



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101874207 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 27

(21) 申请号 200880117516. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 11. 20

G01N 33/68 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

PA200701664 2007. 11. 22 DK

PA200701687 2007. 11. 28 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2008/050277 2008. 11. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/065414 EN 2009. 05. 28

(71) 申请人 西福根有限公司

地址 丹麦灵比

(72) 发明人 朗·K·拉斯马森 托本·P·弗兰森

安德斯·恩斯特龙 厄兰·霍姆伯格

皮亚·珀森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于表征重组多克隆蛋白质的方法

(57) 摘要

本发明系提供表征平台,其可用来评估在生产期间,由多克隆细胞系产生之不同抗体的量,以及存在于多克隆产物中之抗体的批次间一致性。结构的表征平台是基于移除重链并经由层析分离技术分离剩下的轻链,接着对完整的轻链种类进行质谱分析。

1. 一种用于表征在重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的方法,该方法包括下列步骤:

- a) 制造并纯化重组多克隆抗体组合物;
- b) 还原连接重和完整轻链的半胱氨酸-桥;
- c) 分离重链与完整轻链;
- d) 使该完整轻链接受至少一个层析分析,其系根据物-化特性分离蛋白质;
- e) 使来自步骤(d)的该经分离之完整轻链接受质谱;及
- f) 分析在步骤(e)中获得的数据,以表征在该重组多克隆抗体组合物中之完整轻链种类。

2. 如权利要求第1项之方法,其中该完整轻链包含整个轻链氨基酸序列。

3. 如权利要求第1或2项之方法,其中该完整轻链具有谷氨酰胺以外的N-端氨基酸残基。

4. 如权利要求第1至3项中任一项之方法,其中该层析分析是基于尺寸以外的至少一个物-化特性。

5. 如权利要求第4项之方法,其包括基于至少一个物-化特性的个别层析分析,该物-化特性系选自由净电荷、疏水性、等电点、和亲和力所组成之群组。

6. 如权利要求第5项之方法,其中该个别层析分析是基于净电荷。

7. 如权利要求第1至6项中任一项之方法,其中以多维层析进行该层析分析。

8. 如权利要求第1至7项中任一项之方法,其中该层析分析是或包括高分辨率液相层析。

9. 如权利要求第1至8项中任一项之方法,其中该多克隆抗体组合物是细胞培养物级分,该细胞培养物级分包含该培养物之细胞。

10. 如权利要求第1至9项中任一项之方法,其中步骤(a)涉及从一或多个细胞培养物上清液来制备多克隆抗体组合物。

11. 如权利要求第1至10项中任一项之方法,其中在该重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的表征包括判定在该重组多克隆抗体组合物中有或无该轻链种类。

12. 如权利要求第1至11项中任一项之方法,其中在该重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的表征包括判定该轻链种类在该重组多克隆抗体组合物中的相对比例。

13. 如权利要求第1至12项中任一项之方法,其中步骤(f)包括比较在步骤(e)中获得的数据与自至少一个更进一步之分析技术获得的数据,该更进一步之分析技术系选自由更进一步之蛋白质表征技术和遗传技术所组成之群组。

14. 如权利要求第13项之方法,其中该至少一个更进一步之分析技术是编码该轻链之多核苷酸的遗传分析。

15. 如权利要求第13或14项之方法,其中该遗传分析系选自RFLP、T-RFLP、微阵列分析、定量PCR和核酸测序。

16. 如权利要求第13至15项中任一项之方法,其中该更进一步之表征技术为蛋白质表征技术,其系选自N-端测序和利用特异性检测子分子(如抗-独特型抗体或抗-独特型肽)之复杂同源蛋白质混合物的表征。

17. 一种检测在二或更多个重组多克隆抗体组合物中在完整轻链族群之间变异的方

法,其包括对该二或更多个重组多克隆抗体组合物的每一个进行如权利要求第 1 至 16 项中任一项之方法,并判定在该二或更多个重组多克隆抗体组合物中在完整轻链族群之间的任何变异。

18. 如权利要求第 17 项之方法,其中该二或更多个重组多克隆抗体组合物是在培养期间的不同时间点,自单一多克隆细胞培养物获得。

19. 如权利要求第 17 项之方法,其中该二或更多个重组多克隆抗体组合物是在特定的时间点,自不同多克隆细胞培养物获得。

用于表征重组多克隆蛋白质的方法

【发明领域】

[0001] 本发明系关于用于结构表征在重组多克隆抗体组合物中之不同轻链种类族群的方法。该方法可用于定量和定性分析,并可用于,例如分析批次间一致性,以及评估在制造行程期间的组合物稳定性,并判定给定一批是否满足某些预先定义的释放规格。

【发明背景】

[0003] WO 2006/007853 揭示了表征包含重组多克隆抗体之样品的程序。该方法涉及消化抗体链,以释放出标志肽,其为每个特定蛋白质种类所特有的(所谓的'标志肽'法)。

[0004] 预防或治疗用途之重组多克隆蛋白质的工业生产之先决条件为在培养和下游加工的期间内维持蛋白质多样性。因此,能够在任何想要的时间点,并在任何相关样品中,监视和测量产生多克隆蛋白质之多克隆细胞系的克隆多样性,以及在多克隆蛋白质中之个别蛋白质的相对呈现是重要的,因此允许分析表达系统在单一行程中的稳定性,以及终产物的批次间变异。

[0005] 必须分析在由个别多克隆工作细胞库产生的不同批药物物质中的批次间一致性,以确保特定一批是在预先定义的释放规格中。这类分析会获益于能够判定个别蛋白质在蛋白质之多克隆混合物中之相对比例的方法。

[0006] 在 WO 2006/007853 中描述的标志肽法,提供了鉴定和表征借着酶促消化来产制的独特之疏水性可变区衍生肽的 LC-MS(液相层析-质谱)法,其允许鉴定在重组多克隆抗体中的特定抗体种类。

[0007] Adamczyk 等人(Rapid Communications in Mass Spectrometry 14, 49-51(2000))描述了借着纯化动物-衍生之(即非-重组的)多克隆抗体,还原在轻和重链之间的二硫键,并对重和轻链两者进行 LC-MS,分析多克隆抗体,以提供血清-衍生之多克隆抗体的轮廓。

[0008] Wan 等人(J. of Chromatography A 913, 437-446(2001))描述对在 CHO 细胞中产生之重组单克隆抗体使用 LC-MS,以定量直接来自细胞培养物的抗体糖型(glycoform)。将来自细胞培养物的重组抗体样品还原,并直接注射到 HPLC 系统内,其与质谱仪连接。

[0009] 在 WO 2006/007853 中提供更多的发明背景。

【发明概述】

[0011] 本发明提供在重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的表征方法,该方法包括下列步骤:

[0012] a) 制造并纯化重组多克隆抗体组合物;

[0013] b) 还原连接重和完整轻链的半胱氨酸-桥;

[0014] c) 分离重链和完整轻链;

[0015] d) 使该完整轻链接受至少一个层析分析,其系根据物-化特性分离蛋白质;

[0016] e) 使来自步骤(d)之经分离完整轻链接受质谱;及

[0017] f) 分析在步骤(e)中获得的数据,以表征在该重组多克隆抗体组合物中之完整轻链种类。

[0018] 为了降低该方法之复杂性,并改良从经分离之完整轻链中获得的数据组,我们已经发现必需分离重链与轻链。我们认为这可能是因为重链之物-化特性中的高度异质性,其干扰轻链的表征。而且,我们意外地发现当使用完整轻链时,我们获得对在重组多克隆抗体中轻链抗体之组成更精确的定量。与标志肽法相比较,更进一步的优点为将程序简化成较少的步骤,使其更稳健且更方便使用。

[0019] 欲表征之完整轻链蛋白质,典型地衍生自己知的遗传序列,即用来创造多克隆抗体之序列为已知的。因此,步骤(f)典型地涉及比较在步骤(e)中获得之数据与遗传数据,如可从遗传序列(或在本文中描述之其它遗传分析)来判定每个完整轻链的推论分子量,或步骤(f)涉及比较在步骤(e)中获得之数据与自经分离轻链种类之分子量判定获得的数据。可借着以单克隆抗体之方式表达该抗体,分离轻和重链,并使用质谱判定该轻链之分子量,获得经分离之轻链种类的分子量。比较在步骤(e)中获得之数据与来自分子量判定之数据,会考虑影响分子量的翻译后修饰。

[0020] 虽然本发明仅关于轻链的分析,最后的结果可能涉及测定完整抗体在组合物中的量及/或相对比例,因为在轻链和重链之间总是存在1:1之比例。有可能估计每个抗体种类的实际量(按重量计),因为事先已从其编码序列中得知与任何给定轻链关联之重链的结构。这亦可借着使用,例如质谱,测量每个经分离重链的分子量来进行,以便考虑翻译后修饰(特别是糖基化)。

[0021] 本发明亦提供检测在二或更多个重组多克隆抗体组合物中,在完整轻链族群之间变异的方法,包括对二或更多个重组多克隆抗体组合物的每一个进行上文用于表征在重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的方法,并判定在该二或更多个重组多克隆抗体组合物中,在完整轻链族群之间的任何变异。

[0022] 【附图简述】

[0023] 图1. 经还原和经烷基化 Sym001 之 SEC(尺寸排阻层析)的典型层析谱。HC = 重链, LC = 轻链。

[0024] 图2. Sym001 轻链的典型 LC-MS 层析谱。在上方显示总离子计数(TIC)迹,并在下方显示在214nm处记录的UV迹。

[0025] 图3. Sym001 轻链的典型 UV 层析谱,连同个别抗体的停留时间。

[0026] 图4. Sym001 轻链的 TIC(上方),连同 RhD159 之经萃取离子层析谱(XIC)(下方)。

[0027] 图5. RhD159 的 XIC(上方),连同相对应之 m/z 光谱。

[0028] 图6. 在图5中出示之 m/z 光谱的放大(上方),连同相对应之 XIC(下方)。

[0029] 图7. 注射不同量的 Sym001 WS-1LC,克隆的线性(n = 3)。

[0030] 图8. 两批不同 Sym001 的分析(n = 3)。

[0031] 【发明详述】

[0032] 定义

[0033] 术语“抗-独特型抗体”意指全长抗体或其片段(例如 Fv、scFv、Fab、Fab' 或 F(ab)₂),其特异性地与多克隆蛋白质之个别成员的变异部分结合。优选地,本发明之抗-独特型抗体特异性地与多克隆抗体或多克隆 TcR 之个别成员的变异部分结合。该抗-独特型抗体特异性优选地针对多克隆抗体或多克隆 T 细胞受体之个别成员的抗原特异性-部分,所谓的 V-区。然而,亦可显示对个别成员之限定亚-族群,例如在混合物中呈现之特定 VH

