



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118324847 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 12

(21) 申请号 202410342270.4	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2009.10.29	C07K 1/22 (2006.01)
(30) 优先权数据	C07K 1/18 (2006.01)
61/109,481 2008.10.29 US	C07K 1/36 (2006.01)
(62) 分案原申请数据	C07K 16/24 (2006.01)
200980153069.5 2009.10.29	C07K 16/18 (2006.01)
(71) 申请人 阿布林克斯公司	C07K 16/06 (2006.01)
地址 比利时兹韦纳尔德	A61K 39/395 (2006.01)
(72) 发明人 保罗·R·布朗	A61P 37/06 (2006.01)
斯科特·A·托布勒	A61P 1/04 (2006.01)
安德鲁·M·伍德	A61P 19/02 (2006.01)
奥斯汀·W·伯施	A61P 17/06 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所	A61P 29/00 (2006.01)
11105	
专利代理师 张文辉	
	权利要求书2页 说明书36页
	序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

单域抗原结合性分子的纯化方法

(57) 摘要

本发明公开了使用基于蛋白A的亲合色谱纯化或分离包括一个或多个单一结合域(例如,一个或多个纳米抗体分子)、基本上不含互补性抗体域和免疫球蛋白恒定区的单域抗原结合性(SDAB)分子的工艺和方法。

1. 从含有包含一个或多个纳米抗体分子的单域抗原结合性 (SDAB) 分子和一种或多种污染物的混合物分离或纯化所述SDAB分子的方法, 包括:

(a) 将所述混合物与基于蛋白A的载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述载体的条件下接触, 所述基于蛋白A的载体包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的葡萄球菌蛋白A (SpA) 功能性变体的树脂;

(b) 去除所述污染物中的一种或多种, 其中所述去除所述污染物中的一种或多种的步骤包括在所述SDAB分子保持与所述载体结合的条件下清洗所述结合的载体;

(c) 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子, 由此获得洗脱的SDAB分子预备物; 和

(d) (i) 将所述洗脱的SDAB分子预备物与羟基磷灰石树脂接触并从所述羟基磷灰石树脂选择性洗脱所述SDAB分子, 或

(d) (ii) 用平衡缓冲液预处理所述洗脱的SDAB分子预备物并允许所述经预处理的混合物流过羟基磷灰石树脂。

2. 根据权利要求1的方法, 其中所述基于蛋白A的载体树脂选自下组: MabSELECT™柱、MabSELECT™SuRe柱、MabSELECT™Xtra和ProSep™Va Ultra Plus。

3. 根据权利要求1或2的方法, 其进一步包括:

(e) 通过Planova 20N病毒保留过滤去除可能代表病毒污染物的颗粒, 其包括以下步骤:

(i) 在cHA洗脱缓冲液中平衡Planova 20N VRF装置, 并对其装载Macro-Prep陶瓷羟基磷灰石汇集产物;

(ii) 收集渗出液流中的产物。

4. 根据权利要求1至3中任一项的方法, 其进一步包括:

(f) 超滤/渗滤, 其包括以下步骤:

(i) 滤液产物的浓缩;

(ii) 用组氨酸缓冲液的渗滤;

(iii) 进一步浓缩所述产物;

(iv) 用组氨酸缓冲液流回收汇集物;

(v) 添加组氨酸缓冲液的储液以获得最终药物物质。

5. 提供包含一个或多个纳米抗体分子的重组单域抗原结合性 (SDAB) 分子的方法或工艺, 其包括:

(a) 提供包含编码所述重组SDAB分子的核酸的哺乳动物宿主细胞;

(b) 将所述宿主细胞保持在表达所述重组SDAB分子的条件;

(c) 获得所述重组SDAB分子和一种或多种污染物的混合物;

(d) 使用包含蛋白A的修饰的B-域 (SEQ ID NO:12) 的四聚体的色谱载体从所述混合物纯化或分离重组所述SDAB分子, 其中所述纯化或分离步骤包括将所述混合物与载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述载体的条件下接触;

(e) 去除所述污染物中的一种或多种, 其中所述去除所述污染物中的一种或多种的步骤包括在所述SDAB分子保持与所述载体结合的条件下清洗所述结合的载体; 和

(f) 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子, 由此获得洗脱的SDAB分子预备物。

6. 根据权利要求1或2的方法或工艺, 其进一步包括:

(g) 通过Planova 20N病毒保留过滤去除可能代表病毒污染物的颗粒,其包括以下步骤:

(i) 在cHA洗脱缓冲液中平衡Planova 20N VRF装置,并对其装载Macro-Prep陶瓷羟基磷灰石汇集产物;

(ii) 收集渗出液流中的产物。

7. 根据权利要求1至3中任一项的方法或工艺,其进一步包括: (h) 超滤/渗滤,其包括以下步骤:

(i) 滤液产物的浓缩;

(ii) 用组氨酸缓冲液的渗滤;

(iii) 进一步浓缩所述产物;

(iv) 用组氨酸缓冲液流回收汇集物;

(v) 添加组氨酸缓冲液的储液以获得最终药物物质。

8. SDAB分子,其通过权利要求1-7中任一项所述的方法纯化。

9. 权利要求8的SDAB分子在制造用于治疗或预防受试者的疾病的药物中的用途。

单域抗原结合性分子的纯化方法

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请日:2009年10月29日;申请号:201610020815.5;发明名称:单域抗原结合性分子的纯化方法)的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2008年10月29日提交的U.S.Serial No.61/109,481的优先权,将其全部内容通过提述以其整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经通过EFS-Web提交并通过提述以其整体并入本文的序列表。所述创建于2009年10月28日的ASCII拷贝名为w223738w.txt,大小为12,853字节。

背景技术

[0006] 重组蛋白如抗体通常含有多种需要在蛋白产物成为药学上可接受的之前去除的杂质。这些杂质中的一些可以包括宿主细胞蛋白(HCP)、DNA分子、产物蛋白的变体和/或错误折叠的形式、和高分子量聚集体(HMWA)。在抗体生产过程中聚集体的形成是个问题,因为其能够通过给药时引起补体活化或过敏性反应而对产物安全性产生负面影响。聚集体形成还可能通过造成产物产率减少、峰变宽和活性损失而妨碍制造工艺。这些杂质在不同的色谱模式可能具有宽泛的停留模式。去除这些广谱杂质通常是困难的,通常需要多个涉及不同色谱模式的步骤。

[0007] 常见蛋白纯化方法是基于要纯化的蛋白质和污染物之间在大小、电荷和溶解性上的差异来预测的。基于这些参数的方案包括,但不限于,亲和色谱、离子交换色谱、体积排阻色谱和疏水相互作用色谱。然而,这些色谱方法有时在分离聚集或多聚的抗体类型中存在技术困难。例如,像离子交换和疏水相互作用色谱等技术可能诱导因洗脱(elution)过程中蛋白质浓度的增加或缓冲液浓度和/或pH中所需要的变化而造成的聚集体形成。另外,在多种情况下,抗体在等电点上显示出的差异太小以至于不能通过离子交换色谱进行它们的分离(Tarditi, J. Immunol. Methods 599:13-20(1992))。体积排阻色谱趋于繁琐且导致对产物的严重稀释,这在大规模的、以效率为基础的制造工艺中是个阻碍。还可能发生从亲和色谱柱的配体渗漏,其导致不想要的对洗脱产物的污染(Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69(2000))。

[0008] 尽管可以在重组蛋白的纯化过程中采用几种不同模式的色谱,但是仍然需要开发减少使用的色谱步骤数目并且不破坏或不显著降低重组蛋白的生物活性的纯化工艺。

发明内容

[0009] 本发明部分基于如下发现,即单域抗原结合性(SDAB)分子与蛋白A或其功能性变体相互作用,例如结合,由此使得在所述SDAB分子的纯化中能够使用基于蛋白A的亲和色谱。在其他实施方案中,所述SDAB分子能够使用其他色谱技术纯化,如例子(例如,阳离子)交换色谱。所述SDAB分子可以包含一个或多个单一抗原结合域,其与一种或多种靶蛋白(例如,肿瘤坏死因子和/或人血清白蛋白)相互作用,例如结合。在某些实施方案中,所述SDAB

分子是包含一个或多个纳米抗体分子的单链多肽,其基本上不含互补性抗体域和/或免疫球蛋白恒定区。因此,本发明涉及单独地或组合地使用色谱技术如基于蛋白A的亲合色谱和离子(例如,阳离子)交换色谱纯化或分离包含一个或多个单一结合域(例如,一个或多个纳米抗体分子)的SDAB分子的工艺和方法。

[0010] [注意:纳米抗体TM是Ablynx N.V.的注册商标]

[0011] 因此,在一个方面,本发明描述了一种从含有SDAB分子和一种或多种污染物的混合物(在本文也称作“SDAB分子预备物(preparation)”)分离或纯化SDAB分子(例如,一个或多个纳米抗体分子)的方法或工艺。所述方法或工艺包括:将所述混合物与基于蛋白A的载体或离子(例如,阳离子)交换(CEX)载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述载体的条件下接触;去除一种或多种污染物,例如,通过在所述SDAB分子保持结合于所述载体的条件下清洗结合的载体(例如,用至少一种蛋白A或CEX清洗缓冲液清洗结合的载体);和从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,例如,通过用至少一种蛋白A或CEX洗脱缓冲液洗脱吸附的SDAB分子。

[0012] 在一个实施方案中,所述分离或纯化SDAB分子的方法包括将所述SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与阳离子交换载体接触。

[0013] 在其他实施方案中,所述分离或纯化SDAB分子的方法包括将所述SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与基于蛋白A的树脂接触。

[0014] 所述方法或工艺可以单独使用或与至少一种其他纯化方法组合使用,所述其他纯化方法包括但不限于如下的一种或多种:羟基磷灰石(hydroxyapatite)、亲和色谱(affinity chromatography)、体积排阻色谱(size exclusion chromatography)、疏水相互作用色谱(hydrophobic interaction chromatography)、金属亲和色谱(metal affinity chromatography)、渗滤(diafiltration)、超滤(ultrafiltration)、病毒失活(viral inactivation)(例如,使用低pH)和/或除病毒过滤。例如,所述方法或工艺可以与羟基磷灰石色谱、超滤、病毒失活(例如,使用低pH)和/或除病毒过滤中的一种或多种组合使用。在使用蛋白A载体的实施方案中,所述方法或工艺可以进一步包括离子(例如,阳离子或阴离子)交换色谱。

[0015] 在多个实施方案中,所述方法或工艺进一步包括将所述混合物与羟基磷灰石树脂接触和从所述羟基磷灰石树脂选择性洗脱所述SDAB分子。在其他使用蛋白A载体的实施方案中,所述方法或工艺进一步包括将所述混合物与阳离子交换(CEX)柱接触,和从该柱选择性洗脱所述SDAB分子。

[0016] 前述方法和工艺的实施方案可以包括以下特征中的一种或多种:

[0017] 在一个实施方案中,通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子是在包括所述SDAB分子和细胞培养污染物的混合物中作为细胞培养(例如,宿主细胞(例如,哺乳动物细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞))的产物产生的重组蛋白。所述细胞培养可以是小规模或大规模培养。

[0018] 在其他实施方案中,通过本发明的方法分离或纯化的混合物中的污染物包括一种或多种高分子量蛋白质聚集体、宿主细胞蛋白、DNA和/或蛋白A(例如,浸析的蛋白A(leached protein A))。在多个实施方案中,将所述SDAB分子纯化至至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的纯度。

[0019] 在另一实施方案中,在本发明的方法或工艺中使用的基于蛋白A的载体包括固定化的蛋白A(例如,重组或分离的蛋白A)或其功能性变体的载体,例如,树脂。在一个实施方案中,所述固定化的蛋白A是全长葡萄球菌蛋白A(SpA),其由以从N端起顺序的已知为E、D、A、B和C结构域的约50-60个氨基酸残基的五个结构域构成。例如,所述蛋白A包括图4A中所示的SpA的氨基酸序列(SEQ ID NO:11),或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,与图4A中所示的SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少85%、90%、95%或更多相同的氨基酸序列)。在其他实施方案中,所述固定化的蛋白A是SpA的功能性变体,其包括选自E、D、A、B和/或C的至少一个结构域,或其修饰形式。例如,SpA的功能性变体可以至少包括SpA的结构域B,或结构域B的变体,其具有一个或多个取代的天冬酰胺残基,在本文也称作结构域Z。在一个实施方案中,SpA的功能性变体包括图4B中所示的SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,与图4B中所示的SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、90%、95%或更多相同的氨基酸序列)。可以使用的蛋白A的功能性变体的其他排列包括结构域B,或变体结构域B,和以下的一种或多种:结构域A和/或C;结构域E、A和/或C;或结构域E、D、A和/或C。可以使用E、D、A、B和/或C或它们的功能性变体的任意组合,只要所述组合能够与SDAB分子结合。能够使用的示例性蛋白A载体树脂包括MabSELECT™柱,MabSELECT™ SuRe柱,MabSELECT™ Xtra(GE Healthcare Products),和ProSep™ Va Ultra Plus(Millipore Corporation,Billerica MA)。

[0020] 在一个在本发明的方法或工艺中使用基于蛋白A的载体的实施方案中,将SDAB分子和污染物的混合物在允许所述SDAB分子结合或吸附至基于蛋白A的载体的条件下与所述基于蛋白A的载体接触,例如,装载至所述基于蛋白A的载体上。在某些实施方案中,使用的蛋白A装载缓冲液包括条件介质。可以使用蛋白A平衡溶液来平衡蛋白A柱,所述平衡溶液包括约10至约250mM NaCl和约10至约100mM Tris,pH范围在约6-8;约50至约200mM NaCl和约20至约75mM Tris,pH范围在约6.5-7.5;约100至约175mM NaCl和约40至约60mM Tris,pH范围在约7-7.5;约125至约160mM NaCl和约45至约55mM Tris,pH范围在约7-7.5;约50至约150mM NaCl和约50mM Tris,pH范围在约7.5;或约150mM NaCl和约50mM Tris,pH范围在约6.5、7.0、7.5或8.0。

[0021] 在又一在本发明的方法或工艺中使用基于蛋白A的载体的实施方案中,将混合物的一种或多种污染物去除,例如,通过在SDAB分子保持结合于载体的条件下清洗结合的载体(例如,使用至少一种蛋白A清洗缓冲液清洗结合的载体)。在某些实施方案中,所述蛋白A清洗缓冲液包括约10至约250mM NaCl和约10至约100mM Tris,pH范围在约6-8;约50至约200mM NaCl和约20至约75mM Tris,pH范围在约6.5-7.5;约100至约175mM NaCl和约40至约60mM Tris,pH范围在约7-7.5;约125至约160mM NaCl和约45至约55mM Tris,pH范围在约7-7.5;约50至约150mM NaCl和约50mM Tris,pH范围在约7.5;或约150mM NaCl和约50mM Tris,pH范围在约6.5、7.0、7.5或8.0。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液包括50mM NaCl和50mM Tris,pH 7.5。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液包括10mM、25mM、50mM、75mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM NaCl。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液包括10mM、25mM、50mM、75mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM CaCl_2 。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液包括10mM、25mM、50mM、75mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM Tris。在一些实施方

案中,所述清洗缓冲液包括10mM、25mM、50mM、75mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM柠檬酸盐。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液包括10mM、25mM、50mM、75mM、100mM、150mM、200mM、250mM、300mM、350mM、400mM、450mM或500mM HEPES。在一些实施方案中,所述清洗缓冲液为pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5或9.0。

[0022] 在又一在本发明的方法或工艺中使用基于蛋白A的载体的实施方案中,将所述SDAB分子从所述载体选择性洗脱,例如,通过使用至少一种蛋白A洗脱缓冲液洗脱吸附的SDAB分子。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液包括约5至约50mM NaCl和约5mM至约100mM甘氨酸,在pH 4.0或更低。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液包括约10mM、约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约150mM、约200mM、约250mM、约300mM、约350mM、约400mM、约450mM或约500mM NaCl;约10mM、约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约150mM、约200mM或约250mM甘氨酸。在一些实施方案中,所述洗脱缓冲液为pH 2.0、2.5、3.0、3.5或4.0。在某些实施方案中,所述蛋白A洗脱缓冲液包括约10mM NaCl和约50mM甘氨酸,约pH 3.0。

[0023] 在一个实施方案中,在本发明的方法或工艺中将陶瓷羟基磷灰石色谱与蛋白A色谱组合使用。所述陶瓷羟基磷灰石色谱可以在基于蛋白A的色谱之前,或更通常之后使用。在这些实施方案中,所述方法包括将所述SDAB分子的混合物(例如,在使用蛋白A色谱分离或纯化之后的混合物)与羟基磷灰石树脂接触并从所述树脂选择性洗脱所述SDAB分子。或者,可以将所述混合物用平衡缓冲液预处理,然后使其流过羟基磷灰石树脂。这些方法中的任一也可以组合使用以纯化所述混合物。在一个实施方案中,所述洗脱和装载缓冲液包括约1至约20mM磷酸钠和约0.2至约2.5M氯化钠,其中所述洗脱和装载缓冲液具有约6.4至约7.6的pH。在其他实施方案中,所述平衡缓冲液和清洗缓冲液包括约1至约20mM磷酸钠,约0.01至约2.0M氯化钠,约0至约200mM精氨酸,和约0至约200mM HEPES,其中所述平衡和清洗缓冲液具有约6.2至8.0的pH。在一些实施方案中,所得纯化的SDAB分子含有少于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的高分子量聚集体。

