



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0079693  
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)  
C07K 16/06 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7009676

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월29일

심사청구일자 2011년04월28일

(85) 번역문제출일자 2011년04월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/062651

(87) 국제공개번호 WO 2010/056550

국제공개일자 2010년05월20일

(30) 우선권주장

61/109,481 2008년10월29일 미국(US)

(71) 출원인

와이어쓰 엘엘씨

미합중국 뉴저지주 07940-0874 매디슨 파이브 저  
랄다 팜즈

(72) 별명자

브라운, 폴, 알.

미국 01810 매사추세츠주 앤도버 니콜라스 서클 4  
토블러, 스콧, 안드레아스

미국 02127 매사추세츠주 사우스 보스톤 이스트  
4번가 스트리트 #3 803  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

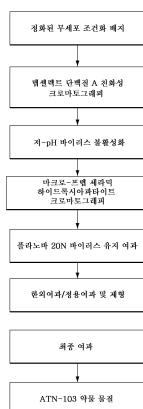
전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 단일 도메인 항원 결합 분자의 정제 방법

### (57) 요 약

상보적 항체 도메인 및 면역글로불린 불변 영역이 실질적으로 없는, 하나 이상의 단일 결합 도메인 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디 분자)을 포함하는 단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자를 단백질 A-기반 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제 또는 분리하는 공정 및 방법이 개시된다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

우드, 앤드류, 웨.

미국 02128 매사추세츠주 보스톤 웨스터 스트리트  
유닛 #3 264

뵈쉬, 오스틴, 웨인

미국 02144 매사추세츠주 셔머빌 아파트먼트 2 브  
로드웨이 783

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자가 단백질 A-기반 또는 양이온 교환-기반 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 지지체와 접촉시키는 단계;

하나 이상의 오염물을 제거하는 단계; 및

지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시키는 단계

를 포함하고, 이때 상기 SDAB 분자가 상보적 항체 가변 도메인 또는 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는, SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물로부터 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 오염물들 중 하나 이상을 제거하는 단계가 결합된 지지체를 SDAB 분자가 지지체에 결합되어 남는 조건 하에 세정하는 것을 포함하는 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 혼합물이 단백질 A-기반 지지체와 접촉되는 방법.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 오염물들 중 하나 이상을 제거하는 단계가 결합된 지지체를 하나 이상의 단백질 A 세정 완충제로 세정하는 것을 포함하고, 이때 상기 단백질 A 세정 완충제가 약 7 내지 7.5 범위의 pH로 약 100 내지 약 175 mM NaCl 및 약 40 내지 약 60 mM 트리스를 포함하는 방법.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시키는 단계가 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 단백질 A 용출 완충제로 용출시키는 것을 포함하고, 이때 상기 단백질 A 용출 완충제가 pH 4.0 이하로 약 5 내지 약 50 mM NaCl 및 약 5 mM 내지 약 100 mM 글리신을 포함하는 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 금속 친화성 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 바이러스 불활성화 또는 바이러스 제거 여과 중 하나 이상을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계 및 SDAB 분자를 히드록시아파타이트 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 혼합물을 양이온 교환 칼럼과 접촉시키는 단계, 및 SDAB 분자를 칼럼으로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 포유류 숙주 세포에서 생산된 재조합 단백질인 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 포유류 숙주 세포가 CHO 세포인 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물 내의 오염물이 고분자량 단백질 응집물, 숙주 세포 단백질, DNA, 또는 침출된 단백질 A 중 하나 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 적어도 90% 더 높은 순도로 정제되는 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질 A-기반 지지체가 고정된 재조합 또는 단리된 전장 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*) 단백질 A (SpA), 또는 이들의 기능적 변이체의 수지를 포함하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 전장 SpA가 도 4a에 제시된 서열 11의 아미노산 서열 또는 이와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, SpA의 기능적 변이체가 SpA의 도메인 B, 또는 하나 이상의 치환된 아스파라긴 잔기를 갖는 도메인 B의 변이체를 적어도 포함하는 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, SpA의 기능적 변이체가 도 4b에 제시된 서열 12의 아미노산 서열, 또는 이와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 혼합물이 양이온 교환-기반 지지체와 접촉되는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서,

SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 약 40 g/L 이상의 용량을 나타내는 양이온 교환 (CEX) 수지와 접촉시키는 단계;

SDAB 분자가 지지체를 통과하여 유동하도록 하고, 지지체를 하나 이상의 양이온 교환 세정 완충제로 세정하는 단계; 및

SDAB 분자를 용출 완충제로 용출시키는 단계

를 포함하는 방법.

#### 청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 칼럼에 로딩/loading)하는데 사용되는 조건 배지 (CM)의 전도율이 약 12 내지 9 mS/cm 사이이고, 로딩 조건의 pH가 약 4.5 이하로 조정되는 방법.

#### 청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 용출 완충제가 약 50 mM 이하의 염화나트륨이고, pH가 약 5.5 내지 7.2인 방법.

#### 청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 혼합물을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계 및 SDAB 분

자를 히드록시아파타이트 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 22

제21항에 있어서, 혼합물을 평형화 완충제로 예비-처리하는 단계 및 예비-처리된 혼합물을 히드록시아파타이트 수지를 통과하여 유동하도록 하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 혼합물과 히드록시아파타이트 수지의 접촉 단계 및 용출 단계가 pH 약 6.4 내지 7.6으로 약 1 내지 20 mM 인산나트륨 및 약 0.2 내지 2.5 M 염화나트륨을 포함하는 완충제 용액에서 실행되는 방법.

### 청구항 24

제22항에 있어서, 평형화 완충제가 pH 약 6.2 내지 8.0으로 약 1 내지 20 mM 인산나트륨, 약 0.01 내지 2.0 M 염화나트륨, 약 0 내지 200 mM 아르기닌, 약 0 내지 200 mM HEPES를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 SDAB 분자가 10% 미만의 고분자량 응집물을 함유하는 것인 방법.

### 청구항 26

단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자가 단백질 A-기반 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 혼합물을 단백질 A-기반 지지체와 접촉시키는 단계;

하나 이상의 오염물을 제거하는 단계;

지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시킴으로써, 용출된 SDAB 분자 제제를 수득하는 단계;

용출된 SDAB 분자 제제를 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계; 및

SDAB 분자를 히드록시아파타이트 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계

를 포함하고, 이때 상기 SDAB 분자가 상보적 항체 가변 도메인 또는 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는, SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물로부터 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법.

### 청구항 27

단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자가 단백질 A-기반 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 단백질 A-기반 지지체와 접촉시키는 단계;

하나 이상의 오염물을 제거하는 단계;

지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시킴으로써, 용출된 SDAB 분자 제제를 수득하는 단계;

용출된 SDAB 분자 제제를 평형화 완충제로 예비-처리하는 단계; 및

예비-처리된 혼합물을 히드록시아파타이트 수지를 통과하여 유동하도록 하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 SDAB 분자가 상보적 항체 가변 도메인 또는 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는, SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물로부터 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법.

### 청구항 28

단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 양이온 교환 지지체와 접촉시키고, SDAB 분자가 지지체를 통과하여 유동하도록 하고, 지지체를 하나 이상의 양이온 교환 세정 완충제로 세정하는 단계,

하나 이상의 오염물을 제거하는 단계;

지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시킴으로써, 용출된 SDAB 분자 제제를 수득하는 단계; 용출된 SDAB 분자 제제를 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계; 및 SDAB 분자를 히드록시아파타이트 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 SDAB 분자가 상보적 항체 가변 도메인 또는 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는, SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물로부터 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법.

### 청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 1개 이상의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 단일 사슬 폴리펩티드인 방법.

### 청구항 30

제29항에 있어서, SDAB 분자가 본래 경쇄가 없는 항체로부터의 1개 이상의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 방법.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 항체가 낙타류(camelid) 항체인 방법.

### 청구항 32

제29항에 있어서, SDAB 분자가 1가, 2가 또는 3가 분자인 방법.

### 청구항 33

제29항에 있어서, SDAB 분자가 단일특이적, 이중특이적 또는 삼중특이적 분자인 방법.

### 청구항 34

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 재조합 분자, CDR-그래프트(grafted) 분자, 인간화 분자, 낙타화 분자, 탈면역화 분자 및/또는 시험관 내에서 파지 디스플레이에 의해 선별된 분자인 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 방법.

### 청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 시토카인, 성장 인자 및 혈청 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 방법.

### 청구항 36

제35항에 있어서, SDAB 분자가 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )에 결합하는 방법.

### 청구항 37

제35항에 있어서, SDAB 분자가 인간 혈청 알부민 (HSA)에 결합하는 방법.

### 청구항 38

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 TNF  $\alpha$ 에 결합하는 2개의 낙타류 가변 영역 및 HSA에 결합하는 1개의 낙타류 가변 영역의 단일 사슬 폴리펩티드 융합물로 구성된 3가의 이중특이적 분자인 방법.

### 청구항 39

제38항에 있어서, SDAB 분자가 N-말단에서 C-말단으로 항-TNF  $\alpha$  SDAB 분자 - 항-HSA SDAB 분자 - 항-TNF  $\alpha$  SDAB 분자의 순서로 배열되는 방법.

### 청구항 40

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 문자가 서열 1의 아미노산 서열, 또는 이와 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 41

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 문자가, TNF  $\alpha$ 에 결합하고 서열 2 (DYWMY (CDR1)), 서열 3 (EINTNGLITKYPDSVKG (CDR2)) 및 서열 4 (SPSGFN (CDR3))의 아미노산 서열을 갖거나 또는 2개 미만의 보존적 아미노산 치환에 의해 상기 CDR들 중 하나와 상이한 CDR을 갖는 3개의 CDR을 포함하는 SDAB 문자 1개 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 42

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 문자가, TNF  $\alpha$ 에 결합하고 도 2에 제시된 서열 1의 대략 아미노산 1 내지 115의 아미노산 서열 또는 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하는 SDAB 문자 1개 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 43

제41항에 있어서, SDAB 문자가, HSA에 결합하고 SFGMS (CDR1; 서열 5), SISGSGSDTLYADSVKG (CDR2; 서열 6) 및/ 또는 GGSLSR (CDR3; 서열 7)의 아미노산 서열을 갖거나 또는 2개 미만의 보존적 아미노산 치환에 의해 상기 CDR들 중 하나와 상이한 CDR을 갖는 3개의 CDR을 포함하는 SDAB 문자 1개 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, SDAB 문자가, HSA에 결합하고 도 2에 제시된 서열 1의 대략 아미노산 125 내지 239의 아미노산 서열 또는 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열과 90% 이상 동일한 아미노산 서열을 갖는 가변 영역을 포함하는 SDAB 문자 1개 이상을 포함하는 방법.

#### 청구항 45

(없음)

#### 청구항 46

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 문자 중 2개 이상이 적어도 5개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개 또는 15개의 글리신 및 세린 잔기를 포함하는 연결 기로 융합된 방법.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, SDAB 문자 중 2개 이상이 서열 9의 아미노산 서열 ((Gly)<sub>4</sub>-Ser-(Gly)<sub>3</sub>-Ser)을 포함하는 연결 기로 융합된 방법.

#### 청구항 48

재조합 단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 문자를 코딩하는 핵산을 포함하는 포유류 숙주 세포를 제공하는 단계;

숙주 세포를 재조합 SDAB 문자가 발현되는 조건 하에 유지시키는 단계;

재조합 SDAB 문자 및 하나 이상의 오염물의 혼합물을 수득하는 단계;

상기 혼합물로부터 단백질 A-기반 또는 양이온 교환 기반 크로마토그래피를 사용하여 재조합 SDAB 문자를 정제 또는 분리하는 단계;

를 포함하며, 이때 상기 정제 또는 분리 단계가

SDAB 문자가 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 혼합물을 지지체와 접촉시키는 단계;

하나 이상의 오염물을 제거하는 단계; 및

지지체로부터 SDAB 문자를 선택적으로 용출시킴으로써, 용출된 SDAB 문자 제제를 수득하는 단계

를 포함하고, 상기 SDAB 문자가 상보적 항체 가변 도메인 또는 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는 것인,

하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 재조합 SDAB 분자를 제공하는 방법 또는 공정.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 용출된 SDAB 분자 제제를 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 금속 친화성 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 또는 바이러스 제거 여과 중 하나 이상에 적용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 제약 조성물로서 재조합 SDAB 분자의 제형을 제조하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 용출된 SDAB 분자를 미리 선택된 표적 부피로 농축시는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 히스티딘 완충제 또는 트리스 완충제의 존재 하에 한외여과/정용여과 단계를 수행함으로써 농축 단계가 달성되는 방법.

#### 청구항 53

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, SDAB 분자가 적어도 약 80 g/L 내지 350 g/L로 농축되는 방법.

#### 청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항의 방법에 의해 정제된 SDAB 분자.

#### 청구항 55

제51항의 SDAB 분자를 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 56

질환을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양으로 제54항의 SDAB 분자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2008년 10월 29일 출원된 미국 일련 번호 61/109,481을 우선권으로 청구하고, 이의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 제출되고 전체적으로 본원에 참고로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2009년 10월 28일에 생성된 상기 ASCII 복사본의 명칭은 w223738w.txt이고, 이의 크기는 12,853 바이트이다.

#### 배경기술

[0005] 배경기술

[0006] 항체와 같은 재조합 단백질은 단백질 생성물이 제약상 허용가능하기 전에 제거될 필요가 있는 다양한 불순물을 전형적으로 함유한다. 이러한 불순물들 중 일부는 숙주 세포 단백질 (HCP), DNA 분자, 변이체 및/또는 미스폴드(misfolded) 형태의 생성물 단백질, 고분자량 응집물 (HMWA)을 포함할 수 있다. 응집물의 형성은 항체 생산 동안 문제가 되는데, 투여 시 보체 활성화 또는 아나필락시스를 야기함으로써 생성물 안전성에 불리하게 영향을

미칠 수 있기 때문이다. 응집물 형성은 감소된 생성물 수율, 피크 확대 및 활성 손실을 야기함으로써 제조 공정을 또한 방해할 수 있다. 이러한 불순물들은 여러 크로마토그래피 양식에서 체류 패턴이 광범위할 수 있다. 이같은 광범위한 스펙트럼의 불순물의 제거는 종종 어렵고, 여러 크로마토그래피 양식을 수반하는 다중 단계를 전형적으로 필요로 한다.

[0007] 정제될 단백질과 오염물 사이의 크기, 전하 및 용해도 차이를 기초로 통상적인 단백질 정제 방법이 예상된다. 이러한 파라메터들을 기초로 하는 프로토콜에는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 그러나, 때때로 이러한 크로마토그래피 방법들은 응집된 종 또는 다양체성 종의 항체들의 분리에서 기술적 어려움을 나타낸다. 이온 교환 및 소수성 상호작용 크로마토그래피와 같은 기술은, 예를 들어, 증가된 단백질 농도 또는 용출 동안 요구되는 완충제 농도 및/또는 pH에서의 변화로 인한 응집물의 형성을 유도할 수 있다. 추가로, 여러 예에서, 항체들이 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리되기에는 너무 작은 등전점 차이를 나타낸다 ([Tarditi, J. Immunol. Methods 599:13-20 (1992)]). 크기 배제 크로마토그래피는 성가신 경향이 있고, 생성물의 상당한 희석을 초래하며, 이는 대규모의 효율-기반 제조 공정에서 방해가 된다. 친화성 크로마토그래피 칼럼으로부터의 리간드의 누출이 또한 발생할 수 있고, 이는 용출된 생성물의 바람직하지 않은 오염을 초래한다 ([Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69 (2000)]).

[0008] 여러 상이한 크로마토그래피 양식들이 재조합 단백질의 정제 동안 사용될 수 있지만, 사용되는 크로마토그래피 단계의 수를 감소시키고 재조합 단백질의 생물학적 활성을 파괴하거나 유의하게 감소시키지 않는 정제 공정을 개발하는 것이 여전히 요구된다.

## 발명의 내용

### 발명의 개요

[0009] 본 발명은, 부분적으로, 단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자가 단백질 A 또는 이의 기능성 변이체와 상호작용함으로써, 예를 들어, 이에 결합함으로써, SDAB 분자의 정제에서 단백질 A-기반 친화성 크로마토그래피를 사용할 수 있게 한다는 발견을 기초로 한다. 또 다른 실시양태에서, SDAB 분자를 또 다른 크로마토그래피 기술, 예컨대 이온 (예를 들어, 양이온) 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. SDAB 분자는 하나 이상의 표적 단백질 (예를 들어, 종양 피사 인자 및/또는 인간 혈청 알부민)과 상호작용하는, 예를 들어, 이에 결합하는 하나 이상의 단일 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, SDAB 분자는 상보적 항체 도메인 및/또는 면역글로불린 불변 영역이 실질적으로 없는, 하나 이상의 나노바디(nanobody) 분자로 구성된 단일 사슬 폴리펩티드이다. 따라서, 본 발명은 단백질 A-기반 친화성 크로마토그래피 및 이온 (예를 들어, 양이온) 교환 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 기술을 개별적으로 또는 조합하여 사용하여, 하나 이상의 단일 결합 도메인 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디 분자)을 포함하는 SDAB 분자를 정제 또는 분리하는 공정 및 방법에 관한 것이다.

[0010] [주: 나노바디(Nanobody)<sup>TM</sup> 및 나노바디즈(Nanobodies)<sup>TM</sup>은 애블링스 엔.브이.(Ablynx N.V.)의 등록 상표이다]

[0011] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물 (본원에서 "SDAB 분자 제제"로 또한 지칭됨)로부터 SDAB 분자 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디 분자)를 분리 또는 정제하는 방법 또는 공정을 특징으로 한다. 이러한 방법 또는 공정은 SDAB 분자가 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 혼합물을 단백질 A-기반 지지체 또는 이온 (예를 들어, 양이온) 교환 (CEX) 지지체와 접촉시키는 단계; 예를 들어, 결합된 지지체를 SDAB 분자가 지지체에 결합되어 남는 조건 하에 세정함으로써 (예를 들어, 결합된 지지체를 하나 이상의 단백질 A 또는 CEX 세정 완충제로 세정함으로써), 하나 이상의 오염물을 제거하는 단계; 및 예를 들어, 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 단백질 A 또는 CEX 용출 완충제로 용출시킴으로써, 지지체로부터 SDAB 분자를 선택적으로 용출시키는 단계를 포함한다.

[0012] 한 실시양태에서, SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법은 SDAB 분자와 하나 이상의 오염물의 혼합물을 양이온 교환 지지체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, SDAB 분자를 분리 또는 정제하는 방법은 SDAB 분자와 하나 이상의 오염물의 혼합물을 단백질 A-기반 수지와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0014] 이러한 방법 또는 공정은 단독으로, 또는 히드록시아파타이트, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래

피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 금속 친화성 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 바이러스 불활성화 (예를 들어, 저-pH를 사용함) 및/또는 바이러스 제거 여과 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 또 다른 정제 방법과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법 또는 공정이 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 한외여과, 바이러스 불활성화 (예를 들어, 저-pH를 사용함) 및/또는 바이러스 제거 여과 중 하나 이상과 조합되어 사용될 수 있다. 단백질 A-지지체가 사용되는 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 이온 (예를 들어, 양이온 또는 음이온) 교환 크로마토그래피를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 실시양태들에서, 이러한 방법 또는 공정은 혼합물을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계 및 SDAB 분자를 히드록시아파타이트 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 추가로 포함한다. 단백질 A-지지체가 사용되는 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 혼합물을 양이온 교환 (CEX) 칼럼과 접촉시키는 단계, 및 SDAB 분자를 칼럼으로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 상기 언급된 방법 및 공정들의 실시양태들은 하기의 특색들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0018] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자는 SDAB 분자 및 세포 배양 오염물을 포함하는 혼합물 내의 세포 배양물, 예를 들어, 숙주 세포 (예를 들어, 포유류 세포, 예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포)의 생성물로서 생산된 재조합 단백질이다. 세포 배양물은 소규모 또는 대규모 배양물일 수 있다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 혼합물 내의 오염물에는 고분자량 단백질 응집물, 숙주 세포 단백질, DNA, 및/또는 단백질 A (예를 들어, 침출된 단백질 A) 중 하나 이상이 포함된다. 실시양태들에서, SDAB 분자는 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 이보다 높은 %의 순도로 정제된다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에서 사용되는 단백질 A-기반 지지체에는 고정된 단백질 A (예를 들어, 재조합 단백질 A 또는 단리된 단백질 A), 또는 이의 기능적 변이체의 지지체, 예를 들어, 수지가 포함된다. 한 실시양태에서, 고정된 단백질 A는 N-말단으로부터의 순서로 E, D, A, B 및 C 도메인으로 공지된 아미노산 잔기 약 50-60개의 도메인 5개로 구성된 전장 스타필로코쿠스(Staphylococcus) 단백질 A (SpA)이다. 예를 들어, 단백질 A는 도 4a에 제시된 SpA의 아미노산 서열 (서열 11), 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, 도 4a에 제시된 서열 11의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하여 동일한 아미노산 서열)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 고정된 단백질 A는 E, D, A, B 및/또는 C 또는 이의 변형 형태로부터 선택된 1개 이상의 도메인을 포함하는 SpA의 기능적 변이체이다. 예를 들어, SpA의 기능적 변이체는 SpA의 도메인 B, 또는 하나 이상의 치환된 아스파라긴 잔기를 갖는 도메인 B의 변이체 (본원에서 도메인 Z로 또한 지칭됨)를 적어도 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, SpA의 기능적 변이체는 도 4b에 제시된 서열 12의 아미노산 서열, 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, 도 4b에 제시된 서열 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하여 동일한 아미노산 서열)을 포함한다. 도메인 B 또는 도메인 B의 변이체, 및 도메인 A 및/또는 C; 도메인 E, A 및/또는 C; 또는 도메인 E, D, A 및/또는 C 중 하나 이상을 포함하는 단백질 A의 기능적 변이체들의 또 다른 순열이 사용될 수 있다. 조합물이 SDAB 분자에 결합할 수 있는 한, E, D, A, B 및/또는 C, 또는 이들의 기능적 변이체의 임의의 조합물이 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 단백질 A 지지체 수지에는 맵셀렉트(MabSELECT)™ 칼럼, 맵셀렉트™ 슈어(MabSELECT™ SuRe) 칼럼, 맵셀렉트™ 엑스트라(MabSELECT™ Xtra) (GE Healthcare Products), 및 프로셉™ 바 울트라 플러스((ProSep™ Va Ultra Plus) (Millipore Corporation, Billerica MA)가 포함된다.

