

(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 110536896 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201880010814.X

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2018.02.06

利商标事务所 11038

### (30) 优先权数据

17155366 2 2017 02 09 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019 08 08

### (86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/052889 2018 02 06

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/146067 EN 2018 08 16

(71)申請人：博華科瑞士股份

地址：瑞士吉伐姆皮諾

(72)发明人 E·马伊薩諾 E·吉里吉拉

权利要求书2页 说明书13页

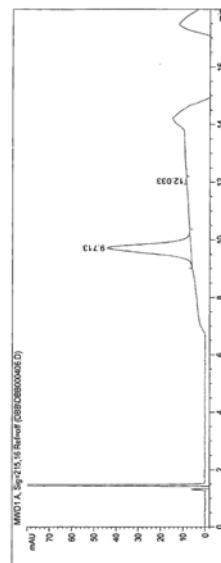
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

## 可溶性PSGL-1蛋白质变体的纯化方法

## (57) 摘要

本发明公开了纯化高酸性重组蛋白质的方法。酸性蛋白质优选PSGL-1的胞外区域或者包含该可溶性部分的融合蛋白和/或嵌合蛋白。纯化为三步层析，其包括在阴离子交换固相、疏水相互作用和羟基磷灰石上的分离。纯度和收率是最佳的，且该方法能够容易地放大并自动化。



1. 纯化目标可溶性蛋白质的方法,所述蛋白质在N-末端包含P-选择素糖蛋白配体-1 (PSGL-1 GenBank登录号Q14242.1) 的成熟胞外结构域,所述方法包括将包含所述目标可溶性蛋白质的混合物按以下所示顺序进行:

- a) 强阴离子交换 (AE) 固相层析,
- b) 疏水相互作用 (HI) 固相层析, 和
- c) 羟基磷灰石 (HA) 固相层析。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述强阴离子交换层析包括将包含目标可溶性蛋白质的混合物与选自Tris、Tricine、三乙醇胺、HEPES、TES、MOPS和磷酸盐的缓冲液组合上样到强阴离子交换固相上。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述缓冲液是浓度低于30mM且pH为6.5至8的Tris 或磷酸盐。

4. 根据权利要求2-3中任一项所述的方法,还包括用NaCl或KCl盐水溶液在等度洗脱或通过将盐水溶液的浓度增加至1M的正梯度洗脱下而将目标蛋白质从所述强阴离子交换固相上洗脱下来。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述疏水相互作用固相是苯基疏水固相。

6. 根据权利要求4-5中任一项所述的方法,其中将包含从AE洗脱的目标可溶性蛋白质的混合物上样到在包含高盐浓度的上样缓冲液中的疏水相互作用固相层析上,其中盐选自:NaCl、硫酸铵和硫酸钾。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述缓冲液是浓度低于100mM的Tris,盐是NaCl。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中在所述Tris缓冲液中,NaCl浓度高于3.5M。

9. 根据权利要求5-8中任一项所述的方法,还包括通过应用缓冲溶液将目标蛋白质从疏水相互作用 (HI) 固相层析中洗脱下来,其中所述NaCl盐浓度低于2.5M。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中将包含从HI洗脱的可溶性目标蛋白质的混合物引入到浓度低于15mM且pH为6.5至8的缓冲液中,并上样到HA柱上。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述缓冲液选自pH为6.6至7.4的Tris和磷酸盐。

12. 根据权利要求10-11中任一项所述的方法,其中所述缓冲液是磷酸盐且其包含浓度低于0.5mM、优选约0.3mM的CaCl<sub>2</sub>。

13. 根据权利要求10-11中任一项所述的方法,其中所述缓冲液是Tris且其包含MgCl<sub>2</sub>。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中MgCl<sub>2</sub>的浓度低于1.5mM,优选为1.2mM。

15. 根据权利要求10-14中任一项所述的方法,其中通过稀释或渗透达到低于15mM的合适缓冲液浓度和6.5至8的pH。

16. 根据权利要求12或15所述的方法,其中在羟基磷灰石固相层析之后的流穿液中发现目标蛋白质。

17. 根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中通过将磷酸根离子浓度增加至15mM以上而将目标蛋白质从羟基磷灰石固相上洗脱下来。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述增加是通过磷酸盐浓度梯度进行的。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述目标可溶性蛋白质在N末端包含PSGL-1 (GenBank登录号Q14242.1) 成熟形式的至少氨基酸5-16。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述目标可溶性蛋白质包含:在N末端的PSGL-1 (GenBank登录号Q14242.1) 成熟形式的至少氨基酸1-47、神经视网膜特异性亮氨酸拉链蛋白 (NCBI登录号NP\_0061681) 的至少氨基酸187-208和包含至少一个Cys的共价二聚化结构域。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述目标蛋白质具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

## 可溶性PSGL-1蛋白质变体的纯化方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及重组蛋白质纯化领域,特别涉及用于体内应用的阴离子蛋白质纯化。

### 背景技术

[0002] 从真核表达系统纯化重组蛋白质是一个非常具有挑战性的问题。据估计,下游加工(包括目标蛋白质的提取、纯化和表征)可占总生产成本的80%或更多。达到令人满意的纯化收率和纯度水平也确实可能大大延迟了为理解任何新设计的、分离的、重组的蛋白质的潜力所需的初步研究。

[0003] 事实上,尽管重组蛋白质通常以非常高的水平表达并分泌到培养基中,但是高密度的细胞生长是造成条件培养基中除感兴趣蛋白质之外的污染蛋白质和大尺寸分子存在的原因,这可能极大影响纯化过程和收率。

[0004] 事实上,源自生长期间发生的细胞裂解的细胞碎片、蛋白质及其降解产物和核酸是纯化方法必须要处理的常见污染物。

[0005] 在重组蛋白质纯化方法中,用抗体或特异性识别复杂混合物中的感兴趣蛋白质的其他蛋白质(即蛋白质-A)进行的亲和纯化方法是最具选择性的,至少在理论上提供了更高纯度的那些方法。尽管重组蛋白质的纯化相当普及了,但这些方法无论如何都隐藏了亲和配体从纯化柱本身泄漏出去的风险,以及这些蛋白质污染物的免疫原性风险。

[0006] P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)的复杂翻译后修饰模式需要真核表达系统来进行其功能性生产,其中对于通过P-选择素的凝集素结构域的Ca<sup>2+</sup>依赖性识别需要两种不同的翻译后修饰(酪氨酸硫酸化以及通过岩藻糖和唾液酸的特定核心20-连接糖基化)。

[0007] PSGL-1是带负电荷的蛋白质,这是由于胞外区域存在至少3个酪氨酸,在功能性蛋白质中被硫酸化。功能性蛋白质的胞外区域中的高糖基化模式和唾液酸的存在进一步造成其带负电荷。

[0008] PSGL-1是白细胞粘附分子,在生理血流下介导细胞在活化内皮细胞上的栓缚(tethering)和滚动(rolling)。这种活性是白细胞外渗的重要初始步骤。PSGL-1最初被识别为P-选择素的配体,随后的工作已表明PSGL-1也是E-选择素和L-选择素的配体(参见例如美国专利第6,277,975号)。

[0009] 因此,在体内诊断系统中的可能用途以及其功能表达所必需的复杂翻译后需求就代表了具有相当挑战性的问题。

[0010] 已经在几种重组系统中公开了PSGL-1胞外结构域的表达,主要是作为与能够诱导二聚体形成的伴侣的嵌合蛋白,这代表了功能形式。

[0011] US 5,827,817描述了重组蛋白质的制备,其中将对应于成熟蛋白的胞外结构域(氨基酸42-320)的可溶形式PSGL-1(sPSGL-1)与IgG的Fc部分框内融合,产生结合P-选择素和E-选择素的二聚体蛋白质,并进行翻译后修饰。在同一专利实施例14中,还公开了通过强阴离子交换层析、接着低盐洗脱和凝集素亲和层析(由于它们对聚糖的亲和力)来纯化该重组产物。备选地,在US 6,933,370中描述了与嵌合蛋白的Fc部分结合的蛋白质A基质上的纯

