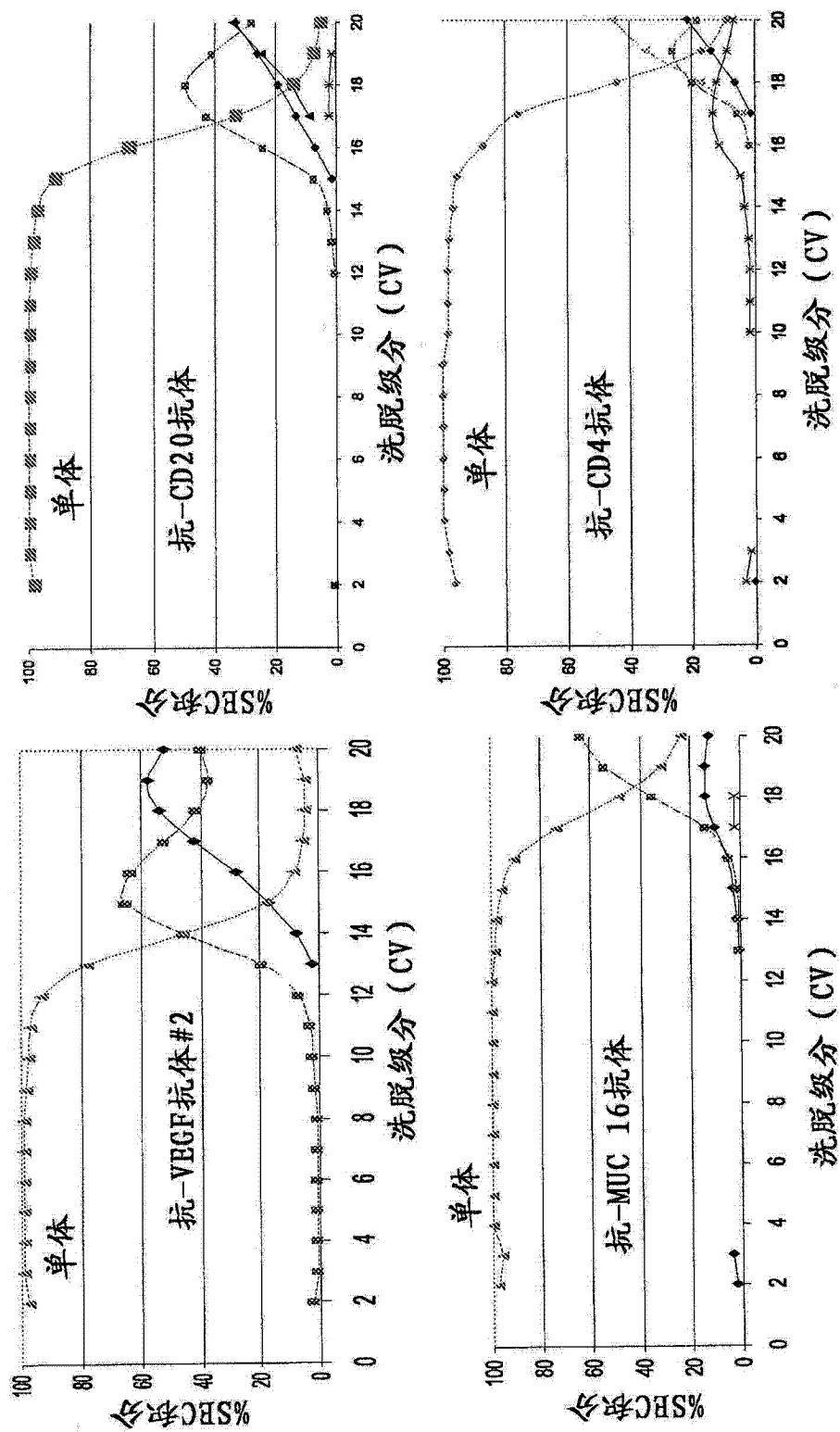


图 4A

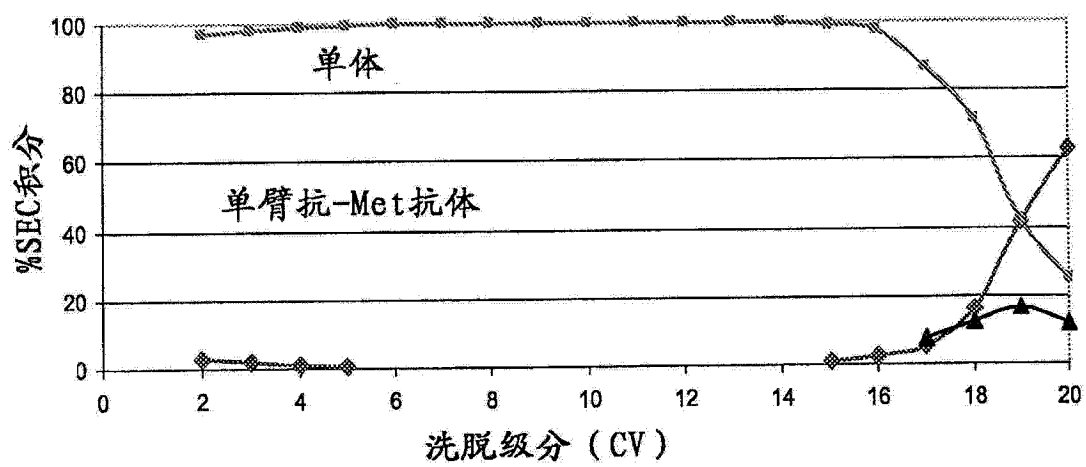


图 4B

