(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110177802 A
(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201780076324.5

(22)申请日 2017.12.08

(30)优先权数据
62/432,402 2016.12.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/065397 2017.12.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/107079 EN 2018.06.14

(71)申请人 格利克尼克股份有限公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 D.S.布洛克 E.Y.梅里基恩 H.奥尔森

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 易方方 张晓飞

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

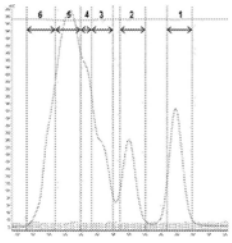
权利要求书4页 说明书52页
序列表5页 附图37页

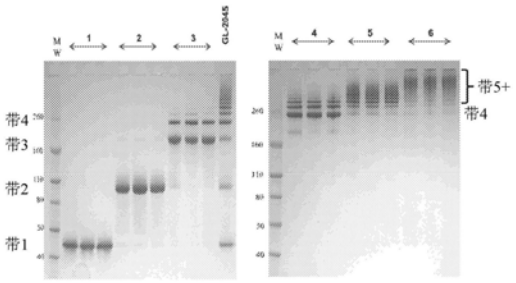
(54)发明名称

多聚化stradomer GL-2045的制造优化

(57)摘要

本公开涉及用于产生被称为最佳制造的stradomer的生物活性蛋白的经过优化的方法。本公开进一步提供了在治疗包含自身免疫性疾病、炎性疾病或感染性疾病的疾病和病状方面有用的组合物和方法。





CN 110177802 A

1.一种重组产生的GL-2045组合物,其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分占总组合物的不到20%。

2.一种重组产生的GL-2045组合物,其中所述GL-2045组合物的最高阶多聚体级分占总组合物的至少约30%。

3.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体级分的二聚体占所述总组合物的约7%到约12%。

4.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体级分的三聚体占所述总组合物的约6%到约11%。

5.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体级分的四聚体占所述总组合物的约10%到约15%。

6.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体级分的五聚体占所述总组合物的约6%到约10%。

7.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约10%到约14%。

8.根据权利要求1或2所述的重组产生的GL-2045组合物,其中所述同源二聚体的二聚体到六聚体级分占所述总组合物的总计约40-60%。

9.一种重组产生的GL-2045组合物,其中:

a)同源二聚体级分占总组合物的不到约20%;

b)最高阶多聚体级分占所述总组合物的至少约30%;

c)所述同源二聚体级分的二聚体占所述总组合物的约7%到约11%;

d)所述同源二聚体级分的三聚体占所述总组合物的约6%到约11%;

e)所述同源二聚体级分的四聚体占所述总组合物的约10%到约15%;

f)所述同源二聚体级分的五聚体占所述总组合物的约6%到约10%;

g)所述同源二聚体级分的六聚体占总级分的约10%到约14%;

h)同源二聚体的二聚体到所述同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约40%到约60%;

i)所述同源二聚体的三聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约32%到约50%;

j)所述同源二聚体的四聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占约26%到约39%;

k)所述同源二聚体的五聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约18%到约23%;或者

l)(a)-(k)的任何组合。

10.一种重组产生的GL-2045组合物,其中:

a)同源二聚体级分占总组合物的不到约20%;

b)最高阶多聚体级分占所述总组合物的至少约30%;

c)所述同源二聚体级分的二聚体占所述总组合物的约7%到约11%;

d)所述同源二聚体级分的三聚体占所述总组合物的约6%到约11%;

e)所述同源二聚体级分的四聚体占所述总组合物的约10%到约15%;

f)所述同源二聚体级分的五聚体占所述总组合物的约6%到约10%;并且

g)所述同源二聚体级分的六聚体占总级分的约10％到约14％。

11.一种重组产生的GL-2045组合物,其中：

a)同源二聚体级分占总组合物的不到约20％；

b)最高阶多聚体级分占所述总组合物的至少约30％；

h)同源二聚体的二聚体到所述同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约40％到约60％；

i)所述同源二聚体的三聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约32％到约50％；

j)所述同源二聚体的四聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约26％到约39％;并且

k)所述同源二聚体的五聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约18％到约23％。

12.一种用根据权利要求1到11中任一项所述的重组产生的经纯化GL-2045治疗或预防有需要的个体的炎性、自身免疫性或感染性疾病或病症的方法。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述疾病或病症选自特发性血小板减少性紫癜、慢性炎性多发性神经病、多灶性运动神经病、重症肌无力、器官移植以及类风湿性关节炎。

14.根据权利要求11或12所述的方法,其中所述GL-2045通过静脉内、皮下、口服、腹膜内、舌下、经颊、透皮、经皮下植入物或肌肉内施用。

15.一种用于产生GL-2045的方法,其包括：

(a)在37℃±1℃下培养已用编码GL-2045的表达载体稳定转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,直到所述CHO细胞达到约500万到约3000万个细胞/毫升的细胞密度；

(b)使生长温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃;以及

(c)从培养基中采集GL-2045。

16.根据权利要求15所述的方法,其中在所述转变生长温度之前,使所述细胞生长到约1000万到约2500万个细胞/毫升的密度。

17.根据权利要求15所述的方法,其中在所述转变生长温度之前,使所述细胞生长到约1000万到约1500万个细胞/毫升的密度。

18.根据权利要求15所述的方法,其中在所述转变生长温度之前,使所述细胞生长到约1500万到2000万个细胞/毫升的密度。

19.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在ActiCHO P基础培养基中进行所述培养。

20.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在用ActiCHO补料A和ActiCHO补料B培养期间向所述CHO细胞补料。

21.根据权利要求20所述的方法,其中每隔一天向所述CHO细胞补料。

22.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述编码GL-2045的表达载体包括SEQ ID NO:1的前导肽。

23.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述编码GL-2045的表达载体进一步包括piggyBac转座酶识别序列并用编码piggyBac转座酶的载体转染。

24.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述编码GL-2045的表达载体引起少

于20个基因组插入。

25.一种通过前述权利要求中任一项所述的方法制备的重组产生的GL-2045。

26.一种编码包括GL-2045表达盒的GL-2045的表达载体,其中所述GL-2045表达盒的侧翼为piggyBac最小反向重复元件。

27.一种用于产生GL-2045的方法,其包括:

(a)用根据权利要求26所述的表达载体转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞;

(b)在37℃±1℃的生长温度下在生物反应器中用ActiCHO P培养基培养来自(a)的所述CHO细胞;

(c)在37℃±1℃的生长温度下每天用ActiCHO补料A和ActiCHO补料B向(b)的培养物补料,直到所述培养物达到约1000万到约1500万个细胞/毫升的细胞密度;

(d)使所述生长温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃;以及

(e)从所述培养基中采集GL-2045,其中所述方法引起细胞活力在第21天>80%,并且最终蛋白滴度>9,000mg/mL,其中GL-2045的>70%作为多聚体存在,其中所述多聚体的>30%为更高阶多聚体GL-2045。

28.根据权利要求27所述的方法,其中所述细胞活力在培养的第18天超过95%。

29.根据权利要求27或28所述的方法,其中所述多聚体的百分比超过80%。

30.一种纯化通过前述权利要求中任一项所述的方法产生的GL-2045的方法,其包括:

(a)通过亲和色谱法从培养上清液中纯化GL-2045;以及

(b)通过阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法以及疏水相互作用色谱法中的一种或多种来精制GL-2045。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述亲和色谱法使用蛋白A柱。

32.根据权利要求30或31所述的方法,其中所述蛋白A柱为耐NaOH柱。

33.根据权利要求30到32中任一项所述的方法,其中所述蛋白A柱为MabSelect SuRue树脂。

34.根据权利要求30到33中任一项所述的方法,其中通过亲和色谱法纯化包括利用三种不同洗涤缓冲液中的一种来优化纯化条件。

35.根据权利要求30到34中任一项所述的方法,其中通过亲和色谱法纯化包括从亲和色谱柱中洗脱GL-2045。

36.根据权利要求35所述的方法,其中洗脱GL-2045包括用pH梯度洗脱。

37.根据权利要求35所述的方法,其中洗脱GL-2045包括不用pH梯度洗脱。

38.根据权利要求30到35中任一项所述的方法,其中再生所述亲和色谱柱以去除结合的GL-2045。

39.根据权利要求38所述的方法,其中比制造商推荐的更频繁地再生所述亲和色谱柱。

40.根据权利要求38所述的方法,其中在每个纯化循环之前再生所述亲和色谱柱。

41.根据权利要求38所述的方法,其中用0.5M NaOH缓冲液来再生所述亲和色谱柱。

42.根据权利要求30到41中任一项所述的方法,其中精制GL-2045包括阴离子交换流穿色谱法。

43.根据权利要求42所述的方法,其中阴离子交换流穿色谱法包括使用Q琼脂糖快速流动柱。

44.根据权利要求30到43中任一项所述的方法，其中精制GL-2045包括阳离子交换色谱法。

45.根据权利要求44所述的方法，其中阳离子交换色谱法包括使用POROS XS柱。

46.根据权利要求44或45所述的方法，其中阳离子交换色谱法包括使用乙酸钠洗脱缓冲液。

47.根据权利要求46所述的方法，其中所述洗脱缓冲液进一步包括36.5-38.5％的1M NaCl缓冲液。

48.根据权利要求30到41中任一项所述的方法，其中精制GL-2045包括疏水相互作用色谱法。

49.根据权利要求48所述的方法，其中疏水相互作用色谱法包括使用丁基FF树脂。

50.根据权利要求48所述的方法，其中疏水相互作用色谱法包括使用苯基HP树脂。

51.根据权利要求49或50所述的方法，其中所述柱引起GL-2045同源二聚体分离。

52.根据权利要求48所述的方法，其中疏水相互作用色谱法包括使用辛基FF树脂。

53.根据权利要求52所述的方法，其中所述柱引起去除GL-2045的无序聚集体。

54.一种用于纯化GL-2045的方法，其包括：

(a)通过蛋白A亲和色谱法从培养上清液中纯化GL-2045，其中蛋白A柱使用耐碱培养基，如MabSelect SuRe培养基，其中用至少两个洗涤循环进行所述纯化，并且其中在每次纯化运行之后用高NaOH再生步骤，如0.5M NaOH缓冲液来进行原位清洗(CIP)程序。

55.一种用于精制GL-2045的方法，其包括：

(a)通过阳离子交换色谱法来精制GL-2045，其中阳离子交换柱含有高容量、高分辨率树脂，如POROS XS，并且其中所述洗脱缓冲液为包含36.5-38.5％的1M NaCl缓冲液的乙酸钠缓冲液；

(b)通过阴离子交换色谱法来精制GL-2045，其中阴离子交换柱含有具有高化学稳定性、允许原位清洁和卫生方案的强阴离子交换培养基，如Q琼脂糖快速流动培养基；以及

(c)通过疏水相互作用色谱法来精制GL-2045，其中疏水相互作用培养基为丁基FF、苯基HP或辛基FF树脂，并且被选择成除了精制之外还分离或去除GL-2045的特定级分。

56.根据权利要求54或55所述的方法，其中GL-2045的最终蛋白滴度为>4g/L。

57.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中GL-2045的最终蛋白组成为>70％多聚体。

58.根据权利要求57所述的方法，其中所述多聚体为更高阶多聚体。

59.一种通过前述权利要求中任一项所述的方法制备的重组产生的经纯化GL-2045。

多聚化stradomer GL-2045的制造优化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年12月9日提交的美国临时申请第62/432,402号的优先权,所述美国临时申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 对以电子方式提交的文本文件的说明

[0004] 与本申请一起以电子方式提交的文本文件的内容以全文引用的方式并入本文中:序列表的计算机可读格式副本(文件名:GLIK_017_01WO_ST25.txt;记录日期:2017年12月8日;文件大小:15kb)。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及免疫学、自身免疫、炎症和肿瘤免疫学领域。更具体地说,本发明涉及制造GL-2045的经过优化的方法。本发明还涉及包括此类最佳制造的GL-2045 的新颖组合物以及使用GL-2045组合物的方法。本发明进一步涉及治疗或预防病理学病状,如自身免疫性疾病和炎性疾病。

背景技术

[0006] 自20世纪50年代早期以来,汇集的人类静脉内免疫球蛋白(IVIG)已经用于治疗免疫缺陷病症,并且在最近几十年中,用于治疗自身免疫性疾病和炎性疾病。IVIG经由若干机制介导致耐受性免疫效应,所述机制包含使IVIG聚集体与补体C1q和Fcγ受体 (FcγR)结合以及使免疫细胞,如NK细胞(例如,FcγRIIIa)、巨噬细胞(例如,FcγRIIa)、 B细胞(例如,FcγRIIb)、单核细胞以及单核细胞衍生的细胞(包含树突细胞)上的这些受体交联。IVIG是由汇集的人类血浆制造的无菌、纯化免疫球蛋白G(IgG)产品的配制品,其通常含有超过90%的未修饰的IgG以及少量和可变量的多聚体免疫球蛋白 IgA或IgM(Rutter等人,《美国皮肤病学会杂志(J Am Acad Dermatol)》,2001年6月; 44(6):1010-1024)。

[0007] 大量公布的数据表明,hIVIG的小型聚集的IgG级分,特别是那些聚集体的Fc部分,在治疗由病理免疫复合物介导的某些疾病方面不成比例地有效。已经观察到,痕量 (1-5%)的IgG作为多聚体形式存在于IVIG内,并且IgG二聚体可以构成hIVIG的5-15%。已经描述了IVIG疗法的替代方案,其使用与IVIG聚集体相似的亲合性地结合Fc受体和补体组分C1q的重组产生的Fc多聚体来进行(参见美国专利申请公开第2010/0239633 号、US 2013/0156765、US 2015/0218236和PCT公开第WO 2015/132364号)。

[0008] 此前已经公开了一种此类Fc多聚体GL-2045(美国专利申请公开第2013/0156765号)。GL-2045是作为IVIG重组模拟物的多聚化通用stradomer。GL-2045结合免疫球蛋白IgG1 Fc结合的大多数或所有配体。进一步地,GL-2045以高亲和力和亲合力结合所有典型受体以及补体C1q,并且具有比IVIG高10-1,000倍的体外功效。此外,GL-2045 或其鼠类等效物在自身免疫性疾病的多个动物模型中是有效的,所述疾病包含胶原诱导的关节炎、实验性自身免疫性神经病、特发性血小板减少性紫癜以及实验性自身免疫性重症肌无力。如此,GL-2045还在治疗广泛范围的自身免疫性疾病方面具有潜在的临床效用,包含但不限于

特发性血小板减少性紫癜、慢性炎性多发性神经病、多灶性运动神经病、重症肌无力、器官移植和类风湿性关节炎。

[0009] 除了GL-2045在效力和功效方面优于IVIG的优点之外，GL-2045在制造过程方面展示了若干优点。IVIG为汇集的人类血浆产品，这意味着IVIG来源于成千上万的供体的血液，所述供体的血清然后混合在一起并且随后被纯化以去除病毒和其它感染原以及聚集的IgG。如此，可及性和供应有限并且生产成本较高。此外，IVIG各批次之间存在显著程度的可变性。相反地，GL-2045是重组产生的，并且因此消除了供应的困难和生产成本，同时提供了对制造过程的更大控制。

[0010] GL-2045同源二聚体以一定亲和力且不以高亲合力结合于Fc配体，包含Fcγ受体和补体C1q。GL-2045还天然地形成能够以一定亲合力结合于典型受体的更高阶多聚体。GL-2045的这些更高阶多聚体模拟IVIG的多聚体级分的增强的功效。然而，标准细胞培养条件产生不同水平的细胞活力、不同程度的多聚化蛋白和蛋白滴度。因此，本领域需要制造产生限定的多聚体模式的GL-2045，并且具体地引起更高阶多聚体的百分比增加、同时优化细胞活力和蛋白滴度的GL-2045的方法。

发明内容

[0011] 本发明提供以下所有三种：经改进细胞活力、经改进高蛋白滴度以及相对于标准制造技术的更高阶多聚体百分比的惊人且显著的增加。这种经过优化的制造方法因此提供了如与非最佳制造的GL-2045组合物相比具有用于治疗炎性疾病的增强功效的最佳制造的GL-2045组合物。GL-2045的经过优化的制造包含经过优化的上游制造方法以及在一些实施例中经过优化的下游方法。经过优化的上游制造方法：a)产生高蛋白滴度；b) 维持高细胞活力以最小化细胞碎片；以及c)保持对GL-2045的功能必需的同源二聚体的高度有序的多聚体以及(如果需要)同源二聚体两者。经过优化的下游制造方法包含特别采用各种纯化方法来维持GL-2045的所选多聚体曲线。因此，在一些实施例中，本文提供了具有限定的多聚体曲线的GL-2045组合物。

[0012] 在一些实施例中，提供了用于产生GL-2045的方法，所述方法包括：在37℃±1℃下培养已用编码GL-2045的表达载体稳定转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，直到所述 CHO细胞达到约500万到约3000万个细胞/毫升的细胞密度；使生长温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃；以及从培养基中采集GL-2045。在一些实施例中，在转变所述生长温度之前，使所述细胞生长到约1000万到约2500万个细胞/毫升的密度。在一些实施例中，在转变所述生长温度之前，使所述细胞生长到约1000万到约1500万个细胞/毫升的密度。在一些实施例中，在转变所述生长温度之前，使所述细胞生长到约1500万到2000 万个细胞/毫升的密度。在一些实施例中，采用双温度转变，在约第3天从37℃±1℃转变到34℃±1℃，在生物反应器培养的约第7天，第二次温度从34℃±1℃转变到31℃±1 ℃。

[0013] 在一些实施例中，在ActiCHO P基础培养基中培养所述CHO细胞。在一些实施例中，在用ActiCHO补料A和ActiCHO补料B培养期间向所述CHO细胞补料。在一些实施例中，每隔一天向所述CHO细胞补料。在一些实施例中，所述编码GL-2045的表达载体包括SEQ ID NO:1的前导肽。在一些实施例中，所述编码GL-2045的表达载体进一步包括piggyBac转座酶识别序列并用编码piggyBac转座酶的载体转染。在一些实施例中，所述编码GL-2045的表达载体导

致少于20个基因组插入。

[0014] 在一些实施例中,提供了一种通过本文所描述的方法制备的重组产生的GL-2045。在一些实施例中,提供了一种编码包括GL-2045表达盒的GL-2045的表达载体,其中所述GL-2045表达盒的侧翼为piggyBac最小反向重复元件。

[0015] 在一些实施例中,提供了一种用于产生GL-2045的方法,所述方法包括:用本文所描述的表达载体来转染CHO细胞;在37℃±1℃的生长温度下在生物反应器中用 ActiCHO P培养基培养所述CHO细胞;在37℃±1℃的生长温度下每天用Acti CHO补料 A和Acti CHO补料B向所述CHO细胞的培养物补料,直到所述培养物达到约1000万到约1500万个细胞/毫升的细胞密度;使所述生长温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃;以及从所述培养基中采集GL-2045,其中所述方法导致细胞活力在第21天>80%,并且最终蛋白滴度>9,000mg/mL,其中GL-2045的>70%作为多聚体存在,其中所述多聚体的>30%为更高阶多聚体GL-2045。在一些实施例中,所述细胞活力在培养的第18天超过95%。在一些实施例中,所述多聚体的百分比超过80%。

[0016] 在一些实施例中,提供了一种纯化通过本文所描述的方法产生的GL-2045的方法,所述方法包括:通过亲和色谱法从培养上清液中纯化GL-2045;以及通过阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法和疏水相互作用色谱法中的一种或多种来精制GL-2045。

[0017] 在一些实施例中,在亲和色谱法之前采用深度过滤。在一些实施例中,深度过滤器为X0HC(密理博(Millipore))。在一些实施例中,所述深度过滤单元从上清液中去除了高百分比的DNA。在一些实施例中,那个深度过滤单元为Emphaze™ AEX混合纯化器(3M)。

[0018] 在一些实施例中,所述亲和色谱法使用蛋白A柱。在一些实施例中,所述蛋白A 柱包括耐NaOH树脂。在一些实施例中,所述蛋白A树脂为MabSelect SuRe树脂。在一些实施例中,通过亲和色谱法纯化包括利用三种不同洗涤缓冲液中的一种来优化纯化条件。在一些实施例中,通过亲和色谱法纯化包括从亲和色谱柱中洗脱GL-2045。在一些实施例中,洗脱GL-2045包括用pH梯度洗脱。在一些实施例中,洗脱GL-2045包括不用pH梯度洗脱。在一个实施例中,使用甘氨酸缓冲液进行洗脱。在另一实施例中,使用乙酸缓冲液进行洗脱。在一些实施例中,再生所述亲和色谱柱以去除结合的 GL-2045。在一些实施例中,比制造商推荐的更频繁地再生所述亲和色谱柱。在一些实施例中,在每个纯化循环之前再生所述亲和色谱柱。在一些实施例中,用0.5M NaOH 缓冲液来再生所述亲和色谱柱。

[0019] 在一些实施例中,精制GL-2045包括阴离子交换流穿色谱法。在一些实施例中,阴离子交换流穿色谱法包括使用Q琼脂糖快速流动柱。在一些实施例中,精制GL-2045 包括阳离子交换色谱法。在一些实施例中,阳离子交换色谱法包括使用POROS XS柱。在一些实施例中,阳离子交换色谱法包括使用乙酸钠洗脱缓冲液。在一些实施例中,所述洗脱缓冲液进一步包括1M NaCl缓冲液的36.5-39.0%。在一个实施例中,所述洗脱方法为分步洗脱,并且在另一实施例中,所述洗脱为梯度洗脱。在一些实施例中,精制 GL-2045包括疏水相互作用色谱法。在一些实施例中,疏水相互作用色谱法包括使用丁基FF树脂。在一些实施例中,疏水相互作用色谱法包括使用苯基HP树脂。在一些实施例中,疏水相互作用色谱法(“HIC”)包括使用苯基琼脂糖6快速流动高Sub树脂。在一个实施例中,所述HIC方法处于流穿模式,并且在另一实施例中,所述HIC方法处于结合模式。在一些实施例中,所述HIC树脂导致GL-2045同源二聚体分离。在一些实施例中,疏水相互作用色谱法包括使用辛基FF树脂。在一些实施

例中,所述柱导致去除GL-2045的无序聚集体。

[0020] 在一些实施例中,提供了一种用于纯化GL-2045的方法,所述方法包括:通过蛋白A亲和色谱法从培养上清液中纯化GL-2045,其中蛋白A柱使用如MabSelect SuRe培养基等耐碱培养基,其中用至少两个洗涤循环进行所述纯化,并且其中在每次纯化运行后用如0.5M NaOH缓冲液等高NaOH再生步骤进行原位清洗(CIP)程序。

[0021] 在一些实施例中,提供了一种用于纯化GL-2045的方法,所述方法包括通过阳离子交换色谱法来精制GL-2045,其中阳离子交换柱含有如POROS XS等高容量、高分辨率树脂,并且其中所述洗脱缓冲液为包含36.5-39.0%的1M NaCl缓冲液的乙酸钠缓冲液。在一些实施例中,所述用于纯化GL-2045的方法进一步包括通过阴离子交换色谱法来精制GL-2045,其中阴离子交换柱含有具有高化学稳定性、经允许的原位清洁和卫生方案的如Q琼脂糖快速流动培养基等强阴离子交换培养基。在一些实施例中,所述用于纯化 GL-2045的方法进一步包括通过疏水相互作用色谱法来精制GL-2045,其中疏水相互作用培养基为丁基FF、苯基HP或辛基FF树脂,并且选择成除了精制之外分离或去除 GL-2045的特定级分。在一些实施例中,所述用于纯化和/或精制GL-2045的方法导致在所有过滤和色谱法步骤之后GL-2045的最终蛋白滴度(即,最终药物物质)>4g/L。在一些实施例中,GL-2045的最终蛋白组成包括>70%的多聚体。在一些实施例中,所述多聚体的>28%为如通过分析型SEC-HPLC所分析的更高阶多聚体。

[0022] 在一些实施例中,提供了一种通过本文所描述的方法制备的经纯化GL-2045。在一些实施例中,所述通过本文所描述的方法制备的经纯化GL-2045具有限定的多聚体模式,所述多聚体模式最小化同源二聚体和/或所述同源二聚体的二聚体的百分比或以其它方式平衡同源二聚体、更低阶多聚体、更高阶多聚体和最高阶多聚体的百分比。在一些实施例中,提供了一种用本文所描述的重组产生的经纯化GL-2045治疗或预防有需要的个体的炎性、自身免疫性或感染性疾病或病症的方法。在一些实施例中,所述疾病或病症选自特发性血小板减少性紫癜、慢性炎性多发性神经病、多灶性运动神经病、重症肌无力、器官移植以及类风湿性关节炎。在一些实施例中,所述GL-2045通过静脉内、皮下、口服、腹膜内、舌下、经颊、透皮、经皮下植入或肌肉内施用。

[0023] 在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045组合物,其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分占总组合物的不到约20%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分占所述总组合物的12-19%。在其它实施例中,所述同源二聚体级分占所述总组合物的 14-19%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分占所述总组合物的15.5-17.5%。在另一个实施例中,所述同源二聚体级分占所述总组合物的约16.2%。

[0024] 在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045组合物,其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分的二聚体占总组合物的约7%到约12%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分的所述二聚体占所述总组合物的约9%或约11%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分的所述二聚体占所述总组合物的约10%。

[0025] 在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045组合物,其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分的三聚体占总组合物的约5.5%到约11%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分的所述三聚体占所述总组合物的约6.5%或约8%。在一些实施例中,所述同源二聚体级分的所述三聚体占所述总组合物的约7%。

[0026] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分的四聚体占总组合物的约10％到约16％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述四聚体占所述总组合物的约13％或约15％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述四聚体占所述总组合物的约14％。

[0027] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分的五聚体占总组合物的约6％到约9％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述五聚体占所述总组合物的约7％到约8％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述五聚体占所述总组合物的约7％。

[0028] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中所述GL-2045组合物的同源二聚体级分的六聚体占总组合物的约10％到约14％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约12％或约13％。在一些实施例中，所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约12.7％。

[0029] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中最高阶多聚体(即，在同源二聚体的七聚体中的那些多聚体以及以上级分)占总组合物的至少约28％。在一些实施例中，所述最高阶多聚体占总组合物的不超过约35％。在一些实施例中，最高阶多聚体级分占所述总组合物的约30％到约34％。在一些实施例中，所述最高阶多聚体级分占所述总组合物的约31.4％。

[0030] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中

[0031] (a)同源二聚体级分占总组合物的不到约20％；

[0032] (b)最高阶多聚体级分占所述总组合物的至少约28％；

[0033] (c)所述同源二聚体级分的二聚体占所述总组合物的约7％到约12.5％；

[0034] (d)所述同源二聚体级分的三聚体占所述总组合物的约5.5％到约11％；

[0035] (e)所述同源二聚体级分的四聚体占所述总组合物的约10％到约16％；

[0036] (f)所述同源二聚体级分的五聚体占所述总组合物的约6％到约10％；

[0037] (g)所述同源二聚体级分的六聚体占总级分的约10％到约14％；

[0038] (h)同源二聚体的二聚体到所述同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约40％到约60％；

[0039] (i)所述同源二聚体的三聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约32％到约50％；

[0040] (j)所述同源二聚体的四聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约26％到约39％；

[0041] (k)所述同源二聚体的五聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约18％到约23％；或者

[0042] (l)(a)-(k)的任何组合。

[0043] 在一些实施例中，提供了一种重组产生的GL-2045组合物，其中总组合物的大约80％包括更高阶多聚体，意指同源二聚体的二聚体及以上(即，带2及以上)。在一些实施例中，重组产生的GL-2045总组合物的大约60-80％包括同源二聚体的三聚体及以上 (即，带3及以上)。在一些实施例中，重组产生的GL-2045总组合物的约54-72％包括四聚体及以上(即，带4及以上)。在一些实施例中，提供了一种GL-2045，其中总组合物的大约44-57％包括

五聚体及以上(即,带5及以上)。在一些实施例中,重组产生的GL-2045总组合物的约38-51%包括六聚体及以上(即,带6及以上)。

[0044] 在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045,其中组合物的带2-6(即,同源二聚体的二聚体到同源二聚体的六聚体)占所述组合物的约39-61%。在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045,其中组合物的带3-6(即,同源二聚体的三聚体到同源二聚体的六聚体)占所述组合物的约32-50%。在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045,其中组合物的带4-6(即,同源二聚体的四聚体到同源二聚体的六聚体)占所述组合物的约26-39%。在一些实施例中,提供了一种重组产生的GL-2045,其中组合物的带5-6(即,同源二聚体的五聚体到同源二聚体的六聚体)占所述组合物的约16-23%。

附图说明

[0045] 图1A到图1B展示了通过尺寸排阻色谱法进行的GL-2045分级分离(图1A)以及通过非还原凝胶对所得级分进行的分析(图1B)。

[0046] 图2展示了GL-2045级分的生物层干涉分析。

[0047] 图3A到图3B展示了针对GL-2045的凝胶分析(图3A)以及尺寸排阻分级分离结果(图3B)。

[0048] 图4A到图4D展示了GL-2045级分在补体依赖性细胞杀伤测定中的影响。

[0049] 图5A到图5C展示了洗脱色谱图(图5A)以及在Fcγ RIIIa结合测定中使用的GL-2045 的SDS-PAGE分析(图5B和图5C)。

[0050] 图6A到图6B展示了图5中所展示的经洗脱级分与Fcγ RIIIa的结合(图6A)以及最佳拟合曲线(图6B)。

[0051] 图7展示了阳离子交换级分的SDS-Page分析:GL-GLM-01＝重组的、未分级分离的Fc(G001);GL-GLM-02＝未分级分离的GL-2045;GL-GLM-05＝在pH 6.0下分级分离的GL-2045;GL-GLM-06＝在pH 6.5下分级分离的GL-2045;GL-GLM-07＝在pH 7.0下分级分离的GL-2045;GL-GLM-08＝在pH 7.5下分级分离的GL-2045。

[0052] 图8展示了在存在未分级分离的或分级分离的GL-2045的情况下用作为化学引诱物的C5a进行的嗜中性粒细胞趋化测定的结果:GL-GLM-01＝重组的、未分级分离的Fc(G001);GL-GLM-02＝未分级分离的GL-2045;GL-GLM-05＝在pH 6.0下分级分离的GL-2045;GL-GLM-06＝在pH 6.5下分级分离的GL-2045;GL-GLM-07＝在pH 7.0 下分级分离的GL-2045;GL-GLM-08＝在pH 7.5下分级分离的GL-2045。

[0053] 图9展示了在培养的第4天、第8天和第10天在一组不同培养基中生长的CHO细胞的细胞密度(以百万/毫升为单位)。

[0054] 图10展示了在培养的第4天、第8天和第10天在一组不同培养基中生长的CHO 细胞的细胞活力(%)。

[0055] 图11展示了在培养的第10天在一组不同培养基中生长的CHO细胞的蛋白滴度(mg/mL)。

[0056] 图12A到图12B展示了对由在图9-11中所展示的一组培养基中生长的CHO细胞产生的GL-2045蛋白的凝胶分析。

[0057] 图13A到图13B展示了PowerCHO3 CD、ADCF-Mab Hyclone和ActiCHO P培养基的补

料时间表(图13A)以及Cellvento、BalanCD CHO生长A、CD FortiCHO Life和 CD4MCHO Hyclone培养基的补料时间表(图13B)。

[0058] 图14展示了在培养的第0-11天在一组不同的培养基+补料组合中生长的CHO细胞的细胞密度(e^6个细胞/毫升)。

[0059] 图15展示了在培养的第0-11天在一组不同的培养基+补料组合中生长的CHO细胞的细胞活力(%)。

[0060] 图16展示了来自在培养的第0-11天在一组不同的培养基+补料组合中生长的CHO细胞的GL-2045的蛋白滴度(mg/mL)。

[0061] 图17展示了对培养基+补料组合的影响以及在图13A-13B中展示的关于GL-2045多聚化的时间表的SDS-PAGE分析。

[0062] 图18A到图18B展示了ActiCHO-P培养基+每天补料(红色)和ActiCHO-P培养基+每隔一天补料(蓝色)对细胞密度(图18A)、细胞活力(图18B)、培养基pH(图18C) 和GL-2045蛋白滴度(图18D)的影响。

[0063] 图19展示了ActiCHO-P培养基+每天补料(红色)和ActiCHO-P培养基+每3天补料(蓝色)对GL-2045蛋白滴度的影响。

[0064] 图20A到图20B展示了相较于将ActiCHO补料A与ActiCHO基础培养基(蓝色) 一起使用,组合ActiCHO补料A与PowerCHO2(红色)基础培养基对细胞活力(图20A) 和GL-2045蛋白滴度(图20B)的影响。

[0065] 图21A到图21C展示了经过优化的摇瓶条件对细胞密度(图21A)、细胞活力(图21B)和GL-2045蛋白滴度(图21C)的影响。

[0066] 图22展示了蛋白A纯化的GL-2045的SDS-PAGE分析。

[0067] 图23A到图23B展示了在通过pH梯度洗脱来洗脱GL-2045之后来自蛋白A柱的洗脱曲线(图23A)以及经分离级分的SDS-PAGE分析(图23B)。

[0068] 图24展示了洗脱色谱图以及非还原SDS-PAGE分析。

[0069] 图25展示了洗脱色谱图以及非还原SDS-PAGE分析。

[0070] 图26展示了运行C1-C3的洗脱色谱图。

[0071] 图27展示了来自运行C1-C3的洗脱峰38%-39%的非还原SDS-PAGE分析。

[0072] 图28展示了离子色谱纯化的GL-2045的密度测定分析。

[0073] 图29A到图29B展示了来自HIC柱的洗脱曲线图(上图)以及洗脱和流穿级分(FT)的SDS-PAGE分析(下图)。

[0074] 图30展示了MO45的HIC柱精制的洗脱曲线图(右图)以及Nu-PAGE分析(右图)。

[0075] 图31展示了MO45的HIC柱精制的洗脱曲线图。

[0076] 图32展示了MO45的HIC柱精制的洗脱曲线图以及SDS-PAGE分析。

[0077] 图33展示了最佳制造的GL-2045组合物的限定的多聚体模式。

具体实施方式

[0078] 本文所描述的用于生产经过优化的重组GL-2045的方法包含在优化细胞活力和蛋白滴度的同时导致GL-2045多聚化的经过优化的上游制造方法。在一些实施例中,优化状态通过经过优化的下游制造进行到药品。进一步地,本文中提供了包括具有限定的多聚体模

式的GL-2045的组合物。本文所提供的组合物具有用于治疗自身免疫疾病、炎性疾病、过敏症、抗体介导的疾病以及补体介导的疾病的效用。

[0079] 如本文所使用的，“药品”指代制造商销售的GL-2045的最终剂型。

[0080] 如本文所使用的，当结合权利要求书和/或说明书中的术语“包括”使用时，词语“一(a/an)”的使用可以意指“一个/种”，但还与“一个/种或多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义一致。

[0081] 如本文所使用的，术语“仿生物”、“仿生分子”、“仿生化合物”和相关术语指代模仿另一种化合物如汇集的人静脉注射免疫球蛋白(“hIVIG”)、单克隆抗体或抗体的Fc 片段的功能的人造化合物。“生物活性”仿生物是具有与其天然存在的配对物相同或相似的生物活性的化合物。“天然存在的”意指通常在生物体中发现的分子或其部分。天然存在还意指基本上天然存在。“免疫活性”仿生物是展现出与如抗体、细胞因子、白介素和本领域中已知的其它免疫分子等天然存在的免疫活性分子相同或相似的免疫活性的仿生物。在优选实施例中，本发明的仿生物是经过优化的多聚化stradomer，如本文所定义的(例如，优化制造的GL-2045)。

[0082] “直接连接”意指彼此连接而无介入或外来序列的两个序列，例如，从在DNA或克隆片段中插入限制酶识别位点导出的氨基酸序列。本领域普通技术人员应理解，“直接连接”包含添加或去除氨基酸，只要多聚化能力基本上不受影响即可。

[0083] “同源”意指在给定核酸或氨基酸序列的整个序列上的同一性。例如，“80％同源”意指给定序列与要求保护的序列具有约80％的同一性并且可以包含插入、缺失、取代和移码。本领域普通技术人员应理解，可以进行序列比对以将插入和缺失考虑在内从而确定在序列的整个长度上的同一性。

[0084] 已经描述了，hIVIG与新生儿Fc受体(FcRn)结合并使FcRn完全饱和，并且FcRn 的这种竞争性抑制可以在hIVIG的生物活性中起到重要作用(例如，F.Jin等人，《人类免疫学(Human Immunology)》，2005,66(4)403-410)。由于与Fcγ受体强力结合的免疫球蛋白还至少在一定程度上与FcRn结合，因此本领域技术人员应认识到，能够结合多于一种Fcγ受体结合的stradomer还会与FcRn结合并且可以使FcRn完全饱和。

[0085] IgG1有两种人多晶型物，被称为DEL多晶型物和EEM多晶型物。DEL多晶型物在位置356处具有D并且在位置358处具有L；EEM多晶型物在位置356处具有E并且在位置358处具有M(卡巴特编号，SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3个别为EEM多晶型物和DEL多晶型物)。本文所提供的多晶型物可以包括DEL IgG1多晶型物或EEM IgG1多晶型物。因此，即使在DEL多态性的上下文中明确产生了用于特定突变体的句子，本领域技术人员也应理解，可以对EEM多晶型物进行相同的突变以产生相同的结果。

[0086] US 2010/0239633公开了使用连接的免疫球蛋白Fc结构域来创建hIVIG的有序多聚化免疫球蛋白Fc仿生物(被称为stradomer的生物活性有序多聚体)，所述有序多聚化免疫球蛋白Fc仿生物包括包含stradomer的各个组分之间的限制位点和亲和标签的短序列，以用于治疗包含自身免疫疾病和其它炎性疾病的病理病状。参见通过引用以其全文并入本文的US 2010/0239633。US 2013/0156765公开了其中各个组分直接连接而非通过限制位点或亲和标签分离的stradomer。US 2013/0156765还具体公开了IgG2铰链多聚化结构域与其C末端直接连接的包括IgG1 Fc结构域的多聚化stradomer(GL-2045)，所述多聚化

stradomer相对于N末端连接的构建体(例如,US 2010/0239633中描述的 GL-2019)展现出增强的多聚化和补体结合。参见通过引用以其全文并入本文的US 2013/0156765。GL-2045的结构是:IgG1铰链-IgG1CH2 IgG1 CH3-IgG2铰链,并且 GL-2045作为SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5(分别为EEM多晶型物和DEL多晶型物) 提供。

[0087] stradomer单元单体

[0088] 如本文所使用的,术语“stradomer单元单体”指代当与至少第二stradomer单元单体缔合时形成包括至少一个Fc结构域以及在GL-2045的情况下IgG2铰链多聚化结构域的同源二聚体“stradomer单元”的单个连续肽分子。在优选实施例中,GL-2045的 stradomer单元包含两个缔合的stradomer单元单体。然而,GL-2045stradomer还可以含有三个或更多个stradomer单元单体。

[0089] 本发明的最佳制造的stradomer(最佳制造的GL-2045)含有IgG1 Fc单体的N末端与前导肽(SEQ ID NO:1)的C末端之间以及IgG1 Fc的C末端与多聚化结构域IgG2 铰链(SEQ ID NO:6)的N末端之间的直接连接。

