



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107988192 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201711191958.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2010.08.02

C12N 9/64(2006.01)

(30)优先权数据

C12N 11/14(2006.01)

61/230,308 2009.07.31 US

C12M 1/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201080037078.0 2010.08.02

(71)申请人 百深有限责任公司

地址 瑞士奥普菲孔市

申请人 百深公司

(72)发明人 M·哈斯拉赫 A·米特雷尔

C·菲德勒 C·迈尔

(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 汤国华

权利要求书1页 说明书30页 附图2页

(54)发明名称

用于纯化重组ADAMTS13和其它蛋白质的方法以及其组合物

(57)摘要

本文提供用于将具有1型凝血酶敏感蛋白基序的重组A解整合素样金属肽酶13(ADAMTS13)蛋白质从样品中纯化的方法。所述方法包括在使得ADAMTS13蛋白质出现于由羟基磷灰石所得的洗脱液或上清液中的条件下,通过用色谱法使样品与羟基磷灰石接触来使ADAMTS13蛋白质富集。所述方法可进一步包括使用结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法。其它任选的步骤涉及超滤/渗滤、阴离子交换色谱法、阳离子交换色谱法和病毒灭活,本文还提供用于使蛋白质样品中的病毒污染物灭活的方法,其中将所述蛋白质固定于载体上。本文还提供根据所述方法制备的ADAMTS13的组合物。

1. 一种用于在治疗性蛋白质组合物的纯化中使蛋白质溶液中的脂质包衣病毒污染物灭活的体外方法,所述方法包括:

提供包含治疗性蛋白质的蛋白质溶液;

在体外将所述治疗性蛋白质固定在载体上,其中所述固定通过载体上的基团和蛋白质上的基团之间的键而发生,以及其中所述固定在不存在溶剂-清洁剂混合物的条件下进行,所述混合物包含非离子型清洁剂和有机溶剂;

随后,在所述治疗性蛋白质保持固定在所述载体上时,用包含处于适合于实现脂质包衣病毒污染物灭活的浓度下的非离子型清洁剂和有机溶剂的溶剂-清洁剂混合物将所述治疗性蛋白质处理适合于实现脂质包衣病毒污染物灭活的时间。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述治疗性蛋白质为选自ADAMTS13、因子VIII、因子VIIa、因子IX、血管性血友病因子和抗MIF抗体中的至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述载体是色谱树脂。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述溶剂-清洁剂混合物包含1% Triton X-100、0.3% 磷酸三正丁酯和0.3% 聚山梨醇酯80。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述溶剂-清洁剂混合物的处理持续30分钟到1小时。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述方法进一步包括使用存储缓冲液将所述治疗性蛋白质从所述载体上洗脱。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述存储缓冲液具有大于7.0的pH值并包含小于10mM的钙离子、缓冲化合物、0.05%非离子型清洁剂和盐。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述载体是阳离子交换树脂;以及其中在用存储缓冲液从阳离子交换树脂上洗脱的步骤之后没有超滤、渗滤或缓冲液更换步骤。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,与所述治疗性蛋白质处于溶液中时的溶剂-清洁剂混合物的处理相比,所述溶剂-清洁剂混合物的处理导致所述治疗性蛋白质聚集物的形成减少。

用于纯化重组ADAMTS13和其它蛋白质的方法以及其组合物

[0001] 本申请是申请日为2010年8月2日、申请号为201080037078.0 (PCT/EP2010/061192)、发明名称为“用于纯化重组ADAMTS13和其它蛋白质的方法以及其组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2009年7月31日提交的美国临时申请第61/230,308号的权益,其全部以引用方式并入本文,并且我们要求所述申请的优先权。

技术领域

[0004] 本发明一般来说涉及纯化具有1型凝血酶敏感蛋白基序的重组解整合素样金属肽酶13 (ADAMTS13) 和其它蛋白质的方法,以及包含此类纯化蛋白质的组合物。

背景技术

[0005] 金属蛋白酶基因家族,ADAM (解整合素金属蛋白酶),包括具有不同功能的膜锚定蛋白酶成员。ADAMTS家族成员与ADAM的不同之处在于C末端有一个或多个凝血酶敏感蛋白1样 (TSP1) 域,并且没有通常在ADAM金属蛋白酶中观察到的EGF重复序列、跨膜域和胞质尾区。

[0006] 具有1型凝血酶敏感蛋白基序的解整合素样金属肽酶13 (ADAMTS13) 是ADAMTS家族的一员。ADAMTS13具有八个凝血酶敏感蛋白域,并且没有疏水性跨膜域。因此,它被分泌。ADAMTS13裂解血管性血友病因子 (von Willebrand Factor) 的Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶键,并且需要钙和锌离子以便发挥作用。ADAMTS13也称为“血管性血友病因子-裂解蛋白酶”和“VWFCP”。

[0007] ADAMTS13表达不足已经与一些疾病,例如血栓性障碍,诸如血栓性血小板减少性紫癜 (TTP) 的发病机理有牵连 (参见,例如美国专利公布第20070015703号)。在TTP中,ADAMTS13的不足和/或受抑制导致整个身体的小血管中形成广泛的微观血栓 (血栓性微血管病)。穿过微观血块的红细胞经受剪切应力,引起红细胞的细胞膜损伤,进而又导致血管内溶血和裂红细胞形成。血栓也引起血流量减少,从而可导致末梢器官损伤。症状通常包括神经学问题,诸如幻觉、行为怪异、精神状态改变、中风或头痛;肾功能衰竭;发烧;和导致瘀伤或紫癜的血小板减少 (血小板计数低);以及涉及贫血和黄疸的微血管溶血性贫血。目前的疗法涉及用于减少针对ADAMTS13的循环抗体的血浆除去法,和/或补充所述酶在血液中的水平。

[0008] 因此,存在对提供用于纯化 (特别是在商业生产规模上纯化) 可用作治疗剂的重组ADAMTS13的方法的强烈需要。纯化ADAMTS13已被证明是困难的,并且已尝试包括色谱法的各种方法。结合非ADAMTS13蛋白质,而允许ADAMTS13蛋白质出现在洗脱液或上清液中的色谱材料将提供用于纯化的有用方法。结合ADAMTS13蛋白质,而使非ADAMTS13杂质留在溶液或更加强烈地结合的色谱材料也提供引人注目的方法,并且可与其它方法一起串联使用。本公开提供此类方法。

[0009] 此外,病毒污染物也在ADAMTS13蛋白质以及其它蛋白质和重组蛋白质的纯化中造

成难题。一种常规方法涉及用溶液形式的溶剂-清洁剂混合物处理待纯化的样品。样品与溶剂-清洁剂化学品一起培育导致脂质包衣病毒失活。然而,这种溶液内处理不能有效要求将样品转移到至少一个其它容器以便(例如)有助于在处理后将溶剂-清洁剂化学品。此外,一些蛋白质(包括ADAMTS13)对溶剂-清洁剂化学品敏感,导致聚集物的形成。本公开提供涉及在溶剂-清洁剂处理期间将蛋白质固定的方法以解决病毒灭活的此类问题。

发明内容

[0010] 本发明的一个方面涉及一种用于从包含ADAMTS13蛋白质和非ADAMTS13杂质的样品中纯化具有1型凝血酶敏感蛋白基序的重组解整合素样金属肽酶13 (ADAMTS13) 蛋白质(尤其人类ADAMTS13)的方法。已意外地发现,可在适合于从非ADAMTS13杂质中纯化ADAMTS13蛋白质的条件下使用羟基磷灰石色谱法。所述方法包括在使得ADAMTS13蛋白质出现于由羟基磷灰石所得的洗脱液中的条件下,用色谱法使样品与羟基磷灰石接触来使ADAMTS13蛋白质富集。也就是说,在使得ADAMTS13蛋白质,优选ADAMTS13蛋白质的实质性部分不与羟基磷灰石结合,而杂质得以保留的条件下,对样品进行羟基磷灰石色谱法。在一些优选实施方案中,从在培养包含重组ADAMTS13核酸的CHO细胞后所收集的上清液中纯化重组ADAMTS13蛋白质。在一些优选实施方案中,上清液或洗脱液中的收率百分比意外地为50%到100%。所述方法可进一步包括串联色谱法,其包括用色谱法使由羟基磷灰石所得的洗脱液与结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触。在一些优选实施方案中,通过串联色谱法富集后的ADAMTS13收率百分比意外地为至少60%。

[0011] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括任选的预富集制备步骤以浓缩样品中的ADAMTS13和/或使ADAMTS13蛋白质与阴离子交换树脂结合。例如,所述方法可进一步包括在用色谱法与羟基磷灰石接触前,用色谱法使样品阴离子交换树脂接触并从阴离子交换树脂中洗脱ADAMTS13蛋白质;和/或在用色谱法与羟基磷灰石接触前,通过超滤来浓缩样品中的ADAMTS13蛋白质;和/或在用色谱法与羟基磷灰石接触前,通过渗滤交换到包含钙离子和锌离子的缓冲液中来使ADAMTS13蛋白质稳定。在一些优选实施方案中,在串联色谱法前,将样品通过10倍到20倍超滤来浓缩,使缓冲液通过具有30kDa截留分子量的渗滤来交换成含有钙和锌离子的低电导率缓冲液,并且使ADAMTS 13与阴离子交换树脂结合并从所述阴离子交换树脂中洗脱(诸如ANX Sepharose Fast Flow, POROS 50D, 或POROS 50PI)。在一些优选实施方案中,来自阴离子交换色谱步骤的洗脱液池是用羟基磷灰石稀释缓冲液以1:4稀释来使电导率降低至6mS/cm,然后进行羟基磷灰石串联色谱法,其包括羟基磷灰石色谱法,接着使用由羟基磷灰石所得的洗脱液,以结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂来进行色谱法。在一些优选实施方案中,来自预富集步骤的洗脱液可意外地提供至少75%的收率百分比。

[0012] 在一些实施方案中,在用色谱法与羟基磷灰石或混合模式树脂接触后,所述方法进一步包括通过阳离子交换色谱法来进行的任选精炼步骤。在此类实施方案中,在与羟基磷灰石或阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触后,所述方法可进一步包括通过降低缓冲液电导率来制备ADAMTS13蛋白质以便进行阳离子交换的步骤。在一些实施方案中,此制备步骤是通过超滤/渗滤、渗析和/或凝胶过滤来进行。在一些实施方案中,当使用超滤/渗滤时,截留量为10kDa。在一些实施方案中,缓冲液更换是通过ANX琼脂糖凝胶-FF低取代度的

阴离子交换色谱法来进行。在使用渗析的一些实施方案中,渗析可由通过单个渗析模块的不超过2次操作组成。在一些优选实施方案中,阳离子交换色谱法是在Source S柱或POROS S柱上进行。在一些优选实施方案中,降低缓冲液电导率后的ADAMTS13收率百分比意外地为至少90%,并且通过阳离子交换色谱法精炼后的ADAMTS13收率百分比意外地为至少70%。

[0013] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括对ADAMTS13蛋白质进行任选的病毒灭活步骤(例如)以使病毒失活和/或清除病毒和病毒颗粒。在一些实施方案中,病毒灭活步骤包括将包含非离子型清洁剂和有机溶剂的溶剂-清洁剂混合物添加至ADAMTS13蛋白质。在一些优选实施方案中,将ADAMTS13蛋白质固定,例如,固定于阳离子交换树脂上。在一些实施方案中,溶剂-清洁剂混合物包含1% TRITONX-100、0.3% 磷酸三正丁酯,和0.3% 吐温80;且/或溶剂-清洁剂处理在12°C到16°C下持续30分钟。或者或另外,病毒灭活步骤可包括用纳滤器过滤ADAMTS13蛋白质以清除病毒和/或病毒颗粒。在一些此类实施方案中,在溶剂-清洁剂处理之前和/或之后,由20N或35N过滤器进行纳滤。在一些实施方案中,病毒灭活步骤是在如上所述的制备步骤之后,和/或在串联色谱步骤之后;和/或在如上所述的精炼阳离子交换色谱法之后进行。在一些优选实施方案中,病毒灭活后的ADAMTS13收率百分比意外地为至少95%。

[0014] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将ADAMTS13蛋白质从阳离子交换树脂上洗脱。在一些优选实施方案中,使用梯度洗脱,例如,使用包含具有低盐浓度的第一缓冲液和具有较高盐浓度的第二缓冲液的梯度洗脱。在一些更优选实施方案中,使用分步洗脱,甚至更优选地,分步洗脱涉及用存储缓冲液从树脂中洗脱ADAMTS13蛋白质。例如,存储缓冲液可具有大于7.0的pH值并包含小于10mM钙离子、缓冲化合物、0.05%非离子型清洁剂和盐。在一些更优选实施方案中,用存储缓冲液从树脂洗脱后,所述方法不包括后续的浓缩或缓冲液更换步骤。

[0015] 在一个特别优选实施方案中,提供一种用于从包含ADAMTS13蛋白质和非ADAMTS13杂质的样品中纯化重组ADAMTS13蛋白质的方法,所述方法包括在使得ADAMTS13蛋白质出现于由羟基磷灰石所得的洗脱液或上清液中的条件下,用色谱法使样品与羟基磷灰石接触;然后用色谱法(优选作为串联色谱法)使所述洗脱液与结合ADAMTS13蛋白质的阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触。

[0016] 在另一个特别优选实施方案中,在如上所述的色谱步骤之前,用色谱法使样品与阴离子交换树脂接触,并将ADAMTS13蛋白质从阴离子交换树脂上洗脱;和/或通过超滤来浓缩样品中的ADAMTS13蛋白质,并通过渗滤交换到包含钙离子和锌离子的缓冲液中来使ADAMTS13蛋白质稳定,然后用色谱法与羟基磷灰石接触。

[0017] 在另一个特别优选实施方案中,在与羟基磷灰石或阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触后,所述方法进一步包括通过降低缓冲液电导率来制备ADAMTS13蛋白质以便进行阳离子交换的步骤,其中所述制备步骤是通过超滤/渗滤来进行;和/或通过由通过单个渗析模块的不超过2次操作组成的渗析来进行;和/或通过凝胶过滤来进行。

[0018] 在另一特别优选实施方案中,所述方法包括从在培养包含重组ADAMTS13核酸的CHO细胞后所收集的上清液中获得样品;在用色谱法与羟基磷灰石接触前,用色谱法使样品与阴离子交换树脂接触并将ADAMTS13蛋白质从阴离子交换树脂上洗脱;和/或通过超滤来浓缩样品中的ADAMTS13蛋白质;和在用色谱法与羟基磷灰石接触前,通过渗滤交换到包含

钙离子和锌离子的缓冲液中来使ADAMTS13蛋白质稳定;接着在使得ADAMTS13蛋白质出现于由羟基磷灰石所得的洗脱液或上清液中的条件下,用色谱法使样品与羟基磷灰石接触;然后用色谱法使洗脱液与结合ADAMTS13蛋白质的阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触;接着通过降低缓冲液电导率来制备ADAMTS13蛋白质以便进行阳离子交换,例如通过超滤/渗滤来制备;和/或通过由通过单个渗析模块的不超过2次操作组成的渗析来制备;和/或通过凝胶过滤来制备,所述方法任选进一步包括一个或多个病毒灭活步骤。在一些此类实施方案中,病毒灭活步骤包括将包含非离子型清洁剂和有机溶剂的溶剂-清洁剂混合物添加至ADAMTS13蛋白质,其中ADAMTS13蛋白质是固定于阳离子交换树脂上,并且溶剂-清洁剂混合物包含1% TRITONX-100、0.3% 磷酸三正丁酯和0.3% 吐温80。在另一实施方案中,除溶剂-清洁剂处理以外或代替溶剂-清洁剂处理,病毒灭活步骤使用纳滤器来清除病毒和/或病毒颗粒。在一些优选实施方案中,以上概述的整个程序的ADAMTS13收率百分比意外地为22-24%或更高,且在更加优选实施方案中,聚集物意外地减少50%。