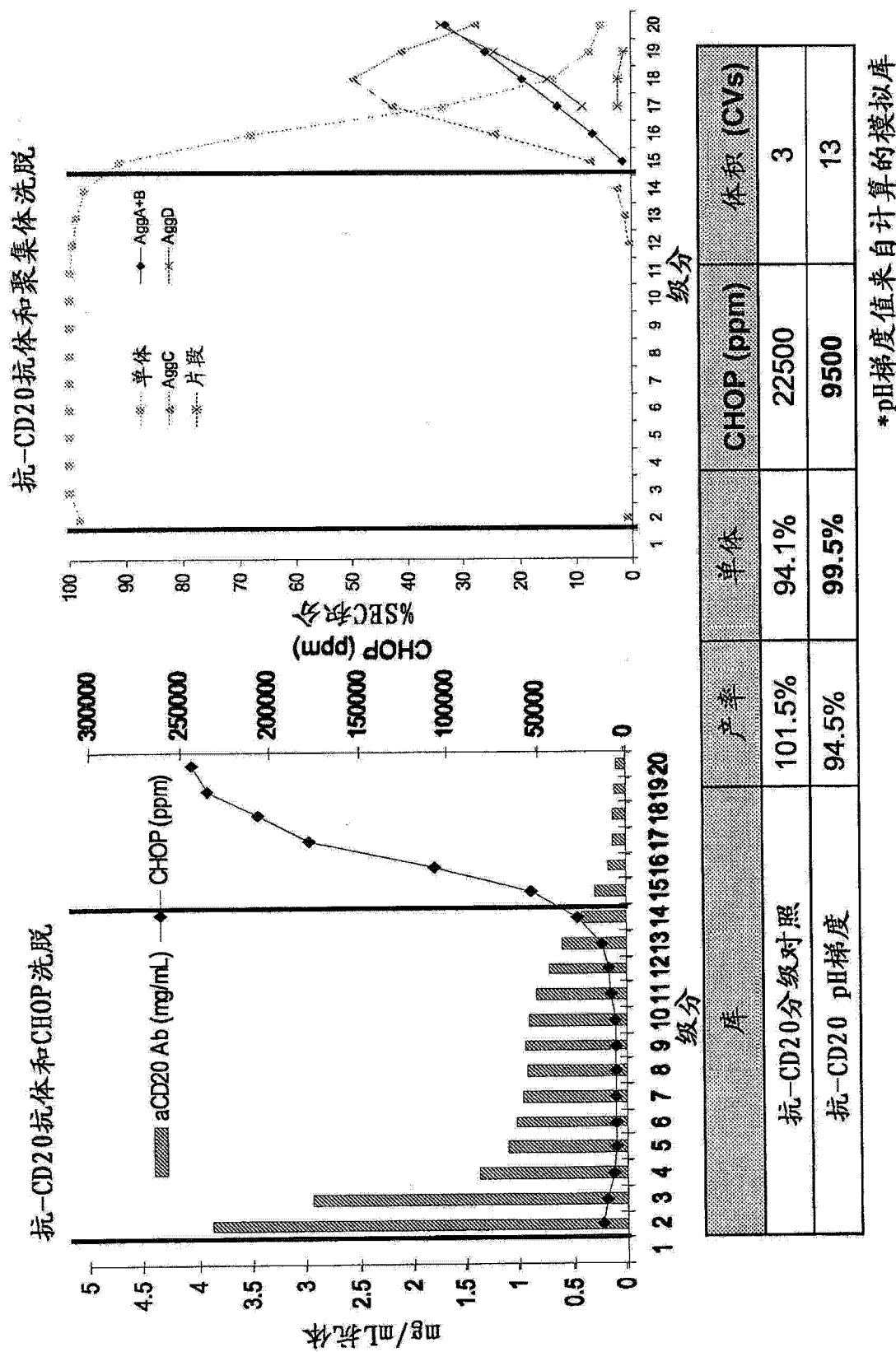


图 5

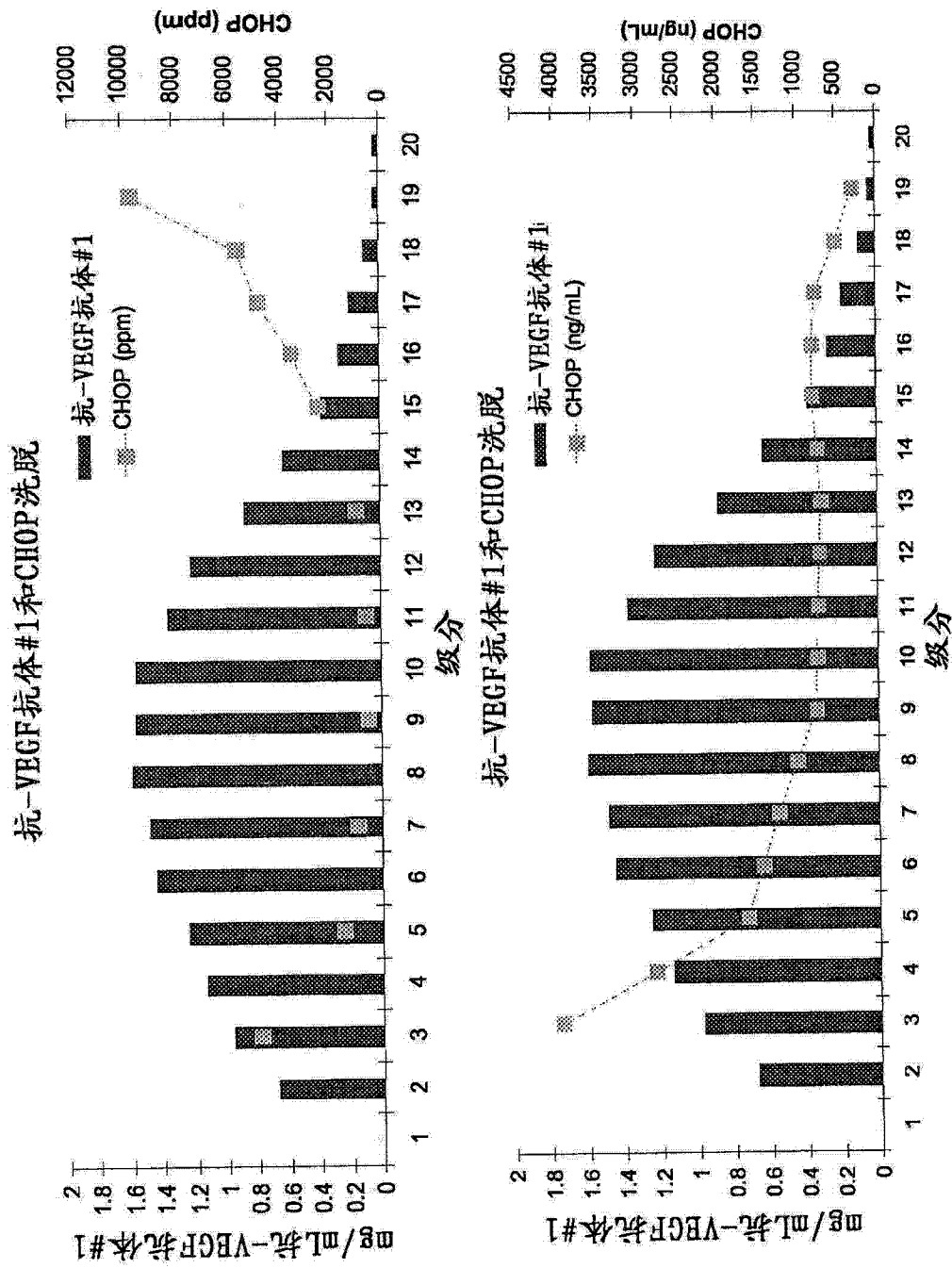


图 6

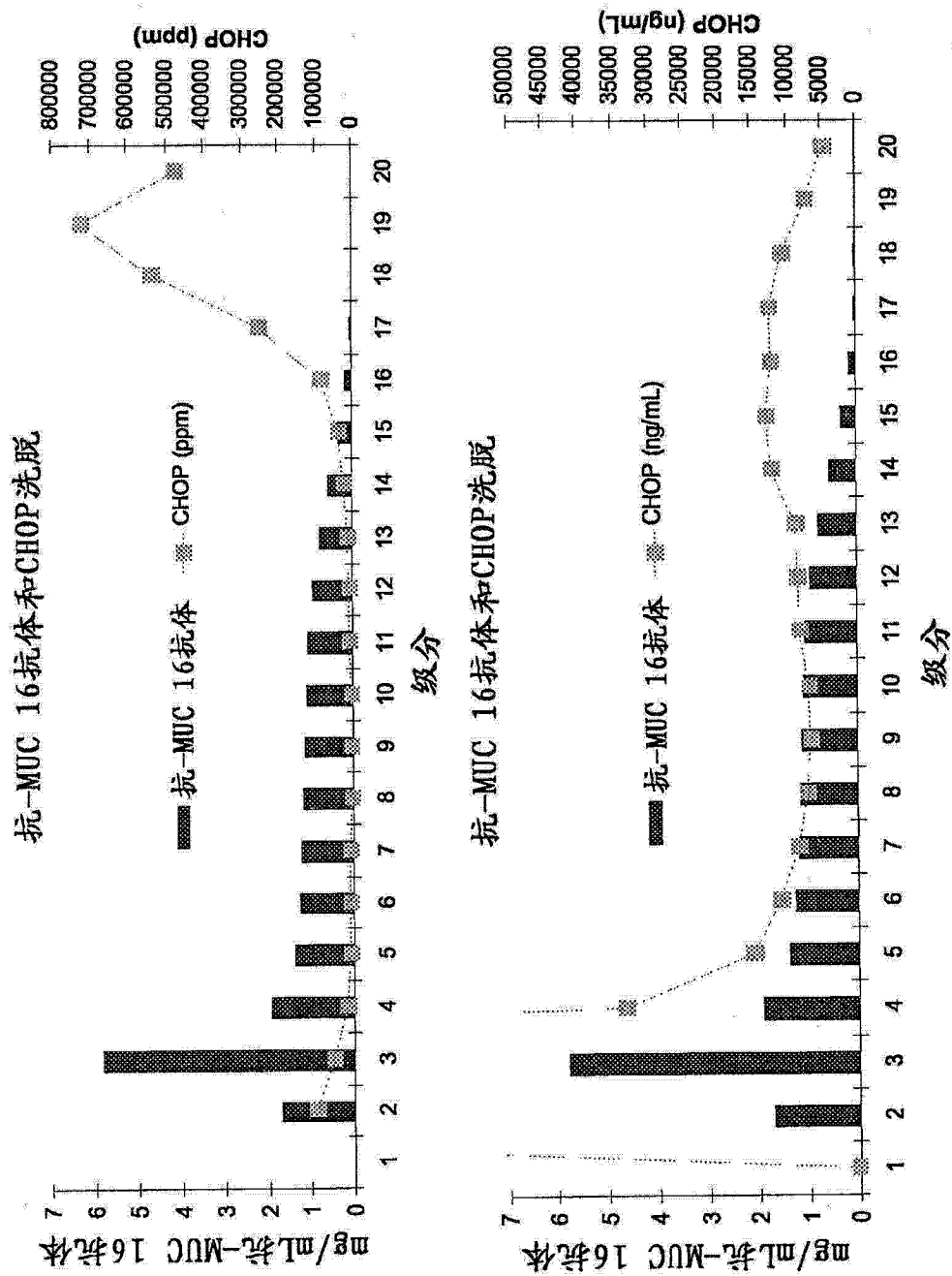


