



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0136649
(43) 공개일자 2017년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/06 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01) C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01) C07K 1/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/065 (2013.01)
A61K 39/39525 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7034448(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년10월20일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7012851
원출원일자(국제) 2010년10월20일
심사청구일자 2015년10월20일
- (85) 번역문제출일자 2017년11월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/053388
- (87) 국제공개번호 WO 2011/050071
국제공개일자 2011년04월28일
- (30) 우선권주장
61/253,411 2009년10월20일 미국(US)
- (71) 출원인
애브비 인코포레이티드
미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건
로드 1
- (72) 발명자
히크먼 로버트 케이.
미국 매사추세츠주 01605 우스터 히비스커스 드라
이브 6
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용한 항-IL-13 항체의 분리 및 정제

(57) 요약

본 발명은 항-IL-13 항체를 분리 및 정제하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 친화성 크로마토그래피 단계를 사용하여 약제에 사용하기에 충분한 순도를 갖는 항체 조성물을 제공한다. 본원에 기재된 방법은 pH 바이러스 감소/불활성화, 한외여과/정용여과, 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 친화성 크로마토그래피), 이온교환 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 포함한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 한 가지 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1

- 항-IL-13 항체 중쇄 가변 영역 서열

1	10	20	30	40
EVTLRSGPG LVKPTQTTL TCTLYGFSLS TSDMGVDWIR				
CDR1				
QPPGKGLEWL AHIWDDVKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV				
CDR2				
VLKLTSDVPV DTATYYCART VSSGYIYYAM DYWGQGLVT				
CDR3				
VSS				
- 항-IL-13 항체 경쇄 가변 영역 서열

1	10	20	30	40
DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ISCRASQDIR NYLNWYQQKP				
CDR1				
GKAPKLLIFY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP				
CDR2				
EDIATYYCQQ GNTLPLTFGG GTKVEIK				
CDR3				

(52) CPC특허분류

C07K 1/14 (2013.01)

C07K 1/16 (2013.01)

C07K 1/18 (2013.01)

C07K 1/20 (2013.01)

C07K 1/22 (2013.01)

C07K 16/244 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 및 한 가지 이상의 숙주 세포 단백질(HCP)을 포함하는 시료 혼합물로 부터 숙주 세포 단백질(HCP)-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제(preparation)를 생산하는 방법에 의해 생산된, 항체 또는 이의 항원-결합 부분 1mg 당 0.14ng 미만의 HCP를 함유하는, HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제(preparation)로서, 상기 방법이,

(a) 상기 시료 혼합물을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 수지와 접촉시키고, 상기 친화성 크로마토그래피 수지를 25 mM Tris, 100 mM NaCl을 포함하는 pH 7.2의 완충액, 뒤이어 20 mM 나트륨 시트레이트/시트르산, 0.5 M NaCl을 포함하는 pH 6.0의 완충액, 그 후 25 mM Tris, 100 mM NaCl을 포함하는 pH 7.2의 완충액으로 세척하여, 친화성 크로마토그래피 시료를 수집하는 단계;

(b) 상기 친화성 크로마토그래피 시료의 pH를 강하시켜, 3 내지 4의 pH를 갖는 강하된 pH 시료를 형성하는 단계;

(c) 상기 강하된 pH 시료를 4.5 내지 8.5의 pH로 조정하고 이같이 조정된 pH의 시료를 이온교환 물질과 접촉시켜 이온교환 시료를 수집하는 단계;

(d) 상기 이온교환 시료를 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 물질과 접촉시켜 상기 HCP-감소된 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제를 포함하는 HIC 시료를 수집하는 단계를 포함하는,

항체 또는 이의 항원-결합 부분 1mg 당 0.14ng 미만의 HCP를 함유하는, HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제(preparation).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이온교환 물질이 음이온 교환 물질인, HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제(preparation).

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분이, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제.

청구항 4

약제학적으로 허용되는 담체 및 제2항에 따른 HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제를 포함하는, 천식, 호산구 증가증, 아토피성 피부염, 및 알레르기성 비염으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물이 HCP 효소 연결된 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정되었을 때 검출가능한 수준의 HCP를 함유하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 6

약제학적으로 허용되는 담체 및 제3항에 따른 HCP-감소된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 제제를 포함하는, 천식, 호산구 증가증, 아토피성 피부염, 및 알레르기성 비염으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물이 HCP 효소 연결된 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정되었을 때 검출가능한 수준의 HCP를 함유하지 않는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 2009년 10월 20일에 출원된 미국가특허출원 제61/253,411호를 우선권 주장하며, 이에 따라 원출원의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

배경 기술

[0002] 사람 IL-13은 활성화 T 세포로부터 클로닝된 17-kDa 당단백질이고 Th2 계통, Th0 및 Th1 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 수 가지 비-T 세포 군체(예를 들어, 비만 세포)의 활성화 T 세포에 의해 생성된다(Zurawski and de Vries, 1994 Immunol Today, 15, 19-26). IL-13은 사람 B 세포에서 IgE로의 면역글로불린 동형전환을 촉진하며(Punnonen, Aversa et al. 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) 사람 및 마우스 모두에서 염증성 사이토카인 생성을 억제한다(de Waal Malefyt et al., 1993, J Immunol, 151,6370- 81; Doherty et al., 1993, J Immunol, 151, 7151-60). IL-13은 이의 세포 표면 수용체 IL-13R α 1 및 IL-13R α 2에 결합한다. IL-13R α 1은 IL-13과 저 친화성(KD ~10nM)으로 상호작용하고, 이어서 IL-4R이 모집되어 고 친화성(KD ~0.4 nM) 신호전달 이중이량체 수용체 복합체를 형성한다(Aman et al., 1996, J Biol Chem, 271, 29265-70; Hilton et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93, 497-501). IL-4R/IL-13R α 1 복합체는 B 세포, 단구/대식세포, 수지상세포, 산호성백혈구, 호염구, 섬유아세포, 내피세포, 기도상피세포 및 기도평활근세포와 같은 많은 세포 유형에서 발현된다(Graber et al., 1998, Eur J Immunol, 28, 4286-98; Murata et al., 1998, Int Immunol, 10, 1103-10; Akaiwa et al., 2001, Cytokine, 13, 75-84). IL-13R α 1/IL-4R 수용체 복합체는 여러 가지의 전사 신호 전달인자 및 활성화인자(ST AT6)를 포함한 신호전달 경로 및 인슐린 수용체 기질-2(IRS-2) 경로의 활성화를 유도한다(Wang et al., 1995, Blood, 86,4218-27; Takeda et al., 1996, J Immunol, 157,3220-2). IL-13R α 2 채널은 단독으로 IL-13에 대해 고 친화성(KD ~0.25-0.4nM)을 나타내며 IL-13 결합을 음성 조절하는 유인 수용체(Donaldson et al., 1998, J Immunol, 161, 2317-24)와 대식세포 및 가능한 다른 세포 유형에서 AP-1 경로를 통해 TGF- β 합성 및 섬유증을 유도하는 신호전달 수용체(Fichtner Feigl, Strober et al. 2006 Nat Med 12 99-106) 둘 다로서 작용한다.

[0003] 천식에 대한 전임상 동물모델에서 실시된 몇몇 연구는 IL-13이 천식에서 중요한 역할을 한다는 것을 교시한다. 이들 테이터는 IL-13 녹아웃(knock out) 마우스에서 천식에 대한 내성뿐만 아니라 다양한 마우스 모델에서 IL-13 길항제(가용성 IL-13 수용체, 항-IL-13 mAb 등)로 천식 표현형의 억제를 포함한다(Wills-Karp and Chiramonte, 2003, Curr Opin Pulm Med, 9 21-7; Wills-Karp, 2004, Immunol Rev, 202 175-90). 다수의 연구들은 마우스 및 기니아 피그의 폐에 재조합 IL-13의 약물 투여가 기도점액과분비, 호산구증가증 및 기도과민성을 유도한다는 것을 증명했다("AHR"; Grunig et al., 1998, Science, 282, 2261-3; Wills-Karp et al., 1998, Science, 282, 2258-61; Kibe et al., 2003, Am J Respir Crit Care Med, 167,50-6; Vargaftig and Singer, 2003, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 284, L260-9; Vargaftig and Singer, 2003, Am J Respir Cell Mol Biol, 28, 410-9). 이러한 IL-13 효과는 IL-13의 항시적 또는 유도적 발현을 갖는 유전자이식 마우스 시스템에서 재생된다(Zhu et al., 1999, J Clin Invest, 103, 779-88; Zhu et al., 2001, Am J Respir Crit Care Med, 164, S67- 70; Lanone et al., 2002, J Clin Invest, 110,463-74). 또한, IL-13의 만성 유전자이식 과발현은 상피하조직 섬유증 및 폐기종을 유도한다. IL-13(및 IL-4) 신호전달 분자 STAT6의 결손 마우스는 알레르겐-유도된 AHR 및 점액과형성을 발생하지 못한다(Kuperman et al., 2002, Nat Med, 8, 885-9). 가용성 IL-13 수용체 융합 단백질(sIL-13R α 2Fc)을 사용한 연구는 실험용 알레르겐 난알부민(OVA)-유도된 기도 질환에서 이 사이토카인의 핵심적인 역할을 증명하였다(Grunig et al., 1998, Science, 282, 2261-3; Wills-Karp et al., 1998, Science, 282, 2258-61; Taube et al., 2002, J Immunol, 169, 6482-9). 또한, 항-IL-13 치료의 효능이 만성 천식 쥐 모델에서 증명되었다. 이와 같은 만성 천식 모델은, 점액과분비 및 AHR의 특징을 나타내는 것이외에, 보다 급성인 모델에서 볼 수 없는 사람 질환의 몇 가지 특징을 증명한다. 이들 특징으로는 상피간 공간에 위치한 폐조직의 호산구증가증뿐만 아니라 콜라겐 침착의 증가로 측정되는 평활근 섬유증이 포함된다. 만성 천식 모델은 OVA-감작 마우스에게 총 4주동안 주 1회 OVA 에어로졸 반복 접종(challenge)하여 유도한다. OVA 접종의 마지막 2주동안에(연구 36일째부터 연구 53일째에 평가된 효능 판독과 함께) 투여된 항-IL-13

항체는 AHR, 페럼, 배세포증식증, 점액과분비 및 기도섬유증을 유의적으로 억제하였다(Yang et al., 2005, J Pharmacol Exp Ther, 313, 8-15). IL-13은 IL-13 mRNA 및 단백질의 증가된 수준이 천식 환자의 폐에서 검출되었고 이는 천식의 중증도와 상관관계가 있기 때문에 사람 천식의 발병에 연루되어 있다(Huang et al., 1995, J Immunol, 155, 2688-94). 또한, 증가된 IL-13 수준을 유도하는 사람 IL-3 유전자다형성이 동정되었고 침식 및 아토피와 연관이 있으며(Heinzmann et al., 2000, Hum Mol Genet, 9, 549-59; Hoerauf et al., 2002, Microbes Infect, 4, 37-42; Vercelli, 2002, Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2, 389-93; Heinzmann et al., 2003, J Allergy Clin Immunol, 112, 735-9; Chen et al., 2004, J Allergy Clin Immunol, 114, 553-60; Vladich et al., 2005, J Clin Invest, 115, 747-54), 증가된 IL-13 수준이 천식 환자의 폐에서 검출되었다(Huang et al., 1995, J Immunol, 155, 2688-94; Arima et al., 2002, J Allergy Clin Immunol, 109, 980-7; Berry et al., 2004, J Allergy Clin Immunol, 114, 1106-9). 또한, 좀더 높은 혈장 IL-13 수준을 일으키는 IL-13 유전자의 다형성을 갖는 사람들은 아토피 및 천식 위험이 증가함에 따라 IL-13과 천식사이의 유전적 연계성이 증명되었다(Wills-Karp, 2000, Respir Res, 1, 19-23).

[0004] 다양한 사람 장애에서 사람 IL-13의 역할이 있음으로 인하여, IL-13 활성을 억제 또는 제거하는 치료 전략들이 설계되어 왔다. 특히, IL-13과 결합하여 중화시키는 항체가 IL-13 활성을 억제하는 수단으로서 탐구되어 왔다. 그러나, 본 분야에서는 그와 같은 항체를 약제로 사용하기 위해 개량된 제조 및 정제 방법을 여전히 필요로 하고 있다. 본 발명은 그와 같은 필요성을 해결한다.

발명의 내용

[0005] 특정 양태로서, 본 발명은 IL-13과 결합하는 분리 정제된 항체 및 항체 단편뿐만 아니라 이와 같은 항체 및 단편을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 특정 양태로서, 본 발명은 사람 IL-13과 결합하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 본 발명의 분리된 항-IL-13 항체는 임상, 연구 및 개발용으로 사용될 수 있다. 특정 양태로서, 본 발명은 도 1에 동정된 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 항-IL-13 항체에 관한 것이다.

[0006] 본 발명의 특정 양태는 시료 매트릭스로부터 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 정제하여 항체가 숙주 세포 단백질("HCP") 및 여과된(leached) 단백질 A로부터 실질적으로 유리되도록 하는 방법에 관한 것이다. 특정 관점에서, 시료 매트릭스(또는 간단히 "시료")는 본 발명의 항-IL-13 항체를 생성하기 위해 사용된 세포주를 포함한다. 특정 관점에서, 시료는 사람 항-IL-13 항체를 생성하기 위해 사용된 세포주를 포함한다.

[0007] 특정 양태로서, 본 발명은 다른 무엇보다 세포 및 세포 파편을 제거하는 일차 회수 단계를 포함하는 IL-13 항체의 정제 방법을 제공한다. 이 방법의 특정 양태로서, 일차 회수 단계는 한 가지 이상의 원심분리 또는 침출여과 단계를 포함한다. 이로써 한정되는 것은 아니지만 예를 들면 그러한 원심분리 단계는 약 7,000 x g 내지 약 11,000 x g로 실시할 수 있다. 추가로, 상기 방법의 특정 양태는 침출여과 단계(예를 들어, 디리피드 침출여과 단계)를 포함할 것이다.

[0008] 특정 양태로서, 일차 회수 시료는 친화성 크로마토그래피 단계에 적용시킨다. 친화성 크로마토그래피 단계는 일차 회수 시료를 적합한 친화성 크로마토그래피 지지체를 포함한 컬럼에 적용시키는 것을 포함한다. 이와 같은 크로마토그래피 지지체의 비제한적 예는 이로써 한정하는 것은 아니지만 단백질 A 수지, 단백질 G 수지, 목적하는 항체를 유도하는 항원을 포함한 친화성 지지체 및 Fc 결합 단백질을 포함한 친화성 지지체를 포함한다. 단백질 A 수지는 항체(IgG)의 친화성 정제 및 분리에 유용하다. 한 가지 관점으로서, 단백질 A 컬럼은 시료를 로딩하기 전에 적합한 완충액으로 평형시킨다. 적합한 완충액의 예로는 pH가 약 7.2인 트리스/NaCl 완충액을 들 수 있다. 이와 같은 평형 후, 시료는 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼에 로딩 후, 컬럼은 예를 들어, 평형 완충액을 사용하여 일회 또는 수회 세척할 수 있다. 컬럼을 용출하기 전에 상이한 완충액을 사용한 세척을 포함하여 다른 세척들을 사용할 수 있다. 이어서, 적절한 용출 완충액을 사용하여 단백질 A 컬럼을 용출할 수 있다. 적합한 용출 완충액의 예로는 pH가 약 3.5인 아세트산/NaCl 완충액을 들 수 있다. 용출액은 본 분야의 전문가에게 잘 알려진 방법으로 모니터링할 수 있다. 예를 들면, OD₂₈₀에서 흡광도를 측정할 수 있다. 그런 다음, 추가 공정을 위해 목적하는 용출 분획을 수집할 수 있다.

[0009] 본 발명의 특정 양태로서, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 후 낮은 pH 조정 단계를 수행한다. 이와 같은 양태로서, 추정 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함한 단백질 A 용출액을 약 3 내지 약 4의 pH에 적용시켜 pH를 조정한다. 특정 관점으로서, pH는 약 3.5로 조정한다. 무엇보다도, 낮은 pH는 시료를 오염시킬 수 있는 pH-민감성 바이러스의 감소 및/또는 불활성화를 촉진시킨다. 적절한 시간의 경과 후, pH는 약 4.5 내지

약 6.0(이로써 한정하는 것은 아니지만 pH 약 5.0을 포함)으로 조정하고, 시료를 추가의 정제 단계에 적용시킨다.

[0010] 특정 양태로서, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 또는 낮은 pH 조정 단계 후 이온교환 단계를 실시한다. 이온교환 단계는 양이온 또는 음이온 교환이거나 이들의 연속 조합일 수 있다. 이 단계는 일회 이온교환 과정일 수 있거나 양이온교환 단계에 이어 음이온교환 단계 또는 반대의 단계 조합과 같은 수회 이온교환 단계를 포함할 수 있다. 한 가지 관점으로서, 이온교환 단계는 일단계 과정이다. 다른 관점으로서, 이온교환 단계는 이단계 이온교환 과정을 포함한다. 적합한 양이온 교환 컬럼은 정지상이 음이온 그룹을 포함하는 컬럼이다. 이러한 컬럼의 예로는 프락토겔(Fractogel)TM SO₃⁻를 들 수 있다. 이러한 음이온 교환 포획 크로마토그래피 단계는 시료로부터 항체의 분리를 촉진한다. 적합한 음이온교환 컬럼은 정지상이 양이온 그룹을 포함하는 컬럼이다. 이러한 컬럼의 예로는 Q 세파로즈(Q Sepharose)TM 컬럼을 들 수 있다. 대안으로는 Pall Mustang Q 막 카트리지를 들 수 있다. 하나 이상의 이온교환 단계는 숙주 세포 단백질 및 DNA와 같은 불순물 및 필요한 경우 친화성 매트릭스 단백질을 감소시킴으로써 항체를 추가로 분리한다. 이러한 음이온교환 과정은 목적하는 항체는 음이온교환 수지(또는 고체상)와 상호작용 또는 결합하지 않는 크로마토그래피의 유동 통과 모드이다. 그러나, 많은 불순물들은 음이온교환 수지와 상호작용 및 결합하지 않는다. 특정 관점으로서, 이온교환 단계는 음이온교환 크로마토그래피이다.

[0011] 시료 완충액의 pH 및 이온강도를 조정함으로써 이온교환 크로마토그래피를 위한 친화성 크로마토그래피 용출액을 준비한다. 예를 들면, 친화성 용출액은 1 M 트리스 완충액으로 pH를 약 4.5 내지 약 8.5로 조정할 수 있다. 시료(친화성 용출액)를 이온교환 컬럼에 로딩하기 전에, 컬럼을 적합한 완충액으로 평형시킬 수 있다. 적합한 완충액의 예는 pH가 약 4.5 내지 약 8인 트리스/NaCl 완충액이다. 평형 후 컬럼에 친화성 용출액을 로딩할 수 있다. 로딩 후 컬럼은 적합한 완충액으로 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 적합한 완충액의 예는 평형 완충액 자체이다. 유동-통과물 수집은 예를 들어, 흡광도(OD₂₈₀)가 약 0.2 AU 이상으로 올라갈때 시작할 수 있다.

[0012] 특정 양태로서, 일차 회수 후 또는 다르게는 친화성 크로마토그래피 단계의 부재하에 제1 및 제2 이온교환 단계를 실시한다. 이와 같은 양태중 특징적으로는, 이온교환 시료를, 중간 여과 단계, 제1 이온교환 단계 이전에 또는 제1 및 제2 이온교환 단계 사이에 또는 이들 모두에 적용시킨다. 특정 관점으로서, 이러한 여과 단계는 포획 한외여과/정용여과("UF/DF")를 포함한다. 무엇보다도, 이와 같은 여과는 항-IL-13 항체 및 이의 항원-결합 부분의 농축 및 완충액교환을 촉진시킨다.

[0013] 본 발명의 특정 양태는 하나 이상의 소수성 상호작용 크로마토그래피("HIC") 단계를 포함한 방법을 제공한다. 적합한 HIC 컬럼은 정지상이 소수성 그룹을 포함한 컬럼이다. 이러한 컬럼의 비제한적 예로는 페닐 HP 세파로즈TM 컬럼을 들 수 있다. 특정 환경에서, 항-IL-13 항체는 분리/정제 과정에서 응집체를 형성할 것이다. 하나 이상의 HIC 단계의 포함은 그러한 응집의 감소 또는 제거를 촉진한다. 또한, HIC는 불순물의 제거를 보조한다. 특정 양태로서, HIC 단계는 고 염 완충액을 사용하여 소수성 컬럼과 항-IL-13 항체(또는 이의 응집체)의 상호작용을 촉진한다. 그런 다음, 항-IL-13 항체는 저 농도의 염을 사용하여 용출시킬 수 있다.

[0014] 특정 양태로서, HIC 용출액은 이로써 한정하는 것은 아니지만 Ultipor DV50TM 필터(Pall Corporation, East Hills, N.Y.)와 같은 바이러스 제거 필터를 사용하여 여과된다. 또한 이와 같은 양태에서 ViresolveTM 필터(Millipore, Billerica, Mass.); Zeta Plus VRTM 필터(CUNO, Meriden, Conn.); 및 PlanovaTM 필터(Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.)와 같은 대안적 필터를 사용할 수 있다.

[0015] 특정 양태로서, 본 발명은 분리된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 및 허용되는 담체를 포함하는 한 가지 이상의 약제학적 조성물에 관한 것이다. 한 가지 관점으로서, 본 발명의 조성물은 항-IL-13 항체에 추가하여 한 가지 이상의 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함한다. 다른 관점으로서, 본 발명의 조성물은 추가로 한 가지 이상의 약제를 포함한다.

[0016] 시료 생성물에서 목적하는 항체의 순도는 본 분야의 전문가에게 잘 알려진 방법, 예를 들면, 크기별 배제 크로마토그래피, PorosTM A HPLC 검정, HCP ELISA, 단백질 A ELISA 및 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 비제한적 예로서 항-IL-13 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이다.
- 도 2는 설정값, 공정중 관리 검사 및 조치 기준을 포함한 예시적인 세포배양 공정 흐름도이다.
- 도 3은 다른 세포배양 공정 유동 전략들을 비교한 것이다.
- 도 4는 설정값, 공정중 관리 검사 및 조치 기준을 포함한 일차 회수 포획 크로마토그래피 공정 흐름도이다.
- 도 5는 다른 일차 회수 및 포획 공정 전략들을 비교한 것이다.
- 도 6은 설정값, 공정중 관리 검사 및 조치 기준을 포함한 정밀 정제 공정도이다.
- 도 7은 다른 정밀 정제 공정 흐름 전략들을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 IL-13과 결합하는 항체에 관한 것이다. 한 가지 관점으로서, 본 발명은 사람 IL-13과 결합하는 분리된 항체 또는 이의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 본 발명의 분리된 항-IL-13 항체는 임상, 연구 및 개발용으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 정제될 수 있는 적합한 항-IL-13 항체는 ABT-308로 이후에 식별된 항체를 포함하여, 전문이 본원에 참조로 인용된 국제 특허 출원 제PCT/US2007/019660호에 기술되어 있다. 예시적인 항-IL-13 항체 중쇄 및 경쇄 서열을 도 1에 도시한다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 포함한 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 아래에 기술된 본 발명의 상세한 설명은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 명확하게 하기 위한 목적으로 다음과 같은 목록으로 기술된다:
- [0020] 1. 정의
- [0021] 2. 항체 발생
- [0022] 3. 항체 생산
- [0023] 4. 항체 정제
- [0024] 5. 시료 순도 검정 방법
- [0025] 6. 추가 변형
- [0026] 7. 약제학적 조성물; 및
- [0027] 8. 항체 용도.
- [0028] 1. 정의
- [0029] 본 발명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록 우선적으로 특정 용어들을 다음과 같이 정의한다.
- [0030] 용어 "항체"는 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)가 디설파이드 결합에 의해 상호연결되어 있는 4개의 폴리펩타이드 채로 구성된 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭한다) 및 중쇄 불변영역(CH)으로 구성된다. 중쇄 불변영역은 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭한다) 및 경쇄 불변영역으로 구성된다. 경쇄 불변영역은 1개의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 과변이영역(상보성결정영역(CDR)이라 한다)과 이러한 CDR에 산재되어 있는 영역으로 보다 보전적인 골격영역(FR)으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며 이들은 다음과 같은 순서로 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4.
- [0031] 용어 항체의 "항원-결합 부분"(또는 "항체 부분")은 항원(예를 들어, hIL-13)과 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 유지하는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 완전한 길이의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 알려져 왔다. 항체의 용어 "항원-결합 부분"내에 포함된 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인을 포함한 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 단편이 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 결합되어 있는 이가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인을 포함하는 Fd 단편; (iv) 항체 한쪽 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인을 포함하는 Fv 단편; (v) VH 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward et al., (1989)

Nature, 341: 544-546, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, 비록 Fv 단편의 두 도메인인 VL 및 VH가 별개의 유전자에 의해 암호화되지만, VL과 VH 영역은 이들 영역이 쌍을 이루어 일가 분자[단일쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음; 예를 들어, 참조(Bird et al.(1988) *Science*, 242: 423-426 및 Huston et al.(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883), 이들의 전문은 본원에 참고로 인용된다]를 형성하고 있는 단일 단백질 체로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커를 통해 재조합 방법을 사용하여 결합될 수 있다. 이러한 단일쇄 항체는 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에도 포함된다. 단일쇄 항체의 다른 형태, 예컨대 이중항체(diabody)도 포함되는 것으로 의도된다. 이중항체는 단일 폴리펩타이드 쇠에서 VH 및 VL 도메인이 발현되지만, 동일 쇠 상의 두 도메인 사이에 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 상기 도메인들이 다른 쇠의 상보성 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 2가의 이특이적 항체이다[예를 들어, 참조: Holliger, P., et al.(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123), 이들의 전문은 본원에 참고로 인용된다]. 또한, 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 좀더 큰 면역복합 분자의 일부일 수 있는데, 이것은 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드와 해당 항체 또는 항체 부분의 공유 또는 비공유 결합에 의해 형성된다. 이와 같은 면역복합 분자의 예는 스트렙타비딘 코어 영역의 사용에 의해 제조된 4량체 scFv 분자(Kipriyanov, S. M., et al.(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다) 및 시스템인 잔기, 마커 펩타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용에 의해 제조된 2가 및 비오틴화 scFv 분자(Kipriyanov, S. M., et al.(1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다)를 포함한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 부분은 각각 완전한 항체의 파파인 또는 펩신 분해와 같은 통상적인 기술을 사용함으로써 완전한 항체로부터 수득할 수 있다. 게다가, 항체, 항체 부분 및 면역복합 분자들은 본원에 기술된 표준 DNA 재조합기술을 사용함으로써 제조할 수 있다. 한 가지 관점으로서, 항원-결합 부분은 완전한 도메인 또는 완전한 도메인의 쌍이다.

