



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114651007 A

(43) 申请公布日 2022.06.21

(21) 申请号 202080077533.3

(22) 申请日 2020.11.04

(30) 优先权数据

62/931,874 2019.11.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/058774 2020.11.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/091933 EN 2021.05.14

(71) 申请人 安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·R·安巴伊卡尔 L·迪亚兹

N·戈麦斯 B·J·蒂洛森

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

专利代理师 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

C07K 16/06 (2006.01)

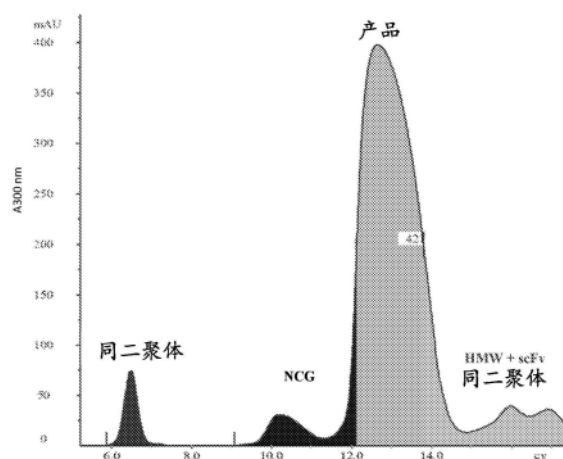
权利要求书4页 说明书30页 附图4页

(54) 发明名称

阳离子交换色谱期间的高盐洗涤以去除产品相关的杂质

(57) 摘要

本发明涉及在阳离子交换纯化操作期间去除低等电点产品相关的杂质的方法。



1. 一种用于纯化多特异性蛋白的方法,该方法包括
将包含多特异性蛋白的样品加载到阳离子交换色谱介质上;
用至少一种包含100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质;以及
从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含100-125mM氯化钠。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含100-105mM氯化钠。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含105-147mM氯化钠。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含105-125mM氯化钠。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含125-147mM氯化钠。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH $5.0 \pm 0.05\%$ 至 pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。
9. 根据权利要求7所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH 4.91-5.1。
10. 根据权利要求7所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH 4.9、5.0、或 5.1。
11. 根据权利要求7所述的方法,其中该洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。
18. 根据权利要求1所述的方法,其中用至少三种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,这些洗涤缓冲液中至少一种包含0-147mM氯化钠。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,这些洗涤缓冲液中至少一种包含0-70mM氯化钠。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠,随后洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中用包含乙酸盐、0mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后用选自自由以下组成的组的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质:包含乙酸盐、100mM氯化钠的洗涤缓冲液,包含乙酸盐、105mM氯化钠的洗涤缓冲液,或包含乙酸盐、125mM氯化钠的洗涤缓冲液。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后用包含乙酸盐、0-70mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后用包含乙酸盐、0mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后用包含乙酸盐、70mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

26. 根据权利要求18所述的方法,其中用至少三种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液,随后

包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液,随后

包含乙酸盐、0mM氯化钠的第三洗涤缓冲液或包含乙酸盐、70mM氯化钠的洗涤缓冲液。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中用以下洗涤该阳离子交换介质:

包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液,随后

选自由以下组成的组的第二洗涤缓冲液:包含乙酸盐、100mM氯化钠的洗涤缓冲液,包含乙酸盐、105mM氯化钠的洗涤缓冲液,或包含乙酸盐、125mM氯化钠的洗涤缓冲液;随后包含乙酸盐、0mM氯化钠的第三洗涤缓冲液。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中用以下洗涤该阳离子交换介质:

包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液,随后

包含乙酸盐、147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液,随后

包含乙酸盐、70mM氯化钠的第三洗涤缓冲液。

29. 根据权利要求1所述的方法,其中用2.5mM/CV的包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

30. 根据权利要求1所述的方法,其中通过梯度将该多特异性蛋白从该阳离子交换介质洗脱。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中该梯度是线性梯度或步长梯度。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中该梯度是盐梯度。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含0-1M氯化钠。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含70-500mM氯化钠。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含125mM氯化钠。

36. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

37. 根据权利要求1所述的方法,其中将该阳离子交换介质加载至少10g/L的多特异性蛋白。

38. 根据权利要求1所述的方法,其中将该阳离子交换介质加载10g/L至40g/L的多特异性蛋白。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中将该阳离子交换介质加载15g/L至30g/L。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中将该阳离子交换介质加载25g/L至40g/L。

41. 根据权利要求1所述的方法, 其中将该阳离子交换介质加载10g/L的多特异性蛋白, 用包含105mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤并以8mM/CV在盐梯度中洗脱。

42. 根据权利要求1所述的方法, 其中将该阳离子交换介质加载15g/L至30g/L的多特异性蛋白, 用包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤。

43. 根据权利要求1所述的方法, 其中将该阳离子交换介质加载25g/L至40g/L的多特异性蛋白, 其中至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

44. 根据权利要求1所述的方法, 其中至少一种产品相关的杂质是同二聚体、高分子量物质、半抗体、团聚体、低分子量物质、抗体片段、或轻链错配。

45. 一种纯化工艺, 该纯化工艺包括单元操作, 该单元操作包括根据权利要求1所述的方法进行的阳离子交换色谱。

46. 根据权利要求1所述的方法, 该方法进一步包括在阳离子交换色谱步骤之前和/或之后, 用于纯化该多特异性蛋白的一个或多个单元操作, 该单元操作包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱柱、和/或混合模式色谱柱。

47. 根据权利要求1所述的方法, 其中该多特异性蛋白是双特异性蛋白。

48. 根据权利要求1所述的方法, 其中该多特异性蛋白是双特异性抗体。

49. 一种根据权利要求1所述的方法产生的纯化的多特异性蛋白。

50. 根据权利要求1所述的方法, 其中该阳离子交换色谱介质是树脂。

51. 一种从阳离子交换色谱的洗脱液中减少低pI产品相关的杂质的方法, 该方法包括将包含多特异性蛋白和至少一种具有低于该多特异性蛋白的pI的产品相关的杂质的组合物加载到阳离子交换色谱介质上;

用第一洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,

用包含100-147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质;

从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白;

其中与从相应的在洗涤缓冲液配制品中不含氯化钠的方法中回收的阳离子交换色谱洗脱液相比, 该阳离子交换色谱洗脱液具有减少的低pI产品相关的杂质。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中用第三洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

53. 一种在高盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱以减少产品相关的杂质的方法, 该方法包括

将包含多特异性蛋白和至少一种产品相关的杂质的组合物加载到平衡阳离子交换柱上;

用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质, 其中一种洗涤缓冲液包含100-147mM氯化钠; 以及

从阳离子交换色谱树脂洗脱结合的多特异性蛋白。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中在加载该组合物前, 用不含氯化钠的缓冲液来平衡该阳离子交换介质。

55. 一种用于生产分离的、纯化的重组多特异性蛋白的方法, 该方法包括

用表达该多特异性蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养;

培养该宿主细胞以表达该多特异性蛋白;

从该细胞培养收获重组多特异性蛋白;

亲和纯化该重组多特异性蛋白；
将该亲和纯化的重组多特异性蛋白加载到阳离子交换色谱树脂上；
用至少一次包括100-147mM氯化钠的洗涤来洗涤该阳离子交换树脂；
从该阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白；以及
以流过模式将包含重组多特异性蛋白的阳离子交换色谱洗脱液加载到另外的色谱介质上。

56. 根据权利要求55所述的方法，其中该另外的色谱介质选自阳离子交换色谱介质、多模式色谱介质、疏水相互作用色谱介质和羟基磷灰石色谱介质。

57. 根据权利要求55所述的方法，其中该亲和纯化的多特异性蛋白在洗脱液池中并且使其经受低pH病毒灭活，随后在加载到阳离子交换介质上之前进行中和。

58. 根据权利要求56所述的方法，其中使来自第三色谱介质的流过物经受超滤和渗滤单元操作。

59. 一种根据权利要求55所述的方法的分离的、纯化的重组多特异性蛋白。

60. 一种药物组合物，该药物组合物包含根据权利要求55所述的方法产生的分离的、纯化的重组多特异性蛋白。

阳离子交换色谱期间的高盐洗涤以去除产品相关的杂质

[0001] 本申请要求于2019年11月7日提交的美国临时申请号62/931,874的权益,该临时申请通过引用以其全文特此并入。

技术领域

[0002] 本发明涉及生物药剂制造领域。特别地,本发明涉及用于去除多特异性蛋白阳离子交换纯化操作中产品相关的杂质的方法。

背景技术

[0003] 抗体产品是生物药剂市场上最大的领域,在未来十年内能够容易达到数千亿美元的销售额。治疗性抗体的商业开发开始于1980年代,其中批准了第一批治疗性单克隆抗体,此后其一直在持续发展和扩大。尽管单克隆抗体能够以高亲和力和特异性与靶标结合,并且已非常成功的用于治疗某些适应症,但它们在治疗方面也有局限性。单克隆抗体只能与单一靶标结合;然而,许多疾病是多因性的。在癌症免疫疗法中,针对单一靶标的治疗可能不足以完全破坏或固定癌细胞。另外,一些接受单克隆抗体治疗的患者可能在一段时间后对治疗无响应,或甚至出现耐药性。

[0004] 已开发出新的抗体样结构,例如抗体Fab片段、Fc融合蛋白、抗体-药物偶联物、乙二醇工程改造的抗体,尤其是双特异性和其他多特异性抗体样结构,以应对这些挑战。这些抗体样结构,特别是双特异性抗体,相对于传统的单克隆抗体治疗提供了改进(例如多靶标亲和力),并被证明是有效的具有多种形式的新一代生物治疗剂,可以开发用于应对甚至更多具有挑战性的治疗适应症。

[0005] 双特异性抗体是这些抗体样结构中最多样化的组,其结构的种类也在不断增加,以应对更大范围的治疗适应症的挑战。这些结构将抗体的结合特性与工程改造到该结构中的另外的分子特性相结合,以适应靶向疾病适应症的需求。正在开发双特异性抗体,用于各种适应症和用途,例如将免疫效应细胞重新定向至肿瘤细胞以针对癌症进行免疫应答、阻断信号传导途径、靶向肿瘤血管生成、阻断细胞因子、穿越血脑屏障、诊断测定、治疗病原体、并作为递送剂。(Sedykh等人,Drug Design,Development and Therapy[药物设计、开发和疗法]18(12),195-208,2018;Walsh,Nature Biotechnology[自然生物技术],32(10),992-1000,2014;Ecker等人,mAbs 7(1),9-14,2015;Spiess等人,Mol Immunol[分子免疫学]67,95-106,2015;Fan等人,J Hematol&Oncology[血液与肿瘤学杂志]8:130-143,2015;Williams等人,Process Design for Bispecific Antibodies[双特异性抗体的工艺设计],Biopharmaceutical Processing,Development,Design and Implementation of Processes[生物药剂加工、开发、设计与工艺实现],Jagschies等人编辑,爱思唯尔有限公司(Elsevier Ltd),第837-855页,2018)。

[0006] 这些多特异性蛋白的开发带来了新的生物制造挑战,特别是关于产品不稳定性和低表达产量。特别地,多特异性蛋白的纯化由于形成产品相关的变体(例如同二聚体、半抗体、团聚体、高分子量物质和低分子量物质等)而变得复杂。这些产品相关的变体与目标多

特异性蛋白分享相似的结构和物理特性,例如电荷,这使其难以在纯化期间分离。这些产品有关的杂质降低了多特异性药物产品的产量和活性。

[0007] 在阳离子交换色谱单元操作期间,与目标多特异性蛋白具有相似电荷(等电点, pI)的产品相关的杂质可以与多特异性蛋白共洗脱,从而使纯化复杂并降低产量。在洗脱之前分离低pI产品相关的杂质将是有益的。本文所述的发明通过在阳离子交换色谱期间提供高盐洗涤条件以去除这些低pI产品相关的杂质而满足了此需求。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于纯化多特异性蛋白的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白的样品加载到阳离子交换色谱介质上;用至少一种包含100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质;并且从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100-105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含105-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含105-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含125-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH $5.0 \pm 0.05\%$ 至 pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH 4.91-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐, pH 4.9、5.0、或5.1。在另一个相关实施例中,该洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠。

[0009] 在一个实施例中,用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。在一个实施例中,用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。

[0010] 在一个实施例中,用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,这些洗涤缓冲液中至少一种包含0-147mM氯化钠。在相关实施例中,用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,这些洗涤缓冲液中至少一种包含0-70mM氯化钠。在一个实施例中,用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠,随后洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠。在相关实施例中,用包含乙酸盐、0mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后用选自以下组成的组的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质:包含乙酸盐、100mM氯化钠的洗涤缓冲液,包含乙酸盐、105mM氯化钠的洗涤缓冲液,或包含乙酸盐、125mM氯化钠的洗涤缓冲液。在一个实施例中,用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐、0-70mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。在相关实施例中,用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐、0mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。在另一个相关实施例中,用包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后包含70mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质。

