(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689675 A
(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780055118.6

(22)申请日 2017.09.06

(30)优先权数据
62/384,240 2016.09.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2017/055374 2017.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/047080 EN 2018.03.15

(71)申请人 葛兰素史密斯克莱知识产权发展有限公司
地址 英国米德尔塞克斯

(72)发明人 A.C.杜梅茨 K.E.戈克伦 N.E.利维 J.R.莫莱克 A.S.汤姆森 K.G.杨西

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 曹立莉

(51)Int.Cl.
C07K 1/22(2006.01)

权利要求书2页 说明书21页 附图9页

(54)发明名称

纯化抗体的方法

(57)摘要

本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含辛酸盐和精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

CN 109689675 A

1.从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含大于约50mM辛酸盐和大于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液清洗所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述辛酸盐为辛酸钠。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述洗涤缓冲液包含约75mM至约300mM辛酸盐。

4.根据权利要求1至3任一项的方法,其中所述洗涤缓冲液包含约0.75M至约1.5M精氨酸。

5.根据权利要求1至4任一项的方法,其中所述洗涤缓冲液还包含约0.5M至约1M赖氨酸。

6.根据前述权利要求任一项的方法,其中洗脱的所述重组多肽包含少于约2%片段化的重组多肽。

7.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述HCP衍生自哺乳动物细胞。

8.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述HCP为磷脂酶B-样2蛋白质。

9.根据权利要求1至7任一项的方法,其中所述HCP为组织蛋白酶L。

10.根据权利要求9的方法,其中所述重组多肽从组织蛋白酶L中的纯化通过在步骤(c)的洗脱液中减少的组织蛋白酶L活性测量。

11.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述洗涤缓冲液的pH为pH 7至pH 9;或pH 7.5至pH 8.5。

12.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述重组多肽为单克隆抗体(mAb)。

13.根据权利要求12的方法,其中所述mAb为IgG1或IgG4。

14.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述洗涤缓冲液不包含氯化钠。

15.根据前述权利要求任一项的方法,其中所述超抗原选自蛋白A、蛋白G和蛋白L。

16.根据前述权利要求任一项的方法,其中步骤(c)之后HCP的量少于约200ng HCP/mg产物。

17.从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含多于约50mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;(b2)用包含多于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

18.从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含多于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;(b2)用包含多于约50mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

19.从磷脂酶B-样2蛋白质纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含约100mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

20.从组织蛋白酶L纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含约150mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲

液洗涤所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

21.从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含所述重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含浓度大于约250mM的辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤所述超抗原色谱固体载体;和(c)从所述超抗原色谱固体载体洗脱所述重组多肽。

纯化抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用固定在固体载体上的超抗原如蛋白A、蛋白G或蛋白L进行蛋白质纯化的领域。特别地，本发明涉及洗涤缓冲液组分和使用洗涤缓冲液在洗涤步骤中除去宿主细胞杂质、使所需蛋白质产物的损失最小化的方法。

背景技术

[0002] 宿主细胞蛋白(HCP)杂质-被FDA归类为“与过程相关的”杂质-必须在生物制药下游加工中去除到足够低的水平。在典型的下游加工过程中，一些单克隆抗体(mAb)产物对HCP的充分清除会特别具有挑战性。大多数mAb下游过程采用“平台”方法；典型的mAb下游平台由蛋白A亲和色谱捕获，然后是一至三个非亲和性精制(polishing)步骤组成。蛋白A亲和捕获步骤是平台的主力，并提供大部分HCP清除。随后的精制步骤通常是离子交换、疏水相互作用或多元层析。

[0003] 对于许多mAb产品，在第一次精制色谱步骤后HCP浓度足够低。然而，有许多mAb，其中专门实施第二精制色谱步骤以除去另外的HCP；这可需要大量的过程开发工作，并导致更大的过程复杂性。先前的研究已经确定了与mAb产物分子具有吸引力相互作用的HCP杂质亚群(Levy等人，(2014)Biotechnol.Bioeng.111(5):904-912；Aboulaich等人，(2014)Biotechnol.Prog.30(5):1114-1124)。逃避了蛋白A步骤清除的大多数HCP是由于产物结合而不是共洗脱或吸附到蛋白A配体或基质上。难以去除的HCP群体相对较小-与细胞培养物中存在的不同HCP群体相比-并且对于不同的mAb产品而言是类似的。

[0004] 尽管对于所有mAb产品而言难以除去的HCP杂质群体大致相同，但不同程度的HCP-mAb相互作用可显著影响蛋白A步骤中的总HCP清除率；mAb产物氨基酸序列的微小变化可影响蛋白A和精制步骤中的HCP-mAb相互作用。加载到蛋白A柱上的HCP群体对HCP-mAb结合的可能性具有明显影响，其可受细胞年龄、收获方法和条件的影响，并且在不同宿主细胞系之间观察到小的差异。除了产物结合之外，对于大多数蛋白A树脂，存在低水平的与基础基质结合并与产物共洗脱的HCP杂质。受控孔隙玻璃树脂具有更高水平的与基础基质结合的HCP。

[0005] 一种特定的洗涤添加剂，辛酸钠，以前已被确定为是破坏HCP-mAb缔合并导致蛋白A洗脱液中的低HCP浓度的最成功物质之一。辛酸钠(也称为辛酯钠)是一种八碳饱和脂肪酸，发现其在临界胶束浓度约为360mM时在小鼠中无毒。以前的研究使用50mM辛酸钠(Aboulaich等人，(2014)Biotechnol.Prog.30(5):1114-1124)、40mM辛酸钠和不同的NaCl和pH(Chollangi等人，(2015)Biotechnol.Bioeng.112(11):2292-2304)和用于改善HCP清除率的高达80mM的辛酸钠(Herzer等人，(2015)Biotechnol.Bioeng.112(7):1417-1428)，和具有NaCl的在高pH下的50mM辛酸钠用于总HCP清除和去除蛋白水解HCP杂质(Bee等人，(2015)Biotechnol.Prog.31(5):1360-1369)。先前已经提交了含有高达100mM辛酸钠的蛋白A洗涤物的专利申请(WO2014/141150；WO2014/186350)。另外，辛酸用于在蛋白A捕获步骤之前和之后在非色谱过程中沉淀宿主细胞蛋白杂质(Brodsky等人，(2012)

Biotechnol.Bioeng.109(10):2589-2598;Zheng等人,(2015)Biotechnol.Prog.31(6):1515-1525;Herzer等人,(2015)Biotechnol.Bioeng.112(7):1417-1428)。

[0006] 本领域需要提供从宿主细胞蛋白质中纯化蛋白质,特别是抗体的改进方法。

发明内容

[0007] 本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含大于约50mM辛酸盐和大于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液清洗超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0008] 在另一实施方案中,所述辛酸盐为辛酸钠。在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约75mM至约300mM辛酸盐。

[0009] 在本发明另一方面,该洗涤缓冲液包含约0.75M至约1.5M精氨酸。

[0010] 在本发明另一方面,该洗涤缓冲液还包含约0.5M至约1M赖氨酸。

[0011] 在本发明一个实施方案中,所述洗脱的重组多肽包含少于约2%片段化的重组多肽.

[0012] 在本发明一个方面,HCP衍生自哺乳动物细胞,例如,HCP为磷脂酶B-样2蛋白质和/或组织蛋白酶L。在本发明另一方面,重组多肽从组织蛋白酶L的纯化通过在步骤(c)的洗脱液中减少的组织蛋白酶L活性测量。

[0013] 在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液的pH为pH 7至pH 9;或pH 7.5至pH 8.5。

[0014] 在本发明另一实施方案中,所述重组多肽为单克隆抗体(mAb),例如,IgG1或IgG4。

[0015] 在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液不包含氯化钠。

[0016] 在本发明一个方面,所述超抗原选自蛋白A、蛋白G和蛋白L。

[0017] 在本发明另一方面,步骤(c)之后HCP的量少于约200ng HCP/mg产物。

[0018] 本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含多于约50mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;(b2)用包含多于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0019] 本发明还提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含多于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体精氨酸;(b2)用包含多于约50mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供从磷脂酶B-样2蛋白质纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含约100mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0021] 在另一实施方案中,本发明提供从组织蛋白酶L纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体,(b)用包含约150mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0022] 在一方面，本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含浓度大于约250mM的辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0023] 在另一方面，本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体，(b)用包含约150mM至约850mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0024] 在另一方面，本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约100mM至约850mM辛酸盐和约0.25M至约1.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0025] 附图简述

[0026] 图1：使用mAb1作为模型的蛋白A洗脱液中的百分比产率(三角形，▲)和HCP浓度(正方形，■)，其中在洗涤中使用不同浓度的辛酸钠。

[0027] 图2：对于洗涤缓冲液中5种浓度的辛酸钠的洗脱、剥离(strip)和洗涤级分中加载的mAb1的百分比。

[0028] 图3：在不同辛酸钠浓度的溶液中mAb1吸附MabSelect SuRe树脂的Langmuir等温线拟合。

[0029] 图4：使用100mM和250mM辛酸钠洗涤缓冲液的5种mAb的蛋白A洗脱液HCP浓度。

[0030] 图5：使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠和精氨酸的洗涤缓冲液的mAb2的蛋白A洗脱液HCP浓度。注意：所有洗涤缓冲液含有300mM乙酸钠。

[0031] 图6：使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠和精氨酸的洗涤缓冲液的两种不同mAb1进料流的蛋白A洗脱液HCP浓度。注意：所有洗涤缓冲液含有300mM乙酸钠。

[0032] 图7：使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠和精氨酸的洗涤缓冲液的mAb5进料流的蛋白A洗脱液PLBL2浓度。

[0033] 图8：使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠和精氨酸的洗涤缓冲液的mAb5进料流的蛋白A洗脱液HCP浓度。

[0034] 图9：使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠和精氨酸的洗涤缓冲液的mAb5进料流的蛋白A步骤产率。

[0035] 图10：对于含有辛酸钠和精氨酸或赖氨酸的洗涤液，mAb3蛋白A洗脱液中的组织蛋白酶L活性。

[0036] 图11：单克隆抗体加工中间体的抗体片段化百分比。

[0037] 图12：仅使用辛酸盐的洗涤缓冲液以及使用辛酸盐加精氨酸洗涤缓冲液的HCP浓度。

[0038] 图13：在25℃下保持长达10天的单克隆抗体原料药(bulk drug)物质的抗体片段化百分比。

[0039] 发明详述

[0040] 应当理解，本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统，其当然可

以变化。还应当理解，本发明所用的术语仅为描述具体的实施方案，而不是为了限制。如本说明书及所附权利要求书中使用的，除非内容明确另有所指，否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括所指事物的复数形式。因此，例如，提及“多肽”包括两种或多种多肽的组合等。

[0041] 术语“包含”涵盖了“包括”或“由.....组成”，例如“包含”X的组合物可以仅由X组成，或者可以包括另外的组分，例如X+Y。术语“基本上由.....组成”将特征的范围限制为指定的材料或步骤以及不会实质上影响所要求保护的特征的基本特性的那些。术语“由.....组成”排除了任何其他组分的存在。

[0042] 当涉及可测量值如量、持续时间等时，本发明所用的“约”是指涵盖从特定数值的±20％或±10％的变体(包括±5％、±1％和±0.1％)，这样的变体适于施行所公开的方法。

[0043] 除非另有所指，否则本发明所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。尽管任何与本发明所述的方法和材料相似或相当的方法和材料可用于本发明测试的实践中，但优选的材料和方法如本发明所述。在描述和请求本发明中，将用到以下术语。

[0044] 本发明替换使用的“多肽”、“肽”和“蛋白”是指氨基酸残基的聚合物。多肽可以是天然(组织衍生的)来源的、重组的或由原核或真核细胞制品天然表达的，或者是经由合成方法化学生产的。该术语适用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物)，也适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般的化学结构不同的结构，但作用的方式与天然存在的氨基酸类似的化学化合物。科学和专利文献中充分地描述了非天然残基。一些示例性的用作天然氨基酸残基模拟物的非天然组合物和指导如下所述。芳香族氨基酸的模拟物可通过由以下替代而生成：例如D-或L-萘基丙氨酸(naphylalanine)；D-或L-苯基甘氨酸；D-或L-2噻吩基丙氨酸(thieneylalanine)；D-或L-1,-2,3-,或4-芘基丙氨酸(pyreneylalanine)；D-或L-3噻吩基丙氨酸(thieneylalanine)；D-或L-(2-吡啶基)-丙氨酸；D-或L-(3-吡啶基)-丙氨酸；D-或L-(2-吡嗪基)-丙氨酸；D-或L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸；D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸；D-(三氟甲基)-苯丙氨酸；D-对-氟-苯丙氨酸；D-或L-对-联苯基苯丙氨酸；D-或L-对-甲氧基-联苯基苯丙氨酸；D-或L-2-吲哚(烷基)丙氨酸；和D-或L-烷基丙氨酸，其中烷基可以为取代或未取代的甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、仲丁基、异戊基，或非酸性氨基酸。非天然氨基酸的芳香族环包括，例如噻唑基、噻吩基(thiophenyl)、吡唑基、苯并咪唑基、萘基、呋喃基、吡咯基和吡啶基的芳香族环。

[0045] 本发明所用的“肽”包括作为本发明具体举例说明的那些肽的保守变体的肽。本发明所用的“保守变体”表示使用另一生物学上相似的残基替代氨基酸残基。保守变体的实例包括但不限于，一个疏水性残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、正亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个疏水残基，或一个极性残基取代另一个极性残基，如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸或谷氨酰胺取代天冬酰胺等。可互相取代的中性亲水性氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸。

