



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本 (11) 公開編號：TW 201520227 A

(43) 公開日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：103108771 (22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 12 日

(51) Int. Cl. : C07K16/24 (2006.01) C07K1/14 (2006.01)

(30) 優先權：2013/03/12 美國 61/777,883
2013/11/12 美國 14/078,181(71) 申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)
美國

(72) 發明人：邱姆薩 克里斯 M CHUMSAE, CHRIS M. (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：12 共 59 頁

(54) 名稱

結合人類 TNF- α 之人類抗體及其製備方法

HUMAN ANTIBODIES THAT BIND HUMAN TNF-ALPHA AND METHODS OF PREPARING THE SAME

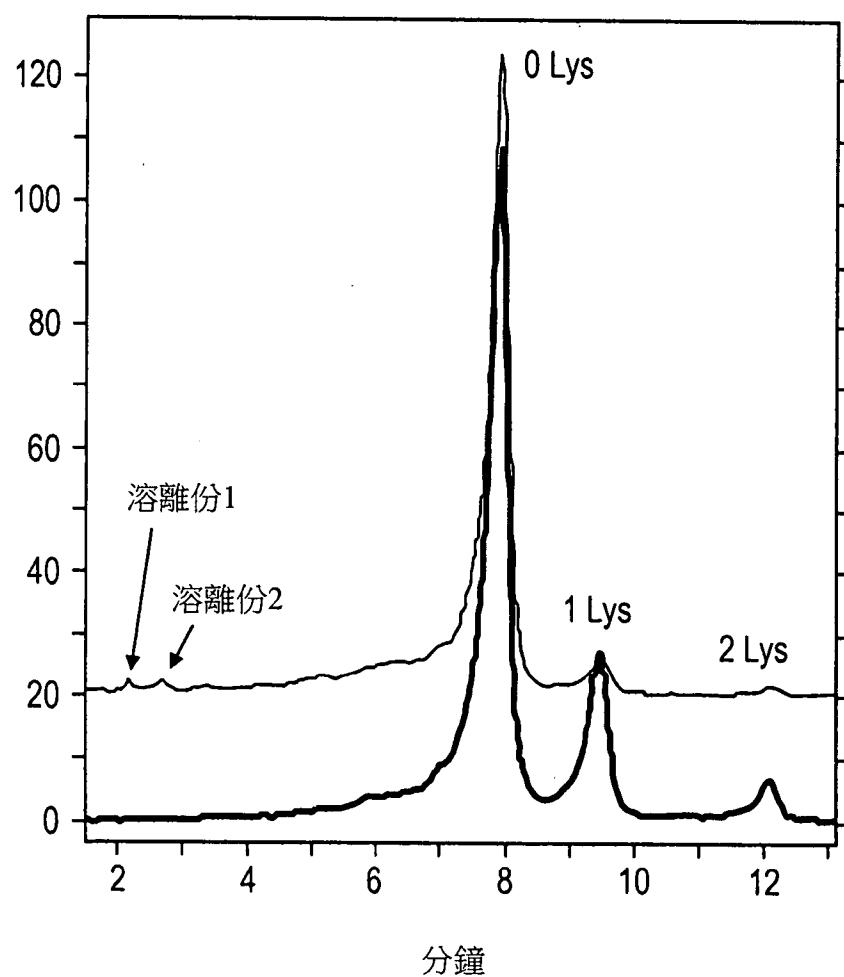
(57) 摘要

本發明鑑別經甲基乙二醛(MGO)修飾之重組 TNF- α 抗體(例如阿達木單抗(Adalimumab))。MGO 修飾減少阿達木單抗與 TNF- α 之間的結合。揭示減少經 MGO 修飾之抗體之存在的方法，其用於製造阿達木單抗 TNF- α 抗體。

Methylglyoxal (MGO)-modified recombinant TNF-alpha antibodies (eg., Adalimumab) are identified. MGO modification decreases binding between Adalimumab and TNF-alpha. Methods are disclosed for reducing the presence of MGO-modified antibodies in the production of Adalimumab TNF-alpha antibodies.

201520227

TW 201520227 A



分鐘

圖 1

201520227

201520227

發明摘要

※ 申請案號：103108771

※ 申請日：103.3.12

※IPC 分類：
C07K16/24 (2006.01)
C07K1/14 (2006.01)

【發明名稱】

結合人類TNF- α 之人類抗體及其製備方法

HUMAN ANTIBODIES THAT BIND HUMAN TNF-ALPHA AND
METHODS OF PREPARING THE SAME

【中文】

● 本發明鑑別經甲基乙二醛（MGO）修飾之重組TNF- α 抗體（例如阿達木單抗（Adalimumab））。MGO修飾減少阿達木單抗與TNF- α 之間的結合。揭示減少經MGO修飾之抗體之存在的方法，其用於製造阿達木單抗TNF- α 抗體。

【英文】

Methylglyoxal (MGO)-modified recombinant TNF-alpha antibodies (e.g., Adalimumab) are identified. MGO modification decreases binding between Adalimumab and TNF-alpha. Methods are disclosed for reducing the presence of MGO-modified antibodies in the production of Adalimumab TNF-alpha antibodies.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

結合人類TNF- α 之人類抗體及其製備方法

HUMAN ANTIBODIES THAT BIND HUMAN TNF-ALPHA AND
METHODS OF PREPARING THE SAME

[相關申請案]

本申請案主張2013年3月12日申請之美國臨時專利申請案第61/777,883號及2013年11月12日申請之美國專利申請案第14/078,181號的優先權。

[序列表]

本申請案隨附有呈電腦可讀形式之序列表，其準確再現本文中所述之序列。

【技術領域】

本發明係關於特異性結合至人類TNF- α 之抗體。更特定言之，揭示經甲基乙二醛（MGO）修飾之重組TNF- α 抗體。亦提供減少經MGO修飾之TNF- α 抗體的方法。

【先前技術】

腫瘤壞死因子 α （「TNF- α 」）為由許多細胞類型（諸如單核細胞及巨噬細胞）產生之細胞介素。參見例如 Old, L. Science 230:630-632 (1985)。TNF- α 在許多生物過程中起重要作用，且已牽涉於多種其他人類疾病及病症（包括敗血症、感染、自體免疫疾病、移植排斥及移植物抗宿主病）之病理生理學中。參見例如 Vasilli, P., Annu. Rev. Immunol. 10:411-452 (1992)；及 Tracey, K. J. 及 Cerami, A. Annu. Rev. Med. 45:491-503 (1994)。



在致力於治療/預防此等疾病時，各種治療策略已經設計以抑制或抵制TNF- α 活性。美國專利第6,090,382號揭示以高親和力及緩慢解離動力學特異性結合至人類TNF- α 之人類抗體（例如重組人類抗體）。亦揭示表現重組人類TNF- α 抗體之核酸、載體及宿主細胞。該等重組TNF- α 抗體之一個實例被稱為阿達木單抗（Adalimumab），其以商標名Humira[®]出售。美國專利第6,090,382號之全部內容據此以引用的方式併入本發明中。

重組生物治療劑典型地由活細胞產生，且與傳統小分子藥物相比本質上更複雜。各種轉譯後修飾已經報導為重組單株抗體之異質性的主要促成因素（參考文獻1-4）。此等修飾中之些（例如糖基化及唾液酸併入）可在醣酵期間發生（參考文獻5-7）。一些其他修飾（諸如氧化及雙硫鍵加擾）可在製造、純化及儲存期間發生。

該等修飾之一個實例為所謂酸性物質（電荷變異體）。當藉由弱陽離子交換層析（WCX）分析重組單株抗體時，觀測酸性物質（圖1）。一種主要促成因素為重鏈之C末端離胺酸因細胞衍生之羧肽酶而移除，從而減少總正電荷（參考文獻8）。此等變異體通常分別被稱為Lys0、Lys1及Lys2物質。

C末端醯胺化（參考文獻9）為醣酵期間之另一酶促過程。另一類型之變異體由自發性非酶促轉化產生，該等自發性非酶促轉化包括自N末端麩醯胺酸（Gln）形成焦麩胺酸（Pyro-Glu），其移除游離N末端之正電荷（參考文獻10）；及將天冬醯胺（Asn）脫醯胺為天冬胺酸（Asp）或異天冬胺酸（isoAsp或isoD），其引入帶負電荷之羧酸（參考文獻11及12）。

一些修飾即使其不改變抗體分子之形式電荷亦可使抗體於弱陽離子交換層析上之滯留時間偏移。此等修飾可經由擾動局部電荷及構形來發揮其作用。舉例而言，不完全糖基化（參考文獻13）或游離硫氫

基之存在（參考文獻14-16）可使抗體於弱陽離子交換層析上之滯留時間偏移。值得注意，一些修飾由代謝物賦予，諸如糖基化由葡萄糖賦予、甲硫胺酸氧化由反應性氧物質（ROS）賦予、半胱胺酸化由半胱胺酸賦予（參考文獻17），且S-高半胱胺酸化及N-高半胱胺酸化由高半胱胺酸賦予（參考文獻2、18-23）。儘管許多修飾之機制已經報導，但此等機制不能充分解釋重組單株抗體於弱陽離子交換層析上所觀測之異質性。

【發明內容】

本發明藉由鑑別經修飾之重組抗體之可能會負面地影響該等抗體之功能性的新穎物質來推進此項技術。本發明亦提供減少該等物質之量而不實質上危害抗體產生之總產率的方法。

在一個實施例中，揭示阿達木單抗抗體之兩種酸性物質，其當抗體於化學成分確定之培養基（CDM）中培養之中國倉鼠卵巢（CHO）細胞中表現時存在。詳細分析已顯示，阿達木單抗中之若干精胺酸殘基經甲基乙二醛（MGO）修飾，此藉由用可靠MGO處理天然抗體而進一步證實。MGO與精胺酸之間的反應導致形成羥基醯亞胺及/或氫咪唑酮。所得羥基醯亞胺及氫咪唑酮加合物分別增加抗體之分子量54及72道爾頓（Dalton）。

在另一實施例中，此等修飾使得抗體與未經修飾之形式之溶離時間相比更早地溶離於弱陽離子交換層析圖中。因此，抗體在多個位點處經修飾之程度對應於酸性之偏移程度及溶離時間。阿達木單抗抗體經MGO之修飾為重組單株抗體之首個報導的經MGO之修飾。

在另一實施例中，揭示一種組合物，其包含能夠結合TNF- α 之結合蛋白。在一個態樣中，結合蛋白可含有至少一種易受甲基乙二醛（MGO）影響之胺基酸，且結合蛋白之至少一部分可含有一或多種經MGO修飾之胺基酸。

在另一實施例中，揭示一種組合物，其包含能夠結合TNF- α 之結合蛋白。在一個態樣中，結合蛋白可含有至少一種易受甲基乙二醛（MGO）影響之胺基酸，且組合物可藉由實質上移除結合蛋白之含有至少一種經MGO修飾之胺基酸的分子來製備。術語「實質上」可意謂至少50%。在另一態樣中，術語「實質上」可意謂含有至少一種經MGO修飾之胺基酸的分子之至少60%、70%、80%、90%或甚至100%移除。

出於本發明之目的，術語「易受甲基乙二醛（MGO）影響之」係指可在適當細胞培養條件下與MGO反應之基團或殘基（例如精胺酸）。阿達木單抗中之易受MGO影響之精胺酸的清單展示於表1中。阿達木單抗中之易受MGO影響之肽的實例展示於表2中。

術語「結合蛋白之至少一部分」意謂儘管組合物中之所有結合蛋白分子均能夠結合TNF- α ，但在組合物中此等分子存在至少兩種群體，其中一種群體含有一或多種已經MGO修飾之胺基酸，而另一群體不含有已經MGO修飾之胺基酸。在另一態樣中，所有結合蛋白分子均可含有一或多種已經MGO修飾之胺基酸。

在一個態樣中，結合蛋白之含有至少一種經MGO修飾之胺基酸的部分少於結合蛋白總量之15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

在另一實施例中，結合蛋白為人類抗體或其抗原結合部分，其中結合蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF- α 解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定。在一個態樣中，結合蛋白在美國專利第6,090,382號之實例4中所述之標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF- α 細胞毒性。在另一態樣中，結合蛋白為如美國專利第6,090,382號中所述之D2E7抗體。

在另一實施例中，細胞培養參數可影響甲基乙二醛（MGO）修飾

之程度。MGO為可自葡萄糖、脂質或其他代謝路徑產生之高度反應性代謝物。在一個態樣中，細胞培養條件可經修改以減少MGO產生，從而減少重組抗體經MGO之修飾。綜合而言，所揭示之發現強調細胞培養條件對重組產生之抗體之關鍵品質屬性的影響。此等發現為改良製造過程提供其他參數，且可證實適用於品質源於設計（QbD）方法。

在另一實施例中，揭示自過程及/或產物相關之雜質純化標靶蛋白產物之方法。特定言之，揭示純化含有標靶蛋白之組合物之方法。在一個態樣中，提供減少產物相關之電荷變異體（亦即酸性及鹼性物質）的方法。在另一態樣中，該方法包括使過程混合物與離子（陰離子或陽離子）交換吸附劑於水性鹽溶液中允許標靶及非標靶蛋白均結合至吸附劑之裝載條件下接觸，及使過量標靶分子通過管柱，及隨後用平衡（亦即預裝載）條件下所用之相同水性鹽溶液之洗液回收結合標靶蛋白。

在另一實施例中，揭示一種純化含有標靶蛋白之組合物之方法，其可包括至少以下步驟：(a) 使用裝載緩衝液將組合物裝載至陽離子交換吸附劑，其中裝載緩衝液之pH值低於標靶蛋白之pI；(b) 用洗滌緩衝液洗滌陽離子交換吸附劑，其中洗滌緩衝液之pH值低於標靶蛋白之pI；(c) 用溶離緩衝液使陽離子交換吸附劑溶離，該溶離緩衝液能夠減少標靶蛋白與陽離子交換吸附劑之間的結合；及(d) 收集溶離液，其中標靶蛋白於溶離液中之百分比高於標靶蛋白於組合物中之百分比。在一個態樣中，洗滌緩衝液與裝載緩衝液相同。在另一態樣中，溶離緩衝液之電導率高於洗滌緩衝液之電導率。在另一態樣中，溶離緩衝液之pH值可在5.5與9.0之間、在6與8之間或在6.5與8之間。溶離緩衝液之電導率可藉由增加溶離緩衝液之鹽濃度來升高。溶離緩衝液之鹽濃度可在20 mM NaCl與200 mM NaCl之間、在40 mM NaCl與160 mM NaCl之間或在60 mM NaCl與120 mM NaCl之間。