[0019] 在将ADAMTS13固定于阳离子交换树脂上的一些实施方案中,所述方法进一步包括使用以具有大于7.0的pH值并包含小于10mM钙离子、缓冲化合物、0.05%非离子型清洁剂和盐的存储缓冲液进行的分步洗脱;或使用包含具有低盐含量的第一缓冲液和具有较高盐含量的第二缓冲液的梯度洗脱来将ADAMTS13蛋白质从树脂上洗脱。

[0020] 本发明的另一个方面涉及一种包含根据本文描述的方法的任何实施方案制备的重组ADAMTS13蛋白质的组合物。在一些实施方案中,组合物是药物组合物,例如,包含纯化ADAMTS13蛋白质和药学上可接受的载体的组合物。

[0021] 本发明的另一个方面涉及一种用于将蛋白质样品中的病毒污染物灭活的方法,其中蛋白质可为来自可具有病毒污染物的来源的任何蛋白质。在优选实施方案中,蛋白质是重组蛋白质,特别是在暴露于有机溶剂和清洁剂时易发生聚集的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质可为ADAMTS13蛋白质,尤其重组ADAMTS13,或不同的蛋白质(尤其是不同的重组蛋白质)。在一些实施方案中,重组蛋白质是凝血因子。在一些实施方案中,蛋白质是(例如)以下一种或多种:因子VIII、因子II、因子VIIa、因子IX、凝血酶、血管性血友病因子、抗MIF抗体或由色谱法纯化的另一种蛋白质。病毒灭活可结合或不结合蛋白质纯化来进行。在一些实施方案中,所述方法包括将蛋白质固定于载体上;和用包含非离子型清洁剂和有机溶剂的清洁剂-溶剂混合物来处理固定的蛋白质。在一些优选实施方案中,载体是色谱树脂。在更加优选实施方案中,清洁剂-溶剂混合物包含1% Triton X-100、0.3% 磷酸三正丁酯和0.3% 聚山梨醇酯80 (吐温80)。溶剂-清洁剂混合物处理可持续较长时间,例如30分钟到1小时,同时蛋白质保持固定于色谱树脂上,例如,阳离子交换树脂上;且/或溶剂-清洁剂处理可在2℃到10℃下发生。与蛋白质未固定于溶液中时的溶剂-清洁剂混合物处理相比,这种病毒灭活的方法可意外地将清洁剂-溶剂混合物处理期间蛋白质聚集物的形成减少显著的量(例如,减少大于50%)。在一些优选实施方案中,在所述程序之后,用缓冲液将蛋白质从载体上洗脱,诸如梯度洗脱,其中形成的少量聚集物是在后期洗脱馏分中进一步清除。在一些优选实施方案中,在所述程序之后,用存储缓冲液将蛋白质洗脱。在一些更优选实施方案中,洗脱缓冲液包含0.1%浓度的吐温80。在一些更加优选实施方案中,用存储缓冲液从树脂洗脱后,所述方法不包括后续的浓缩或缓冲液更换步骤。在一些优选实施方案中,聚集物意外地减少50%。

[0022] 在另一个特别优选实施方案中,提供一种用于将蛋白质样品中的病毒污染物灭活的方法,所述方法包括:将蛋白质固定于色谱树脂上;和用包含1%Triton X-100、0.3%磷酸三正丁酯和0.3%聚山梨醇酯80的溶剂-清洁剂混合物处理固定的蛋白质30分钟到1小时。在一些此类实施方案中,所述方法进一步包括用具有大于7.0的pH值并且包含小于10mM钙离子、缓冲化合物、0.05%非离子型清洁剂和盐的存储缓冲液来洗脱蛋白质。

[0023] 下文更详细地描述本发明的这些方面和其它方面。

附图说明

[0024] 图1描述根据本发明的用于从包含ADAMTS13和非ADAMTS13杂质的样品中纯化具有1型凝血酶敏感蛋白基序的重组A解整合素样金属肽酶13 (ADAMTS13) 的方法的示例性步骤的流程图。如本文所公开并且如本领域技术人员所理解,图1中阐明的步骤的顺序可重新排序,且/或可省略一个或多个步骤。

[0025] 图2A-D描述阳离子交换柱上的纯化操作的变化。图2A描述涉及在病毒灭活后进行的分步洗脱阳离子交换色谱法的程序;图2B描绘涉及分步洗脱阳离子交换色谱法,但先前未进行病毒灭活的程序;图2C描述涉及梯度洗脱阳离子交换色谱法,接着在色谱柱上将病毒灭活的程序;并且图2D描述涉及梯度洗脱阳离子交换色谱法,但是先前未进行病毒灭活的程序。

具体实施方式

[0026] 本发明的一个方面涉及一种用于从样品中纯化具有1型凝血酶敏感蛋白基序的重组解整合素样金属肽酶13 (ADAMTS13) 蛋白质的方法,所述样品也可包含非ADAMTS13杂质。蛋白质样品也可包含可通过一个或多个病毒灭活步骤来清除和/或灭活的病毒污染物。

[0027] 如本文使用的“具有1型凝血酶敏感蛋白基序的解整合素样金属肽酶13”、“ADAMTS13”、“ADAMTS13蛋白质”、“ADAMTS13多肽”和“重组ADAMTS13”是可互换的(除非另有规定)并且是指重组哺乳动物ADAMTS13蛋白质,其也可为全长ADAMTS13蛋白质的生物活性衍生物或片段。全长人类和鼠科ADAMTS13蛋白质的氨基酸序列具有相应UniProtKB®入藏登记号:Q76LX8和Q769J6。关于人类ADAMTS13的结构细节和序列信息可见于Zheng等((2001) J. Biol. Chem. 276:41059-63) 中。

[0028] 如本文使用的术语“其生物活性衍生物或片段”是指具有与ADAMTS13的生物功能相似,或实质上相似的生物功能的任何多肽。其生物活性衍生物或片段的多肽序列可包含一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或替换,所述一个或多个氨基酸的不存在、存在和/或替换分别对ADAMTS13蛋白质的一种或多种生物活性不具有任何实质性的负面影响。例如,选择性剪接产生全长蛋白质的生物活性片段的130kDa物质。所述多肽的生物活性可通过熟知的方法来测量,所述方法例如测试ADAMTS13对于血管性血友病因子(vWF)的解蛋白活性,和/或下游效应的后续减少和/或延迟的方法。“下游效应”是指ADAMTS13蛋白质对于其天然底物的作用的一个或多个生物、生物化学或生理表现,不论所述效应是由ADAMTS13功能直接引起,还是由其间接引起,例如由ADAMTS13发挥活性后的事件级联产生的效应。检测包括但不限于测试以下的方法:血小板附着于内皮的减少和/或延迟、血小板聚集减少和/或延迟、形成血小板串减少和/或延迟、血栓形成减少和/或延迟、血栓生长减少和/或延迟、血管

阻塞减少和/或延迟、vWF (例如FRETs-VWF73 (Peptides International, Louisville, KY)) 蛋白裂解, 和/或血栓崩解 (参见, 例如题为“Methods for measuring ADAMTS13 activity and protein on platelets and in plasma”的美国专利第7,270,976号第6栏第55行到第10栏第34行, 和第12栏第1行到第18栏第25行, 和题为“Self-quenching homofluorophore compositions for detecting enzyme activity”的第7,468,258号第11栏第26行到第16栏第50行; 也参见题为“ADAMTS13-containing compositions having thrombolytic activity”的美国专利公布第20070015703号的第[0036]、[0043]–[0045]和[0053]段, 和题为“Substrates specific to von willebrand factor cleaving protease and method of assaying the activity”的第20070065895号; 和题为“Method for Detection of Condition in Consciousness Disorder Patient and Kit for the Detection”的欧洲申请第1990421A1号, 所述文献是鉴于ADAMTS13多肽和其衍生物和/或片段的检测以引用方式并入本文)。

[0029] 重组ADAMTS13 (例如重组人类ADAMTS13) 可通过本领域中已知的任何方法来表达。一个具体实施例公开于W002/42441中, 其鉴于制备重组ADAMTS13核苷酸序列的方法而以引用方式并入本文 (参见第14页第6行到第18页第4行)。在一些实施方案中, 根据以下方法来产生重组ADAMTS13: (i) 通过遗传工程, 例如经由RNA反转录和/或DNA扩增来制备重组ADAMTS13核苷酸序列; (ii) 例如通过转染, 诸如经由电穿孔或显微注射将重组ADAMTS13核苷酸序列引入真核细胞中; (iii) 例如以连续或分批方式培养转化细胞; (iv) 例如以原构方式或在诱导后表达重组ADAMTS13; 和 (v) 例如从培养基中或通过收获转化细胞来分离包含所表达的重组ADAMTS13的样品; 和 (vi) 根据本文公开的方法, 从样品中纯化ADAMTS13蛋白质。

[0030] 重组ADAMTS13可通过在合适的宿主系统, 优选真核宿主系统, 并且更优选特点在于可产生药学有效的ADAMTS13分子的系统中表达来产生。真核细胞的实例包括但不限于哺乳动物细胞, 诸如CHO、COS、HEK293、BHK、SK-Hep和HepG2。在一个优选实施方案中, 使用CHO细胞, 并且细胞将重组ADAMTS13蛋白质分泌到培养基中。关于用于重组表达ADAMTS13的试剂或条件, 没有特定限制, 并且可使用本领域中已知或市售的任何系统。

[0031] 如本文使用的“样品”是指包含ADAMTS13蛋白质和非ADAMTS13杂质的任何组合物。本领域技术人员将认识到, 如本文所使用的样品可为产生如上所述的重组ADAMTS13的结果。因此, 样品可包括在培养表达重组ADAMTS13的转化细胞后所收集的上清液; 从培养基中纯化重组ADAMTS13蛋白质的工艺的一个或多个步骤中的包含ADAMTS13的缓冲液; 和/或从细胞培养物中收获的转化细胞。或者, 样品可为血液、血浆或血液或血浆的小部分。

[0032] 在一些实施方案中, 从包含100L细胞培养物上清液的样品中纯化ADAMTS13。然而, 本领域技术人员将认识到本发明方法可视情况按比例扩大 (例如) 以用于大规模生产。因此, 在一些实施方案中, 所述方法包括以商业生产规模, 例如, 从至少约250L样品、至少约500L样品或至少约1,000L样品中纯化ADAMTS13蛋白质。

[0033] 如本文所使用的“非ADAMTS13杂质”通常是指工艺相关的杂质。杂质可包括例如宿主细胞杂质 (诸如污染性宿主细胞蛋白质, 也称为宿主细胞抗原) 和其它生物分子杂质, 诸如DNA、RNA和细胞碎片; 培养基组分; 溶剂; 清洁剂等。另外, 非ADAMTS13杂质也包括产物相关的杂质, 例如不具有生物活性的ADAMTS13蛋白质的衍生物或片段, 或ADAMTS13蛋白质的

聚集物。在血液或血浆的情况下,非ADAMTS13杂质可包括通常在血液或血浆中发现的其它蛋白质,例如白蛋白、免疫球蛋白等。如本文所使用的“聚集物”是指包含一个以上ADAMTS13多肽分子或一个以上任何其它蛋白质分子的结构,其对应于高分子量结构或寡聚结构,诸如二聚体、三聚体和其它大分子多聚体。“非ADAMTS13杂质”也可包括病毒污染物。“病毒污染物”是指由病毒产生和/或来源于病毒的任何杂质,包括(例如)病毒颗粒、病毒蛋白质、病毒DNA、病毒RNA或其片段。

[0034] 术语“纯化”、“纯化的”、“以纯化”等是指从非ADAMTS13杂质中清除、隔离或分离ADAMTS13。例如,在植物、细菌、酵母或哺乳动物宿主细胞中表达的重组ADAMTS13蛋白质可通过清除非ADAMTS13杂质(包括例如宿主细胞蛋白质)来纯化。纯度百分比可表示ADAMTS13蛋白质相较于宿主细胞蛋白质(例如CHO蛋白质)的百分比。“实质上纯化的”重组ADAMTS13至少约60%不含、优选至少约75%不含,并且更优选至少约90%不含(或约95%、约99%,或约99.9%不含)非ADAMTS13杂质。具体来说,“实质上纯化的”重组ADAMTS13至少约60%不含、优选至少约75%不含,并且更优选至少约90%不含(或约95%、约99%,或约99.9%不含)宿主细胞蛋白质。宿主细胞蛋白质可(例如)通过免疫化学方法使用多克隆抗血清来检测,此情况在下文更详细地讨论。

[0035] 清除污染物也可导致ADAMTS13蛋白质富集。如本文所使用的“富集”和“以富集”是指样品中的重组ADAMTS13的百分比增加。因此,在样品受到一些处理,例如对样品进行一个或多个色谱步骤后,样品中的ADAMTS13百分比增加时,发生ADAMTS13蛋白质的富集。在一个实施方案中,当非ADAMTS13杂质,尤其宿主细胞蛋白质减少至少约10倍到约115倍时,ADAMTS13充分富集。在一个实施方案中,当非ADAMTS13杂质减少至少约20倍(例如约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍等),并且尤其是宿主细胞蛋白质发生减少时,ADAMTS13充分富集。

[0036] 本领域技术人员能使用本领域中可利用的方法来测定非ADAMTS13杂质、尤其宿主细胞蛋白质的减少倍数。例如,可利用非ADAMTS13杂质的检测。在一个实施方案中,样品是培养表达重组ADAMTS13的转化细胞后收集的调整的上清液,并且测定非ADAMTS13杂质减少倍数的检测测量了宿主细胞蛋白质的水平。在一个特定实施方案中,转化细胞是转化的CHO细胞,并且检测是测量CHO蛋白质的酶联免疫吸附血清学检测。可计算非ADAMTS13杂质的减少倍数,例如,将样品中的非ADAMTS13杂质的量与所洗脱的非ADAMTS13杂质质量相比较来计算,即,计算为负载中的杂质水平(例如,以ppm计)除以洗脱液中的杂质水平(例如,以ppm计)。

[0037] 可例如通过免疫化学方法,使用针对宿主细胞的蛋白质组分的多克隆抗血清和/或用于制造ADAMTS13的重组载体系统来检测宿主细胞蛋白质。一般来说,可针对来源于宿主细胞的抗原来产生抗血清,其中宿主细胞包含在制造工艺中使用但是缺乏编码ADAMTS13的基因的表达载体。可使用与本文描述的方法相同和/或实质上相似的方法来提取宿主细胞杂质。然后,使用与本文描述的方法相同和/或实质上相似的方法获得的纯化(或部分纯化)宿主细胞抗原可用于制备针对宿主细胞的蛋白质组分的抗血清和用于制造ADAMTS13的重组载体系统。可在免疫检测中,例如在ELISA中或通过蛋白质印迹分析,使用抗血清来检测宿主细胞蛋白质。也可通过由2D凝胶电泳分离待分析的样品和检测所存在的蛋白质的银染色和/或胶体金染色来检测宿主细胞蛋白质杂质。HPLC也可用来量化宿主细胞杂质水平;

