



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107365346 A

(43)申请公布日 2017. 11. 21

(21)申请号 201710269454.2

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.05.25

C07K 1/18(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 1/16(2006.01)

61/348,143 2010.05.25 US

(62)分案原申请数据

201180025404.0 2011.05.25

(71)申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 H·F·刘 B·D·凯利

D·E·麦尔斯 B·麦库伊

K·M·佩蒂

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

权利要求书1页 说明书51页 附图30页

(54)发明名称

纯化多肽的方法

(57)摘要

本发明提供用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法及包含通过该方法纯化的多肽的制剂。该纯化方法包括阳离子交换材料和/或混合型材料。

1. 用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法, 其中, 所述方法包括 (i) 或 (ii):

(i) (a) 按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将所述组合物加样至阳离子交换材料上和 (b) 将从所述阳离子交换材料回收的组合物加样至混合型材料上的顺次步骤; 或

(ii) (a) 将所述组合物加样至混合型材料上和 (b) 按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将从混合型材料回收的组合物加样至阳离子交换材料上的顺次步骤。

纯化多肽的方法

[0001] 本申请是申请人于2011年5月25日提交的题为“纯化多肽的方法”的中国专利申请201180025404.0的分案申请

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2010年5月25日提交的美国临时专利申请号61/348,143的优先权,该临时专利申请的内容在此完整引入本文作为参考。

技术领域

[0004] 本发明提供用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法,及包含通过该方法纯化的多肽的制剂。

背景技术

[0005] 多肽的大规模、经济纯化是生物技术产业越来越重要的问题。通常,使用哺乳动物细胞系或细菌细胞系,通过细胞培养来产生多肽,该细胞系通过插入包含该多肽的基因的重组质粒改造为产生目的多肽。由于所使用的细胞系是活生物,必须用包含糖类、氨基酸和生长因子(通常从动物血清的制剂供给)的复合生长培养基饲养它们。希望从饲喂给细胞的化合物的混合物及从细胞自身的副产物分离目的多肽。

[0006] 通常尝试用不同层析技术的组合来从细胞产生的其他产物分离目的多肽。这些技术根据它们的电荷、疏水性程度、大小或目的多肽与固定化捕获剂之间的特异性相互作用来分开多肽的混合物。对于这些技术中的每一种,可获得几种不同的层析树脂,允许根据所涉及的具体多肽精确调整纯化方案。这些分离方法中的每一种的本质是,可以使多肽或者以不同的速率沿长柱向下移动,达到随着它们进一步沿柱下移而提高的物理分离,或者选择性黏附于分离介质,然后通过不同溶剂差异洗脱。在一些情况下,在杂质特异性黏附于柱而目的多肽不黏附于柱时,从杂质分离目的多肽,即,目的多肽存在于“流穿液(flow-through)”中。

[0007] 大规模、低成本纯化多肽至足以用作人用药物的纯度仍是巨大挑战。

[0008] 发明概述

[0009] 本文提供用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法,其中,该方法包括(i)或(ii):(i)(a)按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将该组合物加样至阳离子交换材料上和(b)将从该阳离子交换材料回收的组合物加样至混合型材料上的顺次步骤;或(ii)(a)将该组合物加样至混合型材料上和(b)按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将从混合型材料回收的组合物加样至阳离子交换材料上的顺次步骤。

[0010] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该多肽具有约6和约10之间的pI。在一些实施方案中,该多肽具有约7和约9之间的pI。

[0011] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该多肽是抗体或免疫黏附素。在一些实施方案中,该多肽是免疫黏附素。在一些实施方案中,该多肽是抗体。在一些实施方案中,该抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该单克隆抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在

一些实施方案中,该单克隆抗体是IgG单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗体是抗原结合片段。在一些实施方案中,该抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFv、Fv和双抗体。

[0012] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该至少一种污染物是中国仓鼠卵巢蛋白质(CHOP)、浸出(leached)的A蛋白、DNA、聚集蛋白质、细胞培养基成分、庆大霉素和病毒污染物中的任意一种或多种

[0013] 在该方法中任一种的一些实施方案中,(i)和/或(ii)中的顺次步骤是连续的。在该方法中任一种的一些实施方案中,(i)和/或(ii)中的顺次步骤是不连续的。在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法是(i)。在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法是(ii)。

[0014] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该加样密度在约150g/L和约2000g/L之间。在一些实施方案中,该密度在约150g/L和约1000g/L之间。在一些实施方案中,该密度在约500g/L和约700g/L之间。

[0015] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该阳离子交换材料包含羧酸官能团或磺酸官能团。在一些实施方案中,该官能团是磺丙基、磺乙基、磺异丁基或羧基。在一些实施方案中,该阳离子交换材料是膜、monolith或树脂颗粒。在一些实施方案中,该阳离子交换材料是树脂。在一些实施方案中,该阳离子交换材料是Mustang S、Sartobind S、S03Monolith、SCeramic HyperD、Poros HS50、Poros HS20、磺丙基-Sepharose Fast Flow (SPSFF)、SP-Sepharose XL (SPXL)、CM Sepharose Fast Flow、CaptoS、Fractogel Se HiCap、Fractogel S03或Fractogel C00。在一些实施方案中,该阳离子交换材料是Poros HS50。

[0016] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该混合型材料包含能够进行阴离子交换和疏水作用的官能团。在一些实施方案中,该混合型材料是Capto-Adhere树脂、MEP HyperCel树脂、HEA HyperCel树脂、PPA HyperCel树脂或ChromaSorb膜。在一些实施方案中,该混合型材料是Capto-Adhere树脂。

[0017] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法包括随同该阳离子交换材料和/或阴离子交换材料使用平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液,且该平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的电导率在约2mS/cm至约25mS/cm之间。在一些实施方案中,该平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的电导率在约3mS/cm至约8mS/cm之间。

[0018] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法包括随同该阳离子交换材料和/或阴离子交换材料使用平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液,且该平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的pH在约4.5和约6.5之间。

[0019] 在该方法中任一种的一些实施方案中,随同该阳离子交换材料和/或阴离子交换材料的平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液是相同的。在该方法中任一种的一些实施方案中,随同该阳离子交换材料和/或阴离子交换材料的平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液是不同的。

[0020] 在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法进一步包括使包含该多肽的组合物在步骤(a)和(b)之前或之后经受一个或多个其他纯化步骤。在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法进一步包括回收该纯化的多肽。在该方法中任一种的一些实施方案中,该方法进一步包括将该纯化的多肽与可药用载体组合。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A-D显示用Poros HS50、SPSFF、S03Monolith和Mustang S纯化抗-CD11a抗体的层析谱。

[0023] 图2显示用SPSFF、Poros HS50、Mustang S和S03monolith收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(Mab(“单体抗体”)浓度)和C/C₀(中国仓鼠卵巢蛋白质(“CHOP”)浓度)。C是所收集的级分中Mab或CHOP的浓度,C₀是加样物(load)中Mab或CHOP的浓度。

[0024] 图3显示用S03monolith、Mustang S、SPSFF和Poros HS50收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(Mab浓度)和C/C₀(高分子量(“HMW”)浓度)。C是所收集的级分中Mab或HMW的百分比,C₀是加样物中Mab或HMW的百分比。

[0025] 图4A-D显示用S03monolith、Mustang S、SPSFF和Poros HS50收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(Mab浓度)、C/C₀(HMW1浓度)和C/C₀(HMW2浓度)。

[0026] 图5A显示用Poros HS50加样的包含抗-CD11a抗体的产物中HMW和Mab的层析谱;图5B显示使用Poros HS50的洗脱混合物(pool)中HMW和Mab的层析谱(内部图显示峰的扩大部分);图5C显示用Poros HS50收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(g/L CV)的流穿(“FT”)混合物中的累积HMW%和FT级分中的HMW%。

[0027] 图6A显示用SPSFF柱收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物的FT混合物的层析谱;图6B显示用SPSFF收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(mg/mL CV)的FT混合物中的累积HMW%和FT级分中的HMW%;图6C显示用SPSFF收集不同量的包含抗-CD11a抗体的产物(mg/mL)的HMW%。

[0028] 图7A-D显示用Poros HS50、SPSFF、S03Monolith和Mustang S纯化抗-VEGF抗体的层析谱。

[0029] 图8显示用Poros HS50、Mustang S、S03monolith和SPSFF加样不同量的产物(g/L CV或MV)的抗-VEGF抗体的C/C₀(Mab浓度)。

[0030] 图9显示用SPSFF、Sartobind S、Poros HS50、Mustang S和S03monolith收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(CHOP浓度)。

[0031] 图10显示用SPSFF、Poros HS50、Mustang S和S03monolith收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV或MV)的DNA的量(pg/mg)。

[0032] 图11显示用SPSFF、Sartobind S、具有稀释Mab的Poros HS50、Poros HS50、Mustang S和S03monolith收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(HMW浓度)。

[0033] 图12显示用SPSFF、具有稀释Mab的Poros HS50、Poros HS50、Mustang S和S03monolith收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV或MV)的C/C₀(HMW1浓度)和C/C₀(HMW2浓度)。

[0034] 图13A-E显示在多种pH和盐浓度下使用包含抗-CD20抗体的产物的结合于树脂(Poros HS50、SE HiCap、SPSFF、SPXL和Capto S)的%HMW。

[0035] 图14A-E显示在多种pH和盐浓度下使用包含抗-CD20抗体的产物的结合于树脂(Poros HS50、SE HiCap、SPSFF、SPXL和Capto S)的%CHOP。

[0036] 图15显示用Poros HS50和Capto S收集不同量的包含抗-CD20抗体的产物(g/L

CV)的C/C₀(HMW浓度%)。

[0037] 图16显示用Poros HS50和Capto S收集不同量的包含抗-CD20抗体的产物(g/L CV)的累积HMW(%)。

[0038] 图17显示用Poros HS50和Capto S收集不同量的包含抗-CD20抗体的产物(g/L CV)的C/C₀(CHOP浓度)。

[0039] 图18显示用Poros HS50和Capto S收集不同量的包含抗-CD20抗体的产物(g/L CV)的累积CHOP(ppm)。

[0040] 图19A-B显示在多种流速下用SPSFF纯化抗-VEGF抗体的在280nm获得的UV迹线对运行时间(图19A)和对产物加样体积(图19B)作图的层析谱。

[0041] 图20显示在多种流速下用SPSFF收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(mg/mL CV)的C/C₀(Mab浓度)和C/C₀(CHOP浓度)。

[0042] 图21显示在多种流速下用SPSFF收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/mL CV)的DNA的量(pg/mg)。

[0043] 图22显示在多种流速下用SPSFF收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV)的C/C₀(HMW浓度)。

[0044] 图23显示在多种流速下用Poros HS50收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV)的C/C₀(HMW浓度(%))、C/C₀(CHOP浓度(ppm))和DNA的量(pg/mg)。

[0045] 图24显示在多种加样电导率下用Poros HS50纯化抗-VEGF抗体的层析谱。

[0046] 图25A-B显示使用在多种加样电导率下加样包含抗-VEGF抗体的产物的Poros HS50的来自洗脱的洗脱物(P1峰)和来自清洗的洗脱物(P2峰)的层析谱。

[0047] 图26显示在多种加样电导率下用Poros HS50纯化抗-VEGF抗体的加样不同量的CHOP(ug/mL CV)的级分中CHOP的量(ppm)。

[0048] 图27显示在多种加样电导率下用Poros HS50收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(mg/mL CV)的C/C₀(HMW浓度)。

[0049] 图28A-B显示在多种加样电导率和多种流速下收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物((g/L CV)的DNA的量(pg/ml)(不同加样电导率的加样物中不同量的DNA(pg/mg)))。

[0050] 图29显示用线性盐梯度洗脱物洗脱的Poros HS50收集不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(mg/mL CV)的DNA的量(pg/mL)和抗体浓度。

[0051] 图30显示用柱床高度为4.6cm或14.2cm的Poros HS50的加样不同量的包含抗-VEGF抗体的产物(g/L CV)的C/C₀(HMW浓度(%))、C/C₀(CHOP浓度(ppm))和DNA的量(pg/mg)。

[0052] 图31A-F显示在多种pH和电导率(用NaAC或甘氨酸HCl作为缓冲盐)下使用Capto Adhere树脂的抗-VEGF抗体(FT级分中)、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的%Mab回收。

[0053] 图32A-F显示在多种pH和电导率(用NaAC或甘氨酸HCl作为缓冲盐)下将Capto Adhere树脂用于抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的%HMW结合。

[0054] 图33A-F显示在多种pH和电导率(用NaAC或甘氨酸HCl作为缓冲盐)下将Capto Adhere树脂用于抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的%CHOP结合。

[0055] 图34显示用偶联的Capto Adhere柱和Poros HS50柱纯化抗-CD11a抗体的层析谱。

[0056] 发明详述

[0057] I. 定义

[0058] 术语“多肽”或“蛋白质”意指氨基酸的序列,其链长足以产生更高水平的三级和/或四级结构。因此,蛋白质区别于“肽”,肽也是基于氨基酸的分子,但不具有这种结构。通常,本文使用的蛋白质将具有至少约5-20kD、备选地至少约15-20kD、优选至少约20kD的分子量。“肽”意指氨基酸的序列,其通常不显示更高水平的三级和/或四级结构。肽通常具有小于约5kD的分子量。

[0059] 包含于本文的定义之内的多肽的实例包括哺乳动物蛋白质,如,例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体生成素;胰高血糖素;凝血因子,如因子VIII C、因子IX、组织因子和von Willebrands因子;抗凝血因子,如蛋白C;心房钠尿肽;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶; RANTES(regulated onactivation normally T-cell expressed and secreted);人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,如人血清白蛋白;Muellerian抑制物质;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白质,如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),如CTLA-4;抑制素;激活蛋白;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,如骨衍生神经营养因子(BDNF),神经营养蛋白-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,如NGF-b;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),如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-II(IGF-I和IGF-II);消(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP);CD蛋白,如CD3、CD4、CD8、CD19和CD20;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(IL),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如AIDS被膜的部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,如CA125(卵巢癌抗原)或HER2、HER3或HER4受体;免疫黏附素;上列蛋白质中任一种的片段和/或变体;以及与包括例如上列蛋白质中任一种的蛋白质结合的抗体,包括抗体片段。

[0060] “纯化的”多肽(例如抗体)意指多肽的纯度已提高,使得它以比它在自然环境中存在和/或最初在实验室条件下合成和/或扩增时更纯的形式存在。纯度是相对值,并非必然意指绝对纯度。

[0061] 在本文中使用时,术语“表位标记的”指包含与“标记多肽”融合的多肽的嵌合多肽。标记多肽具有足够的残基来提供可以针对其制备抗体的表位,但也足够短,使得它不干扰与之融合的多肽的活性。还优选标记多肽相当独特,使得该抗体基本上不与其他表位交叉反应。适宜的标记多肽通常具有至少6个氨基酸残基,且通常在约8个和50个氨基酸残基之间(优选地,在约10个和20个氨基酸残基之间)。

[0062] 为了本文的目的,“活性的”或“活性”指多肽的一种或多种形式,其保持天然或天然存在的多肽的生物学和/或免疫学活性,其中,“生物学”活性指由天然或天然存在的多肽引起的生物学功能(抑制或刺激),其不同于诱导产生针对天然或天然存在的多肽所具有的抗原表位的抗体的能力,“免疫学”活性指诱导产生针对天然或天然存在的多肽所具有的抗

原表位的抗体的能力。

[0063] 术语“拮抗剂”以最广泛的含义使用,且包括部分或完全阻断、抑制或中和天然多肽的生物学活性的任意分子。类似地,术语“激动剂”以最广泛的含义使用,且包括模拟天然多肽的生物学活性的任意分子。适宜的激动剂或拮抗剂分子明确包括激动剂或拮抗剂抗体或抗体片段、天然多肽的片段或氨基酸序列变体等。用于鉴定多肽的激动剂或拮抗剂的方法可以包括使多肽与候选激动剂或拮抗剂分子接触,并测量通常与该多肽相关的一种或多种生物学活性的可检测的变化。

[0064] “依赖补体的细胞毒性”或“CDC”指分子在补体的存在下裂解靶标的能力。通过补体系统的第一成分(C1q)与复合关联抗原的分子(例如多肽(例如抗体))的结合来起始补体激活途径。为了评估补体激活,可以进行例如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) 中所述的CDC测定。

[0065] “结合”目的抗原(例如肿瘤相关多肽抗原靶标)的多肽是这样的多肽,其以足够的亲和力结合该抗原,使得该多肽可用作靶向表达该抗原的细胞或组织的诊断剂和/或治疗剂,且不显著与其他多肽交叉反应。在这类实施方案中,如通过荧光激活细胞分选术(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)测定,该多肽与“非靶标”多肽的结合程度小于该多肽与它的具体靶标多肽的结合的约10%。

[0066] 对于多肽与靶分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性结合至”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或对特定多肽或特定多肽靶标上的表位“特异”意指显著不同于非特异性相互作用的结合。可以例如与对照分子的结合比较,通过测定分子的结合来测量特异性结合,该对照分子通常是不具有结合活性的具有相似结构的分子。例如,可以通过与类似于靶标的对照分子(例如过量的非标记靶标)竞争来测定特异性结合。在这种情况下,如果过量的未标记靶标竞争性抑制标记靶标与探针的结合,则指示特异性结合。

[0067] “抑制肿瘤细胞生长”的多肽或“生长抑制性”多肽是导致癌细胞的可测量的生长抑制的多肽。在一个实施方案中,在细胞培养物中约0.1至约30 μ g/ml或约0.5nM至约200nM的多肽浓度下测量生长抑制,其中,在肿瘤细胞暴露于该多肽1-10天后测定该生长抑制。如果按约1 μ g/kg至约100mg/kg体重施用多肽导致肿瘤大小或肿瘤细胞增殖在首次施用该多肽后约5天至约3个月内、优选约5天至约30天内降低,则该多肽在体内是生长抑制性的。

[0068] “诱导凋亡”的多肽是诱导通过膜联蛋白V的结合、DNA的断裂、细胞皱缩、内质网的膨胀、细胞破碎和/或膜小泡(称为凋亡小体)的形成测定的程序性细胞死亡的多肽。优选地,该细胞是肿瘤细胞,例如前列腺细胞、乳腺细胞、卵巢细胞、胃细胞、子宫内膜细胞、肺细胞、肾细胞、结肠细胞、膀胱细胞。可用多种方法来评价与凋亡相关的细胞事件。例如,可以通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸(PS)易位;可以通过DNA断裂成梯来评价DNA断裂;可以通过亚二倍体细胞的任意增加来评价核/染色质凝聚以及DNA断裂。优选地,诱导凋亡的多肽是这样的多肽,在膜联蛋白结合测定中,相对于未处理的细胞,该多肽导致约2至约50倍、优选约5至约50倍和最优选约10至约50倍的膜联蛋白结合的诱导。

[0069] “诱导细胞死亡”的多肽是使活细胞变得不能存活的多肽。优选地,该细胞是癌细胞,例如乳腺细胞、卵巢细胞、胃细胞、子宫内膜细胞、唾液腺细胞、肺细胞、肾细胞、结肠细胞、甲状腺细胞、胰腺细胞或膀胱细胞。可以在缺乏补体和免疫效应细胞的情况下测定体外细胞死亡来区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或依赖补体的细胞毒性(CDC)诱

导的细胞死亡。因此,可以用热失活的血清(即,在缺乏补体的情况下)在缺乏免疫效应细胞的情况下进行细胞死亡的测定。为了确定多肽是否能够诱导细胞死亡,可以相对于未处理的细胞评估通过碘化丙啶(PI)、台盼蓝(见Moore等Cytotechnology 17:1-11(1995))或7AAD的摄取评价的膜完整性的丧失。

[0070] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,且明确涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、形成自至少两种完整抗体的多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示希望的生物学活性。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可以与抗体互换使用。

[0071] 抗体是天然存在的免疫球蛋白分子,其具有全都基于免疫球蛋白折叠的不同结构。例如,IgG抗体具有通过二硫键结合形成功能性抗体的两条“重”链和两条“轻”链。每条重链和轻链本身包含“恒定”(C)区和“可变”(V)区。V区决定抗体的抗原结合特异性,而C区提供结构支持,并在与免疫效应物的非抗原特异性相互作用中发挥作用。抗体或抗体的抗原结合片段的抗原结合特异性是抗体特异性结合特定抗原的能力。

[0072] 抗体的抗原结合特异性由V区的结构特征决定。可变性并非在可变结构域的110个氨基酸的跨度内均匀分布。相反,V区由15-30个氨基酸的称为构架区(FR)的相对不变的序列组成,该序列由长度各为9-12个氨基酸的称为“高变区”的极端可变的较短区域分隔开。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,四个FR主要采用 β -折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接 β -折叠结构的环,且在一些情况下形成 β -折叠结构的部分。各链中的高变区通过FR近距离保持在一起,并与来自其他链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中的参与。

[0073] 每个V区通常包含3个互补决定区(“CDR”,其中每个CDR包含“高变环”)和4个构架区。因此,抗体结合部位(以实质性亲和力结合具体希望的抗原所需的最小结构单位)通常将包含3个CDR及散布其间来支持并以适当的构象呈递CDR的至少3个、优选4个构架区。经典的四链抗体具有通过相互协作的V_H和V_L结构域定义的抗原结合部位。某些抗体(如骆驼抗体和鲨鱼抗体)缺乏轻链,依赖于仅由重链形成的结合部位。可以制备单结构域改造免疫球蛋白,其中,在缺乏V_H和V_L间协作的情况下由重链或轻链单独形成结合部位。

[0074] 术语“可变的”指这样的事实,可变结构域的某些部分的序列在抗体间广泛不同,且用于各具体抗体对其具体抗原的结合和特异性。但是,可变性并非在抗体的整个可变结构域内均匀分布。它集中在轻链可变结构域和重链可变结构域二者中称为高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,四个FR主要采用 β -折叠构型,通过三个高变区连接,该高变区形成连接 β -折叠结构的环,且在一些情况下形成 β -折叠结构的部分。各链中的高变区通过FR近距离保持在一起,并与来自其他链的高变区一起促成抗体的抗原结合部位的形成(见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中的参与。

[0075] 在本文中使用时,术语“高变区”指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区可

以包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如, V_L 中的约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3), V_H 中的约31-35B(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)))和/或来自“高变环”的那些残基(例如 V_L 中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3), V_H 中的26-32(H1)、52A-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987)))。

[0076] “构架”或“FR”残基是除本文定义的高变区残基外的那些可变结构域残基。

[0077] “抗体片段”包含完整抗体的部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;和形成自抗体片段的多特异性抗体。

[0078] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,各具有单个抗原结合部位)和残余的“Fc”片段(其名称反映了它易于结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合部位,且仍能够交联抗原。

[0079] “Fv”是包含完整的抗原识别和抗原结合部位的最小抗体片段。此区域由紧密非共价结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。各可变结构域的三个高变区正是在此构型中相互作用来定义 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合部位。六个高变区共同赋予抗体抗原结合特异性。但是,甚至单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对抗原特异的高变区)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力低于整个结合部位。

[0080] Fab片段还包含轻链恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的相同之处在于,在重链CH1结构域的羧基端加入了几个残基,其包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是对其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基具有至少一个自由巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初作为其间具有铰合部半胱氨酸的Fab'片段对产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0081] 根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分配至称为 κ 和 λ 的两个明显不同的类型之一。

[0082] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体分配至不同种类。存在五个主要种类的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些中的几个可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同种类的抗体的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型众所周知。

[0083] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中,这些结构域存在于单条多肽链中。在一些实施方案中,Fv多肽进一步在 V_H 和 V_L 结构域之间包含多肽接头,该多肽接头使scFv能够形成希望的结构用于抗原结合。scFv的综述见Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113卷, Rosenberg和Moore编辑, Springer-Verlag, 纽约, 269-315页(1994)。

[0084] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合部位的小抗体片段,该片段包含在同一条多肽链中与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)(V_H - V_L)。通过使用太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合部位。双抗体更充分地描述于例如EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中。

[0085] 本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即,除了可以在产生单克隆抗体的过程中出现的可能的变体(这类变体通常以较小的量存在)外,包含该群体的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性外,单克隆体的优势在于它们未受其他免疫球蛋白污染。修饰词“单克隆的”指抗体获自基本上同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任意具体的方法来产生抗体。例如,待按照本文提供的方法使用的单克隆抗体可以通过最先由Kohler等,Nature 256:495 (1975)描述的杂交瘤法制备,或者可以通过重组DNA法制备(见例如美国专利号4,816,567)。还可以用例如Clackson等,Nature 352:624-628 (1991)和Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597 (1991)中所述的技术从噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0086] 本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中,部分重链和/或轻链与衍生自特定物种或隶属于特定抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与衍生自另一物种或隶属于另一抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,以及这类抗体的片段,只要它们显示希望的生物学活性(美国专利号4,816,567;Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855 (1984))。本文的目的嵌合抗体包括“灵长类源化(primatized)”抗体,其包含衍生自非人灵长类(例如旧大陆猴,如狒狒、猕猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列(美国专利号5,693,780)。

[0087] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其包含最少的衍生自非人免疫球蛋白的序列。在大多数情况下,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中,用来自具有希望的特异性、亲和力和容量的诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的非人物种(供体抗体)的高变区的残基取代来自受体的高变区的残基。在一些情况下,用对应的非人残基取代人免疫球蛋白的构架区(FR)残基。此外,人源化抗体可以包含不见于受体抗体中或供体抗体中的残基。产生这些修饰来进一步改进抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个(且通常为两个)可变结构域的基本上全部,其中,全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,而除上文指出的一个或多个FR取代外,全部或基本上全部FR是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区,通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的详情见Jones等,Nature321:522-525 (1986);Riechmann等,Nature 332:323-329 (1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596 (1992)。

[0088] 为了本文的目的,“完整抗体”是包含重链可变结构域和轻链可变结构域以及Fc区的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选地,完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0089] “天然抗体”通常是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每条重链和轻链还具有规则间隔开的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域匹配(align),轻链可变结构域与重链的可变结构域匹配。认为特定氨基酸残基形成轻链可变结构域和重链可变结构域之间的界面。

[0090] “裸抗体”是未与异源分子(如毒性部分或放射性标记)缀合的抗体(如本文所定

义)。

[0091] 在一些实施方案中,抗体“效应子功能”指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)且随抗体同种型而变的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和依赖补体的细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体的下调。

[0092] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中,表达Fc受体(FcR)的非特异性毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别结合在靶细胞上的抗体,随后引起该靶细胞的裂解。用于介导ADCC的初级细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, *Annu.Rev.Immunol* 9:457-92(1991)的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的ADCC测定。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或此外,可以例如在动物模型中,如在Clynes等, *PNAS(USA)* 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。

[0093] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR并执行效应子功能的白细胞。在一些实施方案中,该细胞至少表达Fc γ RIII,并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞;优选PBMC和NK细胞。

[0094] 用术语“Fc受体”或“FcR”来描述与抗体的Fc区结合的受体。在一些实施方案中,该FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有主要在其胞质结构域中不同的相似的氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(见**Daëron**, *Annu.Rev.Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu.Rev.Immunol.* 9:457-92(1991);Capel等, *Immunomethods* 4:25-34(1994);和de Haas等, *J.Lab.Clin.Med.* 126:330-41(1995)中。本文的术语“FcR”涵盖了其他FcR,包括有待在将来鉴定的那些。该术语还包含负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿受体FcRn(Guyer等, *J.Immunol.* 117:587(1976);和Kim等, *J.Immunol.* 24:249(1994))。

[0095] 本文所用的术语“顺次的”指在该方法的步骤(a)和(b)之间没有层析步骤。

[0096] 本文所用的术语“连续的”指将阳离子交换材料和混合型材料直接连接,或以允许在阳离子交换材料和混合型材料间连续流动的某种其他机制连接。

[0097] “污染物”指不同于希望的多肽产物的物质。污染物包括但不限于:宿主细胞物质,如CHOP;浸出的A蛋白;核酸;希望的多肽的变体、片段、聚集体或衍生物;另一多肽;内毒素;病毒污染物;细胞培养基成分等。

[0098] 本文提到的“约”某个值或参数包括(和描述)涉及该值或参数本身的变动。例如,提到“约X”的描述包括了“X”的描述。

[0099] 除非文中清楚地另有说明,本文及所附权利要求中使用的单数形式“一”、“或”和“该”包括复数指代物。应理解,本文描述的本发明的方面和变通形式包括由该方面和变通

形式组成和/或基本上由该方面和变通形式组成。

[0100] II. 纯化方法

[0101] 本文提供用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法。具体而言,该方法包括使用过载的阳离子交换材料。例如,该方法包括按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度加样至阳离子交换材料上。

[0102] 本文提供的纯化方法可以进一步包括加样至混合型材料上。例如,在一些实施方案中,该方法包括(a)按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将该组合物加样至阳离子交换材料上和(b)将从该阳离子交换材料回收的组合物加样至混合型材料上的顺次步骤。在另一实例中,在一些实施方案中,该方法包括(a)将该组合物加样至混合型材料上和(b)按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将从该混合型材料回收的组合物加样至阳离子交换材料上的顺次步骤。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该顺次步骤是连续的。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该顺次步骤是不连续的。在一些实施方案中,该连续纯化利用相同的流速、电导率和/或pH。

[0103] 上述方法可以进一步包括加样至A蛋白亲和层析材料上的步骤。加样至A蛋白亲和层析材料上的步骤通常(但并非必然)在一个或多个其他层析步骤之前进行。在一些实施方案中,加样至A蛋白亲和层析材料上的步骤可以与任意顺序的过载阳离子交换层析和混合型层析的顺次步骤组合。在一些实施方案中,该顺次步骤是连续的。在一些实施方案中,该连续纯化利用相同的流速、电导率和/或pH。

[0104] 阳离子交换材料是固相,其带负电荷,且具有用于与流经或流过该固相的水溶液中的阳离子交换的自由阳离子。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该阳离子交换材料可以是膜、monolith或树脂。在优选实施方案中,该阳离子交换材料可以是树脂。该阳离子交换材料可以包含羧酸官能团或磺酸官能团,如,但不限于磺酸盐、羧酸、羧甲基磺酸、磺异丁基、磺乙基、羧基、磺丙基、磺酰基、磺氧乙基或正磷酸盐。

[0105] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该阳离子交换材料可以利用常规层析材料或对流层析材料。该常规层析材料包括例如灌注材料(例如聚(苯乙烯-二乙烯苯)树脂)和扩散材料(例如交联琼脂糖树脂)。在一些实施方案中,该聚(苯乙烯-二乙烯苯)树脂可以是Poros HS树脂。该Poros HS树脂可以是Poros HS 50 μ m或Poros HS 20 μ m颗粒。在一些实施方案中,该交联琼脂糖树脂可以是磺丙基-Sepharose Fast Flow(“SPSFF”)树脂。该对流层析材料可以是膜(例如聚醚砜)或monolith材料(例如交联聚合物)。该聚醚砜膜可以是Mustang S。该交联聚合物monolith材料可以是交联的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-co-二甲基丙烯酸乙二醇酯),例如monolith S03。

[0106] 本领域已知的阳离子交换材料的实例包括但不限于Mustang S、Sartobind S、S03Monolith、S Ceramic HyperD、Poros HS50、Poros HS20、SPSFF、SP-Sepharose XL (SPXL)、CM Sepharose Fast Flow、Capto S、Fractogel Se HiCap、Fractogel S03或Fractogel C00。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该阳离子交换材料是Poros HS50。在一些实施方案中,该Poros HS树脂可以是Poros HS 50 μ m或Poros HS 20 μ m颗粒。

[0107] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该混合型材料包含能够执行一种或多种以下功能性的官能团:阴离子交换、形成氢键和疏水作用。在一些实施方案中,该混合性材料包含能够进行阴离子交换和疏水作用的官能团。该混合型材料可以包含N-苄基-N-

甲基乙醇胺、4-巯基-乙基-吡啶、己胺或苯丙胺作为配体,或包含交联的聚烯丙胺。该混合型材料的实例包括Capto-Adhere、MEP HyperCel、HEA HyperCel或PPA HyperCel树脂,或ChromaSorb膜。在一些实施方案中,该混合型材料是Capto-Adhere树脂。

[0108] 在一些实施方案中,本文提供用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法,其中该方法包括(i)或(ii):(i)(a)按高于约150g/L树脂的加样密度将该组合物加样至Poros HS50上和(b)将从PorosHS50回收的组合物加样至Capto-Adhere上的顺次步骤;或(ii)(a)将该组合物加样至Capto-Adhere上和(b)按高于约150g/L树脂的加样密度将从Capto-Adhere回收的组合物加样至Poros HS50上的顺次步骤。

[0109] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,按高于约150g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L或1000g/L阳离子交换材料中任一个的加样密度将该组合物加样至阳离子交换材料上。可以按约150g/L至2000g/L、150g/L至1500g/L、150g/L至1000g/L、200g/L至1500g/L、300g/L至1500g/L、400g/L至1000g/L或500g/L至1000g/L阳离子交换材料中任一个的加样密度将该组合物加样至阳离子交换材料上。在一些实施方案中,按约150g/L、300g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、850g/L、900g/L、1000g/L、1500g/L或2000g/L阳离子交换材料中任一个的加样密度将该组合物加样至阳离子交换材料上。

[0110] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,按高于约25g/L、50g/L、75g/L、100g/L、150g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L或550g/L混合型材料中任一个的加样密度将该组合物加样至混合型材料上。按约25g/L至1000g/L、25g/L至700g/L或25g/L至500g/L混合型材料中任一个的加样密度将该组合物加样至混合型材料上。

[0111] 可以利用的多种缓冲液取决于,例如,希望的缓冲液pH、希望的缓冲液电导率、目的蛋白质的特征和纯化方法。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该方法包括使用缓冲液。该缓冲液可以是加样缓冲液、平衡缓冲液或洗涤缓冲液。在一些实施方案中,加样缓冲液、平衡缓冲液和/或洗涤缓冲液中的一种或多种是相同的。在一些实施方案中,加样缓冲液、平衡缓冲液和/或洗涤缓冲液是不同的。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该缓冲液包含盐。该缓冲液可以包含氯化钠、醋酸钠或其混合物。在一些实施方案中,该缓冲液是氯化钠缓冲液。在一些实施方案中,该缓冲液是醋酸钠缓冲液。

[0112] 本文所用的加样物是加样至层析材料上的组合物。加样缓冲液是用来将包含目的多肽的组合物加样至层析材料上的缓冲液。在加样待纯化的组合物之前,可以用平衡缓冲液平衡层析材料。在将组合物加样至层析材料上之后,用洗涤缓冲液来从固相洗脱目的多肽。

