



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522278 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 10

(21) 申请号 200780036281. 4

(22) 申请日 2007. 09. 27

(30) 优先权数据

0602061-4 2006. 09. 29 SE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 03. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2007/000862 2007. 09. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/039141 EN 2008. 04. 03

(73) 专利权人 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 72001

代理人 权陆军 付磊

(51) Int. Cl.

C07K 1/22(2006. 01)

C07K 14/31(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

B01D 15/38(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20060134805 A1, 2006. 06. 22,

US 5580788 A, 1996. 12. 03,

审查员 陈红霞

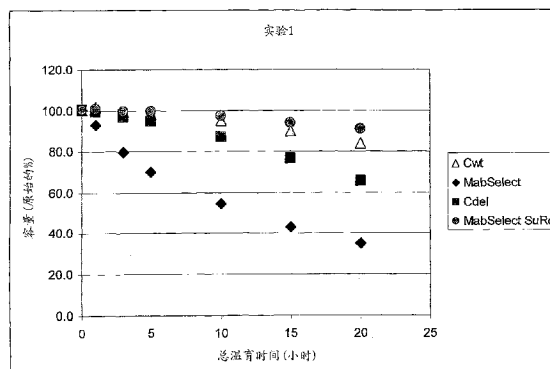
权利要求书2页 说明书11页
序列表2页 附图2页

(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. 一种层析配体,该配体由一个或多个来自葡萄球菌A蛋白 (SpA)的具有在Fc区域结合IgG的性质的结构域C单位和末端偶联基团组成,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,

其中所述层析配体在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%。

2. 根据权利要求1的配体,它能结合抗体的Fab部分。

3. 根据权利要求1的配体,其中所述偶联基团包含至少一个氮和/或硫原子。

4. 根据权利要求1的配体,其中所述末端基团包含精氨酸或半胱氨酸。

5. 权利要求1-4中任一项定义的多聚体层析配体,它含有至少2个所述结构域C单位。

6. 根据权利要求5的配体,其除了所述至少2个结构域C单位以外,还包含一个或多个其它基于蛋白的单位,其中所述其他基于蛋白的单位是碱稳定的。

7. 根据权利要求5的配体,它包含2-8个任选通过接头区段偶联的所述结构域C单位。

8. 编码在权利要求1-7中任一项定义的配体的核酸序列。

9. 包含在权利要求8中定义的核酸序列的表达系统。

10. 层析基质,其包含偶联到至少一种不溶载体上的权利要求1-7中任一项定义的配体。

11. 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1-7中任一项定义的配体。

12. 根据权利要求11的基质,其中所述载体包含基本上球形的颗粒。

13. 根据权利要求10-12中任一项的基质,其中所述载体是多孔的。

14. 制备层析基质的方法,该方法包含,提供权利要求1-7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。

15. 根据权利要求14的方法,其中所述偶联通过配体的氮或硫原子进行。

16. 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)的具有在Fc区域结合IgG的性质的结构域C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,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。

17. 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,其中所述配体是由至少2个葡萄球菌A蛋白(SpA)的具有在Fc区域结合IgG的性质的结构域C单位和末端偶联基团组成的多聚体;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,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。

18. 根据权利要求16或17的方法,其中所述靶化合物是蛋白。

19. 根据权利要求18的方法,其中所述靶化合物是抗体。

20. 根据权利要求16-18中任一项的方法,其中所述配体如权利要求1-7中任一项所定义。

21. SpA的具有在Fc区域结合IgG的性质的结构域C作为碱稳定的免疫球蛋白吸附剂的应用,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。

22. 根据权利要求21的应用,其包含根据权利要求16-20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16-20中任一项的方法。

23.根据权利要求22的应用,其中通过与氢氧化钠温育进行所述再生。

24.根据权利要求23的应用,其中氢氧化钠的浓度为0.5 M。

25.SpA的具有在Fc区域结合IgG的性质的结构域C作为Fab片段-结合吸附剂的应用,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。

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

[0001] 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。

[0002] 背景

[0003] 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。

[0004] 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)。

[0005] 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不希望的污垢,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, LinhuIt, 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。

[0006] 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。

[0007] US 5,151,350(RepIigen)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。