然而,HPLC方法并不如免疫检测或银染色方法一样灵敏。优选地,将宿主细胞杂质减少到可使用(例如)这些分析方法中的一种或多种方法检测出的水平以下。

[0038] 如本文所使用的术语“约”表示指定值加上或减去10%形成的近似范围。

[0039] ADAMTS13的富集

[0040] 一般来说,本发明提供一种从包含ADAMTS13蛋白质和非ADAMTS13杂质的样品中纯化重组ADAMTS13蛋白质(优选人类ADAMTS13蛋白质)的方法,其中所述方法包括用色谱法使样品与(i)羟基磷灰石或(ii)串联排列的羟基磷灰石和混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触,以便使样品中的ADAMTS13的量富集。如本文所使用的“用色谱法接触”是指使用本文描述和/或本领域中已知的任何模式的色谱法使待分离的样品或其它混合物与色谱树脂接触。模式包括但不限于分批模式和柱色谱法。接触是通过在树脂上、中或内部暴露和/或培育样品、通过树脂过滤样品,或以任何其它方式来实现。色谱法所使用的缓冲液通常为磷酸盐缓冲液。

[0041] 在一些实施方案中,在使得ADAMTS13蛋白质出现于由羟基磷灰石所得的洗脱液中的条件下,用色谱法使样品与羟基磷灰石接触。“在…条件下”是指进行色谱法的一个或多个参数或变量,包括(例如)柱高度、填料、缓冲液(pH值、盐浓度、离子强度等)、温度、压力和类似参数或变量。也就是说,在使得ADAMTS13蛋白质,优选样品中的ADAMTS13蛋白质的实质性部分不与羟基磷灰石结合的条件下,对样品进行羟基磷灰石色谱法。如果使用柱色谱法,那么ADAMTS13蛋白质,优选其实质性部分将流经柱,从而使离开柱的呈流过馏分或洗脱液形式的缓冲液中的ADAMTS13富集,而非ADAMTS13杂质得以保留。如果使用分批色谱法,那么上清液或上清液馏分将包含ADAMTS13蛋白质或其实质性部分。“洗脱液”在本文中“流过”、“流过馏分”、“上清液”或“上清液馏分”可互换使用。可以收集洗脱液(或上清液)。此类收集是在样品暴露于树脂并且培育完成后,(例如)通过对色谱树脂进行离心、沉淀、过滤等来发生。从羟基磷灰石收集的洗脱液(或上清液)可进一步进行根据本发明的一个或多个步骤。

[0042] 在一些实施方案中,例如,所述方法进一步包括用色谱法使由羟基磷灰石所得的洗脱液与结合ADAMTS13蛋白质的混合模式树脂,诸如阳离子交换/疏水性相互作用树脂接触。也就是说,ADAMTS13蛋白质样品可进行串联色谱法,首先优选在ADAMTS13蛋白质的实质性部分不结合羟基磷灰石的条件下,进行羟基磷灰石色谱法,接着进行结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂色谱法。下文提供关于羟基磷灰石色谱法步骤和使用阳离子交换/疏水性相互作用树脂的混合模式色谱法的任选串联步骤的更多细节。

[0043] (a) 羟基磷灰石色谱法

[0044] 羟基磷灰石色谱法步骤涉及如本文所描述、如本领域中已知,或如本领域技术人员尤其鉴于本文中的公开可了解的任何羟基磷灰石色谱法。羟基磷灰石色谱法在本领域是熟知的。羟基磷灰石具有化学式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$,并且是骨骼和牙齿无机物以及其它生物结构的主要成分。羟基磷灰石可从此类天然来源获得或可通过熟知方法合成。羟基磷灰石广泛地用作尤其用于蛋白质的色谱分离的色谱介质或载体。粒径通常不是关键的,并且可广泛变化。典型粒径在约1 μm 到约1,000 μm 直径范围内,优选约10 μm 到约100 μm 直径。空隙率也可广泛地变化。在优选实施方案中,平均孔径在约100 Å到约10,000 Å、更优选约500 Å到约

3,000 Å、甚至更优选500 Å到3,000 Å的范围内。

[0045] 各种羟基磷灰石色谱介质是市售的,并且任何可获得形式的材料都可用于实践本文公开的方法。可使用的市售陶瓷羟基磷灰石材料的非限制性实例包括MACRO-PREP™、I型和II型羟基磷灰石(Biorad,Hercules,CA)和HAULTROGEL®(PALL,Ann Arbor,MI)。在一个实施方案中,对样品进行II型羟基磷灰石(Biorad,Hercules,CA)色谱法。

[0046] 意外地,已发现在用色谱法使样品与羟基磷灰石接触后,样品中的非ADAMTS13杂质的显著或实质性部分结合羟基磷灰石,而ADAMTS13蛋白质的显著或实质性部分保持在溶液中。因此,如以上所讨论,用羟基磷灰石处理样品可根据熟知方法,以分批模式或以柱色谱法模式来进行,并且分别在上清液或洗脱液中收集充分富集的ADAMTS13蛋白质。

[0047] 如本文所使用的“实质性部分”是指与羟基磷灰石色谱法步骤前相比,重组ADAMTS13蛋白质在样品上清液或洗脱液中的回收率为约30%到约100%(例如约40%到约90%,例如约50%到约80%,例如约60%到约70%)。例如,上清液或洗脱液中约50%到100%的回收率表明样品是在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过的条件下进行羟基磷灰石色谱法。

[0048] 在优选实施方案中,待进行羟基磷灰石色谱法的样品具有低电导率,例如,在室温下约3mS/cm与约15mS/cm之间的电导率,优选在室温下小于约10mS/cm的电导率。在一个实施方案中,样品在室温下具有6mS/cm的电导率。在另一个实施方案中,样品在室温下具有7mS/cm的电导率。本领域技术人员容易认识到样品的电导率可用包含(例如)氯化钠、氯化钾、硫酸钠、磷酸钠、磷酸钾等的中性盐的盐溶液来调整,并且可适当地用约20mM磷酸盐缓冲液来缓冲。样品优选具有约6.5与约9.0之间的pH值,并且优选具有7与8之间的pH值。样品可保持与羟基磷灰石接触达使得非ADAMTS13杂质可充分结合的任何长度的时间,例如,约5分钟到约24小时。可在上清液馏分或流过馏分中收集富集的ADAMTS13,所述馏分可包括来自后续清洗,尤其是第一次清洗的洗脱液。

[0049] 在一个实施方案中,在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分保持于上清液或洗脱液中的条件下对样品进行羟基磷灰石色谱法会产生ADAMTS13富集,例如,与羟基磷灰石色谱法前的样品相比,非ADAMTS13杂质,尤其宿主细胞蛋白质减少约10倍到约115倍。在一个实施方案中,羟基磷灰石色谱法减少样品中的宿主细胞蛋白质至少约20倍(例如,约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍,例如,约100倍等)。

[0050] 在优选实施方案中,在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分保持于上清液或洗脱液中的条件下对样品进行羟基磷灰石色谱法会产生非ADAMTS13杂质,尤其宿主细胞蛋白质清除约90%到约99%。在一个实施方案中,对样品进行羟基磷灰石色谱法会产生非ADAMTS13杂质,尤其宿主细胞蛋白质清除至少约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.5%等)。因此,本文公开的包括通过在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分保持于上清液或洗脱液中的条件下对样品进行羟基磷灰石色谱法来使ADAMTS13蛋白质富集的方法也可提供包含实质上纯化的ADAMTS13蛋白质的缓冲液。

[0051] 以下实施例中提供使得ADAMTS13的实质性部分流过羟基磷灰石色谱柱的示例性柱条件。一般来说,为了在羟基磷灰石色谱法期间使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过,色谱柱优选具有约5cm到约30cm,例如20cm到30cm之间的柱床高度。另外,在对样品进行羟基磷灰石色谱法之前,例如,在将样品装载至羟基磷灰石柱上之前,所述柱可首先分别用尤

其由羟基磷灰石制造商建议的熟知清洗、活化和/或平衡缓冲液来清洗、活化和/或平衡。在一个实施方案中,所述柱是用相同缓冲液,例如,包含20mM Na/K PO₄、具有7.0的pH值并且在室温下具有5.5.mS/cm的电导率的缓冲液来活化和平衡。

[0052] (b) 混合模式阳离子交换/疏水相互作用色谱法

[0053] 在一个实施方案中,ADAMTS13蛋白质是通过使用羟基磷灰石,接着使用结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂进行的串联色谱法来富集。已意外地发现ADAMTS13结合混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂,而非ADAMTS13杂质留在溶液中或更加强烈地结合混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂。因此,可根据熟知方法,以连续分批模式或连续柱色谱法模式对样品进行羟基磷灰石处理,接着混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂处理,并且在使样品分别进行串联分批模式色谱法或串联柱色谱法后,可在最终上清液馏分或最终洗脱液池中收集充分富集的ADAMTS13蛋白质。因此,如本文所述,通过在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分保持于上清液中或以洗脱液形式流过包含羟基磷灰石的柱的条件下对样品进行羟基磷灰石色谱法来使蛋白质ADAMTS13富集。在用羟基磷灰石处理之后,包含富集ADAMTS13的所收集上清液或洗脱液任选地进行混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的分批模式或柱色谱法。在一个实施方案中,将来自羟基磷灰石步骤的上清液或洗脱液进料到包含混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的色谱柱中。混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的分批模式或柱色谱法可通过本文所描述、本领域中已知或本领域技术人员尤其鉴于本文中的公开可了解的任何方法来进行。适合于在羟基磷灰石色谱法之后使用的优选混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂是包含亲水性连接物的琼脂糖基基质。亲水性连接物可包含(例如)经由硫醚基团的功能配体。亲水性配体可带负电荷,并且可进一步包含疏水性基团,例如,碳氢化合物。进一步包含疏水性基团的亲水性配体可形成混合模式配体,即,适合于进行如本文所述的混合模式色谱法的具有多模式官能度的配体。在一些实施方案中,混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的离子容量可在约0.07mM/mL到约0.09mM/mL之间,并且具有约2到约14之间的pH稳定性。一般来说,ADAMTS13是经由离子键、氢键和/或疏水键来结合混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂。

[0054] 可根据本文描述的方法使用的市售混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的实例包括但不限于CAPTOTMMMC介质(GE Healthcare)和SampliQ SAX(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)。在一个优选实施方案中,混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂是CAPTOTMMMC。CAPTOTMMMC是基于具有约75μm平均粒径的刚性、高度交联、串珠琼脂糖的多模式弱阳离子交换剂。它包含在高盐浓度下结合蛋白质的具有多模式官能度的配体。对于具有约10cm到约20cm柱床高度的约1m直径柱来说,在约20℃下,使用在小于约3巴下(约0.3MPa)具有与水大约相同粘度的工艺缓冲液时,它具有约600cm/h的典型流速。

[0055] 在混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂色谱法期间,ADAMTS13结合混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂并进一步与非ADAMTS13杂质(例如,在样品预富集时存在的宿主细胞蛋白质)分离。当在柱上进行混合模式色谱法步骤时,阳离子交换/疏水性相互作用树脂吸附ADAMTS13蛋白质,同时污染性非ADAMTS13杂质通过流过色谱柱而从工艺物料流中清除并与样品中的ADAMTS13蛋白质分离。

[0056] 然后,将吸附ADAMTS13的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂清洗,以便

(例如)清除松散结合的污染物或杂质和/或调整缓冲液电导率以准备将ADAMTS13从树脂上洗脱。也就是说,在用色谱法使样品与羟基磷灰石接触,并且用色谱法使所收集的包含ADAMTS13的上清液或洗脱液与混合模式阳离子/疏水性相互作用树脂接触并吸附到其上之后,将混合模式阳离子/疏水性相互作用树脂用清洗缓冲液清洗。一般来说,清洗缓冲液包含缓冲离子磷酸盐和中性盐并具有高的pH值以使得当缓冲液的相关参数增加时,例如,随着缓冲液的盐浓度和/或pH值增加,ADAMTS13与混合模式阳离子/疏水性相互作用树脂的结合减弱。在一个实施方案中,首先将ADAMTS13所结合的混合模式阳离子/疏水性相互作用树脂用平衡缓冲液清洗,例如,用包含约20mM磷酸盐和约25mM NaCl并且在室温下具有约7.0pH值的平衡缓冲液清洗。后续清洗可使用包含(例如)约20mM磷酸盐、约80mM NaCl并在室温下具有约8.0pH值的清洗缓冲液来进行。ADAMTS13所结合的混合模式阳离子/疏水性相互作用树脂可进行用缓冲液的最终清洗,所述缓冲液包含(例如)50mM Na/K PO₄和160mM NaCl,并且在室温下具有8.0的pH值和16.5mS/cm的电导率。

[0057] 在进行羟基磷灰石色谱法,接着结合ADAMTS13蛋白质的阳离子交换/疏水性相互作用树脂的混合模式色谱法,和任选的清洗之后,用洗脱缓冲液将重组ADAMTS13蛋白质从混合模式色谱法树脂上洗脱。一般来说,洗脱缓冲液包含约5mM到约100mM的缓冲离子,例如,20mM到50mM的缓冲离子。示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷(tris)、HEPES、咪唑、组氨酸、MES、柠檬酸盐、Gly-Gly、三(羟甲基)氨基甲烷/醋酸盐等。洗脱缓冲液通常还包含单价或二价阳离子,诸如但不限于钠、钾或钙离子,优选呈高浓度的盐形式(例如Cl⁻、PO₄⁻、SO₄⁻或OAc阴离子等)。在一个优选实施方案中,洗脱缓冲液包含高浓度的钠离子,例如,大于约700mM Na⁺。洗脱缓冲液可具有从约7到约11范围内的pH值。在一个实施方案中,洗脱缓冲液包含50mM Na/K PO₄、1,000mM NaCl并且在室温下具有8.0的pH值和93mS/cm的电导率。

[0058] 以下实施例中提供使得从羟基磷灰石柱获得的富集ADAMTS13可结合柱中的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂并且与非ADAMTS13杂质分离的示例性条件。一般来说,混合模式阳离子交换/疏水性色谱柱的柱床高度可为约1cm到约100cm,或取决于样品体积而甚至更高。此外,取决于(例如)样品中与ADAMTS13的量相比的非ADAMTS13杂质的量,羟基磷灰石色谱柱容积与混合模式阳离子交换/疏水性相互作用色谱柱的柱容积的比率可为约10:1。

[0059] 另外,本领域技术人员将认识到,对于包含羟基磷灰石和混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法的实施方案来说,将在某些实施方案中选择用于清洗、活化和/或平衡的树脂和缓冲液以便与两个柱都相容。在一个实施方案中,使柱独立地活化。在另一个实施方案中,柱以串联方式平衡、加载和清洗一次,接着仅对混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂进行一次或多次第二或后续清洗和洗脱。在一个实施方案中,用于活化和平衡混合模式阳离子交换/疏水性相互作用色谱柱的缓冲液与用于活化和平衡羟基磷灰石柱的缓冲液相同。在一个实施方案中,用于活化和平衡混合模式阳离子交换/疏水性相互作用色谱柱的缓冲液是包含20mM Na/K PO₄并且在室温下具有7.0pH值和5.5.mS/cm电导率的缓冲液。

