(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0142564
(43) 공개일자 2024년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/22 (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/22 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7030267
(22) 출원일자(국제) 2023년02월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/062322
(87) 국제공개번호 WO 2023/154822
국제공개일자 2023년08월17일
(30) 우선권주장
63/267,810 2022년02월10일 미국(US)

(71) 출원인
코디악 사이언시스 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94304 팔로 알토 1200 페이지 밀 로드
(72) 발명자
추어브리겐 안드레아스 세바스티안
미국 캘리포니아 94304 팔로 알토 1200 페이지 밀 로드 코디악 사이언시스 인코포레이티드 내
인-알본 캐롤
미국 캘리포니아 94304 팔로 알토 1200 페이지 밀 로드 코디악 사이언시스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인아주김장리

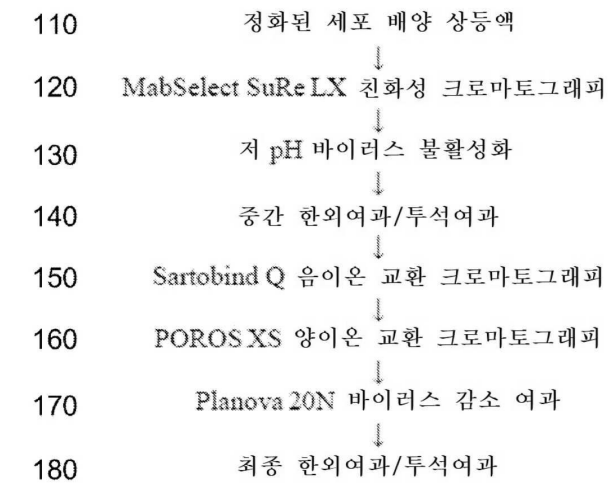
전체 청구항 수 : 총 89 항

(54) 발명의 명칭 **생산물 정제 방법**

(57) 요 약

원하는 분자 및 화학 종으로부터의 HCP(숙주 세포 단백질)를 포함하는 오염물질 종의 친화성 크로마토그래피 정제 및 분리와 관련된 실시형태가 본 명세서에 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 16/248 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법으로서,

친화성 크로마토그래피 매트릭스에 용리제를 로딩하는 단계로서, 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합하는, 상기 로딩하는 단계; 및 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽(chaotropic) 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법으로서,

친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키고 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 것을 통한, 방법.

청구항 3

관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법으로서,

관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 마그네슘 또는 마그네슘염을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 5

친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및

Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계

를 포함하되, 상기 제2 완충제 카오트로픽 제제는 상기 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아닌, 방법.

청구항 6

생산물 생산 방법으로서,

(i) 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계,

(ii) 상기 로딩 유체를 상기 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

(iii) 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계,

(iv) 상기 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및

(v) 상기 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 7

생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계,

상기 로딩 유체를 상기 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계,

상기 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및

상기 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 8

생산물 생산 방법으로서,

접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계

상기 접합 단백질을 상기 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계,

상기 접합 단백질을 용출시키는 단계 및

상기 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 9

생산물 생산 방법으로서,

관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 상기 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 상기 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 11

생산물 생산 방법으로서,

관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계,

상기 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및

상기 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 용출물은 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성하는, 방

법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 약학적 조성물에 완충 용액이 첨가되는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 약학적 조성물에 방부제 용액이 첨가되는, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 유리체내 주사를 위해 추가로 정제되는, 방법.

청구항 16

생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 상기 로딩 유체를 상기 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계,

상기 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및

상기 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 17

생산물 생산 방법으로서,

용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

제1 세척 완충제로 세척하는 단계,

카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계,

상기 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계

용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물이 수집되며, 상기 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 50mM Na-인산염을 포함하는, 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 250mM NaCl을 더 포함하는, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 Tris 및 염을 포함하는, 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 용리제는 관심 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 24

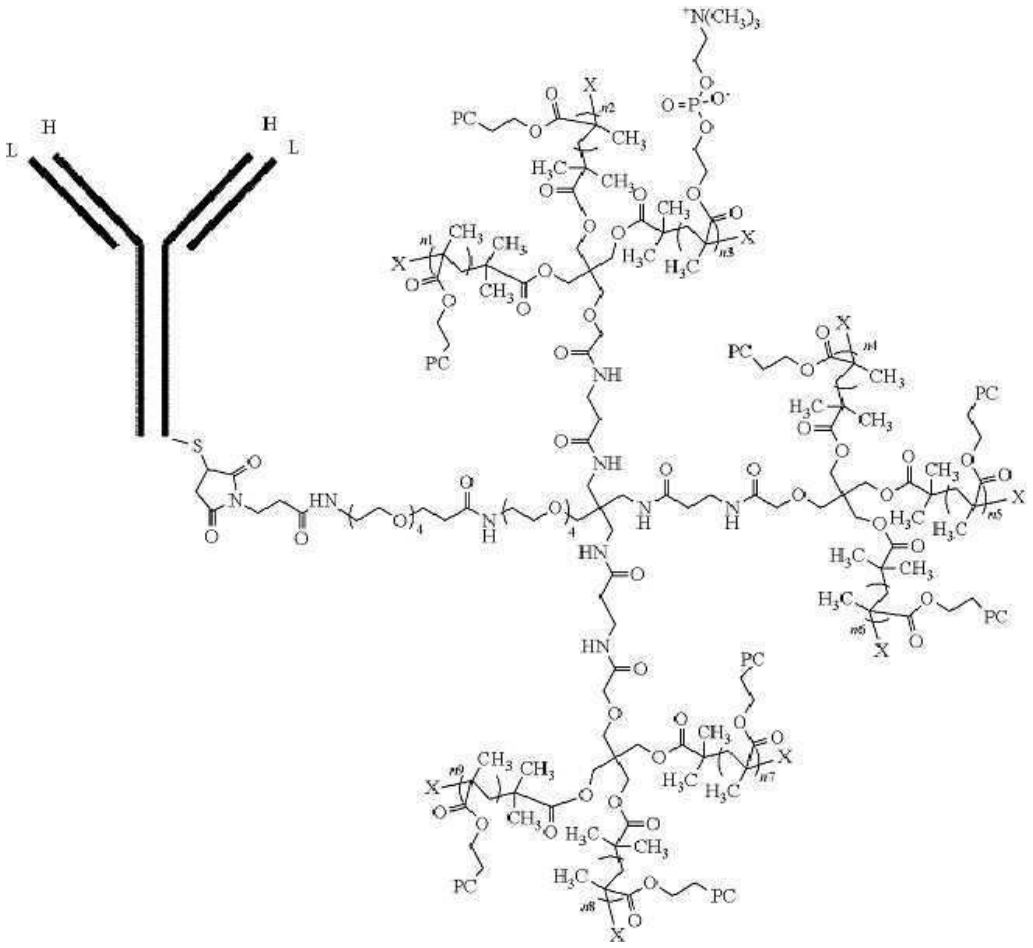
제23항에 있어서, 상기 관심 단백질은 항체인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항체는 추가로 중합체에 접합되어 항체 접합체를 형성하는, 방법.

청구항 26

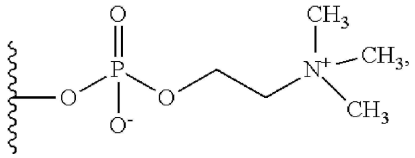
제24항에 있어서, 상기 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

상기 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 상기 문자 H로 표시되며, 상기 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 상기 문자 L로 표시되고;

상기 중합체는, 결합이 상기 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴(sulfhydryl)을 통해 상기 항-VEGF-A 항체에 결합되고;

PC는 다음과 같고: 

상기 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아

이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고;

i) n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 항체 접합체는 이중특이적 항체를 포함하는, 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 항-VEGF 및 항 IL-6 결합 모이어티를 포함하는, 방법.

청구항 29

생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계,

상기 세포 배양 상등액을 상기 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계,

상기 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 단계,

카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계,

용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 상기 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 상기 용출시키는 단계,

상기 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계,

상기 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계,

상기 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및

상기 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 상기 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 세포 배양 상등액은 무-동물 성분(animal component free) 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되는, 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 세포 배양 상등액을 가공하는 단계는 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포 배양물은 세포 및 세포 잔해 제거로 정화되는, 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 용리제는 상기 정화된 세포 배양 상등액을 포함하는, 방법.

청구항 34

친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법으로서,

로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 상기 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 상기 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조

건 하에서 상기 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 35

생산물 생산 방법으로서,

관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계,

상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 상기 카오트로픽 제제를 제거하는 단계,

용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 상기 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 상기 용출시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 36

단백질 정제 시스템으로서,

결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼;

인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제,

Tris를 포함하는 중간 세척 완충제,

염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및

포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제

를 포함하는, 시스템.

청구항 37

단백질 정제 시스템으로서,

결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼;

Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제,

중간 Tris 세척 완충제,

염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및

포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제

를 포함하는, 시스템.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 칼럼은 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함하는, 시스템.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 리간드는 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하는, 시스템.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제는 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는, 시스템.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 50mM 인산나트륨을 포함하는, 시

스템.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 포함하는, 시스템.

청구항 43

제36항에 있어서, 상기 제1 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함하는, 시스템.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 제1 Tris 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 더 포함하는, 시스템.

청구항 45

제36항에 있어서, 상기 중간 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함하는, 시스템.

청구항 46

제36항에 있어서, 상기 제1 Tris 세척 완충제의 pH는 약 7.2인, 시스템.

청구항 47

제36항에 있어서, 상기 제2 세척 완충제의 pH는 약 7.8인, 시스템.

청구항 48

제36항에 있어서, 상기 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도는 약 2.8M인, 시스템.

청구항 49

제36항에 있어서, 상기 용출 완충제의 포름산나트륨 농도는 10mM을 포함하는, 시스템.

청구항 50

항체 정제 시스템으로서,

항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 상기 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 상기 칼럼; 및

카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제

를 포함하는, 시스템.

청구항 51

제1항에 있어서, 상기 관심 단백질은 이중특이적 항체인, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-6에 특이적인, 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 OG2072인, 방법.

청구항 54

제1항에 있어서, 상기 관심 단백질은 항체 접합체인, 방법.

청구항 55

제1항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스인, 방법.

청구항 56

제1항에 있어서, 상기 완충 용액의 카오트로픽 제제는 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상으로 이루어지는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상의 농도는 각각 0.05 내지 3.5M인, 방법.

청구항 58

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 Tris를 더 포함하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 5mM인, 방법.

청구항 60

제1항에 있어서, 상기 완충 용액의 pH는 5.5 초과인, 방법.

청구항 61

제3항에 있어서, 상기 용출물은 바이러스성 불순물을 더 함유하는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 64

제3항에 있어서, 상기 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 상기 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 상기 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 66

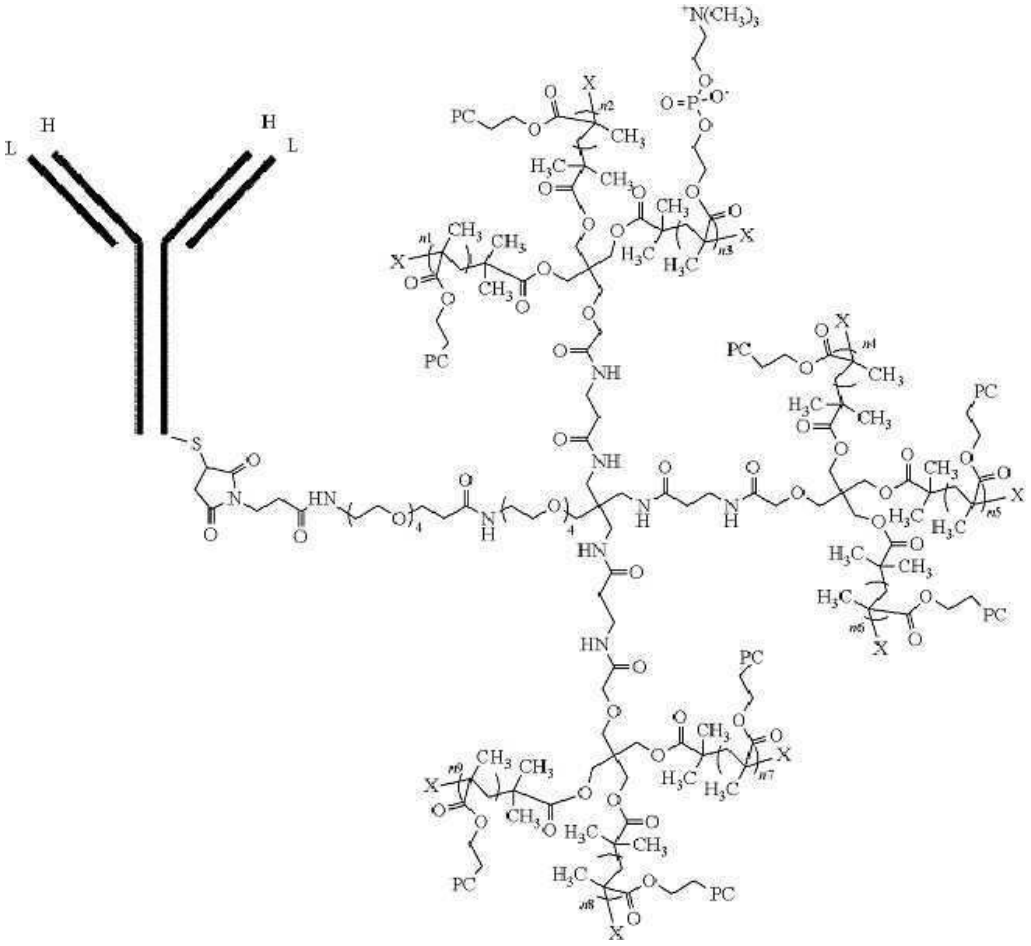
제64항에 있어서, 상기 세척 전 완충 용액은 인산나트륨을 포함하는, 방법.

청구항 67

제64항에 있어서, 상기 세척 전 완충 용액은 Tris 및 염을 포함하는, 방법.

청구항 68

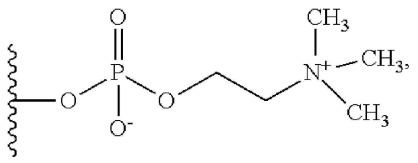
제25항에 있어서, 상기 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

상기 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 상기 문자 H로 표시되며, 상기 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 상기 문자 L로 표시되고;

상기 중합체는, 결합이 상기 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 상기 항-VEGF-A 항체에 결합되고;

PC는 다음과 같고: 

상기 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고;

n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이다.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 항체 접합체는 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 상기 항-VEGF-A 항체 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 상기 항-VEGF-A 항체 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함하는, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 항-VEGF 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체를 포함하며, 상기 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 상기 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 상기 항체는 C449에서 중합체에 결합되는, 방법.

청구항 71

제1항에 있어서, 상기 관심 표적 단백질은 세포 배양에 의해 생산되는, 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 세포 배양은 CHO 세포를 포함하는, 방법.

청구항 73

제3항에 있어서, 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 상기 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 74

제3항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 상기 관심 표적 단백질 이외의 핵산, 내독소, 소포제 또는 기타 소분자를 제거하는, 방법.

청구항 75

제3항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 상기 관심 표적 단백질이 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거하는, 방법.

청구항 76

제3항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 상기 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거하는, 방법.

청구항 77

제4항에 있어서, 상기 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 상기 관심 표적 단백질이 용출되지 않는, 방법.

청구항 78

제3항에 있어서, 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함하는, 방법.

청구항 79

제3항에 있어서, 상기 용리제는 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산된, 방법.

청구항 80

제3항에 있어서, 상기 생산물은 관심 단백질인, 방법.

청구항 81

제3항에 있어서, 불순물은 숙주 세포 단백질 불순물을 포함하는, 방법.

청구항 82

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 10mM Na-인산염을 포함하는, 방법.

청구항 83

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 인산염-기반 종을 포함하는, 방법.

청구항 84

제17항에 있어서, 상기 제1 세척 완충제는 50mM NaCl을 더 포함하는, 방법.

청구항 85

생산물 처리 방법으로서,

용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및

카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하는 단계

를 포함하되, 상기 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 상기 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 상기 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함하는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 제1 농도의 카오트로픽 염의 농도는 0M이며, 상기 제2 농도의 카오트로픽 염의 농도는 4.0M인, 방법.

청구항 87

제85항에 있어서, 상기 카오트로픽 염은 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상인, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 카오트로픽 염은 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화리튬 및 염산구아니디늄으로부터 선택되는, 방법.

청구항 89

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 아세트산염, 구연산염, ACES, BES, 비신(Bicine), HEPES, MES, MOPS, MOPSO, TAPS, 트리신(Tricine), Bis-Tris, Bis-Tris 프로판, 카코딜산염(Cacodylate), CAPS, CAPSO, CHES, 글리신, 글리실글리신, 이미다졸, PIPES, TEA 또는 TES 중 하나 이상을 더 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 서열 목록

[0002] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2023년 2월 8일에 생성된 KDIAK.141WO.xml이라는 제목의 파일로 제공되며, 이 파일의 크기는 843,266바이트이다. 서열 목록의 전자 형식의 정보는 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0003] 임의의 우선권 출원에 대한 참조에 의한 원용

[0004] 본 출원은 2022년 2월 10일자로 출원된 미국 가출원 제63/267810호에 대한 우선권을 주장한다.

[0005] 해외 또는 국내 우선권 주장이 본 출원과 함께 제출된 출원 데이터 시트에서 식별되는 임의의 그리고 모든 출원은 37 CFR 1.57에 따라 참조에 의해 원용된다.

[0006] 본 발명의 분야

[0007] 본 개시내용은 항체 및 기타 세포 생산물 정제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0008] 세포 배양에서 유래한 분자 종의 처리 및 정제에 관련된 단위 조작은 원하는 분자 종 및 원치않는 분자 종의 우선적인 분리를 포함한다. 특히, 크로마토그래피 및 단백질 A 크로마토그래피는 완충 용액을 통한 임의의 주어진 세척 또는 흐름과 비교하여 다양한 분자 결합의 상호작용을 기반으로 특정 종의 우선적 분리를 가능하게 한다.

이 단계에서 단위 조작의 최적화는 불순물은 감소시키면서 전체적인 순도 및 원하는 분자 종의 수율을 높일 수 있다.

발명의 내용

[0009] 카오트로픽(chaotropic) 제제의 적용에 의한 생산물 정제 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0010] 본 명세서에 제공된 일부 실시형태는 생산물 정제에 관련된 처리 단계에서 사용하기 위한 새로운 정제 방법을 제공함에 따라 생산물의 순도 및 조성의 개선을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 생산물은 단백질 생산물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 정제는 크로마토그래피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 크로마토그래피는 단백질 A 또는 단백질 G일 수 있다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 제제는 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0011] 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 생산물 정제 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공된 일부 실시형태는 세포 배양물을 수확하는 단계 후 단백질 생산물을 정제하기 위한 새로운 방법을 제공함에 따라 이전 기술의 특정 한계를 극복하는 것을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 단백질 생산물은 항체이다. 일부 실시형태에서, 단백질 생산물은 항-VEGF 항체이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 항-VEGF 항체는, 대상체에 투여되었을 때 항체 또는 단백질의 반감기(예를 들어, 안구 반감기 등)를 연장하는 중합체 모이어티(moiety)를 포함하는, 항-VEGF 항체 접합체(예를 들어, KSI-301, KSI-501) 또는 항-VEGF 단백질 접합체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단백질 생산물을 정제하는데 사용될 수 있는 완충 시약의 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0012] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키고 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 단계를 통한 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0013] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0014] 일부 실시형태에서 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함하며, 제2 완충제 카오트로픽 제제는 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아니다.

[0016] 일부 실시형태에서 생산물 생산 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서 생산물 생산 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서 생산물 생산 방법으로서, 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계, 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 접합 단백질을 용출시키는 단계 및 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0019] 일부 실시형태에서 생산물 생산 방법으로서, 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척하는 단계, 그 다음 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집

하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 발명에 제공된 일부 실시형태에서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(ultrafiltration: UF) 및/또는 투석여과(diafiltration: DF) 중 하나 이상을 포함한다.

[0020] 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서 생산물 생산 방법으로서, 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서 용출물은 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성한다. 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서 완충 용액이 약학적 조성물에 첨가된다. 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서 방부제 용액이 약학적 조성물에 첨가된다. 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서 약학적 조성물은 유리체내(intravitreal) 주사를 위해 추가로 정제된다.

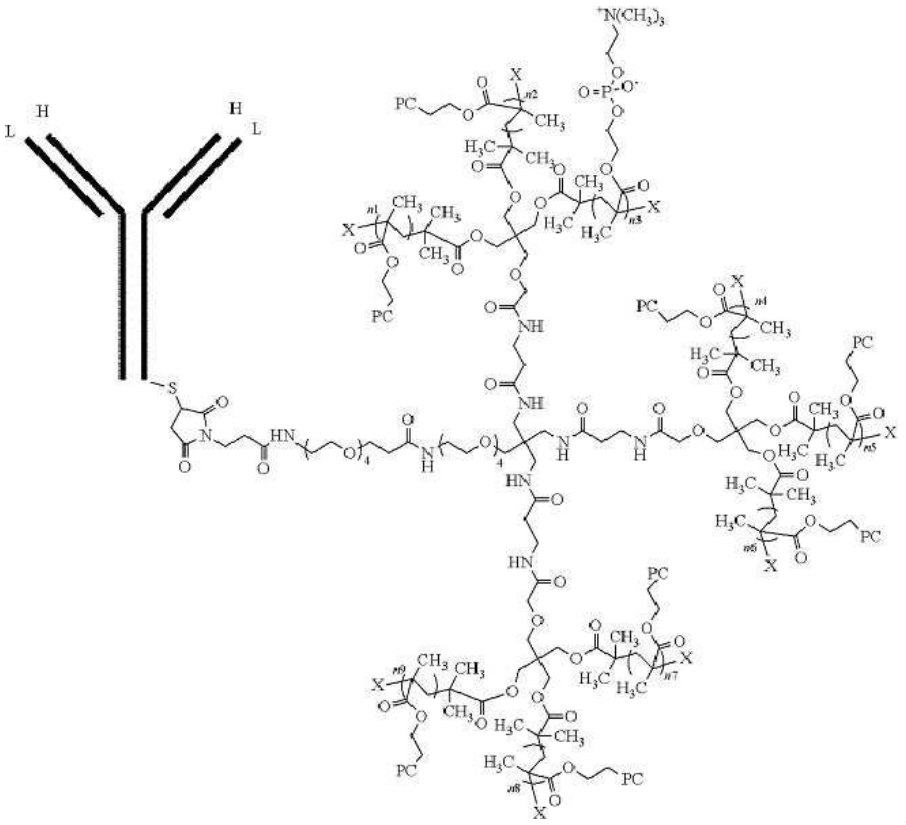
[0021] 일부 실시형태에서, 생산물 처리 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계를 포함한다. 이 방법은 카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하는 단계로서, 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함하는, 단계를 더 포함한다.

[0022] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다.

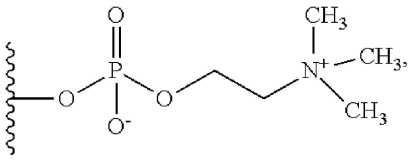
[0023] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법으로서, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물이 수집되며, 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 50mM Na-인산염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 250mM NaCl을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제가 Tris 및 염을 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계가 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 용리제는 관심 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 추가로 중합체에 접합되어 항체 접합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 이중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 항-VEGF 및 항 IL-6 결합 모이어티를 포함한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:

[0026] 

[0027] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고, 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴(sulfhydryl)을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합된다. 상기 구조의 목적을 위해, PC는 다음을 갖는 구조를 의미한다:

[0028]  , 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0029] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계, 그 다음 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계, 그 다음 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계 및 Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 것을 진행하는 단계, 그 다음 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계, 그 다음 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0030] 일부 실시형태에서, 세포 배양 상등액은 무-동물 성분(animal component free) 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었다. 일부 실시형태에서, 세포 배양 상등액은 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 세포 및 세포 잔해 제거로 정화(clarify)된다. 일부 실시형태에서, 용리제는 정화된(clarified) 세포 배양 상등액을 포함한다.

[0031] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법으로서, 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 그 다음 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함

하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조건 하에서 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0032] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계, 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계, 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 카오트로픽 제제를 제거하는 단계를 포함하는, 방법이 본 명세서에 제공된다. 그 다음 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 용출물은 단백질 생산물을 포함한다.

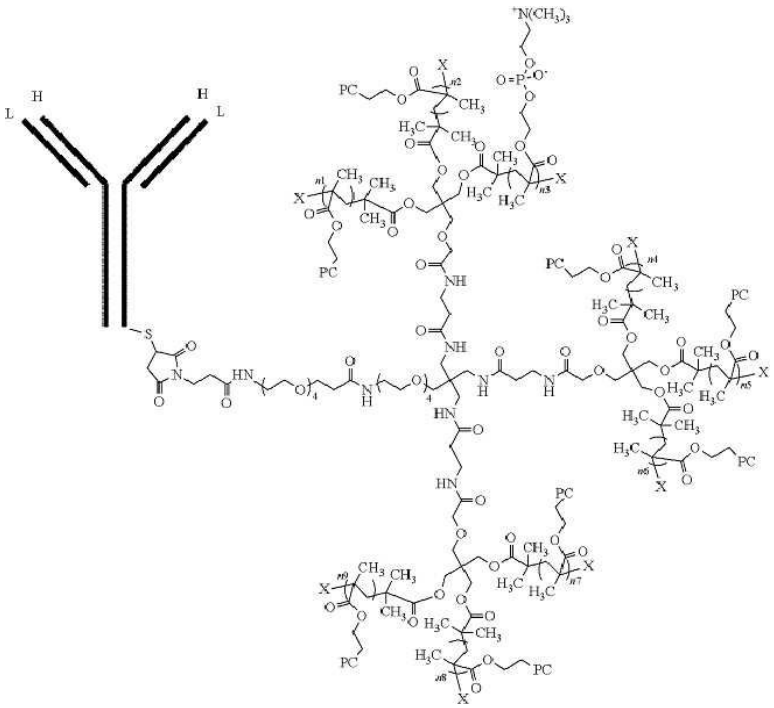
[0033] 일부 실시형태에서, 단백질 정제 시스템으로서, 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제, Tris를 포함하는 중간 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0034] 일부 실시형태에서, 단백질 정제 시스템으로서, 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제, 중간 Tris 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 칼럼은 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 리간드는 단백질 A 또는 단백질 G를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제는 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 50mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 중간 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제의 pH는 약 7.2이다. 일부 실시형태에서, 제2 세척 완충제의 pH는 약 7.8이다. 일부 실시형태에서, 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도는 약 2.8M이다. 일부 실시형태에서, 용출 완충제의 포름산나트륨 농도는 10mM을 포함한다.

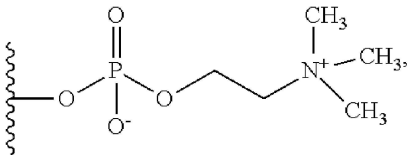
[0035] 일부 실시형태에서, 항체 정제 시스템으로서, 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 칼럼, 카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템이 본 명세서에 기술된다.

[0036] 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 이중특이적 항체이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-6에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 항체 접합체이다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 카오트로픽 제제는 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상의 농도는 0.05 내지 3.5M이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액은 Tris를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 5mM이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 pH는 5.5 초과이다. 일부 실시형태에서, 용출물은 바이러스성 불순물을 더 함유한다.

[0037] 본 명세서에 기술된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함한다. 본 명세서에 기술된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함한다. 본 명세서에 기술된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전(prewash) 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 본 명세서에 기술된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척-후(post-wash) 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 Tris 및 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:



[0038] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고, 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고, 여기서 PC는 다음의 구조를 갖는다:



[0039] , 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0040] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함한다.

[0041] 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 항체는 C449에서 중합체에 결합된다.

[0042] 일부 실시형태에서, 관심 표적 단백질은 세포 배양에 의해 생산된다. 일부 실시형태에서, 세포 배양은 CHO 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척-후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 핵산, 내독소(endotoxin), 소포제(antifoam agent) 또는 기타 소분자를 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는다. 본 발명에 기술된 방법의 일부 실시형태에서, 방법은 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과(tangential flow filtration), 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 용리제는 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었다. 일부 실시형태에서, 생산물은 관심 단백질이다. 일부 실시형태에

서, 불순물은 숙주 세포 단백질 불순물을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 관심 단백질의 수집 및 정제의 일부 실시형태에 대한 일반적인 프로토콜을 기술한다.

도 2는 관심 단백질의 수집 및 정제에 대한 일반적인 프로토콜을 기술한다.

도 3은 본 개시내용의 실시형태에 따른 칼럼 크로마토그래피에 대한 일반적인 프로토콜을 기술한다.

도 4는 서로 다른 세척 완충 용액으로 실행된 크로마토그래피 프로파일 세트를 기술한다.

도 5는 서로 다른 세척 완충 용액으로 실행된 크로마토그래피 프로파일 세트를 기술한다.

도 6은 서로 다른 세척 완충 용액으로 실행된 크로마토그래피 프로파일 세트를 기술한다.

도 7은 서로 다른 세척 완충 용액으로 실행된 크로마토그래피 프로파일 세트를 기술한다.

도 8은 항-VEGF 항체의 일부 실시형태에 대한 아미노산 서열이다.

도 9는 IL-6-VEGF Trap 융합 단백질의 일부 실시형태를 도시한다. VEGF Trap 도메인은 가변 도메인 바로 앞 N-말단에 위치(좌측)하거나 항체의 Fab 영역과 힌지(hinge) 영역 사이에 위치(우측)한다.

도 10은 VEGF_trap_변이체_1, VEGF_trap_변이체_2 및 VEGF_trap_변이체_3의 서열 목록을 도시한다.

도 11은 항-IL-6 중쇄 가변 영역 서열의 실시형태를 도시한다. CDR은 밑줄로 표시된다.

도 12는 VEGF trap 서열의 다양한 실시형태를 도시한다. 서열들 사이에 차이가 있는 부분은 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된다. 도 12는 추가로 링커(GS) 서열 실시형태의 일부 실시형태를 도시한다. 이는 이중 반복 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 링커(GS)로서 표시될 수 있다.

도 13 및 도 14는 항-IL-6 분자에 대한 중쇄 서열의 일부 실시형태를 도시한다. CDR은 밑줄로 표시된다.

도 15는 항-IL-6 분자에 대한 경쇄 서열의 일부 실시형태를 도시한다. CDR은 밑줄로 표시된다.

도 16a 및 도 16b는 항-IL-6 분자에 대한 중쇄 서열의 일부 실시형태를 도시한다. CDR은 밑줄로 표시된다.

도 17a 및 도 17b는 CDR의 조합의 일부 실시형태를 도시한다.

도 18은 VEGFR-Fc 서열 변이체의 일부 실시형태를 도시한다. 서열들 사이에 차이가 있는 부분은 굵은 글씨 및 밑줄로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종과 원치않는 분자 종을 우선적으로 분리하는 크로마토그래피를 사용하여 불순물을 감소시키기 위한 방법 및 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0045] 일부 실시형태에서는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 다음을 포함한다: 용리제를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계.

[0046] 일부 실시형태에서는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키고 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 것을 통한 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법이다.

[0047] 일부 실시형태에서는 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 마그네슘 또는 마그네슘염을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함한다.

[0049] 일부 실시형태에서는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관

심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함하며, 제2 완충제 카오트로픽 제제는 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아니다.

[0050] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 (i) 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, (ii) 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, (iii) 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, (iv) 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 (v) 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0051] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

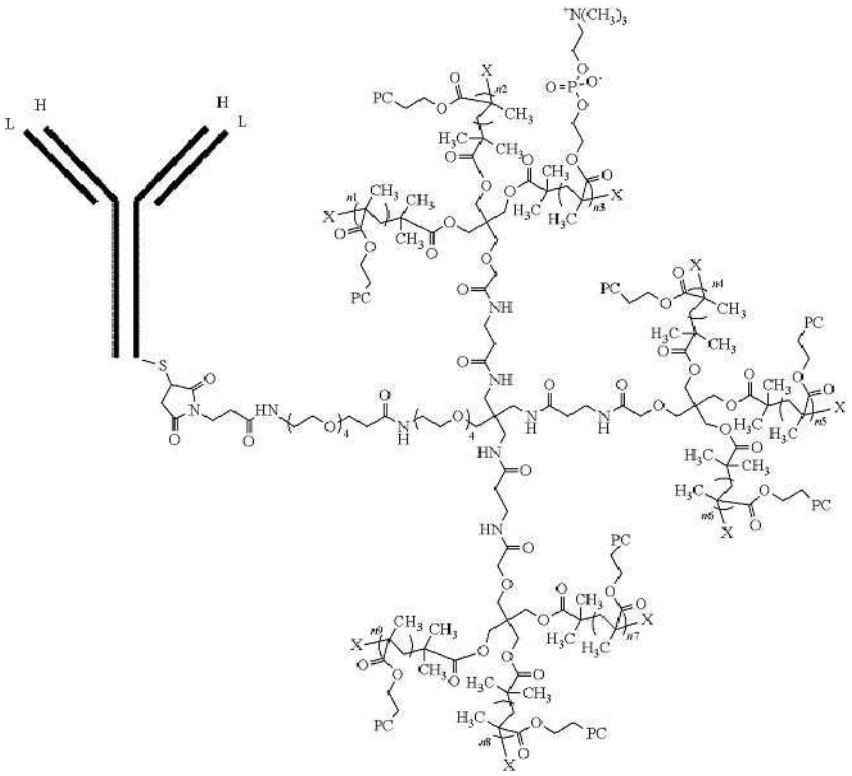
[0052] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계, 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 접합 단백질을 용출시키는 단계 및 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0053] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함한다.

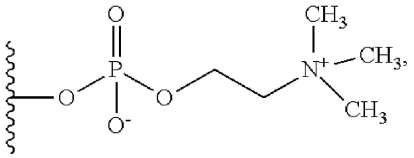
[0054] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용출물은 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액이 약학적 조성물에 첨가된다. 일부 실시형태에서 방부제 용액이 약학적 조성물에 첨가된다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 유리체내 주사를 위해 추가로 정제된다.

[0055] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다.

[0056] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물이 수집되며, 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 50mM Na-인산염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 250mM NaCl을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 Tris 및 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 용리제는 관심 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 추가로 중합체에 접합되어 항체 접합체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:

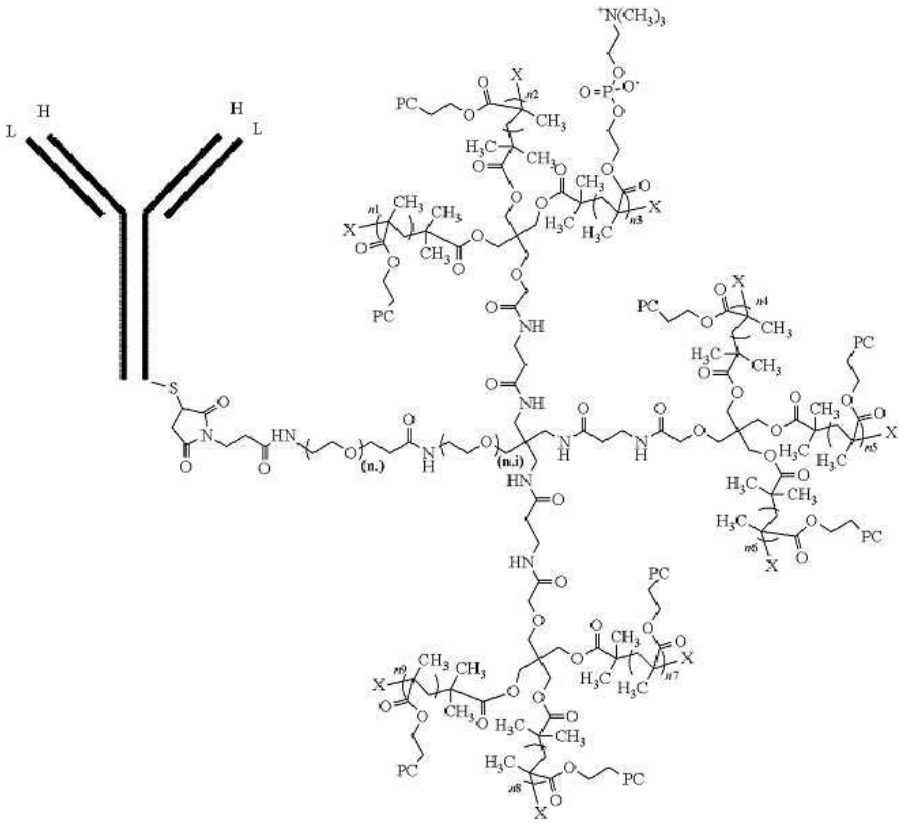


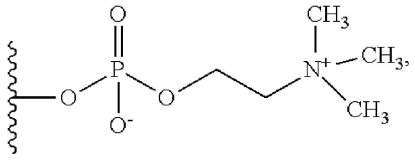
[0057] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는 다음과 같다:



, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 이중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 항-VEGF 및 항 IL-6 결합 모이어티를 포함한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (II)의 구조를 갖는다:



[0059] 여기서 "n."는 1 내지 50의 정수이고 "n.i"는 1 내지 50의 정수이고; 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는 다음과 같다:  , 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 이중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 항-VEGF 및 항 IL-6 결합 모이어티를 포함한다.

[0060] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계, 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계, 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양 상등액은 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었다. 일부 실시형태에서, 세포 배양 상등액을 가공하는 단계는 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 세포 및 세포 잔해 제거로 정화된다. 일부 실시형태에서, 용리제는 정화된 세포 배양 상등액을 포함한다.

[0061] 일부 실시형태에서는 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조건 하에서 세

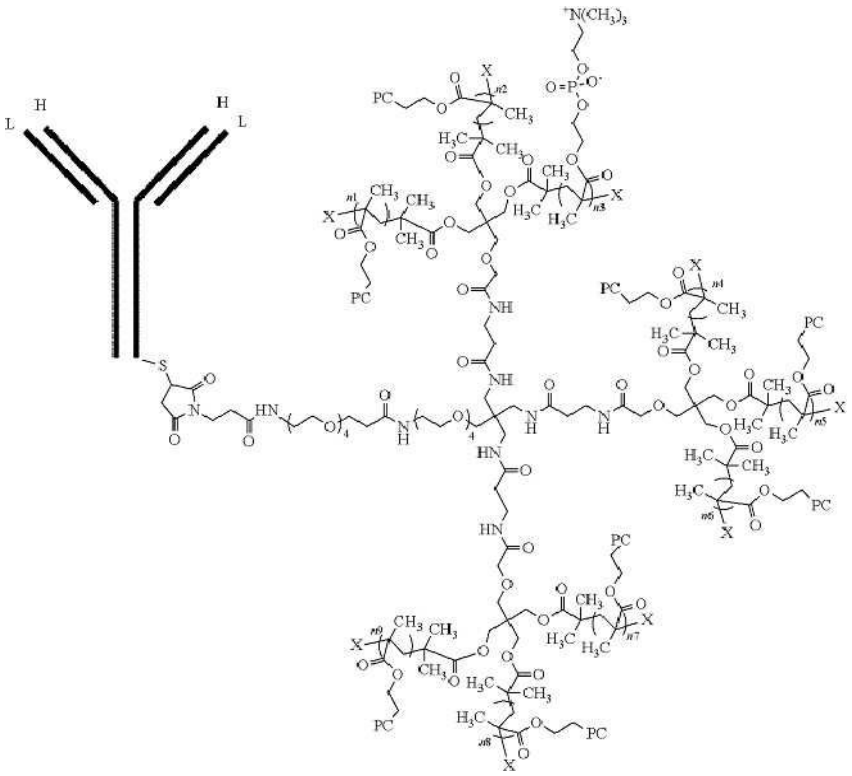
척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0062] 일부 실시형태에서는 생산물 생산 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 카오트로픽 제제를 제거하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 용출물을 수집하며, 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함한다.

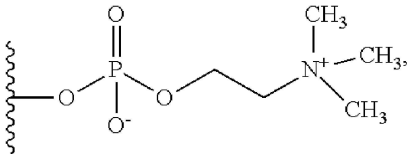
[0063] 일부 실시형태에서는 단백질 정제 시스템이다. 일부 실시형태에서, 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제, Tris를 포함하는 중간 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다.

[0064] 일부 실시형태에서는 단백질 정제 시스템이다. 일부 실시형태에서, 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제, 중간 Tris 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 칼럼은 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 리간드는 단백질 A 또는 단백질 G를 포함한다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제는 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 50mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 중간 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Tris 세척 완충제의 pH는 약 7.2이다. 일부 실시형태에서, 제2 세척 완충제의 pH는 약 7.8이다. 일부 실시형태에서, 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도는 약 2.8M이다. 일부 실시형태에서, 용출 완충제의 포름산나트륨 농도는 10mM을 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서는 항체 정제 시스템이다. 일부 실시형태에서, 이 시스템은 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 칼럼; 및 카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 이중특이적 항체이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-6에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 OG2072이다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 항체 접합체이다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 카오트로픽 제제는 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상의 농도는 각각 0.05 내지 3.5M이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액은 Tris를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 5mM이다. 일부 실시형태에서, 완충 용액의 pH는 5.5 초과이다. 일부 실시형태에서, 용출물은 바이러스성 불순물을 더 함유한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 Tris 및 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 가지며,



[0066] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는 다음과 같다:



, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서, R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 여기서 항체는 C449에서 중합체에 결합된다.

[0067] 일부 실시형태에서, 관심 표적 단백질은 세포 배양에 의해 생산된다. 일부 실시형태에서, 세포 배양은 CHO 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 핵산, 내독소, 소포제 또는 기타 소분자를 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 용리제는 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었다. 일부 실시형태에서, 생산물은 관심 단백질이다. 일부 실시형태에서, 불순물은 숙주 세포 단백질 불순물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 10mM

Na-인산염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 인산염-기반 종을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 세척 완충제는 50mM NaCl을 더 포함한다.

[0068] 일부 실시형태에서는 생산물 처리 방법이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하는 단계를 포함하며, 여기서 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 여기서 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 여기서 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 농도의 카오트로픽 염의 농도는 0M이며, 여기서 제2 농도의 카오트로픽 염의 농도는 4.0M이다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 염은 리튬, 리튬염, 마그네슘, 마그네슘염, 칼슘, 칼슘염, 구아니디늄 및/또는 구아니디늄염 중 하나 이상이다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 염은 염화마그네슘, 염화칼슘, 염화리튬 및 염산구아니디늄으로부터 선택된다.

[0069] 일부 실시형태에서, 완충 용액은 다음 중 하나 이상을 더 포함한다: 아세트산염, 구연산염, ACES, BES, 비신(Bicine), HEPES, MES, MOPS, MOPSO, TAPS, 트리신(Tricine), Bis-Tris, Bis-Tris 프로판, 카코딜산염(Cacodylate), CAPS, CAPSO, CHES, 글리신, 글리실글리신, 이미다졸, PIPES, TEA 또는 TES.

[0070] 일부 실시형태에서, 비특이적 상호작용을 무효화하기 위한 카오트로픽 제제를 포함하는 방법론을 사용하여 용액으로부터 원치않는 분자를 제거한다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 제제는 친화성 크로마토그래피 단계의 일부로서 사용된다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 제제는 이온 교환 크로마토그래피 단계의 일부로서 사용된다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피의 일부로서 사용되는 카오트로픽 제제는 요소(urea), 알코올 및 세제와 같이 낮은 전도성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 소수성 상호작용 수지를 포함하는 방법론을 사용하여 용액으로부터 원치않는 분자를 제거하며, 여기서 관심 단백질은 코스모트로픽(kosmotropic) 제제로 수지 상에 결합되며 카오트로픽 염에 대한 구배를 적용하는 동안 용출된다.

[0071] 세포 배양물로부터 수집할 때, 원하는 분자 종이 상당한 농도로 존재할 수 있지만, 숙주 세포 단백질, 세포 잔해, 핵산, 내독소 또는 원하는 분자 종의 순도를 손상시킬 수 있는 기타 분자와 같은 다른 원치않는 분자 종 또한 존재할 수 있다. 결합, 모양, 크기, 전하 및 기타 물리적 특성과 관련된 차별적인 특성을 기초로, 다양한 상등액 조성물을 분류 및 정제하는 것이 가능하게 된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종의 정제는 상기 원하는 분자 종의 투여의 결과로서 환자의 더 나은 결과 및 더 적은 합병증을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 원하는 분자 종의 효능 증가 또는 투여량 감소를 가능하게 할 수 있다.

[0072] 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 혈액에서 수집된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 혈장에서 수집된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 세포 배양물에서 수집된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 무-동물 성분 세포 배양물에서 수집된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 정화된 세포 배양 유체(clarified cell culture fluid: CCCF)에서 수집된다. 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종은 세포 상등액에서 수집된다.

[0073] 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 세균성이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 대장균이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 진핵성이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 사카로마이세스 세레비지에(S. cerevisiae)이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 포유동물이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 인간 세포에서 유래한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 일차 조직이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 확립된 세포주이다. 확립된 세포주의 비-제한적 예시에는 CHO 세포, HeLa 세포, 마우스 3T3 섬유아세포, HEK293 세포 및 KT-3 세포가 포함된다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 세포 유형의 혼합물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 단일 세포 유형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 림프구이다. 일부 실시형태에서, 세포 배양물은 T 세포이다.

[0074] 일부 실시형태에서, 원하는 분자 종에는 대상체에게 투여되었을 때 항체의 반감기를 연장하는 중합체성 모이어티를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체(예를 들어, KSI-301, KSI-501)가 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치않는 분자 종에는 숙주 세포 단백질(HCP)이 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 크로마토그래피는 단백질 A 기질을 사용하여 달성될 수 있으며, 여기서 특정 카오트로픽 제제를 적용하면 원하는 분자 종이 기질에 결합된 상태를 유지하면서 원치않는 분자 종을 효율적으로 용출할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법 및 시스템은 세포 배양물에서 수확된 세포 생산물의 정제 방법을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 세포 처리 진행에 따른 손실률을 낮추면서 높은 순도의 원하는 분자 종을 달성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 HCP의 수준을 감소시켜서 최종 약물 생산물을 투여할 때 환자의 합병증을 줄일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 세포 생산물을 정제와 관련된 비용 또는 시간을 줄일 수 있다.

[0075] 종종 전체 세포 추출물에는 원하는 분자 종뿐만 아니라 원치않는 불순물도 존재하기 때문에 세포 배양물의 수확 및 처리는 상당한 정제 및 수집을 위한 노력을 필요로 할 수 있다. 수집된 세포 배양물의 다중-단계 처리는 숙주 세포 단백질(HCP), 고분자량(HMW) 종 및 저분자량(LMW) 종과 같은 생산물-관련 불순물을 포함하는 불순물의 효율적인 제거를 가능하게 한다. 관심 단백질(예를 들어, 항체)에 대한 다중-단계 정제 공정의 첫 번째 단계에서, 일부 공정은 친화성 크로마토그래피를 사용하며, 여기서 결과에 따른 관심 단백질의 효율 및 순도는 모든 하류 정제 절차에 영향을 미친다. 추가적으로, 하류 공정 중의 친화성 크로마토그래피는 생산물을 농축하는데 기여하여 이후 처리 단계에서 비례적으로 더 작은 장치를 사용할 수 있게 할 수 있으며, 이는 비용 및 처리 과정에 소요되는 시간을 줄이는데 기여할 수 있다. 따라서, 후속 처리 단계를 위한 농축 수율의 손실 또는 손상없이 친화성 크로마토그래피 과정에서 불순물 제거를 최적화하는데 이점이 있다.

[0076] 일부 실시형태에서, 방법은 항체 및/또는 단백질을 정제하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 최적화된 세척 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0, pH 8.5, pH 9.0 또는 pH 6.0 및 pH 9.0 사이의 임의의 정수의 pH이다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 pH 7.0이다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 pH 7.2이다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 pH 6.0이다.

[0077] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM 또는 5mM 및 200mM 사이의 임의의 정수 단위의 인산나트륨(Na-인산염)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM Na-인산염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 50mM Na-인산염을 포함한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM 또는 5mM 및 200mM 사이의 임의의 정수 단위의 Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 50mM Tris를 포함한다.

[0079] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM, 10mM, 25mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM 또는 5mM 및 200mM 사이의 임의의 정수 단위의 Bis-Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 5mM Bis-Tris를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 50mM Bis-Tris를 포함한다.

[0080] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 50mM, 100mM, 250mM, 500mM, 750mM, 1M, 1.5M, 2M, 3M 또는 50mM 및 3M 사이의 임의의 정수 단위의 NaCl을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 2M NaCl을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 50mM NaCl을 포함한다.

[0081] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 1M, 1.5M, 1.65M, 2M, 2.8M, 3M, 4M, 5M 또는 1M 및 5M 사이의 임의의 정수 단위의 $MgCl_2$을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 2.8M $MgCl_2$를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 2M $MgCl_2$를 포함한다.

[0082] 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 카오트로프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 카오트로프 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 카오트로픽 양이온을 포함한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 카오트로픽 음이온을 포함한다. 카오트로픽 양이온의 비-제한적 예시에는 구아니디늄, 마그네슘, 칼슘, 나트륨 및 리튬이 포함된다. 카오트로픽 음이온의 비-제한적 예시에는 염화물, 황산염, 아세트산염, 구연산염, 질산염 및 아질산염이 포함된다. 일부 실시형태에서, 카오트로프 염은 CaCl2, 염화구아니디늄, 아세트산리튬, LiCl, MgCl2, MgSO4, NaNO3 또는 NaCl이다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제는 둘 이상의 카오트로프 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 카오트로프는 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.5M, 1M, 1.5M, 1.65M, 2M, 2.8M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M, 10M 또는 0.05M 및 10M 사이의 임의의 정수 단위로 최적화된 세척 완충제에 존재한다. 일부 실시형태에서, 카오트로프는 1M로 최적화된 세척 완충제에 존재한다. 일부 실시형태에서, 카오트로프는 2.8M로 최적화된 세척 완충제에 존재한다. 일부 실시형태에서, 최적화된 세척 완충제에 존재하는 카오트로프의 농도는 정제하는 단백질 및/또는 항체에 대해 최적화된다.

