



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105073769 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201480013955. 9

C07K 1/36(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 07

(30) 优先权数据

61/783, 381 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/021802 2014. 03. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/159064 EN 2014. 10. 02

(71) 申请人 EMD 密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 N·卡 M·奥尔斯坦

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 黄歆 过晓东

(51) Int. Cl.

C07K 1/22(2006. 01)

C07K 14/31(2006. 01)

权利要求书2页 说明书16页

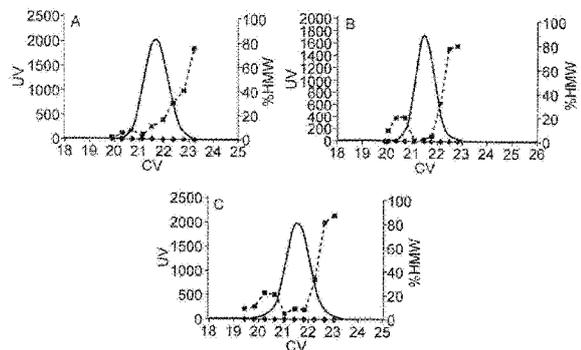
序列表4页 附图7页

(54) 发明名称

利用基于 A 蛋白的色谱增加蛋白纯度的方法

(57) 摘要

本发明提供通过在纯化包含 Fc 的蛋白期间使用的 A 蛋白色谱步骤期间去除蛋白聚集体来增加包含 Fc 的蛋白的纯度的方法。



1. 一种降低含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物中蛋白聚集体的水平的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供含有包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的样品;

(b) 使所述样品与固定在固体支持物上的 A 蛋白配体接触,其中所述 A 蛋白配体是基于 A 蛋白的 C 结构域,从而包含 Fc 区的蛋白结合至所述 A 蛋白配体;

(c) 利用 pH 梯度方法获得含有所述包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物,所述 pH 梯度方法采用高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液;

其中除了在洗脱所述包含 Fc 的蛋白之后去除的蛋白聚集体,在洗脱所述包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体,从而降低所述洗脱混合物中蛋白聚集体的水平。

2. 一种降低含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物中蛋白聚集体的水平的方法,所述方法包括以下步骤:

(d) 提供含有包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的样品;

(e) 使所述样品与固定在固体支持物上的 A 蛋白配体接触,其中所述 A 蛋白配体是基于 A 蛋白的 C 结构域,从而包含 Fc 区的蛋白结合至所述 A 蛋白配体;

(f) 利用 pH 分步方法获得含有所述包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物,所述 pH 分步方法采用以递减的 pH 值次序顺序使用的两种或更多种缓冲液,

其中除了在洗脱所述包含 Fc 的蛋白之后去除的蛋白聚集体,在洗脱所述包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体,从而降低所述洗脱混合物中蛋白聚集体的水平。

3. 权利要求 2 的方法,其中步骤 (f) 包含 2 个或更多个,或者 3 个或更多个,或者 4 个或更多个,或者 5 个或更多个,或者 6 个或更多个,或者 7 个或更多个,或者 8 个或更多个,或者 9 个或更多个,或者 10 个或更多个小 pH 变化步骤,pH 范围为约 5.0-约 3.0。

4. 权利要求 1 的方法,其中高 pH 缓冲液具有约 6.0 的 pH,而低 pH 缓冲液具有约 3.0 的 pH。

5. 权利要求 2 的方法,其中所述分步洗脱方法中使用的缓冲液中的至少一种具有 3.6-4.4 的 pH。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述包含 Fc 的蛋白选自抗体或 Fc-融合蛋白。

7. 权利要求 2 的方法,其中所述包含 Fc 的蛋白为抗体。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。

9. 权利要求 2 的方法,其中所述包含 Fc 的蛋白选自抗体或 Fc-融合蛋白。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述 pH 梯度跨越 5 个柱体积至 30 个柱体积。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述固体支持物选自可控孔度玻璃、二氧化硅、氧化锆、氧化钛、琼脂糖、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醚、聚乙烯醇和聚苯乙烯以及它们的衍生物。

13. 权利要求 2 的方法,其中所述固体支持物选自可控孔度玻璃、二氧化硅、氧化锆、氧化钛、琼脂糖、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醚、聚乙烯醇和聚苯乙烯以及它们的衍生物。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述 A 蛋白配体包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

15. 权利要求 2 的方法,其中所述 A 蛋白配体包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述固体支持物为聚乙烯醇或聚乙烯醚。

17. 权利要求 2 的方法,其中所述固体支持物为聚乙烯醇或聚乙烯醚。

## 利用基于 A 蛋白的色谱增加蛋白纯度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明提供通过利用基于 A 蛋白的色谱降低样品中的蛋白聚集体水平来增加包含 Fc 的蛋白的纯度的方法,所述基于 A 蛋白的色谱采用基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体。

### 背景技术

[0002] 蛋白纯化的常规方法通常包括细胞培养方法,例如利用重组工程化的哺乳动物或细菌细胞系产生所关注的蛋白,然后是:(a) 用于去除细胞和细胞碎片的澄清步骤,例如利用差速离心和/或过滤;以及(b) 一个或多个下游色谱步骤以便将所关注的蛋白与澄清的细胞培养进料中的各种杂质分开。

[0003] 蛋白聚集体或高分子量蛋白质是需要从包含所关注的产物(例如,包含 Fc 的蛋白或抗体分子)的生物制药制品去除的重要杂质之一。例如,在产物可以用于诊断、治疗或其他应用之前,必须从包含所关注的产物的生物制药制品去除蛋白聚集体和其他污染物。在治疗应用以及获得食品和药物管理局批准的情况下这特别重要。

[0004] 在单克隆抗体和包含 Fc 的蛋白的情况下,纯化过程的行业标准通常包括纯化过程,其包括几个单元操作。重要步骤之一是纯化步骤,其采用称作 A 蛋白、分离自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 并结合抗体的 Fc 区的亲和配体。通常,蛋白聚集体也结合 A 蛋白柱,并且常最终在与包含 Fc 的蛋白相同的洗脱混合物 (pool) 中。

[0005] 去除蛋白聚集体是具有挑战性的,因为蛋白聚集体和生物制药制品中所关注的产物(其一般为单体分子)的物理和化学特性之间有相似性。在包含 Fc 的蛋白的情况下,A 蛋白色谱之后,下游可以使用一种或多种不同方法以从生物制药制品去除蛋白聚集体,包括例如大小排阻色谱、离子交换色谱和疏水相互作用色谱。

[0006] 以前已报道在 A 蛋白色谱步骤期间通过利用 pH 梯度洗脱可以去除一些蛋白聚集体。参见例如, PCT 公开 W02011/028753 和 Pan et al., *Analytical Biochemistry* 388 (2009) 273-278, 其援引加入本文。但是,如这些参考文献中讨论的,洗脱包含 Fc 的蛋白之后或同时,蛋白聚集体从 A 蛋白柱洗脱掉。

### 发明内容

[0007] 相对于以前描述的方法,本发明提供全新且改良的从含有包含 Fc 的蛋白的样品去除更大量的蛋白聚集体的方法。本文所述的方法采用基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体,并且使用 pH 梯度洗脱或 pH 分步洗脱,使得除了在洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除蛋白聚集体,在洗脱包含 Fc 的蛋白之前洗脱至少 30% 的蛋白聚集体。由此,相对于现有技术描述的方法,本文所述的方法使得总体上更大地去除蛋白聚集体,现有技术描述的方法主要在洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除蛋白聚集体。

[0008] 本发明至少部分是基于新的和意外的发现,通过使包含 Fc 的蛋白结合至固定的基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体,并且如本文所述,利用 pH 梯度方法或 pH 分步方法,

除了在洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除蛋白聚集体,在洗脱包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体。比现有技术方法去除更大量的蛋白聚集体不仅实现洗脱混合物中包含 Fc 的蛋白增加的纯度,而且还减少可以用来去除这类蛋白聚集体的一个或多个额外的下游步骤的负荷。在一些实施方案中,本文所述的方法减少去除蛋白聚集体的下游步骤的数量,或者 A 蛋白步骤之后不需要使用一个或多个下游步骤以从洗脱混合物去除蛋白聚集体。

[0009] 在一些实施方案中,本发明提供一种降低含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物中的蛋白聚集体水平的方法,所述方法包括以下步骤:提供含有包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的样品;使所述样品与固定在固体支持物上的 A 蛋白配体接触,其中所述 A 蛋白配体是基于 A 蛋白的 C 结构域,从而包含 Fc 区的蛋白结合至所述 A 蛋白配体;利用 pH 梯度方法获得含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物,所述 pH 梯度方法采用高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液;其中除了洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除的蛋白聚集体,在洗脱包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体,从而降低洗脱混合物中的蛋白聚集体水平。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供一种降低含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物中的蛋白聚集体水平的方法,所述方法包括以下步骤:提供含有包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的样品;使所述样品与固定在固体支持物上的 A 蛋白配体接触,其中所述 A 蛋白配体是基于 A 蛋白的 C 结构域,从而包含 Fc 区的蛋白结合至所述 A 蛋白配体;利用 pH 分步方法获得含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物,所述 pH 分步方法采用以递减的 pH 值次序顺序使用的两种或更多种缓冲液,其中除了洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除的蛋白聚集体,在洗脱包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体,从而降低洗脱混合物中的蛋白聚集体水平。

[0011] 在一些实施方案中,利用 pH 分步方法获得洗脱混合物,所述 pH 分步方法采用 pH 值降序的一系列小 pH 变化步骤。在一些实施方案中,每个小 pH 变化为 0.1-0.5 的等级(order)。在一具体实施方案中,每个小 pH 变化为 0.2 的等级。

[0012] 在一些实施方案中,系列的小 pH 变化步骤包括 2 个或更多个步骤,或者 3 个或更多个步骤,或者 4 个或更多个步骤,或者 5 个或更多个步骤,或者 6 个或更多个步骤,或者 7 个或更多个步骤,或者 8 个或更多个步骤,或者 9 个或更多个步骤,或者 10 个或更多个步骤。在一具体实施方案中,使用的系列 pH 变化步骤的次序为:pH 5.0;pH 4.8;pH 4.6;pH 4.4;pH 4.2;pH 4.0;pH 3.8;pH 3.6;pH 3.4;pH 3.2;和 pH 3.0。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供一种增加包含 Fc 的蛋白的纯度的方法,所述方法包括以下步骤:提供含有包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的样品;使所述样品与固定在固体支持物上的 A 蛋白配体接触,其中所述 A 蛋白配体是基于 A 蛋白的 C 结构域,并且其中包含 Fc 的蛋白结合至所述 A 蛋白配体;以及利用 pH 梯度洗脱方法或 pH 分步方法获得含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物,其中除了洗脱包含 Fc 的蛋白之后去除的蛋白聚集体,在洗脱包含 Fc 的蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体,从而增加洗脱混合物中的包含 Fc 的蛋白的纯度。

[0014] 在一些实施方案中,A 蛋白包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。在其他实施方案中,A 蛋白包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

[0015] 本文所述方法的一些实施方案,在洗脱的 pH 梯度方法的情况下,高 pH 缓冲液具有约 6.0 的 pH,而低 pH 缓冲液具有约 3.0 的 pH。