[0060] 在优选实施方案中,在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过羟基磷灰石树脂,接着结合混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂,然后从其上洗脱的条件下,对样品进

行羟基磷灰石和混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法。在更优选实施方案中,此串联色谱法产生充分富集的ADAMTS13。在一些实施方案中,对可预富集的样品(例如,在培养表达重组ADAMTS13的转化宿主细胞后收集的调整上清液)进行本文描述的串联色谱法产生约40%到约80%ADAMTS13(例如,在约45%到约75%之间,例如,在约50%到约70%之间,例如,约55%到约65%)和/或约40%到约90%(例如,约45%到约85%之间,例如,约50%到约80%之间,例如,约55%到约75%)活性。

[0061] 在一些实施方案中,串联色谱法清除约90%到约99%的宿主细胞杂质。在一个实施方案中,与对样品进行串联色谱法之前的ADAMTS13纯度相比,如本文所述的串联色谱法增加ADAMTS13纯度至少约600倍,例如至少约650倍,例如至少约700倍,例如至少约800倍,例如至少约900倍,例如至少约1,000倍,例如至少约1,100倍,例如至少约1,200倍,例如至少约1,300倍,例如至少约1,400倍,或至少约1,500倍。

[0062] 在一些实施方案中,对可优选地通过UF/DF和/或阴离子交换来预富集的样品(例如,在培养表达重组ADAMTS13的转化宿主细胞后收集的调整上清液)进行本文描述的串联色谱法产生具有约600到约1,500ppm非ADAMTS13杂质(例如宿主细胞抗原)的样品。例如,串联色谱法可产生具有约750到约1250ppm非ADAMTS13杂质的样品,优选具有小于约1,000ppm非ADAMTS13杂质的样品。

[0063] 在一些实施方案中,与串联色谱法之前的样品相比,串联色谱法会产生非ADAMTS13杂质(尤其宿主细胞抗原)的减少约1,000倍到约3,000倍。在一些实施方案中,对可预富集的样品(例如在培养表达重组ADAMTS13的转化宿主细胞后收集的调整上清液)进行本文描述的串联色谱法减少非ADAMTS13杂质(例如宿主细胞抗原)至少约1,000倍,例如至少约1,300倍,例如至少约1,500倍,例如至少约2,000倍,例如至少约2,500倍,例如至少约3,000倍等。

[0064] 因此,在优选实施方案中,来自包含重组ADAMTS13的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的洗脱缓冲液提供包含实质上纯化的ADAMTS13蛋白质的组合物。

[0065] 样品的预富集制备

[0066] 在一些实施方案中,本文公开的方法进一步包括制备包含ADAMTS13的样品以便通过羟基磷灰石色谱法或羟基磷灰石和混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法来富集。在此任选预富集步骤中,样品中的ADAMTS13可进行以下操作中的一个或两个:(a)通过超滤/渗滤(UF/DF)来浓缩;和/或(b)用色谱法与结合ADAMTS13并随后从其上洗脱的离子交换树脂接触。

[0067] (a) 预富集超滤/渗滤(UF/DF)

[0068] 在任选预富集步骤中,样品中的ADAMTS13通过预富集超滤来浓缩,并且样品的缓冲液通过渗滤来交换。预富集超滤/渗滤步骤通常是在如上所述的通过羟基磷灰石色谱法或羟基磷灰石接着混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法来使ADAMTS13富集之前进行。预富集超滤/渗滤步骤通常在任何预富集阴离子交换色谱法(如果进行)之前进行。此预富集超滤/渗滤(UF/DF)步骤可有效地清除小分子量组分,例如,细胞培养基的小分子量组分。此类组分可能结合到随后的色谱柱并降低柱的ADAMTS13容量。因此,预富集UF/DF可优化稍后色谱步骤的装载。在一个实施方案中,清除约30kDa以下的小分子量组分或至少其实质性部分。在一些实施方案中,清除(或实质上清除)的小分子量组分是约60kDa以

下、约55kDa以下、约50kDa以下、约45kDa以下、约40kDa以下、约35kDa以下、约30kDa以下、约25kDa以下、约20kDa以下等的组分。

[0069] 在某些实施方案中,还使用预富集超滤/渗滤步骤以将ADAMTS13交换到适当的缓冲溶液中以便后续处理和/或用于进一步浓缩样品。在一个实施方案中,适合的缓冲溶液是适合于预富集阴离子交换色谱法的低电导率缓冲液,条件是要进行此类阴离子交换色谱法。例如,低电导率缓冲液在室温下具有小于约10mS/cm的电导率,例如约7mS/cm到约8mS/cm,例如7mS/cm,并且可具有等于或大于约7.0的pH值。

[0070] 在另一个实施方案中,适合的缓冲溶液是适合于通过羟基磷灰石色谱法来富集的富集缓冲液,在所述色谱法之后可进行混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的色谱法。例如,富集缓冲液可包含20mM Na/K PO₄并且在室温下具有约7的pH值。在另一个实施方案中,适合的缓冲溶液还包含钙和/或锌离子,任一种或两种离子可使ADAMTS13蛋白质稳定。在一个实施方案中,适合的缓冲溶液包含小于约10mM(例如,2mM)浓度的钙离子。在另一个实施方案中,适合的缓冲溶液补充有小于约50μM(例如,5μM)浓度的锌离子。

[0071] 在一些实施方案中,适合的缓冲溶液包含在具有等于或大于约7.0的pH值的溶液中具有缓冲能力的缓冲剂。在一个实施方案中,缓冲剂选自由以下组成的组:磷酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷、HEPES、咪唑、组氨酸、MES、柠檬酸盐、Gly-Gly、三(羟甲基)氨基甲烷醋酸盐等。

[0072] 此预富集UF/DF步骤之后获得的样品可在后续纯化步骤中使用,例如,样品可为包含待通过羟基磷灰石色谱法,或羟基磷灰石色谱法接着阳离子交换/疏水性相互作用树脂混合模式色谱法清除的宿主细胞蛋白质的UF/DF浓缩池。在一些实施方案中,与预富集UF/DF步骤之前的样品相比,预富集UF/DF步骤之后的样品被浓缩约10倍到约20倍,例如约15倍。

[0073] (b) 预富集阴离子交换色谱法

[0074] 另一个任选预富集步骤包括预富集色谱法,其可在通过羟基磷灰石色谱法或羟基磷灰石接着混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法使ADAMTS13富集之前进行。本领域技术人员将认识到,预富集色谱法可在任选预富集超滤/渗滤步骤之后进行。或者,可单独地,即在不进行任选预富集超滤/渗滤步骤的情况下进行预富集色谱法。

[0075] 在一些实施方案中,预富集色谱步骤包括用色谱法使包含ADAMTS13的样品与阴离子交换树脂接触并将ADAMTS13蛋白质从阴离子交换树脂上洗脱。也就是说,ADAMTS13结合于阴离子交换树脂上并随后从其上洗脱。如本文所使用的术语“阴离子交换树脂”是指适合于阴离子交换色谱法而且(例如)由于带正电荷的基团(在中性pH值下)而具有净正电荷的任何树脂。实例包括但不限于二乙基氨基乙烷(DEAE)、二甲基乙醇胺(DMAE)、聚乙烯亚胺(PEI)、四级氨基乙烷(QAE)、三甲基氨基乙基(TMAE)、四级铵(Q)等及其组合。

[0076] 在一个实施方案中,阴离子交换树脂还具有以下特点中的一个或多个:大孔隙、灌注流动行为和对流行为。可在本文公开的预富集步骤中使用的市售阴离子交换树脂的非限制性实例包括Q-Sepharose Fast Flow(GE Healthcare,Piscataway,NJ)、ANX-Sepharose Fast Flow low sub(GE Healthcare)、DEAE-Sepharose Fast Flow(GE Healthcare)、DEAE-Toyopearl(Tosoh Bioscience LLC,Grove City,OH)、QAE-Toyopearl(Tosoh Bioscience LLC)、POROS® Q(Applied Biosystems,Foster City,CA)、POROS® 50D

(Applied Biosystems)、POROS®50PI (Applied Biosystems)、Convective Interaction Media (CIM®; BIA Separation)、Fractogel-DMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX)、Fractogel EMD-TMAE (Capital Scientific Inc., Austin, TX)、Matrex Cellulfine DEAE (Chisso Corp., Rye, NY) 等。

[0077] 在预富集阴离子交换色谱法期间, ADAMTS13结合于阴离子交换树脂上并与非ADAMTS13杂质(例如可存在于预富集UF/DF浓缩池中的宿主细胞组分)分离。一般来说, 阴离子交换树脂吸附ADAMTS13蛋白质, 而具有大于操作pH值的等电点的非ADAMTS13杂质通过流过阴离子交换柱而从工艺物料流中清除。等电点低于操作pH值的非ADAMTS13杂质更强烈地, 优选强烈得多地结合于树脂上, 以致于其不优先与ADAMTS13蛋白质共洗脱。然后, 将吸附ADAMTS13的柱在洗脱之前清洗, 以便(例如)清除松散结合的杂质或污染物和/或调整缓冲液的电导率以准备洗脱。通常情况下, 所结合的ADAMTS13通过增加缓冲液的离子强度而从阴离子交换树脂上洗脱。在一个实施方案中, ADAMTS13通过分步洗脱来洗脱。一般来说, 加载样品和清洗缓冲液在室温下具有约7到约9之间(例如7.7)的pH值和小于约10mS/cm(例如6.5mS/cm)的电导率。洗脱缓冲液在室温下可具有约6到约9(例如7)的pH值和大于约10mS/cm(例如16.5mS/cm)的电导率。

[0078] 通常情况下, 来自阴离子交换色谱步骤的洗脱液产生约60%到约120%的ADAMTS13活性(例如产生约70%或约80%到约107%的ADAMTS活性)且/或包含纯度为约20%到约70%(例如纯度为约30%、约40%、约50%、约60%等)的重组ADAMTS13。在一个实施方案中, 阴离子交换色谱法减少非ADAMTS13杂质约2倍到约5倍。在一个优选实施方案中, 预富集制备之后的收率百分比可为约75%。

[0079] 然后, 洗脱的ADAMTS13可如上所述通过对样品进行使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过的羟基磷灰石色谱法来富集, 或在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过的条件下对样品进行羟基磷灰石串联色谱法, 接着结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的色谱法来富集。

[0080] 病毒灭活

[0081] 本领域技术人员将认识到病毒灭活方法可尤其适用于从包含或可能包含病毒污染物(由病毒产生和/或来源于病毒的杂质, 包括(例如)病毒颗粒、病毒蛋白质、病毒DNA、病毒RNA和其片段)的样品中纯化重组ADAMTS13。因此, 在一个实施方案中, 本文公开的方法进一步包括至少一个病毒灭活步骤。术语“病毒灭活”是指以下任一种或两种情况: 病毒保持于溶液中, 但是失活或灭活(例如, 通过(例如)溶解脂质包膜病毒的脂质包衣而使得其不能生存); 和将病毒和/或病毒污染物从样品中物理清除(例如, 通过尺寸排阻)。因而, 在本文公开的情境中, “病毒灭活”是指病毒失活和病毒清除的任一种或两种情况。

[0082] 如果进行的话, 那么病毒灭活可在整个纯化工艺中发生一次或一次以上。另外, 其可在对样品进行羟基磷灰石色谱法之前或之后发生。在一些实施方案中, 病毒灭活是在以下更详细描述的进行阳离子交换色谱法来精炼的任选步骤之前和之后发生。然而, 本领域技术人员将认识到病毒灭活(如果有的话)可任选地在纯化工艺期间的任何步骤时发生。此外, 本领域技术人员可认识到病毒灭活的适当时机。

[0083] 使得脂质包膜病毒不能生存的方法在本领域是熟知的。一般来说, 使样品中的脂质包膜病毒失活(或灭活)的方法包括将溶剂-清洁剂混合物添加至样品(参见, 例如

Edwards等(1987)“Tri (n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives”Vox Sang 52:53-59(尤其参见第54-55页);和美国专利第4,540,573号(第7栏第9行到第12栏第42行);第4,764,369号(第7栏,第17行到第12栏第47行);第4,939,176号(第3栏第59行到第10栏第14行);第5,151,499号(第2栏第59行到第11栏第38行);第6,090,599号(第4栏第20行到第8栏第67行);第6,468,733号(第5栏第12行到第9栏第36行);和第6,881,573号(第5栏第63行到第14栏第9行);其各自以引用方式并入本文)。用于使脂质包衣病毒失活的溶剂-清洁剂组合可为本领域中已知的任何溶剂-清洁剂组合并且优选包含非离子型清洁剂和有机溶剂。非限制性实例包括磷酸三正丁酯(TnBP)和Triton X-100™,以及吐温80™(CAS 9005-65-6)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯、胆酸钠等。溶剂和/或清洁剂的浓度可为本领域中通常使用的那些浓度,例如大于约0.1%的TnBP和大于约0.1%的TritonX-100™。

[0084] 在一些实施方案中,溶剂-清洁剂混合物使病毒灭活的条件包括约10到约100mg/ml的溶剂-清洁剂,约5到约8范围内的pH值水平,和约2℃到约37℃、优选约12℃到约25℃范围内的温度,时长约30分钟到约24小时、优选约30分钟到约1小时。在一些实施方案中,将混合物在处理期间轻微振荡或搅拌。在一个实施方案中,病毒灭活步骤包括在15℃到25℃下将溶剂-清洁剂混合物(例如,包含0.3%TnBP、1%Triton X-100™和0.3%吐温80™的溶剂-清洁剂混合物)添加至样品中达至少1小时。在另一个实施方案中,将样品在12℃到16℃下用包含0.3%TnBP、1%Triton X-100™和0.3%吐温80™的溶剂-清洁剂混合物处理30分钟。如精通本领域的人员所显而易见,可使用其它溶剂-清洁剂组合和/或适合条件,诸如聚山梨酸酯或胆酸酯与磷酸三正丁酯的组合。此类组合可能需要更长处理时间,例如2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时或更长时间。

[0085] 灭活可通过本领域中已知的任何方法产生。例如,灭活可通过稀释,优选以冷稀释缓冲液进行的稀释来停止。例如,在一些实施方案中,灭活是通过用一个体积的包含约20mM MES,并且在室温下具有约6的pH值的冷稀释缓冲液稀释来停止。

[0086] 在用溶剂-清洁剂组合使脂质包衣病毒失活之后,可清除溶剂-清洁剂混合物。例如,溶剂-清洁剂混合物可经由色谱法或其它合适的方法来清除。在一些实施方案中,使用具有溶剂-清洁剂清除(SDR)树脂,诸如,例如HyperD™树脂(Biosepra Inc.,MA)(参见,例如美国专利第6,468,733号(第5栏第12行到第9栏第36行),其全部以引用方式并入本文)的色谱法。