[0083] 관련성

[0084] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 친화성 크로마토그래피 단계의 용출물의 HCP 수준을 완화시키는 세척 절차가 확립되었다. 완충제 내의 완충 강도, 전도성 및 pH에 대한 범위 또한 정의되었다. 용출물의 HCP 수준을 감소시키는 것을 가능하게 하는 염이 식별되었다. 호프마이스터(Hofmeister) 시리즈에 따라 염의 HCP 수준 감소 효율이 카오트로픽 강도와 관련성이 있음이 발견되었다. 또한 이러한 접근 방식이 다른 항체 유형 및 다른 Fc 융합 단백질에 대해 작동함이 발견되었으며, 이에 따라 본 명세서에 개시된 바와 같은 본 발명의 개념은 임의의 항체

및/또는 단백질과 함께 사용하는데에 일반적으로 적용될 수 있다. 또한 이 기술은 2개의 서로 다른 단백질 A 친화성 크로마토그래피 수지와 함께 작동하는 것으로 나타났다.

[0085] 여기 기술된 작업은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 유래한 서로 다른 항체 및 항체-유사 작제물을 사용하였다. CHO 발현 시스템은 인간에서 생산되는 것과 유사한 번역-후 변형이 있는 복잡한 단백질을 생산하는 능력에 따라 산업에서 생물의약품 생산을 위해 사용되는 가장 일반적인 시스템이다. 지금까지, 6,000개를 초과하는 CHO HCP가 확인되었다.

[0086] 포유동물 세포의 생물약학적 생산물의 하류 공정는 현재 총 생산 비용의 큰 부분을 차지한다. 하류 공정의 주된 문제는 숙주 세포 단백질(HCP)을 제거하는 것이다. HCP는 생물약학적 약물 생산물과 함께 정제될 수 있는 공정-관련 불순물이다. 하류 공정에는 전형적으로 단백질 A 친화성 크로마토그래피 단계 후 응집물, 생산물 변이체, HCP 및 숙주 세포 DNA를 제거하는 추가 연마 단계가 포함된다. 많은 같은 HCP가 단백질 A 크로마토그래피 단계 후 생물약학적 산업에 걸쳐 발견된다. 이것은 산업에서 거의 보편적으로 항체 및 항체-유사 작제물의 생산을 위해 CHO 세포를 사용할 뿐만 아니라 매우 유사한 조건으로 단백질 A 친화성 크로마토그래피 단계를 사용함에 따른 결과이다. 후자의 경우 생물의약품은 생리학적 조건(중성 pH 및 생리학적 염 조건)에서 수지에 적용되며, 생리학적 조건뿐만 아니라 높은 염화나트륨 농도의 완충제로 수지를 세척한 다음 용출 단계를 통해 생산물을 수집한다. 이러한 플랫폼 접근 방식의 결과로서, 친화성 크로마토그래피 용출물은 같은 HCP 및 유사한 수준의 많은 것을 함유한다. 일부이지만 생물약학적 생산물의 유형을 기반으로 하는 작은 변화가 있다. 조사에서, 69%의 회사가 약물 생산 중 개별 HCP와 관련된 문제를 경험했으며 생물제조에서 가장 큰 문제 중 하나로 간주되는 것으로 나타났다. 일부 HCP는 높은 위험이 있으며 여기에는 생산물 분자 또는 제형화에 사용되는 부형제를 분해할 가능성이 있는 면역원성, 생물학적 활성 또는 효소적 활성이 있는 것이 포함될 수 있다. 공정 개발에서, HCP를 제거하는 것의 필요성은 인식하기 쉽지만, HCP의 수준을 가능한 많이 완화시키는 것은 어렵고, 하지만 중요하다. 이러한 고-위험 HCP 중 일부는 리파제(lipase)이며, 이는 지방 및 지질을 분해하는 효소이다. 리파제는 제형화에서 종종 사용되는 폴리솔베이트(polysorbate)도 분해할 수 있으므로, 치료제의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 유사하게, 가수분해효소(hydrolase)가 폴리솔베이트 분해에 대한 근본 원인이 된다는 것이 발견되었다. 이러한 HCP는 이후 안정성을 손상시킬 수 있으며 약물 제품의 유통 기한을 줄일 수 있다. 폴리솔베이트의 분해는 제형화에서 입자 형성으로 이어져, 안전성 문제를 일으킬 수도 있다. 그 다음, 세린 프로테아제, 카텝신 및 메탈로프로티나제와 같은 프로테아제는 항체, 항체-유사 작제물 및 기타 단백질을 분해할 수 있다. 결론적으로, 다양한 HCP 종이 생물학적 제형에서 활성 성분과 부형제 모두에 영향을 미칠 수 있다. 중요하게도, HCP는 인간에서 면역원성이 있을 가능성도 있다. 원치않는 면역 반응은 HCP에 의해 유발되는 가장 심각한 피해일 수 있으며 치명적일 수도 있다. 포스포리파제(phospholipase) B-유사 2 단백질이 레브리키주맙(lebrikizumab)에서 발견되었으며 임상 연구로부터의 데이터에 기반하여 이는 대략적으로 90%의 대상자에서 면역 반응을 촉발하는 것으로 나타났다. 고/위험 HCP 및 이들의 잠재적 영향에 대한 개요를 표 5a에 나타내었다. 이러한 모든 이유 때문에, HCP 수준을 가능한 많이 완화시키는 것은 중요하다. 일부 HCP는 생산물에 비특이적으로 결합하며 이후 함께 정제된다. 이러한 HCP를 제거하는 것이 가장 큰 문제이다. 본 연구는 이러한 생산물과 HCP의 비특이적 상호작용을 해체하여 HCP 수준을 완화시키는 것에 집중되어 있다. 이러한 접근 방식을 통해 제거된 HCP 유형의 특징은 본 연구의 범위를 벗어나 있다. 여기서 본 발명자들은 카오트로픽 염을 함유하는 세척 단계의 적용을 통해 HCP의 수준이 유의적으로 완화될 수 있음을 보여준다. 어떤 HCP의 유형이 제거되는지는 두고 볼 일이다.

[0087] 정의

[0088] 용어 "세포"에는 원핵 및 진핵 세포가 포함되며, 세균 세포, 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 비-인간 동물 세포, 인간 세포 또는 예를 들어 하이브리도마와 같은 세포 융합체가 더 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포에서 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포는 진핵 세포이며 다음 세포들로부터 선택된다: CHO(예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 망막 세포, 베로(Vero), CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431(표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르톨리 세포(Sertoli cell), BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포 및 앞서 언급된 세포에서 유래된 세포주. 일부 실시형태에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자를 포함한다.

[0089] 본 명세서에 사용된 "친화성 크로마토그래피"는 생물분자들 사이의 특이적 가역적 상호작용을 이용하여 크로마토그래피성 분리를 일으키는 방법이다.

[0090] 본 명세서에 사용된 "단백질 A 크로마토그래피"는 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 대한 단백질 A의 IgG 결합 도메인의 친화성에 의지하는 특이적 친화성 크로마토그래피 방법을 의미한다. 면역글로불린에서, Fc 부분은 면역글로불린 불변 도메인 CH2 및 CH3 또는 이들과 실질적으로 유사한 면역글로불린 도메인을 포함한다. 단백질 A는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 세포벽의 천연 단백질에서 유래되었으며, 재조합 또는 합성 방법에 의해 생산된 단백질 A뿐만 아니라 단백질 A의 변이체는 Fc 영역에 결합하는 능력을 유지할 수 있다. 단백질 A 크로마토그래피는 단백질 A 칼럼에서와 같이 종종 고체 지지체에 고정된다. 단백질 G 및 단백질 L 또한 유사한 방식으로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고체 지지체는 단백질 A에 부착되는 매트릭스이다.

[0091] 본 명세서에 사용된 용어 "친화성 크로마토그래피 매트릭스" 또는 "AC 매트릭스"는 관심 단백질과 AC 매트릭스 사이, 예를 들어 수용체와 리간드, 효소와 기질 또는 항원과 항체 사이의 고특이적 결합 상호작용을 기반으로 생화학적 혼합물의 분리를 가능하게 하는 고체상 매체, 전형적으로 겔 또는 수지의 의미로 의도된다. 따라서, 고체상 매체는 완충제 조건에 따라 관심 단백질이 가역적으로 부착할 수 있는 표적을 포함한다. AC 매트릭스를 포함할 수 있는 고정된 또는 고체상 매체의 비-제한적 예시에는 아가로스 비드(agarose bead)(예를 들어, 상업적으로 이용 가능한 세파로스(Sepharose) 매트릭스)와 같은 겔 매트릭스 및 다공성 유리 비드(예를 들어, 상업적으로 이용 가능한 ProSep 매트릭스)와 같은 유리 매트릭스가 포함된다.

[0092] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 분리하기 위한 방법론은 칼럼 크로마토그래피를 포함한다. 이 공정에서, AC 매트릭스가 칼럼 내에 형성되고, 관심 단백질을 함유하는 생화학적 혼합물이 이 칼럼을 통해 흐른다. 관심 단백질은 AC 매트릭스에 결합하게 된다. 이후 칼럼을 통해 세척 용액을 흘려 칼럼을 세척하는 단계가 뒤따르고, 칼럼을 통해 용출 완충제를 흘려 칼럼에서 관심 단백질을 용출시키는 단계가 뒤따른다.

[0093] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 분리하기 위한 방법론은 막(membrane) 크로마토그래피를 포함한다. 막 크로마토그래피 방법은 막성 시트에 맞도록 구성된 AC 매트릭스에 의지하며, 여기서 관심 단백질을 함유하는 생화학적 혼합물이 막을 통해 흐른다. 막 크로마토그래피의 비-제한적 예시는 싸토리우스 사의 Sartobind Rapid A이다. 관심 단백질이 적어도 약 500kDa인 일부 실시형태에서, 막 크로마토그래피가 바람직한 크로마토그래피 방법이다.

[0094] 본 발명에 사용할 수 있는 추가 친화성 크로마토그래피에는 예를 들어 단백질 G, 단백질 A/G 및 단백질 L 칼럼이 포함되며, 이들 각각은 또한 이 분야에서 확립된 결합 특성을 갖는 면역글로불린-결합 세균성 단백질이다. 따라서, 단백질 G 매트릭스, 단백질 A/G 매트릭스 또는 단백질 L 매트릭스인 AC 매트릭스는 항체, 항체 단편 또는 Fc 영역을 포함하는 단백질(예를 들어, Fc 융합 단백질)을 정제하는데 사용될 수 있다.

[0095] 본 개시내용이 특히 단백질 A를 사용한 항체의 정제와 관련하여 기술되지만, 임의의 단백질이 특정 AC 매트릭스에 선택적으로 결합하는 것으로 이 분야에 알려져 있는 한, 이 단백질은 본 명세서에 기술된 세척 방법을 사용한 정제에 수용적이다.

[0096] 본 명세서에 사용된 "카오트로픽 제제"는 비-공유 결합력을 약화시키거나 방해하고 생물분자 시스템 내 엔트로피를 증가시키는 분자이다. 일부 실시형태에서, 염화리튬, 염화마그네슘, 염화칼슘 및/또는 염화구아니디늄이 카오트로픽 제제이다. 카오트로픽 제제의 비-제한적 예시에는 부탄올, 염화칼슘, 에탄올, 염화구아니디늄, 과염소산리튬, 아세트산리튬, 염화마그네슘, 페놀, 프로판올, 황산 도데실 나트륨, 티오요소(thiourea) 및 요소가 포함된다. 카오트로픽 제제에는 단백질의 용해성에 영향을 미치는 염이 포함된다. 카오트로픽 음이온에는 예를 들어 염화물, 질산염, 브롬화물, 염소산염, 요오드화물, 과염소산염 및 티오시안산염이 포함된다. 카오트로픽 양이온에는 예를 들어 리튬, 마그네슘, 칼슘 및 구아니디늄이 포함된다.

[0097] 본 명세서에 사용된 "용리제"(eluent 또는 eluant)는 크로마토그래피의 이동상에서 담체 부분을 의미한다. 액체 크로마토그래피에서, 용리제는 칼럼에 투입하는 액체 용매이며, 가스 크로마토그래피의 경우에는 담체 가스이다. 일부 실시형태에서, 용리제는 항체, 숙주 세포 단백질(HCP) 및 기타 관심 분자를 포함하는 담체 액체 용매를 의미한다.

[0098] 본 명세서에 사용된 "용출물"(eluate)은 크로마토그래피 단계에서 나오는 분석 물질을 의미하며, 고체상을 통과하는 분석체 및 용질 모두를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용출물은 구체적으로 추가 공정을 위해 수집되는 분석 물질을 의미한다. 일부 실시형태에서, 용출물은 수확된 세포에서 수집된 항체를 의미하며, 다르게는 "생산물 용출물"로 알려진다. 일부 실시형태에서, 용출물은 수확된 세포에서 수집된 HCP를 의미하며, 다르게는 "세척 용출물"로 알려진다.

[0099] "신생혈관 장애"는 변형된 조절장애가 있거나 조절되지 않는 혈관신생을 특징으로 하는 장애 또는 질환 상태이

다. 신생혈관 장애의 예시에는 신생성 전환(예를 들어, 암) 및 당뇨병성 망막증, 나이-관련 황반변성 및 망막 정맥 폐쇄증을 포함하는 안구 신생혈관 장애가 포함된다.

[0100] "안구 신생혈관" 장애는 환자의 눈의 변형된 조절장애가 있거나 조절되지 않는 혈관신생을 특징으로 하는 장애이다. 이러한 장애에는 망막 정맥 폐쇄증, 시신경 유두 신혈관생성, 홍채 신혈관생성, 망막 신혈관생성, 맥락막 신혈관생성, 각막 신혈관생성, 유리체 신혈관생성, 녹내장, 판누스(pannus), 익상편(pterygium), 황반부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반부종, 혈관성 망막병증, 망막 변성, 포도막염(uveitis), 망막의 염증성 질환 및 증식성 유리체망막병증이 포함된다.

[0101] 용어 항체에는 온전한 항체 및 이의 결합 단편이 포함된다. 결합 단편은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 의미한다. 결합 단편의 예시에는 Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자(예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다. scFv 항체는 문헌[Houston JS. 1991. Methods in Enzymol. 203:46-96]에 기술되어 있다. 또한, 항체 단편에는 기능적 항원 결합 부위에 VH 도메인, 즉 VL 도메인과 함께 조립할 수 있는 VH 도메인 또는 VL 도메인, 즉 VH 도메인과 함께 조립할 수 있는 VL 도메인의 특징을 가져 전장 항체의 항원 결합 특성을 제공하는 단일 사슬 폴리펩타이드가 포함된다.

[0102] 항체가 이의 표적 항원(들)에 특이적으로 결합한다는 것은 적어도 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 또는 10^{10} M^{-1}의 친화도를 의미한다. 특이적 결합은 규모에서 검출 가능할 정도로 높으며 적어도 하나의 관련없는 표적에 대해 발생하는 비-특이적 결합으로부터 구별될 수 있다. 특이적 결합은 특정 기능기들 사이의 결합 형성 또는 특정 공간적인 적합성(예를 들어, 자물쇠와 열쇠 유형)의 결과일 수 있는 반면 비특이적 결합은 일반적으로 반데스발스 힘의 결과이다. 특이적 결합은 반드시 항체 또는 융합 단백질이 유일한 하나의 표적에 결합함을 나타내지는 않는다.

[0103] 기본 항체 구조 단위는 하위단위의 4량체이다. 각각의 4량체는 2개의 동일한 쌍의 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50 내지 70kDa)을 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 이 가변 영역은 처음에는 절단 가능한 신호 펩타이드에 연결된 상태로 발현된다. 신호 펩타이드가 없는 가변 영역은 때로는 성숙한 가변 영역으로 지칭된다. 따라서, 예를 들어, 경쇄 성숙 가변 영역은 경쇄 신호 펩타이드가 없는 경쇄 가변 영역을 의미한다. 그러나, 가변 영역에 대한 언급은 신호 서열이 반드시 존재함을 의미하지 않으며; 사실 신호 서열은 일단 항체 또는 융합 단백질이 발현 및 분비되면 절단된다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 쌍은 항체의 결합 영역을 정의한다. 경쇄 및 중쇄 각각의 카복시-말단 부분은 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 정의한다. 중쇄 불변 영역은 주로 효과기(effector) 기능을 담당한다. IgG 항체에서, 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 영역으로 나뉜다. CH1 영역은 이황화물 및 비공유 결합에 의해 경쇄 불변 영역에 결합한다. 힌지 영역은 항체의 결합 및 효과기 영역 사이에 유연성을 제공하며 또한 4량체 하위단위에서 2개의 중쇄 불변 영역 사이의 분자 간 이황화물 결합을 위한 부위도 제공한다. CH2 및 CH3 영역은 효과기 기능 및 FcR 결합의 주요 부위이다.

[0104] 경쇄는 카파(kappa) 또는 람다(lambda)로 분류된다. 중쇄는 감마(gamma), 뮤(mu), 알파(alpha), 델타(delta) 또는 엡실론(epsilon)으로 분류되며, 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 항체 아이소타입(isotype)을 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 세그먼트(segment)에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 세그먼트를 포함한다. (일반적으로, 문헌[Fundamental Immunology(Paul, W., ed., 2^{nd} ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7](모든 목적을 위해 이의 전체가 참조에 의해 원용됨)을 참조할 수 있음).

[0105] 각 경쇄/중쇄 쌍의 성숙 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 따라서, 온전한 항체는 2개의 결합 부위를 가지며, 즉 2가(divalent)이다. 천연 항체에서, 결합 부위는 동일하다. 그러나, 2개의 결합 부위가 서로 다른 이중특이적 항체를 만들 수 있다(예를 들어, 문헌[Songsivilai S, Lachmann PC. 1990. Bispecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. Clin Exp Immunol. 79:315-321]; 및 문헌[Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. 1992. Formation of bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol. 148: 1547-1553] 참조). 가변 영역은 모두 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR)이 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 불리는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 동일한 일반적인 구조를 나타낸다. 각 쌍의 2개의 사슬에서 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬되어, 특이적 에피토프에 결합하는 것을 가능하게 한다. N-말단에서 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄 모두 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 도메인을 포함한다. 편의상, 가변 중쇄 CDR은 CDR_H1, CDR_H2 및 CDR_H3으로 지칭될 수 있으며; 가변 경쇄 CDR은 CDR_L1, CDR_L2 및 CDR_L3로 지칭될 수 있다. 각 도메인에

대한 아미노산 배정은 문헌[Kabat EA, et al. 1987 and 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, MD)] 또는 문헌[Chothia C, Lesk AM. 1987. Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. J Mol Biol 196:901-917]; 문헌[Chothia C, et al. 1989. Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions. Nature 342:877-883]의 정의에 따른다. Kabat은 또한 서로 다른 중쇄 가변 영역 사이 또는 서로 다른 경쇄 가변 영역 사이에 해당하는 잔기가 같은 번호로 배정되는 널리 사용되는 넘버링 규정(Kabat numbering)을 제공한다. Kabat 넘버링을 항체 불변 영역에 사용할 수 있지만, EU 넘버링이 본 출원의 경우와 같이 보다 일반적으로 사용된다. 본 명세서에 개시된 예시적인 항체에 대한 특이적 서열이 제공되지만, 단백질 사슬의 발현 후 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카복시 말단에서 하나 내지 여러 개의 아미노산, 특히 중쇄 C-말단 라이신(lysine) 잔기가 누락되거나 분자 중 일부 또는 모두에서 유도체화될 수 있음을 인정할 것이다.

[0106] 용어 "에피토프"(epitope)는 항체 또는 세포 외 트랩(trap) 세그먼트가 결합하는 항원 상의 부위를 의미한다. 단백질 상의 에피토프는 하나 이상의 단백질의 3차 폴딩(folding)에 의해 병치된 연속 아미노산 또는 비연속 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프(선형 에피토프로도 알려짐)는 전형적으로 변성 용매에 노출된 상태에서 유지되지만 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프(구조적 에피토프로도 알려짐)는 전형적으로 변성 용매 처리로 손실된다. 에피토프는 전형적으로 고유한 공간적 형태에서 적어도 3개, 그리고 보다 일반적으로는 적어도 5개 또는 8 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 형태를 결정하는 방법에는 예를 들어 x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명이 포함된다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)]를 참고할 수 있다.

[0107] 같거나 겹치는 에피토프를 인식하는 항체는 표적 항원에 대해 한 항체가 다른 항체의 결합과 경쟁하는 능력을 보여주는 단순 면역검정에서 식별될 수 있다. 항체의 에피토프는 또한 이의 항원에 결합하는 항체(또는 Fab 단편)의 X-선 결정학을 통해 접촉 잔기를 식별하여 정의할 수 있다.

[0108] 대안적으로, 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 2개의 항체는 같은 에피토프를 갖는다. 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우 2개의 항체는 겹치는 에피토프를 갖는다.

[0109] 항체 사이의 경쟁은 검사 중인 항체가 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 저해하는 검정을 통해 결정된다(예를 들어, 문헌[Junghans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990] 참조). 과잉(예를 들어, 적어도 2배, 5배, 10배, 20배 또는 100배)의 검사 항체가 적어도 50%로 참조 항체의 결합을 저해하는 경우 검사 항체는 참조 항체와 경쟁한다. 일부 실시형태에서 검사 항체는 경쟁적 결합 검정에서 측정된 것으로서 75%, 90% 또는 99%로 참조 항체의 결합을 저해한다. 경쟁 검정을 통해 식별된 항체(경쟁 항체)에는 참조 항체와 같은 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애가 발생하도록 참조 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체가 포함된다.

[0110] 용어 "환자"에는 예방적 또는 치료적 처리를 제공받는 인간 및 기타 포유동물 대상체가 포함된다.

[0111] 보존적 또는 비보존적인 것으로 아미노산 치환을 분류하는 목적을 위해, 아미노산을 다음과 같이 그룹화한다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V(사슬 방향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환에는 같은 분류 내 아미노산 사이의 치환이 포함된다. 비-보존적 치환은 이러한 분류 중 하나의 구성원을 다른 것의 구성원으로 교환하는 것을 구성한다.

[0112] 백분율 서열 동일성은 가변 영역에 대한 Kabat 넘버링 규정 또는 불변 영역에 대한 EU 넘버링에 따라 최대로 정렬된 항체 서열로 정의된다. 정렬 후, 대상 항체 영역(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙 가변 영역)을 참조 항체의 같은 영역과 비교하는 경우, 대상 및 참조 항체 영역 사이의 백분율 서열 동일성은 대상 및 참조 항체 영역 모두에서 같은 아미노산이 차지하는 위치의 수를 두 영역의 정렬된 위치의 총 수로 나눈 것으로, 갭은 계산하지 않고, 100을 곱하여 백분율로 전환한 것이다. 다른 서열의 서열 동일성은, 기본 갭 매개변수를 사용한, Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0(Genetics Computer Group, 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재)의 BESTFIT, FASTA 및 TFASTA와 같은 알고리즘을 사용한 서열 정렬을 통해 또는 검사 및 최상의 정렬을 통해(즉, 비교 창에 걸쳐 가장 높은 서열 유사성 백분율을 도출함) 결정할 수 있다. 서열 동일성의 백분율은 비교 창에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 잔기가 두 서열 모두에서 발생한 위치의 수를 결정하여 일치하는 위치의 수를 획득하고, 일치하는 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수(즉,

창 크기)로 나누고, 이 결과에 100을 곱해서 서열 동일성의 백분율을 획득하는 것을 통해 계산된다.

[0113] 하나 이상의 언급된 요소를 "포함"하는 조성물 또는 방법은 구체적으로 언급되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 포함하는 조성물은 항체를 단독으로 또는 다른 성분과의 조합으로 포함할 수 있다.

[0114] 용어 "항체-의존적 세포 독성"(antibody-dependent cellular cytotoxicity) 또는 ADCC는 용해 활성을 보유한 면역 세포(효과기 세포로도 지칭됨)와 항체-코팅된 표적 세포(즉, 결합된 항체가 있는 세포)의 상호작용에 의존하여 세포 사멸을 유도하는 메커니즘이다. 이러한 효과기 세포에는 자연 살해 세포, 단핵구/대식세포 및 호중구가 포함된다. ADCC는 세포에 결합된 항체의 Fc 영역과 호중구, 대식세포 및 자연 살해 세포와 같은 면역 효과기 세포 상의 Fcγ 수용체, 특히 FcγRI 및 FcγRIII 사이의 상호작용에 의해 촉발된다. 표적 세포는 매개하는 효과기 세포의 유형에 따라 식세포 작용(phagocytosis) 또는 용해(lysis)에 의해 제거된다. 항체-코팅된 표적 세포의 사멸은 효과기 세포 활성의 결과로서 발생한다.

[0115] 용어 옵소닌화(opsonization)는 "항체-의존성 세포성 식세포 작용" 또는 ADCP로도 알려져 있으며, 항체-코팅된 세포의 전체 또는 일부가 면역글로불린 Fc 영역에 결합하는 식세포 작용 면역 세포(예를 들어, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포)에 의해 내재화되는 과정을 의미한다.

[0116] 용어 "보체-의존성 세포독성" 또는 CDC는 표적-결합 항체의 Fc 효과기 도메인(들)이 표적 세포막에 구멍을 형성하는 것으로 마무리되는 일련의 효소 반응을 활성화하는 세포 사멸을 유도하는 메커니즘을 의미한다. 전형적으로, 항체-코팅된 표적 세포의 것과 같은 항원-항체 복합체가 결국 표적 세포 사멸로 이어지는 보체 캐스캐이드(cascade)를 활성화하는 보체 성분 C1q에 결합하여 활성화한다. 보체의 활성화는 또한 백혈구의 보체 수용체(예를 들어, CR3)에 결합하여 ADCC를 가능하게 하는 표적 세포 표면 상의 보체 성분의 파면을 초래할 수 있다.

[0117] 인간화 항체는 비-인간 "공여체"(donor) 항체의 CDR이 인간 "수용체"(acceptor) 항체 서열에 이식된 유전자 조작된 항체이다(예를 들어, Queen, US 5,530,101 및 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557 참조). 수용체 항체 서열은 예를 들어 성숙 인간 항체 서열, 이러한 서열의 합성물, 인간 항체 서열의 공통 서열 또는 생식세포계열 영역 서열일 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체로부터의 일부 또는 모든 CDR 및 존재하는 경우 전적으로 또는 실질적으로 인간 항체 서열로부터의 가변 영역 프레임워크 서열 및 불변 영역을 갖는 항체이다. 유사하게, 인간화 중쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체 중쇄로부터의 적어도 하나, 둘 및 일반적으로는 셋의 CDR 모두 및 존재하는 경우 실질적으로 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 유사하게, 인간화 경쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여체 항체 경쇄로부터의 적어도 하나, 둘 및 일반적으로는 셋의 CDR 모두 및 존재하는 경우 실질적으로 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 나노바디 및 dAb 이외에, 인간화 항체는 인간화 중쇄 및 인간화 경쇄를 포함한다. 인간화 항체의 CDR은 해당 잔기의 적어도 85%, 90%, 95% 또는 100%(Kabat으로 정의된 것)가 각각의 CDR 사이에 동일한 경우 실질적으로는 비-인간 항체의 해당 CDR로부터 유래한다. 항체 사슬의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체 사슬의 불변 영역은 Kabat으로 정의된 해당 잔기의 적어도 85, 90, 95 또는 100%가 동일한 경우 각각 실질적으로 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 유래한다.

[0118] 인간화 항체는 종종 마우스 항체로부터의 모든 6개의 CDR(Kabat으로 정의된 것일 수 있음)을 통합하지만, 또한 모든 CDR보다 적은 CDR(예를 들어, 마우스 항체로부터의 적어도 3, 4 또는 5개의 CDR)로 만들어질 수 있다(예를 들어, 문헌[De Pascalis R, Iwahashi M, Tamura M, et al. 2002. Grafting "Abbreviated" Complementary-Determining Regions Containing Specificity-Determining Residues Essential for Ligand Contact to Engineer a Less Immunogenic Humanized Monoclonal Antibody. J Immunol. 169:3076-3084]; 문헌[Vajdos FF, Adams CW, Breece TN, Presta LG, de Vos AM, Sidhu, SS. 2002. Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. J Mol Biol. 320: 415-428]; 문헌[Iwahashi M, Milenic DE, Padlan EA, et al. 1999. CDR substitutions of a humanized monoclonal antibody (CC49): Contributions of individual CDRs to antigen binding and immunogenicity. Mol Immunol. 36:1079-1091]; 문헌[Tamura M, Milenic DE, Iwahashi M, et al. 2000. Structural correlates of an anticarcinoma antibody: Identification of specificity-determining regions (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only. J Immunol. 164:1432-1441]).

[0119] 키메라 항체는 비-인간(예를 들어, 마우스) 항체의 경쇄 및 중쇄의 성숙 가변 영역이 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 조합된 항체이다. 이러한 항체는 실질적으로 또는 전적으로 마우스 항체의 결합 특이성을 유지하며, 약

2/3가 인간 서열이다.

[0120] 베니어 항체(veneered antibody)는 CDR의 일부 및 일반적으로는 모두 및 비-인간 항체의 비-인간 가변 영역 프레임워크 잔기의 일부를 유지하지만 B-세포 또는 T-세포 에피토프에 기여할 수 있는 다른 가변 영역 프레임워크 잔기, 예를 들어 노출된 잔기(Padlan EA. 1991. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol. 28:489-98)가 인간 항체 서열의 해당 위치의 잔기로 대체된 인간화 항체의 유형이다. 이 결과물은 CDR이 전적으로 또는 실질적으로 비-인간 항체로부터 유래하고 비-인간 항체의 가변 영역 프레임워크가 치환을 통해 보다 인간과 유사하게 만들어진 항체이다. 인간 항체는 인간으로부터 분리되거나 인간 면역글로불린 유전자의 발현(예를 들어, 형질전환 마우스에서, 시험관내 또는 파지 디스플레이를 통함)으로부터 생성할 수 있다. 인간 항체의 생산 방법에는 문헌[Ostberg L, Pursch E. 1983. Human x (mouse x human) hybridomas stably producing human antibodies. Hybridoma 2:361-367]; 문헌[Ostberg, 미국 특허 제4,634,664호]; 및 문헌[Engleman et al., 미국 특허 제4,634,666호]의 트리오마(trioma) 방법, 인간 면역글로불린 유전자를 포함한 형질전환 마우스의 사용(예를 들어, Lonberg et al., WO93/12227(1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) 참조) 및 파지 디스플레이 방법(예를 들어, Dower et al., WO 91/17271 및 McCafferty et al., WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 및 US 5,565,332 참조)이 포함된다.

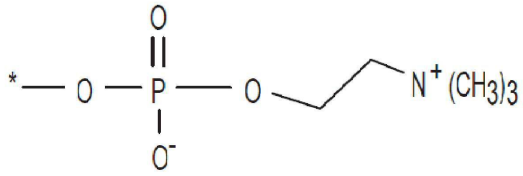
[0121] "중합체"는 함께 연결된 일련의 단량체 군을 의미한다. 중합체는 단일 단량체(동종중합체) 또는 서로 다른 단량체(이종중합체)의 여러 단위체로 이루어진다. 고 분자량의 중합체는 아크릴산염, 메타크릴산염, 아크릴아마이드, 메타크릴아마이드, 스티렌, 비닐-피리딘, 비닐-피롤리돈 및 아세트산 비닐과 같은 비닐 에스터를 포함하지만 이로 제한되지 않는 단량체로부터 제조된다. 추가적인 단량체가 고 분자량 중합체에 유용하다. 두 가지의 서로 다른 단량체를 사용하는 경우, 두 가지의 단량체를 "공단량체"(comonomer)로 부르며, 이는 서로 다른 단량체가 공중합되어 단일 중합체를 형성함을 의미한다. 중합체는 선형이거나 분지형일 수 있다. 중합체가 분지형인 경우, 각 중합체 사슬은 "중합체 암"(polymer arm)으로 지칭된다. 개시 모이어티에 연결된 중합체 암의 말단은 근위 말단이고, 중합체 암의 성장하는 사슬 말단은 원위 말단이다. 중합체 암의 성장 사슬-말단 상에서, 중합체 암 말단기는 라디칼 소거제 또는 다른 기일 수 있다.

[0122] "개시제"(initiator)는 단량체 또는 공단량체를 사용하여 중합을 개시할 수 있는 화합물을 의미한다. 중합은 통상적인 유리 라디칼 중합 또는 제어된/"리빙"(living) 라디칼 중합, 예를 들어 원자 이동 라디칼 중합(ATRP), 가역적 첨가-단편화-종결(RAFT) 중합 또는 나이트록사이드 매개 중합(NMP)일 수 있다. 중합은 "가성"(pseudo) 제어 중합, 예를 들어 변성 전이일 수 있다. 개시제가 ATRP에 적합한 경우, 개시제는 균일 분해되어 라디칼 중합을 개시할 수 있는 라디칼인 개시제 단편 I 및 성장 중합체 사슬의 라디칼과 반응하여 중합을 가역적으로 종결시키는 라디칼 제거제 I'을 형성할 수 있는 불안정한 결합을 함유한다. 라디칼 제거제 I'은 전형적으로 할로겐이지만, 나이트릴과 같은 유기 모이어티일 수도 있다. 일부 실시형태에서, 개시제는 ATRP를 통한 중합을 위한 부위로서 하나 이상의 2-브로모아이소부티레이트기를 함유한다.

[0123] "화학적 링커"는 반감기 연장 모이어티 및 단백질과 같은 2개의 기를 함께 연결하는 화학적 모이어티를 의미한다. 링커는 절단 가능하거나 절단-불가일 수 있다. 절단 가능한 링커는 다른 것들 중에서도 가수분해 가능성, 효소적으로 절단 가능성, pH 민감성, 광불안전성 또는 이황화물 링커일 수 있다. 다른 링커에는 동종이중기능성 및 이종이중기능성 링커가 포함된다. "연결기"는 생물활성제에 대한 하나 이상의 결합으로 이루어지는 공유 결합을 형성할 수 있는 기능기이다. 비-제한적 예시에는 WO2013059137(참조에 의해 원용됨)의 표 1에 설명된 것들이 포함된다.

[0124] 용어 "반응성 기"는 다른 화학적 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 기를 의미하며, 즉 적합한 반응 조건 하에서 공유적으로 반응성이고, 일반적으로 다른 물질에 대한 부착 지점을 나타낸다. 반응성 기는 말레이미드 또는 숙신이미딜 에스터와 같은 모이어티이며, 다른 모이어티 상의 기능기와 화학적으로 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다. 반응성 기에는 일반적으로 친핵체, 친전자체 및 광활성화 가능한 기가 포함된다.

[0125] "포스포릴콜린"(Phosphorylcholine)은 "PC"로도 표시되며, 다음을 의미한다:



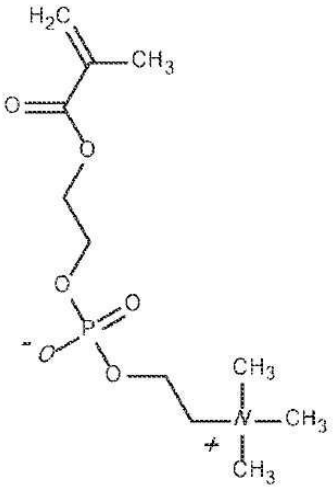
[0126]

[0127] 여기서 *는 부착 지점을 나타낸다. 포스포릴콜린은 양쪽이온성(zwitterionic) 기이며 염(예를 들어, 내부 염) 및 이의 양성자화 및 탈양성자화 형태가 포함된다.

[0128] "포스포릴콜린 함유 중합체"는 포스포릴콜린을 함유하는 중합체이다. "양쪽성이온 함유 중합체"는 양쪽성이온을 함유하는 중합체를 의미한다.

[0129] 폴리(아크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린)[Poly(acryloyloxyethyl phosphorylcholine)] 함유 중합체는 단량체로서 2-(아크릴로일옥시)에틸-2-(트라이메틸암모늄)에틸 포스페이트[2-(acryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium)ethyl phosphate](아래 실시예 6에 나타낸 HEA-PC)를 함유하는 중합체를 의미한다.

[0130] 폴리(메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린)[Poly(methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)] 함유 중합체는 다음과 같이 단량체로서 2-(메타크릴로일옥시)에틸-2-(트라이메틸암모늄)에틸 포스페이트[2-(methacryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium)ethyl phosphate](HEMA-PC 또는 MPC)를 함유하는 중합체를 의미한다(아래 참조):



[0131]

[0132] 본 명세서에 사용된 "MPC" 및 "HEMA-PC"는 호환 가능하다.

[0133] 중합체의 맥락에서 "분자량"은 수평균 분자량 또는 중량평균 분자량 또는 피크(peak) 분자량으로 표현될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 분자량에 대한 모든 참조는 피크 분자량을 의미한다. 이러한 분자량 결정, 수평균(Mn), 중량평균(Mw) 및 피크(Mp)는 크기 배제 크로마토그래피 또는 기타 액체 크로마토그래피 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 분자량 값을 측정하기 위한 다른 방법으로 예를 들어 수평균 분자량을 결정하기 위해 말단기 분석 또는 총괄성의 측정(예를 들어, 어는점 저하, 끓는점 상승 또는 삼투압)을 사용하는 것 또는 중량평균 분자량을 결정하기 위해 광 산란 기술, 초원심분리 또는 점도법을 사용하는 것을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자량은 SEC-MALS(크기 배제 크로마토그래피 - 다중 각도 광 산란)을 통해 측정한다. 일부 실시형태에서, 중합성 시약은 전형적으로 다분산성(즉, 중합체의 수평균 분자량 및 중량평균 분자량이 동일하지 않음)이며, 예를 들어 SEC-MALS 측정에서 유래된 PDI 값으로 판단할 때, 예를 들어 약 1.5 미만의 낮은 다분산성 값을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 다분산성(PDI)은 약 1.4 내지 약 1.2의 범위 내에 있다. 일부 실시형태에서 PDI는 약 1.15, 1.10, 1.05 또는 1.03 미만이다.

[0134] 단수적 표현은 하나 이상의 개체를 의미하며; 예를 들어 단수적으로 표현된 화합물은 하나 이상의 화합물 또는 적어도 하나의 화합물을 의미한다. 이와 같은 바, 단수적 표현, 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세

서에서 호환 가능하게 사용될 수 있다.

[0135] "약"은 서로 다른 기기, 시료 및 시료 조제물 사이에서 측정한 결과에서 볼 수 있는 차이를 의미한다.

[0136] "보호된", "보호된 형태", "보호기" 및 "보호성 기"는 특정 반응 조건 하에서 분자의 특정 화학적 반응성 기능기의 반응을 방지하거나 차단하는 기(즉, 보호기)의 존재를 의미한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응성 기의 유형뿐만 아니라 사용되는 반응 조건 및 있다면 분자의 추가적인 반응성 또는 보호기의 존재에 따라 다르다. 적합한 보호기에는 문헌[Greene et al., "Protective Groups In Organic Synthesis," 3rd Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.]에서 발견되는 바와 같은 것이 포함된다.

[0137] "알킬"은 표시된 수의 탄소 원자를 갖는 직선 또는 분지형 포화 지방족 라디칼을 의미한다. 예를 들어, C_1-C_6 알킬에는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 펜틸, 아이소펜틸, 헥실 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 다른 알킬기에는 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 알킬은 임의의 수, 예를 들어 1 내지 2개, 1 내지 3개, 1 내지 4개, 1 내지 5개, 1 내지 6개, 1 내지 7개, 1 내지 8개, 1 내지 9개, 1 내지 10개, 2 내지 3개, 2 내지 4개, 2 내지 5개, 2 내지 6개, 3 내지 4개, 3 내지 5개, 3 내지 6개, 4 내지 5개, 4 내지 6개 및 5 내지 6개의 탄소를 포함할 수 있다. 알킬기는 전형적으로 1가이지만, 알킬기가 2개의 모이어티를 함께 연결하는 경우와 같이 2가일 수 있다.

[0138] 위에서 및 이하에서 각각 유기 라디칼 또는 화합물과 관련하여 언급된 용어 "저급"(lower)은 최대 7개 또는 최대 4개 및 (비분지형으로서) 하나 이상의 탄소 원자가 있는 분지형 또는 비분지형일 수 있는 화합물 또는 라디칼을 정의한다.

[0139] "알킬렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에서 정의된 바와 같은 알킬기, 즉 2가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬렌에 연결된 2개의 모이어티는 알킬렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다. 예를 들어, 직쇄 알킬렌은 $-(CH_2)_n$의 2가 라디칼로서, n이 1, 2, 3, 4, 5 또는 6인 것일 수 있다. 알킬렌기에는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 아이소프로필렌, 부틸렌, 아이소부틸렌, 2차-부틸렌, 펜틸렌 및 헥실렌이 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0140] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(종종 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 헤테로사이클로알케닐로 지칭되는 기를 포함)에 대한 치환기는 다음으로부터 선택되는 다양한 기일 수 있다: 0 내지 (2m'+1) 범위의 수의 -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', $-CO_2R'$, -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', $-NR"C(O)_2R'$, $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, -CN 및 $-NO_2$로서, 여기서 m'은 이러한 라디칼에서 탄소 원자의 총 수임. R', R" 및 R"'은 각각 독립적으로 수소, 비치환 (C_1-C_8)알킬 및 헤테로알킬, 비치환 아릴, 1 내지 3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기 또는 아릴-(C_1-C_4)알킬기를 의미한다. R' 및 R"이 같은 질소 원자에 부착되는 경우, 이들은 질소 원자와 조합되어 5-, 6- 또는 7-원자 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R"은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하는 것을 의미한다. 용어 "알킬"에는 할로알킬(예를 들어, $-CF_3$ 및 $-CH_2CF_3$) 및 아실(예를 들어, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ 등)과 같은 기가 포함된다. 일부 실시형태에서, 치환된 알킬 및 헤테로알킬기는 1 내지 4개의 치환기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 치환된 알킬 및 헤테로알킬기는 1, 2 또는 3개의 치환기를 갖는다. 예외는 퍼할로(perhalo) 알킬기(예를 들어, 펜타플루오로에틸 등)이다.

[0141] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(종종 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 헤테로사이클로알케닐로 지칭되는 기를 포함)에 대한 치환기는 다음으로부터 선택되는 하나 이상의 다양한 기일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다: 0 내지 (2m'+1) 범위의 수의 -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -할로겐, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', $-CO_2R'$, -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', $-NR"C(O)_2R'$, -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR'", -S(O)R', $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-NRSO_2R'$, -CN 및 $-NO_2$로서, 여기서 m'은 이러한 라디칼에서 탄소 원자의 총 수임. R', R", R"' 및 R""은 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환 헤테로알킬, 치환 또는 비치환 아릴, 예를 들어 1 내지 3개의 할로겐으로 치환된 아릴, 치환 또는 비치환 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기 또는 아릴알킬기를 의미한다. 화합물이 하나를 초과하는 R기를 포함하는 경우, 예를 들어, 각각의 R기는 하나를 초과하는 이들 기가 존재하는 경우 각각 R', R", R"' 및 R"" 기인 것과 같이 독립적으로 선택된다. R' 및 R"이 같은 질소 원자에 부착되는 경

우, 이들은 질소 원자와 조합되어 5-, 6- 또는 7-원자 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R"은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하는 것을 의미하지만 이로 제한되지 않는다. 치환기에 대한 상기 논의에서, 이 분야의 기술자는 용어 "알킬"이 할로알킬(예를 들어, $-CF_3$ 및 $-CH_2CF_3$) 및 아실(예를 들어, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ 등)과 같이, 수소기 이외의 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기를 포함하는 의미임을 이해할 것이다.

[0142] "알콕시"는 알콕시기를 부착 지점에 연결하거나 알콕시기의 2개의 탄소에 연결된 산소 원자를 갖는 알킬기를 의미한다. 알콕시기에는 예를 들어 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 아이소-프로폭시, 부톡시, 2-부톡시, 아이소-부톡시, 2차-부톡시, 3차-부톡시, 펜톡시, 헥속시 등이 포함된다. 알콕시기는 본 명세서에 기술된 다양한 치환기로 추가적으로 치환될 수 있다. 예를 들어, 알콕시기는 할로겐으로 치환되어 "할로-알콕시"기를 형성할 수 있다.

[0143] "카복시알킬"은 카복시기로 치환된 알킬기(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 의미한다. 용어 "카복시사이클로알킬"은 카복시기로 치환된 사이클로알킬기(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 의미한다. 용어 알콕시알킬은 알콕시기로 치환된 알킬기(본 명에서에 정의된 바와 같음)를 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "카복시"는 카복실산 및 이의 에스터를 의미한다.

[0144] "할로알킬"은 일부 또는 모든 수소 원자가 할로겐 원자로 치환된 위에서 정의된 바와 같은 알킬을 의미한다. 할로겐(할로)은 클로로 또는 플루오로를 나타내지만, 브로모 또는 아이오도일 수도 있다. 예를 들어, 할로알킬에는 트라이플루오로메틸, 플루오로메틸, 1,2,3,4,5-펜타플루오로-페닐 등이 포함된다. 용어 "퍼플루오로"(perfluoro)는 불소로 대체된 모든 이용 가능한 수소를 갖는 화합물 또는 라디칼을 정의한다. 예를 들어, 퍼플루오로페닐은 1,2,3,4,5-펜타플루오로페닐을 의미하며, 퍼플루오로메틸은 1,1,1-트라이플루오로메틸을 의미하고, 퍼플루오로메톡시는 1,1,1-트라이플루오로메톡시를 의미한다.

[0145] "플루오로-치환 알킬"은 하나, 일부 또는 모든 수소 원자가 불소로 대체된 알킬기를 의미한다.

[0146] "사이토카인"은 세포-세포 통신에 참여할 수 있는 단백질 신호 분자군의 구성원이다. 사이토카인은 전형적으로 약 8 내지 35kDa의 질량을 갖는 작은 수용성 당단백질이다.

[0147] "사이클로알킬"은 약 3 내지 12, 3 내지 10 또는 3 내지 7개의 엔도사이클릭 탄소 원자를 함유하는 환형 탄화수소기를 의미한다. 사이클로알킬기에는 융합, 브릿지 및 스파이로(spiro) 고리 구조가 포함된다.

[0148] "엔도사이클릭"은 환형 고리 구조의 일부를 구성하는 원자 또는 원자군을 의미한다.

[0149] "엑소사이클릭"은 부착되어 있지만 환형 고리 구조를 정의하지 않는 원자 또는 원자군을 의미한다.

[0150] "사이클릭 알킬 에테르"는 3 또는 4개의 엔도사이클릭 탄소 원자 및 1개의 엔도사이클릭 산소 또는 황 원자를 갖는 4 또는 5개 원자 사이클릭 알킬기(예를 들어, 옥세탄, 티에탄, 테트라하이드로푸란, 테트라하이드로티오펜); 또는 1 또는 2개 엔도사이클릭 산소 또는 황 원자를 갖는 6 내지 7개 원자 사이클릭 알킬기(예를 들어, 테트라하이드로파이란, 1,3-다이옥산, 1,4-다이옥산, 테트라하이드로티오파이란, 1,3-다이티안, 1,4-다이티안, 1,4-옥사티안)를 의미한다.

[0151] "알케닐"은 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 2 내지 6개 탄소 원자의 직쇄 또는 분지형 탄화수소를 의미한다. 알케닐기의 예시에는 비닐, 프로페닐, 아이소프로페닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 아이소부테닐, 부타다이에닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 아이소펜테닐, 1,3-펜타다이에닐, 1,4-펜타다이에닐, 1-헥세닐, 2-헥세닐, 3-헥세닐, 1,3-헥사다이에닐, 1,4-헥사다이에닐, 1,5-헥사다이에닐, 2,4-헥사다이에닐 또는 1,3,5-헥사트라이에닐이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다. 알케닐기는 또한 2 내지 3개, 2 내지 4개, 2 내지 5개, 3 내지 4개, 3 내지 5개, 3 내지 6개, 4 내지 5개, 4 내지 6개 및 5 내지 6개의 탄소를 가질 수 있다. 알케닐기는 전형적으로 1가이지만, 알케닐기가 2개의 모이어티를 함께 연결하는 경우와 같이, 2가일 수 있다.

[0152] "알케닐렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에서 정의한 바와 같은 알케닐기, 즉 2가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알케닐렌으로 연결된 2개의 모이어티는 알케닐렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다. 알케닐렌기에는 에테닐렌, 프로페닐렌, 아이소프로페닐렌, 부테닐렌, 아이소부테닐렌, 2차-부테닐렌, 펜테닐렌 및 헥세닐렌이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0153] "알키닐"은 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 2 내지 6개 탄소 원자의 직쇄 또는 분지형 탄화수소를 의미한다. 알키닐기의 예시에는 아세틸레닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 아이소부티닐, 2차-부티닐, 부타다이이닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 아이소펜티닐, 1,3-펜타다이이닐, 1,4-펜타다이이닐, 1-헥시닐, 2-헥시닐, 3-헥시닐, 1,3-헥

사다이이닐, 1,4-헥사다이이닐, 1,5-헥사다이이닐, 2,4-헥사다이이닐 또는 1,3,5-헥사트라이이닐이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다. 알키닐기는 또한 2 내지 3개, 2 내지 4개, 2 내지 5개, 3 내지 4개, 3 내지 5개, 3 내지 6개, 4 내지 5개, 4 내지 6개 및 5 내지 6개의 탄소를 가질 수 있다. 알키닐기는 전형적으로 1가이지만, 알키닐기가 2개의 모이어티를 함께 연결하는 경우와 같이, 2가일 수 있다.

[0154] "알키닐렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에서 정의된 바와 같은 알키닐기, 즉 2가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알키닐렌에 연결된 2개의 모이어티는 일키닐렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다. 알키닐렌기에는 에티닐렌, 프로피닐렌, 부티닐렌, 2차-부티닐렌, 펜티닐렌 및 헥시닐렌이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0155] "사이클로알킬"은 3 내지 12개의 고리 원자 또는 표시된 수의 원자를 함유하는 포화 또는 부분 불포화된 단환형, 융합 이환형 또는 가교된 다환형 고리 집합체를 의미한다. 단환형 고리에는 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 및 사이클로옥틸이 포함된다. 이환형 및 다환형 고리에는 예를 들어 노보넨(norbornane), 데카하이드로나프탈렌 및 아다만탄(adamantane)이 포함된다. 예를 들어, C_{3-8}사이클로알킬에는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로옥틸 및 노보넨이 포함된다.