[0016] 在本文所述方法的一些实施方案中,在洗脱的 pH 分步方法的情况下,至少一种使

用的缓冲液具有 3.6-4.4 的 pH。

[0017] 在一些实施方案中,本文所述的分步洗脱方法采用一系列小 pH 变化步骤,其中 pH 步骤范围从约 5.0 的高 pH 至约 3.0 的低 pH,每个 pH 步骤与前一 pH 步骤差异为 0.1、0.2、0.3、0.4 或 0.5 的 pH。在一具体实施方案中,以下列顺序使用小 pH 变化步骤:5.0;4.8;4.6;4.4;4.2;4.0;3.8;3.6;3.4;3.2;和 3.0。

[0018] 在一些实施方案中,所述包含 Fc 的蛋白为抗体或 Fc 融合蛋白。在一些实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

[0019] 在一些实施方案中,在 pH 梯度洗脱的情况下,pH 梯度跨越 5 个柱体积至 30 个柱体积。

[0020] 用于固定 A 蛋白的示例性固体支持物包括但不限于可控孔度玻璃、二氧化硅、氧化锆、氧化钛、琼脂糖、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醚、聚乙烯醇和聚苯乙烯以及它们的衍生物。

### 附图说明

[0021] 图 1A 示出用 pH 梯度洗脱自 3 种树脂 (A-MabSelect Sure™;B- 树脂 A 和 C- 树脂 C) 的 mAb-1 (装载密度 12mg/mL) 的色谱图洗脱区,其中 X- 轴代表柱体积 (CV),左侧 Y- 轴是 UV 280 吸光度 (mAU, 实线),而右侧 Y- 轴是通过 SEC 确定的每个部分中聚集体物质的百分比 (连接的正方形)。树脂 A 和树脂 B 在峰前去除的蛋白聚集体的量显著高于 MabSelect SuRe™,这表明在特征谱开始时更有效的聚集体物质去除。对于全部 3 种树脂,在洗脱特征谱的末端部分中也获得了大量的聚集体物质,正如以前对 MabSelect Sure™报道的。

[0022] 图 1B 示出利用 pH 梯度洗脱自 MabSelect SuRe™ (通过菱形示出)、树脂 A (通过正方形示出) 和树脂 B (通过三角形示出) 的 mAb-1 (装载密度 12mg/mL) 的收率对单体纯度。树脂 A 和树脂 B 获得比 MabSelect SuRe™ 高水平的单体纯度,同时保持高收率。

[0023] 图 2 示出对 MabSelect SuRe™ 和树脂 A 洗脱部分获得的代表性 SEC 特征谱。X- 轴代表时间,而 Y- 轴是在 280nm 处的 UV 吸光度。示出进料特征谱 (通过黑色实线示出),以及来自洗脱特征谱的早期部分 (峰前,通过灰色虚线示出)、洗脱特征谱的中间 (通过黑色虚线示出) 和洗脱峰的晚期部分 (峰后,通过点线示出) 的部分。基于单体峰 (8-9 分钟) 将峰归一化并比对。对于 MabSelect SuRe™,在特征谱末端洗脱的部分中观察到更大量的聚集体去除。对于树脂 A,在峰前和峰后部分中观察到更大量的聚集体去除。

[0024] 图 3 示出用 pH 梯度洗脱自 5 种树脂 (A-MabSelect Sure™; B-ProSep® Ultra Plus ;C- 树脂 A ;D- 树脂 B ;和 E- 树脂 C) 的 mAb-2 (装载密度 12mg/mL) 的色谱图洗脱区,其中 X- 轴代表柱体积 (CV),左侧 Y- 轴是 UV 280 吸光度 (以 mAU 测量并通过实线示出),而右侧 Y- 轴是通过 SEC 确定的每个部分中聚集体物质的百分比 (通过连接的正方形示出)。在树脂 A 和树脂 B 的峰前中去除的聚集体的量显著高于 MabSelect SuRe™、ProSep® Ultra Plus 或树脂 C。

[0025] 图 4 示出用 pH 梯度洗脱自 3 种树脂 (A-MabSelect Sure™;B- 树脂 A 和 C- 树脂 C) 的 mAb-2 (装载密度 40mg/mL) 的色谱图洗脱区,其中 X- 轴代表柱体积 (CV),左侧 Y- 轴是 UV 280 吸光度 (以 mAU 测量并通过实线示出),而右侧 Y- 轴是通过 SEC 确定的每个部分

中聚集体物质的百分比（通过连接的正方形示出）。

[0026] 图 5 示出用 pH 分步洗脱自 3 种树脂 (A-MabSelect Sure™; B- 树脂 A 和 C- 树脂 C) 的 mAb-2 (装载密度 12mg/mL) 的色谱图洗脱区, 其中 X- 轴代表柱体积 (CV), 左侧 Y- 轴是 UV 280 吸光度 (以 mAU 测量并通过实线示出), 而右侧 Y- 轴是通过 SEC 确定的每个部分中聚集体物质的百分比 (通过连接的正方形示出)。

[0027] 图 6 示出 mAb-3 的色谱图, 其使用树脂 A, 采用一系列小 pH 变化步骤用于洗脱, 每个 pH 步骤与前一 pH 步骤的差异为 0.2 的值。图 6a 示出利用一系列小 pH 变化步骤的 mAb-3 洗脱的色谱图, 其中 X- 代表柱体积 (CV), 左侧 Y- 轴为 UV 280 吸光度 (以 mAU 测量), 而右侧 Y- 轴为 pH, 其中小 pH 变化步骤为: pH 5.0 ; pH 4.8 ; pH 4.6 ; pH 4.4 ; pH 4.2 ; pH 4.0 ; pH 3.8 ; pH 3.6 ; pH 3.4 ; pH 3.2 和 pH 3.0。图 6b 示出图 6a 色谱图中的主要洗脱峰的放大版本, 显示每个步骤洗脱部分中存在的聚集体物质百分比。

### 具体实施方式

[0028] 本发明至少是基于令人惊讶和出乎意料的发现, 当如本文所述, 利用 pH 梯度洗脱或 pH 分步洗脱从 A 蛋白色谱柱洗脱靶蛋白 (例如, 包含 Fc 的蛋白) 时, 除了在洗脱靶蛋白之后去除蛋白聚集体, 在洗脱靶蛋白之前去除至少 30% 的蛋白聚集体, 实现洗脱混合物中更高纯度的靶蛋白。因此, 在本发明的一实施方案中, 提供一种纯化靶蛋白的方法, 所述方法包括使所述靶蛋白结合至基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体并用 pH 梯度洗脱。在本发明的另一实施方案中, 提供一种纯化靶蛋白的方法, 所述方法包括使所述靶蛋白结合至基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体并用 pH 分步方法洗脱。

[0029] 为了可以更容易地理解本公开, 首先定义某些术语。额外的定义在整个说明书中示出。

#### [0030] I. 定义

[0031] 如本文所用, 术语“SpA”、“A 蛋白”或“金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) A 蛋白”指分离自细菌金黄色葡萄球菌的 42kDa 多结构域蛋白。SpA 通过其称作 X 结构域的羧基端细胞壁结合区结合至细菌细胞壁。在氨基端区, 其包括 5 个免疫球蛋白结合结构域, 称作 E、D、A、B 和 C (Sjodhal, *Eur J Biochem. Sep 78*(2):471-90(1977); Uhlen et al., *J Biol Chem. Feb259*(3):1695-702(1984))。这些结构域每个均包含约 58 个氨基酸残基, 并且它们享有 65-90% 氨基酸相同性。

[0032] SpA 的 E、D、A、B 和 C 结构域每个均具有不同的 Ig- 结合位点。一个位点是对 Fc (Ig 的 IgG 类别的恒定区), 而另一个是对某些 Ig 分子的 Fab 部分 (负责抗原识别的 Ig 部分)。已报道每个结构域均包含 Fab 结合位点。SpA 的非 Ig 结合部分位于 C- 端, 并且命名为 X 区或 X- 结构域。

[0033] 本文中可交换地使用的术语“C 结构域”、“SpA 的 C 结构域”、“A 蛋白的 C 结构域”和“金黄色葡萄球菌 A 蛋白的 C 结构域”指其氨基酸序列在 SEQ ID NO:1 中示出或由例如 SEQ ID NO:2 示出的核苷酸序列编码的多肽。“C 结构域”是折叠为三螺旋束结构的 58 个氨基酸多肽。其能够通过螺旋 1 和 2 表面上的残基结合 Fc, 或者通过螺旋 2 和 3 表面上的残基结合 Fab。如本文方法中所用, 基于 C 结构域的 A 蛋白配体包括结合包含 Fc 的蛋白的野生型 C 结构域序列及其任何变体和衍生物, 并且使得利用本文所述的方法更大量地去除蛋

白聚集体。

[0034] 在各种实施方案中,用于本文所述方法的基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体包含 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

[0035] 如本文所用,术语“色谱”指一种动态分离技术,其将靶蛋白(例如,免疫球蛋白或包含 Fc 的蛋白)与混合物中的其他分子分开并允许将其分离。通常,在色谱方法中,流动相(液体或气体)运送包含所关注的靶分子的样品穿过或通过固定相(通常为固体)介质。对固定相的分配或亲和力的差异分离不同分子,而流动相在不同时间携带出不同分子。

[0036] 如本文所用,术语“亲和色谱”指一种色谱模式,其中通过其与特异性地与靶蛋白相互作用的分子(例如,基于 A 蛋白的配体)的相互作用分离待分离的靶蛋白(例如,包含 Fc 的蛋白)。在本文所述的各种实施方案中,亲和色谱包括将包含靶分子(例如,免疫球蛋白或包含 Fc 的蛋白)添加至携带基于 A 蛋白的 C 结构域的配体的固体支持物。

[0037] 如本文所用,术语“A 蛋白亲和色谱”指利用基于 A 蛋白的 C 结构域的基于 A 蛋白或 SpA 的配体分开或分离物质,如本文描述的那些,其中将 SpA 或 A 蛋白配体固定在例如固体支持物上。

[0038] 本领域已知的 A 蛋白亲和色谱介质/树脂的实例包括具有固定在可控孔度玻璃骨架上的 A 蛋白的那些,例如, **PROSEP®** A 和 **PROSEP®** vA 介质/树脂(EMD MILLIPORE); 具有固定在聚苯乙烯固相上的 A 蛋白的那些,例如, **POROS®** 50A 和 **POROS®** MabCapture™A 介质/树脂(APPLIED BIOSYSTEMS, INC.); 以及具有固定在琼脂糖固体支持物上的 A 蛋白的那些,例如, rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™或 MABSELECT™介质或树脂(GE HEALTHCARE)。可以将用于本文所述方法的 A 蛋白配体固定在任何上述固体支持物上。

[0039] 除了上述基质,还可以将 A 蛋白固定在亲水交联聚合物上。参见例如,整体援引加入本文的美国专利第 7,951,885 号,其描述了示例性亲水交联聚合物。不希望被理论束缚,考虑可以将本文涵盖的配体固定在亲水交联聚合物上,例如美国专利第 7,951,885 号中描述的那些。

[0040] 在本文中可交换使用的术语“亲和基质”或“亲和色谱基质”指其上连接亲和色谱配体(例如,基于 A 蛋白的 C 结构域)的固体支持物。所述配体能够通过亲和相互作用结合待从混合物纯化或去除的所关注的分子(例如,免疫球蛋白或包含 Fc 的蛋白)。

