



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0091678  
(43) 공개일자 2011년08월12일

(51) Int. Cl.

*C07K 1/22* (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)  
*C07K 1/20* (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011176

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년10월20일

심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 2011년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/061329

(87) 국제공개번호 WO 2010/141039

국제공개일자 2010년12월09일

(30) 우선권주장

61/196,753 2008년10월20일 미국(US)

(71) 출원인

**아보트 러보러터리즈**미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트  
파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6  
에이-1

(72) 발명자

**히크먼 로버트 케이.**미국 매사추세츠주 01605 우스터 히비스커스 드라  
이브 6**황 칭**미국 매사추세츠주 01604 우스터 오크우드 레인  
51

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

**장춘**

전체 청구항 수 : 총 29 항

**(54) 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용한 항체의 분리 및 정제****(57) 요 약**

본원에는 약제학적 용도로의 사용에 충분히 순수한 항체 조성물을 생성하는 친화성 크로마토그래피 단계를 사용하는 항체의 분리 및 정제 방법이 기술된다. 본원에 기술된 방법은 pH 바이러스 감소/불활성화, 한외여과/투석 여과, 친화성 크로마토그래피, 바람직하게는 단백질 A 친화성, 이온 교환 크로마토그래피, 및 소수성 크로마토그래피를 포함한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

**대 표 도 - 도1**

- 항-IL-12 항체 (ABT-874) 중쇄 가변 영역 서열  

$$\begin{array}{ccccccccc} 1 & 10 & 20 & 30 & 40 \\ \text{QVQLVESGGG} & \text{VVQPGRSLRL} & \text{SCAASGFTFS} & \text{SYGMHWVRQA} \\ \text{CDR1} & & & \\ \text{PGKGLEQVAF} & \text{IRYDGSNKYY} & \text{ADSVKGRFTI} & \text{SRDN5KNLY} \\ \text{CDR2} & & & \\ \text{LQMNSLRAED} & \text{TAVYYCKTHG} & \text{SHDNWGQGTW} & \text{VTVSS} \\ \text{CDR3} & & & \end{array}$$

- 항-IL-12 항체 (ABT-874) 경쇄 가변 영역 서열  

$$\begin{array}{ccccccccc} 1 & 10 & 20 & 30 & 40 \\ \text{QSVLTQPPSV} & \text{SGAPGQRVTI} & \text{SCSGSRNIG} & \text{SNTVKWYQQL} \\ \text{CDR1} & & & \\ \text{PGTAPKLLIY} & \text{YGNDQRPSGV} & \text{PDRFSGSKGT} & \text{SASLAITGVQ} \\ \text{CDR2} & & & \\ \text{AEDEADYYCQ} & \text{SYDRYTHPAL} & \text{LFPGTGTKVTVLG} & \\ \text{CDR3} & & & \end{array}$$

(72) 발명자

위드 셰릴 엘.

미국 로드아일랜드주 02857 시추에이트 세인트 메리스 로드 30

에니스 스콧 티.

미국 매사추세츠주 01609 우스터 브리검 로드 14

페릴리-팔머 바바라

미국 매사추세츠주 01740 볼튼 본 힐 로드 70

완 민

미국 메릴랜드주 21704 프레더릭 켄달 드라이브  
3824

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

항체 및 하나 이상의 숙주세포-단백질 (host cell-protein: HCP)을 포함하는 샘플 혼합물로부터 HCP 감소된 항체 제제를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은

- (a) 상기 샘플 매트릭스의 pH를 약 3 내지 약 4로 감소시켜 일차 회수 샘플을 형성하고;
- (b) 상기 일차 회수 샘플의 pH를 약 6.0 내지 약 8로 조절한 후, 상기 일차 회수 샘플을 친화성 크로마토그래피 수지와 접촉시키고, 친화성 크로마토그래피 샘플을 수집하고;
- (c) 상기 친화성 크로마토그래피 샘플을 이온 교환 수지와 접촉시키고, 이온 교환 샘플을 수집하고;
- (d) 상기 이온 교환 샘플을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (hydrophobic interactive chromatography: HIC) 수지와 접촉시키고, 상기 HCP-감소된 항체 제제를 포함하는 HIC 샘플을 수집함을 포함하는,

항체 및 하나 이상의 숙주세포-단백질 (host cell-protein: HCP)을 포함하는 샘플 혼합물로부터 HCP 감소된 항체 제제를 제조하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 시트르산, 아세트산, 카프릴산 등으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적합한 산을 상기 샘플 혼합물과 혼합함으로써 상기 pH 감소를 달성하는, 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 수지가 단백질 A 수지인, 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단백질 A 수지가 MabSelect™ 수지인, 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 이온 교환 수지가 음이온 교환 수지 또는 양이온 교환 수지인, 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 이온 교환 수지가 양이온 교환 수지인, 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 양이온 교환 수지가 프랙토겔(Fractogel), 카복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE), 설포프로필 (SP), 포스페이트 (P) 및 설포네이트 (S)로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 양이온 교환 수지가 Fractogel™  $\text{SO}_3^-$ 인, 방법.

### 청구항 9

제5항에 있어서, 상기 이온 교환 수지가 음이온 교환 수지인, 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 음이온 교환 수지가 큐 세파로즈(Q sepharose), 디에틸아미노에틸 (DEAE), 4급 아미노에틸 (QAE) 및 4급 아민 (Q) 그룹으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 11

제11항에 있어서, 상기 음이온 교환 수지가 큐-세파로즈인, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 상기 이온 교환 단계가 제1 이온 교환 단계 및 제2 이온 교환 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 하나 이상의 소수성 그룹을 포함하는 컬럼을 사용하여 상기 HIC를 수행하는, 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 소수성 그룹이 알킬-, 아릴-그룹 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 컬럼이 폐닐 세파로즈 (예를 들어, Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 컬럼, Phenyl Sepharose™ High Performance 컬럼), Octyl Sepharose™ High Performance 컬럼, Fractogel™ EMD Propyl, Fractogel™ EMD Phenyl 컬럼, Macro-Prep™ Methyl, Macro-Prep™ t-Butyl Support, WP HI-Propyl (C<sub>3</sub>)™ 컬럼, 및 Toyopearl™ Ether, Phenyl 또는 Butyl 컬럼으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 컬럼이 폐닐 세파로즈를 포함하는, 방법.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 바이러스 입자를 제거시키고 완충액 교환을 촉진하기 위해, 상기 HIC 샘플을 여과시키는 여과 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 상기 HCP-감소된 항체 제제가 항-IL-12 항체 또는 이의 항원-결합부, 또는 항-TNF α 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는, 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 HCP-감소된 항체 제제가 항-IL-12 항체 또는 이의 항원-결합부인, 방법.

#### 청구항 20

제18항에 있어서, 상기 HCP-감소된 항체 제제가 항-TNF α 항체 또는 이의 항원 결합부인, 방법.

#### 청구항 21

제19항에 있어서, 상기 항-IL-12 항체 또는 이의 항원-결합부가 사람화된 항체, 키메릭 항체 또는 다가 항체인, 방법.

#### 청구항 22

제19항에 있어서, 상기 항-TNF α 항체 또는 이의 항원-결합부가 사람화된 항체, 키메릭 항체 또는 다가 항체인, 방법.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 상기 항-IL-12 항체 또는 이의 항원-결합부가 사람화된 항체인, 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서, 상기 항-TNF α 항체 또는 이의 항원-결합부가 사람화된 항체인, 방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 상기 제제가 실질적으로 HCP를 포함하지 않는, 방법.

**청구항 26**

제1항에 있어서, 심층 여과를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 27**

제1항의 방법에 의해 제조되는 HCP-감소된 항체 제제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 항체가 항-IL-12 항체 또는 이의 항원-결합부, 또는 항-TNF  $\alpha$  항체 또는 이의 항원-결합부인, 약제학적 조성물.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 상기 조성물이 실질적으로 HCP를 포함하지 않는, 약제학적 조성물.

**명세서****배경기술**

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본원은 2008년 10월 20일 출원된 미국 임시출원 제61/196,753호 (전부 참조로 본원에 삽입됨)를 우선권으로 주장한다.

[0003]

**발명의 배경**

[0004]

발효 배양에 의해 생성되는 약제학적 등급의 모노클로날 항체에 대한 정제 방법은 통상적으로 4개의 기본 단계를 포함한다. 이들 단계는 (1) 수거/정화 - 발효 배양물로부터 숙주 세포의 분리; (2) 포획 - 정화된 수거물 중 대다수의 성분으로부터 항체의 분리; (3) 미세 정제 - 잔류 숙주 세포 오염물 및 응집물의 제거; 및 (4) 제형화 - 항체를 최대 안정성 및 저장 기간을 위해 적합한 담체에 배치.

[0005]

그러나, 종종 이들 단계들이 반드시 약제학적 상황에서 사용하기에 충분한 순도의 항체 조성물을 생성하는 것은 아니다. 약제학적 사용에 적합한 충분히 순수한 형태로 목적하는 항체를 생성 및 정제하는 방법이 현재 필요하다. 본 발명은 이러한 필요를 해결한다.

**발명의 내용**

[0006]

본 발명은 샘플 매트릭스로부터 항체를 분리 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 특정 양상으로, 본 발명은 친화성 크로마토그래피, 바람직하게는 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다. 특정 양상으로, 본원에 기술된 방법은 산 불활성화 단계, 친화성 크로마토그래피 단계 및 하나 이상의 추가의 크로마토그래피 및/또는 여과 단계를 이용한다. 크로마토그래피 단계는 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 방법으로 정제된 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0007]

본 발명의 하나의 양태는 생성된 항체 조성물이 숙주 세포 단백질 (host cell protein: HCP)를 실질적으로 포함하지 않는 항체 또는 항원-결합부를 정제하는 방법에 관한 것이다. 하나의 양상에서, 샘플 매트릭스 (또는 간단히 "샘플")은 본 발명의 특정 항체를 생성하는데 사용된 세포주의 수거물을 포함한다. 특정 양상에서, 샘플 매트릭스는 항-IL-12 항체를 생성하는데 사용된 세포주로부터 제조되고; 또 다른 양상에서, 샘플 매트릭스는 항-TNF  $\alpha$  항체를 생성하는데 사용된 세포주로부터 생성되며; 또 다른 양상에서, 샘플 매트릭스는 항-IL-18 항체를 생성하는데 사용된 세포주로부터 제조된다.

[0008]

본 발명의 하나의 방법은 추정적인 목적 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 샘플 매트릭스의 pH를 조절하는 것을 수반한다. 하나의 양상에서, pH는 산성 pH로 조절된다. 적합한 pH의 예는 약 pH 3 내지 5이고, 바람

직하게는 약 pH 3.5이다. 이러한 일차 회수는 부분적으로 pH-민감성 바이러스를 감소시키거나 불활성화시키기 위해서 수행된다. 바이러스의 감소 및/또는 불활성화에 추가하여, 산성 조건은 세포 및 세포 파편의 제거를 용이하게 함으로써 일차 회수 샘플을 형성한다. 적당한 시간 후, pH를 보다 중성 또는 염기성 pH로 조절할 수 있으며, 일차 회수 샘플은 친화성 크로마토그래피, 바람직하게는 단백질 A 크로마토그래피한다. 하나의 양상에서, 친화성 크로마토그래피 샘플은 수집하여 후속 크로마토그래피 단계, 예를 들어 이온 교환 및 소수성 상호작용 크로마토그래피를 더욱 진행한다.

[0009] 하나의 양태에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 일차 회수 샘플을 적합한 친화성 크로마토그래피 지지체를 포함하는 컬럼에 공급하는 것을 포함한다. 이러한 크로마토그래피 지지체에 대한 비제한적 예는, 이로 제한됨이 없이, 단백질 A 수지, 단백질 G 수지, 목적하는 항체가 생성된 항원을 포함하는 친화성 지지체, 및 Fc 결합 단백질을 포함하는 친화성 지지체를 포함한다. 단백질 A 수지가 친화성 정제 및 항체 (IgG)의 분리에 유용하다. 하나의 양상에서, 단백질 A 컬럼은 샘플 로딩 전에 적합한 완충액으로 평형화된다. 적합한 완충액의 예는 Tris/NaCl 완충액 (약 pH 7.2)이다. 이러한 평형화 후, 샘플을 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼의 로딩 후, 컬럼을, 예를 들어 평형화 완충액을 사용하여 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 컬럼을 용출시키기 전에 상이한 완충액을 사용하는 세척을 포함한 다른 세척을 이용할 수 있다. 이어서, 단백질 A 컬럼을 적합한 용출 완충액을 사용하여 용출시킬 수 있다. 적합한 용출 완충액의 예는 아세트산/NaCl 완충액 (약 pH 3.5)이다. 용출물은 당업자에 널리 공지된 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, OD<sub>280</sub>에서의 흡광도가 측정될 수 있다. 이어서, 용출된 관심 분획물(들)을 추가의 프로세싱을 위해 준비할 수 있다.

[0010] 하나의 양태에서, 이온 교환 단계는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 이어진다. 이러한 이온 교환 단계는 양 이온 또는 음이온 교환 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 단계는 단일 이온 교환 절차이거나 다수의 이온 교환 단계, 예를 들어 양이온 교환 단계에 이온 음이온 교환 단계 또는 이와는 반대의 단계를 포함할 수 있다. 하나의 양상에서, 이온 교환 단계는 1단계 절차이다. 또 다른 양상에서, 이온 교환 단계는 2단계 이온 교환 공정을 수반한다. 적합한 양이온 교환 컬럼은 정지상이 음이온성 그룹을 포함하는 컬럼이다. 이러한 컬럼의 예는 Fractogel™ SO<sub>3</sub><sup>-</sup>이다. 이러한 이온 교환 포획 크로마토그래피 단계는 샘플로부터 항체의 분리를 용이하게 한다. 적합한 음이온 교환 컬럼은 정지상이 양이온성 그룹을 포함하는 컬럼이다. 이러한 컬럼의 예는 Q Sepharose™ 컬럼이다. 하나 이상의 이온 교환 단계가 불순물, 예를 들어 숙주 세포 단백질 및 DNA 및, 적용 가능한 경우, 친화성 매트릭스 단백질을 감소시킴으로써 항체를 더욱 분리시킨다. 이러한 음이온 교환 절차는 목적 항체가 음이온 교환 수지 (또는 고체상)와 상호작용 또는 이에 결합하지 않는 관류 (flow through) 모드이다. 그러나, 많은 불순물은 음이온 교환 수지와 상호작용하고 이에 결합한다. 특정 양태에서, 음이온 교환 단계는 음이온 교환 크로마토그래피이다.

[0011] 친화성 크로마토그래피 용출물은 샘플 완충액의 pH 및 이온 농도를 조절함으로써 이온 교환에 대해 준비된다. 예를 들어, 친화성 용출물은 1 M Tris 완충액 중에서 약 pH 6.0 내지 약 pH 8.5로 조절될 수 있다. 샘플 (친화성 용출물)을 이온 교환 컬럼에 로딩하기 전, 컬럼을 적합한 완충액으로 평형화시킬 수 있다. 적합한 완충액의 예는 약 pH 6.0 내지 약 pH 8의 Tris/NaCl 완충액이다. 평형 후, 컬럼에 친화성 용출물을 로딩할 수 있다. 로딩 후, 컬럼을 적합한 완충액으로 1회 또는 수회 세척할 수 있다. 적합한 완충액의 예는 평형화 완충액 그 자체이다. 관류물 수집은, 예를 들어 흡광도 (OD<sub>280</sub>)가 약 0.2 AU 이상일 때 시작할 수 있다.

[0012] 특정 양태에서, 본 발명은 추가의 단계를 이용한다. 이러한 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피 (hydrophobic interactive chromatography: "HIC")의 사용을 수반한다. 적합한 컬럼은 정지상이 소수성 그룹을 포함하는 것이다. 이러한 컬럼의 예는 Phenyl Sepharose™ 컬럼이다. 목적 항체가 분리/정제 과정 동안 응집물을 형성할 수 있다. 이러한 소수성 크로마토그래피 단계는 이를 응집물의 제거를 용이하게 한다. 또한, 이는 불순물의 제거를 돋는다. 이 절차는 항체 (또는 이의 응집물)와 소수성 컬럼과의 상호작용을 촉진하는 고염 완충액을 사용한다. 컬럼은 저농도의 염을 사용하여 용출시킨다.

[0013] 또 다른 양태에서, HIC 용출물은 바이러스 제거 필터, 예를 들어 Ultipor DV20™ 필터를 사용하여 여과시킨다. 이러한 절차는 페닐 용출물로부터 바이러스 입자를 분리시켜 (존재하는 경우) 바이러스 양을 안전 수준으로 감소시킨다. 당업자에게 널리 공지된 필터를 이러한 양태에 사용할 수 있다.

[0014] 생성된 샘플 생성물 중의 목적 항체의 순도는 당업자에게 널리 공지된 방법, 예를 들어 크기-배재 크로마토그래피, Poros™ A HPLC 검정, HCP ELISA, 단백질 A ELISA, 및 웨스턴 블로트 분석을 이용하여 분석될 수 있다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 분리된 항체 또는 이의 항원-결합부 및 허용되는 담체를 포함하는 하나 이상의 약

제학적 조성물에 관한 것이다. 또 다른 양상에서, 이 조성물은 하나 이상의 약제학적 제제를 추가로 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 항-IL-12 항체의 비제한적 예 (ABT-847)에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 도시한다.

도 2는 항-IL-18 항체의 비제한적 예 (ABT-325)에 대한 중쇄 및 경쇄 서열을 도시한다.

도 3은 항-TNF  $\alpha$  항체의 비제한적 예 (아달리무마브)에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 도시한다.

도 4는 항-IL-12 항체를 포획하고 생성물 및 공정 관련된 불순물, 예를 들어 단일 및 이중 경쇄 단편, CHO 숙주 세포 단백질 (HCP), DNA 등을 감소시키기 위해 MabSelect<sup>TM</sup> 단백질 A 크로마토그래피를 이용한 후 생성물 순도를 보이는 300 L 생물반응기로부터의 대표적인 크로마토그램을 도시한다.

도 5는 MabSelect<sup>TM</sup> 세척 조건에 대한 평가를 도시한다.

도 6은 MabSelect<sup>TM</sup> 용출물의 pH를 8로 조절하고 전도도를 7 mS/cm로 조절한 후 수득된 침전물의 폴리아크릴아미드 겔에 대한 사진이다.

도 7은 300 L 생물반응기 규모 Q Sepharose<sup>TM</sup> FF 크로마토그래피 컬럼의 대표적인 관류 세척물 프로필을 도시한다.

도 8은 300 L 생물반응기 규모 Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP 크로마토그래피 컬럼의 대표적인 용출물 프로필을 도시한다.

도 9는 MabSelect<sup>TM</sup> 수지에 대한 10% 파과점 (breakthrough point)이 37.4 g 항체/수지 L로 확인되는 동적 결합능 (dynamic binding capacity) 검정 결과를 도시한다.

도 10은 단백질 A 공정과 AY-04 공정 사이의 중간 차이를 비교하기 위해 수행된 폴리아크릴아미드 겔의 사진이다. 각 샘플당 2  $\mu$ g의 항체가 로딩되었다.

도 11은 용출 pH에 대한 MabSelect<sup>TM</sup> 아달리무마브 회수율을 도시한다. 이 도면은 적어도 90%의 수율이 2.5 내지 3.8의 용출 pH 범위에서 수득되었으며, 수율의 상당한 감소가 pH 4에서 발생한다는 것을 입증한다.

도 12는 용출 pH 및 항온처리 시간에 대해 아달리무마브 단량체의 회수를 비교하는 검정 결과를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

본 발명은 샘플 매트릭스로부터 항체를 분리 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 하나의 양상은 항체 정제의 다양한 단계에서 생성되는 샘플에 대한 바이러스 감소/불활성화에 관한 것이다. 특정 양상에서, 본원에 기술된 방법은 산 바이러스 감소/불활성화 단계 후 하나 이상의 크로마토그래피 단계를 이용한다. 크로마토그래피 단계는 하기 크로마토그래피 절차 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 방법으로 정제되는 하나 이상의 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0018]

본 발명을 분명하게 설명하려는 것으로서, 결코 제한하려는 것이 아닌, 하기의 상세한 기술은 다음과 같은 부분으로 나뉜다:

[0019] 1. 정의;

[0020] 2. 항체 제조;

[0021] 3. 항체 생산;

[0022] 4. 항체 정제;

[0023] 5. 샘플 순도 검정 방법;

[0024] 6. 추가의 변형;

[0025] 7. 약제학적 조성물; 및

[0026] 8. 항체 사용.

## 1. 정의

본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 특정 용어가 먼저 정의된다.

용어 "항체"는 디설파이드 결합으로 서로 연결된 4개의 폴리펩타이드 쇄, 2개의 중쇄 (H 쇄) 및 2개의 경쇄 (L 쇄)로 구성된 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 VH로 약어 표기됨) 및 중쇄 불변 영역 (CH)으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로 약어 표기됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)이라 불리는 보다 보존된 영역이 사이에 배치된, 상보성 결정 영역 (CDR)이라 불리는 고가변 영역으로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 아미노-말단부터 카복시-말단까지 하기 순으로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

용어 항체 (또는 "항체 일부분")의 "항원-결합부"는 항원 (예: hIL-12, hTNF $\alpha$ , 또는 hIL-18)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능은 전체-길이 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다고 밝혀졌다. 항체의 "항원-결합부"에 속하는 결합 단편의 예는 하기를 포함한다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인을 포함하는 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인을 포함하는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인을 포함하는 Fv 단편; (v) VH 도메인을 포함하는 dAb 단편 [참조: Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR). 또한, 비록 Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH는 분리된 유전자에 의해 암호화되지만, 이들은 단일 단백질로 만들어지게 할 수 있는 합성 링커에 의해 재조합 방법으로 연결될 수 있으며, 이때 VL 및 VH 영역은 짹을 지어 일가 분자 (단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성한다 [참조: Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 또한, 이러한 단일쇄 항체를 항체의 "항원-결합부"에 포함시키고자 한다. 디아바디(diabody)는 이가의 이특이적 항체이며, 이때 VH 및 VL 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇄 상에서, 단 너무 짧아 동일 쇄 상의 2개의 도메인 간의 짹짓기를 허용하지 않는 링커를 사용하여 발현되며, 이로써 VH 및 VL 도메인은 다른 쇄의 상보성 도메인과 짹짓고 2개의 항원 결합 부위를 생성한다 [참조: Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 또한, 항체 또는 이의 항원-결합부는, 항체 또는 항체 일부분이 하나 이상의 다른 단백질 또는 웨타이드와 공유적 또는 비-공유적 화합에 의해 형성되는, 더욱 큰 면역부착 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예는, 사량체 scFv 분자를 제조하기 위한 스트렙트아비딘 코어 영역의 사용 [참조: Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨] 및 이가의 바이오티닐화된 scFv 분자를 제조하기 위한 시스테인 잔기, 마커 웨타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용 [참조: Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]을 포함한다. 항체 일부분, 예를 들어 Fab 및 F(ab')2 단편은 통상의 기술, 예를 들어 전체 항체에 대한 각각 과파인 또는 웨신 분해를 이용하여 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 또한, 항체, 항체 일부분 및 면역부착 분자는 본원에 기술되어 있는 바와 같은 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 하나의 양상으로, 항원 결합부는 완전한 도메인 또는 완전한 도메인의 쌍이다.

본원에서 사용되는 문구 "사람 인터류킨 12" (본원에서 hIL-12 또는 IL-12로 약어 표기됨)은 주로 대식세포 및 수지상 세포에 의해 분비되는 사람 사이토카인을 포함한다. 이 용어는 디설파이드 브릿지에 의해 함께 연결된 35 kD 서브유닛 (p35) 및 40 kD 서브유닛 (p40)을 포함하는 헤테로이량체성 단백질을 포함한다. 헤테로이량체성 단백질은 "p70 서브유닛"으로 언급된다. 사람 IL-12의 구조는, 예를 들어 문헌 [참조: Kobayashi, et al. (1989) J. Exp. Med. 170:827-845; Seder, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10188-10192; Ling, et al. (1995) J. Exp. Med. 154:116-127; Podlaski, et al. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 294:230-237, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]에 더욱 기술되어 있다. IL-12를 암호화하는 핵산은 GenBank 등록번호 NM\_000882로 입수 가능하며, 폴리펩타이드 서열은 GenBank 등록번호 NP\_000873.2로 입수 가능하다. 용어 사람 IL-12는 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 사람 IL-12 (rh IL-12)를 포함하고자 한다.

본원에서 사용되는 문구 "사람 인터류킨 18" (hIL-18 또는 IL-18로 약어 표기됨)은 생물학적으로 불활성인 193

개 아미노산 전구체 단백질로서 초기에 합성되는 사람 사이토카인뿐만 아니라 T 세포 증식의 공동-자극, NK 세포 세포독성의 증진, T 세포 및 NK 세포에 의한 IFN- $\gamma$  생성 유도 및 T 헬퍼 타입 1 (Th1) 분화의 강화를 포함하는 생물학적 활성을 나타내는, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 전구체 단백질의, 예를 들어 카스파제-1 또는 카스파제-4에 의한 절단에 의해 생성된 156개 아미노산의 성숙 단백질을 포함한다. IL-18을 암호화하는 핵산은 GenBank 등록번호 NM\_001562로 입수가능하며, 폴리펩타이드 서열은 GenBank 등록번호 NP\_001553으로 입수가능하다. 용어 사람 IL-18은 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 사람 IL-18 (rh IL-18)을 포함하고자 한다.

[0033] 문구 "사람 종양 피사 인자- $\alpha$ " (본원에서 hTNF  $\alpha$  또는 TNF  $\alpha$ 로 약어 표기됨)은 지질 대사, 응고, 인슐린 내성 및 내피 기능에 영향을 끼치는 단핵구/대식세포에 의해 주로 분비되는 다기능성의 염증촉진성 사이토카인이다. TNF  $\alpha$ 는 17 kD 단백질 서브유닛의 가용성 호모삼량체이다. TNF  $\alpha$ 의 막-결합된 26 kD 전구체 형태도 존재한다. 윤활 세포 및 조직의 대식세포에서 발견된다. 단핵구 또는 대식세포 이외의 세포도 TNF  $\alpha$ 를 생성한다. 예를 들어, 사람 비-단핵구 종양 세포주도 TNF  $\alpha$ 를 생성하며, CD4+ 및 CD8+ 말초 혈액 T 림프구 및 일부 배양된 T 및 B 세포주도 TNF  $\alpha$ 를 생성한다. TNF  $\alpha$ 를 암호화하는 핵산은 GenBank 등록번호 X02910으로 입수가능하며, 폴리펩타이드 서열은 GenBank 등록번호 CAA26669로 입수가능하다. 용어 사람 TNF  $\alpha$ 는 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 사람 TNF  $\alpha$  (rh TNF  $\alpha$ )를 포함하고자 한다.

[0034] 용어 "캐벳 (Kabat) 번호매김", "캐벳 정의" 및 "캐벳 표지화"가 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당해 기술 분야에서 인식되는 이를 용어는 항체 또는 이의 항원 결합부의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 있는 다른 아미노산 잔기보다 더욱 가변적인 (즉, 고가변적인) 아미노산을 번호매김하는 시스템을 언급한다 [참조: Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391, 및 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 중쇄 가변 영역에 대해, 고가변 영역은 CDR1에 대해서는 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2에 대해서는 아미노산 위치 50 내지 65, CDR3에 대해서는 아미노산 위치 95 내지 102에 이른다. 경쇄 가변 영역에 대해, 고가변 영역은 CDR1에 대해서는 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2에 대해서는 아미노산 위치 50 내지 56, CDR3에 대해서는 아미노산 위치 89 내지 97에 이른다.

[0035] 용어 "사람 항체"는 문헌 [참조: See Kabat, et al. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]에 기술되어 있는 바와 같이 사람 배선 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 사람 항체는, 예를 들어 CDR 및 특히 CDR3에서, 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체 세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 돌연변이는 "선택적 돌연변이 접근"을 이용하여 도입될 수 있다. 사람 항체는, 예를 들어 사람 배선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 활성 증진 아미노산 잔기와 같은 아미노산 잔기로 대체된 하나 이상의 위치를 가질 수 있다. 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열의 일부가 아닌 아미노산 잔기로 대체된 20개 이하의 위치를 가질 수 있다. 다른 양태에서, 10개 이하, 5개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하의 위치가 대체된다. 하나의 양태에서, 이를 대체는 CDR 영역에서 일어난다. 그러나, 본원에서 사용되는 용어 "사람 항체"는 또 다른 포유동물, 예를 들어 마우스의 배선으로부터 유도된 CDR 서열이 사람 프레임워크 서열로 이식된 항체를 포함하고자 하는 것은 아니다.

[0036] 문구 "선택적 돌연변이유발 접근"은 CDR 아미노산, 하나 이상의 적합한 선택적 돌연변이유발 위치, 과변이 및/ 또는 접촉 위치를 선택하고 개별적으로 돌연변이시킴으로써 항체의 활성을 개선하는 방법을 포함한다. "선택적으로 돌연변이된" 사람 항체는 선택적 돌연변이유발 접근을 이용하여 선택된 위치에서 돌연변이를 포함하는 항체이다. 또 다른 양상에서, 선택적 돌연변이유발 접근은 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 (이하, 각각 H1, H2 및 H3라 함) 또는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 (이하, 각각 L1, L2 및 L3라 함)에서 선택된 개별 아미노산 잔기를 우선적으로 돌연변이시키는 방법을 제공하고자 하는 것이다. 아미노산 잔기는 선택적 돌연변이유발 위치, 접촉 위치 또는 과변이 위치로부터 선택될 수 있다. 개별 아미노산은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서의 이들의 위치에 기초하여 선택된다. 과변이 위치가 또한 접촉 위치일 수 있음을 이해할 필요가 있다. 하나의 양상에서, 선택적 돌연변이유발 접근은 "표적화된 접근"이다. 용어 "표적화된 접근"은 표적화된 방식, 예를 들어 "그룹-방식으로 표적화된 접근" 또는 "CDR-방식으로 표적화된 접근"으로 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 또는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 있는 선택된 개별 아미노산 잔기를 돌연변이시키는 방법을 포함하고자 한다. "그룹-방식으로 표적화된 접근"에서는, 특정 그룹의 개별 아미노산 잔기가 그룹 I (L3 및 H3 포함), II (H2 및 L1 포함) 및 III (L2 및 H1 포함)을 포함하는 선택

적 돌연변이에 표적되며, 이때 상기 그룹은 표적화 선호 순으로 열거된다. "CDR-방식으로 표적화된 접근"에서는, 특정 CDR의 개별 아미노산 잔기가 H3, L3, H2, L1, H1 및 L2의 표적화 선호 순으로 선택적 돌연변이에 표적된다. 선택된 아미노산 잔기는, 예를 들어 적어도 2개의 다른 아미노산 잔기로 돌연변이되며, 항체의 활성에 대한 돌연변이의 효과가 측정된다. 활성은 항체의 결합 특이성/친화도 및/또는 항체의 중화 효능 변화로 측정된다. 선택적 돌연변이유발 접근이 파지 디스플레이, 사람 배선 유전자를 갖는 유전자도입 동물, 사람 B-세포로부터 분리된 사람 항체를 포함한 임의의 공급원으로부터 유도되는 임의의 항체의 최적화에 사용될 수 있다는 것을 이해할 수 있어야 한다. 선택적 돌연변이유발 접근은 파지 디스플레이 기술을 이용하여서는 추가로 최적화될 수 없는 항체에 이용될 수 있다. 파지 디스플레이, 사람 IgG 배선 유전자를 갖는 유전자도입 동물, 사람 B-세포로부터 분리된 사람 항체를 포함하는 임의의 공급원으로부터의 항체가 선택적 돌연변이유발 접근 이전 또는 이후에 역돌연변이될 수 있다는 것을 이해할 수 있어야 한다.

[0037]

문구 "재조합 사람 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리되는 사람 항체, 예를 들어 숙주 세포로 형질감염되는 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현되는 항체, 재조합의 조합적 사람 항체 라이브러리로부터 분리되는 항체, 사람 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입인 동물 (예: 마우스)로부터 분리되는 항체 [참조: Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨] 또는 사람 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리되는 항체를 포함한다. 이러한 재조합 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유도되는 가변 및 불변 영역을 갖는다 [참조: Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]. 그러나, 특정 양태에서, 이러한 재조합 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발되며 (또는 사람 Ig 서열에 대해 유전자도입인 동물이 사용되는 경우에는 생체내 체세포 돌연변이유발되며), 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 이에 관련되는 한편, 생체내에서 사람 항체 배선 레퍼토리에는 천연적으로 존재할 수 없는 서열이다. 그러나, 특정 양태에서, 이러한 재조합 서열은 선택적 돌연변이유발 접근 또는 역돌연변이 또는 이들 모두의 결과이다.

