



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104023804 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201280065729. 6

(22) 申请日 2012. 11. 02

(30) 优先权数据

61/554, 898 2011. 11. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/063242 2012. 11. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/067301 EN 2013. 05. 10

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D·纳达拉贾 A·梅塔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

B01D 15/08 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书52页 附图13页

(54) 发明名称

超载和洗脱层析

(57) 摘要

本发明提供了通过超载层析材料和洗脱产物, 从包含多肽和至少一种污染物的组合物中纯化多肽的方法。

1. 用于从包含多肽和一种或多种污染物的组合物中纯化多肽的方法,所述方法包括
 - a) 以超过层析材料对于多肽的动态结合容量的量将组合物装载到层析材料上,
 - b) 在一种或多种污染物仍然与层析材料结合的条件下,从层析材料上洗脱多肽,和
 - c) 混合包含步骤 a) 和 b) 的层析流出液中的多肽的级分。
2. 权利要求 1 的方法,其中多肽是抗体或免疫粘附素。
3. 权利要求 2 的方法,其中多肽是免疫粘附素。
4. 权利要求 2 的方法,其中多肽是抗体。
5. 权利要求 4 的方法,其中抗体是单克隆抗体。
6. 权利要求 5 的方法,其中单克隆抗体是嵌合抗体、人源化抗体,或人抗体。
7. 权利要求 5 的方法,其中单克隆抗体是 IgG 单克隆抗体。
8. 权利要求 4 的方法,其中抗体是抗原结合片段。
9. 权利要求 8 的方法,其中抗原结合片段是 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、di-scFv、bi-scFv、串联 (di, tri)-scFv、Fv、sdAb、三功能抗体、BiTE、双抗体或三价抗体。
10. 权利要求 1 的方法,其中多肽是酶、激素、融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子或白介素。
11. 权利要求 1-10 中任一项的方法,其中至少一种污染物是中华仓鼠卵巢蛋白 (CHOP)、宿主细胞蛋白 (HCP)、泄露的蛋白 A、羧肽酶 B、核酸、DNA、产物变体、聚集的蛋白质、细胞培养基组分、庆大霉素、多肽片段、内毒素和病毒性污染物中的任何一种或多种。
12. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中层析材料是混合模式材料、阴离子交换材料、疏水性相互作用材料,或亲和材料。
13. 权利要求 1-12 中任一项的方法,其中装载密度在约 50g/L 至约 2000g/L 之间。
14. 权利要求 13 的方法,其中装载密度在约 200g/L 至约 1000g/L 之间。
15. 权利要求 1-14 中任一项的方法,其中以约层析材料对于一种或多种污染物的动态结合容量将组合物装载到层析材料上。
16. 权利要求 1-15 中任一项的方法,其中以层析材料对于多肽的动态结合容量的 20 倍将组合物装载到层析材料上。
17. 权利要求 1-16 中任一项的方法,其中层析材料对多肽的分配系数大于 30。
18. 权利要求 17 的方法,其中层析材料对多肽的分配系数大于 100。
19. 权利要求 1-18 中任一项的方法,其中方法还包括使用装载缓冲液和洗脱缓冲液。
20. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的电导率的电导率。
21. 权利要求 20 的方法,其中装载缓冲液具有约 4.0mS 至约 7.0mS 的电导率。
22. 权利要求 20 的方法,其中洗脱缓冲液具有约 0.0mS 至约 7.0mS 的电导率。
23. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的电导率的电导率。
24. 权利要求 23 的方法,其中装载缓冲液具有约 4.0mS 至约 10.0mS 的电导率。
25. 权利要求 23 的方法,其中装载缓冲液具有约 4.0mS 至约 7.0mS 的电导率。
26. 权利要求 23 的方法,其中洗脱缓冲液具有约 5.5mS 至约 17.0mS 的电导率。
27. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液的电导率在约 10 倍柱体积 (CV) 中以从约 5.5mS 至约 1.0mS 的梯度减少。
28. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液的电导率在约 15CV 中以从约 5.5mS 至约

1. 0mS 的梯度减少。

29. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液的电导率在约 5CV 中以从约 10. 0mS 至约 1. 0mS 的梯度减少。

30. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液的电导率在约 10 倍 CV 中以从约 10. 9mS 至约 1. 0mS 的梯度减少。

31. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的 pH 的 pH。

32. 权利要求 31 的方法,其中装载缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

33. 权利要求 31 的方法,其中洗脱缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

34. 权利要求 19 的方法,其中洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的 pH 的 pH。

35. 权利要求 34 的方法,其中装载缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

36. 权利要求 34 的方法,其中洗脱缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

37. 权利要求 1-36 中任一项的方法,其中组合物是来自亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析或疏水性相互作用层析的洗出液。

38. 权利要求 37 的方法,其中亲和层析是蛋白 A 层析。

39. 权利要求 1-38 中任一项的方法,其中进一步纯化多肽。

40. 权利要求 39 的方法,其中通过病毒过滤进一步纯化多肽。

41. 权利要求 39 的方法,其中通过亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析和疏水性相互作用层析中的一种或多种进一步纯化多肽。

42. 权利要求 1-41 中任一项的方法,其中进一步浓缩多肽。

43. 权利要求 42 的方法,其中通过超滤、渗滤或超滤和渗滤的组合浓缩多肽。

44. 权利要求 39-43 中任一项的方法,还包括组合多肽与可药用的运载体。

超载和洗脱层析

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2011 年 11 月 2 日提交的临时专利申请 U. S. 系列号 61/554, 898 的优先权益, 其通过引用全文整合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明提供了从包含产物和至少一种污染物的组合物中纯化产物的方法, 和包含通过所述方法纯化的产物的制剂。

[0004] 发明背景

[0005] 阴离子交换 (AEX) 层析被普遍用于流通模式中作为单克隆抗体 (MAb) 的平台精制步骤。在标准的流通条件下结合 AEX 树脂的某些 MAb 可以解决设备的适应性难题。对于质量要求通常较低的早期临床研发阶段, 通过使用结合和洗脱模式的 AEX 或混合模式的树脂纯化这些非平台性的 MAb。然而, 由于这些树脂的低动态结合容量 (DBC), 晚期执行时将需要大小约 1000L 的柱子, 或者在较小柱子上进行多次循环, 因而限制了设备的通量。

[0006] 通常使用结合和洗脱层析 (B/E) 或流通 (F/T) 层析实施 MAb 纯化。目前, 已经将弱分配层析 (Kelley, BD 等, 2008Biotechnol Bioeng101(3):553-566; 美国专利申请公开号 2007/0060741) 和过载层析 (PCT/US2011/037977) 分别导入到 AEX 树脂和阳离子交换 (CEX) 树脂上, 以增强 MAb 纯化。下文强调了这些层析模式每者的一般机制和限制。

[0007] 结合和洗脱层析: 在 B/E 层析中, 通常装载产物使层析材料的 DBC 最大化, 然后鉴别洗涤和洗脱条件, 使得洗脱液中获得最大产物纯度。B/E 层析的限制是装载密度与实际树脂 DBC 的限制。

[0008] 流通层析: 使用 F/T 层析, 鉴别了这样的装载条件, 在所述条件下杂质与层析材料强结合, 同时产物流通。F/T 层析允许对标准 MAb 进行高装载密度, 但对非平台性 MAb 却不能执行, 或者能够对那些非平台性 MAb 进行 F/T 操作的溶液条件不能在现有的生产设备中执行。

[0009] 弱分配层析: 该操作模式通过鉴别溶液条件, 增强了 F/T 模式, 在所述溶液条件下具有 MAb 与树脂的弱结合 (2 至 20g/L)。在这些条件下, 杂质比在 F/T 模式下的结合更强, 因而获得了增强的纯化。然而, 装载条件靶向具有范围在 0.1-20 内的低产物分配系数 (K_p)。

[0010] 过载层析: 在该层析模式下, 超过层析材料对产物的动态结合容量装载目标产物, 因而被称为过载。所述操作模式已被证实用阳离子交换 (CEX) 基质, 特别是用膜提供了 MAb 纯化。然而, 该方法的限制是树脂的低产量, 因为没有洗脱阶段。

[0011] 将多肽大规模的、有成本效益地纯化至足以用作人治疗剂的纯度仍然是艰巨的难题。

[0012] 本文引用的所有参考文献, 包括专利申请和公开都通过引用全文整合到本文中。

[0013] 概述

[0014] 本发明提供了用于从包含多肽和一种或多种污染物的组合物中纯化多肽的方法, 所述方法包括 a) 以超过层析材料对于多肽的动态结合容量的量将组合物装载到层析材料

上, b) 在其中一种或多种污染物仍然与层析材料结合的条件下, 从层析材料上洗脱多肽, 和 c) 混合包含步骤 a) 和 b) 的层析流出液中的多肽的级分。

[0015] 在一些实施方案中, 多肽是抗体或免疫粘附素。在一些实施方案中, 抗体是单克隆抗体; 例如但不限于嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0016] 在一些实施方案中, 抗体是抗原结合片段; 例如但不限于 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、di-scFv、bi-scFv、串联 (di, tri)-scFv、Fv、sdAb、三功能抗体、BiTE、双抗体和三价抗体。

[0017] 在一些实施方案中, 多肽是酶、激素、融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子或白介素。

[0018] 在一些实施方案中, 多肽是从包含一种或多种污染物的组合物中纯化的; 例如, 中华仓鼠卵巢蛋白 (CHOP)、宿主细胞蛋白 (HCP)、泄露的蛋白 A、羧肽酶 B、核酸、DNA、产物变体、聚集的蛋白质、细胞培养基组分、庆大霉素、多肽片段、内毒素和病毒性污染物。

[0019] 在本发明的一些实施方案中, 层析材料选自混合模式材料、阴离子交换材料、疏水性相互作用材料, 和亲和材料。

[0020] 在一些实施方案中, 以约层析材料对于一种或多种污染物的动态结合容量将组合物装载到层析材料上。

[0021] 在一些实施方案中, 多肽的层析材料的分配系数大于 30 或大于 100。

[0022] 在一些实施方案中, 方法提供了这样的 OEC, 其中洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的电导率的电导率。在其他实施方案中, 洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的电导率的电导率。在一些实施方案中, 方法提供了这样的 OEC, 其中洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的 pH 的 pH。在其他实施方案中, 洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的 pH 的 pH。

[0023] 在一些实施方案中, 方法的多肽在来自亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析和疏水性相互作用层析的洗出液中。在一些实施方案中, 多肽在来自蛋白 A 层析的洗出液中。

[0024] 在一些实施方案中, 还通过例如病毒过滤、亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析和 / 或疏水性相互作用层析进一步纯化方法的多肽。在一些实施方案中, 多肽是通过例如超滤、渗滤或超滤和渗滤的组合而进一步浓缩的。在一些实施方案中, 方法的多肽还与可药用的运载体组合。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 显示了在 MAb3 的分批结合条件下, 在 Capto Adhere 树脂上的高通量筛选 (HTS) 结果。图 1A 显示了 MAb3 的 K_p 常数值值的等值线。图 1B 显示了在用树脂尝试 80g/L 产物的上清液时, MAb3 的实际结合容量。图 1C 显示了在用树脂尝试 80g/L 产物的上清液时, 杂质 (宿主细胞蛋白) 的实际结合容量。所有的等值线图都是使用源自原始数据的应答表面模型生成的。

[0027] 图 2 显示了优化的 OEC 操作模式的层析图。用于该次运行的 MAb3 的装载密度为 180g/L。

[0028] 图 3 显示了使用 MAb3 的 OEC 模式的装载优化。

[0029] 图 4 显示了具有 OEC 操作模式的靶装载条件的层析图。相似的装载和洗脱条件导致拖尾, 因而导致混合物体积增加了 45%。用于该次运行的 MAb3 的装载密度为 180g/L。

- [0030] 图 5 显示了使用 MAb3 的 OEC 模式的洗脱优化。
- [0031] 图 6 显示了级分中的杂质分析和杂质的累积分析。
- [0032] 图 7 显示了在 1000g/L 装载密度的 OEC 模式下, Capto Adhere 树脂的 MAb3CHOP 贯穿 (breakthrough) 分析。
- [0033] 图 8 显示了在从 70g/L 至 180g/L 的装载密度范围内试验性规模运行的产率分析。
- [0034] 图 9 显示了对弱分配层析操作模式和过载和洗脱层析操作模式的比较。产物是 MAb3, 层析材料是 Capto Adhere 树脂。
- [0035] 图 10 显示了在 150g/L 装载密度的 OEC 操作模式下, QMA 树脂的 MAb3CHOP 分析。
- [0036] 图 11 显示了在 150g/L 装载密度的 OEC 操作模式下, Capto Adhere 树脂的 MAb4CHOP 分析。
- [0037] 图 12 显示了在 150g/L 装载密度的 OEC 操作模式下, Capto MMC 树脂的 MAb4CHOP 分析。
- [0038] 图 13 显示了在 200g/L 装载密度的 OEC 模式下, Capto Adhere 树脂的 MAb3CHOP 贯穿分析。将 MAb3 蛋白 A 混合物装载到 Capto Adhere 树脂上, 至 200g/L (超过产物结合容量 50g/L)。CHOP 贯穿分析显示多至 200g/L MAb 处理 CHOP 未贯穿。

[0039] 发明详述

[0040] I. 定义

- [0041] 如本文描述的术语“产物”是待通过 OEC 纯化的物质;例如, 多肽。
- [0042] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中可互换的使用, 指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是线性的或分支的, 可以包含经修饰的氨基酸, 并可以被非氨基酸中断。术语还涵盖了被天然地或通过介入修饰的氨基酸聚合物;例如, 形成二硫键、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他的操作或修饰, 如与标记组分缀合。定义还包括了例如含有一个或多个氨基酸类似物 (包括例如, 非天然氨基酸等), 以及本领域已知的其他修饰的多肽。如本文中使用的术语“多肽”和“蛋白质”具体涵盖了抗体。
- [0043] “纯化的”多肽 (例如, 抗体或免疫粘附素) 意指多肽的纯度增加, 使所述多肽以比其在天然环境中, 和 / 或比初始合成时, 和 / 或比在实验室条件下扩增时所存在的形式更纯的形式存在。纯度是一个相对的术语, 不必然表示绝对纯度。
- [0044] 本文中使用的术语“经表位标记的”指包含与“标签多肽”融合的多肽的嵌合多肽。标签多肽具有足够多的残基以提供可以制备抗体的表位, 但也足够短, 使其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽还优选地相当独特, 使抗体基本上不与其他表位交叉反应。合适的标签多肽一般具有至少 6 个氨基酸残基, 并且通常在约 8 至 50 个氨基酸残基之间 (优选在约 10 至 20 个氨基酸残基之间)。
- [0045] 用于本文目的的“活性的”或“活性”指保留了天然或天然存在的多肽的生物学和 / 或免疫学活性的多肽形式, 其中“生物学”活性指由天然或天然存在的多肽导致的、除了诱导针对天然或天然存在的多肽具有的抗原性表位的抗体的生产以外的能力的生物学功能 (抑制性或刺激性的), 并且“免疫学”活性指诱导针对天然或天然存在的多肽具有的抗原性表位的抗体的生产的能力。
- [0046] 术语“拮抗剂”使用最宽泛的含义, 并且包括部分或完全阻断、抑制或中和天然多肽的生物学活性的任何分子。类似的, 术语“激动剂”使用最宽泛的含义, 并且包括模拟天

然多肽的生物学活性的任何分子。合适的激动剂或拮抗剂分子具体包括激动剂或拮抗剂抗体或抗体片段、天然多肽的片段或氨基酸序列变体等。用于鉴别多肽的激动剂或拮抗剂的方法可包括将多肽与候选激动剂或拮抗剂分子接触，并测量通常与多肽相关的一种或多种生物学活性的可检测的改变。

[0047] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体的条件下分子裂解靶的能力。补体激活通路是由补体系统的第一组分(C1q)结合与同族抗原复合的分子(例如,多肽(例如抗体))而起始的。为了评估补体激活,可以实施CDC测定法,例如,如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)中所述。

[0048] “结合”目标抗原(例如,肿瘤相关多肽抗原靶)的多肽是以足够的亲和力结合抗原的多肽,使得所述多肽可用作靶向表达所述抗原的细胞或组织中的诊断剂和/或治疗剂,且与其他多肽显著地交叉反应。在这类实施方案中,如通过荧光激活的细胞分选(FACS)分析或放射性免疫沉淀(RIA)所测定的,多肽与“非靶”多肽的结合程度将少于多肽与其特定靶多肽结合的约10%。

[0049] 关于多肽与靶分子的结合,术语“特异的结合”或“特异性地结合于”或特别多肽或特别多肽靶上的表位“特异性的”意指在测量上不同于非特异性的相互作用的结合。可以通过例如确定分子的结合与对照分子的结合的比较,来测量特异的结合,所述对照分子一般是不具有结合活性的结构相似的分子。例如,可以通过与类似于靶的对照分子竞争,例如,过量的未标记的靶,来确定特异的结合。在此情况下,如果标记的靶与探针的结合被过量的未标记的靶竞争性抑制,则表示了特异的结合。

[0050] 本文中的术语“抗体”使用最宽泛的含义,具体覆盖了单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段只要其表现出理想的生物学活性。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与抗体互换的使用。

[0051] 抗体是天然存在的免疫球蛋白分子,具有全部基于免疫球蛋白折叠的可变结构。例如,IgG抗体具有通过二硫键合以形成功能性抗体的2条“重”链和2条“轻”链。每条重链和轻链本身包含“恒定区”(C)和“可变区”(V)。V区确定了抗体的抗原结合特异性,同时C区提供了结构支持和与免疫效应子的非抗原特异性相互作用中的功能。抗体或抗体的抗原结合片段的抗原结合特异性是抗体与特别抗原特异性结合的能力。

[0052] 通过V区的结构特征确定抗体的抗原结合特异性。变异性并非均匀的分布在可变结构域的110个氨基酸跨度中。相反,V区由15-30个氨基酸的被称为框架区(FR)的相对不变的片段组成,所述框架区被每个为9-12个氨基酸长的被称为“超变区”的高度变异性的较短区域分隔开。天然重链和轻链的可变结构域每者包含4个FR,主要采用 β -片层构象,由3个超变区连接,所述超变区形成环状连接,并且在一些情况下形成 β -片层结构的部分。每条链中的超变区通过FR与来自其他链的超变区紧密的靠在一起,对形成抗体的抗原结合位点作贡献(参见Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但却表现出多种效应子功能,如抗体参与的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。

[0053] 每个V区通常包含3个互补决定区(CDR,每个CDR含有“超变环”)和4个框架区。抗体结合位点,以实质的亲和力与特定的理想抗原结合所必需的最小结构单元,将因此通

常包括 3 个 CDR 和至少 3 个、优选 4 个框架区散布其中,以恰当的构象保持和呈递 CDR。经典的四链抗体具有由配合的 V_H 和 V_L 结构域定义的抗原结合位点。某些抗体,如骆驼和鲨鱼抗体,缺少轻链,仅依赖于由重链形成的结合位点。可以制备单结构域改造的免疫球蛋白,其中在缺少 V_H 和 V_L 之间配合的情况下,由重链或轻链单独形成结合位点。

[0054] 术语“可变”指这样的事实,即,可变结构域的某些部分的序列在抗体之间显著不同,并用于每个特定抗体与其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并非均匀的分布在抗体的整个可变结构域。而是集中在轻链和轻链可变结构域中被称为超变区的 3 个区段中。可变结构域的更加高度保守的部分被称为框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域每者包含 4 个 FR,主要采用 β -片层构象,由 3 个超变区连接,所述超变区形成环状连接,并且在一些情况下则形成 β -片层结构的部分。每条链中的超变区通过 FR 与来自其他链的超变区紧密的靠在一起,对形成抗体的抗原结合位点作贡献 (参见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但却表现出多种效应子功能,如抗体参与的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

[0055] 术语“超变区”当用于本文中时,指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。超变区可包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如,大概是 V_L 中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3),和 V_H 中的约 31-35B (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3) (Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和 / 或来自“超变环”的那些残基 (例如, V_L 中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3),和 V_H 中的 26-32 (H1)、52A-55 (H2) 和 96-101 (H3) (Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)))。

[0056] “框架”或“FR”残基是本文定义的超变区残基以外的那些可变结构域残基。

[0057] “抗体片段”包含完整抗体的部分,优选地包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和 Fv 片段;双抗体;串联双抗体 (taDb)、线性抗体 (例如,美国专利号 5,641,870,实施例 2; Zapata 等, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); 单臂抗体、单可变结构域抗体、微抗体 (minibodies)、单链抗体分子;由抗体片段形成的多特异性抗体 (例如,包括但不限于:Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH3、(scFV)₄-Fc、di-scFv、bi-scFv 或串联 (di, tri)-scFv); 和双特异性 T 细胞募召剂 (BiTE)。

[0058] 木瓜蛋白酶消化抗体产生 2 个相同的抗原结合片段,被称为“Fab”片段,每个都具有单个抗原结合位点,和剩余的“Fc”片段,该片段的名称反映了片段易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生了具有 2 个抗原结合位点并仍然能够交联抗原的 $F(ab')_2$ 片段。

[0059] “Fv”是含有完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区由处于紧密、非共价缔合的 1 条重链和 1 条轻链可变结构域的二聚体组成。在该构象中,每个可变结构域的 3 个超变区相互作用,在 V_H - V_L 二聚体的表面定义了抗原结合位点。综上所述,6 个超变区赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单可变结构域 (或仅包含抗原特异性的 3 个超变区的一半 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力,虽然比整个结合位点的亲和力低。

[0060] Fab 片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段不同,区别在于在重链 CH1 结构域的羧基末端添加了若干残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有至少

一个游离巯基的 Fab' 的命名。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为之间具有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段生产的。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0061] 来自任何脊椎动物的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”可以分为两类明显不同的类型之一，称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)，基于其恒定结构域的氨基酸序列。

[0062] 根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列，抗体可以分为不同的类型。有五大类完整的抗体：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中一些还进一步分为亚类（同种型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。对应不同类型的抗体的重链恒定结构域分别被称为 α、δ、ε、γ 和 μ。不同类型的免疫球蛋白的亚基结构和三维构象是普遍已知的。

[0063] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中。在一些实施方案中，Fv 多肽还在 V_H 和 V_L 结构域之间包含多肽接头，所述多肽接头使 scFv 能够形成用于抗原结合的理想的结构。关于 scFv 的综述，参见 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg and Moore 编著, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994) 中的 Plückthun。

[0064] 术语“双抗体”指具有 2 个抗原结合位点的小抗体片段，所述片段包含与在同一多肽链中的轻链可变结构域 (V_L) 相连的重链可变结构域 (V_H) (V_H-V_L)。通过使用太短以至于不允许在同一链的 2 个结构域之间配对的接头，强迫结构域与另一条链的互补结构域配对，并生成 2 个抗原结合位点。双抗体更详细地描述在例如 EP404,097 ;W093/11161 ;和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 中。

[0065] 术语“多特异性抗体”使用最宽泛的含义，具体覆盖了具有多表位特异性的抗体。这类多特异性抗体包括但不限于：包含重链可变结构域 (V_H) 和轻链可变结构域 (V_L) 的抗体，其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性；具有 2 个或多个 V_L 和 V_H 结构域的抗体，每个 V_HV_L 单元结合不同的表位；具有 2 个或多个单可变结构域的抗体，每个单可变结构域结合不同的表位；全长抗体、抗体片段如 Fab、Fv、dsFv、scFv、双抗体、双特异性双抗体、三价抗体、三功能抗体、共价或非共价连接的抗体片段。“多表位特异性”指特异性结合相同或不同的靶上的两个或多个不同的表位的能力。“单一特异性”指仅结合一个表位的能力。根据一个实施方案，多特异性抗体是以 5 μM 至 0.001pM、3 μM 至 0.001pM、1 μM 至 0.001pM、0.5 μM 至 0.001pM 或 0.1 μM 至 0.001pM 的亲和力结合每个表位的 IgG 抗体。

[0066] 表达方式“单结构域抗体”(sdAb) 或“单可变结构域 (SVD) 抗体”一般指这样的抗体，所述抗体中的单个可变结构域 (V_H 或 V_L) 可以赋予抗原结合。换言之，单可变结构域不需要为了识别靶抗原而与另一个可变结构域相互作用。单结构域抗体的例子包括源自骆驼科动物（羊驼和骆驼）和软骨鱼（例如护士鲨）的抗体，和通过重组方法源自人和小鼠抗体的抗体 (*Nature* (1989) 341:544-546 ;*Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56 ;*Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235 ;*Trends Biotechnol* (2003) :21:484-490 ;W02005/035572 ;W003/035694 ;*Febs Lett* (1994) 339:285-290 ;W000/29004 ;W002/051870)。

[0067] 术语“单克隆抗体”在本文中用于指从基本均质的抗体的群体中获得的抗体，即，构成群体的单个抗体是相同的和 / 或结合相同表位，除了可能在生产单克隆抗体的过程中产生的可能的变体外，这类变体一般以少量存在。与通常包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制品相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性外，单克隆抗体的优点还在于不被其他的免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示抗体的

特征是从基本均质的抗体群体获得的,并不理解为要求通过任何特定的方法生产抗体。例如,待根据本文提供的方法使用的单克隆抗体可以通过 Kohler 等, Nature256:495(1975) 首次描述的杂交瘤方法或者可以通过重组 DNA 方法制备(参见例如,美国专利号 4,816,567)。还可以使用例如 Clackson 等, Nature352:624-628(1991) 和 Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 中描述的技术,从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0068] 本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分是与源自特定物种的抗体的相应序列相同或同源的,或者属于特定的抗体类型或亚类,而链的其余部分是与源自另一种物种的抗体的相应序列相同或同源的,或者属于另一种抗体类型或亚类,以及这类抗体的片段,只要所述片段表现出理想的生物学活性(美国专利号 4,816,567;Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855(1984))。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类化的”抗体,所述抗体包含源自非人灵长类(例如,旧世界猴,如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列(美国专利号 5,693,780)。