[0008] 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(RepIigen)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,US6,399,750(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。

[0009] 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。

[0010] 因而,US 6,831,161(Uhlen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。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 发明概述

[0015] 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。

[0016] 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层析配体的方法来实现。

[0017] 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。

[0018] 附图简述

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 定义

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 术语“基于蛋白的”配体在本文中是指包含肽或蛋白的配体、或肽的部分或蛋白的部分。

[0029] 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。

[0030] 发明详述

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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, Gülich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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 在一个实施方案中, 根据本发明的配体在0.5M 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0.5MNaOH中温育5小时后, 保留它的原始结合容量的至少95%。

[0038] 在有利的实施方案中, 根据本发明的配体能在0.5M 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0.5MNaOH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%。

[0039] 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。

[0040] 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现为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CdeI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。

[0041] 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SEQID 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SEQID 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。

[0042] 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 NO2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 NO2所示氨基酸的至少40%、有利地至少77%、更有利地至少%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。

[0043] 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USP6,399,750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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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(monoIith);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。

[0049] 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 Acta79(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 suspensionpolymerization”(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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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MabSeIect™SuRe(GE HealthcareBio-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MabSeIect™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。

[0056] 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0.5M NaOH温育,进行再生。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 附图详述

[0060] 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MabseIect™(◆);销售的碱更稳定的最近的A蛋白产物MabSeIect™SuRe(X);SEQ ID NO 1定义的来自SpA的结构域C(△);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MabSeIect™SuRe非常相当的碱稳定性。

[0061] 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CdeI)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。

[0062] 实验部分

[0063] 本发明实施例仅为解释目的而提供,且不当解释为限制所附权利要求书定义的本发明。

[0064] 实施例1:4种A蛋白-衍生的配体的碱稳定性的柱研究

[0065] 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。

[0066] -MabSeIect™和MabSeIect 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

[0067] -Cwt(SEQ ID NO.1定义的来自SpA的野生型结构域C,和CdeI(SEQ ID NO.2定义的来自SpA的缺失的野生型结构域C)。

[0068] 在开始和在0.5M 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。

[0069] 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MabSeIect™和MabSeIect™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。MabSeIect™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,MabSeIect™SuRe配体由源自结构域B类似物“Z”(它又通过蛋白工程方法针对高pH稳定化)的4个结构域组成。结果,MabSeIect™SuRe耐受最高达0.5M NaOH的原位清洁(CIP)条件。MabSeIect™和MabSeIect™SuRe配体都偶联至琼脂糖颗粒。

[0070] 配体Cwt和CdeI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。

[0071] 材料和方法

[0072] 靶化合物

[0073] 10×10mI注射液,溶液,GAMMANORM®165mg/mI(Octapharma.008664),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。

[0074] 层析柱

[0075] 如下面的表1所述进行配体偶联和柱填充:

[0076] 表1:在实验1中使用的柱

[0077]	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

[0078] “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“MabSeIect SuRe U669082柱420060310(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。