[0090] 作为解释实例,本领域技术人员应理解,本发明的最佳制造的stradomer分子可以通过制备编码Fc结构域单体和多聚化区域的多核苷酸分子来构建。可以将这种多核苷酸分子插入到表达载体中,所述表达载体可以用于转化细菌群或转染哺乳动物细胞群。stradomer单元单体然后可以通过在适当的培养条件下培养转化的细菌或转染的哺乳动物细胞来产生。例如,通过选择具有genetecin/G418的细胞,可以实现延续稳定转染细胞池的无性系细胞系。可替代地,细胞可以在CMV启动子的控制下用编码本发明的最佳制造的stradomer的DNA(例如,根据SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5编码stradomer 的DNA)进行瞬时转染。所表达stradomer单元单体然后可以形成功能性stradomer单元和单体,在此之前,stradomer单体或单元进行自聚集或者stradomer单体用stradomer 间单体连接进行缔合。所表达stradomer然后可以通过本文所描述的下游制造方法(例如,亲和色谱法、离子交换色谱法和/或疏水相互作用色谱法)从细胞培养基中纯化。本领域技术人员应理解,核酸构建体中包含的前导肽仅用于促进stradomer单元单体肽的产生并且在表达成熟蛋白质后被裂解。因此,本发明的生物活性仿生物不包括前导肽。

[0091] 簇stradomer

[0092] 在一个实施例中,根据本公开制成的最佳制造的GL-2045是簇stradomer。“簇stradomer”是具有中心部分“头部”和两个或更多个“腿部”的具有径向形式的仿生物,其中每个腿包括能够结合至少一种Fcγ受体和/或补体的一个或多个Fc结构域。簇 stradomer由于导致stradomer多聚化的多聚化结构域的存在因此也被称为“多聚化 stradomer”。因此,含有一个stradomer单体分子上的多个Fc结构域的连续stradomer还可以被分类为簇stradomer或多聚化stradomer,只要所述分子还含有至少一个多聚化结构域即可。每个簇stradomer包含多于一个同源二聚体蛋白,每个同源二聚体蛋白被称为“簇stradomer单元”。每个簇stradomer单元包含多聚化的至少一个区域以及包括至少一个功能性Fc结构域的“腿部”区域。多聚化区域一旦用另一个簇stradomer单元多聚化就会创建簇stradomer“头部”。腿部区域可以能够结合与每个腿部区域中存在的Fc 结构域一样多的补体分子。例如,腿部区域可以结合与每个腿部区域中存在的Fc结构域一样多的C1q分子。因此,簇stradomer是能够结合两个或更多个C1q分子的仿生化合物,由此避免了也被称为补体依赖

性细胞毒性(CDC)的补体介导溶解。

[0093] 本发明的最佳制造的stradomer内所含有的多聚化区域是IgG2铰链区。如本领域中已知的，人IgG2的铰链区可以形成共价二聚体(Yoo,E.M.等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》170,3134-3138(2003);Salfeld,《自然生物技术(Nature Biotech.)》25,1369-1372(2007))。IgG2二聚体的形成可能经由C-C键通过IgG2铰链结构来介导(Yoo 等人,2003)，这表明仅铰链结构就可以介导二聚体的形成。然而，在人血清中发现的IgG2 二聚体的量是有限的。据估计，作为同源二聚体的二聚体存在的IgG2的量小于总IgG2 的10％(Yoo等人,2003)。此外，并无定量证据证明IgG2的多聚化超出了同源二聚体的二聚体。(Yoo等人,2003)。即，尚未在人血清中发现用于形成更高阶多聚体的天然 IgG2。含IgG2铰链stradomer(例如，最佳制造的GL-2045)作为更高阶多聚体存在，并且不同于人血清中的其中IgG2铰链相互作用可变的天然IgG2，GL-2045已经被证明形成了高度稳定的多聚体，这通过非还原SDS-PAGE凝胶、分析超速离心法和在37℃、100％湿度下进行的3个月稳定性研究证实。此外，还令人吃惊的是，含IgG2铰链 stradomer制剂中多聚体的量显著高于约10％的二聚体，并且在人血清中并未观察到IgG2 的多聚体。例如，属于多聚体的stradomer的百分比超过20％并且可以超过30％、40％、 50％、60％、70％、80％或甚至90％，所述多聚体包含同源二聚体的二聚体、三聚体、四聚体和更高阶多聚体。在特别优选的实施例中，作为同源二聚体存在的GL-2045的百分比在10％与20％之间，并且作为同源二聚体的更高阶多聚体存在的GL-2045的对应百分比大于70％。

[0094] SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中描述了GL-2045的氨基酸序列。

[0095] 如本文所使用的术语“分离的”多肽或肽指代不具有天然存在的配对物或已经从天然伴随其的组分中分离或纯化的多肽或肽，所述组分例如在如胰腺、肝脏、脾脏、卵巢、睾丸、肌肉、关节组织、神经组织、胃肠组织、或乳房组织或肿瘤组织(例如，乳腺癌组织)等组织中或者在如血液、血清或尿液等体液中。通常，当多肽或肽按干重计至少 70％不含蛋白质和其天然缔合的其它天然存在的有机分子时，所述多肽或肽被视为是“分离的”。优选地，本发明的多肽(或肽)的制剂按干重计为本发明的多肽(肽)的至少 80％、更优选至少90％并且最优选至少99％。由于化学合成的多肽或肽与天然伴随其的组分内在地分离，因此合成的多肽或肽是“分离的”。

[0096] 本发明的分离的多肽(或肽)可以例如通过表达编码多肽或肽的重组核酸或者通过化学合成来获得。在与其天然起源的源不同的细胞系统中产生的多肽或肽是“分离的”，因为所述多肽或肽必然不含天然伴随其的组分。在优选的实施例中，本发明的分离的多肽仅含有对应于IgG1 Fc单体和IgG2铰链多聚化结构域(SEQ ID No:6)的序列，并且不含可以辅助克隆或纯化蛋白质的另外的序列(例如，引入的限制酶识别位点或纯化标签)。分离度或纯度可以通过任何适合的方法来进行测量，例如柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法或HPLC分析法。

[0097] 制造方法

[0098] GL-2045形成同源二聚体的有序多聚体并且在同源二聚体和所有多聚体级分中具有活性。对于GL-2045功能而言，制造过程产生经过优化的多聚体曲线是至关重要的。如本文所使用的，“经过优化的多聚体曲线”或“经过优化的多聚化曲线”指代同源二聚体与GL-2045的更高阶多聚体的组合，所述组合针对GL-2045产生了期望的生物学结果作为IVIG模

拟物(例如,通过补体系统的初始活化和/或随后例如在不受理论限制的情况下在C3/C3b水平下对补体活化的抑制和对CDC的阻止而增强的与C1q的结合)。本领域技术人员应认识到,将各种多聚体级分从最优制造的GL-2045中分离出来单独地作为单独的产物或与其它元素组合会是有利的,包含用于其它治疗目的。例如,如实例中提供的,GL-2045的较大多聚体级分在与C1q结合并调节下游补体介导的效应子功能时以及在结合低亲和力FcγR时比较小的多聚体级分更具活性。因此,本发明的方法不仅涉及包括经过优化的多聚体曲线的GL-2045组合物,而且涉及仅包括基于期望的效应子功能的所选多聚体的GL-2045组合物。在这种实施例中,产生了一种期望的生物学结果的GL-2045经过优化的多聚体曲线可能不同于产生另一种期望的生物学结果的经过优化的多聚体曲线。

[0099] 在不受理论束缚的情况下,据认为,同源二聚体类似于未聚集的IgG1充当受体和配体缓冲液。更高阶多聚体以增加的亲合力与低亲和力Fcγ受体和补体因子(例如,属于六聚体的C1q)结合,并且如本文所描述的,与同源二聚体或更低阶多聚体(例如, GL-2045同源二聚体的二聚体、三聚体和/或四聚体)相比展现出加强的生物功效。因此,在临床有效GL-2045的生产中,多聚化程度是上游和下游制造的关键性考虑因素。如此,不仅期望通过经过优化的上游制造方法保持GL-2045的最佳细胞活力、高蛋白滴度和最佳多聚化曲线,而且还期望通过经过优化的下游制造方法保持和/或增强GL-2045的最佳多聚化曲线。

[0100] 在一些实施例中,本文所描述的经过优化的制造方法产生了其中GL-2045的至少70%或至少80%作为非同源二聚体(例如,同源二聚体的二聚体、同源二聚体的三聚体等)存在的GL-2045蛋白组合物。在一些实施例中,GL-2045的大于70%或大于80%作为非同源二聚体存在。例如,经过优化的制造方法可以产生其中GL-2045的80%、85%、 90%、95%或更多作为非同源二聚体存在的GL-2045蛋白组合物。在一些实施例中,蛋白组合物包括作为最高阶多聚体(即,同源二聚体的7聚体及以上)存在的、GL-2045 的至少28%或至少30%。在一些实施例中,蛋白组合物包括作为最高阶多聚体存在的、 GL-2045的不超过35%。在一些实施例中,蛋白组合物包括作为四聚体、五聚体、六聚体和7聚体存在的、GL-2045的至少约35%(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分4到6)。在一些实施例中,GL-2045的至少约35%作为同源二聚体的三聚体及以上存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分3及以上)。在一些实施例中,GL-2045 的至少约35%作为同源二聚体的三聚体、四聚体、五聚体或六聚体存在(即,总GL-2045 组合物的至少35%包含级分3到6)。在一些实施例中,GL-2045的至少约35%作为同源二聚体的四聚体及以上存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分4及以上)。在一些实施例中,GL-2045的至少约35%作为同源二聚体的四聚体和五聚体存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分4和5)。在一些实施例中,GL-2045的至少约 35%作为同源二聚体的五聚体及以上存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分 5及以上)。在一些实施例中,GL-2045的至少约35%作为同源二聚体的五聚体和六聚体存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分5和6)。在一些实施例中,GL-2045 的至少约35%作为同源二聚体的六聚体及以上存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分6及以上)。在一些实施例中,GL-2045的至少约35%作为同源二聚体的7聚体及以上存在(即,总GL-2045组合物的至少35%包含级分7及以上)。例如,本文所描述的经过优化的制造方法可以产生其中GL-2045的40%、45%、50%、55%或更多作为同源二聚体的五聚体及以上存在的GL-2045蛋白组合物。用于含Fc治疗剂(例如,单克隆抗体)的当前制造方法已经集中于

通过下游过滤步骤增加的蛋白滴度和产率上。这些方法通常不考虑制造过程对含Fc蛋白质的多聚化的影响，并且与本文所描述的方法形成鲜明对比，寻求使蛋白质聚集和多聚化最小化。令人惊讶的是，产生最高蛋白产率的GL-2045的培养条件不一定产生作为多聚体存在的、GL-2045的最高百分比。如此，本文所描述的数据证明，影响总蛋白滴度的制造变量至少部分地独立于影响多聚化曲线的变量。因此，本领域技术人员将会无法基于现有技术预测哪种上游制造条件将会影响 GL-2045多聚化。

[0101] 例如，用于用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞进行重组蛋白生产的确立方案提供了在特定培养日从37℃到31℃的温度转变(Ouguchi等人，《细胞技术学(Cytotechnology)》, 52(3)，第199-207页，(2006)；Masterson和Smales，《制药学生物工艺(Pharmaceutical Bioprocessing)》，2(1)，第49-61页，(2014))。然而，本发明人发现，与Ouguchi等人所描述的相比，从37℃到32.5℃的温度转变在优化蛋白滴度的同时保持了细胞密度和高细胞活力。进一步地，本发明人发现，基于细胞密度而非基于如先前所描述的给定培养日来转变温度导致GL-2045蛋白滴度提高近10g/L。

[0102] 此外，本发明人已经发现，由经过优化的上游制造方法产生的经过优化的多聚化曲线的保持部分地依赖于经过优化的下游制造方法(例如，亲和色谱法和/或离子交换色谱法)。广泛描述并通常使用单克隆抗体(mAb)和Fc融合蛋白过滤和纯化技术。然而，当应用于GL-2045时，这些技术导致对GL-2045多聚化曲线有不可预测的修改。例如，本发明人已经令人惊讶地发现，尽管大多数蛋白A柱常规地用于纯化mAb和Fc融合蛋白，但不适于用于纯化GL-2045，如实例8所证明的。蛋白A是极其昂贵的试剂，从而花费了数百万美元以遵循单一药物的良好生产规范(GMP)纯化进行使用并且为了在经济上可行需要重复使用多达100次或更多次。与mAb和Fc融合蛋白一样，GL-2045结合蛋白A；然而，与mAb和Fc融合蛋白不同，由于GL-2045与蛋白A的亲合结合， GL-2045并未通过正常的洗脱步骤与蛋白质A完全解离。本发明人已经出乎意料地发现，利用蛋白A柱来纯化GL-2045需要更频繁的柱清洗计划，在所述纯化中，保持了最佳多聚化曲线。

[0103] 本发明人已经进一步发现，本领域常用的蛋白A柱原位清洗(CIP)程序出乎意料地导致GL-2045多聚化曲线发生变化。正常的CIP程序需要在纯化运行结束时进行柱清洗，这会涉及蛋白质上清液穿过柱的多个循环。然而，本发明人已经发现，GL-2045的高亲合力导致GL-2045与蛋白A解离不足。因此，蛋白A的结合位点仍然被占据，从而阻碍了GL-2045在随后的循环中的结合并导致损失同源二聚体。因此，与和mAb或 Fc融合蛋白一起使用的方案相比，本发明人已经出乎意料地发现，使用GL-2045，进行蛋白A柱的CIP清洗必须比使用单克隆抗体或Fc融合蛋白以及如0.5M NaOH等高度严格的再生缓冲液时更为频繁。

[0104] pH洗脱梯度通常与蛋白A柱一起使用以优化纯化期间的蛋白质产率。本发明人已经出人意料地发现，本领域中用于优化单克隆抗体或Fc融合蛋白的蛋白A柱产率的pH 洗脱梯度可能引起GL-2045的同源二聚体或更高阶多聚体组分的不期望的损失，由此改变GL-2045的多聚化曲线(展示在实例10中)。如此，本发明人还确定了使用洗脱梯度技术来优化GL-2045的产率和多聚化的组合的方法。另外，本发明人已经出乎意料地发现，pH洗脱梯度可以应用于蛋白A柱以用于新的目的，即，用于从同源二聚体聚集体中分离出最大的高度有序的GL-2045多聚体(如实例11所展示的)。

[0105] 本发明人还已经发现，当使用本领域中常用的离子交换柱如阴离子交换和阳离子

交换来纯化单克隆抗体和Fc融合蛋白时，pH和/或盐的变化可以改变GL-2045的多聚化曲线，如实例12中所展示的。这与单克隆抗体或Fc融合蛋白形成鲜明对比，在所述单克隆抗体或Fc融合蛋白中，盐或pH的变化可能导致损失少量蛋白质，但药物的组成并未改变。另外，本发明人已经令人惊讶地发现，盐和/或pH的调整可以出于新的目的用于从可能具有相似分子质量的同源二聚体的聚集体中分离出最大的高度有序的GL-2045 多聚体。如实例13所展示的，发明人使用功能性测定来证明从最高阶多聚体级分中去除无序聚集体是与更高的效能和更高纯度的GL-2045产物相关联的。

[0106] 疏水相互作用(HIC)柱在本领域中通常用于通过各种机制来纯化单克隆抗体和Fc融合蛋白，所述机制包含高产率捕获、精制单克隆抗体、从全长形式中去除截短的物种、将活性形式与无活性形式分离以及清除病毒。然而，当在GL-2045的上下文中使用时，发明人已经发现，标准HIC柱是不可预测的。如实例14所展示的，包含不同基质的7 个HIC柱与范围为16％到62％的差异很大的捕获率相关联，尽管所有柱使用相同的上清液和相同的缓冲液。

[0107] 进一步地，本发明任预测，缓冲液的变化可以改变GL-2045的多聚化曲线。这与单克隆抗体或Fc融合蛋白形成鲜明对比，在所述单克隆抗体或Fc融合蛋白中，缓冲液的变化将会导致损失少量蛋白质或不太完美的精制，但药物的基本组成并未改变。

[0108] 此外，本发明人已经发现，因为GL-2045同源二聚体包含IgG1 Fc和导致形成高度有序多聚体的多聚化结构域，所以GL-2045亲合性地结合于与天然IgG1 Fc同源二聚体无亲合力地结合的所有或几乎所有配体和靶标。不足为奇的是，这包含所有低亲和力Fc 受体和补体C1q以及纯化柱中常用的蛋白A和蛋白G。然而，这一亲合结合还会导致不太期望的潜在靶标结合，例如内毒素。为此，本发明人已经确定期望的是多步纯化过程，包含通过蛋白A来纯化GL-2045以及通过阳离子交换色谱法、阴离子交换流经和疏水相互作用柱中的至少一种或多种来精制经过蛋白A纯化的GL-2045。在优选实施例中，期望的是四步纯化过程，包含通过蛋白A纯化GL-2045以及通过处于结合模式的阳离子交换色谱法、处于流经模式的阴离子交换和处于结合或流经模式的疏水相互作用柱所有这三种来精制经过蛋白A纯化的GL-2045。实例15中概述了这个四步纯化过程。本领域技术人员应容易理解，可以在实例15所描述的过程之前、期间或之后的任何点添加包含深度过滤和超滤步骤在内的另外的过滤步骤，以进一步纯化GL-2045组合物。

[0109] 上游制造

[0110] 通常来说，上游制造方法是在受控条件下接种并在培养物中生长生物材料以制造某些类型的蛋白质生物产品(例如，GL-2045)的方法。如本文所使用的，“上游制造方法”具体指代在不参考通常被分类为下游制造方法的后续纯化和过滤步骤的情况下重组产生蛋白质的方法。更改或改变旨在优化特定蛋白质特性(例如，多聚化效率)的上游制造方法在本文中被称为“经过优化的上游制造方法”。上游蛋白质制造的若干方面可以进行优化(例如，改变或更改以实现期望的结果)以产生具有特定特性的最终蛋白质产物。可以优化的上游重组蛋白质生产的各个方面可以包含但不限于编码蛋白质的表达载体的组成、细胞类型、基础培养基、包含补料的培养基添加剂、补料时间表、传代时间表、培养温度、温度转变、湿度、通风程度、pH、接种细胞密度、CO_2水平和/或氧气水平。在一些实施例中，本文所描述的经过优化的上游制造方法产生了高GL-2045滴度，其中更高阶多聚体的百分比与非优化

上游制造方法产生的GL-2045相比有所增长。

[0111] 在本发明的一些方面，用编码GL-2045的表达载体转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一些方面，将GL-2045表达盒插入到基因组中是由piggyBac转座子介导的，其中 GL-2045表达盒的侧翼为piggyBac最小反向重复元件。这个GL-2045表达载体与编码 piggybac转座酶的载体的共表达介导基因整合到基因组的主动转录的区域中，从而导致产生与标准转染方法相比具有稳定的且增强的基因表达的细胞系(参见通过引用并入本文的US 2010/0311116和Matasci等人，《生物技术与生物工程(Biotechnol.Bioeng.)》, 第108卷，第2141-2140页，(2011))。背负式系统通常至少部分地由于大量整合的转基因而增加了蛋白质的产生。然而，本发明人选择了转基因插入率相对较低(例如，通过UV分光光度法确定的约11个拷贝)的高滴度高活力克隆细胞系；然而，本领域技术人员应理解，使用选择性抗生素压力还允许使用大于约50个插入拷贝或超过约100个插入拷贝的转基因插入速率。在一些实施例中，表达载体包括编码前导肽(例如，SEQ ID NO:1)的核酸。在一些方面，表达载体进一步包括用于允许选择成功转染的CHO细胞的抗生素抗性基因。在本发明的一些方面，成功转染的CHO细胞在不存在抗生素选择的情况下生成(参见US 2010/0311116)。在一些方面，表达载体进一步包括用于促进 GL-2045的高水平表达的转录启动子(例如，CMV启动子)。

[0112] 在一些实施例中，在生物反应器中培养用GL-2045表达载体转染的CHO细胞。在一些实施例中，仔细选择存在许多变体的CHO细胞系，使得一旦使用优先在转录活性位点处产生插入的技术用GL-2045表达载体稳定转染。在一些实施例中，应用于所述转染的所选CHO细胞系的培养条件允许培养方案持续比标准制造方法更长的时间而不会对细胞活力产生不利影响。标准制造方法在生物反应器中平均可以进行达到12天，此时由于培养物中存在的细胞碎片增加，细胞活力减小。除了与细胞活力的损失相关联之外，细胞碎片显著增加了与过滤和纯化相关联的挑战。在本发明的一些实施例中，将细胞以预定的细胞密度播种在生物反应器中并培养>12天。在一些实施例中，将细胞在生物反应器中以可接受的活细胞密度培养13天、14天、15天、16天、17天、18天、19 天、20天、21天或更多天。

[0113] 在一些实施例中，ActiCHO P用作基础培养基以用于最佳制造的GL-2045的上游制造。如本文中可互换使用的术语“ActiCHO P”和“优化的培养基”指代可商购的ActiCHO®基础培养基(“ActiCHO P”，通用电气医疗集团(GE Healthcare))、其任何实质性拷贝或包括与ActiCHO P基本上相同的数量、基本上相同的成分的培养基。ActiCHO P最近也已经被通用电气作为Hyclone“ActiPro”出售，Hyclone“ActiPro”是与ActiCHO P 几乎完全相同的产品并且是用于这些公开内容的等效试剂。在一些实施例中，除了基础培养基之外，还使用了ActiCHO®补料A和补料B(最近也被通用电气作为Hyclone“细胞加强(Cell Boost)7a”和Hyclone“细胞加强7b”出售，Hyclone“细胞加强7a”和 Hyclone“细胞加强7b”是与ActiCHO®补料A和补料B完全相同的产品并且是用于本公开的等效试剂)。如本文中可互换使用的术语“ActiCHO补料A”或“优化的补料A”和如本文中可互换使用的术语“ActiCHO补料B”或“优化的补料B”指代可商购的ActiCHO®补料(通用电气医疗集团)、其任何实质性拷贝或包括与ActiCHO补料A和/ 或ActiCHO补料B基本上相同的数量、基本上相同的成分的补料。在本发明的一些方面，每天用ActiCHO补料A和补料B向利用GL-2045表达载体转染的CHO细胞补料。在本发明的一些方面中，每隔一天用ActiCHO补料A和补料B向利用GL-2045表

达载体转染的CHO细胞补料。在本发明的一些方面，经由连续补料用ActiCHO补料A和补料B向利用GL-2045表达载体转染的CHO细胞补料。

[0114] 在经过优化的上游制造方法的一些实施例中，在转变温度之前，使利用GL-2045表达载体转染的CHO细胞生长到特定的细胞密度。在一些方面，在转变温度之前，CHO 细胞生长到密度为约500-3000万个细胞/毫升。在一些方面，在转变温度之前，细胞生长到密度为约600、700、800、900、1000、1500、2000、2500或约3000万个细胞/毫升。在一些方面，在转变温度之前，CHO细胞生长到密度为约1000-2500万个细胞/毫升。在经过优化的制造方法的一些方面，在转变温度之前，CHO细胞生长到密度为约 1000-1500万个细胞/毫升。

[0115] 在一些实施例中，在37℃±1℃下培养用GL-2045表达载体转染的CHO细胞，直至达到预定的细胞密度。在一些方面，在细胞达到预定的细胞密度之后，温度转变到32.5 ℃±1℃。这个方面与用于重组蛋白生产的先前描述的培养方法形成对比，其中将细胞在37℃下培养预定的天数，之后温度常常转变到31℃（Ouguchi等人，《细胞技术学(Cytotechnology)》，52(3)，第199-207页，(2006)；Masterson和Smales，《制药学生物工艺(Pharmaceutical Bioprocessing)》，2(1)，第49-61页，(2014)）。本发明人已经确定，基于细胞密度而非培养时间将温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃出乎意料地提供了以下的组合：相对于标准上游制造方法，活力增加、细胞密度提高并且蛋白滴度大幅度增加。在一些实施例中，使利用GL-2045表达载体转染的CHO细胞经受双重温度转变。在一个实施例中，在达到峰值活细胞密度之前，将转染的CHO细胞在37℃±1℃下培养并转变到34℃±1℃。在优选实施例中，这个温度转变会在CHO细胞仍处于对数生长期时发生。在特别优选的实施例中，初始温度转变发生在培养的第3天或第4天。在另一个实施例中，在37℃±1℃下培养转染的CHO细胞，直至达到预定的细胞密度，此时温度转变到34℃±1℃。在优选实施例中，在第一次温度转变时，细胞密度在 500-2000万个细胞/毫升之间。在特别优选的实施例中，在第一次温度转变时，细胞密度在800-1500万个细胞/毫升之间。在一些实施例中，第二次温度转变发生在第7天±1天。在一些实施例中，温度然后进一步转变到31℃。在一些实施例中，这个第二次温度转变在初始温度转变后的大约第4天执行。

[0116] 下游制造方法

[0117] 在一些实施例中，采集GL-2045通过下游制造方法完成。在一些实施例中，下游制造方法与本文所描述的经过优化的上游制造方法组合地使用，以去除或分离特定的蛋白质级分(例如，去除同源二聚体GL-2045的无序高分子量聚集体)。如本文所使用的，“下游制造方法”是对蛋白质上清液执行的蛋白质纯化和过滤步骤以生成具有期望的纯度和/或浓度的蛋白组合物。在一些实施例中，下游制造方法已经针对GL-2045的纯化和过滤进行了优化以产生和/或保持GL-2045的特定多聚化曲线，在本文中被称为“经过优化的下游制造方法”。

[0118] 在一些实施例中，GL-2045通过色谱法纯化。在一些实施例中，GL-2045使用蛋白 A柱纯化。如上所述，蛋白A柱非常昂贵并且被重复使用相当多次以便在经济上可行。蛋白A柱的重复使用需要“再生”蛋白A柱以保持蛋白质结合能力。如本文所使用的，“再生(regenerating/regenerate)”指代从蛋白A柱中去除在洗脱过程期间未去除的结合蛋白。在一些实施例中，在GL-2045纯化期间，蛋白A柱必须比制造商说明书所示出的更频繁地再生或者比本领域中用于纯化单克隆抗体或Fc融合蛋白的正常情况更频繁地再生。在一些实

施例中，蛋白A柱必须以是制造商建议的频率的至少两倍再生。在另外的实施例中，蛋白A柱必须在GL-2045上清液穿过柱的每个连续回合之间再生。在这种实施例中，用蛋白A亲和柱纯化GL-2045需要使用高严格再生缓冲液来从蛋白A柱中去除亲合性地结合的GL-2045多聚体并且再生蛋白A柱的完全结合能力。在优选实施例中，高严格再生缓冲液不会引起蛋白质A柱的降解，或与柱的降解很少相关联。在一些实施例中，高严格再生缓冲液包括可溶碱。在一些实施例中，碱是氢氧化钠(NaOH)。在一些实施例中，再生缓冲液的NaOH浓度大于0.3M NaOH。例如，高严格再生缓冲液可以大于0.35M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M或更多NaOH。在特定实施例中，再生缓冲液中NaOH的浓度为0.5M NaOH。

[0119] 在一些实施例中，优化从蛋白A亲和柱中洗脱的GL-2045以从药品中去除GL-2045的高分子量无序聚集体或减少GL-2045的高分子量无序聚集体的量。在一些实施例中，GL-2045按洗脱梯度从蛋白A柱中洗脱(例如，pH洗脱梯度)。

[0120] 在一些实施例中，用于GL-2045的经过优化的下游制造方法包括多步纯化过程，所述多步纯化过程包括通过亲和色谱法(例如，蛋白A亲和色谱法)进行纯化以及选自阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法和疏水相互作用柱的至少一个或多个精制步骤。在优选实施例中，使用用于GL-2045的四步纯化过程代替本领域通常实践的两步或三步纯化过程，所述四步纯化过程包括通过亲和色谱法(例如，蛋白A亲和色谱法)进行纯化、通过阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法和疏水相互作用柱中的每一个进行精制。术语“精制”通常指代蛋白A纯化后去除其余的杂质，包含聚集体、内毒素、DNA和/或病毒。另外，对于GL-2045，“精制”另外意指如通过使用这些相同的色谱技术来控制同源二聚体和特定的更高阶多聚体的百分比。

[0121] 在一些实施例中，通过离子交换色谱法(例如，阳离子或阴离子交换)来精制 GL-2045。在一些实施例中，通过离子交换色谱法精制GL-2045用洗脱缓冲液执行，所述洗脱缓冲液减少了和/或最小化了在蛋白A纯化后过程期间保留的GL-2045同源二聚体的无序高分子量聚集体的量。在一些实施例中，执行洗脱步骤以从蛋白A柱中洗脱 GL-2045。在一些实施例中，执行梯度洗脱以从蛋白A柱中洗脱GL-2045。在一些实施例中，洗脱缓冲液是乙酸钠缓冲液。在一些实施例中，洗脱缓冲液中乙酸钠的浓度为至少25mM。例如，洗脱缓冲液中乙酸钠的浓度可以是乙酸钠的至少30mM、35mM、40 mM、45mM、50mM、55mM、60mM、75mM、100mM或更多。在一些实施例中，洗脱缓冲液是50mM乙酸钠。在一些实施例中，洗脱缓冲液是添加有不同量的另外的盐缓冲液(例如，NaCl缓冲液)的50mM乙酸钠。在一些实施例中，另外的缓冲液是 1M NaCl pH 5缓冲液(“缓冲液b”)。在一些实施例中，洗脱缓冲液包括至少30％的缓冲液B。在一些实施例中，洗脱缓冲液包括30％与40％之间的缓冲液B。在一些实施例中，洗脱缓冲液包括35％与40％之间的缓冲液B。在更进一步的实施例中，洗脱缓冲液包括37％与39％之间的缓冲液B。在一些实施例中，洗脱缓冲液是38％+/-0.5％的缓冲液b。

[0122] 在一些实施例中，使用疏水相互作用色谱法(HIC)来精制GL-2045。在一些实施例中，选择HIC柱以去除GL-2045的高分子量无序聚集体(例如，Octyl FF HIC柱)。可以执行流经模式或结合模式以便用HIC柱来纯化GL-2045。本领域技术人员应理解，调整如pH和盐条件等变量将会确定GL-2045是与HIC树脂结合还是流经柱。在一些实施例中，选择HIC柱以纯化GL-2045的特定级分，如同源二聚体和/或更高阶多聚体(例如，丁基HP和/或苯基HP柱)。在一些实施例中，可以期望分离GL-2045的特定级分以用于治疗特定疾病指征。例如，HIC柱

可以用于生成基本上包含特定GL-2045级分的药品(例如,主要包含GL-2045同源二聚体的药品、主要包含同源二聚体的二聚体的药品、主要包含GL-2045的更高阶多聚体的药品等)。将GL-2045级分分离成单独的产物会有利于某些疾病指征。例如,GL-2045同源二聚体与FcγRI结合,但基本上不与其它 FcR结合。如此,GL-2045同源二聚体会对治疗至少部分地由FcγRI信号传导介导的疾病特别有用,如腹膜炎(Heller等人,《免疫学杂志》,第162卷,1992)或急性肺损伤 (Xie等人,《免疫学杂志》,第188卷,2012)。同样地,GL-2045的三聚体以及可能的二聚体和四聚体会对治疗自身免疫疾病特别有用(参见WO 2015/168643)。在C1q是六聚体时,五聚体、六聚体和七聚体在治疗补体介导的疾病时会特别有用。本领域技术人员应认识到,这些仅是GL-2045级分会有利于治疗某些疾病的方法中的一些。

[0123] 在一些实施例中,本文所描述的经过优化的下游制造方法可以是单独的纯化和/或过滤技术的组合。例如,在一些实施例中,经过优化的下游方法可以包括通过亲和色谱法来纯化GL-2045(例如,通过针对蛋白A柱的优化方法进行纯化)、之后用离子交换色谱法(例如,通过优化的阳离子交换方法进行精制)和/或疏水相互作用柱进行另外的精制。在一些实施例中,本文所描述的经过优化的下游方法包括四步纯化过程,所述四步纯化过程包含通过蛋白A、阳离子交换、阴离子交换流经和疏水相互作用柱进行纯化。在一些实施例中,还可以使用另外的深度过滤和/或超滤步骤。

[0124] 因此,本文中可互换使用的术语“最佳制造方法”或“经过优化的制造方法”可以指代经过优化的上游制造方法和/或经过优化的下游制造方法。在一些实施例中,经过优化的制造方法包括经过优化的上游方法和经过优化的下游方法两者。如此,如本文所使用的术语“最佳制造的stradomer”或“最佳制造的GL-2045”指代根据经过优化的上游制造条件和/或经过优化的下游制造方法制备的高滴度高阶多聚体显性GL-2045组合物。尽管本文所描述的GL-2045组合物可以是最佳地产生的GL-2045(即,通过本文所描述的方法制备的GL-2045),但是本领域技术人员应理解,落入本文所描述的限定的多聚体模式内的GL-2045组合物可以通过其它方式实现。因此,“GL-2045组合物”或“重组GL-2045组合物”或“经纯化GL-2045组合物”指代包括GL-2045的组合物,所述组合物包含GL-2045药品,无论所述组合物是否是经由最佳制造方法制备的。本文中,术语“多聚体模式”或“结合模式”或任何类似术语可互换使用并且指代在GL-2045组合物的分析测定中观察到的多聚体模式。图33中示出了示例性多聚体模式。

[0125] 在一些实施例中,本文提供了具有限定的多聚体模式的重组产生的GL-2045组合物。如本文所使用的,术语“限定的多聚体模式”或“限定的多聚化模式”或“限定的结合模式”指代GL-2045多聚化的模式,所述模式是可再生的并且可以按照作为同源二聚体、更高阶多聚体和/或最高阶多聚体存在的总GL-2045组合物的百分比来描述。本领域普通技术人员应理解,同源二聚体和/或多聚体百分比的绝对值可以基于所使用的分析方法而变化。例如,与对完全相同的组合物的分析用SEC-HPLC相比,对SDS-PAGE 凝胶的数字软件分析将会产生略有不同的多聚体百分比。除非本文中另有说明,否则本文所描述的GL-2045组合物的同源二聚体和多聚体的百分比表达为通过分析用 SEC-HPLC方法测量的百分比。在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045,其中 GL-2045的至少80％作为非同源二聚体或“多聚体”(例如,同源二聚体的二聚体、同源二聚体的三聚体等)存在。在一些实施例中,GL-2045的大于80％作为多聚体存在。例如,经过优化的制造方法如本文中所描述的那些可以产生

GL-2045蛋白质组合物，其中GL-2045的80％、85％、90％、95％或更多作为多聚体存在。在一些实施例中，GL-2045 的至少30％作为“最高阶多聚体”存在，在本文中被定义为同源二聚体的7聚体及以上。在一些实施例中，重组产生的GL-2045的不超过40％作为最高阶多聚体存在。本领域普通技术人员还应理解，当我们谈论“带”或“级分”时，除非另有说明，否则带的数量意味着级分中存在的同源二聚体的数量。因此，例如，带2包括同源二聚体的二聚体，而带3包括同源二聚体的三聚体。因此，例如，带2包括同源二聚体的二聚体、带3包括同源二聚体的三聚体、带4包括同源二聚体的四聚体等。

[0126] 如本文所使用的，术语“更高阶多聚体”指代同源二聚体的三聚体及以上(即，级分3及以上中存在的多聚体)。如本文所使用的，术语“最高阶多聚体”指代级分7及以上的多聚体、或包含同源二聚体的7聚体及以上的级分。

[0127] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分占总组合物的不到约20％。在一些实施例中，同源二聚体级分占总蛋白组合物的约12％到约19％、约14％到约19％、约15.5％到约17.5％或约14％到约18.5％。在一些实施例中，同源二聚体级分占总蛋白组合物的约15.9％或约16.2％。

[0128] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分的二聚体占总组合物的约7％到约13％、约7％到约12.5％、约7％到约12％、约9％到约11％或约9.1％到约11.7％。在一些实施例中，同源二聚体级分的二聚体占总蛋白组合物的约10％或约10.6％。

[0129] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分的三聚体占总组合物的约5.5％到约11％、约5.5％到约10％或约6.5％到约8％。在一些实施例中，同源二聚体级分的三聚体占总蛋白组合物的约7％或约7.3％。

[0130] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分的四聚体占总组合物的约10％到约16％、约11％到约16％、约13％到约15％或约12.4％到约15.1％。在一些实施例中，同源二聚体级分的四聚体占总蛋白组合物的约14％或约14.3％。

[0131] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分的五聚体占总组合物的约6％到约9％、约7％到约8％或约7.1％到约8.2％。在一些实施例中，五聚体级分的二聚体占总蛋白组合物的约7％或约7.5％。

[0132] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分的六聚体占总组合物的约10％到约14％、约12％到约13％或约12.1％到约13.2％。在一些实施例中，同源二聚体级分的六聚体占总蛋白组合物的约12.7％或约12.6％。

[0133] 在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中最高阶多聚体级分占总组合物的至少约28％。在一些实施例中，最高阶多聚体级分占总蛋白组合物的不超过约35％。在一些实施例中，最高阶多聚体级分占总蛋白组合物的约30％到约34％或约28.6％到约35.1％。在一些实施例中，最高阶多聚体级分占总蛋白组合物的约31.4％或约31.9％。在一些实施例中，提供了重组产生的GL-2045组合物，其中同源二聚体级分占总组合物的不到约20％；最高阶多聚体级分占所述总组合物的至少约28％；同源二聚体级分的二聚体占所述总组合物的约7％到约13％；同源二聚体级分的三聚体占所述总组合物的约 5％到约11％；所述同源二聚体级分的四聚体占所述总组合物的约10％到约16％；所述同源二聚体级分的五聚体占所述总组合物的约6％到约10％；所述同源二聚体级分的六聚体占总级分

的约10％到约14％;同源二聚体的二聚体到所述同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约40％到约60％;所述同源二聚体的三聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约32％到约50％;同源二聚体的四聚体到同源二聚体级分的六聚体占所述总组合物的约30％到约37％;所述同源二聚体的五聚体到所述同源二聚体级分的所述六聚体占所述总组合物的约18％到约23％;或前述内容的任何组合。

[0134] 在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045组合物,其中总GL-2045组合物的约80％包括同源二聚体的二聚体及以上(即,带2及以上)。在一些实施例中,重组产生的总GL-2045组合物的约60-80％、62-80％或60-78％包括同源二聚体的三聚体及以上(即,带3及以上)。在一些实施例中,重组产生的总GL-2045组合物的约54-76％、约54-72％、约56-76％或约54-67％包括四聚体及以上(即,带4及以上)。在一些实施例中,提供了 GL-2045组合物,其中总组合物的约44-60％、44-57％或44-51％包括五聚体及以上(即,带5及以上)。在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045组合物,其中总组合物的约38-51％包括六聚体及以上(即,带6及以上)。

[0135] 在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045,其中组合物的带2到带6(即,同源二聚体的二聚体到同源二聚体的六聚体)包括组合物的约39-61％或约44-60％。在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045,其中组合物的带3到带6(即,同源二聚体的三聚体到同源二聚体的六聚体)包括组合物的约32-50％或约35-48％。在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045,其中组合物的带4到带6(即,同源二聚体的四聚体到同源二聚体的六聚体)包括组合物的约26-39％或约30-39％。在一些实施例中,提供了重组产生的GL-2045,其中组合物的带5到带6(即,同源二聚体的五聚体到同源二聚体的六聚体)包括组合物的约16-23％或约18-23％。

[0136] 在不受理论约束的情况下,GL-2045在与低亲和力Fc受体和C1q结合时的最低活性组分是同源二聚体以及同源二聚体的二聚体。本领域技术人员应容易了解,人们可以使用本文所描述的经过优化的色谱方法或类似的纯化技术来减少最终产物中同源二聚体或同源二聚体和二聚体的量。因此,本领域技术人员应知道,这样做将会改变本文所公开的多聚体的百分比。例如且不限于前述内容的通用性,如果本领域技术人员要在纯化过程中去除同源二聚体的50％或同源二聚体和二聚体,则每个其余的多聚体(即,三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、7聚体等)的百分比将会相应地增加。去除同源二聚体的90％和二聚体的50％将会使最终产物中存在的总蛋白减少约20％+/-5％,并且因此将会增加表示为总蛋白质的百分比的三聚体、四聚体、五聚体、六聚体和7聚体的百分比。