[0021] 단백질 A-기반 지지체가 본 발명의 방법 또는 공정에서 사용되는 한 실시양태에서, SDAB 분자와 오염물의 혼합물이 SDAB 분자가 단백질 A-기반 지지체에 결합하거나 흡착되도록 하는 조건 하에 단백질 A-기반 지지체와 접촉되고, 예를 들어, 지지체 상에 로딩/loading)된다. 특정 실시양태에서, 조건화 배지를 포함하는 단백질 A 로딩 완충제가 사용된다. 단백질-A 칼럼이 약 6 내지 8 범위의 pH로 약 10 내지 약 250 mM NaCl 및 약 10 내지 약 100 mM 트리스(Tris); 약 6.5 내지 7.5 범위의 pH로 약 200 mM NaCl 및 약 20 내지 약 75 mM 트리스; 약 7 내지 7.5 내지 7.5 범위의 pH로 약 100 내지 약 175 mM NaCl 및 약 40 내지 약 60 mM 트리스; 약 7 내지 7.5 범위의 pH로 약 125 내지 약 160 mM NaCl 및 약 45 내지 약 55 mM 트리스; 약 7.5 범위의 pH로 약 50 내지 약 150 mM NaCl 및 약 50 mM 트리스; 또는 약 6.5, 7.0, 7.5 또는 8.0 범위의 pH로 약 150 mM NaCl 및 약 50 mM 트리스를 포함하는 단백질 A 평형화 용액을 사용하여 평형화될 수 있다.

[0022] 단백질 A-기반 지지체가 본 발명의 방법 또는 공정에서 사용되는 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 결합된 지지체를 SDAB 분자가 지지체에 결합되어 남는 조건 하에 세정함으로써 (예를 들어, 결합된 지지체를 하나 이상의

단백질 A 세정 완충제로 세정함으로써), 혼합물의 하나 이상의 오염물이 제거된다. 특정 실시양태에서, 단백질 A 세정 완충제는 약 6 내지 8 범위의 pH로 약 10 내지 약 250 mM NaCl 및 약 10 내지 약 100 mM 트리스; 약 6.5 내지 7.5 범위의 pH로 약 50 내지 약 200 mM NaCl 및 약 20 내지 약 75 mM 트리스; 약 7 내지 7.5 범위의 pH로 약 100 내지 약 175 mM NaCl 및 약 40 내지 약 60 mM 트리스; 약 7 내지 7.5 범위의 pH로 약 125 내지 약 160 mM NaCl 및 약 45 내지 약 55 mM 트리스; 약 7.5 범위의 pH로 약 50 내지 약 150 mM NaCl 및 약 50 mM 트리스; 또는 약 6.5, 7.0, 7.5, 또는 8.0 범위의 pH로 약 150 mM NaCl 및 약 50 mM 트리스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 pH 7.5로 50 mM NaCl 및 50 mM 트리스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 또는 500 mM NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 또는 500 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 또는 500 mM 트리스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 또는 500 mM 시트레이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제는 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 또는 500 mM HEPES를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세정 완충제의 pH는 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 또는 9.0이다.

[0023] 단백질 A-기반 지지체가 본 발명의 방법 또는 공정에서 사용되는 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 단백질 A 용출 완충제로 용출시킴으로써, SDAB 분자가 지지체로부터 선택적으로 용출된다. 일부 실시양태에서, 용출 완충제는 pH 4.0 이하로 약 5 내지 약 50 mM NaCl 및 약 5 mM 내지 약 100 mM 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용출 완충제는 약 10 mM, 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 150 mM, 약 200 mM, 약 250 mM, 약 300 mM, 약 350 mM, 약 400 mM, 약 450 mM, 또는 약 500 mM NaCl; 약 10 mM, 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 150 mM, 약 200 mM, 또는 약 250 mM 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용출 완충제의 pH는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 또는 4.0이다. 특정 실시양태에서, 단백질 A 용출 완충제는 약 3.0의 pH로 약 10 mM NaCl 및 약 50 mM 글리신을 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 세라믹 히드록시아파타이트 크로마토그래피가 본 발명의 방법 또는 공정에서 단백질 A 크로마토그래피와 조합되어 사용된다. 세라믹 히드록시아파타이트 크로마토그래피는 단백질 A 기반 크로마토그래피 전에, 또는 더욱 빈번하게는 단백질 A 기반 크로마토그래피 후에 사용될 수 있다. 이같은 실시양태에서, 이러한 방법은 SDAB 분자의 혼합물 (예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피로의 분리 또는 정제 후의 혼합물)을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계 및 SDAB 분자를 수지로부터 선택적으로 용출시키는 단계를 포함한다. 별법적으로, 혼합물을 평형화 완충제로 예비-처리한 후, 히드록시아파타이트 수지를 통과하여 유동하도록 할 수 있다. 이러한 방법들 중 어느 한쪽이 혼합물을 정제하기 위해 조합되어 또한 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 용출 및 로딩 완충제는 약 1 내지 약 20 mM 인산나트륨 및 약 0.2 내지 약 2.5 M 염화나트륨을 포함하고, 이때 용출 및 로딩 완충제의 pH는 약 6.4 내지 약 7.6이다. 또 다른 실시양태에서, 평형화 완충제 및 세정 완충제는 약 1 내지 약 20 mM 인산나트륨, 약 0.01 내지 약 2.0 M 염화나트륨, 약 0 내지 약 200 mM 아르기닌, 및 약 0 내지 약 200 mM HEPES를 포함하고, 이때 평형화 및 세정 완충제의 pH는 약 6.2 내지 8.0이다. 실시양태들에서, 생성된 정제된 SDAB 분자는 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 이보다 낮은 % 이하의 고분자량 응집물을 함유한다.

[0025] 또 다른 실시양태에서, 이온 교환 크로마토그래피가 본원에 기술된 바와 같은 단백질 A 크로마토그래피 및/또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피 중 하나 또는 양쪽 모두와 조합되어 사용된다. 단백질 A 크로마토그래피가 이온 교환 크로마토그래피 전에 수행되는 예시적인 방법 또는 공정은 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 단백질 A 지지체와 접촉시키는 단계, SDAB 분자가 지지체에 흡착되도록 하는 단계, 지지체 및 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 단백질 A 세정 완충제로 세정하는 단계, 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 단백질 A 용출 완충제로 용출시킴으로써 SDAB 분자 제제를 수집하는 단계를 포함한다. 이러한 방법 또는 공정은 SDAB 분자 제제를 이온 교환 지지체와 접촉시키는 단계, SDAB 분자가 지지체를 통과하여 유동하도록 하는 단계, 지지체를 하나 이상의 이온 교환 세정 완충제로 세정함으로써 이온 교환 통과-유동물을 수집하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 이온 교환 통과-유동물을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계, 통과-유동물이 수지에 흡착되도록 하는 단계, 수지를 하나 이상의 히드록시아파타이트 세정 완충제로 세정하는 단계, 및 정제된 SDAB 분자를 하나 이상의 히드록시아파타이트 용출 완충제로 수지로부터 용출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0026]

또 다른 실시양태에서, 이온 (예를 들어, 양이온) 교환 크로마토그래피 (CEX)가 단독으로, 또는 또 다른 수지, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피 및/또는 세라믹 히드록시아파타이트 크로마토그래피 중 하나 또는 양쪽 모두와 조합되어 사용된다. 이러한 방법 또는 공정은 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 이온 교환 지지체와 접촉시키는 단계, SDAB 분자가 지지체를 통하여 유동하도록 하는 단계, 지지체를 하나 이상의 이온 (예를 들어, 양이온) 교환 세정 완충제로 세정하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 양이온 교환 지지체는 캡토(Capto)<sup>TM</sup> S (GE Healthcare), 프락토겔(Fractogel)<sup>®</sup> SO3-(M) (EMD Chemicals), 토요펄<sup>®</sup> 기가캡((Toyopearl<sup>®</sup> Gigacap) S-650M (Tosoh Bioscience) 또는 포로스(Poros)<sup>®</sup> HS 50 (Applied Biosystems)으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, CEX 수지는 적어도 약 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 또는 60 g/L의 용량을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 칼럼에 로딩하는데 사용되는 조건 배지 (CM)의 전도율은 약 15 내지 5 mS/cm 사이, 14 내지 6 mS/cm 사이, 13 내지 8 mS/cm 사이, 12 내지 9 mS/cm 사이, 또는 11 내지 10 mS/cm 사이, 또는 약 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 또는 13 mS/cm이다. 또 다른 실시양태에서, 로딩 조건의 pH는 약 6, 5.5, 5, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1, 4, 3.9, 3.8, 또는 3.7 이하로 조정된다. 실시양태들에서, 용출 완충제는 약 100 mM 이하의 염화나트륨, 약 90 mM 이하의 염화나트륨, 약 80 mM 이하의 염화나트륨, 약 70 mM 이하의 염화나트륨, 약 60 mM 이하의 염화나트륨, 약 50 mM 이하의 염화나트륨, 약 40 mM 이하의 염화나트륨, 또는 약 30 mM 이하의 염화나트륨, 20 mM 이하의 염화나트륨, 약 10 mM 이하의 염화나트륨, 약 5 mM 이하의 염화나트륨, 약 1 mM 이하의 염화나트륨이고, pH가 약 4 내지 8, 약 5 내지 7.5, 약 5.5 내지 7.2, 약 6 내지 7.1, 또는 약 6.5 내지 7, 또는 약 5, 5.5, 6, 6.5, 또는 7이다. 또 다른 실시양태에서, 하류 cHA 평형화 완충제를 사용하여 CEX 칼럼이 또한 용출될 수 있다.

[0027]

특정 실시양태에서, 양이온 교환 크로마토그래피가 SDAB 정제에서 사용되는 유일한 크로마토그래피 방법이다. 또 다른 실시양태에서, 양이온 교환 크로마토그래피가 또 다른 크로마토그래피 방법 (예를 들어, 히드록시아파타이트 크로마토그래피)과 조합되어 사용된다. 양이온 교환 크로마토그래피가 수행되는 예시적인 방법 또는 공정은 로딩 완충제 또는 조건화 배지의 전도율을 감소시키는 조건 (예를 들어, 약 15 내지 5 mS/cm, 14 내지 6 mS/cm, 13 내지 8 mS/cm, 12 내지 9 mS/cm, 또는 11 내지 10 mS/cm, 또는 약 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 또는 13 mS/cm의 조건) 하에 SDAB 분자 및 하나 이상의 오염물을 함유하는 혼합물을 양이온 교환 지지체와 접촉시키는 단계, SDAB 분자가 지지체에 흡착되도록 하는 단계, 지지체 및 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 양이온 교환 세정 완충제로 세정하는 단계, 흡착된 SDAB 분자를 하나 이상의 용출 완충제로 용출시킴으로써 SDAB 분자 제제를 수집하는 단계를 포함한다. 이러한 방법 또는 공정은 SDAB 분자 제제를 또 다른 지지체 또는 수지와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어, 이러한 방법 또는 공정은 이온 교환 통과-유동물을 히드록시아파타이트 수지와 접촉시키는 단계, 통과-유동물이 수지에 흡착되도록 하는 단계, 수지를 하나 이상의 히드록시아파타이트 세정 완충제로 세정하는 단계, 및 정제된 SDAB 분자를 하나 이상의 히드록시아파타이트 용출 완충제로 수지로부터 용출시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0028]

또 다른 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은, 예를 들어, 한외여과/정용여과 단계를 수행함으로써, 용출된 SDAB 분자를 미리 설정된 표적 부피로 농축시키는 단계를 추가로 포함한다. 농축 단계는 용출된 SDAB 분자의 완충제를 교환하는데 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 농축된, 용출된 SDAB 분자를 히스티딘 완충제 또는 트리스 완충제의 존재 하에 여과할 수 있고, 예를 들어, 정용여과할 수 있다. 히스티딘 완충제가 사용되는 실시양태에서, 완충제의 농도는 pH 약 7, 약 6, 약 5, 약 4, 약 3, 또는 약 4 내지 6.5, 약 5 내지 6, 약 5.9, 약 5.8, 약 5.7, 약 5.6, 또는 약 5.5 범위로 적어도 약 5 내지 30 mM, 약 7.5 내지 28 mM, 약 10 내지 20 mM, 약 12 내지 15 mM, 또는 약 10 mM, 약 11 mM, 약 12 mM, 약 13 mM, 약 14 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 28 mM이다. 실시양태들에서, 소량의 농축된 제형 완충제가 용출된, 농축된 SDAB 분자에 첨가된다 (예를 들어, 적어도 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20% v/v의 농축된 제형 완충제). 실시양태들에서, 농축된 제형 완충제는 약 10 내지 50 mM 히스티딘 (예를 들어, 약 20 mM, 약 30 mM 히스티딘, 약 10 내지 60% 당 (예를 들어, 수크로스, 소르비톨 또는 트레할로스), 예를 들어, 약 50% 수크로스, 및 약 0.001 내지 약 0.1% (예를 들어, 약 0.06%)의 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트 80)이다. SDAB 분자에 대한 예시적인 제형이 와이어쓰(Wyeth)의 이름으로 2008년 10월 29일 출원된 USSN 12/608,553에 기술되어 있고, 이의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0029]

실시양태들에서, SDAB 분자는 적어도 약 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 80 g/L, 90 g/L g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 210 g/L, 220 g/L, 230 g/L, 240 g/L, 250 g/L, 260 g/L, 270 g/L, 280 g/L, 290 g/L, 300 g/L, 310 g/L, 320 g/L, 330 g/L, 340 g/L, 350 g/L 또는 이보다 높은 g/L로 농축된다.

- [0030] 특정 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 SDAB 문자의 순도, 활성, 독성, 약동학 및/또는 약역학 중 하나 이상의 파라메터를 평가 (예를 들어, 검출, 정량 및/또는 모니터링)하는 단계; (임의적으로) 하나 이상의 파라메터를 기준 값과 비교함으로써 SDAB 문자를 평가 또는 선택하는 단계를 포함한다. 비교는 하나 이상의 파라메터가 기준 값과 미리 선택된 관계를 지니는지를 결정하는 단계, 예를 들어, 기준 값 범위 (범위의 종점을 포함하거나 또는 배제함) 내에 속하는지 또는 기준 값과 동등한지 또는 이보다 큰지를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 파라메터가 미리 선택된 관계를 충족시키면, 예를 들어, 기준 값 내에 속하면, SDAB 문자가 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 파라메터와 기준 값 사이의 미리 선택된 관계가 충족되는지 여부의 분석법, 방법, 또는 지시가, 예를 들어 컴퓨터 판독가능 매체에서, 기록 또는 제출된다. 미리 선택된 관계를 충족시키는 것의 이같은 방법, 분석법 또는 지시가 제품 삽입물, 개론 (예를 들어, 미국 약전), 또는 임의의 또 다른 물질, 예를 들어, 시판용으로 또는 미국 또는 외국 규제 기관에 대한 의뢰를 위해 예를 들어 배포될 수 있는 표지 상에 열거될 수 있다.
- [0031] 한 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 결정된 값을 기준값과 비교함으로써, 제조 공정을 분석하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0032] 한 실시양태에서, 이러한 방법은 분석에 적어도 부분적으로 의존하여 제조 공정을 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 이러한 방법은 분석을 기초로 제조 공정을 변경하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 본원에 기술된 방법 또는 분석을 기초로 공정에 관한 결정을 내리는 단계를 포함하는, 선택된 공정에 의해 제조된 SDAB 문자, 예를 들어, TNF 나노바디 문자의 공정, 예를 들어, 제조 공정을 평가하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 이러한 방법은 방법 또는 분석을 적어도 부분적으로 기초로 하여 제조 공정을 유지하거나 변경하는 단계를 추가로 포함한다. 따라서, 또 다른 실시양태에서, 평가 관계자는 본원에 기술된 방법 또는 분석을 실행하지 않고, 단지 본원에 기술된 방법 또는 분석에 의해 수득된 결과에 의존한다.
- [0034] 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 배치(batch)-대-배치 변동을 모니터링 또는 제어하는 방법에서 또는 제제를 기준 표준물과 비교하기 위해 2개 이상의 제제를 비교하는 단계를 포함한다.
- [0035] 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 결정을 적어도 부분적으로 기초로 하여, 예를 들어, 제제를 분류하거나, 선택하거나, 허용 또는 폐기하거나, 발매 또는 보류하거나, 약물 제품으로 가공하거나, 선적하거나, 상이한 위치로 이동시키거나, 제형하거나, 표지하거나, 포장하거나, 시판하거나, 판매하거나 또는 판매용으로 제공하는 결정을 내리는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 규제 요건, 예를 들어, 규제 기관, 예를 들어, FDA의 승인후 요건에 따르는 방법을 특색으로 한다. 이러한 방법은 본원에 기술된 바와 같은, SDAB 문자의 파라메터의 평가를 제공하는 단계를 포함한다. 승인후 요건은 상기 파라메터들 중 하나 이상의 측정을 포함할 수 있다. 이러한 방법은, 임의적으로, 관찰된 용액 파라메터가 미리 선택된 기준을 충족시키는지 여부 또는 파라메터가 미리 선택된 범위 내에 있는지 여부를 결정하는 단계; 임의적으로, 예를 들어, 값 또는 결과를 규제 기관에 전송함으로써, 분석 값 또는 결과를 제출하거나 기관과 소통하는 단계를 또한 포함한다.
- [0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 보고서-수신 단체에게 보고서를 제공함, SDAB 문자, 예를 들어, TNF 나노바디 문자의 샘플을 기준 규격, 예를 들어, FDA 요건의 준수에 대해 평가함, SDAB 문자의 제제가 일부 미리 규정된 요건을 충족시킨다는 지시를 또 다른 관계인으로부터 조사함, 또는 SDAB 문자의 제제에 관한 정보를 또 다른 관계자에게 제출함 중 하나 이상의 방법을 특색으로 한다. 예시적인 수신 단체 또는 또 다른 관계자에는 정부, 예를 들어, 미국 연방 정부, 예를 들어, 정부 기관, 예를 들어, FDA가 포함된다. 이러한 방법은 하기 단계들 중 하나 이상 (또는 모두)를 포함한다; 제1 국가, 예를 들어, 미국에서 SDAB 문자의 수성 제형을 제조 및/또는 테스트하는 단계; 제1 국가 밖으로 분취량의 샘플을 보내는 단계, 예를 들어, 이를 미국 밖의 제2 국가로 보내는 단계; SDAB 문자의 제제의 구조에 관한 데이터, 예를 들어, 본원에 기술된 구조 및/또는 사슬에 관한 데이터, 예를 들어, 본원에 기술된 방법들 중 하나 이상에 의해 생성된 데이터를 포함하는 보고서를 제조하거나 수신하는 단계; 및 상기 보고서를 보고서 수신 단체에게 제공하는 단계.
- [0038] 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 문자, 예를 들어, 나노바디 문자 (예를 들어, TNF-결합 나노바디 문자)는 하나 이상의 단일 결합 도메인 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 나노바디 문자는 1개 이상의 면역글로불린 가변 도메인 (1개, 2개 또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR) 포함)을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어, 단일 사슬 폴리펩티드를 포함하거나 또는 이로 구성될 수

있다. SDAB 분자의 예로는 천연적으로 경쇄가 없는 분자 (예를 들어, VHH, 나노바디, 또는 낙타류(camelid) 유래 항체)가 포함된다. 이같은 SDAB 분자는 낙타, 라마, 단봉낙타, 알파카 및 과나코와 같은 낙타류로부터 유래 또는 수득될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, SDAB 분자는 또 다른 천연 발생 단일 도메인 분자, 예컨대 상어 단일 도메인 폴리펩티드 (IgNAR); 및 단일 도메인 스캐폴드(scaffold) (예를 들어, 피브로넥틴 스캐폴드)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 단일 도메인 분자를 포함할 수 있다. 상어로부터 단일 도메인 분자가 유래될 수 있다.

[0039]

한 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자는 하나 이상의 단일 도메인 분자로 구성된 단일 사슬 폴리펩티드이다. 실시양태들에서, 나노바디 분자는 1가 또는 다가 (예를 들어, 2가, 3가, 또는 4가)이다. 또 다른 실시양태에서, 나노바디 분자는 단일특이적 또는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 또는 사중특이적)이다. SDAB 분자는 재조합 분자, CDR-그래프트(grafted) 분자, 인간화 분자, 낙타화 분자, 탈면역화 분자 및/또는 시험관 내에서 생성된 (예를 들어, 파지 디스플레이에 의해 선별된) 분자인 하나 이상의 단일 도메인 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, SDAB 분자는 하나 이상의 표적 항원에 결합하는 하나 이상의 단일 도메인 분자를 포함하는 단일 사슬 융합 폴리펩티드일 수 있다. 전형적으로, 표적 항원은 포유류, 예를 들어, 인간의 단백질이다. 특정 실시양태에서, SDAB 분자는 혈청 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민 (인간 혈청 알부민 (HSA)), 피브린, 피브리노겐 또는 트랜스페린 중 하나 이상으로부터 선택된 인간 혈청 단백질에 결합한다.