[0038]

"분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 포함한다 (예를 들어, hIL-12를 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 hIL-12 이외의 다른 항원을 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). hIL-12에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 IL-12 분자를 결합할 수 있다. 또한, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 부재할 수 있다. 본 발명과 관련하여 정제될 수 있는 적합한 항-IL-12 항체는, 이로 제한됨이 없이, 미국 특히 제6,914,128호 (전부 참조로 본원에 삽입됨)에서 J695로 확인되는 항-IL-12 항체 (이후에 ABT-874로 확인됨)를 포함하여, 상기 미국 특허에 기술되어 있다. 본 발명과 관련하여 정제 및 분리될 수 있는 적합한 항-IL-18 항체는, 후에 ABT-325로 확인된 항체를 포함하여, USSN 제09/780,035호 및 제 10/988,360호에 기술되어 있다. 적합한 항-TNF  $\alpha$  항체는 아달리무마브 (Abbott Laboratories)이다.

[0039]

"중화 항체" (또는 "hIL-12 활성을 중화시키는 항체")는 hIL-12에의 결합으로 hIL-12의 생물학적 활성이 억제되는 항체를 포함한다. hIL-12의 생물학적 활성 억제는 hIL-12에 대한 하나 이상의 지시자, 예를 들어 식물성혈구응집소 모세포 증식 검정 (PHA)에서 사람 식물성혈구응집소 모세포 증식 억제 또는 사람 IL-12 수용체 결합 검정에서 수용체 결합 억제를 측정함으로써 평가될 수 있다. hIL-12 생물학적 활성에 대한 이들 지시자는 당해 기술 분야에서 공지된 시험관내 또는 생체내 검정에서 수개의 표준 중 하나 이상에 의해 평가될 수 있다.

[0040]

"중화 항체" (또는 "hIL-18 활성을 중화시키는 항체")는 hIL-18에의 결합으로 hIL-18의 생물학적 활성이 억제되는 항체를 포함한다. hIL-18의 생물학적 활성 억제는 hIL-18에 대한 하나 이상의 지시자, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포에 의한 IFN  $\gamma$  생성 유도 또는 사람 IL-18 수용체 결합 검정에서 수용체 결합 억제를 측정함으로써 평가될 수 있다. hIL-18 생물학적 활성에 대한 이들 지시자는 당해 기술 분야에서 공지된 시험관내 또는 생체내 검정에서 수개의 표준 중 하나 이상에 의해 평가될 수 있다.

[0041]

용어 "활성"은 항원에 대한 항체, 예를 들어 IL-12 항원에 결합하는 항-hIL-12 항체의 결합 특이성/친화도 및/또는 항체, 예를 들어 hIL-12에의 결합이 hIL-12의 생물학적 활성을 억제하는 항-hIL-12 항체의 중화 효능, 예를 들어 PHA 모세포 증식의 억제 또는 사람 IL-12 수용체 결합 검정에서 수용체 결합의 억제와 같은 활성을 포함한다. 또한, 용어 "활성"은 항원에 대한 항-IL-18 항체, 예를 들어 IL-18 항원에 결합하는 항-hIL-18 항체의 결합 특이성/친화도 및/또는 항체, 예를 들어 hIL-18에의 결합이 hIL-18의 생물학적 활성을 억제하는 항-hIL-18 항체의 중화 효능과 같은 활성을 포함한다. 또한, 용어 "활성"은 항원에 대한 항-TNF  $\alpha$  항체, 예를 들어 TNF  $\alpha$  항원에 결합하는 항-TNF  $\alpha$  항체의 결합 특이성/친화도 및/또는 항체, 예를 들어 hTNF  $\alpha$ 에의 결합이 hTNF  $\alpha$ 의 생

물학적 활성을 억제하는 항-TNF α 항체의 중화 효능과 같은 활성을 포함한다.

- [0042] 문구 "표면 플라스몬 공명"은, 예를 들어 BIACore 시스템 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ.)을 사용하여, 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도 변화를 검출함으로써 실시간의 생물특이적 상호작용 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 포함한다. 추가의 설명을 위해 문헌 [참조: Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 및 Johnnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입된다]을 참조한다.
- [0043] 본원에서 사용되는 용어 "Koff"는 항체/항원 복합체로부터 항체의 분리에 대한 해리 속도 (off rate)를 언급하고자 한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 용어 "Kd"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 언급하고자 한다.
- [0045] 문구 "핵산 문자"는 DNA 문자 및 RNA 문자를 포함한다. 핵산 문자는 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있으며, 하나의 양상에서, 이본쇄 DNA이다.
- [0046] 항체 또는 항체 일부분 (예: VH, VL, CDR3), 예를 들어 hIL-12, hTNF α 또는 hIL-18에 결합하는 항체 또는 항체 일부분을 암호화하는 핵산과 관련하여 본원에서 사용되는 문구 "분리된 핵산 문자"는, 항체 또는 항체 일부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 hIL-12, hTNF α, 또는 hIL-18 이외의 다른 항원을 결합하는 항체 또는 항체 일부분을 암호화하는 다른 뉴클레오타이드 서열이 없는 핵산 문자를 포함하며, 이때 다른 서열이 사람 게놈 DNA에서 핵산을 천연적으로 플랭킹할 수 있다. 따라서, 예를 들어 항-hIL-12, 항-TNF α 또는 항-hIL-18 항체의 VH 영역을 암호화하는 본 발명의 분리된 핵산은, 예를 들어 IL-12, hTNF α, 또는 hIL-18 이외의 항원을 결합하는 다른 VH 영역을 암호화하는 다른 서열을 포함하지 않는다. 또한, 문구 "분리된 핵산 문자"는 이가의 이특이적 항체, 예를 들어 VH 및 VL 영역이 디아바디의 서열 이외의 다른 서열을 포함하지 않는 디아바디를 암호화하는 서열을 포함하고자 한다.
- [0047] 문구 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입되는 세포를 포함한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 언급하고자 한다는 것을 이해할 필요가 있다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 의해 특정 변형이 다음 세대에 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손이 실제로 모 세포와 동일할 수는 없으나, 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위에 여전히 포함된다.
- [0048] 본원에서 사용되는 용어 "변형"은 항체 또는 이의 항원-결합부에서 하나 이상의 아미노산을 변화시키는 것을 언급하고자 한다. 변화는 하나 이상의 위치에서 아미노산의 부가, 치환 또는 결실에 의해 생성될 수 있다. 변화는 공지된 기술, 예를 들어 PCR 돌연변이유발을 이용하여 생성될 수 있다.
- [0049] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 참조된 값보다 약 10 내지 20% 크거나 작은 범위를 언급하고자 한다. 특정 상황에서, 당업자는 참조된 값의 특성 때문에 용어 "약"은 그 값으로부터 10 내지 20%의 편차보다 크거나 작은 범위를 의미할 수 있다.
- [0050] 본원에서 사용되는 문구 "바이러스 감소/불활성화"는 특정 샘플에서 바이러스 입자수의 감소 ("감소") 및 특정 샘플에서 바이러스 입자의 활성, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 감염성 또는 복제능의 감소 ("불활성화")를 언급하고자 한다. 바이러스 입자의 수 및/또는 활성에서의 이러한 감소는 약 1% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 20% 내지 약 99%, 더욱 바람직하게는 약 30% 내지 약 99%, 더욱 바람직하게는 약 40% 내지 약 99%, 더욱더 바람직하게는 약 50% 내지 약 99%, 더욱더 바람직하게는 약 60% 내지 약 99%, 한층 더 바람직하게는 약 70% 내지 약 99%, 한층 더 바람직하게는 약 80% 내지 약 99%, 한층 더 바람직하게는 약 90% 내지 약 99%일 수 있다. 특정한 비제한적 양태에서, 정제된 항체 생성물에서, 존재하는 경우, 바이러스의 양은 그 바이러스에 대한 ID<sub>50</sub> (표적 집단을 50% 감염시킬 바이러스의 양)보다 적은, 바람직하게는 그 바이러스에 대한 ID<sub>50</sub>보다 적어도 10배 적은, 더욱 바람직하게는 그 바이러스에 대한 ID<sub>50</sub>보다 적어도 100배 적은, 더욱더 바람직하게는 그 바이러스에 대한 ID<sub>50</sub>보다 적어도 1000배 적은 양이다.
- [0051] 문구 "접촉 위치"는 26개의 공지된 항체-항원 구조물 중 하나에서 항원을 접촉하는 아미노산에 의해 차지되는 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 또는 CDR3에 있는 아미노산 위치를 포함한다. 만약 항체-항원 복합체의 26개의 공지된 해명된 구조물의 CDR 아미노산이 항원을 접촉하는 경우, 이때의 그 아미노산은 접촉 위치를 차지하는 것으로 간주될 수 있다. 접촉 위치는 비-접촉 위치에서보다 항원을 접촉하는 아미노산에 의해 차지될 가능성성이 더욱 높다. 하나의 양상에서, 접촉 위치는 26개의 구조물 중 3 초과로 (>1.5%) 항

원을 접촉하는 아미노산을 포함하는 CDR 위치이다. 또 다른 양상에서, 접촉 위치는 25개의 구조물 중 8 초파로 (>32%) 항원을 접촉하는 아미노산을 포함하는 CDR 위치이다.

## [0052] 2. 항체 제조

[0053] 이 부분에서 사용되는 바와 같은 용어 "항체"는 온전한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 언급한다.

[0054] 본 기술의 항체는, 목적 항원으로 동물의 면역화시킨 후 통상의 모노클로날 항체 방법, 예를 들어 표준 체세포 하이브리드화 기술 [참조: Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495]로의 처리를 포함하는, 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화 절차가 바람직하지만, 원칙적으로, 모노클로날 항체를 생성하기 위한 다른 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스 또는 종양원성 형질전환을 이용할 수 있다.

[0055] 하이브리도마를 제조하기 위한 하나의 바람직한 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 하이브리도마 생성은 매우 널리 -확립된 절차이다. 면역화 프로토콜 및 융합을 위한 면역화된 비장세포의 분리 기술은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예: 쥐 골수종 세포) 및 융합 절차도 공지되어 있다.

[0056] 항체는 바람직하게는 사람, 키메릭 또는 사람화 항체일 수 있다. 본 기술의 키메릭 또는 사람화된 항체는 상술된 바와 같이 제조되는 비-사람 모노클로날 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 목적하는 비-사람 하이브리도마로부터 수득되고 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 비-쥐 (예: 사람) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 키메릭 항체를 제조하기 위해서, 쥐 가변 영역은 당해 기술 분야에 공지된 방법 (예: Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호의 방법)을 이용하여 사람 불변 영역에 결합될 수 있다. 사람화된 항체를 생성하기 위해서, 쥐 CDR 영역은 당해 기술 분야의 공지된 방법을 이용하여 사람 프레임워크에 삽입될 수 있다 [참조: Winter의 미국 특허 제5,225,539호, Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호; 및 제6,180,370호].

[0057] 하나의 비제한적 양태에서, 본 기술의 항체는 사람 모노클로날 항체이다. IL-12, TNF $\alpha$ , 또는 IL-18에 대해 지시되는 이러한 사람 모노클로날 항체는 마우스 시스템보다는 사람 면역 면역 시스템의 부분들을 갖는 유전자도입 또는 염색체도입(transchromosomal) 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 이를 유전자도입 및 염색체도입 마우스는 본원에서 HuMAb Mouse<sup>®</sup> (Medarex, Inc.), KM Mouse<sup>®</sup> (Medarex, Inc.), 및 XenoMouse<sup>®</sup> (Amgen)로 언급되는 마우스를 포함한다.

[0058] 또한, 사람 면역글로불린 유전자를 발현하는 대체적 염색체도입 동물 시스템이 당해 기술분야에서 사용가능하며, 항-IL-12, 항-TNF $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체와 같은 본원 기술의 항체를 증가시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"라 언급되는, 사람 중쇄 도입염색체 및 사람 경쇄 도입염색체 모두를 갖는 마우스가 사용될 수 있다: 이러한 마우스는 문헌 [참조: Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727]에 기술되어 있다. 또한, 사람 중쇄 및 경쇄 도입염색체를 갖는 소가 문헌 [참조: Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894 및 PCT 공개 번호 제WO 2002/092812호]에 기술되어 있으며, 본원에서 항-IL-12, 항-TNF $\alpha$ , 또는 항-IL18 항체를 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0059] 이로 제한됨이 없이, 항-IL-12, 항-TNF $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체 또는 이의 항원 결합부, 또는 항-IL-12-관련, 항-TNF $\alpha$ -관련, 또는 항-IL-18-관련 항체를 포함하는, 본 발명의 재조합 사람 항체는 재조합의 조합적 (combinatorial) 항체 라이브러리, 예를 들어 사람 림프구로부터 유도되는 mRNA로부터 제조되는 사람 VL 및 VH cDNA를 사용하여 제조되는, scFv 과지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 분리될 수 있다. 이러한 라이브러리를 제조 및 스크리닝하는 방법이 당해 기술 분야 공지되어 있다. 과지 디스플레이 라이브러리를 생성하기 위해 시판되는 키트 (예: Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 카탈로그 번호 제27-9400-01호; 및 Stratagene SurfZAPTM 과지 디스플레이 키트, 카탈로그 번호 제240612호, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨) 이외에, 특히 항체 디스플레이 라이브러리를 생성 및 스크리닝하는데 사용하기 위해 처리할 수 있는 방법 및 시약에 대한 예가 문헌 [참조: Ladner 등의 미국 특허 번호 제5,223,409호; Kang 등의 PCT 공개 번호 제WO 92/18619호; Dower 등의 PCT 공개 번호 제WO 91/17271호; Winter 등의 PCT 공개 번호 제WO 92/20791호; Markland 등의 PCT 공개 번호 제WO 92/15679호; Breitling 등의 PCT 공개 번호 제WO 93/01288호; McCafferty 등의 PCT 공개 번호 제WO 92/01047호; Garrard 등의 PCT 공개 번호 제WO 92/09690호; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628;

Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 및 Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982; 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]에 기술되어 있다.

[0060] 또한, 본원의 사람 모노클로날 항체는, 면역화 시 사람 항체 반응이 생성될 수 있도록 사람 면역 세포가 이로 재구성된 SCID 마우스를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 마우스는, 예를 들어 Wilson 등의 미국 특허 제5,476,996호 및 제5,698,767호에 기술되어 있다.

[0061] 특정 양태에서, 본 발명의 방법은 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체 및 항체 일부, 항-IL-12-관련, 항-TNF  $\alpha$ -관련, 또는 항-IL-18-관련 항체 및 항체 일부, 및 사람 항체 및 항체 일부를 포함하며, 이들은 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체와 동등한 특성, 예를 들어 낮은 해리 동역학 및 높은 중화능과 함께 hIL-12, hTNF  $\alpha$ , 또는 hIL-18에 대해 결합하는 높은 친화도를 갖는다. 하나의 양상에서, 본 발명은, 표면 플라스몬 공명으로 측정 시, 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의 Kd 및  $1 \times 10^{-3}$  s-1 이하의 Koff 속도 상수로 hIL-12, hTNF  $\alpha$ , 또는 hIL-18로부터 해리되는, 분리된 사람 항체 또는 이의 항원-결합부로의 처리를 제공한다. 특정한 비제한적 양태에서, 본 발명에 따라 정제되는 항-IL-12 항체는 생리학적 조건 하에서 ABT-874가 IL-12에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제한다. 특정한 비제한적 양태에서, 본 발명에 따른 항-IL-18 항체는 생리학적 조건 하에서 ABT-325가 IL-18에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제한다. 특정한 비특이적 양태에서, 항-TNF  $\alpha$  항체는 생리학적 조건 하에서 아달리무마브가 TNF  $\alpha$ 에 결합하는 것을 억제한다.

[0062] 본 발명의 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 단편, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체 또는 이의 단편은, 항체의 불변 영역이 비변형된 항체에 비해 적어도 하나의 불변 영역-매개된 생물학적 이펙터 기능이 감소되도록 변형될 수 있다. Fc 수용체에 대해 감소된 결합을 나타내도록 본 발명의 항체를 변형시키기 위해서, 항체의 면역글로불린 불변 영역 절편은 Fc 수용체 (FcR) 상호작용에 필수적인 특정 영역에서 돌연변이될 수 있다 [참조: Canfield and Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491; 및 Lund et al. (1991) J. of Immunol. 147:2657-2662, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]. 또한, 항체의 FcR 결합 능력의 감소는 FcR 상호작용에 의존하는 다른 이펙터 기능, 예를 들어 읍소닌화 및 포식작용 및 항원-의존적 세포성 세포독성을 감소시킬 수 있다.

### 3. 항체 생성

[0063] 본 발명의 항체를 발현하기 위해서, 부분적 또는 전체-길이의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 유전자가 전사 및 해독 조절 서열에 작동가능하게 연결되도록 하나 이상의 발현 벡터에 삽입된다 [참조: 미국 특허 제 6,914,128호, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 이와 관련하여, 용어 "작동가능하게 연결된"은, 벡터 내의 전사 및 해독 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 해독을 조절하는 이들의 의도된 기능을 하도록 벡터에 결합된다는 것을 의미하고자 한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 사용되는 발현 숙주 세포에 적합하도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별개의 벡터에 삽입될 수 있거나, 더욱 전형적으로는, 2개의 유전자가 동일한 발현 벡터에 삽입된다. 항체 유전자는 표준 방법 (예: 항체 유전자 단편 및 벡터에 상보적 제한 부위의 결합, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 평활 말단 결합)으로 발현 벡터에 삽입된다. 발현 벡터는 항체 또는 항체-관련 경쇄 또는 중쇄 서열의 삽입 전, 이미 항체 불변 영역 서열을 수반할 수 있다. 예를 들어, 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체 또는 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체-관련 VH 및 VL 서열을 전체 길이 항체 유전자로 전환시키는 하나의 접근은 이들을 이미 각각 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 암호화하는 발현 벡터로 삽입하여, VH 절편이 벡터 내의 CH 절편(들)에 작동가능하게 연결되고 VL 절편이 벡터 내의 CL 절편으로 작동가능하게 연결되게 하는 것이다. 추가로 또는 달리, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 쇄의 분비를 촉진시키는 시그널 웹타이드를 암호화할 수 있다. 항체 쇄 유전자는 시그널 웹타이드가 항체 쇄 유전자의 아미노 말단에 인-프레임(in-frame)으로 연결되도록 벡터에 클로닝될 수 있다. 시그널 웹타이드는 면역글로불린 시그널 웹타이드 또는 이종 시그널 웹타이드 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 시그널 웹타이드)일 수 있다.

[0064] 항체 쇄 유전자에 추가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 쇄 유전자의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열을 가질 수 있다. 용어 "조절 서열"은 항체 쇄 유전자의 전사 또는 해독을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소 (예: 폴리아데닐화 시그널)을 포함하고자 한다. 이러한 조절 서열은 문헌 [참조: Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]에 기술되어 있다. 당업자라면 조절 서열의 선택을 포함한 발현

벡터의 디자인이 형질전환될 숙주 세포의 선택과 같은 인자, 목적하는 단백질의 발현 수준 등에 의존적일 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 대해 적합한 조절 서열은 포유동물 세포에서 고수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 성분, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 (CMV)로부터 유도되는 프로모터 및/또는 인핸서 (예: CMV 프로모터/인핸서), 시미안 바이러스 40 (SV40)로부터 유도되는 프로모터 및/또는 인핸서 (예: SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스로부터 유도되는 프로모터 및/또는 인핸서 (예: 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유도되는 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 바이러스성 조절 성분에 대한 추가의 기술을 위해, 문헌 [참조: Stinski의 미국 특허 제5,168,062호; Bell 등의 미국 특허 제4,510,245호 및 Schaffher 등의 미국 특허 제4,968,615호, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]을 참조한다.

[0066] 항체 쇄 유전자 및 조절 서열에 추가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 하나 이상의 추가의 서열, 예를 들어 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예: 복제 오리진) 및/또는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다 [참조: Axel 등에 의한 미국 특허 제4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 예를 들어, 전형적으로 선별 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 약물, 예를 들어 G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여한다. 적합한 선별 마커는 (dhfr-숙주 세포에서 메토트렉세이트 선별/증폭으로 사용하기 위한) 디하이드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자 및 (G418 선별을 위한) neo 유전자를 포함한다.

[0067] 본 발명의 항체 또는 항체 일부분은 숙주 세포에서 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 재조합 발현에 의해 제조될 수 있다. 항체를 재조합적으로 발현하기 위해서, 숙주 세포는 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고 숙주 세포가 배양되는 배지로 분비되어 배지로부터 항체가 회수될 수 있도록 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 단편을 갖는 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 형질감염된다. 표준 재조합 DNA 방법을 이용하여 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 수득하고 이를 유전자를 재조합 발현 벡터로 삽입하며, 벡터를 숙주 세포로 도입한다 [참조: Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989), 미국 특허 제4,816,397호 & 제6,914,128호, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨].

[0068] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)이 표준 기술에 의해 숙주 세포로 형질감염된다. 용어 "형질감염"의 다양한 형태는 외인성 DNA를 원핵성 또는 진핵성 숙주 세포로 도입하기 위해 통상적으로 이용되는 다양한 기술, 예를 들어 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-엑스트란 형질감염 등을 포함하고자 한다. 비록 이론적으로는 원핵성 또는 진핵성 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시킬 수 있지만, 진핵 세포, 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다 잘 적절하게 풀딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 조립 및 분비할 것으로 예상되므로, 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 숙주 세포에서의 항체의 발현이 적합하다. 항체의 원핵성 발현은 고수율의 활성 항체의 생성에 덜 효과적인 것으로 보고되었다 [참조: Boss and Wood (1985) Immunology Today 6:12-13, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨].

[0069] 본원에서 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포는 원핵세포, 효모 효는 상술된 보다 고등한 진핵세포이다. 이러한 목적상 적합한 원핵세포는 진정세균, 예를 들어 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세(Enterobacteriaceae), 예를 들어 에세리키아 (*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 어위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세়েন্স (*Serratia marcescens*), 시겔라 (*Shigella*), 바실러스 (*Bacillus*), 예를 들어 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*) (예: 비. 리케니포르미스 41P (1989. 4. 12.에 공개된 DD 266,710에 기술됨), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 아에루기노사 (*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 비록 다른 균주, 예를 들어 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하지만, 하나의 적합한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라 294 (ATCC 31,446)이다. 이를 예는 제한하는 것이 아닌, 설명을 위한 것이다.

[0070] 원핵세포에 추가하여, 진핵세포 미생물, 예를 들어 사상 진균 또는 효모가 폴리펩타이드 암호화 벡터에 대해 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상의 빵 효모가 하등 진핵성 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 예를 들어 하기와 같은 다수의 다른 속, 종 및 균주가 일반적으로 이용가능하며 본원에서 사용된다: 쉬조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*

*pombe*); 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어 케이. 락티스 (*K. lactis*), 케이. 프라질리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미 (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilae*) (ATCC 36,906), 케이. 썬모톨레란스 (*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르크시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*yarrowia*) (EP 402,226); 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 카디다 (*Candida*); 트리코데르마 레시아 (*Trichoderma reesiae*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*); 쉬와니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 쉬와니오마이세스 옥시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예를 들어 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolypocladium*), 및 아스페질루스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (*A. nidulans*) 및 에이. 니거 (*A. niger*).

[0071] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 숙주, 예를 들어 스포도프테라 푸루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (모충), 에데스 에깁티 (*Aedes aegypti*) (모기), 에데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터 (*Drosophila melanogaster*) (초파리), 및 봄빅스 모리 (*Bombyx mori*)로부터의 다양한 배클로바이러스 균주 및 변이체 및 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 오토크라파 칼리포르니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하며, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위한 본 발명에 따른 본원에서의 바이러스로 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물도 숙주로서 사용될 수 있다.

[0072] 본 발명의 재조합 항체의 발현을 위한 적합한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (문헌 [참조: Urlaub and Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220]에 기술된 dhfr- CHO 세포 포함, 예를 들어 문헌 [참조: Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]에 기술되는 바와 같이, DHFR 선별 마커와 함께 사용됨), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입되는 경우, 항체는 숙주 세포에서 항체의 발현 또는 숙주 세포가 성장하는 배양 배지로 항체의 분비를 가능하게 하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다. 유용한 포유동물 숙주 세포의 다른 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 사람 배아 신장 세포주 (현탁 배양으로의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 203 세포, 문헌 [참조: Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [참조: Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [참조: Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 사람 경구 암 종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 신장 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 사람 폐 세포 (WI 38, ATCC CCL 75); 사람 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [참조: Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 사람 간암 세포주 (Hep G2)이다 (상기 문헌은 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입된다).

[0073] 숙주 세포는 항체 생성을 위한 상술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선별하거나 목적하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭하기에 적합하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양된다.

[0074] 항체 생성에 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판되는 배지, 예를 들어 Ham's F10<sup>TM</sup> (Sigma), Minimal Essential Medium<sup>TM</sup> ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium<sup>TM</sup> ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [참조: Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 제Re. 30,985호, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]에 기술된 배지 중 어떠한 것도 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이를 배지 중 어떠한 것도, 필요한 경우, 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예: 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염 (예: 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예: HEPES), 뉴클레오타이드 (예: 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예: 젠타마이신 약물), 미량 원소 (통상  $\mu\text{M}$  범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글로코즈 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 또한, 당업자에게 공지된 임의의 다른 보충물도 적합한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등을 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 앞서 사용되는 것들이며, 당업자에게 자명할 것이다.

[0075] 또한, 숙주 세포는 온전한 항체의 부분, 예를 들어 Fab 단편 또는 scFv 분자를 생성하도록 사용될 수 있다. 상술된 절차의 변형이 본 발명의 범위에 속한다는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들어, 특정 양태에서, 숙주 세포를 본 발명의 항체의 경쇄 또는 중쇄 (단, 둘 다는 아님)를 암호화하는 DNA로 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 재조합 DNA 기술은, 항-IL-12 항체와 관련하여 IL-12, 구체적으로 hIL-12에 대한 결합에 필요하지 않은 경쇄 또는 중쇄 또는 이둘 모두를 암호화하는 DNA, 또는 항-IL-18 항체와 관련하여 IL-12, 구체적으로 hIL-18에 대한 결합에 필요하지 않은 DNA, 또는 항-TNF  $\alpha$  항체와 관련하여 TNF  $\alpha$ , 구체적으로 hTNF  $\alpha$ 에 대한 결합에 필요하지 않은 DNA 중 일부 또는 모두를 제거하는데 이용될 수 있다. 또한, 이러한 절두된 DNA 분자로부터 발현되는 분자도 본 발명의 항체에 포함된다. 또한, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄는 본 발명의 항체이고 다른 중쇄 및 경쇄는 본 발명의 항체의 특이성에 따라 IL-12, TNF  $\alpha$ , 또는 IL-18 이외의 다른 항원에 대해 특이적인 이작용성 항체도 본 발명의 항체를 표준 화학적 가교결합법에 의해 제2 항체에 가교결합시킴으로써 생성될 수 있다.

[0076] 본 발명의 항체 또는 항원-결합부의 재조합 발현을 위한 적합한 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 모두를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 인산칼슘-매개된 형질감염에 의해 dhfr-CHO 세포로 도입된다. 재조합 발현 벡터 내에 항체 중쇄 및 경쇄가 각각 고수준의 유전자 전사를 유도하기 위해서 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 성분에 작동가능하게 연결된다. 또한, 재조합 발현 벡터는 메토트렉세이트 선별/증폭을 이용하여 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선별을 가능하게 하는 DHFR 유전자를 갖는다. 선별된 형질전환체 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄의 발현이 가능하도록 배양되며, 온전한 항체가 배양 배지로부터 회수된다. 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키며, 형질전환체를 선별하고, 숙주 세포를 배양하며, 배양 배지로부터 항체를 회수한다.

[0077] 재조합 기술을 이용하여 항체를 세포내에 또는 원형질막주위공간에 생성하거나 배지로 직접적으로 분비할 수 있다. 하나의 양상으로, 항체가 세포내적으로 생성되는 경우, 1 단계로서, 미립자성 파편, 숙주 세포 또는 용해된 세포 (예를 들어, 세포파쇄에 의해 생성됨)를, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과로 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon<sup>TM</sup> 또는 Millipore Pellicon<sup>TM</sup> 한외여과 유니트를 사용하여 농축할 수 있다.

[0078] 본 발명의 방법 이전, 세포 파편으로부터 항체의 정제를 위한 절차는 초기에는 항체의 발현 부위에 의존적이다. 일부 항체는 세포로부터 주위 성장 배지로 직접적으로 분비될 수 있으며; 다른 것은 세포내적으로 제조된다. 후자 항체의 경우, 정제 과정의 제1 단계는 전형적으로 기계적 전단, 삼투압 쇼크 또는 효소적 처리를 포함한 다양한 방법으로 수행될 수 있는 세포의 용해를 수반한다. 이러한 파괴는 세포의 전내용물을 세포파쇄물로 방출시키며, 또한 작은 크기 때문에 제거하기 어려운 세포하 단편을 생성한다. 이들은 일반적으로 분별 원심분리 또는 여과에 의해 제거된다. 항체가 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon<sup>TM</sup> 또는 Millipore Pellicon<sup>TM</sup> 한외여과 유니트를 사용하여 먼저 농축된다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 재조합 숙주 세포는 또한 세포 배양 배지로부터, 예를 들어 접선 유동 여과에 의해 세포 배양 배지로부터 분리될 수 있다. 항체는 본 발명의 항체 분리 방법을 이용하여 배양 배지로부터 추가로 회수될 수 있다.

#### 4. 항체 정제

##### 4.1 항체 정제 일반

[0080] 본 발명은 항체 및 적어도 하나의 HCP를 포함하는 혼합물로부터 정제된 (또는 "HCP-감소된") 항체 제제를 생성하는 방법을 제공한다. 본 발명의 정제 과정은 항체가 상술된 방법 및 당해 기술 분야의 통상의 방법으로 생성되는 경우, 분리 단계에서 시작한다. 표 1은 정제 계획에 대한 하나의 양태를 요약한다. 이로 제한됨이 없이, 단백질 A 친화성 크로마토그래피가 생략되거나 이온 교환 단계의 순서가 뒤바뀐 변형을 포함하는 이러한 계획에 대한 변형이 고려되며 본 발명의 범위에 속한다.

[0082]

[표 1]

## 정제 단계 및 이들의 관련 목적

정제 단계	목적
1차 회수	샘플 매트릭스의 정화
친화성 크로마토그래피	항체 포획, 속주 세포 단백질 및 관련 불순물 감소
양이온 교환 크로마토그래피	항체 포획, 속주 세포 단백질 및 관련 불순물 감소
한외여과/투석여과	농축 및 완충액 교환
음이온 교환 크로마토그래피	속주 세포 단백질 및 DNA의 감소
페닐 Sepharose™ HP 크로마토그래피	항체 응집물 및 속주 세포 단백질의 감소
바이러스 여과	큰 바이러스가 존재하는 경우, 이의 제거
최종 한외여과/투석여과	항체 농축 및 제형화

[0083]

[0084]

일단 항체를 포함하는 정화된 용액 또는 혼합물이 수득되면, HCP와 같은 세포에 의해 생성되는 다른 단백질로부터 항체의 분리는 이온 교환 단계(들) 및 소수성 상호작용 분리 단계(들)을 포함하는 상이한 정제 기술의 조합을 이용하여 수행된다. 분리 단계는 단백질의 전하, 소수성 정도 또는 크기에 기초하여 단백질의 혼합물을 분리한다. 본 발명의 하나의 양상에서, 분리는 양이온, 음이온 및 소수성 상호작용을 포함한 크로마토그래피를 이용하여 수행된다. 수개의 상이한 크로마토그래피 수지가 이를 기술 각각에 대해 이용가능하며, 포함되는 특정 단백질에 대한 정제 계획의 정확한 조정을 가능하게 한다. 분리 방법 각각에 대한 본질은, 컬럼 아래로 더욱 통과함에 따라 증가하는 물리적 분리를 달성하도록 컬럼 아래로 상이한 속도로 가로지르거나, 상이한 용매에 의해 달리 용출되도록 분리 매질에 선택적으로 부착하게 야기될 수 있다. 일부 경우, 불순물은 컬럼에 특이적으로 부착하고 항체는 부착하지 않는, 즉 항체가 관류물에 존재하는 경우, 항체는 불순물로부터 분리된다.

[0085]

상기 주목되는 바와 같이, 정제 계획의 정확한 조정은 정제되는 단백질에 대한 고려사항에 의존적이다. 특정 양태에서, 본 발명의 정제 단계는 하나 이상의 HCP로부터 항체를 분리하기 위해 이용된다. 본원에 기술된 방법을 이용하여 성공적으로 분리될 수 있는 항체는, 이로 제한됨이 없이, 사람 IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, 및 IgM 항체를 포함하며, 특정 양태에서, 본 발명의 정제 전략은, 예를 들어 IgG<sub>3</sub> 항체의 정제와 관련하여서는, IgG<sub>3</sub> 항체가 단백질 A에 불충분하게 결합하기 때문에, 단백질 A 친화성 크로마토그래피의 사용을 배제한다. 정제 계획의 구체적인 조정을 가능하게 하는 다른 인자는, 이로 제한됨이 없이, 단백질 A가 Fc 영역에 결합하기 때문에 (예를 들어, Fab 단편과 비교하여 전체 길이의 항체와 관련하여) Fc 영역의 존재 또는 부재; 목적 항체를 제조하는데 사용되는 특정 배선 서열; 및 항체의 아미노산 조성 (예: 항체의 일차 서열 및 분자의 전체적 전하/소수성)을 포함한다. 하나 이상의 특성을 공유하는 항체는 그러한 특성의 이점을 취하도록 조정되는 정제 전략을 이용하여 정제될 수 있다.