化。据说这种层析法表现出(预期的)缺点,主要是由于蛋白质A从柱中泄漏导致。

[0012] EP 1681298和EP 1681299处理了PSGL-1的重组可溶形式的纯化以及从感兴趣蛋白质中除去污染DNA的技术问题。据说通过阴离子交换层析、接着通过疏水相互作用固相层析以及通过用高盐、水醇溶液洗涤或者备选通过金属螯合层析而实现了目标。

[0013] WO01/72769 A2公开了纯化PSGL-1或PSGL-1融合蛋白的方法,其通过将这些蛋白质进行阴离子交换层析接着进行疏水相互作用层析来进行。

[0014] 文献WO2014/159441 A1和WO2010/051360 A1公开了使用各种层析方法的步骤来纯化蛋白质的方法。

[0015] Takada M.等在J.Clin.Invest.,1997,99(11):2862-2690中描述了使用重组可溶性PSGL-1来研究肾损伤缺血/再灌注大鼠模型中的急性和长期移植排斥,据说其中的sPSGL-1降低了肾损伤。通过阴离子交换、羟基磷灰石和尺寸排阻层析来纯化蛋白质。

[0016] 然而,文献中所描述的不同替代性纯化方法并未提出以下两个技术问题:a)达到适合于体内应用的纯度水平和b)实现适用于工业放大的纯化方法。

[0017] 本发明提出并解决了这两个问题,实现了具有适合“体内”用途的纯度(无DNA和其他蛋白质)的可溶性PSGL-1,以及适合大规模制备的纯化方法。

[0018] 这个结果已通过以下系列层析步骤实现:阴离子交换(AE)、疏水相互作用(HI)和作为最后层析步骤的羟基磷灰石(HA)。这相对于已知现有技术不是显而易见的。

## 发明内容

[0019] 本发明涉及纯化目标可溶性蛋白质的方法,所述蛋白质在N-末端包含P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1GenBank登录号Q14242.1)的成熟胞外形式,所述方法包括将包含目标可溶性蛋白质的混合物进行:

[0020] a)强阴离子交换柱层析,

[0021] b)疏水相互作用柱层析,和

[0022] c)羟基磷灰石柱层析,其中所述层析按所示顺序进行。

[0023] 强离子交换层析包括将混合物与选自Tris、Tricine、三乙醇胺、HEPES、TES、MOPS和磷酸盐的缓冲液组合上样到强阴离子交换(AE)上,所述混合物包含目标可溶性蛋白质(通常是细胞培养条件培养基,其中蛋白质在细胞生长期间就原本已分泌)。根据优选的方面,缓冲液是浓度低于30mM的Tris或磷酸盐,pH包含6.5至8,更优选6.8至7.8,甚至更优选包含7.4至7.8。

[0024] 用NaCl或KCl盐水溶液在等度洗脱或通过将盐水溶液的浓度增加至1M的正梯度洗脱下而将目标蛋白质从AE上洗脱下来。然后将AE洗脱物上样到疏水相互作用固相上进行第二个层析步骤,其中所述HI固相优选带有苯基疏水官能团。

[0025] 通过将包含目标可溶性蛋白质的AE洗脱物与包含高盐浓度的缓冲液组合来进行所述上样,其中盐选自:NaCl、硫酸铵和硫酸钾。根据优选的实施方案,缓冲液是浓度低于100mM的Tris,盐是NaCl。

[0026] 通过降低缓冲溶液中的NaCl浓度低于2.5M,将目标蛋白质从疏水相互作用(HI)层析洗脱下来。

[0027] 然后使HI洗脱物中的缓冲液达到低于15mM的浓度和6.5至8的pH并上样到HA柱上。

- [0028] 优选地,所述缓冲液是具有6.6至7.4的pH的Tris或磷酸盐。
- [0029] 更优选地,缓冲液是磷酸盐,其中CaCl<sub>2</sub>以低于0.5mM的浓度添加,优选为约0.3mM。
- [0030] 备选地,所述缓冲液是具有上述相同pH范围的Tris,优选包含MgCl<sub>2</sub>。
- [0031] 甚至更优选地,MgCl<sub>2</sub>具有低于1.5mM的浓度,优选为约1.2mM。
- [0032] 优选的缓冲液浓度、组成和pH是通过将包含目标蛋白质的HI洗脱液进行稀释或渗透来实现的,然后将其上样到HA固相柱上进行第三个层析步骤。在该层析之后,要么在流穿液中发现目标蛋白质,要么备选地通过将磷酸根离子浓度增加至15mM以上来洗脱目标蛋白质,其中所述增加优选通过磷酸盐浓度梯度进行。
- [0033] 将本发明的纯化方法应用于在N末端包含PSGL-1 (GenBank登录号Q14242.1) 成熟形式的至少氨基酸5-16的可溶性目标蛋白质。
- [0034] 更优选地,它还包含神经视网膜特异性亮氨酸拉链蛋白 (NCBI登录号NP\_0061681) 的至少氨基酸187-208,或与氨基酸187-208具有90%同源性的氨基酸序列。
- [0035] 甚至更优选地,所述可溶性目标蛋白质包含:在N末端的PSGL-1 (GenBank登录号Q14242.1) 成熟胞外形式的至少氨基酸1-19或1-47、神经视网膜特异性亮氨酸拉链蛋白 (NCBI登录号NP\_0061681) 的至少氨基酸187-208以及包含至少一个适用于二硫桥的Cys的共价二聚化结构域。
- [0036] 可溶性目标蛋白质的一般和优选实施方案在序列表中分别为SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:1所示。

## 附图说明

- [0037] 图1.在实施例2的HA纯化后,最终汇集级分在215nm处的RP-HPLC分析。目标蛋白质的保留时间 (R<sub>t</sub>) 为约9.7分钟。
- [0038] 图2.在实施例3的HA纯化后,最终汇集级分在215nm处的RP-HPLC分析。目标蛋白质的保留时间 (R<sub>t</sub>) 为约9.7分钟。
- [0039] 图3.在实施例4的HA纯化后,最终汇集级分在215nm处的RP-HPLC分析。目标蛋白质的保留时间 (R<sub>t</sub>) 为约9.7分钟。

## 具体实施方式

- [0040] 定义
- [0041] 表述“固体基质”、“固体支持物”和“树脂”旨在包括适合于连接可用于使目标蛋白质能够与固定相结合的官能团的任何种类的固相支持物或基质,在下文中也称为固体支持物。固定相包含基质和选择性结合目标蛋白质(或污染物)的官能团。基质通常通过共价键结合官能团。
- [0042] “阴离子交换固相层析”(AE)是指包含阳离子基团作为官能团的固定相,所述阳离子基团例如二乙基氨基乙基(DEAE)、三甲基铵基乙基(trimethylammoniumethyl, TMAE)和季铵。优选的AE官能团是强阴离子交换基团;更优选的是季铵离子或类似的带正电荷的官能团。
- [0043] “疏水相互作用固相”(HI)是指具有疏水基团作为官能团的固定相。疏水官能团的例子是:丁基、辛基、苯基等。

[0044] “羟基磷灰石层析”(HA)是指在具有式 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ 的磷酸钙形式上进行的层析,也表示为式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,这表示包含两个实体的晶胞。出于层析目的,HA优选为陶瓷HA(I型或II型)。

[0045] “HPLC”是指用于分析或制备目的的高性能或高压液相层析系统。RP-HPLC是指用于分析重组蛋白质样品的反相HPLC技术,优选使用苯基或C4柱。

[0046] 如说明书中将更详细描述的,“低磷酸盐缓冲液”是指包含2mM至15mM、优选约5mM磷酸根离子浓度的溶液。通过将0.69g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 溶解在1升 $\text{H}_2\text{O}$ 中就获得了低磷酸盐缓冲液的例子。低磷酸盐缓冲液可包含盐(例如 $\text{MgCl}_2$ 或 $\text{CaCl}_2$ ),在 $\text{MgCl}_2$ 的情况下包含0.1至1.2mM的浓度,优选约1mM,在 $\text{CaCl}_2$ 的情况下为0.1mM至1mM,优选0.3mM。