[0041] 在本文中可交换使用时,术语“靶蛋白”或“所关注的蛋白”指可以利用 A 蛋白的 C 结构域或者其变体或衍生物纯化的任何蛋白。在各种实施方案中,靶蛋白为包含 Fc 的蛋白,例如 Fc 融合蛋白的免疫球蛋白。

[0042] 术语“免疫球蛋白”、“Ig”或“抗体”(在本文中可交换使用)指具有由两条重链和两条轻链组成的基本 4-多肽链结构的蛋白,例如通过链间二硫键稳定所述链,其具有特异性结合抗原的能力。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在本文中可交换使用)指具有由一条重链和一条轻链组成的基本 2-多肽链结构的蛋白,例如通过链间肽接头稳定所述链,其具有特异性结合抗原的能力。术语“结构域”指包含例如通过  $\beta$ -折叠和/或链内二硫键稳定的肽环(例如,包含 3-4 个肽环)的重链或轻链多肽的球状区域。基于在“恒定”结构域的情况下在各种类别成员的结构域内相对缺少序列变化,或者在“可变”结构域的情

况下在各种类别成员的结构域内的显著变化,结构域在本文中进一步称为“恒定”或“可变”的。抗体或多肽“结构域”在本领域中常可交换地称作抗体或多肽“区”。抗体轻链的“恒定”结构域可交换地称为“轻链恒定区”、“轻链恒定结构域”、“CL”区或“CL”结构域。抗体重链的“恒定”结构域可交换地称为“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“CH”区或“CH”结构域。抗体轻链的“可变”结构域可交换地称为“轻链可变区”、“轻链可变结构域”、“VL”区或“VL”结构域。抗体重链的“可变”结构域可交换地称为“重链可变区”、“重链可变结构域”、“VH”区或“VH”结构域。

[0043] 免疫球蛋白或抗体可以是单克隆或多克隆的,并且可以以单体或聚合物形式存在,例如以五聚体形式存在的 IgM 抗体和 / 或以单体、二聚体或多聚体形式存在的 IgA 抗体。术语“片段”指包含比完整或完全抗体或抗体链少的氨基酸残基的部分 (part) 或部分 (portion) 抗体或抗体链。可以通过化学或酶促处理完整或完全抗体或抗体链来获得片段。还可以通过重组方式获得片段。示例性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc 和 / 或 Fv 片段。

[0044] 本发明的方法可以用来纯化可以结合至 A 蛋白的任何抗体或其片段,包括但不限于人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或它们的片段。在一些实施方案中,利用本文所述方法纯化的抗体是治疗性抗体。

[0045] 示例性治疗性抗体包括 Herceptin™;Rituxan™;Avastin™;Bexxar™;Campath™;Erbix™;Humira™;Raptiva™;Remicade™;ReoPro™; **Prolia®; Xgeva®; Simulect™; Synagis™;Xolair™;Zenapax™;Mylotarg™**和 Vectibix™。示例性 Fc 融合蛋白包括融合至可溶形式的受体或酶的融合蛋白以及它们的变体、衍生物或类似物,例如 **ENBREX®**。

[0046] 应当理解利用本文所述方法纯化的靶蛋白是包含 Fc 区的蛋白,因此可以通过 A 蛋白纯化。如本文所用,术语“Fc 区”或“Fc”指与 A 蛋白相互作用的免疫球蛋白分子的那些氨基酸残基。Fc 区是抗体的可结晶的尾区,并且与称作 Fc 受体的细胞表面受体相互作用。

[0047] 术语“Fc 结合”、“结合 Fc 部分”或“结合至 Fc 部分”指本文所述的亲和配体结合至抗体的恒定部分 (Fc) 的能力。在一些实施方案中,本发明的配体以至少 10<sup>7</sup>M、或至少 10<sup>8</sup>M、或至少 10<sup>9</sup>M 的亲和力结合抗体 (例如,人 IgG1、IgG2 或 IgG4) 的 Fc 部分。

[0048] 如本文所用,术语“片段”指全长包含 Fc 的蛋白如免疫球蛋白的一部分。片段的实例包括 Fab 片段、单链抗体分子、双抗体、线性抗体以及形成自抗体片段的多特异性抗体。

[0049] 利用本文所述方法纯化的包含 Fc 的蛋白可以利用任何合适的表达系统或细胞类型进行表达。在一些实施方案中,包含 Fc 的蛋白在哺乳动物细胞如 CHO 或 NS0 细胞、杂交瘤、小鼠细胞等中表达。在另一实施方案中,利用非哺乳动物细胞培养 (例如,昆虫细胞、酵母细胞、大肠杆菌 (Escherichia coli) 等) 表达包含 Fc 的蛋白。在细胞培养中表达之后,通常利用澄清方法如深层过滤、离心、絮凝 / 沉淀 (例如,酸沉淀或刺激响应性聚合物) 去除不溶性物质。通常将这种澄清的细胞培养物装载至 A 蛋白柱以将包含 Fc 的蛋白与可溶性杂质如宿主细胞蛋白、DNA、病毒或其他杂质分开。

[0050] 如本文所用,术语“纯化的多肽”或“纯化的蛋白”是利用如本文所述的 pH 梯度或 pH 分步方法的来自 A 蛋白亲和步骤的洗脱产物。纯化的多肽 / 蛋白优选主要包含多肽单体。

[0051] 如本文所用,术语“未纯化的多肽”、“未纯化的蛋白”或“蛋白负载”是 A 蛋白亲和

纯化步骤之前的装载材料或起始材料中的多肽或蛋白。

[0052] 如本文所用,术语“包含 Fc 的蛋白的纯度”定义为相对于 A 蛋白色谱柱洗脱掉的总蛋白的靶蛋白(即,包含 Fc 的蛋白)的单体物质,所述 A 蛋白色谱柱采用固定在固体支持物上的基于 A 蛋白的 C 结构域的配体。因此,纯度可以通过洗脱混合物中总单体比总蛋白的比例来计算。总蛋白可以包含靶蛋白的一种或多种蛋白片段、聚集体、单体物质以及它们的变体。在本文所述的各种方法中,相对于现有技术中描述的 A 蛋白色谱方法,包含 Fc 的蛋白的纯度增加至少 5%、或至少 10%、或至少 15%、或至少 20%、或至少 25%、或至少 30%或更多。

[0053] 通常,在本文所述的 A 蛋白色谱方法的情况下,用包含靶蛋白的样品装载 A 蛋白柱之后,利用合适的洗脱缓冲液从柱洗脱掉靶蛋白,同时测量在 280nm 处的 UV 吸光度,从而获得靶蛋白的洗脱特征谱。洗脱特征谱通常包括峰前、峰和峰后。一旦洗脱开始,当在 280nm 处测量的蛋白吸光度达到一定水平如 50mAU 或更高时,在预定柱体积收集部分,并且当在 280nm 处的吸光度达到例如低于 50mAU 时终止。具有高吸光度值的洗脱部分或多个部分是形成峰并包含靶蛋白的部分或多个部分。可以将这些部分汇集以产生包含靶蛋白的洗脱混合物。这样的部分或多个部分通常落在洗脱特征谱的中间。反之,一般将洗脱特征谱开始或结束时出现的具有较低吸光度的部分或多个部分弃去,因为它们包含蛋白聚集体。

[0054] 如本文所用,术语“包含 Fc 的蛋白的收率”定义为相对于从 A 蛋白色谱柱洗脱掉的蛋白的总量,洗脱混合物中收集的蛋白的量。在一些实施方案中,洗脱混合物包含在 500mAU 或更高的吸光度值开始并在 500mAU 或更低的吸光度值结束的部分。

[0055] 如本文所用,术语“峰前”指在指定 UV 吸光度之前收集且不包括在洗脱混合物中的蛋白洗脱特征谱的部分。在一些实施方案中,峰前指在吸光度达到 500mAU 或更高之前回收的总蛋白。

[0056] 如本文所用,术语“峰后”指在指定 UV 吸光度之后收集的蛋白洗脱特征谱的部分。在一些实施方案中,峰后指在吸光度达到 500mAU 或更低之后回收的总蛋白。

[0057] 在本文中可交换使用的术语“蛋白聚集体”指所关注的产物如包含 Fc 的蛋白的至少两个分子的缔合。所关注产物的至少两个分子的缔合可以通过任何方式产生,包括但不限于非共价相互作用如电荷-电荷、疏水和范德华相互作用;以及共价相互作用如二硫键相互作用或不可还原的交联。聚集体可以是二聚体、三聚体、四聚体或大于四聚体的多聚体等。术语“蛋白聚集体”包括包含 Fc 的蛋白的任何更高级别的物质。

[0058] 可以利用本领域公知并广泛接受的方法大小排阻色谱 (SEC) 测量蛋白样品中的聚集体浓度(参见例如, Gabrielson et al., J. Pharm. Sci., 96, (2007), 268 - 279)。在一些实施方案中,利用 UV 吸光度测量洗脱部分中各种分子量物质的相对浓度,同时通过按照柱制造商的说明书进行系统校准来确定部分的分子量。测量聚集体浓度的其他方法包括例如凝胶电泳和光散射。

[0059] 如本文所用,术语“单体”指单一单元的包含 Fc 的蛋白。例如,在抗体的情况下,单体由两条重链和两条轻链组成;在独臂抗体的情况下,单体由一条重链和一条轻链组成。

[0060] 如本文所用,术语“配体”指基于 A 蛋白的 C 结构域的生物分子,其固定在固体支持物(例如,多孔表面)上且能够吸引包含 Fc 的蛋白。在本文所述的一些实施方案中,配体包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列,或者其变体、片段或衍生物。在本文所述的一些其

他实施方案中,配体包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列,或者其变体、片段或衍生物。

[0061] 术语“固体支持物”一般指连接配体的任何材料(多孔或无孔)。配体连接至固体支持物可以通过共价键(例如在接枝的情况下)或者通过包被、粘附、吸附和相似机制。用于本文所述方法和组合物的固体支持物的实例包括但不限于膜、多孔珠、有翼或多孔纤维、整体柱。合适的膜包括但不限于表面修饰或未修饰的聚偏氟乙烯(PVDF)、聚醚砜(PES)、聚醚醚砜(PEES)、纤维素、尼龙、聚四氟乙烯(PTFE)、超高分子量聚乙烯(UPE)。合适的多孔珠包括但不限于二氧化硅、陶瓷、聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醚、聚乙烯醇、包括琼脂糖和纤维素在内的多糖。合适的有翼或多孔纤维包括但不限于尼龙、纤维素、PES。合适的整体柱包括但不限于二氧化硅、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、和聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇。在一些实施方案中,将配体固定在色谱介质如多孔柱上,然后将其填充入色谱柱备用。

[0062] 术语“装载密度”是每色谱介质体积装载至色谱柱的含有包含 Fc 的蛋白的样品的量。装载密度以 g/L 测量。在一些实施方案中,以 5g/L、或 10g/L、或 12g/L、或 15g/L、或 20g/L、或 30g/L、或 40g/L 或更高的装载密度装载样品。

[0063] “缓冲液”是通过其酸-碱缀合组分的作用抗 pH 变化的溶液。可以例如根据期望的缓冲液 pH 采用的各种缓冲液描述于 Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., Ed. Calbiochem Corporation (1975)。