[0024] 在其他实施方案中,将所述离子交换色谱与如本文所述的蛋白A色谱和/或羟基磷灰石色谱之一或二者组合使用。在所述离子交换色谱之前进行所述蛋白A色谱的示例性方法或工艺包括:将含有所述SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与蛋白A载体接触,使得所述SDAB分子能够吸附至所述载体,用至少一种蛋白A清洗缓冲液清洗所述载体和吸附的SDAB分子,用至少一种蛋白A洗脱缓冲液洗脱吸附的SDAB分子,由此收集SDAB分子预备物。所述方法或工艺可以进一步包括将所述SDAB分子预备物与离子交换载体接触,使得所述SDAB分子能够流过所述载体,用至少一种离子交换清洗缓冲液清洗所述载体,由此收集所述离子交换流出物。在某些实施方案中,所述方法或工艺进一步包括将所述离子交换流出物与羟基磷灰石树脂接触,使得所述流出物能够吸附至树脂,用至少一种羟基磷灰石清洗缓冲液清洗所述树脂,并用至少一种羟基磷灰石洗脱缓冲液从所述树脂洗脱纯化的SDAB分子。

[0025] 在其他实施方案中,将离子(例如,阳离子)交换色谱(CEX)单独使用,或与另一树脂例如蛋白A色谱和/或陶瓷羟基磷灰石色谱之一或二者组合使用。所述方法或工艺包括将含有所述SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与离子交换载体接触,使得所述SDAB分子能够流过所述载体,用至少一种离子(例如,阳离子)交换清洗缓冲液清洗所述载体。在一个实施方案中,阳离子交换载体选自:CaptoTM S (GE Healthcare), Fractogel® S03- (M) (EMD

Chemicals), Toyopearl®Gigacap S-650M(Tosoh Bioscience) 或 Poros®HS 50(Applied Biosystems)。在一个实施方案中,所述CEX树脂显示至少约10g/L、20g/L、30g/L、40g/L、50g/L或60g/L的能力。在其他实施方案中,用于装载该柱的条件介质(condition media)(CM)的电导率在约15和5mS/cm之间,14和6mS/cm之间,13和8mS/cm之间,12和9mS/cm之间,或11至10mS/cm之间,或约7mS/cm,8mS/cm,9mS/cm,10mS/cm,11mS/cm,12mS/cm,或13mS/cm。在其他实施方案中,将装载条件的pH调节至低于约6.5、5.5、5.4、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.3、9、3.8或3.7。在几个实施方案中,所述洗脱缓冲液为约100mM氯化钠或更少,约90mM氯化钠或更少,约80mM氯化钠或更少,约70mM氯化钠或更少,约60mM氯化钠或更少,约50mM氯化钠或更少,约40mM氯化钠或更少,或约30mM氯化钠或更少,20mM氯化钠或更少,约10mM氯化钠或更少,约5mM氯化钠或更少,约1mM氯化钠或更少,并具有约4至8,约5至7.5,约5.5至7.2,约6至7.1,或约6.5至7,或约5.5、5.6、6.5或7的pH。在其他实施方案中,CEX柱也可以使用下游cHA平衡缓冲液洗脱。

[0026] 在某些实施方案中,所述阳离子交换色谱是SDAB纯化中使用的唯一色谱方法。在其他实施方案中,将阳离子交换色谱与其他色谱方法(例如,羟基磷灰石色谱)组合使用。其中进行阳离子交换色谱的示例性方法或工艺包括:将含有所述SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与阳离子交换载体在降低所述装载缓冲液或条件介质的电导率的条件下接触(例如,在约15至5mS/cm,14至6mS/cm,13至8mS/cm,12至9mS/cm或11至10mS/cm,或约7mS/cm,8mS/cm,9mS/cm,10mS/cm,11mS/cm,12mS/cm或13mS/cm的条件下),使所述SDAB分子能够吸附至所述载体,用至少一种阳离子交换清洗缓冲液清洗所述载体和吸附的SDAB分子,用至少一种洗脱缓冲液洗脱所述吸附的SDAB分子,由此收集SDAB分子预备物。所述方法或工艺可以进一步包括将所述SDAB分子预备物与另一载体或树脂接触,例如,所述方法或工艺可以进一步包括将离子交换流出物与羟基磷灰石树脂接触,使所述流出物能够吸附至所述树脂,用至少一种羟基磷灰石清洗缓冲液清洗所述树脂,和用至少一种羟基磷灰石洗脱缓冲液从所述树脂洗脱纯化的SDAB分子。

[0027] 在其他实施方案中,所述方法或工艺进一步包括浓缩洗脱的SDAB分子至预设的目标体积,例如,通过进行超滤/渗滤步骤。所述浓缩步骤也可以用于交换洗脱的SDAB分子的缓冲液。例如,可以将所述浓缩的、洗脱的SDAB分子过滤,例如,在组氨酸缓冲液或Tris缓冲液存在下渗滤。在使用组氨酸缓冲液的实施方案中,所述缓冲液的浓度为至少约5至30mM,约7.5至28mM,约10至20mM,约12至15mM,或约10mM,约11mM,约12mM,约13mM,约14mM,约15mM,约20mM,约25mM,约28mM,pH为约7,约6,约5,约4,约3,或范围在约4至6.5,约5至6,约5.9,约5.8,约5.7,约5.6或约5.5。在一些实施方案中,将小体积的浓缩配制缓冲液添加至洗脱的、浓缩的SDAB分子(例如,至少2、5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20%v/v的浓缩配制缓冲液)。在多个实施方案中,所述浓缩配制缓冲液为约10至50mM组氨酸(例如,约20mM,约30mM组氨酸,约10至60%糖(例如,蔗糖,山梨糖醇或海藻糖),例如,约50%蔗糖,和约0.001至约0.1%,例如,约0.06%的表面活性剂(例如,聚山梨酯80))。用于SDAB分子的示例性制剂记载于2008年10月29日以Wyeth的名义提交的USSN 12/608,553中,将其内容通过提述并入本文。

[0028] 在多个实施方案中,将所述SDAB分子浓缩至至少约20g/L、30g/L、40g/L、80g/L、90g/L、100g/L、150g/L、200g/L、210g/L、220g/L、230g/L、240g/L、250g/L、260g/L、

270g/L、280g/L、290g/L、300g/L、310g/L、320g/L、330g/L、340g/L、350g/L或更高。

[0029] 在某些实施方案中,所述方法或工艺包括:评估(例如,检测、定量和/或监测)所述SDAB分子的纯度、活性、毒性、药代动力学和/或药效学中的至少一种参数;(任选地)将所述至少一种参数与参照值比较,由此评估或选择SDAB分子。所述比较可以包括测定所述至少一种参数是否与参照值具有预先选定的关系,例如,测定其是否落入参照值的范围内(包括或排出该范围的端点);是否等于或大于所述参照值。在某些实施方案中,如果所述至少一种参数符合预先选定的关系,例如,落入参照值内,那么选择所述SDAB分子。在其他实施方案中,将是否满足所述至少一种参数和参照值之间预先选定的关系的测定法、方法或指征记录或记下,例如,于计算机可读介质中。满足预先选定的关系的这些方法、测定法或指征可以列在产品插页、概要(例如,美国药典)或任何其他材料,例如,可以分发的标签,例如,用于商业用途,或用于向美国或外国管理机构提交。

[0030] 在一个实施方案中,所述方法或工艺进一步包括将所述测定值与参照值比较,由此分析所述制造工艺。

[0031] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括至少部分基于所述分析保持所述制造工艺。在一个实施方案中,所述方法进一步包括基于所述分析改变所述制造工艺。

[0032] 在另一个实施方案中,所述方法包括评估工艺,例如,SDAB分子的制造工艺,例如,通过选择的工艺制造的TNF纳米抗体分子的制造工艺,其包括基于本文描述的方法或分析做出关于所述工艺的决定。在一个实施方案中,所述方法进一步包括至少部分基于所述方法或分析保持或改变制造工艺。因此,在另一实施方案中,做出评估的一方不实施本文所述的方法或分析,而仅仅依赖于本文所述的方法或分析获得的结果。

[0033] 在另一实施方案中,所述方法包括在监控或控制批次间变化的方法中比较两种或更多种预备物或将预备物与参照标准比较。

[0034] 在又一实施方案中,所述方法可进一步包括做出决定以至少部分基于所述决定来例如分类、选择、接受或丢弃、发放或扣留、加工成药物产品、运输、转移至不同地点、配制、贴标、包装、上市、销售或承诺销售所述预备物。

[0035] 在另一个方面,本发明描述了符合监管要求的方法,所述监管要求例如,监管机构例如FDA的批准后要求。所述方法包括提供对SDAB分子的参数的评估,如本文所述。所述批准后要求可以包括对一种或多种上述参数的测量。所述方法还任选地包括测定观察到的溶液参数是否满足预先选择的标准,或者所述参数是否在预先选择的范围内;任选地,记录分析的数值或结果,或与所述机构沟通,例如,通过将该数值或结果传送给所述监管机构。

[0036] 在另一个方面,本发明描述了下述中的一项或多项的方法:向报告接收机构提供报告,评估SDAB分子,例如,TNF纳米抗体分子的样品对参照标准(例如,FDA要求)的符合情况,从另一方寻求SDAB分子预备物满足一些预先确定的要求的指示,或向另一方提交关于SDAB分子预备物的信息。示例性接收机构或他方包括政府,例如,美国联邦政府,例如,政府机构,例如,FDA。所述方法包括以下步骤中的一步或多步(或全部):在第一国,例如,美国,制备和/或测试SDAB分子;将样品的至少一个等分试样发送到第一国之外,例如,将其发送到美国之外,给第二国;准备或接收包括有关所述SDAB分子预备物的结构的数据的报告,所述数据例如与本文所述的结构和/或链有关的数据,例如,通过本文描述的一种或多种方法生成的数据;和向报告接收结构提供所述报告。

[0037] 通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子,例如,纳米抗体分子(例如,TNF结合性纳米抗体分子)可包含一个或多个单结合域(例如,一个或多个纳米抗体)。例如,所述纳米抗体分子可以包含,或其组成为,多肽,例如,单链多肽,其包含至少一个免疫球蛋白可变域(包括一个、两个或三个互补决定区(CDR))。SDAB分子的例子包括天然不含轻链的分子(例如,VHH,纳米抗体,或骆驼科动物(camelid)来源的抗体)。这些SDAB分子可以源自或获得自骆驼科动物例如骆驼(camel)、美洲驼(llama)、单峰骆驼(dromedary)、羊驼(alpaca)和原驼(guanaco)。在其他实施方案中,所述SDAB分子可以包括单域分子,包括但不限于其他天然存在的单域分子,如鲨鱼单域多肽(IgNAR);和单域支架(例如,纤连蛋白支架)。单域分子可以源自鲨鱼。

[0038] 在一个实施方案中,通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子是包含一个或多个单域分子的单链多肽。在多个实施方案中,所述纳米抗体分子是单价或多价的(例如,二价、三价或四价)。在其他实施方案中,所述纳米抗体分子是单一特异性或多重特异性的(例如,双重特异性、三重特异性或四重特异性)。所述SDAB分子可以包含一个或多个单域分子,所述单域分子为重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的、和/或体外生成的(例如,通过噬菌体展示选择的)。例如,所述SDAB分子可以是包含一个或多个单域分子的单链融合多肽,所述单域分子与一个或多个靶抗原结合。所述靶抗原通常为哺乳动物的蛋白质,例如,人的蛋白质。在某些实施方案中,所述SDAB分子与血清蛋白结合,例如,选自血清白蛋白(人血清白蛋白(HSA))、纤维蛋白、纤维蛋白原或转铁蛋白中的一种或多种的人血清蛋白。

[0039] 在一个示例性实施方案中,通过本发明的方法分离或纯化的SDAB分子是三价、双重特异性分子,由与靶抗原(例如,肿瘤坏死因子 α (TNF α))结合的两个单域分子(例如,两个骆驼科动物可变区)和一个与血清蛋白(例如,HSA)结合的单域分子(例如,骆驼科动物可变区)的单链多肽融合物构成。所述SDAB分子的单域分子从N端到C端可以按以下顺序排列:TNF α -结合性单域分子-HAS结合性单域分子-TNF α -结合性单域分子。应理解针对一个或多个靶的单域分子的任何顺序或组合可以如文本所述配制。

[0040] 在一个实施方案中,通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子在本文称作“ATN-103”,其包含或其组成为图2中所示的SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图2中所示的SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、90%、95%或更多相同的氨基酸序列)。能够如本文所述配制的其它三价、双重特异性纳米抗体分子的实例包括TNF24、TNF25、TNF26、TNF27、TNF28、TNF60和TNF62,其公开于WO 2006/122786的表29中。

[0041] 在一些实施方案中,通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子的单域分子中的至少一个与TNF α 结合,其包括具有如下氨基酸序列的一个、两个或三个CDR: DYWMY(CDR1)、EINTNGLITKYPDSVKG(CDR2)和/或SPSGFN(CDR3),或具有与所述CDR之一的区别少于3、2或1个氨基酸取代(例如,保守取代)的CDR。在其他实施方案中,所述单域分子包含具有图2中所示SEQ ID NO:1的约氨基酸1至115的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图2中所示SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、90%、95%或更多相同的氨基酸序列)的可变区。在多个实施方案中,所述TNF α 结合性单域分子具有图2中所示SEQ ID NO:1的TNF α 结合性单域抗体分子的一种或多种生物学活性。例如,所述TNF α 结合性单域分

子结合至与图2中所示SEQ ID NO:1的TNF α 结合性单域分子识别的表位相同或相似的表位(例如,以其三聚体形式结合至TNF α ;结合至接触TNF受体的TNF α 位点;结合至包含第一TNF单体(单体A)上位置88的Gln和位置90的Lys以及第二TNF单体(单体B)上位置146的Glu的TNF α 三聚体中的表位,或如W0 06/122786中公开的表位)。在其他实施方案中,所述TNF α 结合性单域分子具有与W0 06/122786中公开的任何TNF α 结合性单域分子类似的活性(例如,结合亲和力、解离常数、结合特异性、TNF抑制活性)。

[0042] 在其他实施方案中,所述TNF α 结合性纳米抗体分子包含W0 2006/122786中公开的纳米抗体中的一个或多个。例如,所述TNF α 结合性纳米抗体分子可以是W0 2006/122786中公开的单价、二价、三价TNF α 结合性纳米抗体分子。示例性TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于TNF1、TNF2、TNF3、其人源化形式(例如,TNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33)。单价TNF α 结合性纳米抗体的其他实例公开于W0 2006/122786的表8中。示例性二价TNF α 结合性纳米抗体分子包括但不限于TNF55和TNF56,其包含两个通过肽接头连接的TNF30纳米抗体以形成单一融合多肽(公开于W0 2006/122786)。二价TNF α 结合性纳米抗体分子的其他实例作为TNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8公开于W0 2006/122786的表19中。

[0043] 在其他实施方案中,通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子的单域分子中的至少一个与HSA结合,其包括具有如下氨基酸序列的一个、两个或三个CDR:SFGMS(CDR1)、SISGSGSDTLYADSVKG(CDR2)和/或GGSLSR(CDR3),或具有与所述CDR之一的区别少于3、2或1个氨基酸取代(例如,保守取代)的CDR。在其他实施方案中,所述单域分子包含可变区,所述可变区具有图2中所示SEQ ID NO:1的约氨基酸125至239的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列(例如,相对于图2中所示SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少85%、90%、95%或更多相同的氨基酸序列)。在多个实施方案中,所述HSA结合性单域分子具有图2中所示SEQ ID NO:1的HSA结合性单域分子的一种或多种生物学活性。例如,所述HSA结合性单域分子结合至与图2中所示SEQ ID NO:1的HSA结合性单域分子识别的表位相同或相似的表位。在其他实施方案中,所述HSA结合性单域分子具有与W0 06/122786中公开的任何HSA结合性单域分子类似的活性(例如,结合亲和力、解离常数、结合特异性)。

[0044] 在其他实施方案中,所述HSA结合性SDAB分子包含W0 2006/122786中公开的纳米抗体中的一个或多个。例如,所述HSA结合性SDAB分子可以是W0 2006/122786中公开的单价、二价、三价HSA结合性纳米抗体分子。在其他实施方案中,所述HSA结合性SDAB分子可以是具有至少一种与HSA结合的结合特异性的单一特异性或多重特异性分子。示例性HSA结合性纳米抗体包括但不限于ALB1、其人源化形式(例如,ALB6、ALB7、ALB8、ALB9、ALB10),其公开于W0 06/122786。

[0045] 在其他实施方案中,所述SDAB分子的单域分子中的两个或更多个用或不用连接基团(linking group)融合成基因(genetic)或多肽融合物。所述连接基团可以是对于本领域技术人员显而易见的任何连接基团。例如,所述连接基团可以是长度为1至100个原子的生物相容性聚合物。在一个实施方案中,所述连接基团包括或其组成为聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚异亮氨酸或聚精氨酸残基,或其组合。例如,所述聚甘氨酸或聚丝氨酸接头可以包括至少五个、七个、八个、九个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、三十五个和四十个甘氨酸和丝氨酸残基。能够使用的示例性接头包括Gly-Ser重复序列,例如,以一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个重复的(Gly)₄-Ser重复序列(SEQ ID NO:

8)。在多个实施方案中,所述接头(linker)具有以下序列:(Gly)₄-Ser-(Gly)₃-Ser或((Gly)₄-Ser)_n,其中n是4、5或6(SEQ ID NO:10)。