[0156] "사이클로알킬렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에 정의된 바와 같은 사이클로알킬기, 즉 2가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 사이클로알킬렌에 연결된 2개의 모이어티는 사이클로알킬렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다. 사이클로알킬렌기에는 사이클로프로필렌, 사이클로부틸렌, 사이클로펜틸렌, 사이클로헥실렌 및 사이클로옥틸렌이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0157] "헤테로사이클로알킬"은 3개의 고리 내지 20개의 고리 및 1개 내지 약 5개의 N, O 및 S와 같은 헤테로원자를 갖는 고리 시스템을 의미한다. B, Al, Si 및 P를 포함하지만 이로 제한되지 않는 추가적인 헤테로원자 또한 유용할 수 있다. 헤테로원자는 또한 -S(O)- 및 $-S(O)_2-$와 같지만 이로 제한되지 않은 것과 같이 산화될 수 있다. 예를 들어, 헤테로사이클에는 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로티오페닐, 모르폴리노, 피롤리디닐, 피롤리닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 파이라졸리디닐, 파이라졸리닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 인돌리닐, 퀴누클리디닐 및 1,4-다이옥사-8-아자-스파이로[4.5]덱-8-일이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0158] "헤테로사이클로알킬렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에서 정의한 바와 같은 헤테로사이클로알킬기를 의미한다. 헤테로사이클로알킬렌에 연결된 2개의 모이어티는 헤테로사이클로알킬렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다.

[0159] "아릴"은 6 내지 16개의 고리 탄소 원자를 함유하는 단환형 또는 융합 이환형, 삼환형 또는 더 많은 방향족 고리 집합체를 의미한다. 예를 들어, 아릴은 페닐, 벤질 또는 나프틸일 수 있다. "아릴렌"은 아릴기로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다. 아릴기는 알킬, 알콕시, 아릴, 하이드록시, 할로겐, 시아노, 아미노, 아미노-알킬, 트라이플루오로메틸, 알킬렌다이옥시 및 옥시-C_2-C_3-알킬렌; 이들에서 선택적으로 추가로 치환, 예를 들어 앞서 정의된 바와 같이 치환된 것 모두; 또는 1- 또는 2-나프틸; 또는 1- 또는 2-페난트레닐로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 라디칼로 단일(mono)-, 이(di)- 또는 삼(tri)-치환될 수 있다. 알킬렌다이옥시는 페닐의 2개의 인접 탄소 원자에 부착된 2가 치환체, 예를 들어 메틸렌다이옥시 또는 에틸렌다이옥시이다. 옥시-C_2-C_3-알킬렌은 페닐의 2개의 인접 탄소 원자에 부착된 2가 치환체, 예를 들어 옥시에틸렌 또는 옥시프로필렌이다. 옥시-C_2-C_3-알킬렌-페닐에 대한 예시는 2,3-다이하이드로벤조푸란-5-일이다.

[0160] 일부 실시형태에서 아릴은 나프틸, 페닐 또는 알콕시, 페닐, 할로겐, 알킬 또는 트라이플루오로메틸로 단일- 또는 이치환된 페닐이며, 특히 페닐 또는 알콕시, 할로겐 또는 트라이플루오로메틸로 단일- 또는 이치환된 페닐이고, 특히 페닐이다.

[0161] R로 치환된 페닐기의 예시는 예를 들어 헤테로사이클릭 고리에서 선택적으로 치환된 4-클로로펜-1-일, 3,4-다이클로로펜-1-일, 4-메톡시펜-1-일, 4-메틸펜-1-일, 4-아미노메틸펜-1-일, 4-메톡시에틸아미노메틸펜-1-일, 4-하이드록시에틸아미노메틸펜-1-일, 4-하이드록시에틸-(메틸)-아미노메틸펜-1-일, 3-아미노메틸펜-1-일, 4-N-아세틸아미노메틸펜-1-일, 4-아미노펜-1-일, 3-아미노펜-1-일, 2-아미노펜-1-일, 4-페닐-펜-1-일, 4-(이미다졸-1-일)-페닐, 4-(이미다졸-1-일메틸)-펜-1-일, 4-(모르폴린-1-일)-펜-1-일, 4-(모르폴린-1-일메틸)-펜-1-일, 4-(2-메톡시에틸아미노메틸)-펜-1-일 및 4-(피롤리딘-1-일메틸)-펜-1-일, 4-(티오페닐)-펜-1-일, 4-(3-티오페닐)-펜-1-일, 4-(4-메틸피페라진-1-일)-펜-1-일 및 4-(피페리디닐)-페닐 및 4-(피리디닐)-페닐이다.

[0162] "아릴렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에 정의된 바와 같은 아릴기를 의미한다. 아릴렌에 연결된 2개

의 모이어티는 아릴렌의 서로 다른 원자에 연결된다. 아릴렌기에는 페닐렌이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0163] "아릴렌-옥시"는 아릴렌에 연결된 모이어티 중 하나가 산소 원자를 통해 연결된 위에 정의된 바와 같은 아릴렌기를 의미한다. 아릴렌-옥시기에는 페닐렌-옥시가 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0164] 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴기에 대한 치환기는 다양하며 다음으로부터 선택된다: 0 내지 방향족 고리 시스템 상의 열린 원자가의 총 수의 범위의 수의 -할로겐, -OR', -OC(O)R', -NR'R", -SR', -R', -CN, $-NO_2$, $-CO_2R'$, -CONR'R", -C(O)R', -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', $-NR"C(O)_2R'$, -NR'-C(O)NR"R"', $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, -S(O)R', $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, 퍼플루오로(C_1-C_4)알콕시 및 퍼플루오로(C_1-C_4)알킬; 및 여기서 R', R" 및 R"'은 독립적으로 수소, (C_1-C_8)알킬 및 헤테로알킬, 비치환 아릴 및 헤테로아릴, (비치환 아릴)-(C_1-C_4)알킬 및 (비치환 아릴)옥시-(C_1-C_4)알킬로부터 선택됨.

[0165] 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 치환기는 선택적으로 식 $-T-C(O)-(CH_2)_q-U-$의 치환기로 대체될 수 있으며, 여기서 T 및 U는 독립적으로 -NH-, -O-, $-CH_2-$ 또는 단일 결합이고, q는 0 내지 2의 정수이다. 대안적으로, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 치환기는 선택적으로 식 $-A-(CH_2)_r-B-$의 치환기로 대체될 수 있으며, 여기서 A 및 B는 독립적으로 $-CH_2-$, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ 또는 단일 결합이고, r은 1 내지 3의 정수이다. 그렇게 형성된 새로운 고리의 단일 결합 중 하나는 선택적으로 이중 결합으로 대체될 수 있다. 대안적으로, 아릴 또는 헤테로아릴 고리의 인접 원자 상의 2개의 치환기는 선택적으로 식 $-(CH_2)_s-X-(CH_2)_t-$의 치환기로 대체될 수 있으며, 여기서 s 및 t는 독립적으로 0 내지 3의 정수이고, X는 -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, $-S(O)_2-$ 또는 $-S(O)_2NR'-$이다. -NR'- 및 $-S(O)_2NR'-$에서 치환기 R'은 수소 또는 비치환 (C_1-C_6)알킬로부터 선택된다.

[0166] "헤테로아릴"은 5 내지 16개의 고리 원자를 함유하는 단환형 또는 융합 이환형 또는 삼환형 방향족 고리 집합체를 의미하며, 여기서 1 내지 4개의 고리 원자는 각각 N, O 또는 S인 헤테로원자이다. 예를 들어, 헤테로아릴에는 피리딜, 인돌릴, 인다졸릴, 퀴녹살리닐, 퀴놀리닐, 아이소퀴놀리닐, 벤조티에닐, 벤조푸라닐, 푸라닐, 피롤릴, 티아졸릴, 벤조티아졸릴, 옥사졸릴, 트라이아졸릴, 테트라졸릴, 파이라졸릴, 이미다졸릴, 티에닐 또는 치환된 특히 예를 들어 알킬, 나이트로 또는 할로겐으로 단일- 또는 이-치환된 임의의 다른 라디칼이 포함된다. 피리딜은 2-, 3- 또는 4-피리딜, 유리하게는 2- 또는 3-피리딜을 나타낸다. 티에닐은 2- 또는 3-티에닐을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 퀴놀리닐은 2-, 3- 또는 4-퀴놀리닐을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 아이소퀴놀리닐은 1-, 3- 또는 4-아이소퀴놀리닐을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 벤조피라닐, 벤조티오피라닐은 각각 3-벤조피라닐 또는 3-벤조티오피라닐을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 티아졸릴은 2- 또는 4-티아졸릴을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 트라이아졸릴은 1-, 2- 또는 5-(1,2,4-트라이아졸릴)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 테트라졸릴은 5-테트라졸릴일 수 있다.

[0167] 일부 실시형태에서, 헤테로아릴은 피리딜, 인돌릴, 퀴놀리닐, 피롤릴, 티아졸릴, 아이소옥사졸릴, 트라이아졸릴, 테트라졸릴, 파이라졸릴, 이미다졸릴, 티에닐, 푸라닐, 벤조티아졸릴, 벤조푸라닐, 아이소퀴놀리닐, 벤조티에닐, 옥사졸릴, 인다졸릴 또는 치환된, 특히 단일- 또는 이-치환된 임의의 라디칼이다.

[0168] 용어 "헤테로알킬"은 1 내지 3개의 N, O 및 S와 같은 헤테로원자를 갖는 알킬기를 의미한다. B, Al, Si 및 P를 포함하지만 이로 제한되지 않는 추가적인 헤테로원자 또한 유용할 수 있다. 헤테로원자는 또한 -S(O)- 및 $-S(O)_2-$와 같지만 이로 제한되지 않은 것과 같이 산화될 수 있다. 예를 들어, 헤테로알킬에는 에테르, 티오에테르, 알킬-아민 및 알킬-티올이 포함될 수 있다.

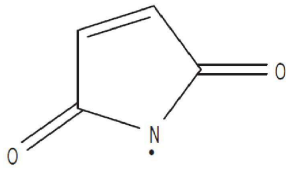
[0169] 용어 "헤테로알킬렌"은 적어도 2개의 다른 기를 연결하는 위에서 정의된 바와 같은 헤테로알킬기를 의미한다. 헤테로알킬렌에 연결된 2개의 모이어티는 헤테로알킬렌의 같은 원자 또는 서로 다른 원자에 연결될 수 있다.

[0170] "친전자체"는 친전자성 중심, 즉 전자를 구하는 중심을 갖고, 친핵체와 반응할 수 있는, 이온성일 수 있는 이온 또는 원자 또는 원자 집합을 의미한다. 친전자체(또는 친전자성 시약)은 반응 상대로부터 결합 전자를 모두 수용하여 반응 상대(친핵체)와 결합을 형성하는 시약이다.

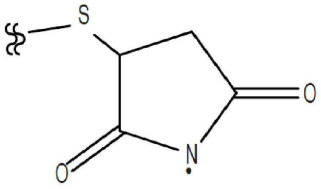
[0171] "친핵체"는 친핵성 중심, 즉 친전자성 중심을 구하거나 친전자체와 반응할 수 있는 중심을 갖는, 이온성일 수

있는 이온 또는 원자 또는 원자 집합을 의미한다. 친핵체(또는 친핵성 시약)는 결합 전자를 모두 제공하여 반응 상대(친전자체)와 결합을 형성하는 시약이다. "친핵성기"는 반응성 기와 반응한 후의 친핵체를 의미한다. 비제한적 예시에는 아미노, 하이드록실, 알콕시, 할로알콕시 등이 포함된다.

[0172] "말레이미도"는 다음의 구조를 갖는 피롤-2,5-다이온-1-일기를 의미한다:



[0173] , 이는 설프하이드릴(예를 들어, 티오알킬)과 반응 시 다음의 구조를 갖는 S-말레이미도기를 형성한다:



[0174] , 여기서 "•"은 말레이미도기에 대한 부착 지점을 나타내며 "§"은 본래의 설프하이드릴을 갖는 기의 나머지 부분에 대한 티올 황 원자의 부착 지점을 나타낸다.

[0175] 본 개시내용의 목적을 위해, 단백질 및 폴리펩타이드에서 발견되는 "천연 발생 아미노산"은 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-글루타민, L-글루탐산, L-글리신, L-히스티딘, L-아이소류신, L-류신, L-라이신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신 및 또는 L-발린이다. 단백질에서 발견되는 "비-천연 발생 아미노산"은 천연 발생 아미노산으로 언급한 것들과 다른 임의의 아미노산이다. 비-천연 발생 아미노산에는 제한없이 천연 발생 아미노산의 D 이성질체 및 천연 발생 아미노산의 D 및 L 이성질체의 혼합물이 포함된다. N-알파-메틸 아미노산(예를 들어, 사르코신), 4-하이드록시프롤린, 데스모신, 아이소데스모신, 5-하이드록시라이신, 엡실론-N-메틸라이신, 3-메틸히스티딘과 같은 다른 아미노산은 천연 발생 단백질에서 발견되지만, 일반적으로 mRNA의 리보솜 번역이 아닌 다른 수단에 의해 도입되므로 본 개시내용의 목적을 위해 단백질에서 발견되는 비-천연 발생 아미노산으로 간주된다.

[0176] 중합체의 기하학, 구조 또는 전체적인 구조와 관련하여 "선형"은 단일 중합체 암을 갖는 중합체를 의미한다.

[0177] 중합체의 기하학, 구조 또는 전체적인 구조와 관련하여 "분지형"은 개시제 내에 함유된 코어 구조에서 연장된 2개 이상의 중합체 "암"을 갖는 중합체를 의미한다. 개시제는 원자 이동 라디칼 중합(ATRP) 반응에 사용될 수 있다. 분지형 중합체는 2개의 중합체 사슬(암), 3개의 중합체 암, 4개의 중합체 암, 5개의 중합체 암, 6개의 중합체 암, 7개의 중합체 암, 8개의 중합체 암, 9개의 중합체 암 또는 더 많은 중합체 암을 보유할 수 있다. 각 중합체 암은 중합체 개시 부위에서 연장된다. 각 중합체 개시 부위는 단량체의 추가를 통한 중합체 사슬의 성장을 위한 부위가 될 수 있다. 예를 들어 그리고 제한없이, ATRP를 사용하면 개시제 상의 중합체 개시 부위는 전형적으로 제1구리 할로겐화물과 같은 전이 금속 화합물에 의해 촉매된 가역적 산화환원 과정을 겪는 유기 할로겐화물이다. 일부 실시형태에서, 할로겐화물은 브로민이다.

[0178] "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 조성물에 포함될 수 있고 환자에서 유의한 부정적인 독성학적 효과를 유발하지 않으며 치료적 용도, 특히 인간에서의 용도에 대해 FDA에서 승인하거 승인 가능한 부형제를 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제의 비-제한적 예시에는 물, NaCl, 일반 염 용액, 락테이트화 링거, 정상 수크로스, 정상 글루코스 등이 포함된다.

[0179] 치료용 단백질은 발명을 지연시키고, 중증도를 감소시키고, 추가적인 악화를 억제하고/하거나 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 개선하는 투여량, 투여 경로 및 투여 빈도를 의미하는 유효 요법으로 투여된다. 환자가 이미 장애를 겪고 있는 경우, 요법은 치료적 유효 요법으로 지칭될 수 있다. 환자가 일반적인 개체군에 비해 장애의 위험이 증가했지만 아직 증상을 경험하지 않은 경우, 이 요법은 예방적 유효 요법으로 지칭될 수 있다. 일부 예시에서, 치료적 또는 예방적 효능은 역사적 대조군에 비교한 개별 환자 또는 같은 환자의 과거 경험에서

관찰될 수 있거나 다른 실시예에서, 치료적 또는 예방적 효능은 처리된 환자의 개체군을 비처리 환자의 대조 개체군에 비교하는 전임상 또는 임상 시험에서 입증될 수 있다.

[0180] 물질의 "생물학적 반감기"는 물질의 도입 후 조직 또는 유기체에서 물질의 절반이 제거되는데 필요한 시간을 특정하는 약동학적 매개변수이다.

[0181] "OG1786"은 중합체 합성에 사용되는 9개의 팔이 있는 개시제로서, 이는 트라이플루오로아세트산과 OG1786의 염 형태를 나타낸다. OG1786은 사용된 다른 염 또는 유리 염기로서 사용될 수 있다.

[0182] "OG1801"은 단량체 HEMA-PC를 사용한 ATRP 합성을 위해 개시제로서 OG1786을 사용하여 만든 대략적으로(+/-15%) 750kDa 중합체(Mn 또는 Mp를 통함)이다.

[0183] "OG1802"는 추가된 말레이미드 기능성이 있는 OG1801로서 여기서 각각의 n_1, n_2, n_3, n_4, n_5, n_6, n_7, n_8 및 n_9는 중합체의 총 분자량이 (Mw) 750,000±15%달톤이 되도록 정수(양성)(0 내지 약 3000까지)이다.

[0184] 다중-각도 광 산란(MALS)은 레이저 광이 분자에 충돌하고, 빛의 진동 전기장이 분자 내에서 진동 쌍극자를 유도하는 거대분자 분석 기술이다. 이 진동 쌍극자는 빛을 재-방출할 것이며 Wyatt miniDawn TREOS와 같은 MALS 검출기를 사용하여 측정할 수 있다. 방출된 빛의 강도는 거대분자에서 유도된 쌍극자의 규모에 따라 달라지며 이는 거대분자의 분극률에 비례하고, 유도된 쌍극자가 클수록 산란된 빛의 강도가 커진다. 따라서, 이러한 거대분자의 용액으로부터의 산란을 분석하려면, 주위 매체(예를 들어, 용매)에 상대적인 분극률을 알아야 한다. 이는 Wyatt Optilab T-rEX 시차 굴절계를 사용한 dn/dc($=\Delta n/\Delta c$) 값의 측정을 통해 분자 농도 변화 Δc에 따른 용액의 굴절률 n의 변화 Δn을 측정하여 결정할 수 있다. MALS 결정에 사용되는 2개의 몰 중량 매개변수는 수평균 분자량(Mn) 및 중량평균 분자량(Mw)이며 다분산지수(PDI)는 Mw를 Mn으로 나눈 것이다. SEC는 또한 SEC에서 가장 높은 피크의 분자량으로 정의되는 피크 분자량 Mp의 또 다른 평균 분자량 결정을 가능하게 한다.

[0185] PDI는 별개의 단백질(예를 들어, OG1950)과 다분산 생물중합체(예를 들어, OG1802)의 접합으로부터 유래한 중합체 및 생물접합체의 분자량 분포의 범위를 측정하는데 사용된다. 단백질 시료의 경우, 용액의 모든 단백질 분자가 거의 같은 길이 및 몰 질량을 가질 것으로 예상되는 번역 생산물이라는 사실로 인해 다분산도가 1.0에 가깝다. 반면, 다양한 길이의 중합체 사슬이 중합 과정 중에 합성되는 생물중합체의 다분산 성질로 인해, 분자량의 좁은 분포에 대한 품질 속성 중 하나로서 시료의 PDI를 결정하는 것은 매우 중요하다.

[0186] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 용액의 분자가 크기에 따라 분리되는 크로마토그래피 기술이다. 다양한 공극 크기의 수지로 채워진 칼럼을 통해 시료를 운반하기 위해 전형적으로 수성 용액이 적용된다. 수지는 분석물이 칼럼을 통과할 때 분석물에 대해 불활성일 것으로 예상되며 분석물은 고유 크기 및 선택된 칼럼의 공극 크기 특성을 기반으로 서로 분리된다.

[0187] SEC와 MALS의 결합 또는 SEC/MALS는 SEC 교정 표준 세트에 의존하는 것과 달리 몰 질량 및 크기(평균 제곱근 반지름)의 정확한 분포를 제공한다. 이 유형의 방식은 전통적인 칼럼 교정 방법을 능가하는 많은 이점을 갖는다. 각 용출 분획에 대해 광 산란 및 농도를 측정하기 때문에, 용출 위치와 관계없이 몰 질량 및 크기를 결정할 수 있다. 이는 생물중합체(OG1802) 또는 생물접합체(예를 들어, KSI-301, KSI-501)와 같은 구형이 아닌 형태의 거대분자를 갖는 종에 특히 적절하며; 이러한 종은 전형적으로 칼럼 교정 표준 세트에 의해 기술될 수 있는 방식으로 용출되지 않는다.

[0188] 일부 실시형태에서, SEC/MALS 분석에는 Shodex SEC-HPLC 칼럼(7.8×300㎜)이 장착된 Waters 2996 Photodiole 어레이 검출기 및 Alliance 2695 용매 전달 모듈이 있는 Waters HPLC 시스템이 포함된다. 이는 Wyatt miniDawn TREOS 및 Wyatt Optilab T-rEX 시차 굴절계와 온라인으로 연결된다. Waters HPLC 시스템을 제어하기 위해 Waters의 Empower 소프트웨어를 사용할 수 있으며 Wyatt miniDawn TREOS로부터의 MALS 데이터, T-rEX 검출기로부터의 dn/dc 데이터 및 Waters 2996 Photodiole 어레이 검출기로부터의 A280 흡광도 신호를 사용하여 질량 회수 데이터를 수집하기 위해 Wyatt의 ASTRA V 6.1.7.16 소프트웨어를 사용할 수 있다. SEC는 1×PBS pH 7.4에서 1㎖/분으로 수행할 수 있으며, 시료 주입 시, 절대 몰 질량(Mp, Mw, Mn) 및 다분산지수(PDI)를 결정하기 위해 ASTRA 소프트웨어를 통해 MALS 및 RI 신호를 분석할 수 있다. 추가로, 계산에는 또한 중합체 및 단백질에 대한 입력 dn/dc 값이 각각 0.142 및 0.183으로 포함된다. KSI-301 dn/dc 값의 경우, dn/dc는 아래 식을 사용하여 약 0.148이 되는 중합체 및 단백질의 가중된 MW를 기반으로 계산된다:

[0189] 접합체 dn/dc = $0.142\times[Mw_{중합체}/(Mw_{중합체}+Mw_{단백질})]+0.183\times[Mw_{단백질}/(Mw_{중합체}+Mw_{단백질})]$

[0190] 여기서 OG1802에 대한 $Mw_{중합체}$는 800kDa이며 OG1950에 대한 $Mw_{단백질}$은 146kDa이다.

[0191] "KSI-301"은 분지형 고분자량 포스포릴콜린 기반 생물중합체에 공유 결합된 재조합 포유동물 세포 발현 전장 인간화 항-VEGF 단클론 항체의 생물접합체이다. 일부 실시형태에서, KSI-301은 무-방부제 멸균 수용액이 50mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도로 일회용 유리 바이알에 담긴 상태로 공급된다. 도 8은 KSI-301의 항체 부분의 아미노산 서열을 나타낸다. KSI-301은 연장된 안구 반감기를 갖는 항-혈관 내피 성장 인자(VEGF) 생물제약이다. KSI-301은 다음의 2가지 중간체의 생물접합체이다: (1) OG1950 항체 중간체, 재조합 전장 인간화 항-huVEGF A 단클론 항체 및 (2) OG1802 생물중합체 중간체, 포스포릴콜린 생물중합체. 불활성 생물중합체인 OG1802의 추가는 생물학적 물질의 크기를 증가시키므로, KSI-301의 안구 약동학(PK)이 현재 승인된 항-huVEGF-A 치료제 보다 연장된다. KSI-301을 사용한 비임상 연구에서 KSI-301가 huVEGF-A에 대해 고친화성으로 적절하게 결합하여 huVEGF 수용체 1 및 2(huVEGFR)에 대한 결합이 억제되는 것으로 나타났다. 이는 결국 huVEGF-A 매개 기능을 폐지한다.

[0192] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법들 중 임의의 하나 이상에서 투여되는 분자는 이의 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되는 미국 특허 공개 제2017/0190766호에 개시된 분자들 중 임의의 하나이다.

[0193] 도 8은 말단 라이신이 제거된 KSI-301의 항체 부분의 아미노산 서열을 나타낸다. 말단 라이신 제거는 항체에서의 번역-후 변형이다. 재조합 IgG의 중쇄 C-말단의 라이신 잔기는 CHO 숙주 세포에 내인성인 카복시펩티다제에 의해 세포 배양 중에 제거된다(종종 큰 범위까지). 본 명세서에 언급된 모든 항체 서열에 대해, 본 명세서에 기술된 예시적인 항체에 대한 특정 서열(더 길 수 있음)이 제공되지만, 단백질 사슬의 발현 후 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카복시 말단의 하나 내지 여러 개의 아미노산, 특히 중쇄 C-말단 라이신 잔기가 일부 또는 모든 분자에서 누락되거나 유도체화될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 항체 서열은 이러한 라이신 클립에 의해 변형될 수 있으며, 이는 도 8에 나타낸 바와 같은 변형된 버전(하나 이상의 밑줄친 잔기가 제거됨)을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 도 8의 중쇄의 라이신이 제거된다. 일부 실시형태에서, GK가 제거된다. 일부 실시형태에서, PGK가 제거된다. 일부 실시형태에서, SPGK가 제거된다. 이 분야의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이, 분자 개체군 전체에 걸쳐, 라이신 클립은 다양할 수 있으며 완전하지 않을 수 있다. 따라서, 예를 들어 90, 95, 98, 99 또는 100%의 분자는 하나 이상의 클립 버전을 가질 수 있는 반면, 10, 5, 2, 1 또는 그 아래 0%까지는 전장일 수 있다(앞의 값들 중 임의의 2개의 값 사이로 정의되는 임의의 범위를 포함함). 따라서, 본 명세서에 사용된 KSI-301은 도 8에 설명된 중쇄 변이체에 대한 모든 옵션 중 임의의 하나 및 모든 옵션을 포함한다.

[0194] 본 명세서에 사용된 "항-VEGF 항체" 또는 "항-VEGF 항체 접합체"가 언급될 때마다, 항-VEGF 융합 단백질, 예를 들어 아플리베르셉트(aflibercept)와 같은 항-VEGF 단백질 또한 고려된다. 따라서, 본 명세서에 기술된 "항-VEGF 항체 접합체"가 언급될 때마다, 본 명세서에 기술된 바와 같은 포스포릴콜린 함유 생물중합체(예를 들어, OG1802)에 공유 결합된 항-VEGF 단백질, 예를 들어 아플리베르셉트 또한 고려된다. 본 명세서에 기술된 다양한 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체 요법에 대한 임의의 언급 또한 항-VEGF 단백질, 예를 들어 아플리베르셉트 접합체 요법을 고려한다. 본 명세서에 기술된, 눈 장애 치료 방법의 다양한 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체에 대한 임의의 언급 또한 아플리베르셉트 생물중합체 접합체를 고려한다.

[0195] 정제 방법

[0196] 일부 실시형태에서, 생산물 정제 방법이 제공된다. 이 방법은 카오트로픽 제제로 결합된 단백질 생산물을 세척하는 단계 및 이후 결합된 단백질을 수집하는 단계를 포함한다. 이 방법은 추가적인 상류 및 하류 정제 공정을 더 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법이 제공된다. 이 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 용리제를 로딩하는 단계로서, 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합하는, 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함한다.

[0198] 일부 실시형태에서, 관심 표적 단백질은 세포 배양을 통해 생산된다. 일부 실시형태에서, 세포 배양은 CHO 세포이다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 이중특이적 항체이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-6에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 OG2072이다. 일부 실시형태에서, 관심 단백질은 항체 접합체이다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스이다.

[0199] 일부 실시형태에서, 완충 용액의 카오트로픽 제제는 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상으로 이루어진다.

[0200] 일부 실시형태에서, 마그네슘염의 농도는 2 내지 3.5M이다. 일부 실시형태에서, 이 농도는 $MgCl_2$의 약

2.8M이다.

[0201] 일부 실시형태에서, 마그네슘염의 농도는 다음과 같다: 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4. 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 또는 3.5M, 또는 전술한 범위 사이의 임의의 값.

[0202] 일부 실시형태에서, 칼슘염의 농도는 1 내지 3M이다. 일부 실시형태에서, 이 농도는 $CaCl_2$의 약 2.0M이다.

[0203] 일부 실시형태에서, 칼슘염의 농도는 다음과 같다: 1, 1.5, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4. 2.5, 2.7 또는 3M, 또는 전술한 범위 사이의 임의의 값.

[0204] 일부 실시형태에서, 구아니디늄염의 농도는 0.05 내지 3M이다. 일부 실시형태에서, 이 농도는 염산구아니디늄의 약 1.0M이다.

[0205] 일부 실시형태에서, 구아니디늄염의 농도는 다음과 같다: 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 2.75 또는 3M, 또는 전술한 범위 사이의 임의의 값.

[0206] 일부 실시형태에서, 완충 용액은 Tris를 더 포함한다.

[0207] 일부 실시형태에서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 5mM이다.

[0208] 일부 실시형태에서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 10mM이다.

[0209] 일부 실시형태에서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 50mM 또는 50mM보다 큰 값이다.

[0210] 일부 실시형태에서, 완충 용액의 pH는 5.5보다 크다.

[0211] 일부 실시형태에서, 생산물을 정제하고 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 불순물을 감소시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음, 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키는 단계 및 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 단계를 포함한다.

[0212] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함한다.

[0213] 일부 실시형태에서, 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법이 본 명세서에 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩한 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 핵산, 내독소, 소포제, 기타 분자 또는 관심 표적 단백질 이외의 기타 소분자를 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거한다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거한다. 일부 실시형태에서, 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 용리제는 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산된다. 일부 실시형태에서, 생산물은 정제된 관심 단백질이다. 일부 실시형태에서, 불순물은 숙주 세포 단백질(HCP) 불순물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 용출물은 바이러스성 불순물을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩한 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩한 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세척 전 완충 용액은 Tris 및 염을 포함한다. 이 방법의 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항

체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함한다. 본 명세서에 제공되는 방법의 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체는 다음을 포함한다: MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG), 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 항체는 C449에서 중합체에 결합된다.

[0214] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함한다.

[0215] 일부 실시형태에서, 생산물 처리 방법이 제공된다. 이 방법은 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하는 단계를 더 포함하며, 여기서 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 여기서 제1 농도의 카오트로픽 염의 농도가 0M이며, 제2 농도의 카오트로픽 염의 농도가 4.0M인 것을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 염은 마그네슘 기반이다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽 염은 MgCl2이다.

[0216] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함하며, 여기서 제2 완충제 카오트로픽 제제는 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아니다.

[0218] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0219] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0220] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계, 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 접합 단백질을 용출시키는 단계 및 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0221] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다.

[0222] 일부 실시형태에서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과, 한외여과 및/또는 투석여과 중 하나 이상을 포함한다.

[0223] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계를 포함한다.

[0224] 일부 실시형태에서, 용출물은 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성한다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물에 완충 용액이 첨가된다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물에 방부제 용액이 첨가된다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 유리체내 주사를 위해 추가로 정제된다.

[0225] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다.

[0226] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0227] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0228] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계, 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 접합 단백질을 용출시키는 단계 및 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함한다.

[0229] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다.

[0230] 이 방법은 여기서 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계가 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 용출물이 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물에 완충 용액이 첨가된다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물에 방부제 용액이 첨가된다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물이 유리체내 주사를 위해 추가로 정제된다는 것을 더 포함할 수 있다.

[0231] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계를 포함한다.

[0232] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함한다.

[0233] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함한다.

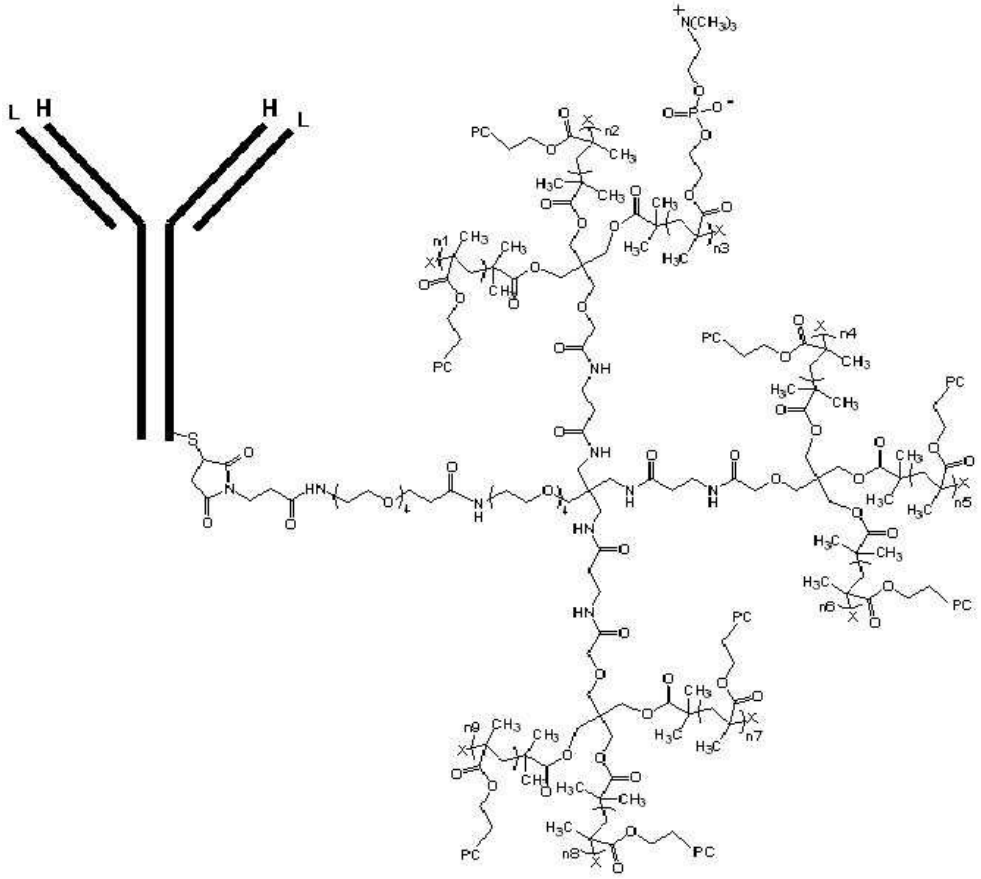
[0234] 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 50mM Na-인산염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 250mM NaCl을 더 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 Tris 및 염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계가 다음을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다: 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 또는 투석여과(DF) 중 하나 이상. 이 방법은 여기서 용리제가 관심 단백질을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 관심 단백질이 항체라는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 항체가 추가로 중합

체에 접합되어 항체 접합체를 형성한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 항체 접합체가 이중특이적 항체를 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 이중특이적 항체가 항-VEGF 및 항-IL-6 결합 모이어티를 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다.

[0235] 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 10, 50, 100, 150, 200mM 또는 10 내지 200mM 사이의 임의의 정수의 Na-인산염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 인산염-기반 종을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 25, 50, 100, 150, 200 또는 25 내지 200mM 사이의 임의의 정수의 NaCl을 더 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 농도의 카오트로픽 염의 농도는 0M이며, 여기서 제2 농도의 카오트로픽 염의 농도는 4.0M이라는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 카오트로픽 염이 마그네슘 기반이라는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 카오트로픽 염이 MgCl2라는 것을 더 포함할 수 있다.

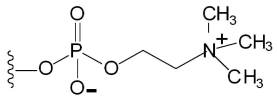
[0236] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 VEGF trap에 융합된 길항제(antagonist) IL-6 항체를 포함하는 단백질 작제물을 포함하며, 여기서 항체는 분리된 길항성 IL-6 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중특이적 항체는 VEGF-항-IL-6 이중 억제제를 포함하며, 여기서 VEGF-항-IL-6 이중 억제제는 항-IL-6 항체 또는 이의 단편 및 항-VEGF trap(VEGFR1/2)의 트랩 항체 융합을 포함하고, 여기서 이중 억제제는 VEGFR의 절단을 감소시키는 VEGFR 서열을 갖는 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하고, 여기서 항체는 단편 항원 결합(Fab) 영역, 힌지 영역 및 단편 결정화 가능(Fc) 영역을 포함하고, 여기서 항-VEGF trap은 항체의 중쇄, 여기서 중쇄는 IL-6 VH를 포함하는 중쇄의 N-말단에 위치하거나 Fab와 힌지 영역 사이에 위치한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 (1) 항-VEGF-A 항체 및 (2) 포스포릴콜린 함유 중합체를 포함하는 항체 접합체를 포함하며, 여기서 중합체는 항체의 가변 영역 외부의 시스테인에서 항체에 공유 결합되고, 여기서 상기 시스테인은 재조합 DNA 기술을 통해 부가된 것이다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 보체 인자 D(CFD)에 특이적으로 결합하여 CFD의 단백질 분해 활성을 직접적으로 억제하는 분리된 길항제 항체를 포함한다.

[0237] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:



[0238]

[0239] 여기서 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-CFD 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항체에 결합되고; PC는



이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X = a) -OR 여기서 R = H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) H 또는 c) Br을 포함하는 임의의 할로겐화물이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합은 약 1500 내지 약 3500±약 10% 내지 약 20%이다.

[0240] 일부 실시형태는 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 발견되는 바와 같은 부분 경쇄 서열 및 부분 중쇄 서열을 갖는 항-CFD 항체 또는 이의 변이체를 포함하는 다음 중 임의의 것 또는 조성물(약학적 조성물을 포함)을 제공한다. 표 1A에서, 밑줄친 서열은 본 명세서에 제공되는 CDR 서열의 일부 실시형태이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물은 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 제공되는 옵션 중 임의의 것으로부터의 부분 또는 완전 경쇄 서열 및 부분 또는 완전 중쇄 서열을 갖는 항체 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 결합 단편)는 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 제공되는 CDR 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 결합 단편)는 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 제공되는 CDR 중 임의의 셋 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 결합 단편)는 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 제공되는 CDR 중 임의의 여섯 모두를 포함할 수 있다. 또한 다양한 작제물에 대한 CDR 서열을 표 1A, 1B, 1C, 1D 및/또는 1E에서 발견할 수 있다.

표 1

표 1A: 항-CFD 길항제 단클론 항체의 가변 영역 서열(CDR 은 밑줄로 표시함).

mAb	중쇄	경쇄
KCD002	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYY MAWVRQVPEKGLEWVGNINYDGSSTYYLDSLK SRFIISRDSAKNILYLQMSSLKSEDTATYFCARGE DFYLYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 276)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIHSY LAWYQQKQGKSPQLIVYNTKTLAEGVPSRF SGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGI PPTFGGGTKLEIK (서열번호 309)
KCD003	EVQLQQSRPELVKPGASVKIFCKASGYTFTDYY MNWMRQRHGETLEWIGDINPNNGDPSYNQKFK DKATLTVDKSSSTASMELRSLTSDDSAVYYCAR EGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 277)	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 310)
KCD005	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDHY MNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSCNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAVYYCTR EGASFAFWGQGTLVTVSA (서열번호 278)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPVTFGAGTKLELK (서열번호 311)
KCD009	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFRNYGM NWVKQGPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFK GRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCVRD GPGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 279)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLIIEHSD GNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQ GSHVPVTFGAGTNLELK (서열번호 312)
KCD010	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYD MDWVKQSHGKSLEWIGHINPNNGGTIYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCGT GDFAYWGHGTLVTVSA (서열번호 280)	QIVLTQSPAIMSVSPGEKVTLTCSASSSVSSS YLYWYQKKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWS SYPPTFGAGTKLELK (서열번호 313)
KCD023	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNI DWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGINYNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCGTG DYAYWGQGTLVTVSA (서열번호 281)	QIVLTQSPAFMSASPGEKVTLTCSASSSVSSS YLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPGR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWT SYPPTFGAGTKLELK (서열번호 314)
KCD036	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYT MTWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFK GKATFTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCAR RHYGSSWDYWGQGTTLTVSS (서열번호 282)	DIKLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINTY LSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFS GSGSGQDYSLTISSLEYEEMGIYYCLQYDEFP YTFGGGTKLEIK (서열번호 315)
KCD040	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASDFNIKDTY MHWVMQRPEQGLEWIGKIDPANGNTEFDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCTR AMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 283)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAGSSVSY MYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPVRF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWS NYPYTFGGGTKLEIK (서열번호 316)
KCD042	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTYI HWVSQRPEQGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQG KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCVNA MEYWGQGTSVTVSS (서열번호 284)	QSVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSANSSVSD MYWFQQRPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWST YPWTFGGGTKLEIK (서열번호 317)

[0241]

[0242]

mAb	중쇄	경쇄
KCD044	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTY MHWVSQRPERGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCLN AMEYWGQGTSVTVSS (서열번호 285)	QSVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSANSSVSD MYWYQQRPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWST YPWTFGGGTKLEIK (서열번호 318)
KCD047	EVQLQQSGAEFVKPGASVRLSCTASGFNIKDTY MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKDDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASA MDYWGQGTSVTVSS (서열번호 286)	QIVLTQSPAVMSASPGEKVAMTCSASSSVTY MYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWST YPFPFGSGTKLEIK (서열번호 319)
KCD048	EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKATY MHWVRQRPEKGLEWIGRIDPANGHTIYDPQFQG KATITSDTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCAEA MDYWGQGTSVTVSS (서열번호 287)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSATSSVSYM YWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSG SGSGTSYSLTISRMEAEDDATYYCQQWSNY PFTFGGGTKLEIK (서열번호 320)
KCD070	EIQLQQTGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYIIL WVKQSHGKSLEWIGNINPYYDYTSYNLKFKGK ATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARSD GYYGGDYWGQGTSVTVSS (서열번호 2788)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGT AVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDR FTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLADYFCQQYS SYPWTFGGGTTLEIK (서열번호 321)
KCD101	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKF KGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCG RNGYDGSMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 289)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY LNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEIK (서열번호 322)
KCD102	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKF KGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RNGYDGSMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 290)	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY LNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEIK (서열번호 323)
KCD103	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTKYNQKF KDKATLTVETSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA GNGYDGSMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 291)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNS LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSRVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQANTLP YTFGGGTKLEIK (서열번호 324)
KCD104	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTYYNQKF KGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RNGYDGAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 292)	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY LNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEIK (서열번호 325)
KCD118	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAFGYTFTDYY KNWMRQRHGESLEWIGDINPNSGDANYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR EGPSFAYWGHGTLVTVSA (서열번호 293)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCF QGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 326)
KCD119	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY TNWMRQRHGESLEWIGDINPNTGDTSYNQKFR	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG

[0243]

mAb	중쇄	경쇄
	VKATLTVDKSSGTAYMGLRSLTSEDSAVYYCT REGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 294)	VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTTLEIK (서열번호 327)
KCD121	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGDTSYNQKFR GKATLTVDKSSSTAFMELRSLTSEDSAVYYCAR EGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 295)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSNQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 328)
KCD122	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYY KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGDANYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAR EGPSFAYWGHGTLVTVSA (서열번호 296)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 329)
KCD123	EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFY KNWMRQRHGESLEWIGDINPNNGGTNYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR EGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 297)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 330)
KCD124	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDHY MNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAVYYCTR EGASFAFWGQGTLVTVSA (서열번호 298)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPLTFGAGTKLELK (서열번호 331)
KCD131	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASAYTFTDYY INWVKQRPGQGPEWIGWIFPGSNSTYSNEKFEV KATLTVDESSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARL GYFGSSYHALDYWGQGTSVTVSS (서열번호 299)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSH LAWFQQKQGKSPRLLVYSATNLPDGVPSRF SGSGSGTQYSLKINILQSEDFGSYYCQHFWG TPWTFGGGTKLEIK (서열번호 332)
KCD136	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCSASGFNIKNTY MHWVNQRPEQGLEWIGRIDPANGITKYAPNFQ GKATITADTSSNTAYLQLSNLTSEDTAIYYCTRA MDYWGQGTSVTVSS (서열번호 300)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MYWYQQKPGSSPRLLIYDISNLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWDT YPWTFGGGTKLEIK (서열번호 333)
KCD200	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTSYY KNWMRQRHGESLEWIGDINPNSGDTAYNQKFK GKATLTVDRSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR EGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 301)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQVSISCRSSQTIVHS NGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 334)
KCD208	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTVSGFNIKNTY MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGDTTYAPKFQ GKATITADTSSNSAYLHLSRLTSEDTAIYYCSLY DYDGYWGQGTTLTVSS (서열번호 302)	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSS LHWYRQKSGTSPKPWIYGTSHLASGVPVRFS GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWDT YPWTFGGGTKLEIK (서열번호 335)
KCD214	EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCTASGFNIKNTY MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTEYAPKFQ	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCRVSSSISSSS LHWYQQKSGTSPKPWIYGTSNLASGVPVRF

[0244]

mAb	중쇄	경쇄
	GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIYYCALY DYDGYWGQGTTLTVSS (서열번호 303)	SGSRSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSD YPWTFGGGTKLEIK (서열번호 336)
KCD220	QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCKATGYTFTGY WIEWVKQRPGHGLEWIGETLPGSDSNNYNEKF KGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTTEDSAIYYCA RDYSNYWYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 304)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNY LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSNLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDSKH RTFGGGTKLEIK (서열번호 337)
KCD224	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGV DWIRQSPGKGLEWLGVIWGVGSTNYNSALKSR LSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARSY DGSYWYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 305)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQVISNY LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLP YTFGSGTKLEIK (서열번호 338)
119_TA F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYY MNWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADFK RRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTR EGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 306)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSN GDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQ GSHVPPTFGQGTKVEIK (서열번호 339)
119_TA F Germ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYY MSWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCT REGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 307)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHS NGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCF QGSHVPPTFGQGTKVEIK (서열번호 340)
119_Hu man Germ	EVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQA PGQGLEWIGDINPNTGDTSYNQKFQGRVTSTRD TSISTAYMELSRLRSDDTVVYYCTREGPSFAYW GQGTLVTVSS (서열번호 308)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVHS NGDTYLEWFQQRPGQSPNLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCF QGSHVPPTFGGGTKVEIK (서열번호 341)

표 1B: 광범위한 CDR 정의를 기반으로 한 항-CFD 길항제 단클론 항체의 CDR

	H1	H2	H3	L1	L2	L3
KCD002	GFTFSDYYMA (서열번호 342)	INYDGSSTYYLDSLKS (서열번호 372)	ARGEDFYLYAMDY (서열번호 402)	RASENIHSYLA (서열번호 432)	NTKTLAE (서열번호 462)	QHHYGIPPT (서열번호 492)
KCD003	GYTFTDYYMN (서열번호 343)	INPNNGDPSYNQKFKD (서열번호 373)	AREGPSFAY (서열번호 403)	RSSQTIVHSNGDTYLE (서열번호 433)	KVSNRFS (서열번호 463)	FQGSHVPPT (서열번호 493)
KCD005	GYTFTDHYMN (서열번호 344)	INPNNGGTSCNQKFKG (서열번호 374)	TREGASFAF (서열번호 404)	RSSQSIVHSNGDTYLE (서열번호 434)	KVSNRFS (서열번호 464)	FQGSHVPVT (서열번호 494)
KCD009	GYIFRNYGMN (서열번호 345)	INTYTGEPTYADDFKG (서열번호 375)	VRDGPGFAY (서열번호 405)	RSSLIIEHSDGNTYLE (서열번호 435)	KVSNRFS (서열번호 465)	FQGSHVPVT (서열번호 495)
KCD010	GYTFTDYDMD (서열번호 346)	INPNNGGTIYNQKFKG (서열번호 376)	GTGDFAY (서열번호 406)	SASSSVSSSYLY (서열번호 436)	STSNLAS (서열번호 466)	HQWSSYPPT (서열번호 496)
KCD023	GYTFTDYNID (서열번호 347)	INPNNGGINYNQKFKG (서열번호 377)	GTGDYAY (서열번호 407)	SASSSVSSSYLY (서열번호 437)	STSNLAS (서열번호 467)	HQWTSYPPT (서열번호 497)
KCD036	GYSFTGYTMT (서열번호 348)	INPYNGGTNYNQKFKG (서열번호 378)	ARRHYGSSWDY (서열번호 408)	KASQDINTYLS (서열번호 438)	RANRLVD (서열번호 468)	LQYDEFPYT (서열번호 498)
KCD040	DFNIKDTYMH (서열번호 349)	IDPANGNTEFDPKFQG (서열번호 379)	TRAMDY (서열번호 409)	SAGSSVSYMY (서열번호 439)	DTSNLAS (서열번호 469)	QQWSNYPYT (서열번호 499)
KCD042	GFNIKHTYIH (서열번호 350)	IDPANGNTKYDPKFQG (서열번호 380)	VNAMEY (서열번호 410)	SANSSVSDMY (서열번호 440)	DTSNLAS (서열번호 470)	QQWSTYPWT (서열번호 500)
KCD044	GFNIKHTYMH (서열번호 351)	IDPANGNTKYDPKFQG (서열번호 381)	LNAMEY (서열번호 411)	SANSSVSDMY (서열번호 441)	DTSNLAS (서열번호 471)	QQWSTYPWT (서열번호 501)
KCD047	GFNIKDTYMH (서열번호 352)	IDPANGYTKDDPKFQG (서열번호 382)	ASAMDY (서열번호 412)	SASSSVTYMY (서열번호 442)	DTSNLAS (서열번호 472)	QQWSNYPFT (서열번호 502)

[0245]