[0137] 而且,本领域技术人员应进一步认识到,目前的色谱技术通常不允许去除或减少如最高阶多聚体等单个多聚体带,且不在某种程度上同时移除如六聚体以及在更小程度上五聚体等相邻带。因此,本领域技术人员应知道,由于移除或减少最高阶多聚体而观察到的任何给定多聚体或同源二聚体的百分比的补偿性增加将会使给定多聚体从GL-2045 的被去除的级分在更大程度上更进一步增加(例如,当去除或减少最高阶多聚体时,同源二聚体的百分比将会比观察到的增加的六聚体百分比增加更多)。在任何情况下,其余的多聚体的多聚体百分比的累积增加应当等于被去除的级分的多聚体百分比,这依赖于归因于分析方法的某种可变性。

[0138] 药物组合物

[0139] 本文所描述的GL-2045组合物的施用将会经由任何常用途径、口服地、胃肠外地或局部地施用。示例性途径包含但不限于口服、鼻腔、经颊、直肠、阴道、眼部、皮下、肌内、腹膜内、静脉内、动脉内、瘤内、脊柱、鞘内、关节内的、动脉内、蛛网膜下、舌下、口腔粘膜、支气管、淋巴、子宫内、皮下的、瘤内、集成在如缝合线等可植入装置上或如可植入聚合物等可植入装置中、硬膜内、皮质内或真皮。如本文所描述的，这种组合物通常作为药学上可接受的组合物施用。在优选实施例中，静脉内或皮下施用分离的最佳制造的stradomer。

[0140] 如本文所使用的术语“药学上可接受的载剂”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸收延迟剂等。将这种介质和药剂用于药物活性物质是本领域中熟知的。除了在任何常规介质或药剂与本发明的载体或细胞不相容的范围内之外，设想了其在治疗组合物中的使用。补充性活性成分也可以掺入组合物中。

[0141] 本发明的GL-2045组合物可以配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包含与如例如盐酸或磷酸等无机酸或者如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等有机酸形成的酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成的)。与游离羧基形成的盐还可以源自如例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁等无机碱以及如异丙胺、二甲胺、组氨酸、普鲁卡因等有机碱。

[0142] 通过将最佳制造的GL-2045以所需的量根据需要与以上枚举的各种其它成分一起掺入适当的溶剂中、然后进行过滤灭菌来制备无菌注射液。在一些实施例中，无菌注射液被配制用于肌内、皮下或静脉内施用。通常，通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒剂中来制备分散体，所述无菌媒剂含有基础分散介质以及来自以上枚举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下，优选的制备方法是真空-干燥和冷冻-干燥技术，所述真空-干燥和冷冻-干燥技术从其先前的无菌过滤溶液中产生活性成分加上任何另外的期望成分的粉末。

[0143] 进一步地，一个实施例是适于口服施用的GL-2045组合物并且在具有或不具有惰性稀释剂的情况下以药学上可接受的载剂提供。载剂应当是可同化的或可食用的并且包含液体载剂、半固体载剂(例如，糊剂)或固体载剂。除了在任何常规介质、药剂、稀释剂或载剂对受体或对其中所包含的最佳制造的stradomer制剂的治疗效果有害的范围内之外，其用于口服施用的最佳制造的stradomer组合物中以实践本发明的方法的用途是适当的。载剂或稀释剂的实例包含脂肪、油、水、盐溶液、脂质、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等或其组合。如本文所使用的术语“口服施用”包含口服、经颊、肠内或胃内施用。

[0144] 在一个实施例中，GL-2045组合物通过任何方便且实际的方式与载剂组合，即，通过溶解、悬浮、乳化、混合、封装、微囊化、吸收等。这种程序对于本领域技术人员来说是常规的。

[0145] 在具体实施例中，粉末形式的GL-2045组合物与半固体或固体载剂充分组合或混合。混合可以通过如研磨等任何方便的方式执行。还可以在混合过程中加入稳定剂以保护组合物免于损失治疗活性(例如，通过在胃中变性)。用于可口服施用组合物的稳定剂的实例包含：缓冲剂；对胃酸分泌的拮抗剂；氨基酸，如甘氨酸和赖氨酸；糖类，如右旋糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘露醇；蛋白水解酶抑制剂等。更优选地，对于口服施用的组合物，稳定剂还可以包含对胃酸分泌的拮抗剂。

[0146] 进一步地，与半固体或固体载剂组合的用于口服施用的GL-2045组合物可以进一

步配制成硬壳或软壳明胶胶囊、片剂或丸剂。更优选地，明胶胶囊、片剂或丸剂被肠溶包衣。肠溶包衣防止组合物在pH为酸性的胃或上肠中变性。参见美国专利号5,629,001。在到达小肠后，其中的碱性pH将包衣溶解并允许释放组合物与肠细胞例如派伊尔氏淋巴集结M细胞(Peyer's patch M cell)相互作用。

[0147] 在另一个实施例中，粉末形式的GL-2045组合物与产生纳米颗粒的材料完全组合或混合，所述纳米颗粒封装免疫活性仿生物或附着有免疫活性的仿生物。每个纳米颗粒将会具有小于或等于100微米的尺寸。纳米颗粒可以具有允许胃肠吸收否则将不具有口服生物可利用性的免疫活性仿生物的粘膜粘着性质。

[0148] 在另一个实施例中，在具有或不具有稳定剂的情况下，粉末状组合物与如水或盐溶液等液体载剂组合。

[0149] 可以使用的特定GL-2045制剂是不含钾的低渗磷酸基缓冲剂中的免疫活性仿生蛋白的溶液，其中所述缓冲液的组成如下：6mM磷酸二氢钠一水合物、9mM磷酸氢二钠七水合物、50mM氯化钠、pH 7.0+/-0.1。低渗缓冲液中免疫活性仿生蛋白的浓度范围可以为10μg/mL到100mg/mL。这个配制品可以经由任何施用途径施用，例如但不限于静脉内施用。

[0150] 进一步地，与半固体载剂组合的用于局部施用的GL-2045组合物可以进一步配制成乳膏或凝胶软膏。用于形成凝胶软膏的优选载剂是凝胶聚合物。用于制造本发明的凝胶组合物的优选聚合物包含但不限于卡波姆、羧甲基纤维素和普朗尼克聚合物。具体地说，粉末状Fc多聚体组合物与含有如卡波姆980等聚合剂的含水凝胶以在0.5％与5％wt/体积之间的强度组合，以应用于皮肤，从而治疗皮肤上或皮肤下的疾病。如本文所使用的术语"局部施用"包含应用于真皮、表皮、皮下、或粘膜表面。

[0151] 进一步地，GL-2045组合物可以配制成用于皮下或真皮下植入的聚合物。用于可植入药物输注聚合物的优选配制品是通常被视为安全的药剂并且可以包含例如交联葡聚糖(Samantha Hart，理学硕士论文，"从新型交联葡聚糖凝胶中洗脱抗生素：定量(Elution of Antibiotics from a Novel Cross-Linked Dextran Gel:Quantification)"，弗吉尼亚理工学院暨州立大学(Virginia Polytechnic Institute and State University)，2009年6月8日)、葡聚糖-酪胺(Jin等人，(2010)，《组织工程学A部分(Tissue Eng.Part A.)》，16(8)：2429-40)、葡聚糖-聚乙二醇(Juke等人，(2010)，《组织工程学A部分》，16(2)：565-73)或葡聚糖-戊二醛(Brondsted等人，(1998)，《受控释放杂志(J.Controlled Release)》，53：7-13)。本领域技术人员应知道，可以形成许多类似的聚合物和水凝胶，从而掺入聚合物或水凝胶内固定的stradomer并将孔径控制到期望直径。

[0152] 在配制后，以与剂量配制品相容的方式并且以如治疗有效一样的量的方式施用溶液以使症状得以改善或补救。配制品可以通过如可摄取溶液、药物释放胶囊等各种剂型容易地施用。剂量的某种变化可以根据正在治疗的个体的病状而发生。在任何情况下，负责施用的人可以确定用于个别个体的适当剂量。此外，对于人施用，制剂满足如FDA 生物制剂评估和研究标准中心(FDA Center for Biologics Evaluation and Research standards)要求的无菌性、总体安全性和纯度标准。

[0153] 施用途径将会随着正在治疗的疾病的位置和性质自然地变化并且可以包含例如皮内、透皮、真皮下、肠胃外、鼻腔、静脉内、肌内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、瘤内、灌注、灌洗、直接注射、直肠内和口服施用。

[0154] 在一个实施例中，静脉内、皮下、口服、腹膜内、舌下、经颊、透皮、直肠、通过真皮下植入或肌内施用GL-2045组合物。在特定实施例中，静脉内、皮下或肌内施用最佳制造的stradomer。在一个实施例中，以约0.005mg/Kg到约1000mg/Kg的剂量施用最佳制造的stradomer。在另外的实施例中，以约0.01mg/Kg到约100mg/Kg的剂量施用最佳制造的stradomer。在又另外的实施例中，以约0.1mg/Kg到约20mg/Kg的剂量施用最佳制造的stradomer。在再另外的实施例中，以约1mg/Kg到约10mg/Kg的剂量施用最佳制造的stradomer。在再另外的实施例中，以约2mg/Kg到约5mg/Kg的剂量施用最佳制造的stradomer。最佳制造的stradomer可以每天、每周、每两周、每月或有时以更长的间隔施用至少一次。可以使用两阶段给药方案，其中第一给药阶段包括第二给药阶段的约0.1％到约300％。

[0155] 在另外的实施例中，在施用一种或多种另外的药剂和/或治疗剂之前、期间或之后施用GL-2045组合物。在另外的实施例中，另外的药物活性剂包括：类固醇；生物抗自身免疫药物，如单克隆抗体、融合蛋白或抗细胞因子；非生物抗自身免疫药物；免疫抑制剂；抗生素；以及抗病毒剂；细胞因子；或以其它方式能够充当免疫调节剂的药剂。在再另外的实施例中，类固醇是强的松、泼尼松龙、可的松、地塞米松、莫米松、睾酮、雌性激素、氧雄龙、氟替卡松、布地奈德、倍氯米松、沙丁胺醇或左旋沙丁胺醇。在再另外的实施例中，单克隆抗体是依库丽单抗(eculizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、英利昔单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、利妥昔单抗(rituximab)、托珠单抗(tocilizumab)、戈利木单抗(golimumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、LY2127399、贝利木单抗(belimumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、美泊利单抗(mepolizumab)、妥珠单抗(necitumumab)、纳武单抗(nivolumab)、丹尼托昔单抗(dinutuximab)、苏金单抗(secukinumab)、依伏库单抗(evolocumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、派姆单抗(pembrolizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、维多珠单抗(vedolizumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、阿托曲妥珠单抗(adotrastuzumab)、雷昔库单抗(raxibacumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、本妥昔单抗(brentuximab)、伊匹单抗(ipilumumab)、地诺单抗(denosumab)、康纳单抗(canakinumab)、优特克单抗(ustekinumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、兰尼单抗(ranibizumab)、帕尼单抗 (panitumumab)、那他珠单抗(natalizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗 (cetuximab)、依法利珠单抗(efalizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、托西莫单抗-I131 (toitumomab-I131)、阿仑单抗(alemtuzumab)、曲妥珠单抗(gemtuzumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、巴利昔单抗(basilixumab)、达利珠单抗(daclizumab)、阿昔单抗 (abciximab)、米龙诺单抗(murononomab)、威多廷(vedotin)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、莫维珠单抗(motavizumab)或赛妥珠单抗(certolizumab)。在再另外的实施例中，融合蛋白是依那西普或阿巴西普。在再另外的实施例中，抗细胞因子生物制剂是阿那白滞素。在再另外的实施例中，抗风湿性非生物药物是环磷酰胺、甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、羟氯喹、来氟米特、米诺环素、有机金组合物、福他替尼(fostamatinib)、托法替尼(tofacitinib)、艾托考昔(etoricoxib)或柳氮磺胺吡啶。在再另外的实施例中，免疫抑制剂是环孢菌素A、他克莫司、西罗莫司、霉酚酸酯、依维莫司、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、巴利昔单抗、达利珠单抗或阿仑单抗。在再另外的实施例中，在施用化学治疗剂的给药之前、期间或之后施用最佳制造的stradomer。在

再另外的实施例中，最佳制造的stradomer和另外的治疗剂在一起施用时显示出治疗协同作用。在一个实施例中，在施用另外的治疗剂之前施用最佳制造的stradomer。在另一个实施例中，在施用另外的治疗剂的同时施用最佳制造的stradomer。在再另一个实施例中，在施用另外的治疗剂之后施用最佳制造的stradomer。

[0156] 在一个实施例中，GL-2045组合物共价地固定到可植入装置。在一个实施例中，最佳制造的stradomer固定到缝合处。在另一个实施例中，最佳制造的stradomer固定到移植物或支架。在另一个实施例中，最佳制造的stradomer固定到心脏瓣膜、矫形关节置换物或植入的电子引线。在另一个实施例中，最佳制造的stradomer固定到并嵌入可植入基质内。在优选实施例中，最佳制造的stradomer固定到并嵌入可植入水凝胶内。在一个实施例中，水凝胶包含葡聚糖、聚乙烯醇、聚丙烯酸钠或丙烯酸盐聚集体。在另外的实施例中，最佳制造的stradomer固定在水凝胶中施用，所述水凝胶的孔径大得足以允许免疫细胞进入从而与固定的stradomer相互作用并且然后返回以进行循环。在另外的实施例中，水凝胶的孔径为5到50微米。在优选实施例中，水凝胶的孔径为25-30 微米。

[0157] 在另一个实施例中，施用GL-2045组合物以用物种特异性或嵌合性stradomer分子治疗人、非人灵长类动物(例如，猴子、狒狒和黑猩猩)、小鼠、大鼠、牛、马、猫、狗、猪、兔、山羊、鹿、绵羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、仓鼠、蝙蝠、鸟类(例如，鸡、火鸡和鸭)、鱼和爬行动物。在另一个实施例中，人是成人或儿童。在再另一个实施例中，施用最佳制造的stradomer以预防补体介导的疾病。在另外的实施例中，施用stradomer 以预防伴侣动物和家畜中的疫苗相关自身免疫病状。

[0158] 如本文所使用的术语“肠胃外施用”包含任何形式的施用，其中组合物被吸收到个体中而不涉及经由肠吸收。用于本发明的示例性肠胃外施用包含但不限于皮下、肌内、静脉内、腹膜内、瘤内、眼内、鼻内、或关节内施用。

[0159] 另外，本发明的GL-2045组合物可以任选地在另一种药剂之前、期间或之后施用。

[0160] 如所指示的，以下是针对特定示例性疾病的各种药物配制品类别的具体实例和优选的施用途径：

[0161] 经颊或舌下可溶片剂：心绞痛、结节性多动脉炎。

[0162] 静脉内、肌内或皮下：重症肌无力、溶血性尿毒综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、膜性肾病、视神经脊髓炎、抗体介导的同种异体移植物排斥、狼疮性肾炎、膜性增生性肾小球肾炎(MPGN)、特发性血小板减少性紫癜、包涵体肌炎、副蛋白血症性IgM脱髓鞘性多发性神经病、坏死性筋膜炎、天疱疮、坏疽、皮肌炎、肉芽肿瘤、淋巴瘤、败血症、再生病症性贫血、多系统器官衰竭、多发性骨髓瘤、意义不明的单克隆丙种球蛋白病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病变、炎性肌病、血栓性血小板减少性紫癜、肌炎、贫血症、瘤形成、溶血性贫血、脑炎、脊髓炎、特别是与人类T细胞嗜淋巴细胞病毒1型相关联的脊髓病、白血病、多发性硬化和视神经炎、哮喘、表皮坏死松解症、兰伯特-伊顿肌无力综合征、神经病、葡萄膜炎、格林-巴利综合征、移植物抗宿主疾病、僵人综合征、具有抗Yo抗体的副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性脑脊髓炎和具有抗Hu抗体的感觉神经病、系统性血管炎、系统性红斑狼疮、自体免疫性糖尿病性神经病、急性特发性全自主神经病、伏格特-小柳- 原田综合征、多灶性运动神经病、与抗-/GM1相关联的下运动神经元综合征、脱髓鞘、膜性增生性肾小球肾炎、心肌炎、川崎病、类风湿性关节炎、以及伊文氏综合征(Evan’

s syndrome)、CIDP、MS、皮肌炎、肌肉萎缩症。本文所使用的术语“静脉内施用”包含用于经由静脉内注射或输注将本发明化合物或组合物递送到体循环的所有技术。

[0163] 真皮凝胶、乳液、乳膏或贴剂:白癜风、带状疱疹、痤疮、唇炎。

[0164] 直肠栓剂、凝胶或输注:溃疡性结肠炎、痔疮炎症。

[0165] 作为丸剂、锭剂、胶囊化的或具有肠溶包衣的口服剂:克罗恩氏病、口炎性腹泻、肠易激综合征、炎性肝病、巴雷特食管。

[0166] 皮质内:癫痫、阿尔茨海默病、多发性硬化、帕金森氏病、亨廷顿氏病。

[0167] 腹腔内输注或植入:子宫内膜异位。

[0168] 医疗装置:涂覆在冠状动脉支架、假体关节上。

[0169] 最佳制造GL-2045的治疗应用

[0170] 在一个实施例中,提供了用于治疗或预防疾病或病状的方法,所述疾病或病状如自身免疫疾病、炎性疾病或补体介导的疾病。

[0171] 基于合理的设计以及体外和体内验证,本发明的最佳制造的GL-2045将会充当重要的生物药物以用于治疗炎性疾病和病症并且更改如针对过敏症、癌症、自身免疫疾病、感染性疾病和炎性疾病的生物免疫疗法等多个其它上下文中的免疫功能。适于用本文所公开的具有免疫活性的最佳制造的GL-2045进行治疗的医学病状包含由补体活化或补体介导的效应子功能引起或者与补体活化或补体介导的效应子功能相关联的任何疾病,包含增加的或不适当的补体活性。这种医学病状包含目前或先前已经用如依库丽单抗等补体结合药物治疗的那些病状。依库丽单抗与补体蛋白C5(经典补体途径中在C1和 C1q下游的补体蛋白)结合,从而抑制其裂解和随后的补体介导的细胞溶解。本发明的仿生物提供了本领域中已知的其它补体结合药物的安全且有效的替代方案。例如,在一些实施例中,本发明的仿生物结合经典补体途径的C1复合物中的第一亚单元C1q。适于用具有免疫活性的最佳制造的stradomer治疗的医学病状包含但不限于重症肌无力、溶血性尿毒综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、膜性肾病、视神经脊髓炎、抗体介导的同种异体移植排斥、狼疮性肾炎、黄斑变性、镰状细胞疾病和膜性增生性肾小球肾炎(MPGN)。适于用本文所描述的具有免疫活性的最佳制造的GL-2045治疗的另外的医学病状包含:目前用包含hIVIG在内的广泛免疫抑制疗法进行常规治疗或已经发现hIVIG在临床上有用的那些医学病状,如自身免疫性血细胞减少症、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、重症肌无力、抗因子VIII自身免疫性疾病、皮肌炎、血管炎和葡萄膜炎(参见F.G.van der Meche 等人,《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.)》326,1123(1992);P.Gajdos等人,《柳叶刀i(Lancet i)》,406(1984);Y.Sultan,M等人,《柳叶刀ii(Lancet ii)》,765(1984); M.C.Dalakas等人,《新英格兰医学杂志》329,1993(1993);D.R.Jayne等人,《柳叶刀 (Lancet)》337,1137(1991);P.LeHoang等人,《眼科免疫学与炎症(Ocul.Immunol. Inflamm.)》8,49(2000));以及可以使用或已经在临床上使用单克隆抗体的那些癌症或炎性疾病病状。可以通过属于本发明主题的化合物有效治疗的那些病状中包含的病状包含细胞因子网络不平衡的炎性疾病、由致病性自身抗体或自身侵袭性T细胞介导的自身免疫性病症、或者慢性复发性自身免疫性、炎性或感染性疾病或过程的急性或慢性期。

[0172] 另外,具有涉及补体的炎性组分的其它医学病状将会受益于用GL-2045组合物进

行治疗，如哮喘、红斑狼疮、肾小球肾炎、肾小球肾病、关节炎、包含自身免疫性溶血性贫血和自身免疫性心脏病在内的自身抗体介导的疾病、多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、亨廷顿氏病、阿尔茨海默病、帕金森氏病、炎症性肠病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、非典型溶血性尿毒综合征、包含例如心肌梗死、脊髓损伤和中风在内的再灌注损伤、移植器官或血液排斥、乙型肝炎、丙型肝炎、人类免疫缺陷病毒相关炎症、肾上腺脑白质营养不良、以及癫痫性病症，尤其是据信与病毒后脑炎(postviral encephalitis) 相关联的那些病症，包含拉斯穆森综合征(Rasmussen Syndrome)、韦斯特综合征(West Syndrome)和林-戈综合征(Lennox-Gastaut Syndrome)。

[0173] 使用本文所描述的GL-2045组合物进行治疗的通用方法是向患有疾病或病状的个体施用治疗有效量的GL-2045组合物以引发治疗。在一些实施例中，疾病或病状可以广泛地分类为细胞因子网络不平衡的炎性疾病、由致病性自身抗体或自身侵袭性T细胞介导的自身免疫疾病、或者慢性复发性疾病或过程的急性或慢性期。

[0174] 如本文所使用的术语“治疗(treating/treatment)”指代向个体施用治疗有效量的本发明的最佳制造的stradomer，使得个体在疾病或病状或者疾病或病状的症状方面有所改善。改善是疾病或病状或者疾病或病状的症状的任何改善或补救。改善是可观察到的或可测量的改善或者可以是个体的总体健康感受的改善。因此，本领域技术人员应认识到，治疗可以改善疾病病状，但可能不会完全治愈疾病。具体地说，个体的改善可以包含以下中的一种或多种：炎症减少；如C反应蛋白等炎性实验室标志物减少；如通过如自身抗体等自身免疫标志物或者血小板计数、白细胞计数或红细胞计数的改进中的一种或多种证明的自身免疫性减少、皮疹或紫癜减少、虚弱、麻木或刺痛减少、高血糖患者的血糖水平升高、关节疼痛、炎症、肿胀或退化减轻、痉挛和腹泻频率和体积减少、心绞痛减少、组织炎症减少或癫痫发作频率降低；癌症肿瘤负荷减少、肿瘤进展时间增加、癌症疼痛减轻、存活率增加或生活质量改善；或骨质疏松症的进展延迟或改善。

[0175] 如本文所使用的术语“治疗有效量”指代导致疾病或病状的症状得到改善或补救的量。本领域普通技术人员应理解，本文所产生的GL-2045的治疗有效量可以根据最终药品而变化。因此，例如，如果人们要清除所有更低阶多聚体，则可以想到可能需要减少剂量的所得更高阶多聚体。如此，有GL-2045的多于一种“治疗有效剂量”。

[0176] 如本文所使用的，“预防”可以意指完全预防疾病状状、延迟疾病状状的发作或减轻随后发展的疾病状状的严重性。

[0177] 如本文所使用的术语“个体”被视为意指根据本文所描述的方法被施用本发明的最佳制造的stradomer的任何哺乳动物个体。在具体实施例中，本公开的方法用于治疗人类个体。本公开的方法还可以用于治疗非人灵长类动物(例如，猴子、狒狒和黑猩猩)、小鼠、大鼠、牛、马、猫、狗、猪、兔、山羊、鹿、绵羊、雪貂、沙鼠、豚鼠、仓鼠、蝙蝠、鸟类(例如，鸡、火鸡和鸭)、鱼和爬行动物，以产生物种特异性或嵌合性stradomer 分子。

[0178] 已经证明，补体抑制减少了抗体介导的疾病(参见例如Stegall等人，《美国移植杂志(American Journal of Transplantation)》，2011年11月；11(1)：第2405-2413页—电子出版物2011年9月22日)。本发明的最佳制造的stradomer还可以用于治疗抗体介导的疾病或病状。自身抗体介导许多已知的自身免疫疾病并且很可能在众多其它自身免疫疾病中发挥作用。可以使用本发明的最佳制造的stradomer的公认的抗体介导的疾病包含但不限于：

抗肾小球基底膜抗体介导肾炎，包含古德帕斯丘氏综合征(Goodpasture's)；实体器官移植中的抗供体抗体(供体特异性同种抗体)；视神经脊髓炎中的抗水通道蛋白4抗体；神经性肌强直、边缘性脑炎和莫旺氏综合征中的抗VGKC抗体；重症肌无力中的抗烟碱型乙酰胆碱受体和抗MuSK抗体；兰伯特-伊顿肌无力综合征中的抗VGCC 抗体；常常与肿瘤相关联的边缘性脑炎中的抗AMPAR和抗GABA(B)R抗体；僵人综合征或惊跳症中的抗GlyR抗体；复发性自然流产、休斯综合征和系统性红斑狼疮中的抗磷脂、抗心磷脂和抗β_2糖蛋白I抗体；僵人综合征、自身免疫性小脑性共济失调或边缘性脑炎中的抗谷氨酸脱羧酶抗体；包含边缘性特征和皮质下特征两者的最新描述的综合征中的抗NMDA受体抗体，年轻成人和儿童中常见的伴有常常与卵巢畸胎瘤相关联但可以具有非副肿瘤性的明显运动病症；系统性红斑狼疮中的抗双链DNA、抗单链DNA、抗RNA、抗SM和抗C1q抗体；结缔组织疾病中的抗核和抗核仁抗体，所述结缔组织疾病包含硬皮病、斯耶格伦氏综合征(Sjogren's syndrome)和多肌炎，所述抗核和抗核仁抗体包含抗Ro、抗La、抗Scl 70、抗Jo-1；类风湿性关节炎中的抗类风湿性因子抗体；结节性多动脉炎中的抗乙型肝炎表面抗原抗体；CREST综合征中的抗着丝点抗体；心内膜炎中的抗链球菌抗体或作为心内膜炎风险的抗链球菌抗体；桥本氏甲状腺炎中的抗甲状腺球蛋白、抗甲状腺过氧化物酶和抗TSH受体抗体；混合性结缔组织疾病和系统性红斑狼疮中的抗U1RNP抗体；以及天疱疮中的抗桥粒芯蛋白和抗角质细胞抗体。

[0179] 本发明的GL-2045组合物可以用于治疗包含但不限于以下的病状：充血性心力衰竭 (CHF)、血管炎、红斑痤疮、痤疮、湿疹、心肌炎和心肌的其它病状、系统性红斑狼疮、糖尿病、脊椎病、滑膜成纤维细胞和骨髓基质；骨质流失；佩吉特氏病、骨巨细胞瘤；多发性骨髓瘤；乳腺癌；废用性骨量减少；营养不良、牙周病、戈谢病、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、脊髓损伤、急性化脓性关节炎、骨软化症、库兴氏综合征、单骨纤维性发育不良、多骨纤维性发育不良、牙周重构和骨折；结节病；溶骨性骨癌、肺癌、肾癌和直肠癌；骨转移、骨痛管理和体液性恶性高钙血症、强直性脊柱炎以及其它脊柱关节病；移植排斥、病毒性感染、血液学肿瘤和瘤样病状，例如霍奇金氏淋巴瘤；非霍奇金氏淋巴瘤(伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞白血病、蕈样真菌病、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病和淋巴浆细胞白血病)、包含B细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤和T细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤的淋巴细胞前体细胞肿瘤、胸腺瘤、包含外周T细胞白血病、成人T细胞白血病/T细胞淋巴瘤和大颗粒性淋巴细胞白血病的成熟T细胞和NK细胞的肿瘤、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、骨髓瘤如包含成熟的AML、没有分化的AML、急性早幼粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病和急性单核细胞白血病的急性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、以及包含慢性髓细胞性白血病的慢性骨髓增生性疾病、中枢神经系统肿瘤例如脑瘤(神经胶质瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、室管膜细胞瘤和成视网膜细胞瘤)、实体瘤(鼻咽癌、基底细胞癌、胰腺癌、胆管癌、卡波济氏肉瘤、睾丸癌、子宫癌、阴道癌或子宫颈癌、卵巢癌、原发性肝癌或子宫内膜癌、血管系统肿瘤(血管肉瘤和血管外皮细胞瘤))或其它癌症。

[0180] 本发明的GL-2045组合物可以用于治疗自身免疫疾病。如本文所使用的术语“自身免疫疾病”指代多于80种疾病和病状的变化组。在所有这些疾病和病状中，潜在的问题是身体的免疫系统攻击身体本身。自身免疫疾病影响所有主要的身体系统，包含结缔组织、神经、肌肉、内分泌系统、皮肤、血液以及呼吸系统和胃肠系统。自身免疫疾病包含例如慢性炎

性脱髓鞘性多发性神经病变、多灶性运动神经病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化、重症肌无力和1型糖尿病。

[0181] 可使用本发明的组合物和方法治疗的疾病或病状可以是血液免疫过程，包含但不限于镰状细胞病、特发性血小板减少性紫癜、同种免疫/自身免疫性血小板减少症、获得性免疫血小板减少症、自身免疫性嗜中性白血球减少症、自身免疫性溶血性贫血、细小病毒B19相关红细胞再生病症、获得性抗因子VIII自身免疫、获得性血管性血友病、意义不明的多发性骨髓瘤和单克隆丙种球蛋白病、败血症、再生病症性贫血、纯红细胞再生病症戴-布二氏贫血(Diamond-Blackfan anemia)、新生儿溶血性疾病、免疫介导的嗜中性白血球减少症、血小板输注无效、新生儿输注后紫癜、溶血性尿毒综合征、系统性血管炎、血栓性血小板减少性紫癜或伊文氏综合征。

[0182] 疾病或病状还可以是神经免疫过程，包含但不限于格林-巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病变、副蛋白血症性IgM脱髓鞘性多发性神经病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、重症肌无力、多灶性运动神经病、与抗GM1相关联的下运动神经元综合征、脱髓鞘、多发性硬化和视神经炎、僵人综合征、具有抗Yo抗体的副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性脑脊髓炎、具有抗Hu抗体的感觉神经病、癫痫、脑炎、脊髓炎、特别是与人类T细胞嗜淋巴细胞病毒1型相关联的脊髓病、自身免疫性糖尿病性神经病、阿尔茨海默病、帕金森氏病、亨廷顿氏病或急性特发性全自主神经病。

[0183] 疾病或病状还可以是与听力丧失或视力丧失相关联的炎症或自身免疫。例如，疾病或病状可以是自身免疫相关听力丧失，如噪声诱导的听力丧失或年龄相关听力丧失，或者可以与听力装置(例如，耳蜗植入物)等装置的植入相关联。在一些实施例中，本文所提供的组合物可以在植入装置之前、同时或之后施用于个体。

[0184] 疾病或病状还可以是风湿性疾病过程，包含但不限于川崎病、类风湿性关节炎、费耳蒂氏综合征、ANCA阳性血管炎、自发性多肌炎、皮肌炎、抗磷脂综合征、复发性自然流产、系统性红斑狼疮、幼年特发性关节炎、雷诺氏症、CREST综合征或葡萄膜炎。

[0185] 疾病或病状还可以是皮肤免疫疾病过程，包含但不限于中毒性表皮坏死松解症、坏疽、肉芽肿瘤、包含寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、落叶型天疱疮的自身免疫性皮肤发疱性疾病、白癜风、链球菌中毒性休克综合征、硬皮病、包含弥漫性和局限性皮肤系统性硬化的系统性硬化、或特应性皮炎(尤其是类固醇依赖性皮炎)。

[0186] 疾病或病状还可以是肌肉骨骼免疫疾病过程，包含但不限于包涵体肌炎、坏死性筋膜炎、炎性肌病、肌炎、抗核心蛋白聚糖(BJ抗原)肌病、副肿瘤性坏死性肌病、X连锁空泡化肌病(X-linked vacuolated myopathy)、青霉胺诱导的多肌炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病或心肌病。

[0187] 疾病或病状还可以是胃肠免疫疾病过程，包含但不限于恶性贫血、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻、疱疹样皮炎、隐源性肝硬化、反应性关节炎、克罗恩氏病、惠普耳氏病、溃疡性结肠炎或硬化性胆管炎。

[0188] 疾病或病状还可以是移植物抗宿主疾病、抗体介导的移植物排斥、骨髓移植后排斥、感染性疾病后炎症、淋巴瘤、白血病、瘤形成、哮喘、具有抗β细胞抗体的1型糖尿病、斯耶格伦氏综合征、混合性结缔组织疾病、爱迪生氏病、伏格特-小柳-原田综合征、膜性增生性肾小球肾炎、古德帕斯丘氏综合征、格雷夫斯氏病、桥本氏甲状腺炎、韦格纳氏肉芽肿病、微

小性多动脉炎(micropolyarteritis)、丘-施二氏综合征、结节性多动脉炎或多系统器官衰竭。

[0189] 如本文所使用的,“过敏症”包含IgE介导的所有免疫反应以及模拟IgE介导的反应的那些反应。过敏症由触发IgE或IgE样免疫应答的过敏原诱导,所述过敏原包含蛋白质、多肽、碳水化合物及其组合。示例性过敏症包含坚果过敏、花粉过敏和昆虫叮咬过敏。示例性过敏原包含:毒葛和橡树中的漆酚;屋尘抗原;桦树花粉组分Bet v 1和 Bet v 2;芹菜中的15kD抗原;苹果抗原Mal d 1;桃中的Pru p3;梯牧草花粉过敏原 Phl p 1;黑麦草中的Lol p 3、Lol p I或Lol p V;百慕大草中的Cyn d 1;尘螨过敏原尘螨Der p1、Der p2或Der f1;谷蛋白中的α-醇溶蛋白和γ-醇溶蛋白表位;蜂毒磷脂酶 A2;花生中的Ara h 1、Ara h 2和Ara h 3表位。

[0190] 在另一个实施例中,本文所描述的GL-2045组合物可以用于引发系统,在所述引发系统中,从患者抽取血液并在引回到患者体内之前与一种或多种最佳制造的stradomer 短暂接触约一个半小时到约三个小时的时间段。采用这个形式的细胞疗法,患者自身的效应子细胞暴露于在体外固定于基质上的最佳制造的stradomer从而通过将效应子细胞暴露于最佳制造的stradomer来调节效应子细胞。然后,将包含经调节效应子细胞的血液输注回到患者体内。这种引发系统可以具有众多临床和治疗应用。

[0191] 本文所公开的GL-2045组合物还可以容易地应用于更改各种上下文中的免疫系统应答以影响免疫应答曲线的具体变化。更改或调节个体的免疫应答指代增加、减少或改变免疫应答的比例或组分。例如,细胞因子的产生或分泌水平可以根据需要通过靶向补体以及适当的FcR组合来增加或减少,其中stradomer被设计成结合补体并与这些受体相互作用。也可以增加或减少抗体的产生;可以改变两个或更多个细胞因子或免疫细胞受体的比例;或者可以使另外类型的细胞因子或抗体产生。

[0192] 在优选实施例中,患有自身免疫疾病或炎性疾病的个体使其免疫应答更改,包括向个体施用治疗有效量的本文所描述的GL-2045组合物的步骤,其中所述治疗有效量的GL-2045组合物更改了个体的免疫应答。理想的是,这一干预治疗了个体的疾病或病状。更改的免疫应答可以是增加的或减少的应答并且会涉及更改的细胞因子水平或趋化因子水平,所述更改的细胞因子水平包含IL-1RA和其它IL-1家族成员IL-6、IL-10、IL-8、 IL-23、IL-7、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1受体、其它TNF家族成员和TNF受体 TNF-α、其它干扰素家族成员IFN-α中的任何一种的水平,所述更改的趋化因子水平包含CCL、CXC、XC和FAM19趋化因子家族成员中的任何一种的水平。在优选实施例中,IL-6或IL-8响应于治疗而减少。在特别优选的实施例中,IL-6和IL-8响应于治疗而减少和/或IL-10或IL-1RA响应于治疗而增加。然而,本发明不受描述的仿生物的任何特定机制限制。更改的免疫应答可以是个体中更改的自身抗体水平。更改的免疫应答可以是个体中更改的自身侵袭性T细胞水平。

[0193] 例如,减少自身免疫疾病中TNF-α产生的量可以具有治疗效果。这一点的实际应用是抗TNF-α抗体疗法(例如,REMICADE®),临床上证明抗TNF-α抗体疗法用于治疗斑块状银屑病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和强直性脊柱炎。这些自身免疫疾病具有不同的病因,但共享与炎症和免疫细胞活性有关的疾病过程的关键免疫组分。被设计成减少TNF-α产生的stradomer将会在这些和许多其它自身免疫疾病中同样有效。更改的免疫应答曲线还可以是用于引发减少抗体例如靶向个体自己的组织的自身抗

体的产生的直接或间接调节或者个体中更改的自身侵袭性T细胞水平。例如,多发性硬化是可以通过干扰素β疗法治疗的涉及自身反应性T细胞的自身免疫疾病。参见例如Zafranskaya M等人,《免疫学(Immunology)》,2007年5月,121(1): 第29-39页—电子出版物2006年12月18日。被设计成减少自身反应性T细胞水平的最佳制造的stradomer将会在多发性硬化以及涉及自身反应性T细胞的其它自身免疫疾病中同样有效。

[0194] 本文所描述的GL-2045组合物可以用于调节包含树突细胞、巨噬细胞、破骨细胞、单核细胞或NK细胞在内免疫细胞的共刺激分子的表达、或抑制相同的这些免疫细胞的分化、成熟或包含白介素-12(IL-12)在内的细胞因子分泌、或增加包含白介素-10(IL-10)、白介素-6(IL-6)或IL1-RA在内的细胞因子分泌。本领域技术人员还可以通过将免疫细胞暴露于优化的免疫活性仿生物并测量对免疫细胞功能的调节来验证经过优化的免疫活性仿生物的功效,其中所述免疫细胞是树突细胞、巨噬细胞、破骨细胞或单核细胞。在一个实施例中,免疫细胞在体外暴露于经过优化的免疫活性仿生物,这进一步包括确定细胞表面受体数量或细胞因子产生数量的步骤,其中所述细胞表面受体数量或所述细胞因子产生数量的变化指示了对免疫细胞功能的调节。在另一个实施例中,免疫细胞在自身免疫疾病模型动物体内暴露于经过优化的免疫活性仿生物,这进一步包括评估自身免疫疾病的改善程度的步骤。

[0195] 本文所描述的GL-2045组合物还可以用作装置的组分。在一些实施例中,本文所提供的GL-2045可以涂覆在如医疗植入物等装置上。例如,最佳制造的stradomer可以涂覆在冠状动脉支架上或作为纳米颗粒治疗的一部分以加强渗透并延长药物释放,例如以用于葡萄膜炎或黄斑变性中的眼内使用。本文所描述的最佳制造的stradomer还可以用作诊断剂的组分。在一些实施例中,本领域技术人员可以通过确定在哪些患者中使用 stradomer可能特别有益来使治疗个性化。例如,本领域技术人员可以将患者的免疫细胞暴露于免疫活性仿生物并且通过流式细胞术或细胞因子曲线来测量对免疫细胞的活化或成熟的调节,以鉴别出高应答者。

[0196] 本文所引用的所有参考文献均通过引用以其全文并入。

[0197] 实例

[0198] 在制造过程中采用各种方法来优化以下的组合:高蛋白滴度、伴随有低细胞碎片的长期活力以及GL-2045的高阶多聚体的产生。具体地说,改变上游制造过程的以下方面,以确定具有增加的多聚化性质的GL-2045产品的最佳条件:基础培养基、补料类型、补料定时、温度转变、通风和摇瓶条件。在每种情况下,分析细胞密度、活力、蛋白滴度和多聚化以鉴别出最佳条件。进一步地,改变下游制造过程的包含缓冲液、洗涤方案和柱选择在内的方面,以确定GL-2045的用于纯化和过滤的最佳条件,其中保持了GL-2045 的最佳多聚化曲线。仅通过说明的方式而不是通过限制的方式提供以下实例。