图 7

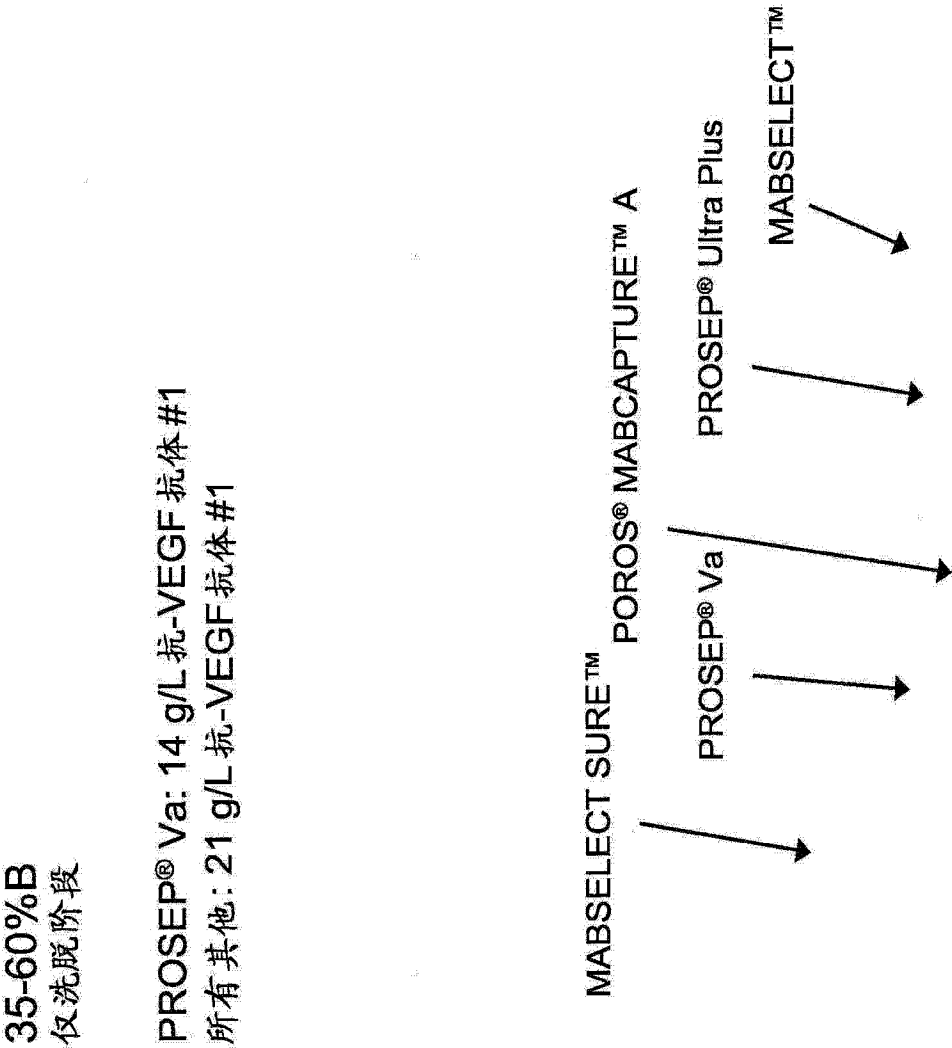


图 8

Pareto原理：
“可以通过20%的原因来解释80%的观测行为”