在另一實施例中，揭示一種純化含有標靶蛋白之組合物之方法，其可包括至少以下步驟：(a) 使用裝載緩衝液將組合物裝載至陰離子交換吸附劑，其中裝載緩衝液之pH值低於標靶蛋白之等電點(pI)；(b) 使標靶蛋白中之大多數通過而不結合至陰離子交換吸附劑；(c) 收集含有該非結合標靶蛋白之通過性裝載緩衝液；(d) 用洗滌緩衝液洗滌陰離子交換吸附劑；(e) 使結合至陰離子交換吸附劑之標靶蛋白自陰離子交換吸附劑解離；(f) 收集含有該解離標靶蛋白之洗滌緩衝液。在另一態樣中，該方法可進一步包括步驟(g)：彙集來自步驟(c)及(f)之收集物以獲得含有標靶蛋白之經純化組合物。標靶蛋白於彙集之收集物中之百分比高於標靶蛋白於原始組合物中之百分比。

在一個態樣中，裝載緩衝液可含有陰離子試劑及陽離子試劑，其中裝載緩衝液之電導率及pH值係藉由於裝載緩衝液中增加或降低陽離子試劑之濃度且維持陰離子試劑之恆定濃度來調節。在另一態樣中，陰離子試劑係選自由以下組成之群：乙酸鹽、檸檬酸鹽、氯陰離子、硫酸鹽、磷酸鹽及其組合。在另一態樣中，陽離子試劑係選自由以下組成之群：鈉、Tris、緩血酸胺、銨陽離子、精胺酸及其組合。

在一個實施例中，標靶蛋白為實質上不含MGO修飾之人類抗體或其抗原結合部分。在一個態樣中，標靶蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF- α 解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定。在另一態樣中，標靶蛋白在美國專利第6,090,382號之實例4中所述之標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF- α 細胞毒性。在另一態樣中，標靶蛋白為如美國專利第6,090,382號中所述之D2E7抗體。

【圖式簡單說明】

圖1展示阿達木單抗在蛋白A純化之後的典型WCX層析圖。

圖2展示溶離份1及2中之輕鏈及重鏈的去卷積質譜。

圖3展示含有經MGO修飾之Arg殘基之肽的代表性MS/MS質譜。

圖4展示精胺酸經MGO之化學修飾。

圖5展示經純化之0離胺酸溶離份在5小時時程內經MGO之修飾。

圖6展示圖5之峰a及b之質譜。

圖7展示肽MS/MS資料在來自細胞培養物之酸性溶離份1與來自甲基乙二醛培育之酸性溶離份1之間的比較。

圖8展示與TNF- α 複合的阿達木單抗Fab次單元之晶體結構，表明MGO修飾可造成可能會妨礙阿達木單抗結合TNF- α 之能力的構形變化。

圖9展示0 Lys溶離份（頂部：0 Lys）及MGO增濃溶離份（底部：峰1）之表面電漿子共振（SPR）資料。

圖10展示受甲基乙二醛影響之酸性區域在兩步驟層析分離之前與之後的比較，其中頂部跡線為酸性區域之擴展視圖（其中表示兩個獨特MGO峰），且下部跡線展示此酸性區域且及MGO變異體之完全清除。

圖11展示當使用阿達木單抗用Tris-乙酸鹽緩衝液系統執行可逆結合模式時的CEX層析圖。

圖12展示酸性物質藉由Poros XS樹脂用NaCl/Tris-乙酸鹽溶液之移除。

【實施方式】

本發明鑑別經甲基乙二醛（MGO）修飾之重組抗體之新穎物質，其可能會對抗體之結構及功能具有負面影響。本發明亦提供降低該等變異體物質之百分比而不實質上危害抗體產生之產率的方法。更特定言之，本發明描述當阿達木單抗於使用化學成分確定之培養基（CDM）之CHO細胞中表現時細胞培養物中阿達木單抗之經甲基乙二醛（MGO）修飾之形式。

在一個實施例中，某些精胺酸（例如阿達木單抗之CDR1中之R30）

之側鏈經MGO之修飾可導致形成在側鏈之鋁末端處起始之五員環，其可進一步穿透至TNF- α 結構中。此等MGO修飾可能會因立體約束而妨礙阿達木單抗結合TNF- α 之能力。

在一個實施例中，對酸性物質異質性之控制可藉由以下方式來獲得：用陰離子交換（AEX）吸附劑材料及水性鹽溶液在允許所關注之蛋白及非標靶蛋白均結合至AEX吸附劑之裝載條件下自包含蛋白之混合物純化所關注之蛋白，其中隨後將所關注之結合蛋白用包含平衡（亦即裝載）緩衝液中所用之相同水性鹽溶液之洗滌緩衝液回收。在一個態樣中，用作裝載及洗滌緩衝液之水性鹽溶液具有大於所關注之蛋白之等電點（pI）的pH值。

在另一實施例中，所揭示之純化方法可包括調節水性鹽溶液之電導率及/或pH值。在一個態樣中，調節可包括降低水性鹽溶液之電導率。在另一態樣中，用以達成對酸性物質異質性之所要控制的調節可包括增加溶液之裝載電導率。在另一態樣中，調節可增加水性鹽溶液之pH值。在另一態樣中，用以達成對酸性物質異質性之所要控制的調節可包括降低水性鹽溶液之pH值。電導率及/或pH值之該等增加及/或降低可具有水性鹽溶液之電導率及/或pH值的1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%及前述中之一或更多者內之範圍的量值。

在另一實施例中，水性鹽溶液之電導率及pH值係藉由於水性鹽溶液中增加或降低陽離子試劑之濃度且維持陰離子試劑之恆定濃度來調節。在一個態樣中，陰離子試劑係維持在約0.05 mM與100 mM之間或約0.1 mM與90 mM之間或約0.5 mM與80 mM之間或約1 mM與70 mM之間或約1.5 mM與60 mM之間或約2 mM與50 mM之間或約2.5 mM與40 mM之間或約3 mM與30 mM之間或約3.5 mM與25 mM之間或約4 mM與

20 mM之間或約4.5 mM與15 mM之間或約4.5 mM與10 mM之間或約5 mM與7 mM之間的濃度下。在另一態樣中，陰離子試劑係維持在約5 mM之濃度下。在另一態樣中，陰離子試劑係維持在約10 mM之濃度下。在另一態樣中，陰離子試劑係維持在約18.5 mM之濃度下。

在另一實施例中，陽離子試劑於水性鹽溶液中之濃度經增加或降低以達成約5與12之間或約5.5與11.5之間或約6與11之間或約6.5與10.5之間或約7與10之間或約7.5與9.5之間或約8與9之間或約8.5與9之間的pH值。在某些實施例中，陽離子試劑於水性鹽溶液中之濃度經增加或降低以達成8.8之pH值。在某些實施例中，陽離子試劑於水性鹽溶液中之濃度經增加或降低以達成9之pH值。

在另一實施例中，蛋白混合物之蛋白負載經調節至約50 g/L與500 g/L之間或約100 g/L與450 g/L之間或約120 g/L與400 g/L之間或約125 g/L與350 g/L之間或約130 g/L與300 g/L之間或約135 g/L與250 g/L之間或約140 g/L與200 g/L之間或約145 g/L與200 g/L之間或約150 g/L與200 g/L之間或約155 g/L與200 g/L之間或約160 g/L與200 g/L之間的蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約100 g/L之蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約20 g/L之蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約105 g/L之蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約140 g/L之蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約260 g/L之蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約300 g/L之蛋白負載。

在另一實施例中，當水性鹽溶液用作裝載及洗滌緩衝液以自含有蛋白之樣品純化所關注之蛋白（例如抗體）時，陽離子試劑於水性鹽溶液中之濃度以有效減少蛋白或抗體樣品中酸性物質異質性之量約

1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%及前述中之一或多者內之範圍的量增加或降低。

在另一實施例中，陰離子試劑為乙酸鹽、檸檬酸鹽、氯陰離子、硫酸鹽、磷酸鹽或其組合。在某些實施例中，陽離子試劑為鈉、Tris、緩血酸胺、銨陽離子、精胺酸或其組合。

舉例而言但無限制性，如本發明中詳述，當抗體使用包含陰離子交換吸附劑材料、150 g/L之蛋白負載及含有5 mM乙酸鹽/精胺酸之裝載/洗滌緩衝液（pH 8.8）的層析來純化時，抗體製劑中酸性物質之多達60%被移除。

在本發明之另一實施例中，對酸性物質異質性之控制可藉由以下方式來獲得：用陽離子交換（CEX）吸附劑材料及水性鹽溶液在允許所關注之蛋白及非標靶蛋白均結合至CEX吸附劑之裝載條件下自包含蛋白之混合物純化所關注之蛋白，使用與裝載緩衝液相同之緩衝液條件洗掉酸性物質、帶電變異體、分子變異體及雜質，及用具有比裝載緩衝液更高電導率之緩衝液使結合蛋白標靶自CEX吸附劑溶離。在某些實施例中，用作裝載及洗滌緩衝液之水性鹽溶液具有低於所關注之蛋白之等電點（pI）的pH值。

在另一實施例中，純化方法可包括調節水溶液之電導率及/或pH值。在某些實施例中，該等調節將為降低電導率，而在其他實施例中，用以達成對酸性物質異質性之所要控制的必需調節將包括增加裝載電導率。在某些實施例中，該等調節亦將為增加水性鹽溶液之pH值，而在其他實施例中，用以達成對酸性物質異質性之所要控制的必需調節將包括降低水性鹽溶液之pH值。電導率及/或pH值之該等增加及/或降低可具有水性鹽溶液之電導率及/或pH值的1%、5%、10%、15%、20%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%及前述中之一或更多者內之範圍的量值。

在某些實施例中，水性鹽溶液之電導率及pH值係藉由於水性鹽溶液中增加或降低陰離子試劑之濃度且維持陽離子試劑之恆定濃度來調節。在某些實施例中，陽離子試劑係維持在約0.5 mM與500 mM之間或約1 mM與450 mM之間或約5 mM與400 mM之間或約10 mM與350 mM之間或約15 mM與300 mM之間或約20 mM與250 mM之間或約25 mM與200 mM之間或約30 mM與150 mM之間或約35 mM與100 mM之間或約40 mM與50 mM之間的濃度下。在某些實施例中，陰離子試劑係維持在約15 mM或約20 mM或約25 mM或約30 mM或約35 mM或約40 mM或約45 mM或約50 mM或約60 mM或約65 mM或約75 mM或約90 mM或約115 mM或約120 mM或約125 mM或約135 mM或約140 mM或約145 mM或約150 mM或約175 mM或約250 mM或約275 mM或約300 mM或約350 mM或約375 mM或約400 mM之濃度下。

在某些實施例中，陰離子試劑於水性鹽溶液中之濃度經增加或降低以達成約2與12之間或約2.5與11.5之間或約3與11之間或約3.5與10.5之間或約4與10之間或約4.5與9.5之間或約5與9之間或約5.5與8.5之間或約6與8之間或約6.5與7.5之間的pH值。在某些實施例中，陰離子試劑於水性鹽溶液中之濃度經增加或降低以達成5或5.5或6或6.5或6.8或7.5之pH值。

在某些實施例中，蛋白混合物之蛋白負載經調節至約50與500 g/L之間或約100與450 g/L之間或約120與400 g/L之間或約125與350 g/L之間或約130與300 g/L之間或約135與250 g/L之間或約140與200 g/L之間或約145與150 g/L之間的蛋白負載。在某些實施例中，蛋白或抗體混合物之蛋白負載經調節至約40 g/L之蛋白負載。

在某些實施例中，當水性鹽溶液用作裝載及洗滌緩衝液以自含有

蛋白之樣品純化所關注之蛋白（例如抗體）時，陰離子試劑於水性鹽溶液中之濃度以有效減少蛋白或抗體樣品中酸性物質異質性之量約1%、1.2%、1.5%、2%、2.2%、2.5%、3%、3.2%、3.5%、4%、4.2%、4.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%及前述中之一或多者內之範圍的量增加或降低。

在某些實施例中，陽離子試劑為鈉、Tris、緩血酸胺、銨陽離子、精胺酸或其組合。在某些實施例中，陰離子試劑為乙酸鹽、檸檬酸鹽、氯陰離子、硫酸鹽、磷酸鹽或其組合。

舉例而言但無限制性，如本發明中詳述，抗體製劑中酸性物質之存在在使用陽離子交換吸附劑材料及包含140 mM Tris之裝載及洗滌緩衝液（pH 7.5）純化之後自起始物質減少6.5%。

除非本文中另外定義，否則本文中所用之科學及技術術語具有一般技術者通常所理解之含義。若發生任何潛在分歧，則本文中所提供之定義優先於任何辭典或外來定義。除非另外為情形所需，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。除非另外說明，否則使用「或」意謂「及/或」。使用術語「包括（including）」以及其他形式（諸如「包括（includes）」及「包括（included）」）不具限制性。

一般而言，本文中所述之與細胞與組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白與核酸化學及雜交結合使用的命名法為在此項技術中熟知且常用之命名法。除非另外指明，否則本文中所提供之方法及技術一般根據此項技術中熟知之習知方法且如本說明書通篇引用及論述之各種一般及更特定參考文獻中所述來進行。酶促反應及純化技術係根據製造商之說明書如此項技術中通常所實現或如本文中所述來進行。本文中所述之與分析化學、合成有機化學及藥物與醫藥化學結合使用的命名法及其實驗室程序及技術為在此項技術中熟知

且常用者。標準技術用於化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及傳遞及治療患者。

下文定義選擇術語以使得本發明可更容易得到理解。

術語「抗體」係指免疫球蛋白（Ig）分子，其一般包含四個多肽鏈，即兩個重（H）鏈及兩個輕（L）鏈；或其保持Ig分子之抗原決定基結合特徵之功能片段、突變體、變異體或衍生物。該等片段、突變體、變異體或衍生物抗體形式在此項技術中已知。在全長抗體之一實施例中，各重鏈包含重鏈可變區（VH）及重鏈恆定區（CH）。重鏈可變區（域）在本發明中亦命名為VDH。CH包含三個域，即CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區（VL）及輕鏈恆定區（CL）。CL包含單一CL域。輕鏈可變區（域）在本發明中亦命名為VDL。VH及VL可進一步再分為高變之區，稱為互補決定區（CDR），與更保守之區（稱為構架區（FR））穿插。一般而言，各VH及VL由按以下次序自氨基末端至羧基末端排列之三個CDR及四個FR組成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。免疫球蛋白分子可具有任何類型（例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY）、類別（例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2）或子類別。

