

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780036281.4

[51] Int. Cl.

B01D 15/38 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 101522278A

[22] 申请日 2007.9.27

[21] 申请号 200780036281.4

[30] 优先权

[32] 2006. 9. 29 [33] SE [31] 0602061 - 4

[86] 国际申请 PCT/SE2007/000862 2007.9.27

[87] 国际公布 WO2008/039141 英 2008.4.3

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.27

[71] 申请人 通用电气健康护理生物科学股份公司

地址 瑞典乌普萨拉

[72] 发明人 M·哈尔 S·拉森 A·穆兰伊

G·罗德里戈 邹瑾瑜

P·-M·阿伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 付磊

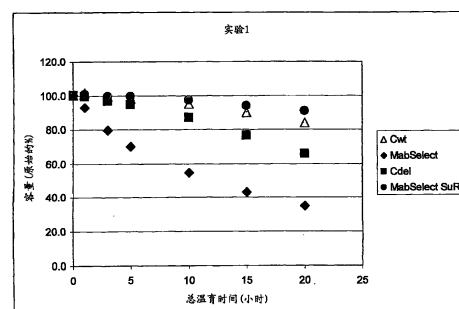
权利要求书 2 页 说明书 17 页 序列表 2 页
附图 2 页

[54] 发明名称

用于抗体分离的包含来自金黄色葡萄球菌 A 蛋白的结构域 C 的层析配体

[57] 摘要

本发明涉及层析配体, 它包含来自葡萄球菌 A 蛋白(SpA)的结构域 C 或其功能片段或变体。层析配体呈现耐得住苛刻原位清洁(CIP)条件的有利能力, 且能结合抗体的 Fab 片段。可以给配体提供末端偶联基团, 例如精氨酸或半胱氨酸, 以促进它与不溶载体(例如珠或膜)的偶联。本发明也涉及使用配体分离抗体的方法, 和可以包含洗涤步骤和/或用碱再生的纯化规程。



1. 基本上碱稳定的层析配体, 该配体包含一个或多个来自葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的结构域 C 单位、或其功能片段或变体。
2. 根据权利要求 1 的配体, 它在 0.5 M NaOH 中温育 5 小时后, 保留它的原始结合容量的至少 95%。
3. 根据权利要求 1 或 2 的配体, 它能结合抗体的 Fab 部分。
4. 根据前述权利要求中任一项的配体, 其中所述结构域 C 序列对应于 SEQ ID NO 1 定义的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项的配体, 其中所述结构域 C 序列对应于 SEQ ID NO 2 定义的氨基酸序列。
6. 根据前述权利要求中任一项的配体, 它另外包含末端偶联基团, 所述基团优选包含至少一个氮和/或硫原子。
7. 根据权利要求 6 的配体, 其中所述末端基团包含精氨酸或半胱氨酸。
8. 权利要求 1-7 中任一项定义的多聚体层析配体, 它含有至少 2 个结构域 C 单位或至少 2 个其功能片段或变体。
9. 根据权利要求 8 的配体, 其除了所述至少 2 个结构域 C 单位或至少 2 个其功能片段或变体以外, 还包含一个或多个其它基于蛋白的单位, 所述其他基于蛋白的单位优选是碱稳定的。
10. 根据权利要求 8 的配体, 它包含 2-8 个任选通过接头区段偶联的结构域 C 单位。
11. 编码在权利要求 1-10 中任一项定义的配体的核酸序列。
12. 包含在权利要求 11 中定义的核酸序列的表达系统。
13. 层析基质, 其包含偶联到至少一种不溶载体上的权利要求 1-10 中任一项定义的配体。
14. Fab 片段-结合层析基质, 其包含偶联到至少一种不溶载体上的权利要求 1-10 中任一项定义的配体。
15. 根据权利要求 14 的基质, 其中所述载体包含基本上球形的颗粒。
16. 根据权利要求 13-15 中任一项的基质, 其中所述载体是多孔的。
17. 制备层析基质的方法, 该方法包含, 提供权利要求 1-10 中任一项定义的配体, 和将所述配体偶联到至少一种多孔载体上。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述偶联通过配体的氮或硫原子进行。

19. 分离一种或多种靶化合物的方法，该方法包含，使包含所述化合物的液体接触层析基质；允许所述化合物吸附到存在于基质上的配体，其中所述配体由一个或多个葡萄球菌 A 蛋白(SpA)结构域 C 或其功能片段或变体组成；和，任选地，如下洗脱所述化合物：通过使液体穿过所述基质，这使化合物从配体释放出来。

20. 分离一种或多种靶化合物的方法，该方法包含，使包含所述化合物的液体接触层析基质；允许所述化合物吸附到存在于基质上的配体，其中所述配体是包含至少 2 个葡萄球菌 A 蛋白(SpA)结构域 C 单位或其功能片段或变体的多聚体；和，任选地，如下洗脱所述化合物：通过使液体穿过所述基质，这使化合物从配体释放出来。

21. 根据权利要求 19 或 20 的方法，其中所述靶化合物是蛋白、优选抗体。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项的方法，其中所述配体如权利要求 1-10 中任一项所定义。

23. SpA 的结构域 C 或其功能片段作为碱稳定的免疫球蛋白吸附剂的应用。

24. 根据权利要求 23 的应用，其包含根据权利要求 19-22 中任一项的方法，其中所述靶化合物从基质洗脱，且其进行 2-300 次，任选地在其之间有洗涤步骤；基质的碱再生；和最后重复权利要求 19-22 中任一项的方法。

25. 根据权利要求 24 的应用，其中通过与氢氧化钠、优选约 0.5 M NaOH 温育进行所述再生。

26. SpA 的结构域 C 或其功能片段作为 Fab 片段-结合吸附剂的应用。

用于抗体分离的包含来自金黄色葡萄球菌 A 蛋白的结构域 C 的层析配体

技术领域

本发明涉及层析领域，且更具体地涉及适用于抗体分离的新颖的亲配体。因而，本发明包括这样的亲和配体，包含根据本发明的配体的层析基质，和抗体分离方法，其中使用根据本发明的配体。

背景

术语层析包括一族密切相关的分离方法，它们基于 2 个互不混溶相的接触，其中一个相是固定相，且另一个相是流动相。一个在其中层析非常重要的领域是生物技术领域，例如用于药物和诊断剂的大规模经济生产。一般而言，通过细胞培养细胞内地或通过分泌进周围的培养基中来生产蛋白。由于使用的细胞系是活生物，所以必须给它们饲喂含有糖、氨基酸、生长因子等的复合生长培养基。从饲喂给细胞的化合物的混合物和从其它细胞组分分离所需蛋白至足够的纯度，例如用作人治疗剂，提出了巨大挑战。

