

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825024.1

[51] Int. Cl.

*A61K 39/395 (2006.01)*

*C07K 16/02 (2006.01)*

*C07K 16/04 (2006.01)*

*C07K 16/06 (2006.01)*

*C12P 21/08 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2006年11月1日

[11] 公开号 CN 1856324A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/531 (2006.01)*

*G01N 33/563 (2006.01)*

[22] 申请日 2003.9.11 [21] 申请号 03825024.1

[30] 优先权

[32] 2002. 9.17 [33] US [31] 60/411,419

[86] 国际申请 PCT/US2003/028543 2003.9.11

[87] 国际公布 WO2004/026427 英 2004.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.10

[71] 申请人 GTC 生物治疗学公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 E·伯克 - 韦尔森 M·戴

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所  
代理人 罗菊华

权利要求书 4 页 说明书 30 页 附图 7 页

[54] 发明名称

缺乏重链间二硫键的免疫球蛋白分子的分离

[57] 摘要

本发明以用于在保留生物学活性的同时将免疫球蛋白半抗体可靠且可操纵地与免疫球蛋白全抗体分离的方法、以及纯化的免疫球蛋白半抗体制剂和纯化的免疫球蛋白全抗体制剂为特征。这些解离的半抗体可通过层析与全抗体分离。存在四种已知的 IgG 分子亚型: IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 及 IgG<sub>4</sub>。IgG<sub>4</sub> 分子与其它 IgG 同种型的区别在于将两重链亚基连接在一起的二硫键并不总是形成。由于将重链亚基维系在一起的非共价相互作用,在纯化的 IgG<sub>4</sub> 蛋白凝胶过滤之后, IgG<sub>4</sub> 分子的异质性并不明显。然而,当纯化的 IgG<sub>4</sub> 蛋白在非还原条件下通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)分离时,可鉴别两种不同的蛋白种类 - 全抗体和“半抗体”。

1. 用于将 IgG 半抗体与 IgG 全抗体分离的方法，其中半抗体和全抗体为同一同种型，包括：

获得包含同一同种型 IgG 半抗体和 IgG 全抗体混合物的样品；

降低样品的 pH，使得半抗体彼此解离，形成所得溶液；和

将所得溶液施加到差异性地延缓 IgG 半抗体和 IgG 全抗体迁移的柱子上。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述柱子保留存在于所得溶液之中的 IgG 半抗体和 IgG 全抗体两者。

3. 权利要求 2 的方法，其中柱子为离子交换柱。

4. 权利要求 3 的方法，其中离子交换柱为阳离子交换柱。

5. 权利要求 2 的方法，进一步包括将柱子置于选择性地洗脱为柱子所保留的 IgG 半抗体的条件之下。

6. 权利要求 5 的方法，其中选择性地洗脱为柱子所保留的 IgG 半抗体的条件包括向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 升至足以选择性地洗脱所述 IgG 半抗体的水平。

7. 权利要求 6 的方法，其中存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 7.0 或更高。

8. 权利要求 5 的方法，进一步包括将柱子置于洗脱为柱子所保留的 IgG 全抗体的条件之下。

9. 权利要求 8 的方法，其中洗脱 IgG 全抗体的条件包括向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度升至足以洗脱所述 IgG 全抗体的水平。

10. 权利要求 1 的方法，其中 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为 IgG4 同种型。

11. 权利要求 1 的方法，其中 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为 IgG1、IgG2 或 IgG3 同种型。

12. 权利要求 1 的方法，其中 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为哺乳动

物 IgG 半抗体和 IgG 全抗体。

13. 权利要求 12 的方法，其中哺乳动物 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为人 IgG 半抗体和 IgG 全抗体。

14. 权利要求 12 的方法，其中哺乳动物 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为嵌合 IgG 半抗体和 IgG 全抗体。

15. 权利要求 12 的方法，其中哺乳动物 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为  $F(ab)_2$  半抗体和  $F(ab)_2$  全抗体。

16. 权利要求 1 的方法，其中样品获自于奶。

17. 权利要求 16 的方法，其中奶来自于哺乳动物。

18. 权利要求 16 的方法，其中奶来自于有蹄动物、猪、兔或小鼠。

19. 权利要求 1 的方法，其中样品获自于卵。

20. 权利要求 1 的方法，其中样品获自于血清。

21. 权利要求 1 的方法，其中样品获自于细胞培养基。

22. 通过权利要求 1 的方法获得的纯化的 IgG 半抗体制剂。

23. 权利要求 22 的纯化的 IgG 半抗体制剂，其中抗体为 IgG4 同种型。

24. 权利要求 22 的纯化的 IgG 半抗体制剂，其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 90%。

25. 权利要求 24 的纯化的 IgG 半抗体制剂，其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 95%。

26. 权利要求 25 的纯化的 IgG 半抗体制剂，其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 99%。

27. 通过权利要求 1 的方法获得的纯化的 IgG 全抗体制剂，其中与由权利要求 1 的方法处理之前的样品相比，全抗体构成制剂中全部抗体的更大的一部分。

28. 权利要求 27 的纯化的 IgG 全抗体制剂，其中抗体为 IgG4 同种型。

29. 权利要求 27 的纯化的 IgG 全抗体制剂，其中全抗体构成制剂中全部抗体的至少 80%。

30. 权利要求 29 的纯化的 IgG 全抗体制剂，其中全抗体构成制剂中全部抗体的至少 90%。

31. 用于将 IgG 半抗体与 IgG 全抗体分离的方法，其中半抗体和全抗体为同一同种型，包括：

获得包含同一同种型 IgG 半抗体和 IgG 全抗体混合物的样品；

降低样品的 pH，使得半抗体彼此解离，形成所得溶液；

将所得溶液施加到离子交换柱上，使得所述 IgG 半抗体和 IgG 全抗体都为柱子所保留；

向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 升至足以选择性地洗脱所述 IgG 半抗体的水平；和

随后向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度升至足以洗脱所述 IgG 全抗体的量。

32. 权利要求 31 的方法，其中样品获自于奶。

33. 权利要求 32 的方法，其中奶来自于哺乳动物。

34. 权利要求 33 的方法，其中奶来自于有蹄动物、猪、兔或小鼠。

35. 权利要求 31 的方法，其中样品获自于卵。

36. 权利要求 31 的方法，其中样品获自于血清。

37. 权利要求 31 的方法，其中样品获自于细胞培养基。

38. 权利要求 31 的方法，其中 IgG 半抗体和 IgG 全抗体为 IgG4 同种型。

39. 权利要求 31 的方法，其中样品的 pH 降至低于 4.0 的 pH。

40. 权利要求 36 的方法，其中 pH 降至大约 2.0 到 4.0 之间的 pH。

41. 权利要求 40 的方法，其中 pH 降至大约 3.5 的 pH。

42. 权利要求 31 的方法，其中离子交换柱为阳离子交换柱。

43. 权利要求 31 的方法，其中存在于柱内的缓冲液的 pH 升至至少 6.5 或更高。

44. 权利要求 43 的方法，其中存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 7.0。

45. 通过权利要求 31 的方法获得的纯化的 IgG 半抗体制剂。

46. 权利要求 45 的纯化的半抗体制剂，其中抗体为 IgG4 同种型。

47. 权利要求 45 的纯化的半抗体制剂, 其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 90%。

48. 权利要求 47 的纯化的半抗体制剂, 其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 95%。

49. 权利要求 48 的纯化的半抗体制剂, 其中半抗体构成制剂中抗体总量的至少 99%。

50. 通过权利要求 31 的方法获得的纯化的 IgG 全抗体制剂, 其中与由权利要求 31 的方法处理之前的样品相比, 全抗体构成制剂中全部抗体的更大的一部分。

51. 权利要求 50 的纯化的 IgG 全抗体制剂, 其中抗体为 IgG4 同种型。

52. 权利要求 50 的纯化的 IgG 全抗体制剂, 其中全抗体构成制剂中全部抗体的至少 80%。

53. 权利要求 52 的纯化的 IgG 全抗体制剂, 其中全抗体构成制剂中全部抗体的至少 90%。

54. 纯化的 IgG 半抗体制剂, 其中制剂中全部抗体的至少 90% 为半抗体。

55. 纯化的 IgG 全抗体制剂, 其中制剂包括半抗体和全抗体, 并且其中全部抗体的至少 80% 为全抗体。

56. 权利要求 55 的制剂, 其中制剂进一步含有酪蛋白污染物。

57. 权利要求 1 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

58. 权利要求 31 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

59. 权利要求 2 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

60. 权利要求 5 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

61. 权利要求 6 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

62. 权利要求 43 的方法, 其中所述柱子为 HIC 柱。

## 缺乏重链间二硫键的免疫球蛋白分子的分离

### 发明领域

[001] 本发明提供了允许在保留生物学活性的同时从“免疫球蛋白全抗体 (immunoglobulin whole antibodies)”中可控制地分离免疫球蛋白半抗体 (immunoglobulin half antibodies) 的方法学。更具体地, 本发明以用于从免疫球蛋白全抗体中分离免疫球蛋白半抗体的方法、以及纯化的免疫球蛋白半抗体制剂和纯化的免疫球蛋白全抗体制剂为特征。

### 发明背景

[002] 免疫球蛋白分子例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 分子为参与脊椎动物免疫应答的多聚体蛋白。免疫球蛋白分子的基本结构为四聚体, 并由两轻链亚基和两重链亚基组成; 重链亚基是类别特异性的, 并赋予不同类别的免疫球蛋白分子以独特的特征。免疫球蛋白分子的四链结构是通过每个重链亚基氨基端部分与轻链亚基之间以及两重链亚基的羧基端部分之间强的非共价相互作用维系在一起的。二硫键通过在重链和轻链亚基以及两重链亚基之间均建立连接进一步加强了这些互作。为了本发明的目的, 也应当指出 IgM 具有 10 个重链和 10 个轻链, 而 IgA 主要为二聚体, 含 4 条链的轻链和重链种类。

[003] 存在四种已知的 IgG 分子亚型: IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 及 IgG<sub>4</sub>。IgG<sub>4</sub> 分子与其它 IgG 同种型的区别在于将两重链亚基连接在一起的二硫键并不总是形成。由于将重链亚基维系在一起的非共价相互作用, 在纯化的 IgG<sub>4</sub> 蛋白凝胶过滤之后, IgG<sub>4</sub> 分子的异质性并不明显。然而, 当纯化的 IgG<sub>4</sub> 蛋白在非还原条件下通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离时, 可鉴别两种不同的蛋白种类。一种在 150kD 大小

范围内迁移，与四聚体分子的大小一致，而另一种在 80kD 左右的大小范围内迁移，这与含一个重链亚基和一个轻链亚基的“半免疫球蛋白”的大小一致(King 等 (1992), *Biochem J* 281: 317-23)。

### 发明概述

[004] 本发明部分地是基于尽管若干变性条件可引发“免疫球蛋白半抗体”的解离，然而那些条件中多数造成聚集和不可逆变性，并且不易应用于分离用于生物疗法的 80kD 和 150kD 种类地发现。当仔细选择条件使得解离可控制时，解离也可以通过酸化实现。本发明提供了允许在保留生物学活性的同时从“免疫球蛋白全抗体”中可控制地分离免疫球蛋白半抗体的方法学。

