



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103079666 B

(45)授权公告日 2017.10.24

(21)申请号 201180037262.X

(22)申请日 2011.07.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103079666 A

(43)申请公布日 2013.05.01

(30)优先权数据
61/369,148 2010.07.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.01.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/045524 2011.07.27

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/015912 EN 2012.02.02

(73)专利权人 米迪缪尼有限公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 T·林克 W·K·王 A·夏
H·萨瑟斯 A·亨德 C·汤普森

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 沈端

(51)Int.Cl.
B01D 15/04(2006.01)
B01J 41/20(2006.01)

(56)对比文件
W0 2005/052006 A2,2005.06.09,说明书第
220段.
W0 2009/149281 A1,2009.12.10,说明书第
120、221、226、242、245、247-248、266、330-331
段.

审查员 贾宁

权利要求书2页 说明书26页
序列表20页 附图6页

(54)发明名称

纯化活性多肽或免疫偶联物的方法

(57)摘要

本发明提供了使用阴离子交换色谱法,通过
纯化含有一种活性多肽或免疫偶联物以及它的
一种酸性变体(例如一种脱氨酶变体)的溶液而
分离该活性多肽或免疫偶联物的方法。

1. 一种用于从包含多肽以及该多肽的脱酰胺化种类的溶液产生经纯化的多肽的方法, 其中该多肽的所述脱酰胺化种类导致了所述多肽效力的抑制, 该方法包括: (a) 将该多肽与一种阴离子交换色谱基质相接触, 并且 (b) 用从Tris/HCl、pH 8.0中的150mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的300mM NaCl的线性盐梯度将结合的多肽从该阴离子交换色谱基质洗脱, 从而将所述多肽与脱酰胺化种类分离并且产生一种经纯化的多肽, 其中所述脱酰胺化种类的75%至99%被去除; 所述多肽包括一种抗-CD22抗体或它的抗原结合片段以及一种绿脓杆菌外毒素或其细胞毒性片段、以及其保守修饰变体。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述阴离子交换色谱基质包含季铵以及叔铵的离子交换基团。

3. 如权利要求2所述的方法, 其中所述阴离子交换色谱基质包含一种季铵的离子交换基团。

4. 如权利要求3所述的方法, 其中该阴离子交换色谱基质是Q琼脂糖凝胶。

5. 如权利要求1所述的方法, 其中该线性盐梯度是从Tris/HCl、pH 8.0中的175mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的275mM NaCl。

6. 如权利要求1所述的方法, 其中该线性盐梯度是从Tris/HCl、pH 8.0中的192mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的245mM NaCl。

7. 如权利要求1所述的方法, 其中该脱酰胺化种类的约80%被去除。

8. 如权利要求1所述的方法, 其中该脱酰胺化种类的约85%被去除。

9. 如权利要求1所述的方法, 其中该脱酰胺化种类的约90%被去除。

10. 如权利要求1所述的方法, 其中该脱酰胺化种类的约95%被去除。

11. 如权利要求1所述的方法, 其中该脱酰胺化种类的约96%、97%、98%或99%被去除。

12. 如权利要求1-11任一所述的方法, 其中该抗体或抗原结合片段包括一个Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv、双硫化物连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、内抗体、IgG△CH₂、迷你抗体、F(ab')₃、四体抗体、三体抗体、双体抗体、单一结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb²、a(scFv)₂、或scFv-Fc。

13. 如权利要求1-11任一所述的方法, 其中所述绿脓杆菌外毒素或其细胞毒性片段、以及其保守修饰变体具有一个氨基酸序列, 该序列选自下组, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:16至22。

14. 如权利要求1-11任一所述的方法, 其中所述绿脓杆菌外毒素或其细胞毒性片段、以及其保守修饰变体具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

15. 如权利要求1-11任一所述的方法, 其中所述抗体或它们的抗原结合片段包括一个VH和VL序列。

16. 如权利要求15所述的方法, 其中所述VH序列选自下组, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:6至11。

17. 如权利要求15所述的方法, 其中所述VL序列选自下组, 该组由以下各项组成: SEQ ID NO:2、以及12至15。

18. 如权利要求1所述的方法, 其中该多肽是包括SEQ ID NO:1的V_H-PE38亚单位以及SEQ ID NO:2的V_L亚单位的CAT-8015免疫毒素。

19. 一种组合物, 包括具有小于25%, 小于20%, 小于10%, 小于5%, 小于3%, 小于2%,

或小于1%的脱酰胺化种类的一种经纯化的多肽,其中所述多肽通过如权利要求1或4所述的方法纯化。

20.如权利要求19所述的组合物,其中所述多肽包括SEQ ID NO:1的V_H-PE38亚单位以及SEQ ID NO:2的V_L亚单位。

21.一种药物组合物,包括如权利要求19或20中任一项中所述的组合物以及一种药学上可接受的载体。

22.一种配制品,包括如权利要求19或20中任一项所述的组合物以及至少一种赋形剂,该赋形剂选自下组,该组由以下各项组成:氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、和氢氧化钠以及水。

23.一种配制品,包括如权利要求19或20中任一项所述的组合物,包括在25mM磷酸钠的1mg/mL CAT-8015、4%蔗糖、8%甘氨酸、0.02%聚山梨酸酯80、pH 7.4,所述CAT-8015包括SEQ ID NO:1的V_H-PE38亚单位以及SEQ ID NO:2的V_L亚单位。

纯化活性多肽或免疫偶联物的方法

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明提供了用于从包含一种多肽或免疫偶联物以及它的一种酸性变体的溶液中对该活性多肽或免疫偶联物进行纯化的方法,其中该酸性变体是所述多肽或免疫偶联物的一个脱酰胺化种类。本发明还提供了包含此类经纯化的多肽或免疫偶联物的配制品。

背景技术

[0003] 大规模、经济的蛋白质纯化是生物制药行业的一个因素。治疗性蛋白质典型地是使用原核或真核细胞系产生的,这些细胞系经过工程化处理以表达来自一种重组质粒的感兴趣的蛋白质,该质粒包含编码该蛋白质的基因。将所希望的蛋白质从被送至细胞的组分和细胞副产物的混合物中以达到足以用作治疗剂(例如足以用作一种人类治疗物)的纯度进行分离由于多个原因对生物制品制造商提出了严峻的挑战。

[0004] 基于蛋白质的药物产物的制造商必须遵守严格的监管标准,包括极为严格的纯度要求。为了确保安全性,监管机构(例如美国食品与药品监督管理局(FDA))要求基于蛋白质的药物产品基本上不含杂质,包括与产品相关的污染物(例如聚集体)、该重组蛋白的片段和变体以及与过程相关的污染物(例如宿主细胞蛋白、培养基组分、病毒、DNA以及外毒素)。尽管在生物制药行业可以获得并广泛使用不同的蛋白纯化方案,但他们典型地包括一个亲和纯化步骤,例如对于抗体而言进行蛋白A纯化,以便达到药学可接受的纯度。

[0005] 形成一个可适用于某一特定生物分子或不同生物分子的纯化方案(该方案是成规模的、可控的、并且在策略上采用了特定树脂或树脂组合的用途)应当允许它在整个药物形成过程中的非常早期的阶段整合至产品形成过程中。设计一种纯化方案的方法能够将制造过程的昂贵费用变化最小化,否则这可能随后在药物发展中是必需的或在批准之后情况更坏。随着该过程成规模并且达到GMP生产条件,额外的固有复杂问题即产生,包括与树脂包装和缓冲液制备有关的复杂问题。制造过程及其能力可通过以下方式改进:简化纯化方案、取消过程步骤并且将产出和生产率最大化,同时维持正在纯化的分子的完整性和纯度。因此,令人希望的并且有利的是以一个简单并且有效的过程起始,该过程能产生一种具有高质量和高安全性的药物物质。

[0006] 与药物产品的纯化相关的一个复杂问题是在整个纯化过程中维持效力。很多因素能造成效力的降低或抑制,包括在发展过程中药物产品的修饰。这种修饰能在该过程的各个阶段发生,例如当该蛋白质在细胞中表达时、或当已经从细胞中分离的蛋白质经受各种条件或缓冲液时。本发明提供了一种用于从包含多肽或偶联物的经修饰的变体的溶液纯化该活性多肽或免疫偶联物的方法,其中这种经修饰的变体的存在导致了最终药物产品效力的抑制。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了一种用于从包含多肽以及一种酸性变体(例如一种脱酰胺化的变

体)的溶液中纯化感兴趣的多肽的方法。

[0009] 具体而言,本发明提供了一种用于纯化活性免疫偶联物的方法,其中该免疫偶联物在一个或多个残基上脱酰胺化,并且其中这种脱酰胺化作用导致所述免疫偶联物效力的抑制,该方法包括:(a)将该免疫偶联物与一种阴离子交换AIEX色谱基质相接触;并且(b)用一种高盐缓冲液将该结合的免疫偶联物从该AIEX色谱基质洗脱,从而将该活性偶联物与该脱酰胺化的变体分离。

[0010] 本发明还提供了一种用于从包含多肽以及该多肽的一种酸性变体的溶液中产生经纯化的多肽的方法,其中该多肽的酸性变体导致了该多肽效力的抑制,该方法包括:(a)将该多肽与一种阴离子交换(AIEX)色谱基质相接触,并且(b)用一种高盐缓冲液将该结合的多肽从该AIEX色谱基质洗脱,从而将所述多肽与该酸性变体分开并且产生一种经纯化的多肽。

[0011] 本发明进一步提供了一种从含该肽以及该多肽的一种酸性变体的溶液中产生经纯化的多肽或免疫偶联物的方法,该方法包括:(a)在一种表达该多肽或免疫偶联物的细菌细胞中产生该多肽或免疫偶联物;(b)将包含多肽或免疫偶联物的包涵体从这些细菌细胞分离;(c)将从这些包涵体分离的多肽或免疫偶联物再折叠;(d)将包含该多肽或免疫偶联物的组合物与一种AIEX色谱基质相接触;并且(e)用一种高盐缓冲液将该结合的多肽或免疫偶联物从该AIEX色谱基质洗脱,从而将该多肽或免疫偶联物从该溶液中纯化。

[0012] 在某些实施方案中,该酸性变体是一种脱酰胺化的变体。在其他实施方案中,在纯化过程中该酸性或脱酰胺化变体的约75%至约99%之间被去除,尤其是约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0013] 本发明的AIEX基质包含季胺或叔胺的离子交换基团,一个季氨(Q)基团,在某些实施方案中,该AIEX基质是Q琼脂糖凝胶。

[0014] 本发明的多肽或免疫偶联物用线性或阶梯式盐梯度洗脱。在某些实施方案中,该线性盐梯度是从约Tris/HCl、pH 8.0中的150mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的约300mM NaCl,从Tris/HCl、pH 8.0中的约175mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的约275mM NaCl,或从Tris/HCl、pH 8.0中的约192mM NaCl至Tris/HCl、pH 8.0中的约245mM NaCl。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的多肽或免疫偶联物包括一种抗体或它的抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段包括一个Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv、双硫化物连接的Fv、V_{NAR}结合域、IgNar、内抗体(intrabody)、IgG Δ CH₂、迷你抗体、F(ab')₃、四体抗体(tetrabody)、三体抗体(triabody)、双体抗体(diabody)、单一结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、a(scFv)₂、或scFv-Fc。在一些实施方案中,该抗体或抗原结合片段结合一种细胞表面受体,例如该细胞表面受体是CD22。在其他实施方案中,该抗体或它的抗原结合片段包括一个VH和VL序列,其中该VH序列选自下组,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:6至11,并且该VL序列选自下组,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:2以及12至15。

[0016] 在另一个实施方案中,该多肽或免疫偶联物包括一种毒素,其中该毒素选自下组,该组由以下各项组成:绿脓杆菌外毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素以及它们的亚单位,连同肉毒杆菌毒素A至F或变体、或它们的衍生物。在一些实施方案中,该绿脓杆菌外毒素或它的变体具有一个氨基酸序列,该序列选自下组,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:16至22。在一个特定的实施方案中,该免疫偶联物是包括SEQ ID NO:1的VH-PE38亚单位以

及SEQ ID NO:2的VL亚单位的CAT-8015免疫毒素。

[0017] 本发明还提供了一种组合物,该组合物包括一种具有小于约25%与约1%之间的脱酰胺化种类的经纯化的免疫偶联物,其中所述免疫偶联物通过以上所说明的任意一种方法纯化。该组合物可以存在小于约25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、或1%的该脱酰胺化种类。在某些实施方案中,该组合物是一种药物组合物,它包括一种经纯化的多肽或免疫偶联物以及一种药学上可接受的载体。

[0018] 本发明还提供一种配制品,该配制品包括25mM磷酸钠、4%蔗糖、8%甘氨酸、0.02%聚山梨酸酯80(PS80)、pH7.4中的1mg/mL CAT-8015。在其他实施方案中,该配制品被冷冻干燥。

[0019] 本发明还提供了一种用于修饰包含多肽和脱酰胺化的变体的多肽溶液的生物活性的方法,该方法包括通过线性洗脱AIEX色谱法将该多肽与该脱酰胺化的变体分离;并且将该经纯化的多肽与脱酰胺化的变体以固定的量值结合,以便获得该多肽溶液的所希望的生物活性。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图1,描绘了CAT-8015参比标准品的离子交换色谱(IEC)曲线的图。CAT-8015的前峰表示大部分的非活性脱酰胺化的、或同脱酰胺化(iso-deamidated)的CAT-8015,而该主峰包含大部分的活性的完整的CAT-8015免疫偶联物。

[0022] 图2,描绘了CAT-8015的相对效力百分数与该样品中前峰百分数的关系的图。

[0023] 图3,描绘通过Q琼脂糖凝胶HP色谱进行的CAT-8015实验室规模纯化洗脱曲线的图。使用Q琼脂糖凝胶HP纯化CAT-8015。大部分的活性的完整的CAT-8015留在馏分(fraction)D5、D7以及D9中(跨越从D3至D12的主峰,如以上峰所示)。

[0024] 图4,QHP上样以及洗脱液池样品的SDS-PAGE分析(实验室规模纯化)。道1对应着QHP上样池;道2对应着QHP洗脱液池;并且道3对应着CAT-8015参比标准品。

[0025] 图5,通过Q琼脂糖凝胶HP色谱进行的CAT-8015大规模纯化。使用Q琼脂糖凝胶HP纯化CAT-8015。正如该图和表3所示,大部分活性的、完整的CAT-8015留在馏分5、6以及7。

[0026] 图6,QHP上样以及洗脱液池样品的SDS-PAGE分析(大规模纯化)。道1对应着QHP上样池;并且道2对应着QHP洗脱液池。

[0027] 图7,描绘HA产物中前峰百分数作为溶解pH的函数的图,如实例6中所说明。

[0028] 发明详细说明

[0029] 本发明提供了一种用于从包括多肽或免疫偶联物以及它的一种酸性变体的溶液中纯化该活性多肽或免疫偶联物的方法。在一个实施方案中,该酸性变体包括该多肽或免疫偶联物的一种脱酰胺化形式。与阴离子交换柱的预期洗脱行为相比,大部分脱酰胺化的变体在盐梯度洗脱条件下先于完整的多肽洗脱。这些方法的详细内容在此提供。