	H1	H2	H3	L1	L2	L3
KCD048	GFNIKATYMH (서열번호 353)	IDPANGHTIY DPQFQG (서열번호 383)	AEAMDY (서열번호 413)	SATSSVSYMY (서열번호 443)	DTSNLAS (서열번호 473)	QQWSNYPFT (서열번호 503)
KCD070	GYSFTDYIIL (서열번호 354)	INPYYDYTSY NLKFKG (서열번호 384)	ARSDGYYGG DY (서열번호 414)	KASQDVGTA VA (서열번호 444)	WASTRHT (서열번호 474)	QQYSSYPWT (서열번호 504)
KCD101	GYTFTSYWM H (서열번호 355)	IDPSDSYTNY NQKFKG (서열번호 385)	GRNGYDGSM DY (서열번호 415)	RASQDISNYL N (서열번호 445)	YPSRLHS (서열번호 475)	QQGNTLPYT (서열번호 505)
KCD102	GYTFTSYWM H (서열번호 356)	IDPSDSYTNY NQKFKG (서열번호 386)	ARNGYDGSM DY (서열번호 416)	RASQDISNYL N (서열번호 446)	YPSRLHS (서열번호 476)	QQGNTLPYT (서열번호 506)
KCD103	GYTFTSYWM H (서열번호 357)	IDPSDSYTKY NQKFKD (서열번호 387)	AGNGYDGSM DY (서열번호 417)	RASQDISNSL N (서열번호 447)	YTSRLHS (서열번호 477)	QQANTLPYT (서열번호 507)
KCD104	GYTFTSYWM H (서열번호 358)	IDPSDSYTYY NQKFKG (서열번호 388)	ARNGYDGAM DY (서열번호 418)	RASQDISNYL N (서열번호 448)	YPSRLHS (서열번호 478)	QQGNTLPYT (서열번호 508)
KCD118	GYTFTDYYK N (서열번호 359)	INPNSGDANY NQKFKG (서열번호 389)	AREGPSFAY (서열번호 419)	RSSQTIVHSN GDTYLE (서열번호 449)	KVSNRFS (서열번호 479)	FQGSHVPPT (서열번호 509)
KCD119	GYTFTDYYTN (서열번호 360)	INPNTGDTSY NQKFRV (서열번호 390)	TREGPSFAY (서열번호 420)	RSSQTIVHSN GDTYLE (서열번호 450)	KVSNRFS (서열번호 480)	FQGSHVPPT (서열번호 510)
KCD121	GYTFTDYYK N (서열번호 361)	INPNNGDTSY NQKFRG (서열번호 391)	AREGPSFAY (서열번호 421)	RSNQTIVHSN GDTYLE (서열번호 451)	KVSNRFS (서열번호 481)	FQGSHVPPT (서열번호 511)
KCD122	GYTFTDYYK N (서열번호 362)	INPNNGDANY NQKFKG (서열번호 392)	AREGPSFAY (서열번호 422)	RSSQTIVHSN GDTYLE (서열번호 452)	KVSNRFS (서열번호 482)	FQGSHVPPT (서열번호 512)
KCD123	GYTFTDFYKN (서열번호 363)	INPNNGGTNY NQKFKG (서열번호 393)	AREGPSFAY (서열번호 423)	RSSQTIVHSN GDTYLE (서열번호 453)	KVSNRFS (서열번호 483)	FQGSHVPPT (서열번호 513)
KCD124	GYTFTDHYM N (서열번호 364)	INPNNGGTSY NQKFKG (서열번호 394)	TREGASFAF (서열번호 424)	RSSQSIVHSN GDTYLE (서열번호 454)	KVSNRFS (서열번호 484)	FQGSHVPLT (서열번호 514)

[0246]

	H1	H2	H3	L1	L2	L3
KCD131	AYTFTDYYIN (서열번호 365)	IFPGSNSTYSN EKFEV (서열번호 395)	ARLGYFGSSY HALDY (서열번호 425)	RASENIYSHL A (서열번호 455)	SATNLPD (서열번호 485)	QHFWGTPW T (서열번호 515)
KCD136	GFNIKNTYMH (서열번호 366)	RIDPANGITK YAPNFQG (서열번호 396)	TRAMDY (서열번호 426)	SASSSVSYMY (서열번호 456)	DISNLAS (서열번호 486)	QQWDTYPW T (서열번호 516)
KCD200	GYTFTSYYKN (서열번호 367)	INPNSGDTAY NQKFKG (서열번호 397)	AREGPSFAY (서열번호 427)	RSSQTIVHSN GDTYLE (서열번호 457)	KVSNRFS (서열번호 487)	FQGSHVPPT (서열번호 517)
KCD208	GFNIKNTYMH (서열번호 368)	RIDPANGDTT YAPKFQG (서열번호 398)	SLYDYDGY (서열번호 428)	SVSSSISSSSL H (서열번호 458)	GTSHLAS (서열번호 488)	QQWDTYPW T (서열번호 518)
KCD214	GFNIKNTYMH (서열번호 369)	RIDPANGDTT YAPKFQG (서열번호 399)	ALYDYDGY (서열번호 429)	RVSSSISSSSL H (서열번호 459)	GTSNLAS (서열번호 489)	QQWSDYPW T (서열번호 519)
KCD220	GYTFTGYWIE (서열번호 370)	ETLPGSDSNN YNEKFKG (서열번호 400)	ARDYSNYWY FDV (서열번호 430)	RASQDISNYL N (서열번호 460)	YTSNLHS (서열번호 490)	QQDSKHRT (서열번호 520)
KCD224	GFSLTSYGVD (서열번호 371)	VIWGVGSTN YNSALKS (서열번호 401)	ARSYDGSYW YFDV (서열번호 431)	RASQVISNYL N (서열번호 461)	YTSRLHS (서열번호 491)	QQYSKLPYT (서열번호 521)

[0247]

표 1C: 밑줄 표시한 CDR 이 있는 88 개의 마우스 항-CFD 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 서열

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
FKCD001	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASDNSFTGYYMHWVKQSHGNILDWIGYIDPYNGVSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMEIRSLTSEDSAVYYCASYYGSSPYWYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 522)	KCD001	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSHFLTISRLEAEDAATYFCQQWSSNPYTFGGGTKLEIK (서열번호 610)
KCD002	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVGNINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRDSAKNILYLQMSSLKSEDTATYFCARGEDFYLYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 523)	KCD002	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIHSYLAWYQQKQGKSPQLIVYNTKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGIPPTFGGGTKLEIK (서열번호 611)
KCD003	EVQLQQSRPELVKPGASVKIFCKASGYTFTDYYMNWMRQRHGETLEWIGDINPNNGDPSYNQKFKDKATLTVDKSSSTASMELRSLTSDDSAVYYCAREGPSFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 524)	KCD003	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 612)
KCD004	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSGKTFTSHGINWVKQRPGQGLEWIGYIYIGNGYNEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAYMQLSSLTFEDSAIYFCVRKAYGNYGFDDWGQGTTLTVSS (서열번호 525)	KCD004	DIQMTQSPTSLSASLGESVSLTCRASQEISGYLNWLQQKPDGSIKRLIYAASTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYANYPFTFGSGTKLEVK (서열번호 613)
KCD005	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDHYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSCNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAVYYCTREGASFAFWGQGTLVTVSA (서열번호 526)	KCD005	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELK (서열번호 614)
KCD006	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFKIKDTYMHWVKERPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCANAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 527)	KCD006	QIILTQSPAIMSASPGEKVTMTCSARSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 615)
KCD007	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFKIKDTYMHWVKERPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCANAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 528)	KCD007	QIILTQSPAIMSASPGERVTMTCSASSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPLRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 616)

[0248]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
KCD008	EVQLQQSGPELVKAGASVKMSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLAWIGRIDPANGNIKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSDDTAVYYCTSAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 529)	KCD008	QIVLTQSPEIMSASPGEKVTMTCSARSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMETEDAATYYCQQWSTYPFTFGSGTKLEIK (서열번호 617)
KCD009	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFRNYGMNWVKQGPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCVRDGPGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 530)	KCD009	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLIIEHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQGSHVPVTFGAGTNLELK (서열번호 618)
KCD010	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYDMDWVKQSHGKSLEWIGHINPNNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCGTGDFAYWGHGTLVTVSA (서열번호 531)	KCD010	QIVLTQSPAIMSVSPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQKKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWSSYPPTFGAGTKLELK (서열번호 619)
KCD011	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSNTMSWVRQTPEKRLEWVAYITNGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHDYYTMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 532)	KCD011	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEIK (서열번호 620)
KCD013	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFKIKDTYMHWVKERPDQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCANAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 533)	KCD013	QIILTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 621)
KCD014	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITNGGGNTYYPDTIKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHGTGYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 534)	KCD014	EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPLTFGAGTKLELK (서열번호 622)
KCD015	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTEYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDSAAYYCTSAMEFWGQGTSVTVSS (서열번호 535)	KCD015	QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPRSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPFTFGGGTKLEVK (서열번호 623)
KCD016	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNFWMHWVKQRPGQGLEWIGFFNPSTAYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTA	KCD016	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDF

[0249]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	YLHLSSLTSEDSAVYYCARRDYGSSYG WYFDVWGAGTTVTVSS (서열번호 536)		GYYYCQHFWSTPTFGGGTKLEIK (서열번호 624)
KCD017	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTDY SITSGYSWHWIRQFPGNKLEWLGYIHS SGNTNYNPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQ LNSVTSEDTATYYCALHYYGSSFGWY FDVWGAGTTVTVSS (서열번호 537)	KCD017	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVYITCKASQ DVGTAVAWYQQTSGQSPKLLIYWASTR HTGVPDRFTGSGSGTDFTLTLSNVQSED LADYFCQQYTSYPLTFGAGTKLELK (서열번호 625)
KCD018	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASG YTFTSYTVHWVKQRPGQGLEWIGYINP SSGFTDYNQKFKDKTTLTADISSSTAYI QLSSLTSEDSAVYYCARRGVNWSWFA YWGQGTLVTVSA (서열번호 538)	KCD018	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQ SVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPQLLI YWASTRESGVPERFTGSGSGTDFTLTISS VQAEDLAVYYCHQYLSSWTFGGGTKL EIK (서열번호 626)
KCD019	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG YTFATYTIHWVKQRPGQGLEWIGYLNL RNDYTHYNQKFRDKAALTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYNCAFRLGNDRQ GWYFDVWGAGTTVTVSS (서열번호 539)	KCD019	DIVMTQAHRFMSTSVGDRVIISCKASQD VGTAVAWYQQTPGQSPKILIYWTSTRH TGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDL ADYFCQQYTTYPLTFGGGTKLEIK (서열번호 627)
KCD022	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGY SITSGYSWHWIRQFPGNTLEWMGYIHY SGSTNYNPSLESRISFTRDTSKNQFFLQ LNSVTTEDTATYYCALHFYGYNLGWY FDVWGAGTTVTVSS (서열번호 540)	KCD022	DIVMTQSHKFMSTSIGDRVIITCKASQD VGTTVAWYQQRPGQSPKLLIYWASTRH TAVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDL ADYFCQQYTSYPLTFGAGTQLELK (서열번호 628)
KCD023	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGY TFTDYNIDWVKQSHGKSLEWIGDINPN NGGINYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY MELRSLTSEDTAVYYCGTGDYAYWGQ GTLVTVSA (서열번호 541)	KCD023	QIVLTQSPAFMSASPGEKVTLTCSASSS VSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNL ASGVPGRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AASYFCHQWTSYPPTFGAGTKLELK (서열번호 629)
KCD030	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASG YTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGYIN PSIGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSAVFYCATFIYYAMDY WGQGTSVTVSS (서열번호 542)	KCD030	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNI NVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHT GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIAT YYCQQGQSYPYTFGGGTKLEIK (서열번호 630)
KCD033	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCTASGY SFTGYTMTWVKQSHGKNLEWIGLINPY NGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSIAY MELLSLTSEDSAVYYCARRHYGSNWD YWGQGTTLTVSS (서열번호 543)	KCD033	DIKLTQSPSSIYTSLGERVTITCKASQDIN TYLSWFQQRPGKSPKTLIYRADRLVDG VPSRVRGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGI YYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (서열번호 631)

[0250]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
KCD036	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMTWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTNYNQKFKGKATFTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARRHYGSSWDYWGQGTTLTVSS (서열번호 544)	KCD036	DIKLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEEMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (서열번호 632)
KCD038	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFADYTMNWVKQSHGKSLEWIGLINPYNGGTSYNQKFMGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARWGTYSHNYDYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 545)	KCD038	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWYFQKPGQSPKFLIYKVSNRFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPFTFGSGTKLEIK (서열번호 633)
KCD039	EVQLQQSGPEMVKPGASMKISCKASGYSFADYTLNWVKQSHGKSLEWIGLINPYNGGTSYNQKFMGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTRWGTYSHNYDYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 546)	KCD039	DVVMTQTPLSLSVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGITDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPFTFGSGTKLEIK (서열번호 634)
KCD040	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASDFNIKDTYMHWVMQRPEQGLEWIGKIDPANGNTEFDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCTRAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 547)	KCD040	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAGSSVSYMYWYQQKPGSSPRVLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSNYPYTFGGGTKLEIK (서열번호 635)
KCD042	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTYIHWVSQRPEQGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCVNAMEYWGQGTSVTVSS (서열번호 548)	KCD042	QSVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSANSSVSDMYWFQQRPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSTYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 636)
KCD044	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIKHTYMHWVSQRPERGLEWIGKIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCLNAMEYWGQGTSVTVSS (서열번호 549)	KCD044	QSVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSANSSVSDMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSTYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 637)
KCD047	EVQLQQSGAEFVKPGASVRLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGYTKDDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 550)	KCD047	QIVLTQSPAVMSASPGEKVAMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSTYPFTPGSGTKLEIK (서열번호 638)
KCD048	EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKATYMHWVRQRPEKGLEWIGRIDPA	KCD048	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSATSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASG

[0251]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	NGHTIYDPQFQGKATITSDTSSNTAYLQLNSLTSEDTAVYYCAEAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 551)		VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDDATYYCQQWSNYPFTFGGGTKLEIK (서열번호 639)
KCD049	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSSYGVQWVRQPPGQGLEWLVVIWRDGSITYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNYNYYVMDYWGQGTAVTVSS (서열번호 552)	KCD049	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDKYGISFLNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDPAMYFCQQGKEVPWTFGGGTKLEIK (서열번호 640)
KCD050	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLNSYGVQWVRQPPGQGLEWLVVIWRDGTITYNSALKSRLSINKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNFNYYVMDYWGQGTAVTVSS (서열번호 553)	KCD050	DIVMTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDKYGISFLNWFQQKPGQPPRLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDPAVYFCQQGKEFPWTFGGGTKLEIK (서열번호 641)
KCD052	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLNSYGVQWVRQPPGQGLEWLGVIWRDGSITYNSALKSRLSIRKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCGRTSHYGNYNYYVMDYWGQGTAVTVSS (서열번호 554)	KCD052	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDKYGISFLNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDPAIYFCQQGKEVPWTFGGGTKLEIK (서열번호 642)
KCD056	EVKLVESGGGLVQPGGSLKVSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPEKRLEWVAYITNGGGSTYYPDTEKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRHDYYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 555)	KCD056	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTTLEIK (서열번호 643)
KCD057	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITNGGGATYYPDTVKGQFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCARHDFYALDFWGQGTSVTVSS (서열번호 556)	KCD057	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLKYDNLLYTFGGGTKLEIK (서열번호 644)
KCD058	EVKLVESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSRYIMSWVRLTPEKRLEWVAFITNGGGNTYHPDTVKGRFTISRDNANNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCARHDYYALDYWGQGTSVTVSS (서열번호 557)	KCD058	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEIK (서열번호 645)
KCD062	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITSGGSSTYYPDTVKGRFTISRDNAKSTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHAHFYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 558)	KCD062	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEIK (서열번호 646)

[0252]

[0253]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
KCD063	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSSYIMSWVRQTPEKRLEWVAYITNGGGSTYYPDTVKGRLTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRHAHYYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 559)	KCD063	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYITWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTKLEIK (서열번호 647)
KCD064	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYIMSWVRQTPEKRLGWVAYITSGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHGTGYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 560)	KCD064	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLYTFGGGTELEIK (서열번호 648)
KCD065	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSDFTNYNQNFADKATLTADRSSSTAYMQLSSLTSEESAVYYCAIRLGYDRQGWYFDVWGAGTTVTVSS (서열번호 561)	KCD065	DIVMTQSHKFLSTSLGDRVSITCKASQDVGSAVAWYQQKPGQSPDLLIYWTFTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSGDLADYFCQQYSNYPLTFGGGTKLEIK (서열번호 649)
KCD066	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTDYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSGGYTDYNQKFKDKTALTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRRDYWFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 562)	KCD066	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCHQYYSYLTFGAGTKLELK (서열번호 650)
KCD070	EIQLQQTGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYIILWVKQSHGKSLEWIGNINPYYDYTSYNLKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARSDGYYGGDYWGQGTSVTVSS (서열번호 563)	KCD070	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLADYFCQQYSSYPWTFGGGTTLEIK (서열번호 651)
KCD075	QVQLLQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFSNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSSINYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTGTDWYFDVWGAGTTVTVSS (서열번호 564)	KCD075	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSGGQGISNYLNWYQQKPDGTFKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDVATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 652)
KCD077	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGHTIYDPRFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCSRGLLGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 565)	KCD077	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYTASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPHMYTFGGGTKLEIK (서열번호 653)
KCD101	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSSTA	KCD101	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	YMQLSSLTSEDSAVYYCGRNGYDGSM DYWGQGTSVTVSS (서열번호 566)		YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 654)
KCD102	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVID PSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARNGYDGSM DYWGQGTSVTVSS (서열번호 567)	KCD102	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 655)
KCD103	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVID PSDSYTKYNQKFKDKATLTVETSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCAGNGYDGSM DYWGQGTSVTVSS (서열번호 568)	KCD103	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SNSLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS RVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIAT YFCQQANTLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 656)
KCD104	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVID PSDSYTYYNQKFKGKATLTVDTSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARNGYDGAM DYWGQGTSVTVSS (서열번호 569)	KCD104	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 657)
KCD110	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY SFTGYYMHWVKQSHGNILDWIGYIDP DNGVSSKNQKFTGKATVTADKSSSTA YMELRSLTSEDSAVYYCAGYYGSSWY WYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 570)	KCD110	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASG VPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAAT YYCQQWSSNPYTFGGGTKLEIK (서열번호 658)
KCD111	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY SFTDYYMHWVKQSHGNILDWIGYIDP YNGVSSYNQKFKGKATLSVDQSSSTA YMELRSLTSEDSAVYYCSSYYGSSPYW YFDVWGTGTRVTVSS (서열번호 571)	KCD111	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASG VPTRFSGSGSGTSYSLTISKLEAEDAATY YCQQWSSNPYTFGGGTKLEIK (서열번호 659)
KCD112	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY SFTAYYMNWVKHSPEKSLEWIGDINPS TGGTTYNQKFKARATLTVDKSSSTAY MQLKSLTSEDSAVYYCATTYYSGNSY VGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 572)	KCD112	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ DVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIFWTSTR HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED LALYYCQQHYTTPWTFGGGTKLEIK (서열번호 660)
KCD114	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY SFTAYYMNWVKQSPEKSLEWIGDINPS TGGTTYNQNFKAKATLTVDKSSSTAY MHLKSLTSEDSAVYYCATTYYSGNSY VGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 573)	KCD114	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ DVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIFWASTR HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED LALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (서열번호 661)

[0254]

[0255]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
KCD115	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY SFTGYYMNWVKQSPEKSLEWIGDINPS TGGTTYNQKFKAKATLTVDKSSSTAY MQLKSLTSEDSAVYYCATPYYYGSSY VGFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 574)	KCD115	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ DVSTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTR HTGVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAED LALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (서열번호 662)
KCD118	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAFGY TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP NSGDANYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAY WGHGTLVTVSA (서열번호 575)	KCD118	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGIYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 663)
KCD119	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDYYTNWMRQRHGESLEWIGDINP NTGDTSYNQKFRVKATLTVDKSSGTA YMGLRSLTSEDSAVYYCTREGPSFAY WGQGTLVTVSA (서열번호 576)	KCD119	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTTLEIK (서열번호 664)
KCD121	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP NNGDTSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAF MELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAYW GQGTLVTVSA (서열번호 577)	KCD121	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSNQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 665)
KCD122	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDYYKNWMRQRHGESLEWIGDINP NNGDANYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMELRSLTSEDSAVYFCAREGPSFAYW GHGTLVTVSA (서열번호 578)	KCD122	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 666)
KCD123	EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDFYKNWMRQRHGESLEWIGDINPN NGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY MELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAYW GQGTLVTVSA (서열번호 579)	KCD123	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 667)
KCD124	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDHYMNWVKQSHGKSLEWIGDINP NNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMELRSLTSGDSAVYYCTREGASFAF WGQGTLVTVSA (서열번호 580)	KCD124	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK (서열번호 668)
KCD125	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG NTFTSYGINWVKQRPGQGLEWIGYIYI GTGYTEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAY	KCD125	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI SGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSG VPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADY

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	MQLSSLTSEDSAIYFCVRKAYGNYGFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 581)		YCLQYASYPFTFGSGTKLEIK (서열번호 669)
KCD126	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSGKTFTSHGINWVKQRPGQGLEWIGYIYIGNGYNEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAYMQLSSLTFEDSAIYFCVRKAYGNYGFDDWGQGTTLTVSS (서열번호 582)	KCD126	DIQMTQSPTSLSASLGESVSLTCRASQEISGNLNWLQQKPDGSIKRLIYAASTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYANYPFTFGSGTKLEVK (서열번호 670)
KCD127	QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCKASGYTFTNFWMDWVKQRPGQGLEWIGNIYPSGSETHYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSGYYGSRYLYYFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 583)	KCD127	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRSTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIR (서열번호 671)
KCD128	QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCKASGYTFTSYWMDWVMQRPGQGLEWIGNIYPSGSETHYNQKFKDKATLTVDKSSTTAYMQLSSLTFEDSAVYYCARSGFIGSRYLYYFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 584)	KCD128	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASQDVSNAVAWYQLKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAADLAVYYCQQHYITPYTFGGGTKLEIK (서열번호 672)
KCD129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESMVYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGYYWYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 585)	KCD129	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRMEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK (서열번호 673)
KCD131	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASAYTFTDYYINWVKQRPGQGPEWIGWIFPGSNSTYSNEKFEVKATLTVDESSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARLGYFGSSYHALDYWGQGTSVTVSS (서열번호 586)	KCD131	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWFQQKQGKSPRLLVYSATNLPDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINILQSEDFGSYYCQHFWGTPWTFGGGTKLEIK (서열번호 674)
KCD132	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARTGYYSNLYAVDYWGQGTSVTVSS (서열번호 587)	KCD132	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYVATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGNYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEMR (서열번호 675)
KCD133	EVQLVESGGGLLQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSSNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMFYLEMNNLKTEDTAMYYCVRDRGYYYVMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 588)	KCD133	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYQQKPGQPPKLLINAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIK (서열번호 676)
KCD134	EVQLQQSGPEMVKPGASVKMSCQASGYTFTDYYMNWVKQSHGETLEWIGDIY	KCD134	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDDDMNWYQQKPGEPPKLLISEGNSLRP

[0256]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	PHNGYTAYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDSAVYYCARGGQLRL PAWFAYWGQGTLVTVSA (서열번호 589)		GVPSRFSSSGYGTDFVFTIEDMFSEDVA DYHCLQSDNLPYTFGGGTKLEIK (서열번호 677)
KCD135	EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASG YIFTDYSIHWVKQSHGKSLEWIGYINPN NGGTSYNQKFKGKATLTVNKSSTTAY MELRSLTSEDSAVYFCARDTTIVGDYW GQGTTLTVSS (서열번호 590)	KCD135	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQ HVGTNVVWYQQKPGQSPKALIYSASYR YSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNVQSED LAEYFCQQFNSYPLTFGGGTKLEIK (서열번호 678)
KCD136	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCSASGF NIKNTYMHWVNQRPEQGLEWIGRIDP ANGITKYAPNFQGKATITADTSSNTAY LQLSNLTSEDTAIYYCTRAMDYWGQG TSVTVSS (서열번호 591)	KCD136	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSS VSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDISNLASG VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT YYCQQWDTYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 679)
KCD137	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGF TFSGYGMSWVRQIPDKRLEWVAISSRD NSFTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYL QMSSLKSEDTALYFCTRHPYLPTGGYV MDYWGQGTSVTVSS (서열번호 592)	KCD137	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQ DVGTAVAWYQQRPGQSPKLLIYWAST RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTVSNVQSE DLADYFCQQYTSYPLTFGAGTKLELK (서열번호 680)
KCD139	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG YTFTSYGINWVKQRPGQGLEWIGYIYI ANGYTENNEKFKGKAKLTSDISSSTAY MQLSSLTSEDSAIYFCARRFDYAGALD YWGQGTSVTVSS (서열번호 593)	KCD139	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV DSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIHRAS NLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAD DVAIYYCQQTNDDPYTFGGGTNLEIK (서열번호 681)
KCD200	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTSYYKNWMRQRHGESLEWIGDINPN SGDTAYNQKFKGKATLTVDRSSSTAY MELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFAYW GQGTLVTVSA (서열번호 594)	KCD200	DVLMTQTPLSLPVSLGDQVSISCRSSQTI VHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK (서열번호 682)
KCD205	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSG NTFTSHGINWVKQRPGQGLEWIGYIYI GNGYNEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAY MQLSSLTSEDSAIYFCVRKAYGNYGFD DWGQGTTLTVSS (서열번호 595)	KCD205	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEI SGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSG VPKRFSGSSSGSDYSLTISSLESDDFADY YCLQYASYPFTFGSGTKLEIK (서열번호 683)
KCD207	AVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGF SFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KSNNYATYYADSVKDRFTLSRDDSES MLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRQGFY WYFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 596)	KCD207	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTI VHSNGNTYLEWYLQKSGQSPKLLIYNV SNRFSGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCFQGSHVPYTFGSGTKLEIK (서열번호 684)

[0257]

[0258]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
KCD208	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTVSGF NIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDP ANGDTTYAPKFQGKATITADTSSNSAY LHLSRLTSEDTAIYYCSLYDYDGYWGQ GTTLTVSS (서열번호 597)	KCD208	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSI SSSSLHWYRQKSGTSPKPWIYGTSHLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWDTYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 685)
KCD210	EVQLQQSGPVLVKPGASVTMSCKASG YTFTEYYMNWVKQSHGKSLDWIGVIN PYSGGTSYKQKFKDKATLTVDKSSSTA YMELNGLTSEDSAVYFCVRGGLRRNY FDYWGQGTTLTVSS (서열번호 598)	KCD210	EIVLTQSPALMTASPGEKVTITCSVSSSIS STNLHWYQQKSGTSPKPWIFGTSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISNMEAEDAA TYYCQQWNSYPFTFGTGTKLEIK (서열번호 686)
KCD212	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGF TFSRYGMSWVRQTPDKRLEWVATISS AGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLF LQMSSLKSEDTAMYYCARPLNYYGTS SFDYWGQGTTLTVSS (서열번호 599)	KCD212	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSS VSSTYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNL ASGVPPRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDA ATYYCQQYDSSPNTFGAGTKLELK (서열번호 687)
KCD214	EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCTASGF NIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDP ANGNTEYAPKFQGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDTAIYYCALYDYDGYWGQ GTTLTVSS (서열번호 600)	KCD214	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCRVSSSI SSSSLHWYQQKSGTSPKPWIYGTSNLAS GVPVRFSGSRSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWSDYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 688)
KCD216	QVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFIDYYINWVKQRPGQGLEWIGWIFPG SDSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY MLLSSLTSEDSAVYFCARYGYYGSSFY AMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 601)	KCD216	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENI YSNLAWYQQKQGKSPQLLVYAATNLA DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDF GSYYCQHFWGTPPTFGGGSKLEIK (서열번호 689)
KCD217	QVQVQQPGAEFVKTGASVKLSCKTSG YTFIDYWIHWVKQRPGHGLEWIGRIDP NTGGSKYYEKFKRKATLTVDKPSRTV YMQLSSLTSEDSAVYYCTREYDYGWF GYWGQGTLVTVSE (서열번호 602)	KCD217	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENI YGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLA DGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDV ATYYCQNVLSTPWTFGGGTKLEIK (서열번호 690)
KCD219	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGWIFPG SGSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY MLLSSLPSEDSAVYFCARYGYYGSSFY AMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 603)	KCD219	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENI YSNLAWYQQKQGKSPQLLVYAATNLA DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDF GSYYCQHFWGSPPTFGGGTKLEIK (서열번호 691)
KCD220	QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCKATG YTFTGYWIEWVKQRPGHGLEWIGETLP GSDSNNYNEKFKGKATFTADTSSNTAY	KCD220	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSNLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT

[0259]

ID	중쇄 가변 영역 아미노산 서열	ID	경쇄 가변 영역 아미노산 서열
	MQLSSLTTEDSAIYYCARDYSNYWYF DVWGTGTTVTVSS (서열번호 604)		YFCQQDSKHRTFGGGTKLEIK (서열번호 692)
KCD224	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFS LTSYGVDWIRQSPGKGLEWLGVIWGV GSTNYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAMYYCARSYDGSYWYF DVWGTGTTVTVSS (서열번호 605)	KCD224	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQVI SNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAT YYCQQYSKLPYTFGSGTKLEIK (서열번호 693)
KCD225	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGY TFTDYYINWMKQRPGQGLEWIGWIFPG SDSTYYNEKFKGKATLTVDKSSSTAY MLLSSLTSEDSAVYFCARLGYYSHSYY AMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 606)	KCD225	DIQMTQSPASLSVSTGETVTITCRASENI YSNLAWFQQKQGKSPQLLVYAATNLA DGVPSRFSGSGSGTQYSLKITSLQSEDFG SYYCQHFWGTPLTFGAGTKLDLK (서열번호 694)
KCD229	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGF SFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KSNNYATYYADSVKDRFTIFRDDSESM LYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGYYW YFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 607)	KCD229	DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYNV FNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYYCFQGSHVPYTFGSGTKLEIK (서열번호 695)
KCD230	QVQLQQPGTELVKPGASVKLPCKASG YTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGEID PSDTYINYNQKFKGKATLTVDTSSTTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARYTTIMASD YWGQGTTLTVSS (서열번호 608)	KCD230	DIQMTQTTSSLSVSLGDRVTISCRASQDI TNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAT YYCQQYSKLPWTFGGGTKLEIK (서열번호 696)
KCD232	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGF SFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSESM VYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGYYW YFDVWGTGTTVTVSS (서열번호 609)	KCD232	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYRV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRME AEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEI K (서열번호 697)

표 1D: CDR 정의를 기반으로 한 변이 인간화 CFD 길항제 항체의 가변 영역 서열

[0260]

	CDR1	CDR2	CDR3
경쇄	$QX_1X_2X_3HX_4NX_5X_6X_7YX_8E$, 여기서 X_1은 T, D, G, H, I, N, Q, R, V 또는 W; X_2는 I, A 또는 V; X_3은 V, A, D, E, F, I, K, L, Q, R, S, W 또는 Y; X_4는 S, A, D, F, G, I, R, T, V 또는 W; X_5는 G, E, F 또는 S; X_6은 D 또는 E; X_7은 T, S 또는 V; X_8은 L 또는 I	$X_1X_2LX_3X_4KX_5X_6X_7RX_8$; 여기서 X_1은 N, D, E, R, S, V 또는 Y; X_2는 L 또는 I; X_3은 I 또는 T; X_4는 Y, D, E, F, G, L, R, S, T 또는 V; X_5는 V, A 또는 I; X_6은 S, A, F, G, K, L, Q, R, T 또는 Y; X_7은 N, E, G, H, I, L, Q, R, T 또는 Y; X_8은 F, E, G, I, L, R 또는 W	$X_1QGSX_2X_3PX_4T$, 여기서 X_1은 F 또는 M; X_2는 H, A, E, F, G, L, N, Q, T, V, W 또는 Y; X_3은 V, W, Q 또는 N; 및 X_4는 P 또는 V
중쇄	$GYX_1FTX_2X_3X_4X_5$, 여기서 X_1은 T, D, E, F, H, I, K, P, R, S, W 또는 Y; X_2는 D, A, F, G, S, V 또는 Y; X_3은 Y 또는 F; X_4는 Y 또는 P; X_5는 M, H 또는 I	$WIGDX_1X_2X_3X_4X_5$ $X_6X_7X_8$ X_9, X_{10}, 여기서 X_1은 I, L 또는 V; X_2는 N, A 또는 G; X_3은 P 또는 T; X_4는 N, A, D, G, H, I, L, R, T,V, W 또는 Y; X_5는 T, I, K, L, Q, R, S 또는 V X_6은 G 또는 V; X_7은 임의의 아미노산; X_8은 I를 제외한 임의의 아미노산; X_9는 K 또는 R을 제외한 임의의 아미노산; X_{10}은 I 또는 W를 제외한 임의의 아미노산.	$X_1REGPX_2FX_3X_4$, 여기서 X_1은 T, A 또는 Q; X_2는 S 또는 A; X_3은 A 또는 R; 및 X_4는 Y, A, H, F, V, Y 또는 L

[0261]

	CDR1	CDR2	CDR3
경쇄	$QX_1X_2X_3HX_4NX_5X_6X_7Y$, 여기서 X_1은 T, D, G, H, I, N, Q, R, V 또는 W; X_2는 I, A 또는 V; X_3은 V, A, D, E, F, I, K, L, Q, R, S, W 또는 Y; X_4는 S, A, D, F, G, I, R, T, V 또는 W; X_5는 G, E, F 또는 S; X_6은 D 또는 E; X_7은 T, S 또는 V	KX_1X_2; 여기서 X_1은 V, A 또는 I; X_2는 S, A, F, G, K, L, Q, R, T 또는 Y	$X_1QGSX_2X_3PX_4T$, 여기서 X_1은 F 또는 M; X_2는 H, A, E, F, G, L, N, Q, T, V, W 또는 Y; X_3은 V, W, Q 또는 N; 및 X_4는 P 또는 V
중쇄	$X_1X_2X_3$, 여기서 X_1은 D, A, F, G, S, V 또는 Y; X_2는 Y 또는 F; X_3은 Y 또는 P	$X_1X_2X_3X_4X_5$ $X_6X_7X_8$, 여기서 X_1은 I, L 또는 V; X_2는 N, A 또는 G; X_3은 P 또는 T; X_4는 N, A, D, G, H, I, L, R, T, V, W 또는 Y; X_5는 T, I, K, L, Q, R, S 또는 V X_6은 G 또는 V; X_7은 임의의 아미노산; X_8은 I를 제외한 임의의 아미노산	$EGPX_1FX_2X_3$, 여기서 X_1은 S 또는 A; X_2는 A 또는 R; 및 X_3은 Y, A, H, F, V, Y 또는 L

표 1E: 최종 중쇄 및 경쇄 후보 및 이들의 변이체의 아미노산 서열(KCD119 변이체 서열: CDR 실시형태는 밑줄로 표시함)

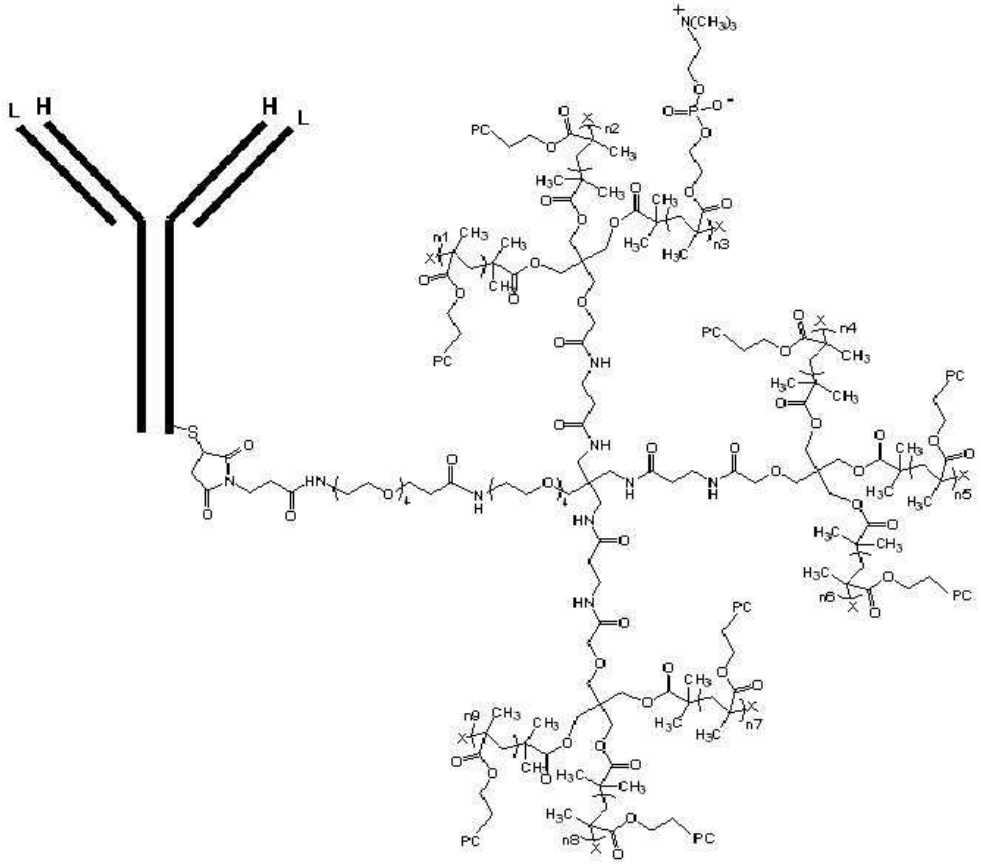
중쇄	
KCD119 TAF	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPNTGDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 698)
54V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVTGDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 699)
54I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 700)
54V59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVTGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 701)
54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 702)
34I54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 703)
31S34I54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 704)
34I54I59D84S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMSSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 705)
31S34I54I59D84S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITGDTDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMSSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGTLVTVSS (서열번호 706)
경쇄	
KCD119 TAF	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHVPPTFGQGTKVEIK (서열번호 707)

[0262]

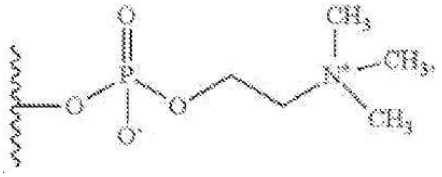
54R	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIRKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHVPPTFGQGTKVEIK (서열번호 708)
101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (서열번호 709)
54R101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIRKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (서열번호 710)
54G101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQTIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLIGKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHVPVTFGQGTKVEIK (서열번호 711)

[0263]

[0264] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항-VEGF-A 항체 접합체가 다음의 구조를 갖는 것을 더 포함할 수 있다:

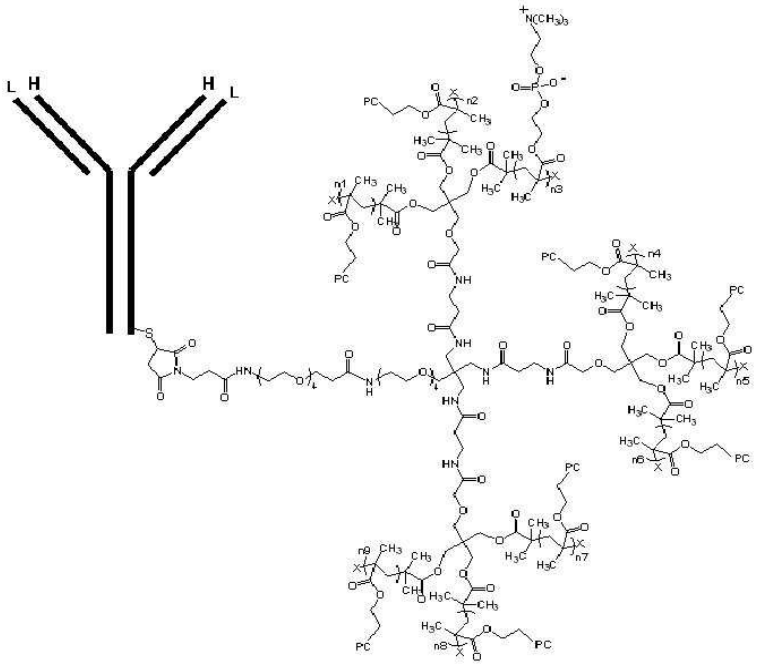


[0265]

[0266] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는  이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X = a) OR 여기서 R = H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) H 또는 c) Br을 포함하는 임의의 할로겐화물; 및 i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

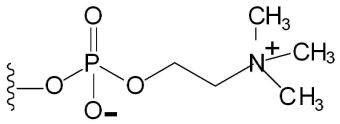
[0267] 일부 실시형태에서, 항 VEGF A 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하며, 221번 위치는 T이고, 항 VEGF-A 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함하고, Kabat 4번 위치는 L이다. 선택적으로, 항-VEGF-A 중쇄 아이소타입은 인간 IgG1이다. 선택적으로, 항-VEGF-A 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이다. 일부 실시형태에서, VEGF-A에 결합하는 항체는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1; 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2; 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3; 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1; 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2; 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3; 다음 돌연변이 중 적어도 하나(EU 넘버링): L234A, L235A 및 G237A; 및 다음 돌연변이 중 적어도 하나(EU 넘버링): Q347C 또는 L443C;를 포함한다.

[0268] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항-IL-6 항체 접합체가 다음의 구조를 갖는 것을 더 포함할 수 있다:



[0269]

[0270] 여기서 항-IL-6 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-IL-6 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-IL-6 항체(및/또는 Ab-



Trap)에 결합되고; PC는 이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X = a) OR 여기서 R = H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) H 또는 c) Br을 포함하는 임의의 할로겐화물; 및 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 500의 정수이다. 일부 실시형태에서, X = OR이고, 여기서 R은 다음과 같고: 당, 아미노알킬, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보닐옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, --CO--O--R_7, 카보닐 --CCO--R_7, --CO--NR_8R_9, --$(CH_2)_n$--$COOR_7$, --CO--$(CH)_n$--$COOR_7$, --$(CH_2)_n$--NR_8R_9, 에스터, 알콕시카보닐, 아릴옥시카보닐, 여기서 n은 1 내지 6의 정수이고, 여기서 각각의 R_7, R_8 및 R_9는 다음으로 이루어진 군으로부터 별도로 선택된다: 수소 원자, 할로겐 원자, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보일옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, 5-원자 고리 및 6-원자 고리.

[0271] 일부 실시형태에서, 항-IL-6 항체 또는 본 명세서에 달리 사용되는 "IL-6 항체-VEGF Trap 융합", "IL-6 항체-VEGF Trap", "Ab IL-6-VEGF Trap", "항IL-6-VEGF Trap", "VEGFR-항IL6", "VEGFR-항IL-6", "VEGF Trap-항-IL6 항체 융합"(TAF), "VEGF Trap-IL6", "VEGFR IL-6", "IL6-VEGFR" 또는 유사 용어 또는 반대 용어(예를 들어, "VEGF Trap-IL-6 Ab", "VEGF Trap-IL-6 항체 융합" 등)은 IL-6 항체와 VEGF Trap 사이의 융합을 나타낸다. 실시형태가 도 9에 도시되어 있다. 일반적으로 사용되는 경우, 두 용어의 순서는 바뀔 수 있다. 특이적으로 사용

되는 경우, 두 용어의 순서는 작제물에서 구성 요소의 상대적인 위치를 나타낸다. 용어 "Ab-Trap", "IL-6 Ab-VEGF Trap", "Ab IL-6 VEGF Trap" 또는 "Ab IL-6-Trap" 또는 "항IL-6 VEGF Trap", "Trap-Ab", 항IL-6-VEGFR, 항IL6-VEGFR 또는 기타 유사 용어 또는 반대 용어(예를 들어, "VEGF Trap-IL-6 Ab", "VEGF Trap-IL-6 항체 융합" 등)는 Ab가 VEGF 결합 단백질의 관련 도메인에 융합되어 VEGF trap을 제공하는 배열을 나타낸다. 위에 언급된 바와 같이, VEGF 결합 단백질의 이 부분은 VEGF가 VEGF 수용체에 결합하는 것을 막는 것이다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, Trap 및 항체 부분의 배열(순서)은 다양할 수 있다. 따라서, 달리 명시적으로 또는 맥락을 통해 나타나지 않는 한, Ab-Trap(또는 I1-6/VEGF Trap 등) 융합에 관해 본 명세서에 사용된 표현은 항체와 Trap의 위치에 대한 모든 기술된 실시형태를 나타낸다. 따라서, 달리 설명되지 않는 한, Ab-Trap(또는 I1-6/VEGF Trap 등)은 도 9의 좌측 실시형태 및 도 9의 우측 실시형태 및 도 9의 두 실시형태를 나타낸다. 따라서, 일반적인 언어는 편의상 3가지 옵션 모두를 기술하는 것으로 표시된다. 방향이 구체적으로 표시되는 경우, 이는 예를 들어 "배열"이 다음 중 하나 일 수 있음을 명시함으로써 표시될 수 있다: Trap-Ab, Trap IL-6 Ab, VEGF Trap Ab IL-6, VEGF Trap Ab IL6. 유사하게, 본 실시예 중 일부의 맥락에서 예시의 맥락에 의해 표시되는 분자의 특정 방향 또는 배열이 인식될 것이다. 두 배열(대안 및 결합)은 본 명세서에 제공되는 융합 단백질의 모든 논의에 대해 명시적으로 고려된다. 추가로, 순서로 인해, IL-6 Ab라는 표현이 융합 단백질의 맥락에서 사용되는 경우 이 표현에는 항체가 인접해 있는 도 9 좌측의 옵션 및 TRAP이 Ab "내부"에 위치한 옵션(도 9 우측) 모두가 포함되는 것으로 이해된다. 다시 말해, 용어 "Ab" 또는 "항체"는 융합 단백질의 맥락(또는 기타 유사 용어)에서 사용되는 경우 달리 언급되지 않는 한 3가지 옵션(도 9의 좌측, 도 9의 우측 및 두 옵션 모두) 모두를 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF Trap은 다음 방식들 중 하나의 방식으로 IL-6에 융합된다: IL-6 VH를 포함하는 중쇄의 N-말단 끝에 융합; 또는 IL-6 VH를 포함하는 중쇄의 힌지 영역과 CH1 도메인 사이에 융합. 항체 또는 이의 단편을 지칭하는 명칭에 사용되는 경우 Ab, 항체, "항" 또는 기타 유사 용어의 명칭 사이에 차이는 없다. "I1-6" 또는 "IL6" 또는 "IL-6"의 명칭 사이에 차이는 없다. IL-6와의 융합 작제물을 언급하는 경우, 본 명세서에 사용된 용어 "VEGF", "VEGFR", "VEGF Trap", "VEGFR Trap"은 호환 가능하게 사용된다. 용어는 IL-6 융합 배열과 별개로 사용되는 경우 다른 의미를 가질 수 있으며, 해당 용어의 맥락에 따라 달라질 것이다.

[0272] 일부 실시형태에서, 항체는 VEGF Trap 서열에 연결 또는 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 Trap 서열은 표 2A에 나타낸 바와 같을 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열은 표 2A에 나타난 것과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 표 2A에 나타난 것과 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 동일하다. 일부 실시형태에서, 미국 공개 특허 제20150376271호의 VEGF Trap 분자들 중 임의의 것이 본 명세서에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, VEGF Trap 서열은 다음의 방식들 중 하나의 방식으로 IL-6에 융합된다: IL-6 VH를 포함하는 중쇄의 N-말단 끝에 융합(도 9의 좌측); 또는 IL-6 VH를 포함하는 중쇄의 힌지 영역과 CH1 도메인 사이에 융합(도 9의 우측). 달리 명시되지 않는 한, 대안적인 것과 혼합인 경우의 두 옵션 모두가 임의의 Ab-Trap 융합이 논의되는 본 명세서에 제공되는 실시형태에 대해 고려된다. 일부 실시형태에서, 용어 "Trap"은 적어도 하나의 VEGF와 VEGFR 사이의 신호전달을 길항할 수 있는 전장 세포외 영역 또는 이의 임의의 부분 또는 서로 다른 VEGF로부터의 부분들의 조합을 의미한다. 바람직하게는, 세포외 trap 부분은 VEGFR-1, -2 또는 -3 중 적어도 하나의 도메인을 포함하며, 보다 바람직하게는 D2 및 D3와 같은 적어도 둘의 인접한 도메인을 포함한다. 선택적으로, 세포외 도메인은 적어도 둘의 서로 다른 VEGFR로부터의 적어도 하나의 도메인을 포함한다. 바람직한 세포외 도메인은 VEGFR-1의 D2 및 VEGFR-2의 D3를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다.

표 2

표 2A: VEGFR1 의 도메인 2 및 VEGFR2 의 도메인 3 의 융합 서열.

[0273]

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTC EATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (서열번호 114)

[0274] 일부 실시형태에서, IL-6 Ab VEGF Trap 작제물은 표 2B 또는 2B-1에 제공된 서열 중 임의의 것을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 작제물은 표 2B 또는 2B-1의 서열과 적어도 예를 들어 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 그 이상 동일할 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은, 항체 IL-6 도메인이 표 1E의 CDR 중 하나 이상을 함유하지 않는다는 것을 제외하고, 이러한 백분율과 일치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 VEGF Trap 서열(예를 들어, 표 2C)과 함께, 도 5에서 식별되는 서열들 중 하나 이상, 예를 들어 CDR 중 하나 이

상(상자 표시한 CDR 중 2, 3, 4, 5 또는 6을 포함) 및/또는 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 함유하는 것이다. 일부 실시형태에서, 이 서열은 다른 것에 직접적으로 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 유연성 연결 서열 또는 부분이 사용될 수 있다. 연결 서열은 Ab 서열과 VEGF Trap 서열 사이에 위치할 수 있다. 이러한 서열은 5 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 연결 서열은 약 4:1의 비율로 G와 S를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 다음 서열을 포함한다: GGGGSGGGGS(서열번호 748). 일부 실시형태에서, 임의의 유연성 링커가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-6 Ab의 Fc 부분은 IgG1이다.

표 2B: 이중 억제 분자에 대한 중쇄 및 경쇄 서열. CDR은 중쇄 및 경쇄에 밑줄로 표시, VEGF trap 서열은 검은색으로 굵게 표시. Gly-Ser 링커는 이탤릭체로 표시함.

ID	중쇄	경쇄
A	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ LWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 712)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 730)
B	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ LWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 731)

[0275]

	SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 713)	
C	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVT DRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ LWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 714)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 732)
D	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 733)

[0276]

	AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 715)	
E	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 716)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 734)
F	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 735)

[0277]

	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 717)	
G	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QAWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 718)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 736)
H	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QAWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 737)

[0278]

	SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 719)	
I	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEI GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSK HQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*GGGGSG GGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSP FAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTV TDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QAWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSCSPGK (서열번호 720)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 738)
J	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAIS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 739)

[0279]

	TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 721)	
K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAIS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 722)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 740)
L	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAIS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 741)

[0280]

	TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 723)	
M	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 724)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 742)
N	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 743)

[0281]

	TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 725)	
O	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWS WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWG YYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATV NGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC SPGK (서열번호 726)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 744)
P	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAW GYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFV EMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT VNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 745)

[0282]

	LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS CSPGK (서열번호 727)	
Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAW GYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFV EMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT VNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS CSPGK (서열번호 728)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 746)
R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMH WVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAW GYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSC*GGGGSGGGGS*SDTGRPFV EMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEAT VNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAA SSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYW YQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 747)

[0283]

	LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS CSPGK (서열번호 729)	

[0284]

표 2B-1.