[0064] 本文中的“平衡缓冲液”是用来制备用于装载靶蛋白的固体支持物(具有固定的 A 蛋白)的缓冲液。

[0065] “洗涤缓冲液”在本文中用来指在装载之后和洗脱靶蛋白之前通过固体支持物(具有固定的 A 蛋白)的缓冲液。

[0066] II. A 蛋白色谱

[0067] A 蛋白色谱是一种亲和色谱形式,最常用于纯化包含 Fc 的蛋白如免疫球蛋白或抗体。一般来说,在合适的细胞培养中表达靶蛋白(例如,包含 Fc 的蛋白),并且使细胞培养进料进行澄清,然后将澄清的进料装载至 A 蛋白色谱介质,例如,填充在色谱柱中。

[0068] A 蛋白色谱一般采用固体支持物如多孔珠或树脂,具有固定在其上的合适的 A 蛋白配体。然后将 A 蛋白结合的固体支持物填充在色谱柱中。可以首先将柱用合适的平衡缓冲液平衡。然后通过用含有包含 Fc 的蛋白的样品(例如,澄清的细胞培养进料)装载柱来使包含靶蛋白(例如,包含 Fc 的蛋白)的澄清进料与柱中的固体支持物接触。通常,可溶性杂质如宿主蛋白和 DNA 不结合至 A 蛋白,因此在流过中去除并转移至废物中。随后,通过暴露于合适的洗脱缓冲液来从 A 蛋白色谱柱洗脱结合的包含 Fc 的蛋白。通常洗脱的流速范围为 60 个柱体积(CV)/小时至 5 个 CV/小时。在梯度洗脱的情况下,通常洗脱进行 5-60 个柱体积。

[0069] 如本文所述,包含 Fc 的蛋白的洗脱可以利用两种不同方法进行。在一些实施方案中,将高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液混合以产生范围为 pH 7.0-3.0 的 pH 梯度。在一些实施方案中,pH 梯度在 7.0、或约 6.8、或约 6.6、或约 6.4、或约 6.2、或约 6.0、或约 5.8、或约 5.6、或约 5.4、或约 5.2、或约 5.0、或约 4.8、或约 4.6、或约 4.4、或约 4.2、或约 4.0 开始,并且 pH 梯度在 3.0、或约 3.2、或约 3.4、或约 3.6、或约 3.8 结束。

[0070] 在固定体积的部分中收集洗脱的蛋白用于单体对聚集体含量的进一步分析。

[0071] 在一些实施方案中,以 pH 值的降序顺序使用不同 pH 值的两种或更多种缓冲液以洗脱 A 蛋白结合的包含 Fc 的蛋白。在一些实施方案中,用于分步洗脱的第一缓冲液具有 4.4、或约 4.2、或约 4.0、或约 3.8、或约 3.6 的 pH;而用于分步洗脱的第二缓冲液具有 3.5、或约 3.4、或约 3.3、或约 3.2、或约 3.1、或约 3.0 的 pH。

[0072] 在一具体实施方案中,第一缓冲液具有约 3.75 的 pH,而第二缓冲液具有约 3.0 的 pH。在固定体积的部分中收集洗脱的蛋白用于单体对聚集体含量的进一步分析。

[0073] 在一些实施方案中,分步洗脱用来洗脱 A 蛋白结合的包含 Fc 的蛋白,而 pH 的小变化用于随时间的多步洗脱蛋白。随后可以将多个洗脱混合物合并以回收包含 Fc 的蛋白。

[0074] 在一些实施方案中,分步洗脱采用 pH 降序的一系列小 pH 变化步骤,每个 pH 步骤与前一 pH 步骤的差异为约 0.1-约 0.5 的 pH 值。例如,在一些实施方案中,pH 的高点为约 5.0,其以 0.1-0.5 的 pH 值的分步方式减少,pH 的低点为约 3.0。在一具体实施方案中,一系列小 pH 变化步骤包括以下列顺序的 pH 值:5.0;4.8;4.6;4.4;4.2;4.0;3.8;3.6;3.4;3.2 和 3.0。

[0075] 额外的缓冲液也可以用于所述方法,其促进蛋白结合至 A 蛋白配体。这类缓冲液通常具有比用于分步洗脱步骤的缓冲液更高的 pH。

[0076] III. 用于本文所述方法的示例性缓冲液

[0077] 如上文讨论的,通常在用含有包含 Fc 的蛋白的样品装载柱之前平衡 A 蛋白色谱柱。在一些实施方案中,使用的平衡缓冲液是等渗的,具有 6.0-8.0 的 pH。示例性平衡缓冲液包含 25mM Tris、25mM NaCl、5mM EDTA, pH 7.1。

[0078] 在 A 蛋白色谱期间通常采用的另一缓冲液是装载缓冲液。装载缓冲液用来将包含 Fc 的蛋白以及蛋白聚集体的混合物装载至其上固定 A 蛋白的固体支持物。通常,平衡和装载缓冲液是相同的。

[0079] 随后用洗脱缓冲液洗脱 A 蛋白结合的包含 Fc 的蛋白。在本文所述的一些实施方案中,洗脱缓冲液包含高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液,从而形成 pH 梯度,这通过调整洗脱缓冲液中高 pH 缓冲液和低 pH 缓冲液的百分比而形成。在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有 7.0-3.0 或 6.0-3.0 的 pH。在不存在任何蛋白的情况下测量如本文所用的 pH 值。可以使用的 pH 缓冲液的实例包括但不限于 Tris、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、甲酸和铵缓冲液,以及这些的组合。优选的缓冲液为柠檬酸盐、乙酸盐和甲酸缓冲液。

[0080] 在一些实施方案中,pH 梯度的高点的范围为 pH 5.1-6.0,而 pH 梯度的低点的范围为 pH 3.0-3.7。

[0081] 在分步洗脱以及使用一系列小 pH 变化步骤的情况下,以递减的 pH 值的次序顺序使用两种或更多种缓冲液。这些缓冲液可以如上文所述利用相似的缓冲液预制,或者利用色谱系统混合以维持它们的 pH。

[0082] 不希望被理论束缚,在一些实施方案中考虑 pH 梯度洗脱方法可以与 pH 分步洗脱方法联用,例如,在另一种之后使用一种。

[0083] IV. 用于本文所述方法的示例性配体

[0084] 本发明的方法采用基于 A 蛋白的 C 结构域的 A 蛋白配体。在一些实施方案中,用于本文所述方法的配体包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。在其他实施方案中,用于本文所述方法的配体包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。本发明还涵盖这些序列的变体、

片段和衍生物,其结合包含 Fc 的蛋白,以及如本文所述进行 pH 梯度或 pH 分步洗脱方法时,使得在洗脱包含 Fc 的蛋白之前洗脱至少 30% 的蛋白聚集体。

[0085] V. 测量含有包含 Fc 的蛋白的洗脱混合物中蛋白聚集体水平的方法

[0086] 蛋白可以聚集或错误折叠。当使用亲和色谱如 A 蛋白色谱时,期望的靶蛋白(即,单体)常与蛋白聚集体共纯化。因此,蛋白聚集体常常最终在包含靶蛋白的洗脱混合物中,并且通常使洗脱混合物进行一个或多个随后的步骤以去除这类聚集体。这类额外的步骤可以包括在它们的电荷、疏水程度或大小的基础上分离聚集体的色谱技术。示例性技术包括但不限于离子交换色谱、疏水相互作用色谱、混合模式色谱或大小排阻色谱。这些技术通常在 A 蛋白步骤之后去除蛋白聚集体。但是,这些方法中的每种均需要额外的缓冲液、树脂或吸附剂用于进一步纯化,导致较长的加工时间和较高的成本。

[0087] 本文所述的方法使得在 A 蛋白洗脱步骤期间于靶蛋白之前和之后去除蛋白聚集体,从而增加总产物纯度并减少通常需要用去去除蛋白聚集体的额外步骤的数量或者避免需要使用一个或多个额外步骤。

[0088] 如本文证实的,相对于现有技术所述的仅在洗脱靶蛋白之后去除蛋白聚集体的方法,包含靶蛋白的洗脱混合物中的蛋白聚集体水平显著较低。结果,如通过蛋白单体对总蛋白的比例测量的,洗脱混合物中靶蛋白的纯度增加。

[0089] 可以利用本领域已知的许多方法和本文所述的方法测量各种洗脱部分中的蛋白聚集体水平。例如,可以利用动态光散射、高压大小排阻色谱、非对称流场流分级分离、凝胶电泳、荧光或荧光染料检测。

[0090] 大小排阻色谱容易使用,并且常是选择的工具。大小排阻色谱在分子量的基础上分离物质,其中 UV 色谱图下的面积用来定量单体、聚集体和片段物质的相对量。

[0091] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应当理解为限制性的。本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及图均援引加入本文。

[0092] 实施例

[0093] 实施例 1 :A 蛋白配体的产生

[0094] 编码基于 C 结构域两种 A 蛋白配体的合成基因获得自 DNA 2.0(Menlo Park, CA)。这些配体的氨基酸序列在 SEQ ID NO:3 和 4 中示出。

[0095] 每个合成基因的 5' 端包括起始甲硫氨酸的密码子。每个基因的 5' 和 3' 分别包含 NdeI 和 BamHI 限制性位点。用 NdeI 和 BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA) 消化这些合成基因以及使用的表达载体,即 pET11a,在 0.7% 琼脂糖 TAE 凝胶上分离 DNA 片段,切除适当的 DNA 片段并利用来自 QIAGEN (Valencia, CA) 的凝胶抽提试剂盒进行纯化。利用 T4DNA 连接酶 (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA) 将纯化的插入物连接入 pET11a 的骨架或任何其他合适的表达载体。

[0096] 按照制造商的说明书,将连接反应转化入 DH5 $\alpha$  感受态大肠杆菌 (E. coli) (INVITROGEN, Carlsbad, CA),平板接种在包含 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的 Technova LB 平板上并使其在 37 $^{\circ}$ C 下生长过夜。为了获得纯化的 DNA,挑取单克隆用于在包含 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的 LB 中过夜培养。利用来自 QIAGEN (Valencia, CA) 的旋转 mini-prep 试剂盒纯化 DNA。通过利用 NdeI 和 BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, MA) 进行限制性消化分析证实重组质粒的特性。

[0097] 实施例 2 :A 蛋白配体的表达和纯化

[0098] 利用 pET 载体如 pET11a 在大肠杆菌菌株如菌株 BL21 (DE3) (PROMEGA, Madison WI) 中表达实施例 1 所述的 A 蛋白配体。

[0099] 从平板选择单克隆并使其在包含 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的 LB 培养基中于 37°C 下生长过夜。将过夜培养物 100 倍稀释入包含 100  $\mu$ g/mL 氨苄西林的新鲜 LB 培养基并使其生长至一定的细胞密度,从而在 600nm 下的光密度为 $\sim$ 0.8。添加 1mM 异丙基- $\beta$ -D- 硫代吡喃半乳糖苷之后,使细胞生长额外的 2 小时。通过 SDS-PAGE 分析和蛋白印迹证实表达。

[0100] 通过离心 (4000rpm, 4°C, 5 分钟) 收获细胞并将其重悬于 3mL 包含 20mM 咪唑的磷酸盐缓冲盐水中。通过超声处理将细胞裂解,并且通过离心 (4000rpm, 4°C, 30 分钟) 使细胞碎片沉淀。利用 50mL IgG 亲和树脂 (固定在可控孔度玻璃上的多克隆 hIgG), 应用 $\sim$ 500mL 细胞裂解物纯化 A 蛋白配体。用 30mL 磷酸盐缓冲盐水洗涤柱,并且在 0.1M 柠檬酸, pH 3 中洗脱 A 蛋白配体。将配体透析入 18mega-0hm Milli-Q® 水 (EMD MILLIPORE, Billerica, MA) 过夜。利用 UV 分光计基于理论消光系数证实蛋白浓度 (Pace et. al., Protein Science 4:2411(1995))。