[0087] 在蛋白质固定情况下将病毒污染物灭活

[0088] 在一些实施方案中,病毒灭活包括在将蛋白质固定时,用溶剂-清洁剂使病毒灭活。此类程序可用于本文所述的ADAMTS13多肽以及其它蛋白质的病毒灭活。其它蛋白质可包括但不限于来自可具有病毒污染物的来源的任何蛋白质或生物物质,包括免疫系统蛋白质(抗体、单克隆抗体、融合蛋白质、Fc融合、主要组织相容性抗原、T细胞受体)、酶(氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、连接酶)、结构蛋白质、纤维蛋白质(诸如细胞骨架蛋白质,如肌动蛋白、Arp2/3、冠蛋白、肌营养不良蛋白、角蛋白、肌球蛋白、血影蛋白、Tau蛋白质、微管蛋白和细胞外基质蛋白质,如胶原蛋白、弹性蛋白、F-脊椎蛋白)、球状蛋白质、血浆蛋白质(血清白蛋白和血清淀粉样P组分)、凝血因子(如补体蛋白质、因子VIII、因子XIII、纤维蛋白、蛋白质C、蛋白质S、蛋白质Z、蛋白质Z相关蛋白酶抑制剂、凝血酶、血管性血友病

因子)、C-反应蛋白质、血红素蛋白、细胞粘附蛋白质(钙粘蛋白、室管膜素、整联蛋白、NCAM、选择素)、跨膜运输蛋白质(CFTR、糖蛋白D、拼接酶)、离子通道(乙酰胆碱受体钾通道)、同向转运/逆向转运蛋白质(葡萄糖转运体)、激素和生长因子(表皮生长因子胰岛素、胰岛素样生长因子、催产素)、受体(跨膜受体、G蛋白质偶联受体、视紫红质、细胞内受体,如雌激素受体)、DNA结合蛋白质(组蛋白)、转录调控蛋白质(c-myc F0XP2、F0XP3、MyoD、p53)、营养存储/运输蛋白质(铁蛋白)、伴侣蛋白质、大分子复合物(核小体、核糖核蛋白、信号识别粒子、剪接体)等。在优选实施方案中,蛋白质是重组蛋白质,特别是在暴露于有机溶剂和清洁剂时易发生聚集的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质是ADAMTS13蛋白质,尤其是重组ADAMTS13,或不同的蛋白质(尤其是不同的重组蛋白质)。在一些实施方案中,重组蛋白质是凝血因子。在一些实施方案中,蛋白质是(例如)因子VIII、因子II、凝血酶、因子VIIa、因子IX、血管性血友病因子、抗MIF抗体中的一种或多种,尤其是顺应色谱纯化的蛋白质和/或对溶剂-清洁剂处理敏感的蛋白质。因此,本发明的另一个方面针对固定蛋白质的病毒灭活。优选地,病毒灭活是结合蛋白质纯化程序来进行,以使得所述程序涉及通过使所纯化的蛋白质固定进行的蛋白质制剂的病毒灭活。

[0089] 纯化各种蛋白质的下游工艺(诸如如上所述的工艺)中采用的传统溶剂-清洁剂病毒灭活步骤通常涉及(例如)在分批程序中将溶液形式的溶剂-清洁剂混合物添加到所纯化的样品中。在分批程序中,在搅拌容器(例如,用于大规模纯化的槽罐)中,将包含蛋白质的样品用溶剂-清洁剂混合物(例如,包含约1% Triton X-100、约0.3%磷酸三正丁酯和约0.3%聚山梨醇酯80的混合物)处理。在溶剂-清洁剂化学品溶解之后,可将所处理的样品溶液泵送至第二搅拌容器中,此时发生所定义的实际病毒灭活,因为蛋白质溶液在此经过培育以使得此类失活发生(例如,约30分钟到约一个小时)。

[0090] 相比之下,本发明的一些实施方案涉及包含蛋白质(例如所纯化的蛋白质)的组合物的病毒灭活,其中蛋白质是固定的。所述工艺包括在蛋白质固定时,而不是目标蛋白质处于溶液中时,使包含所关注的蛋白质的组合物与溶剂-清洁剂混合物接触。在优选实施方案中,蛋白质固定于色谱树脂上。在蛋白质固定于色谱树脂上(例如,色谱柱上)的情况下,病毒灭活在本文中称为“柱上”病毒灭活。以下实施例中描述的ADAMTS13在Poros S上的纯化提供进行柱上病毒灭活的这种工艺的一个实施方案。本领域技术人员将认识到,蛋白质可通过各种方法固定于各种载体上。例如,蛋白质可结合于任何固体或半固体载体(包括载玻片、珠粒、基质或膜)上。固定可通过相对于蛋白质溶液的其它组分将蛋白质固定于载体的任何工艺来进行。固定可由于载体上的基团和蛋白质上的基团之间的一种或多种类型的键(诸如,例如共价键、氢键、静电相互作用、范德华力等或其组合)而发生。

[0091] 对固定于色谱柱上的蛋白质进行病毒灭活可使纯化简化。例如,不需要一个以上容器(诸如在大规模纯化中使用的双槽罐系统),色谱纯化和病毒灭活可在同一容器中,例如同色色谱柱上进行。这简化了蛋白质纯化的下游工艺,例如,缩短了时间、节省了试剂和/或提高了效率。在一些实施方案中,色谱柱是阳离子交换树脂。在一些实施方案中,色谱柱是阴离子交换树脂。

[0092] 固定蛋白质的病毒灭活的某些实施方案的另一意外的益处是减少聚集物形成。一些蛋白质对于溶剂-清洁剂混合物显示敏感性,例如在与溶液形式的溶剂-清洁剂试剂接触时形成聚集物。不受特定理论或假说的限制,在敏感蛋白质固定时,例如在蛋白质结合于色

谱树脂时,使其与溶剂-清洁剂混合物接触可仅由于固定的蛋白质分子无法在物理上彼此接触而防止了聚集物的形成。在一些实施方案中,灭活导致形成少于约20%聚集物、少于约18%、少于约15%、少于约12%、少于约10%或少于约5%聚集物。并且,在某些实施方案中,与蛋白质制剂在蛋白质未固定的情况下进行病毒灭活时的聚集水平相比,聚集水平降低至少约10%、约20%、约50%或约100%。

[0093] 在一个优选实施方案中,将蛋白质装载于色谱树脂上并且将溶剂-清洁剂处理用作清洗步骤,优选持续足够长的培育期以使得脂质包膜病毒灭活的清洗步骤。例如,清洗步骤优选持续约30分钟到约一个小时。溶剂-清洁剂混合物包含处于适合于实现此类病毒灭活的浓度下的如上所述的非离子型清洁剂和有机溶剂。例如,在一些实施方案中,溶剂-清洁剂混合物包含1%Triton X-100、0.3%磷酸三正丁酯和0.3%聚山梨醇酯80。以下提供关于ADAMTS13纯化的一些特定实施方案的更多细节。

[0094] 病毒灭活也可包括(例如)通过过滤(诸如使用纳滤器的纳滤)的病毒清除。此类病毒清除可单独,或结合病毒失活(灭活),例如包含如上所述的溶剂-清洁剂混合物处理的病毒失活步骤来进行。当病毒灭活包括病毒失活和病毒清除时,病毒清除可在通过溶剂-清洁剂处理的病毒失活之前和/或之后发生。一般来说,样品的病毒清除涉及过滤样品,例如,使样品通过具有将ADAMTS13保持于样品中同时使得病毒和病毒污染物流过的孔径的过滤器。在一个实施方案中,过滤器的孔径在约15nm与约50nm之间。过滤还可通过使用20N或35N的过滤器(Planova,Asahi Kasei)的纳滤来进行。在一些实施方案中,使用预过滤器以防止纳滤器堵塞,例如,可使用约2 μ m过滤器,或0.2 μ PVDF或PES膜。

[0095] 通过阳离子交换色谱法来精炼

[0096] 在一些实施方案中,在羟基磷灰石色谱法(或羟基磷灰石接着混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法)之后,所述方法进一步包括通过阳离子交换树脂色谱法来精炼包含ADAMTS13的样品的任选步骤。在此步骤,包含ADAMTS13的缓冲液的电导率可在精炼之前降低(如果有必要)以达到适合于阳离子交换色谱法的电导率。

[0097] (a)降低缓冲液电导率

[0098] 在羟基磷灰石色谱法或羟基磷灰石接着混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法之后,可通过降低缓冲液电导率,例如,通过清除离子组分(例如氯化钠)来制备包含ADAMTS13蛋白质的缓冲液以便进行阳离子交换。在一些实施方案中,缓冲液电导率降低至小于约5mS/cm且/或pH值降低至约6.0。缓冲液电导率可通过本领域中已知、本文所述或如本领域技术人员尤其鉴于本文公开可了解的任何方法来降低。非限制性实例包括超滤/渗滤(例如,使用横流膜匣或空心纤维模块)、凝胶过滤、渗析等。

[0099] 在一个实施方案中,通过以具有约10kDa截留量的膜,相对于阳离子交换平衡缓冲液(例如,包含20mM MES、在室温下pH值为6.0的缓冲液)进行超滤/渗滤来制备ADAMTS13蛋白质以便进行阳离子交换。在一些实施方案中,超滤/渗滤膜是PES膜,其具有约10kDa到约50kDa截留量,例如约20kDa截留量、约30kDa截留量、约40kDa截留量等。使用此类方法,缓冲液pH值可从约8.0降低到约6.0;且/或缓冲液电导率可在室温下降低到约2mS/cm以下。在一些此类实施方案中,渗滤缓冲液可包含20mM MES并且可具有在室温下为6.0的pH值和/或在室温下为0.6mS/cm的电导率。在一些实施方案中,渗滤缓冲液电导率可与所使用的阳离子交换平衡缓冲液的相同或实质上相同。

[0100] 在一个实施方案中,制备包含ADAMTS13的缓冲液以便进行阳离子交换是通过渗析,例如,使用包含血液渗析模块,诸如空心纤维血液渗析模块(Aquamax系列,PES chemistry of the Hollowfibers,Edwards Lifesciences,Unterschleienheim,Germany)的Dialyzer Hardware来进行的。一般来说,对于约5L的样品,使用约2m²的过滤面积;并且样品缓冲液和渗析缓冲液是彼此以反向流运作。在一些实施方案中,渗析由通过单个渗析模块的不超过两次操作组成。“单个渗析模块”是指借以进行渗析的一个单元或结构。渗析模块通常包含装入管状外壳中的一束末端开放的空心纤维膜以建立各自具有入口和出口通路的两个不同的腔室,即腔式流室和毛细管外室。半渗透性空心纤维膜将两个腔室分隔,并基于溶质的大小和浓度梯度选择性地允许传送,同时限制其它溶质在2个腔室之间传送。通过以逆流流动模式操作模块,通过膜的溶质很快被刷除并稀释成较大体积的渗析溶液(“冲刷液”),从而保持尽可能最大的浓度梯度。因此,渗析可经由单个渗析模块以单次冲刷操作来进行。

[0101] 在一些实施方案中,使用这些方法的组合,例如,可使用UF/DF与渗析以实现样品的浓缩和缓冲液更换以便准备通过阳离子交换色谱法来精炼。在其它实施方案中,可通过阴离子交换色谱法来进行缓冲液更换。

[0102] (b) 阳离子交换色谱法

[0103] 如上所述,本文公开的方法可任选地包括通过阳离子交换树脂色谱法来精炼样品。如本文所使用的术语“阳离子交换树脂”是指适合于阳离子交换色谱法而且(例如)由于带负电荷的基团(在中性pH值下)而具有净负电荷的任何树脂。实例包括但不限于羧基、羧甲基(CM)基团、磺烷基基团(SP,SE)、甲基磺酸酯(S)基团、纤维素硫酸酯、肝素等,及其组合。此步骤通常是设计来浓缩ADAMTS13产物、将产物置于预配制的缓冲液中,并进一步减少非ADAMTS13杂质,包括工艺相关杂质(例如宿主细胞蛋白质(诸如CHO蛋白质)、宿主细胞DNA(诸如CHO DNA)、溶剂-清洁剂混合物的试剂等),以及产物相关杂质(例如ADAMTS13的聚集物和非生物活性片段)。

[0104] 在一个实施方案中,阳离子交换树脂还具有以下特点中的一个或多个:大孔隙、灌注流动行为和对流行为。可用于本文公开的精炼步骤中的市售阳离子交换树脂的非限制实例包括POROS[®]S(Applied Biosystems)、Convective Interaction Media(CIM[®];BIA Separation)、Toyopearl Gigacap S(Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA)、Toyopearl Gigacap CM(Tosoh)、Toyopearl SP(Tosoh)、Toyopearl CM(Tosoh)、MacroPrep S(Bio-rad, Hercules, CA)、UNOsphereS(Bio-rad, Hercules, CA)、MacroPrepCM((Bio-rad, Hercules, CA)、Fractogel EMD SO3(Merck)、Fractogel EMD COO(Merck)、Fractogel EMD SE Hicap(Merck)、Cellufine Sulfate(Chisso)、CM and SP Trisacryl(Pall)、CM and S HyperD(Pall)、Mustang S(Pall)、S and CM Sepharose CL(GE Healthcare)、S and CM Sepharose FF(GE Healthcare)、S and CM CAPTO[™](GE Healthcare)、MonoS(GE Healthcare)、Source S(GE Healthcare)等。

[0105] 阳离子交换树脂色谱法是本领域中熟知的方法。在一些实施方案中,阳离子交换柱具有约0.2到约0.5mg ADAMTS13/mL的最大负载。在一个优选实施方案中,柱以至少0.3mg ADAMTS13/mL进行装载。一般来说,在阳离子交换树脂色谱法期间,ADAMTS13结合于阳离子交换树脂上,并且使缓冲液和某些杂质流过。然后,可将吸附ADAMTS13的柱清洗,以便(例

如) 清除松散结合的污染物或杂质和/或调整缓冲液以准备将ADAMTS13从阳离子交换树脂上洗脱。然后, 可将ADAMTS13在洗脱液中洗脱。

[0106] 在一些实施方案中, 从阳离子交换色谱法步骤获得的洗脱液含有高于预期的量的ADAMTS13聚集物。在一些实施方案中, 例如, 洗脱液包含大于约15%的聚集物, 据信所述聚集物是在浓缩和通过渗析器步骤的缓冲液更换, 和/或阳离子交换色谱法步骤之后引入的。

[0107] 为产生具有显著较低聚集物百分比的ADAMTS13, 如在图2中关于阳离子交换树脂Poros S的进一步详述, 可使用阳离子交换树脂的特定条件。例如, 在一些实施方案中, 例如, 如上文更详细地描述, 使用包含通过阳离子交换色谱法的纯化接着柱上溶剂-清洁剂病毒灭活的组合。这种组合优选产生在洗脱液中与ADAMTS13多肽一起出现的较低量的聚集物。在更优选实施方案中, 洗脱程序包括梯度洗脱(而不是分步洗脱), 其可(例如)进一步清除洗脱峰下行部段的ADAMTS13聚集物。在更优选实施方案中, 洗脱缓冲液中的吐温80的浓度大于约0.05%, 例如约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%, 优选约0.1%、约0.11%、约0.12%、约0.13%、约0.14%或约0.15%。据信, 浓度增加对于ADAMTS13具有进一步稳定作用, 可进一步防止在从树脂上洗脱ADAMTS13期间形成高分子量结构。“使ADAMTS13蛋白质稳定”或“对于ADAMTS13的稳定作用”是指倾向于促进尤其呈完整和/或单体形式, 或实质上完整和/或单体形式, 而非片段或聚集形式的ADAMTS13的天然结构的产生。稳定也可是指所获得的ADAMTS13抵抗分裂、天然结构损失和/或面对其它不稳定条件(诸如温度变化、pH值变化、离子强度变化等)发生聚集的倾向。