[0046] “保守变体”还包括使用取代的氨基酸代替未取代的母体氨基酸，条件是取代的多肽的抗体也与未取代的多肽起免疫反应。这样的保守取代在本发明所述的蛋白质的种类的定义之内。

[0047] 本发明所用的“阳离子的”是指在pH 7.4时具有净正电荷的任何肽。肽的生物活性可通过本领域技术人员已知的和本发明所述的标准方法测定。

[0048] 当关于蛋白使用“重组”时，表示该蛋白已通过引入异源核酸或蛋白或者改变天然核酸或蛋白来进行修饰。

[0049] 本发明所用的“治疗性蛋白”指的是(例如)研究者或临床医生所寻找的、可向哺乳动物给药以引出组织、系统、动物或人类的生物学或医学应答的任何蛋白和/或多肽。治疗性蛋白可引出多于一种生物学或医学应答。此外，术语“治疗有效量”是指与未接受该量的相应的受试者相比，导致(但不限于)疾病、病症或副作用的痊愈、预防或减轻、或者疾病或病症进展速率降低的任何量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量以及在患者中有效地引起增强或有助于第二种药物的治疗作用的生理功能的量。

[0050] 本发明所鉴定的所有“氨基酸”残基为天然的L-构型。与标准多肽命名一致，氨基酸残基的缩写如下表所示。

[0051] 表1:氨基酸缩写

[0052]

1个字母	3个字母	氨基酸
Y	Tyr	L-酪氨酸
G	Gly	L-甘氨酸
F	Phe	L-苯丙氨酸
M	Met	L-甲硫氨酸
A	Ala	L-丙氨酸
S	Ser	L-丝氨酸
I	Ile	L-异亮氨酸
L	Leu	L-亮氨酸
T	Thr	L-苏氨酸
V	Val	L-缬氨酸
P	Pro	L-脯氨酸
K	Lys	L-赖氨酸
H	His	L-组氨酸
Q	Gln	L-谷氨酰胺
E	Glu	L-谷氨酸
W	Trp	L-色氨酸
R	Arg	L-精氨酸
D	Asp	L-天冬氨酸
N	Asn	L-天冬酰胺
C	Cys	L-半胱氨酸

[0053] 应当注意所有的氨基酸残基序列在本发明通过从左至右的方向为从氨基端至羧基端的常规方向的通式表示。

[0054] 纯化方法

[0055] 在一方面本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法，该方法包括：

(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含辛酸盐和精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0056] 在一方面,本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含大于约50mM辛酸盐和大于约0.5M精氨酸的洗涤缓冲液清洗超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0057] 在一方面,本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含浓度大于250mM的辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0058] 在一方面,本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含约150mM至约850mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0059] 在另一方面,本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含辛酸盐的第一洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;(b2)用包含精氨酸的第二洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0060] 在另一方面,本发明涉及从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b1)用包含精氨酸的第一洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;(b2)用包含辛酸盐的第二洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0061] 在步骤(a)中将溶液施加(或加载)到超抗原色谱固体载体后,重组多肽将被吸附到固定在固体载体上的超抗原上。然后可以通过使含有吸附的重组多肽的固定化超抗原与本发明所述的洗涤缓冲液接触来除去HCP杂质。

[0062] “超抗原”表示这样的通用配体:其与免疫球蛋白超家族的成员在不同于这些蛋白的靶配体结合部位的位点处相互作用。葡萄球菌肠毒素是与T-细胞受体相互作用的超抗原的例子。结合抗体的超抗原包括但不限于:蛋白G,其结合IgG恒定区(Bjorck和Kronvall(1984)J.Immunol.,133:969);蛋白A,其结合IgG恒定区和VH结构域(Forsgren和Sjoquist,(1966)J.Immunol.,97:822);和蛋白L,其结合VL结构域(Bjorck,(1988)J.Immunol.,140:1194)。因此在一个实施方案中,超抗原选自蛋白A、蛋白G和蛋白L。

[0063] 本发明中使用的术语“蛋白A”包括从其天然来源(例如,金黄色葡萄球菌的细胞壁)回收的蛋白A、合成(例如通过肽合成或通过重组技术)生产的蛋白A、及其保留结合具有C_H2/C_H3区域的蛋白的能力的变体。蛋白A可以商业上购自例如Repligen或Pharmacia。

[0064] 本发明中使用的“亲和色谱”是这样的色谱方法:其利用生物分子之间的特异性的可逆相互作用(而不是生物分子的一般性质诸如等电点、疏水性或大小)实现层析分离。“蛋白A亲和色谱”或“蛋白A色谱”表示利用蛋白A的IgG结合结构域对免疫球蛋白分子的Fc部分的亲和力的特异性亲和色谱方法。该Fc部分包含人或动物免疫球蛋白恒定结构域C_H2和C_H3或与这些基本上类似的免疫球蛋白结构域。在实践中,蛋白A层析涉及使用固定化至固体载

体的蛋白A。参见Gagnon,Protein A Affinity Chromotography,Purification Tools for Monoclonal Antibodies,pp.155-198,Validated Biosystems,(1996)。蛋白G和蛋白L也可以用于亲和色谱。固体载体是蛋白A附着于其上的非水性基质(例如,柱、树脂、基质、珠子、凝胶等)。这样的载体包括琼脂糖、琼脂糖凝胶、玻璃、二氧化硅、聚苯乙烯、火棉胶、木炭、砂、聚甲基丙烯酸酯、交联的聚(苯乙烯-二乙烯基苯)和具有葡聚糖表面补充剂(extender)的琼脂糖和任意其它合适材料。这样的材料是本领域众所周知的。可以使用任意合适的方法将超抗原附着于固体载体。将蛋白附着于合适的固体载体的方法是本领域众所周知的。参见例如Ostrove,Guide to Protein Purification,Methods in Enzymology,(1990)182:357-371。这样的固体载体(具有和没有固定化的蛋白A或蛋白L)可容易地得自许多商业来源,诸如Vector Laboratory(Burlingame,Calif.),Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,Calif.),BioRad(Hercules,Calif.),Amersham Biosciences(GE Healthcare的一部分,Uppsala,Sweden)和Millipore(Billerica,Mass.)。

[0065] 本发明所述的方法可包括一个或多个进一步的纯化步骤,如一个或多个进一步的色谱步骤。在一个实施方案中,所述一个或多个进一步的色谱步骤选自:阴离子交换色谱、阳离子交换色谱和混合模式色谱,特别是阴离子交换色谱。

[0066] 在一个实施方案中,所述方法还包括过滤本发明所述的方法的步骤(c)产生的洗脱液。

[0067] 在一个实施方案中,该方法在步骤(c)之后还包括以下步骤:(d)用30mM乙酸、100mM HCl将含有回收蛋白质的溶液滴定至约pH 3.5;(e)使步骤(d)的溶液在约pH 3.5下保持约30至约60分钟;和(f)用1M Tris将步骤(e)的溶液的pH调节至约pH 7.5。在一个实施方案中,该方法还包括过滤步骤(f)产生的溶液。

[0068] 在一个实施方案中,步骤(a)中施加于柱的重组蛋白的量(即载荷比)为35mg/ml或更低,例如30mg/ml或更低,20mg/ml或更低,15mg/ml或更低或10mg/ml或更低。应理解,“载荷比”是指每毫升(ml)树脂的毫克(mg)蛋白质(例如单克隆抗体)。

[0069] 洗涤缓冲液

[0070] “缓冲液”是缓冲溶液,其通过其酸碱共轭组分的作用抵抗pH的变化。“平衡缓冲液”是指用于制备用于色谱的固相的溶液。“上样缓冲液”是指用于将蛋白质和杂质的混合物加载到固相(即色谱基质)上的溶液。平衡和上样缓冲液可以是相同的。“洗涤缓冲液”是指用于在上样完成后从固相中除去残留杂质的溶液。“洗脱缓冲液”用于从色谱基质中除去靶蛋白。

[0071] "盐"为酸和碱的相互作用形成的化合物。

[0072] 在本发明一个方面,该洗涤缓冲液包含脂族羧酸盐。所述脂族羧酸盐可以是直链的或支链的。在一些实施方案中,所述脂族羧酸盐是脂族羧酸或其盐,或所述脂族羧酸盐的来源是脂族羧酸或其盐。在一些实施方案中,所述脂族羧酸盐是直链的,且选自甲酸(蚁酸)、乙酸(醋酸)、丙酸、丁酸(酪酸)、戊酸(缬草酸)、己酸、庚酸、辛酸、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十一烷酸、十二烷酸(月桂酸)、十三烷酸、十四烷酸(肉豆蔻酸)、十五烷酸、十六烷酸(棕榈酸)、十七烷酸、十八烷酸(硬脂酸)和二十烷酸(arachididic acid)或其任意盐。因此,所述脂族羧酸盐可以包含长度为1-20个碳的碳主链。在一个实施方案中,所述脂族羧酸盐包含6-12个碳的主链。在一个实施方案中,所述脂族羧酸盐选自己酸盐、庚酸盐、

辛酸盐、癸酸盐和十二酸盐。在另一实施方案中，所述脂族羧酸盐为辛酸盐。

[0073] 在一个实施方案中，所述脂族羧酸盐的来源选自脂族羧酸、脂族羧酸的钠盐、脂族羧酸的钾盐和脂族羧酸的铵盐。在一个实施方案中，所述脂族羧酸盐的来源为脂族羧酸的钠盐。在另一实施方案中，洗涤缓冲液包含辛酸钠、癸酸钠或十二酸钠，特别是辛酸钠。

[0074] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约50mM辛酸盐。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约200mM辛酸盐。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约250mM辛酸盐。在另一实施方案中，洗涤缓冲液包含至少约50mM辛酸盐，如至少约75mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM或约300mM辛酸盐。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含少于约850mM辛酸盐，如少于约800mM、约750mM、约700mM、约650mM、约600mM、约550mM、约500mM、约450mM、约400mM、约350mM、约300mM辛酸盐。在另一实施方案，洗涤缓冲液包含约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM或约250mM辛酸盐。

[0075] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约50mM辛酸钠。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约200mM辛酸钠。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含多于约250mM辛酸钠。在另一实施方案中，洗涤缓冲液包含至少约50mM辛酸钠，如至少约75mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM或约300mM辛酸钠。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含少于约850mM辛酸钠，如少于约800mM、约750mM、约700mM、约650mM、约600mM、约550mM、约500mM、约450mM、约400mM、约350mM、约300mM辛酸钠。在另一实施方案，洗涤缓冲液包含约100mM、约125mM、约150mM、约175mM、约200mM或约250mM辛酸钠。

[0076] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含约50mM至约750mM辛酸盐；约50mM至约500mM辛酸盐；约75mM至约400mM辛酸盐；约75mM至约350mM辛酸盐；约75mM至约300mM辛酸盐；约75mM至约200mM辛酸盐；多于约250mM至约750mM辛酸盐；多于约250mM至约500mM辛酸盐；多于约250mM至约400mM辛酸盐；多于约250mM至约350mM辛酸盐；或多于约250mM至约300mM辛酸盐。

[0077] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含约50mM至约750mM辛酸钠；约50mM至约500mM辛酸钠；约75mM至约400mM辛酸钠；约75mM至约350mM辛酸钠；约75mM至约300mM辛酸钠；约75mM至约200mM辛酸钠；多于约250mM至约750mM辛酸钠；多于约250mM至约500mM辛酸钠；多于约250mM至约400mM辛酸钠；多于约250mM至约350mM辛酸钠；或多于约250mM至约300mM辛酸钠。

[0078] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含有机酸、有机酸的共轭碱的碱性金属盐或铵盐、和有机碱。在一个实施方案中，洗涤缓冲液的制备不添加NaCl。

[0079] 在一个实施方案中，所述有机酸的共轭碱为有机酸的共轭碱的钠盐、钾盐或铵盐。在一个实施方案中，所述有机酸为乙酸且乙酸的共轭碱为钠盐(即乙酸钠)。

[0080] 在一个实施方案中，洗涤缓冲液另外包含约1mM至约500mM乙酸。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含约45mM乙酸。在一个实施方案中，洗涤缓冲液另外包含约1mM至约500mM Tris碱。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含约55mM Tris碱。在一个实施方案中，洗涤缓冲液另外包含约1mM至约500mM乙酸钠。在一个实施方案中，洗涤缓冲液包含约300mM乙酸钠。

[0081] 在一个实施方案中，所述洗涤缓冲液的pH为约pH 7至约pH 9；例如约pH 7.5至约pH 8.5。

[0082] 在一个实施方案中，所述洗涤缓冲液包含约0.25M至约1.5M精氨酸。在另一实施方

案中,所述洗涤缓冲液包含约0.25M至约2M精氨酸。在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约0.5M至约2M精氨酸。在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约0.75M至约1.5M精氨酸。在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约1M、约1.1M、约1.2M、约1.3M、约1.4M、约1.5M、约1.6M、约1.7M、约1.8M、约1.9M、或约2M精氨酸。在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约0.5M至约2M精氨酸,特别是约0.75M至约2M精氨酸。在另一实施方案中,所述洗涤缓冲液包含大于约1M精氨酸。

[0083] 应理解,提及"精氨酸"不仅指天然氨基酸,还包括精氨酸衍生物或其盐,例如精氨酸HCl、乙酰精氨酸、胍丁胺、精氨酸、N-α-丁酰基-L-精氨酸或N-α-特戊酰精氨酸。

[0084] 或者,精氨酸可包含在初始洗涤缓冲液中(即同时使用)。因此,在一方面,本发明提供从宿主细胞蛋白质(HCP)纯化重组多肽的方法,该方法包括:(a)将包含重组多肽和HCP的溶液施加至超抗原色谱固体载体;(b)用包含约100mM至约850mM辛酸盐和约0.25M至约1.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体;和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。如本发明所述的实施例中所示,包含辛酸盐和精氨酸的组合的超抗原色谱洗涤具有改善的宿主细胞蛋白质清除的意外协同效应,特别是用于去除PLBL2和组织蛋白酶L,它们是两种特别难以去除的宿主细胞蛋白质。