基因家族的特异性。

[0034] 术语“抗-独特型肽”意指特异性的肽-配体,其能够特异性地结合并因此鉴定在同源蛋白质之混合物内的个别蛋白质成员。优选地,本发明之抗-独特型肽特异性地与多克隆抗体或多克隆 TcR 的个别成员结合。本发明之抗-独特型肽优选地针对个别抗体或个别 T 细胞受体之序列的抗原-特异性部分。然而,抗-独特型肽亦可显示对个别成员之限定亚-族群的特异性。

[0035] 术语“克隆多样性”或“多克隆”意指多克隆蛋白质、编码其之核酸序列,或生产其之多克隆细胞系的变异性或多样性。变异性之特征在于在多克隆蛋白质之个别成员之氨基酸序列上的差异,或在编码序列文库之核酸序列上的差异。关于多克隆细胞系,可借着在该细胞系内呈现之核酸序列的变异性来评估克隆多样性,例如像是以单一位点整合到个别细胞之基因组内。然而,亦可根据在细胞系内,在细胞表面上呈现之氨基酸序列的变异性来评估。

[0036] 术语“表位”意指在抗原性分子中,T-细胞受体或抗体会与之结合的部分。抗原或抗原性分子通常会同时存在数个或甚至许多表位。

[0037] 术语“抗体”描述血清的功能性组份,且经常以分子之集合(抗体或免疫球蛋白、片段等等)或以单一分子(抗体分子或免疫球蛋白分子)提及。抗体分子能够与特定的表位(抗原或抗原性表位)结合或反应,其可转而导致诱导免疫学效应物机制。通常将个别抗体分子视为单特异性的,而抗体分子之组合物可能是单克隆的(即由相同的抗体分子组成)或多克隆的(即由与在相同抗原上或在可区别之不同抗原上相同或不同的表位反应之不同抗体分子组成)。可将构成多克隆抗体之可区别且不同的抗体分子称为“成员”。每个抗体分子均具有独特的结构,使其能够特异性地与其相对应之抗原结合,且所有天然的抗体分子均具有相同的全面性基本结构,为两个相同的轻链和两个相同的重链。

[0038] 术语“免疫球蛋白”普遍地用来当作在血液或血清中找到的抗体混合物之集体称呼。因此,经常将血清-衍生之多克隆抗体称为免疫球蛋白或 γ 球蛋白。然而,“免疫球蛋白”亦可用来称呼衍生自其它来源的抗体混合物,例如重组的免疫球蛋白。

[0039] 当在本文中使用术语“个别克隆”时,代表表达特定蛋白质(例如单克隆抗体)之细胞的同基因族群。可借着例如,以想要之核酸转染宿主细胞,接着选择阳性转染子,而获得这类个别克隆,可扩大单一克隆,或可集合若干单一克隆并扩大之。可借着混合表达多克隆蛋白质之不同个别成员的个别克隆,产制多克隆细胞系。

[0040] 术语“个别成员”或“不同成员”代表包含不同、但同源之蛋白质分子(如多克隆蛋白质)的蛋白质组合物之蛋白质分子,其中该个别蛋白质分子与该组合物之其它分子是同源的,但亦含有一或多段多肽序列,其特征为在该多克隆蛋白质的个别成员之间,在氨基酸序列上的差异,亦称为可变区。例如,在由抗体 Ab1 到 Ab50 组成的多克隆抗体中,会将所有具有 Ab1 序列的蛋白质视为该多克隆抗体之个别成员,且 Ab1 可能与 Ab2 蛋白质在例如 CDR3 区中有差异。个别成员之亚-族群,例如可由属于 Ab1、Ab12 和 Ab33 之抗体构成。

[0041] 术语“多克隆抗体”描述不同抗体分子的组合物,其能够与在相同或在不同抗原上之数个不同的特定抗原性表位结合或反应。亦可将多克隆抗体视为“单克隆抗体之鸡尾酒”。多克隆抗体的变异性位于构成该多克隆抗体之个别抗体所谓的可变区中,特别是在互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 中。可借着本发明之方法表征的多克隆抗体,可以是任何来源

的,例如嵌合的、人源化的或完全人的。

[0042] 可互换使用术语“多克隆制造性细胞系”、“多克隆细胞系”、“多克隆主要细胞库(pMCB)”和“多克隆工作细胞库(pWCB)”,并意指以感兴趣之变体核酸序列文库转染的表达蛋白质之细胞族群。一起构成重组多克隆制造性细胞系的个别细胞,可仅携带感兴趣之不同核酸序列的一个拷贝,编码感兴趣之重组多克隆蛋白质的一个成员,其中优选地将每个拷贝整合到每个细胞之基因组的相同位点内。或者,每个个别细胞可携带不同核酸序列(其编码重组多克隆蛋白质之一成员)的多个拷贝。可构成这类制造性细胞系的细胞,可以是例如细菌、真菌、真核细胞,如酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞,尤其是永生的哺乳动物细胞系,如 CHO 细胞、COS 细胞、BHK 细胞、骨髓瘤细胞(例如 Sp2/0 细胞、NS0)、NIH 3T3、YB2/0 和永生化的人类细胞,如 HeLa 细胞、HEK 293 细胞或 PER.C6。

[0043] 当在本文中使用时,术语“多克隆蛋白质”意指包含不同、但同源之蛋白质分子的蛋白质组合物,优选地选自免疫球蛋白超家族。甚至更优选地是同源蛋白质分子,其为抗体或 T 细胞受体(TcR),特别是抗体。因此,每个蛋白质分子与该组合物之其它分子都是同源的,但亦含有至少一段可变的肽序列,其特征在于在个别成员之间在氨基酸序列上的差异,亦称为多克隆蛋白质之不同变体成员。这类多克隆蛋白质的已知实例包括抗体、T 细胞受体 and B 细胞受体。多克隆蛋白质可由限定亚组的蛋白质分子组成,已经借着共同的特征来限定其等,如对想要的靶物共享结合活性,例如在针对想要靶抗原之多克隆抗体的情况下。重组多克隆蛋白质通常由这类限定亚组的分子构成,其中每个成员的序列是已知的。与血清-衍生之免疫球蛋白不同,重组多克隆蛋白质正常不会含有显著比例的非-靶物-特异性蛋白质。

[0044] 术语“蛋白质”意指任何的氨基酸链,不管长度或翻译后修饰。蛋白质可以单体或多聚体存在,包含二或更多个经组装的肽链、蛋白质片段、多肽、寡肽或肽。

[0045] 术语“独特的标志肽”,描述自多克隆蛋白质之个别成员之可变区起源的一些肽。优选地,借着蛋白酶处理或其它蛋白质断裂方法产生该肽,并可明白地指派该肽为多克隆蛋白质之单一个别成员,便称之为独特的标志肽。

[0046] 术语“重组多克隆抗体”意指使用重组技术制造之抗体的集合。在本发明之前后文中,若其编码序列是已知的,即亦若从杂交瘤或永生化之 B- 细胞中表达它,便认为该抗体是重组的。然而,本发明显然特别针对重组多克隆抗体组合物的表征,其中使用正常用于重组抗体之商业生产的细胞系来表达抗体,例如上文提及的人类或其它哺乳动物细胞系之一。在本发明之前后文中,术语“重组多克隆蛋白质”包括“重组多克隆抗体”。

[0047] 根据本发明之重组多克隆抗体,优选地包含至少两个不同抗体的族群,其中至少轻链是不同的。

[0048] 所有的免疫球蛋白(与其特异性无关),均具有四个多肽链的共同结构:两个相同的重链,每一个有可能携带共价附接之寡糖基团,视表达条件而定;以及两个相同的未经糖基化之轻链。二硫键将重链和轻链连接在一起。亦借着二硫键将重链彼此连接。所有的四个多肽链均含有分别在羧基和氨基末端找到的恒定和可变区。

[0049] 根据其等之重链组份,将免疫球蛋白分成五大类:IgG、IgA、IgM、IgD、和 IgE。有两种类型的轻链, κ (卡帕)和 λ (拉姆达)。个别分子可含有 κ 或 λ ,但绝不可含有两者。进一步将 IgG 和 IgA 细分成亚类,起因于在每一类中在氨基酸序列上的微小差异。在人

类中找到四个 IgG 亚类 :IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4。在小鼠中亦找到四个 IgG 亚类 :IgG1、IgG2a、IgG2b、和 IgG3。在人类中,有三个 IgA 亚类, IgA1、IgA2、和 IgA3。

[0050] 术语“完整轻链”意指重组产生之多肽,其由轻链多肽之可变和恒定区两者组成。完整轻链是编码轻链之多核苷酸的表达产物,考虑到可能在生产期间,在表达宿主内发生的翻译后修饰,以及后续的纯化及 / 或加工。

[0051] 发明之详细说明

[0052] 本发明之目的是提供用于结构表征的平台,以获得关于在包含重组多克隆抗体之样品中有或无个别抗体或其相对比例的信息。可使用该表征平台,在重组多克隆抗体之生产或纯化的过程期间,或在重组多克隆抗体组合物之长期储存期间,评估不同方面。

[0053] 优选地,可为了下列目的之一,使用本发明之表征平台 :i) 判定在单一样品中,个别成员或一些个别成员彼此之间的相对呈现, ii) 评估在不同样品中之一或多个个别成员的相对比例,以便判定批次间一致性,以及 iii) 评估一或多个个别成员的实际比例。任选地,可将这与在表达载体中,一开始用来产制该多克隆制造性细胞系的所翻译序列相比较。可使用该表征平台,以监视多克隆细胞系的克隆多样性,及 / 或个别抗体在由该细胞系产生之重组多克隆抗体中的呈现。该表征平台特别适合在个别生产行程期间,表征组合物稳定性,以及监视批次间一致性两者。

[0054] 本发明之一实施方案,是表征一或多个样品的的方法,该样品的每一个包含一或多个重组多克隆抗体,其中该多克隆抗体包含多个抗体,其差异在于其等之可变区,而得以获得关于该重组多克隆抗体之个别抗体的相对比例或存在的的信息,该方法包括借着至少一个层析技术,从该样品中分离经分离轻链的等分试样,随后使该经分离轻链接受质谱,任选地还有编码蛋白质之序列的一或多个遗传分析。在人类抗体的场合中,轻链可以是 λ 或 κ 同种型,或 λ 和 κ 同种型两者的混合物,或在非 - 人类抗体之场合中为其它的同种型。

[0055] 本发明的一个重要特征是编码每对关联重和轻链 (其构成该多克隆抗体之成员) 的序列为已知的。从本发明之分析方法获得的信息,仅与轻链有关。借着判定不同轻链在多克隆抗体中的量,亦可计算完整抗体的量,因为可从其等之编码序列中得知,或使用例如质谱以实验判定每个重链之计算分子量。