서열번호	서열
1	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENN LNLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKV LIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRAL RQM
2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY SDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSS
3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIK

[0285]

표 2C: 항-IL-6 중쇄 가변 영역 서열. CDR 은 밑줄 표시함.

ID	서열
I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFS LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSS (서열번호 89)
II	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSS (서열번호 90)
IIa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 256)
IIb	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 257)
IIc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 258)
IId	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQTWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 259)
IIe	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQVWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 260)
IIf	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 261)
IIg	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYYALDIWGQGTLVTVSS (서열번호 262)

[0286]

표 2D: 항-IL-6 경쇄 가변 영역 서열. CDR 은 밑줄 표시함.

ID	서열
III	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIK (서열번호 91)
IV	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIK (서열번호 92)
V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIK (서열번호 93)

[0287]

[0288] 일부 실시형태에서, 항체는 표 2E(표 2E1, 표 2E2 및/또는 표 2E3을 포함함)의 CDR 중 하나 이상(또는 임의의 것)을 갖는다.

표 2E1.

		서열
중쇄	CDR1	GFTFSPFAMS (서열번호 94)
	CDR2	KISPGGSWTYYSDTVTG (서열번호 95)
	CDR3	QLWGYYALDI (서열번호 171)
경쇄	CDR1	SASISVSYMY (서열번호 96)
	CDR2	DMSNLAS (서열번호 97)
	CDR3	MQWSGYPYT (서열번호 98)

[0289]

표 2E2.

		서열
중쇄	CDR1	PFAMS (서열번호 244)
	CDR2	KISPGGSWTYYSDTVTG (서열번호 245)
	CDR3	QLWGYYALDI (서열번호 246)
경쇄	CDR1	SASISVSYMY (서열번호 247)
	CDR2	DMSNLAS (서열번호 248)
	CDR3	MQWSGYPYT (서열번호 249)

[0290]

표 2E3.

		서열
중쇄	CDR1	GFTFSPFAMS (서열번호 250)
	CDR2	WVAKISPGGSWTYYSDTVTG (서열번호 251)
	CDR3	ARQLWGYYALDI (서열번호 252)
경쇄	CDR1	SASISVSYMY (서열번호 253)
	CDR2	LLIYDMSNLAS (서열번호 254)
	CDR3	MQWSGYPYT (서열번호 255)

[0291]

[0292] 일부 실시형태에서, IL-6 길항제 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2 및/또는 2E3에 나타난 중쇄 가변 영역 중 임의의 하나의 3개의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2 및/또는 2E3에 나타난 경쇄 가변 영역 중 임의의 하나의 3개의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 항체는 표 2C에 나타난 중쇄 가변 영역 중 임의의 하나의 3개의 CDR 및 표 2D에 나타난 경쇄 가변 영역 중 임의의 하나의 3개의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 CDR은 다음 표 3(표 3A 및/또는 3B를 포함함) 또는 표 4(표 4A 및/또는 4B를 포함함)에 지정된 것들 중 하나 이상이다.

표 3

표 3A: 항 IL-6 중쇄 CDR 서열.

ID	CDR1	CDR2	CDR3
I	GFTFSPFAIS (서열번호 99)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 100)	ARQLWGYYALDV (서열번호 101)
II	GFTFSPFAWS (서열번호 102)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 103)	ARQLWGYYALDV (서열번호 104)
IIa	GFTFSPFAMH (서열번호 49)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 50)	ARQAWGYYALDI (서열번호 51)
IIb	GFTFSPFAMH (서열번호 52)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 53)	ARQSWGYYALDI (서열번호 54)
IIc	GFTFSPFAMH (서열번호 55)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 56)	ARQGWGYYALDI (서열번호 57)
IId	GFTFSPFAMH (서열번호 58)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 59)	ARQTWGYYALDI (서열번호 60)
IIe	GFTFSPFAMH (서열번호 61)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 62)	ARQVWGYYALDI (서열번호 63)
IIf	GFTFSPFAMH (서열번호 64)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 65)	ARQQWGYYALDI (서열번호 66)
IIg	GFTFSPFAMH (서열번호 67)	VAKISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 68)	ARQKWGYYALDI (서열번호 69)

[0293]

표 3B: 항 IL-6 중쇄 CDR 서열.

CDR1	CDR2	CDR3
PFAMH (서열번호 172)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 173)	QAWGYYALDI (서열번호 174)
PFAMH (서열번호 175)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 176)	QSWGYYALDI (서열번호 177)
PFAMH (서열번호 178)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 179)	QGWGYYALDI (서열번호 180)
PFAMH (서열번호 181)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 182)	QTWGYYALDI (서열번호 183)
PFAMH (서열번호 184)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 185)	QVWGYYALDI (서열번호 186)
PFAMH (서열번호 187)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 188)	QQWGYYALDI (서열번호 189)
PFAMH (서열번호 190)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 191)	QKWGYYALDI (서열번호 192)
PFAIS (서열번호 193)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 194)	QLWGYYALDV (서열번호 195)
PFAWS (서열번호 196)	KISPGGSWTYYSDTVTD (서열번호 197)	QLWGYYALDV (서열번호 198)

[0294]

표 4

표 4A: 항 IL-6 경쇄 CDR 서열.

ID	CDR1	CDR2	CDR3
III	SASISVSYLY (서열번호 105)	LLIYDDSSLAS (서열번호 106)	QQWSGYPYT (서열번호 107)
IV	SASISVSYLY (서열번호 108)	LLIYDASSLAS (서열번호 109)	QQWSGYPYT (서열번호 110)
V	SASISVSYLY (서열번호 111)	LLIYDDSNLAS (서열번호 112)	QQWSGYPYT (서열번호 113)

[0295]

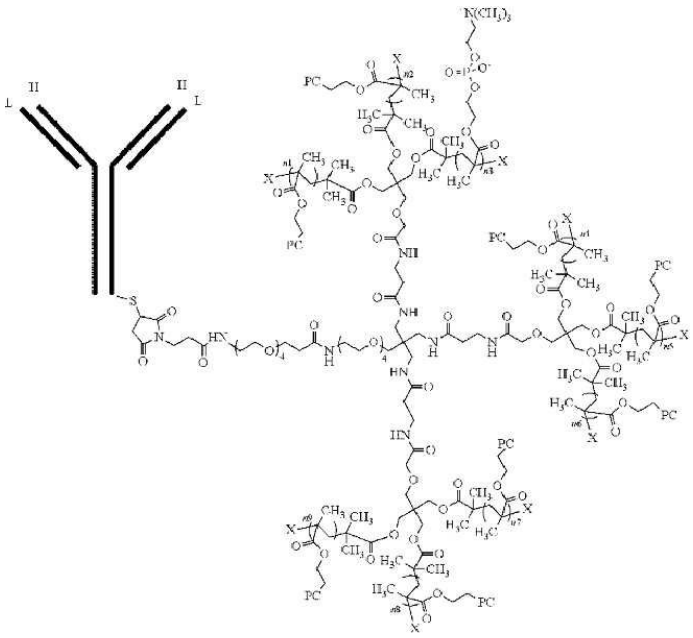
표 4B: 항 IL-6 경쇄 CDR 서열.

CDR1	CDR2	CDR3
SASISVSYLY 서열번호 199)	DDSSLAS 서열번호 200)	QQWSGYPYT 서열번호 201)
SASISVSYLY 서열번호 202)	DASSLAS 서열번호 203)	QQWSGYPYT 서열번호 204)
SASISVSYLY 서열번호 205)	DDSNLAS 서열번호 206)	QQWSGYPYT 서열번호 207)

[0296]

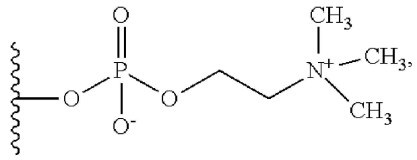
[0297] 일부 실시형태에서, IL-6에 결합하는데 사용되는 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2, 2E3, 3A, 3B, 4A 및/또는 4B의 서열 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-6에 결합하는데 사용되는 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2, 2E3, 3A, 3B, 4A 및/또는 4B의 서열 중 셋 이상을 포함하는 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-6에 결합하는데 사용되는 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2, 2E3, 3A, 3B, 4A 및/또는 4B 중 임의의 하나의 서열 중 6개를 포함하는 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-6에 결합하는 항체는 표 2C, 2D, 2E1, 2E2, 2E3, 3A, 3B, 4A 및/또는 4B 중 임의의 하나에 명시된 CDR 6개를 포함하는 항체와 결합을 위해 경쟁하는 것일 수 있다.

[0298] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항체 접합체가 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는 것을 더 포함할 수 있다:



[0299]

[0300] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합

되고; PC는 다음과 같고:  ; 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, X는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0301] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계, 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계, 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계를 포함한다.

[0302] 일부 실시형태에서, 이 방법은 여기서 세포 배양 상등액이 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 세포 배양 상등액을 가공하는 단계가 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 단계를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 세포 배양물이 세포 및 세포 잔해 제거로 정화되는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 용리제가 정화된 세포 배양 상등액을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법으로서, 이 방법은 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조건 하에서 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0303] 일부 실시형태에서, 생산물 생산 방법이 제공된다. 이 방법은 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 카오트로픽 제제를 제거하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함한다.

[0304] 일부 실시형태에서, 단백질 정제 시스템이 제공된다. 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제, Tris를 포함하는 중간 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다.

[0305] 일부 실시형태에서, 단백질 정제 시스템이 제공된다. 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제, 중간 Tris 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다.

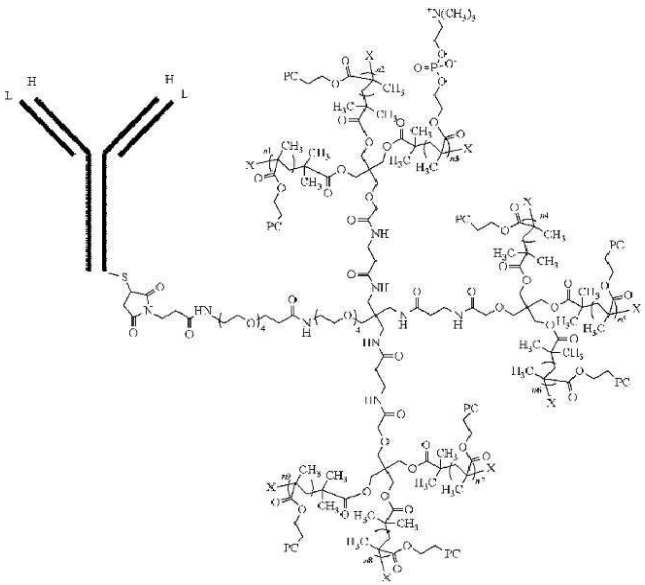
[0306] 일부 실시형태에서, 이 시스템은 여기서 칼럼이 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 리간드가 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제가 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제가 약 50mM 인산나트륨을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제가 약 250mM NaCl을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제가 약 50mM Tris를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제가 약 250mM NaCl을 더 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 중간 Tris 세척 완충제가 약 50mM Tris를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제의 pH가 약 7.2인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제2 세척 완충제의 pH가 약 7.8인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도가 약 2.8M인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 용출 완충제의 포름산나트륨 농도가 10mM을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0307] 일부 실시형태에서, 단백질 정제 시스템이 제공된다. 이 시스템은 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 여기서 항체는 각각 서열번호 2 및 서열번호 1의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 칼럼, 카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함한다.

[0308] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 단백질이 이중특이적 항체인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 이중특이적 항체가 VEGF 및 IL-6에 특이적인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 단백질이 항체 접합체인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스가 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 마그네슘염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 마그네슘염의 농도가 1.5 내지 3.5M인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 칼슘염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 칼슘염의 농도가 1 내지 3M인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 구아니디늄염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 구아니디늄염의 농도가 0.05 내지 3M인 것을 더 포함할 수 있다.

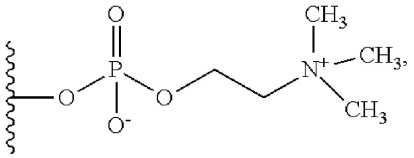
[0309] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액이 Tris를 더 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 Tris의 농도가 적어도 5mM인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 pH가 5.5 초과인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 용출물이 바이러스성 불순물을 더 함유하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 전 완충 용액이 인산나트륨을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 전 완충 용액이 Tris 및 염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0310] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항체 접합체가 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는 것을 더 포함할 수 있다:



[0311]

[0312] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 상기 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는 다음과 같고:



[0313] , 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X

는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0314] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항체 접합체가 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄가 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄가 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항-VEGF 항체 접합체가 다음을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다: MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 여기서 항체는 C449에서 중합체에 결합된다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 표적 단백질이 세포 배양에 의해 생산되는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세포 배양이 CHO 세포를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 핵산, 내독소, 소포제 또는 관심 표적 단백질 이외의 기타 소분자를 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 용리제가 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었음을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 생산물이 관심 단백질인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 불순물이 숙주 세포 단백질 불순물을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0315] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 개시내용의 정제 방법은 숙주 세포 단백질(HCP)와 같은 불순물을 제거하는데 효과적이다. 실시예에 상세하게 기술된 바와 같이, 이 방법은 관심 단백질의 높은 수득율 및 관심 단백질의 높은 농도를 달성하면서, 세척 용출물에서 HCP를 제거하는데 효과적이다. 예를 들어, 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 80%를 초과하거나, 81%를 초과하거나, 82%를 초과하거나, 83%를 초과하거나, 84%를 초과하거나, 85%를 초과하거나, 86%를 초과하거나, 87%를 초과하거나, 88%를 초과하거나, 89%를 초과하거나, 90%를 초과하거나, 91%를 초과하거나, 92%를 초과하거나, 93%를 초과하거나, 94%를 초과하거나, 95%를 초과하거나, 96%를 초과하거나, 97%를 초과하거나, 98%를 초과하거나, 99%를 초과하는 관심 단백질의 수득률을 초래한다.

[0316] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 개시내용의 정제 방법은 친화성 크로마토그래피-기반 정제 방법으로부터 불순물을 제거하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 크로마토그래피-기반 정제 방법은 이동상의 분석물과 고정상의 리간드 사이의 특이적 거대분자 결합 상호작용에 기반한 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 종의 높은 수득율을 달성하면서, 세척 용출물에서 불순물을 제거하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, 이 방법은 관심 종의 높은 농도를 달성하면서, 세척 용출물에서 불순물을 제거하는데 효과적이다. 예를 들어, 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 80%를 초과하거나, 81%를 초과하거나, 82%를 초과하거나, 83%를 초과하거나, 84%를 초과하거나, 85%를 초과하거나, 86%를 초과하거나, 87%를 초과하거나, 88%를 초과하거나, 89%를 초과하거나, 90%를 초과하거나, 91%를 초과하거나, 92%를 초과하거나, 93%를 초과하거나, 94%를 초과하거나, 95%를 초과하거나, 96%를 초과하거나, 97%를 초과하거나, 98%를 초과하거나, 99%를 초과하는 관심 종의 수득률을 초래한다.

[0317] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 개시내용의 정제 방법은 단클론 항체(mAb)를 포함하는 시료로부터 불순물을 제거하는데 효과적이다. 일부 실시형태에서, mAb를 구성하는 잔기는 전체적인 항체 형태 또는 구조를 변화시키기 위해 변경 또는 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, mAb를 구성하는 잔기는 결합 상대에 대한 결합 효능을 조절하기 위해 변경 또는 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, mAb를 구성하는 잔기는 항원 결합 부위에서 결합 효능 조절하기 위해 변경 또는 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, mAb를 구성하는 잔기는 접합 효능을 조절하

기 위해 변경 또는 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변경된 잔기는 조작된 시스테인일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단클론 항체는 VEGF에 특이적인 도메인을 포함한 특이적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 특이적 결합 도메인은 하나 이상의 VEGF 수용체의 하나 이상의 세포외 구성 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 Fc 부분을 더 포함한다.

[0318] 표 5에는 존재할 수 있고 본 발명의 방법을 통해 제거 가능한 일반적인 고-위험 HCP 종이 나열되어 있다. 이 표는 제형화된 약물 생산물에 대한 가능한 하류 영향을 더 포함한다. 본 발명의 기술 없이, 일부 HCP 종은 다른 원하는 분자 종에 접근하는 물리화학적 특성으로 인해 제거하기 어려워진다. 일부 실시형태에서, 표 5의 종들 중 임의의 하나 이상을 제거하는데 본 명세서에 제공된 실시형태 중 임의의 하나 이상이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표 5의 종들 중 하나 이상으로부터 관심 생산물이 선택된다. 일부 실시형태에서, 표 5의 종들 중 하나 이상으로부터 관심 단백질이 선택된다. 제거하기 어려운 HCP는 분자량이 15kDa을 초과하고/하거나 pI가 7.3 내지 9.3인 단백질로 분류될 수 있다.

표 5

표 5: 일반적인 HCP 종 A

단백질 명칭	MW (Da)	pI	기능	영향	영향의 유형	참고문헌
78 kDa 포도당 조절 단백질(GRP78; BiP)	72,379	5.07	소포체 내강에서 단백질 폴딩 및 품질 관리	약물 품질	약물의 응집	Farrell et al., 2015; Liu et al., 2019; Valente et al., 2015
알파-에놀라제(enolase)	47,141	6.37	2-포스포글리세레이트를 포스포에놀피루브산으로 탈수시키는 것을 촉매함	약물 품질	약물의 변형	Valente et al., 2015; Zhang et al., 2014
아넥신(Annexin) A5(ANXA5)	35,752	4.82	인지질에 높은 친화성으로 결합하며 세포자멸사의 마커 역할을 함	면역원성	면역원성 반응	Fukuda et al., 2019; Gilgunn & Bones, 2018
C-X-C 모티프 케모카인 3 (CXCL3)	10,686	8.74	잠재적 종양 유발 특성이 있는 사이토카인	생물학적 기능	면역원성 반응	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
카복시에스테라제(CEB)a	60,175	5.51	에스터- 또는 아미드-함유 기질을 알코올 및 카복실산으로 절단하는 것을 촉매함	제형화	폴리솔베이트의 분해	McShan et al., 2016; Zhang et al., 2020

[0319]

카복시펩티다제 D(Cpd)	152,406	5.77	C-말단 아미노산을 방출하는 세린 엑소펩티다제	약물 품질	약물의 변형	Hu et al., 2016; Dick et al., 2008; Park, et al., 2017
카텝신(Cathepsin) (B, L, Z)a	37,280	5.57	세포내 단백질가수분해를 담당하는 시스테인 프로테아제	약물 품질	약물의 단편화	Luo et al., 2019; Migani et al., 2017; Park, et al., 2017; Vanderlaan et al., 2018
카텝신 (D,E)a	43,021	4.67	산성 및 중성 pH 모두에서 활성이 있는 아스파틸 프로테아제	약물 품질	약물의 단편화	Bee et al., 2017; Lima et al., 2018; Robert et al., 2009; Yang et al., 2019
클러스테린(Clusterin)(CLU)	51,656	5.45	세포 파편의 정소 및 세포자멸사와 관련된 다기능성 이황화-연결 이종이량체성 당단백질	면역원성	면역원성 반응	Aboulaich et al., 2014; Gilgunn & Bones, 2018; Goey et al., 2018
글루타티온-S-트렌스퍼라제(GST)a	25,608	9.04	환원된 글루타티온을 외인성 및 내인성 소수성 친전자체에 접합시킴	면역원성	면역원성 반응	Goey et al., 2018; Jawa et al., 2016
지질단백질 리파제(LPL)	53,109	7.95	LDL 의 트라이아실글리세롤의 가수분해를 촉매하고 혈장	제형화	폴리솔베이트의 분해	Chiu et al., 2017; Levy et al., 2014;

[0320]

			트라이글리세리드 및 HDL 농도를 조절함			Park et al., 2017
리소솜산 리파제(LAL)	45,325	8.15	콜레스테릴 에스터 및 트라이글리세리드를 가수분해함	제형화	분해	Levy et al., 2014; McShan et al., 2016
리소솜 포스포리파제 A2 (LPLA2)	47,307	6.02	글리세로인지질의 아실 에스터 결합을 절단하여 유리 지방산을 생성함	제형화	폴리솔베이트의 분해	Hall et al., 2016; McShan et al., 2016; Shayman et al., 2011
매트릭스 메탈로프로티나제(MMP)a	70,460	9.25	세포외 매트릭스 단백질의 분해를 담당하는 엔도펩티다제	약물 품질	약물의 분해	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1)	16,326	9.81	C-C 케모카인 수용체에 대한 리간드로 작용함	인간에서 생물학적 기능	사이토카인 방출	Leister et al., 2019; Vanderlaan et al., 2018; Yoshimura & Leonard, 1989
펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이성화효소 A(PPIA)	18,012	7.68	프롤린 잔기에 대한 펩타이드 결합 N-말단의 시스-트랜스 이성질화를 촉매	약물 품질	약물의 응집	Jawa et al., 2013; Zhang et al., 2016
퍼옥시레독신(PRDX)a	22,263	8.22	세포내 과산화수소 농도를 조절함	면역원성	면역원성 반응	Albrecht et al., 2018; Jawa et al., 2016; Joucla et al., 2013;

[0321]

						Park et al., 2017
포스포리파제 B - 유사 2(PLBL2)	66,289	5.76	잠재적으로 인지질의 지방산으로의 가수분해를 촉매함	면역원성	면역원성 반응	Fischer et al., 2017; Jawa et al., 2016; Tran et al., 2016; Zhang et al., 2020
프로콜라겐-라이신 2-옥소글루타레이트 5-데옥시게나제_1(PLOD1)	83,595	6.08	콜라겐 알파 사슬의 라이신 잔기의 수산화를 촉매함	면역원성	면역원성 반응	Hogwood et al., 2016; Jawa et al., 2016
단백질 이황화 이성화효소(PDI)	57,010	4.78	이황화 결합의 형성 및 파괴를 촉매함	약물 품질	약물의 응집	Aboulaich et al., 2014; Gilgunn &Bones,2018; Goey et al., 2018; Maeda et al., 2007
단백질 S100a	11,241	5.28	칼슘 균형, 세포자멸사, 이동, 증식, 분화, 에너지 대사 및 염증을 조절함	면역원성	면역원성 반응	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
피루브산 키나제(PK)	62089.32 58628.38	6.19 6.07	포스포에놀피루브산의 피루브산으로의 전환을 촉매하며 세포 대사 조절에서의 역할을 함	면역원성	면역원성 반응	Goey et al., 2018; Jawa et al., 2016; Park et al., 2017
세린 프로테아제(HTRA1)	51,214	7.82	프로테오글리칸을 분해하며	약물 품질	약물의 변형	Dorai et al., 2011; Gilgunn &

[0322]

			잠재적으로 N-말단을 자름			Bones, 2018; Goey et al., 2018
시알레이트 o-아세틸에스테라제(SIAE)	60,775	6.32	카복실산 에스터 결합을 가수분해함	제형화	폴리솔베이트의 분해	Schauer et al., 1988
형질전환 성장 인자-β1(TGF-β1)	44,310	8.90	면역 항상성 및 면역 억제를 유지	인간에서 생물학적 기능	사이토카인 방출	Beatson et al., 2011; Vanderlaan et al., 2018

[0323]

[0324] 도 1과 관련하여, 무 동물 성분 세포 배양 공정으로부터 OG2072 항체의 정제를 위한 공정(100)이 개시된다. 이 공정은 3개의 크로마토그래피 단계 및 2개의 TFF(접선 유동 여과) 단계뿐만 아니라 저 pH 바이러스 불활성화를

포함한다. 먼저, 정화된 세포 상등액을 수집한다(110). 다음, 정화된 세포 상등액에 대한 친화성 크로마토그래피(120)를 수행한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 과정에서 수집된 결과 용출물에 대해 저 pH 바이러스 불활성화(130) 후 중간 여과(140)를 실행한다. 그 다음 음이온 교환 크로마토그래피(150) 다음 양이온 교환 크로마토그래피(160)를 포함하는 추가 크로마토그래피 라운드를 수행한다. 그 다음 바이러스 감소 여과(170) 및 최종 한외여과/투석여과(180)을 수행한다.

[0325] 저 pH 바이러스 불활성화는 용액을 240분 동안 pH 3.5로 유지한 다음 pH 7로 중성화하는 단계를 포함할 수 있다. 저 pH 바이러스 불활성화는 대안적으로 60분 동안 pH 3.5로 유지한 다음 pH 5.5, 6 또는 6.5로 단계적으로 중성화하는 단계를 포함할 수 있다. MabSelect SuRe LX 친화성 크로마토그래피(MSS LX)는 바이러스 불활성화/중성화 단계 및 그 다음 항체를 Sartobind Q 음이온 교환 크로마토그래피(AEX 크로마토그래피)에 알맞은 상태가 되도록 하기 위한 첫 번째 TFF(TFF1)가 뒤따를 수 있다. 그 다음 POROS XS 양이온 교환 크로마토그래피(CEX 크로마토그래피) 및 바이러스 감소 여과(Planova 20N)를 실행하였다. POROS XS는 10mM 인산나트륨, pH 5, 40mM NaCl, 추가로 보충제로서 아세트산염에서의 결합 단계(15mS/cm 미만) 후 50mM Na-아세트산, pH 6, 10mM NaCl→50mM Na-아세트산, pH 6, 300mM NaCl로 10CV 동안 구배 용출시키는 단계를 포함한다. POROS XS 크로마토그래피 중에 50mM Na-아세트산, pH 5 및 150mM NaCl을 포함하는 추가적인 세척을 수행한 다음 NaCl을 165, 180, 195 또는 210mM로 서서히 증가시킬 수 있다. POROS XS 칼럼 단계에 30cm 배드 높이로 10CV 내에 pH 5에서 150mM NaCl→400mM NaCl로 구배가 제공되도록 또는 30cm 배드 높이로 12CV 내에 pH 6에서 50mM NaCl→350mM NaCl로 구배가 제공되도록 할 수 있다. 구배 용출 전, 세척 단계를 수행할 수 있으며, 세척 단계는 다음을 포함할 수 있다: 2CV의 50mM Na-아세트산, pH 5.0, 10mM NaCl, 그 다음 5CV의 18.8mM 인산나트륨, pH 7.0, 22.5mM NaCl, 그 다음 3CV의 50mM Na-아세트산, pH 5.0, 10mM NaCl, 그 다음 2CV의 50mM 아세트산나트륨, pH 6.0, 10mM NaCl. 마지막으로, 2차 TFF(TFF2)를 실행하여 항체를 제형화하고 항체 중간체를 얻었다.

[0326] 도 2는 생물분자의 정제를 위한 공정(200)을 도시한다. 먼저 발효 공정(210)을 사용하여 세포 배양물을 성장 및 배양한다. 그 다음 수확 공정(220)에서 세포 배양물을 수집하여 정화된 세포 농축물을 얻는다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 및 바이러스 불활성화/중성화(230)을 사용하여 정화된 세포 농축물을 정제하는데, 이 공정의 결과물이 생산물 잔류물이다. 그 다음 수집된 생산물 잔류물에 대한 접선 흐름 여과(240)를 실행하며, 음이온 교환 크로마토그래피(250) 및 양이온 교환 크로마토그래피(260)를 순차적으로 실행한다. 그 다음 처리된 생산물 잔류물을 바이러스 감소 여과(270)하며, 여기서 이 다음 2차 접선 흐름 여과(280)를 실행하여 정제된 생산물을 얻는다.

[0327] 도 3과 관련하여, 원하는 분자 종의 수율 및 순도를 평가하기 위해 측정 가능한 HCP 종의 배율-감소를 평가하는 프로토콜을 개발하였다. 무 동물 성분 세포 배양 공정으로부터 OG2072 항체의 칼럼 정제를 위한 공정(300)을 개시한다. 이 공정은 평형화(310), 그 다음 칼럼에 정화된 세포 배양 유체(CCCF)를 로딩하는 것(320)을 포함한다. 그 다음 칼럼을 세척 1(330), 그 다음 세척 2(340), 그 다음 세척 3(350) 및 세척 4(360)를 포함하는 일련의 세척 처리를 한다. 세척 2(340)는 하위 세척 340A, 340B 및 340C를 포함할 수 있다. 세척 4(360)에 이어, 용출(370)을 수행하며, 여기서 칼럼에 용출 후 완충제(380)를 실행하여 수지를 재생한다. 이 공정은 pH 7에서 50mM Na-인산 및 250mM NaCl로 단백질 A 칼럼을 평형화하는 단계(310), 그 다음 로딩하는 단계(320)로서, 여기서 칼럼에 정화된 세포 배양 유체(CCCF)를 로딩하는, 단계, 그 다음 pH 7에서 50mM Na/인산 및 250mM NaCl을 사용한 첫 번째 세척(330)을 포함하는 일련의 세척 단계(330 내지 360)를 포함한다. 세척 2(340)는 표 6C에 기술된 바와 같은 다양한 세척 완충제 및 조건을 포함할 수 있다. 세척 3(350)은 pH 7에서 50mM Na-인산 및 2M NaCl를 사용한 세척을 포함하며, 세척 4(360)은 pH 7에서 50mM Na-인산, 250mM NaCl을 포함한다. pH 3.5에서 10mM Na-포름산으로 용출(370)을 수행하였고, 용출 후 칼럼을 통해 pH 2.1에서 100mM 구연산을 실행하였다.

[0328] 일부 실시형태에서, 도 8, 11 내지 16 중 임의의 하나 이상에 명시된 아미노산 서열에 대한 임의의 하나 이상의 서열은 본 명세서에 제공되는 다른 실시형태 중 임의의 것의 해당 구조로 바뀔 수 있거나 본 명세서에 제공되는 다른 서열 중 임의의 것으로 교환될 수 있다. 일부 실시형태에서, 작재물은 VEGFR-항-IL-6 형태이고 이는 경쇄 서열(예를 들어, 도 15, 서열 4A)에 연결된, 중쇄 IL-6 서열(예를 들어, 도 13, 서열 3A 또는 3B)에 연결된, 링커(예를 들어, 도 12, 서열 2A)에 연결된, 서열 1A 내지 1D(도 12) 중 하나의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열 1A 내지 1D(도 12) 중 임의의 하나는 링커(도 12)와, 그리고 중쇄 항-IL-6 서열(도 13 내지 도 14, 서열 3A 내지 3I)과, 그리고 경쇄 항-IL-6 서열(도 15, 서열 4A 내지 4C)과 결합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 작제물의 임의의 특정 단위에 대한 다른 상응하는 서열 중 임의의 것은 이들 단위들 중 임의의 하나로 바뀌거나 이를 대신할 수 있다.

[0329] 일부 실시형태에서, 항-IL-6 항체 작제물 중 임의의 것이 예를 들어, 본 명세서에 제공되는 실시형태의 표 2C,

2D, 2E, 0.3 및/또는 0.4, 및 도 8, 11 내지 16의 것을 포함하는, 조성물, 구성 요소 또는 요법으로서의 용도를 위해 고려된다.

[0330] 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 VEGF Trap 서열의 94번 위치, VEGF Trap 서열의 95번 위치의 돌연변이 또는 VEGF Trap 서열의 T94I 및 H95I를 포함한다.

[0331] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제가 제공된다. VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 항-IL-6 항체와 VEGF(VEGFR1/2) trap의 trap 항체 융합을 포함하며, 여기서 이중 억제제는 VEGFR 서열 내 적어도 하나의 점 돌연변이를 포함하여 VEGFR 서열의 절단을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 1.0MDa의 분자량을 갖는다.

[0332] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 염증성 망막 질환에 대한 요법을 제공한다.

[0333] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 불변 중쇄, 불변 경쇄, 단편 항원 결합, 단편 결정화 가능(Fc), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 가변 중쇄, 가변 경쇄 및 CDR 영역을 포함한다.

[0334] 일부 실시형태에서, 항-IL-6 중쇄 가변 영역 서열은 도 11의 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13으로부터 선택될 수 있다.

[0335] 일부 실시형태에서, VEGF trap 서열은 도 12의 서열번호 14, 15, 16 또는 17 중 적어도 하나로부터 선택될 수 있다.

[0336] VEGFR-항-IL-6 이중 억제제에 대한 일부 실시형태에서, 항-IL-6 분자의 중쇄 서열은 도 13 내지 도 14의 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27 중 적어도 하나로부터 선택될 수 있다.

[0337] VEGFR-항-IL-6 이중 억제제에 대한 일부 실시형태에서, 항-IL-6 분자의 경쇄 서열은 도 15의 서열번호 28, 29 또는 30 중 적어도 하나로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR을 포함한다.

[0338] VEGFR-항-IL-6 이중 억제제에 대한 일부 실시형태에서, 항-IL-6 분자의 중쇄 서열은 도 16a 및 도 16b의 옵션 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, 5G, 5H 또는 5I 중 적어도 하나로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR을 포함한다.

[0339] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 도 18의 서열번호 85, 86, 87 또는 88 중 적어도 하나로부터의 VEGFR-Fc 서열을 포함한다.

[0340] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 도 11 내지 도 18의 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0341] 일부 실시형태에서, VEGFR-항-IL-6 이중 억제제는 IL-6 VH, IL-6 VL, IL-6 Fc, VEGF Trap 및 링커를 포함한다. 일부 실시형태에서, IL-6 VH는 도 16a 또는 도 16b 또는 도 13 내지 도 14의 IL6 VH 서열로부터의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, IL-6 VL은 도 15의 IL6 VL 서열로부터의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc는 도 16a 또는 도 16b의 Fc 서열로부터의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, VEGF Trap은 VEGF trap 서열로부터의 서열을 포함한다.

[0342] 일부 실시형태에서, 다음을 포함하는 단백질 작제물이 제공된다: 적어도 3개의 중쇄 CDR; 적어도 3개의 경쇄 CDR; VEGF trap 서열; 및 링커 서열, 여기서 각각의 서열은 도 11 내지 도 18의 서열로부터 선택된다.

[0343] 일부 실시형태에서, 다음을 포함하는 융합 단백질이 제공된다: IL-6 VH, IL-6 VL, IL-6 Fc, VEGF Trap 및 여기서 융합 단백질은 HUVEC 증식을 변화시킨다. 일부 실시형태에서, 각각의 서열은 도 11 내지 도 18의 서열로부터 선택된다.

[0344] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 적어도 약 2배 감소, 적어도 약 3배 감소, 적어도 약 4배 감소, 적어도 약 5배 감소, 적어도 약 6배 감소, 적어도 약 7배 감소, 적어도 약 8배 감소, 적어도 약 9배 감소, 적어도 약 10배 감소, 적어도 약 15배 감소 또는 적어도 약 20배 감소인 용출물 내 HCP 오염물질의 백분율 감소를 초래한다.

[0345] 따라서, 일 양상에서, 본 개시내용은 관심 단백질이 결합하는 친화성 크로마토그래피(AC) 매트릭스를 사용한 정제된 단백질(예를 들어, 앙체, 항체 단편 또는 Fc 영역을 포함하는 단백질(예를 들어, Fc 융합 단백질)) 생산 방법으로서, AC 매트릭스를 염화마그네슘 또는 등가의 카오트로픽 제제를 포함하는 세척 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 염화마그네슘을 포함하는 세척 용액은 AC 매트릭스로부터 관심 단백질이 용출되기 전에 약 7.8의 pH를 가지며, 약 6, 약 6.1, 약 6.2, 약 6.3, 약 6.4, 약 6.5, 약 6.6,

약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.9, 약 8, 약 8.1, 약 8.2, 약 8.3, 약 8.4, 약 8.5, 약 8.6, 약 8.7, 약 8.8, 약 8.9, 약 9의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 세척 용액은 약 1M, 약 1.1M, 약 1.2M, 약 1.3M, 약 1.4M, 약 1.5M, 약 1.6M, 약 1.7M, 약 1.8M, 약 1.9M, 약 2M, 약 2.1M, 약 2.2M, 약 2.3M, 약 2.4M, 약 2.5M, 약 2.6M, 약 2.7M, 약 2.8M, 약 2.9M, 약 3M, 약 3.1M, 약 3.2M, 약 3.3M, 약 3.4M, 약 3.5M, 약 3.6M, 약 3.7M, 약 3.8M, 약 3.9M, 약 4M, 약 4.1M, 약 4.2M 또는 4.2M 초과의 염화마그네슘을 포함한다.

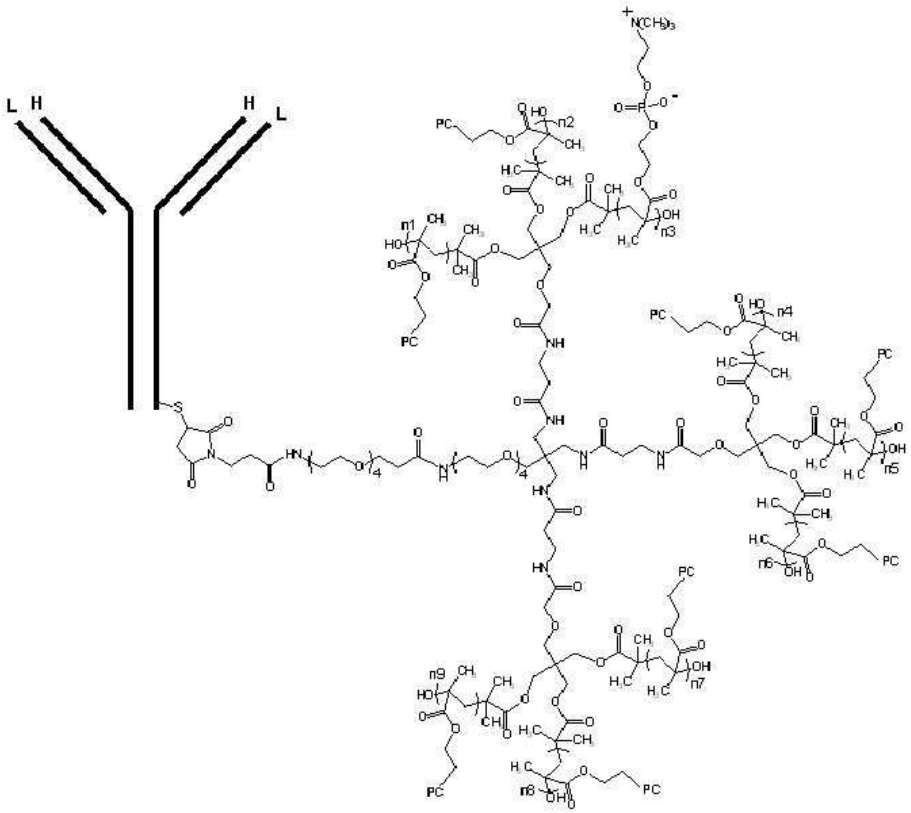
[0346] 항체 접합체

[0347] 항-VEGF 항체(항-VEGF 단백질, 예를 들어 아플리베르셉트) 및 이의 접합체가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체 자체는 다른 항-VEGF 제제와 다르며 다른 항-VEGF 제제를 능가하는 우수한 결과를 제공한다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체는 다른 항체 및/또는 다른 항체 접합체의 활성에 대해 기대보다 놀라운 우수성을 나타낸다.

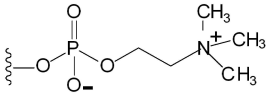
[0348] 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체는 다음을 포함하는 항체 접합체인 KSI-301이다:

[0349] (1) 항-VEGF-A 항체; 및

[0350] (2) 포스포릴콜린 함유 중합체, 여기서 중합체는 항-VEGF-A 항체의 가변 영역 외부 시스테인에서 항-VEGF-A 항체에 공유 결합하며, 여기서 상기 시스테인은 서열의 같은 위치에 발생하는 비-시스테인 아미노산을 대체하고, 여기서 항-VEGF-A 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 시스테인은 중쇄의 Fc 영역 내에 존재하고, 여기서 중쇄의 서열은 서열번호 270 중 적어도 하나이고, 여기서 경쇄의 서열은 서열번호 275(또는 도 8의 이들의 변이체 중 임의의 것) 중 적어도 하나를 포함하고, 여기서 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:



[0351]

[0352] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 상기 중쇄 중 하나에 묘사된, EU 넘버링에 따른 C443의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; 여기서 PC는  이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나;

ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0353] 역사적으로, 단백질에 분자를 접합하면 종종 단백질의 의도된 표적에 대한 결합 상호작용의 감소를 초래하였다. 본 개시내용의 일부 실시형태에서, 활성 부위 외부의 위치에 접합하는 경우, 예상했던 것과 같은 수준의 감소가 반드시 관찰되지는 않는다. 본 명세서에 제공된 증거는 예상했던 것과 반대의 효과를 보여준다. 일부 실시형태에서, 그리고 이론에 의해 제한하려는 의도 없이, 접합체는 항체 단독 보다 우수할 수 있다. 예를 들어, 리간드와 이의 특이적 수용체의 상호작용은, 리간드 상의 친수성 아미노산과 수용체 상의 친수성 아미노산의 상호작용을 통해 이루어지는 것과 같이, 종종 리간드와 수용체의 입체특이적 상호작용을 통해 이루어지며, 물 분자는 이들 상호작용에서 가장 중요한 위치에 존재한다. 동시에, 이러한 친수성 입체특이성은 일반적으로 소수성-소수성 아미노산에 의해 매개/생성될 수 있는 비-특이적 소수성 상호작용을 강조하지 않고/않거나 억제하는 것을 통해 더 강화된다.

[0354] 일부 실시형태에서, VEGF 리간드("VEGFL")와 VEGF-수용체("VEGFR") 사이의 적어도 90%의 상호작용을 차단할 수 있는 항-VEGF 항체 접합체가 제공된다. 예를 들어, 이것은 VEGFR와 VEGFL 사이의 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 효과적으로 전부의 상호작용을 차단할 수 있다. 일부 실시형태에서, 언급된 차단은 포화 농도에서 발생한다. 일부 실시형태에서, VEGF 리간드와 VEGF-수용체 사이의 적어도 95%의 상호작용을 차단하는 항-VEGF 항체 접합체가 제공된다. 이러한 차단의 우수성의 예시는 루센티스(Lucentis®(라니비주맙: ranibizumab)) 또는 아바스틴(Avastin®(베바시주맙: bevacizumab))보다 또는 심지어 항체 OG1950(접합되지 않은 것)보다 더 높은 정도로 차단하는 항-VEGF 항체 생물접합체(본 명세서에 제공되는 항체 접합체, 예를 들어 KSI-301)의 능력이다. 사실, 이러한 결과는 예상하지 못했으며, 항체에 중합체를 부가하는 것이 항체의 결합/활성에 일부의 해로운 영향을 제공하거나 해로운 영향을 제공하지 않을 것임을 기대할 수 있지만, 이러한 방식으로 항체의 차단 능력을 실제로 개선할 것이라는 것은 예상하지 못했다.

[0355] 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 접합체는 VEGFR과 VEGFL 사이의 적어도 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%의 활성 및/또는 상호작용을 억제한다. 일부 실시형태에서, IC50 값은 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100nM 또는 전술한 값들 중 임의의 하나 이상의 미만일 수 있다. 일부 실시형태에서, KD는 2*10^-13, 1*10^-13, 1*10^-12, 1*10^-11, 1*10^-10M 또는 전술한 값들 중 임의의 하나의 미만일 수 있다. 일부 실시형태에서, IC50 값은 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300 또는 전술한 값들 중 임의의 하나의 미만일 수 있다.

[0356] 일부 실시형태에서, VEGF 리간드와 VEGF-수용체 사이의 적어도 90%의 상호작용을 차단하는 항-VEGF 항체가 제공된다. 예를 들어, 이것은 VEGFR과 VEGFL 사이의 적어도 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 효과적으로 전부의 상호작용을 차단할 수 있다. 이러한 차단의 우수성의 예시로서, 루센티스(라니비주맙) 또는 아바스틴(베바시주맙) 보다 더 높은 정도로 차단하는 OG1950(및 본 발명에서 제공되는 항체)의 능력이 있다.

[0357] 일부 실시형태에서, 루센티스(라니비주맙) 또는 아바스틴(베바시주맙)과 같은 다른 항체가 본 명세서에 기술된 공정들 중 하나 이상을 통해 본 명세서에 기술된 바와 같은 중합체들 중 하나 이상에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 항체 또는 이의 단편이 본 명세서에 기술된 공정들 중 하나 이상을 통해 본 명세서에 기술된 바와 같은 중합체들 중 하나 이상에 접합될 수 있다.

[0358] 일부 실시형태에서 항체는 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나를 포함하는 중쇄 아미노산 가변 영역 및 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나를 포함하는 경쇄 아미노산 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 본 명세서에 제공되는 중합체 중 하나 이상에 접합된다. 일부 실시형태에서, 접합된 항체는 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나 및/또는 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나와 적어도 90% 동일하다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나 및 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나의 6개의 CDR뿐만 아니라 L443C(EU 넘버링, 또는 449C)의 점 돌연변이를 함유한다. 일부 실시형태에서, 접합된 항체는 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나 및/또는 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나와 적어도 90% 동일하며 다음의 돌연변이를 포함하고: L234A, L235A 및 G237A(EU 넘버링), 다음의 돌연변이 중 적어도 하나를 포함한다: Q347C(EU 넘버링) 또는 L443C(EU 넘버링).

[0359] 일부 실시형태에서 VEGF-A에 결합하는 항체가 제공된다. 항체는 다음을 포함한다: 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1; 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2; 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3; 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1; 서열번

호 200의 CDRL2인 CDRL2; 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3; 다음의 돌연변이(EU 넘버링) 중 적어도 하나: L234A, L235A 및 G237A; 및 다음의 돌연변이(EU 넘버링) 중 적어도 하나: Q347C 또는 L443C.

[0360] 본 명세서에 비추어 볼 때, 이 분야의 기술자가 인식할 수 있는 바와 같이, 본 명세서에 제공되는 항체 중 임의의 것은 본 명세서에 제공되는 중합체 중 임의의 것에 접합될 수 있으며/있거나 본 명세서에 제공되는 임의의 항체는 중합체에 부위 특이적으로 접합하는 것을 가능하게 하도록 첨가된 시스테인을 가질 수 있다.

[0361] "VEGF" 또는 "혈관 내피 성장 인자"는 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 미치는 인간 혈관 내피 성장 인자이다. 특히, 용어 VEGF는 (i) VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(KDR/Flk-1) 또는 VEGFR-3(FLT-4)와 같은 VEGF 수용체에 결합하고; (ii) VEGF 수용체와 관련된 티로신 키나제 활성을 활성화하고; (iii) 이에 따라 혈관형성 또는 혈관형성 과정에 영향을 미치는 성장 인자의 부류의 임의의 구성원을 의미한다.

[0362] 인자들 중 VEGF 패밀리는 다음의 5개의 관련 당단백질로 만들어진다: VEGF-A(VPE로도 알려짐), -B, -C, -D 및 PGF(태반 성장 인자). 이들 중, VEGF-A는 가장 잘 연구되었고 항-혈관형성 요법의 표적이다. 문헌[Ferrara et al, (2003) Nat. Med. 9:669-676] 참조. VEGF-A는 대안적인 스플라이싱 및 단백질 분해 모두에 의해 생성되는 다음과 같은 여러 가지 서로 다른 아이소타입으로 존재한다: $VEGF\text{-}A_{206}$, $VEGF\text{-}A_{189}$, $VEGF\text{-}A_{165}$ 및 $VEGF\text{-}A_{121}$. 이 아이소폼은 헤파린 및 뉴로필린(neuropilin)이라 불리는 비-신호 결합 단백질에 결합하는 능력이 서로 다르다. 이 아이소폼은 모두 이량체로서 생물학적으로 활성이다.

[0363] VEGF의 다양한 효과는 VEGF, 예를 들어 VEGF-A(P15692), -B(P49766), -C(P49767) 및 -D(Q43915)가 수용체 티로신 키나제(RTK)에 결합하는 것에 의해 매개된다. VEGF 패밀리 수용체는 제5류(class V) RTK에 속하며 각각 세포외 도메인(ECD)에 7개의 Ig-유사 도메인을 가지고 있다. 인간에서, VEGF는 다음과 같은 3가지 유형의 RTK에 결합한다: VEGFR-1(Flt-1)(P17948), VEGFR-2(KDR, Flk-1)(P935968) 및 VEGFR-3(Flt-4)(P35916). 맥락에서 달리 명확하게 드러나지 않는 한 VEGF에 대한 언급은 천연 형태와 적어도 90, 95, 98 또는 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 천연 아이소폼 또는 천연 변이체 또는 유도된 변이체 중 임의의 것의 VEGF-A, -B, -C, -D 및 PGF 중 임의의 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 이러한 VEGF는 인간 VEGF이다. 마찬가지로 VEGFR에 대한 언급은 천연 서열과 적어도 90, 95, 98 또는 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 임의의 천연 아이소폼 또는 천연 변이체 또는 유도된 변이체를 포함하는 VEGR-1, R-2 또는 R-3 중 임의의 것을 의미한다.

[0364] VEGF 길항제 요법은 특정 암 및 습성 AMD의 치료에 대해 승인되었다. 베바시주맙(아바스틴, Genentech/Roche)은 인간 VEGF, 특히 VEGF-A의 모든 아이소폼 및 VEGF-A의 생물활성 단백질 분해 단편에 결합하여 중화하는 인간화 마우스 단클론 항체이다. 예를 들어, 문헌[Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 3(5):391-400] 참조. 베바시주맙은 특정 암의 치료를 위해 승인되었다.

[0365] 베바시주맙 가변 경쇄 CDR은 CDR_L1: SASQDISNYLN(서열번호 749), CDR_L2: FTSSLHS(서열번호 750) 및 CDR_L3: QQYSTVPWT(서열번호 751)이다. 베바시주맙 가변 중쇄 CDR은 CDR_H1: GYTFTNYGMN(서열번호 752), CDR_H2: WINTYTGEPTYAADFKR(서열번호 753) 및 CDR_H3: YPHYYGSSHWYFDV(서열번호 755)이다. CDR은 복합 Kabat/Chothia 정의를 사용하는 CDRH1을 제외하고 Kabat에 의해 정의된다. 일부 실시형태에서, 베바시주맙 서열에 시스테인이 추가될 수 있으며 항체(및/또는 베바시주맙의 6개 CDR을 포함하는 변이체)는 본 명세서에 제공되는 중합체 중 임의의 하나 이상에 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 베바시주맙 또는 라니비주맙 CDR이 본 명세서에 제공되는 조성물 및 방법에 사용될 수 있다.