[0086]

## 4.2 일차 회수

[0087]

본 발명의 정제 방법의 초기 단계는 샘플 매트릭스로부터 제1 단계의 정화 및 항체의 일차 회수를 포함한다. 일차 회수 과정은 또한 샘플 매트릭스에 존재할 수 있는 바이러스를 감소시키거나 불활성화시키는 것에 의미가 있을 수 있다. 예를 들어, 열 불활성화 (저온살균), pH 불활성화, 용매/세제 처리, UV 및 γ-선 조사 및 특정한 화학적 불활성화제, 예를 들어 β-프로피오락톤 또는, 예를 들어 문헌 [참조: 미국 특허 제4,534,972호, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]에 기술된 바와 같은 구리 폐난트롤린의 첨가를 포함하는, 다양한 바이러스 감소/불활성화 방법 중 하나 이상이 정제의 일차 회수 단계 동안 이용될 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 샘플 매트릭스는 일차 회수 단계 동안 pH 바이러스 감소/불활성화에 노출된다.

[0088]

pH 바이러스 감소/불활성화 방법은, 이로 제한됨이 없이, 낮은 pH에서 일정 기간 동안 혼합물을 항온처리한 후 pH를 중화시키고 여과시켜 미립자를 제거하는 것을 포함한다. 특정 양태에서, 혼합물은 약 pH 2 내지 5, 바람직하게는 약 pH 3 내지 4, 더욱 바람직하게는 약 pH 3.5에서 항온처리될 것이다. 샘플 혼합물의 pH는, 이로 제한됨이 없이 시트르산, 아세트산, 카프릴산 또는 다른 적합한 산을 포함하는 임의의 적합한 산에 의해 낮춰질 수 있다. pH 수준의 선택은 항체 생성물의 안정성 프로필 및 완충액 성분에 크게 의존한다. 낮은 pH 바이러스 감소/불활성화 동안 표적 항체의 품질이 pH 및 낮은 pH 항온처리의 지속에 의해 영향을 받는다는 것이 알려져

있다. 특정 양태에서, 낮은 pH 항온처리의 지속은 0.5시간 내지 2시간, 바람직하게는 0.5시간 내지 1.5시간, 더욱 바람직하게는 1시간일 것이다. 바이러스 감소/불활성화는 단백질 농도 이외에, 이러한 동일한 변수들에 의존적이며, 이는 고농도에서의 감소/불활성화를 제한할 수 있다. 따라서, 단백질 농도, pH 및 감소/불활성화의 지속 중 적합한 변수를 선택하여 바이러스 감소/불활성화의 바람직한 수준을 달성할 수 있다.

[0089] 특정 양태에서, 바이러스 감소/불활성화는 적합한 필터를 사용하여 달성될 수 있다. 적합한 필터의 비제한적 예는 Ultipor DV50™ 필터 (Pall Corporation)이다. 비록 본 발명의 특정 양태가 일차 회수 단계 동안 이러한 여과를 이용하지만, 다른 양태에서는, 정제의 끝에서 두 번째 또는 최종 단계를 포함하여, 정제 과정의 다른 단계에서 이용된다. 특정 양태에서, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, Viresolve™ 필터 (Millipore, Billerica, Mass.); Zeta Plus VR™ 필터 (CUNO; Meriden, Conn.); 및 Planova™ 필터 (Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Buffalo Grove, Ill.)를 포함하는 대체적 필터가 바이러스 감소/불활성화에 사용된다.

[0090] 바이러스 감소/불활성화가 이용되는 양태에서, 샘플 혼합물은, 필요한 경우, 추가의 정제 단계를 위해 조절될 수 있다. 예를 들어, 낮은 pH 바이러스 감소/불활성화 후, 샘플 혼합물의 pH는 전형적으로, 정제 과정을 계속하기 전에, 더욱 중성인 pH, 예를 들어 약 pH 4.5 내지 약 pH 8.5, 바람직하게는 약 pH 4.9로 조절된다. 추가로, 혼합물은 목적하는 전도로를 얻기 위해서 주사용수 (WFI)로 플러싱될 수 있다.

[0091] 특정 양태에서, 일차 회수는 샘플 매트릭스를 더욱 정화하여 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체의 정제를 돋는 하나 이상의 원심분리 단계를 포함할 것이다. 샘플의 원심분리는, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 7000 내지 약 12,750 x g에서 수행될 수 있다. 대규모 정제와 관련하여, 이러한 원심분리는, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 생성된 상청액에서 150 NTU의 탁도 수준을 달성하기 위한 유속 세트로 온-라인 상에서 수행할 수 있다.

[0092] 특정 양태에서, 일차 회수는 샘플 매트릭스를 더욱 정화하여 본 발명의 항체의 정제를 돋도록 하나 이상의 심층 여과 (depth filtration) 이용을 포함할 것이다. 심층 여과는 다단계 밀도를 갖는 여과 매질을 포함한다. 이러한 다단계 밀도는 커다란 입자는 필터의 표면 근처에 포획되고, 작은 입자는 필터의 표면에 있는 큰 개방 부위는 통과하고 단지 필터의 중심에 가까운 더욱 작은 개구에 포획되도록 한다. 특정 양태에서, 심층 여과 단계는 탈지 (delipid) 심층 여과 단계일 수 있다. 비록 특정 양태는 단지 일차 회수 단계 동안만 여과 단계를 이용하지만, 다른 양태는, 하나 이상의 추가의 정제 단계 동안, 탈지 심층 필터를 포함하는 심층 필터를 사용한다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 심층 필터의 비제한적 예는 Cuno™ 모델 30/60ZA 심층 필터 (3M Corp.), 및 0.45/0.2  $\mu\text{m}$  Sartopore™ 이중층 필터 카트리지를 포함한다.

#### 4.3 친화성 크로마토그래피

[0093] 특정 양태에서, 일차 회수 샘플은 HCP로부터 목적 항체를 더욱 정제하기 위해 친화성 크로마토그래피에 적용된다. 특정 양태에서, 크로마토그래피 물질은 목적 항체에 선택적으로 또는 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 크로마토그래피 물질이 비제한적 예는 단백질 A, 단백질 G, 목적 항체가 결합되는 항원을 포함하는 크로마토그래피 물질 및 Fc 결합 단백질을 포함하는 크로마토그래피 물질을 포함한다. 구체적 양태에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 일차 회수 샘플을 적합한 단백질 A 수지를 포함하는 컬럼에 공급하는 것을 포함한다. 단백질 A 수지는 다양한 항체의 이소타입, 특히 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, 및 IgG<sub>4</sub>의 친화성 정제 및 분리에 유용하다. 단백질 A는 일차적으로 Fc 영역을 통해 포유동물 IgG에 결합하는 세균 세포벽 단백질이다. 이의 천연 상태에서, 단백질 A는 5개의 IgG 결합 도메인뿐만 아니라 다른 비공지된 기능의 도메인을 갖는다.

[0094] 단백질 A 수지에 대한 수개의 시판 공급원이 있다. 하나의 적합한 수지는 MabSelect™ (GE Healthcare)이다. MabSelect™으로 패킹된 적합한 컬럼에 대한 비제한적 예는 약 1.0 cm 직경 x 약 21.6 cm 길이 컬럼 (약 17 mL 베드 용적)이다. 이러한 크기의 컬럼은 소규모 정제에 사용될 수 있으며, 규모를 크게 하는데 사용되는 다른 컬럼과 비교될 수 있다. 예를 들어, 베드 용적이 약 6.6 L인 20 cm x 21 cm 컬럼이 더욱 큰 규모의 정제를 위해 사용될 수 있다. 컬럼에 무관하게, 컬럼은 적합한 수지, 예를 들어 MabSelect™를 사용하여 패킹될 수 있다.

[0095] 특정 양태에서, 특정한 목적 항체의 정제를 조정하기 위해 단백질 A 수지의 동적 결합능 (DBC)를 확인하는 것이 유리할 것이다. 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, MabSelect™ 컬럼의 DBC는 단일 유속 로드 또는 이중-유동 로드 전략에 의해 결정될 수 있다. 단일 유속 로드는 전체 로딩 기간에 걸쳐 약 300 cm/hr의 속도에서 평가될 수 있다. 이중-유속 로드 전략은 약 300 cm hr의 선형 속도에서 약 35 mg 단백질/mL 수지 이하로 컬럼을 로딩한

후 로드의 마지막 부분에 대해서는 더욱 긴 체류 시간이 가능하도록 선형 속도를 절반으로 감소시킴으로써 측정될 수 있다.

[0097] 특정 양태에서, 단백질 A 컬럼은 샘플로딩 전 적합한 완충액으로 평형화될 수 있다. 적합한 완충액의 비제한적 예는 Tris/NaCl 완충액 (약 pH 7.2)이다. 적합한 평형화 조건에 대한 비제한적 예는 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 약 pH 7.2이다. 이러한 평형화 후, 샘플을 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼 로딩 후, 컬럼은, 예를 들어 평형화 완충액을 사용하여 1회 또는 수회 세척될 수 있다. 상이한 완충액을 사용하는 세척을 포함한 다른 세척을 컬럼 용출 전에 수행할 수 있다. 예를 들어, 컬럼을 하나 이상의 컬럼 용적의 20 mM 시트르산/나트륨 시트레이트, 0.5 M NaCl (약 pH 6.0)을 사용하여 세척할 수 있다. 이러한 세척 후 임의로 평형화 완충액을 사용하는 하나 이상의 세척을 수행할 수 있다. 이어서, 단백질 A 컬럼은 적합한 용출 완충액을 사용하여 용출될 수 있다. 적합한 용출 완충액의 비제한적 예는 아세트산/NaCl 완충액 (약 pH 3.5)이다. 적합한 조건은, 예를 들어 0.1 M 아세트산 (약 pH 3.5)이다. 용출물은 당업자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, OD<sub>280</sub>에서의 흡광도 측정이 이어질 수 있다. 컬럼 용출물은 약 0.5 AU의 초기 굴절에서 개시하여 용출 피크의 트레일링 (trailing) 가장자리에서는 약 0.5 AU의 판독값으로 수집될 수 있다. 이어서, 목적 용출 분획(들)은 추가의 프로세싱을 위해 준비될 수 있다. 예를 들어, 수집된 샘플은 약 pH 10의 Tris (예: 1.0 M)을 사용하여 약 pH 5.0으로 적정될 수 있다. 임의로, 이러한 적정된 샘플은 여과되고 더욱 프로세싱될 수 있다.

#### 4.4 이온 교환 크로마토그래피

[0099] 특정 양태에서, 본 발명은 항체 및 하나 이상의 HCP를 포함하는 혼합물을 하나 이상의 이온 교환 분리 단계에 적용하여 항체를 포함하는 용출물이 수득되도록 상기 혼합물로부터 HCP-감소된 항체 제제를 생성하는 방법을 제공한다. 이온 교환 분리는 2개의 물질이 이를 각각의 이온 전하 차이에 기초하여 분리되는 임의의 방법을 포함하며, 양이온 교환 물질 또는 음이온 교환 물질을 사용할 수 있다.

[0100] 양이온 교환 물질 대 음이온 교환 물질의 사용은 단백질의 전체 전하에 기초한다. 따라서, 양이온 교환 단계의 사용 이전에 음이온 교환 단계를 이용하거나 음이온 교환 단계 이전에 양이온 교환 단계를 사용하는 것이 본 발명의 범위에 속한다. 또한, 단지 양이온 교환 단계, 단지 음이온 교환 단계 또는 2개의 임의의 연속 조합을 이용하는 것도 본 발명의 범위에 속한다.

[0101] 분리를 수행함에 있어서, 초기 항체 혼합물은 다양한 기술, 예를 들어 배치 정제 기술 또는 크로마토그래피 기술을 이용하여 이온 교환 물질과 접촉될 수 있다.

[0102] 예를 들어, 배치 정제와 관련하여, 이온 교환 물질은 목적하는 출발 완충액에 제조되거나 이로 평형화된다. 제조 또는 평형화 시, 이온 교환 물질의 슬러리가 수득된다. 분리될 항체가 이온 교환 물질에 대해 흡수되도록 항체 용액을 슬러리와 접촉시킨다. 이온 교환 물질에 결합하지 않는 HCP(들)을 포함하는 용액을, 예를 들어 슬러리를 가라앉히고 상정액을 제거함으로써 슬러리로부터 분리시킨다. 슬러리는 하나 이상의 세척 단계에 적용될 수 있다. 필요한 경우, 슬러리는 이온 교환 물질에 결합된 HCP를 탈착하도록 더욱 높은 전도도의 용액과 접촉될 수 있다. 결합된 폴리펩타이드를 용출하기 위해서, 완충액의 염 농도를 증가시킬 수 있다.

[0103] 또한, 이온 교환 크로마토그래피는 이온 교환 분리 기술로서 이용될 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피는 문자의 전체 전하 사이의 차이에 기초하여 문자를 분리시킨다. 항체 정제를 위해, 항체는 이온 교환 물질, 예를 들어 수지에 부착되는 작용기의 전하와 반대되는 전하를 가져야 한다. 예를 들어, 일반적으로 pI 이하의 완충 pH에서 전체적인 양성 전하를 갖는 항체가 음으로 하전된 작용기를 포함하는 양이온 교환 물질에 잘 결합할 것이다.

[0104] 이온 교환 크로마토그래피에서, 용질의 표면에 하전된 패치는, 주변 완충액의 이온 강도가 낮은 한, 크로마토그래피 매트릭스에 부착되는 반대 전하에 의해 이끌린다. 용출은 일반적으로 이온 교환 매트릭스의 하전된 부위에 대해 용질과 경쟁하도록 완충액의 이온 강도 (즉, 전도도)를 증가시킴으로써 달성된다. pH를 변화시키고 이로써 용질의 전하를 변경시키는 것이 용질의 용출을 달성하는 또 다른 방법이다. 전도도 또는 pH의 변화는 점진적이거나 (구배 용출) 또는 단계적 (단계 용출)일 수 있다.

[0105] 음이온성 또는 양이온성 치환체가 크로마토그래피의 음이온성 또는 양이온성 지지체를 형성하기 위해 매트릭스에 부착될 수 있다. 음이온 교환 치환체의 비제한적 예는 디에틸아미노에틸 (DEAE), 4급 아미노에틸 (QAE) 및

4급 아민 (Q) 그룹을 포함한다. 양이온성 치환체는 카복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE), 설포프로필 (SP), 포스페이트 (P) 및 설포네이트 (S)를 포함한다. 셀룰로즈 이온 교환 수지, 예를 들어 DE23<sup>TM</sup>, DE32<sup>TM</sup>, DE52<sup>TM</sup>, CM-23<sup>TM</sup>, CM-32<sup>TM</sup>, 및 CM-52<sup>TM</sup>가 Whatman Ltd (Maidstone, Kent, U.K.)로부터 입수가능하다. 또한, SEPHADEX®-기초 및 -가교-결합된 이온 교환기가 공지되어 있다. 예를 들어, DEAE-, QAE-, CM-, 및 SP-SEPHADEX® 및 DEAE-, Q-, CM- 및 S-SEPHAROSE® 및 SEPHAROSE® Fast Flow가 모두 Pharmacia AB로부터 입수가능하다. 또한, DEAE 및 CM 유도체화된 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체, 예를 들어 TOYOPEARL™ DEAE-650S 또는 M 및 TOYOPEARL™ CM-650S 또는 M이 Toso Haas Co. (Philadelphia, Pa)로부터 입수가능하다.

[0106] 항체 및 불순물, 예를 들어 HCP(들)을 포함하는 혼합물이 이온 교환 컬럼, 예를 들어 양이온 교환 컬럼에 로딩된다. 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 혼합물은 사용되는 컬럼에 따라 약 80 g 단백질/L 수지의 로드로 로딩될 수 있다. 적합한 양이온 교환 컬럼의 예는 베드 용적이 약 116 L인 80 cm 직경 x 23 cm 길이 컬럼이다. 이어서, 이러한 양이온 컬럼에 로딩된 혼합물은 세척 완충액 (평형 완충액)으로 세척될 수 있다. 이어서, 항체는 컬럼으로부터 용출되고, 제1 용출물이 수득된다.

[0107] 이러한 이온 교환 단계는 목적 항체의 포획을 용이하게 하며, 불순물, 예를 들어 HCP를 감소시킨다. 특정 양상에서, 이온 교환 컬럼은 양이온 교환 컬럼이다. 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 양이온 교환 컬럼에 적합한 수지는 CM HyperDF 수지이다. 이를 수지는 시판 공급원, 예를 들어 Pall Corporation으로부터 입수가능하다. 이러한 양이온 교환 절차는 실온에서 또는 실온 근처에서 수행될 수 있다.

#### 4.5 한외여과/투석여과

[0109] 본 발명의 특정 양태는 항체 샘플을 더욱 정제하고 농축시키기 위해 한외여과 및/또는 투석여과 단계를 이용한다. 한외여과는 문헌 [참조: Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman and A. Zydny (Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1996); 및 Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)]에 상세히 기술되어 있다. 바람직한 여과 과정은 문헌 [참조: Millipore catalogue entitled "Pharmaceutical Process Filtration Catalogue" pp. 177-202 (Bedford, Mass., 1995/96)]에 기술되어 있는 바와 같은 접선 유동 여과이다. 한외여과는 일반적으로 0.1 μm 보다 작은 세공 크기를 갖는 필터를 사용하는 여과를 의미하는 것으로 간주된다. 이러한 작은 세공 크리를 갖는 필터를 사용함으로써, 항체는 필터 뒤에 남겨지는 한편, 샘플의 용적은 필터를 통과하는 샘플 완충액의 투과를 통해 감소될 수 있다.

[0110] 투석여과는 염, 당 및 비-수성 용매를 제거 및 교환하고/하거나 결합된 종을 분리하고/하거나 저분자량 물질을 제거하고/하거나 이온 및/또는 pH 환경의 신속한 변화를 초래하기 위해 한외필터를 이용하는 방법이다. 미세용질은 용매를 한외여과되는 용액에 대략 한외여과 속도와 동일한 속도로 가함으로써 가장 효과적으로 제거된다. 이는 일정 용적의 용액으로부터 미세종을 세척하여 보유된 항체를 효과적으로 정제한다. 본 발명의 특정 양태에서, 투석여과 단계는, 임의로 추가의 크로마토그래피 또는 다른 정제 단계 전에, 본 발명과 관련지어 사용되는 다양한 완충액을 교환하고, 항체 제제로부터 불순물을 제거하기 위해 이용된다.

#### 4.6 소수성 상호작용 크로마토그래피

[0112] 또한, 본 발명은, 소수성 상호작용 분리 단계를 추가로 포함하는, 항체 및 적어도 하나의 HCP를 포함하는 혼합물로부터 HCP-감소된 항체 제제를 생성하는 방법을 특징으로 한다. 예를 들어, 이온 교환 컬럼으로부터 수득된 제1 용출물은 감소된 수준의 HCP를 갖는 제2 용출물이 수득되도록 소수성 상호작용 물질로 처리될 수 있다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 단계, 예를 들어 본원에 기술되는 것은 일반적으로 단백질 응집물, 예를 들어 항체 응집물, 및 공정-관련된 불순물을 제거하기 위해 수행된다.

[0113] 분리를 수행함에 있어서, 샘플 혼합물은, 예를 들어 배치 정제 기술을 이용하거나 컬럼을 이용하여, HIC 물질과 접촉된다. HIC 정제 전, 예를 들어 혼합물을 예비-컬럼을 통과시킴으로써, 임의의 무질서유발제(chaotropic agent) 또는 매우 소수성인 물질을 제거하는 것이 바람직할 수 있다.

[0114] 예를 들어, 배치 정제와 관련하여, HIC 물질은 목적하는 평형 완충액 중에 제조되거나 이에 대해 평형화된다. HIC 물질의 슬러리가 수득된다. 항체 용액은 HIC 물질에 대해 분리될 항체를 흡수하도록 슬러리와 접촉된다.

HIC 물질에 결합하지 않는 HCP를 포함하는 용액은, 예를 들어 슬러리를 가라앉히고 상청액을 끓김으로써 슬러리로부터 분리된다. 슬러리는 하나 이상의 세척 단계로 처리될 수 있다. 필요한 경우, 슬러리는 HIC 물질에 결합된 항체를 털착하도록 낮은 전도도의 용액과 접촉될 수 있다. 결합된 항체를 용출시키기 위해, 염 농도가 감소될 수 있다.

[0115] 이온 교환 크로마토그래피는 분리할 항체의 전하에 의존적인 반면, 소수성 상호작용 물질은 항체의 소수성을 이용한다. 항체의 소수성 그룹은 컬럼의 소수성 그룹과 상호작용한다. 단백질이 더욱 소수성일수록, 컬럼과 더 옥 강하게 상호작용할 것이다. 따라서, HIC 단계는 숙주 세포 유도된 불순물 (예: DNA 및 다른 고분자량 및 저 분자량 생성물-관련 종)을 제거한다.

[0116] 소수성 상호작용은 높은 이온 농도에서 가장 강하므로, 이러한 형태의 분리는 염 침전 또는 이온 교환 절차 후 편리하게 수행된다. 항체의 HIC 컬럼에의 흡착은 고염 농도를 사용함으로써 유리하나, 실제 농도는 항체 및 선택된 특정 HIC 리간드의 특성에 의존적으로 다양한 범위에 걸쳐 변할 수 있다. 다양한 이온은 이들이 소수성 상호작용을 증진 (염석 효과)시키거나 물의 구조를 파괴 (무질서유발 효과)하는가에 따라 소위 솔루포빅 (soluphobic) 시리즈로 배열되고 소수성 상호작용을 약화시킬 수 있다. 양이온은 증가하는 염석 효과의 면에서 Ba<sup>++</sup>; Ca<sup>++</sup>; Mg<sup>++</sup>; Li<sup>+</sup>; Cs<sup>+</sup>; Na<sup>+</sup>; K<sup>+</sup>; Rb<sup>+</sup>; NH4<sup>+</sup>로 등급이 매겨지고, 음이온은 증가하는 무질서유발 효과의 면에서 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; CH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Cl<sup>-</sup>; Br<sup>-</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>; I<sup>-</sup>; SCN<sup>-</sup>로 등급이 매겨질 수 있다.

[0117] 일반적으로, Na, K 또는 NH<sub>4</sub> 설페이트가 HIC에서 리간드-단백질 상호작용을 효과적으로 증진시킨다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > NaCl > NH<sub>4</sub>Cl > NaBr > NaSCN의 상관관계로 표시되는 바와 같이, 상호작용의 세기에 영향을 끼치는 염이 제조될 수 있다. 일반적으로, 약 0.75 내지 약 2 M 황산암모늄 또는 약 1 내지 4 M NaCl의 염 농도가 유용하다.

[0118] HIC 컬럼은 일반적으로 소수성 리간드 (예: 알킬 또는 아릴 그룹)이 커플링된 베이스 매트릭스 (예: 가교결합된 아가로즈 또는 합성 공중합체 물질)를 포함한다. 적합한 HIC 컬럼은 폐널 그룹으로 치환된 아가로즈 수지 (예: Phenyl Sepharose™ 컬럼)을 포함한다. 많은 HIC 컬럼이 시판된다. 예로는, 이로 제한됨이 없이, 저치환 또는 고치환을 갖는 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow 컬럼 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Phenyl Sepharose™ High Performance 컬럼 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Octyl Sepharose™ High Performance 컬럼 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Fractogel™ EMD Propyl 또는 Fractogel™ EMD Phenyl 컬럼 (E. Merck, Germany); Macro-Prep™ Methyl 또는 Macro-Prep™ t-Butyl Support (Bio-Rad, California); WP HI-Propyl (C3)™ 컬럼 (J. T. Baker, New Jersey); 및 Toyopearl™ Ether, Phenyl 또는 Butyl 컬럼 (TosoHaas, PA)을 포함한다.

#### 4.7 예시적 정제 전략

[0120] 특정 양태에서, 일차 회수물은 생산 생물반응기 수거물로부터 세포 및 세포 파편 (HCP 포함)을 제거하기 위해 연속해서 pH 감소, 원심분리 및 여과 단계를 이용하여 계속 처리될 수 있다. 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 항체, 배지 및 세포를 포함하는 배양물은 약 1시간 동안 약 pH 3.5의 산을 사용하여 pH-매개된 바이러스 감소/불활성화 처리될 수 있다. pH 감소는 시트르산, 예를 들어 3 M 시트르산과 같은 공지된 산 제제를 사용하여 촉진될 수 있다. 산 pH에의 노출은 pH 민감성 바이러스 오염물을, 완전히 제거시키지 않는 경우, 감소시키며, 일부 배지/세포 오염물을 침전시킨다. 이러한 바이러스 감소/불활성화 단계에 이어서, 약 20분 내지 약 40분 동안 수산화나트륨, 예를 들어 3 M 수산화나트륨과 같은 염기를 사용하여 pH를 약 4.9 또는 5.0으로 조절한다. 이러한 조절은 약 20°C에서 수행할 수 있다. 특정 양태에서, pH 조절된 배양물은 약 7000 x g 내지 약 11,000 x g에서 원심분리된다. 특정 양태에서, 생성된 샘플 상청액은 다수의 심층 필터를 포함하는 필터 트레이인을 통해 여과된다. 특정 양태에서, 필터 트레이인은 약 12개의 16인치 Cuno™ 모델 30/60ZA 심층 필터 (3M Corp.) 및 3개의 30인치 0.45/0.2 μm Sartopore™ 2 필터 카트리지 (Sartorius)가 장착된 약 3개의 둥근 필터 하우징을 포함한다. 정화된 상청액은 예비-멸균된 수거 용기와 같은 용기에 수집되며 약 8°C로 유지된다. 이어서, 이 온도는 하기에 개요되는 포획 크로마토그래피 단계 또는 단계들을 수행하기 전에 약 20°C로 조절된다. 당업자가 상기된 조건들을 변화시킬 수 있으나, 여전히 본 발명의 범위에 속한다는 것을 주목해야 한다.

[0121] 특정 양태에서, 일차 회수물은 단백질 A 수지를 사용하는 친화성 크로마토그래피로 처리될 것이다. 단백질 A 수지에 대한 수개의 시판 공급원이 있다. 하나의 적합한 수지는 MabSelect™ (GE Healthcare)이다. MabSelect™로 패킹된 적합한 컬럼의 예는 약 1.0 cm 직경 x 약 21.6 cm 길이 (약 17 mL 베드 용적)의 컬럼이

다. 이러한 크기의 컬럼은 벤치 규모에 사용될 수 있으며, 규모를 크게 하는데 사용되는 다른 컬럼과 비교될 수 있다. 예를 들어, 베드 용적이 약 6.6 L인 20 cm x 21 cm 컬럼이 시판 생산에 사용될 수 있다. 컬럼에 무관하게, 컬럼은 적합한 수지, 예를 들어 MabSelect™를 사용하여 패킹될 수 있다.

[0122] 특정 양상으로, 단백질 A 컬럼은 샘플로딩 전 적합한 완충액으로 평형화될 수 있다. 적합한 완충액의 비제한적 예는 Tris/NaCl 완충액 (약 pH 6 대지 8, 바람직하게는 약 pH 7.2)이다. 적합한 평형화 조건에 대한 비제한적 예는 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 약 pH 7.2이다. 이러한 평형화 후, 샘플을 컬럼에 로딩할 수 있다. 컬럼로딩 후, 컬럼은, 예를 들어 평형화 완충액을 사용하여 1회 또는 수회 세척될 수 있다. 상이한 완충액을 사용하는 세척을 포함한 다른 세척을 컬럼 용출 전에 수행할 수 있다. 예를 들어, 컬럼을 하나 이상의 컬럼 용적의 20 mM 시트르산/나트륨 시트레이트, 0.5 M NaCl (약 pH 6.0)을 사용하여 세척할 수 있다. 이러한 세척 후 임의로 평형화 완충액을 사용하는 하나 이상의 세척을 수행할 수 있다. 이어서, 단백질 A 컬럼은 적합한 용출 완충액을 사용하여 용출될 수 있다. 적합한 용출 완충액의 비제한적 예는 아세트산/NaCl 완충액 (약 pH 3.5)이다. 적합한 조건은, 예를 들어 0.1 M 아세트산 (약 pH 3.5)이다. 용출물은 당업자에게 널리 공지된 기술을 이용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, OD<sub>280</sub>에서의 흡광도 측정이 이어질 수 있다. 컬럼 용출물은 약 0.5 AU의 초기 굴절에서 개시하여 용출 피크의 트레일링 가장자리에서는 약 0.5 AU의 판독값으로 수집될 수 있다. 이어서, 목적 용출 분획(들)은 추가의 프로세싱을 위해 준비될 수 있다. 예를 들어, 수집된 샘플은 약 pH 10의 Tris (예: 1.0 M)을 사용하여 약 pH 5.0으로 적정될 수 있다. 임의로, 이러한 적정된 샘플은 여과되고 더욱 프로세싱될 수 있다.

[0123] MabSelect™ 컬럼의 동적 결합능 (DBC)은 단일 유속 로드 또는 이중-유동 로드 전략에 의해 결정될 수 있다. 단일 유속 로드는 전체 로딩 기간에 걸쳐 약 300 cm/hr의 속도에서 평가될 수 있다. 이중-유속 로드 전략은 약 300 cm hr의 선형 속도에서 약 35 mg 단백질/mL 수지 이하로 컬럼을 로딩한 후 로드의 마지막 부분에 대해서는 더욱 긴 체류 시간이 가능하도록 선형 속도를 절반으로 감소시킴으로써 측정될 수 있다.

[0124] 이어서, 단백질 A 용출물은 양이온 교환 컬럼을 사용하여 더욱 정제될 수 있다. 특정 양태에서, 양이온 교환 컬럼에 사용되는 평형화 완충액은 약 pH 5.0의 완충액이다. 적합한 완충액의 예는 약 210 mM 나트륨 아세테이트 (pH 5.0)이다. 평형화 후, 컬럼은 상기 일차 회수 단계로부터 제조된 샘플로 로딩된다. 컬럼은 이온 교환 수지, 예를 들어 CM Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare)로 패킹된다. 이어서, 컬럼은 평형화 완충액을 사용하여 세척된다. 이어서, 컬럼은 평형화 완충액 또는 세척 완충액과 비교하여 더욱 높은 이온 농도를 갖는 완충액을 사용하여 용출 단계로 처리된다. 예를 들어, 적합한 용출 완충액은 약 790 mM 나트륨 아세테이트 (pH 5.0)일 수 있다. 항체는 용출될 것이며, OD<sub>280nm</sub>에서 UV 분광광도계를 사용하여 모니터링될 수 있다. 특정 예에서, 용출 수집은 상부로부터는 3 OD<sub>280nm</sub> 하부로는 8 OD<sub>280nm</sub>일 수 있다. 당업자는 조건을 변화시킬 수 있으며 이들도 본 발명의 범위에 속한다는 것을 이해할 필요가 있다.

[0125] 특정 양태에서, 단백질 A 용출물은 음이온 교환 컬럼을 사용하여 더욱 정제된다. 이러한 단계를 위한 적합한 컬럼에 대한 비제한적 실시예는 베드 용적이 약 85 L인 60 cm 직경 x 30 cm 길이 컬럼이다. 이 컬럼은 음이온 교환 수지, 예를 들어 Q Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare)으로 패킹된다. 컬럼은 Tris/염화나트륨과 같은 적합한 완충액의 약 7 컬럼 용적을 사용하여 평형화될 수 있다. 적합한 조건의 예는 25 mM Tris, 50 mM 염화나트륨 (pH 8.0)이다. 당업자는 조건을 변화시킬 수 있으며 여전히 본 발명의 범위에 속한다. 컬럼은 상기 개략된 단백질 A 정제 단계로부터의 수집 샘플로 로딩된다. 또 다른 양상으로, 컬럼은 양이온 교환 동안 수집된 용출물로부터 로딩된다. 컬럼 로딩 후, 컬럼은 평형화 완충액 (예: Tris/염화나트륨 완충액)으로 세척된다. 항체를 포함하는 관류물은 OD<sub>280nm</sub>에서 UV 분광광도계를 사용하여 모니터링될 수 있다. 이러한 음이온 교환 단계는 관련된 불순물, 예를 들어 DNA와 같은 핵산 및 숙주 세포 단백질을 감소시킨다. 목적 항체는 컬럼의 고체상, 예를 들어 Q Sepharose™과 실질적으로 상호작용하지도 않고 이에 결합하지도 않으나 많은 불순물은 컬럼의 고체상과 상호작용하고 이에 결합한다는 사실 때문에, 분리가 일어난다. 음이온 교환은 약 12°C에서 수행될 수 있다.