如本文中所用，術語抗體之「抗原結合部分」（或「抗體部分」）係指抗體之一或多個保持特異性結合至抗原（例如hTNF- α ）之能力的片段。已展示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段來進行。術語抗體之「抗原結合部分」內涵蓋之結合片段的實例包括（i）Fab片段，由VL、VH、CL及CH I域組成之單價片段；（ii）F(ab')₂片段，包含兩個在鉸鏈區由二硫橋鍵連接之Fab片段之二價片段；（iii）由VH及CH1域組成之Fd片段；（iv）由抗體之單一臂之VL及VH域組成之Fv片段；（v）dAb片段（Ward等人，(1989) Nature 341:544-546），其由VH域組成；及（vi）經分離之互補決定區（CDR）。此外，儘管Fv片段之兩個域VL

及VH由各別基因編碼，但其可使用重組方法藉由使其能夠以單一蛋白鏈形式製造的合成連接子接合，其中VL及VH區配對以形成單價分子（稱為單鏈Fv（scFv）；參見例如Bird等人（1988）*Science* 242:423-426及Huston等人（1988）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883）。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特異性抗體，其中VH及VL域表現於單一多肽鏈上，但使用太短以致不允許兩個域之間於同一鏈上配對的連接子，從而迫使域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點（參見例如Holliger, P.等人，(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak, R. J.等人，(1994) *Structure* 2:1121-1123）。

如本文中所用，術語「人類抗體」意欲包括具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變及恆定區之抗體。本發明之人類抗體可例如於CDR中且尤其於CDR3中包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基（例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變）。

如本文中所用，術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組方法製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體；自重組組合人類抗體庫分離之抗體；自關於人類免疫球蛋白基因轉基因之動物（例如小鼠）分離之抗體（參見例如Taylor, L. D.等人，(1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295）；或藉由任何其他方法製備、表現、產生或分離之抗體，該等其他方法包括將人類免疫球蛋白基因序列拼接至其他DNA序列。該等重組人類抗體具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變及恆定區。然而，在某些實施例中，該等重組人類抗體可經受活體外突變誘發（或當使用人類Ig序列之動物轉殖基因時，為活體內體細胞突變誘發），且因此重組

抗體之VH及VL區之胺基酸序列雖然衍生自且關於人類生殖系VH及VL序列，但該等胺基酸序列為可不活體內天然存在於人類抗體生殖系抗體庫內之序列。

如本文中所用，術語「表面電漿子共振」係指允許藉由例如使用BIAcore系統（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.）偵測生物感測器基體內之蛋白濃度變化來分析即時生物特異性相互作用的光學現象。關於進一步描述，參見實例1及Jonsson, U.等人, (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26；Jonsson, U.等人, (1991) Biotechniques 11:620-627；Johnsson, B.等人, (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131；及Johnnson, B.等人, (1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

術語「生物活性」係指分子之任一或多種生物性質（如活體內發現般天然存在抑或藉由重組方法提供或實現）。生物性質包括但不限於結合受體或受體配位體、誘導細胞增殖、抑制細胞生長、誘導其他細胞介素、誘導細胞凋亡及酶促活性。

術語「中和」係指當結合蛋白特異性結合至抗原/配位體時抵消抗原/配位體之生物活性。在一實施例中，中和結合蛋白結合至抗原/配位體（例如細胞介素）且降低其生物活性至少約20%、40%、60%、80%、85%或85%以上。

「特異性」係指結合蛋白選擇性結合抗原/配位體之能力。

「親和力」為結合蛋白與抗原/配位體之間的相互作用之強度，且係藉由結合蛋白之結合域之序列以及藉由抗原/配位體之性質（諸如尺寸/形狀及/或電荷）來測定。結合蛋白之親和力可經選擇以提供所要治療端點同時使負面副作用減至最少。親和力可使用熟習此項技術者已知之方法來量測（US 20090311253）。

術語「效能」係指結合蛋白達成所要作用之能力，且為其治療功

效之量度。效能可使用熟習此項技術者已知之方法來評估（US 20090311253）。

術語「交叉反應性」係指結合蛋白結合除其所針對之標靶外之標靶的能力。一般而言，結合蛋白將以適當高親和力結合其標靶組織/抗原，但對於非標靶正常組織將呈現適當低親和力。個別結合蛋白一般經選擇以滿足兩個準則。(1)組織染色適於抗體標靶之已知表現。(2)人類與有毒物種（小鼠及食蟹獼猴）來自相同器官之組織之間有相似染色模式。評估交叉反應性之此等及其他方法為熟習此項技術者所已知（US 20090311253）。

術語「生物功能」係指結合蛋白之特異性活體外或活體內作用。結合蛋白可靶向抗原/配位體之若干類別，且經由多種作用機制達成所要治療結果。結合蛋白可靶向可溶蛋白、細胞表面抗原以及細胞外蛋白沈積物。結合蛋白可促效、拮抗或中和其標靶之活性。結合蛋白可幫助清除其結合之標靶，或可在結合至細胞時產生細胞毒性。兩種或兩種以上抗體之部分可合併為多價形式以於單一結合蛋白分子中達成相異功能。用於評估生物功能之活體外分析及活體內模型為熟習此項技術者所已知（US 20090311253）。

術語「溶解性」係指蛋白保持分散於水溶液內之能力。蛋白於水性製劑中之溶解性視疏水性及親水性胺基酸殘基之適當分佈而定，且因此溶解性可與恰當地摺疊之蛋白之產生相關。熟習此項技術者將能夠使用為熟習此項技術者所已知之常規HPLC技術及方法偵測結合蛋白溶解性之增加或降低（US 20090311253）。

結合蛋白可使用多種宿主細胞產生或可活體外產生，且每努力相對產率確定「產生效率」。影響產生效率之因素包括但不限於宿主細胞類型（原核或真核）、表現載體之選擇、核苷酸序列之選擇及所採用之方法。結合蛋白產生中所用之物質及方法以及產生效率之量測為熟習

此項技術者所已知 (US 20090311253)。

術語「結合物」係指化學連接至第二化學部分（諸如治療劑或細胞毒性劑）之結合蛋白（諸如抗體）。術語「試劑」包括化合物、化合物之混合物、生物大分子或由生物物質製成之提取物。在一實施例中，治療劑或細胞毒性劑包括但不限於百日咳毒素 (pertussis toxin)、紫杉醇、細胞遲緩素B (cytochalasin B)、短桿菌肽D (gramicidin D)、溴化乙錠、吐根素 (emetine)、絲裂黴素 (mitomycin)、依託泊昔 (etoposide)、特諾波賽 (tenoposide)、長春新鹼 (vincristine)、長春鹼 (vinblastine)、秋水仙鹼 (colchicine)、小紅莓 (doxorubicin)、道諾黴素 (daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神黴素 (mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、1-去氫睪固酮 (1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素 (glucocorticoids)、普魯卡因 (procaine)、四卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、普萘洛爾 (propranolol) 及嘌呤黴素 (puromycin) 及其類似物或同源物。當在免疫分析之情況下使用時，結合抗體可為用作偵測抗體的經可偵測標記之抗體。

術語「載體」係指能夠輸送其已連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」，其係指其他DNA片段可接合之環形雙股DNA環。另一類型之載體為病毒載體，其中其他DNA片段可接合至病毒基因組。其他載體包括RNA載體。某些載體能夠在其被引入之宿主細胞中自主複製（例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體）。其他載體（例如非游離型哺乳動物載體）在引入至宿主細胞中時可整合至宿主細胞之基因組中，且從而與宿主基因組一起複製。某些載體能夠導引其可操作地連接之基因的表現。該等載體在本文中稱為「重組表現載體」（或簡言之「表現載體」）。一般而言，重組DNA技術中所用之表現載體通常呈質體形式。在本發明書中，由於質體為最常

用之載體形式，因此「質體」及「載體」可互換使用。然而，亦包括提供等效功能之其他表現載體形式，諸如病毒載體（例如複製缺陷反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒）。一組pHybE載體（美國專利申請案第61/021,282號）用於親本結合蛋白選殖。

術語「重組宿主細胞」或「宿主細胞」係指已引入外源性DNA之細胞。該等術語不僅係指特定主題細胞，而且係指該種細胞之後代。因為某些修飾可能因突變或環境影響而於後代中發生，所以該後代可能實際上與母體細胞不一致，但仍包括於如本文中所用之術語「宿主細胞」之範疇內。在一實施例中，宿主細胞包括原核及真核細胞。在一實施例中，真核細胞包括原生生物、真菌、植物及動物細胞。在另一實施例中，宿主細胞包括但不限於原核細胞株大腸桿菌 (*E. Coli*)；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2及PER.C6；昆蟲細胞株Sf9；及真菌細胞釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

術語「轉染」涵蓋多種常用於將外源性核酸（例如DNA）引入至宿主細胞中之技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。

術語「細胞介素」係指由一個細胞群體釋放之以細胞間介體形式作用於另一細胞群體上的蛋白。術語「細胞介素」包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白及天然序列細胞介素之生物活性等效物。

術語「生物樣品」意謂一定量之來自活物或先前活物的物質。該等物質包括但不限於血液（例如全血）、血漿、血清、尿液、羊膜液、滑液、內皮細胞、白血球、單核細胞、其他細胞、器官、組織、骨髓、淋巴結及脾臟。

術語「組分」係指組合物之成分。舉例而言，關於診斷套組，組分可為可包括於用於分析測試樣品之套組中的捕捉抗體、偵測或結合

抗體、對照、校準劑、一系列校準劑、敏感度面板、容器、緩衝液、稀釋劑、鹽、酶、酶之輔因子、偵測試劑、預處理試劑/溶液、受質（例如呈溶液形式）、終止溶液及其類似物。因此，「組分」可包括諸如藉由結合至抗分析物（例如抗多肽）抗體而固定於固體載體上之多肽或其他如上所述分析物。一些組分可呈溶液形式或經凍乾以便復原用於分析中。

「對照」係指已知不含分析物（「陰性對照」）或含有分析物（「陽性對照」）之組合物。陽性對照可包含已知濃度之分析物。「對照」、「陽性對照」及「校準劑」在本文中可互換地用於指包含已知濃度之分析物的組合物。「陽性對照」可用於確立分析效能特徵且為試劑（例如分析物）之完整性的適用指示。

術語「Fc區」界定免疫球蛋白重鏈之C末端區，其可藉由完整抗體之番木瓜蛋白酶消化而產生。Fc區可為天然序列Fc區或變異Fc區。免疫球蛋白之Fc區一般包含兩個恆定域，即CH2域及CH3域，且視情況包含CH4域。置換Fc部分中之胺基酸殘基以改變抗體效應功能在此項技術中已知（例如美國專利第5,648,260號及第5,624,821號）。Fc區介導若干重要效應功能，例如細胞介素誘導、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性（ADCC）、吞噬作用、補體依賴性細胞毒性（CDC）及抗體及抗原-抗體複合物之半衰期/清除率。在一些情況下，此等效應功能就治療性免疫球蛋白而言為合乎需要的，但在其他情況下，可能視治療目標而為不必要的或甚至有害的。

術語「Kabat編號」、「Kabat界定」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。此項技術中公認之此等術語係指對抗體或其抗原結合部分之重及輕鏈可變區中比其他胺基酸殘基可變性更大（亦即高變）之胺基酸殘基進行編號的系統（Kabat等人（1971）Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 及 Kabat 等人（1991）Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)。就重鏈可變區而言，高變區範圍就CDR1而言自胺基酸位置31至35，就CDR2而言自胺基酸位置50至65，且就CDR3而言自胺基酸位置95至102。就輕鏈可變區而言，高變區範圍就CDR1而言自胺基酸位置24至34，就CDR2而言自胺基酸位置50至56，且就CDR3而言自胺基酸位置89至97。

術語「CDR」意謂免疫球蛋白可變區序列內之互補決定區。就各重及輕鏈可變區而言，在重鏈及輕鏈之各可變區中存在三個命名為CDR1、CDR2及CDR3之CDR。術語「CDR集」係指存在於能夠結合抗原之單一可變區中的一組三個CDR。此等CDR之精確邊界已根據不同系統不同地界定。Kabat所述之系統(Kabat等人(1987)及(1991))不僅提供適用於抗體之任何可變區之明確殘基編號系統，而且提供界定三個CDR之確切殘基邊界。此等CDR可稱為Kabat CDR。Chothia及合作者(Chothia及Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917；Chothia等人(1989) Nature 342:877-883)發現，Kabat CDR內之某些子部分儘管在胺基酸序列水準方面具有極大多樣性，但取幾乎一致肽主鏈構形。此等子部分命名為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別表示輕鏈及重鏈區。此等區可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。界定與Kabat CDR重疊之CDR的其他邊界已由Padlan(1995) FASEB J. 9:133-139 及 MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45描述。其他CDR邊界界定可不嚴格地遵循本文中系統之一，但仍然將與Kabat CDR重疊，但其可鑒於以下預測或實驗發現而縮短或延長：特定殘基或殘基組或甚至全部CDR不顯著影響抗原結合。本文中所用之方法可利用根據此等系統中任一者界定之CDR，但某些實施例使用Kabat或Chothia界定之CDR。

術語「抗原決定基」意謂由結合蛋白結合之抗原區，例如能夠特

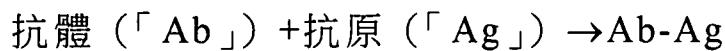
異性結合至免疫球蛋白或T細胞受體之多肽及/或其他決定子。在某些實施例中，抗原決定基決定子包括分子之化學活性表面分組（諸如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或礦醯基），且在某些實施例中，可具有特定三維結構特徵及/或比電荷特徵。在一實施例中，抗原決定基包含已知結合至特異性結合搭配物上之互補位點的抗原區（或其片段）之胺基酸殘基。抗原片段可含有一個以上抗原決定基。在某些實施例中，結合蛋白在其於蛋白及/或大分子之複合混合物中識別其標靶抗原時特異性結合抗原。若抗體交叉競爭（一者阻止另一者之結合或調節作用），則結合蛋白「結合至相同抗原決定基」。另外，抗原決定基之結構界定（重疊、相似、一致）具資訊性；且功能界定涵蓋結構（結合）及功能（調節、競爭）參數。蛋白之不同區可運行不同功能。舉例而言，細胞介素之特定區與其細胞介素受體相互作用以引起受體活化，而蛋白之其他區可為使細胞介素穩定化所需。為消除細胞介素信號傳導之負面作用，細胞介素可用特異性結合至受體相互作用區之結合蛋白來靶向，從而阻止其受體結合。或者，結合蛋白可靶向造成細胞介素穩定化之區，從而指定用於降解之蛋白。對抗原決定基識別進行目測及模型化之方法為熟習此項技術者所已知（US 20090311253）。

「藥物動力學」係指藥物由生物體吸收、分配、代謝及排泄之過程。為產生具有所要藥物動力學概況之多價結合蛋白分子，選擇具有相似所要藥物動力學概況之母體結合蛋白。所選親本結合蛋白之PK概況可使用熟習此項技術者已知之方法於嚙齒動物中容易地測定（US 20090311253）。