[0056] 在一优选的实施方案中,完整轻链包含整个的轻链氨基酸序列,即由制造性细胞系生产的轻链多肽,包括在该完整轻链之表达或分泌期间发生的翻译后加工。

[0057] 在一实施方案中,完整轻链具有谷氨酰胺以外的 N- 端氨基酸残基,可想象该 N- 端可在表征之前先接受加工。亦可让 C- 端接受加工。

[0058] 在一实施方案中,层析过程是基于尺寸以外的至少一个物 - 化特性。

[0059] 在一实施方案中,个别的层析过程是基于至少一种物 - 化特性,选自由净电荷、疏水性、等电点、和亲和力所组成之群组。

[0060] 在一实施方案中,个别的层析过程是基于净电荷。

[0061] 在一实施方案中,以多维层析来进行该层析过程。

[0062] 在一实施方案中,该层析过程是或包括高分辨率液相层析法。

[0063] 在一实施方案中,该多克隆抗体组合物是细胞培养物级分,如包括该培养物之细胞的细胞培养物级分。该细胞培养物级分典型地为细胞培养物的样品,其包含在该细胞培养物中代表每个细胞系之细胞,使该样品得以代表较大的细胞培养物。

[0064] 在一实施方案中,步骤(a)涉及从一或多个细胞培养物上清液来制备多克隆抗体组合物。

[0065] 在一实施方案中,在重组多克隆抗体组合物中之抗体种类的表征,涉及判定在该重组多克隆抗体组合物中有或无轻链种类。

[0066] 在一实施方案中,在重组多克隆抗体组合物中之抗体种类的表征,涉及判定在该重组多克隆抗体组合物中之轻链种类的相对比例。

[0067] 在一实施方案中,判定在重组多克隆抗体组合物中之完整轻链种类的相对比例,包括分析存在于该组合物中的一或多个标记(sentinel)蛋白质。

[0068] 在一实施方案中,步骤(f)包括比较在步骤(e)中获得的数据与从至少一个更进一步之分析技术(其选自更进一步之蛋白质表征技术和遗传技术所组成之群组)中获得的数据。

[0069] 在一实施方案中,该至少一个更进一步之分析技术为编码轻链之多核苷酸或自制造性细胞系获得或衍生之多核苷酸的遗传分析。

[0070] 在一实施方案中,该遗传分析系选自 RFLP、T-RFLP、微阵列分析、定量 PCR 和核酸测序。

[0071] 在一实施方案中,更进一步之表征技术是蛋白质表征技术,其系选自 N-端测序和利用特异性检测子分子(如抗-独特型抗体或抗-独特型肽)之复杂同源蛋白质混合物的表征。

[0072] 在一实施方案中,在步骤 a) 至 e) 之前、期间或之后,执行该至少一个更进一步的分析。

[0073] 本发明亦提供检测在二或更多个重组多克隆抗体组合物中,在完整轻链族群之间变异的方法,包括对该二或更多个重组多克隆抗体组合物的每一个,进行如在本文中描述之轻链种类的表征方法,并判定在该二或更多个重组多克隆抗体组合物中,在完整轻链族群之间的任何变异。

[0074] 在一实施方案中,该二或更多个重组多克隆抗体组合物是在培养期间内的不同时间点,自单一多克隆细胞培养物获得。

[0075] 在一实施方案中,该二或更多个重组多克隆抗体组合物是在特定的时间点,自不同的多克隆细胞培养物获得。

[0076] 在一实施方案中,借着比较存在于该二或更多个重组多克隆抗体组合物中之至少三种,如至少 5 种或至少 10 种完整轻链的相对比例,来检测该变异。

[0077] 在一实施方案中,借着比较存在于该二或更多个重组多克隆抗体组合物中之至少两种完整轻链的相对比例,来检测该变异。典型地,对存在于该二或更多个重组多克隆抗体组合物中之 50 或更少种完整轻链,如在 2-40、2-30、2-25、2-20、2-15、2-10 或 2-5 种之间的完整轻链,进行比较。

[0078] 可使重组多克隆抗体接受任选的额外的表征,如遗传及/或蛋白质分析。遗传分析意指诸如从编码完整轻和重链之遗传序列中推论氨基酸序列及/或预测质量、限制性片段长度多态性(RFLP)分析、末端-RFLP(T-RFLP)、微阵列分析、定量 PCR,如实时 PCR 和核酸测序之类的技术。蛋白质表征技术意指经常在蛋白质组学之领域中,用于表征未知蛋白质的技术,例如层析分析,其根据物-化特性分离蛋白质。

[0079] 除了质谱之外,可在适当之处对相同的样品,或更适合对平行的样品,使用一或多个下列的蛋白质表征技术:同源蛋白质之蛋白水解消化的分析、“庞大”N-端测序,以及使用对同源蛋白质特异性之检测子分子的分析。

[0080] 多克隆制造性细胞系之克隆多样性的遗传分析

[0081] 在本发明之某些实施方案中,除了本发明之表征方法之外,亦可借着评估编码多克隆蛋白质之特殊成员的细胞量,监视在生产多克隆蛋白质之表达系统中的多克隆性。

[0082] 除了蛋白质表征方法之外,亦可进行在本文中描述的一或多个遗传分析,包括判定编码多克隆蛋白质之个别成员的 mRNA 水平。可在 mRNA 或基因组水平,使用例如 RFLP 或 T-RFLP 分析、寡核苷酸微阵列分析、定量 PCR,如实时 PCR,以及获自(或用以创造)制造性细胞系之基因序列的可变区之核酸测序,来监视遗传分析。或者,可进一步定性地使用相同的技术,以证实多克隆细胞系的(遗传)多样性。可对在培养期间内之不同时间点,获自单一多克隆细胞培养物的样品,监视编码多克隆蛋白质的核酸序列,藉此监视在整个生产行程中个别编码序列的相对比例,以评估其组合物稳定性。或者,可对在特定时间点,获自不同多克隆细胞培养物之样品,监视编码多克隆蛋白质之核酸序列,藉此监视在不同批次中个别编码序列的相对比例,以评估批次间变异。优选地,在遗传分析中使用的样品,是例如借着沉淀或离心,而使其富含该培养物之细胞的细胞培养物级分。在一实施方案中,可对产生该重组多克隆抗体的制造性细胞系进行遗传分析,另一方面对获自该细胞系之多克隆抗体样品进行层析和质谱分析。通常借着在想要的时间点,收获细胞培养物之级分,接着(例如借着离心)移除培养基,获得用于遗传分析的样品。优选地在体外细胞生产年龄的限制之下,从细胞中获得用于比较批次间一致性的样品。

[0083] 在一实施方案中,可能先前已经进行过遗传分析,如编码个别轻链之基因的测序,并用以创造制造性细胞系。亦想象可与蛋白质表征步骤(如层析和质谱分析)同时,或在其之后进行这类遗传分析。

[0084] 如何进行在本文中提及之遗传分析技术的细节,对熟谙此艺者而言是例行的,并由 WO 2006/007853 提供如何进行在本发明之前后文中 RFLP/T-RFLP、寡核苷酸微阵列分析、定量 PCR 和核酸测序的进一步指导。

[0085] 重和轻链的分离

[0086] 本发明之一特征,是在质谱之前的步骤中,分离重和轻链。该分离达到数个目的。首先,其减少了在样品中不同蛋白质次-单元的数目。其次,若在哺乳动物表达系统中制造,已知抗体重链会改变其等的糖基化程度,以致于每个重链可能在质谱仪的层析谱上产生数个高峰。因此,从质谱步骤中排除重链,提供了抗体较佳且较精确的表征。

[0087] 可使用尺寸分离,如凝胶过滤完成重和轻链的分离,其充分严谨地定量分离这两群链(参见图 1)。也可以使用其它的分离技术,如亲和层析步骤,其中保留重链而在流-通中发现轻链。

[0088] 质谱

[0089] 质谱(MS)分析是蛋白质之结构表征的基本工具。在气相中对经离子化之分析物进行质谱测量。按照定义,质谱仪包括离子来源、质量分析仪(其测量经离子化分析物之质量对电荷比(m/z)),以及检测器(其登记每个 m/z 值的离子数目)。电喷雾离子化(Electrospray ionization,ESI)和基质辅助激光脱附/离子化(matrix-assisted laser

desorption/ionization, MALDI), 是两种最常用来使蛋白质或肽挥发和离子化, 以便进行 MS 分析的技术。ESI 使分析物从溶液中离子化, 并因此容易地与基于液相 (例如层析和电泳) 之分离工具偶联。MALDI 经由激光脉冲, 使样品从干的、结晶状的基质中升华并离子化。MALDI-MS 正常是用来分析相对较简单的肽混合物, 但是为了分析复杂的样品, 优选地并入液相-层析 ESI-MS 系统 (LC-MS)。质量分析仪对该技术是最重要的, 且其关键参数为敏感性、分辨率、质量精确性, 以及从肽片段中产生富含信息之离子质量光谱 (MS/MS 光谱) 的能力。在蛋白质组学研究中, 目前使用四种基本类型的质量分析仪。那些为离子阱、飞行时间 (TOF)、四极和傅里叶 (Fourier) 变换离子回旋加速器 (FT-MS) 分析仪。其等在设计和性能上极为不同, 各有自己的长处和弱点。这些分析仪可单独运作, 但在某些情况下, 可放在一起串联, 以利用每一个的长处 (关于更多的细节, 参见 Aebersold & Mann, Nature 2003, 422:198-207)。

[0090] 在 MALDI- 和 ESI-MS 两者中, 在出现之分析物的量和测量到的信号强度之间的关系是复杂且不完全了解的。因此, 质谱仪是内在不佳的定量装置。在蛋白质组学领域中, 已经发展出稳定的同位素蛋白质标示法, 以获得定量的 MS 数据。这些方法使用以下事实: 成对的在化学上相同之肽, 具有不同的稳定同位素组合, 可因其等之质量差异而在质谱仪中加以区别, 且这类肽对的信号强度比, 精确地指出两种肽的丰度比。因此, 可判定在原始样品中, 其等之相对应蛋白质的相对丰度。可经由 i) 代谢标示、ii) 以酶促方式或 iii) 化学反应, 将稳定的同位素标签导入蛋白质。目前, 对蛋白质或肽附贴化学同位素-标签, 是最常使用的方法 (关于更多细节, 参见 Aebersold & Mann, Nature 2003, 422:198-207)。最近, 已经有越来越多的努力针对无-标记方法, 其依据在 LC-MS 行程之间直接比较肽高峰面积。借着改变单一蛋白质或少许标准蛋白质的量, 已经显示肽高峰信号的强度几乎线性地符合其等在样品中的浓度, 且在不同 LC-MS 行程之间的高峰面积比, 可靠地反映其等在样品中的相对量 (Wang 等人, J. Proteome Res. 2006, 5:1214-1223)。