[0032]

용어 "사람 인터루킨 13"(본원에서 hIL-13 또는 IL-13으로 약칭됨)은 활성화 T 세포로부터 클로닝되고(Zurawski and de Vries, 1994 *Immunol Today* 15 19-26) Th2 계통의 활성화 T 세포에 의해 생산되는 17-kDa 당단백질을 가리킨다. 또한, Th0 및 Th1 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 및 수 가지 비-T 세포 군체(예를 들어, 비만 세포)도 IL-13을 생산한다(Zurawski and de Vries, 1994 *Immunol Today* 15 19-26). IL-13 기능은 사람 B 세포에서 IgE로의 면역글로불린 동형 전환을 촉진하고(Punnonen, Aversa et al. 1993 *Proc Natl Acad Sci USA* 90 3730-4) 사람과 마우스 모두에서 염증성 사이토카인 생산을 억제한다(de Waal et al., 1993 *J Immunol* 151 6370- 81; Doherty et al., 1993 *J Immunol* 151 7151-60). IL-13은 IL-13R α 1 및 IL-13R α 2로서 동정된 세포 표면 수용체와 결합한다. IL-13R α 1 수용체는 IL-13과 저 친화성(KD ~10 nM)으로 상호작용하고 이어서 IL-4R을 소집하여 고 친화성(KD ~0.4 nM) 신호전달 이중이량체 수용체 복합체를 형성한다(Aman et al., 1996 *J Biol Chem* 271 29265-70; Hilton et al., 1996 *Proc Natl Acad Sci USA* 93 497-501). IL-4R/IL-13R α 1 복합체는 B 세포, 단구/대식세포, 수지상세포, 산호성백혈구, 호염구, 섬유아세포, 내피세포, 기도상피세포 및 기도평활근 세포와 같은 많은 세포 유형에서 발현된다(Graber et al., 1998, *Eur J Immunol*, 28, 4286-98; Murata et al., 1998, *Int Immunol*, 10, 1103-10; Akaiwa et al, 2001, *Cytokine*, 13 75-84). IL-13R α 1/IL-4R 수용체 복합체의 결합은 여러 가지의 전사 신호 전달인자 및 활성화인자(ST AT6)를 포함한 신호전달 경로 및 인슐린 수용체 기질-2(IRS-2) 경로의 활성화를 유도한다(Wang et al., 1995, *Blood*, 864218-27; Takeda et al., 1996 *J Immunol*, 157,3220-2). IL-13R α 2 쇠는 단독으로 IL-13에 대해 고 친화성(KD ~0.25 내지 0.4nM)을 나타내며 IL-13 결합을 음성 조절하는 유인 수용체(Donaldson et al., 1998, *J Immunol*, 161, 2317-24)와 대식세포 및 가능한 다른 세포 유형에서 AP-1 경로를 통해 TGF- β 합성 및 섬유증을 유도하는 신호전달 수용체(Fichtner-Feigl, et al., 2006 *Nat Med* 12 99-106) 둘 다로서 작용한다. IL-13을 암호화하는 핵산은 진뱅크(Genbank) 수탁번호 NM_002188로 입수가능하고, 폴리펩타이드 서열은 진뱅크 수탁번호 NP_002179로 입수할 수 있다. 용어 사람 IL-13은 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 사람 IL-13(rh IL-13)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0033]

용어 "캐뱃 번호", "캐뱃 정의" 및 "캐뱃 표지"는 상호교환적으로 본원에서 사용된다. 이러한 용어는 당해 분야에서 인지되며 항체 또는 이의 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 다른 아미노산 잔기 보다 더 가변적인(즉, 추가변성) 아미노산 잔기의 번호를 지정하는 체계를 의미한다[참조: Kabat et al.(1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190: 382-391 및 Kabat, E. A., et al.(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 이들 전문이 본원에 참조로서 인용됨]. 중쇄 가변 영역에 있어서, 추가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 65 및 CDR3의 경우 아미노산 위치 95 내지 102의 범위내

해당한다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 56 및 CDR3의 경우 아미노산 위치 89 내지 97의 범위이다.

[0034] 용어 "사람 항체"는 캐뻛 등에 의해 기술된 사람 배선 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다(참조: Kabat, et al. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). 본 발명의 사람 항체는, 예를 들어, CDR 및 특히 CDR3에 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 특정부위 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 돌연변이는 "선택적 돌연변이유발 접근"을 사용하여 도입할 수 있다. 사람 항체는 아미노산 잔기(예를 들어, 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 활성 증강 아미노산 잔기)가 하나 이상의 위치에서 치환될 수 있다. 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열의 일부가 아닌 아미노산 잔기들로 20개까지의 위치에서 치환될 수 있다. 다른 양태로서, 10개 이하, 5개 이하, 3개 또는 2개 이하의 위치가 치환된다. 한 가지 양태로서, 이들 치환은 CDR 영역내이다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "사람 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 사람 골격 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0035] 용어 "선택적 돌연변이유발 접근"은 하나 이상의 적합한 선택적 돌연변이유발 위치, 초돌연변이 위치 및/또는 접촉 위치에서 CDR 아미노산을 선택하고 개별적으로 돌연변이시킴으로써 항체의 활성을 개량하는 방법을 포함한다. "선택적으로 돌연변이된" 사람 항체는 선택적 돌연변이유발 접근을 사용하여 선택된 위치에서의 돌연변이를 포함하는 항체이다. 다른 관점으로서, 선택적 돌연변이유발 접근은 항체의 중쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 선택된 개개의 아미노산 잔기(이하, 각각 H1, H2 및 H3이라 칭함) 또는 경쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 선택된 개개의 아미노산 잔기(하기에, 각각 L1, L2 및 L3이라 칭함)를 우선적으로 돌연변이시키는 방법을 제공한다. 아미노산 잔기는 선택적 돌연변이유발 위치, 접촉 위치 또는 초돌연변이 위치중에서 선택될 수 있다. 개개의 아미노산은 경쇄 또는 중쇄 가변영역에서의 위치를 기준으로 선택된다. 초돌연변이 위치는 또한 접촉 위치일 수 있음을 이해하여야 한다. 한 가지 관점으로서, 선택적 돌연변이유발 접근은 "표적된 접근"이다. 용어 "표적된 접근"은 항체의 중쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 또는 경쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에서 선택된 개개의 아미노산 잔기를 표적된 방식으로, 예를 들어, "그룹별 표적된 접근" 또는 "CDR별 표적된 접근"으로 돌연변이시키는 방법을 포함한다. "그룹별 표적된 접근"에서, 특정 그룹의 개개 아미노산 잔기들은 표적 우선 순위로 그룹 I(L3 및 H3을 포함), 그룹 II(H2 및 L1을 포함) 및 그룹 III(L2 및 H1을 포함)을 포함한 선택적 돌연변이를 위해 표적이 된다. "CDR별 표적된 접근"의 경우는, 특정 CDR내의 개개 아미노산 잔기가 H3, L3, H2, L1, H1 및 L2의 표적 우선 순위로 하여 선택적 돌연변이를 위해 표적이 된다. 선택된 아미노산 잔기는, 예를 들어, 2개 이상의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이되고, 항체의 활성에 미치는 돌연변이의 효과가 결정된다. 활성은 항체의 결합 특이성/친화성 및/또는 항체의 중화능에서의 변화로서 측정된다. 선택적 돌연변이 접근은 파아지디스플레이, 사람 IgG 배선 유전자를 갖는 유전자이식 동물, 사람 B-세포로부터 분리된 사람 항체를 포함한 임의 공급원으로부터 유래된 임의 항체의 최적화를 위해 사용될 수 있음은 이해되어야 한다. 선택적 돌연변이유발 접근은 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 최적화될 수 없는 항체에 추가로 사용될 수 있다. 파아지디스플레이, 사람 IgG 배선 유전자를 갖는 유전자이식 동물, 사람 B-세포로부터 분리된 사람 항체를 포함한 임의 공급원으로부터 유래된 임의 항체가 선택적 돌연변이유발 접근의 전후에 역돌연변이에 적용될 수 있음은 이해되어야 한다.

[0036] 용어 "재조합 사람 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 발생 또는 분리된 사람 항체를 포함하며, 예를 들어, 사람 면역글로불린 유전자가 도입된 유전자이식 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체(예를 들어, 참조: Taylor, L. D., et al.(1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다) 또는 사람 면역글로불린 유전자 서열을 기타 DNA 서열로 스플라이싱함을 포함하는 임의의 기타 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 분리된 항체를 포함한다. 당해 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다[참조(Kabat, E. A., et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)]. 그러나 특정 양태에서, 당해 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는 사람 Ig 서열이 도입된 유전자이식 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용되고 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련된 것이지만 생체내 사람 항체 배선 레퍼토리내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다. 그러나 특정 양태로서, 그러한 재조합 항체는 선택적 돌연변이유발 접근 또는 역돌연변이 또는 이들 둘다의 결과물이다.

- [0037] "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 유리된 항체를 포함한다(예를 들어, hIL-13과 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 hIL-13이 아닌 다른 항원과 특이적으로 결합하는 항체로부터 실질적으로 유리되어 있다). hIL-13과 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종의 IL-13 분자와 결합할 수 있다. 게다가, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질로부터 실질적으로 유리될 수 있다.
- [0038] "중화 항체"(또는 hIL-13 활성을 중화시킨 항체)는 hIL-13과 결합하여 hIL-13의 생물학적 활성을 억제하는 항체를 포함한다. hIL-13의 생물학적 활성의 그와 같은 억제는 hIL-13 생물학적 활성의 지시제 하나 이상을 측정함으로써 평가할 수 있다. hIL-13 생물학적 활성의 지시제는 본 분야에 알려진 몇 가지 표준 시험관내 또는 생체내 검정중 하나 이상에 의해 평가할 수 있다.
- [0039] 용어 "활성"은 항원에 대한 항체(예를 들어, IL-13 항원과 결합하는 항-hIL-13 항체)의 결합 특이성/친화성 및/또는 항체의 중화능(예를 들어, hIL-13과 결합하여 hIL-13의 생물학적 활성을 억제하는 항-hIL-13 항체)과 같은 활성을 포함한다.
- [0040] "표면 플라스몬 공명"이란 용어는, 예를 들어, BIAcore[®] 시스템(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N. J.)을 사용하여 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변경을 검출하여 생체특이적 상호작용을 실시간 분석할 수 있는 광학 현상을 의미한다. 이에 대한 상세한 설명은 문헌[Jonsson, U., et al.(1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., et al.(1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al.(1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; 및 Johnson, B., et al.(1991) Anal. Biochem. 198: 268-277]을 참고로 할 수 있으며, 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 " K_{off} "는 항체/항원 복합체로부터 항체의 해리에 대한 오프 속도 상수(off rate constant)를 가리키는 것으로 의도된다.
- [0042] 본원에 사용된 용어 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 가리키는 것으로 의도된다.
- [0043] 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함한다. 핵산 분자는 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있으나, 한 가지 관점에서 이본쇄 DNA이다.
- [0044] 예를 들어, hIL-13과 결합하는 것과 같은 항체 또는 항체 부분(예를 들어, VH, VL, CDR3)을 암호화하는 핵산과 관련하여 본원에 사용된 용어 "분리된 핵산 분자"는 해당 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 hIL-13이 아닌 다른 항원과 결합하는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 다른 뉴클레오타이드로부터 유리된 핵산 분자를 포함하고, 여기서 사람 게놈 DNA내의 해당 핵산 분자에 다른 서열이 천연적으로 인접할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 항-hIL-13 항체의 VH 영역을 암호화하는 본 발명의 분리된 핵산 분자는 예를 들어, hIL-13이 아닌 다른 항원과 결합하는 다른 VH 영역을 암호화하는 어떠한 다른 서열도 함유하지 않는다. 용어 "분리된 핵산 분자"는 또한 2가 이특이성 항체(예를 들어, VH 및 VL 영역이 이중항체의 서열이 아닌 다른 어떠한 서열도 함유하지 않는 이중항체)를 암호화하는 서열을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0045] 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 포함한다. 이러한 용어는 특정 해당 세포뿐만 아니라 이 세포의 후손도 가리키는 것을 의도하는 것으로 이해되어야 한다. 후대에 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 후손은 사실상 모세포와 동일하지 않지만 본원에서 사용된 "숙주 세포"란 용어의 범위에는 포함된다.
- [0046] 본원에 사용된 용어 "변형"은 항체 또는 이의 항원-결합 부분에서 하나 이상의 아미노산이 변화된 것을 가리키는 것으로 의도된다. 변화는 하나 이상의 위치에 아미노산을 부가, 치환 또는 결실시킴으로써 생산될 수 있다. 변화는 PCR 돌연변이유발과 같은 공지된 기술을 사용하여 생산할 수 있다.
- [0047] 본원에 사용된 용어 "약"은 참조값보다 약 10% 내지 20% 초과 또는 미만의 범위를 가리키는 것으로 간주된다. 특정 환경하에서, 본 분야 전문가가 참조값의 특성상 용어 "약"이 참조값으로부터 10 내지 20% 이상 또는 이하의 편차를 의미할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "바이러스 감소/불활성화"는 특정 시료에 바이러스 입자의 수적 감소("감소")뿐만 아니라 활성(예를 들면, 이로써 한정하는 것은 아니지만 특정 시료중에 바이러스 입자의 감염성 또는 복제능력) 감소("불활성화")를 가리키는 것으로 의도된다. 바이러스 입자의 그러한 수적 및/또는 활성 감소는 약 20% 내지 약 99%, 약 30% 내지 약 99%, 약 40% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 99%, 약 60% 내지 약 99%, 약 70% 내지 약 99%, 약 80% 내지 99% 및 약 90% 내지 약 99%를 포함하여 약 1% 내지 약 99%의 범위에 있을 수 있다. 비제한적

인 특정 양태로서, 정제된 항체 생산물중의 바이러스의 양은 해당 바이러스에 대해 ID50(표적 군체의 50%를 감염시키는 바이러스의 양) 미만이거나, 해당 바이러스에 대해 ID50의 적어도 10배 미만이거나, 해당 바이러스에 대해 ID50의 적어도 100배 미만이거나, 해당 바이러스에 대해 ID50의 적어도 1000배 미만이다.

[0049] 용어 "접촉 위치"는 항체의 중쇄 가변영역 또는 경쇄 가변영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3내에서 26개의 공지된 항체-항원 구조중 하나내에 존재하는 항원과 접촉하는 아미노산이 점유하고 있는 아미노산 위치를 포함한다. 만일 항체-항원 복합체의 26개 공지된 해리 구조중 하나에 존재하는 CDR 아미노산이 항원과 접촉하는 경우, 이때 그 아미노산은 접촉 위치를 점유하고 있는 것으로 고려될 수 있다. 접촉 위치는 비접촉 위치에서 보다 항원과 접촉하는 아미노산에 의해 점유될 확률이 더 높다. 한 가지 관점에서, 접촉 위치는 26개 구조중 3개 초과(>1.5%)에서 항원과 접촉하는 아미노산을 함유하는 CDR 위치이다. 다른 관점에서, 접촉 위치는 25개 구조중 8개 초과(>32%)에서 항원과 접촉하는 아미노산을 함유하는 CDR 위치이다.

[0050] 2. 항체 발생

[0051] 본원에 사용된 용어 "항체"는 완전한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 가리킨다.

[0052] 본 발명의 항체는 목적하는 항원으로 동물의 면역화 및 후속적인 통상적인 단클론 항체 방법론(예를 들어, 참조(Kohler and Milstein(1975) Nature 256: 495)의 표준 체세포 하이브리드화 기술)을 포함한 다양한 기술에 의해 발생될 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화 방법이 바람직하지만, 원칙적으로 단클론 항체를 생산하는 다른 기술들(예를 들어, B 림프구의 바이러스 또는 암세포 형질전환)도 사용할 수 있다.

[0053] 하이브리도마를 생산하는 한 가지 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 하이브리도마 생성은 아주 잘 확립된 방법이다. 융합을 위해 면역화된 비장세포의 분리를 위한 면역화 프로토콜 및 기술들은 본 분야에 공지되어 있다. 또한, 융합 파트너(예를 들어, 쥐 골수종 세포) 및 융합 방법도 공지되어 있다.

[0054] 항체는 사람, 키메라 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 상기된 바와 같이 제조된 비인간 단클론 항체의 서열을 기초로 하여 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 목적하는 비인간 하이브리도마로부터 획득하고 표준 분자 생물 기술을 사용하여 비쥐(예를 들어, 사람) 면역글로불린 서열을 함유하도록 조작할 수 있다. 예를 들면, 키메라 항체를 제조하기 위해, 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 사람 불변영역에 쥐 가변영역을 연결할 수 있다(예를 들어, 참조: Cabilly 등의 미국 특허 공보 제4,816,567호). 인간화 항체를 제조하는 경우는 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 사람 골격대로 쥐 CDR 영역을 삽입시킬 수 있다(예를 들어, 참조: Winter의 미국 특허 공보 제5,225,539호 및 Queen 등의 미국 특허 공보 제5,530,101호, 제5,585,089호, 제5,693,762호 및 제6,180,370호).

[0055] 한 가지 비제한적 양태로서, 본 발명의 항체는 사람 단클론 항체이다. IL-13에 대한 사람 단클론 항체는 마우스 면역 시스템이 아닌 사람 면역 시스템의 일부를 갖는 유전자이식 또는 염색체이식 마우스를 사용하여 발생될 수 있다. 이들 유전자이식 및 염색체이식 마우스는 본원에 HuMAb Mouse®(Medarex, Inc.), KM Mouse®(Medarex, Inc.) 및 XenoMouse®(Amgen)로 언급된 마우스들을 포함한다.

[0056] 또한, 대안으로서 사람 면역글로불린 유전자를 발현하는 염색체이식 동물 시스템이 본 분야에서 사용되고 있으며 항-IL-13 항체와 같은 본 발명의 항체를 생성하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 사람 중쇄 이식염색체 및 사람 경쇄 이식염색체 둘 다를 갖는 마우스("TC 마우스"라고 한다)를 사용할 수 있다. 이와 같은 마우스는 참조(Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727)에 기술되어 있다. 또한, 사람 중쇄 및 경쇄 이식염색체를 가진 소가 본 분야에 공개되어 있고(예를 들어, 참조(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) 및 국제 특허 출원 공보 제WO 2002/092812호) 본 발명의 항-IL-13 항체를 생성하기 위해 사용할 수 있다.

[0057] 이로써 한정하는 것은 아니지만 항-IL-13 항체, 이의 항원 결합 부분 또는 본원에 기술된 항-IL-13 관련 항체를 포함한 본 발명의 제조할 사람 항체는 제조할 조합의 항체 라이브러리, 예를 들면 사람 림프구로부터 유래된 mRNA로 제조된 사람 VL 및 VH cDNA를 사용하여 제조한 scFv 파아지 디스플레이 라이브러리를 선별함으로써 분리할 수 있다. 이와 같은 라이브러리를 제조하고 선별하는 방법론은 본 분야에 공지되어 있다. 파아지 디스플레이 라이브러리를 발생시키는 시판용 키트(예를 들어, 본원에 전문이 인용된 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System의 카탈로그 번호 27-9400-01; 및 Stratagene SurfZAP™ 파아지 디스플레이 키트 카탈로그 번호 240612) 이외에, 항체 디스플레이 라이브러리를 발생시키고 선별하는데 사용이 특히 용이한 방법 및 시약의 예는 Ladner 등의 미국 특허 공보 제5,223,409호; Kang 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 92/18619호; Dower 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 91/17271호; Winter 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 92/20791호; Markland 등의

국제 특허 출원 공보 제WO 92/15679호; Breitling 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 93/01288호; McCafferty 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 92/01047호; Garrard 등의 국제 특허 출원 공보 제WO 92/09690호; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al.(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature(1990) 348:552-554; Griffiths et al.(1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al.(1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al.(1991) Nature 352:624-628; Gram et al.(1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al.(1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al.(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 및 Barbas et al.(1991) PNAS 88:7978-7982에서 찾아 볼 수 있으며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

[0058] 또한, 본 발명의 사람 단클론 항체는 면역화시에 사람 항체 반응이 발생될 수 있도록 사람 면역 세포가 재구성되어 있는 SCID 마우스를 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 마우스는 예를 들어, Wilson 등의 미국 특허 공보 제5,476,996호 및 제5,698,767호에 기술되어 있다.

[0059] 특정 양태로서, 본 발명의 방법은 항-IL-13 항체 및 항체 부분, 항-IL-13-관련 항체 및 항체 부분 및 항-IL-13 항체와 균등한 특성(예를 들어, 저 해리역학 및 고 중화능의 hIL-13과의 고 친화성)을 가진 사람 항체 및 항체 부분을 포함한다. 한 가지 관점으로서, 본 발명은 표면 플라스몬 공명으로 측정된 약 1×10^{-8} M 이하의 Kd 및 1×10^{-3} s⁻¹ 이하의 Koff 역반응 속도 상수로 hIL-13으로부터 해리되는 분리된 사람 항체 또는 이의 항원-결합 부분으로의 치료를 제공한다. 비제한적 특정 양태로서, 본 발명에 따라 정제된 항-IL-13 항체는 생리학적 조건 하에서 IL-13에 ABT-308의 결합을 경쟁적으로 억제한다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태로서, 이로써 한정되는 것은 아니지만 항-IL-13 항체 또는 이의 단편과 같은 항체 또는 이의 단편은 하나 이상의 불변영역-매개된 생물학적 작동 기능이 비변형 항체에 비하여 감소하도록 항체의 불변 영역이 변형될 수 있다. Fc 수용체와 감소된 결합을 나타내도록 본 발명의 항체를 변형시키기 위해 항체의 면역글로불린 불변영역을 Fc 수용체(FcR) 상호작용에 필요한 특정 영역에서 돌연변이시킬 수 있다[예를 들어, 참조(Canfield and Morrison(1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491; 및 Lund et al.(1991) J. of Immunol. 147:2657-2662, 이들 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다]. 또한, 항체의 FcR 결합능 감소는 FcR 상호작용에 의존하는 다른 작동 기능(예를 들어, 옵소닌작용 및 식세포작용 및 항원-의존성 세포독성)을 감소시킬 수 있다.

[0061] 3. 항체 생산

[0062] 3.1 일반적인 생산 전략

[0063] 본 발명의 항체를 발현하기 위해, 부분적인 또는 완전한 길이의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 유전자가 전사 및 해독 조절 서열에 작동적으로 연결되도록 하나 이상의 발현 벡터내로 삽입한다(예를 들어, 미국 특허 공보 제6,914,128호, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다). 본원에 용어 "작동적으로 연결된"은 벡터내의 전사 및 해독 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 해독을 조절하는 기능을 수행할 수 있도록 벡터내로 항체 유전자가 연결된다는 것을 의미한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 사용된 발현 숙주 세포와 호환적인 것으로 선택한다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별도의 벡터내로 삽입될 수 있거나, 보다 전형적으로는 두 유전자 모두 동일한 발현 벡터내로 삽입된다. 항체 유전자는 발현 벡터내로 표준 방법(예를 들어, 항체 유전자 단편과 벡터상의 상보적 제한부위의 연결 또는 제한부위가 존재하지 않는 경우 평활말단 연결)에 의해 삽입한다. 항체 또는 항체-관련 경쇄 또는 중쇄 서열의 삽입이전에, 발현 벡터는 이미 항체 불변영역 서열을 가질 수 있다. 예를 들면, 항-IL-13 항체 또는 항-IL-13 항체-관련 VH 및 VL 서열을 완전한 서열의 항체 유전자로 전환시키는 접근은 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 이미 암호화하는 발현 벡터내로 각각 그들을 삽입시켜 VH 절편이 벡터내의 CH 절편에 작동적으로 연결되고 VL 절편이 벡터내의 CL 절편(들)에 작동적으로 연결되도록 하는 것이다. 추가적으로 또는 대안으로서, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체쇄의 분비를 촉진하는 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 항체쇄 유전자는 신호 펩타이드가 항체쇄 유전자의 아미노 말단에 프레임내로 연결되도록 벡터에 클로닝될 수 있다. 신호 펩타이드는 면역글로불린 신호 펩타이드 또는 이중 신호 펩타이드(즉, 비면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩타이드)일 수 있다.

[0064] 항체쇄 유전자 이외에, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포내에서 항체쇄 유전자의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열을 가질 수 있다. 용어 "조절 서열"은 항체쇄 유전자의 전사 및 해독을 조절하는 프로모터, 인핸서, 및 기타 발현 조절 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다. 이러한 조절 서열은 예를 들어, 문헌[참조: Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego,

CA(1990)]에 기술되어 있으며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다. 본 분야의 전문가들은 조절 서열의 선택을 포함한 발현 벡터의 설계가 형질전환 숙주 세포의 선택, 목적하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요소에 의해 좌우될 수 있음을 이해할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 적합한 조절 서열은 포유동물 세포에서 단백질 발현의 고 수준을 유도하는 바이러스 요소를 포함하며, 예로는 사이토메갈로바이러스(CMV)로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서(예를 들어, CMV 프로모터/인핸서), 시미안 바이러스 40(SV40)(예를 들어, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 메이저 후기 프로모터(AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서를 들 수 있다. 바이러스 조절 요소 및 이의 서열에 대한 추가 설명은, 예를 들어, Stinski의 미국 특허 공보 제5,168,062호, Bell 등의 미국 특허 공보 제4,510,245호 및 Schaffner 등의 미국 특허 공보 제4,968,615호를 참조할 수 있으며, 이들 특허의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

[0065] 항체쇄 유전자 및 조절 서열에 추가적으로, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포내에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제원) 및/또는 선별 마커 유전자와 같은 하나 이상의 추가 서열을 가질 수 있다. 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 촉진한다(예를 들어, 참조: Axel 등의 미국 특허 공보 제 4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호, 이들의 전문은 본원에 참고로 인용된다). 예를 들면, 전형적으로 선별 마커 유전자를 벡터가 도입된 숙주 세포에 약물(예를 들어, G418, 하이그로마이신 또는 메토포렉세이트)에 대한 내성을 부여한다. 적합한 선별 마커 유전자는 하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(메토포렉세이트 선별/중폭을 갖는 dhfr- 숙주 세포에서 사용) 및 neo 유전자(G418 선별용)를 포함한다.

[0066] 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 숙주 세포에서 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 재조합 발현에 의해 제조할 수 있다. 항체를 재조합적으로 발현시키기 위해, 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 단편을 갖는 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 숙주 세포를 형질감염시키며, 이에 따라 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포내에서 발현된 다음 숙주 세포의 배양 배지내로 분비되며 이들 배지로부터 항체를 회수한다. 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 수득하고, 이들 유전자를 재조합 발현 벡터내로 삽입시키며, 벡터를 숙주 세포내로 도입하는데 표준 재조합 DNA 방법을 사용하며, 예로는 Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.,(1989), Ausubel et al.(eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates,(1989) 및 미국 특허 공보 제4,816,397호 및 제6,914,128호에 기술된 방법을 들 수 있으며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

[0067] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 표준 기술에 의해 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)로 숙주 세포를 형질감염시킨다. 용어 "형질감염"의 여러 유형은 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로 외인성 DNA의 도입을 위해 흔히 사용되는 아주 다양한 기술을 포함하는 것으로 의도되며, 예로는 전기천공, 칼슘-인산염 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 들 수 있다. 비록 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현하는 것이 이론상 가능하지만, 진핵 세포, 특히 포유동물 숙주 세포들이 원핵 세포보다 적절히 폴딩되고 면역학적으로 활성적인 항체를 보다 양호하게 어셈블링하고 분비하기때문에 포유동물 숙주 세포와 같은 진핵 세포에서 항체를 발현하는 것이 적합하다. 항체 유전자의 원핵 세포 발현은 활성적인 항체를 고 수율로 생산하는데 효과적이지 않은 것으로 보고되어 있다(Boss and Wood(1985) Immunology Today 6:12-13, 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다).

[0068] 본 발명에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 발현하는데 적합한 숙주 세포는 상기된 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵 세포이다. 이 목적에 적합한 원핵세포는 그람 음성 또는 그람 양성 유기체와 같은 진정세균이며, 예로는 에스케리키아(예를 들어, 이. 콜라이), 엔테로박터, 어위니아, 크렙시엘라, 프로테우스, 살모넬라(예를 들어, 살모넬라 타이피리움), 세라티아(예를 들어, 세라티아 마르세스칸스) 및 쉬겔라와 같은 장내세균과뿐만 아니라 B. 서브틸리스 및 B. 리철포르미스(예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 기술된 B. 리철포르미스 41P)와 같은 바실러스속, P. 아에루기노사과 같은 슈도모나스속 및 스트렙토마이세스속을 들 수 있다. 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 W3110(ATCC 27,325)와 같은 균주가 적합하게 사용될 수 있으나, 한 가지 적합한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294(ATCC 31,446)이다. 이들 예는 발명을 제한하려는 것이 아니라 구체적으로 설명하고자 하는 것이다.

[0069] 원핵세포이외에, 사상진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 폴리펩타이드 암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지에 또는 혼한 빵효모가 하등 진핵 숙주 미생물가운데 가장 빈번히 사용된다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주들이 흔하게 사용되고 있으며 본 발명에서 유용하게 사용될 수 있으며, 예로는 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주(예를 들어, K. 락티스(*K. lactis*), K. 프라질리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), K. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), K. 윌케라미(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178), K. 왈티(*K. waltii*)(ATCC 56,500), K. 드로소필라룸(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906), K. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*) 및 K. 마르시아누스(*K.*

marxianus)); 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 캔디다(*Candida*); 트리코더마 리시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 쉬와니오마이세스(*Schwanniomyces*)(예를 들어, 쉬와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*)); 및 사상진균(예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스페르길러스(*Aspergillus*) 숙주(예를 들어, A. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 A. 나이거(*A. niger*)))를 들 수 있다.