[0030] 术语“多肽”、“肽”、“蛋白质”以及“蛋白质片段”在此可以互换使用以便表示氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是一种对应的自然产生的氨基酸的人工化学模拟物,并且适用于自然发生的氨基酸聚合物以及非自然发生的氨基酸聚合物。

[0031] 术语“氨基酸”是指自然发生的以及合成的氨基酸,连同与自然发生的氨基酸功能类似的氨基酸类似物以及氨基酸模拟物。自然发生的氨基酸是通过遗传密码编码的那些氨

氨酸,以及随后被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐、以及O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指以下化合物,这些化合物具有与自然发生的氨基酸相同的基本化学结构,例如一个与氢相结合的 α 碳、羰基基团、氨基基团、以及R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、蛋氨酸甲基硫。这些类似物能具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保留了与自然发生氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指以下化学化合物,这些化合物具有不同于通常的氨基酸的化学结构、但与自然发生的氨基酸的功能相类似的结构。带负电的氨基酸包括天门冬氨酸(或天门冬氨酸盐)以及谷氨酸(或谷氨酸盐)。带正电的氨基酸包括精氨酸、组氨酸以及赖氨酸。

[0032] 在此有待纯化的“组合物”包括感兴趣的多肽以及一种或多种杂质。该组合物可以被“部分纯化”(即已经经受一个或多个纯化步骤,例如通过在此说明的非亲和色谱或可以直接从产生该多肽的宿主细胞或生物体中直接获得(例如,该组合物可以包括收获的细胞培养液)。

[0033] 术语“多肽”或“感兴趣的多肽”或“感兴趣的蛋白质”以及“目标蛋白质”或“蛋白质”可以互换使用,并且是指一种蛋白质或多肽,例如有待通过本发明的一种方法从蛋白质混合物中纯化的一种抗体或免疫偶联物(如在此所定义),以及其他材料例如所感兴趣的多肽的一种酸性变体。

[0034] “酸性变体”是一种多肽或免疫偶联物的变体,它比该感兴趣的多肽更具有酸性(例如,通过阳离子交换色谱确定的)。酸性变体的一个实例是一种脱酰胺化的变体。

[0035] 脱酰胺化的蛋白质是以下蛋白质,它们的某些或全部游离酰胺功能基团被羟基化成为羧酸,例如将谷氨酰胺转化成谷氨酸。这一反应的速率取决于一级序列、三维结构、pH、温度、缓冲液类型、离子强度以及其他溶液特性。重要的是,脱酰胺化反应将一个负电荷导入该分子。如以下进一步说明,这种蛋白质脱酰胺化反应对蛋白质活性可具有一种负影响。

[0036] 如在此所使用,术语“抗体”和“免疫偶联物”在最广泛的意义上可以互换使用,并且包括单克隆抗体(例如,全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体,只要它们展示出所希望的生物活性)以及在此说明的抗体片段。术语“双特异性抗体”旨在包括以下任一抗体,它具有两种不同的结合特异性,即该抗体结合了两种不同的表位,这些表位可位于相同的靶抗原或更常见地位于不同的靶抗原上。

[0037] 天然抗体和免疫偶联物通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白质,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连,而二硫化物连接的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规律性地间隔的链间二硫桥。每条重链在一端具有一个可变结构域(V_H),之后跟随多个恒定结构域。每条轻链在一端具有一个可变结构域(V_L)并且在另一端具有一个恒定结构域。该轻链的恒定结构域与该重链的第一恒定结构域对齐,并且该轻链的可变结构域与该重链的可变结构域对齐。据信,特定氨基酸残基在轻链与重链可变区结构域之间形成一个界面(Clothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物期刊]186,651-66,1985);Novotny and Haber, Proc.Natl.Acad.Sci.USA82,4592-4596(1985)。基于重链的组成,定义了五类人类免疫球蛋白,并且被命名为IgG、IgM、IgA、IgE、以及IgD。IgG类抗体与IgA类抗体被进一步分成以下亚类:即,IgG1、IgG2、IgG3、以及IgG4、以及IgA1以及IgA2。IgG、IgA以及IgD抗体中的重链具有三个恒定区结构域,它们被指定为CH1、CH2以及CH3,并且IgM和IgE抗体中的重链具有四

个恒定区结构域CH1、CH2、CH3以及CH4。因此,重链具有一个可变区以及三个或四个恒定区。免疫球蛋白结构和功能在文献中进行综述,例如Harlow等人Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual* [抗体:实验室手册],第14章, Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), Cold Spring Harbor (冷泉港) (1988)。

[0038] 术语“抗体片段”是指一种完整抗体的一部分,并且指一种完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于: Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv以及单链Fv片段、线性抗体、单链抗体、以及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0039] 在此所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体中获得的一种抗体,即单个抗体,这些抗体包括除了可能自然发生的突变(可能少量存在)之外其他均相同的群体。单克隆抗体是高特异性的并且结合一种单一抗原。而且,与典型地包括指向不同决定簇(位点)的不同抗体的多克隆制剂相比,每种单克隆抗体指向该抗原上的一个单一决定簇。抗体“选择性地结合”或“特异性地结合”是指与可替代的物质(包括不相关的蛋白质)相比,该抗体与一个位点反应地或联系地更加频繁、更加快速、持续时间更长、亲和力更大、或以上特点的组合。“选择性地结合”或“特异性地结合”是指例如,抗体与蛋白质结合的K_D是至少约0.1mM,但更经常是至少约1μM。“选择性地结合”或“特异性地结合”经常是指抗体与蛋白质结合的K_D经常是至少约0.1μM或更好,并且在其他时候是至少约0.01μM或更好。由于不同物种的同源蛋白之间的序列同一性,特异性结合能包括识别一种以上物种的肿瘤细胞标志蛋白的抗体。

[0040] 在此的抗体特异性地包括“嵌合”抗体,在这些抗体中重链和/或轻链的一部分与衍生自一种特定物种或属于特定抗体类型或亚类的抗体所对应的序列相同或同源,而这些链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一个抗体类型或亚类的抗体、以及这些抗体的片段所对应的序列相同或同源,只要它们展示出令人希望的生物活性(美国专利号4,816,567;以及Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* [美国国家科学院院刊] USA81:6851-6855 (1984))。

[0041] 非人类(例如,鼠类)抗体的“人源化”形式是包含从非人类免疫球蛋白衍生的最小序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自该受体的一个高可变区的残基被来自一种非人类物种(供体抗体)(例如具有所希望的特异性、亲和力以及能力的小鼠、大鼠、兔或非人类的灵长类动物)的高可变区的残基代替。在一些情况下,人类免疫球蛋白的构架区(FR)残基被对应的非人类残基代替。而且,人源化抗体可以包括在该受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以便使抗体性能进一步改进。通常,该人源化抗体将基本上都包括至少一个、并且典型地两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高可变环对应着一种非人类免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的FR是具有人类免疫球蛋白序列的FR。该人源化抗体可任选地还应当包括至少一个免疫球蛋白恒定区(Fc)的一部分,典型地是一种人类免疫球蛋白的一部分。更详细内容,参见Jones等人, *Nature* [自然] 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* [自然] 332:323-329 (1988); 以及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* [结构生物学] 2:593-596 (1992)。还请见以下综述文章及其中所引述的参考文献:Vaswani和Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* [过敏哮喘与免疫] 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* [生物化学科学学报] 23:1035-1038 (1995); Hurle和Gross, *Curr. Op. Biotech.* [生物技术] 5:428-433 (1994)。

[0042] “人类抗体”是一种物质,它具有有一种氨基酸序列,该序列对应于由人类产生抗体的序列和/或已使用在此披露的制造人类抗体的任一种技术制造。人类抗体的定义特异性地排除了包括非人类抗原结合残基的人源化抗体。

[0043] 如在此使用的术语“免疫偶联物”或“偶联物”或“免疫毒素”是指一种化合物或它的一种衍生物,该物与一种细胞连接剂(例如,一种抗-CD22抗体或它的片段)相结合,并且通过以下通式来定义:C-L-A,其中C=细胞毒素,L=连接物,并且A=细胞结合剂(例如,抗-CD22抗体或抗体片段)。免疫偶联物还可通过该通式按照以下相反顺序来定义:A-L-C。

[0044] 如在此使用的术语“细胞毒素”或“细胞毒剂”是指一种抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²以及Lu的放射性同位素)、化学治疗剂例如甲氨蝶呤、阿霉素、长春花碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂、酶类以及它们的片段(例如核苷酸分解酶(nucleolytic enzyme)),抗生素类、以及毒素例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括它们的片段和/或变体,以及以下披露的各种抗肿瘤或抗癌药。细胞毒剂的实例包括但不限于:相思豆毒素、蓖麻毒素、绿脓杆菌外毒素(PE)、白喉毒素(DT)、肉毒杆菌毒素、或它们的经修饰毒素。例如,PE和DT是高毒性化合物,它们典型地通过肝毒素导致死亡。然而,PE和DT能通过以下方式修饰成一种形式用作免疫毒素:去除该毒素的天然靶向组分(例如,PE的结构域Ia或DT的B链)并且将它替换成一种不同的靶向部分,例如一种抗体。

[0045] 在一些实施方案中,该毒素是绿脓杆菌外毒素。绿脓杆菌外毒素A(PE)是一种由绿脓假单胞菌分泌的极具活性的单体蛋白质(分子量为66kD),它在真核细胞中通过催化它的ADP-核糖化反应使延伸因子2(EF-2)失活而抑制蛋白质合成(催化已氧化的NAD的ADP核糖基部分转移至EF-2上)。

[0046] 该毒素含有三个结构域,它们协同作用引起细胞毒性。结构域Ia(氨基酸1-252)介导细胞结合。结构域II(氨基酸253-364)负责易位至细胞溶质,而结构域III(氨基酸400-613)介导延伸因子2的ADP核糖化反应,使该蛋白质失活并造成细胞死亡。结构域Ib(氨基酸365-399)的功能仍然未确定,尽管它的一个大部分(氨基酸365-380)可被删去而不损失细胞毒性。见Siegall等人,J.Biol.Chem.264:14256-14261(1989)。

[0047] 在本发明中使用的绿脓杆菌外毒素(PE)包括该天然序列、该天然序列的细胞毒性片段、以及该天然PE的保守修饰变体以及它们的细胞毒性片段。PE的细胞毒性片段包括以下片段,它们具有细胞毒性,随后在靶细胞中存在或不存在蛋白水解加工或其他加工(例如,作为一种蛋白或前体蛋白)PE的细胞毒性片段包括PE40、PE38以及PE35。PE40是PE的截短衍生物,正如之前本领域所说明。参见Pai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院刊]USA,88:3358-62(1991);Kondo等人J.Biol.Chem.[生物化学期刊]263:9470-9475(1988)。PE38是一段截短的PE,由天然PE的氨基酸253-364以及381-613组成。PE35是PE的一个35kD羧基端片段,由位置280处的一个Met之后跟随天然PE的氨基酸281-364以及381-613组成。在一个实施方案中,使用了细胞毒性片段PE38。PE38是一种前体蛋白质,当在细胞内加工时它能被激活成其细胞毒性形式。

[0048] “PE免疫偶联物”或“PE免疫毒素”是一种免疫偶联物或免疫毒素,该免疫偶联物或免疫毒素包括一种抗体或它的抗原结合片段以及一种PE毒素或它的变体。

[0049] 提及从包含多肽以及一种或多种杂质的组合物中“纯化”该多肽或免疫偶联物是指通过从该组合物中(完全或部分地)去除至少一种杂质而增加该组合物中多肽的纯度。根据本发明,进行纯化而不使用亲和色谱步骤。

[0050] 术语“色谱”是指以下过程,通过该过程混合物中感兴趣的一种溶质与混合物中的其他溶质由于该混合物的各个溶质在流动相的影响下、或在结合和洗脱过程中通过固定介质的速率不同而分开。

[0051] 术语“离子交换”以及“离子交换色谱”是指以下色谱过程,其中混合物中感兴趣的一种溶质(如蛋白质)与一种连接(例如通过共价附接)固相离子交换材料的带电化合物相互作用,这样与混合物中的溶质杂质或污染物相比,所感兴趣的溶质与该带电化合物非特异性更多或更少地相互作用。混合物中污染性溶质比所感兴趣的溶质从该离子交换材料柱更快或更慢洗脱,或相对于感兴趣的溶质与该树脂相结合或从其排除。“离子交换色谱”特异性地包括阳离子交换、阴离子交换、以及混合型色谱。

[0052] 词组“离子交换材料”是指一种带有负电荷(即,阳离子交换树脂)或正电荷(即,阴离子交换树脂)的固相。电荷可能是通过将一或多个带电配体附接至该固相(例如通过共价连接)上来提供。可替代地或此外,电荷可以是该固相的固有特性(例如,对于硅胶而言,它带有一个总体的负电荷)。

[0053] “阴离子交换树脂”是指一种带正电的固相,由此具有一个或多个附接到其上的带正电的配体。可以使用附接至适宜形成阴离子交换树脂的固相的任一种带正电的配体,例如季铵基团,可商购的阴离子树脂,包括DEAEcellulose、Poros PI20、PI50、HQ10、HQ20、HQ50、D50(来自应用生物系统公司(Applied Biosystems))、Sartobind Q(来自赛多利斯集团(Sartorius))、MonoQ、MiniQ、Source15Q以及30Q、Q、DEAE以及ANX Sepharose Fast Flow、Q Sepharose High Performance、QAE SEPHADEX™以及FAST Q SEPHAROSE™(通用医疗公司(GE Healthcare))、WP PEI、WP DEAM、WP QUAT(来自J.T.Baker公司)、Hydrocell DEAE以及Hydrocell QA(生物实验室公司(Biochrom Labs Inc.))、UNOsphere Q、Macro-Prep DEAE以及Macro-Prep High Q(来自伯乐公司(Biorad))、陶瓷HyperD Q、陶瓷HyperD DEAE、Trisacryl M以及LS DEAE、SpheroxLS DEAE、QMA Spherosil LS、QMA Spherosil M以及Mustang Q(来自颇尔公司(Pall Technologies))、DOWEX Fine Mesh Strong Base Type I以及Type II阴离子树脂以及DOWEX MONOSPHER E77、弱碱阴离子(来自道液体分离公司(Dow Liquid Separations))、Intercept Q膜、Matrex CellufineA200、A500、Q500、以及Q800(来自密理博公司(Millipore))、Fractogel EMD TMAE、Fractogel EMD DEAE以及Fractogel EMD DMAE(来自EMD公司)、Amberlite弱强阴离子交换型I和II、DOWEX弱和强阴离子交换型I和II、Diaion弱和强阴离子交换型I和II、Duolite(来自西格玛奥利奇公司(Sigma-Aldrich))、TSK gel Q以及DEAE5PW以及5PW-HR、Toyopearl SuperQ-650S、650M以及650C、QAE-550C以及650S、DEAE-650M以及650C(来自东曹达公司(Tosoh))、QA52、DE23、DE32、DE51、DE52、DE53、Express-Ion D以及Express-Ion Q(来自沃特曼公司(Whatman))。