[0108] ADAMTS13蛋白质也可通过在收获期间使用的基质来稳定, 例如, 通过在对浓缩的收获物进行通过溶剂-清洁剂处理进行的病毒灭活时使用的基质来稳定。此外, 确实形成的聚集物可通过稍后的纯化步骤来清除, 所述纯化步骤诸如捕获于阴离子交换色谱柱(诸如, 如本文所述的ANX Sepharose)上; 和/或通过色谱法(诸如, 如本文所述的羟基磷灰石/Capto MMC的串联色谱法)的精炼。

[0109] 使用如上所述的一个或多个修改可产生包含较低量的ADAMTS13多肽聚集物的洗脱液。例如, 在优选实施方案中, 来自阳离子交换柱的洗脱液可包含少于约20%、少于约18%、少于约15%、少于约12%、少于约10%或少于约5%的聚集物。

[0110] 阳离子交换树脂色谱法的最后步骤包括用洗脱缓冲液来洗脱ADAMTS13蛋白质。在一些实施方案中, 结合的ADAMTS13是通过增加缓冲液的离子强度来从阳离子交换树脂上洗脱。包含用于以色谱法接触阳离子交换树脂的ADAMTS13的缓冲液通常在室温下具有小于约10mS/cm, 例如小于5mS/cm的电导率。此外, 包含用于以色谱法接触阳离子交换树脂的ADAMTS13的缓冲液通常在室温下具有小于约7.0, 例如6.0的pH值。用于从蛋白质阳离子交换树脂上洗脱ADAMTS13的洗脱缓冲液可具有低于此类缓冲液的离子强度。树脂也可用pH值等于或实质上等于预定存储缓冲液的pH值的缓冲液来清洗。

[0111] 在一个优选实施方案中, 用存储缓冲液将ADAMTS13蛋白质从阳离子交换树脂上洗脱。一般来说, 存储缓冲液是指在室温下具有约5与约9之间的pH值, 并且包含钙、缓冲化合物和盐的缓冲液。存储缓冲液的pH值在室温下可大于约7.0(例如约7.5)。存储缓冲液可包含少于约10mM的Ca⁺⁺(例如, 2mM的Ca⁺⁺); 缓冲化合物可选自由以下组成的组: 磷酸酯、三(羟甲基)氨基甲烷、HEPES、组氨酸、咪唑、gly-gly、MES、甘氨酸、醋酸盐等; 并且盐可选自由以下组成的组: NaCl、KCl、CaCl₂、MgCl₂等。在一个优选实施方案中, 存储缓冲液具有大于7.0的

pH值并且包含少于10mM的钙离子、缓冲化合物和盐。在一个更优选实施方案中,存储缓冲液进一步包含非离子型清洁剂,例如,约0.01到约0.5%非离子型清洁剂,例如0.05%非离子型清洁剂。在更优选实施方案中,在用存储缓冲液从阳离子交换树脂上洗脱之后,洗脱液不进行后续浓缩,也不进行缓冲液更换步骤。

[0112] 在一个特定实施方案中,Source S (GE healthcare),例如,具有约20cm柱床高度的Source S柱用作精炼步骤的阳离子交换树脂。在此类实施方案中,柱可用约2个柱体积的约2M NaCl来活化,并且用约6个柱体积的包含约20mM MES、约10mM NaCl和约2mM CaCl₂,并在室温下具有约6的pH值的缓冲液来平衡。包含ADAMTS13的缓冲液可在室温下以低于约5mS/cm的电导率与柱接触,并且随后用平衡缓冲液清洗柱,最后再收集包含ADAMTS13蛋白质的洗脱液。收集之后,洗脱液可(例如)通过阴离子交换色谱法、渗滤、超滤、渗析等来浓缩并缓冲液更换成存储缓冲液。

[0113] 在另一个特定实施方案中,在精炼包含ADAMTS13蛋白质的样品中,将POROS[®]S用作阳离子交换树脂。在此实施方案中,包含用于以色谱法接触阳离子交换树脂的ADAMTS13的缓冲液可具有小于约5mS/cm的电导率和介于约6.1与约6.4之间的pH值。虽然分步洗脱可优选地提供更浓的产物,但是ADAMTS13可使用梯度洗脱来洗脱。如果进行梯度洗脱,可使用两种缓冲液,例如,具有低盐含量(例如,少许到没有盐)的第一缓冲液和具有较高盐含量(例如,约500mM)的第二缓冲液以使得洗脱液池可具有约200mM的盐浓度。如果进行分步洗脱,洗脱缓冲液可包含存储缓冲液,例如,具有约300mM NaCl、约2mM CaCl₂、约20mM组氨酸、约0.05%吐温80,并且在室温下可具有约7.5的pH值的存储缓冲液。在一些此类实施方案中,在POROS[®]S步骤之后不需要缓冲液更换,即,从POROS[®]S获得的ADAMTS13馏分已经处于缓冲液中并且具有适合于存储的浓度。在其它实施方案中,从POROS[®]S柱获得的ADAMTS13馏分可进行进一步浓缩和/或缓冲液更换步骤。

[0114] 一般来说,根据本文公开方法的一些实施方案来纯化重组ADAMTS13蛋白质产生具有纯ADAMTS13蛋白质的组合物。在一个实施方案中,根据公开方法来纯化重组蛋白质产生至少约90%纯,例如至少约95%纯,例如至少约98%纯,例如或至少约99%纯的ADAMTS13蛋白质。可根据公开方法的一些实施方案获得至少约20%的产率。在一个实施方案中,所述方法提供至少约5%,例如约30%,例如约10%,例如约20%,例如约40%,例如约50%,例如约60%,例如约70%,例如约80%,例如约90%或例如约95%的产率。在一些实施方案中,所述方法提供具有范围在约500单位/毫克ADAMTS13到约1,000单位/毫克ADAMTS13变化的比活性的ADAMTS13蛋白质。在另一个实施方案中,所述方法提供具有范围在约1,200单位/毫克ADAMTS13 UV 280蛋白质到约2,400单位/毫克ADAMTS13 UV 280蛋白质变化的比活性的ADAMTS13蛋白质。在重组ADAMTS13蛋白质由经重组ADAMTS13核酸转化的CHO细胞产生的另一个实施方案中,根据公开方法纯化重组ADAMTS13产生具有少于约1,000ppm宿主细胞杂质的组合物。在一些实施方案中,所述方法提供存储缓冲液中的至少约2mg/mL ADAMTS13蛋白质。

[0115] 包含重组ADAMTS13蛋白质的组合物

[0116] 本发明进一步提供包含根据本文公开方法纯化的重组ADAMTS13的组合物。本文公开的组合物可适用于存储纯化的重组ADAMTS13。例如,在一些实施方案中,纯化的ADAMTS13蛋白质是(例如)在约-60℃以下冷冻存储。本文公开的组合物还可适用于治疗性施用

ADAMTS13蛋白质,和/或制备用于治疗性施用,尤其肠胃外施用的组合物。例如,在一些实施方案中,根据本文所述方法获得的纯化的ADAMTS13是呈原料药物质形式,即,准备配制成治疗性施用组合物的形式。

[0117] 因此,本发明的另一个方面涉及纯化的重组ADAMTS13蛋白质与赋形剂或其它药学上可接受的载体混合的药物组合物。在优选实施方案中,药学上可接受的载体是药学惰性的。药学惰性载体是不与或实质上不与活性药物反应,且/或尤其不影响或实质上不影响活性物质的所需药物性质的载体。药物组合物可以本领域中已知的任何方式制备,例如,通过传统的混合、溶解、粒化、糖衣药丸制作、细磨、乳化、囊装、包埋、冻干等来制备。

[0118] 取决于所治疗的病状,这些药物组合物可配制来全身地或局部地施用。配制和施用技术可见于最新版的“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co, Easton Pa.)中。合适的路线可包括(例如)口服或穿粘膜施用;以及肠胃外递送,包括肌肉内施用、皮下施用、髓内施用、鞘内施用、心室内施用、静脉内施用、腹膜内施用、鼻内施用等。

[0119] 适用于本发明的药物组合物包括包含作为呈可有效实现预期用途的量的活性成分的ADAMTS13的组合物。如本文所使用的ADAMTS13的“有效量”可指增强、提高、改善、增加或产生天然ADAMTS13的生物效应的量。基于ADAMTS13在裂解参与凝血的一种较大蛋白质血管性血友病因子中的作用,天然ADAMTS13的生物效应包括vWF裂解蛋白酶活性。“有效量”包括ADAMTS13导致血小板聚集水平降低的量,例如,将患凝血障碍的个体的水平减少到与不患凝血障碍的个体更具有可比性的水平的量。凝血障碍包括但不限于血栓性血小板减少性紫癜(TTP)(又称莫斯科维茨(Moschcowitz)综合症)、厄普肖舒尔曼(Upshaw-Schulman)综合症(TTP的家族形式)和中风。“有效量”还包括在治疗一种或多种凝血障碍和相关病状中达到预防和/或治疗益处的量。某些的有效量的测定完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0120] 本发明提供治疗和/或预防动物受试者的凝血障碍和相关病状的方法、药物组合物和试剂盒。如本文所使用的术语“动物受试者”包括人类以及其它哺乳动物。

[0121] 如本文所使用的术语“治疗和/或预防”包括分别实现治疗益处和/或预防益处。治疗益处是指所治疗的潜在凝血障碍的逆转或改善。例如,在TTP患者中,治疗益处包括根除或缓解一个或多个与TTP相关的病状和/或症状,以使得虽然事实上患者可能仍罹患潜在障碍,但是观察到患者的改善。例如,治疗不仅可在血栓形成得以减少或根除时提供治疗益处,而且在观察到患者的伴随TTP的症状改善(诸如减少头痛、降低发烧和/或延迟肾功能衰竭)时也提供治疗益处。

[0122] 关于预防益处,本发明的药物组合物可施用给处于患上凝血障碍风险中的患者,包括(例如)即使可能尚未作出诊断,但是报告一个或多个通常与如TTP的凝血障碍相关的症状或病状的患者。

[0123] 除了活性成分以外,药物组合物可包含有助于将活性化合物加工成可药用的制剂的适当的药学上可接受的载体,诸如赋形剂和助剂。

[0124] 用于肠胃外施用的药物制剂通常包含水溶性形式的活性成分的水溶液。在一些实施方案中,可以适当的油注射混悬液形式制备活性物质的混悬液。合适的亲脂性溶剂或赋形剂包括油(诸如芝麻油)或合成脂肪酸酯(诸如油酸乙酯或甘油三酯)或脂质体。水性注射混悬液可含有增加混悬液粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖酐。任选

地,混悬液也可含有合适的稳定剂或增加活性物质溶解度以便(例如)制备高浓度溶液的药剂。

[0125] 对注射来说,本发明的药物组合物可在水溶液,优选生理相容缓冲液(诸如汉克斯溶液、林格氏溶液或生理缓冲盐水)中配制。对组织或细胞施用来说,在制剂中使用适合于待渗透的特定屏障的渗透剂。此类渗透剂一般在本领域为已知的。

[0126] 用于口服的药物制剂可通过以下获得:将活性物质与固体赋形剂组合,任选地研磨所得混合物,并且(如果需要的话)在添加合适的助剂之后,加工颗粒混合物以获得片剂或糖衣药丸核心。合适的赋形剂包括碳水化合物或蛋白质填充剂,诸如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;来自玉米、小麦、米、马铃薯等的淀粉;纤维素,诸如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠;树胶,包括阿拉伯胶和黄蓍胶;和蛋白质,诸如明胶和胶原蛋白。如果需要的话,可添加崩解或溶解剂,诸如交联聚乙烯基吡咯烷酮、琼脂、褐藻酸或其盐,诸如褐藻酸钠。也可使用载体以使得药物组合物配制成片剂、丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆、膏剂、溶液、混悬液、糖衣药丸等,以便由待治疗的患者口服和/或鼻腔摄入。

[0127] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制成的压接式胶囊,以及由明胶和诸如甘油或山梨糖醇的涂料制成的软质、密封胶囊。压接式胶囊可含有与以下物质混合的活性物质:填充剂或粘合剂,诸如乳糖或淀粉;润滑剂,诸如滑石粉或硬脂酸镁;和任选地稳定剂。在软胶囊中,可在存在或不存在稳定剂的情况下,将活性化合物溶解或混悬于合适的液体,诸如油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。

[0128] 包含根据本文所述的方法制备的ADAMTS13或其它蛋白质的组合物可与药学上可接受的载体一起配制,放置于适当的容器(或试剂盒)中,并且贴有供治疗所指示病状的标签。

[0129] 实施例

[0130] 提供以下实施例以用于说明目的,而不欲限制本发明的范围。

[0131] 实施例1

[0132] 图1提供根据本文公开的本发明的某些实施方案的纯化ADAMTS13蛋白质的示例性方法。在所提供的实施例中,从在培养包含重组ADAMTS13核苷酸序列的CHO细胞后收集的上清液中纯化重组ADAMTS13蛋白质。在此实施例中,样品是包含约2单位/毫升(约2微克/毫升)ADAMTS13蛋白质的细胞培养物上清液。

[0133] 如图1所示,包含ADAMTS13和非ADAMTS13杂质的样品可首先进行任选预富集制备:(a)如步骤101所示,样品可通过超滤浓缩(约10倍到约20倍)并且通过渗滤(分子量截留量为约30kDa)来进行缓冲液更换;和(b)如步骤102所示,ADAMTS13蛋白质可在进一步富集之前结合于阴离子交换树脂并从其上洗脱。

[0134] 样品的预富集制备

[0135] (a) 预富集超滤/渗滤(UF/DF)

[0136] 如图1步骤101所示,为了优化预富集阴离子交换色谱法的装载,将细胞培养物上清液浓缩约10倍到约20倍并且使用PES膜(约30kDa到约50kDa截留量;Pall Omega)渗滤至含有钙和锌离子的低电导率缓冲液中,据认为钙和锌离子可使ADAMTS13稳定。细胞培养物上清液渗滤的缓冲液是20mM三(羟甲基)氨基甲烷、0.1%聚山梨醇酯80、85mM NaCl、2mM CaCl₂、5μM ZnCl₂,其pH值在室温下是7.7。

[0137] (b) 预富集阴离子交换色谱法

[0138] 如图1步骤102所示,预富集阴离子交换色谱法可使用来自GE healthcare的ANX Sepharose Fast Flow低取代度来进行。此阴离子交换树脂可根据以下条件来使用(表1-2)。

[0139] 柱负载:最大0.5mg ADAMTTS13Ag/ml树脂;柱床高度:20cm

[0140] 表1

[0141]