[005] IgG<sub>4</sub> 抗体的产生导致形成全抗体和半抗体的混合物。全抗体通过重链铰链区中的重链间二硫键形成四聚体。在另一方面，半抗体缺乏这些重链间二硫键。不过，已发现尽管缺乏重链间二硫键，半抗体非共价互作以形成四聚体。由于半抗体之间的这种非共价互作，其物理性质与全抗体高度相似，使得难以在非还原条件下从全抗体中分离半抗体。本发明提供了克服有关分离的这种困难的方法学。

[006] 本发明部分地也是基于解离的半抗体能够通过层析与全抗体分离的发现。从而，本发明以用于将免疫球蛋白全抗体与免疫球蛋白半抗体分离的方法、以及纯化的免疫球蛋白半抗体制剂和纯化的免疫球蛋白全抗体制剂为特征。

[007] 因此，在一个方面，本发明以用于将半抗体与全抗体分离的方法为特征，其中半抗体和全抗体为同一同种型。该方法包括：

获得包含同一同种型的半抗体和全抗体的混合物的样品；

降低样品的 pH，使得半抗体彼此解离，形成所得溶液；和

将所得溶液施加到差异性地延缓半抗体和全抗体迁移(mobility)的柱子上。

[008] 在优选的实施方案中，抗体为免疫球蛋白分子，如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 或 IgG<sub>4</sub> 分子。优选地，抗体为 IgG<sub>4</sub> 分子。在其它实施方案

中，抗体为 IgA<sub>1</sub> 和 IgA<sub>2</sub>、IgD、IgE 或 IgM 分子。

[009] 在有些实施方案中，抗体为天然存在的抗体，如在哺乳动物中产生的抗体，如小鼠单克隆抗体或人抗体。在其它实施方案中，抗体是经修饰的，如重组抗体，如嵌合抗体、人源化抗体或抗体片段，如 F(ab)<sub>2</sub> 片段。又在其它实施方案中，抗体已就例如其对特定配体的亲和力和特异性被修饰，如通过噬菌体展示技术。抗体可以例如在轻链或重链的恒定区或可变区中被修饰。举例来说，抗体可通过例如存在于抗体可变区一个或多个 CDR 和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于抗体恒定区之内的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。生产方法包括在转基因哺乳动物尤其是有蹄动物的奶或其它体液中。最优选在山羊 (caprines) 或牛中。

[0010] 本发明的其它特点和有利之处将因以下详细说明和权利要求而一目了然。

#### 附图的简要说明

[0011] 图 1 显示了纯化 IgG4 和富集 150kD 种类的流程图。

[0012] 图 2A 为 IgG4 解离的动力学研究 (使用多种浓度的柠檬酸盐)。

[0013] 图 2B 为 IgG4 解离的动力学研究 (使用多种浓度的柠檬酸盐)。

[0014] 图 2C 为 IgG4 解离的动力学研究 (使用多种浓度的柠檬酸盐)。

[0015] 图 3A 使用 pH 3.0 和 100 mM 的甘氨酸进行的 IgG4 解离动力学研究。

[0016] 图 3B 使用 pH 3.0 和 200 mM 的甘氨酸进行的 IgG4 解离动力学研究。

[0017] 图 3C 使用 pH 3.5 和 100 mM 的甘氨酸进行的 IgG4 解离动力学研究。

[0018] 图 3D 使用 pH 3.5 和 200 mM 的甘氨酸进行的 IgG4 解离动

力学研究。

[0019] 图 4 在大小排阻层析之后进行的抗体解离动力学研究。

[0020] 图 5 为 IgG4 r-Mab 中 80kD 和 150 kD 种类的分选（在长达三个月的时间内测试了纯化材料的稳定性。未检测到聚集或降解）。

[0021] 图 6 为阳离子交换层析级分的等电聚焦分析。

[0022] 图 7 为 IgG4 CEX2/5/02 级分的 N-连接的寡糖分布。

## 详细描述

### 术语解释:

#### 离子交换层析:

蛋白质由 20 个常见氨基酸组成。这些氨基酸中有些拥有或带正电荷或带负电荷的侧链基团（“R”基）。比较正负电荷的整体数目将会提供有关蛋白质性质的信息。如果蛋白质具有较之于负电荷更多的正电荷，其被描述为碱性蛋白。如果负电荷多于正电荷，则蛋白是酸性的。当蛋白含有优势的离子电荷时，它可与携带相反电荷的支持物结合。碱性蛋白带正电荷，将与带负电荷的支持物结合。酸性蛋白带负电荷，将与阳性支持物结合。因而应用离子交换层析允许分子基于它们的电荷而分离。分子家族（酸性、碱性和中性）通过该技术可容易地分离。这可能是最频繁使用的用于蛋白质纯化的层析技术。

#### 疏水相互作用层析 ("HIC")

HIC 允许比离子交换层析所观察到的大得多的选择性。这些疏水氨基酸可结合到含固定了的疏水基团的支持物上。应当注意这些 HIC 支持物通过“簇集 (clustering)”效应起作用；当这些分子结合时，不形成或共享共价或离子键。

#### 凝胶过滤层析

该技术基于大小和形状分离蛋白。用于凝胶过滤层析的支持物为含有给定大小的称之为“孔”的洞的珠子。较大分子不能穿越所述

孔，绕过珠子运动，并比可穿越孔的较小分子更快地穿过间隔珠子的空间迁移。

### 亲和层析

该技术允许靶分子的一步纯化。该技术可用于纯化任何蛋白，只要存在特异性的配基。

[0023] 本发明涉及用于改善全抗体和半抗体分离的系统。如本文所用，术语“Ig”或“抗体”是指免疫球蛋白分子，例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 分子或其任何亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

[0024] 如本文所用，术语“全 Ig”或“全抗体”是指免疫球蛋白分子，例如 IgA<sub>1</sub> 和 IgA<sub>2</sub>、IgD、IgE、IgG 或 IgM 分子或其任何亚型，其由两条轻链免疫球蛋白亚基和两条重链免疫球蛋白亚基组成，其中两条重链免疫球蛋白亚基通过一个或多个二硫键彼此共价结合。

[0025] 如本文所用，术语“半 Ig”或“半抗体”是指免疫球蛋白分子，例如 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 分子或其任何亚型，其由 1) 一条轻链免疫球蛋白亚基和一条重链免疫球蛋白亚基或者 2) 两条轻链免疫球蛋白亚基和两条重链免疫球蛋白亚基组成，其中重链亚基不通过二硫键彼此共价结合。

[0026] 如本文所用，当用于描述抗体时，术语“同种型”是指抗体的特定类型和亚型，如 IgG4 同种型。

[0027] 如本文所用，短语“差异性地延缓迁移”是指涉及至少两种蛋白的过程，其中蛋白被施加到柱上，并且一种蛋白进入和离开柱子所需时间平均起来不同于另一种蛋白进入和离开柱子所需的时间。

[0028] 如本文所用，用以描述蛋白和柱子的相互作用的短语“与……相互作用”是指其中蛋白的迁移被柱改变的过程。蛋白迁移的改变可因以下作用而产生：蛋白和柱子之间瞬时的分子相互作用，如包括范德瓦耳斯力和/或偶极-偶极相互作用；蛋白和柱子之间稳定的相互作用，如包括范德瓦耳斯力或偶极-偶极相互作用；或者柱子对

不同大小的蛋白在通过柱子时所经历的有效柱体积的影响。

[0029] 如本文所用，短语“瞬时分子相互作用”是指以小于1秒的半衰期形成和断开的或者可逆的分子结合相互作用。注意就本发明而言所述材料能够从柱子上洗脱下来，这一点也很重要。

[0030] 如本文所用，短语“稳定的分子相互作用”是指以等于或大于1秒的半衰期形成和断开的分子结合相互作用。

[0031] 如本文所用，用以描述蛋白和柱子之间的相互作用的短语“为...所保留”或“结合”是指具有足够强度和持续时间的相互作用，使得若干个柱体积的合适洗涤缓冲液可施加（即通过）柱子，而洗涤缓冲液中不会有多于10%的蛋白自柱中洗脱下来。优选地，当蛋白为柱子所保留或与之结合时，在向柱子施加若干个柱体积的合适的洗涤缓冲液之后，少于25%、10%、5%、2%、1%的蛋白会从柱子上洗掉。

[0032] 如本文所用，作为应用于纯化的半抗体制剂如层析纯化的半抗体制剂的术语“纯”是指其中不多于约25%或更少的总抗体浓度由全抗体组成的半抗体制剂。优选地，不多于约15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的总抗体浓度由全抗体组成。

[0033] 如本文所用，作为应用于纯化的全抗体制剂如层析纯化的全抗体制剂的术语“纯”是指其中不多于约30%或更少的总抗体浓度由半抗体组成的半抗体制剂。再次地，它是产物特异性的，但30为所报道的最高值。优选地，不多于约30%、20%、15%、10%、5%或更少的总抗体浓度由半抗体组成。

[0034] 其它术语具有其通常的定义，如将会由本发明所属技术领域技术人员所定义的那样。

#### 本发明的实施方案：抗体结构或特异性的改变

[0035] 根据本发明，存在许多提供抗体结构有益修饰的实施方案。这些变化反映了用于生产所讨论抗体的DNA的改变。

[0036] 在有些实施方案中，抗体含重链铰链区的修饰。举例来说，铰链区或其部分已通过缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天

然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。

[0037] 在有些实施方案中，样品由哺乳动物获得，如有蹄类动物（如牛、山羊或绵羊）、猪、兔或小鼠。举例来说，样品可从奶、血液（如血清）或组织匀浆中获得。在其它实施方案中，样品由鸟类获得，如鸡、火鸡、鸭、雉鸡或鸵鸟。举例来说，样品可从卵、血液（如血清）或组织匀浆中获得。又在另一个实施方案中，样品是曾用来培养细胞如哺乳动物细胞、鸟类细胞、鱼细胞或昆虫细胞的培养基。在优选的实施方案中，提供样品的哺乳动物、鸟类或细胞为转基因哺乳动物、鸟类或细胞，如产生目的抗体如外源抗体的转基因哺乳动物、鸟类或细胞。在优选的实施方案中，样品是从哺乳动物如产生目的抗体如外源抗体的转基因哺乳动物的奶中获得的。

[0038] 在优选的实施方案中，在降低样品的 pH 之前部分纯化样品。举例来说，可处理样品以除去非免疫球蛋白的蛋白质、小分子和脂质。此类处理可包括层析步骤如离子交换层析或亲和层析、沉淀步骤以及离心步骤。举例来说，可处理奶以除去酪蛋白、细胞碎片和脂质；可处理卵以除去溶菌酶；可例如通过起始凝血处理血液以除去细胞和凝血因子；并且可处理组织匀浆和细胞培养基以除去不可溶的蛋白和细胞碎片。在有些实施方案中，通过向样品中加酸，例如酸性缓冲液，如甘氨酸-HCl、柠檬酸盐、乙酸盐、甲酸盐缓冲液或酸性溶液，如 HCl 或磷酸溶液而降低样品的 pH。在优选的实施方案中，通过向样品中添加甘氨酸-HCl 缓冲液而降低样品的 pH。