[0085] 在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约100mM至约750mM辛酸盐;约100mM至约500mM辛酸盐;约100mM至约400mM辛酸盐;约100mM至约350mM辛酸盐;或约100mM至约300mM辛酸盐;和/或约0.25M至约2M精氨酸,约0.5M至约1.5M精氨酸;或约0.5M至约1M精氨酸。

[0086] 在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约100mM至约750mM辛酸钠;约100mM至约500mM辛酸钠;约100mM至约400mM辛酸钠;约100mM至约350mM辛酸钠;或约100mM至约300mM辛酸钠;和/或约0.25M至约2M精氨酸;约0.5M至约1.5M精氨酸;或约0.5M至约1M精氨酸。

[0087] 在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液包含约0.5M至约2M精氨酸和约50mM至约750mM辛酸钠;约0.5M至约1.5M精氨酸和约50mM至约500mM辛酸钠;或约0.5M至约1.5M精氨酸和约50mM至约250mM辛酸钠。

[0088] 在一个实施方案中,所述洗涤缓冲液还包含约0.5M至约1M赖氨酸,如约0.75M赖氨酸。在该实施方案中,所述赖氨酸包含在初始洗涤缓冲液中(即同时使用)。在一个备选实施方案中,所述赖氨酸包含在分开的洗涤缓冲液中(即相继使用)。如本发明提供的实施例中所示,显示添加赖氨酸成功地减少了洗脱体积。

[0089] 重组多肽

[0090] 在一个实施方案中所述多肽为抗原结合多肽。在一个实施方案中所述抗原结合多肽选自抗体、抗体片段、免疫球蛋白单一可变域(dAb)、mAbdAb、Fab、$F(ab')_2$、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、闭合构象的多特异性抗体、二硫键连接的scFv或双特异性抗体或可溶受体。在另一实施方案中所述抗原结合蛋白为抗体,例如单克隆抗体(mAb)。术语重组多肽、产物分子和mAb在此可互换使用。该抗体可为,例如,嵌合的、人源化或结构域抗体。

[0091] 术语Fv、Fc、Fd、Fab,或$F(ab)_2$以其标准含义使用(参见,例如Harlow等人,Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,(1988))。

[0092] "嵌合抗体"指的是一种基因工程抗体,其含有来自供体抗体的天然存在的可变区(轻链和重链)以及来自受体抗体的轻链和重链恒定区。

[0093] "人源化抗体"指的是一类基因工程抗体,其CDR源自非人供体免疫球蛋白,而该分

子的剩余的源自免疫球蛋白的部分来自一种(或多种)人免疫球蛋白。此外,可改变框架支撑残基(framework support residues)以保持结合亲和力(参见,例如Queen等人,(1989)Proc.Natl.Acad Sci USA,86:10029-10032,Hodgson等人,(1991)Bio/Technology,9:421)。合适的人受体抗体可以根据与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列的同源性而选自常规数据库,例如KABAT.RTM.数据库、Los Alamos数据库和Swiss Protein数据库。特征在于与供体抗体的框架区的同源性(在氨基酸基础上)的人抗体可适于为供体CDR的插入提供重链恒定区和/或重链可变框架区。能够提供轻链恒定区或可变框架区的合适的受体抗体可以类似的方式选择。应当注意,受体抗体的重链和轻链不要求源自同一受体抗体。现有技术描述了生产这样的人源化抗体的若干种方法--见例如EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0094] 术语“供体抗体”指的是一种抗体(单克隆和/或重组的),其将其可变区、CDR或其它功能片段或其类似物的氨基酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体,从而提供改变的免疫球蛋白编码区并生成表达的改变的抗体,该抗体具有抗原特异性和该供体抗体的中和活性特征。术语“受体抗体”指的是与该供体抗体异源的抗体(单克隆和/或重组的),其将编码其重链和/或轻链框架区和/或其重链和/或轻链恒定区的全部(或任何部分,但在一些实施方案中为全部)氨基酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体。在一些实施方案中,人抗体为受体抗体。

[0095] “CDR”定义为抗体的互补决定区的氨基酸序列,其为免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,4th Ed.,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987)。在免疫球蛋白的可变部分有三个重链和三个轻链CDR(或CDR区)。因此,本发明所用的“CDR”指的是所有三个重链CDR或所有三个轻链CDR(或如果适宜,所有的重链CDR和所有的轻链CDR)。抗体的结构和蛋白折叠可意味着其它残基被认为是抗原结合区的部分,且这可被技术人员理解。(参见例如Chothia等人,(1989)Nature 342:877-883)。

[0096] 本发明所用的术语“结构域”指的是一种折叠的蛋白结构,其具有独立于该蛋白其它部分的三级结构。通常,结构域是蛋白离散功能特性形成的原因,且在很多情况中可以被添加、除去或转移至其它蛋白而不会损失该蛋白剩余部分和/或结构域的功能。“抗体单一可变域”是折叠的多肽结构域,其包含抗体可变域的序列特征。因此,它包括完整的抗体可变域和修饰的可变域,例如,其中一个或多个环被以下所代替:不是抗体可变域特征的序列,或已被截短的抗体可变域或者包含N-端或C-端延伸的抗体可变域,以及至少保留全长域的结合活性和特异性的可变域的折叠片段。

[0097] 短语“免疫球蛋白单一可变域”指的是不依赖不同的V区或结构域而特异结合抗原或表位的抗体可变域(V_H,V_{HH},V_L)。免疫球蛋白单一可变域可与其它不同的可变区或可变域以一种形式(例如同源或异源多聚体)存在,其中其它可变区或可变域不是该单一免疫球蛋白可变域抗原结合所必需的(例如,其中该免疫球蛋白单一可变域不依赖于另外的可变域结合抗原)。本发明所用的术语“结构域抗体”或“dAb”与能够结合至抗原的“免疫球蛋白单一可变域”是相同的。免疫球蛋白单一可变域可以是人抗体可变域,但也包括来自其它物种如啮齿动物(例如,WO 00/29004所公开的)、鲛口鲨和骆驼科的V_{HH} dAb(纳米抗体)的单一抗体可变域。骆驼科V_{HH}是来自包括普通骆驼、美洲驼、羊驼、单峰骆驼和原驼物种的免疫球蛋白单一可变域多肽,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。这样的V_{HH}域可根据本领域可用的标

准技术被人源化，而且根据本发明这样的结构域仍被认为是“结构域抗体”。本发明所用的″V_H″包括骆驼科V_{HH}域。NARV是另一种类型的免疫球蛋白单一可变域，其在包括铰口鲨的软骨鱼中被鉴定。这些结构域也被称为新型抗原受体可变区(通常简写成V(NAR)或NARV)。更多详情参见Mol.Immunol.(2006)44,656-665和US2005/0043519。

[0098] 术语“mAbdAb和dAbmAb”在本发明中用于指包含单克隆抗体和至少一种单一结构域抗体的抗原结合蛋白。这两个术语可互换使用，并且意图具有与本发明所用相同的含义。

[0099] 通常，从宿主细胞蛋白质中纯化重组多肽导致重组多肽的片段化。申请人已发现，当利用本发明所述的纯化方法时，重组多肽片段化的量显著降低。在一个实施方案中，被洗脱的重组多肽包含少于约10％、约9％、约8％、约7％、约6％、约5％、约4％、约3％、约2％、或约1％片段化的重组多肽。在另一实施方案中，所述重组多肽为抗体且洗脱抗体包含少于约10％、约9％、约8％、约7％、约6％、约5％、约4％、约3％、约2％、或约1％的片段化抗体。

[0100] 宿主细胞蛋白质

[0101] “杂质”表示在超抗原层析之前存在于加样样品中或在超抗原层析之后存在于洗脱液中的任何外来的或不希望的分子。可有“工艺杂质”存在。这些是由于在其中生产目标蛋白的工艺而存在的杂质。例如，这些包括宿主细胞蛋白(HCP)、RNA和DNA。“HCP”表示在细胞培养或发酵过程中由宿主细胞产生的、与目标蛋白无关的蛋白，包括细胞内蛋白和/或分泌蛋白。宿主细胞蛋白的一个例子是蛋白酶，如果在纯化过程中和以后仍然存在，其可以造成对目标蛋白的损伤。例如，如果蛋白酶保留在包含目标蛋白的样品中，它可以产生最初不存在的产物相关的物质或杂质。蛋白酶的存在可以造成在纯化过程中和/或在最终制剂中目标蛋白随时间的衰变，例如片段化。

[0102] 在一个实施方案中，宿主细胞蛋白质由哺乳动物细胞或细菌细胞产生/衍生。在另一个实施方案中，哺乳动物细胞选自人或啮齿动物(例如仓鼠或小鼠)细胞。在又一个实施方案中，人细胞是HEK细胞，仓鼠细胞是CHO细胞或小鼠细胞是NSO细胞。

[0103] 在一些实施方案中，宿主细胞选自CHO细胞、NSO细胞、Sp2/0细胞、COS细胞、K562细胞、BHK细胞、PER.C6细胞和HEK细胞(即，宿主细胞蛋白质衍生自这些宿主细胞)。或者，宿主细胞可为：选自以下的细菌细胞：大肠杆菌(例如，W3110，BL21)，枯草芽孢杆菌和/或其它合适的细菌；真核细胞，如真菌或酵母细胞(例如，巴斯德毕赤酵母、曲霉属、酿酒酵母、裂殖酵母、粗糙链孢霉)。

[0104] 所述“溶液”可以是细胞培养基，例如细胞培养物进料流。可以将进料流过滤。所述溶液可以是澄清的未加工的肉汤(CUB)(或澄清的发酵液/上清液)。所述CUB也被称作通过澄清除去了任何细胞和/或细胞碎片的细胞培养物上清液。所述溶液可以是表达蛋白的细胞的裂解制备物(例如，溶液是裂解物)。

[0105] 工艺杂质也包括用于培养细胞或确保目标蛋白的表达的组分，例如，溶剂(例如用于培养酵母细胞的甲醇)、抗生素、甲氨蝶呤(MTX)、培养基组分、絮凝剂等。也包括这样的分子：其为在步骤之前渗入样品中的超抗原固相的组成部分，例如，蛋白A、蛋白G或蛋白L。

[0106] 杂质也包括：“产物相关的变体”，其包括保留它们的活性、但是在它们的结构上存在不同的蛋白；和因为它们的结构差异而已经丧失它们的活性的蛋白。这些产物相关的变体包括，例如，高分子量物质(HMW)、低分子量物质(LMW)、聚集的蛋白、前体、降解的蛋白、错误折叠的蛋白、二硫键错配连接的(underdisulfide-bonded)蛋白、片段和去酰胺化的物

质。

[0107] 可以测量这些杂质中的任一种在洗脱液中的存在，以确定洗涤步骤是否已经成功。例如，我们已经证实了表达为ng HCP/mg产物的HCP水平的下降(参见实施例)。或者，检测到的HCP可表示为“百万分之一”或“ppm”，其等于ng/mg，或“ppb”(“十亿分之一”)，其等于pg/mg。

[0108] 在一个实施方案中，步骤(c)之后HCP的量少于约200ng HCP/mg产物(即ng/mg)；少于约150ng/mg；少于约100ng/mg；少于约50ng/mg；或少于约20ng/mg。

[0109] 当与不含脂族羧酸盐的对照洗涤步骤相比时，和/或与纯化前的溶液(例如澄清的未加工的肉汤)相比时，也可显示降低。

[0110] 在一个实施方案中，与先前公开的100mM辛酸盐洗涤(例如参见WO2014/141150)相比，在步骤(c)之后HCP的相对减少因子为约2倍至约50倍。因此，在一个实施方案中，在步骤(c)之后，与基本上由100mM辛酸盐组成的洗涤缓冲液相比，HCP的相对减少因子为约2倍至约50倍。在进一步的实施方案中，相对减少因子是至少约2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍或50倍。为避免疑义，提及“基本上由100mM辛酸盐组成的洗涤缓冲液”并不排除存在对100mM辛酸盐洗液的基本特征没有实质影响的其它组分，例如，缓冲盐和/或乙酸钠。

[0111] 在一个实施方案中，在本发明的洗涤步骤后，目标蛋白从洗脱液的回收率是100％、99％、98％、97％、96％、95％、90％、85％、80％、70％、60％、50％或更低，包括在100％至50％的范围内或在由该范围内的不连续值的任何对限定的任何子范围内的任何不连续值。在一个实施方案中，目标蛋白从洗脱液的回收率大于70％，如大于75％、80％、85％、90％、95％或99％。根据下式，通过将洗脱液中的目标蛋白的量确定为施加于柱的目标蛋白的量的百分比，计算在洗脱液中的回收率百分比(％)：

[0112] 回收率百分比＝洗脱液中的产物的量÷施加到柱上的产物的量X 100

[0113] 通过ELISA、OCTET或其它确定一种或多种上述杂质的水平的方法，可以确定存在于洗脱液中的杂质(即宿主细胞蛋白质)的量。在本发明描述的实施例中，使用ELISA方法确定样品中的HCP的水平。

[0114] 在一个实施方案中，宿主细胞蛋白质选自PLBL2(磷脂酶B-样2蛋白质)和/或组织蛋白酶L。

[0115] 在一个实施方案中，宿主细胞蛋白质为PLBL2。因此，在本发明一个方面，提供了从磷脂酶B-样2蛋白质(PLBL2)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和PLBL2的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约150mM至约850mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0116] 在本发明另一方面，提供了从磷脂酶B-样2蛋白质(PLBL2)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和PLBL2的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约55mM至约850mM辛酸盐和约0.25M至约1.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0117] 在本发明另一方面，提供了从磷脂酶B-样2蛋白质(PLBL2)纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和PLBL2的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约100mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱

固体载体洗脱重组多肽。

[0118] 已经发现PLBL2是HCP杂质，其在抗体特别是mAb5的下游加工过程中难以除去(参见实施例)，这是由于与产物分子的明显结合。因此，在一个实施方案中，重组多肽是抗体，例如IgG抗体，特别是IgG4抗体。PLBL2量可以使用本领域已知的方法测量，例如通过ELISA，例如实施例中描述的或WO2015/038884中公开的PLBL2特异性ELISA。

[0119] 组织蛋白酶L蛋白酶在CHO细胞培养期间产生，并且它可潜在地降解抗体，例如mAb3产物分子(参见实施例)。因此，在一个实施方案中，重组多肽是抗体，例如IgG抗体，特别是IgG1抗体。

[0120] 在一个实施方案中，宿主细胞蛋白质为组织蛋白酶L。在该实施方案中，重组多肽从组织蛋白酶L中的纯化可通过在步骤(c)的洗脱液中减少的组织蛋白酶L活性(例如使用PromoKine PK-CA577-K142)测量。

[0121] 在本发明一个方面，提供了从组织蛋白酶L纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和组织蛋白酶L的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约150mM至约850mM辛酸盐的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0122] 在本发明另一方面，提供了从组织蛋白酶L纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和组织蛋白酶L的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约55mM至约850mM辛酸盐和约0.25M至约1.5M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0123] 在本发明另一方面，提供了从组织蛋白酶L纯化重组多肽的方法，该方法包括：(a)将包含重组多肽和组织蛋白酶L的溶液施加至超抗原色谱固体载体；(b)用包含约150mM辛酸盐和约1.1M精氨酸的洗涤缓冲液洗涤超抗原色谱固体载体；和(c)从超抗原色谱固体载体洗脱重组多肽。

[0124] 在本发明一个方面，提供了通过本发明定义的任一个纯化方法获得的纯化的重组多肽。

[0125] 现在将参考以下非限制性实施例描述本发明。

[0126] 聚山梨酯降解

[0127] 聚山梨酯，如聚山梨酯20和聚山梨酯80为广泛用于稳定最终制剂产品中的蛋白质药物的非离子表面活性剂。聚山梨醇酯可以被药物产品中的残留酶降解，这可影响产品的最终保质期。不受理论束缚，本发明所述的方法通过减少最终产物中残留的宿主细胞蛋白的量来减少降解的聚山梨酯的量。在一个实施方案中，降解的聚山梨酯的量少于约50％、约40％、约30％、约20％、约10％、约5％、约4％、约3％、约2％或约1％。

[0128] 实施例1：筛选和优化蛋白A洗涤中的pH和辛酸钠浓度

[0129] 介绍

[0130] 在本发明所述的工作中，优化蛋白A洗涤以实现使用双柱过程(蛋白A随后阴离子交换)对所有mAb产物的足够的HCP去除。现有平台方法经常需要第二精制步骤以达到所需的HCP水平。消除色谱步骤简化了过程，实现了更快的过程开发，并可以降低设施适应风险。洗涤优化的策略是通过破坏HCP-mAb相互作用来改善HCP清除。筛选多种洗涤添加剂和洗涤pH，然后优化整个蛋白A过程中的总HCP去除。

[0131] 材料和方法

[0132] 正辛酸钠,冰醋酸,乙酸钠,氢氧化钠,苯甲醇和trizma碱购自Sigma-Aldrich Chemical Co.(St.Louis,MO)。使用水制备溶液,使用Millipore Milli-Q®系统进一步纯化。使用3M Tris碱或3M乙酸进行任何pH调节。

[0133] 用于生产mAb的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养

[0134] 澄清的未过滤肉汤(CUB)含有几种GSK mAb产品中的一种,如mAb1(IgG1,pI=8.7,MW=149kDa)、mAb2(IgG1,pI=8.3,MW=149kDa)、mAb3(IgG1,pI=7.9,MW=149kDa)、mAb4(IgG1,pI=8.6,MW=148kDa)或mAb5(IgG4,pI=7.1,MW=145kDa)。类似的方法用于产生和收获本研究中使用的所有mAb。例如,通过用表达mAb1的DG44细胞接种2升反应器来制备mAb1,活细胞计数为1.23-1.24MM/mL,活力为~93.8%。然后将培养物维持在~34℃,pH~6.9和6g/L葡萄糖中16天。搅拌速率保持在~300rpm。培养后,将未澄清的含有细胞和mAb的培养液以10,000g分批离心20分钟。然后通过来自Nalgene的0.45μM和0.2μM SFCA过滤器对培养液进行真空过滤。

[0135] 蛋白A纯化

[0136] 将来自GE Healthcare的MabSelect SuRe™(MSS)蛋白A树脂填充在0.5cm直径的柱中,最终床高度为25cm。在重力沉降后,使用ÄKTA Avant 25将树脂在0.4M NaCl中以475cm/hr的线性流速流动填充2小时。填充质量通过以下评估:注入100μL 2M NaCl以确认不对称性为1.0+/-0.2和每米至少1000个板。所有蛋白A实验使用35mg mAb/mL树脂的载荷比,并且所有工艺流速等于300cm/hr的线性流速。蛋白A色谱和缓冲液描述于表2中。

[0137] 表2:蛋白A色谱的操作条件(WO2014/141150)。

[0138]

色谱步骤:	组成:	体积:
1. 平衡	55 mM Tris 碱，45 mM 乙酸，pH 7.5	3 CV
2. 样品载荷	澄清未加工的原料 (CUB)，载荷比 =35 mg/mL	
3. 含辛酸盐的洗涤液:	55 mM Tris 碱，45 mM 乙酸，辛酸钠的指示浓度，指示 pH	变化的
4. 平衡	55 mM Tris 碱，45 mM 乙酸，pH 7.5	3 CV
5. 洗脱	1.8 mM 乙酸钠，28.2 mM 乙酸，pH 3.6	3 CV
6. 剥离(Strip)	300 mM 乙酸，pH 2.6	3 CV
7. 中和	55 mM Tris 碱，45 mM 乙酸，pH 7.5	1 CV
8. 清洁	0.1 M 氢氧化钠	3 CV
9. 储存	33 mM 乙酸，167 mM 乙酸钠，2%苄醇 (V/V) pH 5.5	3 CV

[0139] 洗涤优化

[0140] 先前的研究表明,许多难以去除的HCP杂质与mAb直接缔合(Levy等人,(2014)Biotechnol.Bioeng.111(5):904-912;Aboulaich等人,(2014)Biotechnol.Prog.30(5):1114-1124);破坏HCP-mAb相互作用的溶液条件可在蛋白A洗涤步骤期间提供改善的HCP清除,并且在该工作中,为此目的筛选和优化各种洗涤溶液。具体地,在样品加载之后使用不同pH的含有不同浓度的辛酸钠的洗涤溶液,以在洗脱之前从蛋白A吸附的mAb中清除HCP。为了评估和量化每次HCP去除的洗涤有效性,如下面的ELISA方法部分所述开发了内部HCP ELISA。先前发现辛酸钠在用于蛋白A洗涤时提供稳健的HCP清除。然而,之前的研究仅限于

辛酸钠浓度低于100mM和pH 7.5;最初的范围研究之后是球形中心复合设计研究,以表征辛酸钠蛋白A洗涤在一系列范围的浓度和pH内的行为。这些设计如下表3和4所示。根据下面的统计分析方法部分完成了统计建模。

[0141] 分析

[0142] 蛋白A产量

[0143] 通过使用Nanodrop 2000c(Thermo Scientific)测量洗脱液中的mAb浓度来确定蛋白A产量。对每个洗脱液样品的三个Nanodrop读数取平均值以确定蛋白质浓度;通过将mAb浓度乘以洗脱液体积(由色谱图确定)计算蛋白A洗脱液中的总mAb含量。使用Agilent 1100系列HPLC上的POROS®A 20μM柱测定负载的mAb浓度。将分析蛋白A上的每个CUB样品的原始数据与对已知浓度的每种特定mAb的标准进行比较,以计算滴度。将总负载体积乘以测量的滴度以计算加载的mAb的总质量,并通过将洗脱液中的总mAb除以负载中的总mAb来计算产率。

[0144] 宿主细胞蛋白质(HCP)浓度测量:HCP ELISA

[0145] 内部开发了使用HCP ELISA的宿主细胞蛋白质分析以量化CHO衍生的产物样品中免疫原性HCP的总量(Mihara等人,(2015)J.Pharm.Sci.104:3991-3996)。该HCP ELISA是使用定制的山羊抗CHO HCP多克隆抗体和内部生产的HCP参考标准开发的,用于跨CHO衍生产品的多产品使用。

[0146] 统计分析

[0147] 为了分析HCP清除率和产量方面的洗涤性能,进行了范围试验和中心复合设计研究。这些因子均按比例缩放至-1,1单位标度,并将一般线性模型根据数据拟合。对每个响应拟合单独的模型。选择最终模型后,评估残差的模型假设并酌情进行转换。所有模型项均针对5%显著性水平进行评估,并从完整模型开始向后消除,包括所有二次因子项。

[0148] MabSelect SuRe平衡等温线测量

[0149] 将MabSelect SuRe™树脂缓冲液交换到DI水中以产生~50%的浆液。将浆液加入ResiQuot中,用室内真空管干燥,并将20.8μL树脂塞分配到96深孔板中。在单独的96孔板中,产生具有100mM、250mM和500mM辛酸钠的0至10mg/mL的蛋白质溶液。测量每种溶液的蛋白质浓度,然后向每个树脂塞中加入1mL。在搅拌下将树脂-蛋白质混合物平衡过夜。通过直接过滤到UV 96孔板中将树脂移除,并测量最终浓度。吸附蛋白质浓度q用以下等式计算:

[0150] $$q = \frac{V_{液体}(c_0 - c_f)}{V_{树脂}}.$$

[0151] 结果和讨论

[0152] 本节中的结果表明,高浓度的辛酸钠(>100mM)在蛋白A色谱层析过程中比先前公开的基于辛酸钠的蛋白A洗涤缓冲液去除了显著更多的宿主细胞蛋白(HCP)。使用具有相对高HCP水平的几种mAb作为模型证实了这一点,并且通过统计实验设计证实了这一点;测试的mAb的CUB(蛋白A负荷)具有10^6至10^7ng/mg的HCP浓度。

[0153] 这项工作的主要目的是评估辛酸钠浓度和洗涤缓冲液的pH在蛋白A色谱步骤中对HCP清除率的影响。主要目标是双重的。第一个是了解在辛酸钠浓度和pH值的整个工作范围内对HCP的影响。使用范围界定设计来探索两个参数的全部范围(表3);最大辛酸钠浓度为1M,pH范围为7-9。第二个目标是优化辛酸钠浓度和pH值以进行HCP清除,同时保持可接受的

步骤产率。球形中心复合设计(CCD,表4)用于该优化。范围界定和CCD研究都使用mAb1作为模型mAb。这些初步研究的结果在其它mAb上进行了测试。范围和CCD的结果如下所示。

[0154] 表3:范围界定研究设计以探索蛋白A洗涤液中高达1M的辛酸钠浓度和7.0至9.0的pH。

[0155]

洗涤数	辛酸钠浓度(mM)	pH
1	0	7.0
2	250	7.5
3	500	8.0
4	750	8.5
5	1000	9.0

[0156] 表4:球形中心复合实验设计以优化蛋白A洗涤液中的辛酸钠浓度和pH.