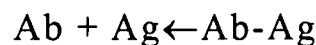
「生物可用性」係指活性藥物在投與之後達至其標靶之量。生物可用性為若干先前所述性質（包括穩定性、溶解性、免疫原性及藥物動力學）之函數，且可使用熟習此項技術者已知之方法來評估（US 20090311253）。



術語「 K_{on} 」意謂結合蛋白（例如抗體）與抗原締合以形成抗體/抗原複合物之結合速率常數。術語「 K_{on} 」亦意謂如本文中可互換使用之「締合速率常數」或「 k_a 」。指示結合蛋白與其標靶抗原之結合速率或結合蛋白（例如抗體）與抗原之間的複合物形成速率之此值亦由以下方程式展示：



如此項技術中已知，術語「 K_{off} 」意謂結合蛋白（例如抗體）自抗體/抗原複合物的解離之離解速率常數或「解離速率常數」。此值指示結合蛋白（例如抗體）自其標靶抗原之解離速率或Ab-Ag複合物隨時間推移分離為游離抗體及抗原，如由以下方程式所示：



術語「 K_d 」及「平衡解離常數」意謂在平衡下於滴定量測中或藉由將解離速率常數（ K_{off} ）除以締合速率常數（ K_{on} ）獲得之值。締合速率常數、解離速率常數及平衡解離常數用於表示結合蛋白（例如抗體）與抗原之結合親和力。測定締合及解離速率常數之方法在此項技術中所熟知。使用基於螢光之技術提供檢查在平衡下生理緩衝液中之樣品的高敏感度及能力。可使用其他實驗方法及儀器，諸如BIAcore®（生物分子相互作用分析）分析（例如可獲自BIAcore International AB，一家GE Healthcare公司，Uppsala, Sweden之儀器）。另外，亦可使用可獲自Sapidyne Instruments（Boise, Idaho）之KinExA®（動力排除分析）分析。

術語「變異體」意謂在胺基酸序列或轉譯後修飾方面不同於既定多肽之多肽。胺基酸序列之差異可藉由以下方式來產生：添加（例如插入）、缺失或保守取代胺基酸，但保持既定多肽之生物活性（例如變異TNF- α 抗體可關於結合至TNF- α 而與抗TNF- α 抗體競爭）。保守取代胺基酸（亦即將胺基酸用具有相似性質（例如帶電區之親水性及程度

及分佈)之不同胺基酸置換)在此項技術中公認為典型地包括微小變化。如此項技術中所理解，此等微小變化可部分藉由考慮胺基酸之親水指數而鑑別(參見例如Kyte等人(1982)J. Mol. Biol. 157: 105-132)。胺基酸之親水指數係基於其疏水性及電荷之考慮。此項技術中已知，蛋白中具有相似親水指數之胺基酸可經取代且蛋白仍保持蛋白功能。在一個態樣中，親水指數為 ± 2 之胺基酸經取代。胺基酸之親水性亦可用於展現將產生保持生物功能之蛋白的取代。在肽之情況下胺基酸親水性之考慮允許計算該肽之最大局部平均親水性，一種已經報導與抗原性及免疫原性相當相關之適用量度(參見例如美國專利第4,554,101號)。如此項技術中所理解，具有相似親水性值之胺基酸的取代可產生保持生物活性(例如免疫原性)之肽。在一個態樣中，取代係用親水性值在彼此之 ± 2 內的胺基酸進行。胺基酸之疏水性指數及親水性值均受該胺基酸之特定側鏈影響。與觀測結果一致，與生物功能相容之胺基酸取代理解為視胺基酸且尤其彼等胺基酸之側鏈之如由疏水性、親水性、電荷、尺寸及其他性質展現的相對相似性而定。術語「變異體」亦包括已諸如藉由蛋白水解、磷酸化或其他轉譯後修飾來區別地處理、但保持其生物活性或抗原反應性(例如結合至TNF- α 之能力)的多肽或其片段。除非另外定義，否則術語「變異體」涵蓋變異體之片段。變異體可與野生型序列具有99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%或75%一致性。

轉譯後修飾之差異可藉由添加一或多個化學基團至經修飾分子之胺基酸或自分子移除一或多個該等基團來實現。修飾之實例可包括但不限於磷酸化、糖基化或MGO修飾。

熟習此項技術者將容易顯而易知，本文中所述之方法之其他適合修改及改編為明顯的且可在不偏離本文中所揭示之實施例之範疇的情



況下使用適合等效物進行。現已詳細描述某些實施例，參考以下實例將更清楚地理解該等實施例，該等實例僅出於說明之目的包括在內且並不意欲具限制性。

實例

實例1：鑑別MGO-mAb之不同形式

在製造阿達木單抗之傳統過程中，抗體表現典型地藉由使用水解物及植物蛋白胰作為原料而進行。如由弱陽離子交換層析方法定義，當阿達木單抗使用化學成分確定之培養基（CDM）以CHO細胞表現時，酸性物質之百分比與由傳統產生過程產生的酸性物質之百分比相比增加。特定言之，如圖1中所示，觀測到兩個相異早期溶離層析峰。標記為Lys 0、Lys 1及Lys 2之峰分別為於重鏈上不具有C末端Lys、具有一個C末端Lys及具有兩個C末端Lys之抗體。頂部跡線來自使用化學成分確定之培養基（CDM）產生之阿達木單抗，且底部跡線來自使用酵母提取物產生之阿達木單抗。於使用CDM之細胞培養物中表現之抗體中觀測到兩個峰，且將其分別由溶離份1及2表示。此等峰為用CDM進行阿達木單抗產生所獨有。隨後使用弱陽離子交換部分分離來分離峰。

藉由還原LC/MS對分離峰之分析關於阿達木單抗重鏈及輕鏈展現預期值之質譜，但其他峰對應於+54 Da及+72 Da之質量增加，具有可能歸因於各別鏈之多個位點處之其他修飾的其他下部強度峰（圖2）。如圖2左圖中所示，觀測到三個主峰，其對應於23408 Da下之輕鏈理論分子量加23462及23480之質量。兩個自理論分子量偏移之峰分別自預期質量發散54及72道爾頓之增加。如圖2右圖中所示，觀測到三個峰，其對應於50637 Da下之重鏈理論分子量加對應於54及72 Da增加之另一質量梯級。就來自溶離份1及2之輕鏈及重鏈兩者而言，觀測到具有此等分子量增加之峰，但顯著地在Lys-0對照中不存在（圖2之底部光

譜)。

隨後藉由肽映射與LC/MS/MS偵測分析峰。將產生54 Da及72 Da之分子量增加的修飾局部化至此肽之特定Arg，且已導致胰蛋白酶錯裂解(圖3)。此觀測結果支持羥基醯亞胺在失水之後轉化為氫咪唑酮之假設。結果表明，修飾局部化至錯裂解之胰蛋白酶肽，其中加合係於精胺酸側鏈上。

基於此等觀測結果，抗體之加合有可能歸因於在存在化學成分確定之培養基(CDM)下生長之細胞培養物中的甲基乙二醛(MGO)積聚。甲基乙二醛修飾精胺酸殘基之反應流程展示於圖4中。MGO與精胺酸側鏈之初始加合導致形成羥基醯亞胺，所觀測之質量增加為+72Da。在脫水為氫咪唑酮之後，所得產物具有+54Da質量增加。

為了證實甲基乙二醛積聚為與早期溶離酸性峰相關之+54 Da及+72 Da質量增加的原因，將抗體在一時程內用合成甲基乙二醛培育且進行分析。WCX-10部分分離用於分離零離胺酸物質，其為僅存在弱陽離子交換層析圖之顯性主峰的阿達木單抗抗體。將0 Lys物質在37°C下在存在2.7 mM MGO下培育歷時五小時之時程。

如圖5中所示，在該時程內，幾乎所有0 Lys均轉化為原始材料中自CDM表現分析所見之兩個相異酸性峰。在相同條件下培育之後不曝露於MGO的離胺酸0亦展示為對照。隨後將來自經MGO處理120分鐘之樣品的峰a及b收集，且藉由LC/MS分析以評估已導致之化學修飾水準。

後續分析經MGO培育之0 Lys物質展示先前觀測之+54 Da及+72 Da質量異質性梯級為阿達木單抗輕鏈及重鏈之質譜中的普遍模式(圖6)。更特定言之，將來自經MGO處理之0 Lys重組抗體物質的峰a及b部分分離，且藉由還原LC/MS分析。頂部圖展示兩個峰之相應輕鏈質譜，且底部圖描繪部分分離峰之重鏈。就兩個溶離份而言，均觀測到對應於+54 Da及+72 Da的鏈之質量異質性。所得修飾與細胞培養物酸

性峰中所見之觀測結果一致，支持修飾歸因於甲基乙二醛之先前資料。因此，酸性偏移0 Lys物質之部分分離隨後LC/MS/MS胰蛋白酶映射證實，精胺酸殘基之MGO修飾為所觀測之加合的原因。

另外，藉由LC/MS/MS將來自兩種細胞培養物及MGO尖峰之酸物質與彼此相比。所得MS/MS光譜展示關於精胺酸殘基處錯裂解（具有MGO加合特徵+54 Da及+72 Da質量增加）高度相當之片段產生概況（圖7）。資料提供以下證實：由使用化學成分確定之培養基產生的酸性峰係歸因於表現之阿達木單抗重組抗體經已積聚於細胞培養生物反應器中之甲基乙二醛的修飾。此外，精胺酸之修飾可影響肽主鏈之片段產生。兩個質譜之間的強相似性進一步支持以下觀點：精胺酸已經歷可能會導致肽主鏈不穩定之修飾。

實例2 與阿達木單抗抗體之甲基乙二醛修飾相關的功能傾向

精胺酸殘基之甲基乙二醛修飾因由向胰蛋白酶之活性位點加合之MGO賦予的立體約束而導致錯裂解。為了更佳定量及測定阿達木單抗初級結構中之所有易受影響之精胺酸殘基，進行內切蛋白酶Lys-C消化，其中精胺酸殘基不再公認為肽映射協議中之標靶受質。使用Sequest演算法針對阿達木單抗之FASTA序列評估所有Lys-C肽。若干位點鑑別為潛在易受影響之位點，但一個具有特定易受影響性之位點在輕鏈之R30處鑑別出。阿達木單抗D2E7之輕鏈及重鏈之序列分別命名為SEQ ID No. 1及SEQ ID No. 2。所有潛在易受影響之精胺酸殘基的清單均展示於表1中。不同位點可具有不同的易受MGO修飾影響之水準。並非所有位點均必須由MGO於單一分子中修飾。表2列出阿達木單抗上易受甲基乙二醛修飾之肽片段。

表1 阿達木單抗中MGO修飾之潛在位點

Ab鏈類型	阿達木單抗輕鏈 (SEQ ID No. 1)	阿達木單抗重鏈 (SEQ ID No. 2)
精胺酸位點	精胺酸30 精胺酸93 精胺酸108	精胺酸16 精胺酸259 精胺酸359 精胺酸420

表2. 易受甲基乙二醛修飾之肽的清單

序列	活化 類型	修飾	電 荷	m/z [Da]	MH+ [Da]	RT [min]	MS 次序
EPQVYTLPPSrDEL TK	HCD	R11(MGO(R)72)	2	972.9988	1944.99	27.71	MS2
EPQVYTLPPSrDEL TK	CID	R11(MGO(R)72)	3	649.0014	1944.99	27.72	MS2
EPQVYTLPPSrDEL TK	CID	R11(MGO)	3	642.9988	1926.982	27.81	MS2
EPQVYTLPPSrDEL TK	HCD	R11(MGO)	3	642.9988	1926.982	27.82	MS2
EPQVYTLPPSrDEL TK	CID	R11(MGO)	2	963.9942	1926.981	27.88	MS2
EPQVYTLPPSrDEL TK	HCD	R11(MGO)	2	963.9942	1926.981	27.89	MS2
EVQLVESGGGLVQPGGrSLR	CID	R16(MGO(R)72)	2	1027.055	2053.103	32	MS2
EVQLVESGGGLVQPGGrSLR	HCD	R16(MGO(R)72)	2	1027.055	2053.103	32.01	MS2
EVQLVESGGGLVQPGGrSLR	CID	R16(MGO)	3	679.0353	2035.091	32.11	MS2
EVQLVESGGGLVQPGGrSLR	CID	R16(MGO)	2	1018.05	2035.092	32.13	MS2
EVQLVESGGGLVQPGGrSLR	HCD	R16(MGO) R18(MGO)	2	1018.05	2035.092	32.15	MS2
DIQMTQSPSSLSASVGDrVTITcR	HCD	C23(羧甲基)	3	888.7587	2664.261	35.6	MS2
DIQMTQSPSSLSASVGDrVTITcR	HCD	R18(MGO), C23(羧甲基)	3	888.7583	2664.26	36.63	MS2
YNrAPYTFGQGTK	CID	R3(MGO(R)72)	2	787.8835	1574.76	17.61	MS2
YNrAPYTFGQGTK	HCD	R3(MGO(R)72)	2	787.8835	1574.76	17.62	MS2
YNrAPYTFGQGTK	CID	R3(MGO(R)72)	3	525.5911	1574.759	17.63	MS2
YNrAPYTFGQGTK	HCD	R3(MGO(R)72)	3	525.5911	1574.759	17.64	MS2
YNrAPYTFGQGTKVEIK	CID	R3(MGO(R)72) R3(MGO(R)72),	2	1022.461	2043.916	46.16	MS2
SLrLScAASGFTFDDYAMHWVR	CID	C6(羧甲基)	3	888.4062	2663.204	49.36	MS2
SLrLScAASGFTFDDYAMHWVR	HCD	R3(MGO(R)72), C6(羧甲基)	3	888.4062	2663.204	49.38	MS2