[0054] 提及“固相”是指一种或多种带电配体可以粘附到其上的非水性基质。该固相可以是一种纯化柱,离散颗粒的不连续相、膜、或滤器等。形成该固相的材料实例包括多糖(例如,琼脂糖和纤维素);以及其他机械稳定的基质例如硅胶(例如,受控孔玻璃)、聚(苯乙烯二乙烯)苯、聚丙烯酰胺、陶瓷颗粒以及以上项的衍生物。

[0055] 术语“特异性结合”如此处所使用以便说明感兴趣的分子与结合至固相基质上的配体之间相互作用,通常是指感兴趣的蛋白质在一个结合位点上通过蛋白质的空间互补以及配体结构的联合作用而可逆性地结合至一种配体上,在该结合位点上结合有静电力、氢键、疏水作用力、和/或范德华力。空间互补性越大并且在结合部位的其他作用力越强,则蛋白质与其所对应的配体的结合特异性就越大。特异性结合的非限定性实例包括抗体-抗原结合、酶-底物结合、酶-辅因子结合、金属离子螯合、DNA结合蛋白-DNA结合、调节蛋白-蛋白相互作用、以及类似物。

[0056] 术语“非特异性结合”如在此所使用以便说明感兴趣的分子与配体或结合到固相基质上的其他化合物之间的相互作用,是指感兴趣的蛋白质在相互作用的位点上通过静电力、氢键、疏水作用力、和/或范德华力与配体或固相基质上的化合物相结合,但是缺少增强非结构作用力效果的结构互补。非特异性相互作用的实例包括但不限于:静电力、疏水作用力、以及范德华力连同氢键。

[0057] “盐”是通过酸和碱的相互作用而形成的一种化合物。用于本发明的盐包括但不限于:醋酸盐(例如,醋酸钠)、柠檬酸盐(例如,柠檬酸钠)、氯化物(例如,氯化钠)、硫酸盐(例如,硫酸钠)、或一种钾盐。

[0058] 术语“洗涤剂”是指离子和非离子表面活性剂,例如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188);Triton; 十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠(sodium octylglycoside);月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、或十八烷基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或十八烷基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-、或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基(lauroamidopropyl)-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-、或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-、或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;椰油酰基甲基牛磺酸钠、或油烯基甲基牛磺酸钠(disodiummethyl oleyl-aurate);以及MONAQUAT™系列(孟那工业公司(MonaIndustries, Inc)新泽西州帕特森市),有用的洗涤剂是聚山梨醇酯,例如聚山梨醇酯20(TWEEN20®)或聚山梨醇酯80(TWEEN80®)。

[0059] 在本发明中所使用的“缓冲液”是一种溶液,它通过加入酸或碱通过其酸碱偶联物组分的作用来抵抗pH的变化。在本发明中可以采用各种缓冲液,这取决于纯化过程中缓冲液所希望的pH以及特定步骤[参见Buffers.A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)]。可用于控制本发明的一个方法中所希望pH范围的缓冲液组分的非限定实例包括醋酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐、铵盐缓冲液例如醋酸铵、琥珀酸盐、MES、CHAPS、MOPS、MOPSO、HEPES、Tris、以及类似物、连同以下各项的组合:TRIS-苹果酸-NaOH、马来酸盐、氯乙酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、丙酸盐、吡啶、哌嗪、ADA、PIPES、ACES、BES、TES、曲辛、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(bicine)、TAPS、乙醇胺、CHES、CAPS、甲胺、哌啶、O-硼酸、碳酸、乳酸、丁二酸、二乙基丙二酸、双甘氨酸、HEPPS、HEPPSO、咪唑、酚、POPSO、琥珀酸盐、TAPS、基于胺的物质、苄胺、三甲基或二甲基或乙基或苯胺、乙二胺、或吗啉(morpholine)。若需要,在缓冲液中可存在额外的组分(添加物),例如可使用盐来调节缓冲液离子强度,例如氯化钠、硫酸钠以及氯化钾;以及其他添加剂例如氨基酸(例如甘氨酸和组氨酸)、离液剂 chaotropes (例如尿素)、醇类(例如乙醇、甘露醇、甘油、以及苯甲醇)、洗涤剂(见以上)、以及糖类(例如蔗糖、甘露醇、麦芽

糖、海藻糖、葡萄糖、以及果糖)。所使用的缓冲液组分以及添加剂、以及浓度可根据本发明所进行的色谱类型而变化。

[0060] “上样缓冲液”是用来将包括感兴趣的多肽分子以及一种或多种杂质的组合物上样至离子交换树脂上的物质。上样缓冲液具有导电率和/或pH,这样感兴趣的多肽分子(以及通常一种或多种杂质)与该离子交换树脂,或这样将感兴趣的蛋白质流动通过柱子同时这些杂质结合到树脂上。

[0061] 术语“洗涤缓冲液”当在此使用时是指一种缓冲液,用于在洗脱感兴趣的多肽分子之前洗涤离子交换树脂或将其再平衡。方便地,洗涤缓冲液和上样缓冲液可以是一样的,但不是必须要求的。

[0062] “洗脱缓冲液”用于将感兴趣的多肽从固相中洗脱。洗脱缓冲液的导电率和/或pH是使感兴趣的多肽从离子交换树脂洗脱。

[0063] 多肽的“pI”或“等电点”是指该多肽的正电荷与负电荷平衡时的pH。pI能从该多肽附接的碳水化合物的氨基酸残基或唾液酸残基的净电荷计算而得或能通过等点聚焦来确定。

[0064] 提及将一种分子“结合至”一种离子交换材料是指在适当条件(pH/导电率)下将该分子暴露于该离子交换材料,这样由于该分子与该离子交换材料的一个或多个带电基团之间的离子相互作用该分子在离子交换材料中或在该材料上是可逆性不能移动的。

[0065] 提及“洗涤”该离子交换材料是指使一种适宜的缓冲液通过或经过该离子交换材料。

[0066] 将一种分子(例如,多肽或杂质)从一种离子交换材料“洗脱”是指通过改变该离子交换材料周围缓冲液的离子强度将该分子从其中去除,这样该缓冲液与该分子竞争该离子交换材料上的带电位点。

[0067] 如在本披露内容和权利要求中所使用,单数形式“一种/个”(“a”,“an”)和“该”包括复数形式,除非在上下文中的其他地方清楚地指出。

[0068] 应当理解,当用语言“包含”来说明实施方案时,还提供了就“由……组成”和/或“主要由……组成”而言所说明的其他类似实施方案。

[0069] 如在此在词组如“A和/或B”中所使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”以及“B”。类似地,在词组如“A、B和/或C”中所使用的术语“和/或”旨在涵盖以下实施方案中的每一个:A、B和 C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0070] 绿脓杆菌外毒素以及其他毒素

[0071] 毒素可以与本发明的抗体一起使用以产生免疫毒素。示例性的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素以及它们的亚单位,连同肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素可以从商业来源中很容易地购得(例如西格玛化学品公司(Sigma Chemical Company)密苏里州,圣路易斯市区)。白喉毒素是从白喉杆菌中分离出的。蓖麻毒素是来自蓖麻(蓖麻子)的凝集素RCA60。该术语还提及了它的毒性变体。例如,见美国专利号5,079,163和4,689,401。蓖麻凝集素(RCA)以两种形式存在,根据它们大致的分子量65kD与120kD分别被命名为RCA₆₀和RCA₁₂₀(Nicholson & Blaustein, J. Biochem. Biophys. Acta[生物化学与生物物理学报期刊]266:543(1972))。A链负责使蛋白质合成失活并杀死细胞。B链将蓖麻毒素连接至细胞表

面半乳糖残基上并且有助于A链转移至细胞溶质内 (Olsnes等人, Nature [自然] 249:627-631 (1974) 和美国专利号3,060,165)。

[0072] 相思豆毒素包括来自相思豆的毒性凝集素。毒性主要成分相思豆毒素a、b、c以及d具有的分子量是从约63kD至67k,并且由两条二硫化物连接的多肽链A和B组成。A链抑制蛋白质合成;B链(相思豆毒素b)结合至D-半乳糖残基上(参见Funatsu等人, Agr. Biol. Chem. [农业生物化学] 52:1095 (1988); 以及Olsnes, Methods Enzymol [酶学方法]. 50:330-335 (1978))。

[0073] 在本发明的优选实施方案中,该毒素是绿脓杆菌外毒素(PE)。绿脓杆菌外毒素(或外毒素A)是由绿脓杆菌产生的一种外毒素。如在此使用的术语“绿脓杆菌外毒素”是指一种全长天然(自然发生的)PE或一种经修饰的PE。此类修饰可包括但不限于:消除结构域Ia、去除结构域Ib、II和III中的各种氨基酸、单个氨基酸取代以及在羧基端加入一个或多个序列,例如KDEL (SEQ ID NO:3) 以及REDL (SEQ ID NO:4)。参见Siegall 等人 J. Biol. Chem. [生物化学期刊] 264:14256-14261 (1989)。在一个优选的实施方案中,PE的细胞毒性片段保留了天然PE细胞毒性的至少50%、优选75%,更优选至少90%,并且最优选95%。在一个最优选的实施方案中,该细胞毒性片段比天然PE更具有毒性。

[0074] 天然的绿脓杆菌外毒素A(PE)是一种由绿脓杆菌分泌的极具活性的单体蛋白质(分子量是66kD),它抑制了真核细胞中的蛋白质合成。这种天然PE序列由共同转让的美国专利号5,602,095提供,该专利通过引用结合在此。作用的方法是将延伸因子2(EF-2)的ADP核糖化反应失活。该外毒素包含三个联合起效造成细胞毒性的结构域。结构域Ia(氨基酸1-252)介导细胞的结合。结构域II(氨基酸253-364)负责易位至细胞溶质中,而结构域III(氨基酸400-613)介导延伸因子2的ADP核糖化作用。结构域Ib的功能(氨基酸365-399)依然未确定,尽管它的一个大部分(氨基酸365-380)可被删去而不丢失细胞毒性。参见Siegall等人, (1989), 同上。

[0075] 在本发明中采用的PE包括该天然序列、该天然序列的细胞毒性片段、以及天然PE的保守修饰变体以及它的细胞毒性片段。用于本发明的PE变体说明于US7,355,012、以及WO2007/016150以及WO2009/032954中。PE的细胞毒性片段包括以下部分,它们具有细胞毒性,在靶细胞中具有或没有随后的蛋白水解加工或其他加工(例如,作为蛋白或前体蛋白)。PE的细胞毒性片段包括PE40、PE38以及PE35。

[0076] 在优选的实施方案中,PE已被修饰以降低或消除非特异性细胞结合,经常通过如美国专利号4,892,827所传授的去除结构域Ia完成,尽管这还可以通过例如将结构域Ia的某些残基突变完成。例如,美国专利号5,512,658披露了一种突变的PE,其中存在结构域Ia,但其中位置57、246、247以及249上的结构域Ia的碱性残基被酸性残基(谷氨酸,或“E”)替代,展示出显著减弱的非特异性细胞毒性。PE的突变形式有时是指PE4E。

[0077] PE40是PE的一种截短衍生物,如之前本领域所说明,被删去了天然PE分子的结构域Ia。参见Pai等人 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:3358-62 (1991); 以及Kondo等人, J. Biol. Chem. [生物化学期刊] 263:9470-9475 (1988)。PE35是PE的一种35kD羧基端片段,其中氨基酸残基1-279已经被删去并且该分子以位置280处的Met起始,之后跟随天然PE的氨基酸281-364以及381-613。例如,在美国专利5,602,095和4,892,827中披露的PE35和PE40。PE4E是PE的一种形式,其中存在着天然PE的所有结构域,但其中结构域Ia在位置57、

246、247以及249处的碱性残基被酸性残基(谷氨酸或“E”)替代。

[0078] 在一些优选的实施方案中,采用了细胞毒性片段PE38。PE38是一种截短的PE前体蛋白,由氨基酸253-364以及381-613组成,在细胞内加工时它被激活成细胞毒性形式(参见例如美国专利号5,608,039,7,355,012,以及Pastan等人,Biochim.Biophys.Acta[生物化学与生物物理学报]1333:C1-C6(1997))。

[0079] 如以上所指出,结构域Ib中的一些或全部可能被删去,并且剩余部分被一种连接物连接或被一个肽键直接连接。结构域II的氨基部分中有一些可以被删去。并且,C-末端可包含残基609-613的天然序列(REDLK)(SEQ ID NO:5),或可以包括一种变化物,该变化物被发现维持了该结构体易位至细胞溶质中的能力,例如REDL(SEQ ID NO:4)或KDEL(SEQ ID NO:3),以及这些序列的重复。参见美国专利号5,854,044;5,821,238;以及5,602,095以及W099/51643。然而在优选的实施方案中,该PE是PE4E、PE40或PE38,PE中的任一种形式(其中非特异性细胞毒性已被消除或降低至一定水平,其中不发生对非靶向细胞的重要毒性),可以在本发明的免疫偶联物中使用,只要它依然能够在靶细胞中易位和EF-2核糖化作用。

[0080] PE的保守修饰变体

[0081] PE的保守修饰变体或它的细胞毒性片段在氨基酸水平与感兴趣的PE(例如PE38)具有至少80%的序列相似性,优选至少85%的序列相似性,更优选地至少90%的序列相似性,并且更优选地至少95%的序列相似性。

[0082] 术语“保守修饰的变体”应用至氨基酸序列和核酸序列。考虑到特定的核酸序列,保守修饰的变体是指以下氨基酸序列,它们编码了相同或基本相同的氨基酸序列,或者如果该核酸不编码一种核酸序列则是指基本相同的核酸序列。由于遗传编码的简并性,大量功能性相同的核酸编码了任一种给定的多肽。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码了氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸被密码子特异化的每个位置上,还可将该密码子变为所说明的任一种对应的密码子,而不改变编码的多肽。这类氨基酸变化是“沉默变化”,它们是保守修饰变化的一个种类。在此编码多肽的每种核酸序列还说明了核酸的每种可能的沉默变化。熟练的技术人员应当认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,它通常是甲硫氨酸的唯一密码子)可以被修饰以产生一种功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变化在每个说明的序列中是固有的。

[0083] 对于氨基酸序列,熟练的技术人员应当认识到,对一种核酸、肽、多肽或蛋白质序列进行的单个取代、删除或添加(这在经编码的序列中改变、增加或删除一个单一氨基酸或小百分数的氨基酸)是一种“保守修饰的变体”,其中该改变导致一种氨基酸被一种化学上相似的氨基酸取代。

[0084] 本发明所采用的绿脓杆菌外毒素可以通过本领域内的普通技术人员所熟知的测定法来测定所希望的细胞毒性水平。因此,PE的细胞毒性片段以及此类片段的保守修饰变体可以很容易测定细胞毒性。大部分候选PE分子可以通过本发明所熟知的方法同时对细胞毒性进行测定。例如候选分子的亚基团可以测定细胞毒性。这些候选分子的阳性反应亚基可以继续再分类并再次测定,直到识别该所希望的一个或多个细胞毒性片段。此类方法允许快速筛选PE的大量细胞毒性片段或保守变体。