[0070] 당화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래한다. 무척추 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 배콜로바이러스(baculoviral) 균주 및 변이체 및 이에 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포, 예를 들어, 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에데스 애집티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주들로부터의 곤충 숙주 세포가 동정되어 있다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주들이 공개적으로 사용되고 있으며, 예로는 오토그라파 캘리포니카 NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주를 들 수 있으며, 이와 같은 바이러스는 본 발명에 따른 바이러스로서, 특히 스포도테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위한 바이러스로서 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, পে튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명의 재조합 항체를 발현하는데 적합한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO 세포)(참조: Urlaub and Chasin,(1980) PNAS USA 77:4216-4220)에 기술되어 있는 것으로, 예를 들면, 문헌(참조: Kaufman and Sharp(1982) Mol. Biol. 159:601-621)에 기술된 것과 같은 DHFR 선별 마커와 함께 사용되는 dhfr- CHO 세포를 포함하며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다), NS0 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포내로 도입되는 경우, 항체는 숙주 세포 내에서 항체의 발현 또는 숙주 세포가 성장하는 배양 배지내로 항체의 분비가 이루어지도록 하기에 충분한 시간 동안 숙주세포를 배양함으로써 생산된다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 사람 배아 신장 세포주[(293 또는 현탁 배양물에서의 성장을 위해 아클로닝된 293 세포, 참조(Graham et al., J. Gen Virol. 36:59(1977))]; 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980)); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 사람 자궁경부암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 사람 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 사람 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 사람 간암 세포주(Hep G2)이며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

[0072] 숙주 세포는 항체 생산을 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 목적하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절히 변형된 통상의 영양 배지에서 배양시킨다.

[0073] 항체를 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양시킬 수 있다. Ham's F10TM(Sigma), Minimal Essential MediumTM((MEM),(Sigma)), RPMI-1640(Sigma) 및 Dulbecco's Modified Eagle's MediumTM(DMEM), Sigma)과 같은 시판 배지가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, Ham et al., Meth. Enz. 58:44(1979),

[0074] Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255(1980), 미국 특허 공보 제4,767,704호, 제4,657,866호, 제4,927,762호, 제4,560,655호 및 제5,122,469호; 국제 특허 출원 공보 제WO 90/03430호; 제WO 87/00195호 또는 미국 특허 공보 제Re. 30,985호에 기술된 배지중 어떠한 것도 숙주 세포의 배양 배지로서 사용될 수 있으며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다. 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피세포성장인자), 염(예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예를 들어, HEPES), 뉴클레오타이드(예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예를 들어, 젠타마이신 약물), 미량원소(보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨) 및 글루코스 또는 균등 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 어떠한 다른 필요한 보충제도 본 분야의 전문가에게 알려져 있는 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건이 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 종전에 사용된 것들이며, 당업자에게는 명백히 알려져 있는 것이다.

[0075] 또한, 숙주 세포를 사용하여 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 완전한 항체의 부분을 생산할 수 있다. 상기 방

법의 변형들이 본 발명의 범위에 속한다는 것은 이해되어야 한다. 예를 들어, 특정 양태로서, 숙주 세포를 본 발명의 항체의 경쇄 또는 중쇄(그러나 둘 다는 아니다)를 암호화하는 DNA로 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 재조합 DNA 기술을 사용하여 IL-13, 특히 hIL-13과의 결합에 필요하지 않은 경쇄 및 중쇄중 어느 하나 또는 둘 다를 암호화하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거할 수 있다. 이와 같이 절삭된 DNA 분자로부터 발현된 분자들 또한 본 발명의 항체에 포함된다. 추가로, 표준 화학적 가교 방법에 의해 본 발명의 항체를 제2 항체에 가교시킴으로써 한개의 중쇄와 한개의 경쇄가 본 발명의 항체이고 다른 중쇄와 경쇄가 IL-13이 아닌 다른 항원에 대해 이중기능 항체를 생산할 수 있다.

[0076] 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 재조합 발현을 위해 적합한 시스템에서, 항체 중쇄와 항체 경쇄 둘 다를 암호화하는 재조합 발현 벡터는 인산칼슘-매개된 형질감염에 의해 dhfr-CHO 세포내로 도입된다. 재조합 발현 벡터내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 유전자의 고 수준 전사가 진행되도록 각각 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소에 작동적으로 연결된다. 또한, 재조합 발현 벡터는 메토타렉세이트 선별/증폭을 사용하는 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선별을 허용하는 DHFR 유전자를 보유한다. 선별된 형질전환 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄의 발현이 이루어지도록 배양되고 배양 배지로부터 완전한 항체를 회수한다. 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키며, 형질전환체를 선별하고, 숙주 세포를 배양하며, 배양 배지로부터 항체를 회수하는데 표준 분자 생물학 기술을 사용한다.

[0077] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포내 또는 주변세포질 공간내로 생산되도록 하거나 직접 배지로 분비되도록 할 수 있다. 한 가지 관점에서, 만일 항체가 세포내로 생산되는 경우, 첫 단계로서, 예를 들어, 균질화로 인해 생성된 숙주 세포 또는 용해된 세포의 미세 파편을, 예를 들어, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지내로 분비된 경우, 일차로 시판되고 있는 단백질 농축 필터(예를 들어, Amicon™ 또는 Millipore Pellicon™ 한외여과 유니트)를 사용하여 발현 시스템의 상청액을 농축시킬 수 있다.

[0078] 본 발명의 방법이전에, 우선적으로 세포 파편으로부터 항체를 정제하는 과정은 항체의 발현 위치에 의해 좌우된다. 일부 항체는 직접 세포로부터 주변 성장 배지로 분비될 수 있으며, 다른 항체는 세포내로 생성된다. 후자 항체의 경우, 정제 과정의 첫번째 단계는 전형적으로 기계적 전단, 삼투압 충격 또는 효소 처리를 포함한 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있는 세포의 용해를 포함한다. 이와 같은 분쇄는 세포의 내용물이 파쇄액으로 방출되도록 하고 또한 아세포 단편을 생산하는데, 이러한 아세포 단편들은 크기가 작기때문에 제거하기가 어렵다. 이들은 일반적으로 분별 원심분리 또는 여과에 의해 제거한다. 항체가 분비된 경우, 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 우선 시판되고 있는 단백질 농축 필터(예를 들어, Amicon™ 또는 Millipore Pellicon™ 한외여과 유니트)를 사용하여 농축시킨다. 항체가 배지로 분비된 경우, 또한 재조합 숙주 세포를, 예를 들어, 접선 유도 여과에 의해 세포 배양 배지로부터 분리할 수 있다. 또한, 항체는 본 발명의 항체 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 추가로 회수할 수 있다.

[0079] 3.2 예시적인 생산 전략

[0080] 특정 양태로서, 항-IL-13 항체 생산의 첫 단계는 교반용 플라스크 및 바이오웨이브 백을 사용하여 한개의 동결 바이알로부터 항-IL-13 항체-발현 CHO 세포를 110 L 식종용 생물반응기에 접종하는데 필요한 생체량으로 증식시키는 것이다. 마스터 셀 배양 CHO 세포의 동결 바이알을 해동하고 배양 배지(SR-512)에 투입한 후 원심분리한다. 세포를 성장 배지에 재현탁시키고 일회용 교반용 플라스크, 진탕 플라스크 및/또는 바이오웨이브 백의 용적을 늘리면서 37℃ 및 5% CO₂에서 증식시킨다. 식종용 생물반응기내로 접종하기 전에 이중 20L 웨이브 백을 사용하여 최종 세포 생체량 증식을 최대화한다. 약 15 내지 17일 경과하여 모든 20L 웨이브 백으로부터 세포 밀도가 $\geq 2.0 \times 10^6$ 생존 세포/mL에 도달한 경우, 추가로 증식시키기 위해 성장 배지 SR-520을 채운 110 L 식종용 생물반응기로 배양물을 옮긴다. 접종 후 온도 및 pH는 37℃ 및 7.1로 설정하고 NaOH의 첨가 및 CO₂를 살포하여 조절한다. 생물반응기의 용존 산소(DO)는 공기와 산소를 살포하여 40%의 목표값으로 조절한다. 약 2 내지 4일 경과한 후 일단 세포 밀도가 $\geq 2.6 \times 10^6$ 생존 세포/mL에 도달하면, 배양물을 3000 L 생산용 생물반응기로 옮긴다.

[0081] 특정 양태로서, 3000 L 생산용 생물반응기에 부분 충전(partial fill)하여 추가로 세포 배양물을 증식시킨다. 처음에, 반응기를 성장 배지(SR-520)로 채우고 110L 식종용 생물반응기로부터 채취한 한 회분을 접종한다. 이와 같은 불충분 충전(short-fill) 단계 동안에, 온도, 용존산소 및 pH는 각각 37℃, 40% 및 7.1로 조절한다.

배양 pH는 CO₂의 살포 및 NaOH의 첨가로 조절한다. 전형적으로 세포는 2 내지 4일 성장한 후 $\geq 1.6 \times 10^6$ 생존 세포/mL의 생산 단계 밀도에 도달한다.

[0082] 생산 단계를 개시하기 위해 3000 L 생물반응기내 세포 배양물에 생산 배지 SR-521(1950 L)을 첨가한다. 소포제 C를 첨가하여 기포를 줄인다. CO₂ 살포 및 NaOH 첨가를 온오프 가동하면서 배양 pH를 6.9의 목표값으로 조절한다. 온도 및 용존 산소는 각각 35℃ 및 40%의 목표값으로 조절한다. 생물반응기의 DO는 처음에 공기 살포에 의해 원하는 값으로 조절하고 필요한 경우 순수 산소를 보충한다. 특정 양태로서, 생존 세포 밀도가 $\geq 3.0 \times 10^6$ 세포/mL에 도달한 경우 온도는 33℃의 목표값으로 낮추고 pH 및 DO는 각각 6.9 및 40%의 목표값으로 유지하는 한편, 다른 양태로서 35℃의 목표값을 유지한다. 필요한 경우 글루코즈(SR-334)를 첨가한다. 세포 생존율이 $\leq 50\%$ 로 떨어지면 배양물을 수집하고 하기와 같이 정제한다.

[0083] 4. 항체 정제

[0084] 4.1 일반적인 항체 정제

[0085] 본 발명은 항체 및 하나 이상의 HCP를 포함한 혼합물로부터 정제된(또는 "HCP-감소된") 항체 제제를 생산하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 최종 정제된 제제를 침출된 단백질 A에서 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 정제 과정은 상기된 방법 및 본 분야의 통상적인 방법을 사용하여 항체가 생산되었을 때 분리 단계로 시작한다. 표 1은 정제 계획의 한 가지 양태를 요약한 것이다. 이 계획은 이로써 한정하는 것은 아니지만 단백질 A 친화성 크로마토그래피 단계를 삭제하거나 이온교환 단계의 순서를 바꾸거나 하는 등의 변형이 있을 수 있으며, 이러한 계획의 변형은 본 발명의 범위에 포함되는 것이다.

표 1

정제 단계 및 이의 관련 목적

정제단계	목적
일차 회수	시료 매트릭스의 정화
친화성 크로마토그래피	항체 포획, 숙주 세포 단백질 및 관련된 불순물 감소
낮은 pH 배양	바이러스 감소/불활성화
음이온교환 크로마토그래피	항체 포획, 숙주 세포 단백질 및 관련된 불순물 감소
소수성 상호작용 크로마토그래피	항체 응집체 및 숙주 세포 단백질의 감소
바이러스 여과	존재하는 경우 거대 바이러스의 제거
한외여과/정용여과	농축 및 완충액 교환
최종 여과	항체의 농축 및 제형

[0086]

[0087] 일단 항체를 포함한 정화 용액 또는 혼합물이 수득되면, 이온교환 분리 단계(들) 및 소수성 상호작용 분리 단계(들)를 포함한 상이한 정제 기술의 조합을 사용하여 HCP와 같은 세포에 의해 생산된 다른 단백질로부터 항체를 분리한다. 분리 단계는 단백질의 혼합물을 전하, 소수성 정도 또는 크기를 기초로 분리한다. 본 발명의 한 가지 관점에서, 분리는 양이온, 음이온 및 소수성 상호작용을 포함한 크로마토그래피를 사용하여 실시한다. 이들 기술의 각각에 적합한 몇 가지 상이한 크로마토그래피 수지가 사용되고 있으며, 이에 따라 정제 계획에 관련된 특정 단백질에 정확하게 맞출 수가 있다. 각 분리 방법의 핵심은 단백질들이 컬럼을 따라 상이한 속도로 내려올 수 있어서 이들이 컬럼을 통과하면서 물리적 분리를 증대시키거나 선택적으로 분리 매질에 흡착되도록 하여 상이한 용매에 의해 차별적으로 용출되도록 하는 것이다. 일부 경우는 불순물이 컬럼에 특이적으로 흡착하지만 항체는 흡착하지 않을 때 불순물로부터 항체가 분리되며, 즉, 항체는 용출액에 존재한다.

[0088] 상기된 바와 같이, 정제 계획의 정확한 맞춤은 정제하고자 하는 단백질에 의해 좌우된다. 특정 양태로서, 본 발명의 분리 단계를 사용하여 하나 이상의 HCP로부터 항체를 분리한다. 본원에 사용된 방법을 사용하여 성공적

으로 정제할 수 있는 항체는 이로써 한정되는 것은 아니지만 IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ 및 IgM 항체를 포함한다. 특정 양태로서, 본 발명의 정제 전략은 예를 들어, IgG₃ 항체의 정제와 관련하여 단백질 A 친화성 크로마토그래피의 사용을 배제하는데 그 이유는 IgG₃ 항체가 단백질 A와 비효율적으로 결합하기 때문이다. 정제 계획의 특정 맞춤을 가능하게 해 주는 다른 요인은 이로써 한정되는 것은 아니지만 단백질 A가Fc 영역에 결합하기 때문에 Fc 영역의 유무(예를 들면, Fab 단편과 비교하여 완전한 길이의 항체와 관련하여); 목적하는 항체를 발생시키는데 사용된 특정 배선 서열; 및 항체의 아미노산 조성(예를 들면, 항체의 일차 서열뿐만 아니라 분자의 총 전하/소수성)을 포함한다. 한 가지 이상의 특징을 공유하는 항체들을 이러한 특징의 이점을 취하기 위해 맞춤 정제 전략을 사용하여 정제할 수 있다.

[0089] 4.2 일차 회수

[0090] 본 발명에 따른 정제 방법의 초기 단계는 시료 매트릭스로부터 항체의 정화 및 일차 회수의 일단계를 포함한다. 추가로, 일차 회수 과정은 또한 시료 매트릭스에 존재할 수 있는 바이러스를 감소 또는 불활성화시키는 시점일 수 있다. 예를 들면, 가열 불활성화(저온살균), pH 불활성화, 용매/세정제 처리, UV 및 감마선 조사 및 특정 불활성화 화학물질(예를 들어, β-프로피오락톤 또는 미국 특허 공보 제4,534,972호의 구리 페난트롤린)의 첨가를 포함하여 정제의 일차 회수 단계 동안에 여러 가지 바이러스 감소/불활성화 방법중 임의로 하나 이상을 사용할 수 있으며, 위 특허의 전문은 본원에 참고로 인용된다. 본 발명의 특정 양태로서, 일차 회수 단계 동안에 시료 매트릭스를 pH 바이러스 감소/불활성화에 노출시킨다.

[0091] pH 바이러스 감소/불활성화의 방법은 이로써 한정되는 것은 아니지만 낮은 pH에서 일정 시간 동안 혼합물을 배양하고 후속하여 pH를 중화시키며 입자를 여과에 의해 제거하는 것을 포함한다. 특정 양태로서, 혼합물은 약 2 내지 5의 pH에서, 약 3 내지 4의 pH에서(이로써 한정하는 것은 아니지만 약 pH 3.5를 포함) 항온배양한다. 시료 혼합물의 pH는 이로써 한정하는 것은 아니지만 시트르산, 아세트산, 카프릴산 또는 다른 적합한 산으로 낮출 수 있다. pH 수준의 선택은 항체 생산물 및 완충액 성분의 안정성 프로필에 의해 주로 좌우된다. 낮은 pH 바이러스 감소/불활성화 동안에 표적 항체의 질이 pH 및 낮은 pH 항온배양 기간에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특정 양태로서, 낮은 pH 항온배양 시간은 이로써 한정하는 것은 아니지만 30분 내지 1.5시간을 포함하여(이로써 한정하는 것은 아니지만 약 1시간을 포함) 30분 내지 2시간일 것이다. 바이러스 감소/불활성화는 고 농도에서 감소/불활성화를 제한할 수 있는 단백질 농도이외에 그러한 동일한 변수에 의해 좌우된다. 따라서, 단백질 농도, pH 및 감소/불활성화 기간의 적절한 변수를 선택하여 바이러스 감소/불활성화의 목적하는 수준을 달성할 수 있다.

[0092] 특정 양태로서, 바이러스 감소/불활성화는 적당한 필터를 사용하여 달성할 수 있다. 적합한 필터의 비제한적 예는 폴 코포레이션(Pall Corporation)의 Ultipor DV50™ 필터이다. 비록 본 발명의 특정 양태가 일차 회수 단계동안에 그러한 여과를 사용하지만, 다른 양태로서 여과는 정제 과정의 마지막 전단계 또는 마지막 단계를 포함하여 정제 과정의 다른 단계에서 사용된다. 특정 양태로서, 바이러스 감소/불활성화를 위해 다른 필터가 사용되며, 이로써 한정하는 것은 아니지만 예로는 Viresolve™ 필터(Millipore, Billerica, Mass.), Zeta Plus VR™ 필터(CUNO; Meriden, Conn.) 및 Planova™ 필터(Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.)를 들 수 있다.

[0093] 바이러스 감소/불활성화가 사용되는 양태에서, 필요한 경우 추가의 정제 단계시 시료 혼합물을 조정할 수 있다. 예를 들면, 낮은 pH 바이러스 감소/불활성화 후 전형적으로 정제 과정을 계속 진행하기 이전에 시료 혼합물의 pH를 더욱 중성인 pH로, 예를 들면 약 4.5 내지 약 8.5(이로써 한정하는 것은 아니지만 약 4.9를 포함)로 조정한다. 추가적으로, 혼합물을 주사용수(WFI)로 처리하여 목적하는 전도도를 수득한다.

[0094] 특정 양태로서, 일차 회수는 시료 매트릭스를 추가로 정화하고 그림으로써 항-IL-13 항체를 정제하는데 보조하기 위한 하나 이상의 원심분리 단계를 포함하는 것이다. 시료의 원심분리는 이로써 한정하는 것은 아니고, 예를 들면 7,000 x g 내지 약 12,750 x g로 가동할 수 있다. 대규모 정제의 경우, 원심분리는 이로써 한정하는 것은 아니고, 예를 들면, 생성된 상청액에 150 NTU의 탁도가 달성되도록 유속을 설정하여 온라인으로 진행할 수 있다. 그런 다음 상청액을 추가의 정제를 위해 수집할 수 있다.

[0095] 특정 양태로서, 일차 회수는 시료 매트릭스를 추가로 정화하고 그림으로써 본 발명의 항체를 정제하는데 보조하기 위한 하나 이상의 심층 여과 단계를 포함할 것이다. 심층 여과 방식 필터는 밀도흡배를 갖는 여과 매질을 함유한다. 이와 같은 밀도흡배는 좀더 큰 입자들이 필터의 표면 가까이에 포착되도록 하는 한편 좀더 작은 입

자들은 필터의 표면에서 좀더 큰 구멍 영역을 통과하고 단지 필터의 중심에 보다 가까이 위치한 좀더 작은 구멍들에 포착되도록 한다. 특정 양태로서 심층 여과 단계는 디리피드 심층 여과 단계일 수 있다. 비록 특정 양태가 일차 회수 단계 동안에만 심층 여과 단계를 사용하지만, 다른 양태는 하나 이상의 추가적인 정제 단계 동안에 디리피드 심층 여과 방식 필터를 포함한 심층 여과 방식 필터를 사용한다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 심층 여과 방식 필터의 비제한적 예는 CunoTM 모델 30/60ZA 심층 여과 방식 필터(3M Corp.) 및 0.45/0.2 μ m SartoporeTM 이중층 필터 카트리지를 포함한다.

[0096] 4.3 친화성 크로마토그래피

[0097] 특정 양태로서, 일차 회수 시료를 친화성 크로마토그래피에 적용시켜 추가로 목적하는 항체를 HCP로부터 정제한다. 특정 양태에서 크로마토그래피 물질은 목적하는 항체와 선택적으로 또는 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 크로마토그래피 물질의 비제한적 예는 단백질 A, 단백질 G, 목적하는 항체에 의해 결합된 항원을 포함한 크로마토그래피 물질 및 Fc 결합 단백질을 포함한 크로마토그래피 물질을 포함한다. 특정 양태로서, 친화성 크로마토그래피 단계는 일차 회수 시료를 적합한 단백질 A 수지를 포함한 컬럼에 적용하는 것을 포함한다. 단백질 A 수지는 다양한 항체 동형, 특히 IgG₁, IgG₂ 및 IgG₄의 친화성 정제 및 분리에 유용하다. 단백질 A는 Fc 영역을 통해 포유동물 IgG에 일차로 결합하는 세균 세포벽 단백질이다. 단백질 A는 천연 상태에서 5개의 IgG 결합 도메인뿐만 아니라 미확인된 기능의 다른 도메인을 갖는다.

[0098] 단백질 A 수지는 몇몇 시판품이 있다. 적합한 수지는 이로써 한정하는 것은 아니지만 GE Healthcare의 MabSelectTM 및 Millipore의 ProSep Ultra PlusTM을 포함한다. MabSelectTM으로 충전한 적합한 컬럼의 비제한적 예는 직경 약 1.0 cm x 길이 약 21.6 cm의 컬럼(약 17 mL의 충전용적)이다. 이러한 크기의 컬럼은 소규모 정제를 위해 사용될 수 있으며 규모를 확장하기 위해 사용되는 다른 컬럼과 비교할 수 있다. 예를 들면, 충전제 부피가 약 6.6 L인 20 cm x 21 cm 컬럼이 좀더 대량의 정제를 위해 사용될 수 있다. 컬럼과 상관없이, 컬럼은 MabSelectTM 또는 ProSep Ultra PlusTM과 같은 적합한 수지를 사용하여 충전시킬 수 있다.

[0099] 특정 양태로서, 목적하는 특정 항체의 맞춤형 정제를 위해, 단백질 A 수지의 동적결합능(DBC)을 확인하는 것이 유리할 것이다. 이로써 제한하는 것이 아니고 예를 들면, MabSelectTM 또는 ProSep Ultra PlusTM 컬럼의 DBC는 단일 유속 로딩 또는 이중 유속 로딩 전략에 의해 측정할 수 있다. 단일 유속 로딩은 전체 로딩 기간 내내 약 300 cm/hr의 속도로 결정될 수 있다. 이중 유속 로딩 전략은 약 300 cm/hr의 선속도로 컬럼을 약 35 mg 단백질/mL 수지까지 로딩시킨다음 체류 시간을 좀더 길게하기 위해 나머지 로딩 부분에 대해 선속도를 반으로 감속함으로써 결정할 수 있다.

[0100] 특정 양태로서, 단백질 A 컬럼은 시료 로딩 전에 적합한 완충액으로 평형시킬 수 있다. 적합한 완충액의 비제한적 예는 pH가 약 7.2인 Tris/NaCl 완충액이다. 적합한 평형 조건의 비제한적 예는 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 약 7.2의 pH이다. 이와 같은 평형 후 시료는 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼의 로딩 후, 컬럼은 예를 들면 평형 완충액을 사용하여 일회 또는 수회 세척할 수 있다. 상이한 완충액을 사용한 세척을 포함한 다른 세척을 컬럼을 용출하기 전에 사용할 수 있다. 예를 들면, 20 mM 시트르산/나트륨 시트레이트, 0.5 M NaCl(pH 약 6.0)의 컬럼 용량 1회 이상을 사용하여 컬럼을 세척할 수 있다. 임의로 이러한 세척에 이어서 평형 완충액을 사용한 일회 이상의 세척을 수행할 수 있다. 이어서, 단백질 A 컬럼은 적절한 용출 완충액으로 용출시킬 수 있다. 적합한 용출 완충액의 비제한적 예는 아세트산/NaCl 완충액(pH 약 3.5)이다. 적합한 조건은 예를 들어, 0.1 M 아세트산(pH 약 3.5)이다. 용출물은 본 분야의 전문가에게 잘 알려진 기술을 사용하여 모니터링할 수 있다. 예를 들어, OD₂₈₀에서의 흡광도를 측정할 수 있다. 컬럼 용출물은 약 0.5 AU의 초기 굴절에서 시작하여 용출 정점의 뒤편 가장자리에서 약 0.5 AU의 관독에 이르기까지 수집할 수 있다. 그런 다음 목적하는 용출 분획을 추가 공정을 위해 준비할 수 있다. 예를 들면, 수집된 시료를 pH 약 10의 Tris(예를 들어, 1.0 M)를 사용하여 약 5.0의 pH로 적정할 수 있다. 임의로 앞서 적정된 시료는 여과하고 후처리할 수 있다.

[0101] 4.4 이온교환 크로마토그래피

[0102] 특정 양태로서, 본 발명은 항체 및 하나 이상의 HCP를 포함한 혼합물을 한 가지 이상의 이온교환 분리 단계에 적용시켜 항체를 포함한 용출물을 수득함으로써 상기 혼합물로부터 HCP-감소된 항체 체제를 생산하는 방법을 제공한다. 이온교환 분리는 두 물질의 각 이온 전하 차이를 기초로 하여 이들 물질을 분리하는 모든 방법을 포함하며 양이온 교환 물질 또는 음이온 교환 물질을 사용할 수 있다.