[0039] 在优选的实施方案中，降低样品的 pH，直至解离完成。在有些实施方案中，降低样品的 pH 直到 pH 为大约 4.0、3.5 或更低，由此提供其中大多数半抗体彼此解离的所得溶液。在优选的实施方案中，降低样品的 pH 直到 pH 为大约 3.5。

[0040] 在有些实施方案中，柱子为阳离子交换柱。在其它实施方案中，柱子为大小排阻柱。又在其它实施方案中，柱子为疏水相互作用柱子。

[0041] 又在其它实施方案中，柱子为亲和柱。优选地，柱子为阳

离子交换柱。Source S、S-Sepharose、POROS SH 及其它高选择性阳离子交换剂。

[0042] 在有些实施方案中，柱子保留（即结合）存在于所得溶液之中的半抗体。在其它实施方案中，柱子保留（即结合）存在于所得溶液之中的全抗体。又在其它实施方案中，柱子并不保留（即结合）存在于所得溶液之中的半抗体或全抗体，而是与半抗体、全抗体或两者相互作用（如减缓其运动），使得半抗体和全抗体穿越柱子行进的速率不同。在优选的实施方案中，柱子保留（即结合）存在于所得溶液之中的半抗体和全抗体两者。

[0043] 在有些实施方案中，离子交换柱保留（即结合）样品之中存在的大多数抗体。在有些实施方案中，离子交换柱保留样品之中存在的大约 80%、90%、95%、98% 或更多的抗体。在优选的实施方案中，离子交换柱保留（即结合）样品之中存在的大约 80%、90%、95%、98% 或更多的半抗体。在优选的实施方案中，离子交换柱保留（即结合）样品之中存在的大约 80%、90%、95%、98% 或更多的 Ig 全抗体。

[0044] 在优选的实施方案中，柱子在低 pH 如大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低的 pH 条件下结合半抗体。在更为优选的实施方案中，柱子在低 pH 条件下结合半抗体、但在中性到高 pH 如大约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH 条件下不结合半抗体。

[0045] 在优选的实施方案中，柱子在低 pH 如大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低的 pH 条件下结合全抗体。在更为优选的实施方案中，柱子在低 pH 条件以及中性到高 pH 条件如大约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH 下结合全抗体。

[0046] 在有些实施方案中，所述方法进一步包括将柱子置于选择性洗脱为柱子所保留的半抗体的条件之下。此类条件可包括例如改变存在于柱内的缓冲液的 pH 或离子强度。在优选的实施方案中，选择性洗脱结合在柱子上的半抗体的条件包括向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 被升至足以选择性洗脱半抗体的水平。

[0047] 在有些实施方案中，向柱中添加的提高存在于柱内的缓冲

液的 pH 的缓冲液（即“高 pH 缓冲液”）具有大约 4.0 到 8.0 的 pH。在有些实施方案中，所述高 pH 缓冲液包括例如 MES（2-[N-吗啉代]乙烷磺酸）、HEPES（N-[2-羟乙基]哌嗪-N'[4-丁烷磺酸]）、乙酸盐缓冲液或其混合物。在有些实施方案中，高 pH 缓冲液为 Tris 缓冲液（三（羟甲基）氨基甲烷）。缓冲液列表也包括有或无氯化钠的磷酸盐缓冲液。这些缓冲液中有些可以或可以不含离子或非离子型去污剂，象聚山梨酸酯（polysorbate）20 或聚山梨酸酯 80 或 CHAPS 或胆酸盐。在优选的实施方案中，高 pH 缓冲液具有约 4.0 到 8.0 的 pH，并且包括 HEPES-乙酸盐缓冲液。

[0048] 在优选的实施方案中，半抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 升高至大约 6.5、7.0、7.5 或更高而从柱上洗脱下来。在优选的实施方案中，大多数半抗体如 75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更多的半抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 升高至大约 6.5、7.0、7.5 或更高而从柱上洗脱下来。在优选的实施方案中，半抗体通过将存在于柱内的缓冲液的盐浓度升高至高达 300 mM 而从柱上洗脱下来。

[0049] 在优选的实施方案中，当存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 6.5、7.0 或更高时，全抗体依然结合在柱上。在优选的实施方案中，在存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 6.5、7.0 或更高之后，大多数全抗体如 80%、90%、95%、98%、99% 或更多的全抗体依然结合在柱上。

[0050] 在有些实施方案中，如此添加被加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为一个或多个阶梯组成的阶梯式梯度上升。在其它实施方案中，如此添加被加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为线性梯度上升。在其它实施方案中，如此添加被加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 首先作为阶梯式梯度升至例如约 4.0、4.5 或 5.0 的 pH，然后作为线性梯度升至例如约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH。又在其它实施方案中，如此添加被加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 首先作为线性梯度升至例如约 4.5、5.0 或 5.5 的 pH，然后作为阶梯式梯度升至例如约

6.5、7.0、7.5 或更高的 pH。优选地，如此添加被加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为阶梯式梯度升至约 4.5 的 pH，然后作为线性梯度升至约 7.0 的 pH。

[0051] 在有些实施方案中，所述方法进一步包括将柱子置于洗脱为柱子所保留的全抗体的条件之下。此类条件可包括例如改变存在于柱内的缓冲液的 pH 或离子强度。在优选的实施方案中，所述条件包括向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度以足以洗脱全抗体的量增大。在尤为优选的实施方案中，所述条件包括向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 提高，并且向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度增大，其中 pH 以及离子强度提高的组合足以洗脱全抗体。在优选的实施方案中，存在于柱内的缓冲液的 pH 和离子强度是独立地提高的。在其它实施方案中，存在于柱内的缓冲液的 pH 和离子强度同时提高。在优选的实施方案中，在洗脱全抗体之前从柱中洗脱出半抗体，并在提高存在于柱内的缓冲液的离子强度前提高存在于柱内的缓冲液的 pH。

[0052] 在有些实施方案中，向柱中添加的提高存在于柱内的缓冲液的离子强度的缓冲液（即“高离子强度缓冲液”）包括具有高浓度的一种或多种盐。在有些实施方案中，高离子强度缓冲液包括至少一种盐，如 NaCl、KCl，或者可能增大的缓冲液浓度，以至少 5 mM、100 mM、150mM 或更高的浓度存在。在优选的实施方案中，高离子强度缓冲液包括至少大约 50 mM NaCl，或者更优选大约 100 mM NaCl。在有些实施方案中，高离子强度缓冲液进一步包括其它磷酸盐。

[0053] 在优选的实施方案中，全抗体通过：1) 将存在于柱内的缓冲液的 pH 提高至例如约 5 到 7.0 或更高，并且 2) 将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至例如高离子强度缓冲液的离子强度而自柱中洗脱。在尤为优选的实施方案中，全抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 提高至约 7.0 并将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至高离子强度缓冲液的离子强度而自柱中洗脱。

[0054] 在优选的实施方案中，通过将存在于柱内的缓冲液的 pH

提高至约 5.0 到 7.0 或更高、并将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至高离子强度缓冲液的离子强度，大多数全抗体如 51%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的全抗体自柱中洗脱。在优选的实施方案中，洗脱的全抗体约 70%、75%、80%、85%、90% 或更纯。

[0055] 在有些实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度作为由一个或多个阶梯组成的阶梯式梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度作为线性梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度首先作为阶梯式梯度然后作为线性梯度上升。又在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度首先作为线性梯度然后作为阶梯式梯度上升。在优选的实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度升至大约与 5 mM NaCl 溶液相同或更高的离子强度。在优选的实施方案中，在从柱上洗脱全抗体前从柱上洗脱出半抗体，由此允许半抗体与全抗体分离。在尤为优选的实施方案中，在从柱上洗脱全抗体前从柱上洗脱出大多数半抗体如 75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更多的半抗体，由此允许半抗体与全抗体分离。

[0056] 在另一方面，本发明以用于将半抗体与全抗体分离的方法为特征，其中半抗体和全抗体为同一同种型。所述方法包括：

获得包含同一同种型半抗体和全抗体的混合物的样品；

降低样品的 pH，使得半抗体彼此解离，形成所得溶液；

将所得溶液施加到离子交换柱上，使得所述半抗体和全抗体都为柱子所保留；

向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 升至足以选择性地洗脱半抗体的水平；和

向柱子添加缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度升至足以洗脱全抗体的量。

[0057] 在优选的实施方案中，抗体为免疫球蛋白分子，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 分子。优选地，抗体为 IgG4 分子。在其它实施方案中，抗体为 IgA、IgD、IgE 或 IgM 分子。

[0058] 在有些实施方案中，抗体为天然存在的抗体，如在哺乳动物中产生的抗体，例如小鼠单克隆抗体或人抗体。在其它实施方案中，抗体为经修饰的如重组抗体，例如嵌合抗体、人源化抗体、Fc 融合蛋白或抗体片段如 F(ab)<sub>2</sub> 片段。又在其它实施方案中，抗体已就例如其对特定配体的亲和力和特异性而言被改变，例如通过噬菌体展示技术。抗体可在例如轻链或重链的恒定或可变区被修饰。举例来说，抗体可例如通过存在于抗体可变区中一个或多个 CDR 和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于抗体恒定区之内的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。

[0059] 在有些实施方案中，抗体含重链铰链区的修饰。举例来说，铰链区或其部分已通过缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。举例来说，IgG1、IgG2 或 IgG3 抗体可包含 IgG4 型铰链区。

[0060] 在有些实施方案中，样品由哺乳动物获得，如有蹄类动物（如奶牛、山羊或绵羊）、猪、兔或小鼠。举例来说，样品可从奶、血液（如血清）或组织提取物中获得。在其它实施方案中，样品由鸟类获得，如鸡、火鸡、鸭、雉鸡或鸵鸟。举例来说，样品可从卵、血液（如血清）或组织匀浆中获得。又在其它实施方案中，样品是曾用来培养细胞如哺乳动物细胞、鸟类细胞、鱼细胞或昆虫细胞的细胞培养基。在优选的实施方案中，提供样品的哺乳动物、鸟类或细胞为转基因哺乳动物、鸟类或细胞，例如产生目的抗体如外源抗体的转基因哺乳动物、鸟类或细胞。在优选的实施方案中，样品是从哺乳动物例如产生目的抗体如外源抗体的转基因哺乳动物获得的奶。

[0061] 在优选的实施方案中，在降低样品的 pH 之前部分纯化样品。举例来说，可处理样品以除去非免疫球蛋白的蛋白质、小分子和脂质。此类处理可包括层析步骤如离子交换层析或亲和层析、过滤、

沉淀步骤以及离心步骤。举例来说，可处理奶以除去酪蛋白和可溶脂质，以及非外源免疫球蛋白的蛋白质；可处理卵以除去溶菌酶；可例通过起始凝血处理血液以除去细胞；并且可处理组织匀浆和细胞培养基以除去不可溶的蛋白和细胞碎片。在有些实施方案中，通过向样品中加酸而降低样品的 pH，例如酸性缓冲液，如甘氨酸-HCl、柠檬酸盐、乙酸盐、甲酸盐缓冲液或酸性溶液，如 HCl 或磷酸溶液。在优选的实施方案中，通过向样品中添加甘氨酸-HCl 缓冲液而降低样品的 pH。