[0047] “可溶性目标蛋白质”是指重组的高度阴离子蛋白质,优选P-选择素糖蛋白配体1(PSGL-1)的可溶形式,更优选表达为嵌合蛋白或融合蛋白,其中选择素结合区域包含PSGL-1的至少氨基酸5-16,携带对选择素结合而言重要的氨基酸和翻译后修饰,如Cummings RD, Brazilian Journal of Medical and Biological research, 1999, 32:519-528中所述,并且可溶于水性介质,例如具有不低于6.5的pH的缓冲溶液,即来自CHO细胞的条件培养基。

[0048] 通过免疫测定(ELISA、RIA、蛋白质印迹、SPR等)用商业 $\alpha$ -PSGL-1抗体,或者基于免疫学特征或分子量、在特定柱上的保留时间以及重组分子的其他物理性质而通过物理分离方法(例如HPLC、RP-HPLC、SDS-PAGE),可以监测复杂化合物(前文定义的)以及粗纯化物(即部分纯化物,例如洗脱的层析级分)中的PSGL-1及其嵌合体的存在。

[0049] 在本文上下文中提到层析时,固体支持物、固相或基质可互换使用以表示层析的固定相,其中通常目标蛋白质处于流动相中,并首先使其流过而将其吸附到固定相上,然后通过改变条件将其释放。

[0050] 根据本发明的优选实施方案,在固体基质本身或者最终浆化(例如在水中)的固体基质上进行层析,并施加到柱(例如有机合成中常用的层析柱)上。也采用商购的树脂预填柱。在使用之前,可以通过使用本领域已知的程序(例如多次洗涤,即用水)任选地处理树脂(或预填柱)以除去可能从柱中泄露并在洗脱液中收集到的可能杂质。

[0051] 因此,例如,根据厂商说明书,通过重力或通过改进的压力洗脱,或者通过合适的泵,使用缓冲液处理柱适当的时间范围并以监测的流速进行。这些条件应使基质随后能够通常通过离子键可逆地吸附蛋白质,从而构成负载蛋白质的固体基质。

[0052] 除非另有说明,“适当的时间范围”是指进行过柱洗脱(或者,如果可能的话,通过再循环相同洗脱介质进行多次洗脱),直到所需百分比的基质(通常高于树脂理论容量(根据树脂说明书)的50%)都与目标蛋白质结合。

[0053] 上样物的实际量还取决于洗涤和洗脱条件,并通过测量洗脱液中感兴趣的目标蛋白质进行监测。典型的洗脱时间为约30分钟至约3小时。

[0054] “流速”是指能够表示为线性流速(cm/h)并根据所选基质进行设定的恒定流速;例如,离子交换层析优选设定为约90cm/h。

[0055] 通常,在每次层析运行之前,应根据厂商说明用与纯化用上样溶液或介质匹配的缓冲液来平衡固定相。平衡后,可将条件培养基上样到柱上,上样后如果需要的话,用合适的缓冲液进行洗涤。合适的洗涤缓冲液的例子是平衡缓冲液本身以及具有相同pH缓冲范围和盐浓度的不同缓冲液。

[0056] 出于本发明的目的,当目标蛋白质包含在复杂混合物(例如先前已分泌它的条件细胞培养基)中,或者更通常包含在缓冲溶液(例如上样或洗脱缓冲液)中,以及存在不适合目标蛋白质预期用途的污染物,所述溶液将在下文中定义为“混合物”或“复杂混合物”,至少直到目标蛋白质达到适合预期用途的纯度水平(即 $\geq 90\%$ ,或优选 $\geq 95\%$ ,以用于体内应用)。

[0057] 如本发明所述,通过结合和解吸具有不同性质的固相来分离和纯化上述定义的混合物或复杂混合物中的可溶性目标嵌合蛋白,其中进行了三种不同固相的层析程序。通过将条件(即缓冲液或盐浓度、pH等)从“上样”溶液转变为“洗脱”溶液来进行对所述固相上样和从所述固相上洗脱。在可溶性目标重组嵌合蛋白的“上样”和“洗脱”之间,可以洗涤固相以除去仅与其松散结合的污染物(即通常为蛋白质)。为除去这些污染物,通常使用具有上样缓冲液相同组成或相同离子的选定缓冲液,如本领域技术人员所知的。

[0058] 在任选的洗涤之后,将具有洗脱缓冲液的液体组合物与上样了目标蛋白质的基质相接触,通常通过在监测条件下过柱渗滤约10分钟至约180分钟的一段时间以用改变的缓冲条件(即高盐对低盐、不同pH等)洗脱目标蛋白质。这种模式在本文中定义为“正层析”。然而,也可以通过使污染物结合固相、在流穿液中回收目标蛋白质来进行层析。这种模式在本文中定义为“负层析”,尽管很少使用,但它可以提供有趣的结果,如在本发明中用于HA层析的优选实施方案。

[0059] 详细说明

[0060] 本发明的主要方面涉及纯化本质上为酸性的可溶性目标蛋白质的三步法,所述蛋白质优选包含PSGL-1的N-末端部分,所述方法基于强阴离子交换、疏水相互作用和羟基磷灰石层析。

[0061] 优选地,可溶性目标蛋白质是嵌合蛋白,其N-末端包含SEQ ID NO:1的至少氨基酸5-16、1-19、5-41或1-47,其中氨基酸1代表成熟PSGL-1蛋白质的第一个氨基酸,对应于GenBank记录登录号Q14242.1(2016年11月2日更新)的氨基酸42并且是Gln(Q)。优选地,P-选择素结合区域包含成熟PSGL-1的氨基酸1-47或由其组成,如SEQ ID NO:1所示。

[0062] 根据优选的实施方案,嵌合目标蛋白质在N末端包含成熟PSGL-1的至少氨基酸1-19,或更优选其氨基酸1-47;此外,它包含如以下式所定义的具有至少一个半胱氨酸和少量侧翼氨基酸的共价二聚化结构域,以及作为非共价二聚化结构域的与神经视网膜特异性亮氨酸拉链(NRL)蛋白(NCBI登录号NP\_0061681)的至少氨基酸187-208具有至少90%同源性或同一性的氨基酸序列。这种可溶性嵌合体在本文中有时也称为sPSGL-1-NRL。

[0063] 更优选地,神经视网膜特异性亮氨酸拉链蛋白(NCBI登录号NP\_0061681,2016年10月15日更新),即非共价二聚化结构域,优选包含氨基酸186-209、185-210、184-211、183-212、182-213、181-214、181-215、186-208、186-210、187-208,或者包含至少氨基酸187-208加上额外的取自序列NP\_006168.1的181-215区域的氨基酸187-208的N-或C-末端或两端的1、2、3、4、5、6或7个侧翼氨基酸的任何片段。

[0064] “共价二聚化结构域”是指至少携带一个可用于二硫桥的半胱氨酸的短氨基酸序列。这种共价二聚化结构域的例子是IgG的铰链区。

[0065] 共价二聚化结构域具有通式:

[0066]  $(X_1)_n-C(X_2)_m-(X_3)$ ,

- [0067] 其中
- [0068]  $X_1$ 和 $X_2$ 代表任何氨基酸或氨基酸序列,不包括Cys;
- [0069] C是半胱氨酸;
- [0070]  $X_3$ 是任何氨基酸,以及
- [0071] n和m是包含1至6的整数。
- [0072]  $X_1$ 优选包含脯氨酸和/或组氨酸和/或苏氨酸。
- [0073] 更优选地, $X_1$ 包含脯氨酸和组氨酸或者组氨酸和苏氨酸或者脯氨酸和苏氨酸。
- [0074] 根据优选的实施方案, $X_1$ 包含脯氨酸、组氨酸和苏氨酸,优选按此顺序;n最多为5; $X_2$ 是或包含脯氨酸。根据另一优选的实施方案, $X_2$ 是Pro-Pro且 $X_3$ 包含半胱氨酸和至少脯氨酸。
- [0075] 更优选地,共价二聚化结构域是IgG1铰链区或其功能片段,对应于SEQ ID NO:1的氨基酸48-55。
- [0076] 在更通常的实施方案中,共价二聚化结构域由SEQ ID NO:2的残基15-17所定义。
- [0077] SEQ ID NO:1代表可溶性PSGL-1-NRL嵌合目标蛋白质的优选实施方案,而SEQ ID NO:2代表可溶性PSGL-1-NRL嵌合目标蛋白质更通常的通式。
- [0078] 嵌合蛋白还优选包含C末端的间隔区,所述间隔区在其C-末端包含适于与其他分子和/或化学部分(例如成像和/或治疗部分)共价化学缀合的残基。用于化学缀合的示例性氨基酸是半胱氨酸和赖氨酸。间隔区为约4-20个氨基酸的长度,并包含一个或多个选自下组的氨基酸:Gly、Ser、Pro、Ala、Val、Leu,且在其C-末端携带半胱氨酸或赖氨酸,优选是在倒数第二位。间隔区是优选嵌入丙氨酸或其他中性氨基酸(例如缬氨酸或类似物)的聚甘氨酸,并且它携带半胱氨酸或赖氨酸,优选赖氨酸,接着是Gly、Ser、Pro、Ala、Val、Leu,优选Gly。优选的间隔区具有对应于SEQ ID NO:1的氨基酸91-99的序列,还包含残基100和101,用于缀合反应中的正确化学反应性。然而,氨基酸91-99的序列仅代表间隔区的示例性实施方案,因为可由本领域技术人员设计可同样适用于此目的的其他氨基酸序列。事实上,间隔区更通常的实施方案由残基42的特征所限定,优选与SEQ ID NO:2的残基43和/或44的特征组合。
- [0079] SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的大多数N-末端部分由PSGL-1蛋白质的N-末端部分所代表,由于5、7和10位酪氨酸(成熟天然PSGL-1蛋白质的相同位置)上至少3个或更多个硫酸化的存在而提供净负电荷。
- [0080] 蛋白质中的硫酸化是指在目标蛋白质中所包含的氨基酸上或氨基酸之间用 $-SO_4H$ 取代至少一个羟基( $-OH$ )。
- [0081] 在自然界中,PSGL-1是翻译后高度加工的蛋白质:它是糖基化的,特别是当正确地翻译后加工时它包含16位苏氨酸残基上的O-连接聚糖;O-连接聚糖通常包含糖残基,例如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、岩藻糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖(Man)、己糖、木糖、唾液酸或其混合物。
- [0082] 通常存在于本发明嵌合蛋白的PSGL-1N末端部分上的O-连接聚糖由GalNAc、GlcNAc、岩藻糖、唾液酸和半乳糖所构成。PSGL-1上的O-连接聚糖优选是唾液酸化和岩藻糖基化的,并优选由与苏氨酸残基结合(即与Thr<sup>16</sup>结合)的唾液酸化路易斯X聚糖结构(sLe<sup>x</sup>,唾液酸-吡喃半乳糖基-岩藻糖-N-乙酰葡萄糖胺)组成。天然和重组PSGL-1的翻译后修饰已在

R.D.Cumming, Braz.J.Biol.Res., 1999, 32 (5) :520-528 和 D.Sako, Cell, 1995, 83:323-331 中描述。值得注意的是, PSL-1 蛋白通常以二聚体形式存在, 其中每个单体通过至少一个二硫桥与另一个共价连接。

[0083] 根据上面给出的定义, 在本发明中, AE 和 HI 层析以正模式进行, 而 HA 可以通过正模式或负模式进行, 尽管在前面给定条件下于流穿液中回收目标蛋白质的 HA 负层析是优选的。

[0084] 对于根据本发明的纯化方法而言, 在从重组细胞系 (优选稳定表达该蛋白质的 CHO 细胞) 中回收上清液 (即“细胞条件培养基”) 后, 优选在 0.45 或 0.22 μm 多孔膜 (即硝酸纤维素或其他材料) 上过滤或离心以除去细胞和细胞碎片。

[0085] 细胞培养基通常是真核无血清培养基 (例如 EXCEL CHO、OptiCHO™ (LifeTechnology)、GE/PAA 的 ActiCHO™、FortiCHO™ (Thermo Fisher Scientific)、Millipore 的 CellVento™ CHO 200 和 CellVento™ CHO 220、SAFC 的 83836C、Irvine 的 BalanCD™, 其组成未公开, 或类似培养基) 并包含 10mM、优选 4-8mM 谷氨酰胺 (或类似物 GlutMax™)。

[0086] 此外, 在上样到层析用固定相之前, 还应使条件培养基的 pH 值包含约 6.5 至约 8, 优选 6.8 至 7.8, 或更优选包含 7.2 至 7.6, 通常约 7.5, 可以通过加入适量的碱或酸 (例如碱性碱等) 来调节, 因为条件培养基通常是酸性的。

[0087] 此外, 对于 AE 层析而言, 例如监测细胞条件培养基的中等电导率也是重要的, 其优选应低于 30mS/cm, 更优选低于 20mS/cm, 甚至更优选低于 10mS/cm。

[0088] 然后, 在阴离子交换固定相上进行第一次阴离子交换 (AE) 层析。固定相包含作为阴离子交换剂的官能团, 优选强阴离子交换剂, 更优选季铵。优选的树脂是 Capto Q™ (GE), 即具有季铵官能团的交联珠状琼脂糖。替代性基质是携带相同官能团的苯乙烯/二乙烯苯。

[0089] 将经调节和过滤的培养基上样到 AE 固相柱之前, 通常用合适的缓冲液进行平衡, 所述缓冲液通常具有与上样缓冲液相同的组成。合适缓冲液的例子是包含 5mM 和 30mM 之间浓度的 Tris 缓冲液, pH 包含约 6.5 至约 8, 优选 6.8 至 7.8, 更优选 7.4 至 7.8, 或约 7.5。缓冲液可含有低浓度的盐, 即低于 0.3M 的 NaCl 或 KCl, 优选低于 0.1M 的 NaCl 或 KCl, 更优选低于 5mM 的 NaCl 或 KCl。

[0090] 替代性平衡/上样/洗涤缓冲液是: Tricine (pH 范围: 7.4-8.8), 三乙醇胺 (pH 范围: 7.3-8.3), HEPES (pH 范围: 7.0-8.0)。更多的替代性缓冲剂如下: TES (pH 范围: 7.2-7.8), MOPS (pH 范围: 6.5-7.9), 具有低盐浓度的磷酸盐 (pH 范围: 6.7-7.6), 其中所述盐优选 NaCl 或 KCl, 浓度低于 0.3M 的 NaCl 或 KCl, 优选低于 0.1M 的 NaCl 或 KCl, 更优选低于 5mM 的 NaCl 或 KCl。

[0091] 以 10-90cm/h、优选 60-90cm/h、更优选 80-90cm/h 的速度进行 AE 上样。

[0092] 通过等度洗脱或者通过将盐水溶液浓度增加至 1M 的正梯度洗脱来实现从 AE 上将结合的分子洗脱下来。PSGL-1 变体 1A 的典型梯度洗脱包括增加单阳离子盐浓度, 优选在 Tris 或磷酸盐缓冲液 5-30mM、优选 15-25mM 中的 NaCl 或 KCl。优选的洗脱条件是 10 个柱体积洗脱缓冲液的 0 至 100% 梯度, 即在 20mM Tris 中的 0-100% 的 1M NaCl。

[0093] 当通过等度步骤进行洗脱时, 典型的洗脱步骤至少为三个: 几个柱体积 (CV) (即 3-4 个通常是合适的), 每个柱体积包含单阳离子盐的增加盐浓度溶液, 即从浓度 20-40%、优

选25-35%、更优选28-33%作为第一步(即约30%)开始,41-80%、更优选50-70%、甚至更优选55-65% (即约60%) 作为第二步,以及81-100%、更优选90-98%或约100%作为第三步,如果需要,盐溶液为pH接近中性的Tris 5-30mM (20mM) 中的1M单阳离子盐(即NaCl) 溶液。

[0094] 根据优选的实施方案,用20%至40%、优选25%至35%、更优选约30%以及(90-100%)、更优选100%的20mM Tris pH 7.5,1M NaCl溶液的两步洗脱AE柱。因此,两步洗脱代表了本方法明显优于标准AE洗脱条件的优点。

[0095] 通过RP-HPLC确定的第一次AE层析的结果是复杂混合物,其中目标蛋白质仍然被条件培养基中存在的超过95%的总DNA和超过约40%的总蛋白质污染,因此需要进一步纯化。