[0046] 通过本发明的方法或工艺分离或纯化的SDAB分子可以进一步通过连接,例如共价或非共价连接第二部分来修饰。例如,所述纳米抗体分子可以共价附接于合适的药理学可接受的聚合物,例如聚乙二醇(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚乙二醇或mPEG)。聚乙二醇化的(pegylated)纳米抗体分子的实例作为TNF55-PEG40、TNF55-PEG60、TNF56-PEG40和TNF56-PEG60公开于WO 06/122786。

[0047] 在一个实施方案中,所述方法或工艺进一步包括离子(例如,阳离子或阴离子)交换色谱、羟基磷灰石色谱、亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱、金属亲和色谱、渗滤、超滤和/或除病毒过滤中的一种或多种。

[0048] 在一个实施方案中,所述方法或工艺进一步包括将所述重组SDAB分子的制剂作为药物组合物制备。所述制剂可以包括单独的SDAB分子或其与第二药剂的组合,例如,第二治疗或药理学活性剂,其可用于治疗TNF α 相关病症,例如,炎性或自身免疫病症,包括但不限于,类风湿性关节炎(RA)(例如,中度至重度类风湿性关节炎),关节炎性病状(例如,银屑病关节炎,多关节幼年特发性关节炎(JIA)、强直性脊柱炎(AS)、银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎性肠病和/或多发性硬化。例如,所述第二药剂可以是抗TNF抗体或其TNF结合性片段,其中所述第二TNF抗体与不同于所述制剂的TNF结合性SDAB分子的表位结合。能够与所述TNF结合性SDAB分子共同配制的药剂的其他非限定性实例包括但不限于,细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂。在一个实施方案中,所述额外的药剂是关节炎的标准治疗法,包括但不限于,非甾体抗炎剂(NSAID);皮质类固醇,包括泼尼松龙(prednisolone),泼尼松(prednisone),可的松(cortisone)和曲安西龙(triamcinolone);和疾病改善性抗风湿药物(DMARD),如甲氨蝶呤(methotrexate),羟氯喹(hydroxychloroquine)(Plaquenil)和柳氮磺吡啶(sulfasalazine),来氟米特(leflunomide)(Arava®),肿瘤坏死因子抑制剂,包括伊纳西普(etanercept)(Enbrel®),英夫利昔单抗(infliximab)(Remicade®)(含或不含甲氨蝶呤),和阿达木单抗(adalimumab)(Humira®),抗CD20抗体(例如,Rituxan®),可溶性白介素1受体,如阿那白滞素(Kineret®),金,米诺环素(minocycline)(Minocin®),青霉胺(penicillamine),和细胞毒性剂,包括硫唑嘌呤(azathioprine),环磷酰胺(cyclophosphamide),和环孢霉素(cyclosporine)。有利地,这些组合治疗可以使用较低剂量的所给药的剂,由此避免与多种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

[0049] 在另一个方面,本发明描述了通过本文所述的方法或工艺制备的SDAB分子。含有通过本文所述的方法或工艺制备的SDAB分子的组合物,例如,药物组合物和制剂也包括在本发明中。例如,所述制剂可以包括在药学上可接受的载体中的本文描述的SDAB分子。

[0050] 在一个实施方案中,通过本文所述的方法或工艺制备的SDAB分子适合于向受试者,例如,人受试者(例如,患有TNF α 相关病症的患者)给药。所述SDAB分子或其制剂可以通过注射(例如,皮下、血管内、肌肉内或腹膜内)或通过吸入向所述受试者给药。

[0051] 在另一个方面,本发明涉及用于治疗或预防受试者(例如,人受试者)中与本文所述的SDAB分子相关的病症(例如,TNF α 相关病症,例如,炎性病症或自身免疫病症,包括但不

限于,类风湿性关节炎(RA)(例如,中度至重度类风湿性关节炎),关节炎性病状(例如,银屑病关节炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA)、强直性脊柱炎(AS)、银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎性肠病和/或多发性硬化)的方法。所述方法包括以使TNF α 相关病症的一种或多种症状减少的量单独或与任何本文所述的任何组合治疗组合向受试者,例如人患者,给药药物组合物,所述药物组合物包括通过本文所述的方法或工艺制备的TNF结合性SDAB。

[0052] 在另一个方面,本发明描述了包括含有通过本文所述的方法或工艺制备的SDAB的装置、注射器或小瓶的试剂盒或制品。

[0053] 本文提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过提述以其整体并入。

[0054] 本发明的一个或多个实施方案的详细内容在下面的附图和说明书中描述。通过这些描述和附图,并且通过权利要求书,本发明的其他特征、目的和优点会是显而易见的。

附图简述

[0056] 图1描绘了预测的ATN-103结构的示意图。

[0057] 图2描绘了ATN-103多肽链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0058] 图3描绘了ATN-103纯化工艺的流程圖。

[0059] 图4A描绘了全长葡萄球菌蛋白A(SpA)的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)。图4B描绘了SpA的修饰的结构域B的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。以粗体指明 α 螺旋区。

发明详述

[0061] 本发明至少部分基于如下发现,即SDAB分子包括与蛋白A或其功能性变体相互作用,例如结合,的一个或多个单一结合域(例如,一个或多个纳米抗体分子),由此使得在所述SDAB分子的纯化中能够使用基于蛋白A的亲色谱模式。因此,本发明涉及使用基于蛋白A的亲色谱纯化或分离包括一个或多个单一结合域(例如,一个或多个纳米抗体分子)、不含互补性抗体域和免疫球蛋白Fc区的抗原结合性融合多肽的工艺和方法。

[0062] 为了使本发明更加易于理解,首先定义某些术语。其他定义在详述的通篇中阐述。

[0063] 如用于本文,冠词“一个”和“一种”指一个/多于一个或指一种/多于一种(例如,指至少一个/一种)该冠词的语法对象。

[0064] 术语“或”用于本文意指术语“和/或”并且与术语“和/或”可以互换使用,除非上下文明确地指出其他情况。

[0065] 术语“蛋白/蛋白质”和“多肽”在本文可以互换使用。

[0066] “约”和“大约”应通常意指鉴于测量的性质或精确度产生的所测量量的可接受程度的误差。示例性误差程度通常为给定数值或数值范围的百分之二十(20%)之内,10%之内,并且更通常为5%之内。

[0067] 术语“SDAB分子预备物(SDAB molecule preparation)”指含有SDAB分子和/或一种或多种不想要的污染物的任何组合物。所述预备物可以是部分分离或纯化的,例如,通过使其通过如本文所述的色谱柱,例如,基于蛋白A的或阳离子交换载体。

[0068] 术语“色谱”指通过将混合物与吸附剂接触将所述混合物中在化学上有区别分子彼此分开,其中一类分子可逆地结合于或吸附于所述吸附剂。被吸附剂最弱地吸附或保留的分子在那些被更强烈地吸附或保留的分子不被释放的条件下从所述吸附剂释放。

[0069] 术语“流过模式(flow-through mode)”指SDAB分子预备物分离技术,其中意图将所述预备物中含有的至少一种SDAB分子流过色谱树脂或载体,而至少一种潜在的污染物或杂质结合于所述色谱树脂或载体。流过模式可以用于例如羟基磷灰石色谱和离子交换色谱。

[0070] “结合模式”指其中使预备物中含有的至少一种抗体分子结合至色谱树脂或载体,而至少一种污染物或杂质流过的SDAB分子预备物分离技术。结合模式可以用于,例如,羟基磷灰石色谱和离子交换色谱。

[0071] “污染物”指除了进行纯化的蛋白质样品中存在的进行纯化的蛋白质之外,任何外来的或想要拒绝的(objectionable)分子,特别是生物大分子如DNA、RNA或蛋白质。污染物包括,例如,其他来自用于重组表达进行纯化的蛋白质的细胞的宿主细胞蛋白,在之前的亲和色谱步骤中可能浸析到样品中的作为亲和色谱步骤中所用吸附剂一部分的蛋白质,如蛋白A,和靶蛋白自身的错误折叠变体。

[0072] “宿主细胞蛋白”包括由天然存在的宿主细胞基因组编码的蛋白质,向所述宿主细胞基因组中引入了编码待纯化的蛋白质的DNA。宿主细胞蛋白可能是待纯化蛋白质的污染物,其水平可以通过纯化降低。宿主细胞蛋白可以通过任何合适的方法来测定,包括凝胶电泳和染色和/或ELISA测定法,等等。宿主细胞蛋白包括,例如,作为重组蛋白表达的产物产生的中国仓鼠卵巢(CHO)蛋白(CHOP)。

[0073] 术语“高分子量聚集体”或“HMWA”指至少两个抗体分子的结合。所述结合可能通过任何方法产生,包括但不限于共价的、非共价的、二硫键或非还原性交联。所述至少两个分子可以与相同或不同的抗原结合。

[0074] 如本文所述,术语“蛋白A”和相关短语,如“基于蛋白A的载体”意图包括蛋白A(例如,重组的或分离的蛋白A),或其功能性变体。在一个实施方案中,蛋白A是全长葡萄球菌蛋白A(SpA),其由以从N端起顺序的已知为E、D、A、B和C结构域的约50-60个氨基酸残基的五个结构域构成(Sjodhal Eur J Biochem 78:471-490(1977); Uhlen et al. J. Biol. Chem. 259:1695-1702(1984))。这些结构域含有大约58个残基,各享有约65%-90%氨基酸序列同一性。蛋白A和抗体之间的结合研究显示,尽管SpA的全部五个结构域(E、D、A、B和C)与IgG通过其Fc区结合,但是结构域D和E展现显著的Fab结合(Ljungberg等Mol. Immunol. 30(14):1279-1285(1993); Roben等J. Immunol. 154:6437-6445(1995); Starovasnik等Protein Sci 8:1423-1431(1999)。Z结构域,一种B结构域的功能类似物和能量最小化版本(Nilsson等Protein Eng 1:107-113(1987))显示对抗体可变域区具有可忽略的结合(Cedergren等Protein Eng 6(4):441-448(1993); Ljungberg等(1993)见上文; Starovasnik等(1999)见上文)。蛋白A可以包括图4A中显示的SpA的氨基酸序列(SEQ ID NO:11),或与其基本上相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,蛋白A是包括选自E、D、A、B和/或C的至少一个结构域或其修饰形式的SpA的功能性变体。例如,SpA的所述功能性变体可以至少包括SpA的结构域B,或结构域B的变体,其具有一个或多个取代的天冬酰胺残基,在本文也称作结构域Z。在一个实施方案中,SpA的所述功能性变体包括图4B中所示的SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与其基本上相同的氨基酸序列。可以使用的蛋白A的功能性变体的其他排列包含结构域B,或变体结构域B,和以下的一种或多种:结构域A和/或C;结构域E、A和/或C;或结构域E、D、A和/或C。可以使用E、D、A、B和/或C或它们的功能性变体的任意组

合,只要所述组合能够与SDAB分子结合。

[0075] “陶瓷羟基磷灰石”或“cHA”指不溶性羟基化磷酸钙,例如,具有式 $[\text{CaO}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 或 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$,其在高温下烧结成球状、大孔的陶瓷形式。术语“cHA”包含,但不限于,I型和II型陶瓷羟基磷灰石。除非特别指明,“cHA”指任何粒径:包括但不限于20、40和80 μm 。

[0076] “纯化”多肽意指减少可能存在于蛋白质样品中外来的或想要拒绝的成分的量,特别是生物大分子如蛋白质或DNA。外来蛋白的存在可以通过任何合适的方法包括凝胶电泳和染色和/或ELISA测定法来测定。DNA的存在可以通过任何合适的方法包括凝胶电泳和染色和/或采用聚合酶链式反应的测定法来测定。在多个实施方案中,将所述多肽,例如,SDAB分子纯化至至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高纯度。

[0077] 当对包含蛋白质和其他污染物的混合物进行某个工艺时使目标多肽在所得产物中的浓度高于起始产物,从而将多肽从所述混合物“分离”(或“移除”)。

[0078] 本发明的方法和组合物包括具有指定序列或与其基本上相同或相似的序列(例如,与指定序列至少85%、90%、95%相同或更高的序列)的多肽。在氨基酸序列的语境下,术语“基本上相同”用于本文是指第一氨基酸含有足够或最低数量的与第二氨基酸序列中对齐的氨基酸残基i)相同的,或ii)为保守取代的氨基酸残基,从而使所述第一和第二氨基酸序列能够具有共有结构域和/或共有功能活性。例如,含有共有结构域的氨基酸序列与参照序列具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0079] 本发明的多肽还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体,和它们的任何组合。术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”在涉及本发明的蛋白质时包括任何至少保留了相应的天然抗体或多肽的某些功能性质的多肽。本发明的多肽片段除了在本文他处讨论的特定抗体片段之外,还包括蛋白水解片段,以及缺失片段。本发明的多肽的变体包括如上所述的片段,还包括因氨基酸取代、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或者可以是非天然存在的。非天然产生的变体可以使用领域内已知的诱变技术产生。变体多肽可以包含保守或非保守的氨基酸取代、缺失或添加。本发明的片段的衍生物是经过改变因而展现额外的不存在于天然多肽上的特性的多肽。实例包括融合蛋白。变体多肽在本文也可称作“多肽类似物”。如用于本文,多肽的“衍生物”是指具有一个或多个通过功能性侧基反应而化学衍生的残基的题述多肽。“衍生物”还包括那些含有一个或多个的二十个基本氨基酸天然存在的氨基酸衍生物的多肽。例如,4-羟脯氨酸可以取代脯氨酸;5-羟赖氨酸可以取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可以取代组氨酸;高丝氨酸可以取代丝氨酸;以及鸟氨酸可以取代赖氨酸。

[0080] 术语“功能性变体”是指具有与天然存在的序列基本上相同的氨基酸序列,或由基本上相同的核苷酸序列编码并且能够具有天然存在的序列的一种或多种活性的多肽。

[0081] 序列之间的同源性或序列同一性(在本文这两个术语可互换使用)的计算如下进行。

[0082] 为了测定两个氨基酸序列的百分比同一性,出于最佳比较的目的比对序列(例如,为了最佳比对可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或二者中引入缺口,且非同源性序列可以为了比较目的而不加以考虑)。在优选的实施方案中,为比较目的比对的参照序列的长度是参照序列长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%、60%,并且甚至更优选

至少70%、80%、90%、100%。然后比较在相应氨基酸位置的氨基酸残基。当第一序列中的某个位置由与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基占据时,那么所述分子在该位置是相同的(如用于本文,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。

[0083] 两个序列之间的百分比同一性是在考虑了为了所述两个序列的最佳比对而需要引入的缺口的数目和每个缺口的长度的条件下,这些序列所共享的相同位置数的函数。

[0084] 序列的比较和两个序列之间百分比同一性的测定可以使用数学算法完成。在优选的实施方案中,两个氨基酸序列之间的百分比同一性使用Needleman和Wunsch((1970) J.Mol.Biol.48:444-453)算法测定,该算法已经纳入GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)的GAP程序中,其使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,和16、14、12、10、8、6或4的缺口加权和1、2、3、4、5或6的长度加权。在又一个优选的实施方案中,两个核苷酸序列之间的百分比同一性使用GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序测定,其使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的缺口加权和1、2、3、4、5或6的长度加权。特别优选的参数设定(也是未另外指明时应该使用的参数设定)是Blossum 62得分矩阵,且缺口罚分(gap penalty)为12,缺口延伸罚分为4,而移码缺口罚分为5。

[0085] 两个氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性可以使用E.Meyers和W.Miller((1989)CABIOS,4:11-17)的算法测定,该算法已经纳入ALIGN程序(2.0版),其使用PAM120重残表,缺口长度罚分为12且缺口罚分为4。

[0086] 本文描述的核酸和蛋白质序列可以用作“查询序列”针对公共数据库进行检索,例如,以鉴定其他家族成员或相关序列。这类检索可以使用Altschul,等(1990) J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)来进行。BLAST核苷酸检索可以用NBLAST程序,得分=100,字长=12来进行以获得与本发明的核酸(SEQ ID NO:1)分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序,得分=50,字长=3来进行以获得与本发明的蛋白质(SEQ ID NO:1)蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的含缺口的比对,可以利用如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述的缺口BLAST(Gapped BLAST)。当利用BLAST和缺口BLAST程序时,可以使用各程序的缺省参数(例如,XBLAST和NBLAST)。

[0087] “保守氨基酸取代”是其中将氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替代的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族是本领域中已经定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸),具有非荷电极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸),具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0088] 下文进一步详细描述本发明的多个方面。

[0089] 单域抗原结合性(SDAB)分子

[0090] 在某些实施方案中,通过本发明的方法纯化的SDAB分子是由一个或多个纳米抗体分子构成的单链融合多肽。例如,所述SDAB分子可以是包含一个或多个纳米抗体分子的单链融合多肽,其与借由接头,例如肽接头,连接的一个或多个靶抗原结合。

[0091] 如用于本文,“融合多肽”指含有两个或更多个可操作地关联(例如连接)的部分

(例如,蛋白质部分)的蛋白质。通常,所述部分是共价连接的。所述部分可以直接连接,或借由间隔物或接头连接(例如,如本文所述的连接基团)。融合多肽可以通过标准重组DNA技术产生。例如,将编码不同多肽序列的DNA片段根据常规技术符合读框地连接在一起,所述技术例如,通过采用平末端或错开的末端(stagger-ended termini)以供连接,限制酶消化以提供合适的末端,视需要填补粘末端,碱性磷酸酶处理以避免不想要的结合,和酶法连接。在另一实施方案中,融合基因可以通过常规技术(包括自动DNA合成仪)合成。或者,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端(overhangs),其能够继而退火并重新扩增产生嵌合基因序列(参见,例如,Ausubel等(eds.)Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,1992)。此外,许多商业上可以获得的表达载体编码融合部分。在一些实施方案中,融合多肽作为寡聚体存在,如单一连续多肽或两个或更多个不连续的多肽的二聚体或三聚体。在其他实施方案中,可以向融合蛋白的N或C末端添加额外的氨基酸序列以促进表达、空间柔性、检测和/或分离或纯化。