[0085] 抗-CD22/PE免疫偶联物

[0086] 在一个实施方案中,感兴趣的多肽包括一种特异性结合CD22的抗体。“CD22”是指

一种属于Ig超家族的限制连接的B细胞抗原。它在60%至70%的B细胞淋巴瘤和白血病中表达,并且不存在于B细胞发育早期阶段的细胞表面或在干细胞上。参见例如Vaickus等人, Crit.Rev.Oncol/Hematol.11:267-297 (1991)。在另一个实施方案中,感兴趣的多肽是一种结合CD22的抗体片段(例如,Fab或scFv)。

[0087] 如在此所使用,提及抗体,术语“抗CD22”是指一种特异性结合CD22 的抗体,并且包括提及一种对抗CD22产生的抗体。在一些实施方案中,该CD22是一种灵长类CD22,例如人类CD22。在一个实施方案中,该抗体被产生以对抗人类CD22,它是通过被一种非灵长类哺乳动物在引入到编码了人类CD22的cDNA的动物中之后而合成的。在另一个实施方案中,感兴趣的多肽是一种CD22抗体免疫偶联物,它包括PE38外毒素。

[0088] CD22/PE38免疫偶联物的一个实例是在国际专利申请公开号W098/41641和W02003/27135、美国专利号7,541,034、7,355,012、以及美国专利号2007/0189962中说明的CAT-8015,所有文献通过引用结合在此。CAT-8015是一种重组免疫毒素蛋白质,由一种基于鼠类抗-CD22抗体RFB4的抗体Fv片段组成,RFB4与一种截短形式的绿脓杆菌外毒素蛋白质PE38融合。抗-CD22Fv片段由两个结构域V_L和V_H组成,其中后一个结构域经修饰以便改进与人类CD22靶点的结合。CAT-8015蛋白质由两种独立的多肽V_L链(SEQ ID NO:2)以及V_H链(在C端融合到PE38结构域(V_H-PE38)上(SEQ ID NO:1))组成。用于本发明的其他V_L和V_H-PE38在US7,541,034、7,355,012以及2007/0189962中说明。两个结构域经设计每个包含工程化处理的丝氨酸残基,它们允许形成一个细胞内二硫键。这种特点增加了该融合蛋白的稳定性。

[0089] CAT-8015的V_H-P38亚单位(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列是以下序列:

[0090]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGQGLTVTS AKASGG **PEGGSLAALTAHQACHLP**
LETFTRRHQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALA
SPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGP
ADSGDALLERNYPTGAEF LGDGGDV SFSTRGTQNWTVERLLQAH RQLEE
RGYV FVG YHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYG
YAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVER
LIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVI PS AIPTDPRNV
GGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:1)

[0091] PE38序列以粗体显示,V_H结构域与PE38结构域之间的五个氨基酸连接物用下划线显示。

[0092] CAT-8015的V_L亚单位(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列是以下序列:

[0093]

MDIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:2)

[0094] 在其他实施方案中,该免疫偶联物的V_H结构域的氨基酸序列是以下各项中的一个:

[0095]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:6)

[0096]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGYNWGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:7)

[0097]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTWGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:8)

[0098]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGSTYGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:9)

[0099]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTWGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:10)

[0100]

MEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYSSYGVLFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:11)

[0101] 在另一个实施方案中,该免疫偶联物的VL结构域的氨基酸序列是以下各项中的一个:

[0102]

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIARYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:12)

[0103]

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIHGYNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:13)

[0104]

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIGRYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:14)

[0105]

MDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRGYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS
NLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

[0106] 在某些其他实施方案中,该免疫偶联物的PE毒素是一种PE或它的变体,它选自以下各项:

[0107] 天然PE

[0108]

AEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRRSSRMSVDP AIADTNGQVLHYSMVLEGGNDALKLAIDNALSITS DGLTIRLEG
GVEPNKPVRYSYTRQARGSWSLNWLVP IGHKEPSNIKVF IHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDATFFVR
AHESNEMQPTLAISHAGVSVMMAQTQPRREKRWSEWASGKVLCLDPLDGVVNYLAQQRCLDDTWEGKIYRVLGN
PAKHDLDIKPTVISHRLHFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQV
DQVIRNALASPGSGDLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFL
GDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALA
YGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETI

LGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:16)

[0109] PE40

[0110]

GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAI
REQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAANADVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGD
VSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQ
DQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPL
AERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:17)

[0111] PE38

[0112]

GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAI
REQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLL
LQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALL
RVYVPRSSSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPR
NVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:18)

[0113] PE35

[0114]

MWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTG
NDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQS
IVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGE
VERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQ
PGKPPREDLK (SEQ ID NO:19)

[0115] PE-LR

[0116]

RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQ
DLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPL
RLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
(SEQ ID NO:20)

[0117] PE-LR-6X

[0118]

RHRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQHRQLEEGGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQ
DLDAIWAGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPRSSSLPGFYATSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPL
RLDAITGPEEAGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDSEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
(SEQ ID NO:21)

[0119] PE-38 (CAT-8015)

[0120]

PEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGE
AIREQPEQARLALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTV
RLLQHRQLEERGYVFGYHGTFLAAQSI VFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGA
LLRVYVPRSSSLPGFYRTSLTLAAPEAAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTD

PRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPREDLK (SEQ ID NO:22)

[0121] 该免疫偶联物的PE毒素与VH或VL结构域直接融合或偶联或经由该VH或VL结构域的N端或C端的连接物直接融合或偶联。连接物的一个实例是以上针对CAT-8015所说明,并且对应着氨基酸序列KASGG (SEQID NO:23)。额外的连接物可容易地通过本领域已知的技术产生。

[0122] PE免疫偶联物的表达

[0123] 本发明的PE免疫偶联物表达于细胞中,例如细菌细胞,并且接着从包涵体中分离。之后,使用下游纯化步骤将从包涵体中分离的PE免疫偶联物进一步纯化。

[0124] 各种宿主表达载体系统可被利用以表达本发明的PE免疫偶联物。此类宿主表达系统代表着通过其可以产生并随后纯化感兴趣的编码序列的载体,但还代表当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,原位表达本发明的一种抗体分子的细胞。这些包括但不限于:微生物,例如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA转化的细菌(例如,大肠杆菌、枯草杆菌)、质粒DNA或粘粒DNA表达载体;用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母菌属、毕赤酵母属);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体感染的昆虫细胞体系(例如杆状病毒);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体感染的载体(例如,花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒、TMV)或用重组质粒表达载体转化的植物细胞系统;或包含重组表达结构体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BLK、293、3T3细胞),这些结构体包含衍生自哺乳动物基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或衍生自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。

[0125] 编码VL和VH-PE各个毒素(例如VH-PE38)多肽的DNA通过本领域所熟知的技术导入一种表达载体中。

[0126] “载体”是指用于将一种核酸克隆和/或转移至一种宿主细胞中的任何运载体。载体可以是可能与另一个DNA片段附接于其上的复制子,这样以便产生附接片段的复制。“复制子”是指以下任意一种遗传因子(例如,质粒、噬菌体、粘粒、染色体、病毒),它充当DNA体内复制的自动单元,即在其自我控制下能复制。术语“载体”包括用于在体外、活体外或体内将该核酸引入细胞中的运载体。可以使用本领域熟知的大量载体,以便操作核酸,将响应元件和启动子(例如可诱导的启动子)整合至基因中等等。可能的载体包括例如质粒,例如pBR322或pUC质粒衍生物,或Bluescript载体。例如,将对应于响应元件和启动子的DNA片段插入一种合适的载体能伴随着将合适的DNA片段连接至具有互补结合端的一种选定载体。可替代地,DNA分子的末端可以被酶催化修饰或者任意位点通过将核苷酸序列(连接物)连接至该DNA末端中而产生。此类载体可进行工程化处理,以便含有可选择的提供细胞选择的标记基因。此类标记允许识别和/或选择宿主细胞,这些细胞表达了该标记所编码的蛋白质。

[0127] 术语“表达载体”是指一种载体、质粒或运载体,它被设计成能在插入的核酸序列易位至宿主之后将其表达。该经克隆的基因(即所插入的核酸序列)例如编码抗CD22VH、抗CH22VL、或抗CD22VH或VL、与一种PE毒素相融合的基因,通常在控制元件的控制下(例如启动子、最小启动子、增强子或类似物)被安置。起始控制区或启动子(它们用于驱动核酸在所希望的宿主细胞中的表达)很多,并且是本领域的普通人员所熟悉的。能驱动这些基因表达的基本上任何一种启动子可用于表达载体中,包括但不限于:病毒启动子、细菌启动子、动

物启动子、哺乳动物启动子、合成启动子、组成型启动子、组织特异性启动子、发病机制或疾病相关启动子、发育特异性启动子、可诱导的启动子、光调节的启动子；包括但不限于：SV40早期(SV40)启动子区、包含在劳氏肉瘤(RSV)的3'长末端重复(LTR)中的启动子、腺病毒(Ad)的E1A或主要晚期启动子(MLP)、人类巨细胞病毒(HCMV)主要即刻早期启动子、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)启动子、IE1启动子、延伸因子1 α (EF1)启动子、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子、泛酸C(Ube)启动子、球蛋白启动子、小鼠金属硫蛋白-L启动子和转录控制区的调节序列、广谱表达型启动子(HPRT、波形蛋白、 β -肌动蛋白、微管蛋白以及类似物)、中间纤维的启动子(结蛋白、神经丝蛋白、角蛋白、GFAP以及类似物)、治疗剂(MDR、CFTR或因子VIII类型以及类似物)的启动子、发病机制或疾病相关的启动子此外,这些表达序列可以通过增加增强子或调节性序列以及类似物来修饰。

[0128] 术语“表达”是指由一个编码序列所编码的产物的生物产生。在大多数情况下,DNA序列(包括编码序列)被转录形成信使RNA(mRNA)。然后,该信使RNA被翻译形成一种具有相关生物活性的多肽产物。而且,表达过程可涉及进一步加工步骤至RNA产物的转录,例如剪接去除内含子、和/或一种多肽产物的转录后加工。

[0129] VL和VH-PE38多肽表达于细胞中,例如细菌细胞,例如大肠杆菌中。这些多肽表达于例如大肠杆菌中,并从包涵体中分离。在某些实施方案中,VL和VH-PE38亚单位表达于不同的细胞中。例如,VL表达于一个细胞中的一个第一载体上,而VH-PE38表达于一个不同细胞中的一个第二载体上。来自每种细胞系的包涵体被回收并溶解。在某些实施方案中,这些包涵体在约9.0至约10.5的pH范围内被溶解。在其他实施方案中,这些包涵体在pH9.0、pH10.0或pH10.5被溶解。将这些溶解的VL和VH-PE38包涵体合并,从而形成包含这些VL和VH-PE38亚单位的一种免疫偶联物。

[0130] 在其他实施方案中,这些VL和VH-PE38亚单位表达于相同细胞的不同载体上,例如VL表达于一个细胞中的一个第一载体上,而VH-PE38表达于相同细胞中的一个不同载体上。来自该细胞的包涵体被回收,溶解,并且将VL和VH-PE38亚基合并以形成一种免疫偶联物。在某些其他实施方案中,VL和VH-PE38亚基表达于相同细胞中的相同载体上。

[0131] 利用下游色谱步骤以便进一步纯化这种免疫偶联物。

[0132] 色谱条件

[0133] 正如本领域所理解,用于本发明的色谱的上样、洗涤以及洗脱条件应当取决于所使用的特定色谱介质/配体。当然,本发明的过程联合使用了其他蛋白质纯化方法学,例如盐沉淀、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法、反相液相色谱、或其他常规使用的蛋白质纯化技术。然而,考虑到本发明的过程应当消除或显著降低其他纯化步骤的需要。

[0134] 在所感兴趣多肽的色谱分离过程中还进行了阴离子交换色谱。如本领域所熟知,考虑到基质以及所附接的带电基团,阴离子交换物可以基于不同材料。例如,可以使用以下基质,其中所提及的材料可能或多或少发生交叉连接:基于琼脂糖的(例如SEPHAROSE Fast Flow[®](例如Q-SEPHAROSE FF)、以及SEPHAROSE High Performance[®];基于纤维素的(例如DEAESEPHACEL[®]);基于硅石和基于合成聚合物的、或树脂例如SuperQ-650(来自TOSOH BIOSEP)以及Macro High Q(来自BIO-RAD)。对于阴离子交换树脂,共价地附接至基质上的带电基团可以是例如二乙氨乙基(DEAE)、季氨乙基(QAE)、和/或季铵(Q)。在某些实施方案中,该树脂选择下组,该组包括但不限于:Q Sepharose High Performance、Q Sepharose

Fast Flow、DEAE Sepharose Fast Flow、Capto Q、Capto DEAE、Toyopearl SuperQ650 (M)、Toyopearl SuperQ650 (S)、Toyopearl DEAE650 (M)、Toyopearl DEAE650 (S)、TSKgel SuperQ-5PW (30)、TSKgel SuperQ-5PW (20)、TSKgel DEAE-5PW (30)、TSKgel DEAE-5PW (20)、EMD Chemicals: Fractogel EMD DEAE (S)、Fractogel EMD DEAE (M)、Fractogel EMD DMAE (S)、Fractogel EMD DMAE (M)、Fractogel EMD TMAE (S)、Fractogel EMD TMAE (M)、以及 Baker Bond XWP500 PolyQuat-35、SPE。在本过程的一个实施方案中,所采用的阴离子交换树脂是 Q-SEPHAROSE FF[®]。

[0135] 尽管任意一个这些树脂可以用于抗体的小规模纯化,但某些尺寸的树脂以及较低的成本易于进行生产规模的分离。如果该树脂的尺寸太小,则在该系统中产生相当大的后压力。此外,能纯化的多肽的量值是受限的。如果该树脂制作或购买成本太高,则它在大规模纯化使用时并不经济适用或具有操作性。

[0136] 因此,在本发明中所使用的树脂必须具有某一尺寸以便提供有效的按比例放大而无需过高的成本。“制造水平的纯化”意味着在满足商业规模生产的规模上对来自一种重组制剂的抗体的纯化。在预先确定步骤中所使用的树脂应当与用于制造水平的最终实验方案所使用的树脂相同,因为如果改变了树脂,人们可能不容易预测分离这些聚集体所必须的条件变化。用于小规模或实验室规模纯化的特定树脂可能不易于大规模纯化。用于本发明的这类树脂包括:例如 Q-SEPHAROSE HP。然而,熟练的技术人员将识别出用于商业规模生产的其他阴离子交换树脂。

[0137] 当填充阴离子交换色谱柱时所使用的树脂柱由该柱的尺度来反映,即该柱的直径以及树脂的高度,并且根据以下因素变化,例如在所应用的溶液中抗体的量值以及所使用树脂的结合能力。

[0138] 在进行阴离子交换色谱之前,该交换树脂可以用一种缓冲液平衡。各种缓冲液中的任意一种适用于交换树脂的平衡,例如醋酸钠、磷酸钠、三羟甲基氨基甲烷、TRIS、磷酸盐、双-TRIS 以及 L-组氨酸。本领域熟练的技术人员应当理解,可以将很多其他缓冲液用于平衡,只要所应用的抗体溶液 pH 和导电率是大约相同的。当进行“结合-冲洗”(bind-washout)过程时,平衡缓冲液和洗涤缓冲液是相同的。当进行“结合-洗脱”过程时,洗脱缓冲液可以由一种或多种缓冲液物质制成,以便控制 pH。所使用的盐是例如一种高溶解度盐,例如氯化钠或磷酸钾,但可以使用维持了该抗体的功能性并且允许将该抗体单体从该树脂中去除的任何盐。