[0062] 在优选的实施方案中，降低样品的 pH，直至大多数半抗体彼此解离。在有些实施方案中，降低样品的 pH，直至大约 60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的半抗体彼此解离。在有些实施方案中，降低样品的 pH 直到它为大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低，由此提供其中大多数半抗体彼此解离的所得溶液。在有些实施方案中，降低样品的 pH 直到它为大约 2.0 到 4.0。在优选的实施方案中，降低样品的 pH 直到它为大约 3.5。

[0063] 在优选的实施方案中，离子交换柱为阳离子交换柱。

[0064] 在有些实施方案中，离子交换柱保留（即结合）存在于样品之中的大多数抗体。在有些实施方案中，离子交换柱保留（即结合）存在于样品之中的大约 51%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的抗体。在优选的实施方案中，离子交换柱保留（即结合）存在于样品之中的大约 51%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的半抗体。在优选的实施方案中，离子交换柱保留（即结合）存在于样品之中的大约 51%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的全抗体。

[0065] 在优选的实施方案中，离子交换柱在低 pH 如大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低的 pH 条件下结合半抗体。在更为优选的实施方案中，离子交换柱在低 pH 条件下结合半抗体，但在中性到高 pH 如大约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH 条件下不结合半抗体。

[0066] 在优选的实施方案中，离子交换柱在低 pH 如大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低的 pH 条件下结合全抗体。在更为优选的实施方案中，离子交换柱在低 pH 如大约 5.0、4.5、4.0、3.5 或更低的 pH 条件下结合全抗体。

案中，离子交换柱在低 pH、以及中性到高 pH 条件如大约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH 下结合全抗体。

[0067] 在有些实施方案中，向柱中添加的提高存在于柱内的缓冲液的 pH 的缓冲液（即“高 pH 缓冲液”）具有大约 4.0 到 8.0 的 pH。在有些实施方案中，高 pH 缓冲液包括例如 MES（2-[N-吗啉代]乙烷磺酸）、HEPES（N-[2-羟乙基]哌嗪-N' [4-丁烷磺酸]）、乙酸盐缓冲液或其混合物。在有些实施方案中，高 pH 缓冲液为 Tris 缓冲液（三（羟甲基）氨基甲烷）。缓冲液列表也包括有或无氯化钠的磷酸盐缓冲液。这些缓冲液中有些可能或可能不含离子或非离子型去污剂，象聚山梨酸酯 20 或聚山梨酸酯 80 或 CHAPS 或胆酸盐。

[0068] 在优选的实施方案中，高 pH 缓冲液具有约 4.0 到 8.0 的 pH，并且包括 HEPES-MES-乙酸盐缓冲液。

[0069] 在优选的实施方案中，半抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 升高至大约 6.5、7.0、7.5 或更高而从柱上洗脱下来。在优选的实施方案中，大多数半抗体如 75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更多的半抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 升高至大约 6.5、7.0、7.5 或更高而从柱上洗脱下来。在优选的实施方案中，洗脱的半抗体为大约 75%、80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多的全抗体。也就是说，当你洗脱半 Ab 时，所得产物可看作是全抗体，或者可表示为具有特定纯度水平的产物水平。举例来说，为了本发明的目的，我们将按百分比来提及多少 Ab 为 150 kD。

[0070] 在优选的实施方案中，当存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 6.5、7.0、7.5 或更高时，全抗体依然结合在柱上。在优选的实施方案中，在存在于柱内的缓冲液的 pH 升至大约 6.5、7.0、7.5 或更高之后，大多数全抗体如 80%、90%、95%、98%、99% 或更多的全抗体依然结合在柱上。

[0071] 在有些实施方案中，如此添加向柱中加入的高 pH 缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为由一个或多个阶梯组成的阶梯式梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高 pH 缓冲液，

使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为线性梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高 pH 缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 首先作为阶梯式梯度升至例如约 4.0、4.5 或 5.0 的 pH，然后作为线性梯度升至例如约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH。又在其它实施方案中，如此添加待加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 首先作为线性梯度升至例如约 4.5、5.0 或 5.5 的 pH，然后作为阶梯式梯度升至例如约 6.5、7.0、7.5 或更高的 pH。在优选的实施方案中，如此添加待加入柱中的缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的 pH 作为阶梯式梯度升至约 4.5 的 pH，然后作为线性梯度升至约 7.0 的 pH。我们也应当指出也可以使用线性梯度注解。

[0072] 在有些实施方案中，向柱中添加的提高存在于柱内的缓冲液的离子强度的缓冲液（即“高离子强度缓冲液”）包括具有高浓度的一种或多种盐。在有些实施方案中，高离子强度缓冲液包括至少一种盐，如 NaCl、KCl，或者可能增大的缓冲液浓度，以至少 5 mM、100 mM、150mM 或更高的浓度存在。在优选的实施方案中，高离子强度缓冲液包括至少大约 5 mM NaCl，更优选大约 100 mM NaCl 或更高。在有些实施方案中，高离子强度缓冲液进一步包括 MES（2-[N-吗啉代]乙烷磺酸）、HEPES（N-[2-羟乙基]哌嗪-N'[4-丁烷磺酸]）、乙酸盐缓冲液或其混合物。在有些实施方案中，高 pH 缓冲液可以是 Tris 缓冲液（三（羟甲基）氨基甲烷）。缓冲液列表也包括有或无氯化钠的磷酸盐缓冲液。这些缓冲液中有些可能或可能不含离子或非离子型去污剂，象聚山梨酸酯 20 或聚山梨酸酯 80 或 CHAPS 或胆酸盐。

[0073] 在有些实施方案中，全抗体通过提高存在于柱内的缓冲液的 pH 和离子强度两者而自柱中洗脱。在优选的实施方案中，全抗体通过：1) 将存在于柱内的缓冲液的 pH 提高至例如约 6.5、7.0、7.5 或更高，并且 2) 将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至例如高离子强度缓冲液的离子强度而自柱中洗脱。在尤为优选的实施方案中，全抗体通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 提高至约 7.0 并将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至高离子强度缓冲液的离子强度而自柱中洗

脱。

[0074] 在优选的实施方案中，通过将存在于柱内的缓冲液的 pH 提高至例如约 6.5、7.0、7.5 或更高、并将存在于柱内的缓冲液的离子强度提高至例如高离子强度缓冲液的数值，大多数全抗体如 51%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多的全抗体自柱中洗脱。在优选的实施方案中，洗脱的全抗体为约 70%、75%、80%、85%、90% 或更纯。

[0075] 在有些实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度作为由一个或多个阶梯组成的阶梯式梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度作为线性梯度上升。在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度首先作为阶梯式梯度然后作为线性梯度上升。又在其它实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度首先作为线性梯度然后作为阶梯式梯度上升。在优选的实施方案中，如此添加向柱中加入的高离子强度缓冲液，使得存在于柱内的缓冲液的离子强度升至大约与 5 mM NaCl 溶液相同的离子强度。

[0076] 在优选的实施方案中，在从柱上洗脱全抗体前从柱上洗脱出半抗体，由此允许半抗体与全抗体分离。在尤为优选的实施方案中，在从柱上洗脱全抗体前从柱上洗脱出大多数半抗体如 75%、80%、85%、90%、95%、98% 或更多的半抗体，由此允许半抗体与全抗体分离。

[0077] 在另一方面，本发明以通过本文所述方法获得的纯化的半抗体制剂为特征。

[0078] 在优选的实施方案中，纯化的半抗体制剂包括含  $\gamma$  免疫球蛋白的分子，如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 或 IgG<sub>4</sub> 半抗体。优选地，纯化的半抗体制剂包括 IgG<sub>4</sub> 半抗体。在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂可包括 IgA、IgD、IgE 或 IgM 半抗体。

[0079] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂包括天然存在的半抗体，如在哺乳动物中产生的半抗体，例如小鼠单克隆半抗体或人半

抗体。在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂包括修饰的半抗体，如重组半抗体，例如嵌合半抗体、人源化半抗体、其中可变区被另一多肽取代了的 Fc 融合蛋白或半抗体片段，例如由 F(ab)<sub>2</sub> 片段获得的半抗体。又在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂包括例如已就其对特定配体的亲和力和特异性而言被改变了的半抗体，例如通过噬菌体展示技术。半抗体可在例如轻链或重链的恒定或可变区被修饰。举例来说，半抗体可例如通过存在于半抗体可变区中一个或多个 CDR 和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于半抗体恒定区之内的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。

[0080] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂包括含重链铰链区修饰的半抗体。举例来说，铰链区或其部分已通过例如缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。举例来说，IgG1、IgG2 或 IgG3 半抗体可能包含 IgG4 型铰链区。

[0081] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂中存在的半抗体构成了制剂中存在的全部抗体的 80%、85%、90%、95%、98%、99% 或更多。在优选的实施方案中，纯化的半抗体制剂中存在的半抗体构成了制剂中存在的全部抗体的至少 80%。

[0082] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂含污染物，如蛋白质、小分子、核酸和/或脂质污染物。举例来说，此类污染物可以是从中获得纯化的半抗体制剂的样品和/或用以获得该制剂的过程的反映。举例来说，如果纯化的半抗体制剂是由奶样品获得的，则制剂可能含有典型地见于奶中的污染蛋白或小分子，如酪蛋白、乳糖、磷酸钙、酪蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、乳铁蛋白和/或痕量血清蛋白内源免疫球蛋白象内源免疫球蛋白。如果是获自于卵，则它可能含有典型地见于卵中的污染蛋白或小分子，如溶菌酶、卵清蛋白。如果是获自于动物血清，则它可能含有典型地见于血液中的污染蛋白或小分子，如葡萄糖、胆固醇、血红蛋白、白蛋白、内源抗体。在可通过本发明的方法纯化的最后一种来源或原料流中，如果制剂由细胞培养基获得，

则它可能含有典型地见于细胞培养基中的污染蛋白或小分子，如胞外基质蛋白、青霉素、葡萄糖以及来自于细胞培养基的其它组分。

[0083] 在另一方面，本发明以通过本文所述方法获得的纯化的全抗体制剂为特征。

[0084] 在优选的实施方案中，纯化的全抗体制剂包括含 $\gamma$ 免疫球蛋白的分子，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 全抗体。优选地，纯化的全抗体制剂包括 IgG4 全抗体。在其它实施方案中，纯化的全抗体制剂包括 IgA、IgD、IgE 或 IgM 全抗体。

[0085] 在有些实施方案中，纯化的全抗体制剂包括天然存在的全抗体，如在哺乳动物中产生的全抗体，例如小鼠或大鼠单克隆全抗体或人全抗体。在其它实施方案中，纯化的全抗体制剂包括修饰的全抗体，如重组全抗体，例如嵌合全抗体、人源化全抗体、Fc 融合蛋白或其片段或全抗体片段，如 F(ab)<sub>2</sub> 片段。又在其它实施方案中，纯化的全抗体制剂包括例如已就其对特定配体的亲和力和特异性而言被改变了的全抗体，例如通过噬菌体展示技术。全抗体可在例如轻链或重链的恒定或可变区被修饰。举例来说，全抗体可例如通过存在于全抗体可变区中一个或多个 CDR 和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于全抗体恒定区之内的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。