YNrAPYTFGQGTK	CID	R3(MGO)	2	778.8782	1556.749	17.49	MS2
YNrAPYTFGQGTK	HCD	R3(MGO)	2	778.8782	1556.749	17.5	MS2
YNrAPYTFGQGTK	CID	R3(MGO)	3	519.5878	1556.749	17.56	MS2
YNrAPYTFGQGTK	HCD	R3(MGO)	3	519.5878	1556.749	17.57	MS2
SFNrGEc	HCD	R4(MGO) , C7(羧甲基)	2	462.8614	924.7156	5.29	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	CID	R6(MGO(R)72)	3	727.3791	2180.123	32.15	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	HCD	R6(MGO(R)72)	3	727.3791	2180.123	32.16	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	CID	R6(MGO(R)72)	2	1090.566	2180.125	32.2	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	HCD	R6(MGO(R)72)	2	1090.566	2180.125	32.21	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	CID	R6(MGO)	3	721.3756	2162.112	31.52	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	HCD	R6(MGO)	3	721.3756	2162.112	31.53	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	CID	R6(MGO)	2	1081.561	2162.115	31.55	MS2
ASQGIrNYLAWYQQKPGK	HCD	R6(MGO)	2	1081.561	2162.115	31.56	MS2
DTLMISrTPEVTcVVVDVSCHEDPEVK	CID	R7(MGO(R)72) , C13(羧甲基)	3	1010.155	3028.451	44.42	MS2
DTLMISrTPEVTcVVVDVSCHEDPEVK	HCD	R7(MGO(R)72) , C13(羧甲基)	3	1010.155	3028.451	44.43	MS2
DTLMISrTPEVTcVVVDVSCHEDPEVK	CID	R7(MGO(R)72) , C13(羧甲基)	3	1004.152	3010.442	44.14	MS2
DTLMISrTPEVTcVVVDVSCHEDPEVK	HCD	R7(MGO(R)72) , C13(羧甲基)	3	1004.152	3010.442	44.15	MS2

與其同源結合搭配物TNF- α 複合的阿達木單抗Fab單元之晶體結構顯示，R30緊密包含於CDR1與抗原表面之間的接觸表面中（圖8）。圖展示精胺酸30突出至TNF- α 結構（由箭頭指示）中之側鏈（由箭頭指示）。此側鏈經MGO之修飾將導致形成在側鏈之鈎末端處起始且進一步穿透至TNF- α 結構中之五員環。MGO修飾因此可能會因立體約束而妨礙阿達木單抗結合TNF- α 之能力。

為了進一步闡明與阿達木單抗及因MGO於使用化學成分確定之培養基的細胞培養物表現中之積聚所致之化學修飾相關的任何功能傾向，使用弱陽離子交換層析分離經增濃MGO修飾之溶離份。亦獲得純

0 Lys溶離份之對照溶離份。藉由表面電漿子共振分析兩個溶離份以計算TNF- α 與固定抗體之締合及解離速率。經MGO修飾之阿達木單抗與0 Lys對照相比觀測到三倍降低(圖9)。因此，似乎輕鏈之精胺酸30(R30)之甲基乙二醛修飾向受影響之阿達木單抗藥物群體賦予功能傾向。此等資料支持以下假設：輕鏈之精胺酸30之側鏈上的化學修飾誘導立體干擾CDR1及TNF- α 結合表面，此可能會導致阿達木單抗效能顯著下降。因此，需要減少阿達木單抗藥物或藥品中的抗體之此修飾形式之量。

實例3 使用AEX及/或CEX策略移除經甲基乙二醛修飾之阿達木單抗

使用層析策略以移除WCX到10層析圖上之早期溶離酸性區。在進行移除過程之後，產生不含此區之阿達木單抗藥物。如本文中所揭示，化學成分確定之培養基中阿達木單抗之表現可由於積聚MGO加合至受影響之精胺酸殘基之帶正電鈦基團而造成溶離於此酸性區中之物質增加。所揭示之層析策略有助於澄清阿達木單抗製劑之此功能傾向。所得阿達木單抗BDS不含或實質上不含甲基乙二醛修飾之負面影響且正常結合至其標靶(TNF- α)。

使用陽離子交換層析(CEX)、陰離子交換層析(AEX)抑或兩者來純化蛋白之決定主要基於蛋白之總電荷。因此，利用陰離子交換步驟隨後使用陽離子交換步驟或利用陽離子交換步驟隨後使用陰離子交換步驟在本發明之範疇內。此外，僅利用陽離子交換步驟、僅利用陰離子交換步驟或利用兩者之任何連續組合在本發明之範疇內。

在進行分離時，可藉由使用多種技術中任一者(例如使用分批純化技術或層析技術)使初始蛋白混合物與離子交換物質接觸。

舉例而言，將離子交換層析用作純化技術以將經MGO修飾之形式與非經MGO修飾之形式分離。離子交換層析基於分子之總電荷之間的

差異分離分子。在抗體之情況下，抗體具有與連接至離子交換物質（例如樹脂）之官能基之電荷相反的電荷，以便結合。舉例而言，抗體（一般於pH值低於其pI之緩衝液中具有總正電荷）將較佳結合至陽離子交換物質（含有帶負電官能基）。

在離子交換層析中，溶質表面上之帶電片由連接至層析基體之相反電荷吸引，限制條件為周圍緩衝液之離子強度較低。一般藉由增加緩衝液之離子強度（亦即電導率）以與溶質關於離子交換基體之帶電位點競爭來達成溶離。改變溶質之pH值且從而改變電荷為達成溶質溶離之另一方式。電導率及/或pH值變化可為逐漸（梯度溶離）或逐步的。

實例3.1 使用AEX移除經甲基乙二醛修飾之阿達木單抗

此處描述一種自過程及產物相關之雜質純化標靶蛋白產物的方法。特定言之，提供一種減少產物相關之電荷變異體（亦即酸性及鹼性物質）的方法。該方法包括使過程混合物與陰離子交換（AEX）吸附劑於水性鹽溶液中在允許標靶及非標靶蛋白均結合至AEX吸附劑之裝載條件下接觸，及使過量標靶分子通過管柱，及隨後用平衡（亦即預裝載）條件下所用之相同水性鹽溶液之洗液回收結合標靶蛋白。

源物質-此研究中所用之抗體係衍生自採用化學成分確定之培養基（CDM）及水解物培養基兩者的細胞培養條件。經由親和層析（蛋白-A，GE MabSuRe）自澄清之收集物捕捉抗體，其中溶離液於pH值約為4.2的約20 mM乙酸之緩衝液系統中。

誘導之pH值梯度陰離子交換層析-將POROS 50PI（Applied生物系統）樹脂填充於1.0 cm×10.0 cm（OmniFit）管柱中。使管柱於含有乙酸鹽作為陰離子及緩血酸胺（Tris）或精胺酸作為陽離子之二組分緩衝液中平衡。在此等實驗中，將陰離子（亦即乙酸鹽）濃度保持恆定，且添加陽離子（Tris/精胺酸）以達成所要pH值。最初在無蛋白之情況下，藉由用pH 9.0之乙酸鹽/Tris或乙酸鹽/精胺酸緩衝液平衡管柱，隨

後pH 7.0之等效緩衝液之步進變化，進行誘導之pH值梯度。在無蛋白之情況下進行的誘導之pH值梯度係在5 mM、10 mM、20 mM及30 mM之受控乙酸鹽濃度下操作。

隨後將POROS 50PI管柱以含20 g/L D2E7之5 mM乙酸鹽/Tris（或精胺酸）(pH 9.0)裝載，隨後為10管柱體積(CV)等濃度洗液，且隨後以操作緩衝液至5 mM乙酸鹽/Tris（或精胺酸）(pH 7.0)之步進變化進行誘導之pH值梯度溶離。隨後將管柱更新(5 CV之100 mM乙酸鹽+1 M NaCl)，原地清潔(3 CV之1 M NaOH，60分鐘保持)，且儲存(5 CV之20%乙醇)。在溶離期間，將管柱流出物部分分離成 $0.5 \times CV$ ，且藉由UV280、WCX-10及SEC分析(如下描述)。藉由將上文所述之源物質用Milli-Q水稀釋至5 mM乙酸鹽且用精胺酸滴定至所要pH值來製備D2E7 AEX-裝載。

流動通過性陰離子交換層析-使用誘導之pH值梯度結果，選擇操作pH值以按流動通過性模式操作POROS 50PI管柱。選擇pH值(例如pH 8.8)以使酸性物質與離胺酸變異體之間的離析最佳化。首次操作係藉由以下方式進行：裝載150 g/L於5 mM乙酸鹽/精胺酸pH 8.8緩衝液系統中，隨後為20 CV等濃度洗液。將FTW溶離份自50-150 mAU收集，且藉由UV280、WCX-10及SEC分析。來自此操作之結果展示於表3中。此操作能夠減少酸性物質60%且以約68%回收率移除幾乎所有可偵測高分子量物質(亦即聚集物)。

表3 因AEX所致之酸性物質及聚集物減少

AEX Poros 50PI，150 g/L FT，5 mM乙酸鹽/精胺酸pH 8.8	酸性物質		SEC		
	AR1+2	LysSurn	HMW	Mono	LMW
AEX負載(t=0)	17.805	81.685	1.704	97.947	0.343
AEX負載(t=10天，4°C)	19.711	79.746	1.975	97.831	0.194
AEX FTW(t=0)	7.085	92.108	0.019	99.889	0.092
AEX FTW(t=10天，4°C)	8.069	91.773	0.04	99.853	0.107

此處呈現之資料展示一種藉由以下方式自產物相關之雜質（亦即電荷變異體及分子量變異體）精細純化D2E7的方法：將過程流在允許標靶及非標靶蛋白均結合至AEX吸附劑之水性鹽條件（亦即低電導率及高pH值）下裝載至陰離子交換吸附劑，及使過量標靶分子通過管柱，及隨後用平衡（亦即預裝載）條件下所用之相同水性鹽溶液之洗液回收結合標靶蛋白。

實例3.2 使用CEX移除經甲基乙二醛修飾之阿達木單抗

此實例描述一種自過程及產物相關之雜質純化標靶蛋白產物的方法，其藉由使用陽離子交換（CEX）技術進行。特定言之，揭示一種減少標靶分子之產物相關之電荷變異體（亦即酸性物質）的可逆結合方法。舉例而言，該方法可包括以下步驟中之些或所有。

在一個步驟中，使過程混合物與陽離子交換（CEX）吸附劑於具有一pH值及電導率之受控水性緩衝溶液中在允許標靶及非標靶蛋白均結合至CEX吸附劑之裝載條件下接觸。裝載緩衝液之pH值低於抗體分子之pI。

在另一步驟中，使用與裝載緩衝液相同之緩衝液條件洗掉帶電變異體、分子變異體及雜質。隨後可將產物用具有比裝載緩衝液之電導率更高之電導率的緩衝液溶離。

在此實例中，使用三種抗體分子。阿達木單抗抗體係獲自AY04製造過程中之濃縮fractogel溶離液及CDM 300 L按比例增大操作之蛋白A溶離液。將其緩衝液交換至作為CEX裝載物質之29 mM Tris-乙酸鹽緩衝液（pH 7.5）中。

將Poros XS (Applied Biosystems) 強CEX樹脂、CM Hyper D (Pall) 弱CEX樹脂、Nuvia S (Bio-Rad) 強樹脂及GigaCap S 650 (Tosoh Biosciences) 強樹脂填充於 $1.0\text{ cm} \times 10.0\text{ cm}$ (OmniFit) 管柱中。使管柱於具有適當pH值及電導率之緩衝液系統中平衡。於平衡緩衝液中製

備管柱裝載，且將其在40 g蛋白/公升樹脂下裝載於管柱上，隨後用20 CV之平衡緩衝液洗滌。將抗體產物用150 mM氯化鈉及30 mM Tris-乙酸鹽緩衝溶液溶離出。將1 M NaCl用於管柱更新，且將1 M NaOH溶液用於管柱清潔。

在不同pH值及電導率下評估四種緩衝液/鹽系統，氯化鈉/Tris-乙酸鹽、Tris-乙酸鹽、硫酸銨/Tris-乙酸鹽及精胺酸/Tris-乙酸鹽。緩衝液條件列於表4中。

表4. 緩衝液條件

樹脂	緩衝液	pH值	電導率
Poros XS (強)	Tris-乙酸鹽	7.5、6.5、5.5	每種pH值下3種電導率
	氯化鈉	7.5、6.5、5.5	每種pH值下3種電導率
	硫酸銨	7.5	每種pH值下3種電導率
CM Hyper D (弱)	Tris-乙酸鹽	7.5	3種電導率
	氯化鈉	7.5、6.8、6.0	每種pH值下3種電導率
	硫酸銨	7.5	3種電導率
Nuvia S (強)	Tris-乙酸鹽	7.5	3種電導率
	氯化鈉		3種電導率
	硫酸銨		3種電導率
GigaCap S 650	Tris-乙酸鹽	7.5	3種電導率

使用阿達木單抗用Tris-乙酸鹽緩衝液系統執行可逆結合模式。裝載使用pH 7.5之緩衝液及145 mM之Tris濃度與40 g蛋白/公升樹脂。將管柱洗液部分分離。藉由UV280、WCX-10及SEC分析來分析洗液溶離份及溶離彙集物。層析圖展示於圖11中。

實例4 阿達木單抗中因Poros XS樹脂所致之電荷變異體減少

在此實例中，評估不同樹脂及緩衝液條件。起始物質含有14%總AR及3% AR1。就酸性物質移除而言，藉由改變樹脂及緩衝液條件進行實驗。結果描述於以下部分中。

於Poros XS樹脂上使用NaCl(用以改變電導率)與固定29 mM Tris-乙酸鹽緩衝液(用於pH值控制)進行實驗。測試三種pH值水準，即pH 7.5、6.8及6.0。將各pH值在各電導率(其中改變NaCl之量)下進行研究。如圖12中所示，酸性物質可經移除3%，產率為90%。為了進一步減少酸性物質，所達成之產率在不同緩衝液條件下不同。在pH 7.5及45 mM NaCl下，酸性物質之量減少6.8%，阿達木單抗產率為75%。如表5中所示，AR1在72%之阿達木單抗產率下顯著減少至約零百分比，且在80%以上之阿達木單抗產率下顯著減少至少於0.5%。將管柱洗液部分分離，且藉由與溶離液相鄰之次序指定為溶離份1至溶離份5。基於各溶離份之結果計算AR1、AR2、Lys總和相較於產率。

表5. 因CEX所致之AR1移除相較於產率

洗液溶離份	%AR1	%AR2	%Lys總和	產率 (%)
裝載	2.9	12.1	84.3	n/a
溶離液	0	7.8	92.2	72
溶離液+溶離份1	0.3	8.8	91.0	79
溶離液+溶離份1+溶離份2	0.6	9.6	89.8	83
溶離液+溶離份1+溶離份2+溶離份3	1.6	10	88.4	88
溶離液+溶離份1+溶離份2+溶離份3+_溶離份4	2.2	10.9	86.8	92
溶離液+溶離份1+溶離份2+溶離份3+_溶離份4+溶離份5	2.9	11	86.1	93

總之，揭示自產物相關之雜質(亦即電荷變異體及分子量變異體)純化阿達木單抗的方法。更特定言之，可將過程流在允許標靶蛋白及雜質均結合至CEX吸附劑之適當水性條件下裝載至陽離子交換吸附劑，其中裝載及洗滌緩衝液之pH值及電導率低於標靶蛋白之pI。隨後可藉由使用與裝載緩衝液相同之洗滌緩衝液洗掉酸性物質及其他雜質。最後，可藉由使用高電導率水溶液回收結合標靶蛋白。

