



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0004543
(43) 공개일자 2023년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/06 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/065 (2013.01)
C07K 1/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7037511
(22) 출원일자(국제) 2021년03월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월26일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/000171
(87) 국제공개번호 WO 2021/191684
국제공개일자 2021년09월30일
(30) 우선권주장
63/200,752 2021년03월25일 미국(US)
2020900948 2020년03월27일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
해마로직스 리미티드
오스트레일리아, 엔에스더블유 2011 울루무루, 80
윌리엄스 스트리트, 스위트 204
(72) 발명자
던, 로잔
오스트레일리아, 엔에스더블유 2011 울루무루, 80
윌리엄스 스트리트, 스위트 204 해마로직스 리미
티드 내
알라하리, 아루나쿠마리
오스트레일리아, 엔에스더블유 2011 울루무루, 80
윌리엄스 스트리트, 스위트 204 해마로직스 리미
티드 내
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 **조성물 및 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 바람직하지 않은 성분으로부터 결합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다. 이러한 결합 단백질은 암 등의 장애의 치료에 유용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/30 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

결합 단백질을 포함하는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 배양으로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합하는 결합 단백질을 정제하는 방법으로서,

- CHO 세포 배양으로부터의 결합 단백질을 중성 pH의 단백질 A 수지에 결합시키는 단계;
- 단백질 A 수지를 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하여 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계; 및
- 단백질 A 수지에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄로부터 결합 단백질을 정제하는 방법으로서,

- 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조성물을 중성 pH의 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩하여 조성물 중의 결합 단백질을 친화성 크로마토그래피 컬럼에 결합시키는 단계;
- 친화성 크로마토그래피 컬럼을 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하여 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계; 및
- 친화성 크로마토그래피 컬럼에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 항체인 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 항체가 항-카파 골수종 항원 (KMA) 항체인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항체가 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 비해 KMA에 우선적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기성 세척 완충제가 9 내지 11의 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 염기성 세척 완충제가 9.5 내지 10.5의 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기성 세척 완충제가 0.1M 내지 0.2M 탄산나트륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 염기성 세척 완충제가 1M 염화나트륨을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피를 세척하여 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계가 친화성 크로마토그래프 컬럼을 염기성 세척 완충제로 2회 세척하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제1 세척에서 염기성 세척 완충제가 0.2M 염화나트륨을 포함하고, 제2 세척에서 염기성 세척 완충제가 0.1M 염화나트륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 염기성 세척 완충제가 동일한 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼의 세척 단계가 산성 세척 완충제로의 세척을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 산성 세척 완충제가 5.5 내지 6.5의 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 산성 세척 완충제가 약 35 mM 인산나트륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리 완충제가 산성인 방법.

청구항 18

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리 완충제가 산성 세척 완충제보다 더 낮은 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리 완충제가 2.5 내지 3.5의 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리 완충제가 약 10 mM 인산나트륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼이 단백질 A 크로마토그래피 컬럼인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 불활성화 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 여과 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제2항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조성물이 결합 단백질을 발현하는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포의 세포 배양으로부터 수득된 세포 배양액인

방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 임의의 가능성 있는 고분자량 종을 제거하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄가 카파 경쇄인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄가 카파 경쇄 이량체인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄의 분자량이 22 내지 100 kD 인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질을 제약 조성물 또는 진단 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제30항에 있어서,

상기 결합 단백질이

- 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 것인 방법, 또는 제약 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질이 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 항체에 대하여 적어도 75% 비-결합된 항체인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질이 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 85% 비-결합된 결합 단백질인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질이 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 90% 비-결합된 결합 단백질인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용리된 결합 단백질이 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 85% 내지 95% 비-결합된 결합 단백질인 방법.

청구항 36

항-KMA 결합 단백질을 포함하는 조성물로서, 상기 조성물 중의 결합 단백질의 20% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질인 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 조성물 중의 결합 단백질의 15% 미만, 10% 미만, 6% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 항체인 조성물.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 결합 단백질이 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 글수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 것인 조성물.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 CHO 세포에 의해 생성된 것인 조성물.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 항체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 41

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 항체인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 바람직하지 않은 성분으로부터 결합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다. 이러한 결합 단백질은 암 등의 장애의 치료에 유용할 수 있다.

배경 기술

[0002] 대규모 단백질 정제의 경제성은, 특히 치료적 결합 단백질에 있어 중요한데, 이는 이들 분자가 시장에서 치료적 생물제제의 큰 비율을 차지하기 때문이다. 이들의 치료적 가치에 추가로, 예를 들어, 모노클로날 항체 등의 결합 단백질은 또한 진단 분야에서 중요한 도구이다. 생물제약 응용을 위한 결합 단백질의 생성은 전형적으로, 바람직하지 않은 성분을 생성하는 것으로 공지된 세포 배양의 사용을 수반한다. 결합 단백질 정제와 관련하여, 특히 친화성 크로마토그래피와 관련하여, 상당한 진전이 이루어졌지만, 이러한 방법은 결합 단백질의 요망되는 단량체를 정제하기 위해 특히 적합하지 않을 수 있다. 따라서, 결합 단백질의 개선된 정제 방법이 요구된다.

발명의 내용

발명의 요약

[0003] [0004] 제조합 DNA 기술을 사용한 결합 단백질의 생성은 종종 세포 배양액 중의 바람직하지 않은 성분의 축적을 초래할 수 있다. 이들 바람직하지 않은 성분은 결합 단백질의 고분자량 집합물 및 중쇄와 회합되지 않은 유리(free) 경쇄와 결합 단백질의 복합체를 포함한다. 이 문제는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포가 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 자연적으로 분비하기 때문에 관심 결합 단백질을 생성하기 위해 CHO 세포를 사용할 때 특히 현저할 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도, 단백질 정제 공정에 염기성 세척 단계를 혼입함으로써 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄로부터 결합 단백질을 정제하는 방법을 확인하였다. 방법은 고수율의 비-결합된 결합 단백질이 회수될 수 있게 하고, 따라서 고순도 결합 단백질 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 치료적으로 보다 강력할 수 있다. 따라서, 제1 측면에서, 본 개시내용은, 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조성물을 중성 pH의 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩하여 조성물 중의 결합 단백질을 친화

성 크로마토그래피 컬럼에 결합시키는 단계; 친화성 크로마토그래피 컬럼을 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하여 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계; 및, 친화성 크로마토그래피 컬럼에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계를 포함하는, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄로부터 결합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다.