[0139] 在进行“结合-洗脱”过程时,该抗体单体从该树脂中的洗脱是用一种基本上非变性缓冲液进行的,该缓冲液具有的 pH 和离子强度足以有效地洗脱该单体抗体,由此将含有抗体的洗脱液回收,同时留下与该树脂结合的聚集体。在本文中,有效洗脱意思是上样至该树脂上的抗体的至少 75%,或至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 95% 被回收。在离子交换后,仅约 1.0%、优选仅 0.5%、最优选小于 0.1% 的聚集体留在抗体制剂中。

[0140] 在一个实施方案中,洗脱作为一种梯度分步洗脱来进行。在另一种实施方案中,洗脱按照线性梯度进行。

[0141] 出人意料地,这些免疫偶联物蛋白质的脱酰胺化变体在较高盐浓度下洗脱,尽管由于一个天冬酰胺残基的脱酰胺化作用造成负电荷明显净增加。因此,这些效力降低的变体通过在此说明的离子交换色谱从更具活性的蛋白质中分离。

[0142] 在本发明的某些实施方案中,在纯化过程中去除了该多肽或该免疫偶联物的起始样品中存在的酸性或脱酰胺化的变体的约75%至约99%。在其他实施方案中,去除了该酰胺化变体的至少75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%。因此,包含该活性多肽或免疫偶联物的组合物具有至少在约25%至约1%之间的脱酰胺化的种类,例如小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。

[0143] 本发明的脱酰胺化的变体包括包含一种PE毒素或它的变体的免疫偶联物,其中脱酰胺化作用发生在该免疫偶联物中的一个或多个残基上,例如在该PE毒素或它的变体中的一个或多个残基上。在某些实施方案中,脱酰胺化作用发生在该免疫偶联物中的1、2、3、4或5个残基上。在其他实施方案中,包括一种PE毒素或它的变体的免疫偶联物在该PE毒素或它的变体中的1、2、3、4或5个残基上脱酰胺化,例如在SEQ ID NO:1的位置358、在SEQ ID NO:16的位置495、在SEQ ID NO:17的位置243、在SEQ ID NO:18的位置227、在SEQ ID NO:19的位置200、在SEQ ID NO:20的位置212、在SEQ ID NO:21的位置212或SEQ ID NO:22的位置229。

[0144] 在一个实施方案中,该洗脱缓冲液的盐浓度足够高,以便从该树脂中替换抗体单体而不替换聚集体。然而,应当理解,可以使用pH增加和更低的盐浓度以便将抗体单体从该树脂洗脱。

[0145] 本发明的任意或所有色谱步骤可以通过任意一种机械手段进行。例如可以在柱子中进行色谱法。该柱可以在具有或没有压力下从上到下或从下到上运行。在该色谱过程中,柱子中的液体流动方向可以反向。色谱还可以使用其中固体介质从所使用的液体分离的批次过程进行,以便通过任何适宜的手段(包括重力、离心或过滤)上样、洗涤并洗脱。色谱还通过将样品与一种过滤器相接触而进行,与其他的分子相比该过滤器更强地吸收或保留了样品中的某些分子。在以后的说明中,本发明的各个实施方案在柱子中进行的色谱环境下进行说明。然而,应当理解,使用柱子仅仅是可以使用的数个色谱模型中的一个,并且使用柱子的本发明的阐述不仅限于将本发明应用至柱色谱,因为本领域熟练的技术人员还可以容易地将这些传授内容应用至其他模型,例如使用批次过程或过滤器的模型。

[0146] 可以使用各种不同的上样、洗涤和洗脱条件,正如所希望的。在一些实施方案中,将初始上样条件改变,这样从初始非HT洗脱的蛋白质(例如,抗体)直接应用至HT柱。

[0147] 洗脱可以例如通过改变液相中的盐条件而实现。例如,该液相的盐和/或导电率被(线性或分布)增加至抗体洗脱的点。示例性洗涤条件包括例如10mM磷酸盐,pH6.7,其中洗脱通过(分布或按照线性方式)增加盐浓度实现(例如,增加至10mM磷酸盐,1.5M NaCl,pH6.7)。在此说明的所有各个实施方案或任选项可以在任一或所有变体中组合。

[0148] 在将样品应用至柱子之前,该柱可以用即将用于色谱分析蛋白质的缓冲液或盐进行平衡。如以下所讨论,色谱(以及有待纯化的蛋白质上样)可以在各种缓冲液或盐类中发生,包括钠盐、钾盐、铵盐、镁盐、钙盐、氯化物盐、氟化物盐、醋酸盐、磷酸盐、和/或柠檬酸盐和/或Tris缓冲液。本领域熟练的技术人员由于方便处理而优选柠檬酸盐缓冲液和盐类。此类缓冲液或盐类可以具有至少约5.5的pH。在一些实施方案中,平衡可以在包含Tris或一种磷酸钠缓冲液的溶液中进行。在一些实施方案中,平衡在至少约5.5的pH下发生。平衡可以在约6.0与约8.6之间的pH,优选在约6.5与7.5之间的pH发生。最优选地,该溶液包括浓度为约25毫摩尔并且pH为约6.8的磷酸钠。

[0149] 本发明的蛋白质纯化过程可适用于从任一蛋白质中去除一种酸性变体。特异性地

考虑用于本发明的一些蛋白质包括抗体或它们的变体。其他蛋白质包括但不限于：重组融合蛋白质，包括一个或多个恒定抗体免疫球蛋白结构域，任选地一种抗体的Fc部分，以及一种感兴趣的蛋白质。

[0150] 配制品

[0151] 经纯化的多肽或免疫偶联物的配制品通过将本发明的一种经纯化的多肽或免疫偶联物与一种药学可接受的运载体（例如，载体，赋形剂）相结合而制备，用于储存和使用（Remington, The Science and Practice of Pharmacy [配药科学与实践] 第20版 Mack Publishing (马克出版公司), 2000)。合适的药学可接受的运载体包括但不限于：非毒性缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；盐类，例如氯化钠；抗氧化剂，包括抗坏血酸以及蛋氨酸；防腐剂（例如，十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚，丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯，例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；以及间甲酚）；低分子量多肽（例如，小于约10个氨基酸残基）；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；碳水化合物，例如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如EDTA；糖类，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐反离子，例如钠；金属复合物（例如，锌-蛋白复合物）；以及非离子表面活性，例如TWEEN或聚乙二醇（PEG）。

[0152] 本发明的抗体和/或免疫偶联物组合物（即连接至抗体的PE）尤其用于胃肠外给药，例如经脉给药或给药至体腔或器官的内腔。用于给药的组合物通常包括溶解于一种药学上可接受的载体（优选一种水性载体）中的抗体和/或免疫偶联物溶液。可以使用各种水性载体，例如缓冲性盐水以及类似物。这些溶液是无菌的并且通常不含令人不希望的物质。这些组合物可以通过常规的、熟知的灭菌技术来灭菌。这些组合物可以包含药学上可接受的助剂物质，正如大致生理条件下所要求的，例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂以及类似物，例如醋酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠以及类似物。这些配制品中融合蛋白的浓度可以广泛地变化，并且应当主要基于以下条件选择：流体体积、粘度、体重以及符合所选特定的给药方式以及病人需求的类似物。

[0153] 因此，一种用于静脉给药的典型药学免疫偶联物组合物应当是每天约0.3至约50 μ g/kg，尤其是每天20-50 μ g/kg的总体治疗，其中剂量优选连续给药或每天分配（allocate）三次。用于制备可给药的组合物的实际方法对于本领域的普通技术人员而言应当是已知或明显的，并且在诸如雷明顿的医药科学（Remington's Pharmaceutical Science）19th ed., Mack Publishing Company (马克出版公司)，宾夕法尼亚州伊斯顿市（Easton）（1995）的出版物中更加详细地描述。

[0154] 可以给予包括本发明的免疫偶联物的组合物用于治疗性治疗。在治疗性应用中，将组合物给予患有疾病的患者，其量值足以治疗或至少部分地停止疾病以及其并发症。足够实现以上的量值被定义为一个“治疗有效性剂量”。有效用于此用途的量值应当取决于疾病的严重程度以及病人总体健康状况。

[0155] 可以进行这些组合物的单一或多次给药，这取决于如该病人所要求并且耐受的剂量和频率。在任意情况下，该组合应当提供足够量值的本发明的蛋白质，以便有效地治疗病人。该剂量可以每隔一天一天三次给药或每隔一天连续给药持续一个周期（例如21天），但

可以周期性地应用,直至达到一种治疗效果或直到副作用使得治疗中断。通常,该剂量应当足以治疗或改善疾病的症状或迹象,而不会对病人产生不可接受的毒性。该化合物的有效量值是以下值,它提供了一种或多种症状的主观性缓解或一种客观可识别的改进,正如临床医生或其他有资质的观察者所指出的。

[0156] 在一个实施方案中,该免疫偶联物被配制成一种药物组合物,它包含至少一种可接受的赋形剂。药学上可接受的CAT-8015免疫偶联物配制品包括在25mM磷酸钠、4%蔗糖、8%甘氨酸、0.02%聚山梨醇酯80 (PS80)、pH7.4中的0.5mg/mL至2.5mg/mL CAT-8015,通常1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL或1.5mg/mL。在额外的实施方案中,磷酸钠可以是在20mM至100mM、25mM至50mM、或25mM至35mM的范围内;蔗糖可以是在2%、3%、4%、5%或6%;甘氨酸可以是在5%–10% 的范围内,通常是5%、6%或7%;聚山梨醇酯80可以是在从约0.01%至约1%的范围内,通常是0.01%、0.02%、0.03%、0.04%或0.05%;其中pH在6.5至8.0的范围内,通常在pH7.2、7.3、7.4、7.5或7.6。还可以利用本领域的普通技术人员已知的其他缓冲剂。

[0157] 在本发明的某些实施方案中,该配制品被冷冻干燥。术语“冷冻干燥”是指通过快速冷冻并脱水的干燥形式、在高真空条件下在冷冻状态下制备的任一组合物或配制品。“冷冻干燥”或“冷冻干燥作用”是指冷冻并且干燥一种溶液的过程。经冷冻干燥的配制品或组合物经常即配即用或通过加入无菌的蒸馏水进行复水。在某些实施方案中,本发明的经冷冻干燥的配制品被复水至小瓶中。

[0158] 对于静脉给药而言,本发明的配制品例如一种液体配制品或从一种经冷冻干燥的配制品复水的配制品被置于小瓶中,其中配制品中的免疫偶联物按照以上说明的浓度存在。该配制品从小瓶中取出并且加入至一种静脉(IV)袋溶液中,其中该IV袋含有从约30mL至约100mL溶液,通常是50mL、60mL、70mL或80mL。还可以将一个分开的IV袋“保护溶液”加到IV袋的总体积中,其中该保护性溶液包含某一量值的聚山梨醇酯80,这样使得在最终IV袋溶液中存在的聚山梨醇酯80是在0.001%至约3%的聚山梨醇酯80的范围内,通常在约0.01%至约0.1%的范围内,并且更通常是0.01%、0.02%、0.03%、0.04%或0.05%。该保护性溶液可以在小瓶中提前配制,这样使得聚山梨醇酯80的浓度是约0.5%至约5%,并且可以是0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%或5.0%。该保护性溶液阻止免疫偶联物或药物(例如,CAT-8015)吸收至IV袋的接触表面,由此阻止或抑制该免疫偶联物或药物在给药过程中贴于该IV袋上并且允许该病人接受适当剂量的免疫偶联物或药物。该IV袋溶液可以通过输注给病人而给药用于不同的持续时间,通常是30分钟至1小时,通常30分钟。

[0159] 本发明的免疫偶联物以及配制品的不同用途包含于由特定人类细胞造成的各种疾病病况,这些细胞可以通过该蛋白的毒性作用而被消除。本发明的免疫偶联物的一个应用是用于治疗表达CD22的B细胞恶性肿瘤或恶性B细胞。示例性B细胞恶性肿瘤包括慢性B淋巴细胞性细胞(B-CLL)、儿童急性淋巴细胞白血病(pALL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)以及毛细胞白血病(HCL)。

[0160] 本申请中所引述的所有文件、专利、期刊论文和其他材料通过引用结合在此。

[0161] 尽管本发明已经结合它的几个实施方案、参考附图充分地进行说明,应当理解的是各种变更和修改对于本领域的普通人员而言可以是明显的。此类变更和修改应当被理解为如同包含在本发明的范围之内,正如所附权利要求所定义,除非它们与其背离。

[0162] 实例

[0163] 实例1.CAT-8015的表达、回收和包涵体分离

[0164] 进行了包含CAT-8015VL和CAT-8015VH-PE38表达载体的不同细胞系的发酵。通过连续离心来收获发酵物。将发酵收获物在2°C-8°C下以每分钟0.5至0.8L速率通过一个连续离心机,并且在大约15,000rpm速度下进行离心。离心后,将细胞团浆(paste)在小于等于70°C冷冻。

[0165] 在此处理之后,将VH-PE38和VL细胞团浆在2°C至8°C下融化12至24小时。细胞被裂解,释放包含VL和VH-PE38产物的包涵体。随后,将得到的包涵体溶解并且获得V_H-PE38和V_L产物。

[0166] 使用30kDA超滤中空纤维筒,将产物浓缩至大概1mg/mL(通过考马斯亮蓝总蛋白测定法确定)。然后,用5至6体积的20mM Tris、100mM尿素pH7.4将滞留物透析过滤,以便实现2.5至3.0mS/cm的导电率。该产物在2°C至8°C储存达到72小时。