[0086] 在有些实施方案中，纯化的全抗体制剂包括含重链铰链区修饰的全抗体。举例来说，铰链区或其部分已通过例如缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。举例来说，IgG1、IgG2 或 IgG3 全抗体可能包含 IgG4 型铰链区。

[0087] 在有些实施方案中，纯化的全抗体制剂中存在的全抗体构成了制剂中存在的全部抗体的 60%、70%、80%、85%、90% 或更多。在优选的实施方案中，纯化的全抗体制剂中存在的全抗体构成了制剂中存在的全部抗体的至少 90%。

[0088] 在有些实施方案中，全抗体制剂含全抗体和半抗体两者。

在优选的实施方案中，全抗体构成了此制剂中存在的抗体总量的至少80%、85%、90%、95%或更多。在尤为优选的实施方案中，全抗体构成了此制剂中存在的抗体总量的至少90%或更多。

[0089] 在另一方面，本发明以纯化的半抗体制剂为特征。

在优选的实施方案中，纯化的半抗体制剂包括含 $\gamma$ 免疫球蛋白的分子，如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4半抗体。在尤为优选的实施方案中，纯化的半抗体制剂包括IgG4半抗体。在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂包括IgA、IgD、IgE或IgM半抗体。

[0090] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂包括天然存在的半抗体，如在哺乳动物中产生的半抗体，例如小鼠单克隆半抗体或人半抗体。在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂包括修饰的半抗体，如重组半抗体，例如嵌合半抗体、人源化半抗体、或半抗体片段，例如由F(ab)<sub>2</sub>片段获得的半抗体。又在其它实施方案中，纯化的半抗体制剂包括例如已就其对特定配体的亲和力和特异性而言被改变了的半抗体，例如通过噬菌体展示技术。半抗体可在例如轻链或重链的恒定或可变区被修饰。举例来说，半抗体可例如通过存在于半抗体可变区中一个或多个CDR和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于半抗体恒定区之内的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。

[0091] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂包括含重链铰链区修饰的半抗体。举例来说，铰链区或其部分已通过例如缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。举例来说，IgG1、IgG2或IgG3半抗体可能包含IgG4型铰链区。

[0092] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂中存在的半抗体构成了制剂中存在的全部抗体的80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多。在优选的实施方案中，纯化的半抗体制剂中存在的半抗体构成了制剂中存在的全部抗体的至少99%。

[0093] 在有些实施方案中，纯化的半抗体制剂含污染物，如蛋白

质、小分子和/或脂质污染物。举例来说，此类污染物可以是从中获得纯化的半抗体制剂的样品和/或用以获得该制剂的过程的反映。举例来说，如果纯化的半抗体制剂是由奶样品获得的，则制剂可能含有典型地见于奶中的污染蛋白或小分子，如酪蛋白、乳糖、磷酸钙、酪蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、乳铁蛋白和/或痕量血清蛋白内源免疫球蛋白象内源免疫球蛋白...如果制剂是由卵获得的，则它可能含有典型地见于卵中的污染蛋白或小分子，如溶菌酶...如果制剂是由血清获得的，则它可能含有典型地见于血液中的污染蛋白或小分子，如葡萄糖、胆固醇、血红蛋白、白蛋白、内源抗体...或者如果制剂是由细胞培养基获得的，则它可能含有典型地见于细胞培养基中的污染蛋白或小分子，如胞外基质蛋白、青霉素、葡萄糖以及来自于细胞培养基的其它组分。

[0094] 在另一方面，本发明以纯化的抗体制剂为特征，其中制剂包括半抗体和全抗体的分离。

[0095] 在优选的实施方案中，纯化的抗体制剂包括含免疫球蛋白的分子，如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 或 IgG<sub>4</sub> 全及半抗体。在尤为优选的实施方案中，纯化的抗体制剂包括 IgG<sub>4</sub> 全及半抗体。在其它实施方案中，纯化的抗体制剂包括 IgA、IgD、IgE 或 IgM 全及半抗体。这些抗体可以是任何哺乳动物的那些抗体，但它们优选完全是人抗体或人源化抗体。

[0096] 在有些实施方案中，纯化的抗体制剂包括天然存在的抗体，如在哺乳动物中产生的抗体，例如小鼠或大鼠单克隆抗体或人抗体。在其它实施方案中，纯化的抗体制剂包括修饰抗体，如重组抗体，例如嵌合抗体、转基因抗体、人源化抗体、或抗体片段，例如 F(ab) 和 F(ab)<sub>2</sub> 片段。又在其它实施方案中，纯化的抗体制剂包括例如已就其对特定配体的亲和力和特异性而言被改变了的抗体，例如通过噬菌体展示技术。抗体可在例如轻链或重链的恒定或可变区被修饰。举例来说，抗体可例如通过存在于抗体可变区中一个或多个 CDR 和/或构架部分之内的一个或多个氨基酸残基、和/或存在于抗体恒定区之内的一

个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代而被修饰。

[0097] 在有些实施方案中，纯化的抗体制剂包括含重链铰链区修饰的抗体。举例来说，铰链区或其部分已通过缺失、插入或取代而被修饰，如具有不同于天然存在的同型和同亚型抗体中存在的铰链区的铰链区或其部分。举例来说，IgG1、IgG2 或 IgG3 抗体可能包含 IgG4 型铰链区。

[0098] 在有些实施方案中，纯化的抗体制剂中存在的全抗体构成了制剂中存在的全部抗体的 60%、70%、80%、85%、90%或更多。在优选的实施方案中，纯化的抗体制剂中存在的全抗体构成了该制剂中存在的全部抗体的至少 70%。

[0099] 在有些实施方案中，纯化的抗体制剂含污染物，如蛋白质、核酸、小分子和/或脂质污染物。举例来说，此类污染物可以是从中获得纯化的抗体制剂的样品和/或用以获得该制剂的过程的反映。举例来说，如果纯化的抗体制剂是由奶样品获得的，则制剂可能含有典型地见于奶中的污染蛋白或小分子，如酪蛋白、乳糖、磷酸钙、酪蛋白、 $\alpha$ -乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、乳铁蛋白和/或痕量血清蛋白内源免疫球蛋白象内源免疫球蛋白。如果制剂是由卵获得的，则它可能含有典型地见于卵中的污染蛋白或小分子，如溶菌酶、卵清蛋白。如果制剂是由血清获得的，则它可能含有典型地见于血液中的污染蛋白或小分子，如葡萄糖、胆固醇、血红蛋白、白蛋白、内源抗体。最后如果制剂是由细胞培养基获得的，则它可能含有典型地见于细胞培养基中的污染蛋白或小分子，如胞外基质蛋白、青霉素、葡萄糖以及来自于细胞培养基或生物反应器容器的其它组分。

## 实施例 1

### 两种形式的 hIgG<sub>4</sub> 的优化分离

[00100] 1. 山羊奶中 rhIgG<sub>4</sub> 的分离

[00101] 2. 80kD 和 150kD 种类物质的分离

[00102] 3. 配制

### 1. 山羊奶中 rhIgG4 的分离

通过双重切向流过滤来澄清山羊奶，将澄清的奶以 10 mg/mL 的充填容量 (loading capacity) 施加到 POROS A 蛋白 50 柱上。线速度 120cm/hr。洗脱用 0.2 M 甘氨酸-HCl pH 3.5 进行。

将洗脱蛋白的 pH 调整至 3.6

将抗体在室温下温育 1 小时。

### 2. 80kD 和 150kD 种类物质 (半及全 IgG4) 的分离

调整 pH 至 4.5，并将材料加载到 Source S 柱上。

充填容量 9 mg/mL

线速度 120cm/hr

80kD 种类物质 (半抗体) 的洗脱通过使用从 pH 4.5 到 pH 7.3 的 pH 梯度进行。

150kD 种类物质 (全抗体) 的洗脱通过应用小幅增加的 NaCl 浓度 (0-10 mM) 进行。

### 3. 配制

收集全及半抗体级分，浓缩并更换缓冲液为 PBS pH 6.0，添加 Tween 80。

表 1. 未分级的、全抗体富集的以及半抗体富集的材料稳定性研究 (通过大小排阻层析分析的聚集)

样品	%单体
12 周时的 150kD IgG4	98.8
9 周时的 150kD IgG4	99.6
8 周时的 150kD IgG4	99.6
7 周时 PA 纯化的 IgG4	99.2
6 周时的 80kD IgG4	99.8

表 2. 全抗体富集材料的稳定性研究  
(非还原条件下的 SDS-PAGE)

时间点	150 kD MAb 含量 (%)
0 时间点	82
1 周	82
2 周	81
3 周	81
4 周	81
5 周	81
7 周	82
8 周	82

### 转基因动物中的抗体生产

[00103] 免疫球蛋白为正常地由循环的 B 淋巴细胞合成、修饰、装配并分泌的杂多聚蛋白。利用重组 DNA 技术, 有可能设计 B 淋巴细胞以外的细胞以表达免疫球蛋白基因。这种努力中所遭遇的困难来自数种因素: 1) 免疫球蛋白的重链和轻链都必须以适当的水平共表达; 2) 新生免疫球蛋白经历多种可能在异源细胞中不够保真或有效发生的共翻译修饰和翻译后修饰; 3) 免疫球蛋白需要附属的伴侣蛋白用于其装配; 4) 细胞的合成及分泌能力可能不足以分泌大量的异源蛋白; 以及 5) 分泌的免疫球蛋白可能在外来细胞的胞外环境中不稳定。

[00104] 由于免疫球蛋白具有许多治疗、诊断和工业应用, 本领域需要这样的表达系统, 即其中这些蛋白能够以高水平、以功能性构象并以允许其容易地收获和纯化的形式可再现地生产。转基因动物技术的发展增大了使用大动物作为遗传设计的蛋白工厂的可能性。P. C. T. 申请 WO 90/04036 (1990 年 4 月 19 日公布) 公开了转基因技术用于免疫球蛋白表达的用途。WO 92/03918 (1992 年 3 月 19 日) 和 WO 93/12227

(1993年6月24日)教导了将未重排的免疫球蛋白基因引入到转基因动物的生殖系中。使用完整的免疫球蛋白基因(包括其相应的启动子区在内)将导致其在淋巴细胞中表达,并分泌到宿主动物的血流中;这使得用于抑制宿主内源免疫球蛋白表达的策略成为必要,并提出了从含许多其它蛋白质、包括蛋白水解酶在内的血清中纯化免疫球蛋白的问题。此外,如选择转基因途径,必须以使得重和轻链基因相伴表达的方式将其都掺入到宿主基因组之中。

[00105] 本发明涉及用于生产分泌到转基因动物奶之中的单克隆抗体的方法以及用于生产此类动物的方法。这是通过工程化DNA构建体实现的,其中将编码特定对的免疫球蛋白重和轻链的DNA片段克隆到优先在乳腺上皮细胞中表达的启动子序列的下游。然后将含启动子连接的重和轻链基因的该重组DNA共注射到植入前的胚胎中。对子代进行两种转基因存在的筛选。然后对来自这些世系的代表性雌兽进行挤奶,并对奶进行单克隆抗体存在的分析。为使抗体存在,重和轻链基因必须都同时在同一细胞中表达。可从奶中纯化抗体,或者包含免疫球蛋白的奶本身可用于向受体递送抗体。