- [0005] 일례에서, 조성물은 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 CHO 세포로부터 수득된 세포 배양액 또는 그로부터 유래된 조성물이다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은, 하기를 포함하는, 결합 단백질을 포함하는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 배양으로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합하는 결합 단백질을 정제하는 방법을 포함한다:
- [0006] - CHO 세포 배양으로부터의 결합 단백질을 중성 pH의 단백질 A 수지에 결합시키는 단계;
- [0007] - 단백질 A 수지를 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하여 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계; 및
- [0008] - 단백질 A 수지에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계.
- [0009] 일례에서, 결합 단백질은 항체를 포함한다. 또 다른 예에서, 결합 단백질은 항체이다. 또 다른 예에서, 항체는 항-카파 글수중 항원 (KMA) 항체이다. 또 다른 예에서, 항체는 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 비해 KMA에 우선적으로 결합한다.
- [0010] 일례에서, 염기성 세척 완충제는 9 내지 11의 pH를 갖는다. 또 다른 예에서, 염기성 세척 완충제는 9.5 내지 10.5의 pH를 갖는다. 또 다른 예에서, 염기성 세척 완충제는 0.1M 내지 0.2M 탄산나트륨을 포함한다. 또 다른 예에서, 염기성 세척 완충제는 1M 염화나트륨을 추가로 포함한다.
- [0011] 일례에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하기 위한 친화성 크로마토그래피의 세척은 친화성 크로마토그래피 컬럼을 염기성 세척 완충제로 2회 세척하는 것을 포함한다. 이 예에서, 제1 세척에서 염기성 세척 완충제는 0.2M 염화나트륨을 포함할 수 있고, 제2 세척에서 염기성 세척 완충제는 0.1M 염화나트륨을 포함할 수 있다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 동일한 pH를 갖는다.
- [0012] 또 다른 예에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼의 세척은 산성 세척 완충제로의 세척을 추가로 포함한다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 5.5 내지 6.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 약 35 mM 인산나트륨을 포함한다.
- [0013] 일례에서, 용리 완충제는 산성이다. 일례에서, 용리 완충제는 산성 세척 완충제보다 더 낮은 pH를 갖는다. 일례에서, 용리 완충제는 2.5 내지 3.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 용리 완충제는 약 10 mM 인산나트륨을 포함한다.
- [0014] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 컬럼이다.
- [0015] 일례에서, 방법은 바이러스 불활성화 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 바이러스 여과 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 예에서, 방법은 한외여과 단계를 추가로 포함한다.
- [0016] 또 다른 예에서, 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조성물은 결합 단백질을 발현하는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포의 세포 배양으로부터 수득된 세포 배양액이다. 일례에서, 세포 배양액은 정화된 것이다.
- [0017] 또 다른 예에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄이다. 일례에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄의 분자량은 약 22.5 - 25 kD이다. 또 다른 예에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄 이량체이다. 이 예에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 이량체의 분자량은 약 45 - 50 kD이다. 일례에서, 본원에 개시된 조성물로부터 정제된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 또는 그의 복합체의 분자량은 20 내지 100 kD이다. 또 다른 예에서, 분자량은 22 내지 80 kD이다. 또 다른 예에서, 분자량은 22 내지 50 kD이다.
- [0018] 일례에서는, 고분자량 집합물을 제거함으로써 본 개시내용의 조성물을 추가로 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 일례에서, 본 개시내용의 방법은 또한 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함할 수 있다. 일례에서는, 용리된 결합 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 임의의 가능성 있는 고분자량 종을 제거한다. 또 다른 예에서, 방법은 용리된 결합 단백질을 제약 조성물 또는 진단 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0019] 일례에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 방법에 따라 정제된 결합 단백질을 포함하는 제약 또는 진단 조성물을 포함한다. 일례에서, 제약 조성물은 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 결합 단백질을 포함한다.
- [0020] 일례에서, 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 항체에 대하여 적어도 75% 비-결합된 항체이다. 또 다른 예에서, 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 85% 비-결합된 결합 단백질이다. 또 다른 예에서, 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 90% 비-결합된 결합 단백질이다. 또 다른 예에서, 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 85% 내지 95% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 항-KMA 결합 단백질을 포함하는 조성물을 포함하며, 여기서 조성물 중의 결합 단백질의 20% 미만은 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질이다. 일례에서는, 조성물 중의 결합 단백질의 15% 미만, 10% 미만, 6% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 항체이다. 일례에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합한다. 일례에서, 결합 단백질은 CHO 세포에 의해 생성된다. 일례에서, 결합 단백질은 항체를 포함한다. 일례에서, 결합 단백질은 항체이다.
- [0022] 본원에서의 임의의 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 임의의 다른 예에 준용하는 것으로 간주된다.
- [0023] 본 발명은 본원에 기재된 구체적 예에 의해 범위가 제한되어선 안되며, 이들 예는 단지 예시 목적으로 의도된다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 범위 내에 명백히 포함된다.
- [0024] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 또는 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수의 (즉, 하나 이상의) 이들 단계, 물질의 조성, 단계의 그룹 또는 물질의 조성물의 그룹을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0025] 이하, 본 발명은 하기 비-제한적 실시예에 의해, 또한 첨부 도면을 참조로 하여 기재된다.
- [0026] **서열 목록의 핵심**
- [0027] 서열 번호:1 - 카파Mab 가변 중쇄 (V_H)의 아미노산 서열.
- [0028] 서열 번호:2 - 카파Mab 에피토프 아미노산 서열.
- [0029] 서열 번호:3 - 카파Mab 가변 경쇄 (V_L)의 아미노산 서열.
- [0030] 서열 번호:4 - 카파Mab V_H CDR1의 아미노산 서열.
- [0031] 서열 번호:5 - 카파Mab V_H CDR2의 아미노산 서열.
- [0032] 서열 번호:6 - 카파Mab V_H CDR3의 아미노산 서열.
- [0033] 서열 번호:7 - 카파Mab V_L CDR1의 아미노산 서열.
- [0034] 서열 번호:8 - 카파Mab V_L CDR2의 아미노산 서열.
- [0035] 서열 번호:9 - 카파Mab V_L CDR3의 아미노산 서열.
- [0036] 서열 번호:10 - 카파Mab 에피토프 2 (개선된 결합)의 아미노산 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] **발명의 상세한 설명**

[0038] 일반적 기술 및 선택된 정의

[0039] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업계 (예: 분자 생물학, 항체 제조, 생화학, 종양학 및 단백질 정제)의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주된다.

[0040] 달리 지시되지 않는 한, 본 개시내용에서 활용되는 분자 및 통계 기술은 당업자에게 널리 공지된 표준 기술이다. 이러한 기술은 하기 문헌 등의 출처의 문헌 전반에 걸쳐 기재되고 설명되어 있다: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley 및 Sons (1984), J. Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (편집자), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover 및 B.D. Hames (편집자), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 및 1996), 및 F.M. Ausubel 등 (편집자), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함), Ed Harlow and David Lane (편집자) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan 등 (편집자) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트 포함).

[0041] 어구 "항-KMA 결합 단백질"은 본 개시내용과 관련하여 카과 골수종 항원에 결합하는 또는 특이적으로 결합하는 결합 단백질을 지칭한다. 카과 골수종 항원 (KMA)은 카과 골수종 세포에 대한 선택성을 갖는 막-결합 경쇄이다 (Boux, HA. 등 (1983) J Exp Med. 158:1769).

[0042] 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 KMA 보유 세포에 결합할 수 있다. 또 다른 예에서, 항-KMA 결합 단백질은 KMA 보유 세포를 죽일 수 있다. 일례에서, 본 개시내용에 포함되는 항-KMA 결합 단백질은 온전(intact) 면역글로불린에 결합하지 않는다. 다시 말해서, 예시적 항-KMA 결합 단백질은 온전 Ig 분자에서와 같은 Ig 중쇄와 회합되어 있는 카과 경쇄를 인식하지 못한다.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에 기재된 결합 단백질 및 KMA의 상호작용과 관련하여 용어 "결합"은, 상호 작용이 KMA 상의 특정 구조 (예: 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 따라 달라짐을 의미한다. 예를 들어, 결합 단백질은 일반적으로 항원보다는 특이적 항원 구조를 인식하고 그에 결합한다. 예를 들어, 결합 단백질이 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 라벨링된 "A" 및 결합 단백질을 함유하는 반응에서, 에피토프 "A" (또는 유리, 라벨링되지 않은 "A")를 함유하는 분자의 존재는, 결합 단백질에 결합된 라벨링된 "A"의 양을 감소시킬 것이다. 일례에서, 본원에 개시된 KMA 결합 단백질은 유리 카과 경쇄 (예: 혈청 항원)에 비해 KMA (즉, 세포 표면 항원)에 우선적으로 결합한다. 유리 카과 경쇄에 비해 KMA에 우선적으로 결합하는 본원에 개시된 결합 단백질은, 이것이 유리 경쇄와 반응하거나 회합하는 것보다 KMA와 더 빈번히, 더 빠르게, 더 큰 지속기간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 회합한다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합"은 결합 단백질과 KMA 사이의 결합 상호작용이 결합 단백질에 의한 KMA의 검출에 따라 달라짐을 의미하는 것으로 간주된다. 따라서, 결합 단백질은 다른 분자, 세포 또는 유기체의 혼합물 중에 존재하는 경우에도 KMA에 특이적으로 결합하거나 이를 인식한다. 일례에서, 결합 단백질은, 이것이 대체 항원 또는 세포와 반응하거나 회합하는 것보다 KMA와 더 빈번히, 더 빠르게, 더 큰 지속기간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 회합한다. 일례에서, KMA에 특이적으로 결합하는 본원에 개시된 결합 단백질은 또한 유리 경쇄에 비해 KMA에 우선적으로 결합하거나 이를 인식할 수 있다. 예를 들어, KMA에 특이적으로 결합하는 결합 단백질은 제2 항원에 특이적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있음이 이 정의를 읽음으로써 또한 이해된다. 이와 같이, "특이적 결합"은 반드시 또 다른 항원의 배타적 결합 또는 검출 불가능한 결합을 필요로 하지는 않는다. 용어 "특이적으로 결합"은 본원에서 "선택적으로 결합"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 본원에서 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미하며, 각각의 용어는 다른 용어에 대한 명시적 지지를 제공하는 것으로 이해된다. 특이적 결합을 결정하는 방법은 숙련자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 결합 단백질을 KMA 또는 대체 항원과 접촉시킨다. 이어서, KMA 또는 대체 항원에 대한 결합 단백질의 결합을 결정하고, 대체 항원보다는 KMA에 대하여 상기에 기재된 바와 같이 결합하는 결합 단백질을 KMA에 특이적으로 결합하는 것으로 고려한다. 유사한 방법을 사용하여 우선적 결합을 식별할 수 있다. 이 경우, 대체 항원은 유리 경쇄이다.