[0040]

한 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자는 표적 항원, 예를 들어, 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )에 결합하는 2개의 단일 도메인 분자 (예를 들어, 2개의 낙타류 가변 영역), 및 혈청 단백질, 예를 들어, HSA에 결합하는 1개의 단일 도메인 분자 (예를 들어, 낙타류 가변 영역)의 단일 사슬 폴리펩티드 융합물로 구성된 3가의 이중특이적 분자이다. SDAB 분자의 단일 도메인 분자들은 N-말단에서 C-말단으로 하기의 순서로 배열될 수 있다: TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자 - HAS-결합 단일 도메인 분자 - TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자. 하나 이상의 표적에 대한 단일 도메인 분자들의 임의의 순서 또는 조합이 본원에 기술된 바와 같이 제형될 수 있음이 이해될 것이다.

[0041]

한 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자는 본원에서 "ATN-103"으로 지칭되고, 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열, 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하여 동일한 아미노산 서열)을 포함하거나, 이러한 서열로 구성된다. 본원에 기술된 바와 같이 제형될 수 있는 추가적인 3가의 이중특이적 나노바디 분자의 예로는 WO 2006/122786의 표 29에 개시된 TNF24, TNF25, TNF26, TNF27, TNF28, TNF60 및 TNF62가 포함된다.

[0042]

특정 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자의 단일 도메인 분자 1개 이상이 TNF  $\alpha$ 에 결합하고, DYWMY (CDR1), EINTNGLITKYPDSVKG (CDR2) 및/또는 SPSGFN (CDR3)의 아미노산 서열을 갖거나 또는 3개, 2개 또는 1개 미만의 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 치환)에 의해 상기 CDR들 중 하나와 상이한 CDR을 갖는 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 대략 아미노산 1 내지 115의 아미노산 서열 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하여 동일한 아미노산 서열)을 갖는 가변 영역을 포함한다. 실시양태들에서, TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 항체 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 지닌다. 예를 들어, TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자가 인식하는 에피토프와 동일하거나 유사한 에피토프에 결합한다 (예를 들어, 삼량체성 형태의 TNF  $\alpha$ 에 결합함; TNF 수용체에 접촉하는 TNF  $\alpha$  부위에 결합함; 제1 TNF 단량체 (단량체 A) 상의 위치 88의 Glu 및 위치 90의 Lys 및 제2 TNF 단량체 (단량체 B) 상의 위치 146의 Glu를 포함하는 TNF  $\alpha$  삼량체 내의 에피토프, 또는 WO 06/122786에 개시된 바와 같은 에피토프에 결합함). 또 다른 실시양태에서, TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자는 WO 06/122786에 개시된 임의의 TNF  $\alpha$ -결합 단일 도메인 분자와 유사한 활성 (예를 들어, 결합 친화력, 해리 상수, 결합 특이성, TNF-억제 활성)을 지닌다.

[0043]

또 다른 실시양태에서, TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 나노분자들 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 1가, 2가, 3가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자일 수 있다. 예시적인 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디에는 TNF1, TNF2, TNF3, 이들의 인간화 형태 (예를 들어, TNF29, TNF30, TNF31, TNF32, TNF33)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 1가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디의 추가적인 예가 WO 2006/122786의 표 8에 개시되어 있다. 예시적인 2가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자에는 단일 융합 폴리펩티드를 형성하도록 펩티드 링커를 통해 연결된 2개의 TNF30 나노바디를 포함하는 TNF55 및 TNF56가 포함

되지만, 이에 한정되지는 않는다 (WO 2006/122786에 개시되어 있음). 2가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자의 추가적인 예가 WO 2006/122786의 표 19에 TNF4, TNF5, TNF6, TNF7, TNF8로서 개시되어 있다.

[0044] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자의 단일 도메인 분자 1개 이상이 HSA에 결합하고, SFGMS (CDR1), SISGSGSDTLYADSVKG (CDR2) 및/또는 GGSLSR (CDR3)의 아미노산 서열을 갖거나 또는 3개, 2개 또는 1개 미만의 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 치환)에 의해 상기 CDR들 중 하나와 상이한 CDR을 갖는 1개, 2개 또는 3개의 CDR을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 대략 아미노산 125 내지 239의 아미노산 서열 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, 도 2에 제시된 서열 1의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하여 동일한 아미노산 서열)을 갖는 가변 영역을 포함한다. 실시양태들에서, HSA-결합 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 HSA-결합 단일 도메인 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 지닌다. 예를 들어, HSA-결합 단일 도메인 분자는 도 2에 제시된 서열 1의 HSA-결합 단일 도메인 분자가 인식하는 에피토프와 동일하거나 유사한 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, HSA-결합 단일 도메인 분자는 WO 06/122786에 개시된 임의의 HSA-결합 단일 도메인 분자와 유사한 활성 (예를 들어, 결합 친화력, 해리 상수, 결합 특이성)을 지닌다.

[0045] 또 다른 실시양태에서, HSA-결합 SDAB 분자는 WO 2006/122786에 개시된 나노분자들 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, HSA-결합 SDAB 분자는 WO 2006/122786에 개시된 1가, 2가, 3가 HSA-결합 나노바디 분자일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HSA-결합 SDAB 분자는 HSA에 대한 결합 특이성을 중 하나 이상이 있는 단일특이적 또는 다중특이적 분자일 수 있다. 예시적인 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디에는 WO 06/122786에 개시된 ALB1, 이의 인간화 형태 (예를 들어, ALB6, ALB7, ALB8, ALB9, ALB10)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0046] 또 다른 실시양태에서, SDAB 분자의 단일 도메인 분자들 중 2개 이상이, 연결 기와 함께 또는 연결 기 없이, 유전적 또는 폴리펩티드 융합물로서 융합된다. 연결 기는 당업자에게 명백한 임의의 연결 기일 수 있다. 예를 들어, 연결 기는 원자 1개 내지 100개 길이의 생체적합성 중합체일 수 있다. 한 실시양태에서, 연결 기는 폴리글리신, 폴리세린, 폴리라이신, 폴리글루타메이트, 폴리이소류신 또는 폴리아르기닌 잔기, 또는 이들의 조합물을 포함하거나, 이들로 구성된다. 예를 들어, 폴리글리신 또는 폴리세린 링커가 적어도 5개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개, 20개, 30개, 35개 및 40개의 글리신 및 세린 잔기를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 링커에는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 이를 초과하는 개수의 반복물의 Gly-Ser 반복물, 예를 들어, (Gly)<sub>4</sub>-Ser 반복물 (서열 8)이 포함된다. 실시양태들에서, 링커의 서열이 하기와 같을 수 있다: (Gly)<sub>4</sub>-Ser-(Gly)<sub>3</sub>-Ser 또는 ((Gly)<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub> [식중, n은 4, 5, 또는 6이다] (서열 10).

[0047] 본 발명의 방법 또는 공정에 의해 분리 또는 정제되는 SDAB 분자는 예를 들어 공유결합에 의해 또는 비-공유결합에 의해 제2 모이어티(moietiy)에 결합됨으로써 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, 나노바디 분자는 적절한 약리학적으로 허용가능한 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 또는 이의 유도체 (예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 mPEG)에 공유결합에 의해 부착될 수 있다. PEG화 나노바디 분자의 예가 WO 06/122786에 TNF55-PEG40, TNF55-PEG60, TNF56-PEG40 및 TNF56-PEG60으로서 개시되어 있다.

[0048] 한 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 이온 (예를 들어, 양이온 또는 음이온) 교환 크로마토그래피, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 금속 친화성 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 및/또는 바이러스 제거 여과 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 한 실시양태에서, 이러한 방법 또는 공정은 제약 조성물로서 재조합 SDAB 분자의 제형을 제조하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 제형은 SDAB 분자를 단독으로, 또는 류머티스성 관절염 (RA) (예를 들어, 중등도 내지 중증 류머티스성 관절염), 관절염성 상태 (예를 들어, 건선성 관절염, 다관절형 소아 특발성 관절염 (JIA), 강직성 척추염 (AS), 건선, 궤양성 결장염, 크론병, 염증성 장 질환, 및/또는 다발성 경화증을 포함하지만 이에 한정되지 않는 TNF  $\alpha$  관련 장애, 예를 들어, 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는데 유용한 제2 작용제, 예를 들어, 제2의 치료적으로 또는 약리학적으로 활성인 작용제와 조합하여 포함할 수 있다. 예를 들어, 제2 작용제는 항-TNF 항체 또는 이의 TNF 결합 단편일 수 있고, 이때 제2 TNF 항체는 제형의 TNF-결합 SDAB 분자와 상이한 에피토프에 결합한다. TNF-결합 SDAB 분자와 공동-제형될 수 있는 작용제들의 또 다른 비-제한적인 예로는 시토카인 억제제, 성장 인자 억제제, 면역억제제, 항염증제, 대사 억제제, 효소 억제제, 세포독성제, 및 세포증식억제제가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 한 실시양태에서, 추가적인 작용제는 비-스테로이드성 항염증제 (NSAID); 프레드니솔론, 프레드니손, 코르티손 및 트리암시놀론이 포함되는 코르티코스테로이드; 및 질환 변형 항-류머티스성 약물 (DMARD), 예컨대 메토트렉세이트, 히드록시클로로퀸 (Plaquenil) 및 설파살라진, 레플루노

미드 (Arava<sup>®</sup>), 이태너셉트 (Enbrel<sup>®</sup>), 인플릭시맙 (Remicade<sup>®</sup>) (메토트렉세이트와 함께 또는 메토트렉세이트 없이) 및 아달리무맙 (Humira<sup>®</sup>)이 포함되는 종양 과사 인자 억제제, 항-CD20 항체 (예를 들어, Rituxan<sup>®</sup>), 가용성 인터류킨-1 수용체, 예컨대 아나킨라 (Kineret<sup>®</sup>), 금, 미노사이클린 (Minocin<sup>®</sup>), 페니실라민, 및 아자티오프린, 시클로포스파미드 및 시클로스포린이 포함되는 세포독성제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 관절염에 대한 표준 치료제이다. 이같은 조합 요법은 투여되는 치료제들을 더 낮은 투여량으로 유리하게 사용할 수 있고, 따라서 다양한 단독요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법 또는 공정에 의해 제조된 SDAB 문자를 특색으로 한다. 본원에 기술된 방법 또는 공정에 의해 제조된 SDAB 문자를 함유하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물 및 제형이 본 발명에 또한 포함된다. 예를 들어, 제형은 제약상 허용가능한 담체 내에 본원에 기술된 SDAB 문자를 포함할 수 있다.

[0051] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 방법 또는 공정에 의해 제조된 SDAB 문자는 대상, 예를 들어, 인간 대상 (예를 들어, TNFa 관련 장애에 걸린 환자)에게 투여하기에 적절하다. 예를 들어, SDAB 문자 또는 이의 제형이 주사 (예를 들어, 피하, 혈관내, 근육내 또는 복강내)에 의해 또는 흡입에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0052] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상 (예를 들어, 인간 대상)에서 본원에 기술된 SDAB 문자와 관련된 장애 (예를 들어, 류머티스성 관절염 (RA) (예를 들어, 중등도 내지 중증 류머티스성 관절염), 관절염성 상태 (예를 들어, 건선성 관절염, 다관절형 소아 특발성 관절염 (JIA), 강직성 척추염 (AS), 건선, 궤양성 결장염, 크론병, 염증성 장 질환, 및/또는 다발성 경화증을 포함하지만 이에 한정되지 않는 TNF $\alpha$  관련 장애, 예를 들어, 염증성 또는 자가면역 장애)를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 대상, 예를 들어, 인간 환자에게 본원에 기술된 방법 또는 공정에 의해 제조된 TNF-결합 SDAB를 포함하는 제약 조성물을, 단독으로 또는 본원에 기술된 조합 요법들 중 어느 하나와 조합하여, TNF $\alpha$  관련 장애의 증상을 중 하나 이상이 감소되도록 하는 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 방법 또는 공정에 의해 제조된 SDAB를 함유하는 기구, 주사기 또는 바이알을 포함하는 키트 또는 제조품을 특색으로 한다.

[0054] 본원에서 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 기타 참고문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0055] 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 상세사항이 하기의 첨부된 도면 및 상세한 설명에 기재된다. 본 발명의 또 다른 특색, 목표, 및 장점이 상세한 설명 및 도면, 및 청구항으로부터 명백할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

#### 도면의 간단한 설명

도 1은 ATN-103의 예상 구조의 개략도를 도해한다.

도 2는 ATN-103 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열 (서열 1)을 도해한다.

도 3은 ATN-103 정제 공정의 순서도를 도해한다.

도 4a는 전장 스타필로코쿠스 단백질 A (SpA)의 아미노산 서열 (서열 11)을 도해한다. 도 4b는 SpA의 변형된 도메인 B의 아미노산 서열 (서열 12)을 도해한다. a-나선 영역이 볼드체로 지시된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 상세한 설명

[0057] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 하나 이상의 단일 결합 도메인 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디 문자)를 포함하는 SDAB 문자가 단백질 A 또는 이의 기능성 변이체와 상호작용함으로써, 예를 들어, 이에 결합함으로써, SDAB 문자의 정제에서 단백질 A-기반 친화성 양식의 크로마토그래피를 사용할 수 있게 한다는 발견을 기초로 한다. 따라서, 본 발명은 상보적 항체 도메인 및 면역글로불린 Fc 영역을 갖지 않는, 하나 이상의 단일 결합 도메인 (예를 들어, 하나 이상의 나노바디 문자)를 포함하는 항원-결합 융합 폴리펩티드를 단백질 A-기반 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제 또는 분리하는 공정 및 방법에 관한 것이다.

[0059] 본 발명이 더욱 용이하게 이해될 수 있기 위해, 특정 용어들이 먼저 정의된다. 추가적인 정의가 상세한 설명

전반에 걸쳐 기재된다.

[0060] 본원에서 사용된 관사("a" 및 "an")는 관사의 문법적 목적에 1개 또는 1개 초과 (즉, 1개 이상)을 지칭한다.

[0061] 용어 "또는"은, 문맥적으로 명확하게 다르게 지시되지 않는 한, 용어 "및/또는"을 의미하도록 본원에서 사용되고, 이와 상호교환가능하게 사용된다.

[0062] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0063] "약" 및 "대략적으로"는 측정의 정확성 또는 성질을 고려했을 때 측정된 양에 대한 허용가능한 정도의 오차를 일반적으로 의미할 것이다. 예시적인 오차 정도는 소정의 값 또는 값들의 범위의 20 퍼센트 (%) 이내, 전형적으로는 10% 이내, 더욱 전형적으로는 5% 이내이다.

[0064] 용어 "SDAB 문자 제제"는 SDAB 문자 및/또는 하나 이상의 원치 않는 오염물을 함유하는 임의의 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 크로마토그래피 칼럼, 예를 들어, 단백질 A-기반 또는 양이온 교환 지지체에 통과시킴으로써, 제제가 부분적으로 분리 또는 정제될 수 있다.

[0065] 용어 "크로마토그래피"는 혼합물을 흡착제와 접촉시킴으로써 혼합물 내의 화학적으로 상이한 분자들을 분리하는 것을 지칭하고, 이때 분자들 중 하나의 부류가 가역적으로 흡착제에 결합하거나 흡착제 상에 흡착된다. 더욱 강하게 흡착되거나 유지되는 분자는 방출되지 않는 조건 하에 최소로 강하게 흡착제에 흡착된 또는 흡착제에 의해 유지되는 분자가 흡착제로부터 방출된다.

[0066] 용어 "통과-유동(flow-through) 방식"은 제제 내에 함유된 하나 이상의 SDAB 문자는 크로마토그래피 수지 또는 지지체를 통과하여 유동되도록 의도되는 한편, 하나 이상의 잠재적인 오염물 또는 불순물은 크로마토그래피 수지 또는 지지체에 결합하는 SDAB 문자 제제 분리 기술을 지칭한다. 예를 들어, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에서 통과-유동 방식이 사용될 수 있다.

[0067] "결합 방식"은 제제 내에 함유된 하나 이상의 항체 문자는 크로마토그래피 수지 또는 지지체에 결합하는 한편, 하나 이상의 잠재적인 오염물 또는 불순물은 통과하여 유동되는 SDAB 문자 제제 분리 기술을 지칭한다. 예를 들어, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에서 결합 방식이 사용될 수 있다.

[0068] "오염물"은 정제될 단백질의 샘플 내에 존재하는 정제될 단백질 이외의 임의의 의해 또는 바람직하지 않은 문자, 특히 생물학적 거대분자 예컨대 DNA, RNA, 또는 단백질을 지칭한다. 오염물에는, 예를 들어, 정제될 단백질을 재조합에 의해 발현하도록 사용되는 세포로부터의 기타 숙주 세포 단백질, 이전의 친화성 크로마토그래피 단계 동안 샘플 내로 침출될 수 있는 친화성 크로마토그래피 단계에서 사용되는 흡착제의 일부분인 단백질, 예컨대 단백질 A, 및 표적 단백질 자체의 미스-폴딩(mis-folded) 변이체가 포함된다.

[0069] "숙주 세포 단백질"은 정제될 단백질을 코딩하는 DNA가 도입되는 숙주 세포의 천연 발생 게놈에 의해 코딩되는 단백질을 포함한다. 숙주 세포 단백질은 정제될 단백질의 오염물일 수 있고, 이의 수준이 정제에 의해 감소될 수 있다. 젤 전기영동 및 염색 및/또는 ELISA 분석법이 특히 포함되는 임의의 적합한 방법에 의해 숙주 세포 단백질을 분석할 수 있다. 숙주 세포 단백질에는, 예를 들어, 재조합 단백질의 발현의 생성물로서 생산된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 단백질 (CHOP)이 포함된다.

[0070] 용어 "고분자량 응집물" 또는 "HMWA"는 2개 이상의 항체 문자의 회합물을 지칭한다. 회합은 공유결합, 비-공유 결합, 디설파이드 또는 비-환원성 가교를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 방법에 의해 일어날 수 있다. 2개 이상의 문자는 동일한 항원 또는 상이한 항원에 결합할 수 있다.

[0071] 본원에서 사용된 용어 "단백질 A" 및 관련 구절, 예컨대 "단백질 A-기반 지지체"는 단백질 A (예를 들어, 재조합 단백질 A 또는 단리된 단백질 A), 또는 이의 기능적 변이체를 포함하도록 의도된다. 한 실시양태에서, 단백질 A는 N-말단으로부터의 순서로 E, D, A, B 및 C 도메인으로 공지된 아미노산 잔기 약 50-60개의 도메인 5개로 구성된 전장 스타필로코쿠스 단백질 A (SpA)이다. ([Sjodhal Eur J Biochem 78: 471-490 (1977)]; [Uhlen et al. J. Biol. Chem. 259: 1695-1702 (1984)]). 이러한 도메인들은 각각 약 65%-90% 아미노산 서열 동일성을 공유하는 약 58개의 잔기를 함유한다. 단백질 A와 항체 간의 결합 연구는 SpA의 5개 도메인 모두 (E, D, A, B 및 C)가 IgG에 이의 Fc 영역을 통해 결합하는 한편, 도메인 D 및 E는 유의한 Fab 결합을 나타낸다는 것을 나타냈다 ([Ljungberg et al. Mol. Immunol. 30(14):1279-1285 (1993)]; [Roben et al. J. Immunol. 154:6437-6445 (1995)]; [Starovasnik et al. Protein Sci 8:1423-1431 (1999)]). B 도메인의 기능성 변이체 및 에너지-최소화 버전인 Z-도메인 ([Nilsson et al. Protein Eng 1:107-113 (1987)])은 항체 가변 도메인 영역에 대한 결합이 무시할 만한 것으로 나타났다 ([Cedergren et al. Protein Eng 6(4):441-448 (1993)];

[Ljungberg et al. (1993) 상기 문현]; [Starovasnik et al. (1999) 상기 문현]). 단백질 A는 도 4a에 제시된 SpA의 아미노산 서열 (서열 11), 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 단백질 A는 E, D, A, B 및/또는 C 또는 이의 변형 형태로부터 선택된 1개 이상의 도메인을 포함하는 SpA의 기능적 변이체이다. 예를 들어, SpA의 기능적 변이체는 SpA의 도메인 B, 또는 하나 이상의 치환된 아스파라긴 잔기를 갖는 도메인 B의 변이체 (본원에서 도메인 Z로 또한 지칭됨)를 적어도 포함할 수 있다. 한 실시 양태에서, SpA의 기능적 변이체는 도 4b에 제시된 서열 12의 아미노산 서열, 또는 이와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 도메인 B 또는 도메인 B의 변이체, 및 도메인 A 및/또는 C; 도메인 E, A 및/또는 C; 또는 도메인 E, D, A 및/또는 C 중 하나 이상을 포함하는 단백질 A의 기능적 변이체들의 또 다른 순열이 사용될 수 있다. 조합물이 SDAB 분자에 결합할 수 있는 한, E, D, A, B 및/또는 C, 또는 이들의 기능적 변이체의 임의의 조합물이 사용될 수 있다.