步骤	缓冲液	柱容积 (CV)	流速 (cm/h)
柱活化	ANX-HS	2	100
平衡	ANX-Equi	6	100
负载	浓缩和渗滤的 CCS		
清洗 1	ANX-W1	2,5	100
清洗 2	12.5% ANX-EluB/87.5%ANXEluA	3	100
洗脱梯度	12.5% ANX-EluB/87.5%ANXEluA 到 100% ANX-EluB	11	100
洗脱后	ANX-HS	3	100

[0142] 或者,如表2详述,可以2.8柱体积的包含48%ANX-EluB和52%ANX-EluA的缓冲液来使用分步洗脱。也指示其它潜在合适的缓冲液。

[0143] 表2

[0144]

缓冲液	制剂
ANX-Equi	20 mM 三(羟甲基)氨基甲烷、0.1% 聚山梨醇酯 80、50 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、5 μM ZnCl ₂ , pH 值=7.7 (室温)
ANX-W1	20 mM 三(羟甲基)氨基甲烷、0.1%聚山梨醇酯 80、50 mM NaCl, pH 值=7.7 (室温)
ANX-EluA	20 mM Na/K PO ₄ , pH 值=7.0 (室温)
ANX-EluB	20 mM Na/K PO ₄ 、400 mM NaCl, pH 值=7.0 (室温)

[0145]

ANX-HS	2 M NaCl
--------	----------

[0146] 可使用与图1步骤102指示的树脂不同的树脂。例如,可使用来自Applied Biosystems,Foster City,CA的POROS 50D和POROS 50PI。来自使用此树脂的预富集阴离子交换色谱法的洗脱液可提供纯度为约20%到约70%的重组ADAMTS13,并且样品的此预富集制备之后的收率百分比可为至少约75%。

[0147] ADAMTS13的富集

[0148] 如分别在图1步骤103和104中所示,然后可使ADAMTS13经由精炼步骤(a)和(b)富集。使包含ADAMTS13的样品进行串联色谱法,首先进行步骤103的在II型羟基磷灰石柱(Biorad,Hercules,CA)上的羟基磷灰石色谱法,接着进行步骤104的在阳离子交换/疏水性相互作用树脂CAPTOTMMMC (GE healthcare)上的混合模式色谱法。更具体地说,来自步骤102的预富集阴离子交换色谱法的洗脱液池以羟基磷灰石稀释缓冲液1:4稀释以使电导率降低至约6mS/cm。使稀释洗脱液池进行步骤103的在使得ADAMTS13蛋白质的实质性部分流过的条件下的羟基磷灰石,接着步骤104的结合ADAMTS13蛋白质的混合模式阳离子交换/疏水性相互作用树脂的串联色谱法。下文和表3-4中提供串联色谱法的条件。

[0149] 柱1:树脂:II型羟基磷灰石(Biorad)(HA);负载:最大2mg总蛋白质/毫升树脂;柱床高度:20-30cm。

[0150] 柱2:树脂:Capto MMC (GE healthcare);负载:3-6mg ADAMTS13/ml树脂;柱床高度:10cm。

[0151] 柱容积比率HA:MMC=10:1。

[0152] 表3

[0153]

步骤	缓冲液	柱容积 (CV)	流速 (cm/h)
活化 (MMC)	MMC 洗脱	3 (MMC)	50 (MMC)
平衡	HA-Equi.	4 (HA)	50 (HA)
平衡	HA-Equi.	1(HA)	50 (HA)
负载	稀释的捕获物洗脱液 (以 HA-Equi 1:5 稀释) 的电导率 < 6 mS/cm	20 - 30 L	30 (HA)
重新平衡	HA-Equi.	0.5 (HA)	30 (HA)
清洗 1 (MMC)	MMC-Equi.	3 (MMC)	50 (MMC)
清洗 2 (MMC)	MMC 清洗	4 (MMC)	50 (MMC)
洗脱 (MMC)	75% MMC 洗脱缓冲液/	4 (MMC)	50 (MMC)

[0154]

	25% MMC 清洗缓冲液		
--	---------------	--	--

[0155] 表4

[0156]

缓冲液	配制	电导率
HA稀释	20mM Na/K PO ₄ , pH值7.0 (室温)	
TANDEM-Equi.	20mM Na/K PO ₄ , 25mM NaCl, pH值7.0 (室温)	约5.5mS/cm (室温)
MMC清洗	50mM Na/K PO ₄ , 160mM NaCl, pH值8.0 (室温)	约16.5mS/cm (室温)
MMC洗脱	50mM Na/K PO ₄ , 1000mM NaCl, pH值8.0 (室温)	约93mS/cm (室温)
HA洗脱	300mM K PO ₄ , pH值7.0 (室温)	约33mS/cm (室温)

[0157] 通过串联色谱法富集之后的ADAMTS13收率百分比可为至少60%。

[0158] 病毒灭活

[0159] 如图1步骤105所示,样品可进行溶剂-清洁剂处理以使污染性病毒或病毒颗粒灭

活;且/或使样品过滤以清除此类病毒或病毒颗粒。也如图1所示,病毒灭活步骤105可在程序中的不同点进行,例如在串联色谱步骤103和104之前,或在以下描述的涉及浓缩和缓冲液更换的步骤,即步骤106之后进行。

[0160] 对通过溶剂-清洁剂处理来使病毒灭活来说,将样品用包含1% Triton X-100®、0.3% 磷酸三正丁酯和0.3% 聚山梨酸酯80的溶剂-清洁剂混合物在约12℃到约16℃下处理30分钟(特定地使脂质包膜病毒灭活)。实施例2中提供更多细节。

[0161] 或者或另外,对样品进行过滤,例如通过0.2μm颗粒过滤器的纳滤。例如,将溶剂-清洁剂处理之后的混合物用以下描述的1体积精炼平衡缓冲液稀释,并且通过0.2μm PVDF或PES膜过滤。过滤可在溶剂-清洁剂处理之前和/或之后进行。处理之后的过滤可用于清除可能已在处理期间形成的颗粒物质。也如图1中所示,还可通过使用20N过滤器(Planova, Asahi Kasei)的纳滤来进行过滤,其中病毒灭活步骤105是在串联色谱步骤103和105之前进行。如下所述,可在样品通过阳离子交换色谱法精炼之后进行进一步的病毒灭活步骤105。

[0162] 来自此病毒灭活的ADAMTS13收率百分比可为至少95%。

[0163] 通过阳离子交换色谱法来精炼

[0164] 富集之后,ADAMTS13可通过阳离子交换树脂色谱法来精炼,并且包含ADAMTS13的缓冲液的电导率可在精炼之前降低,以便达到适合于阳离子交换色谱法的电导率。因此,富集后步骤可涉及(a)降低缓冲液电导率;接着(b)阳离子交换色谱法。

[0165] (a)降低缓冲液电导率

[0166] 如图1步骤106所示,用于阳离子交换色谱法的制备可涉及使用UF/DF(以10kDa的截留量)和Dialyzer Hardware来进行的浓缩和缓冲液更换。在所说明的实施方案中,用于缓冲液更换的Dialyzer Hardware涉及具有0.3-1.9m²过滤面积的空心纤维血液渗析模块(Aquamax系列,PES chemistry of the Hollowfibers,Edwards Lifesciences, Unterschleibheim,Germany)。在操作期间,在管线内监测以下参数:压力(模块前、模块后以及跨膜压力)、电导率和温度。渗析器卡盘与两个泵连接,一个进料样品(通过空心纤维)并且一个进料渗析缓冲液(在反向流动方向上环绕中空纤维)。对于约5L的样品,使用大约2m²的过滤面积;并且流体流动通过以下方式固定:40ml/min(样品流动或20ml/min/m²过滤面积)、60ml/min(渗析缓冲液流动,反向流动)。在渗析之前和之后,将空心纤维模块用渗析缓冲液冲洗,并且对收集产物进行渗析后冲洗。渗析之后,样品具有与之前大约相同的体积,虽然其在很小的程度上被浓缩。

[0167] 以这种方式降低缓冲液电导率之后的ADAMTS13收率百分比可为约90%。

[0168] 在其它实施方案中,缓冲液更换可通过如步骤102中的ANX Sepharose-FF低取代度上的阴离子交换色谱法来进行。

[0169] 阳离子交换色谱法

[0170] 如图1步骤107所示,在使ADAMTS13蛋白质富集(和任选的浓缩和缓冲液更换步骤106和/或病毒灭活步骤105)之后,样品可通过阳离子交换色谱法来精炼。包含ADAMTS13蛋白质的缓冲液在Source S柱(GE healthcare)或POROS®S柱,诸如POROS®50HS柱(Applied Biosystems)上精炼。

[0171] 在Source 30S柱上精炼的条件提供于表5中,并且用于精炼步骤的缓冲液提供于

表6中。

[0172] 树脂:Source 30S (GE healthcare);柱负载:最大0.2 (0.5) mg ADAMTS13/ml树脂;柱床高度:20cm。

[0173] 表5

[0174]

步骤	缓冲液	柱容积 (CV)	流量 (cm.h)
柱活化	2 M NaCl	2	32
平衡	SOS-Equi.	6	32
负载			32
清洗	SOS-Equi.	3	32
洗脱 (梯度)	100% SOS-Equi./0% SOS-Elu.到 0% SOS-Equi./100% SOS-Elu.	5	19
洗脱后	SOS-Elu.	3	32

[0175] 表6

[0176]

缓冲液	配制	注解
SOS-Equi.	20 mM MES, pH 值 6.0 (室温)	缓冲液可含有 10 mM NaCl、2 mM CaCl ₂
SOS-Elu.	20 mM MES、500 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ , pH 值 6.0 (室温)	

[0177] 将来自Source S柱的洗脱液浓缩并且相对于存储缓冲液来渗滤。

[0178] 在POROS®S柱上精炼的条件提供于表7中,并且用于精炼步骤的缓冲液提供于表8中。

[0179] 树脂:POROS®S (Applied Biosystems,Foster City,CA);柱负载:最大12mg ADAMTS13/ml树脂;柱床高度:20cm。

[0180] 表7

[0181]

步骤	缓冲液	柱容积 (CV)	流速 (cm/h)
柱活化	2M NaCl	5 CV	50
平衡	Poros Equi.	10 CV (直到 pH 值和电导率给出平坦和稳定的信号为止)	50
负载	溶剂-清洁剂处理和稀释后的 MMC 洗脱液	电导率小于 5 mS/cm (室温)	32
重新平衡	Poros Equi.	5 CV	32
清洗 1	Poros 清洗 1	5 CV	32
清洗 2	Poros 清洗 2	7 CV	32
洗脱	Poros Elu.	5 CV	19
洗脱后	2M NaCl	3 CV	32

[0182] 表8

[0183]

Poros Equi.	20mM MES 酸、30mM NaCl、0.1%吐温 80, pH 值 6.0 (室温), 在 25°C 下电导率为约 3.9 mS/cm
Poros 清洗 1	20mM L-组胺酸、5mM NaCl、2mM CaCl ₂ 、0.05%吐温 80, pH 值 6.0(室温), 在 25°C 下电导率为约 1.9 mS/cm
Poros 清洗 2	20mM L-组胺酸、5mM NaCl、2mM CaCl ₂ 、0.05%吐温 80, pH 值 7.5 (室温), 在 25°C 下电导率为约 1.9 mS/cm
Poros Elu.	20mM L-组胺酸、300mM NaCl、2mM CaCl ₂ 、0.05%吐温 80, pH 值 7.5(室温), 在 25°C 下电导率为约 18mS/cm

[0184] 将来自 POROS®S 柱的洗脱液池浓缩并且相对于存储缓冲液来渗滤。

[0185] 此进一步精炼步骤之后的 ADAMTS13 收率百分比可为至少约 70%，并且在缓冲液更换之后为至少约 90%。

[0186] 如图 1 步骤 108 所示, 根据如上所述的方法获得纯化的 ADAMTS13 蛋白质。ADAMTS 冷冻并存储于 (例如) 约 -60°C 以下。整个工艺的收率可为约 22% 到约 24% 或更大。

[0187] 实施例 2

[0188] 图 2 提供可用于图 1 步骤 107 的阳离子交换色谱法的各种条件的概述。具体来说, 从各种操作所获得的 ADAMTS13 产物的比较表明, 图 2C 的条件减少污染性聚集物。

[0189] 如图 2A 所示, 变化 A 是如以下更详细讨论的使用溶剂-清洁剂 (S/D) 处理来使病毒灭活, 接着采用分步洗脱的 Poros S 阳离子交换色谱法的组合。如图 2B 所示, 变化 B 涉及使用分步稀释的 Poros 50S 阳离子交换色谱法, 但是之前未进行病毒灭活。A 和 B 两种变化可根据表 9 概述的程序来进行。

[0190] 表 9

[0191]

	缓冲液 体 积 (CV)	缓冲液组成	流 速 (cm/h)	观测结果
活化	5	2 M NaCl	50	
平衡	6	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	50	
产物装载	约 12	S/D 处理并稀释的产物溶液	32	柱负载最大 6 mg ADAMTS13/ml 树脂
清洗 1	10	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	32	
清洗 2	8	20 mM 组胺酸、30 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、0.05%吐温 80, pH 值 7.0 (室温)	32	
分步洗脱	5	20mM 组胺酸、200 mM NaCl、 2 mM CaCl ₂ 、0.05%吐温 80, pH 值 7.5 (室温)	25	UV ₂₈₀ 信号显著上升之后 汇集开始, 并且 UV ₂₈₀ 信号下降到最大峰值 (约 1CV) 处的 UV ₂₈₀ 信号的 5% 以下之后, 汇集结束。

[0192] 在变化 A 中, 使来自步骤 106 的调整 (渗析) 洗脱液进行的溶剂-清洁剂病毒灭活步骤 105。将洗脱液首先通过具有 0.2μ 孔径的过滤器过滤以清除特定物质。然后, 将滤液用来

自储备溶液的溶剂-清洁剂混合物补充至1%Triton X-100、0.3%磷酸三正丁酯和0.3%聚山梨醇酯80(吐温80)的最终浓度。在约12℃到约25℃的范围变化的温度下,在轻微搅拌或振荡下,进行灭活约30分钟到约一个小时的时限。通过用一个体积的冷稀释缓冲液(20mM MES, pH值6.0, 室温)使溶液稀释来停止灭活。为了保护柱,将溶剂-清洁剂处理并将稀释的溶液再次用(例如)0.2μ过滤器过滤,以便清除可能已在病毒灭活处理期间形成的颗粒物。

[0193] 然后,使溶剂-清洁剂灭活和稀释的产物溶液进行使用分步稀释的Poros 50HS阳离子交换色谱法步骤107。色谱法细节如以上表9中概述。所得的洗脱液池提供呈原料药物质形式的ADAMTS13蛋白质,其可冷冻存储于-60℃以下。

[0194] 在变化B中,对于来自步骤106的调整(渗析)洗脱液进行阳离子交换色谱法步骤107,而不进行溶剂-清洁剂病毒灭活步骤105。阳离子交换色谱法的细节如以上详述。

[0195] 如图2C所示,变化C是涉及使用梯度洗脱的Poros 50HS阳离子交换色谱法纯化,接着柱上溶剂-清洁剂病毒灭活的组合。此变化意外地使在其它情况下存在于纯化ADAMTS13蛋白质中的聚集物减少。可用于变化C的色谱法细节概述于以下表10中。

[0196] 表10

[0197]