[0199] 实例1—GL-2045的分级分离和生物层干涉法分析

[0200] 使用GE Hi-Load 26/60Superdex 200pg柱(通用电气,#17-1071-01)在0.05M Tris-HCL+0.15M NaCl缓冲液(pH 7.5)中对GL-2045溶液进行分级分离。以2.6mL/min 的流速加载3.2mL GL-2045溶液。收集体积为2.0mL的六个级分(1到6)并且通过 280nm处的UV测量确定蛋白浓度(图1A)。评估每个GL-2045级分的多聚化。简而言之,将级分1到6中的每个级分的样本加载到4-12%的非还原性Nu-Page BT凝胶(英杰公司(Invitrogen),#

NP0322BOX)上。使样本在150伏特下运行约3小时。结果提供在图1B中并且证明了在级分1到6之间存在GL-2045的更高阶多聚体时的明显差异。级分1到3包含更低阶多聚体(例如,带1到4)。级分1几乎仅包含表观MW为55KD 的同源二聚体(带1,来自非还原性SDS-PAGE的MW估计)。级分2包含MW为110KD 的同源二聚体的大约97％二聚体(带2)。级分3主要包含MW分别为165KD和220KD 的带3和带4连同更少量的带2、带5(MW＝275KD)、带6(MW＝330KD)和带7(MW＝385KD)。级分4主要包含带4、带5和带6连同更少量的带3、带7、带8(MW ＝440KD)和更高阶带。然而,级分5和级分6主要包含更高阶多聚体(带5+)。

[0201] 使用生物层干涉法动力学结合分析来分析用于与FcγRIIIA受体结合的GL-2045级分。生物层干涉法检测了固定在生物传感器尖端表面上的配合基与溶液中的分析物之间的结合。当结合发生时,其使生物传感器尖端处的光学厚度增加,这导致了波长偏移(检测为响应单位"RU")。最大结合水平(RU max)是处于平衡时的最大可能样本结合量,所述最大可能样本结合量使传感器表面的配合基的量饱和。

[0202] 使带His标记的受体蛋白(5μg/mL)与抗His传感器尖端(抗Penta-His HIS1K,福特生物(ForteBio)目录号(Cat.#)18-5121)在来自ForteBio的1X动力学分析缓冲液(目录号18-1092)中结合300秒。将加载的传感器转移到无带标记受体或配体的1X 动力学缓冲液中,以获得持续60秒的基线测量结果。获得基线之后,通过将传感器尖端转移到含有所选纯化stradomer的1x动力学缓冲液中在50μg/ml、25μg/ml和12.5 μg/ml的浓度下测量受体/蛋白质的缔合速率60秒。通过将传感器尖端转移到1X动力学缓冲液中来测量解离速率300秒,并且使用福特生物软件来计算RU值、缔合速率值、解离速率和K_d值。

[0203] 图2中示出了结合曲线结果并且表2中提供了通过福特生物八字节软件计算的动力学结合数据。这些结合曲线证明了含有较高分子量GL-2045的级分(例如,级分3、4、5和6)相比于针对较低分子量级分(例如,级分1和2)观察到的解离速率具有越来越低的解离速率的较高亲合力,并且表明GL-2045的高分子量级分比较低分子量级分亲合性更高地结合。

[0204] 表2:GL-2045级分的动力学结合数据的总结

[0205]

级分	K_D	K_{on}	K_{dis}	R_{max}	R^2	X^2
GL-2045	1.56E-11	4.73E+05	7.39E-06	0.830	0.999	0.0640
1	2.72E-07	1.00E+05	2.73E-02	0.507	0.986	0.0760
2	1.06E-08	3.34E+05	3.55E-03	0.673	0.995	0.0543
3	2.14E-10	5.94E+05	1.27E-04	0.786	0.997	0.1195
4	7.33E-12	5.99E+05	4.39E-06	0.852	0.991	0.2782
5	1.25E-12	1.18E+06	1.47E-06	0.853	0.993	0.1366
6	4.01E-11	1.08E+06	4.33E-05	0.930	0.994	0.0691

[0206] 实例2—GL-2045级分的补体依赖性细胞(CDC)杀伤测定

[0207] 评估GL-2045级分抑制补体活化的能力。通过尺寸排斥色谱法将GL-2045分级分离成6个级分(图3A),分析每个级分在非还原凝胶上的多聚化(图3B)。为了确定每个级分对补体活化的影响,将表达CD20的Will-2细胞用抗CD20单克隆抗体培育20分钟,之后对细胞进行离心并重新悬浮在新鲜培养基中。然后在以下六种浓度中的一种下将细胞培育在96孔板中在含有本文所描述的级分1到6中的每个级分的培养基中以及作为比较在未分级分离的

GL-2045中;100μg/mL、50μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL 或1μg/mL。将血清加入到细胞悬浮液中以引发补体依赖性细胞裂解,并且将板在37℃下培育3小时。用Promega Cytotox Glo测定对细胞死亡进行定量。将Cytotox测定试剂加入到板的每个孔中,并且将板在室温下在黑暗中培育15分钟。在Promega GloMax光度计上读取15分钟后的荧光值,并且根据这个读数计算细胞死亡。结果示出在图4A到图4D中并且证明级分5和级分6(含有带5到13中的较高分子量多聚体)示出了比级分1到4中存在的较小分子量多聚体更深度的CDC抑制。还应注意,仅包括带4及更高的级分展现出有效CDC抑制,这与更高阶多聚体与六聚体C1q的多价Fc结合相一致。

[0208] 实例3—GL-2045级分与FcγRIIIa的结合

[0209] 确定GL-2045级分与FcγRIIIa的结合。将GL-2045上清液用具有20mM磷酸钠、0.15M NaCl的pH 7.2的结合缓冲液在蛋白A HiTrap MabSelect Sure(通用电气# 11-0034-95)上你哥哥亲和色谱法纯化,并用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱(图5A)。将经亲和色谱法纯化的GL-2045储存在pH 7.2的1X PBS(质量生物有限公司(Quality Biological,Inc)#119-069-101)中。将纯化的GL-2045的池用pH 5.0的50mM乙酸钠进行进一步透析,并且用具有50mM乙酸钠的pH 5.0的结合缓冲液和具有50mM乙酸钠、1M NaCl的pH 5.0的洗脱梯度(0到100%洗脱缓冲液)在POROS CIEX柱(GOPURE 柱1.2cm D x 10cm L,Poros XS,生命技术公司(Life Technologies),#4448885)上通过阳离子交换色谱法进行精制。这个精制步骤在未从最终级分中消除最高阶多聚体和/ 或无序聚集体的情况下执行。作为最后一步,将CIEX精制的GL-2045浓缩到体积≤5mL、与凝胶过滤运行缓冲液进行缓冲液交换并且注入到使用pH 7.5的0.05M Tris-HCl+0.15 M NaCl作为运行缓冲液(Tris HCl,pH 7.5,天惠华公司(Teknova)#T1075)的凝胶过滤柱(Hiload 26/60Superdex 200pg(通用电气#17-1071-01))中。然后,通过凝胶分析来分析级分的多聚化(图5B和图5C)。

[0210] 使用FcγRIIIa ELISA结合测定法来确定经分级分离GL-2045与FcγRIIIa的结合。简而言之,使用重组FcγRIII涂覆96个板,并使这96个板与GL-2045反应。洗涤之后,在基于ELISA的测定法中使用Fc检测mAb来确定FcγRIIIa结合的材料的量(图6A和图6B)。每个级分的EC_{50}值示出在表3中。这些结果证明,更高阶多聚体(级分1C4、1C5、1C6、1C7、1C8、1C9、1C10和1C11)展现出通过低EC_{50}指示的比更低阶多聚体(级分1D9、1E4和1F7)亲合性更高的FcγRIIIa结合并且令人惊讶地展现出比最高分子量多聚体(级分1C3、1C2、1C1、1B12、1B11)亲合性更高的结合。推测最高阶分子量级分包括一些较低效力高分子量聚集级分以及高功能性最高阶多聚体(例如,级分1B11、1B12、1C1、1C2和1C3)。这些结果非常令人惊讶地表明,并非所有GL-2045 高分子量级分都展现出与FcγRs的结合增加,这可能是由于同源二聚体的无序聚集效果,如与高度有序的高分子量多聚体的形成相反的那样。这些数据表明需要经过优化的下游制造方法(包含用于蛋白A纯化、离子交换色谱法和疏水相互作用色谱法的优化条件) 与最佳上游制造方法相组合,以产生和保留高分子量高阶多聚体并消除无序高分子量聚集体(例如,1B11和1B12),所述无序高分子量聚集体在结合靶标低亲和力受体时不那么有效(参见表3中1B11和1B12的EC_{50}值)。

[0211] 表3:GL-2045级分与FcγRIIIa结合的EC_{50}值

[0212]

级分	AC/CIEX EC50 ng/mL
1B9	NT
1B10	NT
1B11	27.2
1B12	10.8
1C1	4.96
1C2	7.09
1C3	3.68
1C4	1.92
1C5	2.33
1C6	1.59
1C7	1.56
1C8	1.01
1C9	2.52
1C10	0.870
1C11	1.60
1D4	2.26
1D5	NT
1D9	3.15
1E4	3.82
1E8	NT
1F7	15.7
1F8	NT

[0213] NT＝未测试

[0214] 实例4—GL-2045级分的C5a诱导型趋化分析

[0215] 使GL-2045细胞培养物在具有左旋谷酰胺(龙沙集团(Lonza),#17-605E)和HT 补体(生命技术公司,#11067-030)的PowerCHO2培养基(龙沙集团,#U21-070) 中生长。将GL-2045上清液通过亲和色谱法用蛋白A HiTrap MabSelect Sure(通用电气, #11-0034-95)纯化,然后使用不同的pH条件用AIEX HiScreen Q FF(通用电气, #28-9505-10)进行分级分离,以将低分子带与高分子带分离。结果示出在图7中 (GL-GLM-01＝重组的未分级分离Fc(G001)、GL-GLM-02＝未分级分离GL-2045、GL-GLM-05＝pH 6.0的经分级分离GL-2045、GL-GLM-06＝pH 6.5的经分级分离 GL-2045、GL-GLM-07＝pH 7.0的经分级分离GL-2045、GL-GLM-08＝pH 7.5的经分级分离GL-2045)。最后,将不同的级分浓缩并针对HBSS(龙沙集团,#10-527F)进行透析。

[0216] 将GL-2045上清液通过亲和色谱法用具有20mM磷酸钠、0.15M NaCl、pH 7.2的蛋白A(pA)HiTrap MabSelect Sure(通用电气,#11-0034-95)纯化。在用结合缓冲液进行第一次洗涤并用包括1M NaCl、5mM EDTA、2M尿素、50mM磷酸盐pH 7.0的缓冲液进行第二次洗涤之后,用0.1M甘氨酸pH 2.7来洗脱与pA结合的蛋白质。

[0217] 将经亲和色谱法纯化的GL-2045储存在pH 7.0的1X PBS(质量生物有限公司#119-069-101)中。将4批纯化的GL-2045用pH 6.0、6.5、7.0或7.5的50mM Tris-HCl 进一步稀释(6X),并用具有50mM Tris-HCl的pH 6.0、6.5、7.0或7.5的结合缓冲液在HiScreen Q-

FF柱上通过阴离子交换色谱法纯化，并用50mM Tris-HCl+1M NaCl在 pH 6.0、6.5、7.0、7.5下通过梯度洗脱(0到100％洗脱缓冲液)进行洗脱。

[0218] 利用这些纯化的级分来确定GL-2045级分对嗜中性粒细胞趋化性的影响。简而言之，将补体C5a作为化学引诱物以1nM的浓度加入到博伊登室的下部孔中。在加入到博伊登室之前，嗜中性粒细胞(最终浓度为2.25x 10^6个细胞/毫升，从PBMC全血中纯化而来)用指示的GL-2045级分(0.02-10μg/mL为最终浓度μg/mL)或重组Fc对照物 (GLM-001，G001)预先培育30分钟。然后将细胞悬浮液加入到博伊登室的上部孔中并培育25分钟。培育期之后，通过计算每个条件下较低室中细胞的数量来评估迁移的群体，并且确定每个条件下的趋化性百分比(图8)。未观察到GL-GLM-001(重组Fc对照物G001)具有趋化性。更高阶多聚体(包括带5到13的级分GL-GLM-002、 GL-GLM-005、GL-GLM-006和GL-GLM-007)展现出比更低阶多聚体(包括带1到4 的级分GL-GLM-008)亲合性更高的C5A诱导型趋化性抑制。

[0219] 实例1到4中提供的数据证明了GL-2045的更高阶多聚体的加强的功效。基于以上数据，测试上游制造方案以确定用于GL-2045的更高阶多聚体(例如，图1、图3、图 5和图7中的带5+)的特定生产的最佳条件从而实现最大的生物功效。

[0220] 实例5-GL-2045产生中的基础培养基筛选

[0221] 本实验的目的是测试一组基础培养基对GL-2045蛋白滴度、细胞活力、细胞密度和GL-2045多聚化的影响。

[0222] 使GL-2045在37℃和5％CO_2下的振荡培育箱中在具有L-谷氨酰胺(龙沙公司 #17-605E)和次黄嘌呤钠和胸苷(HT，Gibco#11067-030)的ProCHO5培养基(龙沙集团#12-766Q)中生长。传代后，对细胞进行洗涤，并且在所选培养基(在表4中示出) 中将所述细胞以0.5x 10^6个细胞/毫升一式两份地接种到50mL的管状旋转体(Tube Spin)中。每个管含有10mL的培养物，并且将所述每个管置于37℃、5％CO2、80％湿度和180rpm转速下的科耐(Kuhner)牌磁悬浮振荡培育箱中。在第4天、第8天和第10天，从每种培养物中取出一毫升样品以测量细胞密度、细胞活力和葡萄糖水平。将样品离心，并且将上清液储存在+4℃下。用作为组分的L-谷氨酰胺和HT补充未列出 4mM L-谷氨酰胺和1X次黄嘌呤钠和胸苷的所选培养基。表4中示出了所选培养基的生长条件。

[0223] 表4:所选培养基生长条件

[0224]

培养基	制造商	L-谷氨酰胺	HT	C02 百分比	湿度百分比
CD FortiCHO	生命技术公司（LifeTechnologies）	4 mM	1 X	5	80
TC-42（CHOMACS CD）	TeutoCell（Xell）	4 mM	1 X	5	80
Hyclone CDM4CHO	赛默飞世尔科技公司（Thermo Scientific）	4 mM	-	5	80
Hyclone ADCF MAB	赛默飞世尔科技公司	4 mM	-	5	80
PowerCHO3 CD	龙沙集团	4 mM	1 X	5	80
Ex-Cell CHO5	西格玛-奥德里奇公司（Sigma-Aldrich）	4 mM	-	5	80
BalanCD CHO 生长 A	欧莞公司（Irvine）	4 mM	1 X	5	80
EX-CELL CD CHO	西格玛奥德里奇公司	4 mM	-	5	80
CHO-S-SFM II	生命技术公司	4 mM	-	5	80
ExpiCHO 表达	生命技术公司	-	1 X	5	80
通用电气医疗集团（GE Healthcare）SFM4CHO	通用电气医疗集团	4 mM	1 X	5	80
ClonaCell-CHO CD	干细胞技术有限公司（Stemcell Tech.）	4 mM	1 X	5	80
通用电气医疗集团 HYQ SFX-CHO LM	通用电气医疗集团	4 mM	1 X	5	80
Cell Vento CHO 210	密理博	4 mM	1 X	5	80
ActiCHO P	通用电气	4 mM	-	5	80
Cell Vento CHO 110	密理博	4 mM	1 X		80
CD 杂交瘤	赛默飞世尔科技公司	4 mM	-	5	80
CD OptiCHO	赛默飞世尔科技公司	4 mM	1 X	5	80
PowerCHO-GS	赛多利斯（Sartorius）AG	4 mM	-		80

[0225] 评估在所选培养基中生长的GL-2045细胞培养物的细胞密度、细胞活力、蛋白滴度和更高阶多聚体的百分比。通过混合细胞与台盼蓝(Trypan Blue)来进行细胞密度和细胞活力评估。使用手动细胞计数器对活细胞和死细胞进行计数。示出了培养的第4天和第8天的细胞密度(图9，表5)和细胞活力(图10，表6)的数据。在所测试的19种培养基中，用ActiCHO P、CHOMACS CD和CD FortiCHO观察到第4天的最大细胞密度。到了第8天，与第4天相比，除ActiCHO P、BalanCD CHO、ExpiCHO、Cell Vento CHO 210和Cell Vento CHO 210之外，所有培养基的细胞密度方面的趋势均为负。在19 种培养基中，用ActiCHO P、随后是ExpiCHO、Cell Vento CHO 110和HYQ SFX-CHO LM 观察到所测试的第8天的最大细胞活力。在19种培养基中经测试从第4天到第8天在细胞活力方面具有正趋势的唯一培养基为ActiCHO P。因此，在第4天产生高细胞密度且在第8天没有细胞密度的负趋势的唯一培养基为ActiCHO P。

[0226] 表5:GL-2045-产生CHO细胞密度

[0227]

培养基	第4天 (10^6/mL)	第8天 (10^6/mL)
CD FortiCHO	9.75	0.00
TC-42（CHOMACS CD）	10.35	0.00
Hyclone CDM4CHO	4.70	0.00
Hyclone ADCF MAB	2.00	1.81
PowerCHO3 CD	3.72	1.34
Ex-Cell CHO5	4.20	1.20
ActiCHO P	11.40	23.30
BalanCD CHO 生长 A	7.80	13.46
EX-Cell CD CHO	4.80	1.24
CHO-S-SFM II	7.10	0.00
ExpiCHO 表达	7.40	19.40
SFM4CHO	7.30	6.80
ClonaCell-CHO CD	6.10	3.80
HYQ SFX-CHO LM	1.70	2.80
Cell Vento CHO 210	6.90	16.50
Cell Vento CHO 110	7.70	17.40
CD 杂交瘤	5.35	5.00
CD OptiCHO	6.45	4.70
PowerCHO-GS	2.80	1.25

[0228] 表6:GL-2045-产生CHO细胞活力

[0229]

培养基	第4天 (存活率)	第8天 (存活率)
CD FortiCHO	99.5	0.0
TC-42（CHOMACS CD）	99.4	0.0
Hyclone CDM4CHO	89.5	0.0
Hyclone ADCF MAB	98.5	78.6
PowerCHO3 CD	82.7	29.1
Ex-Cell CHO5	85.0	56.9
ActiCHO P	92.4	100.0
BalanCD CHO 生长 A	98.5	91.0
EX-Cell CD CHO	92.2	27.3
CHO-S-SFM II	98.9	0.0
ExpiCHO 表达	99.5	98.8
SFM4CHO	99.7	80.0
ClonaCell-CHO CD	96.0	62.9
HYQ SFX-CHO LM	100.0	95.2

[0230]

Cell Vento CHO 210	98.6	90.7
Cell Vento CHO 110	99.4	98.3
CD 杂交瘤	99.1	82.6
CD OptiCHO	99.2	83.2
PowerCHO-GS	98.2	86.2

[0231] 在第10天旋转沉降培养物，在0.2μm下进行过滤并保持在4℃直到使用蛋白A亲和

柱进行纯化。对于纯化，通过亲和色谱法用具有pH值为7.2的20mM磷酸钠、0.15M NaCl的结合缓冲液的1mL蛋白A柱HiTrap MabSelect SuRe(美国通用电气公司，# 11-0034-93)对上清液培养物进行纯化。用结合缓冲液洗涤柱结合蛋白，然后用pH值为 7.0的1M NaCl、5mM EDTA、2M尿素、50mM磷酸盐进行第二次洗涤。用pH值为 2.7的0.1M甘氨酸洗脱与柱结合的GL-2045，并在pH值为7.0的1X PBS中通过HiPrep 26/10脱盐柱(美国通用电气公司，#17-5087-01)对其进行脱盐。将经纯化的全部样品储存在4℃下。通过生物层干涉法(Octet)对蛋白滴度进行测量(图11和表7)。在所测试的19种基础培养基中，用Cell Vento CHO 110、随后是BalanCD CHO生长A培养基、ActiCHO P和ExpiCHO观察第10天的最大蛋白滴度。其它培养基的滴度显著下降。

[0232] 表7:GL-2045滴度

[0233]

培养基	蛋白(mg/L)
Cell Vento CHO 110	577.9
BalanCD CHO生长A	542.0
ActiCHO P	514.4
ExpiCHO表达	513.0
Cell Vento CHO 210	359.1
CD FortiCHO	323.7
CHO-S-SFM II	296.2
CD OptiCHO	295.8
SFM4CHO	295.8
PowerCHO-GS	269.9
TC-42(CHOMACS CD)	232.4
CD杂交瘤	226.7
EX-CELL CD CHO	194.4
HYQ SFX-CHO LM	179.2
Ex-Cell CHO5	179.2
ClonaCell-CHO CD	170.9
Hyclone CDM4CHO	111.6
PowerCHO3 CD	105.5
Hyclone ADCF MAB	89.4

[0234] 为了确定更高阶多聚体的百分比，将每种经纯化培养物运行(以非还原形式)到SDS-PAGE凝胶(NuPage 3%-8%Tris-乙酸盐凝胶，生命技术公司，#EA03752BOX)上。在3μL样品缓冲液(NuPage，LDS(4X)，生命技术公司，#NP0007)、20μM碘乙酰胺(Bio Rad#163-2109)和去离子(DI)水中将2μg蛋白稀释到10μL的最终体积。将样本在80℃下加热10分钟并加载到凝胶上，并且使用运行缓冲液(Tris-乙酸盐SDS (20X)(生命技术公司，#LA0041))在150V下运行1小时25分钟。将凝胶在去离子水中进行洗涤、用SimplyBlue Safe进行染色(生命技术公司，#LC6060)并在去离子水中进行脱色。完全脱色后，使用来自Syngene的G:BOX系统拍摄照片，并用Syngene 软件GeneTools通过密度测定法分析带型图案。测量每个泳道中

每个单独带的强度(图 12A和图12B)。

[0235] 出乎意料地,用ActiCHO P、然后是EX-CELL CD CHO和CH-S SFM2观察到所测试的19种培养基的带4以上的更高阶多聚体的最大百分比(表8)。这些数据指示,更高阶多聚体的增加的百分比是要控制的自变量且不与总蛋白滴度的增加简单相关。ActiCHO P导致了第三最高的蛋白滴度和最大水平的多聚化(带5+中存在的45.9%的蛋白),同时Cell Vento CHO 110导致了最大的蛋白滴度,但多聚化水平显著降低(带5+ 中存在的32.6%的蛋白)。

[0236] 表8:GL-2045多聚化分析

[0237]

培养基	带(1-4)百分比	带(5+)百分比
ActiCHO P	54.1	45.9
EX-CELL CD CHO	59.4	40.6
CHO-SSFM2	61.2	38.8
TC-42	64.0	36.0
SFM4CHO	64.1	35.9
Power CHO3 CD	65.3	34.7
Hyclone ADCF	66.1	33.9
Cell Vento 210	66.5	33.5
Cell Vento 110	67.4	32.6
CD OptiCHO	67.6	32.4
ExpiCHO	68.1	31.9
CD杂交瘤	68.6	31.4
Power CHO GS	68.7	31.3
Balance CD CHO	70.0	30.0
CDM4CHO	70.2	29.8
Clonal Cell CHO	70.4	29.6
CD FortiCHO	70.4	29.6
HYQ SFX CHO	70.8	29.2
EX-CELL CHO 5	71.4	28.6

[0238] 实例6-具有补料的GL-2045的培养基筛选

[0239] 所推荐补料时间表

[0240] 基于实例5中的实验结果,使与最高GL-2045蛋白滴度相关联的四种基础培养基以及与最低GL-2045蛋白滴度相关联的三种基础培养基经受重复实验,其中在培养期间提供了可商购获得的补料。产生高滴度的Cell Vento 110和ExpiCHO未被选择用于补料实验,因为未识别出制造商所推荐的补料。在不使用补料的情况下,Cell Vento CHO 110 为用于细胞适应的完全培养基,而Cell Vento 210与补料组合用于培养物。表9详述了在此实验中使用的培养基与补料组合。

[0241] 表9:培养基+补料组合

[0242]

培养基	补料
Cell Vento CHO-210 EMD 密理博#1025531000	Cell Vento 补料-210+半胱氨酸/酪氨酸+葡萄糖 EMD 密理博#1.02488
BalanCD CHO 生长 A 培养基 欧莞公司#91118	BalanCD CHO 补料 1 欧莞公司#91127
CD FortiCHO 生命技术公司#A11483-01	CD 高效补料 C AGT 营养补体 生命技术公司#A13275-04
CDM4CHO Hyclone#SH30558.01	细胞加强 4（PS307） Hyclone SH30857
PowerCHO3 CD 龙沙集团#12-772Q	Power 补料 A+L-谷氨酰胺 #BE02-044Q
ADCF-Mab Hyclone#SH30349.02	细胞加强 4（PS307） Hyclone#SH30857
ActiCHO P 培养基 PAA#U21-070	补料 A、补料 B PAA#U15-072、PAA#U05-034*

[0243] *PAA随后成为通用电气医疗集团生命科技的部分

[0244] 使GL-2045克隆58在37℃和5％CO2下的振荡培育箱中在具有L-谷氨酰胺(龙沙公司#17-605E)和次黄嘌呤钠和胸苷(HT,Gibco#11067-030)的“ProCHO5”培养基 (龙沙集团#12-766Q)中培养。传代后,对细胞进行洗涤并以0.5x 10^6个细胞/毫升进行接种,然后当密度达到1x 10^6到3x 10^6个细胞/毫升且≥80％存活率时进行继代培养。GL-2045克隆58直接适应表10中详细描述的所选培养基。当细胞获得稳定的倍增时间 (20-30个小时)且在至少2-3次传代中获得≥90％的活细胞密度(VCD)时,认为适应完成。将细胞以0.5x 10^6个细胞/毫升接种到所选培养基中(d0)且在设定为150rpm、37 ℃、5％CO_2和高湿度的培育箱的标准振荡平台中进行培育。对于除PowerCHO3 CD之外的所有培养物,第3天(d3)开始补料。d1开始补料PowerCHO3 CD培养基。总的培养物体积为120mL。当存活率降至50％时采集培养物。GL-2045稳定细胞系在7种培养基中的每一种连同制造商根据所推荐方案推荐的补料中生长。图13A和图13B概述了所测试培养基中的每一种的补料策略和时间表。

[0245] 对细胞密度、细胞活力和GL-2045蛋白滴度的测量贯穿整个研究。对于蛋白滴度,使样品离心至沉淀细胞,并如实例6中所描述的通过细胞上清液的生物层干涉法(Octet)对细胞上清液中的蛋白进行测量。如实例5中所描述的,在蛋白A纯化后在每组研究终止时评估GL-2045多聚化。培养持续直到第14天或直到存活率下降到50％以下。

[0246] 令人惊讶的是,使用制造商所推荐的补料在ActiCHO P中生长的GL-2045实现了远比用制造商所推荐的补料在任何其它培养基中生长的GL-2045更高的峰值细胞密度。这种优异的细胞密度比除Cell Vento 210(图14)之外的所测试的所有其它培养基/补料组合令人惊讶地高出3倍或更多倍。

[0247] 进一步地,使用制造商所推荐的补料在ActiCHO P、CD FortiCHO或ADCF MAB 中生长的GL-2045在第10天实现了远比用制造商所推荐的补料在其它培养基中生长的 GL-2045更好(2-3倍)的细胞活力。这表明与所测试的若干其它培养基/补料组合相比,这三种培养基产生优异的细胞活力(图15)。

[0248] 此外,使用制造商所推荐的ActiCHO补料A和ActiCHO补料B在ActiCHO P培养基中

生长的GL-2045CHO稳定细胞系产生比任何其它培养基和所测试的制造商所推荐的补料显著更高的滴度(图16)。由ActiCHO P培养物产生的滴度比由所测试的任何其它培养基产生的滴度至少高4倍,与在第12天在Cell Vento CHO-210中小于500mg/L 并且对于其它培养基的甚至更低的滴度相比,第10天摇瓶中的滴度达到2g/L。

[0249] 如实例5中所描述的,确定了如根据不同培养物条件通过百分比多聚体在带5及以上(5+)中所测量的GL-2045多聚化(图17,表10)。使用制造商所推荐的基础培养基和补料的GL-2045多聚化率最高的为CD FortiCHO,其次是ActiCHO和PowerCHO3。与其它培养物条件相比,ADCF-Mab与BalanCD表现出明显更差的GL-2045多聚化。

[0250] 表10:具有培养基+补料组合的百分比多聚体

[0251]

培养基+补料	带1-4百分比	带5+百分比
(1)ADCF-Mab+细胞加强4补料	76.2%	23.8%
(2)PowerCHO3 CD+PowerFeed A	70.3%	29.7%
(3)CDM4CHO+细胞加强4补料	74.8%	25.2%
(4)CD FortiCHO+CD高效补料C	64.3%	35.7%
(5)BalanCD CHO生长A+BalanCD CHO补料1	76.1%	23.9%
(6)Cell Vento CHO-210+Cell Vento补料-210	72.2%	27.8%
(7)ActiCHO P+补料A、补料B	69.9%	30.1%

[0252] 总而言之,ActiCHO P培养基在细胞密度、活力和蛋白滴度方面明显优于所测试的其它培养基。密度测定分析表明CD FortiCHO培养基+CD高效补料C具有35.7%的最活跃多聚体的最高百分比(表10,带5+)。然而,CD FortiCHO培养基+CD高效补料C具有4.7%的不会移动到凝胶中的高分子量材料的最高百分比(如在图17中的凝胶顶部所看到的),这表明这种培养基还产生比ActiCHO P更多级分的具有更少的高度有序且更多功能性多聚体的聚集、无序的多聚体。ActiCHO P+补料A和补料B具有带4以上30.1%的更高阶多聚体带的第二最高百分比,所述更高阶多聚体带具有可忽略的量的不会移动到凝胶中的非特异性聚集的高分子量材料。因此,ActiCHO P可能具有最高百分比的全功能更高阶多聚体带。令人惊讶的是,这些数据进一步表明上游制造条件不仅会影响细胞活力、密度和总蛋白滴度,而且还会影响GL-2045的临床有效的更高阶多聚体的产生。如实例3中所展现的,最高分子量级分展现出与FcRγIIIa的结合降低,这表明最高分子量级分(例如,无序的GL-2045聚集体)具有比GL-2045的高度有序的多聚体更低的生物活性。如本文所示,令人非常惊讶的是,在所测试的所有基础培养基中,仅ActiCHO-P 表现出高的总GL-2045蛋白滴度、高度多聚化以及最低量的无序、高分子量GL-2045 聚集体。

[0253] 改变后的补料方案

[0254] 在确定ActiCHO P培养基+补料产生最佳蛋白滴度和更高阶多聚体产生后,对改变后的补料时间表进行测试以确定是否可以通过每隔一天补料来获得相似或经过优化的结果。如图18所展现的,如与每天补料相比,每隔一天补料(蓝色)没有明显影响细胞密度(图18A)、细胞活力(图18B)、培养物pH(图18C)或蛋白滴度(图18D)。这些结果令人惊讶地指示,相似的结果可以通过每隔一天补料而获得,并且对于维持无菌性和最小化制造成本而言可能是优选的。然而,每隔两天补料的相似实验表明,随着以低于每2天的频率补料,活力和蛋

白产生可能开始减小(图19)。

[0255] 进行另外的实验以确定ActiCHO P补料是否可以与其它非ActiCHO基础培养基一起使用来实现相似结果。简而言之,GL-2045克隆58在Power CHO-2 CD(龙沙集团, #12-771Q)+4mM L-谷氨酰胺(龙沙集团,#17-605E)+1X HT补体(Gibco,#11067-030) 中进行培养。传代后,对细胞进行洗涤并以0.3x 10^6个细胞/毫升接种在ActiCHO P完全培养基ActiCHO P+6mM L-谷氨酰胺(龙沙集团,#17-605E)或Power CHO-2 CD完全培养基中并且在没有温度转变的情况下对其进行培养。每天以+1mL ActiCHO补料A (PAA,#U15-072)+0.1mL补料B(PAA,#U05-034)对ActiCHO P PowerCHO培养物进行补料。如实例5中所描述的,在第9天确定了整个培养过程的细胞活力和蛋白滴度 (图20)。结果表明,当根据制造商的推荐与ActiCHO补料A和补料B一起使用时, PowerCHO2和ActiCHO P两者产生相同的细胞活力和GL-2045蛋白产率。因此,如果多聚体组合物相对于ActiCHO P+A+B保持不变,则ActiCHO补料A和B可能能够与其它选择的高性能基础培养基一起使用。

[0256] 实例7-GL-2045产生的最佳定时和温度转变范围

[0257] 本实验的目的是评估最佳定时和温度转变范围。许多研究者已经考虑了温度转变对重组中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系的细胞周期、细胞凋亡和新陈代谢的影响。然而,虽然总体考虑了温度转变对活细胞密度的影响,但是却很少关注最佳温度转变结果所需的最小细胞密度。进一步地,最小的细胞密度是有必要的,因为尚未考虑在多聚化stradomer 中成功进行温度转变。

[0258] 本发明的诸位研究者惊讶地发现,为了达到最佳的GL-2045表达和最大滴度,在温度转变时需要1000万个细胞/毫升的最小活细胞密度。进一步地,这个要求比温度转变发生时的培养天数更重要。当活细胞密度处于对数生长阶段时,通常当活细胞密度为 1000-1500万个细胞/毫升时,令人惊讶的是,温度转变的定时最成功。根据初始接种密度,这通常对应于生物反应器培养的第4-5天。

[0259] 此外,与本领域中的描述不同,对于制造高滴度的GL-2045的最佳上游条件而言,温度从37摄氏度(37℃)+/-1.0℃转变到32.5℃+/-1.0℃优于到31℃+/-0.5℃的温度转变。除温度转变的性质之外,使用相同的条件从稳定的CHO克隆产生两个单独的GL-2045 上清液池。在10L XDR-10一次性生物反应器系统生物反应器(Xcellerex,美国通用电气公司)中培养CHO细胞,其中第5天时pH值从7.1转变到7.0。使用7升的ActiCHO-P CD(目录号U21-051)来生产每天280ml的PAA补料A(目录号U15-053)和每天28 ml的PAA补料B(目录号U15-054)。PAA补料A和补料B相当于ActiCHO补料A和补料B。到32.5度(A)的温度转变和到31.0度(B)的温度转变各自发生在第5天。表11示出了结果。

[0260] 表11:温度转变对CHO细胞活力和GL-2045产率的影响

[0261]

组	pA-纯化产率	第21天活力	第22天活力	峰值细胞密度
A	7.2g/L	90.2%	88.8%	25.0x 10^6个细胞/毫升(第9天)
B	5.1g/L	86.1%	83.8%	19.3x 106个细胞/毫升(第9天)

[0262] 实例8-GL-2045的蛋白A柱纯化需要更频繁的CIP程序

[0263] 通过亲和色谱法(AC)用具有pH值为7.2的20mM磷酸钠、0.15M NaCl的结合缓冲液的蛋白A HiTrap MabSelect SuRe柱(通用电气#11-0034-95)来纯化GL-2045,并用pH值为

2.7的0.1M甘氨酸来洗脱GL-2045。AC-纯化GL-2045储存在pH值为7.0 的1X PBS(质量生物有限公司#119-069-101)中。在每次运行结束时,在没有柱原位清洗(CIP)程序的情况下对AC GL-2045进行纯化。CIP程序通常涉及使稀释的氢氧化钠 (0.1-0.5M NaOH)在纯化循环之间流过柱以水解沉积物,同时对蛋白A树脂进行消毒,从而再生蛋白A柱的结合能力(Boulet-Audet等人,《科学报告(Scientific Reports)》,第 6卷,2016)。在4个单独的蛋白A亲和柱(柱1-4,运行11.27.12)上纯化GL-2045。在用100%洗脱缓冲液洗脱柱后,然后使用相同的蛋白A亲和柱进行第二次亲和纯化运行 (运行11.28.12)。使用相同的柱纯化GL2045两次示出,在第二次纯化运行后(图22),较低分子量物种(同源二聚体和同源二聚体的二聚体两者)的量减少。如表12中所示, SDS-PAGE的密度测定分析展现出同源二聚体和二聚体带明显损耗,这表明较低分子量带在与蛋白A亲和柱结合方面无法胜过未能通过用洗脱缓冲液洗脱而从蛋白A柱完全移除的与蛋白A高度亲合的残留GL-2045蛋白。

[0264] 表12:蛋白A-纯化GL-2045的密度测定

[0265]

同源二聚体带 1	**运行 11.27.12**	**运行 11.28.12**	**差异运行 1/2 百分比**
柱 1	14.1	8.8	-37.6
柱 2	16.5	16.8	1.8
柱 3	21.8	18.5	-15.1
柱 4	22.2	21.3	-4.1
		平均值	-13.8
二聚体 带 2	**运行 11.27.12**	**运行 11.28.12**	**差异运行½百分比**
柱 1	24.9	19.8	-20.4
柱 2	17.5	15.3	-12.6
柱 3	17.1	14.5	-15.2
柱 4	15.5	11.7	-24.5
		平均值	-18.2

[0266] 较低分子量带的损耗表明存在与亲和柱基于亲合力的结合,由此具有多个蛋白A结合位点的高分子量多聚体GL-2045胜过低分子量物种,这导致较低分子量物种损耗并有效地改变药物的组成。这些数据表明,当使用蛋白A柱进行多次纯化运行时,更频繁的 CIP程序以及因此更频繁的蛋白A柱再生对于GL-2045的最佳纯化是必需的。这些结果是出乎意料的,因为如上所描述,再生通常需要使用将降解在本领域中最常使用的蛋白 A柱的NaOH。更频繁地使用此类缓冲液将因此导致蛋白A柱更快降解。如此,必须使用能够承受具有如0.5M NaOH等高强度NaOH缓冲液的频繁的CIP程序的蛋白A柱来再生在GL-2045纯化中重复使用的蛋白A柱,从而维持完整的GL-2045药物的最佳简况。

[0267] 实例9-再生用于GL-2045的重复纯化循环的蛋白A的CIP程序需要0.5M NaOH

[0268] 如实例8中所示,低分子量物种在不存在CIP程序的情况下的损耗还表明存在在第一次柱运行后仍保持与蛋白A亲和柱结合的高分子量物种,因此占据结合位点并防止较低分子量物种在随后的纯化运行中结合。这些数据表明,应当采用另外的CIP程序来维护蛋白A纯化GL-2045的多聚体曲线。

[0269] 本发明的发明人使用HiTrap MabSelect柱(美国通用电气公司#28-4082-58)进行定期的每日纯化发现,在大约6-7次纯化运行后,经纯化GL-2045的组成发生了变化,这表现

为同源二聚体和二聚体级分的微量损耗。纯化例如单克隆抗体的技术人员不期望在6-7次蛋白A纯化运行后发现经纯化产物的组成发生变化。为了解决这个问题，执行具有制造商所推荐的0.1M NaOH的CIP程序来再生蛋白A柱的结合能力。在每次纯化运行后执行这些CIP程序，这比本领域中所使用的更频繁。采用频繁的CIP程序带来了一些改进，但并未解决较低分子量物种的损耗问题。本发明的发明人因此推断，GL-2045 与蛋白A的亲合结合需要比技术人员通常将使用的方案更严格的CIP方案以完全再生柱，从而促进同源二聚体和二聚体的保留。