- [0103] 양이온 교환 물질 대 음이온 교환 물질의 사용은 단백질의 총 전하에 의해 좌우된다. 따라서, 양이온 교환 단계의 사용 이전에 음이온 교환 단계를 사용하거나 음이온 교환 단계의 사용 이전에 양이온 교환 단계를 사용하는 것은 본 발명의 범위에 속한다. 또한, 양이온 교환 단계만 사용하거나, 음이온 교환 단계만 사용하거나, 이들 둘의 연속 조합을 사용하는 것도 본 발명의 범위에 속한다.
- [0104] 분리를 수행함에 있어서, 초기 항체 혼합물은 다양한 기술을 사용하여, 예를 들면 회분식 정제 기술 또는 크로마토그래피 기술을 사용하여 이온교환 물질과 접촉시킬 수 있다.
- [0105] 예를 들어, 회분식 정제와 관련하여, 이온교환 물질은 목적하는 출발 완충액중에 유입하거나 평형시킨다. 유입 또는 평형시 이온교환 물질의 슬러리가 수득된다. 이 슬러리와 항체 용액을 접촉시키면 분리할 항체가 이온교환 물질에 흡착한다. 이온교환 물질과 결합하지 않는 HCP를 포함한 용액은 예를 들어, 슬러리가 침전하도록 하고 상청액을 제거함으로써 슬러리로부터 분리한다. 슬러리는 한 가지 이상의 세척 단계에 적용시킬 수 있다. 필요한 경우, 슬러리를 전도도가 보다 높은 용액과 접촉시켜 이온교환 물질에 결합되어 있는 HCP를 탈리시킬 수 있다. 결합된 폴리펩타이드를 용출하기 위해 완충액의 염 농도를 증가시킬 수 있다.
- [0106] 또한 이온교환 크로마토그래피는 이온교환 분리 기술로서 사용할 수 있다. 이온교환 크로마토그래피는 분자의 총 전하간 차이를 기초로 분자를 분리한다. 항체의 정제시, 항체는 결합이 이루어지도록 하기 위해 이온교환 물질(예를 들어, 수지)에 부착된 작용기의 것과 상반대는 전하를 가져야 한다. 예를 들면, 일반적으로 항체의 pI보다 낮은 완충액 pH에서 총 양전하를 갖는 항체는 음전하 작용기를 함유한 양이온교환 물질에 잘 결합할 것이다.
- [0107] 이온교환 크로마토그래피에서, 주변 완충액의 이온세기는 낮다는 것을 전제로 하여 용질 표면의 전하 패치는 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 반대 전하에 의해 유인된다. 일반적으로 용출은 완충액의 이온세기(즉, 전도도)를 증가시켜 이온교환 매트릭스의 전하 부위에 대해 용질과 경쟁시킴으로써 달성된다. pH에 변화를 줌으로써 용질의 전하를 변경시키는 것은 용질의 용출을 달성하는 또 다른 방법이다. 전도도 또는 pH의 변화는 점증적(구배 용출)이거나 단계별(계단식 용출)일 수 있다.
- [0108] 크로마토그래피를 위한 음이온 또는 양이온 지지체를 형성하기 위해 매트릭스에 음이온 또는 양이온을 결합시킬 수 있다. 음이온 교환 치환체의 비제한적 예는 디에틸아미노에틸(DEAE), 4급 아미노에틸(QAE) 및 4급 아민(Q) 그룹을 포함한다. 양이온 치환체는 카르복시메틸(CM), 설포닐에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)를 포함한다. DE23TM, DE32TM, DE52TM, CM-23TM, CM-32TM 및 CM-52TM과 같은 셀룰로즈 이온교환 수지가 Whatman Ltd.(Maidstone, Kent, UK)으로부터 시판되고 있다. 또한, SEPHADEX®-계 및 가교 이온 교환기가 알려져 있다. 예를 들면, DEAE-, QAE-, CM- 및 SP-SEPHADEX® 및 DEAE-, Q-, CM- 및 S-SEPHAROSE® 및 SEPHAROSE® 고속 유동이 Pharmacia AB로부터 시판되고 있다. 또한, DEAE 및 CM 유도체화 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체(예를 들어, TOYOPEARLTM DEAE-650S 또는 M 및 TOYOPEARLTM CM-650S 또는 M)가 Toso Haas Co.(Philadelphia, PA)로부터 시판되고 있다. 특정 양태로서, 음이온 교환 단계는 Pall Mustang Q 막 카트리지를 사용하여 달성한다.
- [0109] 항체 및 불순물(예를 들어, HCP(들))을 포함한 혼합물을 양이온교환 컬럼과 같은 이온교환 컬럼에 로딩한다. 이로써 한정하는 것은 아니며 예를 들면, 혼합물은 사용 컬럼에 따라 약 80 g 단백질/L 수지의 부하로 로딩할 수 있다. 적합한 양이온 교환 컬럼의 예는 직경 80 cm x 길이 23 cm로 충전체용적이 약 116 L인 컬럼이다. 이어서, 양이온 컬럼에 로딩된 혼합물은 세척 완충액(평형 완충액)으로 세척할 수 있다. 그런 다음, 항체를 컬럼으로부터 용출하여 일차 용출물을 획득한다.
- [0110] 이와 같은 이온교환 단계는 목적하는 항체의 포획을 촉진하는 한편 HCP와 같은 불순물을 감소시킨다. 특정한 관점에서, 이온 교환 컬럼은 양이온 교환 컬럼이다. 이로써 한정하는 것은 아니고 예를 들면 그와 같은 양이온 교환 컬럼에 적합한 수지는 CM HyperDFTM 수지이다. 이들 수지는 Pall Corporation과 같은 제조사로부터 구입 가능하다. 이러한 양이온 교환 과정은 실온이나 실온에 가까운 온도에서 실시할 수 있다.
- [0111] 4.5 한외여과/정용여과
- [0112] 본 발명의 특정 양태는 항체 시료를 추가로 정제 및 농축하기 위해 한외여과 및/또는 정용여과를 사용한다. 한외여과는 Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman and A. Zydney(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996) 및 Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan(Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)에 상세히 기술되어 있다. 한 가지 여과 과정은 Millipore 카탈로그

(제목: Pharmaceutical Process Filtration Catalogue) pp. 177-202(Bedford, Mass., 1995/96)에 기술된 접선 유동여과이다. 한외여과는 일반적으로 0.1 μm 보다 작은 기공 크기를 갖는 필터를 사용하는 여과를 의미한다. 이와 같이 작은 기공 크기를 갖는 필터를 사용함으로써, 시료의 용량은 시료 완충액이 필터를 통과하면서 줄어들 수 있는 한편 항체는 필터에 걸러진다.

[0113] 정용여과는 한외필터를 사용하여 염, 당 및 비수성 용매를 제거 및 교환시키고, 결합된 중으로부터 분리 유리시키며, 저분자량 물질을 제거하고/하거나 이온 및/또는 pH 환경의 급속한 변화를 유도하는 방법이다. 용액에 용매를 첨가하여 한외여과 속도와 거의 동일한 속도로 한외여과함으로써 미세용질은 가장 효율적으로 제거된다. 이것은 일정한 용적의 용액으로부터 미세종을 세척하여 걸러진 항체를 효과적으로 정제한다. 본 발명의 특정 양태로서, 정용여과 단계는 본 발명과 관련하여 사용된 여러 완충액을 교환하기 위해 임의로 추가의 크로마토그래피 또는 다른 정제 단계 이전에 사용하고 또한 항체 제제로부터 불순물을 제거하기 위해 사용한다.

[0114] 4.6 소수성 상호작용 크로마토그래피

[0115] 또한 본 발명은 소수성 상호작용 분리 단계를 추가로 포함하여, 항체와 하나 이상의 HCP를 포함한 혼합물로부터 HCP-감소된 항체 제제를 생산하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 이온교환 컬럼으로부터 수득한 일차 용출물을 소수성 상호작용 물질에 적용시켜 감소된 수준의 HCP를 갖는 이차 용출물을 수득할 수 있다. 본원에 기술된 것과 같은 소수성 상호작용 크로마토그래피 단계는 일반적으로 항체 응집체와 같은 단백질 응집체 및 공정-연관된 불순물을 제거하기 위해 수행한다.

[0116] 분리를 수행함에 있어서, 예를 들어, 회분식 정제 기술을 사용하거나 컬럼을 사용하여 시료 혼합물을 HIC 물질과 접촉시킨다. HIC 정제 이전에 모든 무질서유발제 또는 극소수성 물질을, 예를 들면, 혼합물을 예비컬럼에 통과시킴으로써 제거하는 것이 바람직할 수 있다.

[0117] 예를 들면, 회분식 정제와 관련하여, HIC 물질은 목적하는 평형 완충액에 투입해 두거나 이에 평형시킨다. HIC 물질의 슬러리가 수득된다. 이 슬러리와 항체 용액을 접촉시키면 분리할 항체가 HIC 물질에 흡착한다. HIC 물질과 결합하지 않는 HCP를 포함한 용액은 예를 들어, 슬러리가 침전하도록 하고 상청액을 제거함으로써 슬러리로부터 분리한다. 슬러리는 한 가지 이상의 세척 단계에 적용시킬 수 있다. 필요한 경우, 슬러리를 전도도가 보다 낮은 용액과 접촉시켜 HIC 물질에 결합되어 있는 항체를 탈리시킬 수 있다. 결합된 항체를 용출하기 위해 염 농도를 감소시킬 수 있다.

[0118] 이온교환 크로마토그래피는 분리할 항체의 전하에 의존하는 한편, 소수성 상호작용 크로마토그래피는 항체의 소수성을 사용한다. 항체의 소수성 그룹은 컬럼의 소수성 그룹과 상호작용할 것이다. 단백질이 소수성이 강할수록 단백질은 컬럼과 더 강하게 상호작용한다. 따라서, HIC 단계는 숙주 세포로부터 유래된 불순물(예를 들어, DNA 및 다른 고분자량 및 저분자량 생산물-연관된 중)을 제거한다.

[0119] 소수성 상호작용은 고 이온세기에서 가장 강력하며, 이에 따라 이와 같은 분리 형태는 편리하게는 염침강 또는 이온교환 공정 이후에 수행한다. HIC 컬럼에 항체의 흡착은 고 염농도에 의해 유리하게 진행되지만, 실질적인 농도는 항체의 성질 및 선택된 특정 HIC 리간드에 따라 넓은 범위에서 다양할 수 있다. 여러 가지 이온들이 소수성 상호작용을 촉진하거나(염석 효과) 물 구조를 붕괴시키고(무질서유발 효과) 소수성 상호작용의 약화를 초래하는 지의 여부에 따라 소위 소용매성 시리즈로 배열될 수 있다. 양이온은 염석 효과를 증가시키는 측면에서 Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} , Li^{+} , Cs^{+} , Na^{+} , K^{+} , Rb^{+} , NH_4^{+} 로 등급이 지정되는 한편, 음이온은 무질서유발 효과를 증가시키는 측면에서 PO^{---} , SO_4^{--} , $\text{CH}_3\text{CO}_3^{-}$, Cl^{-} , Br^{-} , NO_3^{-} , ClO_4^{-} , I^{-} , SCN^{-} 로 등급이 지정된다.

[0120] 일반적으로 황산나트륨, 황산칼륨 또는 황산암모늄이 HIC에서 리간드-단백질 상호작용을 효과적으로 촉진한다. 상호작용 세기에 영향을 미치는 염들이 다음과 같은 순서로 제형될 수 있다: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NaBr} > \text{NaSCN}$. 일반적으로, 염농도가 약 0.75 내지 약 2 M의 황산암모늄 또는 약 1 내지 4 M의 NaCl이 유용하다.

[0121] HIC 컬럼은 보통 소수성 리간드(예를 들어, 알킬 그룹 또는 아릴 그룹)가 결합되어 있는 염기 매트릭스(예를 들어, 가교 아가로스 또는 합성 공중합체 물질)를 포함한다. 적합한 HIC 컬럼은 페닐 그룹으로 치환된 아가로스 수지를 포함한다(예를 들어, 페닐 세파로즈TM 컬럼). 많은 HIC 컬럼이 시판되고 있다. 예로는 이로써 한정하는 것은 아니지만 저 치환 또는 고 치환을 갖는 페닐 세파로즈TM 6 고속 유동 컬럼(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); 페닐 세파로즈TM 고성능 컬럼(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); 옥틸 세파로즈TM 고

성능 컬럼(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); 프락토겔™ EMD 프로필 또는 프락토겔™ EMD 페닐 컬럼 (E. Merck, Germany); Macro-Prep™ Methyl 또는 Macro-Prep™ t-부틸 지지체(Bio-Rad, California); WP HI-프로 필(C3)™ 컬럼(J. T. Baker, New Jersey); 및 Toyopore™ 에테르, 페닐 또는 부틸 컬럼(TosoHaas, PA)을 포함 한다.

[0122] 4.7 예시적인 정제 전략

[0123] 특정 양태로서, 일차 회수는 처음에 원심분리 및 여과 단계를 사용하여 생산용 생물반응기 수확물로부터 세포 및 세포 파편(HCP를 포함)을 제거함으로써 진행한다. 이로써 한정하는 것은 아니고 예를 들면, 항체, 배지 및 세포를 포함한 배양액을 약 7000 x g 내지 약 11,000 x g로 원심분리할 수 있다. 특정 양태로서, 그럼 다음, 생성된 시료 상청액을 복수의 심층 여과 방식 필터를 포함한 필터 트레인을 통과시킨다. 특정 양태로서, 필터 트레인은 약 12개의 16-인치 Cuno™ 모델 30/60ZA 심층 여과 방식 필터(3M Corp.) 및 3개의 30-인치 0.45/0.2 µm Sartopore™ 2 필터 카트리지(Sartorius)가 장착된 약 3개의 원형 필터 하우징을 포함한다. 정화된 상청액은 용기(예를 들어, 예비멸균된 수집 용기)에 수집하고 약 8℃로 유지한다. 이어서, 이 온도를 포획 크로마토 그래피 단계 또는 아래 요약된 단계 이전에 약 20℃로 조정한다. 본 분야의 전문가들은 상기 조건을 다양하게 조정할 수 있으며 이러한 조정은 본 발명의 범위에 속한다는 것은 주지되어야 한다.

[0124] 특정 양태로서, 일차 회수에 이어서 단백질 A 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피가 수행될 것이다. 단백질 A 수지는 몇몇 시판처가 있다. 한 가지 적합한 수지는 GE Healthcare의 MabSelect™이다. MabSelect™이 충전된 적합한 컬럼의 예는 직경이 약 1.0 cm이고 길이가 약 21.6 cm인 컬럼(약 17 mL의 충전제용적)이다. 이러한 크기의 컬럼은 실험실 규모를 위해 사용될 수 있다. 이것은 규모를 확장하기 위해 사용되는 다른 컬럼과 비교될 수 있다. 예를 들면, 충전제용적이 약 6.6 L인 20 cm x 21 cm 컬럼은 상업적 생산을 위해 사용할 수 있다. 컬럼과 상관없이, 컬럼은 MabSelect™과 같은 적합한 수지로 충전시킬 수 있다.

[0125] 특정한 관점에서, 단백질 A 컬럼은 시료의 로딩 이전에 적합한 완충액으로 평형시킬 수 있다. 적합한 완충액의 예는 이로써 한정하는 것은 아니지만 pH 약 7.2를 포함하여 pH 약 6 내지 8인 Tris/NaCl 완충액이다. 적합한 조건의 특이적 예는, 25mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.2이다. 평형 후, 시료를 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼의 로딩 후 컬럼은 예를 들어, 평형 완충액을 사용하여 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 상이한 완충액을 사용한 세척을 포함하여 다른 세척을 컬럼 용출 이전에 사용할 수 있다. 예를 들면, 컬럼을 20 mM 시트르산/나트륨 시트레이트, 0.5 M NaCl(pH 약 6.0)의 일회 이상의 컬럼 용량을 사용하여 세척할 수 있다. 이 세척 후에 임의로 평형 완충액을 사용하여 1회 이상의 세척을 실시할 수 있다. 이어서, 단백질 A 컬럼을 적절한 용출 완충액으로 용출시킬 수 있다. 적합한 용출 완충액의 예는 pH가 약 3.5인 아세트산/NaCl 완충액이다. 적합한 조건은 예를 들면, 0.1 M 아세트산(pH 3.5)이다. 용출물은 본 분야의 전문가에게 잘 알려진 기술을 사용하여 모니터링할 수 있다. 예를 들면, OD₂₈₀에서의 흡광도를 측정할 수 있다. 컬럼 용출물은 약 0.5 AU의 초기 굴절에서 시작하여 용출 정점의 뒤편 가장자리에서 약 0.5 AU의 판독에 이르기까지 수집할 수 있다. 그런 다음 목적하는 용출 분획(들)을 추가 공정을 위해 준비할 수 있다. 예를 들면, 수집된 시료를 pH 약 10의 Tris(예를 들어, 1.0 M)를 사용하여 약 5.0의 pH로 적정할 수 있다. 임의로 앞서 적정된 시료는 여과하고 후처리할 수 있다.

[0126] MabSelect™ 컬럼의 동적결합능(DBC)은 단일 유속 로딩 또는 이중 유속 로딩 전략에 의해 결정할 수 있다. 단일 유속 로딩은 전체 로딩 기간 내내 약 300 cm/hr의 속도로 결정될 수 있다. 이중 유속 로딩 전략은 약 300 cm/hr의 선속도로 컬럼을 약 35 mg 단백질/mL 수지까지 로딩시킨다음 체류 시간을 좀더 길게하기 위해 나머지 로딩 부분에 대해 선속도를 반으로 감소함으로써 결정할 수 있다.

[0127] 그런 다음, 단백질 A 용출물은 pH-매개된 바이러스 감소/불활성화 단계를 사용함으로써 추가로 정제할 수 있다. 특정 양태로서, 이 단계는 용출물의 pH를 이로써 한정하는 것은 아니지만 약 3.5를 포함하여 약 3 내지 약 5로 약 1시간동안 조정하는 것을 포함한다. pH 감소는 알려진 산 제제, 예를 들면, 시트르산(예를 들어, 3 M 시트르산)을 사용하여 촉진시킬 수 있다. 산 pH로의 노출은 완전히 제거하는 것은 아니지만 pH 민감성 바이러스 오염물을 감소시키고 일부 배지/세포 오염물을 침전시킨다. 이와 같은 바이러스 감소/불활성화 단계 후 pH는 수산화나트륨(예를 들어, 3 M 수산화나트륨)과 같은 염기를 사용하여 약 4.9 또는 5.0으로 약 20분 내지 약 40분 동안 조정한다. 이러한 조정은 약 20℃에서 진행할 수 있다.

[0128] 특정 양태로서, pH 조정된 배양액은 음이온교환 컬럼을 사용하여 추가로 정제한다. 이 단계에 적합한 컬럼의

비제한적 예는 충전제용적이 약 85 L인 직경 60 cm x 길이 30 cm 컬럼이다. 컬럼은 GE Healthcare의 Q 세파로즈™ 고속 유동과 같은 음이온교환 수지를 충전시킨다. 컬럼은 Tris/염화나트륨과 같은 적절한 완충액의 약 7회 컬럼 용량으로 평형시킬 수 있다. 적합한 조건의 예는 25 mM Tris, 50 mM 염화나트륨(pH 8.0)이다. 전문가들은 조건을 다양하게 사용할 수 있지만 이들은 본 발명의 범위에 속한다. 상기된 단백질 A 정제 단계로부터 수집된 시료를 컬럼에 로딩한다. 다른 관점에서, 컬럼은 양이온교환 동안 수집된 용출물로 로딩한다. 컬럼의 로딩 후 컬럼은 평형 완충액(예를 들어, Tris/염화나트륨 완충액)으로 세척한다. 항체를 포함한 유동-통과물은 OD_{280nm}에서 UV 분광기를 사용하여 모니터링할 수 있다. 이러한 음이온 크로마토그래피 단계는 공정 관련된 불순물(예를 들어, DNA와 같은 핵산 및 숙주 세포 단백질)을 감소시킨다. 분리는, 목적하는 항체가 컬럼의 고체상과, 예를 들면, Q 세파로즈™과 실질적으로 상호작용하지 않거나 결합하지 않지만 많은 불순물은 컬럼의 고체상과 상호작용하고 결합한다는 사실로 인하여 일어난다. 음이온교환은 약 12℃에서 수행할 수 있다.

[0129] 특정 양태로서, pH 조정된 배양액은 이후에 양이온 교환 컬럼을 사용하여 추가로 정제한다. 특정 양태로서, 양이온 교환 컬럼에 사용된 평형 완충액은 약 5.0의 pH를 갖는 완충액이다. 적합한 완충액의 예는 약 210 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)이다. 평형 후 컬럼에 상기 일차 회수 단계로부터 제조된 시료를 로딩한다. 컬럼은 GE Healthcare의 CM 세파로즈™ 고속 유동과 같은 양이온 교환 수지로 충전시킨다. 이어서, 컬럼을 평형 완충액으로 세척한다. 그런 후 평형 또는 세척 완충액과 비교하여 보다 강한 이온세기를 갖는 완충액을 사용하여 컬럼을 용출 단계에 적용시킨다. 예를 들면, 적합한 용출 완충액은 약 790 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)일 수 있다. 항체는 용출될 것이고 OD_{280nm}으로 설정한 UV 분광기로 모니터링할 수 있다. 특정 예로서, 용출 수집은 3 윌부분 OD_{280nm} 내지 8 윌부분 OD_{280nm}에서 이루어질 수 있다. 본 분야의 전문가들은 조건을 다양하게 변형시킬 수 있지만 이러한 변형은 본 발명의 범위에 포함된다는 것을 이해하여야 한다.

[0130] 특정 양태로서, pH 조정된 배양물, 양이온 교환 용출물 또는 음이온 교환 용출물은, 예를 들어, 16 인치 Cuno™ 디리피드 필터를 사용하여 여과한다. 디리피드 필터를 사용한 이와 같은 여과에 이어서, 예를 들면, 30 인치 0.45/0.2 μm Sartopore™ 이중층 필터 카트리지로 수행할 수 있다. 이온교환 용출 완충액을 사용하여 필터에 남아있는 잔여 용량을 플러시(flush)하고 한외여과/정용여과에 적용할 수 있다.

[0131] 한외여과/정용여과 단계를 달성하기 위해, 여과 매질을 적합한 완충액(예를 들어, 20 mM 인산나트륨, pH 7.0)에 준비한다. 염화나트륨과 같은 염을 첨가하여 이온세기(예를 들어, 100 mM 염화나트륨)를 증가시킬 수 있다. 이와 같은 한외여과/정용여과 단계는 항-IL-13 항체를 농축시키고, 아세트산나트륨을 제거하며, pH를 조정하는 역할을 한다. 이 단계를 실시하는데 사용가능한 시판 필터가 있다. 예로는 Millipore 제품인 30 kD 분획분자량(MWCO) 셀룰로즈 한외필터 막 카세트를 들 수 있다. 이 여과 과정은 실온에서나 실온가까이에서 실시할 수 있다.

[0132] 특정 양태로서, 상기 포획 여과 단계로부터 수집한 시료를 이차 이온교환 분리 단계에 적용한다. 이 이차 교환 분리는 특정 양태로서 일차 이온교환 분리의 상반된 전하를 기초로 한 분리를 포함한다. 예를 들면, 일차 회수 후 음이온 교환 단계가 사용된 경우, 이차 이온교환 크로마토그래피 단계는 양이온 교환 단계일 수 있다. 반대로, 만일 일차 회수 단계에 이어서 양이온 교환 단계를 실시한 경우, 이 단계 후 음이온 교환 단계를 수행한다. 특정 양태로서, 일차 이온교환 용출물은 이를 적절한 완충액 조건으로 조정된 경우 이를 이차 이온교환 크로마토그래피 단계에 직접 적용시킬 수 있다. 적합한 음이온 및 양이온 분리 물질 및 조건은 상기에 기재되어 있다.

[0133] 본 발명의 특정 양태로서, 항체를 함유한 시료는 소수성 상호작용 분리 단계를 사용하여 추가로 가공될 것이다. 이와 같은 단계에 적합한 컬럼의 비제한적 예는 충전제용적인 약 75 L인 직경 80 cm x 길이 15 cm인 컬럼이며, 이로써 한정하는 것은 아니지만 Amersham Biosciences(Upsala, Sweden)의 페닐 HP 세파로즈™와 같은 HIC를 위해 사용하기에 적절한 수지로 충전한다. 이전의 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 수득한, 목적하는 항체를 포함하는 유동-통과물을 등량의 약 1.7 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨(pH 7.0)으로 희석할 수 있다. 이어서, 이것을 0.45/0.2 μm Sartopore™ 2 이중층 필터 또는 이의 균등체를 사용하여 여과시킬 수 있다. 특정 양태로서, 소수성 크로마토그래피 과정은 2회 이상의 주기를 포함한다.

[0134] 특정 양태로서, HIC 컬럼은 우선 적합한 완충액으로 평형시킨다. 적합한 완충액의 비제한적 예는 0.85 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨, pH 7.0이다. 본 분야의 전문가들은 완충제의 농도를 변경하고/하거나 균등한 완충액

으로 치환시킴으로써 평형 완충액을 다양하게 변형시킬 수 있으며 이러한 변형은 본 발명의 범위에 포함된다. 특정 양태로서, 이후에 컬럼을 음이온 교환 용출 시료로 로딩하고 황산암모늄/인산나트륨과 같은 적절한 완충제로 수회(예를 들어, 3회) 세척한다. 적합한 완충제의 예는 1.1 M 황산나트륨, 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 약 7.0)을 포함한다. 임의로 컬럼은 추가의 세척 주기에 적용할 수 있다. 예를 들어, 이차 세척 주기는 적절한 완충제를 사용한 수회 컬럼 세척(예를 들어, 1 내지 7회)을 포함할 수 있다. 적합한 완충제의 비제한적 예는 0.85 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨, pH 7.0을 포함한다. 한 가지 관점에서, 로딩된 컬럼은 적절한 완충제를 사용하여 3차 세척에 적용한다. 컬럼은 1.1 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨(pH 약 7.0)과 같은 완충제를 사용하여 수회(예를 들어, 1 내지 3회) 세척할 수 있다. 마찬가지로, 본 분야의 전문가들은 완충 조건을 다양하게 변형시킬 수 있으며, 이러한 변형은 본 발명의 범위에 포함된다.

[0135] 컬럼은 적절한 용출 완충액을 사용하여 용출시킨다. 이와 같은 용출 완충액의 적합한 예는 0.5 M 황산암모늄, 15 mM 인산나트륨(pH 약 7.0)이다. 목적하는 항체는 통상적인 분광기를 사용하여 OD_{280nm} 3의 윗부분 내지 OD_{280nm} 3의 정점 아랫부분 사이를 검출하고 수집할 수 있다.

[0136] 본 발명의 특정한 관점에서, 소수성 크로마토그래피 단계의 용출물은 존재하는 경우 완전한 바이러스를 포함하여 바이러스 입자를 제거하기 위해 여과에 적용시킨다. 적합한 필터의 비제한적 예는 폴 코포레이션의 Ultipor DV50TM 필터이다. 이 여과 단계에서 다른 바이러스 필터를 사용할 수 있으며 본 분야의 전문가에게 잘 알려져 있다. HIC 용출물은 약 0.1 μ m의 사전습윤처리된 필터 및 2 x 30-인치 Ultipor DV50TM 필터 트레인(filter train)을 약 34 psig로 통과시킨다. 특정 양태로서, 여과 공정 후 필터는 필터 하우징에 걸러진 항체를 제거하기 위해, 예를 들어, HIC 용출 완충액을 사용하여 세척한다. 여액은 사전멸균처리된 용기에 약 12°C에서 저장할 수 있다.

[0137] 특정 양태로서, 위에서 수득한 여액을 다시 한외여과/정용여과에 적용시킨다. 이 단계는 실습자의 최종 목표가 예를 들어, 약제학적 제형에 항체를 사용하는 것이라면 중요하다. 사용하는 경우, 이 과정은 항체의 농축, 사전에 사용된 완충액의 제거 및 이를 특정 제형 완충액으로의 교체를 촉진할 수 있다. 특정 양태로서, 제형 완충액의 수회 용량(예를 들어, 2회 용량)으로의 연속 정용여과를 실시한다. 적합한 제형 완충액의 비제한적 예는 5 mM 메티오닌, 2% 만니톨, 0.5% 수크로즈, pH 5.9 완충액(Tween 없음)이다. 이와 같은 2회 용량 교환의 완성시 항체는 농축된다. 일단 항체의 예정된 농축이 도달되면, 실습자는 약 0.005%(v/v)의 최종 Tween 농도에 도달하기 위해 첨가해야 하는 10% Tween의 양을 결정할 수 있다.

[0138] 본 발명의 특정 양태는 추가의 정제 단계를 포함할 것이다. 이온 교환 크로마토그래피 방법 이전, 동안 또는 후에 실시될 수 있는 추가의 정제 방법의 예는 에탄올 침전, 등전점전기영동, 역상 HPLC, 실리카상의 크로마토그래피, 헤파린 α -세파로즈TM상의 크로마토그래피, 추가의 음이온 교환 크로마토그래피 및/또는 추가의 양이온 교환 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 겔전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 포획 시약으로서 단백질 G, 항체, 특이 기질, 리간드 또는 항원을 사용)을 포함한다.

[0139] 본 발명의 특정 양태로서, 항-IL-13 항체는 도 1에 나타난 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열을 포함하는 IgA₁, IgA₂, IgD, IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ 또는 IgM 동형 항체이다. 특정 양태로서, 항-IL-13 항체는 도 1에 나타난 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열을 포함하는 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 동형 항체이다.

[0140] 5. 시료 순도 검정 방법

[0141] 5.1 숙주 세포 단백질의 검정

[0142] 또한 본 발명은 분리된/정제된 항체 조성물에 남아 있는 숙주 세포 단백질(HCP)의 농도를 측정하는 방법을 제공한다. 상기된 바와 같이, HCP는 최종 표적 물질 산물(예를 들어, 항-IL-13 항체)로부터 제거되는 것이 바람직하다. 예시적인 HCP는 항체 생산원에서 기원하는 단백질을 포함한다. 표적 항체로부터 HCP를 동정하고 충분히 제거하지 못하는 것은 효능 감소 및/또는 부작용을 초래할 수 있다.

[0143] 본원에 사용된 용어 "HCP ELISA"는, 검정에서 사용된 이차 항체가 항체(예를 들어, 항-IL-13 항체)를 발생시키기 위해 사용된 세포(예를 들어, CHO 세포)로부터 생산된 HCP에 대해 특이적인, ELISA를 가리킨다. 이차 항체는 본 분야의 전문가에게 알려진 통상의 방법에 따라 생산할 수 있다. 예를 들면, 위장 생산 및 정제 가동에 의해 수득된 HCP를 사용하여 이차 항체를 생산할 수 있으며, 즉, 목적하는 항체를 생산하기 위해 사용된 것과

동일한 세포주를 사용하지만 이 세포주는 항체 DNA로 형질감염되지 않는다. 예시적인 양태로서, 선택한 세포 발현 시스템(즉, 표적 항체를 생산하기 위해 사용된 세포 발현 시스템)에서 발현된 것과 유사한 HCP를 사용하여 이차 항체를 생산한다.