[0157]

洗涤数	辛酸钠浓度(mM)	pH
1	150	8.0
2	250	7.0
3	250	8.5
4	500	8.7
5	500	8.0
6	500	7.3
7	750	8.5
8	750	7.5
9	850	8.0

[0158] 从CCD研究获得的结果显示在表5中。总体而言,蛋白A洗涤缓冲液的pH对HCP清除的影响最小。含有500mM或750mM辛酸钠的洗涤液在整个测试的pH范围内具有几乎相同的HCP水平。如方法部分中所述进行统计分析。简而言之,对每个响应(产量和HCP)拟合单独的模型,并且使用F检验针对5%显著性评估模型项。F-检验证实洗涤液pH对HCP浓度没有统计学显著影响。类似的分析也证实pH不是产率百分比的重要因素。

[0159] 表5:蛋白A洗涤溶液的辛酸钠浓度和pH的中心复合设计的结果(用mAb1测试)。

[0160]

辛酸钠浓度 (mM)	**pH**	**HCP (ng/mg)**	**%产率**
150	8.0	205.8	98.7
250	7.5	69.9	87.5
250	8.5	31.4	94.3
500	7.3	17.1	77.4
500	8.0	18.2	75.7
500	8.7	19.0	76.0
750	7.5	17.2	73.7
750	8.5	13.6	74.1
850	8.0	15.5	70.1

[0161] CCD结果的统计分析证实,对于HCP清除率和百分比产率,辛酸钠浓度都是一个重要因素-使用线性和二次项。当辛酸钠浓度从0增加到1M时,HCP浓度(ng/mg)降低了两个数量级(图1-百分比产率(三角形,▲)和HCP浓度(正方形,■))。然而,随着辛酸钠浓度增加超过250mM,产率从高于90%降至70%(图1)。大于250mM辛酸钠的步骤产率的这种大的降低可能是由于辛酸盐胶束的形成。通过实验确定蛋白A洗涤缓冲液中的辛酸临界胶束浓度(CMC)为340mM。当辛酸钠的浓度从250mM增加至500mM时,产率降低15%,HCP仅降低2.8%。这可表明游离形式的辛酸钠是去除HCP的活性形式,而CMC之上的任何浓度都显示收益递减,因为辛酸盐胶束导致产率损失。

[0162] 实施例2:产率损失和潜在缓解策略的研究

[0163] CMC之上百分比产率的降低表明,辛酸盐胶束-而不是游离形式的辛酸盐-可以降低蛋白A步骤的产率。为了确定产率损失的性质,对使用不同的辛酸钠洗涤液的蛋白A过程,在洗脱液、剥离物(strip)和洗涤级分中测量mAb浓度(图2)。该结果表明,高辛酸钠浓度下的产率损失是由于洗涤步骤中的解吸附。

[0164] 为了进一步表征高辛酸钠洗涤期间的产率损失,测量平衡结合等温线以确定高辛酸钠浓度下的mAb能力(capacity)损失(图3)。先前公开的含100mM辛酸钠的辛酸盐洗涤液,当用Langmuir等温线拟合时具有57g/L的最大结合能力。吸附等温线在250mM辛酸钠时相似,但在500mM辛酸钠时,Langmuir等温线拟合较差。该结果证实,高浓度的辛酸钠洗涤降低了蛋白A树脂的结合能力并导致产率损失。

[0165] 在确定产率损失的来源后,研究了降低产率损失的方法。研究的两种策略是减少洗涤体积和降低载荷比。在4、6和8个CV下测试250mM辛酸钠洗涤液。将洗涤长度从8个CV减少到4个CV仅使产率增加2%(表6),并且HCP浓度仅从31.0增加到35.8ng/mg。这表明高辛酸钠洗涤液可以达到可接受的HCP水平,且体积小于在初始范围界定和CCD研究中测试的体积,并且还表明较小的洗涤体积不能补偿高辛酸钠浓度导致降低的结合能力。

[0166] 表6:使用mAb1作为模型的不同体积的250mM辛酸钠洗涤液的HCP浓度和蛋白A步骤产率。

[0167]

洗涤体积 (CV)	HCP (ng/mg)	%产率
4	35.8	89.7
6	33.0	89.6
8	31.0	87.7

[0168] 还研究了在蛋白A捕获期间降低的载荷比对高浓度辛酸钠洗涤期间产率损失的缓解(表7)。当载荷比从30mg/ml降至10mg/ml时,对于250mM和500mM辛酸钠洗涤液,产率分别增加4.7%和7.7%。载荷比对蛋白A洗脱液中的HCP浓度影响最小。

[0169] 表7:使用mAb1作为模型,用250mM和500mM辛酸钠洗涤液的不同蛋白A载荷比的HCP浓度和蛋白A步骤产率。

[0170]

辛酸钠浓度 (mM)	载荷比 (g/L)	HCP	%产率

[0171]

		(ng/mg)	
250	10	42.3	95
250	15	38.1	92.8
250	20	46.3	92.3
250	25	41.9	91.8
250	30	40.2	90.2
500	10	24.5	88.5
500	15	23.4	86.9
500	20	20.2	85.5
500	25	18.6	84.8
500	30	16.9	80.8

[0172] 实施例3:用其它的mAb改善洗涤的性能

[0173] 仅使用mAb1作为模型产物完成前述蛋白A洗涤优化研究。CCD研究证实,pH不是HCP去除的重要因素。统计分析和随后的产率研究表明,辛酸钠浓度最理想可高达400mM。为了证实250mM辛酸钠洗涤液相对先前开发的100mM辛酸钠洗涤液改进了HCP去除,在该部分中研究了其它mAb。对于含有100或250mM辛酸钠的洗涤液,比较5种mAb的蛋白A洗脱液中的HCP浓度(图4)。一种mAb(mAb3)来自两个独立的上游过程:具有较高水平HCP的高细胞密度过程和与所研究的其他分子相当的标准过程。

[0174] 除了mAb2之外,当使用250mM辛酸钠洗涤液时,此处测试的所有mAb在蛋白A洗脱液中为小于100ng/mg。在大多数情况下,仅通过增加洗涤液中的辛酸钠浓度,HCP浓度就提高了大约一个数量级。另外,这些mAb在辛酸钠浓度升高的情况下具有可接受的步骤产率和产品质量。

[0175] 实施例4:向基于辛酸钠的蛋白A洗涤液添加精氨酸

[0176] 精氨酸-一种氨基酸-与作为脂肪酸的辛酸钠相比具有非常不同的物理和化学性质。假设这两种添加剂之间的结构差异可导致正交(orthogonal)HCP去除机制,即精氨酸和辛酸盐的混合物可比仅具有单一组分的洗涤液具有更好的HCP去除。完成以下研究以评估辛酸盐/精氨酸混合物的总HCP去除和特定HCP去除。

[0177] 辛酸盐/精氨酸的蛋白A洗涤缓冲液的总HCP清除率

[0178] 用mAb1和mAb2测试含有辛酸钠和精氨酸组合的蛋白A洗涤缓冲液。mAb2的结果显示在图5中。蛋白A洗涤缓冲液仅含有100mM辛酸钠或750mM精氨酸,导致HCP浓度在700和1300ng/mg之间。将辛酸钠浓度增加至250mM导致HCP清除率的大幅改善-与上文讨论的“高辛酸钠”结果一致。在pH 8.5下含有250mM辛酸钠的洗液在蛋白A洗脱液中产生273ng/mg HCP。向基于辛酸盐的蛋白A洗液中添加精氨酸进一步改善了HCP去除:在pH 7.5或8.5下,250mM辛酸钠与750mM精氨酸分别导致HCP浓度为209ng/mg和144ng/mg。

[0179] 用mAb1完成了类似的辛酸盐/精氨酸研究。mAb1来自两个独立的上游过程:“标准”补料分批生物反应器和高细胞密度过程。高细胞密度过程导致更高的产物滴度和HCP浓度。它作为“最坏情况”的进料材料被纳入本研究。结果如图6所示。

[0180] 总体而言,mAb1结果与图5中显示的mAb2结果相似。对于标准mAb1进料流和高密度材料,通过将辛酸钠从100mM增加至250mM,改善了HCP清除率。另外,500mM精氨酸比单独的

辛酸钠洗涤液具有更好的HCP清除率。然而，用辛酸钠和精氨酸洗涤-作为混合物或通过顺序洗涤施加-显示出相对于任一组分独立改善的HCP清除率。最佳性能是在pH 8.5下含有250mM辛酸钠和750mM精氨酸的洗涤液。对于高密度和标准mAb1，高辛酸钠和精氨酸的这种组合产生的蛋白A洗脱液分别为113ng/mg和67ng/mg。

[0181] 实施例5：去除PLBL2的辛酸盐/精氨酸蛋白A洗涤液

[0182] PLBL2是特异性HCP杂质，由于与产物分子的明显结合，在mAb5(一种IgG4)的下游加工过程中难以除去。先前已发现这种特定的HCP杂质在下游加工过程中与IgG4产物结合。在HCP ELISA分析期间，PLBL2也引起“稀释性非线性”。在mAb5的蛋白A步骤期间，测试含有高辛酸钠浓度和/或精氨酸的蛋白A洗涤液的PLBL2去除。

[0183] 洗涤液在辛酸钠浓度高达750mM、pH值为7.5至8.5、精氨酸浓度高达1M下进行测试。对于每个蛋白A洗涤试验，报告总PLBL2浓度(图7，使用PLBL2特异性ELISA测量)以及总HCP(图8)和步骤产率(图9)。

[0184] 对于不同的测试洗涤液，PLBL2浓度从接近1至600ng/mg变化。不含精氨酸且含少于100mM辛酸钠的洗涤液表现最差并且产生具有约600ng/mg PLBL2的蛋白A洗脱液。将辛酸钠浓度增加至250mM将PLBL2降低至～100ng/mg；辛酸钠浓度大于250mM继续使PLBL2降低至～50ng/mg，但也导致产率损失。总HCP也通常随着辛酸钠的增加而降低。

[0185] 含有精氨酸的蛋白A洗液在PLBL2清除方面是最成功的，并且它们也显示出良好的总HCP去除。不含辛酸钠的1000mM精氨酸产生约10ng/mg PLBL2和62ng/mg HCP。高浓度的精氨酸不会导致显著的产率损失。

[0186] 辛酸钠和精氨酸的组合是mAb5最有效的洗涤剂。具体地，250mM辛酸钠与1M精氨酸在pH 7.5或8.5下产生2-3ng/mg PLBL2和～20-30ng/mg HCP，同时保持～90％步骤产率。含有1M精氨酸和100mM辛酸钠的洗涤液也是成功的，但导致略高的PLBL2和HCP浓度。

[0187] 实施例6：用于组织蛋白酶L活性降低的辛酸盐/精氨酸洗涤液

[0188] 用mAb3测试含有辛酸钠和精氨酸的蛋白A洗液的组织蛋白酶L清除能力。组织蛋白酶L蛋白酶在CHO细胞培养期间产生，并且它可潜在地降解mAb3产物分子。已经证明，在蛋白A过程中，组织蛋白酶L不从mAb3中除去。测试含有100mM辛酸钠、250mM辛酸钠、100mM辛酸钠与1000mM精氨酸，以及100mM辛酸钠与750mM赖氨酸的洗涤液。

[0189] 对于该特定产品，含有250mM辛酸钠的洗涤液导致意外的蛋白A洗脱行为：低pH洗脱-通常在约2个柱体积中完成-延长至超过10个柱体积。另外，当测试250mM辛酸钠洗涤液时，mAb3蛋白A洗脱液具有非常高的聚集体(通过SEC测量)。使用高辛酸钠洗涤液测试的任何其他产品均未观察到这种行为。

[0190] 含有精氨酸或赖氨酸的蛋白A洗涤液不具有仅对250mM辛酸钠观察到的延长的洗脱行为。三种不同的洗涤液(100mM辛酸盐(“平台msss洗脱液”)；250mM辛酸盐，1M精氨酸(“cap/arg msss洗脱液”)；250mM辛酸盐，750mM赖氨酸(“cap/lys msss洗脱液”))在蛋白A洗脱液中测量的组织蛋白酶L活性见图10；表8中列出了蛋白A的洗脱体积。使用100mM辛酸钠、1000mM精氨酸的洗涤液测得的活性显著降低，随后的稳定性研究表明，与100mM辛酸钠洗涤液相比，使用该洗涤液制备的材料的片段化减少。添加750mM赖氨酸而不是精氨酸成功地降低了大的洗脱体积，但没有显著降低组织蛋白酶L的活性。辛酸钠和1000mM精氨酸的组合提供改善的组织蛋白酶L和总HCP清除率，同时保持合理的洗脱体积和可接受的产品质量

属性。

[0191] 表8:使用不同洗涤溶液的mAb3的蛋白A洗脱液体积。

[0192]

洗涤液	洗脱体积(CV)
100mM辛酸钠	1.73
250mM辛酸钠	9.89
250mM辛酸钠,剥离用于洗脱	5.41
250mM辛酸钠,90mM精氨酸	3.95
250mM辛酸钠,然后90mM精氨酸	9.75
250mM辛酸钠,750mM赖氨酸	1.95
250mM辛酸钠,1M精氨酸	1.59
100mM辛酸钠,1M精氨酸	1.49

[0193] 实施例7:去除HCP的辛酸盐/精氨酸蛋白A洗涤液

[0194] 用mAb3测试含有辛酸钠和精氨酸的蛋白A洗涤液的HCP清除能力。洗涤缓冲液浓度和所得HCP浓度列于下表9中。对于mAb3,将精氨酸/辛酸盐洗涤液与仅含辛酸盐洗涤液进行比较。

[0195] 150mM辛酸盐洗涤液提供比100mM辛酸盐洗涤液显著更高的HCP清除率。1.1M精氨酸和150mM辛酸盐的组合进一步将HCP清除率改善了显著的因子。在蛋白A步骤期间改善的HCP清除使得能够去除在仅用辛酸盐处理中所需的最终精制色谱步骤。

[0196] 表9

[0197]

辛酸盐(mM)	精氨酸(M)	HCP(ng/mg)
150	1.1	97.3
150	0	556.0
100	0	907.0

[0198] 实施例8:mAb3片段化的减少

[0199] 在纯化期间测试含有辛酸钠和精氨酸的洗涤液的mAb3蛋白A纯化的抗体片段化。产生的数据(图11-13)包括3批含有100mM辛酸盐洗涤液的洗涤缓冲液,和2批含有150M辛酸盐和1.1M精氨酸的洗涤缓冲液。

[0200] 图11显示了在整个下游过程中抗体片段化百分比(用SEC HPLC测量)。图12显示了该过程的HCP浓度。辛酸盐/精氨酸批次在该过程中没有显著的抗体片段形成,而仅含辛酸盐的批次在第三个精制步骤(辛酸盐/精氨酸洗涤液不需要)后具有显著的抗体片段生成。

[0201] 此外,比较了由两种方法(仅辛酸盐和辛酸盐+精氨酸)产生的原料药物物质的稳定性。来自辛酸盐+精氨酸过程的原料药物物质在25摄氏度下10天内未产生抗体片段化;来自仅辛酸盐过程的原料药物物质在25摄氏度下10天内产生显著的抗体片段化(图13)。