[0270] 然而，蛋白A柱(例如，MabSelect)中常用的树脂不耐NaOH，并且因此使用更严格的NaOH缓冲液将迅速降解，并且此类降解与降低的净化能力和GL-2045多聚体组合物的变化相关联。然而，较不常使用的蛋白A培养基(例如，MabSelect SuRe(美国通用电气公司#11-0034-95))可以承受0.5NaOH的增强的清洗。如此，本发明的发明人使用0.5M NaOH缓冲液将MabSelect SuRe柱与日常CIP程序一起使用。在实施更频繁且更严格的CIP程序后，每天完成GL-2045的蛋白A纯化而不损耗同源二聚体或二聚体且不改变GL-2045的组成。

[0271] 因此，本发明的发明人发现，GL-2045的蛋白A柱CIP需要比用单克隆抗体或Fc 融合蛋白工作的技术人员通常采用的程序更严格且更频繁的CIP程序，以保留同源二聚体和二聚体，并且因此保留完整的GL-2045药物的最佳简况。

[0272] 实例10-蛋白A柱pH洗脱梯度用于纯化非高度有序的多聚体的同源二聚体聚集体的GL-2045

[0273] pH洗脱梯度通常在蛋白纯化期间与蛋白A柱一起使用以优化总蛋白产率，但通常不用于改变药物的组成。本发明的发明人发现，蛋白A柱上的此类pH洗脱梯度可以用于从更高阶多聚体中消除GL-2045的无序聚集体。通过亲和色谱法(AC)用具有pH值为7.2的20mM磷酸钠、0.15M NaCl的结合缓冲液的蛋白A HiTrap MabSelect SuRe(美国通用电气公司#11-0034-95)对GL-2045CHO上清液进行纯化，随后用结合缓冲液对其进行另外的洗涤。通过包括pH值为2.7的0％到100％的0.1M甘氨酸的洗脱缓冲液洗脱与蛋白A结合的GL-2045，从而从蛋白A亲和柱产生GL-2045洗脱的pH梯度。将洗脱液级分收集到96孔板(德国葛莱娜第一生化股份有限公司(Greiner bio-one)# 780271)中，并通过向每个孔中加入pH值为9.0的Tris-HCl在pH 7.5下对其进行中和。然后，在非还原SDS-PAGE凝胶(4-12％NuPage Bis-Tris，英杰公司#NP0322BOX)上运行等效蛋白量的级分中的每一种。

[0274] 通过用pH洗脱梯度洗脱蛋白A柱获得的级分的SDS-PAGE分析证明，最后在级分 D6和D7中洗脱了极高分子量物种(图23A和图23B)。令人惊讶的是，第一级分(D1) 也含有高分子量物种。如此，这些结果表明，可以通过蛋白A亲和柱的pH梯度洗脱来从GL-2045的主要物种(例如，同源二聚体、二聚体和更高阶多聚体)中分离高分子量级分。如实例1-3中所示，这些级分可以代表通过所减少的Fc受体结合和所减少的CDC 抑制所证明的较低活性物种。

[0275] 凝胶(图23B，最右泳道)上还示出了通过再生(通过0.5M NaOH进行CIP并通过HCl中和)获得的极高分子量级分。这些结果表明，洗脱后驻留在蛋白A柱上的高分子量物种再次表明在CIP程序期间需要高严格的NaOH缓冲液来再生全柱结合能力。

[0276] 因此，尽管通常不用于此目的，但pH洗脱梯度可以用于将GL-2045的高分子量、无序聚集体从生物活性的更低级和更高阶多聚体中去除、分离。可以采用此类分离来进一步优化或维持经过优化的GL-2045的多聚体曲线。可替代地，可以使用分步洗脱梯度来得到优

化的GL-2045组合物。

[0277] 实例11-离子交换柱盐和pH条件修饰GL-2045多聚体组合物

[0278] 纯化GL-2045的重要目标是严格控制最终、经纯化产物的多聚体组合物。离子交换柱(例如,阳离子和阴离子交换)常规地用于纯化单克隆抗体和Fc融合蛋白的精制步骤。本发明的发明人用包括不同浓度的盐的洗脱缓冲液测试阳离子交换培养基POROS CIEX(英杰公司GoPure XS(10mL)目录号4448885)。首先通过蛋白A亲和色谱法纯化GL-2045,并且然后在加载在CIEX柱上之前将其汇集并透析在pH值为5.0的50mM 乙酸钠中。使用pH值为5的50mM乙酸钠作为平衡和洗涤缓冲液。用具有加入的不同量的缓冲液B(pH值为5的1M NaCl,在图24中以%示出)的50mM乙酸钠洗脱缓冲液测试洗脱缓冲液(EB)盐含量对GL-2045精制的影响。在AktaAvant上进行色谱法运行。简而言之,Avant方法包括以2mL/min的速度用pH值为5的50mM乙酸钠平衡总体积为10个柱体积(cv)的CIEX柱。将此前在pH值为5的50mM乙酸钠中透析的 65到100mg的GL-2045加载到所述柱上。用5cv的结合缓冲液以2mL/min的速度洗涤所述柱。然后用包括不同百分比的NaCl(例如,包括30-50%缓冲液B的洗脱缓冲液) 的介于9cv与15cv之间的缓冲液以2mL/min的速度洗脱GL-2045。

[0279] 为用包括30%缓冲液b、40%缓冲液b和50%缓冲液b(分别为30%EB、40%Eb 和50%EB)的洗脱缓冲液洗脱的GL-2045确定GL-2045的回收率,从而确定洗脱缓冲液的最佳盐浓度范围(图24)。这些数据表明,洗脱缓冲液中盐含量的改变可以基本上修饰GL-2045的多聚体组合物。

[0280] 表13:用包括30-50%缓冲液b的洗脱缓冲液洗脱的GL-2045的回收率

[0281]

洗脱步骤	缓冲液B百分比	级分	负载百分比
1	30	5A1-5A3	37.9
2	40	5B1-5B3	53.8
3	50	6A1-6A3	3.2
4	100	1A1-1B5	0.6
废料			4.2

[0282] 如实例11中所示并如表13中所量定的,当用30%EB、40%EB或50%EB洗脱缓冲液洗脱时,SDS-PAGE分析在分离GL-2045分子量物种方面展现出巨大的差异。用包括30-40%缓冲液b的洗脱缓冲液洗脱91.7%的材料,并且用包括50%缓冲液B的洗脱缓冲液回收的材料仅为高分子量材料。这些数据表明,洗脱缓冲液的改变可以基本上修饰GL-2045的多聚体组合物。因此,清楚的是,选择用于离子交换的洗脱缓冲液可以用于修饰GL-2045的多聚体组合物,这是这种技术的新颖用途。同时,本发明的发明人已经发现,如果在离子交换精制步骤中不期望改变GL-2045的组合物,则在选择用于离子交换精制步骤中的洗脱缓冲液的盐浓度时需要本领域技术人员不通常实践的精确度水平。

[0283] 实例12-可以使用离子交换色谱法来减少或消除同源二聚体或同源二聚体的二聚体

[0284] 由于用包括30%到40%之间的缓冲液b的洗脱缓冲液洗脱实例11中91.7%的 GL-2045材料,并且用包括50%缓冲液B的洗脱缓冲液回收的材料仅为高分子量材料,因此选择具有30-40%的缓冲液b范围的洗脱缓冲液进行进一步分析。所采用方法与实例11中所描述

方法相似。

[0285] 当用包括35％、36％或37％或更高的缓冲液b(分别为35％EB、36％EB、37％EB) 的洗脱缓冲液洗脱时，SDS-PAGE分析在分离GL-2045同源二聚体方面展现出巨大的差异。应注意，相比之下，在35％EB时清晰可见的同源二聚体和同源二聚体的二聚体在 36％EB时大大降低，并且在37％EB和更高时完全消除(图25)。类似地，当在35％EB、 36％EB或37％Eb时洗脱时或当用具有较高缓冲液b浓度的洗脱缓冲液洗脱时， SDS-PAGE分析在分离GL-2045的最高阶多聚体或较大的无序聚集体方面展现出巨大的差异。因此，清楚的是，选择用于离子交换的洗脱缓冲液可以用于修饰GL-2045的多聚体曲线，这是这种技术的新颖用途。同样显而易见的是，本领域技术人员可以使用这种分步洗脱的数据来选择单步或多步洗脱以获得所期望的GL-2045曲线。例如，使用 POROS CIEX柱和包括36.5-38.5％缓冲液b的洗脱缓冲液进行的GL-2045精制将通过多聚体10保持所有同源二聚体、二聚体和多聚体，并将洗脱掉大的无序聚集体和最高阶多聚体。实例4示出了使用不同柱的相似实例。

[0286] 实例13-可以使用离子交换色谱法来减少或消除大的同源二聚体聚集体和最高阶多聚体

[0287] 制造GL-2045的最佳组合物需要最小化最高阶GL-2045多聚体的量(例如，高于可清晰描绘的带10的带，大约600kD)并且需要消除高于1000kD的材料以去除大的同源二聚体聚集体和最高阶多聚体两者，其增加的化合价赋予免疫原性增大的理论风险。用包括不同百分比缓冲液b(38％EB(C1)、39％EB(C2)和40％EB(C3))的洗脱缓冲液来洗脱GL-2045(图26)。在38％(C1)、39％(C2)和40％(C3)处观察到GL-2045 的主要洗脱峰(图26)，然后在50％和100％缓冲液B处观察到较小的洗脱峰。确定了每种洗脱缓冲液的GL-2045回收率并表示在表14中。

[0288] 表14:具有不同洗脱缓冲液的GL-2045的产率百分比

[0289]

C1产率		
洗脱步骤	缓冲液B百分比	产率百分比
1	38	85.1
2	50	10.7
3	100	0.6
废料		3.5
C2产率		
洗脱步骤	缓冲液B百分比	产率百分比
1	39	93.4
2	50	2.96
3	100	0.2
废料		3.6
C3产率		
洗脱步骤	缓冲液B百分比	产率百分比

1	40	93.8
2	50	1.97
3	100	0.6
废料		3.5

[0290] 通过视觉检查SDS-PAGE分析确定了经洗脱GL-2045级分的多聚体曲线(图27)。目视检查经洗脱级分的SDS-PAGE分析表明,38%的洗脱缓冲液、回收的GL-2045具有最少量的残余高分子量材料。

[0291] 通过密度测定定量了GL-2045峰(图28,在表15中总结为SDS-PAGE带中的百分比强度)。峰11代表具有最低分子量的同源二聚体,并且峰1代表具有优选消除的最高分子量材料的材料。

[0292] 表15:密度测定分析的总结

[0293]

峰	AC/CIEX 38% (C1)	AC/CIEX 39% (C2)	AC/CIEX 40% (C3)	AC (对照)
1	2.87	2.64	2.7	4.93
2	1.73	0.83	0.62	0.8
3	1.55	1.11	0.58	1.09
4	3.34	3.43	3.39	3.29
5	5.08	4.9	5.34	5.16
6	10.04	9.55	10.05	9.86
7	11.27	11.1	11.55	10.13
8	20.22	19.52	20.89	17.35
9	10.12	12.1	11.6	9.2
10	11.47	12.4	11.43	9.29
11	13.68	16.36	14.75	14.67

[0294] 这些结果表明,在pH 5下用包括38%或39%缓冲液B的乙酸洗脱缓冲液进行的分步洗脱方案产生了GL-2045的大约85%的优选级分并减少了高于600kD的较高分子量级分。尽管视觉检查SDS-PAGE表明高分子量材料在用包括38%缓冲液b的洗脱缓冲液洗脱的级分中最低,但是密度测定分析表明用包括39%缓冲液b的洗脱缓冲液获得了最高分子量级分的最低百分比。然而,密度测定分析表明,与单独通过亲和色谱法纯化的材料相比,所有CIEX纯化的蛋白组合物含有较少量的高分子量级分(带1)。总体而言,洗脱分析表明,可以通过使用Poros CIEX柱应用受控的洗脱条件来控制大聚集体和最高阶多聚体的量。因此,清楚的是,选择用于离子交换的洗脱缓冲液可以用于修饰大聚集体和GL-2045的最大高度有序的多聚体组合物,这是这种技术的新颖用途。实例4中有使用不同柱的相似实例。

[0295] 实例14-用疏水相互作用色谱柱修饰GL-2045多聚体组合物

[0296] GL-2045由稳定的HEK 293F细胞系产生,并在具有Glutamax(Gibco#35050-061)和Geneticin(Gibco#10131-027)的293Freestyle培养基(Gibco#12338-018)中生长。每周采集两次上清液,并以0.2μm将其过滤到1L的过滤器系统中(Corning#431098)。然后用具有pH值为7.2的20mM磷酸钠、0.15M NaCl的结合缓冲液的蛋白A HiTrap MabSelect SuRe(通用电气#11-0034-95)纯化GL-2045上清液,并用pH值为3.0-3.6的0.1M柠檬酸钠洗脱缓冲液对其进行洗脱。AC-纯化GL-2045储存在pH值为7.0的1X PBS(Quality Biological,Inc.#119-069-101)中。

[0297] 然后使用HiTrap HIC选择试剂盒(通用电气#28-4110-07)在7种不同的疏水相互作用柱(HIC)上纯化GL-2045。表16中描述了包含在这种试剂盒中的柱。

[0298] 表16:疏水相互作用柱

[0299]

	柱:	CV
1	HiTrap辛基FF	1mL
2	HiTrap丁基HP	1mL
3	HiTrap苯基FF(低Sub)	1mL
4	HiTrap丁基FF	1mL
5	HiTrap丁基-S FF	1mL
6	HiTrap苯基FF(高Sub)	1mL
7	Hi Trap苯基FF	1mL

[0300] 用pH值为7.0的50mM磷酸钠、1.0M硫酸铵(起始缓冲液)来平衡HIC柱,并将3.5mg的AC纯化GL-2045(在4个体积的起始缓冲液中稀释)加载到每个柱中。在用起始缓冲液洗涤之后,使用0%到100%的pH值为7.0的50mM磷酸钠进行梯度洗脱。通过SDS page来测试所有经级分的峰和流穿。将未还原样品加载到15%Tris HCl (Bio-Rad#161-115)中。使用银染色剂试剂盒形式英杰公司#LC6100进行染色。

[0301] 七种不同的HIC柱展示了GL-2045的不同多聚体曲线。作为实例,丁基HP柱从在A12中发现的多聚体分子量物种中分离同源二聚体级分(级分A10)。用苯基HP柱看到了相同的效果(B11级分相较于B8级分)。用辛基FF柱在洗脱级分中回收了仅16%的所加载材料,这表明所述材料可以非常适合GL-2045的流穿模式精制方法。进一步地,来自辛基FF柱的经洗脱级分含有较高的分子量物种,这表明所述柱也可以非常适合用于去除具有较低效力的极高分子量同源二聚体聚集体物种。

[0302] 对称为MO45的鼠版本的GL-2045进行类似实验,通过蛋白A亲和色谱法对MO45 进行纯化,并且然后通过HIC用Hiload 26/10苯基琼脂糖凝胶高性能(通用电气 17-1086-01)在AKTA Avant(通用电气)上对其进行进一步纯化。用pH值为7.0的0.1 M磷酸钠、1M硫酸铵(起始缓冲液)平衡HIC柱,并将MO45加载到柱上,随后用起始缓冲液进行洗涤步骤以去除所有未结合的材料。然后通过梯度洗脱用pH值为7.0的 0.1M磷酸钠洗脱缓冲液洗脱MO45(图30-31)。

[0303] 通过SDS-PAGE来分析MO45的HIC纯化级分,以确定HIC柱精制对MO45多聚体曲线的影响。这些结果进一步证明,疏水相互作用柱可以用于修饰MO45的多聚体组合物,这可以通过同源二聚体、二聚体、三聚体和多聚体级分的清晰分离来标示(图32)。

[0304] 实例15-最佳产生的GL-2045的示例性方案

[0305] 本文所描述数据证明了GL-2045的上游和下游制造过程的若干变量的最佳条件,其导致对以下各项进行优化:(1)蛋白滴度;(2)整个培养物的细胞活力;以及(3)GL-2045的多聚化和(4)对最终GL-2045药物物质中的多聚体曲线的维持。重要的是,GL-2045 的多聚化水平对stradomer的临床功效是至关重要的(参见实例1-4)。目前的培养方法不一定针对具体级分的优化产生或特定多聚化模式的增强。如此,影响多聚化的上游培养试剂和条件以及下游纯化介质和条件都是未知的,并且无法基于现有技术对其进行预测。

[0306] 本文所描述数据产生发现以下用于产生最佳制造的GL-2045的方案元素：

[0307] (1)用于产生最佳制造的GL-2045的最佳基础培养基为ActiCHO P。

[0308] 本文所描述数据证明，最佳基础培养基为ActiCHO P。在生物反应器中在ActiCHO P基础培养基中培养的CHO细胞导致高细胞密度和细胞活力，同时与其它经测试基础培养基相比对蛋白滴度的增加进行了优化。令人惊讶的是，ActiCHO P培养基导致在培养方案结束时存在的GL-2045的更高阶多聚体的百分比增加。

[0309] (2)用于产生最佳制造的GL-2045的最佳补料为ActiCHO P，为ActiCHO补料A和补料B。

[0310] 本文所描述数据进一步证明，最佳补料为每天或每隔一天添加到培养物中的ActiCHO P补料A和补料B。ActiCHO P补料A和补料B保持高细胞密度和高细胞活力，同时导致比其它经测试培养基/补料组合高4倍的蛋白滴度。重要且出乎意料的是，具有补料A和补料B的ActiCHO P培养基导致高水平的高度有序的多聚体，并且重要的是，与其它经测试培养基/补料组合相比，导致GL-2045的高分子量、无序聚集体的百分比减小。这些数据表明，这种特定的培养基/补料组合导致产生了更高百分比的临床功效增强的GL-2045多聚体(例如，更高百分比的高度有序的GL-2045多聚体)。本发明的发明人惊奇地发现每隔一天添加补料A和补料B的结果是相似的，这表明这种特定的培养基/补料组合可以用于降低成本和减轻与日常培养操纵相关联的污染风险。

[0311] 进一步地，具有补料A和补料B的ActiCHO P培养基导致产生了作为更高阶多聚体存在的相当大百分比的GL-2045，同时使GL-2045的无序、高分子量聚集体的百分比最小化。如此，这种特定的培养基/补料组合令人惊讶地特别对高度有序的多聚化 GL-2045的生物学功能和临床有效级分进行了优化，因此优化了GL-2045多聚体曲线的保留，同时在另外的下游纯化步骤中减少了消除高阶聚集体的需要。

[0312] (3)用于产生最佳制造的GL-2045的最佳温度转变为基于细胞密度从37℃转变为32.5℃。

[0313] 本文所描述数据另外证明，基于细胞密度将温度从37℃转变到32.5℃导致最佳细胞密度、活力和蛋白滴度。这种温度转变方案偏离已建立的方案(Ouguchi等人，《细胞技术学(Cytotechnology)》，52(3)，第199-207页，(2006)；Masterson和Smales，《制药学生物工艺》，2(1)，第49-61页，(2014))，其描述了简单地基于培养日期将温度从 37℃转变到31℃。本发明的发明人出人意料地发现，在细胞密度达到约10-15x 10^6个细胞/毫升之后，将温度转变到32.5℃不仅导致维持了高细胞密度和细胞活力，而且与先前已建立的方案相比导致蛋白滴度显著增加。

[0314] 本文所证明数据表明，特定的下游纯化方案导致具有经过优化的多聚化曲线的GL-2045组合物。在执行这些纯化方法时，必须严格注意通过控制柱条件和缓冲液来维持GL-2045的所期望多聚体曲线。这与单克隆抗体、Fc融合蛋白或类似CHO衍生蛋白形成鲜明对比，其中产率的纯度和保留是主要目标。

[0315] (4)GL-2045的经过优化的蛋白A纯化需要频繁且严格的CIP方法。

[0316] GL-2045亲合性地结合蛋白A。这种亲合结合导致当使用通常用于mAb纯化的CIP程序时GL-2045保持与柱中的蛋白A培养基结合。结果，通过使用蛋白A柱的重复循环，GL-2045的同源二聚体级分不能与蛋白A结合并流过柱。这导致最终蛋白A纯化 GL-2045产物的

多聚体曲线的显著且功能上重要的变化。GL-2045的亲合结合因此导致需要比在本领域中常用的程序更频繁且更严格的(例如,使用0.5M NaOH洗涤缓冲液) CIP程序(例如,在mAb或Fc融合蛋白纯化期间)。这些结果是出乎意料的,因为最常使用的蛋白A柱不能承受去除GL-2045多聚体并完全再生蛋白A柱所需的严格的NaOH 洗涤。因此,仅一些蛋白A柱(尤其是MabSelect SuRe)能够用于GL-2045纯化,并且将需要频繁的使用大约0.5M NaOH的CIP程序来维持所期望的GL-2045多聚体曲线。

[0317] (5)pH洗脱梯度或分步洗脱促进GL-2045的最高分子量级分与更低级和更高阶多聚体分离。

[0318] 使用通过蛋白A纯化的pH洗脱梯度导致在第一和最后洗脱级分中洗脱的最高分子量组分。这些数据表明,可以利用pH梯度将GL-2045的生物活性级分(例如,同源二聚体、二聚体和更高阶多聚体)与包含无序的高分子量聚集体的级分分离,这些级分此前已被示出为具有降低的生物活性。

[0319] (6)用于通过离子交换色谱法精制GL-2045的最佳洗脱缓冲液是乙酸盐缓冲液+30-40%缓冲液b,尤其是37.5%-39%+/0.5%。

[0320] 离子交换色谱法通常用于在mAb产生期间精制药物杂质。然而,本发明的发明人利用离子交换色谱法来消除GL-2045的特定级分(例如,同源二聚体的最高阶多聚体和高分子量无序聚集体),使得实现了最佳多聚化曲线。具体地,本发明的发明人发现, 30-40%缓冲液b的洗脱缓冲液减少了GL-2045的高分子量无序聚集体的量。甚至更具体地,38-39%缓冲液b的洗脱缓冲液尤其维持最终GL-2045产物中存在的同源二聚体的量,同时还对无序聚集体的减少的量进行优化。

[0321] (7)疏水相互作用柱(HIC)可以用于实现特定的GL-2045多聚化曲线。

[0322] 本文的数据证明,多种HIC可以用于纯化GL-2045的精制步骤。例如,从主要含有高分子量物种的辛基FF柱流过,这表明这个柱可以专门用于去除GL-2045的高分子量聚集体。可替代地,丁基HP柱可以用于从多聚体级分中分离出同源二聚体级分以供应用,其中所述级分中的一种可以实现更期望的结果。可替代地,HIC柱可以用于结合模式。

[0323] GL-2045的经过优化的制造方案

[0324] 总之,结合上文所讨论的所有参数,以下方案导致GL-2045的最高蛋白产率,同时维持作为多聚体的总体群体的最高百分比。

[0325] 使用ExcellGene SA(Monthey,瑞士)的专有转染系统用两种载体来转染CHO细胞,一种GL-2045表达载体包括侧翼为piggyBac转座酶靶向序列的GL-2045表达盒,并且第二载体包括piggyBac转座酶。PiggyBac转座子优先插入到基因组的高度转录区域中,并且另外含有提供与基因沉默绝缘的反向末端重复子。转染导致表达盒整合到高度转录的基因组区域中,从而建立一组具有少于20个转基因基因组插入的稳定转染的 CHO细胞。然后在37℃的生长温度下在生物反应器中用ActiCHO P培养基培养CHO细胞。在此培养期间,在37℃的生长温度下每天用Acti CHO补料A和补料B向细胞补料,直到培养物达到约1000万到约1500万个细胞/毫升的细胞密度。在达到这种密度之后,使生长温度从37℃±1℃转变到32.5℃±1℃,并且在培养的最后一天从培养基中采集由培养基最佳制造的GL-2045。

[0326] 此方案导致细胞活力在培养的第18天大于95%,并且在第21天大于80%,并且最终总蛋白滴度大于9,000mg/mL,其中GL-2045的大于70%作为非同源二聚体而存在,并且大

于30％作为高于第五多聚体的更高阶多聚体而存在。

[0327] 用不会阻碍最大高度有序的多聚体通过的切向流动过滤系统从培养上清液中采集 GL-2045，从而保留上清液的同源二聚体和多聚体曲线。然后采用下游制造方法来分离GL-2045、去除杂质并且分离特定级分以便控制GL-2045的多聚体曲线(例如，去除无序的高分子量聚集体)。通过蛋白A亲和色谱法来纯化GL-2045，其中选择能够承受高碱度再生的蛋白A培养基。进一步地，使用多于一种洗涤缓冲液以使能够进一步控制纯化过程。另外，比正常情况更频繁地执行CIP程序，并且用0.5M NaOH缓冲液执行所述CIP程序以去除已经与柱亲合性地结合的GL-2045多聚体，从而完全再生如保持最终 GL-2045组合物中的同源二聚体所需的蛋白A柱的结合能力。在使用或不使用pH洗脱梯度的情况下，从蛋白A柱洗脱GL-2045。在通过蛋白A柱亲和色谱法纯化之后，采用另外的精制步骤。使用阳离子交换色谱法用包括37-39％+/-0.5％缓冲液b的洗脱缓冲液、优选地用CIEX POROS XS树脂去除GL-2045的高分子量无序聚集体。在一些实施例中， HIC柱用于进一步纯化GL-2045。为了去除GL-2045的高分子量无序聚集体，将辛基FF 树脂用作另外的洗脱步骤。可替代地，使用含有丁基HP的柱来分离特定的GL-2045级分(例如，分离更高阶多聚体)。另外，将阴离子交换柱(尤其是Q琼脂糖快速流动柱) 用作另外的精制步骤，特别是在流穿模式下。

[0328] 虽然这些另外的纯化步骤可以单独使用，但是优选的是，与所有三种阴离子交换、阳离子交换和疏水相互作用色谱法组合使用通过蛋白A亲和色谱法纯化GL-2045以得到最终GL-2045药物物质，其中最终蛋白滴度>4g/L，其中GL-2045的>70％作为多聚体存在，其中多聚体的>30％为五聚体多聚体或更高。

[0329] 实例16-对最佳产生的GL-2045的分析

[0330] 为了进一步表征通过本文所描述的方法制备的最佳产生的GL-2045，使用本文所描述的ActiPRO基础培养基、补料、温度转变根据本文所描述的上游方法在生物反应器中产生了GL-2045。然后，使所得GL-2045上清液通过密理博XOHC深度过滤器，接着通过0.2μm过滤器进行过滤，并且使用多种下游加工方法进行处理。在每个加工步骤之后对GL-2045组合物的多聚化曲线进行评估，并且图33中示出了所述多聚化曲线。经过滤GL-2045制剂的多聚化曲线在图33中通过红色点示出。然后，使经过滤GL-2045制剂经受用蛋白质A MabSelect Sure进行亲和色谱法(通用电气#11-0034-95)(多聚化曲线在图33中通过蓝色点示出)，并且然后使用Q琼脂糖快速流动柱在流穿模式下用AIEX 对所述制剂进行纯化。然后，将所得GL-2045的pH值调节到pH 5.0±0.10并通过0.2μm 过滤器过滤(多聚化曲线在图33中通过绿色点示出)。然后，在疏水相互作用色谱法(多聚化曲线在图33中通过橘色点示出)和过滤(多聚化曲线在图33中通过紫色点示出) 之前，通过使用包括pH值为5.0的50mM乙酸Na+375mM NaCl的洗脱缓冲液的分步洗脱在结合模式下用使用Poros XS柱的阳离子交换色谱法纯化GL-2045(多聚化曲线在图33中通过黄色点示出)。下表17示出了图33的原始数据。

[0331] 表17:通过分析HPLC确定的多聚体百分比

[0332]

运行	步骤	7+聚体	6 聚体	5 聚体	4 聚体	3 聚体	2 聚体	同源二聚体	容器
HH RegTox 运行 1	1 MabSelect 加载	35.4	13.3	7.4	13.6	7.7	8.4	13.0	SUB
HH RegTox 运行 1	2 MabSelect 汇集	35.7	12.7	7.4	13.9	7.4	9.6	13.4	SUB
HH RegTox 运行 1	3 AEX 汇集	36.4	12.5	7.2	13.8	7.3	9.4	13.1	SUB
HH RegTox 运行 1	4 CEX 汇集	32.1	12.3	7.5	14.4	7.8	10.6	15.3	SUB
HH RegTox 运行 1	5 HIC 汇集	31.7	12.4	7.4	13.7	7.4	10.8	16.6	SUB
HH RegTox 运行 1	6 UFDF 汇集	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
HH RegTox 运行 1	7 DS	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
HH RegTox 运行 2	1 MabSelect 加载	35.8	13.0	7.3	13.2	7.7	8.4	13.6	SUB
HH RegTox 运行 2	2 MabSelect 汇集	35.2	12.7	7.5	13.8	7.5	9.7	13.7	SUB
HH RegTox 运行 2	3 AEX 汇集	35.9	12.5	7.4	13.7	7.3	9.5	13.6	SUB
HH RegTox 运行 2	4 CEX 汇集	30.8	12.3	7.7	14.4	8.1	10.9	15.8	SUB
HH RegTox 运行 2	5 HIC 汇集	30.3	12.4	7.7	13.9	7.9	11.0	16.9	SUB
HH RegTox 运行 2	6 UFDF 汇集	31.8	12.3	7.7	14.0	7.9	10.9	15.4	SUB
HH RegTox 运行 2	7 DS	31.1	12.4	7.8	14.2	8.0	11.0	15.6	SUB
HH 100 L 运行 1	1 MabSelect 加载	39.2	12.4	7.2	12.8	7.2	7.5	13.4	SS
HH 100 L 运行 1	2 MabSelect 汇集	38.8	12.3	7.3	13.1	7.0	8.1	13.5	SS
HH 100 L 运行 1	3 AEX 汇集	37.7	12.4	7.3	13.3	7.1	8.3	13.9	SS
HH 100 L 运行 1	4 CEX 汇集	33.0	12.7	7.7	14.2	7.8	9.2	15.5	SS
HH 100 L 运行 1	5 HIC 汇集	33.2	12.8	7.2	12.6	6.7	9.5	18.0	SS
HH 100 L 运行 1	6 UFDF 汇集	33.9	12.9	7.5	12.9	6.8	9.5	16.6	SS
HH 100 L 运行 1	7 DS								SS
HH 100 L 运行 2	1 MabSelect 加载								SS

[0333]

HH 100 L 运行 2	2 MabSelect 汇集	35.6	12.0	7.6	13.2	7.5	9.3	14.7	SS
HH 100 L 运行 2	3 AEX 汇集	35.4	11.9	7.6	13.4	7.6	9.4	14.7	SS
HH 100 L 运行 2	4 CEX 汇集	30.6	12.0	8.0	14.0	8.2	10.5	16.6	SS
HH 100 L 运行 2	5 HIC 汇集	30.0	12.1	7.7	13.0	7.5	10.9	18.8	SS
HH 100 L 运行 2	6 UFDF 汇集	30.6	12.3	7.9	13.2	7.7	10.9	17.5	SS
HH 100 L 运行 2	7 DS								SS
HH 100 L 运行 3	1 MabSelect 加载	34.5	12.7	8.0	13.6	7.6	9.2	14.4	SS
HH 100 L 运行 3	2 MabSelect 汇集	36.1	12.4	7.8	13.2	7.4	9.2	13.9	SS
HH 100 L 运行 3	3 AEX 汇集	36.0	12.4	7.7	13.3	7.4	9.3	14.0	SS
HH 100 L 运行 3	4 CEX 汇集	29.5	12.3	8.1	14.2	8.3	10.8	16.7	SS
HH 100 L 运行 3	5 HIC 汇集	29.6	12.3	7.9	13.2	7.7	11.0	18.2	SS
HH 100 L 运行 3	6 UFDF 汇集	29.8	12.6	8.0	13.5	7.9	11.1	17.2	SS
HH 100 L 运行 3	7 DS								SS
HH 250 L 运行	1 MabSelect 加载								SUB
HH 250 L 运行	2 MabSelect 汇集	34.8	12.9	7.6	14.1	7.3	9.6	13.8	SUB
HH 250 L 运行	3 AEX 汇集	34.7	12.8	7.5	14.2	7.3	9.7	13.7	SUB
HH 250 L 运行	4 CEX 汇集	29.5	12.7	7.8	15.0	8.0	11.0	15.9	SUB
HH 250 L 运行	5 HIC 汇集	29.5	12.7	7.6	13.8	7.4	11.3	17.6	SUB
HH 250 L 运行	6 UFDF 汇集	30.1	12.9	7.8	14.1	7.6	11.3	16.2	SUB
HH 250 L 运行	7 DS								SUB
JJ GMP 1	1 MabSelect 加载								SS
JJ GMP 1	2 MabSelect 汇集	33.6	13.17	7.54	14.66	7.22	9.49	13.88	SS
JJ GMP 1	3 AEX 汇集	34.80	12.70	7.50	14.60	7.20	9.30	14.00	SS
JJ GMP 1	4 CEX 汇集	33.00	12.40	7.40	14.80	7.40	10.00	14.80	SS
JJ GMP 1	5 HIC 汇集	31.80	12.90	7.40	14.10	7.00	10.30	16.50	SS
JJ GMP 1	6 UFDF 汇集	31.40	12.80	7.30	14.20	7.10	10.40	16.80	SS
JJ GMP 1	7 DS	32.90	12.60	7.30	14.10	7.20	10.40	15.50	SS

[0334]

JJ GMP 2	1 MabSelect 加载								SS
JJ GMP 2	2 MabSelect 汇集	34.95	13.13	7.48	14.72	7.04	9.35	13.23	SS
JJ GMP 2	3 AEX 汇集	34.40	12.80	7.40	14.90	7.20	9.50	13.80	SS
JJ GMP 2	4 CEX 汇集	32.10	12.60	7.60	15.20	7.50	10.30	14.70	SS
JJ GMP 2	5 HIC 汇集	31.00	13.00	7.40	14.50	7.10	10.60	16.50	SS
JJ GMP 2	6 UFDF 汇集	30.60	13.00	7.50	14.50	7.10	10.70	16.60	SS
JJ GMP 2	7 DS	31.60	12.60	7.40	14.30	7.10	10.60	16.40	SS
JJ GMP 3	1 MabSelect 加载								SS
JJ GMP 3	2 MabSelect 汇集	34.23	13.17	7.54	14.49	7.18	9.50	13.86	SS
JJ GMP 3	3 AEX 汇集	34.20	13.00	7.50	14.50	7.20	9.60	14.00	SS
JJ GMP 3	4 CEX 汇集	32.30	12.70	7.50	14.90	7.50	10.20	14.80	SS
JJ GMP 3	5 HIC 汇集	30.00	12.80	7.80	14.50	7.50	10.80	16.60	SS
JJ GMP 3	6 UFDF 汇集	29.90	12.90	7.70	14.60	7.50	10.70	16.70	SS
JJ GMP 3	7 DS	31.30	12.60	7.70	14.40	7.50	10.70	15.90	SS

[0335] 在每个步骤之后，通过分析HPLC来评估同源二聚体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体和7+聚体级分的百分比。简而言之，根据本文所描述的上游方法产生来自GL-2045稳定转染的CHO的上清液。接着根据本文所描述的下游方法来纯化 GL-2045。在以下连续纯化阶段中获得样品：蛋白A MabSelect SuRe加载、蛋白A MabSelect SuRe汇集、阴离子交换汇集、阳离子交换汇集、HIC汇集、UFDF汇集以及药物物质。通过分析SEC-HPLC来比较样品。简而言之，在高性能液体色谱法系统(安捷伦(Agilen)1100 HPLC系统)上使用与在280nm下的UV检测串联的两个SEC柱 (安捷伦Bio SEC(300 Å))通过HPLC来进行等度分离。用60分钟的运行时间和0.5 mL/min的流速来进行色谱分析。计算每个峰的相对面积百分比。

[0336] 结果示于图33中。如在图33中显而易见的是，GL-2045的下游加工改变了最小级分、同源二聚体和同源二聚体的二聚体以及最大级分、7-聚体+的水平，而级分3-6保持相当稳定的状态。对于较小的多聚体，从蛋白A柱加载到最终药物物质的渐进式下游制造步骤导致同源二聚体和同源二聚体的二聚体的回收增加。然而，渐进式下游加工步骤对最高阶多聚体具有相反的作用，这导致其相对百分比降低。

[0337] 所得GL-2045药物产品具有限定的多聚体模式，其包括按总组合物的百分比计小于约20％的同源二聚体以及大于约28％的7-聚体及以上。组合物还包括约7-12％的同源二聚体的二聚体、约6-11％的同源二聚体的三聚体、约10-16％的同源二聚体的四聚体、约 6-9％的同源二聚体的五聚体、以及约10-14％的同源二聚体的六聚体。

序列表

<110> 格利克尼克股份有限公司

Block, David S

Olsen, Henrik

Merigeon, Emmanuel Y

<120> 多聚化stradomer GL-2045的制造优化

<130> GLIK-017/01WO

<150> US 62/432,402

<151> 2016-12-09

<160> 6

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成后的前导序列

<400> 1

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 3
<211> 232
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 3
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

145 150 155 160
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 185 190
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
210 215 220
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys
245 250 255
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260

<210> 5
<211> 264
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 5
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
115 120 125
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

145 150 155 160
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 185 190
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
210 215 220
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys
245 250 255
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 6
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