[0092] 单域抗原结合性(SDAB)分子包括其互补决定区是单域多肽一部分的分子。实例包括但不限于,重链可变域,天然不含轻链的结合性分子,源自常规4链抗体的单域,经工程改造的不同于源自抗体的那些的结构域和单域支架。SDAB分子可以是领域内的任何SDAB分子,或任何未来的单域分子。SDAB分子可以源自任何物种,包括但不限于,小鼠、人、骆驼、美洲驼、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。此术语还包括来自骆驼科(Camelidae)和鲨鱼之外的物种的天然存在的单域抗体分子。

[0093] 在本发明的一个方面,SDAB分子可以衍生自在鱼中发现的免疫球蛋白的可变区,比如,例如,其衍生自鲨鱼血清中发现的称作新抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型。产生衍生自NAR(“IgNARs”)可变区的单域分子的方法在WO 03/014161和Streltsov(2005)Protein Sci.14:2901-2909中描述。

[0094] 根据本发明的另一方面,SDAB分子是称为无轻链的重链的天然存在的单域抗原结合性分子。这类单域分子公开于例如WO 9404678和Hamers-Casterman,C.等(1993)Nature 363:446-448。为了清楚,将这种衍生自天然不含轻链的重链分子的可变域在本文称作VHH或纳米抗体以将其与四链免疫球蛋白的常规VH相区别。这种VHH分子可以源自骆驼科物种,例如骆驼、美洲驼、单峰驼、羊驼和原驼。除骆驼科之外的其他物种可以产生天然不含轻链的重链分子;这些VHH在本发明的范围内。

[0095] 在某些实施方案中,所述SDAB分子包含至少一个免疫球蛋白可变域(包括一个、两个和/或三个互补决定区(CDR)),缺少互补性抗体可变链(例如,缺少相应的轻链可变区(VL)的重链可变区(VH)),和/或免疫球蛋白恒定区,例如,Fc区(或能够结合蛋白A的恒定区或其部分)。

[0096] 在某些实施方案中,SDAB分子不包括具有重和轻抗体可变域或链的抗体分子(例如,全长抗体),或其具有重和轻抗体片段的抗原结合性片段(例如,在单一肽链中具有轻链和重链可变区的Fab、F(ab')₂片段、scFv,或由抗体单臂的VL和VH域组成的Fv片段)。

[0097] 所述SDAB分子可以是重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的和/或体外生成的(例如,通过噬菌体展示选择的),如在下文更详细描述。

[0098] 术语“抗原结合性”旨在包括多肽的部分,例如,本文所述的单域分子,其包含形成

与靶抗原或其表位结合的界面的决定子。就蛋白质(或蛋白质模拟物)而言,抗原结合部位通常包括一个或多个(至少四个氨基酸或氨基酸模拟物的)环,其形成与靶抗原结合的界面。通常,多肽的抗原结合部位,例如,单域抗体分子,包括至少一个或两个CDR,或更通常包括至少三个、四个、五个或六个CDR。

[0099] VH和VL区可以细分成超变异性的区,其称作“互补决定区”(CDR),穿插以更保守的称为“框架区”(FR)的区。框架区和CDR的范围已经通过多种方法精确定义(参见,Kabat, E.A.,等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242; Chothia, C.等(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; 和Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用的AbM定义。一般性地参见例如, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)。通常,除非特别指明,使用以下定义:重链可变域的CDR1的AbM定义,和对其他CDR的Kabat定义。另外,参考Kabat或AbM CDR描述的本发明的多个实施方案也可以使用Chothia超变环来实现。每个VH和VL通常包括三个CDR和四个FR,从氨基端到羧基端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0100] 术语“免疫球蛋白可变域”在本领域经常被理解为与人或动物来源的VL或VH域相同或基本上相同。应该认识到免疫球蛋白可变域可能在某些物种(例如,鲨鱼和美洲驼)中经过演化而在氨基酸序列上有别于人或哺乳动物的VL或VH。然而,这些结构域主要涉及抗原结合。术语“免疫球蛋白可变域”通常包括至少一个或两个CDR,或更通常包括至少三个CDR。

[0101] “免疫球蛋白恒定域”或“恒定区”意图包括与人或动物来源的CL、CH1、CH2、CH3或CH4结构域相同或基本上类似的免疫球蛋白结构域。参见例如Charles A Hasemann and J. Donald Capra, *Immunoglobulins: Structure and Function*, in William E. Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Second Edition, 209, 210-218 (1989)。术语“Fc区”是指包括免疫球蛋白结构域CH2和CH3或与这些基本上相似的免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白恒定域的Fc部分。

[0102] 在某些实施方案中,所述SDAB分子是单价或多重特异性分子(例如,二价、三价或四价分子)。在其他实施方案中,所述SDAB分子是单一特异性、双重特异性、三重特异性或四重特异性分子。分子是否为“单一特异性”或“多重特异性”,例如“双重特异性”,是指结合性多肽与之反应的不同表位的数目。多重特异性分子可以对本文描述的目标多肽的不同表位为特异性的,或者可以对目标多肽以及对异源表位(如异源多肽或固体支持材料)是特异性的。

[0103] 如用于本文,术语“价”指SDAB分子中存在的潜在结合域,例如,抗原结合域的数目。每个结合域特异性结合一个表位。当SDAB分子包含多于一个结合域时,每个结合域可以特异性结合相同表位,对于具有两个结合域的抗体,称为“二价单一特异的”,或可特异性结合不同表位,对于具有两个结合域的SDAB分子,称为“二价双重特异的”。SDAB分子也可以是双重特异并且对于每种特异性是二价的(称为“双重特异性四价分子”)。双重特异性二价分子,和制备它们的方法描述于例如美国专利5,731,168; 5,807,706; 5,821,333号和美国专利申请公开号2003/020734和2002/0155537中,将它们的全部内容通过提述并入本文。双重

特异性四价分子,和制备它们的方法描述于例如WO 02/096948和WO 00/44788中,将这两篇的内容通过提述并入本文。一般性地参见PCT公开WO 93/17715;WO 92/08802;WO 91/00360;WO 92/05793;Tutt等,J.Immunol.147:60-69(1991);美国专利4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819号;Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。

[0104] 在某些实施方案中,SDAB分子是包含一个或多个单域分子(例如,纳米抗体)的单链融合多肽,其不含与一个或多个靶抗原结合的互补可变域或免疫球蛋白恒定区(例如,Fc区)。由所述抗原结合性多肽识别的示例性靶抗原包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)。在某些实施方案中,所述抗原结合性单域分子与血清蛋白结合,所述血清蛋白例如,选自血清白蛋白(人血清白蛋白(HSA))或转铁蛋白中的一种或多种的人血清蛋白。

[0105] TNF α

[0106] 本领域已知肿瘤坏死因子 α 与炎症病症如类风湿性关节炎、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和多发性硬化有关。TNF α 和受体(CD120a和CD120b)均得到了大量详细的研究。处于其生物活性形式的TNF α 是三聚体。已经开发了几种使用抗TNF α 抗体拮抗TNF α 作用的策略且目前在商业上是可以获得的,如Remicade®和Humira®。针对TNF α 的抗体分子是已知的。TNF α 结合性单域抗原结合性分子(例如,纳米抗体)的多个实例公开于WO 2004/041862,WO 2004/041865,WO 2006/122786,将它们的全部内容以其整体通过提述并入本文。单域抗原结合性分子的其他实例公开于US2006/286066,US 2008/0260757,WO 06/003388,US 05/0271663,US 06/0106203,将它们的全部内容以其整体通过提述并入本文。在其他实施方案中,针对TNF α 和血清蛋白(例如HSA)的单一、双重、三重和其他多重特异性单域抗体公开于这些参考文献中。

[0107] 在具体的实施方案中,所述TNF α 结合性纳米抗体分子包括WO 2006/122786中公开的纳米抗体中的一种或多种。例如,所述TNF α 结合性纳米抗体分子可以是WO 2006/122786中公开的单价、二价、三价TNF α 结合性纳米抗体分子。示例性TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于TNF1、TNF2、TNF3、其人源化形式(例如,TNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33)。单价TNF α 结合性纳米抗体的其他实例公开于WO 2006/122786的表8。示例性二价TNF α 结合性纳米抗体分子包括但不限于TNF55和TNF56,其包含两个通过肽接头连接的TNF30纳米抗体以形成单一融合多肽(公开于WO 2006/122786)。二价TNF α 结合性纳米抗体分子的其他实例作为TNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8公开于WO 2006/122786的表19。

[0108] 在其他实施方案中,所述HSA结合性纳米抗体分子包括WO 2006/122786中公开的纳米抗体中的一种或多种。例如,所述HSA结合性纳米抗体分子可以是WO 2006/122786中公开的单价、二价、三价HSA结合性纳米抗体分子。在其他实施方案中,所述HSA结合性纳米抗体分子可以是具有至少一种与HSA结合的结合特异性的单一特异性或多重特异性分子。示例性TNF α 结合性纳米抗体包括但不限于WO 06/122786中公开的ALB1、其人源化形式(例如,ALB6、ALB7、ALB8、ALB9、ALB10)。

[0109] 在其他实施方案中,将纳米抗体分子的单域分子中的两个或更多个用或不用连接基团融合,作为遗传物或多肽融合物。所述连接基团可以是任何对于本领域技术人员显而易见的连接基团。例如,所述连接基团可以是长度为1至100个原子的生物相容性聚合物。在一个实施方案中,所述连接基团包括或其组成为聚甘氨酸、聚丝氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚异亮氨酸或聚精氨酸残基,或其组合。例如,所述聚甘氨酸或聚丝氨酸接头可以包括至少

五个、七个、八个、九个、十个、十二个、十五个、二十个、三十个、三十五个和四十个甘氨酸和丝氨酸残基。能够使用的示例性接头包括Gly-Ser重复序列,例如,以一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个重复的 $(\text{Gly})_4\text{-Ser}$ 重复序列(SEQ ID NO:8)。在多个实施方案中,所述接头具有以下序列: $(\text{Gly})_4\text{-Ser-(Gly)}_3\text{-Ser}$ (SEQ ID NO:9)或 $((\text{Gly})_4\text{-Ser})_n$,其中n是4、5或6(SEQ ID NO:10)。

[0110] 在一个示例性实施方案中,在本文中称作“ATN-103”的由两个与靶抗原(例如,肿瘤坏死因子 α (TNF α))结合的单域抗体分子(例如,两个骆驼科动物可变区)和一个与血清蛋白(例如,HSA)结合的单域抗体分子(例如,一个骆驼科动物可变区)的单链多肽融合物构成的抗原结合性多肽已经显示与蛋白A或其功能性变体结合。ATN-103是人源化的、三价、双重特异性、TNF α 抑制性融合蛋白。这种蛋白质的抗原是肿瘤坏死因子 α (TNF)。图1提供了ATN-103的预测结构的示意图。这种融合蛋白源自骆驼科动物并且与人免疫球蛋白VH域具有高度序列和结构同源性。其单一多肽链由两个对TNF α 的结合域和一个对人血清白蛋白(HSA)的结合域构成,带有连接所述结构域的两个九氨基酸G-S接头。ATN-103的详述提供在WO 06/122786中。

[0111] 从相应表达载体的DNA序列预测的ATN-103多肽链的完整氨基酸序列示于图2中(SEQ ID NO:1)(残基编号以NH₂端起始作为1号残基)。由所述DNA序列编码的最后一个氨基酸残基为S³⁶³并且构成所述蛋白质的COOH端。二硫键键合的ATN-103(没有翻译后修饰)的预测分子量为38434.7Da。ATN-103不含N联糖基化共有序列。通过纳升电喷雾四极杆飞行时间串联质谱(nanoelectrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry)观察到的主要亚型的分子量相当于38433.9Da,确认了不存在翻译后修饰。

[0112] 在图2中,互补决定区(CDR)标有下划线(SEQ ID NOs:2-7)。预测的分子内二硫键由参与的半胱氨酸残基的连接来说明。TNF的结合域以粗体显示且与HSA的结合域以粗斜体显示。连接这些结合域的氨基酸接头为斜体。还显示了所述多肽链的信号肽(¹⁹MGW...VHS⁻¹)。

[0113] SDAB分子的制备

[0114] 所述SDAB分子可以包含一个或多个重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的和/或体外生成的(例如,通过噬菌体展示选择的)单域分子(例如,纳米抗体分子)。用于生成抗体和SDAB分子以及重组修饰它们的技术是本领域已知的并且在下文详细描述。

[0115] 本领域技术人员已知的多种方法可用于获得抗体。例如,单克隆抗体可以通过按照已知方法生成杂交瘤来产生。然后使用标准方法,如酶联免疫吸附测定(ELISA)和表面等离子共振(BIACORE™)分析来筛选以这种方式形成的杂交瘤,以鉴定一种或多种产生与指定抗原特异性结合的纳米抗体的杂交瘤。可以使用指定抗原的任何形式用作免疫原,例如,重组抗原,天然存在的形式,它们的任何变体或片段,以及它们的抗原性肽。

[0116] 制备抗体和SDAB分子的一个示例性方法包括筛选蛋白表达文库,例如,噬菌体或核糖体展示文库。噬菌体展示记载在例如Ladner等,美国专利5,223,409号;Smith(1985) Science 228:1315-1317;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690;和WO 90/02809中。

[0117] 除了使用展示文库,还可以使用指定抗原来免疫非人动物,例如,啮齿动物,例如,

小鼠、仓鼠或大鼠。在一个实施方案中,所述非人动物包括人的至少部分免疫球蛋白基因。例如,可以用人Ig基因座的大片段工程化改造在小鼠抗体产生上有缺陷的小鼠株。使用杂交瘤技术,可以产生和选择衍生自具有期望特异性的基因的抗原特异性单克隆抗体。参见,例如,XENOMOUSETM,Green等(1994) *Nature Genetics* 7:13-21,US2003-0070185,WO 96/34096,于1996年10月31日公开,和PCT申请号PCT/US96/05928,于1996年4月29日提交。

[0118] 在另一实施方案中,从非人动物获得SDAB分子,然后修饰,例如,人源化、去免疫化、嵌合,可以使用本领域已知的重组DNA技术来产生。已经描述过多种用于制备嵌合抗体和SDAB分子的方法。参见,例如,Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851,1985; Takeda等, *Nature* 314:452,1985, Cabilly等,美国专利4,816,567号;Boss等,美国专利4,816,397号;Tanaguchi等,欧洲专利公开EP171496;欧洲专利公开0173494,英国专利GB 2177096B。也可以使用。例如,表达人重链和轻链基因,但无法表达内源小鼠免疫球蛋白重链和轻链基因的转基因小鼠来产生人源化抗体和SDAB分子。Winter描述了一种示例性CDR移植方法,其可以用于制备本文描述的人源化抗体和SDAB分子(美国专利5,225,539号)。特定人抗体的所有CDR可以用非人CDR的至少一部分替代,或者仅仅所述CDR中的一些可以用非人CDR替代。只有必要替代人源化抗体和SDAB分子结合到预定抗原所需的CDR数。

[0119] 人源化抗体可以通过将不直接参与抗原结合的Fv可变域的序列用来自人Fv可变域的等效序列替代来生成。用于生成人源化抗体或其片段的示例性方法由Morrison(1985) *Science* 229:1202-1207;由Oi等(1986) *BioTechniques* 4:214;以及由US 5,585,089;US 5,693,761;US 5,693,762;US 5,859,205;和US 6,407,213提供。这些方法包括分离、操作和表达编码来自至少重链或轻链之一的全部或部分的免疫球蛋白Fv可变域的核酸序列。这些核酸可以从针对预定的靶产生纳米抗体的杂交瘤获得,如上所述,以及从其他来源获得。然后将编码人源化SDAB分子,例如,纳米抗体分子的重组DNA克隆至合适的表达载体中。

[0120] 在某些实施方案中,将人源化SDAB分子,例如,纳米抗体分子通过引入保守取代、共有序列取代、种系取代和/或回复突变来优化。这些改变的免疫球蛋白分子可以通过本领域已知的数种方法中的任一制备(例如,Teng等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:7308-7312,1983;Kozbor等, *Immunology Today*, 4:7279,1983;Olsson等, *Meth. Enzymol.*, 92:3-16,1982),并且可以根据PCT公开W092/06193或EP 0239400的教导制备。

[0121] 用于人源化SDAB分子,例如,纳米抗体分子的技术公开在WO 06/122786中。

[0122] SDAB分子,例如,纳米抗体分子,也可以通过特异性缺失人T细胞表位或通过公开在WO 98/52976和WO 00/34317中的方法“去免疫化”来修饰。简言之,可以分析重链和轻链可变域(例如,纳米抗体的)的结合II类MHC的肽;这些肽代表潜在的T细胞表位(如WO 98/52976和WO 00/34317中定义的)。对于潜在T细胞表位的检测,可以采用称为“肽穿针引线(peptide threading)”的计算机建模方法,此外可以对人II类MHC结合性肽的数据库检索存在于V_H和V_L序列中的基序,如WO 98/52976和WO 00/34317中所述。这些基序结合至18种主要II类MHC DR同种异型,并由此构成潜在T细胞表位。检测出的潜在T细胞表位可以通过取代可变域中的少量氨基酸残基,或优选通过单氨基酸取代来去除。通常,进行保守取代。通常,但不排除其他情况,可以使用对于人种系抗体序列中的位置而言常见的氨基酸。人种系序列,例如,公开在Tomlinson等(1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798;Cook, G.P.等(1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5):237-242;Chothia, D.等(1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817;和