[0366] 베바시주맙과 같은 마우스 단클론 항체에서 유래된 또 다른 항-VEGF 분자가 습성 AMD를 위한 치료제로서 승인되었다: 라니비주맙(루센티스(라니비주맙), Genentech/Roche). 라니비주맙은 항체 단편 또는 Fab이다. 라니비주맙은 베바시주맙의 가변 중쇄 및 경쇄의 친화성 성숙화를 통해 생산되었다. 일부 실시형태에서, 라니비주맙 서열에 시스테인이 추가될 수 있으며 항체(및/또는 라니비주맙의 6개 CDR을 포함하는 변이체)는 본 명세서에 제공되는 중합체 중 임의의 하나 이상에 접합될 수 있다.

[0367] 라니비주맙 CDR은 친화성 성숙화 이후 개선 사항이 추가된 경우를 제외하고 베바시주맙과 같다: 라니비주맙 가변 경쇄 CDR은 CDR_L1: SASQDISNYLN(서열번호 749), CDR_L2: FTSSLHS(서열번호 750) 및 CDR_L3: QQYSTVPWT(서열번호 751)이다. 라니비주맙 가변 중쇄 CDR은 CDR_H1: GYDFTHYGMN(서열번호 754), CDR_H2: WINTYTGEPTYAADFKR(서열번호 753) 및 CDR_H3: YPYYYGTSHWYFDV(서열번호 756)이다.

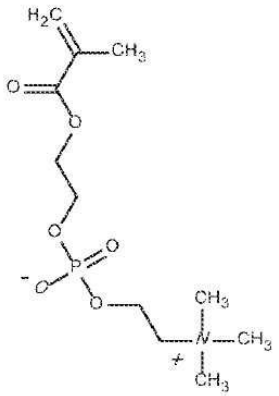
[0368] 일부 실시형태에서, 항체의 가변 영역 외부 시스테인에서 포스포릴콜린 함유 중합체에 결합된 항-VEGF-A 항체를 갖는 항체 접합체로서, 여기서 시스테인이 재조합 DNA 기술을 통해 부가된, 항체 접합체가 제시된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 단일 시스테인에 결합된다. 일부 실시형태에서, "재조합 DNA 기술을 통해 부가된"은 알려진 또는 존재하는 항체의 같은 위치에 또는 공동 항체 서열에 존재하는 비-시스테인 아미노산을 시스테인 잔기가 대체함을 의미한다. 따라서, 예를 들어 항체가 IgG1이고 중쇄가 EU 443번 위치에 류신을 보유하는 경우, 이 류신이 재조합 DNA 기술을 통해 시스테인으로 대체된다(L443C, EU 넘버링 또는 449C). 이에 상응하여, 천연 IgG1 서열 EU 347번 위치는 Q(글루타민)이며 이 Q는 재조합 DNA 기술을 통해 시스테인으로 대체되어 Q347C가 수득된다.

[0369] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하며 여기서 중쇄는 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시형태에서, 시스테인은 Fc 영역 내에 존재하며 항-VEGF-A 항체는 면역글로불린 G(IgG)이다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 중쇄는 CDR_H1: GYDFTHYGMN(서열번호 754), CDR_H2: WINTYTGEPTYAADFKR(서열번호 753) 및 CDR_H3: YPYYYGTSHWYFDV(서열번호 756)을 가지며, 221번 위치가 T이고, 항-VEGF-A 경쇄는 CDR_L1: SASQDISNYLN(서열번호 749), CDR_L2: FTSSLHS(서열번호 750) 및 CDR_L3: QQYSTVPWT(서열번호 751)을 갖고, Kabat 4번 위치는 L이다.

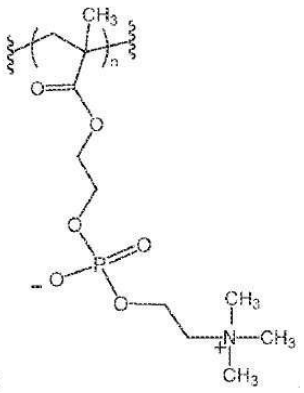
[0370] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 중쇄 아이소타입은 IgG1이다. 일부 실시형태에서, IgG1 불변 도메인은 효과기 기능을 조절하기 위해 IgG1 불변 도메인에 비해 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 효과기 기능 돌연변이는 다음 중 하나 이상이다: (EU 넘버링) E233X, L234X, L235X, G236X, G237X, A327X, A330X 및 P331X, 여기서 X는 임의의 천연 또는 비천연 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 이 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다(EU 넘버링): E233P, L234V, L234A, L235A, G237A, A327G, A330S 및 P331S. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음의 돌연변이를 갖는다(EU 넘버링): L234A, L235A 및 G237A.

[0371] 일부 실시형태에서, 시스테인 잔기는 항-VEGF-A 중쇄에 존재하며 Q347C(EU 넘버링) 또는 L443C(EU 넘버링)이다. 일부 실시형태에서, 시스테인 잔기는 L443C(EU 넘버링 또는 449C)이다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262이며 경쇄 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나를 포함한다.

[0372] 일부 실시형태에서, 포스포릴콜린 함유 중합체는 아래에 제시된 바와 같은 2-(메타크릴로일옥시에틸)-2'-(트라이메틸암모늄)에틸 포스페이트(MPC) 단량체를 포함하되:



[0373] , 중합체가 다음의 반복 단위를 포함하도록 이루어진다:



[0374] ;

[0375] 여기서 n은 1 내지 3000의 정수이며 굴곡선은 중합체에서 단량체 단위 사이의 부착 지점을 나타낸다.

[0376] 일부 실시형태에서, 중합체는 3개 이상의 암(arm)을 갖거나, 3개 이상의 중합체 개시 부위를 포함한 개시제로 합성된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 암을 갖거나, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 중합체 개시 부위를 포함하는 개시제로 합성된다. 보다 바람직하게는, 중합체는 3, 6 또는 9개의 암을 갖거나, 3, 6 또는 9개의 중합체 개시 부위를 포함하는 개시제로 합성된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 9개의 암을 갖거나, 9개의 중합체 개시 부위를 포함하는 개시제로 합성된다.

[0377] 일부 실시형태에서, 부가되는 중합체는 약 300,000 내지 약 1,750,000Da(SEC-MAL)의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 약 500,000 내지 약 1,000,000Da의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 약 600,000 내지 약 900,000Da의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 약 750,000 내지 약 850,000Da의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 약 800,000 내지 약 850,000Da의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 약 750,000 내지 약 800,000Da의 분자량을 갖는다.

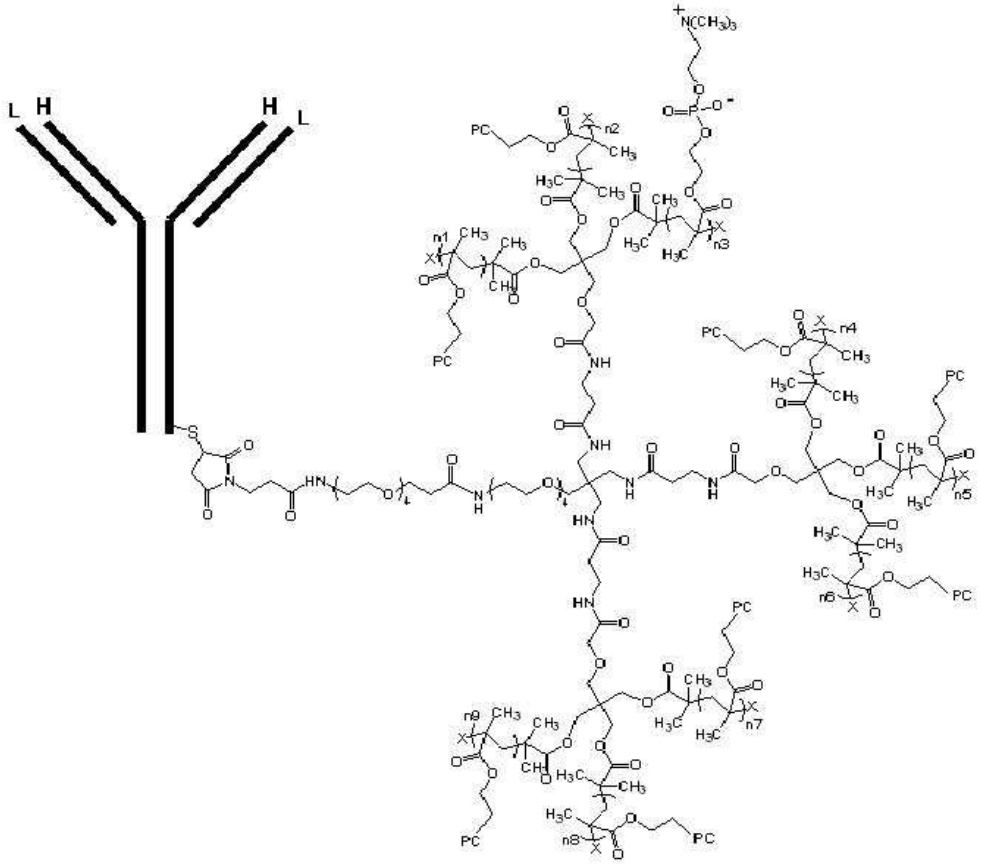
[0378] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항체 중 임의의 것은 중합체에 추가 접합되어 생물접합체를 형성할 수 있다. 이 생물접합체의 분자량은 (총으로, SEC-MAL) 약 350,000 내지 2,000,000달톤, 예를 들어, 약 450,000 내지 1,900,000달톤, 약 550,000 내지 1,800,000달톤, 약 650,000 내지 1,700,000달톤, 약 750,000 내지 1,600,000달톤, 약 850,000 내지 1,500,000달톤, 약 900,000 내지 1,400,000달톤, 약 950,000 내지 1,300,000달톤, 약 900,000 내지 1,000,000달톤, 약 1,000,000 내지 1,300,000달톤, 약 850,000 내지 1,300,000달톤, 약 850,000 내지 1,000,000달톤 및 약 1,000,000 내지 1,200,000달톤일 수 있다.

[0379] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 정제된다. 일부 실시형태에서, 중합체는 항체 중합체가 다분산성인 양상으로, 즉 중합체 PDI는 1.0이 아니다. 일부 실시형태에서, PDI는 1.5 미만이다. 일부 실시형태에서, PDI는 1.4 미만이다. 일부 실시형태에서, PDI는 1.3 미만이다. 일부 실시형태에서, PDI는 1.2 미만이다. 일부 실시형태에서, PDI는 1.1 미만이다.

[0380] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 가지며, 여기서 항-VEGF-A 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262이고, 경쇄 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나를 포함하고, 여기서 항체는 C449에서만 중합체에 결합된다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 9개의 암을 가지며 약 600,000 내지 약 1,000,000Da의 분자량을 갖는다.

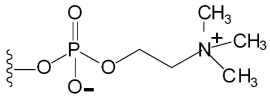
[0381] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 가지며, 여기서 항-VEGF-A 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262이고, 항-VEGF-A 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30이고, 여기서 항체는 C443(EU 넘버링 또는 449C)에서만 중합체에 결합된다. 일부 실시형태에서, 이 중합체는 9개의 암을 가지며 약 600,000 내지 약 1,000,000Da의 분자량을 갖는다.

[0382] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 갖는다:



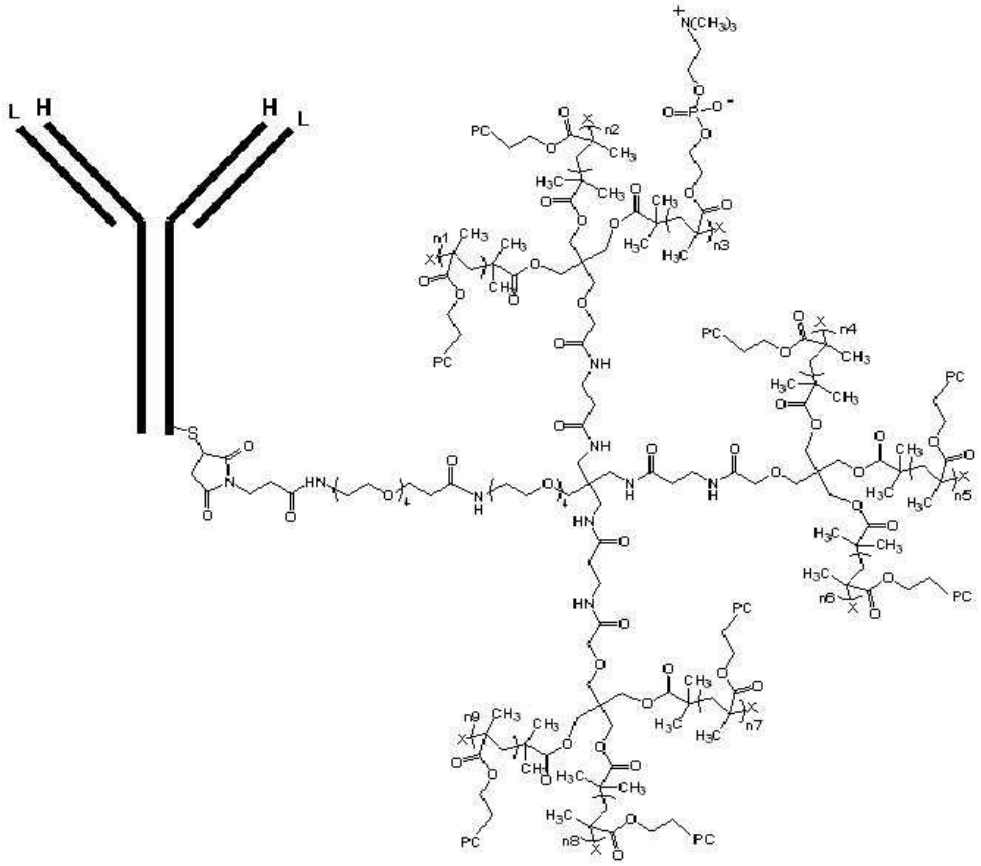
[0383]

[0384] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C449의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; 여기서

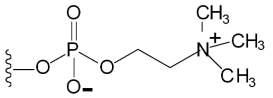


PC는 이고 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필 또는 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 500의 정수이다. 일부 실시형태에서, X는 -OR로서, 여기서 R은 당, 아미노알킬, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보닐옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, --CO--O--R_7, 카보닐 --CCO--R_7, --CO--NR_8R_9, --$(CH_2)_n$--$COOR_7$, --CO--$(CH)_n$--$COOR_7$, --$(CH_2)_n$--NR_8R_9, 에스터, 알콕시카보닐, 아릴옥시카보닐, 여기서 n은 1 내지 6의 정수이고, 여기서 각각의 R_7, R_8 및 R_9는 수소 원자, 할로겐 원자, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체로 이루어진 군으로부터 별도로 선택된다: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보일옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, 5-원자 고리 및 6-원자 고리.

[0385] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 다음 화학식 (I)의 구조를 가지며,



[0386]

[0387] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 여기서 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링 또는 449C)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; 여기서 PC는  이고; 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서 여기서 R은 H, 메틸, 에틸, 프로필 또는 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이다. 일부 실시형태에서, n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 500의 정수이다. 일부 실시형태에서, X는 -OR이며, 여기서 R은 당, 아미노알킬, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보닐옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, --CO--O--R_7, 카보닐 --CCO--R_7, --CO--NR_8R_9, --$(CH_2)_n$--$COOR_7$, --CO--$(CH)_n$--$COOR_7$, --$(CH_2)_n$--NR_8R_9, 에스터, 알콕시카보닐, 아릴옥시카보닐, 여기서 n은 1 내지 6의 정수이고, 여기서 각각의 R_7, R_8 및 R_9는 수소 원자, 할로겐 원자, 다음 잔기의 단일-치환, 다중-치환 또는 비치환 변이체로 이루어진 군으로부터 별도로 선택된다: 포화 C_1 내지 C_{24} 알킬, 불포화 C_2 내지 C_{24} 알케닐 또는 C_2 내지 C_{24} 알키닐, 아실, 아실옥시, 알킬옥시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 알콕시, 사이클로알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아릴알콕시 카보닐, 알콕시 카보닐아실, 아미노, 아미노카보닐, 아미노카보일옥시, 나이트로, 아지도, 페닐, 하이드록시, 알킬티오, 아릴티오, 옥시설포닐, 카복시, 시아노 및 다중할로겐화 알킬을 포함하는 할로겐화 알킬, 5-원자 고리 및 6-원자 고리. 일부 실시형태에서, 이러한 작제물을 KSI-301로 지정한다.

[0388] 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 액체 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 항체 접합체는 약학적으로 허용 가능한 담체와 결합된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 방법 중 임의의 것은 다음의 약물 제형을 사용할 수 있다: a) 50mg/mℓ OG1950 항체 중간체 및 274mg/mℓ OG1802 생물중합체 중간체를 포함한, 324mg/mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 50mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 0.025%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 12.5mM 인산나트륨 완충제, b) 약 324mg/mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 약 50mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 0.01 내지 0.5%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 10 내지 15mM 인산나트륨 완충제, c) 50mg/mℓ OG1950 항체 중간체 및 274mg/mℓ OG1802 생물중합체 중간체를 포함한, 324 mg/mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 50mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 선택적 0.025%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 12.5mM 인산나트륨 완충제, d) 약 50mg/mℓ OG1950 항체 중간체 및 약 274mg/mℓ OG1802 생물중합체 중간체를 포함한, 약 324mg/mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 50mg/ mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 폴리솔베이트 20을 함유하는 인산나트륨 완충제, e) 약 259 내지 356 mg/mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 약 40 내지 55mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 0.01 내지 0.5%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 10 내지 15mM 인산나트륨 완충제, f) 약 292 내지 340mg/mℓ 의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 약 45 내지 52.5mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 0.01 내지 0.5%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 10 내지 15mM 인산나트륨 완충제 또는 g) 약 259 내지 356mg /mℓ의 항체-생물중합체 접합체 총 질량에 등가인, 약 40 내지 55mg/mℓ(항체 질량 기준)의 농도에서 pH 6.5의 0.01 내지 0.5%(w/w) 폴리솔베이트 20을 함유하는 10 내지 15mM 인산나트륨 완충제. 이러한 제형 중 임의의 것에서, 항체는 도 8의 VH 및 VL(또는 이들 VH 및/또는 VL 서열 내 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두의 CDR), 예를 들어 OG1950(예를 들어, 서열번호 1, 15 내지 18 및 2)을 사용할 수 있다.

[0389] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체가 제시된다. 항-VEGF-A 항체 중쇄는 적어도 다음 CDR 서열을 갖는다: 서열번호 172의 CDRH1인 CDR_H1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDR_H2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDR_H3. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 중쇄는 이러한 CDR을 가지며 추가로 221번 위치에 트레오닌(T)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 경쇄는 적어도 다음 CDR을 갖는다: 서열번호 199의 CDRL1인 CDR_L1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDR_L2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDR_L3. 일부 실시형태에서, 이 항-VEGF-A 항체는 이러한 CDR을 가지며 추가로 Kabat 4번 위치에 류신(L)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체 중쇄의 아이소타입은 IgG1이며 CH_1, 힌지, CH_2 및 CH_3 도메인을 갖는다. 일부 실시형태에서 경쇄 아이소타입은 카파(kappa)이다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF 항체 접합체(예를 들어, KSI-301) 작제물은 이들 CDR 중 하나 이상을 가질 것이다.

[0390] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체의 IgG1 도메인은 ADCC, ADCP 및 CDC와 같은 효과기 기능을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 실시형태에서, IgG1 돌연변이는 효과기 기능을 감소시킨다. 일부 실시형태에서 효과기 기능 돌연변이를 위해 사용하는 아미노산은 (EU 넘버링) E233X, L234X, L235X, G236X, G237X, G236X, D270X, K322X, A327X, P329X, A330X, A330X, P331X 및 P331X를 포함하며, 여기서 X는 임의의 천연 또는 비천연 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 다음 중 하나 이상을 포함한다: E233P, L234V, L234A, L235A, G237A, A327G, A330S 및 P331S(EU 넘버링). 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 중쇄는 다음 돌연변이를 갖는다(EU 넘버링): L234A, L235A 및 G237A. 일부 실시형태에서, 천연 인간 IgG1 서열에 비교한 효과기 기능 돌연변이의 수는 10을 초과하지 않는다. 일부 실시형태에서 천연 인간 IgG1 서열에 비교한 효과기 기능 돌연변이의 수는 5, 4, 3, 2 또는 1을 초과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 항체는 효과기 기능을 초래하는 항체의 능력이 감소하도록 감소된 Fc 감마 결합 및/또는 보체 C1q 결합을 갖는다. 이것은 안과적 징후/장애에 특히 유리할 수 있다.

[0391] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체는 다음의 아미노산 돌연변이 중 하나 이상을 포함한다: L234A, L235A, G237A(EU 넘버링) 및 L443C(EU 넘버링 또는 449C).

[0392] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체는 인간 면역글로불린 G(IgG1)이거나 이의 일부이다.

[0393] 일부 실시형태에서, VEGF-A 항체는 면역-매개 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 중쇄 불변 도메인을 포함한다.

[0394] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체가 제공된다. 이 항-VEGF-항체는 서열번호 172의 CDRH1인 서열을 포함하는 CDR_H1, 서열번호 173의 CDRH2인 서열을 포함하는 CDR_H2, 서열번호 174의 CDRH3인 서열을 포함하는 CDR_H3, 서열번호 199의 CDRL1인 서열을 포함하는 CDR_L1, 서열번호 200의 CDRL2인 서열을 포함하는 CDR_L2 및 서열번호 201의 CDRL3인 서열을 포함하는 CDR_L3을 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0395] 대안적으로, IgG 도메인은 IgG2, IgG3 또는 IgG4 또는 불변 영역이 이들 아이소타입 중 하나를 초과하는 것에서 형성된 복합체(예를 들어, IgG2 또는 IgG4로부터의 CH1 영역, 힌지, IgG1으로부터의 CH2 및 CH3 영역)일 수 있다. 이러한 도메인은 IgG1에 대해 언급된 하나 이상의 EU 위치에서 효과기 기능을 감소 및/또는 조절하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 인간 IgG2 및 IgG4는 인간 IgG1 및 IgG3에 비해 감소된 효과기 기능을 갖는다.

[0396] 항-VEGF-A 중쇄는 반감기 연장 모이어티를 접합시키는데 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술을 통한 돌연변이로서 부가된 시스테인 잔기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 돌연변이는 (EU 넘버링) Q347C(EU 넘버링) 및/또는 L443C(EU 넘버링 또는 449C)이다. 일부 실시형태에서, 이 돌연변이는 L443C(EU 넘버링 또는 449C)이다. 일부 실시형태에서, 중합체에 대한 항체의 화학량론은 1:1; 다시 말해, 접합체는 하나의 중합체 분자에 접합된 하나의 항체 분자를 갖는다.

[0397] 항-VEGF-A 항체의 반감기는 "반감기 연장 모이어티" 또는 "반감기 연장기"의 부착에 의해 연장될 수 있다. 반감기 연장 모이어티에는 문제의 생물학적 약물과 함께 프레임에서 발현될 수 있는(또는 상황에 따라 화학적으로 접합되는) 펩타이드 및 단백질 및 하나 이상의 아미노산 측쇄 또는 -SH, -OH, -COOH, -CONH2, -NH2 또는 하나 이상의 N- 및/또는 O-글리칸 구조와 같은 말단 작용기에 부착 또는 접합될 수 있는 다양한 중합체가 포함된다. 반감기 연장 모이어티는 일반적으로 생물학적 약물의 생체 내 순환 반감기를 증가시키는 역할을 한다.

[0398] 펩타이드/단백질 반감기 연장 모이어티의 예시에는 Fc 융합(Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, et al. Designing CD4 immunoadhesions for AIDS therapy. Nature. 1989. 337:525-31), 인간 혈청 알부민(HAS) 융합(Yeh P, Landais D, Lemaitre M, et al. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. Proc Natl Acad Sci USA. 1992. 89:1904-08), 카복시 말단 펩타이드(CTP) 융합(Fares FA, Suganuma N. Nishimori K, et al. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit. Proc Natl Acad Sci USA. 1992. 89:4304-08), 비-정확 반복 펩타이드 서열(XTEN) 융합의 유전적 융합(Schellenberger V, Wang CW, Geething NC, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat Biotechnol. 2009. 27:1186-90), 엘라스틴 유사 펩타이드(ELPylation)(MCpherson DT, Morrow C, Minehan DS, et al. Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G(VPGVG19-VPGV, from *Escheriachia coli*. Biotechnol Prog. 1992. 8:347-52), 인간 트랜스페린 융합(Prior CP, Lai C-H, Sadehghi H et al. Modified transferrin fusion proteins. 특허 WO2004/020405. 2004), 프롤린-알라닌-세린(PASylation)(Skerra A, Theobald I, Schlapsky M. Biological active proteins having increased in vivo and/or vitro stability. 특허 WO2008/155134 A1. 2008), 호모-아미노산 중합체(HAPylation)(Schlapschy M, Theobald I, Mack H, et al. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. Protein Eng Des Sel. 2007. 20:273-84) 및 젤라틴 유사 단백질(GLK) 융합(Huang Y-S, Wen X-F, Zaro JL, et al. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte-colony-stimulating-factor by fusion with gelatin-like protein polymer. Eur J. Pharm Biopharm. 2010. 72:435-41)이 포함된다.

[0399] 중합체 반감기 연장 모이어티의 예시에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 분지형 PEG, PolyPEG®(Warwick Effect Polymers; 영국 코번트리 소재), 폴리시알산(PSA), 전분, 하이드록실에틸 전분(HES), 하이드록시알킬 전분(HAS), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 황산, 더마탄 황산, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 산화물(PAO), 폴리알킬렌 글리콜(PAG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시 메틸포르말)(PHF), 양쪽이온성 중합체, 포스포릴콜린 함유 중합체 및 MPC를 포함하는 중합체, 폴리(Gly_x-Ser_y), 히알루론산(HA), 헤파로산 중합체(HEP), 플렉시머, 덱스트란 및 폴리-시알산(PSA)이 포함된다.

[0400] 일 실시형태엣 반감기 연장 모이어티는 N-하이드록시석신이미드(NHS) 에스터를 사용하여 단백질의 유리 아미노기를 통해 항체에 접합될 수 있다. 아미노기에 대한 접합을 표적화하는 시약은 라이신의 ε-아민기, N-말단 아미노산의 α-아민기 및 히스티딘의 δ-아민기와 무작위로 반응할 수 있다.

[0401] 그러나, 본 명세서에 개시된 항-VEGF-A 항체는 중합체 접합에 이용 가능한 많은 아민기를 갖는다. 따라서 유리 아미노기에 대한 중합체의 접합은 VEGF에 결합하는 항체 단백질의 능력에 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

[0402] 일부 실시형태에서, 반감기 연장 모이어티는 말레이미드 화학 또는 이전 산화 후 항체의 탄수화물 모이어티에 대한 중합체 하이드라지드(hydrazide) 또는 중합체 아민의 결합을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 적절한 티올-반응성 화학을 사용하여 하나 이상의 유리 SH기에 결합된다. 일부 실시형태에서 말레이미드 결합이 사용된다. 일부 실시형태에서, 결합은 자연적으로 존재하거나 유전자 조작을 통해 유도된 시스테인에서 발생한다.

[0403] 일부 실시형태에서, 중합체는 부위 지정 돌연변이를 통해 항-VEGF-A 항체에 도입된 시스테인 잔기에 공유 결합된다. 일부 실시형태에서, 이 시스테인 잔기는 항체의 Fc 부분에 사용된다. 일부 실시형태에서, Fc 영역에 시스테인 잔기를 도입하는 부위는 WO 2013/093809, US 7,521,541, WO 2008/020827, US 8,008,453, US 8,455,622 및 US2012/0213705에서 제공되며, 이들은 모든 목적을 위해 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 일부 실시형태에서, 시스테인 돌연변이는 EU 넘버링에 의한 인간 IgG 중쇄를 참조하여 Q347C(EU 넘버링) 및 L443C이다.

[0404] 일부 실시형태에서, 항체와 반감기 연장제의 역할을 하는 고분자량의 중합체의 접합체가 제공된다. 일부 실시형태에서, 접합체는 양쪽이온성 중합체에 결합되는 항체를 포함하며 여기서 중합체는 하나 이상의 단량체 단위체로부터 형성되고 여기서 적어도 하나의 단량체 단위체는 양쪽이온성기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 양쪽이온성기는 포스포릴콜린이다.

[0405] 일부 실시형태에서, 단량체 단위체 중 하나는 HEMA-PC이다. 일부 실시형태에서, 중합체는 HEMA-PC인 단일 단량체로부터 합성된다.

[0406] 일부 실시형태에서, 일부 항체 접합체는 2 또는 3개 이상의 중합체 암을 가지며 여기서 단량체는 HEMA-PC이다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 중합체 암을 가지며 여기서 단량체는 HEMA-PC이다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 3, 6 또는 9개의 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 9개의 암을 갖는다.

[0407] 일부 실시형태에서, 중합체-항체 접합체는 100,000 내지 1,500,000Da의 분자량을 갖는 중합체 부분을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 500,000 내지 1,000,000Da의 분자량을 갖는 중합체 부분을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 600,000 내지 800,000Da의 분자량을 갖는 중합체 부분을 갖는다. 일부 실시형태에서, 이 접합체는 600,000 내지 850,000Da의 분자량을 갖는 중합체 부분을 가지며 9개의 암을 갖는다. 중합체에 접합되는 항체에 대한 분자량이 주어지는 경우, 분자량은 관련된 임의의 탄수화물 모이어티를 포함한 단백질의 분자량과 중합체의 분자량을 더한 것이 될 것이다.

[0408] 일부 실시형태에서, 약 100kDa 내지 1650kDa의 Mw에 의해 측정된 분자량을 갖는 HEMA-PC 중합체를 갖는 항-VEGF-A 항체가 제공된다. 일부 실시형태에서, Mw에 의해 측정된 중합체의 분자량은 약 50kDa 내지 1000kDa이다. 일부 실시형태에서, Mw에 의해 측정된 중합체의 분자량은 약 600kDa 내지 약 900kDa이다. 일부 실시형태에서, Mw에 의해 측정된 중합체 분자량은 750kDa±15%이다.

[0409] 일부 실시형태에서, 중합체는 하나 이상의 중합체 개시 부위를 갖는 ATRP에 적합한 개시제로부터 만들어진다. 일부 실시형태에서, 중합체 개시 부위는 2-브로모아이소부티레이트 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시제는 3개 이상의 중합체 개시 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시제는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 중합체 개시 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시제는 3, 6 또는 9개의 중합체 개시 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시제는 9개의 중합체 개시 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 개시제는 OG1786이다.

[0410] 항-VEGF-A 항체는 (i) 유전자 조작을 통해 재조합 DNA를 생산하는 단계, (ii) 예를 들지만 이로 제한되지 않는 형질주입, 전기천공 또는 미세주입을 통해 원핵 세포 또는 진핵 세포에 재조합 DNA를 도입하는 단계, (iii) 형질전환된 세포를 배양하는 단계, (iv) 예를 들어 항시적으로 또는 유도 방식으로 항체를 발현시키는 단계 및 (v) 정제된 항체를 수득하기 위하여 예를 들어 세포 배지로부터 또는 형질전환된 세포를 수확하여 항체를 분리하는 단계 및 (vi) 정제된 항체를 수득하는 단계를 포함하는 재조합 발현을 통해 생산될 수 있다.

[0411] 항-VEGF-A 항체는 약학적으로 허용 가능한 항체 분자를 생산하는 것을 특징으로 하는 적합한 원핵 또는 진핵 숙주 시스템에서의 발현을 통해 생산될 수 있다. 진핵 세포의 예시는 CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hip 및 HepG2와 같은 포유동물 세포이다. 다른 적합한 발현 시스템은 원핵(예를 들어, pET/BL21을 사용한 대장균 발현 시스템), 효모(사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및/또는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 시스템) 및 곤충 세포이다.

[0412] 다양한 벡터가 본 명세서에 기술된 항체의 제조를 위해 사용될 수 있으며 진핵 및 원핵 발현 벡터로부터 선택된

다. 원핵 발현을 위한 벡터의 예시에는 preset, pet 및 pad와 같지만 이로 제한되지 않는 플라스미드가 포함되며, 여기서 원핵 발현 벡터에 사용되는 프로모터에는 lac, trc, trp, recA 또는 araBAD 중 하나 이상이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 진핵 발현을 위한 벡터의 예시에는 다음이 포함된다: (i) AOX1, GAP, GAL1 또는 AUG1과 같지만 이로 제한되지 않는 프로모터를 사용하는 pAO, pPIC, pYES 또는 pMET와 같지만 이로 제한되지 않는 효모 발현용 벡터; (ii) PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64 또는 polh와 같지만 이로 제한되지 않는 프로모터를 사용하는 pMT, pAc5, pIB, pMIB 또는 pBAC와 같지만 이로 제한되지 않는 곤충 세포 발현용 벡터 및 (iii) pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3 또는 pBPV와 같지만 이로 제한되지 않는 포유동물 세포 발현용 벡터 및 일 양상에서 CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV 및 베타-엑틴과 같지만 이로 제한되지 않는 프로모터를 사용하는 백시니아 바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 레트로바이러스와 같지만 이로 제한되지 않는 바이러스 시스템으로부터 유래된 포유동물 세포 발현용 벡터.

[0413] 중합체에 대한 단백질 접합 방법

[0414] 일부 실시형태에서, 재조합 DNA 기술을 통해 부가된 시스테인 잔기를 갖는 치료용 단백질을 말레이미드, 비닐설폰, 오쏘피리딜-이황화물 및 아이오도아세트아마이드로 이루어진 군으로부터 선택된 설프하이드릴 특이적 반응기를 갖는 반감기 연장 모이어티에 접합하여 치료용 단백질-반감기 연장 모이어티 접합체를 제공하는 단계를 갖는 치료용 단백질-반감기 연장 모이어티 접합체 제조 방법이 제시된다.

[0415] 일부 실시형태에서 항-VEGF 항체 접합체 제조 방법, 예를 들어 OG1950으로부터 KSI-301을 제조하는 방법이 제공된다. 이 방법은 30× 몰 초과의 TCEP 환원제로 OG1950 단백질을 환원시키는 단계를 포함한다. 환원 후, 항체를 산화하여 캡이 제거된 OG1950 항체를 생성하며 여기서 항체에 자연적으로 존재하는 경쇄 및 중쇄 사이 및 내부 이황화 결합이 형성된다. 그 다음 부형제를 첨가하고 3 내지 10× 몰 초과의 말레이미드 생물중합체를 첨가하여 OG1950를 접합한다. 생물중합체는 공유 티오에테르 연결을 통해 OG1950에 연결된다. 접합 후, 접합하지 않은 항체 및 중합체 모두를 제거하여 항-VEGF 항체 접합체, 예를 들어 KSI-301을 정제한다.

[0416] 위에 기술된 단백질 및 공정 또한 달라질 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 접합된 단백질(항체 또는 항-VEGF 항체일 필요없음) 제조 공정이 제공된다. 이 공정은 단백질의 하나 이상의 시스테인을 환원하여 용액에 캡이 제거된 단백질을 형성하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 시스테인을 환원시킨 후 캡이 제거된 단백질을 다시 산화시켜 단백질의 조작된 시스테인 잔기가 유리 티올 형태로 유지되어 용액에서 재산화된 캡이 제거된 단백질을 형성하는 것을 보장하면서 환원된 단백질에 적어도 하나의 이황화 연결을 복원한다. 그 다음 적어도 하나의 부형제를 용액에 첨가한다. 이 부형제는 중합체 유도 단백질 침전을 감소시킨다. 부형제를 첨가한 후, 중합체를 용액에 첨가함으로써, 조작된 시스테인 잔기에서 재산화된 캡 제거된 단백질에 중합체가 접합되어 접합된 단백질이 형성되도록 한다.

[0417] 일부 실시형태에서, 환원제의 몰 초과량은 기능하는 임의의 양으로 변경될 수 있다. 일부 실시형태에서, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90× 몰 초과의 환원제(모든 실시형태에서 TCEP일 필요는 없음)가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 항체(치료적 또는 다른 항체)가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15× 몰 초과의 말레이미드 생물중합체가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합체에 대해 과잉의 캡 제거 단백질이 있다. 일부 실시형태에서, 재산화 캡 제거 또는 캡 제거 단백질의 양은 중합체의 양보다 적다. 일부 실시형태에서, 재산화 캡 제거 또는 캡 제거 단백질의 양은 중합체 양의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%이다. 일부 실시형태에서, 질량으로 측정한 것으로서, 단백질보다 2.5 내지 4.5배 많은 중합체가 사용된다. 일부 실시형태에서, 질량으로 측정한 것으로서, 단백질보다 10 내지 20배 많은 중합체가 사용된다. 일부 실시형태에서 환원된 항체의 양은 중합체의 양보다 크다. 일부 실시형태에서 중합체의 양은 환원된 항체의 양보다 크다.

[0418] 일부 실시형태에서, 정제 단계는 선택적이다.

[0419] 일부 실시형태에서, 항체 접합체를 만드는 방법은 항-VEGF-A 항체를 포스포릴콜린 함유 중합체에 접합시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서 이 방법은 항-VEGF-A 항체를 포스포릴콜린 함유 중합체에 접합시키는 단계를 포함한다. 이 항-VEGF-A 항체는 재조합 DNA 기술을 통해 부가된 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 부가된 아미노산 잔기는 시스테인 잔기이다. 일부 실시형태에서, 이 시스테인 잔기는 항체의 가변 영역의 외부에 부가된다. 시스테인 잔기는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 부가될 수 있다.

[0420] 일부 실시형태에서, 중합체는 포스포릴콜린 함유 중합체를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 포스포릴콜린 함유 중합체는 말레이미드, 비닐설폰, 오쏘피리딜-이황화물 및 아이오도아세트아마이드로 이루어진

군으로부터 선택된 설프하이드릴 특이적 반응기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스포릴콜린 함유 중합체 상의 설프하이드릴 특이적 반응기는 항-VEGF-A 항체 상의 시스테인 잔기와 반응하여 항체 접합체를 만든다.

[0421] 일부 실시형태에서, 접합되는 단백질은 항체, 항체 단백질 융합체 또는 이의 결합 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 단백질은 항체가 아니지만 효소, 리간드, 수용체 또는 기타 단백질 또는 이의 돌연변이 또는 변이체이다. 일부 실시형태에서, 본래의 단백질은 적어도 하나의 이황화 결합 및 적어도 하나의 본래의 것이 아닌 시스테인을 함유한다.

[0422] 일부 실시형태에서, 부형제는 산 또는 염기일 수 있다. 일부 실시형태에서, 부형제는 세제, 당 또는 하전된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 부형제는 중합체에 대한 접합 중 용액에서 단백질이 유지되는 것을 돕는다. 일부 실시형태에서, 부형제는 단백질을 함유하는 용액에 중합체를 첨가하기 전에 단백질을 함유하는 용액에 첨가된다.

[0423] 일부 실시형태에서, 반응은 약 pH 5 내지 약 pH 9의 수성 조건 하에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 반응은 pH 6.0 내지 pH 8.5, pH 6.5 내지 pH 8.0 또는 pH 7.0 내지 pH 7.5에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 반응은 pH 8 내지 pH 9에서 발생한다.

[0424] 일부 실시형태에서, 중합체는 섭씨 2 내지 37도에서 단백질에 접합된다. 일부 실시형태에서, 접합은 섭씨 0 내지 40도, 섭씨 5 내지 35도, 섭씨 10 내지 30도 및 섭씨 15 내지 25도에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 중합체는 섭씨 5 내지 10도에서 접합된다.

[0425] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 접합된 단백질은 정제를 위해(접합되지 않은 것으로부터 접합된 것을 옮기기 위해) 이온 교환 매체 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피 매체와 접촉될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 매체, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및/또는 친화성 크로미토그래피 매체는 유리 중합체로부터 또는 재산화된 캡 제거 단백질로부터 접합된 단백질을 분리한다.

[0426] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 중합체는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 양쪽성 이온, 포스포릴콜린 또는 말레이미드 작용기에 중합체 분지점의 중심을 가교하는 PEG 링커. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 중합체 중 임의의 것은 본 명세서에 제공되는 방법을 통해 단백질에 부가될 수 있다.

[0427] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 단백질 중 임의의 것은 본 명세서에 제공되는 방법 중 하나 이상을 통해 본 명세서에 제공되는 중합체의 임의의 것에 접합될 수 있다.

[0428] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 공정(들)은 단백질 및/또는 항체 접합체를 만들고 정제하기 위한 더 큰 규모의 가공을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 적용되는 부피는 적어도 1리터, 예를 들어 1, 10, 100, 1,000, 5,000 또는 10,000리터 이상이다. 일부 실시형태에서, 생산 및/또는 정제되는 항체 접합체의 양은 0.1, 1, 10, 100, 1000, 2000, 2500 또는 3000그램 이상일 수 있다.

[0429] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질은 재조합 DNA 기술을 통해 부가된 시스테인 잔기를 갖는 본 명세서에 기술된 항-VEGF-A 항체 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체 중쇄는 다음의 CDR을 갖는다: 서열번호 172의 CDRH1인 CDR_H1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDR_H2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDR_H3. 중쇄는 또한 221번 위치에 트레오닌(T)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-VEGF 경쇄는 다음의 CDR을 갖는다: 서열번호 199의 CDRL1인 CDR_L1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDR_L2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDR_L3. 항-VEGF-A 경쇄는 또한 Kabat 4번 위치에 류신(L)을 가질 수 있다.

[0430] 일부 실시형태에서, 항-VEGF-A 항체는 IgG1이다. 일부 실시형태에서, 중쇄는 효과기 기능을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 다음의 아미노산 위치(EU 넘버링) 중 하나 이상에 대한 것이다: E233, L234, L235, G236, G237, A327, A330 및 P331. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: E233P, L234V, L234A, L235A, G237A, A327G, A330S 및 P331S(EU 넘버링). 일부 실시형태에서, 돌연변이는 (EU 넘버링) L234A, L235A 및 G237A이다.

[0431] 일부 실시형태에서, 재조합 DNA 기술을 통해 치료용 단백질에 부가된 시스테인 잔기는 Cys-Cys 이황화 결합 짝짓기에 관여되어서는 안 된다. 이와 관련하여, 치료용 단백질은 이량체성일 수 있다. 따라서 예를 들어 온전한 항-VEGF-A 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는다. 예를 들어 Cys 잔기가 중쇄에 도입되는 경우, 온전한 항체는 동일한 위치에 이렇게 도입된 2개의 시스테인을 가질 것이며 이들 시스테인 잔기가 사슬-내 이황화 결합을 형성할 가능성이 존재한다. 도입된 시스테인 잔기가 Cys-Cys 이황화 결합을 형성하거나 그렇게 할 경향을 갖는 경우, 그 도입된 Cys 잔기는 접합에 유용하지 않을 것이다. 사슬-내 이황화 짝짓기를 일으키는 중쇄 및 경쇄의

위치를 피하는 방법이 이 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 제2015/0158952호를 참고할 수 있다.

[0432] 일부 실시형태에서, 재조합 DNA 기술을 통해 도입된 시스테인 잔기는 (EU 넘버링) Q347C 및 L443C로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 시스테인 잔기는 L443C(EU 넘버링 또는 449C)이다. 일부 실시형태에서, 중쇄 항체는 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나에 제시된 아미노산 서열을 가지며; 경쇄는 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 갖는다.

[0433] 일부 실시형태에서, 설프하이드릴 특이적 반응기는 말레이미드이다.

[0434] 일부 실시형태에서, 반감기 연장 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 분지형 PEG, PolyPEG®(Warwick Effect Polymers; 영국 코번트리 소재), 폴리시알산(PSA), 전분, 하이드록실에틸 전분(HES), 하이드록시알킬 전분(HAS), 탄수화물, 다당류, 풀루란, 키토산, 히알루론산, 콘드로이틴 황산, 더마탄 황산, 덱스트란, 카복시메틸-덱스트란, 폴리알킬렌 산화물(PAO), 폴리알킬렌 글리콜(PAG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 폴리옥사졸린, 폴리아크릴로일모르폴린, 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리카복실레이트, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물, 폴리스티렌-코-말레산 무수물, 폴리(1-하이드록시메틸에틸렌 하이드록시메틸포르말)(PHF), 양쪽이온성 중합체, 포스포릴콜린 함유 중합체 및 2-메타크릴로일옥시-2'-에틸트라이메틸암모늄포스페이트(MPC)를 포함하는 중합체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0435] 일부 실시형태에서, 반감기 연장 모이어티는 양쪽이온성 중합체이다. 일부 실시형태에서, 양쪽성 이온은 포스포릴콜린, 즉 포스포릴콜린 함유 중합체이다. 일부 실시형태에서, 중합체는 MPC 단위체로 이루어진다.

[0436] 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 3개 이상의 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 3, 6 또는 9개의 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 9개의 암을 갖는다. 일부 실시형태에서, 중합체는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 이상의 중합체 개시 부위를 포함하는 개시제로 합성된다.

[0437] 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 약 300,000 내지 1,750,000Da의 분자량을 갖는다. 일부 실시형태에서, MPC 중합체는 약 500,000 내지 1,000,000Da 또는 약 600,000 내지 900,000Da의 분자량을 갖는다.

[0438] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질-반감기 연장 모이어티 접합체 제조 방법은 환원된 시스테인 설프하이드릴기를 생성하는 조건 하에서 치료용 단백질을 티올 환원제와 접촉시키는 추가적인 단계를 갖는다. 위에서 논의한 바와 같이, 재조합 DNA 기술을 통해 부가된 시스테인 잔기는 짝을 이루지 않는 것, 즉 Cys-Cys 사슬 내 이황화 결합에 관여하지 않거나 이러한 결합에 실질적으로 관여하지 않는 것이 바람직하다. 그러나, 이러한 Cys-Cys 이황화 결합에 관여하지 않거나 접합에 대해 자유로운 Cys 잔기는 배양 배지 내 유리 시스테인과 반응하여 이황화 부가물을 형성하는 것으로 알려진다. 예를 들어, WO 2009/052249 참조. 그렇게 유도된 시스테인은 접합에 이용할 수 없을 것이다. 이황화 부가물로부터 새롭게 부가된 시스테인을 자유롭게 만들기 위해, 정제 후 단백질을 환원제, 예를 들어 다이티오트레이톨로 처리한다. 그러나, 이러한 환원제 처리는 많은 것이 사슬 간 및 사슬 내 Cys-Cys 이황화 결합에 관여하는 본래의 시스테인을 포함하는 치료용 단백질 내 시스테인 잔기 전부를 환원시킬 것이다. 본래의 Cys-Cys 이황화는 일반적으로 단백질의 안정성 및 활성에 중요하며 이들은 재형성되어야 한다. 일부 실시형태에서, 모든 본래의(예를 들어, 사이 및 내부) Cys-Cys 이황화는 재형성된다.

[0439] 본래의 사슬-간 및 사슬-내 이황화 잔기를 재형성하기 위해, 시스테인 이황화 부가물을 제거하기 위한 환원 이후, 치료용 단백질을 지정된 시간 동안, 예를 들어 밤새 산화 조건 및/또는 산화제에 노출시킨다. 일부 실시형태에서, 본래의 이황화 결합의 재형성을 달성하기 위해 밤샘 외기 노출(ambient air exposure overnight) 방법을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본래의 이황화를 복원하기 위해 산화제를 사용한다. 일부 실시형태에서, 산화제는 수성 CuSO4 및 디하이드로아스코르브산(DHAA)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 산화제는 DHAA이다. 일부 실시형태에서, 사용되는 DHAA의 범위는 5 내지 30당량 범위이다. 일부 실시형태에서, 범위는 10 내지 20당량이다. 일부 실시형태에서, 범위는 15당량이다.

[0440] 일부 실시형태에서, 티올 환원제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 트리스[2-카복시에틸]포스핀 염산염(TCEP), 다이티오트레이톨(DTT), 다이티오에리트리톨(DTE), 수소화붕소나트륨($NaBH_4$), 시아노수소화붕소나트륨(NaCNBH3), β-머캅토에탄올(BME), 시스테인 염산염 및 시스테인. 일부 실시형태에서, 티올 환원제는 TCEP이다.

[0441] 일부 실시형태에서, 티올 환원제 농도는 치료용 단백질 농도에 비해 1 내지 100배 몰 초과이다. 일부 실시형태에서, 티올 환원제 농도는 치료용 단백질 농도에 비해 20 내지 50배 몰 초과이다. 일부 실시형태에서, 티올 환

원제는 치료용 단백질과 항온 처리한 후 치료용 단백질의 산화 전에 제거된다.

[0442] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질을 반감기 연장 모이어티와 접합하는 방법은 접합 후 치료용 단백질 접합체를 정제하는 추가적인 단계를 갖는다. 일부 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기술을 사용하여 치료용 단백질 접합체를 정제한다.

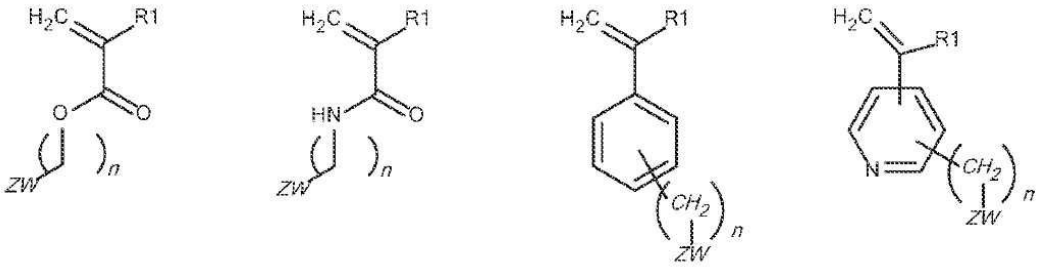
[0443] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 접합되지 않은 치료용 단백질에 비해 적어도 20%의 생물학적 활성을 유지한다. 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 접합되지 않은 치료용 단백질에 비해 적어도 50%의 생물학적 활성을 유지한다. 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 본래의 치료용 단백질에 비해 적어도 90%의 생물학적 활성을 유지한다.

[0444] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 접합되지 않은 치료용 단백질에 비해 증가된 반감기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 접합되지 않은 치료용 단백질에 비해 적어도 1.5배 증가한 반감기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 치료용 단백질 접합체는 접합되지 않은 치료용 단백질에 비해 적어도 5배 증가한 반감기를 갖는다.