[0069] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。在绝大部分情况下,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体超变区的残基被具有理想特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体),如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的超变区残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含基本上全部的至少 1 个,通常 2 个可变结构域,其中,所有的或基本上所有的超变环都对应于非人免疫球蛋白的超变环,并且所有的或基本上所有的 FR 都是人免疫球蛋白序列的 FR,除了如上述的 FR 取代。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等, Nature321:522-525(1986);Riechmann 等, Nature332:323-329(1988);和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0070] 出于本文的目的,“完整抗体”是包含重链和轻链可变结构域以及 Fc 区的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选的,完整抗体具有一个或多个效应子功能。

[0071] “天然抗体”通常是约 150,000 道尔顿的异四聚化的糖蛋白,由 2 条相同的轻(L)链和 2 条相同的重(H)链组成。每条轻链通过 1 个共价的二硫键与重链相连,而不同的免疫球蛋白同种型的重链之间的二硫键数量也不同。每条重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫桥。每条重链在一个末端具有可变结构域(V_H),之后具有多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),在另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,轻链的可变结构域与重链的可变结构域对齐。特定的氨基酸残基被认为形成了轻链和重链可变结构域之间的界面。

[0072] “裸露的抗体”是未与异源分子(如细胞毒性部分或放射性标记)缀合的抗体(如本文定义)。

[0073] 在一些实施方案中,抗体的“效应子功能”指归因于抗体的 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)的那些生物学活性,且随抗体同种型而不同。抗体效应子功能的例子包括:Clq 结合和补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC) ;吞噬作用 ;细胞表面受体的下调。

[0074] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指细胞介导的反应,在所述反应中,表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如,天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别在靶细胞上结合的抗体,然后导致靶细胞裂解。用于介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞,仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol*9:457-92(1991) 的第 464 页的表 3 概括了在造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目标分子的 ADCC 活性,可以实施体外 ADCC 测定法,如美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 所述。用于这类测定法的效应子细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。可选的或额外的,可以在体内评估目标分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,如 Clynes 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656(1998) 中公开的动物模型。

[0075] “人效应子细胞”是表达一种或多种 FcR 并实施效应子功能的白细胞。在一些实施方案中,细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞 ;PBMC 和 NK 细胞是优选的。

[0076] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述与抗体的 Fc 区结合的受体。在一些实施方案中, FcR 是天然序列的人 FcR。此外,优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位变体和备选地可变剪切形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA(活化型受体)和 Fc γ RIIB(抑制型受体),其具有差别主要在于其胞质结构域中的类似的氨基酸序列。活化型受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。抑制型受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。(参见 **Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol*9:457-92(1991) ;Capel 等, *Immunomethods*4:25-34(1994) ;和 de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995) 中对 FcR 进行了综述。其他 FcR,包括将来待鉴定的那些,都被本文中的术语“FcR”涵盖。该术语还包括新生儿受体 FcRn,这是负责母体 IgG 向胎儿转移的受体 (Guyer 等, *J. Immunol.* 117:587(1976) 和 Kim 等, *J. Immunol.* 24:249(1994))。

[0077] 本文使用的术语“顺序”涉及层析时指第一层析后接第二层析。在第一层析和第二层析之间也可以包括其他步骤。

[0078] 本文使用的术语“连续”涉及层析时指具有直接相连的,或允许在两种层析材料之间连续流动的一些其他机制的第一层析材料和第二层析材料。

[0079] “污染物”指与理想的多肽产物不同的材料。污染物包括但不限于:宿主细胞材料,如 CHOP ;泄露的蛋白 A ;核酸 ;理想多肽的变体、片段、聚集物或衍生物 ;另一种多肽 ;内毒素 ;病毒性污染物 ;细胞培养基组分等。在一些例子中,污染物可以是宿主细胞蛋白质 (HCP),来自例如但不限于细菌细胞,如大肠杆菌细胞、昆虫细胞、原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞、真菌细胞。

[0080] 层析材料的“动态结合容量”是在未结合产物显著的贯穿出现前,材料在实际的流动条件下将要结合的产品 (例如多肽) 的量。

[0081] 本文使用的“分配系数” K_p 指产物 (例如多肽) 在静止相中的摩尔浓度除以产物在移动相中的摩尔浓度。

[0082] “装载密度”指与一定体积的层析材料（例如数升）接触的组合物量，例如克。在一些例子中，装载密度用 g/L 表示。

[0083] 本文中提及“约”一定数值或参数时，包括（描述了）对于数值或参数本身的变异。例如，涉及“约 X”的描述包括了对“X”的描述。

[0084] 如本文和所附权利要求中使用的，单数形式“a”或“the”包括了复数指代，除非语境中另外明确指出。应理解，本文描述的本发明的方面和变异包括了“由方面和变异组成”和 / 或“基本由方面和变异组成”。

[0085] II. 纯化方法

[0086] 本文提供了使用过载和洗脱层析 (OEC) 从包含产物和至少一种污染物的组合物中纯化产物（如多肽）的方法。OEC 提供了这样的操作模式，其中在单种层析模式中实现不同的层析模式提供的好处。OEC 可以在多种树脂上执行，同时提供增强的杂质去除和显著的生产优势，如更小的柱体积，更好的设备适合度和更低的成本。OEC 的操作模式可以分解为 3 种不同的组分。

[0087] 1. 过载 - 将组合物装载到层析材料上，使产物（如多肽）装载到层析材料上的量超过材料对于产物的动态结合容量 (DBC)。在一些实施方案中，确定杂质与层析材料强烈结合的装载条件，如 pH 和电导率。在一些实施方案中，选择层析条件，使得即使产物贯穿，绝大多数，如果不是所有的杂质不贯穿。在一些实施方案中，组合物的装载量是或者接近材料对于一种或多种污染物的 DBC。过载模式允许所利用的层析材料超过材料对于产物的典型 DBC。

[0088] 2. 混合 - 洗脱液中的产物，如多肽的混合开始于产物贯穿。由于装载条件是使杂质在贯穿期间继续结合，因此可以在层析的装载阶段在洗脱液中获得清洁的产物混合物。

[0089] 3. 洗脱 - 在结束将组合物装载到层析材料后，使用经鉴别的洗脱条件，从层析材料上洗脱产物（如多肽），所述洗脱条件使得洗脱结合的产物，同时大部分的杂质仍然与层析材料结合。

[0090] 在一些方面，OEC 显著增加层析材料利用，超过材料对于产物的 DBC，从而提供相比其他层析方法的好处。例如，高 10 倍的层析材料利用可以导致显著更低的成本。

[0091] 与其中优化层析材料的装载以最大化产物（如多肽）与层析树脂的结合的传统的结合和洗脱层析不同，可以优化 OEC 装载条件以最大化污染物与层析材料的结合而并非产物与层析材料的结合。在一些方面，向层析材料装载的组合物量超过层析材料对于多肽的动态结合容量。在装载层析材料的过程中，一些产物将在洗涤中贯穿，而一些产物仍然与层析材料结合。在结束装载后，可以从层析材料中洗脱与层析材料结合的剩余产物。在一些上述实施方案中，层析材料是层析柱。在一些上述实施方案中，层析材料是层析膜。

[0092] 在本发明的一些方面，以约层析材料对组合物中的一种或多种污染物的动态结合容量将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中，以超过层析材料对产物的结合容量的量将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中，以约层析材料对一种或多种污染物的动态结合容量并超过层析材料对产物的结合容量将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中，以层析材料对产物的 DBC 的 20 倍将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中，以层析材料对产物的 DBC 的 100 倍将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中，以约层析材料对组合物中的所有污染物的动态结合容量将组合物装载到层析材料上。在一些

实施方案中,以约层析材料对组合物中的所有污染物的动态结合容量并超过层析材料对产物的结合容量将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中,以少于层析材料对所有污染物的动态结合容量并超过层析材料对产物的结合容量将组合物装载到层析材料上。在一些上述实施方案中,层析材料位于层析柱中。在一些实施方案中,层析柱是工业规模的层析柱。在一些上述实施方案中,层析材料是层析膜。

[0093] 可以通过确定特定层析材料的产物或污染物的分配系数 (K_D) 作为 pH 和反离子浓度的函数,估算层析材料对产物和一种或多种污染物的动态结合容量。例如,可以确定层析材料(例如混合模式树脂)对多肽的动态结合容量。可以通过用过量的产物和 / 或污染物挑战结合,确定在具体的 pH 和反离子浓度组合条件下,层析材料对产物或污染物的实际结合容量。

[0094] 在一些实施方案中,当产物(例如多肽)的 K_D 大于约 30 时实施 OEC。在一些实施方案中,当产物的 K_D 大于约 50 时实施 OEC。在一些实施方案中,当产物的 K_D 大于约 75 时实施 OEC。在一些实施方案中,当产物的 K_D 大于约 100 时实施 OEC。

[0095] 可以通过测量特定层析材料在不同的 pH 和反离子浓度下的 K_D 和动态结合容量,确定包含产物(如多肽)和污染物的特定组合物的 OEC 条件。可以进行高通量筛选以确定这样的 OEC 条件,其中污染物结合高且可以在不洗脱绝大部分如果不是全部的污染物的条件下洗脱产物。例如,可以在高通量系统中,在多种 pH 和反离子浓度的缓冲液中孵育组合物与层析材料;例如在多孔板的孔中。在孵育期之后,分离层析材料和上清液,确定上清液中的产物或污染物的量。在一些实施方案中,使用低浓度的组合物确定 K_D 。在一些实施方案中,使用高浓度的组合物确定动态结合容量。

[0096] 除了提供关于层析材料对特定产物和污染物的 K_D 和动态结合容量的信息外,高通量筛选在 pH 和反离子浓度方面对于装载和洗脱条件提供了指导。例如,在一些实施方案中,通过高通量筛选选择装载缓冲液的 pH 和反离子浓度,使污染物与层析材料的结合最大化,也还使洗出液中的产物(例如多肽)量最大化,同时使洗出液中的污染物,例如宿主细胞蛋白质的量最小化。在一些实施方案中,在通过高通量筛选确定的 pH 和电导率下,将组合物装载到层析材料上,其中组合物中约所有的污染物都结合在层析材料上。在一些实施方案中,在通过高通量筛选确定的 pH 和电导率下,从层析材料上洗脱产物,其中从层析材料上洗脱了约所有的产物,而约所有的污染物仍然结合在层析材料上。

[0097] 在一些实施方案中,本发明提供了(例如,通过使用高通量筛选技术)用于鉴别操作条件的方法,所述操作条件导致层析材料结合最大量的污染物,而不论每 mL 层析材料结合的产物的量。筛选步骤用于鉴别这样的洗脱条件,所述洗脱条件使结合的产物从层析材料上洗脱而杂质仍然与层析材料紧密结合。

[0098] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,层析材料是包含能够进行一种或多种下列功能的官能团的混合模式材料:阴离子交换、阳离子交换、形成氢键和疏水性相互作用。在一些实施方案中,混合模式材料包含能够进行阴离子交换和疏水性相互作用的官能团。混合模式材料可含有 N- 苯甲基 -N- 甲基乙醇胺、4- 巯基 - 乙基 - 吡啶, 己胺或苯丙胺作为配体,或含有交联的聚丙烯胺。混合模式材料的例子包括 Capto Adhere 树脂、QMA 树脂、Capto MMC 树脂、MEP HyperCel 树脂、HEA HyperCel 树脂、PPA HyperCel 树脂或 ChromaSorb 膜或 Sartobind STIC。在一些实施方案中,混合模式材料是 Capto Adhere 树脂。在一些上

述实施方案中,混合模式材料是混合模式层析柱。在一些上述实施方案中,混合模式材料是混合模式膜。

[0099] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,层析材料是离子交换层析材料;例如,阴离子交换层析材料或阳离子交换层析材料。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,层析材料是阴离子交换材料。在一些实施方案中,阴离子交换层析材料是带正电且具有用于交换流过或流通固相的含水溶液中的阴离子的自由的阴离子的固相。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,阴离子交换材料可以是膜、棒状或树脂。在一个实施方案中,阴离子交换材料可以是树脂。在一些实施方案中,阴离子交换材料可包含伯胺、仲胺、叔胺或季铵离子官能团、多胺官能团或二乙氨基官能团。在一些上述实施方案中,阴离子交换层析材料是阴离子交换层析柱。在一些上述实施方案中,阴离子交换层析材料是阴离子交换层析膜。

[0100] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,层析材料是阳离子交换材料。在一些实施方案中,阳离子交换材料是带负电且具有用于交换流过或流通固相的含水溶液中的阳离子的自由的阳离子的固相。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,阳离子交换材料可以是膜、棒状或树脂。在一些实施方案中,阳离子交换材料可以是树脂。阳离子交换材料可包含羧酸官能团或磺酸官能团,例如但不限于磺酸盐、羧酸、羧甲基磺酸、磺异丁基、磺乙基、羧基、磺丙基、磺酰基、磺氧乙基或正磷酸盐。在一些上述实施方案中,阳离子交换层析材料是阳离子交换层析柱。在一些上述实施方案中,阳离子交换层析材料是阳离子交换层析膜。在本发明的一些实施方案中,层析材料不是阳离子交换层析材料。

[0101] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,离子交换材料可利用常规的层析材料或对流的层析材料。常规的层析材料包括例如:灌注性材料(例如,聚(苯乙烯-二乙烯基苯)树脂)和扩散性材料(例如,交联的琼脂糖树脂)。在一些实施方案中,聚(苯乙烯-二乙烯基苯)树脂可以是 Poros 树脂。在一些实施方案中,交联的琼脂糖树脂可以是磺丙基-Sepharose Fast Flow (SPSFF) 树脂。对流层析材料可以是膜(例如,聚醚砜)或棒状材料(例如,交联的聚合物)。聚醚砜膜可以是 Mustang。交联的聚合物棒状材料可以是交联的聚甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯共聚物。

[0102] 阴离子交换材料的例子是本领域已知的,包括但不限于:Poros HQ50、Poros PI50、Poros D、Mustang Q、Q Sepharose FF 和 DEAE Sepharose。

[0103] 阳离子交换材料的例子是本领域已知的,包括但不限于:Mustang S、Sartobind S、S03Monolith、S Ceramic HyperD、Poros XS、Poros HS50、Poros HS20、SPSFF、SP-Sepharose XL (SPXL)、CM Sepharose Fast Flow、Capto S、Fractogel Se HiCap、Fractogel S03 或 Fractogel C00。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,阳离子交换材料是 Poros HS50。在一些实施方案中,Poros HS 树脂可以是 Poros HS50 μm 或 Poros HS20 μm 颗粒。

[0104] 在本发明的一些方面,层析材料是疏水性相互作用层析材料。疏水性相互作用层析 (HIC) 是液相层析技术,其根据疏水性分离生物分子。HIC 层析材料的例子包括但不限于:Toyopearl hexyl650、Toyopearl butyl650、Toyopearl phenyl650、Toyopearl ether650、Source、Resource、Sepharose Hi-Trap、Octyl sepharose、Phenyl sepharose。在一些上述实施方案中,HIC 层析材料是 HIC 层析柱。在一些上述实施方案中,HIC 层析材料是 HIC 层析膜。

[0105] 在本发明的一些方面,层析材料是羟磷灰石 (HAP) 层析材料。羟磷灰石层析材料的例子包括但不限于 HA Ultrogel 和 CHT 羟磷灰石。在一些上述实施方案中,HAP 层析材料是 HAP 层析柱。在一些上述实施方案中,HAP 层析材料是 HAP 层析膜。

[0106] 在本发明的一些方面,层析材料是亲和层析材料。亲和层析材料的例子包括但不限于用蛋白 A 或蛋白 G 衍生的层析材料。亲和层析材料的例子包括但不限于:Prosep-VA、Prosep-VA Ultra Plus、Protein A sepharose fast flow、Tyopearl Protein A、MAbSelect、MAbSelect SuRe 和 MAbSelect SuRe LX。在一些上述实施方案中,亲和层析材料是亲和层析柱。在一些上述实施方案中,亲和层析材料是亲和层析膜。

[0107] 可以优化组合物在层析材料上的装载,用于通过 OEC 分离产物和污染物。在一些实施方案中,产物是多肽。在一些实施方案中,优化组合物在层析材料上的装载,用于污染物与层析材料的结合。例如,可以在多种不同的 pH 的装载缓冲液中,将组合物装载到层析材料(例如层析柱)上,而装载缓冲液的电导率是恒定的。可选的,可以在多种不同的电导率的装载缓冲液中,将组合物装载到层析材料上,而装载缓冲液的 pH 是恒定的。在结束将组合物装载到层析材料上和从层析材料上洗脱产物至混合级分中之后,混合级分中的污染物的量提供了关于对于给定的 pH 或电导率的产物和污染物的分离的信息。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,以大于约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L、2000g/L 或 5000g/L 层析材料中的任之一的多肽的装载密度将组合物装载到层析材料上。在一些实施方案中,以约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L 或 2000g/L 层析材料中的任之一的多肽的装载密度将组合物装载到层析材料上。可以约 30g/L 和 2000g/L 之间、30g/L 和 1000g/L 之间、30g/L 和 200g/L 之间、30g/L 和 180g/L 之间、50g/L 和 2000g/L 之间、50g/L 和 1000g/L 之间、50g/L 和 200g/L 之间、50g/L 和 180g/L 之间、150g/L 和 2000g/L 之间、150g/L 和 1500g/L 之间、150g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1500g/L 之间、300g/L 和 1500g/L 之间、400g/L 和 1000g/L 之间或 500g/L 和 1000g/L 之间的层析材料中的任之一的多肽的装载密度将组合物装载到层析材料上。

[0108] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,以大于约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L、2000g/L 或 5000g/L 混合模式层析材料中的任之一的多肽的装载密度将组合物装载到混合模式层析材料上。在一些实施方案中,以约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L 或 2000g/L 混合模式层析材料中的任之一的多肽的装载密度将组合物装载到混合模式层析材料上。可以约 30g/L 和 2000g/L 之间、30g/L 和 1000g/L 之间、30g/L 和 200g/L 之间、30g/L 和 180g/L 之间、50g/L 和 2000g/L 之间、50g/L 和 1000g/L 之间、50g/L 和 200g/L 之间、50g/L 和 180g/L 之间、150g/L 和 2000g/L 之间、150g/L 和 1500g/L 之间、150g/L

L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1500g/L 之间、300g/L 和 1500g/L 之间、400g/L 和 1000g/L 之间或 500g/L 和 1000g/L 之间的混合模式层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到混合模式层析材料上。在一些实施方案中,以 70g/L 至 180g/L 的密度将多肽装载到层析材料上。在本发明的一些实施方案中,混合模式层析是 Capto Adhere 树脂。在一些实施方案中,以 70g/L 至 180g/L 的密度将多肽装载到 Capto Adhere 层析材料上。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是抗体或其片段。

[0109] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,以大于约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L、2000g/L 或 5000g/L 阴离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阴离子交换层析材料上。在一些实施方案中,以约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L 或 2000g/L 阴离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阴离子交换层析材料上。可以约 30g/L 和 2000g/L 之间、30g/L 和 1000g/L 之间、30g/L 和 200g/L 之间、30g/L 和 180g/L 之间、50g/L 和 2000g/L 之间、50g/L 和 1000g/L 之间、50g/L 和 200g/L 之间、50g/L 和 180g/L 之间、150g/L 和 2000g/L 之间、150g/L 和 1500g/L 之间、150g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1500g/L 之间、300g/L 和 1500g/L 之间、400g/L 和 1000g/L 之间或 500g/L 和 1000g/L 之间的阴离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阴离子交换层析材料上。

[0110] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,以大于约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L、2000g/L 或 5000g/L 阳离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阳离子交换层析材料上。在一些实施方案中,以约 30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、300g/L、400g/L、500g/L、550g/L、600g/L、650g/L、700g/L、800g/L、900g/L、1000g/L 或 2000g/L 阳离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阳离子交换层析材料上。可以约 30g/L 和 2000g/L 之间、30g/L 和 1000g/L 之间、30g/L 和 200g/L 之间、30g/L 和 180g/L 之间、50g/L 和 2000g/L 之间、50g/L 和 1000g/L 之间、50g/L 和 200g/L 之间、50g/L 和 180g/L 之间、150g/L 和 2000g/L 之间、150g/L 和 1500g/L 之间、150g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1000g/L 之间、200g/L 和 1500g/L 之间、300g/L 和 1500g/L 之间、400g/L 和 1000g/L 之间或 500g/L 和 1000g/L 之间的阳离子交换层析材料中的任一的肽的装载密度将组合物装载到阳离子交换层析材料上。

[0111] 上述方法还可以包括装载到蛋白 A 亲和层析材料的步骤。在一些实施方案中,多肽产物是在 OEC 之前首先通过蛋白 A 亲和层析纯化的抗体或其片段。装载到蛋白 A 亲和层析材料的步骤一般但不必需是在其他层析步骤之前实施的。在一些实施方案中,装载到蛋白 A 亲和层析材料的步骤可以与过载的交换和洗脱层析的顺序步骤组合。在一些实施方案中,顺序步骤是连续的。在一些实施方案中,连续纯化使用相同的流速、电导率和 / 或 pH。

[0112] 可以优化在 OEC 模式下产物（如多肽）从层析材料上的洗脱，用于产生具有最少污染物和处于最小混合体积的产物。例如，可以在装载缓冲液中将组合物装载到层析材料（例如层析柱）上。在结束装载后，可以在多种不同 pH 的缓冲液中洗脱产物，而洗脱缓冲液的电导率是恒定的。可选的，可以在多种不同电导率的缓冲液中洗脱产物，而洗脱缓冲液的 pH 是恒定的。在结束从层析材料上洗脱产物之后，混合级分中的污染物的量提供了关于对于给定的 pH 或电导率的产物和污染物的分离信息。大数量的级分（例如，8 倍柱体积）的产物洗脱表示洗脱谱“拖尾”。在本发明的一些实施方案中，使洗脱拖尾最小化。

[0113] 可以根据例如缓冲液的理想 pH、缓冲液的理想电导率、目标蛋白质的特征和纯化方法，使用多种缓冲液。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，方法包括使用缓冲液。缓冲液可以是装载缓冲液、平衡缓冲液或洗涤缓冲液。在一些实施方案中，装载缓冲液、平衡缓冲液和 / 或洗涤缓冲液中的一种或多种是相同的。在一些实施方案中，装载缓冲液、平衡缓冲液和 / 或洗涤缓冲液是不同的。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，缓冲液包含盐。装载缓冲液可包含氯化钠、醋酸钠或其混合物。在一些实施方案中，装载缓冲液是氯化钠缓冲液。在一些实施方案中，装载缓冲液是醋酸钠缓冲液。

[0114] 本文使用的装载是将组合物装载到层析材料上。装载缓冲液是用于将包含目标产物的组合物装载到层析材料上的缓冲液。可以在装载待纯化的组合物之前，用平衡缓冲液平衡层析材料。在一些例子中，在将组合物装载到层析材料上之后和从固相上洗脱目标多肽之前，使用洗涤缓冲液。然而，可以通过洗涤缓冲液从层析材料上去除一些目标产物（例如多肽）（例如，与流通型模式相似）。

[0115] 本文使用的洗脱是从层析材料上去除产物（例如多肽）。洗脱缓冲液是用于从层析材料上洗脱多肽或其他目标产物的缓冲液。在许多情况下，洗脱缓冲液具有不同于装载缓冲液的物理特征。例如，洗脱缓冲液可具有不同于装载缓冲液的电导率或不同于装载缓冲液的 pH。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有低于装载缓冲液的电导率。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有高于装载缓冲液的电导率。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有低于装载缓冲液的 pH。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有高于装载缓冲液的 pH。在一些实施方案中，洗脱缓冲液具有不同于装载缓冲液的电导率和 pH。洗脱缓冲液可以具有更高或更低电导率和更高或更低 pH 的任意组合。

[0116] 电导率指含水溶液在两个电极之间传导电流的能力。在溶液中，电流通过离子运输而流动。因此，伴随含水溶液中存在的离子量增加，溶液将具有更高的电导率。测量电导率的基础单位是 Siemen（或姆欧）、姆欧（mS/cm），可以使用电导仪测量，如多种模型的 Orion 电导仪。由于电解电导率是溶液中的离子携带电流的容量，因此可以通过改变其中的离子浓度改变溶液的电导率。例如，可以改变溶液中的缓冲剂浓度和 / 或盐（例如，氯化钠、醋酸钠或氯化钾）浓度以获得理想的电导率。优选地，修饰多种缓冲液的盐浓度来获得理想的电导率。

[0117] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中，装载缓冲液具有大于约 4.0mS/cm、4.5mS/cm、5.0mS/cm、5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm、7.0mS/cm、7.5mS/cm、8.0mS/cm、8.5mS/cm、9.0mS/cm、9.5mS/cm 或 10mS/cm 中的任一电导率。电导率可以在约 4mS/cm 和 17mS/cm 之间、4mS/cm 和 10mS/cm 之间、4mS/cm 和 7mS/cm 之间、5mS/cm 和 17mS/cm 之间、5mS/cm 和 10mS/cm 之间或 5mS/cm 和 7mS/cm 之间中的任一。在一些实施方案中，电导率是约

4mS/cm、4.5mS/cm、5.0mS/cm、5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm、7.0mS/cm、7.5mS/cm、8.0mS/cm、8.5mS/cm、9.0mS/cm、9.5mS/cm 或 10mS/cm 中的任一。在一个方面,电导率是装载缓冲液、平衡缓冲液和 / 或洗涤缓冲液的电导率。在一些实施方案中,装载缓冲液、平衡缓冲液和洗涤缓冲液中的一种或多种的电导率是相同的。在一些实施方案中,装载缓冲液的电导率不同于洗涤缓冲液和 / 或平衡缓冲液的电导率。在一些实施方案中,在具有约 5.5mS/cm 的电导率的缓冲液中,将组合物装载到混合模式层析材料上。在一些实施方案中,多肽是抗体或其片段。