[0096] 目标蛋白质从层析中的纯化和有效回收可以通过不同方式进行监测,即通过不同分析方法来检测层析级分或流穿液中感兴趣的蛋白质,这可以根据所使用的洗脱方法进行选择:即当通过梯度进行洗脱时,可以通过使用合适抗体通过免疫化学方法(例如蛋白质印迹、RIA、ELISA或SPR)来分析级分,以便检测含有目标蛋白质的级分。合适抗体的例子是小鼠抗PSGL-1 IgG (Merck)。

[0097] 洗脱级分中的残留DNA可以通过商业测定法进行监测,例如DNA定量试剂盒、荧光测定(Sigma)。

[0098] 事实上,重组PSGL-1融合蛋白(本发明方法中由sPSGL-1-NRL变体1A (SEQ ID NO: 1)示例)是高度带负电荷的,并且在AE树脂上的表现与其他生物分子(当然例如其他酸性蛋白质和核酸)类似。

[0099] 由此可见,对于酸性蛋白质(例如PSGL-1的胞外可溶部分)而言,污染物中的DNA代表了比碱性蛋白质更多的问题,因为DNA与酸性蛋白质两者都具有相同的负电荷。

[0100] 事实上,EP 1681298和EP 1681299处理了重组可溶形式PSGL-1的纯化和从感兴趣蛋白质中除去污染DNA的技术问题。据说通过阴离子交换层析,接着通过疏水相互作用固相层析以及通过用高盐、水醇溶液洗涤或备选通过金属螯合层析达到了目的。

[0101] 在该问题上保持沉默的Takada公开了通过阴离子交换(AE)层析,接着通过HA和通过尺寸排阻层析(SEC)从重组CHO细胞的条件培养基中纯化可溶形式PSGL-1。用这种方法达到的纯度和收率都没有公开。

[0102] 根据本发明,在AE层析之后,用固体NaCl使AE汇集的洗脱级分的盐浓度达到高盐浓度,即包含2M至5M、更优选3.5至4.5M、通常约4M的盐浓度,进行下一个疏水相互作用柱的上样。替代性盐是技术人员已知浓度的硫酸铵、硫酸钾或氯化钾。优选通过添加所需的碱或酸将pH调节至中性,即约7.5。在层析之前,用具有高盐浓度的合适缓冲液平衡HI柱。合适缓冲液的例子是TRIS/NaCl缓冲液或磷酸盐/NaCl缓冲液,pH包含7至8,优选7.5,4M NaCl。NaCl的替代性盐是浓度通常包含1M至2M的硫酸铵,或者浓度通常包含1M至3M的硫酸钾。

[0103] 在具有疏水官能团的固定相上进行如上所定义的疏水相互作用(HI)层析。疏水官能团的例子是:丁基、辛基或苯基。优选的固定相是具有苯基作为官能团的Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> (GE)。可以使用其他商业树脂,例如辛基-或丁基-Sepharose<sup>TM</sup>,优选Capto Butyl<sup>TM</sup> (GE)。替代性树脂基质是具有相同丁基或苯基官能团的苯乙烯/二乙烯苯。

[0104] 通常用与上样溶液相同组成的缓冲溶液(即用高盐溶液)进行洗涤,具有包含2M至

5M、更优选3.5至4.5M、通常约4M NaCl的盐浓度。如上样溶液一样,也考虑了本领域技术人员已知的替代性盐,例如硫酸铵、硫酸钾或氯化钾。缓冲系统的浓度通常低于100mM,并将pH调节至如上所定义的中性值。

[0105] 通常使用1至5个柱体积的上样缓冲液进行洗涤,优选2-4个柱体积。

[0106] 在HI层析期间,上样溶液的高盐浓度促进了重组蛋白质与疏水官能团的相互作用。通过这种层析,核酸和其他污染物都被收集在流穿级分中,而目标重组蛋白质结合在固定相上。

[0107] 通过降低盐浓度来洗脱蛋白质,即包含NaCl的缓冲液情况下低于2.5M的NaCl,更优选低于3.5M,或者在缓冲体系中包括有机改性剂,例如本领域技术人员已知的低级醇(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)。

[0108] 合适的洗脱缓冲液是在上样具有目标蛋白质的混合物之前用于柱平衡的缓冲液。它包含比用于HI洗脱的缓冲液低得多的盐浓度,或者它根本不含盐。优选的合适洗脱缓冲液是包含7至8、优选7.5的pH的Tris或磷酸盐缓冲液。

[0109] 低盐缓冲液洗脱可以通过梯度或等度步骤进行。如果通过梯度进行洗脱,通常通过SDS-PAGE或通过如上所述的免疫化学方法来分析级分,以检测含有目标蛋白质的级分,而等度步骤洗脱的再现性允许不必进行免疫化学分析。

[0110] 通常在HIC之后,无其他蛋白质的目标蛋白质纯度不高于70-75%,残留DNA含量仍然是约5%。

[0111] 然后,作为最后的层析步骤,进行羟基磷灰石(HA)柱层析。

[0112] 羟基磷灰石(HA)具有带正电荷和带负电荷的两种基团,已经描述过通过C-位点(钙基团)与其结合的酸性蛋白质的纯化,以及通过P-位点(磷酸基团)结合的碱性蛋白质的纯化。HA还具有对DNA的亲和力,DNA是由于核酸骨架中的磷酸基团而带负电荷。事实上,HA还用于将DNA从物质的复杂组合物(例如细胞裂解物)中纯化出来。

[0113] 然而,即使已经表征了HA相互作用模式,尽管重组蛋白质的纯化相当普及了,但是对于所有蛋白质和污染物来说,羟基磷灰石在层析过程中的表现仍然不容易预测。

[0114] 在重组蛋白质纯化领域,已经描述了HA层析结合其他层析步骤,以除去高分子量蛋白质聚集体(即US 8,058,407)或者纯化复杂分子,例如病毒样颗粒(即,EP 1893751所公开的)。

[0115] 就申请人对可溶性PSGL-1蛋白质的了解而言,HA层析仅在Takada(上文引用)中描述过,随后需要尺寸排阻层析(SEC)。然而,SEC不易放大,因此不适合工业应用。

[0116] 几种羟基磷灰石层析树脂是可商购的。任何形式的羟基磷灰石都适用于本发明的目的,优选陶瓷HA,可作为I型或II型树脂获得,其中II型是优选的(可商购获得,即来自Bio-Rad,如CHT<sup>TM</sup>)。

[0117] 在HA层析之前,通过调节盐和缓冲液类型和浓度来制备HI洗脱液,以达到非常低的盐和磷酸盐浓度。这些条件通常通过对通常具有与上样缓冲液相同组成的合适缓冲液进行渗滤,或者用非常低的盐和磷酸根离子溶液(通常为水)稀释前次层析洗脱液来达到。根据本发明的低盐和磷酸盐缓冲液的例子是2-10mM磷酸盐缓冲液,pH包含6.5至8,更优选包含6.6至7.4,甚至更优选包含约6.7至约7.2。在优选的实施方案中,pH为约6.8,磷酸盐缓冲液可包含且优选包含低CaCl<sub>2</sub>或MgCl<sub>2</sub>浓度或者Tris 1-20mM。

[0118] 因此,为进行羟基磷灰石(HA)层析,稀释或渗滤的疏水相互作用洗脱液优选加入二价阳离子,更优选浓度优选低于1mM、或优选低于0.5mM、更优选约0.3mM(包括中间值和极限值的范围)的CaCl<sub>2</sub>。根据本发明的羟基磷灰石层析需要合适的上样缓冲液,即低浓度磷酸盐和低浓度NaCl缓冲液,pH包含6.5至8,更优选包含6.6至7.4,甚至更优选包含约6.7至约7.2。在优选的实施方案中,pH为约6.8。低盐和磷酸盐缓冲条件优选通过渗滤达到,优选在合适的超滤装置中对HA上样缓冲液进行渗滤。合适装置的例子是:搅拌超滤单元、切向流盒或者中空纤维筒。备选地,可将HI层析洗脱液适当稀释,即用水稀释至2-10倍。优选的稀释倍数为约4至5。