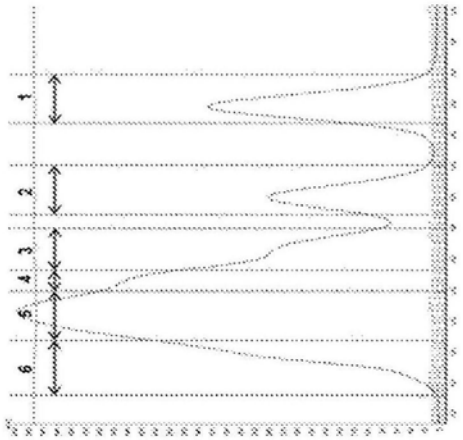


图1A

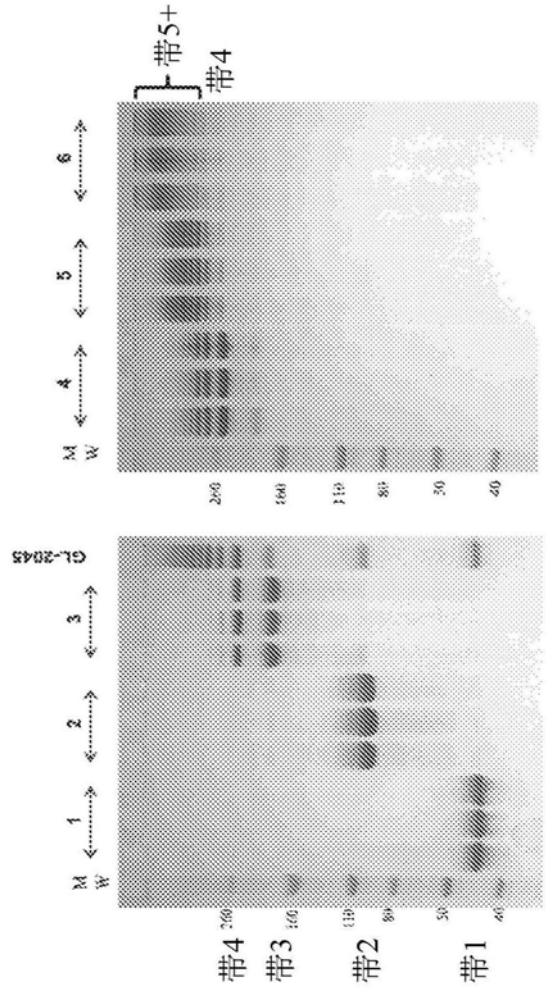


图1B

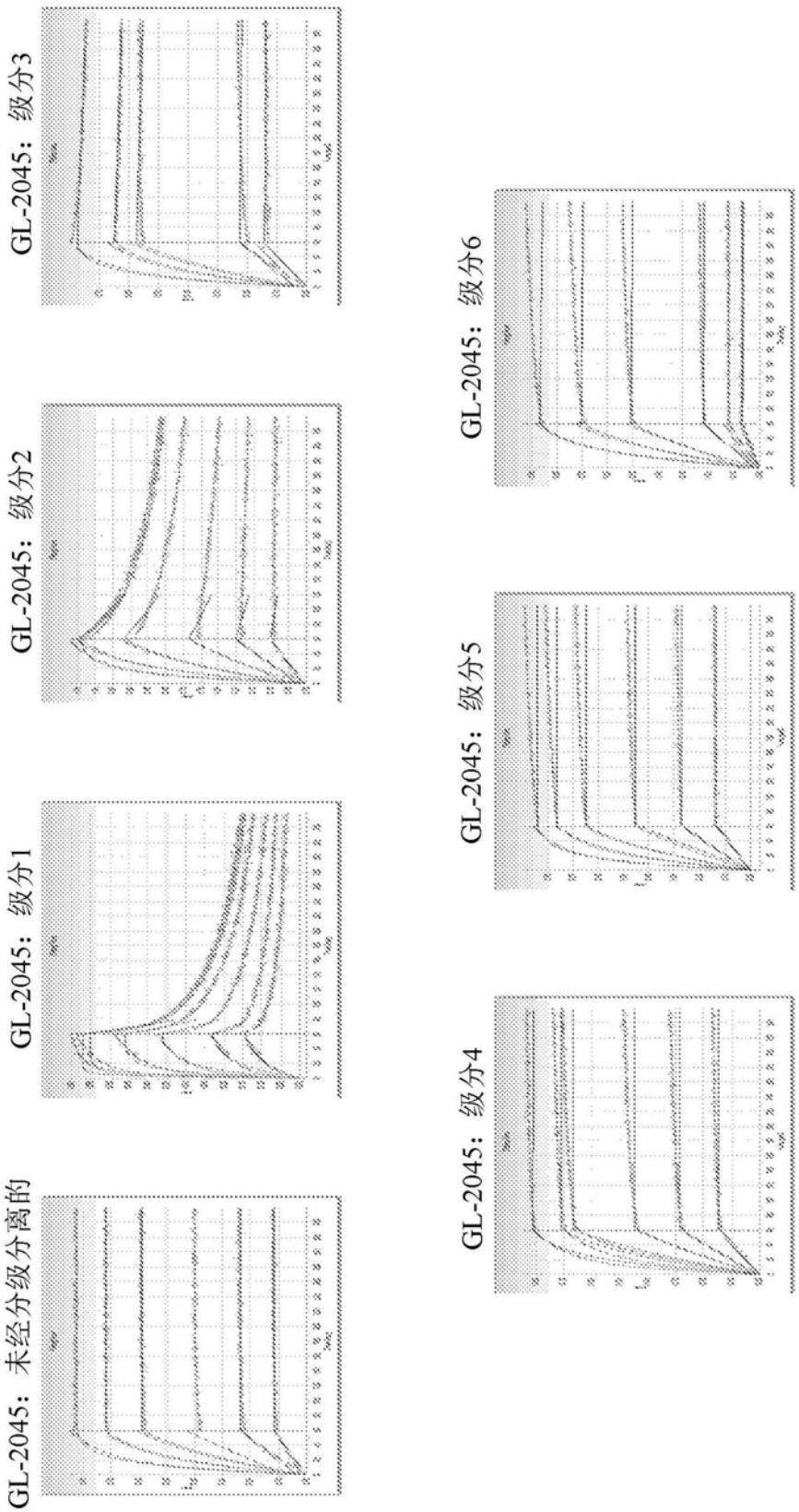

GL-2045：未经分级分离的
GL-2045：级分1
GL-2045：级分2
GL-2045：级分3
GL-2045：级分4
GL-2045：级分5
GL-2045：级分6

图2

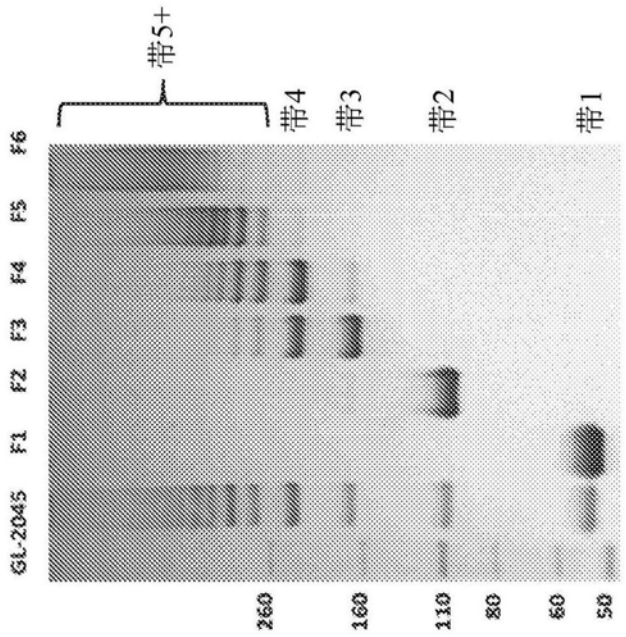

带5+
带4
带3
带2
带1
F6
F5
F4
F3
F2
F1
GL-2045
260
160
110
80
60
50

图3A

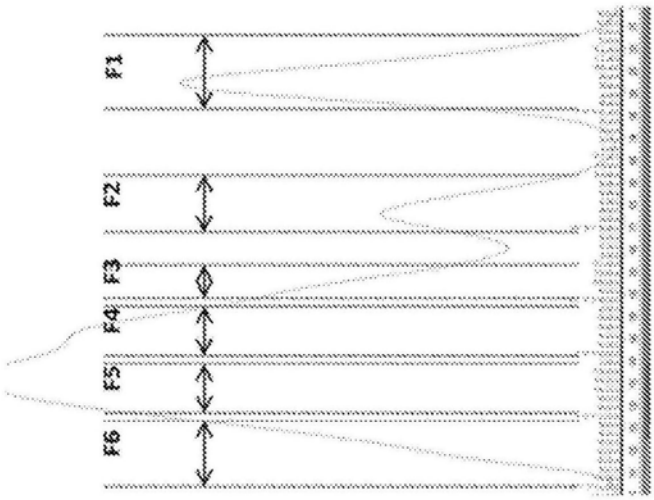

F1
F2
F3
F4
F5
F6

图3B

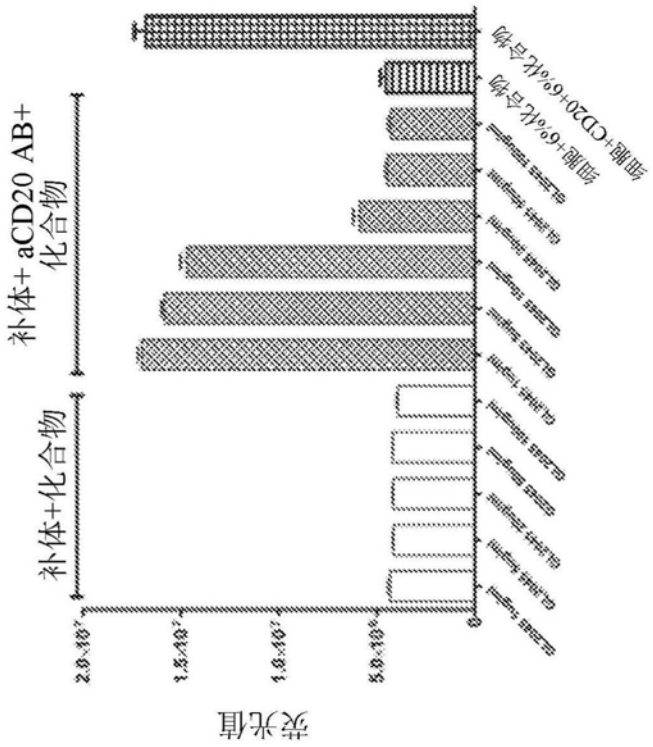

荧光值
补体+化合物
补体+ aCD20 AB+
化合物
细胞+6%化合物
细胞+CD20+6%化合物

图4A

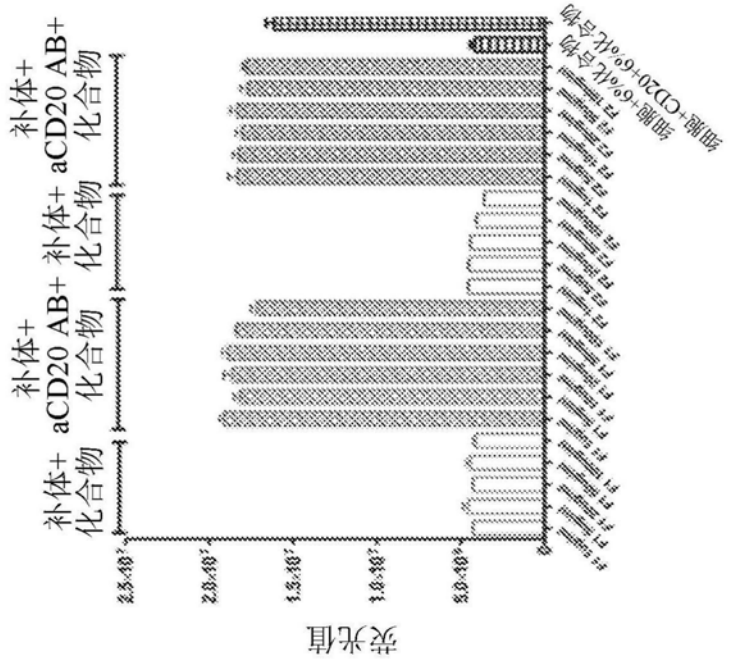

荧光值
补体+
化合物
补体+ aCD20 AB+
化合物
补体+ 补体+ aCD20 AB+
化合物 化合物
细胞+6%化合物
细胞+CD20+6%化合物

图4B

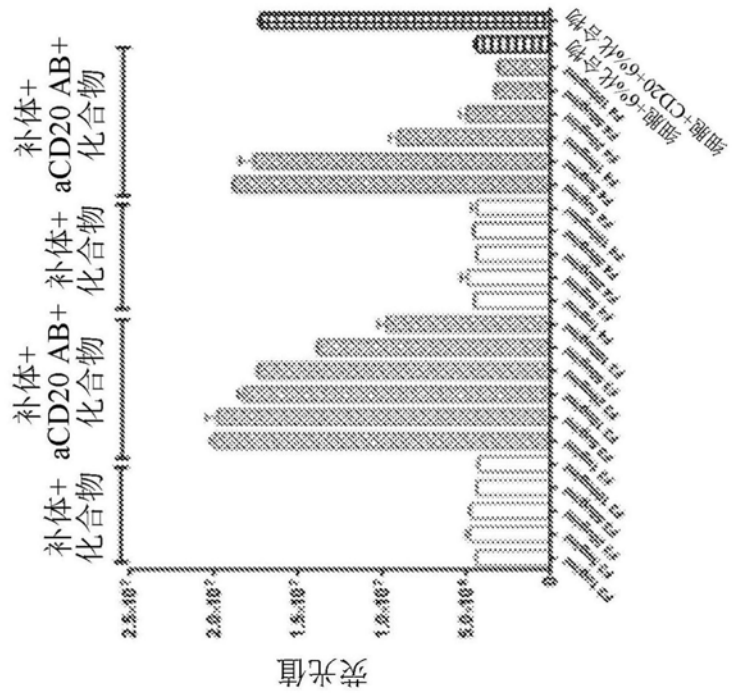

荧光值
补体+ 化合物
补体+ aCD20 AB+ 化合物
补体+ 化合物
补体+ aCD20 AB+ 化合物
细胞+6%化合物
细胞+CD20+6%化合物

图4C

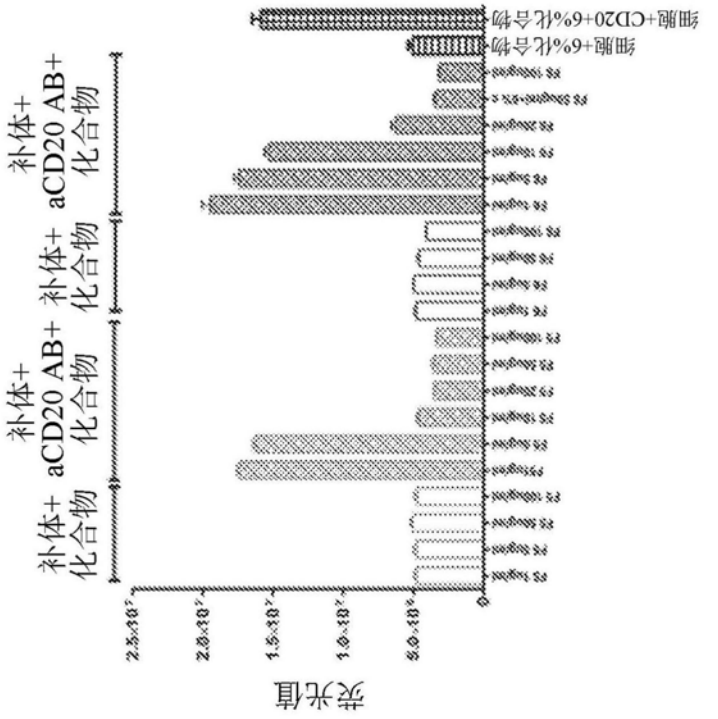

荧光值
补体+ 化合物
补体+ aCD20 AB+ 化合物
补体+ 化合物
补体+ aCD20 AB+ 化合物
细胞+6%化合物
细胞+CD20+6%化合物

图4D

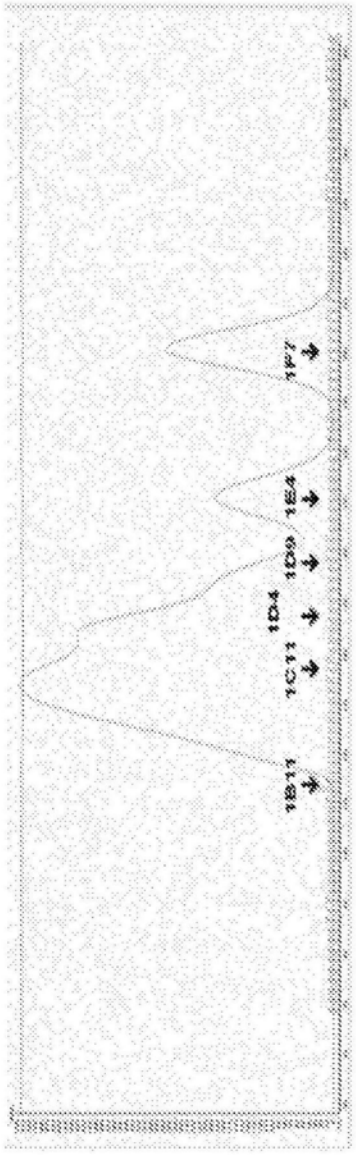


图5A

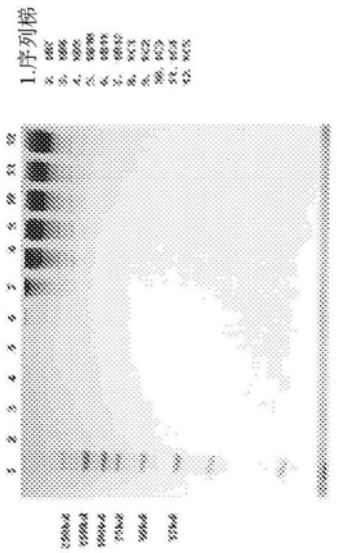


图5B

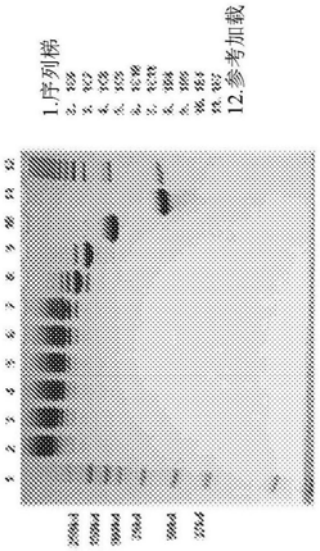


图5C

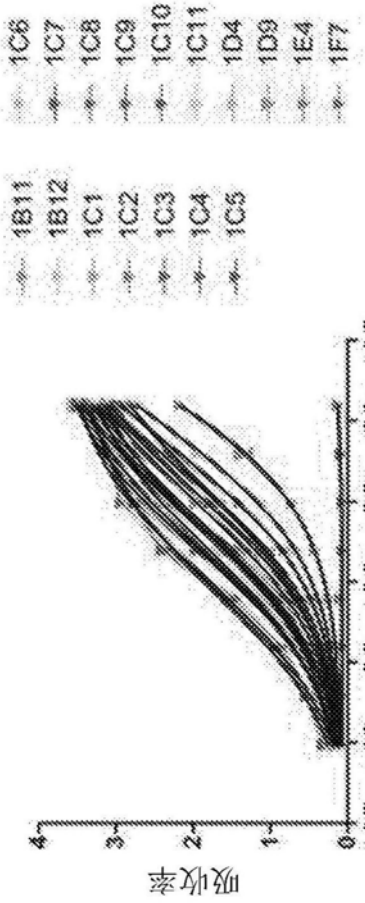

1C6
1C7
1C8
1C9
1C10
1C11
1D4
1D9
1E4
1F7
1B11
1B12
1C1
1C2
1C3
1C4
1C5
-1.5
-2.0
-2.5
-3.0
-3.5
-4.0
-4.5
对数浓度
吸收率
0
1
2
3
4

图6B

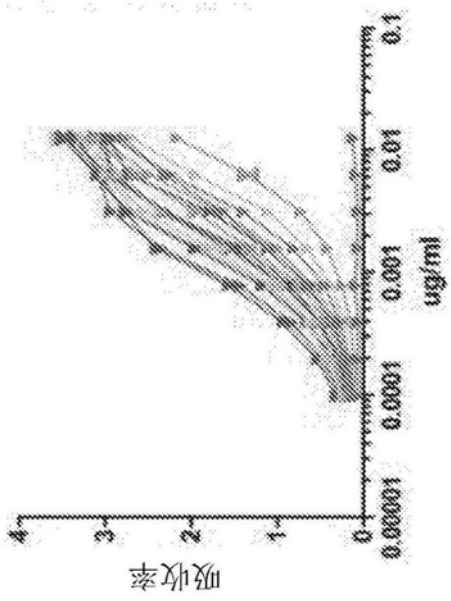

0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
ug/ml
吸收率
0
1
2
3
4

图6A

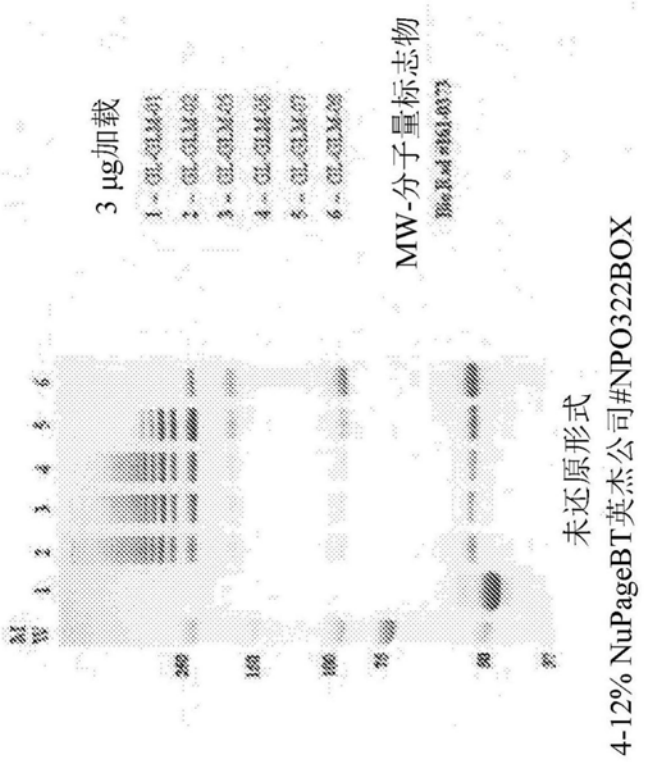


图7

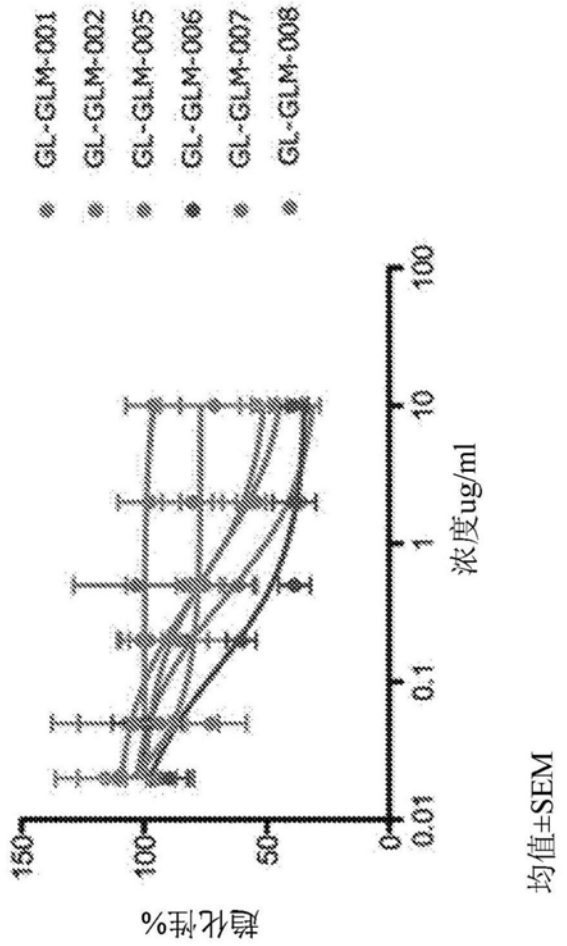

GL-GLM-001
GL-GLM-002
GL-GLM-005
GL-GLM-006
GL-GLM-007
GL-GLM-008
抑化性%
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
浓度ug/ml
均值±SEM

图8

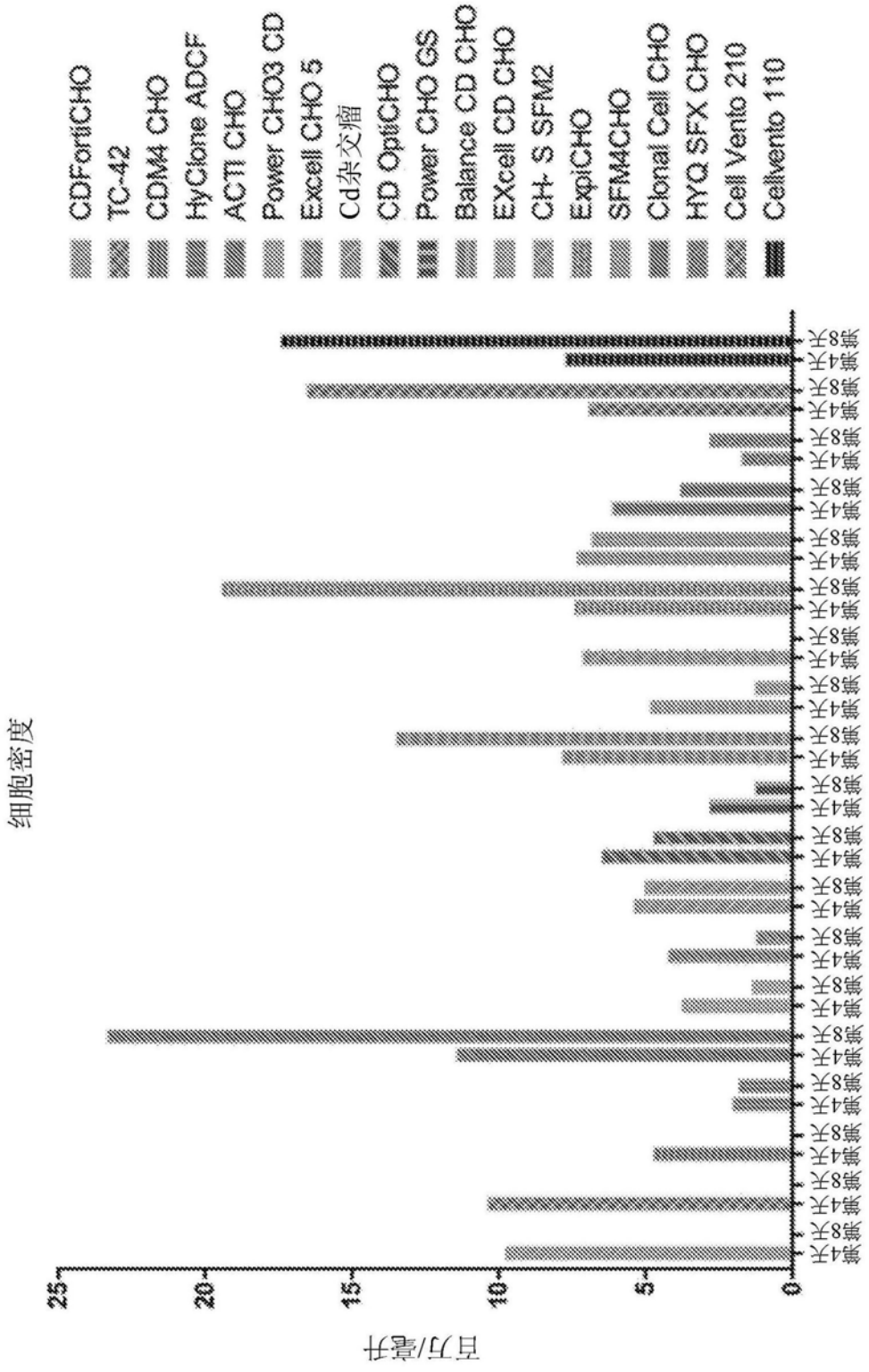

CDFortiCHO
TC-42
CDM4 CHO
HyClone ADCF
ACTI CHO
Power CHO3 CD
Excell CHO 5
Cd杂交瘤
CD OptiCHO
Power CHO GS
Balance CD CHO
EXcell CD CHO
CH- S SFM2
ExpiCHO
SFM4CHO
Clonal Cell CHO
HYQ SFX CHO
Cell Vento 210
Cellvento 110
细胞密度
百万/毫升
0
5
10
15
20
25
第4天
第8天

图9

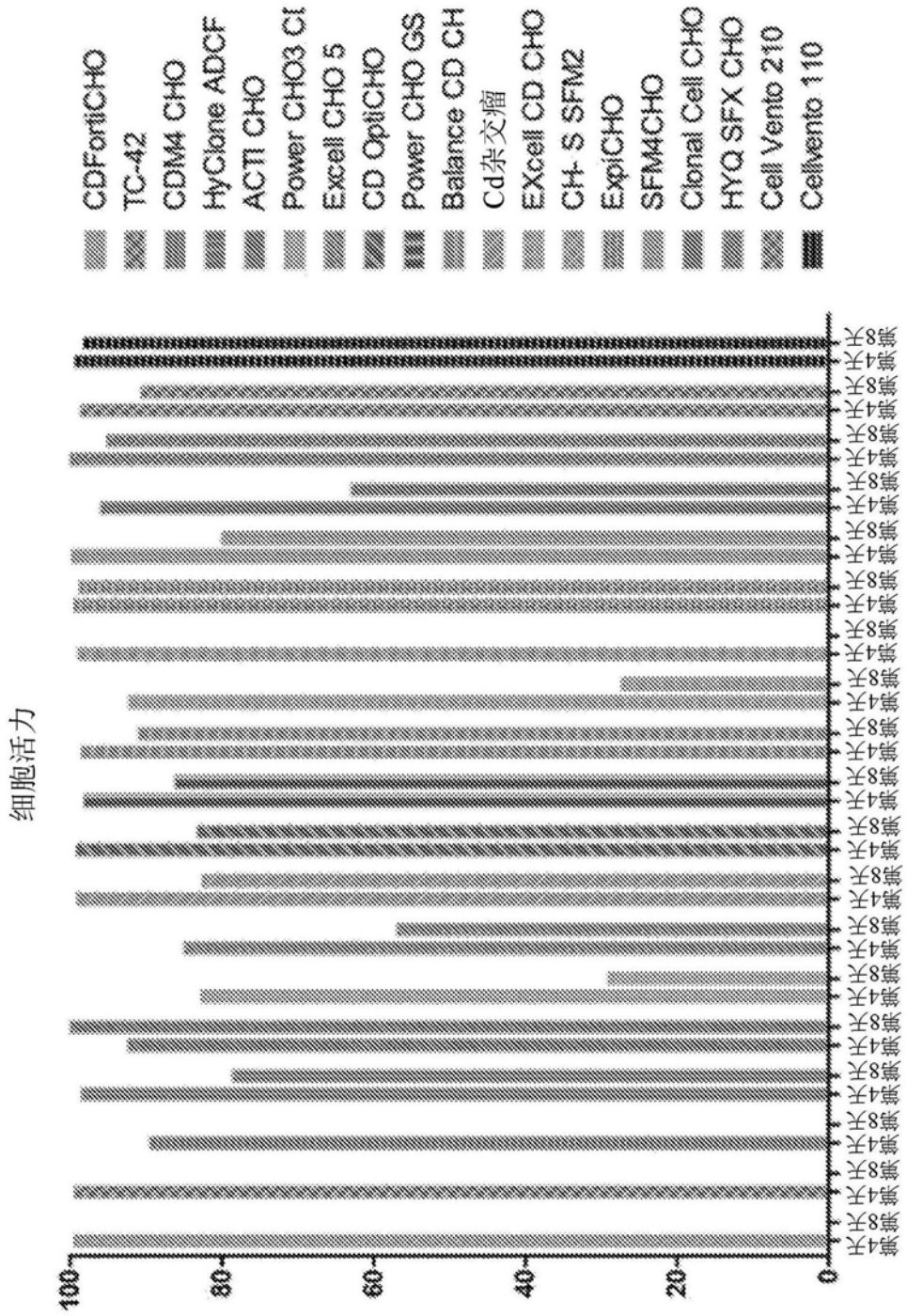

CDFortiCHO
TC-42
CDM4 CHO
HyClone ADCF
ACTI CHO
Power CHO3 Cl
Excell CHO 5
CD OptiCHO
Power CHO GS
Balance CD CH
Cd杂交瘤
EXcell CD CHO
CH- S SFM2
ExpiCHO
SFM4CHO
Clonal Cell CHO
HYQ SFX CHO
Cell Vento 210
Cellvento 110
细胞活力
100
80
60
40
20
0
第8天
第4天

图10

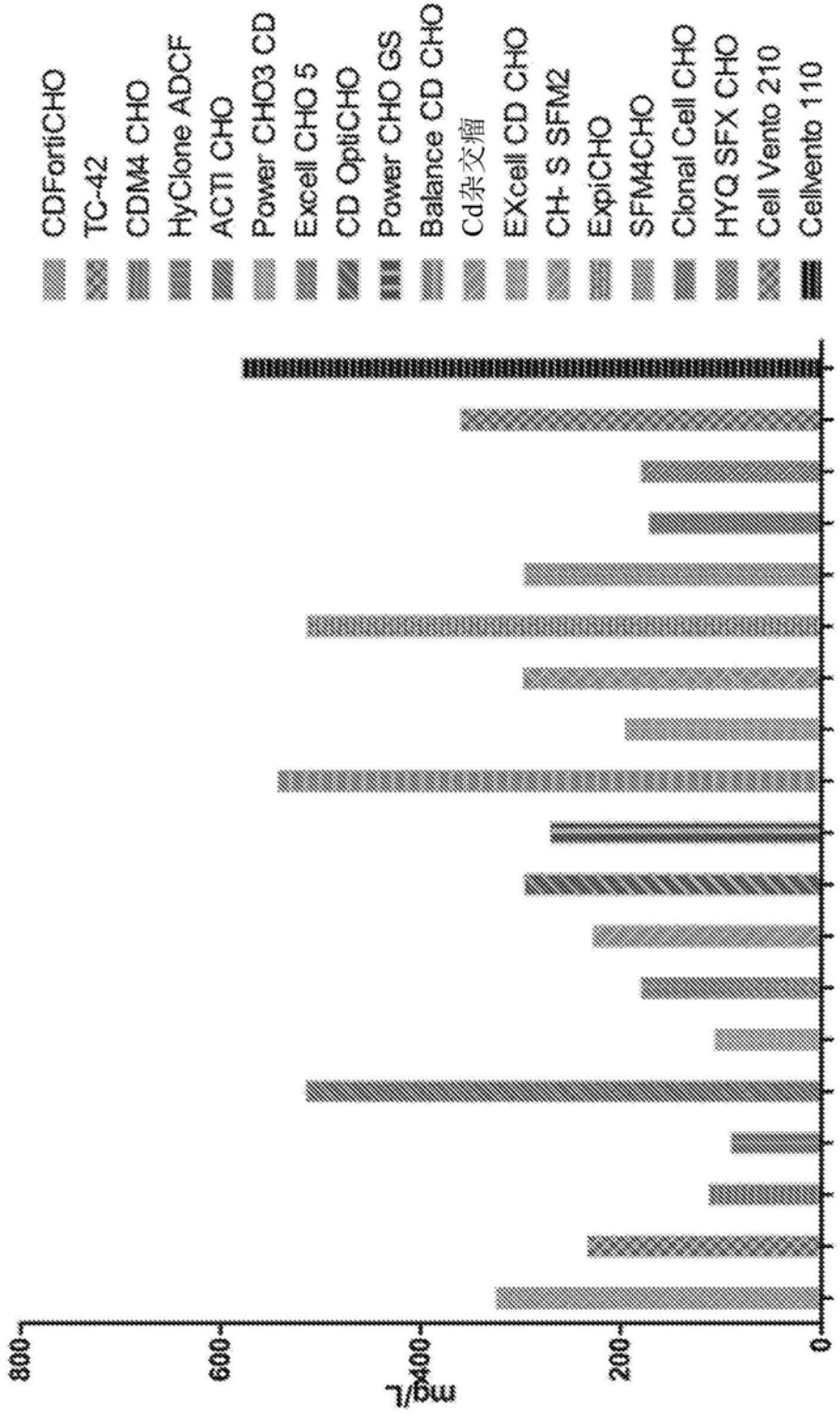
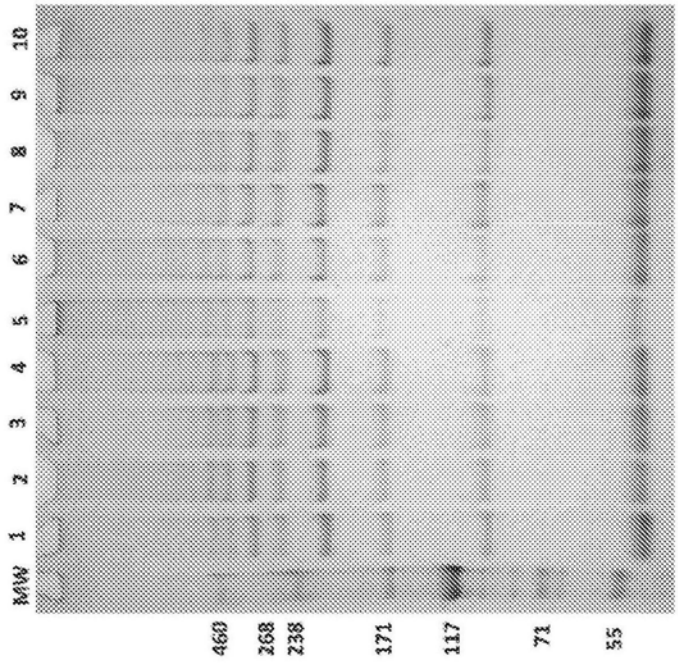

CDFortiCHO
TC-42
CDM4 CHO
HyClone ADCF
ACTI CHO
Power CHO3 CD
Excell CHO 5
CD OptiCHO
Power CHO GS
Balance CD CHO
Cd杂交瘤
EXcell CD CHO
CH- S SFM2
ExpiCHO
SFM4CHO
Clonal Cell CHO
HYQ SFX CHO
Cell Vento 210
Cellvento 110
800
600
400
200
0
mg/L

图11



1. CD FortiCHO中的GL-2045
2. TC-42（CHOMACS CD）中的GL-2045
3. Hyclone CDM4CHO中的GL-2045
4. Hyclone ADCF MAB中的GL-2045
5. ActiCHO P中的GL-2045
6. PowerCHO3 CD中的GL-2045
7. Ex-cell CHO 5中的GL-2045
8. Cd杂交瘤中的GL-2045
9. CD OptiCHO中的GL-2045
10. PowerCHO-GS中的GL-2045

图12A

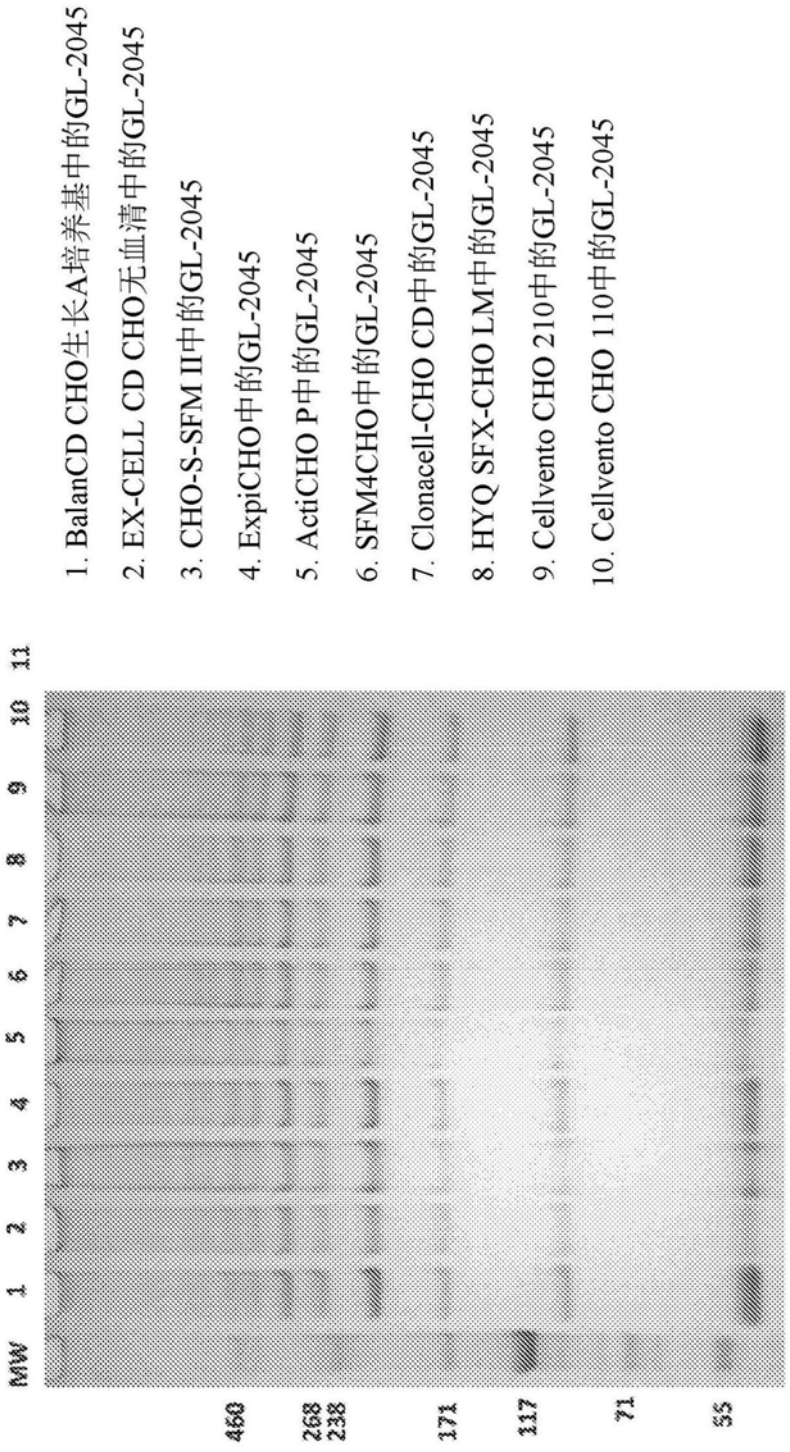

1. BalanCD CHO生长A培养基中的GL-2045
2. EX-CELL CD CHO无血清中的GL-2045
3. CHO-S-SFM II中的GL-2045
4. ExpiCHO中的GL-2045
5. ActiCHO P中的GL-2045
6. SFM4CHO中的GL-2045
7. Clonacell-CHO CD中的GL-2045
8. HYQ SFX-CHO LM中的GL-2045
9. Cellvento CHO 210中的GL-2045
10. Cellvento CHO 110中的GL-2045
MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
460
268
238
171
117
71
55

