



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115551877 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202180023593.1

(22) 申请日 2021.03.26

(30) 优先权数据

2020900948 2020.03.27 AU

63/200,752 2021.03.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/000171 2021.03.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/191684 EN 2021.09.30

(71) 申请人 哈马洛吉克斯有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 R·邓恩 A·阿拉哈里

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.

C07K 1/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书3页 说明书18页

序列表5页

(54) 发明名称

组合物和方法

(57) 摘要

本公开文本涉及一种从不期望的组分纯化结合蛋白的方法。此类结合蛋白可以用于治疗障碍如癌症。

1. 一种用于从包含结合不与重链缔合的游离轻链的结合蛋白的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养物纯化所述结合蛋白的方法, 所述方法包括:

- 使来自所述CHO细胞培养物的所述结合蛋白与中性pH的蛋白A树脂结合;
- 将所述蛋白A树脂用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤, 以从所述组合物洗涤出不与重链缔合的游离轻链; 以及
- 将与所述蛋白A树脂结合的结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。

2. 一种从不与重链缔合的游离轻链纯化结合蛋白的方法, 所述方法包括:

- 将包含所述结合蛋白和与重链缔合的游离轻链的组合物加载到中性pH的平衡亲和色谱柱上, 以使所述组合物中的结合蛋白与所述亲和色谱柱结合;
- 将所述亲和色谱柱用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤, 以从所述组合物洗涤出不与重链缔合的游离轻链; 以及
- 将与所述亲和色谱柱结合的结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中所述结合蛋白包括抗体。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中所述结合蛋白是抗体。

5. 根据权利要求3或权利要求4所述的方法, 其中所述抗体是抗 κ 骨髓瘤抗原 (KMA) 抗体。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中相比于不与重链缔合的游离轻链, 所述抗体优先结合KMA。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中所述碱性洗涤缓冲液的pH为9至11。

8. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述碱性洗涤缓冲液的pH为9.5至10.5。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中所述碱性洗涤缓冲液包含0.1M至0.2M碳酸钠。

10. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述碱性洗涤缓冲液进一步包含1M氯化钠。

11. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中将所述亲和色谱柱洗涤以洗涤出与重链缔合的游离轻链包括将所述亲和色谱柱用碱性洗涤缓冲液洗涤两次。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中在所述第一次洗涤时, 所述碱性洗涤缓冲液包含0.2M氯化钠, 并且在所述第二次洗涤时, 所述碱性洗涤缓冲液包含0.1M氯化钠。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述碱性洗涤缓冲液的pH相同。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法, 其中洗涤所述亲和色谱柱包括用酸性洗涤缓冲液洗涤。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述酸性洗涤缓冲液的pH为5.5至6.5。

16. 根据权利要求14或15所述的方法, 其中所述酸性洗涤缓冲液包含约35mM磷酸钠。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法, 其中所述洗脱缓冲液是酸性的。

18. 根据权利要求14至16中任一项所述的方法, 其中所述洗脱缓冲液的pH低于所述酸性洗涤缓冲液的pH。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中所述洗脱缓冲液的pH为2.5至3.5。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中所述洗脱缓冲液包含约10mM磷酸钠。

21. 根据权利要求2至20中任一项所述的方法, 其中所述亲和色谱柱是蛋白A色谱柱。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括病毒灭活步骤。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括病毒过滤步骤。

24. 根据权利要求2至23中任一项所述的方法, 其中包含所述结合蛋白和与重链缔合的游离轻链的所述组合物是从表达所述结合蛋白的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞培养物获得的细胞培养液。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中对所述经洗脱的结合蛋白进行阳离子交换色谱法以去除任何潜在的高分子量种类。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中所述不与重链缔合的游离轻链是 κ 轻链。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中所述不与重链缔合的游离轻链是 κ 轻链二聚体。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述不与重链缔合的游离轻链的分子量在22kD与100kD之间。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括将所述经洗脱的结合蛋白配制成药物组合物或诊断组合物的步骤。

30. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含通过根据权利要求1至29中任一项所述的方法产生的结合蛋白。

31. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法或根据权利要求30所述的药物组合物, 其中所述结合蛋白包含:

-SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区, 或与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的 κ 骨髓瘤抗原(KMA)表位。

32. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的, 相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的抗体, 所述经洗脱的结合蛋白是至少75%未结合的抗体。

33. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的, 相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白, 所述经洗脱的结合蛋白是至少85%未结合的结合蛋白。

34. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的, 相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白, 所述经洗脱的结合蛋白是至少90%未结合的结合蛋白。

35. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的, 相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白, 所述经洗脱的结合蛋白是在85%与95%之间未结合的结合蛋白。

36. 一种包含抗KMA结合蛋白的组合物, 其中所述组合物中少于20%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。

37. 根据权利要求36所述的组合物, 其中所述组合物中少于15%、少于10%、少于6%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的抗体。

38. 根据权利要求36或37所述的组合物,其中所述结合蛋白包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区,或与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的组合物,其中所述结合蛋白是由CHO细胞产生的。

40. 根据权利要求36至39中任一项所述的组合物,其中所述结合蛋白包括抗体。

41. 根据权利要求39至43中任一项所述的组合物,其中所述结合蛋白是抗体。

组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开文本涉及一种从不期望的组分纯化结合蛋白的方法。此类结合蛋白可以可用于治疗障碍如癌症。

背景技术

[0002] 大规模蛋白质纯化的经济性很重要,特别是对于治疗性结合蛋白,因为这些分子在市场上的治疗性生物制品中占很大比例。除了其治疗价值之外,结合蛋白(如单克隆抗体)例如也是诊断领域中的重要工具。用于生物制药应用的结合蛋白的产生通常涉及使用已知会产生不期望的组分的细胞培养。虽然在纯化结合蛋白方面、特别是关于亲和色谱法已经取得了实质性的进展,但此类方法可能不是特别适于纯化所期望的结合蛋白的单体。因此,需要改进的纯化结合蛋白的方法。

发明内容

[0003] 使用重组DNA技术产生结合蛋白可能常常会导致细胞培养液中不期望的组分的积累。这些不期望的组分包括结合蛋白的高分子量聚集体以及所述结合蛋白与不与重链缔合的游离轻链的复合物。当中国仓鼠卵巢(CHO)细胞被用来产生目的结合蛋白时,这个问题可能特别明显,因为CHO细胞会自然分泌出不与重链缔合的游离轻链。诸位发明人已经令人惊讶地鉴定出一种通过将碱性洗涤步骤并入所述蛋白质纯化过程中而从不与重链缔合的游离轻链纯化结合蛋白的方法。所述方法允许回收较高产率的未结合的结合蛋白,从而提供较高纯度的结合蛋白组合物。此类组合物在治疗上可能更加有效。因此,在第一方面,本公开文本涉及一种从不与重链缔合的游离轻链纯化结合蛋白的方法,所述方法包括:将包含所述结合蛋白和与重链缔合的游离轻链的组合物加载到中性pH的平衡亲和色谱柱上,以使所述组合物中的结合蛋白与所述亲和色谱柱结合;将所述亲和色谱柱用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤,以从所述组合物洗涤出不与重链缔合的游离轻链;以及将与所述亲和色谱柱结合的结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。

[0004] 在一个例子中,所述组合物是从被基因修饰成表达结合蛋白的CHO细胞获得的细胞培养液或源自其的组合物。

[0005] 在另一个例子中,本公开文本涵盖一种用于从包含结合不与重链缔合的游离轻链的结合蛋白的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物纯化所述结合蛋白的方法,所述方法包括:

[0006] -使来自所述CHO细胞培养物的所述结合蛋白与中性pH的蛋白A树脂结合;

[0007] -将所述蛋白A树脂用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤,以从所述组合物洗涤出不与重链缔合的游离轻链;以及