本發明之範疇不由本文中所述之特定實施例限制。實際上，根據前述描述及附圖，除了本文中所述者之外，本發明之各種修改對熟習此項技術者而言亦將變得顯而易見。該等修改意欲屬於本發明及申請專利範圍之範疇內。

參考文獻

可於本申請案通篇引用或列於以下之所有引用之參考文獻（包括文獻參考文獻、專利、專利申請案及網站）的內容均據此明確以全文引用的方式併入本發明中用於任何目的。除非另外指明，否則本發明可利用免疫學、分子生物學及細胞生物學之在此項技術中熟知的習知技術。

本發明亦以全文引用的方式將分子生物學及藥物傳遞之領域中熟知的技術併入。此等技術包括但不限於以下公開案中所述之技術：

1. Awdeh, Z.L., A.R. Williamson及B.A. Askonas, *One cell-one immunoglobulin. Origin of limited heterogeneity of myeloma proteins.* Biochem J, 1970. **116**(2): 第241-8頁。
2. Liu, H.等人, *Heterogeneity of monoclonal antibodies.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(7): 第2426-2447頁。
3. Vlasak, J.及R. Ionescu, *Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods.* Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008. **9**(6): 第468-481頁。
4. Manning, M.等人, *Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update.* Pharmaceutical Research, 2010. **27**(4): 第544-575頁。
5. Mizuuchi, T.等人, Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G. J Immunol, 1982. **129**(5): 第2016-20頁。
6. Parekh, R.B.等人, Association of rheumatoid arthritis and



primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 1985. **316**(6027): 第452-7頁。

7. Jefferis, R., *Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics*. *Biotechnology Progress*, 2005. **21**(1): 第11-16頁。

8. Reed J, H., Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture. *Journal of Chromatography A*, 1995. **705**(1): 第129-134頁。

9. Johnson, K.A. 等人, Cation exchange HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Analytical Biochemistry*, 2007. **360**(1): 第75-83頁。

10. Moorhouse, K.G.等人, Validation of an HPLC method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody IDEC-C2B8 after papain digestion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997. **16**(4): 第593-603頁。

11. Harris, R.J.等人, *Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. **752**(2): 第233-245頁。

12. Huang, L.等人, *In Vivo Deamidation Characterization of Monoclonal Antibody by LC/MS/MS*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(5): 第1432-1439頁。

13. Gaza-Bulseco, G.等人, Characterization of the glycosylation state of a recombinant monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008. **862**(1-2): 第155-60頁. 2007年12月8日電子出版。

14. Zhang, W.及M.J. Czuprynski, *Free Sulfhydryl in Recombinant*

Monoclonal Antibodies. Biotechnology Progress, 2002. 18(3): 第 509-513頁。

15. Chumsae, C., G. Gaza-Bulseco 及 H. Liu, Identification and localization of unpaired cysteine residues in monoclonal antibodies by fluorescence labeling and mass spectrometry. Anal Chem, 2009. 81(15): 第6449-57頁。

16. Xiang, T., C. Chumsae 及 H. Liu, Localization and Quantitation of Free Sulfhydryl in Recombinant Monoclonal Antibodies by Differential Labeling with ^{12}C and ^{13}C Iodoacetic Acid and LC $\ddot{\text{A}}$ 'MS Analysis. Analytical Chemistry, 2009. 81(19): 第8101-8108頁。

17. Ren, D. 等人, Reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments. Journal of Chromatography A, 2008. 1179(2): 第198-204頁。

18. Jakubowski, H., *Protein N-homocysteinylation: implications for atherosclerosis.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2001. 55(8): 第 443-447頁。

19. Chumsae, C. 等人, Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. Journal of Chromatography B, 2007. 850(1-2): 第 285-294頁。

20. Zhang, B. 等人, Unveiling a Glycation Hot Spot in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody. Analytical Chemistry, 2008. 80(7): 第2379-2390頁。

21. Quan, C. 等人, A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it

affects charge-based behavior. Analytical Biochemistry, 2008. 373(2): 第179-191頁。

22. Cordoba, A.J.等人, *Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution*. Journal of Chromatography B, 2005. 818(2): 第115-121頁。

23. Liu, H., G. Gaza-Bulseco及E. Lundell, *Assessment of antibody fragmentation by reversed-phase liquid chromatography and mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. 876(1): 第13-23頁. 2008年10月15日電子出版。

24. 美國專利第6,090,382號。

等效物

本發明可在不偏離其精神或本質特徵之情況下以其他特定形式來實施。前述實施例因此在所有態樣中均欲視為說明性而非限制本發明。本發明之範疇因此由所附申請專利範圍而非由前述描述來指示，且具有申請專利範圍等效性之含義及範圍內的所有變化因此均意欲包括於本文中。

【符號說明】

無

序列表

<110> 克里斯 M 邱姆薩

<120> 結合人類TNF- α 之人類抗體及其製備方法

<130> 555357

<150> 61/777,883

<151> 2013-03-12

<150> 14/078,181

<151> 2013-11-12

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

201520227

LATH-20140305-2 - 555364 BBI-394TW - xxx AR Humira MGO SEQ_ST25 - Chinese Translation
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 451
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

201520227

LATH-20140305-2 - 555364 BBI-394TW - xxx AR Humira MGO SEQ_ST25 - Chinese Translation
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

20152027

LATH-20140305-2 - 555364 BBI-394TW - xxx AR Humira MGO SEQ_ST25 - Chinese Translation
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

申請專利範圍

1. 一種組合物，其包含能夠結合TNF- α 之結合蛋白，其中該結合蛋白包含至少一種易受甲基乙二醛（MGO）影響之胺基酸，且其中該結合蛋白之至少一部分包含一或多種經MGO修飾之胺基酸。
2. 如請求項1之組合物，其中該結合蛋白之包含至少一種經MGO修飾之胺基酸的該部分少於12%。
3. 如請求項1之組合物，其中該結合蛋白之包含至少一種經MGO修飾之胺基酸的該部分少於6%。
4. 如請求項1之組合物，其中該易受MGO影響之胺基酸為精胺酸。
5. 如請求項1至4中任一項之組合物，其中該結合蛋白為人類抗體或其抗原結合部分，其中該結合蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF- α 解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定，且其中該結合蛋白在標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF- α 細胞毒性。
6. 一種組合物，其包含能夠結合TNF- α 之結合蛋白，該結合蛋白包含易受甲基乙二醛（MGO）影響之胺基酸，其中該組合物係藉由實質上移除該結合蛋白之包含至少一種經MGO修飾之胺基酸的分子來製備。
7. 如請求項6之組合物，其中包含至少一種經MGO修飾之胺基酸的該等分子之70%以上經移除。
8. 如請求項6之組合物，其中包含至少一種經MGO修飾之胺基酸的該等分子之90%以上經移除。
9. 如請求項6之組合物，其中該易受MGO影響之胺基酸為精胺酸。
10. 如請求項6至9中任一項之組合物，其中該結合蛋白為人類抗體或

其抗原結合部分，其中該結合蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 1×10^{-3} s⁻¹或 1×10^{-3} s⁻¹以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF-α解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定，且其中該結合蛋白在標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF-α細胞毒性。

11. 一種純化包含標靶蛋白之組合物的方法，該方法包含：
 - (a) 使用裝載緩衝液將該組合物裝載至陽離子交換吸附劑，其中該裝載緩衝液之pH值低於該標靶蛋白之pI；
 - (b) 用洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換吸附劑，其中該洗滌緩衝液之pH值低於該標靶蛋白之該pI；
 - (c) 用溶離緩衝液使該陽離子交換吸附劑溶離，該溶離緩衝液能夠減少該標靶蛋白與該陽離子交換吸附劑之間的結合；及
 - (d) 收集溶離液，其中該標靶蛋白於該溶離液中之百分比高於該標靶蛋白於該組合物中之百分比。
12. 如請求項11之方法，其中該溶離緩衝液之電導率高於該洗滌緩衝液之電導率。
13. 如請求項11之方法，其中該溶離緩衝液之電導率係藉由增加該溶離緩衝液之鹽濃度來升高。
14. 如請求項11之方法，其中該溶離緩衝液之pH值在5.5與9.0之間。
15. 如請求項13之方法，其中該溶離緩衝液之該鹽濃度在20 mM NaCl與200 mM NaCl之間。
16. 如請求項11至15中任一項之方法，其中該標靶蛋白為人類抗體或其抗原結合部分，其中該標靶蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 1×10^{-3} s⁻¹或 1×10^{-3} s⁻¹以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF-α解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定，且其中該標靶蛋白在標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF-α細胞毒性。

TNF- α 細胞毒性。

17. 一種純化包含標靶蛋白之組合物的方法，該方法包含：
 - (a) 使用裝載緩衝液將該組合物裝載至陰離子交換吸附劑，其中該裝載緩衝液之pH值低於該標靶蛋白之等電點(pI)；
 - (b) 使該標靶蛋白中之大多數通過而不結合至該陰離子交換吸附劑；
 - (c) 收集含有該非結合標靶蛋白之該通過性裝載緩衝液；
 - (d) 用洗滌緩衝液洗滌該陰離子交換吸附劑；
 - (e) 使結合至該陰離子交換吸附劑之該標靶蛋白自該陰離子交換吸附劑解離；及
 - (f) 收集含有該解離標靶蛋白之該洗滌緩衝液。
18. 如請求項17之方法，其中該裝載緩衝液包含陰離子試劑及陽離子試劑，其中該裝載緩衝液之電導率及pH值係藉由於該裝載緩衝液中增加或降低陽離子試劑之濃度且維持陰離子試劑之恆定濃度來調節。
19. 如請求項18之方法，其中該陰離子試劑係選自由以下組成之群：乙酸鹽、檸檬酸鹽、氯陰離子、硫酸鹽、磷酸鹽及其組合。
20. 如請求項18之方法，其中該陽離子試劑係選自由以下組成之群：鈉、Tris、緩血酸胺、銨陽離子、精胺酸及其組合。
21. 如請求項17至20中任一項之方法，其中該標靶蛋白為人類抗體或其抗原結合部分，其中該標靶蛋白以 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之 K_d 及 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下之 K_{off} 速率常數自人類TNF- α 解離，該等常數兩者均藉由表面電漿子共振測定，且其中該標靶蛋白在標準活體外L929分析中以 1×10^{-7} M或 1×10^{-7} M以下之IC₅₀中和人類TNF- α 細胞毒性。