[0011] 在一个实施例中,用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质:包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐、0mM氯化钠的第三洗涤缓冲液或包含乙酸盐、70mM氯化钠的洗涤缓冲液。在相关

实施例中,用以下洗涤阳离子交换介质:包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液;随后选自由以下组成的组的第二洗涤缓冲液:包含乙酸盐、100mM氯化钠的洗涤缓冲液,包含乙酸盐、105mM氯化钠的洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐的洗涤缓冲液或包含乙酸盐、125mM氯化钠的洗涤缓冲液;随后用包含乙酸盐、0mM氯化钠的第三洗涤缓冲液洗涤。在相关实施例中,用以下洗涤阳离子交换介质:包含乙酸盐、0mM氯化钠的第一洗涤缓冲液;随后包含乙酸盐、147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液,随后包含乙酸盐的洗涤缓冲液洗涤;随后包含乙酸盐、70mM氯化钠的第三洗涤缓冲液。

[0012] 在一个实施例中,用2.5mM/CV的包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。

[0013] 在一个实施例中,通过梯度将该多特异性蛋白从阳离子交换介质洗脱。在相关实施例中,该梯度是线性梯度或步长梯度(step gradient)。在相关实施例中,该梯度是盐梯度。在相关实施例中,用于形成洗脱梯度的缓冲液包含0-1M氯化钠。在另一个相关实施例中,至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含70-500mM氯化钠。在另一个相关实施例中,至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含125mM氯化钠。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

[0014] 在一个实施例中,将该阳离子交换介质加载至少10g/L的多特异性蛋白。在一个实施例中,将该阳离子交换介质加载10g/L至40g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中,将该阳离子交换介质加载15g/L至30g/L。在相关实施例中,将该阳离子交换介质加载25g/L-40g/L。在一个实施例中,将该阳离子交换介质加载10g/L的多特异性蛋白,用包含105mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤并以8mM/CV在盐梯度中洗脱。在一个实施例中,将该阳离子交换介质加载15g/L至30g/L的多特异性蛋白,用包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤。在一个实施例中,将该阳离子交换介质加载25g/L至40g/L的多特异性蛋白,其中至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

[0015] 在一个实施例中,至少一种产品相关的杂质是同二聚体、高分子量物质、半抗体、团聚体、低分子量物质、抗体片段、或轻链错配(mis-assembly)。在一个实施例中,纯化工艺包括这样的单元操作,该操作单元包括根据以上所述的方法进行的阳离子交换色谱。

[0016] 在一个实施例中,以上方法进一步包括,用于纯化多特异性蛋白的一个或多个单元操作(在阳离子交换色谱步骤之前和/或之后),该单元操作包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱柱、和/或混合模式色谱柱。

[0017] 在一个实施例中,该多特异性蛋白是双特异性蛋白。在一个实施例中,该多特异性蛋白是双特异性抗体。在一个实施例中,根据以上所述的方法产生纯化的多特异性蛋白。在一个实施例中,该阳离子交换色谱介质是树脂。

[0018] 本发明提供了从阳离子交换色谱的洗脱液中减少低pI产品相关的杂质的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白和至少一种具有低于多特异性蛋白的pI的产品相关的杂质的组合物加载到阳离子交换色谱介质上;用第一洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,用包含100-147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质;从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白;其中与从相应的在洗涤缓冲液配制品中不含氯化钠的方法中回收的阳离子交换色谱洗脱液相比,该阳离子交换色谱洗脱液具有减少的低pI产品相关的杂质。在一个实施例中,用第三洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。

[0019] 本发明提供了在高盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱以减少产品相关的杂质的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白和至少一种产品相关的杂质的组合物加载到平衡阳离子交换柱上;用至少两种洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质,其中一种洗涤缓冲液包含100-147mM氯化钠;并且从阳离子交换色谱树脂洗脱结合的多特异性蛋白。在一个实施例中,在加载组合物前,用不含氯化钠的缓冲液来平衡阳离子交换介质。

[0020] 本发明提供了用于产生分离的、纯化的重组多特异性蛋白的方法,该方法包括用表达多特异性蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养;培养宿主细胞以表达多特异性蛋白;从细胞培养收获重组多特异性蛋白;亲和纯化重组多特异性蛋白;将亲和纯化的重组多特异性蛋白加载到阳离子交换色谱树脂上;用至少一次包括100-147mM氯化钠的洗涤来洗涤阳离子交换树脂;从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白;并以流过模式将包含重组多特异性蛋白的阳离子交换色谱洗脱液加载到另外的色谱介质上。在一个实施例中,另外的色谱介质选自阳离子交换色谱介质、多模式色谱介质、疏水相互作用色谱介质和羟基磷灰石色谱介质。在一个实施例中,该亲和纯化的多特异性蛋白在洗脱液池中并且使其经受低pH病毒灭活,随后在加载到阳离子交换介质上之前进行中和。在一个实施例中,使来自第三色谱介质的流过物经受超滤和渗滤单元操作。在一个实施例中,根据以上所述的方法制成分离的、纯化的重组多特异性蛋白。在一个实施例中,用以上所述的方法产生包含分离的、纯化的重组多特异性蛋白的药物组合物。

附图说明

[0021] 图1示出了随主产品(双特异性#1)一起洗脱的产品相关的杂质(同二聚体,NCG)。

[0022] 图2示出了在高盐洗涤条件下,将所有在pI方面低于主产品的产品相关的杂质在第二和第三次洗涤步骤之间从柱洗出。洗脱前基线恢复为零。洗脱峰减少到一个峰。

[0023] 图3示出了柱上残留了多种杂质,并随主产品一起洗脱。这些杂质包括半抗体(级分1-4,其中约50%半抗体)、2X轻链错配(级分5和6)和高分子量(级分12-21)。

[0024] 图4示出了高盐洗涤导致洗脱曲线中峰的数量从四个峰减少到一个带有小肩峰的单峰,该峰仍含有2X LC2错配的物质(与预期比率为1相比LC1/LC2<0.11)。

[0025] 图5示出了在陡峭的洗脱梯度下高负载密度导致的单一洗脱峰。在高负载密度下,低pI产品相关的杂质不能从主产品分离,并且主要存在于级分1-3中,如降低的CE-SDS所示。

[0026] 图6示出了以较缓的梯度降低加载密度导致主要的低pI产品杂质分离成含有错配的LC1物质的明显峰。

[0027] 图7示出了高盐洗涤的结果。洗脱曲线中杂质峰的数量减少,大部分杂质在第二和第三次洗涤步骤期间被去除。第三洗涤步骤在洗脱开始之前将UV基线重新设置为零,从而收紧了洗脱曲线,导致主产品有效的多的收集和更好质量。

[0028] 图8示出了在高盐洗涤条件下,所有低pI产品相关的杂质(pI为6.8的同二聚体物质和任何具有低pI的聚集物质)在“洗涤池”中都流经柱进入废物或单独收集,以测试其内含物。洗脱前基线恢复为零。洗脱峰减少到一个峰。

具体实施方式

[0029] 因为文献中关于多特异性蛋白的下游处理的信息不是很多,因此经常应用为单克隆抗体开发的平台(Shulka和Norman,第26章Downstream Processing of Fc Fusion Proteins,Bispecific Antibodies,and Antibody-Drug Conjugates[Fc融合蛋白、双特异性抗体和抗体药物缀合物的下游处理],在第二版Process Scale Purification of Antibodies[抗体的生产规模纯化]中,Uwe Gottschalk编辑,第559-594页,John Wiley& Sons[约翰威立父子公司],2017)。将多特异性蛋白进行高度工程改造,在对于抗体典型的条件下,以结合和洗脱模式对此类蛋白进行阳离子交换色谱(CEX)可能不足以稳定多特异性蛋白和/或管理随主产品一起洗脱的产品相关的杂质。这些产品相关的杂质的等电点均低于和高于主要产品。发现那些pI低于主产品的产品相关杂质随主产品一起洗脱,如前峰。这样的洗脱曲线不支持强健、可持续、商业规模的制造工艺的发展。

[0030] 发现使用高盐洗涤策略产生主产品的更好产量和纯度,并改善制造工艺。在洗脱步骤之前添加高盐洗涤通过将较低pI产品相关的杂质除去,从而降低洗脱液池中此较低pI产品相关的杂质。添加含105-147mM范围内的氯化钠的洗涤步骤会导致产品相关的杂质的pI低于洗脱步骤前从阳离子交换介质中洗涤出或洗脱的主要产品,这减少了洗脱曲线中峰的数量。当存在前峰时,基于OD的洗脱液自动合并变得很困难。发现将高盐洗涤步骤合并到阳离子交换色谱方案减少了洗脱前与低pI产品相关的杂质相关的前峰,从而减少了在洗脱期间收集主产品工艺中使用的更为保守的策略的需求,这可能会导致产量更低和制造工艺不稳健。

[0031] 本发明提供了用于纯化多特异性蛋白的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白的样品加载到阳离子交换色谱介质上;用至少一种包含100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤该阳离子交换介质;并且从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白。

[0032] 本发明提供了从阳离子交换色谱的洗脱液中减少低pI产品相关的杂质的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白和至少一种具有低于多特异性蛋白的pI的产品相关的杂质的组合物加载到阳离子交换色谱介质上;用第一洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,用包含100-147mM氯化钠的第二洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质;从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白;其中与从相应的在洗涤缓冲液配制品中不含氯化钠的方法中回收的阳离子交换色谱洗脱液相比,该阳离子交换色谱洗脱液具有减少的低pI产品相关的杂质。

[0033] 本发明提供了在高盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱以减少产品相关的杂质的方法,该方法包括将包含多特异性蛋白和至少一种产品相关的杂质的组合物加载到平衡阳离子交换柱上;用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质,其中一种洗涤缓冲液包含100-147mM氯化钠;并且从阳离子交换色谱树脂洗脱结合的多特异性蛋白。

[0034] 本发明提供了用于产生分离的、纯化的重组多特异性蛋白的方法,该方法包括用表达多特异性蛋白的宿主细胞在生物反应器中建立细胞培养;培养宿主细胞以表达多特异性蛋白;从细胞培养收获重组多特异性蛋白;亲和纯化重组多特异性蛋白;将亲和纯化的重组多特异性蛋白加载到阳离子交换色谱树脂上;用至少一次包括100-147mM氯化钠的洗涤来洗涤阳离子交换树脂;从阳离子交换色谱树脂洗脱该多特异性蛋白;并以流过模式将包含重组多特异性蛋白的阳离子交换色谱洗脱液加载到第三色谱介质上。

[0035] 本发明提供了包括这样的单元操作的纯化工艺,该单元操作包括根据本文所述的

方法进行的阳离子交换色谱。

[0036] 本发明提供了根据本文披露的方法产生的纯化的多特异性蛋白。

[0037] 本发明提供了根据以上所述的任何方法产生的包含分离的、纯化的重组多特异性蛋白的药物组合物。

[0038] 在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含0-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含70-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100-105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含105-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含105-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含125-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含0、70、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、142、144、145、146、或147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含0mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含70mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含147mM氯化钠。

[0039] 在本发明的一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为 5.0 ± 0.05 至 5.0 ± 0.1 。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 4.9-5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 4.9、5.0、或5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH $5.0 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 4.9-5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 4.9、5.0、或5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 5.0。洗涤缓冲液可以高或低0.05至0.1个pH单位(电导率发生变化)以稳健去除产品相关的杂质。

[0040] 在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0041] 在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125mM氯化钠。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、147mM氯化钠。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0042] 在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-147mM氯化钠,pH $5.0 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70-147mM氯

化钠, pH 5.0±0.05%至pH 5.0±0.1%。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠, pH 5.0±0.05%至pH 5.0±0.1%。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠, pH 5.0±0.05%至pH 5.0±0.1%。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠, pH 5.0±0.05%至pH 5.0±0.1%。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠, pH 5.0±0.05%至pH 5.0±0.1%。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠, pH 5.00±0.05%至pH 5.0±0.1%。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠, pH 5.00±0.05%至pH 5.0±0.1%。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0043] 在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、147mM氯化钠,pH $5.00 \pm 0.05\%$ 至pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0044] 在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-147mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70-147mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠,pH4.9-5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0045] 在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、147mM氯化钠,pH 4.9-5.1。在相关实施例中,乙酸盐浓度为100mM。

[0046] 在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-147mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70-147mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-125mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-105mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-147mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105-125mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125-147mM氯化钠,pH 4.9、5.0或5.1。