[0126] 특정 양태에서, 어떤 이온 교환 단계가 먼저 사용되는가에 의존적인, 양이온 교환 또는 음이온 교환 용출물은, 예를 들어 16 인치 Cuno™ 탈지 필터를 사용하여 후속적으로 여과된다. 탈지 필터를 사용하는 이러한 여과 후, 예를 들어 30인치 0.45/0.2 μm Sartopore™ 이중층 필터 카트리지를 사용하여 여과될 수 있다. 이온 교환 용출 완충액을 사용하여 필터에 잔류하는 잔류 용적을 플러싱하고 한외여과/투석여과를 준비할 수 있다.

[0127] 한외여과/투석여과 단계를 수행하기 위해서, 여과 매질은 적합한 완충액, 예를 들어 20 mM 인산나트륨 (pH 7.

0)에 제조된다. 염화나트륨과 같은 염, 예를 들어 100 mM 염화나트륨이 첨가되어 이온 강도를 증가시킬 수 있다. 이러한 한외여과/투석여과 단계는 항-IL-12, 항-TNF  $\alpha$ , 또는 항-IL-18 항체를 농축시키고, 나트륨 아세테이트를 제거하며, pH를 조절하는 것을 돋는다. 이러한 단계를 실시하기 위한 시판 필터가 입수가능하다. 예를 들어, Millipore가 30 kD 분자량 컷-오프 (MWCO) 셀룰로즈 울트라필터 막 카세트를 제조한다. 이러한 여과 절차는 실온에서 또는 실온 근처에서 수행될 수 있다.

[0128] 특정 양태에서, 상기의 포획 여과 단계로부터의 샘플은 제2의 이온 교환 분리 단계로 처리된다. 바람직하게는, 이러한 제2 이온 교환 분리는 제1 이온 교환 분리의 반대 전하에 기초한 분리를 수반할 것이다. 예를 들어, 일차 회수 후 음이온 교환 단계가 이용되었다면, 제2 이온 교환 크로마토그래피 단계는 양이온 교환 단계일 수 있다. 역으로, 일차 회수 단계 이후 양이온 교환 단계가 수행되었다면, 음이온 교환 단계가 이어질 것이다. 특정 양태에서, 제1 이온 교환 용출물은 제2 이온 교환 크로마토그래피 단계에 직접적으로 처리될 수 있으며, 이 때 제1 이온 교환 용출물을 적합한 완충 조건으로 조절된다. 적합한 음이온성 및 양이온성 물질 및 조건은 상술된 바와 같다.

[0129] 본 발명의 특정 양태에서, 항체를 포함하는 샘플은 소수성 상호작용 분리 단계를 이용하여 더욱 프로세싱될 것이다. 이러한 단계를 위한 적합한 컬럼의 비제한적 예는, HIC를 위해 사용되는 적합한 수지, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 폐널 HP Sepharose™ (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden)으로 패킹되는, 베드 용적이 약 75 L인 80 cm 직경 x 15 cm 길이 컬럼이다. 목적 항체를 포함하는 이전의 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 수득되는 관류 제제는 동일 용적의 약 1.7 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨 (pH 7.0)으로 희석될 수 있다. 이어서, 0.45/0.2  $\mu$ m Sartopore™ 2 이중층 필터 또는 이의 등가물을 사용하여 여과될 수 있다. 특정 양태에서, 소수성 크로마토그래피 절차는 2회 이상의 사이클을 포함한다.

[0130] 특정 양태에서, HIC 컬럼은 먼저 적합한 완충액을 사용하여 평형화된다. 적합한 완충액의 비제한적 예는 0.85 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨 (pH 7.0)이다. 당업자는 완충제의 농도를 변화시키고/시키거나 동등한 완충액을 치환함으로써 평형화 완충액을 변화시킬 수 있으며 이들도 여전히 본 발명의 범위에 속한다. 특정 양태에서, 컬럼은 음이온 교환 관류물 샘플로 로딩되고, 황산암모늄/인산나트륨과 같은 적합한 완충 시스템으로 수회, 예를 들어 3회 세척된다. 적합한 완충 시스템의 예는 1.1 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨 완충액 (약 pH 7.0)을 포함한다. 임의로, 컬럼은 추가의 세척 사이클을 겪을 수 있다. 예를 들어, 제2의 세척 사이클은 적합한 완충 시스템을 사용하는 다수의 컬럼 세척물, 예를 들어 1 내지 수회 세척물을 포함할 수 있다. 적합한 완충 시스템의 비제한적 예는 0.85 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨 (pH 7.0)을 포함한다. 하나의 양상으로, 로딩된 컬럼은 적합한 완충 시스템을 사용하여 제3의 세척을 겪을 수 있다. 컬럼은 1.1 M 황산암모늄, 50 mM 인산나트륨 (약 pH 7.0)과 같은 완충 시스템을 사용하여 수회, 예를 들어 1회 내지 3회 세척될 수 있다. 당업자는 완충 조건을 변화시킬 수 있으며, 이들도 여전히 본 발명의 범위에 속한다.

[0131] 컬럼은 적합한 용출 완충액을 사용하여 용출된다. 이러한 용출 완충액의 적합한 예는 0.5 M 황산나트륨, 15 mM 인산나트륨, 약 pH 7.7이다. 목적 항체는 통상의 분광광도계를 사용하여 상부로부터는 3 OD<sub>280nm</sub>에서 피크의 하부로부터는 3 OD<sub>280nm</sub>에서 검출 및 수집될 수 있다.

[0132] 본 발명이 특정 양상에서, 소수성 크로마토그래피 단계로부터의 용출물은, 존재하는 경우, 온전한 바이러스를 포함하여, 바이러스 입자의 제거를 위해 여과 처리된다. 적합한 필터의 예는 Ultipor DV50™ 필터 (Pall Corporation)이다. 다른 바이러스 필터가 이러한 여과 단계에 사용될 수 있으며, 당업자에게 널리 공지되어 있다. HIC 용출물은 약 34 psig에서 약 0.1  $\mu$ m의 예비-습윤된 필터 및 2 x 30인치 Ultipor DV50™ 필터 트레이인을 통해 여과된다. 특정 양태에서, 여과 과정 후, 필터는 필터 하우징에 보유된 임의의 항체를 제거하기 위해, 예를 들어 HIC 용출 완충액을 사용하여 세척된다. 여과물은 약 12°C에서 예비-멸균된 용기에 저장될 수 있다.

[0133] 특정 양태에서, 상기 수득된 여과물은 다시 한외여과/투석여과로 처리된다. 실시자의 최종 목적이 예를 들어 약제 제형에 항체를 사용하고자 하는 것인 경우, 이 단계가 중요하다. 이러한 과정은, 이용되는 경우, 항체의 농축, 이전에 사용된 완충 염의 제거를 용이하게 하며, 특정 제형 완충액으로 대체한다. 특정 양태에서, 다수 용적, 예를 들어 2 용적의 제형 완충액을 사용하는 연속 투석여과가 수행된다. 적합한 제형 완충액의 비제한적 예는 5 mM 메티오닌, 2% 만니톨, 0.5% 슈크로즈, pH 5.9 완충액 (Tween 부재)이다. 이러한 디아볼륨 (diavolume) 교환을 마친 후, 항체는 농축된다. 항체에 대한 예정 농도가 도달되면, 실시자는 약 0.005% (v/v)의 최종 Tween 농도에 도달하도록 첨가되어야 하는 10% Tween의 양을 계산할 수 있다.

[0134] 본 발명의 특정 양태는 정제 단계를 추가로 포함할 것이다. 이온 교환 크로마토그래피 전, 동안 또는 후에 수

행될 수 있는 추가의 정제 절차의 예는 에탄올 침전, 등전점 포커싱, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 Sepharose™ 상에서의 크로마토그래피, 추가의 음이온 교환 크로마토그래피 및/또는 추가의 양이온 교환크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 포획 시약으로서 단백질 G, 항체, 특정 기질, 리간드 또는 항원을 사용)를 포함한다.

[0135] 본 발명의 특정 양태에서, 항-IL-12 항체는 도 1에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, 또는 IgM 이소타입 항체이다. 바람직한 양태에서, 항-IL-12 항체는 도 1에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub> 이소타입이며, 보다 바람직하게는 항-IL-12 항체는 도 1에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgG<sub>1</sub> 항체이다. 본 발명의 특정 양태에서, 항-TNF α 항체는 도 3에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, 또는 IgM 이소타입 항체이다. 바람직한 양태에서, 항-TNF α 항체는 도 3에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub> 이소타입이며, 보다 바람직하게는 항-TNF α 항체는 도 3에 개략된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 IgG<sub>1</sub> 항체이다.

## 5. 샘플 순도 검정 방법

### 5.1 숙주 세포 단백질 검정

[0136] 또한, 본 발명은 분리/정제된 항체 조성물 중의 잔류 수준의 숙주 세포 단백질 (HCP) 농도를 측정하는 방법을 제공한다. 상술된 바와 같이, HCP는 바람직하게는 최종 표적 물질 산물, 예를 들어 항-IL-12, 항-TNF α, 또는 항-IL-18 항체로부터 제거된다. 예시적 HCP는 항체 생성 공급원으로부터 기원하는 단백질을 포함한다. 표적 항체로부터 HCP를 확인하고 충분히 제거하지 못하면, 감소된 효능 및/또는 유해한 주체 반응을 이끌 수 있다.

[0137] 본원에서 사용되는 용어 "HCP ELISA"는, 검정에 사용되는 제2 항체가 항체 (예: 항-IL-12, 항-TNF α, 또는 항-IL-18 항체)를 생성하기 위해 사용되는 세포, 예를 들어 CHO 세포로부터 생성되는 HCP에 특이적인, ELISA를 언급한다. 제2 항체는 당업자에게 공지된 통상의 방법에 따라 생성될 수 있다. 예를 들어, 제2 항체는 삼(sham) 생성 및 정제 수행에 의해 수득되는 HCP를 사용하여 생성될 수 있다. 즉, 목적 항체를 생성하기 위해 사용된 동일한 세포주가 사용되나, 세포주는 항체 DNA로 형질감염되지는 않는다. 예시적 양태에서, 제2 항체는 선택된 세포 발현 시스템, 즉 표적 항체를 생성하는데 사용된 세포 발현 시스템에서 발현되는 것과 유사한 HPC를 사용하여 생성된다.

[0138] 일반적으로, HCP ELISA는 2종의 항체, 즉 제1 항체 및 제2 항체 사이에 HCP를 포함하는 액체 샘플을 샌드위칭하는 것을 포함한다. 샘플은 샘플 중의 HCP가, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 염소 항-CHO (친화성으로 정제됨)(Cygnus)에 대한 제1 항체에 의해 포획되는 시간 동안 항온처리된다. 항체 (예: 항-CHO HCP 바이오티닐화된 항체)를 생성하는데 사용되는 세포로부터 생성되는 HCP에 대해 특이적인 표지된 제2 항체 또는 항체의 혼합물이 첨가되고, 샘플 중의 포획된 HCP에 결합한다. 특정 양태에서, 제1 및 제2 항체는 폴리클로날 항체이다. 특정 양태에서, 제1 및 제2 항체는 HCP에 대해 생성된 폴리클로날 항체의 블렌드, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 바이오티닐화된 염소 항 숙주 세포 단백질 혼합물 599/626/748이다. 샘플 중에 포함된 HCP의 양은 제2 항체 표지물에 기초하여 적합한 시험을 이용하여 측정된다.

[0139] HCP ELISA는 항체 조성물, 예를 들어 상술된 과정을 이용하여 수득된 용출물 또는 관류물 중의 HCP의 수준을 측정하는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 이때 조성물은 단백질 A 효소 결합된 면역흡착 검정 ("ELISA")에 의해 측정시 HCP에 대해 검출가능한 수준을 갖지 않는다.

### 5.2 친화성 크로마토그래피 물질 검정

[0140] 또한, 특정 양태에서, 본 발명은 분리/정제된 항체 조성물에서 잔류 수준의 친화성 크로마토그래피 물질을 측정하는 방법을 제공한다. 특정 양상으로, 이러한 물질은 정제 과정 동안 항체 조성물로 침출된다. 특정 양태에서, 분리/정제된 항체 조성물 중 단백질 A의 농도를 확인하는 방법이 이용된다. 본원에서 사용되는 용어 "단백질 A ELISA"는, 검정에 사용되는 제2 항체가 목적 항체, 예를 들어 항-IL-12, 항-TNF α, 또는 항-IL-18 항체를

정제하기 위해 사용되는 단백질 A에 특이적인, ELISA를 언급한다. 제2 항체는 당업자에게 공지된 통상의 방법에 따라 생성될 수 있다. 예를 들어, 제2 항체는 항체 제조 및 생성을 위한 통상의 방법과 연관지어 천연 발생 또는 재조합 단백질 A를 사용하여 제조될 수 있다.

[0144] 일반적으로, 단백질 A ELISA는 항-단백질 A 항체의 2종, 즉 제1의 항-단백질 A 항체 및 제2의 항-단백질 A 항체 사이에 단백질 A를 포함하는 (또는 가능하게는 단백질 A를 함유하는) 액체 샘플을 샌드위칭하는 것을 포함한다. 샘플은 항-단백질 A 항체, 예를 들어 이로 제한됨이 없이, 폴리클로날 항체 또는 폴리클로날 항체의 블렌드의 제1종에 노출되고, 제1 항체에 의해 포획되는 샘플 중의 단백질 A에 대해 충분한 시간 동안 항온처리된다. 이어서, 표지된 제2 항체, 예를 들어, 이로 제한됨이 없이, 단백질 A에 대해 특이적인 폴리클로날 항체 또는 폴리클로날 항체의 블렌드가 첨가되고, 샘플 중의 포획된 단백질 A에 결합한다. 본 발명과 관련하여 유용한 항-단백질 A 항체에 대한 추가의 비제한적 예는 닦 항-단백질 A 및 바오티닐화된 항-단백질 A 항체를 포함한다. 샘플에 포함된 단백질 A의 양은 제2 항체의 표지물에 기초하여 적합한 시험을 이용하여 측정된다. 대체적 친화성 크로마토그래피 물질의 농도를 확인하는데 유사한 검정을 이용할 수 있다.

[0145] 단백질 A ELISA는 항체 조성물, 예를 들어 상술된 과정을 이용하여 수득된 용출물 또는 관류물 중의 단백질 A의 수준을 측정하는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 이때 조성물은 단백질 A 효소 결합된 면역흡착 검정 ("ELISA")에 의해 측정시 단백질 A에 대해 검출가능한 수준을 갖지 않는다.

## 6. 추가의 변형

[0147] 본 발명의 항체는 변형될 수 있다. 일부 양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 목적하는 효과를 제공하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 폐길화를 문헌 [참조: Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992); EP 0 154 316; 및 EP 0 401 384, 각각이 전부 본원에 참조로 삽입됨]에 기술되어 있는 바와 같이 당해 기술 분야에 공지된 임의의 폐길화 반응에 의해 수행될 수 있다. 하나의 양상으로, 폐길화는 반응성 폴리에틸렌 글리콜 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행되다. 본 발명의 항체 및 항체 단편의 폐길화에 적합한 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 본원에서 사용되는 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화하기 위해 사용되었던 임의의 형태의 PEG, 예를 들어 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜을 포함하고자 한다.

[0148] 본 발명의 폐길화된 항체 및 항체 단편을 제조하는 방법은 일반적으로 (a) 항체 또는 항체 단편을 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들어 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체를 적합한 조건 하에서 반응시켜 항체 또는 항체 단편이 하나 이상의 PEG 그룹에 부착되게 하고, (b) 반응 생성물을 수득하는 단계를 포함할 것이다. 공지된 변수 및 목적하는 결과에 기초하여 최적 반응 조건 또는 아실화 반응을 선택하는 것이 당업자에게는 자명할 것이다.

[0149] IL-12, TNF $\alpha$ , 또는 IL-18에 특이적인 폐길화된 항체 및 항체 단편은 일반적으로 본원에서 기술되는 항-IL-12, 항-TNF $\alpha$  또는 항-IL-18 항체를 투여함으로써 IL-12-관련, TNF $\alpha$ -관련, 또는 IL-18-관련 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 폐길화된 항체 및 항체 단편은, 비폐길화된 항체 및 항체 단편과 비교하여 증가된 반감기를 갖는다. 폐길화된 항체 및 항체 단편은 단독으로, 함께 또는 다른 약제학적 조성물과 병용하여 사용될 수 있다.

[0150] 본 발명의 항체 또는 항체 일부는 또 다른 기능성 분자 (예: 또 다른 웹타이드 또는 단백질)로 유도체화되거나 이에 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 일부는 면역부착 분자를 포함하여 본원에 기술되는 사람 항-hIL-12, 항-TNF $\alpha$ , 또는 항-hIL-18 항체의 유도체화된 형태 및 달리 변형된 형태를 포함하고자 한다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 항체 일부는 하나 이상의 다른 분자 실체, 예를 들어 또 다른 항체 (예: 이특이적 항체 또는 디아바디), 검출체, 세포독성제, 약제학적 제제 및/또는 항체 또는 항체 일부의 또 다른 분자 (예: 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 연합을 중재할 수 있는 단백질 또는 웹타이드에 (화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 화합 등에 의해) 기능적으로 연결될 수 있다.

[0151] 유도체화된 항체의 일 유형은 (예를 들어, 이특이적 항체를 제조하기 위해서, 동일한 유형 또는 상이한 유형의) 2개 이상의 항체를 가교결합시킴으로써 생성된다. 적합한 가교결합제는 적합한 스페이서 (예: m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르)에 의해 분리된 2개의 명백하게 반응성인 그룹을 갖는 헤테로이작용성 또는 호모이작용성 (예: 디석신이미딜 수베레이트)인 것을 포함한다. 이러한 링커는 Pierce Chemical Company (Rockford, IL)로부터 입수 가능하다.

[0152]

본 발명의 항체 또는 항체 일부가 유도체화될 수 있는 유용한 검출가능한 제제는 형광 화합물을 포함한다. 예시적인 형광성 검출제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 또한, 항체는 검출가능한 효소, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코즈 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 항체가 검출가능한 효소로 유도체화되는 경우, 이는 검출가능한 반응 산물을 생성하기 위해 효소가 사용하는 추가의 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들어, 검출제 서양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출가능한 착색된 반응 산물을 이끈다. 또한, 항체는 바이오틴으로 유도체화되고 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적 측정을 통해 검출될 수 있다.

[0153]

## 7. 약제학적 조성물

[0154]

본 발명의 항체 및 항체 일부분은 환자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로 혼입될 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 항체 일부 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항세균제, 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 하나 이상의 물, 포스페이트 완충된 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등, 및 이들의 배합물을 포함한다. 많은 경우에서, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 항체 또는 항체 일부분의 저장 기간 또는 효과를 증진시키는 소량의 보조 물질, 예를 들어 습윤제, 유화제, 보존제 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있다.

[0155]

본 발명의 항체 및 항체 일부분은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물로 혼입될 수 있다. 항체 또는 항체 일부분은, 예를 들어 0.1 내지 250 mg/mL 항체를 포함하는 주사가능한 용액으로 제조될 수 있다. 주사가능한 용액은 플린트 또는 앰버 바이알, 앰플 또는 예비-충전된 주사기에 액체 또는 동결건조된 용량 형태로 구성될 수 있다. 완충제는 pH 5.0 내지 7.0 (최적 pH 6.0)의 L-히스티딘 약 1 내지 50 mM (최적 5 내지 10 mM)일 수 있다. 다른 적합한 완충제는, 이로 제한됨이 없이, 나트륨 석시네이트, 나트륨 아세테이트 또는 인산칼륨을 포함한다. 염화나트륨은 용액의 독성을 0 내지 300 mM (액체 용량 형태에 대해 최적 150 mM)의 농도로 조절하기 위해 사용될 수 있다. 원칙적으로는 0 내지 10% 슈크로즈 (최적 0.5 내지 1.0%)의 냉동보호제가 동결건조된 용량 형태에 대해 포함될 수 있다. 다른 적합한 냉동보호제는 트레할로즈 및 락토즈를 포함한다. 원칙적으로는 1 내지 10% 만니톨 (최적 24%)의 벌크화제가 동결건조된 용량 형태에 포함될 수 있다. 원칙적으로는 1 내지 50 mM L-메티오닌 (최적 5 내지 10 mM)의 안정화제가 액체 및 동결건조된 용량 형태 모두에 사용될 수 있다. 다른 적합한 벌크화제는 글리신, 아르기닌을 포함하며, 0 내지 0.05% 폴리소르베이트-80 (최적 0.005 내지 0.01%)로 포함될 수 있다. 추가의 계면활성제는, 이로 제한됨이 없이, 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 계면활성제를 포함한다.

[0156]

하나의 양상에서, 약제학적 조성물은 항체를 약 0.01 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량으로 포함한다. 또 다른 양상에서, 항체의 용량은 격주로 투여되는 약 1 mg/kg 또는 매주 투여되는 약 0.3 mg/kg를 포함한다. 숙련된 의사는 환자에게 투여하기 위한 적합한 용량 및 요법을 알아낼 수 있다.

[0157]

본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은, 예를 들어 액체, 반고체 및 고체 형태, 예를 들어 액체 용액제 (예: 주사가능 및 주입가능 용액제), 분산제 또는 혼탁제, 정제, 환제, 산제, 리포좀 및 좌제를 포함한다. 형태는, 예를 들어 의도된 투여 방식 및 치료 적용에 따른다. 전형의 조성물은 주사가능 또는 주입가능 용액제의 형태, 예를 들어 다른 항체와 함께 사람을 수동 면역하는데 사용되는 것과 유사한 조성물의 형태이다. 하나의 투여 방식은 비경구 (예: 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 하나의 양상에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 또 다른 양상에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0158]

치료 조성물은 전형적으로 멸균되어야 하며, 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 한다. 조성물은 용액제, 마이크로에멀젼, 분산제, 리포좀 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 주문 구조로 제형화될 수 있다. 멸균 주사 용액제는, 필요한 경우, 상기 열거된 성분 중 하나 또는 배합물과 함께, 적합한 용매 중에 활성 화합물 (즉, 항체 또는 항체 일부분)을 필요량으로 가한 후 여과 멸균시켜 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산제는 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것 중의 필요한 다른 성분들을 포함하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 가하여 제조된다. 멸균 주사 용액제의 제조를 위한 멸균 동결건조된 분말의 경우, 제조 방법은 미리 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가의 필요한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 분무-건조이다. 용액의 적합한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅물의 사용, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해

유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 지연된 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 유발할 수 있다.

[0159] 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있으며, 일 경로/방식의 투여는 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이다. 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 다양할 것이다. 특정 양태에서, 활성 화합물은 신속 방출로부터 이를 보호할 담체, 예를 들어 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템과 함께 제조될 수 있다. 생물분해성의 생물적합 종합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허되었거나 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다 [참조: Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨].

[0160] 특정 양상에서, 본 발명의 항체 또는 항체 일부는, 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 또한, 화합물 (및, 필요한 경우, 다른 성분)은 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐에 포함되거나 정제로 타정되거나 환자의 식사에 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, 화합물은 부형제와 함께 삽입되고 삼킬 수 있는 정제, 구강정제, 트로키제, 캡슐제, 엘리서, 혼탁제, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 비경구 투여 이외의 다른 투여로 투여하기 위해서, 화합물은 이의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 피복되거나 이와 함께 공동-투여되어야 할 수 있다.

[0161] 또한, 보완적 활성 화합물이 조성물에 포함될 수 있다. 특정 양상으로, 본 발명의 항체 또는 항체 일부분은 IL-12, TNF  $\alpha$ , 또는 IL-18 활성이 유해한 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 공동-제형화되고/되거나 공동-투여된다. 예를 들어, 본 발명의 항-hIL-12, 항-TNF  $\alpha$  또는 항-IL-18 항체 또는 항체 일부분은 다른 표적물을 결합하는 하나 이상의 추가의 항체 (예: 다른 사이토카인을 결합하거나 세포 표면 분자를 결합하는 항체)와 공동-제형화되고/되거나 공동-투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 항체는 상기 치료제 중 2개 이상과 병용하여 사용될 수 있다. 이러한 병용 요법은 유리하게는 보다 적은 용량의 치료제를 사용함으로써 다양한 단독요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다. 숙련의는, 본 발명의 항체가 병용 요법의 일부로서 사용되는 경우, 항체가 단독으로 환자에게 투여될 때보다 더욱 적은 용량의 항체가 바람직할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다 (예를 들어, 상승적 치료 효과가 병용 요법의 이용을 통해 달성될 수 있으며, 이로써 목적하는 치료 효과를 달성하는데 더욱 적은 용량의 항체 사용을 가능하게 한다).

[0162] 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 단독으로 또는 추가의 제제, 예를 들어 치료제와 병용하여 사용될 수 있으며, 상기 추가의 제제는 이의 의도된 목적대로 당업자에 의해 선택된다. 예를 들어, 추가의 제제는 본 발명의 항체로 치료되는 질환 또는 상태의 치료에 유용한 것으로 인식되는 치료제일 수 있다. 또한, 추가의 제제는 치료 조성물에 유익한 특성을 부여하는 제제, 예를 들어 조성물의 점도에 영향을 끼치는 제제일 수 있다.

[0163] 또한, 본 발명에 포함시키고자 하는 배합물은 의도된 목적에 유용한 배합물이라는 것을 알아야 한다. 하기 제시된 제제는 설명을 위한 것으로서 제한하려는 의도가 아니다. 본 발명의 일부인 배합물은 본 발명의 항체 및 하기 열거된 것들 중에서 선택되는 적어도 하나의 추가 제제일 수 있다. 또한, 배합물은, 형성된 조성물이 이의 의도된 기능을 수행할 수 있도록 배합되는 경우, 하나 초과의 추가의 제제, 예를 들어 2개 또는 3개의 추가의 제제를 포함할 수 있다.

[0164] 일부 배합물은 이부프로펜과 같은 약물을 포함하는 NSAID로 불리는 비-스테로이드성 소염 약물(들)이다. 다른 배합물은 프레드니솔론을 포함하는 코르티코스테로이드이며; 스테로이드의 널리 공지된 부작용은 본 발명의 항체와 병용하여 환자를 치료하는 경우 필요한 스테로이드 용량을 차츰 줄임으로써 감소되거나 심지어는 제거될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항체 일부분이 배합될 수 있는 류마티스성 관절염을 위한 치료제의 비제한적 예는 하기를 포함한다: 사이토카인 억제성 소염 약물(들) (CSAID); 다른 사람 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들어 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF에 대한 항체 또는 길항체. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포 표면 분자, 예를 들어 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 또는 CD154 (gp39 또는 CD40L)를 포함하는 이들의 리간드에 대한 항체와 배합될 수 있다.

[0165] 치료제의 일부 배합물은 자가면역 및 후속 염증 케스케이드의 상이한 단계에서 방해할 수 있으며; 예는 키메라, 사람화 또는 사람 TNF 항체와 유사한 TNF 길항체, D2E7, [참조: 미국 출원 번호 제08/599,226호, 1996년 2월 9일 출원, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨], cA2 (Remicade<sup>TM</sup>), CDP 571, 항-TNF 항체 단편 (예: CDP870), 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체 (p75TNFR IgG (Enbrel<sup>TM</sup>) 또는 p55TNFR IgG (Lenercept), 가용성

IL-13 수용체 (sIL-13), 및 TNF α 전환 효소 (TACE) 억제제를 포함하며; 마찬가지로 IL-1 억제제 (예: 인터류킨-1-전환 효소 억제제, 예를 들어 Vx740, 또는 IL-1RA 등)이 동일한 이유로 효과적일 수 있다. 다른 배합물은 인터류킨 11, 항-P7 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL)를 포함한다. 또 다른 배합물은 IL-12 기능과 병행하거나 이에 의존적이거나 이와 협조할 수 있는 자가면역 반응에 대한 기타 주요한 플레이어를 포함하며, 특히 IL-18 항체 또는 가용성 IL-18 수용체를 포함하는 IL-18 길항제, 또는 IL-18 결합 단백질이 포함된다. IL-12 및 IL-18은 겹치기는 하나 구분되는 기능을 가지며, 이들 모두에 대한 길항제의 배합물이 가장 효과적일 수 있다. 또 다른 배합물은 비-고갈성 항-CD4 억제제를 포함한다. 또 다른 배합물은 항체, 가용성 수용체 또는 길항성 리간드를 포함하는 공동-자극 경로 CD80 (B7.1) 또는 CD86 (B7.2)의 길항제를 포함한다.

[0166] 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 제제, 예를 들어 메토트렉세이트, 6-MP, 아자티오프린, 세파살라진, 메살라진, 올살라진, 클로로퀴닌/하이드록시클로로퀸, 펜실라민, 오로티오말레이트 (근육내 및 경구), 아자티오프린, 코히신, 코르티코스테로이드 (경구, 흡입 및 국소 주사), β-2 아드레노수용체 효능제 (살부타몰, 테르부탈린, 살메테랄), 크산틴 (테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로밀, 케토티펜, 이프라트로퓸 및 옥시트로퓸, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레피우노마이드, NSAID, 예를 들어 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들어 프로드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린제, 염증촉진성 사이토카인, 예를 들어 TNF α 또는 IL-1에 의한 시그널링을 방해하는 제제 (예: IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1β 전환 효소 억제제 (예: Vx740), 항-P7, p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL), TNF α 전환 효소 (TACE) 억제제, T-세포 시그널링 억제제, 예를 들어 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 세파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토푸린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체 (예: 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFR IgG (Enbrel<sup>TM</sup>) 및 p55TNFR IgG (Lenercept), sIL-1 RI, sIL-IRII, sIL-6R, 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13)) 및 소염성 사이토카인 (예: IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β)와 배합될 수 있다. 일부 배합물은 메토트렉세이트 또는 레피우노마이드 및, 중등도 또는 중증 류마티스 관절염의 경우, 사이클로스포린을 포함한다.

[0167] 본 발명의 항체 또는 항체 일부가 배합될 수 있는 염증성 장 질환을 위한 치료제의 비제한적 예는 하기를 포함한다: 부데노사이드, 상피 성장 인자, 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 세파살라진, 아미노살리실레이트, 6-머캅토푸린, 아자티오프린, 메트로니다졸, 리폭시게나제 억제제, 메살라민, 올살라진, 밸살라지드, 항산화제, 트롬복산 억제제, IL-1 수용체 길항제, 항-IL-1α 모노클로날 항체, 항-IL-6 모노클로날 항체, 성장 인자, 엘라스타제 억제제, 피리디닐-이미다졸 화합물, 기타 사람 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들어 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF에 대한 항체 또는 이의 길항제. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포 표면 분자, 예를 들어 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 이들의 리간드에 대한 항체와 배합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 제제, 예를 들어 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레피우노마이드, NSAID, 예를 들어 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린제, 염증촉진성 사이토카인, 예를 들어 TNF α 또는 IL-1에 의한 시그널링을 방해하는 제제 (예: IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1β 전환 효소 억제제 (예: Vx740), 항-P7, p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL), TNF α 전환 효소 억제제, T-세포 시그널링 억제제, 예를 들어 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 세파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토푸린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체 (예: 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1RI, sIL-IRII, sIL-6R, 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13)) 및 소염성 사이토카인 (예: IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β).

[0168] 항체 또는 항원 결합부가 배합될 수 있는 크론병에 대한 치료제의 예는 하기를 포함한다: TNF 길항제, 예를 들어 항-TNF 항체, D2E7 [참조: U.S. 출원 번호 제08/599,226호, 1996년 2월 9일 출원, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨], cA2 (Remicade<sup>TM</sup>), CDP 571, 항-TNF 항체 단편 (예: CDP870), TNFR-Ig 제작물 (p75TNFR IgG (Enbrel<sup>TM</sup>) 및 p55TNFR IgG (Lenercept)), 항-P7, p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL), 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13), 및 PDE4 억제제를 포함한다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 코르티코스테로이드, 예를 들어 부데노사이드 및 텍사메타손과 배합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세파살라진, 5-아미노살리실산 및 올살라진과 같은 제제, 및 염증촉진성 사이토카인, 예를 들어 IL-1의 합성 또는 작용을 방해하는 제제, 예를 들어 IL-1 전환 효소 억제제 (예: Vx740) 및 IL-1ra와 배합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 T 세포 시그널링 억제제, 예를 들어 티로신 키나제 억제제인 6-머캅토푸린과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 IL-11과 배합될 수 있다.