[0045] 용어 "면역글로불린"은, 면역글로불린 도메인을 포함하는 항-KMA 결합 단백질 등의 본 개시내용의 결합 단백질을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예시적 면역글로불린은 항체이다. 용어 "면역글로불린"에 포함되는 추가의 단백질은 도메인 항체, 낙타류 항체 및 연골 어류로부터의 항체 (즉, 면역글로불린 신규 항원 수용체

(IgNAR))를 포함한다. 그러나, 일반적으로, 낙타류 항체 및 IgNAR은 V_H 를 포함하고 V_L 은 없으며, 종종 중쇄 면역글로불린으로서 언급된다. 다른 "면역글로불린"은 T 세포 수용체를 포함한다.

[0046] 용어 "결합 단백질"은 본 개시내용과 관련하여 특정 항원과 면역학적으로 반응성인 인간 또는 인간화된 면역글로불린 분자를 지칭하기 위해 사용되며, 폴리클로날 및 모노클로날 항체 둘 다를 포함한다. 용어 "결합 단백질"은 또한, 항원-결합능을 갖는 단편을 포함한, 항체의 항원 결합 형태를 포함한다 (예: 하기 문헌에서 논의된 바와 같은 Fab', F(ab')₂, Fab, Fv 및 rIgG: Pierce Catalogue and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York (1998)). 용어는 또한 재조합 단일 사슬 Fv 단편 (scFv) 뿐만 아니라 그의 2가 (디-scFv) 및 3가 (트리-scFv) 형태를 지칭하기 위해 사용된다. 용어 항체는 또한 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함한다. 일례에서, 본 개시내용의 결합 단백질은 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합한다. 또 다른 예에서, 결합 단백질은 중쇄와 회합되지 않은 유리 카파 경쇄에 결합한다.

[0047] 용어 결합 단백질은 본원에서 사용되는 바와 같이 이중-특이적 분자 등의 항체를 포함하는 결합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 결합 단백질은 상기 언급된 면역글로불린, 예컨대 항체 및 상기 언급된 단편, 예컨대 Fv를 포함할 수 있다.

[0048] 항체의 "항원 결합 단편"은 온전 항체의 하나 이상의 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 및 항체 단편으로부터 형성된 단일-사슬 항체 분자를 포함한다. 예를 들어, 용어 항원 결합 단편은 재조합 단일 사슬 Fv 단편 (scFv) 뿐만 아니라 그의 2가 (디-scFv) 및 3가 (트리-scFv) 형태를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 일례에서, 결합 단백질은 항원 결합 단편이다. 이러한 단편은 당업계에서 공지된 다양한 방법을 통해 생성될 수 있다.

[0049] 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 본 개시내용과 관련하여 특정 항원을 인식하고 그에 결합하는 항체의 2개의 가변 사슬 (중쇄 및 경쇄)의 부분을 지칭하기 위해 사용된다. CDR은 가변 사슬의 가장 가변적인 부분이고 결합 단백질에 그의 특이성을 제공한다. 일반적으로 가변 중쇄 (V_H) 및 가변 경쇄 (V_L) 각각에는 3개의 CDR이 존재한다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이, "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합하는 본원에서 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분을 지칭하며, 예를 들어, CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 프레임워크 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 가변 영역은 3개의 CDR과 함께 3 또는 4개의 FR (예: FR1, FR2, FR3 및 임의로 FR4)을 포함한다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L 는 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0051] 일례에서, CDR 및 FR에 할당되는 아미노산 위치는 "Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991"에 따라 정의된다 (또한 본원에서 "카바트 (Kabat) 넘버링 시스템" 또는 "카바트"로서 언급됨).

[0052] 가변 도메인에 대한 수정 또는 대체 넘버링 시스템을 포함하는 다른 규약은 IMGT (Lefranc, 등 (2003), Dev Comp Immunol 27: 55- 77), 코티아(Chothia) (Chothia C, Lesk AM (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Chothia, 등 (1989), Nature 342: 877-883) 및 AHO (Honegger A, Plueckthun A (2001) J Mol Biol 309: 657-670)를 포함한다. 편의상, 본 개시내용의 결합 단백질의 예는 또한 IMGT에 따라 라벨링될 수 있다.

[0053] 용어 "항체 중쇄"는 본원에서 그의 자연 발생 구성형태로 모든 항체 분자 중에 존재하는 두가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 큰 것을 지칭하기 위해 사용된다. "항체 경쇄"는, 본원에서 사용되는 바와 같이, 그의 자연 발생 구성형태로 모든 항체 분자 중에 존재하는 두가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다. κ 및 λ 경쇄는 두가지 주요 항체 경쇄 이소타입을 지칭한다.

[0054] "숙주 세포", "숙주 세포 라인", 및 "숙주 세포 배양" 등의 용어는 본 개시내용과 관련하여, 이러한 세포의 자손을 포함한, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 숙주 세포는, 계대 (passage) 수에 관계 없이 1차 형질전환된 세포 및 그로부터 유래된 자손을 포함하는, "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량이 부모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다. 일례에서, 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.

[0055] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은, 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적

치환을 고려하지 않으며, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요한 경우, 서열을 정렬시키고 갭을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성의 결정을 위한 정렬은 당업계의 실무자의 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는, 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함한, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0056] "완충제"는, 용액 중의 그의 존재에 의해, pH의 단위 변화를 유발하기 위해 첨가되어야 하는 산 또는 알칼리의 양을 증가시키는 물질을 지칭한다. 완충 용액은 그의 산-염기 컨jug레이트 성분의 작용에 의해 pH 변화에 저항한다. 생물학적 시약과의 사용을 위한 완충 용액은 일반적으로, 용액의 pH가 생리적 범위 내에 있도록 수소 이온의 일정한 농도를 유지할 수 있다. 전통적인 완충제 성분은 유기 및 무기 염, 산 및 염기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 생물학적 분자 (예: 항체)의 정제에서의 사용을 위한 예시적 완충제는 쓰비티이온성 또는 "Good" 완충제를 포함하며, 예를 들어 하기 문헌을 참조한다: Good 등 (1966) Biochemistry 5:467 및 Good 및 Izawa (1972) Methods Enzymol. 24:62. 예시적 완충제는 TES, MES, PIPES, HEPES, MOPS, MOPSO, TRICINE 및 BICINE를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0057] 용어 "세척 완충제"는 본원에서, 본원에 개시된 결합 단백질이 결합되는, 주어진 물질, 예를 들어, 조성물 또는 컬럼 또는 수지로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 등의 불순물을 없애기 위해 사용되는 용액을 지칭하기 위해 사용된다.

[0058] 용어 "염기성"은 본 개시내용과 관련하여 염기성 pH를 갖는 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 용어는 세척 완충제와 관련하여 염기성 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 일례에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 2.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 3 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 3.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 4 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 4.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 4.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 적어도 5.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 2.5 내지 5.5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 또 다른 예에서, 용어 염기성은 중성보다 3 내지 5 초과의 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 9 내지 11의 pH를 갖는다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 9.5 내지 10.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 적어도 9의 pH를 갖는다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 적어도 9.5의 pH를 갖는다.

[0059] 반면, 용어 "산성"은 본 개시내용과 관련하여 산성 pH를 갖는 완충제를 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, 용어는 세척 완충제와 관련하여 산성 pH를 갖는 세척 완충제를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 산성 완충제는 7 미만의 pH를 갖는다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 5 내지 6.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 5.5 내지 6.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 6.5 이하의 pH를 갖는다. 용리 완충제 등의 본 개시내용의 다른 완충제는 세척 완충제보다 더 산성일 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 용리 완충제는 4 미만의 pH를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 용리 완충제는 3.5 이하의 pH를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 용리 완충제는 2.5 내지 3.5의 pH를 가질 수 있다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중성 pH"는 7의 pH를 지칭한다.

[0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "친화성 크로마토그래피 컬럼"은 친화성 크로마토그래피가 수행되는 수지를 포함하는 컬럼을 지칭한다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피는 본원에 개시된 조성물을 적합한 친화성 크로마토그래피 지지체를 포함하는 컬럼에 적용하는 것을 포함한다. 이러한 크로마토그래피 지지체의 비-제한적 예는 단백질 A 수지, 단백질 G 수지, 관심 결합 단백질이 그에 대해 발생된 항원을 포함하는 친화성 지지체, 및 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 지지체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 수지, 단백질 L 크로마토그래피 수지 또는 단백질 G 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 수지를 포함한다. 상업적으로 입수가 가능한 단백질 A 크로마토그래피 수지의 예는 MabSelect Xtra 및 MabSelect SuRe를 포함한다.