5.1。在相关实施例中，乙酸盐浓度为100mM。

[0047] 在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠，pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、70mM氯化钠，pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100mM氯化钠，pH4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、105mM氯化钠，pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、125mM氯化钠，pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、147mM氯化钠，pH 4.9、5.0或5.1。在相关实施例中，乙酸盐浓度为100mM。

[0048] 在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 pH 5.0 ± 0.1 。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 pH 5.0 ± 0.1 。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、125mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 ± 0.1 。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、147mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、70mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、0mM氯化钠，pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至 pH 5.0 ± 0.1 。

[0049] 在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、0-147mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、70-147mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100-125mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100-105mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105-147mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105-125mM氯化钠，pH 5.0。在本发明的一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、125-147mM氯化钠，pH 5.0。洗涤缓冲液可以高或低0.05至0.1个pH单位(电导率发生变化)以稳健去除产品相关的杂质。

[0050] 在一个实施例中，用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。在一个实施例中，该洗涤缓冲液包含0-147mM氯化钠。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含0、70、100、105、125、或147mM氯化钠。在一个实施例中，该洗涤缓冲液包含乙酸盐。在一个实施例中，该洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是 $5.0 \pm 0.05\%$ 至 pH $5.0 \pm 0.1\%$ 。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是4.9-5.1。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是4.9、5.0、或5.1。在一个实施例中，用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质：至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-70mM氯化钠，并且至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM钠。在一个实施例中，用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质：一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠，随后包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液。在一个实施例中，用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质：一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠，随后包含乙酸盐、0-70mM氯化钠的洗涤缓冲液。在一个实施例中，用至少两种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质：第一洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM NaCl，并且第二洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠。在一个实施例中，第二洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自100、105、125和147mM氯化钠。在一个实施例中，用至少两

种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质：第一洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM NaCl，并且第二洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-70mM氯化钠。在一个实施例中，第一洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自100、105和147mM氯化钠。在一个实施例中，该第一缓冲液浓度的浓度是100mM乙酸盐、0mM氯化钠，并且第二洗涤缓冲液的浓度是100mM乙酸盐、125mM氯化钠。

[0051] 在一个实施例中，用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质。在一个实施例中，该洗涤缓冲液包含0-147mM氯化钠。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含0、70、100、105、125、或147mM氯化钠。在一个实施例中，该洗涤缓冲液包含乙酸盐。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是 $5.0 \pm 0.05\%$ 至 $5.0 \pm 0.1\%$ 。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是4.9-5.1。在一个实施例中，至少一种洗涤缓冲液的pH是4.9、5.0、或5.1。

[0052] 在一个实施例中，用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换介质：至少两种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-70mM氯化钠，并且至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM钠。在一个实施例中，用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质，一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠；随后包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液；随后包含乙酸盐、0-70mM氯化钠的洗涤缓冲液。在一个实施例中，该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM NaCl；第二洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠；并且第三洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-70mM氯化钠。在一个实施例中，第一洗涤缓冲液的氯化钠浓度为0mM氯化钠。在一个实施例中，第二洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自100、105和147mM氯化钠。在一个实施例中，第三洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自0和70mM氯化钠。在一个实施例中，该第一洗涤缓冲液浓度是100mM乙酸盐、0mM氯化钠；第二洗涤缓冲液选自100mM乙酸盐、100mM氯化钠和100mM乙酸盐、105mM氯化钠；并且第三洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、0mM氯化钠。在一个实施例中，该第一洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、0mM氯化钠；第二洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、147mM氯化钠并且第三洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、70mM氯化钠。

[0053] 在一个实施例中，用2.5mM/CV的包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤阳离子交换树脂。

[0054] 在一个实施例中，通过梯度将该多特异性蛋白从阳离子交换介质洗脱。在相关实施例中，该梯度是线性梯度或步长梯度。在相关实施例中，该梯度是盐梯度。在相关实施例中，至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含0-1M氯化钠。在相关实施例中，至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含70-500mM氯化钠。

[0055] 在一个实施例中，至少一种用于形成洗脱梯度的缓冲液包含125mM氯化钠。在相关实施例中，至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

[0056] 在一个实施例中，在加载组合物前，用不含氯化钠的缓冲液来平衡阳离子交换介质。

[0057] 在一个实施例中，将该阳离子交换介质加载10g/L的多特异性蛋白，用包含105mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤并以8mM/CV在盐梯度中洗脱。

[0058] 在一个实施例中，至少一种产品相关的杂质是同二聚体、高分子量物质、半抗体、团聚体、低分子量物质、抗体片段、或轻链错配。

[0059] 在一个实施例中，该亲和纯化的多特异性蛋白在洗脱液池中并且使其经受低pH病毒灭活，随后在加载到阳离子交换介质上之前进行中和。

[0060] 在一个实施例中,该阳离子交换色谱介质是树脂。

[0061] 在一个实施例中,该第三色谱介质选自阳离子交换色谱介质、多模式色谱介质、疏水相互作用色谱介质和羟基磷灰石色谱介质。在一个实施例中,使来自第三色谱介质的流过物经受超滤和渗滤单元操作。

[0062] 在一个实施例中提供了,用于纯化多特异性蛋白的一个或多个单元操作(在阳离子交换色谱步骤之前和/或之后),该单元操作包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱柱、和/或混合模式色谱柱。

[0063] 在一个实施例中,该多特异性蛋白是双特异性蛋白。在一个实施例中,该多特异性蛋白是双特异性抗体。

[0064] “多特异性”、“多特异性蛋白”和“多特异性抗体”在本文用于指重组工程化以同时结合和中和同一抗原上的至少两个不同抗原或至少两个不同表位的蛋白。例如,多特异性蛋白可以被工程化以靶向与针对肿瘤的靶向细胞毒性剂或感染剂组合的免疫效应子。已发现这些多特异性蛋白可通过将免疫效应细胞重定向至肿瘤细胞、通过阻断信号传导途径修饰细胞信号传导、靶向肿瘤血管生成、阻断细胞因子、以及作为药物的预靶向递送媒介物(如递送化学治疗剂、放射性标记(以改善检测灵敏度)和纳米颗粒(定向到特定的细胞/组织,如癌细胞))而用于多种应用,如在癌症免疫疗法中。

[0065] 最常见和最多样化的多特异性蛋白是结合两种抗原的蛋白,在本文中称为“双特异性”、“双特异性蛋白”和“双特异性抗体”。双特异性蛋白可分为两大类:免疫球蛋白G(IgG)样分子和非IgG样分子。IgG样分子保留Fc介导的效应子功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),Fc区有助于改善溶解性和稳定性并且促进一些纯化操作。非IgG样分子较小,可增强组织穿透力(参见Sedykh等人,Drug Design,Development and Therapy[药物设计、开发与疗法]18(12),195-208,2018;Fan等人,J Hematol&Oncology[血液与肿瘤学杂志]8:130-143,2015;Spiess等人,Mol Immunol[分子免疫学]67,95-106,2015;Williams等人,第41章Process Design for Bispecific Antibodies in Biopharmaceutical Processing Development[生物药剂加工开发中双特异性抗体的工艺设计],Design and Implementation of Manufacturing Processes[制造工艺的设计与实现],Jagschies等人编辑,2018,第837-855页。双特异性蛋白有时被用作具有对不同抗原或表位数目的结合特异性的另外组分的框架,增加了分子的结合特异性。

[0066] 包括双特异性抗体的双特异性蛋白的形式正在不断发展,并且包括但不限于四源杂交瘤(quadromas)、杵臼结构(knobs-in-holes)、交叉单克隆抗体(cross-Mab)、双可变结构域IgG(DVD-IgG)、IgG-单链Fv(scFv)、scFv-CH3 KIH、双功能Fab(DAF)、半-分子交换、 $\kappa\lambda$ -体、串联scFv、scFv-Fc、双抗体、单链双抗体(sc双抗体)、sc双抗体-CH3、三抗体、微型抗体、微型体、TriBi微型体、串联双抗体、sc双抗体-HAS、串联scFv-毒素、双亲和重定向分子(dual-affinity retargeting molecule(DART))、纳米抗体、纳米抗体-HSA、对接和锁定(DNL)、链交换工程化结构域SEED体(SEEDbody)、三功能抗体(Triomab)、亮氨酸拉链(LUZ-Y)、**XmAb[®]**;Fab-臂交换、DutaMab、DT-IgG、电荷对(charged pair)、Fcab、正交Fab、IgG(H)-scFv、scFv-(H) IgG、IgG(L)-scFv、IgG(L1H1)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zy体、DVI-Ig4(四位一体)、

Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、sc双抗体-Fc、双抗体-Fc、胞内抗体、ImmTAC、HSA体(HSABody)、IgG-IgG、Cov-X-体、scFv1-PEG-scFv₂、双特异性T细胞衔接子(**BITE**[®])和半衰期延长的双特异性T细胞衔接子(HLE **BITE**[®]) (Fan,同上;Spiess,同上;Sedykh,同上;Seimetz等人,Cancer Treat Rev[癌症治疗评论]36(6)458-67,2010;Shulka和Norman,第26章Downstream Processing of Fc Fusion Proteins,Bispecific Antibodies,and Antibody-Drug Conjugates[Fc融合蛋白、双特异性抗体和抗体药物缀合物的下游处理],在第二版Process Scale Purification of Antibodies[抗体的生产规模纯化]中,Uwe Gottschalk编辑,p559-594,John Wiley& Sons[约翰威立父子公司],2017;Moore等人,MAbs 3:6,546-557,2011)。

[0067] 在一些实施例中,双特异性蛋白可以包括博纳吐单抗、卡妥索单抗、厄妥索单抗、索利托单抗、targomiRs、鲁吉珠单抗(ABT981)、伐努赛珠单抗(RG7221)、壬托鲁单抗(ABT122)、ozoralixumab(ATN103)、floteuzmab(MGD006)、帕妥昔珠单抗(AMG112、MT112)、lymphomun(FBTA05)、(ATN-103)、AMG211(MT111、Medi-1565)、AMG330、AMG420(B1836909)、AMG-110(MT110)、MDX-447、TF2、rM28、HER2Bi-aATC、GD2Bi-aATC、MGD006、MGD007、MGD009、MGD010、MGD011(JNJ64052781)、IMCgp100、钢标记的IMP-205、xm734、LY3164530、OMP-305BB3、REGN1979、COV322、ABT112、ABT165、RG-6013(ACE910)、RG7597(MEDH7945A)、RG7802、RG7813(R06895882)、RG7386、BITS7201A(RG7990)、RG7716、BFKF8488A(RG7992)、MCLA-128、MM-111、MM141、MOR209/ES414、MSB0010841、ALX-0061、ALX0761、ALX0141;BII034020、AFM13、AFM11、SAR156597、FBTA05、PF06671008、GSK2434735、MEDI3902、MEDI0700、MEDI7352、以及其分子或变体或类似物,和上述任何一种的生物仿制药。

[0068] 双特异性蛋白还包括三特异性抗体、四价双特异性抗体、不含抗体组分多特异性蛋白(如双抗体、三抗体或四抗体、微型体)、和能够结合多个靶标的单链蛋白。Coloma,M.J.等人,Nature Biotech[自然生物技术].15(1997)159-163

[0069] 在一些实施例中,目的多特异性蛋白与以下特异性结合、中和、和/或相互作用:一种或多种CD蛋白、HER受体家族蛋白、细胞粘附分子、生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子、骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白、凝血和凝血相关蛋白、集落刺激因子(CSF)、其他血液和血清蛋白血型抗原;受体、受体相关蛋白、生长激素、生长激素受体、T细胞受体;神经营养因子、神经营养蛋白、松弛素(relaxin)、干扰素、白介素、病毒抗原、脂蛋白、整合素、类风湿因子、免疫毒素、表面膜蛋白、转运蛋白、归巢受体、地址素、调节蛋白和免疫粘附素。

[0070] 在一些实施例中,目的多特异性蛋白单独或以任何组合与以下一种或多种蛋白质结合、中和、和/或相互作用:CD蛋白(包括但不限于CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD70、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174)、HER受体家族蛋白(包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受体)、EGFRvIII、细胞粘附分子(例如LFA-1、Mol、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和 α_v/β_3 整合素)、生长因子(包括但不限于例如血管内皮生长因子("VEGF"));VEGFR2、生长激素、促甲状腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素、生长激素释放因子、甲状旁腺激素、米勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance)、人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α)、促红细胞生成素(EPO)、神经生长因子(如NGF- β)、血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(包括例如aFGF和bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Cripto、转