[0091] 层析分离技术

[0092] 根据本发明, 使完整轻链接受一或多个层析分离技术 (步骤 d)。

[0093] 多克隆蛋白质之个别成员的层析分离, 可能是基于在物-化特性上的差异, 如 i) 净电荷 (例如离子-交换层析法 (IEX))、ii) 疏水性 (例如反-相层析法 (RP-HPLC)), 以及基于盐浓度之疏水性相互作用层析法 (HIC))、iii) 等电点 (pI 值) (例如层析聚焦法), 或 iv) 亲和 (例如使用抗-独特型肽/抗体的亲和层析法, 或分离 κ 和 λ 抗体轻链的蛋白质-L 层析法)。第五个已熟知的层析技术是基于尺寸之物-化特性。然而, 这不是特别适合于分离同源蛋白质 (如抗体轻链) 的技术, 因为所有的轻链基本上均具有相同的尺寸。

[0094] 优选地, 层析分离技术提供了轻链种类 (其具有相同或几乎相同之分子量) 足够好的分离, 以致于随后可在质谱仪中区别这些。质谱仪分离并区别具有几乎相同之分子量之两个轻链种类的能力, 决定了在初始的层析步骤期间, 应该分离哪一个轻链种类。在层析分离技术中获致充分分离的方法, 存在于熟谙此艺者的能力内, 其可调整所使用的缓冲溶液、梯度、流速、压力、管柱材料等等。

[0095] 虽然原则上可使用任何层析分离技术, 但较方便的是使用可与后续之质谱仪兼容的方法和系统, 而得以避免更换缓冲溶液。优选地使用 LC-MS, 因为两个系统 (液相层析法和质谱) 已联机, 因此排除了收集级分的需求。

[0096] a) 离子 - 交换层析法

[0097] 在本发明之某些实施方案中,使用离子 - 交换层析法分离重组多克隆抗体之个别轻链成员,或多克隆蛋白质之个别成员的亚 - 族群。借着离子 - 交换层析法的分离,是基于在欲分离之组合物中个别轻链的净电荷。依据轻链的 pI- 值,以及所选择之管柱缓冲溶液的 pH 值和盐浓度,可使用阴离子或阳离子 - 交换层析法,以至少某种程度分离个别轻链。例如,所有的个别轻链正常均会与带负电荷的阳离子 - 交换介质结合,只要 pH 值完全低于该个别轻链之最低 pI- 值。随后可依据个别蛋白质之净电荷,典型地使用渐增的盐(例如氯化钠)梯度或渐增的 pH 值,从管柱中洗脱出已结合之轻链的个别成员。在洗脱期间,会获得数个级分。单一级分优选地含有一个别轻链成员,但亦可含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多不同的成员。阳离子和阴离子 - 交换的一般原则为在技术领域已熟知的,并可买到离子 - 交换层析法的管柱。

[0098] b) 层析聚焦法

[0099] 在本发明更进一步的实施方案中,使用层析聚焦法分离重组多克隆抗体之个别轻链成员,或多克隆抗体之个别轻链成员的亚 - 族群。借着层析聚焦法的分离,是基于在个别蛋白质之 pI 值上的差异,并使用具有超过轻链之 pI 值之 pH 值的管柱缓冲溶液进行。在重组多克隆蛋白质中,具有相对较低之 pI 值的个别成员,会与带正电荷的弱阴离子 - 交换介质结合。随后可依据个别轻链成员的 pI 值,借着在管柱中产生渐减的 pH 梯度(使用经设计以涵盖该个别成员之 pI 值之 pH 范围的多缓冲溶液),从管柱中洗脱出已结合之重组多克隆蛋白质的个别轻链成员。在洗脱期间,会获得数个级分。单一级分优选地含有多克隆蛋白质之一个别轻链成员,但亦可含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 个或更多不同的轻链成员。使用阴离子 - 交换剂之层析聚焦法的一般原则为在技术领域已熟知的,并可买到阴离子管柱。利用阳离子 - 交换剂的层析聚焦法亦为在技术领域已知的(Kang, X. 和 Frey, D. D., 2003. J. Chromatogr. 991, 117-128)。

[0100] c) 疏水性相互作用层析法

[0101] 在本发明更进一步的实施方案中,使用疏水性相互作用层析法分离重组多克隆抗体之个别轻链成员,或多克隆抗体之个别轻链成员的亚 - 族群。借着疏水性相互作用层析法的分离,是基于在欲分离之组合物中,个别蛋白质之疏水性上的差异。重组产生之轻链与在缓冲溶液(其偏好疏水性相互作用)中利用疏水性配体修饰的层析介质结合。这典型地在含有低百分比有机溶剂的缓冲溶液(RP-HPLC)或在含有相当高浓度之经挑选盐的缓冲溶液(HIC)中达成。随后可依据个别轻链成员的疏水性,典型地使用渐增梯度之有机溶剂(RP-HPLC)或渐减梯度之经挑选盐(HIC),从管柱中洗脱出个别轻链成员。在洗脱期间,会获得数个级分。单一级分优选地含有多克隆蛋白质之一个别轻链成员,但亦可含有多克隆蛋白质之 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多个不同的轻链成员。疏水性相互作用层析法的一般原则为在技术领域已熟知的,并可买到用于 RP-HPLC 和 HIC 的管柱。质谱仪经常具有直接与其连接的 HPLC 组件,使得 RP-HPLC 的使用成为事前之分离步骤是优选的。

[0102] d) 疏水性电荷诱导层析法

[0103] 在本发明更进一步的实施方案中,使用疏水性电荷诱导相互作用层析法(HCIC)分离重组多克隆抗体之个别轻链成员,或多克隆抗体之个别轻链成员的亚 - 族群。借着

HCIC 的分离,是基于在欲分离之组合物中,个别蛋白质之疏水性上的差异。吸附是基于温和的疏水性相互作用,并在不添加盐类下进行。解吸附则是基于借着改变移动相 pH 而达成的电荷互斥。可借着梯度最适化(例如借着改变在移动相中的 pH 值和缓冲溶液盐),达到个别轻链的最佳分离,接着吸附至 HCIC 树脂。单一级分优选地含有一个别轻链成员,但亦可含有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多个不同的轻链。疏水性电荷诱导层析法的一般原则为在技术领域已熟知的,并可买到 HCIC 用的管柱。市售之 HCIC 树脂的实例为 MEP HyperCel™(PALL, East Hills, NY, USA)。MEP HyperCel™ 吸附剂是为了捕捉和纯化单克隆及多克隆抗体而特别设计的高性能、高选择性层析材料。

[0104] e) 亲和层析法

[0105] 在本发明更进一步的实施方案中,使用亲和层析法分离多克隆抗体之个别轻链成员,或多克隆抗体之个别轻链成员的亚-族群。借着亲和层析法的分离,是基于在对特异性检测子分子、配体或蛋白质之亲和力上的差异。将检测子分子、配体或蛋白质,或众多的这些(以下将这些不同的选项称为配体)固定化在层析介质上,并在有利于在个别成员和经固定化配体之间相互作用的条件下,将轻链施用于亲和管柱。在管柱流-通中,收集对经固定化配体显示无亲和力的蛋白质,并随后在抵消结合的条件(例如低 pH、高盐浓度或高配体浓度)下,从管柱中洗脱出对经固定化配体显示出亲和力的蛋白质。在洗脱期间,会获得数个级分。单一级分优选地含有多克隆抗体之一个别轻链成员,但亦可含有多克隆抗体之 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多个不同的轻链成员。可用来表征重组多克隆蛋白质的配体是,例如,目标-抗原、抗-独特型分子或用以分离带有 κ 或 λ 轻链之抗体的蛋白质 L。

[0106] 可进行利用抗-独特型分子(例如抗-独特型肽或抗-独特型抗体,其特异性地与多克隆蛋白质之个别成员或这类个别成员之亚-族群结合)的亲和层析法,以获得关于该重组多克隆蛋白质之经挑选成员(亦称为前哨蛋白质),或个别成员之亚-族群之相对比例的信息。确实,每种个别的抗-独特型分子均仅特异性地与一种个别成员结合,而不会与该重组多克隆蛋白质之其它成员结合,虽然在本发明中,亦可使用会与经限定亚-组之成员结合的抗-独特型分子。优选地,对所有个别成员产制抗-独特型分子,而得以表征整个多克隆组合物。在该重组多克隆蛋白质为多克隆抗体之处,该抗-独特型分子针对抗体序列的抗原-特异性部分。可将抗-独特型分子个别地固定化在层析介质上,使得一管柱含有一抗-独特型分子,藉此获得关于特殊蛋白质成员或蛋白质亚-族群的信息。然后将流-通施加在带有第二个经固定化抗-独特型分子的第二个管柱中,等等。或者,将数种不同的抗-独特型分子固定化在施加在相同管柱中的相同层析介质上。然后在允许将个别蛋白质洗脱至不同级分中的条件下,例如借着在管柱中添加渐增量的游离独特型分子,或使用 pH 或盐梯度,进行洗脱。利用该途径,有可能利用单维分析,获得多克隆蛋白质之数种成员的比例信息。

[0107] 多克隆抗体可能由含有 κ 轻链或 λ 轻链的个别成员组成。在这类多克隆抗体中,可借着使用对 λ 轻链抗体缺少亲和力的蛋白质 L,将带有 λ 轻链的抗体与带有 κ 轻链的抗体分开。因此,可使用蛋白质 L 亲和层析法,将含有 λ 轻链之抗体成员的亚组与含有 κ 轻链之抗体成员的亚组分开。随后可使用本发明之表征方法,进一步表征 κ 和 λ 抗体亚组。

[0108] 多维层析法

[0109] 通常,一个分离过程便足以在质谱步骤中获得轻链的良好分辨。当然,这并非排除使用额外的分离过程,在下文中极简要地描述之。

[0110] 依据在欲分析之样品(例如重组多克隆蛋白质)中,变体同源蛋白质的复杂性,可能希望组合二或更多个上述在(a)至(e)中的层析技术,成为二维、三维或多维格式。优选地在所有维中均使用液相层析,代替二维凝胶电泳。然而,这并非排除为了重组多克隆蛋白质之表征,在一或多维中使用凝胶电泳或沉淀技术。

[0111] 通常,在多维层析法中,在不同维使用基于不同物-化特性之层析技术是有利的,例如在第一维中借着电荷分离,在第二维中借着疏水性分离,并在第三维中借着亲和力。然而,当在连续维中使用时,有些层析技术可提供额外的分离,甚至其等利用蛋白质的类似物-化特性。例如,当在层析聚焦法之后,接着是离子-交换层析法,或利用彼此相随之不同配体的亲和层析法时,可获得额外的分离。