在这样的分离中，在第一步中，通常通过过滤来去除细胞和/或细胞碎片。一旦已经得到含有目标蛋白的澄清溶液，就经常使用不同层析步骤（经常基于不同的分离原理）的组合，将目标蛋白与溶液的其它组分分离。因而，这种步骤基于电荷、疏水性程度、亲和力性质、大小等，从混合物分离蛋白。几种不同的层析基质，例如用于离子交换、疏水作用层析(HIC)、反相层析 (RPC)、亲和层析和固定化金属亲和层析(IMAC)的基质，可用于这些技术的每种，从而允许使纯化方案适合包含的特定蛋白。在医学领域具有不断增加的重要性的一种示例性的蛋白是免疫球蛋白，也称作抗体，例如免疫球蛋白 G (IgG)。

与在所有处理技术中一样，重要的目的是保持低的生产成本。结果，经常提出改进的层析技术，并可能时重新使用基质。但是，由于层析基质的每次使用都会留下刚刚进行的操作的某些痕迹，许多不同的清洁规程都可以用于清洁和/或恢复基质到它的原始形式。需要去除的普遍已知的材料是例如未洗脱的蛋白和蛋白聚集体以及潜在有害的材料，例如病毒、内毒素等，它们可以源自细胞培养。最常用的清洁是用缓冲液简单

洗涤。为了更有效地清洁基质，经常使用酸和/或碱处理。为了甚至更有效地恢复基质，常用称作原位清洁(Cleaning In Place)(CIP)的碱性方法。标准的 CIP 包含用 1M NaOH、pH 14 处理基质。这种苛刻处理将有效地去除上面讨论的类型的希望的不污垢，但是可能另外损害一些层析基质材料。例如，其中配体是蛋白或基于蛋白的许多亲和基质不能耐得住标准的 CIP，至少在维持它们的原始性质时不能。已知结构修饰，例如在碱性条件下天冬酰胺和谷氨酰胺残基肽主链的脱酰胺作用和切割，是在碱性溶液中处理蛋白后丧失活性的主要原因，且天冬酰胺是这二者中最敏感的。还已知脱酰胺作用速率是高度特异性的和构象依赖性的，且蛋白中最短的脱酰胺作用半衰期已经与序列-天冬酰胺-甘氨酸-和-天冬酰胺-丝氨酸相关联。参见例如 Gülich, Linhult, Nygren, Uhlen 和 Hober (2000) *Journal of Biotechnology* 80, 169-178。对碱性条件的稳定性可以被人工改造入蛋白配体。

尽管有文件证明的碱敏感性，但 A 蛋白广泛用作亲和层析基质中的配体，这是因为它的结合 IgG、而不显著影响免疫球蛋白对抗原的亲合力的能力。众所周知，A 蛋白是细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞壁的组分。这种葡萄球菌蛋白(称作 SpA)由 5 个结构域(按照从 N 末端的次序命名为 E、D、A、B 和 C，它们能在 Fc 区域结合抗体)和不结合任何抗体的 C-末端区域(或“X”区域)组成。Jansson 等人(Jansson, Uhlen 和 Nygren (1998) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20, 69-78: “All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding”)后来表明，所有个别的 SpA 结构域也在 Fab 区域结合某些抗体。

US 5,151,350 (Repligen)涉及编码 A 蛋白和 A 蛋白-样材料的基因的克隆和表达。该基因的克隆和它的核苷酸序列表征使得 1982 年首次能够得到用于在不同的宿主-载体系统中克隆的大量 A 蛋白-样材料和核苷酸序列。

由于实现了 A 蛋白在重组系统中的生产，已经提出其它的基因操作。例如，US 5,260,373 (Repligen)描述了重组蛋白 A 的基因操作，以促进其与支持物的附着，且更具体地其通过精氨酸的偶联。此外，US 6,399,750 (Pharmacia Biotech AB)描述了另一种重组 A 蛋白配体，其已经通过半胱氨酸偶联至支持物上。

但是,为了维持选择性和结合容量,需要在比常规 CIP 更温和的条件下清洁上面讨论的类型的 A 蛋白层析基质。在该上下文中,应当理解,清洁与层析基质的寿命密切相关。例如,如果降低的性能是可接受的,那么可以用标准的 CIP 清洁敏感的基质。因而,已经作出努力来提供呈现出 A 蛋白的突出性质(例如选择性)、但是更耐受 CIP 所用碱性条件的层析基质。

因而,US 6,831,161 (Uhlén 等人)涉及使用固定化的蛋白亲和配体的亲和分离方法,其中已经修饰一个或多个天冬酰胺(Asn)残基来增加碱稳定性。该专利也描述了制备稳定化的组合蛋白的方法,其通过修饰蛋白分子内的 Asn 残基,以增加蛋白在碱性条件下的稳定性,并随机化蛋白分子,以修饰它的结合特征实现,和组合蛋白,其中在与随机化步骤分开的步骤中,已经通过修饰一个或多个它的 Asn 残基,增加了蛋白在碱性条件下的稳定性。

此外,WO 03/080655 (Amersham Biosciences)涉及免疫球蛋白-结合蛋白,其中至少一个天冬酰胺残基已经突变成谷氨酰胺或天冬氨酸以外的氨基酸。根据该专利申请,这种更特异性的突变在最高达约 13-14 的 pH 值赋予比亲本分子增加的化学稳定性。突变的蛋白可以例如源自能结合免疫球蛋白分子的互补决定区(CDR)以外的区域的蛋白,例如 A 蛋白,优选源自葡萄球菌 A 蛋白的 B-结构域。本发明也涉及亲和分离基质,它包含所述突变的免疫球蛋白-结合蛋白作为配体。

尽管存在上述向更加碱稳定的基于 A 蛋白的层析配体的发展,但改进的配体和层析基质领域中仍然需要抗体的高特异性分离和允许更容易生产的替代性的野生型配体构建。

在 US 2006/0134805 (Berg 等人)中描述了这样的改进的层析基质的一个实例,它涉及包含已经固定化了抗体-结合蛋白配体的多孔颗粒的分离基质。更具体地,已经在配体密度、凝胶相分配系数(K_{av})和颗粒大小方面最优化了公开的层析基质,以提供特别适合于抗体的高容量纯化的基质。公开的基质的配体可以包含抗体-结合蛋白例如 A 蛋白、G 蛋白和/或 L 蛋白。