- [0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "바이러스 불활성화 단계"는, 바이러스를 조성물 중에 남아 있게 하지만, 영구적으로 생존 불가능하게 만든 공정을 지칭한다. 예를 들어, 바이러스 불활성화는 용액을 저pH로 조정함으로써 수행될 수 있다.
- [0063] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "저 pH"는 2 내지 4의 pH, 또는 3.4 내지 3.6의 pH, 또는 3.5의 pH를 의미하는 것으로 이해된다.
- [0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "바이러스 여과 단계"는, 바이러스가 조성물로부터 제거되게 하는 공정을 지칭한다. 예를 들어, 바이러스 여과는 나노필터 (예: Planova 20N) 등의 필터를 통해 조성물을 통과시킴으로써 수행될 수 있다.
- [0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "고분자량 형태" 또는 "고분자량 형태들"은 2개 이상의 결합 단백질 단량체 형태의 결합 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 결합 단백질 (예: 항-KMA 결합 단백질)의 고분자량 형태는 이량체, 또는 삼량체, 또는 사량체이다.
- [0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는, 박테리아, 곤충 및 포유류 세포를 포함한, 본원에 개시된 재조합 결합 단백질을 발현할 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 예를 들어, 포유류 세포는 HEK293 세포 또는 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO 세포)일 수 있다. 일례에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 예를 들어, 숙주 세포는 본원에 개시된 결합 단백질을 발현하는 유전적으로 변형된 숙주 세포일 수 있다. 따라서, 일례에서, 본 개시내용의 방법은 CHO 세포 배양의 배양액 또는 그로부터 유래된 조성물로부터 본원에 개시된 결합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있다.
- [0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발효"는 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 숙주 세포가 세포 배양 배지에서 증식되어 결합 단백질을 발현하는 과정을 지칭한다. 최적 발효 조건은, 온도 범위, 통기 수준, 공급 속도 및 배지 조성을 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 파라미터에 따라 달라진다. 발효는 호기성, 혐기성 또는 미세호기성 조건 하에서 수행될 수 있다. 발효는 또한 예를 들어 하나의 또는 생물반응기를 사용하여 대규모 배치 배양에서 수행될 수 있다.
- [0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "정화된" 또는 "정화"는 원심분리, 침출 여과, 침전, 응집(flocculation) 및/또는 침강 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함하는 하나 이상의 단계를 사용한 전체 세포 및/또는 세포 파편의 제거를 수반하는 하나 이상의 단계를 지칭한다. 정화는 일반적으로 하나 이상의 불순물의 제거를 수반하고, 결합 단백질의 포획을 수반하는 정제 단계 전에 수행된다. 예를 들어, 정화는 침출 여과 및 원심분리를 수반할 수 있다. 일례에서, 본 개시내용의 조성물은 본원에 개시된 방법에 따라 정제되기 전에 정화된다.
- [0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 배양액"은 발효 동안 또는 후, 그러나 결합 단백질의 포획을 수반하는 정제 단계 전의 결합 단백질을 포함하는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일례에서, 세포 배양액은 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조제물을 제공하기 위해 정제되거나 부분적으로 정제된 것이다.
- [0070] 용어 "정제하다" 또는 "정제하는" 또는 "정제"는 결합 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액으로부터 적어도 하나의 불순물을 완전히 또는 부분적으로 제거하는 것을 지칭하며, 이로써 용액 중의 결합 단백질의 순도 수준이 개선된다. 불순물은 본 개시내용의 방법의 결과로서, 예를 들어 정제 공정 전에 또는 동안 수행된 단계에 의해 생성된 결합 단백질과 존재할 수 있는 DNA, RNA, 숙주 세포 단백질 (HCP), 내독소, 지질 및 하나 이상의 첨가제를 포함한다. 정제된 결합 단백질은 본질적으로 순수하고 바람직하게는 본질적으로 균질하다 (즉, 오염 단백질 등을 갖지 않음). 일례에서, 본 개시내용의 방법은 본원에 개시된 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 정제하거나 부분적으로 정제한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 본원에 개시된 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 및 고분자량 집합물을 정제하거나 부분적으로 정제한다. 일례에서, 고분자량 집합물은 이량체 등의 결합 단백질 복합체이다. 일례에서, 정제된 결합 단백질은 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 있어 적어도 60% 무함유, 보다 바람직하게는 적어도 75% 무함유, 또한 보다 바람직하게는 적어도 90% 무함유이다. 또 다른 예에서, 정제된 결합 단백질은 결합 단백질의 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 및 고분자량 집합물에 있어 적어도 60% 무함유, 보다 바람직하게는 적어도 75% 무함유, 또한 보다 바람직하게는 적어도 90% 무함유이다. 이들 예에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄일 수 있다. 일례에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 22 내지 25 kD의 분자량을 갖는다. 일례에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄 이량체이다. 일례에서, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 45 내지 50 kD의 분자량을 갖는다.
- [0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "제약 조성물"은 인간으로의 치료적 단백질의 전달을 위한 당업계에서 일반

적으로 허용되는 화합물과의 결합 단백질의 제제를 지칭한다. 예시적 화합물은 모든 그의 제약상 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "진단 조성물"은 진단 형태의 본원에 개시된 결합 단백질의 제공을 위한 당 업계에서 일반적으로 허용되는 화합물과의 결합 단백질의 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 시험관내 또는 생체 내에서 사용될 수 있고, 따라서, 응용에 따라, 적절한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 그에 따라 제제화될 수 있다.

[0073] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형 및 단수 형태의 용어, 예를 들어 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명백히 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 임의로 포함한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은, 달리 언급되지 않는 한, 지정된 값의 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 1\%$ 를 지칭한다.

[0075] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되고, 양쪽 의미 또는 한쪽 의미에 대한 명시적 지지를 제공하는 것으로 간주된다.

[0076] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다" 또는 "포함" 또는 "포함하는" 등의 변형어는, 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹의 포함, 그러나 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지는 않음을 암시하는 것으로 이해될 것이다.

[0077] 결합 단백질

[0078] 본 개시내용에서의 생성, 정제, 제제화 또는 사용을 위한 결합 단백질은 하기 개시내용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일례에서, 결합 단백질은 재조합 결합 단백질이다. 일례에서, 결합 단백질은 CHO 세포에 의해 생성된다.

[0079] 일례에서, 결합 단백질은 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 단백질은 항체일 수 있다. 예를 들어, 결합 단백질은 모노클로날 항체일 수 있다. 일례에서, 결합 단백질은 인간 항체이다. 일례에서, 항체는 인간화된다. 일례에서, 항체는 키메라 항체이다.

[0080] 일례에서, 결합 단백질은 항-KMA 결합 단백질이다. 예를 들어, 결합 단백질은 항-KMA 항체일 수 있다. 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 비해 KMA에 우선적으로 결합한다.

[0081] 일례에서, 결합 단백질은 VH 영역 및 VL 영역을 포함하며, 여기서 VH 영역은 = 서열 번호:4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하고, 여기서 VL 영역은 서열 번호:7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 이 예에서, 결합 단백질은 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 단백질은 항체를 포함하는 이중-특이적 분자일 수 있다. 이 예에서, 항체는 상기에 참조된 CDR을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 결합 단백질은 항체이다.

[0082] 따라서, 일례에서, 결합 단백질은 VH 영역 및 VL 영역을 포함하는 항체이며, 여기서 VH 영역은 서열 번호:4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하고, 여기서 VL 영역은 서열 번호:7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다.

[0083] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 VL 영역을 포함하는 항체이다.

[0084] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 VL 영역을 포함하는 항체이다.

[0085] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포

합하는 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 VL 영역을 포함하는 항체이다.

[0086] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 VL 영역을 포함하는 항체이다.

[0087] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하거나 또는 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체와 카파 골수종 항원 (KMA)의 동일한 에피토프에 결합하는 항체이다.

[0088] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 VH 영역 및 서열 번호:3에 기재된 VL 영역을 포함하는 항체이다.