[0144] 일반적으로, HCP ELISA는 항체의 두 층사이, 즉, 일차 항체와 이차 항체 사이에 HCP를 포함하는 액체 시료를 샌드위치하는 것을 포함한다. 시료를 배양하는 동안 시료중의 HCP는 일차 항체(이로써 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 친화성 정제된 염소 항-CHO(Cygnus))에 의해 포획된다. 항체를 생성하기 위해 사용된 세포로부터 생산된 HCP에 대해 특이적인 표지된 이차 항체 또는 항체 블렌드(예를 들어, 비오틴화 항-CHO HCP)이 첨가되고 시료중의 HCP와 결합한다. 특정 양태로서, 일차 및 이차 항체는 다클론 항체이다. 특정한 관점에서, 일차 및 이차 항체는 HCP에 대해 발생한 다클론 항체의 블렌드(이로써 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 비오틴화 염소 항 숙주 세포 단백질 혼합물 599/626/748)이다. 시료에 함유된 HCP의 양은 이차 항체의 표지를 기초로 한 적절한 시험을 사용하여 결정한다.

[0145] HCP ELISA가 상기된 방법을 사용하여 수득한 용출물 또는 유동-통과물과 같은 항체 조성물에서 HCP의 수준을 결정하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 HCP 효소 연결된 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정되었을 때 검출 가능한 수준의 HCP를 함유하지 않으면서 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0146] 5.2 친화성 크로마토그래피 물질의 검정

[0147] 특정 양태로서, 본 발명은 또한 분리된/정제된 항체 조성물중의 친화성 크로마토그래피 물질의 잔여 수준을 측정하는 방법을 제공한다. 이와 관련하여 그와 같은 물질은 정제 과정동안에 항체 조성물로 침출된다. 특정 양태로서, 분리된/정제된 항체 조성물중의 단백질 A의 농도를 측정하는 검정이 사용된다. 본원에 사용된 용어 "단백질 A ELISA"는 검정에 사용된 이차 항체가 목적하는 항체(예를 들어, 항-IL-13 항체)를 정제하기 위해 사용된 단백질 A에 특이적인 ELISA를 가리킨다. 이차 항체는 본 분야의 전문가에게 알려진 통상적인 방법에 따라 생산할 수 있다. 예를 들면, 항체 발생 및 생산을 위한 통상적인 방법과 관련하여 천연 또는 재조합 단백질 A를 사용하여 이차 항체를 생산할 수 있다.

[0148] 일반적으로 단백질 A ELISA는 두 층사이, 즉, 일차 항-단백질 A 항체와 이차 항-단백질 A 항체의 두 층사이 단백질 A를 포함하는(또는 가능한 단백질 A를 함유하는) 액체 시료를 샌드위치하는 것을 포함한다. 시료는 항-단백질 A 항체(이로써 한정하는 것은 아니지만 예를 들면, 다클론 항체 또는 다클론 항체의 블렌드)의 제1층에 노출되고 시료중의 단백질 A가 일차 항체에 의해 포획되기에 충분한 시간동안 항온배양한다. 이어서, 단백질 A에 대해 특이적인 표지된 이차 항체(이로써 한정하는 것은 아니지만 예를 들면, 다클론 항체 또는 다클론 항체의 블렌드)가 첨가되고 시료중의 포획된 단백질 A와 결합한다. 본 발명과 관련하여 유용한 항-단백질 A 항체의 추가적인 비제한적인 예는 닭 항-단백질 A 및 비오틴화 항-단백질 A 항체를 포함한다. 시료에 함유된 단백질 A의 양은 이차 항체의 표지를 기초로 한 적절한 시험을 사용하여 측정된다. 유사한 검정을 사용하여 대안적 친화성 크로마토그래피 물질의 농도를 측정할 수 있다.

[0149] 단백질 A ELISA는 상기된 방법을 사용하여 수득한 용출물 또는 유동-통과물과 같은 항체 조성물중의 단백질 A의 수준을 결정하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 단백질 A 연결된 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정되었을 때 검출가능한 수준의 단백질 A를 함유하지 않으면서 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0150] 6. 추가 변형

[0151] 본 발명의 항체는 변형될 수 있다. 일부 양태로서, 목적하는 효과를 제공하기 위해 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 화학적으로 변형시킨다. 예를 들면, 문헌(Focus on Growth Factors 3:4-10(1992); 유럽 특허 공보 제 EP 0 154 316호; 및 제EP 0 401,384호)에 기술되어 당해 분야에 공지된 임의의 폐질화 반응으로 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 폐질화를 수행할 수 있으며, 위 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다. 한 가지 관점에서, 폐질화는 반응성 폴리에틸렌 글리콜 분자(또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행한다. 본 발명의 항체 및 항체 단편의 폐질화를 위해 적합한 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 본원에 사용된 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화하는데 사용된 PEG의 모든 형태를 포함하는 것을 의미하며, 예로는 모노(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜을 들 수 있다.

[0152] 본 발명의 폐질화 항체 및 항체 단편을 제조하는 방법은 일반적으로(a) 항체 또는 항체 단편을 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, PEG의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체)과 항체 또는 항체 단편이 하나 이상의 PEG 그룹에 결합되도록 하는 적합한 조건하에서 반응시키고(b) 반응 생산물을 수득하는 단계를 포함한다. 본 분야의 전문가가 공지된 변수 및 목적하는 결과를 기준으로 최적의 반응 조건 또는 아실화 반응을 선택하는 것은 용이하

게 이를 수 있는 것이다.

- [0153] IL-13에 대해 특이적인 폐질화 항체 및 항체 단편은 일반적으로 본원에 기술된 항-IL-13 항체 및 항체 단편을 투여함으로써 본 발명의 IL-13-연관된 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 일반적으로 폐질화 항체 및 항체 단편은 비폐질화 항체 및 항체 단편에 비하여 반감기가 증가한다. 폐질화 항체 및 항체 단편은 단독으로, 함께 또는 다른 약제학적 조성물과 배합하여 사용될 수 있다.
- [0154] 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 유도체화되거나 다른 작용 분자(예를 들어, 다른 펩타이드 또는 단백질)에 결합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 면역접착 분자를 포함하여 본원에 기술된 사람 항체-hIL-13 항체의 유도체화된 형태 및 다르게 변형된 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 하나 이상의 다른 분자 존재, 예를 들면 다른 항체(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 이중항체), 검출제, 세포독성제, 약제 및/또는 다른 분자(예를 들어, 스트렙타비딘 중심 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와 항체 또는 항체 부분의 결합을 중재할 수 있는 단백질 또는 펩타이드에 작용적으로 연결될 수 있다.
- [0155] 유도체화 항체의 한 가지 유형은 두 가지 이상의 항체(동일한 유형 이거나 상이한 유형으로, 예를 들면, 이중특이적 항체를 형성)를 가교시킴으로써 생산한다. 적합한 가교제는 적절한 스페이서 에 의해 분리된 2개의 상이한 반응기를 갖는 이중이중작용성(예를 들어, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르) 또는 단독 이중작용성(예를 들어, 디석신이미딜 수베레이트)인 것을 포함한다. 이러한 링커는 Pierce Chemical Company(Rockford, IL)로부터 구입할 수 있다.
- [0156] 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 유도체화할 수 있는 유용한 검출제는 형광 화합물을 포함한다. 형광 검출제의 예는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설폰일 클로라이드, 피코에리쓰린 등을 포함한다. 또한, 항체는 검출효소로 유도체화될 수 있으며, 예로는 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코즈 옥시다제 등을 포함한다. 항체가 검출효소로 유도체화되는 경우, 항체는 추가의 시약을 첨가하여 검출되는데 이때 효소는 시약과 함께 검출가능한 반응 생성물을 생산한다. 예를 들면, 검출제로서 서양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘을 첨가하면 검출가능한 착색 반응 생성물이 생긴다. 또한, 항체는 비오틴으로 유도체화될 수 있으며 이 경우 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적인 측정을 통해 검출한다.
- [0157] 7. 약제학적 조성물
- [0158] 본 발명의 항체 및 항체 부분은 대상자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물내로 혼입시킬 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 및 항체 부분 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 혼화가능한 임의 및 모든 용매, 분산매질, 피복제, 항균제, 향진균제, 등장화제, 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 물, 염수, 인산염 완충 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등중 하나 이상 뿐만 아니라 이들의 배합물을 포함한다. 많은 경우에 있어서, 조성물에 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올(예를 들어, 만니톨), 솔비톨 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 추가로 소량의 보조물질, 예를 들어, 습윤제, 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 포함할 수 있으며, 이는 항체 또는 항체 부분의 저장수명 또는 효능을 증진시켜 준다.
- [0159] 본 발명의 항체 및 항체 부분은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물내로 혼입될 수 있다. 항체 또는 항체 부분은, 예를 들어, 0.1 내지 250 mg/mL 항체를 함유하는 주사용액으로서 제조할 수 있다. 주사용액은 플린트 또는 앰버 바이알, 앰플 또는 사전충전형 주사기중에 액체 또는 동결건조 용량형으로 구성될 수 있다. 완충제는 pH 5.0 내지 7.0(최적 pH 6.0)의 L-히스티딘 약 1 내지 50 mM(최적으로는 5 내지 10 mM)일 수 있다. 다른 적합한 완충제는 이로써 한정하는 것은 아니지만 나트륨 석시네이트, 나트륨 시트레이트, 인산나트륨 또는 인산 칼륨을 포함한다. 염화나트륨은 용액의 독성을 변화시키는데 0 내지 300 mM(액체 용량형에서 최적으로는 150 mM)의 농도로 사용할 수 있다. 동해방지제가 동결건조 용량형에 포함될 수 있으며, 주로 0 내지 10%(최적으로는 0.5 내지 1.0%) 수크로스가 사용된다. 다른 적합한 동해방지제로는 트레할로즈 및 락토스가 포함된다. 증량제가 동결건조 용량형에 포함될 수 있으며, 주로 1 내지 10% 만니톨(최적으로는 24%)이 사용된다. 안정화제가 액체 및 동결건조 용량형에 사용될 수 있으며 주로 1 내지 50 mM L-메티오닌(최적으로 5 내지 10 mM)이다. 다른 적합한 증량제는 글리신 및 아르기닌을 포함하며 0 내지 0.05% 폴리솔베이트-80(최적으로는 0.005 내지 0.01%)으로서 포함될 수 있다. 추가의 계면활성제는 이로써 한정하는 것은 아니지만 폴리솔베이트 20 및 BRIJ 계면활성제를 포함한다.

- [0160] 한 가지 관점에서, 약제학적 조성물은 항체를 약 0.01 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량으로 포함한다. 다른 관점에서, 항체의 용량은 약 1 mg/kg이 격주로 투여되거나 약 0.3 mg/kg이 매주 투여되는 것이 포함된다. 전문의는 대상자에게 적합한 투여 용량 및 용법을 정확히 파악할 수 있다.
- [0161] 본 발명의 조성물은 다양하게 제형될 수 있다. 이들 제형에는, 예를 들어, 액체, 반고체 및 고체 용량형, 예를 들어, 액체 용액(예를 들어, 주사액 및 주입액), 분산제 또는 현탁제, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌제가 포함된다. 형태는, 예를 들어, 투여 방식 및 치료요법 적용의 의도된 방식에 의해 좌우된다. 전형적인 조성물은 다른 항체로 사람을 수동 면역화하는데 사용하는 것과 유사한 조성물과 같은 주사액 또는 주입액의 형태이다. 한 가지 투여 방식은 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 한 가지 관점에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 관점에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.
- [0162] 치료용 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건에서 무균이고 안정해야 한다. 조성물은 고도의 약물 농도에 적합한 용액, 마이크로에멀전, 분산제, 리포솜 또는 기타 정확한 구조로 제형될 수 있다. 멸균주사액은 필요량의 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 부분)을 적당한 용매중에, 필요한 경우 상기된 성분중 한 가지 또는 둘 이상의 조합과 함께 혼합시킨 후 여과 멸균시킴으로써 제조할 수 있다. 일반적으로 분산제는 기본 분산매질 및 상기된 것중에서 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클내에 활성 화합물을 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균주사액의 제조를 위한 멸균 동결건조분말의 경우 제조 방법은 진공건조 및 분무건조가 있으며, 이러한 방식에 의해 사전에 여과 멸균된 용액으로부터 활성성분과 기타 추가적인 필요 성분의 분말이 생성된다. 용액의 적당한 유통성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 피복제의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사용 조성물의 지속적인 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성할 수 있다.
- [0163] 본 발명의 항체 및 항체 부분은 본 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있으며, 한 가지 투여 경로/방식은 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이다. 당업자에 의해 인지되고 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 다양할 수 있다. 특정 양태로서, 활성 화합물은 급속한 방출에 대해 화합물을 보호할 수 있는 담체와 함께, 예를 들어, 서방성 제형(이식, 경피 패치 및 마이크로캡슐화 전달시스템을 포함)으로 제조할 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생체분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이와 같은 제형의 많은 제조 방법이 특허로 등록되어 있거나 본 분야의 전문가에게 일반적으로 알려져 있다(예를 들어, 참조: Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, 이 문헌의 전문은 본원에 참고로 인용된다).
- [0164] 특정한 관점에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은, 예를 들어, 불활성 회석제 또는 자화성 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 또한, 화합물(및 필요한 경우 다른 성분)은 연질 또는 경질 피 젤라틴 캡슐에 봉입되거나, 정제로 타정되거나, 직접 환자의 음식에 혼합될 수 있다. 경구 치료용 투여의 경우 화합물은 부형제와 혼합하여 삼키는정제, 구강정, 구중정, 캡슐, 엘릭서제, 현탁제, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 비경구외의 다른 방식에 의해 투여하는 경우, 화합물의 불활성화를 차단하는 물질로 화합물을 코팅하거나 동시에 투여하는 것이 필요할 수 있다.
- [0165] 또한, 보조적인 활성 화합물이 조성물에 함유될 수 있다. 특정한 관점에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 IL-13 활성의 유해 작용에 의한 장애를 치료하는데 유용한 한 가지 이상의 추가적인 치료제와 함께 제형되고/되거나 병용투여된다. 예를 들어, 본 발명의 항-hIL-13 항체 또는 항체 부분은 다른 표적과 결합하는 한 가지 이상의 추가 항체(예를 들어, 다른 사이토카인과 결합하거나 세포 표면 분자와 결합하는 항체)와 함께 제형되고/되거나 병용투여된다. 게다가, 본 발명의 한 가지 이상의 항체는 상기 치료제중 두 가지 이상과 병용할 수 있다. 이러한 병용 치료요법은 투여되는 치료제의 용량을 유익하게 낮춰 사용할 수 있고, 이에 따라 여러 가지 단독치료요법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다는 장점이 있다. 전문의는 본 발명의 항체가 병용치료요법의 일부로서 사용될 때 항체를 단독으로 환자에게 투여하는 경우보다 낮은 용량의 항체가 바람직할 수 있다(예를 들어, 병용치료요법을 사용함으로써 상승치료효과를 달성할 수 있고, 차례로 항체 용량을 낮춰 사용하게 되어 목적하는 치료효과를 달성할 수 있다)는 것을 인지할 것이다.
- [0166] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 단독으로 사용되거나 추가적인 제제(예를 들어, 치료제)와 병용될 수 있고, 상기 추가 제제는 의도하는 목적에 따라 전문가에 의해 선택될 수 있음은 이해되어야 한다. 예를 들어, 추가 제제는 본 발명의 항체에 의해 치료되는 질환 또는 병태를 치료하는데 유용한 것으로 본 분야에서 인정되고 있는 치료제일 수 있다. 또한, 추가 제제는 치료용 조성물에 유익한 속성을 제공하는 제제, 예를 들어,

조성물의 점도에 영향을 미치는 제제일 수 있다.

[0167] 추가로, 본 발명의 범위에 포함되는 병용은 의도된 목적에 유용한 병용임을 이해하여야 한다. 아래 기술된 제제는 구체적으로 설명하기 위한 것으로 한정하려는 의도가 있는 것이 아니다. 본 발명의 일부인 병용은 본 발명의 항체와 아래에 수록된 것중에서 선택된 한 가지 이상의 추가 제제일 수 있다. 또한, 병용은 병용에 의해 형성된 조성물이 의도한 기능을 수행할 수 있다면 한 가지 이상의 추가 제제, 예를 들어, 두 가지 또는 세 가지의 추가 제제를 포함할 수 있다.

[0168] 일부 병용은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 비스테로이드성 소염 약물(또한 NSAIDS라고 한다)이다. 다른 병용은 프레드니솔론을 포함한 코르티코스테로이드이다. 스테로이드 사용의 잘 알려진 부작용은 본 발명의 항체와 병용하여 환자를 치료할 때 필요한 스테로이드 용량을 점진적으로 감량함으로써 줄일 수 있거나 심지어 제거할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 부분과 병용될 수 있는 류마티스성 관절염 치료제의 비제한적 예는 사이토카인 억제성 소염 약물(들)(CSAID); 다른 사람 사이토카인 또는 성장인자(예를 들어, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF 및 PDGF)의 항체 또는 길항제를 포함한다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 세포 표면 분자(예를 들어, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD90 또는 CD154를 포함한 이들의 리간드(gp39 또는 CD40L))에 대한 항체와 조합될 수 있다.

[0169] 치료제의 일부 병용은 자가 면역 및 후속적인 염증 일련과정의 상이한 지점에서 간섭할 수 있다. 예로는 키메라, 인간화 또는 사람 TNF 항체와 같은 TNF 길항제, D2E7(1996년 2월 9일에 출원된 미국 특허 출원 공보 제 08/599,226호, 이의 전문은 본원에 참고로 인용된다), cA2(RemicadeTM), CDP 571, 항-TNF 항체 단편(예를 들어, CDP870) 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 또는 이의 유도체(p75TNFR1gG(EnbrelTM) 또는 p55TNFR1gG(Lenercept)), 가용성 IL-13 수용체(sIL-13) 및 TNF α 전환효소(TACE) 억제제도 포함된다. 유사하게 IL-1 억제제(예를 들어, Vx740 또는 IL-1RA 등과 같은 인터루킨-1-전환 효소 억제제)가 동일한 이유로 효과적일 수 있다. 다른 병용으로는 인터루킨 11, 항-P7 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드(PSGL)이 포함된다. 또한 다른 병용은 IL-13 기능과 병행하여, 의존하여 또는 협력하여 작용할 수 있는 자가면역 반응의 다른 핵심 작용제를 포함한다. 또 다른 병용은 비소모성 항-CD4 억제제를 포함한다. 또 다른 병용은 항체, 가용성 수용체 또는 길항성 리간드를 포함한 공동자극 경로 CD80(B7.1) 또는 CD86(B7.2)의 길항제를 포함한다.

[0170] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 메토크세이트, 6-MP, 아자티오프린, 설파살라진, 메살라진, 올살라진 클로로퀸/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 아우로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 코키신, 코르티코스테로이드(경구, 흡인 및 국소 주사), β-2 아드레날린수용체 작용제(살부타몰, 테르부탈린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로피움 및 옥시트로피움, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID(예를 들어, 이부프로펜), 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론), 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린작용제, 프로-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인에 의한 신호전달의 차단제(예를 들어, TNF α 또는 IL-1(예를 들어, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1β 전환효소 억제제(예를 들어, Vx740), 항-P7, p-셀렉틴 당단백질 리간드(PSGL), TNF α 전환효소(TACE) 억제제, T-세포 신호전달 억제제(예를 들어, 키나제 억제제), 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 안지오텐신 전환효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체(예를 들어, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFR1gG(EnbrelTM) 및 p55TNFR1gG(Lenercept)), sIL-1 RI, sIL-1 RII, sIL-6R, 가용성 IL-13 수용체(sIL-13) 및 소염성 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGFβ)과 같은 제제와 병용될 수 있다. 일부 병용은 메토크세이트 또는 레플루노마이드 및 중등도나 중증도 류마티스성 관절염의 경우, 사이클로스포린을 포함한다.

[0171] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"으로 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"은 목적하는 치료 결과를 달성하는데 필요한 용량에서 및 기간 동안의 효과적인 양을 가리킨다. 항체 또는 항체 부분의 치료학적 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 및 항체 또는 항체 부분이 환자에게 목적하는 반응을 유발하는 능력에 따라 다양할 수 있다. 또한 치료학적 유효량은 항체 또는 항체 부분의 어떠한 독성 또는 유해 효과도 치료학적으로 유익한 효과를 초과하지 않는 양이다. "예방학적 유효량"은 목적하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 용량에서 및 기간 동안의 효과적인 양을 가리킨다. 전형적으로, 예방 용량은 질환의 발생전 또는 초기 상태에서 대상자에게 사용되기 때문에 예방학적 유효

량은 치료학적 유효량보다 적을 것이다.

[0172] 용량용법은 최적의 목적 반응(예를 들어, 치료 또는 예방 반응)을 제공하도록 조절할 수 있다. 예를 들어, 전량 투여하거나, 경과 시간에 맞춰 수회 분할 용량으로 투여하거나, 치료요법 상황의 위급성에 비례하여 용량을 줄이거나 늘려 투여할 수 있다. 특정 양태로서, 간편한 투여 및 용량의 균등성을 위해 비경구 조성물을 단위용량형으로 제형하는 것이 특히 유리할 수 있다. 본원에 사용된 단위용량형은 치료받을 포유동물 대상자에게 단위 용량으로서 맞춰진 물리적으로 구분된 단위를 가리킨다. 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 배합하여 목적하는 치료요법 효과를 생산하는 것으로 계산된 활성 화합물의 예정량을 포함한다. 본 발명의 단위용량형에 대한 명세는(a) 활성 화합물의 고유 특징 및 달성하고자 하는 특정한 치료요법 또는 예방 효과 및(b) 개체의 민감한 치료에 있어서 활성 화합물의 조제 분야에서의 고유 한계에 의해 및 직접적으로 이들에 의존하여 서술된다.

[0173] 본 발명에 따른 항체 또는 항체 부분의 치료학적 또는 예방학적 유효량의 예시적이고 비제한적인 범위는 0.01 내지 20 mg/kg 또는 1 내지 10 mg/kg 또는 0.3 내지 1 mg/kg이다. 용량 값은 완화시키고자 하는 병태의 유형 및 증증도에 따라 다양할 수 있음은 주지되어야 한다. 추가로, 임의 특정 대상자의 경우 특정 용량용법은 대상자의 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 전문가의 판단에 따라 경과 시간과 함께 조절되어야 한다는 것과 본원에 기술된 용량 범위는 단지 예시적인 것에 불과하고 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하려는 의도가 없다는 것은 이해되어야 한다.

[0174] 8. 본 발명의 항체의 용도

[0175] 8.1 항-IL-13 항체의 일반적인 용도

[0176] 본 발명의 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 IL-13과 결합하는 능력하에서 통상적인 면역검정(예를 들어, 효소 연결된 면역흡착 검정(ELISA), 방사선면역검정(RIA) 또는 면역조직화학)을 사용하여(예를 들어, 시료 매트릭스중의, 한 가지 관점에서는 혈청 또는 혈장과 같은 생물학적 시료중의) IL-13(한 가지 관점에서, hIL-13)을 검출하는데 사용할 수 있다. 본 발명은 생물학적 시료를 본 발명의 항체 또는 항체 부분과 접촉시키고 IL-13과 결합된 항체 또는 비결합된 항체를 검출함으로써 시료중의 IL-13을 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 시료중의 IL-13을 검출하는 방법을 제공한다. 항체는 검출성 물질로 직접 또는 간접 표지시켜 결합된 또는 비결합된 항체의 검출을 촉진한다. 적합한 검출성 물질은 여러 가지 효소, 보결기, 형광물질, 발광물질 및 방사선물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알카리성 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함한다. 적합한 보결기 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함한다. 적합한 형광물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 피코에리쓰린을 포함한다. 발광물질의 예는 루미놀을 포함한다. 적합한 방사선물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 또는 ^3H 를 포함한다. 시료중의 IL-13의 검출은 진단 측면에서, 예를 들어, 증가된 IL-13과 연관된 병태의 진단에 유용할 수 있고/있거나 항-IL-13 항체로의 치료로부터 호전될 수 있는 대상자를 동정하는데 유용할 수 있다.

[0177] 표지된 항-IL-13 항체에 대한 검출 방법의 대안으로서, 예를 들어, 검출 물질로 표지된 rhIL-13 표준물과 비표지된 항-IL-13 항체(예를 들어, 항-hIL-13 항체)를 사용한 경쟁 면역검정의 사용에 의해 시료에서 IL-13을 검출할 수 있다. 이 검정에서는 시료, 표지된 rhIL-13 표준물 및 항-hIL-13 항체를 혼합하고 비표지된 항체에 결합된 표지된 rhIL-13 표준물의 양을 결정한다. 시료중의 hIL-13의 양은 항-hIL-13 항체에 결합된 표지된 rhIL-13 표준물의 양과 반비례한다.

[0178] 본 발명의 항체 및 항체 부분은 IL-13 활성(한 가지 관점에서 hIL-13 활성)을 생체내 및 시험관내에서 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 부분은, 예를 들어, IL-13을 함유하는 세포 배양물에서, 사람 대상자에게서 또는 본 발명의 항체가 교차반응하는 IL-13을 갖는 다른 포유동물 대상자(예를 들어, 개코원숭이, 게 먹이원숭이 및 벵골원숭이와 같은 영장류)에게서 IL-13 활성을 억제하는데 사용할 수 있다. 한 가지 관점에서, 본 발명은 사람 IL-13 및 적어도 한 가지의 추가적인 영장류 IL-13(개코원숭이 IL-13, 마모셋원숭이 IL-13, 침팬치 IL-13, 게먹이원숭이 IL-13 및 벵골원숭이 IL-13으로 이루어진 그룹중에서 선택됨)의 활성을 중화시키지만 마우스 IL-13의 활성을 중화시키지 않는 분리된 사람 항체 또는 이의 항원-결합 부분을 제공한다. 한 가지 관점에서, IL-13은 사람 IL-13이다. 예를 들어, hIL-13을 함유하는 또는 함유하는 것으로 추정되는 세포 배양 배지에 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 첨가하여 배양물중의 hIL-13 활성을 억제시킬 수 있다.

[0179] 다른 관점에서, 본 발명은 IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 장애를 앓고 있는 대상자에게서 IL-13 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 장애"는 이

장애를 앓고 있는 대상자에게 IL-13의 존재가 이 장애의 병리학 또는 이 장애의 악화에 기여하는 요인에 책임이 있는 것으로 나타난 또는 추정되는 질환 및 다른 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 장애는 IL-13 활성의 억제가 그 장애의 증세 및/또는 발전을 호전시키는 것으로 기대되는 장애이다. 이러한 장애는 이 장애를 앓고 있는 대상자의 생물학적 유액중에 IL-13의 농도 증가(예를 들어, 대상자의 혈청, 혈장, 활액중에 IL-13의 농도 증가)에 의해 입증될 수 있으며, 그러한 증가는, 예를 들어, 상기된 바와 같이 항-IL-13 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 한 가지 관점에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 본원에 기술된 질환 또는 장애를 치료하는 치료요법에 사용할 수 있다. 다른 관점에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 본원에 기술된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약물의 제조에 사용할 수 있다. IL-13 활성이 유해하게 작용하여 발생하는 장애는 많은 예가 있다. 예를 들어, IL-13은 이로써 한정하는 것은 아니지만 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환과 같은 호흡기 장애를 포함하여 면역 및 염증 요소와 연관이 있는 다양한 질환과 연관된 병리에 중요한 역할을 한다. 추가적인 IL-13 연관된 장애는 이로써 한정되는 것은 아니지만 아토피성 장애(예를 들어, 아토피성 피부염 및 알레르기성 비염); 피부, 위장기관 및 간의 염증 및/또는 자가면역 병태(예를 들어, 궤양성 대장염 및/또는 크론병과 같은 염증성 장질환(IBD), 및 간(간경변, 간경화); 경피증; 종양 또는 암(예를 들어, 호지킨 림프종)을 포함한다.