[0008] -将与所述蛋白A树脂结合的结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。

[0009] 在一个例子中,所述结合蛋白包括抗体。在另一个例子中,所述结合蛋白是抗体。在另一个例子中,所述抗体是抗 κ 骨髓瘤抗原(KMA)抗体。在另一个例子中,相比于不与重链缔合的游离轻链,所述抗体优先结合KMA。

[0010] 在一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液的pH为9至11。在另一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液的pH为9.5至10.5。在另一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液包含0.1M至0.2M碳酸钠。在另一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液进一步包含1M氯化钠。

[0011] 在一个例子中,将所述亲和色谱柱洗涤以洗涤出不与重链缔合的游离轻链包括将所述亲和色谱柱用碱性洗涤缓冲液洗涤两次。在此例子中,在所述第一次洗涤时,所述碱性洗涤缓冲液可以包含0.2M氯化钠,并且在所述第二次洗涤时,所述碱性洗涤缓冲液可以包含0.1M氯化钠。在一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液的pH相同。

[0012] 在另一个例子中,洗涤所述亲和色谱柱进一步包括用酸性洗涤缓冲液洗涤。在一个例子中,所述酸性洗涤缓冲液的pH为5.5至6.5。在一个例子中,所述酸性洗涤缓冲液包含约35mM磷酸钠。

[0013] 在一个例子中,所述洗脱缓冲液是酸性的。在一个例子中,所述洗脱缓冲液的pH低于所述酸性洗涤缓冲液的pH。在一个例子中,所述洗脱缓冲液的pH为2.5至3.5。在一个例子中,所述洗脱缓冲液包含约10mM磷酸钠。

[0014] 在一个例子中,所述亲和色谱柱是蛋白A色谱柱。

[0015] 在一个例子中,所述方法进一步包括病毒灭活步骤。在另一个例子中,所述方法进一步包括病毒过滤步骤。在另一个例子中,所述方法进一步包括超滤步骤。

[0016] 在另一个例子中,包含所述结合蛋白和与重链缔合的游离轻链的所述组合物是从表达所述结合蛋白的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞培养物获得的细胞培养液。在一个例子中,所述细胞培养液已被澄清。

[0017] 在另一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链是 κ 轻链。在一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链的分子量为约22.5kD至25kD。在另一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链是 κ 轻链二聚体。在此例子中,所述不与重链缔合的游离轻链二聚体的分子量为约45kD至50kD。在一个例子中,从本文所公开的组合物纯化的所述不与重链缔合的游离轻链或其复合物的分子量在20kD与100kD之间。在另一个例子中,所述分子量在22kD与80kD之间。在另一个例子中,所述分子量在22kD与50kD之间。

[0018] 在一个例子中,可能期望的是通过去除高分子量聚集体来进一步纯化本公开文本的组合物。因此,在一个例子中,本公开文本的方法还可以包括阳离子交换色谱法步骤。在一个例子中,对经洗脱的结合蛋白进行阳离子交换色谱法以去除任何潜在的高分子量种类。在另一个例子中,所述方法进一步包括将所述经洗脱的结合蛋白配制成药物组合物或诊断组合物的步骤。

[0019] 在一个例子中,本公开文本涵盖一种药物或诊断组合物,所述药物或诊断组合物包含根据本文所公开的方法纯化的结合蛋白。在一个例子中,所述药物组合物包含结合蛋白,所述结合蛋白包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区,或与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的 κ 骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0020] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的抗体,所述经洗脱的结合蛋白是至少75%未结合的抗体。在另一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,所述经洗脱的结合蛋白是至少85%未结合的结合蛋白。在另一个例子中,如通

过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,所述经洗脱的结合蛋白是至少90%未结合的结合蛋白。在另一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,所述经洗脱的结合蛋白是在85%与95%之间的未结合的结合蛋白。

[0021] 在另一方面,本公开文本涵盖一种包含抗KMA结合蛋白的组合物,其中所述组合物中少于20%的所述结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。在一个例子中,所述组合物中少于15%、少于10%、少于6%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的抗体。在一个例子中,所述结合蛋白包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区,或与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。在一个例子中,所述结合蛋白是由CHO细胞产生的。在一个例子中,所述结合蛋白包括抗体。在一个例子中,所述结合蛋白是抗体。

[0022] 除非另有说明,否则本文中的任何例子应在细节上作必要修改后适用于任何其他例子。

[0023] 本发明的范围不受本文所述的具体例子的限制,这些例子仅旨在用于举例说明的目的。如本文所述,功能等同的产品、组合物和方法显然在本发明的范围内。

[0024] 在整个本说明书中,除非另外确切说明或上下文另有要求,否则提及单一步骤、物质组合物、一组步骤或一组物质组合物应视为包括单数和复数的(即一个或多个)那些步骤、物质组合物、一组步骤或一组物质组合物。

[0025] 下面通过以下非限制性例子并参考附图来描述本发明。

[0026] 序列表的说明

[0027] SEQ ID NO:1-κMab可变重链(V_H)的氨基酸序列。

[0028] SEQ ID NO:2-κMab表位氨基酸序列。

[0029] SEQ ID NO:3-κMab可变轻链(V_L)的氨基酸序列。

[0030] SEQ ID NO:4-κMab V_H CDR1的氨基酸序列。

[0031] SEQ ID NO:5-κMab V_H CDR2的氨基酸序列。

[0032] SEQ ID NO:6-κMab V_H CDR3的氨基酸序列。

[0033] SEQ ID NO:7-κMab V_L CDR1的氨基酸序列。

[0034] SEQ ID NO:8-κMab V_L CDR2的氨基酸序列。

[0035] SEQ ID NO:9-κMab V_L CDR3的氨基酸序列。

[0036] SEQ ID NO:10-κMab表位2的氨基酸序列(改进的结合)。

具体实施方式

[0037] 一般技术与选定定义

[0038] 除非另有特别定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语应均具有与本领域(例如,分子生物学、抗体制造、生物化学、肿瘤学和蛋白质纯化)的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0039] 除非另有指示,否则本公开文本所用的分子和统计技术是本领域技术人员所熟知的标准程序。在以下来源中的文献中的各处描述并解释了此类技术:例如J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984); J.Sambrook等

人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T.A. Brown (编辑), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1卷和第2卷, IRL Press (1991); D.M. Glover和B.D. Hames (编辑), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1卷-第4卷, IRL Press (1995和1996); 和F.M. Ausubel等人 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括目前为止的所有更新); Ed Harlow和David Lane (编辑) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988); 和J.E. Coligan等人 (编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (包括目前为止的所有更新)。

[0040] 短语“抗KMA结合蛋白”在本公开文本的上下文中用来指结合或特异性结合 κ 骨髓瘤抗原的结合蛋白。 κ 骨髓瘤抗原 (KMA) 是对 κ 骨髓瘤细胞具有选择性的膜结合轻链 (Boux, HA. 等人 (1983) J Exp Med. 158:1769)。

[0041] 在一个例子中, 抗KMA结合蛋白能够结合携带KMA的细胞。在另一个例子中, 抗KMA结合蛋白能够杀死携带KMA的细胞。在一个例子中, 本公开文本所涵盖的抗KMA结合蛋白不结合完整的免疫球蛋白。换言之, 示例性抗KMA结合蛋白不识别与Ig重链 (如在完整的Ig分子中) 缔合的 κ 轻链。

[0042] 如本文所使用, 关于本文所述的结合蛋白和KMA的相互作用的术语“结合”意指所述相互作用取决于KMA上特定结构 (例如, 抗原决定簇或表位) 的存在。例如, 结合蛋白识别并结合特定的抗原结构, 而不是普遍地结合抗原。例如, 如果结合蛋白与表位“A”结合, 则在含有标记的“A”和所述结合蛋白的反应中, 含有表位“A” (或游离的未标记的“A”) 的分子的存在将减少与所述结合蛋白结合的标记的“A”的量。在一个例子中, 相比于游离 κ 轻链 (例如血清抗原), 本文所公开的KMA结合蛋白优先结合KMA (即, 细胞表面抗原)。相比于游离 κ 轻链优先结合KMA的本文所公开的结合蛋白与KMA的反应或缔合比所述结合蛋白与游离轻链的反应和缔合更频繁、更快速、且持续时间更长和/或亲和力更大。