[0118] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的电导率的电导率。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,洗脱缓冲液具有小于约 0.0mS/cm、0.5mS/cm、1.0mS/cm、1.5mS/cm、2.0mS/cm、2.5mS/cm、3.0mS/cm、3.5mS/cm、4.0mS/cm、4.5mS/cm、5.0mS/cm、5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm 或 7.0mS/cm 中的任一电导率的电导率。电导率可以在约 0mS/cm 和 7mS/cm 之间、1mS/cm 和 7mS/cm 之间、2mS/cm 和 7mS/cm 之间、3mS/cm 和 7mS/cm 之间或 4mS/cm 和 7mS/cm 之间、0mS/cm 和 5.0mS/cm 之间、1mS/cm 和 5mS/cm 之间、2mS/cm 和 5mS/cm 之间、3mS/cm 和 5mS/cm 之间或 4mS/cm 和 5mS/cm 之间中的任一。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的电导率是约 0.0mS/cm、0.5mS/cm、1.0mS/cm、1.5mS/cm、2.0mS/cm、2.5mS/cm、3.0mS/cm、3.5mS/cm、4mS/cm、4.5mS/cm、5.0mS/cm、5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm 或 7.0mS/cm 中的任一。在一些实施方案中,上述洗脱缓冲液用于混合模式 OEC、阴离子交换 OEC、阳离子交换 OEC、亲和 OEC 或 HIC OEC。

[0119] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的电导率的电导率。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,洗脱缓冲液具有大于约 5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm、7.0mS/cm、7.5mS/cm、8.0mS/cm、8.5mS/cm、9.0mS/cm、9.5mS/cm、10mS/cm、11mS/cm、12mS/cm、13mS/cm、14mS/cm、15mS/cm、16mS/cm、17.0mS/cm、18.0mS/cm、19.0mS/cm、20.0mS/cm、21.0mS/cm、22.0mS/cm、23.0mS/cm、24.0mS/cm 或 25.0mS/cm 中的任一电导率的电导率。电导率可以在约 5.5mS/cm 和 17mS/cm 之间、6.0mS/cm 和 17mS/cm 之间、7mS/cm 和 17mS/cm 之间、8mS/cm 和 17mS/cm 之间、9mS/cm 和 17mS/cm 之间或 10mS/cm 和 17mS/cm 之间中的任一。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的电导率是约 5.5mS/cm、6.0mS/cm、6.5mS/cm、7.0mS/cm、7.5mS/cm、8.0mS/cm、8.5mS/cm、9.0mS/cm、9.5mS/cm、10mS/cm、11mS/cm、12mS/cm、13mS/cm、14mS/cm、15mS/cm、16mS/cm 或 17.0mS/cm 中的任一。在一些实施方案中,上述洗脱缓冲液用于混合模式 OEC、阴离子交换 OEC、阳离子交换 OEC、亲和 OEC 或 HIC OEC。在一些实施方案中,在约 4 至约 1mS/cm 的电导率中,从混合模式层析上洗脱多肽。在一些实施方案中,在约 4 至约 1mS/cm 的电导率中,从 Capto Adhere 层析上洗脱多肽。在一些实施方案中,在约 4mS/cm 至约 1mS/cm 的电导率中,从 Capto Adhere 层析上洗脱抗体或其片段。

[0120] 在任何上述实施方案的一些方面,通过阶梯梯度或线性梯度,洗脱缓冲液的电导率改变自装载和 / 或洗涤缓冲液的电导率。

[0121] 在本发明的一些实施方案中,在具有约 5.5mS/cm 电导率的缓冲液中,将包含多肽的组合物装载到层析材料上,并在具有约 4mS/cm 电导率的洗脱缓冲液中从层析材料上洗脱多肽。在一些实施方案中,装载缓冲液具有约 5.5mS/cm 的电导率并且洗脱缓冲液具有约 3mS/cm 的电导率。在一些实施方案中,装载缓冲液具有约 5.5mS/cm 的电导率并且洗脱缓冲液具有约 2mS/cm 的电导率。在一些实施方案中,装载缓冲液具有约 5.5mS/cm 的电导率

并且洗脱缓冲液具有约 1mS/cm 的电导率。在上述实施方案的其他实施方案中,层析材料是 Capto Adhere 树脂。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是抗体或其片段。

[0122] 在任何上述实施方案的一些方面,通过阶梯梯度或通过线性梯度,洗脱缓冲液的电导率改变自装载和 / 或洗涤缓冲液的电导率。在一些实施方案中,在约 5.5mS/cm 将包含多肽的组合物装载到 Capto Adhere 层析上,并通过从约 5.5mS/cm 至约 1mS/cm 的线性电导率梯度在约 5 倍柱体积 (CV) 中从 Capto Adhere 层析上洗脱目标多肽。在一些实施方案中,在约 5.5mS/cm 将包含多肽的组合物装载到 Capto Adhere 层析上,并通过从约 5.5mS/cm 至约 1mS/cm 的线性电导率梯度在 10.0CV 中从 Capto Adhere 层析上洗脱目标多肽。在一些实施方案中,在约 10mS/cm 将包含多肽的组合物装载到 Capto Adhere 层析上,并通过从约 10.0mS/cm 至约 1mS/cm 的线性电导率梯度在约 5CV 中从 Capto Adhere 层析上洗脱目标多肽。在一些实施方案中,在约 10mS/cm 将包含多肽的组合物装载到 Capto Adhere 层析上,并通过从约 10.0mS/cm 至约 1mS/cm 的线性电导率梯度在约 10CV 中从 Capto Adhere 层析上洗脱目标多肽。在一些实施方案中,在约 10mS/cm 将包含多肽的组合物装载到 Capto Adhere 层析上,并通过从约 10.0mS/cm 至约 1mS/cm 的线性电导率梯度在约 15CV 中从 Capto Adhere 层析上洗脱目标多肽。

[0123] 在任何上述实施方案的一些方面,通过阶梯梯度或通过线性梯度,洗脱缓冲液的电导率改变自装载和 / 或洗涤缓冲液的电导率。在一些实施方案中,在约 5.5mS/cm 将包含多肽的组合物装载到层析材料上,并通过在 5.5mS/cm 至 1mS/cm 之间的线性电导率梯度在 5 倍柱体积中,5.5mS/cm 至 1mS/cm 在 10 倍柱体积中,从层析材料上洗脱目标多肽。在一些实施方案中,在约 10mS/cm 将包含多肽的组合物装载到层析材料上,并通过在 10.0mS/cm 至 1mS/cm 之间的线性电导率梯度在 5 倍柱体积中,10.0mS/cm 至约 1mS/cm 在 10 倍柱体积中,10.0mS/cm 至 1mS/cm 在 15 倍柱体积中,从层析材料上洗脱目标多肽。

[0124] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,装载缓冲液具有小于约 10、9、8、7、6 或 5 中任一的 pH。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,装载缓冲液具有大于约 4、5、6、7、8 或 9 中任一的 pH。装载缓冲液可具有在约 4 和 9 之间、4 和 8 之间、4 和 7 之间、5 和 9 之间、5 和 8 之间、5 和 7 之间、5 和 6 之间中任一的 pH。在一些实施方案中,装载缓冲液的 pH 是约 4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5 或 8 中的任一。pH 可以是装载缓冲液、平衡缓冲液或洗涤缓冲液的 pH。在一些实施方案中,装载缓冲液、平衡缓冲液和 / 或洗涤缓冲液中的一种或多种的 pH 是相同的。在一些实施方案中,装载缓冲液的 pH 不同于平衡缓冲液和 / 或洗涤缓冲液的 pH。

[0125] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的 pH 的 pH。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,洗脱缓冲液具有小于约 8、7、6、5、4、3 或 2 中的任一的 pH。洗脱缓冲液的 pH 可以是在约 4 和 9 之间、4 和 8 之间、4 和 7 之间、4 和 6 之间、4 和 5 之间、5 和 9 之间、5 和 8 之间、5 和 7 之间、5 和 6 之间、6 和 9 之间、6 和 8 之间、6 和 7 之间中的任一。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的 pH 是约 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0 中的任一。

[0126] 在一些实施方案中,洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的 pH 的 pH。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,洗脱缓冲液具有大于约 5、6、7、8 或 9 中的任一的 pH。洗脱缓冲液的 pH 可以是在约 4 和 9 之间、5 和 9 之间、6 和 9 之间、7 和 9 之间、8 和 9 之间、4 和 8 之

间、5 和 8 之间、6 和 8 之间、7 和 8 之间、4 和 7 之间、5 和 7 之间、和 6 和 7 之间中的任一。在一些实施方案中,洗脱缓冲液的 pH 是约 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0 中的任一。

[0127] 在任何上述实施方案的一些方面,通过阶梯梯度或线性梯度,洗脱缓冲液的 pH 改变自装载和 / 或洗涤缓冲液的 pH。

[0128] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,流速小于约 50CV/hr、40CV/hr 或 30CV/hr 中的任一。流速可以是在约 5CV/hr 和 50CV/hr 之间、10CV/hr 和 40CV/hr 之间,或 18CV/hr 和 36CV/hr 之间中的任一。在一些实施方案中,流速是约 9CV/hr、18CV/hr、25CV/hr、30CV/hr、36CV/hr 或 40CV/hr 中的任一。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,流速小于约 100cm/hr、75cm/hr 或 50cm/hr 中的任一。流速可以是在约 25cm/hr 和 150cm/hr 之间、25cm/hr 和 100cm/hr 之间、50cm/hr 和 100cm/hr 之间或 65cm/hr 和 85cm/hr 之间中的任一。

[0129] 床高度是所使用的层析材料的高度。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,床高度大于约 3cm、10cm 或 15cm 中的任一。床高度可以是在约 3cm 和 35cm 之间、5cm 和 15cm 之间、3cm 和 10cm 之间,或 5cm 和 8cm 之间中的任一。在一些实施方案中,床高度是约 3cm、5cm、10cm,或 15cm 中的任一。在一些实施方案中,床高度是基于负载中的多肽或污染物的量决定的。

[0130] 在一些实施方案中,层析是在具有大于约 1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL、10mL、15mL、20mL、25mL、30mL、40mL、50mL、75mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、1L、2L、3L、4L、5L、6L、7L、8L、9L、10L、25L、50L、100L、200L、300L、400L、500L、600L、700L、800L、900L 或 100L 的体积的容器柱中。

[0131] 在本发明的一些实施方案中,从层析中收集级分。在一些实施方案中,收集的级分大于约 0.01CV、0.02CV、0.03CV、0.04CV、0.05CV、0.06CV、0.07CV、0.08CV、0.09CV、0.1CV、0.2CV、0.3CV、0.4CV、0.5CV、0.6CV、0.7CV、0.8CV、0.9CV、1.0CV、2.0CV、3.0CV、4.0CV、5.0CV、6.0CV、7.0CV、8.0CV、9.0CV 或 10.0CV。在一些实施方案中,混合含有产物(例如多肽)的级分。在一些实施方案中,混合含有来自负载级分和来自洗脱级分的多肽的级分。本领域技术人员可以确定级分中的多肽的量;例如,可以通过 UV 光谱确定级分中的多肽的量。在一些实施方案中,混合含有可检测的多肽片段的级分。

[0132] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,至少一种污染物是宿主细胞材料,如 CHOP;泄露的蛋白 A;核酸;理想多肽的变体、片段、聚集物或衍生物;另一种多肽;内毒素;病毒性污染物;细胞培养基组分、羧肽酶 B、庆大霉素等中的任何一种或多种。在一些例子中,污染物可以是来自例如但不限于细菌细胞,如大肠杆菌细胞、昆虫细胞、原核细胞、真核细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞、真菌细胞的宿主细胞蛋白质(HCP)。

[0133] 宿主细胞蛋白质(HCP)是来自生产多肽的细胞的蛋白质。例如,CHOP是来自宿主细胞的蛋白质,即,中华仓鼠卵巢蛋白质。可以通过酶联免疫吸附测定法(“ELISA”)或 Meso Scale Discovery(“MSD”)测量 CHOP 的量。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,HCP(例如,CHOP)的量降低大于约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。HCP 的量可以降低约 10%和 99%之间、30%和 95%之间,30%和 99%之间、50%和 95%之间,50%和 99%之间、75%和 99%之间,或 85%和 99%之间中的任一。

在一些实施方案中，HCP 的量可以降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 中的任一。在一些实施方案中，通过比较从（一个或多个）纯化步骤回收的组合物中的 HCP 的和在（一个或多个）纯化步骤之前的组合物中的 HCP 的量，确定降低。

[0134] 聚集的多肽可以是高分子量 (HMW) 蛋白质。在一些实施方案中，聚集的多肽是目标多肽的多聚物。HMW 蛋白质可以是二聚体，多至 8x 单体，或更大的目标多肽。用于测量聚集的蛋白质（例如，HMW 蛋白质）的方法是本领域已知的，并描述在实施例章节中。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，聚集的蛋白质的量降低大于约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。聚集的蛋白质的量可以降低约 10% 和 99% 之间、30% 和 95% 之间、30% 和 99% 之间、50% 和 95% 之间、50% 和 99% 之间、75% 和 99% 之间，或 85% 和 99% 之间中的任一。聚集的蛋白质的量可以降低约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。在一些实施方案中，通过比较从（一个或多个）纯化步骤回收的组合物中的聚集的蛋白质（例如，HMW 蛋白质）的和在（一个或多个）纯化步骤之前的组合物中的聚集的蛋白质（例如，HMW 蛋白质）的量，确定降低。

[0135] 片段多肽可以是低分子量 (LMW) 蛋白质。在一些实施方案中，片段化多肽是目标多肽的片段。LMW 蛋白质的例子包括但不限于：Fab（片段抗原结合）、Fc（片段，可结晶）区或目标抗体的两种或任何随机片段化部分的组合。测量片段化蛋白质（例如，LMW 蛋白质）的方法是本领域已知的，并描述在实施例章节中。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，LMW 蛋白质的量降低大于约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。LMW 蛋白质的量可以降低约 10% 和 99% 之间、30% 和 95% 之间、30% 和 99% 之间、50% 和 95% 之间、50% 和 99% 之间、75% 和 99% 之间，或 85% 和 99% 之间中的任一。LMW 蛋白质的量可以降低约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。在一些实施方案中，通过比较从（一个或多个）纯化步骤回收的组合物中的片段化蛋白质（例如，LMW 蛋白质）的和在（一个或多个）纯化步骤之前的组合物中的片段化蛋白质（例如，LMW 蛋白质）的量，确定降低。

[0136] 泄露的蛋白 A 是从其所结合的固相上脱离或洗下的蛋白 A。例如，泄露的蛋白 A 可以从蛋白 A 层析柱上泄露的。可以通过例如 ELISA 测量蛋白 A 的量。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，泄露的蛋白 A 的量降低大于约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 中的任一。泄露的蛋白 A 的量可以降低约 10% 和 99% 之间、30% 和 95% 之间、30% 和 99% 之间、50% 和 95% 之间、50% 和 99% 之间、75% 和 99% 之间，或 85% 和 99% 之间中的任一。在一些实施方案中，泄露的蛋白 A 的量降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 中的任一。在一些实施方案中，通过比较从（一个或多个）纯化步骤回收的组合物中的泄露的蛋白 A 的和在（一个或多个）纯化步骤之前的组合物中的泄露的蛋白 A 的量，确定降低。

[0137] 测量 DNA（如宿主细胞 DNA）的方法是本领域已知的，并描述在实施例章节中。在本文所述的任何方法的一些实施方案中，DNA 的量降低大于约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 中的任一。DNA 的量可以降低约 10% 和 99% 之间、30% 和 95% 之间、30% 和 99% 之间、50% 和 95% 之间、50% 和 99% 之间、75% 和 99% 之间，或 85% 和 99%

之间中的任一。DNA 的量可以降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 中的任一。在一些实施方案中,通过比较从(一个或多个)纯化步骤回收的组合物中的 DNA 的量和在(一个或多个)纯化步骤之前的组合物中的 DNA 的量,确定降低。

[0138] 细胞培养基组分指存在于细胞培养基中的组分。细胞培养基可以是在收获细胞时的细胞培养基。在一些实施方案中,细胞培养基组分是庆大霉素。可以通过 ELISA 测量庆大霉素的量。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,细胞培养基组分的量降低大于约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 中的任一。细胞培养基组分的量可以降低约 10% 和 99% 之间、30% 和 95% 之间、30% 和 99% 之间、50% 和 95% 之间、50% 和 99% 之间、75% 和 99% 之间,或 85% 和 99% 之间中的任一。在一些实施方案中,细胞培养基组分的量降低约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 中的任一。在一些实施方案中,通过比较从(一个或多个)纯化步骤回收的组合物中的细胞培养基组分的量和在(一个或多个)纯化步骤之前的组合物中的细胞培养基组分的量,确定降低。

[0139] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,方法还可以包括在本文所述的任何 OEC 之前或之后的一个或多个的纯化步骤。其他纯化流程包括例如,离子交换层析,如阴离子交换层析和阳离子交换层析、亲和层析,如蛋白 A 层析和蛋白 G 层析、混合模式层析,羟磷灰石层析;凝胶过滤层析;亲和层析;凝胶电泳;透析;乙醇沉淀;逆相 HPLC;硅胶层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;和金属螯合柱以结合多肽的表位标记形式。

[0140] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,方法还包括回收纯化的多肽。在一些实施方案中,纯化的多肽是从本文所述的任何纯化步骤中回收的。层析步骤可以是阳离子交换层析、混合模式层析或蛋白 A 层析。在一些实施方案中,OEC 层析是混合模式层析,并且其他层析是阴离子交换层析。在一些实施方案中,OEC 层析是混合模式层析,并且其他层析是阳离子交换层析。在一些实施方案中,OEC 层析是混合模式层析,并且其他层析是 HIC 层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阴离子交换层析,并且其他层析是阳离子交换层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阴离子交换层析,并且其他层析是混合模式层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阴离子交换层析,并且其他层析是 HIC 层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阳离子交换层析,并且其他层析是阴离子交换层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阳离子交换层析,其他层析是混合模式层析。在一些实施方案中,OEC 层析是阳离子交换层析,并且其他层析是 HIC 层析。在一些实施方案中,OEC 层析是 HIC 层析,并且其他层析是混合模式层析。在一些实施方案中,OEC 层析是 HIC 层析,并且其他层析是阴离子交换层析。在一些实施方案中,OEC 层析是 HIC 层析,并且其他层析是阳离子交换层析。

[0141] 在一些实施方案中,在 OEC 后,通过病毒过滤进一步纯化多肽。病毒过滤是去除多肽纯化补料流中的病毒性污染物。病毒过滤的例子包括超滤和微滤。在一些实施方案中,使用细小病毒过滤器纯化多肽。

[0142] 在一些实施方案中,在用 OEC 模式层析后浓缩多肽。浓缩方法的例子是本领域已知的,包括但不限于超滤和渗滤。

[0143] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,方法还包括组合纯化方法纯化的多肽与可药用的运载体。

[0144] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括:a) 在具有约 6.5 的

pH 和约 5.3mS/cm 至约 5.6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂 150-200g 抗体 ;b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的包含 100mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0145] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 6.5 的 pH 和约 5.3mS/cm 至约 5.6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到在 1.6-10.8L 柱中的 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂 70-180g 抗体 ; b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的包含 100mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0146] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 8.6 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂约 200g 抗体 ;b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0147] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 6.1 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂约 200g 抗体 ;b) 用约 6.0 的 pH 和约 0.65mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0148] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 5.5 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂约 200g 抗体 ;b) 用约 4.9 的 pH 和约 1.1mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0149] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 6.5 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto Adhere 树脂上,装载密度为每升 Capto Adhere 树脂约 200g 抗体 ;b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0150] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 6.5 的 pH 和小于约 5.5mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 QMA 树脂上,装载密度为每升 QMA 树脂约 103g 抗体 ;b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0151] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 5.5 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Poros XS 树脂上,装载密度为每升 Poros XS 树脂约 200g 抗体 ;b) 用 pH 约 5.5 的 50-350mM 醋酸洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0152] 在一些实施方案中,本发明提供了用于纯化抗体的方法,包括 :a) 在具有约 7.0 的 pH 和小于约 6mS/cm 的电导率的装载缓冲液中,将包含抗体的组合物装载到 Capto MMC 树脂上,装载密度为每升 Capto MMC 树脂约 147g 抗体 ;b) 用约 6.5 的 pH 和约 1mS/cm 的电导率的 20mM MES 的洗脱缓冲液,从树脂上洗脱抗体 ;和收集包含抗体的混合物。

[0153] III. 多肽

[0154] 提供的多肽用于纯化多肽的任何方法和包含通过本文所述方法纯化的多肽的制

剂中。

[0155] 在一些实施方案中,本发明提供了通过使用过载和洗脱层析,纯化多肽的方法。在一些实施方案中,多肽是治疗性多肽。在一些实施方案中,多肽是拮抗剂。在一些实施方案中,多肽是激动剂。在一些实施方案中,多肽是抗体。在一些实施方案中,多肽是经表位标记的。在一些实施方案中,多肽保留生物学和/或免疫学活性。在一些实施方案中,多肽是拮抗剂。在一些实施方案中,多肽启动补体依赖性细胞毒性。在一些实施方案中,多肽是抗体或免疫粘附素。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用混合模式层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用阴离子交换层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用阳离子交换层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用 HIC 层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用 HAP 层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用亲和层析基质的 OEC 纯化的。在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是通过使用不是,或不包括阳离子交换层析的层析基质的 OEC 纯化的。

[0156] 在一些实施方案中,多肽具有大于约 5,000 道尔顿、10,000 道尔顿、15,000 道尔顿、25,000 道尔顿、50,000 道尔顿、75,000 道尔顿、100,000 道尔顿、125,000 道尔顿或 150,000 道尔顿中任一分子量。多肽可具有约 50,000 道尔顿至 200,000 道尔顿之间、或 100,000 道尔顿至 200,000 道尔顿之间中任一分子量。可选的,本文使用的多肽可具有约 120,000 道尔顿或约 25,000 道尔顿的分子量。

[0157] pI 是等电点,是特定分子或表面不带任何电荷的 pH。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,多肽的 pI 可以是在约 6 至 10 之间、7 至 9 之间,或 8 至 9 之间中的任一。在一些实施方案中,多肽具有约 6、7、7.5、8、8.5、9、9.5 或 10 中任一的 pI。

[0158] 待使用本文所述方法纯化的多肽一般是使用重组技术生产的。用于生产重组蛋白质的方法描述在例如美国专利号 5,534,615 和 4,816,567 中,通过引用具体整合到本文中。在一些实施方案中,目标蛋白质是在 CHO 细胞中生产的(参见例如 W094/11026)。当使用重组技术时,多肽可以在胞内生产、在周质空间生产或直接分泌到培养基中。

[0159] 可以从培养基或从宿主细胞裂解液中回收多肽。可以通过多种物理或化学的方法破裂用于表达多肽的细胞,如冻融循环、超声、机械破裂或细胞裂解剂。如果多肽是在胞内生产的,作为第一步骤,通过例如离心或超滤去除宿主细胞或裂解的片段的微粒残渣。Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) 描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间中的多肽的流程。简而言之,在存在醋酸钠 (pH3.5)、EDTA 和苯甲磺酰氟 (PMSF) 的条件下,使细胞浆融解约 30min。可以通过离心去除细胞残渣。当多肽是分泌到培养基中时,一般首先使用可商购的多肽浓缩滤器,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元,浓缩来自这类表达体系的上清液。上述步骤中的任一步都可以包括蛋白酶抑制剂,如 PMSF,以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素,以抑制外来污染物的生长。

[0160] 可通过本发明方法纯化的多肽的例子包括但不限于免疫球蛋白、免疫粘附素、抗体、酶、激素、融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子和白介素。多肽的例子包括但不限于:哺乳动物蛋白质,如肾素;激素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺素;甲状腺刺激激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A-链;

胰岛素 B-链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子如因子 VIIIc、因子 IX、组织因子和 von Willebrands 因子;抗凝血因子,如蛋白 C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤维蛋白溶酶原激活剂,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,如人血清白蛋白;Muellerian-抑制性物质;松弛素 A-链;松弛素 B-链;原松弛素;小鼠促性腺激素相关肽;酶;微生物蛋白质,如 β -内酰胺酶;DNA 酶;IgE;细胞毒性 T-淋巴细胞相关抗原(CTLA),如 CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5 或-6(NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6)或神经生长因子如 NGF-b;血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,如 aFGF 和 bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),如 TGF- α 和 TGF- β ,包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I 和-II(IGF-I 和 IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白质(IGFBP);细胞因子;CD 蛋白,如 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD20;红细胞生成素;骨诱导性因子;免疫毒素;融合多肽,即,包含两个或多个异源多肽或其片段并由重组核酸编码的多肽;含有 Fc 的多肽,例如包含与第二多肽融合的免疫球蛋白 Fc 区或其片段的融合蛋白;免疫缀合物;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF;白介素(IL),例如 IL-1 至 IL-10;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒性抗原,例如 AIDS 衣壳的一部分;运输蛋白;归巢受体;地址素;调控蛋白;整联蛋白如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM;肿瘤相关抗原,如 CA125(卵巢癌抗原)或 HER2、HER3 或 HER4 受体;免疫粘附素;和任何上述蛋白质的片段和/或变体,以及与蛋白质,包括例如任何上述蛋白质结合的抗体,包括抗体片段。

[0161] (A) 抗体

[0162] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,用于纯化多肽的任何方法和包含通过本文所述方法纯化的多肽的制剂中的多肽是抗体。