Tomlinson等(1995)EMBO J.14:4628-4638中.V BASE名录提供了人免疫球蛋白可变区序列的综合名录(由Tomlinson,I.A.等MRC Centre for Protein Engineering,Cambridge,UK编纂)。这些序列可以用作人序列的来源,例如,对于框架区和CDR。也可以使用人的共有框架区,例如,如U.S.6,300,064中所述。

[0123] SDAB分子,例如,纳米抗体分子,可以由经过遗传工程化改造而产生所述蛋白质的活宿主细胞产生。遗传工程改造细胞以产生蛋白质的方法是本领域公知的。参见例如Ausabel等,eds.(1990),Current Protocols in Molecular Biology(Wiley,New York)。这些方法包括将编码所述蛋白质并允许所述蛋白质表达的核酸引入活宿主细胞。这些宿主细胞可以是在培养中生长的细菌细胞、真菌细胞或优选是动物细胞。细菌宿主细胞包括但不限于大肠杆菌细胞。合适的大肠杆菌菌株的实例包括:HB101、DH5a、GM2929、JM109、KW251、NM538、NM539,和任何无法切割外源DNA的大肠杆菌菌株。能使用的真菌宿主细胞包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和曲霉属(*Aspergillus*)细胞。能使用的几个动物细胞系的实例是CHO、VERO、BHK、HeLa、Cos、MDCK、293、3T3和WI38。可以使用本领域技术人员公知的方法建立新的动物细胞系(例如,通过转化、病毒感染和/或选择)。任选地,所述蛋白质可以由所述宿主细胞分泌至培养基中。

[0124] 修饰的SDAB分子

[0125] 使用本发明的方法纯化的SDAB分子,例如,纳米抗体分子,可以具有与天然存在的结构域,例如,VH域的氨基酸序列在一个框架区内的至少一个氨基酸位置处不同的氨基酸序列。

[0126] 应该理解本发明的一些SDAB分子(例如人源化SDAB分子)的氨基酸序列可以与天然存在的结构域,例如,天然存在的VH1-I域的氨基酸序列在至少一个框架区中的至少一个氨基酸位置处不同。

[0127] 本发明还包括纯化所述SDAB分子的衍生物的方法。这些衍生物通常可以通过修饰,并且具体而言通过化学和/或生物(例如酶的)修饰SDAB分子和/或形成本文公开的SDAB分子的一个或多个氨基酸残基来获得。

[0128] 这些修饰的实例,以及能够以这样的方式修饰的SDAB分子序列内的氨基酸残基的实例(即,或者在蛋白质骨架上,但优选在侧链上),能够用于引入这样的修饰的方法和技术,以及这些修饰的潜在用途和优势是技术人员所清楚的。

[0129] 例如,这样的修饰可以涉及向所述SDAB分子中或所述SDAB上引入(例如通过共价连接或以其他合适的方式)一个或多个官能团、残基或部分(moiety),并且具体而言一个或多个赋予所述SDAB分子一种或多种期望的性质或功能的官能团、残基或部分。这些官能团的实例会是技术人员所清楚的。

[0130] 例如,这种修饰可以包含引入(例如通过共价结合或以任何其他合适的方式)一个或多个官能团,所述官能团增加所述SDAB分子的半衰期、溶解度和/或吸收,降低所述SDAB分子的免疫原性和/或毒性,去除或削弱所述SDAB分子的任何不合期望的副作用,和/或赋予所述SDAB分子其他有利的性质和/或减少不合期望的性质;或前述的两项或更多项的任意组合。这些官能团和用于引入他们的技术的实例会是技术人员所清楚的,并且通常可以包含所有本文在上引用的一般背景技术中提及的全部官能团和技术,以及本身已知的用于

修饰药物蛋白,并且特别是用于修饰抗体或抗体片段(包括ScFv's和148单域抗体)的官能团和技术,对此参考例如Remington's Pharmaceutical Sciences,16th ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1980)。这种官能团可以例如直接连接至(例如,共价地)本发明的纳米抗体,或任选地通过合适的接头或间隔物(spacer)连接,其对于技术人员也会是显而易见的。

[0131] 一种广泛使用的增加药物蛋白的半衰期和/或降低免疫原性的技术包括附接合适的药理学可接受的聚合物,如聚乙二醇(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚乙二醇或mPEG)。通常,可以使用任何合适形式的聚乙二醇化,例如本领域用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)域抗体和ScFv's)的聚乙二醇化;参考例如Chapman,Nat.Biotechnol.,54,531-545(2002);Veronese和Harris,Adv.Drug Deliv.Rev.54,453-456(2003),Harris和Chess,Nat.Rev.Drug.Discov.,2,(2003)和WO 04/060965。多种用于蛋白质的聚乙二醇化的试剂在商业上也是可以获得的,例如,从Nektar Therapeutics,USA获得。

[0132] 优选地,使用定点聚乙二醇化,特别是通过半胱氨酸残基(参见例如Yang等,Protein Engineering,16,10,761-770(2003))。例如,为了这个目的,PEG可以附接于天然存在于SDAB分子中的半胱氨酸残基,SDAB分子可以经修饰从而合适地引入一个或多个用于附接PEG的半胱氨酸残基,或者可以将包含一个或多个用于附接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列融合至本发明的纳米抗体的N端和/或C端,其全部使用技术人员本身已知的蛋白质工程技术。

[0133] 优选地,对于SDAB分子,使用的PEG具有大于5000的分子量,例如大于10000且小于200000,例如小于100000;例如在20000-80000的范围内。

[0134] 关于聚乙二醇化,应该注意通常情况下,本发明还涵盖任何在一个或多个氨基酸位置经聚乙二醇化的SDAB分子,优选以这样一种方式,即所述聚乙二醇化(1)增加体内半衰期;(2)降低免疫原性;(3)提供对于聚乙二醇化本身已知的一种或多种其他有益性质;(4)基本上不影响所述SDAB分子的亲和力(例如,如通过合适的测定法,如那些在下文实施例中描述的测定法测定,不使所述亲和力降低超过90%,优选不超过50%,和不超过10%);和/或(4)不影响所述SDAB分子的任何其他期望的性质。合适的PEG基团和用于特异性或非特异性附接它们的方法对于技术人员会是显而易见的。

[0135] 用于这种聚乙二醇化的合适试剂盒和试剂可以从例如Nektar(CA,USA)获得。

[0136] 另一种通常较不优选的修饰包括N联或O联糖基化,其通常作为与翻译同步(co-translational)和/或翻译后修饰的一部分,依赖于用于表达所述SDAB分子的宿主细胞。

[0137] 色谱工艺

[0138] 纯化蛋白质的工艺经常需要多个步骤,每个步骤导致产率的进一步降低。基于蛋白A的色谱是多种通常使用的技术之一。通过基于蛋白A的色谱进行的蛋白质纯化可以在含有固定化的蛋白A配体的柱中进行(通常为填充有甲基丙烯酸酯共聚物或琼脂糖珠的改性载体的柱,所述改性载体上附有由蛋白A或其功能性衍生物组成的吸附剂)。该柱通常用高盐浓度的缓冲液平衡,并且将在相容的非变性高盐溶液中含有蛋白质混合物(靶蛋白,加上污染性蛋白质)的样品加载至该柱上。随着所述混合物通过该柱,靶蛋白结合至柱内的吸附剂,同时未结合的污染物流过。然后用降低的盐浓度将结合的蛋白质从柱洗脱。通常,可以通过用以逐渐或逐步降低的梯度应用的盐浓度洗脱柱来回收靶蛋白,从而在有利于多种结

合的蛋白释放的特定盐浓度选择性释放所述蛋白,并收集适当的(discreet)级分直到获得含有更加纯化的蛋白质的级分。通过在整个适当的时间段内收集流过级分,可分离含有特定蛋白质的级分。在靶蛋白结合至柱(同时允许污染物流过)的工艺中,通常使用对蛋白A具有更大亲和力的吸附剂来结合范围更大的蛋白质,这些蛋白质会收集在有利于所述蛋白质释放的特定级分中。

[0139] 本发明的工艺可以与其他蛋白质纯化方法组合使用,如盐析、亲和色谱、羟基磷灰石色谱、反向液相色谱、离子交换色谱或任何其他常用的蛋白质纯化技术。然而,预期本发明的工艺会消除或显著减少对其他纯化步骤的需要。

[0140] 本发明的任何或所有色谱步骤可以通过任何机械手段进行。例如,色谱可以在柱中进行。柱可以加压或不加压和从顶部至底部或从底部至顶部运行。柱中流体流动的方向在色谱工艺中可以反转。色谱也可以使用分批工艺进行,其中将固体介质与用于装载、清洗和洗脱样品的液体通过任何合适的手段分开,所述手段包括重力、离心或过滤。色谱也可以通过将样品与吸附或保留样品中一些分子比其他分子更强烈的滤器接触来进行。在以下描述中,本发明的多种实施方案在色谱柱中进行的色谱的背景下描述。然而,要理解柱的使用只是可以使用的多种色谱方法之一,而使用柱的本发明的示例不将本发明的应用限制为柱色谱,因为本领域技术人员可以容易地将所述教导同样应用到其他方法,如使用分批工艺或滤器的那些方法。

[0141] 合适的载体可以是任何目前可以获得的或稍后开发出的具有实施要求保护的方法所必须的特征的材料,并且可以基于任何合成的、有机的或天然的聚合物。例如,常用的载体物质包括有机材料如纤维素、聚苯乙烯、琼脂糖(agarose)、琼脂糖凝胶(sepharose)、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、葡聚糖和淀粉,以及无机材料,如炭(charcoal)、二氧化硅(玻璃珠或砂)和陶瓷材料。合适的固体载体公开在例如Zaborsky“Immobilized Enzymes”CRC Press,1973,Table IV的28-46页中。

[0142] 在平衡和色谱之前,可以将色谱介质(载体和附于载体的吸附剂)在选择溶液,例如盐和/或缓冲溶液中预平衡。预平衡充当替代用于再生和/或储存色谱介质的溶液的功能。本领域技术人员会认识到预平衡溶液的成分依赖于储存溶液和用于后续色谱的溶液的成分。因此,合适的预平衡溶液可以包括与用于进行色谱相同的缓冲液或盐,任选地,以高于用于进行色谱的浓度包括。能够用于色谱的缓冲液和盐在下文讨论。例如,当用于进行色谱的溶液以给定浓度包含磷酸钠时,预平衡可以在包含更高浓度磷酸钠的溶液中进行。作为对此的示例,如果用于进行色谱的溶液包含介于约0.5毫摩尔和约50毫摩尔之间的磷酸钠,那么预平衡可以在包含浓度介于约0.2摩尔和约0.5摩尔的磷酸钠的溶液中进行,更优选磷酸钠浓度介于约0.3摩尔和约0.4摩尔之间,包括端值。

[0143] 在将样品加样至柱之前,可以将该柱在将要用于色谱蛋白质的缓冲液或盐中平衡。如下文所讨论的,色谱(和装载要纯化的蛋白质)可以在多种包括钠盐、钾盐、铵盐、镁盐、钙盐、氯化物、氟化物、乙酸盐、磷酸盐和/或柠檬酸盐和/或Tris缓冲液的多种缓冲液中进行。柠檬酸盐缓冲液和盐是本领域技术人员出于处理的方便而优选的。这些缓冲液或盐可以具有至少约5.5的pH。在一些实施方案中,平衡可以在包含Tris或磷酸钠缓冲液的溶液中进行。任选地,所述磷酸钠缓冲液的浓度介于约0.5毫摩尔和约50毫摩尔之间,更优选浓度介于约15毫摩尔和35毫摩尔之间。优选地,平衡在至少约5.5的pH下进行。平衡可以在介

于约6.0和约8.6之间的pH下进行,优选在介于约6.5和7.5之间的pH下。更优选地,所述溶液包含浓度为约25毫摩尔且pH为约6.8的磷酸钠缓冲液。

[0144] 合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、乙酸盐缓冲液和/或柠檬酸盐缓冲液。可以接受的盐可以包括但不限于氯化钠、氯化铵、氯化钾、乙酸钠、乙酸铵、硫酸钠、硫酸铵、硫氰酸铵、柠檬酸钠、磷酸钠、和它们的钾盐、镁盐和钙盐,以及这些盐的组合。在其他实施方案中,所述盐包括柠檬酸钠和氯化钠。可以接受的用于色谱系统的盐浓度范围通常在从0至约2M柠檬酸钠,0至约4M氯化钠,0至约3M硫酸铵,0至约1M硫酸钠和0至约2M磷酸钠的范围。盐浓度的范围可以包括0至约1M柠檬酸钠,0至约2M氯化钠,0至约1.5M硫酸铵,0至约1M硫酸钠和0至约1.5M磷酸钠。也可以使用其他缓冲液和盐。在装载之后,可以用更多的相同溶液清洗所述吸附剂以造成靶蛋白(未结合至所述吸附剂的)流过所述吸附剂。然后将所述的蛋白质收集在所述流过级分中。用于结合污染物,同时靶蛋白不结合的条件可以由本领域技术人员简单地优化。本文讨论的盐浓度是示例性的,而其他盐和盐浓度可以通过改变流速、温度和洗脱时间如本领域已知的来使用。

[0145] 使用柱的条件如本领域所知根据特定的柱而变化。对于大多数感兴趣的蛋白质,pH范围可以介于约6.0和约8.6之间,或者介于约6.5和约7.5之间。然而,已知特定蛋白质对极限pH有抗性,而较宽的范围可能是可行的。典型条件包括5-7的pH范围而柠檬酸钠浓度范围在0至约0.8M(例如0.5M柠檬酸钠,pH 6.0)。

[0146] 本领域技术人员在决定哪种缓冲液或盐适合于进行纯化的特定蛋白质时受到本领域知识的指导。此外,技术人员能够容易地决定选择使用的缓冲液或盐的最佳浓度,通过例如确立污染物结合至柱同时感兴趣的蛋白质在流过级分中流过的特定缓冲液或盐条件。可以收集柱流出物的级分并加以分析以测定靶蛋白和污染物洗脱的缓冲液或盐的浓度。合适的分析包括,例如,用电导率仪(测定样品中的盐浓度)加上凝胶电泳或ELISA测定法(测定样品中蛋白质的身份)对电导率的测量。任选地,可以用更多的与装载蛋白质样品相同的溶液清洗柱,并且也可以收集这种清洗溶液并与流过液体合并。

[0147] 在收集包含进行纯化的蛋白质的流过物和任选的洗出物之后,可能保持结合于柱的蛋白质可以通过使用包含用于色谱的缓冲液或盐的溶液洗提色谱介质而释放,但以较低离子强度色谱以释放污染物蛋白质。然后,可以使用会有从所述色谱介质释放大多数或全部蛋白质并且减少或消除任何可能存在于所述色谱介质中的微生物污染的效果的溶液再生该柱。在一个实施方案中,这样的溶液可以包含氢氧化钠。也可以使用其他试剂。然后,可以将该柱清洗并储存在能够阻碍微生物生长的溶液中。这样的溶液可以包含氢氧化钠,但其他试剂可能也是合适的。

[0148] 任何纯化阶段的样品的蛋白质浓度可以通过任何合适的方法测定。这些方法是本领域公知的并且包括:1)比色法如Lowry测定法、Bradford测定法、Smith测定法和胶体金测定法;2)利用蛋白质的UV吸收特性的方法;和3)基于凝胶上经染色的蛋白质条带的视觉评估,其依赖于与在相同凝胶上已知量的蛋白质标准品比较。参见例如Stoschek (1990), Quantitation of Protein,于Guide to Protein Purification, Methods in Enzymol. 182:50-68。

[0149] 靶蛋白,以及可能存在于样品中的污染性蛋白质,能够通过任何合适的手段监测。优选地,所述技术应该敏感到足以检测范围介于约百万分之二(ppm)(按照纳克每毫克进行

纯化的蛋白质来计算)至500ppm之间的污染物。例如,酶联免疫吸附测定法(ELISA),一种本领域熟知的方法,可以用于检测第二种蛋白质对蛋白质的污染。参见例如Reen(1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA),于Basic Protein and Peptide Protocols,Methods Mol.Biol.32:461-466,将其通过提述以其整体并入本文。在一个方面,这类其他蛋白质对所述蛋白质的污染可以在本文所述的方法之后减少,优选减少至至少约1/2,更优选减少至至少约1/3,更优选减少至至少约1/5,更优选减少至至少约1/10,更优选减少至至少约1/20,更优选减少至至少约1/30,更优选减少至至少约1/40,更优选减少至至少约1/50,更优选减少至至少约1/60,更优选减少至至少约1/70,更优选减少至至少约1/80,更优选减少至至少约1/90,并且最优选减少至至少约1/100。

[0150] 在另一方面,在本文描述的方法之后这些其他蛋白质对所述蛋白质的污染不超过约10,000ppm,优选不超过约2500ppm,更优选不超过约400ppm,更优选不超过约360ppm,更优选不超过约320ppm,更优选不超过约280ppm,更优选不超过约240ppm,更优选不超过约200ppm,更优选不超过约160ppm,更优选不超过约140ppm,更优选不超过约120ppm,更优选不超过约100ppm,更优选不超过约80ppm,更优选不超过约60ppm,更优选不超过约40ppm,更优选不超过约30ppm,更优选不超过约20ppm,更优选不超过约10ppm,并且最优选不超过约5ppm。这种污染的范围可以从不可检测的水平至约10ppm或从约10ppm至约10,000ppm。如果蛋白质是为了药理学用途而进行纯化的,本领域技术人员会认识到第二种蛋白质的优选水平可以依赖于每位患者要给药的蛋白质的周剂量,以患者每周不会接受超过特定量的污染性蛋白质为目的。因此,如果减少蛋白质的每周所需剂量,那么有可能增加第二种蛋白质的污染水平。