[0043] 如本文所使用, 术语“特异性结合”应意指结合蛋白与KMA之间的结合相互作用取决于通过结合蛋白对KMA的检测。因此, 结合蛋白即使在存在于其他分子、细胞或生物体的混合物中时也特异性结合或识别KMA。在一个例子中, 结合蛋白与KMA的反应或缔合比所述结合蛋白与可替代抗原或细胞的反应或缔合更频繁、更快速、且持续时间更长和/或亲和力更大。在一个例子中, 相比于游离轻链, 特异性结合KMA的本文所公开的结合蛋白也可以优先结合或识别KMA。通过阅读此定义还应理解: 例如, 与KMA特异性结合的结合蛋白可以或可以不与第二抗原特异性结合。因此, “特异性结合”不一定要求排他性结合或与另一种抗原的无法检测的结合。术语“特异性结合”在本文中可以与“选择性结合”互换使用。通常, 本文对结合的提及意指特异性结合, 并且每个术语应理解为对另一个术语提供明确的支持。用于确定特异性结合的方法对技术人员来说是清楚的。例如, 使本公开文本的结合蛋白与KMA或可替代抗原接触。然后测定结合蛋白与KMA或可替代抗原的结合, 并且如上所述结合KMA、而不结合可替代抗原的结合蛋白被认为是与KMA特异性结合。可以使用类似的方法来鉴定优先结合。在此例子中, 所述可替代抗原将是游离轻链。

[0044] 术语“免疫球蛋白”应被理解为包括本公开文本的结合蛋白 (如抗KMA结合蛋白), 其包含免疫球蛋白结构域。示例性免疫球蛋白是抗体。术语“免疫球蛋白”所涵盖的另外的蛋白质包括结构域抗体、骆驼科抗体和来自软骨鱼类的抗体 (即, 免疫球蛋白新抗原受体

(IgNAR))。通常,骆驼科抗体和IgNAR包含 V_H ,但缺乏 V_L ,且通常被称为重链免疫球蛋白。其他“免疫球蛋白”包括T细胞受体。

[0045] 术语“结合蛋白”在本公开文本的上下文中用来指与特定抗原免疫反应的人或人源化免疫球蛋白分子并且包括多克隆抗体和单克隆抗体。术语“结合蛋白”还包括抗体的抗原结合形式,包括具有抗原结合能力的片段(例如,Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv和rIgG,如Pierce Catalogue and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.);Kuby,J.,Immunology,第3版,W.H.Freeman&Co.,New York(1998)中所披露的)。所述术语还用于指重组单链Fv片段(scFv)以及其二价形式(di-scFv)和三价形式(tri-scFv)。术语“抗体”还包括双抗体、三抗体和四抗体。在一个例子中,本公开文本的结合蛋白结合不与重链缔合的游离轻链。在另一个例子中,结合蛋白结合不与重链缔合的游离 κ 轻链。

[0046] 如本文所使用的术语“结合蛋白”涵盖包括抗体(如双特异性分子)的结合蛋白。例如,结合蛋白可以包括上文提及的免疫球蛋白(如抗体)和上文提及的片段(如Fv)。

[0047] 抗体的“抗原结合片段”包括完整抗体的一个或多个可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段;双抗体;线性抗体;和由抗体片段形成的单链抗体分子。例如,术语抗原结合片段可以用于指重组单链Fv片段(scFv)以及其二价形式(di-scFv)和三价形式(tri-scFv)。在一个例子中,所述结合蛋白是抗原结合片段。此类片段可以经由本领域已知的各种方法来产生。

[0048] 术语“互补决定区”或“CDR”在本公开文本的上下文中用来指抗体中识别并结合特定抗原的两个可变链(重链和轻链)的一部分。CDR是可变链的最多变的部分并且为结合蛋白提供了其特异性。通常,在可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)中的每一个上有三个CDR。

[0049] 如本文所使用,“可变区”是指如本文所定义的抗体的重链和/或轻链的如下部分:所述部分与抗原特异性结合并且例如包含CDR即CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列以及框架区(FR)。例如,可变区包含三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和任选地FR4)以及三个CDR。 V_H 是指重链的可变区。 V_L 是指轻链的可变区。

[0050] 在一个例子中,分配给CDR和FR的氨基酸位置是根据Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987和1991(在本文中也被称为“Kabat编号系统”或“Kabat”)定义的。

[0051] 包括修正或用于可变结构域的替代编号系统的其他约定包括IMGT(Lefranc等人(2003),Dev Comp Immunol 27:55-77)、Chothia(Chothia C,Lesk AM(1987),J Mol Biol 196:901-917;Chothia等人(1989),Nature 342:877-883)和AHO(Honegger A,Plückthun A(2001)J Mol Biol 309:657-670)。为了方便起见,本公开文本的结合蛋白的例子也可以根据IMGT进行标记。

[0052] 术语“抗体重链”在本文中用于指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中的较大者。如本文所使用,“抗体轻链”是指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中的较小者。 κ 和 λ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0053] 术语如“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”在本公开文本的上下文中可互换使用,并且是指其中已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和源自其的后代,不考虑传代次数。后代的核

酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。本文包括如在初始转化细胞中所筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体后代。在一个例子中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0054] 关于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在用以实现最大百分比序列同一性并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分而比对序列和引入缺口(如果需要)后,候选序列中与所述参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于测定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以从事本领域的技术人员的技术范围内的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0055] “缓冲液”是指这样的物质,通过其在溶液中的存在增加了用以引起pH的单位变化所必须添加的酸或碱的量。缓冲溶液通过其酸碱共轭组分的作用抵抗pH的变化。用于与生物试剂一起使用的缓冲溶液通常能够维持恒定浓度的氢离子,使得所述溶液的pH处于生理范围内。传统的缓冲液组分包括但不限于有机盐 and 无机盐、有机酸和无机酸以及有机碱和无机碱。用于在纯化生物分子(例如,抗体)中使用的示例性缓冲液包括两性离子或“Good”缓冲液,参见例如Good等人(1966) *Biochemistry* 5:467以及Good and Izawa (1972) *Methods Enzymol.* 24:62。示例性缓冲液包括但不限于TES、MES、PIPES、HEPES、MOPS、MOPSO、TRICINE和BICINE。

[0056] 术语“洗涤缓冲液”在本文中用于指用于从本文所公开的结合蛋白所结合的给定材料(例如,组合物或柱或树脂)带走杂质(如不与重链缔合的游离轻链)的溶液。

[0057] 术语“碱性”在本公开文本的上下文中用于指具有碱性pH的缓冲液。例如,所述术语在关于洗涤缓冲液使用时可以是指具有碱性pH的洗涤缓冲液。在一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少2.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少3的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少3.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少4的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少4.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少4.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性至少5.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性2.5至5.5的pH的洗涤缓冲液。在另一个例子中,术语“碱性”用于指具有高于中性3至5的pH的洗涤缓冲液。在一个例子中,碱性洗涤缓冲液的pH为9至11。在一个例子中,碱性洗涤缓冲液的pH为9.5至10.5。在一个例子中,碱性洗涤缓冲液的pH为至少9。在一个例子中,碱性洗涤缓冲液的pH为至少9.5。

[0058] 相比之下,术语“酸性”在本公开文本的上下文中用于指具有酸性pH的缓冲液。例如,所述术语在关于洗涤缓冲液使用时可以是指具有酸性pH的洗涤缓冲液。本文所公开的酸性缓冲液的pH小于7。在一个例子中,酸性洗涤缓冲液的pH为5至6.5。在一个例子中,酸性洗涤缓冲液的pH为5.5至6.5。在一个例子中,酸性洗涤缓冲液的pH小于或等于6.5。本公开文本的其他缓冲液(如洗脱缓冲液)可以比洗涤缓冲液更具酸性。例如,本文所公开的洗脱缓冲液的pH可以小于4。在另一个例子中,洗脱缓冲液的pH可以小于或等于3.5。在另一个例