图12B

PowerCHO3 CD
龙沙集团

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Power补料A	%	1	20		20											
	g/L		24		29.088											
L-谷氨酰胺	%	2	2mM		2mM											
L-谷氨酰胺	g/L		1.848		1.745											

ADCF-Mab Hyclone

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hyclone细胞加强4 (PS3073)	%	1			5			5			5			5		
	g/L				6.060			6.300			6.615			6.946		

ActiCHO P
培养基

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Power补料A	%	1			4	4	4	4	4	4	4	4	4			
	g/L				4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8			
Power补料B	%	2			0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4			
	g/L				0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48			
葡萄糖		3	每天监测并且当葡萄糖水平低于2 g/L时使其达到4 g/L													

图13A

Cellvento CHO-210

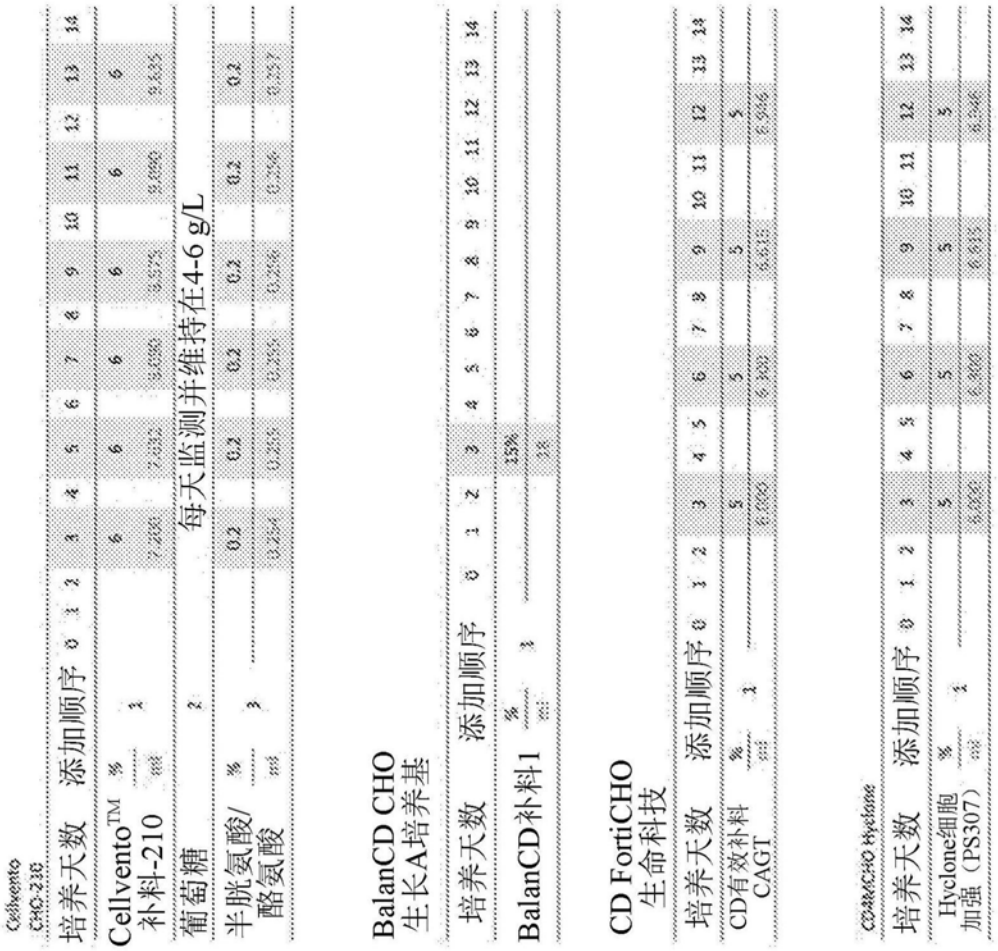
培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cellvento™ 补料-210	%	1			6		6		6		6		6		6	
	ml				7.200		7.632		8.090		8.575		9.090		9.635	
葡萄糖		2	每天监测并维持在4-6 g/L													
半胱氨酸/酪氨酸	%	3			0.2		0.2		0.2		0.2		0.2		0.2	
	ml				0.254		0.255		0.255		0.256		0.256		0.257	

BalanCD CHO 生长A培养基

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BalanCD补料1	%	1			15%											
	ml				18											

CD FortiCHO 生命科技

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CD有效补料 CAGT	%	1			5			5			5			5		
	ml				6.000			6.300			6.615			6.946		



CD4MCHO Hyclone

培养天数	添加顺序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hyclone细胞加强（PS307）	%	1			5			5			5			5		
	ml				6.000			6.300			6.615			6.946		

图13B

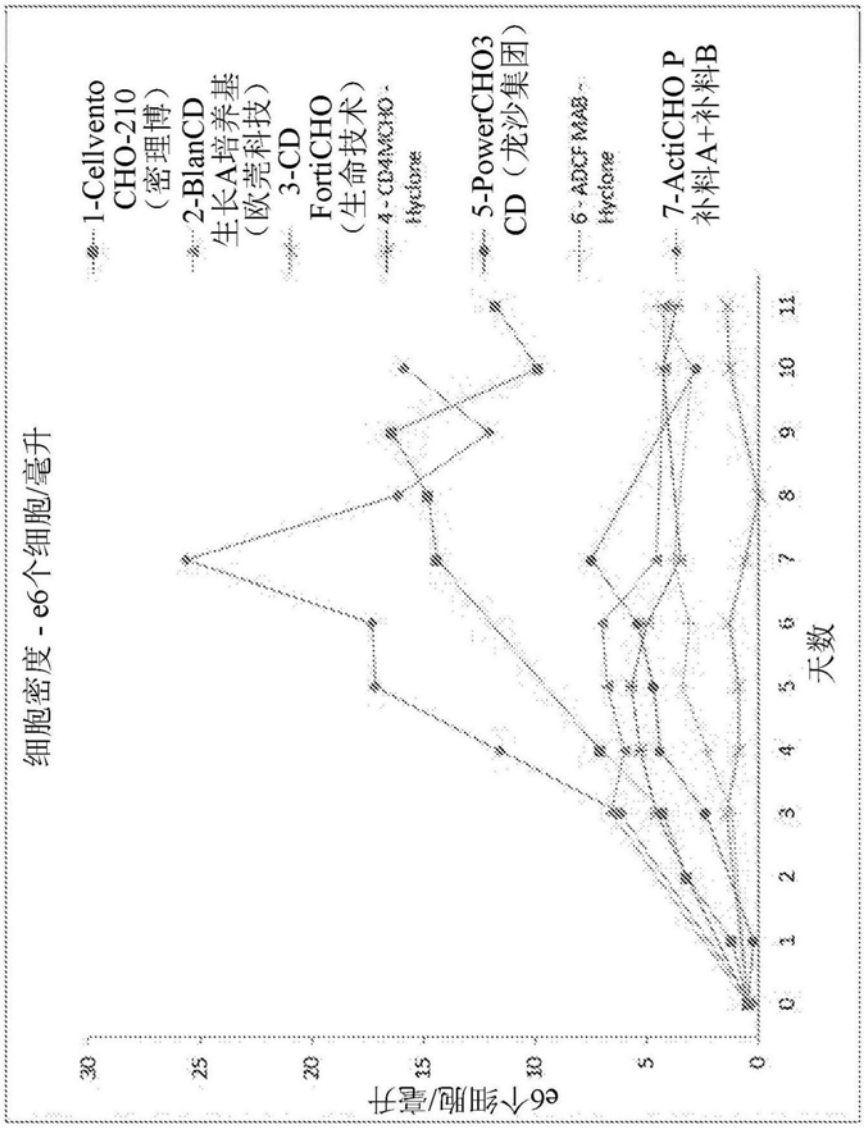

细胞密度 - e6个细胞/毫升
1-Cellvento CHO-210 （密理博）
2-BlanCD 生长A培养基 （欧莞科技）
3-CD FortiCHO （生命技术）
4-CD4MCHO-Hyclone
5-PowerCHO3 CD（龙沙集团）
6-ADCF M4B-Hyclone
7-ActiCHO P 补料A+补料B
e6个细胞/毫升
天数
0
5
10
15
20
25
30
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

图14

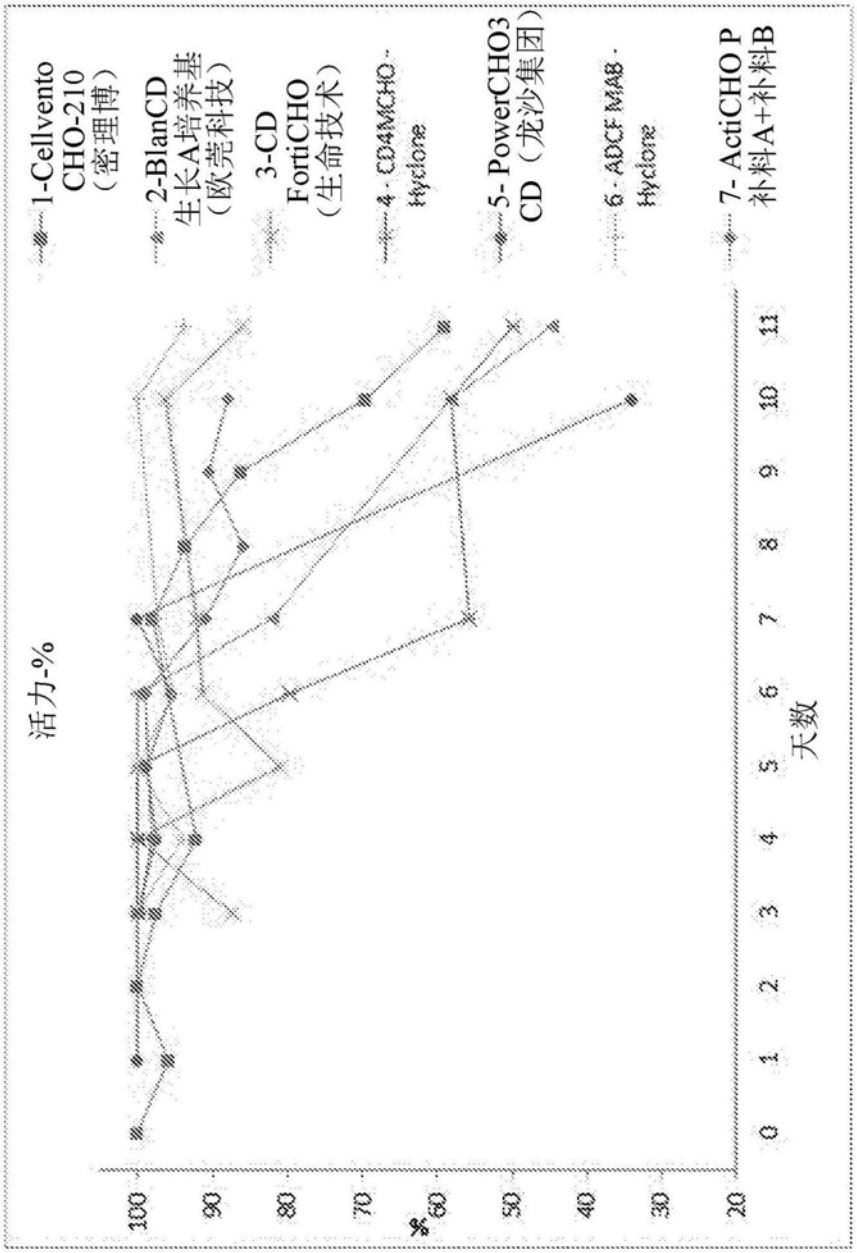

1-Cellvento CHO-210（密理博）
2-BlanCD 生长A培养基（欧亮科技）
3-CD FortiCHO（生命技术）
4 - CD4MCHO - Hyclone
5- PowerCHO3 CD（龙沙集团）
6 - ADCF MAB - Hyclone
7- ActiCHO P 补料A+补料B
活力-%
天数
100
90
80
70
60
50
40
30
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

图15

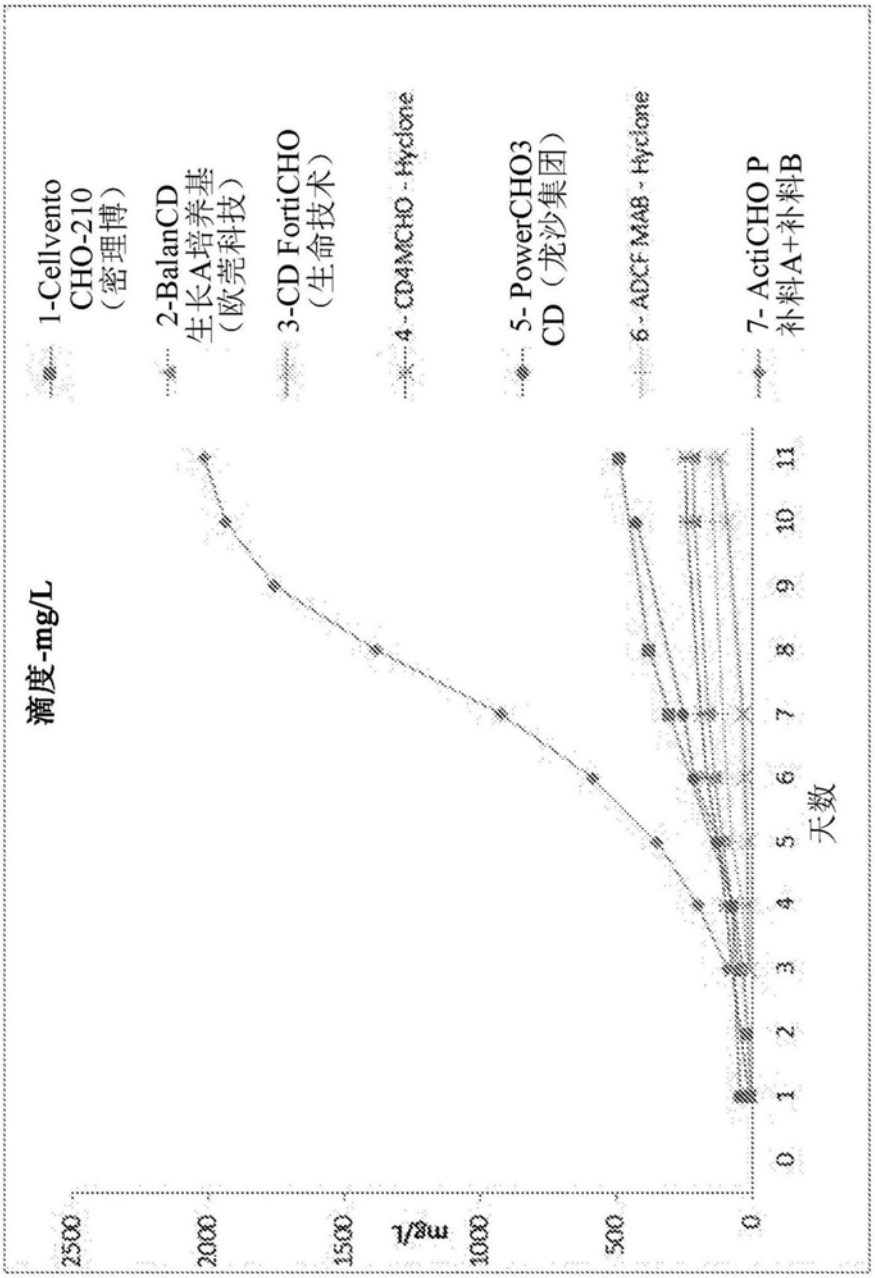

滴度-mg/L
1-Cellvento CHO-210（密理博）
2-BalanCD 生长A培养基（欧莞科技）
3-CD FortiCHO（生命技术）
4 - CD4MCHO - Hyclone
5- PowerCHO3 CD（龙沙集团）
6 - ADCF MAB - Hyclone
7- ActiCHO P 补料A+补料B
mg/L
2500
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
天数

图16

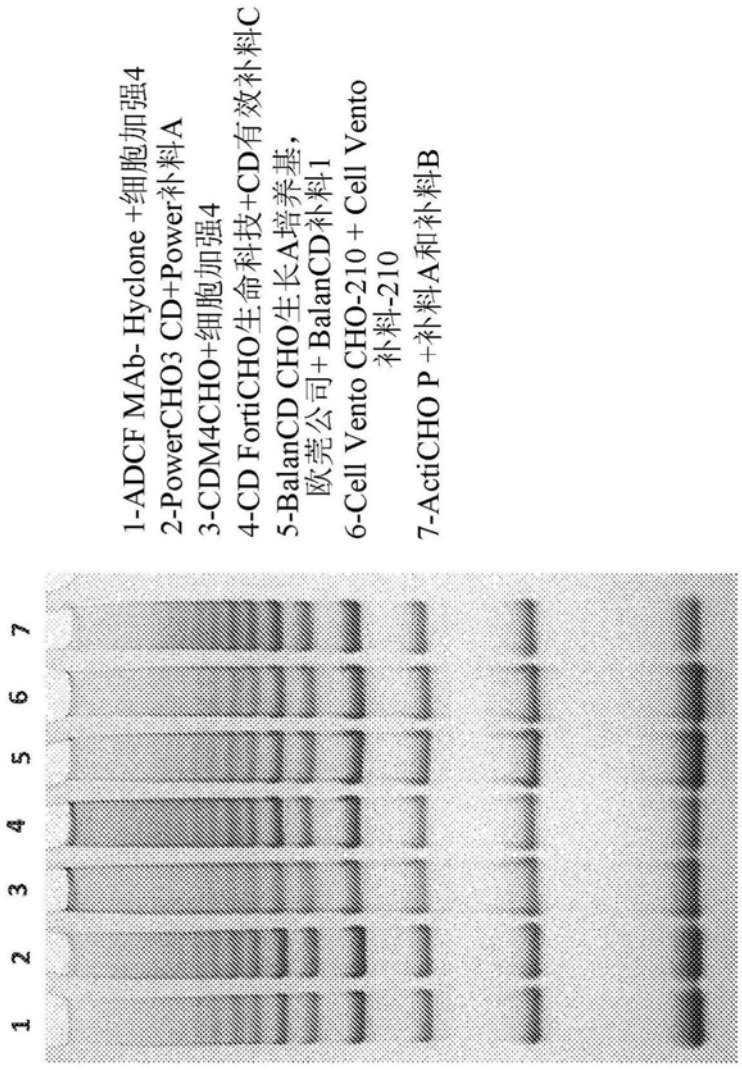

1-ADCF MAb- Hyclone +细胞加强4
2-PowerCHO3 CD+Power补料A
3-CDM4CHO+细胞加强4
4-CD FortiCHO生命科技+CD有效补料C
5-BalanCD CHO生长A培养基，
欧莞公司+ BalanCD补料1
6-Cell Vento CHO-210 + Cell Vento
补料-210
7-ActiCHO P +补料A和补料B
1 2 3 4 5 6 7

图17

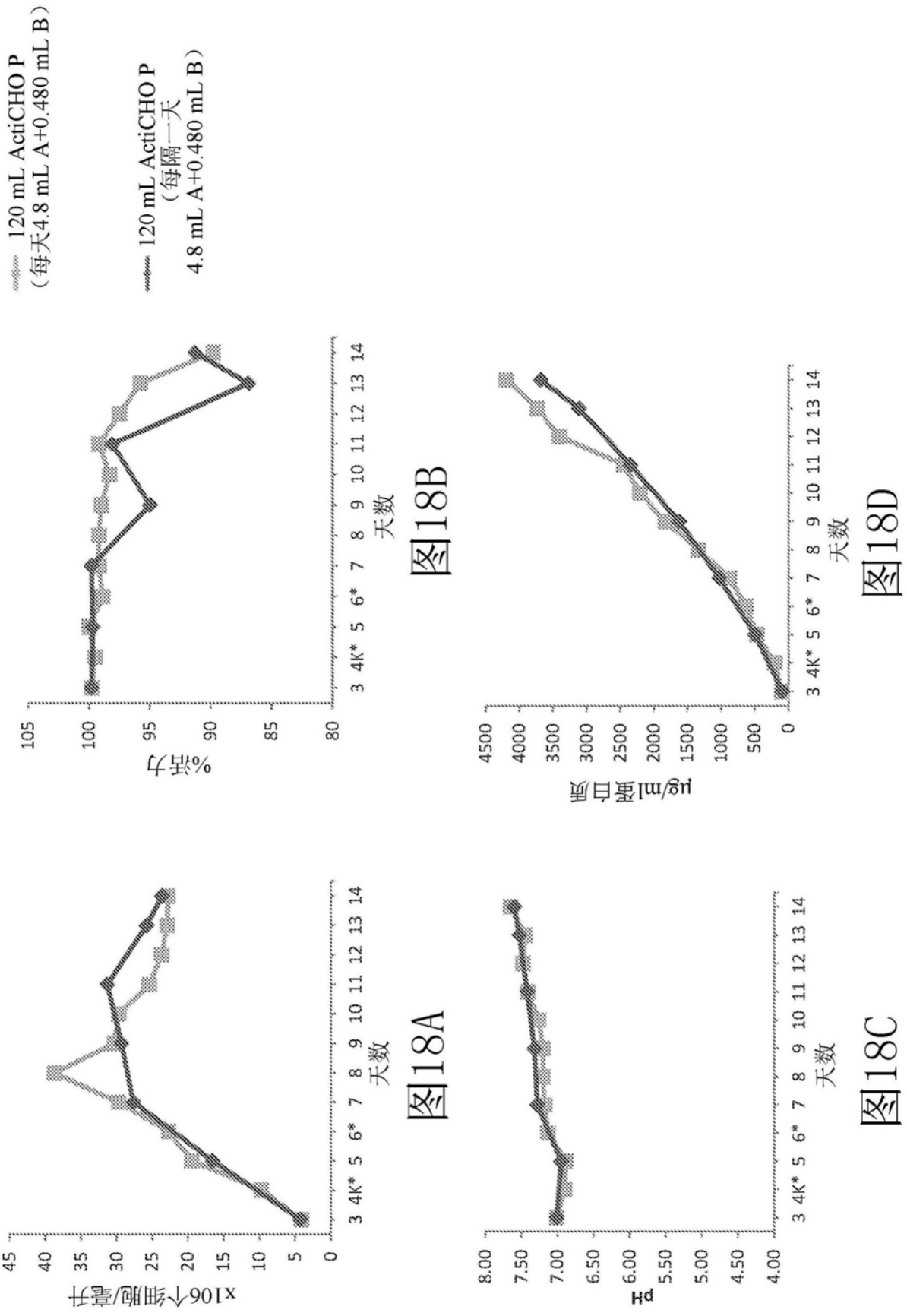


图18A 图18B 图18C 图18D

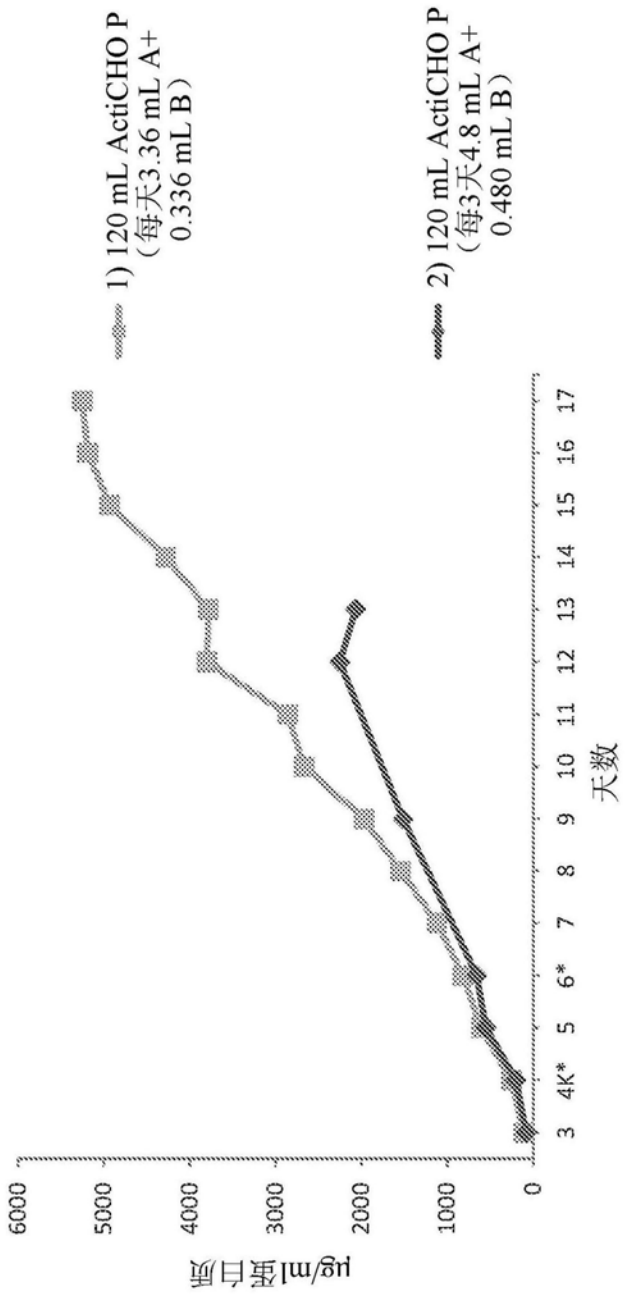

1) 120 mL ActiCHO P
（每天3.36 mL A+
0.336 mL B）
2) 120 mL ActiCHO P
（每3天4.8 mL A+
0.480 mL B）
μg/ml蛋白质
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
3
4K*
5
6*
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
天数

图19

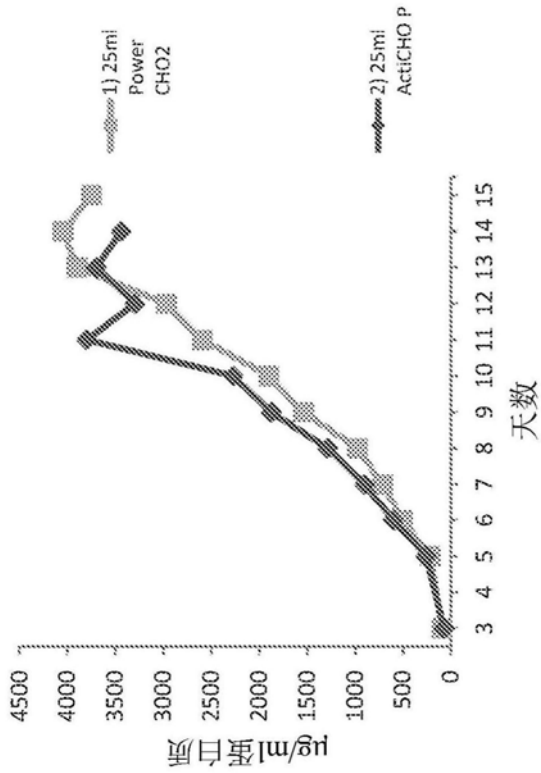

1) 25ml Power CHO2
2) 25ml ActiCHO P
μg/ml蛋白质
天数
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

图20B

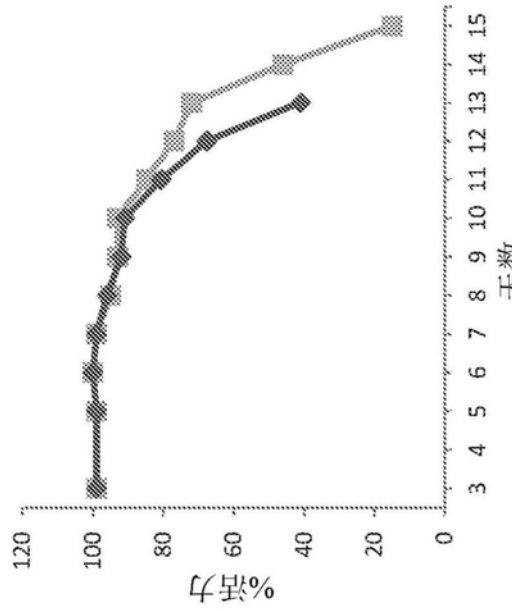

%活力
天数
0
20
40
60
80
100
120
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

图20A

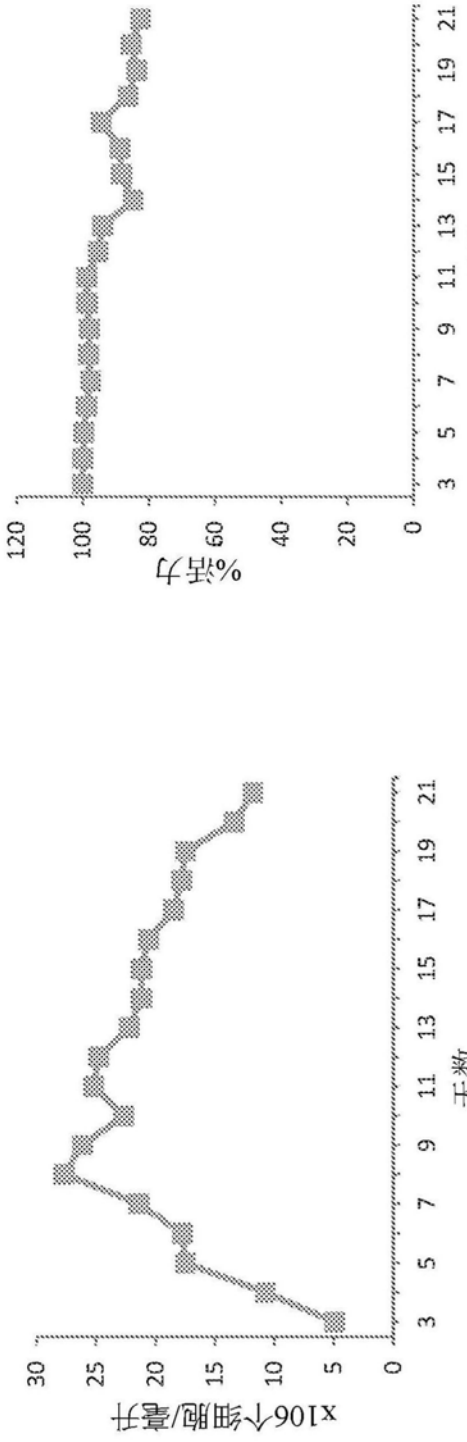


图21A

图21B

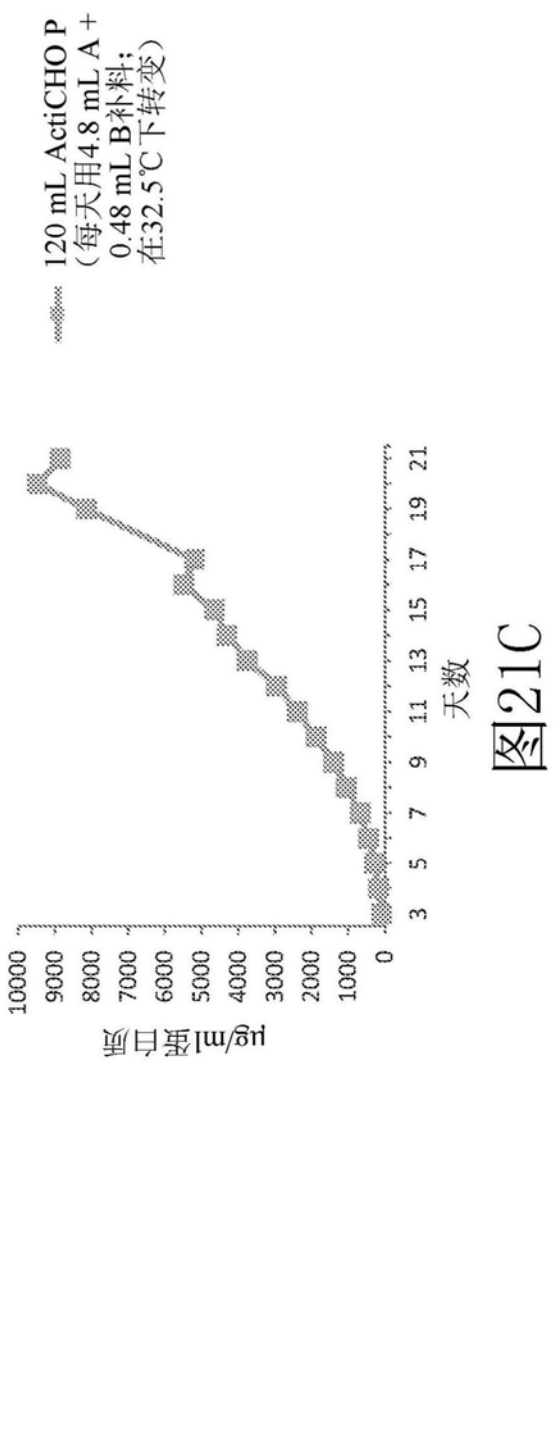


图21C

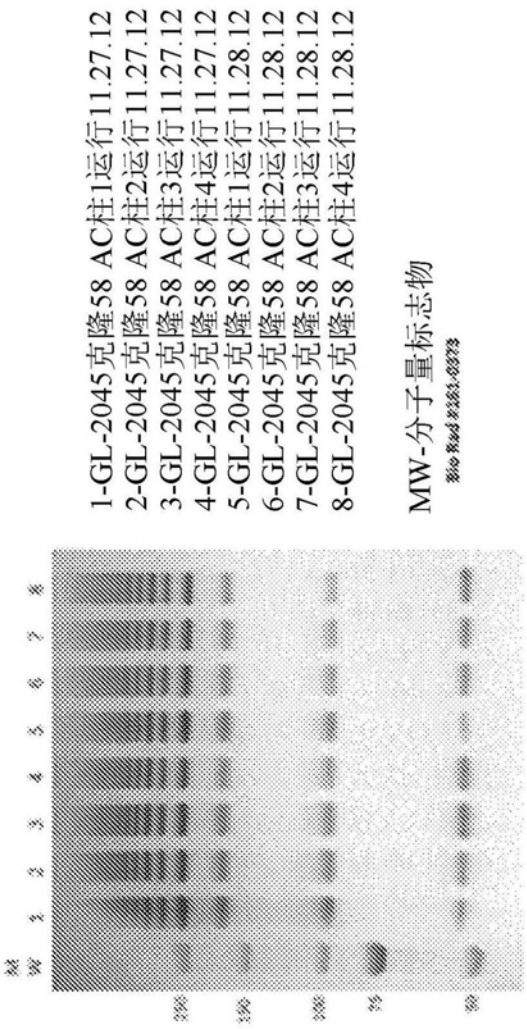

1-GL-2045克隆58 AC柱1运行11.27.12
2-GL-2045克隆58 AC柱2运行11.27.12
3-GL-2045克隆58 AC柱3运行11.27.12
4-GL-2045克隆58 AC柱4运行11.27.12
5-GL-2045克隆58 AC柱1运行11.28.12
6-GL-2045克隆58 AC柱2运行11.28.12
7-GL-2045克隆58 AC柱3运行11.28.12
8-GL-2045克隆58 AC柱4运行11.28.12
MW-分子量标志物

图22

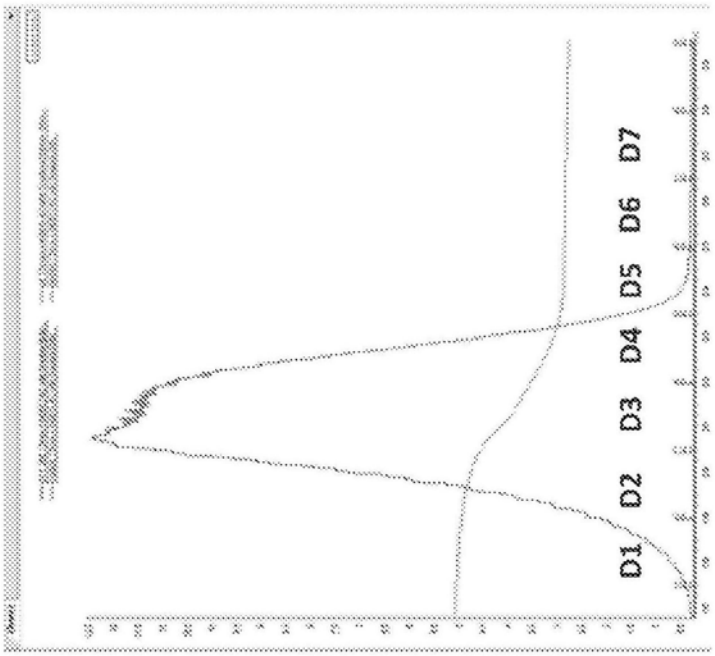

D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7

图23A

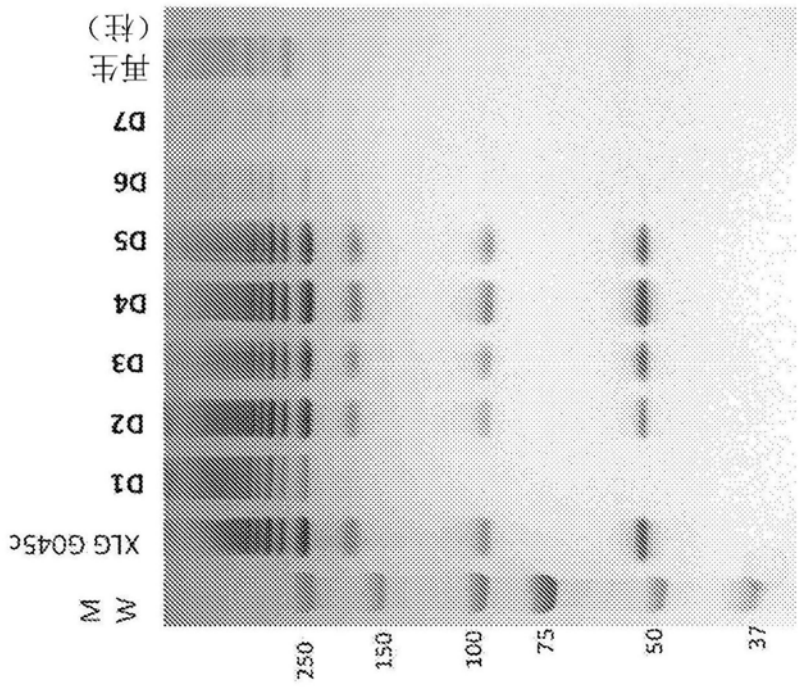

M
W
XLG G045c
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
再生
(柱)
250
150
100
75
50
37