[0089] 다양한 예에서, 언급된 서열 번호와 언급된 % 동일성을 갖는 상기에 참조된 서열 변이체는 또한 VH 영역 및 VL 영역을 가질 수 있으며, 여기서 VH 영역은 서열 번호:4에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하고, 여기서 VL 영역은 서열 번호:7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호:8에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 및 서열 번호:9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 예를 들어, 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 1과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열, 서열 번호: 4, 서열 번호: 5, 서열 번호: 6에 나타난 바와 같은 CDR을 포함하는 VH 및 서열 번호: 3과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 아미노산 서열 및 서열 번호: 7, 서열 번호: 8, 서열 번호: 9에 나타난 바와 같은 CDR을 포함하는 VL을 갖는다.

[0090] 또 다른 예에서, 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 1 및 서열 번호: 3에 나타난 CDR을 가지며, 여기서 CDR은 카바트 넘버링 시스템을 사용하여 할당된다. 또 다른 예에서, 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 1 및 서열 번호: 3에 나타난 CDR을 가지며, 여기서 CDR은 IMGT 넘버링 시스템을 사용하여 할당된다. 또 다른 예에서, 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 1 및 서열 번호: 3에 나타난 CDR을 가지며, 여기서 CDR은 카바트의 EU 넘버링 시스템을 사용하여 할당된다.

[0091] 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 네이키드(naked) 항체이다. 다른 예에서, 항-KMA 결합 단백질은 전장 항체, 온전 항체 또는 전체 항체이다. 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 단일특이성이다. 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 이중-특이성이다.

[0092] 또한, 상기 예에서, 결합 단백질은 서열 번호:2 또는 서열 번호:10에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 KMA 에피토프에 결합할 수 있다.

[0093] 또 다른 예에서, 본 개시내용에 따른 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 2에 나타난 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항체와 경쟁한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용에 따른 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호: 10에 나타난 바와 같은 아미노산 서열로 이루어진 에피토프에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항체와 경쟁한다.

[0094] 결합 단백질은 당업계에서 공지된 다양한 방법을 사용하여 KMA 또는 그의 영역 또는 에피토프에 결합하는 것에 대하여 경쟁하는 그의 능력에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, KMS-11, KMS-26 및 JJN3 등의 카파 인간 골수종 세포 라인 (κ HMCL) 상의 KMA에 대한 결합이 평가될 수 있다 (Asvadi 등 (2015) British Journal of Haematology, 169, 333-343). 이 절차에서, 항-KMA 결합은 확립된 절차를 사용하여 비오틴과 컨쥬게이션된다 (Hofmann K, 등 (1982) Biochemistry 21: 978-84). 이어서, 결합 단백질은 κ HMCL 세포 상의 KMA에 대한 비오틴화 항체의 결합과 경쟁하는 그의 능력에 의해 평가된다. κ HMCL 세포에 대한 비오틴화 항체의 결합은 라벨링된 항체 상의 비오틴에 결합할 플루오레세인-라벨링된 스트렙타비딘의 부가에 의해 평가될 수 있다. 이어서, 세포의 형광 염색이 유동 세포계측법에 의해 정량화되고, 항체의 경쟁 효과가 경쟁자의 부재 하에 얻은 형광 수준의 백분율로서 표시된다.

[0095] 일례에서, 결합 단백질은 면역 세포 관여자(engager)를 포함한다. 예를 들어, 결합 단백질은 면역 세포 관여 이중-특이적 결합 단백질일 수 있다. 예를 들어, 면역 세포 관여자는 본원에 개시된 결합 단백질을 T-세포 또는 자연 살해 (NK) 세포에 관여시킬 수 있다. 면역 세포 관여자의 예는 항-CD3 결합 도메인, 항-CD19 결합 도

메인 및 항-CD16 결합 도메인을 포함한다. 일례에서, 면역 세포 관여자는 항-CD3 결합 도메인을 통해 T-세포에 관여할 수 있다. 다른 예에서, 면역 세포 관여자는 항-CD4 또는 항-CD8 결합 도메인을 통해 T-세포에 관여할 수 있다. 면역 세포 관여자의 다양한 다른 예가 하기 문헌에 개시되어 있다: Suurs 등, (2019) *Pharmacology and Therapeutics.*, 201:103-119.

[0096] 상기에 참조된 예에서, KMA에 대한 본원에 개시된 결합 단백질의 친화도는 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일례에서, KMA에 대한 결합 단백질의 해리 상수 (K_D) 또는 회합 상수 (K_A) 또는 평형 상수 (K_D)가 결정된다. 결합 단백질에 대한 이들 상수는, 일례에서, 방사선라벨링 또는 형광-라벨링 KMA-결합 검정에 의해 측정된다. 이 검정은 라벨링되지 않은 KMA의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 라벨링된 KMA와 결합 단백질을 평형화한다. 비-결합된 KMA의 제거를 위한 세척 후, 라벨의 양을 결정한다. 서열 번호:2를 포함하는 아미노산 서열을 사용하여 유사한 검정을 수행할 수 있다.

[0097] 친화도 측정은 항체 반응에 대한 표준 방법론, 예를 들어, 면역검정, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) (Rich 및 Myszkowski *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:54, 2000; Englebienne *Analyst.* 123: 1599, 1998), 등은 적정 열량계측법 (ITC) 또는 당업계에 공지된 다른 동적 상호작용 검정에 의해 결정될 수 있다. 일례에서, 상수는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여, 예를 들어, 고정화 KMA와 BIAcore 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지 주 피스카타웨이)을 사용하여 측정된다. 예시적 SPR 방법이 미국 특허 번호 7,229,619에 기재되어 있다.

[0098] 결합 단백질 조성물

[0099] 본 발명자들은 놀랍게도, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질을 낮은 수준으로 포함하는 유용한 결합 단백질 조성물을 확인하였다. 이러한 조성물은 보다 효과적인 치료를 제공하는 증가된 치료적 효력, 또는 잠재적으로, 보다 낮은 투여 및 그에 따라 증가된 안전성 및/또는 보다 비용 효율적인 제조로 인해 특히 유리할 수 있다. 일례에서, 본 개시내용은, 상기에 참조된 결합 단백질을 포함하며, 여기서 조성물 중의 결합 단백질의 20% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질인 조성물에 관한 것이다. 또 다른 예에서, 조성물은 상기에 참조된 결합 단백질을 포함하며, 여기서 조성물 중의 결합 단백질의 15% 미만 이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질이다. 또 다른 예에서, 조성물은 상기에 참조된 결합 단백질을 포함하며, 여기서 조성물 중의 결합 단백질의 10% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질이다. 또 다른 예에서, 조성물은 상기에 참조된 결합 단백질을 포함하며, 여기서 조성물 중의 결합 단백질의 6% 미만이 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄와의 복합체 중의 결합 단백질이다. 일례에서, 결합 단백질은 항-KMA 결합 단백질이다. 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 VH 및 VL을 포함하며, 여기서 VH는 서열 번호: 4, 5 및 6에 기재된 바와 같은 CDR을 포함하고, VL은 서열 번호: 7, 8 및 9에 기재된 바와 같은 CDR을 포함한다. 일례에서, 항-KMA 결합 단백질은 서열 번호:1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호:3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일례에서, 조성물 중의 결합 단백질은 CHO 세포에 의해 생성된다. 일례에서, 조성물 중의 결합 단백질은 항체를 포함한다. 일례에서, 조성물 중의 결합 단백질은 항체이다.

[0100] 결합 단백질의 생성

[0101] 일례에서, 본원에 기재된 바와 같은 결합 단백질은 펩티드 또는 폴리펩티드이다 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다). 일례에서, 결합 단백질은 재조합이다.

[0102] 재조합 펩티드 또는 폴리펩티드의 경우, 이를 코딩하는 핵산은 발현 벡터로 클로닝될 수 있으며, 이어서 숙주 세포, 예컨대 대장균(*E. coli*) 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유류 세포, 예컨대 유인원 COS 세포, 차이 니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 세포, 또는 골수종 세포로 트랜스펙션되고, 이는 다른 경우에는 면역글로불린 또는 항체 단백질을 생성하지 않는다.

[0103] 적합한 분자 클로닝 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 하기 문헌에 기재되어 있다: Ausubel 등, (편집자), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트 포함) 또는 Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). 폭넓게 다양한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법이 재조합 핵산의 구축에 적합하다. 재조합 항체의 생성 방법 또한 당업계에 공지되어 있다. 미국 특허 번호 4,816,567 또는 미국 특허 번호 5,530,101을 참조한다.