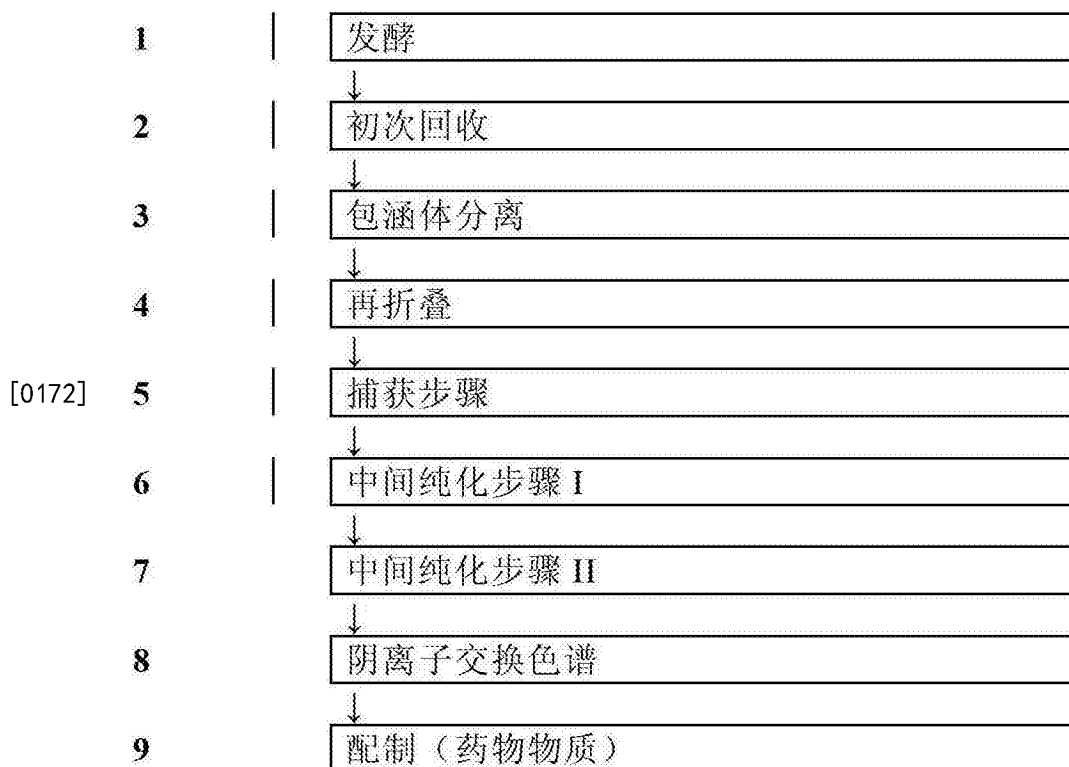
[0167] 实例2.通过阴离子交换色谱用高效树脂进行的活性CAT-8015的分析规模纯化

[0168] V_H-P38亚单位的表达导致该亚单位的一个脱酰胺化变体的形成。发现该酰胺化作用发生在免疫偶联物的PE38部分。V_H-P38亚单位的脱酰胺化作用导致CAT-8015蛋白质的效力降低。出人意料地,以下说明的色谱条件成功地去除了该脱酰胺化的变体,由此提供了在纯化过程中去除非活性 种类的能力。因为该脱酰胺化作用发生在该融合结构体的PE38部分,所以这些色谱条件可以用于将一种PE偶联物的任一脱酰胺化变体去除。

[0169] CAT-8015从分离的包涵体中复性,并且随后通过一个4柱过程纯化。表1提供了复性与纯化单元操作的概括。

[0170] 表1-CAT-8015产物流程图

[0171] 步骤单元操作



[0173] 图1显示了CAT-8015参比标准品样品的分析离子交换色谱法(chromotagrophy)

(IEC) 曲线。如在曲线中所显示,前峰出现在主峰洗脱之前。对从IEC中洗脱的各个馏分检测CAT-8015相对于一种参比标准品的生物活性,使用了一种凋亡生物测定法,它测量了测试样品诱导表达CD22受体的Daudi细胞系剂量依赖性凋亡死亡的能力。一旦结合CD22并且内化,CAT-8015诱导Daudi细胞经由Caspase3/7进行凋亡,它能通过Caspase-GloTM3/7测定系统测量。该测定样品的效力通过测定样品的EC50除以参比标准品的50%有效浓度(EC50)来确定。凋亡生物测定的结果显示,CAT-8015的相对效力与CAT-8015的前峰百分数有关联,如图1所显示。图2显示了该相对效力与前峰百分数之间的相关性。

[0174] 将来自多个IEC分析的前峰馏分和主峰馏分收集,汇集并进行肽图谱分析以及液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)分析。将结果与从肽图谱分析以及经纯化的CAT-8015的LC-MS/MS实验所获得的结果进行对比。经纯化的CAT-8015药物物质的分析显示Asn-358被部分地脱酰胺化成Asp-358和同-Asp-358(表2)。发现Asp-358和同-Asp-358显著地富集在前峰馏分,而主峰馏分富集了完整的CAT-8015(表2)。结合起来,这些结果显示在Asn-358进行脱酰胺化作用导致一种基于细胞的生物测定的相对效力受到损失。Asp-358残基存在于该免疫偶联物的PE毒素部分,由此说明包含一种PE毒素或它的变体的免疫偶联物(其中存在Asp-358)应当很可能经受脱酰胺化作用并且经受效力或活力的降低。

[0175] 表2:

[0176] 氨基酸358基于肽图谱分析以及LC-MS/MS在CAT-8015药物底物、前峰馏分和主峰馏分的分配

[0177]

氨基酸	药物物质 (%)	前峰 (%)	主峰 (%)
N358	78.1	3.1	88.9
D358	11.9	44.0	2.2
同-D358	10.0	52.9	8.9

[0178] D358=脱酰胺化的Asn-358;同-D358=同-脱酰胺化的Asn-358;N358=Asn-358。

[0179] 来自完整CAT-8015的脱酰胺化CAT-8015的分离是通过阴离子交换色谱使用强离子交换基团而实现,这些基团例如Q(季氨基)偶联到小直径树脂例如Source15(颗粒直径:15 μ m;GE Healthcare)以及Sepharose HighPerformance(颗粒直径:34 μ m;GE Healthcare)上。生物制造过程中小直径色谱树脂的应用被典型操作条件下产生的显著反压力复杂化,正如柱子的几何结构、流速以及缓冲液组合成所限定。基于这些考虑以及高分辨率色谱步骤的要求,选择Q Sepharose High Performance用于将脱酰胺化CAT-8015与完整CAT-8015分离。发展了色谱条件,这些条件实现了高分辨率,同时在不同制造规模上维持操作能力。

[0180] 实例3.CAT-8015的实验室规模纯化

[0181] 该柱首先用5柱子体积(CV)的缓冲液C(预先平衡/剥离(strip)缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0、1.0M NaCl)预先平衡,并且随后用5倍CV的缓冲液A(平衡缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0)以100cm/hr的线性流动速率平衡。该色谱树脂是Q Sepharose High Performance(QHP,GEHealthcare),在Millipore Vantage柱中,2.2cm x19.5cm,并且在AKTAExplorer上运行。制备中间纯化产物池用于通过用10体积的缓冲液A进行透析过滤,使用10kDa MWC0膜上样至该高效阴离子交换柱上。将经透析过滤的疏水性相互作用产物池上样至QHP柱上,线性流速为100cm/hr,之后跟随用缓冲液A以相同的流速进行2倍CV的再次平

衡步骤。CAT-8015用10倍CV的线性梯度(从35%缓冲液B(洗脱缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0、500mM NaCl)至55%缓冲液B)以100cm/hr的线性流速洗脱。在280nm监测洗脱产物。收集馏分,并通过分析离子交换色谱(IEC)分析%前峰。将含有小于25%前峰的馏分汇集。通过分析IEC在强阴离子交换柱上对QHP池分析%前峰。通过凋亡生物测定测量相对效力,如以上所说明。

[0182] 在pH8.0,CAT-8015强效地与阴离子交换树脂结合,其中在流动通过的馏分中通过A280处的吸收没有检测到蛋白质。在用Tris/HCl,pH8.0中的175mM NaCl的首次洗涤步骤之后,CAT-8015按照从35%B(在Tris/HCl,pH8.0中的175mM NaCl)至55%B(在Tris/HCl,pH8.0中的275mM NaCl)的线性盐梯度从该柱子洗脱。CAT-8015从柱子在39%B(在Tris/HCl,pH8.0中的192mM NaCl)与49%B(在Tris/HCl,pH8.0中的245mM NaCl)之间洗脱。图3显示了CAT-8015的QHP色谱曲线。

[0183] 通过分析IEC来分析馏分。表3显示了在44.5%(223mM NaCl)与47.2%(236mM NaCl)之间洗脱的馏分结果。

[0184] 表3:

[0185] 收集的QHP馏分的IEC分析

[0186]

馏分编号	%前峰 ^a	%主峰
C12	41.0	59
D12	34.5	65.5
D11	27.0	73
D9	17.6	82.4
D7	15.9	84.1
D5	18.7	81.3
D3	21.9	78.1

[0187] ^a前峰包含大于90%的脱酰胺化的CAT-8015。

[0188] 表3显示了按照一种盐梯度洗脱模式操作的阴离子交换色谱能够将脱酰胺化的CAT-8015以一种有效的方式从完整CAT8015中分开。

[0189] 出人意料地,完整CAT-8015以一种更高盐浓度被洗脱,尽管由于一个天冬酰胺残基的脱酰胺化作用使得负电荷明显净增加。该结果与通过IEC观察到的色谱曲线相一致。将含有CAT-8015的样品注射到一个分析阴离子交换柱(PL-SAX,Varian)中,该柱在pH8.0时用Tris/HCl缓冲液体系平衡并通过一个步骤以及与多个梯度洗脱步骤的组合洗脱(图1)。

[0190] 根据小于25%前峰含量的汇集(pooling)标准,合并馏分。通过SDS-PAGE、分析IEC和凋亡生物测定对QHP池分析%前峰以及相对效力。如图4所显示,SDS-PAGE分析显示QHP上样池和洗脱样品含有高纯化的CAT-8015。然而,QHP上样池不能满足通过IEC和生物活性对纯度的目标规格。与QHP洗脱液池相对比,QHP上样池的纯度和效力测量值,正如以下表4所展示,显示使用QHP的阴离子交换色谱步骤导致通过CAT-8015的IEC和相对效力在纯度方面显著增加。从中间纯化步骤II中产生QHP上样池。

[0191] 表4:

[0192] 通过IEC和生物活性测量的CAT-8015纯度

[0193]

步骤	%前峰	%主峰	相对效力(%)
QHP上样池	53.8	46.2	52
QHP洗脱液池	16.5	83.8	80

[0194] 随后将QHP产物池透析过滤至配制品缓冲液中,以产生CAT-8015药物物质。

[0195] 因此,制造CAT-8015药物物质要求将脱酰胺化的CAT-8015从活性CAT-8015中分离。使用高效树脂(例如QHP)的阴离子交换色谱将脱酰胺化的CAT-8015从完整CAT-8015中分离并且增加对目标规格的生物活性是成功进行CAT-8015药物物质的先决条件。

[0196] 实例4.CAT-8015的大规模纯化

[0197] 该柱首先用5倍CV的缓冲液C(平衡/剥离缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0、1.0M NaCl)预先平衡,线性流速为66cm/hr,并且随后用5倍CV的缓冲液A进行平衡,线性流速为76cm/hr。该色谱树脂是Q Sepharose HighPerformance(QHP,GE Healthcare),在BP300, 30cm x22cm柱床中,在K Prime仪器上运行。制备中间纯化产物池用于通过用10体积的缓冲液A(平衡缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0)进行透析过滤、使用10kDa MWC0膜而上样至该高效阴离子交换柱上。将经透析过滤的产物池上样至QHP柱上,线性流速为64cm/hr,之后跟随使用缓冲液A以76cm/hr的2倍CV再平衡步骤。CAT-8015用10倍CV线性梯度(从35%缓冲液B(洗脱缓冲液:10mM Tris/HCl、pH8.0、500mM NaCl)至55%缓冲液B),以76cm/hr的线性流速洗脱。在280nm监测产物的洗脱。收集馏分,并通过分析离子交换色谱(IEC)分析%前峰。将含有小于25%前峰的馏分汇集。通过分析IEC在强阴离子交换柱上对QHP池分析%前峰。通过凋亡生物测定来测量相对效力。

[0198] 如以上所说明进行CAT-8015的大规模阴离子交换色谱。由于设备限制,以降低的流速进行QHP纯化。以22.3mS/cm与26.4mS/cm之间的导电率将CAT-8015从该柱中洗脱。图5显示了根据以上所说明的方法而纯化的CAT-8015的QHP色谱曲线。

[0199] 通过分析IEC分析馏分。表5显示了以23.8与25.4mS/cm之间的导电率洗脱的馏分结果。表5显示按照一种线性盐梯度洗脱模式操作的阴离子交换色谱能够将脱酰胺化的CAT-8015从完整CAT-8015中分离。将脱酰胺化的CAT-8015从完整CAT-8015中分离在小于2mS/cm的导电率范围内发生。

[0200] 表5

[0201] 收集的馏分%前峰纯度的IEC分析

[0202]

馏分	%前峰	%主峰
1	55.1	44.9
2	39.0	61
3	30.1	69.9
4	25.1	74.9
5	18.7	81.3
6	14.7	85.3
7	16.4	83.6

[0203] 根据小于25%的前峰含量汇集指标将馏分4至7合并。通过SDS-PAGE以及SEC、分析

IEC以及凋亡生物测定,对QHP池分析%前峰以及相对效力。SDS-PAGE分析,如图6中所示,显示了QHP上样池以及含有洗脱样品的高纯化的CAT-8015。然而,该QHP上样池不能满足通过SEC、IEC以及相对效力对纯度的目标规格。与QHP洗脱液池相比,QHP上样池的纯度和效力测量值,正如以下表6和7所展示,显示了使用QHP的阴离子交换色谱步骤导致通过CAT-8015的SEC、IEC和相对效力在纯度方面的显著增加。从中间纯化步骤II中产生了QHP上样池。

[0204] 表6

[0205] 通过SEC测定的CAT-8015纯度

[0206]

步骤	%单体	%聚集体	%其他
QHP上样池	92.7	0.7	6.6
QHP洗脱液池	99.0	1.0	0

[0207] 表7

[0208] 通过IEC和生物活性测定的CAT-8015纯度

[0209]

步骤	%前峰	%主峰	相对效力(%)
QHP上样池	50.3	49.7	51
QHP洗脱液池	17	83	75

[0210] 随后,将该QHP产物池透析过滤至配制品缓冲液中,以便产生CAT-8015药物物质。

[0211] 实例2至4显示了使用树脂(例如Q Sepharose High Performanc)的阴离子交换色谱将脱酰胺化的CAT-8015从完整CAT-8015中分离的能力,以及增加其满足目标规格的相对效力的能力(见表4和6)。脱酰胺化的CAT-8015通过一个额外的负电荷而与完整CAT-8015相区别。与阴离子交换柱的预期洗脱行为相比,脱酰胺化CAT-8015中的大部分在盐梯度洗脱条件下先于完整CAT-8015洗脱(见表3和5)。在分析规模、实验室规模以及大规模的阴离子交换色谱法条件下观察到这种未预期的洗脱方式。这种洗脱方式是未预期的,因为线性高盐洗脱缓冲液预期将造成该变体的一个更高负电荷。因此,实例2至4显示使用一种线性洗脱缓冲液,可以使用阴离子交换色谱法将一种脱酰胺化种类从活性免疫偶联物中去除。将脱酰胺化CAT-8015从完整CAT-8015中分离发生在一个特定的导电率范围内,强化了对于高分辨阴离子交换树脂、仔细控制洗脱条件以及加工过程中测试所收集馏分的需要。

[0212] 实例5. 修改CAT-8015配制品的生物活性

[0213] 通过将特定量值的脱酰胺化前峰与该活性主峰混合来校对CAT-8015组合物的效力。为了获得包含一种特定CAT-8015效力的组合物,将CAT-8015前峰产物的多个等分部分与CAT-8015主峰产物的多个等分部分合并,以达到具有一种特定CAT-8015效力的组合物。通过控制该组合物中CAT-8015效力水平,产生了一种CAT-8015配制品用于给予一个所希望剂量的特定体积的重组CAT-8015。