[0445] 일부 실시형태에서, 치료용 단백질을 반감기 연장 모이어티에 접합하는 방법의 양쪽이온성 중합체는 양쪽성 이온성기를 갖는 라디칼 중합 가능한 단량체이며 방법은 중합 매체 내 자유 라디칼 중합 가능한 양쪽성 이온성 단량체를 중합하여 중합체를 제공하는 추가적인 단계를 갖고 매체는 다음을 포함한다: 전이 금속 촉매 $M_t^{(q-1)+}$, 여기서 M_t는 전이 금속이고, q는 금속의 더 높은 산화 상태이고, q-1은 금속의 더 낮은 상화 상태이고, 여기서 금속 촉매는 $Mt^{(q-1)+}X'_{(q-1)}$ 형태의 염으로 공급되고, 여기서 X'은 반대 이온 또는 기이거나, 전이 금속 촉매는 산화된 불활성화 상태에서 환원된 활성화 상태로 전이 금속을 환원시킬 수 있는 환원제와 함께 더 높은 산화 상태 $M_t^{q+}X'_q$에서 불활성화 금속 염을 제공하여 인시츄(in situ)로 공급됨; 리간드; 및 개시제.

[0446] ATRP 전이 금속 촉매로서 기능하기 위해, 전이 금속은 하나의 전자에 의해 분리되는 적어도 2개의 쉽게 접근 가능한 산화 상태, 더 높은 상화 상태 및 더 낮은 산화 상태를 가져야 한다. ATRP에서, 가역성 산화환원 반응은 전이 금속 촉매가 더 높은 산화 상태와 더 낮은 산화 상태 사이를 순환하고 중합체 사슬은 전파(propagating) 사슬 말단을 갖는 것과 휴면(dormant) 사슬 말단을 갖는 것 사이를 순환하는 결과를 초래한다. 예를 들어, 미국 특허 제7,893,173호 참조.

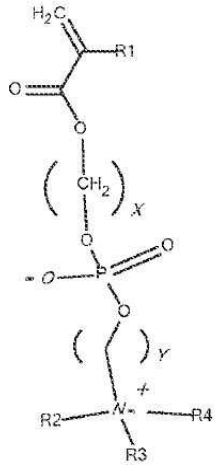
[0447] 일부 실시형태에서, 라디칼 중합 가능한 양쪽성 이온성 단량체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0448]

[0449] 여기서 R1은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고, ZW는 양쪽성 이온이고 n은 1 내지 6의 정수이다.

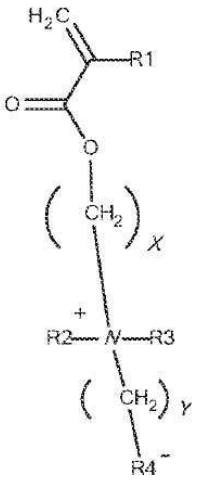
[0450] 일부 실시형태에서, 라디칼 중합 가능한 단량체는



[0451]

[0452] 으로, 여기서 R1은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고, R2, R3, R4는 같거나 서로 다르며 H 또는 C_{1-4} 알킬이고, X 및 Y는 같거나 서로 다르며 1 내지 6의 정수이다. 일부 실시형태에서, R1, R2, R3 및 R4는 각각 메틸이고 X 및 Y는 각각 2이다.

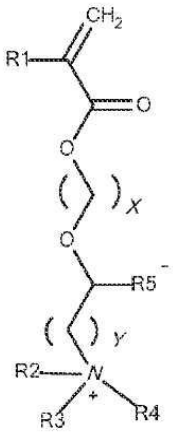
[0453] 일부 실시형태에서, 라디칼 중합 가능한 단량체는



[0454]

[0455] 으로, 여기서 R1은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고, R2 및 R3은 같거나 서로 다르며 H 또는 C_{1-4} 알킬이고, R4는 PO_4^-, SO_3^- 또는 CO_2^-이고, X 및 Y는 같거나 서로 다르며 1 내지 6의 정수이다. 일부 실시형태에서, R1, R2 및 R3은 메틸이고, R4는 PO_4^-이고, X 및 Y는 각각 2이다.

[0456] 일부 실시형태에서, 단량체는



[0457]

[0458] 으로, 여기서 R1은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고, R2, R3 및 R4는 같거나 서로 다르며 H 또는 C_{1-4} 알킬이고, R5는 PO_4-, SO_3- 또는 CO_2-이고, X 및 Y는 같거나 서로 다르며 1 내지 6의 정수이다. 일부 실시형태에서, R1, R2, R3 및 R4는 메틸이고, R5는 PO_4-이고, X 및 Y는 2이다.

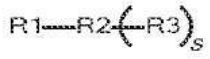
[0459] 일부 실시형태에서, 전이 금속 Mt는 Cu, Fe, Ru, Cr, Mo, W, Mn, Rh, Re, Co, V, Zn, Au 및 Ag로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 금속 촉매는 $Mt^{(q-1)+}X'_{(q-1)}$ 형태의 염으로서 공급된다. $M_t^{(q-1)+}$는 Cu^{1+}, Fe^{2+}, Ru^{2+}, Cr^{2+}, Mo^{2+}, W^{2+}, Mn^{3+}, Rh^{3+}, Re^{2+}, Co^{+}, V^{2+}, Zn^{+}, Au^{+} 및 Ag^{+}로 이루어진 군으로부터 선택되며, X'은 할로겐, C_{1-6} 알콕시, $(SO_4)_{1/2}$, $(PO_4)_{1/3}$, $(R7PO_4)_{1/2}$, $(R7_2PO_4)$, 트라이플레이트, 헥사플루오로포스페이트, 메탄설포네이트, 아릴설포네이트, CN 및 $R7CO_2$로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 R7은 H 또는 할로겐으로 1 내지 5회 치환될 수 있는 직선형 또는 분지형 C_{1-6} 알칼기이다. 일부 실시형태에서, $M_t^{(q-1)+}$는 Cu^{1+}이고, X'는 Br이다.

[0460] 일부 실시형태에서, $M_t^{(q-1)+}$는 인시츄로 공급된다. 일부 실시형태에서, $M_t^{q+}X_q$는 $CuBr_2$이다. 일부 실시형태에서, 환원제는 저 산화 수준의 황 화합물, 아황산수소나트륨, 금속 이온을 포함하는 무기염, 금속, 하이드라진 수화물 및 이러한 화합물의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 환원제는 금속이다. 일부 실시형태에서, 환원제는 Cu^0이다.

[0461] 일부 실시형태에서, 환원제는 유기 화합물이다. 일부 실시형태에서, 유기 화합물은 알킬티올, 머캅토에탄올 또는 쉽게 에놀화되는 카보닐 화합물, 아스코르브산, 아세틸 아세톤, 캄포설폰산, 하이드록시 아세톤, 환원당, 단당류, 포도당, 할데하이드 및 이러한 유기 화합물의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

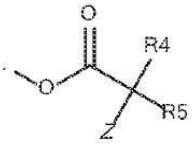
[0462] 일부 실시형태에서, 리간드는 2,2'-바이피리딘, 4,4'-다이-5-노닐-2,2'-바이피리딘, 4,4-다이노닐-2,2'-바이피리딜, 4,4',4''-트리스(5-노닐)-2,2':6',2''-터피리딘, N,N,N',N',N''-펜타메틸다이에틸렌트라이아민, 1,1,4,7,10,10-헥사메틸트라이에틸렌테트라민, 트리스(2-다이메틸아미노에틸)아민, N,N-비스(2-피리딜메틸)옥타데실아민, N,N,N',N'-테트라[(2-피리달)메틸]에틸렌다이아민, 트리스[(2-피리딜)메틸]아민, 트리스(2-아미노에틸)아민, 트리스(2-비스(3-부톡시-3-옥소프로필)아미노에틸)아민, 트리스(2-비스(3-(2-에틸헥속시)-3-옥소프로필)아미노에틸)아민 및 트리스(2-비스(3-도데콕시-3-옥소프로필)아미노에틸)아민으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 리간드는 2,2'-바이피리딘이다.

[0463] 일부 실시형태에서, 개시제는 다음의 구조를 갖는다:



[0464]

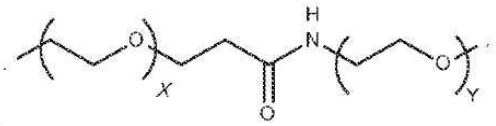
[0465] 여기서 R1은 친핵성 반응기이고, R2는 링커를 포함하고, R3은



[0466] 구조를 갖는 중합체 합성 개시제 모이어티를 포함하고, 여기서 R4 및 R5는 같거나 서로 다르며 알킬, 치환된 알킬, 알킬렌, 알콕시, 카복시알킬, 할로알킬, 사이클로알킬, 사이클릭 알킬 에테르, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬렌, 아릴, 아릴렌, 아릴렌-옥시, 헤테로아릴, 아미노, 아미도 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; Z는 할로겐, -OR(여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필 또는 아이소프로필임), -SCN 또는 -NCS이고; s는 1 내지 20의 정수이다.

[0467] 일부 실시형태에서, Z는 Br이고, R4 및 R5는 각각 메틸이다. 일부 실시형태에서, R1은 $-NH_2$, -OH 및 -SH로 이루어진 군으로부터 선택된다.

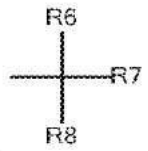
[0468] 일부 실시형태에서 R2는 알킬, 치환된 알킬, 알킬렌, 알콕시, 카복시알킬, 할로알킬, 사이클로알킬, 사이클릭 알킬 에테르, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬렌, 아릴, 아릴렌, 아릴렌-옥시, 헤테로아릴, 아미노, 아미도 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시형태에서, R2는



[0469]

[0470] 이며, 여기서 X 및 Y는 같거나 서로 다르며 1 내지 20의 정수이다. 일부 실시형태에서, X 및 Y는 각각 4이다.

[0471] 일부 실시형태에서, R3은

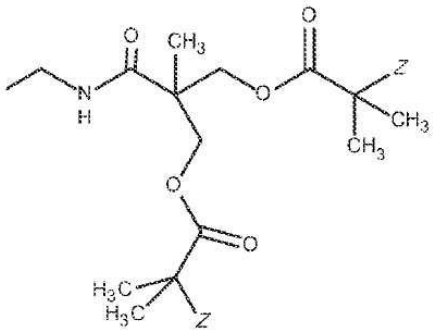


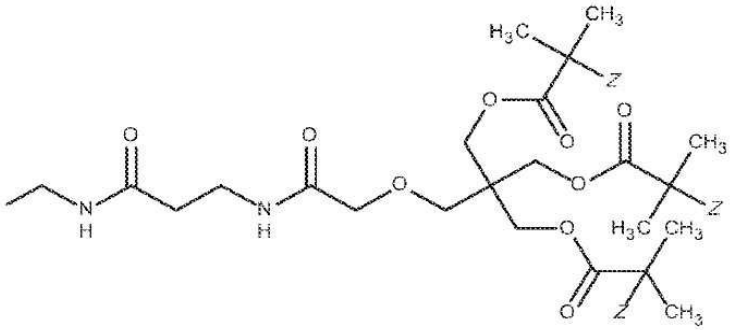
[0472]

[0473] 이며, 여기서 R6, R7 및 R8은 같거나 서로 다르며



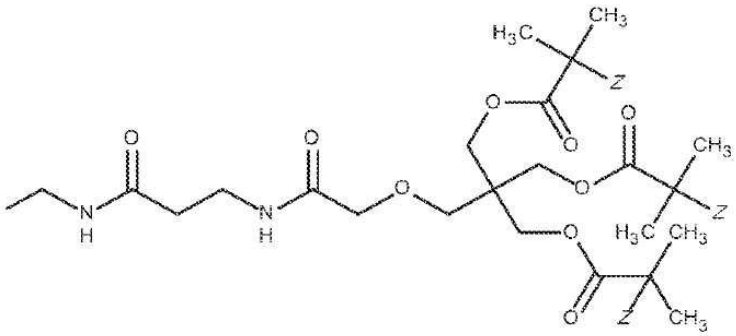
[0474] ,

[0475]  및



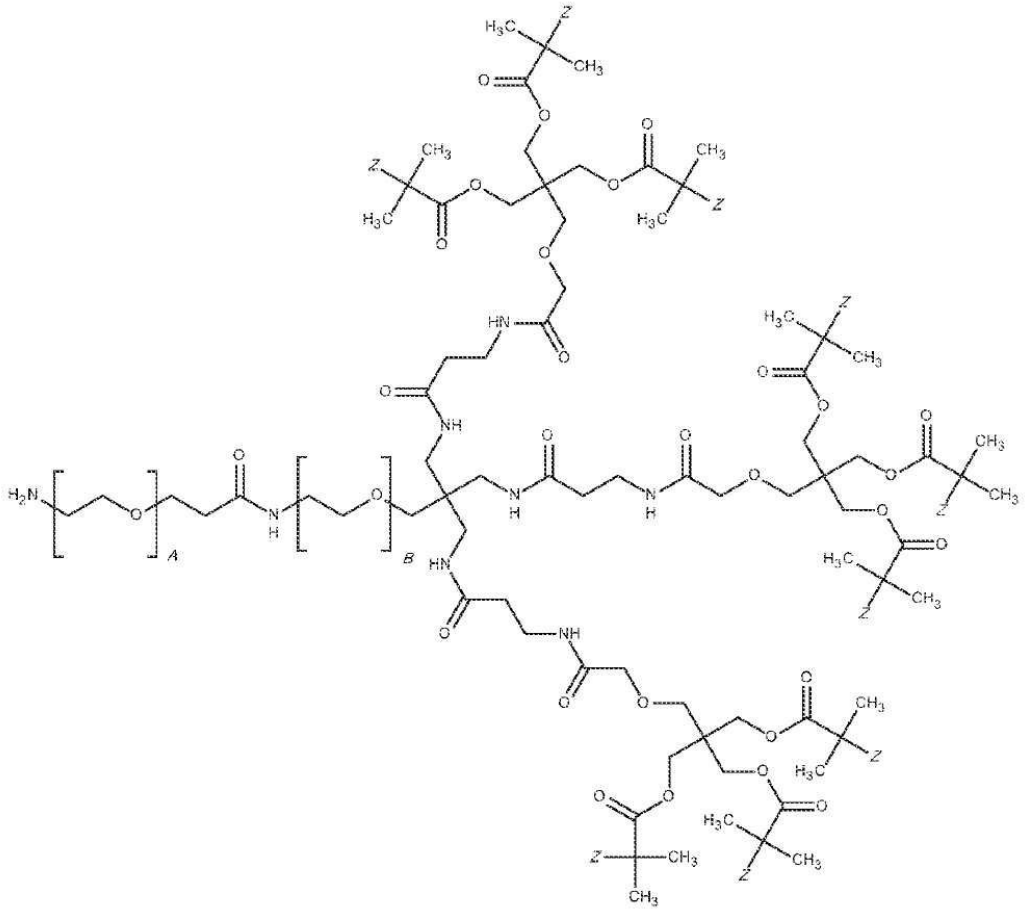
[0476]

[0477] 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Z는 -OR(여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필 또는 아이소프로필임), -SCN, -NCS, -F, -Cl, -Br 또는 -I이다. 일부 실시형태에서, Z는 -Br이고, R6, R7 및 R8은 각각



[0478] 이다.

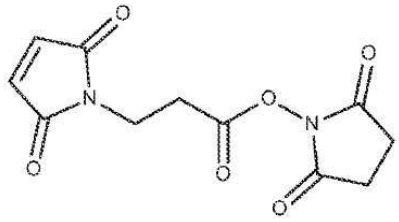
[0479] 일부 실시형태에서, 개시제는 다음의 구조를 갖는다:



[0480]

[0481] 여기서 A 및 B는 같거나 서로 다르며 2 내지 12의 정수이고, Z는 임의의 할로겐화물, 예를 들어 Br이다. 일부 실시형태에서, A 및 B는 각각 4이다.

[0482] 일부 실시형태에서, 방법은 중합체를 말레이미드 시약과 반응시켜 말단 말레이미드를 갖는 중합체를 제공하는 단계를 추가로 갖는다. 일부 실시형태에서, 말레이미드 화합물은



[0483] 이다.

[0484] 약학적 조성물

[0485] 치료용 단백질은 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 약학적 조성물에 통합될 수 있다. 경구 투여에 적합한 약학적 조성물은 캡슐, 용액, 시럽 또는 현탁액(수성 또는 비-수성 액체 내에; 또는 식용 폼 또는 휩(whip)으로서; 또는 에멀션으로서)과 같은 개별 단위로 제시될 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐에 적합한 부형제에는 락토스, 옥수수 전분 또는 이들의 유도체, 스테아르산 또는 이의 염이 포함된다. 연질 젤라틴 캡슐로 사용하기에 적합한 부형제에는 예를 들어 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 또는 액체 폴리올 등이 포함된다. 용액 및 시럽의 제조를 위해, 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어 물, 폴리올 및 당이 포함된다. 현탁액의 제조를 위해 오일(예를 들어, 식물성 오일)을 사용하여 수중유 또는 유중수 현탁액을 제공할 수 있다.

[0486] 약학적 조성물은 비강 투여를 위해 적합화될 수 있으며, 여기서 부형제는 고체이고 코로 들이마시는 방식, 즉 코에 가까이 대고 분말 용기로부터 비강을 통해 빠르게 흡입하는 방식으로 투여되는 예를 들어 20 내지 500마이크론 범위의 입자 크기를 갖는 거친 분말이 포함된다. 비강 스프레이 또는 비강 드롭으로 투여하기 위한 부형제

가 액체인 적합한 조성물에는 활성 성분의 수용액 또는 오일 용액이 포함된다. 흡입으로 투여하기에 적합한 약학적 조성물에는 개량된 용량의 압착된 에어로졸, 네뷸라이저 또는 인서플레이터의 다양한 유형의 수단에 의해 생성될 수 있는 미세 입자 먼지 또는 미스트가 포함된다.

[0487] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물에는 항-산화제, 완충제, 세균발육억제제 및 제형을 의도된 수용자의 혈액과 실질적으로 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액이 포함된다. 주사 가능 용액에 사용될 수 있는 부형제에는 예를 들어 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일이 포함된다. 조성물은 단위-투여량 또는 다중-투여량 용기 내에, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알 내에 담긴 상태로 제공될 수 있으며, 사용하기 직전에, 멸균 액체, 예를 들어 주사용수를 첨가하기만 하면 되는 동결-건조된 상태로 보관될 수 있다. 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 즉석 주사 용액 및 현탁액을 제조할 수 있다. 약학적 조성물은 약 250 내지 400mOsm/kg 물의 삼투질농도를 나타내는 실질적으로 등장성일 수 있다.

[0488] 약학적 조성물은 방부제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미료, 착색제, 취기제, 염(그 자체가 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 제공될 수 있는 물질), 완충제, 코팅제 또는 항산화제를 함유할 수 있다. 이들은 또한 이 물질에 더해 치료적 활성 제제를 함유할 수 있다. 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 조합으로 사용될 수 있다. 이러한 부형제에는 염수, 완충 염수(예를 들어, 인산 완충 염수), 덱스트로스, 리포솜, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합이 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0489] 항체 및 이들을 함유하는 약학적 조성물은 예를 들어 경구 투여, 유리체내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 골내 투여, 비강내 투여, 국소 투여, 복강내 투여 및 병변내 투여를 포함하여 환자의 질환의 치료 또는 예방하는데 효과적인 요법으로 투여될 수 있다. 비경구 주입에는 근육내 투여, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 복강내 투여 또는 피하 투여 또는 다른 경로가 포함된다. 요법에서 또는 예방으로서, 활성 제제는 주사 가능한 조성물로서, 예를 들어 멸균 수성 분산액으로서 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서 제제는 등장성이거나 실질적으로 등장성이다.

[0490] 포유동물, 특히 인간에게 투여하는 경우, 활성 제제의 투여량은 0.01㎎/㎏ 체중, 전형적으로는 약 1㎎/㎏으로 예상된다. 의사는 개체의 나이, 체중, 성별 및 반응, 치료받는 질환 또는 장애 및 치료받는 개체의 나이 및 상태를 포함하는 요인에 따라 개체에 대해 가장 적합한 실제 투여량을 결정할 수 있다. 상기 투여량은 평균적인 경우의 예시이다. 물론 더 높거나 더 낮은 투여량이 가치있는 경우가 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여량은 0.5 내지 20㎎/눈, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19㎎일 수 있다.

[0491] 이러한 투여량은 적절한 빈도(예를 들어, 매주, 격주로, 매달, 2달에 한 번, 분기마다, 1년에 두 번, 매해)로 반복될 수 있다. 부작용이 발생하는 경우 투여량의 양 및/또는 빈도를 일반적인 임상 관행에 따라 줄일 수 있다. 일 실시형태에서, 약학적 조성물은 1 내지 30일에 한 번 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 약학적 조성물은 30일에 두 번 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 약학적 조성물은 1주에 한 번 투여될 수 있다.

[0492] 항체 및 약학적 조성물은 단독으로 또는 치료적 화합물 또는 분자, 예를 들어 항-염증성 약물, 진통제 또는 항생제와 같은 다른 화합물과 함께 사용될 수 있다. 이러한 다른 화합물과의 투여는 동시에, 별도로 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 구성 요소는 적절한 경우 지침을 포함할 수 있는 키트의 형태로 제조될 수 있다.

[0493] 본 명세서에 개시된 항체 및 약학적 조성물은 질환, 특히 본 명세서에 기술된 안구 질환 또는 상태의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

[0494] 항-VEGF 항체 접합체 또는 항-VEGF 단백질 접합체 및 이를 함유하는 약학적 조성물은 안구, 안구내 및/또는 유리체내 주사 및/또는 공막근처 주사 및/또는 망막하 주사 및/또는 테논하 주사 및/또는 맥락막상 주사 및/또는 결막하 및/또는 점안액 및/또는 연고 형태의 국소 투여를 위해 제형화되고 이를 통해 투여될 수 있다. 이러한 항체 및 조성물은 다양한 방법으로 예를 들어 문헌[Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis(March 2006)]와 같은 참고문헌에 기술된 것을 포함하여, 유리체 내로 화합물을 천천히 방출하는 것을 가능하게 하는 장치 및/또는 데포(depot)로서 유리체내로 전달될 수 있다. 일 예시에서, 장치는 장기간 동안 화합물을 방출하는 미니펌프 및/또는 매트릭스 및/또는 수동 확산 시스템 및/또는 캡슐화된 세포의 형태일 수 있다(Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006)).

[0495] 안구, 안구내 또는 유리체내 투여를 위한 제형은 이 분야에 알려진 방법 및 성분을 사용하여 제조할 수 있다.

효율적인 치료를 위한 주된 요구 사항은 눈을 통한 적절한 침투이다. 약물을 국소적으로 전달할 수 있는 눈의 앞부분의 질환과 달리, 망막 질환은 보다 부위-특이적 접근 방식이 필요하다. 점안제 및 연고는 눈의 뒤에 침투하는 경우가 드물고, 혈액-안구 장벽은 전신적으로 투여된 약물이 안구 조직으로 침투하는 것을 방해한다. 따라서, AMD 및 CNV와 같은 망막 질환을 치료하기 위한 약물 전달을 위해 선택하는 방법은 직접적인 유리체내 주사이다. 유리체내 주사는 일반적으로 환자의 상태 및 전달되는 약물의 특성 및 반감기에 따른 간격으로 반복된다.

[0496] 치료적 항체 및 관련 접합체는 일반적으로 멸균 접근 포트가 있는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 담긴다. 이러한 조성물은 또한 사전에 채워진 주사기의 형태로 제공될 수 있다.

[0497] "안정한" 제형은 그 안의 단백질 또는 기타 반감기 연장 모이어티의 중합체에 접합된 단백질이 보관 시 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 본질적으로 유지하는 것이다. "안정한"은 또한 제형이 응집 및/또는 탈아미드화를 포함한 불안정 징후를 거의 나타내지 않거나 전혀 나타내지 않음을 의미한다. 예를 들어, 제공되는 제형은 5 내지 8℃의 온도에서 표시된 바와 같이 보관할 경우 적어도 2년 동안 안정성을 유지할 수 있다. 본 개시내용의 항-VEGF 항체 접합체에 적합한 제형은 예를 들어 PCT 공개 번호 제WO2017117464호에 기술되어 있으며, 이의 전체는 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0498] 이 분야에서 단백질의 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술을 이용할 수 있으며 예를 들어 문헌[Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991)] 및 문헌[Jones, 1993 Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90]에서 이러한 기술에 대해 다루고 있다. 안정성은 선택된 시간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서 제형의 보관은 적어도 6개월, 12개월, 12 내지 18개월 또는 2년 이상 동안 안정하다.

[0499] 항체 또는 이의 단편과 같은 단백질은 약학적 조성물에서 "물리적 안정성을 유지"하는데, 이는 색상 및/또는 투명성을 시각적으로 검사하거나 UV 광 산란 또는 크기 배제 크로마토그래피로 측정할 때 응집, 침전, 탈아미드화 및/또는 변성의 징후를 나타내지 않는 경우이다.

[0500] 단백질은 약학적 조성물에서 "화학적 안정성을 유지"하는데, 이는 주어진 시점에서의 화학적 안정성이 단백질이 그 생물학적 활성을 여전히 유지하는 것으로 간주되는 정도인 경우이다. 화학적 안정성은 단백질의 화학적으로 변형된 형태를 검출하고 정량하여 평가할 수 있다. 화학적 변형에는 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, SDA-PAGE 및/또는 매트릭스-보조 레이저 탈리 이온화/비행시간 질량분석(MALDI/TOF MS)을 사용하여 평가할 수 있는 크기 변형(예를 들어, 클리핑)이 포함될 수 있다. 다른 유형의 화학적 변형에는 전하 변경(예를 들어, 탈아미드화의 결과로 발생함)이 포함되며, 이는 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피로 평가할 수 있다. 항체는 약학적 조성물에서 "생물학적 활성을 유지"하는데, 이는 주어진 시점에서의 항체의 생물학적 활성이 예를 들어 항원 결합 분석에서 결정된 것으로서 약학적 제형이 제조된 시점에서 나타난 생물학적 활성의 약 10% 이내(분석의 오차 이내)에 있는 경우이다.

[0501] 단백질-중합체 접합체는 "화학적 안정성을 유지"하는데, 이는 단백질과 중합체 사이의 화학적 결합이 온전하게 유지되는 경우, 예를 들어 가수분해되거나 붕괴되지 않는 경우이다. 접합체의 단백질 부분은 위에 기술된 바와 같이 화학적 안정성을 유지한다.

[0502] "등장성"은 관심 제형이 본질적으로 인간 혈액 또는 유리체내 주사의 경우 유리체와 같은 삼투압을 갖는 것을 의미한다. 등장성 제형은 일반적으로 약 250 내지 400mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 등장성은 예를 들어 증기압 또는 얼음-동결 유형 삼투압계를 사용하여 측정할 수 있다.

[0503] 본 명세서에 사용된 "완충제"는 산-염기 접합체 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충된 용액을 의미한다. 일부 실시형태에서, 완충제는 약 3.0 내지 약 8.0; 예를 들어 약 4.5 내지 8; 또는 약 6 내지 약 7.5; 또는 약 6.0 내지 약 7.0 또는 약 6.5 내지 7.0 또는 약 7.0 내지 약 7.5; 또는 약 7.1 내지 약 7.4의 pH를 갖는다. 위의 범위 사이의 임의의 지점의 pH 또한 고려된다.

[0504] 일부 실시형태에서, "PBS" 인산염 완충 염수, Tris 기반 완충제 및 히스티딘-기반 완충제가 사용된다. 일부 실시형태에서, 아세트산 완충제가 사용된다.

[0505] 일부 실시형태에서, PBS 완충제는 적절한 pH를 제공하도록 적정된 적어도 Na_2HPO_4, KH_2PO_4 및 NaCl로 구성된다.

일부 실시형태에서, 완충제는 안정한 보관 용액을 제공하기 위해 KCL 및 기타 염과 같은 기타 약학적 부형제, 세제 및/또는 방부제를 함유할 수 있다.

[0506] "방부제"는 본질적으로 그 안의 세균 작용을 감소시켜 예를 들어 다중-사용 제형의 생산을 용이하게 하는 제형에 포함될 수 있는 화합물이다. 잠재적인 방부제의 예시에는 염화 옥타데실다이메틸벤질 암모늄, 염화 헥사메토늄, 염화 벤잘코늄(알킬기가 긴-사슬 화합물인 염화 알킬벤질다이메틸암모늄의 혼합물) 및 염화 벤제토늄이 포함된다. 다른 유형의 방부제에는 페놀, 부틸 및 벤질 알코올과 같은 방향족 알코올, 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 사이클로헥사놀, 3-펜타놀 및 m-크레솔이 포함된다.

[0507] 일부 실시형태에서, 제형은, 인간에 사용하거나 동물 시험을 위한 안전성을 위해, 내독소가 충분히 낮은 수준이어야 한다. "내독소"는 그람-음성 세균의 세포막으로부터 유래한 지질다당류(LPS)이다. 내독소는 소수성 지질 모이어티(지질 A)에 공유 결합된 친수성 다당류 모이어티로 이루어진다. 문헌[Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. 1991. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. 5(12):2652-2660]. 지질 A는 내독소의 대부분의 생물학적 활성, 즉 독성을 담당한다. 내독소는 세균 세포가 사멸한 경우뿐만 아니라 성장 및 분열 중에도 대량으로 배출된다. 이들은 열-안정성이 높고 일반적인 살균 조건 하에서 파괴되지 않는다. 극도의 열 또는 pH 처리, 예를 들어 180 내지 250℃ 및 0.1M을 초과하는 산 또는 염기를 사용해야 한다(Petsch D, Anspach F. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol. 76: 97-119). 물론 이러한 조건은 생물학적 약물에 매우 해로울 것이다.

[0508] 생명공학 및 약학 산업에서, 생산 과정 중 그리고 최종 생산물에서 내독소를 발견할 수 있다. 세균은 물, 염수 및 완충제를 포함한 영양이 부족한 매체에서 성장할 수 있으므로, 예방책을 취하지 않는 한 내독소는 많아질 것이다. 동물이나 사람에게 내독소를 주사하면 내독소 쇼크, 조직 손상 및 심지어는 사망을 포함한 매우 다양한 병리생리학적 영향이 발생한다. 문헌[Ogikubo Y, Ogikubo Y, Norimatsu M, Noda K, Takahashi J, Inotsume M, Tsuchiya M, Tamura Y. 2004. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantifications of endotoxin contamination of porcine vaccines. Biologics 32:88-93].

[0509] 내독소를 저농도(1ng/㎖)로 정맥내 주사할 경우 포유동물에서 발열 반응 및 쇼크가 유발된다(Fiske JM, Ross A, VanDerMeid RK, McMichael JC, Arumugham. 2001. Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations. J Chrom B. 753:269-278). 약학적 및 생물학적 생산물의 정맥내 적용에서 내독소의 최대 수준은 모든 약전에서 시간 당 체중 kg 당 5 내독소 유닛(EU)으로 설정된다(Daneshiam M, Guenther A, Wendel A, Hartung T, Von Aulock S. 2006. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. J Immunol Method 313:169-175). EU는 내독소의 생물학적 활성의 측정값이다. 예를 들어, 100pg의 표준 내독소 EC-5 및 120pg의 대장균 O111:B4의 내독소는 1EU의 활성을 갖는다(Hirayama C, Sakata M. 2002. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. J Chrom B 781:419-432). 이러한 역치 수준을 달성하는 것은 생물학적 연구 및 약학적 산업에서 언제나 과제였다(Berthold W, Walter J. 1994. Protein Purification: Aspects of Processes for Pharmaceutical Products. Biologicals 22:135-150; Petsch D, Anspach FB. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotech 76:97-119).

[0510] 정맥내 주사를 통해 전달할 약물에 내독소가 존재하는 것은 특히 우려되는 사항이다. 약물(페니실린)의 유리체내 주사는 Rycroft에 의해 1945년에 처음으로 수행되었다. 문헌[Rycroft BW. 1945. Penicillin and the control of deep intra-ocular infection. British J Ophthalmol 29 (2): 57-87]. 유리체는 높은 수준의 약물이 도입되어 상대적으로 긴 시간 동안 유지될 수 있는 챔버이다. 유리체내 주사를 통해 달성할 수 있는 약물의 농도는 국소 투여 또는 전신성 투여(예를 들어, 정맥내)에 의해 생성될 수 있는 농도를 훨씬 초과한다.

[0511] 유리체내 주사에서 잠재적으로 발생할 수 있는 가장 위험한 합병증 중 하나는 내안구염이다. 내안구염은 다음의 2가지 부류로 나뉜다: 감염성 및 무균성. 감염성 내안구염은 일반적으로 세균, 진균 또는 기생생물에 의해 발생한다. 감염성 내안구염의 증상에는 심한 통증, 시력 상실, 결막 및 그 아래 상공막의 발적이 포함된다. 감염성 내안구염은 긴급한 진단 및 치료가 필요하다. 가능한 치료법에는 항생제의 유리체내 주사 및 일부의 경우 유리체 절제술이 포함된다. 시력이 없고 통증이 있는 눈을 제거하기 위한 핵 제거가 필요할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Christy NE, Sommer A. 1979. Antibiotic prophylaxis of postoperative endophthalmitis. Ann Ophthalmol 11 (8): 1261-1265] 참조.

[0512] 반면 무균성 내안구염은 감염성 물질과 관련되지 않으며 유리체내 항생제 및/또는 유리체망막 수술없이 해결되는 유리체강의 급성 안구내 염증으로 정의할 수 있다. 유리체 미생물 연구가 이루어진 경우, 무균성 내안구염의 진단을 유지하기 위해 음성적 배양 결과가 입증되어야 한다. 문헌[Marticorena J, Romano V, Gomez-Ulla F.

2012 "Sterile Endophthalmitis after Intravitreal Injections" Med Inflam. 928123].

[0513] 내독소로 오염된 생물학적 약물의 유리체내 주사가 무균성 내안구염을 일으킬 수 있다는 것이 관찰되었다. 문헌[Marticorena, et al]. 베바시주맙(아바스틴)은 식품의약국으로부터 교모세포종의 치료 및 전이성 결장암, 진행성 비평편 비-소-세포 폐암 및 전이성 신장암의 치료에 대해 승인되었다. 베바시주맙은 또한 습성 AMD의 치료제로서 오프라벨로 널리 사용된다. 베바시주맙은 100mg/4mℓ로 제조사로부터 제공된다. 이 용액은 유리체내 주사에 직접 사용할 수 없으며 약사가 조제해야 한다. 무균성 내안구염 집단이 관찰되었으며 조제 약사에 의해 실수로 베바시주맙이 내독소로 오염되어 발생한 것으로 이론화되었다.

[0514] 내독소 유리체내 주사의 심각한 임상 결과를 고려해 볼 때, 유리체내 투여를 통해 환자에게 제공될 수 있는 내독소의 총량은 매우 제한적이다. 일부 실시형태에서, 5.0EU/mℓ을 초과하지 않는 내독소 수준을 갖는 항체 또는 항체-접합체를 갖는 용액이 제공된다. 일부 실시형태에서, 내독소 수준은 1.0EU/mℓ을 초과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 내독소 수준은 0.5EU/mℓ을 초과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 내독소 수준은 0.2EU/mℓ을 초과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 내독소 수준은 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 또는 0.01EU/mℓ을 초과하지 않는다.

[0515] 내독소의 존재를 위해 일반적으로 사용되는 2가지의 FDA-승인된 검사법은 토끼 발열원 시험법과 LAL(Limulus Amoebodyte Lysate) 분석법이다(Hoffman S, et al. 2005. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells J. Immunol. Methods 298:161-173; Ding JL, Ho BA. 2001. New era in pyrogen testing. Biotech. 19:277-281). 토끼 발열원 시험법은 1920년에 개발되었으며 시험 용액을 주사한 토끼에서 열이 오르는 것을 모니터링하는 것을 포함한다. 그러나, 토끼 발열원 시험법의 사용은 비용과 긴 소요 시간으로 인해 여러 해에 걸쳐 크게 감소하였다. 훨씬 더 일반적인 것은 LAL 시험법이다. LAL은 투구게의 혈액으로부터 유래하며 내독소에 노출되면 응고된다.

[0516] 가장 단순한 LAL 분석법 중 하나가 LAL 겔-응고 분석법이다. 근본적으로, LAL 응고 분석법은 문제의 시료의 연속 희석과 결합된다. 겔의 형성은 시료 내 내독소의 양에 비례한다. 시료로부터 연속 희석액을 준비하고 각 희석액의 LAL 겔을 형성하는 능력에 대해 분석한다. 일부 지점에서 음성 반응이 포함된다. 본래 시료 내 내독소의 양은 희석액 분석 결과로부터 추정할 수 있다.

[0517] 탁도계 LAL 분석법(Ong KG, Lelan JM, Zeng KF, Barrett G, Aourob M, Grimes CA. 2006. A rapid highly-sensitive endotoxin detection system. Biosensors and Bioelectronics 21:2270-2274) 및 발색계 LAL 분석법(Haishima Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Matsuda R, Hayashi Y. 2003. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. J Pharm Biomed Analysis. 32:495-503)을 포함한 다른 LAL 시험법 또한 개발되었다. 탁도계 분석법 및 발색계 분석법은 단순 겔-응고 희석 분석법보다 훨씬 더 민감하고 정량적이다.

[0518] 일부 실시형태에서 본 명세서에 개시된 항체를 갖는 조성물에서 내독소의 양을 감소시키는 방법이 제공된다. 이 방법은 조성물을 항체에 결합하는 친화성 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계; 친화성 크로마토그래피 수지로부터 항체를 용출하여 길항제를 갖는 친화성 크로마토그래피 용리제를 형성하는 단계; 친화성 크로마토그래피 용리제를 항체와 결합하는 이온-교환 수지와 접촉시키는 단계; 및 이온-교환 수지로부터 항체를 용출시키는 단계를 가지며, 여기서 이온-교환 수지로부터 용출된 항체는 실질적으로 내독소가 없다.

[0519] 내독소의 양을 감소시키기 위한 상기 방법 또는 본 명세서에 언급된 다른 방법 또는 공정은 상기 단계에 기술된 순서로 수행하거나 선택적으로 이 단계의 순서를 변경하여 수행하거나 심지어는 단계 중 하나 이상을 반복하여 수행할 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물에서 내독소의 양을 감소시키는 방법은 기술된 단계의 순서로 수행된다. 일부 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 수지의 접촉, 세척 및 용출 단계는 친화성 크로마토그래피 용리제를 이온 교환 수지와 접촉시키는 단계 이전에 같은 순서로 1회를 초과하여 반복할 수 있다. 이 방법은 또한 각 수지 결합 단계 후 옮겨진 용리제 중 하나 이상에 대해 수행될 수 있는 예를 들어 0.1-마이크론, 0.20-마이크론 또는 0.45-마이크론 필터를 사용한 여과 단계를 포함할 수 있다.

[0520] 특정한 경우에서, 조성물을 친화성 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계, 세척 단계 및 친화성 크로마토그래피 수지로부터 항체를 용출시키는 단계는 제1 용리제를 이온-교환 수지와 접촉시키는 단계 이전에 1회를 초과하여 반복할 수 있다. 일 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 수지는 재조합 단백질 A("rProteinA") 수지를 포함한다. 적합한 재조합 단백질 A 수지 중 하나의 예시는 MabSelect Sure 및 Mabselect Sure LX(Cytiva)이다. 또 다른 실시형태에서, 적합한 친화성 크로마토그래피 수지는 단백질 G 크로마토그래피 수지를 포함할 것이다.

다른 실시형태에서, 적합한 친화성 크로마토그래피 수지는 혼합 단백질 A/단백질 G 수지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 친화성 크로마토그래피 수지는 단백질 L 수지를 포함한다. 다른 실시형태에서, 적합한 친화성 크로마토그래피 수지는 MEP HyperCel® 수지(BioSepra, 프랑스 세르지 생 크리스토프 소재)와 같은 4-머캅토에틸피리딘 리간드를 포함하는 소수성 전하 유도 수지를 포함한다.

[0521] 일부 실시형태에서, 이온 교환 수지는 음이온-교환 수지를 포함한다. 이 분야의 기술자가 이해할 수 있는 바와 같이, 이온 교환제는 매트릭스와 관련된 것뿐만 아니라 부착된 하전된 기와 관련된 다양한 물질을 기초로 할 수 있다. 예를 들어, 언급된 물질들이 다소 가교될 수 있는 다음의 매트릭스가 사용될 수 있다: POROS XS(ThermoFisher), POROS XQ(ThermoFisher), MacroCap Q(Cytiva, 뉴저지주 피스캐터웨이 소재), 아가로스 기반(예를 들어, Sepharose CL-6B®, Sepharose Fast Flow® 및 Sepharose High Performance®), 셀룰로스 기반(예를 들어, DEAE Sephacel®), 덱스트란 기반(예를 들어, Sephadex®), 실리카 기반 및 합성 중합체 기반. 음이온 교환 수지의 경우, 매트릭스에 공유 결합되는 하전된 기는 예를 들어 다이에틸아미노에틸, 4차 아미노에틸 및/또는 4차 암모늄일 수 있다. 일부 실시형태에서 음이온-교환 수지는 4차 아민기를 포함한다. 항-M-CSF 항체에 결합하기 위한 4차 아민기를 갖는 모범적인 음이온-교환 수지는 Q Sepharose® 수지(Amersham, 뉴저지주 피스캐터웨이 소재)이다.

[0522] 다른 양상에서, 조성물을 앞서 언급한 음이온-교환 크로마토그래피 단계에 적용한 이후 내독소 수준이 원하는 것보다 높은 경우, 조성물을 대안적으로 양이온 교환 수지에 적용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 내독소로부터 단백질의 정제가 가능하기 위해 조성물의 임의의 내독소는 문제의 단백질보다 이온-교환 수지에 대해 차등 결합을 가져야 한다. 이와 관련하여, 내독소는 음전하를 띠며 일반적으로 음이온 교환 수지에 결합할 것이다. 단백질과 내독소 모두 음이온 교환 수지에 결합하는 경우, 염 구배를 사용하여 이 둘을 서로 다른 분획으로 용출함으로써 정제할 수 있다. 또한 단백질의 pI에 관련된 완충제의 pH를 변화시켜 특정 수지에 대한 단백질의 상대적인 결합을 변경할 수 있다. 일부 실시형태에서, 양이온-교환 크로마토그래피가 사용되는 유일한 이온-교환 크로마토그래피이다.

[0523] 일부 실시형태에서, 음이온 교환 수지 후 내독소 수준이 너무 높을 경우, 예를 들어 조성물을 양이온 교환 수지와 접촉시키는 단계 및 그 다음 세척하는 단계를 통해 조성물에 2차 이온-교환 단계를 추가로 적용하고, 이후 이온-교환 수지로부터 용출시키는 단계를 적용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 양이온 교환 수지는 결합을 위한 설폰기를 포함한다. 예시적인 양이온 교환 수지는 SP Sepharose® 수지 FF(Amersham, 뉴저지주 피스캐터웨이 소재) POROS XS(CEX)(ThermoFisher)이다. 일부 실시형태에서, 내독소 제거는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 달성된다. 일부 실시형태에서, 내독소 및 mAb 모두 같거나 유사한 전하를 갖는 경우 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용한다. 일부 실시형태에서, Sartobind Phenyl(Sartorius, 독일 괴팅겐 소재)을 사용하는 것과 같은 예시적인 시스템을 통해 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행할 수 있다.

[0524] 일부 실시형태에서, 지정된 수준의 내독소를 갖는 항체 단백질 용액을 생산한 후, 단백질의 최종 제형화 전에 여러 단계가 존재한다. 일부 실시형태에서, 단백질에 반감기 연장 모이어티가 접합된다. 이후 접합체는 환자에게 주사되는 최종 약물 제형으로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 접합체는 이온-교환 수지 상에서 다시 정제되며, 이는 양이온-교환 수지일 수 있다. 다른 실시형태에서, 단백질은 제형화된다. 모든 경우에서, 단백질 시료 또는 단백질-중합체 접합체에 내독소 오염물질이 도입되는 것을 방지하기 위해 정상적인 실험실 절차를 사용해야 한다.

[0525] 일부 실시형태에서, 다음의 배열 중 임의의 것이 본 명세서에서 고려된다:

[0526] 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법으로서, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계로서, 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합하는, 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법.

[0527] 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법으로서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키고 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 것을 통한, 방법.

[0528] 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계를 포함하는, 방법.

[0529] 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함하는, 방법.

[0530] 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계, Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 포함하며, 여기서 제2 완충제 카오트로픽 제제는 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아닌, 방법.

[0531] 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

[0532] 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

[0533] 생산물 생산 방법으로서, 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계, 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 접합 단백질을 용출시키는 단계 및 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

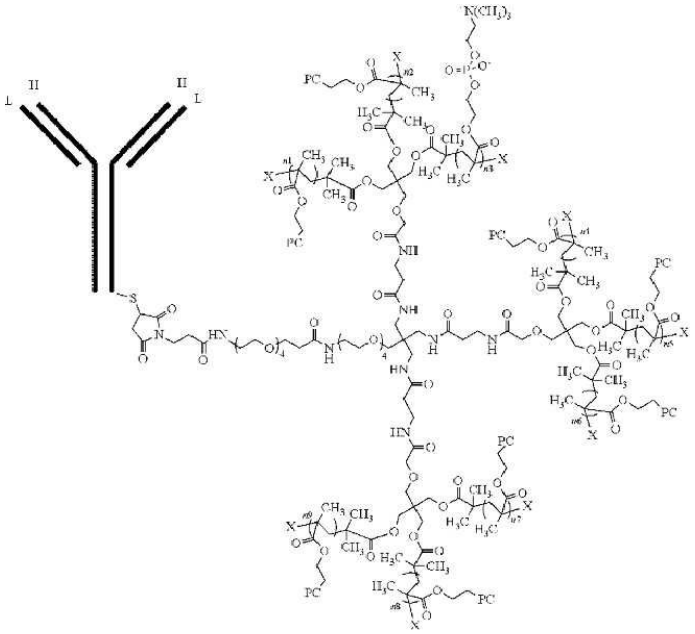
[0534] 생산물 생산 방법으로서, 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함하는, 방법. 이 방법은 여기서 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계가 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 용출물이 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물에 완충 용액이 첨가된다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물에 방부제 용액이 첨가된다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 약학적 조성물이 유리체내 주사를 위해 추가로 정제된다는 것을 더 포함할 수 있다.

[0535] 생산물 생산 방법으로서, 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

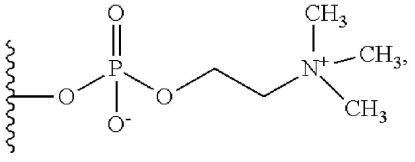
[0536] 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 포함하는, 방법.

[0537] 생산물 생산 방법으로서, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함하는, 방법. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 50mM Na-인산염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 250mM NaCl을 더 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 Tris 및 염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계가 다음을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다: 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 또는 투석여과(DF) 중 하나 이상. 이 방법은 여기서 용리제가 관심 단백질을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 관심 단백질이 항체라는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 항체가 추가로 중합체에 접합되어 항체 접합체를 형성한다는 것을 더 포함할

수 있다. 이 방법은 여기서 항체 접합체가 이중특이적 항체를 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 이중특이적 항체가 항-VEGF 및 항-IL-6 결합 모이어티를 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 항체 접합체가 다음의 구조를 갖는다는 것을 더 포함할 수 있다:



[0538] , 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된,



C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는 이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서, 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0539] 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계, 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계, Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 단계, 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물을 수집하며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계, 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계, 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계를 포함하는, 방법. 이 방법은 여기서 세포 배양 상등액이 무-동물성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 세포 배양 상등액을 가공하는 단계가 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 단계를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 세포 배양물이 세포 및 세포 잔해 제거로 정화되는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 여기서 용리제가 정화된 세포 배양 상등액을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법으로서, 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 관심 단백질을 용출시키는 데 적합한 조건 하에서 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0540] 생산물 생산 방법으로서, 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 카오트로픽 제제를 제거하는 단계, 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물을 수집하며, 여기서 용출물

은 단백질 생산물을 포함하는, 단계를 포함하는, 방법.

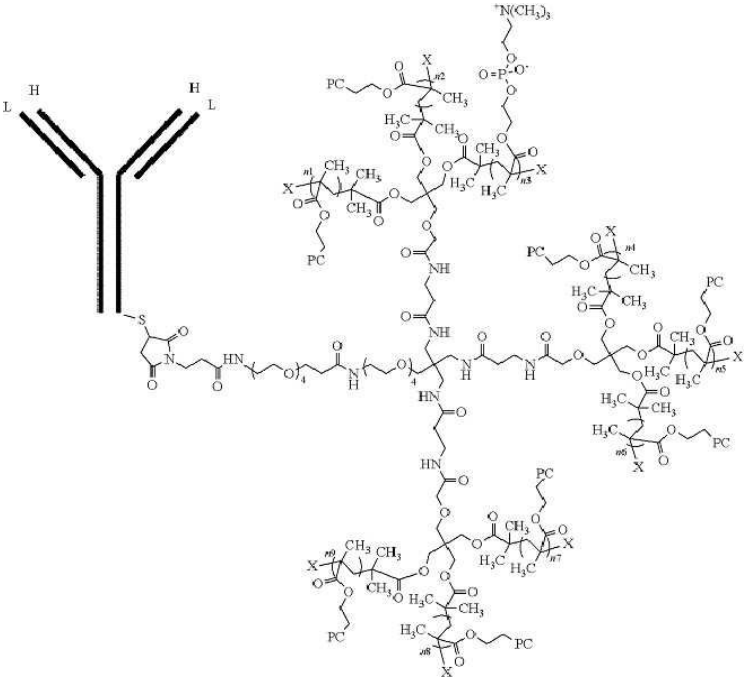
[0541] 단백질 정제 시스템으로서, 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제, Tris를 포함하는 중간 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템.

[0542] 단백질 정제 시스템으로서, 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼; Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제, 중간 Tris 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템. 이 시스템은 여기서 칼럼이 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 리간드가 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제가 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제가 약 50mM 인산나트륨을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제가 약 250mM NaCl을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제가 약 50mM Tris를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제가 약 250mM NaCl을 더 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 중간 Tris 세척 완충제가 약 50mM Tris를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제1 Tris 세척 완충제의 pH가 약 7.2인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제2 세척 완충제의 pH가 약 7.8인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도가 약 2.8M인 것을 더 포함할 수 있다. 이 시스템은 여기서 용출 완충제의 포름산나트륨 농도가 10mM을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

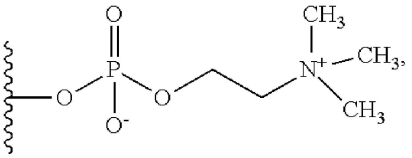
[0543] 항체 정제 시스템으로서, 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 여기서 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 칼럼; 및 카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하는, 시스템.