[0163] 抗体的分子靶包括 CD 蛋白及其配体,例如但不限于:(i) CD3、CD4、CD8、CD19、CD11a、CD20、CD22、CD34、CD40、CD79 α (CD79a) 和 CD79 β (CD79b);(ii) ErbB 受体家族的成员,如 EGF 受体、HER2、HER3 或 HER4 受体;(iii) 细胞粘附分子,如 LFA-1、Mac1、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM 和 α v/ β 3 整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基(例如,抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗体);(iv) 生长因子,如 VEGF;IgE;血型抗原;flk2/flt3 受体;肥胖(OB)受体;mp1 受体;CTLA-4;蛋白 C、BR3、c-met、组织因子、 β 7 等;和(v) 细胞表面和跨膜肿瘤相关抗原(TAA),如美国专利号 7,521,541 中所述。

[0164] 其他示例性抗体包括选自但不限于:抗雌激素受体抗体、抗孕激素受体抗体、抗 p53 抗体、抗 HER-2/neu 抗体、抗 EGFR 抗体、抗组织蛋白酶 D 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 E-钙粘素抗体、抗 CA125 抗体、抗 CA15-3 抗体、抗 CA19-9 抗体、抗 c-erbB-2 抗体、抗 P-糖蛋白抗体、抗 CEA 抗体、抗视网膜母细胞瘤蛋白抗体、抗 ras 原癌蛋白抗体、抗 Lewis X 抗体、抗 Ki-67 抗体、抗 PCNA 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD5 抗体、抗 CD7 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD9/p24 抗体、抗 CD10 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 CD13 抗体、抗 CD14 抗体、抗

CD15 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD23 抗体、抗 CD30 抗体、抗 CD31 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD34 抗体、抗 CD35 抗体、抗 CD38 抗体、抗 CD41 抗体、抗 LCA/CD45 抗体、抗 CD45RO 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CD39 抗体、抗 CD100 抗体、抗 CD95/Fas 抗体、抗 CD99 抗体、抗 CD106 抗体、抗泛素抗体、抗 CD71 抗体、抗 c-myc 抗体、抗细胞角蛋白抗体、抗波形蛋白抗体、抗 HPV 蛋白质抗体、抗 κ 轻链抗体、抗 λ 轻链抗体、抗黑色素体抗体、抗前列腺特异性抗原抗体、抗 S-100 抗体、抗 τ 抗原抗体、抗纤维蛋白抗体、抗角蛋白抗体和抗 Tn- 抗原抗体。

[0165] (i) 多克隆抗体

[0166] 在一些实施方案中,抗体是多克隆抗体。多克隆抗体优选由多次皮下(sc)或腹腔内(ip)注射相关抗原和佐剂的动物内产生。可使用双功能剂或衍生剂,例如,马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 ,或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中 R 和 R_1 是不同的烷基,缀合相关抗原与对待免疫物种是免疫原性的多肽,例如钥孔虫血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白,或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0167] 通过组合例如 $100\ \mu\text{g}$ 或 $5\ \mu\text{g}$ 多肽或缀合物(分别用于兔或小鼠)和 3 倍体积的弗氏完全佐剂,并在多个位点皮内注射所述溶液,来用抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。1 个月后,通过在多个位点皮下注射肽或缀合物的原始量的 $1/5$ 至 $1/10$ 和弗氏完全佐剂,强化动物。7 至 14 天后,将动物放血,测定血清的抗体滴度。加强动物,直到滴度平台。在一些实施方案中,用相同抗原与不同多肽缀合,和/或通过不同交联剂缀合的缀合物加强动物。还在重组细胞培养物中作为多肽融合物生产缀合物。此外,恰当的使用聚集剂,如明矾,来增强免疫应答。

[0168] (ii) 单克隆抗体

[0169] 在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。单克隆抗体是从基本均质的抗体群体中获得的,即,构成群体的单个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了在生产单克隆抗体的过程中产生的可能的变体外,这类变体一般只存在微量。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是不同的或多克隆抗体的混合物。

[0170] 例如,单克隆抗体可以通过使用首先由 Kohler 等, Nature256:495(1975) 描述的杂交瘤方法制备,或者可以由重组 DNA 方法制备(美国专利号 4,816,567)。

[0171] 在杂交瘤方法中,如本文所述接种小鼠或其他恰当的宿主动物,如田鼠,引发生产或能够生产特异性结合用于免疫接种的多肽的抗体的淋巴细胞。可选的,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂(如聚乙二醇),将淋巴细胞与骨髓瘤融合,形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, 第 59-103 页(Academic Press, 1986))。

[0172] 将如此制备的杂交瘤细胞接种并生长在合适的培养基中,所述培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基一般将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶(HAT 培养基),上述物质阻止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0173] 在一些实施方案中,骨髓瘤细胞是高效融合、支持选择的抗体生产细胞的抗体的稳定高水平生产的那些细胞,并且对于培养基如 HAT 培养基敏感。其中,在一些实施方

案中,骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,如源自可获得自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤,和可获得自美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA) 的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞的细胞系。还描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0174] 测定生长杂交瘤细胞的培养基生产针对抗原的单克隆抗体。在一些实施方案中,通过免疫沉淀或体外结合测定,如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA),确定杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0175] 可以通过 Munson 等, Anal. Biochem. 107:220 (1980) 的 Scatchard 分析,确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0176] 在鉴别出生产具有理想的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过极限稀释法亚克隆所述克隆,并通过标准方法生长 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。用于该目的合适培养基包括例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为动物的腹水肿瘤在体内生长。

[0177] 通过常规的免疫球蛋白纯化工艺,例如,多肽 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,从培养基、腹水或血清中合适地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0178] 使用常规方法 (例如,通过使用能够特异结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针),对编码单克隆抗体的 DNA 方便地分离和测序。在一些实施方案中,杂交瘤细胞充当这类 DNA 的来源。一经分离,就可以将 DNA 放入表达载体中,然后将所述载体转染到否则不生产免疫球蛋白多肽的宿主细胞中,如大肠杆菌细胞、猿类 COS 细胞、中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组的宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述包括 Skerra 等, Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 (1993) 和 Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)。

[0179] 在另一实施方案中,可以从使用 McCafferty 等, Nature 348:552-554 (1990) 描述的技术生成的抗体噬菌体文库中,分离抗体或抗体片段。Clackson 等, Nature 352:624-628 (1991) 和 Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物描述了通过链改组生产高亲和力 (nM 范围) 的人抗体 (Marks 等, Bio/Technology 10:779-783 (1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的对策 (Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行的备选方案。

[0180] DNA 也可以是修饰的,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列替代同源的鼠序列 (美国专利号 4,816,567; Morrison 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)), 或者通过共价连接免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列。

[0181] 通常,这类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定结构域,或者取代抗体的 1 个抗原组合位点的可变结构域,以生成包含具有对抗原的特异性的 1 个抗原组合位点和具有对不

同抗原的特异性的另一个抗原组合位点的嵌合二价抗体。

[0182] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,抗体是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM。在一些实施方案中,抗体是 IgG 单克隆抗体。

[0183] (iii) 人源化抗体

[0184] 在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。本领域已描述了用于人源化非人抗体的方法。在一些实施方案中,人源化抗体具有从非人来源导入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,通常来自“输入”的可变结构域。人源化基本可以按照 Winter 及其同事 (Jones 等, *Nature*321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*332:323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science*239:1534-1536(1988)) 的方法实施,通过用人抗体的相应序列取代超变区序列。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中基本上少于整个人可变结构域被来自非人物种的相应序列取代。在实践上,人源化抗体通常是这样的人抗体,其中一些超变区残基以及可能一些 FR 残基被来自啮齿类抗体的类似位点上的残基取代。

[0185] 对于降低抗原性而言,待用于制备人源化抗体的轻链和重链的人可变结构域的选择是非常重要的。根据所谓的“最适”方法,针对已知的人可变结构域序列的完整文库,筛选啮齿类抗体的可变结构域序列。接受与啮齿类最近似的人序列作为人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims 等, *J. Immunol.* 151:2296(1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.* 196:901(1987))。另一种方法使用源自轻链或重链可变区的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架区。相同的框架可以用于若干种不同的人源化抗体 (Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*89:4285(1992); Presta 等, *J. Immunol.* 151:2623(1993))。

[0186] 更重要的是,将要人源化的抗体保留了对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这一目标,在方法的一些实施方案中,通过使用亲代和人源化序列的三维模型分析亲代序列和多种概念性的人源化产物的方法,制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是本领域技术人员可常规获得的和熟知的。可获得示例和展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。对这些展示物的观察允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。藉此,可以从受体和输入序列选择和组合 FR 残基,从而实现理想的抗体特征,如对于(一种或多种)靶抗原增加的亲和力。一般而言,超变区残基直接且大部分实质地参与影响抗原结合。

[0187] (v) 人抗体

[0188] 在一些实施方案中,抗体是人抗体。作为人源化的备选方案,可以生成人抗体。例如,现在可以生产转基因动物(例如,小鼠),所述转基因动物在免疫接种后能够在缺少内源性免疫球蛋白生产的条件下,生产完全的人抗体库。例如,已描述了在嵌合和种系突变体小鼠中纯合缺失抗体重链连接区 (J_H) 基因导致对内源性抗体生产的完整抑制。在这类种系突变体小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原刺激后生产人抗体。参见例如 Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*362:255-258(1993); Bruggermann 等, *Year in Immuno.* 7:33(1993); 和美国专利号 5,591,669; 5,589,369; 和 5,545,807。

[0189] 可选的,可以使用噬菌体展示技术 (McCafferty 等, *Nature*348:552-553(1990)),

从来自未免疫接种的供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因库中, 体外生产人抗体和抗体片段。根据该技术, 将抗体 V 结构域基因符合读框地克隆到丝状噬菌体 (如 M13 或 fd) 的主要或次要外壳多肽基因中, 并作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝, 基于抗体功能特性的选择也导致选择编码表现出这些特性的抗体的基因。因此, 噬菌体模拟了 B 细胞的一些特性。可以以多种方式实施噬菌体展示; 其综述参见例如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。V- 基因区段的若干来源可用于噬菌体展示。Clackson 等, *Nature* 352:624-628 (1991) 从源自经免疫接种的小鼠的脾脏的 V 基因的小随机组合文库中, 分离出抗恶唑酮抗体的多种阵列。可以构建来自未经免疫接种的人供体的 V 基因库, 并基本上按照 Marks 等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 或 Griffith 等, *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 描述的技术分离针对抗原 (包括自身抗原) 的多种阵列的抗体。还参见美国专利号 5, 565, 332 和 5, 573, 905。

[0190] 还可以通过体外活化的 B 细胞生成抗体 (参见美国专利 5, 567, 610 和 5, 229, 275)。

[0191] (v) 抗体片段

[0192] 在一些实施方案中, 抗体是抗体片段。已研发了多种用于生产抗体片段的技术。传统上, 这些片段是经由对完整抗体的蛋白水解消化得到的 (参见例如, Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical* 方法 24:107-117 (1992) 和 Brennan 等, *Science* 229:81 (1985))。然而, 现在可以通过重组宿主细胞直接生产这些片段。例如, 可以从如上所述的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可选的, 可以直接从大肠杆菌中回收 Fab'-SH 片段, 并化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根据另一种方法, 可以直接从重组宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。用于生产抗体片段的其他技术对本领域技术人员是显而易见的。在其他实施方案中, 选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 W093/16185; 美国专利号 5, 571, 894; 和美国专利号 5, 587, 458。抗体片段还可以是“线性抗体”, 例如美国专利 5, 641, 870 所述。这类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0193] 在一些实施方案中, 提供了本文所述的抗体的片段。在一些实施方案中, 抗体片段是抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗原结合片段选自 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、Fv 和双抗体组成的组。

[0194] (vi) 双特异性抗体

[0195] 在一些实施方案中, 抗体是双特异性抗体。双特异性抗体是具有对于至少 2 种不同的表位的结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可结合 2 种不同的表位。可选的, 双特异性抗体结合臂可以与结合白细胞上的触发分子的臂组合, 所述触发分子如 T 细胞受体分子 (例如 CD2 或 CD3), 或 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R), 如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16), 从而对细胞聚焦细胞防御机制。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段 (例如, F(ab')₂ 双特异性抗体) 制备。

[0196] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产方法是基于共表达 2 条免疫球蛋白重链-轻链对, 其中 2 条链具有不同的特异性 (Millstein 等, *Nature* 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机搭配, 这些杂交瘤 (四

价体瘤 (quadroma)) 生产潜在的 10 种不同抗体分子的混合物, 其中仅 1 种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤纯化正确的分子, 是非常麻烦的, 产率也低。类似的方法公开在 W093/08829 和 Traunecker 等, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) 中。

[0197] 根据不同的方法, 融合具有理想的结合特异性的抗体可变结构域 (抗体-抗原组合位点) 和免疫球蛋白恒定结构域序列。在一些实施方案中, 所述融合是与包含铰链、CH2 和 CH3 区的至少一部分的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。在一些实施方案中, 含有轻链结合必需的位点的第一重链恒定区 (CH1) 存在于至少一种融合体中。将编码免疫球蛋白重链融合体, 以及需要时, 免疫球蛋白轻链的 DNA, 插入到独立的表达载体中, 并共转染到合适的宿主生物中。当在构建中使用的不等比例的 3 种多肽链提供了最佳产率时, 这为调节实施方案中的 3 种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而, 当等比例的至少 2 种多肽链的表达获得高产率时, 或者当比例并非特别重要时, 可以将 2 条或全部 3 条多肽链的编码序列插入到 1 个表达载体中。

[0198] 在该方法的一些实施方案中, 双特异性抗体由在一臂中的具有第一结合特异性的杂合的免疫球蛋白重链, 和在另一臂中的杂合的免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 构成。发现该不对称结构协助从不需要的免疫球蛋白链的组合中分离理想的双特异性化合物, 因为仅一半的双特异性分子存在免疫球蛋白轻链, 提供了促进分离的方式。该方法公开在 W094/04690 中。生成双特异性抗体的其他细节参见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)。

[0199] 根据美国专利号 5, 731, 168 中描述的另一种方法, 可以改造在一对抗体分子之间的界面, 使从重组细胞培养物中回收的异二聚体百分比最大化。在一些实施方案中, 界面至少包括抗体恒定结构域的 C_H3 结构域的一部分。在该方法中, 用较大的侧链 (例如, 酪氨酸或色氨酸) 取代来自第一抗体分子的界面中的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链 (例如, 丙氨酸或苏氨酸) 取代大的氨基酸侧链, 在第二抗体分子的界面上生成与 (一个或多个) 大侧链相同或相似大小的补偿性“空洞”。这为增加异二聚体相比其他不需要的终产物 (如同二聚体) 的产率提供了机制。

[0200] 双特异性抗体包括交联的或“异源缀合的”抗体。例如, 异源缀合物中的抗体之一可以与抗生物素蛋白偶联, 另一个与生物素偶联。已经提出这类抗体例如将免疫系统细胞靶向至不想要的细胞 (美国专利号 4, 676, 980), 和用于治疗 HIV 感染 (W091/00360、W092/200373 和 EP03089)。可以使用任何方便的交联方法制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域普遍已知的, 公开在美国专利号 4, 676, 980 中, 还公开了多种其他的交联技术。

[0201] 文献中还描述了从抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如, 可以使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science* 229:81 (1985) 描述了这样的方法, 其中完整抗体被蛋白水解切割以生成 F(ab')₂ 片段。在存在二巯基化物络合剂亚砷酸钠的条件下, 还原这些片段, 以稳定邻位的二巯基化物, 阻止形成分子间二硫键。然后, 生成的 Fab' 片段被转化成硫代硝基苯甲酸盐 (thionitrobenzoate) (TNB) 衍生物。然后, 通过用巯基乙胺还原, 将 Fab'-TNB 衍生物中的一种再转化为 Fab'-巯基, 并与等摩尔量的其他 Fab'-TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。生产的双特异性抗体可用于作用于酶的选择性固定的活性剂。

[0202] 还描述了用于制备和从重组细胞培养物中直接分离双特异性抗体片段的多种技术。例如, 使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.* 148(5):1547-155

3(1992)。通过基因融合,连接来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与 2 个不同抗体的 Fab' 部分。在铰链区还原抗体同二聚体形成单体,并重新氧化形成抗体异二聚体。该方法还可用于生产抗体同二聚体。Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体”技术提供了用于制备双特异性抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域 (V_L) 相连的重链可变结构域 (V_H),所述接头太短以至不允许同一链上的 2 个结构域配对。因此,强迫 1 个片段的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段的互补的 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成 2 个抗原结合位点。还报道了另一种通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的对策。参见 Gruber 等, J. Immunol. 152:5368(1994)。

[0203] 考虑具有二价以上的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt 等, J. Immunol. 147 :60(1991)。

[0204] (vii) 多价抗体

[0205] 在一些实施方案中,抗体是多价抗体。多价抗体可以比二价抗体更快地被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或异化)。本文提供的抗体可以是具有 3 个或多个抗原结合位点(例如,四价抗体)的多价抗体(是除 IgM 类以外的),其可以通过重组表达编码抗体多肽链的核酸而方便的生产。多价抗体可包含二聚化结构域和 3 个或多个抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含 Fc 区或铰链区(或由之组成)。在该方案中,抗体将包含 Fc 区和 3 个或多个在 Fc 区氨基末端的抗原结合位点。本文中优选的多价抗体包含 3 个至约 8 个,但优选 4 个抗原结合位点(或由之组成)。多价抗体至少包含一条多肽链(并优选 2 条多肽链),其中(一条或多条)多肽链包含 2 个或更多个可变结构域。例如,(一条或多条)多肽链可包含 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$,其中 VD1 是第一可变结构域,VD2 是第二可变结构域,Fc 是 Fc 区中的 1 条多肽链,X1 和 X2 代表氨基酸或多肽,n 是 0 或 1。例如,(一条或多条)多肽链可包含: $VH-CH1-$ 柔性接头 $-VH-CH1-Fc$ 区链;或 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 区链。本文中的多价抗体优选还包含至少 2 条(并优选 4 条)轻链可变结构域多肽。本文中的多价抗体可例如包含从约 2 条至约 8 条轻链可变结构域多肽。本文考虑的轻链可变结构域多肽包含轻链可变结构域,和任选地还包含 CL 结构域。

[0206] 在一些实施方案中,抗体是多特异性抗体。多特异性抗体的例子包括但不限于:包含重链可变结构域 (V_H) 和轻链可变结构域 (V_L) 的抗体,其中 V_HV_L 单元具有多表位特异性;具有 2 个或多个 V_L 和 V_H 结构域的抗体,每个 V_HV_L 单元结合不同的表位;具有 2 个或多个单可变结构域的抗体,每个单可变结构域结合不同的表位;已经共价或非共价连接的全长抗体、抗体片段,如 Fab、Fv、dsFv、scFv、双抗体、双特异性双抗体、三价抗体、三功能抗体、抗体片段。在一些实施方案中,抗体具有多表位特异性;例如特异性结合位于相同或不同靶位上的 2 个或更多个不同表位的能力。在一些实施方案中,抗体是单特异性的;例如,仅结合 1 个表位的抗体。根据一个实施方案,多特异性抗体是以 $5\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $3\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $1\mu M$ 至 $0.001pM$ 、 $0.5\mu M$ 至 $0.001pM$,或 $0.1\mu M$ 至 $0.001pM$ 的亲和力结合每个表位的 IgG 抗体。

[0207] (viii) 其他的抗体修饰

[0208] 理想的是关于效应子功能修饰本文提供的抗体,从而例如增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可以通过在抗体的 Fc 区中导入一个或多个氨基酸替换实现的。可选的或额外的,可以在

Fc 区中导入（一个或多个）半胱氨酸残基，从而允许在该区形成链间二硫键。因而生成的同二聚体抗体可具有改善的内化能力和 / 或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B. J., *Immunol.* 148:2918-2922(1992)。还可以使用 Wolff 等, *Cancer Research* 53:2560-2565(1993) 所述的异双功能交联接头, 制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体。可选的, 具有双重 Fc 区的抗体可被改造, 并从而可具有增强的补体介导的裂解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230(1989)。

[0209] 为了增加抗体的血清半衰期, 可以如 US2006/0067930 所述在抗体中产生氨基酸改变, 其通过引用全文整合到本文中。

[0210] (B) 多肽变体和修饰

[0211] 本文所述的多肽, 包括抗体的（一种或多种）氨基酸序列修饰可用于纯化本文所述的多肽（例如, 抗体）的方法。

[0212] (i) 变体多肽

[0213] “多肽变体”意指这样的多肽, 优选活性多肽, 所述多肽如本文定义与多肽的全长天然序列、缺少信号肽的多肽序列、多肽的有或无信号肽的胞外结构域具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性。这类多肽变体包括例如这样的多肽, 其中在全长天然氨基酸序列的 N 或 C- 末端添加或缺失了一个或多个氨基酸残基。通常, TAT 多肽变体将与全长天然序列多肽序列、缺少信号肽的多肽序列、多肽的有或无信号肽的胞外结构域具有至少约 80% 氨基酸序列同一性, 可选的至少约 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 中任一氨基酸序列同一性。任选的, 相比天然的多肽序列, 变体多肽将具有不超过 1 个的保守氨基酸替换, 可选的, 相比天然的多肽序列, 不超过约 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个中任一保守氨基酸替换。

[0214] 变体多肽可以在 N 端或 C 端截短, 或者可缺少内部残基, 例如相比全长天然多肽时。某些变体多肽可缺少对理想的生物学活性不必需的氨基酸残基。可以通过多种常规技术中的任一种制备这些具有截短、缺失和插入的变体多肽。理想的变体多肽可以是化学合成的。另一种合适的技术涉及分离和通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增编码理想的变体多肽的核酸片段。在 PCR 中的 5' 和 3' 引物处应用定义核酸片段的理想的末端的寡核苷酸。优选的, 变体多肽与本文公开的天然多肽共享至少一种生物学和 / 或免疫学活性。

[0215] 氨基酸序列插入包括氨基和 / 或羧基末端的融合物, 长度范围从 1 个残基至含有上百个或更多个残基的多肽, 以及在序列内插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的例子包括具有 N- 末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的 N- 或 C- 末端与酶或多肽的融合体, 所述酶或多肽增加了抗体的血清半寿期。

[0216] 例如, 理想的是改善多肽的结合亲和力和 / 或其他生物学特性。通过向抗体核酸中导入恰当的核苷酸改变, 或通过肽合成, 制备多肽的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如在多肽的氨基酸序列中缺失和 / 或插入和 / 或替换残基。在最终构建体中实现删除、插入和替换的任意组合, 只要最终构建体具有理想的特征。氨基酸改变也可以改变多肽（例如, 抗体）的翻译后过程, 如改变糖基化位点的数量或位置。

[0217] 可以通过比较多肽序列与同源的已知多肽分子的序列并使高同源性区域中发生

的氨基酸序列改变的数量最小化,发现用于确定可以插入、替换或缺失哪个氨基酸残基而对理想活性没有负面影响的指导条例。

[0218] 用于鉴别多肽(例如,抗体)的某些残基或区是用于诱变的优选的位置的有效方法被称为“丙氨酸筛选诱变”,如 Cunningham 和 Wells, Science244:1081-1085(1989) 中所述。在本文中,鉴别了残基或靶残基的组(例如,带电残基,如 Arg、Asp、His、Lys 和 Glu),并通过中性或带负电的氨基酸(最优选丙氨酸或苯丙氨酸)取代,影响氨基酸与抗原的相互作用。然后,通过在,或对于取代位点导入另外的或其他的变体,细化那些对替换表现出功能敏感性的氨基酸位置。因此,尽管用于导入氨基酸序列变异的位点是预先确定的,突变的本质本身是不需要预先确定的。例如,为了分析在给定位点突变的表现,在靶密码子或区进行 ala 筛选或随机诱变,并筛选具有理想活性的表达的抗体变体。

[0219] 另一种变体类型是氨基酸替换变体。这些变体的抗体分子中具有至少一个氨基酸残基被不同的残基取代。替换诱变最感兴趣的位点包括超变区,但也考虑 FR 改变。下表 1 在“优选替换”的标题下显示了保守替换。如果这类替换导致生物学活性的改变,则可以导入更实质性的改变(在表 1 中命名为“示例性替换”)或如下文参照氨基酸类别时进一步所述,并筛选产物。

[0220] 表 1.