[0180] 따라서, 항-IL-13 항체 또는 이의 항원-결합 부분 또는 생체내에서 이를 발현하는 벡터는 IL-13의 이상 발현으로 과다한 IL-13이 발생하여 초래되는 천식 또는 기타 염증성 및/또는 자가면역 병태와 같은 질환 또는 외래로부터 투여된 IL-13으로 인한 합병증의 치료에 바람직하다.

[0181] 8.2 호흡기 장애에 항-IL-13 항체의 사용

[0182] 본 발명의 특정 양태로서, 항-IL-13 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 이로써 한정하는 것은 아니지만 호흡기 장애(예를 들어, 천식(예를 들어, 알레르기성 및 비알레르기성 천식(예를 들어, 아동이 호흡기세포융합바이러스(RSV)로 감염되어 앓게된 천식))), 만성 폐쇄성 폐질환(COPD) 및 기도 염증, 호산구증가증, 섬유증 및 점액과다생성과 연관된 다른 병태(예를 들어, 낭포성섬유증 및 폐섬유증)를 포함하여 한 가지 이상의 IL-13-연관된 장애의 치료에 사용된다.

[0183] 특정 양태로서, 본 발명은 호흡기 장애, 예를 들어, 천식(예를 들어, 알레르기성 및 비알레르기성 천식), 알레르기, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD) 및 기도 염증, 호산구증가증, 섬유증 및 점액과다생성과 연관된 다른 병태(예를 들어, 낭포성섬유증 및 폐섬유증)와 연관된 한 가지 이상의 증세를 치료(예를 들어, 경감, 완화) 또는 예방하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 천식 증세는 이로써 한정하는 것은 아니지만 천명, 숨가쁨, 기관지수축, 기도과민증, 폐활량감소, 섬유증, 기도염증 및 점액생산을 포함한다. 본 발명의 방법은 대상자에게 IL-13 항체 또는 이의 단편을 한 가지 이상의 증세를 치료(예를 들어, 경감, 완화)하는데 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. IL-13 항체는 치료학적으로 또는 예방학적으로 또는 둘 다로 투여될 수 있다. IL-13 길항제, 예를 들어, 항-IL-13 항체 또는 이의 단편은 대상자에게 단독으로 또는 본원에 기술된 다른 치료 방식과 병용하여 투여될 수 있다. 특정 양태로서, 대상자는 본원에 기술된 바와 같은 IL-13 연관된 질환을 앓고 있는 포유동물(예를 들어, 사람)이다.

[0184] 앞서 주지한 바와 같이, IL-13은 천식과 연관된 병리학적인 반응을 일으키는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 연루되어 있다. 그러나, 구별되는 면역학적 경로들의 다른 매개인들이 또한 천식 발병과정에 연루되어 있고, IL-13이외에 이들 매개인자들을 차단하는 것은 추가적인 치료 유용성을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 결합 단백질은 이중특이적 항체내로 혼입될 수 있으며, 이중특이적 항체내에서 이로써 한정하는 것은 아니지만 IL-13 및 프로-염증성 사이토카인(예를 들어, 종양 괴사 인자- α (TNF- α))을 포함한 표적쌍과 결합할 수 있다. TNF- α 는 천식에서 염증반응을 증폭시킬 수 있으며 질환의 중증도와 연관이 있을 수 있다(McDonnell et al., Progress in Respiratory Research(2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250). 이것은 IL-13과 TNF- α 둘 다를 차단하는 것이 특히 기도 질환에 유익한 효과를 나타낼 수 있음을 제안한다. 비제한적 양태로서, 본 발명의 이중특이적 항체는 IL-13과 TNF- α 둘 다와 결합하며 천식의 치료에 사용된다.

[0185] 다른 양태로서, 본 발명의 결합 단백질은 IL-13과 IL-1베타, IL-13과 IL-9, IL-13과 IL-4, IL-13과 IL-5, IL-13과 IL-25, IL-13과 TARC, IL-13과 MDC, IL-13과 MIF, IL-13과 TNF- β , IL-13과 LHR 작용제, IL-13과 CL25, IL-13과 SPRR2a, IL-13과 SPRR2b 및 IL-13과 ADAM8과 결합하는 이중특이적 항체 분자를 발생시키는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 CSF1(MCSF), CSF2(GM-CSF), CSF3(GCSF), FGF2, IFN α 1, IFN β 1; IFN γ , 히스타민 및 히스타민 수용체, EL1A, DL1B, BL2, IL3, EL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, EL11, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, EL19, IL-20, IL-21, IL-22, EL-23, EL-24, EL-25, IL-26, IL-27, EL-28, IL-30,

EL-31, EL-32, IL-33, KtTLG, PDGFB, IL2RA, EL4R, IL5RA, IL8RA, DL8RB, IL12RB1, IL12RB2, EL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCERIA, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTB4R 및 키티나제로 이루어진 그룹중에서 선택된 천식 관련 표적 한 가지 이상과 함께 IL-13과 결합할 수 있는 이중특이적 항체를 제공한다.

[0186] 실시예

[0187] 1. 항-IL-13 항체의 생산

[0188] 약물 물질의 생산 한 회분은 생산반응기의 일회 주기로부터 유래된 약물 물질의 시드 트레인, 생산, 일차회수 및 포획 및 정밀정제로부터 수득한 ABT-308 단클론 항체의 용액이다.

[0189] 1.1 배지 제조

[0190] USP/EP/JP 기준을 충족하는 정제수로 GMP Solution Records에 따라 용액을 제조한다. 조제된 배지 용액은 적당한 크기의 사전멸균된 용기, 냉 또는 생물반응기내로 0.1 μ m 초과한다. 사용 후 0.1 μ m 필터는 완전성 시험을 한다. 증식 및 생산 배지의 조성은 표 2에 기재되어 있다.

표 2

세포 배양 배지 조성

원료	증식배지 SR-512	증식배지 SR-520	생산배지 SR-521
PFCHO (A)-SI	-	+	+
글루타민을 함유하고 NaHCO ₃ 는 함유하지 않는 PFCHO 파트A (변형됨)	+	-	-
PFCHO 파트B (구연산철 원액)	+	+	+
재조합 사람 인슐린	+	+	+
덱스트로즈 (무수)	-	+	+
L-글루타민	+	+	+
L-아스파라긴 일수화물	-	+	-
중탄산나트륨	+	+	+
HEPES, 유리산	-	+	+
NaCl	-	+	+
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF)	-	+	+
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	-	+	+
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	-	+	+
박토 TC 이스틀레이트	+	+	+
파이톤 펩톤	-	+	+
메토틱세이트	+	+	+
2N NaOH	-	+	+
2N HCl	-	+	+

[0191] 1.2 접종물 증량

[0192] MCB의 동결 바이알 1개에 있는 CHO 세포를 스피너 플라스크와 바이오웨이브 백에서 배양 증식시켜 110 L의 식종용 생물반응기에 접종하는데 필요한 생물량을 수득한다. 마스터 셀 뱅크의 동결 바이알을 해동시키고 증식배지 (SR-512)에 투입한 후 원심분리한다. 세포를 증식배지에 재현탁시키고 일회용 스피너 플라스크 또는 바이오웨이브 백에서 용적을 늘려가면서 37℃ 및 5% CO₂의 조건으로 배양 증식시킨다. 식종용 생물반응기에 접종하기 전에 이중 20L 웨이브 백을 사용하여 최종 세포량을 최대로 증식시킨다. 약 15 내지 17일 경과하여 두 개의 20L 웨이브 백에서 세포 밀도가 $\geq 2.0 \times 10^6$ 생존세포/mL에 도달하였을 때 배양물을 추가로 증식시키기 위해 증식배지 SR-520이 충전된 110L 식종용 생물반응기로 옮긴다. 접종 후, 표적 온도는 37℃이고 pH는 7.1의 표적으로 설정하여 NaOH 첨가와 CO₂를 살포하여 조절한다. 생물반응기안의 용존산소(DO)는 공기와 산소를 살포하여 40%의 표적값으로 조절한다. 약 2-4일 경과하여 세포 밀도가 $\geq 2.6 \times 10^6$ 생존세포/mL에 도달하였을 때 배양물

을 3000L 생산용 생물반응기로 옮긴다.

1.3 불충분-충전 생물반응기

3000L 생산용 생물반응기의 불충분 충전을 사용하여 세포 배양물을 추가로 증식시킨다. 처음에, 반응기를 증식 배지(SR-520)으로 충전하고 110L 식중용 생물반응기의 한회분을 접종한다.

이와 같은 불충분-충전 단계동안에, 온도, 용존산소 및 pH는 37℃, 40% 및 7.1로 각각 조절한다. 배양물 pH는 CO₂ 살포 및 NaOH 첨가로 조절한다. 전형적으로, 세포는 2 내지 4일간 성장시켰을 때 $\geq 1.6 \times 10^6$ 생존세포/mL 의 필요한 밀도에 도달한다.

1.4 생산용 생물반응기

3000L 생물반응기중의 세포 배양물에 생산용 배지 SR-521(1950 L)를 첨가하여 생산 단계를 개시한다. 발포제 C 를 첨가하여 거품을 줄인다. CO₂ 분무와 NaOH 첨가를 가동-정지하면서 배양물의 pH를 6.9의 표적값으로 조절한다. 온도 및 용존산소는 각각 35℃ 및 40%의 표적값으로 조절한다. 생물반응기의 DO는 공기 살포에 의해 목적 하는 값으로 조절하고, 필요한 경우 순수 산소를 보충한다. 생존세포 밀도가 $\geq 3.0 \times 10^6$ 세포/mL에 도달했을 때 온도를 33℃의 표적값으로 강하시키고 pH 및 DO를 각각 6.9 및 40%의 표적값으로 유지한다. 글루코즈(SR-334)를 필요에 따라 첨가한다. 세포 생존율이 $\leq 50\%$ 로 떨어질때 배양물을 수집한다.

1.5 공정 성능

공정 성능 및 공정중 시험 결과는 각각 표 3 및 4에 기술되어 있다.

표 3

ABT-308 제조동안의 세포배양물 공정 성능

식중 트레인	조치 기준	회분 번호		
		55173BI	55176BI	57199BI
식중용 생물반응기로 옮길때의 생존율 (%)	≥ 80	96	98	96
식중용 생물반응기로 옮길때의 생존세포 밀도 ($\times 10^6$ /mL)	≥ 2.0	2.2	2.8	3.0
식중용 및 생성용 생물반응기		55448BI	57128BI	58067BI
불충분충전 단계로 옮길때의 생존세포 포 밀도 ($\times 10^6$ /mL)	≥ 2.6	3.0	3.1	3.8
불충분충전 단계의 종점시 생존세포 밀도 ($\times 10^6$ /mL)	≥ 1.6	1.7	2.1	2.1
온도조정시 생존세포 밀도 ($\times 10^6$ /mL)	≥ 3.0	3.5	3.2	3.2
수집시 생존율(%)	≤ 50	45	25	40
수집된 ABT-308 역가 (g/L)	값을 기록한다	1.10	1.08	1.08

표 4

공정중 세포배양물 시험 결과

시험 항목	조치 기준	회분 번호		
		55173BI	55176BI	57199BI
오염 점검	무성장	합격	합격	합격
식중용 생물반응기		55448BI	57128BI	58067BI
오염 점검	무성장	합격	합격	합격
생성용 생물반응기		55448BI	57128BI	58067BI
내독소 (EV/mL)	≤ 5	< 1	< 1	< 1
TEM (바이러스-유사 입자/mL)	$\leq 10^8$	합격	합격	합격
마이코플라스마	음성	합격	합격	합격
외래성 바이러스	바이러스 오염의 증거 없음	합격	합격	합격
MVM에 대한 Q-PCR	음성	합격	합격	합격
오염 점검	무성장	합격	합격	합격

[0202]

[0203]

2. 항-IL-13 항체의 분리 및 정제

[0204]

일차 회수 및 포획 과정은 여과에 의한 수집물의 정화, 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의한 항체의 포획, 낮은 pH 바이러스 불활성화 및 침출여과를 포함한다. 정밀 정제 과정은 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 바이러스 여과, 한외여과/정용여과 및 최종 여과, 병충전 및 동결을 포함한다.

[0205]

2.1 용액 제조

[0206]

USP 정제수(USP-PW) 또는 주사용수(WFI)로 GMP Solution Records에 따라 용액을 제조한다. 대부분의 용액은 방사선조사된 백, 가압멸균 또는 증기처리된 용기내로 0.2 μ m 여과한다.

[0207]

2.2 일차 회수 및 정화

[0208]

여과에 의한 일차 회수의 목적은 생산용 생물반응기 수집물로부터 세포 및 세포 파편을 제거하는 것이다. 비처리 수집물을 침출 여과 방식 필터, 디리피드 침출 여과 방식 필터 및 막 필터로 구성된 필터 트레인에 통과시킨다. 수집 탱크에 정화된 상청액을 수거하고 2-8 $^{\circ}$ C로 보존한다. 정화된 수집물에 대한 공정중 조절은 Poros A 크로마토그래피에 의한 ABT-308 농도, 바이오버든 및 내독소시험을 포함한다.

[0209]

2.3 단백질 A 친화성 크로마토그래피

[0210]

단백질 A 친화성 크로마토그래피의 목적은 정화된 수집물로부터 ABT-308을 포획하고 공정-연관된 불순물을 줄이는데 있다. 전형적으로 3회의 크로마토그래피 주기를 수행하여 전체 수집물을 처리한다. 3회 주기로부터 획득한 생산물 풀을 합쳐 후속 공정에 적용한다.

[0211]

직경 45 cm x 길이 22 cm의 컬럼(35 L)을 MabSelect[®] 단백질 A 수지(GE Healthcare) 또는 ProSep Ultra Plus[™](Millipore)로 충전하고 사용요건을 점검한다. 컬럼을 USP 정제수(USP-PW)에 이어서 0.2 M 아세트산으로 처리한 후 마지막으로 USP PW로 세정하여 저장 완충액을 제거한다. 컬럼을 25 mM Tris, 100 mM NaCl(pH 7.2)로 평형시키고 MabSelect[®] 단백질 A 수지(GE Healthcare)의 경우 최대 32 g 단백질/L 수지 또는 ProSep Ultra Plus[™] 수지(Millipore)의 경우 최대 45 g 단백질/L 수지에 정화된 수집물을 로딩한다. 컬럼을 25 mM Tris, 100 mM NaCl(pH 7.2)로 세척한 다음 20 mM 나트륨 시트레이트, 0.5 M NaCl(pH 6.0)으로 세척한 후, 마지막으로 다시 25 mM Tris, 100 mM NaCl(pH 7.2)로 세척한다. 컬럼으로부터 0.1 M 아세트산(pH 3.5)로 항체를 용출한다. 각 주기 후에 필요한 경우 용출물 풀의 pH를 4.1의 표적으로 조절한다. 공정중 조절은 A₂₈₀, SE-HPLC, 바이오버든 및 내독소 시험에 의한 단백질 농도의 결정을 포함한다.

[0212]

일차 주기 후에, 컬럼을 0.2 M 아세트산으로 재생하고 USP-PW로 세정한다. 이차 주기 후 컬럼을 0.2 M 아세트산으로 재생하고 USP-PW로 세정한 다음, 0.1 M 아세트산, 20% 에탄올 살균한 후, 50 mM 나트륨 아세테이트, 20%

에탄올(pH 5)중에서 세척하고 단기간 저장해 둔다. 삼차 주기 후에, 컬럼을 0.2 M 아세트산으로 재상하고 USP-PW로 세정한다. 이어서, 컬럼을 0.4 M 아세트산, 0.5 M NaCl, 0.1% Tween 80으로 세정한 후 USP-PW로, 이어서 50 mM NaOH 1.0 M NaCl로, 이어서, USP-PW로 차례로 세척한다. 마지막으로 컬럼을 0.1 M 아세트산, 20% 에탄올로 살균한 후, 50 mM 아세트산, 20% 에탄올(pH 5.0)중에서 세척하고 저장해 둔다.

[0213] 2.4 낮은 pH 항온배양 및 여과

[0214] 낮은 pH 항온배양은 단백질 A 용출물에 존재할 수 있는 외래성 피막바이러스를 불활성화시켜 바이러스 안전성에 대해 추가적인 보장을 제공하는 바이러스 감소 전용단계이다. 낮은 pH 항온배양 후 여과의 목적은 낮은 pH 처리동안에 형성될 수 있는 모든 침전물을 제거하는데 있다.

[0215] 합친 단백질 A 크로마토그래피 용출물의 pH는 0.5 M 인산을 사용하여 3.5의 표적값으로 조절하고 18 내지 25℃에 60 내지 70분간 보존해 둔다. 이어서, 혼합물을 1 M Tris(pH 10)을 사용하여 pH 5로 조절하고, 심층 여과 방식 필터 및 막 필터의 병용에 의해 정화한 다음, 10 내지 14℃로 냉각시킨다. 낮은 pH 처리 및 여과 단계의 공정중 조절은 A₂₈₀, SE-HPLC, 바이오버튼 및 내독소 시험에 의한 단백질 농도의 결정을 포함한다.

[0216] 2.5 일차 회수 및 포획 공정 성능

[0217] 일차 회수 및 포획 조작과정의 공정 성능은 표 5에 기술되어 있고, 공정중 조절의 결과는 표 6에 기술되어 있다.

표 5

일차 회수 및 포획 공정 성능

유닛조작과정	수율 (%)		
	56136BI	57058BI	58207BI
수집물 정화	80	81	87
단백질 A 크로마토그래피	103	109	99
낮은 pH 항온 배양 및 Q 세파로즈™ 로딩 후 산물 ^a	79 ^b	91	97

a. 낮은 pH 불활성화 후 표본 오차로 인한 수율함

b. 로트 57058BI 및 로트 58207BI 보다 로트 56136BI 에서의 심층 필터 영역이 3배 더 넓었다. 로트 56136BI에서 더 넓은 필터 면적은 수율 감소를 초래하였다.

[0218]

표 6

일차 회수 및 포획 공정중 시험 결과

유닛조작과정	공정중 시험 ^a	조치 기준	56136BI	57058BI	58207BI
수집물 정화	생균수	≤ 15.0 CFU/mL	NA ^b	0.0	0.6
	내독소	≤ 5 EU/mL	NA ^b	< 1	< 1
단백질 A 크로마토그래피	SE-HPLC	≥ 90.0%	97.4	96.6	96.5
	생균수	≤ 15.0 CFU/mL	0.0	0.0	0.0
	내독소	≤ 5 EU/mL	< 1	< 1	< 1
낮은 pH 항온 배양	SE-HPLC	≥ 90.0%	98.4	97.9	98.0
	생균수	≤ 15.0 CFU/mL	0.0	0.0	0.0
	내독소	≤ 5 EU/mL	< 1	< 1	< 1

a. 후속 유닛조작과정의 출발시점에 채집된 바이오버튼 및 내독소 시료

b. 시료 채취되지 않음

[0220] 2.6 강음이온 교환 크로마토그래피

[0221] 강음이온 교환 크로마토그래피 단계의 목적은 숙주 세포 단백질, DNA 및 내독소와 같은 공정-관련된 불순물을 줄이는데 있다. 또한, 이것은 바이러스 제거 단계로 작용할 수 있다. 특정 양태로서, Q 세파로즈™ FF 수지 컬

럼은 유동-통과 모드로 작동되며, 이때 항체는 컬럼을 통과하고 불순물은 수지에 결합되어 남으며, 다른 양태로서, Q 세파로즈™ FF 수지 컬럼 대신에 Mustang Q™ 막(Pall Corp.)을 사용한다. 조작은 10 내지 14℃에서 수행한다.

[0222] 직경 45 cm x 길이 22 cm의 컬럼(35 L)을 Q 세파로즈™ FF 수지(GE Healthcare)로 충전시키고 사용요건을 점검한다. 컬럼을 25 mM Tris, 50 mM NaCl(pH 8.0)으로 평형시킨다. 중화되고 여과된 불활성화 용액의 pH를 1 M Tris(pH 10)으로 8.0으로 조절하고, 전도도는 5.0 내지 6.5로 조정하며, 용액을 디리피드 막 필터를 통해 여과한다. Q 세파로즈™ 로드는 컬럼을 통해 80 g 단백질/L 수지의 최대 로드로 펌핑한다. 로딩 후 컬럼을 25 mM Tris, 50 mM NaCl(pH 8.0)으로 세척하고 용출액과 세척액을 합친다. 이것은 Q 세파로즈™ 유동-통과액과 세척액(QFTW) 풀이다. Q 세파로즈™ 단계에서 공정중 조절은 A₂₈₀, SE-HPLC, 바이오버든 및 내독소 시험에 의한 농도를 포함한다.

[0223] 컬럼은 25mM 인산나트륨, 1.0M NaCl(pH 7.0)으로 재생하고, 이어서 WFI로 세정한 후, 1.0 M NaOH로 살균하고, WFI로 세정한다. 그런 후, 컬럼을 25 mM 인산나트륨, 1.0 M NaCl(pH 7.0)로 중화시키고 25 mM 인산나트륨, 20% 이소프로판올(pH 7.0)중에 저장해 둔다.

[0224] 2.7 소수성 상호작용 크로마토그래피

[0225] 페닐 세파로즈™ 단계의 목적은 ABT-308 응집체, 단편 및 공정-관련된 불순물의 제거에 있다. 조작과정은 10 내지 14℃에서 실시한다.

[0226] 직경 60 cm x 길이 15 cm의 컬럼(42 L)을 페닐 세파로즈™ HP 수지(GE Healthcare)로 충전시키고 사용요건을 점검한다. 컬럼을 WFI, 후에 20 mM 인산나트륨, 1.1 M 황산암모늄(pH 7.0)으로 평형시킨다.

[0227] Q 세파로즈™ 유동-통과액 및 세척액을 40 mM 인산나트륨, 2.2 M 황산암모늄(pH 7.0)으로 1:1(v/v)로 희석시킨다. 이 용액(페닐 세파로즈™ 로드)을 0.2 μm 필터를 통해 여과하고 컬럼에 64 g 단백질/L 수지의 최대 로드로 로딩한다. 컬럼을 25 mM 인산나트륨, 1.4 M 황산암모늄(pH 7.0)으로 세척하고, 11 mM 인산나트륨, 0.625 M 황산암모늄(pH 7.0)을 사용하여 컬럼으로부터 ABT-308을 용출한다. 페닐 세파로즈™ 단계에서 공정중 조절은 A₂₈₀, SE-HPLC, 바이오버든 및 내독소 시험에 의한 농도를 포함한다.

[0228] 컬럼을 WFI로 재생하고, 1 M NaOH로 살균한 후, WFI로 세정하고 25 mM 인산나트륨, 20% 이소프로판올(pH 7)중에 저장한다.

[0229] 2.8 나노여과

[0230] 나노여과는 바이러스 제거 전용단계이며 페닐 세파로즈™ HP 컬럼 용출물에 존재할 수 있는 직경 20 nm 이상의 외래성 바이러스를 물리적으로 제거하여 바이러스 안전성에 대해 추가적 보장을 제공한다. 조작과정은 10 내지 14℃에서 수행한다.

[0231] 페닐 세파로즈™ HP 컬럼 용출물을 15 mM 히스티딘(pH 5.6)으로 사전 습윤된 1 μm 필터 및 Ultipor DV20 필터 트레이에 통과시킨다. 여과 후, 필터 트레이를 15 mM 히스티딘(pH 5.6)으로 플러시하여 모든 체류된 ABT-308을 회수한다. 사용 후 DV20 필터에 대해 완전성 시험을 실시하고 필터를 버린다. 필터가 완전성 시험에 합격하지 못한 경우 용액은 상기한 바와 같이 재여과할 수 있다. 나노여과 단계에서 공정중 조절은 A₂₈₀, SE-HPLC, 바이오버든 및 내독소 시험에 의한 농도를 포함한다.

[0232] 2.9 한외여과/정용여과에 의한 ABT-308 약물 물질의 제형

[0233] UF/DF 단계의 목적은 최종 제형 완충액 15 mM 히스티딘(pH 5.6)내로 약물 물질의 정용여과 및 ABT-308의 농축이다. 이들 조작과정은 10 내지 14℃에서 실시한다.

[0234] 나노여과액을 30 kDa MWCO 폴리에테르 설폰 막을 사용하여 약 50 g/L로 농축시키고, 제형 완충액으로 정용여과한 후, 약 180 g/L로 농축한다. UF 시스템으로 생산물이 고갈되고 정용여과 완충액으로 세정하여 시스템에 남아 있는 모든 생산물을 회수한다. 농축액과 세척액을 합쳐 정용여과된 ABT-308을 약 120 내지 160 g/L의 농도

로 생산한다. 농축된 ABT-308을 막 필터를 통해 여과한다. 한외여과/정용여과 단계에서 공정중 조절은 A_{280} , SE-HPLC, 바이오버든 및 내독소 시험에 의한 농도를 포함한다.

[0235] 각각의 실행 후 한외여과 시스템을 WFI로 플러시하고 250 ppm 차아염소산나트륨 용액으로 세척한 후, 0.1 M 수산화나트륨중에서 살균하고 저장해 둔다.

[0236] 2.10 최종 여과, 병주입 및 동결

[0237] 여과 및 병주입 조작은 2 내지 8℃에서 Class 100 Laminar Flow Hood의 Class 100 영역에서 실시한다. 제조된 ABT-308을 0.2 μm 필터를 통해 사전멸균된 무발열원 PETG 병으로 여과한다. 표지된 병을 동결될때까지 -80℃ (공칭)의 빈 냉동고에 넣은 후 -80℃(공칭)로 유지된 저장 냉동고로 옮긴다. 최종 여과 및 병주입 단계에서 공정중 조절은 A_{280} , 바이오버든 및 내독소 시험(약물 시험결과)을 포함한다.

[0238] 2.11 정밀 정제 공정 성능

[0239] 일치 회수 및 포획 조작과정의 공정 성능은 표 7에 기술되어 있고, 공정중 조절의 결과는 표 8에 기술되어 있다.

표 7

정밀 정제 공정 성능

유닛조작과정	수율 (%)		
	56003BF	57001BF	57002BF
로트			
음이온교환 크로마토그래피	96	95	93
소수성 상호작용 크로마토그래피	97	92	94
나노여과	98	98	96
한외여과/정용여과	91	94	89
최종 여과, 충전 및 동결	93	97	100
총생산, 포획 및 정밀 정제	50	63	63

[0240]

표 8

공정중 정밀 정제 시험 결과

유닛조작과정	공정중 시험 ^a	조치 기준	56003BF	57001BF	57002BF
음이온교환 크로마토그래피	SE-HPLC	$\geq 90.0\%$	99.1	98.5	98.4
	바이오버든	$\leq 15.0 \text{ CFU/mL}$	0.0	0.1	0.0
	내독소	$\leq 5 \text{ EU/mL}$	< 1	< 1	< 1
소수성 상호작용 크로마토그래피	SE-HPLC	$\geq 90.0\%$	99.8	99.7	99.7
	바이오버든	$\leq 15.0 \text{ CFU/mL}$	0.0	0.0	0.0
	내독소	$\leq 5 \text{ EU/mL}$	< 1	< 1	< 1
나노여과	SE-HPLC	$\geq 90.0\%$	99.8	99.7	99.7
	바이오버든	$\leq 15.0 \text{ CFU/mL}$	0.0	0.0	0.0
	내독소	$\leq 5 \text{ EU/mL}$	< 1	< 1	< 1
한외여과/정용여과	SE-HPLC	$\geq 90.0\%$	99.7	99.6	99.6
	바이오버든	$\leq 15.0 \text{ CFU/mL}$	0.0	0.0	0.0
	내독소	$\leq 5 \text{ EU/mL}$	6 ^b	< 1	< 1
최종 여과, 충전 및 동결	바이오버든	$\leq 1 \text{ CFU/mL}^c$	0 ^d	0 ^d	0 ^d
	내독소	$\leq 0.2 \text{ EU/mg}^c$	$\leq 0.1^d$	$\leq 0.1^d$	$\leq 0.1^d$

a. 후속 유닛조작과정의 출발점에서 채집한 생균수 및 내독소 시험

b. 6 EU/mL의 내독소 결과는 유의적으로 판단되지 않는다. 그 이유는 후속 약물 물질이 0.2 이하의 EU/mg의 명세를 충족하였기 때문이다. 추가로, 로트 56003BF는 공학적 실행으로 사람 용도로 공개된 것은 아니다.

c. 약물 물질 공개 명세

d. 약물 물질 공개 결과

[0241]

[0242] 3. 항체 조성물중의 숙주 세포 단백질 농도의 결정

[0243] 이 과정은 항체 시료중의 잔여 숙주 세포 단백질 농도를 결정하는 시험 방법론을 제시한다. 효소 연결된 면역 흡착 검정(ELISA)을 사용하여 특이적 항체의 두 층사이에 숙주 세포 단백질(항원)이 샌드위치되도록 한다. 그런 후 비특이적 부위를 카세인으로 차단시킨다. 이어서, 숙주 세포 단백질을 항온배양하며, 이 과정에서 항원 분자들이 일차 항체(피복 항체)에 의해 포획된다. 그런 다음, 이차 항체(비오티닐화 항-숙주 세포 단백질)를 첨가하며, 이들 항체는 항원(숙주 세포 단백질)에 고정된다. HRP-결합된 뉴트라비딘을 첨가하며, 이들은 비오티닐화 항-숙주 세포 단백질과 결합한다. 후속하여 K 블루 기질을 첨가한다. 발색 기질은 결합된 효소 연결된 항체에 의해 가수분해되어 블루 칼라를 생산한다. 2 M H_3PO_4 로 반응을 중지시키고, 칼라는 노랑으로 변색한다. 색상 강도는 웰에 결합된 항원의 양과 정비례한다.