[0104] 단리 후, 핵산은 추가 클로닝 (DNA의 증폭)을 위해 또는 무세포 시스템에서 또는 세포에서 발현을 위해 발현 구축물 또는 발현 벡터에서의 프로모터에 작동가능하게 연결되어 삽입된다. 따라서, 본 개시내용의 또 다른 예는

본 개시내용의 단리된 핵산 및 하나 이상의 추가의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 구축물을 제공한다. 적합하게, 발현 구축물은 당업계에서 이해되는 바와 같이 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 효모 또는 박테리아 인공 염색체의 유전 성분을 포함하거나 이들 형태이다. 발현 구축물은 박테리아 또는 다른 숙주 세포에서 단리된 핵산의 유지 및 증식에, 재조합 DNA 기술에 의한 조작에 및/또는 본 개시내용의 핵산 또는 결합 단백질의 발현에 적합할 수 있다.

- [0105] 세포에서의 발현을 위한 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 하기 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 결합 단백질을 코딩하는 서열 (예: 본원에 제공된 정보로부터 유래됨), 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열. 예시적 신호 서열은 원핵생물 분비 신호 (예: pelB, 알칼리 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II), 효모 분비 신호 (예: 인버타제 리더, α 인자 리더, 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유류 분비 신호 (예: 단순 포진 gD 신호)를 포함한다.
- [0106] 포유류 세포에서 활성인 예시적 프로모터는 사이토메갈로바이러스 급초기 프로모터 (CMV-IE), 인간 신장 인자 1- α 프로모터 (EF1), 소형 핵 RNA 프로모터 (U1a 및 U1b), α -미오신 중쇄 프로모터, 유인원 바이러스 40 프로모터 (SV40), 라우스 육종 바이러스 프로모터 (RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β -액틴 프로모터; CMV 인핸서/ β -액틴 프로모터를 포함하는 하이브리드 조절 요소 또는 면역글로불린 또는 항체 프로모터 또는 그의 활성 단편을 포함한다. 유용한 포유류 숙주 세포 라인의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 또는 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)를 포함한다.
- [0107] 예를 들어 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 에스.폼베(*S. pombe*)를 포함하는 균으로부터 선택된 효모 세포와 같은 효모 세포에서의 발현에 적합한 전형적인 프로모터는 *ADHI* 프로모터, *GAL1* 프로모터, *GAL4* 프로모터, *CUP1* 프로모터, *PHO5* 프로모터, *nmt* 프로모터, *RPR1* 프로모터, 또는 *TEF1* 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0108] 단리된 핵산 또는 이를 포함하는 발현 구축물을 발현을 위해 세포로 도입하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 주어진 세포에 사용되는 기술은 공지된 성공적인 기술에 따라 달라진다. 재조합 DNA를 세포로 도입하기 위한 수단은, 다른 것들 중에서도 특히, 미세주입, DEAE-텍스트란에 의해 매개되는 트랜스펙션, 리포펙타민 (Gibco, 미국 메릴랜드주) 및/또는 선택틴 (Gibco, 미국 메릴랜드주) 사용에 의한 것과 같은 리포솜에 의해 매개되는 트랜스펙션, PEG-매개 DNA 흡취, DNA-코팅 텅스텐 또는 금 입자 (Agracetus Inc., 미국 위스콘신주) 사용에 의한 것과 같은 마이크로입자 충돌 및 전기천공을 포함한다.
- [0109] 결합 단백질 (예: 항체 또는 항원 결합 단편) 생성에 사용되는 숙주 세포는, 사용되는 세포 유형에 따라, 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예컨대 Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 돌베코 변형 이글 배지 ((DMEM), Sigma)가 포유류 세포 배양에 적합하다. 본원에서 논의된 다른 세포 유형의 배양을 위한 배지는 당업계에 공지되어 있다.
- [0110] 결합 단백질의 생성을 위한 예시적 프로토콜은 하기 단계를 포함할 수 있다. 재조합 결합 단백질을 발현할 수 있는 포유류 숙주 세포를 교반 탱크 생물반응기 시스템 및 유가식(fed-batch) 배양에서 배양할 수 있다. 유가식 배양의 일례에서, 포유류 숙주 세포 및 배양 배지를 초기에 배양 배지에 공급하고, 추가의 배양 영양소를, 연속적으로 또는 불연속적 증분으로, 배양 동안 배양물에, 발효 종료 전에 배양 용기로부터 세포 및/또는 결합 단백질의 주기적 제거와 함께 또는 이러한 제거 없이 공급한다.
- [0111] 성장 단계에서, 포유류 숙주 세포를 성장을 위해 최적화된 조건 하에 일정 기간 동안 성장시킨다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH, 용해 산소 (dO_2), 및 영양소 보충은 일반적으로 숙주 세포에 따라 맞춤화되고, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 일반적으로, pH는 약 6.5 내지 7.5의 수준으로 조정된다. CHO 세포 등의 포유류 세포 배양을 위한 적합한 온도 범위는 약 30°C 내지 38°C이고, 적합한 dO_2 는 공기 포화의 5-90%이다. 발효의 생성 단계 동안 세포 배양 환경은 전형적으로 배치 사이의 결합 단백질의 생성에서 컨시스턴시(consistency) 및 품질을 보장하도록 제어된다. 전형적으로, CHO 세포에 의해 생성된 결합 단백질이 세포 배양 배지로 분비된다. 발효 후, 결합 단백질을 포함하는 세포 배양 배지를 정화시킬 수 있다.
- [0112] 유리 경쇄-결합 단백질 복합체
- [0113] 본 발명자들은, 결합 단백질의 생성 동안, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄가 결합 단백질과 결합하여 복합체를 형성할 수 있음을 실험적으로 확인하였다. 치료적 제제에서 이러한 복합체의 존재는, 이들이 제제의 효력에 영

향을 주기 때문에, 특히 바람직하지 않다.

- [0114] 일례에서, 본 개시내용은, 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 조성물을 중성 pH의 평형화된 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩하여 조성물 중의 결합 단백질을 친화성 크로마토그래피 컬럼에 결합시키는 단계, 친화성 크로마토그래피 컬럼을 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하여 조성물로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 세척하는 단계; 및 친화성 컬럼에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계를 포함하는, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄로부터 결합 단백질을 정제하는 방법에 관한 것이다.
- [0115] 일례에서, "평형화", "세척" 또는 "용리"는 적어도 1 컬럼 부피 (CV)의 각각의 완충제를 크로마토그래피 컬럼으로 통과시키는 것을 포함한다. 예를 들어, "세척" 단계는 적어도 1 CV의 세척 완충제를 크로마토그래피 컬럼으로 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서는, 세척 단계에서 적어도 1 내지 25 CV의 세척 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 또 다른 예에서는, 세척 단계에서 적어도 3 내지 20 CV의 세척 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 또 다른 예에서는, 세척 단계에서 적어도 5 내지 15 CV의 세척 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 일례에서, "용리" 또는 "용리하는" 단계는 적어도 1 CV의 용리 완충제를 크로마토그래피 컬럼으로 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서는, 용리 단계에서 적어도 1 내지 25 CV의 용리 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 또 다른 예에서는, 용리 단계에서 적어도 3 내지 20 CV의 용리 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 또 다른 예에서는, 용리 단계에서 적어도 5 내지 15 CV의 용리 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다. 각각의 단계에서 필요한 CV 수의 결정은 당업자의 이해 범위 내에서 잘 고려된다.
- [0116] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 1X 인산염 완충 식염수 (PBS)로 평형화된다. 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 적어도 10 CV의 1X PBS로 평형화될 수 있다.
- [0117] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세척 완충제"는 크로마토그래피 컬럼의 고체 상으로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 대체하기 위해 배합되는 완충제를 지칭한다. 일례에서, 방법은 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로의 세척을 포함한다. 일례에서, 염기성 완충제는 9.5 내지 10.5의 pH를 갖는다. 또 다른 예에서, 염기성 세척 완충제는 탄산나트륨을 포함한다. 세척 완충제 중의 탄산나트륨의 예시적 농도는 0.1M 내지 0.2M의 범위이다. 또 다른 예에서, 염기성 세척 완충제는 또한 염화나트륨을 포함한다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 1M 염화나트륨을 포함한다.
- [0118] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼의 세척은 염기성 세척 완충제로의 2회 세척을 포함한다. 다른 예에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 컬럼에 결합된 결합 단백질이 용리되기 전에 염기성 세척 완충제로 3, 4 또는 5 회 세척될 수 있다. 일례에서, 염기성 세척 완충제는 동일한 pH를 갖는다. 예를 들어, 세척 완충제는 10.2의 pH를 가질 수 있다. 일례에서, 컬럼은 0.2M 탄산나트륨을 포함하는 염기성 세척 완충제로 세척된 후 0.1M 탄산나트륨을 포함하는 또 다른 염기성 세척 완충제로 세척된다. 이 예에서는 약 5 - 20 CV의 각각의 세척 완충제가 크로마토그래피 컬럼으로 통과될 수 있다. 일례에서는, 제1 세척에서 적어도 10 CV가 크로마토그래피 컬럼으로 통과되고, 제2 세척에서 적어도 5 CV가 크로마토그래피 컬럼으로 통과된다.
- [0119] 일례에서, 본 개시내용의 방법은 친화성 크로마토그래피 컬럼을 산성 세척 완충제로 세척하는 것을 포함한다. 일례에서, 본 개시내용의 방법은, 컬럼을 염기성 세척 완충제로 세척한 후 친화성 크로마토그래피 컬럼을 산성 세척 완충제로 세척하는 것을 포함한다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 5.5 내지 6.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 인산나트륨을 포함한다. 예를 들어, 산성 세척 완충제는 20 - 50mM 인산나트륨을 포함할 수 있다. 일례에서, 산성 세척 완충제는 약 35mM 인산나트륨을 포함할 수 있다.
- [0120] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼에 결합된 결합 단백질은 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용리 완충제로 세척함으로써 용리될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "용리 완충제"는 크로마토그래피 컬럼에 결합된 결합 단백질을 제거하기 위해 제제화된 완충제를 지칭한다. 용리 완충제는 결합 단백질을 해리시키도록 작용한다. 전형적인 용리 물질은 당업계에 널리 공지되어 있고, 보다 높은 농도의 염, 유리 친화성 리간드 또는 유사체, 또는 주어진 물질로부터의 결합 단백질의 해리를 촉진시키는 다른 물질을 가질 수 있다. 용리 완충제의 전도도 및/또는 pH는, 결합 단백질이 컬럼으로부터 용리되도록 하는 것이다. 일례에서, 용리 완충제는 산성이다. 일례에서, 용리 완충제는 본원에 개시된 방법에서 사용되는 세척 완충제보다 더 산성이다. 일례에서, 용리 완충제는 2 - 4의 pH를 갖는다. 일례에서, 용리 완충제는 2.5 내지 3.5의 pH를 갖는다. 일례에서, 용리 완충제는 3의 pH를 갖는다. 일례에서, 용리 완충제는 인산나트륨을 포함한다. 예를 들어, 용리 완충제는 5 내지 15 mM 인산나트륨을 포함할 수 있다. 일례에서, 용리 완충제는 10 mM 인산나트륨을 포함한다.