[0214] 实例6. 在溶解过程中调整pH造成脱酰胺化种类减少,正如捕获和中间纯化步骤后所测量

[0215] 尽管脱酰胺化种类能够使用如以上说明的纯化步骤从活性免疫偶联物中去除,CAT-8015脱酰胺化种类的水平还可以通过在纯化过程中在早期步骤时调整pH而有效地降低(即再折叠步骤(以上表1中的步骤4))。用于达到更低水平的CAT-8015脱酰胺化种类的再

折叠操作包括以下亚步骤:

[0216] 再折叠亚步骤1:溶解、澄清和浓缩:VH-PE38和VL包涵体在室温(15-30°C)下融化12至24小时。VH-PE38和VL包涵体以1:1摩尔比率合并,并且通过加入50mM Tris、20mM EDTA、pH7.4调整至15%(w/v)固体。这些包涵体通过对每kg15%(w/v)固体包涵体悬浮液加入5kg包涵体溶解缓冲液(50mM乙醇胺、8M尿素、0.5M精氨酸、2mM EDTA、10mM DTE)而溶解。包涵体溶解缓冲液的pH在pH9.0与10.5之间变化,以0.5pH为单位增加。溶解在室温(15-30°C)下进行2小时,持续搅拌。溶解的包涵体通过深度过滤通过一系列滤器而澄清。澄清的滤液通过切向流过滤至5-6g/L,使用5kDa分子量截留(MWCO)超滤膜而被浓缩。

[0217] 再折叠亚步骤2:再折叠:CAT-8015的再折叠通过将澄清并浓缩的包涵体滤液10倍稀释至预先冷却(2-8°C)的再折叠缓冲液(50mM乙醇胺、1M精氨酸、2mM EDTA、0.91mM氧化的谷胱甘肽、pH9.5)中而起始。将再折叠溶液在2-8°C维持48至72小时,并持续混合。再折叠通过将再折叠溶液在浓缩和透析过滤之前放置在室温(15-30°C)而终止。该再折叠溶液通过使用10kDa MWCO膜进行切向流过滤而浓缩,并且用10个体积的20mM磷酸钠、pH7.4而透析过滤。将浓缩并透析过滤的再折叠溶液过滤通过0.2μm滤器(TMAE上样)。

[0218] 作为捕获步骤(以上表1的步骤5)的一部分,从以上再折叠操作中获得的CAT-8015制剂被上样至Fractogel TMAE柱子(EMD Biosciences或等效物)上,该柱用20mM磷酸钾、pH7.4平衡。上样之后,该柱首先用20mM磷酸钾、pH7.4洗涤,并然后用20mM磷酸钾、0.1%(w/w) Triton X100、pH7.4洗涤,之后跟随一个用20mM磷酸钾、100mM氯化钠、pH7.4的随后洗涤。该产物从柱子中在用20mM磷酸钾、200mM氯化钠、pH7.4的反相流中被洗脱。该柱用2M氯化钠提取(strip),用1N氢氧化钠消毒并且在室温下储存于0.1N氢氧化钠中。

[0219] 作为中间纯化步骤1的一部分,进行羟基磷灰石色谱。羟基磷灰石色谱步骤作为一个流动通过的色谱步骤操作。从以上捕获步骤获得的产物直接上样至陶瓷羟基磷灰石柱(伯乐实验室(Bio-Rad Laboratories)或等效物),该柱用400mM磷酸钾、200mM氯化钠、pH7.4,之后跟随20mM磷酸钾、200mM氯化钠、pH7.4平衡。在该色谱条件下,在流动通过的馏分中收集产物(HA产物)。该柱用400mM磷酸钾、200mM氯化钠、pH7.4提取,用1N氢氧化钠消毒并且在室温下储存于0.1N氢氧化钠中。

[0220] 通过高效阴离子交换色谱分析从以上的HA产物中的前峰百分数。表8和图7显示了HA产物中前峰百分数作为溶解pH的函数。如在表8和图7所显示,将VH-PE38和VL包涵体在更低的pH下溶解导致了更少的脱酰胺化CAT-8015产物。在复性和纯化过程中的早期步骤中控制CAT-8015脱酰胺化的能力可以增加总过程产率,同时维持最终纯化的药物物质的品质。

[0221] 表8

[0222] 在HA产物中前峰百分数作为溶解pH的函数

[0223]

溶解pH	9.0	9.5	10.0	10.5
前峰(%)	9.8	14.5	22.1	31.8

序列表

<110> 米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE, LLC)

<120> 纯化活性多肽或免疫偶联物的方法

<130> MED0581.PCT

<140> PCT/US2011/045524

<141> 2011-07-27

<150> 61/369,148

<151> 2010-07-30

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 476

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

[0001]

<400> 1

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile
20 25 30

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Lys Ala Ser Gly
115 120 125

Gly Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys

130	135	140
His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp		
145	150	155 160
Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu		
	165	170 175
Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg		
	180	185 190
Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile		
	195	200 205
Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala		
	210	215 220
Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly		
225	230	235 240
Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn		
	245	250 255
Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe		
	260	265 270
[0002] Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala		
	275	280 285
His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly		
	290	295 300
Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala		
305	310	315 320
Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly		
	325	330 335
Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala		
	340	345 350
Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg		
	355	360 365
Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro		
	370	375 380
Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu		
385	390	395 400
Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu		
	405	410 415

Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser
420 425 430

Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser
435 440 445

Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala
450 455 460

Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
465 470 475

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

[0003]

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 3

[0004]

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 4

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 5

Arg Glu Asp Leu Lys

1

5

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 6

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile

20

25

30

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp

35

40

45

Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr

50

55

60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu

65

70

75

80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

	85	90	95
	Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe Ala		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
	115	120	
<210>	7		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成多肽		
<400>	7		
	Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly		
	1 5 10 15		
	Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile		
	20 25 30		
	Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp		
	35 40 45		
[0005]	Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr		
	50 55 60		
	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu		
	65 70 75 80		
	Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr		
	85 90 95		
	Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Tyr Asn Trp Gly Val Leu Phe Ala		
	100 105 110		
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
	115 120		
<210>	8		
<211>	124		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列的描述: 合成多肽		
<400>	8		
	Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly		
	1 5 10 15		

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile
20 25 30
Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr Thr Trp Gly Val Leu Phe Ala
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 9

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile
20 25 30
Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Thr Tyr Gly Val Leu Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 10

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile
20 25 30

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

[0007]

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 11

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile
20 25 30

Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Cys Leu Glu Trp

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 13

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Gly
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

[0009]

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 14

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Arg
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 15

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Gly
20 25 30

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80

[0010]

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 16

<211> 597

<212> PRT

<213> 绿脓杆菌

<400> 16

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu

65	70	75	80
Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser	85	90	95
Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn	100	105	110
Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His	115	120	125
Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys	130	135	140
Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu	145	150	155
Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met	165	170	175
Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser	180	185	190
Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr	195	200	205
Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile	210	215	220
Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys	225	230	235
Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu	245	250	255
Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe	260	265	270
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly	275	280	285
Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser	290	295	300
Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly	305	310	315
Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala	325	330	335
Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg	340	345	350

[0011]

	Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp	
	355	360 365
	Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe	
	370	375 380
	Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn	
	385	390 395 400
	Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg	
		405 410 415
	Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln	
		420 425 430
	Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala	
		435 440 445
	Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly	
		450 455 460
	Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly	
		465 470 475 480
[0012]	Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr	
		485 490 495
	Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu	
		500 505 510
	Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly	
		515 520 525
	Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu	
		530 535 540
	Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg	
		545 550 555 560
	Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln	
		565 570 575
	Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro	
		580 585 590
	Arg Glu Asp Leu Lys	
		595
	<210> 17	
	<211> 361	
	<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 17

Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	His	Gln	Ala	Cys	His	Leu	Pro
1			5				10				15				
Leu	Glu	Thr	Phe	Thr	Arg	His	Arg	Gln	Pro	Arg	Gly	Trp	Glu	Gln	Leu
		20					25				30				
Glu	Gln	Cys	Gly	Tyr	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ala
		35					40				45				
Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Asn	Gln	Val	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Leu
		50				55					60				
Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln
65					70				75						80
Pro	Glu	Gln	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu
				85					90					95	
Arg	Phe	Val	Arg	Gln	Gly	Thr	Gly	Asn	Asp	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Asn
			100					105					110		
Ala	Asp	Val	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Cys	Ala
			115					120					125		
Gly	Pro	Ala	Asp	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Asn	Tyr	Pro	Thr
			130				135						140		
Gly	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Arg
145					150					155					160
Gly	Thr	Gln	Asn	Trp	Thr	Val	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	His	Arg	Gln
				165					170					175	
Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Phe	Leu
				180					185					190	
Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Ile	Val	Phe	Gly	Gly	Val	Arg	Ala	Arg	Ser	Gln
				195					200				205		
Asp	Leu	Asp	Ala	Ile	Trp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp	Pro	Ala
				210				215					220		
Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asp	Gln	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg	Gly	Arg
225					230					235					240
Ile	Arg	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser	Ser	Leu

[0013]

	245	250	255
Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala			
260	265	270	
Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp			
275	280	285	
Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu			
290	295	300	
Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro			
305	310	315	320
Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro			
325	330	335	
Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro			
340	345	350	
Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys			
355	360		
<210> 18			
<211> 345			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成多肽			
<400> 18			
Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro			
1	5	10	15
Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu			
20	25	30	
Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala			
35	40	45	
Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu			
50	55	60	
Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln			
65	70	75	80
Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu			
85	90	95	
Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn			
100	105	110	

[0014]

[0015]	Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr		
	115	120	125
	Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg		
	130	135	140
	Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln		
	145	150	155 160
	Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu		
	165	170	175
	Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln		
	180	185	190
	Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala		
	195	200	205
	Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg		
	210	215	220
	Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu		
	225	230	235 240
[0015]	Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala		
	245	250	255
	Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp		
	260	265	270
	Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu		
	275	280	285
	Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro		
	290	295	300
	Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro		
	305	310	315 320
	Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro		
	325	330	335
	Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys		
	340	345	
	<210> 19		
	<211> 318		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 19

Met Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val
1 5 10 15

Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
20 25 30

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu
35 40 45

Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala
50 55 60

Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
65 70 75 80

Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu
85 90 95

Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val
100 105 110

Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu
115 120 125

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr
130 135 140

His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val
145 150 155 160

Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
165 170 175

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro
180 185 190

Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val
195 200 205

Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala
210 215 220

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu
225 230 235 240

Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg
245 250 255

Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile

[0016]

	260	265	270
	Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp		
	275	280	285
	Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp		
	290	295	300
	Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys		
	305	310	315
	<210> 20		
	<211> 230		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列的描述: 合成多肽		
	<400> 20		
	Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu		
	1	5	10 15
	Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln		
	20	25	30
[0017]	Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu		
	35	40	45
	Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala		
	50	55	60
	Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp		
	65	70	75 80
	Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr		
	85	90	95
	Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn		
	100	105	110
	Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe		
	115	120	125
	Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val		
	130	135	140
	Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr		
	145	150	155 160
	Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro		
	165	170	175

Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
180 185 190

Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu
195 200 205

Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
210 215 220

Pro Arg Glu Asp Leu Lys
225 230

<210> 21

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 21

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Pro Thr Gly Ala Glu
1 5 10 15

[0018]

Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln
20 25 30

Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu
35 40 45

Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
50 55 60

Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp
65 70 75 80

Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr
85 90 95

Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala Gly Arg Ile Arg Asn
100 105 110

Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe
115 120 125

Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val
130 135 140

Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
145 150 155 160

Gly Pro Glu Glu Ala Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
165 170 175

Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro
180 185 190

Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Ser Glu
195 200 205

Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro
210 215 220

Pro Arg Glu Asp Leu Lys
225 230

<210> 22

<211> 347

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 22

[0019]

Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His
1 5 10 15

Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
20 25 30

Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr
35 40 45

Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn
50 55 60

Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg
65 70 75 80

Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu
85 90 95

Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala
100 105 110

Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr
115 120 125

Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser
130 135 140

	Thr	Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Trp	Thr	Val	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	His
	145					150					155					160
	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr
				165						170				175		
	Phe	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Ile	Val	Phe	Gly	Gly	Val	Arg	Ala	Arg
				180					185					190		
	Ser	Gln	Asp	Leu	Asp	Ala	Ile	Trp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp
		195						200					205			
	Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asp	Gln	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg
	210					215						220				
	Gly	Arg	Ile	Arg	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser
	225				230					235					240	
	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Tyr	Arg	Thr	Ser	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Pro	Glu
				245						250					255	
	Ala	Ala	Gly	Glu	Val	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	His	Pro	Leu	Pro	Leu	Arg
				260				265						270		
[0020]	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Arg	Leu	Glu	Thr
		275					280						285			
	Ile	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu	Ala	Glu	Arg	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Ser	Ala
	290					295						300				
	Ile	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Asn	Val	Gly	Gly	Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser
	305				310						315				320	
	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Gln	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser
				325					330					335		
	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Arg	Glu	Asp	Leu	Lys					
				340				345								
	<210>	23														
	<211>	5														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	人工序列的描述：合成多肽														
	<400>	23														
	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly											
	1				5											