圖式

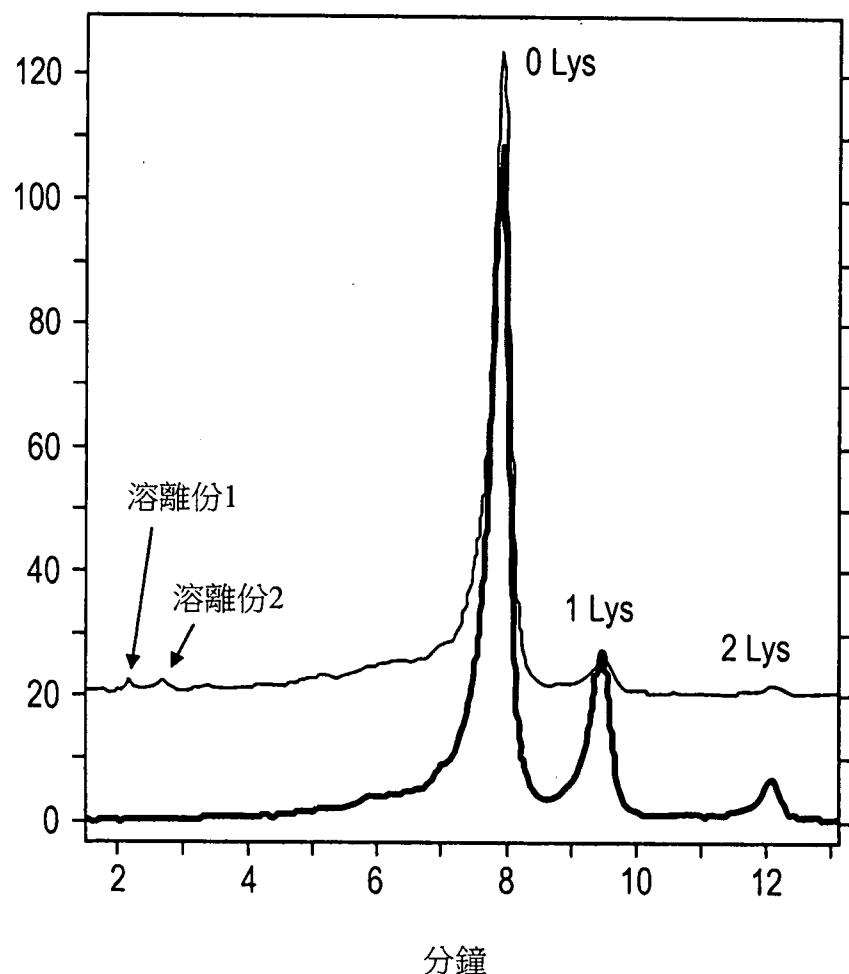


圖 1

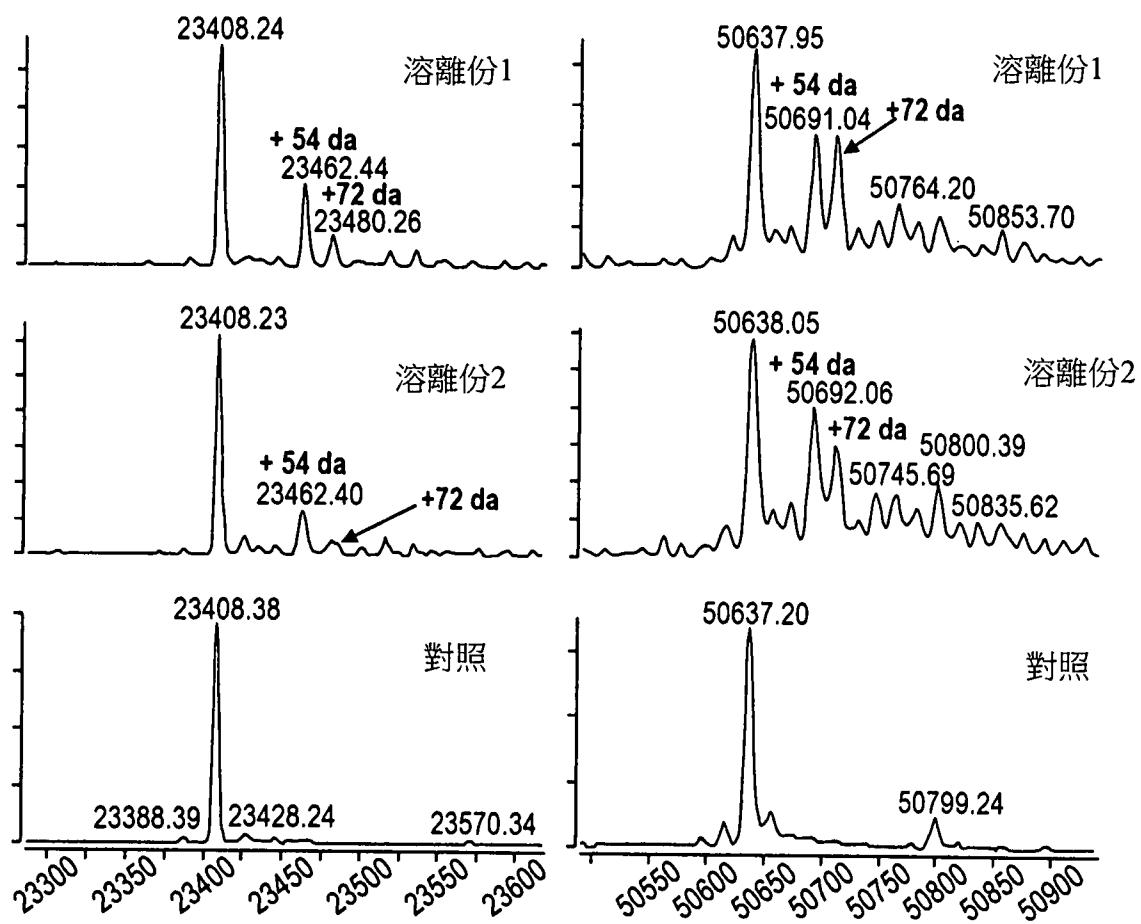


圖 2

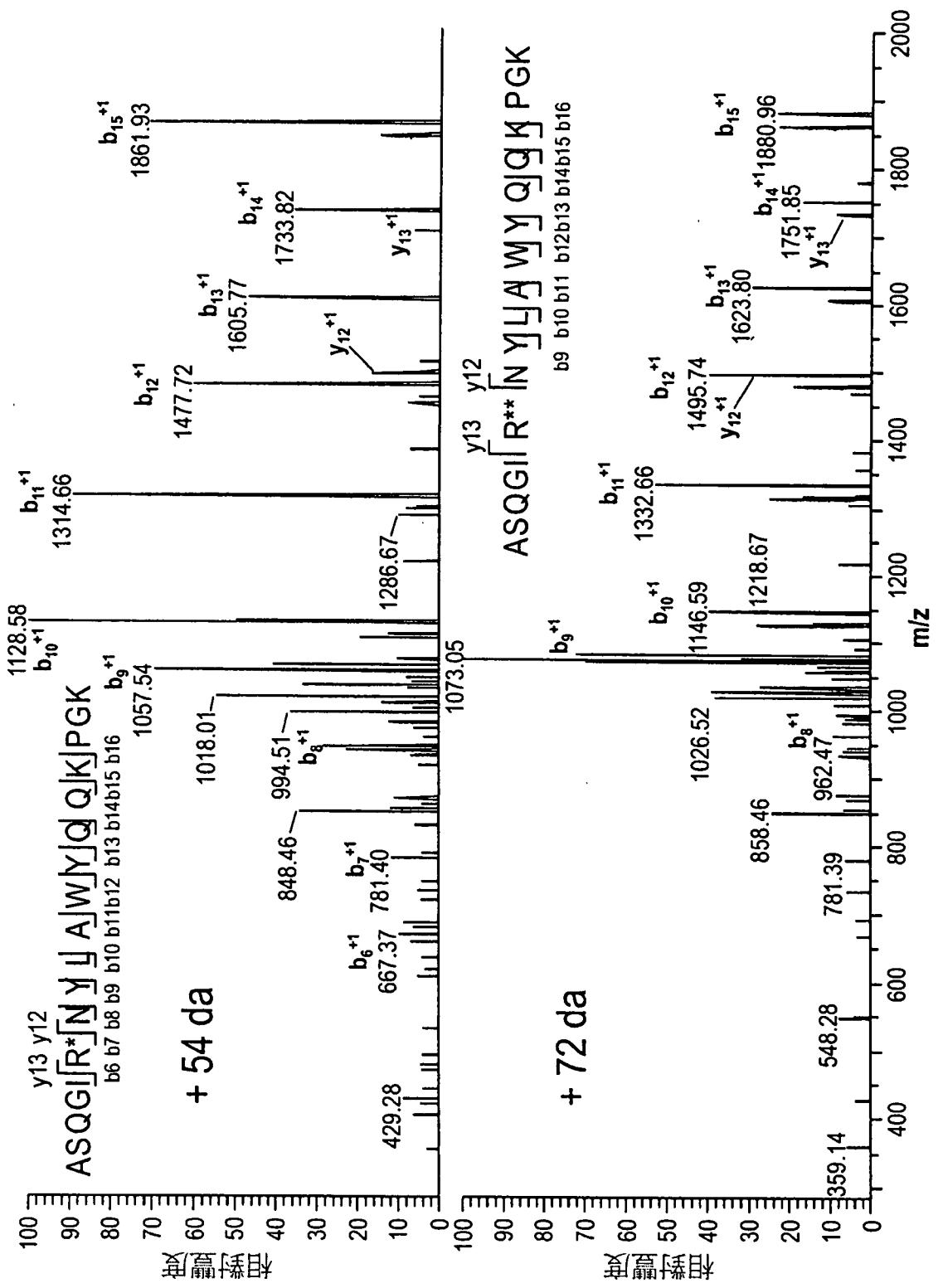


圖 3

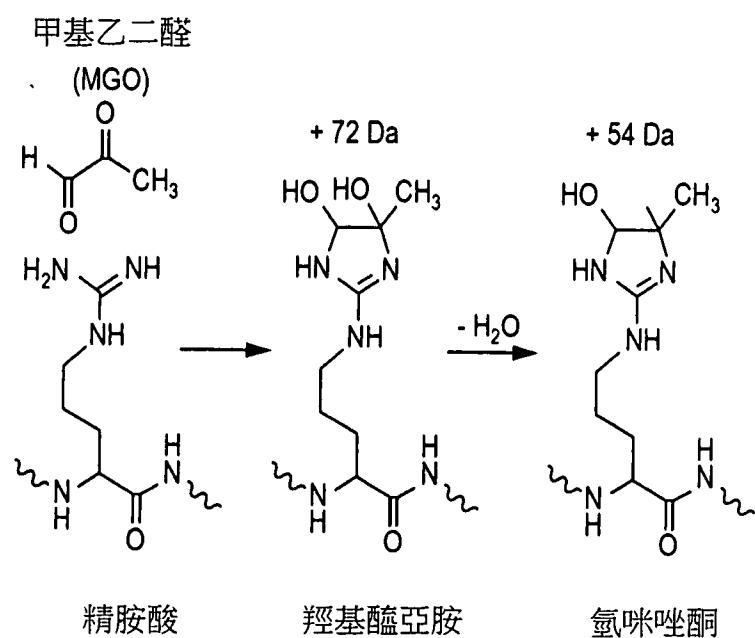


圖 4

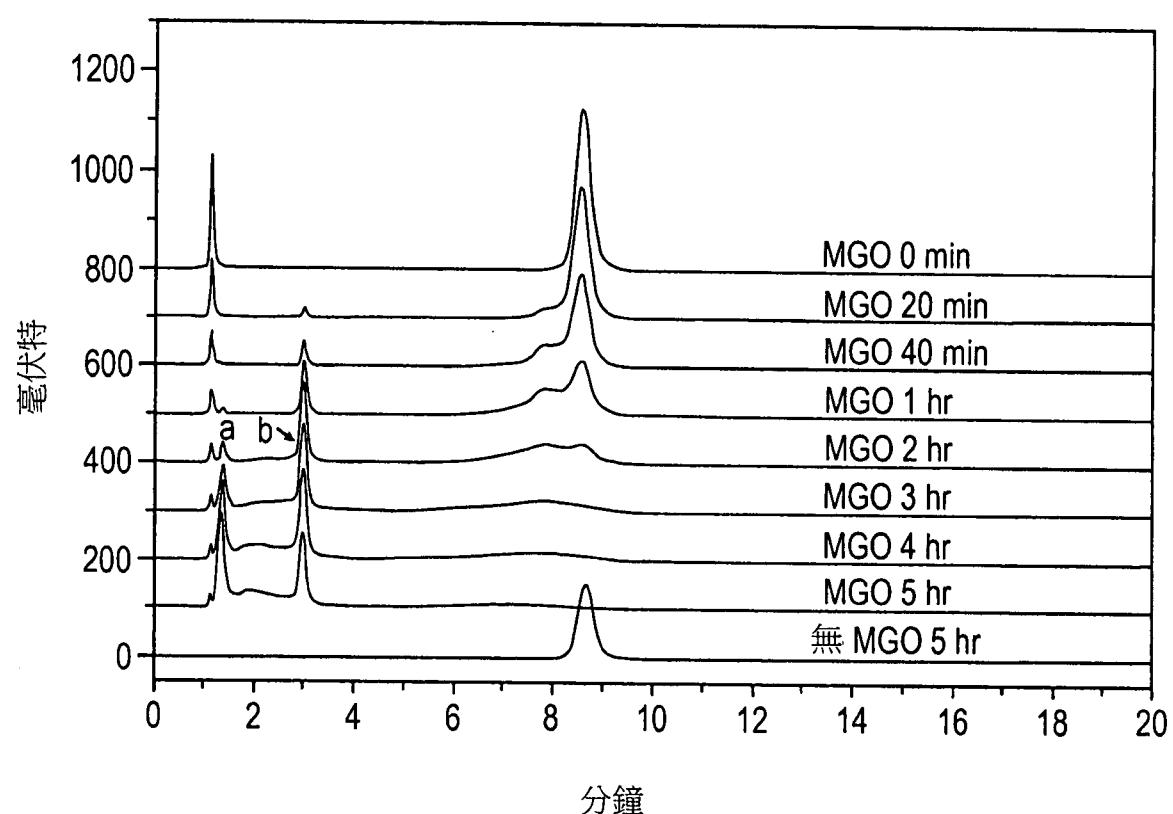


圖 5

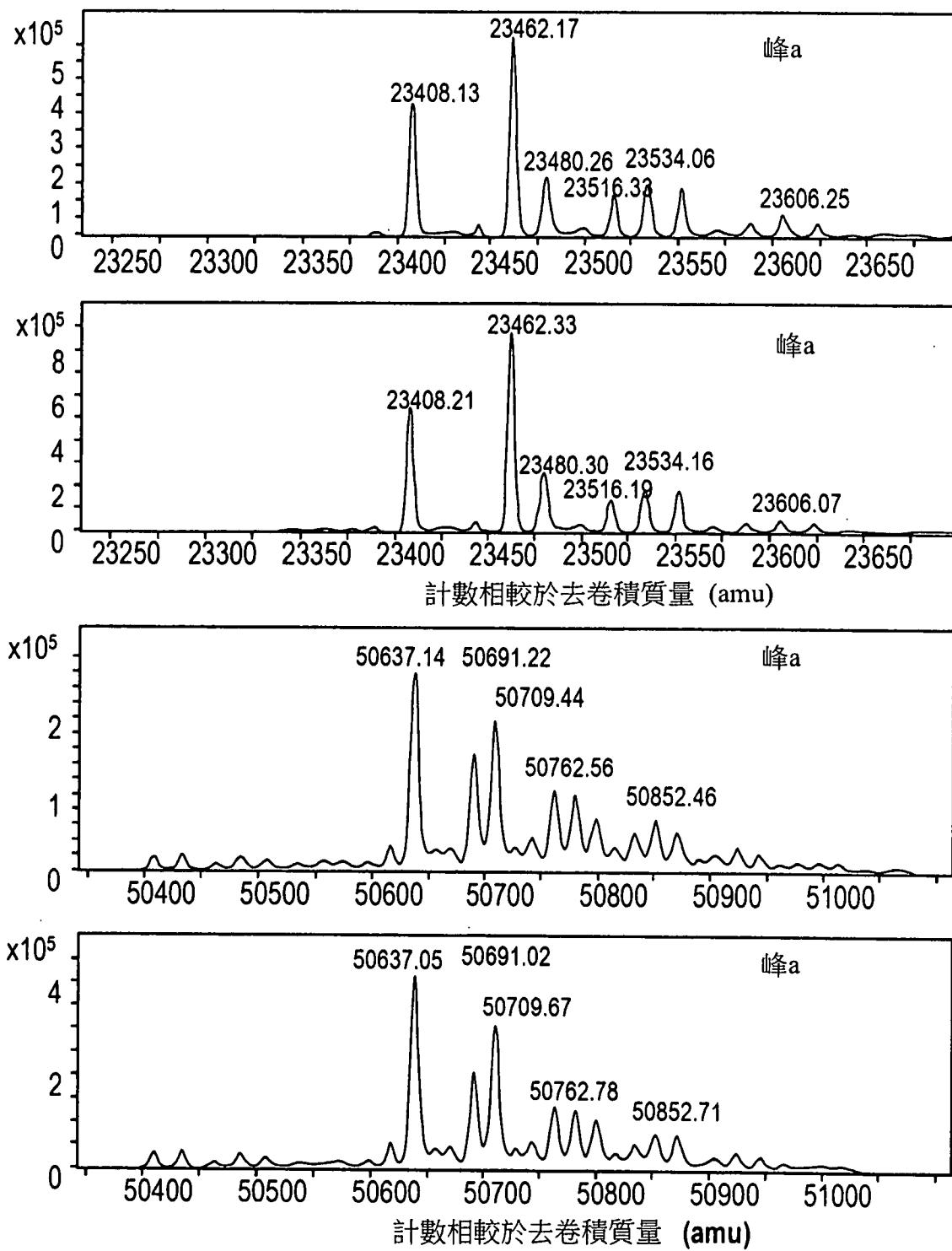


圖6

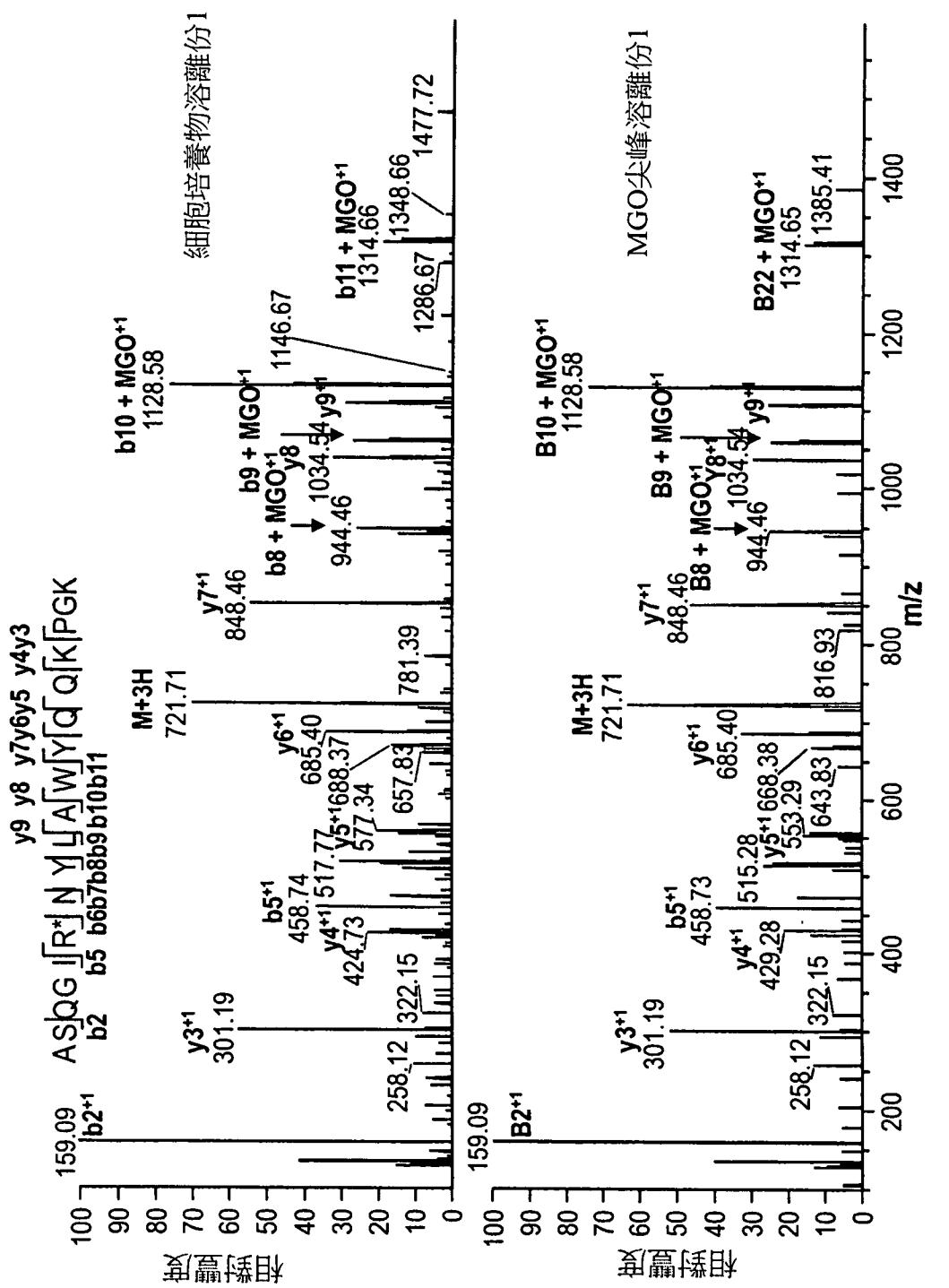


圖 7

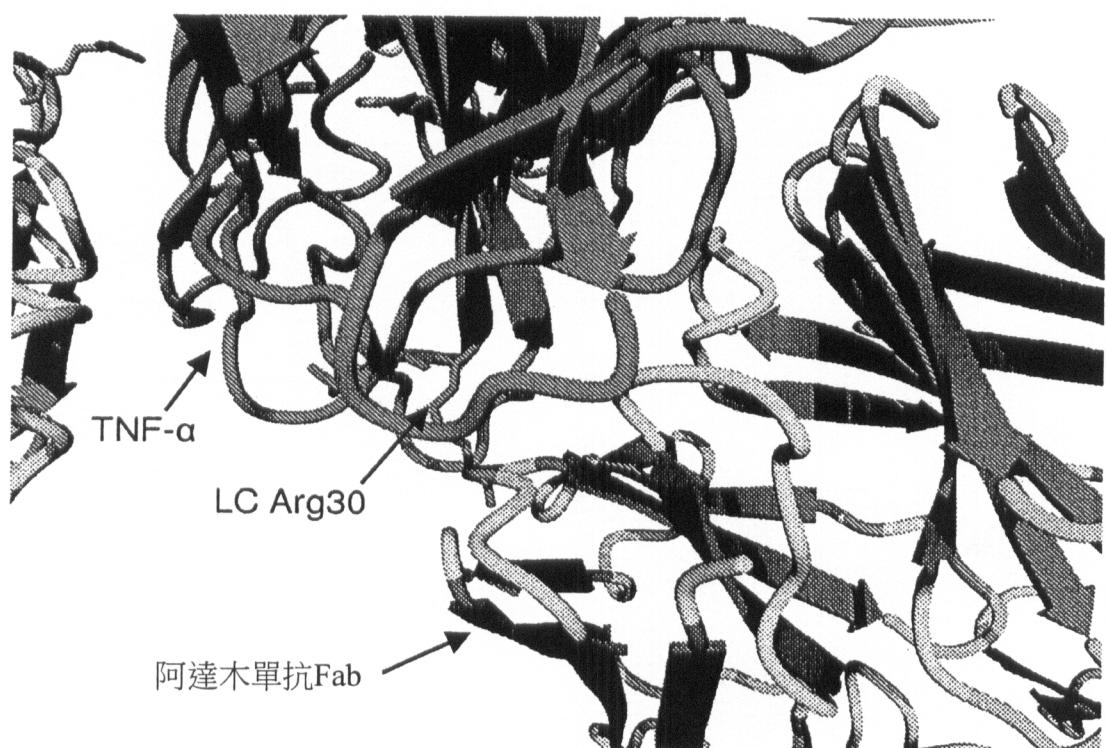


圖8

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