[0072] "세라믹 히드록시아파타이트" 또는 "cHA"는 고온에서 구형의 거대다공성 세라믹 형태로 소결된 불용성 히드록실화 인산칼슘, 예를 들어, 화학식  $[CaO(PO_4)_6(OH)_2$  또는  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ]의 인산칼슘을 지칭한다. 용어 "cHA"는 제I형 및 제II형 세라믹 히드록시아파타이트를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 달리 상술되지 않는 한, "cHA"는 20, 40, 및 80  $\mu m$ 를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 입자 크기를 지칭한다.

[0073] 폴리펩티드를 "정제"하는 것은 단백질의 샘플 내에 존재할 수 있는 외래 또는 바람직하지 않은 요소, 특히 생물학적 거대분자 예컨대 단백질 또는 DNA의 양을 감소시키는 것을 의미한다. 젤 전기영동 및 염색 및/또는 ELISA 분석법이 포함되는 임의의 적합한 방법에 의해 외래 단백질의 존재를 분석할 수 있다. 젤 전기영동 및 염색 및/또는 중합효소 연쇄 반응을 사용하는 분석법이 포함되는 임의의 적합한 방법에 의해 DNA의 존재를 분석할 수 있다. 실시양태들에서, 폴리펩티드, 예를 들어, SDAB 분자는 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 이보다 높은 %의 순도로 정제된다.

[0074] 표적 폴리펩티드의 농도가 출발물보다 생성물에서 더 높도록 공정에 혼합물이 적용되는 경우에 폴리펩티드가 단백질 및 또 다른 오염물을 포함하는 혼합물로부터 "분리" (또는 "제거")된다.

[0075] 본 발명의 방법 및 조성물은 특정된 서열, 또는 이와 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어, 특정된 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 이를 초과하는 %로 동일한 서열의 폴리펩티드를 포함한다. 아미노산 서열의 맥락에서, 용어 "실질적으로 동일한"은 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열이 공통된 구조적 도메인 및/또는 공통된 기능적 활성을 가질 수 있도록 i) 제2 아미노산 서열 내의 정렬된 아미노산 잔기와 동일하거나 또는 ii) 이의 보존적 치환인 충분한 개수 또는 최소 개수의 아미노산 잔기를 함유하는 제1 아미노산을 지칭하도록 본원에서 사용된다. 예를 들어, 기준 서열에 대한 동일성이 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인, 공통된 구조적 도메인을 함유하는 아미노산 서열.

[0076] 상기 폴리펩티드들의 단편, 유도체, 유사체, 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합이 본 발명의 폴리펩티드로서 또한 포함된다. 본 발명의 단백질을 지칭할 때의 용어 "단편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"는 상응하는 천연 항체 또는 폴리펩티드의 기능성 성질들 중 적어도 일부를 유지하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드의 단편에는, 본원의 다른 곳에서 논의된 특이적 항체 단편에 더하여, 단백질분해성 단편, 뿐만 아니라 결실 단편이 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드의 변이체에는 상기 기술된 바와 같은 단편이 포함되고, 아미노산 치환, 결실 또는 삽입으로 인해 아미노산 서열이 변경된 폴리펩티드가 또한 포함된다. 변이체는 천연적으로 발생할 수 있거나, 또는 비-천연 발생 변이체일 수 있다. 당업계에 공지된 돌연변이유발 기술을 사용하여 비-천연 발생 변이체가 생산될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 본 발명의 단편의 유도체는 천연 폴리펩티드 상에서 발견되지 않는 추가적인 특색을 나타내도록 변경된 폴리펩티드이다. 예로는 융합 단백질이 포함된다. 변이체 폴리펩티드는 본원에서 "폴리펩티드 유사체"로 또한 지칭될 수 있다. 본원에서 사용된, 폴리펩티드의 "유도체"는 하나 이상의 잔기가 촉媒 관능기의 반응에 의해 화학적으로 유도체화된 대상 폴리펩티드를 지칭한다. 20개의 표준 아미노산의 하나 이상의 천연 발생 아미노산 유도체를 함유하는 폴리펩티드가 "유도체"로서 또한 포함된다. 예를 들어, 4-히드록시프롤린이 프롤린을 치환할 수 있고; 5-히드록시라이신이 라이신을 치환할 수 있으며; 3-메틸히스티딘이 히스티딘을 치환할 수 있고; 호모세린이 세린을 치환할 수 있고; 오르니틴이 라이신을 치환할 수 있다.

[0077] 용어 "기능적 변이체"는 아미노산 서열이 천연 발생 서열과 실질적으로 동일하거나, 또는 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되고, 천연 발생 서열의 하나 이상의 활성을 지닐 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0078] 서열들 간의 상동성 또는 서열 동일성 (이러한 용어들은 본원에서 상호교환가능하게 사용됨)의 계산은 하기와

같이 수행된다.

- [0079] 2개의 아미노산 서열의 백분율 동일성을 결정하기 위해, 서열들을 최적의 비교 목적을 위해 정렬한다 (예를 들어, 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 양쪽 모두에 갭(gap)이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비-상동성 서열이 무시될 수 있다). 바람직한 실시양태에서, 비교 목적을 위해 정렬되는 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 그후, 상응하는 아미노산 위치에서의 아미노산 잔기들을 비교한다. 제1 서열 내의 위치를 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기가 차지하면, 분자들이 이러한 위치에서 동일하다 (본원에서 사용된 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동가이다).
- [0080] 2개의 서열 간의 백분율 동일성은 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 개수 및 각각의 갭의 길이를 고려했을 때 서열들이 공유하는 동일한 위치의 개수의 합수이다.
- [0081] 서열들의 비교 및 2개의 서열 간의 백분율 동일성의 결정을 수학 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 블라섬(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 웨이트(weight) 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 입수가능) 내의 GAP 프로그램 내로 혼입된 [Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 서열 간의 백분율 동일성을 결정할 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 웨이트 40, 50, 60, 70, 또는 80 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 입수가능) 내의 GAP 프로그램을 사용하여 2개의 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 동일성이 결정된다. 파라메터들의 특히 바람직한 세트 (그리고 달리 특정되지 않는 한 사용되어야 하는 세트)는 갭 폐널티 12, 갭 확장 폐널티 4, 및 프레임시프트(frameshift) 갭 폐널티 5의 블라섬 62 채점 매트릭스이다.
- [0082] PAM120 웨이트 잔기 표, 갭 길이 폐널티 12 및 갭 폐널티 4를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된 [E. Meyers and W. Miller (1989) CABIOS, 4:11-17]의 알고리즘을 사용하여 2개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 간의 백분율 동일성을 결정할 수 있다.
- [0083] 본원에 기술된 핵산 및 단백질 서열은, 예를 들어, 다른 패밀리 구성원 또는 관련 서열을 확인하기 위해, 공공 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로 추가로 사용될 수 있다. [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 이같은 검색을 수행할 수 있다. 본 발명의 핵산 (서열 1) 분자에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 수득하기 위해 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어 길이 = 12로 BLAST 뉴클레오티드 검색을 수행할 수 있다. 본 발명의 단백질 (서열 1) 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 BLAST 단백질 검색을 수행할 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해, 갭(Gapped) BLAST가 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라메터를 사용할 수 있다.
- [0084] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄가 있는 아미노산 잔기로 교체되는 것이다. 유사한 측쇄가 있는 아미노산 잔기들의 패밀리가 당업계에 공지되어 있다. 이러한 패밀리에는 염기성 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비-극성 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄가 있는 아미노산 (예를 들어, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다.
- [0085] 본 발명의 다양한 측면들이 하기에서 추가로 상세하게 기술된다.
- [0086] **단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자**
- [0087] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 정제되는 SDAB 분자는 하나 이상의 나노바디 분자로 구성된 단일 사슬 용합 폴리펩티드이다. 예를 들어, SDAB 분자는 하나 이상의 표적 항원에 결합하는, 링커, 예를 들어, 펩티드 링커를 통해 연결된 하나 이상의 나노바디 분자를 포함하는 단일 사슬 용합 폴리펩티드일 수 있다.
- [0088] 본원에서 사용된 "융합 폴리펩티드"는 2개 이상의 작동가능하게 회합된, 예를 들어, 연결된 모이어티, 예를 들어 단백질 모이어티를 함유하는 단백질을 지칭한다. 전형적으로, 모이어티들은 공유결합으로 회합된다. 모이

어티들을 직접적으로 회합될 수 있거나, 또는 스페이서 또는 링커 (예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 연결기)를 통해 연결된다. 융합 폴리펩티드는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 DNA 단편들이 통상적인 기술에 따라, 예를 들어, 결찰을 위한 끝부분이 평활한 (blunt-ended) 또는 끝부분이 엇갈린(stagger-ended) 말단, 적합한 말단을 제공하는 제한 효소 소화, 필요에 따른 접착성 끝부분의 채워넣기, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파테이스 처리, 및 효소에 의한 결찰을 사용함으로써, 인-프레임(in-frame)으로 함께 결찰된다. 또 다른 실시양태에서, 자동화된 DNA 합성 기를 포함하는 통상적인 기술에 의해 융합 유전자를 합성할 수 있다. 별법적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭이 2개의 연속적인 유전자 단편 사이의 상보적인 오버행(overhang)을 야기하는 앵커(anchor) 프라이머를 사용하여 수행될 수 있고, 이어서 상기 오버행들이 어닐링(annealing) 및 재증폭되어 키메라 유전자 서열이 생성될 수 있다 (예를 들어, [Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992] 참조). 또한, 융합 모이어티를 코딩하는 다수의 발현 벡터가 시판된다. 일부 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 단일한 인접 폴리펩티드들 또는 2개 이상의 비-인접 폴리펩티드들의 올리고머, 예컨대 이량체 또는 삼량체로서 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 추가적인 아미노산 서열이 융합 단백질의 N- 또는 C-말단에 부가되어, 발현, 입체적 유연성, 검출 및/또는 단리 또는 정제를 용이하게 할 수 있다.

[0089]

단일 도메인 항원 결합 (SDAB) 분자는 이의 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부분인 분자를 포함한다. 예로는 중쇄 가변 도메인, 본래 경쇄가 없는 결합 분자, 통상적인 4쇄 항체로부터 유래된 단일 도메인, 조작된 도메인, 및 항체로부터 유래된 것들 이외의 단일 도메인 스캐폴드가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. SDAB 분자는 당업계의 임의의 것일 수 있거나, 또는 임의의 장래의 단일 도메인 분자일 수 있다. SDAB 분자는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 어류, 상어, 염소, 토끼 및 소를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 이러한 용어는 낙타과(*Camelidae*) 및 상어 이외의 종으로부터의 천연 발생 단일 도메인 항체 분자를 또한 포함한다.

[0090]

본 발명의 한 측면에서, SDAB 분자는 어류에서 발견되는 면역글로불린의 가변 영역, 예를 들어, 상어의 혈청에서 발견되는 신규 항원 수용체 (NAR: Novel Antigen Receptor)로서 공지된 면역글로불린 아이소타입으로부터 유래된 것으로부터 유래될 수 있다. NAR의 가변 영역으로부터 유래된 단일 도메인 분자 ("IgNAR")의 제조 방법이 WO 03/014161 및 [Streltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909]에 기술되어 있다.

[0091]

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, SDAB 분자는 경쇄가 없는 중쇄로 공지된 천연 발생 단일 도메인 항원 결합 분자이다. 예를 들어, WO 9404678 및 [Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448]에 이같은 단일 도메인 분자가 개시되어 있다. 명화성을 위해, 경쇄가 본래 없는 중쇄 분자로부터 유래된 이러한 가변 도메인은 이를 4쇄 면역글로불린의 통상적인 VH와 구별하기 위해 본원에서 VHH 또는 나노바디로서 공지된다. 이같은 VHH 분자는 낙타과 종으로부터, 예를 들어, 낙타, 라마, 단봉낙타, 알파카 및 과나코에서 유래될 수 있다. 낙타과 이외의 또 다른 종이 경쇄가 본래 없는 중쇄 분자를 생산할 수 있다; 이같은 VHH는 본 발명의 범주 내에 속한다.

[0092]

특정 실시양태에서, SDAB 분자는 상보적 항체 가변 사슬 (예를 들어, 상응하는 경쇄 가변 영역 (VL)의 부재 하의 중쇄 가변 영역 (VH)), 및/또는 면역글로불린 불변 영역, 예를 들어, Fc 영역 (또는 단백질 A에 결합할 수 있는 불변 영역 또는 이의 일부분)의 부재 하에 1개 이상의 면역글로불린 가변 도메인 (1개, 2개 및/또는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR) 포함)을 포함한다.

[0093]

특정 실시양태에서, SDAB 분자는 중쇄 및 경쇄 항체 가변 도메인 또는 사슬이 있는 항체 분자 (예를 들어, 전장 항체), 또는 중쇄 및 경쇄 항체 단편이 있는 이의 항원-결합 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 단일 폴리펩티드 사슬 내에 있는 scFv, 또는 항체의 한쪽 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편)을 포함하지 않는다.

[0094]

SDAB 분자는, 하기에 더욱 상세하게 기술된 바와 같이, 재조합 분자, CDR-그래프트 분자, 인간화 분자, 낙타화 분자, 탈면역화 분자 및/또는 시험관 내에서 생성된 (예를 들어, 파지 디스플레이에 의해 선별된) 분자일 수 있다.

[0095]

용어 "항원 결합"은 표적 항원 또는 이의 에피토프에 결합하는 계면을 형성하는 결정자를 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어, 본원에 기술된 단일 도메인 분자의 일부분을 포함하도록 의도된다. 단백질 (또는 단백질 모방체)과 관련하여, 항원 결합 부위는 표적 항원에 결합하는 계면을 형성하는 하나 이상의 루프(loop) (4개 이상의 아미노산 또는 아미노산 모방체의 루프)를 전형적으로 포함한다. 전형적으로, 폴리펩티드, 예를 들어, 단일 도메인 항체 분자의 항원 결합 부위는 적어도 1개 또는 2개의 CDR, 더욱 전형적으로는 적어도 3개, 4개, 5

개 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0096] VH 및 VL 영역은 "프레임워크 영역" (FR)으로 명명된 더욱 보존된 영역이 산재된, "상보성 결합 영역" (CDR)으로 명명된 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 다수의 방법에 의해 프레임워크 영역 및 CDR의 범위가 정확하게 정의되었다 ([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]; [Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917]; 및 <Oxford Molecular>의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용되는 AbM 정의 참조). 일반적으로, 예를 들어, [Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)]을 참조한다. 일반적으로, 달리 명확하게 지시되지 않는 한, 하기의 정의가 사용된다: 중쇄 가변 도메인의 CDR1의 AbM 정의 및 나머지 CDR에 대한 카밧(Kabat) 정의. 또한, 카밧 또는 AbM CDR에 관하여 기술된 본 발명의 실시양태들은 코티아(Chothia) 초가변 루프를 사용하여 또한 실행될 수 있다. 전형적으로 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0097] 용어 "면역글로불린 가변 도메인"은 인간 또는 동물 기원의 VL 또는 VH 도메인과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 것으로 당업계에서 종종 이해된다. 면역글로불린 가변 도메인이 특정 종, 예를 들어, 상어 및 라마에서 발달되어, 인간 또는 포유류 VL 또는 VH과 아미노산 서열이 상이할 수 있음을 이해하여야 한다. 그러나, 이러한 도메인들은 항원 결합에서 주로 수반된다. 용어 "면역글로불린 가변 도메인"은 전형적으로 적어도 1개 또는 2개의 CDR, 더욱 전형적으로는 적어도 3개의 CDR을 포함한다.

[0098] "불변 면역글로불린 도메인" 또는 "불변 영역"은 인간 또는 동물 기원의 CL, CH1, CH2, CH3 또는 CH4 도메인과 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 면역글로불린 도메인을 포함하도록 의도된다. 예를 들어, [Charles A Hasemann and J. Donald Capra, Immunoglobulins: Structure and Function, William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989)] 참조. 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 도메인 CH2 및 CH3 또는 이와 실질적으로 유사한 면역글로불린 도메인을 포함하는 불변 면역글로불린 도메인의 Fc 부분을 지칭한다.

[0099] 특정 실시양태에서, SDAB 문자는 1가 또는 다중특이적 문자 (예를 들어, 2가, 3가, 또는 4가 문자)이다. 또 다른 실시양태에서, SDAB 문자는 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 또는 사중특이적 문자이다. 문자가 "단일 특이적" 또는 "다중특이적", 예를 들어, "이중특이적"인지 여부는 결합 폴리펩티드가 반응하는 상이한 에피토프의 개수를 지칭한다. 다중특이적 문자는 본원에 기술된 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프들에 대해 특이적일 수 있거나, 또는 표적 폴리펩티드뿐만 아니라 이종성 에피토프, 예컨대 이종성 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질에 대해 특이적일 수 있다.

[0100] 본원에서 사용된 용어 "결합가(valency)"는 SDAB 문자 내에 존재하는 잠재적인 결합 도메인, 예를 들어, 항원 결합 도메인의 개수를 지칭한다. 각각의 결합 도메인은 1개의 에피토프에 특이적으로 결합한다. SDAB 문자가 1개를 초과하는 결합 도메인을 포함하는 경우, 각각의 결합 도메인은 "2가 단일특이적"으로 칭해지는, 2개의 결합 도메인이 있는 항체에 대해서 동일한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나, 또는 "2가 이중특이적"으로 칭해지는, 2개의 결합 도메인이 있는 SDAB 문자에 대해서 상이한 에피토프들에 특이적으로 결합할 수 있다. 또한 SDAB 문자는 이중특이적이고 각각의 특이성에 대해 2가일 수 있다 ("이중특이적 4가 문자"로 칭해짐). 이중 특이적 2가 문자, 및 이의 제조 방법이, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 및 미국 출원 공개 번호 2003/020734 및 2002/0155537에 기술되어 있고, 이를 모두의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 이중특이적 4가 문자, 및 이의 제조 방법이, 예를 들어, WO 02/096948 및 WO 00/44788에 기술되어 있고, 이를 모두의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 일반적으로, PCT 공개 WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; [Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991)]; 미국 특허 번호 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; [Kostelnik et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)] 참조.

[0101] 특정 실시양태에서, SDAB 문자는 상보적 가변 도메인 또는 면역글로불린 불변 영역, 예를 들어, Fc 영역을 갖지 않는, 하나 이상의 단일 도메인 문자 (예를 들어, 나노바디)를 포함하는 단일 사슬 융합 폴리펩티드이고, 이는 하나 이상의 표적 항원에 결합한다. 항원 결합 폴리펩티드가 인식하는 예시적인 표적 항원에는 종양 고지 인자  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )가 포함된다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 단일 도메인 문자는 혈청 알부민 (인간 혈청 알부민 (HSA)) 또는 트랜스페린 중 하나 이상으로부터 선택된 혈청 단백질, 예를 들어, 인간 혈청 단백질에 결합한다.

[0102] TNF  $\alpha$

[0103]

종양 괴사 인자 알파는 염증성 장애 예컨대 류머티스성 관절염, 크론병, 궤양성 결장염 및 다발성 경화증과 관련되는 것으로 당업계에 공지되어 있다. TNFa 및 수용체 (CD120a 및 CD120b) 양쪽 모두 매우 상세하게 연구되어 있다. 생활성 형태의 TNFa는 삼량체이다. 항-TNFa 항체를 사용하여 TNFa의 작용을 길항하기 위한 여러 전략이 개발되었고, 레미케이드(Remicade)<sup>®</sup> 및 휴미라(Humira)<sup>®</sup>과 같이 현재 시판되고 있다. TNFa에 대한 항체 분자들이 공지되어 있다. TNFa-결합 단일 도메인 항원 결합 분자 (예를 들어, 나노바디)의 수많은 예가 WO 2004/041862, WO 2004/041865, WO 2006/122786에 개시되어 있고, 이들 모두의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 단일 도메인 항원 결합 분자의 추가적인 예가 US 2006/286066, US 2008/0260757, WO 06/003388, US 05/0271663, US 06/0106203에 개시되어 있고, 이들 모두의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 또 다른 실시양태에서, TNFa 및 혈청 단백질, 예를 들어, HSA에 대한 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 및 또 다른 다중특이적 단일 도메인 항체들이 이러한 참고문헌들에 개시되어 있다.

[0104]

구체적인 실시양태에서, TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 나노바디들 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 1가, 2가, 3가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자일 수 있다. 예시적인 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디에는 TNF1, TNF2, TNF3, 이들의 인간화 형태 (예를 들어, TNF29, TNF30, TNF31, TNF32, TNF33)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 1가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디의 추가적인 예가 WO 2006/122786의 표 8에 개시되어 있다. 예시적인 2가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자에는 단일 융합 폴리펩티드를 형성하도록 펩티드 링커를 통해 연결된 2개의 TNF30 나노바디를 포함하는 TNF55 및 TNF56가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다 (WO 2006/122786에 개시되어 있음). 2가 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디 분자의 추가적인 예가 WO 2006/122786의 표 19에 TNF4, TNF5, TNF6, TNF7, TNF8로서 개시되어 있다.