- [0169] 본 발명의 항체 또는 항체 일부가 배합될 수 있는 다발성 경화증을 위한 치료제의 비제한적 예는 하기를 포함한다: 코르티코스테오이드, 프레드니솔론, 메티프레드니솔론, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 메토트렉세이트, 4-아미노피리딘, 티자니딘, IFN $\beta$  1a (Avonex; Biogen), IFN $\beta$  1b (Betaseron; Chiron/Berlex), 공중합체 1 (Cop-1, Copaxone, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.), 고압 산소, 정맥내 면역글로불린, 클라브리빈, 다른 사람 사이토카인 또는 성장인자, 예를 들어 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF에 대한 항체 또는 이의 길항체. 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 세포 표면 분자, 예를 들어 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 또는 이들의 리간드에 대한 항체와 배합될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 제제, 예를 들어 메토트렉세이트, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노마이드, NSAID, 예를 들어 이부프로펜, 코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니솔론, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린제, 염증촉진성 사이토카인, 예를 들어 TNF $\alpha$  또는 IL-1에 의한 시그널링을 방해하는 제제 (예: IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 $\beta$  전환 효소 억제제 (예: Vx740), 항-P7, p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL), TACE 억제제, T-세포 시그널링 억제제, 예를 들어 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-미캡토푸린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토카인 수용체 및 이의 유도체 (예: 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, sIL-1 RI, sIL-1 RII, sIL-6R, 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13)) 및 소염성 사이토카인 (예: IL-4, IL-10, IL-13 및 TGF $\beta$ )와 배합될 수 있다.
- [0170] 항체 또는 이의 항원 결합부가 배합될 수 있는 다발성 경화증에 대한 치료제의 예는 IFN $\beta$ , 예를 들어 IFN $\beta$  1a 및 IFN $\beta$  1b, 코파손, 코르티코스테로이드, IL-1 억제제, TNF 억제제 및 CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체를 포함한다.
- [0171] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 항체 일부분의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"은 목적하는 치료 효과를 달성하기에 필요한 용량에서 기간 동안 효과적인 양을 언급한다. 항체 또는 항체 일부분의 치료학적 유효량은 개체의 질환 상태, 나이, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체 또는 항체 일부분의 능력에 따라 변할 수 있다. 또한, 치료학적 유효량은 치료학적으로 유리한 효과가 항체 또는 항체 일부분의 어떠한 독성 또는 치명적 효과의 결점을 메우기에 충분한 양이다. "예방학적 유효량"은 목적하는 예방 효과를 달성하기에 필요한 용량에서 기간 동안 효과적인 양을 언급한다. 전형적으로, 예방 용량은 질환 전 또는 초기 단계에서 환자에게 사용되며, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적을 것이다.
- [0172] 용량 요법은 최적의 목적하는 반응 (예: 치료 또는 예방 반응)을 제공하도록 조절될 수 있다. 예를 들어, 단일 일시투여로 투여될 수 있거나, 수개의 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 치료 상황의 긴급 사태에 의해 지시되는 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 특정 양태에서, 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 이유로 비경구 조성물을 용량 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 용량 단위 형태는 치료될 포유동물 환자를 위해 단위 용량으로 맞춰진 물리적으로 구분된 단위를 언급하며; 각각의 단위는 필요한 약제학적 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 갖도록 계산된 활성 화합물의 예정된 양을 포함한다. 본 발명의 용량 단위 형태에 대한 자세한 사양은 (a) 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정한 치료 또는 예방 효과 및 (b) 개체의 감수성을 치료하기 위해 활성 화합물을 조제하는 분야에서의 고유한 제한에 의해 지시되며 이에 직접적으로 의존적이다.
- [0173] 본 발명의 항체 또는 항체 일부분의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 예시적인 비제한적 범위는 0.01 내지 20 mg/kg, 또는 1 내지 10 mg/kg, 또는 0.3 내지 1 mg/kg이다. 용량값은 경감될 증상의 유형 및 중증도에 따라 다양할 수 있다는 것을 주목해야 한다. 또한, 임의의 특정 환자에 대해서는 개별적 요구 및 조성물의 투여를 지휘하는 사람의 전문적 판단에 따라 시간 경과에 따라 구체적인 용량 요법이 조절되어야 하며, 본원에 제시된 용량 범위는 단지 예시적인 것으로서 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하려는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다.
- [0174] 8. 본 발명의 항체의 이용
- [0175] 8.1. 일반적인 항-IL-12 항체 사용
- [0176] IL-12에 결합하는 능력이 주어지는 한, 항-IL-12 항체 또는 이의 부분은 통상의 면역검정, 예를 들어 효소 결합

된 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성면역검정 (RIA) 또는 조직 면역조직화학을 이용하여 (예: 샘플 매트릭스, 하나의 양상으로 생물학적 샘플, 예를 들어 혈청 또는 혈장 중에서) IL-12, 하나의 양상으로 hIL-12를 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 샘플을 본 발명의 항체 또는 항체 일부와 접촉시키고 IL-12에 결합된 항체 (또는 항체 일부분) 또는 비결합된 항체 (또는 항체 일부분)을 검출함으로써 샘플 중에서 IL-12를 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플 중에서 IL-12를 검출하는 방법을 제공한다. 항체는 결합되거나 비결합된 항체의 검출을 용이하게 하도록 검출가능한 물질로 직접적으로 또는 간접적으로 표지된다. 적합한 검출가능한 물질은 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^3\text{H}$ 를 포함한다. 샘플 중에서 IL-12의 검출은 진단 환경, 예를 들어 증가된 IL-12와 관련된 상태의 진단에 유용할 수 있고/있거나 항-IL-12 항체로의 치료로부터 유리할 수 있는 환자를 확인하는데 유용할 수 있다.

[0177] 항체를 표지하는 것에 대한 대체법으로서, IL-12는, 예를 들어 검출가능한 물질로 표지된 rhIL-12 표준물 및 비표지된 항-IL-12 항체, 예를 들어 항-hIL-12 항체를 사용하는 경쟁적 면역검정에 의해 샘플 중에서 검정될 수 있다. 이러한 검정에서, 샘플, 표지된 rhIL-12 표준물 및 항-hIL-12 항체는 배합되고 비표지된 항체에 결합된 표지된 rhIL-12 표준물의 양을 측정한다. 샘플 중의 hIL-12의 양의 항-hIL-12 항체에 결합된 표지된 rhIL-12 표준물의 양에 반비례한다.

[0178] 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 시험관내 및 생체내에서 IL-12 활성, 하나의 양상으로 hIL-12 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은, 예를 들어 IL-12를 포함하는 세포 배양물, 사람 환자 또는 본 발명의 항체가 교차-반응하는 IL-12를 갖는 다른 포유동물 환자 (예: 영장류, 예를 들어 비비, 사이노몰거스 및 리서스)에서 IL-12 활성을 억제하는데 사용될 수 있다. 하나의 양상으로, 본 발명은 사람 IL-12, 및 비비 IL-12, 마모셋 IL-12, 침팬지 IL-12, 사이노몰거스 IL-12 및 리서스 IL-12로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 추가의 영장류 IL-12의 활성은 중화시키나 마우스 IL-12의 활성은 중화시키지 않는, 분리된 사람 항체 또는 이의 항원-결합부를 제공한다. 하나의 양상에서, IL-12는 사람 IL-12이다. 예를 들어, hIL-12를 포함하거나 이를 포함하는 것으로 의심되는 세포 배양물에서, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 배양물 중의 hIL-12 활성을 억제하기 위해 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0179] 하나의 양상으로, 본 발명은 IL-12 활성이 유해한 장애를 앓는 환자에서 IL-12 활성을 억제하는 방법을 제공한다. IL-12는 다양한 장애의 병리생리학에 연관되어 있다 [참조: Windhagen et al., (1995) J. Exp. Med. 182: 1985-1996; Morita et al. (1998) Arthritis and Rheumatism. 41: 306-314; Bucht et al., (1996) Clin. Exp. Immunol. 103: 347-367; Fais et al. (1994) J. Interferon Res. 14:235-238; Pyrronchi et al., (1997) Am. J. Path. 150:823-832; Monteleone et al., (1997) Gastroenterology. 112:1169-1178, 및 Berrebi et al., (1998) Am. J. Path. 152:667-672; Pyrronchi et al. (1997) Am. J. Path. 150:823-832, 이의 전체 교시가 본 원에 참조로 삽입됨]. 본 발명은 상기한 장애를 앓는 환자에게 IL-12 활성이 억제되도록 본 발명의 항체 및 항체 일부분을 투여하는 것을 포함하여 상기한 장애를 앓는 환자에서 IL-12 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 하나의 양상에서, IL-12는 사람 IL-12이고, 환자는 사람 환자이다. 달리, 환자는 본 발명의 항체가 교차-반응하는 IL-12를 발현하는 포유동물일 수 있다. 추가로, 환자는 (예를 들어, hIL-12의 투여에 의해 또는 hIL-12 도입유전자의 발현에 의해) hIL-12가 도입된 포유동물일 수 있다. 본 발명의 항체는 치료 목적으로 사람 환자에게 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 수의학적 목적상 또는 사람 질환에 대한 동물 모델로서 항체가 교차-반응하는 IL-12를 발현하는 비-사람 포유동물에게 투여될 수 있다. 후자에 있어, 이러한 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 효능을 평가 (예를 들어, 투여 용량 및 시간 경과를 시험)하는데 유용할 수 있다.

[0180] 본원에서 사용되는 문구 "IL-12 활성이 유해한 장애"는 장애를 앓는 환자에서 IL-12의 존재가 장애의 병리생리학에 책임이 있거나 있는 것으로 의심되거나 장애를 악화시키는데 기여하는 인자이거나 인자인 것으로 의심되는 것으로 밝혀진 질환 및 기타 장애를 포함시키고자 한다. 따라서, IL-12 활성이 유해한 장애는 IL-12 활성의 억제가 증상 및/또는 장애의 진행을 완화하는 것으로 예상되는 장애이다. 이러한 장애는, 예를 들어 상술된 바와 같은 항-IL-12 항체를 사용하여 검출될 수 있는, 예를 들어 장애를 앓는 환자의 생물학적 유체에서 IL-12의 농도 증가 (예: 환자의 혈청, 혈장, 윤활액 등에서의 IL-12의 농도 증가)에 의해 입증될 수 있다. IL-12 활성이 유해한 다수의 장애 예가 있다. 하나의 양상에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 본원에서 기술되는 질환 또는

장애를 치료하기 위한 요법에 사용될 수 있다. 또 다른 양상에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 본원에서 기술되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다. 소수의 비제한적인 특정 장애의 치료 시 본 발명의 항체 및 항체 일부분의 사용은 하기에서 더욱 기술된다.

[0181]

인터류킨 12는 면역 및 염증 인자를 수반하는 다양한 질환과 연관된 병리에서 중요한 역할을 한다. 이들 질환은, 이로 제한됨이 없이, 류마티스성 관절염, 콜관절염, 소아 만성 관절염, 라임 관절염, 건선 관절염, 반응 관절염, 척추관절염, 전신홍반루푸스, 크론병, 궤양성 결장염, 염증장병, 인슐린 의존 당뇨병, 갑상선염, 천식, 알레르기병, 건선, 피부염 피부경화증, 아토피성 피부염, 이식대숙주병, 기관 이식거부, 기관 이식과 관련된 급성 또는 만성 면역병, 사르코이드증, 죽상경화증, 파종 혈관내 응고, 가와사키병, 그레이브스병, 신장증후군, 만성 피로증후군, 베게너 육아종증, 헤노흐-쇤라인 자반증 (Henoch-Schoenlein purpura), 신장의 현미경적 혈관염, 만성 활성 간염, 포도막염, 패혈 쇼크, 독소 쇼크 증후군, 패혈증 증후군, 악액질, 감염성 질병, 기생충 병, 후천성 면역결핍 증후군, 급성 횡단 척수염, 헌팅تون씨 무도병, 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 출중, 원발성 담관성 간경화증, 용혈빈혈, 악성암, 심장부전, 심근경색, 애디슨씨병, 산발성, 다선성 I형 결핍증 및 다선성 결핍 II형, 슈미트씨 증후군, 성인 (급성) 호흡곤란증후군, 탈모증, 원형탈모증, 혈청음성 관절증, 관절증, 라이터씨병, 건선관절증, 궤양성결장염관절증, 장자병 윤활막염, 클라미디아, 예르시니아 및 살모넬라 관련 관절증, 척추관절증, 죽상병/동맥경화증, 아토피성 알레르기, 자가면역수포병, 보통천포창, 낙엽천포창, 유사천포창, 선형 IgA 병, 자가면역 용혈빈혈, 큐스 양성 용혈빈혈, 후천성 악성빈혈, 소아악성빈혈, 근육통성 뇌염/로얄 프리 병 (Royal Free Disease), 만성 점막피부칸디다증, 거대세포 동맥염, 원발성 경화증 간염, 잠복성 자가면역 간염, 후천성 면역결핍 증후군, 후천성 면역결핍 관련병, C형 간염, 공통가변성면역결핍 (공통가변성 저감마글로불린혈증), 확장성 심근증, 여성 불임, 난소부전, 조기 난소부전, 섬유소성 폐병, 잠복성 섬유화 폐포염, 염증 후 간질성 폐병, 간질성 폐렴, 결합조직병 관련 간질성 폐병, 복합 결합조직병 관련 폐병, 전신 경화증 관련 간질성 폐병, 류마티스성 관절염 관련 간질성 폐병, 전신홍반루푸스 관련 폐병, 피부근육염/다발근육염 관련 폐병, 쇼그렌병 관련 폐병, 강직 척추염 관련 폐병, 혈관염성 광범위 폐병, 혈철소증 관련 폐병, 약물 유도 간질성 폐병, 방사선 섬유증, 폐쇄세기관지염, 만성 호산구성 폐렴, 림프구성 침윤 폐병, 감염후 간질성 폐병, 통풍 관절염, 자가면역 간염, 1형 자가면역 간염 (고전적 자가면역 또는 루푸스 간염), 2형 자가면역 간염 (항-LKM 항체 간염), 자가면역 매개 저혈당증, 흑색가시세포증 관련 B형 인슐린 내성, 부갑상선기능저하증, 기관 이식 관련 급성 면역 질환, 기관 이식 관련 만성 면역 질환, 골관절염, 원발성 경화 담관염, 특발 백혈구감소증, 자가면역 호중구 감소증, 신장병 NOS, 사구체신염, 신장의 현미경적 혈관염, 라임병, 원반형 홍반루푸스, 특발성 또는 NOS 남성 불임, 정자 자가면역성, 다발성 경화증 (모든 서브타입), 인슐린 의존 당뇨병, 교감 눈염증, 결합조직 질환에 부차적인 폐 고혈압, 굿페스쳐 증후군, 결절다발동맥염의 폐동맥 징후, 급성 류마티스열, 류마티스성 척추염, 스틸스병, 전신 경화증, 다카야스씨병/동맥염, 자가면역 저혈소판증, 특발 저혈소판증, 자가면역 갑상선 질환, 갑상선항진증, 갑상선종 자가면역 갑상선저하증 (하시모토씨병), 위축 자가면역 갑상선저하증, 원발성 점액부종, 수정체성 포도막염, 원발성 혈관염, 및 백반증을 포함한다. 본 발명의 사람 항체 및 항체 일부분은 자가 면역 질환, 특히 류마티스성 척추염, 알러지, 자가면역 당뇨병 및 자가면역 포도막염을 포함하는 염증과 관련된 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0182]

특정 양상에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부는 류마티스성 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 인슐린 의존적 당뇨병 및 건선을 치료하는데 사용된다.

[0183]

## 8.2 류마티스성 관절염에서 항-IL-12 항체의 사용

[0184]

인터류킨-12는 류마티스성 관절염과 같은 염증 질환에서의 역할에 연관되어 있다. 유도성 IL-12p40 메세지가 류마티스성 관절염 환자의 윤활액에서 검출되었으며, IL-12는 류마티스성 관절염을 갖는 환자의 윤활액에 존재하는 것으로 밝혀졌다 [참조: Morita et al, (1998) Arthritis and Rheumatism 41: 306-314, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]. IL-12 양성 세포는 류마티스성 관절염 윤활액의 내막 층에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 사람 항체 및 항체 일부분은, 예를 들어 류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 라밍 관절염, 류마티스성 척추염, 골관절염 및 통풍 관절염을 치료하는데 사용될 수 있다. 비록 특정 장애에 대해서는 항체 또는 항체 일부분의 국소 투여가 유리할 수 있지만, 전형적으로, 항체 또는 항체 일부분은 전신적으로 투여된다. 또한, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 자가면역 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 투여될 수 있다.

[0185]

류마티스성 관절염에 대한 콜라겐 유도된 관절염 (CIA) 쥐 모델에서, 관절염 이전에 항-IL-12 mAb (래트 항-마

우스 IL-12 모노클로날 항체, C17.15)로 마우스를 처리함으로써 질환 발병을 현저히 억제하고, 질환의 발생 및 증증도를 감소시켰다. 관절염 발병 후 초기에 항-IL-12 mAb로의 처리로 증증도를 감소시켰으나, 질환의 발병 후 항-IL-12 mAb로의 마우스 처리는 질환 증증도에 최소의 효과를 나타내었다.

### [0186] 8.3 크론병에서 항-IL-12 항체의 사용

또한, 인터류킨-12는 염증성 장 질환, 크론병에 역할을 한다. IFN- $\gamma$  및 IL-12의 증가된 발현이 크론병을 갖는 환자의 장 점막에서 발생한다 [참조: Fais et al., (1994) J. Interferon Res. 14: 235-238; Pyrronchi et al., (1997) Amer. J. Pathol. 150: 823-832; Monteleone et al., (1997) Gastroenterology 112: 1169-1178; Berrebi et al., (1998) Amer. J. Pathol. 152: 667-672, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 항-IL-12 항체는 결장염의 마우스 모델, 예를 들어 TNBS 유도된 결장염 IL-2 녹아웃 마우스 및 최근에 IL-10 녹아웃 마우스에서 질환을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 염증성 장 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

### [0188] 8.4 다발성 경화증에서 항-IL-12 항체의 사용

인터류킨-12는 다발성 경화증의 주요 매개자로서 연관되어 있다. 유도성 IL-12 p40 메세지 또는 IL-12 자체의 발현이 다발성 경화증을 갖는 환자의 병소에서 입증되었다 [참조: Windhagen et al., (1995) J. Exp. Med 182: 1985-1996, Drulovic et al., (1997) J. Neurol. Sci. 147:145-150, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. 다발성 경화증을 갖는 만성 진행성 환자는 증가된 순환 수준의 IL-12를 갖는다. 다발성 경화증을 갖는 환자로부터의 T-세포 및 항원 제시 세포 (APC)로의 조사 결과, Th1-유형 면역 반응을 이끄는 진행적 다발성 경화증의 기초로서 자체-지속 시리즈의 면역 상호작용이 밝혀졌다. T 세포로부터 IFN- $\gamma$ 의 증가된 발현은 APC에 의한 증가된 IL-12 생성을 이끌었으며, 이는 Th1-유형 면역 활성화 및 질환의 만성 상태를 이끄는 사이클을 지속시켰다 [참조: Balashov et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 599-603, 이의 전체 교시가 본원에 삽입됨]. 다발성 경화증에 대한 마우스 및 래트 실험적 알러지성 뇌척수염 (EAE) 모델을 사용하여 다발성 경화증에서 IL-12의 역할을 조사하였다. 마우스에서의 다발성 경화증에 대한 재발-진정 (relapsing-remitting) EAE 모델에서, 항-IL-12 mAb로의 사전 처리는 마비를 늦추고 임상 스코어를 낮췄다. 퍼크의 마비에서 또는 후속 진정 기간 동안 항-IL-12 mAb로의 처리는 임상 스코어를 낮췄다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합부는 사람에서 다발성 경화증과 연관된 증상을 경감시키는 것을 도울 수 있다.

### [0190] 8.5 인슐린-의존적 당뇨병에서 항-IL-12 항체의 사용

인터류킨-12는 인슐린-의존적 당뇨병 (IDDM)의 중요한 매개자로서 연관되어 있다. IDDM은 IL-12를 투여함으로써 NOD 마우스에서 유도되었으며, 항-IL-12 항체는 IDDM의 입양 전달 모델에서 보호적이었다 초기 발병 IDDM 환자는 종종 일부 잔류 섬세포 기능이 유지되는 동안 소위 "허니문 기간"을 경험한다. 이들 잔류 섬세포는 인슐린을 생성하며 투여되는 인슐린보다 우수한 혈당 수준 조절을 한다. 항-IL-12 항체로의 이러한 초기 발병 환자의 처리는 섬세포의 추가의 파괴를 방지하여 인슐린의 내인적 공급원을 유지할 수 있다.

### [0192] 8.6 건선에서 항-IL-12 항체의 사용

인터류킨-12는 건선에서 주요한 매개자로서 연관되어 있다. 건선은 TH1-유형 사이토킨 발현 프로필과 관련된 급성 및 만성 피부 병소를 수반한다 [참조: Hamid et al. (1996) J. Allergy Clin. Immunol. 1 :225-231; Turka et al. (1995) Mol. Med. 1 :690-699, 이의 전체 교시가 본원에 참조로 삽입됨]. IL-12 p35 및 p40 mRNA가 질환을 갖는 사람 피부 샘플에서 검출되었다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합부는 건선과 같은 만성 피부 장애를 경감하는데 도움이 될 수 있다.

### [0194] 8.7 일반적인 항-IL-18 항체의 사용

IL-18에 결합하는 능력이 주어지는 한, 본 발명의 항-IL-18 항체 또는 이의 부분은 통상의 면역검정, 예를 들어

효소 결합된 면역흡착 검정 (ELISA), 방사성면역검정 (RIA) 또는 조직 면역조직화학을 이용하여 (예: 샘플 매트릭스, 하나의 양상으로 생물학적 샘플, 예를 들어 혈청 또는 혈장 중에서) IL-18, 하나의 양상으로 hIL-18을 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 샘플을 본 발명의 항체 또는 항체 일부와 접촉시키고 IL-18에 결합된 항체 (또는 항체 일부분) 또는 비결합된 항체 (또는 항체 일부분)을 검출함으로써 샘플 중에서 IL-18을 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플 중에서 IL-18을 검출하는 방법을 제공한다. 항체는 결합되거나 비결합된 항체의 검출을 용이하게 하도록 검출가능한 물질로 직접적으로 또는 간접적으로 표지된다. 적합한 검출가능한 물질은 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 류미늄을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^3\text{H}$ 를 포함한다. 샘플 중에서 IL-18의 검출은 진단 환경, 예를 들어 증가된 IL-18과 관련된 상태의 진단에 유용할 수 있고/있거나 항-IL-18 항체로의 치료로부터 유리할 수 있는 환자를 확인하는데 유용할 수 있다.

[0196] 항체를 표지하는 것에 대한 대체법으로서, IL-18은, 예를 들어 검출가능한 물질로 표지된 rhIL-18 표준물 및 비표지된 항-IL-18 항체, 예를 들어 항-hIL-18 항체를 사용하는 경쟁적 면역검정에 의해 샘플 중에서 검정될 수 있다. 이러한 검정에서, 샘플, 표지된 rhIL-18 표준물 및 항-hIL-18 항체는 배합되고 비표지된 항체에 결합된 표지된 rhIL-18 표준물의 양을 측정한다. 샘플 중의 hIL-18의 양의 항-hIL-18 항체에 결합된 표지된 rhIL-18 표준물의 양에 반비례한다.

[0197] 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 시험관내 및 생체내에서 IL-18 활성, 하나의 양상으로 hIL-18 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은, 예를 들어 IL-18을 포함하는 세포 배양물, 사람 환자 또는 본 발명의 항체가 교차-반응하는 IL-18을 갖는 다른 포유동물 환자 (예: 영장류, 예를 들어 비비, 사이노몰거스 및 리서스)에서 IL-18 활성을 억제하는데 사용될 수 있다. 하나의 양상으로, 본 발명은 사람 IL-18, 및 비비 IL-18, 마모셋 IL-18, 침팬지 IL-18, 사이노몰거스 IL-18 및 리서스 IL-18로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 추가의 영장류 IL-18의 활성은 중화시키나 마우스 IL-18의 활성은 중화시키지 않는, 분리된 사람 항체 또는 이의 항원-결합부를 제공한다. 하나의 양상에서, IL-18은 사람 IL-18이다. 예를 들어, hIL-18을 포함하거나 이를 포함하는 것으로 의심되는 세포 배양물에서, 본 발명의 항체 및 항체 일부분은 배양물 중의 hIL-18 활성을 억제하기 위해 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0198] 하나의 양상으로, 본 발명은 IL-18 활성이 유해한 장애를 앓는 환자에서 IL-18 활성을 억제하는 방법을 제공한다. IL-18은 면역 및 염증 인자로 수반하는 다양한 질환과 연관된 병리에서 중요한 역할을 한다.

[0199] 본원에서 사용되는 문구 "IL-18 활성이 유해한 장애"는 장애를 앓는 환자에서 IL-18의 존재가 장애의 병리생리학에 책임이 있거나 있는 것으로 의심되거나 장애를 악화시키는데 기여하는 인자이거나 인자인 것으로 의심되는 것으로 밝혀진 질환 및 기타 장애를 포함시키고자 한다. 따라서, IL-18 활성이 유해한 장애는 IL-18 활성의 억제가 증상 및/또는 장애의 진행을 완화하는 것으로 예상되는 장애이다. 이러한 장애는, 예를 들어 상술된 바와 같은 항-IL-18 항체를 사용하여 검출될 수 있는, 예를 들어 장애를 앓는 환자의 생물학적 유체에서 IL-18의 농도 증가 (예: 환자의 혈청, 혈장, 윤활액 등에서의 IL-18의 농도 증가)에 의해 입증될 수 있다. IL-18 활성이 유해한 다수의 장애 예가 있다. 하나의 양상에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 본원에서 기술되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한 요법에 사용될 수 있다. 또 다른 양상에서, 항체 또는 이의 항원 결합부는 본원에서 기술되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다. 소수의 비제한적인 특정 장애의 치료 시 본 발명의 항체 및 항체 일부분의 사용은 하기에서 더욱 기술된다.

[0200] 본 발명은 IL-18 활성의 조절이 필요한 질환 또는 상태의 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 이를 질환 또는 상태는 자가면역 질환, I형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 이식편 거부, 염증성 장 질환, 패혈증, 다발성 경화증, 허혈성 심장 질환 (심장 마비 포함), 허혈성 뇌 손상, 만성 간염, 건선, 만성 췌장염, 급성 췌장염 등을 포함한다.

[0201] 따라서, 항-IL-18 항체 또는 이의 항원-결합부 또는 생체내에서 이를 발현하는 벡터는, IL-18에 대한 이상 발현이 있는, 자가면역 질환, I형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 이식편 거부, 염증성 장 질환, 패혈증, 다발성 경화증, 허혈성 심장 질환 (급성 심장 마비 포함), 허혈성 뇌 손상, 만성 간염, 건선, 만성 췌장염 및 급성 췌장염

및 유사한 질환의 치료 또는 외인적으로 투여된 IL-18에 기인한 합병증에 요구된다.

#### [0202] 8.8 간 손상에서 항-IL-18 항체의 사용

본 발명의 하나의 양상은 간 손상을 치료 및/또는 예방하기 위한 신규한 수단을 제공하는 것이다. IL-18은 간 손상의 예방 및 치료에 효과적이다. 따라서, 본 발명은 또한 간 손상의 치료 및/또는 예방을 위한 의약을 제조하기 위한 IL-18 억제제의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 알콜성 간염, 바이러스성 간염, 면역 간염, 전격 간염, 간 경화증 및 원발성 당뇨 경화증에 의해 발생되는 간 손상의 치료 및/또는 예방에 관한 것이다.

#### [0204] 8.9 관절염에서 항-IL-18 항체의 사용

또한, 본 발명에 따라 IL-18의 억제제가 관절염 치료에 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 치료 효과는 질환의 중증도를 낮추며 질환의 확산을 방지하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명은 관절염의 치료 및/또는 예방을 위한 IL-18 억제제의 용도에 관한 것이다. 이러한 발견은, 상기 개략된 당해 기술 분야의 기술 수준으로부터는 관절 염에 수반되는 하나의 특정 인자, 즉 인터류킨 IL-18의 차단이 관절염이 경감 또는 심지어 질병을 갖는 관절염 관절을 치유한다고 결론지을 수 없었기 때문에, 예상치 못한 것이다.

용어 "관절염"은, 예를 들어 홈페이지 (the Department of Orthopaedics of the University of Washington on Arthritis)에서 정의되는 바와 같이, 모든 상이한 유형의 관절염 및 관절염 상태 (급성 및 만성 관절염 모두)를 포함한다. 관절염 상태의 예는 강직 척추염, 요통, 손목뼈 침착 증후군, 엘러스-단로스-증후군 (Ehlers-Danlos-Syndrome), 통풍, 소아 관절염, 홍반루프스, 근염, 불완전골생성증, 다발성동맥염, 다발성근염, 건선 관절염, 라이터 증후군 (Reiter's syndrome), 피부 경화증, 장 질환을 갖는 관절염, 베세트 질환 (Behcet's disease), 소아 관절염, 퇴행성 관절 질환, 섬유근통, 감염성 관절염, 라임병, 마르판 증후군 (Marfan syndrome), 골관절염, 골파사, 파제트 질환 (Pagets Disease), 류마티스성 다발성 근통, 가성통풍, 반사 교감 신경이상증, 류마티스성 관절염, 류마티즘, 쇼그伦 증후군, 가족성 선종 폴립증 등이다.

류마티스성 관절염 (RA)는 관절 (윤활막, 하나의 세포층 상피) 및/또는 내부 기관의 내막에서 염증을 일으킨다. 이 질환은 수년간 지속하는 경향이 있으며, 전형적으로 전신에 걸쳐 많은 상이한 관절에 영향을 끼치며, 종국에는 연골, 골, 힘줄 및 인대에 손상을 일으킨다. RA에 의해 영향을 받을 수 있는 관절은 목, 어깨, 팔꿈치, 둔부, 허리, 손, 무릎, 발목 및 발에 위치된 관절이다. 많은 경우, 관절은 RA에서 대칭적 패턴으로 염증을 일으킨다.

RA는 미국 인구의 약 1%에서 만연하며, 모든 민족 및 연령에서 분포된다. 이는 전세계에 걸쳐 모두 발생하며, RA를 갖는 환자 중 3:1로 여성이 남성보다 많다.

IL-18 억제제의 투여가 관절염 쥐 모델에서 연골 짓무름을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 또한 연골 파괴의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어 IL-18 억제제의 용도에 관한 것이다.

#### [0210] 항-TNF $\alpha$ 항체의 일반적 사용

종양 괴사 인자- $\alpha$ 는 지질 대사, 응고, 인슐린 내성 및 내피 기능에 영향을 끼치는, 주로 단핵구/대식세포에 의해 분비되는, 다기능성 염증촉진성 사이토카인이다. TNF  $\alpha$ 는 17 kD 단백질 서브유닛의 가용성 호모삼량체이다. TNF  $\alpha$ 의 막-결합된 26 kD 전구체도 존재한다. 조직의 윤활 세포 및 대식세포에서 발견된다. 또한, 단핵구 또는 대식세포 이외의 세포도 TNF  $\alpha$ 를 생성한다. 예를 들어, 사람 비-단핵구성 종양 세포주가 TNF  $\alpha$ 를 생성하며, CD4 $^{+}$  및 CD8 $^{+}$  말초 혈액 T 림프구 및 일부 배양된 T 및 B 세포주도 TNF  $\alpha$ 를 생성한다. 유일한 것은 아니나 류마티스성 관절염에도 수반되며, 많은 염증성 질환을 일으킨다. TNF  $\alpha$ 에 대한 수용체가 수개의 단핵 세포 상, 윤활막 내, 및 말초 혈액 및 윤활액에도 존재한다. TNF  $\alpha$ 는 류마티스성 관절염에서 중요한 염증 매개자이므로, 특이적 면역요법에 대한 유용한 표적물일 수 있다.

TNF  $\alpha$ 는 염증촉진 작용을 일으키므로 조직 손상, 예를 들어 연골 및 골 분해, 부착 분자의 유도, 혈관 내피 세포에서 응고촉진 활성 유도, 호중구 및 림프구 부착 증가 및 대식세포, 호중구 및 혈관 내피 세포로부터 혈소판 활성화 인자의 방출 촉진을 초래한다. 최근에는 TNF  $\alpha$ 와 감염성, 면역 장애, 신생물성 병리, 자가면역 병리 및

이식편대숙주 병리와의 연관을 보인다.

[0213] TNF  $\alpha$ 는 열, 권태감, 거식증 및 악액질을 포함한 그람-음성 패혈증 및 내독소 쇼크에서 중요한 역할을 하는 것으로 믿어진다. 내독소는 TNF  $\alpha$  및 다른 사이토카인에 대한 단핵구/대식세포 생성 및 분비를 강하게 활성화한다. TNF  $\alpha$  및 다른 단핵구-유도된 사이토카인은 내독소에 대한 대사 및 신경호르몬 반응을 매개한다. 사람 지원자에게 내독소 투여는 열, 심계 항진, 증가된 대사 속도 및 스트레스 호르몬 방출을 포함한, 플루-유사 증상을 갖는 급성 질환을 나타낸다. 순환 TNF  $\alpha$ 는 그람-음성 패혈증을 앓는 환자를 증가시킨다.

[0214] 따라서, TNF  $\alpha$ 는 염증 질환, 자가면역 질환, 바이러스, 세균 및 기생충 감염, 악성 및/또는 신경퇴행성 질환과 연관되어 있으며, 류마티스성 관절염 및 크론병과 같은 질환에서 특정한 생물학적 치료를 위한 유용한 표적물이다. TNF  $\alpha$ 에 대한 키메릭 모노클로날 항체를 사용한 오픈-랩 시험에서 염증 억제 및 류마티스성 관절염 및 크론병의 재발 후 성공적인 재치료를 갖는 유리한 효과가 보고되었다.