[0101] 实施例 3 :A 蛋白配体连接至固体支持物

[0102] 如实施例 1 和 2 所述产生并表达各种配体之后,通过多点连接将它们固定至固体支持物。

[0103] 在一示例性实验中,通过在 1 $\sim$ 1.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的存在下,树脂表面上的环氧基和配体上的多个氨基反应过夜来将 A 蛋白配体 (SEQ ID NO:3, 10 $\sim$ 20mg/mL) 固定在美国专利第 7,951,885 号中描述的双交联聚乙烯醇基底基质上,所述专利援引加入本文。参见 Hermanson et. al. Academic Press, 1992, 第 118 页。

[0104] SEQ NO:4 的配体的偶联方法与上述方法相似。

[0105] 实施例 4 :具有聚集体的 mAb 进料的产生

[0106] 在不同的 A 蛋白色谱树脂上利用 pH 梯度洗脱方法纯化两种不同的包含 Fc 的蛋白, mAb-1 和 mAb-2。

[0107] 有意使 mAb-1 和 mAb-2 装载材料聚集以促进洗脱混合物中不同物质的分析。利用以前开发的方法完成聚集体的产生 (参见例如, ACS National Meeting 2012, Cataldo et al.)。具体地, pH 循环法用来产生不可逆且溶液稳定的聚集体。利用离心过滤装置 (Amicon Ultra-15, 10,000NMWL) 浓缩纯化的 mAb。利用 10 和 1N NaOH 与温和搅拌使 pH 升高至 pH 11.0, 然后使其在室温下静置 1 小时。随后,利用 6 和 1M HCl 与温和搅拌使 pH 缓慢 (约 20 分钟) 降低至 pH 5.0。这个过程重复 3 次,然后利用 0.22  $\mu$ m 注射器过滤器过滤溶液,并且在运行色谱实验之前将其透析入平衡缓冲液。

[0108] 实施例 5 :pH 梯度洗脱 A 蛋白色谱

[0109] 在通过 Unicorn 6.1 软件控制的 AKTA Avant 平台 (GE Healthcare) 上进行色谱实验。根据制造商的指导用 MabSelect SuRe™ (GE Healthcare)、ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore)、分别具有 SEQ ID NO:3 和 4 的配体的树脂 A 和 B、以及树脂 C 填充 A 蛋白柱。本文所述实施例中使用的各种色谱树脂的描述在表 1 中示出。利用 0.66cm (内径) x 14cm (床高) 柱进行实验。

[0110] 表 1. 树脂的描述。

[0111]

树脂	商业名称	基底基质	A 蛋白配体
MabSelect SuRe™	MabSelect SuRe™ (GE Healthcare)	琼脂糖	改造的 Z 结构域四聚体
ProSep® Ultra Plus	ProSep® Ultra Plus (EMD Millipore)	可控孔度玻璃	rSPA (重组全长 A 蛋白)
树脂 A	-	聚乙烯醇	SEQ ID NO. 3
树脂 B	-	聚乙烯醇	SEQ ID NO. 4
树脂 C	-	聚乙烯醇	rSPA (重组全长 A 蛋白)

[0112] 将 pH 梯度用于洗脱,从而在高 pH 下包含 Fc 的蛋白结合至 A 蛋白配体,并且在洗脱期间 pH 逐渐降低。通过利用双泵系统以变化的比例混合两种缓冲液,Avant 色谱系统产生这种 pH 梯度,其中保持流速,并且每个泵递送的流的百分比随时间改变。将柱用 0.1M 柠檬酸, pH 6.0 的初始缓冲液平衡 5 个柱体积 (CV)。将包含 Fc 的蛋白 (例如,抗体) 装载至柱上,然后用平衡缓冲液洗涤 4 个 CV。然后利用线性梯度洗脱抗体,其中缓冲液在 20 个 CV 中转变为 0.1M 柠檬酸, pH 3.0。使用 5 个 CV 的梯度延迟。

[0113] 然后,利用 0.1M 氢氧化钠 (MabSelect SuRe™, 树脂 C、树脂 A 和树脂 B) 或 6M 胍 HCl (ProSep® Ultra Plus) 清洗柱。随后将柱重新平衡。对于所有步骤,流速均为 1.6mL/min (3 分钟停留时间),除了蛋白装载步骤,其具有 0.8mL/min (6 分钟停留时间) 的流速。在每种方法的洗脱部分期间,每 0.5 个 CV 收集部分。利用 Agilent 1100 系列 (Agilent Technologies) HPLC 用面积 2.1mm x 30mm 的 POROS® A/20 (Applied Biosystems) A 蛋白柱 (ABI1-5024-12, S/N 33504) 确定每个部分中的抗体浓度。利用下文所述的分析测定进一步表征这些部分中代表聚集体的高分子量 (HMW) 物质。以范围为 12mg/mL 树脂至 40mg/mL 树脂的不同装载密度进行实验。

[0114] 实施例 6:利用大小排阻色谱确定洗脱混合物中的高分子量物质

[0115] 将 Agilent 1260 Infinity 系列 (Agilent Technologies) HPLC 用来进行 SEC 实验,用于确定不同样品中高分子量 (HMW) 物质、单体和低分子量 (LMW) 物质的相对水平。将具有 4 μm 粒径的面积 3.6mm (内径) x 30cm (床高) 的 TSKgel SuperSW3000 (TOSOH Biosciences, #08541) 柱与保护柱 (TOSOH Biosciences #08543) 一起使用。所用的缓冲液系统为 0.2M 磷酸钠, pH 7.0, 流速为 0.35mL/min。调整样品注入,从而每样品装载约 10 μg 的抗体 (进样体积范围为 1-100 μL)。与每个样品集一起运行包含背景缓冲液的空白。还分析凝胶过滤标准品 (Bio-Rad 151-1901) 以确认柱性能。通过在 230nm 和 280nm 处的 UV 吸光度监测 HPLC 色谱。利用 Agilent ChemStation 软件分析吸光度曲线用于峰整合。可以将获得自这个测定的百分比值乘以部分的浓度 (mg/mL) 以获得样品中每个大小变体物质的实际浓度或质量 (例如, SEC 结果: 4% HMW, 92% 单体, 4% LMW; 样品浓度: 2g/L; 样品体积: 10mL; 1.84g/L 单体, 样品中总计 18.4mg 单体)。如样品覆盖中所示,基于单体洗脱混合物对色谱图进行比对和归一化。

[0116] 来自 pH 梯度的 mAb-1 (12mg/mL 的装载密度) 的色谱图的洗脱部分的 UV 痕迹在图 1A 中通过实线示出。获得自 SEC 的相应聚集体含量通过连接的正方形示出。用于在 500mAU 切割峰的相应洗脱混合物纯度和收率数据在表 2 中示出。图 1B 示出 MabSelect Sure™ 以及树脂 A 和 B 的收率对单体纯度。

[0117] 洗脱特征谱内不同部分的 SEC 色谱图证实树脂 A 和 B 的来自特征谱开始和结束的部分包含峰前去除的总聚集体的大百分比 (高于 30%)。在 500mAU 切割特征谱之后, 去除这些聚集体物质, 在所得的洗脱混合物中产生高纯度水平。如表 2 中总结的, 树脂 A 和 B 均证实高洗脱混合物纯度。表 2 包含来自 3 种树脂的 mAb-1pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。切割洗脱峰以包括具有大于 500mAU 的 UV 280 吸光度的部分。切割峰之后确定混合物中的纯度, 并且计算为与混合物中的总蛋白相比, 混合物中单体的总量。切割峰之后确定总收率, 并且计算为相对于来自整个洗脱特征谱的洗脱部分中回收的蛋白总量, 洗脱混合物中 mAb 的总量。

[0118] 表 2. mAb-1 (装载密度 12mg/mL) pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。

[0119]

树脂	混合物中的 单体(%)	总 mAb 收 率(%)	峰前		峰后		去除的总聚 集体(%)
			去除的聚 集体%	总计 %	去除的聚 集体%	总计 %	
MabSelect SuRe™	88.9	80.3	6.1	18.9	26.1	81.1	32.2
树脂 A	94.6	79.4	25.7	41.1	36.9	58.9	62.6
树脂 B	92.6	77.3	22.3	32.8	45.7	67.2	68.0

[0120] 来自洗脱特征谱的开始、中间和结束的 MabSelect SuRe™ 和树脂 A 的代表性 SEC 色谱图在图 2 中示出。基于单体峰 (8-9 分钟) 将特征谱归一化并进行比对。对于 MabSelect SuRe™, 在特征谱末端洗脱的部分中观察到大的聚集体峰。然而, 对于树脂 A, 在早期和晚期洗脱部分中均观察到大的聚集体峰。

[0121] 图 3 示出来自 pH 梯度的 mAb-2 (12mg/mL 的装载密度) 的色谱图的相关洗脱部分的 UV 痕迹。获得自 SEC 的相应聚集体含量通过连接的正方形示出。用于在 500mAU 切割峰的相应洗脱混合物纯度和收率数据在表 3 中示出。结果与用 mAb-1 获得的那些结果相似。

[0122] 表 3 包含来自 5 种树脂的 mAb-2pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。切割洗脱特征谱以包括具有大于 500mAU 的 UV 280 吸光度的部分。切割特征谱之后确定混合物中的纯度, 并且计算为与混合物中的总蛋白相比, 混合物中单体的总量。切割峰之后确定总收率, 并且计算为与来自整个洗脱特征谱的洗脱部分中回收的总量相比, 混合物中的总量。

[0123] 用树脂 A 获得了最高混合物纯度。来自树脂 A 和 B 的来自峰前和峰后的部分包含大百分比的 HMW 物质。ProSep® Ultra Plus 和树脂 C 的 SEC 数据显示, 如现有技术报道的, 对于这些树脂, 聚集体物质主要在洗脱特征谱的尾部中。如下文表 3 中总结的, 树脂 A 和 B 在峰前中去除大于 90% 的总聚集体。

[0124] 表 3. mAb-2 (装载密度 12mg/mL) pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。

[0125]

树脂	混合物中的单体 (%)	总 mAb 收率 (%)	峰前		峰后		去除的总聚集体 (%)
			去除的聚集体 %	总计 %	去除的聚集体 %	总计 %	
MabSelect SuRe™	82.2	86.6	11.2	67.5	5.4	32.5	16.6
ProSep® Ultra Plus	81.0	96.9	0	0	7.4	100	7.4
树脂 A	86.6	82.2	40.5	97.6	1.0	2.4	41.5
树脂 B	83.8	85.2	27.9	92.7	2.2	7.3	30.1
树脂 C	81.1	98.5	0.7	23.3	2.3	76.7	3.0

[0126] 图 4 示出对较高装载密度 40mg/mL 树脂获得的结果。与表 2 中的较低装载密度结果相似,树脂 A 和 B 在洗脱特征谱的开始和结束显示大量的聚集体物质。