	缓冲液体积 (CV)	缓冲液组成	流速 (cm/h)	注解
活化	5	2 M NaCl	50	
平衡	6	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	50	
产物装载	约 6	Capto MMC 纯化的渗析洗脱液池	32	柱负载最大 6 mg ADAMTS13/ml 树脂
清洗 1	10	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	32	
清洗 2	1.5	20 mM MES 酸、30 mM NaCl、1% Triton X-100、0.3% TNBP、0.3% 吐温 80, pH 值 6.0 (室温)	32	
清洗 3	2.1	20 mM MES 酸、30 mM NaCl、1% Triton X-100、0.3% TNBP、0.3% 吐温 80, pH 值 6.0 (室温)	20	S/D 处理: 与 S/D 化学品接触时间为 1 小时
清洗 4	10	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	32	清除 S/D 化学品
清洗 5 (缓冲液 A)	8	20 mM 组氨酸、30 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、0.1%吐温 80, pH 值 7.0 (室温)	32	调整柱以便进行洗脱
分步洗脱	10	在 10 CV 内,从 100%缓冲液 A 到 100%缓冲液 B (20 mM 组氨酸、300 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、0.1%吐温 80, pH 值 7.5 (室温) 的梯度	32	UV ₂₈₀ 信号显著上升之后汇集开始,并且 UV ₂₈₀ 信号下降到最大峰值(约 2-3 CV)处的 UV ₂₈₀ 信号的 5% 以下之后,汇集结束。

[0198] 在变化C中,负载材料是阳离子交换精炼步骤104的洗脱液池,并且优选具有通过渗析或凝胶过滤缓冲液更换获得的4.5mS/cm以下的电导率。值得注意的是,Poros S阳离子

交换色谱法适于包括柱上溶剂-清洁剂处理,其如以上讨论涉及对色谱柱上固定的病毒进行病毒灭活。柱上病毒灭活包括在2℃到10℃下用溶剂-清洁剂混合物清洗一个小时。柱上处理之后,将清洗缓冲液更换以便在洗脱之前有效地将溶剂-清洁剂化学品洗除。

[0199] 洗脱从使用200mM NaCl的分步洗脱更换成梯度洗脱,据信其有助于分离ADAMTS13的单体和寡聚物质,尤其在洗脱峰的下行部段。清除后期洗脱馏分中的聚集物,从而将在其它情况下存在于纯化的ADAMTS13蛋白质中的聚集物进一步清除。作为用于使单体ADAMTS13蛋白质稳定的进一步修改形式,洗脱缓冲液中的吐温80的浓度从0.05%增加到清洗和洗脱缓冲液中的0.1%。据信此举可在从Poros S树脂上洗脱ADAMTS13期间进一步防止聚集物的形成。Poros S色谱程序的细节,包括通过柱上溶剂-清洁剂处理来进行的病毒灭活的细节,概述于表10中。

[0200] 如图2D所示,变化D充当对照。在变化D中,经由Poros 50HS阳离子交换色谱法进行的精炼步骤107仍然使用梯度洗脱和在洗脱缓冲液中增加的吐温80,但是未通过溶剂-清洁剂处理进行柱上病毒灭活。取而代之,在阳离子交换之前,对浓缩的收获物进行病毒灭活溶剂-清洁剂处理步骤105。色谱法细节提供于以下表11中。

[0201] 表11

[0202]

	缓冲液体积 (CV)	缓冲液组成	流速 (cm/h)	注解
活化	5	2 M NaCl	50	
平衡	6	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	50	
产物装载	约 6	Capto MMC 纯化的渗析洗脱液池	32	柱负载最大 6 mg ADAMTS13/ml 树脂
清洗 1	10	20 mM MES 酸、30 mM NaCl, pH 值 6.0 (室温)	32	
清洗 2 (缓冲液 A)	10	20 mM 组胺酸、30 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、0.1%吐温 80, pH 值 7.0 (室温)	32	调整柱以便进行洗脱
分步洗脱	10	在 10 CV 内,从 100%缓冲液 A 到 100%缓冲液 B (20 mM 组胺酸、300 mM NaCl、2 mM CaCl ₂ 、0.1%吐温 80, pH 值 7.5 (室温) 的梯度	32	UV ₂₈₀ 信号显著上升之后汇集开始,并且 UV ₂₈₀ 信号下降到最大峰值 (约 2-3 CV) 处的 UV ₂₈₀ 信号的 5% 以下之后,汇集结束。

[0203] 在变化D中,负载材料是阳离子交换精炼步骤104的洗脱液池,并且优选具有通过渗析或凝胶过滤缓冲液更换获得的4.5mS/cm以下的电导率。Poros S阳离子交换色谱法步骤107再次如上所述使用梯度洗脱代替分步洗脱,以及清洗和洗脱缓冲液中的0.1%吐温80。使用梯度洗脱的Poros S色谱程序的细节概述于表11中。

[0204] 实施例3

[0205] 在进行柱上溶剂-清洁剂病毒灭活的情况下,使用100L等级发酵罐进行实验室规模的实验,以测定此程序对于阳离子交换色谱法步骤107的性能的潜在影响。数据提供于表12中。

[0206] 表12

[0207]

样品	溶剂-清洁剂程序	Poros S 收率*		比活性	CHO HCP 杂质		聚集物		
		% A13 Ag	% A13 Frets 单位	单位/毫克 A13 Ag	ng CHO HCP/单位 A13	ng CHO HCP/ mg A13 Ag	%多聚体	%二聚体	%单体
1	溶剂-清洁剂处理直接在色谱法 Poros S 之前（变化 A）	99	100	696	0.49	346	9.7	7.0	83.3
2	无溶剂/清洁剂处理（变化 B）	133	154	894	0.58	519	1.3	4.6	94.1
3	柱（Poros S）上溶剂-清洁剂处理（变化 C）	89	95	931	0.60	561	1.0	2.3	96.7
4		87	117	905	0.39	354	1.0	3.7	95.3
5	对于浓缩收获物的溶剂-清洁剂处理（变化 D）	65	93	764	0.21	163	0.8	1.5	97.7
6		81	108	845	0.38	324	0.7	1.5	97.8
7		66	131	741	0.31	231	0.2	1.1	98.7
*收率在100%以上反映出对Poros 50S色谱法负载馏分存在检测问题 A13 Ag: ADAMTS13 抗原 A13 Frets: ADAMTS13 Frets 单位 CHO HCP: 中国仓鼠卵巢宿主细胞蛋白质									

[0208] 如表12所示,在Poros S阳离子交换色谱法之前,经由溶液中的溶剂-清洁剂处理来进行病毒灭活可导致形成大量聚集物(图2A的变化A和样品1)。如果省略溶剂-清洁剂处理并进行相同程序,聚集物的形成可显著降低(图2B的变化B和样品2)。

[0209] 在柱上进行溶剂-清洁剂处理,即,在ADAMTS13固定于树脂表面上时使其与溶剂-清洁剂混合物接触也可防止聚集物的形成。另外,确实形成的少量聚集物可进一步通过后期洗脱馏分中的梯度洗脱来清除(图2C的变化C;样品3和4)。

[0210] 为了进行比较,在纯化工艺中进行标准的溶液中溶剂-清洁剂处理,接着Poros S阳离子交换色谱法,而在柱法之前以及在柱上均不进行溶剂-清洁剂处理(图2D的变化D,样品5、6和7)。此程序也可产生具有低含量聚集物的ADAMTS13。

[0211] 本文提到的所有专利和专利公布都是以引用方式并入本文。

[0212] 本领域技术人员在阅读上述说明书后会想到某些修改和改进。应理解,为了简明和易读,所有此类修改和改进已从本文中删除,但是完全在上文权利要求书的范围内。

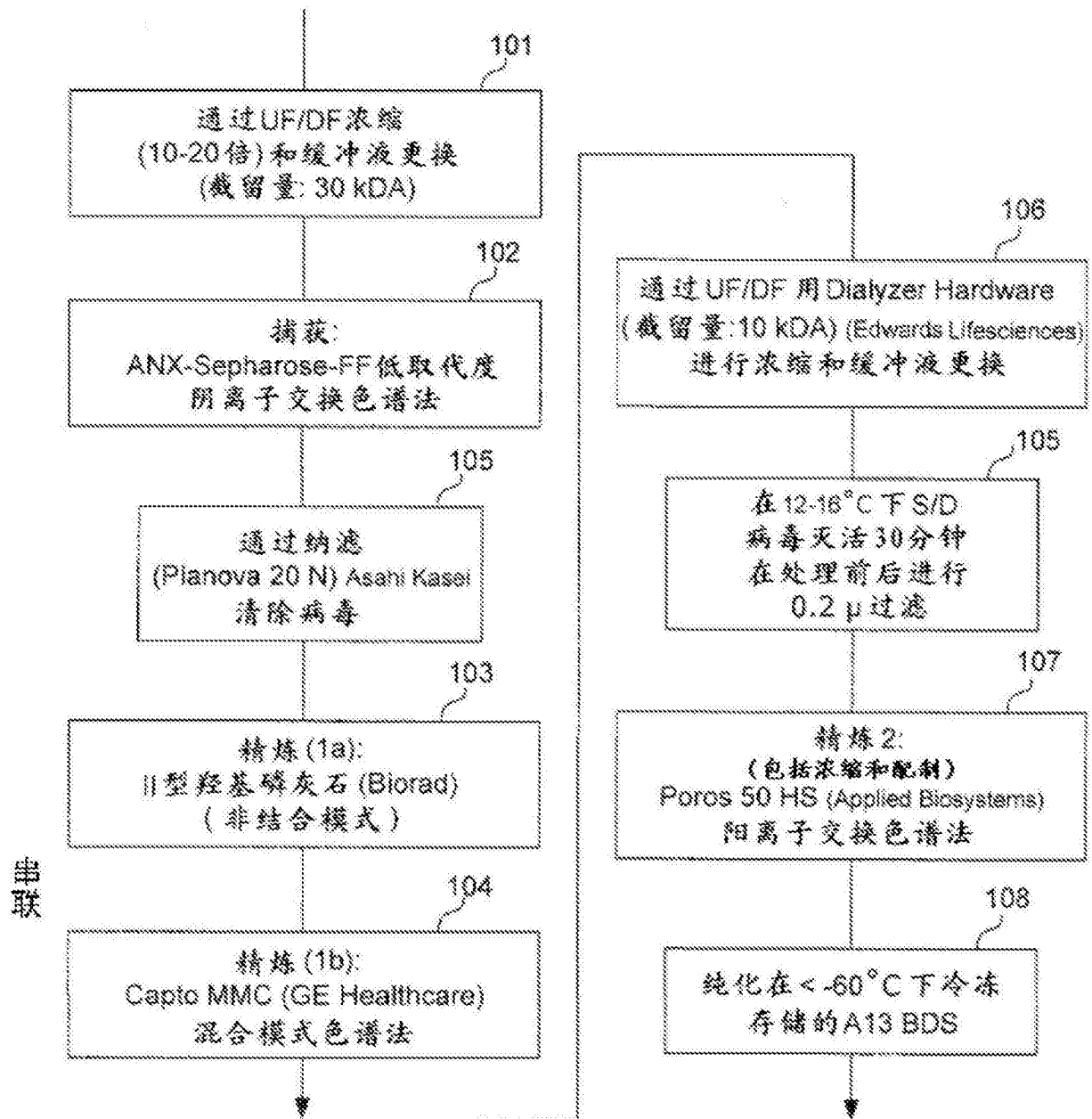


图1

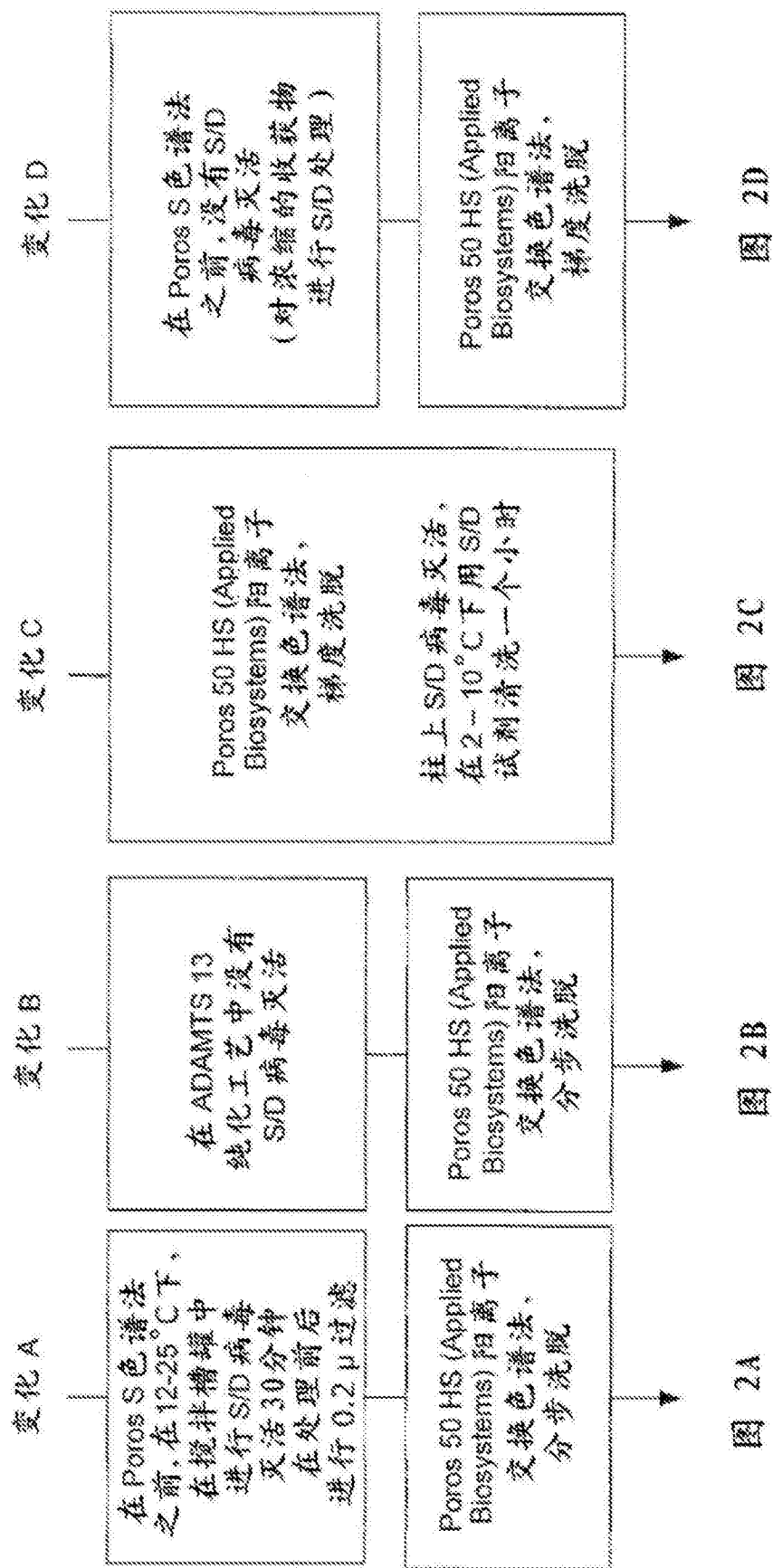


图2