发明概述

本发明的一个方面是,提供新颖的层析配体,它能耐得住重复原位

清洁循环。这可以由所附权利要求书定义的、基于来自 SpA 结构域 C 的结构域 C 的亲配体来实现。

本发明的另一个方面是，提供纯化免疫球蛋白的经济方法。这可以由使用能耐得住重复原位清洁循环的亲配体的方法来实现。

从下面的详细公开内容中将明白本发明的其它方面和优点。

附图简述

图 1 显示了与其它基于蛋白的配体相比，根据本发明的配体的碱稳定性的测试结果。

图 2 显示了与其它基于蛋白的配体相比，根据本发明的配体的 Fab-结合性质的测试结果。

定义

术语结构域 C 或“其功能片段或变体”包括 SpA 结构域 C 的片段或变体，它们具有在 Fc 区域结合 IgG 的性质。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用，且理解为也包括包含抗体和抗体片段的融合蛋白。

术语“Fc-结合蛋白”是指能结合抗体的可结晶部分(Fc)的蛋白，且包括例如 A 蛋白和 G 蛋白或其维持所述结合性质的任意片段或融合蛋白。

术语“Fab 片段”是指抗体的可变部分；因此“Fab-结合配体”能通过 Fab-结合来结合完整抗体；或结合抗体片段，后者包括也称作 Fab 片段的可变部分。

术语“层析”在本文中用于利用层析原理的任意种类的分离，且因此包括分批以及 HPLC 方法。

术语“亲和层析”在本文中用于特定层析模式，其中配体通过生物亲和力以“锁-钥”方式与靶相互作用。在亲和层析中有用的相互作用的实例是例如酶-底物相互作用、生物素-抗生物素蛋白相互作用、抗体-抗原相互作用等。

术语“基于蛋白的”配体在本文中指包含肽或蛋白的配体、或肽的部分或蛋白的部分。

术语抗体的“分离”在本文中用作包括：从包含其它蛋白例如其它抗体和其它组分的混合物纯化特定产物抗体，以及从产物液体分离抗

体，即去除不希望的抗体。

发明详述

因而，本发明涉及一种新颖的层析配体。基于蛋白的且属于已知为亲和配体的类型的根据本发明的层析配体包含来自葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的全部或部分结构域 C。在第一个方面，本发明涉及层析配体，该配体包含一个或多个来自葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的结构域 C 单位或其功能片段或变体。在一个实施方案中，本发明的层析配体基本上是碱稳定的。在该上下文中，术语“基本上碱稳定的”理解为是指，该配体能耐得住使用碱性洗液的重复原位清洁循环，而不释放它的结合容量。

在具体的实施方案中，本发明是层析配体，它包含来自葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的结构域 C，但是不包含 SpA 的其它结构域。

在替代方面，本发明涉及层析配体，该配体包含一个或多个来自葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 的结构域 C 单位或其功能片段或变体，该层析配体能结合抗体的 Fab 部分，如下面更详细讨论的。

如上面所讨论的，Jansson 等人已经表明，结构域 C 可以充当独立的免疫球蛋白吸附剂，不仅仅充当 A 蛋白的部分。发明人已经证实，结构域 C 的免疫球蛋白结合性质完全适宜于它作为层析配体的应用。也如上面所讨论的，Gulich 等人已经表明，在碱性条件下的天冬酰胺和谷氨酰胺残基是在碱溶液中处理后丧失 A 蛋白活性的主要原因，且天冬酰胺是这二者中最敏感的。结果，没有预见到含有多至 6 个天冬酰胺残基的结构域 C 配体呈现出与 A 蛋白相比任何实质的碱稳定性。

但是，如下面实验部分和图 1 所示，本发明人已经非常令人惊奇地表明，通过在碱性条件下温育长至 20 小时的时间，SpA 结构域 C 呈现出与可商业上得到的 A 蛋白产物 (MabSelect™, GE Healthcare, Uppsala, 瑞典) 相比提高许多的碱稳定性。事实上，结构域 C 配体呈现与销售的碱稳定的产物 (MabSelect™ SuRe, GE Healthcare, Uppsala, 瑞典) 类似的碱稳定性值，其中天冬酰胺残基已经突变成其它氨基酸。

除此以外，如上面所讨论的，已经表明，特别碱敏感的脱酰胺作用速率是高度特异性的和构象依赖性的，且已经将最短的脱酰胺作用半衰期与序列-天冬酰胺-甘氨酸-和-天冬酰胺-丝氨酸相关联。非常令人惊奇地，本发明的结构域 C 配体呈现本文提出的有利的碱稳定性，尽管在残

基 28 和 29 (使用结构域 C 的残基的常规编号) 之间存在一个天冬酰胺-甘氨酸键。

在一个实施方案中, 根据本发明的配体在 0.5 M NaOH 中能耐得住至少 10 小时, 而不偏离它的原始免疫球蛋白结合容量超过约 10%、且优选仅仅 5%。因而, 5 小时后, 它将不偏离它的原始结合容量超过 10%、优选 5%。换言之, 本发明的一个实施方案是上述配体, 其在 0.5M NaOH 中温育 5 小时后, 保留它的原始结合容量的至少 95%。

在有利的实施方案中, 根据本发明的配体能在 0.5 M NaOH 中耐得住至少 15 小时, 而不释放它的原始免疫球蛋白结合容量超过约 20%、且优选仅仅 10%。在更有利的实施方案中, 根据本发明的配体能在 0.5 M NaOH 中耐得住至少 20 小时, 而不释放它的原始免疫球蛋白结合容量超过约 30%、且优选仅仅 15%。换言之, 本发明的一个实施方案是上述配体, 其在 0.5M NaOH 中温育 15 小时后, 保留它的原始结合容量的至少 80%、有利地至少 90%。

通过使候选配体与氢氧化钠温育, 例如如实验部分所述, 并随后通过常规层析实验测试结合容量, 本领域技术人员可以容易地测试碱稳定性。

如本领域技术人员可以容易地明白的, 根据本发明的层析配体可以由在本文中表示为 Cwt 的 SEQ ID NO 1 所示的野生型 SpA 结构域 C 氨基酸序列组成。在替代实施方案中, 根据本发明的层析配体由 SpA 结构域 C 的功能片段组成, 例如 SEQ ID NO 2 所示的那个, 它公开了本文表示为 Cdel 的序列, 其中与野生型 SpA 结构域 C 序列相比已经缺失了在位置 3-6 的 Asn-Lys-Phe-Asn。在另外替代性的实施方案中, 通过将例如一个或多个氨基酸添加到野生型 SpA 结构域 C 氨基酸序列的任一端, 或通过野生型 SpA 结构域 C 氨基酸序列的突变, 制备 SpA 结构域 C 的变体, 前提是这种突变基本上不干扰本文所述的与免疫球蛋白-结合和碱稳定性有关的性质。因而, 在特定的实施方案中, 根据本发明的层析配体包含 SEQ ID NO 1 所示的 SpA 结构域 C, 其另外包含突变 G29A。或者, 根据该实施方案的层析配体包含 SEQ ID NO 2 所示的缺失的 SpA 结构域 C, 其因而包含在位置 25 的所述突变(即 G25A)。如技术人员将认识到的, 与野生型序列相比这种氨基酸的添加、突变或缺失优选地应基本上不影响 SpA 结构域 C 配体的折叠模式。