[0119] 通过负洗脱(目标蛋白质在流穿液中发现,而污染物与固定相结合)或正洗脱(目标蛋白质与固定相结合)层析的羟基磷灰石(HA)层析而纯化目标蛋白质。在负洗脱层析中,不需要进一步分析来检测含有目标蛋白质的级分,因为这总是在流穿液中发现。这种层析是优选的,提供了更高纯度的目标蛋白质。此外,它是高度可重复的且更易于实施,因为它不需要洗柱。包括HA的整个过程的高再现性使该过程能够完全自动化,这对于工业方法而言代表了巨大的优势。

[0120] 在负HA层析中,在具有低浓度(即2-15mM,优选5-10mM)磷酸根离子的磷酸盐缓冲液中上样后,在流穿液(FT)中回收了N末端携带可溶形式PSGL-1的嵌合目标蛋白质,所述磷酸盐缓冲液的pH包含6.5至8,更优选包含6.6至7.4,甚至更优选包含约6.7至约7.2,还包含低浓度CaCl<sub>2</sub>,优选约0.3mM的CaCl<sub>2</sub>。在优选的实施方案中,pH为约6.8。

[0121] 备选地,在洗脱(或正)层析中,目标蛋白质在合适的缓冲液中与固定相结合,然后通过改变盐和/或磷酸盐条件进行洗脱。合适的缓冲液的例子是磷酸盐/CaCl<sub>2</sub>或者磷酸盐/MgCl<sub>2</sub>缓冲液,pH包含6.5至8,更优选6.6至7.4,甚至更优选约6.7至约7.2。在优选的实施方案中,pH为约6.8。磷酸根离子的浓度优选低于5mM,甚至更优选低于4、3、2、1、0.1、0.01、0.001mM。

[0122] 在正层析中,可以通过梯度或分步洗脱来增加磷酸盐缓冲液浓度而实现洗脱,优选高于15mM磷酸盐缓冲液并包含至少0.3mM CaCl<sub>2</sub>或1mM MgCl<sub>2</sub>。

[0123] 备选地,也可以在低浓度Tris(即1-10mM Tris)中将目标蛋白质上样到HA上,所述Tris优选包含浓度低于1.2mM、优选约1mM的MgCl<sub>2</sub>。在这种情况下,优选在更高的磷酸根离子浓度缓冲液中洗脱,优选高于15mM并包含16-30mM、优选约20mM的磷酸根离子。通过0-12.5%梯度的500mM磷酸盐缓冲液即可以达到这些洗脱条件。

[0124] 应注意的是,使用“正”和“负”HA层析两者都可以获得无污染DNA和蛋白质的“治疗级”纯度(通常:污染DNA≤2%和无其他蛋白质的纯度≥95%)。

[0125] 实际上,包含HA作为最后纯化步骤的方法使得能够达到高于95%的PSGL-1纯度,PSGL-1纯度优选高于96%、97%、98%或99%无其他蛋白质且没有污染DNA,即如通过商业DNA定量测定(例如DNA定量试剂盒、荧光测定(Sigma))所测得的。

[0126] 至于最终收率,所回收的目标蛋白质具有远高于总目标蛋白质含量50%的收率,通常高于60%,通常约为70%或高于70%。这些收率代表了良好的结果,最重要的是对于工业方法而言,它们是相当标准化的和高度可重复的。

[0127] 如在其所有实施方案中所要求的,整个过程的高再现性使其能够完全自动化,这对于工业方法来说代表了巨大的优势。

[0128] 作为用本发明方法所取得的结果的比较,US2008/0274501描述了HA层析作为HI层析后对来自过表达目标蛋白质的复杂混合物(转基因烟草细胞)的酸性蛋白质的最终“精制(polishing)”步骤。对目标蛋白质回收所报道的最终收率远低于初始蛋白质含量的50%，因此远低于通过本发明方法对目标蛋白质通常所达到的最终收率。

[0129] 以下所描述的本发明及其特定实施方案仅仅是示例性的,不应视为对本发明的限制:它们表明了如何实施本发明且意为说明性的,并不限制本发明的范围。

[0130] 实验部分

[0131] 实施例1:用于初步研究的PSGL-1变体1A的制备。

[0132] 在根据Fugang Li等,J.Biol.Chem,1996,271:3255-3264的共表达编码核心2 $\beta$ -1,6-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶(C2GnT-M)和FTVII(岩藻糖基转移酶VII)的DNA序列的CHO-S细胞(Freedom<sup>TM</sup> CHO-S<sup>TM</sup>试剂盒手册-产品号A13696-01Life science Thermo Fisher Scientific,2015年7月)中产生PSGL-1-NRL嵌合蛋白变体1A(SEQ ID NO:1)。

[0133] 将CHO-S克隆在OptiCHO<sup>TM</sup>培养基中生长至少7天。

[0134] 收集上清液,在0.2 $\mu$ m PES膜上过滤,并上样到预先用20mM TRIS-HCl pH 7.5平衡过的强阴离子交换Capto Q柱(GE 17-5316-02,1.6x 6cm,12mL)上。

[0135] 用8个柱体积的直至1M NaCl的线性梯度将结合的蛋白质洗脱下来。将通过SDS-PAGE鉴定的含有嵌合目标蛋白质的洗脱级分用于第二苯基疏水相互作用层析纯化步骤。

[0136] 将NaCl溶解在汇集级分中至浓度为4M。然后将该汇集物上样到1mL HIC柱(HiTrap Phenyl HP<sup>TM</sup>,GE Healthcare Life Sciences,Catalog#17-1351-01)上。通过将氯化钠浓度线性降低至零的10个柱体积来实现洗脱。通过SDS-PAGE分析鉴定含有目标蛋白质的级分,并汇集在一起用于第三尺寸排阻层析(SEC)步骤。将SEC柱(HiLoad 16/600Superdex 200<sup>TM</sup>pg,GE Healthcare Life Sciences,Catalog#28-9893-35)用作流动相的20mM Tris-HCl pH 7.5,150mM NaCl预平衡。将通过SDS-PAGE分析所显示的含有嵌合目标蛋白质变体1A的级分汇集并浓缩(Amicon超离心过滤单元,EMD Millipore)。

[0137] 按说明书手册所述,用Phast-System(GE)进行纯化蛋白质的蛋白质印迹分析。用PBS+1%BSA将硝酸纤维素膜饱和(在室温下1小时)。在室温下将膜与含有抗P-选择素糖蛋白配体-1抗体1:1000(抗P-选择素糖蛋白配体-1抗体,克隆KPL-1,EMD Millipore,cod.MAB4092)的PBS+0.5%Triton X-100+1%BSA一起温育1小时。将膜与作为二抗的抗小鼠IgG-HRP一起温育并用ECL显色信号,显示了阳性抗PSGL-1抗体识别,如所预期的在约60kDa处作为单一条带出现,其在还原条件下迁移至约30kDa处。

[0138] 使用肽谱(PMAP)阐明了嵌合糖蛋白的翻译后修饰(PTM),包括硫酸化以及N-和O-糖基化。为此目的,使用胰凝乳蛋白酶和Asp-N进行蛋白质消化,接着进行LC-MS液相层析-质谱。

[0139] 对纯化的重组变体1A进行的分析测定得出以下结论:

[0140] • PSGL-1变体1A糖蛋白的N-末端结构主要是焦谷氨酸形式pQATEYEYL。

[0141] • 通过归因于(<sup>50</sup>TCPPCPL<sup>56</sup>)<sub>2</sub>序列的(M+2H)<sup>+2</sup>=728.5的存在确认了PSGL变体1A的二聚体特征。未检测到对应于该肽的单体形式的离子,表明PSGL变体1A完全呈二聚体形式。

[0142] • 确认了Thr<sup>16</sup>上的O-聚糖残基的结构:实际上鉴定了预期的唾液酸-路易斯-X基序,其为包含N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、岩藻糖和唾液酸的核心2结构。