[0113] 电导率指水溶液在两个电极之间传导电流的能力。在溶液中,电流通过离子转移流动。因此,随着存在于水溶液中的离子量增加,溶液将具有更高的电导率。电导率的基本测量单位是Siemen(或mho)、mho(mS/cm),且可以用电导率计(如多种型号的Orion电导率计)测量。由于电介质电导率是溶液中的离子携带电流的能力,因此可以通过改变其中的离子浓度来改变溶液的电导率。例如,可以改变溶液中的缓冲剂浓度和/或盐浓度(例如氯化钠、醋酸钠或氯化钾)来达到希望的电导率。优选地,改变多种缓冲液的盐浓度来达到希望的电导率。

[0114] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该电导率具有高于约2mS/cm、5mS/

cm、7.5mS/cm或10mS/cm中任一个的电导率。该电导率可以是约2mS/cm至25mS/cm、2mS/cm至10mS/cm、3mS/cm至8mS/cm、2mS/cm至6mS/cm、4mS/cm至6mS/cm或2mS/cm至4mS/cm中的任一个。在一些实施方案中,该电导率可以是约2mS/cm、3mS/cm、4mS/cm、5mS/cm、6mS/cm、8mS/cm或10mS/cm中的任一个。在一方面,该电导率是加样缓冲液、平衡缓冲液和/或洗涤缓冲液的电导率。在一些实施方案中,加样缓冲液、平衡缓冲液和洗涤缓冲液中的一种或多种的电导率是相同的。在一些实施方案中,加样缓冲液的电导率不同于洗涤缓冲液和/或平衡缓冲液的电导率。

[0115] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该缓冲液具有低于约10、9、8、7或6中任一个的pH。该缓冲液可以具有约3至10、4至8、4至6或5至6中任一个的pH。在一些实施方案中,该pH是约4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或8中的任一个。该pH可以是加样缓冲液、平衡缓冲液或洗涤缓冲液的pH。在一些实施方案中,加样缓冲液、平衡缓冲液和/或洗涤缓冲液中的一种或多种的pH是相同的。在一些实施方案中,加样缓冲液的pH不同于平衡缓冲液和/或洗涤缓冲液的pH。

[0116] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,流速低于约50CV/小时、40CV/小时或30CV/小时中的任一个。流速可以是约5CV/小时至50CV/小时、10CV/小时至40CV/小时或18CV/小时至36CV/小时中的任一个。在一些实施方案中,流速是约9CV/小时、18CV/小时、25CV/小时、30CV/小时、36CV/小时或40CV/小时中的任一个。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,流速低于约100cm/小时、75cm/小时或50cm/小时中的任一个。流速可以是约25cm/小时至150cm/小时、25cm/小时至100cm/小时、50cm/小时至100cm/小时或65cm/小时至85cm/小时中的任一个。流速可以是阳离子交换材料上的流速或混合型材料上的流速。在一些实施方案中,阳离子交换材料上的流速与混合型材料上的流速相同。在一些实施方案中,阳离子交换材料上的流速不同于混合型材料上的流速。

[0117] 柱床高度是所使用的层析材料的高度。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,柱床高度高于约3cm、10cm或15cm中的任一个。柱床高度可以是约3cm至35cm、5cm至15cm、3cm至10cm或5cm至8cm中的任一个。在一些实施方案中,柱床高度是3cm、5cm、10cm或15cm中的任一个。在一些实施方案中,阳离子交换材料的柱床高度与混合型材料的柱床高度相同。在一些实施方案中,阳离子交换材料的柱床高度不同于混合型材料的柱床高度。

[0118] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该至少一种污染物是CHOP、浸出的A蛋白、DNA、聚集蛋白质、细胞培养基成分、庆大霉素和病毒污染物中的任意一种或多种。

[0119] CHOP是来自宿主细胞的蛋白质,即,中国仓鼠卵巢蛋白质。可以通过酶联免疫吸附测定(“ELISA”)或Meso Scale Discovery(“MSD”)来测量CHOP的量。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,CHOP的量降低了高于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一个。CHOP的量可以降低约10%至99%、30%至95%、30%至99%、50%至95%、50%至99%、75%至99%或85%至99%中的任一个。在一些实施方案中,CHOP的量降低了约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或98%中的任一个。在一些实施方案中,通过将从一个或多个纯化步骤回收的组合物中CHOP的量与该一个或多个纯化步骤之前的组合物中CHOP的量相比较来测定该降低。

[0120] 聚集多肽可以是高分子量(HMW)蛋白质。在一些实施方案中,聚集蛋白质是目的多肽的多聚体。HMW可以是目的多肽的二聚体、至多8x单体或更大。测量聚集蛋白质(例如HMW)

的方法为本领域已知,并描述于实施例部分中。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,聚集蛋白质的量降低了高于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一个。聚集蛋白质的量可以降低约10%至99%、30%至95%、30%至99%、50%至95%、50%至99%、75%至99%或85%至99%中的任一个。聚集蛋白质的量可以降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一个。在一些实施方案中,通过将从一个或多个纯化步骤回收的组合物中聚集蛋白质(例如HMW)的量与该一个或多个纯化步骤之前的组合物中聚集蛋白质(例如HMW)的量相比较来测定该降低。

[0121] 浸出的A蛋白是从其所结合的固相解吸或洗涤出的A蛋白。例如,浸出的A蛋白可以从A蛋白层析柱浸出。可以例如通过ELISA来测量A蛋白的量。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,浸出的A蛋白的量降低了高于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%中的任一个。浸出的A蛋白的量可以降低约10%至99%、30%至95%、30%至99%、50%至95%、50%至99%、75%至99%或85%至99%中的任一个。在一些实施方案中,浸出的A蛋白的量可以降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任一个。在一些实施方案中,通过将从一个或多个纯化步骤回收的组合物中浸出的A蛋白的量与该一个或多个纯化步骤之前的组合物中浸出的A蛋白的量相比较来测定该降低。

[0122] 测量DNA(如CHO细胞DNA)的方法为本领域已知,并描述于实施例部分中。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,DNA的量降低了高于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%中的任一个。DNA的量可以降低约10%至99%、30%至95%、30%至99%、50%至95%、50%至99%、75%至99%或85%至99%中的任一个。DNA的量可以降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%中的任一个。在一些实施方案中,通过将从一个或多个纯化步骤回收的组合物中DNA的量与该一个或多个纯化步骤之前的组合物中DNA的量相比较来测定该降低。

[0123] 细胞培养基成分指存在于细胞培养基中的成分。细胞培养基可以是收获细胞时的细胞培养基。在一些实施方案中,该细胞培养基成分是庆大霉素。可以通过ELISA来测量庆大霉素的量。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,细胞培养基成分的量降低了高于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%中的任一个。细胞培养基成分的量可以降低约10%至99%、30%至95%、30%至99%、50%至95%、50%至99%、75%至99%或85%至99%中的任一个。在一些实施方案中,细胞培养基成分的量可以降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或98%中的任一个。在一些实施方案中,通过将从一个或多个纯化步骤回收的组合物中细胞培养基成分的量与该一个或多个纯化步骤之前的组合物中细胞培养基成分的量相比较来测定该降低。

[0124] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该方法可以进一步在本文所述层析步骤中任一个之前或之后包括一个或多个纯化步骤。在一些实施方案中,该方法进一步包括在步骤(a)和(b)之前或之后使包含多肽的组合物经受一个或多个其他纯化步骤。其他纯化方法包括,例如,羟基磷灰石层析;凝胶过滤层析;亲和层析;凝胶电泳;透析;乙醇沉淀;反相HPLC;硅石上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;及金属螯合柱结合表位标记形式的多肽。

[0125] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该方法进一步包括回收该纯化的多肽。在一些实施方案中,从本文所述纯化步骤中的任一个回收该纯化的多肽。该层析步骤可

以是阳离子交换层析、混合型层析或A蛋白层析。

[0126] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该方法进一步包括将该纯化方法的纯化的多肽与可药用载体组合。

[0127] III. 多肽

[0128] 提供用于纯化多肽的任意方法及包含通过本文所述方法纯化的多肽的制剂中的多肽。

[0129] 在一些实施方案中,该多肽是治疗性多肽。该治疗性多肽可以抑制肿瘤细胞的生长、诱导凋亡和/或诱导细胞死亡。在一些实施方案中,该多肽是拮抗剂。在一些实施方案中,该多肽是激动剂。在一些实施方案中,该多肽是抗体。

[0130] 在一些实施方案中,该多肽具有高于约5,000道尔顿、10,000道尔顿、15,000道尔顿、25,000道尔顿、50,000道尔顿、75,000道尔顿、100,000道尔顿、125,000道尔顿或150,000道尔顿中任一个的分子量。该多肽可以具有约50,000道尔顿至200,000道尔顿或100,000道尔顿至200,000道尔顿中任一个的分子量。备选地,用于本文的多肽可以具有约120,000道尔顿或约25,000道尔顿的分子量。

[0131] pI是等电点,且是特定分子或表面不携带净电荷的pH。在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,多肽的pI可以是约6至10、7至9或8至9中的任一个。在一些实施方案中,多肽具有约6、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10中任一个的pI。

[0132] 通常用重组技术来产生待用本文所述方法纯化的多肽。用于产生重组蛋白质的方法描述于例如美国专利号5,534,615和4,816,567中,该专利在此明确引入作为参考。在一些实施方案中,在CHO细胞中产生目的蛋白质(见例如WO 94/11026)。在使用重组技术时,多肽可以在胞内、在周质间隙中产生,或直接分泌进入培养基中。

[0133] 可以从培养基或从宿主细胞裂解物回收多肽。可以通过多种物理或化学手段来破碎用于表达多肽的细胞,如冻融循环、超声处理、机械破碎或细胞裂解剂。如果多肽在胞内产生,则作为第一步,例如通过离心或超滤来去除颗粒碎片(宿主细胞或裂解片段)。Carter等,Bio/Technology 10:163-167 (1992) 描述了用于分离分泌至大肠杆菌(E.coli)周质间隙的多肽的方法。简言之,在醋酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下融化细胞糊约30分钟。可以通过离心去除细胞碎片。在多肽分泌进入培养基中时,通常先用市售多肽浓缩滤器(例如Amicon或MilliporePellicon超滤单元)浓缩来自这类表达系统的上清。可以在任意前述步骤中包含诸如PMSF的蛋白酶抑制剂来抑制蛋白质水解,且可以包含抗生素来防止外来污染物的生长。

[0134] (A) 抗体

[0135] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,用于纯化多肽的任意方法和包含通过本文所述方法纯化的多肽的制剂中的多肽是抗体。

[0136] 抗体的分子靶标包括CD蛋白质及其配体,如,但不限于:(i) CD3、CD4、CD8、CD19、CD11a、CD20、CD22、CD34、CD40、CD79 α (CD79a) 和CD79 β (CD79b); (ii) ErbB受体家族的成员,如EGF受体,HER2、HER3或HER4受体; (iii) 细胞黏附分子,如LFA-1、Mac1、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和v/3整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基(例如抗-CD11a、抗-CD18或抗-CD11b抗体); (iv) 生长因子,如VEGF; IgE; 血型抗原; flk2/flt3受体; 肥胖(OB) 受体; mpl受体; CTLA-4; 蛋白C、BR3、c-met、组织因子7等; 及(v) 细胞表面和跨膜肿瘤相关抗原(TAA), 如美国专利号7,

521,541中所述的那些。

[0137] 其他示例性抗体非限制性地包括选自：抗-雌激素受体抗体、抗-孕酮受体抗体、抗-p53抗体、抗-HER-2/neu抗体、抗-EGFR抗体、抗-组织蛋白酶D抗体、抗-Bcl-2抗体、抗-E-钙黏蛋白抗体、抗-CA125抗体、抗-CA15-3抗体、抗-CA19-9抗体、抗-c-erbB-2抗体、抗-P-糖蛋白抗体、抗-CEA抗体、抗-成视网膜细胞瘤蛋白质抗体、抗-ras癌蛋白抗体、抗-Lewis X抗体、抗-Ki-67抗体、抗-PCNA抗体、抗-CD3抗体、抗-CD4抗体、抗-CD5抗体、抗-CD7抗体、抗-CD8抗体、抗-CD9/p24抗体、抗-CD10抗体、抗-CD11a抗体、抗-CD11c抗体、抗-CD13抗体、抗-CD14抗体、抗-CD15抗体、抗-CD19抗体、抗-CD20抗体、抗-CD22抗体、抗-CD23抗体、抗-CD30抗体、抗-CD31抗体、抗-CD33抗体、抗-CD34抗体、抗-CD35抗体、抗-CD38抗体、抗-CD41抗体、抗-LCA/CD45抗体、抗-CD45RO抗体、抗-CD45RA抗体、抗-CD39抗体、抗-CD100抗体、抗-CD95/Fas抗体、抗-CD99抗体、抗-CD106抗体、抗-泛素抗体、抗-CD71抗体、抗-c-myc抗体、抗-细胞角蛋白抗体、抗-波形蛋白抗体、抗-HPV蛋白质抗体、抗- κ 轻链抗体、抗- λ 轻链抗体、抗-黑素体抗体、抗-前列腺特异性抗原抗体、抗-S-100抗体、抗-tau抗原抗体、抗-纤维蛋白抗体、抗-角蛋白抗体和抗-Tn抗原抗体。

[0138] (i) 多克隆抗体

[0139] 在一些实施方案中，该抗体是多克隆抗体。优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来在动物中产生多克隆抗体。用双功能剂或衍生剂(例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R和 R^1 是不同的烷基)将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的多肽(例如匙孔梗血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合可以是有用的。

[0140] 通过将例如100 μg 或5 μg 的多肽或缀合物(分别对于兔或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合，并在多个部位皮内注射该溶液来针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。一个月后，通过在多个部位皮下注射来用弗氏完全佐剂中的初始量的1/5至1/10的肽或缀合物加强免疫动物。7至14天后，对动物进行采血，并测定血清的抗体效价。加强免疫动物，直至效价平台期。在一些实施方案中，用同一抗原的缀合物加强免疫动物，但该抗原与不同的多肽缀合和/或通过不同的交联剂缀合。缀合物还可以作为多肽融合物在重组细胞培养物中制备。另外，适宜地用诸如明矾的聚集剂来增强免疫应答。

[0141] (iii) 单克隆抗体

[0142] 在一些实施方案中，该抗体是单克隆抗体。单克隆抗体获自基本上同质的抗体的群体，即，除在产生单克隆抗体的过程中出现的可能的变体(这类变体通常以较小的量存在)外，包含该群体的单个抗体是相同的和/或结合相同的表位。因此，修饰词“单克隆的”指抗体不是离散抗体或多克隆抗体的混合物的特征。

[0143] 例如，单克隆抗体可以用最先由Kohler等，Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤法制备，或者可以通过重组DNA法制备(美国专利号4,816,567)。

[0144] 在杂交瘤法中，按本文所述免疫小鼠或其他适宜的宿主动物(如仓鼠)来引发淋巴细胞，该淋巴细胞产生或能够产生将特异性结合用于免疫的多肽的抗体。备选地，可以体外免疫淋巴细胞。然后用适宜的融合剂(如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103页(Academic

Press,1986))。

[0145] 将这样制备的杂交瘤细胞接种和培养在适宜的培养基中,该培养基优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质防止缺乏HGPRT的细胞生长。

[0146] 在一些实施方案中,该骨髓瘤细胞是高效融合、通过所选择的产抗体细胞支持抗体的稳定高水平产生、且对诸如HAT培养基的培养基敏感的那些。在这些中,在一些实施方案中,该骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,如可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA获得的衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,及可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection), Rockville, Maryland USA获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。还针对人单克隆抗体的产生描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0147] 针对抗该抗原的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。在一些实施方案中,通过免疫沉淀或通过诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)的体外结合测定来测定杂交瘤产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0148] 可以例如通过Munson等, Anal. Biochem. 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0149] 鉴定出产生具有希望的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释法亚克隆该克隆,并通过标准方法培养(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 59-103页 (Academic Press, 1986))。适合用于此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,可以在动物中作为腹水肿瘤体内培养该杂交瘤细胞。

[0150] 通过常规免疫球蛋白纯化方法(例如多肽A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析)适宜地从培养基、腹水或血清分离该亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0151] 编码该单克隆抗体的DNA易于用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。在一些实施方案中,该杂交瘤细胞可作为这种DNA的来源。一旦分离,即可以将该DNA放入表达载体中,然后将该表达载体转染入诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不以其他方式产生免疫球蛋白多肽的骨髓瘤细胞的宿主细胞中,以获得单克隆抗体在该重组宿主细胞中的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述文章包括Skerra等, Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 (1993) 和Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)。

[0152] 在另一实施方案中,可以从用描述于McCafferty等, Nature 348:552-554 (1990)中的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段。Clackson等, Nature 352:624-628 (1991) 和Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 分别描述了用噬菌体文库分离鼠抗体和人抗体。随后的出版物描述了通过链改组产生高亲和力(nM范围)人抗体(Marks等, Bio/Technology 10:779-783 (1992)), 以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组(Waterhouse等, Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993))。因此,这些技术是除传统

单克隆抗体杂交瘤技术之外用于分离单克隆抗体的可行的选择。

[0153] 还可以例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列(美国专利号4,816,567;Morrison等,Proc.Natl Acad.Sci.USA 81:6851(1984)),或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价连接来修饰DNA。

[0154] 通常,这类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定区,或者它们取代抗体的一个抗原结合部位的可变结构域来产生嵌合二价抗体,该嵌合二价抗体包含对抗原具有特异性的一个抗原结合部位和对不同抗原具有特异性的另一抗原结合部位。

[0155] 在本文所述方法中任一种的一些实施方案中,该抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM。在一些实施方案中,该抗体是IgG单克隆抗体。

[0156] (iv) 人源化抗体

[0157] 在一些实施方案中,该抗体是人源化抗体。本领域中已描述了用于人源化非人抗体的方法。在一些实施方案中,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。基本上可以按照Winter及其同事的方法(Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature332:323-327(1988);Verhoeyen等,Science 239:1534-1536(1988)),通过用高变区序列取代对应的人抗体序列来进行人源化。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中,用对应的来自非人物种的序列取代了基本上不再完整的人可变结构域。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中,用来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代了一些高变区残基,且可能取代一些FR残基。

[0158] 用于产生人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链二者)的选择对降低抗原性非常重要。按照所谓的“最佳适合”法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域序列。然后接受最接近于啮齿动物序列的人序列作为该人源化抗体的人构架区(FR)(Sims等,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia等,J.Mol.Biol.196:901(1987))。另一种方法使用衍生自特定轻链或重链可变区亚组的所有人抗体的共有序列的特定构架区。同一构架可以用于几种不同的人源化抗体(Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285(1992);Presta等,J.Immunol.151:2623(1993))。

[0159] 保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性来人源化抗体也很重要。为了达到此目的,在该方法的一些实施方案中,通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可得,并为本领域技术人员所熟悉。说明和显示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可得的。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中可能的作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以从受体序列和输入序列选择和组合FR残基,使得达到希望的抗体特征,如增加的对一种或多种靶抗原的亲和力。通常,高变区残基直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0160] (v) 人抗体

[0161] 在一些实施方案中,该抗体是人抗体。作为人源化之外的选择,可以产生人抗体。例如,现在可能产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫时能够在缺乏内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的所有组成成分。例如,已描述了嵌合和种系突变体小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列

转入这类种系突变体小鼠将导致在抗原攻击时产生人抗体。见例如Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann等, Year in Immuno.7:33 (1993); 及美国专利号5,591,669、5,589,369和5,545,807。

[0162] 备选地,可以用噬菌体展示技术(McCafferty等, Nature 348:552-553 (1990)) 来在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库(gene repertoires)产生人抗体和抗体片段。根据此技术,将抗体V结构域基因符合读框地克隆入丝状噬菌体(如M13或fd)的主要或次要外被多肽基因中,并作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体功能特性的选择还导致编码显示那些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行;它们的综述见例如Johnson, Kevin S.和Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)。可以将V基因区段的几个来源用于噬菌体展示。Clackson等, Nature 352:624-628 (1991) 从衍生自免疫小鼠的脾的V基因的小的随机组合文库分离了一系列多样化的抗-噁唑酮抗体。可以构建来自未免疫的人供体的V基因库,且可以基本上按照Marks等, J.Mol.Biol.222:581-597 (1991) 或Griffith等, EMBO J.12:725-734 (1993) 所述的技术分离抗一系列多样化抗原(包括自身抗原)的抗体。还见美国专利号5,565,332和5,573,905。

[0163] 还可以通过体外活化B细胞来产生人抗体(见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0164] (vi) 抗体片段

[0165] 在一些实施方案中,该抗体是抗体片段。已发展了多种技术来产生抗体片段。通常,通过完整抗体的蛋白水解消化来衍生这些片段(见例如Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) 和Brennan等, Science 229:81 (1985))。但是,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。备选地,可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,并化学偶联来形成F(ab')₂片段(Carter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对本领域的从业者而言显而易见。在其他实施方案中,所选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。见WO 93/16185;美国专利号5,571,894;及美国专利号5,587,458。抗体片段还可以是描述于例如美国专利号5,641,870中的“线性抗体”。这类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0166] 在一些实施方案中,提供本文所述的抗体片段。在一些实施方案中,该抗体片段是抗原结合片段。在一些实施方案中,该抗原结合片段选自Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFv、Fv和双抗体。

[0167] (vii) 双特异性抗体

[0168] 在一些实施方案中,该抗体是双特异性抗体。双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以结合两个不同表位。备选地,双特异性抗体结合臂可以与结合白细胞上的触发分子(如T细胞受体分子(例如CD2或CD3),或IgG的Fc受体(FcγR),如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)和FcγRIII(CD16))的臂组合,以将细胞

防御机制集中于该细胞。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)制备。

[0169] 用于产生双特异性抗体的方法为本领域已知。全长双特异性抗体的传统产生基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中,两条链具有不同的特异性(Millstein等, *Nature* 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(quadromas)产生10种不同抗体分子的可能的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)非常麻烦,且产物产率低。WO 93/08829和Traunecker等, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) 中公开了类似的方法。

[0170] 根据不同的方法,将具有希望的结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。在一些实施方案中,该融合是与包含至少部分铰链区、CH2区和CH3区的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。在一些实施方案中,包含轻链结合所必需的部位的第一重链恒定区(CH1)存在于该融合的至少一个中。将编码免疫球蛋白重链融合和(如果希望)免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体,并共转染入适宜的宿主生物。在将不等比例的三条多肽链用于构建提供最佳产率时,这为在实施方案中调整三个多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。但是,在表达等比例的至少两种多肽链导致高产率时,或在该比例无特殊意义时,可能将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0171] 在此方法的一些实施方案中,该双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现此不对称结构便于从不想要的免疫球蛋白链组合分离希望的双特异性化合物,因为免疫球蛋白轻链仅存在于该双特异性分子的一半中提供了容易的分离方式。此方法公开于W094/04690中。产生双特异性抗体的进一步详情见例如Suresh等, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)。

[0172] 根据美国专利号5,731,168中所述的另一种方法,可以改造抗体分子对间的界面来最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比。在一些实施方案中,该界面包含抗体恒定结构域的至少部分CH3结构域。在此方法中,用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生与一个或多个大的侧链相同或相似大小的补偿“空洞”。这提供了增加异二聚体的产率超过其他不想要的终产物(如同二聚体)的机制。

[0173] 双特异性抗体包括交联抗体或“异缀合物”抗体。例如,异缀合物中的抗体之一可以与抗生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如,已提出这类抗体将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。可以用任意方便的交联方法产生异缀合物抗体。适宜的交联剂为本领域公知,并连同许多交联技术一起公开于美国专利号4,676,980中。

[0174] 还已在文献中描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等, *Science* 229:81 (1985) 描述了蛋白酶解切割完整抗体来产生F(ab')₂片段的方法。在二巯基络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段,以稳定邻位二巯基并防止分子间二硫化物形成。然后将产生的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸盐

(TNB) 衍生物。然后通过用巯基乙胺还原来将Fab'-TNB衍生物之一再转化为Fab'-巯基,并与等摩尔量的其他Fab'-TNB衍生物混合来形成双特异性抗体。可以将产生的双特异性抗体用作(用于)选择性固定酶的物质。

[0175] 还已描述了用于直接从重组细胞培养物产生和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny等,J. Immunol. 148 (5):1547-1553 (1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。在铰链区还原抗体同二聚体形成单体,然后再氧化形成抗体异二聚体。还可以利用此方法来产生抗体同二聚体。Hollinger等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)所述的“双抗体”技术提供了用于产生双特异性抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H),该接头太短而不允许同一条链上的两个结构域间配对。因此,迫使一个片段的V_H和V_L结构域与另一片段的互补的V_L和V_H结构域配对,从而形成两个抗原结合部位。还已报道了通过使用单链Fv (sFv) 二聚体来产生双特异性抗体片段的另一策略。见Gruber等,J. Immunol. 152:5368 (1994)。

[0176] 考虑超过二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt等,J. Immunol. 147:60 (1991)。

[0177] (viii) 多价抗体

[0178] 在一些实施方案中,该抗体是多价抗体。多价抗体可以比二价抗体更快地被表达该抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢)。本文提供的抗体可以是(除IgM种类外的)具有三个或多个抗原结合部位的多价抗体(例如四价抗体),其可以容易地通过重组表达编码该抗体的多肽链的核酸来制备。该多价抗体可以包含二聚化结构域和三个或多个抗原结合部位。优选的二聚化结构域包含Fc区或铰链区(或由Fc区或铰链区组成)。在这种情况下,该抗体将包含Fc区及Fc区氨基端的三个或多个抗原结合部位。本文优选的多价抗体包含三个至约八个,但优选四个抗原结合部位(或由三个至约八个,但优选四个抗原结合部位组成)。该多价抗体包含至少一条多肽链(且优选两条多肽链),其中该一条或多条多肽链包含两个或多个可变结构域。例如,该一条或多条多肽链可以包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中,VD1是第一可变结构域,VD2是第二可变结构域,Fc是Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,n是0或1。例如,该一条或多条多肽链可以包含:VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区链;或VH-CH1-VH-CH1-Fc区链。本文的多价抗体优选进一步包含至少两条(且优选四条)轻链可变结构域多肽。例如,本文的多价抗体可以包含约两条至约八条轻链可变结构域多肽。此处考虑的轻链可变结构域多肽包含轻链可变结构域,且可选地进一步包含CL结构域。

[0179] (ix) 其他抗体修饰

[0180] 可以希望就效应子功能修饰本文提供的抗体,例如,以增强该抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和/或依赖补体的细胞毒作用(CDC)。这可以通过在该抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来达到。备选地或此外,可以在Fc区中引入一个或多个半胱氨酸残基,从而允许在此区域中形成链间二硫键。这样产生的同二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。见Caron等,J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992)和Shopes, B. J., Immunol. 148:2918-2922 (1992)。还可以用Wolff等,Cancer Research 53:

2560-2565 (1993) 中所述的异双功能交联剂来制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体。备选地,可以改造抗体,使其具有双Fc区,从而可以具有增强的补体介导的裂解和ADCC能力。见Stevenson等,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

[0181] 为了增加抗体的血清半衰期,可以按US 2006/0067930中所述在抗体中产生氨基酸改变,该专利在此以其整体引入作为参考。

[0182] (B) 多肽变体和修饰

[0183] 本文所述的多肽(包括抗体)的一个或多个氨基酸序列修饰可以用于本文所述的纯化多肽(例如抗体)的方法。

[0184] (i) 变体多肽

[0185] 本文定义的“多肽变体”意指与该多肽的全长天然序列、缺乏信号肽的多肽序列、有信号肽或无信号肽的多肽胞外域具有至少约80%氨基酸序列同一性的多肽,优选活性多肽。这类多肽变体包括例如这样的多肽,其中,在全长天然氨基酸序列的N端或C端添加或缺失了一个或多个氨基酸残基。通常,TAT多肽变体将与全长天然序列多肽序列、缺乏信号肽的多肽序列、有信号肽或无信号肽的多肽胞外域具有至少约80%氨基酸序列同一性,备选地,具有至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中任一个的氨基酸序列同一性。可选地,与天然多肽序列相比,变体多肽将具有不超过一个保守性氨基酸取代,备选地,与天然多肽序列相比,具有不超过约2、3、4、5、6、7、8、9或10中任一个的保守性氨基酸取代。

[0186] 例如与全长天然多肽相比,变体多肽可以在N端或C端截短,或者可以缺乏内部残基。某些变体多肽可以缺乏并非希望的生物学活性所必需的氨基酸残基。可以通过许多常规技术中的任一种来制备这些具有截短、缺失和插入的变体多肽。可以化学合成希望的变体多肽。另一适宜的技术涉及通过聚合酶链反应(PCR)分离和扩增编码希望的变体多肽的核酸片段。在PCR中的5'和3'引物上利用定义希望的核酸片段末端的寡核苷酸。优选地,变体多肽与本文公开的天然多肽共有至少一种生物学和/或免疫学活性。

[0187] 氨基酸序列插入包括长度从一个残基至包含一百或更多个残基的多肽的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰残基的抗体或与毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N端或C端与增加该抗体的血清半衰期的酶或多肽融合。

[0188] 例如,可以希望改善多肽的结合亲和力和/或其他生物学特性。通过在抗体核酸中引入适当的核苷酸改变或通过肽合成来制备多肽的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如从多肽的氨基酸序列内缺失残基,和/或在多肽的氨基酸序列内插入残基,和/或取代多肽的氨基酸序列内的残基。产生缺失、插入和取代的任意组合来达到最终构建体,只要该最终构建体具有希望的特征。氨基酸改变还可以改变多肽(例如抗体)的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0189] 通过将多肽的序列与已知的同源多肽分子的序列相比较,并最小化在高同源性区域中产生的氨基酸序列改变的数目,可以发现确定可以插入、取代或缺失哪一个氨基酸残基而不负面影响希望的活性的指导。

[0190] 如Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085 (1989)所述,用于鉴定多肽(例如抗体)的某些残基或区域作为优选的诱变位置的优选方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此,鉴定残基或靶残基组(例如带电荷残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并用中性氨基酸或带负

电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)取代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后在取代位点或针对取代位点引入进一步的变体或其他变体来精炼对取代显示功能敏感性的那些氨基酸位置。因此,虽然预先确定引入氨基酸序列变异的位点,但无需预先确定突变本身的性质。例如,为了分析给定位点上的突变的性能,在靶密码子或靶区域处进行丙氨酸扫描或随机诱变,并针对希望的活性筛选所表达的抗体变体。

[0191] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中具有至少一个被不同残基取代的氨基酸残基。对取代诱变而言,最感兴趣的位点包括高变区,但也考虑FR改变。下文表1在“优选取代”的标题下显示保守性取代。如果这类取代导致生物学活性的改变,则可以引入表1中命名为“示例性取代”或如下文参考氨基酸种类进一步描述的更实质性的改变,并筛选产物。

[0192] 表1

[0193]

初始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0194] 通过选择这样的取代来达到多肽的生物学特性的实质性修饰,该取代在其对维持以下的作用上显著不同:(a)取代区域的多肽主链结构,例如,作为片层或螺旋构象;(b)该分子在靶位点处的电荷或疏水性;或(c)侧链的大小。可以根据其侧链性质的相似性来分组氨基酸(在A.L.Lehninger,Biochemistry第2版,73-75页,Worth Publishers,纽约(1975)中):

[0195] (1) 非极性氨基酸:Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met

(M) ;

[0196] (2) 不带电荷的极性氨基酸:Gly (G) 、Ser (S) 、Thr (T) 、Cys (C) 、Tyr (Y) 、Asn (N) 、Gln (Q) ;

[0197] (3) 酸性氨基酸:Asp (D) 、Glu (E) ;

[0198] (4) 碱性氨基酸:Lys (K) 、Arg (R) 、His (H) 。

[0199] 备选地,可以根据共同的侧链特性来对天然存在的残基进行分组:

[0200] (1) 疏水性氨基酸:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0201] (2) 中性亲水性氨基酸:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0202] (3) 酸性氨基酸:Asp、Glu;

[0203] (4) 碱性氨基酸:His、Lys、Arg;

[0204] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0205] (6) 芳族氨基酸:Trp、Tyr、Phe。

[0206] 非保守性取代必需将这些种类之一的成员换为另一种类。

[0207] 还可以取代(通常用丝氨酸)不涉及维持抗体的正确构象的任意半胱氨酸残基来改善该分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可以向多肽中加入一个或多个半胱氨酸键来改善其稳定性(尤其是在该抗体是诸如Fv片段的抗体片段时)。

[0208] 尤其优选的取代变体的类型涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体)的一个或多个高变区残基。通常,相对于它们所产生自的亲本抗体,所得到的选择用于进一步研发的一个或多个变体将具有改善的生物学特性。用于产生这类取代变体的方便的方式涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简言之,突变几个高变区位点(例如6-7个位点)来产生各位点上所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体作为与包装在各颗粒内的M13的基因III产物的融合以单价形式从丝状噬菌体颗粒展示。然后按照本文所公开针对它们的生物学活性(例如结合亲和力)筛选噬菌体展示的变体。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描来鉴定显著促成抗原结合的高变区残基。备选地,或此外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和靶标之间的接触点可以是有益的。这类接触残基和邻近残基是按照本文所述技术进行取代的候选残基。一旦产生这类变体,即可以按照本文所述对该系列变体进行筛选,并选择在一项或多项相关测定中具有较优特性的抗体用于进一步研发。

[0209] 多肽的另一类氨基酸变体改变抗体的初始糖基化模式。多肽可以包含非氨基酸部分。例如,多肽可以是糖基化的。这种糖基化可于在宿主细胞或宿主生物中表达多肽的过程中天然发生,或者可以是源自人为干预的故意修饰。改变意指缺失一个或多个见于该多肽中的糖类部分,和/或加入一个或多个不存在于该多肽中的糖基化位点。

[0210] 多肽的糖基化通常是N联糖基化或O联糖基化。N联糖基化指糖类部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任意氨基酸)是糖类部分酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在将产生潜在的糖基化位点。O联糖基化指糖N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine)、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0211] 通过改变氨基酸序列,使得它包含一个或多个上述三肽序列(对于N联糖基化位点)来方便地达到在多肽中加入糖基化位点。还可以通过向初始抗体的序列中加入一个或

多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代初始抗体的序列来产生改变(对于O联糖基化位点)。

[0212] 可以通过化学方法或酶促方法或通过编码作为糖基化靶点的氨基酸残基的密码子的突变取代来达到去除存在于多肽上的糖类部分。可以通过使用多种内切和外切糖苷酶来达到多肽上的糖类部分的酶促切割。

[0213] 其他修饰包括分别脱酰胺化谷氨酰胺和天冬酰胺残基为对应的谷氨酰胺和天冬氨酸残基,羟化脯氨酸和赖氨酸,磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基的羟基,甲基化赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基,乙酰化N端胺,及酰胺化任意C端羧基。