[0127] 表 4 示出在 40mg/mL 装载密度下来自 3 种树脂的 mAb-2pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。切割洗脱特征谱以包括具有大于 500mAU 的 UV 280 吸光度的部分。切割特征谱之后确定混合物中的纯度,并且计算为与混合物中的总质量相比,混合物中单体的总量。切割特征谱之后确定总收率,并且计算为与来自整个洗脱特征谱的洗脱部分中回收的总量相比,混合物中蛋白的总量。如下文所示,在这个步骤中在峰前树脂 A 和 B 去除大于 48% 的总聚集体。

[0128] 表 4. mAb-2 (装载密度 40mg/mL) pH 梯度洗脱的收率和纯度数据。

[0129]

树脂	混合物中的单体 (%)	总 mAb 收率 (%)	峰前		峰后		去除的总聚集体 (%)
			去除的聚集体 %	总计 %	去除的聚集体 %	总计 %	
树脂 A	82.7	89.0	9.6	48.0	10.4	52.0	20.0
树脂 B	81.7	91.7	10.3	70.1	4.4	29.9	14.7

[0130] 实施例 7 :A 蛋白色谱的 pH 分步洗脱

[0131] 如下文所示,利用 pH 分步洗脱方法纯化包含 Fc 的蛋白 mAb-2。

[0132] 在通过 Unicorn 6.1 软件控制的 AKTA Avant (GE Healthcare) 上进行色谱实验。用 MabSelect SuRe™、树脂 A 或树脂 B 填充 A 蛋白柱。利用 0.66 cm (内径) x 14 cm (床高) 柱进行实验。利用不对称测试证明柱合格。

[0133] 将 pH 分步用于洗脱,从而蛋白在高 pH 下结合,并且在洗脱期间 pH 以逐步方式降低。Avant 色谱系统通过利用双泵系统以指定比例混合两种缓冲液来产生这种 pH 分步。用 0.1M 柠檬酸, pH 5 平衡柱。将抗体装载至柱,然后用平衡缓冲液洗涤 9 个 CV。将该方法编程以混合缓冲液,获得 0.1M 柠檬酸, pH 3.75 的浓度维持 10 个 CV,然后降低至 0.1M 柠檬酸, pH 3 维持 10 个 CV。然后利用 0.1M 氢氧化钠清洗柱,随后重新平衡。对于所有步骤,将

流速设置在 1.6mL/min(3 分钟停留时间),除了蛋白装载步骤,其具有 0.8mL/min(6 分钟停留时间)的流速。在该方法的洗脱部分期间,每 1 个 CV 收集部分。利用上文所述的分析测定表征这些部分。

[0134] mAb-2 的 pH 分步洗脱结果在图 5 中示出。基于切割特征谱以排除前两个部分的相应洗脱混合物纯度和收率在表 5 中示出。表 5 包含来自 3 种树脂的 mAb-2 pH 分步洗脱的收率和纯度数据。将洗脱特征谱切割以排除前两个部分。切割特征谱之后确定混合物中的纯度,并且计算为与混合物中蛋白的总量相比,混合物中单体的总量。切割特征谱之后确定总收率,并且计算为与来自整个洗脱特征谱的洗脱部分中回收的总量相比,混合物中的总量。

[0135] 树脂 A 提供最高的总 mAb 收率,同时还提供最高的单体纯度(88.3%)。树脂 B 提供最高的单体纯度(92.1%)与中等的总收率。这表明 pH 分步洗脱策略可以用于降低终产物混合物中的聚集体水平。

[0136] 表 5. mAb-2(装载密度 12mg/mL) pH 分步洗脱的收率和纯度数据。

[0137]

树脂	混合物中的单体 (%)	总 mAb 收率 (%)
MabSelect SuRe™	86.9	18.5
树脂 A	88.3	69.9
树脂 B	92.1	44.6

[0138] 实施例 8:采用一系列小 pH 变化步骤用于 A 蛋白色谱的分步洗脱

[0139] 在这个示例性实验中,如下文所述,利用一系列小 pH 变化步骤纯化包含 Fc 的蛋白 mAb-3。

[0140] 在通过 Unicorn 6.1 软件控制的 AKTA Avant(GE Healthcare) 上进行色谱实验。用树脂 A 填充 A 蛋白柱。利用 0.66cm(内径) x 14cm(床高) 柱进行实验。利用不对称测试证明柱合格。

[0141] 将一系列小 pH 变化步骤用于洗脱,从而蛋白在高 pH 下结合,并且在洗脱期间 pH 以逐步方式降低。Avant 色谱系统可以通过利用双泵系统以指定比例混合两种缓冲液来产生这种 pH 分步。抗体进料最初包含 10.5% 聚集体。将 A 蛋白柱用 0.1M 柠檬酸, pH 5 平衡 5 个 CV。将抗体进料装载至柱,然后用平衡缓冲液洗涤 5 个 CV。为了洗脱抗体,将方法编程以混合 0.1M 柠檬酸, pH 5 缓冲液与 0.1M 柠檬酸, pH 3, 以便获得 pH 5.0、4.8、4.6、4.4、4.2、4.0、3.8、3.6、3.4、3.2 和 3.0 的溶液。在移至下一步之前,每个 pH 步骤维持 3 个 CV。然后利用 0.1M 氢氧化钠将柱清洗 3 个 CV,然后用 0.1M 柠檬酸, pH 5 重新平衡 5 个 CV。对于所有步骤,将流速设置在 1.6mL/min(3 分钟停留时间),除了蛋白装载步骤,其具有 0.8mL/min(6 分钟停留时间)的流速。在该方法的洗脱部分期间,每个 CV 收集部分。利用上文所述的分析测定表征这些部分。

[0142] mAb-3 的小 pH 分步洗脱结果在图 6 中示出。纯度和收率水平取决于选择洗脱峰的哪些部分用于汇集。表 6 示出几种情况。虽然仅汇集高纯度部分可以获得较高纯度水平,但是这可能不利地影响收率。当汇集来自 22-34CV 的部分时几乎完全回收抗体。所得的纯度为 93%。通过仅选择包含高纯度的部分,可以提高混合物的纯度。当汇集来自 26-29CV

的部分时获得 95% 的纯度水平, 导致约 70% 的收率。当汇集来自 27-29CV 的部分时, 纯度水平为约 96%, 导致约 57% 的收率。在汇集期望的部分之后确定混合物中的纯度, 并且计算为与混合物中蛋白的总量相比, 混合物中单体的总量。汇集部分之后确定总收率, 并且计算为与来自整个洗脱特征谱的洗脱部分中回收的总量相比, 混合物中的总量。

[0143] 表 6. 小 pH 分步洗脱自树脂 A 的 mAb-3 的收率和纯度数据。初始进料单体纯度为 89.5%。

[0144]

汇集的 CV	混合物中的单体 (%)	总 mAb 收率 (%)
22-34	92.9	99.8
26-32	93.5	89.7
26-29	95.2	70.0
27-29	96.0	57.1

[0145] 这表明一系列小 pH 变化步骤可以用于降低来自树脂 A 的终产物混合物中的聚集体水平。通过使用小 pH 变化步骤, 可以鉴定期望的 pH 截止水平以优化纯度和收率。这种方法可以用来指导如上文实施例 7 所述的简化的 pH 分步洗脱方法的开发。这种简化的方法可以包含较少的 pH 分步变化, 对其策略上加以选择以优化给定方法的纯度和收率。

[0146] 根据本说明书内引用的参考文献的教导最全面地理解本说明书, 所述参考文献援引加入本文。本说明书内的实施方案提供本发明中的实施方案的说明, 并且不应当理解为限制其范围。技术人员容易地认识到本发明涵盖许多其他实施方案。所有出版物和发明均整体援引加入本文。如果援引加入的材料与本说明书矛盾或不一致, 则本说明书会取代任何这样的材料。本文中任何参考文献的引用不是承认这类参考文献是本发明的现有技术。

[0147] 除非另有说明, 本说明书 (包括权利要求书) 中使用的所有表示成分、细胞培养、处理条件等的量的数字应当理解为在所有条件下受到术语“约”的修饰。因此, 除非另有相反的说明, 数值参数为近似值, 并且可以根据通过本发明试图获得的期望特性而变化。除非另有说明, 一系列元素之前的术语“至少”应当理解为指该系列中的每个元素。本领域技术人员会认识到或者能够利用不超过常规实验确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同物。以下权利要求书意图涵盖这类等同物。

[0148] 本领域技术人员会清楚, 可以进行本发明的许多修改和变化而不背离其精神和范围。本文所述的具体实施方案仅通过实例的方式提供, 并不意味着以任何方式限制。本发明的真正范围和精神通过以下权利要求书示出, 说明书和实施例仅认为是示例性的。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; EMD 密理博公司

&lt;120&gt; 利用基于 A 蛋白的色谱增加蛋白纯度的方法

&lt;130&gt; P 13/034 PCT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 61/783, 381

&lt;151&gt; 2013-03-14

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 1

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 174

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 2

gCGgataaca aattcaacaa ggagcaacag aaegcattct atgaaattct gcacctgceg 60

aatctgacgg aggageaacg taacggcttt atccagtcce tgaaggatga tccgtctgtg 120

tctaaagaga tcttggcgga ggcaaaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctec gaaa 174

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 290

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

&lt;400&gt; 3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

[0002]

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn  
 50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
 85 90 95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 115 120 125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
 130 135 140

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp  
 165 170 175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 180 185 190

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 195 200 205

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 210 215 220

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu  
 225 230 235 240

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 245 250 255

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
 260 265 270

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 275 280 285

Pro Lys

[0003]

290

<210> 4  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"  
  
 <400> 4  
 Ala Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15  
  
 Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30  
  
 Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45  
  
 Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe  
 50 55 60  
  
 Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys  
 65 70 75 80  
  
 Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu  
 85 90 95  
  
 Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys  
 100 105 110  
  
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
 115 120 125  
  
 Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 130 135 140  
  
 Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 145 150 155 160  
  
 Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 165 170 175  
  
 His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser  
 180 185 190  
  
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205  
  
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 210 215 220

[0004]