化生长因子(TGF)(尤其包括TGF- α 和TGF- β (包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5))、胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II(IGF-I和IGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)和骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白(包括但不限于胰岛素、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素原和胰岛素样生长因子结合蛋白);凝血蛋白和凝血相关蛋白,尤其如,VIII因子、组织因子、范威尔邦德(von Willebrand)因子、蛋白C、 α -1-抗胰蛋白酶、纤溶酶原激活剂(如尿激酶和组织纤溶酶原激活剂("t-PA"))、邦巴辛(bombazine)、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受体、集落刺激因子(CSF)(尤其包括以下物质:M-CSF、GM-CSF和G-CSF)、其他血液和血清蛋白(包括但不限于白蛋白、IgE和血型抗原)、受体和受体相关蛋白(包括例如f1k2/f1t3受体、肥胖(OB)受体、生长激素受体和T细胞受体);神经营养因子,包括但不限于骨源性神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-5或神经营养蛋白-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6);松弛素A链、松弛素B链和松弛素原、干扰素(包括例如干扰素 α 、干扰素 β 和干扰素 γ)、白介素(IL)(例如IL-1至IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受体、IL-4受体和/或IL-13受体、IL-13RA2或IL-17受体、IL-1RAP;病毒抗原,包括但不限于AIDS有包膜病毒抗原、脂蛋白、降钙素、胰高血糖素、心钠素、肺表面活性剂、肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β 、脑啡肽酶、BCMA、STEAP1、IgKappa、ROR-1、ERBB2、间皮素、RANTES(受激活调节的正常T细胞表达与分泌因子)、小鼠促性腺激素相关肽、DNA酶、FR- α 、抑制素和激活素、整合素、蛋白A或D、类风湿因子、免疫毒素、骨形态发生蛋白(BMP)、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰变加速因子(DAF)、AIDS包膜、转运蛋白、归巢受体、MIC(MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、地址素、调节蛋白、免疫粘附素、抗原结合蛋白、生长激素、CTGF、CTLA4、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)-1、MUC1、CEA、c-MET、密蛋白(Claudin)-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GM2、BAFF、OPGL(RANKL)、肌生成抑制素、Dickkopf-1(DKK-1)、Ang2、NGF、IGF-1受体、肝细胞生长因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、程序性细胞死亡蛋白1和配体、PD1和PDL1、甘露糖受体/hCG β 、TNF、TL1A、丙型肝炎病毒、间皮素dsFv[PE38缀合物、嗜肺军团菌(11y)、IFN γ 、 γ 干扰素诱导蛋白10(IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 9型(PCSK9)、干细胞因子、Flt-3、降钙素基因相关肽(CGRP)、OX40L、 α 4 β 7、血小板特异性(血小板糖蛋白Iib/IIb(PAC-1)、转化生长因子 β (TGF β)、透明带精子结合蛋白3(ZP-3)、TWEAK、血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)、硬化蛋白(sclerostin)、以及任何前述内容的生物活性片段或变体。

[0071] 在一些实施例中,目的多特异性蛋白可以包括这样的双特异性抗体,该双特异性抗体与包括CD3和CD19、EpCAM、CEA、PSA、CD33、BCMA、Her2、CD20、P-钙粘素、CD123、gpA33、或B7H3的组合特异性结合。在一些实施例中,目的双特异性抗体可以包括这样的双特异性抗体,该双特异性抗体与包括IL1 α +IL1 β 的组合特异性结合。

[0072] 多特异性蛋白可能具有科学意义或商业意义,特别是基于双特异性的治疗法。可以以多种方式产生多特异性蛋白,最常见的通过使用细胞培养方法重组动物细胞系的方式。多特异性蛋白可以在细胞内产生或分泌到可以从中回收和/或收集的培养基中,并且可以称为“重组多特异性蛋白”、“重组多特异性抗体”、“重组双特异性蛋白”和“重组双特异性抗体”。术语“分离的多特异性蛋白”、“分离的重组多特异性抗体”、“分离的双特异性蛋白”和“分离的双特异性抗体”是指已经从蛋白质、多肽、DNA和/或其他污染物或杂质(例如会干

扰其治疗、诊断、预防、研究或其他用途的产品相关的杂质,特别是低pI产品相关的杂质)中纯化出的多特异性蛋白,包括双特异性蛋白。目的多特异性蛋白包括通过结合两个或更多个靶、特别是下面列出的那些中的靶而发挥治疗作用的多特异性抗体,包括从其衍生的靶、与其相关的靶及其修饰。

[0073] “纯化”意味着通过从组合物中去除(部分或完全)至少一种产品相关的杂质来提高组合物中多特异性蛋白的纯度。通过下游单元操作(特别是那些涉及离子交换色谱的操作)来完成多特异性蛋白的回收和纯化,从而产生更“均质的”多特异性蛋白组合物,其满足产量和产品质量目标(例如减少产品相关的杂质和提高产品质量)。

[0074] “产品相关的杂质”是指产品相关的目的多特异性蛋白的变体。在一些情况下,洗脱峰中这些杂质的pI低于主产品。产品相关的杂质包括,例如,同二聚体、高分子量(HMW)物质、半抗体、团聚体、低分子量(LMW)物质、抗体片段和抗体片段的多种组合、以及轻链错配,例如2XLC、3XLC或4XLC。“半抗体”是指可能(例如)由于两个重链多肽之间的不完全组装或相互作用的破坏而形成的产品相关的杂质。半抗体包含单个轻链多肽和单个重链多肽。“同二聚体”是指可能(例如)当对同一靶标具有特异性的重链和轻链彼此重组而不是配对以形成所需的双特异性异二聚体时而形成的产品相关的杂质。这典型地在宿主细胞中表达期间发生。对于需要多条链(例如轻链,LC)通过改造的残基(例如带电荷的成对突变,杆臼结构等)以正确配对的多特异性构建体,在LC和HC之间错配时,仍然可能存在杂质,其中LC1不是与HC1配对,而是错误地与HC2(2xLC1)配对,反之亦然(2x LC2)。如果多特异性蛋白是二价的,具有两个与每个目标抗原结合的位点,则可能具有3X LC1、4X LC1和错配物种的其他组合。

[0075] 如本文所披露的,产品相关的杂质的pI可以低于所需的多特异性蛋白的pI,并随主产品洗脱。具有较低pI的产品相关的杂质在主产品之前洗脱出来。蛋白质的“等电点”或“pI”是指正电荷平衡蛋白质负电荷的pH。可以使用已知方法(例如根据蛋白质氨基酸残基的净电荷或通过等电聚焦)来计算/确定pI。在一个实施例中,产品相关的杂质的pI和主产品之间的差异是至少0.5个pI单位。在另一个实施例中,该差异是0.5至3个pI单位。在另一个实施例中,该差异是0.5至2个pI单位。在另一个实施例中,该差异是0.5至1个pI单位。在另一个实施例中,该差异是1至3个pI单位。在另一个实施例中,该差异是2至3个pI单位。在另一个实施例中,该差异是至少0.5、1、2、3或更多个pI单位。

[0076] 包含一种或多种编码如本文中所提供的目的多特异性蛋白的多核苷酸的呈质粒、表达载体、转录盒或表达盒形式的表达系统和构建体,以及包含这些表达系统或构建体的宿主细胞。如本文所用,“载体”意指适合用于将多特异性信息编码蛋白转移和/或转运至宿主细胞和/或特定位置和/或宿主细胞内的区室的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒衣壳、病毒体、裸DNA、复合DNA等)。载体可以包括病毒和非病毒载体、非附加型哺乳动物载体。载体通常被称为表达载体,例如,重组表达载体和克隆载体。可以将载体引入宿主细胞以允许载体自身的复制,并从而扩增其中包含的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分,这些序列组分通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择标志物。这些元件可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0077] 一种或多种“细胞”包括任何原核或真核细胞。细胞可以是离体细胞、体外细胞或

体内细胞,可以是单独的或作为高级结构(如组织或器官)的一部分。细胞包括“宿主细胞”,也称为“细胞系”,它们经基因工程化以表达具有商业或科学意义的多特异性蛋白。宿主细胞典型地源自来自原代培养物的谱系,其可在培养中维持无限时间。基因工程化宿主细胞涉及用重组多核苷酸分子转染、转化或转导细胞,和/或以其他方式改变(例如,通过同源重组和基因激活或重组细胞与非重组细胞的融合)以引起宿主细胞表达所需的重组多特异性蛋白。用于遗传工程化细胞和/或细胞系以表达目的多特异性蛋白的方法和载体是本领域技术人员熟知的。

[0078] 宿主细胞可以是任何原核细胞(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如酵母、昆虫或动物细胞(例如CHO细胞))。可经由常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。

[0079] 宿主细胞当在适当条件下培养时表达目的多特异性蛋白,该目的多特异性蛋白随后可以自培养基收集(若宿主细胞将其分泌至培养基中)或直接由产生它的宿主细胞收集(若其并非分泌的)。合适的宿主细胞的选择将取决于各种因素,例如所需的表达水平、活性所需或必需的蛋白质修饰(例如糖基化或磷酸化)以及易于折叠成生物活性分子。

[0080] “培养”或“进行培养”是指细胞在多细胞生物体或组织外部的生长和繁殖。对于哺乳动物细胞的合适培养条件是本领域已知的。细胞培养基和组织培养基可互换地用于指在体外细胞培养期间适合宿主细胞生长的培养基。典型地,细胞培养基含有缓冲液、盐、能量来源、氨基酸、维生素和痕量必需元素。可以使用能够支持适当宿主细胞在培养中生长的任何培养基。可以将细胞培养基进一步补充其他组分以最大化特定培养的宿主细胞中的细胞生长、细胞活力和/或重组蛋白生产,该细胞培养基是可商购的,并且包括RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、伊格尔最低必需培养基、F-12K培养基、哈姆F12培养基、伊思考夫改良的杜尔贝科培养基、麦考伊(McCoy's) 5A培养基、Leibovitz L-15培养基和无血清培养基如EX-CELL™300系列等,该培养基可以从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)或SAFC生物科学公司(SAFC Biosciences)和其他供应商处获得。细胞培养基可以是无血清、无蛋白质、无生长因子和/或无蛋白质胨的培养基。还可以通过添加营养来富集细胞培养物,并以高于其通常的、推荐的浓度使用。

[0081] 在培养过程中可以使用多种培养基配制品,例如,以促进从一个阶段(例如,生长阶段或生长期)过渡到另一阶段(例如,生产阶段或生产期)和/或优化细胞培养期间的条件(例如在灌注培养过程中提供的浓缩培养基)。生长培养基配制品可用于促进细胞生长并使蛋白质表达最小化。生产培养基配制品可用于促进目的蛋白质的生产和细胞的维持,同时使新细胞的生长减至最少。饲料培养基,典型地是包含在细胞培养物生产期过程中消耗的较高浓度组分(如营养素和氨基酸)的培养基,可用于补充和维持活性培养物,特别是分批加料、半灌注或灌注模式的培养物。这种浓缩的饲料培养基可以包含大多数细胞培养基组分,例如,其正常量的约5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、400倍、600倍、800倍或甚至约1000倍。

[0082] 生长期可以在比生产期更高的温度下进行。例如,生长期可以在从约35℃至约38℃的第一温度下进行,并且生产期可以在从约29℃至约37℃,任选地从约30℃至约36℃或从约30℃至约34℃的第二温度下进行。此外,可以在温度变化之前和/或之后的同时添加蛋白质产生的化学诱导剂,如像咖啡因、丁酸酯和六亚甲基双乙酰胺(HMBA)。如果在温度变化

后添加诱导剂,则可以在温度变化后1小时至5天,任选地在温度变化后1至2天添加诱导剂。

[0083] 宿主细胞可以悬浮或以附着在固体基质上的粘附形式培养。可以在带有或不带有微载体的流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶、摇瓶或搅拌罐生物反应器中建立细胞培养。

[0084] 细胞培养能以分批、分批加料、连续、半连续或灌注模式进行。哺乳动物细胞(如CHO细胞)可以在生物反应器中以小于100ml至小于1000ml的较小规模培养。可替代地,可以使用含有1000ml至20,000升以上培养基的较大规模生物反应器。大规模细胞培养,如用于蛋白治疗剂的临床和/或商业规模生物制造的细胞培养,可维持数周甚至数月,在此期间细胞产生所需的一种或多种蛋白。

[0085] 因为产品相关的杂质(例如同二聚体、半抗体等)可能类似于所需的多特异性蛋白,因此已开发了策略和技术(例如杵臼结构,CrossMab,DVD IgG等)来提高细胞培养对所需多特异性蛋白的选择。然而,仍然会产生一部分产品相关的杂质,这些杂质必须在下游处理期间被去除。

[0086] 然后可以从细胞培养基中收获所产生的表达的重组多特异性蛋白。从悬浮细胞中收获蛋白的方法是本领域已知的,并且包括但不限于酸沉淀、加速沉降(如絮凝)、使用重力分离、离心、声波分离、过滤(包括使用超滤器、微滤器、切向流过滤器、替代切向流过滤器、深度过滤器和冲积过滤器的膜过滤)。通过本领域已知的氧化还原折叠工艺,从细胞质中的包涵体中回收由原核生物表达的重组蛋白。