子中,洗脱缓冲液的pH可以为2.5至3.5。

[0059] 如本文所使用,术语“中性pH”是指pH为7。

[0060] 如本文所使用,术语“亲和色谱柱”是指包括通过其进行亲和色谱法的树脂的柱。在一个例子中,所述亲和色谱法包括使本文所公开的组合物经受包括适合的亲和色谱支持物的柱。此类色谱支持物的非限制性例子包括但不限于蛋白A树脂、蛋白G树脂、包含针对其召集目的结合蛋白的抗原的亲和支持物、以及包含Fc结合蛋白的亲和支持物。例如,亲和色谱柱可以包括蛋白A色谱树脂、蛋白L色谱树脂或蛋白G色谱树脂。在一个例子中,所述亲和色谱柱包括蛋白A色谱树脂。蛋白A色谱树脂的可商购获得的例子包括MabSelect Xtra和MabSelect SuRe。

[0061] 如本文所使用,术语“病毒灭活步骤”是指病毒仍存在于组合物中、但使其永久无活力的过程。例如,病毒灭活可以通过将溶液调节至低pH来实现。

[0062] 如本文所用,术语“低pH”应被理解为意指2至4的pH、或3.4至3.6的pH、或3.5的pH。

[0063] 如本文所用,术语“病毒过滤步骤”是指从组合物清除病毒的过程。例如,病毒过滤可以通过使组合物经过过滤器(如纳米过滤器(例如,Planova 20N))来实现。

[0064] 如本文所使用,术语“高分子量形式”或“多种高分子量形式”是指呈两个或更多个结合蛋白单体形式的结合蛋白。例如,结合蛋白(例如抗KMA结合蛋白)的高分子量形式是二聚体、或三聚体或四聚体。

[0065] 如本文所使用,术语“宿主细胞”是指任何能够表达本文所公开的重组结合蛋白的细胞,包括细菌细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。例如,哺乳动物细胞可以是HEK293细胞或中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。在一个例子中,所述宿主细胞是CHO细胞。例如,宿主细胞可以是表达本文所公开的结合蛋白的经基因修饰的宿主细胞。因此,在一个例子中,本公开文本的方法可以用于从CHO细胞培养物的培养液或源自其的组合物纯化本文所公开的结合蛋白。

[0066] 如本文所使用,术语“发酵”是指使含有编码结合蛋白的多核苷酸序列的宿主细胞在细胞培养基中进行繁殖以表达所述结合蛋白的过程。最佳发酵条件取决于多个参数,所述多个参数包括但不限于温度范围、曝气水平、进料速率和培养基组成。发酵可以在需氧条件、厌氧条件或微需氧条件下进行。发酵也可以使用例如一个或多个生物反应器在大规模分批培养中进行。

[0067] 如本文所使用,术语“澄清的”或“澄清”是指涉及使用包括任何以下项(单独或组合)的一个或多个步骤去除整个细胞和/或细胞碎片的一个或多个步骤:离心、深度过滤、沉淀、絮凝和/或沉降。澄清通常涉及去除一种或多种杂质并且在涉及捕获结合蛋白的纯化步骤之前进行。例如,澄清可以涉及深度过滤和离心。在一个例子中,本公开文本的组合物是在根据本文所公开的方法进行纯化之前被澄清。

[0068] 如本文所使用,术语“细胞培养液”是指在发酵期间或之后、但在涉及捕获结合蛋白的纯化步骤之前的包含结合蛋白的细胞培养基。在一个例子中,所述细胞培养液已被纯化或部分地纯化以提供包含结合蛋白和与重链缔合的游离轻链的制剂。

[0069] 术语“纯化(purify)”、“纯化(purifying)”或“纯化(purification)”是指从含有结合蛋白和一种或多种杂质的溶液完全地或部分地去除至少一种杂质,由此提高所述溶液中所述结合蛋白的纯度水平。杂质包括DNA、RNA、宿主细胞蛋白(HCP)、内毒素、脂质、以及可

以与由本公开文本的方法得到的(例如通过在纯化过程之前或期间进行的步骤产生的)结合蛋白一起存在的一种或多种添加剂。被纯化的结合蛋白优选是基本上纯的并且期望是基本上均质的(即,不含污染性蛋白等)。在一个例子中,本公开文本的方法从本文所公开的组合物纯化或部分纯化不与重链缔合的游离轻链。在另一个例子中,本公开文本的方法从本文所公开的组合物纯化或部分纯化不与重链缔合的游离轻链和高分子量聚集体。在一个例子中,高分子量聚集体是结合蛋白复合物(如二聚体)。在一个例子中,经纯化的结合蛋白至少60%不含、更优选至少75%不含、且更优选至少90%不含不与重链缔合的游离轻链。在另一个例子中,经纯化的结合蛋白至少60%不含、更优选至少75%不含、且更优选至少90%不含不与重链缔合的游离轻链和所述结合蛋白的高分子量聚集体。在这些例子中,所述不与重链缔合的游离轻链可以是 κ 轻链。在一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链的分子量在22kD与25kD之间。在一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链是 κ 轻链二聚体。在一个例子中,所述不与重链缔合的游离轻链的分子量在45kD与50kD之间。

[0070] 如本文所使用,术语“药物组合物”是指结合蛋白与用于向人递送治疗性蛋白的本领域通常所接受的化合物的配制品。示例性化合物包括其所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0071] 如本文所用,术语“诊断组合物”是指结合蛋白与用于提供呈诊断形式的本文所公开的结合蛋白的本领域通常所接受的化合物的配制品。此类配制品可以在体外或体内使用,并且因此取决于应用,可以相应地用合适的载体、稀释剂和/或赋形剂进行配制。

[0072] 除非上下文另有明确指示,否则如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数的术语和单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“所述”例如任选地包括复数指示物。

[0073] 除非相反地指示,否则如本文所使用,术语“约”是指指定值的 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、更优选 $\pm 1\%$ 。

[0074] 术语“和/或”(例如,“X和/或Y”)应被理解为意指“X和Y”或“X或Y”,且应被视为对这两种含义或任一种含义提供明确的支持。

[0075] 在整个说明书中,词语“包括(comprising)”或变体(如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”)应理解为意指包括所述的要素、整体或步骤,或要素、整体或步骤的组,但是不排除任何其他要素、整体或步骤,或要素、整体或步骤的组。

[0076] 结合蛋白

[0077] 本公开文本中用于产生、纯化、配制或使用的结合蛋白包括但不限于以下公开文本。在一个例子中,所述结合蛋白是重组结合蛋白。在一个例子中,所述结合蛋白是由CHO细胞产生的。

[0078] 在一个例子中,所述结合蛋白可以包括抗体。例如,所述结合蛋白可以是抗体。例如,所述结合蛋白可以是单克隆抗体。在一个例子中,所述结合蛋白是人抗体。在一个例子中,所述抗体是人源化的。在一个例子中,所述抗体是嵌合抗体。

[0079] 在一个例子中,所述结合蛋白是抗KMA结合蛋白。例如,所述结合蛋白可以是抗KMA抗体。在一个例子中,相比于不与重链缔合的游离轻链,所述抗KMA结合蛋白优先结合KMA。

[0080] 在一个例子中,所述结合蛋白包含VH区和VL区,其中所述VH区包含:CDR1,其含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列;CDR2,其含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;和

CDR3,其含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并且其中所述VL区包含:CDR1,其含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列;CDR2,其含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;和CDR3,其含有SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。在此例子中,所述结合蛋白可以包括抗体。例如,所述结合蛋白可以是包括抗体的双特异性分子。在此例子中,所述抗体可以包含上文提及的CDR。在另一个例子中,所述结合蛋白是抗体。