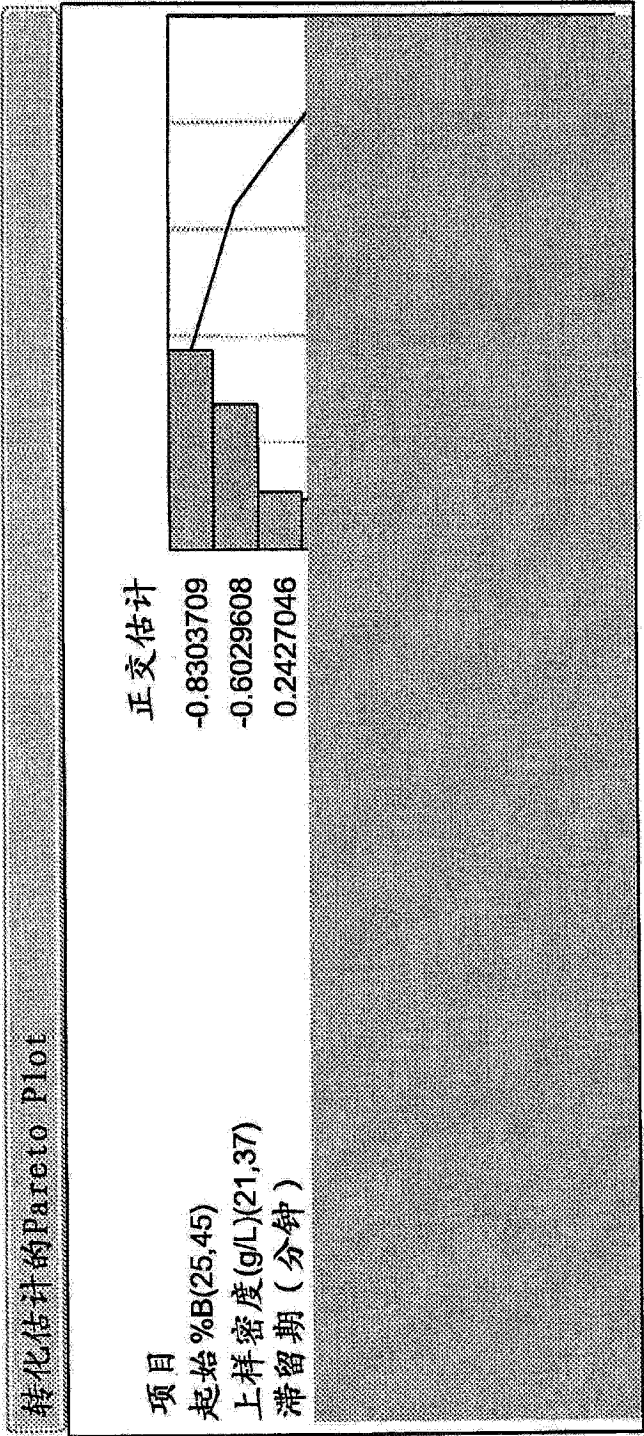


图 9

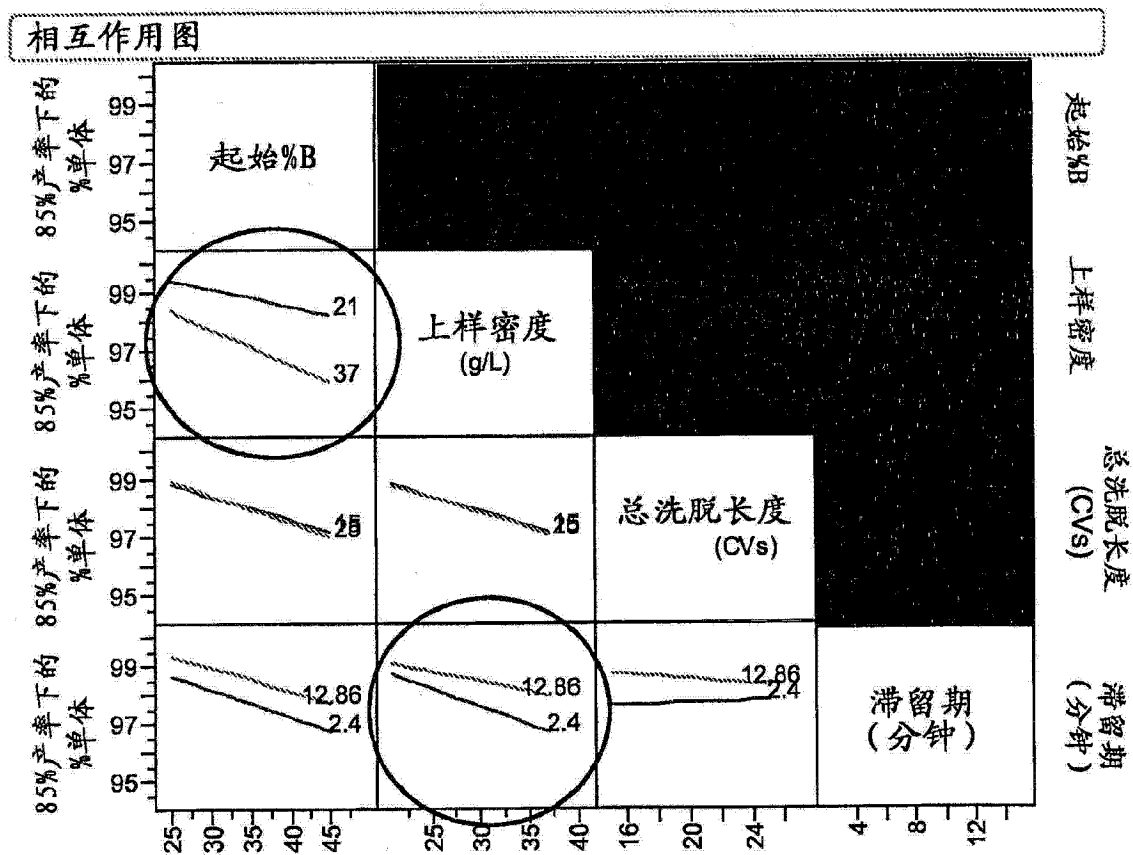


图 10

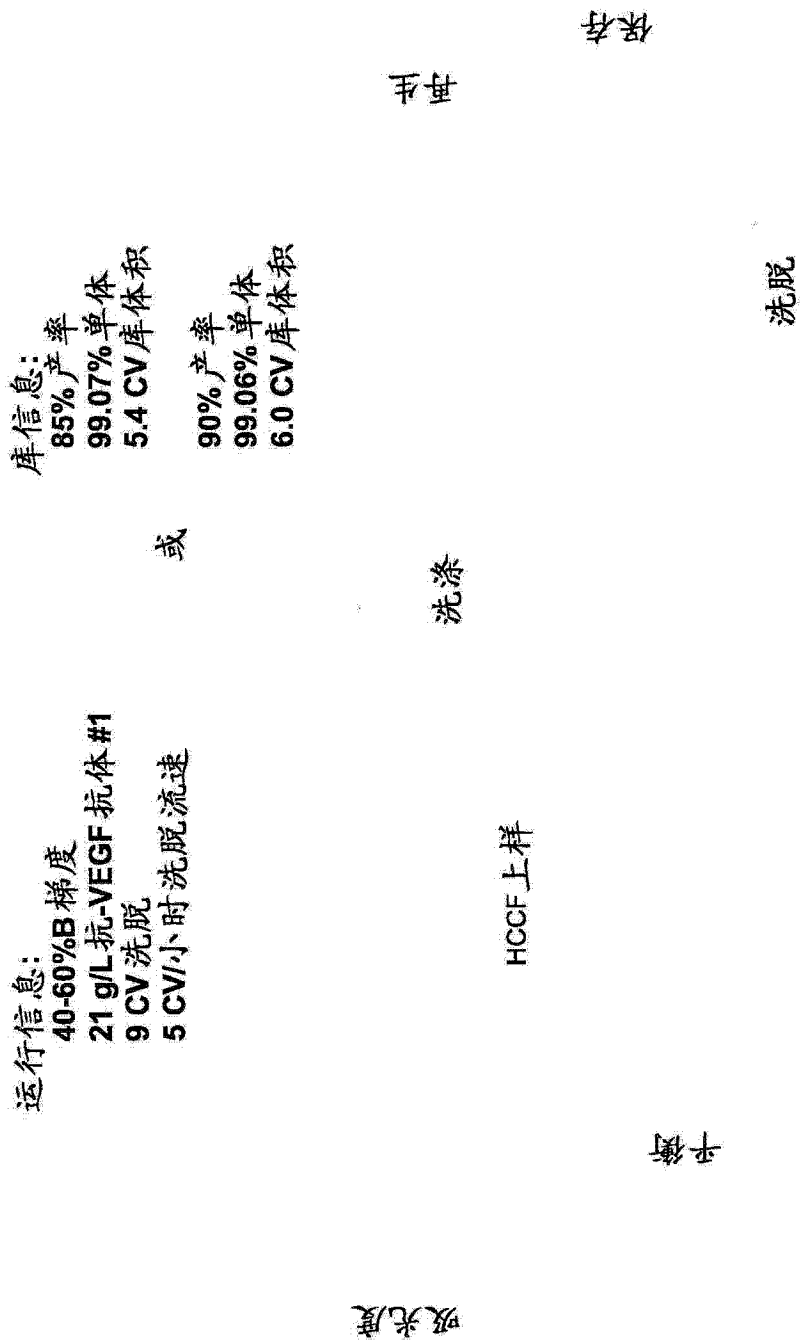