[0087] 然后,可以通过一个或多个下游单元操作从任何杂质,如剩余的细胞培养基、细胞提取物、不需要的组分、宿主细胞蛋白、表达不正确的蛋白、产品相关的杂质等中纯化或部分纯化收获的多特异性蛋白。

[0088] 从收获的细胞培养液中纯化多特异性蛋白可以从捕获色谱开始。捕获色谱利用与目的重组多特异性蛋白结合的介质(例如树脂、膜、凝胶等),例如亲和色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱(HIC)、固相金属亲和色谱(IMAC)等。此类材料是本领域已知的并且可以是可商购的。亲和色谱选择可以包括例如底物结合捕获机制、适体结合捕获机制或辅因子结合捕获机制。对于含有Fc组分的多特异性蛋白,可以使用抗体或抗体片段结合捕获机制,例如蛋白质A、蛋白质G、蛋白质A/G和蛋白质L。目的重组蛋白可以用聚组氨酸标签标记或者表位(如FLAG[®])标记并且随后使用针对这种表位的特异性抗体进行纯化。

[0089] 在下游处理的任何点都可以进行病毒灭活和/或病毒过滤,以从包含目的多特异性蛋白的组合物中去除病毒物质。一种用于实现病毒灭活的方法是在低pH或其他适合的溶液条件下孵育以实现病毒灭活。在低pH病毒灭活之后,可以进行中和操作,该操作将重新调节经过病毒灭活的溶液至更符合后续单元操作要求的pH值。典型地,在pH 5-7进行中和。病毒灭活或中和的病毒灭活池后也可以进行过滤,例如深层过滤,以除去任何产生的浑浊或沉淀。可以使用微滤器或纳滤器进行病毒过滤,诸如可以从旭化成株式会社(Plavona[®])和EDM Millipore(VPro[®])获得的那些。

[0090] 术语“精制”在本文用于指进行一个或多个色谱步骤以从包含接近最终所需纯度的重组多特异性蛋白的流体组合物中去除残留的污染物和杂质,如DNA、宿主细胞蛋白;产

物特异性杂质、变体产物和聚集体和病毒吸附。例如,可以通过使包括重组多特异性蛋白的流体流过一种或多种色谱柱或一种或多种膜吸收剂,使其选择性结合目标重组多特异性蛋白或存在于流体组合物中的污染物或杂质,以结合和洗脱模式进行精制。在此实例中,一种或多种色谱柱或膜吸收剂的洗脱液/滤液包括重组多特异性蛋白。

[0091] 模式精制色谱利用介质(例如树脂和/或膜),该介质含有以下模式使用的试剂:流过模式(其中多特异性蛋白流过树脂/膜并包含在流过洗脱液中,而污染物和杂质与色谱介质结合)、正面色谱或超载色谱模式(将含有目标蛋白质的溶液加载到柱上,直到其上的吸附位被占据,并且对固定相(目的蛋白质)具有最低亲和力的物质开始洗脱)、或结合并洗脱模式(其中目的蛋白质与色谱介质结合,并在污染物和杂质流过色谱介质或从色谱介质中洗涤出后被洗脱)。此类色谱操作的实例包括离子交换色谱(IEX)(包括阴离子交换色谱(AEX)和/或阳离子交换色谱(CEX));疏水相互作用色谱(HIC);混合模式或多模式色谱(MM)、羟基磷灰石色谱(HA);反相色谱、尺寸排阻色谱(SEC)和凝胶过滤。在一个实施例中,该色谱方法是阳离子交换色谱。在一个实施例中,该阳离子交换介质是树脂。

[0092] “阳离子交换色谱”是指在带负电荷且具有游离阳离子的固相介质上进行的色谱用于与通过或穿过固相的水溶液中的阳离子交换。电荷可能是通过将一个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,它带有总体的负电荷)。可商购的阳离子交换介质是可用的,并且其中包括但不限于固定在琼脂糖上的磺基丙基(SP)(例如SP-SEPHAROSE FAST FLOW™、SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™,来自通用电气医疗集团(GE Healthcare))、CAPTO S™、CAPTO SP ImpRes™、CAPTO S ImpAct™(通用电气医疗集团)、FRACTOGEL-S03™、FRACTOGEL-SE HICAP™、FRACTOPREP™(EMD Merck)、Fractogel® EMD S03-(M)、Fractogel® EMD SE Hicap(M)、Eshmuno® CPX、Eshmuno® S树脂、Fractogel® EMD C00-(M)、含Mustang S的Mustang S Acrodisc、含Mustang S的AcroPrep、含CM Ceramic HyperD® F的CM Ceramic HyperD® F AcroSep。

[0093] 对于本发明的方法,以结合和洗脱模式进行阳离子交换色谱。将来自先前下游步骤的洗脱液或储存池中的多特异性蛋白加载到阳离子交换介质上,使得目标多特异性蛋白与阳离子交换介质结合。通过将多特异性蛋白与阳离子交换介质“结合”是指在适当条件下(pH/电导率)将多特异性蛋白暴露于阳离子交换介质,使得多特异性蛋白凭借目的多特异性蛋白与阳离子交换介质的一个或多个带电基团之间的离子相互作用来可逆地固定在阳离子交换介质中或之上。洗脱液或池可能源自先前的单元操作,例如亲和色谱、中和的低pH病毒灭活、深层过滤或收获和/或精制色谱操作。可以将另外的缓冲液添加至洗脱液或池中,使得多特异性蛋白的最终负载处于所需浓度。

[0094] 然后使加载的阳离子交换色谱介质经受至少一次洗涤步骤。洗涤阳离子交换介质意指使适当的洗涤缓冲液通过或穿过阳离子交换介质。洗涤缓冲液的功能是从阳离子交换介质中去除一种或多种污染物,而基本上不洗脱目的多特异性蛋白。“缓冲液”意味着通过其酸-碱偶联组分的作用抵抗pH变化的溶液。在一个实施例中,该缓冲液是乙酸盐。在一个实施例中提供了100mM乙酸盐。在一个实施例中,该洗涤缓冲液的pH在 $5.0 \pm 0.05\%$ 至 $5.0 \pm 0.1\%$ 的范围内。在一个实施例中,该洗涤缓冲液的pH在4.9至5.1的范围内。在一个实施例

中,该洗涤缓冲液的pH是4.9、5.0、或5.1。在本发明的一个实施例中,至少一种洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH 5.0。洗涤缓冲液可以高或低0.05至0.1个pH单位(电导率发生变化)以稳健去除产品相关的杂质。

[0095] 至少一种洗涤缓冲液还包含盐。在一个实施例中,该盐是氯化钠。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是从0mM至147mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是从70mM至147mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是100mM至147mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是100mM至125mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是100mM至105mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是105mM至147mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是105mM至125mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是125mM至147mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是0mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是70mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是100mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是105mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是125mM。在一个实施例中,洗涤缓冲液中氯化钠的浓度是147mM。

[0096] 洗涤步骤在加载后并且洗脱目的多特异性蛋白之前洗涤了阳离子交换介质。本发明提供了至少一个包含高盐浓度洗涤缓冲液的洗涤步骤。找到高盐洗涤缓冲液以在洗脱主产品之前从阳离子交换介质洗涤或洗脱低pI产品相关的杂质。除高盐洗涤步骤外,可能还有一个或多个另外的洗涤步骤,这些步骤使用不含盐的缓冲液和/或与高盐洗涤缓冲液相比含有浓度较低的盐的缓冲液。优选地,在洗脱开始之前的最后洗涤步骤结束时,UV基线已经回到或非常接近于零。根据本发明的一个实施例,至少有两个洗涤步骤。在一个实施例中,有“第一洗涤缓冲液”和“第二洗涤缓冲液”。根据本发明的一个实施例,至少有三个洗涤步骤。在一个实施例中,有“第一洗涤缓冲液”、“第二洗涤缓冲液”和“第三洗涤缓冲液”。术语“第一次洗涤”、“第二次洗涤”和/或“第三次洗涤”不应解释为在一个或多个洗涤步骤之间排除使用一种或多种另外的洗涤或其他缓冲液。在洗脱目的多特异性蛋白之前,洗涤缓冲液用于洗涤或重新平衡阳离子交换材料。一种或多种洗涤缓冲液配制品可以与平衡和/或最终经调节的负载缓冲液配制品相同。

[0097] 在本发明的一个实施例中,该第一次洗涤包括:包含乙酸盐的洗涤缓冲液,pH 5.0 $\pm$ 0.5至pH 5.0 $\pm$ 0.1%。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为4.9至5.1。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为4.9、5.0、或5.1。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为5.0。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐,pH 5.0。在本发明的一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-147mM氯化钠。在本发明的一个实施例中,该第一次洗涤包括:包含100mM乙酸盐、0mM氯化钠的洗涤缓冲液,pH 5.0 $\pm$ 0.5至pH 5.0 $\pm$ 0.1%。

[0098] 在本发明的一个实施例中,该第二次洗涤包括:包含乙酸盐的洗涤缓冲液,pH 5.0 $\pm$ 0.5至pH 5.0 $\pm$ 0.1%。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为4.9to 5.1。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为4.9、5.0、或5.1。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐,pH 5.0。

[0099] 在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含0-147mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含70-147mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100-147mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100-125mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100-105mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含105-147mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含105-125mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含125-147mM氯化钠。在本发明的一个相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含125mM氯化钠。

[0100] 在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、0-147mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、70-147mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100-147mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100-125mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100-105mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105-147mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105-125mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、125-147mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、125mM氯化钠,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。

[0101] 在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、0mM氯化钠,pH 5.0。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、70mM氯化钠,pH 5.0。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、100mM氯化钠,pH 5.0。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、105mM氯化钠,pH 5.0。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、125mM氯化钠,pH 5.0。在相关实施例中,该第二洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、147mM氯化钠,pH 5.0。

[0102] 在本发明的一个实施例中,该第三次洗涤包括:包含乙酸盐的洗涤缓冲液,pH 5.0 ± 0.05 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含乙酸盐,pH为4.9至5.1。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐,pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含0-147mM氯化钠。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含0mM氯化钠。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、0mM氯化钠,pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至pH 5.0 ± 0.1 。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含70mM氯化钠。在本发明的一个实施例中,该第三洗涤缓冲液包含100mM乙酸盐、70mM氯化钠,pH $5.0 \pm 0.5\%$ 至pH 5.0 ± 0.1 。

[0103] 在一个实施例中,用至少三种洗涤缓冲液洗涤阳离子交换色谱介质,一种洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM氯化钠;随后包含乙酸盐、100-147mM氯化钠的洗涤缓冲液;随后包含乙酸盐、0-70mM氯化钠的洗涤缓冲液。在一个实施例中,该第一洗涤缓冲液包含乙酸盐、0mM NaCl;第二洗涤缓冲液包含乙酸盐、100-147mM氯化钠;并且第三洗涤缓冲液包含乙酸盐、0-

70mM氯化钠。在一个实施例中，第一洗涤缓冲液的氯化钠浓度为0mM氯化钠。在一个实施例中，第二洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自100、105和147mM氯化钠。在一个实施例中，第三洗涤缓冲液的氯化钠浓度选自0和70mM氯化钠。在一个实施例中，该第一洗涤缓冲液浓度是100mM乙酸盐、0mM氯化钠；第二洗涤缓冲液选自100mM乙酸盐、100mM氯化钠和100mM乙酸盐、105mM氯化钠；并且第三洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、0mM氯化钠。在一个实施例中，该第一洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、0mM氯化钠；第二洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、147mM氯化钠；并且第三洗涤缓冲液是100mM乙酸盐、70mM氯化钠。

[0104] 在本发明的一个实施例中，将该阳离子交换介质加载至少10g/L的多特异性蛋白。在本发明的一个实施例中，将该阳离子交换介质加载10g/L至40g/L的多特异性蛋白。在本发明的一个相关实施例中，将该阳离子交换介质加载15g/L至40g/L的多特异性蛋白。在本发明的一个相关实施例中，将该阳离子交换介质加载20g/L至40g/L的多特异性蛋白。在本发明的一个相关实施例中，将该阳离子交换介质加载25g/L至40g/L的多特异性蛋白。在本发明的一个相关实施例中，将该阳离子交换介质加载35g/L至40g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载15g/L至35g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载15g/L至25g/L的多特异性蛋白。在一个实施例中，将该阳离子交换介质加载15g/L至20g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载15g/L至35g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载20g/L至35g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载20g/L至30g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载20g/L至25g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载25g/L至35g/L的多特异性蛋白。在相关实施例中，将该阳离子交换介质加载25g/L至30g/L的多特异性蛋白。

[0105] 在一个实施例中，本发明提供了将该阳离子交换介质加载10g/L的多特异性蛋白，用至少一种包含105mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤并以8mM/CV在盐梯度中洗脱。