[0081] 因此,在一个例子中,所述结合蛋白是包含VH区和VL区的抗体,其中所述VH区包含:CDR1,其含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列;CDR2,其含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;和CDR3,其含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并且其中所述VL区包含:CDR1,其含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列;CDR2,其含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;和CDR3,其含有SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。

[0082] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含VH区和VL区的抗体,所述VH区包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,所述VL区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,或所述结合蛋白与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0083] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含VH区和VL区的抗体,所述VH区包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,所述VL区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或所述结合蛋白与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0084] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含VH区和VL区的抗体,所述VH区包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,所述VL区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列,或所述结合蛋白与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0085] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含VH区和VL区的抗体,所述VH区包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,所述VL区包含与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,或所述结合蛋白与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0086] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体,或所述结合蛋白与包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体结合相同的κ骨髓瘤抗原(KMA)表位。

[0087] 在另一个例子中,所述结合蛋白是包含SEQ ID NO:1中所示的VH区和SEQ ID NO:3中所示的VL区的抗体。

[0088] 在各个例子中,与所列举的SEQ ID具有所列举的同一性%的上文提及的序列变体也可以具有VH区和VL区,其中所述VH区包含:CDR1,其含有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列;CDR2,其含有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列;和CDR3,其含有SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列,并且其中所述VL区包括:CDR1,其含有SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列;

CDR2,其含有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列;和CDR3,其含有SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。例如,所述抗KMA结合蛋白具有如下VH和VL,所述VH包含如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、与SEQ ID NO:1至少90%、至少95%、至少98%、至少99%相同的氨基酸序列中所示的CDR,所述VL包含如SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、以及与SEQ ID NO:3至少90%、至少95%、至少98%、至少99%相同的氨基酸序列中所示的CDR。

[0089] 在另一个例子中,所述抗KMA结合蛋白具有如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3中所示的CDR,其中所述CDR是使用Kabat编号系统分配的。在另一个例子中,所述抗KMA结合蛋白具有如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3中所示的CDR,其中所述CDR是使用IMGT编号系统分配的。在另一个例子中,所述抗KMA结合蛋白具有如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3中所示的CDR,其中所述CDR是使用Kabat的EU编号系统分配的。

[0090] 在一个例子中,所述抗KMA结合蛋白是裸抗体。在其他例子中,所述抗KMA结合蛋白是全长抗体、完整抗体或整个抗体。在一个例子中,所述抗KMA结合蛋白是单特异性的。在一个例子中,所述抗KMA结合蛋白是双特异性的。

[0091] 此外,在上述例子中,所述结合蛋白可以结合包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的KMA表位。

[0092] 在另一个例子中,根据本公开文本的抗KMA结合蛋白与结合或特异性结合包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的表位的抗体竞争。在另一个例子中,根据本公开文本的抗KMA结合蛋白与结合或特异性结合由如SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列组成的表位的抗体竞争。

[0093] 可以使用本领域已知的各种方法通过结合蛋白竞争结合KMA或其区域或表位的能力来鉴定所述结合蛋白。例如,可以评估与 κ 人骨髓瘤细胞系(κ HMCL)(如KMS-11、KMS-26和JJN3)上的KMA的结合(Asvadi等人(2015)British Journal of Haematology,169,333-343)。在此程序中,抗KMA结合蛋白使用已建立的程序与生物素缀合(Hofmann K等人(1982)Biochemistry 21:978-84)。然后通过结合蛋白与生物素化抗体竞争结合 κ HMCL细胞上的KMA的能力来评价所述结合蛋白。可以通过添加将与经标记的抗体上的生物素结合的荧光素标记的链霉亲和素来评估生物素化抗体与 κ HMCL细胞的结合。然后通过流式细胞术来定量细胞的荧光染色,并将抗体的竞争效应表示为在不存在竞争物的情况下获得的荧光水平的百分比。

[0094] 在一个例子中,所述结合蛋白包括免疫细胞衔接器。例如,所述结合蛋白可以是接合免疫细胞的双特异性结合蛋白。例如,所述免疫细胞衔接器可以将本文所公开的结合蛋白与T细胞或自然杀伤(NK)细胞接合。免疫细胞衔接器的例子包括抗CD3结合结构域、抗CD19结合结构域和抗CD16结合结构域。在一个例子中,所述免疫细胞衔接器可以经由抗CD3结合结构域接合T细胞。在其他例子中,所述免疫细胞衔接器可以经由抗CD4或抗CD8结合结构域接合T细胞。Suurs等人,(2019)Pharmacology and Therapeutics.,201:103-119中披露了免疫细胞衔接器的各个其他例子。

[0095] 在上文提及的例子中,可以使用各种方法来测量本文所公开的结合蛋白对KMA的亲合力。在一个例子中,测定了结合蛋白对KMA的解离常数(K_D)或缔合常数(K_A)或平衡常数(K_D)。在一个例子中,通过放射标记或荧光标记的KMA结合测定来测量结合蛋白的这些常数。这种测定在存在未标记的KMA的滴定系列的情况下用最小浓度的经标记的KMA平衡结合

蛋白。然后进行洗涤以去除未结合的KMA,并确定标记的量。可以使用包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列进行类似的测定。

[0096] 可以通过针对抗体反应的标准方法来确定亲和力测量结果,所述标准方法是例如免疫测定、表面等离子体共振 (SPR) (Rich和Myszka Curr.Opin.Biotechnol 11:54,2000; Englebienn Analyst.123:1599,1998)、等温滴定量热法 (ITC) 或本领域已知的其他动力学相互作用测定。在一个例子中,通过使用表面等离子体共振测定 (例如,使用BIAcore表面等离子体共振 (BIAcore, Inc., 新泽西州皮斯卡塔韦)) 用固定化的LMA测量所述常数。在美国专利号7,229,619中描述了示例性SPR方法。

[0097] 结合蛋白组合物

[0098] 诸位发明人已经令人惊讶地鉴定出有用的结合蛋白组合物,所述结合蛋白组合物包含低水平的与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白。此类组合物可能特别有利的原因在于,治疗效力增加从而导致更有效的治疗,或潜在地更少的给药以及因此增加安全性和/或使制造更有成本效益。在一个例子中,本公开文本涉及一种包含上文提及的结合蛋白的组合物,其中所述组合物中少于20%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。在另一个例子中,所述组合物包含上文提及的结合蛋白,其中所述组合物中少于15%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。在另一个例子中,所述组合物包含上文提及的结合蛋白,其中所述组合物中少于10%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。在另一个例子中,所述组合物包含上文提及的结合蛋白,其中所述组合物中少于6%的结合蛋白是与不与重链缔合的游离轻链复合的结合蛋白。在一个例子中,所述结合蛋白是抗KMA结合蛋白。在一个例子中,所述抗KMA结合蛋白包含VH和VL,其中所述VH包含SEQ ID NO:4、5和6中所示的CDR,并且所述VL包含SEQ ID NO:7、8和9中所示的CDR。在一个例子中,所述抗KMA结合蛋白包含:VL,其含有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列;和VH,其含有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。在一个例子中,所述组合物中的结合蛋白是由CHO细胞产生的。在一个例子中,所述组合物中的结合蛋白包括抗体。在一个例子中,所述组合物中的结合蛋白是抗体。

[0099] 结合蛋白的产生

[0100] 在一个例子中,如本文所述的结合蛋白是肽或多肽 (例如是抗体或其抗原结合片段)。在一个例子中,所述结合蛋白是重组的。

[0101] 在重组肽或多肽的情况下,编码其的核酸可以克隆到表达载体中,然后将所述表达载体转染到宿主细胞中,如大肠杆菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞例如猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、人胚胎肾 (HEK) 细胞或原本不产生免疫球蛋白或抗体蛋白的骨髓瘤细胞。