[0105]

또 다른 실시양태에서, HSA-결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 나노바디들 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, HSA-결합 나노바디 분자는 WO 2006/122786에 개시된 1가, 2가, 3가 HSA-결합 나노바디 분자일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, HSA-결합 나노바디 분자는 HSA에 대한 결합 특이성을 중 하나 이상을 갖는 단일특이적 또는 다중특이적 분자일 수 있다. 예시적인 TNF  $\alpha$ -결합 나노바디에는 WO 06/122786에 개시된 ALB1, 이의 인간화 형태 (예를 들어, ALB6, ALB7, ALB8, ALB9, ALB10)가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0106]

또 다른 실시양태에서, 나노바디 분자의 단일 도메인 분자들 중 2개 이상이, 연결 기와 함께 또는 연결 기 없이, 유전적 또는 폴리펩티드 융합물로서 융합된다. 연결 기는 당업자에게 명백한 임의의 연결 기일 수 있다. 예를 들어, 연결 기는 원자 1개 내지 100개 길이의 생체적합성 중합체일 수 있다. 한 실시양태에서, 연결 기는 폴리글리신, 폴리세린, 폴리라이신, 폴리글루타메이트, 폴리이소류신 또는 폴리아르기닌 잔기, 또는 이들의 조합물을 포함하거나, 이들로 구성된다. 예를 들어, 폴리글리신 또는 폴리세린 링커가 적어도 5개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개, 20개, 30개, 35개 및 40개의 글리신 및 세린 잔기를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 링커에는 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 이를 초과하는 개수의 반복물의 Gly-Ser 반복물, 예를 들어, (Gly)<sub>4</sub>-Ser 반복물 (서열 8)이 포함된다. 실시양태들에서, 링커의 서열이 하기와 같을 수 있다: (Gly)<sub>4</sub>-Ser-(Gly)<sub>3</sub>-Ser (서열 9) 또는 ((Gly)<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub> [식중, n은 4, 5, 또는 6이다] (서열 10).

[0107]

한 예시적인 실시양태에서, 본원에서 "ATN-103"으로 지칭되는, 표적 항원, 예를 들어, 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNFa)에 결합하는 2개의 단일 도메인 항체 분자 (예를 들어, 2개의 낙타류 가변 영역), 및 혈청 단백질, 예를 들어, HSA에 결합하는 1개의 단일 도메인 항체 분자 (예를 들어, 낙타류 가변 영역)의 단일 사슬 폴리펩티드 융합물로 구성된 항원 결합 폴리펩티드가 단백질 A 또는 이의 기능적 변이체에 결합하는 것으로 나타났다. ATN-103은 인간화된 3가의 이중특이적 TNFa-억제 융합 단백질이다. 이러한 단백질에 대한 항원은 종양 괴사 인자-알파 (TNF)이다. 도 1은 ATN-103의 예상 구조의 개략도를 제공한다. 이러한 융합 단백질은 낙타류로부터 유래되고, 인간 면역글로불린 VH 도메인에 대한 서열 및 구조적 상동성의 정도가 높다. 이의 단일 폴리펩티드 사슬은 TNF  $\alpha$ 에 대한 2개의 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민 (HSA)에 대한 1개의 결합 도메인으로 구성되고, 이때 아미노산 9개의 G-S 링커 2개가 도메인들을 연결한다. ATN-103의 상세한 설명이 WO 06/122786에서 제공된다.

[0108]

상응하는 발현 벡터의 DNA 서열로부터 예상된 ATN-103 폴리펩티드 사슬의 완전한 아미노산 서열이 도 2에서 제시된다 (서열 1) (잔기들은 잔기 번호 1로서의 NH<sub>2</sub>-말단에서 시작하여 번호가 매겨진다). DNA 서열에 의해 코딩되는 마지막 아미노산 잔기는 S<sup>363</sup>이고, 단백질의 COOH-말단을 구성한다. 디설파드-결합 ATN-103 (번역후 변형 없음)에 대한 예상 분자량은 38434.7 Da이다. ATN-103은 N-연결 글리코실화 컨센서스(consensus) 서열을 함유하지 않는다. 나노전기분무 이온화 사중극자 비행 시간 질량 분광광도법에 의해 우세한 이소형(isoform)에 대해 관찰된 분자량은 38433.9 Da에 상응하고, 이는 번역후 변형의 부재를 증명한다.

- [0109] 도 2에서, 상보성 결정 영역 (CDR)에 밑줄이 그어진다 (서열 2-7). 예상되는 분자내 디설피드 결합이 수반되는 시스테인 잔기들의 연결에 의해 표시된다. TNF에 대한 결합 도메인은 볼드체로 표시되고, HSA에 대한 결합 도메인은 이탤릭 볼드체로 표시된다. 이러한 결합 도메인들을 연결하는 아미노산 링커는 이탤릭체로 표시된다. 폴리펩티드 사슬에 대해 신호 펩티드 ( ${}^{-19}\text{MGW...VHS}^{-1}$ )가 또한 제시된다.
- [0110] SDAB 분자의 제조
- [0111] SDAB 분자는 재조합 분자, CDR-그래프트 분자, 인간화 분자, 낙타화 분자, 탈면역화 분자 및/또는 시험관 내에서 생성된 (예를 들어, 과지 디스플레이에 의해 선별된) 분자인 하나 이상의 단일 도메인 분자 (예를 들어, 나노바디)로 구성될 수 있다. 항체 및 SDAB 분자를 생성시키고, 이들을 재조합적으로 변형시키기 위한 기술들이 당업계에 공지되어 있고, 하기에서 상세하게 기술된다.
- [0112] 당업자에게 공지된 수많은 방법이 항체를 수득하는데 이용가능하다. 예를 들어, 공지된 방법에 따른 하이브리도마의 생성에 의해 모노클로날 항체를 생산할 수 있다. 그후, 이러한 방식으로 형성된 하이브리도마를 표준 방법, 예컨대 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA) 및 표면 플라즈몬 공명 (BIACORE™) 분석을 사용하여 스크리닝하여, 특정 항원에 특이적으로 결합하는 나노바디를 생산하는 하나 이상의 하이브리도마를 확인한다. 임의 형태의 특정 항원, 예를 들어, 재조합 항원, 천연 발생 형태, 임의의 변이체 또는 이들의 단편, 뿐만 아니라 이들의 항원성 펩티드가 면역원으로서 사용될 수 있다.
- [0113] 항체 및 SDAB 분자를 제조하는 한 예시적인 방법은 단백질 발현 라이브러리, 예를 들어, 과지 또는 리보솜 디스플레이 라이브러리의 스크리닝을 포함한다. 과지 디스플레이가, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,223,409 (래드너 (Ladner) 등); [Smith (1985) *Science* 228:1315-1317]; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; 및 WO 90/02809에 기술되어 있다.
- [0114] 디스플레이 라이브러리의 사용에 더하여, 특정 항원을 사용하여 비-인간 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스, 햄스터 또는 래트를 면역화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물은 인간 면역글로불린 유전자의 적어도 일부분을 포함한다. 예를 들어, 마우스 항체 생산이 결핍된 마우스 계통을 인간 Ig 유전자좌의 대형 단편으로 조작하는 것이 가능하다. 하이브리도마 기술을 사용하여, 원하는 특이성이 있는 유전자로부터 유래된 항원-특이적 모노클로날 항체를 생산 및 선택할 수 있다. 예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™, [Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21], US 2003-0070185, WO 96/34096 (1996년 10월 31일 공개), 및 PCT 출원 번호 PCT/US96/05928 (1996년 4월 29일 출원) 참조.
- [0115] 또 다른 실시양태에서, SDAB 분자가 비-인간 동물로부터 수득된 후, 변형되고, 예를 들어, 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 인간화, 탈면역화, 키메라 분자가 생산될 수 있다. 키메라 항체 및 SDAB 분자를 제조하기 위한 다양한 접근법들이 기술되어 있다. 예를 들어, [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985]; [Takeda et al., *Nature* 314:452, 1985], 미국 특허 번호 4,816,567 (캐빌리 (Cabilly) 등); 미국 특허 번호 4,816,397 (보스(Boss) 등); 유럽 특허 공개 EP171496 (타나구치(Tanaguchi) 등); 유럽 특허 공개 0173494, 영국 특허 GB 2177096B 참조. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 없는 트랜스제닉(transgenic) 마우스를 사용하여, 인간화 항체 및 SDAB 분자를 또한 생산할 수 있다. 본원에 기술된 인간화 항체 및 SDAB 분자를 제조하는데 사용될 수 있는 예시적인 CDR-그래프트 방법이 윈터(Winter)에 의해 기술되었다 (미국 특허 번호 5,225,539). 특정 인간 항체의 모든 CDR이 비-인간 CDR의 적어도 일부분으로 교체될 수 있거나, 또는 일부 CDR만 비-인간 CDR로 교체될 수 있다. 미리 결정된 항원에 대한 인간화 항체 및 SDAB 분자의 결합에 필요한 CDR의 개수를 교체하는 것만이 필요하다.
- [0116] 항원 결합에 직접적으로 수반되지 않는 Fv 가변 도메인의 서열을 인간 Fv 가변 도메인으로부터의 등가의 서열로 교체함으로써 인간화 항체가 생성될 수 있다. 인간화 항체 또는 이의 단편을 생성시키기 위한 예시적인 방법이 [Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207]; [Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214]; 및 US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; 및 US 6,407,213에서 제공된다. 이러한 방법들은 중쇄 또는 경쇄 중 하나 이상으로부터 면역글로불린 Fv 가변 도메인 전체 또는 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 단리하고, 조작하고, 발현시키는 것을 포함한다. 상기 기술된 바와 같이 미리 결정된 표적에 대한 나노바디를 생산하는 하이브리도마로부터, 뿐만 아니라 또 다른 공급원으로부터 이같은 핵산을 수득할 수 있다. 그후, 인간화 SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자를 코딩하는 재조합 DNA를 적합한 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 인간화 SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자가 보존적 치환, 컨센서스 서열 치환, 생식계

열 치환 및/또는 역돌연변이의 도입에 의해 최적화된다. 이같은 변경된 면역글로불린 분자를 당업계에 공지된 여러 기술 (예를 들어, [Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983]; [Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983]; [Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982]) 중 임의의 기술에 의해 제조할 수 있고, PCT 공개 WO92/06193 또는 EP 0239400의 교시에 따라 제조할 수 있다.

[0118] SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자를 인간화시키는 기술이 WO 06/122786에 개시되어 있다.

[0119] 인간 T 세포 에피토프의 특이적 결실 또는 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 개시된 방법에 의한 "탈면역화"에 의해 SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자가 또한 변형될 수 있다. 간략하게, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인, 예를 들어, 나노바디의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 MHC 클래스 II에 결합하는 웨티드에 대해 분석할 수 있다; 이러한 웨티드들은 잠재적인 T-세포 에피토프를 나타낸다 (WO 98/52976 및 WO 00/34317에 개시된 바와 같음). WO 98/52976 및 WO 00/34317에 기술된 바와 같이, 잠재적인 T-세포 에피토프의 검출을 위해, "웨티드 쓰레딩 (threading)"으로 칭해지는 컴퓨터 모델링 접근법을 적용할 수 있고, 또한 인간 MHC 클래스 II 결합 웨티드의 데이터베이스를  $V_H$  및  $V_L$  서열 내에 존재하는 모티프들에 대해 검색할 수 있다. 이러한 모티프들은 18개의 주요 MHC 클래스 II DR 동종이형 중 임의의 동종이형에 결합하고, 따라서 잠재적인 T 세포 에피토프를 구성한다. 검출된 잠재적인 T-세포 에피토프를 가변 도메인 내의 소수의 아미노산 잔기를 치환함으로써, 또는 바람직하게는 단일 아미노산 치환에 의해 제거할 수 있다. 전형적으로, 보존적 치환이 이루어진다. 종종, 배타적이지는 않지만, 인간 생식계열 항체 서열들 내의 한 위치에 공통적인 아미노산이 사용될 수 있다. 인간 생식계열 서열이, 예를 들어, [Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798]; [Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242]; [Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817]; 및 [Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638]에 개시되어 있다. V BASE 디렉토리가 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 종합적인 디렉토리를 제공한다 ([Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK]에 의해 구축됨). 이러한 서열들이, 예를 들어, 프레임워크 영역 및 CDR에 대해, 인간 서열의 출처로 사용될 수 있다. 예를 들어, U.S. 6,300,064에 기술된 바와 같이, 켄센서스 인간 프레임워크 영역이 또한 사용될 수 있다.

[0120] 단백질을 생산하도록 유전자 조작된 살아 있는 숙주 세포에 의해 SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자를 생산할 수 있다. 단백질을 생산하도록 세포를 유전자 조작하는 방법이 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, [Ausabel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York)] 참조. 이같은 방법은 단백질을 코딩하고 이의 발현을 허용하는 핵산을 살아 있는 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 이러한 숙주 세포는 배양물에서 성장된 박테리아 세포, 진균 세포, 또는, 바람직하게는, 동물 세포일 수 있다. 박테리아 숙주 세포에는 대장균 세포가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 적절한 대장균 균주의 예로는 HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 및 외래 DNA를 절단하지 못하는 임의의 대장균 균주가 포함된다. 사용될 수 있는 진균 숙주 세포에는 사카로마이세스 세레비지아에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 세포가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수 있는 동물 세포의 몇몇 예는 CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, 및 WI38이다. 당업자에게 주지된 방법을 사용하여 (예를 들어, 형질전환, 바이러스 감염 및/또는 선별에 의해) 새로운 동물 세포주가 확립될 수 있다. 임의적으로, 숙주 세포가 단백질을 배지 내로 분비할 수 있다.

[0121] 변형된 SDAB 분자

[0122] 본 발명의 방법을 사용하여 정제되는 SDAB 분자, 예를 들어, 나노바디 분자는 프레임워크 영역들 중 하나 내의 1개 이상의 아미노산 위치에서 천연 발생 도메인, 예를 들어, VH 도메인의 아미노산 서열과 아미노산 서열이 상이할 수 있다.

[0123] 본 발명의 SDAB 분자들, 예컨대 인간화 SDAB 분자들 중 일부의 아미노산 서열이 프레임워크 영역들 중 1개 이상 내의 1개 이상의 아미노산 위치에서 천연 발생 도메인, 예를 들어, 천연 발생 VHI-I 도메인의 아미노산 서열과 상이할 수 있음을 이해하여야 한다.

[0124] 본 발명은 SDAB 분자의 유도체를 정제하는 방법을 또한 포함한다. SDAB 분자 및/또는 본원에 개시된 SDAB 분자를 형성하는 아미노산 잔기를 중 하나 이상의 변형에 의해, 특히 화학적 및/또는 생물학적 (예를 들어, 효소에 의한) 변형에 의해 이같은 유도체를 일반적으로 수득할 수 있다.

[0125] 이같은 변형의 예, 뿐만 아니라 이같은 방식으로 변형될 수 있는 SDAB 분자 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 단백질 골격 또는 측쇄 상의 잔기, 바람직하게는 측쇄 상의 잔기)의 예, 이같은 변형을 도입하기 위해 사용될 수 있

는 방법 및 기술, 및 이같은 변형의 잠재적인 용도 및 장점이 당업자에게 명백할 것이다.

[0126] 예를 들어, 이같은 변형은 하나 이상의 관능기, 잔기 또는 모이어티, 특히 SDAB 분자에 하나 이상의 원하는 성질 또는 기능성을 부여하는 하나 이상의 관능기, 잔기 또는 모이어티를 SDAB 분자 내로 또는 분자 상에 (예를 들어, 공유결합 연결에 의해 또는 또 다른 적절한 방식으로) 도입하는 것을 수반할 수 있다. 이같은 관능기의 예는 당업자에게 명백할 것이다.

[0127] 예를 들어, 이같은 변형은 SDAB 분자의 반감기, 용해도 및/또는 흡수를 증가시키고/시키거나, SDAB 분자의 면역원성 및/또는 독성을 감소시키고/시키거나, SDAB 분자의 바람직하지 않은 부작용을 제거하거나 약화시키고/시키거나, SDAB 분자에게 또 다른 유리한 성질을 부여하고/하거나 이의 원치 않는 성질을 감소시키거나, 또는 상기 중 2가지 이상이 임의로 조합된 하나 이상의 관능기를 (예를 들어, 공유결합 연결에 의해 또는 또 다른 적절한 방식으로) 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이같은 관능기 및 이를 도입하기 위한 기술의 예가 당업자에게 명백할 것이고, 이러한 예는 상기 본원에서 인용된 일반적인 배경 기술에서 언급된 모든 관능기 및 기술, 뿐만 아니라 제약 단백질의 변형, 특히 항체 또는 항체 단편 (ScFv 및 148-단일 도메인 항체 포함)의 변형에 대해 공지되어 있는 관능기 및 기술을 포함할 것이며, 이에 대해 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)]을 예를 들어 참조한다. 이같은 관능기는, 당업자에게 또한 명백할 바와 같이, 본 발명의 나노바디에 직접적으로 (예를 들어, 공유결합에 의해), 또는 임의적으로는 적절한 링커 또는 스페이서를 통해 연결될 수 있다.

[0128] 제약 단백질의 반감기를 증가시키고/시키거나 면역원성을 감소시키기 위한 한 광범위하게 사용되는 기술은 적절한 약리학적으로 허용가능한 종합체, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 또는 이의 유도체 (예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 mPEG)의 부착을 포함한다. 일반적으로, 임의의 적절한 형태의 PEG화, 예컨대 항체 및 항체 단편 ((단일) 도메인 항체 및 ScFv를 포함하지만 이에 한정되지 않음)에 대해 당업계에서 사용되는 PEG화를 사용할 수 있다; 예를 들어 [Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002)]; [Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003)], [Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003)] 및 WO 04/060965를 참조한다. 단백질의 PEG화를 위한 다양한 시약이, 예를 들어, <Nektar Therapeutics> (USA)로부터, 또한 시판된다.

[0129] 바람직하게는, 특히 시스테인 잔기를 통해, 부위-지정 PEG화가 사용된다 (예를 들어 [Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)] 참조). 예를 들어, 이러한 목적을 위해, PEG가 SDAB 분자에서 천연적으로 발생하는 시스테인 잔기에 부착될 수 있거나, PEG의 부착을 위한 하나 이상의 시스테인 잔기를 적절하게 도입하도록 SDAB 분자가 변형될 수 있거나, 또는 PEG의 부착을 위한 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 서열이 본 발명의 나노바디의 N- 및/또는 C-말단에 융합될 수 있고, 이를 모두는 당업자에게 공지되어 있는 단백질 조작 기술을 사용한다.

[0130] 바람직하게는, SDAB 분자에 대해, 분자량이 5000 초과, 예컨대 10,000 초과이고, 200,000 미만, 예컨대 100,000 미만; 예를 들어 20,000-80,000 범위인 PEG가 사용된다.

[0131] PEG화와 관련하여, 일반적으로, 본 발명이 하나 이상의 아미노산 위치에서 PEG화된 임의의 SDAB 분자를 또한 포함하고, 이때 바람직하게는 상기 PEG화가 (1) 생체내 반감기를 증가시키고/시키거나; (2) 면역원성을 감소시키고/시키거나; (3) PEG화에 대해 공지된 하나 이상의 추가적인 이로운 성질을 제공하고/하거나; (4) SDAB 분자의 친화력에 본질적으로 영향을 미치지 않고/않거나 (예를 들어, 적절한 분석법, 예컨대 하기 실시예에 기술된 것들에 의해 결정 시, 상기 친화력을 90% 초과만큼, 바람직하게는 50% 초과만큼, 10% 초과만큼 감소시키지 않음); (4) SDAB 분자의 어떠한 또 다른 바람직한 성질에도 영향을 미치지 않는 방식으로 PEG화되었음을 주지하여야 한다. 적절한 PEG 기 및 이를 특이적으로 또는 비-특이적으로 부착시키는 방법이 당업자에게 명백할 것이다.

[0132] 이같은 PEG화를 위한 적절한 키트 및 시약을 <Nektar> (CA, USA)로부터 예를 들어 수득할 수 있다.

[0133] 일반적으로 덜 선호되는 또 다른 변형에는 N-연결 또는 O-연결 글리코실화가 포함되고, 일반적으로 이는 SDAB 분자를 발현시키는데 사용되는 숙주 세포에 따라, 번역과 동시의 변형 및/또는 번역후 변형의 일부이다.

#### 크로마토그래피 공정

[0135] 단백질 정제 공정은 종종 수많은 단계를 필요로 하고, 이때 각각의 단계는 수율에서의 추가적인 감소를 초래한다. 단백질 A-기반 크로마토그래피는 통상적으로 사용되는 다수의 기술 중 하나이다. 단백질 A-기반 크로마토그래피에 의한 단백질 정제는 고정된 단백질 A 리간드를 함유하는 칼럼 (전형적으로, 단백질 A 또는 이의 기능

적 유도체로 구성된 흡착제가 고정된 메타크릴레이트 공중합체 또는 아가로스 비드의 변형된 지지체로 충전된 칼럼) 상에서 수행될 수 있다. 이러한 칼럼은 전형적으로 높은 염 농도의 완충제로 평형화되고, 혼화성의 비-변성 고염 용액 내의 단백질들 (표적 단백질 + 오염 단백질)의 혼합물을 함유하는 샘플을 칼럼 상에 로딩한다. 혼합물이 칼럼을 지나면서, 표적 단백질은 칼럼 내의 흡착제에 결합하는 한편, 미결합 오염물은 통과-유동된다. 그후, 결합된 단백질이 감소된 염 농도로 칼럼으로부터 용출된다. 전형적으로, 점진적으로 또는 계단식으로 감소되는 구배로 적용되는 염 농도로 칼럼을 용출시켜, 다양한 결합된 단백질들을 이들의 방출에 도움이 되는 특정 염 농도에서 선택적으로 방출시키고, 더 많은 정제된 단백질을 함유하는 분획이 수득될 때까지 별개의 분획들을 수집함으로써, 표적 단백질을 회수할 수 있다. 별개의 기간들에 걸쳐 통과-유동 분획들을 수집함으로써, 특정 단백질을 함유하는 분획들을 단리할 수 있다. (오염물은 통과-유동되는 한편) 표적 단백질이 칼럼에 결합되는 공정에서, 단백질 A에 대한 친화력이 더 큰 흡착제가 단백질의 방출에 도움이 되는 특정 분획에서 수집될 더 넓은 범위의 단백질에 결합하도록 전형적으로 사용된다.