[0202] 由于组织蛋白酶L的清除率提高,洗涤缓冲液中辛酸盐和精氨酸的组合显著降低了整个下游过程中抗体片段化的产生。

[0203] 结论

[0204] 通过修改洗涤缓冲液以最小化HCP-mAb相互作用来优化蛋白A步骤中的HCP清除。

初步筛选研究得出结论,即蛋白A洗涤缓冲液的pH值(从7到9变化)不会显著影响HCP清除率或步骤产率。辛酸钠浓度对步骤产率和HCP去除都有很大影响。在非常高的辛酸钠浓度(高于CMC)下,HCP清除率是最佳的,但步骤产率非常低。该研究发现,与先前使用的100mM辛酸钠洗涤液相比,使用含有250mM辛酸钠的蛋白A洗涤液提供了HCP清除的较大改善,同时保持了可接受的步骤产率。该研究还发现,与仅含有辛酸钠的洗涤液相比,含有250mM辛酸钠和500-1000mM精氨酸的组合的蛋白A洗涤液具有更高的HCP清除率。发现含有辛酸钠和精氨酸的蛋白A洗涤液成功地从mAb3和mAb5中分别去除了组织蛋白酶L和PLBL2-两种特别难以除去的HCP杂质。

[0205] 应该理解,这里描述的实施方案可以应用于本发明的所有方面。此外,本说明书中引用的所有出版物,包括但不限于专利和专利申请,均通过引用并入本发明,如同完全阐述一样。

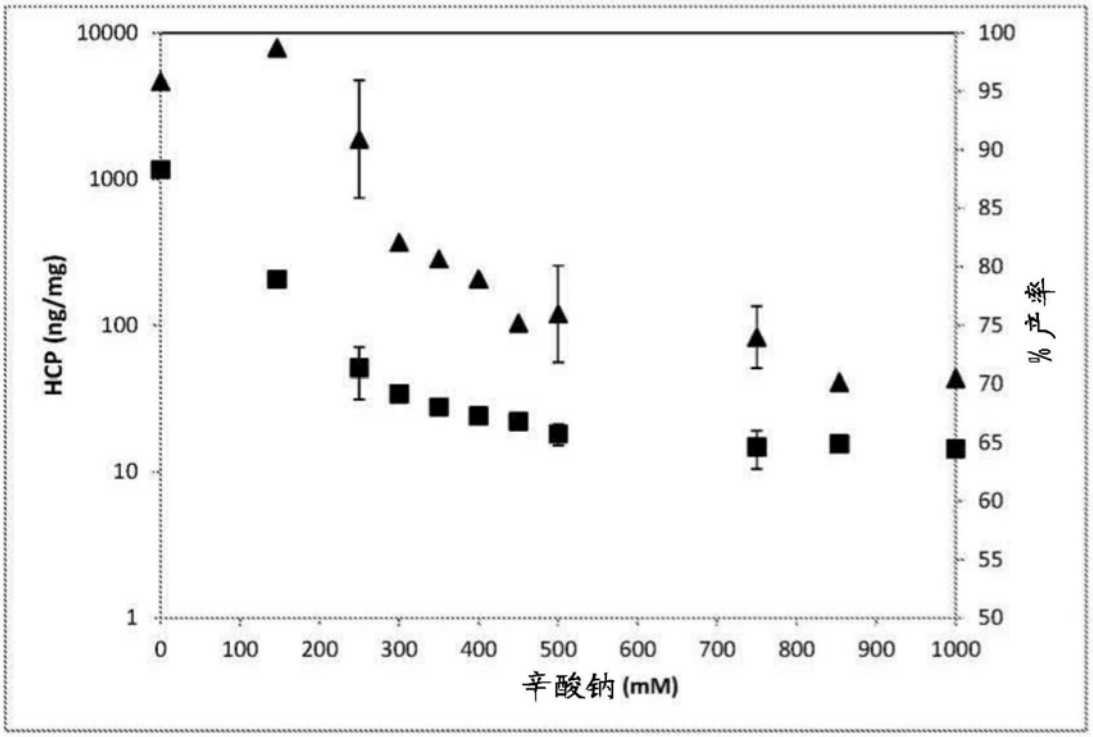

10000
1000
100
10
1
HCP (ng/mg)
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
% 产率
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
辛酸钠 (mM)

图1

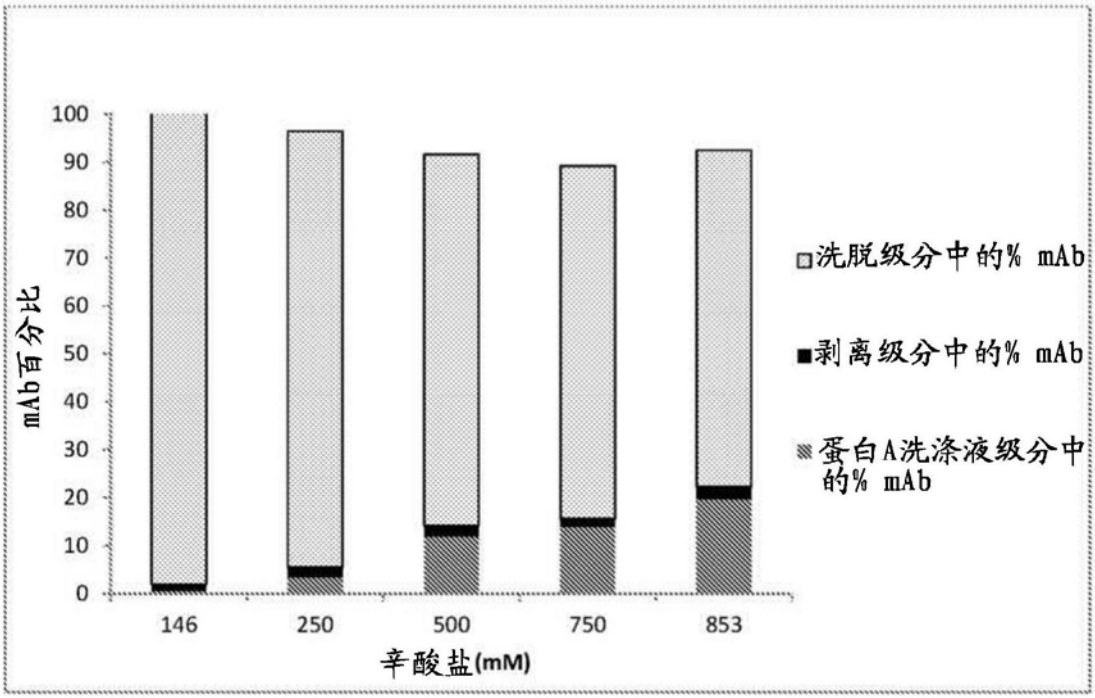

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
mAb百分比
146
250
500
750
853
辛酸盐(mM)
洗脱级分中的% mAb
剥离级分中的% mAb
蛋白A洗涤液级分中的% mAb

图2

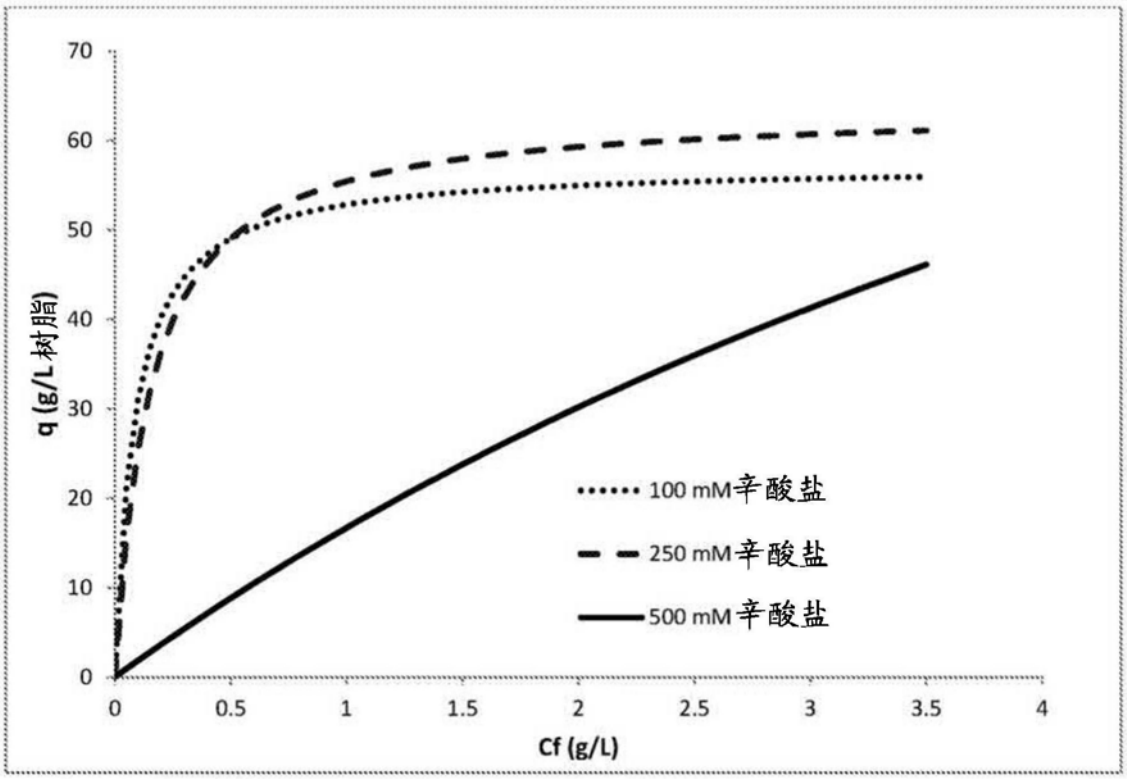

70
60
50
40
30
20
10
0
q (g/L 树脂)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
Cf (g/L)
100 mM辛酸盐
250 mM辛酸盐
500 mM辛酸盐

图3

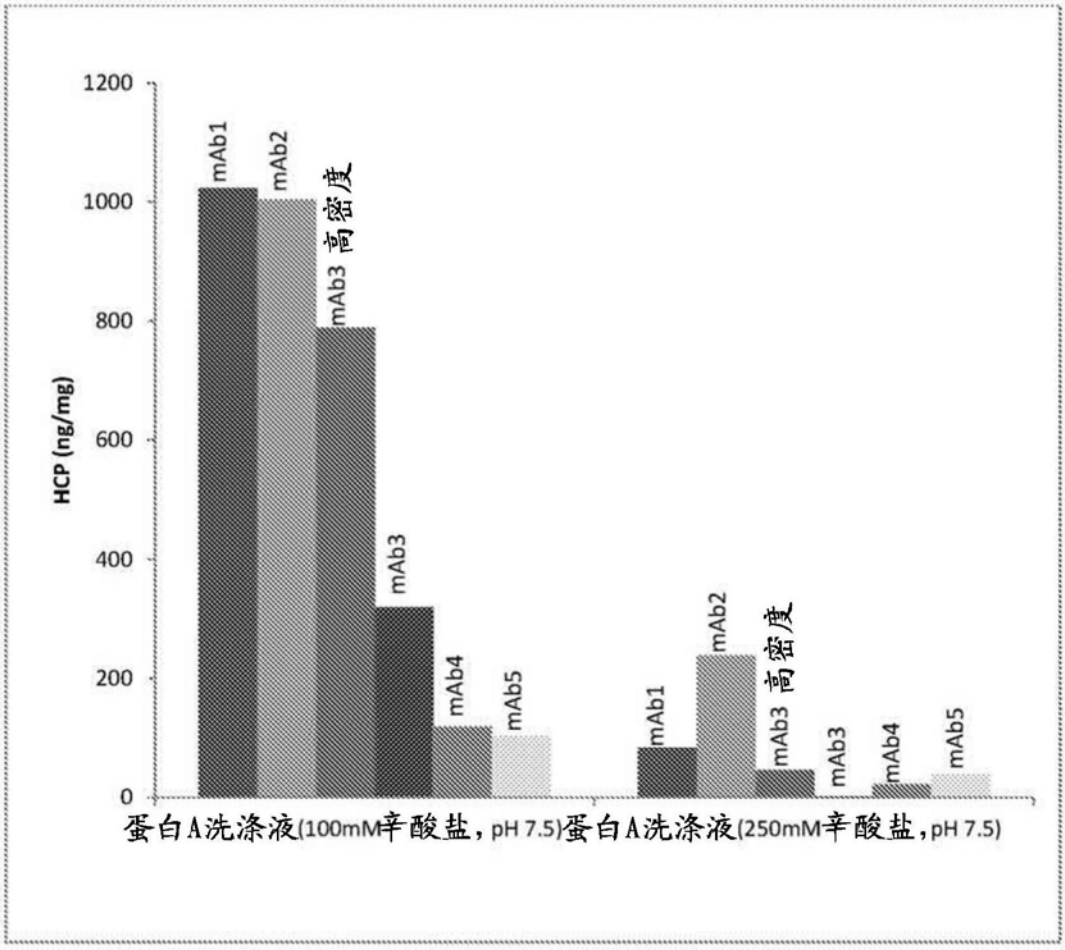

1200
1000
800
600
400
200
0
HCP (ng/mg)
mAb1
mAb2
mAb3 高密度
mAb3
mAb4
mAb5
mAb1
mAb2
mAb3 高密度
mAb3
mAb4
mAb5
蛋白A洗涤液(100mM辛酸盐，pH 7.5)
蛋白A洗涤液(250mM辛酸盐，pH 7.5)