[0106] 在一个实施例中，本发明提供了将该阳离子交换介质加载15g/L至30g/L的多特异性蛋白，并用至少一种包含147mM氯化钠的洗涤缓冲液洗涤。

[0107] 在本发明一个实施例中，将该阳离子交换介质加载25g/L至40g/L的多特异性蛋白，其中至少一种洗涤缓冲液和一种洗脱缓冲液包含125mM氯化钠。

[0108] 然后从阳离子交换色谱介质的固相洗脱结合的多特异性蛋白。可以通过梯度洗脱多特异性蛋白。该梯度可以是线性梯度或步长梯度。该梯度可以是盐梯度。梯度可以是线性盐梯度或步长盐梯度(step salt gradient)。对于盐梯度，盐浓度(离子强度)在梯度期间随时间而变化。需要足够的盐浓度以破坏多特异性蛋白的结合并将其释放到洗脱液中。可以使用的盐的实例包括氯化钠、氯化钾和乙酸盐。

[0109] 可以使阳离子交换色谱洗脱液经受进一步的下流精制色谱纯化单元操作。在一个实施例中，以下阳离子交换色谱，以流过模式将目的多特异性蛋白施加到精制色谱介质中。

[0110] 在精制色谱操作之后，可以通过超滤和渗滤操作完成纯化的多特异性蛋白的浓缩和缓冲液交换成所需的配制品缓冲液用于原料药的大量储存。

[0111] 可以测量纯化的多特异性蛋白的关键属性和性能参数，以更好地指导有关制造期间每个步骤性能的决策。这些关键属性和参数可以实时监测、近实时监测和/或事后监测。在细胞培养期间可以测量主要的键参数，如消耗的培养基组分(如葡萄糖)、累积的代谢

副产物(如乳酸和氨)的水平、和与细胞维持和存活相关的参数,如溶解氧含量。可在制造工艺的适当储存期间进行监测关键属性,如比生产率、活细胞密度、pH、摩尔渗透压浓度、外观、颜色、聚集、产率百分比和滴度,。可以使用已知技术和可商购的设备进行监测和测量。

[0112] 这些药物组合物(溶液、悬浮液等)可包含以下一种或多种:缓冲剂,例如中性缓冲盐溶液、磷酸盐缓冲盐溶液等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂;无菌稀释剂,诸如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠,固定油,诸如可用作溶剂或悬浮介质的合成的单甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇,或其他溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖。胃肠外制剂可以被封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0113] 尽管在本申请中使用的术语是本领域中的标准术语,但是本文提供了某些术语的定义以确保权利要求的含义的清楚性和确定性。单位、前缀和符号可能会用它们的SI接受形式表示。本文列举的数字范围包括定义范围的数字,并且包括并支持所定义范围内的每个整数。除非另外指示,否则本文所述的方法及技术可根据本领域中熟知的常规方法且如贯穿本说明书所引用及论述的各种通用及更特定参考文献中所描述来进行。参见例如 Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约(2001)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Greene Publishing Associates[格林出版联合公司](1992);以及Harlow和Lane Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册]Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约(1990)。在本申请中所引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、论文、书籍、和专著,都通过引用清楚地并入本文。

[0114] 本发明在范围上不受本文所述的特定实施例的限制,这些特定实施例旨在作为本发明各个方面的单个说明,并且功能上等效的方法和组分也在本发明的范围内。在本发明的实施例中描述的内容可以与本发明的其他实施例组合。实际上,除了本文中显示和描述的那些之外,根据前述描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这类改变旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0115] 以下实例,包括进行的实验和实现的结果,仅提供解释说明目的,并且不应被解释为限制所附权利要求的范围。

[0116] 实例

[0117] 实例1单一无盐洗涤双特异性#1

[0118] 在表1中概括的条件下,将在乙酸盐缓冲液中含有完全人双特异性工程改造的免疫球蛋白(双特异性#1)的中和蛋白A池加载到Capto-SP ImpRes[®]阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部(GE Healthcare Bio-Science),马尔堡(Marlborough),马萨诸塞州(MA))。

[0119] 表1使用低盐洗涤进行阳离子交换色谱的条件

[0120]

	双特异性#1
柱尺寸和柱速	20 ± 2cm 180 cm/hr ± 10%
浓度 g/L	20
预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗涤 1	100 mM 乙酸盐 pH 5.0 CV 2.0
洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
洗脱梯度起点, %B	0
洗脱梯度终点, %B	100
洗脱梯度长度, CV	31.25
洗脱盐梯度, mM/CV	16.0
柱体积 CVs	17.5
产量	70%
回收洗脱液中的杂质	整个洗脱步骤通过级分收集。最好的级分产生 0.9% 的 HMW、0% 的 NCG

[0121] 图1在洗脱曲线中显示了三个峰,表明柱上残留了多种杂质,并随主产品一起洗脱。这些杂质包括同二聚体、NCG (非共有糖基化)、和高分子量物质 (HMW)。

[0122] 实例2高盐洗涤双特异性#1

[0123] 在表2所述的条件下,将在乙酸盐缓冲液中含有双特异性#1的中和病毒灭活池加载到Capto-SPImpRes[®]阳离子交换色谱树脂。

[0124] 表2使用高盐洗涤进行阳离子交换色谱的条件

[0125]		双特异性#1
	柱尺寸和柱速	20 ± 2cm 180 cm/hr 线性速度
	浓度	30 g/L
	预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
	平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤 1	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤 2	100 mM 乙酸盐 147 mM 氯化钠 pH 5.0 CV 2.5
	洗涤 3	100 mM 乙酸盐 70 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.00
	洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 350 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱梯度起点, %B	20
	洗脱梯度终点, %B	100
	洗脱梯度长度, CV	17.5
	洗脱盐梯度, mM/CV	16.0
	柱体积 CVs	17.5
	产量	70%
	回收洗脱液中的杂质	1.6% HMW 0.5% NCG

[0126] 发现当添加高盐洗涤时,先前在洗脱洗脱液中去除的较低pI杂质现在在洗脱之前从洗涤的树脂中去除。图2示出了添加高盐洗涤导致洗脱曲线中杂质峰的数量从三个峰减少到一个峰。在第二和第三洗涤步骤之间去除了大部分杂质, ≥68%的NCG以及≥80%的同二聚体。在第二次洗涤期间,主要从树脂中去除同二聚体和NCG,或者其最低程度的与树脂结合。第三洗涤步骤在洗脱开始之前将UV基线重新设置为零,从而收紧了洗脱曲线,导致主产品有效的多的收集和更好质量。添加高盐洗步骤优化了纯化,使其更加强健并具有制造工艺友好性,从而降低了产品质量的超规格结果,并保持了可接受的产量。

[0127] 这些条件在双特异性#1的负载浓度为15-30g/L时是有效的。

[0128] 另外,测试了高于和低于洗涤缓冲液pH 5.0的0.05个pH单位 (pH 4.95-5.05), 并发现对去除低pI产品相关的杂质是有效的,与以上结果一致。

[0129] 发现使用2.5柱体积的第二洗涤缓冲液足以从阳离子交换介质中洗涤/洗脱出产品相关的杂质。较小的柱体积不能有效地去除产品相关的杂质,而使用大于2.5柱体积开始洗脱主产品。

[0130] 实例3单一无盐洗涤双特异性#2

[0131] 在表3中概括的条件下,将含有工程改造的完全人抗异源IgG双特异性抗体(双特

异性#2)的中和蛋白A洗脱液池(100mM醋酸盐,pH 5.0)加载到Capto-SP ImpREs® 阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部,马尔堡,马萨诸塞州)。

[0132] 表3在低盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱的条件

[0133]		双特异性#2
	柱尺寸和柱速	4.66 mL, 140%线性速度 (cm/hr)
	浓度	
	加载量 (g/L)	25
	预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
	平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱梯度起	0
[0134]	点, %B	
	洗脱梯度终	
	点, %B	100
	洗脱梯度长度,	
	CV	31
	洗脱盐梯度,	
	mM/CV	16
	池柱体积	2.5
[0135]	产量(从合并的级分 7 至 11)	65%
	回收洗脱液中的杂质(从合并的级分 7 至 11)	SE-HPLC HMW (%) = 1.5% SE-HPLC LMW (%) = 0.9% 半抗体 = 0% 降低的 CE/SDS LC1/LC2 比率 = 1.40

[0135] 图3示出了柱上残留了多种杂质,并随主产品一起洗脱。这些杂质包括半抗体(级分1、2、3、4,其中约50%半抗体)、2X轻链错配(级分5和6,其中LC1与LC2比率<0.4,这表明LC2与HC1组装错误)、和高分子量(HMW级分12至21)。尽管色谱分离的分辨率对于包含杂质的明显前峰是可以接受的,但制造工艺使用了基于OD的自动合并;为此,有必要通过从超过

前峰的最高OD开始收集洗脱液,从而降低了产量,并使得该工艺不足以用于制造操作。

[0136] 实例4高盐洗涤双特异性#2

[0137] 在表4中概括的条件下,将含有双特异性#2的中和蛋白A洗脱液池(100mM醋酸盐, pH 5.0)加载到Capto-SP ImpREs®阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部, 马尔堡,马萨诸塞州)。

[0138] 表4在高盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱的条件

[0139]		双特异性#2
	柱尺寸和柱速	4.66 mL, 140%线性速度 (cm/hr)

[0140]

浓度	
加载量 (g/L)	20
预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗涤 1	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗涤 2	100 mM 乙酸盐 100 mM 氯化钠 pH 5.0
洗涤 3	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
洗脱梯度起 点, %B	0
洗脱梯度终 点, %B	100
洗脱梯度长度, CV	31
洗脱盐梯度, mM/CV	16.0
池柱体积	3
产量 (从合并的级 分 5-10)	73%
回收洗脱液中的 杂质 (对应于级分 5-10)	SE-HPLC HMW (%) = 1.4 SE-HPLC LMW (%) = 0.6 半抗体 = 0.4% 降低的 CD/SDS LC1/LC2 比率 = 0.8

[0141] 发现添加高盐洗涤步骤时 (含有100mM氯化钠的洗涤2), 在洗脱之前从CEX树脂中去除了半抗体杂质 (在收集的洗涤2和3中检测到100%半抗体)。图4示出了高盐洗涤导致洗脱曲线中峰的数量从四个峰减少到一个带有小肩峰的单峰, 该峰仍然含有2X LC2错配的物质 (当LC1和LC2分别正确组装到HC1和HC2时, 与预期比率为1相比LC1/LC2<0.11)。第三洗涤步骤在洗脱开始之前也将UV基线重新设置为零, 从而收紧了洗脱曲线, 导致主产品有效的多的收集和更好质量。这种优化的用较高盐洗涤的程序, 适用于生产车间。CEX纯化产量从

65%增加至73%，具有足够的洗脱曲线用于收集具有低水平的半抗体、错配的LC2物质(通过LC1与LC2的比率接近1来证明)、HMW和LMW以及基于吸光度的合并标准的纯化池。

[0142] 实例5单一无盐洗涤双特异性#3

[0143] 在表5中概括的条件下,将含有完全人工程改造的IgG/Fab融合蛋白(双特异性#3)的中和蛋白A洗脱液池加载到Capto-SP ImpREs®阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部,马尔堡,马萨诸塞州)。

[0144] 表5无盐负载条件下高负载密度阳离子交换色谱的条件

[0145]		双特异性#3
	柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h 线性速度
	浓度	
	加载量 (mg/ml)	25
	预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
	平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱梯度起点, %B	0
	洗脱梯度终点, %B	100
	洗脱梯度长度, CV	31
	洗脱盐梯度, mM/CV	16
[0146]	池柱体积	1.5
	产量	44%
	回收洗脱液中的杂质 (对应于级分 3、5 和 6)	降低的 CR/SDS LC1/LC2 比率= 0.9 SE-HPLC HMW (%) = 1.7 SE-HPLC LMW (%) = 0.9 SE-HPLC 单体 = 97.4%

[0147] 图5示出了在陡峭的洗脱梯度下高负载密度导致的单一洗脱峰。在高负载密度下,低pI产品相关的杂质不能从主产品分离,并且主要存在于级分1、2和3中,如CE-SDS LC1与LC2的比率从4降低至7(错配的LC物质)和LMW物质从2降低至4%所示。

[0148] 实例6较低负载密度,单一无盐洗涤,双特异性#3

[0149] 在表6中概括的条件下,将含有完全人工程改造的IgG/Fab融合蛋白(双特异性#3)的中和蛋白A洗脱液池加载到Capto-SP ImpREs®阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部,马尔堡,马萨诸塞州)。