[0112] 作为多维LC技术的另一选择,可使用与适当之电泳技术(如凝胶电泳或毛细管电泳)组合的免疫沉淀法,以及后续的抗原定量,以表征重组多克隆蛋白质。该技术对表征靶向复杂抗原之重组多克隆抗体会是特别有用的。可使用经标示之抗原混合物和蛋白质A珠,使靶向例如复杂病毒抗原之重组多克隆抗体免疫沉淀。随后可使用等电聚焦或2D PAGE分离抗原,接着是个别抗原的定量,反映靶向该特定抗原之重组多克隆抗体中的抗体量。

[0113] 在重组蛋白质中排除N-端电荷异质性

[0114] 在上文描述的蛋白质表征技术中,在同源蛋白质池中个别蛋白质之异质性,可能使表征复杂化,因为单一蛋白质可能结果在例如IEX图谱中产生数个高峰。异质性是在抗体及其它重组蛋白质中的共同现象,并归因于酶促或非-酶促的翻译后修饰。这些修饰可引起尺寸或电荷异质性。常见的翻译后修饰包括N-糖基化(仅在重链)、甲硫氨酸氧化、蛋白水解断裂和脱酰胺化。异质性亦可能起源自遗传水平的修饰,如在转染期间导入的突变(Harris, J. R. 等人1993. *Biotechnology* 11,1293-7),以及在转录期间,在重和轻链之可变基因之间的交换事件(Wan, M. 等人1999. *Biotechnol Bioeng.* 62,485-8)。这些修饰是外遗传的,并因此不能仅从构建物之遗传结构预知。

[0115] 可在表征之前处理这些翻译后修饰中可能产生异质性的一些。有助于表征的这类修饰-不会删除由多克隆制造性细胞系产生之成熟蛋白质的重要部分,在本发明之前后文中,认为其保留完整轻链-即可修饰完整轻链,如借着一或多个下列的技术。在一实施方案中,这类'经修饰之'完整轻链包括至少90%,如至少91%、如至少92%、如至少93%、如至少94%、如至少95%、如至少96%、如至少97%、如至少98%、如至少99%、如100%成熟完整轻链的氨基酸序列。

[0116] 可借着使用特异性的羧肽酶抑制剂,或借着以羧肽酶处理抗体,解决起因于酶促移除C-端赖氨酸的电荷改变,以简化整体图案(Perkins, M. 等人2000. *Pharm Res.* 17, 1110-7)。

[0117] 已经显示蛋白质之化学降解(如脱酰胺化),在生产和储存期间是一重要问题,且结果导致电荷异质性。在温和的条件下,发生Asn到Asp的脱酰胺化,以及异Asp(异天冬氨酰基肽键)的形成(Aswad, D. W. 等人2000. *JPharm Biomed Anal.* 21,1129-36)。这些重排最易存在于Asn-Gly、Asn-Ser和Asp-Gly序列,在那里局部多肽链的柔韧性很高。

[0118] 电荷异质性亦可能起因于 N-端被焦谷氨酸 (PyroGlu) 封闭,是由于 N-端谷氨酰胺残基之环化(脱酰胺化)的结果。已经对 IgG 以及其它蛋白质描述了这类翻译后修饰。抗体 N-端的部分环化,结果会导致电荷异质性,产生复杂的 IEX 图案。借着使用酶焦谷氨酰胺酶不能解决这个问题,首先是因为必须在经还原和经烷基化抗体上进行去封闭,以便获得高产量的经去封闭抗体 (Mozdzanowski, J. 等人 1998, Anal. Biochem. 260, 183-7), 这与后续的 IEX 分析不兼容,其次是因为对于所有的抗体,不可能获得 100% 切开。

[0119] 因此,本发明另一个方面系关于排除由 N-端谷氨酰胺残基之环化引起的电荷异质性。借着确保没有多肽链含有 N-端谷氨酰胺,例如借着将该 N-端谷氨酰胺残基变更为其它的氨基酸残基,排除 N-端 PyroGlu 残基的形成。对于抗体,可替换在轻链之 N-端处的 Gln 残基。这可借着核酸序列(其编码具有 N-端谷氨酰胺之多肽)的顶点诱变来进行。优选地,借着谷氨酸残基置换 N-端谷氨酰胺残基,因为这是谷氨酰胺的不带电荷衍生物。在重组多克隆蛋白质中,可改变编码成员的个别序列,并再插入表达载体内,以产制表达经改变蛋白质的新细胞系。然后可将该细胞系纳入生产多克隆蛋白质的细胞集合中。

[0120] 更进一步其它的示性表征技术

[0121] 在本发明一实施方案中,借着至少一个更进一步的蛋白质表征技术,监视同源蛋白质池或产生该同源蛋白质之表达系统的多克隆性。这类更进一步的蛋白质表征技术,可以是任何能够提供关于单克隆蛋白质之混合物或重组多克隆蛋白质的个别成员,在溶液中或在存在于多克隆细胞系中之细胞表面上的存在和相对比例之信息的技术(单独或与其它技术并用)。依据重组多克隆蛋白质的复杂性,可使用一或多个下列技术:i) 额外的层析分离技术、ii) 多克隆蛋白质之蛋白水解消化物的分析,以便鉴定代表多克隆蛋白质之个别成员的独特标志肽、iii) “庞大”N-端测序,以及 iv) 使用特异性检测子分子(例如可用于表征多克隆蛋白质之前哨蛋白质成员)的分析。可适当地与步骤 d) 和 e) 平行,或甚至在步骤 d) 和 e) 之后,进行额外的蛋白质表征技术。

[0122] 在一实施方案中,更进一步之蛋白质表征技术是同源蛋白质之可变区之蛋白水解消化物的分析,如同在 WO 2006/007853 中提及的。WO2006/007853 亦提供关于使用“庞大”N-端测序,以及利用特异性检测子分子之复杂同源蛋白质混合物的表征的更多教导。

[0123] 然而,因为本发明方法的优点,为了表征重组多克隆抗体之轻链种类,典型地不需要其它的蛋白质表征技术。

[0124] 蛋白质样品

[0125] 多克隆蛋白质可以是例如衍生自获自多克隆细胞培养物之细胞培养物上清液,例如以“未经加工”上清液之形式,其仅已经(例如借着离心)与细胞分开,或已经(例如借着蛋白质 A 亲和纯化、免疫沉淀或凝胶过滤)纯化之上清液。然而,这些预先-纯化步骤并不是重组多克隆蛋白质之表征的一部分,因为其等并未提供任何在组合物中不同同源蛋白质的分离。优选地,使欲接受本发明之表征过程的样品接受至少一个纯化步骤。最优选的是包括至少 90% 纯度之同源蛋白质,如至少 95%,或更优选的是 99% 纯度之同源蛋白质的样品。或者,多克隆抗体可以是分开制造并经纯化之抗体的混合物。

[0126] 可对在培养期间内之不同时间点,获自单一多克隆细胞培养物的样品,监视构成多克隆蛋白质的不同同源蛋白质,藉此监视在整个生产行程期间之个别多克隆蛋白质成员的相对比例,以评估其组合物稳定性。或者,可对在特定时间点,获自不同多克隆细胞培养

物的样品,监视构成多克隆蛋白质的不同同源蛋白质,藉此监视在不同批次中,个别编码序列的相对比例,以评估批次间一致性。

[0127] 欲表征之不同同源蛋白质之混合物的复杂性

[0128] 欲借着本发明之方法表征的样品,包括不同同源蛋白质(其具有不同的可变区蛋白质,特别是不同的重组蛋白质)的经限定亚组。典型地,已经借着共同特征限定多克隆蛋白质的个别成员,如对想要的目标共享结合活性,例如在抗体的情况下。典型地,欲借着本发明之表征平台分析的多克隆蛋白质组合物,会包括至少 3、4、5、10 或 20 种不同的变体成员(不同的同源蛋白质)。因此,该多克隆蛋白质组合物典型地会包括(至少)3 种不同的同源蛋白质,如(至少)4、(至少)5、(至少)6、(至少)7、(至少)8、(至少)9、(至少)10、(至少)11、(至少)12、(至少)13、(至少)14、(至少)15、(至少)16、(至少)17、(至少)18、(至少)19、(至少)20、(至少)21、(至少)22、(至少)23、(至少)24 或(至少)25 种不同的同源蛋白质,如在 2 到 30 种之间的不同同源蛋白质,例如 2 到 5 之间、6 到 10 之间、11 到 15 之间、16 到 20 之间、21 到 25 之间或 26 到 30 种之间的不同同源蛋白质。在某些场合中,该多克隆蛋白质组合物可包括更多种不同的变体成员,如至少 50 或 100 种不同的同源蛋白质。通常,没有任何单一变体成员构成超过在多克隆蛋白质组合物中之个别成员总量的 75%。优选地,没有个别成员超过 50%,更优选的是不超过在最终多克隆组合物中之个别成员总量的 25%。在许多情况下,没有任何个别成员会超过在最终多克隆组合物中之个别成员总量的 10%。

[0129] 在本发明优选之实施方案中,包括不同同源蛋白质(具有不同可变区)之样品是多克隆抗体。该多克隆抗体可由一或多种不同的抗体亚类或同种型构成,如人类同种型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2,或鼠同种型 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgA。

[0130] 在以下非-限制性实施例中,会更进一步描述本发明。

实施例

[0131] 实施例 1:制备重组多克隆抗体

[0132] 根据 WO 2006/007850 之实施例 5,制备含有 25 种不同个别抗-RhD 抗体的重组多克隆抗体组合物。在后文中,将该多克隆抗体组合物称为“Sym001”。

[0133] 实施例 2:分离轻链

[0134] 根据本发明,个别抗体的鉴定是基于全长轻链(代替仅是来自轻链的肽)之质量和停留时间。该特征简化了方法(不需要酶),并因此改良了方法的稳健性。在 Sym001 中的轻链(κ),其在序列上彼此非常类似,除了 CDR 区之外,不含翻译后修饰,如 N-连接之糖基化、磷酸化等等,并因此可预期多少将其离子化至相同的程度。评估抗体反应的线性、回收和再现性。亦调查两批 Sym001,以评估在不同批次中,个别抗体的相对量。

[0135] 借着对水使用 PD10 管柱(GE Healthcare)或透析,将样品脱盐,并监视 A280。然后将样品冷冻干燥,并在 6M Gua-HCl、0.2M Tris, pH8.4 中重建,至 10 毫克/毫升之终浓度,并分别利用 DTT 和碘乙酸还原和烷基化。

[0136] 在 Agilent 1100 HPLC 系统上,在 Superose™12 10/300 GL 尺寸排阻管柱(GE healthcare)上分离该样品之轻链。以 0.15 毫升/分钟之流速,利用 6M Gua-HCl、50mM NaP, pH8.4 洗脱轻链。样品装载: $< 1\%$ 的管柱体积。