- [0121] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 크기 배제 크로마토그래피 HPLC (SEC-HPLC) 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 75% 또는 85%, 또는 90%, 또는 95%, 또는 99% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0122] 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 75% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0123] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 85% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0124] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 90% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0125] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 적어도 95% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0126] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 85% 내지 95% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0127] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 결합 단백질은 SEC-HPLC 및/또는 BioCore 검정에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질에 대하여 90% 내지 95% 비-결합된 결합 단백질이다.
- [0128] 또 다른 예에서, 본 개시내용은, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포 배양 또는 그로부터 유래된 조성물로부터의 결합 단백질을 중성 pH의 친화성 크로마토그래피 수지에 결합시키는 단계; 수지를 중성 pH보다 적어도 2.5 내지 5 초과의 pH를 갖는 염기성 세척 완충제로 세척하는 단계; 및 수지에 결합된 결합 단백질을 용리 완충제로 용리하는 단계를 포함하는, 결합 단백질을 발현하는 CHO 세포 배양으로부터 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합하는 결합 단백질을 정제하는 방법을 제공한다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 수지를 포함한다.
- [0129] 일례에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 제거된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄이다. 일례에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 제거된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄의 분자량은 22 내지 25 kD이다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 제거된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄는 카파 경쇄 이량체이다. 일례에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 제거된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄의 분자량은 45 내지 50 kD이다.
- [0130] 일례에서, 본원에 개시된 조성물로부터 정제된 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄 또는 그의 복합체의 분자량은 20 내지 100 kD이다. 또 다른 예에서, 분자량은 22 내지 80 kD이다. 또 다른 예에서, 분자량은 22 내지 50 kD이다.
- [0131] 일례에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 조성물을 적합한 친화성 크로마토그래피 지지체를 포함하는 컬럼에 적용하는 것을 포함한다. 이러한 크로마토그래피 지지체의 비-제한적 예는 단백질 A 수지, 단백질 G 수지, 관심 항체가 그에 대해 발생된 항원을 포함하는 친화성 지지체, 및 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 지지체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 단백질 A 수지는 항체 (IgG) 결합에 유용하다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 수지를 포함한다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 컬럼이다. 또 다른 예에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 L 크로마토그래피 컬럼이다. 추가의 예에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 G 크로마토그래피 컬럼이다.
- [0132] 용리액은 당업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, OD₂₈₀에서의 흡광도가 후속될 수 있다. 용리된 결합 단백질은, 필요한 경우 하기에서 논의되는 추가의 방법 단계 중 하나 이상을 통해 추가의 가공처리를 위해 준비될 수 있다.

[0133] 출발 조성물

[0134] 일례에서, 출발 조성물은 본원에 개시된 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 배양에 따라 수득된 세포 배양액이다. 예를 들어, 출발 조성물은 본원에 개시된 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 CHO 세포의 배양에 따라 수득된 세포 배양액일 수 있다. 그러나, 이 출발 조성물은 본 개시내용의 방법에 대한 적용 전에 부분적으로 정제되어야 할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양액은 세포 파편의 제거를 위해 정화되어야 할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 방법에 따라 정제된 조성물은, 이들이 본원에 개시된 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 배양에 따라 수득된 세포 배양액으로부터 유래되고 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 포함하는 한, 특별히 제한되지 않는다. 일례에서, 출발 조성물은 비-결합된 결합 단백질, 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 결합 단백질 및 중쇄와 회합되지 않은 비-결합된 유리 경쇄를 포함한다. 일례에서, 조성물은 또한 결합 단백질의 고분자량 집합물을 포함한다.

[0135] 일례에서, 출발 조성물은 항-KMA 결합 단백질과 같은 본원에 개시된 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 CHO 세포의 배양에 따라 수득된 세포 배양액으로부터 유래된다.

[0136] 추가 방법 단계

[0137] 일례에서, 본 개시내용의 방법은, 결합 단백질이 상기에 참조된 세척 단계에 적용되고 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된 후 추가의 단계를 포함한다. 예를 들어, 용리된 결합 단백질은 이후에 추가의 크로마토그래피 단계에 적용될 수 있다. 예를 들어, 용리된 결합 단백질은 임의의 가능성 있는 고분자량 종을 제거하기 위해 양이온 교환 크로마토그래피에 적용될 수 있다. 예를 들어, 결합 단백질 복합체와 같은 고분자량 집합물을 제거하기 위해 양이온 교환 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 따라서, 일례에서, 본 개시내용의 방법은 양이온 교환 크로마토그래피를 추가로 포함할 수 있다. 다른 예시적 추가의 크로마토그래피 정제 단계는 이온 교환 크로마토그래피, 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및/또는 혼합 모드 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일례에서, 본 개시내용의 방법은 바이러스 불활성화 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용의 방법은 바이러스 여과 단계를 추가로 포함한다.

[0138] 일례에서, 정화된 세포 배양액은 본 개시내용에 따른 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄를 제거하도록 정제된 후 양이온 교환 크로마토그래피, 한외여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 페닐 세파로스 HP 크로마토그래피, 바이러스 여과 및 한외여과에 적용된다.

[0139] 제제화

[0140] 일례에서, 방법은 정제된 결합 단백질을 제약 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0141] 본원에서의 개시내용은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 정제된 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.

[0142] 투여되는 결합 단백질을 포함하는 적절한 제약 조성물은 생리학적으로 허용가능한 담체 중에서 제조될 수 있다. 용액 또는 에멀전을 위해, 적합한 담체는, 예를 들어, 수성 또는 알콜성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함하고, 이는 식염수 및 완충 매질을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거의 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 젖산 링거 또는 고정 오일을 포함할 수 있다. 다양한 적절한 수성 담체가 당업자에게 공지되어 있고, 이는 물, 완충수, 완충 식염수, 폴리에올 (예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜), 텍스트로스 용액 및 글리신을 포함한다. 정맥내 비히클은 다양한 첨가제, 보존제, 또는 유체, 영양소 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다 (일반적으로 하기 문헌 참조: Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980). 조성물은 생리학적 조건에 접근하기 위해 필요에 따라 임의로 제약상 허용가능한 보조제 물질, 예컨대 pH 조정 및 완충 작용제 및 독성 조정 작용제, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 젖산나트륨을 함유할 수 있다. 화합물은, 당업계에 공지된 동결건조 및 재구성 기술에 따라, 사용 전에 저장을 위해 동결건조되고 적합한 담체 중에서 재구성될 수 있다.