[0221]

原始残基	示例性替换	优选替换
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp, Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg

Met (M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe (F)	Trp ;Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr (T)	Val ;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe
Val (V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu

[0222] 通过选择这样的替换,实现对多肽生物学特性的实质性修饰,所述替换维持 (a) 替换区域中的多肽骨架结构,例如,作为片层或螺旋构象;(b) 分子在靶位点的电荷或疏水性;或(c) 侧链体积的效果显著不同。可以根据其侧链特性的相似性对氨基酸分组 (A. L. Lehninger, Biochemistry, 第2版,第73-75页,Worth Publishers, New York (1975)):

[0223] (1) 非极性 :Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

[0224] (2) 不带电的极性 :Gly (G)、Ser、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

[0225] (3) 酸性 :Asp (D)、Glu (E)

[0226] (4) 碱性 :Lys (K)、Arg (R)、His (H)

[0227] 可选的,可以基于共同的侧链特性,将天然存在的残基分组:

[0228] (1) 疏水性 :正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

[0229] (2) 中性亲水性 :Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

[0230] (3) 酸性 :Asp、Glu ;

[0231] (4) 碱性 :His、Lys、Arg ;

[0232] (5) 影响链取向的残基 :Gly、Pro ;

[0233] (6) 芳香族 :Trp、Tyr、Phe。

[0234] 非保守替换限定为将上述类型之一的成员交换为另一种类型。

[0235] 还可以替换不参与维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基,一般是用丝氨酸,以改善分子的氧化稳定性,并阻止异常交联。相反,可以向多肽添加(一个或多个)半胱氨酸键,以改善稳定性(特别的是当抗体是抗体片段,如Fv片段时)。

[0236] 特别优选的替换变体类型涉及替换亲代抗体(例如,人源化抗体)的一个或多个超变区残基。一般而言,所获得的选定用于进一步研发的(一种或多种)变体将具有相对于生成其的亲代抗体改善的生物学特性。用于生成这类替换变体的常规方法涉及使用噬菌体展示的亲代抗体成熟的。简而言之,突变若干超变区位点(例如,6-7个位点),以在每个位点生成所有的可能的氨基替换。如此生成的抗体变体以丝状噬菌体颗粒的单价形式展示,作为与包装在每个颗粒中的M13的基因III产物的融合物。然后,如本文公开的筛选经噬菌体展示的变体的生物学活性(例如,结合亲和力)。为了鉴别用于修饰的候选超变区位点,

可以实施丙氨酸扫描诱变,鉴别对抗原结合有显著贡献的超变区残基。可选的或额外的,有利的是分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴别抗体和靶之间的接触点。这类接触残基和临近的残基是根据本文所述技术进行替换的候选物。一旦生成这类变体,就将变体组进行本文所述的筛选,并可以选择在一个或多个相关测定法中具有优秀特性的抗体用于进一步研发。

[0237] 多肽的另一种类型的氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化模式。多肽可包含非氨基酸部分。例如,多肽可以是糖基化的。这类糖基化可以在宿主细胞或宿主生物表达多肽的过程中天然发生,或者可以是由人为干预产生的故意的修饰。改变意指删除多肽中可见的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加多肽中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0238] 多肽糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接的指碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸,是用于酶促连接碳水化合物部分和天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中存在这些三肽序列之一产生了潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指连接糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸,最常见是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[0239] 通过改变氨基酸序列使其含有上述三肽序列中的一种或多种,方便地实现向多肽添加糖基化位点(用于N-连接的糖基化位点)。还可以通过对原始抗体的序列添加或替换一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基进行改变(用于O-连接的糖基化位点)。

[0240] 可以化学地、或酶促地、或通过突变替换编码作为糖基化靶的氨基酸残基的密码子,实现去除存在于多肽上的碳水化合物部分。可以通过使用多种内切和外切糖苷酶,实现酶促切割多肽上的碳水化合物部分。

[0241] 其他修饰包括分别将谷氨酰胺和天冬酰胺残基脱酰胺为相应的谷氨酰胺和天冬酰胺残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸和苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化,N-末端胺的乙酰化,和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0242] (ii) 嵌合多肽

[0243] 可以以形成包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的多肽的嵌合分子的方式修饰本文描述的多肽。在一些实施方案中,嵌合分子包含多肽与标签多肽的融合物,所述标签多肽提供了抗标签抗体可以选择性结合的表位。表位标签一般位于多肽的氨基或羧基末端。可以使用针对标签多肽的抗体检测多肽的这类经表位标记的形式存在。此外,提供表位标签使多肽能够通过亲和纯化而方便的纯化,所述亲和纯化使用抗标签抗体或另一种类型的结合表位标签的亲和基质。

[0244] 在可选的实施方案中,嵌合分子可包含多肽与免疫球蛋白或与免疫球蛋白的特定区的融合物。嵌合分子的二价形式被称为“免疫粘附素”。

[0245] 如本文中使用的,术语“免疫粘附素”表示组合了异源多肽的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能的抗体样分子。在结构上,免疫粘附素包含具有理想的结合特异性的、除了抗体的抗原识别和结合位点以外的(即,是“异源的”)氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是连续的氨基酸序列,至少包含受体或配体的结合位点。免疫粘附素的免疫球蛋白恒定结构域序列可以获得自任何免疫球蛋白,如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD

或 IgM。

[0246] Ig 融合体优选包括用多肽的可溶的形式（删除或失活了跨膜结构域）替换 Ig 分子内的至少一个可变区。在特别优选的实施方案中，免疫球蛋白融合体包括 IgG1 分子的铰链、CH₂ 和 CH₃，或铰链、CH₁、CH₂ 和 CH₃ 区。

[0247] (iii) 多肽缀合物

[0248] 用于多肽制剂中的多肽可以与细胞毒性剂缀合，如化疗剂、生长抑制剂、毒素（例如，细菌、真菌、植物或动物源的酶促活性毒素，或其片段）或放射性同位素（即，放射性缀合物）。

[0249] 可以使用用于生成这类缀合物的化疗剂。此外，可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合的活性片段、内毒素 A 链（来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)）、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、塑莲根毒素 A 链、 α -帚曲霉素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白，石竹素蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、石碱草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、白树毒素、mitogellin、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素和 tricothecene。可利用多种放射性核苷酸生产放射缀合的多肽。例子包括 ²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re。使用多种双功能蛋白质偶联剂，如 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫基)丙酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物（如二亚胺代己二酸二甲酯 HCL）、活性酯（如二琥珀酰亚胺辛二酸酯）、醛类（如戊二醛）、双叠氮化合物（如双（对叠氮苯甲酰）己二胺）、双重氮衍生物（如双-（对重氮苯甲酰）-乙二胺）、二异氰酸盐（如 tolylene2,6-二异氰酸）和双活性氟化合物（如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）制备多肽和细胞毒性剂的缀合物。例如，可以如 Vitetta 等，*Science*238:1098 (1987) 所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14-标记的 1-异硫氰基苯甲基 3-甲基二乙烯三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是示例性的用于缀合放射性核苷酸与多肽的螯合剂。

[0250] 本文还考虑了多肽与一种或多种小分子毒素（如加利车霉素、美登木素生物碱 (maytansinoid)、trichothene 和 CC1065) 以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物的缀合物。

[0251] 美登木素生物碱是有丝分裂抑制剂，其通过抑制微管蛋白聚合发挥作用。美登素是从东非灌木齿叶美登木 (*Maytenus serrata*) 中首次分离的。之后发现某些微生物也生产美登木素生物碱，如美登醇和 C-3 美登醇酯。还考虑合成的美登醇及其衍生物和类似物。存在许多本领域已知的用于制备多肽-美登木素生物碱缀合物的连接基团，包括例如在美国专利号 5,208,020 中公开的。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定型基团、光不稳定型基团、肽酶不稳定型基团，或酯酶不稳定型基团，如上述专利中公开的，优选二硫化物和硫醚基团。

[0252] 接头可以在多个位置与美登木素生物碱分子连接，取决于连接的类型。例如，可以通过使用常规的偶联技术，通过与羟基反应形成酯键。反应可以发生在具有羟基的 C-3 位置、用羟甲基修饰的 C-14 位置、用羟基修饰的 C-15 位置和具有羟基的 C-20 位置。在优选的实施方案中，在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位成键。

[0253] 另一种目标缀合物包含与一个或多个加利车霉素分子缀合的多肽。抗生素的加利车霉素家族能够在亚皮摩尔浓度下产生双链 DNA 断裂。关于制备加利车霉素家族的缀

合物,参见例如美国专利号 5,712,374。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于: γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I 。抗体可以缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA,其是抗叶酸剂。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点,且都不易于越过细胞膜。因此,这些活性剂通过多肽(例如,抗体)介导的内化作用的细胞摄入,极大地增强了它们的细胞毒性效应。

[0254] 其他可与本文所述的多肽缀合的抗肿瘤剂包括 BCNU、链脲霉素、长春新碱和 5-氟尿嘧啶,被统称为 LL-E33288 复合物的活性剂的家族,以及埃斯波霉素。

[0255] 在一些实施方案中,多肽可以是在多肽和具有核酸裂解活性的化合物(例如,核酶或 DNA 内切核酸酶,如脱氧核糖核酸酶;DNA 酶)之间的缀合物。

[0256] 在另一个实施方案中,多肽(例如,抗体)可以与“受体”(如链霉亲和素)缀合用于肿瘤预靶向,其中将多肽受体缀合物施用给患者,随后使用清除剂从循环中去除未结合的缀合物,然后施用与细胞毒性剂(例如,放射性核苷酸)缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0257] 在一些实施方案中,多肽可以与前药活化酶缀合,所述酶将前药(例如,肽类化疗剂)转化为活性抗癌药。免疫缀合物的酶组分包括任何能够作用于前药,使其转化为更高活性的细胞毒性形式的酶。

[0258] 有用的酶包括但不限于:可用于将含有磷酸盐的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶;可用于将含有硫酸盐的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;可用于将无毒的 5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物,5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可用于将含有肽的前药转化为游离药物的蛋白酶,如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L);可用于转化含有 D-氨基酸取代基的前药的 D-丙氨酰羧肽酶;可用于将糖基化的前药转化为游离药物的碳水化合物切割酶,如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可用于将用 β -内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 β -内酰胺酶;和可分别用于将用苯氧乙酰基或苯乙酰基在氨基氮处衍生的药物转化为游离药物的青霉素酰胺酶,如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。可选的,可以使用具有酶促活性的抗体,在本领域也被称为“抗体酶(abzyme)”,将前药转化为游离的活性药物。

[0259] (iv) 其他

[0260] 多肽的另一种类型的共价修饰包含连接多肽与多种非蛋白质类聚合物之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可以将多肽包埋在微胶囊中,所述微胶囊是通过例如凝聚技术或通过界面聚合(分别例如,羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中,或在粗乳液中制备的。这类技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 18 版, Gennaro, A. R., 编, (1990) 中。

[0261] IV. 获得用于制剂和方法中的多肽

[0262] 可以使用本领域普遍已知的方法获得用于本文所述方法中的多肽,包括重组方法。下列章节提供了对这些方法的指导。

[0263] (A) 多核苷酸

[0264] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换的使用,指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括 DNA 和 RNA。

[0265] 可以从任何来源获得编码多肽的多核苷酸,包括但不限于:从认为具有多肽 mRNA 并以可检测的水平表达所述 mRNA 的组织制备的 cDNA 文库。因此,可以从来自人组织制备的 cDNA 文库中便利的获得编码多肽的多核苷酸。还可以从基因组文库或者通过已知的合成方法(例如,自动化的核酸合成)获得多肽编码基因。

[0266] 例如,多核苷酸可以编码整个免疫球蛋白分子链,如轻链或重链。完整的重链不仅包括重链可变区(V_H),还包括重链恒定区(C_H),所述重链恒定区通常包含 3 个恒定结构域: C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} ;和“铰链”区。在一些情况下,存在恒定区是理想的。

[0267] 可以由多核苷酸编码的其他多肽包括结合抗原的抗体片段,如单结构域抗体(“dAb”)、Fv、scFv、Fab' 和 $F(ab')_2$ 和“微抗体(minibody)”。微抗体(通常)是二价的抗体片段,从中切除了 C_{H1} 和 C_k 或 C_L 结构域。由于微抗体小于常规抗体,因此,其应该在临床/诊断用途中实现更好的组织渗透性,但由于二价,其应该保持比单价抗体片段(如 dAb)更高的结合亲和力。因此,除非上下文另外指出,否则本文使用的术语“抗体”不仅涵盖完整的抗体分子,还涵盖上述类型的结合抗原的抗体片段。优选地,存在于编码的多肽中的每个框架区将包含相对于相应的人受体框架的至少一个氨基酸替换。因此,例如,框架区可包含相对于受体框架区的共计 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸替换。

[0268] 适当地,本文所述的多核苷酸可以是分离的和/或纯化的。在一些实施方案中,多核苷酸是分离的多核苷酸。

[0269] 术语“分离的多核苷酸”意指分子是从其通常的或天然的环境中移出的或分离的,或者生产所述分子的方式使其不存在于其通常的或天然的环境中。在一些实施方案中,多核苷酸是纯化的多核苷酸。术语“纯化的”意指已经去除了至少一些污染分子或物质。

[0270] 适当地,多核苷酸是基本纯化的,使相关的多核苷酸构成了组合物中存在的主要(即,最高丰度的)多核苷酸。

[0271] (B) 表达多核苷酸

[0272] 下列说明主要涉及通过培养用含有编码多肽的多核苷酸的载体转化或转染的细胞生产多肽。当然,也考虑本领域普遍已知可用于制备多肽的备选方法。例如,可以通过使用固相技术的直接肽合成(参见例如,Stewart 等, *Solid-Phase Peptide Synthesis* W. H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154(1963)), 生产恰当的氨基酸序列或其部分。可以使用手工技术或通过自动化,实施体外蛋白质合成。可以使用例如 Applied Biosystems 肽合成仪(Foster City, Calif.) 和生产商的说明,实现自动化合成。多肽的多个部分可以单独化学合成并使用化学或酶促方法组合以生产理想的多肽。

[0273] 将本文所述的多核苷酸插入到(一个或多个)表达载体中,用于生产多肽。术语“控制序列”指在特定的宿主生物中,表达有效连接的编码序列所必需的 DNA 序列。控制序列包括但不限于:启动子(例如,天然相关的或异源启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。

[0274] 当多核苷酸处于与另一种多核苷酸序列的功能性关系之中时,所述多核苷酸是“有效连接的”。例如,前序列或分泌先导序列的核酸是与多肽的核酸有效连接的如果其表达为参与多肽分泌的前蛋白;启动子或增强子是与编码序列有效连接的如果其影响序列的转录;或者核糖体结合位点是与编码序列有效连接的如果其位置协助翻译。一般而言,“有

效连接的”意指连接的核酸序列是连续的,而在分泌先导序列的情况下,连接的核酸序列是连续的,并位于阅读相中。然而,增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点连接实现的。如果不存在这类位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸适体或接头。

[0275] 对于抗体,轻链和重链可以克隆到相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的核酸片段是与(一个或多个)表达载体中的控制序列有效连接的,所述控制序列确保免疫球蛋白多肽的表达。

[0276] 可以通过普遍已知的方法,将含有多核苷酸序列(例如,可变重链和/或可变轻链编码序列,和任选的表达控制序列)的载体转移到宿主细胞中,所述方法取决于细胞宿主的类型而不同。例如,氯化钙转染是常用于原核细胞的,而磷酸钙处理、电穿孔、脂质体转染、生物微粒轰击或基于病毒的转染也可用于其他的细胞宿主(一般参见 Sambrook 等, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 第 2 版, 1989)。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用凝聚胺 (polybrene)、原生质体融合、脂质体、电穿孔和显微注射。对于生产转基因动物,可以将转基因显微注射到受精卵中,或者可以掺入到胚胎干细胞的基因组中,并将这类细胞的核转移到去核卵细胞中。

[0277] (C) 载体

[0278] 术语“载体”包括表达载体、转化载体和穿梭载体。

[0279] 术语“表达载体”意指能够在体内或体外表达的构建体。

[0280] 术语“转化载体”意指能够从一个对象转移到另一个对象的构建体,所述对象可以是相同物种,或者可以是不同物种。如果构建体能够从一种物种转移到另一物种中,如从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 质粒转移到细菌(如芽孢杆菌属细菌)中,则转化载体有时也被称为“穿梭载体”。构建体甚至能够从大肠杆菌质粒转移到农杆菌 (*Agrobacterium*),再到植物中。

[0281] 可以将载体转化到如下所述的提供多肽的表达的合适的宿主细胞中。多种载体是可公开获得的。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种方法将合适的核酸序列插入到载体中。一般而言,使用本领域已知的技术,将 DNA 插入到(一个或多个)恰当的限制性内切核酸酶位点中。构建含有一种或多种上述组分的合适载体应用了本领域技术人员已知的标准连接技术。

[0282] 载体可以是例如质粒、病毒或噬菌体载体,其提供了复制起点,任选用于表达所述多核苷酸的启动子和任选所述启动子的调控子。载体可含有本领域普遍已知的一个或多个可选择的标志物基因。

[0283] 这些表达载体在宿主生物中通常是可复制的,作为附加体或作为宿主染色体 DNA 的整合部分。

[0284] (D) 宿主细胞

[0285] 宿主细胞可以是例如细菌、酵母或其他真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。

[0286] 被遗传改造的转基因多细胞宿主生物可用于生产多肽。生物可以是例如转基因哺乳动物(例如,转基因山羊或小鼠品系)。

[0287] 合适的原核生物包括但不限于真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*),如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是可公众获得的,如

大肠杆菌 K12 菌株 MM294(ATCC31, 446) ;大肠杆菌 X1776(ATCC31, 537) ;大肠杆菌菌株 W3110(ATCC27, 325) 和 K5772(ATCC53, 635)。其他合适的原核宿主细胞包括肠杆菌科,如埃希氏菌 (*Escherichia*),如大肠杆菌、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*),如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*),如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*) 和志贺氏菌属 (*Shigella*),以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如,地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*),如绿脓假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子是示例性的,而非限制性的。菌株 W3110 是一个特别优选的宿主或亲代宿主,因为它是用于重组多核苷酸产物发酵的通常的宿主菌株。优选地,宿主细胞分泌最少量的蛋白水解酶。例如,可以修饰菌株 W3110,以在编码宿主内源性多肽的基因中产生遗传突变,这类宿主的例子包括大肠杆菌 W3110 菌株 1A2,其具有完整的基因型 *tonA* ;大肠杆菌 W3110 菌株 9E4,其具有完整的基因型 *tonA ptr3* ;大肠杆菌 W3110 菌株 27C7(ATCC55, 244),其具有完整的基因型 *tonA ptr3phoA E15(argF-lac) 169degP ompT kan'* ;大肠杆菌 W3110 菌株 37D6,其具有完整的基因型 *tonA ptr3phoA E15(argF-lac) 169degP ompT rbs7ilvG kan'* ;大肠杆菌 W3110 菌株 40B4,其是具有非卡那霉素抗性 *degP* 缺失突变的菌株 37D6 ;和具有突变的周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。可选的,体外克隆方法,例如 PCR 或其他核酸聚合酶反应是合适的。

[0288] 在这些原核宿主中,可以制备表达载体,所述表达载体通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。此外,可以存在任意数量的多种普遍已知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统,或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常控制表达,任选地具有操纵子序列,和具有核糖体结合位点序列等,用于起始和完成转录和翻译。

[0289] 可使用真核微生物表达。真核微生物,如丝状真菌或酵母是多肽编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是常用的低等真核宿主微生物。其他的包括粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) ;克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) (MW98-8C、CBS683、CBS4574)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis* (ATCC12, 424))、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus* (ATCC16, 045))、威克克鲁维酵母 (*K. wickeramii* (ATCC24, 178))、*K. waltii* (ATCC56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum* (ATCC36, 906))、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*) ;耶氏酵母属 (*Yarrowia* (EP402, 226)) ;巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) ;假丝酵母属 (*Candida*) ;里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) ;粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) ;许旺酵母属 (*Schwanniomyces*),如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ;和丝状真菌,如脉孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolyposcladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主,如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。甲基营养缺陷型酵母在本文中是合适的,包括但不限于:能够在甲醇中生长的酵母,选自汉森酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属、克勒克酵母属 (*Kloeckera*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*) 和红酵母属 (*Rhodotorula*) 组成的属。酵母属是优选的酵母宿主,其具有合适的载体,所述载体具有理想的表达控制序列(例如启动

子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C 和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。

[0290] 除微生物以外,也可以使用哺乳动物组织细胞培养物表达和生产本文所述的多肽,且在一些情况下是优选的(参见 Winnacker, From Genes to Clones VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987))。对于一些实施方案,真核细胞是优选的,因为本领域中已经研发了多种能够分泌异源多肽(例如,整个免疫球蛋白)的合适的宿主细胞系,包括 CHO 细胞系、多种 Cos 细胞系、HeLa 细胞,优选骨髓瘤细胞系或经转化的 B 细胞或杂交瘤。在一些实施方案中,哺乳动物宿主细胞是 CHO 细胞。

[0291] 在一些实施方案中,宿主细胞是脊椎动物宿主细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 (COS-7, ATCC CRL1651) 转化的猴肾 CV1 细胞系;人胎肾细胞系(293 或亚克隆用于在悬浮培养物中生长的 293 细胞);胎鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10);中华仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO 或 CHO-DP-12 细胞系);小鼠支持细胞;猴肾细胞(CV1 ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL34);布法罗大鼠肝细胞(BRL3A, ATCC CRL1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL75);人肝细胞(Hep G2, HB8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562, ATCC CCL51);TRI 细胞;MRC5 细胞;FS4 细胞;和人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

[0292] V. 制剂和制备制剂的方法

[0293] 本文还提供了包含通过本文所述方法纯化的多肽(例如,抗体)的制剂,和制备制剂的方法。例如,纯化的多肽可以与可药用的运载体组合。

[0294] 在一些实施方案中,通过混合具有理想纯度的多肽与任意的可药用的运载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编著(1980)), 可以制备多肽制剂用于以冻干制剂或含水溶液的形式储藏。

[0295] 本文使用的“运载体”包括可药用的运载体、赋形剂或稳定剂,其对在应用的剂量和浓度下暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理上可接受的运载体是含水的 pH 缓冲溶液。

[0296] 可接受的运载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受体是无毒的,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如,十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;雷锁酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖类,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐的反离子,如钠;金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物)和 / 或非离子型表面活性剂,如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

[0297] 在一些实施方案中,多肽制剂中的多肽保持了功能性活性。

[0298] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。可以通过无菌滤膜过滤方便的实现。

[0299] 本文中的制剂还可含有对治疗的特定适应症所必需的一种以上的活性化合物,优

选地是具有并不不利地影响彼此的互补活性的那些化合物。例如,除多肽外,理想的是在一个制剂内包括额外的多肽(例如,抗体)。可选的或额外的,组合物还可包含化疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心血管保护剂。这类分子合适的以对预期目的有效的量的组合存在。

[0300] V. 制品

[0301] 由本文所述的方法纯化的多肽和/或包含通过本文所述方法纯化的多肽的制剂可以包含在制品中。制品可包含含有多肽和/或多肽制剂的容器。优选地,制品包含:(a) 容器,所述容器在容器中包含含有本文所述的多肽或多肽制剂的组合物;和(b) 具有用于向对象施用制剂的说明的包装说明书。

[0302] 制品包含容器,和位于容器上或与容器相连的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以用多种材料制成,如玻璃或塑料。容器持有或含有制剂,并可具有无菌的进口(例如,容器可以是静脉溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是多肽。标签或包装说明书说明了组合物在对象中的用途,对所提供的多肽和任何其他药物的给药剂量和时间间隔给予具体指导。制品还可以包括其他从商业和用户角度有利的材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。在一些实施方案中,容器是注射器。在一些实施方案中,注射器还包含在注射装置中。在一些实施方案中,注射装置是自动注射器。

[0303] “包装说明书”用于指习惯性地包含在治疗性产物的商业包装中的说明书,含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症候,与包装产物组合的其他治疗性产物的信息,和/或对使用这类治疗性产物的警告。

[0304] VI. 示例性实施方案

[0305] 在一些实施方案中,本发明提供了用于从包含多肽和一种或多种污染物的组合物中纯化多肽的方法,所述方法包括 a) 以超过层析材料对于多肽的动态结合容量的量将组合物装载到层析材料上, b) 在其中一种或多种污染物仍然与层析材料结合的条件下,从层析材料上洗脱多肽,和 c) 混合包含步骤 a) 和 b) 的层析流出液中的多肽的级分。

[0306] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是抗体或免疫粘附素。

[0307] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是免疫粘附素。

[0308] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是抗体。

[0309] 在上述实施方案的其他实施方案中,抗体是单克隆抗体。

[0310] 在上述实施方案的另一实施方案中,单克隆抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0311] 在上述实施方案的其他实施方案中,单克隆抗体是 IgG 单克隆抗体。

[0312] 在上述实施方案的其他实施方案中,抗体是抗原结合片段。

[0313] 在上述实施方案的另一实施方案中,抗原结合片段选自 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、di-scFv、bi-scFv、串联(di, tri)-scFv、Fv、sdAb、三功能抗体、BiTE、双抗体或三价抗体。

[0314] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽选自酶、激素、融合蛋白、含有 Fc 的蛋白质、免疫缀合物、细胞因子或白介素。

[0315] 在上述实施方案的其他实施方案中,至少一种污染物是中华仓鼠卵巢蛋白

(CHOP)、宿主细胞蛋白 (HCP)、泄露的蛋白 A、羧肽酶 B、核酸、DNA、产物变体、聚集的蛋白质、细胞培养基组分、庆大霉素、多肽片段、内毒素和病毒性污染物中的任何一种或多种。

[0316] 在上述实施方案的其他实施方案中,层析材料选自混合模式材料、阴离子交换材料、疏水性相互作用材料和亲和材料。

[0317] 在上述实施方案的其他实施方案中,装载密度在约 50g/L 至约 2000g/L 之间。

[0318] 在上述实施方案的另一实施方案中,装载密度在约 200g/L 至约 1000g/L 之间。

[0319] 在上述实施方案的其他实施方案中,以约层析材料对于一种或多种污染物的动态结合容量将组合物装载到层析材料上。

[0320] 在上述实施方案的其他实施方案中,以层析材料对于多肽的动态结合容量的 20 倍将组合物装载到层析材料上。

[0321] 在上述实施方案的其他实施方案中,层析材料的多肽分配系数大于 30。

[0322] 在上述实施方案的仍然其他的实施方案中,层析材料的多肽分配系数大于 100。

[0323] 在上述实施方案的其他实施方案中,方法还包括使用装载缓冲液和洗脱缓冲液。

[0324] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的电导率的电导率。

[0325] 在上述实施方案的其他实施方案中,装载缓冲液具有约 4.0mS 至约 7.0mS 的电导率。

[0326] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有约 0.0mS 至约 7.0mS 的电导率。

[0327] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的电导率的电导率。

[0328] 在上述实施方案的其他实施方案中,装载缓冲液具有约 4.0mS 至约 7.0mS 的电导率。

[0329] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有约 5.5mS 至约 17.0mS 的电导率。

[0330] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液的电导率在约 10 倍柱体积 (CV) 中以从约 5.5mS 至约 1.0mS 的梯度减少。

[0331] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液的电导率在约 15CV 中以从约 5.5mS 至约 1.0mS 的梯度减少。

[0332] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液的电导率在约 5CV 中以从约 10.0mS 至约 1.0mS 的梯度减少。

[0333] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液的电导率在约 10 倍 CV 中以从约 10.9mS 至约 1.0mS 的梯度减少。