[0150] 表6无盐负载条件下较低负载密度阳离子交换色谱的条件

[0151]		双特异性#3
	柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h 线性速度
	浓度 加载量 (mg/mL)	10
	预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
	平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱梯度起点, %B	0
[0152]	洗脱梯度终点, %B	100
	洗脱梯度长度, CV	62
	洗脱盐梯度, mM/CV	8
	池柱体积	3.0
	产量	73%
	回收洗脱液中的杂质 (对应于级分 5、6、7、8、9 和 10)	降低的 CE-SDS LC1/LC2 比率 = 1.2 SE-HLPC HMW (%) = 1.4 SE-HPLC LMW (%) = 0.1 SE-HPLC 单体 = 98.4%

[0153] 由于实例5的高负载密度、陡峭的洗脱梯度条件不能提供足够的来自低pI产品相关的杂质的主产品的分辨率,因此降低了负载密度和梯度条件。图6示出了较低的负载密度(10相比于25g/L)和较缓的梯度(8相比于16mM/CV)使主要的低pI产品杂质分离成由级分1-4形成的明显峰。此级分显示LC1与LC2的比率为3至10,这表明LC1物质错配。相反,主峰显出累积的LC1与LC2比率为1.2。尽管分辨率更好,并且将产量从44%增加到73%,因为它仍然需要基于OD的自动合并,因此仍然有必要通过超过前峰的最高OD开始收集洗脱液,从而降低了产量,使得该工艺不足以用于制造操作。

[0154] 实例7高盐洗涤,双特异性#3

[0155] 在表7中概括的条件下,将含有双特异性#3的中和病毒灭活池加载到Capto-SP ImpRes[®]阳离子交换色谱树脂(通用电气医疗集团生物科学部,马尔堡,马萨诸塞州)。

[0156] 表7在高盐加载下进行阳离子交换色谱的条件。

[0157]		双特异性#3
	柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h 线性速度
	浓度 g/L	10
	预平衡	500 mM 乙酸盐 1.75 M 氯化钠 pH 4.9
	平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
[0158]	洗涤 1	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗涤 2	100 mM 乙酸盐 105 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗涤 3	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
	洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
	洗脱梯度起 点, %B	0
	洗脱梯度终 点, %B	100
	洗脱梯度长度, CV	62
	洗脱盐梯度, mM/CV	8.1
	池柱体积	3.0
	产量	66
	回收洗脱液中的 杂质(对应于级 分 7、8、9、10、 11 和 12)	降低的 CE-SDS LC1 与 LC2 比率 = 1.1 SE-HPLC HMW = 1.4% SE HPLC LMW = 0.0 SE-HPLC 单体 = 98.6%

[0159] 发现当添加高盐洗涤步骤时(洗涤2),在洗脱之前从CEX树脂中去除了杂质。鉴于

收集的洗涤2和洗涤3上的LC1与LC2的比率为8.0 (与LC1和LC2正确组装和配对时的预期比例为1相比), 这些杂质可能对应于错配的LC1物质。图7示出了高盐洗涤导致洗脱曲线中杂质峰的数量从两个峰减少到一个带有小肩峰的单峰, 该峰仍含有错配的物质 (LC1/LC2=2至4)。在第二和第三洗涤步骤期间去除了大部分杂质。第三洗涤步骤在洗脱开始之前也将UV基线重新设置为零, 从而收紧了洗脱曲线, 导致主产品有效的多的收集和更好质量。这种优化用较高盐洗涤的程序, 结合较低的负载水平和较缓的梯度, 适用于生产车间。CEX纯化产量从44%增加至66%, 具有足够的洗脱曲线用于收集具有低水平的错配的LC1物质 (通过LC1与LC2的比率接近1来证明)、HMW和LMW以及基于吸光度的合并标准的纯化池。

[0160] 实例8高盐洗涤双特异性#4

[0161] 在表7所述的条件下, 将含有完全人工程改造的免疫球蛋白双特异性抗体 (双特异性#4) 的中和的低pH值病毒灭活蛋白A洗脱液池加载到Capto-SP ImpREs® 阳离子交换色谱树脂上。

[0162] 表7在高盐洗涤条件下进行阳离子交换色谱的条件

[0163]

	双特异性#4
柱速	20 cm, 180 cm/h 线性速度
浓度 g/L	35
预平衡	200 mM 乙酸盐 1.0 M 氯化钠 pH 5.0
平衡	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗涤 1	100 mM 乙酸盐 pH 5.0
洗涤 2	100 mM 乙酸盐 125 mM 氯化钠 pH 5.0
洗脱缓冲液 A	100 mM 乙酸盐 125 mM 氯化钠 pH 5.0
洗脱缓冲液 B	100 mM 乙酸盐 500 mM 氯化钠 pH 5.0
洗脱梯度起 点, %B	0
洗脱梯度终 点, %B	100
洗脱梯度长度, CV	10
洗脱盐梯度, mM/CV	37.5
平均池柱体积 (CV)	2.5 2-3 (第二轮运行)

[0164]	产量	66% 77.7% (第二轮运行)
	回收洗脱液中的杂质	SE-HPLC HMW = 1.3% (第二轮运行 1.2) SE HPLC LMW = 0.6 (第二轮运行 0.5) %主峰 = 98.1% (第二轮运行 98.3) %后峰 = 0.0 (两轮运行) % 前峰 = 0.0 (两轮运行)

[0165] 发现当添加高盐浓度下的洗涤步骤(洗涤2)时,在洗脱之前,从阳离子交换介质中去除低pI产品相关的杂质(同二聚体和聚集物质)。图8示出了高盐洗涤导致洗脱曲线中杂质峰的数量从三个峰减少到一个峰。不含氯化钠的第一次洗涤使电导率达到基线。在随后的高盐洗涤步骤期间,去除低pI产品相关的杂质,并在洗脱前将电导率基线恢复为零。用具有与高盐洗涤缓冲液相同的高盐配制品的洗脱缓冲液A保持电导率。由于分离是基于pI的,因此允许在洗脱开始之前保持稳定的电导率并收紧洗脱曲线,从而导致对主产品更强健并更有效的收集以及更好的主产品质量。