[0244] 50 mM 중탄산나트륨(피복 완충액) pH 9.4의 제조. 1 L 비이커에 900 mL Milli-Q 물과 4.20 g $\pm$ 0.01 g 중탄산나트륨을 첨가한다. 완전히 용해될 때까지 교반한다. 1 N NaOH를 사용하여 pH를 9.4로 조절한다. 1 L 부피의 플라스크로 옮기고 Milli-Q 물로 용량을 채운다. 균질할때까지 전도 혼합한다. 0.22 μ m 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 제조일로부터 7일까지 공칭 4°C에 저장한다.

[0245] 0.104 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 1.37 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.0176 M KH_2PO_4 , pH = 6.8 내지 6.9(10X PBS)의 제조. 약 400 mL의 Milli-Q 물을 유리 비이커에 첨가한다. 13.94 g $\pm$ 0.01 g의 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가한다. 40.0 g $\pm$ 0.1 g의 NaCl을 첨가한다. 1.00 g $\pm$ 0.01 g의 KCl을 첨가한다. 1.20 g $\pm$ 0.01 g의 KH_2PO_4 를 첨가한다. 균질할때까지 교반한다. 500 mL 부피 플라스크로 옮긴다. Milli-Q 물을 적량 가하여 500 mL 용량을 채운다. 전도 혼합한다. 0.2 μ m 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 제조일로부터 7일까지 실온에 보관한다.

[0246] 1 X PBS + 0.1% Triton X-100, pH 7.40(평판 세척 완충액)의 제조. 4 L 눈금 실린더에서 400 mL 10 X PBS(단계 5.2)를 3500 mL Milli-Q 물과 혼합한다. pH를 점검하고 필요한 경우 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 사용하여 7.40 $\pm$ 0.05로 조정한다. Milli-Q 물로 용량을 채운다. 실린더를 파라필름으로 조밀하게 밀봉하고 균질할때까지 전도 혼합한다. 4 L 병으로 옮긴다. 4 mL의 1 X PBS를 제거하고 버린다. 4 mL의 Triton X-100을 3996 mL의 1 X PBS에 첨가한다. 교반 평판에 올려놓고 교반시켜 완전히 용해시킨다. 희석 완충액 제조를 위해 필요한 양의 평판 세척 완충액을 0.22 μ m 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 실온에 7일까지 보관한다.

[0247] 피복 항체 혼합물-친화성 정제된 염소 항 CHO 599/626/748(수탁 번호 G11201 @ 1.534 mg/mL)의 제조: 주지-원액을 바이알안에 공칭 -80°C에서 저장한다. 분액을 제조한다. 사용시에 평판당 1 분액을 취한다. 사용 직전에 항체 혼합물을 다음과 같이 냉 50 mM 중탄산나트륨중에 희석하여 4 μ g/mL의 최종 농도를 조성한다. 예를 들어, 31 μ L 피복 항체 혼합물을 11969 μ L 냉 피복 완충액에 첨가한다. 조심스럽게 전도 혼합한다.

[0248] 비오티닐화 염소 항 숙주 세포 단백질 혼합물 599/626/748(수탁 번호 G11202 @ 0.822 mg/mL)의 제조. 주지-원액을 바이알안에 공칭 -80°C에서 저장한다. 분액을 제조한다. 사용시에 평판당 1 분액을 취한다. 사용 직전에 비오티닐화 항체 혼합물을 다음과 같이 37°C $\pm$ 2°C 카세인중에 희석시켜 1 μ g/mL의 최종 농도를 조성한다. 예를 들어, 14.6 μ L 비오티닐화 항체 혼합물을 11985 μ L 37°C $\pm$ 2°C 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 전도 혼합한다.

[0249] 뉴트라비딘-HRP의 제조. 신규 로트(lot)(2 mg/바이알)를 다음과 같이 1 mg/mL로 조제한다. 400 μ L의 Milli-Q 물을 바이알에 첨가한 다음, 1600 μ L 1X PBS를 첨가하여 총 2 mL를 조성한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합한다. 공칭 -20°C에 저장한다. 평판당 1 분액을 사용할 수 있도록 목적하는 용량으로 분액을 제조한다. 폴리프로필렌 튜브에서 제조한다. 신규 로트를 정성하여 작용 농도를 결정한다. 제조일로부터 6개월의 유효 기한을 부여한다. 예를 들어, 작용 농도가 0.2 μ g/mL로 결정되었으면, 다음과 같이 제조한다. 사용 직전에, 실온에서 뉴트라비딘-HRP의 1 분액을 해동시킨다. 1 mg/mL 뉴트라비딘 용액을 37°C $\pm$ 2°C 카세인에 의해 0.1 mg/mL(100 μ g/mL)로 희석한다. 10배 희석을 예로 들면, 50 μ L의 뉴트라비딘을 450 μ L의 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합한다. 추가로 100 μ g/mL 용액을 37°C $\pm$ 2°C 카세인에 의해 0.2 μ g/mL로 희석시킨다. 500배 희석을 예로 들면, 24 μ L 뉴트라비딘(100 μ g/mL)을 11976 μ L의 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합한다.

[0250] 5.7 2M 인산(정지 용액)의 제조. 진한인산으로부터 2 M 인산 용액을 다음과 같이 제조한다. 표지에 적힌 인산 퍼센트, 밀도(1.685 g/mL) 및 화학식량(98 g/mole)으로부터, 500 mL의 2 M 인산을 제조하는데 필요한 진한인산의 용량을 계산한다. 이에 따라 계산된 진한인산의 용량을 플라스크에 첨가한다. Milli-Q 물로 용량을 채우고

균질할때까지 전도 혼합한다. 주변 온도에서 제조일로부터 6개월까지 저장한다.

- [0251] 희석 완충액(1X PBS + 0.1% Triton X100, pH 7.4중에 100배 희석된 카세인)의 제조. 0.22 μ m 멸균 여과된 1X PBS + 0.1% Triton X100, pH 7.4중에 37°C $\pm$ 2°C 카세인에 100배 희석을 예로 들면, 1 mL의 37°C $\pm$ 2°C 카세인을 99 mL의 0.22 μ m 멸균 여과된 1X PBS + 0.1% Triton X100, pH 7.4에 첨가한다. 잘 혼합한다. 매사용시마다 새롭게 제조한다.
- [0252] 표준물의 제조. 숙주 세포 단백질 표준물(항원 표준물)(수탁 번호 G11203 @ 1.218 mg/mL): 주지-원액은 70 μ L 분액으로 공칭 -80°C에 저장한다. 1 분액을 실온에서 해동한다. 희석 완충액을 사용하여 폴리프로필렌 튜브에서 연속 희석을 실시한다.
- [0253] 시료의 제조. 폴리프로필렌 튜브에서, 최종 벌크 시료를 희석 완충액에 24 mg/mL로 희석한다. 농도를 기록한다. 주지-아래 용액을 사용하여 스파이크된 시료를 제조하고 아래 참조된 12 mg/mL 용액을 제조한다. 폴리프로필렌 마이크로튜브에서, 추가로 24 mg/mL 용액을 희석 완충액에 12 mg/mL로 희석한다. 총 6개의 웰에 대해 평판의 3중 웰 각각에 12 mg/mL 용액을 로딩한다.
- [0254] 스파이크의 제조. 폴리프로필렌 마이크로튜브에서 상기 제조된 20 ng/mL 표준물을 희석 완충액으로 2배 희석하여 10 ng/mL 숙주 세포 단백질 스파이크를 제조한다. 평판의 3개 웰에 10 ng/mL 스파이크 용액을 로딩한다. 시료의 스파이크를 위해 단계 6.1의 20 ng/mL 표준용액을 사용한다.
- [0255] 스파이크된 시료의 제조. 폴리프로필렌 마이크로튜브에서 각 24 mg/mL 최종 벌크 용액 300 μ L를 20 ng/mL 스파이크 용액(6.1) 300 μ L로 스파이크한다. 총 6개의 웰에 대해 평판의 3중 웰 각각에 스파이크된 시료 용액을 로딩한다.
- [0256] 대조군의 제조. 대조군 범위는 정규 시험에 사용하기 전에 매번 새로운 대조 원액에 대해 설정되어야 한다. 대조원액: ABT-308 약물 농축액의 한 회분에 대해 150 μ L 분액을 제조하고 최대 3년동안 공칭 -80°C에서 동결 저장한다.
- [0257] 작용 대조군의 제조. 대조군의 분액을 실온에서 해동시킨다. 폴리프로필렌 튜브에서 대조군을 희석 완충액으로 24 mg/mL로 희석시킨다. 폴리프로필렌 마이크로튜브에서, 추가로 24 mg/mL 대조 용액을 희석 완충액으로 12 mg/mL로 희석시킨다. 일회 희석액을 제조하고 대조군을 평판의 3개 웰에 로딩한다.
- [0258] ELISA 절차. 평판 세척병을 평판 세척 완충액(단계 5.3 참조, 1X PBS + 0.1% Triton X-100)으로 충전시킨다. 평판 와셔(washer)를 준비한다. 다음의 변수를 점검한다. 변수는 다음과 같이 설정한다: 각 주기(총 5회 주기)동안 평판 유형은 1, 용량은 400 μ L, 잠김시간은 10초, Asp. 시간은 4초이다.
- [0259] 검정 절차. 평판을 냉 50 mM 중탄산나트륨중의 100 μ L/웰의 4 μ g/mL 염소 피복 항체 혼합물로 피복한다. 피복 용액이 웰의 바닥을 균일하게 덮을때까지 평판의 측면을 두드리고, 봉합 테이프로 밀봉한 후, 공칭 4°C하에 평판 진탕기(또는 균등기)에서 속도 3으로 18시간 $\pm$ 1시간 동안 진탕시키면서 항온배양한다. 밤새 항온배양 후, 냉장고에서 평판을 꺼내어 실온에서 평형이 이루어지도록 둔다. 피복액을 제거한다. 종이 타올로 평판을 닦아낸다. 300 μ L/웰의 37°C $\pm$ 2°C 카세인으로 차단시키고, 봉합 테이프로 밀봉한 다음, 37°C $\pm$ 2°C하에 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1시간 동안 진탕시키면서 항온배양한다. 항온배양물 차단동안 표준물, 시료, 대조군, 스파이크 및 스파이크된 시료를 제조한다. 평판을 세척 완충액으로 5회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 8-채널 피펫을 사용하여, 평판의 3중 웰에 100 μ L/웰의 표준물, 시료, 스파이크, 스파이크된 시료 및 대조군을 피펫팅한다. 블랭크로 할당하기 위해 평판의 모든 빈 웰에 희석 완충액 100 μ L/웰을 피펫팅한다. 봉합 테이프로 밀봉하고 37°C $\pm$ 2°C하에 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1시간 동안 진탕시키면서 항온배양한다. 평판에 로딩할때 템플릿을 작성하여 가이드로 사용한다.
- [0260] 평판 판독기 설정. 표준물의 농도를 입력한 템플릿을 설정한다. 시료, 대조군, 스파이크 또는 스파이크된 시료에 대한 희석배율을 입력하지 않는다. 희석제를 함유한 웰을 모든 웰에서 차감될 블랭크로 할당한다. 평판을 세척 완충액으로 5회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 비오틴화 염소 항체를 첨가한다. 봉합 테이프로 밀봉하고 37°C $\pm$ 2°C하에 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1시간 동안 진탕시키면서 항온배양한다. 평판을 세척 완충액으로 5회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 뉴트라비딘-HRP 결합체 용액을 첨가한다. 봉합 테이프로 밀봉하고 37°C $\pm$ 2°C하에 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1시간 동안 진탕시키면서 항온배양한다. 평판을 세척 완충액으로 5회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 냉 K-블루 기질을 첨가하

고, 봉합 테이프를 밀봉한 다음, 실온에서 Lab-line 역가 평판 진탕기(또는 균등기)에서 속도 3으로 진탕하면서 10분간(기질을 첫열에 첨가하면서 타이머를 작동시킨다) 항온배양한다. 100 μ L/웰 2 M 인산(단계 5.7)을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 평판을 속도 3의 평판 진탕기에 3 내지 5분간 올려놓는다. 평판을 450 nm에서 판독한다.

[0261] 데이터 분석 및 계산. 주지-흡광도가 표준곡선의 실용정량한계(2.5 ng/mL 표준)내에 포함되고 하기된 CV(%) 또는 변동(%) 조건을 충족하는 시료, 스파이크, 스파이크된 시료 및 대조군만이 수용된다. 만일 시료의 OD가 2.5 ng/mL 표준이하인 경우, 결과는 2.5 ng/mL 미만으로 기록되어야 한다. 그런 다음, 이 값을 회석 시료 농도(12 mg/mL)로 나누어 ng/mg 값으로 기록한다. 만일 시료가 숙주 세포 농도에서 높아 비-스파이크된 시료 및/또는 스파이크된 시료가 표준 곡선이상인 경우, 값은 >100 ng/mL로 기록한다. 그런 다음, 이 값을 회석된 시료 농도(12 mg/mL)로 나누어 ng/mg 값으로 기록한다. 시료가 2.5 ng/mL 표준 이하인 경우 스파이크 회수 계산을 위해 시료 값을 영으로 간주한다.

[0262] 표준 곡선. 표준 농도가 원안 템플릿에 입력되어야 한다. 이차곡선 접합을 사용한다. 결정계수는 0.99이어야 하고 3중 웰사이의 CV(%)는 20% 이하야 한다. 만일 이 조건이 충족되지 않는 경우, 표준 1(수준 1, 3개 웰)이 배제될 수 있다. 만일 1.25 ng/mL가 배제되는 경우, 2.5 ng/mL내에 포함되는 흡광도 및 100 ng/mL(나머지 표준 곡선점) 흡광도를 갖는 시료 및 스파이크된 시료만이 수용가능하다. 추가로, 각 표준 수준의 3중 웰의 경우 만일 한개 웰이 명백히 오염되었거나 낮은 결합을 보이는 경우, 이는 배제될 수 있다. 만일 웰이 표준 수준에서 배제되는 경우, 나머지 2개는 20%의 변동을 나타내야 한다. 평판의 배경(블랭크)에 가까운 OD 값을 나타내는 최저 표준의 CV(%)는 30%이어야 한다. 만일 1개 웰이 배제되는 경우, 나머지 2개에 대한 변동(%)은 35%이어야 한다. 만일 최저 표준물이 배제되는 경우, 나머지 표준 곡선 수준의 흡광도에 포함되는 흡광도를 갖는 시료 및 스파이크된 시료만이 수용가능하다.

[0263] 시료. CV(%)는 3중 웰사이에 20%이어야 한다. 3중 웰사이의 CV(%)를 기록한다. 각 시료 회석의 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지 2개는 변동(%)이 20%이어야 한다. 주지-만일 비스파이크된 시료 OD가 2.5 ng/mL 표준 OD이하인 경우, 변동(%)을 비스파이크된 결과에 적용하지 않는다. 상기 계산법을 참조한다.

[0264] 평균(ng/mL) 값으로부터 실질적인 숙주 세포 농도를 ng/mg으로 다음과 같이 계산한다. CHO 숙주 세포 단백질(ng/mg) = 평균 "비스파이크된 시료 결과(ng/mL)" - 회석된 시료 농도(12 mg/mL).

[0265] 스파이크. CV(%)는 3중 웰사이에 20%이어야 한다. CV(%)를 기록한다. 스파이크의 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 상기 계산법을 참조한다. 숙주 세포 농도를 ng/mL로 기록한다. 이 결과는 스파이크 회수 계산에 사용될 수 있다. 스파이크의 농도(ng/mL) 결과는 이론상 스파이크 농도의 $\pm 20\%$ 이어야 한다. 결과를 기록하고 합격 또는 불합격을 표시한다. 스파이크 결과가 이론치의 20%내에 속하지 않는 경우, 검정을 반복해야 한다. 평균 스파이크 농도(ng/mL) x 100은 $100\% \pm 20\%$ 10ng/mL이어야 한다.

[0266] 스파이크된 시료. 3중 웰사이에 CV(%)는 20%이어야 한다. 3중 웰사이의 CV(%)를 기록한다. 각 스파이크된 시료 회석으로부터 한개의 웰이 배제될 수 있다. 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 상기 계산법을 참고한다. 각 회석에 대한 "스파이크된 시료 결과"를 ng/mL로 기록한다. 이중 회석사이의 변동(%)을 기록한다. 회석간의 변동(%)은 25%이어야 한다. 이들 결과는 스파이크 회수 계산에 사용될 것이다.

[0267] 다음의 식을 사용하여 각 회석 세트에 대해 스파이크 회수(%)를 계산한다: 스파이크 회수(%) = 스파이크된 시료 값 - 비스파이크된 시료 값 x 100 스파이크 값. 주지-(1) 만일 비스파이크된 시료 값 OD가 2.5 ng/mL 표준이하로 떨어진 경우, 스파이크 회수(%) 계산에서 값을 영으로 고려한다. 각 시료에 대한 각 회석의 경우 스파이크 회수(%)는 $100\% \pm 50\%$ (50% - 150%)이어야 한다. 결과 및 합격/불합격을 기록한다.

[0268] 대조군. 3중 웰사이에 CV(%)는 20%이어야 한다. CV(%) 결과를 기록한다. 대조군의 1개 웰은 배제될 수 있다. 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 상기 계산법을 참조한다. 대조군중의 숙주 세포 농도를 ng/mL로 기록한다. 숙주 세포 농도를 다음과 같이 ng/mg로 계산한다: 숙주 세포 단백질(ng/mg) = ng/mL로서의 대조군 숙주 세포 단백질 결과.

[0269] 4. 항체 조성물중의 단백질 A 농도의 결정

[0270] ELISA에서 평판을 닭 항-단백질 A로 피복하고 항온배양한다. 비특이적 부위를 PBS중에서 카세인으로 차단시킨다. 평판을 1X PBS + 0.1% Triton X-100에서 세척하여 비결합된 물질을 제거한다. 시료 및 Cys-단백질 A 표준물을 1X PBS + 4.1% Triton X + 10% 카세인중에 희석한다. 용액을 95°C $\pm$ 2°C로 가열하여 변성시키고, 단백질 A를 항체로부터 분리한다. 특정 양태로서, 예를 들어, 만일 GE Healthcare의 제품인 경우 용액을 평판에 첨

가하고 항온배양한다. 다른 양태로서, 예를 들어, 만일 단백질 A 친화성 단계가 ProSep Ultra PlusTM Milipore의 사용을 포함하는 경우, 용액을 냉각시키고 각 튜브에 0.85% NaCl +12.5% 1N 아세트산 + 0.1% Tween 20을 첨가하여(1:1) 시료 단백질로부터 단백질 A의 분리를 추가로 촉진한다. 튜브를 격렬하게 와류시키고, 항온배양한 후, 원심분리한다. 상청액을 제거하고 추가로 후처리한다. 비결합 물질을 1X PBS + 0.1% Triton X-100으로 세척하여 제거한다. 미세역가 평판에 비오틴화 닭 항-단백질 A를 첨가하고 항온배양한다. 평판을 세척하여 비결합 물질을 제거하고, 뉴트라비딘-퍼옥시다제 결합체를 첨가한다.

[0271] 뉴트라비딘은 웰에 결합된 비오틴화 닭 항-단백질 A와 결합할 것이다. 평판을 다시 세척하여 비결합된 뉴트라비딘을 제거하고 평판에 K-블루(테트라메틸벤지딘(TMB)) 기질을 첨가한다. 기질은 결합된 뉴트라비딘에 의해 가수분해되어 블루 칼라를 생산한다. 인산으로 반응을 정지시키면 색상이 노랑으로 변색한다. 웰중의 황색의 강도는 웰에 존재하는 단백질 A의 농도와 정비례한다.

[0272] 시약과 용액의 제조. 카세인 병을 반드시 37°C ± 2°C로 가온하고, 2분간 음과처리한 다음, 분취한다. 분액은 공칭 4°C에 저장해 둔다. 검정이 실행될 때 필요한 수의 카세인 분액을 37°C ± 2°C에 넣어 두어야 한다. 피복 완충액 및 기질은 사용직전에 공칭 4°C로 냉각시켜 사용한다.

[0273] 50 mM 중탄산트륨(피복 완충액) pH 9.4. 1 L 비이커에 Milli-Q 물 900mL, 중탄산나트륨 4.20 g ± 0.01 g을 첨가한다. 완전히 용해될때까지 교반시킨다. 1 N NaOH로 pH를 9.4로 조정한다. 1 L 부피 플라스크로 옮기고 Milli-Q 물로 채운다. 균질할때까지 전도 혼합한다. 0.22 CA μm 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 제조일로부터 7일까지 공칭 4°C에 저장한다.

[0274] 104 M Na₂HPO₄ * 7H₂O, 1.37 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.0176 M KH₂PO₄, pH = 6.8 내지 6.9. (10X PBS): 약 400 mL의 Milli-Q 물을 유리 비이커에 첨가한다. 13.94 g ± 0.01 g의 Na₂HPO₄ x 7H₂O를 첨가한다. 40.0g ± 0.1g의 NaCl을 첨가한다. 1.00 g ± 0.01 g의 KCl을 첨가한다. 1.20 g ± 0.01 g의 KH₂PO₄를 첨가한다. 균질할때까지 교반한다. 500 mL 부피 플라스크로 옮긴다. Milli-Q 물로 500 mL 용량을 채운다. 전도 혼합한다. 0.2 CA μm 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 실온에 7일까지 저장한다.

[0275] 1X PBS + 0.1% Triton X-100, pH 7.40(평판 세척 완충액). 4 L 눈금 실린더에, 400 mL의 10X PBS(상기 참조)를 3500 mL의 Milli-Q 물과 혼합한다. pH를 점검하고 필요한 경우 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 사용하여 7.40 ± 0.05로 조정한다. Milli-Q 물로 용량을 채운다. 실린더를 파라필름으로 조밀하게 봉하고 균질할때까지 전도 혼합한다. 4 L 병으로 옮긴다. 4 mL의 1X PBS를 제거하고 버린다. 4 mL의 Triton X-100을 3996 mL의 1X PBS에 첨가한다. 교반 평판에 올려놓고 교반시켜 완전히 용해시킨다. 실온에서 7일까지 저장한다.

[0276] 닭 항-단백질 A 피복 항체. 사용시 평판당 1 분액의 항체를 취한다. 닭 항-단백질 A의 신규 로트를 정성하기 위해, 함께 결합된(동일한 로트의 피복으로부터 제조된) 닭 항-단백질 A-비오틴을 사용하고 정성하는 것이 필요할 수 있다. 사용직전에 항체 혼합물을 냉 50 mM 중탄산나트륨에 피복물 정성동안에 결정된 농도로 희석시킨다. 예를 들어, 정성동안에 평판에 로딩할 피복물의 농도는 6 μg/mL로 결정되었고, 만일 원액 농도가 3000 μg/mL인 경우엔 24 μL의 피복 항체를 11976 μL의 냉 피복 완충액에 첨가한다. 조심스럽게 전도 혼합한다.

[0277] 비오틴화 닭 항-단백질 A. 사용시 평판당 1 분액의 항체를 취한다. 결합된 닭 항-단백질-A-비오틴의 신규 로트를 정성하기 위해, 제조하는데 사용된 동일한 로트의 닭 항-단백질 A를 사용하여 정성하는 것이 필요할 수 있다. 사용직전에 비오틴화 항체를 37°C ± 2°C 카세인에 비오틴화 항체 정성동안에 결정된 농도로 희석시킨다. 예를 들어, 정성동안에 평판에 로딩할 비오틴화 항체의 농도는 4 μg/mL로 결정되었고, 만일 원액 농도가 1000 μg/mL인 경우엔 48 μL의 비오틴화 항체를 11952 μL의 37°C ± 2°C 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 전도 혼합한다.

[0278] 뉴트라비딘-HRP. 신규 로트(2 mg/바이알)을 1 mg/mL로 다음과 같이 제조한다. 400 μL의 Milli-Q 물을 바이알에 첨가한 다음, 1600 μL 1X PBS를 첨가하여 총 2 mL를 조성한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합한다. 공칭 -80°C에 보관한다. 평판당 1 분액을 사용할 수 있도록 목적하는 용량의 분액을 제조한다. 폴리프로필렌 튜브에서 제조한다. 제조일로부터 6개월의 유효 기간을 설정한다. 예를 들어, 만일 작용 농도가 0.1 μg/mL로 결정된 경우, 다음과 같이 제조한다. 사용직전에, 1 분액의 뉴트라비딘-HRP를 실온에서 해동한다. 1 mg/mL의 뉴트라비딘 용액을 37°C ± 2°C 카세인에 의해 0.01 mg/mL(10 μg/mL)로 희석한다. 10배 희석을 예로 들면, 50 μL의 뉴트라비딘을 450 μL의 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합하고, 다시 100 μL의 X10 뉴트라비딘을

900 μ L의 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 와류시켜 혼합한다. 추가로 10 μ g/mL 용액을 37°C $\pm$ 2°C 카세인에 의해 0.1 μ g/mL로 희석한다. 100배 희석을 예로 들면, 120 μ L의 뉴트라비딘(10 μ g/mL)을 11880 μ L의 카세인에 첨가한다. 조심스럽게 수회 전도 혼합한다.

[0279] 정지 용액(구입한 1 N 인산을 사용한다). 구입일로부터 1년까지 주변온도에서 보관한다. 희석 완충액(1X PBS + 4.1% Triton X100 + 10% 카세인, pH 7.4). 86 mL의 1X PBS + 0.1% Triton X100, pH 7.4(단계 5.3으로부터)를 비이커 또는 플라스크에 첨가하고, PBS중의 4 mL의 Triton X-100 및 10 mL의 Blocker 카세인을 첨가한 후, 교반시켜 용해/혼합시킨다. 트리톤이 용해되기까지 20 내지 30분이 소요될 수 있다. 이것은 1X PBS + 4.1% Triton X100 + 10% 카세인(pH 7.4 용액)과 대등하다. 0.22 CA μ m 멸균 필터 유닛을 통해 여과한다. 매번 사용시마다 새롭게 제조한다. 이것은 평판 1개를 위해 충분한 양이다.

[0280] 단백질 A 표준물(항원 표준물). 주의-원액을 70 μ L 분액으로 공칭 -20°C에 저장해 둔다. 1 분액을 빙상에서 해동한다. 아래 표의 실시예에 따라 폴리프로필렌 튜브에서 제조사 COA의 치침 농도로 희석 완충액(상기 참조)을 사용하여 연속 희석을 수행한다. 예를 들면, COA의 치침에서 원액 농도가 2.1 mg/mL(2100000 ng/mL)인 경우엔, 시료를 빙상에서 해동한다. 폴리프로필렌 미량원심분리 튜브에서 최종 벌크 시료를 희석 완충액(상기)중에 20 mg/mL로 희석한다. 2회 희석을 별도로 실시한다. 농도를 기록한다. 하기의 용액을 사용하여 스파이크된 시료를 제조하고 10 mg/mL 용액을 제조한다. 폴리프로필렌 미량원심분리 튜브에서 추가로 20 mg/mL 용액을 희석 완충액에 의해 10 mg/mL로 희석한다.