[0102] 合适的分子克隆技术是本领域已知的并且例如在Ausubel等人, (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括目前为止的所有更新) 或 Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 中进行了描述。各种各样的克隆和体外扩增方法适于构建重组核酸。产生重组抗体的方法也是本领域已知的。参见美国专利号4,816,567和美国专利号5,530,101。

[0103] 分离后,将核酸插入,与表达构建体或表达载体中的启动子可操作地连接,以用于

进一步克隆(扩增DNA)或在无细胞体系中或在细胞中表达。因此,本公开文本的另一个例子提供了一种表达构建体,所述表达构建体包含本公开文本的经分离的核酸以及一个或多个另外的核苷酸序列。适当地,表达构建体呈质粒、噬菌体、黏粒、酵母或如本领域所理解的细菌人工染色体的形式,或包括所述质粒、所述噬菌体、所述黏粒、所述酵母或所述细菌人工染色体的遗传组分。表达构建体可以适于在细菌或其他宿主细胞中维持和繁殖经分离的核酸,以供通过重组DNA技术进行操纵和/或用于所述核酸或本公开文本的结合蛋白的表达。

[0104] 有许多用于在细胞中表达的载体可供使用。载体组分通常包括但不限于以下中的一个或多个:信号序列、编码结合蛋白的序列(例如,源自本文所提供的信息)、增强子元件、启动子和转录终止序列。示例性信号序列包括原核分泌信号(例如,pe1B、碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II)、酵母分泌信号(例如,转化酶前导序列、 α 因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列)或哺乳动物分泌信号(例如,单纯疱疹gD信号)。

[0105] 在哺乳动物细胞中活跃的示例性启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子(CMV-IE)、人类延伸因子1- α 启动子(EF1)、小核RNA启动子(U1a和U1b)、 α -肌球蛋白重链启动子、猿猴病毒40启动子(SV40)、劳斯氏肉瘤病毒启动子(RSV)、腺病毒主要晚期启动子、 β -肌动蛋白启动子;混合调节元件,其包括CMV增强子/ β -肌动蛋白启动子或免疫球蛋白或抗体启动子或其活性片段。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是通过SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚肾系(293细胞或用于在悬浮培养物中生长而亚克隆的293细胞);乳仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0106] 适于在酵母细胞(例如选自毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和裂殖酵母(*S.pombe*))中表达的典型启动子包括但不限于ADH1启动子、GAL1启动子、GAL4启动子、CUP1启动子、PHO5启动子、nmt启动子、RPR1启动子或TEF1启动子。

[0107] 用于将经分离的核酸或包含其的表达构建体引入细胞中以进行表达的方法是本领域技术人员已知的。用于给定细胞的技术取决于已知的成功技术。将重组DNA引入细胞中的方法包括显微注射、由DEAE-葡聚糖介导的转染、由脂质体介导的转染(如通过使用lipofectamine(Gibco,美国马里兰州盖瑟斯堡)和/或cellfectin(Gibco,美国马里兰州盖瑟斯堡))、PEG介导的DNA摄取、电穿孔和微粒轰击(如通过使用DNA包被的钨或金颗粒(Agracetus Inc.,美国威斯康星州))等等。

[0108] 用于产生结合蛋白(例如,抗体或其抗原结合片段)的宿主细胞可以在各种培养基中培养,这取决于所使用的细胞类型。可商购的培养基(如哈氏F10(Ham's F10, Sigma)、最低要素培养基(MEM), Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和杜尔贝科氏改良伊格培养基(DMEM, Sigma))适于培养哺乳动物细胞。用于培养本文所讨论的其他细胞类型的培养基是本领域已知的。

[0109] 用于产生结合蛋白的示例性方案可以包括以下步骤。可以将能够表达重组结合蛋白的哺乳动物宿主细胞在搅拌罐生物反应器系统和分批补料培养物中进行培养。在一个例子中,首先将分批补料培养物、哺乳动物宿主细胞和培养基供应至培养容器中,然后在培养期间将另外的培养营养物连续地或以离散增量进料至培养物,其中在发酵结束前从培养容器定期去除或不去除细胞和/或结合蛋白。

[0110] 在生长阶段中,使哺乳动物宿主细胞在一定条件下生长,并持续针对生长优化的

时间段。培养条件(如温度、pH、溶解氧(dO_2)和营养物补充)一般根据宿主细胞的情况而定,且对普通技术人员来说是清楚的。通常,将pH调节至在约6.5与7.5之间的水平。用于培养哺乳动物细胞(如CHO细胞)的合适温度范围为约30°C至38°C,且合适的 dO_2 在5%-90%的空气饱和度之间。发酵的产生阶段期间的细胞培养环境通常受到控制,以确保各批次之间结合蛋白产生的质量和一致性。通常,由CHO细胞产生的结合蛋白被分泌到细胞培养基中。发酵后,可以将包含结合蛋白的细胞培养基澄清。

[0111] 游离轻链-结合蛋白复合物

[0112] 诸位发明人实验性地鉴定出,在结合蛋白的产生期间,不与重链缔合的游离轻链可以与结合蛋白结合并且与之形成复合物。治疗性配制品中存在这样的复合物是特别不期望的,因为这样的复合物可能会影响配制品的效力。

[0113] 在一个例子中,本公开文本涉及一种从不与重链缔合的游离轻链纯化结合蛋白的方法,所述方法包括:将包含所述结合蛋白和不与重链缔合的游离轻链的组合物加载到中性pH的平衡亲和柱上,以使所述组合物中的结合蛋白与所述亲和色谱柱结合;将所述亲和色谱柱用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤,以从所述组合物洗涤出不与重链缔合的游离轻链;以及将与所述亲和柱结合的结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。

[0114] 在一个例子中,“平衡”、“洗涤”或“洗脱”包括使至少1个柱体积(CV)的相应缓冲液通过色谱柱。例如,“洗涤”步骤可以包括使至少1个CV的洗涤缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗涤步骤中,至少1至25个CV的洗涤缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗涤步骤中,至少3至20个CV的洗涤缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗涤步骤中,至少5至15个CV的洗涤缓冲液通过色谱柱。在一个例子中,“洗脱(elution)”或“洗脱(eluting)”步骤可以包括使至少1个CV的洗脱缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗脱步骤中,至少1至25个CV的洗脱缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗脱步骤中,至少3至20个CV的洗脱缓冲液通过色谱柱。在另一个例子中,在洗脱步骤中,至少5至15个CV的洗脱缓冲液通过色谱柱。确定每个步骤所需的CV数量被认为完全在本领域技术人员的范围之内。

[0115] 在一个例子中,将所述亲和色谱柱用1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)平衡。例如,所述亲和色谱柱可以用至少10个CV的1X PBS平衡。

[0116] 如本文所使用,术语“洗涤缓冲液”是指这样的缓冲液,其被配制为用于从色谱柱的固相转移出不与重链缔合的游离轻链。在一个例子中,所述方法包括用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤。在一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液的pH为9.5至10.5。在另一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液包含碳酸钠。洗涤缓冲液中的示例性碳酸钠浓度的范围为0.1M至0.2M。在另一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液包含氯化钠。在一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液包含1M氯化钠。

[0117] 在一个例子中,洗涤所述亲和色谱柱包括用碱性洗涤缓冲液洗涤两次。在其他例子中,可以在将与所述柱结合的结合蛋白洗脱之前将所述亲和色谱柱用碱性洗涤缓冲液洗涤三次、四次或五次。在一个例子中,所述碱性洗涤缓冲液的pH相同。例如,所述洗涤缓冲液的pH可以为10.2。在一个例子中,将所述柱用包含0.2M碳酸钠的碱性洗涤缓冲液洗涤,然后用包含0.1M碳酸钠的另一种碱性洗涤缓冲液洗涤。在此例子中,约5-20个CV的每种洗涤缓冲液可以通过色谱柱。在一个例子中,在第一次洗涤时,至少10个CV通过色谱柱,并且在第二次洗涤时,至少5个CV通过色谱柱。