[0137] 在图 1 中显示经还原和经烷基化之 Sym001 的典型层析谱。

[0138] LC-MS

[0139] 借着对 0.1M 乙酸铵透析 (Slide-A-Lyzer 透析卡匣, 10000 MWC0, Pierce), 将轻链级分脱盐, 并测量 A280。在与 Agilent G1969A LC/MSD TOF 质谱仪 (装有 ACE 3C4-300, 100x2.1 毫米, 3 微米管柱) 联机的 Agilent 1100HPLC 上进行分析。在 60℃ 下, 以 0.4 毫升 / 分钟之流速运转, 利用在 0.04% 三氟乙酸中之乙腈梯度洗脱该轻链。

[0140] 在图 2 中出示代表性层析谱。

[0141] 评估 - 鉴定和定量

[0142] 基于质量和停留时间, 建立个别轻链的身分 (图 3)。

[0143] 借着将在不同轻链多电荷包封中最强烈信号的经提取离子层析谱 (XIC) 作图, 并积分其等之高峰面积, 完成相对定量。

[0144] 使用软件 Analyst QS 1.1 (Agilent) 进行评估。下文描述一抗体的评估, RhD159LC, 其具有 23660.2 之质量。

[0145] RhD159LC

[0146] 1) 在 m/z 光谱中具有最高强度 (计数) 之 m/z 高峰的鉴定

[0147] 对于抗体 RhD159 (23660.2Da), $M+25H$ 之理论 m/z 值为 947.41。这是从 TIC (总离子层析谱) 中提取的, 以阐明在图 4 中出示的 XIC (经提取离子层析谱)。

[0148] 为了获得高峰时间间隔, 提取 m/z 光谱 (图 5)。

[0149] 具有最高强度 (计数) 之分子离子为 947.43 ($M+25H$)。

[0150] 2) 在 m/z 光谱中具有最高强度 (计数) 之 m/z 高峰的定量 (判定高峰面积)

[0151] 扩大具有最高强度 (计数) 的分子离子。这是使用自动发现高峰最大值并设定 m/z 范围的提取离子工具, 从 TIC 中提取的。在修平之后, 积分在所获得 XIC 中相当于 RhD159 LC 的高峰 (图 6)。

[0152] 线性

[0153] 借着注射 5 种水平 ($n = 3$) 的 Sym001 WS-1 LC, 证实抗体反应的线性 (参见图 7)。

[0154] 回收

[0155] 如在表 1 中所示, 利用构成 Sym001 之 25 种个别抗体的钉入 (spike-in) 实验证实回收。分别在一或两种水平分析每种抗体轻链, 并在两种水平处钉入 Sym001 WS-1LC。

[0156] 表 1: 在钉入实验中的回收和线性

[0157]

抗体 LC	回收(%)		线性(R^2)	
	水平 1	水平 2	单独的 Ab	在 WS-1 LC 中的 Ab
RhD157	88	101	0.9935	0.9943
RhD159	121	112	1.0000	0.9980
RhD160	98	101	n.d.	0.9914
RhD162	80	80	n.d.	1.0000
RhD189	108	107	0.9952	1.0000
RhD191 (n=3)	81	74	0.9970	0.9909
RhD192	120	121	0.9999	1.0000
RhD196	104	101	0.9977	0.9998
RhD197pE (n=3)	69	79	0.9996	0.9936
RhD199	123	112	0.9994	0.9968
RhD201	114	102	n.d.	0.9926
RhD202	98	87	0.9971	0.9943
RhD203pE (n=3)	77	81	0.9998	0.9968
RhD207 tot	84	86	0.9997	0.9998
RhD240	104	119	1.0000	0.9944
RhD241	104	106	1.0000	0.9999
RhD245	122	117	0.9971	0.9992
RhD293	132	121	0.9956	0.9972
RhD301	94	95	n.d.	1.0000
RhD305	71	78	0.9953	0.9974
RhD306	85	79	n.d.	0.9995
RhD317	97	88	0.9860	0.9960
RhD319pE (n=3)	78	82	0.9986	0.9981
RhD321	95	104	n.d.	0.9965
RhD324 (n=3)	134	128	0.9646	0.9994

[0158] n. d. :未测定

[0159] 再现性 - 相对定量

[0160] 表 2 显示在六个不同的时候分析,替在 Sym001 WS-1 中每种抗体轻链计算相对面积的结果。两名分析人进行六个样品制备,其使用还原缓冲溶液的四种制备物和 SEC(尺寸排阻层析法)期间使用移动相的五种制备物。测试两个 SEC 管柱批号。利用移动相的四种制备物和两批 RPC(反相层析法)管柱进行 LC-MS 部分。RSD(相对标准偏差)值是在 1.1-8.4% 的范围内。

[0161] 表 2 :在六个不同的时候分析在 Sym001 WS-1 中之轻链的相对面积(%)

[0162]

抗体	行程						平均值	标准偏差	RSD
RhD	1	2	3	4	5	6			(%)
157	15.4	15.4	15.5	15.5	15.1	15.2	15.4	0.16	1.1
159	4.1	4.2	4.1	4.4	4.2	4.4	4.2	0.13	3.1
160	21.7	22.1	22.0	21.2	20.5	20.9	21.4	0.63	2.9
162	1.8	1.6	1.6	1.8	1.9	1.7	1.7	0.13	7.4
189	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.02	3.5
191	7.3	7.0	7.1	7.3	6.9	7.2	7.1	0.17	2.3
192	1.3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.06	4.3
196	3.8	3.8	3.7	3.9	4.0	3.8	3.8	0.10	2.6
197pE	3.5	3.7	3.8	3.5	3.7	3.7	3.7	0.11	3.1
199	1.9	1.8	2.0	1.9	1.9	1.8	1.9	0.07	3.8
201	4.5	4.6	4.5	4.7	4.9	4.8	4.7	0.16	3.4
202	9.4	9.3	9.3	9.8	9.8	10.1	9.6	0.32	3.4
203pE	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.02	6.0
207pE	2.8	2.8	2.9	2.5	2.7	2.9	2.8	0.16	5.9
207-QA	2.5	2.6	2.7	2.2	2.4	2.6	2.5	0.17	6.9
240	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	0.03	1.9
241	3.0	3.0	2.9	3.0	3.0	3.0	3.0	0.06	2.0
245	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	0.05	5.1
293	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.03	4.2
301	1.8	1.8	1.8	1.7	1.8	1.6	1.8	0.08	4.4
305	2.9	2.9	2.9	2.8	3.0	2.9	2.9	0.08	2.8
306	5.2	4.8	4.8	5.1	5.3	4.7	5.0	0.24	4.8
317	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.02	1.8
319pE	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	0.03	2.6

[0163]

321	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.02	8.4
324	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.02	6.6
总和	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		

[0164] pE 代表 N-端 Gln 残基被环化成 pyroGln。在 RhD207 的案例中,发现两个版本的 LC;为全长和经截短之形式,后者的前两个残基(QA),因为借着信号肽酶加工而丧失。

[0165] 分析两个不同批次的 Sym001

[0166] 分析两个不同批次 (n = 3),并在图 8 中出示结果。

[0167] 如在图 8 中所见,本发明之轻链 LC-MS 法能够检测在两批之间的改变(参见例如抗体 157 和 202)。

[0168] 结论

[0169] 我们已经发展出基于 LC-MS 之方法,我们可藉其鉴定并定量构成 Sym001 的 25 种抗体:

[0170] • 发展出 RP-HPLC 法以获得轻链的分辩,尤其是具有近似质量的那些。

[0171] • 在 Sym001 样品(Sym001 WS-1)中找到与所有 25 种抗体之轻链一致的质量。对于一抗体(RhD207),发现额外的经截短形式。

[0172] • 已经对全部 25 种不同的轻链确认了正确的停留时间。

[0173] • 借着注射不同量的 Sym001 WS-1LC,证实抗体轻链反应的线性。

[0174] • 利用全部 25 种不同轻链的钉入实验证实回收。

[0175] • 以一个样品 Sym001 WS-1 测试再现性($n = 6$)。

[0176] • 分析两批($n = 3$),并显示轻链 LC-MS 方法能够检测批次间的改变。

[0177] 熟谙此艺者会知晓本发明有关在实行本文描述之方法时有许多可想象的变化。因此,在本文中,本身并没有打算提供所有在本发明之范围内的可能变化。在本文中引用的所有专利和非-专利文献,均藉此全部以引用方式纳入本文中,用于所有目的。