[0214] (ii) 嵌合多肽

[0215] 可以以形成嵌合分子的方式修饰本文所述的多肽,该嵌合分子包含与另一异源多肽或氨基酸序列融合的多肽。在一些实施方案中,嵌合分子包含多肽与标记多肽的融合,该标记多肽提供抗-标记抗体可以选择性结合的表位。该表位标记通常放置的多肽的氨基端或羧基端。可以用抗该标记多肽的抗体来检测这类表位标记形式的多肽的存在。另外,表位标记的提供使得能够使用抗-标记抗体或另一类结合该表位标记的亲合基质,通过亲和纯化容易地纯化该多肽。

[0216] 在备选实施方案中,该嵌合分子可以包含多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白的特定区域的融合。该嵌合分子的二价形式称为“免疫黏附素”。

[0217] 本文所用的术语“免疫黏附素”指抗体样分子,其将异源多肽的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能组合。在结构上,免疫黏附素包含不同于抗体的抗原识别和结合部位(即“异源的”)的具有希望的结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合。免疫黏附素分子的黏附素部分通常是至少包含受体或配体的结合部位的连续的氨基酸序列。免疫黏附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可以获自任意免疫球蛋白,如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

[0218] Ig融合优选包含用可溶(跨膜结构域缺失或失活)形式的多肽取代Ig分子内的至少一个可变区。在尤其优选的实施方案中,该免疫球蛋白融合包含IgG1分子的铰链部、CH₂和CH₃,或铰链部、CH₁、CH₂和CH₃区。

[0219] (iii) 多肽缀合物

[0220] 用于多肽制剂中的多肽可以与诸如化疗剂、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的具有酶活性的毒素,或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)的细胞毒剂缀合。

[0221] 可以使用用于产生这类缀合物的化疗剂。此外,可以使用的具有酶活性的毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、塑莲根毒蛋白II A链、 α -帚曲霉素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白质、香石竹毒蛋白蛋白质、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、*sapaonaria officinalis*抑制剂、多花白树毒蛋白、米托洁林(mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯。可获得多种放射性核素用于产生放射性缀合抗体。实例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。用多种双功能蛋白质偶联剂产生多肽和细胞毒剂的缀合物,如3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、亚胺基硫

烷(IT)、亚胺酯的双功能衍生物(如己二酰亚氨酸二甲酯HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、二-叠氮基化合物(如二(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、二-重氮基衍生物(如二-(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如2,6-二异氰酸甲苯酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以按Vitetta等,Science 238:1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳14标记的3-甲基二乙烯三胺五乙酸1-异硫氰基苄酯(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与多肽缀合的示例性整合剂。

[0222] 本文还考虑多肽和一种或多种小分子毒素(如棘孢霉素、美登木素生物碱、单端孢霉烯和CC1065及这些毒素的具有毒素活性的衍生物)的缀合物。

[0223] 美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初分离自东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)。随后发现某些微生物也产生美登木素生物碱,如美登木醇和C-3美登木醇酯。还考虑合成的美登木醇及其衍生物和类似物。存在许多本领域已知的用于制备多肽-美登木素生物碱缀合物的连接基团,包括例如美国专利号5,208,020中公开的那些。该连接基团包括上述专利中所公开的二硫基、硫醚基、酸敏感基团、光敏感基团、肽酶敏感基团或酯酶敏感基团,优选二硫基和硫醚基。

[0224] 取决于连接类型,接头可以在多个位置附着于美登木素生物碱分子。例如,可以使用常规偶联技术,通过与羟基反应来形成酯键。该反应可以发生在具有羟基的C-3位、用羟甲基修饰的C-14位、用羟基修饰的C-15位和具有羟基的C-20位。在优选实施方案中,在美登木醇或美登木醇类似物的C-3位形成连接。

[0225] 另一目的缀合物包含与一个或多个棘孢霉素分子缀合的多肽。棘孢霉素家族的抗生素能够以低于皮摩尔的浓度产生双链DNA断裂。棘孢霉素家族的缀合物的制备见例如美国专利号5,712,374。可以使用的棘孢霉素结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰- γ_1^I 、PSAG和 θ_1^I 。抗体可以缀合的另一抗肿瘤药物是抗叶酸剂QFA。棘孢霉素和QFA都具有胞内作用位点,且不易跨过质膜。因此,细胞通过多肽(例如抗体)介导的内化作用摄取这些药剂大幅增强了它们的细胞毒效应。

[0226] 可以与本文所述多肽缀合的其他抗肿瘤剂包括BCNU、链脲菌素、长春花新碱和5-氟尿嘧啶(统称为LL-E33288复合体的药剂家族),以及埃斯波霉素(esperamicin)。

[0227] 在一些实施方案中,该多肽可以是多肽和具有溶核活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA内切核酸酶,如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)间的缀合物。

[0228] 还在另一实施方案中,该多肽(例如抗体)可以与“受体”(如链霉抗生物素蛋白)缀合用于肿瘤预寻靶,其中,对患者施用该多肽受体缀合物,然后用清除剂从循环去除未结合的缀合物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0229] 在一些实施方案中,该多肽可以与前体药物活化酶缀合,该前体药物活化酶缀合将前体药物(例如肽基化疗剂)转化为活性抗癌药物。该免疫缀合物的酶成分包括任意酶,该酶能够以这样的方式作用于前体药物,以将该前体药物转化为它的更具活性的毒性形式。

[0230] 有用的酶包括但不限于:用于将包含磷酸酯的前体药物转化为游离药物的碱性磷酸酶;用于将包含硫酸酯的前体药物转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;用于将无毒性的5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;用于将包含肽的前体药物转化为游离药物的蛋白酶,如serratia蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如

组织蛋白酶B和L)；用于转化包含D-氨基酸取代基的前体药物的D-丙氨酰羧肽酶；用于将糖基化的前体药物转化为游离药物的糖切割酶，如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶；用于将用 β -内酰胺衍生化的药物转化为游离药物的 β -内酰胺酶；及青霉素酰胺酶，如用于将分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基在其氨基氮处衍生化的药物转化为游离药物的青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。备选地，可以用具有酶活性的抗体(在本领域中也称为“抗体酶”)来将前体药物转化为游离活性药物。

[0231] (iv) 其他

[0232] 多肽的另一类共价修饰包括将多肽与多种非蛋白质聚合物之一连接，例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。多肽还可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊(例如，分别为羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊)中、胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊(nanocapsule))中或粗滴乳状液中。这类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Gennaro, A.R., 编辑, (1990)中。

[0233] IV. 获得用于制剂和方法的多肽

[0234] 可以用本领域公知的方法(包括重组方法)获得用于本文所述纯化方法的多肽。以下部分提供关于这些方法的指导。

[0235] (A) 多核苷酸

[0236] 在本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”指任意长度的核苷酸聚合物，且包括DNA和RNA。

[0237] 编码多肽的多核苷酸可以获自任意来源，包括但不限于从被认为具有该多肽mRNA并以可检测的水平表达它的组织制备的cDNA文库。因此，编码多肽的多核苷酸可以方便地获自从人组织制备的cDNA文库。还可以从基因组文库或通过已知的合成方法(例如自动化核酸合成)获得编码多肽的基因。

[0238] 例如，该多核苷酸可以编码整条免疫球蛋白分子链，如轻链或重链。完整的重链不仅包括重链可变区(V_H)，还包括重链恒定区(C_H)，该重链恒定区通常将包含三个恒定结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} ，及“铰链”区。在一些情况下，希望存在恒定区。

[0239] 可以由多核苷酸编码的其他多肽包括结合抗原的抗体片段，如单结构域抗体(“dAb”)、Fv、scFv、Fab' 和 $F(ab')_2$ 及“微抗体(minibody)”。微抗体(通常)是已从其切除了 C_{H1} 和 C_k 或 C_L 结构域的二价抗体片段。由于微抗体比常规抗体小，它们应在临床/诊断使用中达到更好的组织穿透，但由于是二价，它们应保持比单价抗体片段(如dAb)高的结合亲和力。因此，除非文中另有说明，本文所用的术语“抗体”不仅涵盖全抗体分子，还涵盖上文所讨论的类型的结合抗原的抗体片段。优选地，相对于对应的人受体构架，存在于所编码的多肽中的每个构架区将包含至少一个氨基酸取代。因此，例如，相对于受体构架区，该构架区可以包含总计三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三、十四个或十五个氨基酸取代。

[0240] 适宜地，可以分离和/或纯化本文所述的多核苷酸。在一些实施方案中，该多核苷酸是分离的多核苷酸。

[0241] 术语“分离的多核苷酸”旨在表明该分子已从它的正常或天然环境移出或分离，或已以这样的方式产生，使得它不存在于它的正常或天然环境中。在一些实施方案中，该多核

苷酸是纯化的多核苷酸。术语纯化的旨在表明至少已移出了一些污染分子或物质。

[0242] 适宜地,该多核苷酸是基本上纯化的,使得相关多核苷酸构成存在于组合物中的优势(即丰度最高)多核苷酸。

[0243] 可以将包含编码重链可变结构域和/或编码轻链可变结构域的插入片段的重组核酸用于本文所述的方法。在定义上,这类核酸包括编码的单链核酸,由该编码核酸及与之互补的核酸组成的双链核酸,或这些互补(单链)核酸本身。

[0244] 还可以在抗体的重链可变结构域和/或轻链可变结构域之外产生一个或多个修饰。这种突变核酸可以是沉默突变,其中,一个或多个核苷酸被具有编码一个或多个相同氨基酸的新密码子的其他核苷酸取代。这种突变序列可以是简并序列。简并序列在遗传密码的意义内是简并的,因为用其他核苷酸取代无限数目的核苷酸而不导致最初编码的氨基酸序列的改变。由于它们不同的限制位点和/或具体宿主(尤其是酵母、细菌或哺乳动物细胞)优选的特定密码子的频率,可以用这类简并序列来获得重链可变结构域和/或轻链可变结构域的最佳表达。

[0245] 与一个或多个氨基酸序列具有某种程度的序列同一性或序列同源性的序列是具有本文定义的具体特性的多肽或编码这种多肽的任意核苷酸序列(后文称为“同源序列”)。在此,术语“同源物”意指与主题氨基酸序列和主题核苷酸序列具有某种同源性的实体。在此,术语“同源性”可以等同于“同一性”。

[0246] 在一些实施方案中,同源氨基酸序列和/或核苷酸序列应编码保持抗体功能活性和/或增强抗体活性的多肽。在一些实施方案中,选取同源序列包含这样的氨基酸序列,该氨基酸序列可以与主题序列至少约75%、85%或90%同一,优选地至少约95%或98%同一。通常,同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。虽然也可以按照相似性(即,具有相似的化学特性/功能的氨基酸残基)来考虑同源性。在一些实施方案中,优选按照序列同一性来表示同源性。

[0247] 在本背景中,选取同源序列包含这样的核苷酸序列,该核苷酸序列可以与编码本文所述多肽的核苷酸序列(主题序列)至少约75%、85%或90%同一,优选地至少约95%或98%同一。通常,同源物将包含与主题序列相同的编码活性位点等的序列。虽然也可以按照相似性(即,具有相似的化学特性/功能的氨基酸残基)来考虑同源性。在一些实施方案中,优选按照序列同一性来表示同源性。

[0248] 这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过寡核苷酸介导(或位点定向)诱变、PCR诱变和盒诱变预先制备的多肽的变体或非变体形式来制备。

[0249] (B) 多核苷酸的表达

[0250] 以下描述主要涉及通过培养用包含编码多肽的多核苷酸的载体转化或转染的细胞来产生多肽。当然,考虑可以利用本领域公知的备选方法来制备多肽。例如,可以使用固相技术(见例如Stewart等,Solid-Phase Peptide Synthesis W.H.Freeman Co.,San Francisco,Calif.(1969);Merrifield,J.Am.Chem.Soc.85:2149-2154(1963)),通过直接肽合成来产生适当的氨基酸序列或其部分。可以使用手动技术或通过自动化来进行体外蛋白质合成。可以例如按照厂家的说明用Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City,Calif.)来达到自动化合成。可以分别化学合成多肽的多种部分并用化学方

法或酶促方法组合来产生希望的多肽。

[0251] 将本文所述多核苷酸插入用于产生多肽的一个或多个表达载体中。术语“控制序列”指在特定宿主生物中表达有效连接的编码序列所必需的DNA序列。控制序列包括但不限于启动子(例如天然相关的启动子或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。

[0252] 在将它放置在与另一多核苷酸序列的功能关系中时,多核苷酸“有效连接”。例如,如果它表达为参与多肽分泌的前蛋白,则前序列或分泌前导序列的核酸与多肽的核酸有效连接;如果它影响序列的转录,则启动子或增强子与编码序列有效连接;或者,如果放置它来便于翻译,则核糖体结合位点与编码序列有效连接。通常,“有效连接”意指所连接的核酸序列是连续的,且在分泌前导序列的情况下是连续且在阅读相中的。但是,增强子不必是连续的。通过在方便的限制位点处连接来达到连接。如果这类位点不存在,则按照常规实施使用合成的寡核苷酸衔接物或接头。

[0253] 对于抗体,可以将轻链和重链克隆在相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的核酸区段与该一个或多个表达载体中确保免疫球蛋白多肽表达的控制序列有效连接。

[0254] 选择基因成分—通常,表达载体包含选择标记(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性新霉素抗性),以允许检测用希望的DNA序列转化的那些细胞(见例如US 4,704,362)。在一些实施方案中,选择基因编码这样的蛋白质,该蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其他毒素(例如氨苄青霉素、新霉素、氨基嘌呤或四环素)的抗性;(b) 弥补营养缺陷;或(c) 提供不能从复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0255] 选择方案的一个实例利用药物来阻断宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予药物抗性的蛋白质,从而从该选择方案存活下来。这种显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0256] 适合用于哺乳动物细胞的选择标记的另一实例是使得能够鉴定有能力摄取编码本文所述抗体的核酸的细胞的那些,如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II(优选灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0257] 例如,首先通过在包含氨基嘌呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。在利用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如ATCC CRL-9096)。

[0258] 备选地,可以通过在包含用于该选择标记的选择剂(如氨基糖苷抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418)的培养基中培养细胞来选择用编码本文所述多肽、野生型DHFR蛋白质和另一选择标记(如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH))的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(尤其是包含内源DHFR的野生型宿主)。见美国专利号4,965,199。

[0259] 适合用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb等, Nature 282:39 (1979))。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株(例如ATCC No.44076或PEP4-1)提供了选择标记。Jones, Genetics 85:12 (1977)。然后,酵母宿主细胞基因组中trp1损伤的存在为通过缺乏色氨酸的情况下的生长来检测转化提供了有效的环境。类似地,通过已知的具有Leu2基因的质粒弥补了Leu2缺乏的酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)。

[0260] 此外,可以用衍生自1.6 μm环状质粒pKD1的载体来转化克鲁维酵母属

(*Kluyveromyces*) 酵母。备选地, 针对乳酸克鲁维酵母 (*K.lactis*) 报道了用于大规模产生重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg, *Bio/Technology* 8:135 (1990)。还公开了用于通过克鲁维酵母属的工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体。Fleer等, *Bio/Technology* 9:968-975 (1991)。

[0261] 信号序列成分-多肽不仅可以直接重组产生, 还可以作为与异源多肽的融合多肽产生, 该异源多肽优选是信号序列或在成熟多肽的N端具有特异性切割位点的其他多肽。所选择的异源信号序列优选是宿主细胞识别和加工 (即, 通过信号肽酶切割) 的信号序列。可以用选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II前导序列的原核信号序列取代信号序列。对于酵母分泌, 可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列 (包括酵母属 (*Saccharomyces*) 和克鲁维酵母属 α -因子前导序列) 或酸性磷酸酶前导序列、白假丝酵母 (*C.albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列或W090/13646中所述的信号来取代天然信号序列。在哺乳动物细胞表达中, 可用哺乳动物信号序列, 以及病毒分泌前导序列, 例如单纯疱疹gD信号。

[0262] 将这种前体区的核酸序列与编码本文所述多肽的核酸序列符合读框地连接。

[0263] 复制起点-表达载体和克隆载体都包含使得该载体能够在所选择的一种或多种宿主细胞中复制的多核苷酸序列。通常, 在克隆载体中, 此序列是使得该载体能够独立于宿主染色体DNA复制的序列, 且包含复制起点或自主复制序列。对多种细菌、酵母和病毒而言, 这类序列是公知的。来自质粒pBR322的复制起点适合用于大多数革兰氏阴性菌, 2 μ 质粒起点适合用于酵母, 多种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV) 用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常, 哺乳动物表达载体不需要复制起点成分 (通常可以使用SV40起点, 但只是因为它包含早期启动子)。

[0264] 启动子成分-表达载体和克隆载体通常包含宿主生物可识别, 且与编码多肽的核酸有效连接的启动子。适合用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸 (trp) 启动子系统及杂合启动子 (如tac启动子)。但是, 其他已知的细菌启动子也是适宜的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码多肽的DNA有效连接的Shine-Dalgarno (S.D.) 序列。

[0265] 适宜地, 该表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞 (例如COS细胞, 如COS 7细胞, 或CHO细胞) 的载体中的真核启动子系统。一旦已将载体掺入适当的宿主, 即可以在适合用于高水平表达核苷酸序列并收集和纯化交叉反应抗体的条件下维持该宿主。

[0266] 对真核生物而言, 启动子序列是已知的。基本上所有真核基因都具有定位在起始转录的位点上游约25至30个碱基的富含AT的区域。见于许多基因的转录起点上游70至80个碱基的另一序列是CNCAAT区, 其中N可以是任意核苷酸。大多数真核基因的3'端是AATAAA序列, 其可以是在编码序列的3'端加入poly A尾的信号。将所有这些序列适宜地插入真核表达载体中。

[0267] 适合用于酵母宿主的启动子序列的实例包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶 (如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶) 的启动子。

[0268] 其他酵母启动子 (其是具有通过生长条件控制转录的附加优势的诱导型启动子)

是醇脱氢酶2、异细胞色素 (isocytochrome) C、酸性磷酸酶、氮代谢相关降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适合用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于EP 73,657中。还有利地与酵母启动子一起使用酵母增强子。

[0269] 例如通过获自病毒(例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒和最优选猿猴病毒40(SV40))基因组、获自异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)或获自热休克启动子的启动子来控制哺乳动物宿主细胞中从载体转录本文所述的多肽,只要这类启动子与宿主细胞系统相容。

[0270] 作为SV40限制片段方便地获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该限制片段还包含SV40病毒复制起点。作为HindIII E限制片段方便地获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利号4,419,446中公开了用牛乳头状病毒作为载体来在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利号4,601,978中描述了此系统的修改。关于人 β -干扰素cDNA在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下在小鼠细胞中的表达,还见Reyes等,Nature 297:598-601(1982)。备选地,可以用劳斯肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0271] 增强子元件成分-将增强子序列插入载体通常增加高等真核生物的编码本文所述多肽的DNA的转录。现已知来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素基因)的许多增强子序列。但是,通常将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点晚期一侧(bp100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期一侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。关于用于激活真核启动子的增强元件,还见Yaniv,Nature 297:17-18(1982)。增强子可以在多肽编码序列5'或3'的位置剪接入载体,但优选定位在启动子5'的位点。

[0272] 转录终止成分-用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和(偶尔)3'非翻译区获得这类序列。一种有用的转录终止成分是牛生长激素聚腺苷酸化区域。见WO 94/11026及其中公开的表达载体。

[0273] 可以通过公知的方法将包含多核苷酸序列(例如可变重链和/或可变轻链编码序列和可选的表达控制序列)的载体转入宿主细胞中,该方法取决于细胞宿主的类型而不同。例如,氯化钙转染常用于原核细胞,而磷酸钙处理、电穿孔、脂转染、生物射弹或基于病毒的转染可以用于其他细胞宿主。(通常见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(ColdSpring Harbor Press,第2版,1989)。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射。对于转基因动物的产生,转基因可以显微注射入受精的卵母细胞,或者可以掺入胚胎干细胞的基因组,并将这类细胞的细胞核转入去核的卵母细胞。

[0274] 在将重链和轻链克隆在分开的表达载体上时,共转染该载体来获得完整免疫球蛋白的表达和组装。一旦表达,即可以按照本领域的标准技术(包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、HPLC纯化、凝胶电泳等)纯化全抗体、它们的二聚体、单条轻链和重链或其他免疫球蛋白形式(通常见Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,(1982))。对于药用,优选至少约90%至95%同质性、最优选约98%至99%或更高同质性的基本上纯的免疫球蛋白。

[0275] (C) 构建体

[0276] 通常,构建体将是允许在适宜的宿主中表达该多核苷酸编码的一条或多条多肽的表达载体。构建体可以包含例如以下的一个或多个:在宿主中具有活性的启动子;一个或多个调节序列,如增强子;复制起点;及标记,优选选择标记。宿主可以是真核或原核宿主,虽然可以优选真核(尤其是哺乳动物)宿主。适宜启动子的选择显然将在某种程度上取决于所使用的宿主细胞,但可以包括来自人病毒(如HSV、SV40、RSV等)的启动子。许多启动子为本领域技术人员公知。

[0277] 构建体可以包含编码含有三个轻链高变环或三个重链高变环的多肽的多核苷酸。备选地,该多核苷酸可以编码含有通过适当长度的适宜柔性的接头连接的三个重链高变环和三个轻链高变环的多肽。另一种可能性是单个构建体可以包含编码两条分开的多肽的多核苷酸,一条多肽包含轻链环,一条多肽包含重链环。该分开的多肽可以独立表达,或者可以形成单个共同操纵子的部分。

[0278] 构建体可以包含一种或多种调节特征(如增强子、复制起点)和一种或多种标记(可选择的或其他)。构建体可以采取质粒、酵母人工染色体、酵母微型染色体的形式,或者可以整合入全部或部分病毒基因组,尤其是减毒病毒或对人类不致病的类似病毒。

[0279] 可以方便地配制构建体用于对哺乳动物(优选人)受试者安全施用。通常,将以多个整分试样提供它们,每个整分试样包含足够用于有效免疫至少一名正常成年人受试者的构建体。

[0280] 可以以液体或固体形式,优选作为冻干粉提供构建体,通常在使用前用无菌水性液体再水化该冻干粉。

[0281] 可以用佐剂或其他成分配制构建体,其具有增加受试者响应构建体的施用的免疫应答(例如通过特异性抗体效价测量)的作用。

[0282] (D) 载体

[0283] 术语“载体”包括表达载体和转化载体和穿梭载体。

[0284] 术语“表达载体”意指能够在体内或在体外表达的构建体。

[0285] 术语“转化载体”意指能够从一个实体转移至另一实体(其可以属于该物种或可以属于不同物种)的构建体。如果构建体能够从一个物种转移至另一物种(如从大肠杆菌质粒至如芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细菌),则有时将该转化载体称为“穿梭载体”。它甚至可以是能够从大肠杆菌质粒转移至土壤杆菌属(*Agrobacterium*)至植物的构建体。

[0286] 可以将载体转化入下文所述的适宜宿主细胞来提供多肽的表达。多种载体是公开可得的。载体可以是例如质粒、黏粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种方法来将适当的核酸序列插入载体中。通常,用本领域已知的技术将DNA插入一个或多个适当的限制性内切核酸酶位点。包含一种或多种这些成分的适宜载体的构建利用技术人员已知的标准连接技术。

[0287] 载体可以是例如质粒、病毒或噬菌体载体,其提供复制起点,可选地提供用于表达该多核苷酸的启动子,且可选地提供该启动子的调节基因。载体可以包含一个或多个本领域公知的选择标记基因。

[0288] 这些表达载体通常可作为附加体或作为宿主染色体DNA的整合部分在宿主生物中复制。

[0289] (E) 宿主细胞

[0290] 宿主细胞可以是例如细菌、酵母或其他真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。

[0291] 可以用已进行了遗传操作的转基因多细胞宿主生物来产生多肽。该生物可以是例如转基因哺乳动物生物(例如转基因山羊或小鼠品系)。

[0292] 适宜的原核生物包括但不限于真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公开可得的,如大肠杆菌K12菌株MM294(ATCC 31,446)、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)、大肠杆菌菌株W3110(ATCC 27,325)和K5772(ATCC 53,635)。其他适宜的原核宿主细胞包括肠杆菌科,如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌;肠杆菌属(*Enterobacter*);欧文氏菌属(*Erwinia*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);变形杆菌属(*Proteus*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*);沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*);和志贺氏菌属(*Shigella*);以及芽孢杆菌属,如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)(如地衣芽孢杆菌41P);假单胞菌属(*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌;和链霉菌属(*Streptomyces*)。这些实例是说明性的而不是限制性的。菌株W3110是尤其优选的宿主或亲本宿主,因为它是进行重组多核苷酸产物发酵的常用宿主菌株。优选地,宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如,可以修饰菌株W3110来在编码宿主内源多肽的基因中产生遗传突变,这类宿主的实例包括大肠杆菌W3110菌株1A2,其具有完整基因型tonA;大肠杆菌W3110菌株9E4,其具有完整基因型tonA ptr3;大肠杆菌W3110菌株27C7(ATCC 55,244),其具有完整基因型tonA ptr3phoA E15(argF-lac)169degP ompT kan';大肠杆菌W3110菌株37D6,其具有完整基因型tonA ptr3phoA E15(argF-lac)169degP ompT rbs7ilvG kan';大肠杆菌W3110菌株40B4,其是具有非卡那霉素抗性degP缺失突变的菌株37D6;及具有突变周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。备选地,体外克隆方法,例如PCR或其他核酸聚合酶反应是适宜的。

[0293] 可以在这些原核宿主中制备通常将包含与该宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)的表达载体。此外,将存在任意数目的多种公知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子通常将控制表达(可选地用操纵基因序列),且具有用于起始和完成转录和翻译的核糖体结合位点序列等。

[0294] 可以用真核微生物来进行表达。诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是适合用于编码多肽的载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是常用的低等真核宿主微生物。其他宿主包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属宿主,如乳酸克鲁维酵母(MW98-8C、CBS683、CBS4574)、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*)(ATCC12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦尔提克鲁维酵母(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K. thermotolerans*)和马克思克鲁维酵母(*K. marxianus*);耶氏酵母属(*Yarrowia*)(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*);假丝酵母属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma reesei*);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),如许旺酵母(*Schwanniomyces*

occidentalis);和丝状真菌,如脉孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*);和曲霉属(*Aspergillus*)宿主,如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。甲基营养酵母在本文中是适宜的,且包括但不限于选自汉森酵母属(*Hansenula*)、假丝酵母属、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、酵母属、球拟酵母属(*Torulopsis*)和红酵母属(*Rhodotorula*)的能够在甲醇上生长的酵母。酵母属是优选的酵母宿主,适宜的载体具有希望的表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。

[0295] 除微生物外,还可以用哺乳动物组织细胞培养物来表达和产生本文所述的多肽,且在一些情况下是优选的(见Winnacker,From Genes to ClonesVCH Publishers,N.Y.,N.Y.(1987))。对于一些实施方案,可以优选真核细胞,因为本领域已研发了许多适宜的能够分泌异源多肽(例如完整的免疫球蛋白)的宿主细胞系,且包括CHO细胞系、多种Cos细胞系、HeLa细胞,优选骨髓瘤细胞系或转化的B细胞或杂交瘤。在一些实施方案中,该哺乳动物宿主细胞是CHO细胞。

[0296] 在一些实施方案中,该宿主细胞是脊椎动物宿主细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7,ATCC CRL1651);人胚肾细胞系(293或为在悬浮培养物中生长而亚克隆的293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO或CHO-DP-12细胞系);小鼠支持细胞;猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞;MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0297] 备选地,编码多肽的序列可以掺入转基因中来将其引入转基因动物的基因组,随后表达在该转基因动物的乳汁中。适宜的转基因包括与来自乳腺特异性基因(如酪蛋白或 β 乳球蛋白)的启动子和增强子有效连接的轻链和/或重链的编码序列。

[0298] 备选地,可以在转基因植物(例如烟草、玉米、大豆和苜蓿)中产生本文所述的抗体。改进的“植物产抗体”载体(Hendy等,J.Immunol.Methods 231:137-146(1999))和纯化策略与可转化的作物物种的增加偶联,使得这类方法成为产生重组免疫球蛋白(不仅用于人和动物治疗,还用于工业应用(例如催化性抗体))的实际和有效的手段。此外,已显示植物产生的抗体安全而有效,且避免了使用动物衍生的材料。此外,植物细胞和哺乳动物细胞产生的抗体的糖基化模式的差异对抗原结合或特异性具有很小的影响或无影响。此外,未在接受植物衍生的分泌性二聚体IgA抗体的局部口腔应用的患者中观察到毒性或HAMA的证据(见Larrick等,Res.Immunol.149:603-608(1998))。

[0299] 用本文针对多肽产生描述的表达载体或克隆载体转染或转化宿主细胞,并在根据诱导启动子、选择转化体或扩增编码希望的序列的基因的需要修改的常规营养培养基中培养。熟练的技术人员可以在不进行过多实验的情况下选择诸如培养基、温度、pH等的培养条件。通常,用于最大化细胞培养物的生产力的原理、流程和实施技术可以见于Mammalian CellBiotechnology:a Practical Approach M.Butler,编辑(IRL Press,1991)中。

[0300] 真核细胞转染和原核细胞转化的方法为普通技术人员已知,例如CaCl₂、CaPO₄、脂

质体介导和电穿孔。取决于所使用的宿主细胞,用适合于这类细胞的标准技术进行转化。利用氯化钙的钙处理或电穿孔通常用于原核生物。如Shaw等, *Gene* 23:315 (1983) 和1989年6月29日公开的W089/05859所述,根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染用于转化某些植物细胞。对于无这类细胞壁的哺乳动物细胞,可以利用Graham和vander Eb, *Virology* 52:456-457 (1978) 的磷酸钙沉淀法。美国专利号4,399,216中描述了哺乳动物细胞宿主系统转染的一般方面。通常按照Van Solingen等, *J. Bact.* 130:946 (1977) 和Hsiao等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:3829 (1979) 的方法实现转化入酵母。但是,还可以使用用于将DNA引入细胞的其他方法,如通过核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞融合或聚阳离子(例如1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物、聚鸟氨酸)。用于转化哺乳动物细胞的多种技术见Keown等, *Methods in Enzymology* 185:527-537 (1990) 和Mansour等, *Nature* 336:348-352 (1988)。

[0301] 尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,如在治疗性抗体与细胞毒性剂(例如毒素)缀合且该免疫缀合物本身在肿瘤细胞破坏中显示有效性时,可以在细菌中产生多肽,例如抗体。全长抗体具有更长的循环半衰期。大肠杆菌中的产生更快,且更节约成本。对于在细菌中表达多肽,见例如美国专利号5,840,523,其描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区(TIR)和信号序列,这些专利在此引入作为参考。表达后,从可溶性级分中的大肠杆菌细胞糊分离抗体,且可以通过例如A蛋白柱或G蛋白柱(取决于同种型)来纯化。可以与用于纯化在例如CHO细胞中表达的抗体的方法类似地进行最终的纯化。

[0302] 适合用于表达本文所述的糖基化多肽的宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定了来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的宿主的许多杆状病毒株和变体及对应的容纳昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株是公开可得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5病毒株,且可以将这类病毒用作本文的病毒,尤其是用于转染草地夜蛾细胞。

[0303] 可以在多种培养基中培养用于产生多肽的宿主细胞。诸如Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 的市售培养基适合用于培养宿主细胞。可以根据需要向任意这些培养基中补充激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、酶和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCIN™药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围内的终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等同的能量来源。还可以按本领域技术人员已知的适当浓度包含任意其他必需的补充物。诸如温度、pH等的培养条件是之前用于所选择的表达宿主细胞的那些,且对普通技术人员而言显而易见。

[0304] V. 制剂和制备制剂的方法

[0305] 本文还提供制剂和制备制剂的方法,该制剂包含通过本文所述方法纯化的多肽(例如抗体)。例如,可以将该纯化的多肽与可药用载体组合。

[0306] 在一些实施方案中,可以通过将具有希望的纯度的多肽与可选的可药用载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编辑(1980))混

合,以冻干制剂或水溶液的形式制备多肽制剂用于保存。

[0307] 本文所用的“载体”包括可药用载体、赋形剂或稳定剂,其在所利用的剂量和浓度下对暴露于它的细胞或哺乳动物无毒性。通常,生理可用载体是水性pH缓冲溶液。

[0308] 可药用载体、赋形剂或稳定剂在所利用的剂量和浓度下对受体无毒性,且包括缓冲液,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苯索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0309] 在一些实施方案中,多肽制剂中的多肽保持功能活性。

[0310] 待用于体内施用的制剂必须无菌。这易于通过滤过无菌滤膜来实现。

[0311] 本文的制剂还可以包含所治疗的具体适应症必需的一种以上活性化合物,尤其是相互无不利影响的具有互补活性的那些。这类分子适宜以对预期目的有效的量组合存在。例如,除多肽外,可以希望在一种制剂中包含附加的多肽(例如抗体)。备选地,或此外,该组合物可以进一步包含化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或保心药。这类分子适宜地以对预期目的有效的量组合存在。

[0312] V. 制成品

[0313] 通过本文所述的方法纯化的多肽和/或包含通过本文所述的方法纯化的多肽的制剂可以包含在制成品内。该制成品可以包含含有该多肽和/或多肽制剂的容器。优选地,该制成品包含:(a)包含组合物的容器,该组合物在容器内包含本文所述的多肽和/或多肽制剂;和(b)具有对受试者施用该制剂的说明的包装说明书。

[0314] 制成品包含容器及容器上或伴随容器的标签或包装说明书。适宜的容器包括例如瓶、小管、注射器等。容器可以形成自多种材料,如玻璃或塑料。容器容纳或包含制剂,且可以具有无菌接口(例如容器可以是具有可通过皮下注射针头穿孔的塞子的静脉内溶液袋或小管)。组合物中的至少一种活性剂是多肽。标签或包装说明书指示该组合物在受试者中的用途,具有关于多肽和所提供的任意其他药物的给药量和给药间隔的具体指导。制成品可以进一步包含商业和用户角度希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释液、滤器、针头和注射器。在一些实施方案中,该容器是注射器。在一些实施方案中,该注射器进一步包含在注射装置内。在一些实施方案中,该注射装置是自动注射器。

[0315] 用“包装说明书”来指通常包含在治疗产品的商业包装中的说明,其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与所包装的产品组合的其他治疗产品的信息和/或关于这类治疗产品的使用的警告。