[0118] 在一个例子中,本公开文本的方法包括用酸性洗涤缓冲液洗涤所述亲和色谱柱。在一个例子中,本公开文本的方法包括在已经用碱性洗涤缓冲液洗涤所述柱之后用酸性洗涤缓冲液洗涤所述亲和色谱柱。在一个例子中,所述酸性洗涤缓冲液的pH为5.5至6.5。在一个例子中,所述酸性洗涤缓冲液包含磷酸钠。例如,所述酸性洗涤缓冲液可以包含20mM-50mM磷酸钠。在一个例子中,所述酸性洗涤缓冲液可以包含约35mM磷酸钠。

[0119] 在一个例子中,可以通过用洗脱缓冲液洗涤所述亲和色谱柱来洗脱出与所述亲和色谱柱结合的结合蛋白。因此,如本文所使用,术语“洗脱缓冲液”是指被配制为用于移取与所述色谱柱结合的结合蛋白的缓冲液。所述洗脱缓冲液用于解离所述结合蛋白。典型的洗脱物质是本领域熟知的,并且可以具有较高浓度的盐类、游离亲和配体或类似物,或其他促进从给定材料解离结合蛋白的物质。洗脱缓冲液的电导率和/或pH使得将结合蛋白从柱洗脱出。在一个例子中,所述洗脱缓冲液是酸性的。在一个例子中,所述洗脱缓冲液比本文所公开的方法中所使用的洗涤缓冲液更具酸性。在一个例子中,所述洗脱缓冲液的pH为2-4。在一个例子中,所述洗脱缓冲液的pH为2.5至3.5。在一个例子中,所述洗脱缓冲液的pH为3。在一个例子中,所述洗脱缓冲液包含磷酸钠。例如,所述洗脱缓冲液可以包含在5mM与15mM之间的磷酸钠。在一个例子中,所述洗脱缓冲液包含10mM磷酸钠。

[0120] 在一个例子中,如通过尺寸排阻色谱法HPLC (SEC-HPLC) 和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是75%、或85%、或90%、或95%、或99%未结合的结合蛋白。

[0121] 例如,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是至少75%未结合的结合蛋白。

[0122] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是至少85%未结合的结合蛋白。

[0123] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是至少90%未结合的结合蛋白。

[0124] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是至少95%未结合的结合蛋白。

[0125] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是在85%与95%之间的未结合的结合蛋白。

[0126] 在一个例子中,如通过SEC-HPLC和/或BioCore测定确定的,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白,从所述亲和色谱柱洗脱出的结合蛋白是在90%与95%之间的未结合的结合蛋白。

[0127] 在另一个例子中,本公开文本提供了一种用于从包含结合不与重链缔合的轻链的结合蛋白的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养物纯化所述结合蛋白的方法,所述方法包括:使来自所述CHO细胞培养物或源自其的组合物的所述结合蛋白与中性pH的亲和色谱树脂结合;

将所述树脂用具有高于中性pH至少2.5至5的pH的碱性洗涤缓冲液洗涤；以及将与所述树脂结合的所述结合蛋白用洗脱缓冲液洗脱。在一个例子中，所述亲和色谱柱包括蛋白A树脂。

[0128] 在一个例子中，使用本公开文本的方法去除的不与重链缔合的所述游离轻链是 κ 轻链。在一个例子中，使用本公开文本的方法去除的不与重链缔合的游离轻链的分子量在22kD与25kD之间。在另一个例子中，使用本公开文本的方法去除的不与重链缔合的所述游离轻链是 κ 轻链二聚体。在一个例子中，使用本公开文本的方法去除的不与重链缔合的游离轻链的分子量在45kD与50kD之间。

[0129] 在一个例子中，从本文所公开的组合物纯化的所述不与重链缔合的游离轻链或其复合物的分子量在20kD与100kD之间。在另一个例子中，所述分子量在22kD与80kD之间。在另一个例子中，所述分子量在22kD与50kD之间。

[0130] 在一个例子中，所述亲和色谱法步骤包括使所述组合物经受包括适合的亲和色谱支持物的柱。这样的色谱支持物的非限制性例子包括但不限于蛋白A树脂、蛋白G树脂、包含针对其召集目的抗体的抗原的亲和支持物、以及包含Fc结合蛋白的亲和支持物。蛋白A树脂可用于结合抗体(IgG)。在一个例子中，所述亲和色谱柱包括蛋白A树脂。在一个例子中，所述亲和色谱柱是蛋白A色谱柱。在另一个例子中，所述亲和色谱柱是蛋白L色谱柱。在另外的例子中，所述亲和色谱柱是蛋白G色谱柱。

[0131] 可以使用本领域技术人员已知的技术监测洗脱液。例如，可以跟踪OD₂₈₀处的吸光度。如果需要，可以制备出经洗脱的结合蛋白以用于经由下文所讨论的另外的方法步骤中的一个或多个进行进一步处理。

[0132] 起始组合物

[0133] 在一个例子中，所述起始组合物是在培养已被基因修饰成表达本文所公开的结合蛋白的细胞之后获得的细胞培养液。例如，所述起始组合物可以是在培养已被基因修饰成表达本文所公开的结合蛋白的CHO细胞之后获得的细胞培养液。然而，这种起始组合物可能需要在经受本公开文本的方法之前被部分纯化。例如，细胞培养液可能需要被澄清以去除细胞碎片。因此，根据本公开文本的方法纯化的组合物没有受到特别限制，只要它们是源自培养已经被基因修饰成表达本文所公开的结合蛋白的细胞之后获得的细胞培养液并且包含结合蛋白和不与重链缔合的游离轻链即可。在一个例子中，所述起始组合物包含未结合的结合蛋白、与不与重链缔合的游离轻链结合的结合蛋白、以及未结合的不与重链缔合的游离轻链。在一个例子中，所述组合物还包含所述结合蛋白的高分子量聚集体。

[0134] 在一个例子中，所述起始组合物源自培养已被基因修饰成表达本文所公开的结合蛋白(如抗KMA结合蛋白)的CHO细胞之后获得的细胞培养液。

[0135] 另外的方法步骤

[0136] 在一个例子中，本公开文本的方法包括在结合蛋白经受上文提及的洗涤步骤并且已经从亲和色谱柱洗脱出之后的另外的步骤。例如，经洗脱的结合蛋白可以随后经受另外的色谱法步骤。例如，可以对经洗脱的结合蛋白进行阳离子交换色谱法以去除任何潜在的高分子量种类。例如，可以使用阳离子交换色谱法来去除高分子量聚集体，如结合蛋白复合物。因此，在一个例子中，本公开文本的方法可以进一步包括阳离子交换色谱法。其他示例性的另外的色谱法纯化步骤包括但不限于离子交换色谱法、和/或疏水性相互作用色谱法、和/或混合模式色谱法、和/或尺寸排阻色谱法。在一个例子中，本公开文本的方法进一步包

括病毒灭活步骤。在另一个例子中,本公开文本的方法进一步包括病毒过滤步骤。

[0137] 在一个例子中,将经澄清的细胞培养液纯化以去除根据本公开文本的不与重链缔合的游离轻链,然后对其进行阳离子交换色谱法、超滤、阴离子交换色谱法、苯基-琼脂糖HP色谱法、病毒过滤和超滤。

[0138] 配制品

[0139] 在一个例子中,所述方法进一步包括将所述经纯化的结合蛋白配制成药物组合物的步骤。

[0140] 本公开文本进一步提供了例如一种药物组合物,所述药物组合物包含通过如本文所述的方法纯化的结合蛋白。

[0141] 可以在生理学上可接受的载体中制备待施用的包含结合蛋白的合适的药物组合物。对于溶液或乳液,合适的载体包括例如水性或醇性/水性溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物可以包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。各种合适的水性载体是本领域技术人员已知的,包括水、缓冲水、缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)、葡萄糖溶液和甘氨酸。静脉内媒介物可以包括各种添加剂、防腐剂、或流体、营养物或电解质补充剂(通常参见Remington's Pharmaceutical Science,第16版,Mack,编辑1980)。所述组合物可以任选地含有模拟生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂以及张力调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和乳酸钠。根据已知的冻干和重构技术,所述化合物可以被冻干储存并且在使用前在适合的载体中重组。