图 11

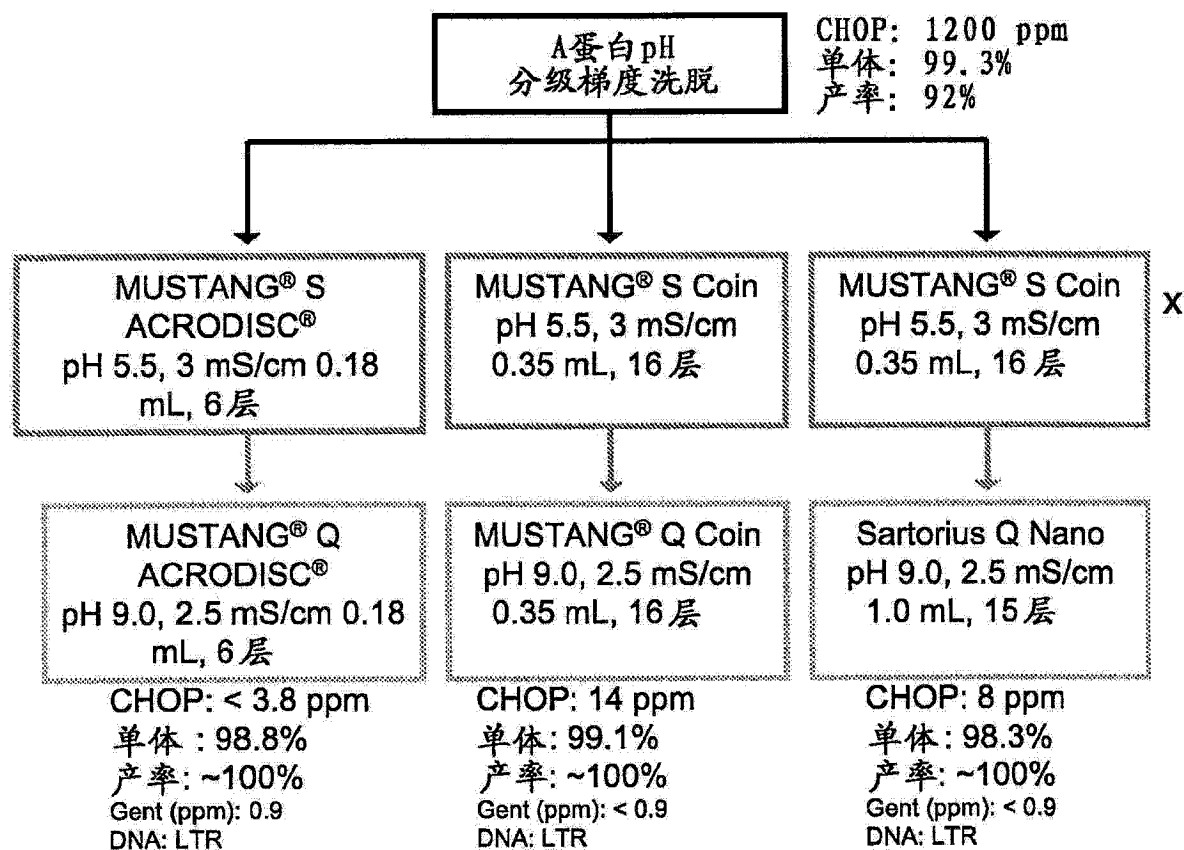


图 12

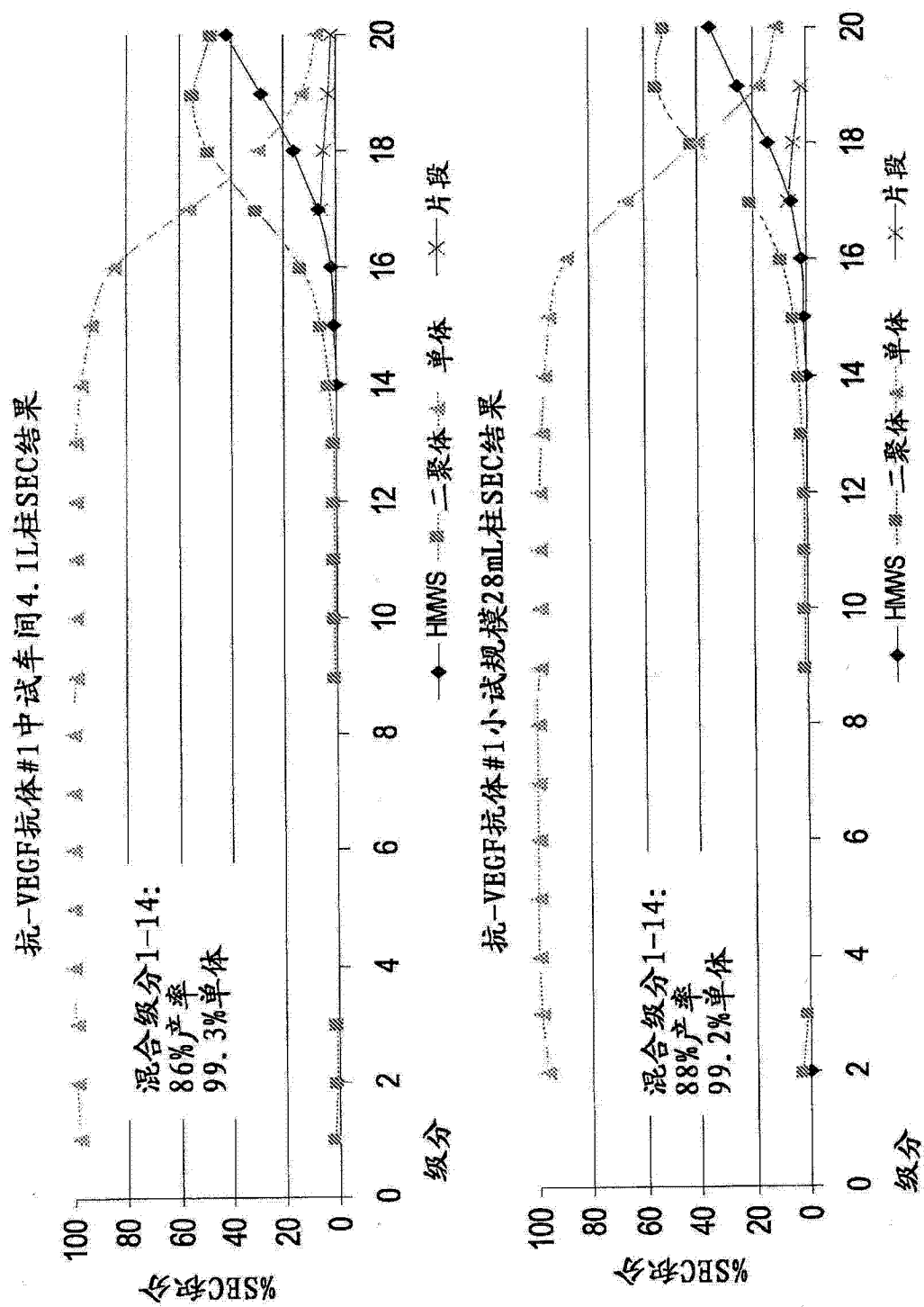


图 13