[0151] 可能存在于进行纯化的蛋白质的样品中的DNA量可以通过任何合适的方法测定。例如,可以使用利用聚合酶链式反应的测定法。任选地,所述技术能够检测10皮克每毫克蛋白和更高水平的DNA污染。DNA水平可以通过HIC来减少,任选地减少至约1/2,优选减少至约1/5,更优选减少至约1/10,更优选减少至约1/15,最优选减少至约1/20。任选地,羟基磷灰石色谱之后的DNA水平少于约20皮克每毫克蛋白质,优选少于15皮克每毫克蛋白质,更优选少于10皮克每毫克蛋白质,最优选少于5皮克每毫克蛋白质。

[0152] 基于蛋白A的色谱

[0153] 在一个实施方案中,含有抗体预备物的收获介质可以通过蛋白A色谱纯化。葡萄球菌蛋白A(SpA)是42kDa的蛋白质,由从N端起的顺序的称为E、D、A、B和C的五个几乎同源的结构域构成(Sjodhal Eur J Biochem 78:471-490(1977);Uhlen等J.Biol.Chem.259:1695-1702(1984))。这些结构域含有大约58个残基,各享有约65%-90%氨基酸序列同一性。蛋白A和抗体之间的结合研究显示,尽管SpA的所有五个结构域(E、D、A、B和C)与IgG通过其Fc区结合,但是结构域D和E显示显著的Fab结合(Ljungberg等Mol.Immunol.30(14):1279-1285(1993);Roben等J.Immunol.154:6437-6445(1995);Starovasnik等Protein Sci 8:1423-1431(1999)。Z结构域,作为B结构域的一个功能性类似物和能量最小化版本(Nilsson等Protein Eng 1:107-113(1987)),显示具有可以忽略的对抗体可变域区的结合(Cedergren等Protein Eng 6(4):441-448(1993);Ljungberg等(1993)见上文;Starovasnik等(1999)见上文)。

[0154] 直到最近,商业上可以获得的蛋白A固定相采用SpA(分离自金黄色葡萄球菌或为

重组表达的) 作为其固定化配体。使用这些柱,不可能为了柱再生和卫生使用碱性条件,像通常对使用非蛋白质配体的其他色谱模式所做的那样(Ghose等Biotechnology and Bioengineering Vol.92(6) (2005))。已经开发了新型树脂(MabSELECT™ SuRe)来对抗更强的碱性条件(Ghose等(2005)见上文)。使用蛋白质工程技术,替代了蛋白A的Z结构域中的许多天冬酰胺残基并且创造了作为四个相同修饰的Z结构域的四聚体的新型配体(Ghose等(2005)见上文)。

[0155] 因此,可以使用商业上可以获得的蛋白A柱根据制造商的说明书实施纯化方法。如所附的例子中所述,可以使用MabSELECT™柱或MabSELECT™ SuRe柱(GE Healthcare Products)。MabSELECT™是含有重组SpA作为其固定化配体的商业上可以获得的树脂。其通过填充床色谱从大介质捕获抗体分子。将MabSELECT™的重组蛋白A配体工程化以有利于蛋白A配体取向,其增强对IgG结合能力。蛋白A配体对IgG结合区的特异性类似于天然蛋白A。MabSELECT™ SuRe柱具有与MabSELECT™所用类似的高度交联琼脂糖基质,使用的配体是四个相同修饰的Z结构域的四聚体(GE Healthcare Products)。其他商业上可以获得的蛋白A柱来源包括但不限于PROSEP-ATM(Millipore,U.K.),其由与可控多孔玻璃共价偶联的蛋白A组成,可以有用地采用。其他有用的蛋白A制剂包括Protein A Sepharose FAST FLOW™(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ),和TOYOPEARL™ 650M Protein A(TosoHaasCo., Philadelphia,PA)。

[0156] 羟基磷灰石树脂

[0157] 多种羟基磷灰石色谱树脂在商业上是可以获得的,并且可以在本发明的实践中使用所述材料的任何可用形式。对适用于羟基磷灰石色谱的条件详细说明在WO 05/044856中提供,将其内容通过提述以其整体并入本文。

[0158] 在本发明的一个实施方案中,羟基磷灰石是晶体形式。用于本发明的羟基磷灰石可以是结块形成颗粒和在高温烧结成稳定的多孔陶瓷物质的那种。羟基磷灰石的粒径可以有很大变化,但是典型的粒径范围在直径为1μm至1,000μm,并且可以从10μm至100μm。在本发明的一个实施方案中,粒径为20μm。在本发明的另一个实施方案中,粒径为40μm。在本发明的又一个实施方案中,粒径为80μm。

[0159] 在cHA柱的制备中可以采用多种色谱载体,最广泛使用的为I型和II型羟基磷灰石。I型具有高蛋白结合能力并且对酸性蛋白质的能力更好。然而,II型具有较低的蛋白结合能力,但是具有更好的对核酸和特定蛋白质的分离度。II型材料还具有非常低的对白蛋白的亲和力并且特别适用于纯化免疫球蛋白的多个种类。技术人员能够决定选择特定羟基磷灰石类型。

[0160] 本发明可以使用松散的、填充在柱中的或在连续环形色谱(a continuous annual chromatograph)中的羟基磷灰石树脂。在本发明第一个实施方案中,将陶瓷羟基磷灰石树脂填入柱中。技术人员能够决定柱尺寸(dimension)的选择。在本发明的一个实施方案中,对于小规模纯化可以使用至少0.5cm的柱直径和约20cm的床高。

[0161] 在本发明的其他实施方案中,可以使用从约cm至约60cm的柱直径。在本发明的又一个实施方案中,可以使用从60cm至85cm的柱直径。在本发明的某些实施方案中,可以使用在pH 9.0的200mM Na₂HP04溶液中的陶瓷羟基磷灰石树脂的浆液以约4cm/min的恒定流速或以重力填充柱。

[0162] 用于羟基磷灰石树脂的缓冲液组成和装载条件

[0163] 在将所述羟基磷灰石树脂与抗体预备物接触之前,可能有必要调整参数如pH、离子强度和温度和在一些情况下的不同种类物质的添加。因此,可选的步骤是通过用产生抗体预备物纯化所必须特性的溶液(例如,用于调整pH、离子强度等或用于引入洗涤剂的缓冲液)清洗羟基磷灰石基质来平衡它。

[0164] 在结合/流过组合模式羟基磷灰石色谱中,用溶液平衡并清洗羟基磷灰石基质,由此产生所述抗体预备物纯化所必需的特性。在本发明的一个实施方案中,可以使用稍具碱性至稍具酸性pH的含有0.01至2.0M NaCl的溶液平衡所述基质。例如,所述平衡缓冲液可以含有1至20mM磷酸钠,在另一个实施方案中,其可以含有1至10mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有2至5mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有2mM磷酸钠,并且在另一个实施方案中可以含有5mM磷酸钠。所述平衡缓冲液可以含有0.01至2.0M NaCl,在一个实施方案中,0.025至0.5M NaCl,在另一个实施方案中,0.05M NaCl,并且在另一个实施方案中,0.1M NaCl。装载缓冲液的pH可以在6.2至8.0的范围。在一个实施方案中,pH可以从6.6至7.7,并且在另一个实施方案中pH可为7.3。所述平衡缓冲液可以含有0至200mM精氨酸,在另一个实施方案中其可以含有120mM精氨酸,并且在另一个实施方案中其可以含有100mM精氨酸。所述平衡缓冲液可以含有0至200mM HEPES,在另一个实施方案中其可以含有20mM HEPES,并且在另一个实施方案中其可以含有100mM HEPES。

[0165] 在制备流过模式的羟基磷灰石色谱中,也可以将所述SDAB分子预备物,缓冲液交换至合适的缓冲液或装载缓冲液中。在本发明的一个实施方案中,可以将所述抗体预备物,缓冲液交换至稍具酸性至稍具碱性pH的含有0.2至2.5M NaCl的装载缓冲液中。例如,所述装载缓冲液可以含有1至20mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有2至8mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有3至7mM磷酸钠,并且在另一个实施方案中可以含有5mM磷酸钠。所述装载缓冲液可以含有0.2至2.5M NaCl,在一个实施方案中,0.2至1.5M NaCl,在另一个实施方案中,0.3至1.0M NaCl,并且在另一个实施方案中,350mM NaCl。所述装载缓冲液的pH可以在从6.4至7.6的范围。在一个实施方案中,所述pH可以从6.5至7.0,并且在另一个实施方案中所述pH可为6.8。

[0166] SDAB分子预备物与羟基磷灰石树脂以结合模式、流过模式或其组合接触可以在含有固相基质的填充床柱、流化床/膨胀床柱中进行,和/或以简单分批操作进行,其中将所述固相基质与所述溶液混合一定的时间。

[0167] 在将羟基磷灰石树脂与抗体预备物接触之后,任选地进行清洗流程。然而,在一些免疫球蛋白的极高纯度不是关键或不需要其他流过抗体的情况下,可以省略清洗流程,省去一个工艺步骤以及清洗溶液。采用的清洗缓冲液会依赖于羟基磷灰石树脂的性质、采用的羟基磷灰石色谱的模式,并因此可以由本领域普通技术人员来决定。在流过模式和结合/流过组合模式中,可以将任选地清洗该柱之后获得的经纯化的抗体流过物与其他经纯化的抗体级分汇集。

[0168] 在结合模式中,可以在任选的清洗流程之后将所述SDAB分子从柱洗脱。为了从柱洗脱抗体,本发明使用稍具酸性至稍具碱性pH的含有约0.2至2.5M NaCl的高离子强度磷酸盐缓冲液。例如,所述洗脱缓冲液可以含有1至20mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有2至8mM磷酸钠,在另一个实施方案中其可以含有2至6mM磷酸钠,在另一个实施方案中可

以含有3mM磷酸钠,并且在另一个实施方案中可以含有5mM磷酸钠。所述洗脱缓冲液可以含有0.2至2.5M NaCl,在一个实施方案中,0.2至1.5M NaCl,在另一个实施方案中,0.3至1.1M NaCl,在另一个实施方案中,1.0M NaCl,并且在另一个实施方案中,0.35M NaCl。所述洗脱缓冲液的pH可以在从6.4至7.6的范围。在一个实施方案中,所述pH可以从6.5至7.3,在另一个实施方案中所述pH可为7.2,并且在另一个实施方案中所述pH可为6.8。为了从柱洗脱抗体可以以连续的或逐步的梯度改变洗脱缓冲液。

[0169] 在结合模式、流过模式二者以及它们的组合中,在抗体洗脱或流过之后可以任选地清洁固相基质,即洗提(stripped)和再生。此过程通常按常规进行以使固相表面上的杂质积累最少化和/或为基质除菌以避免微生物对产物的污染。

[0170] 可以根据本领域普通技术人员知识调整缓冲液成分。

[0171] 其他任选步骤

[0172] 尽管已经发现羟基磷灰石色谱可以单独使用来从聚集体分离单体IgG,如上所述,但是本发明的纯化方法可以与其他蛋白质纯化技术组合使用。在本发明的一个实施方案中,在羟基磷灰石步骤之前的一个或多个步骤对于降低污染物或杂质的负载问题可能是理想的。在本发明的另一个实施方案中,在羟基磷灰石步骤之后的一个或多个纯化步骤对于去除额外的污染物或杂质可能是理想的。

[0173] 描述的cHA纯化流程可以任选地与其他纯化步骤组合,所述其他纯化步骤包括但不限于蛋白A色谱、亲和色谱、疏水相互作用色谱、固定化金属亲和色谱、体积排阻色谱、渗滤、超滤、除病毒过滤和/或离子交换色谱。

[0174] 在一个实施方案中,在cHA纯化步骤之前,收获介质可以任选地通过蛋白A色谱步骤来初始纯化。例如,由与受控多孔玻璃共价偶联的蛋白A组成的PROSEP-ATM(Millipore, U.K.)可以有用地采用。其他有用的蛋白A制剂包括Protein A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、TOYOPEARL™ 650M Protein A(TosoHaas Co., Philadelphia, PA)和MABSELECT™柱(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0175] 作为cHA纯化之前的任选步骤,可以采用离子交换色谱。在这方面,可以将多种阴离子或阳离子取代基附接到基质以形成阴离子或阳离子载体以供色谱。阴离子交换取代基包括二乙基氨基乙基(DEAE)、三甲基氨基乙基丙烯酰胺(TMAE)、季氨基乙基(QAE)和季胺(Q)基团。阳离子交换取代基包括羧甲基(CM)、磺乙基(sulfoethyl)(SE)、磺丙基(SP)、磷酸(phosphate)(P)和磺酸(sulfonate)(S)。纤维素离子交换树脂如DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32和CM-52可以从Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K获得。基于Sephadex和交联的离子交换剂也是已知的。例如,DEAE-、QAE-、CM-、和SP Sephadex、和DEAE-、Q-、CM-和S-Sepharose、和Sepharose全部可以从Amersham Biosciences, Piscataway, NJ获得。另外,DEAE和CM二者衍生的乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物如TOYOPEARL™ DEAE-650S或M和TOYOPEARL™ CM-650S或M可从Toso Haas Co., Philadelphia, PA获得。

[0176] 在本发明的一个实施方案中,可以在结合模式或流过模式中使用离子交换色谱。

[0177] 在某些实施方案中,首先进行所述蛋白A色谱步骤,第二进行所述阴离子交换步骤,而第三进行所述cHA步骤。

[0178] 其他杂质的去除

[0179] 除了HMWA去除之外,已经显示cHA色谱可用于从抗体预备物去除其他杂质。可以通

过本发明的cHA色谱方法去除的其他杂质包括但不限于DNA、宿主细胞蛋白、外来病毒和来自先前纯化步骤的蛋白A污染物。

[0180] 在本发明的一个实施方案中,本发明能够从抗体预备物去除蛋白A。在本发明的一些实施方案中,最终预备物中存在的蛋白A的量能够显著减少,如从300ppm减少至低于1ppm。

[0181] 给药和治疗方法

[0182] 含有通过本文公开的方法纯化的SDAB分子的制剂可以单独或与第二药剂组合向受试者(例如,人受试者)给药,所述第二药剂例如第二治疗或药理学活性剂,以治疗或预防(例如,减少或缓解一种或多种相关症状)TNF α 相关病症,例如,炎性或自身免疫病症。术语“治疗”是指以统计学显著程度或以本领域技术人员可以检测的程度有效改善病状、症状或与病症相关的参数或阻止病症进展的量、方式和/或模式给予治疗。有效量、方式或模式可依赖于受试者而不同并且可以为受试者度身定做。

[0183] 能够治疗的免疫病症的非限定性实例包括但不限于自身免疫病,例如,关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎、狼疮相关关节炎或强直性脊柱炎)、硬皮病、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、脉管炎、多发性硬化、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、重症肌无力、炎性肠病(IBD)、克罗恩氏病、结肠炎、糖尿病(I型);炎性病状,例如,皮肤的(例如,银屑病);急性炎性病状(例如,内毒素血症、脓毒症和败血病,中毒性休克综合征和传染病);移植排斥和变态反应。在一个实施方案中,TNF α 相关病症是关节炎性病状,例如,选自以下中的一种或多种的病症:类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎(RA)(例如,中度至重度类风湿性关节炎)、骨关节炎、银屑病关节炎或强直性脊柱炎、多关节幼年特发性关节炎(JIA);或银屑病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、炎性肠病和/或多发性硬化。

[0184] 在某些实施方案中,所述制剂包括第二治疗剂。例如,对于TNF纳米抗体,所述第二药剂可以是抗TNF抗体或其TNF结合性片段,其中所述第二TNF抗体与所述制剂的TNF结合性SDAB分子具有不同的表位特异性。能够与TNF结合性SDAB共同配制的药剂的其他非限定性实例包括,例如,细胞因子抑制剂、生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、细胞毒性剂和细胞抑制剂。在一个实施方案中,额外的药剂是用于关节炎的标准治疗,其包括但不限于非甾体抗炎剂(NSAID);皮质类固醇,包括泼尼松龙,泼尼松,可的松和曲安西龙;和疾病改善性抗风湿药物(DMARD),如甲氨蝶呤,羟氯喹(Plaquenil)和柳氮磺吡啶,来氟米特(Arava®),肿瘤坏死因子抑制剂,包括伊纳西普(Enbrel®),英夫利昔单抗(Remicade®)(含或不含甲氨蝶呤),和阿达木单抗(Humira®),抗CD20抗体(例如,Rituxan®),可溶性白介素1受体,如阿那白滞素(Kineret®),金,米诺环素(Minocin®),青霉胺,和细胞毒性剂,包括硫唑嘌呤,环磷酰胺,和环孢霉素。有利地,这些组合治疗可以有利地使用较低剂量的所给药的治疗剂,由此避免与多种单一治疗相关的可能的毒性或并发症。

[0185] 所述制剂可以是液态溶液的形式(例如,可注射的和可输注的溶液)。这样的组合物可以通过胃肠外模式(例如,皮下、腹膜内或肌肉内注射)或通过吸入给药。短语“胃肠外给药”如用于本文意指除了肠内和局部给药之外的给药模式,通常通过注射,并包括皮下或