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg  
225 230 235 240

Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu  
245 250 255

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
260 265 270

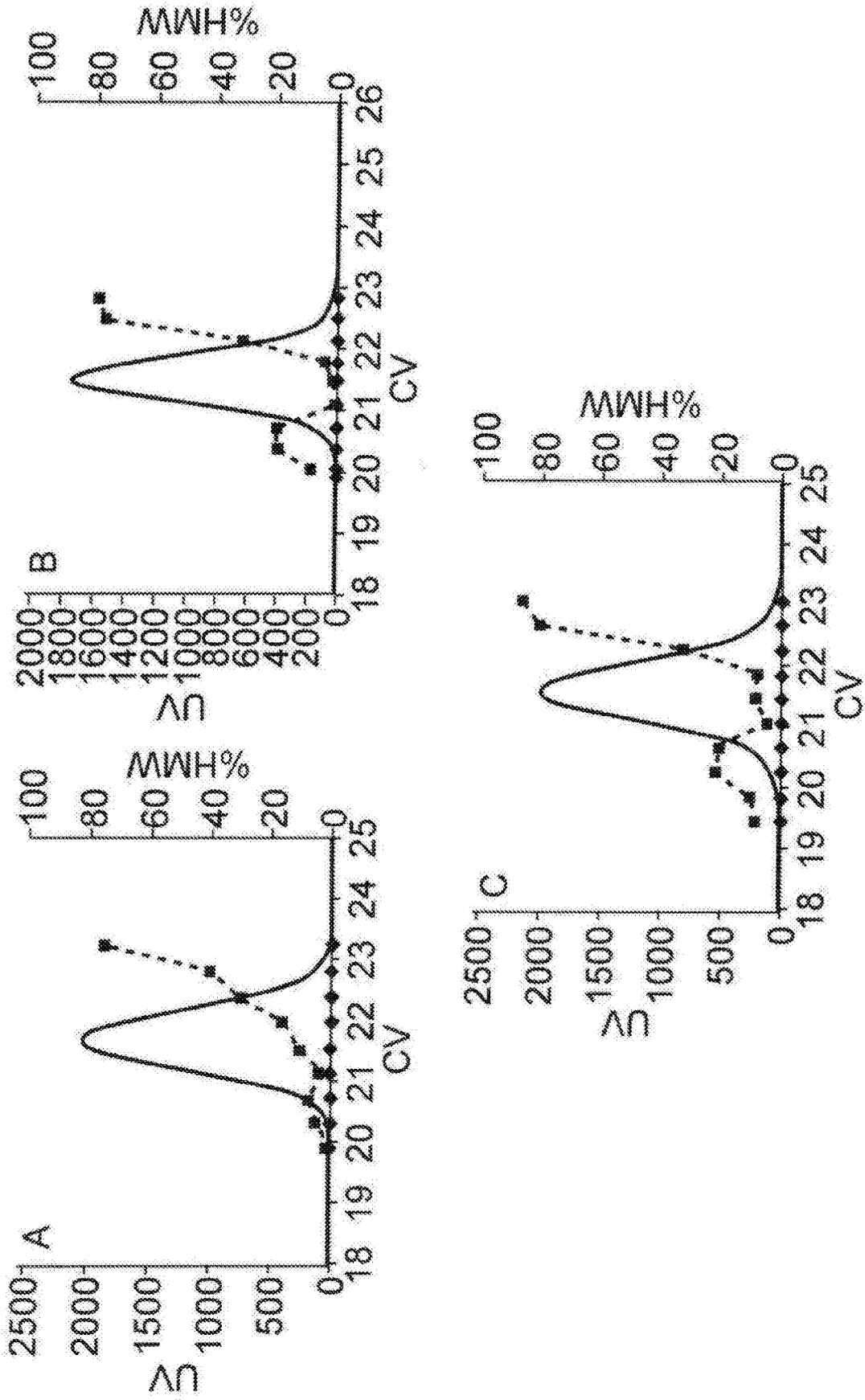


图 1A