[0136] 본 발명의 공정은 또 다른 단백질 정제 방법, 예컨대 염 침전, 친화성 크로마토그래피, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 역상 액체 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 또는 단백질 정제 기술에서 통상적으로 사용되는 임의의 또 다른 방법과 조합되어 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명의 공정이 또 다른 정제 단계에 대한 요구를 제거하거나 상당히 감소시킬 것으로 생각된다.

[0137] 임의의 또는 모든 본 발명의 크로마토그래피 단계는 임의의 기계적 수단에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 칼럼에서 크래마토그래피가 수행될 수 있다. 가압 하에 또는 압력 없이, 그리고 위에서 아래로 또는 아래에서 위로 칼럼이 러닝(running)될 수 있다. 크로마토그래피 공정 동안 칼럼 내의 유체의 유동 방향이 역전될 수 있다. 중력, 원심분리 또는 여과가 포함되는 임의의 적절한 수단에 의한 샘플의 로딩, 세정 및 용출에 사용된 액체로부터 고체 매질이 분리되는 배치(batch) 공정을 사용하여 크로마토그래피를 또한 수행할 수 있다. 샘플 내의 일부 분자를 다른 것보다 더 강하게 흡착하거나 유지시키는 필터와 샘플을 접촉시킴으로써 크로마토그래피를 또한 수행할 수 있다. 하기의 설명에서, 본 발명의 다양한 실시양태들이 칼럼에서 수행되는 크로마토그래피의 맥락에서 설명된다. 그러나, 칼럼 사용은 사용될 수 있는 여러 크로마토그래피 양식 중 하나에 불과하고, 당업자가 교시내용을 또 다른 양식, 예컨대 배치 공정 또는 필터를 사용하는 것에 또한 쉽게 적용할 수 있는 바와 같이, 칼럼을 사용하는 본 발명의 예시가 본 발명의 용도를 칼럼 크로마토그래피에 한정하지 않는 것으로 이해된다.

[0138] 적절한 지지체는 청구된 방법을 실행하는데 필요한 특성이 있는 임의의 현재 이용가능하거나 추후에 개발되는 물질일 수 있고, 임의의 합성, 유기 또는 천연 중합체를 기초로 할 수 있다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 지지체 물질에는 유기 물질 예컨대 셀룰로스, 폴리스티렌, 아가로스, 세파로스, 폴리아크릴아미드, 폴리메타크릴레이트, 텍스트란 및 전분, 및 무기 물질, 예컨대 솔, 실리카 (유리 비드 또는 모래) 및 세라믹 물질이 포함된다. 적절한 고체 지지체가, 예를 들어, [Zaborsky "Immobilized Enzymes" CRC Press, 1973, Table IV, pp 28-46]에 개시되어 있다.

[0139] 평형화 및 크로마토그래피 전에, 크로마토그래피 매질 (지지체 및 지지체에 고정된 흡착제)를 선택된 용액, 예를 들어, 염 및/또는 완충제 용액에서 예비-평형화시킬 수 있다. 예비-평형화는 크로마토그래피 매질을 재생시키고/시키거나 보관하기 위해 사용된 용액을 교체하는 기능을 한다. 당업자는 예비-평형화 용액의 조성이 보관 용액 및 후속 크로마토그래피에 사용될 용액의 조성에 좌우된다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 적합한 예비-평형화 용액은 크로마토그래피를 수행하는데 사용되는 것과 동일한 완충제 또는 염을 포함할 수 있고, 임의적으로는, 이들의 농도는 크로마토그래피를 수행하는데 사용되는 것보다 높다. 크로마토그래피에 사용될 수 있는 완충제 및 염이 하기에서 논의된다. 예를 들어, 크로마토그래피를 수행하는데 사용되는 용액이 소정의 농도의 인산나트륨을 포함하는 경우, 더 높은 농도의 인산나트륨을 포함하는 용액에서 예비-평형화가 일어날 수 있다. 이의 예로서, 크로마토그래피를 수행하는데 사용되는 용액이 약 0.5 mM 내지 약 50 mM 사이의 인산나트륨을 포함하는 경우, 약 0.2 M 내지 약 0.5 M 사이의 농도의 인산나트륨, 더욱 바람직하게는 약 0.3 M 내지 약 0.4 M (경계 포함) 사이의 농도의 인산나트륨을 포함하는 용액에서 예비-평형화가 일어날 수 있다.

[0140] 샘플이 칼럼에 적용되기 전에, 단백질의 크로마토그래피에 사용될 완충제 또는 염으로 칼럼이 평형화될 수 있다. 하기 논의된 바와 같이, 크로마토그래피 (및 정제될 단백질의 로딩)은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 클로라이드, 플루오라이드, 아세테이트, 포스페이트, 및/또는 시트레이트 염 및/또는 트리스 완충제가 포함되는 다양한 완충제 또는 염에서 일어날 수 있다. 시트레이트 완충제 및 염이 폐기 용이성으로 인해 당업자에게 선호된다. 이같은 완충제 또는 염은 pH가 약 5.5 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 트리스 또는 인산나트륨 완충제를 포함하는 용액에서 평형화가 일어날 수 있다. 임의적으로, 인산나트륨 완충제의 농도는 약

0.5 mM 내지 약 50 mM 사이, 더욱 바람직하게는 약 15 mM 내지 35 mM 사이이다. 바람직하게는, 약 5.5 이상의 pH에서 평형화가 일어난다. 약 6.0 내지 약 8.6 사이의 pH, 바람직하게는 약 6.5 내지 7.5 사이의 pH에서 평형화가 일어날 수 있다. 가장 바람직하게는, 용액은 농도 약 25 mM 및 pH 약 6.8의 인산나트륨 완충제를 포함한다.

[0141] 적절한 완충제는 포스페이트 완충제, 트리스 완충제, 아세테이트 완충제, 및/또는 시트레이트 완충제를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 허용가능한 염은 염화나트륨, 염화암모늄, 염화칼륨, 아세트산나트륨, 아세트산암모늄, 황산나트륨, 황산암모늄, 티오시안산암모늄, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 및 이들의 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 염, 및 이러한 염들의 조합물을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 또 다른 실시양태에서, 염은 시트르산나트륨 및 염화나트륨을 포함한다. 크로마토그래피 시스템에 사용되는 염 농도의 허용가능한 범위는 전형적으로 0 내지 약 2M 시트르산나트륨, 0 내지 약 4M 염화나트륨, 0 내지 약 3M 황산암모늄, 0 내지 약 1M 황산나트륨 및 0 내지 약 2M 인산나트륨의 범위이다. 염 농도의 범위는 0 내지 약 1M 시트르산나트륨, 0 내지 약 2M 염화나트륨, 0 내지 약 1.5M 황산암모늄, 0 내지 약 1M 황산나트륨 및 0 내지 약 1.5M 인산나트륨을 포함할 수 있다. 또 다른 완충제 및 염이 또한 사용될 수 있다. 로딩 후, 흡착제를 더 많은 동일한 용액으로 세정하여, 표적 단백질 (흡착제에 결합되지 않음)이 흡착제를 통과하여 유동하게 할 수 있다. 그후, 통과-유동물 분획에서 단백질을 수집한다. 당업자는 표적 단백질은 결합하지 않으면서 오염물을 결합시키기 위한 조건을 쉽게 표적화할 수 있다. 본원에서 논의된 염 농도는 예시적이고, 당업계에 공지된 바와 같이 유속, 온도, 및 용출 시간을 변화시킴으로써 또 다른 염 및 염 농도가 사용될 수 있다.

[0142] 칼럼이 사용되는 조건은 당업계에 공지된 바와 같이 특정 칼럼에 따라 다르다. 대부분의 관심 단백질에 대해, pH 범위는 약 6.0 내지 약 8.6 사이, 또는 별법적으로 약 6.5 내지 약 7.5 사이일 수 있다. 그러나, 특정 단백질은 극단적인 pH에 대해 저항성이 것으로 공지되어 있고, 더 넓은 범위가 가능할 수 있다. 전형적인 조건은 5-7의 pH 범위 및 0 내지 약 0.8M의 시트르산나트륨 농도 범위를 포함한다 (예를 들어 0.5M 시트르산나트륨, pH 6.0).

[0143] 정제될 특정 단백질에 대해 어떠한 완충제 또는 염이 적합할지를 결정하는데 있어서 당업계의 지식이 당업자에게 지침을 제공할 것이다. 또한, 당업자는, 예를 들어, 오염물을 칼럼에 결합하는 한편 관심 단백질은 통과-유동물 분획 내로 통과하여 유동되는 특정 완충제 또는 염 조건을 수립함으로써, 선택된 완충제 또는 염의 최적 사용 농도를 쉽게 결정할 수 있다. 칼럼의 유출물의 분획들을 수집하고 분석하여, 표적 단백질 및 오염물이 용출되는 완충제 또는 염의 농도를 결정할 수 있다. 적절한 분석은, 예를 들어, 전도율 측정기로의 전기 전도도 측정 (샘플 내의 염 농도 결정용) + 젤 전기영동 또는 ELISA 분석법 (샘플 내의 단백질의 신원 결정용)을 포함한다. 임의적으로, 칼럼을 더 많은 양의, 단백질 샘플이 로딩된 동일한 용액으로 세정할 수 있고, 이러한 세정 용액을 또한 수집하여 통과-유동물 액체와 합칠 수 있다.

[0144] 정제될 단백질을 포함하는 통과-유동물 및 임의적인 세정물의 수집 후, 오염 단백질을 방출시키기 위해, 크로마토그래피에 사용된 완충제 또는 염을 포함하는 용액을 더 낮은 이온 강도로 사용하여 크로마토그래피 매질을 스트리핑(stripping)시킴으로써 칼럼에 결합되어 남아 있을 수 있는 단백질을 방출시킬 수 있다. 그후, 크로마토그래피 매질로부터 대부분의 또는 모든 단백질을 방출시키고 크로마토그래피 매질 내에 존재할 수 있는 임의의 미생물 오염을 감소시키거나 제거하는 효과를 가질 용액을 사용하여 칼럼을 재생시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 이같은 용액은 수산화나트륨을 포함할 수 있다. 또 다른 시약이 또한 사용될 수 있다. 이어서, 칼럼을 행구고, 미생물 성장을 방해할 수 있는 용액에서 보관할 수 있다. 이같은 용액은 수산화나트륨을 포함할 수 있지만, 또 다른 시약이 또한 적합할 수 있다.

[0145] 임의의 정제 단계에서의 샘플의 단백질 농도를 임의의 적절한 방법에 의해 결정할 수 있다. 이같은 방법은 당업계에 주지되어 있고, 1) 비색법 예컨대 로우리(Lowry) 분석법, 브래드포드(Bradford) 분석법, 스미스(Smith) 분석법, 및 콜로이드성 금 분석법; 2) 단백질의 자외선 흡수 성질을 활용하는 방법; 및 3) 동일한 젤 상의 기지량의 단백질 표준물과의 비교를 기초로 하는 젤 상의 염색된 단백질 밴드를 기초로 하는 시각적인 평가를 포함한다. 예를 들어 [Stoschek (1990), Quantitation of Protein, Guide to Protein Purification, Methods in Enzymol. 182: 50-68] 참조.

[0146] 표적 단백질, 뿐만 아니라 샘플 내에 존재할 수 있는 오염 단백질을 임의의 적합한 수단에 의해 모니터링할 수 있다. 바람직하게는, 기술이 약 2 백만분율 (ppm) (정제될 단백질 1 mg 당 ng으로 계산됨) 내지 500 ppm 사이 범위의 오염물을 검출하기에 충분히 민감하여야 한다. 예를 들어, 당업계에 주지되어 있는 방법인 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)을 사용하여 제2 단백질에 의한 단백질의 오염을 검출할 수 있다. 예를 들어, 그 전문

이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Reen (1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32: 461-466] 참조. 한 측면에서, 본원에 기술된 방법 후에 이같은 다른 단백질에 의한 단백질의 오염이, 바람직하게는 약 2배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 3배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 5배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 10배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 20배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 30배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 40배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 50배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 60배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 70배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 80배 이상만큼, 더욱 바람직하게는 약 90배 이상만큼, 가장 바람직하게는 약 100배 이상만큼 감소될 수 있다.

[0147] 또 다른 측면에서, 본원에 기술된 방법 후의 이같은 또 다른 단백질에 의한 단백질의 오염은 약 10,000 ppm 이하, 바람직하게는 약 2500 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 400 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 360 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 320 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 280 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 240 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 200 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 160 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 140 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 120 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 100 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 80 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 60 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 40 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 30 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 20 ppm 이하, 더욱 바람직하게는 약 10 ppm 이하, 가장 바람직하게는 약 5 ppm 이하이다. 이같은 오염은 검출불가능한 수준 내지 약 10 ppm 또는 약 10 ppm 내지 약 10,000 ppm일 수 있다. 단백질이 약리학적 용도를 위해 정제되는 경우, 당업자는 1주 당 특정량을 초과하는 오염 단백질이 환자에게 제공되지 않는 것을 목표로 제2 단백질의 바람직한 수준이 환자 당 투여될 단백질의 1주 용량에 좌우될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 요구되는 단백질 1주 용량이 감소되면, 제2 단백질에 의한 오염 수준이 증가될 수 있다.

[0148] 정제될 단백질의 샘플 내에 존재할 수 있는 DNA의 양을 임의의 적절한 방법에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응을 이용하는 분석법을 사용할 수 있다. 임의적으로는, 기술이 단백질 1 mg 당 10 피코그램 이상의 수준의 DNA 오염을 검출할 수 있다. HIC에 의해, 임의적으로는 약 2배 만큼, 바람직하게는 약 5 배 만큼, 더욱 바람직하게는 약 10배 만큼, 더욱 바람직하게는 약 15배 만큼, 가장 바람직하게는 약 20배 만큼, DNA 수준이 감소될 수 있다. 임의적으로, 히드록시아파타이트 크로마토그래피 후의 DNA 수준은 단백질 1 mg 당 약 20 피코그램 미만, 바람직하게는 단백질 1 mg 당 약 15 피코그램 미만, 더욱 바람직하게는 단백질 1 mg 당 약 10 피코그램 미만, 가장 바람직하게는 단백질 1 mg 당 약 5 피코그램 미만이다.

#### 단백질 A-기반 크로마토그래피

[0150] 한 실시양태에서, 항체 제제를 함유하는 수화 배지를 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 스타필로코쿠스 단백질 A (SpA)는 N-말단으로부터의 순서로 E, D, A, B 및 C로 명명된 5개의 거의 상동성인 도메인들로 구성된 42 kDa 단백질이다 ([Sjodhal Eur J Biochem 78: 471-490 (1977)]; [Uhlen et al. J. Biol. Chem. 259: 1695-1702 (1984)]). 이러한 도메인들은 각각 약 65%-90% 아미노산 서열 동일성을 공유하는 약 58개의 잔기를 함유한다. 단백질 A와 항체 간의 결합 연구는 SpA의 5개 도메인 모두 (E, D, A, B 및 C)가 IgG에 이의 Fc 영역을 통해 결합하는 한편, 도메인 D 및 E는 유의한 Fab 결합을 나타낸다는 것을 나타냈다 ([Ljungberg et al. Mol. Immunol. 30(14):1279-1285 (1993)]; [Roben et al. J. Immunol. 154:6437-6445 (1995)]; [Starovasnik et al. Protein Sci 8:1423-1431 (1999)]). B 도메인의 기능성 변이체 및 에너지-최소화 버전인 Z-도메인 ([Nilsson et al. Protein Eng 1:107-113 (1987)])은 항체 가변 도메인 영역에 대한 결합이 무시할 만한 것으로 나타났다 ([Cedergren et al. Protein Eng 6(4):441-448 (1993)]; [Ljungberg et al. (1993) 상기 문헌]; [Starovasnik et al. (1999) 상기 문헌]).

[0151] 최근까지, 시판되는 단백질 A 정지 상은 이의 고정된 리간드로서 SpA (스타필로코쿠스 아우레우스 *Staphylococcus aureus*)로부터 단리되거나 재조합에 의해 발현됨)를 사용하였다. 이러한 칼럼을 사용하면, 비-단백질성 리간드를 사용하는 다른 크로마토그래피 양식에서 전형적으로 수행되듯이 칼럼 재생 및 위생을 위해 알칼리성 조건을 사용하는 것이 가능하지 않았다 ([Ghose et al. Biotechnology and Bioengineering Vol. 92 (6) (2005)]). 더 강한 알칼리성 조건을 견디도록 새로운 수지 (맵셀렉트™ 슈어)가 개발되었다 ([Ghose et al. (2005) 상기 문헌]). 단백질 조작 기술을 사용하여, 다수의 아스파라긴 잔기가 단백질 A의 Z-도메인에서 교체되었고, 4개의 동일하게 변형된 Z-도메인의 사량체로서 새로운 리간드가 생성되었다 ([Ghose et al. (2005) 상기 문헌]).

[0152] 따라서, 제조사의 명세서에 따라 시판되는 단백질 A 칼럼을 사용하여 정제 방법이 수행될 수 있다. 첨부된 실시예에 기술된 바와 같이, 맵셀렉트™ 칼럼 또는 맵셀렉트™ 슈어 칼럼 (GE Healthcare Products)을 사용할 수 있다. 맵셀렉트™은 자신의 고정된 리간드로서 재조합 SpA를 함유하는 시판되는 수지이다. 이는 충전층 크로

마토그래피에 의해 대형 배지로부터 항체 분자를 포획한다. IgG에 대한 결합 용량을 강화하는 단백질 A 리간드의 배향을 선호하도록 맵셀렉트™의 재조합 단백질 A 리간드가 조작된다. IgG의 결합 영역에 대한 단백질 A 리간드의 특이성은 천연 단백질 A의 특이성과 유사하다. 맵셀렉트™ 슈어 칼럼에는 맵셀렉트™에 대해 사용된 것과 유사한 고도로 가교된 아가로스 매트릭스가 있고, 사용된 리간드는 4개의 동일하게 변형된 Z-도메인의 사량체이다 (GE Healthcare Products). 제어형 다공성 유리에 공유결합으로 커플링된 단백질 A로 구성된 프로셉- A(PROSEP-A)™ (Millipore, U.K.)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 단백질 A 칼럼의 또 다른 시판되는 공급원을 유용하게 사용할 수 있다. 또 다른 유용한 단백질 A 제형에는 단백질 A 세파로스 패스트 플로우(FAST FLOW)™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 및 토요펄(TOYOPEARL)™ 650M 단백질 A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA)가 포함된다.

[0153] 히드록시아파타이트 수지

다양한 히드록시아파타이트 크로마토그래피 수지가 시판되고, 임의의 입수가능한 형태의 물질이 본 발명의 실행에서 사용될 수 있다. 히드록시아파타이트 크로마토그래피에 적절한 조건의 상세한 설명이 WO 05/044856에서 제공되고, 이의 내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

본 발명의 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트는 결정질 형태이다. 본 발명에서 사용하기 위한 히드록시아파타이트는 입자를 형성하도록 응집되고 안정적인 다공성 세라믹 뎅어리로 고온에서 소결된 것일 수 있다. 히드록시아파타이트의 입자 크기는 광범위하게 변할 수 있지만, 전형적인 입자 크기는 직경 1  $\mu\text{m}$  내지 1,000  $\mu\text{m}$ 의 범위이고, 10  $\mu\text{m}$  내지 100  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 입자 크기는 20  $\mu\text{m}$ 이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 입자 크기는 40  $\mu\text{m}$ 이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 입자 크기는 80  $\mu\text{m}$ 이다.

[0156] 다수의 크로마토그래피 지지제가 cHA 칼럼의 제조에서 사용될 수 있고, 제I형 및 제II형 히드록시아파타이트가 가장 광범위하게 사용된다. 제I형은 단백질 결합 용량이 높고, 산성 단백질에 대한 결합 용량이 더 양호하다. 그러나, 제II형은 단백질 결합 용량이 더 낮지만, 핵산 및 특정 단백질에 대한 분해능이 더 양호하다. 또한 제II형 물질은 일부민에 대한 친화력이 매우 낮고, 다수의 면역글로불린 종 및 클래스의 정제에 특히 적절하다. 특정 히드록시아파타이트 유형의 선택은 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0157] 본 발명은 유리되어 있거나(loose), 칼럼 내에 충전되어 있거나, 또는 연속 고리식 크로마토그래피 내에 있는 히드록시아파타이트 수지와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세라믹 히드록시아파타이트 수지는 칼럼 내에 충전된다. 칼럼 치수의 선택은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 0.5 cm 이상의 칼럼 직경 + 층 높이 약 20 cm가 소규모 정제에 사용될 수 있다.

[0158] 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 약 cm 내지 약 60 cm의 칼럼 직경이 사용될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 60 cm 내지 85 cm의 칼럼 직경이 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, pH 9.0의 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액 내의 세라믹 히드록시아파타이트 수지의 슬러리가 약 4 cm/분의 유속으로 또는 중력으로 칼럼을 충전시키는데 사용될 수 있다.

[0159] 히드록시아파타이트 수지에 대한 완충제 조성을 및 로딩 조건

[0160] 히드록시아파타이트 수지를 항체 제제와 접촉시키기 전에, pH, 이온 강도 및 온도와 같은 파라메터를 조정할 필요가 있을 수 있고, 그리고 일부 경우에서는 상이한 종류의 물질들을 첨가할 필요가 있을 수 있다. 따라서, 임의적인 단계로서, 히드록시아파타이트 매트릭스를 용액 (예를 들어 pH, 이온 강도 등의 조정 또는 세제의 도입을 위한 완충제)으로 세정함으로써 히드록시아파타이트 매트릭스의 평형화를 수행하여 항체 제제의 정제를 위한 필요한 특성을 초래한다.