肌肉内给药,以及静脉内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、表皮下、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。在一个实施方案中,本文描述的制剂是皮下给药的。

[0186] 药物制剂在制备和储存条件下是无菌且稳定的。药物组合物也可以经测试以确保其满足给药的管理和工业标准。

[0187] 药物制剂可以配制成溶液、微乳剂、分散剂、脂质体或其他适合于高蛋白质浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将本文描述的药剂以需要量与上文所列举的成分之一或组合一起(视需要)加入合适溶剂中,然后进行过滤除菌来制备。通常,分散剂通过将本文描述的药剂加入含有基础分散介质和除上文所列那些之外的所需其他成分的无菌载体中来制备。溶液适当的流动性可以例如通过使用涂覆剂(coating)如卵磷脂来保持,在分散剂的情况下通过保持所需粒径来保持,和通过使用表面活性剂来保持。注射组合物的长时间吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的作用剂来实现,例如,单硬脂酸盐和明胶。

实施例

[0188] 以下实施例仅提供用于说明目的。

[0189] 实施例1:对ATN-103编码序列的描述

[0190] ATN-103是一种靶向TNF α 和HSA的三价纳米抗体分子。纳米抗体通过如W0 06/122786中所述选择TNF α 或HSA分离自源自美洲驼(1lama)的噬菌体文库。检测纳米抗体的特异性活性并选择TNF1作为人TNF α 的纳米抗体抑制剂和ALB1作为人抗HSA纳米抗体用于半衰期延长。将TNF1和ALB1通过CDR移植到最近的人框架(DP51/DP53)上来人源化。在TNF1的人源化过程中,保留了2个骆驼科动物残基(P84和R103)并将这个版本命名为TNF30。在ALB1的人源化过程中,保留了7个骆驼科动物残基(N16、N73、T76、P84、T93、I94和S103)并将这个版本命名为ALB8。将两个TNF30纳米抗体各自通过9个氨基酸的甘氨酸-丝氨酸连接基(Gly₄SerGly₃Ser(SEQ ID NO:9))连接至中央ALB8纳米抗体得到在本文称为“ATN-103”的三价分子。ATN-103的氨基酸序列示于图3,其具有以下构象-TNF30-(甘氨酸-丝氨酸连接基)-ALB8-(甘氨酸-丝氨酸连接基)-TNF30。在图2中,互补决定区(CDR)标有下划线(SEQ ID NOs:2-7)。预测的分子内二硫键由参与的半胱氨酸残基的连接来说明。TNF的结合域以粗体显示且与HSA的结合域以粗斜体显示。连接这些结合域的氨基酸连接基为斜体。还显示了所述多肽链的信号肽(-19MGW...VHS⁻¹)。

[0191] 实施例2:ATN-103纯化工艺

[0192] ATN-103纯化工艺由两个色谱步骤和三个膜过滤步骤组成(参见图3)。所有步骤在室温进行,除非另行指明。

[0193] 每个纯化步骤的原理、目的和说明在下文中提供。

[0194] MabSelect蛋白A亲和色谱和低pH病毒失活

[0195] MabSelectTM蛋白A色谱步骤的主要目的包括从澄清的无细胞条件介质捕获产物和将ATN-103与工艺衍生的杂质(例如,宿主细胞DNA和蛋白质,介质成分和外来剂)分离。

[0196] MabSelect蛋白A是由高度交联的琼脂糖基质构成的亲和树脂,所述基质通过硫醚连接用产生自大肠杆菌(E.coli)发酵的重组蛋白A共价衍生化。

[0197] 将MabSelect蛋白A柱用Tris缓冲的氯化钠溶液平衡并装载澄清的无细胞条件介质(CM)。所有缓冲液以300cm/hr运行。所述平衡缓冲液含有150mM NaCl和50mM Tris,pH

7.5. ATN-103结合至MabSelect™蛋白A树脂而杂质流过该柱。将装载的树脂用Tris缓冲的氯化钠溶液(150mM NaCl和50mM Tris, pH 7.5)清洗以进一步降低杂质水平,再用低浓度Tris缓冲液清洗。所述低浓度Tris清洗缓冲液含有10mM NaCl和10mM Tris, pH 7.5。将结合的产物用低pH甘氨酸缓冲液从柱洗脱。所述低pH甘氨酸洗脱缓冲液含有10mM NaCl和50mM甘氨酸, pH 3.0。将所述树脂用氢氧化钠溶液再生和消毒,然后储存在含有16%乙醇的溶液中。多个循环的MabSelect蛋白A步骤可以产生自一次收获。

[0198] 将产物汇集物保持在18℃至24℃于pH≤3.8下1.5±0.5小时。已经将MabSelect™蛋白A柱之后的低pH失活设计为使包膜病毒失活。然后用浓缩的HEPES缓冲液(2mM HEPES, pH 9.0)中和所述洗脱汇集物并使用深层和0.2μm过滤来过滤。

[0199] Macro-Prep陶瓷羟基磷灰石色谱

[0200] Macro-Prep™陶瓷羟基磷灰石(cHA)步骤的主要目的是去除高分子量聚集体(HMWA)、浸析的蛋白A和宿主细胞来源的杂质,如DNA和宿主细胞蛋白(HCP)。

[0201] Macro-Prep陶瓷羟基磷灰石是由六角晶格构成的不可压缩的基质。钙、磷酸盐和氢氧化钠分子构成所述基质,化学计量学为 $(Ca_5(PO_4)_3(OH))_2$ 。所述cHA树脂是能够促进阳离子交换、阴离子交换和金属配位相互作用的多模式基质。结合的蛋白质的洗脱通常随着盐或磷酸盐浓度的增加实现。

[0202] 首先将cHA柱用含有高浓度氯化钠的缓冲液平衡,再用含有低浓度氯化钠的缓冲液平衡。向cHA柱的装载物为经中和的MabSelect™蛋白A汇集物。装载之后,将柱用低盐平衡缓冲液清洗,并且使用含有较高盐浓度的缓冲液回收ATN-103。在洗脱ATN-103之后,以高得多的盐和磷酸盐浓度从该柱去除HMW和其他杂质。将柱再生,然后储存在氢氧化钠溶液中。

[0203] Planova 20N病毒保留过滤

[0204] Planova 20N病毒保留过滤(VRF)步骤提供了显著水平的病毒清除以通过去除可能代表潜在的外来病毒污染物的颗粒来确保产物安全。

[0205] 将一次性Planova 20N VRF装置用cHA洗脱缓冲液平衡,并装载Macro-Prep陶瓷羟基磷灰石汇集产物。将产物收集在渗出液流中。在装载物经处理之后,使用缓冲液流回收留在系统中的其他产物。

[0206] 超滤/渗滤和配制

[0207] 使用超滤/渗滤步骤(10kDa MW截留值(cut off))来浓缩VRF产物并将其缓冲液交换至配制缓冲液中。

[0208] 在平衡膜组件(module)之后,首先将装载溶液浓缩至预设的目标体积,然后用14mM组氨酸pH 5.8缓冲液渗滤。在进一步浓缩至大约110g/L之后,用组氨酸缓冲液流从该系统回收汇集物以实现大约90g/L的最终蛋白质目标浓度。将小体积(11.1% v/v)的浓缩储液(10mM组氨酸、50%蔗糖和0.1%聚山梨酯80)添加至汇集产物。获得的最终药物物质(DS)为10mM组氨酸pH 6.0、5%蔗糖、0.01%聚山梨酯中的80g/L ATN-103。

[0209] 最终过滤

[0210] 使配制的药物物质通过一次性0.2μm滤器以去除任何潜在的外来微生物污染物和颗粒物质。

[0211] 实施例3:蛋白A捕获比较

[0212] 评估以下基于蛋白A的基质捕获ATN-103的能力:MabSelect™(GE Healthcare)、

MabSelect Xtra™(GE Healthcare)、**ProSep®** Va Ultra Plus (Millipore) 和 MabSelect SuRe™(GE Healthcare)。MabSelect™使用含有Z结构域的蛋白A配体,并且树脂骨架因交联而更加疏水。MabSelect Xtra™使用与MabSelect相同的配体且密度增加30%,并且具有较小的珠和更大的孔径。**ProSep®** Va Ultra Plus具有基于玻璃的骨架和天然蛋白A配体。其设计用于在更高流速下的更高容量。MabSelect SuRe™结合含有Fc的分子(ATN-103没有Fc区)并且它的新型配体允许更大的腐蚀稳定性(caustic stability)。

[0213] 当使用经过MabSelect™纯化的蛋白A峰汇集物作为装载材料(pH=7.0,稀释至1g/L(预期的条件介质浓度))时,**ProSep®** Va Ultra Plus显示了最高的结合能力(16g/L r)而MabSelect™的结合能力与之前证明的结合能力相比显示了20%的增加。

[0214] 检查了流速对动态结合能力(DBC)的影响。对于MabSelect™,结合能力在600cm/hr为7.4g/L r,相比之下在60cm/hr为8.0g/L r。在测试MabSelect Xtra™和**ProSep®** Va Ultra Plus时也观察到了类似的趋势。因此,在测试条件下流速对DBC的影响最小。

[0215] 还检查了改性剂对蛋白A结合能力的影响。结果显示添加0.5M Na₂SO₄能够通过增强疏水性相互作用增加DBC。例如,MabSelect™(含CM)的结合能力增加至在150cm/hr流速时为12.5g/L r。然后将其他结合物质洗脱到不含Na₂SO₄的溶液中。在含Na₂SO₄的CM中检测到了大量的沉淀。当测试MabSelect Xtra™(DBC=16g/L r)和**ProSep®** Va Ultra Plus (DBC=17.5g/L r)时观察到了类似的结果。

[0216] 为了检查PEG对蛋白A结合能力的影响,将6% PEG(4000Da)加入CM。然后将其他结合的物质洗脱至不含PEG的缓冲液中。所述结果显示了在结合能力上的少量增加并且没有检测到沉淀。

[0217] 实施例4:ATN-103MabSelect SuRe™评估

[0218] 在开发MabSelect步骤的过程中,在结合实验中使用了MabSelect Sure™以获得对ATN-103的蛋白A结合机制的更好了解。意想不到的是,ATN-103结合至MabSelect Sure™并且需要pH 4.5的溶液来去除结合的产物。MabSelect Sure™是设计为只结合含有Fc区的分子如抗体的蛋白A树脂。ATN-103不含Fc区。在稍后的开发中测定了MabSelect Sure™能够以突破初始浓度的10%结合高达8g/L树脂的ATN-103。

[0219] 实施例5:ATN-103阳离子交换(CEX)步骤评估

[0220] 评估基于阳离子交换(CEX)的捕获步骤以致力于增加ATN-103纯化工艺中捕获柱的容量。通过将条件介质(CM)的电导率降低至12至9mS/cm之间并将pH滴定至≤4.3,观察到了40g/L r的容量。ATN-103对CEX介质的结合非常弱,因为在这些pH水平下的电荷/摩尔数低。因为这种弱结合,能够将ATN-103从CEX树脂洗脱至低电导率溶液中。洗脱条件通常为≤50mM NaCl,pH 6.5至7.0。所述CEX柱也可以使用下游cHA平衡缓冲液洗脱。

[0221] CEX能力筛选

[0222] 测试了四种阳离子交换剂Capto™ S (GE Healthcare)、**Fractogel®** S03- (M) (EMD Chemicals)、**Toyopearl®** Gigacap S-650M(Tosoh Bioscience)和**Poros®** HS 50(Applied Biosystems)对ATN-103的结合能力。在筛选中使用了0.75mL CM TS2和10uL树脂(目标75g/L树脂)。将柱用含有50mM乙酸钠的缓冲液在与装载条件相同的pH下清洗。将蛋白质用含有

1M NaCl的缓冲液(pH 5.5)洗脱。通过在A280的分光光度法测量了结合的物质。然后用含有1M NaCl和尿素的缓冲液洗提柱。在A280测量的分光光度法显示在洗提之后没有显著物质的结合。对研究的所有树脂观察到了高达约25g/L r的结合能力。Capto™ S和Toyopearl® Gigacap S-650M显示了相对较弱的结合,而Fractogel® S03- (M) 和Poros® HS 50显示了更紧密的结合。此研究表明使用非常低电导率条件通过pH的洗脱是可行的。

[0223] CEX结合能力

[0224] 将CM滴定至pH4.0并用Rodi水3:1稀释(3份CM加入1份Rodi)至0.75总稀释度(8mS/cm装载物)。Capto™ S、Toyopearl® Gigacap S-650M、Poros® HS 50和Fractogel® S03- (M)的结合能力最初使用2mL柱(0.5cm x 10cm)测量超过40g/L的靶结合能力。在4.0至4.3的pH范围内的多种条件下进一步测定Capto™ S、Toyopearl® Gigacap S-650M和Fractogel® S03- (M)的结合能力。例如, Capto™ S的结合能力测得分别为在pH 4.3, 9mS/cm; pH 4.0, 11mS/cm, pH 4.0, 9mS/cm和pH 4.1, 8mS/cm。Toyopearl® Gigacap S-650M的结合能力测得分别为在pH 4.3, 9mS/cm和pH 4.1, 8mS/cm。Fractogel® S03- (M)的结合能力测得分别为在pH 4.3, 12mS/cm; pH 4.3, 9mS/cm; pH 4.0, 12mS/cm, pH 4.1, 9mS/cm, 和pH 4.0, 9mS/cm。结果显示Fractogel® S03- (M)可以在不用水稀释CM条件下使用。不稀释时, Fractogel® S03- (M)在pH 4.0和4.3之间显示了良好的结合能力(DBC范围:25至>40g/L r)。在23%稀释时, Fractogel® S03- (M)在pH 4.0和4.3之间显示了卓越的能力(DBC范围:40至>50g/L r)。

[0225] CEX洗脱方法

[0226] 如CEX结合能力实验中所述进行梯度洗脱。使用柠檬酸盐缓冲液用于pH洗脱。测试了Capto™ S、Toyopearl® Gigacap S-650M、Fractogel® S03- (M) 和Poros® HS 50。体积排阻色谱(SEC)洗脱显示了高纯度ATN-103和低水平的HMW和LMW类物质。纯度的程度至少与蛋白A洗脱物质的纯度相当。可以使用获得自梯度洗脱的信息设计HTS筛选。

[0227] 实施例6:高浓度超滤/渗滤和配制

[0228] 实施例6.1:高浓度超滤/渗滤和配制

[0229] 使用超滤/渗滤步骤(10kDa MW截留值)来浓缩VRH产物并将其缓冲液交换至配制缓冲液中。

[0230] 在平衡膜组件之后,首先将装载溶液浓缩至预设的目标体积,然后用28mM组氨酸pH 5.8缓冲液渗滤。在进一步浓缩至大约200g/L之后,用组氨酸缓冲液流从该系统回收汇集物以实现大约150g/L的最终蛋白质目标浓度。将小体积(17.6% v/v)的浓缩储液(20mM组氨酸、50%蔗糖和0.0667%聚山梨酯80)添加至汇集产物80。获得的最终DS为10mM组氨酸pH 6.0、5%蔗糖、0.01% PS80中的80g/L ATN-103。获得的最终DS为20mM组氨酸pH 6.0、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨酯中的125g/L ATN-103。

[0231] 实施例6.2:高浓度超滤/渗滤

[0232] 使用超滤/渗滤步骤(10kDa MW截留值)来浓缩VRH产物并将其缓冲液交换至配制缓冲液中。

[0233] 在平衡膜组件之后,首先将装载溶液浓缩至大约40g/L,然后用30mM组氨酸pH 5.8,8.5%蔗糖缓冲液渗滤。在进一步浓缩至大约300g/L之后,用渗滤缓冲液从该系统回收汇集物以实现大约175g/L的最终蛋白质目标浓度。

[0234] 实施例6.3:高浓度超滤/渗滤和配制

[0235] 使用超滤/渗滤步骤(10kDa MW截留值)来浓缩VRH产物并将其缓冲液交换至配制缓冲液中。

[0236] 在平衡膜组件之后,首先将装载溶液浓缩至大约40g/L,然后用30mM组氨酸,pH 5.8缓冲液渗滤。在进一步浓缩至大约320g/L之后,用渗滤缓冲液从该系统回收汇集物以实现大约210g/L的最终蛋白质目标浓度。

[0237] 如果DS目标为 ≥ 200 g/L,实施例6.2和实施例6.3的组合会如下进行:可以使用超滤/渗滤步骤(10kDa MW截留值)来浓缩VRF产物并将其缓冲液交换至配制缓冲液中。在平衡膜组件之后,首先将装载溶液浓缩至40g/L,然后用组氨酸蔗糖缓冲液渗滤。在进一步浓缩至大约320g/L之后,用渗滤缓冲液从该系统回收汇集物以实现大约 ≥ 200 g/L的最终蛋白质目标浓度,其中蔗糖已经存在。然后所述制剂掺合物(spike)将为1.01%v/v,所以UF汇集物不会受到显著稀释,并且最终DS将 ≥ 200 g/L。

[0238] 等效物

[0239] 本文引用的所有参考文献通过提述以其整体并入,并且与各篇单独的出版物或专利或专利申请具体并单独指明通过提述以其整体并入用于各种目的相同的程度用于各种目的。

[0240] 本发明不限于本文描述的具体实施方案的范围。事实上,除了本文描述的修饰之外根据前述说明书和附图对本发明的多种修饰对于本领域技术人员会是显而易见。意图使这些修饰落入所附权利要求的范围内。

[0241] 本发明涉及以下方面:

[0242] 1.一种从含有包含一个或多个纳米抗体分子的单域抗原结合性(SDAB)分子和一种或多种污染物的混合物分离或纯化所述SDAB分子的方法,包括:

[0243] 将所述混合物与基于蛋白A的或基于阳离子交换的载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述载体的条件下接触;

[0244] 去除一种或多种污染物;和

[0245] 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,

[0246] 其中所述SDAB分子不具有互补性抗体可变域或免疫球蛋白Fc区。

[0247] 2.1的方法,其中所述去除一种或多种污染物的步骤包括在所述SDAB分子保持与所述载体结合的条件下清洗所述结合的载体。

[0248] 3.1或2的方法,其中将所述混合物与基于蛋白A的载体接触。

[0249] 4.1-3中任一项的方法,其中所述去除一种或多种污染物的步骤包括用至少一种蛋白A清洗缓冲液清洗所述结合的载体,其中所述蛋白A清洗缓冲液包含约100至约175mM NaCl和约40至约60mM Tris,pH范围在约7-7.5。

[0250] 5.1-4中任一项的方法,其中从所述载体选择性洗脱SDAB分子的步骤包括用至少一种蛋白A洗脱缓冲液洗脱吸附的SDAB分子,其中所述蛋白A洗脱缓冲液包含约5至约50mM NaCl和约5mM至约100mM甘氨酸,pH为4.0或更低。

[0251] 6.1-5中任一项的方法,进一步包括以下的一种或多种:羟基磷灰石色谱、阳离子交换色谱、亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱、金属亲和色谱、渗滤、超滤、病毒失活或除病毒过滤。

[0252] 7.1-6中任一项的方法,进一步包括将所述混合物与羟基磷灰石树脂接触和从所述羟基磷灰石树脂选择性洗脱所述SDAB分子。

[0253] 8.6的方法,进一步包括将所述混合物与阳离子交换柱接触和从该柱选择性洗脱所述SDAB分子。

[0254] 9.1-8中任一项的方法,其中所述SDAB分子是在哺乳动物宿主细胞中产生的重组蛋白。

[0255] 10.9的方法,其中所述哺乳动物宿主细胞是CHO细胞。

[0256] 11.1-8中任一项的方法,其中所述混合物中的污染物包含一种或多种高分子量蛋白聚集体、宿主细胞蛋白、DNA或浸析的蛋白A。

[0257] 12.1-11中任一项的方法,其中将所述SDAB分子纯化至至少90%以上的纯度。

[0258] 13.1-12中任一项的方法,其中所述基于蛋白A的载体包含固定化重组或分离的全长葡萄球菌蛋白A (SpA) 或其功能性变体的树脂。

[0259] 14.13的方法,其中所述全长SpA包含图4A中所示的SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与其至少90%相同的氨基酸序列。

[0260] 15.13的方法,其中所述SpA的功能性变体至少包含SpA的结构域B,或结构域B的变体,其具有一个或多个取代的天冬酰胺残基。

[0261] 16.15的方法,其中所述SpA的功能性变体包含图4B中所示的SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与其至少90%相同的氨基酸序列。

[0262] 17.1或2的方法,其中将所述混合物与基于阳离子交换的载体接触。

[0263] 18.17的方法,其中所述方法包括:

[0264] 将所述含有SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与阳离子交换 (CEX) 树脂接触,其中所述CEX树脂显示至少约40g/L的容量;

[0265] 允许所述SDAB分子流过所述载体,用至少一种阳离子交换清洗缓冲液清洗所述载体;和

[0266] 用洗脱缓冲液洗脱所述SDAB分子。

[0267] 19.17或18的方法,其中所述用于装载柱的条件介质 (CM) 的电导率为约12-9mS/cm并且将装载条件的pH调节至小于或等于约4.5。

[0268] 20.17-19中任一项的方法,其中所述洗脱缓冲液等于或小于约50mM氯化钠,并且具有约5.5-7.2的pH。

[0269] 21.17-20中任一项的方法,进一步包括将所述混合物与羟基磷灰石树脂接触并从所述羟基磷灰石树脂洗脱所述SDAB分子。

[0270] 22.21的方法,用平衡缓冲液预处理所述混合物并允许所述经预处理的混合物流过羟基磷灰石树脂。

[0271] 23.22的方法,其中将所述混合物与羟基磷灰石树脂接触的步骤和所述洗脱步骤是在包含约1-20mM磷酸钠和约0.2-2.5M氯化钠、pH为约6.4-7.6的缓冲溶液中进行的。

[0272] 24.22的方法,其中所述平衡缓冲液包含约1-20mM的磷酸钠,约0.01-2.0M氯化钠、

约0-200mM精氨酸、约0-200mM HEPES, pH为约6.2-8.0。

[0273] 25.1-24中任一项的方法,其中所述纯化的SDAB分子含有少于10%高分子量聚集体。

[0274] 26.一种从含有包含一个或多个纳米抗体分子的单域抗原结合性(SDAB)分子和一种或多种污染物的混合物分离或纯化所述SDAB分子的方法,包括:

[0275] 将所述混合物与基于蛋白A的载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述基于蛋白A的载体的条件下接触;

[0276] 去除一种或多种污染物;

[0277] 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,由此获得洗脱的SDAB分子预备物;

[0278] 将洗脱的SDAB分子预备物与羟基磷灰石树脂接触;和

[0279] 从所述羟基磷灰石树脂选择性洗脱所述SDAB分子,

[0280] 其中所述SDAB分子没有互补性抗体可变域或免疫球蛋白Fc区。

[0281] 27.一种从含有包含一个或多个纳米抗体分子的单域抗原结合性(SDAB)分子和一种或多种污染物的混合物分离或纯化所述SDAB分子的方法,包括:

[0282] 将所述混合物与基于蛋白A的载体在允许所述SDAB分子结合或至所述基于蛋白A的载体的条件下接触;

[0283] 去除一种或多种污染物;

[0284] 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,由此获得洗脱的SDAB分子预备物;

[0285] 用平衡缓冲液预处理所述洗脱的SDAB分子预备物;和

[0286] 允许所述经预处理的混合物流过羟基磷灰石树脂,

[0287] 其中所述SDAB分子没有互补性抗体可变域或免疫球蛋白Fc区。

[0288] 28.一种从含有包含一个或多个纳米分子的单域抗原结合性(SDAB)分子和一种或多种污染物的混合物分离或纯化所述SDAB分子的方法,包括:

[0289] 将所述含有SDAB分子和一种或多种污染物的混合物与阳离子交换载体接触,允许所述SDAB分子流过所述载体,用至少一种阳离子交换清洗缓冲液清洗所述载体;

[0290] 去除一种或多种污染物;

[0291] 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,由此获得洗脱的SDAB分子预备物;

[0292] 将洗脱的SDAB分子预备物与羟基磷灰石树脂接触;和

[0293] 从所述羟基磷灰石树脂选择性洗脱所述SDAB分子,

[0294] 其中所述SDAB分子没有互补性抗体可变域或免疫球蛋白Fc区。

[0295] 29.1-28中任一项的方法,其中所述SDAB分子是单链多肽,其包含至少一个免疫球蛋白可变域。

[0296] 30.29的方法,其中所述SDAB分子包含至少一个来自天然不含轻链的抗体的免疫球蛋白可变域。

[0297] 31.30的方法,其中所述抗体是骆驼科动物抗体。

[0298] 32.29的方法,其中所述SDAB分子是单价、二价或三价分子。

[0299] 33.29的方法,其中所述SDAB分子是单一特异性、双重特异性或三重特异性分子。

[0300] 34.1-28中任一项的方法,其中所述SDAB分子包含一个或多个重组的、CDR移植的、人源化的、骆驼源化的、去免疫化的、和/或通过噬菌体展示体外选择的纳米抗体分子。

[0301] 35.1-34中任一项的方法,其中所述SDAB分子结合至选自以下的一种或多种靶抗原:细胞因子、生长因子和血清蛋白。

[0302] 36.35的方法,其中所述SDAB分子结合肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

[0303] 37.35的方法,其中所述SDAB分子结合人血清白蛋白(HSA)。

[0304] 38.1-34中任一项的方法,其中所述SDAB分子是三价、双重特异性分子,其由两个结合TNF α 的骆驼科动物可变区和一个结合HAS的骆驼科动物可变区的单链多肽融合物构成。

[0305] 39.38的方法,其中所述SDAB分子从N端到C端按以下顺序排列:抗TNF α SDAB分子-抗HSASDAB分子-抗TNF α SDAB分子。

[0306] 40.1-34中任一项的方法,其中所述SDAB分子包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与其至少90%相同的氨基酸序列。

[0307] 41.1-34中任一项的方法,其中所述SDAB分子包含至少一个如下SDAB分子,其结合TNF α 并包含具有如下氨基酸序列的三个CDR:SEQ ID NO:2(DYWMY(CDR1))、SEQ ID NO:3(EINTNGLITKYPDSVKG(CDR2))和SEQ ID NO:4(SPSGFN(CDR3)),或具有与所述CDR之一因少于2个保守氨基酸取代而不同的CDR。

[0308] 42.1-34中任一项的方法,其中所述SDAB分子包含至少一个如下SDAB分子,其结合TNF α 并包含具有下列氨基酸序列的可变区:来自图2所示的SEQ ID NO:1的约氨基酸1-115的氨基酸序列、或与图2中所示SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0309] 43.41的方法,其中所述SDAB分子包含至少一个如下SDAB分子,其结合HSA并且包含具有如下氨基酸序列的三个CDR:SFGMS(CDR1;SEQ ID NO:5)、SISGSGSDTLYADSVKG(CDR2;SEQ ID NO:6)和/或GGSLSR(CDR3;SEQ ID NO:7),或具有与所述CDR之一因少于2个保守氨基酸取代而不同的CDR。

[0310] 44.43的方法,其中所述SDAB分子包含至少一个如下SDAB分子,其结合HSA并且包含具有下列氨基酸序列的可变区:来自图2所示的SEQ ID NO:1的约氨基酸125-239的氨基酸序列、或与图2中所示SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0311] 46.1-44中任一项的方法,其中两个或更多个SDAB分子与连接基团融合,所述连接基团包含至少5、7、8、9、10、12或15个甘氨酸和丝氨酸残基。

[0312] 47.46的方法,其中两个或更多个SDAB分子与连接基团融合,所述连接基团包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列((Gly)₄-Ser-(Gly)₃-Ser)。

[0313] 48.一种提供包含一个或多个纳米抗体分子的重组单域抗原结合性(SDAB)分子的方法或工艺,包括:

[0314] 提供包含编码所述重组SDAB分子的核酸的哺乳动物宿主细胞;

[0315] 将所述宿主细胞保持在表达所述重组SDAB分子的条件;

[0316] 获得所述重组SDAB分子和一种或多种污染物的混合物;

[0317] 使用基于蛋白A或基于阳离子交换的色谱从所述混合物纯化或分离所述重组SDAB分子,

[0318] 其中所述纯化或分离步骤包括将所述混合物与载体在允许所述SDAB分子结合或吸附至所述载体的条件下接触;

[0319] 去除一种或多种污染物;和

- [0320] 从所述载体选择性洗脱所述SDAB分子,由此获得洗脱的SDAB分子预备物,
- [0321] 其中所述SDAB分子没有互补性抗体可变域或免疫球蛋白Fc区。
- [0322] 49.48的方法,进一步包括将所述洗脱的SDAB分子预备物进行羟基磷灰石色谱、亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱、金属亲和色谱、渗滤、超滤或除病毒过滤中的一种或多种。
- [0323] 50.48或49的方法,进一步包括制备所述重组SDAB分子的制剂作为药物组合物。
- [0324] 51.1-50中任一项的方法,进一步包括将所述洗脱的SDAB分子浓缩至预先选择的目标体积。
- [0325] 52.51的方法,其中所述浓缩步骤通过在组氨酸缓冲液或Tris缓冲液存在下进行超滤/渗滤步骤来实施。
- [0326] 53.1-51中任一项的方法,其中将所述SDAB分子浓缩至至少约80g/L至350g/L。
- [0327] 54.一种通过1-53中任一项的方法纯化的SDAB分子。
- [0328] 55.一种包含51的SDAB分子的药物组合物。
- [0329] 56.一种治疗或预防受试者中的疾病的方法,包括向所述受试者以有效治疗或预防所述疾病的量给药54的SDAB分子。

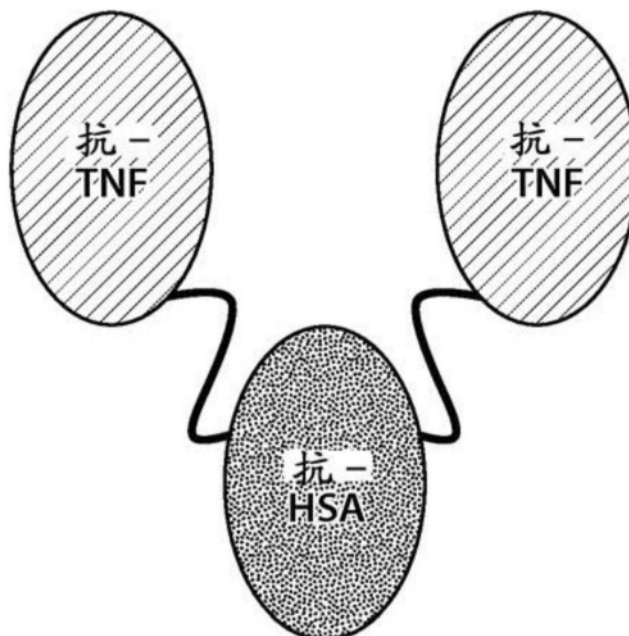


图1

-19 MGWSCIILFLVATATGVHS -1

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY 60

61 PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSSGGGGS 120

121 GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIISGSGS 180

181 DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSG 240

241 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEIN 300

301 TNGLITKYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVT 360

361 VSS (SEQ ID NO:1)

图2

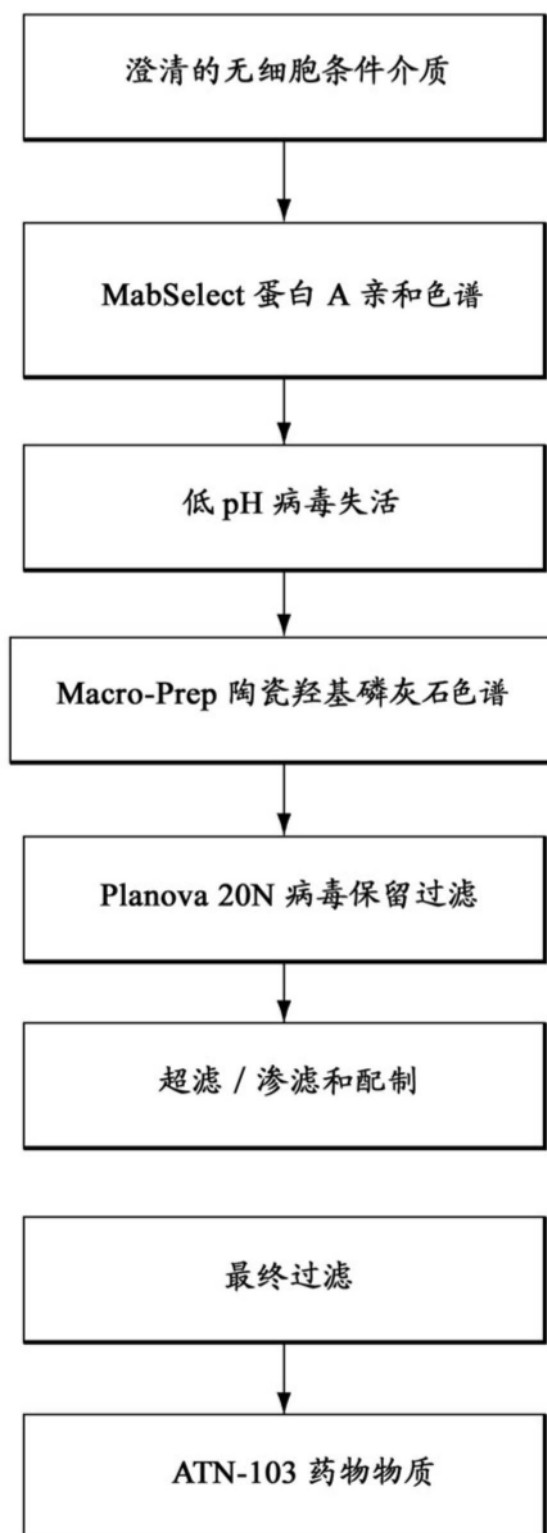


图3

1 aqhdeaqgna fyqvlnmpnl nadqrngfiq slkddpsqsa nvlgeaqkln dsqapkadaq
61 qnkfnkdqqs afyeilnmpn lneeqrngfi qslkddpsqs tnlgeakk1 nesqapkadn
121 nfnkeqqnaf yeilnmpnl eeqrngfiqs lkddpsqsan llaeakk1ne sqapkadnkf
181 nkeqqnafye ilhlplnee qrngfiqslk ddpsqsanll aeakk1ndaq apkadnkfnk
241 eqqnafyeil hlpnlteeqr ngfiqslkdd psvskeilae akk1ndaqap keednnkpgk
301 edgnkpgked gnkpgkednk kpgkedgnkp gkednnkpgk edgnkpgked gnkpgkedgn
361 kpgkedgnkp gkedgngvhv vkpgdtvndi akangttadk iaadnkladk nmikpgqelv
421 vdkkqpanha dankaqalpe t (SEQ ID NO:11)

图4A

1 vdnkfnkeqq nafyeilhlp nlneeqrnaf iqslkddpsq sanllaeakk lndaqapk
(SEQ ID NO:12)

图4B