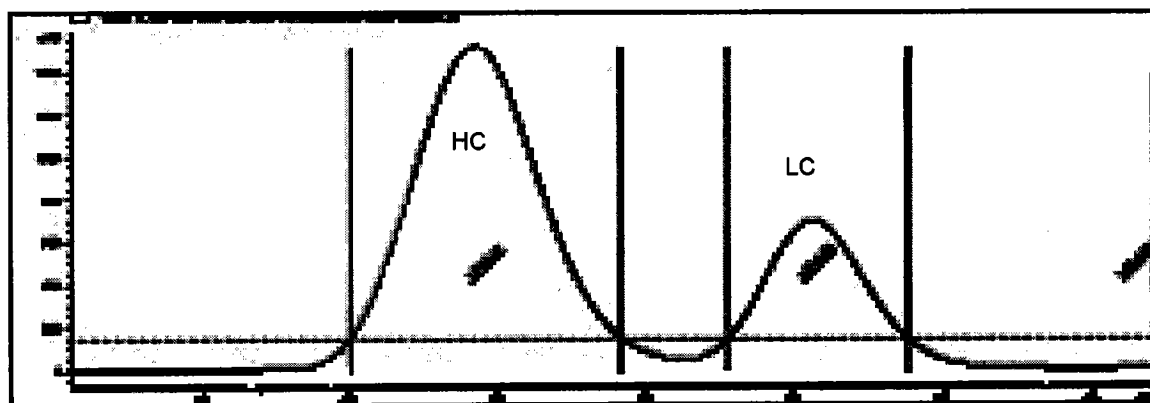


图 1

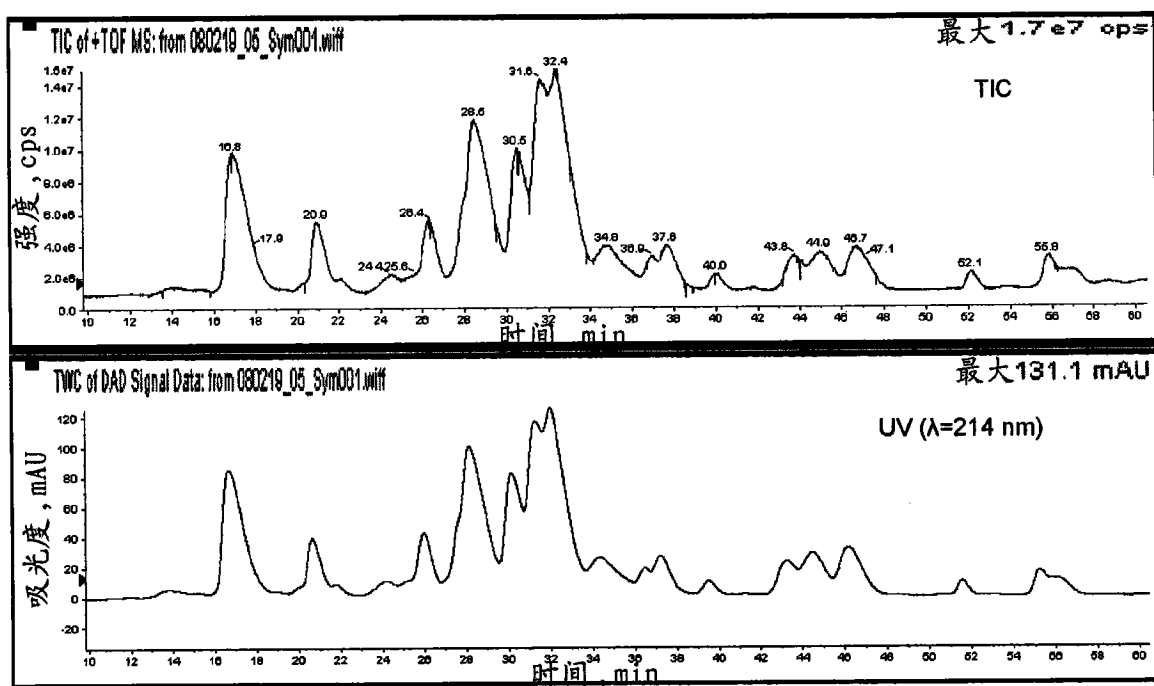


图 2

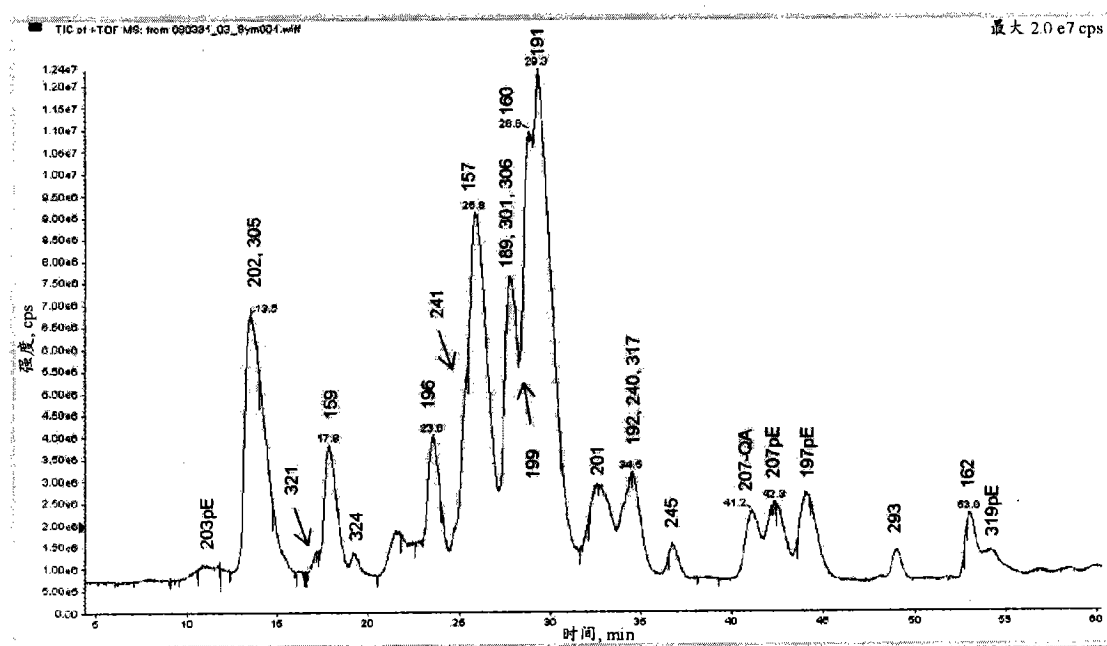


图 3

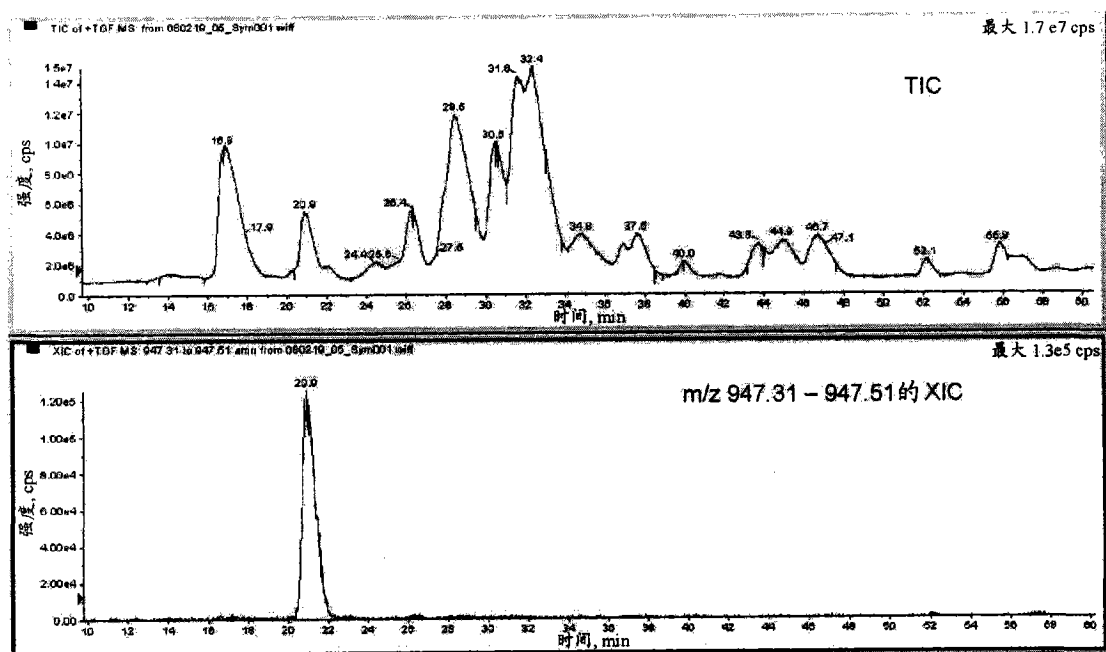


图 4

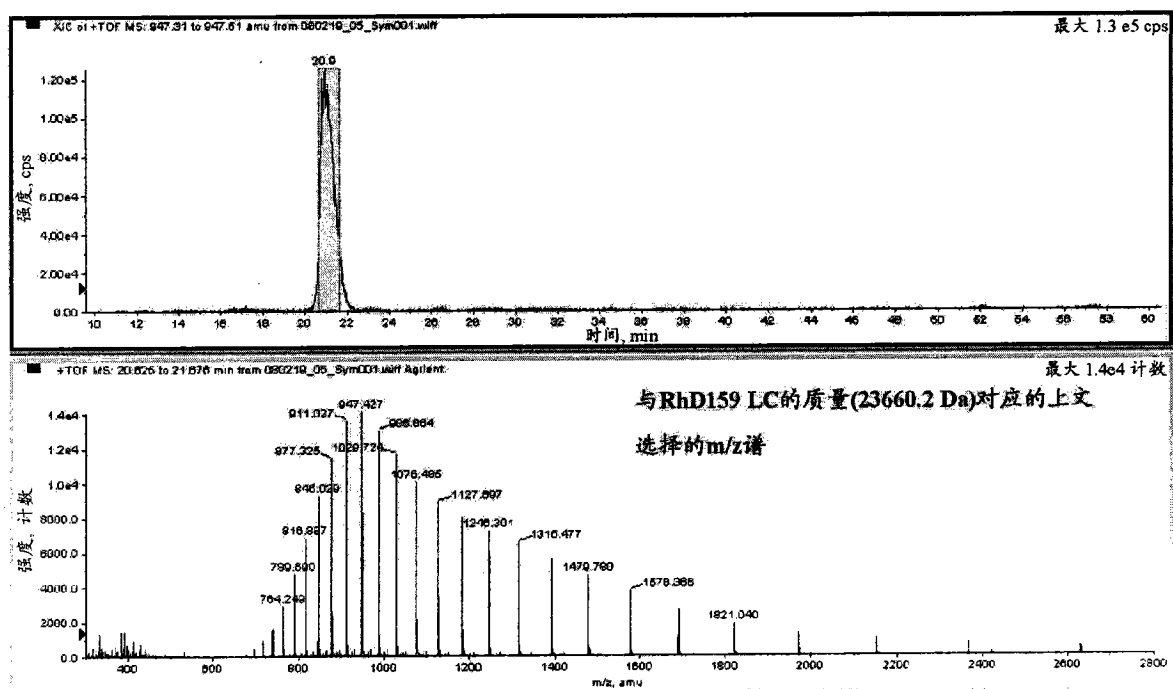