因而，在一个实施方案中，根据本发明的配体的氨基酸序列是 SEQ ID NO 1 定义的序列。在具体的实施方案中，根据本发明的配体包含 SEQ ID NO 1 所示氨基酸的至少 60%、有利地至少 80%、更有利地至少 90% 和最有利地至少 95%、例如约 98%。在具体的实施方案中，根据本发明的配体包含 SEQ ID NO 1 所示氨基酸的至少 35 个、有利地至少 46 个、更有利地至少 52 个、和最有利地至少 55 个、例如 57 个。

在替代实施方案中，根据本发明的配体的氨基酸序列是 SEQ ID NO 2 定义的序列。在具体的实施方案中，根据本发明的配体包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸的至少 40%、有利地至少 77%、更有利地至少 90% 和最有利地至少 94%、例如约 98%。在具体的实施方案中，根据本发明的配体包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸的至少 31 个、有利地至少 42 个、更有利地至少 48 个、和最有利地至少 51 个、例如 53 个。

如上面背景部分所讨论的，方法可以容易地用于通过某些氨基酸（优选含有氮和/或硫原子的氨基酸）偶联蛋白配体，参见例如 USP 6,399,750 或 USP 5,084,559。因而，在一个实施方案中，根据本发明的配体另外包含末端偶联基团，所述基团优选地包含一个或多个氮和/或硫原子。在有利的实施方案中，所述末端偶联基团包含精氨酸或半胱氨酸。在一个实施方案中，所述偶联基团在 C 末端区域中。

此外，本发明也涉及包含至少 2 个上面定义的结构域 C 单位或其功能片段或变体的多聚体层析配体（也表示为“多聚体”）。在一个实施方案中，该多聚体不包含源自 SpA 的单位。在具体的实施方案中，该多聚体不包含其它基于蛋白的单位。在另一个实施方案中，该多聚体不包含能与靶例如抗体或 Fab 片段发生任何实质相互作用的其它单位，因而它不包含其它配体单位。如本领域技术人员将认识到的，多聚体的制备可能需要加入一种或多种肽作为单位之间的接头。因而，限于仅包含根据本发明的结构域 C 单位的多聚体可以另外包含允许构建多聚体的接头，在所述多聚体中，每个结构域 C 单位充分暴露，以能参与靶的结合。

在另一个实施方案中，多聚体包含一个或多个另外的单位，它们不同于结构域 C，且优选基于蛋白、且与结构域 C 同样碱稳定。因而，在多聚体中，根据本发明的配体可以重复，和/或与来自其它来源（例如其它蛋白）的其它单位相组合。在一个实施方案中，多聚体包含 2-8 个单位，例如 4-6 个单位。在一个实施方案中，将一个或多个接头序列插入

多聚体单位之间。这种接头可以例如插入，以允许实际的配体单位维持它们的折叠模式。在该上下文中的接头是众所周知的，技术人员可以容易地决定不干扰本文讨论的配体的性质的合适的氨基酸和链长度。在具体的实施方案中，根据本发明的层析配体不包含除结构域 C 以外的其它 SpA 结构域。

在第二个方面，本发明涉及编码上述层析配体的核酸序列。因而，本发明包括编码所述配体的本发明核酸序列的所有形式，例如 RNA 和 DNA。本发明包括载体，例如质粒，其除了编码序列以外，还包含根据本发明的配体的表达所需的信号序列。在一个实施方案中，载体包含编码根据本发明的多聚体配体的核酸，其中编码每个单位的分开的核酸可以具有同源的或异源的 DNA 序列。这方面也包括包含编码根据本发明的配体的核酸序列的表达系统。表达系统可以例如是原核宿主细胞系统，例如已经修饰成表达本发明的配体的大肠杆菌 (*E. coli*)。在替代实施方案中，表达系统是真核宿主细胞系统，例如酵母。

如本领域技术人员将明白的，根据本发明的配体可以替代地通过蛋白合成方法来生产，其中所述配体通过自动化方法来得到，所述自动化方法按照预定顺序一次添加一个氨基酸。在有利的实施方案中，合成氨基酸序列的区段，并彼此连接，以制备根据本发明的配体。这种合成和连接程序是本领域技术人员众所周知的。

在第三个方面，本发明涉及包含偶联到不溶载体上的上述配体的层析基质。这种载体可以是一个或多个颗粒，例如珠或不规则形状；膜；滤器；毛细管；整体料 (monolith)；和在层析中常用的任意其它形式。因而，在基质的有利的实施方案中，所述载体包含基本上球形的颗粒，也称作珠。合适的颗粒大小可以在 5-500 μm 、例如 10-100 μm 、例如 20-80 μm 的直径范围内。在替代实施方案中，所述载体是膜。为了得到高吸附容量，所述载体优选是多孔的，且然后将配体偶联到外表面以及孔表面。因而，在根据本发明的基质的有利的实施方案中，所述载体是多孔的。

载体可以从有机或无机材料制备。在一个实施方案中，载体从天然聚合物制备，例如交联的碳水化合物材料，例如琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、魔芋 (konjac)、角叉菜聚糖、胶凝糖、藻酸盐等。根据标准方法，例如反向悬浮胶凝作用 (S Hjertén: *Biochim Biophys Acta*

79(2), 393-398 (1964), 容易地制备和任选地交联天然聚合物载体。在替代实施方案中, 载体从合成的聚合物或共聚物制备, 例如交联的合成的聚合物, 例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基酰胺等。根据标准方法, 参见例如 “Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization” (R Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988)), 容易地制备和任选地交联这种合成的聚合物载体。天然的或合成的聚合物载体也可以从商业来源得到, 例如 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, 瑞典, 例如以多孔颗粒形式。在另外替代性的实施方案中, 载体从无机聚合物制备, 例如二氧化硅。无机的多孔的和无孔的载体是该领域众所周知的, 且根据标准方法容易地制备。