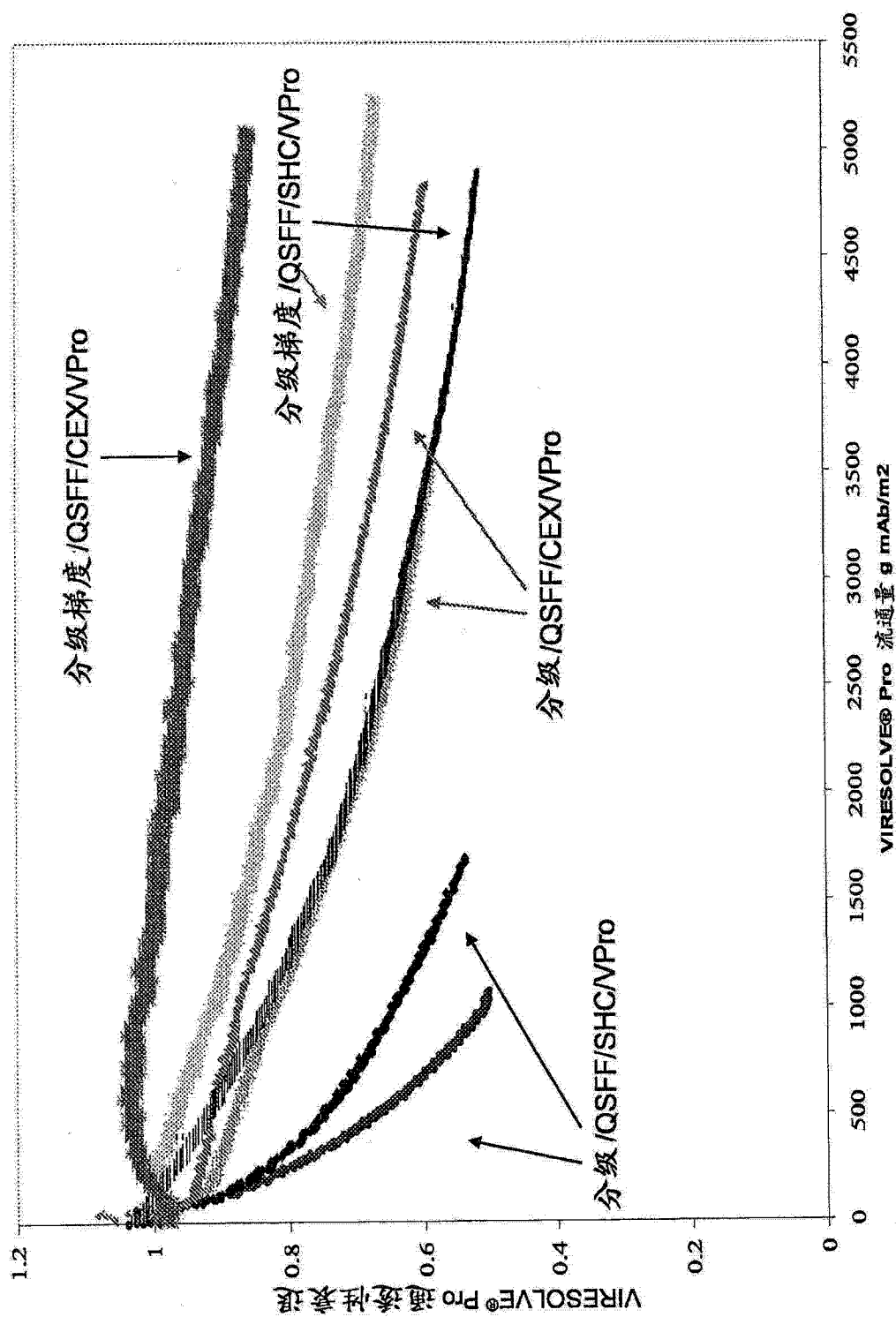


图 14

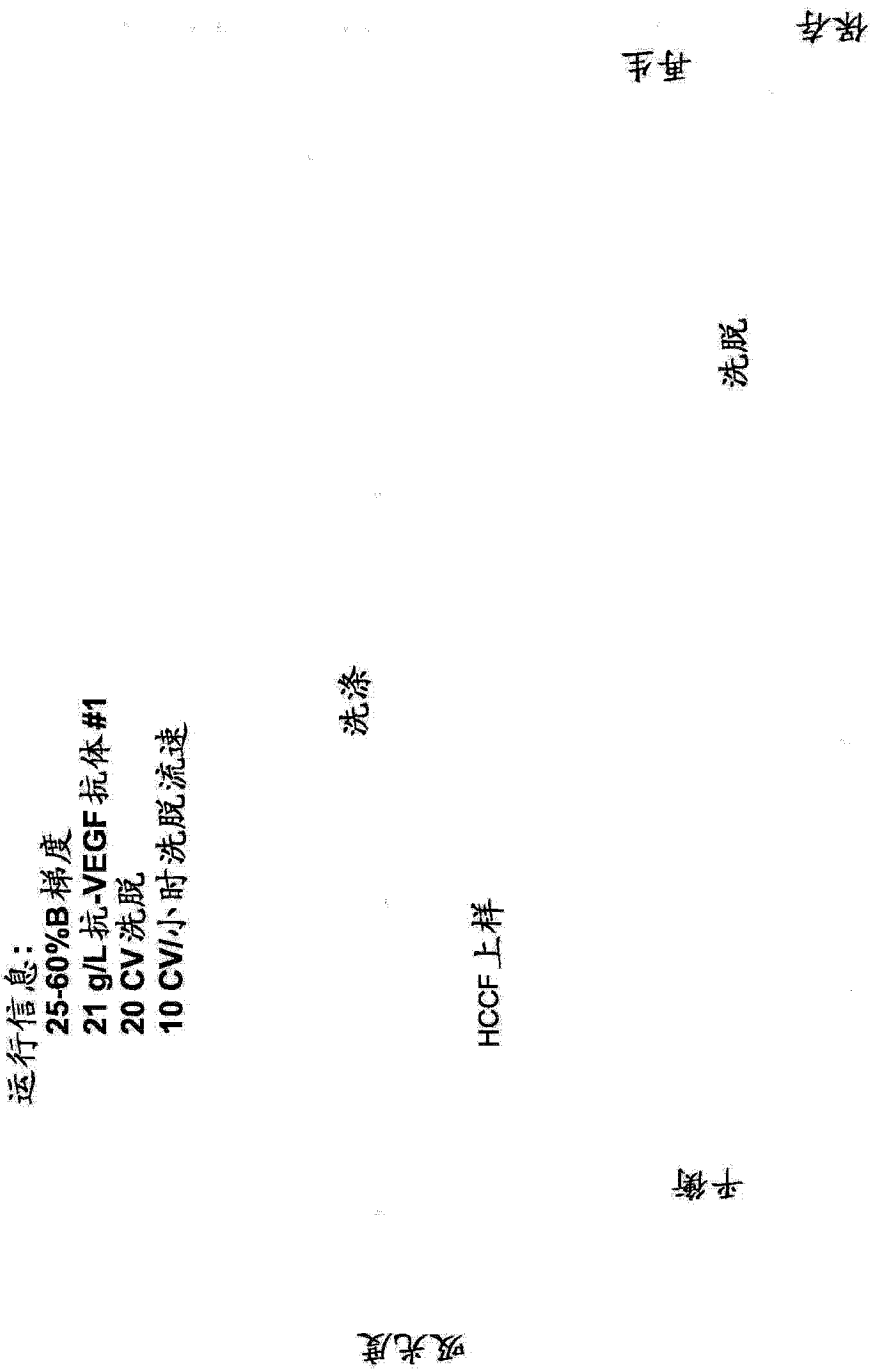


图 15

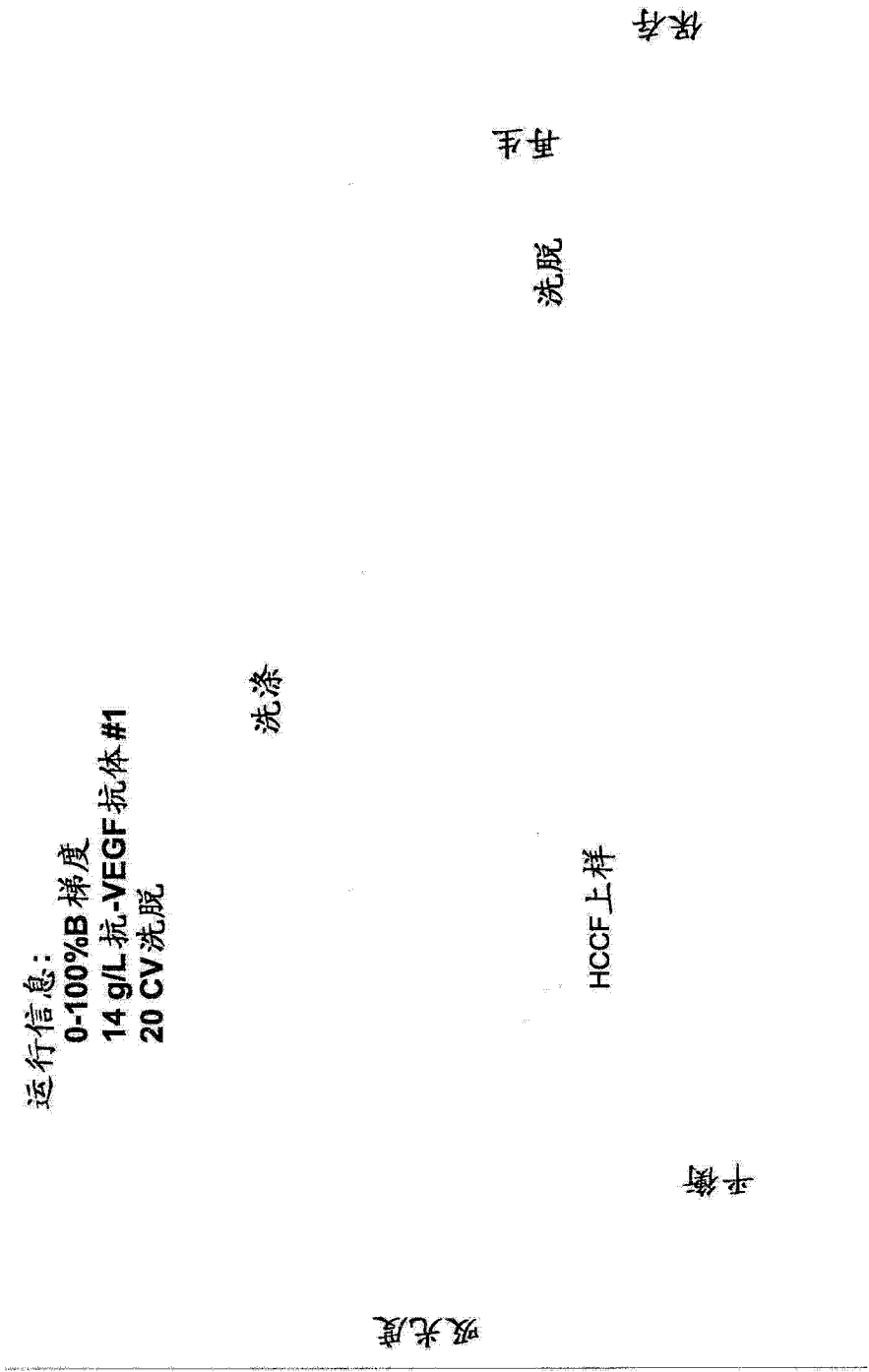