[0215] TNF  $\alpha$ 에 대한 중화 항혈청 및 mAb가 포유동물에서 불리한 생리학적 변화를 없애고 실험적 내독소혈증 및 세균혈증에서 치명적인 챠린지 후 사망을 방지하는 것으로 밝혀졌다. 아달리무마브 (또한 이의 상표명 HUMIRA<sup>®</sup> (Abbott Laboratories)으로도 공지됨)는 TNF  $\alpha$ 에 대해 특이적인 재조합 사람 모노클로날 항체이다. 이 모노클로날 항체는 TNF  $\alpha$ 에 결합하며, p55 및 p75 세포-표면 TNF  $\alpha$  수용체와의 상호작용을 차단한다. 이 모노클로날 항체는 TNF  $\beta$ 의 활성은 억제하지 않는 것으로 보이므로 TNF  $\alpha$ 에 상당히 특이적이다. 보체의 존재하에서, 아달리무마브는 TNF  $\alpha$ 를 발현하는 세포의 표면을 분해한다.

## 실시예

### 1. 항-IL-12 항체의 분리 및 정제

#### 1.1 정제 전략

[0219] IL-12 항체를 생성하도록 고안된 생산 세포 배양 공정이 완결된 후, 브로쓰의 pH를 3.5로 서서히 조절하고 1시간 동안 pH를 유지한 후, pH 5로 재조절한 후, 원심분리 (11,000 x g)시켜 세포 및 침전된 불순물을 제거하였다. 원심분리 상청액을 2단계 여과 트레이 (Cuno 90ZA 심층 여과 후, 0.45/0.2  $\mu$ m 여과)에 의해 더욱 정화하였다. 정화 후, 항체를 포획하고 4 단계 절차로 정제하였다.

[0220] 정화되고 산성화된 세포 배양 수거물을 3 N NaOH로 30분에 걸쳐 pH 7로 적정하고, 크로마토그래피 전에 여과시켰다.

[0221] 1.0 cm 직경 x 21.6 cm 길이 컬럼 (17 mL 베드 용적)을 이러한 공정을 위해 벤치 규모에 사용하였다. 1.0 cm x 15.1 cm 컬럼 (11.9 mL 베드 용적)을 초기 단계에 사용하여 미세 정제 전개를 위한 물질을 생성하였다. 20 cm x 21 cm 컬럼 (6.6 L 베드 용적)을 300 L 규모에 사용하였다. 컬럼을 MabSelect<sup>TM</sup> 수지 (GE Healthcare, cat# 17-5199-04, lot# 302070)로 패킹하고; 비대칭 및 HETP (Height of an Equivalent Theoretical Plate)를 측정하여 패킹의 품질을 결정하였다.

[0222] 컬럼을 25 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.2 완충액으로 사전-평형화하였다. 평형화 후, 컬럼에 정화된 세포 배양 수거물을 로딩하였다 (초기 35 g Ab/L 수지 로딩에 대해서는  $v = 300 \text{ cm/hr}$ , 이어서 로딩을 마칠 때까지 150 cm/hr, 40 g/L 최대). 이어서, 컬럼을 3 컬럼 용적 (CV)의 평형화 완충액으로 세척하고 ( $v = 300 \text{ cm/hr}$ ), 3 CV의 20 mM 시트르산/시트르산나트륨, 0.5 M NaCl, pH 6 완충액으로 세척하고, 추가로 3 CV의 평형화 완충액으로 세척하였다. 이어서, 생성물을 0.1 M 아세트산, 100 mM NaCl, pH 3.5으로 용출하였다 ( $v = 300 \text{ cm/hr}$ ). 컬럼 용출물을 0.1 AU의 초기  $A_{280}$  굴절부터 용출 피크의 트레일링 가장자리에서 0.1 AU의 판독값까지 수집하고 (2 mm 유동 셀 경로), 즉시 1.0 M Tris, pH 10 완충액으로 pH 5로 적정하였다.

[0223] MabSelect<sup>TM</sup> 컬럼의 동적 결합능 (DBC)을 단일 유속 로드 또는 이중 유속 로드 전략으로 측정하였다. 단일 유속 로드는 전체 로딩에 대해 300 cm/hr로 평가하였다. 이중 유속 로드 전략은 300 cm hr의 선형 속도로 35 mg 단백질/mL 수지 이하로 컬럼을 로딩한 후, 선형 속도를 절반으로 줄여 로드의 마지막 부분에 대해서는 보다 긴 체류 시간을 가능하게 하였다. 각각의 실험에서, 컬럼을 오버로딩함으로써 주어진 로딩 조건 하에서 컬럼이 포화되게 하였다. 각각의 수행에 대한 관류물 물질을 분획하여 파과율 (break through) 5%가 검출되기 전 로딩된 총 항체의 양을 측정하였다. 관류 (FT) 분획물의 역가는 Poros A<sup>TM</sup> HPLC 검정으로 수득하였다.

[0224] 회수율을 용출 샘플에 대해 280 nm에서 UV 분광광도법으로 계산하였다 (1 cm 경로 길이를 이용하여 1 mg/mL 용

액에 대해 1.42의 흡광 계수). 로드의 역가를 Poros A<sup>TM</sup> HPLC 검정으로 측정하였다. SEC-HPLC, HCP ELISA 및 단백질 A ELISA를 순도 평가, HCP 제거 및 침출된 단백질 A 수준에 대해 수행하였다.

[0225] MabSelect<sup>TM</sup> 용출물을 1 M Tris 완충액으로 pH 8 ± 0.1로 적정한 후, 물로 6.5 ± 0.5 mS/cm로 회석하였다. 회석된 물질을 1시간 동안 혼합한 후, Cuno<sup>TM</sup> 탈지 0.45/0.22 μm 여과하였다.

[0226] 1.0 cm 직경 x 29 cm 길이 컬럼 (22.8 mL 베드 용적)을 Q Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 크로마토그래피를 위해 벤치 규모에 사용하였다. 20 cm x 29.5 cm 컬럼 (9.27 L 베드 용적)을 300 L 규모에 사용하였다. 컬럼을 Q Sepharose<sup>TM</sup> FF 수지 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, cat# 17-0510-04, 300 L 규모에 대해서는 lot# 296307, 벤치 규모에 대해서는 lot# 303189)로 패킹하고; 비대칭 및 HETP를 측정하여 패킹의 품질을 결정하였다.

[0227] 25 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8로 수지를 평형화하였다. 크로마토그래피를 공정-관련된 불순물은 수지에 흡수되고 항체는 컬럼을 통과하는 관류 모드로 수행하였다. 150 cm/hr로 컬럼을 로딩하고, A<sub>280</sub>이 0.2 AU 이상으로 상승되었을 때 컬럼 관류물 (FTW) 수집을 개시하였다. FTW 물질의 샘플을 30, 50, 80, 90 및 100 g 단백질/L 수지 로딩에 상응하는 간격으로 취하였다. 이어서, 컬럼을 평형화 완충액으로 세척하고, A<sub>280</sub>이 0.2 AU의 OD를 돌아올 때까지 FTW 수집을 계속하였다. Q Sepharose<sup>TM</sup> FTW를 즉시 동일 용적의 1.7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM Na 포스페이트, pH 7 (SR-343)로 회석하여 Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP 컬럼에의 로딩을 준비하였다. 이러한 용액을 0.2 μm 여과시키고, 표지된 Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP에 로딩하였다.

[0228] 회수율을 280 nm에서 UV 분광광도법으로 계산하였다 (1 cm 경로 길이를 이용하여 1 mg/mL 용액에 대해 1.42의 흡광 계수). 순도 평가, HCP 제거 및 침출된 단백질 A 제거를 위해 SEC-HPLC, HCP ELISA 및 단백질 A ELISA를 수행하였다.

[0229] 1.0 cm 직경 x 15.6 cm 길이 컬럼 (12.3 mL 베드 용적)을 Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP 크로마토그래피를 위해 벤치 규모에 사용하였다. 20 cm x 15.5 cm 컬럼 (4.87 L 베드 용적)을 300 L 규모에 사용하였다. 컬럼을 Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP 수지 (GE Healthcare, Piscatway, NJ, cat# 17-1082-04, lot# 298138)로 패킹하고; 비대칭 및 HETP를 측정하여 패킹의 품질을 결정하였다.

[0230] 25 mM 인산나트륨, 0.85 M 황산암모늄, pH 7을 사용하여 수지를 평형화하였다. 이러한 단계에 대한 최대 단백질 로딩은 40 g 단백질/L 수지 (v = 75 cm/hr) 이하였다. 로딩 후 컬럼을 3 컬럼 용적의 20 mM 인산나트륨, 1.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7 (SR-290)으로 세척하였다. 생성물을 37.5 cm/hr의 선형 속도에서 15 mM 인산나트륨, pH 7, 0.5 M 황산암모늄을 사용하는 단계 구배로 용출하였다. 컬럼 용출물을 1.0 AU의 초기 A<sub>280</sub> 굴절부터 용출 피크의 트레일링 가장자리에서 0.2 AU의 판독값까지 수집하였다. 응집물 및 다른 불순물은 수지에 결합된 상태로 잔류하며, 물 또는 0.5 M NaOH로 세척함으로써 HIC 컬럼으로부터 제거하였다.

[0231] 회수율을 280 nm에서 UV 분광광도법으로 계산하였다 (1 cm 경로 길이를 이용하여 1 mg/mL 용액에 대해 1.42의 흡광 계수). 순도 평가, HCP 제거 및 침출된 단백질 A 제거를 위해 SEC-HPLC, HCP ELISA 및 단백질 A ELISA를 수행하였다.

[0232] Ultipor DV20<sup>TM</sup> 필터를 사용하는 바이러스 여과는 벤치 규모 및 확장된 랩 모두에서의 크기 제한 때문에 벤치 규모 또는 확장된 랩에서 평가하지 않았다. 대신, 300 L 규모에서 Ultipor DV50<sup>TM</sup> 필터를 사용하여 예비-임상 물질을 생성하였다. 벤치 규모에서, Phenyl Sepharose<sup>TM</sup> HP 크로마토그래피로부터 용출되는 생성물은 마지막 한외여과 및 투석여과 공정에 직접적으로 사용되었다.

[0233] Millipore 30 kD 분자량 컷-오프 (MWCO) 재생 셀룰로즈 울트라필터를 이 단계 (UF/DF)에 사용하였다. 공정을 수행하기 전, UF 시스템을 1 M NaOH로 위생처리하고, 물로 세정하였다.

[0234] DV50<sup>TM</sup> 여과물을 먼저 30 mg/mL 단백질로 농축하였다. 2 용적 (DV)의 5 mM 히스티딘, 5 mM 메티오닌, 0.5% 슈크로즈, 2% (w/v) 만니톨, pH 5.9 (투석여과 완충액) (SR-265)으로 연속 투석여과를 수행하였다. 잔류물을 40 g/L로 더욱 농축시킨 후, 추가의 6 DV의 투석여과 완충액으로 투석여과하였다. 잔류물을 약 75 g/L로 더욱 농축하였다. 이어서, UF 시스템의 생성물을 배출하고, 투석여과 완충액으로 세정하여 시스템에 보유된 생성물을 회수하였다. 농축물 및 세척물을 합하여 약 65 g/L로 투석여과된 항체 생성물을 생성하였다. 이러한 생성물을 0.2 μm 여과시키고, 최종적인 병입 (bottling)을 준비하였다.

## [0235] 1.2 샘플 순도 분석

[0236] SEC-HPLC. 항체 생성물의 순도를 크기-배제 크로마토그래피 SEC-HPLC로 평가하였다.

[0237] Poros A HPLC 검정. 수거물, MabSelect™ 로드 및 관류물 샘플의 항체 역가를 Poros A™ 정량 포획 검정으로 측정하였다.

[0238] HCP ELISA. 숙주 세포 단백질 수준을 숙주 단백질-ELISA로 평가하였다. HCP는 ELISA에서 2개의 특이적 항체 사이에 샌드위치되었다.

[0239] 플레이트를, 80 rpm으로 진탕하면서, 37°C에서 1시간 동안 100 μL/웰의 염소 항 CHO 친화도 정제된 항체 (50 mM 중탄산나트륨 중 각각 6 μg/mL, pH 9.4)의 혼합물로 코팅한 후; 플레이트의 내용물을 버리고, 80 rpm에서 진탕하면서 37°C에서 1시간 동안 비-특이적 부위를 300 μL/웰의 카제인으로 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 세척 완충액 (1X PBS, 0.1% Triton X-100, pH 9)으로 세척하였다. 5.2 mg/mL 분취량의 CHO 숙주 세포 단백질을 연속 희석함으로써 표준 곡선을 위한 샘플을 제조하였다. 달리 언급이 없는 한, 모든 시약에 대한 희석제는 카제인이었으며, 37°C로 가열되고, 2분 동안 초음파 처리되었다. 표준 곡선을 위한 농도는 300, 200, 133, 89, 59, 40, 26, 및 18 ng/mL였다. 항체 표준물을 5X 희석하고 검정 대조군으로 사용하였다. 허용되는 검정을 위해, 대조군에 대해 계산된 값은 45 내지 76 ng HCP/mL 범위에 속해야 한다. 계산된 값이 표준 곡선 범위에 속하도록 샘플을 희석시켰다. 표준물, 대조물 및 샘플 (100 μL/웰)을 이중으로 플레이트에 로딩하였다. 플레이트를 1시간 동안 800 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 항온처리하였다. 샘플 항온처리 후, 플레이트를 완충액으로 세척하고, 3 μg/mL로 희석된 100 μL/웰의 바이오티닐화된 염소 항 CHO 항체를 로딩하였다. 플레이트를 1시간 동안 80 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 항온처리하였다. 100 μL/웰의 뉴트라비딘-서양고추냉이 페옥시다제 (HRP) (100 μg/mL)를 가하고, 플레이트를 1시간 동안 80 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 항온처리하였다. 최종 세척을 수행하고, 플레이트를 실온에서 랩-라인 역가 플레이트 진탕기에서 스피드 3으로 진탕하면서 7분 동안 100 μL/웰의 K Blue HRP 비색 기질을 사용하여 발색시켰다. 반응을 100 μL/웰의 2 M 인산을 첨가하여 정지시키고, 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. 색상 발색은 시험 샘플에 존재하는 HCP의 양에 비례한다.

[0240] 단백질 A ELISA. 단백질 A 정화를 Cygnus Technologies, Inc. (사람 면역글로불린을 포함하는 샘플에서 단백질 A의 측정을 위한 면역효소 검정, catalog# F050H)로부터의 검정 키트를 사용하여 평가하였다. 표준물, 시약 및 플레이트가 키트에 제공되었다. 샘플을 1X PBS로 1 mg/mL로 희석하고, 변성 완충액 (200 μL 샘플로 50 μL 변성 완충액)으로 5분 동안 100°C에서 변성시켰다. 샘플을 5분 동안 6000 x g에서 원심분리시켜 변성된 항체를 펠릿화시켰다. 100 μL의 바이오티닐화된 항-단백질 A 및 변성된 샘플로부터의 50 μL의 상청액, 대조물 및 표준물을 모든 웰에 가하였다. 플레이트를 180 rpm으로 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 웰의 내용물을 흡출시키고, 플레이트를 300 μL의 세척 용액으로 4회 수동 세척하였다. 스트렙타비딘:알칼리성 포스파타제를 각각의 웰에 가하고 (100 μL), 플레이트를 180 rpm으로 진탕하면서 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 상술된 바와 같이 세척한 후, 100 μL의 알칼리성 포스파타제 비색 기질을 웰에 가하고, 플레이트를 180 rpm으로 진탕하면서 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 405 및 492 nm에서 판독하였다. 16 ng/mL 샘플에 대한 흡광도가 1.2 미만이면, 플레이트를 추가의 30분 동안 항온처리한 후, 다시 판독하였다. 색상 발색은 시험 샘플 중에 존재하는 단백질 A의 양에 비례한다.

## [0241] 1.3 정제 전략의 결과

[0242] 단백질 A 크로마토그래피. MabSelect™ 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 항-IL-12 항체를 포획하고 생성물 및 공정 관련된 불순물, 예를 들어 단일 및 이중 경쇄 단편, CHO 숙주 세포 단백질 (HCP) 및 DNA 등을 감소시켰다. 벤치 규모 및 300 L 생물반응기 규모 모두로부터의 데이터는 우수한 단백질 회수율 및 HCP 정화를 나타내었다 (표 1 및 2). 300 L 생물반응기 규모로부터의 대표적인 크로마토그램이 도 4에 제공되었다.

**표 1**

벤치-규모의 새로운 공정에 대한 회수율 및 순도의 요약

공정 단계	회수율 (%)	순도 (% 단량체)	HCP(ng/mg Ab)*	침출된 단백질 A (ng/mg Ab)
정화	91	ND**	211195.7	0.14
MabSelect™	95	97.5	1121.9	9.36
Q Seph™ FF	96	96.9	34.5	8.21
페닐 HP	90	99.2	11.1	0.65
전체	81	ND**	ND**	ND**

\* 1일 HCP ELISA 검정. SOP PD-122.

\*\* ND - 미측정.

[0243]

**표 2**

300 L 규모의 새로운 공정에 대한 요약

공정 단계	회수율 (%)	순도 (%단량체)	HCP (ng/mg Ab)*	침출된 단백질 A (ng/mg Ab)
정화	91	ND**	141753	ND**
MabSelect™	95	94.44	<2117.6	7.6
탈지 여과	97	95.97	58	3.4
Q Seph™ FF	93	96.21	8	3.7
페닐 Seph™ HP	92	99.72	4	2.3
DV50™	95	99.64	ND**	ND**
UF/DF	99	99.59	ND**	ND**
병입	99	99.55	5	0.3
전체	67	NA***	NA***	NA***

\* 1일 HCP ELISA 검정, SOP PD-122.

\*\* ND = 미측정.

\*\*\* NA = 적용 불가.

[0244]

표 3의 데이터는 MabSelect™ 크로마토그래피의 동적 결합능이 로드 유속, 구체적으로 체류 시간에 의해 영향을 받았다는 것을 입증한다. 300 cm/hr (3.4분 체류 시간)의 일정한 선형 속도로 로딩하는 경우, DBC는 44.3 mg 단백질/mL 수치였다. 이중-유속 로딩 전략 (35 g/L까지는 300 cm/hr, 150 cm/hr로 변경)은 51.7 mg 단백질/mL 수치로 17%의 DBC 증가를 나타내었다. 이러한 DBC 증가는 로드의 후반부에 대해 체류 시간을 두 배로 함으로써 달성되었다. 이론적으로, 컬럼 로딩의 초기 단계에서 결합은 주로 접근이 용이한 부위인 비드 표면에서 발생한다. 이는 결합 동역학에 대한 적은 영향과 함께 보다 빠른 유속의 이용을 가능하게 한다. 일단 모든 쉽게 접근 가능한 부위가 차지되면, 단백질은 덜 쉽게 접근 가능한 부위에 결합하기 위해 세공으로 확산될 필요가 있다. 동역학적으로, 이는 보다 느린 공정이며, 따라서 유속은 결합을 최대화하기 위해 감소되어야 한다.

**표 3**

MabSelect™ 컬럼의 DBC에 대한 유속의 영향

	로드 선형 속도	실험 #	5% BT에서의 DBC (mg Ab/mL 수치)
단일 유속 로드	300 cm/hr	실험 1	43.7
		실험 2	44.9
		평균	44.3
이중-유속 로드	35 mg Ab/mL 수지 로드까지는 300 cm/hr의 초기 선형 속도, 로드 관류율에 함체가 출현할 때까지는 150 cm/hr의 2차 선형 속도	실험 3	51.6
		실험 4	51.7
		평균	51.7

[0246]

[0247] 이중 경쇄의 양은 중간 세척 단계를 수행함으로써 (HPLC-SEC에 따라) 0.5%로부터 0.2%로 감소되었다. 0.5 M NaCl, 25 mM 나트륨 아세테이트, 0.5 M NaCl, pH 5.0 또는 pH 5.5 및 20 mM 시트르산/Na 시트레이트, 0.5 M NaCl, pH 6을 포함한 수개의 세척 완충액을 평가하였다. HPLC-SEC 및 SDS-PAGE 모두로부터의 데이터 (도 5)는 모든 실험으로부터 저분자량 (LMW) 종에 대한 우수한 정화를 나타내었다. 세척을 pH 6에서 수행하는 경우, 낮은 pH 세척과 비교하여 동일한 LMW 정화가 관측되었으며, 95% 단백질 회수율은 중간 세척 단계 없이 수행하는 것에 필적하였다.

[0248] Q Sepharose™ Fast Flow 크로마토그래피. Q Sepharose™ FF 컬럼을 사용하여 음으로 하전된 공정 및 생성물 관련 불순물, 예를 들어 DNA 및 숙주 세포 단백질을 감소시켰다. 이 단계 및 후속 단계는 전체 공정에서 미세 정제 단계를 구성한다.

[0249] 크로마토그래피 전에, 로드 샘플 제조는 MabSelect™ 용출물의 pH 및 전도도 조절로 시작하였다. 용출물의 pH 를 1 M Tris, pH 10를 사용하여 pH 5로부터 pH 8로 조절하고; 즉시 물로 전도도를 약 15 mS로부터 7 mS로 낮추었다. 일단 MabSelect™ 용출물의 전도도가 7 mS/cm에 도달되면, 침전이 일어나기 시작하며, 1시간 동안 계속 진행시킨다. 침전된 물질을 Cuno™ 탈지 또는 30ZA 심층 필터로 제거한 후, 0.45/0.2 μm 여과시켰다. 이러한 로드 제조 단계의 단백질 회수율은 280 nm에서의 UV 흡광도에 따라 96.3%였으며, 이는 침전된 단백질의 대부분이 항체가 아니라는 것을 나타낸다. 이는 또한 침전물의 SDS-PAGE 분석으로 확인되었다 (도 6).

[0250] Q Sepharose™ FF 컬럼을 관류 모드로 작업하였다. 대표적인 크로마토그래피 프로필이 도 7에 제시되어 있다. 300 L 생물반응기 규모에서 80 g Ab/L 수지로 로딩되는 경우, HCP에 대한 어떠한 뚜렷한 파과율도 관측되지 않았다 (표 4). 일단 로딩이 90 g Ab/L 수지에 도달하면, HCP 수준은 관류 세척물 (FTW)에서 두 배가 되었으며, 이는 수지가 이의 결합능에 도달하였음을 나타낸다. HCP 수준을 계속해서 100 g Ab/L 수지 로딩으로 증가시켰다 (표 4). 이는 통용하는 항체 제조 공정을 능가하는 상당한 개선을 나타낸다. 최대 로딩은 50 g Ab/L 수지이다. 이러한 로딩은 Q Sepharose™ 작업에 대한 결합능의 60% 증가를 나타낸다. 로드 용량의 증가는 포획 단계에 대한 양이온 교환기와 대비하여 단백질 A와 같은 친화성 수지의 사용 때문이며, 그 결과 Q Sepharose™ 유니트 작업을 위한 더욱 정화된 공급 스트림을 갖는다.

[0251] 이 단계에 대해 단백질 회수율은 통상적으로 높다. 벤치 및 300 L 생물반응기 규모 수행 모두로부터의 데이터는 필적할만한 단계 수율 (96% 및 93%)을 나타내었다 (표 1 및 2). 또한, HCP 감소 (97% 및 85%)도 두 가지 규모 모두에서 달성되었다 (표 1 및 2).

#### 표 4

QFF 컬럼의 HCP 정화에 대한 로드 양의 영향

Q 로드 양	HCP (ng/mL)*	Ab (mg/mL)	HCP (ng/mg)
Q 로드 심층 여과됨	436.306	7.54	58
Q FTW 30% 로드**	104.122	8.66	12
Q FTW 50% 로드**	61.642	8.59	7
Q FTW 80% 로드**	61.867	8.80	7
Q FTW 90% 로드**	132.955	8.80	15
Q FTW 100% 로드**	157.683	8.52	17
Q FTW 풀(pool)	62.808	8.24	8

\* 1일 HCP ELISA 검정, SOP PD-122.

\*\* 100% 로드 = 100 g Ab/L 수지 로드.

[0252]

[0253] HIC 크로마토그래피. HIC 크로마토그래피를 이용하여 소수성 차이에 기초하여 온전한 항체로부터 응집되고 단편화된 항체 분자들을 제거하였다. 항-IL-12 항체의 경우, 응집물은 HIC 컬럼에 더욱 단단하게 결합하므로 단량체보다 소수성이이다. 컬럼을 0.5 M 황산암모늄으로 용출하는 경우, 단량체성 Ab가 용출되며, 응집물은 컬럼에 결합된 상태로 남아 단지 물 스트리핑시 떨어진다. 이와는 대조적으로, 단편화된 항체 분자 또는 저분자량 (LMW) 종은 온전한 항체보다 덜 소수성이므로, HIC 크로마토그래피 수지에 단단히 결합되지 않는다. 대부분의 LMW는 주요 용출 피크 이전에 컬럼으로부터 용출된다. 업스트림 MabSelect™ 세척 단계는 공정 스트림으로부터 대부분의 LMW를 제거할 수 있으므로, HIC 공정은 최종 생성물 세목을 달성하도록 주로 응집된 항체, 단백질 A

침출물, 잔류 HCP 및 기타 공정 및 생성물 관련 불순물을 제거하게 고안되었다. 대표적인 크로마토그래피 용출 프로필이 도 8에 제시되어 있다.

[0254] 벤치 및 300 L 규모 모두로부터의 데이터는 HIC 크로마토그래피에 의한 90% 이상의 회수율 및 우수한 응집률 제거 (99% 초과의 순도)를 보였다 (표 1 및 2). Q FTW 물질 중의 침출된 단백질 A는 HIC 크로마토그래피 작업에 의해 8.21 ng/mg Ab (ppm)로부터 0.65 ng/mg Ab (ppm)로 감소하였다 (표 1).

[0255] 통용하는 제조 공정 (예: 양이온 교환 포획)과 비교하여, 단백질 A 친화성 포획 기초 공정은 CHO 세포 배양 수거물로부터 보다 높은 수율 및 더욱 우수한 HCP 제거로 항-IL-12 항체를 정제할 수 있었다.

## [0256] 2 항-TNF $\alpha$ 항체의 분리 및 정제

### [0257] 2.1 정제 전략

[0258] 세포 배양 수거물 정화. 세포 배양 13일의 발효 수거물 브로쓰 및 정화된 15일 발효 수거 물질을 이러한 실시 예에서 출발 물질로 사용하였다. 세포 배양 브로쓰를 Beckman Coulter Allegra<sup>TM</sup> 6R 원심분리기로 30분 동안 3000 rpm에서 원심분리하였다. 수집된 상청액을 탈지 필터 (CUNO ZeraPlus<sup>®</sup>

BC0030A DELI-BioCap<sup>TM</sup> 30 일회용 캡슐)를 통해 20 mL/min의 유속으로 여과시켰다. 이어서, 정화된 수거물을 나누고 -80°C에서 저장하였다. 냉동된 수거물을 해동시키고, 컬럼에 로딩하기 전에, 0.22  $\mu\text{m}$  Corning<sup>®</sup>

셀룰로즈 아세테이트 필터를 사용하여 여과시켰다. 수거 브로쓰를 디스크-스택 (disc-stack) 원심분리로 원심 분리하고, 심층 필터 및 탈지 필터를 통해 추가로 여과하였다. 여과물을 컬럼에 로딩하기 전에 4°C에서 저장하였다. 정화 공정은 실온에서 수행하였다.

[0259] 단백질 A 친화성 크로마토그래피. 10 mL (1.6 x 5cm) 컬럼 및 40.2 mL (1.6 x 20cm) 컬럼을 MabSelect<sup>TM</sup> 수지 (GE Healthcare)로 패킹하였다. AKTA Explorer<sup>TM</sup> 크로마토그래피 시스템을 작업에 사용하였다. 컬럼을 0.5 M NaCl을 사용하여 패킹하였다. 표 5는 크로마토그래피 조건을 나타낸다. 용출 피크 분획물을 합하여 1시간 동안 유지시킨 후 3 M 트롤라민으로 pH 8.0으로 중화하였다. 공정은 실온에서 수행하였다.

**표 5**

단백질 A 친화성 크로마토그래피 조건

단계	용액	용적	선행 속도*
		(CV)	(cm/h)
세정	물	5	400
평형화	1X PBS	5	400
로드	샘플 정보 참조	가변	400
세척	1X PBS	5	400
용출	아세트산 완충액 w/ pH 3.2	5	400
재생	1.0% 아세트산/0.5M NaCl	5	400
매 사이클 위생처리	6.0 M 구아나린	5	100
세정	Milli Q 물	5	400
저장	50mM Na 아세테이트 pH5, 20% 에탄올	3	100

\* 선행 속도는 5 cm 높이 컬럼에 대해서는 100 cm/h로, 20 cm 높이 컬럼에 대해서는 400 cm/h로 하여 동일한 체류 시간을 유지하였다.

[0260]

[0261] Q 로드 물질 제조. 2개의 단백질 A 수행으로부터의 중화된 용출물을 합하고 Milli Q 물로 약 0.5 내지 1.0회 희석하여 4.5 내지 5.5 mS/cm (25°C)의 전도도를 달성하였다. 희석된 샘플을 20 mL/min의 유속으로 심층 필터 (CUNO Zeta Plus BioCap<sup>®</sup>

BC0030A30ZA)를 통과시키고, 이어서 0.45  $\mu\text{m}$  셀룰로즈 아세테이트 필터 (Corning, Inc.)에 이어 0.22  $\mu\text{m}$  셀룰로즈 아세테이트 필터 (Corning, Inc.)로 여과하였다. 이어서, 샘플을 Q 컬럼에 로드할 준비를 하였다.

[0262]

Q Sepharose<sup>TM</sup> 음이온 교환 크로마토그래피. 60.3 mL (1.6 x 30m) 및 40.2 mL (1.6 x 20m) 컬럼을 Q Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 수지 (GE Healthcare)로 패킹하고 AKTA Explorer<sup>TM</sup> 크로마토그래피 시스템을 사용하여 작업하였다. 표 6은 크로마토그래피 조건을 나타낸다. 공정은 12°C에서 수행하였다. 컬럼 관류물 샘플을 폐

닐 HP 크로마토그래피 정제를 위해 수집하였다.

### 표 6

**Q 세파로즈 크로마토그래피 조건**

단계	용액	용적 (CV)	선형 속도 (cm/h)
평형화	25mM 트롤라민, 40 mM NaCl, pH 8.0	5	149
로드	샘플 정보 참조	가변	149
세척	25mM 트롤라민, 40 mM NaCl, pH 8	5	149
재생	25 mM NaPi, 1 M NaCl, pH 7.0	3	149
세정	WFI 물	2	149
위생처리	1M NaOH	3	74.6
세정	WFI 물	3	74.6
저장	25mM NaPi, 20% iPrOH	5	74.6

[0263]

[0264] Phenyl Sepharose™ HP 크로마토그래피. 30.2 mL (1.6 x 15cm) 컬럼을 Phenyl Sepharose™ HP 수지 (GE Healthcare)로 패킹하고, AKTA 익스플로러 크로마토그래피 시스템으로 작업하였다. Q 관류물을 1:1 비율의 2.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /40mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  완충액으로 희석하여 Phenyl Sepharose™ HP 컬럼으로의 로딩을 위한 147 ± 11 mS/cm 전도도를 달성하였다. 주요 용출 피크를 수집하였다. 표 7은 크로마토그래피 조건을 나타낸다. 공정은 12°C에서 수행하였다.

### 표 7

**폐닐 HP 크로마토그래피 조건**

단계	용액	용적 (CV)	선형 속도 (cm/h)
평형화	1.1M( $\text{NH}_4$ ) $\text{SO}_4$ , 20mM Na-PO4	5	75
로드	샘플 정보 참조	가변	75
세척	1.1M( $\text{NH}_4$ ) $\text{SO}_4$ , 20mM Na-PO4	5	75
용출	0.6M-0.65M $\text{AmSO}_4$ , 11.4mM NaPi	3	37.5
재생	25mM Na-PO4, 20% iPrOH	3	37.5
세정	Milli Q 물	3	37.5
위생처리	1 M NaOH	3	37.5

[0265]

## 2.2 샘플 순도 분석

[0266] pH. pH 계량기를 사용직전 2개의 pH 표준 용액 (pH 4 및 7 또는 pH 7 및 10)을 사용하여 보정하였다. 측정된 값은 보정점 이내였다. Corning Pinnacle 545 pH 계량기를 사용하였다.

[0267] 전도도. 전도도를 복사계 분석 CDM210 전도도 계량기를 사용하여 25°C에서 측정하였다.

[0268] UV 분광학  $A_{280}$ . UV  $A_{280}$ 을 Agilent UV8453 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 아달리무마브에 대해 사용된 흡광 계수는 1.39 L/g · cm이다.