在第四个方面, 本发明涉及制备层析基质的方法, 该方法包含提供上述的配体, 和将所述配体偶联到载体上。在有利的实施方案中, 所述偶联通过配体的氮或硫原子进行。简而言之, 配体可以直接偶联到载体上; 或通过间隔基元件间接地偶联, 以在载体表面和配体之间提供适当距离。将蛋白配体固定化到多孔的或无孔的表面上的方法是本领域众所周知的; 参见例如上面讨论的美国专利号 6,399,750。

在第五个方面, 本发明涉及分离一种或多种靶化合物的方法, 该方法包含, 使包含所述化合物的液体接触层析基质; 允许所述化合物吸附到存在于基质上的配体, 其中所述配体由一个或多个葡萄球菌 A 蛋白 (SpA) 结构域 C 和/或其功能片段或变体组成; 和, 任选地, 如下洗脱所述化合物: 通过使液体穿过所述基质, 这使化合物从配体释放出来。因而, 在该实施方案中, 配体不包含除结构域 C 以外的其它 SpA-衍生的结构域或其功能片段或变体。在替代实施方案中, 所述配体是包含 2 个或更多个 SpA 结构域 C 单位或其功能片段或变体的多聚体。

在有利的实施方案中, 配体是上述的配体。靶化合物可以是任意有机化合物、生物分子或其它生物学材料, 例如蛋白, 例如抗体; 肽; 细胞, 例如真核和原核细胞; 核酸, 例如 DNA, 例如质粒, 和 RNA; 病毒; 等。在有利的实施方案中, 靶化合物是一个或多个单克隆或多克隆抗体, 例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。在一个实施方案中, 靶化合物是抗体片段, 例如 Fab 片段。在另一个实施方案中, 靶化合物是融合蛋白, 其中至少一个部分是抗体或抗体片段。

在一个实施方案中，层析基质是一次性产物，且如果该方法的目的是从产物液体取出靶化合物例如抗体，则将不需要洗脱。该实施方案可以例如用于从液体（例如医学液体或其中生产许多抗体的液体，例如来自重组动物的乳）取出不希望的抗体。

在替代实施方案中，当吸附的化合物是所需产物时，在该方法中包含洗脱步骤。为了得到最适合吸附的条件，使液体样品与合适的缓冲液或其它液体（例如水）相组合，以提供流动相。本发明的方法有利地在亲和层析的常规条件下运行，且特别对于 A 蛋白层析，如本领域众所周知的。

在第六个方面，本发明涉及 SpA 的结构域 C 或其功能片段或变体作为碱稳定的免疫球蛋白吸附剂的应用。在该上下文中，“碱稳定的”理解为是指，在 0.5M NaOH 中温育的前 5 小时期间，吸附剂碱稳定性低于销售的碱稳定的商业产品例如 MabSelect™SuRe (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, 瑞典)不超过约 10%、例如约 5%。在有利的实施方案中，吸附剂是如上所述的配体。因为所述 MabSelect™SuRe 在这种时间和条件后应当呈现最小的退化，吸附剂的抗体结合容量在这种时间和条件后低于它的原始结合容量应不超过约 10%、例如约 5%。在该上下文中，术语“原始”是指它在任何碱再生之前的容量，且使用本文公开的类型程序，作为并行实验进行对比。

在一个实施方案中，根据本发明的应用包含如上所述的方法，其中抗体从基质洗脱，且其进行至少一次，例如 2-300 次，任选地在其之间有洗涤步骤；基质的碱再生；和最后重复所述分离抗体的方法。洗涤可以例如用合适的缓冲液进行，例如用于平衡柱的缓冲液。在有利的实施方案中，通过与 0.5 M NaOH 温育，进行再生。

本发明也包括纯化一种或多种如上面所讨论的靶化合物的方法，该方法除了使用根据本发明的层析基质纯化以外，包含一个或多个层析步骤。根据该方面的方法可以例如包含使用本发明基质的第一个层析步骤；使用离子交换或疏水作用层析(HIC)的中间层析步骤；和最后使用离子交换、HIC 或反相层析的精制步骤。在具体的实施方案中，该方法包含在具有本文所述的结构域 C 配体的层析基质之前的步骤。这样的在先步骤可以例如是常规的过滤、沉降、絮凝或其它步骤，以去除细胞碎片和其它不希望的组分。

在替代实施方案中，根据本发明的应用是分析或诊断应用，例如免疫测定。

附图详述

图 1 显示了与其它基于蛋白的配体相比，根据本发明的配体的碱稳定性的测试结果。X 轴显示了按小时计的温育时间；而 Y 轴显示了如实施例 1 所述在 0.5M NaOH 中 X 小时后剩余的容量。更具体地，含有 A 蛋白的产物 Mabselect™ (◆)；销售的碱更稳定的最近的 A 蛋白产物 MabSelect™SuRe (X)；SEQ ID NO 1 定义的来自 SpA 的结构域 C (Δ)；和最后 SEQ ID NO 2 定义的来自 SpA 的结构域 C 的缺失实施方案 (■)。如从图 1 可以看出的，根据本发明的结构域 C 配体显示出与碱稳定的产物 MabSelect™SuRe 非常相当的碱稳定性。

图 2 显示了与其它基于蛋白的配体相比，根据本发明的配体的 Fab-结合性质的测试结果。如从该图可以看出的，包含来自 SpA 的结构域 C (Cwt 和 Cdel) 的层析配体呈现出比其它测试的配体高得多的 Fab-结合水平。

实验部分

本发明实施例仅为解释目的而提供，且不应解释为限制所附权利要求书定义的本发明。

实施例 1: 4 种 A 蛋白-衍生的配体的碱稳定性的柱研究

在该实施例中，通过一系列层析运行，测试了 4 种层析基质的碱稳定性，其中的 2 种用于对比，且其中的 2 种是根据本发明的。

-MabSelect™和 MabSelect SuRe™ (两种包含基于蛋白的配体的对比产物, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, 瑞典), 和

-Cwt (SEQ ID NO. 1 定义的来自 SpA 的野生型结构域 C, 和 Cdel (SEQ ID NO. 2 定义的来自 SpA 的缺失的野生型结构域 C)。

在开始和在 0.5 M NaOH 温育步骤后，测量 IgG-结合容量。温育时间是 1-5 小时不等，累积温育时间是 20 小时。

根据标准程序，将根据本发明的配体固定化在琼脂糖颗粒上，并填充在柱(GE Healthcare)中。2 种基质 MabSelect™和 MabSelect™SuRe 是销售的用于纯化单克隆抗体的 GE Healthcare 生产的商业产品。两种产