操作1	1.85E+06	1.13E-04	6.10E-11
操作2	1.90E+06	1.04E-04	5.49E-11
操作3	1.75E+06	1.04E-04	5.96E-11
平均值	1.83E+06	1.07E-04	5.85E-11
峰1操作1	1.46E+06	2.67E-04	1.83E-10
峰1操作2	1.56E+06	2.52E-04	1.61E-10
峰1操作3	1.53E+06	2.53E-04	1.66E-10
平均值	1.52E+06	2.57E-04	1.70E-10

圖9

電荷變異體概況-WCX-10

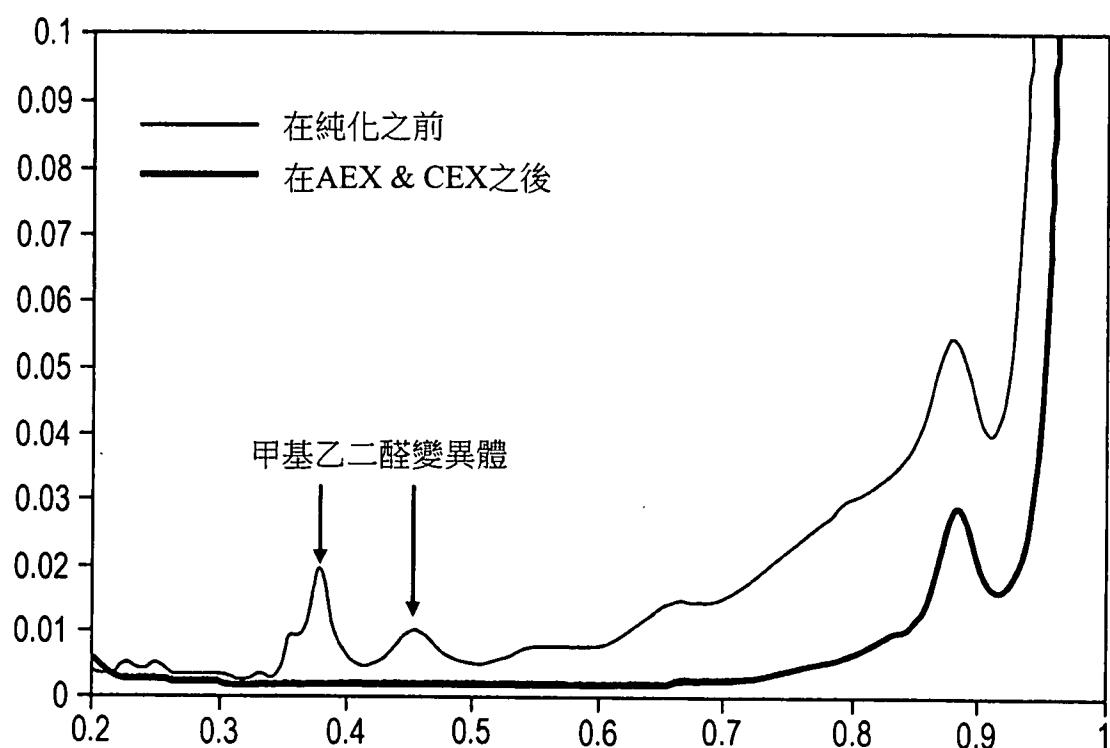


圖 10

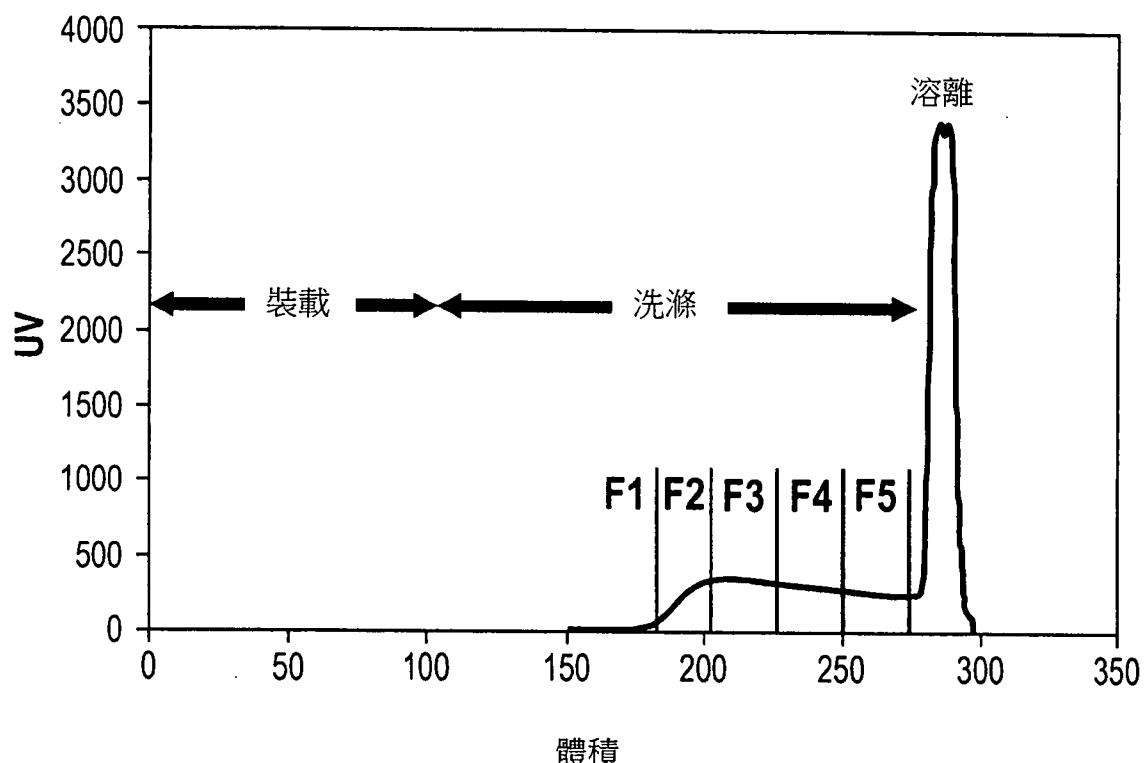


圖 11

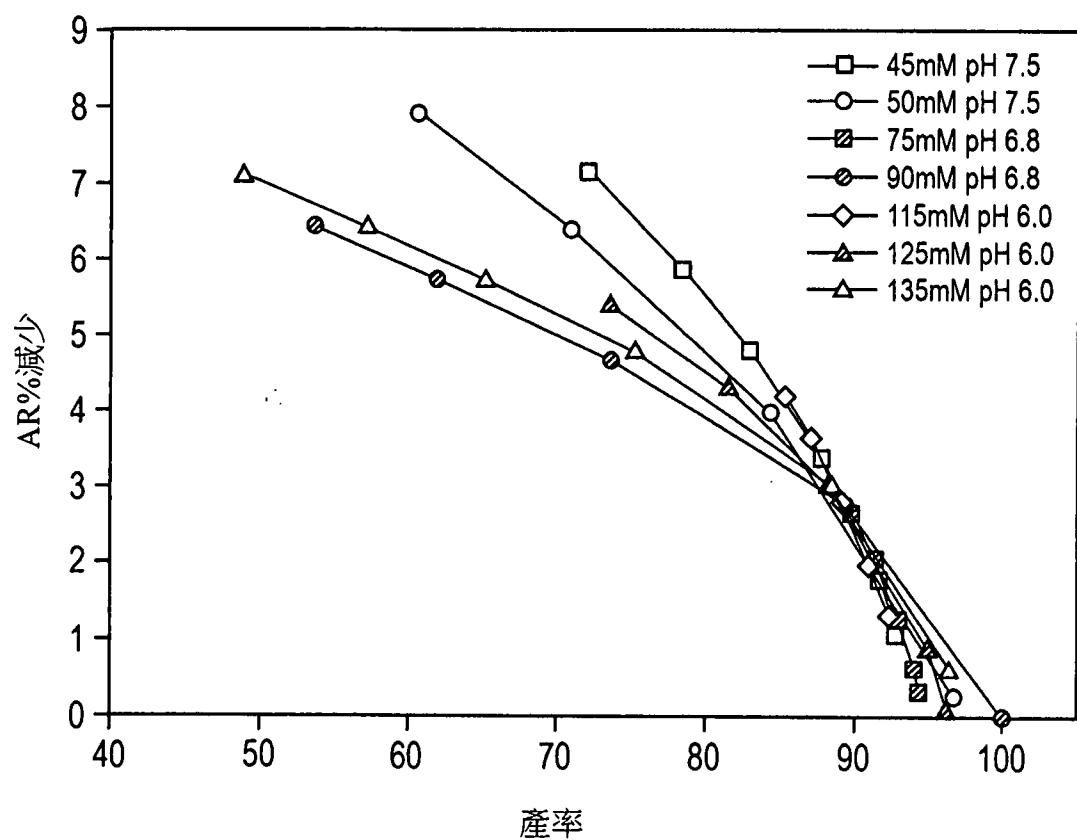


圖 12