[0334] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有小于装载缓冲液的 pH 的 pH。

[0335] 在上述实施方案的其他实施方案中,装载缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

[0336] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

[0337] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有大于装载缓冲液的 pH 的 pH。

[0338] 在上述实施方案的其他实施方案中,装载缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

[0339] 在上述实施方案的其他实施方案中,洗脱缓冲液具有约 4 至约 9 的 pH。

[0340] 在上述实施方案的其他实施方案中,组合物是来自亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析和疏水性相互作用层析的洗出液。

[0341] 在上述实施方案的其他实施方案中,亲和层析是蛋白 A 层析。

[0342] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是进一步纯化的。

[0343] 在上述实施方案的仍然其他的实施方案中,多肽是通过病毒过滤进一步纯化的。

[0344] 在上述实施方案的仍然其他的实施方案中,多肽是通过亲和层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、混合模式层析或疏水性相互作用层析中的一种或多种进一步纯化的。

[0345] 在上述实施方案的其他实施方案中,多肽是进一步浓缩的。

[0346] 在上述实施方案的仍然其他的实施方案中,多肽是通过超滤、渗滤或超滤和渗滤的组合而浓缩的。

[0347] 在上述实施方案的其他实施方案中,方法还包括组合多肽与可药用的运载体。

[0348] 本说明书中公开的所有特征都可以以任何组合方式组合。本说明书中公开的每个特征都可以被用于相同、等价或相似目的的备选特征取代。因此,除非另外明确指出,否则所公开的每个特征都只是一系列等价或相似特征的例子。

[0349] 下列非限制性的例子示例了本发明的其他细节。说明书中所有参考文献的公开内容都通过引用明确整合到本文中。

实施例

[0350] 下列实施例仅用于纯粹的示例本发明,不应被视为以任何方式限制本发明。下列实施例和详细的说明书仅供示例,而不作为限制。

[0351] 材料和方法

[0352] 除非实施例中另外指出,否则所有实施例的材料和方法都如下所示实施。

[0353] MAb 原料

[0354] 所有实施例的MAb原料都选自 Genentech (South San Francisco, CA, U. S. A.) 的工业的、试验性的或小规模的细胞培养批次。在细胞培养发酵期后,分离细胞,并通过蛋白 A 层析纯化澄清的液体。蛋白 A 混合物用于研究杂质清除的机制。表 2 显示了用于实施例中的每个 mAb 的原料特征。

[0355] 表 2. MAb 原料的特征

[0356]

MAb	MAb 标识	pI
------------	---------------	-----------

[0357]

MAb 1	Rituxan[®]	8.8-9.3
MAb 2	抗 oxLDL	9.3
MAb 3	抗 IFNα	8.7
MAb 4	Xolair[®]	7.6
MAb 5	抗 FGFR3	8.1

[0358] MAb 定量

[0359] 使用 UV- 可见光分光光度计 (8453 型 G1103A ;Agilent Technologies ;Santa Clara, CA, U. S. A.) 或 NanoDrop1000 型 ND-1000 (Thermo Fisher Scientific ;Waltham, MA, U. S. A.), 通过 280 和 320nm 处的吸光值, 确定抗体浓度。除抗体以外的其它物质 (即, 杂质) 浓度太低, 以至于对 UV 吸光值没有可见的效果。根据需要, 用恰当的非干扰稀释剂稀释样品至 0.1 - 1.0 吸光值单位的范围内。对样品制备和 UV 测量实施 2 次, 记录平均值。MAb 的吸收系数是在 1.42 至 1.645/mg · ml · cm 的范围内。

[0360] CHO 宿主细胞蛋白质 (CHOP) 定量

[0361] 使用 ELISA 定量被称为 CHOP 的宿主细胞蛋白质的水平。将抗 CHOP 抗体固定在微滴度板的孔中。在孔中孵育含有 CHOP 的样品的稀释液、标准和对照, 再与缀合了辣根过氧化物 (HRP) 的抗 CHOP 抗体孵育。用对苯二胺检测 HRP 酶促活性, 通过在微滴度板读板器中读取 490nm 的吸光值定量 CHOP。基于夹心 ELISA 的原理, 过氧化物酶的浓度对应于 CHOP 浓度。ELISA 的测定范围通常是 5 - 320ng/ml, 测定内变异 <10%。以 ng/ml 为单位报告 CHOP 值。可选的, 用 CHOP 值除以 MAb 浓度, 并用 ppm (百万分之一 ; 例如, ng CHOP/mg MAb) 报告结果。CHOP ELISA 可用于定量样品中的总 CHOP 水平, 但没有定量单个蛋白质的浓度。

[0362] 层析操作条件

[0363] Capto Adhere 和 Capto MMC Capto Adhere 树脂是从 GE Healthcare (Uppsala, Sweden) 获得的。强阳离子交换树脂 (Poros XS 和 Poros50HS) 是从 Applied Biosystems (Address) 获得的。所有的实验室层析实验都是使用来自 GE Healthcare (Uppsala, Sweden) 的 AKTA FPLC 层析系统执行的, 该系统利用 UNICORN 软件。实验室柱的直径为 0.66cm, 高度为 10 - 20cm。在装载前, 将柱子平衡至指明的 pH 和电导率操作条件。然后, 将蛋白 A 混合物装载到柱子上, 再用所需的洗脱缓冲液洗脱下结合的蛋白质。收集在装载, 过载和洗脱阶段过程中的流通液或洗出液级分, 然后分析杂质。MAb 的装载密度在每升树脂 100 至 1000g 之间改变。

[0364] 层析混合物分析

[0365] 收集在装载、过载和洗脱阶段过程中的流通混合物级分 (每者 1 倍柱体积), 分析 MAb 浓度、CHOP 浓度、聚集物、泄露的蛋白 A、CHO DNA 和产率。生成累积图作为洗脱混合级分的函数。使用等式 1 获得累积产率。

[0366] 其中, 对于级分 i, C_i 是 MAb 浓度 (mg/ml), V_i 是级分的体积 (ml), M_p 是装载的蛋白质的质量 (mg)。

$$\text{累积\%产率} = \frac{\sum_{i=1}^y C_i * V_i}{M_p} * 100 \quad \text{等式 1}$$

[0368] 大小排阻层析

[0369] 通过高性能大小排阻层析测定法, 确定单克隆抗体的大小异质性。在环境温度在 1200 系列 HPLC 仪器 (Agilent Technologies) 上运行由 Tosoh Bioscience (Tokyo, Japan) 生产的 TSK G3000SWXL SEC 柱 (直径 = 7.8mm, 高度 = 300mm ; 零件号 08541), 用于确定 MAb 单体对于收集的样品的相对水平。柱的操作流速为 0.3mL/min, 使用 200mM 磷酸钾、250mM 氯

化钾 pH6.2 移动相。每个样品注射 20 μ g 抗体。使用 280nm 处的 UV 吸光值监控单体、LMW 蛋白质和 HMW 蛋白质的分离。使用 ChemStation 软件 (Agilent Technologies) 手工分析单体、LMW 蛋白质和 HMW 蛋白质的百分比。

[0370] CHO DNA 定量

[0371] 使用实时 PCR (TaqMan PCR) 定量产物样品中的 CHO DNA。首先使用 Qiagen's Virus Biorobot 试剂盒, 提取样品和对照中的 DNA。在 96 孔板中, 用 ABI 的序列检测系统, 用 PCR 引物和探针对提取的样品、对照和标准 DNA 进行 TaqMan 实时聚合酶链式反应 (PCR)。用中国地鼠 (*Cricetulus griseus*) 基因组中的 110 碱基对的重复 DNA 序列区段定义引物。用荧光报告染料在 5' 端和淬灭染料在 3' 端标记引物。当探针完整时, 报告子的发射光谱被淬灭剂抑制。聚合酶的 5' 核酸酶活性水解探针, 并释放出报告子, 导致荧光发射增加。序列检测仪对扩增的产物的定量与 DNA 扩增过程中连续测量到的荧光发射光的增加成比例。DNA 扩增超过阈值时的循环数 (CT) 被计算为标准曲线。生成范围在 1pg/mL-10,000pg/mL 之间的标准曲线, 用于定量样品中的 DNA。

[0372] 泄露的蛋白 A 定量

[0373] 通过夹心蛋白质-A ELISA, 确定蛋白 A 混合物中的泄露的蛋白 A 的水平。将鸡抗葡萄球菌蛋白 A 抗体固定在微滴度板的孔中。样品处理程序包括样品稀释和然后使用微波辅助加热解离蛋白 A/IgG 复合物, 作为在夹心 ELISA 上运行样品之前的预处理步骤。如果样品中存在蛋白 A, 则将与包被的抗体结合。使用缀合了辣根过氧化物酶的抗蛋白 A 抗体检测结合的蛋白 A。用产生比色信号的 2 组分的 TMB 底物溶液定量辣根过氧化物酶的酶促活性。

[0374] 原料条件作用

[0375] 用于本研究实验的原料是新鲜的, 或者是从冷藏 (2-8 $^{\circ}$ C 或 -70 $^{\circ}$ C) 中移出的, 并允许其平衡至室温。之后, 必要时, 用滴定剂 (1.5M Tris 碱或 1M 醋酸) 或稀释剂 (纯水、5M 氯化钠, 或 5M 醋酸钠) 调节 pH 和 / 或电导率。使用 Millipak20 (Millipore)、AcroPakTM20 (Pall Corporation) 或真空过滤器 (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, U. S. A.), 对全部原料进行 0.2 μ m 过滤。

[0376] 高通量筛选

[0377] 使用 Tecan Freedom Evo200 机器人 (Tecan US, Research Triangle Park, NC) 进行液相和树脂处理。使用 96 孔过滤板 (Seahorse800 μ L 聚丙烯 0.45 μ m 短滴滤板, E&K Scientific EK-2223) 孵育树脂和蛋白质与缓冲液。在用蛋白质溶液孵育树脂之后, 在 1200x g 离心滤板 3 分钟, 分离溶液和树脂。对于每个阶段, 将 300mL 溶液与 50mL 树脂接触, 获得 6:1 的相体积比。将每个孔平衡至恰当的 pH 和醋酸钠浓度。pH 范围是从 5.00 至 7.5, 以 0.5pH 单位的间隔 (使用醋酸盐缓冲 pH5.00 至 5.5 的条件, 使用 MES 缓冲 pH6.00 至 6.5 的条件, 使用 MOPS 缓冲 7.00 至 7.5 的条件)。在室温实施所有的实验。将浓缩至 5g/L 或 97mg/mL 的部分纯化的蛋白 A 混合物, 交换为 15mM NaOAc 的缓冲液作为这些实验的装载液。实验中用 5g/L 挑战树脂, 以确定产物 Kp 值。然而, 对于实际的产物结合容量, 用 97g/L 挑战树脂。滤液被捕获在收集平板中, 然后使用 Infinite M200 读板器分析。之后, 使用 2 个阶段的 2M NaCl 缓冲液从树脂上剥离结合的蛋白质, 以结束质量平衡。

[0378] 病毒清除研究

[0379] 该研究的目的是评估 Capto Adhere 对 2 模型病毒 (MMV 和 X-MuLV) 的病毒去除能力。用幼稚树脂装填 0.66cm 直径的柱, 至 20cm 床高度。MAb 原料掺入 1% 病毒, 然后经过 Capto Adhere 树脂处理。立即收集混合物, 并测定装载和洗脱样品的病毒计数。制备使用完全培养基 (1:10 和 1:100) 的混合物的多次稀释物, 以确定在缓冲液组分和病毒之间的任何潜在干扰。

[0380] 实施例 1. 高通量筛选

[0381] 该实施例描述了用于确定层析材料的结合容量的高通量筛选方法。在分批结合条件下, 对单克隆抗体 MAb3 在 Capto Adhere 树脂上实施高通量筛选。

[0382] 图 1 展示了结合条件的高通量筛选的结果。在响应表面的附图 (图 1A 和 1B) 中, 红色表示产物结合区 (图 1A 的区 8 和图 1B 的区 7), 绿色为产物 (例如多肽) 非结合区 (表示为区 1)。上清液中的实际的宿主细胞蛋白 (HCP) 含量 (ng/mg) 显示为图 1C 的等值线图。图 1A 显示了 MAb3 的产物 K_p 作为 pH 和反离子浓度的函数。将树脂装载至 5g/L, 使用响应表面模型分析原始数据。然后, 使用模型估算实验空间中对于 pH 和反离子浓度的任意组合的 K_p 。数据显示, 随着 pH 增加和随着电导率增加, $\log K_p$ 也增加。 $\log K_p$ 的增加反映了产物与树脂结合的增加。为了找出树脂上的实际产物结合容量, 以组合了不同的 pH 和反离子浓度的 48 种不同条件, 用 80g/L 挑战树脂 (图 1B)。还分析了来自相同实验平板的上清液的 HCP (ng/mg), 数据绘制为等值线的形式 (图 1C)。使用含有数千 ppm 的 CHOP 的部分纯化的蛋白 A 混合物作为高通量筛选实验的装载物。图中的绿色区 (区 1) 表示上清液中 CHOP 的较低量, 红色区 (图 1B 的区 8 和图 1C 的区 9) 表示上清液中 CHOP 的较高量。

[0383] 可以根据 CHOP 和结合数据的等值线图确定最优装载和洗脱条件的设计空间。这些图使得能够设计流通的操作模式或结合和洗脱的操作模式。用于完整的流通层析的装载条件一般是这样的条件, 其中产物结合最小化, 例如多肽结合, 而杂质 (CHOP) 结合最大化。图 1B 和 1C 之间完全重叠的绿色区 (区 1) 提示能够进行 F/T 模式。然而, 该图中的绿色区 (区 1) 是电导率很低 $\sim 1\text{mS}$ 的区。该条件需要将蛋白 A 混合物稀释约 4 倍, 可能导致规模上设备适合的潜在问题。

[0384] 红色区 (图 1B 的区 7 和图 1C 的区 8) 表示 MAb 和 CHOP 的结合区。在两幅图中都存在一些重叠的红色区域。然而, 图 1B 显示, 在可操作的 pH 和反离子浓度条件下, 55g/L 的最大结合容量是可能的。对于 $\sim 3.5\text{g/L}$ 细胞培养物滴度的高滴度过程, 需要在 1000L 柱上 1 个循环回收所有的产物 (如多肽), 而在较小的柱子上则必须进行多个循环。

[0385] 在 OEC 模式中, 可以基于杂质 (例如, CHOP) 在柱上的行为选择装载条件。不太需要关注与柱子结合的 MAb 的量, 因为可以通过洗脱阶段回收结合的 MAb。因此, 有整个实验空间以设计装载条件, 从而在不受树脂的产物结合容量的限制下, 获得最大的杂质清除。尽管结合和洗脱模式允许 55g/L 装载密度, OEC 允许约 10 倍高的装载容量, 从而允许用较小的柱子执行, 这反过来可以降低每克产物的树脂成本, 提供良好的设备适应性。

[0386] 实施例 2. 优化的 OEC 模式

[0387] 将 HTS 数据用于参数确定以在 OEC 模式中操作。基于装载密度要求、设备适应性和杂质清除, 选择 MAb3 的装载条件为 pH6.5 和 5.5mS/cm。图 2 显示的优化的层析运行的装载密度是 180g/L。在装载阶段, 约 50g/L 多肽产物与树脂结合。从约 0.50D 开始收集产物混合物, 产物在树脂上过载多至 180g/L。在完成装载阶段后, 使用具有 1mS/cm 的低电导率

缓冲液（洗脱缓冲液：20mM MES pH6.5）的洗脱阶段，洗脱结合的蛋白质，导致相比流通层析减少 10–15% 混合物体积。图 3 显示了该层析运行的产率和杂质清除率。

[0388] 实施例 3. 装载优化

[0389] 进行该研究比较 HTS 数据和 OEC 操作模式中的实际柱性能数据。在 3 种不同的 pH 对柱进行装载。基于初始 CHOP 清除和产率数据，选择 pH6.5 为最佳条件。混合物中的 CHOP 浓度范围在 900 至 50 至 400ppm，作为装载 pH 的函数。根据该研究，确定 pH6.5 是装载组合物的最佳条件。此外，虽然产率没有优化，但 pH6.5 仍提供了最大的产率（图 3，表 3）。

[0390] 表 3. OEC 模式的装载条件优化

[0391]

装载		洗脱		混合物 CHOP (ppm)	结合的 MAb (g/L)	产率 (%)
pH	电导率 (mS/cm)	pH	电导率 (mS/cm)			
8	5.4	8	2.7	895	63	60
6.5	5.6	6.5	2.1	48	49	92
5.5	5.3	5.5	3.3	359	29	86

[0392]

装载 CHOP: 20000 ppm

装载密度: 150 g/L

[0393] 实施例 4. 洗脱优化

[0394] 进行该研究优化 OEC 的洗脱条件。为了回收在装载阶段期间结合的产物 (MAb3, ~50g/L)，在结束装载阶段后，将若干倍柱体积的洗涤缓冲液 (50mM MES, 30mM 醋酸钠, pH6.5, ~5.5mS/cm) 流过柱子。观察到大量拖尾，导致装载阶段结束时的混合物体积增加。使用与装载缓冲液具有相似 pH 和电导率的洗涤缓冲液时，混合物体积增加约 45%。该混合物体积的增加可能导致设备适应性的问题（图 4）。

[0395] 洗脱优化研究的目的是获得最大产率、最小 CHOP 和最大混合物体积减少。洗脱阶段用于从柱上洗脱 50g/L 的结合产物。图 5 显示了层析图的洗脱阶段。较低电导率缓冲液在 2 倍柱体积内从柱上洗脱下产物，导致更高的产率和较低的混合物体积（表 4）。另一方面，较高电导率的洗脱缓冲液导致大于 8 倍柱体积的拖尾。如表 4 所示，在所有尝试的洗脱缓冲液中，混合物 CHOP 都小于 20ppm。因此，选择 20mM MES 作为洗脱缓冲液，以增加产率和最小化拖尾。

[0396] 表 4. OEC 的洗脱优化

[0397]

洗脱缓冲液	CHOP (ppm)	% 产率
100 mM MES, pH 6.5, 4 mS	13	91
100 mM MES, pH 6.5, 2 mS	11	93
100 mM MES, pH 6.5, 1 mS	17	94
水	15	90
装载 CHOP: 3200 ppm 装载条件: pH 6.5, 5.5 mS/cm 装载密度: 180 g/L		

[0398] 实施例 5. OEC 的杂质分析

[0399] 分析来自 OEC 的级分的杂质。图 6A 显示了在装载阶段期间和洗脱阶段期间收集的级分中的 MAb 浓度和 CHOP 水平。在装载阶段期间, CHOP 保持在 20–25ppm 之间, 而在仅洗脱结合的 MAb 的洗脱阶段期间, 级分的 CHOP 水平减少。累积分析证实 CHOP 和其他杂质在整个装载和洗脱阶段都仍然是相当一致的 (图 6B)。该运行的装载密度是 180g/L。还研究了相同装载密度的病毒清除, 使用 X-MuLV 和 MMV 作为模式病毒 (表 5)。对于该实验, 装载 pH 是 6.5, 装载电导率是 5.5mS/cm。洗脱条件是 20mM MES pH6.5 和电导率 ~ 1mS/cm。

[0400] 表 5. OEC 模式层析的病毒清除

[0401]

Capto Adhere 树脂	X-MuLV	MMV
装载密度	LRV	LRV
180 g/L	3.6	3.3

[0402] 实施例 6. 最大杂质结合容量确定

[0403] 为了找到通过 OEC 模式用 MAb3 装载的树脂的最大杂质结合容量, 用 1000g/L 蛋白 A 混合物挑战 Capto Adhere 树脂。装载缓冲液是 pH6.5, ~ 5.5mS/cm; 洗脱缓冲液是 20mM MES pH6.5, ~ 1mS/cm。收集每 50g/L 的混合物样品, 分析 CHOP 和蛋白质浓度 (图 7)。对于高达 800g/L 的装载密度, CHOP 没有贯穿, 且洗出液中的 CHOP 小于 20ng/mg。

[0404] 实施例 7. 以试验性规模执行

[0405] 在大小从 1.6L 至 10.8L 的试验性规模柱上执行 OEC 操作模式。柱直径范围从 10cm 至 25cm, 床高度范围是 20–22cm (表 6)。在 pH6.5, ~ 5.5mS/cm 装载样品, 并用 20mM MES pH6.5, ~ 1mS/cm 洗脱。试验性规模运行中的产率显示在图 8 中。试验性规模运行中的装载密度覆盖了从 70 至 180g/L 的装载密度范围。在全部装载密度中, 实现了 94% 的平均产率。在测试的装载密度范围内, 对产率没有影响。在所有的试验性规模运行中, OEC 模式混合物 CHOP 小于 25ppm, 然后在下游清除至在最终的多肽产物 (UFDF 混合物) 中 <2ppm

CHOP(表 7)。平均而言,在所有的试验性规模运行中, HMW 蛋白质降低约 1.1% (表 8),在所有的试验性规模运行中, LMW 蛋白质降低约 0.19% (表 9)。

[0406] 表 6. 用于试验性规模运行的 Capto Adhere 柱大小

[0407]

试验性规模运行	BH	直径 (cm)	CV(L)
第 1 次运行	21	10	1.6
第 2 次运行	21	10	1.6
第 3 次运行	20	14	3.1
第 4 次运行	19	14	2.9
第 5 次运行	19	14	2.9
第 6 次运行	22	25	10.8
第 7 次运行	22	25	10.8
第 8 次运行	21.5	10	1.7
第 9 次运行	20	14	3.1
第 10 次运行	22	25	10.8

[0408] 表 7. 试验性规模 CHOP 数据

[0409]

步骤	第1次运行	第2次运行	第3次运行	第4次运行	第5次运行	第6次运行	第7次运行	第8次运行	第9次运行	第10次运行	第11次运行	第12次运行
HCCF	467000	446000	242000	343000	223000	310000	424000	355000	218000	329000	29700	21500
蛋白A混合物	11360	2200*	5712	9100	5100	4800	5400	6200	9000	7300	5300	4800
Capto Adhere 树脂 (OEC)	13	14	21	11	22	17	17	13	15	25	17	9

[0410] * 在 pH 6.5 的深度过滤后的 CHOP

[0411] HCCF 是收获的细胞培养液

[0412] 表 8. 在 12 次试验性规模运行中的平均% HMW 蛋白质降低

[0413]

平均% HMW 蛋白质降低	0.95±0.49
---------------	-----------

[0414] 表 9. 在 12 次试验性规模中的平均% LMW 蛋白质降低

[0415]

平均% LMW 蛋白质降低	0.19±0.08
---------------	-----------

[0416] 在 OEC 后,混合物中的 CHO DNA 和泄露的蛋白 A 低于可检测。

[0417] 实施例 8. 以生产规模执行

[0418] 在大小为 157L 的生产规模柱 (100cm 直径 × 20cm 高度) 上执行 OEC 操作模式。在生产规模下,将柱装载至 ~ 96g/L。生产规模的两次运行中的 % 产率都 ≥ 95%。在所有的生产规模运行中, OEC 模式混合物 CHOP 小于 17ppm (表 10), 其在下游清除至小于可检测的 CHOP 水平。平均而言,在两此生产规模运行中, HMW 降低约 1.1%, LMW 降低 0.1% 而酸性物质降低 1.65%。

[0419] 表 10. 生产规模的 CHOP (ppm) 数据

[0420]

步骤	第 1 次运行	第 2 次运行
HCCE	30500	32500
蛋白 A 混合物	5749	6157
Capto Adhere 树脂 (OEC)	16	17

[0421] 在 OEC 后,混合物中的 CHO DNA 和泄露的蛋白 A 低于可检测。

[0422] 实施例 9. OEC 对其他 MAb 的适用性

[0423] 使用蛋白 A 混合物作为这些运行的装载物。选择装载和洗脱条件使得能够进行 OEC 模式。下表显示了装载密度、% 产率、与树脂结合的 MAb (g/L)、装载物和混合物中的杂质 (表 11、12、13 和 14)。

[0424] 表 11. OEC 对其他 MAb 的应用性 :CHOP

[0425]

MAb, 装载 pH (电导率 <6mS/cm)	装载密度 (g/L)	洗脱 pH 和 电导率	结合的 MAb (g/L)	装载物 CHOP (ppm)	混合物 CHOP (ppm)	% 产率
MAb 1, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	35	2825	9	93
MAb 2, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	24	5057	12	100
MAb 3, pH 6.5	200	pH 6.5, 1 mS/cm	45	3200	15	97
MAb 4, pH 6.1	200	pH 6.0, 0.65 mS/cm	59	193	4	93
MAb 5, pH 5.5	200	pH 4.9, 1.1 mS/cm	59	4560	145	92

[0426] 表 12. OEC 对其他 MAb 的应用性 : % HMW 蛋白质

[0427]

MAb, 装载 pH (电导率 <6mS/cm)	装载密度 (g/L)	洗脱 pH 和电导率	结合的 MAb (g/L)	装载物 % HMW 蛋白 质	混合物 % HMW 蛋白 质
MAb 1, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	35	5.4	1.6
MAb 2, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	24	5.4	3.8
MAb 3, pH 6.5	200	pH 6.5, 1 mS/cm	45	3.5	1.8
MAb 4, pH 6.1	200	pH 6.0, 0.65 mS/cm	59	1.9	0.5
MAb 5, pH 5.5	200	pH 4.9, 1.1 mS/cm	59	2.4	1.7

[0428] 表 13. OEC 对其他 MAb 的应用性: %泄露的蛋白 A

[0429]

MAb, 装载 pH (电导率 <6mS/cm)	装载密度 (g/L)	洗脱 pH 和电导率	结合的 MAb (g/L)	装载物 泄露的蛋白 A (ppm)	混合物 泄露的蛋白 A (ppm)
MAb 1, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	35	2	LTD*
MAb 2, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	24	2	LTD
MAb 3, pH 6.5	200	pH 6.5, 1 mS/cm	45	3	LTD
MAb 4, pH 6.1	200	pH 6.0, 0.65 mS/cm	59	2	LTD
MAb 5, pH 5.5	200	pH 4.9, 1.1 mS/cm	59	6	LTD