[0143] 선택된 매질 중의 활성 성분(들)의 최적 농도는, 당업자에게 공지된 절차에 따라 경험적으로 결정될 수 있고, 이는 요망되는 궁극적 제약 제제에 따라 달라질 것이다.

[0144] 유사하게, 일례에서, 결합 단백질은 본 개시내용에 따라 정제되고 조성물의 의도된 응용 (예: 시험관내 vs 생체내)에 따라 상기에 참조된 성분 중 하나 이상을 포함하는 진단 조성물로 제제화될 수 있다.

[0145] 실시예

[0146] 실시예 1: 항-카파 골수종 항원 (KMA) 결합 단백질의 발현

[0147] 유가식 현탁 배양에서 결합 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 성장시킴으로써 항-카파 골수종 항원 (항-KMA) 결합 단백질을 발현시킨다. 본원에서 사용된 유전적으로 변형된 CHO 세포의 생성은 일반적으로 WO2003/004056에 기재되어 있다. 현탁 배양 후, CHO 세포를 심층 여과 및 0.2 μ m 여과에 의해 세포 배양액 (CCF)으로부터 제거한다. 생성된 CCF를 수집하고 2℃ 내지 8℃에서 저장한다.

[0148] 실시예 2: 재조합 항-카파 골수종 항원 (KMA) 결합 단백질 A 친화성 크로마토그래피 정제

[0149] 단백질 A 크로마토그래피 정제를 위해 항-KMA 결합 단백질을 함유하는 CCF를 제조하기 위해, CCF의 단백질 농도를 ≤ 3.5 g/L로, 또한 ≥ 6.8 의 pH로 조정하였다.

[0150] 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼 (MabSelect Xtra Load)을 7.3 내지 7.5의 pH 및 14.0-16.8 mS/cm의 전도로 적어도 5 컬럼 부피 (CV)의 1x PBS (평형 완충제)로 평형화하였다.

[0151] 이어서, 단백질 농도 및 pH 조정된 CCF를 평형화된 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩한 후 컬럼을 200 mM 탄산나트륨, 1M 염화나트륨, pH 10.2의 ≥ 15 CV 염기성 세척 완충제로 세척하였다. 컬럼을 100 mM 탄산나트륨, pH 10.2의 ≥ 5 CV의 염기성 세척 완충제, 그 후 35 mM 인산나트륨, pH 6.2의 ≥ 4 CV의 산성 세척 완충제로 세척하였다.

[0152] 항-KMA 결합 단백질을 10 mM 인산나트륨 pH 3.0의 용리 완충제로 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리하고, 280 nm의 흡광도 파장 측정에 의해 모니터링하였다. 단일 피크 분획을 수집하였고, 이는 각각 베이스라인의 15% 초과에서 출발하고 5% 초과에서 종료된다.

[0153] 실시예 3: 재조합 항-KMA 결합 단백질의 대체 단백질 A 친화성 크로마토그래피 정제

[0154] 대체 접근에서, CCF를 염기성 세척 완충제 (200 mM 탄산나트륨, 1M 염화나트륨, pH 10.2)로의 2회 세척 후 용리 및 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 항-카파 골수종 결합 단백질의 수집으로 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 결과는 실시예 2와 유사하였다.

[0155] 실시예 4: 저pH 처리 및 조정

[0156] 항-KMA 결합 단백질을 함유하는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 용리액을 추가로 저pH 바이러스 불활성화, 중화 및 바이러스 여과에 적용하였다. 바이러스 불활성화는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 용리액의 pH를 1 N 염산으로 3.40 내지 3.60으로 조정하고 용리액을 실온에서 60 내지 75분 동안 유지하여 임의의 가능성 있는 오염 바이러스를 불활성화함으로써 수행하였다. 바이러스 불활성화 후에 1N 수산화나트륨으로 용리액을 6.1 내지 6.3의 pH로 중화시킨 후 0.2 μ m 여과하고 추가의 가공처리까지 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.

[0157] 실시예 2 또는 3을 통한 정제 및 후속 바이러스 불활성화, 중화 및 여과 후 항-KMA 단량체의 수율은 SEC-HPLC 및 BioCore 검정에 의해 결정된 활성에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 항-KMA 결합 단백질에 대하여 90%였다.

[0158] 실시예 4: 양이온 교환 크로마토그래피 정제

[0159] 단백질 A 친화성 크로마토그래피 용리액의 저pH 바이러스 불활성화, 중화 및 바이러스 여과 후, 용리액을 양이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 용리액 중에 존재하는 임의의 가능성 있는 고분자량 종을 제거하였다. 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼 (Fractogel EMD SE HiCap)을 pH 6.2에서 ≥ 5 CV의 35 mM 인산나트륨으로 평형화하였다. 용리액의 단백질 농도를 ≤ 8.5 mg/ml pH 6.1 내지 6.3으로 조정한 후 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩하였다.

[0160] 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 결합된 항-KMA 결합 단백질을 ≥ 5 CV의 20 mM 인산나트륨 pH 6.2로 세척하고, 항-KMA 결합 단백질을 35 mM 인산나트륨 및 30 mM 염화나트륨 pH 6.2로 용리하고, 280 nm의 흡광도 파장 측정에 의해 모니터링하였다. 베이스라인 초과에서, 또한 흡광도가 최대 피크 높이의 대략 20% 내지 30%로 내려갈 때 종료하여 단일 피크 분획을 수집하였다.

[0161] 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 양이온 교환 크로마토그래피의 조합은 SEC-HPLC 및 BioCore 검정에 의해 결정된 활성에 의해 결정시 중쇄와 회합되지 않은 유리 경쇄에 결합된 항-KMA 결합 단백질에 대하여 95% 순수 항-KMA 결합 단백질 단량체의 회수를 제공하였다.

[0162] 실시예 5: 제약 조성물로의 제제화

- [0163] 양이온 교환 크로마토그래피 용리액을 Planova 20 N 바이러스 제거 필터로 통과시켜 임의의 우연적 바이러스 오염을 제거하고, 0.22 μm 필터를 통해 추가로 여과하였다. 여과된 조제물을 농축시키고 접선 유동 여과 (TFF)에 의해 20 mM 시트르산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 1.5% 만니톨, 50 μM DTPA pH 6.0으로 정용여과하고, 0.2 μm 필터로 추가로 여과하였다. 필요한 경우 폴리소르베이트 80 (Tween 80)을 0.04%의 최종 농도로 첨가하고, 단백질 농도를 $10.0 \pm 1.0 \text{ mg/ml}$ 로 조정하고, 0.2 μm 필터로 여과하여 항-KMA 결합 단백질의 제제화된 제약 조성물을 생성하였다.
- [0164] 광범위하게 기재된 본 발명의 취지 또는 범위로부터 벗어나지 않으면서 구체적 구현예에 나타난 바와 같이 본 발명에 대하여 많은 변화 및/또는 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 인지될 것이다. 따라서, 본 발명의 구현예는, 모든 면에서, 제한적이 아닌 예시적인 것으로 고려되어야 한다.
- [0165] 상기에서 논의된 모든 공개 문헌은 그 전체가 본원에 포함된다.
- [0166] 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 자료, 장치, 논문 등에 대한 임의의 논의는 단지 본 발명의 맥락을 제공하기 위한 것이다. 임의의 또는 모든 이들 사안이 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재했던 바와 같은 본 발명과 관련된 분야에서 통상의 일반 지식이었음을 또는 선행 기술 기반의 부분을 형성함을 인정하는 것으로 간주되어서는 안된다.
- [0167] 본 출원은 2020년 3월 27일 출원된 오스트레일리아 가특허출원 2020900948로부터의 우선권을 청구하며, 이 가출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> HaemaLogiX Pty Ltd.

<120> COMPOSITION AND METHOD

<130> 180037.00401

<150> AU 2020900948

<151> 2020-03-27

<150> US 63/200,752

<151> 2021-03-25

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> KappaMab epitope amino acid sequence

<400> 2

Leu Asp Ile Lys Arg

1 5

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR2

<400> 8

Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL CDR3

<400> 9

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KappaMab epitope 2 improved binding amino acid sequence

<400> 10

Leu Glu Ile Lys Arg

1 5