- [0143] • 在负扫描模式下通过质谱法证实了酪氨酸5、7和10的硫酸化。
- [0144] 因此,变体1A (SEQ ID N0:1) 包含与(人)选择素正确结合所必需的所有特征。
- [0145] 实施例2:通过AE/HIC/HA(负)纯化PSGL变体1A
- [0146] 将来自单个CHO克隆的600mL条件培养基在0.22μm膜上过滤,并上样到用20mM TRIS pH 7.5平衡过的AEX柱 (Capto Q<sup>TM</sup>, GE, 2.6 x 7cm, 37mL) 上。用30%和100%的20mM TRIS, 1M NaCl, pH 7.5的两步洗脱将结合的蛋白质洗脱下来。目标蛋白洗脱在100%级分中。用1M NaOH清洗柱,并在4℃下储存于20%EtOH中。条件培养基的电导率低于10mS/cm。
- [0147] 在AEX纯化的100%洗脱步骤汇集物中加入固体NaCl至终浓度为4M。将样品分成两部分以使柱不过载。然后将其上样到预先用20mM TRIS, 4M NaCl, pH 7.5平衡过的疏水相互作用层析柱 (Phenyl Sepharose<sup>TM</sup>, GE, 1.6x 9cm, 18mL体积) 上。用50%和100%的20mM TRIS pH 7.5的两步洗脱将结合的蛋白质洗脱下来。目标蛋白质洗脱在50%级分中。
- [0148] 第二次运行后,用0.2M NaOH清洗柱,并在4℃下储存于20%EtOH中。
- [0149] 将来自两次HIC运行的第一洗脱步骤的汇集物合并,通过添加500mM磷酸盐pH 6.8和1M CaCl<sub>2</sub>将磷酸盐/CaCl<sub>2</sub>浓度分别调节到10mM和0.3mM。然后在Amicon<sup>TM</sup>超滤搅拌池 (Merck, 组装有膜YM10, 标称截留分子量为10kDa) 上针对10mM磷酸盐, 0.3mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8进行渗滤。然后,将渗滤的汇集物上样到预先用10mM磷酸盐, 0.3mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8平衡过的羟基磷灰石柱 (BioRad, 2.2x 5cm, 19mL体积) 上。PSGL变体1A洗脱在FT级分中(负层析)。
- [0150] 根据厂商说明书,用Amicon<sup>TM</sup>离心过滤单元浓缩FT级分。将纯化的蛋白质在-40℃下冷冻。终浓度为0.89mg/mL,总收率为38.7mg (73%),纯度为99.7% (图1)。
- [0151] 在每个层析步骤后,通过DNA定量测定 (DNA定量试剂盒、荧光测定, Sigma, 检出限为2mg/L) 和RP-HPLC (相对其他蛋白质的纯度) 分别测量残留的DNA和其他蛋白质污染物。
- [0152] 将数值汇总在下表中:

纯化步骤	PSGL 变体 1A 的 RP-HPLC 纯度	残留 DNA 含量
阴离子交换	<58%	97%
疏水相互作用	72.6%	2%
羟基磷灰石	99.3%	低于检出限

- [0153] [0154] 实施例3:通过AE/HIC/HA(正)纯化PSGL变体1A
- [0155] 将1000mL条件培养基在0.22μm膜上过滤,并上样到用20mM TRIS pH 7.5平衡过的AEX柱 (Capto Q<sup>TM</sup>, GE, 2.6x 7cm, 37mL) 上。用30%和100%的20mM TRIS, 1M NaCl, pH 7.5的两步洗脱将结合的蛋白质洗脱下来。目标蛋白洗脱在100%级分中。用1M NaOH清洗柱,并在4℃下储存于20%EtOH中。
- [0156] 在AEX纯化的100%洗脱步骤汇集物中加入固体NaCl至终浓度为4M。将样品分成两部分以使柱不过载。然后将其上样到预先用20mM TRIS, 4M NaCl, pH 7.5平衡过的疏水相互作用层析柱 (Phenyl Sepharose<sup>TM</sup>, GE, 1.6x 9cm, 18mL体积) 上。用50%和100%的20mM TRIS pH 7.5的两步洗脱将结合的蛋白质洗脱下来。目标蛋白洗脱在50%级分中。
- [0157] 第三次运行后,用0.2M NaOH清洗柱,并在4℃下储存于20%EtOH中。
- [0158] 将来自每次HIC运行的第一洗脱步骤的汇集物合并,用水稀释4倍。然后,将稀释的

汇集物上样到预先用5mM磷酸盐,1mM MgCl<sub>2</sub>,pH 6.8平衡过的羟基磷灰石柱(BioRad,2.2×5cm,19mL体积)上。用0-12.5%梯度的500mM磷酸盐缓冲液将结合的蛋白质洗脱下来。PSGL变体1A作为第一个峰被洗脱。

[0159] 根据厂商说明书,用Amicon离心过滤单元(Ultracel-10膜,10kDa MWCO)浓缩含有目标蛋白质的级分。

[0160] 将纯化的蛋白质在-40℃下冷冻。终浓度为1.09mg/mL,总收率为25mg,相当于总目标蛋白质含量的约70%,纯度为98.7% (图2)。

[0161] 实施例4:通过AE/HA/SEC纯化PSGL变体1A。比较例。

[0162] 本方法在Takada (在背景技术中引用) 中描述。将200mL条件培养基在0.22μm膜上过滤,并上样到用20mM TRIS pH 7.5平衡过的AE柱(Capto Q<sup>TM</sup>,GE,2.6x 7cm,37mL) 上。用30%和100%的20mM TRIS,1M NaCl,pH 7.5的两步洗脱将结合的蛋白质洗脱下来。目标蛋白洗脱在100%级分中。用1M NaOH清洗柱,并在4℃下储存于20%EtOH中。

[0163] 根据厂商说明,使用Amicon离心过滤单元(Ultracel-10膜,10kDa MWCO) 将100%洗脱步骤级分针对25mM Tris,1M NaCl,1mM CaCl<sub>2</sub>,pH 7.4进行浓缩和渗滤。将浓缩物上样到预先用25mM Tris,1M NaCl,1mM CaCl<sub>2</sub>,pH7.4平衡过的羟基磷灰石柱(BioRad,2.2×5cm,19mL体积) 上。使用30mM磷酸盐,150mM NaCl,pH 7.4进行洗脱。

[0164] 根据厂商说明书,使用Amicon离心过滤单元(Ultracel-10膜,10kDa MWCO) 将洗脱液浓缩至5mL,并通过PBS pH 7.2平衡过的Sephacryl S-200HR<sup>TM</sup> (GE Healthcare,2.2x 88cm,334mL) 运行。通过蛋白质印迹分析收集到的级分。如说明书手册所述,用Phast-System (GE) 进行蛋白质印迹分析。用PBS+1%BSA将硝酸纤维素膜饱和(在室温下1小时)。将膜在室温下与含有抗P-选择素糖蛋白配体-1抗体1:1000 (抗P-选择素糖蛋白配体-1抗体,克隆KPL-1,Merck) 的PBS+0.5%Triton X-100+1%BSA一起温育1小时。

[0165] 用PBS+0.5%Triton X-100洗涤3次后,将膜与作为二抗的抗小鼠 IgG-HRP一起温育。

[0166] 在3次洗涤后,用ECL显色HRP信号,显示了阳性抗PSGL-1抗体识别。

[0167] 将纯化的蛋白质在-40℃下冷冻。终浓度为0.2mg/mL,总收率为4.89mg (62.9%) ,纯度为94.8% (图3)。

[0168] 结果表明,用现有技术方法得到的目标蛋白质变体1A的收率更低,最重要的是,纯度更低。

## 序列表

<110> Bracco Suisse SA  
<120> 可溶性PSGL-1蛋白质变体的纯化方法  
<130> B0700  
<150> EP17155366.2  
<151> 2017-02-09  
<160> 2  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 变体1A  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5) .. (5)  
<223> 硫酸化  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7) .. (7)  
<223> 硫酸化  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10) .. (10)  
<223> 硫酸化  
<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (16) .. (16)  
<223> 唾液酸-路易斯-X (O-聚糖)  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (90) .. (90)  
<223> 硫酸化  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (100) .. (100)  
<223> Lys或Cys用于缀合