物的配体都基于结合 IgG 的金黄色葡萄球菌 A 蛋白。MabSelect™配体主要是重组 A 蛋白，它由 5 个同源结构域(E、D、A、B、C)组成。比较起来，MabSelect™SuRe 配体由源自结构域 B 类似物“Z”(它又通过蛋白质工程方法针对高 pH 稳定化)的 4 个结构域组成。结果，MabSelect™SuRe 耐受最高达 0.5 M NaOH 的原位清洁(CIP) 条件。MabSelect™和 MabSelect™SuRe 配体都偶联至琼脂糖颗粒。

配体 Cwt 和 Cdel 构建成具有 C-末端半胱氨酸残基用于根据标准程序偶联至基质上的相同结构域的四聚体。

材料和方法

靶化合物

10 x 10 ml 注射液，溶液，GAMMANORM[®] 165 mg/ml (Octapharma no. 00 86 64)，人正常免疫球蛋白，用于皮下输注或肌肉注射，用作层析实验的靶化合物。

层析柱

如下面的表 1 所述进行配体偶联和柱填充：

表 1：在实验 1 中使用的柱

配体/基质	柱 ID	柱号	批次	日期	柱体积 (ml)
MabSelect SuRe	9	4	U669082	20060310	2,08
Cwt	11	2	U1555055A	20060310	2,02
MabSelect	1	7	U1555045A	20060310	2,12
Cdel	13	2	U1555059A	20060303	2,06

“柱 ID”是指为每个柱给出的独特编号。这些编号包含在层析方法中，且可以在结果文件的日志中找到。例如，表 1 中的第一个柱称作“MabSelect SuRe U669082 柱 4 20060310 (9.)”。“柱号”是填充号，即用相同批次的基质填充的柱在填充后接受不同的柱号。通过测量床高度，估计柱体积。

缓冲液和溶液

缓冲液 A：50 mM 磷酸钠，0.15 M NaCl，pH 7.2

缓冲液 B：50 mM 柠檬酸，0.15 M NaCl，pH 2.5

仪器和实验室设备

层析系统: ÄKTATM explorer 10 (GE Healthcare)

柱硬件: TricornTM 5/100 GL (GE Healthcare)

真空脱气装置: CT 2003-2, 2 通道脱气装置, ChromTech AB

分光光度计: NanoDrop[®] ND-1000 分光光度计, NanoDrop Technologies

离心机: Beckman CoulterTM AvantiTM J-20 XPI, 具有 JLA 8.1000 转子

pH 计(缓冲液 A): Beckman Φ 360 pH / Temp / mV 计

pH 计(缓冲液 B): 实验室 (Laboratory) pH 计 CG 842, SCHOTT

氮: AGA Gas AB, 10 l H 20577708, 仪器

缓冲液和样品的过滤器: 75 mm 瓶顶过滤器 (Bottle Top Filter) – 500 ml, 0.2 μ m 孔径, Nalgene

用于 0.5 M NaOH 的过滤器: 75 mm 瓶顶过滤器 (Bottle Top Filter) – 500 ml, 0.45 μ m 孔径, Nalgene

软件

通过 UNICORNTM 5.01 (GE Healthcare) 控制 ÄKTAexplorerTM 10。除了在层析运行中控制系统以外, UNICORN 用于方法编程和结果评价。

缓冲液制备

缓冲液 A: 将磷酸二氢钠和 NaCl 溶于水。使用 pH 4、pH 7 和 pH 10 标准缓冲液校正 pH 计。在向缓冲液加入 NaOH(水溶液)的同时监视 pH, 直到 pH 达到 7.2。过滤缓冲液, 且在使用前用氮脱气。

缓冲液 B: 将柠檬酸和 NaCl 溶于水。使用 pH 7 和 pH 2 标准缓冲液校正 pH 计。在向缓冲液加入 NaOH(水溶液)的同时监视 pH, 直到 pH 达到 2.5。过滤缓冲液, 且在使用前用氮脱气。

0.5 M NaOH 的制备

将 NaOH(固体)溶于水中, 至 0.5 M。过滤溶液, 且在使用前用氮脱气。

样品制备

实验 1

用 4950 ml 缓冲液 A 稀释 30 ml Gammanorm (165 mg/ml) 至 1 mg/ml。通过 0.2 μ m, 将样品过滤进无菌的 5 升瓶中。

使用 NanoDrop 分光光度计,对样品进行 3 次 280 nm 吸光度测量: 1.2573 AU、1.2432 AU 和 1.2101 AU。平均吸光度: 1.2369 AU。

也在 ÄKTAexplorer 10 上测量在 280 nm 的吸光度。用系统泵以旁路模式将样品抽吸通过系统。使用 10 mm 紫外线池 (UV cell), 且流速是 0.83 ml/分钟。在 280 nm 的吸光度是 1510 mAU。当进行容量计算时, 该值用作参照。

方法描述

通常, MabSelect SuRe 的 CIP 循环包含 CIP 溶液(通常是 0.1-0.5 M NaOH)的 10-15 分钟接触时间。为了减少在该研究中的 CIP 循环的量, 使用更长的接触时间。以 1、2 和 5 小时间隔温育柱, 总接触时间是 20 小时。这对应于 10-15 分钟接触时间的 80-120 个循环。

在 CIP 温育之前, 每个柱进行 2 次起始容量测量。容量测量后, 在 0.5 M NaOH 中温育柱。每个 CIP 温育后, 每个柱进行一次容量测量。

概要地, 如下设计实验:

- 每个柱 2 次起始容量测量。
- CIP 温育, 1 小时。
- 每个柱一次容量测量。
- CIP 温育, 2 小时。
- 每个柱一次容量测量。
- CIP 温育, 2 小时。
- 每个柱一次容量测量。
- CIP 温育, 5 小时。
- 每个柱一次容量测量。
- CIP 温育, 5 小时。
- 每个柱一次容量测量。
- CIP 温育, 5 小时。
- 每个柱一次容量测量。

系统设置:

在室温进行实验。但是, 将样品放置在冰上, 以避免微生物生长。为了避免在将冷样品加热至室温时形成气泡, 在样品和泵之间连接脱气装置。给 ÄKTAexplorer 10 配备 10 mm 紫外线池, 用于紫外线检测。

将缓冲液和样品抽吸通过系统泵。使用下述入口：

- 样品：B 泵 (入口 B1)
- 缓冲液 A：A 泵 (入口 A11)
- 缓冲液 B：A 泵 (入口 A12)
- 0.5 M NaOH：A 泵 (入口 A13)

容量测量，详述

在容量测量(由每个柱一次容量测量组成)之前，以旁路模式抽吸样品，即不使用柱。其目的是使“新鲜的”样品用于每次容量测量，并避免将第一体积的在 CIP 温育期间在室温残留于管和泵中的样品装载上第一柱。