[0161] 조합형 결합/통과-유동 방식 히드록시아파타이트 크로마토그래피에서, 히드록시아파타이트 매트릭스를 용액으로 평형화 및 세정함으로써, 항체 제제의 정제를 위한 필요한 특성을 초래한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 약염기성 내지 약산성 pH의 0.01 내지 2.0 M NaCl을 함유하는 용액을 사용하여 매트릭스를 평형화시킬 수 있다. 예를 들어, 평형화 완충제는 1 내지 20 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 1 내지 10 mM 인산나트륨을 함유할 수 있으며, 또 다른 실시양태에서는 2 내지 5 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 2 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 5 mM 인산나트륨을 함유할 수 있다. 평형화 완충제는 0.01 내지 2.0 M NaCl을 함유할 수 있고, 한 실시양태에서는 0.025 내지 0.5 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 0.05 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 0.1 M NaCl을 함유할 수 있다. 로딩 완충제의 pH는 6.2 내지 8.0 범위일 수 있다. 한 실시양태에서, pH는 6.6 내지 7.7일 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 pH가 7.3일 수 있다. 평형화 완충제는 0 내지 200 mM 아르기닌을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 120

mM 아르기닌을 함유할 수 있으며, 또 다른 실시양태에서는 100 mM 아르기닌을 함유할 수 있다. 평형화 완충제는 0 내지 200 mM HEPES를 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 20 mM HEPES를 함유할 수 있으며, 또 다른 실시양태에서는 100 mM HEPES를 함유할 수 있다.

[0162] SDAB 분자 제제의 완충제를 통과-유동 방식 히드록시아파타이트 크로마토그래피에 대비하여 적합한 완충제 또는 로딩 완충제로 또한 교환할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 제제의 완충제를 약산성 내지 약염기성 pH의 0.2 내지 2.5 M NaCl을 함유하는 로딩 완충제로 교환할 수 있다. 예를 들어, 로딩 완충제는 1 내지 20 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 2 내지 8 mM 인산나트륨을 함유할 수 있으며, 또 다른 실시양태에서는 3 내지 7 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 5 mM 인산나트륨을 함유할 수 있다. 한 실시양태에서 로딩 완충제는 0.2 내지 2.5 M NaCl을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 0.2 내지 1.5 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 0.3 내지 1.0 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 350 mM NaCl을 함유할 수 있다. 로딩 완충제의 pH는 6.4 내지 7.6 범위일 수 있다. 한 실시양태에서 pH는 6.5 내지 7.0일 수 있고, 또 다른 실시양태에서 pH는 6.8일 수 있다.

[0163] SDAB 분자 제제를 결합 양식, 통과-유동 방식, 또는 이들의 조합으로 히드록시아파타이트 수지에 접촉시키는 것이 충전층 칼럼, 고체상 매트릭스를 함유하는 유동/팽창층 칼럼, 및/또는 고체상 매트릭스가 특성 시간 동안 용액과 혼합되는 단순 배치 공정에서 수행될 수 있다.

[0164] 히드록시아파타이트 수지를 항체 제제와 접촉시킨 후, 세정 절차가 임의적으로 수행된다. 그러나, 매우 높은 순도의 면역글로불린이 결정적이지 않거나 또는 추가적인 통과-유동 항체가 요구되지 않는 일부 경우에, 세정 절차가 생략될 수 있어, 공정 단계, 뿐만 아니라 세정 용액이 절약된다. 사용되는 세정 완충제는 히드록시아파타이트 수지의 성질, 사용되는 히드록시아파타이트 크로마토그래피의 양식에 좌우될 것이고, 따라서 당업자에 의해 결정될 수 있다. 통과-유동 방식 및 조합형 결합/통과-유동 방식에서, 칼럼의 임의적인 세정 후 수득된 정제된 항체 통과-유동물을 또 다른 정제된 항체 분획과 풀링(pooling)할 수 있다.

[0165] 결합 양식에서, 임의적인 세정 절차 후 칼럼으로부터 SDAB 분자가 용출될 수 있다. 칼럼으로부터의 항체 용출을 위해, 약산성 내지 약염기성 pH의 약 0.2 내지 2.5 M NaCl을 함유하는 이온 강도가 높은 포스페이트 완충제가 본 발명에서 사용된다. 예를 들어, 용출 완충제는 1 내지 20 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 2 내지 8 mM 인산나트륨을 함유할 수 있으며, 또 다른 실시양태에서는 2 내지 6 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 3 mM 인산나트륨을 함유할 수 있고, 또 다른 실시양태에서는 5 mM 인산나트륨을 함유할 수 있다. 용출 완충제는 0.2 내지 2.5 M NaCl을 함유할 수 있고, 한 실시양태에서는 0.2 내지 1.5 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 0.3 내지 1.1 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 1.0 M NaCl, 또 다른 실시양태에서는 0.35 M NaCl을 함유할 수 있다. 용출 완충제의 pH는 6.4 내지 7.6 범위일 수 있다. 한 실시양태에서 pH는 6.5 내지 7.3일 수 있고, 또 다른 실시양태에서 pH는 7.2일 수 있으며, 또 다른 실시양태에서 pH는 6.8일 수 있다. 연속적 또는 계단식 구배로 칼럼으로부터 항체를 용출시키기 위해 용출 완충제가 변경될 수 있다.

[0166] 결합 양식, 통과-유동 방식, 및 이들의 조합 모두에서, 항체의 용출 또는 통과-유동 후, 임의적으로 고체 상 매트릭스를 세척, 즉 스트리핑 및 재생시킬 수 있다. 전형적으로, 고체 상 표면에 불순물이 증강되는 것을 최소화하고/하거나 매트릭스를 살균하여 미생물로의 생성물 오염을 피하기 위해 규칙적으로 이러한 절차가 수행된다.

[0167] 당업자의 지식에 따라 완충제 성분이 조정될 수 있다.

[0168] 추가적인 임의 단계

[0169] 상기 언급된 바와 같이, 응집물들로부터 단량체성 IgG를 분리하는데 히드록시아파타이트 크로마토그래피가 단독으로 사용될 수 있는 것으로 발견되었지만, 본 발명의 정제 방법은 또 다른 단백질 정제 기술과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 히드록시아파타이트 단계에 선행하는 하나 이상의 단계가 오염물 또는 불순물의 로딩 챌린지(challenge)를 감소시키는데 바람직할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 히드록시아파타이트 단계 이후의 하나 이상의 정제 단계가 추가적인 오염물 또는 불순물을 제거하는데 바람직할 수 있다.

[0170] 기술된 cHA 정제 절차는 단백질 A 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 고정된 금속 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 바이러스 제거 여과, 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하지만 이에 한정되지 않는 또 다른 정제 단계들과 임의적으로 조합될 수

있다.

[0171] 한 실시양태에서, cHA 정제 단계 전에, 임의적으로 수화 배지를 단백질 A 크로마토그래피 단계에 의해 먼저 정제할 수 있다. 예를 들어, 제어형 다공성 유리에 공유결합으로 커플링된 단백질 A로 구성된 프로셉-A(PROSEP-A)<sup>TM</sup> (Millipore, U.K.)를 유용하게 사용할 수 있다. 또 다른 유용한 단백질 A 제형에는 단백질 A 세파로스 패스트 플로우<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 토요필<sup>TM</sup> 650M 단백질 A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA), 및 맵셀렉트(MABSELECT)<sup>TM</sup> 칼럼 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)이 포함된다.

[0172] cHA 정제 전의 임의 단계로서, 이온 교환 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 크로마토그래피를 위한 음이온성 또는 양이온성 지지체를 형성하기 위해 각종 음이온성 또는 양이온성 치환체가 매트릭스에 부착될 수 있다. 음이온성 교환 치환체에는 디에틸아미노에틸 (DEAE), 트리메틸아미노에틸 아크릴아미드 (TMAE), 4차 아미노에틸 (QAE) 및 4차 아민 (Q) 기가 포함된다. 양이온성 교환 치환체에는 카르복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE), 설포프로필 (SP), 포스페이트 (P) 및 설포네이트 (S)가 포함된다. 셀룰로스성 이온 교환 수지 예컨대 DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 및 CM-52가 <Whatman Ltd.> (Maidstone, Kent, U.K.)로부터 입수 가능하다. 세파텍스-기반 및 가교 이온 교환제가 또한 공지되어 있다. 예를 들어, DEAE-, QAE-, CM-, 및 SP 세파텍스, 및 DEAE-, Q-, CM- 및 S-세파텍스, 및 세파로스가 모두 <Amersham Biosciences> (Piscataway, NJ. Further)로부터 입수 가능하다. 추가로, DEAE 및 CM 유도체화 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체 예컨대 토요필<sup>TM</sup> DEAE-650S 또는 M 및 토요필<sup>TM</sup> CM-650S 또는 M이 <Toso Haas Co.> (Philadelphia, PA)로부터 입수 가능하다.

[0173] 본 발명의 한 실시양태에서, 이온 교환 크로마토그래피가 결합 방식 또는 유동-통과 방식으로 사용될 수 있다.

[0174] 특정 실시양태에서, 단백질 A 크로마토그래피 단계가 제일 먼저 수행되고, 음이온 교환 단계가 두번째로 수행되며, cHA 단계가 세번째로 수행된다.

#### 추가적인 불순물의 제거

[0176] HMWA 제거에 더하여, cHA 크로마토그래피가 항체 제제로부터 또 다른 불순물을 제거하는데 유용한 것으로 나타났다. 본 발명의 cHA 크로마토그래피 방법에 의해 제거될 수 있는 또 다른 불순물에는 DNA, 숙주 세포 단백질, 우발성 바이러스, 및 이전의 정제 단계로부터의 단백질 A 오염물이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0177] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명은 항체 제제로부터 단백질 A를 제거할 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 최종 제제 내에 존재하는 단백질 A의 양이 유의하게 감소될 수 있고, 예컨대 300 ppm 내지 1 ppm 미만이다.

#### 투여 및 치료 방법

[0179] 본원에 개시된 방법에 의해 정제된 SDAB 분자를 함유하는 제형은 TNF  $\alpha$  관련 장애, 예를 들어, 염증성 또는 자가면역 장애를 치료 또는 예방하기 위해 (예를 들어, 이와 관련된 하나 이상의 증상을 감소 또는 완화시키기 위해) 단독으로 또는 제2 작용제, 예를 들어, 제2의 치료적으로 또는 약리학적으로 활성인 작용제와 함께 대상 (예를 들어, 인간 대상)에게 투여될 수 있다. 용어 "치료하기"는 통계학적으로 유의한 정도로 또는 당업자가 검출 가능한 정도로, 장애와 관련된 상태, 증상 또는 파라메터를 개선하는데 또는 장애의 진행을 방지하는데 효과적인 양, 방식 및/또는 양식으로 치료법을 투여하는 것을 지칭한다. 효과적인 양, 방식 또는 양식은 대상체에 따라 변할 수 있고, 대상체에 맞춰질 수 있다.

[0180] 치료될 수 있는 면역 장애의 비-제한적인 예로는 자가면역 장애, 예를 들어, 관절염 (류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선성 관절염, 루푸스-관련 관절염 또는 강직성 척추염 포함), 피부경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그伦 증후군, 혈관염, 다발성 경화증, 자가면역 갑상선염, 피부염 (아토피 피부염 및 습진 피부염 포함), 중증 근무력증, 염증성 장 질환 (IBD), 크론병, 결장염, 진성 당뇨병 (제I형); 예를 들어 피부의 염증성 상태 (예를 들어, 건선); 급성 염증성 상태 (예를 들어, 내독소혈증, 패혈증, 독성 쇼크 증후군 및 감염성 질환); 이식 거부 및 알러지가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 한 실시양태에서, TNF  $\alpha$  관련 장애는 관절염성 장애, 예를 들어, 류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염 (RA) (예를 들어, 중등도 내지 중증 류마티스성 관절염), 골관절염, 건선성 관절염, 또는 강직성 척추염, 다관절형 소아 특발성 관절염 (JIA) 중 하나 이상으로부터 선택된 장애; 또는 건선, 궤양성 결장염, 크론병, 염증성 장 질환, 및/또는 다발성 경화증이다.

[0181] 특정 실시양태에서, 제형은 제2 치료제를 포함한다. 예를 들어, TNF-나노바디에 대해, 제2 작용제는 항-TNF 항체 또는 이의 TNF 결합 단편일 수 있고, 이때 제2 TNF 항체는 제형의 TNF-결합 SDAB 분자와 에피토프 특이성이

상이하다. TNF-결합 SDAB와 함께 공동-제형될 수 있는 작용제의 또 다른 비-제한적인 예로는, 예를 들어, 시토카인 억제제, 성장 인자 억제제, 면역억제제, 항염증제, 대사 억제제, 효소 억제제, 세포독성제, 및 세포증식억제제가 포함된다. 한 실시양태에서, 추가적인 작용제는 비-스테로이드성 항염증제 (NSAID); 프레드니솔론, 프레드니손, 코르티손 및 트리암시놀론이 포함되는 코르티코스테로이드; 및 질환 변형 항-류머티스성 약물 (DMARD), 예컨대 메토트렉세이트, 히드록시클로로퀸 (Plaquinil) 및 살파살라진, 레플루노미드 (Arava<sup>®</sup>), 이태너셉트 (Enbrel<sup>®</sup>), 인플릭시맙 (Remicade<sup>®</sup>) (메토트렉세이트와 함께 또는 메토트렉세이트 없이) 및 아달리무맙 (Humira<sup>®</sup>)이 포함되는 종양 과사 인자 억제제, 항-CD20 항체 (예를 들어, Rituxan<sup>®</sup>), 가용성 인터류킨-1 수용체, 예컨대 아나킨라 (Kineret), 금, 미노사이클린 (Minocin<sup>®</sup>), 페니실라민, 및 아자티오프린, 시클로포스파미드 및 시클로스포린이 포함되는 세포독성제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 관절염에 대한 표준 치료제이다. 이같은 조합 요법은 투여되는 치료제들을 더 낮은 투여량으로 유리하게 사용할 수 있고, 따라서 다양한 단독요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0182] 제형은 액체 용액 (예를 들어, 주사용 및 주입용 용액)의 형태일 수 있다. 이같은 조성물은 비경구 방식 (예를 들어, 피하, 복강내 또는 근육내 주사)에 의해 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여"라는 구절은 일반적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고, 피하 또는 근육내 투여, 뿐만 아니라 정맥내, 낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 제형은 피하 투여된다.

[0183] 제약 제형은 무균성이고, 제조 및 보관 조건 하에 안정적이다. 투여를 위한 규제 기준 및 산업 기준을 충족시키는지를 확실히 하기 위해 제약 조성물을 또한 테스트할 수 있다.

[0184] 제약 제형은 용액, 마이크로에멀션, 분산액, 리포솜, 또는 높은 단백질 농도에 적절한 기타 고급 구조물로서 제형될 수 있다. 필요한 양의 본원에 기술된 작용제를 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 적합한 용매 내에 혼입시킨 후 여과 살균시킴으로써 무균성 주사용 용액을 제조할 수 있다. 일반적으로, 본원에 기술된 작용제를 기본적인 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 또 다른 성분을 함유하는 무균성 비히클 내로 혼입시킴으로서 분산액이 제조된다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 용액의 적절한 유동성을 유지시킬 수 있다. 조성물 내에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함함으로써 주사용 조성물의 장기 흡수가 초래될 수 있다.

## 실시예

[0186] 하기의 실시예들은 설명의 목적을 위해서만 제공된다.

### 실시예 1: ATN-103 코딩 서열의 설명

[0188] ATN-103은 TNF  $\alpha$  및 HSA를 표적으로 하는 3가 나노바디 분자이다. WO 06/122786에 기술된 바와 같이 TNF  $\alpha$  또는 HSA에 대한 선별에 의해 라마-유래 과지 라이브러리로부터 나노바디를 단리하였다. 나노바디를 특이적 활성에 대해 테스트하였고, 반감기 확장을 위해 TNF1이 인간 TNF  $\alpha$ 의 나노바디 억제제로서, ALB1이 인간 항-HSA 나노바디로서 선택되었다. 가장 가까운 인간 프레임워크 (DP51/DP53) 상으로의 CDR 그래프트에 의해 TNF1 및 ALB1을 인간화시켰다. TNF1의 인간화 동안, 2개의 낙타류 잔기가 유지되었고 (P84 및 R103), 이러한 벼顶层设计은 TNF30으로 지정되었다. ALB1의 인간화 동안, 7개의 낙타류 잔기가 유지되었고 (N16, N73, T76, P84, T93, I94 및 S103), 이러한 벼顶层设计은 ALB8로 지정되었다. 2개의 TNF30 나노바디를 아미노산 9개의 글리신-세린 링커 (Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>3</sub>Ser (서열 9))에 의해 중앙의 ALB8 나노바디에 각각 연결시켜, 본원에서 "ATN-103"으로 지정되는 3가의 분자를 제공하였다. 하기와 같은 구성의 ATN-103의 아미노산 서열이 도 3에서 제시된다 - TNF30-(글리신-세린 링커)-ALB8-(글리신-세린 링커)-TNF30. 도 2에서, 상보성 결정 영역 (CDR)에 밀줄이 그어진다 (서열 2-7). 예상되는 분자내 디설파드 결합이 수반되는 시스테인 잔기들의 연결에 의해 표시된다. TNF에 대한 결합 도메인은 볼드체로 표시되고, HSA에 대한 결합 도메인은 이탤릭 볼드체로 표시된다. 이러한 결합 도메인들을 연결하는 아미노산 링커는 이탤릭체로 표시된다. 폴리펩티드 사슬에 대해 신호 펩티드 ( ${}^{-19}\text{MGW...VHS}^{-1}$ )가 또한 제시된다.

### 실시예 2: ATN-103 정제 공정

- [0190] ATN-103 정제 공정은 2개의 크로마토그래피 단계 및 3개의 막 여과 단계로 구성된다 (도 3 참조). 달리 지시되지 않는 한 모든 단계들을 실온에서 수행하였다.
- [0191] 각각의 정제 단계의 원리, 목적, 및 설명이 하기에서 제공된다.
- [0192] 맵셀렉트 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 저-pH 바이러스 불활성화
- [0193] 맵셀렉트™ 단백질 A 크로마토그래피 단계의 주요 목표는 정화된 무세포 조건화 배지로부터 생성물을 포착하고, 공정에서 유래된 불순물 (예를 들어, 숙주 세포 DNA 및 단백질, 배지 성분, 및 우발성 물질)로부터 ATN-103을 분리하는 것을 포함한다.
- [0194] 맵셀렉트 단백질 A는 대장균 발효로부터 생산된 재조합 단백질 A로 티오에테르 연결을 통해 공용결합으로 유도 체화된 고도로 가교된 아가로스 매트릭스로 구성된 친화성 수지이다.
- [0195] 맵셀렉트 단백질 A 칼럼을 트리스-완충 염화나트륨 용액으로 평형화시키고, 정화된 무세포 조건화 배지 (CM)를 로딩하였다. 모든 완충제는 300 cm<sup>3</sup>/시로 러닝되었다. 평형화 완충제는 pH 7.5으로 150 mM NaCl 및 50 mM 트리스를 함유하였다. ATN-103은 맵셀렉트™ 단백질 A 수지에 결합하였고, 불순물은 칼럼을 통과하여 유동하였다. 로딩된 수지를 트리스-완충 염화나트륨 용액 (150 mM NaCl 및 50 mM 트리스, pH 7.5)으로 세정하여, 불순물 수준을 추가로 감소시킨 후, 저농도 트리스 완충제가 이어졌다. 저농도 트리스 세정 완충제는 pH 7.5으로 10 mM NaCl 및 10 mM 트리스를 함유하였다. 결합된 생성물을 저-pH 글리신 완충제로 칼럼으로부터 용출시켰다. 저-pH 글리신 용출 완충제는 pH 3.0으로 10 mM NaCl 및 50 mM 글리신을 함유하였다. 히드록시드 용액으로 수지를 재생 및 위생화한 후, 16% 에탄올을 함유하는 용액에서 보관하였다. 1개의 수화물로부터 여러 사이클의 맵셀렉트 단백질 A 단계가 생성될 수 있었다.
- [0196] 생성물 풀을 pH ≤ 3.8에서 1.5±0.5시간 동안 18°C 내지 24°C에서 유지시켰다. 맵셀렉트™ 단백질 A 칼럼 후의 저-pH 불활성화는 외피보유 바이러스를 불활성화시키기 위해 디자인되었다. 그후, 용출 풀을 농축된 HEPES 완충제 (2 mM HEPES, pH 9.0)로 중화하고, 깊이 및 0.2 μm 여과를 사용하여 여과하였다.
- [0197] 마크로-프렙(Macro-Prep) 세라믹 히드록시아파타이트 크로마토그래피
- [0198] 마크로-프렙™ 세라믹 히드록시아파타이트 (cHA) 단계의 주요 목표는 고분자량 응집물 (HMWA), 침출된 단백질 A, 및 숙주 세포-유래 불순물, 예컨대 DNA 및 숙주 세포 단백질 (HCP)을 제거하는 것이다.
- [0199] 마크로-프렙 세라믹 히드록시아파타이트는 6각형 결정 격자로 구성된 암축불능성 매트릭스이다. 칼슘, 포스페이트 및 히드록시드 분자가 (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH))<sub>2</sub>의 화학량론으로 매트릭스를 이룬다. cHA 수지는 양이온 교환, 음이온 교환 및 금속 배위 상호작용을 촉진할 수 있는 멀티-모드 매트릭스이다. 결합된 단백질의 용출은 전형적으로 염 또는 포스페이트 농도의 증가로 달성된다.
- [0200] 먼저 cHA 칼럼을 고농도의 염화나트륨을 함유하는 완충제로 평형화시킨 후, 저농도의 염화나트륨을 함유하는 완충제가 이어졌다. cHA 칼럼에 중화된 맵셀렉트™ 단백질 A 풀을 로딩하였다. 로딩 후, 칼럼을 저염 평형화 완충제로 세정하고, ATN-103을 더 높은 농도의 염을 함유하는 완충제를 사용하여 회수하였다. ATN-103의 용출 후, HMW 및 기타 불순물을 더욱 더 높은 염 및 포스페이트 농도에서 칼럼으로부터 제거하였다. 칼럼을 재생시킨 후, 수산화나트륨 용액에서 보관하였다.
- [0201] 플라노바(Planova) 20N 바이러스 유지 여과
- [0202] 플라노바 20N 바이러스 유지 여과 (VRF) 단계는 잠재적인 우발성 바이러스 오염물을 나타낼 수 있는 입자의 제거에 의해 생성물 안전성을 보증하기 위한 유의한 수준의 바이러스 소거를 제공한다.
- [0203] 1회용 플라노바 20N VRF 기구를 cHA 용출 완충제로 평형화시키고, 마크로-프렙 세라믹 히드록시아파타이트 생성물 풀을 로딩하였다. 생성물이 투과 유류물에서 수집되었다. 로딩이 처리된 후, 완충제 플러시(flush)를 사용하여, 시스템에 남아 있는 추가적인 생성물을 회수하였다.
- [0204] 한외여과/정용여과 및 제형
- [0205] 한외여과/정용여과 단계 (10 kDa MW 차단)를 사용하여, VRF 생성물을 농축하고 이의 완충제를 제형 완충제로 교환하였다.
- [0206] 막 모듈의 평형화 후, 먼저 로딩 용액을 미리 설정된 표적 부피로 농축하고 나서, 14 mM 히스티딘 pH 5.8 완충제로 정용여과하였다. 약 110 g/L로의 추가적인 농축 후, 히스티딘 완충제 플러시로 시스템으로부터 풀을 회수

하여, 약 90 g/L의 최종 단백질 표적 농도를 달성하였다. 소량 (11.1% v/v)의 농축된 모액 (10 mM 히스티딘, 50% 수크로스 및 0.1% 폴리소르베이트 80)을 생성물 풀에 첨가하였다. 수득된 최종 약물 물질 (DS)은 10 mM 히스티딘 pH 6.0, 5% 수크로스, 0.01% 폴리소르베이트 내의 80 g/L ATN-103이었다.