[0269] Poros A HPLC. 항체 농도를 Poros A (단백질 A) HPLC로 측정하였다. 샘플 희석물을 적용하여 보정 범위 내에서 판독하였다. Shimadzu HPLC 시스템을 Poros A 면역검출 센서 카트리지 (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 함께 배치하였다. 컬럼을 주위 온도로 유지하였다. 시스템을 2 mL/분으로 작동시켰다. 자동샘플러 트레이 온도는 4°C로 설정하였다. 흡광도를 280 nm에서 모니터링하였다. 완충액 A는 1X PBS였다. 완충액 B는 0.1 M 아세트산 및 150 mM 염화나트륨이었다. 샘플을 주입하고 아달리무마브를 100% 완충액 B로 용출하였다.

[0270] WCX-10 HPLC. WCX-10 HPLC (약한 양이온 교환) 분석을 수행하였다. Shimadzu HPLC 컬럼을 Dionex ProPac WCX-10 분석 컬럼 및 가드 컬럼 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA)과 함께 배치하였다. 2개의 컬럼 모두를 30°C로 유지하였다. 시스템을 1 mL/분으로 작동시켰다. 자동 샘플러 트레이 온도를 4°C로 설정하였다. 흡광도를 280 nm에서 모니터링하였다. 완충액 A는 10 mM 이염기성 인산나트륨, pH 7.5이고, 완충액 B는 10 mM 이염

기성 인산나트륨/500 mM 염화나트륨, pH 5.5였다. 샘플을 주입하고 아달리무마브를 하기의 구배법을 이용하여 용출하였다.

시간 (분)	완충액 A (%)	완충액 B (%)
0.0	94	6
20.0	84	16
22.0	0	100
26.0	0	100
28.0	94	6
34.0	94	6

[0272]

크기 배제 크로마토그래피 (SEC) HPLC. SEC 분석을 수행하였다. 샘플 희석물을 적용하여 표준 곡선 내에서 판독하였다. Shimadzu HPLC 컬럼을 Superose™ 6 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare)과 함께 배치하였다. 이 컬럼을 주위 온도로 유지하였다. 시스템을 0.5 mL/분으로 작동시켰다. 자동샘플러 트레이 온도를 4°C로 설정하였다. 완충액 A는 20 mM 이염기성 인산나트륨/150 mM 염화나트륨이었다. 샘플을 주입하고, 아달리무마브를 100% 완충액 A를 사용하여 동용매적으로 수행하였다.

[0274]

HCP ELISA. HCP ELISA를 상기 개략된 바와 같이 수행하였다. 샘플 희석물을 적용하여 보정 범위 내에서 판독하였다.

[0275]

단백질 A ELISA 검정. 침출성 단백질 A 농도 분석을 상기 개략된 바와 같이 수행하였다. 샘플 희석물 (Catalog # I028)을 포함하여 사람 면역글로불린 검정 사전-코팅된 키트 (Catalog # F050H)를 갖는 단백질 A 샘플의 측정을 위한 면역효소 검정을 Cygnus Technologies, Inc로부터 구입하였다. 블록 히터 (타입 17600 Dry-Bath, Barnstead/Thermolyne)를 샘플 변성에 사용하였다. 항온처리기 (최대 4000, Barnstead/Lab-Line)를 샘플 항온처리에 사용하였다. 플레이트 판독기 (Spectramax Plus, Molecular Devices)를 405 nm 및 495 nm에서의 흡광도 판독에 사용하였다.

[0276]

SDS-PAGE. 샘플을 1X PBS 완충액으로 고안 농도로 희석한 후, 동일 용적의 2X 로딩 완충액 (Invitrogen™ Novex®)

Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X), Cat# LC2676)을 각각의 희석된 샘플에 가하였다. SDS-PAGE를 환원시키기 위해서, 1/10 용적의 환원제 (invitrogen™ NaPAGE®

Sample Reducing Agent (10X), Cat# NP0004)를 각각의 샘플에 가하였다. 각각의 준비된 샘플 20 μL를 겔 (invitrogen™ 12% Tris-Glycine Gel) 상의 각각의 웰에 로딩하였다. 겔을 108분 동안 125 V 및 35 mA의 일정 전압으로 1X Tri-Glycine-SDS 전개 완충액 (ABC Storage Room으로부터의 10X Tris-Glycine-SDS 완충액으로부터 희석됨) 하에 전개시켰다. SimpleBlue™ SafeStain (invitrogen™, Cat# LC6060)을 사용하여 2시간 동안 겔을 염색하고, 선명한 밴드가 나타날 때까지 Milli Q 물로 탈염색하였다. SeeBlue®

Plus Prestained Standard (1X) (invitrogen™ Cat# LC5925)를 이러한 연구에 마커로 사용하였다. 각각의 준비된 샘플을 동일한 총량의 항체 기준으로 로딩하였다.

[0277]

### 2.3 정제 전략의 결과

[0278]

MabSelect™ 동적 결합능. 주어진 조건 하에서 수지의 동적 결합능은 컬럼을 과다-로딩하고 생성물의 파과율을 분석함으로써 평가할 수 있다. 전형적으로, 최대 결합능을 위한 세팅은 10% 파과율에 상응하는 로딩을 측정하는 것이며, 이는 공정 측정 가변성 및 시간에 따라 침출되는 단백질 A 리간드가 커버되도록 하기 위해 안전 여유로서 10 내지 20%를 감한다. MabSelect™ 수지에 대한 10% 파과점은 37.4 g 항체/L 수지이다 (도 9). 이는 연구되는 조건 하에서 400 cm/hr의 유속에서 32 g/L 수지의 최대 권장 수지 결합능을 제시하였다. 본 예에서는 32g/L 로드 양이 사용되었다.

[0279]

항체 희수율. 생성 수율 및 품질 연구를 위해 수행되는 2개의 수행이 있었다. 수거 브로쓰를 상술된 바와 같이 정화하였다. 여과물을 MabSelect™ 컬럼에 로딩하고, 상술된 바와 같이 전개시켰다. 용출물 pH (pH 4.06)는 충분한 바이러스 환원/불활성화 pH (pH 3.5)보다 높았으며, 따라서 용출물 폴(pool)을 10X 희석된 빙초산 (J.T.Baker 9522-03)으로 pH 3.5로 조정하였다. Q Sepharose™ 크로마토그래피 단계에서, 공정의 불순물 정화 능력을 시험하기 위해 1차 수행에서는 30 g/L를 로딩하고, 2차 수행에서는 40 g/L를 로딩하였다.

[0280] 표 8은 이러한 2개의 수행 및 단백질 A 사용 없는 정제 공정 ("AY-04")으로부터의 항체 회수 단계 수율을 열거 한다.

### 표 8

연구된 단백질 A 공정 및 AY-04 공정에서의 회수율

단계별	단백질 A 공정		데이터 매핑 *
	1차 수행	2차 수행	
여과물 회수			
단백질 A 포획	91.81	97.12	86~91%
바이러스 불활성 여과	91.00	97.65	97~98%
Q Sepharose™ CC	93.87	95.91	88~101%
페닐 Sepharose™ CC	91.57	96.63	87~91%
전체 크로마토그래피	71.81	87.90	72~82%

\* Tech-report ABC/TO R348로부터의 데이터

[0281]

[0282] 숙주 세포 단백질 (HCP)가 CHO 세포에 의해 생성되는 주요 불순물이다. 수거 물질에 운반되는 불순물 이외에도, 단백질 A가 공정 관련 불순물로서 단백질 A 수지 매트릭스로부터 생성물 풀로 침출될 수 있다. 우수한 공정은 HCP 및 침출가능한 단백질 A를 제거하는 능력을 입증해야 한다.

[0283]

HCP 제거. 배치 수거 물질을 MabSelect™ (2.6 x 20cm) 컬럼에 공급하였다. 용출물 중의 HCP 수준을 상술된 바와 같이 측정하고 AY-04 공정에서의 Fractogel™ S 용출물과 비교하였다. 데이터는 MabSelect™ 크로마토그래피가 로딩된 HCP의 99.9%를 제거하고, AY-04의 Fractogel™ S 크로마토그래피가 로딩된 HCP의 88 내지 93%를 제거하였다는 것을 입증한다. 예상된 바와 같이, 단백질 A 친화성 수지가 Fractogel™ S 양이온 교환 수지보다 우수한 HCP 제거 능력을 가졌다.

[0284]

단백질 A 침출가능성. 수지 매트릭스로부터 침출되는 단백질 A를 검출하기 위해서, 시판 ELISA 키트 (Cygnus Technologies, Inc)를 사용하여 단백질 A 함량을 측정하였다. 친화성 단계 동안 침출된 단백질 A는 용출물 중 약 6 ng/mg-항체였다. Q Sepharose™ 및 페닐 HP로의 정제 후, 침출된 단백질 A는 약 0.02 ng/mg로 상당히 감소하였다.

[0285]

SDS-PAGE. 단백질 A 공정과 AY-04 공정 사이의 중간 차이를 비교하기 위해 변성된 환원 SDA-PAGE를 수행하였다. 각각의 샘플의 2 µg 항체를 로딩하였다. 젤에서 어떠한 뚜렷한 차이도 관측되지 않는다 (도 10).

[0286]

MabSelect™ 용출 pH 연구. 단백질 A 친화성 수지의 경우, 항체는 중성 pH에서 결합되고 산성 조건 하에서 용출된다. 낮은 pH 바이러스 감소/불활성화가 매우 효과적이고 모노클로날 정제 과정에서 널리 이용되기 때문에, 바이러스 감소/불활성화 단계는 충분한 시간 동안 산성 MabSelect™ 용출물을 보유하게 함으로써 단순화될 수 있다. 항체 회수율 및 생성물 품질에 대한 용출 pH의 영향은 연구되었다. 약 pH 3.2에서의 용출을 단량체 비율 (%) 및 전체 리신 변이체 측면에서 최고의 회수율 및 허용가능한 생성물 품질에 기초하여 MabSelect™ 용출 pH로서 선택하였다.

[0287]

도 11은 적어도 90%의 수율이 pH 2.5 내지 3.8의 용출 pH에서 수득되었으며 수율의 상당한 감소가 pH 4에서 일어난다는 것을 보인다. 이는 용출 완충액에서 pH 4보다 높은 pH는 MabSelect™ 수지로부터 용출을 충분히 용출 할 수 없었다는 것을 제시한다.

[0288]

항체 응집에 대한 영향. MabSelect™ 용출물 중 모든 항체 (아달리무마브) 단량체 수준은 92%보다 높았다 (도 12). 비록 보다 높은 용출 pH가 응집물을 덜 생성하였지만, 이들은 모두 pH 2.5 내지 3.8의 용출 완충액 pH에서 AY-04 공정에서의 Fractogel™ 크로마토그래피에 대한 인-프로세스 (in-process) 작용 한계 (SEC HPLC 단량체 ≥ 92%)와 부합하였다. 1 내지 3시간 동안의 산성 조건 하에서의 용출물 보유 시간은 항체 응집에 유의하게 영향을 끼치지 않았다.

### [0289] 3. 항-IL-12 항체 조성물 중 숙주 세포 단백질 농도의 측정

[0290] 이러한 절차는 항-IL-12 항체 샘플 중 잔류 숙주 세포 단백질 농도를 측정하기 위한 방법을 기술한다. ELISA를

이용하여 숙주 세포 단백질 (항원)을 특정 항체의 2층 사이에 끼이게 한다. 이후, 카제인으로 비-특이적 부위를 차단한다. 이어서, 숙주 세포 단백질을 항온처리하고 이러한 시간 동안 항원 분자는 제1 항체 (코팅 항체)에 의해 포획된다. 이어서, 제2 항체 (바이오티닐화된 항-숙주 세포 단백질)을 가하고 항원 (숙주 세포 단백질)에 고정시킨다. 바이오티닐화된 항-숙주 세포 단백질에 결합하는 뉴트라비딘 HRP-접합체를 첨가한다. 이어서, K 블루 기질을 첨가한다. 발색성 기질은 결합된 효소 접합체에 의해 분해되어 청색을 나타낸다. 2M  $H_3PO_4$ 로 반응을 정지시켜 색상을 황색으로 변화시킨다. 색상 강도는 웰 중의 결합된 항원의 양에 정비례한다.

- [0291] 50 mM 중탄산나트륨 (코팅 완충액), pH 9.4의 제조. 1 L 비커에 900 mL Milli-Q 물; 4.20 g ± 0.01 g 중탄산나트륨을 가한다. 완전히 용해될 때까지 교반한다. 1 N NaOH로 pH 9.4로 조절한다. 1L 용적 비커에 옮기고 Milli-Q 물로 용적을 늘린다. 균질할 때까지 역전시켜 혼합한다. 0.22 μm 멀균 필터 유니트를 통해 여과시킨다. 제조일로부터 7일까지 공청 온도 4°C에서 저장한다.
- [0292] 0.104 M  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.37 M  $NaCl$ , 0.027 M  $KCl$ , 0.0176 M  $KH_2PO_4$ , pH = 6.8 - 6.9 (10X PBS)의 제조. 약 400 mL의 Milli-Q 물을 유리 비커에 가한다. 13.94 g ± 0.01 g의  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 를 가한다. 40.0 g ± 0.1 g의  $NaCl$ 을 가한다. 1.00 g ± 0.01 g의  $KCl$ 을 가한다. 1.20 g ± 0.01의  $KH_2PO_4$ 를 가한다. 균질할 때까지 교반한다. 500 mL 용적 플라스크에 옮긴다. Milli-Q 물로 500 mL 용액으로 QS한다. 역전시켜 혼합한다. 0.2 μm 멀균 필터 유니트를 통해 여과시킨다. 7일 이하 동안 실온에서 저장한다.
- [0293] 1X PBS + 0.1% Triton X-100, pH 7.40: (플레이트 세척 완충액)의 제조. 4 L 눈금 실런더에서, 400 mL 10X PBS (단계 5.2)를 3500 mL Milli-Q 물과 함께 혼합한다. pH를 점검하고, 필요한 경우, 1 N HCl 또는 1 N NaOH로 pH 7.40 ± 0.05로 조절한다. Milli-Q 물로 용적을 늘린다. 실런더를 단단히 파라필름 (parafilm) 처리하고, 균질할 때까지 역전시켜 혼합한다. 4 L 병으로 옮긴다. 4 mL의 1X PBS를 덜어내어 버린다. 4 mL의 트리톤 X-100을 3996 mL의 1X PBS에 가한다. 교반 플레이트에 놓고, 완전히 용해될 때까지 교반한다. 0.22 μm 멀균 필터 유니트를 통해 희석 완충액 제조에 필요한 플레이트 세척 완충액 양을 여과시킨다. 7일 이하 동안 실온에서 저장한다.
- [0294] 코팅 항체 혼합물: 염소 항 CHO 599/626/748 (lot # G11201 @ 1.534 mg/mL)의 제조, 친화성 정제됨: 주의: 스톡을 바이알에 공청 온도 -80°C로 저장한다. 분취물을 제조한다. 사용시 플레이트당 하나의 분취물을 취한다. 사용 직전에, 하기와 같이 냉 50 mM 중탄산나트륨 중에 4 μg/mL의 최종 농도가 되도록 항체 혼합물을 희석한다. 예를 들어, 31 μL 코팅 항체 혼합물을 11969 μL 냉 코팅 혼합물에 첨가한다. 역전시켜 조심스럽게 혼합한다.
- [0295] 바이오티닐화된 염소 항 숙주 세포 단백질 혼합물, 599/626/748 (lot# G11202 @ 0.822 mg/mL)의 제조: 주의: 스톡을 바이알에 공청 온도 -80°C로 저장한다. 분취물을 제조한다. 사용시 플레이트당 하나의 분취물을 취한다. 사용 직전에, 하기와 같이 37°C ± 2°C 카제인 중에 1 μg/mL의 최종 농도가 되도록 바이오티닐화된 항체 혼합물을 희석한다. 예를 들어, 14.6 μL 바이오티닐화된 항체 혼합물을 11985 μL 37°C ± 2°C 카제인에 첨가한다. 역전시켜 조심스럽게 혼합한다.
- [0296] 뉴트라비딘-HRP의 제조. 하기와 같이 1 mg/mL로 2개의 로트 (2 mg/바이알)을 재구성한다: 400 μL의 Milli-Q 물을 바이알에 가한 후, 총 2 mL에 대해 1600 μL 1X PBS를 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합한다. 공청 온도 - 20°C에서 저장한다. 플레이트당 1 분취물이 사용되도록 목적하는 용적으로 분취물을 제조한다. 폴리프로필렌 관에 제조한다. 새로운 로트를 택하여 작업 농도를 결정한다. 제조일로부터 6개월의 만료기간을 정한다. 예를 들어, 작업 농도가 0.2 μg/mL로 결정되면, 하기와 같이 제조한다. 사용 직전, 뉴트라비딘-HRP의 분취물을 실온에서 해동시킨다. 1 mg/mL 뉴트라비딘 용액을 37°C ± 2°C 카제인으로 0.1 mg/mL (100 μg/mL)로 희석한다. 예를 들어, X10 희석하고, 50 μL의 뉴트라비딘을 450 μL의 카제인에 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합한다. 100 μg/mL 용액을 37°C ± 2°C 카제인으로 0.2 μg/mL로 더욱 희석한다. 예를 들어, X500 희석하고, 24 μL 뉴트라비딘 (100 μg/mL)을 11976 μL의 카제인에 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합한다.
- [0297] 5.7 2M 인산 (정지 용액)의 제조. 하기와 같이 농축된 인산으로부터 2 M 인산 용액을 제조한다. 라벨에 적힌 % 인산, 밀도 (1.685g/mL) 및 화학식량 (98 g/mole)으로부터, 500 mL의 2 M 인산을 제조하는데 필요한 농축된 인산의 용적을 계산한다. 상기 계산된 농축된 인산의 용적을 플라스크에 가한다. Milli-Q 물로 용적을 맞추고 균질할 때까지 역전시켜 혼합한다. 제조일로부터 6개월 이하 동안 주위 온도에서 저장한다.

- [0298] 희석 완충액 (1X PBS + 0.1 % Triton X100에 X100 희석된 카제인, pH 7.4)의 제조. 0.22  $\mu\text{m}$  멸균 여과된 1X PBS + 0.1 % Triton X100, pH 7.4 (상기됨)에 37°C ± 2 °C 카제인 X100을 희석한다. 예를 들어, 99 mL 0.22  $\mu\text{m}$  멸균 여과된 1X PBS + 0.1 % Triton X100, pH 7.4에 1 mL의 37°C ± 2°C 카제인을 가한다. 잘 혼합한다. 사용할 때마다 새로이 제조한다.
- [0299] 표준물의 제조. 숙주 세포 단백질 표준물 (항원 표준물) (lot # G11203 @ 1.218 mg/mL): 주의: 스톡을 70  $\mu\text{L}$  분취물로 공칭 온도 -80°C로 저장한다. 분취물을 실온에서 해동한다. 희석 완충액을 사용하여 폴리프로필렌 관에서 일련의 희석을 수행한다.
- [0300] 샘플의 제조. 최종 벌크 샘플을 폴리프로필렌 관에서 희석 완충액 중에 24 mg/mL로 희석한다. 농도를 기록한다. 주의: 스파이킹된 (spiked) 샘플을 제조하고 하기에서 언급되는 12 mg/mL 용액을 제조하기 위해 이 용액을 사용한다. 폴리프로필렌 마이크로관에서, 24 mg/mL 용액을 희석 완충액 중에 12 mg/mL로 추가 희석한다. 총 6 개의 웰을 위한 플레이트 상에 각각 12 mg/mL 용액에 대한 3중 웰을 로딩한다.
- [0301] 스파이크의 제조. 폴리프로필렌 마이크로관에서 희석 완충액으로 2X 희석시켜 상기된 바와 같이 제조된 20 ng/mL 표준물로부터 10 ng/mL 숙주 세포 단백질 스파이크를 제조한다. 플레이트 상에 10 ng/mL 스파이크 용액에 대한 3중 웰을 로딩한다. 스파이킹 샘플을 위해 단계 6.1로부터의 20 ng/mL 표준 용액을 사용한다.
- [0302] 스파이킹된 용액의 제조. 폴리프로필렌 마이크로관에서, 300  $\mu\text{L}$ 의 각각의 24 mg/mL 최종 벌크 용액을 300  $\mu\text{L}$ 의 20 ng/mL 스파이크 용액 (6.1)로 스파이킹한다. 총 6개의 웰을 위해 각각의 스파이킹된 샘플 용액에 대한 3 중 웰을 로딩한다.
- [0303] 대조물의 제조. 대조 범위는 통상의 시험에 사용하기 전에 모든 새로운 스톡 용액에 대해 설정되어야 한다. 대조 스톡: 150  $\mu\text{L}$  분취량의 일 배치의 ABT-874 약물 기질 농축물을 제조하고, 3년 이하 동안 공칭 온도 -80°C에서 동결 저장한다.
- [0304] 작업 대조물의 제조. 폴리프로필렌 관에서 분취량의 대조물을 실온에서 해동하고, 희석 완충액으로 24 mg/mL로 대조물을 희석한다. 폴리프로필렌 마이크로관에서, 24 mg/mL 대조 용액을 희석 완충액으로 12 mg/mL로 추가 희석한다. 단일 희석물을 제조하고, 대조물을 플레이트의 3개의 웰로 로딩한다.
- [0305] ELISA 절차. 플레이트 세척 병을 플레이트 세척 완충액 (단계 5.3 참조, 1X PBS + 0.1% Triton X-100)으로 채운다. 플레이트 세척기를 프라이밍한다. 하기 변수들을 점검한다: 변수들은 하기와 같이 설정되어야 한다: 플레이트 유형: 1, 각각의 사이클 (총 5개의 사이클)에 대해: 용적: 400  $\mu\text{l}$ ; 담금 시간: 10초; Asp. 시간: 4초.
- [0306] 검정 절차. 플레이트를 냉 50 mM 중탄산나트륨 중의 4  $\mu\text{g/mL}$  염소 코팅 항체 혼합물 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 로 코팅한다. 코팅 용액이 웰의 바닥을 균일하게 커버할 때까지 플레이트의 측면을 두드리고, 밀봉 테이프로 커버한 후, 플레이트 진탕기를 18시간 ± 1시간 동안 속도 3으로 진탕하면서 공칭 온도 4°C에서 항온처리한다. 밤새 항온처리 한 후, 플레이트를 냉장고로부터 꺼내어, 실온으로 평형화한다. 코팅물을 진탕한다. 페이퍼 타월 상에 플레이트를 블로팅한다. 300  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 37°C ± 2°C 카제인으로 차단하고, 밀봉 테이프로 커버한 후, 1시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 (Lab-line Environ) 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2°C에서 항온처리한다. 차단 항온처리 동안 표준물, 샘플, 대조물, 스파이크 및 스파이킹된 샘플을 준비한다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한다. 페이퍼 타월 상에 플레이트를 블로팅한다. 8-채널 피펫을 사용하여, 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 표준물, 샘플, 스파이크, 스파이킹된 샘플 및 대조물을 플레이트의 3중 웰에 피펫팅한다. 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 희석 완충액을 블랭크로서 사용하기 위해 플레이트의 모든 비어있는 웰에 피펫팅하였다. 밀봉 테이프로 커버하고, 1시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다. 플레이트 로딩 시 가이드로서 사용하기 위해 템플레이트를 채운다.
- [0307] 플레이트 판독기 설정. 템플레이트를 설정하여 표준물의 농도를 입력한다. 샘플, 대조물, 스파이크 또는 스파이킹된 샘플에 대한 희석 인수를 입력하지 않는다. 희석물을 포함하는 웰을 모든 웰로부터 감할 블랭크로서 지정한다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한다. 페이퍼 타월 상에 플레이트를 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 바이오티닐화된 염소 항체를 가한다. 밀봉 테이프로 커버하고, 1시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물) 상에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한다. 페이퍼 타월 상에 플레이트를 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 뉴트라비딘-HRP 접합체 용액을 가한다. 밀봉 테이프를 커버하고, 1시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물) 상에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한다. 페이퍼 타월 상에 플레이트를 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}/\text{웰}$ 의 냉 K-블루 기질을 가하고, 밀봉 테이프로 커버 한 후, 랩-라

인 역가 플레이트 진탕기 (또는 등가물) 상에서 속도 3으로 진탕하면서, 10분 동안 실온에서 항온처리한다 (기질을 제1 열에 첨가하자마자 타이머를 개시한다). 100  $\mu$ L/웰의 2M 인산 (단계 5.7)을 첨가함으로써 반응을 정지시킨다. 3 내지 5분 동안 속도 3의 플레이트 진탕기 상에 플레이트를 놓는다. 450 nm에서 플레이트를 판독한다.

[0308] 데이터 분석 및 계산. 주의: 표준 곡선의 실제 정량 한계 (2.5 ng/mL 표준)내에 있고 하기 기술되는 CV % 또는 차이 % 기준에 부합하는 광학 밀도를 갖는 샘플, 스파이크, 스파이킹된 샘플 및 대조물만이 허용된다. 샘플 OD 가 2.5 ng/mL 표준 이하에 속하는 경우, 결과는 2.5 ng/mL 미만으로 보고되어야 한다. 이어서, 이 값은 ng/mg 의 값을 보고하도록 희석된 샘플 농도 (12 mg/mL)로 나누어야 한다. 샘플의 숙주 세포 농도가 높은 경우 (비-스파이킹된 샘플 및/또는 스파이킹된 샘플을 표준 곡선 이상이 되게 하는 농도), 그 값을 100 ng/mL 초과로 보고한다. 이어서, 이 값은 ng/mg의 값을 보고하도록 희석된 샘플 농도 (12 mg/mL)로 나누어야 한다. 샘플이 2.5 ng/mL 표준 이하인 경우, 스파이크 회수율 계산을 위해 샘플 값을 0으로 간주한다.

[0309] 표준 곡선. 표준 농도는 프로토콜 템플레이트에 입력해야 한다. 2차 곡선 적합을 이용한다. 결정 계수는 0.99이어야 하며, 3중 웰 사이의 CV %는 20%이어야 한다. 이러한 기준에 부합하지 않는 경우, 하나의 표준 (1 수준, 3 웰)이 제외될 수 있다. 1.25 ng/mL가 제외되는 경우, 2.5 ng/mL 내지 100 ng/mL (잔류 표준 곡선 포인트)에 속하는 광학 밀도를 갖는 샘플 및 스파이킹된 샘플만이 허용된다. 추가로, 각각의 표준 수준의 3중물에 대해, 하나의 웰이 확실히 오염되거나 낮은 결합을 보이는 경우, 이는 제외될 수 있다. 웰이 표준 수준으로부터 벗어나는 경우, 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 플레이트의 배경 (블랭크)에 가까운 OD 값을 보이는 최저 표준에 대한 CV %는 30%이어야 한다. 하나의 웰이 제외되는 경우, 잔류 반복물의 차이 %는 35%이어야 한다. 최저 표준이 제외되는 경우, 잔류 표준 곡선 수준 광학 밀도에 속하는 광학 밀도를 갖는 샘플 및 스파이킹된 샘플만이 허용된다.

[0310] 샘플. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. 3중 웰 사이의 CV %를 보고한다. 각각의 샘플 희석으로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 주의: 비-스파이킹된 샘플 OD가 2.5 ng/mL 표준 OD 이하인 경우, 차이 % 기준은 비-스파이킹된 결과에 적용하지 않는다. 상기 계산을 참조한다.

[0311] 평균 (ng/mL) 값으로부터 실제 숙주 세포 농도 (ng/mg)를 하기와 같이 계산한다: CHO 숙주 세포 단백질 (ng/mg) = 평균 "비-스파이킹된 샘플 결과 (ng/mL)" - 희석된 샘플 농도 (12 mg/mL).

[0312] 스파이크. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. CV %를 기록한다. 스파이크로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 포인트는 차이 %가 20%이어야 한다. 상기 계산을 참조한다. 숙주 세포 농도 (ng/mL)를 보고한다. 이 결과는 스파이크 회수율 계산에 이용될 것이다. 스파이크에 대한 결과 농도 (ng/mL)는 이론적 스파이크 농도의  $\pm 20\%$ 이어야 한다. 결과를 기록하고 합격 또는 불합격을 나타낸다. 스파이크가 이론치의 20% 내에 있지 않는 경우, 검정은 반복되어야 한다. 평균 스파이크 농도 (ng/mL)  $\times 100$ 은 100%  $\pm 20\%$  10 ng/mL 이어야 한다.

[0313] 스파이킹된 샘플. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. 3중 웰 사이의 CV %를 기록한다. 각각의 스파이킹된 샘플 희석물로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 상기 계산을 참조한다. 각각의 희석물에 대한 "스파이킹된 샘플 결과" (ng/mL)를 보고한다. 이중 희석물 사이의 차이 %를 기록한다. 희석물 사이의 차이 %는 25%이어야 한다. 이러한 결과는 스파이크 회수율 계산에 이용될 것이다.

[0314] 하기 식을 이용하여 각각의 희석 세트에 대한 스파이크 회수율 %를 계산한다: 스파이크 회수율 % = 스파이킹된 샘플 값 - 비-스파이킹된 샘플 값  $\times 100$ . 스파이크 값. 주의: (1) 비-스파이킹된 샘플 값 OD가 2.5 ng/mL 표준 이하인 경우, 스파이크 회수율 계산에서 0으로 간주한다. 스파이크 회수율 %은 각각의 샘플에 대한 각각의 희석에 대해 100%  $\pm 50\%$  (50% - 150%)이어야 한다. 결과 및 합격/불합격을 기록한다.

[0315] 대조물. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. CV %를 기록한다. 대조물로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 상기 계산을 참조한다. 대조물에서의 숙주 세포 농도 (ng/mL)를 보고한다. 숙주 세포 농도 (ng/mL)를 하기와 같이 계산한다: 숙주 세포 단백질 (ng/mg) = 대조 숙주 세포 단백질 결과 (ng/mL).

#### 4. 항-IL-12 항체 조성물 중 단백질 A 농도 측정

[0317] ELISA에서 플레이트를 닦 항-단백질 A로 코팅하고 항온처리한다. 비-특이적 부위를 PBS 중의 카제인으로 차단

한다. 플레이트를 1X PBS + 0.1% Triton X-100에 세척하여 비결합된 물질을 제거한다. 샘플 및 Cys-r단백질 A 표준물을 1X PBS + 4.1% Triton X + 10% 카제인에 희석한다. 용액을 95°C ± 2°C에서 가열하여 변성시키고, ABT-874로부터 단백질 A를 분리하다. 이어서, 용액을 플레이트에 가하고, 항온처리한다. 비결합된 물질을 1X PBS + 0.1% Triton X-100으로 세척한다. 바이오티닐화된 닭 항-단백질 A를 미세역가 플레이트에 가하고, 항온 처리한다. 플레이트를 세척하여 비결합된 물질을 제거하고, 뉴트라비딘-페옥시다제 접합체를 가한다.

[0318] 뉴트라비딘은 웰에 결합된 바이오티닐화된 닭 항-단백질 A에 결합할 것이다. 플레이트를 다시 세척하여 비결합된 뉴트라비딘을 제거하고, K-블루 (테트라메틸벤지딘 (TMB)) 기질을 플레이트에 가한다. 기질을 결합된 뉴트라비딘으로 가수분해시켜 청색을 생성한다. 반응을 인산으로 정지시키고, 색상을 황색으로 변화시킨다. 웰에서의 황색의 강도는 웰에 존재하는 단백질 A의 농도에 정비례한다.

[0319] 시약 및 용액의 제조. 카제인 병을 37°C ± 2°C로 가온하고, 2분 동안 초음파처리한 후, 분취물로 나누어야 한다. 분취물은 공칭 온도 4°C로 저장되어야 한다. 검정을 수행하는 경우, 필요한 수의 카제인 분취물은 37°C ± 2°C에 있어야 한다. 코팅 완충액 및 기질은 차갑게 사용된다 (사용 직전 공칭 온도 4°C).

[0320] 50 mM 중탄산나트륨 (코팅 완충액), pH 9.4. 1 L 비커에 900 mL Milli-Q 물 및 4.20 g ± 0.01 g 중탄산나트륨을 가한다. 완전히 용해될 때까지 교반한다. 1 N NaOH로 pH 9.4로 조절한다. 1 L 용적 플라스크로 옮기고, Milli-Q 물로 용적을 맞춘다. 균질할 때까지 역전시켜 혼합한다. 0.22 CA μm 멸균 필터 유니트를 통해 여과시킨다. 제조일로부터 7일 이하 동안 공칭 온도 4°C에서 저장한다.

[0321] 104 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, 1.37 M NaCl, 0.027 M KCl, 0.0176 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 6.8 - 6.9. (10 X PBS): 약 400 mL의 Milli-Q 물을 유리 비커에 가한다. 13.94 g ± 0.01 g의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O를 가한다. 40.0 g ± 0.1 g의 NaCl를 가한다. 1.00 g ± 0.01 g의 KCl을 가한다. 1.20 g ± 0.01 g의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 가한다. 균일할 때까지 교반한다. 500 mL 용적 플라스크에 옮긴다. Milli-Q 물로 500 mL 용적으로 맞춘다. 뒤집어 혼합한다. 0.2 CA μm 멸균 필터 유니트를 통해 여과한다. 7일 이하 동안 실온에서 저장한다.