[0281] 스파이크의 제조. 폴리프로필렌 미량원심분리 튜브에서, 상기 단계 6.1에서 제조된 0.593 ng/mL 표준물을 희석 완충액으로 2배 희석시켜 0.296 ng/mL 단백질 A 스파이크를 제조한다. 일회 희석을 실시한다. 0.296 ng/mL 스파이크 용액을 위해 3중 웰을 평판상에 로딩할 것이다. 시료의 스파이크를 위해 단계 6.1의 0.593 ng/mL 표준 용액을 사용한다.

[0282] 스파이크된 시료의 제조. 폴리프로필렌 미량원심분리 튜브에서, 500 μ L의 각 20 mg/mL 최종 벌크 용액을 500 μ L의 0.593 ng/mL 스파이크 용액으로 스파이크한다. 변성이 진행되도록 둔다. 총 6개 웰로서 평판상에 각 스파이크된 시료 용액을 위해 3중 웰을 로딩할 것이다.

[0283] 대조군의 제조. ABT-308 약물 물질의 로트를 수득한다. 150 μ L 분액을 제조하고 분취일로부터 3년까지 공칭 -80°C에 동결 저장한다.

[0284] 작용 대조군: 대조군의 분액을 빙상에서 해동한다. 폴리프로필렌 미량원심분리 튜브에서, 대조군을 희석 완충액에 의해 10 mg/mL로 희석시켜 1000 μ L의 최종 용량을 조성한다. 일회 희석을 실시한다. 변성이 진행되도록 둔다. 대조군의 3중 웰을 평판상에 로딩할 것이다.

[0285] 변성. 평판 블랭크를 위해 1000 μ L의 희석 완충액을 평판에서 작동될 블랭크의 수와 동일한 미량원심분리 튜브에 첨가한다. 튜브의 캡을 파라필름으로 봉하여 가열동안에 뚜껑이 열리지 않도록 방지할 수 있거나 튜브위에 제2의 선반을 올려 캡이 계속 밀봉상태를 유지하도록 한다. 표준물, 비스파이크된 시료, 스파이크된 시료, 스파이크, 블랭크 및 대조군을 95°C $\pm$ 2°C에서 15분 동안 가열한다. 사용하는 경우, 냉각동안에 튜브에서 파라필름을 제거한다. 15분간 냉각되도록 두고 약 10000 rpm으로 5분간 원심분리한다. 700 μ L의 상청액을 마이크로튜브로 옮겨 평판에 로딩한다. 트리톤/단백질 펠렛이 붕괴되지 않도록 주의한다.

[0286] 평판 와서 지침 및 수속 설정. 평판 세척 병을 평판 세척 완충액(단계 5.3 참조, 1X PBS + 0.1% Triton X-100)을 충전시킨다. 평판 와셔를 준비한다. 다음의 변수를 점검한다. 변수는 다음과 같이 설정한다: 각 주기(총 4회 주기)동안 평판 유형은 1, Asp 속도는 10 mm/초, 용량은 400 μ L, 잠김시간은 5초, Asp. 시간은 6초이다. 수속을 켜고 95°C로 설정한다. 수속 온도가 적어도 30분동안 95°C $\pm$ 2°C로 평형을 이루도록 둔다.

[0287] 검정 절차: 단계가 종결될때마다 점검한 체크리스트를 가이드로 사용할 수 있다. 추가로, 검정동안에 사용된 모든 장비를 기록한다. 검정이 실시되는 해당 날짜에 사용된 카세인 분액의 양은 37°C $\pm$ 2°C에서 설정되어야 한다. 피복 완충액 및 기질은 차게해서 사용한다. 항온배양 정지 전 및 동안에 표준물, 시료, 대조군, 스파이크 및 스파이크된 시료를 제조한다. 희석물을 제조하고, 에펜도르프 튜브로 옮기며, 15분간 변성시키고, 15분간 냉각시키며, 5분간 원심분리하고, 마이크로튜브로 옮기는데 걸리는 시간은 1시간의 항온배양 정지보다 더 걸릴 수 있다. 평판을 정지시키기 전에 40분 이상은 필요하다. 12 채널 피펫을 사용하여 B열부터 G열까지 수평적으로 평판에 시료, 스파이크된 시료, 표준물, 대조군, 검정 스파이크 및 블랭크를 로딩한다. 표준물은 고농도에서 저농도로 로딩한다. 평판 피복, 비오틴 첨가, 뉴트라비딘 첨가, 기질 첨가 및 정지 용액 첨가는 2행부터 11행까지 수직으로 실시한다.

- [0288] 평판을 냉 50 mM 중탄산나트륨중의 피복 항체 100 μ L/웰로 피복시킨다. 피복 용액이 웰의 바닥을 균일하게 덮을 때까지 평판의 측면을 두드리고, 봉합 테이프로 밀봉한 후, 평판 진탕기(또는 균등기)에서 속도 3으로 진탕시키면서 공칭 4℃에서 항온배양한다.
- [0289] 밤새 항온배양한 후, 냉장고에서 평판을 제거하고 실온에서 평형이 진행되도록 둔다. 피복물을 제거한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 300 μ L/웰의 37℃ $\pm$ 2℃ 카세인으로 정지시키고, 봉합 테이프로 밀봉한 후, Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1 시간 $\pm$ 10분간 진탕시키면서 37℃ $\pm$ 2℃에서 항온배양한다.
- [0290] 항온배양 정지 전에 및 동안에 표준물, 시료, 대조군, 스파이크 및 스파이크된 시료를 제조한다. 평판을 세척 완충액으로 4회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 8-채널 피펫을 사용하여, 100 μ L/웰의 변성된 표준물, 시료, 스파이크, 스파이크된 시료, 블랭크 및 대조군을 평판의 3중 웰에 피펫팅한다. 평판의 바깥 웰은 사용하지 않고, 비-처리된 희석 완충액을 이들 웰에 첨가한다. 봉합 테이프로 밀봉하고 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 2 시간 진탕시키면서 37℃ $\pm$ 2℃에서 항온배양한다. 템플릿을 작성하여 평판을 로딩할때 가이드로 사용한다.
- [0291] 평판 판독기 설정. 평판을 세척 완충액으로 4회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 비오티닐화 항체를 첨가한다. 봉합 테이프로 밀봉하고 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 1 시간 진탕시키면서 37℃ $\pm$ 2℃에서 항온배양한다.
- [0292] 평판을 세척 완충액으로 4회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 뉴트라비딘-HRP 결합체 용액을 첨가한다. 뉴트라비딘을 마지막 열에 첨가했을때 즉시 타이머를 작동시킨다. 봉합 테이프로 밀봉하고 Lab-line Environ 평판 진탕기(또는 균등기)에서 80 rpm $\pm$ 5 rpm으로 30분간 진탕시키면서 37℃ $\pm$ 2℃에서 항온배양한다. 평판을 세척 완충액으로 4회 세척한다. 평판을 종이 타올로 닦아낸다. 100 μ L/웰의 냉 K-블루 기질을 첨가하고, 봉합 테이프로 밀봉한 후, Lab-line 역가 평판 진탕기(또는 균등기)에서 속도 3으로 진탕시키면서 실온에서 10분간 항온배양한다(기질을 제1 열에 첨가했을때 즉시 타이머를 작동시킨다). 100 μ L/웰의 1 N 인산을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 평판을 평판 진탕기에 속도 3으로 3분간 올려놓는다. 평판을 450 nm에서 판독한다.
- [0293] 데이터 분석 및 계산. 주지-흡광도가 표준곡선의 실용정량한계내에 포함되고 하기된 CV(%) 또는 변동(%) 조건을 충족하는 시료, 스파이크, 스파이크된 시료 및 대조군만이 수용된다. 만일 시료의 OD가 표준곡선 이하인 경우, 결과는 0.18 ng/mL(검정 LOQ) 미만으로 기록되어야 한다. 그런 다음, 이 값을 희석 시료 농도(10 mg/mL)로 나누어 ng/mg 값으로 기록한다. 만일 시료가 단백질 A 농도에서 높아 비-스파이크된 시료 및/또는 스파이크된 시료가 표준곡선(2 ng/mL) 이상인 경우, 표준곡선내에 포함되도록 추가로 희석시킨다. 그런 다음, 이 값을 희석된 시료 농도로 나누어 ng/mg 값으로 기록한다. 스파이크 회수 계산을 위해, 비스파이크된 시료 값(ng/mL)이 곡선이하일때 조차 스파이크된 시료 값(ng/mL)으로부터 비-스파이크된 시료 값(ng/mL)을 차감한다. 값이 음수이거나 '범위'로 나타나는 경우에는, 스파이크 회수 계산을 위해 비스파이크된 시료를 영으로 간주한다.
- [0294] 표준 곡선. 표준 농도가 원안 템플릿에 입력되어야 한다. 이차곡선 점합을 사용한다. 결정계수는 0.99이어야 하고 3중 웰사이의 CV(%)는 20% 이어야 한다. 만일 이 조건이 충족되지 않는 경우, 표준 1(수준 1, 3개 웰)이 배제될 수 있다. 만일 0.18 ng/mL가 배제되는 경우, 0.26 ng/mL내에 포함되는 흡광도 및 2 ng/mL(나머지 표준 곡선점) 흡광도를 갖는 시료 및 스파이크된 시료만이 수용가능하다. 추가로, 각 표준 수준의 3중 웰의 경우 만일 한개 웰이 명백히 오염되었거나 낮은 결합을 보이는 경우, 이는 배제될 수 있다. 만일 웰이 표준 수준에서 배제되는 경우, 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 평판의 배경(블랭크)에 가까운 OD 값을 나타내는 최저 표준의 CV(%)는 30%이어야 한다. 만일 한 개의 웰이 배제된 경우, 나머지 2개는 변동(%)가 35%이어야 한다. 만일 최저 표준물이 배제되는 경우, 나머지 표준 곡선 수준의 흡광도에 포함되는 흡광도를 갖는 시료 및 스파이크된 시료만이 수용가능하다.
- [0295] 변동(%)을 다음과 같이 계산한다: 변동(%) = (Abs.(희석결과 1 - 희석결과 2)/평균값) x 100%. 만일 표준물이 상기 조건을 충족하지 못한 경우 검정을 반복해야 한다. 결정 결과의 CV(%) 및/또는 변동(%) 값 및 표준곡선 계수를 기록한다.
- [0296] 시료. 3중 웰사이의 CV(%)는 20%이어야 한다. 3중 웰간의 CV(%)를 기록한다. 각 시료 희석으로부터 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 주지-만일 비스파이크된 시료 OD가 최저 표준 OD 이하인 경우, 변동(%) 조건이 비스파이크된 결과에 적용되어서는 안된다. 상기 계산법을 참조한다.

[0297] 각 회석에 대한 "비스파이크된 시료 결과"를 ng/mL로 기록한다. 이들 값은 스파이크 회수 계산에 사용될 수 있다. 평균 "비스파이크된 시료 결과(ng/mL)" 및 회석간 변동(%)을 계산한다. 결과를 기록한다. 회석간 변동(%)은 25%이어야 한다. 평균(ng/mL)값으로부터 실질적인 단백질 A 농도를 ng/mg로 다음과 같이 계산한다: 단백질 A(ng/mg) = 평균 "비스파이크된 시료 결과(ng/mL)" 회석된 시료 농도(10 mg/mL). 결과를 기록한다.

[0298] 스파이크. 3중 웰간의 CV(%)는 20%이어야 한다. CV(%)를 기록한다. 스파이크로부터 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 상기 계산법을 참조한다. 단백질 A 농도를 ng/mL로 기록한다. 이 결과는 스파이크 회수 계산에 사용될 수 있다. 스파이크에 대한 농도 결과(ng/mL)는 이론상 스파이크 농도의 $\pm 20\%$ 이어야 한다. 결과를 기록하고 합격 또는 불합격을 표시한다. 만일 스파이크 결과가 이론값의 20%내에 포함되지 않는 경우 검정을 반복해야 한다. 평균 스파이크 농도(ng/mL) x 100은 $100\% \pm 20\%$ 0.296 ng/mL이어야 한다.

[0299] 스파이크된 시료. 3중 웰간의 CV(%)는 20%이어야 한다. 3중 웰간의 CV(%)를 기록한다. 각 스파이크된 시료 회석으로부터 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다. 상기 계산법을 참조한다. 각 회석에 대한 "스파이크된 시료 결과"를 ng/mL로 기록한다. 이중 회석간의 변동(%)을 기록한다. 회석간의 변동(%)은 25%이어야 한다. 이들 결과는 스파이크 회수 계산에 사용될 수 있다. 아래 식을 사용하여 각 회석 세트에 대한 스파이크 회수(%)를 계산한다: 스파이크 회수(%) = 스파이크된 시료 값 - 비스파이크된 시료 값 x 100. 스파이크 값. 주지-스파이크 회수 계산시, 비스파이크된 시료 값(ng/mL)이 곡선이하인 경우 조차 스파이크된 시료 값(ng/mL)으로부터 비스파이크된 시료 값(ng/mL)을 차감한다. 만일 그 값이 음수이거나 '범위'로 나타나는 경우 스파이크 회수 계산시 비스파이크된 시료를 0으로 간주한다. 스파이크 회수(%)는 각 시료의 각 회석에 대해 $100\% \pm 50\%$ (50%-150%)이어야 한다. 결과 및 합격/불합격을 기록한다.

[0300] 대조군. 3중 웰간의 CV(%)는 20%이어야 한다. CV(%) 결과를 기록한다. 대조군으로부터 1개 웰이 배제될 수 있다. 나머지 2개는 20%의 변동(%)을 나타내야 한다.

표 9

잔여 숙주 세포 단백질 및 단백질 A 검정 결과

회분 번호	단백질 A (ng/mg)	숙주 세포 단백질 (ng/mg)
56003BF	1.01	< 0.14
57001BF	1.58	< 0.14
57002BF	1.68	< 0.14
88018BF	< 0.29	< 0.14
89001BF	< 0.29	< 0.14
90006BF	< 0.29	< 0.14
90009BF	< 0.29	< 0.14

[0301]

표 10

잔여 숙주 세포 단백질 및 단백질 A 검정 결과: 공정중 시료

회분 번호	공정 단계					
	단백질 A		음이온 교환		소수성 상호작용	
	단백질 A (ng/mg)	HCP (ng/mg)	단백질 A (ng/mg)	HCP (ng/mg)	단백질 A (ng/mg)	HCP (ng/mg)
88018BF	9.55	768	0.79	4	0.17	≤ 0.120
89001BF	8.64	797	0.41	3	0.11	≤ 0.128
90006BF	9.67	914	0.50	3	0.16	≤ 0.118
90009BF	7.86	798	0.50	3	0.18	≤ 0.124

[0302]

[0303] 본원에 기재된 다양한 문헌들의 전문은 본원에 참고로 인용된다.

도면

도면1

- 항-IL-13 항체 중쇄 가변 영역 서열**
1 10 20 30 40
EVTLRRESGPG LVKPTQTTLT TCTLYGFSLS TSDMGVDWIR
CDR1

QPPGKGLEWL AHIWDDVKR YNPALKSRLT ISKDTSKNQV
CDR2

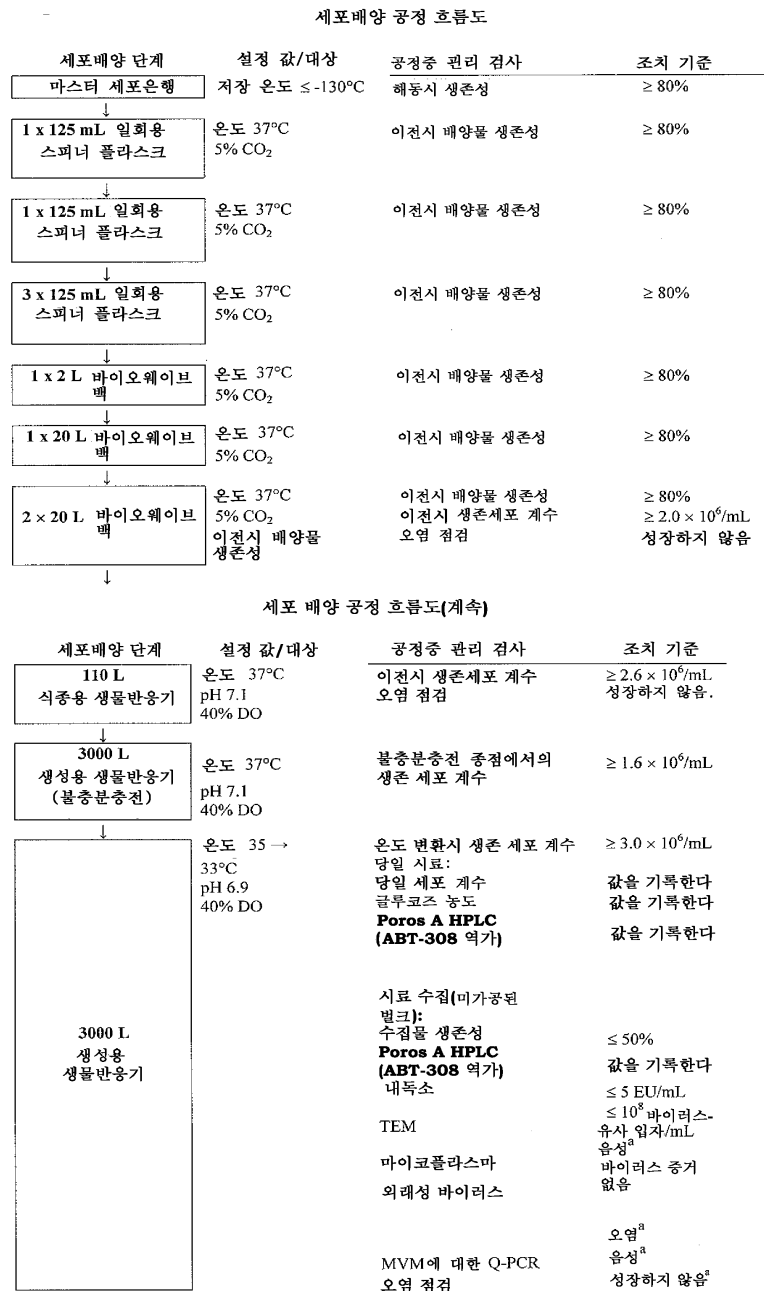
VLKLTSDVPV DTATYYCART VSSGYIYYAM DYWGQGLTVT
CDR3

VSS
- 항-IL-13 항체 경쇄 가변 영역 서열**
1 10 20 30 40
DIQMTQSPSS LSASVGDRV T ISCRASQDIR NYLNWYQQKP
CDR1

GKAPKLLIFY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP
CDR2

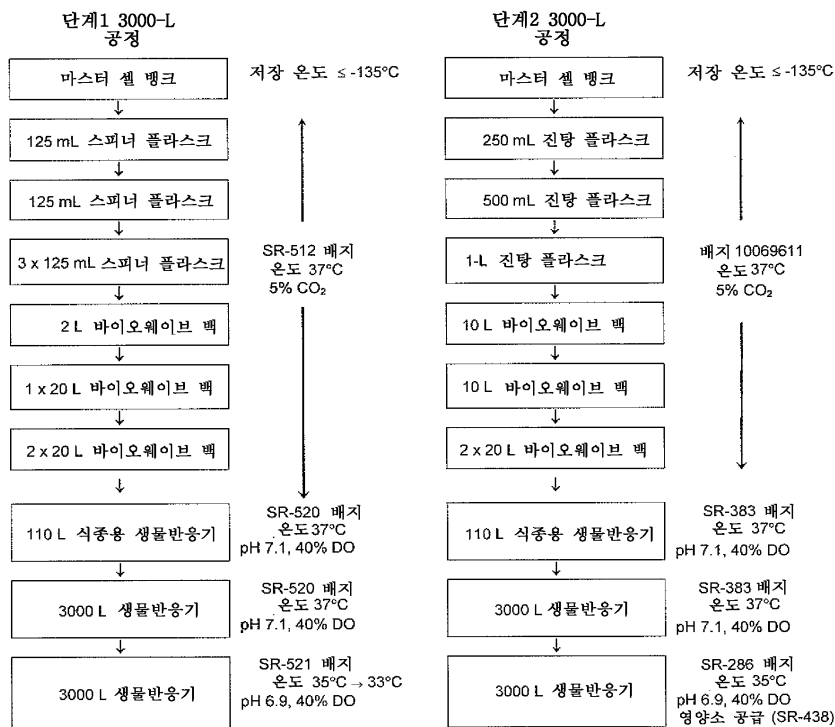
EDIATYYCQ GNTLPLTFGG GTKVEIK
CDR3

도면2



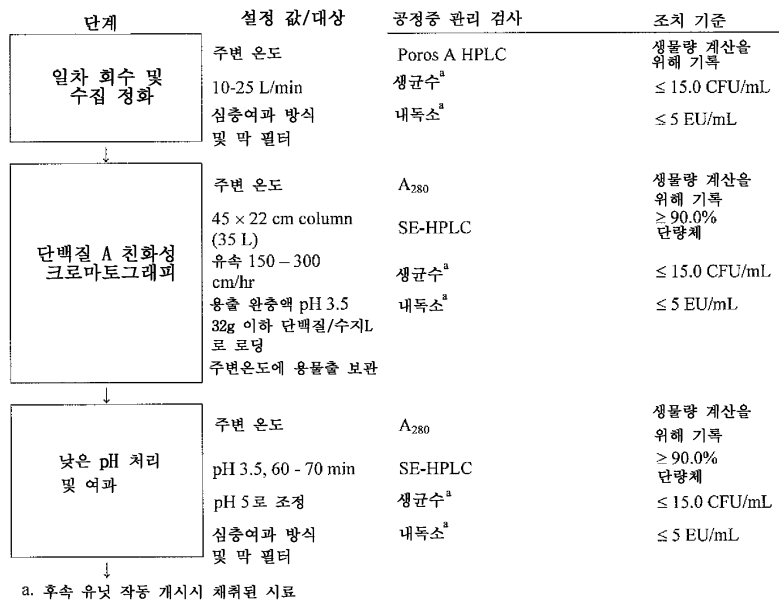
도면3

다른 세포배양 공정 흐름 전략의 비교



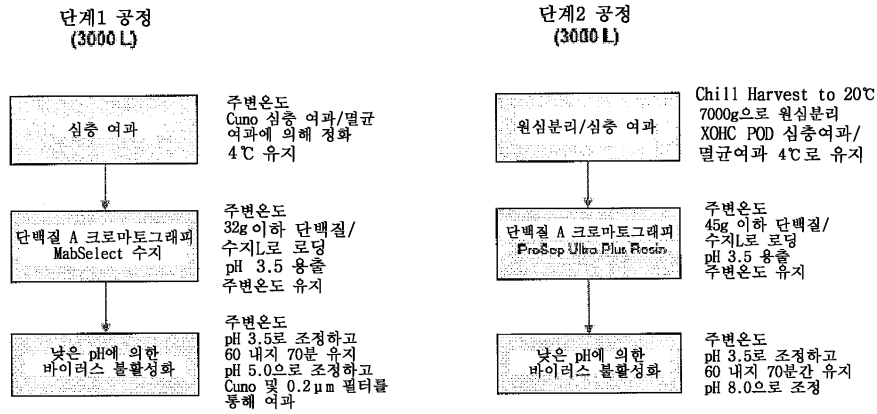
도면4

일차 회수 및 포획 크로마토그래피 공정 흐름도



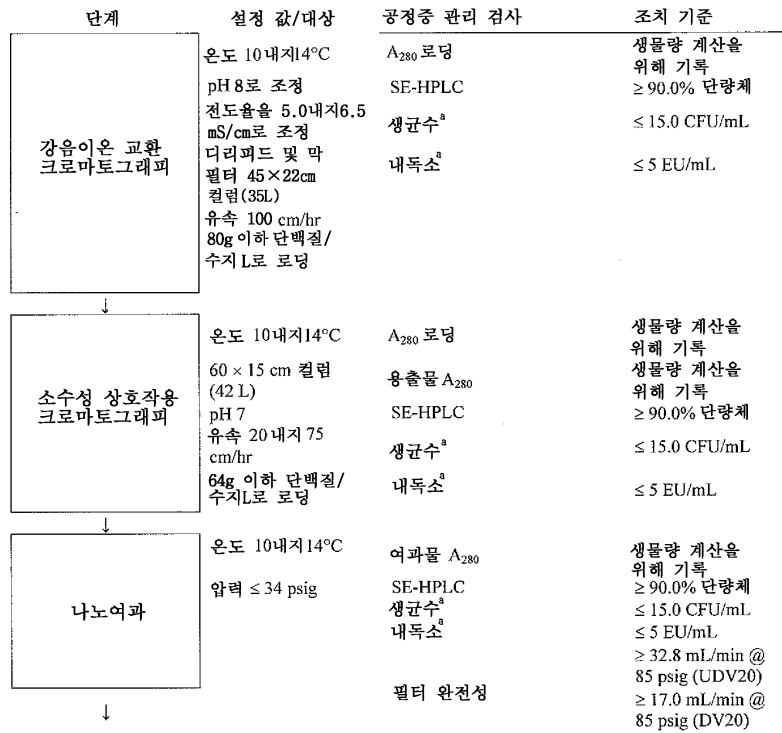
도면5

다른 일차 회수 및 포획 공정 전략의 비교



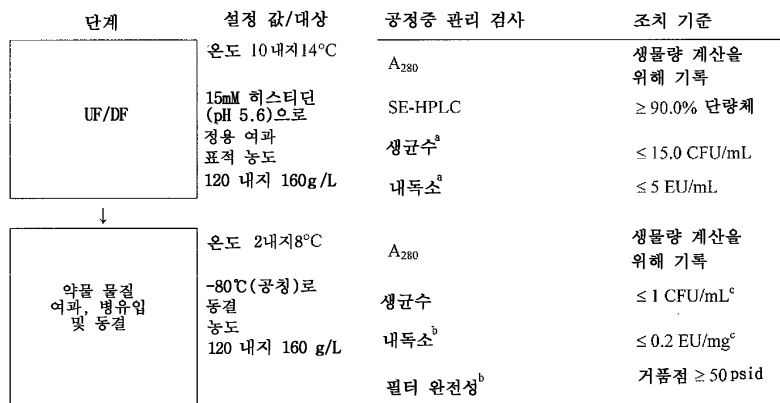
도면6

정밀 정제 공정 흐름도



a. 후속 유닛 작동 개시시 채취된 시료

정밀 정제 공정 흐름도 (계속)



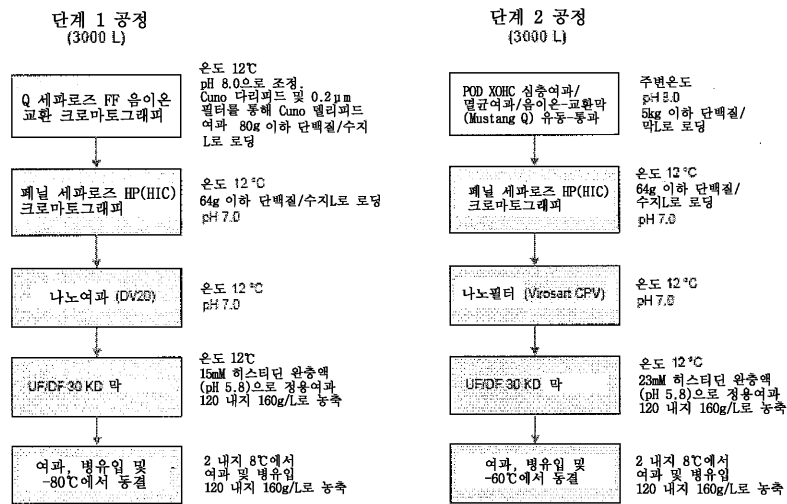
a. 후속 유닛 작동 개시시 채취된 시료

b. 약물 물질 검사 결과

c. 약물 물질 명세

도면7

다른 정밀 정제 공정 전략의 비교



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> ISOLATION AND PURIFICATION OF ANTI-IL-13 ANTIBODIES USING PROTEIN A AFFINITY CHROMATOGRAPHY

<130> 003168.1008

<150> 61/253,411

<151> 2009-10-20

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-13 Antibody Heavy Chain Variable Region

<400> 1

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL-13 Antibody Light Chain Variable Region

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105