图23B

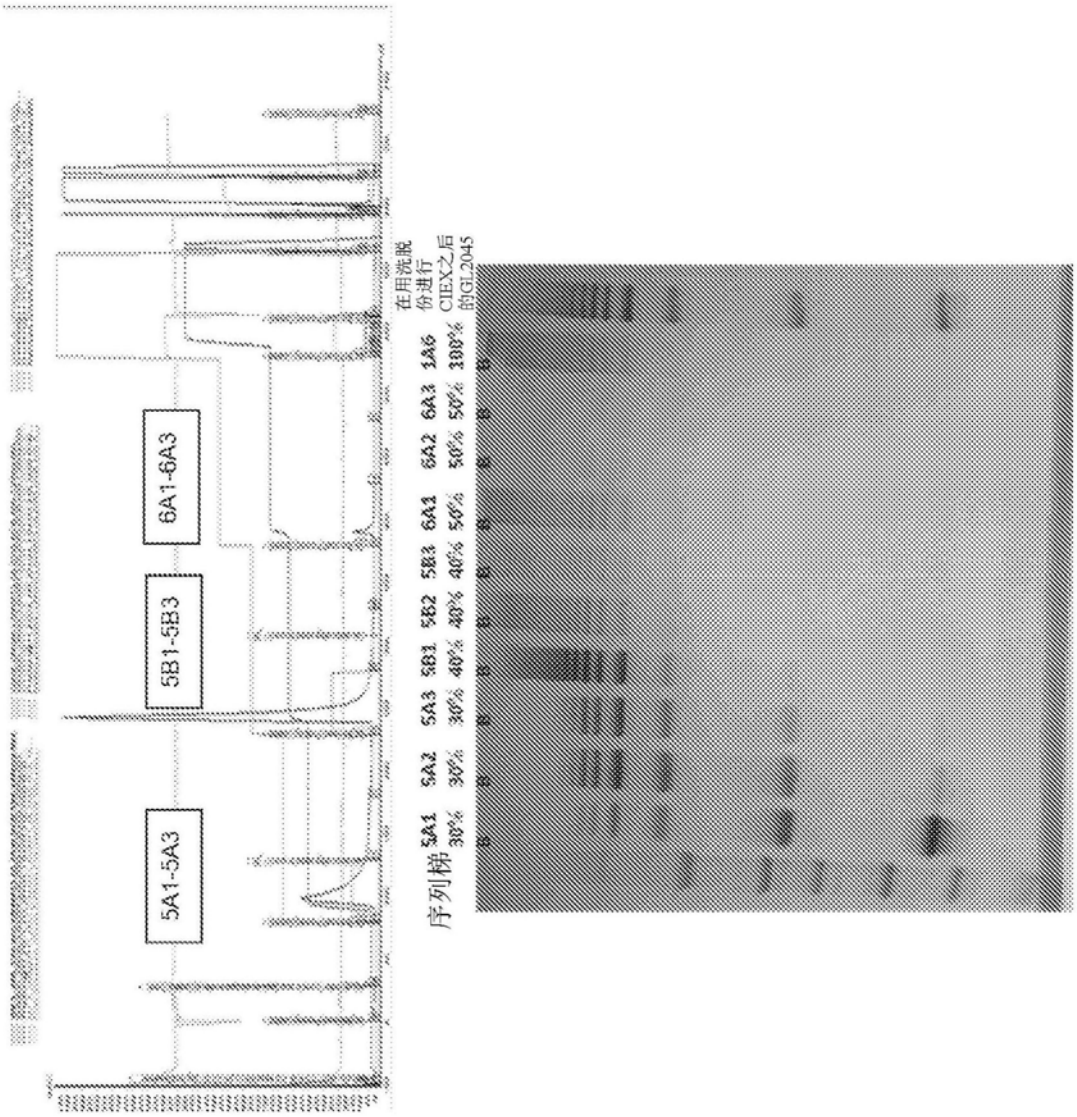

5A1-5A3
5B1-5B3
6A1-6A3
序列梯
5A1 5A2 5A3 5B1 5B2 5B3 6A1 6A2 6A3 1A6
30% 30% 30% 40% 40% 40% 50% 50% 50% 100%
在用洗脱份进行CIEX之后的GI.2045

图24

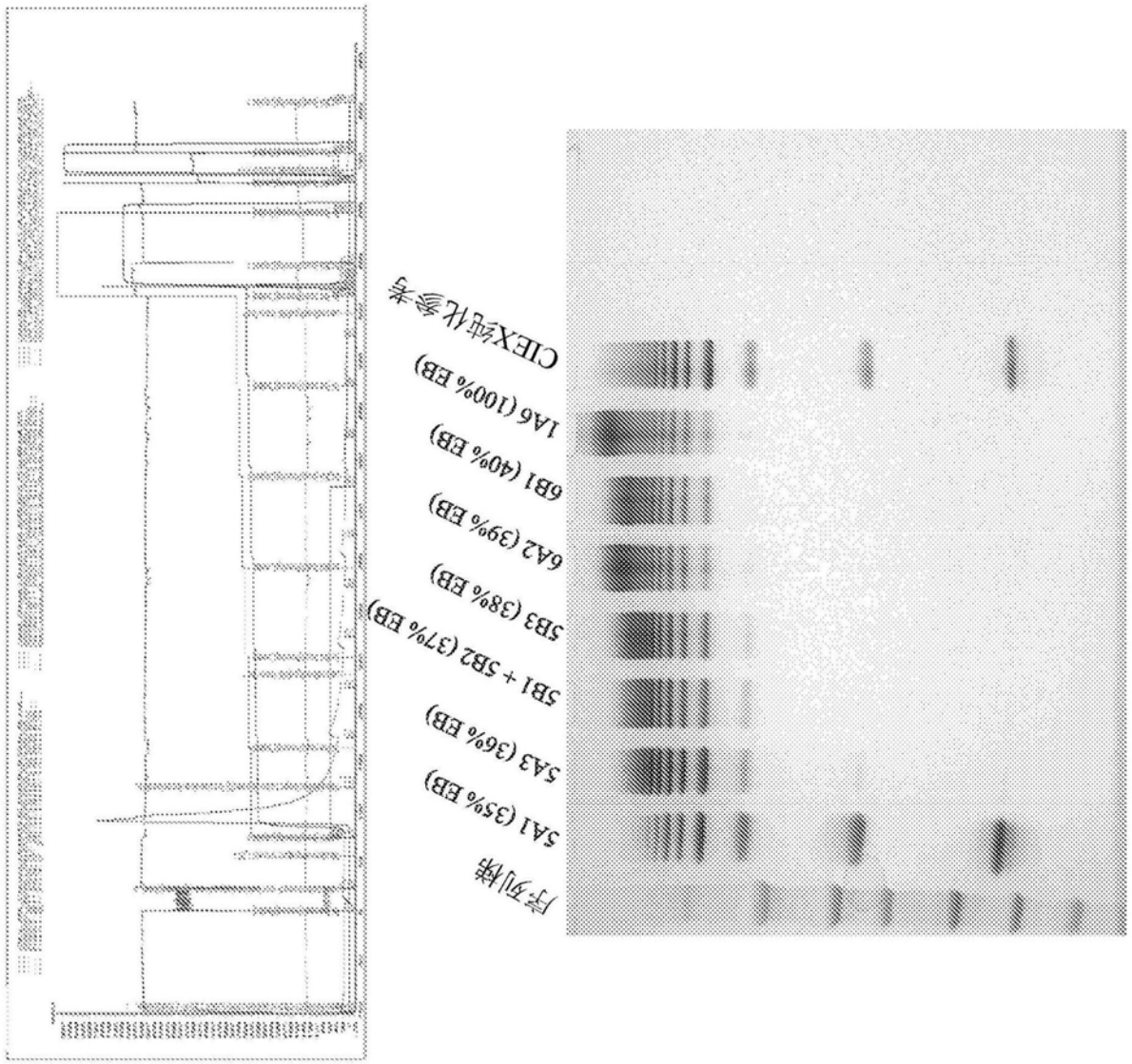

CIEX纯化参考
1A6 (100% EB)
6B1 (40% EB)
6A2 (39% EB)
5B3 (38% EB)
5B1 + 5B2 (37% EB)
5A3 (36% EB)
5A1 (35% EB)
序列梯

图25

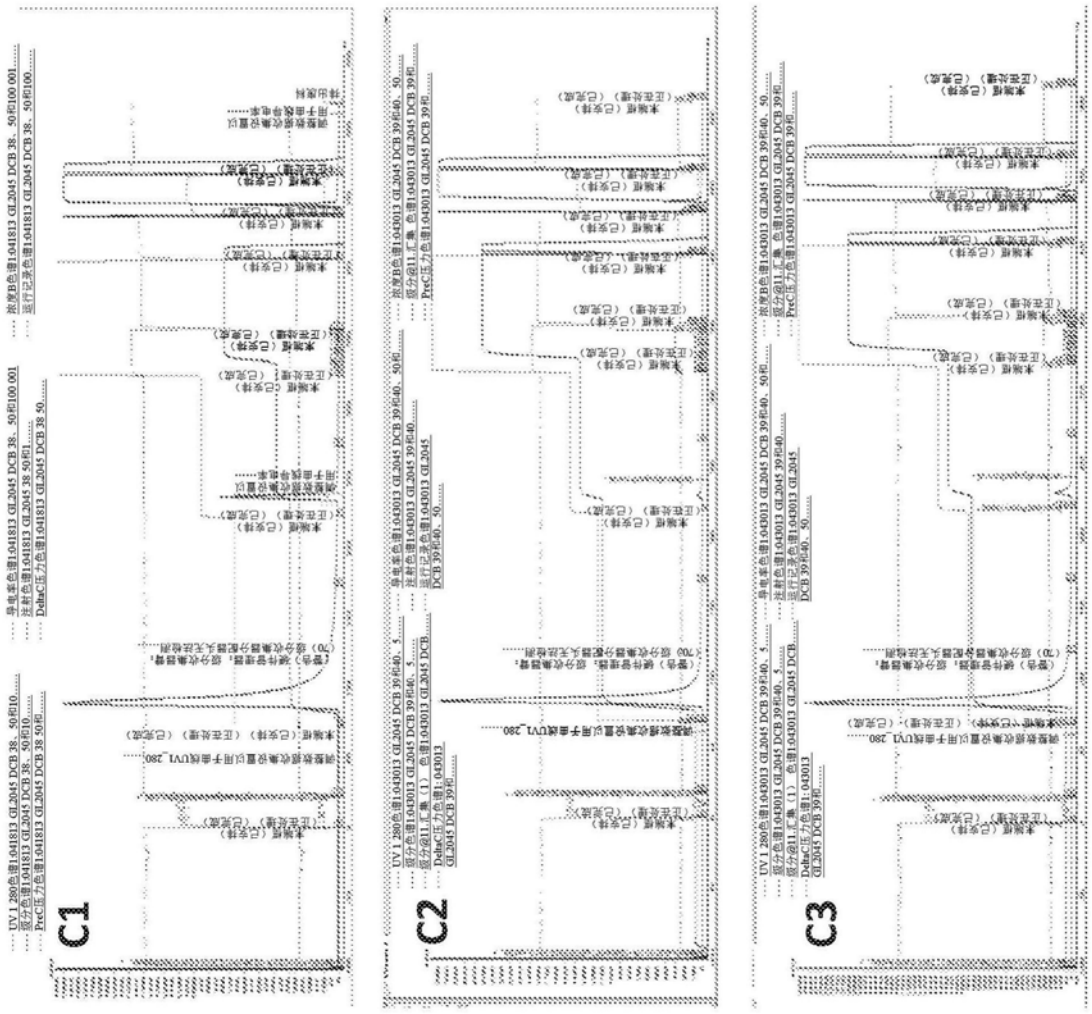

C1
C2
C3

图26

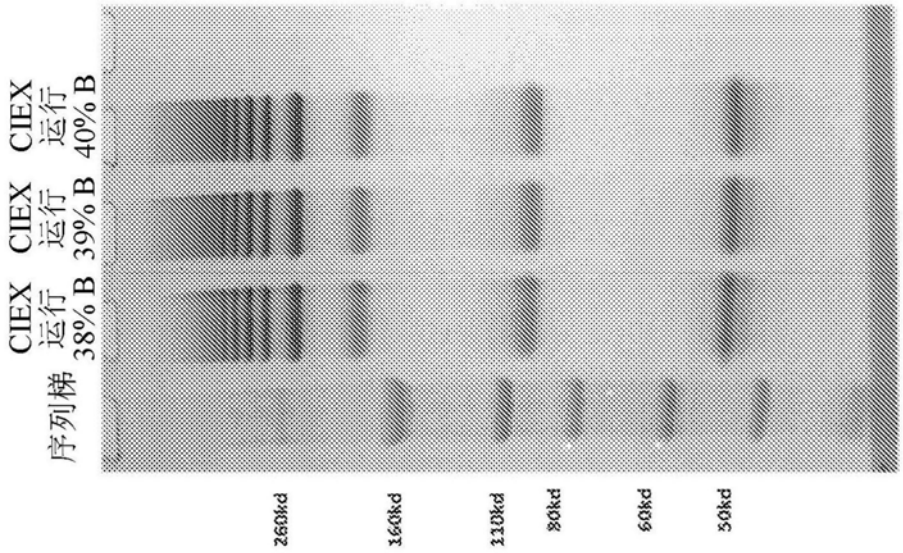

序列梯
CIEX 运行 38% B
CIEX 运行 39% B
CIEX 运行 40% B
260kd
160kd
110kd
80kd
60kd
50kd

图27

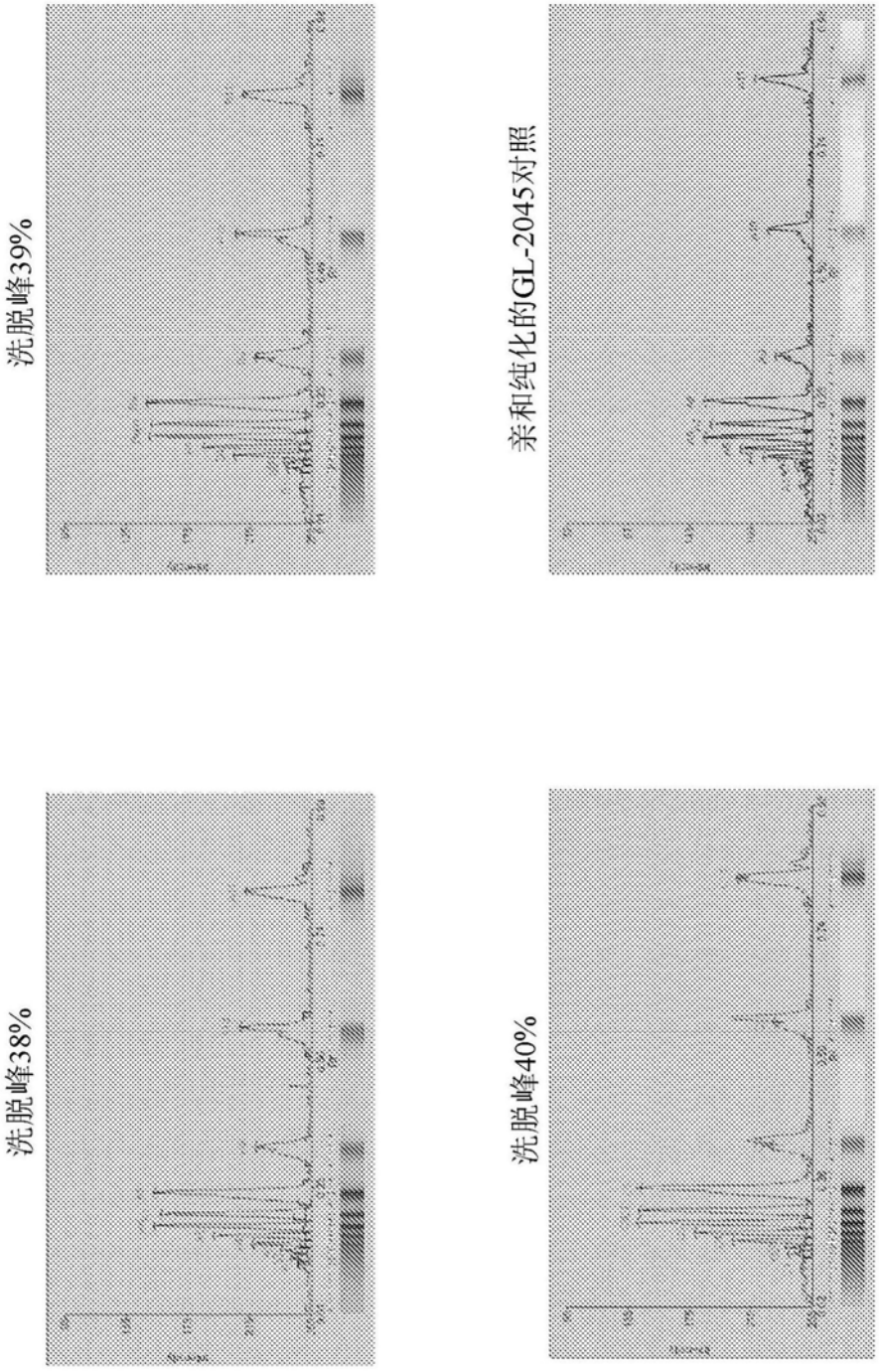


图28

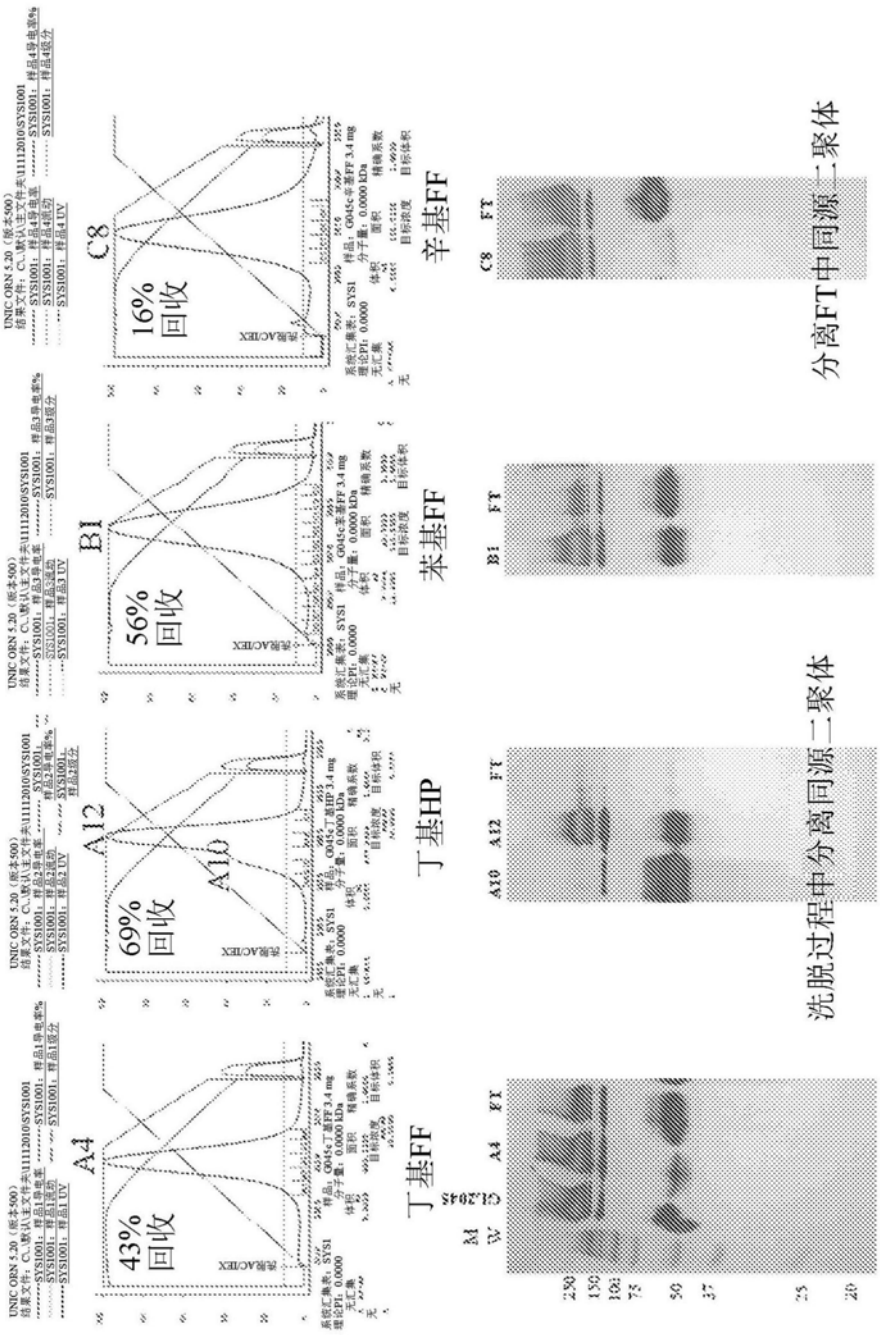

A4
43%
回收
A12
A10
69%
回收
丁基HP
丁基FF
B1
56%
回收
苯基FF
C8
16%
回收
辛基FF
A10 A12 FT
洗脱过程中分离同源二聚体
B1 FT
C8 FT
分离FT中同源二聚体

图29A

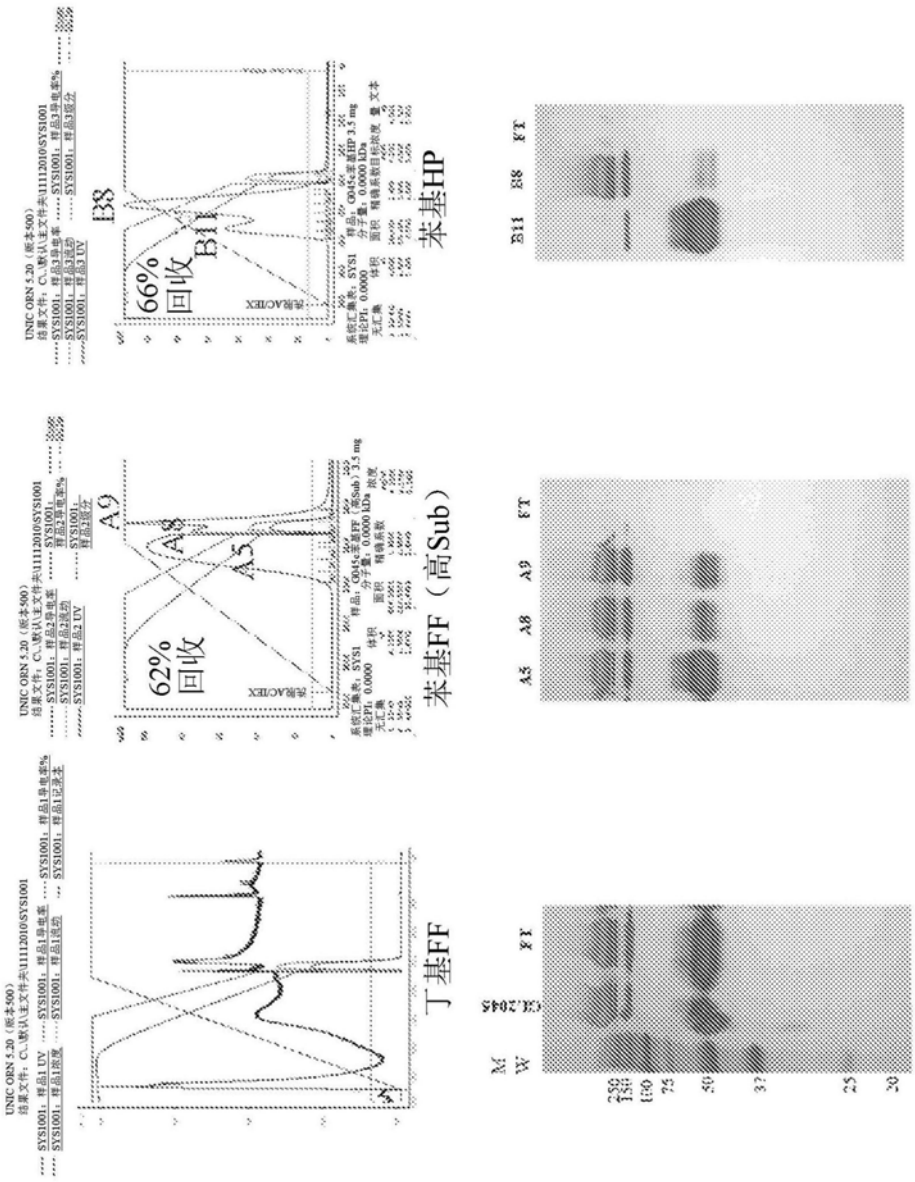


图29B

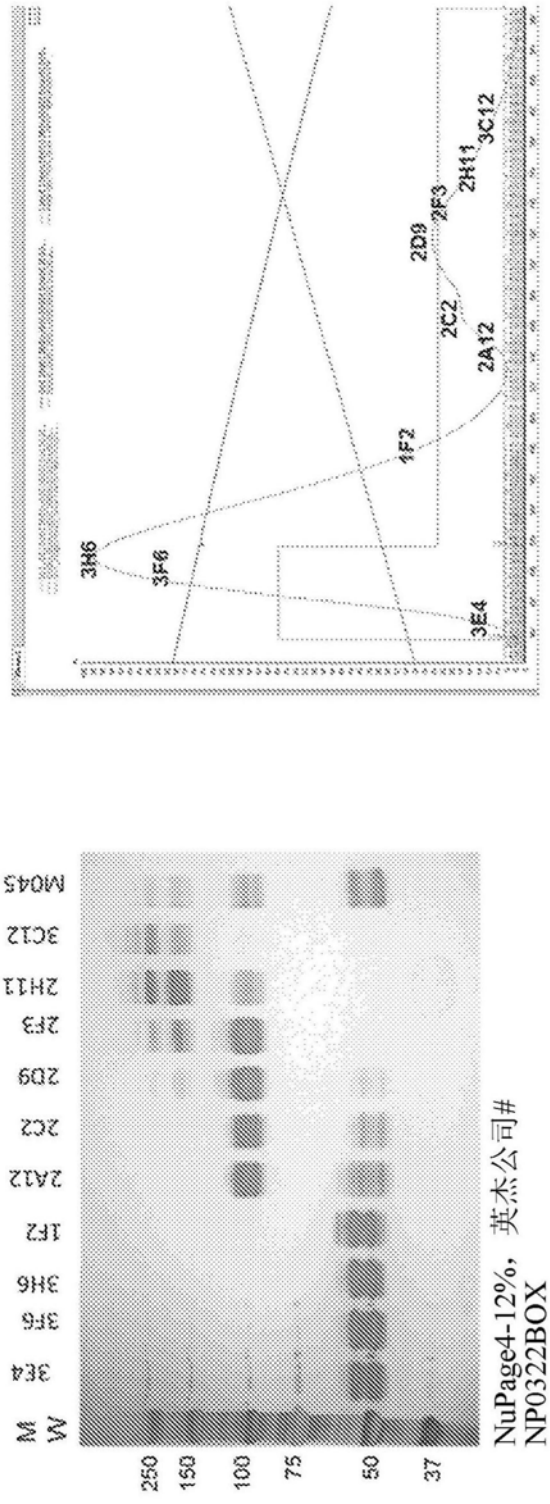

M
W
3E4
3F6
3H6
1F2
2A12
2C2
2D9
2F3
2H11
3C12
M045
250
150
100
75
50
37
NuPage4-12%，英杰公司#
NP0322BOX
3H6
3F6
3E4
1F2
2A12
2C2
2D9
2F3
2H11
3C12
柱：GE，Hiload苯基琼脂糖高性能# 17-1066-01
起始缓冲液：0.1M磷酸纳+ 1M硫酸铵pH 7.0
洗脱缓冲液：0.1M磷酸纳pH 7.0
加载：17 mg（+2V起始缓冲液）
流速：3 ml/min
级分大小：2 ml
数量测量：在280nm下通过UV
（直接用AKTA Avant）

图30

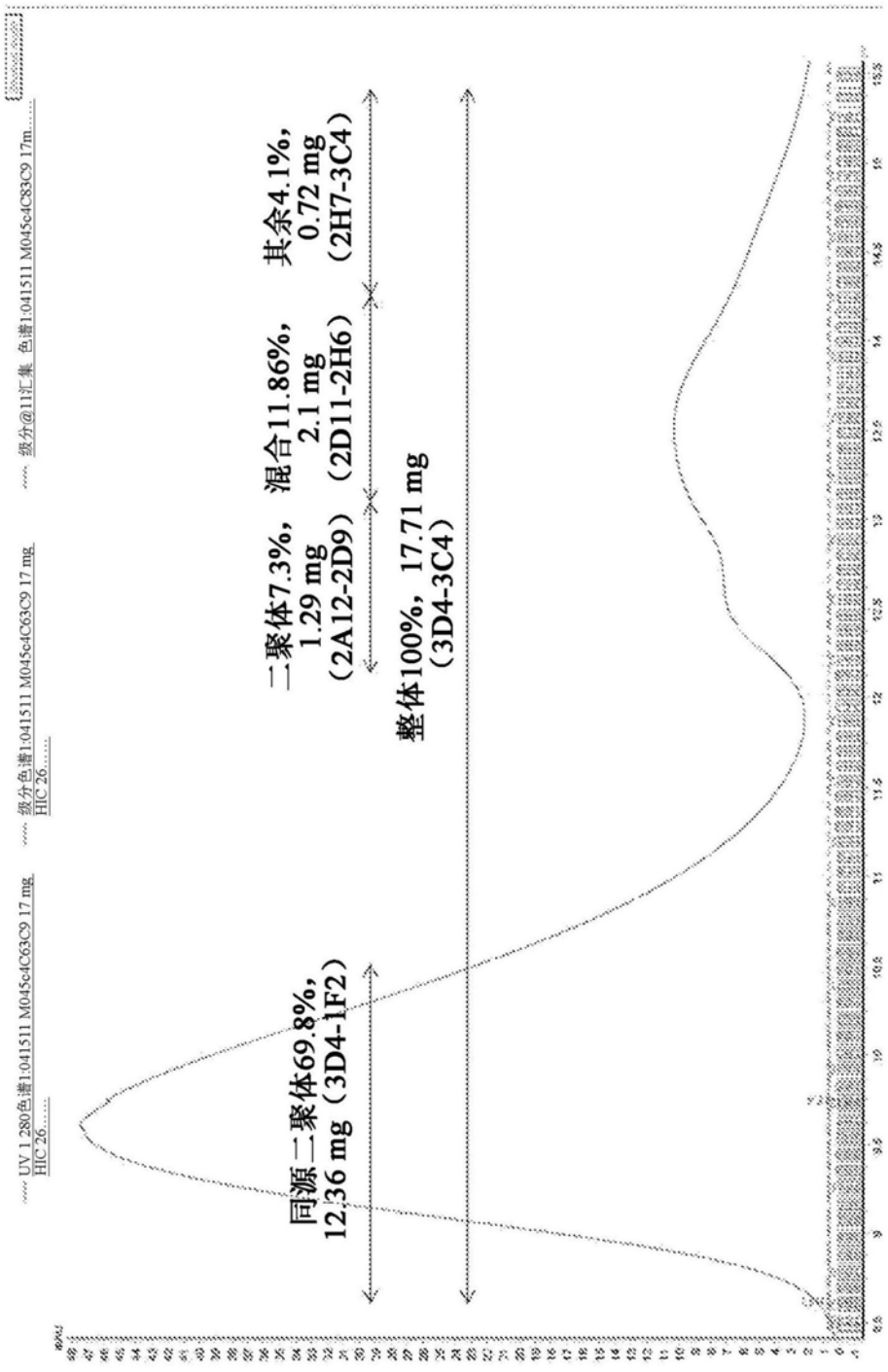

UV 1 280色谱1:041511 M045c4C63C9 17 mg HIC 26.....
级分色谱1:041511 M045c4C63C9 17 mg HIC 26.....
级分@11汇集 色谱1:041511 M045c4C83C9 17m.....
同源二聚体69.8%，
12.36 mg（3D4-1F2）
二聚体7.3%，
1.29 mg
（2A12-2D9）
混合11.86%，
2.1 mg
（2D11-2H6）
其余4.1%，
0.72 mg
（2H7-3C4）
整体100%，17.71 mg
（3D4-3C4）

图31

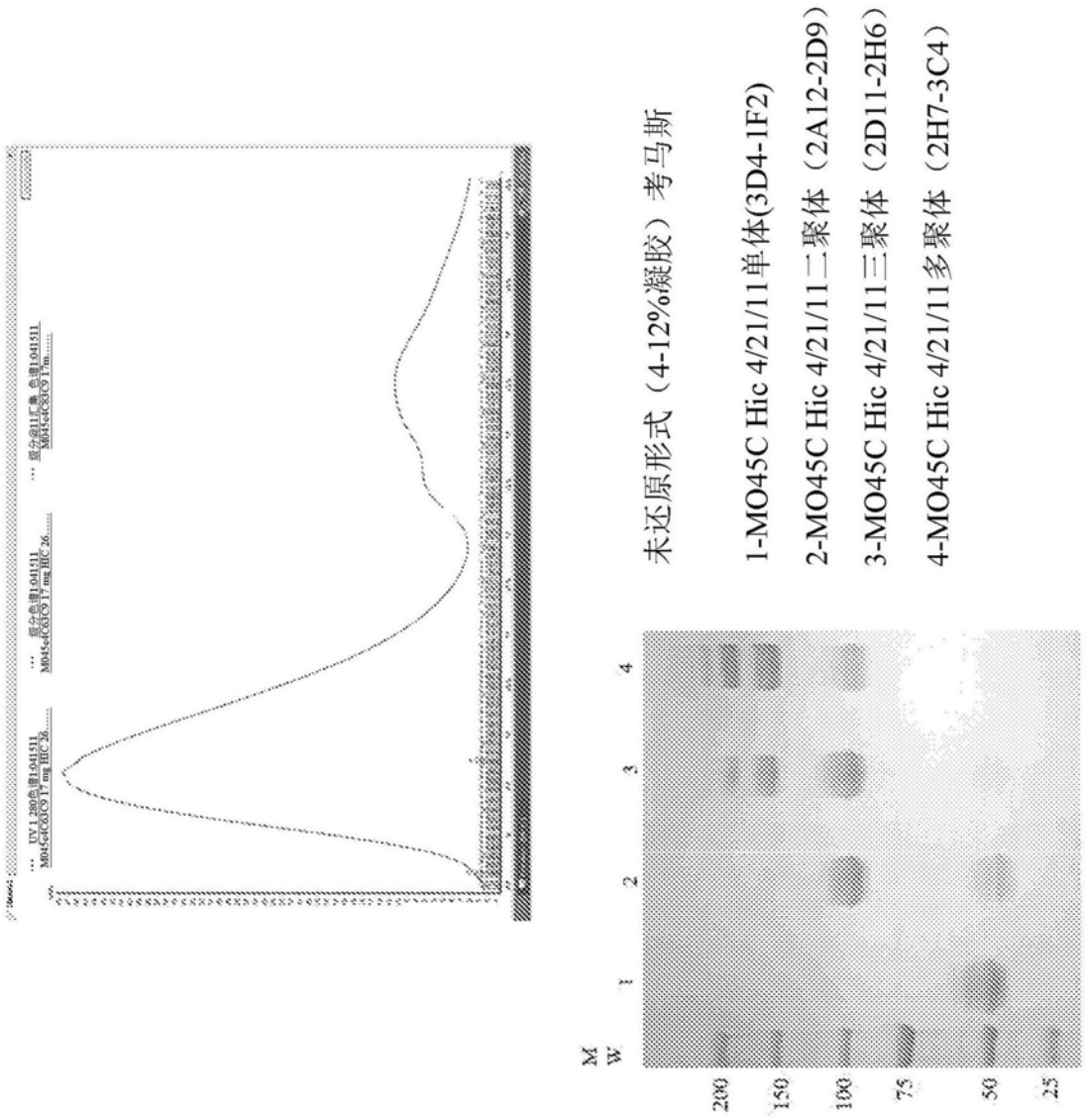

未还原形式（4-12%凝胶）考马斯
1-MO45C Hic 4/21/11单体(3D4-1F2)
2-MO45C Hic 4/21/11二聚体（2A12-2D9）
3-MO45C Hic 4/21/11三聚体（2D11-2H6）
4-MO45C Hic 4/21/11多聚体（2H7-3C4）
M
W
1
2
3
4
200
150
100
75
50
25

图32

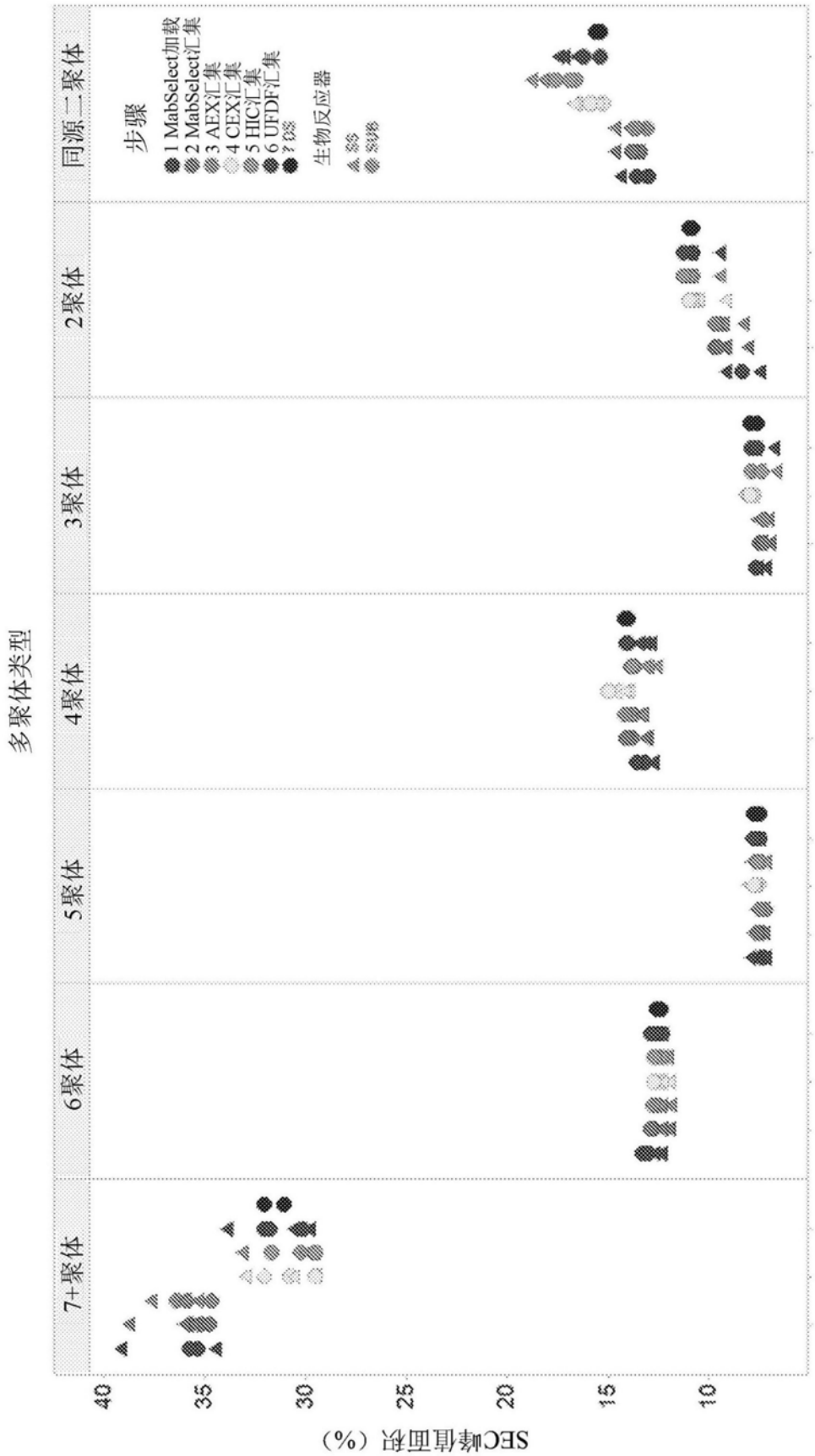

多聚体类型
7+聚体
6聚体
5聚体
4聚体
3聚体
2聚体
同源二聚体
步骤
1 MabSelect加载
2 MabSelect汇集
3 AEX汇集
4 CEX汇集
5 HIC汇集
6 UFDF汇集
生物反应器
SEC峰值面积（%）
40
35
30
25
20
15
10

图33