[0142] 所选培养基中的一种或多种活性成分的最佳浓度可以根据本领域技术人员已知的程序凭经验确定,并且将取决于所期望的最终药物配制品。

[0143] 类似地,在一个例子中,所述结合蛋白可以根据本公开文本进行纯化并且可以被配制成诊断组合物,所述诊断组合物根据所述组合物的预期应用(例如在体外与在体内)包含上文提及的组分中的一种或多种组分。

[0144] 实施例

[0145] 实施例1:抗 κ 骨髓瘤抗原(KMA)结合蛋白的表达

[0146] 通过使被基因修饰成表达结合蛋白的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞在分批补料悬浮培养物中生长来表达抗 κ 骨髓瘤抗原(抗KMA)结合蛋白。在WO 2003/004056中大致描述了本文所使用的经基因修饰的CHO细胞的产生。在悬浮培养后,通过深度过滤和0.2 μ m过滤将CHO细胞从细胞培养液(CCF)去除。将所得CCF收集并在2℃至8℃下储存。

[0147] 实施例2:重组抗 κ 骨髓瘤抗原(KMA)结合蛋白的蛋白A亲和色谱法纯化

[0148] 为了制备出含有抗KMA结合蛋白的CCF以进行蛋白A色谱法纯化,将CCF的蛋白质浓度调节至 ≤ 3.5 g/L并且将pH调节至 ≥ 6.8 。

[0149] 将蛋白A亲和色谱柱(MabSelect Xtra Load)用至少5个柱体积(CV)的1x PBS(平衡缓冲液)平衡,以达到7.3至7.5的pH和在14.0mS/cm-16.8mS/cm之间的电导率。

[0150] 然后,将蛋白质浓度和pH经过调整的CCF加载到经平衡的蛋白A亲和色谱柱上,然后将所述柱用 ≥ 15 个CV的含有200mM碳酸钠、1M氯化钠的碱性洗涤缓冲液(pH 10.2)洗涤。将所述柱用 ≥ 5 个CV的含有100mM碳酸钠的碱性洗涤缓冲液(pH 10.2)进一步洗涤,然后用 ≥ 4 个CV的由35mM磷酸钠组成的酸性洗涤缓冲液(pH 6.2)进一步洗涤。

[0151] 用含有10mM磷酸钠的洗脱缓冲液(pH 3.0)从蛋白A亲和色谱柱洗脱出抗KMA结合蛋白,并通过测量280nm的吸收波长来对其进行监测。将单峰级分收集,所述单峰级分在开始和结束时分别比基线高15%和高5%。

[0152] 实施例3:重组抗KMA结合蛋白的可替代蛋白A亲和色谱法纯化

[0153] 在可替代方法中,将CCF通过蛋白A亲和色谱法用以下方法纯化:用碱性洗涤缓冲液(200mM碳酸钠,1M氯化钠,pH 10.2)洗涤两次,然后从蛋白A亲和色谱柱洗脱并收集抗κ骨髓瘤结合蛋白。结果与实施例2是可比较的。

[0154] 实施例4:低pH处理和调节

[0155] 对含有抗KMA结合蛋白的蛋白A亲和色谱洗脱液进一步进行低pH病毒灭活、中和以及病毒过滤。通过以下方法进行病毒灭活:用1N盐酸将蛋白A亲和色谱洗脱液的pH调节至3.40至3.60,并将洗脱液在室温下保持60分钟至75分钟,以灭活任何潜在污染性病毒。在病毒灭活后,用1N氢氧化钠将洗脱液的pH中和至6.1至6.3,然后进行0.2μm过滤,并在2℃至8℃下储存,直到进一步处理为止。

[0156] 在经由实施例2或实施例3的纯化以及随后的病毒灭活、中和以及过滤后,如通过SEC-HPLC确定的和通过BioCore测定的活性,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的抗KMA结合蛋白,抗KMA单体的产率为90%。

[0157] 实施例4:阳离子交换色谱法纯化

[0158] 在对蛋白A亲和色谱洗脱液进行低pH病毒灭活、中和以及病毒过滤后,对洗脱液进行阳离子交换色谱法,以去除洗脱液中存在的任何潜在的高分子量种类。将阳离子交换色谱柱(Fractogel EMD SE HiCap)用≥5个CV的35mM磷酸钠(pH 6.2)平衡。将洗脱液的蛋白质浓度调节至≤8.5mg/ml,将pH调节至6.1至6.3,然后加载到阳离子交换色谱柱上。

[0159] 将与阳离子交换色谱柱结合的抗KMA结合蛋白用≥5个CV的20mM磷酸钠(pH 6.2)洗涤,并将抗KMA结合蛋白用35mM磷酸钠和30mM氯化钠(pH 6.2)洗脱,通过测量280nm的吸收波长进行监测。收集高于基线的单峰级分,当吸光度下降到最大峰高的大约20%至30%时结束。

[0160] 如通过SEC-HPLC确定的和通过BioCore测定确定的活性,相对于与不与重链缔合的游离轻链结合的抗KMA结合蛋白,蛋白A亲和色谱法和阳离子交换色谱法的组合导致回收95%纯的抗KMA结合蛋白单体。

[0161] 实施例5:配制成药物组合物

[0162] 将阳离子交换色谱洗脱液通过Planova 20N病毒去除过滤器以去除任何无意的病毒污染,并通过0.22μm过滤器进一步过滤。将经过滤的制剂通过切向流过滤(TFF)浓缩和渗滤为20mM柠檬酸钠、100mM氯化钠、1.5%甘露醇、50μM DTPA(pH 6.0),并通过0.2μm过滤器进一步过滤。在需要的情况下添加聚山梨醇酯80(Tween 80)至最终浓度为0.04%,并将蛋白质浓度调节为10.0±1.0mg/ml,并通过0.2μm过滤器过滤,以产生抗KMA结合蛋白的配制药物组合物。

[0163] 本领域技术人员应理解,在不偏离广泛描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对如具体实施方案所示的发明做出众多的变化和/或修改。因此,这些实施方案在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

[0164] 上文所讨论的所有出版物均以其整体并入本文。

[0165] 本说明书中包含的对文献、行为、材料、装置、物品等进行的讨论仅是为了提供本发明的语境的目的。不应承认任何或所有这些内容因为其存在于本说明书的每个权利要求的优先权日之前而形成现有技术基础的一部分或为本发明相关领域中的公知常识。

[0166] 本申请要求2020年3月27日提交的澳大利亚临时专利申请2020900948的优先权，所述澳大利亚临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。

序列表

<110> 哈马洛吉克斯有限公司

<120> 组合物和方法

<130> 531727CN

<150> 2020900948

<151> 2020-03-27

<150> 63/200,752

<151> 2021-03-25

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KappaMab VH

<400> 1

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
          20           25           30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
          50           55           60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115          120          125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
          130          135          140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145          150          155          160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

```

				165					170					175			
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
				180					185					190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
				195				200						205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
				210				215						220			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro		
225							230				235				240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245					250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
				260					265					270			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
				275				280						285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
				290				295						300			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305							310				315				320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
				340					345					350			
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
				355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
				370					375					380			
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
385							390				395				400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				405					410					415			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
				420					425					430			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				435				440						445			

Lys

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KappaMab表位氨基酸序列

<400> 2

Leu Asp Ile Lys Arg

1 5

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KappaMab VL

<400> 3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR1

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR2

<400> 5

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH CDR3

<400> 6

Gly Val Tyr His Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR1

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR2

<400> 8

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL CDR3

<400> 9

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> KappaMab表位2的氨基酸序列(改进的结合)

<400> 10

Leu Glu Ile Lys Arg

1 5