[0322] 1X PBS + 0.1% Triton X-100, pH 7.40: (플레이트 세척 완충액). 4 L 눈금 실린더에서 400 mL 10 X PBS (상기 참조)를 3500 mL Milli-Q 물과 혼합한다. pH를 점검하고, 필요한 경우, 1 N HCl 또는 1 N NaOH로 pH 7.40 ± 0.05로 조절한다. Milli-Q 물로 용적을 맞춘다. 실린더를 단단하게 파라필름처리하고, 균일할 때까지 역전시켜 혼합한다. 4L 병에 옮긴다. 4 mL의 1 X PBS를 덜어내고, 버린다. 4 mL의 트리톤 X-100을 3996 mL의 1 X PBS에 가한다. 교반 플레이트에 놓고 완전히 용해될 때까지 교반한다. 7일 이하 동안 실온에서 저장한다.

[0323] 닭 항-단백질 A 코팅 항체. 사용시 플레이트당 1 분취물의 항체를 취한다. 새로운 로트의 닭 항-단백질 A를 정성하기 위해서, 닭 항-단백질 A-바이오틴 접합체 (동일한 로트의 코팅물로부터 제조)를 함께 사용하고 정성하는 것이 필요할 수 있다. 사용 직전, 항체 혼합물을 냉 50 mM 중탄산나트륨에 코팅물을 정성하는 동안 측정된 농도로 희석한다. 예를 들어, 정성하는 동안 플레이트에 로딩될 코팅물의 농도가 6 μg/mL로 측정되고, 스톡 농도가 3000 μg/mL인 경우, 24 μL 코팅 항체를 11976 μL 냉 코팅 완충액에 가한다. 역전시켜 조심스럽게 혼합한다.

[0324] 바이오티닐화된 닭 항-단백질 A. 사용시 플레이트당 1 분취물의 항체를 취한다. 새로운 로트의 닭 항-단백질 A-바이오틴 접합체를 정성하기 위해, 동일한 로트의 닭 항-단백질 A를 사용하고 이를 정성하는 것이 필요할 수 있다. 사용 직전, 바이오티닐화된 항체를 37°C ± 2°C 카제인 중에 바이오티닐화된 항체 정성 동안 측정된 농도로 희석한다. 예를 들어, 정성하는 동안 플레이트에 로딩될 바이오티닐화된 항체의 농도가 4 μg/mL로 결정되고 스톡 농도가 1000 μg/mL인 경우, 48 μL 바이오티닐화된 항체를 11952 μL 37°C ± 2°C 카제인에 가한다. 역전시켜 조심스럽게 혼합한다.

[0325] 뉴트라비딘-HRP. 하기와 같이 1 mg/mL로 2개의 로트 (2 mg/바이알)을 재구성한다: 400 μL의 Milli-Q 물을 바이알에 가한 후, 총 2 mL에 대해 1600 μL 1X PBS를 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합한다. 공칭 온도 -80°C에서 저장한다. 플레이트당 1 분취물이 사용되도록 목적하는 용적으로 분취물을 제조한다. 폴리프로필렌 관에 제조한다. 제조일로부터 6개월의 만료기간을 정한다. 예를 들어, 작업 농도가 0.1 μg/mL로 결정되면, 하기와 같이 제조한다. 사용 직전, 뉴트라비딘-HRP의 분취물을 실온에서 해동시킨다. 1 mg/mL 뉴트라비딘 용액을 37°C ± 2°C 카제인으로 0.01 mg/mL (10 μg/mL)로 희석한다. 예를 들어, X10 희석하고, 50 μL의 뉴트라비딘을 450 μL의 카제인에 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합하고, X10 희석하고, 100 μL의 X10 뉴트라비딘을 900 μL 카제인에 가한다. 조심스럽게 와동시켜 혼합한다. 10 μg/mL 용액을 37°C ± 2°C 카제인으로 0.1 μg/mL로 더욱 희석한다. 예를 들어, X100 희석하고, 120 μL 뉴트라비딘 (10 μg/mL)을 11880 μL의 카제인에 가한

다. 조심스럽게 수회 역전시켜 혼합한다.

[0326] 정지 용액 (구입한 1 N 인산이 사용됨). 수령일로부터 1년 이하 동안 주위 온도에서 저장한다. 완충액 (1X PBS + 4.1% Triton X100 + 10% 카제인, pH 7.4)을 희석한다. 86 mL의 1X PBS + 0.1% Triton X100, pH 7.4 (단계 5.3)을 비커 또는 플라스크에 가하고, 4 mL의 Triton X-100 및 PBS 중의 10 mL의 차단제 카제인을 가하며, 용해/혼합되게 교반한다. 트리톤을 용해시키는데 20 내지 30분이 걸릴 수 있다. 이는 1X PBS + 4.1% Triton X100 + 10% 카제인, pH 7.4 용액에 상당한다. 0.22 CA μm 멀균 필터 유니트를 통해 여과한다. 사용할 때마다 새로이 제조한다. 이는 1 플레이트에 대해 충분하다.

[0327] 단백질 A 표준물 (항원 표준물). 주의: 스톡을 70 μL 분취물로 공칭 온도 -20°C에서 저장한다. 얼음 상의 분취물을 해동한다. 제작자 COA에 기술된 농도를 이용하여 희석 완충액 (상기 참조)을 사용하여 폴리프로필렌 관에서 하기 표에서의 예에 따라 일련의 희석을 수행한다: 예를 들어, COA가 스톡 농도가 2.1 mg/mL (2100000 ng/mL)라고 기술하는 경우, 얼음 상의 샘플을 해동한다. 폴리프로필렌 마이크로원심분리 관에서, 최종 벌크 샘플을 희석 완충액 (상기) 중에 20 mg/mL로 희석한다. 2번의 분리된 희석을 수행한다. 농도를 기록한다. 스파이크 샘플을 제조하고 10 mg/mL 용액을 제조하기 위해 하기 용액을 사용한다. 예를 들어, 농도 (mg/mL) 용적 μL의 X mg/mL 용액 용적의 희석물 (μL) 120개의 샘플로부터 일련의 희석. 폴리프로필렌 마이크로원심분리 관에서, 20 mg/mL 용액을 희석 완충액 중에 10 mg/mL로 더욱 희석한다.

[0328] 스파이크의 제조. 폴리프로필렌 마이크로원심분리 관에 단계 6.1에서 상기 제조된 0.593 ng/mL 표준물을 희석 완충액으로 2X 희석하여 0.296 ng/mL 단백질 A 스파이크를 제조한다. 단일 희석을 수행한다. 0.296 ng/mL 스파이크 용액에 대한 3중 웨이 플레이트에 로딩될 것이다. 스파이크 샘플을 위해 단계 6.1로부터의 0.593 ng/mL 표준 용액을 사용한다.

[0329] 스파이킹된 샘플의 제조. 폴리프로필렌 마이크로원심분리 관에서 500 μL의 각각의 20 mg/mL 최종 벌크 용액을 500 μL의 0.593 ng/mL 스파이크 용액으로 스파이킹한다. 변성을 유지한다. 각각의 스파이킹된 샘플 용액에 대한 3중 웨이 총 6 웨이를 위한 플레이트에 로딩될 것이다.

[0330] 대조물의 제조. 많은 ABT-874 약물 물질을 수득한다. 150 μL 분취물을 제조하고, 분취된 날로부터 3년 동안 공칭 온도 -80°C에서 냉동 저장한다.

[0331] 작업 대조물. 얼음 상의 분취 대조물을 해동한다. 폴리프로필렌 마이크로원심분리 관에서, 대조물을 1000 μL의 최종 용적을 갖도록 희석 완충액으로 10 mg/mL로 희석한다. 단일 희석물을 제조한다. 변성을 위해 유지한다. 대조물의 3중 웨이 플레이트에 로딩될 것이다.

[0332] 변성. 플레이트 블랭크를 위해, 1000 μL의 희석 완충액을 플레이트에서 수행될 블랭크의 수와 동일한 마이크로원심분리 관에 가한다. 관의 캡을 파라필름 처리하여 가열 동안 파열하는 것을 방지하거나 제2의 랙 (rack)을 관의 상단에 배치하여 뚜껑을 열리지 않게 할 수 있다. 표준물, 비-스파이킹된 샘플, 스파이킹된 샘플, 스파이크, 블랭크 및 대조물을 15분 동안 95°C ± 2°C에서 가열한다. 필요한 경우, 냉각 동안 관으로부터 파라필름을 제거한다. 15분 동안 냉각시키고, 약 10000 rpm에서 5분 동안 원심분리한다. 700 μL의 상청액을 플레이트에 로딩할 마이크로관에 옮긴다. 트리톤/단백질 펠릿이 흐트러지지 않도록 조심한다.

[0333] 플레이트 세척기 설명 및 수조 설정. 플레이트 세척 병을 플레이트 세척 완충액 (단계 5.3 참조, 1X PBS + 0.1% Triton X-100)으로 채운다. 플레이트 세척기를 프라이밍한다. 하기 변수를 점검한다: 변수들은 하기와 같이 설정되어야 한다: 플레이트 유형: 1, 각각의 사이클 (총 4개의 사이클)에 대해: 흡인 속도: 10 mm/s; 용적: 400 μl; 담금 시간: 5초; 흡인 시간: 6초. 수조로 옮겨 95°C로 맞춘다. 수조 온도를 적어도 30분 동안 95°C ± 2°C로 평형화한다.

[0334] 검정 절차. 단계가 완료되었을 때 단계를 점검함으로써 검사항목 명세표를 가이드로서 사용할 수 있다. 추가로, 검정 동안 사용되는 모든 장비를 기록한다. 검정이 수행될 각각의 일에 대해 사용될 카제인 분취물의 양은 37°C ± 2°C이어야 한다. 코팅 완충액 및 기질은 차갑게 사용한다. 표준물, 샘플, 대조물, 스파이크 및 스파이킹된 샘플을 차단 항온처리 전 및 동안 제조한다. 희석액을 제조하고, 에펜도르프 관으로 옮기고, 15분 동안 변성시키고, 15분 동안 냉각시키며, 5분 동안 원심분리하고, 마이크로관으로 옮기는데 1시간 차단 항온처리보다 더 걸릴 수 있다. 플레이트를 차단하기 전에 적어도 40분을 허용한다. 샘플, 스파이킹된 샘플, 표준물, 대조물, 검정 스파이크 및 블랭크를 12 챠널 피펫을 사용하여 B 열로부터 G 열로 수평으로 플레이트에 로딩한다. 표준물을 고농도로부터 저농도로 로딩한다. 플레이트 코팅, 바이오틴 첨가, 뉴트라비딘 첨가, 기질 첨가 및 정지 용액 첨가를 컬럼 2로부터 11까지 수직으로 수행한다.

- [0335] 플레이트를 냉 50 mM 중탄산나트륨 중의 코팅 항체 100  $\mu\text{L}$ /웰로 코팅한다. 코팅 용액이 웰의 바닥을 균일하게 커버할 때까지 플레이트의 측면을 가볍게 두드리고, 밀봉 테이프로 커버한 후, 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 속도 3으로 진탕하면서 공칭 온도 4°C에서 항온처리한다.
- [0336] 밤새 항온처리한 후, 냉장고에서 플레이트를 꺼내어 실온이 되게 한다. 코팅물을 쉐이크 아웃 (shake out)한다. 플레이트를 페이퍼 타월 상에 블로팅한다. 300  $\mu\text{L}$ /웰의 37°C ± 2°C 카제인으로 차단하고, 밀봉 테이프로 커버하고, 1시간 ± 10분 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다.
- [0337] 표준물, 샘플, 대조물, 스파이크 및 스파이킹된 샘플을 차단 항온처리 전 및 동안 제조한다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한다. 플레이트를 페이퍼 타월 상에 블로팅한다. 8-채널 피펫을 사용하여 100  $\mu\text{L}$ /웰의 변성된 표준물, 샘플, 스파이크, 스파이킹된 샘플, 블랭크 및 대조물을 플레이트의 3중 웰에 피펫팅한다. 플레이트의 외측 웰은 사용하지 않으며, 이들 웰에는 비-처리된 회석 완충액을 가한다. 밀봉 테이프로 커버하고, 2시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다. 플레이트를 로딩할 때 가이드로서 사용하기 위해 템플레이트를 채운다.
- [0338] 플레이트 판독기 설정. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한다. 플레이트를 페이퍼 타월 상에 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}$ /웰 바이오티닐화된 항체를 가한다. 밀봉 테이프로 커버하고, 1시간 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다.
- [0339] 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한다. 플레이트를 페이퍼 타월 상에 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}$ /웰 뉴트라비딘-HRP 접합체 용액을 가한다. 뉴트라비딘을 마지막 열에 가하자마자 타이머를 작동시킨다. 밀봉 테이프로 커버하고, 30분 동안 80 rpm ± 5 rpm에서 랩-라인 엔비론 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 진탕하면서 37°C ± 2 °C에서 항온처리한다. 플레이트를 세척 완충액으로 4회 세척한다. 플레이트를 페이퍼 타월 상에 블로팅한다. 100  $\mu\text{L}$ /웰 냉 K-블루 기질을 가하고, 밀봉 테이프로 커버한 후, 랩-라인 역가 플레이트 진탕기 (또는 등가물)에서 속도 3으로 진탕하면서 10분 동안 (기질을 제1 열에 가하자마자 타이머 작동) 실온에서 항온 처리한다. 100  $\mu\text{L}$ /웰 1 N 인산을 가하여 반응을 정지시킨다. 플레이트를 3분 동안 속도 3의 플레이트 진탕기에 놓는다. 450 nm에서 플레이트를 판독한다.
- [0340] 데이터 분석 및 계산. 주의: 표준 곡선의 실제 정량 한계 내에 있고 하기 기술되는 CV % 또는 차이 % 기준에 부합하는 광학 밀도를 갖는 샘플, 스파이크, 스파이킹된 샘플 및 대조물만이 허용된다. 샘플 OD가 표준 곡선 이하에 속하는 경우, 결과는 0.18 ng/mL 미만으로 보고되어야 한다 (검정 LOQ). 이어서, 이 값은 ng/mg의 값을 보고하도록 회석된 샘플 농도 (10 mg/mL)로 나누어야 한다. 비-스파이킹된 및/또는 스파이킹된 샘플이 표준 곡선 (2 ng/mL) 이상이도록 샘플의 단백질 A 농도가 높은 경우, 표준 곡선 내에 속하도록 더욱 회석시킨다. 이어서, 이 값은 ng/mg의 값을 보고하도록 회석된 샘플 농도로 나누어야 한다. 스파이크 회수율 계산을 위해, 비-스파이킹된 샘플의 값 (ng/mL)이 곡선 아래인 경우라도, 비-스파이킹된 샘플의 값 (ng/mL)을 스파이킹된 샘플 값 (ng/mL)으로부터 감한다. 값이 음수이거나 '범위'가 수득되는 경우, 스파이크 회수율 계산을 위해 비-스파이킹된 샘플을 0으로 간주한다.
- [0341] 표준 곡선. 표준 농도는 프로토콜 템플레이트에 입력해야 한다. 2차 곡선 적합을 이용한다. 결정 계수는 0.99이어야 하며, 3중 웰 사이의 CV %는 20%이어야 한다. 이러한 기준에 부합하지 않는 경우, 하나의 표준 (1 수준, 3 웰)이 제외될 수 있다. 0.18 ng/mL가 제외되는 경우, 0.26 ng/mL 내지 2 ng/mL (잔류 표준 곡선 포인트) 광학 밀도에 속하는 광학 밀도를 갖는 샘플 및 스파이킹된 샘플만이 허용된다. 추가로, 각각의 표준 수준의 3중물에 대해, 하나의 웰이 확실히 오염되거나 낮은 결합을 보이는 경우, 이는 제외될 수 있다. 웰이 표준 수준으로부터 벗어나는 경우, 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 플레이트의 배경 (블랭크)에 가까운 OD 값을 보이는 최저 표준에 대한 CV %는 30%이어야 한다. 하나의 웰이 제외되는 경우, 잔류 반복물의 차이 %는 35%이어야 한다. 최저 표준이 제외되는 경우, 잔류 표준 곡선 수준 광학 밀도에 속하는 광학 밀도를 갖는 샘플 및 스파이킹된 샘플만이 허용된다.
- [0342] 차이 %는 다음과 같이 계산한다: 차이 % = |(회석 1의 결과 - 회석 2의 결과)/평균값| × 100%. 표준물이 상기 기준과 부합하지 않는 경우, 검정은 반복되어야 한다. CV % 및/또는 차이 %의 값 및 표준 곡선 결정 계수 결과를 기록한다.
- [0343] 샘플. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. 3중 웰 사이의 CV %를 보고한다. 각각의 샘플 회석으로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 반복물은 차이 %가 20%이어야 한다. 주의: 비-스파이킹된 샘플 OD가 최저 표

준 OD 이하인 경우, 차이 % 기준은 비-스파이킹된 결과에 적용하지 않는다. 상기 계산을 참조한다.

[0344] 각각의 희석률에 대한 "비-스파이킹된 샘플 결과"를 ng/mL로 보고한다. 이들 값은 스파이크 회수율 계산에 사용될 것이다. 평균 "비-스파이킹된 샘플 결과 (ng/mL)" 및 희석률 사이의 차이 %를 계산한다. 결과를 보고한다. 희석률 사이의 차이 %는 25%이어야 한다. 평균 (ng/mL) 값으로부터 실제 단백질 A 농도 (ng/mg)를 하기와 같이 계산한다: 단백질 A (ng/mg) = 평균 "비-스파이킹된 샘플 결과 (ng/mL)" 희석된 샘플 농도 (10 mg/mL). 결과를 기록한다.

[0345] 스파이크. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. CV %를 기록한다. 스파이크로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 포인트는 차이 %가 20%이어야 한다. 상기 계산을 참조한다. 단백질 A 농도 (ng/mL)를 보고한다. 이 결과는 스파이크 회수율 계산에 이용될 것이다. 스파이크에 대한 결과 농도 (ng/mL)는 이론적 스파이크 농도의 ± 20%이어야 한다. 결과를 기록하고 합격 또는 불합격을 나타낸다. 스파이크 결과가 이론치의 20% 내에 있지 않는 경우, 검정은 반복되어야 한다. 평균 스파이크 농도 (ng/mL) x 100은 100% ± 20% 0.296 ng/mL이어야 한다.

[0346] 스파이킹된 샘플. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. 3중 웰 사이의 CV %를 기록한다. 각각의 스파이킹된 샘플 희석률로부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 잔류 반복률은 차이 %가 20%이어야 한다. 상기 계산을 참조한다. 각각의 희석률에 대한 "스파이킹된 샘플 결과" (ng/mL)를 보고한다. 이중 희석률 사이의 차이 %를 기록한다. 희석률 사이의 차이 %는 25%이어야 한다. 이러한 결과는 스파이크 회수율 계산에 이용될 것이다. 하기 식을 이용하여 각각의 희석 세트에 대한 스파이크 회수율 %를 계산한다: 스파이크 회수율 % = 스파이킹된 샘플 값 - 비-스파이킹된 샘플 값 X 100. 스파이크 값. 주의: 스파이크 회수율 계산을 위해, 비-스파이킹된 샘플의 값 (ng/mL)이 곡선 아래인 경우라도, 비-스파이킹된 샘플의 값 (ng/mL)을 스파이킹된 샘플 값 (ng/mL)으로부터 감한다. 값이 음수이거나 '범위'가 수득되는 경우, 스파이크 회수율 계산을 위해 비-스파이킹된 샘플을 0으로 간주한다. 스파이크 회수율 %은 각각의 샘플에 대한 각각의 희석에 대해 100% ± 50% (50% - 150%)이어야 한다. 결과 및 합격/불합격을 기록한다.

[0347] 대조물. CV %는 3중 웰 사이에 20%이어야 한다. CV % 결과를 기록한다. 대조물부터 하나의 웰을 제외할 수 있다. 나머지 반복률은 차이 %가 20%이어야 한다.

[0348] 다양한 간행물이 본원에 인용되었으며, 이들의 내용은 모두 본원에 참조로 인용된다.

## 도면

### 도면1

- 항-IL-12 항체 (ABT-874) 중쇄 가변 영역 서열  
 1            10            20            30            40  
 QVQLVESGGG VVQPGGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA  
 CDR1

PGKGLEQVAF IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY  
 CDR2

LQMNSLRAED TAVYYCKTHG SHDNWGQGTM VTVSS  
 CDR3

- 항-IL-12 항체 (ABT-874) 경쇄 가변 영역 서열  
 1            10            20            30            40  
 QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCSGSRSNIG SNTVKWYQQL  
 CDR1

PGTAPKLLIY YGNDQRPSPGV PDRFSGSKGT SASLAITGVQ  
 CDR2

AEDEADYYCQ SYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG  
 CDR3

도면2

- 항-IL-18 항체 (ABT-325) 중쇄 서열

1 10 20 30 40 50  
EVQLVQSGTE VKKPGESLKI SCKGSGYVT SYWIGWVRQM PGKGLEWMGF

IYPGDSETRY SPTFQGQVTI SADKSFNTAF LQWSSLKASD TAMYYCARVG

SGWYPYTFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV

KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ

TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKS

- 항-IL-18 항체 (ABT-325) 경쇄 서열

1 10 20 30 40 50  
EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASESIS SNLAWYQQKP GQAPRLIFIYT

ASTRATDIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ YNNWPSITFG

QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK

VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ

GLSSPVTKSF NRGE

도면3

- 항-TNF $\alpha$  항체 (아달리무마브) 중쇄 가변 영역 서열

1 10 20 30 40 50  
EVQLVESGGG LVQPGRLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSA  
CDR1

ITWNSGHIDY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKVS  
CDR2

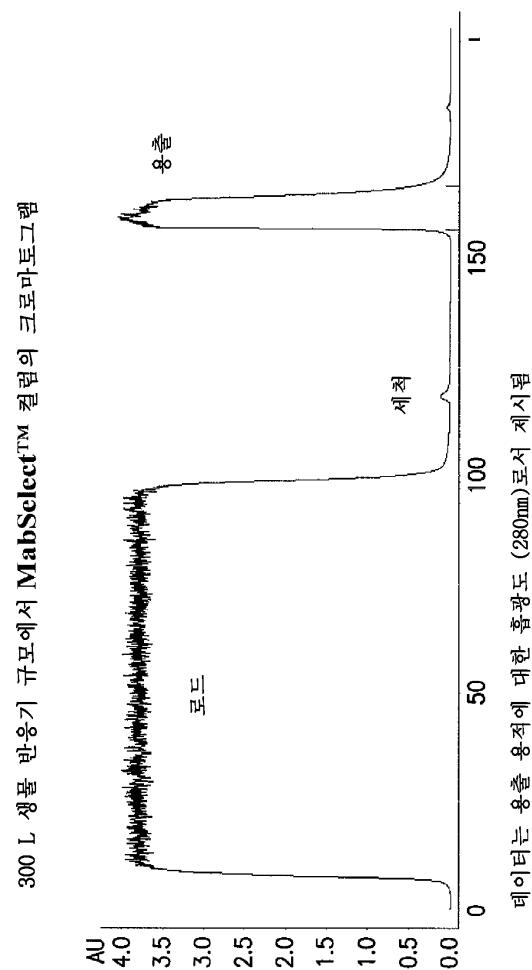
YLSTASSLDY WGQGTLVTVS S  
CDR 3

- 항-TNF $\alpha$  항체 (아달리무마브) 경쇄 가변 영역 서열

ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQR YNRAPYTFGQ  
CDP3 CDP3

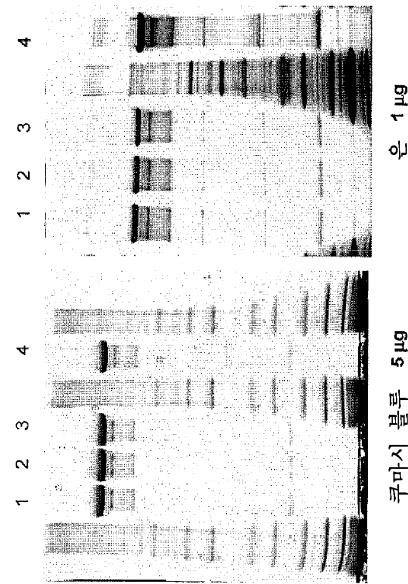
GTKVETK

도면4



## 도면5

MabSelect™ 세척 조건의 평가

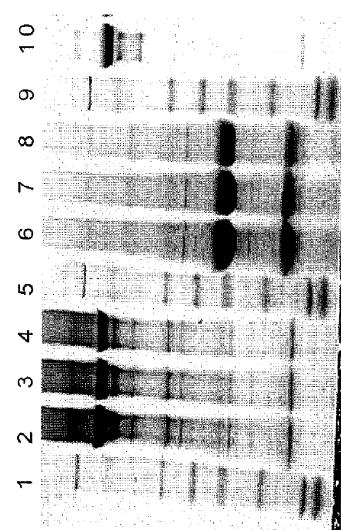


제 1, 2, 3 및 4는 분자량 표준물이다.  
제 5, 6, 7 및 8은 pH 8 및 7mS/cm (기-화원)에서 형성된 첨전물이다.  
제 9는 분자량 pH 8 및 7mS/cm (화원)에서 형성된 첨전물이다.  
제 10은 MabSelect™ 용출물이다.

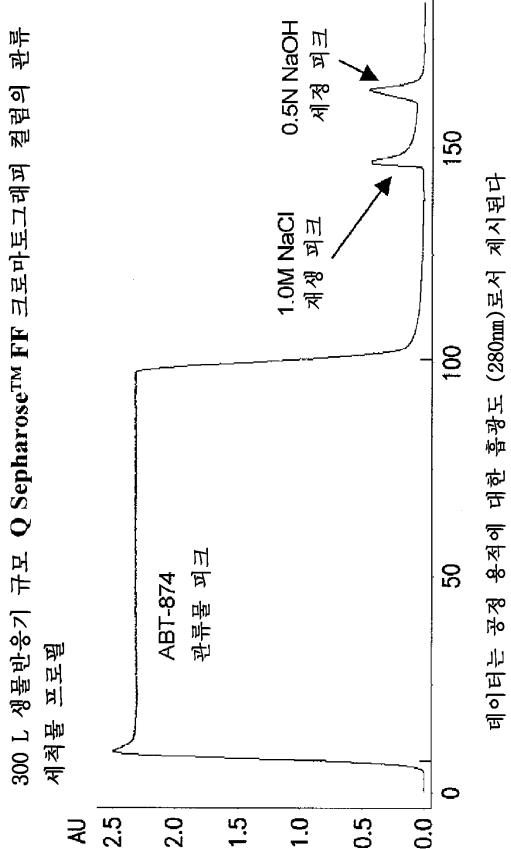
제 1, 2 및 3은 pH 6에서 각각 세척 없이, 또는 0.5M NaCl 세척으로, 또는  
20mM 시트레이트 0.5M NaCl 세척으로 용출물 Ab이다.  
제 4는 20mM 시트레이트, 0.5M NaCl, pH 6 완충액을 사용한 세척이다.

## 도면6

pH 8 7ms/cm 첨전물의 SDS-PAGE

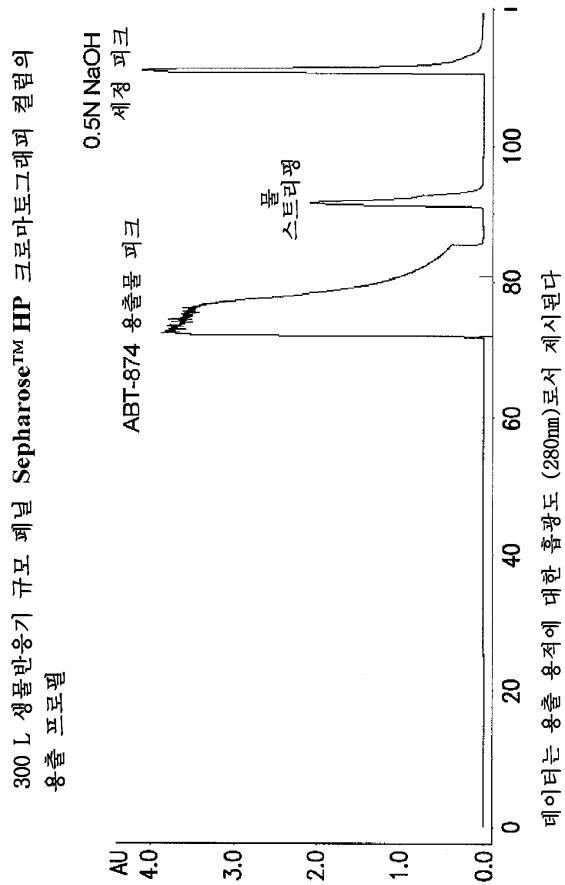


## 도면7

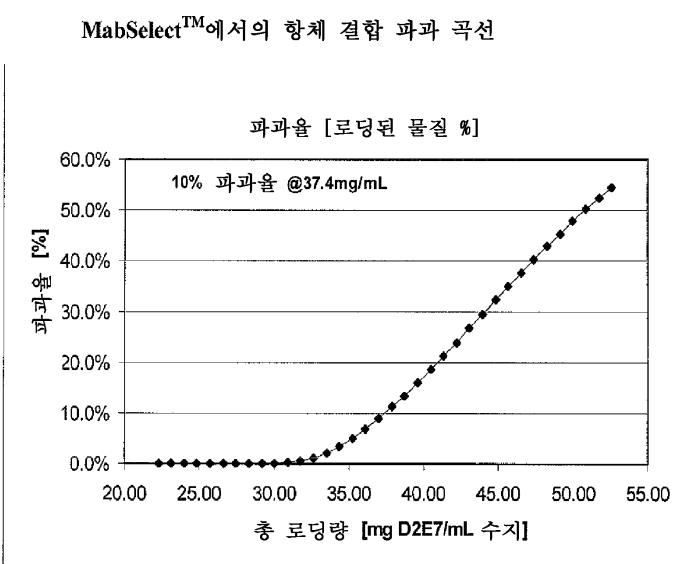


데이터는 공정 용적에 대한 흡광도 (280nm)로서 제시된다.

## 도면8



## 도면9



물질 : AY-04 Lot 35205BI 정화된 항체 수거물

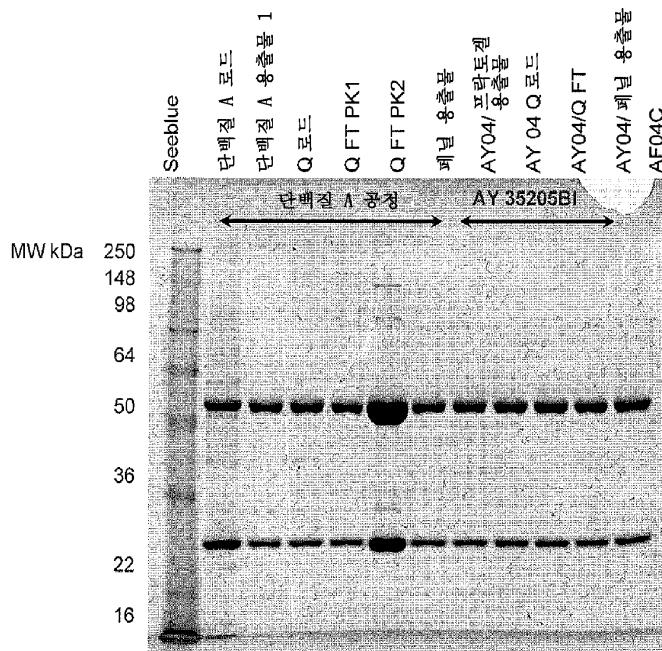
로드 : pH7, 400 cm/hr

철련 크기 : 1.6 x 5 cm

## 도면10

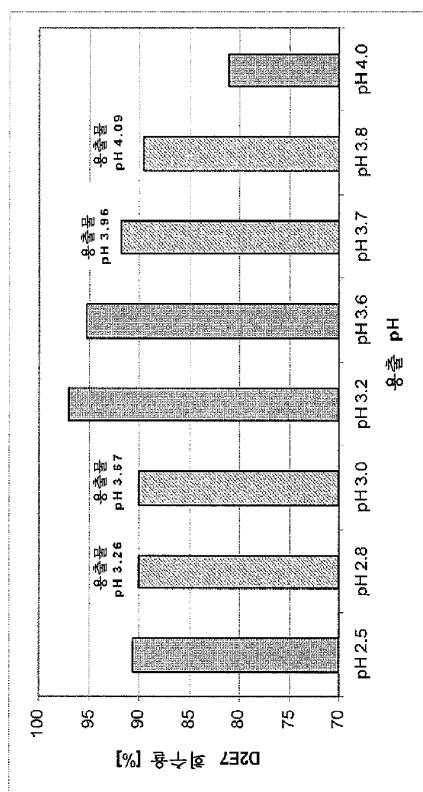
단백질 A 공정 수행 및 AY-04의 SDS-PAGE

SDS-PAGE (단순 청색 염색)



## 도면11

용출 pH에 대한 MabSelect™ 아밀리무마브 회수율



## 도면12