[00106] 可用于本发明的免疫球蛋白基因可由天然来源获得,如单个B细胞克隆或由其衍生的杂交瘤。备选地,它们可包含合成的单链抗体,其中轻链和重链可变区作为单个多肽的一部分表达。此外,可使用已通过改变或者并不改变氨基酸序列的核苷酸取代、通过序列的添加或缺失、或者通过创建其中多肽的不同区域来自不同来源的杂合基因而被预测性地改变的重组抗体基因。抗体基因就其本质而言是极端多样化的,因而自然地耐受大量的变异。本领域熟练技术人员将会理解通过本发明的方法生产抗体的唯一限制在于抗体必须装配为功能性构象并以稳定的形式分泌到奶中。

[00107] 可用于实施本发明的转录启动子是优先在乳腺上皮细胞中激活的那些启动子,包括调节编码乳蛋白如酪蛋白、 $\beta$ 乳球蛋白(Clark等,(1989) *Bio/Technology* 7: 487-492)、乳清酸性蛋白质(Gordon等,(1987) *Bio/Technology* 5: 1183-1187)以及乳白蛋白

(Soulier 等, (1992) FEBS Letts. 297: 13)的基因的启动子。酪蛋白启动子可源自于任一哺乳动物物种的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\kappa$ 酪蛋白基因; 优选的启动子源自于山羊 $\beta$ -酪蛋白基因 (DiTullio, (1992) Bio/Technology 10: 74-77)。

[00108] 为用于本发明, 可使用如下方法学: 在启动子序列的 3' 端引入 XhoI 限制性位点, 以允许免疫球蛋白编码序列的常规插入。优选地, 插入的免疫球蛋白基因在其 3' 一侧侧接来自哺乳动物特异性基因的同源基因组序列, 以提供多聚腺苷酰化位点和转录本稳定化序列。构建体的体内转录导致产生含有位于免疫球蛋白基因翻译起始密码子上游的酪蛋白来源的 5' 非翻译序列以及位于免疫球蛋白基因翻译终止密码子下游的 3' 非翻译序列的稳定 mRNA。最后, 整个盒 (即启动子-免疫球蛋白-3' 区) 侧接使得所述启动子-cDNA 盒容易地作为单个片段切割的限制性位点。这易化了在注射到受精卵之前多余的原核载体来源的 DNA 序列的去除。

[00109] 然后将启动子连接的免疫球蛋白重和轻链 DNA 引入到哺乳动物的生殖系中, 如奶牛、绵羊、山羊、小鼠、牛、骆驼或猪。哺乳动物在文中定义为排除人之外的、具有乳腺且产奶的所有动物。优选在长的时段内大量产奶的哺乳动物物种。典型地, 将 DNA 注射到受精卵的原核之中, 然后将其植入受体雌兽的子宫之中并令其妊娠。出生后, 对推定的转基因动物测试引入 DNA 的存在。这很容易地通过利用与受体物种的 DNA 不表现出交叉杂交的注射基因片段作为探针, 由血细胞或其它可用组织提取的 DNA 的 Southern 印迹杂交实现。选择表现出至少一个拷贝的重链和轻链两种免疫球蛋白基因迹象的子代用于进一步的分析。

[00110] 可以利用任何本领域标准的免疫学技术 (如 Western 印迹、放射性免疫测定、ELISA), 对转基因雌兽进行免疫球蛋白分泌到奶中的测定。该分析中所用抗-免疫球蛋白抗体可以是检测分离的重链或轻链的多克隆或单克隆抗体或者仅与完全装配的 (H2L2) 免疫球蛋白反应的其它抗体。

[00111] 重组免疫球蛋白也就其功能而言进行特征描述，即对特定抗原的结合特异性和亲和力。这利用本领域标准的免疫学方法实现，例如斯卡查德 (Scatchard) 分析、对固定抗原的结合等。通过将上述检测法应用于在自动回收后已被温育渐增时间的奶，也测定给定物种的奶中免疫球蛋白的稳定性特征。

[00112] 利用对固定的 G 蛋白的吸附、柱层析以及抗体纯化领域普通技术人员公知的其它方法，可从奶中纯化通过本发明的方法生产的免疫球蛋白。

[00113] 个体转基因哺乳动物中重组免疫球蛋白的产量水平主要是由转基因在注射到受精卵之后的整合位点和方式决定的。从而，源自于不同注射卵的转基因子代可能就此参数而言变化多样。因此在代表性子代中监测奶中重组免疫球蛋白的含量，且优选最高产的雌兽。

[00114] 本领域熟练技术人员将会认可本发明的方法可用于优化天然及合成的免疫球蛋白的生产。创建转基因动物、测试重链和轻链两种基因的存在、分析免疫球蛋白分泌到雌性子代奶之中、以及最后评估所得抗体质量的步骤可顺序重复，而无需过度实验，以确立用于不同应用的优选构建体。

[00115] 根据本发明，重组免疫球蛋白的性质及其具体使用方式可变化多样。在一个实施方案中，本发明涵盖高水平表达自奶中收集和纯化并以纯化形式使用的抗体。高水平表达在文中定义为大约 1 mg/ml 的蛋白产量。在另一个实施方案中，为人类提供抵抗感染性疾病保护的期望抗体被工程化；然后通过饮用奶实现治疗性给药。又在另一实施方案中，泌乳动物被工程化，以生产对其后代特别有益的抗体，它们通过吸奶获得这些抗体。又在另一实施方案中，动物生产保护泌乳动物本身抵抗乳腺病原体如引起乳腺炎的细菌的抗体。

[00116] 根据本发明生产的转基因、重组或嵌合抗体（如半抗体和/或全抗体）在广泛种类的治疗操作中，例如在制备用于向患者给药的药物组合物中、或者在疾病的诊断中 useful。举例来说，转基因生产的抗体如本领域所公知的那样可用作为抗-关节炎制剂或抗-癌制剂。

[00117] 转基因技术在利用乳蛋白特异性信号和启动子序列在转基因动物的奶中商业生产重组抗体中的应用较之于传统的抗体生产方法提供了显著的优势。这些优势包括所需资本支出总量的缩减、在产品研发生命周期早期投于建造工厂的资本需求的消除、以及努力生产抗体的每个单元的直接生产成本更低。至关重要的是通过本发明变得可用的分离技术允许全抗体与其所有二硫键并非完整无损的抗体解离。事实上，转基因生产可能代表了唯一技术上和经济上可行的商业生产方法。

[00118] 本发明的方法示范了导致正常不分泌的蛋白（如抗体或抗体片段）在转基因哺乳动物奶中有效分泌的策略。本文已证明向抗体 DNA 转录本的 N-末端部分添加山羊 $\beta$ -酪蛋白信号肽、或者 $\beta$ -酪蛋白信号肽和 $\beta$ -酪蛋白的 N-末端部分足以在转基因小鼠及其它转基因动物的奶中分泌这些正常为胞浆的蛋白质。因而，本发明的方法促进了期望抗体或其片段在转基因哺乳动物的奶中可靠和一致的生产。

### 乳特异性启动子

[00119] 可用于实施本发明的转录启动子是优先在乳腺上皮细胞中激活的启动子，包括调节编码乳蛋白如酪蛋白、 $\beta$ 乳球蛋白 (Clark 等, (1989) *Bio/Technology* 7: 487-492)、乳清酸性蛋白质 (Gordon 等, (1987) *Bio/Technology* 5: 1183-1187) 以及乳白蛋白 (Soulier 等, (1992) *FEBS Letts.* 297: 13) 的基因的启动子。酪蛋白启动子可源自于任一哺乳动物物种的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 或 $\kappa$ 酪蛋白基因；优选的启动子源自于山羊 $\beta$ 酪蛋白基因 (DiTullio, (1992) *Bio/Technology* 10: 74-77)。乳特异性蛋白启动子或在乳腺组织中特异性激活的启动子可源自于 cDNA 或基因组序列。优选地，它们是基因组来源的。

[00120] 所有上文所列乳腺特异性基因的 DNA 序列信息在至少一种并且通常在数种生物体中可获得。如参见 Richards 等, *J Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) ( $\alpha$ -乳球蛋白, 大鼠); Campbell 等, *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984) (大鼠 WAP); Jones 等, *J. Biol.*

*Chem.* 260, 7042-7050 (1985) (大鼠 $\beta$ -酪蛋白); Yu-Lee & Rosen, *J. Biol. Chem.* 258, 10794-10804 (1983) (大鼠 $\gamma$ -酪蛋白); Hall, *Biochem. J.* 242, 735-742 (1987) ( $\alpha$ -乳球蛋白, 人); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (牛 $\alpha$ s1 和 $\kappa$ 酪蛋白 cDNA); Gorodetsky 等, *Gene* 66, 87-96 (1988) (牛 $\beta$ 酪蛋白); Alexander 等, *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) (牛 $\kappa$ 酪蛋白); Brignon 等, *FEBS Lett.* 188, 48-55 (1977) (牛 $\alpha$ S2 酪蛋白); Jamieson 等, *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov 等, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988), Alexander 等, *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) (牛 $\beta$ 乳球蛋白); Vilotte 等, *Biochimie* 69, 609-620 (1987) (牛 $\alpha$ -乳球蛋白)。各种乳蛋白基因的结构和功能由 Mercier & Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993) 综述 (特此全文并入用于所有目的)。就有可能必须的附加序列数据而言, 利用现有序列作为探针可容易地克隆侧接已获得区域的序列。来自不同生物体的乳腺特异性调控序列同样通过利用已知的同源核苷酸序列或同源蛋白的抗体作为探针针对此类生物体的文库进行筛选而获得。

### 信号序列

[00121] 在根据本发明可用的信号序列中有乳特异性信号序列或导致真核或原核蛋白分泌的其它信号序列。优选地, 信号序列选自乳特异性信号序列, 即它来自编码分泌到乳中的产物的基因。最为优选地, 乳特异性信号序列与本发明表达系统中所用的乳特异性启动子相关。信号序列的大小对于本发明不是关键的。所有必须的是序列具有足以实现期望的重组蛋白分泌到例如乳腺组织中的大小。举例来说, 来自编码酪蛋白如 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 或 $\kappa$ 酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、乳清酸性蛋白质以及乳白蛋白的基因的信号序列可用于本发明。优选的信号序列为山羊 $\beta$ -酪蛋白信号序列。

[00122] 也可以使用来自其它分泌蛋白, 如由肝细胞、肾细胞或胰腺细胞分泌的蛋白的信号序列。

[00123] 因而，应当理解文中提供了用于将见于多种来源材料的半抗体与全抗体分离的改善的方法的本发明的实施方案仅仅是举例说明了本发明原理的应用。根据前述说明，显然所披露方法要素的形式变化、使用方法、以及用于全抗体和半抗体分离和纯化用途的改善方法的应用是新颖的，并且可被修饰和/或采用，而不会偏离本发明的精神或所附权利要求书的范围。

引用且作为参考并入的文献：

1. MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, 第二版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编辑 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989).
2. NA CLONING, 卷 I 和 II (D. N. Glover 编辑, 1985).
3. NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (B. D. Hames & S. J. Higgins 编辑 1984).
4. TRANSCRIPTION AND TRANSLATION (B. D. Hames & S. J. Higgins 编辑 1984).
5. CULTURE OF ANIMAL CELLS (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987).
6. King DJ 等, *Expression, Purification And Characterization Of A Mouse-Human Chimeric Antibody And Chimeric Fab' Fragment*, BIOCHEM J. 1992 年 1 月 15 日; 281 (第 2 部分): 317-23.
7. IMMOBILIZED CELLS AND ENZYMES (IRL Press, 1986).
8. B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984).
9. METHODS IN ENZYMOLOGY 论文 (Academic Press, Inc., N. Y.).
10. GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. Miller 和 M. P. Calos 编辑, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory).
11. METHODS IN ENZYMOLOGY, 154 和 155 卷 (Wu 等编辑).
12. Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer

和 Walker 编辑, Academic Press, London, 1987).

13. HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, 卷 I-IV (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编辑, 1986).

14. MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

15. 美国专利 No., 6,441,145, Transgenically produced Antithrombin III

16. 美国专利 No., 6,268,487 Purification of biologically active peptides from milk

17. 美国专利 No., 5,849,992 Transgenic production of antibodies in milk

18. 美国专利 No., 5,849,992 Transgenic production of antibodies in milk.

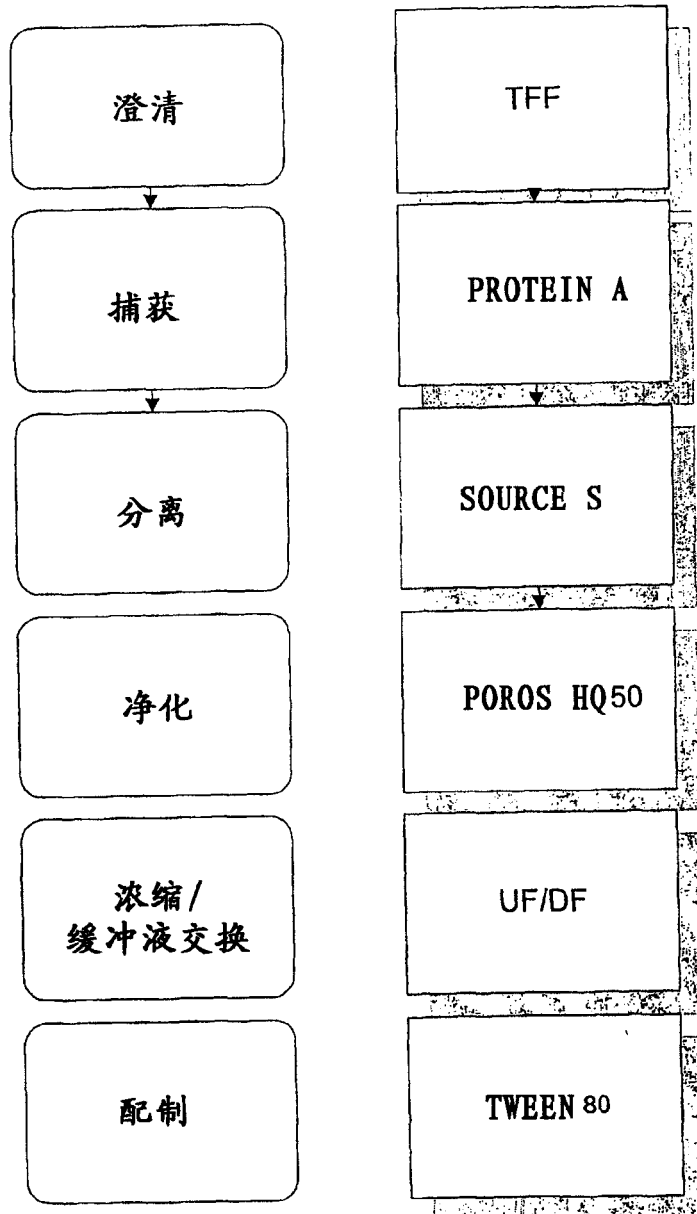


图 1

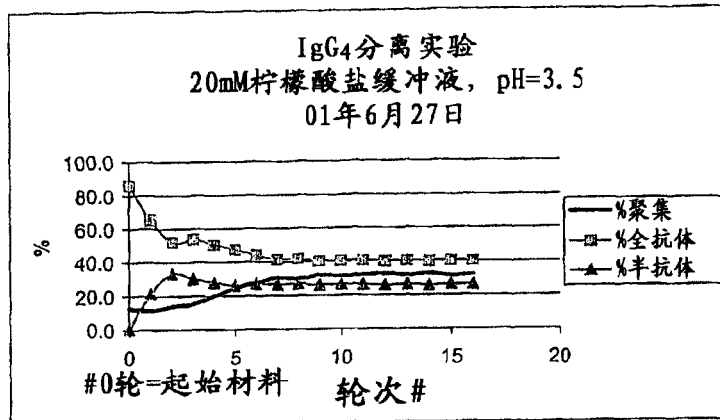


图 2A

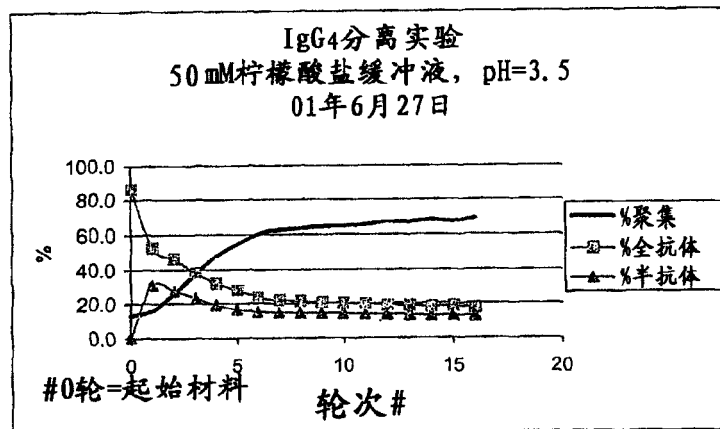


图 2B

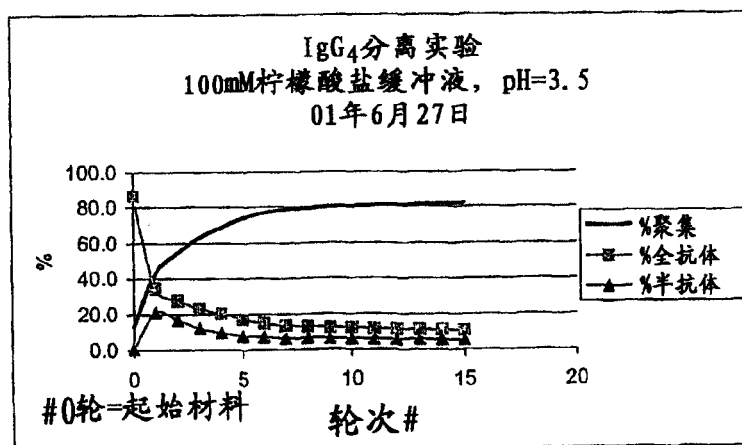


图 2C

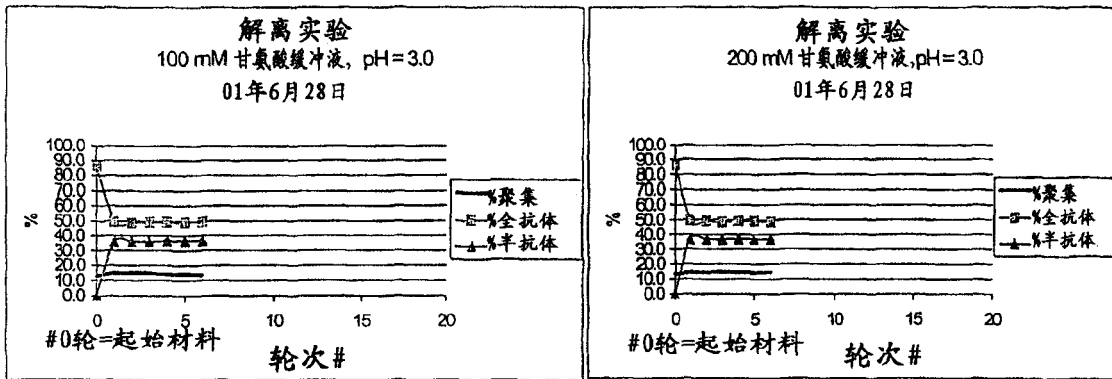


图 3A

图 3B

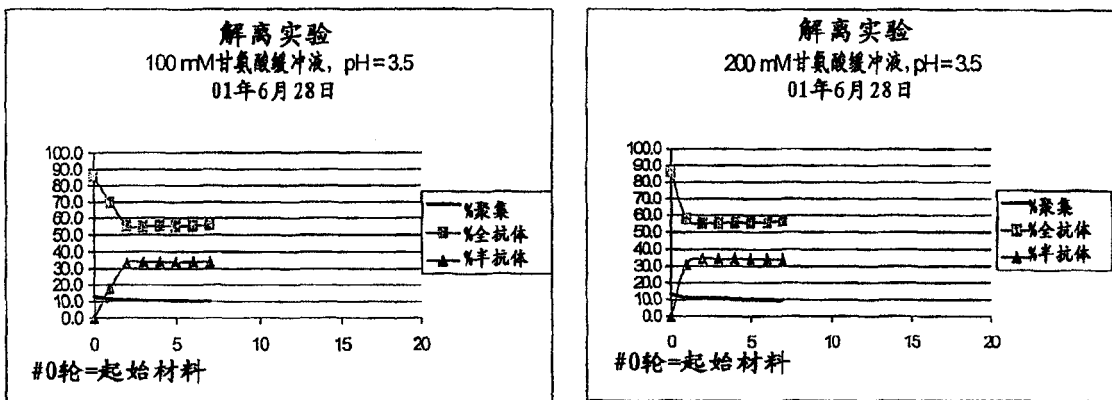


图 3C

图 3D

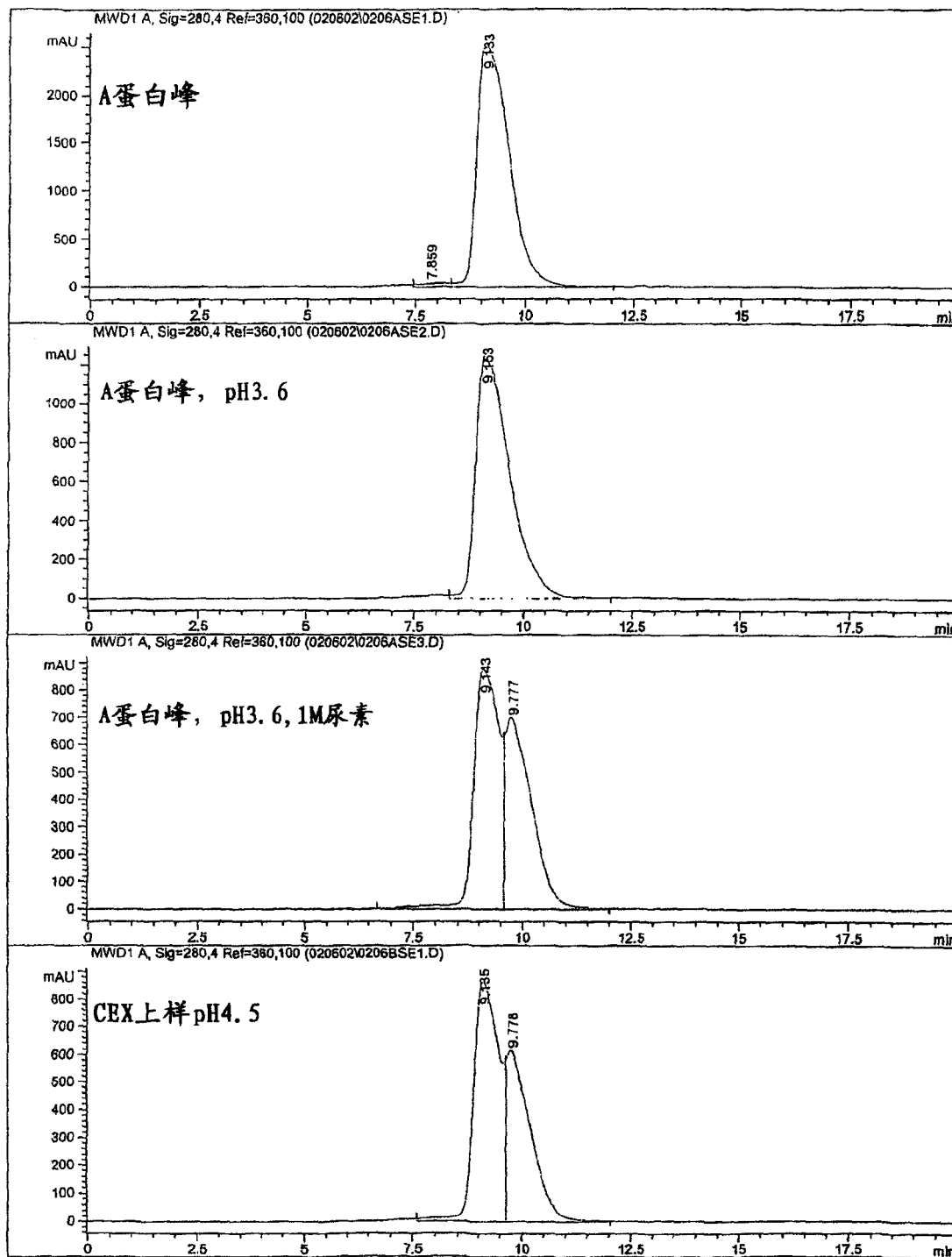


图4

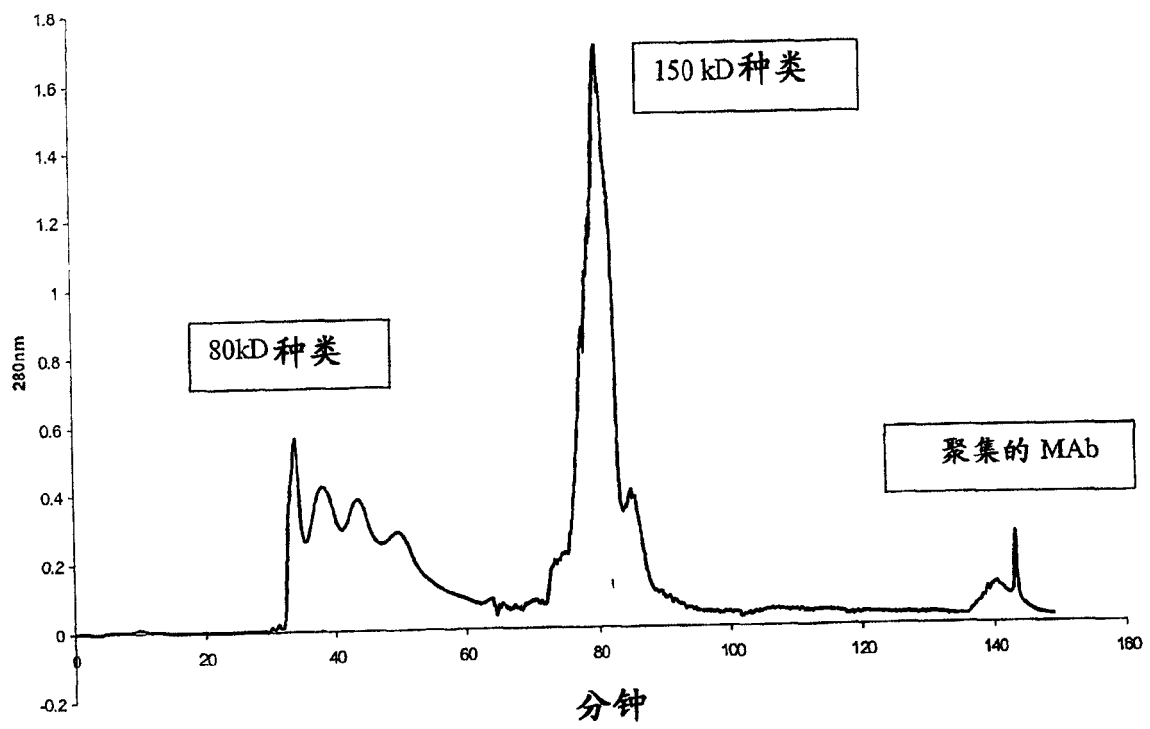


图 5

### 阳离子交换层析级分的等电聚焦分析

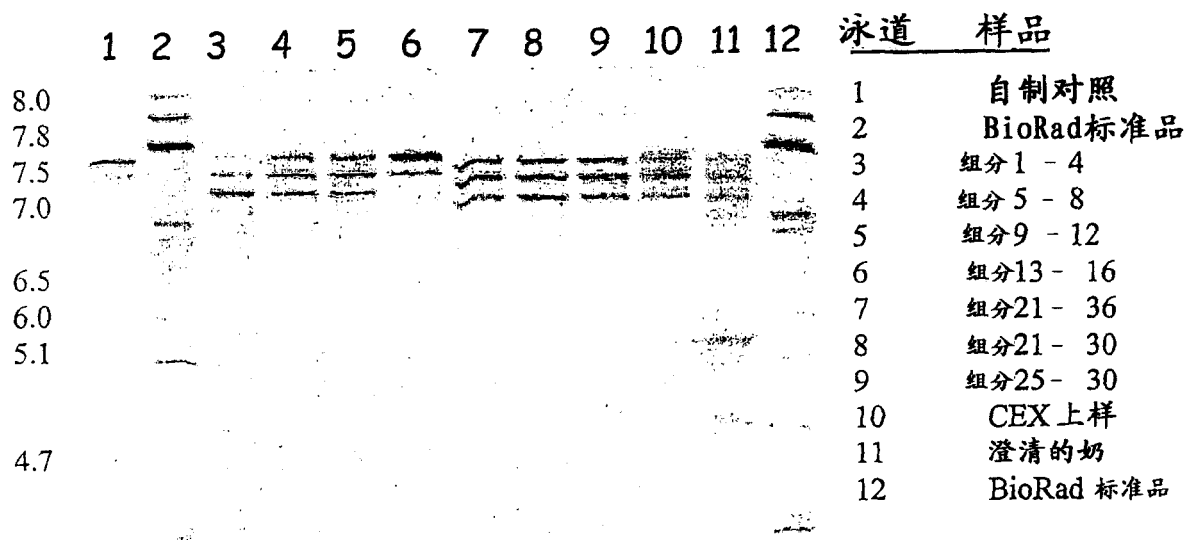