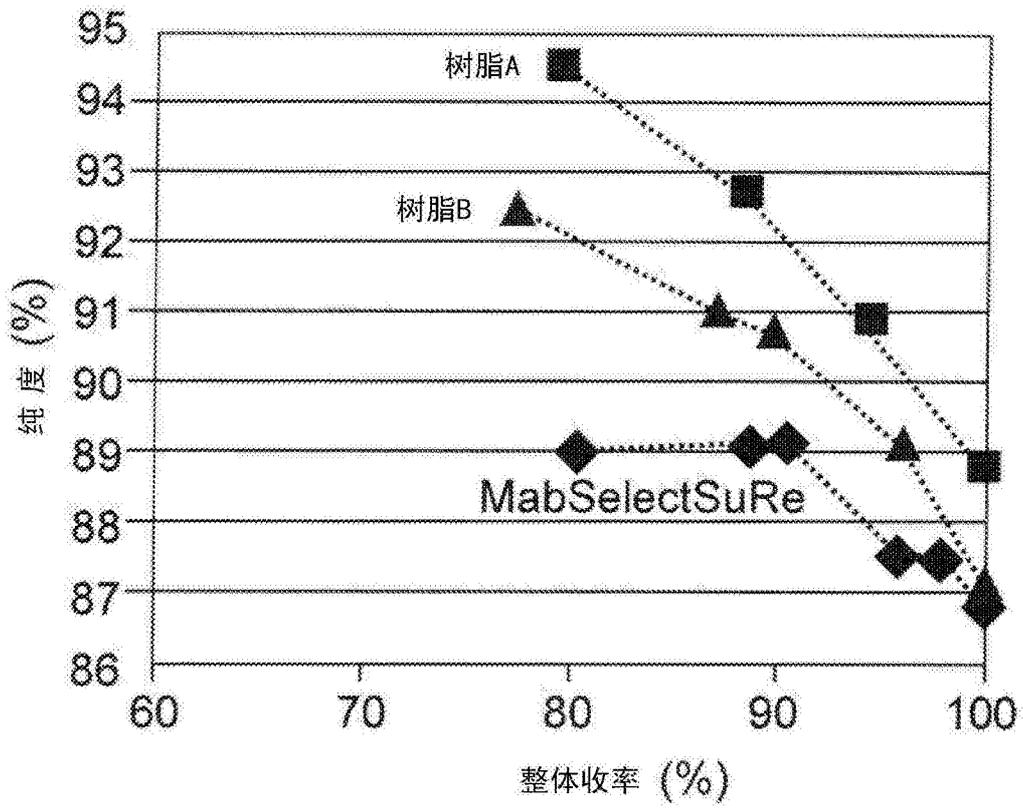


图 1B

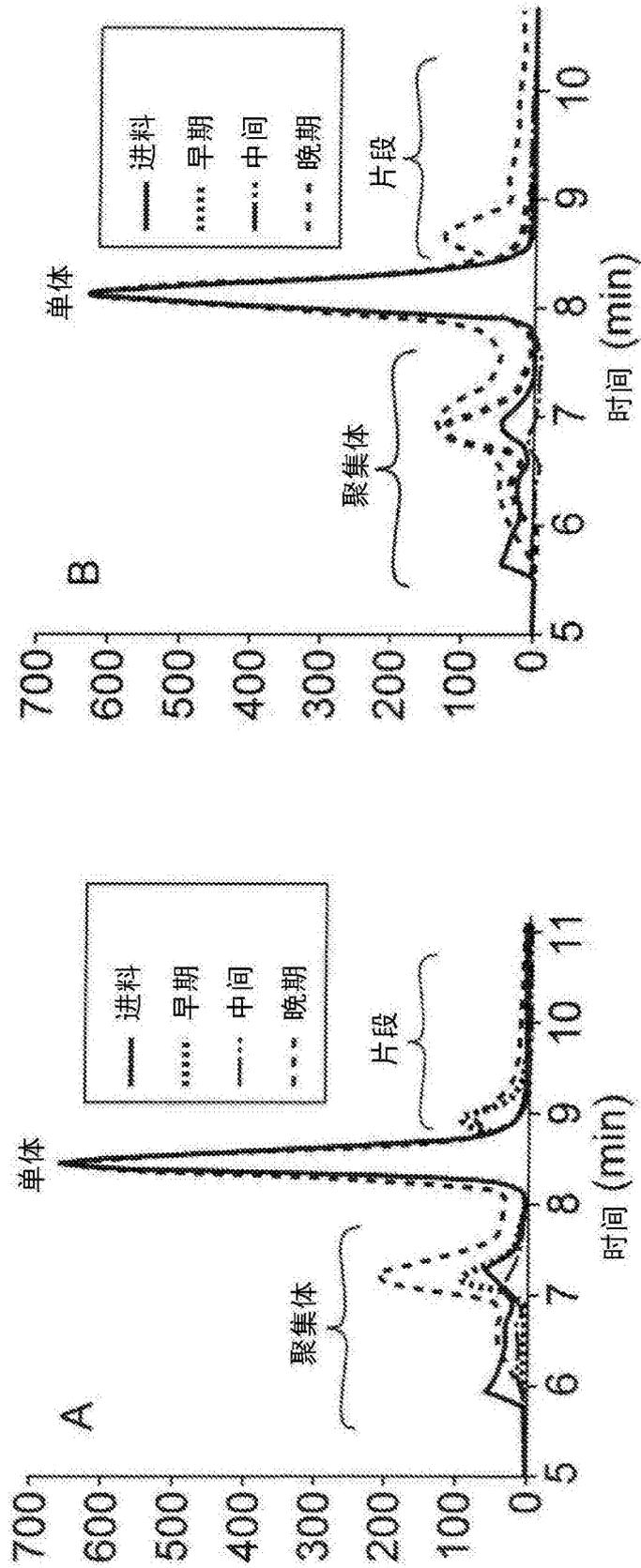


图 2

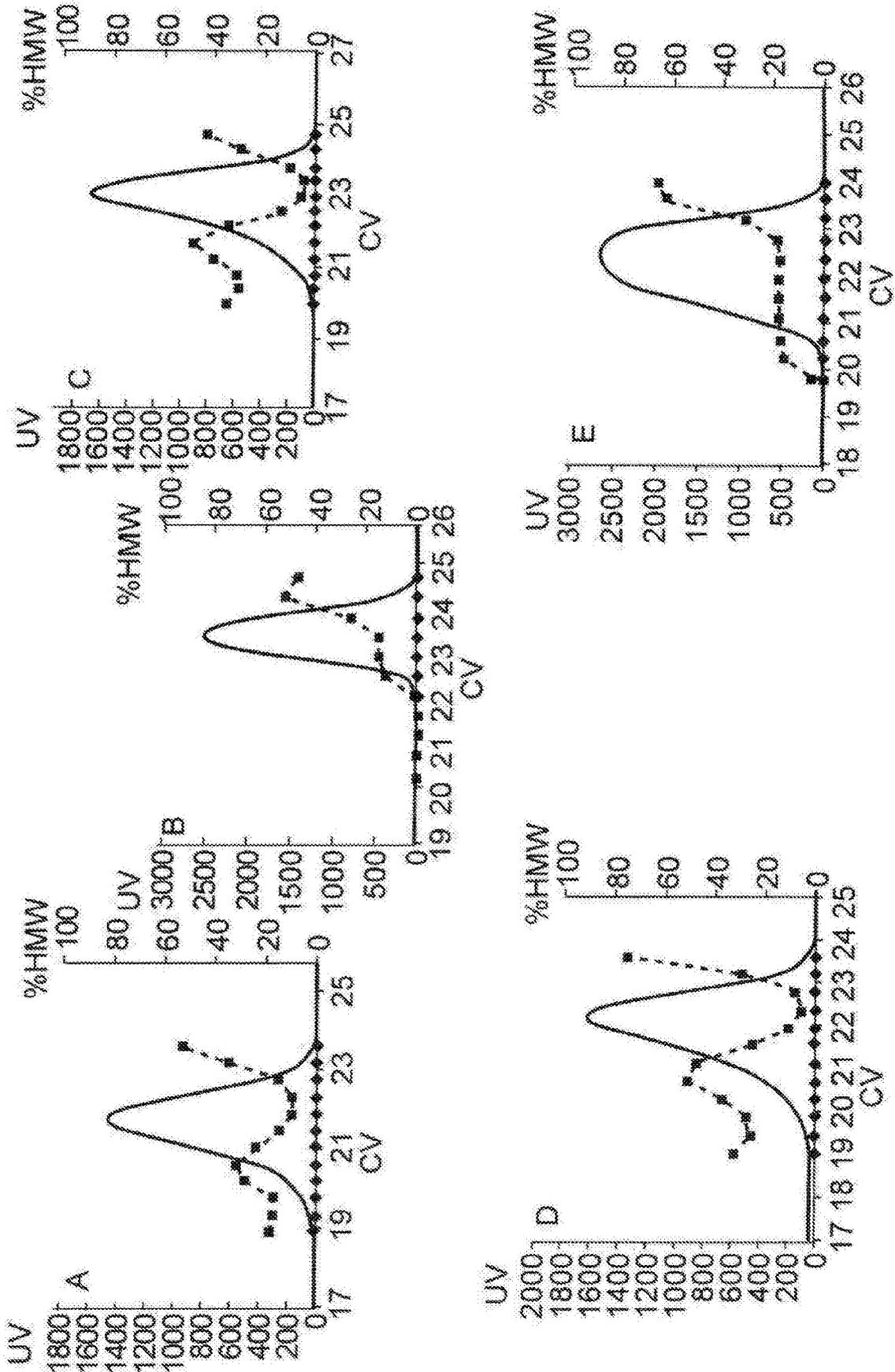


图 3

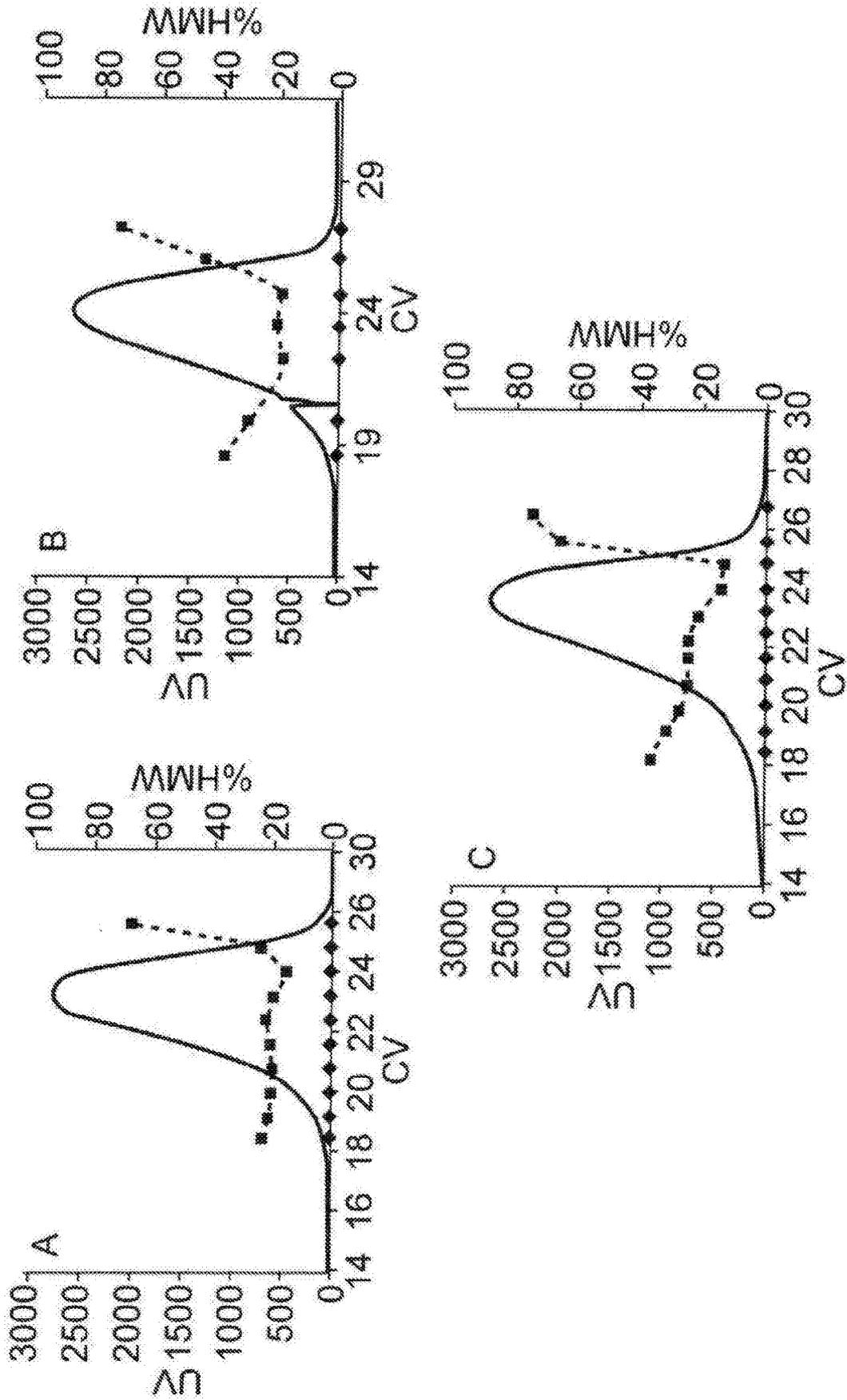


图 4

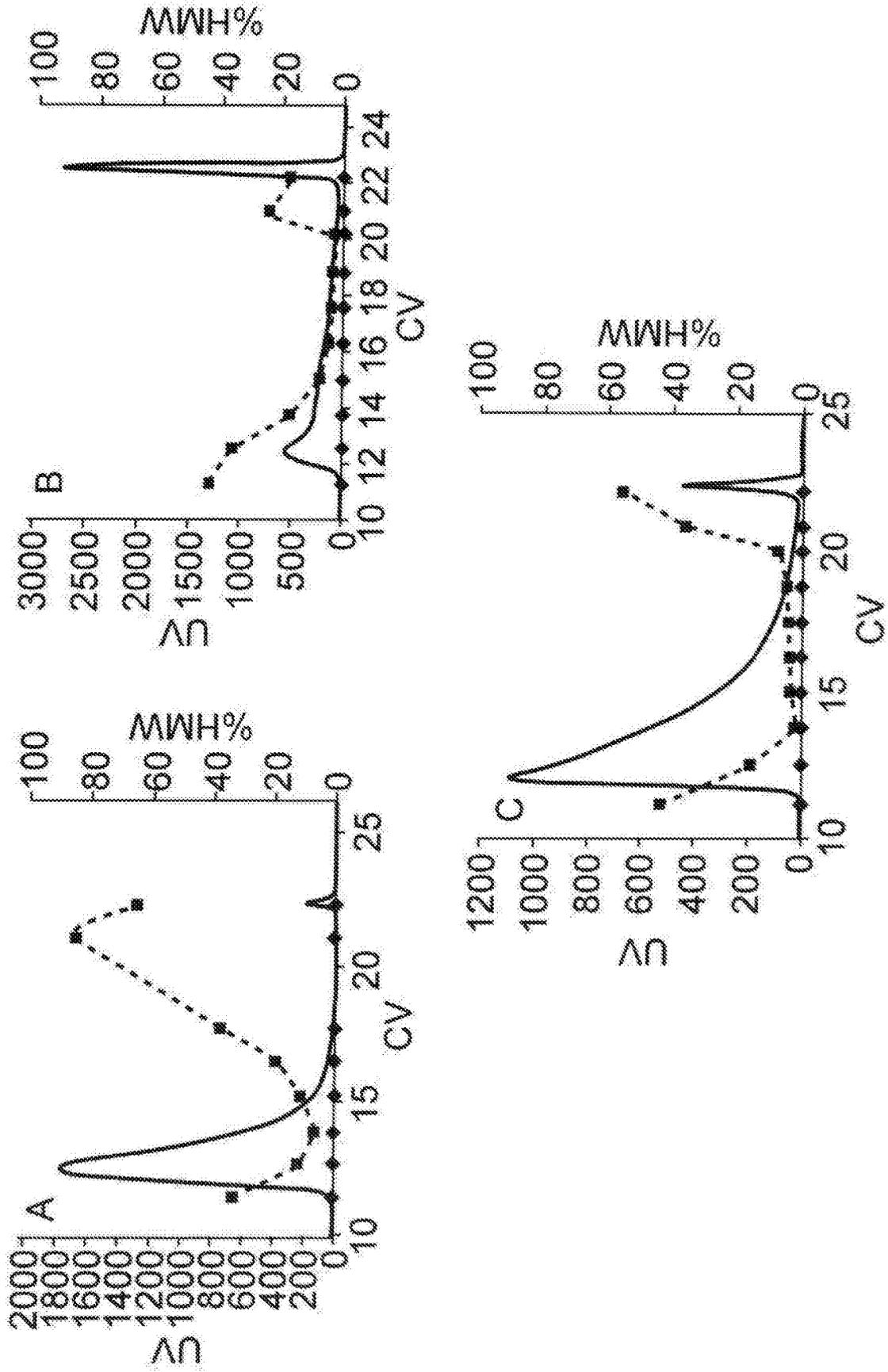


图 5

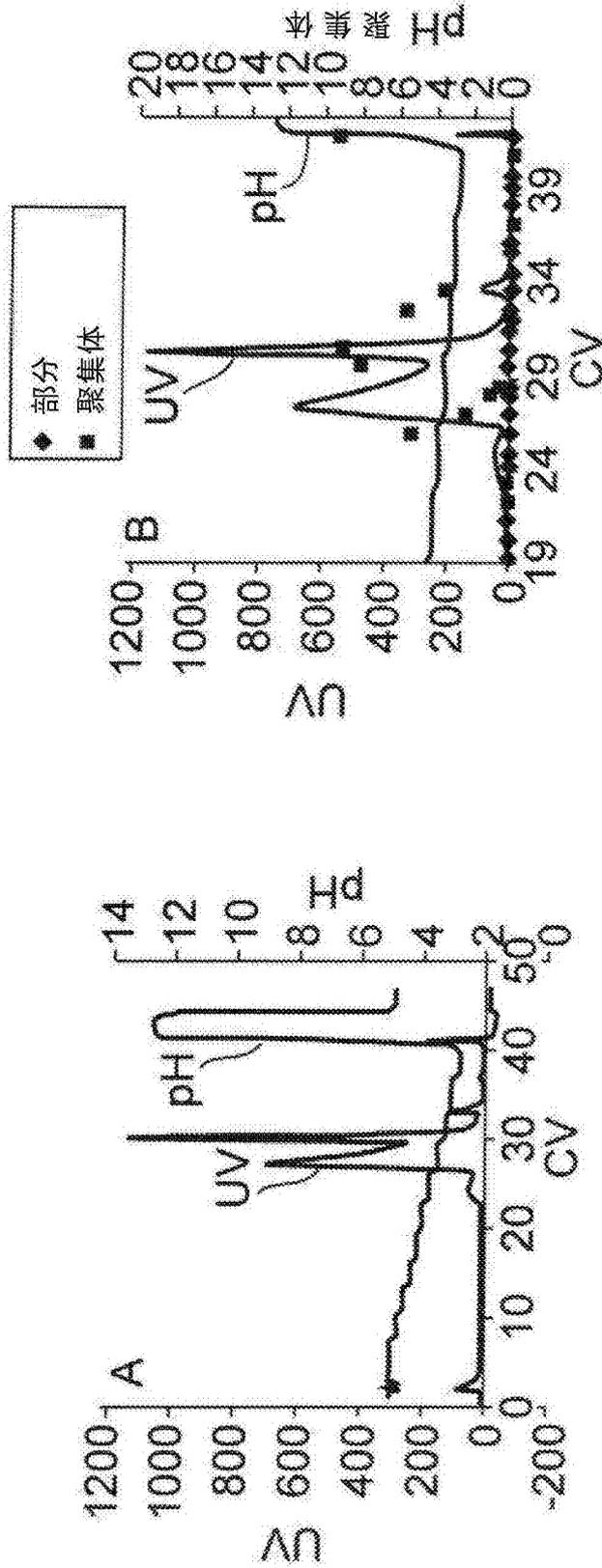


图 6