[0166] 另外,测试了高于和低于洗涤缓冲液pH 5.0的0.1个pH单位(pH 4.9-5.1),并发现对去除低pI产品相关的杂质同样有效。

[0167] 另外,测试了双特异性#4的25至40g/L-r的负载浓度,并发现其杂质清除率与上述35g/L-r条件相似。

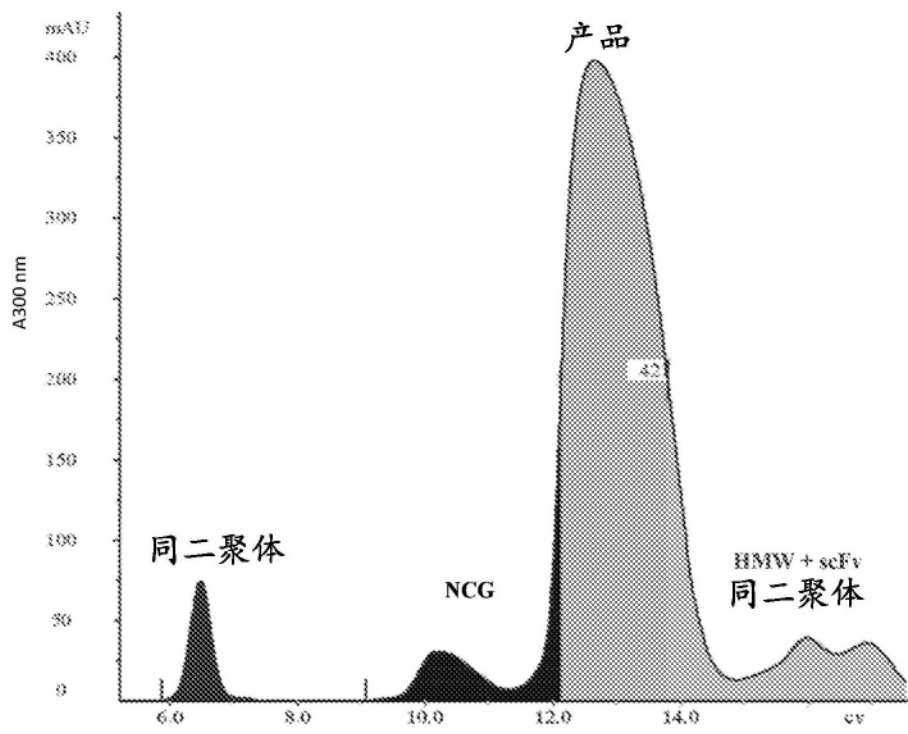


图1

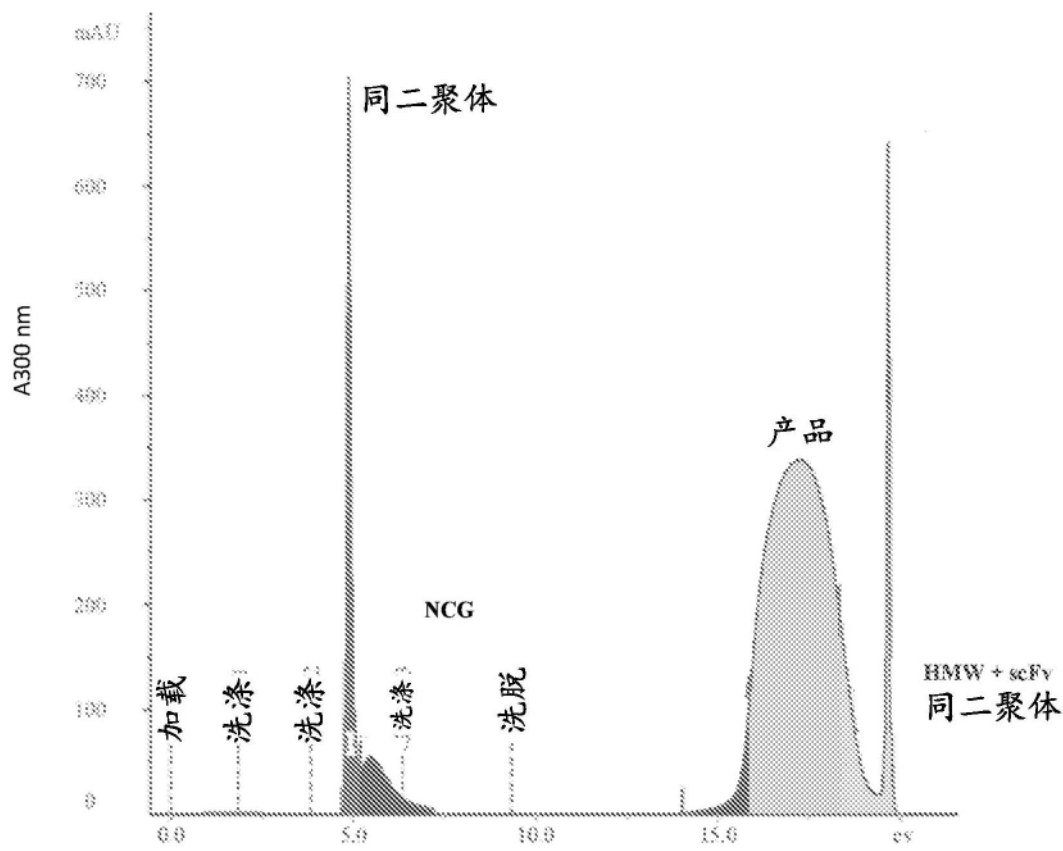


图2

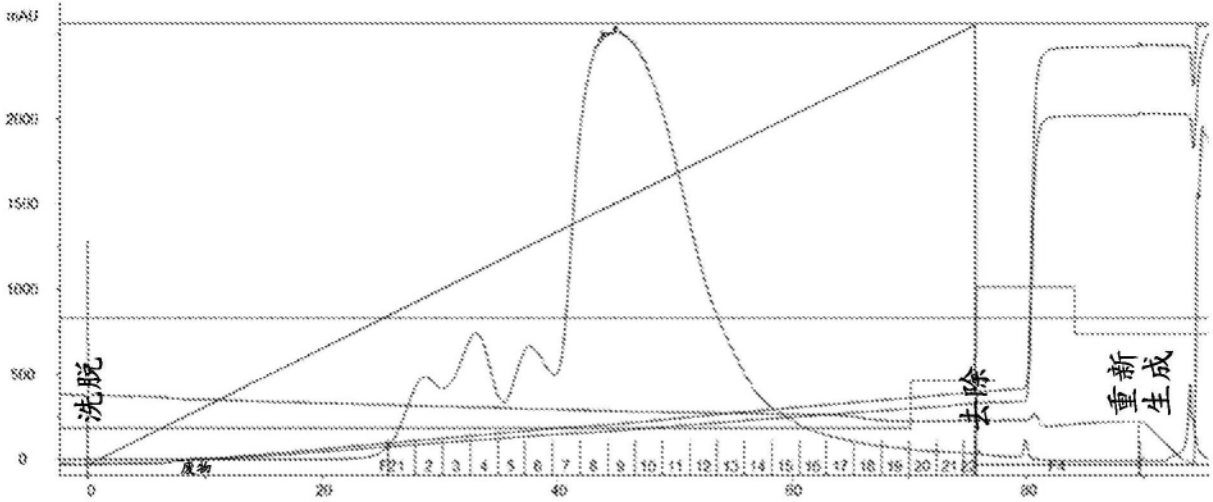


图3

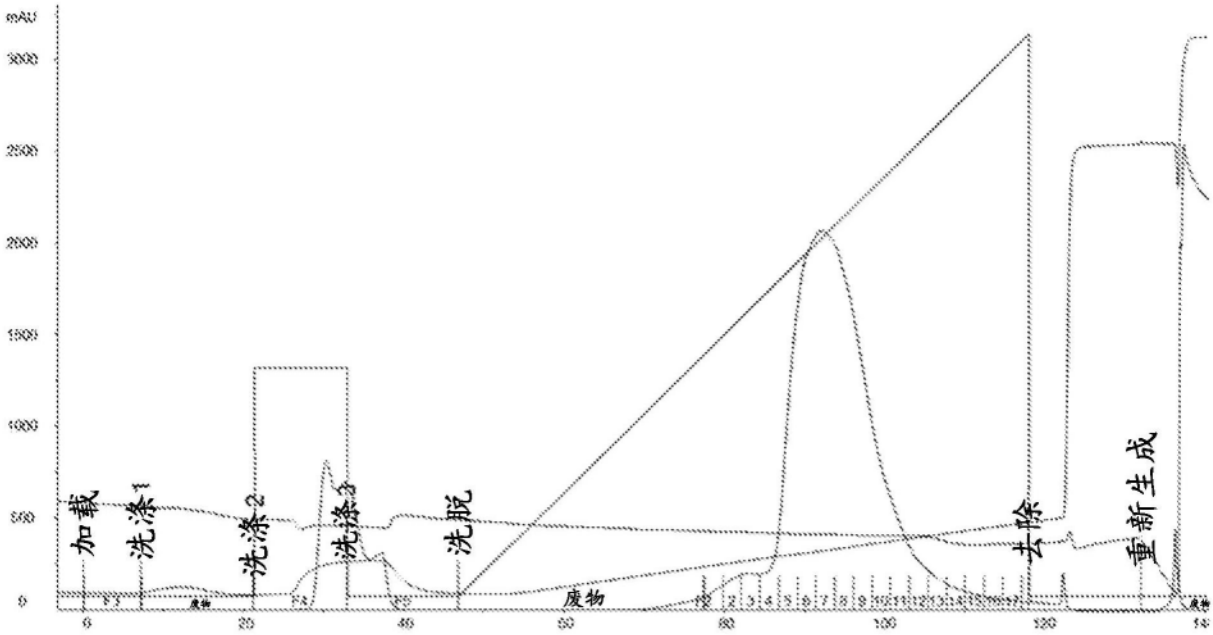


图4

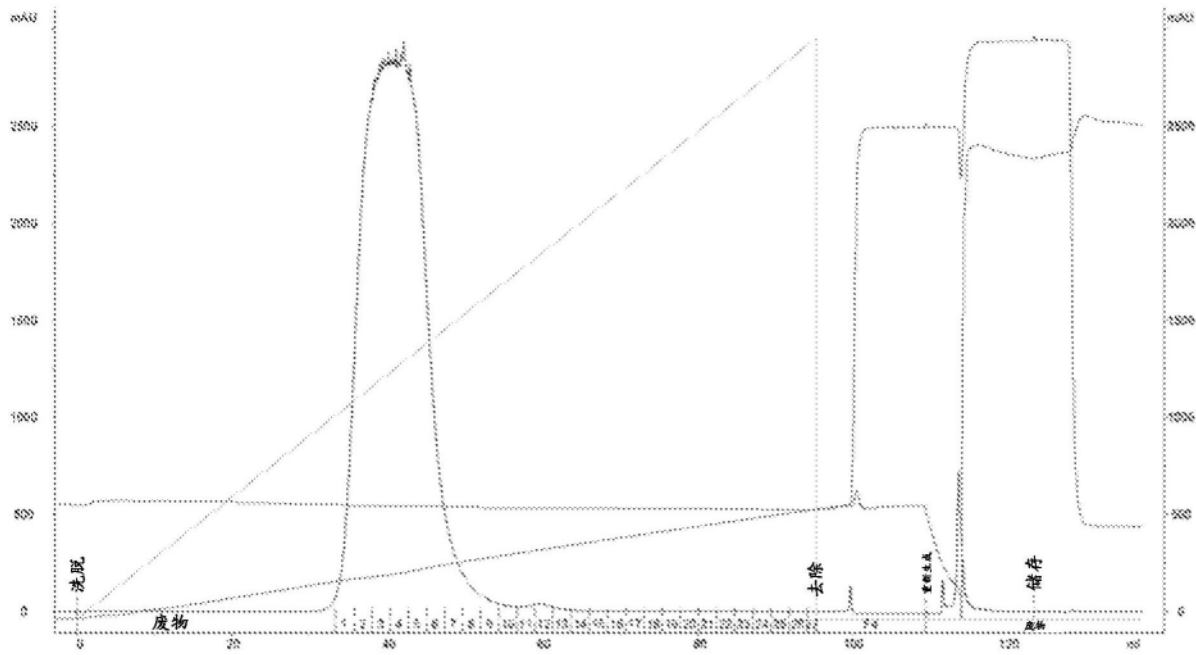


图5

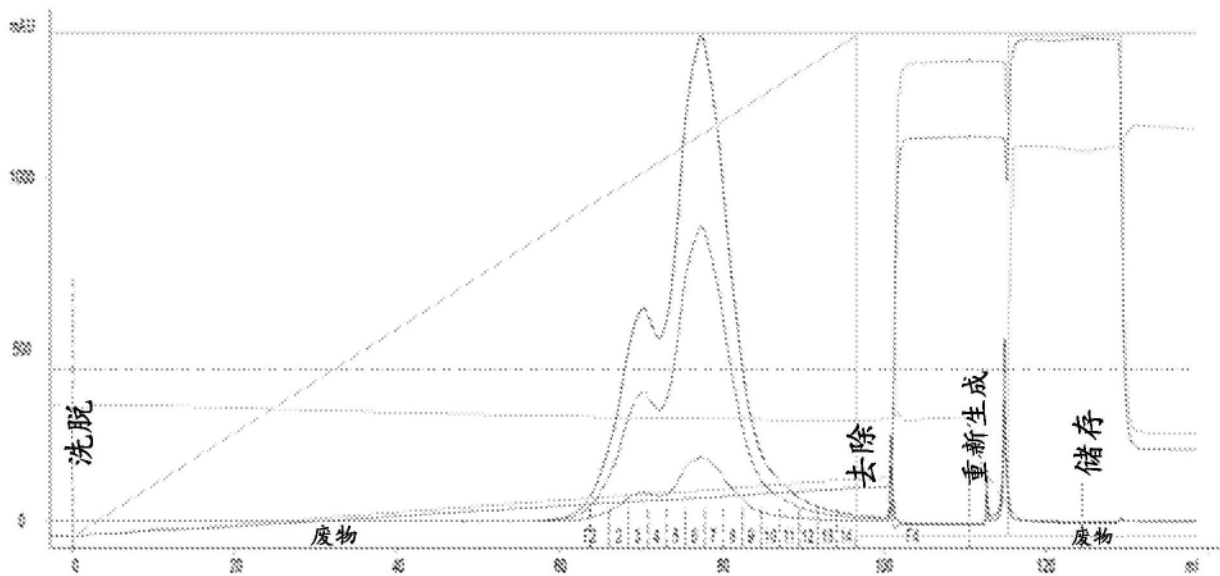


图6

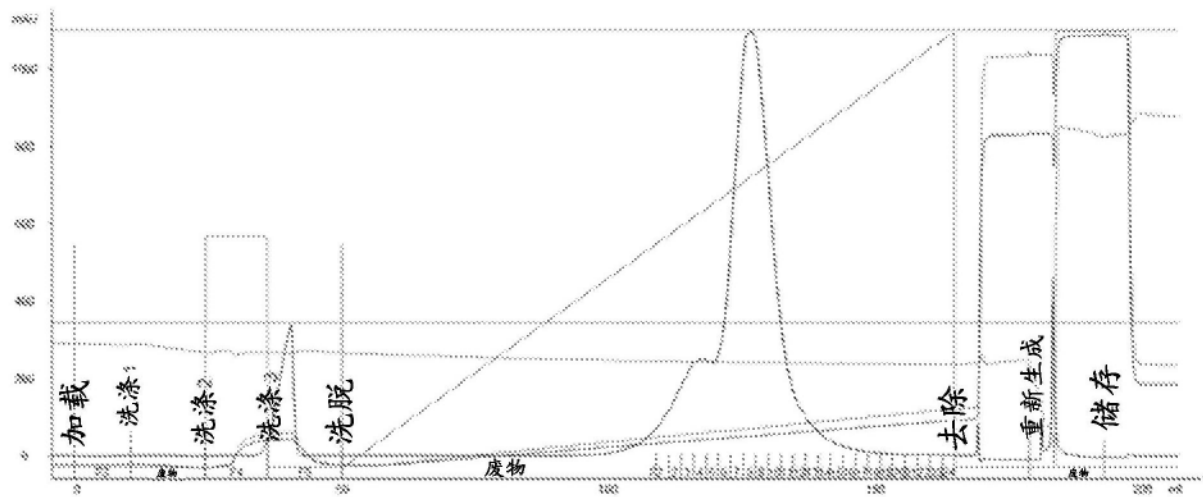


图7

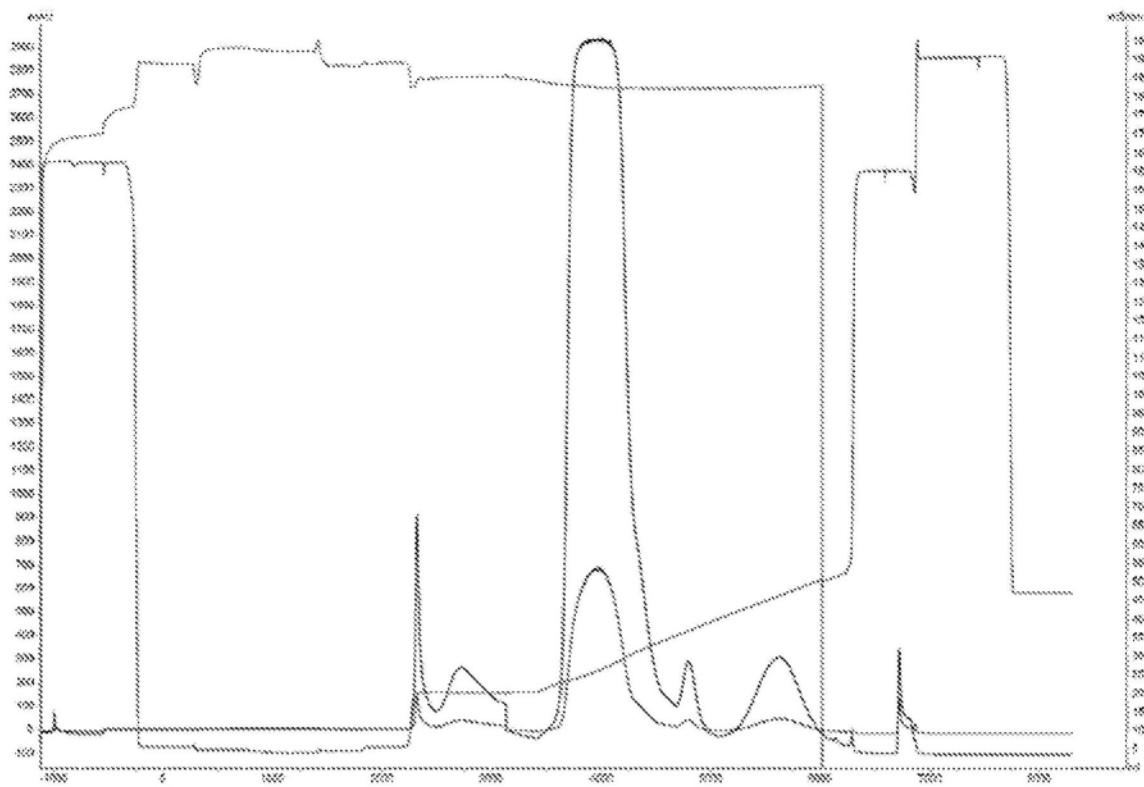


图8