图6

IgG4 CEX2/5/02 级分的N-连接的寡糖分布

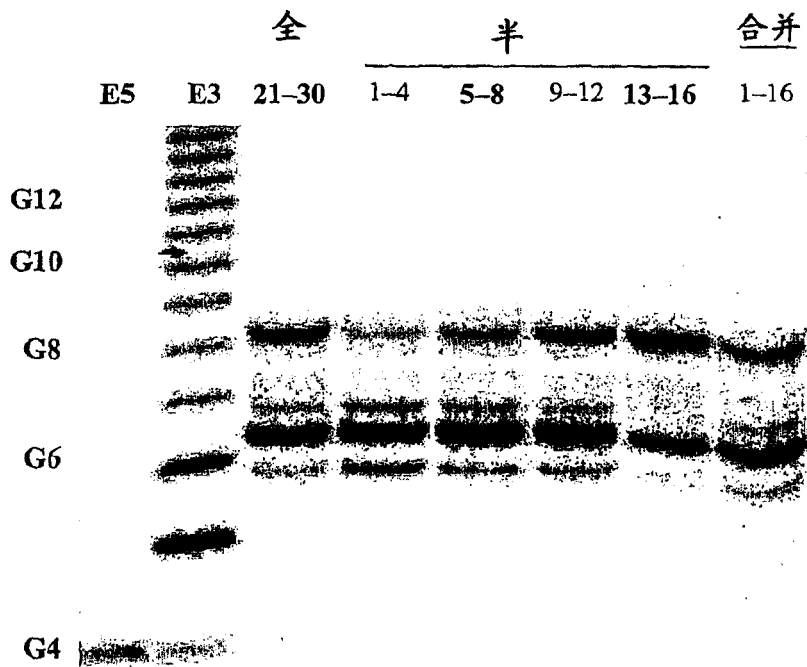


图7

专利名称(译)	缺乏重链间二硫键的免疫球蛋白分子的分离		
公开(公告)号	<a href="#">CN1856324A</a>	公开(公告)日	2006-11-01
申请号	CN03825024.1	申请日	2003-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	GTC生物治疗学公司		
申请(专利权)人(译)	GTC生物治疗学公司		
[标]发明人	E伯克 韦尔森 M戴		
发明人	E·伯克 - 韦尔森 M·戴		
IPC分类号	A61K39/395 B01D C07K16/02 C07K16/04 C07K16/06 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/563		
CPC分类号	C07K16/04 C07K2317/50		
优先权	60/411419 2002-09-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明以用于在保留生物学活性的同时将免疫球蛋白半抗体可靠且可操纵地与免疫球蛋白全抗体分离的方法、以及纯化的免疫球蛋白半抗体制剂和纯化的免疫球蛋白全抗体制剂为特征。这些解离的半抗体可通过层析与全抗体分离。存在四种已知的IgG分子亚型：IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。IgG4分子与其它IgG同种型的区别在于将两重链亚基连接在一起的二硫键并不总是形成。由于将重链亚基维系在一起的非共价相互作用，在纯化的IgG4蛋白凝胶过滤之后，IgG4分子的异质性并不明显。然而，当纯化的IgG4蛋白在非还原条件下通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)分离时，可鉴别两种不同的蛋白种类 - 全抗体和“半抗体”。