[0079] 缓冲液和溶液

[0080] 缓冲液A:50mM磷酸钠,0.15M NaCl,pH 7.2

- [0081] 缓冲液B:50mM柠檬酸,0.15M NaCl,pH 2.5
- [0082] 仪器和实验室设备
- [0083] 层析系统:ÄKTATM explorer 10(GE Healthcare)
- [0084] 柱硬件:TricornTM 5/100GL(GE Healthcare)
- [0085] 真空脱气装置:CT 2003-2,2通道脱气装置,ChromTech AB
- [0086] 分光光度计:NanoDrop[®] ND-1000分光光度计,NanoDropTechnologies
- [0087] 离心机:Beckman CoulterTM AvantiTM J-20XPI,具有JLA 8.1000转子
- [0088] pH计(缓冲液A):Beckman Φ 360pH/Temp/mV计
- [0089] pH计(缓冲液B):实验室(Laboratory)pH计CG 842,SCHOTT
- [0090] 氦:AGA Gas AB,10 IH 20577708,仪器
- [0091] 缓冲液和样品的过滤器:75mm瓶顶过滤器(Bottle Top Filter)-500mL,0.2μm孔径,NaIgene
- [0092] 用于0.5M NaOH的过滤器:75mm瓶顶过滤器(Bottle Top Filter)-500mL,0.45μm孔径,NaIgene
- [0093] 软件
- [0094] 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。
- [0095] 缓冲液制备
- [0096] 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,且在使用前用氦脱气。
- [0097] 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,且在使用前用氦脱气。
- [0098] 0.5M NaOH的制备
- [0099] 将NaOH(固体)溶于水中,至0.5M。过滤溶液,且在使用前用氦脱气。
- [0100] 样品制备
- [0101] 实验1
- [0102] 用4950mL缓冲液A稀释30mL Gammanorm(165mg/mL)至1mg/mL。通过0.2μm,将样品过滤进无菌的5升瓶中。
- [0103] 使用NanoDrop分光光度计,对样品进行3次280nm吸光度测量:1.2573AU、1.2432AU和1.2101AU。平均吸光度:1.2369AU。
- [0104] 也在ÄKTAexplorer 10上测量在280nm的吸光度。用系统泵以旁路模式将样品抽吸通过系统。使用10mm紫外线池(UV cell),且流速是0.83mL/分钟。在280nm的吸光度是1510mAU。当进行容量计算时,该值用作参照。
- [0105] 方法描述
- [0106] 通常,MabSelect SuRe的CIP循环包含CIP溶液(通常是0.1-0.5MNaOH)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。

[0107] 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0.5M NaOH中温育柱。每个CIP温育后,每个柱进行一次容量测量。

[0108] 概要地,如下设计实验:

[0109] • 每个柱2次起始容量测量。

[0110] • CIP温育,1小时。

[0111] • 每个柱一次容量测量。

[0112] • CIP温育,2小时。

[0113] • 每个柱一次容量测量。

[0114] • CIP温育,2小时。

[0115] • 每个柱一次容量测量。

[0116] • CIP温育,5小时。

[0117] • 每个柱一次容量测量。

[0118] • CIP温育,5小时。

[0119] • 每个柱一次容量测量。

[0120] • CIP温育,5小时。

[0121] • 每个柱一次容量测量。

[0122] 系统设置:

[0123] 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10mm紫外线池,用于紫外线检测。

[0124] 将缓冲液和样品抽吸通过系统泵。使用下述入口:

[0125] • 样品:B泵(入口B1)

[0126] • 缓冲液A:A泵(入口A11)

[0127] • 缓冲液B:A泵(入口A12)

[0128] • 0.5M NaOH:A泵(入口A13)

[0129] 容量测量,详述

[0130] 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。

[0131] 每个柱的容量测量方法由下述部分组成:

[0132] • 用5柱体积(CV)缓冲液A平衡柱。

[0133] • 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280nm吸光度的15%。

[0134] • 洗出未结合的样品。用缓冲液A洗涤柱,直到UV_{280nm}曲线降落到低于样品的280nm吸光度的10%。

[0135] • 洗脱。用10CV缓冲液B洗脱结合的材料。

[0136] • 用5CV缓冲液A再次平衡。

[0137] 样品装载流速是0.83mI/分钟。

[0138] CIP温育

[0139] 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0.83mI/分钟的流速,将3CV的0.5M 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0.83mI/分钟的流速,将3CV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3CV缓冲液A进行另外一个洗涤循环。

[0140] 层析结果的评价

[0141] 通过测量应用到柱上的样品的体积,测定容量,直到280nm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1,02mI。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。

[0142] 表2:结果实验1-容量(mg Gammanorm/ml层析基质(凝胶))

[0143]

	MabSeIect SuRe	Cwt	MabSeIect	CdeI
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

[0144] 实验2:Fab-结合的测试

[0145] 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280nm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。

[0146] 制备每种层析介质的10%浆。

[0147] 给滤板装载200μI浆/孔,即20μI介质/孔。

[0148] 平衡-在PBS中5×200μI洗涤

[0149] 样品温育-在PBS中的100μI人多克隆Fab/Kappa,IgG片段(BZ基),15分钟

[0150] 洗涤-5×100μI PBS

[0151] 洗脱-3×100μI 0.1M甘氨酸,pH 3.0

[0152] CIP-用0.5M NaOH进行2×10分钟

[0153] 分析具有液体的板于280nm的UV

[0154] 实验2的结果如图2所示。

<110>GE HeaIthcare 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(StaphyIococcus aureus)