[0316] 通过以下非限制性实施例来说明本发明的其他细节。本说明书中的所有参考文献的公开内容在此明确引用作为参考。

实施例

[0317] 以下实施例旨在纯粹示例本发明,因此不应认为其以任意方式限制本发明。以下实施例和发明详述作为说明提供而不是作为限制提供。

[0318] 实施例1-过载阳离子交换材料的选择

[0319] 此实施例描述用于纯化重组人源化抗-血管内皮生长因子(VEGF)抗体、重组人源化抗-CD11a抗体和重组嵌合抗-CD20抗体的阳离子交换层析法。抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的结构分别公开于美国专利号7,169,901、6,703,018和5,736,137中,这些专利中的每一个在此明确引用作为参考。

[0320] 材料和方法

[0321] 纯化方法

[0322] 通过连续离心处理含有在中国仓鼠卵巢细胞中产生的单克隆抗体的细胞培养液来去除细胞碎片,并通过用深度滤器(depth filter)和0.2um滤器过滤来进一步澄清。通过A蛋白层析纯化收获的细胞培养液。在层析过程中,加样和洗涤条件在中性pH范围,且在低pH范围进行洗脱。将获自A蛋白柱的蛋白混合物的pH和电导率调节至用于阳离子交换层析的加样条件,然后0.22um过滤。将相同的pH和电导率用于阳离子交换层析加样条件、平衡条件和初始洗涤条件。将经过滤和平衡的蛋白混合物用作随后的阳离子交换层析的产物。通过280nm吸光度测定产物的浓度(g/L)。按下文实验方法和结果部分中所示进行具体的阳离子交换层析条件。

[0323] 测定

[0324] 按下文所示进行所有实施例的测定。

[0325] 抗体浓度测定

[0326] 用Poros A蛋白HPLC测定(Applied Biosystems,Foster City,CA)来测定收获的细胞培养液(HCCF)中的抗体浓度。按2.0mL/分钟的流速操作柱,其中在pH 6.3的磷酸钠/氯化钠缓冲液中平衡柱,并用pH 2.5的醋酸/甘氨酸溶液洗脱。监测280nm吸光度,并用洗脱峰面积来从标准曲线定量抗体浓度。使用具有10mm光程长度流动池的分光光度计,通过280nm吸光度(减去320nm吸光度来校正光散射)来测定通过A蛋白亲和层析或离子交换层析获得的纯化混合物中的抗体。将抗体浓度计算为[(280nm吸光度-320nm吸光度) x 稀释倍数]/消光系数。

[0327] CHOP测定

[0328] 使用了酶联免疫吸附测定(ELISA)和Meso Scale Discovery (MSD)测定这两种CHOP测定。

[0329] CHOP ELISA测定-将来自所选择的运行的样品提交至测定组,该测定组进行标准且经验证的ELISA来定量CHOP的水平。将亲和纯化的山羊抗-CHOP抗体固定在微量滴定板孔上。在孔中孵育含CHOP样品、标准品和对照的稀释液,然后用与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗-CHOP抗体孵育。用邻苯二胺二盐酸化物检测辣根过氧化物酶活性。通过在酶标仪中读取492nm吸光度来定量CHOP。用计算机曲线拟合程序来产生标准曲线,并自动计算样品浓度。ELISA的测定范围通常是5ng/mL至320ng/mL,将结果标准化为ppm进行混合物比较。

[0330] CHOP MSD测定-将来自所选择的运行的样品提交至测定组,该测定组进行标准且经验证的MSD测定来定量CHOP的水平。将亲和纯化的山羊抗-CHOP抗体固定在微量滴定板孔上。在孔中孵育含CHOP样品、标准品和对照的稀释液,然后用与MSD SULFO-TAG NHS-ESTER

缀合的山羊抗-CHOP抗体孵育。NHS-ESTER具有胺活性接头N-羟基琥珀酰亚胺酯,其易于偶联至蛋白质的伯胺基团。加入MSD Read Buffer并对板底施加电后测量CHOP浓度。标记的检测抗体通过起始于Multi-Array微孔板电极表面的电化学刺激与含三丙胺的Read Buffer相互作用在620nm发光,并通过CCD相机测量。然后通过标准曲线上的反向回归来获得浓度。该测定的测定范围是5ng/mL至1530ng/mL,将结果标准化为ppm进行混合物比较。

[0331] A蛋白测定

[0332] 在将A蛋白层析用于该回收方法时,检测样品中浸出的A蛋白。通过夹心法A蛋白ELISA来测定A蛋白的水平。将鸡抗-葡萄球菌A蛋白抗体固定在微量滴定板上。样品处理方法包括样品稀释,然后用微波辅助加热解离A蛋白/IgG复合体作为对样品进行夹心法ELISA之前的预处理步骤。如果存在于样品中,则A蛋白结合包被抗体。用辣根过氧化物酶缀合的抗-蛋白质抗体来检测结合的A蛋白。用产生比色信号的2成分TMB底物溶液定量辣根过氧化物酶活性。

[0333] 庆大霉素测定

[0334] 用竞争ELISA来测定所有混合物中的庆大霉素浓度。将抗庆大霉素-BSA的山羊多克隆抗体固定在微量滴定板孔上。庆大霉素与生物素化的庆大霉素竞争结合抗体。加入辣根过氧化物酶-链霉抗生物素蛋白和邻苯二胺底物来检测所结合的生物素标记的庆大霉素的量。将样品系列稀释在测定稀释液中,使得吸光度读数落在该测定的可定量范围之内(0.37-90ng/mL)。

[0335] 大小排阻层析

[0336] 通过高效大小排阻层析测定来测定单克隆抗体的大小异质性。它利用TSK-GEL G3000SWXL柱(7.8mm x 300mm,Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA)来将单体和高分子量种类(HMW)分开。使用200mM磷酸钾、250mM氯化钾、pH 6.2的流动相,按0.3mL/分钟的流速操作柱。对于每个样品,注入20μg的抗体。用280nm吸光度来监测单体和HMW的分开。根据它们的峰面积来计算单体和HMW的百分比。

[0337] DNA测定

[0338] 用于CHO细胞DNA测定的Taqman PCR用实时PCR来检测和定量产物样品中的CHO DNA。首先用Qiagen的Virus Biorobot试剂盒提取来自样品和对照的DNA。用ABI的序列检测系统在96孔板中用PCR引物和探针对提取的样品、对照和标准品DNA进行Taqman实时聚合酶链反应(PCR)。通过中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)基因组中110碱基对区段的重复DNA序列来定义引物。探针在5'端用荧光报道染料标记,在3'端用淬灭染料标记。在探针完整时,淬灭剂抑制报道分子的发射光谱。聚合酶的5'核酸酶活性水解探针并释放报道分子,其导致荧光发射的增加。序列检测器定量扩增产物,其与在DNA扩增过程中连续测量的荧光发射的增加成正比。为标准曲线计算DNA扩增超过阈值(CT)的循环数。产生1pg/mL-10,000pg/mL范围内的标准曲线,用该标准曲线来定量样品中的DNA。

[0339] 实验方法和结果

[0340] 抗-CD11a抗体的纯化

[0341] 在此研究中评价了三种类型的阳离子交换材料:树脂、膜和monolith。就方法性能(例如杂质去除、步骤产率和产物质量)评价了使用这三种阳离子交换材料的抗-CD11a抗体的过载阳离子交换纯化法。

[0342] 在pH 5.5和3mS/cm运行加样产物至多1000g/L CV(柱体积)或MV(膜或monolith体积)的树脂(Poros HS50柱(0.66cm内径(“i.d.”)x5cm,15.1CV/小时)和SP Sepharose FF (“SPSFF”) (0.66cm i.d.x 4.8cm,15.7CV/小时))、monolith(S03Monolith(0.34mL,353MV/小时))和膜(Mustang S(0.18mL,333MV/小时))这三种类型的阳离子交换材料的层析谱。见图1。

[0343] 在pH 5.5和3mS/cm评价了加样至多1000g/L CV或MV的不同量的产物的树脂(Poros HS50柱(15.1CV/小时或75cm/小时)和SPSFF柱(15.7CV/小时或75cm/小时))、膜(Mustang S(333MV/小时))和monolith(S03Monolith(353MV/小时))这三种类型的阳离子交换材料的性能。如图2中所示,对于Mustang S、Monolith S03和Poros HS50,单体抗-CD11a抗体回收超过93%,对于SPSFF,单体抗-CD11a抗体回收为约88%。

[0344] 在pH 5.5和3mS/cm评价了加样至多1000g/L CV或MV的不同量的产物的树脂(Poros HS50柱(15.1CV/小时或75cm/小时)和SPSFF柱(15.7CV/小时或75cm/小时))、膜(Mustang S(333MV/小时))和monolith(S03Monolith(353MV/小时))这三种类型的阳离子交换材料去除CHOP的能力。如图2中所示,monolith材料S03Monolith在去除CHOP上比另外两种阳离子交换材料好。膜(Mustang S)和Poros HS50柱在去除CHOP上相似,且好于SPSFF柱。见图2。

[0345] 在pH 5.5和3mS/cm评价了加样至多1000g/L CV或MV的不同量的产物的树脂(Poros HS50柱(15.1CV/小时或75cm/小时)和SPSFF柱(15.7CV/小时或75cm/小时))、膜(Mustang S(333MV/小时))和monolith(S03Monolith(353MV/小时))这三种类型的阳离子交换材料去除HMW的能力。如图3中所示,树脂阳离子交换材料Poros HS50在去除HMW中最有效,随后是SPSFF。此外,Mustang S在去除HMW中比S03monolith好。见图3。

[0346] 还在pH 5.5和3mS/cm评价了加样至多1000g/L CV或MV的不同量的产物的树脂(Poros HS50柱和SPSFF柱)、膜(Mustang S)和monolith(S03Monolith)阳离子交换材料去除HMW1和HMW2的能力。如图4中所示,Poros HS50和Mustang S在去除HMW2中更有效。

[0347] 在pH 5.5和3mS/cm检查了以至多1000mg/mL CV的不同量加样产物的Poros HS50(15.1CV/小时或75cm/小时)去除HMW1和HMW2的能力。加样物和洗脱混合物中的HMW分别为6.26%和60%。如图5中所示,Poros HS50在去除HMW1和HMW2二者中都有效。

[0348] 在pH 5.5和3mS/cm评价了以至多约800g/L CV的不同量加样产物的SPSFF去除HMW的能力。图6显示层析谱和HMW去除。

[0349] 表2中总结了树脂(Poros HS50柱和SPSFF柱)、膜(Mustang S)和monolith(S03Monolith)这三种不同类型的阳离子交换材料的性能。用于纯化抗-CD11a的商业方法使用结合-洗脱模式,且加样密度为15-44mg/mL CV。如表2中所示,S03Monolith在去除CHOP中最有效,而Poros HS树脂在去除HMW中最有效。过载Poros HS法在HMW和CHOP去除中与商业SPSFF法相似。见表2。

[0350] 表2

[0351]

	加样物中 (g/L)	CEX 混合物中				
		商业 SPSFF 法	Poros HS	SPSFF	Mustang S	SO ₃ monolith
CHOP ppm	商业方法中为 600-900; 本研究中为 600	72-183	<150	<400	<150	<60
HMW %	商业方法中为 ~5; 本研究中为 6.2	0.2	0.4 收集 500g/L CV	1 收集 500g/L CV	2.7 收集 500g/L MV	4.7 收集 500g/L MV

[0352] 抗-VEGF抗体的纯化

[0353] 在此研究中评价了三种类型的阳离子交换材料：树脂、膜和monolith。就方法性能（例如杂质去除、步骤产率和产物质量）评价了使用这三种阳离子交换材料的抗-VEGF抗体的过载阳离子交换纯化法。

[0354] 在pH 5.5和5mS/cm运行了用接近1000g/L CV或MV的产物加样的树脂（Poros HS50柱（0.66cm内径x 5.4cm, 18.5CV/小时）和SPSFF柱（0.66cm内径x 5.5cm, 18.5CV/小时））、monolith（SO3Monolith（0.34mL, 176MV/小时））和膜（Mustang S（0.35mL, 171MV/小时））这三种不同类型的阳离子交换材料的层析谱。见图7。

[0355] 在pH 5.5和5mS/cm评价了加样0和1000g/L CV或MV之间的不同量的产物的树脂（Poros HS50柱（1.8mL）和SPSFF柱（1.8mL））、膜（Mustang S（0.35mL））和monolith（SO3Monolith（0.34mL））这三种类型的阳离子交换材料的性能。对于膜层析和monolithic层析，所使用的流速为100-400MV/小时。对于树脂，所使用的流速在50-200cm/小时（9-36CV/小时）之间。如图8中所示，使用所有阳离子交换材料的单体抗-VEGF抗体回收都超过90%。

[0356] 在pH 5.5和5mS/cm评价了加样0和1000g/L CV或MV之间的不同量的产物的树脂（Poros HS50柱（18CV/小时和1.7mL）和SPSFF柱（18CV/小时和1.7mL））、膜（Mustang S（171MV/小时）和Sartobind S（120MV/小时））和monolith（SO3Monolith（176MV/小时））这三种类型的阳离子交换材料去除CHOP的能力。如图9中所示，monolith，SO3Monolith在去除CHOP上比另外两种阳离子交换材料好。树脂（PorosHS50柱和SPSFF柱）和膜（Mustang S和Sartobind S）阳离子交换材料在去除CHOP中相似。见图9。

[0357] 在pH 5.5和5mS/cm评价了加样0和1000g/L CV或MV之间的不同量的产物的树脂（Poros HS50柱（18CV/小时）和SPSFF柱（18CV/小时））、膜（Mustang S（171MV/小时））和monolith（SO3Monolith（176MV/小时））这三种类型的阳离子交换材料去除DNA的能力。树脂阳离子交换材料Poros HS50在去除DNA中最有效。见图10。

[0358] 在pH 5.5和5mS/cm评价了加样0和1000g/L CV或MV之间的不同量的产物的树脂（Poros HS50柱（18CV/小时）、具有1:2稀释的单体抗体（“Mab”）的Poros HS50柱（18CV/小时）和SPSFF柱（18CV/小时））、膜（Mustang S（176MV/小时）和Sartobind S（120MV/小时））和monolith（SO3Monolith（171MV/小时））这三种类型的阳离子交换材料去除HMW的能力。如图11中所示，树脂阳离子交换材料Poros HS50在HMW去除中最有效，随后是SPSFF。此外，Mustang S在去除HMW中比SO3monolith好。见图11。

[0359] 还在pH 5.5和5mS/cm评价了加样0和1000g/L CV或MV之间的不同量的产物的树脂

(Poros HS50柱 (18CV/小时)、具有稀释的Mab的Poros HS50柱 (18CV/小时) 和SPSFF柱 (18CV/小时))、膜 (MustangS (176MV/小时)) 和monolith (SO3Monolith (171MV/小时)) 阳离子交换材料去除HMW1和HMW2的能力。如图12中所示, HMW2去除通常比HMW1去除更有效。见图12。

[0360] 用多个流速在pH 5.5和5mS/cm评价了树脂 (SPSFF柱 (1.88mL) 和Poros HS50柱 (1.85mL))、膜 (Mustang S coin (0.35mL) 和MustangS (Acrodisc 0.18mL)) 和monolith (SO3Monolith disk (0.34mL-1disk) 和SO3Monolith disk (0.68mL-2disks)) 这三种类型的阳离子交换材料的动态结合容量 (“DBC”)。如表3中所描述和显示, 阳离子交换树脂具有比膜和monolith好的Mab结合容量。通常, 阳离子交换材料的Mab结合容量与它们去除HMW的能力相关。见图11和表3。Poros HS50显示比SPSFF好的质量传递。见表3。Poros HS50显示比Mustang S和MonolithSO3高的DBC。见表3。

[0361] 表3

[0362]

流速		5% BT 下的 DBC
SPSFF (0.66cm 内径 × 5.5cm = 1.88mL)		
9.1CV/小时	50cm/小时	67.2
18.2CV/小时	100cm/小时	52.6
36.4CV/小时	200cm/小时	41.0
54.5CV/小时	300cm/小时	30.7
Poros 50HS (0.66cm 内径 × 5.4cm = 1.85mL)		
9.3CV/小时	50cm/小时	55.7
18.5CV/小时	100cm/小时	51.4
37CV/小时	200cm/小时	47.4
55.6CV/小时	300cm/小时	44.3
Mustang S coin 0.35mL		
171.4CV/小时	1mL/分钟	21.9
Mustang S (Acrodisc) 0.18mL		
171.4CV/小时	1mL/分钟	20.6
Monolith SO3 disk (0.34mL – 1 disk)		
88.2CV/小时	0.5mL/分钟	17.5
176.5CV/小时	1mL/分钟	17.8
Monolith SO3 disk (0.68mL – 2 disk)		
88.2CV/小时	1mL/分钟	17.6

[0363] 抗-CD20抗体的纯化

[0364] 在多种pH和盐浓度下按70–90mg/mL树脂加样产物进行抗-CD20抗体的纯化, 用高通量96孔板和分批结合模式评价了多种类型的阳离子交换树脂 (Poros HS50、SE HiCap、SPSFF、SPXL和Capto S) 去除HMW的能力。通过结合在树脂上的%HMW来评价HMW去除。如图13中所示, Poros HS50在去除HMW中最有效, 随后是SE HiCap。此外, SPSFF在去除HMW中比SPXL好。见图13。此外, SPXL在去除HMW中与Capto S相似。见图13。

[0365] 在多种pH和盐浓度下按70–90mg/mL树脂加样产物, 用高通量96孔板评价了多种类型的树脂 (Poros HS50、SE HiCap、SPSFF、SPXL和Capto S) 去除CHOP的能力。通过结合在树脂上的%CHOP来评价CHOP去除。如图14中所示, Poros HS50在去除CHOP中最有效, 随后是SEHiCap。此外, SPSFF在去除CHOP中比SPXL好。见图14。此外, SPXL在去除CHOP中比Capto S

好。见图14。

[0366] 在5mS/cm和不同pH(Poros HS50在pH 5.5和pH 6,Capto S在pH 5和pH 5.5)加样不同量的产物,用柱层析进一步检查了Poros HS50和Capto S树脂去除HMW的能力。如图15中所示,Poros HS50在结合HMW中比Capto S好。从Poros HS50树脂上的运行收集的产物混合物中的累积HMW%低于从Capto S树脂上的运行收集的产物混合物中的累积HMW%。见图16。

[0367] 还在5mS/cm和不同pH(Poros HS50在pH 5.5和pH 6,Capto S在pH 5和pH 5.5)加样不同量的产物,用柱层析检查了Poros HS50和CaptoS树脂去除CHOP的能力。如图17中所示,Poros HS50在结合CHOP中比Capto S好。从Poros HS50树脂上的运行收集的产物混合物中的累积CHOP低于从Capto S树脂上的运行收集的产物混合物中的累积CHOP。见图18。

[0368] 实施例2-使用多种纯化条件的过载阳离子交换层析

[0369] 此实施例描述用于纯化抗体的过载阳离子交换层析法。

[0370] 材料和方法

[0371] 纯化方法

[0372] 按实施例1中所述制备经过滤和平衡的蛋白混合物,并用作阳离子交换层析的产物。

[0373] 分别用Poros HS50或SPSFF或Capto S树脂装填柱。柱尺寸为0.66cm内径乘以5至15cm柱床高度。所使用的流速为每小时50–200cm(每小时9–36个柱体积(CV))。在280nm监测层析,并在室温下进行。

[0374] 为了避免抗体从层析树脂排除,例如,优化的加样电导率在pH 5–6下为4–6mS/cm,在该电导率下可以获得最大动态结合容量。在第一组研究中,将5–6mS/cm的电导率和5.0–5.5的pH用于阳离子交换柱上的加样条件。

[0375] 每次运行过程中按至多1000g/L柱体积加样通过280nm测定的产物。加样步骤后立即应用使用基质平衡缓冲液的洗涤步骤,直至UV迹线回到基线。在每次层析运行过程中用具有更高盐浓度溶液的洗涤步骤来从基质剥离结合的种类。结合的种类包含不想要的HMW种类、DNA、CHOP和其他杂质。每次运行后用0.5N NaOH溶液清洗柱,并保存在0.1N NaOH溶液中。

[0376] 在加样和洗涤步骤过程中,分级分离来自各运行的流穿液,并收集在适当大小的cornical管中。用UV-Vis分光光度计测量各级分中的蛋白质浓度。在选择的分中测定诸如宿主细胞蛋白质、DNA、浸出的A蛋白和庆大霉素的杂质含量来涵盖上文讨论的整个加样和洗涤步骤。

[0377] 实验方法和结果

[0378] 用SPSFF纯化抗-VEGF抗体

[0379] 于NaAC中在pH 5.5、5mS/cm在多种流速(9CV/小时、8CV/小时和36CV/小时)下运行产物加样量至多为1000mg/mL CV的SPSFF(0.66cm内径x5.5cm柱床高度)的层析谱。见图19。

[0380] 在pH 5.5和5mS/cm评价了多种流速(9CV/小时、18CV/小时和36CV/小时)对加样至多1000g/L CV的不同量的产物的SPSFF的CHOP、DNA和HMW去除的影响。如图20中所示,所测试的流速未显著影响CHOP去除。但是,如图21和22中所示,所测试的流速影响DNA和HMW去除。

[0381] 用Poros HS50纯化抗-VEGF抗体

[0382] 在pH 5.5和5mS/cm评价了多种流速(18CV/小时和36CV/小时)对加样至多1000g/L CV的不同量的产物的Poros HS50的CHOP、DNA和HMW去除的影响。如图23中所示,所测试的流速未显著影响HMW、CHOP和DNA去除。

[0383] 使用至多1000mg/mL CV的不同量的加样产物,在pH 5.5和18CV/小时在多种加样电导率(3mS/cm、5mS/cm、8mS/cm、13mS/cm和18mS/cm)评价了Poros HS50的Mab结合能力。如图24中所示,更高的加样电导率与更低的Mab结合容量相关。

[0384] 在pH 5.5在多种加样电导率(5mS/cm、8mS/cm、13mS/cm和18mS/cm)下运行Poros HS50的层析谱。P1显示350mM NaAC的洗脱峰,P2显示0.5N NaOH的清洗峰。见图25。如图25中所示,在5mS/cm和8mS/cm的加样电导率下存在典型的与Poros HS50的结合。此外,在13mS/cm存在部分结合。见图25。在18mS/cm存在典型的流穿。见图25。

[0385] 按18CV/小时加样至多1000mg/mL CV的不同量的产物,在多种电导率条件(3mS/cm、5mS/cm、5mS/cm且用~2倍稀释的CHOP加样、8mS/cm、13mS/cm和18mS/cm)下在pH 5.5检查了Poros HS50在CHOP去除中的能力。如图26中所示,CHOP去除在越低的加样电导率下越有效。

[0386] 按18CV/小时加样至多1000g/L CV的不同量的产物,在多种加样电导率(3mS/cm、5mS/cm、5mS/cm和2.37mg/ml的~2倍稀释的Mab、8mS/cm、13mS/cm和18mS/cm)下在pH 5.5评价了Poros HS50在HMW去除中的能力。如图27中所示,在3mS/cm,在该方法开始时有更低量的HMW与Poros HS50结合。在13mS/cm,更高量的HMW在该方法开始时与Poros HS50结合,且所结合的HMW的量随时间降低。见图27。

[0387] 在pH 5.5在多种加样电导率和流速(3mS/cm和18CV/小时、5mS/cm和18CV/小时、5mS/cm和36CV/小时、8mS/cm和18CV/小时、13mS/cm和18CV/小时及18mS/cm和18CV/小时)下评价了加样至多1000mg/mL CV的不同量的产物的Poros HS50在DNA去除中的能力。对于3mS/cm、5mS/cm、8mS/cm、13mS/cm和18mS/cm的加样电导率条件,加样物中DNA的量分别为约1000pg/mg、1000pg/mg、7000pg/mg、16821pg/mg和18566pg/mg。如图28(A)和(B)中所示, Poros HS50能够在所测试的加样电导率下结合DNA。

[0388] 还用梯度洗脱在pH 5.5评价了按300mg/mL CV加样产物的PorosHS50结合DNA的能力。如图29中所示,DNA在pH 5.5和5mS/cm与柱结合,并在线性盐梯度洗脱过程中从柱洗脱下来。

[0389] 加样至多约990g/L CV的不同量的产物,在pH 5.5、5mS/cm和18CV/小时评价了Poros HS50(1.88mL树脂)去除庆大霉素的能力。如表4中所示, Poros HS50能够在过载方法中去除庆大霉素。

[0390] 表4

[0391]

样品ID	收集的产物(g/L)	庆大霉素(pg/mL)	庆大霉素(pg/mg)
加样物	—	32.875	7.15
F5	65	<0.37	<0.08
F15	331	<0.37	<0.08
F30	727	<0.37	<0.08

F35	860	<0.37	<0.08
洗脱物	—	321.25	20

[0392] 加样至多约990g/L CV的不同量的产物,在pH 5.5、5mS/cm和18CV/小时评价了Poros HS50 (1.88mL树脂) 去除A蛋白的能力。如表5中所示, Poros HS50能够在过载方法中去除A蛋白浸出物。A蛋白在收集727至860g/L CV之间从柱穿透。见表5。

[0393] 表5

[0394]

样品ID	收集的产物 (g/L)	A蛋白 (ng/mL)	A蛋白 (ng/mg)
Load	—	22.17	4.82
F5	65	<9.8	<2.18
F15	331	<9.8	<2.17
F22	517	<9.8	<2.18
F30	727	<9.8	<2.20
F35	860	13.53	2.99
洗脱物	—	1324.35	82.41

[0395] 加样至多1000mg/mL CV的不同量的产物,在pH 5.5、5mS/cm和18CV/小时评价了Poros HS50在不同柱床高度 (4.6cm柱床高度和14.2cm柱床高度) 下去除HMW、CHOP和DNA的能力。如图30中所示,所测试的柱床高度 (4.6cm和14.2cm) 对HMW、CHOP或DNA去除无显著影响。此外,4.6cm和14.2cm的柱床高度保持相同的滞留期 (3分钟)。

[0396] 加样至多1000g/L CV的不同量的产物,在pH 5.5、5mS/cm和18CV/小时评价了来自Poros HS50柱的洗脱级分中带电荷变体的分布。进行带电荷变体分析之前,用CPB (羧肽酶B) 处理碱性变体。如表6中所示,带电荷变体 (酸性和碱性变体) 和主要变体在最终混合物中的分布不是基本不变的。低加样量下的流穿液中存在更高百分比的酸性变体。见表6。PorosHS50能够结合一些碱性变体。见表6。

[0397] 表6

[0398]

	酸性 (%)	主要 (%)	碱性 (%)
加样物	28.54	60.91	10.54
级分中每个CV收集的Mab (g/L cv)			
65	32.87	62.76	4.37
331	29.78	59.21	11.01
727	29.53	58.05	12.42
833	29.62	57.6	12.78
洗脱混合物 (60.8mg/mL CV)	8.36	32.42	59.22

[0399] 实施例3-用混合型层析纯化多肽

[0400] 此实施例描述用于纯化抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的混合型层析方法。

[0401] 材料和方法

[0402] 纯化方法

[0403] 按实施例1中所述制备经过滤和平衡的蛋白混合物用于随后的混合型层析。用1.5M Tris碱或2N冰醋酸调节混合物至5至8.5的pH。加入3MNaCl调节氯浓度至0mM至250mM。按下文实验方法和结果部分中所示进行具体的混合型层析条件。

[0404] 实验方法和结果

[0405] 在高通量筛选实验中在多种pH和盐浓度下用多种抗体(抗-VEGF抗体(70mg/ml树脂)、抗-CD11a抗体(90mg/ml树脂)和抗-CD20抗体(90mg/ml树脂))评价了混合型树脂(例如Capto Adhere)的性能。经过滤和平衡的A蛋白纯化混合物中CHOP的量(ppm)和%HMW为497和7.6(对于抗-VEGF抗体)、820和6.4(对于抗-CD11a抗体)及4720和3.5(对于抗-CD20抗体)。图31、32和33分别显示多种pH和盐浓度下的Mab回收、HMW与树脂的结合和CHOP与树脂的结合的结果。如图31中所示,对于抗-VEGF抗体和抗-CD20抗体,提高的pH和电导率增加了Mab与Capto Adhere树脂的结合。pH对Capto Adhere结合抗-CD11a抗体的能力具有显著影响。见图31。对于抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体,提高的pH增加了与Capto Adhere树脂结合的HMW种类的百分比。见图32。pH对Capto Adhere结合HMW的能力具有比电导率更显著的影响。见图32。Capto Adhere树脂能够在更宽的pH和电导率范围下结合CHOP。如图33中所示,对于抗-VEGF抗体、抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的大多数等值线图,超过80%的CHOP与树脂结合。

[0406] 表7中总结了Capto Adhere在用于纯化抗-VEGF抗体的高通量筛选实验和柱层析中的性能。通常,在高通量实验中进行的观测与获自柱层析实验的结果相关。

[0407] 表7

[0408]

pH	Condo	FT 中的%		FT 中		结 合		FT 中的 CHOP		结 合 的 %	
		Mab		的%HMW		的%HMW		(ppm)		CHOP	
		孔板	柱	孔板	柱	孔板	柱	孔板	柱	孔板	柱
5.0	5.0	93	100	5.9	5.1	-13.8	7.8	23.0	36.0	93.4	93.0
7.0	5.0	67	76	4.4	4.6	35.4	37.4	10.4	12.8	97.4	96.9
8.0	5.0	27	28	1.2	1.7	83.3	77.9	17.3	31.3	95.3	92.7
8.0	19.4	23	21	1.9	6.9	71.0	40.1	71.1	154.9	79.6	70.9
8.5	5.0	13	22	0.9	2.3	86.0	73.9	23.7	85.0	93.4	83.9

[0409] 还在pH 5.5和5mS/cm,在用于纯化抗-CD11a的柱层析中检查了Capto Adhere去除CHOP和HMW的能力。在按约700mg/mL树脂加样产物时,Capto Adhere树脂能够将CHOP水平降低至低于20ppm;但是,Capto Adhere未能降低%HMW。结果未显示。

[0410] 实施例4-用过载阳离子交换层析和标准阴离子交换层析的组合纯化抗-CD11a抗体

[0411] 此实施例描述用过载阳离子交换层析和标准阴离子交换层析的组合纯化重组人源化CD11a抗体的方法。

[0412] 材料和方法

[0413] 通过连续离心处理含有在中国仓鼠卵巢细胞中产生的单克隆抗体的细胞培养液来去除细胞碎片,并通过用深度滤器和0.2um滤器过滤来进一步澄清。通过以下任一种来纯化抗-CD11a抗体:a)研发运行过载阳离子交换:(i)A蛋白纯化(Prosep vA)、(ii)阳离子交换纯化(CEX)(Poros HS50,以过载模式)和(ii)阴离子交换(AEX)(QSFF);或(b)商业方法:(i)A蛋白纯化(Prosep vA)、(ii)CEX(SPSFF)和(ii)AEX(QSFF)。表8中列出了运行条件。

[0414] 表8

[0415]

商业方法				研发运行过载 CEX		
纯化步骤	操作模式	操作条件	加样密度 (g/L CV)	操作模式	操作条件	加样密度 (g/L CV)
A 蛋白	B/E	STD	8-20	B/E	STD	8-20
CEX	B/E	pH 5.5, 加样 -4.7mS/cm, 洗脱 -13.25mS/cm	15-40	过载	pH 5.5, 5mS/cm	600
AEX	FT	pH 8.0, 6.9mS/cm	15-70	FT	pH 8.0, 5mS/cm	70

[0416] 实验方法和结果

[0417] 就CHOP去除和Mab回收评价了组合过载CEX和AEX的方法的性能。结果总结在表9中。

[0418] 表9

[0419]

商业方法			研发运行过载 CEX		
纯化步骤	CHOP(ng/mg)	单体 (%)	CHOP (ng/mg)	单体 (%)	产率 (%)
A 蛋白	677-939	94.7-95.9	995	93.4	
CEX	116-183	99.3-99.8	158	99.7	90
AEX	<22.2	99.7-99.8	2	99.7	95
Bulk	<1.48	99.6-99.7			

[0420] 在两种条件下评价了Poros HS50和QSFF去除HMW、CHOP、庆大霉素、DNA和浸出的A蛋白的能力：(a) Poros HS50在pH 5.5、3.5mS/cm, QSFF在pH 8.0、3.5mS/cm；和(b) Poros HS50在pH 5.5、5.0mS/cm, QSFF在pH 8.0、5.0mS/cm。条件(a)和(b)的结果分别总结在表10和表11中。去除庆大霉素、DNA和浸出的A蛋白至低于检测极限。在条件(a)下具有比条件(b)下好的CHOP去除。在条件(b)下具有比条件(a)下好的HMW去除。各层析步骤的产物产率为至少90%。

[0421] 表10

[0422]

步骤	HMV (%)		CHOP (ppm)		庆大霉素 (Genamicin, ng/mg)		DNA(ng/mg)		浸出的 A 蛋白 (ng/mg)	
	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物	混合物
POROS HS50	6.4	1.42	1168	55	9.1	<0.1	0.3	0.3	25	<2
QSFF	1.42	1.41	55	2	<0.1	<0.1	0.5	0	<2	<2

[0423] 表11

[0424]

步骤	HMV (%)		CHOP (ppm)		庆大霉素 (ng/mg)		DNA (ng/mg)		浸出的 A 蛋白 (ng/mg)	
	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物		加样物	混合物	加样物	混合物
POROS HS50	6.59	0.28	664	133	5	<0.1	0.3	<LTR	21	<2
QSFF	0.28	0.3	133	2	<0.1	<0.1	<LTR	<LTR	<2	<2

[0425] 实施例5-使用过载阳离子交换层析和混合型层析的组分的纯化

[0426] 此实施例描述用过载阳离子交换层析和混合型层析的组合纯化抗-CD11a抗体和抗-CD20抗体的方法。

[0427] 材料和方法

[0428] 按实施例1中所述制备经过滤和平衡的蛋白混合物用于随后的阳离子交换层析和/或混合型层析。按下文实验方法和结果部分中所示进行具体的阳离子交换层析和/或混合型层析条件。

[0429] 实验方法和结果

[0430] 抗-CD11a纯化

[0431] 实验1-在pH 5.5、5mS/cm和100cm/小时用过载Poros HS50柱和Capto Adhere柱纯化上述经过滤和平衡的产物, Poros HS50加样约~600g/L CV的产物, Capto Adhere加样约~100g/L CV的产物。以两种不同顺序进行实验:a) 顺序A: (i) Poros HS50柱(0.66cm x 5cm)和(ii) Capto Adhere(1.5cm x 20cm);或b) 顺序B: (i) Capto Adhere(0.66cm x 20cm)和(ii) Poros HS50柱(0.66cm x 5cm)。对于顺序A, Poros HS50柱和Capto Adhere柱的加样密度分别为600mg/mL树脂和106mg/mL树脂。对于顺序B, Capto Adhere柱和Poros HS50柱的加样密度分别为100mg/mL树脂和569mg/mL树脂。