[0207] 최종 여과

[0208] 제형된 약물 물질을 1회용  $0.2 \mu\text{m}$  필터에 통과시켜, 임의의 잠재적인 우발성 미생물 오염물 및 미립자 물질을 제거하였다.

[0209] **실시예 3: 단백질 A 포획 비교**

[0210] 하기의 단백질 A-기반 매트릭스들을 ATN-103을 포획하는 용량에 대해 평가하였다: 맵셀렉트™ (GE Healthcare), 맵셀렉트 엑스트라™ (GE Healthcare), 프로셉® 바 울트라 플러스 (Millipore), 및 맵셀렉트 슈어™ (GE Healthcare). 맵셀렉트™은 Z-도메인을 함유하는 단백질 A 리간드를 사용하고, 가교로 인해 수지 골격이 더 소수성이다. 맵셀렉트 엑스트라™은 30% 증가된 밀도로 맵셀렉트와 동일한 리간드를 사용하고, 더 작은 비드 및 더 큰 구멍 크기를 갖는다. 프로셉® 바 울트라 플러스에는 유리 기반 골격 및 천연 단백질 A 리간드가 있다. 이는 더 높은 유속에서의 더 높은 용량에 대해 디자인되었다. 맵셀렉트 슈어™는 Fc 함유 분자에 결합하고 (ATN-103은 Fc 영역을 갖지 않음), 이의 신규 리간드는 더 큰 부식 안정성을 허용한다.

[0211] 맵셀렉트™에 의해 정제된 단백질 A 퍼크 풀이 로딩 물질로 사용되었을 때 (pH = 7.0, 1 g/L로 희석됨 (조건 배지 농도 제외)), 프로셉® 바 울트라 플러스가 가장 높은 결합 용량 (16 g/L r)을 나타냈고, 맵셀렉트™의 결합 용량은 기준에 실연된 결합 용량에 비해 20% 증가를 나타냈다.

[0212] 동적 결합 용량 (DBC)에 대한 유속의 영향을 시험하였다. 맵셀렉트™에 대해, 결합 용량은 60 cm/시에서의 8.0 g/L r과 비교하여 600 cm/시에서 7.4 g/L r이었다. 맵셀렉트 엑스트라™ 및 프로셉® 바 울트라 플러스가 테스트되었을 때 유사한 경향이 관찰되었다. 따라서, 테스트된 조건 하에 DBC에 대해 유속의 최소 영향이 있었다.

[0213] 단백질 A 결합 용량에 대한 변형제의 효과를 또한 시험하였다. 결과는 0.5 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 의 첨가가 소수성 상호작용을 강화함으로써 DBC를 증가시킬 수 있음을 나타냈다. 예를 들어, 맵셀렉트™에 대한 결합 용량 (CM)이 150 cm/시의 유속으로 12.5 g/L r로 증가하였다. 이어서 추가적인 결합된 물질이  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 가 없는 용액에서 용출되었다.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 가 있는 CM에서 다량의 침전이 검출되었다. 맵셀렉트 엑스트라™ (DBC = 16 g/L r) 및 프로셉® 바 울트라 플러스 (DBC = 17.5 g/L r)가 테스트되었을 때 유사한 결과가 관찰되었다.

[0214] 단백질 A 결합 용량에 대한 PEG의 효과를 시험하기 위해, 6% PEG (4000 Da)를 CM 내로 첨가하였다. 이어서 추가적인 결합된 물질이 PEG가 없는 완충제에서 용출되었다. 결과는 결합 용량에서의 약간의 증가를 나타냈고, 침전이 검출되지 않았다.

[0215] **실시예 4: ATN-103 맵셀렉트 슈어™ 평가**

[0216] 맵셀렉트 단계의 개발 동안, ATN-103에 대한 단백질 A 결합 메커니즘을 더 잘 이해하기 위해 맵셀렉트 슈어™가 결합 실험에서 사용되었다. 뜻밖으로, ATN-103이 맵셀렉트 슈어™에 결합하였고, 결합된 생성물을 제거하기 위해 pH 4.5의 용액이 필요하였다. 맵셀렉트 슈어는 항체와 같이 Fc 영역을 함유하는 분자에만 결합하도록 디자인된 단백질 A 수지이다. ATN-103은 Fc 영역을 함유하지 않는다. 추후의 개발에서, 맵셀렉트 슈어™이 초기 농도의 10% 약진으로 수지 1 L 당 8 g까지의 ATN-103에 결합할 수 있는 것으로 결정되었다.

[0217] **실시예 5: ATN-103 양이온 교환 (CEX) 단계 평가**

[0218] ATN-103 정제 공정에서 포획 칼럼의 용량을 증가시키기 위한 시도로 양이온 교환 (CEX)-기반 포획 단계를 평가하였다. 조건 배지 (CM)의 전도율을 12 내지 9 mS/cm로 저하시키고 pH를  $\leq 4.3$ 으로 적정함으로써, 40 g/L r의 용량이 관찰되었다. ATN-103은 이러한 pH에서의 낮은 개수의 전하/몰로 인해 CEX 배지에 매우 약하게 결합한다. 이러한 약한 결합으로 인해, ATN-103이 저-전도율 용액에서 CEX 수지로부터 용출될 수 있다. 용출 조건은 일반적으로  $\leq 50 \text{ mM NaCl}$ , pH 6.5 내지 7.0이었다. 하류 cHA 평형화 완충제를 사용하여 CEX 칼럼을 또한 용출시킬 수 있었다.

[0219] **CEX 능력 스크린**

[0220] 캡토™ S (GE Healthcare), 프락토젤® SO3-(M) (EMD Chemicals), 토요펠® 기가캡 S-650M (Tosoh Bioscience) 및 포로스® HS 50 (Applied Biosystems)의 4가지 양이온 교환제를 ATN-103에 대한 결합 용량에 대해 테스트하였다. 0.75 mL CM TS2 + 10  $\mu$ L 수지 (수지 1 L 당 75 g을 표적으로 함)가 이러한 스크리닝에서 사용되었다. 칼럼을 로딩 조건과 동일한 pH로 50 mM 아세트산나트륨을 함유하는 완충제로 세정하였다. 단백질을 1M NaCl (pH 5.5)을 함유하는 완충제로 용출시켰다. 결합된 질량을 A280에서의 분광광도법에 의해 측정하였다. 이어서 칼럼을 1M NaCl 및 요소를 함유하는 완충제로 스트리핑하였다. A280에서 측정된 분광광도법은 스트리핑 후 유의한 질량이 결합되지 않았음을 나타냈다. 약 25 g/L r까지의 결합 용량이 연구된 모든 수지에 대해 관찰되었다. 캡토™ S 및 토요펠® 기가캡 S-650M은 비교적 더 약한 결합을 나타냈고, 프락토젤® SO3-(M) 및 포로스® HS 50은 더 단단한 결합을 나타냈다. 이러한 연구는 매우 낮은 전도율 조건으로의 pH에 의한 용출이 가능하다는 것을 가리킨다.

#### [0221] CEX 결합 용량

[0222] CM을 pH 4.0으로 적정하고, 총 0.75 희석으로 로디(Rodi) 물로 3:1 희석하였다 (3부 CM을 1부 로디에 첨가함) (8 mS/cm 로딩). 캡토™ S, 토요펠® 기가캡 S-650M, 포로스® HS 50 및 프락토젤® SO3-(M)의 결합 용량을 2 mL 칼럼 (0.5 cm  $\times$  10 cm)을 사용하여 40 g/L를 초과하는 표적 결합 용량에 대해 먼저 측정하였다. 캡토™ S, 토요펠® 기가캡 S-650M 및 프락토젤® SO3-(M)의 결합 용량을 4.0 내지 4.3의 pH 범위 내의 다양한 조건에서 추가로 결정하였다. 예를 들어, 캡토™ S에 대한 결합 용량은 pH 4.3에서 9 mS/cm; pH 4.0에서 11 mS/cm, pH 4.0에서 9 mS/cm, pH 4.1에서 8 mS/cm으로 각각 측정되었다. 토요펠® 기가캡 S-650M에 대한 결합 용량은 pH 4.3에서 9 mS/cm, pH 4.1에서 8 mS/cm로 측정되었다. 프락토젤® SO3-(M)에 대한 결합 용량은 pH 4.3에서 12 mS/cm; pH 4.3에서 9 mS/cm; pH 4.0에서 12 mS/cm, pH 4.1에서 9 mS/cm, pH 4.0에서 9 mS/cm로 각각 측정되었다. 결과는 프락토젤® SO3-(M)이 CM을 물로 희석하지 않으면서 사용될 수 있음을 나타냈다. 희석 없이, 프락토젤® SO3-(M)은 pH 4.0 내지 4.3에서 양호한 결합 용량을 나타냈다 (DBC 범위: 25 내지 > 40 g/L r). 23% 희석으로, 프락토젤® SO3-(M)은 pH 4.0 내지 4.3 사이에서 우수한 용량을 나타냈다 (DBC 범위: 40 내지 > 50 g/L r).

#### [0223] CEX 용출 접근법

[0224] 구배 용출을 CEX 결합 용량에 대한 실험에 기술된 바와 같이 수행하였다. 시트레이트 완충제가 pH 용출에 사용되었다. 캡토™ S, 토요펠® 기가캡 S-650M, 프락토젤® SO3-(M) 및 포로스® HS 50을 테스트하였다. 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 용출은 높은 순도의 ATN-103 및 낮은 수준의 HMW 및 LMW 종을 나타냈다. 순도 정도는 단백질 A로 용출된 물질의 순도에 적어도 필적하였다. 구배 용출로부터 수득된 정보로 HTS 스크린을 디자인할 수 있다.

#### [0225] 실시예 6: 고농축 한외여과/정용여과 및 제형

##### [0226] 실시예 6.1: 고농축 한외여과/정용여과 및 제형

[0227] 한외여과/정용여과 단계 (10 kDa MW 차단)를 사용하여, VRF 생성물을 농축하고 이의 완충제를 제형 완충제로 교환하였다.

[0228] 막 모듈의 평형화 후, 먼저 로딩 용액을 미리 설정된 표적 부피로 농축하고 나서, 28 mM 히스티딘 pH 5.8 완충제로 정용여과하였다. 약 200 g/L로의 추가적인 농축 후, 히스티딘 완충제 플러시로 시스템으로부터 풀을 회수하여, 약 150 g/L의 최종 단백질 표적 농도를 달성하였다. 소량 (17.6% v/v)의 농축된 모액 (20 mM 히스티딘, 50% 수크로스 및 0.0667% 폴리소르베이트 80)을 생성물 풀 80에 첨가하였다. 수득된 최종 DS는 10 mM 히스티딘 pH 6.0, 5% 수크로스, 0.01% PS80 내의 80 g/L ATN-103이었다. 수득된 최종 DS는 20 mM 히스티딘 pH 6.0, 7.5% 수크로스, 0.01% 폴리소르베이트 내의 125 g/L ATN-103이었다.

##### [0229] 실시예 6.2: 고농축 한외여과/정용여과

[0230] 한외여과/정용여과 단계 (10 kDa MW 차단)를 사용하여, VRF 생성물을 농축하고 이의 완충제를 제형 완충제로 교환하였다.

[0231] 막 모듈의 평형화 후, 먼저 로딩 용액을 약 40 g/L로 농축하고 나서, 30 mM 히스티딘, pH 5.8, 8.5% 수크로스 완충제로 정용여과하였다. 약 300 g/L로의 추가적인 농축 후, 정용여과 완충제로 시스템으로부터 풀을 회수하여, 약 175 g/L의 최종 단백질 표적 농도를 달성하였다.

[0232] 실시예 6.3: 고농축 한외여과/정용여과 및 제형

[0233] 한외여과/정용여과 단계 (10 kDa MW 차단)를 사용하여, VRF 생성물을 농축하고 이의 완충제를 제형 완충제로 교환하였다.

[0234] 막 모듈의 평형화 후, 먼저 로딩 용액을 약 40 g/L로 농축하고 나서, 30 mM 히스티딘 pH 5.8 완충제로 정용여과하였다. 약 320 g/L로의 추가적인 농축 후, 정용여과 완충제로 시스템으로부터 풀을 회수하여, 약 210 g/L의 최종 단백질 표적 농도를 달성하였다.

[0235] DS 표적이  $\geq 200$  g/L인 경우, 실시예 6.2 및 실시예 6.3의 조합을 하기와 같이 수행하였다: 한외여과/정용여과 단계 (10 kDa MW 차단)를 사용하여, VRF 생성물을 농축하고 이의 완충제를 제형 완충제로 교환하였다. 막 모듈의 평형화 후, 먼저 로딩 용액을 40 g/L로 농축하고 나서, 히스티딘 수크로스 완충제로 정용여과하였다. 약 320 g/L로의 추가적인 농축 후, 정용여과 완충제로 시스템으로부터 풀을 회수하여, 약  $\geq 200$  g/L의 최종 단백질 표적 농도를 달성하였고, 이때 수크로스가 이미 존재하였다. 그후, 제형 스파이크(spike)가 1.01 % v/v이어서, UF 풀이 유의하게 희석되지 않았고, 최종 DS가  $\geq 200$  g/L이었다.

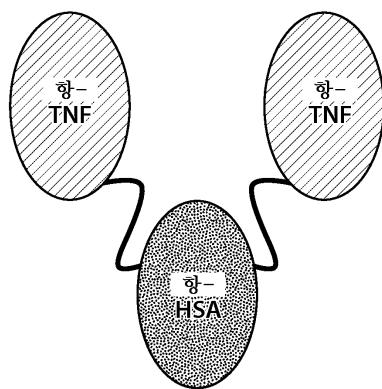
## 등가물

[0237] 본원에서 언급된 모든 참고문헌은 각각의 개별적인 간행물 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 것으로 명확하게 및 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0238] 본 발명은 본원에 기술된 구체적인 실시양태들에 의해 범주가 한정되지 않는다. 실제로, 본원에 기술된 것들에 더하여 본 발명의 다양한 변형이 상기의 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이같은 변형이 첨부된 청구항의 범주 내에 속하도록 의도된다.

## 도면

### 도면1



## 도면2

-19 MGWSCIILFLVATATGVHS -1

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY 60

61 PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVTVSSGGGS 120

121 GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS 180

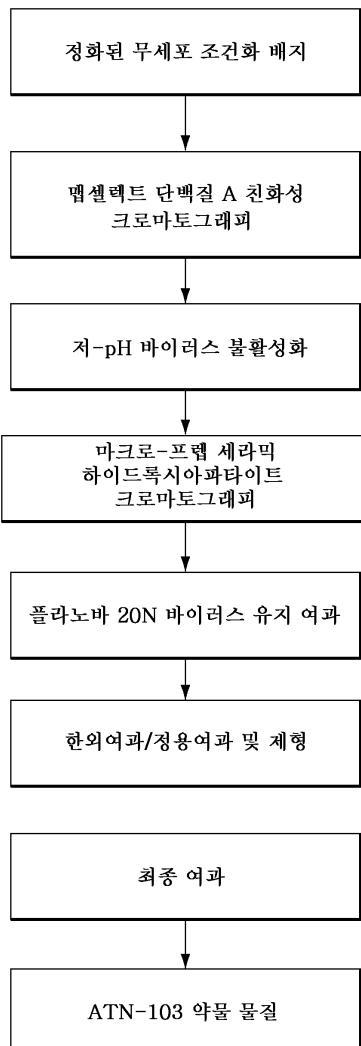
181 DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG 240

241 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEIN 300

301 TNGLITKYPDPSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGTLVT 360

361 **VSS** (서열 1)

## 도면3



**도면4a**

1 aqhdeaqqna fyqvlnmpnl nadqrngfiq slkddpsqsa nvlgeaqkln dsqapkadaq  
 61 qnkfnkdqqs afyeilnmpn lneeqrngrfi qslkddpsqs tnvlgaeakk nesqapkadn  
 121 nfnkeqqnaf yeilnmpnln eeqrngrfiqslk ddpssanll llaeakklna sqapkadnkf  
 181 nkeqqnafye ilhlpnlnee qrngfiqslk ddpssanll aeakklna apkadnkfnk  
 241 eqqnafyel hlpnlteeqr ngfiqslkdd psvskeilae akklndaqap keednnkpgk  
 301 edgnkpgked gnkpgkednk kpgkedgnkp gkdnkkpgk edgnkpgked gnkpgkedgn  
 361 kpgkedgnkp gkedgngvhv vkgdvtvndi akangttadk iaadnkladk nmikpgqelv  
 421 vdkkqpanha dankaqalpe t (서열 11)

**도면4b**

1 vdnkfn**keqq nafyeilhlp nlneeqrnaf iqslkddpsq sanllaeakk lndaqapk**  
 (서열 12)

**서 열 목 록**

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; WYETH

&lt;120&gt; METHODS FOR PURIFICATION OF SINGLE DOMAIN ANTIGEN BINDING

## MOLECULES

&lt;130&gt; W2023-7038W0

&lt;140&gt;&lt;141&gt;&lt;150&gt; 61/109,481

&lt;151&gt; 2008-10-29

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 382

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;220&gt;&lt;221&gt; signal

&lt;222&gt; (1)..(19)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (20)..(382)

&lt;400&gt; 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15 -10 -5

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro

50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

65 70 75

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr

95 100 105

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu

110 115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser

130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

145 150 155

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val Ser

160 165 170

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

175 180 185

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu

190 195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr

210 215 220

Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225 230 235

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val

240 245 250

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

255 260 265

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Tyr Trp Val

270 275 280 285

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Asn Thr

290 295 300

Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

305 310 315

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

320 325 330

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Ser

335 340 345

Gly Phe Asn Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

350 355 360

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 2

Asp Tyr Trp Met Tyr

1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4

Ser Pro Ser Gly Phe Asn

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Ser Phe Gly Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 6

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 7

Gly Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 8

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(10)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (6)..(10)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(15)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (11)..(15)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference  
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (16)..(20)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (16)..(20)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference  
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (21)..(25)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (21)..(25)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference  
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(30)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (26)..(30)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (31)..(35)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (31)..(35)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<400> 8

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser

35

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (21)..(25)

<223> /replace=" "

<220><221> misc\_feature

<222> (21)..(25)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (26)..(30)

<223> /replace=" "

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (26)..(30)

&lt;223&gt; /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

&lt;400&gt; 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

20 25 30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 441

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcal sp.

&lt;400&gt; 11

Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn

1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu

20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys

35 40 45

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys Phe

50 55 60

Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn

65 70 75 80

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp

85 90 95

Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu

100 105 110

Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn

115 120 125

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 130   | 135 | 140 |
| Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys |     |     |
| 325   | 330 | 335 |
| Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn |     |     |
| 340   | 345 | 350 |
| Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn |     |     |
| 355   | 360 | 365 |
| Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly |     |     |
| 370   | 375 | 380 |

Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys  
 385 390 395 400

Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly  
 405 410 415

Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala  
 420 425 430

Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr  
 435 440

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 12

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55