图 16

抗-VEGF抗体#1: pH梯度IEC结果

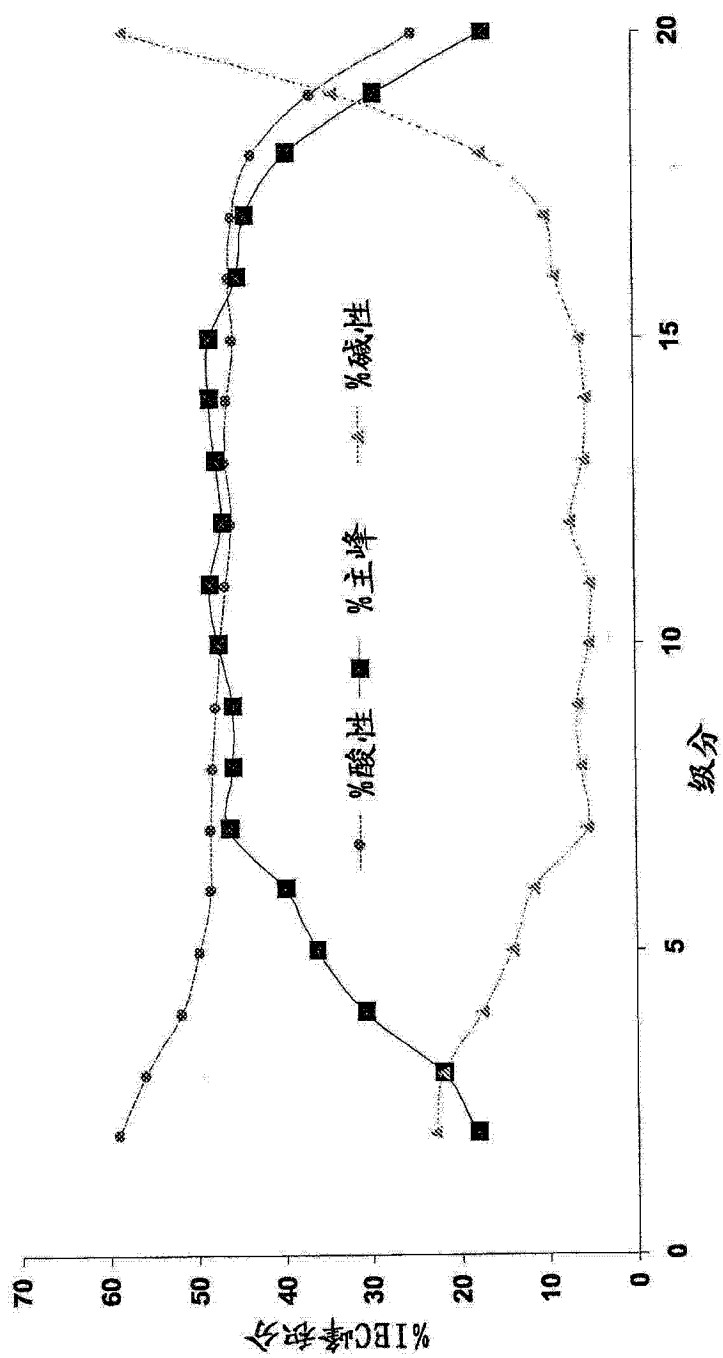


图 17

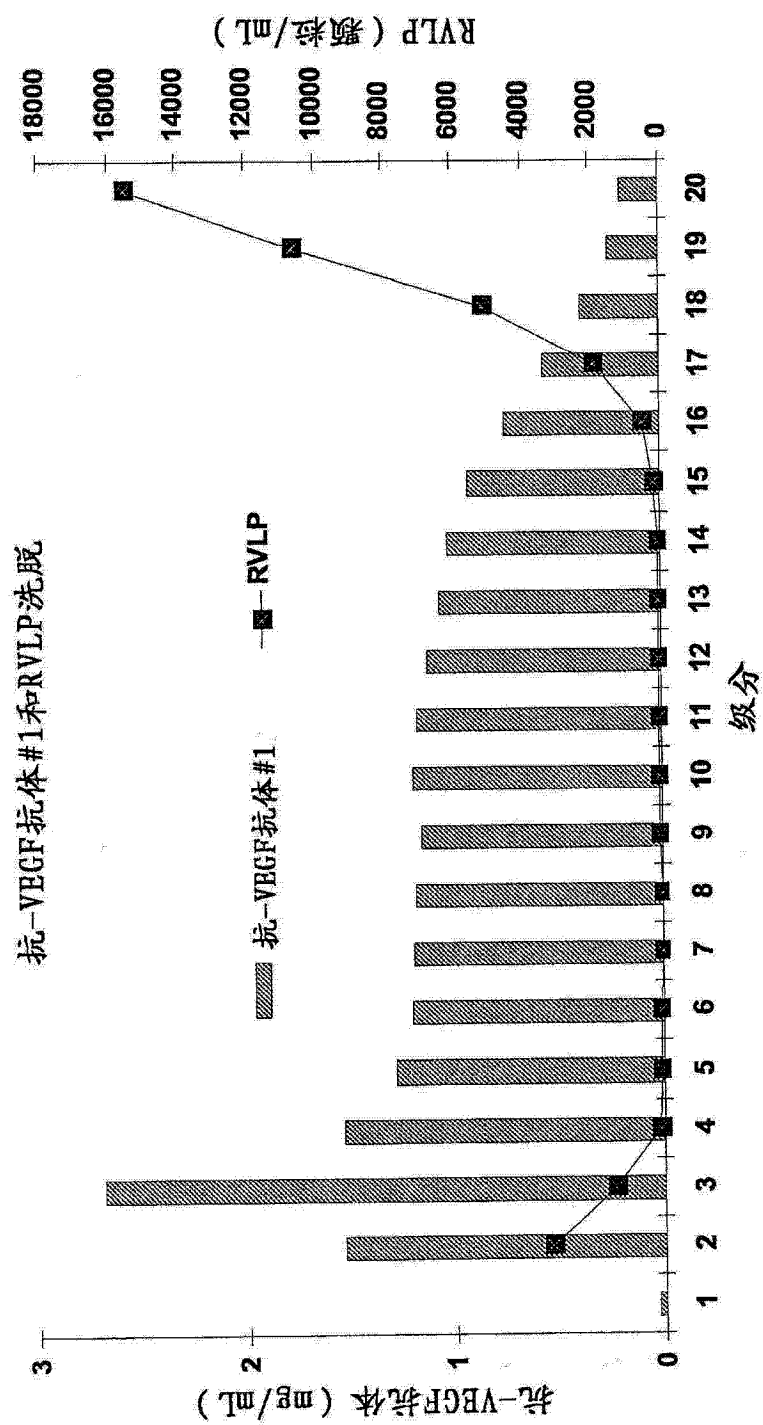