图 5

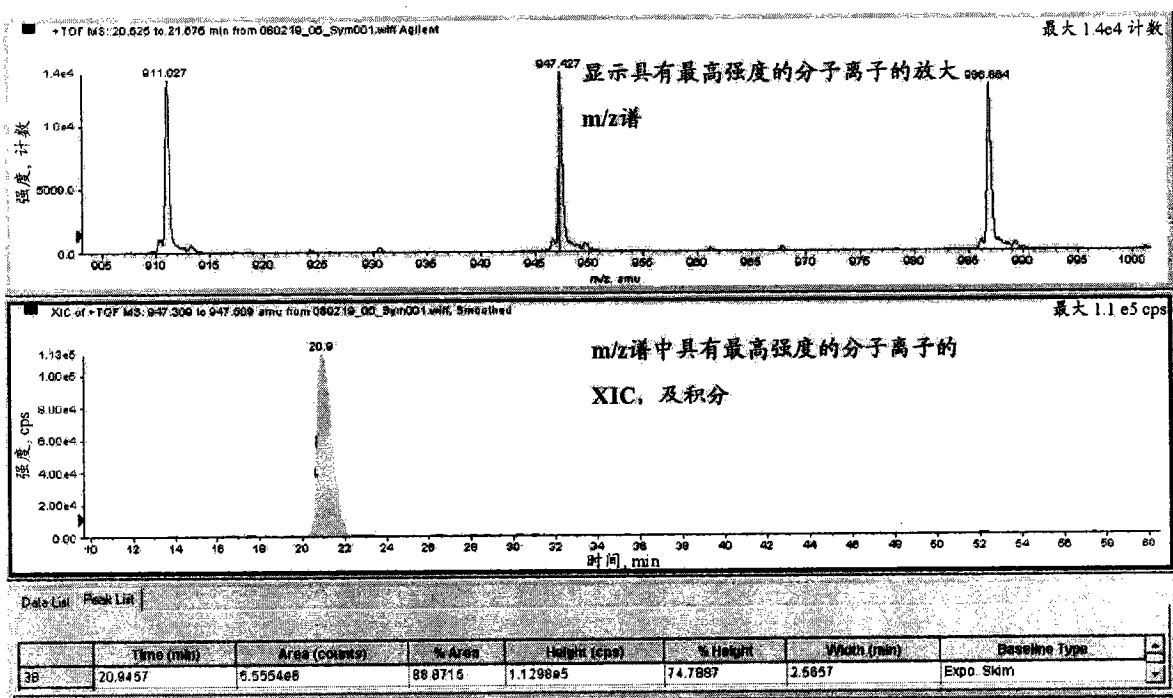


图 6

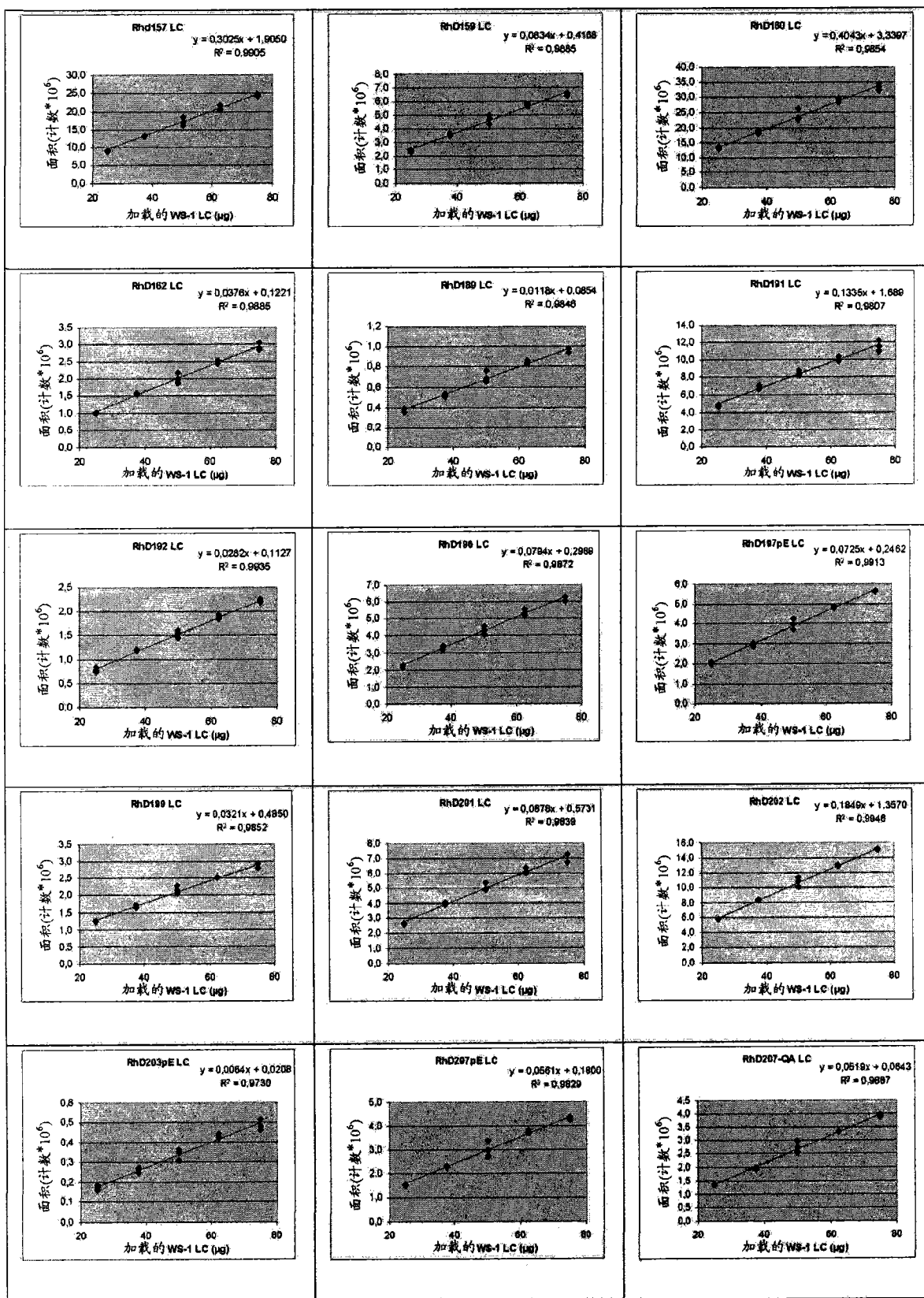


图 7

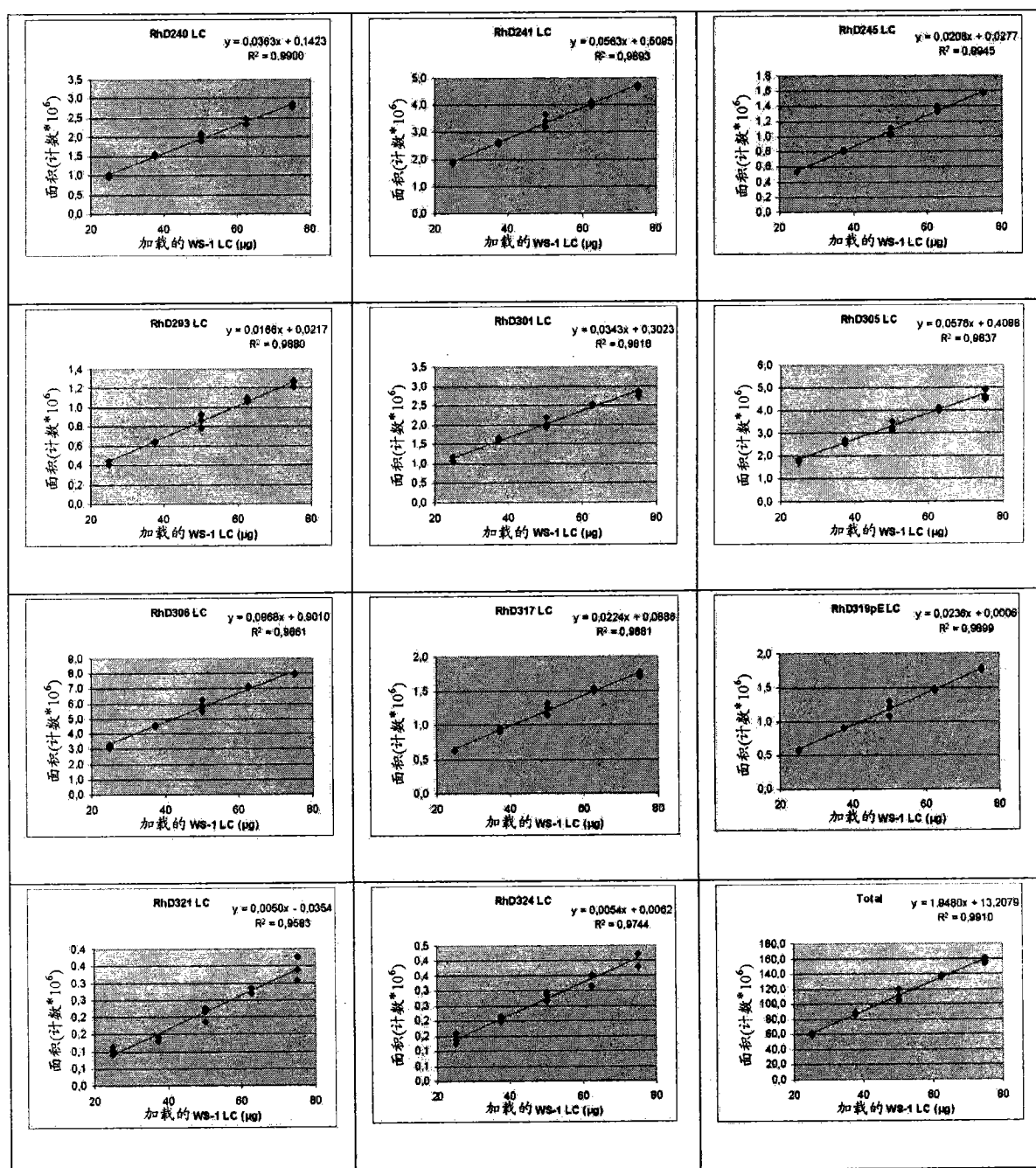


图7(续)

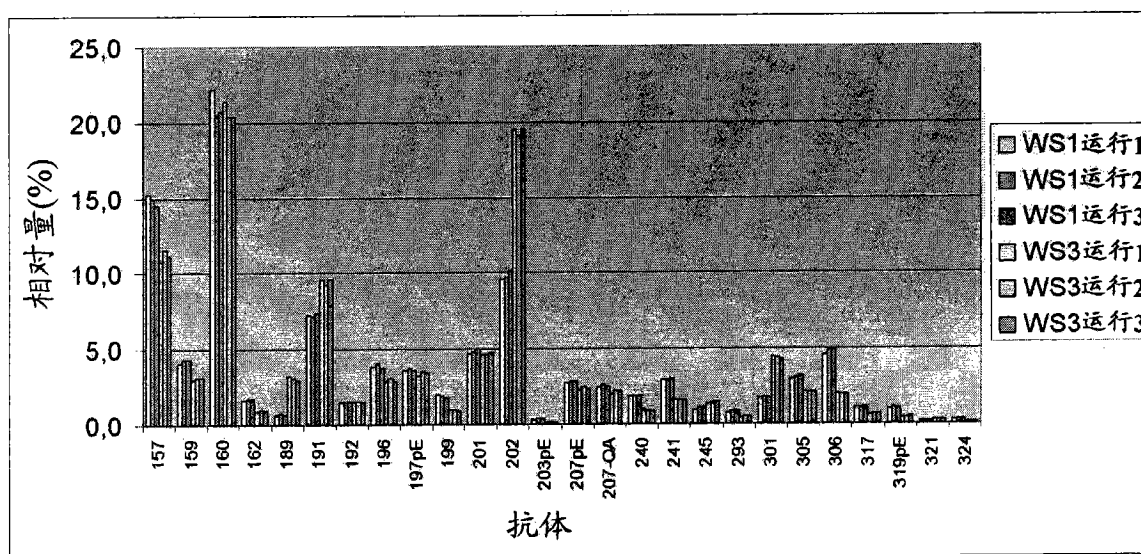


图 8