图4

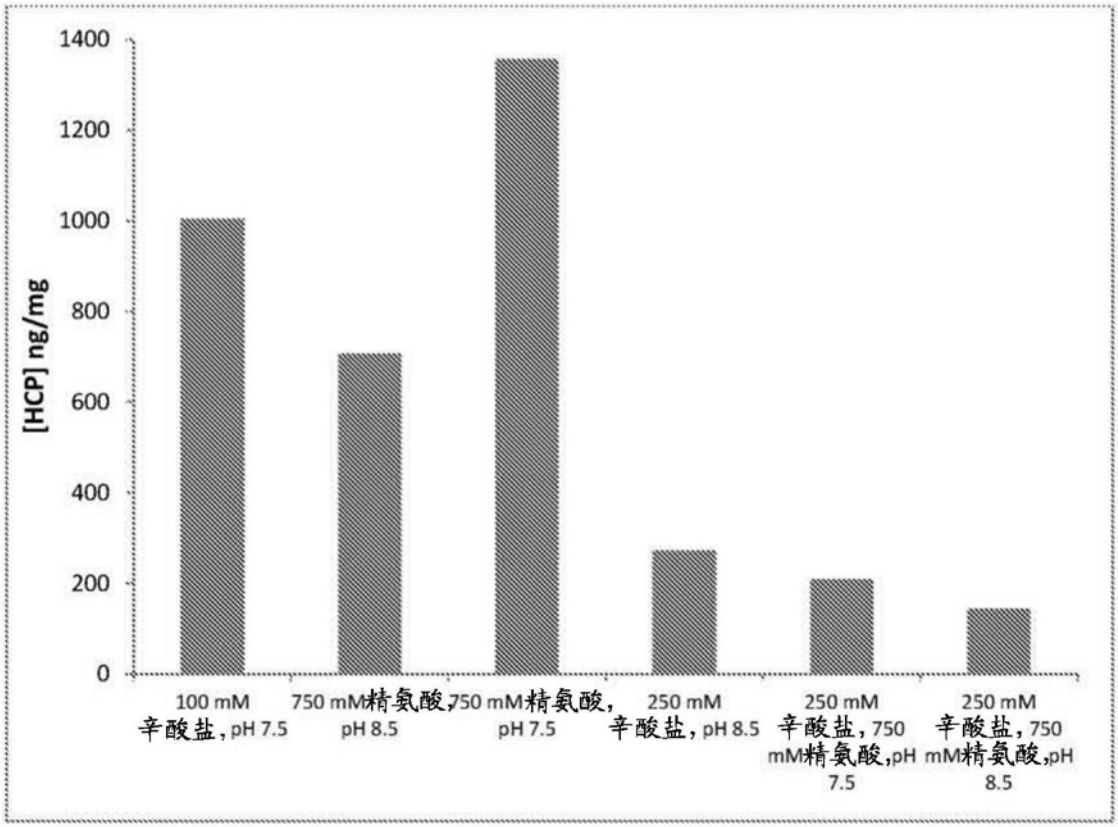

[HCP] ng/mg
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
100 mM 辛酸盐，pH 7.5
750 mM精氨酸，pH 8.5
750 mM精氨酸，pH 7.5
250 mM 辛酸盐，pH 8.5
250 mM 辛酸盐，750 mM精氨酸，pH 7.5
250 mM 辛酸盐，750 mM精氨酸，pH 8.5

图5

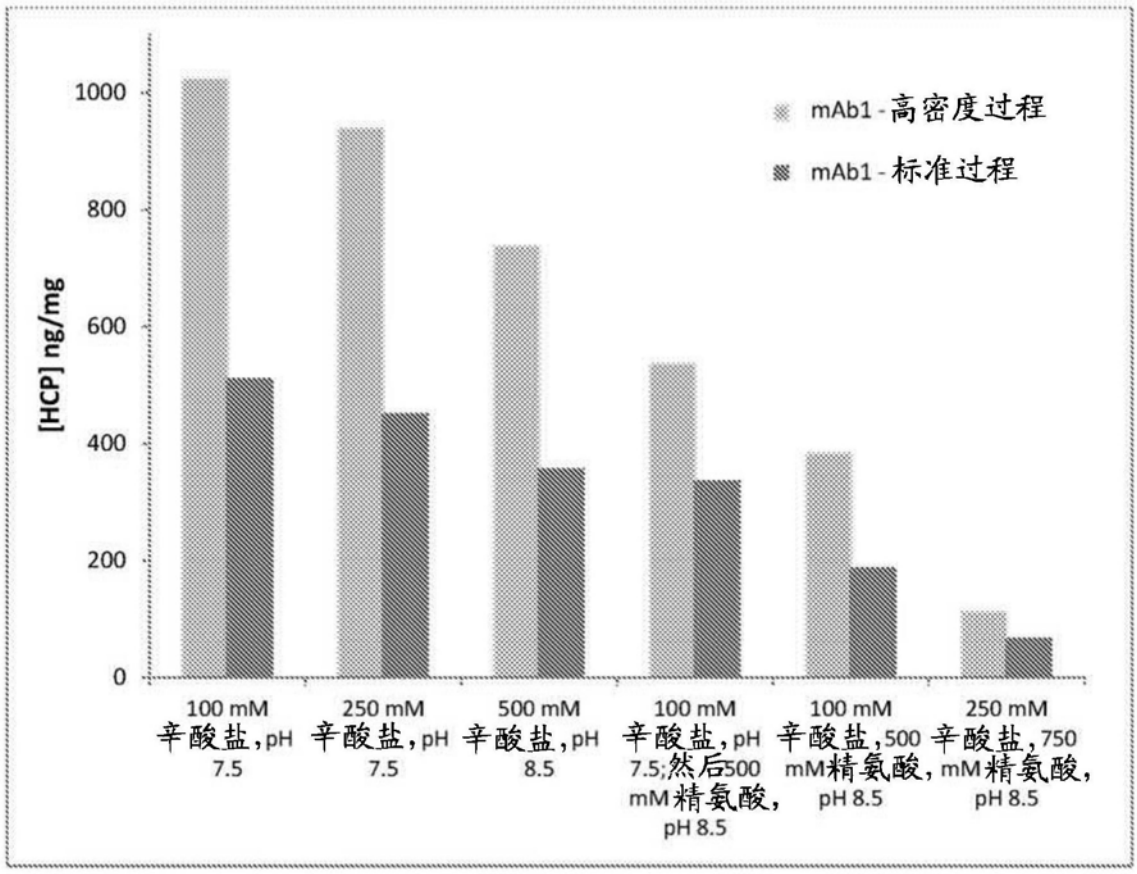

[HCP] ng/mg
1000
800
600
400
200
0
mAb1 - 高密度过程
mAb1 - 标准过程
100 mM 辛酸盐，pH 7.5
250 mM 辛酸盐，pH 7.5
500 mM 辛酸盐，pH 8.5
100 mM 辛酸盐，pH 7.5;然后500 mM 精氨酸，pH 8.5
100 mM 辛酸盐，500 mM 精氨酸，pH 8.5
250 mM 辛酸盐，750 mM 精氨酸，pH 8.5

图6

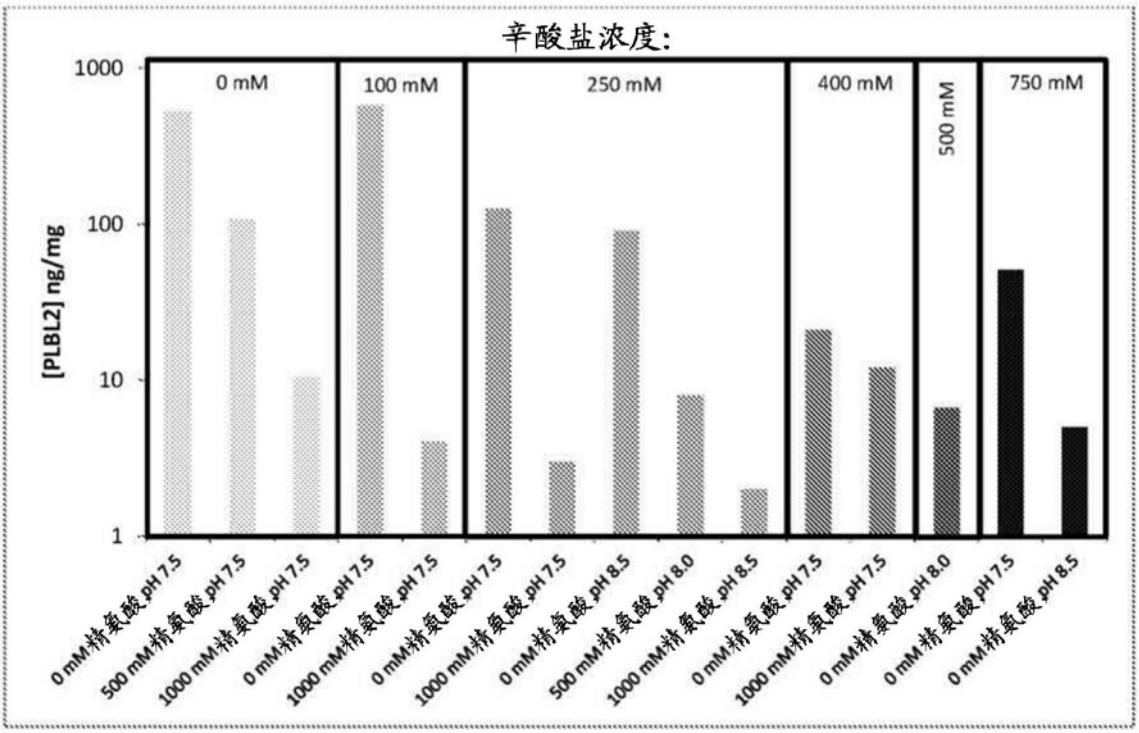

辛酸盐浓度:
0 mM
100 mM
250 mM
400 mM
500 mM
750 mM
[PLBL2] ng/mg
1000
100
10
1
0 mM精氨酸_pH7.5
500 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.5
500 mM精氨酸_pH8.0
1000 mM精氨酸_pH8.5
0 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.0
0 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.5

图7

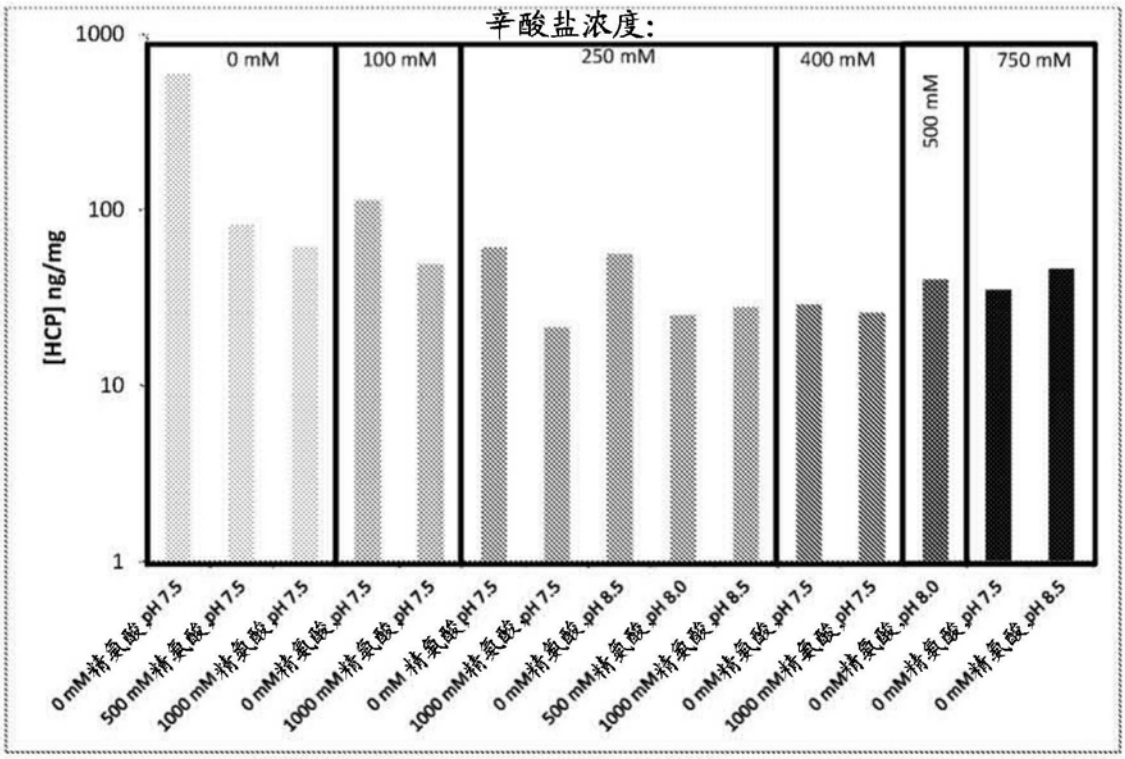

辛酸盐浓度:
0 mM
100 mM
250 mM
400 mM
500 mM
750 mM
[HCP] ng/mg
1000
100
10
1
0 mM精氨酸_pH7.5
500 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM 精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.5
500 mM精氨酸_pH8.0
1000 mM精氨酸_pH8.5
0 mM精氨酸_pH7.5
1000 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.0
0 mM精氨酸_pH7.5
0 mM精氨酸_pH8.5