<400> 1  
 Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr  
 20 25 30  
 Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Pro  
 35 40 45  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Leu Gln Gln Arg Arg Gly Leu Glu Ala  
 50 55 60  
 Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu Arg Ala Glu Val  
 65 70 75 80  
 Ala Arg Leu Ala Arg Glu Arg Asp Leu Tyr Gly Gly Gly Ala Gly  
 85 90 95  
 Gly Gly Gly Lys Gly  
 100

<210> 2

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合PSGL-1-NRL蛋白

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 任意氨基酸或氨基酸序列(来自PSGL-1氨基酸1-4)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2) .. (13)

<223> PSGL-1氨基酸5-16 (选择素结合区)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14) .. (14)

<223> 任意氨基酸或氨基酸序列(来自PSGL-1氨基酸17-47)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> 共价二聚化结构域侧翼区

<220>

<221> DISULFID

<222> (16) .. (16)  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (17) .. (17)  
<223> 共价二聚化结构域侧翼区  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (18) .. (18)  
<223> 任意氨基酸或氨基酸序列(来自NRL氨基酸181-186)  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (19) .. (40)  
<223> NRL氨基酸187-208  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (41) .. (41)  
<223> 任意氨基酸或氨基酸序列(来自NRL氨基酸209-215)  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (42) .. (42)  
<223> 间隔区  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (43) .. (43)  
<223> Lys或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (44) .. (44)  
<223> 排除Cys或Lys的任意氨基酸, 优选Gly或Ala  
<400> 2  
Xaa Tyr Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Xaa Xaa Cys  
1 5 10 15  
Xaa Xaa Leu Glu Ala Glu Arg Ala Arg Leu Ala Ala Gln Leu Asp Ala  
20 25 30  
Leu Arg Ala Glu Val Ala Arg Leu Xaa Xaa Xaa Xaa  
35 40

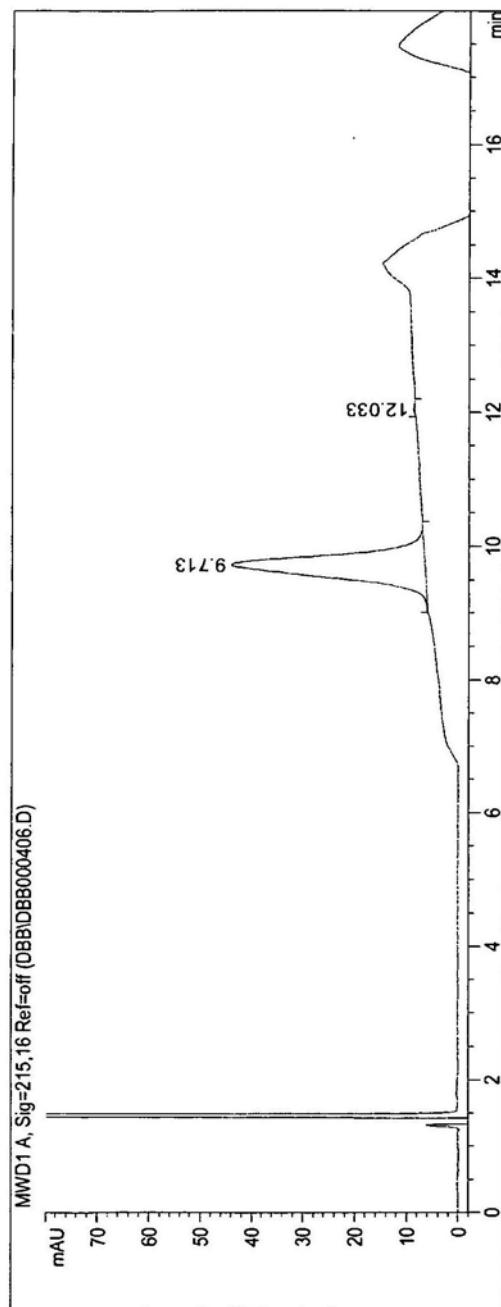


图1

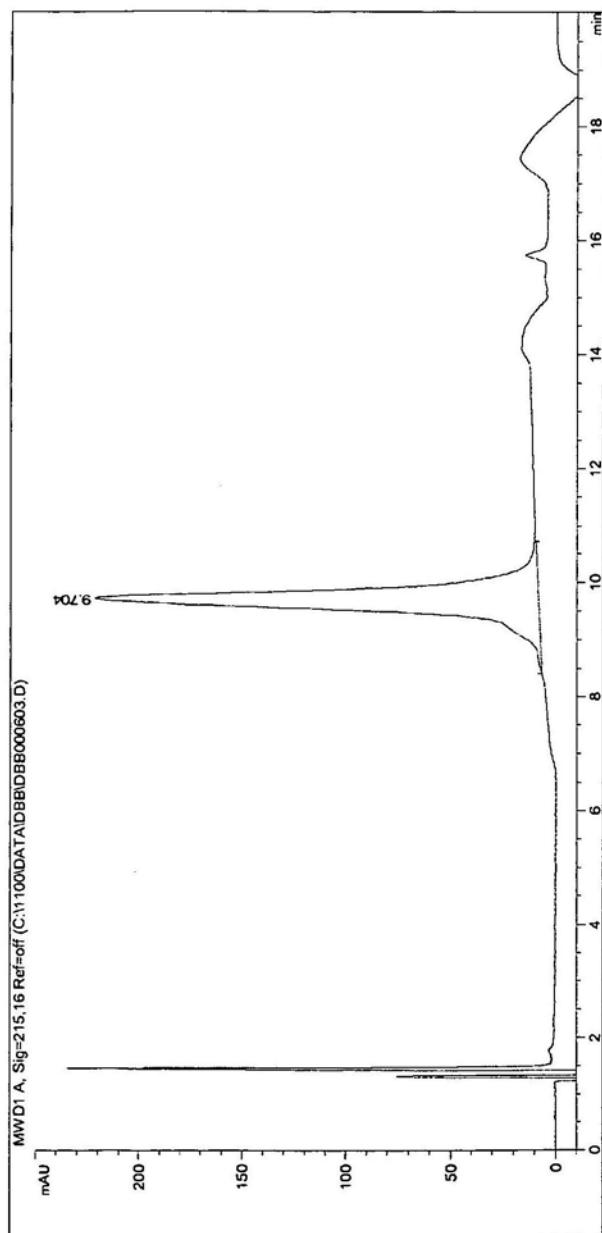


图2

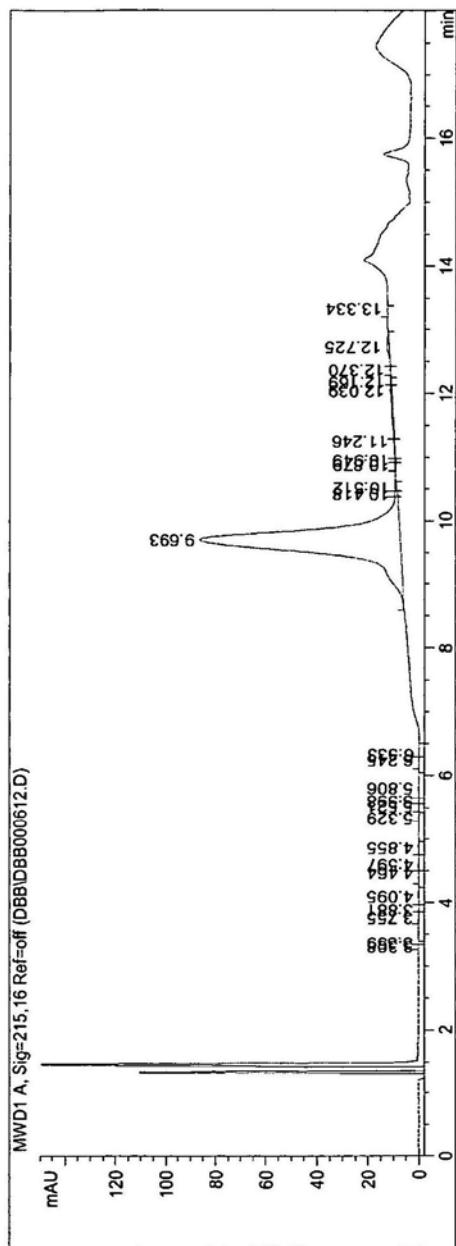


图3