每个柱的容量测量方法由下述部分组成：

- 用 5 柱体积(CV)缓冲液 A 平衡柱。
 - 样品装载。通过把样品装载上用目标层析介质填充的柱，测定动态结合容量。当介质变得越来越被样品饱和时，在 280nm 的吸光度水平将增加，这是由于未结合的样品穿过柱。在该方法中，将样品装载上柱，直到 UV_{280nm} 曲线达到样品的 280 nm 吸光度的 15%。
 - 洗出未结合的样品。用缓冲液 A 洗涤柱，直到 UV_{280nm} 曲线降低到低于样品的 280 nm 吸光度的 10%。
 - 洗脱。用 10 CV 缓冲液 B 洗脱结合的材料。
 - 用 5 CV 缓冲液 A 再次平衡。
- 样品装载流速是 0.83 ml/分钟。

CIP 温育

除了 2 次起始测量的第一次以外，每次容量测量后，进行 CIP 温育。在 CIP 温育方法中，以 0.83 ml/分钟的流速，将 3 CV 的 0.5 M NaOH 抽吸通过每个柱。此后，将系统设定在暂停。暂停长度依赖于 CIP 温育时间的长度，即 1 小时、2 小时或 5 小时。但是，从暂停时间扣除系统将 NaOH 抽吸通过柱所需的时间。CIP 温育后，以 0.83 ml/分钟的流速，将 3 CV 缓冲液 A 抽吸通过每个柱，以去除 NaOH。通过该程序，将所有柱暴露于 NaOH 相同的时间量。最后用 3 CV 缓冲液 A 进行另外一个洗涤循环。

层析结果的评价

通过测量应用到柱上的样品的体积，测定容量，直到 280 nm 吸光度达到样品吸光度的 10%。从该体积扣除死体积，即柱体积、混合器和从抽吸到紫外线池的管。测得没有柱的延迟体积是 1,02 ml。将容量值相对于累积 CIP 温育时间绘图。通过将 CIP 循环后的容量值除以起始容量值的平均值，得到相对容量值。相对容量值用于不同基质之间的更容易对比。

表 2: 结果实验 1 – 容量(mg Gammanorm/ml 层析基质(凝胶))

	MabSelect SuRe	Cwt	MabSelect	Cdel
起始容量1	28,38	27,43	28,98	30,86
起始容量2	28,13	27,40	28,98	30,95
1小时后的容量	29,32	27,79	26,98	30,75
3小时后的容量	28,42	27,26	23,08	29,88
5小时后的容量	28,25	26,94	20,30	29,25
10小时后的容量	27,88	26,07	15,79	26,87
15小时后的容量	27,01	24,65	12,52	23,70
20小时后的容量	25,93	23,02	10,14	20,35

实验 2: Fab-结合的测试

在 96-孔滤板测定中，评价不同层析介质的 Fab-结合能力。在板涡旋仪器上混合液体和层析介质 1 分钟。孔的底部由保持液体的过滤器和层析介质颗粒组成。当进行离心时，液体穿过过滤器，且收集在附着到滤板底部的分开的 96 孔收集紫外线板中。在板读数器中测量收集的液体在 280 nm 的吸光度，并用于检测和估计 Fab。在不同板中收集来自不同步骤（例如洗涤、洗脱）的液体，并分别测量，以能测量在个别级分中的 Fab 的量。

制备每种层析介质的 10%浆。

给滤板装载 200 µl 浆/孔，即 20µl 介质/孔。

平衡-在 PBS 中 5×200 µl 洗涤

样品温育-在 PBS 中的 100 µl 人多克隆 Fab/Kappa, IgG 片段 (B 乙

基), 15 分钟

洗涤- $5 \times 100 \mu\text{l}$ PBS

洗脱- $3 \times 100 \mu\text{l}$ 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0