图8

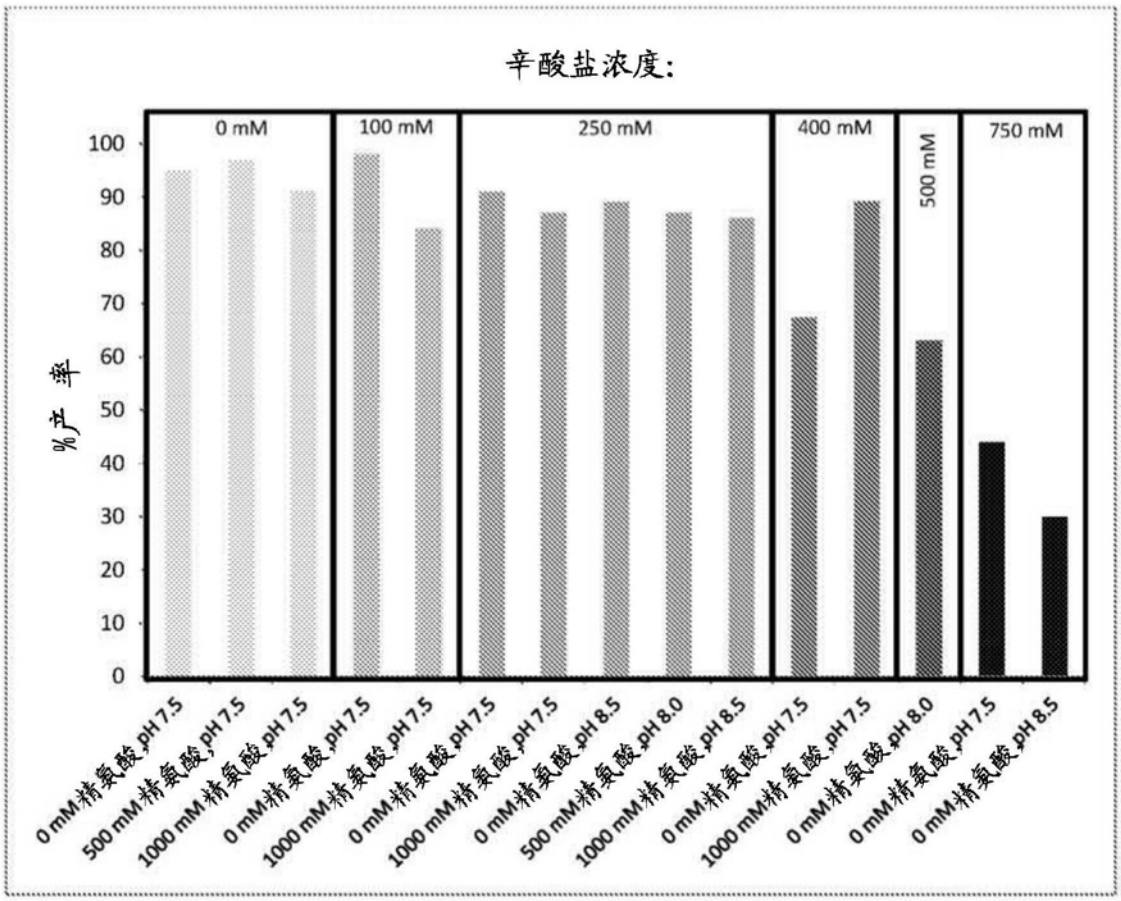

辛酸盐浓度:
0 mM
100 mM
250 mM
400 mM
500 mM
750 mM
%产率
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 mM精氨酸,pH 7.5
500 mM精氨酸,pH 7.5
1000 mM精氨酸,pH 7.5
0 mM精氨酸,pH 7.5
1000 mM精氨酸,pH 7.5
0 mM精氨酸,pH 7.5
1000 mM精氨酸,pH 7.5
0 mM精氨酸,pH 8.5
500 mM精氨酸,pH 8.0
1000 mM精氨酸,pH 8.5
0 mM精氨酸,pH 7.5
1000 mM精氨酸,pH 7.5
0 mM精氨酸,pH 8.0
0 mM精氨酸,pH 7.5
0 mM精氨酸,pH 8.5

图9

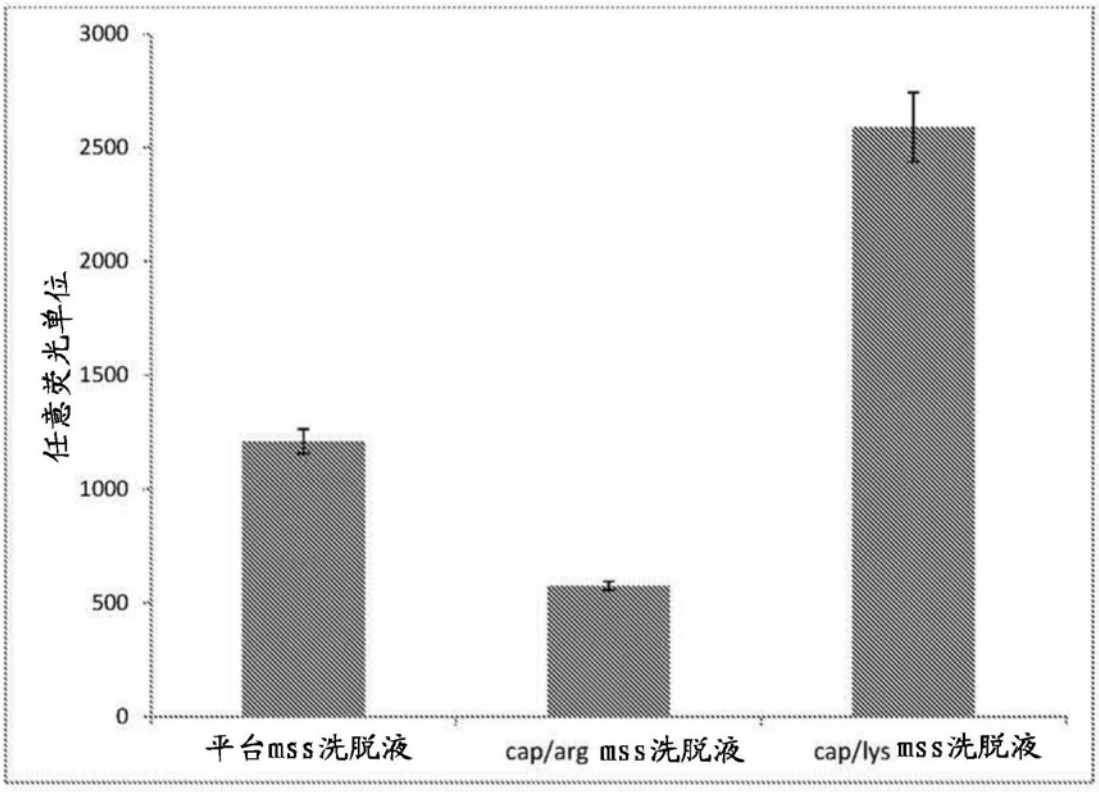

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
任意荧光单位
平台mss洗脱液
cap/arg mss洗脱液
cap/lys mss洗脱液

图10

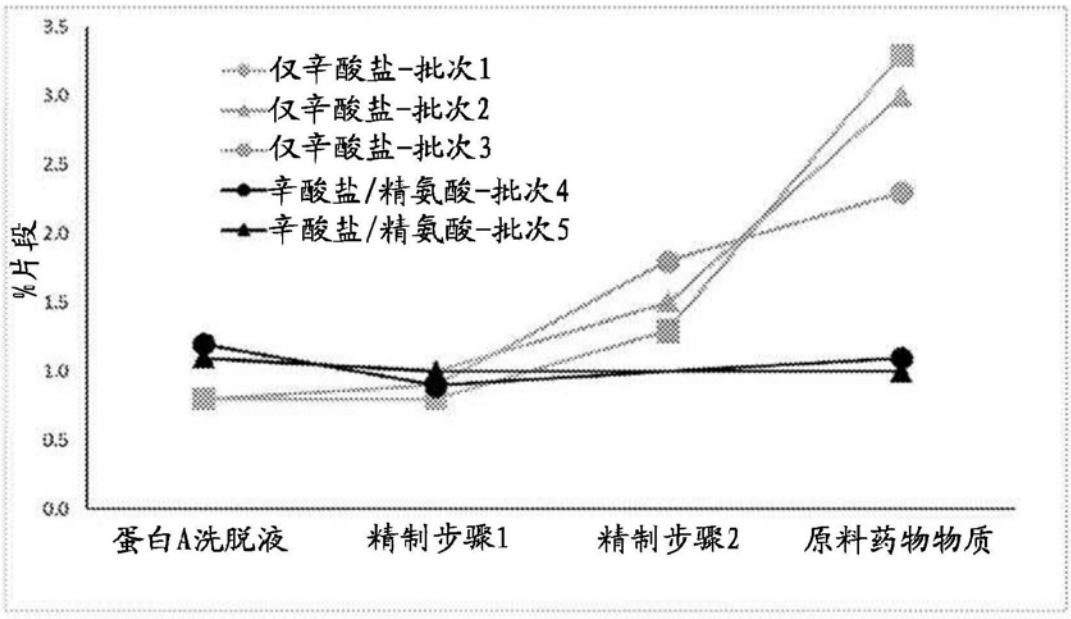

3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
%片段
仅辛酸盐-批次1
仅辛酸盐-批次2
仅辛酸盐-批次3
辛酸盐/精氨酸-批次4
辛酸盐/精氨酸-批次5
蛋白A洗脱液
精制步骤1
精制步骤2
原料药物物质

图11

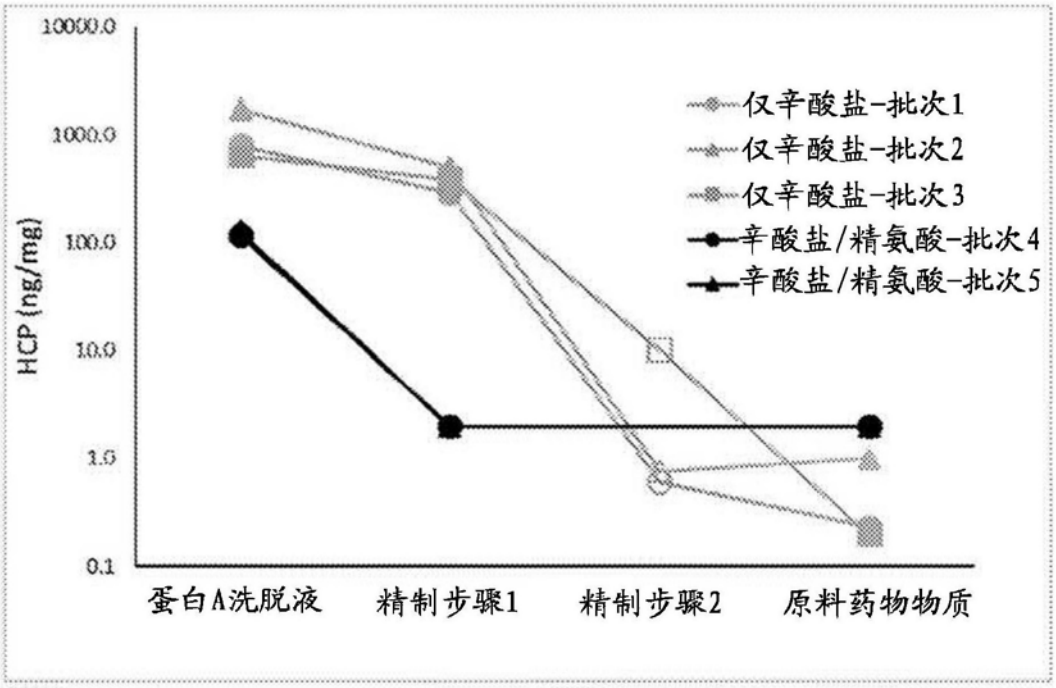

10000.0
1000.0
100.0
10.0
1.0
0.1
HCP (ng/mg)
仅辛酸盐-批次1
仅辛酸盐-批次2
仅辛酸盐-批次3
辛酸盐/精氨酸-批次4
辛酸盐/精氨酸-批次5
蛋白A洗脱液
精制步骤1
精制步骤2
原料药物物质

图12

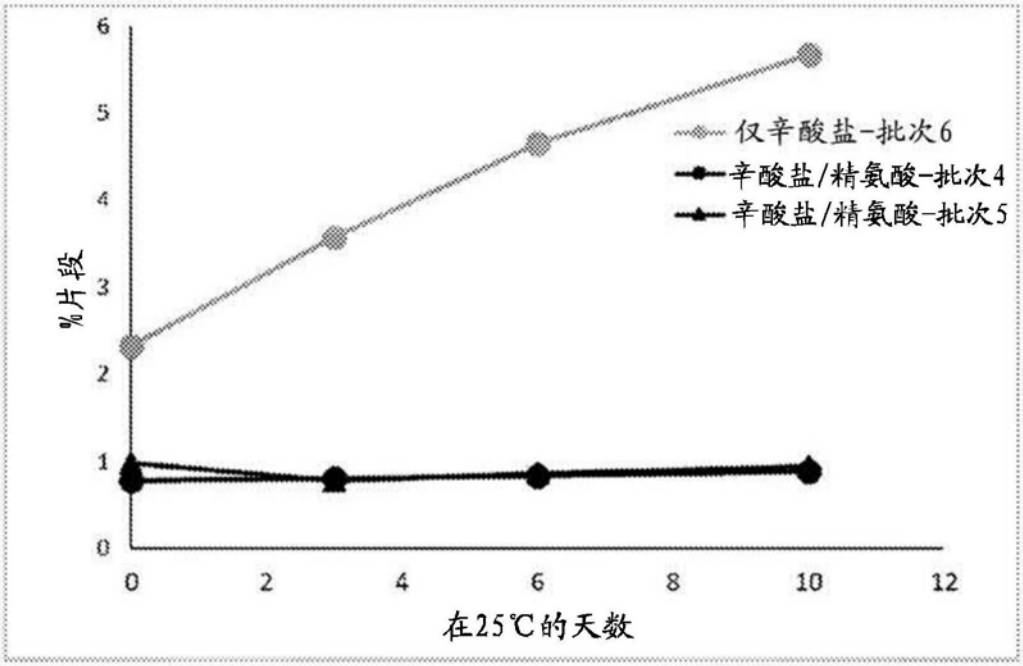

6
5
4
3
2
1
0
%片段
仅辛酸盐-批次6
辛酸盐/精氨酸-批次4
辛酸盐/精氨酸-批次5
0
2
4
6
8
10
12
在25℃的天数

图13