[0432] 对于顺序A, 关于杂质去除的结果总结在表12中, 对于顺序B, 关于杂质去除的结果总结在表13中。两种方法的产物回收产率和关于杂质去除的结果都符合商业方法的纯度和产率。

[0433] 表12: 顺序A

[0434]

步骤描述	步骤回收	CHOP 浓度 (ppm)		%HMW	
		加样物	混合物	加样物	混合物
Poros HS	96	659	110	6.4	0.5
Capto Adhere	100	110	3	0.5	0.4

[0435]

步骤描述	DNA (pg/mg)		浸出的 A 蛋白 (ppm)		庆大霉素 (ppm)	
	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物	混合物
Poros HS	137.6	<2	27	<2	46.8	<1
Capto Adhere	<2	<2	<2	<2	<1	<1

[0436] 表13: 顺序B

[0437]

步骤描述	步骤回收	CHOP 浓度 (ppm)		%HMW	
		加样物	混合物	加样物	混合物
Capto Adhere	102	659	16	6.4	6.2
Poros HS	90	16	2	6.2	0.3

[0438]

步骤描述	DNA (pg/mg)		浸出的 A 蛋白 (ppm)		庆大霉素 (ppm)	
	加样物	混合物	加样物	混合物	加样物	混合物
Capto Adhere	137.6	1.1	27	<2	46.8	<1
Poros HS	1.1	<2	<2	<2	<1	<1

[0439] 实验2-在下表中所列的条件下在pH5.5、5mS/cm和100cm/小时用Capto Adhere (0.66cm x 5.2cm) 然后用Poros HS50柱 (0.66cm x 4.8cm) 连续纯化上述经过滤和平衡的产物, Poros HS50加样约566g/L CV的产物, Capto Adhere加样约614g/L CV的产物。

[0440] 表14: 用于连续处理抗-CD11a抗体的层析条件

[0441]

阶段	缓冲液/溶液	方法参数
平衡	77mM NaAc、pH 5.5、5 mS/cm	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 5 CV
加样	条件 A 蛋白混合物 (pH 5.5 和 5 mS/cm)	加样至多 614 g/L Poros HS50 树脂; OD280 ≥0.5 时开始混合 (pooling); OD280 ≤0.5 时结束混合
洗涤	77mM NaAc、pH 5.5、5 mS/cm	Poros HS50 或 Capto Adhere 柱的 ≥2 CV
剥离 1	2M NaCl	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 5 CV
剥离 2	0.15M 醋酸缓冲液、pH 2.8	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 5 CV
清洗	0.5N NaOH	Poros HS50 或 Capto Adhere 柱的 4 CV
保存	0.1 N NaOH	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 3 CV

[0442] 连续方法的层析谱结果显示在图34中。连续处理导致约90%的Mab回收产率。数据未显示。此外, 加样物中存在617ppm CHOP, 但混合物中仅有3.4ppm, 加样物中存在6.37% HMW, 但混合物中仅有0.6% (90% HMW去除), DNA、A蛋白浸出物和庆大霉素低于检测极限。

[0443] 抗-CD20纯化

[0444] 实验1-在pH 5.5、5mS/cm和100cm/小时用Poros HS50柱 (0.66cm x 5cm) 和Capto Adhere (0.66cm x 8cm) 纯化来自A蛋白层析的产物混合物, Poros HS50柱加样约600g/L CV的产物, Capto Adhere加样约316g/L CV的产物。

[0445] 结果在以下表15中提供。过载Poros HS导致%HMW降低~50%, CHOP降低98%。与SE Hicap、SPFF、SPXL和Capto S相比, Poros HS50是降低%HMW中最好的树脂 (结果未显示)。Capto Adhere未导致额外的%HMW降低, 但导致99%的CHOP降低 (观察到CHOP穿透)。

[0446] 表15

[0447]

树脂	步骤回收	%HMW		CHOP (ppm)	
		加样物	混合物	加样物	混合物
Poros 50 HS	90	3.8	1.7	3812	72
Capto Adhere	100	3.5	3.4	4722	49

[0448] 实验2-在pH 5.5、5mS/cm和100cm/小时用过载Poros HS50柱(0.66cm x 4.8cm)和Capto Adhere柱(0.66cm x 7cm)连续纯化上述经过滤和平衡的产物, Poros HS50加样约~600g/L CV的产物, Capto Adhere加样约~340g/L CV的产物。在下表中所列的条件下以两种不同顺序进行实验:a) 顺序A: (i) Poros HS50柱和(ii) Capto Adhere; 或b) 顺序B: (i) Capto Adhere和(ii) Poros HS50柱。

[0449] 表16: 用于连续处理抗-CD20抗体的层析条件

[0450]

阶段	缓冲液/溶液	方法参数
平衡	77mM NaAc, pH 5.5, 5 mS/cm	Poros HS50 or Capto Adhere 树脂的 5 CV
加样	pH 5.5 和 5 mS/cm 的条件 A 蛋白混合物	上样至多 600 g/L Poros HS50 树脂(它等同于 340 g/L Capto Adhere 树脂); OD280 ≥0.5 时开始混合; OD280 ≤0.5 时结束混合
洗涤	~80mM NaAc、pH 5.5、5 mS/cm	Poros HS50 或 Capto Adhere 柱的 ≥2 CV
剥离 1	2M NaCl	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 5 CV
剥离 2	0.15M 醋酸缓冲液、pH 2.8	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 5 CV
清洗	0.5N NaOH	Poros HS50 或 Capto Adhere 柱的 4 CV
保存	0.1 N NaOH	Poros HS50 或 Capto Adhere 树脂的 3 CV

[0451] 结果在以下表17中提供。连续处理导致约90% (Poros HS50, 然后Capto Adhere) 和约87% (Capto Adhere, 然后Poros HS50) 的Mab回收产率。过载Poros HS导致%HMW降低~59%, CHOP降至低于10ppm, DNA、A蛋白浸出物、庆大霉素低于检测极限。

[0452] 表17

[0453]

步骤顺序	步骤回收 (%)	%HMW		CHOP 浓度 (ppm)	
		加样物	混合物	加样物	混合物
Poros HS / Capto Adhere	92	3.7	1.5	5607	5
Capto Adhere / Poros HS	87	3.7	1.5	4797	6

[0454] 实施方案:

[0455] 1. 用于从包含多肽和至少一种污染物的组合物纯化多肽的方法, 其中, 所述方法包括(i) 或(ii):

[0456] (i) (a) 按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将所述组合物加样至阳离子交换材料上和(b) 将从所述阳离子交换材料回收的组合物加样至混合型材料上的顺次步骤; 或

[0457] (ii) (a) 将所述组合物加样至混合型材料上和(b) 按高于约150g/L阳离子交换材料的加样密度将从混合型材料回收的组合物加样至阳离子交换材料上的顺次步骤。

[0458] 2. 实施方案1的方法, 其中所述多肽具有约6和约10之间的pI。

[0459] 3. 实施方案2的方法, 其中所述多肽具有约7和约9之间的pI。

- [0460] 4.实施方案1-3中任一项的方法,其中所述多肽是抗体或免疫黏附素。
- [0461] 5.实施方案4的方法,其中所述多肽是免疫黏附素。
- [0462] 6.实施方案4的方法,其中所述多肽是抗体。
- [0463] 7.实施方案6的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。
- [0464] 8.实施方案7的方法,其中所述单克隆抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
- [0465] 9.实施方案7的方法,其中所述单克隆抗体是IgG单克隆抗体。
- [0466] 10.实施方案6的方法,其中所述抗体是抗原结合片段。
- [0467] 11.实施方案10的方法,其中所述抗原结合片段选自Fab片段、Fab' 片段、F(ab')₂片段、scFv、Fv和双抗体。
- [0468] 12.实施方案1-11中任一项的方法,其中所述至少一种污染物是中国仓鼠卵巢蛋白质(CHOP)、浸出的A蛋白、DNA、聚集蛋白质、细胞培养基成分、庆大霉素和病毒污染物中的任意一种或多种。
- [0469] 13.前述实施方案中任一项的方法,其中(i)和/或(ii)中的顺次步骤是连续的。
- [0470] 14.实施方案1-13中任一项的方法,其中所述方法是(i)。
- [0471] 15.实施方案1-13中任一项的方法,其中所述方法是(ii)。
- [0472] 16.实施方案1-15中任一项的方法,其中所述加样密度在约150g/L和约2000g/L阳离子交换材料之间。
- [0473] 17.实施方案16的方法,其中所述密度在约500g/L和约1000g/L阳离子交换材料之间。
- [0474] 18.实施方案1-17中任一项的方法,其中所述阳离子交换材料包含羧酸官能团或磺酸官能团。
- [0475] 19.实施方案18的方法,其中所述官能团是磺丙基、磺乙基、磺异丁基或羧基。
- [0476] 20.实施方案1-19中任一项的方法,其中所述阳离子交换材料是膜、monolith或树脂颗粒。
- [0477] 21.实施方案20的方法,其中所述阳离子交换材料是树脂。
- [0478] 22.实施方案1-17中任一项的方法,其中所述阳离子交换材料是Mustang S、Sartobind S、S03 Monolith、S Ceramic HyperD、Poros HS50、Poros HS20、磺丙基-Sepharose Fast Flow (SPSFF)、SP-Sepharose XL (SPXL)、CM Sepharose Fast Flow、Capto S、Fractogel Se HiCap、Fractogel S03或Fractogel C00。
- [0479] 23.实施方案1-22中任一项的方法,其中所述混合型材料包含能够进行阴离子交换和疏水作用的官能团。
- [0480] 24.实施方案23的方法,其中所述混合型材料是Capto-Adhere树脂、MEP HyperCel树脂、HEA HyperCel树脂、PPA HyperCel树脂或ChromaSorb膜。
- [0481] 25.实施方案1-24中任一项的方法,其中所述方法包括随同所述阳离子交换材料和/或混合型材料使用平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液,且所述平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的电导率在约2mS/cm至约25mS/cm之间。
- [0482] 26.实施方案25的方法,其中所述平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的电导率在约3mS/cm和8mS/cm之间。
- [0483] 27.实施方案1-26中任一项的方法,其中所述方法包括随同所述阳离子交换材料

和/或混合型材料使用平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液,且所述平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液的pH在约4.5和约6.5之间。

[0484] 28.实施方案25-27中任一项的方法,其中随同所述阳离子交换材料和/或混合型材料的平衡缓冲液、洗涤缓冲液和/或加样缓冲液是相同的。

[0485] 29.前述实施方案中任一项的方法,其进一步包括在步骤(a)和(b)之前或之后使包含所述多肽的组合物经受一个或多个其他纯化步骤。

[0486] 30.前述实施方案中任一项的方法,其进一步包括回收所述纯化的多肽。

[0487] 31.实施方案30的方法,其进一步包括将所述纯化的多肽与可药用载体组合。

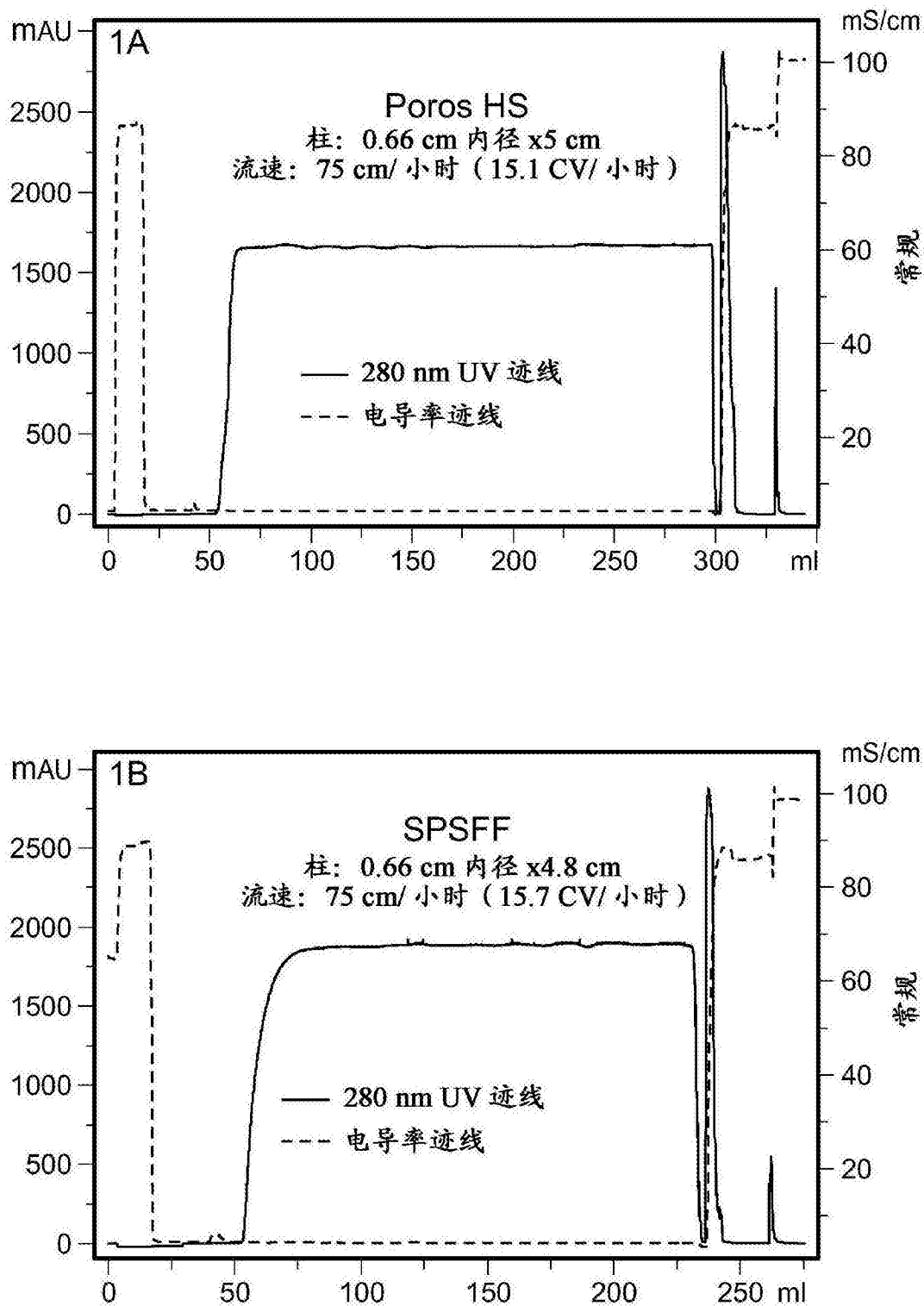


图1

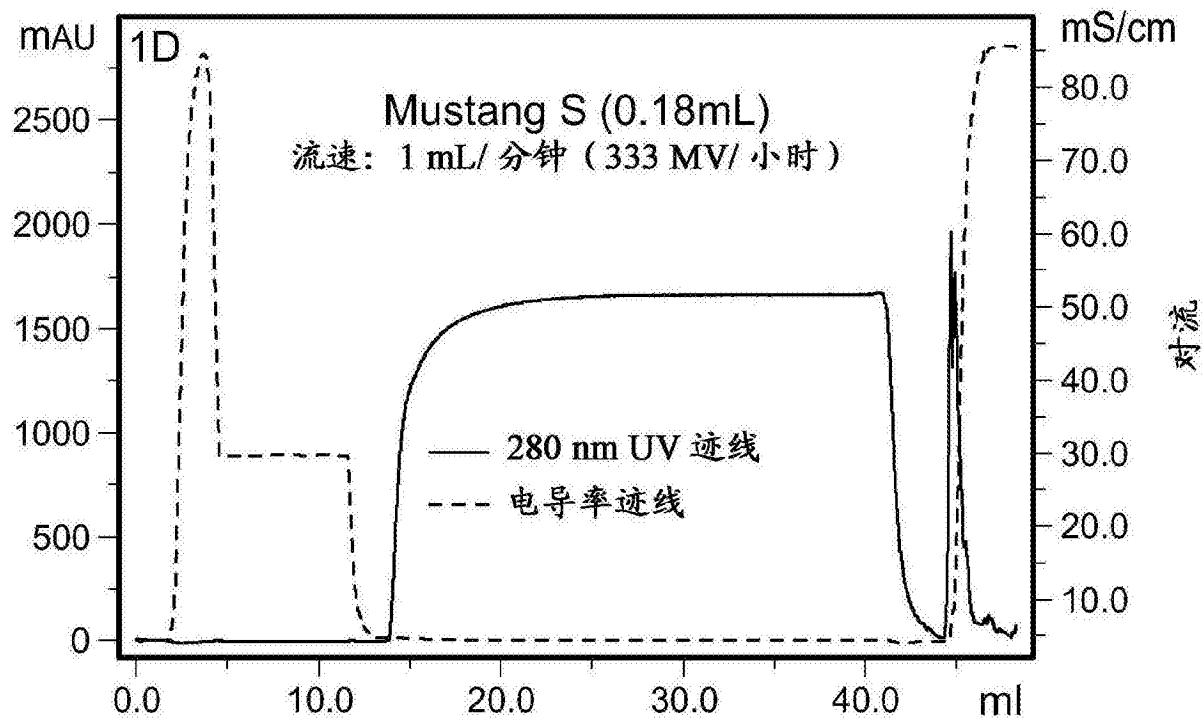
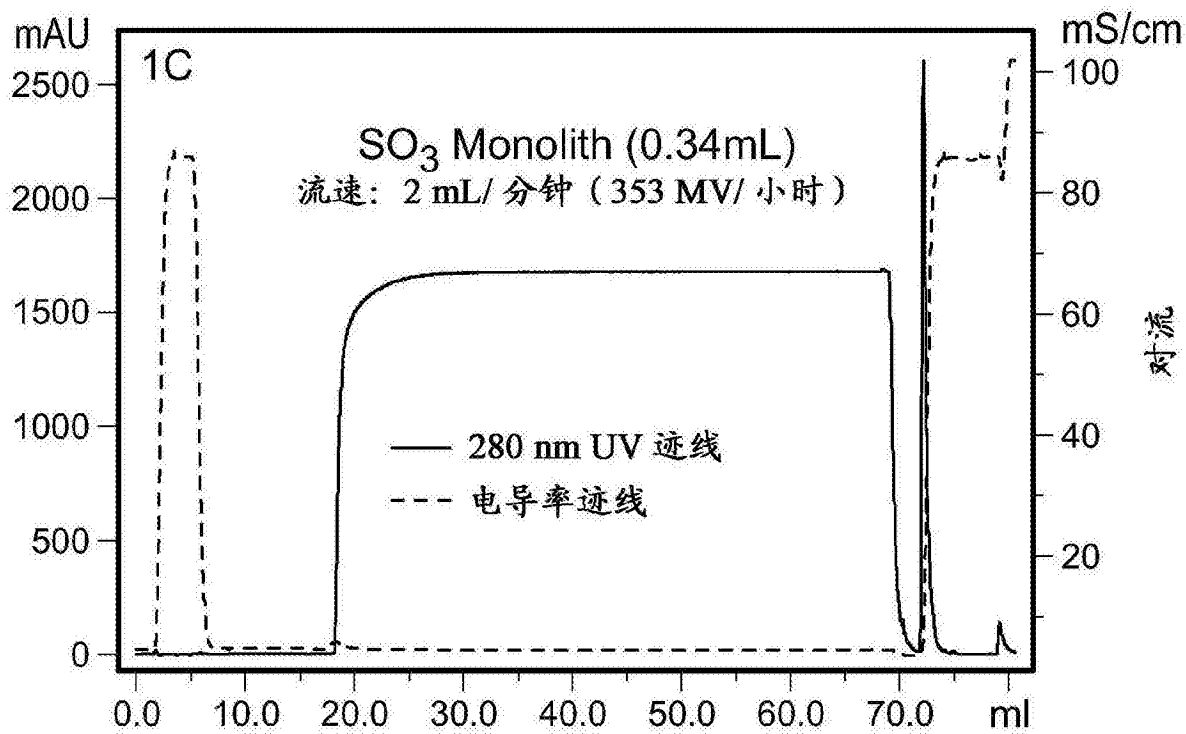


图1 (续)

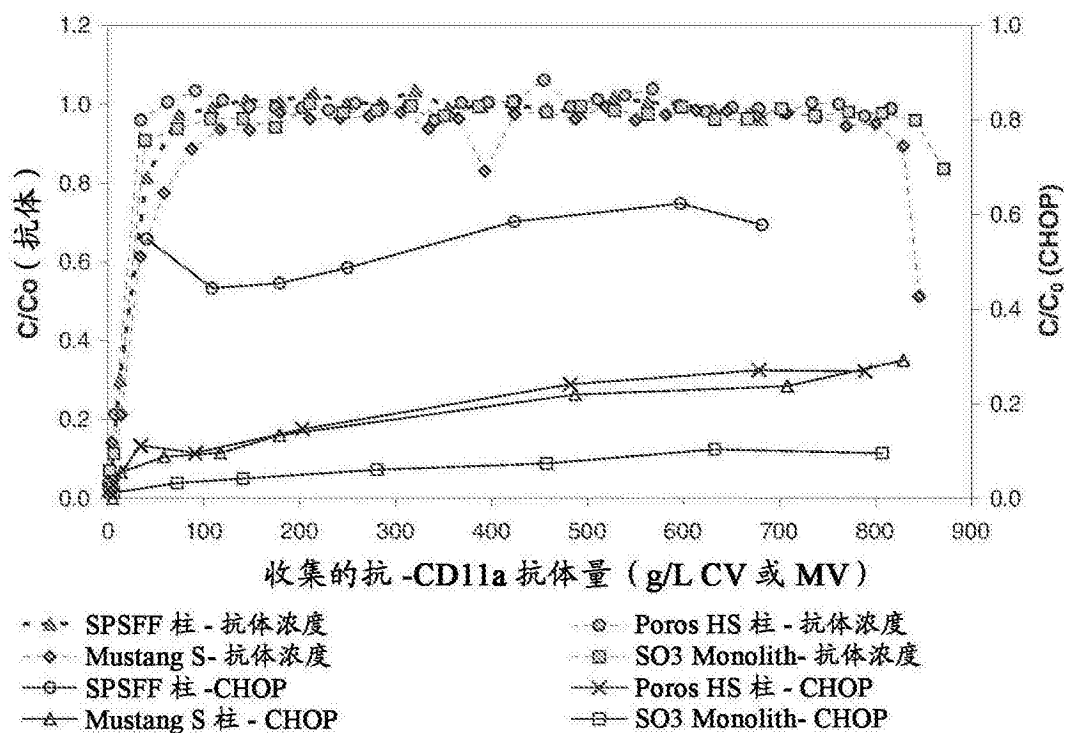


图2

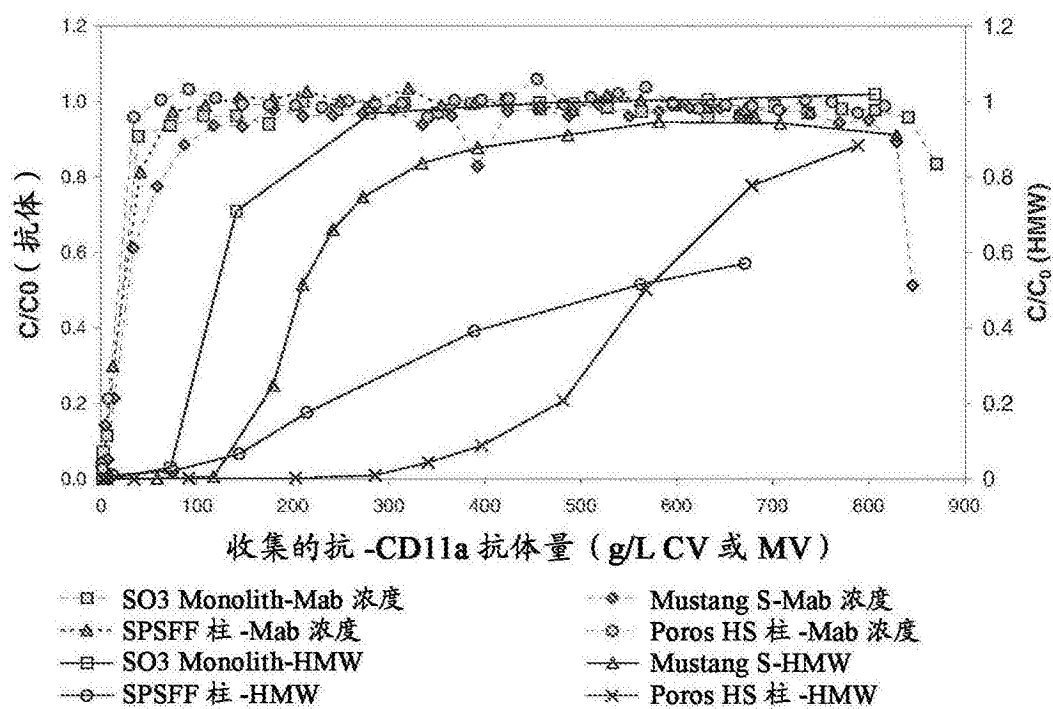


图3

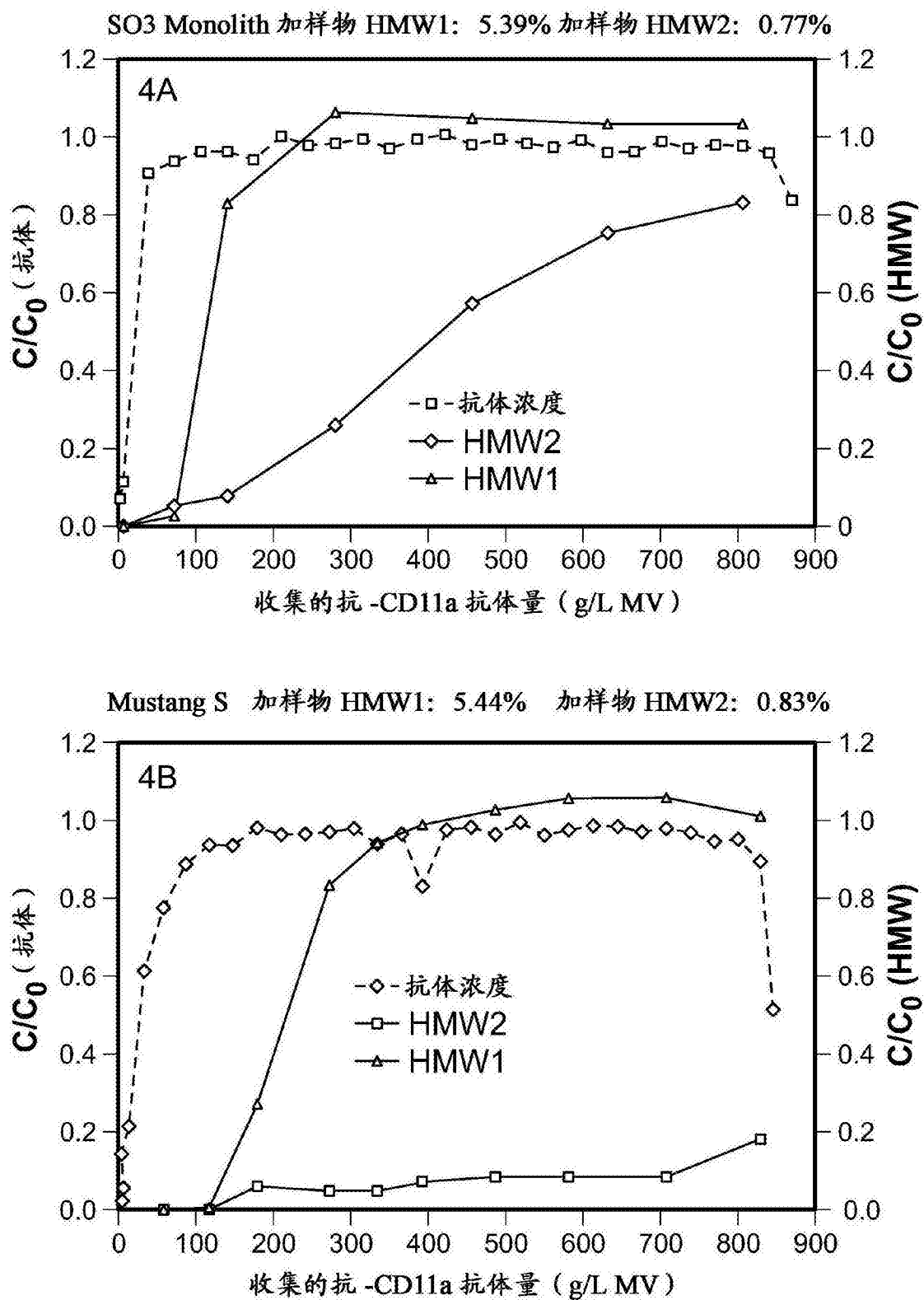


图4

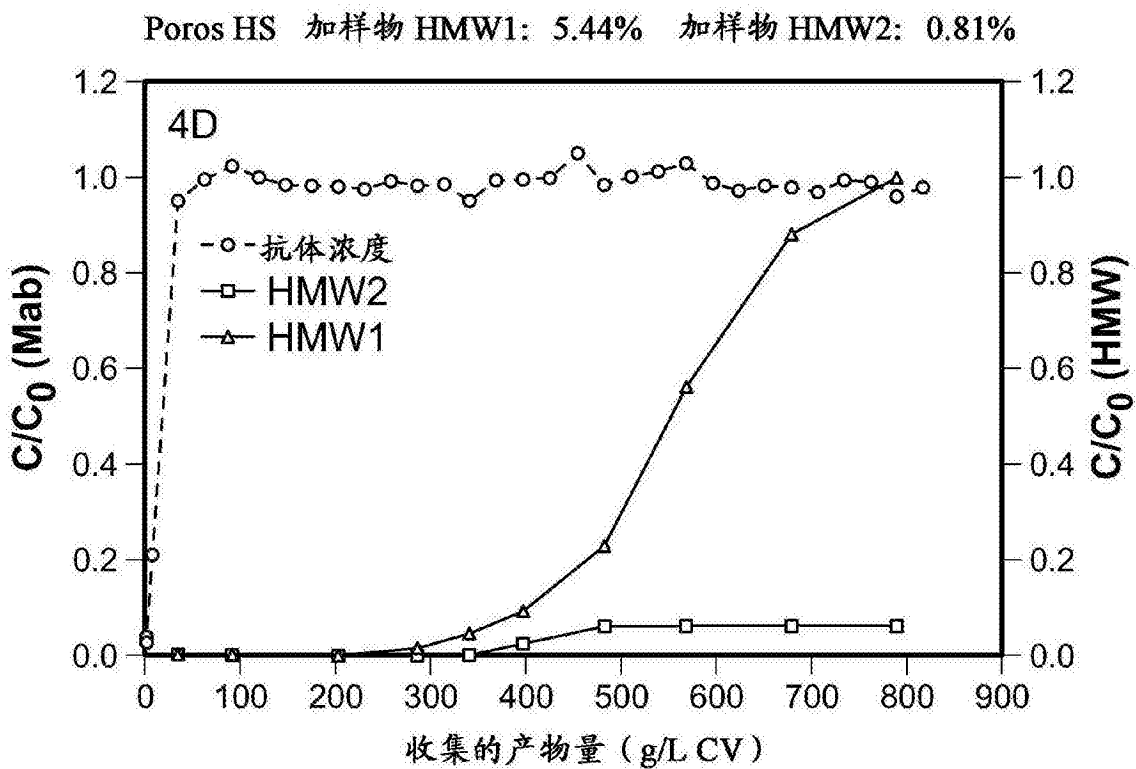
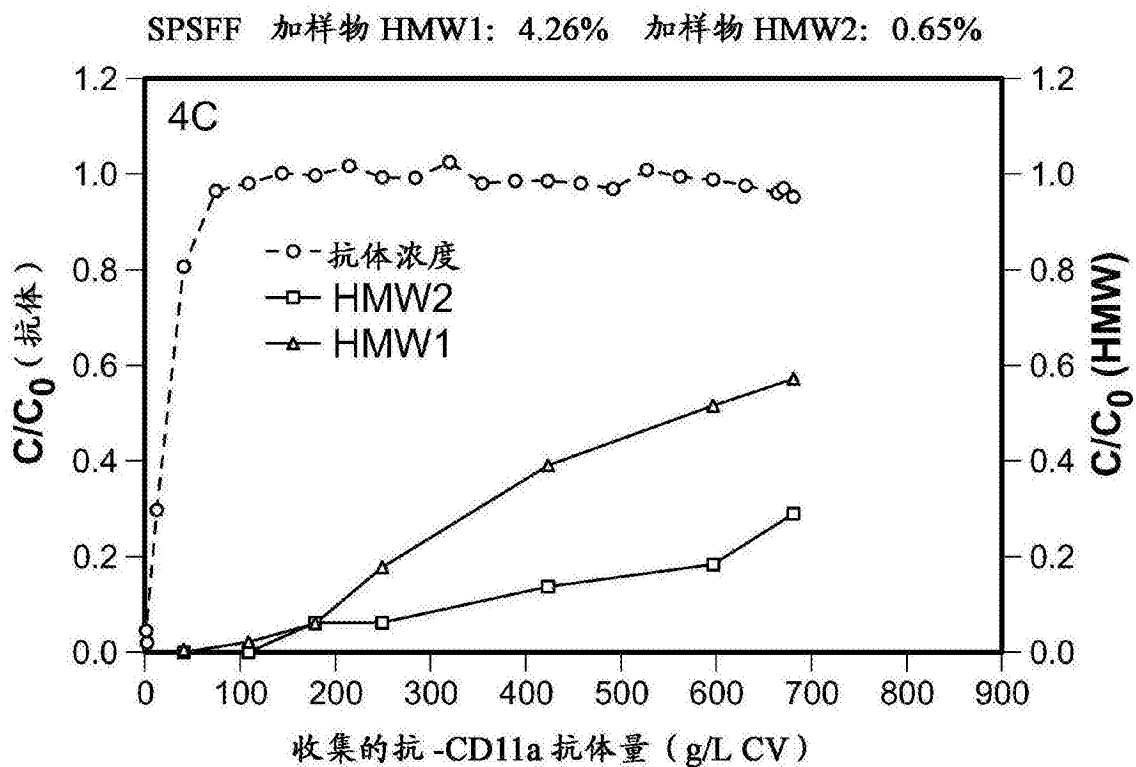


图4(续)