<400>1

Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	GIn	GIn	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1			5				10					15			
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	GIn	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	GIn
			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	GIn	Ala	Pro	Lys						
			50				55								

<210>2

<211>54

<212>PRT

<213>金黄色葡萄球菌(StaphyIococcus aureus)

<400>2

Ala	Asp	Lys	Glu	GIn	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	
1			5				10				15				
Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	GIn	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	GIn	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

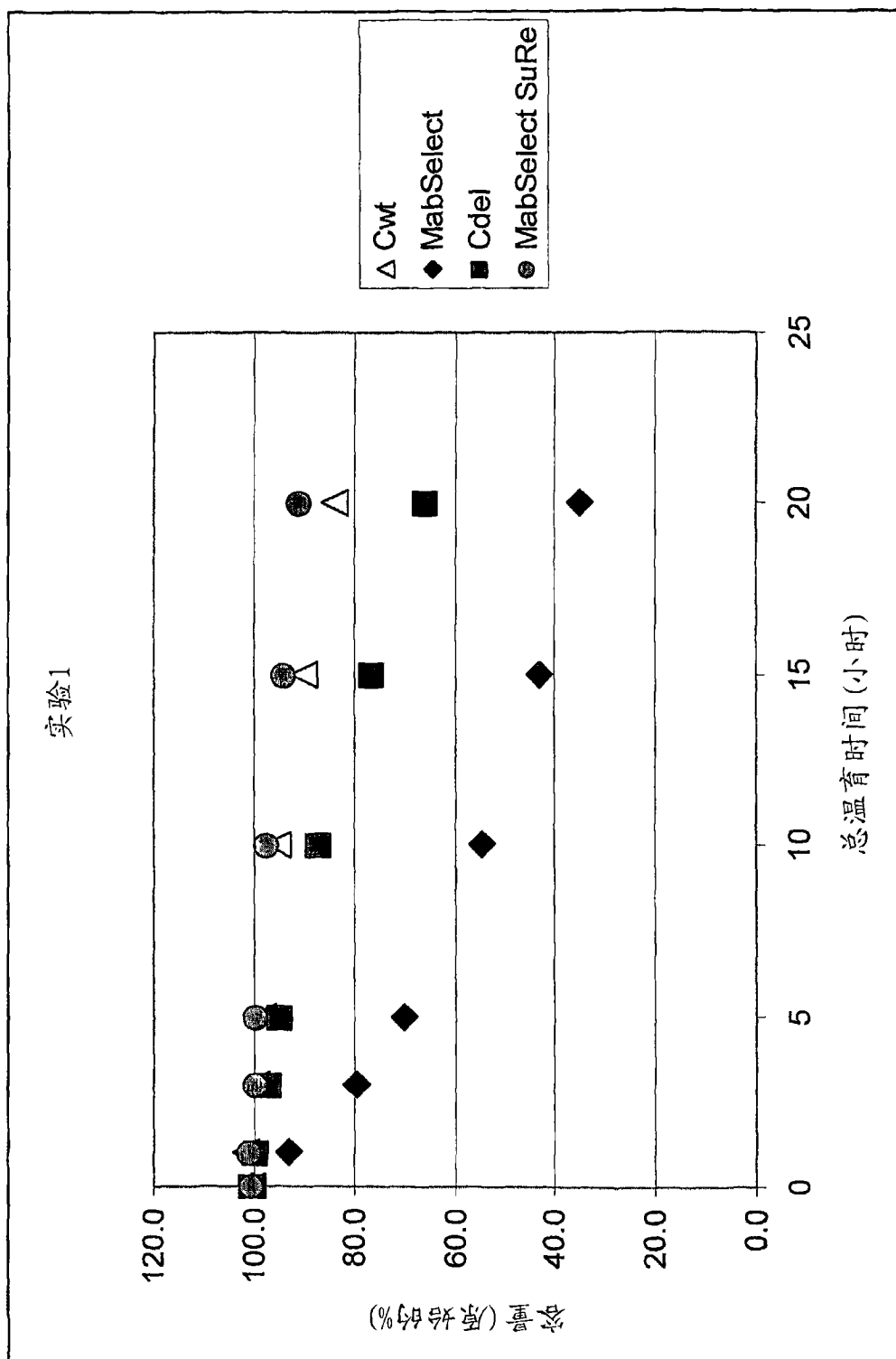


图 1

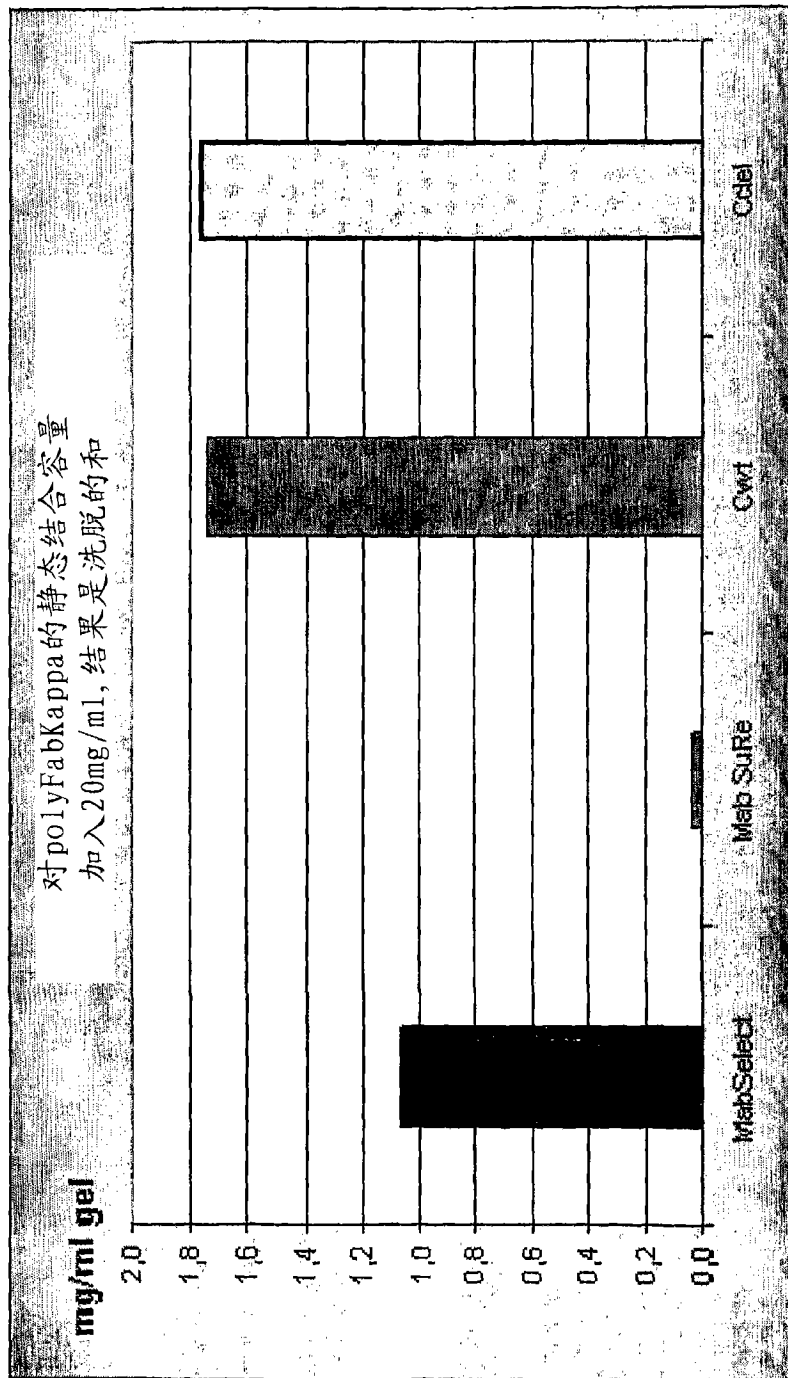


图 2

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	CN101522278B	公开(公告)日	2016-08-10
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	C07K1/22 C07K14/31 G01N33/53 B01D15/38		
代理人(译)	付磊		
审查员(译)	陈红霞		
优先权	0602061 2006-09-29 SE		
其他公开文献	CN101522278A		
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。