[0430] * 小于可检测的

[0431] 表 14. OEC 对其他 MAb 的应用性: CHO DNA

[0432]

MAb, 装载 pH (电导率 <6mS/cm)	装载密度 (g/L)	洗脱 pH 和电导率	结合的 MAb (g/L)	装载物 CHO DNA (pg/mL)	混合物 CHO DNA (pg/mL)
MAb 1, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	35	253	LTD
MAb 2, pH 8.6	200	pH 6.5, 1 mS/cm	24	297	LTD
MAb 3, pH 6.5	200	pH 6.5, 1 mS/cm	45	106	LTD
MAb 4, pH 6.1	200	pH 6.0, 0.65 mS/cm	59	17	LTD
MAb 5, pH 5.5	200	pH 4.9, 1.1 mS/cm	59	4	LTD

[0433] 实施例 10. 基于 K_p 值的 AEX 层析操作模式

[0434] 在完整的流通 (F/T) 层析中, $K_p < 0.1$ 且没有蛋白质与树脂结合。在弱分配层析 (WPC) 中, K_p 为 0.1 至 20, 且在产物和层析基质之间存在弱分配。在结合和洗脱模式下, 产物与树脂紧密结合, $K_p > 100$, 但装载密度限于产物结合容量。然而, 在过载和洗脱型层析 (MAb3) 中, 装载条件是使产物和杂质 $K_p > 100$, 并且虽然产物在达到其结合容量后仍然流通, 但杂质仍保持与树脂结合, 并且没有贯穿直到杂质达到其结合容量, 所述杂质的结合容量高于产物结合容量。

[0435] 洗脱条件是使多肽产物 $K_p < 2$ 。回收结合的产物, 但大部分杂质仍然保持结合 (杂质 $K_p > 100$)。依此, 该模式能够提供良好的杂质清除率, 同时提供非常高的产率 (例如, ~95%) (表 15)。

[0436] 表 15. MAb3 作为 Capto Adhere 树脂上的模式抗体

[0437]

参数	WPC	OEC
装载物	蛋白 A 混合物 (Mab 3)	
装载条件	pH 5, 4.4 mS/cm	pH 6.5, 5.5 mS/cm
K _p	2.6	>100
Log K _p	0.4	4.15
装载物 CHOP	20000 ppm	

[0438]

产物结合(g/L 树脂)	20	50
混合物 CHOP (ppm)	360	50
%产率	86	95

[0439] 在弱分配条件 ($K_p = 2.4$) 和过载和洗脱条件 ($K_p > 100$) 下的柱运行的层析图展示了增加 mAb K_p 对层析图的产物贯穿区的影响 (图 9)。WPC 装载条件: pH 5.5, 4.4 mS/cm; WPC 洗涤条件: 20mM 醋酸盐 pH 5, 4.4 mS/cm。OEC 装载条件: pH 6.5, 5.5 mS/cm; OEC 洗脱条件: 20mM MES pH 6.5, ~ 1mS/cm。

[0440] 表 16. 在典型的流通方法条件下, 分析用于结合 AEX 树脂的 MAb 的 AEX 精细纯化步骤

[0441]

操作模式	F/T	B/E	OEC
装载密度(g/L 树脂)	~200	50	800
柱大小*	220 L	850 L	52 L
混合物体积	11,000 L	~4CV 洗脱 (3400L)	~2500 L
工业适用(混合物管限制)	由于~5X 装载稀释造成的非常大的混合物体积	大型柱或多个循环	更好的工业适用性。降低混合物体积 ~ 10-40%
树脂成本**	\$ 0.7 百万	\$2.98 百万	\$ 0.18 百万

[0442] 模式抗体 :Mab3

[0443] * 假定在 3.5g/L 滴度收获 12,500L

[0444] **CA 树脂为 \$3500/L

[0445] 实施例 11. 不同树脂的 OEC 应用性

[0446] 根据分子的 pI, 可以向下列多个模式树脂 (Capto Adhere、QMA、MEP Hypercel、HEA Hypercel、PPA Hypercel、Capto MMC) 应用 OEC。结合在 Capto Adhere 树脂上的多肽产物性质上是更疏水的, 并可以通过降低洗脱缓冲液的电导率从柱上洗脱结合的产物 (图 5)。然而, 产物在树脂上结合的模式和产物从树脂上洗脱的模式不限于疏水性相互作用, 因此 OEC 操作模式还可以广泛的用于其他的层析材料。表 17 展示了 OEC 可用于其他 CEX 树脂和

IEX 树脂。除非另外指出,否则洗脱缓冲液是 20mM MES。OEC 的潜力不限于上述树脂,且正在进行评估。图 10 显示了 MAb3 在 QMA 树脂上的贯穿分析。图 11 中显示了 MAb4 在 Capto Adhere 树脂上的贯穿分析。图 12 显示了 MAb4 在 Capto MMC 树脂上的贯穿分析。图 13 显示了 MAb3 在 Capto Adhere 树脂上的贯穿分析。

[0447] 表 17. 不同树脂的 OEC 应用性

[0448]

MAb	树脂	装载		洗脱		装载密度 (g/L)	结合的 MAb (g/L)	装载物 CHOP (ppm)	混合物 CHOP (ppm)	% 产率
		pH	电导率 (mS/cm)	pH	电导率 (mS/cm)					
MAb 3	Capto Adhere	6.5	<5.5	6.5	1	200	50	3200	15	97
	QMA	6.5	<5.5	6.5	1	103	17	1800	99	93
MAb 3*	Poros XS	5.5	<6	5.5	**	200	100	9900	370	92
MAb 4	Capto Adhere	6.1	<5.5	6.0	0.65	200	59	193	4	93
	Capto MMC	7	<6	6.5	1	147	10	187	27	93

[0449] **Poros XS MAb3 装载条件 :pH5.5, <6mS/cm;洗脱条件 :缓冲液 A-50mM 醋酸盐 pH5.5, ~ 3mS/cm, 缓冲液 B-350mM 醋酸盐 pH5.5, ~ 24mS/cm, 梯度 :在 10CV 中 20-85%, 混合 :1-8CV。

[0450] 实施例 12. 在 OEC 上的梯度洗脱

[0451] 洗脱优化研究的另一个目标是评估梯度洗脱条件对 Capto Adhere 树脂上 OEC 模式的作用。研发了用于洗脱结合的产物的洗脱阶段 (表 18)。在梯度洗脱运行中,可以基于要求改变移动相的离子强度、pH、组成和浓度。表 18 显示了运行的条件 :装载 (pH 和电导率) 和洗脱 (pH 和电导率梯度) 条件。表中显示的所有数据都是从用 150g/L MAb3 装载密度装载的层析运行中获得的。进行这些运行作为证实可以在 OEC 层析模式下实施梯度洗脱以及可以优化梯度斜率 (盐浓度 (mM)/柱体积) 这一概念的证据。可见相比装载物, % HMWS 平均降低 38% (表 18)。在 5.5mS/cm 电导率运行中,CHOP 降低至 <20ppm,而在 10mS/cm 的更高电导率运行中,获得了 ~ 150ppm 的混合物 CHOP (表 19)。

[0452] 表 18. OEC 上梯度洗脱运行 : % HMW 数据

[0453]

装载 pH	装载电导率	梯度洗脱条件	结合的产物 (g/L)	% HMWS 装载	% HMWS 混合物
6.5	5.5 mS/cm	在 10CV 中 5.5 mS/cm 至 1 mS/cm	43	4.0	2.4
6.5	5.5 mS/cm	在 15CV 中 5.5 mS/cm 至 1mS/cm	43	4.0	2.8
6.5	10 mS/cm	在 5CV 中 10 mS/cm 至 1mS/cm	48	3.8	2.4
6.5	10 mS/cm	在 10CV 中 10 mS/cm 至 1mS/cm	48	3.9	2.2

[0454] 表 19. OEC 上梯度洗脱运行 :CHOP 数据

[0455]

装载 pH	装载电导率	梯度洗脱条件	装载物 CHOP (ppm)	混合物 CHOP (ppm)
6.5	5.5 mS/cm	在 10CV 中 5.5 mS/cm 至 1 mS/cm	3100	17
6.5	5.5 mS/cm	在 15CV 中 5.5 mS/cm 至 1mS/cm	3100	19
6.5	10 mS/cm	在 5CV 中 10 mS/cm 至 1mS/cm	3100	160
6.5	10 mS/cm	在 10CV 中 10 mS/cm 至 1mS/cm	3100	143