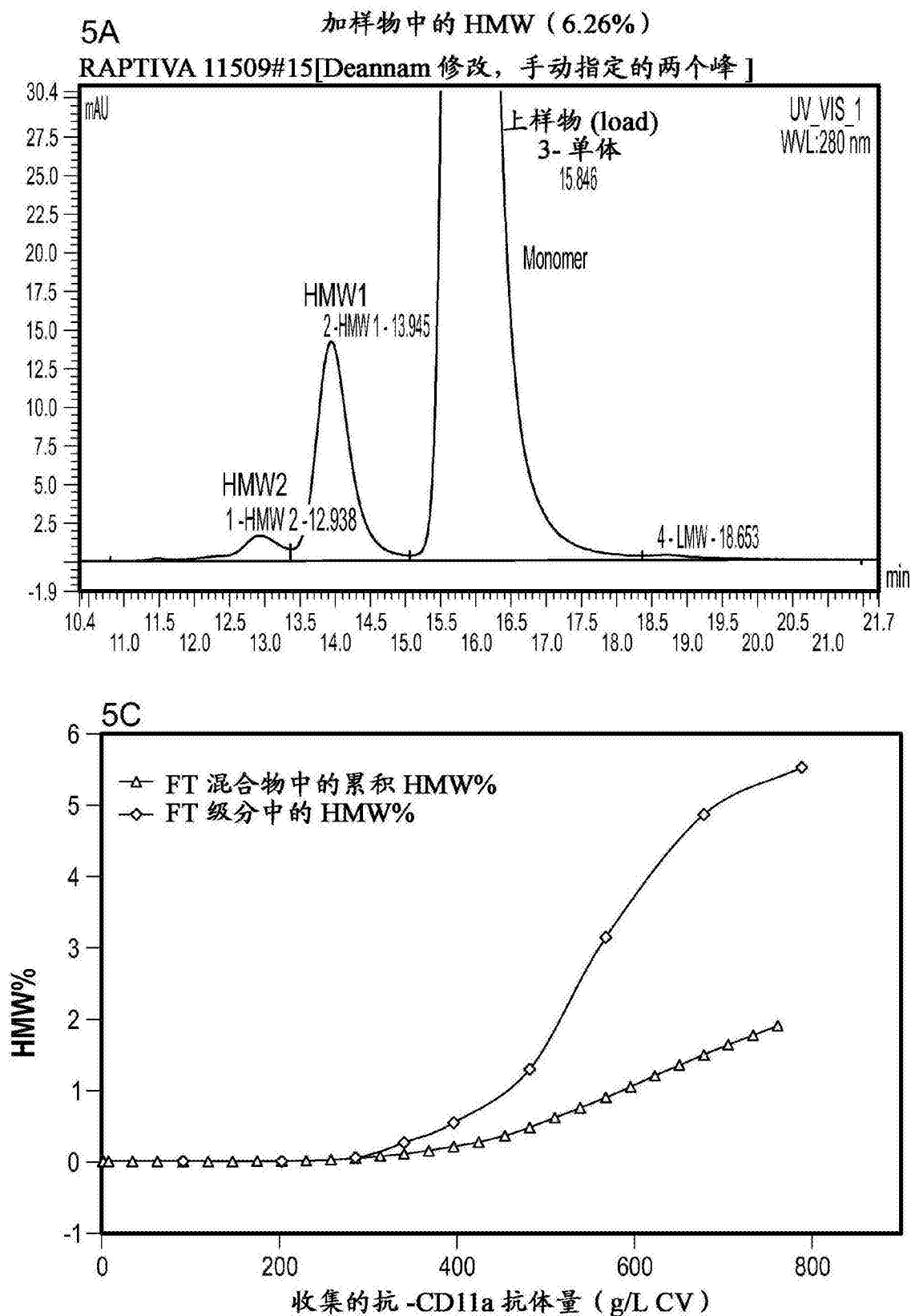


图5

洗脱混合物中的 HMW (60%)

5B

RAPTIVA 11509#23[Deannam 修改, 手动指定的两个峰] 剥离 RAPTIVA 11509#23[Deannam 修改, 手动指定的两个峰] UV_VIS_1

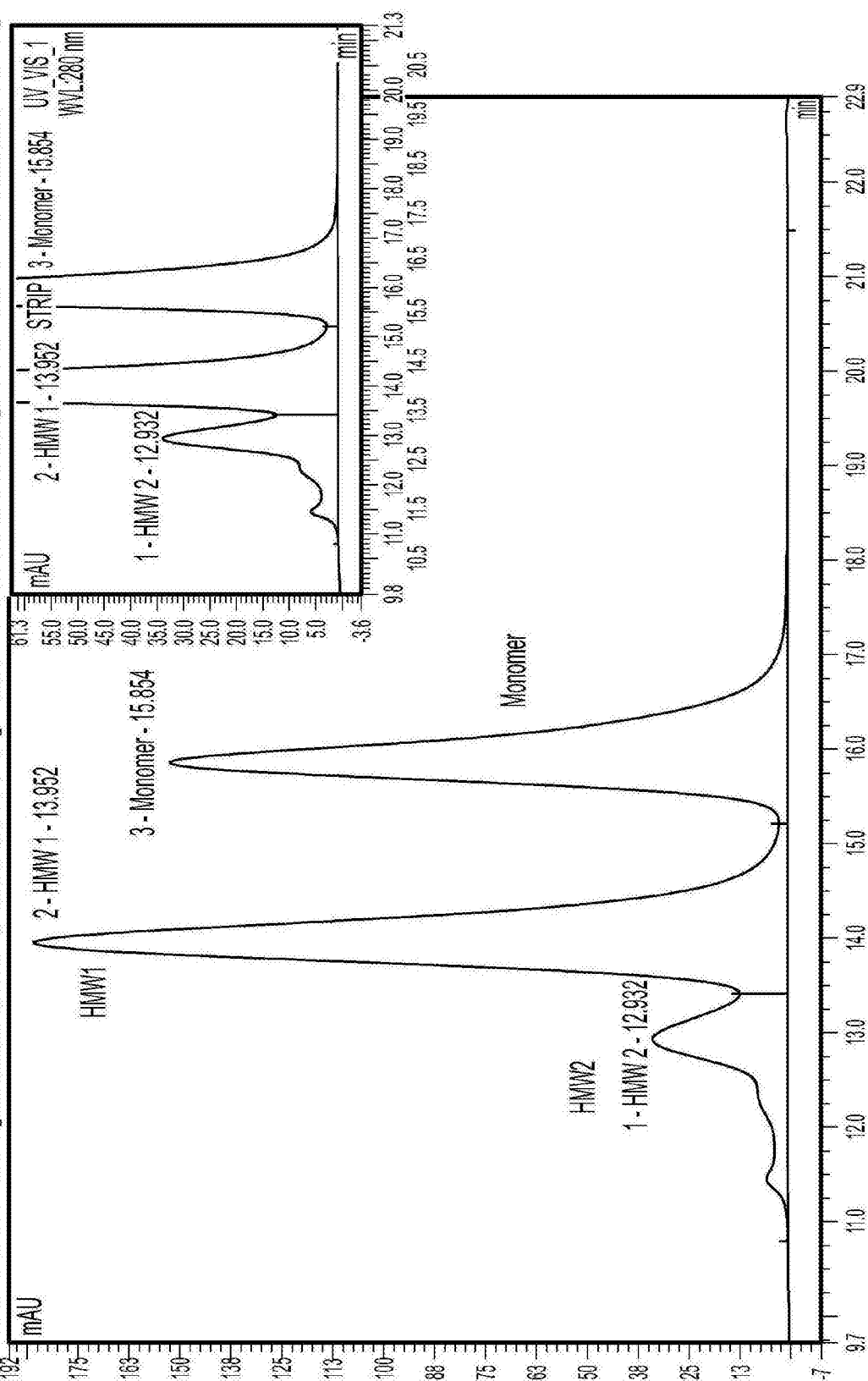


图5(续)

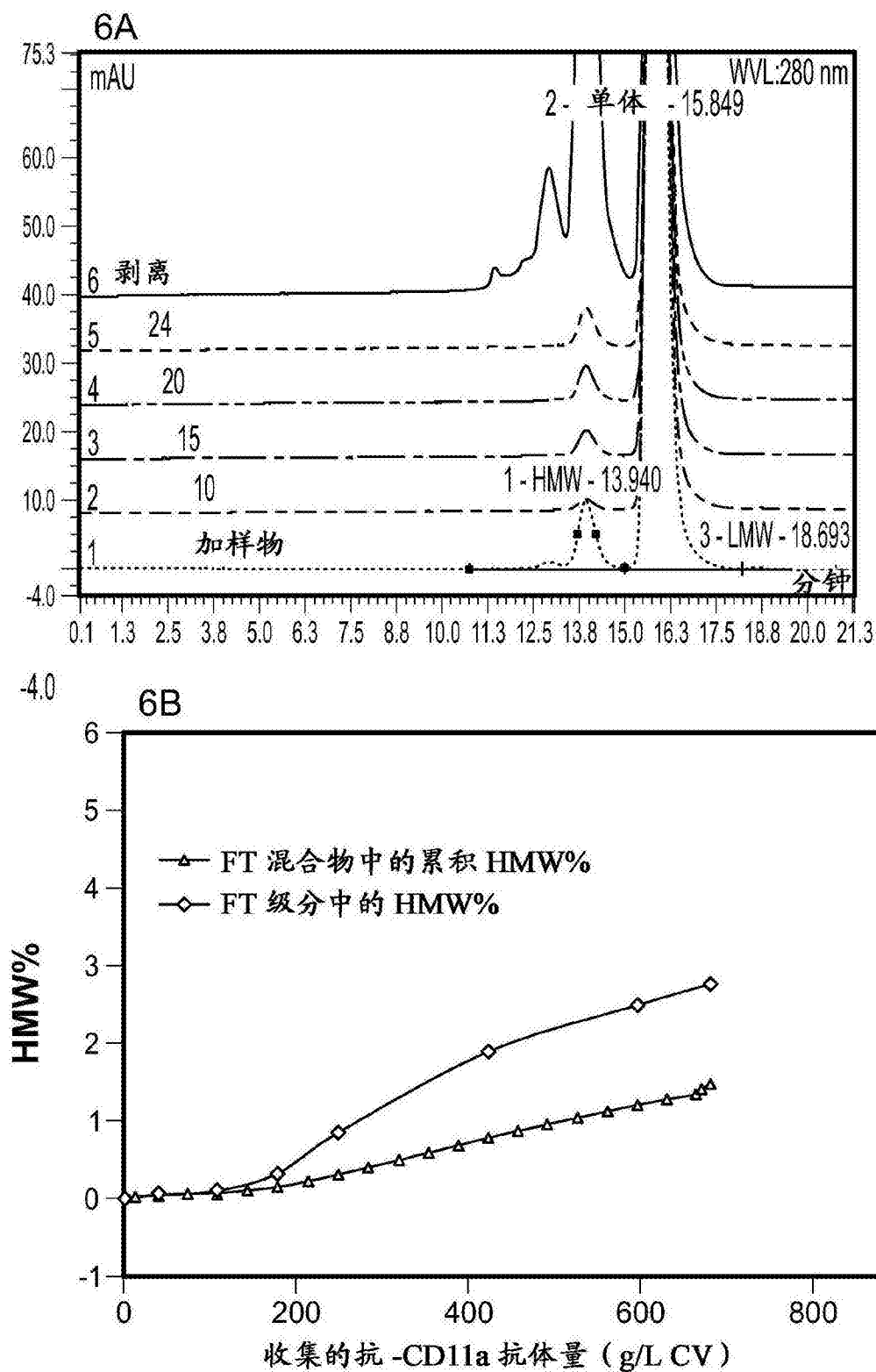


图6

6C

样品 ID	收集的抗 - CD11a (g/L CV)	HMW%
加样物	-	4.83
2	2.20	n.a.
4	40.9	0.05
6	109	0.10
8	179	0.32
10	250	0.85
15	424	1.89
20	597	2.49
24	681	2.76
剥离	-	35.3

图6 (续)

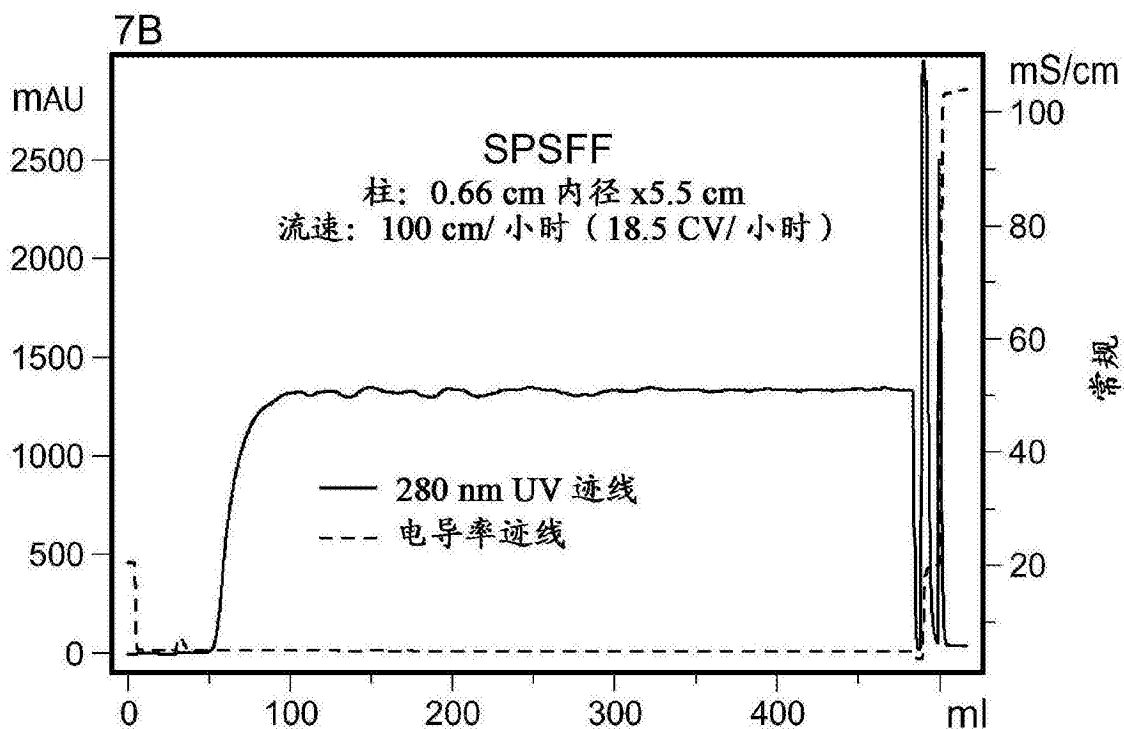
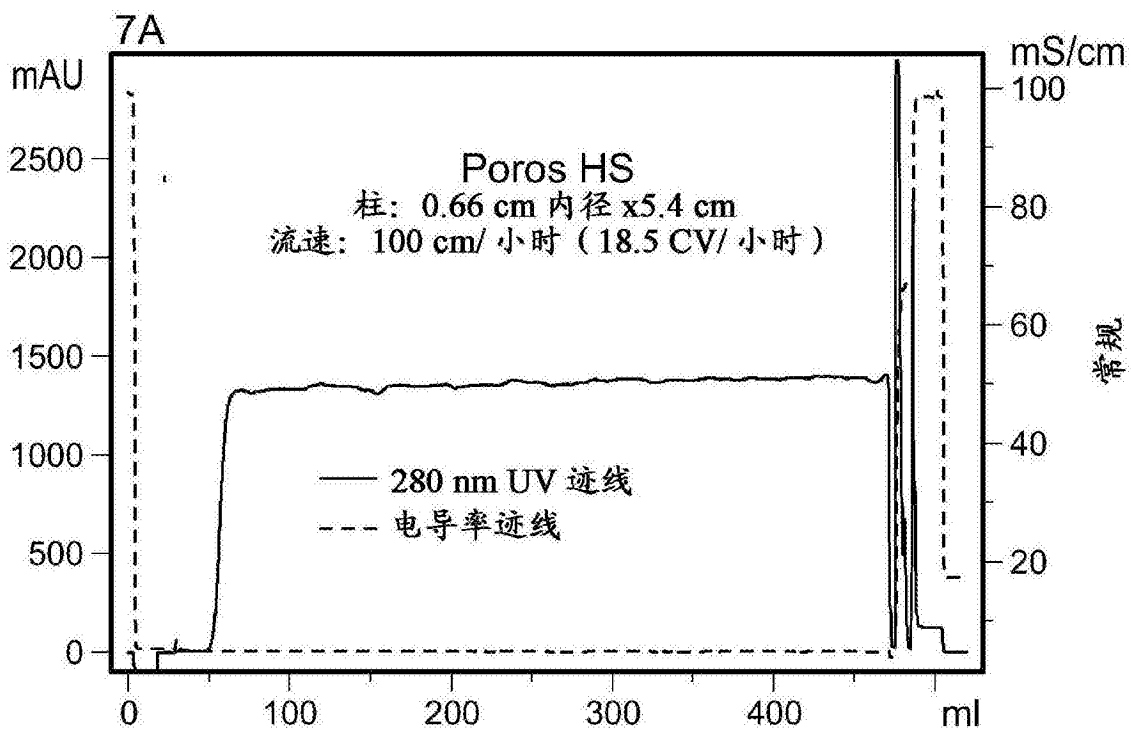


图7

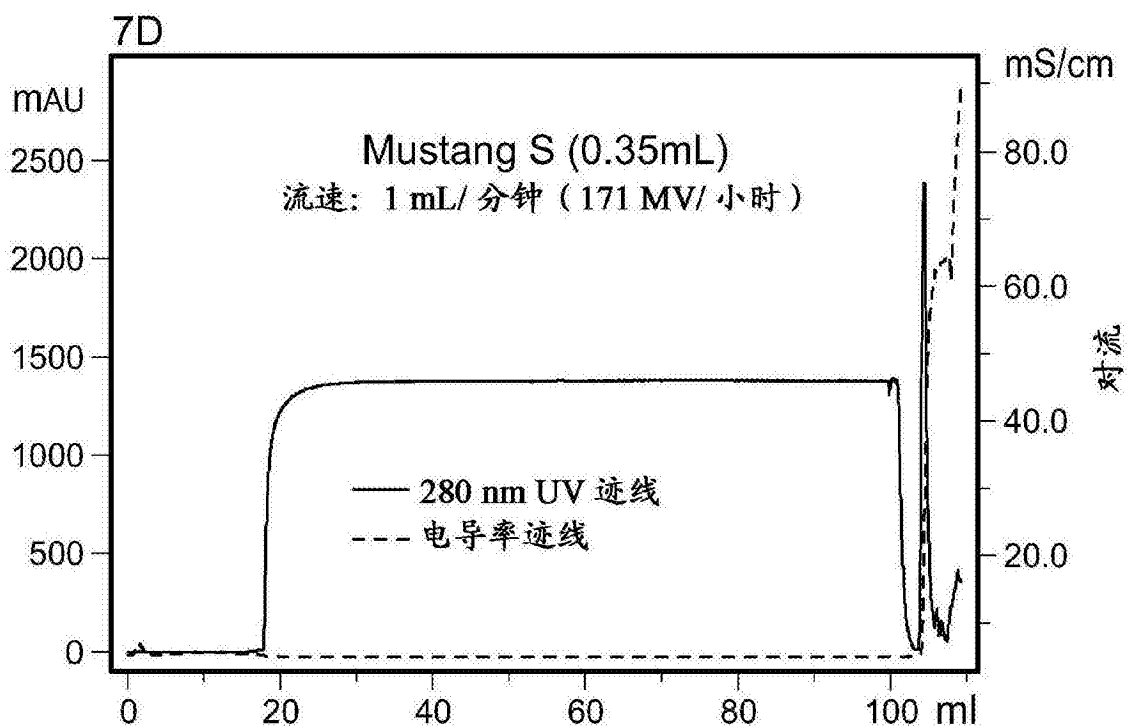
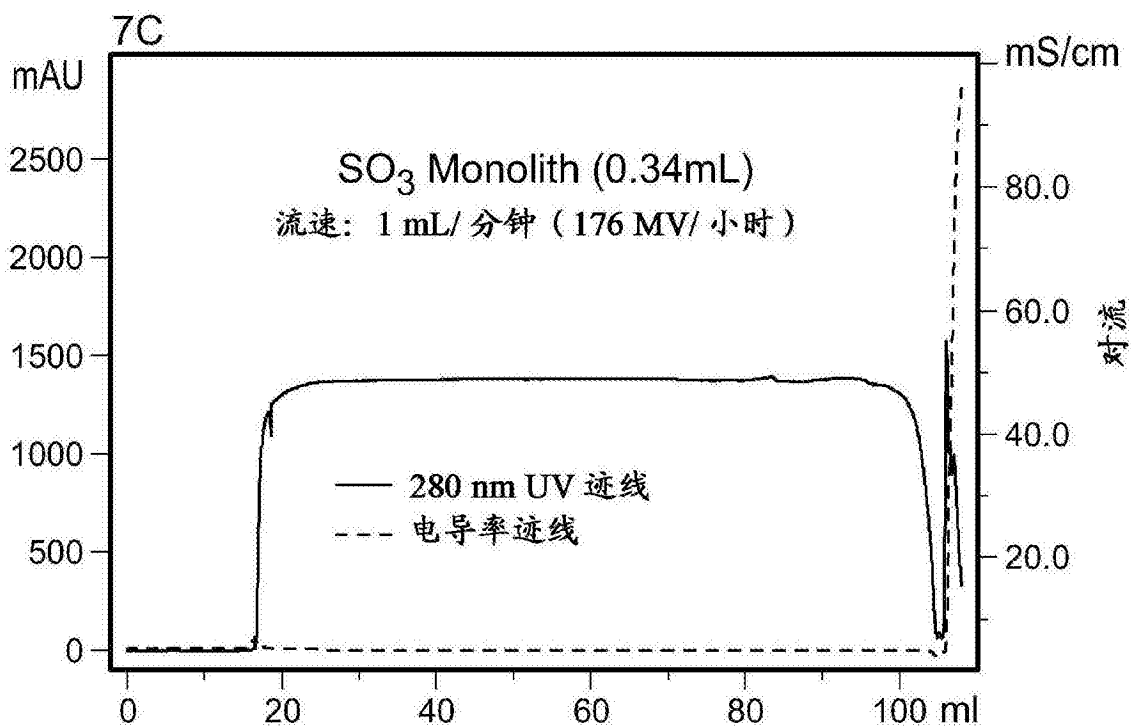


图7(续)