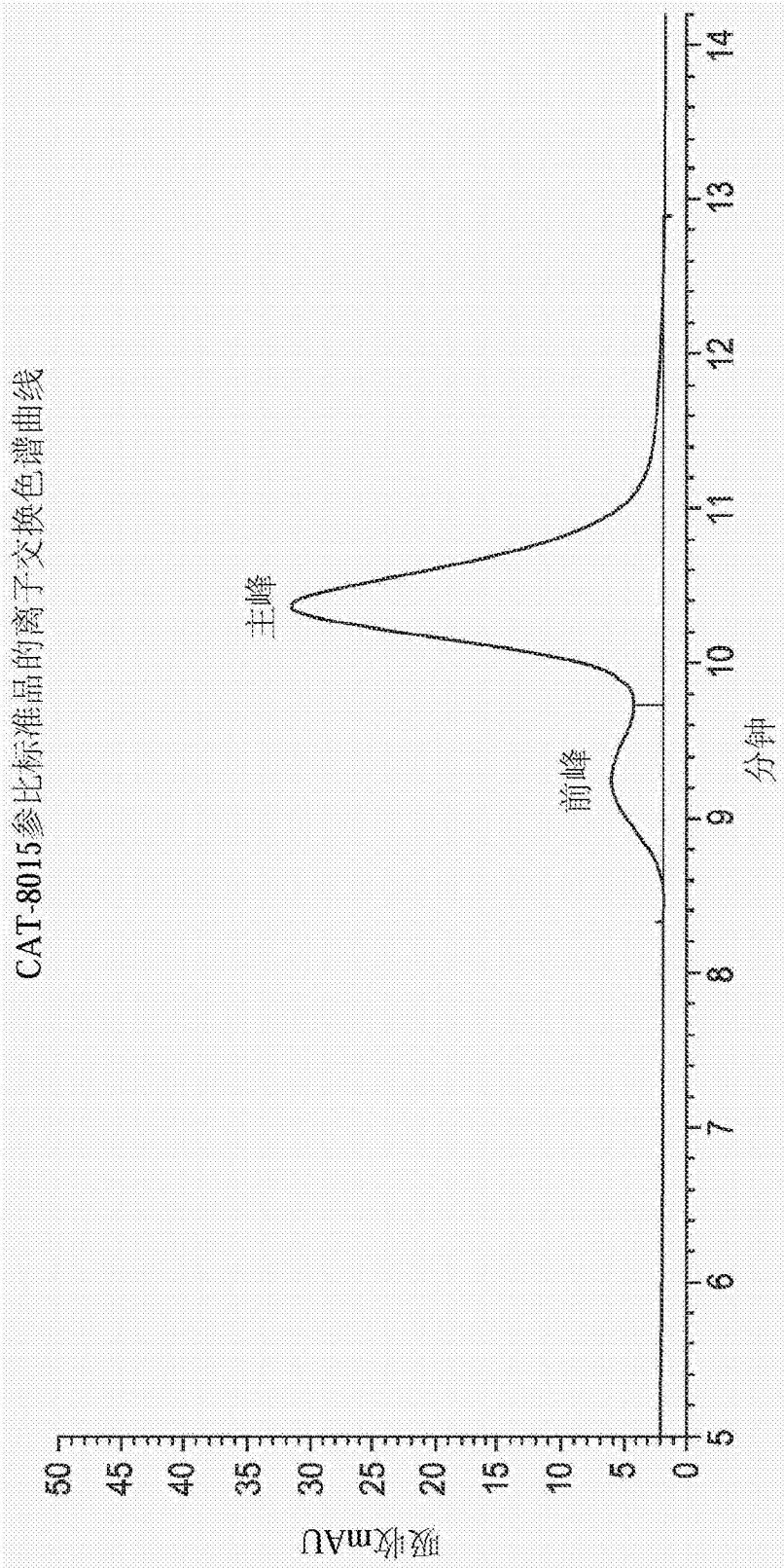


图1

相对效力%与前峰%之间的关系

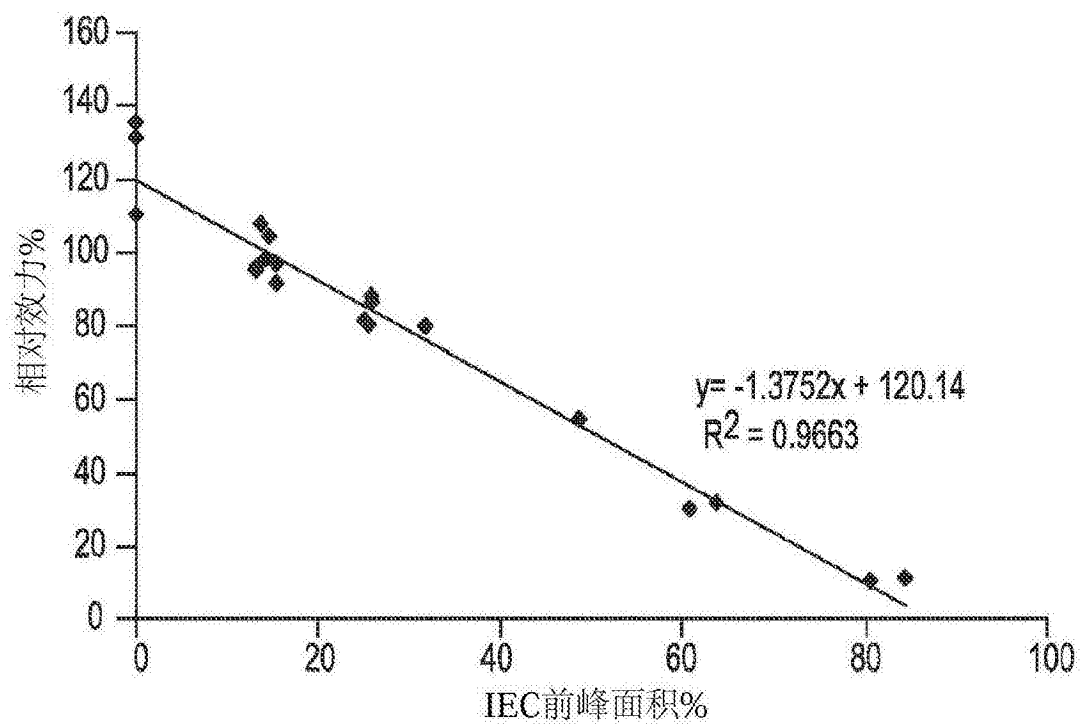


图2

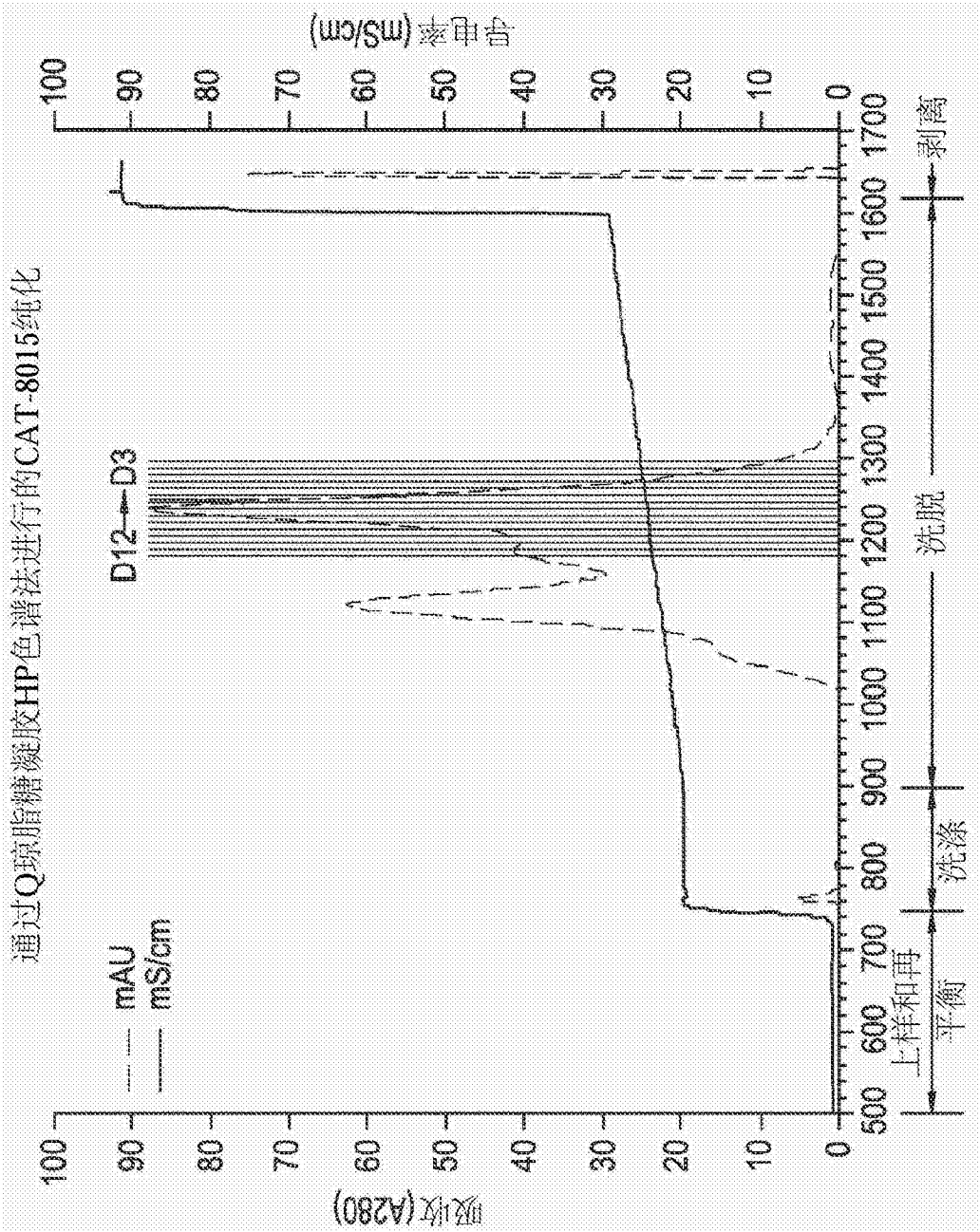


图3

QHP上样与洗脱液池样品的
SDS-PAGE分析

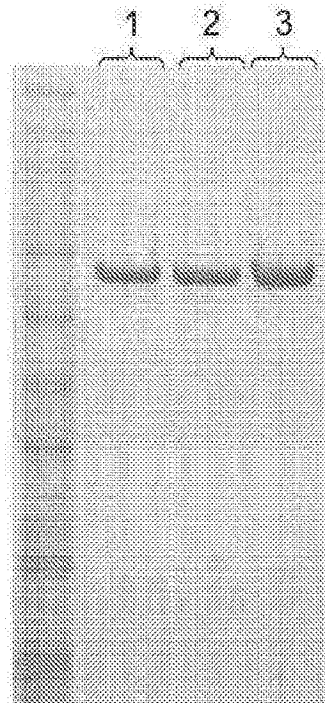


图4

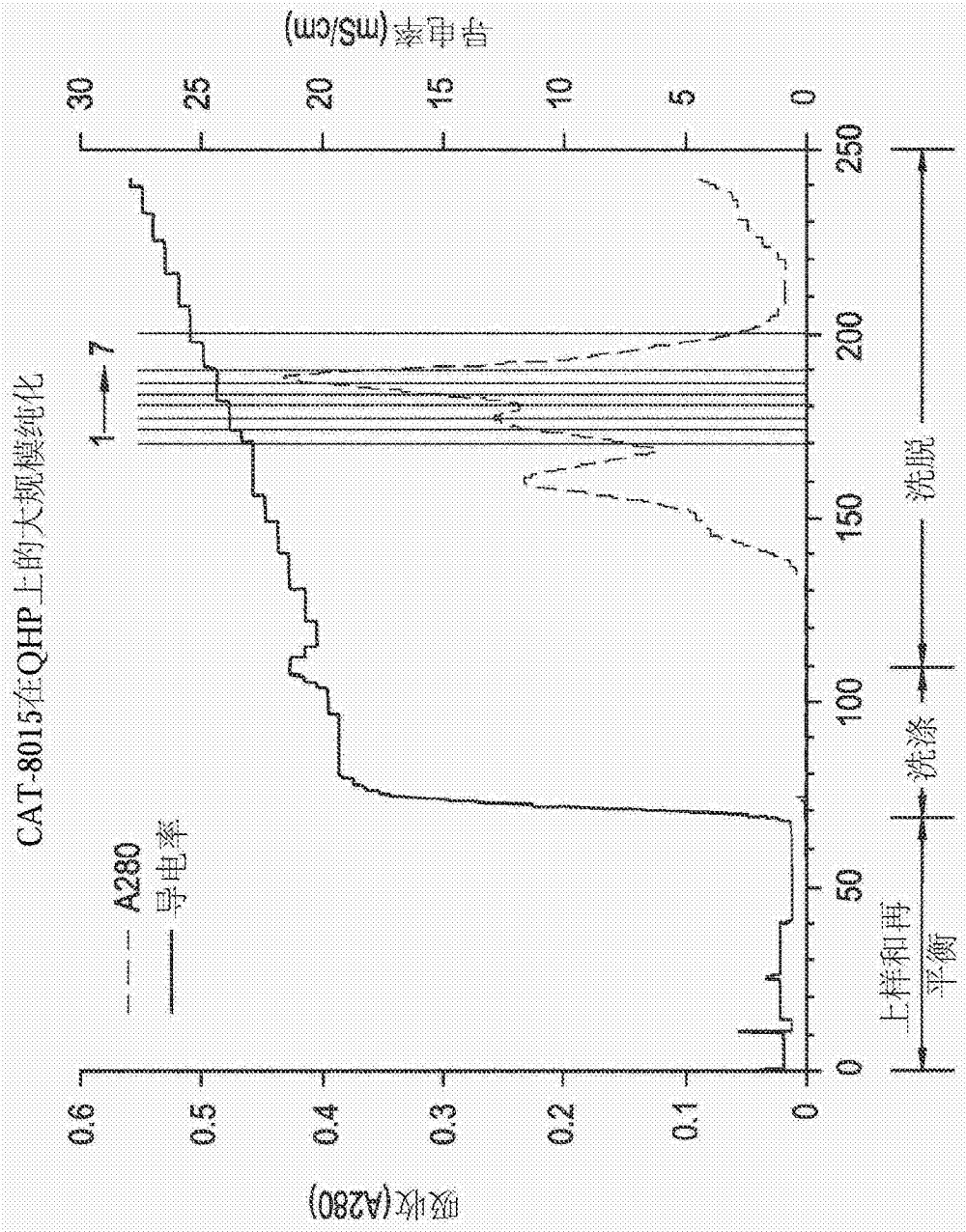


图5

QHP上样与洗脱液池样品的SDS-PAGE分析

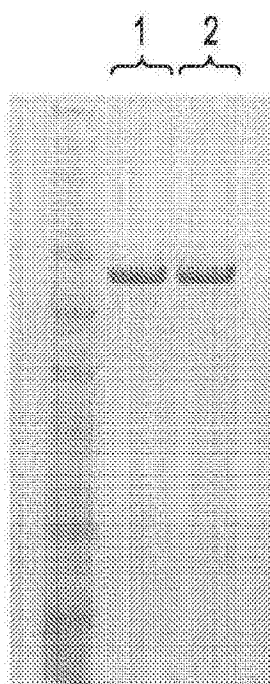


图6

HA产品中前峰百分数作为溶解pH的函数

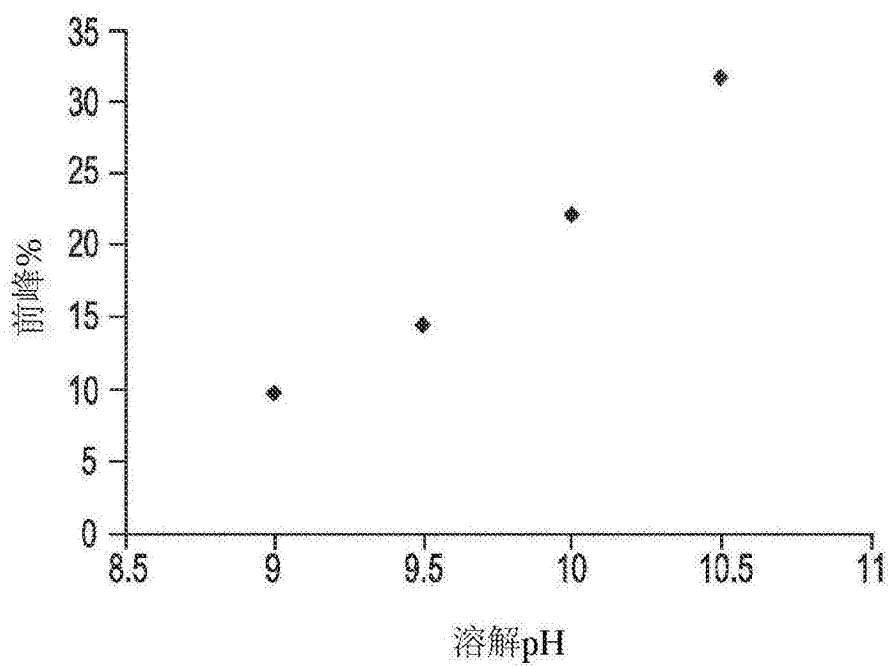


图7