CIP – 用 0.5 M NaOH 进行 2×10 分钟

分析具有液体的板于 280 nm 的 UV

实验 2 的结果如图 2 所示。

<110> GE Healthcare Bio-Sciences AB

<120> 用于抗体分离的包含来自金黄色葡萄球菌 A 蛋白的结构域 C 的层析配体

<130> PU 06101

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

<400> 1

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 2

<211> 54

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

<400> 2

Ala Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50

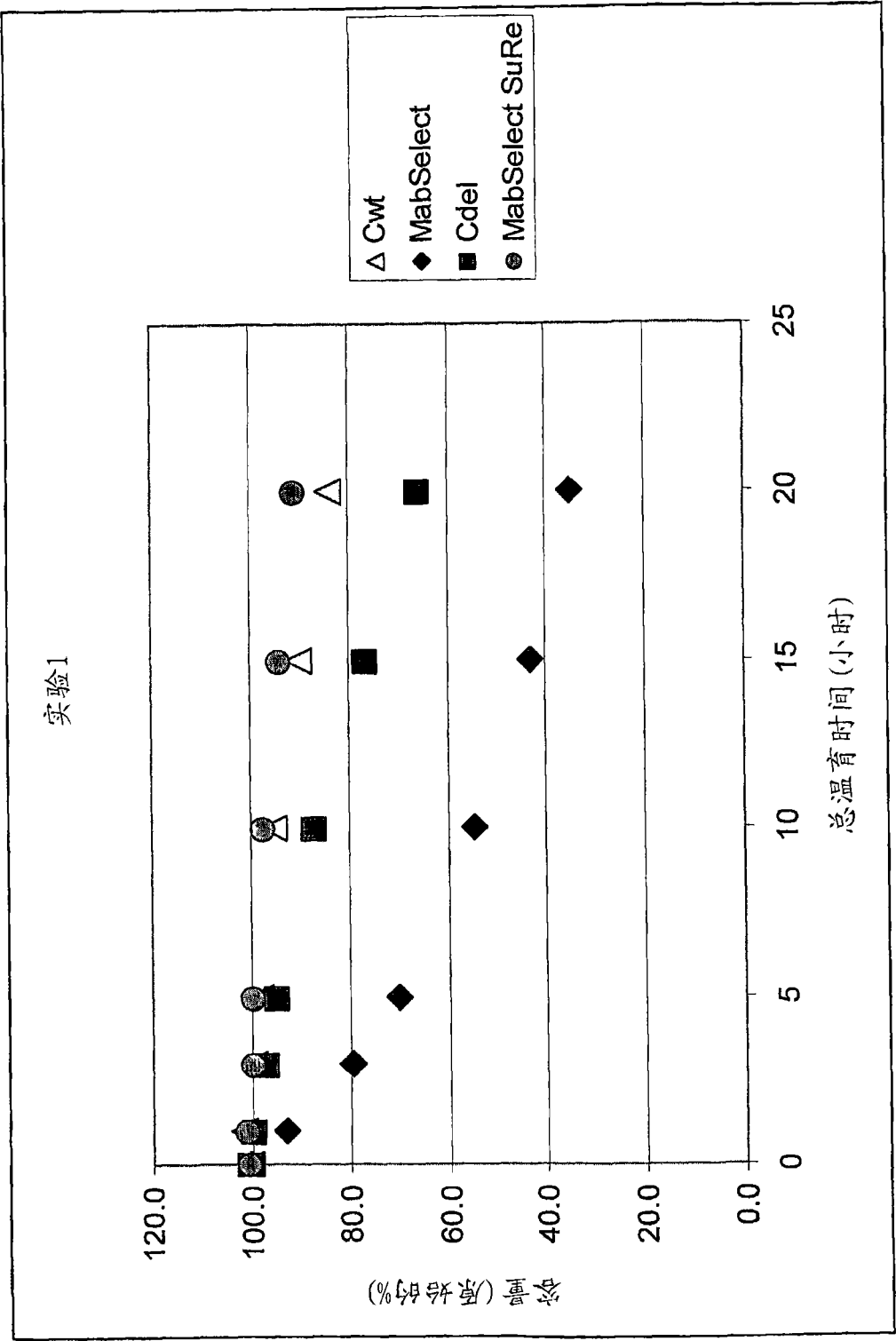


图 1

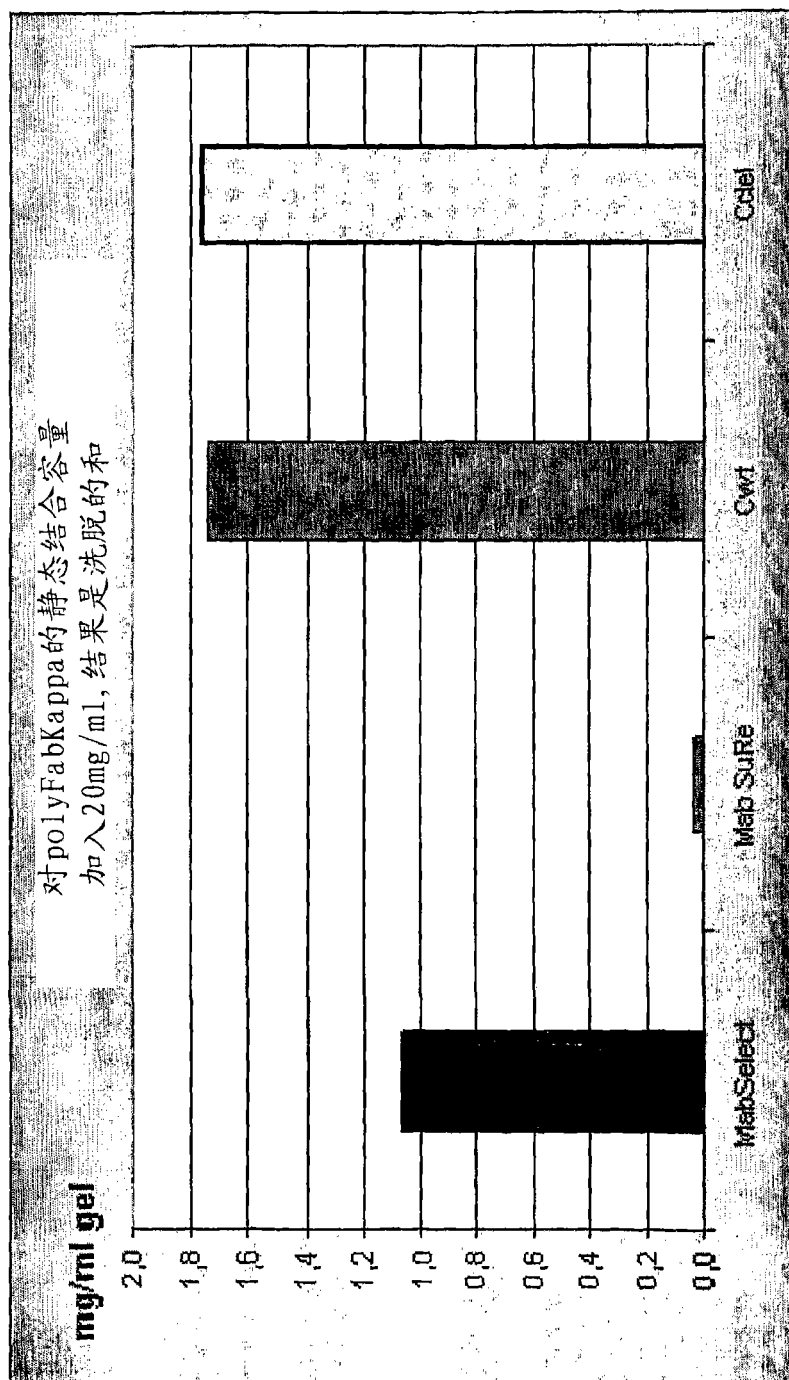


图 2

专利名称(译)	用于抗体分离的包含来自金黄色葡萄球菌A蛋白的结构域C的层析配体		
公开(公告)号	CN101522278A	公开(公告)日	2009-09-02
申请号	CN200780036281.4	申请日	2007-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气健康护理生物科学股份公司		
申请(专利权)人(译)	通用电气健康护理生物科学股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用电气健康护理生物科学股份公司		
[标]发明人	M哈尔 S拉森 A穆兰伊 G罗德里戈 邹瑾瑜 P M阿伯格		
发明人	M·哈尔 S·拉森 A·穆兰伊 G·罗德里戈 邹瑾瑜 P·M·阿伯格		
IPC分类号	B01D15/38 C07K11/22 C07K14/31 G01N33/53		
CPC分类号	B01J20/3244 B01D15/3809 B01J20/3274 C07K1/22 B01J20/286		
代理人(译)	付磊		
优先权	0602061 2006-09-29 SE		
其他公开文献	CN101522278B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及层析配体，它包含来自葡萄球菌A蛋白(SpA)的结构域C或其功能片段或变体。层析配体呈现耐得住苛刻原位清洁(CIP)条件的有利能力，且能结合抗体的Fab片段。可以给配体提供末端偶联基团，例如精氨酸或半胱氨酸，以促进它与不溶载体(例如珠或膜)的偶联。本发明也涉及使用配体分离抗体的方法，和可以包含洗涤步骤和/或用碱再生的纯化规程。