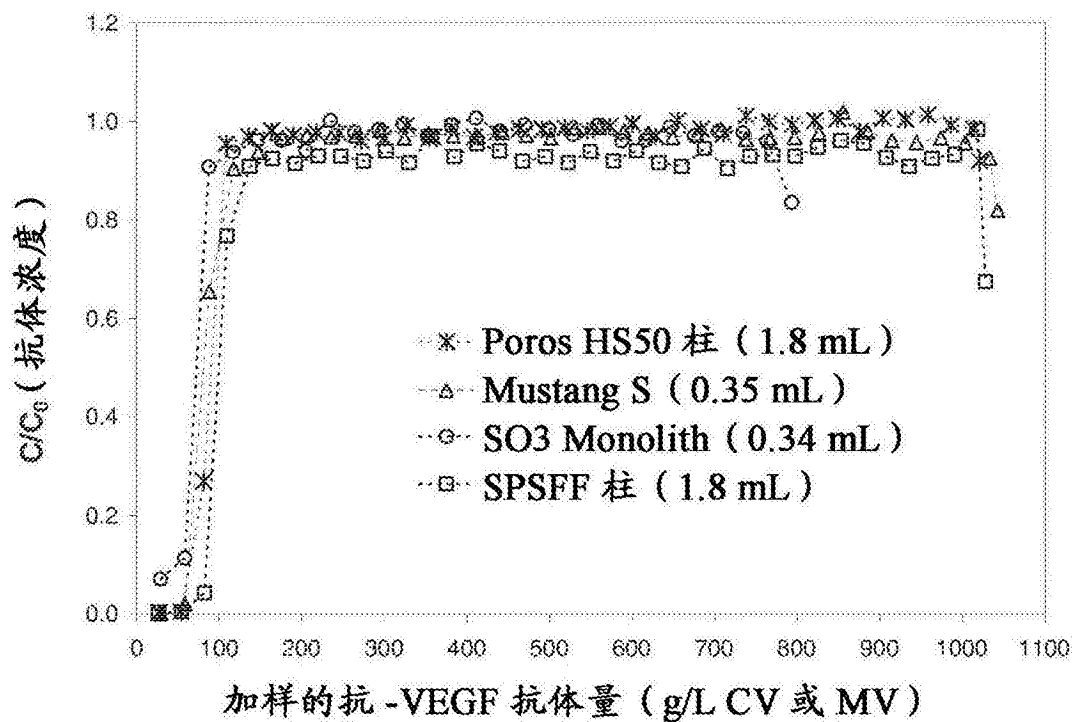


图8

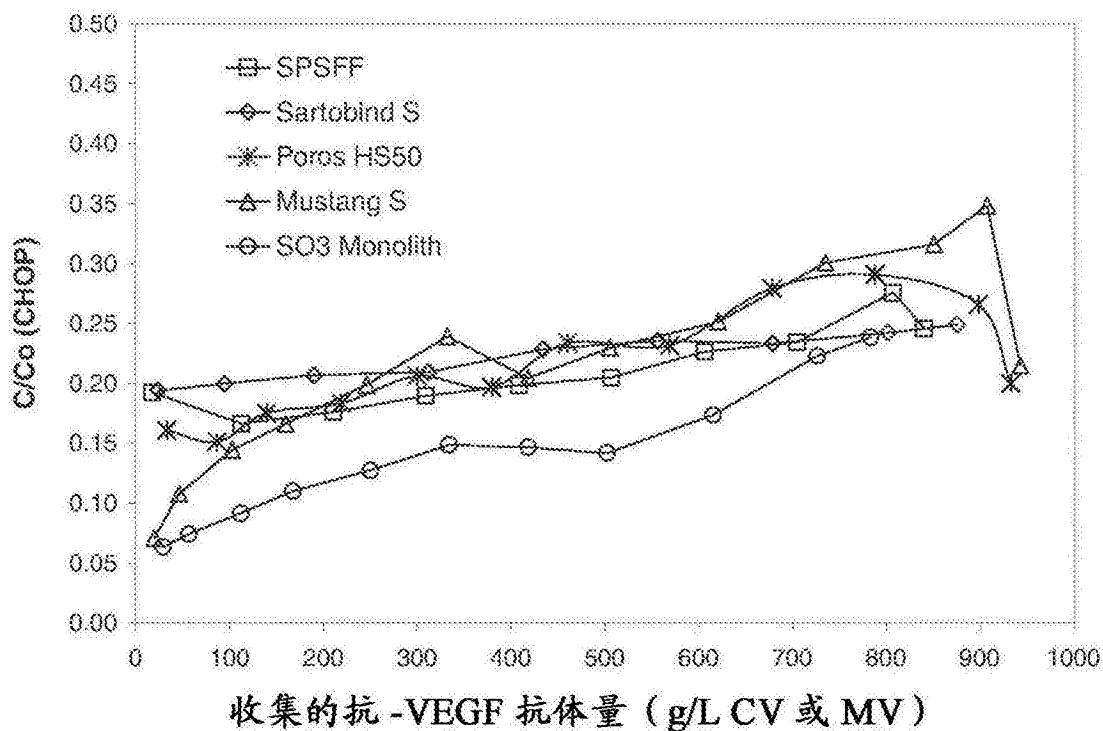


图9

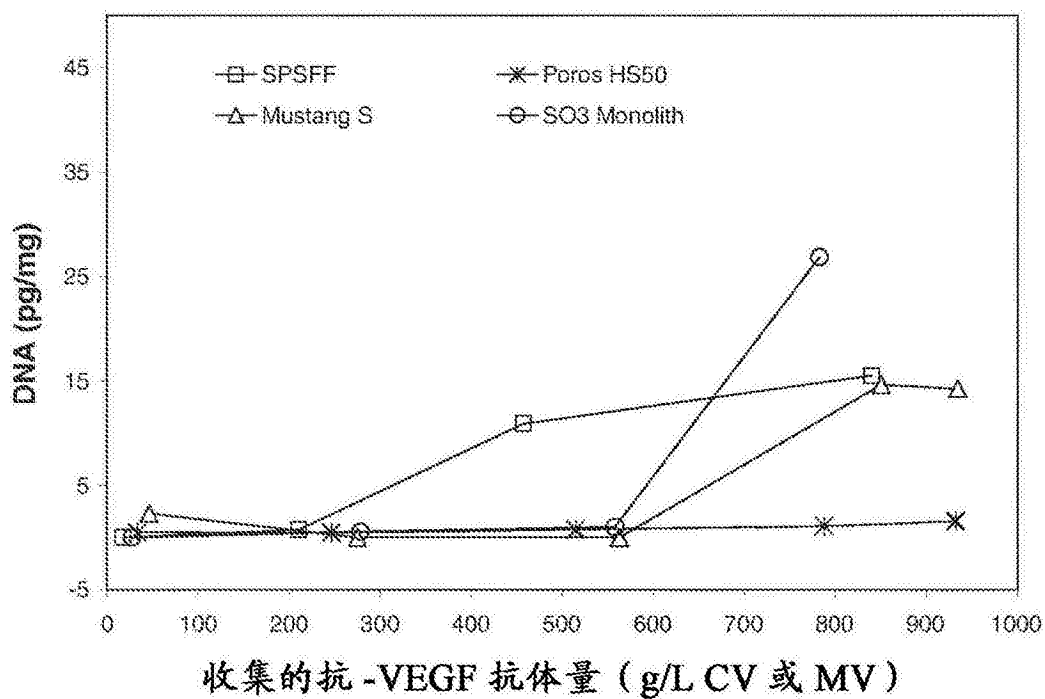


图10

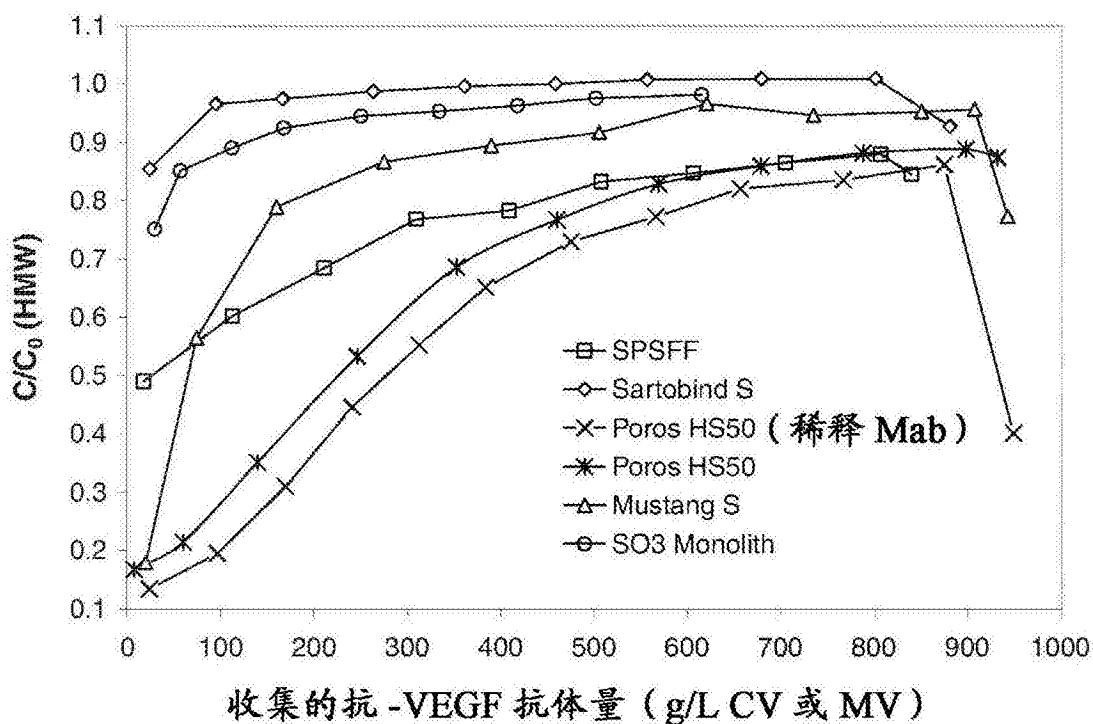


图11

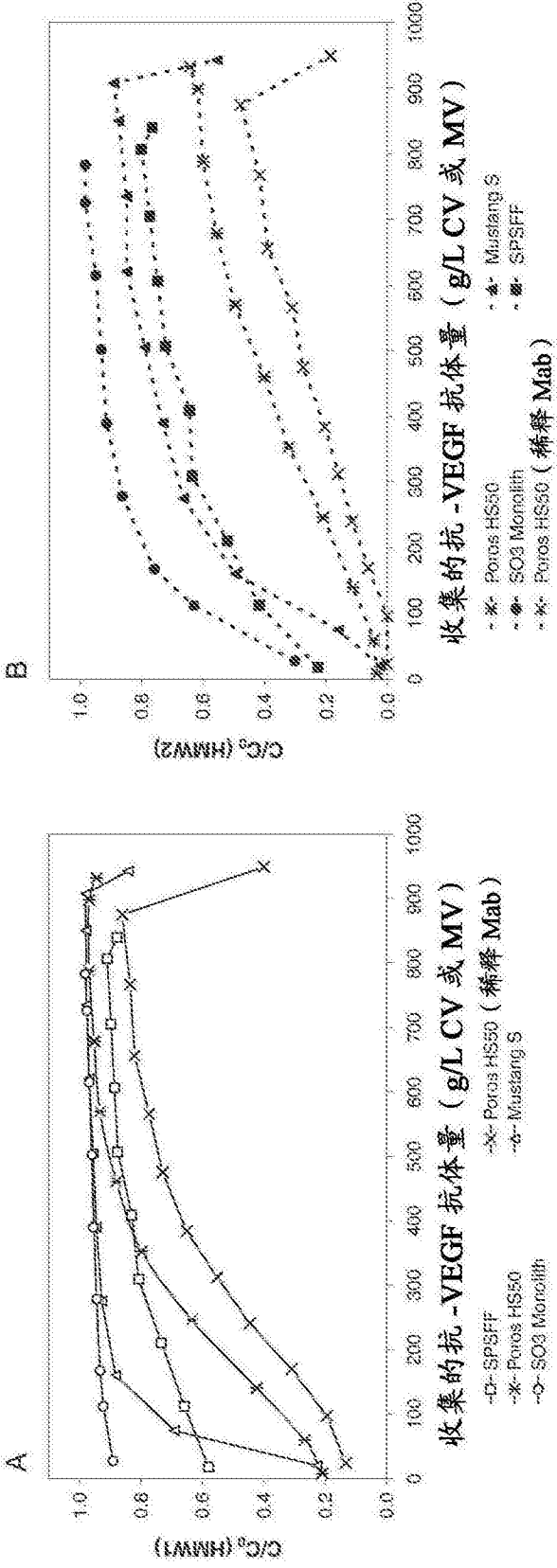


图12

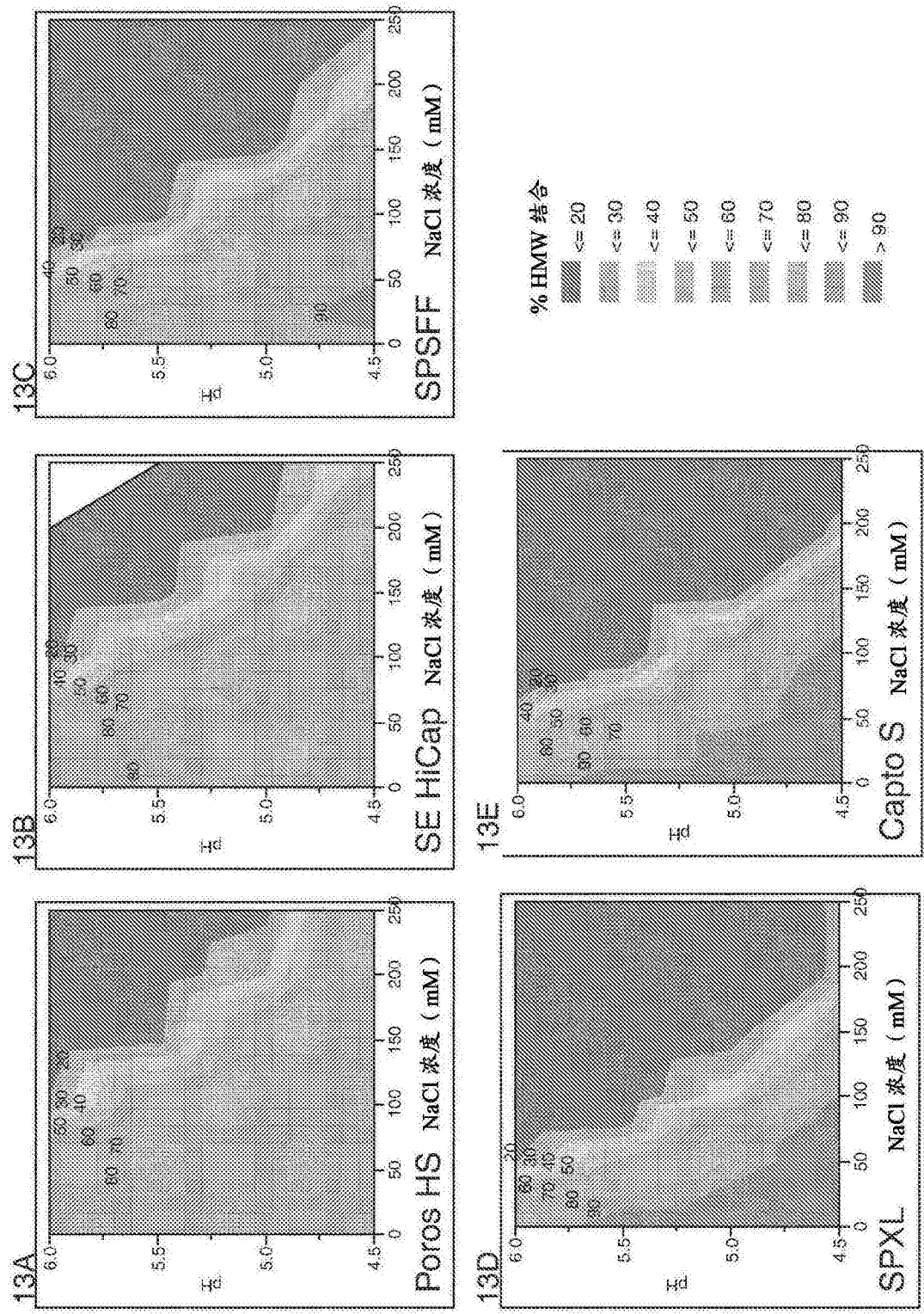


图13

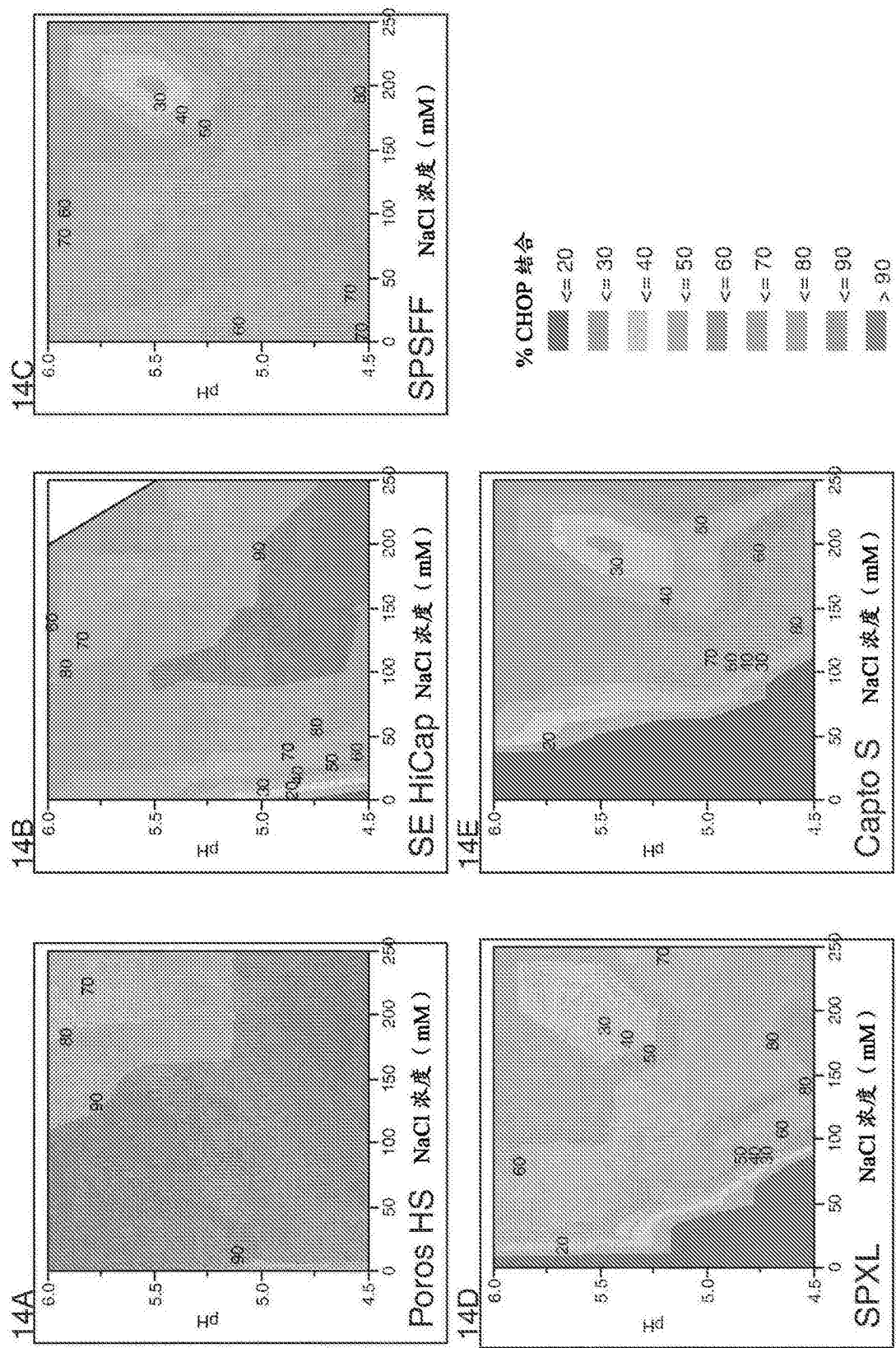


图14

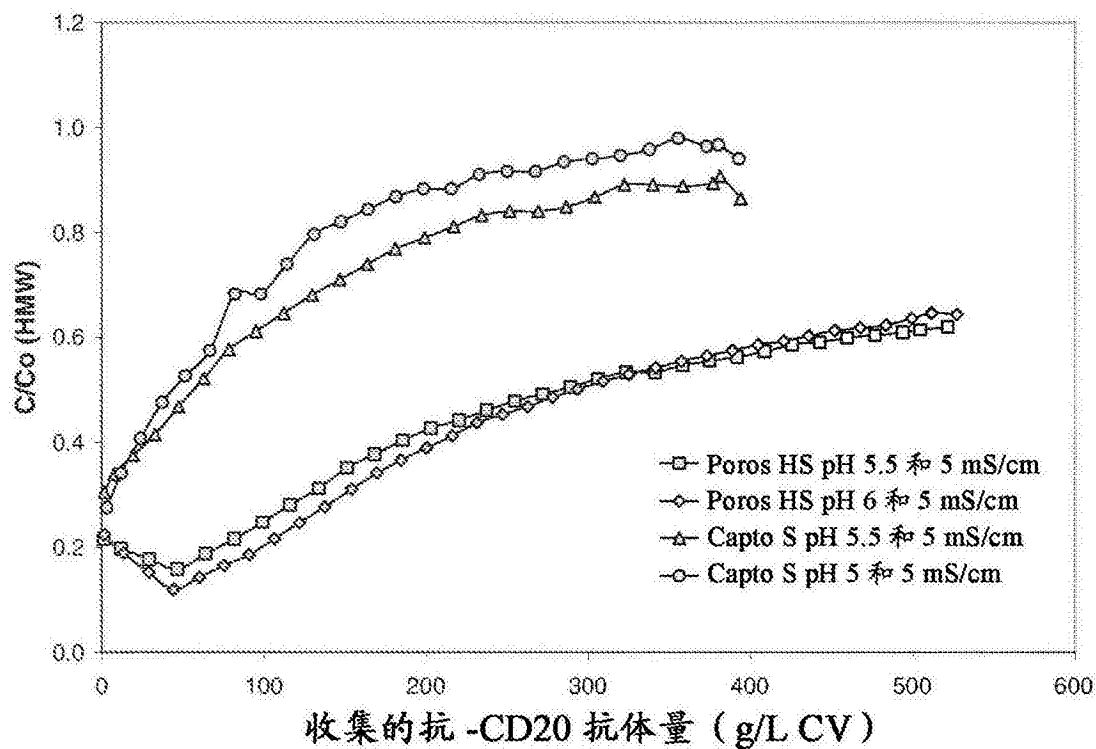


图15

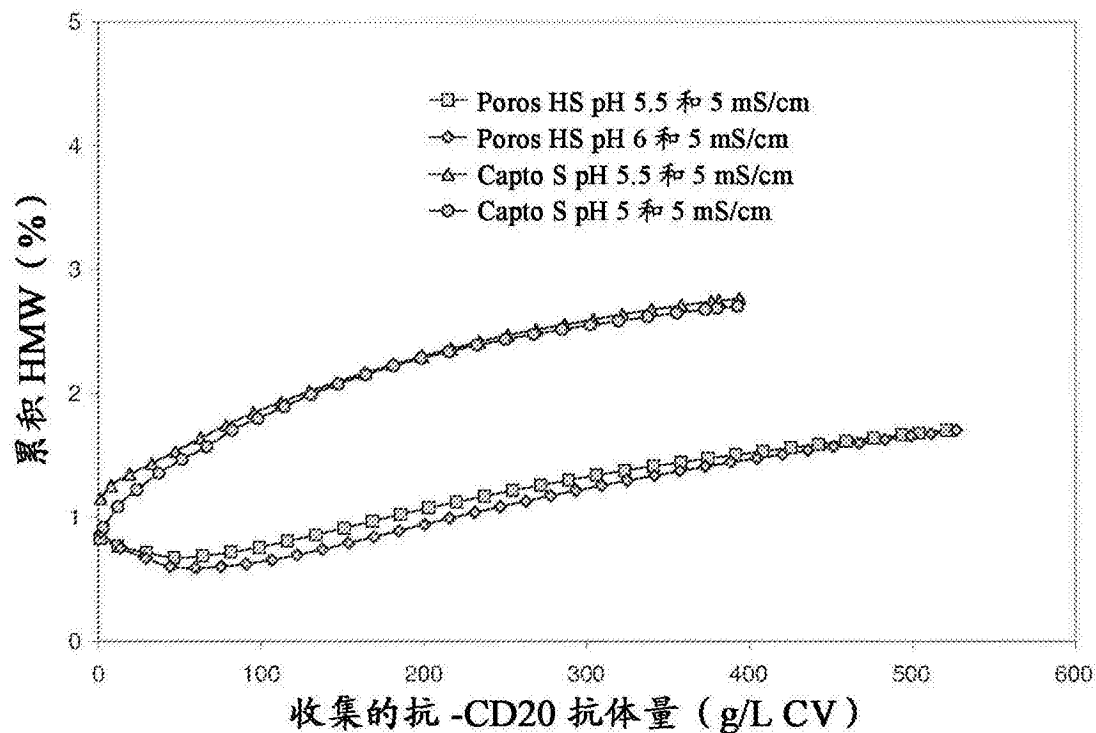


图16

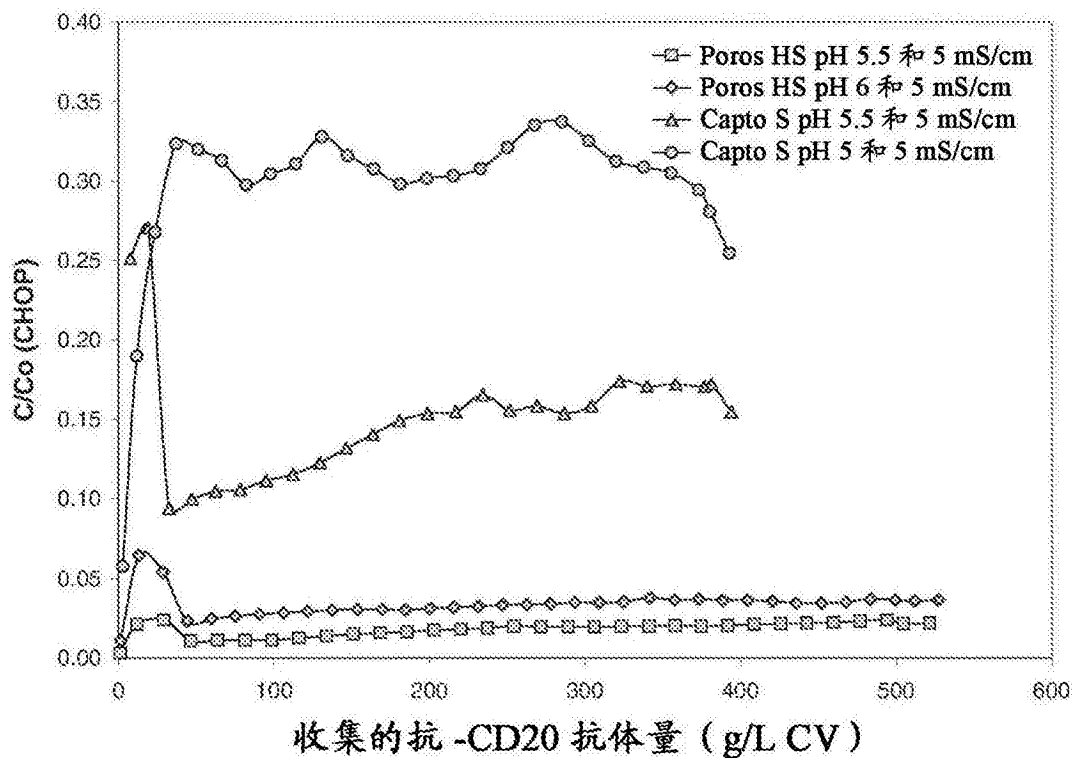


图17

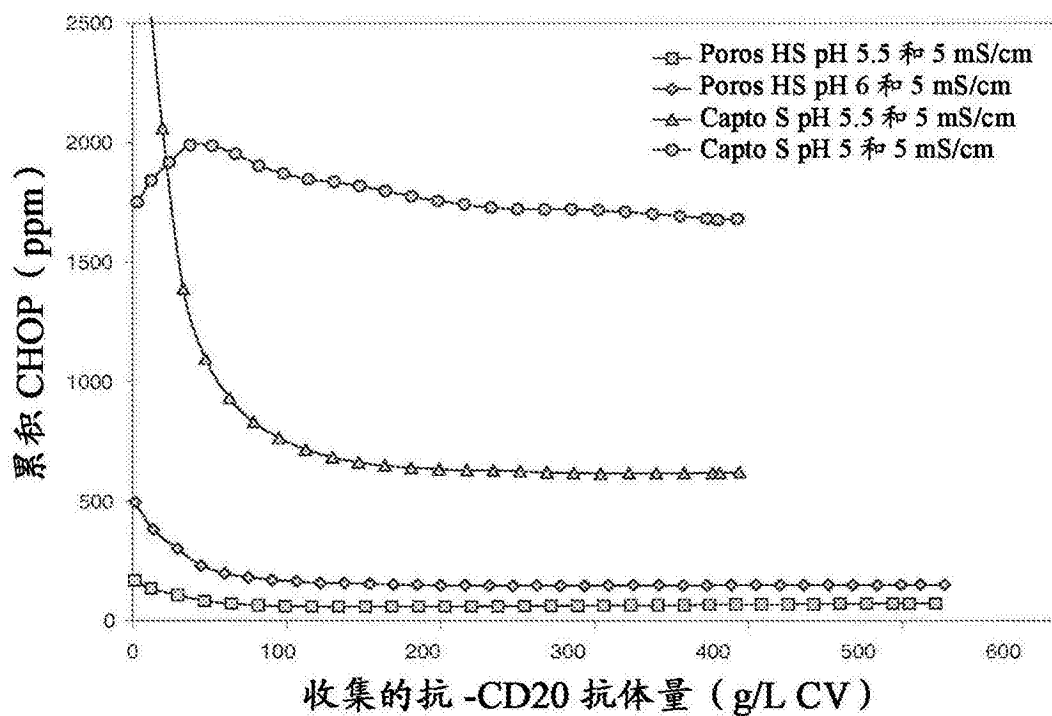


图18

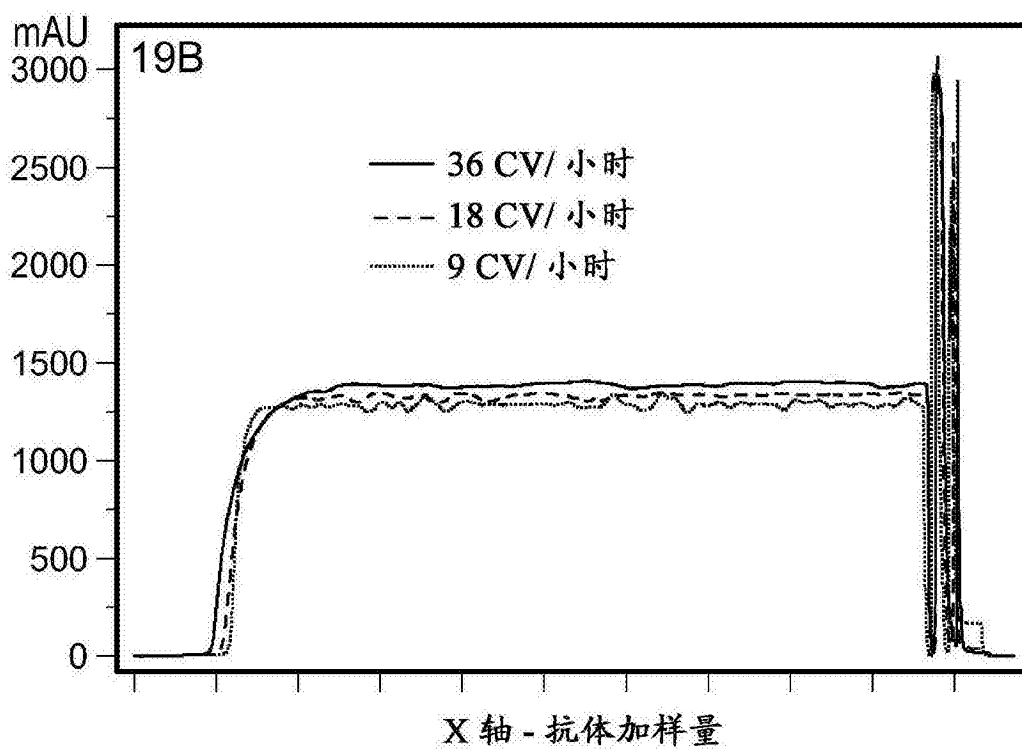
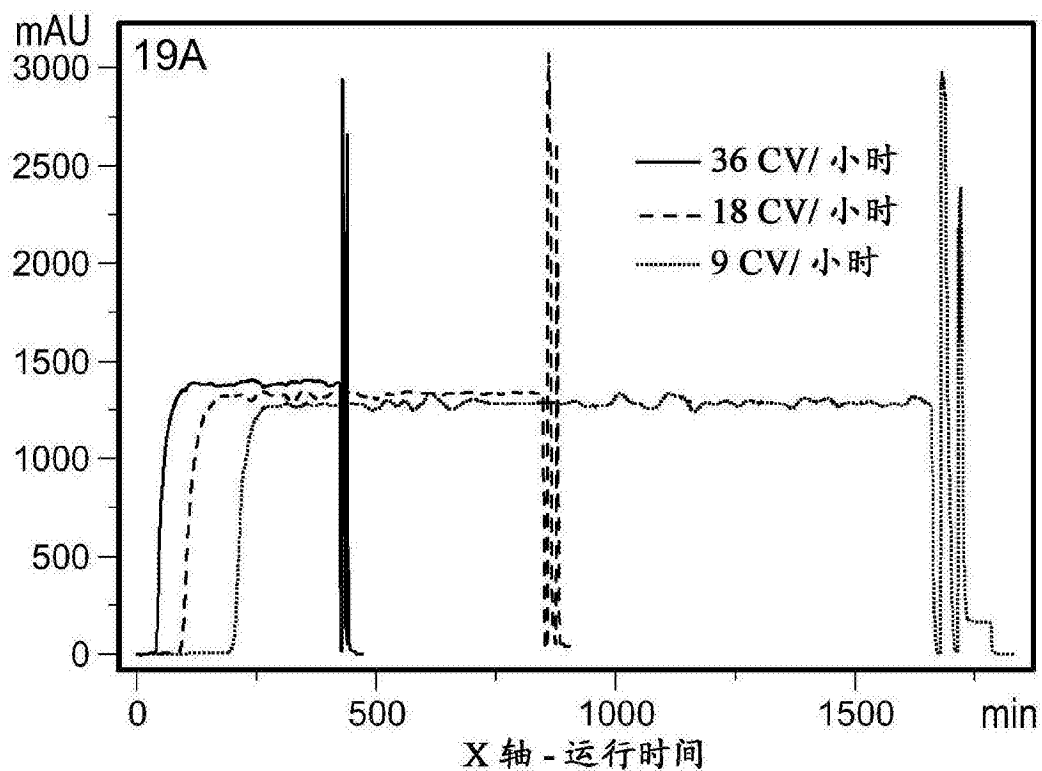