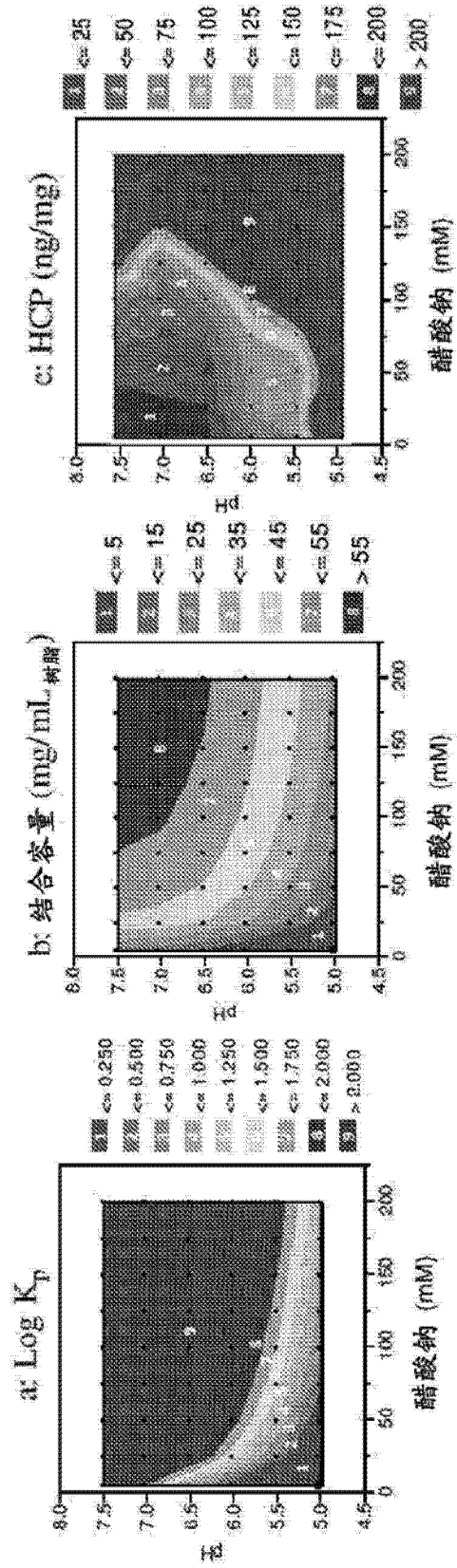


图 1

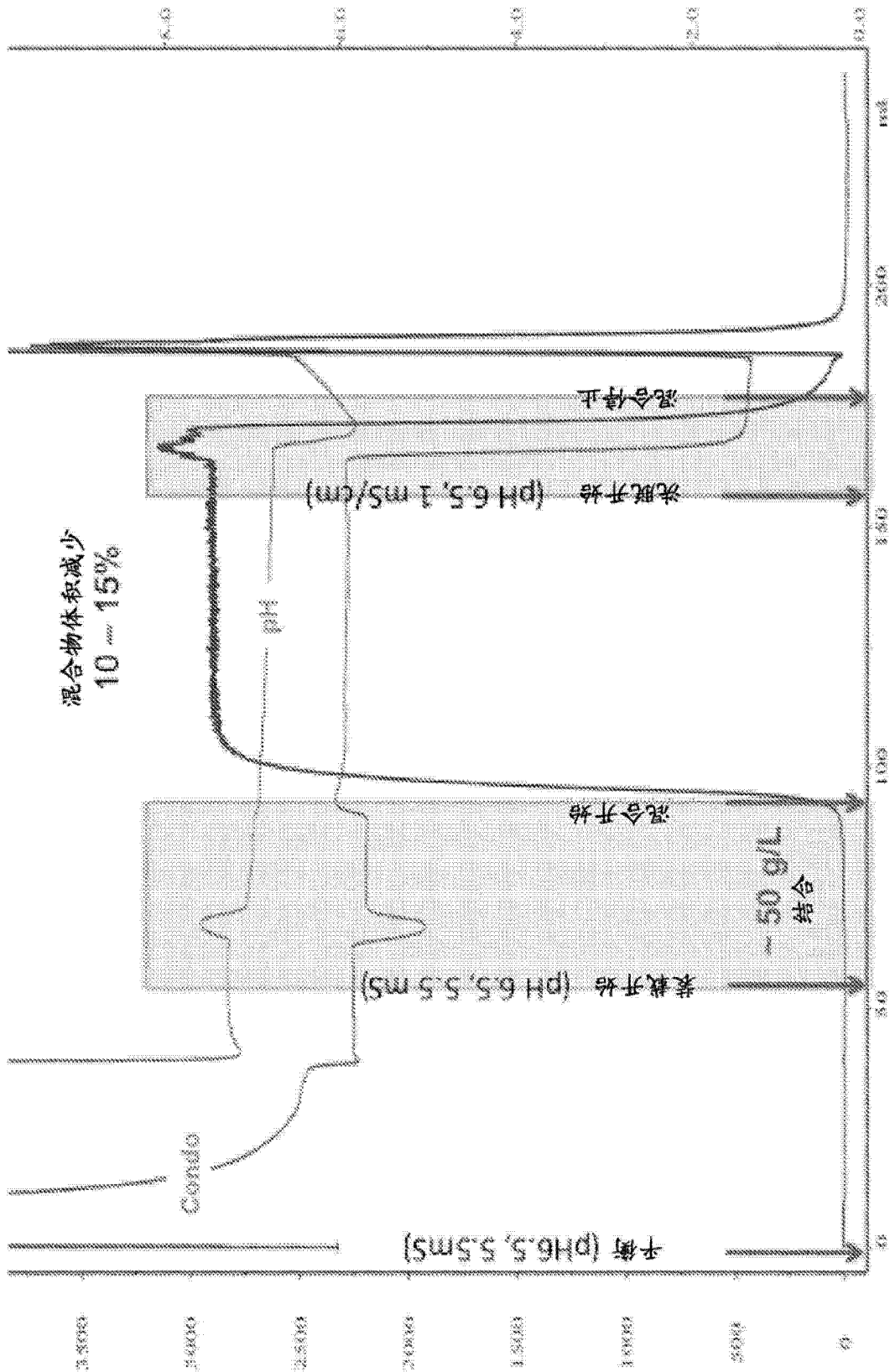


图 2

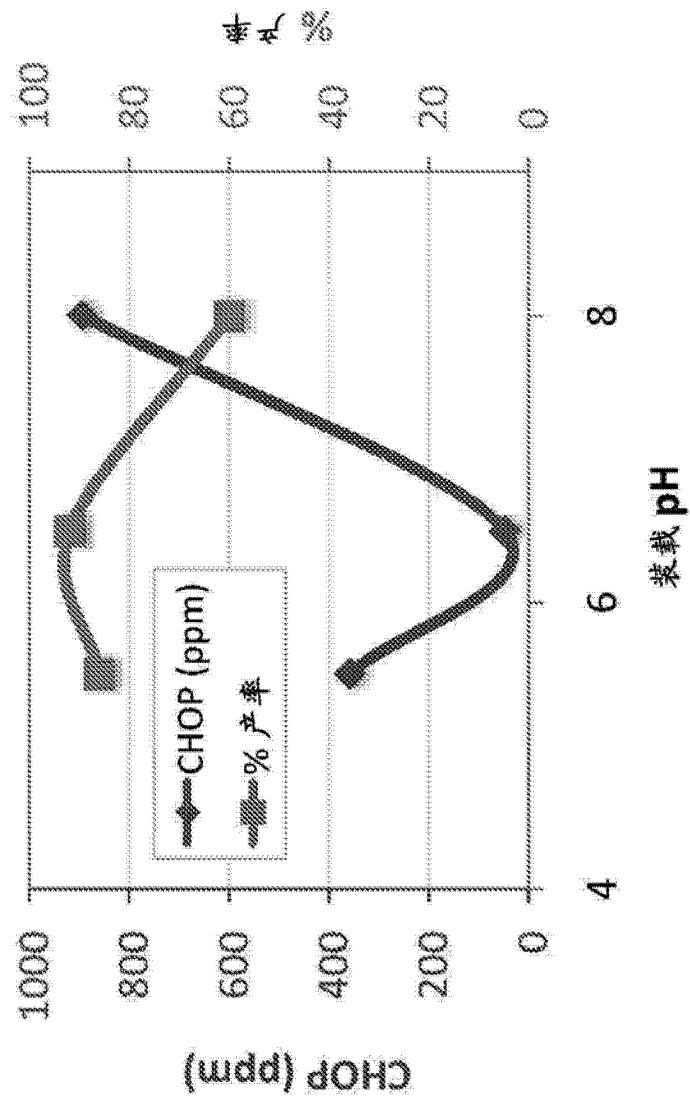


图 3

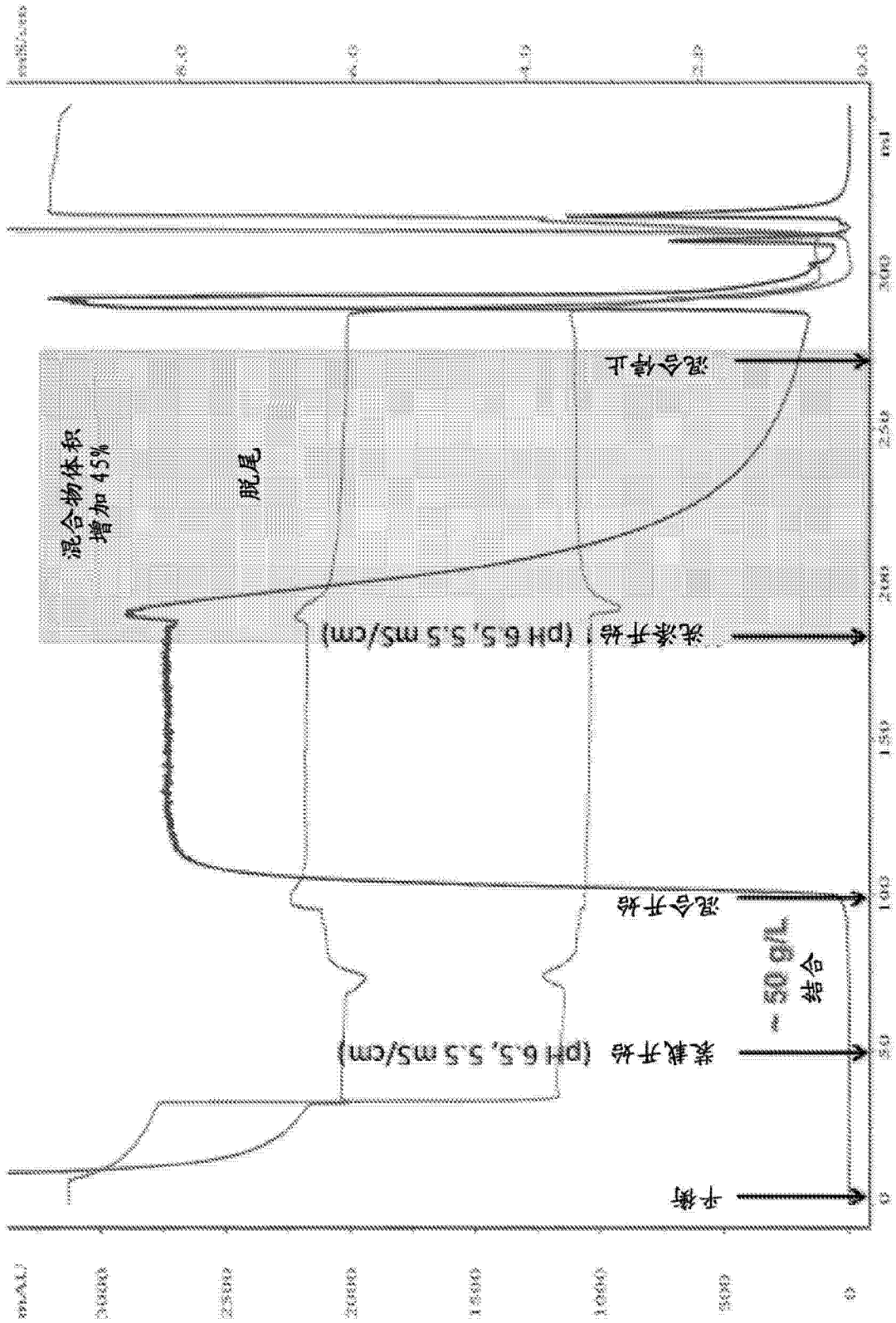


图 4

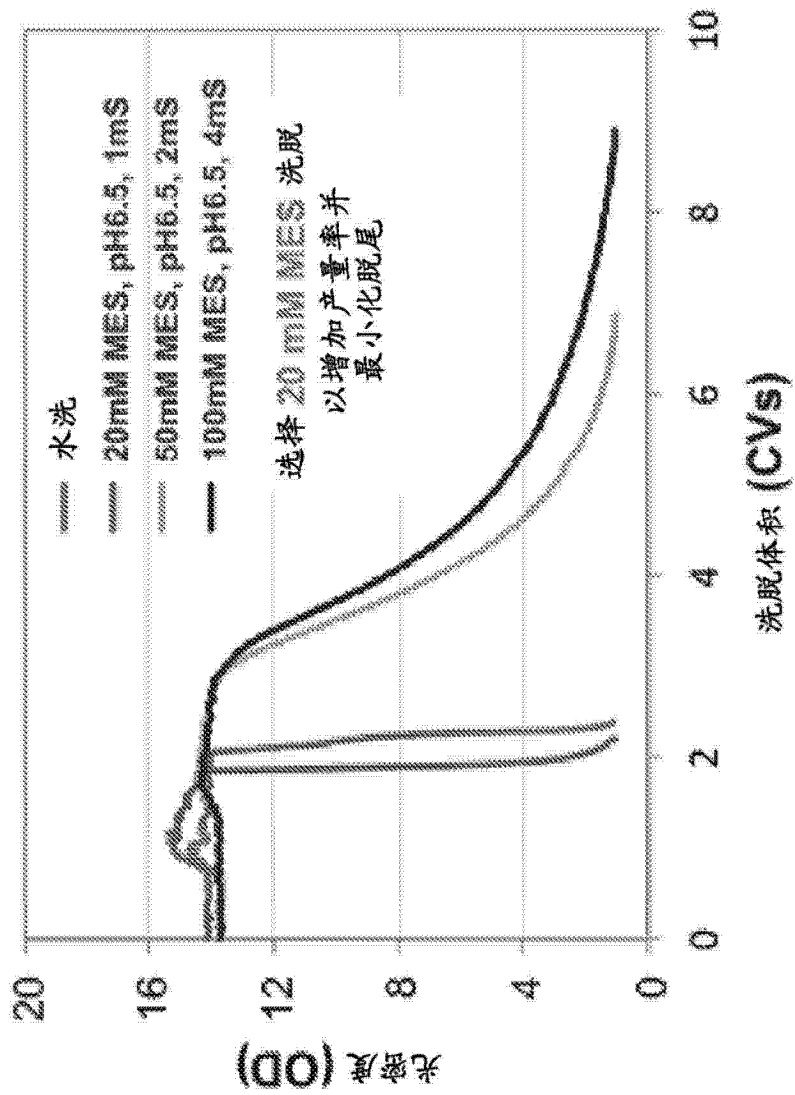


图 5

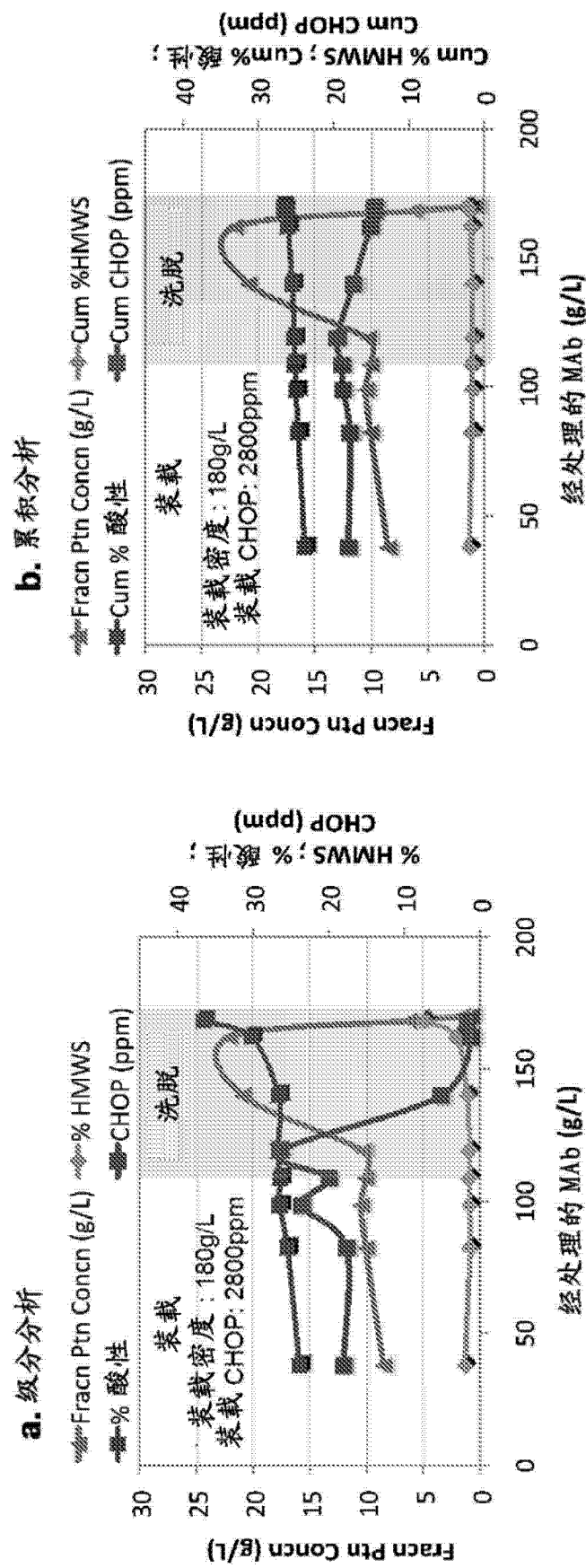


图 6

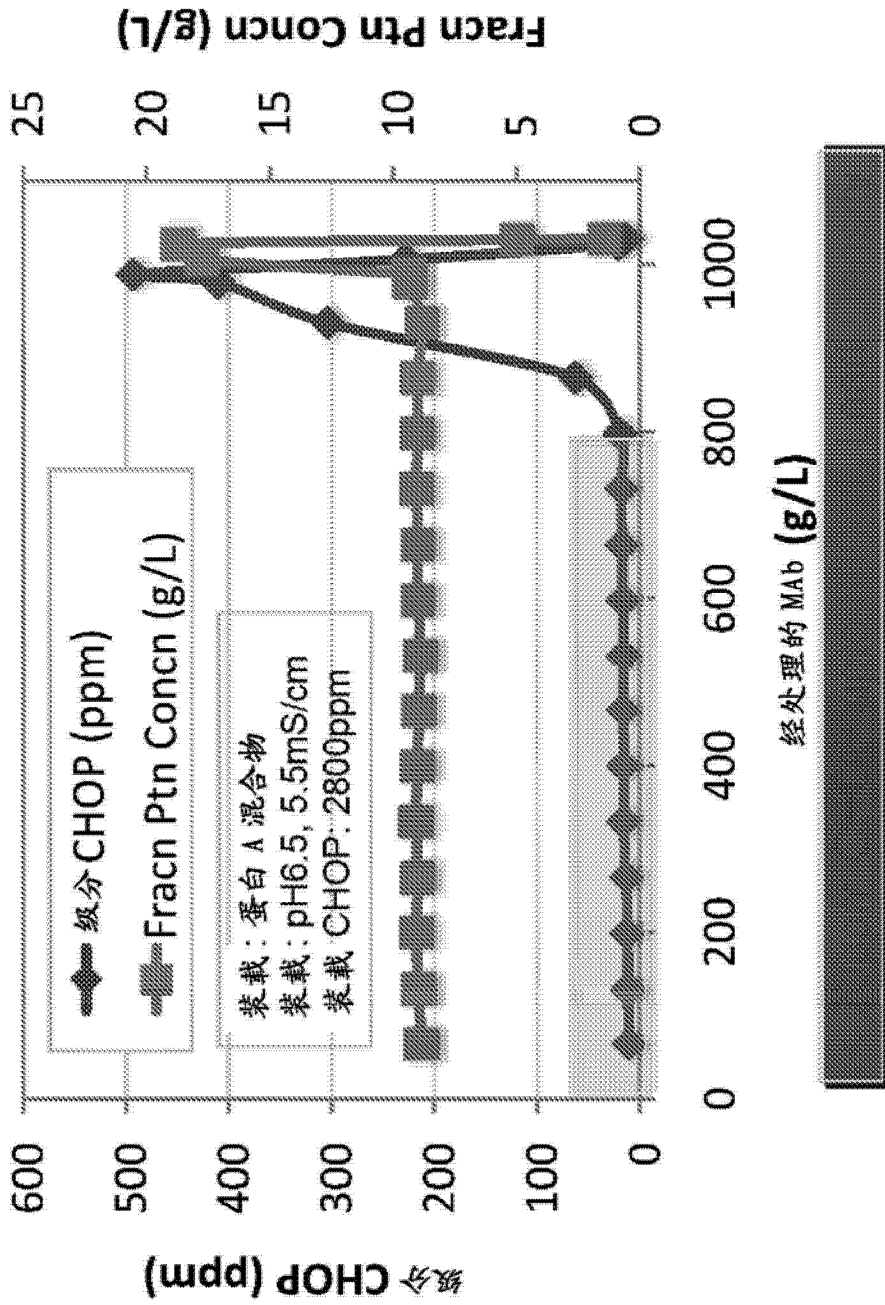


图 7

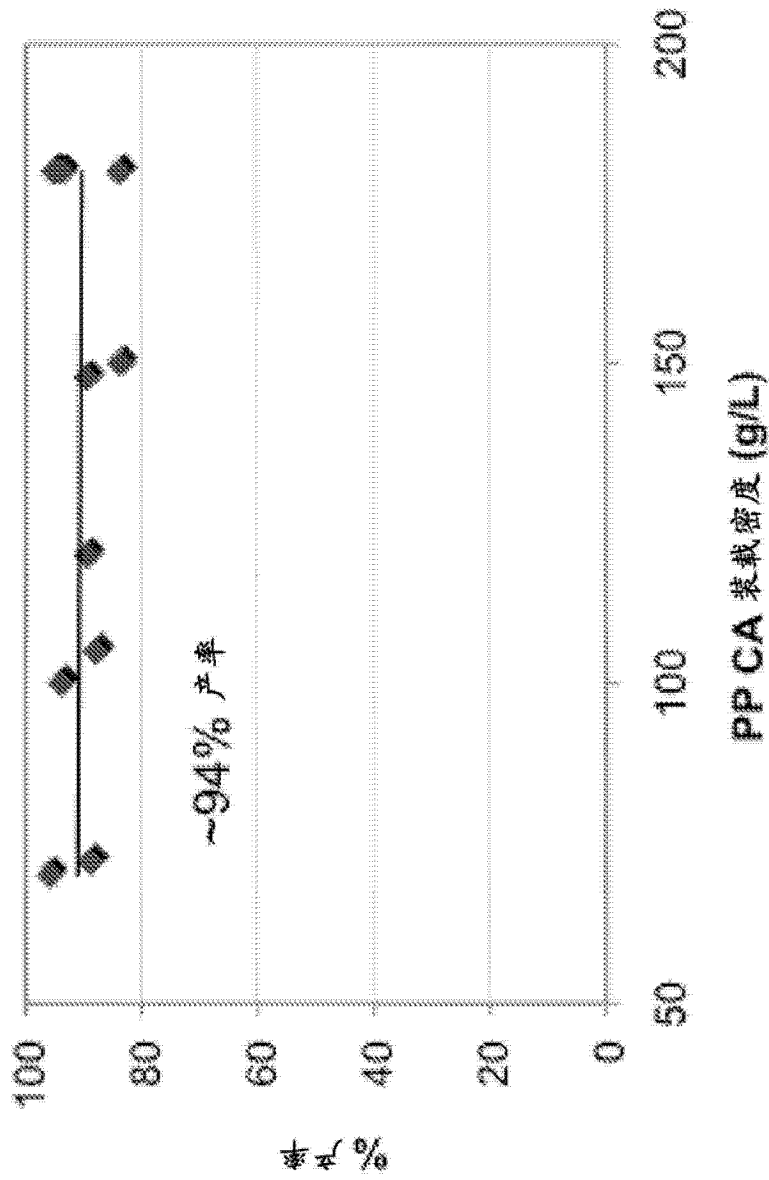


图 8

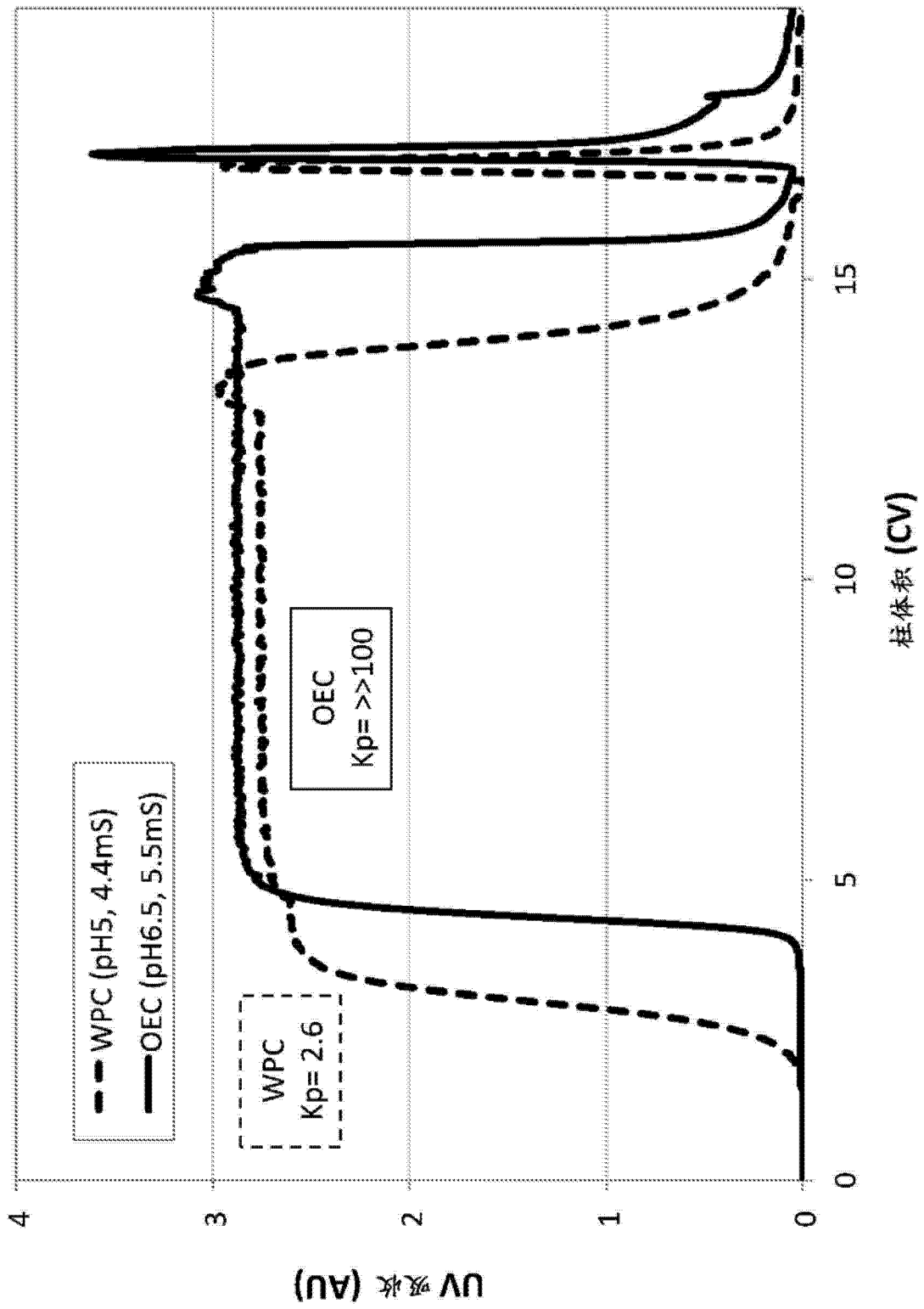


图 9

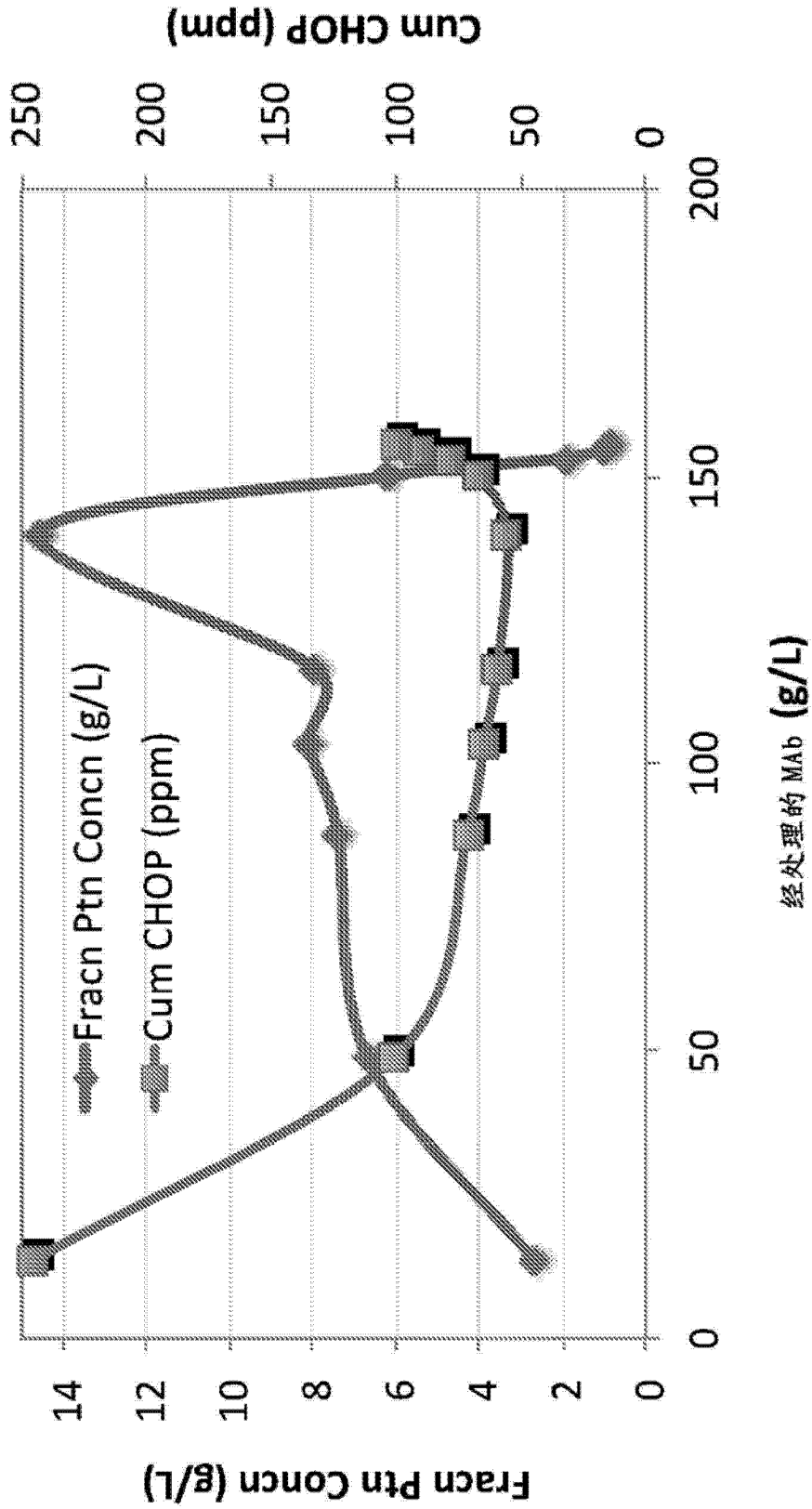


图 10

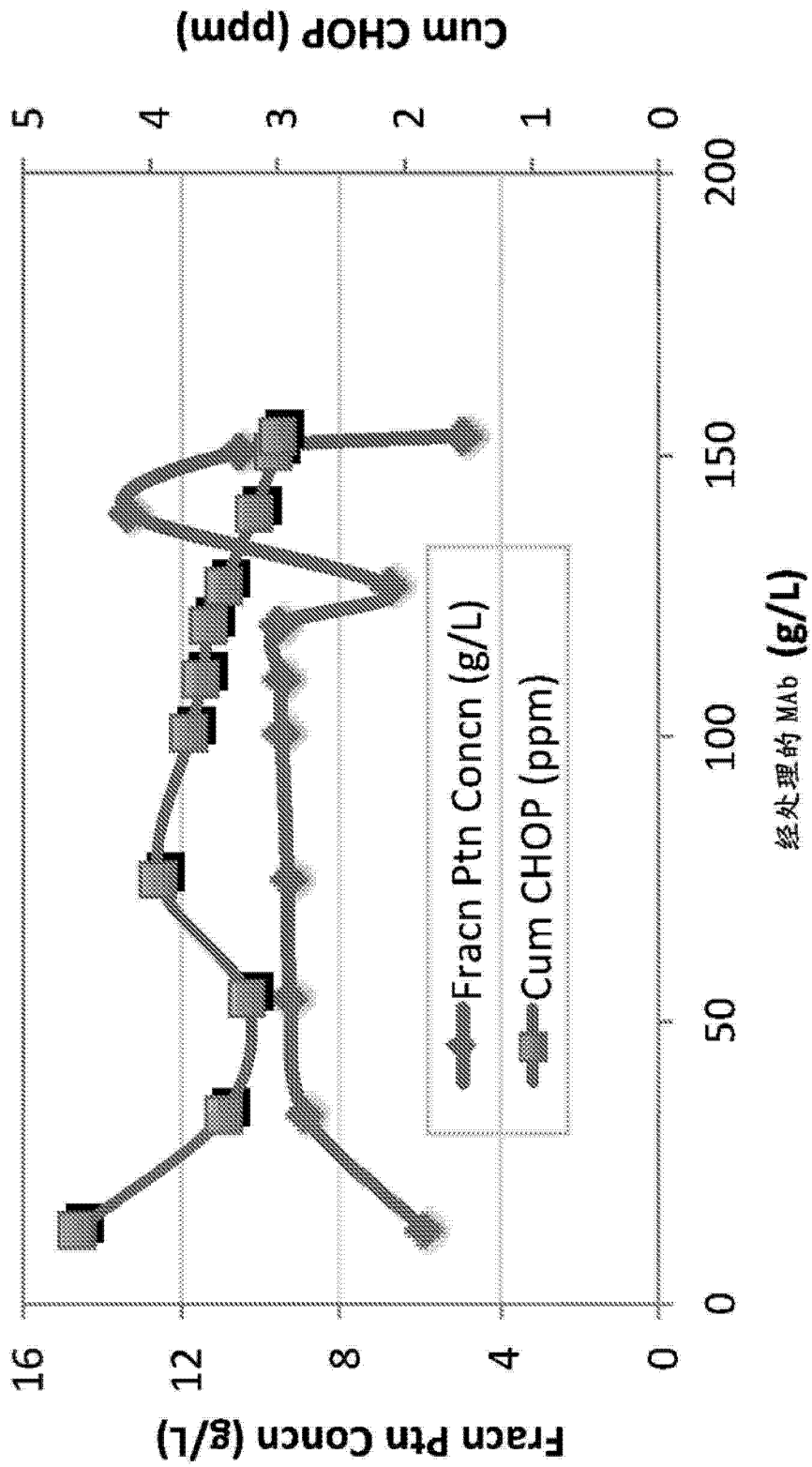


图 11

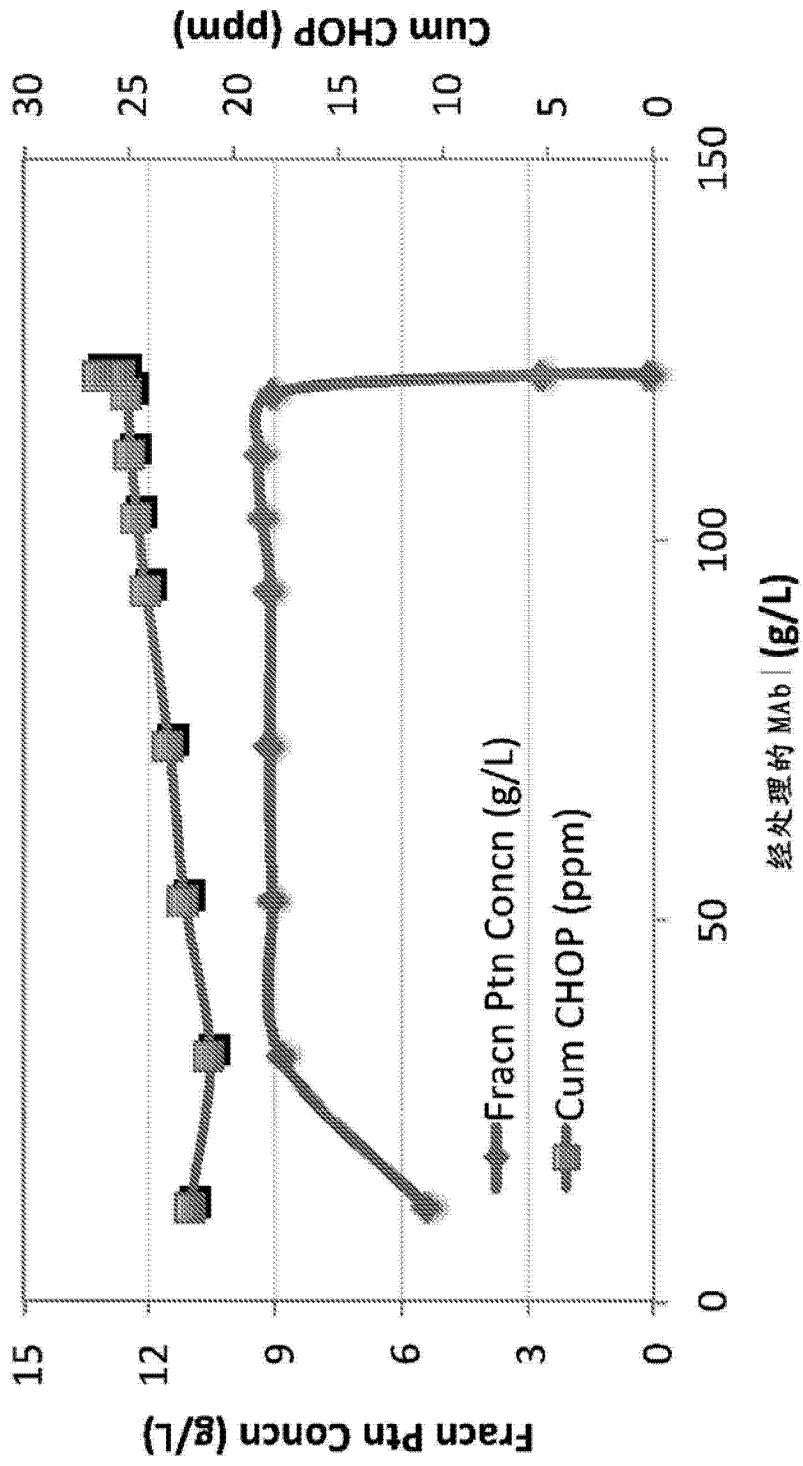


图 12

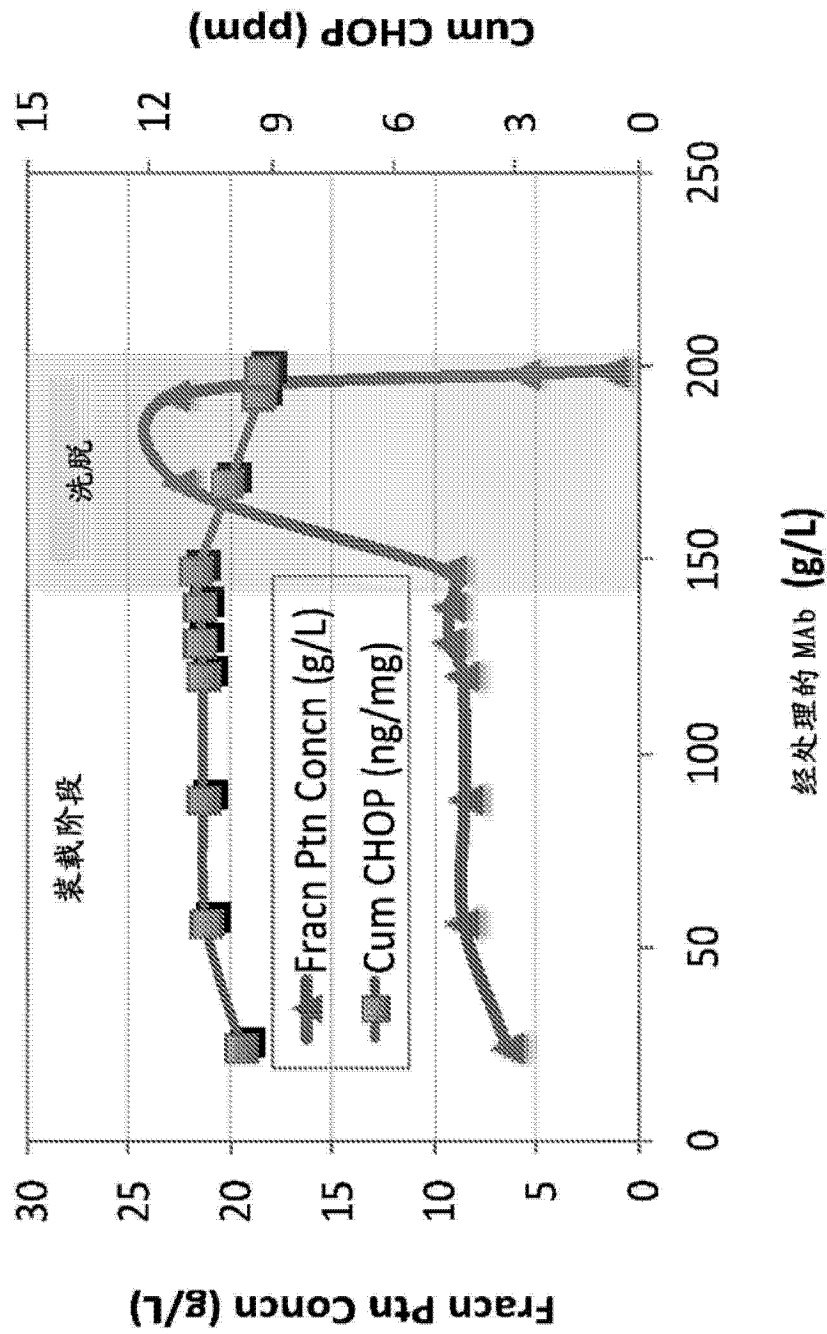


图 13