图 18

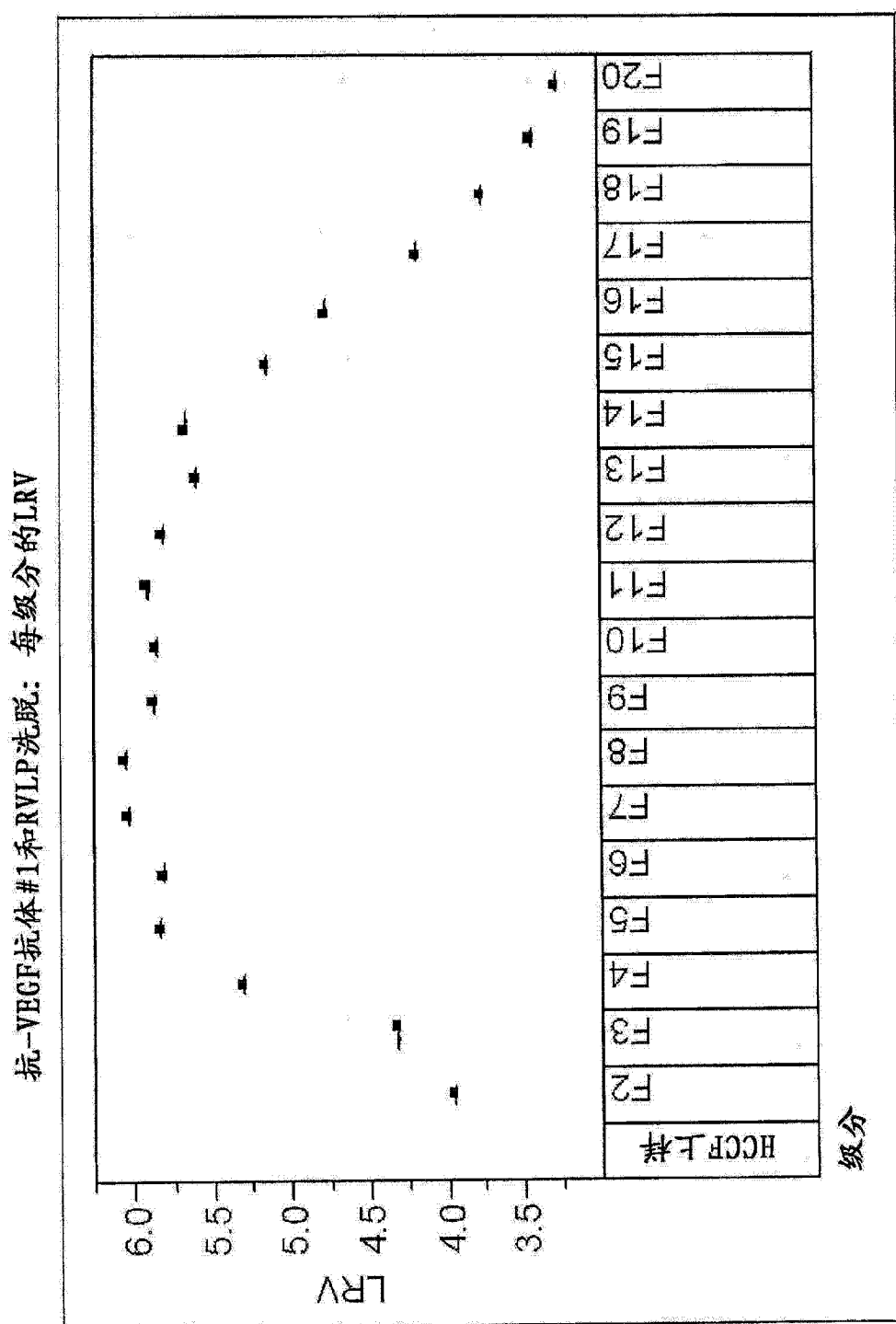


图 19

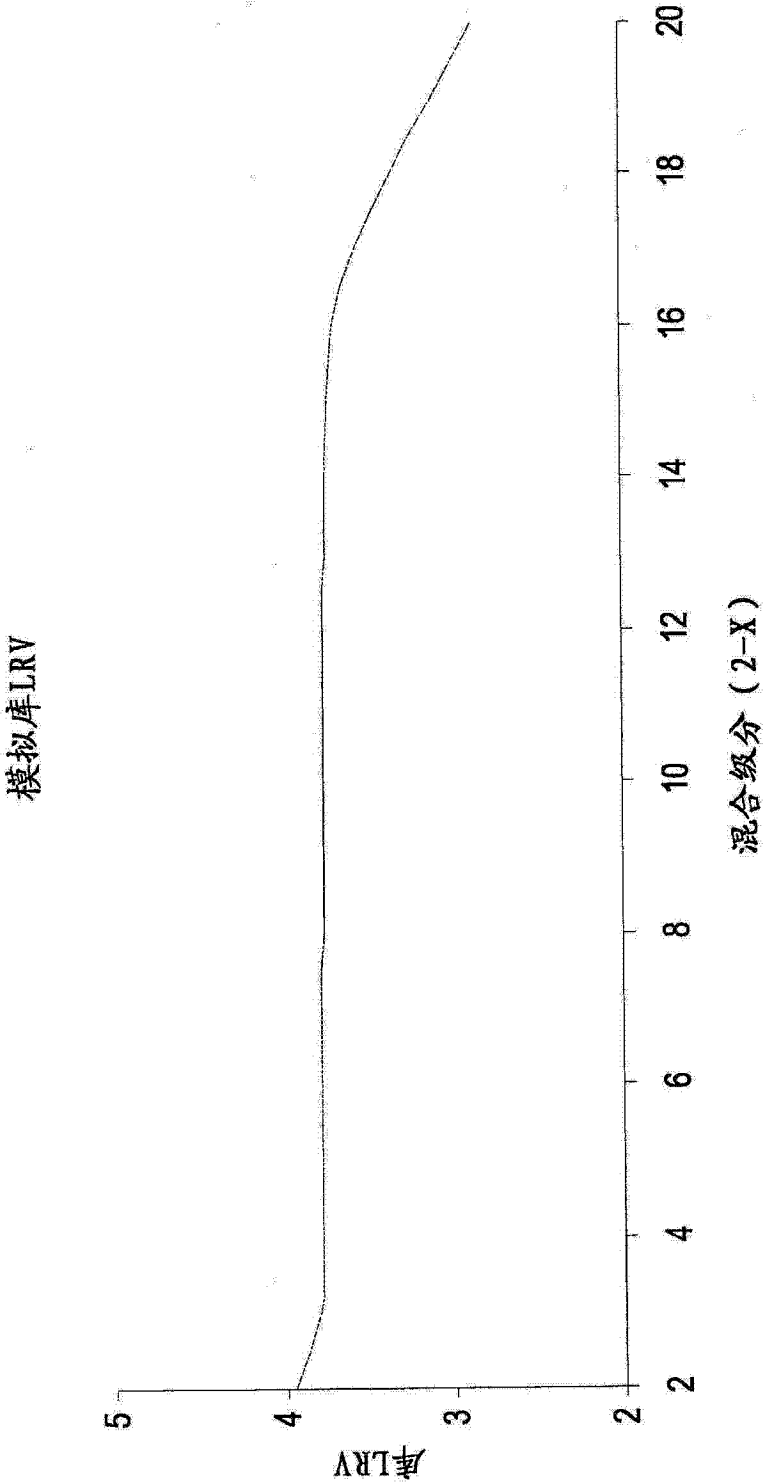


图 20