图19

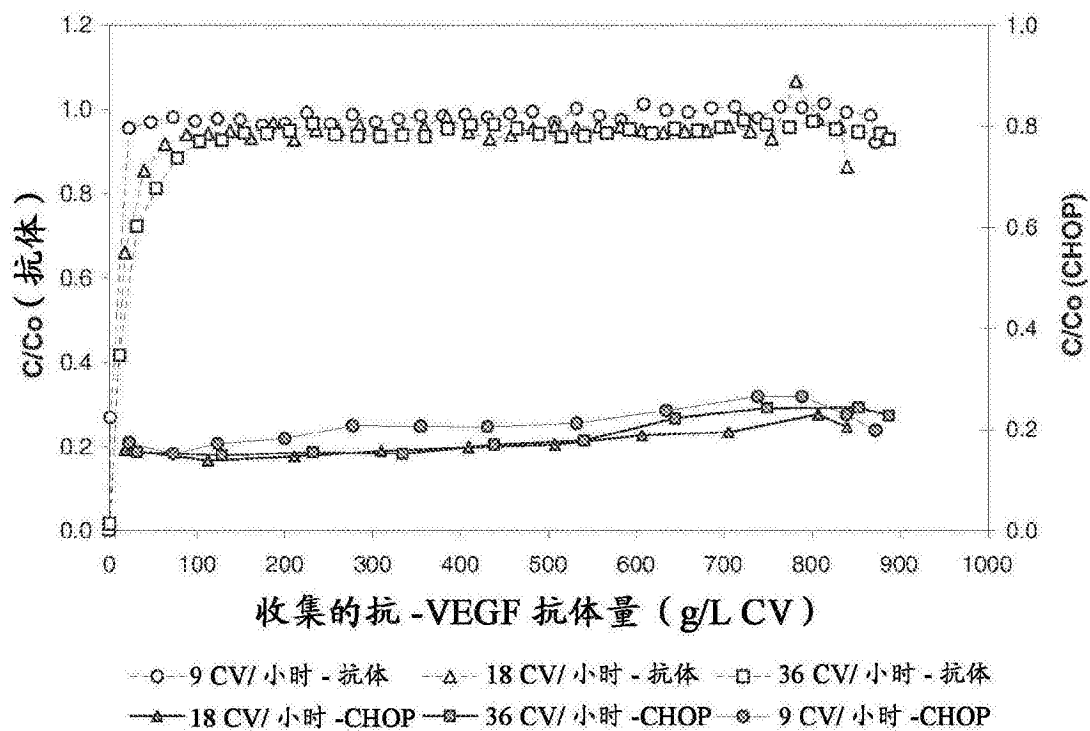


图20

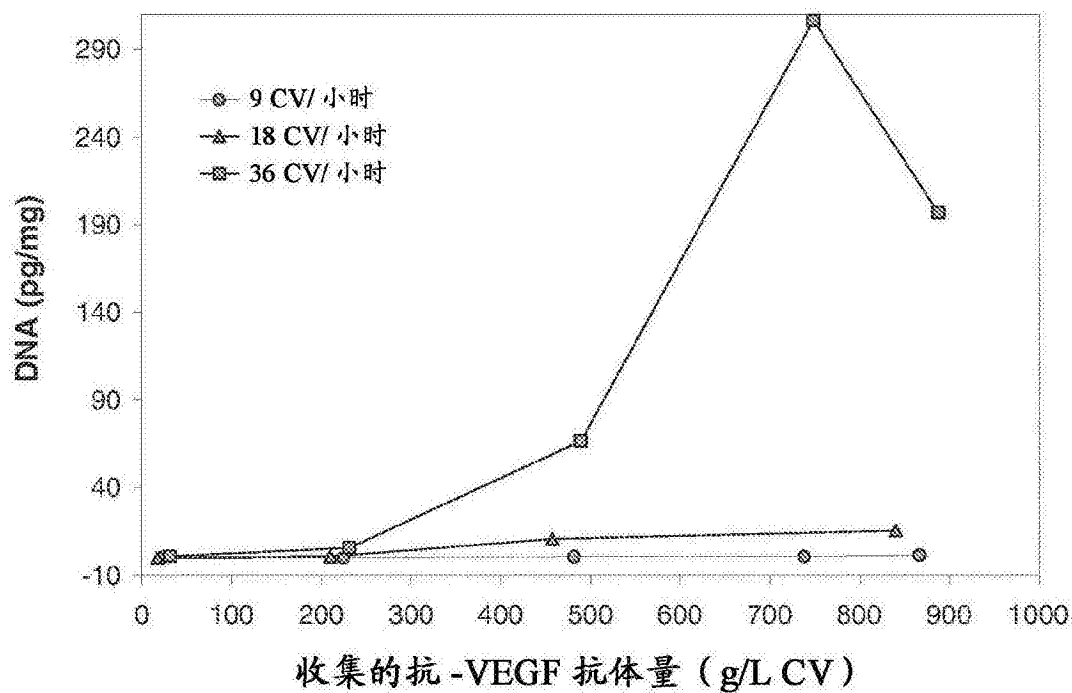


图21

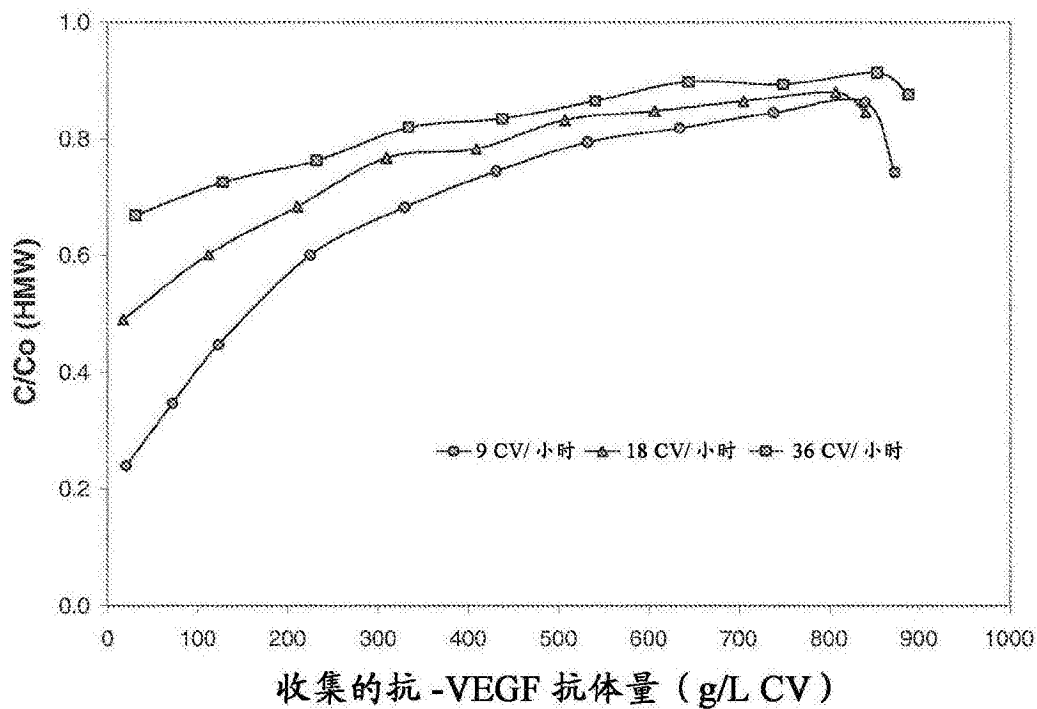


图22

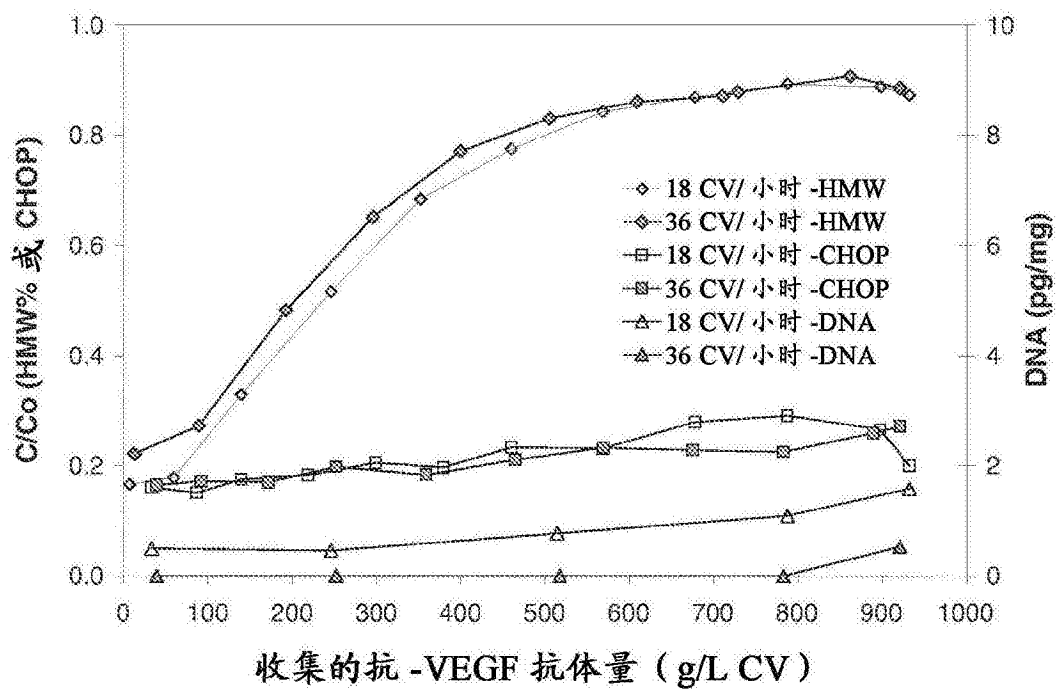


图23

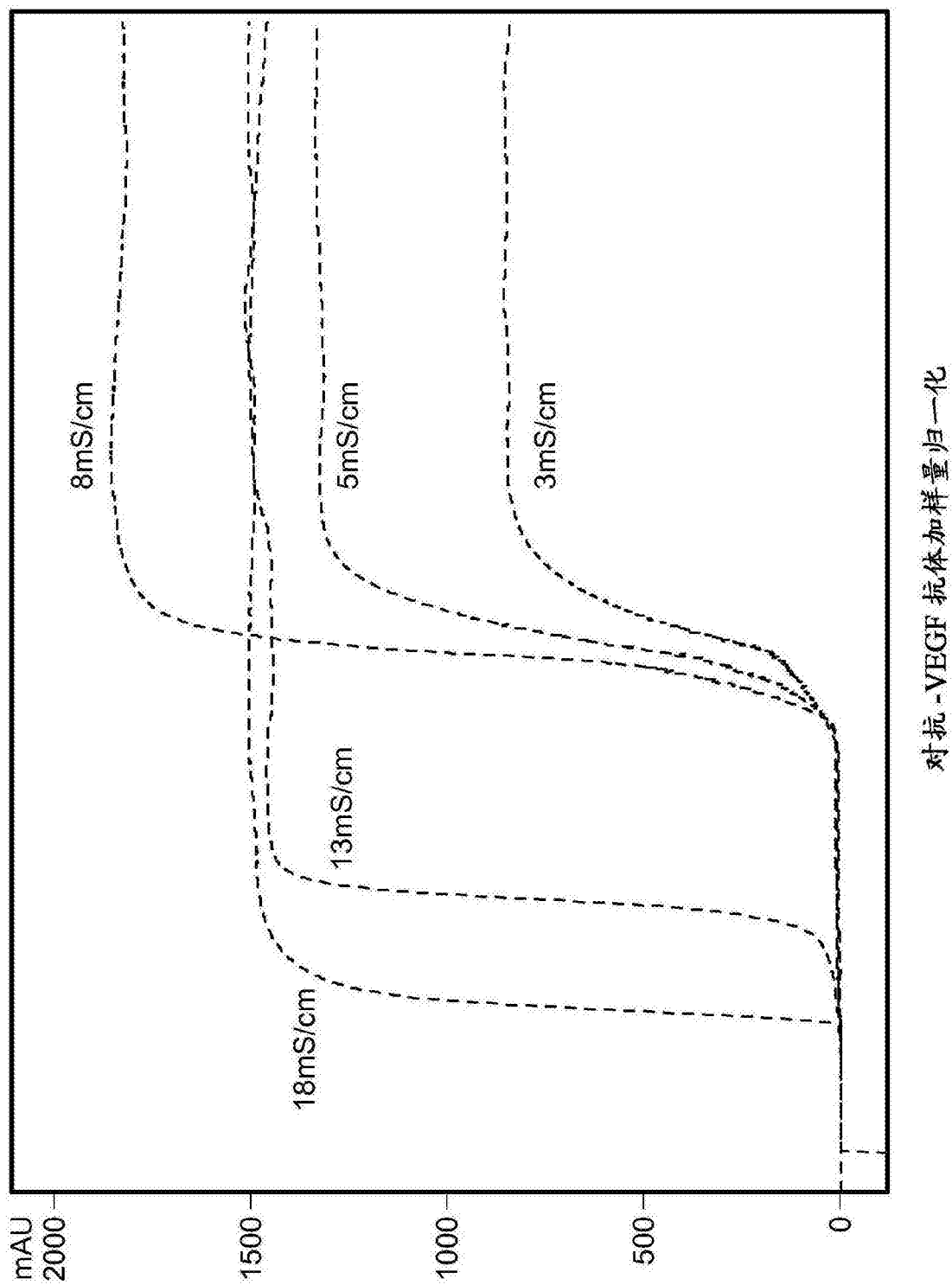


图24

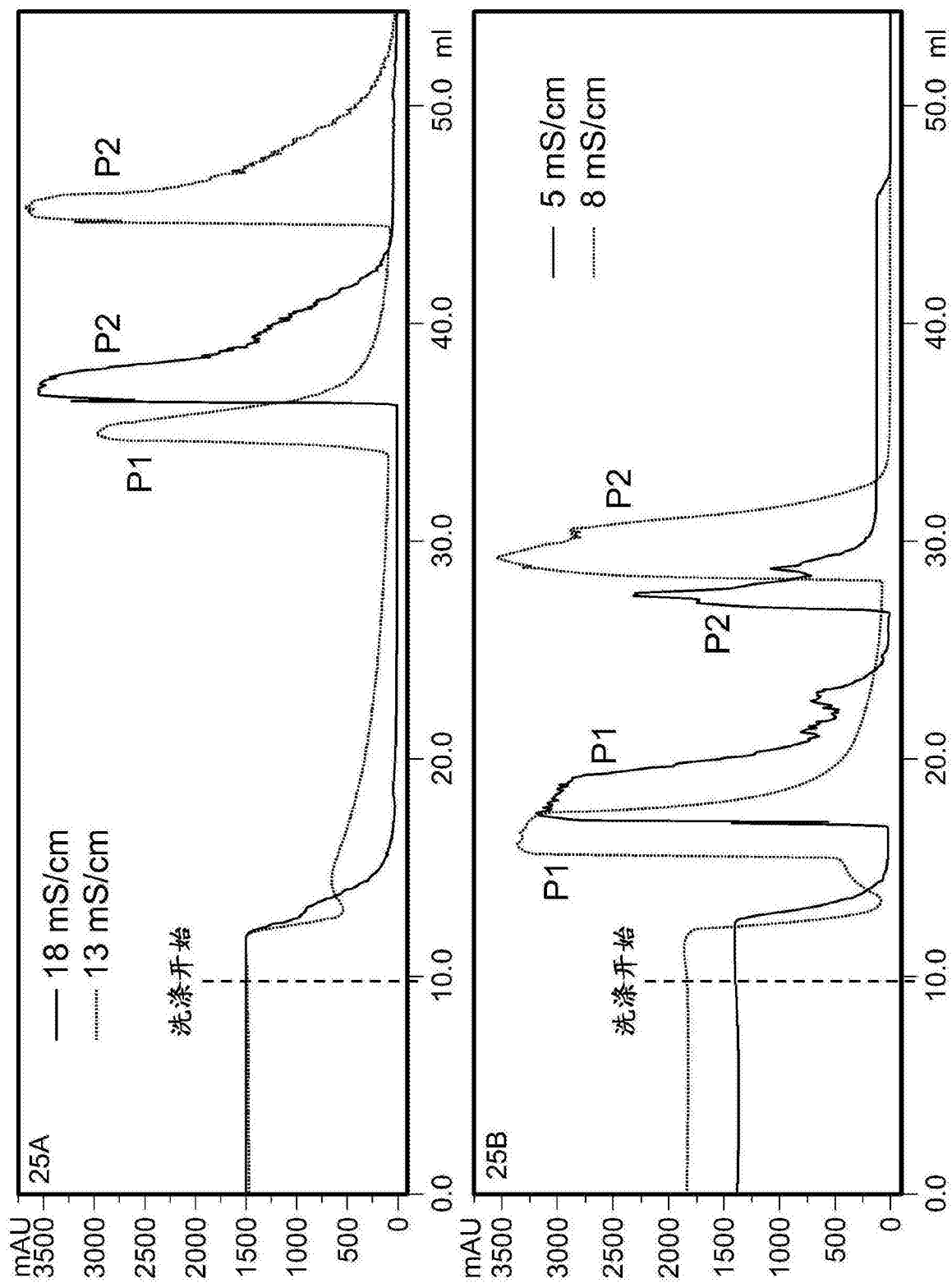


图25

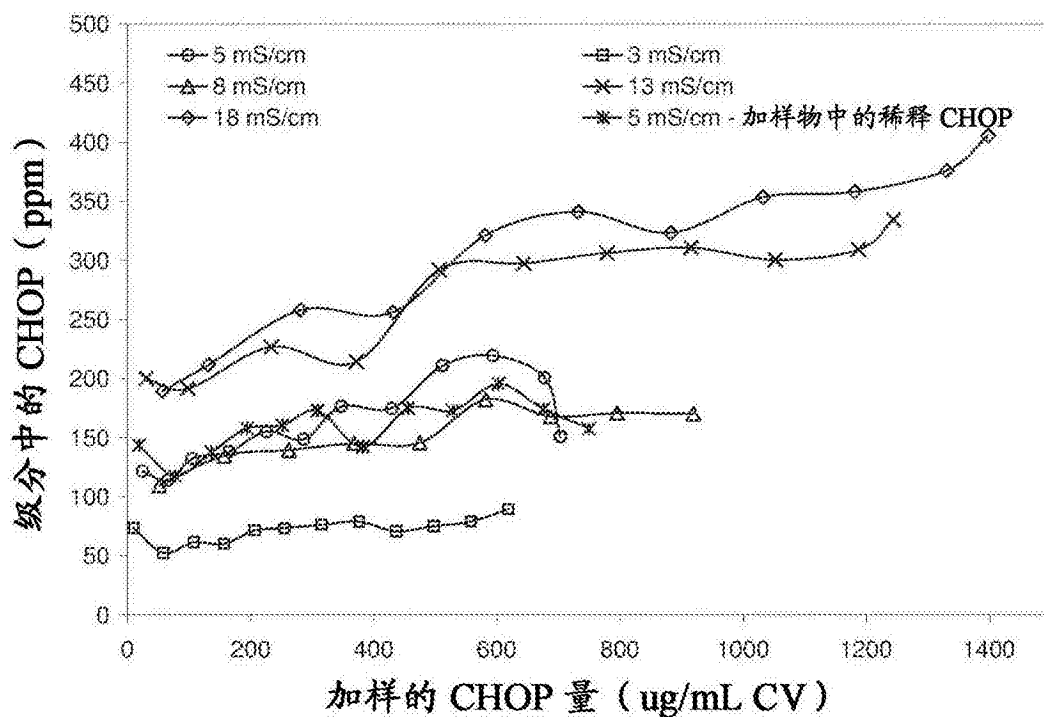


图26

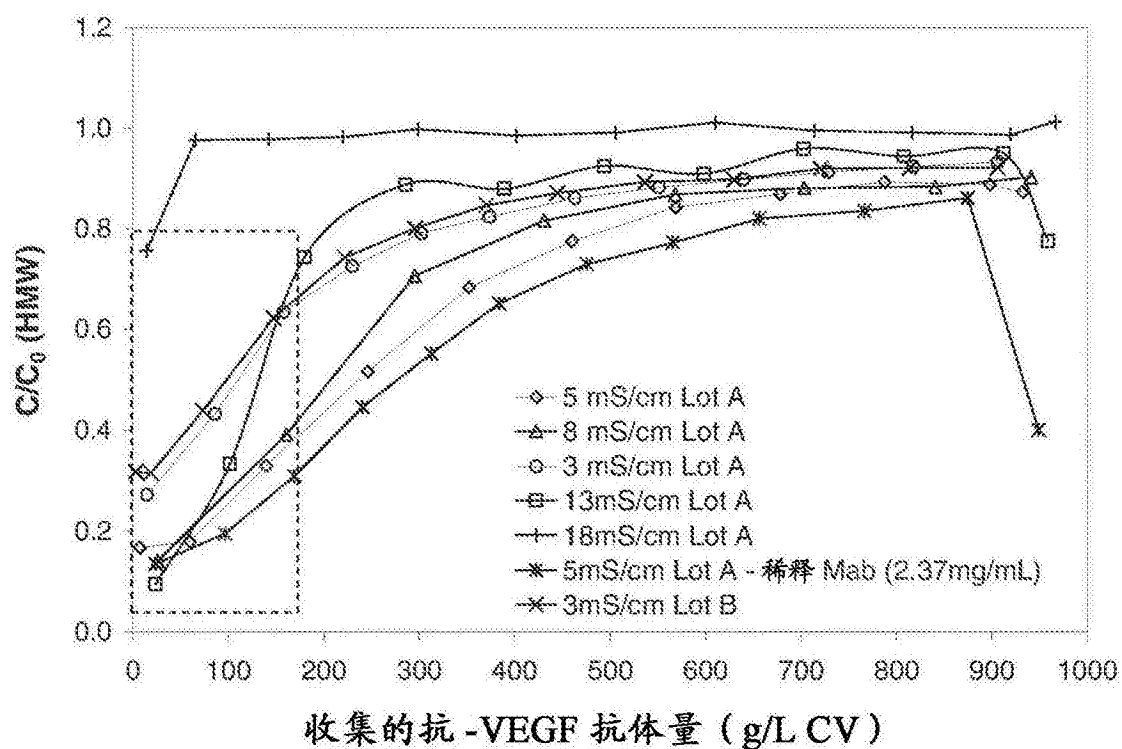


图27

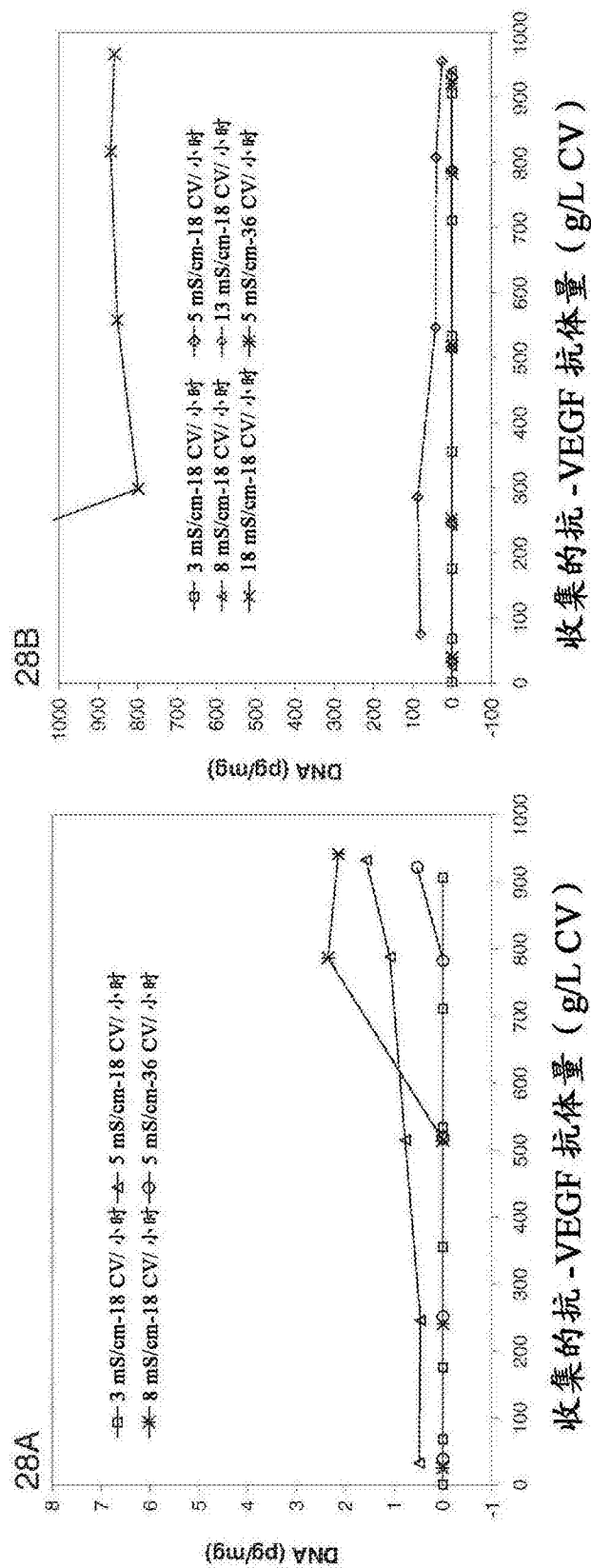


图28

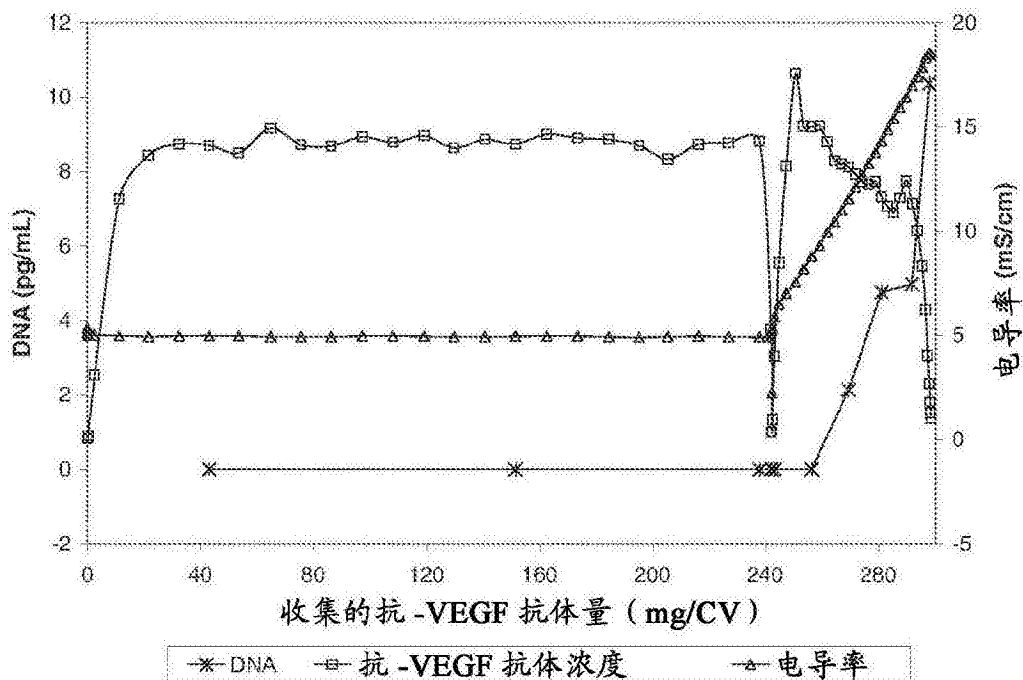


图29

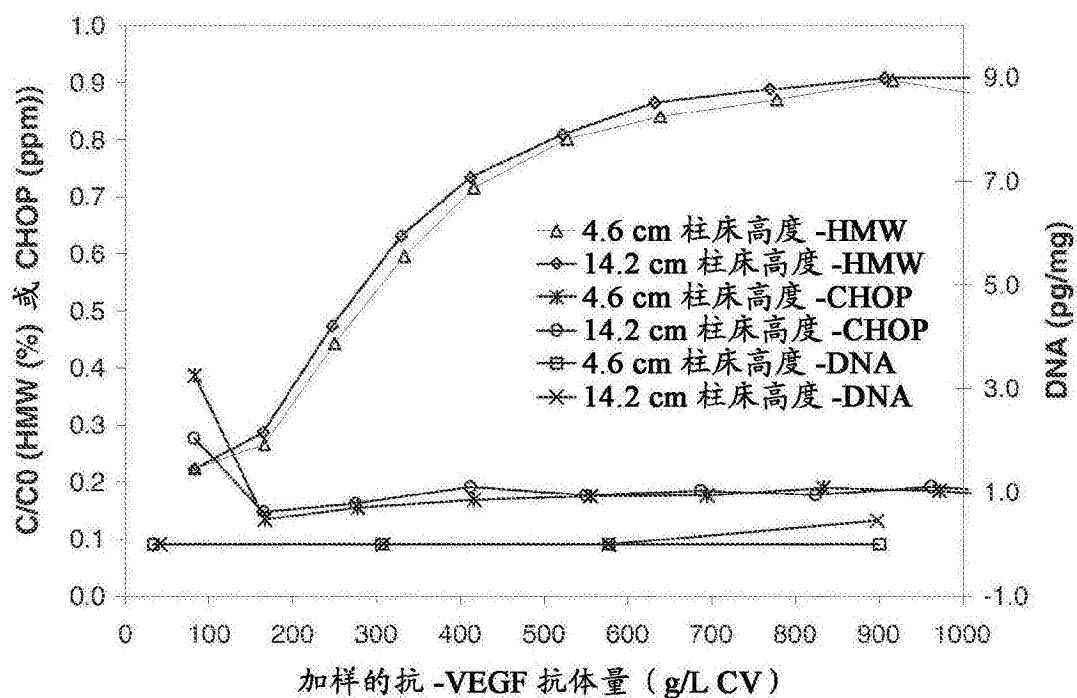


图30

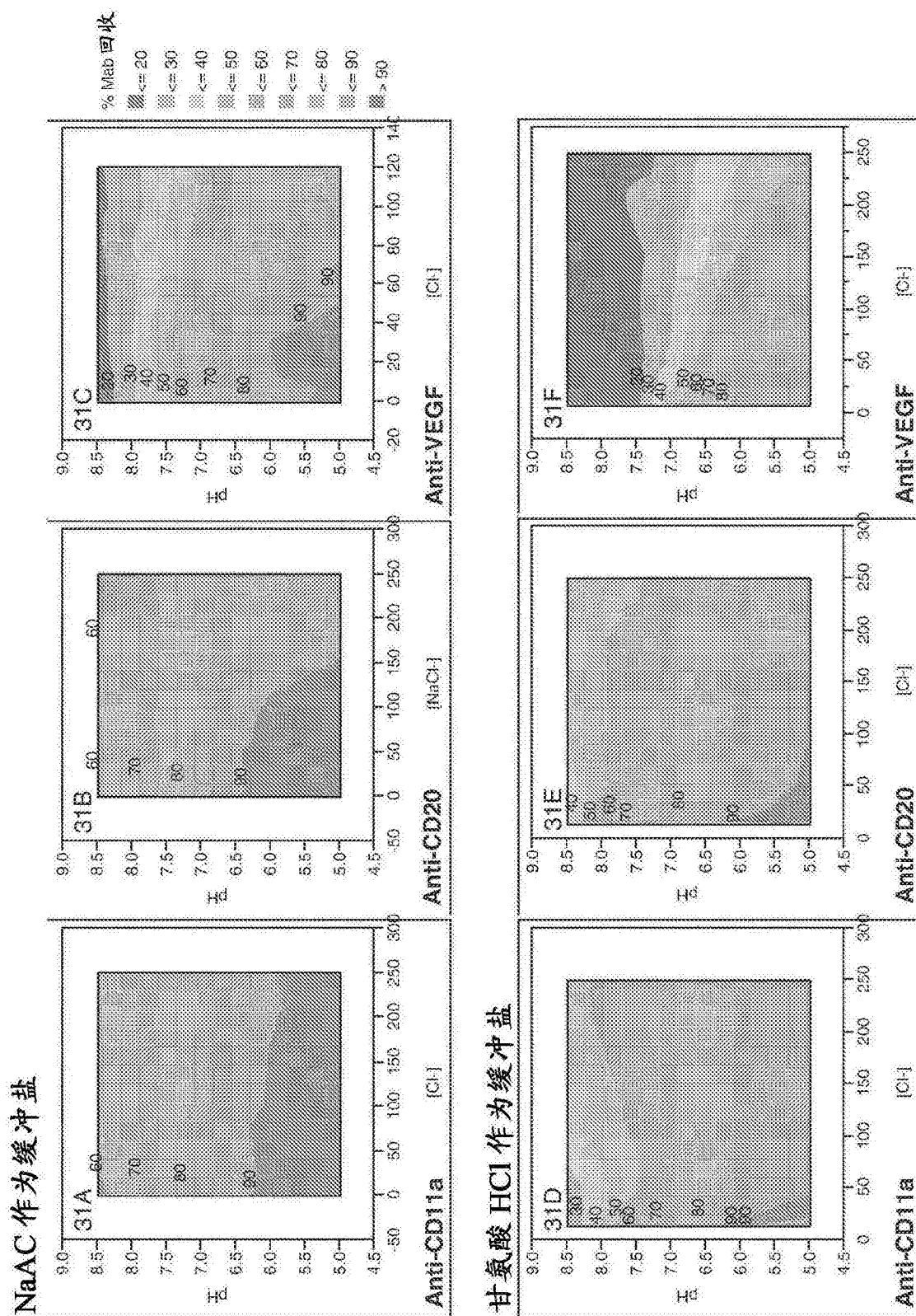


图31

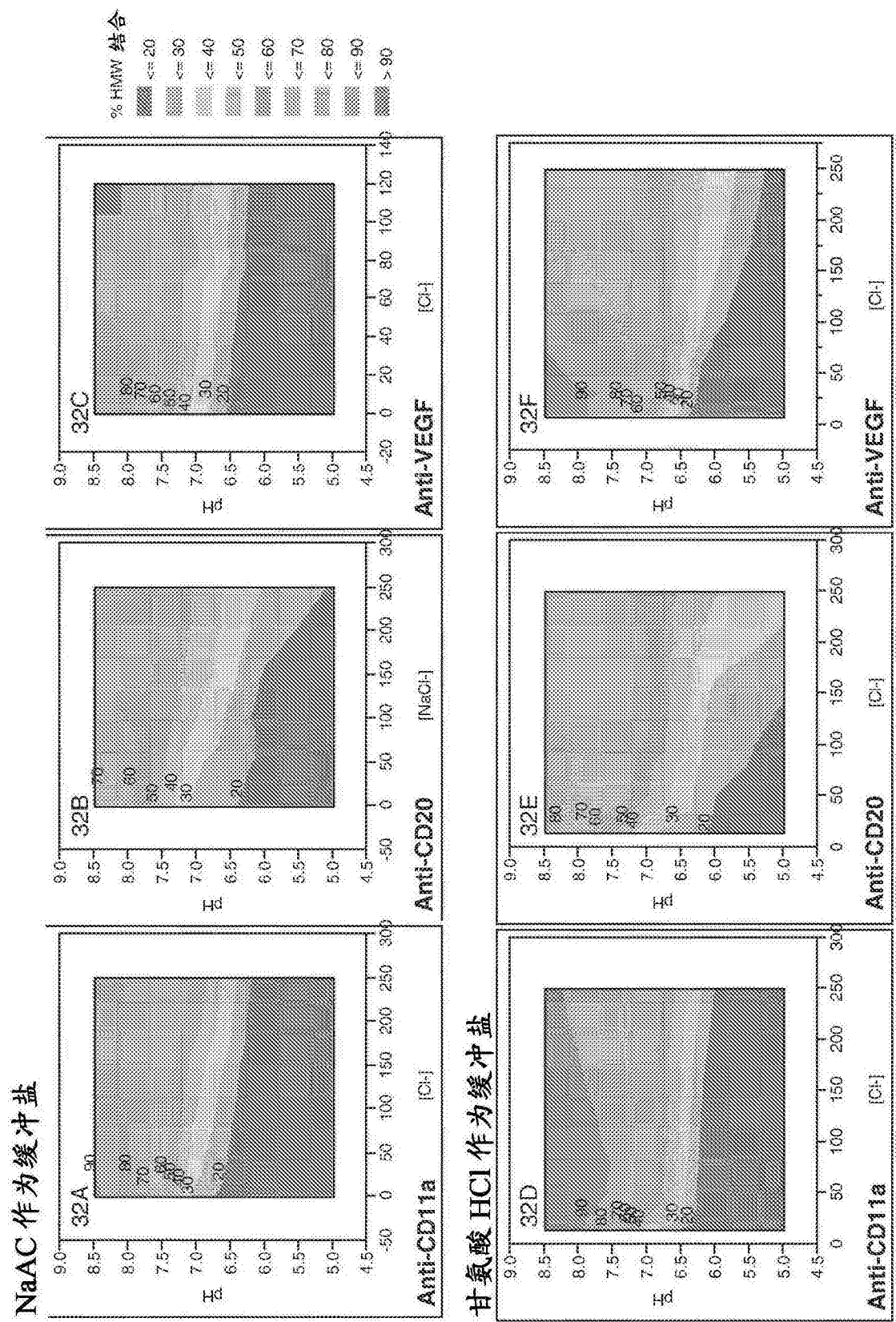
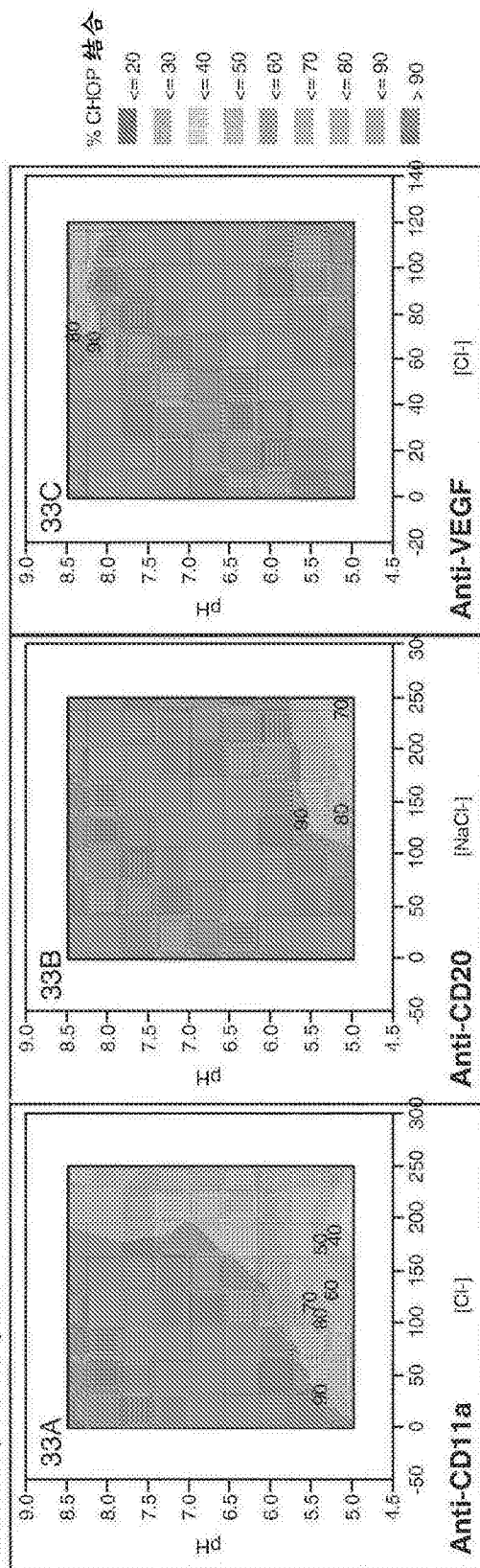


图32

NaAc 作为缓冲盐



甘氨酸 HCl 作为缓冲盐

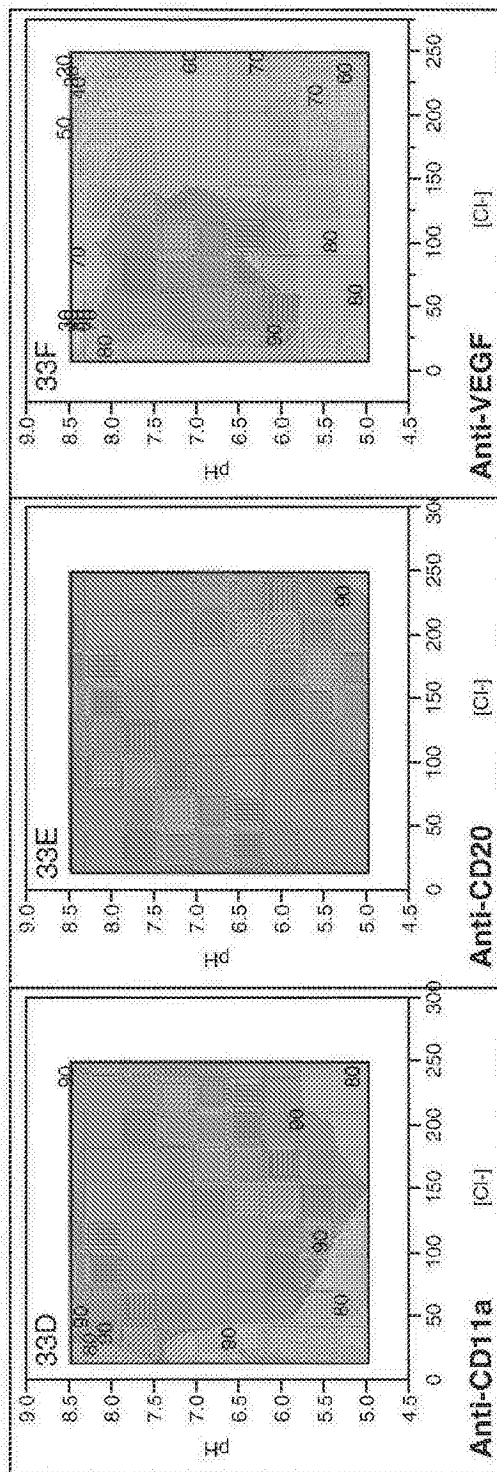


图33

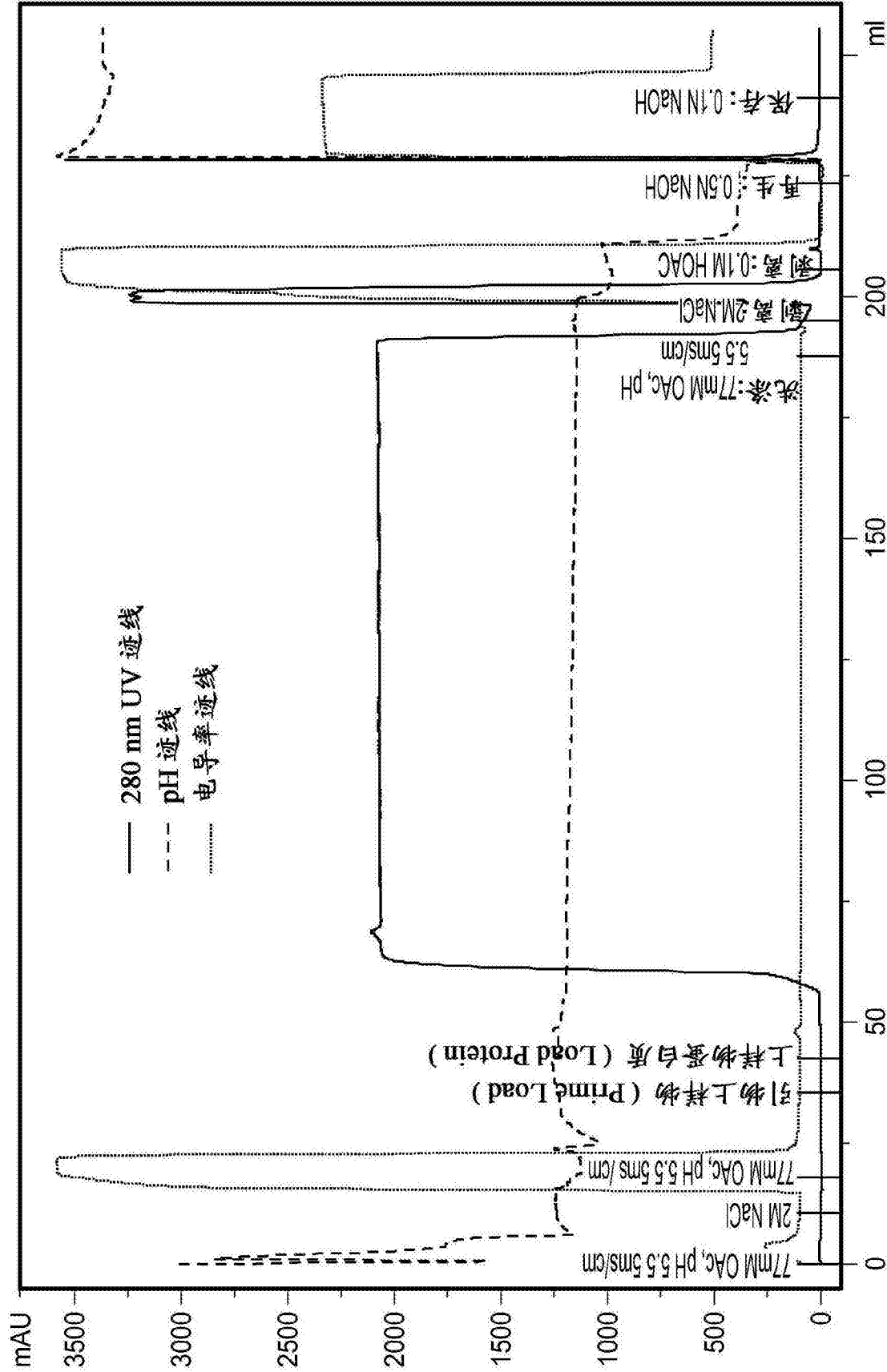


图34