[0544] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 단백질이 이중특이적 항체인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 이중특이적 항체가 VEGF 및 IL-6에 특이적인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 이중특이적 항체가 VEGF 및 IL-6에 특이적인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 단백질이 항체 접합체인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스가 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 마그네슘염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 마그네슘염의 농도가 1.5 내지 3.5M인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 칼슘염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 칼슘염의 농도가 1 내지 3M인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 카오트로픽 제제가 구아니디늄염으로 이루어지는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 구아니디늄염의 농도가 0.05 내지 3M인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액이 Tris를 더 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 Tris의 농도가 적어도 5mM인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액의 pH가 5.5 초과인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 용출물이 바이러스성 불순물을 더 함유하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 전 완충 용액이 인산나트륨을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 전 완충 용액이 Tris 및 염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0545] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항체 접합체가 다음의 구조를 갖는다는 것을 더 포함할 수 있다:



[0546] , 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고; PC는



[0547] 이고, 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0548] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항체 접합체가 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄가 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄가 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 항-VEGF 항체 접합체가 다음을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다: MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 여기서 항체는 C449에서 중합체에 결합된다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 관심 표적 단백질이 세포 배양에 의해 생산되는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세포 배양이 CHO 세포를 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 핵산, 내독소, 소포제 또는 관심 표적 단백질 이외의 기타 소분자를 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계가 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 용리제가 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되었음을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에

기술된 방법은 여기서 생산물이 관심 단백질인 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 불순물이 숙주 세포 단백질 불순물을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0549] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 인산염-기반 종을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 Na-인산염을 포함한다는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 약 0.1mM, 약 1mM, 약 5mM, 약 10mM, 약 15mM, 약 20mM, 약 25mM, 약 30mM, 약 35mM, 약 40mM, 약 45mM, 약 50mM, 약 55mM, 약 60mM, 약 65mM, 약 70mM, 약 75mM, 약 80mM, 약 85mM, 약 90mM, 약 95mM, 약 100mM, 약 150mM, 약 200mM, 약 250mM 또는 0.1 및 250mM 사이에 있는 임의의 정수를 포함하는 약 0.1 내지 약 250mM 인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제1 세척 완충제가 10mM Na-인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0550] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제2 세척 완충제가 염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제2 세척 완충제가 인산염-기반 종을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제2 세척 완충제가 Na-인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제2 세척 완충제가 약 0.1mM, 약 1mM, 약 5mM, 약 10mM, 약 15mM, 약 20mM, 약 25mM, 약 30mM, 약 35mM, 약 40mM, 약 45mM, 약 50mM, 약 55mM, 약 60mM, 약 65mM, 약 70mM, 약 75mM, 약 80mM, 약 85mM, 약 90mM, 약 95mM, 약 100mM, 약 150mM, 약 200mM, 약 250mM 또는 0.1 및 250mM 사이에 있는 임의의 정수를 포함하는 약 0.1 내지 약 2500mM 인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 제2 세척 완충제가 10mM Na-인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0551] 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 완충제가 염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 완충제가 인산염-기반 종을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 완충제가 Na-인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 완충제가 약 0.1mM, 약 1mM, 약 5mM, 약 10mM, 약 15mM, 약 20mM, 약 25mM, 약 30mM, 약 35mM, 약 40mM, 약 45mM, 약 50mM, 약 55mM, 약 60mM, 약 65mM, 약 70mM, 약 75mM, 약 80mM, 약 85mM, 약 90mM, 약 95mM, 약 100mM, 약 150mM, 약 200mM, 약 250mM 또는 0.1 및 250mM 사이에 있는 임의의 정수를 포함하는 약 0.1 내지 약 250mM 인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법은 여기서 세척 완충제가 10mM Na-인산염을 포함하는 것을 더 포함할 수 있다.

[0552] 일부 실시형태에서, 완충 시스템은 Tris 이외의 시스템을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 완충 시스템은 Na-인산염 이외의 시스템을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 완충제는 다음 중 하나 이상일 수 있다: 아세트산염, 구연산염, ACES, BES, 비신, HEPES, MES, MOPS, MOPSO, TAPS, 트리신, Bis-Tris, Bis-Tris 프로판, 카코딜산염, CAPS, CAPSO, CHES, 글리신, 글리실글리신, 이미다졸, PIPES, TEA 또는 TES. 일부 실시형태에서, 완충 시스템은 제공된 것 이외의 pH 값을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 완충 시스템은 2 내지 13의 pH 값을 사용할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사용되는 용출 완충제는 Na-포름산염이 아니다. 일부 실시형태에서, 용출 완충제는 염기성이다. 일부 실시형태에서, 용출 완충제는 산성이다.

[0553] 배열

[0554] 일부 실시형태에서, 다음 배열 중 임의의 것이 본 명세서에 고려된다:

[0555] 1. 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법으로서, 다음을 포함하는 방법: 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계로서, 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합하는, 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계.

[0556] 2. 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법으로서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩 유체를 통과시킨 다음 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 통과시키고 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집하는 것을 통한, 방법.

[0557] 3. 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0558] 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 리튬 및 리튬염, 마그네슘 및 마그네슘염, 칼슘 및 칼슘염 및 구아니디늄 및 구아니디늄염 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척하는 단계.

[0559] 4. 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0560] 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0561] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및

[0562] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계.

[0563] 5. 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0564] 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0565] Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계 및

[0566] Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계,

[0567] 여기서 제2 완충제 카오트로픽 제제는 상기 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아니다.

[0568] 6. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0569] 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계,

[0570] 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0571] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계, 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계.

[0572] 7. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0573] 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집하는 단계,

[0574] 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0575] 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급하는 단계,

[0576] 결합된 관심 단백질을 용출시키는 단계; 및

[0577] 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계.

[0578] 8. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0579] 접합 중합체에 결합된 항체를 포함하는 접합 단백질을 수집하는 단계

[0580] 접합 단백질을 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계

[0581] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계,

[0582] 접합 단백질을 용출시키는 단계 및

[0583] 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집하는 단계.

[0584] 9. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0585] 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계, 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계.

[0586] 10. 배열 9에 있어서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 다음을 포함하는, 방법:

[0587] 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상.

[0588] 11. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0589] 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척하는 단계 및

[0590] 카오트로픽 염을 제거하는 단계 및 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계.

[0591] 12. 배열 11에 있어서, 용출물은 추가로 허용 가능한 약학적 부형제와 결합되어 약학적 조성물을 형성하는, 방

법.

[0592] 13. 배열 12에 있어서, 약학적 조성물에 완충 용액이 첨가되는, 방법.

[0593] 14. 배열 12에 있어서, 약학적 조성물에 방부제 용액이 첨가되는, 방법.

[0594] 15. 배열 12에 있어서, 약학적 조성물은 유리체내 주사를 위해 추가로 정제되는, 방법.

[0595] 16. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0596] 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집하는 단계, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0597] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계,

[0598] 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집하는 단계 및

[0599] 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계.

[0600] 17. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0601] 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0602] 제1 세척 완충제로 세척하는 단계,

[0603] 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계,

[0604] 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척하는 단계 및

[0605] 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계.

[0606] 18. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 50mM Na-인산염을 포함하는, 방법.

[0607] 19. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 250mM NaCl을 더 포함하는, 방법.

[0608] 20. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 Tris 및 염을 포함하는, 방법.

[0609] 21. 배열 17에 있어서, 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계를 더 포함하는, 방법.

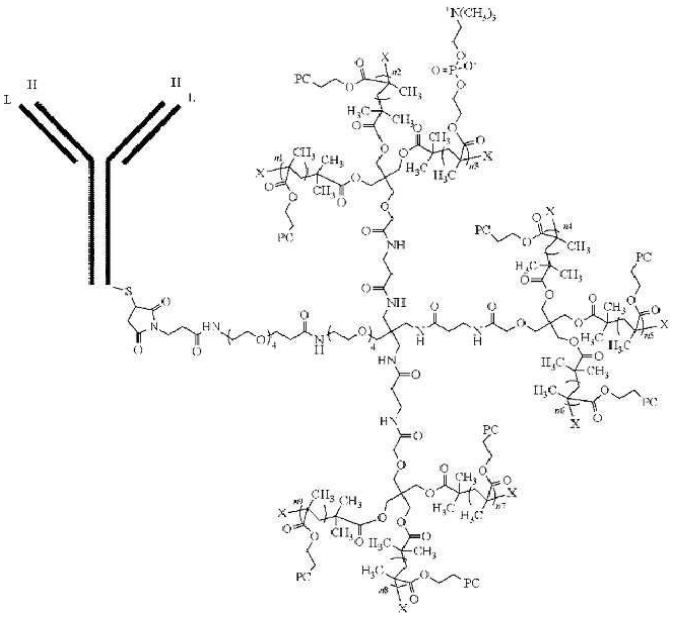
[0610] 22. 배열 21에 있어서, 바이러스성 오염물질을 제거하는 단계는 다음을 포함하는, 방법: 저 pH 불활성화, 세제 불활성화, 연마 크로마토그래피 단계, 바이러스 여과(VF), 한외여과(UF) 및/또는 투석여과(DF) 중 하나 이상.

[0611] 23. 배열 17에 있어서, 용리제는 관심 단백질을 포함하는, 방법.

[0612] 24. 배열 23에 있어서, 관심 단백질은 항체인, 방법.

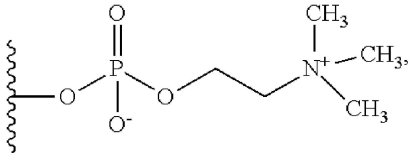
[0613] 25. 배열 24에 있어서, 항체는 추가로 중합체에 접합되어 항체 접합체를 형성하는, 방법.

[0614] 26. 배열 24에 있어서, 항체 접합체는 다음의 구조를 갖는, 방법:



[0615]

[0616] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고; 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고;



[0617] PC는 이고,

[0618] 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0619] 27. 배열 25에 있어서, 항체 접합체는 이중특이적 항체를 포함하는, 방법.

[0620] 28. 배열 24에 있어서, 이중특이적 항체는 항-VEGF 및 항 IL-6 결합 모이어티를 포함하는, 방법.

[0621] 29. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0622] 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수하는 단계,

[0623] 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공하는 단계,

[0624] 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계,

[0625] Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척하는 단계,

[0626] 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척하는 단계,

[0627] 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물을 수집하며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계,

[0628] 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득하는 단계,

[0629] 바이러스 불활성화 용출물을 여과하는 단계,

[0630] 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계 및

[0631] 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득하는 단계.

[0632] 30. 배열 29에 있어서, 세포 배양 상등액은 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산되는, 방법.

[0633] 31. 배열 29에 있어서, 세포 배양 상등액을 가공하는 단계는 세포 배양물로부터 세포 생산물을 수확하는 단계를 포함하는, 방법.

[0634] 32. 배열 31에 있어서, 세포 배양물은 세포 및 세포 잔해 제거로 정화되는, 방법.

[0635] 33. 배열 29에 있어서, 용리제는 정화된 세포 배양 상등액을 포함하는, 방법.

[0636] 34. 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0637] 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시키는 단계, 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척하는 단계 및 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조건 하에서 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시키는 단계.

[0638] 35. 생산물 생산 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0639] 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용하는 단계,

[0640] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척하는 단계,

[0641] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 단계,

[0642] 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 카오트로픽 제제를 제거하는 단계,

[0643] 용출 완충제로 용출시키는 단계로서, 여기서 용출물을 수집하며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함하는, 단계.

[0644] 36. 단백질 정제 시스템으로서, 다음을 포함하는 시스템:

[0645] 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼;

[0646] 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제,

[0647] Tris를 포함하는 중간 세척 완충제,

[0648] 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및

[0649] 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제.

[0650] 37. 단백질 정제 시스템으로서, 다음을 포함하는 시스템:

[0651] 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼;

[0652] Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제,

[0653] 중간 Tris 세척 완충제,

[0654] 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및

[0655] 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제.

[0656] 38. 배열 36에 있어서, 칼럼은 친화성 크로마토그래피를 위한 리간드를 포함하는, 시스템.

[0657] 39. 배열 36에 있어서, 리간드는 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하는, 시스템.

[0658] 40. 배열 36에 있어서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 제1 세척 완충제는 5.5 내지 9.5의 pH를 갖는, 시스템.

[0659] 41. 배열 36에 있어서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 50mM 인산나트륨을 포함하는, 시스템.

[0660] 42. 배열 36에 있어서, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산염 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 포함하는, 시스템.

[0661] 43. 배열 36에 있어서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함하는, 시스템.

[0662] 44. 배열 43에 있어서, 제1 Tris 세척 완충제는 약 250mM NaCl을 더 포함하는, 시스템.

[0663] 45. 배열 36에 있어서, 중간 Tris 세척 완충제는 약 50mM Tris를 포함하는, 시스템.

[0664] 46. 배열 36에 있어서, 제1 Tris 세척 완충제의 pH는 약 7.2인, 시스템.

[0665] 47. 배열 36에 있어서, 제2 세척 완충제의 pH는 약 7.8인, 시스템.

[0666] 48. 배열 36에 있어서, 제2 세척 완충제의 염화마그네슘 농도는 약 2.8M인, 시스템.

[0667] 49. 배열 36에 있어서, 용출 완충제의 포름산나트륨 농도는 10mM을 포함하는, 시스템.

[0668] 50. 항체 정제 시스템으로서, 다음을 포함하는 시스템:

[0669] 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼으로서, 여기서 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하는, 칼럼; 및

[0670] 카오트로픽 염을 포함하는 카오트로픽 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제.

[0671] 51. 배열 1에 있어서, 관심 단백질은 이중특이적 항체인, 방법.

[0672] 52. 배열 51에 있어서, 이중특이적 항체는 VEGF 및 IL-6에 특이적인, 방법.

[0673] 53. 배열 51에 있어서, 이중특이적 항체는 OG2072인, 방법.

[0674] 54. 배열 1에 있어서, 관심 단백질은 항체 접합체인, 방법.

[0675] 55. 배열 1에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 매트릭스인, 방법.

[0676] 56. 배열 1에 있어서, 완충 용액의 카오트로픽 제제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 염으로 이루어지는, 방법: 마그네슘염, 칼슘염 및 구아니디늄염.

[0677] 57. 배열 56에 있어서, 염의 농도는 각각 0.05 내지 3.5M인, 방법.

[0678] 58. 배열 1에 있어서, 완충 용액은 Tris를 더 포함하는, 방법.

[0679] 59. 배열 58에 있어서, 완충 용액의 Tris의 농도는 적어도 5mM인, 방법.

[0680] 60. 배열 1에 있어서, 완충 용액의 pH는 5.5 초과인, 방법.

[0681] 61. 배열 3에 있어서, 용출물은 바이러스성 불순물을 더 함유하는, 방법.

[0682] 62. 배열 61에 있어서, 바이러스성 불순물을 제거하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0683] 63. 배열 62에 있어서, 바이러스성 불순물을 불활성화하는 단계를 더 포함하는, 방법.

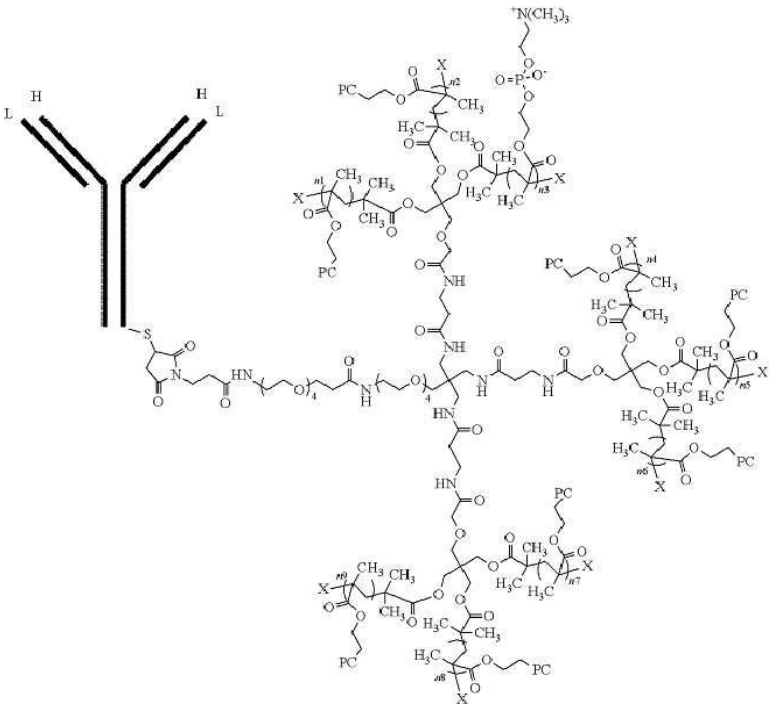
[0684] 64. 배열 3에 있어서, 완충 용액으로 세척하는 단계 이전에 로딩 유체로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 전 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0685] 65. 64에 있어서, 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0686] 66. 64에 있어서, 세척 전 완충 용액은 인산나트륨을 포함하는, 방법.

[0687] 67. 배열 64에 있어서, 세척 전 완충 용액은 Tris 및 염을 포함하는, 방법.

[0688] 68. 배열 25에 있어서, 항체 접합체는 다음의 구조를 갖는, 방법:

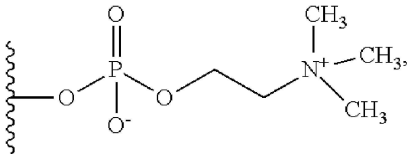


[0689]

[0690] 여기서 항-VEGF-A 항체의 각각의 중쇄는 문자 H로 표시되며, 항-VEGF-A 항체의 각각의 경쇄는 문자 L로 표시되고;

[0691] 중합체는, 결합이 중쇄 중 하나에 묘사된, C443(EU 넘버링)의 설프하이드릴을 통해 항-VEGF-A 항체에 결합되고;

[0692] PC는



[0693] 이고,

[0694] 여기서 굴곡선은 나머지 중합체에 대한 부착 지점을 나타내고, 여기서 X는 a) -OR로서 여기서 R은 -H, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, b) -H, c) -Br, -Cl 또는 -I를 포함하는 임의의 할로겐, d) -SCN 또는 e) -NCS이고; i) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 같거나 다르며 0 내지 3000의 정수이거나; ii) 여기서 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9는 n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7, n8 및 n9의 합이 2500±15%가 되도록 같거나 다르다.

[0695] 69. 배열 68에 있어서, 항체 접합체는 항-VEGF-A 경쇄 및 항-VEGF-A 중쇄를 포함하는 항-VEGF 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄는 서열번호 172의 CDRH1인 CDRH1, 서열번호 173의 CDRH2인 CDRH2 및 서열번호 174의 CDRH3인 CDRH3을 포함하고, 항-VEGF-A 항체 경쇄는 서열번호 199의 CDRL1인 CDRL1, 서열번호 200의 CDRL2인 CDRL2 및 서열번호 201의 CDRL3인 CDRL3을 포함하는, 방법.

[0696] 70. 배열 69에 있어서, 항-VEGF 항체 접합체는 MPC 단량체를 포함하는 중합체에 결합된 항-VEGF-A 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 항체 접합체를 포함하며, 여기서 항-VEGF-A 항체 중쇄의 서열은 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나이고, 항-VEGF-A 항체 경쇄의 서열은 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나이고, 여기서 항체는 C449에서 중합체에 결합되는, 방법.

[0697] 71. 배열 1에 있어서, 관심 표적 단백질은 세포 배양에 의해 생산되는, 방법.

[0698] 72. 배열 71에 있어서, 세포 배양은 CHO 세포를 포함하는, 방법.

[0699] 73. 배열 3에 있어서, 완충 용액으로 세척하는 단계 이후에 용리제로 로딩된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척 후 완충 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[0700] 74. 배열 3에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이

외의 핵산, 내독소, 소포제 또는 기타 소분자를 제거하는, 방법.

[0701] 75. 배열 3에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질이 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 상태를 유지하면서 불순물을 제거하는, 방법.

[0702] 76. 배열 3에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 완충 용액으로 세척하는 단계는 관심 표적 단백질 이외의 숙주 세포 단백질을 제거하는, 방법.

[0703] 77. 배열 4에 있어서, 완충 용액에 카오트로픽 제제를 첨가해도 관심 표적 단백질이 용출되지 않는, 방법.

[0704] 78. 배열 3에 있어서, 바이러스 불활성화, 접선 유동 여과, 투석여과, 한외여과, 이온 교환 크로마토그래피 또는 바이러스 감소 여과 중 하나 이상을 더 포함하는, 방법.

[0705] 79. 배열 3에 있어서, 용리제는 무-동물 성분 세포 배양을 사용한 생물반응기에서 생산된, 방법.

[0706] 80. 배열 3에 있어서, 생산물은 관심 단백질인, 방법.

[0707] 81. 배열 3에 있어서, 불순물은 숙주 세포 단백질 불순물을 포함하는, 방법.

[0708] 82. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 10mM Na-인산염을 포함하는, 방법.

[0709] 83. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 인산염-기반 종을 포함하는, 방법.

[0710] 84. 배열 17에 있어서, 제1 세척 완충제는 50mM NaCl을 더 포함하는, 방법.

[0711] 85. 생산물 처리 방법으로서, 다음을 포함하는 방법:

[0712] 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계; 및

[0713] 카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하는 단계,

[0714] 여기서 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 여기서 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 여기서 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함한다.

[0715] 86. 배열 85에 있어서, 제1 농도의 카오트로픽 염의 농도는 0M이며, 여기서 제2 농도의 카오트로픽 염의 농도는 4.0M인, 방법.

[0716] 87. 배열 85에 있어서, 카오트로픽 염은 마그네슘 기반인, 방법.

[0717] 88. 배열 86에 있어서, 카오트로픽 염은 MgCl2인, 방법.

[0718] 89. 배열 1에 있어서, 완충 용액은 다음 중 하나 이상을 더 포함하는, 방법: 아세트산염, 구연산염, ACES, BES, 비신, HEPES, MES, MOPS, MOPSO, TAPS, 트리신, Bis-Tris, Bis-Tris 프로판, 카코딜산염, CAPS, CAPSO, CHES, 글리신, 글리실글리신, 이미다졸, PIPES, TEA 또는 TES.

[0719] 90. 배열 1에 있어서, 관심 분자는 단백질인, 방법.

[0720] 91. 배열 90에 있어서, 단백질은 항체 또는 항체-유사 작제물, 예를 들어 Fc-융합 단백질인, 방법.

[0721] **실시예**

[0722] 실시예 1: OG2072의 전반적인 정제를 위한 프로토콜

[0723] 무 동물 성분 세포 배양 공정으로부터의 OG2072 항체 정제 공정(100)이 기술된다(도 1). 이 공정은 3가지 크로마토그래피 단계 및 2가지 TFF(접선 흐름 여과) 단계를 포함하며, 뿐만 아니라 저 pH 바이러스 불활성화를 포함한다. 먼저, CHO 세포로부터 정화된 세포 상등액을 수집하였다(110). 그 다음, 정화된 세포 상등액에 대한 친화성 크로마토그래피(120)을 수행하였다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 과정에서 수집된 결과 용출물에 대해 저 pH 바이러스 불활성화(130)와 이후의 중간 여과(140)를 실행하였다. 그 다음 음이온 교환 크로마토그래피(150) 이후 양이온 교환 크로마토그래피(160)를 포함하는 추가 라운드의 크로마토그래피를 수행하였다. 그 다음 바이러스 감소 여과(170) 및 최종 한외여과/투석여과(180)를 수행하였다.

[0724] 저 pH 바이러스 불활성화에는 용액을 240분 동안 pH 3.5에서 유지시킨 다음 pH 7로 중화하는 단계를 포함시켰다. MabSelect SuRe LX 친화성 크로마토그래피(MSS LX) 후 바이러스 불활성화/중화 단계를 수행하고 그 다음 제1 TFF(TFF1)를 수행하여 항체를 Sartobind Q 음이온 교환 크로마토그래피(AEX 크로마토그래피)에 맞게 조절하였다. 그 다음 POROS XS 양이온 교환 크로마토그래피(CEX 크로마토그래피) 및 바이러스 감소 여과

(Planova 20N)를 실행하였다. POROSXS는 10mM 인산나트륨, pH 5, 40mM NaCl 및 보충으로서 아세트산염에서 결합시키는 단계(15mS/cm 미만), 그 다음 50mM Na-아세트산염, pH 6, 10mM NaCl에서 50mM Na-아세트산염, pH 6, 300mM NaCl로 10CV로 구배 용출시키는 단계를 포함한다. POROS XS 크로마토그래피 중 2CV의 50mM Na-아세트산염, pH 5.0, 10mM NaCl, 그 다음 5CV의 18.8mM 인산나트륨, pH 7.0, 22.5mM NaCl, 그 다음 3CV의 50mM Na-아세트산염, pH 5.0, 10mM NaCl, 그 다음 2CV의 50mM 아세트산나트륨, pH 6.0, 10mM NaCl을 포함하는 추가 세척을 수행하였다. 마지막으로, 제2 TFF(TFF2)를 실행하여 항체를 제형화하고 항체 중간체를 수득하였다. 그러나, HCP 수준은 안과적 적용에 대해서는 27ng/mg으로 너무 높은 것으로 나타났다.

[0725] 도 2는 마찬가지로 생물분자의 정제 공정(200)을 도시한다. 먼저 발효 공정(210)을 사용하여 세포를 성장 및 배양하였다. 그 다음 수확 단계(220)에서 세포 배양물을 수집하여 정화된 세포 농축물을 얻었다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 및 바이러스 불활성화/중화(230)를 사용하여 정화된 세포 농축물을 정제하였고, 이 공정의 결과물로 생산물 잔류물을 얻었다. 그 다음 수집한 생산물 잔류물에 대해 접선 흐름 여과(240)를 실행하였으며, 음이온 교환 크로마토그래피(250) 단계 및 양이온 교환 크로마토그래피(260) 단계를 순차적으로 실행하였다. 그 다음 처리된 생산물 잔류물에 바이러스 감소 여과(270)를 적용하였으며, 여기서 그 다음 제2 접선 흐름 여과(280)를 실행하여 정제된 생산물을 수득하였다.

[0726] 실시예 2: 칼럼 크로마토그래피 중 OG2072의 정제 프로토콜; 일반적인 Na-인산염 프로토콜

[0727] 원하는 분자 종의 수율 및 순도를 평가하기 위해 측정 가능한 HCP 종의 배수-감소 평가 프로토콜을 개발하였다. 무 동물 성분 세포 배양 공정으로부터의 OG2072 항체 칼럼 정제 공정(300)이 기술된다(도 3)(표 6A). 이 공정은 평형화(310), 이후 칼럼에 정화된 세포 배양 유체(CCCF)를 로딩하는 단계(320)를 포함한다. 그 다음 칼럼을 세척 1(330), 그 다음 세척 2(340), 세척 3(350) 및 세척 4(360)를 포함하는 일련의 세척으로 처리하였다. 세척 2(340)는 하위 세척 340A, 340B 및 340C를 포함할 수 있다. 세척 4(360) 다음, 용출(370)을 수행하고, 칼럼 상에서 용출-후 단계(380)를 실행한다. 이 공정은 pH 7에서 50mM Na-인산염 및 250mM NaCl로 단백질 A 칼럼을 평형화하는 단계(310), 그 다음 칼럼을 정화된 세포 배양 유체(CCCF)로 로딩하는 단계(320), 그 다음 pH 7에서 50mM Na/인산염 및 250mM NaCl로 세척하는 제1 세척 단계(330)를 포함하는 일련의 세척 단계(330 내지 360)를 포함한다. 세척 2(340)는 표 6C에 기술된 바와 같은 다양한 세척 완충제 및 조건을 포함할 수 있다. 세척 3(350)은 pH 7에서 50mM Na-인산염 및 2M NaCl로 세척하는 것을 포함하며, 세척 4(360)은 pH 7에서 50mM Na-인산염, 250mM NaCl을 포함한다. pH 3.5에서 10mM Na-포름산으로 용출(370)을 달성하였으며, 용출-후 단계를 pH 2.1에서 100mM 구연산에서 칼럼을 통해 실행하였다. 다양한 용액의 흐름 속도 및 칼럼 부피(CV)가 표 6A의 우측에 개시되어 있다. 완충제 조성은 표 6A에 개시되어 있다.

표 6

표 6A: 일반적인 크로마토그래피 정제.

단계	완충제	CV	흐름 속도(cm/h)
평형화	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	5	400
로딩			200
세척 1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	2	200
세척 2 – 첨가제 농도 1	다양함. 표 6C 에 기술되어 있음.	3	400
세척 2 – 첨가제 농도 2		3	400
세척 2 – 첨가제 농도 3		3	400
세척 3	50 mM Na-인산염, 2 M NaCl, pH 7	3	400
세척 4	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	3	400
용출	10 mM Na-포름산염 pH 3.5	4	400
용출 후	100 mM 구연산, pH 2.1	2	400
CIP	0.1 NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	400

[0728]

[0729] 실시예 2.5: 칼럼 크로마토그래피 중 OG2072의 정제

[0730] 표 6A에 기술된 바와 같이 칼럼 크로마토그래피 단계를 수행하였다. 칼럼을 pH 7에서 50mM Na-인산염 및 250mM

NaCl을 포함하는 완충제로 평형화하였다. 평형화 중 칼럼 부피(CV)는 5였으며, 400cm/시간의 흐름 속도로 공급하였다. 그 다음 200cm/시간의 속도로 칼럼을 로딩하였다. 도 6A에 기술된 바와 같이 일련의 세척을 수행하였다. 그 다음 pH 3.5에서 10mM Na-포름산염을 사용하여 칼럼을 용출하였다. 용출 단계는 4의 CV 및 400 cm/시간의 흐름 속도를 적용하였다.

[0731] 실시예 3: 세포 추출물로부터 숙주-세포 단백질 수준을 감소시키기 위한 프로토콜

[0732] 친화성 크로마토그래피를 사용한 항체 정제 공정이 기술된다(표 6B). 칼럼 정제 전, 무 동물 성분 세포 배양 공정 및 발효를 사용한 10ℓ 생물반응기에서 OG2072를 생산하였다. 생물반응기로부터 수집된 정화된 세포 배양 유체(CCCF: 상등액 SG01174/A1)는 단백질 A-HPLC를 통해 4.118mg/mℓ인 것으로 결정되었다. 이 물질을 280mℓ 분량으로 분주하고 단백질 A 칼럼 상에서 18g/ℓ의 수지 충전으로 5회 실행하였다. 단백질 용액은 pH 7.4였고 전도도는 13.9mS/cm였다.

표 6B: 카오트로픽 크로마토그래피 정제(염화마그네슘)

단계	완충제	CV	흐름 속도(cm/h)
평형화	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	5	300
로딩			200
세척 1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	2	200
세척 2 – 첨가제 농도 1	50 mM Tris, pH 8.8	4	300
세척 2 – 첨가제 농도 2	100 mM Tris, 2.8 M $MgCl_2$	4	100
세척 2 – 첨가제 농도 3	50 mM Tris, pH 8.8	1.2	100
세척 3	50 mM Tris, pH 8.8	2.8	300
세척 4	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7	2	300
용출	10 mM Na-포름산염 pH 3.5	5	300
용출 후	100 mM 구연산, pH 2.1	2	300
CIP	0.1 NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	300

[0733]

[0734] 표 6B에 기술된 바와 같이 칼럼 크로마토그래피 단계를 수행하였다. 칼럼을 pH 7에서 50mM Na-인산염 및 250mM NaCl을 포함하는 완충제로 평형화하였다. 평형화 중 칼럼 부피(CV)는 5였으며, 400cm/시간의 흐름 속도로 공급하였다. 그 다음 200cm/시간의 속도로 칼럼을 로딩하였다. 도 6B에 기술된 바와 같이 일련의 세척을 수행하였다. 100mM Tris 및 2.8M $MgCl_2$를 포함하는 세척이 기재되어 있다. 100mM Tris 및 2.8M $MgCl_2$를 포함하는 세척은 4의 CV 및 100cm/시간의 흐름 속도를 더 포함하였다. 그 다음 pH 3.5에서 10mM Na-포름산염을 사용하여 칼럼을 용출하였다. 용출 단계는 4의 CV 및 300cm/시간의 흐름 속도를 적용하였다.

[0735] pH 7에서 50mM Na-인산염, 250mM NaCl을 사용하여 평형화를 수행하고, CCCF를 칼럼에 로딩하였다. 50mM Na-인산염, 250mM NaCl에서 제1 세척 후, pH 8.8에서 50mM Tris로 제2 세척을 수행하였다. 그 다음 100mM Tris 및 2.8M MgCl2로 제3 세척을 수행하였다. 그 다음 다양한 흐름 속도에서 pH 8.8에서 50mM Tris를 포함하는 세척 4 및 5를 수행하였다(도 4 참조). 그 다음 pH 7에서 50mM Na-인산염, 250mM NaCl에서 최종 세척 6을 수행하였다. 세척 후, pH 3.5에서 10mM Na-포름산염을 사용하여 관심 단백질을 용출하고, 용출-후 용액으로서 100mM 구연산 pH 2.1를 실행하였다. 표 6B의 우측에 다양한 유체의 흐름 속도가 개시되어 있다. 이의 결과 참조 실행에 비해 HCP 수준이 8배 감소한 것으로 나타났다. 기술된 세척 단계가 HCP 수준의 감소를 도울 뿐만 아니라 다른 불순물(예를 들어, 내독소 및 핵산)의 수준의 감소도 돕는 것으로 생각할 수 있다.

[0736] 실시예 4: 숙주-세포 단백질 수준의 감소에 대한 실험적 변경

[0737] 다음 연구 설계 및 방법은 달리 명시되지 않는 한 실시예 2에 제시된 프로토콜을 따른다. 세척 절차에 대한 변화에 따라 숙주-세포 단백질(HCP) 수준이 감소하였다. 표 6C는 본 개시내용의 일부 실시형태에 따른 세척 2 상의 변형을 나타낸다. 표 6C는 세척 2 단계없이 실시예 2에 개시된 프로토콜을 따른 참조 실행의 결과를 추가로

개시한다. 89.3%의 단계 수율 및 1842.71ng/mg의 HCP 농도를 개시한 참조에 비해, Tris+2.8M MgCl2 실행은 226.27ng/mg으로 8배 감소된 HCP 농도와 함께 87.9%의 단계 수율을 나타냈다.

표 6C: 크로마토그래피 정제 결과.

실행	시료 ID	단계 수율(%)	GP-HPLC (% HMW2)	GP-HPLC (% HMW1)	GP-HPLC (% 순도)	HCP (ng/mg)	항-VEGF RP (%)	항-IL6 RP(%)	pH
세척 2: Tris+1.2M Urea	KV00080	90.8	0.78	4.71	94.52	1086.7	98.7	97.9	6.76
세척 2: NaPO4 + 3.0M Urea + IPA	KV00097	87.7	1.86	6.15	92	438.9	99.6	96.9	6.71
세척 2: Na 구연산염+0.3 M Urea	KV00082	88.3	1.14	3.34	95.53	1198.3	93.5	95.2	4.81
세척 2: Tris+아르기닌	KV00083	81.1	0.67	4.48	94.86	531.4	96.1	101.8	7.07
참조 실행	KV00084	89.3	1.07	4.52	94.42	1842.7	100	100	6.28
Eshmuno A- 참조 실행	KV00087	82.9	0.24	1.51	98.26	2427.3	102.3	99	4.121
Eshmuno A- 세척 2: Tris+3M MgCl2	KV00088	85.3	0.34	2.19	97.47	488.0	97.5	101.9	4.194
Eshmuno A - 세척 2: Tris + 3M	KV00101D	107.3	7.24	15.48	77.29	230.9	97.2	88	6.92

[0738]

MgCl2, 용출 4M MgCl2									
세척 2: Tris + 2.8 M MgCl2	KV00103	87.9	1.14	4.58	94.3	226.3	105.3	100.6	6.15
세척 2: Tris + MgCl2, MgCL2 구배 용출	KV00105D	81	1	6.1	92.9	696.1	111.9	113	7.189
세척 2: Tris + MgCl2, MgCL2 구배 용출	KV00106D		0.92	5.88	93.2	670.0	110.2	111.9	

[0739]

[0740] 실시예 5: 다양한 세척 완충제를 사용한 실험 실행

[0741] 정제 조건 및 완충제 조성을 평가하기 위해 다양한 가변 세척 조건을 시험하였다. 표 6D는 다양한 세척 완충제를 나타낸다. 실행 1은 세척 단계에서 가능한 가장 낮은 pH 값을 결정하기 위한 탐색용 실행이었다. 도 3에 기술된 바와 같이 세척 1 단계 후 pH 6에서 pH 3으로 pH 용출 구배를 수행하였다. 표 6F는 기술된 각각의 세척 완충제를 사용한 용출에 따른 HCP 및 수율 수준을 나타내며, 각각의 세척 완충제는 표 6D에 기술된 실행에 상응한다. 이의 결과 서로 다른 생산물 순도 및 HCP 농도를 산출하는 다양한 세척 및 칼럼 조합이 나타났다.

표 6D: 크로마토그래피 정제 실행

[0742]

실행	실험	완충제
1	0001	MSS LX: pH 6.0 에서 pH 3.0 로 용출 구배(50 mM Na-구연산염)
2	0002	MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8 이후 요소의 점진적인 증가(1, 2, 3 M)
3	0003	MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8, 1.2M 요소
4	0004	MSS LX: 50 mM Na-인산염, pH 7 로 세척 이후 요소의 점진적인 증가(1, 2 & 3 M) 및 50 mM Na-인산염 pH 6.5, 3 M 요소, 10% IPA
5	0005	이어지는 실행을 수행하지 않음
6	0006	MSS LX: 50 mM 구연산염 pH 4.7 로 세척 이후 요소의 점진적인 증가(1, 2, 3 M) 및 50 mM Na-구연산염, pH 4.6, 3 M 요소, 10% IPA
7	0007	MSS LX: 50 mM 구연산염 pH 4.7, 0.3 M 요소
8	0008	MSS LX: 50 mM Tris pH 8.8 로 세척 이후 아르기닌의 점진적인 증가(0.25, 0.5, 0.75 M); 이어지는 실행을 수행하지 않음
9	0009	MSS LX: 참조 실행(표 6B 에 개시된 바와 같지만 세척 2 단계가 없음)
10	0010	MSS LX: 50 mM Tris pH 8.8 로 세척 이후 100 mM Tris 염기, 4.0 M MgCl2, pH 6.6 를 적용한 MgCl2 의 점진적인 증가(1, 2, 3, 4 M)
11	0011	MSS LX: 50 mM Tris 염기, 3 M MgCl2 를 시도하였지만 칼럼이 막혔음. 크로마토그래피 로딩 물질을 3 일 동안 주변 조건에 두었고 침전물이 형성되었음. 용기는 불투명하였고, 침전은 발견되지 않았음. 또한, 이전 실행(0010)에서는 50 mM Tris 염기, 4 M MgCl2 에서 50 mM Na-인산염 2.0 M NaCl, pH 7 로 변경되었는데, 이는 인산마그네슘이 쉽게 결정화되어 칼럼 상 침전을 유발할 수 있음. 새로운 칼럼을 주문하였음. Eshmuno A 수지의 스크리닝을 계속하였음.
12	0012	Eshmuno A: 참조 조건(표 6B 에 개시된 바와 같지만 세척 2 단계가 없음)
13	0013	Eshmuno A: 50 mM Tris 염기 이후 100 mM Tris 염기, 4.0 M MgCl2, pH 6.6 를 적용한 MgCl2 의 점진적인 증가(1, 2, 3, 3.6, 0 M)

[0743]

15	0014b	Eshmuno A: 50 mM Tris, pH 8.8 이후 50 mM Tris 염기, 3 M MgCl2 및 100 mM Tris 염기, 4 M MgCl2, pH 6.6 로 용출
16	0014c	Eshmuno A: 50 mM Na-구연산염, pH 4.7 이후 염화마그네슘의 점진적인 증가(1, 2, 3, 0 M)
17	0014d	Eshmuno A: 수지 용량
18	0015	MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8 이후 50 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2 및 50 mM Tris, pH 8.8
19	0016	MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8 이후 50 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2 및 50 mM Tris, pH 8.8 (이중 실행)
20	0017	MSS LX: 50 mM Tris, pH 8.8 이후 50 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2 및 2.8 M 에서 4 M MgCl2 로 구배 용출

표 6F: 크로마토그래피 정제 결과.

[0744]

#	실행 설명	수율 (%)	GP-HPLC (% HMW2)	GP-HPLC (% HMW1)	GP-HPLC (% 순도)	HCP (ng/mg)	항-VEGF RP (%)	항-IL6 RP(%)	pH
3	MSS LX - 세척 2: Tris+1.2M 요소	90.8	0.78	4.71	94.52	1086.7	98.7	97.9	6.76
4	MSS LX - 세척 2: NaPo4+3.0M 요소+IPA	87.7	1.86	6.15	92	438.9	99.6	96.9	6.71
7	MSS LX - 세척 2: Na 구연산염+0.3M 요소	88.3	1.14	3.34	95.53	1198.3	93.5	95.2	4.81
8	MSS LX - 세척 2: Tris+아르기닌	81.1	0.67	4.48	94.86	531.4	96.1	101.8	7.07
9	MSS LX – 참조 실행	89.3	1.07	4.52	94.42	1842.7	100	100	6.28
12	Eshmuno A – 참조 실행	82.9	0.24	1.51	98.26	2427.3	102.3	99	4.12
14	Eshmuno A - 세척 2: Tris+3M MgCl2	85.3	0.34	2.19	97.47	488.0	97.5	101.9	4.19
15	Eshmuno A - 세척 2: Tris+3M MgCl2, 용출 4M MgCl2	107.3	7.24	15.48	77.29	230.9	97.2	88	6.92
18	MSS LX – 세척 2: Tris+2.8M MgCl2	87.9	1.14	4.58	94.3	226.3	105.3	100.6	6.15
20	MSS LX - 세척 2: Tris+MgCl2. MgCl2 구배 용출	81	1	6.1	92.9	696.1	111.9	113	7.19

[0745]

[0746] 실시예 6: 다양한 세척 완충제를 사용한 실험 실행

[0747] 도 4는 표 6D에 기술된 실행 6의 크로마토그래피 프로파일을 나타낸다. 50 mM Na-구연산염, pH 4.7에서 단계 2에 대한 요소 세척 조건을 사용한 MabSelect Sure LX 이후 요소의 점진적인 증가(1, 2 및 3M) 및 50mM Na-구연산염 pH 4.6, 3M 요소, 10% IPA. 요소 및 IPA를 50mM Na-인산염, pH 7, 2.0M NaCl로 제거하였다. 그래프에 따르면, 요소는 세척 마지막에서 일부 A280 활성을 보인다. pH 4.7에서, 2M 요소 이상은 상당한 OG2072의 용출을 일으킨다. pH 7 및 pH 8.8에서, 3M 요소는 OG2072의 조기 용출로 이어지지 않는다. 나타낸 바와 같이, 선은 다음과 같이 화살표와 함께 식별 및 표시된다: 사각형, A280; +, 펌프 B 활성%; 별, pH. 따라서, 본 실시예는 다양한 요소 세척 조건을 사용한 크로마토그래피 실행의 결과를 입증한다.

[0748] 실시예 7: 다양한 세척 완충제를 사용한 실험 실행

[0749] 도 5는 표 6D에 기술된 실행 7의 크로마토그래피 프로파일을 나타낸다. 50 mM Na-구연산염, pH 4.7, 0.3M 요소

세척을 사용한 MabSelect Sure LX. 요소 및 IPA를 50mM Na-인산염, pH 7, 2.0M NaCl로 제거하였다. 그래프에 따르면, 세척에서 발견된 A280 활성은 많지 않았다. 나타낸 바와 같이, 선은 다음과 같이 화살표와 함께 식별 및 표시된다: 사각형, A280; +, 펌프 B 활성%; 별, pH. 따라서, 본 실시예는 다양한 요소 세척 조건을 사용한 크로마토그래피 실행의 결과를 입증한다.

[0750] 실시예 8: 다양한 세척 완충제를 사용한 실험 실행

[0751] 도 6는 표 6D에 기술된 실행 10의 크로마토그래피 프로파일을 나타낸다. 구체적으로, 도 6은 MgCl2의 점진적 증가가 적용된 크로마토그래피 프로파일을 나타내며, 여기서 카오트로프는 관심 단백질을 용출하기 위해 사용될 수 있다. 50mM Tris, pH 8.8 이후 MgCl2의 점진적 증가(1, 2, 3, 4M)와 함께 50mM Tris를 사용한 MabSelect Sure LX. MgCl2를 50mM Na-인산염, pH 7, 2.0M NaCl로 제거하였다. 용출 전, 칼럼을 50mM Na-인산염, pH 7, 250mM NaCl로 평형화하였다. 50mM Tris 염기에서 전환하는 동안, 4.0M MgCl2 및 50mM Na-인산염 결정 형성이 발생하였다. 인산염 이온 및 마그네슘 이온은 동시에 존재할 수 없으며 그렇지 않으면 칼럼의 막힘을 유도하는 인산마그네슘 결정이 형성된다. 이 프로파일은 3M MgCl2가 관심 단백질의 용출이 없는 카오트로프 농도의 상한임을 나타내며, 적어도 4M MgCl2의 존재는 관심 단백질의 정량적 용출을 유도함을 보여준다. 나타낸 바와 같이, 선은 다음과 같이 화살표와 함께 식별 및 표시된다: 사각형, A280; +, 펌프 B 활성%; 별, pH. 따라서, 본 실시예는 다양한 MgCl2 농도를 사용한 크로마토그래피 실행의 결과를 입증한다.

[0752] 실시예 9: 다양한 세척 완충제를 사용한 실험 실행

[0753] 도 7은 표 6D에 기술된 실행 18의 크로마토그래피 프로파일을 나타낸다. 50mM Tris, pH 8.8 이후 2.8M MgCl2와 함께 50mM Tris를 사용한 MabSelect Sure LX. MgCl2를 50mM Tris, pH 8.8로 제거한 다음 50mM Na-인산염, pH 7, 2M NaCl을 적용하였다. 용출 전, 칼럼을 50mM Na-인산염, pH 7, 250mM NaCl로 평형화하였다. 나타낸 바와 같이, 선은 다음과 같이 화살표와 함께 식별 및 표시된다: 사각형, A280; +, 펌프 B 활성%; 별, pH. 따라서, 본 실시예는 설정된 MgCl2 농도를 사용한 크로마토그래피 실행의 결과를 입증한다.

[0754] 실시예 10: Tris-기반 완충제를 사용한 칼럼 정제 프로토콜

[0755] 칼럼 정제 과정에서 대안적인 완충제 조성을 고려하고 분석하였다. 표 6G는 무 동물 성분 세포 배양 공정으로부터 OG2072 항체를 칼럼 정제하기 위한 공정의 실시형태를 나타낸다. 평형화 및 세척 단계를 위한 완충제는 Tris 단독 또는 NaCl 또는 MgCl2와의 조합으로 이루어진다. 50mM Tris, pH 7.2 및 250mM NaCl로 평형화를 수행하였다. 세척 1에는 50mM Tris, pH 7.2, 250mM NaCl가 포함되며, 세척 2는 50mM Tris, pH 7.8, 2.8M MgCl2를 포함하고, 세척 3은 50mM Tris, pH 8.8로 수행하였다. 그 다음 50mM Tris, pH 7.2, 250mM NaCl로 세척 4를 진행하였다. 이의 결과 칼럼 프로토콜의 실시형태가 대안적인 완충제를 사용하여 달성될 수 있는 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서, 대안적인 완충제는 주로 Tris로 구성된다. 따라서, 본 실시예는 Tris 기반 완충제의 사용을 입증한다.

표 6G: 대안적인 완충제를 사용한 카오트로픽 크로마토그래피 정제.

[0756]

단계	완충제	CV	흐름 속도(cm/h)
평형화	50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.2	5	300
로딩			200
세척 1	50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.2	2	200
세척 2	50 mM Tris, pH 7.8, 2.8 M $MgCl_2$	3	100
세척 3	50 mM Tris, pH 8.8	3	100
세척 4	50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.2	3	300
용출	10 mM Na-포름산염 pH 3.5	4	300
용출 후	100 mM 구연산, pH 2.1	2	300
CIP	0.1 NaOH	3	300

[0757] 실시예 11

[0758] 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 정제 방법을 나타낸다. 먼저 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하며, 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척한다. 세척에서 수집된 유체는 HCP

종을 포함한다. 그 다음 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 정제 방법을 입증한다.

[0759] 실시예 12

[0760] 본 실시예는 로딩 유체로부터의 생산물 정제 및 불순물 감소 방법을 나타낸다. 로딩 유체는 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하며 이 로딩 유체를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 통과시킨다. 그 다음, 카오트로픽 염을 포함하는 적어도 하나의 세척 용액을 매트릭스에 적용한다. 그 다음 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 정제 방법을 입증한다.

[0761] 실시예 13

[0762] 본 실시예는 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법을 나타낸다. 이 방법은 관심 단백질을 포함하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는 단계를 포함한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 마그네슘 또는 마그네슘염을 포함하는 하나 이상의 완충 용액으로 세척한다. 세척에서 수집되는 유체는 HCP 종을 포함한다. 그 다음 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 관심 단백질을 포함하는 용출물에서의 불순물 분리 방법을 입증한다.

[0763] 실시예 14

[0764] 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 인산 나트륨 및 염을 포함하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계를 수행한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 포함하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 수행한다. 세척에서 수집되는 유체는 HCP 종을 포함한다. 그 다음 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0765] 실시예 15

[0766] 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저 관심 단백질을 함유하는 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 Tris 및 염을 함유하는 제1 완충제로 세척하는 제1 세척 단계를 수행한다. 그 다음, Tris 및 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척하는 제2 세척 단계를 수행하는데, 여기서 제2 완충제 카오트로픽 제제는 제1 완충제에 함유된 것과 같은 염이 아니다. 세척에서 수집되는 유체는 HCP 종을 포함한다. 그 다음 용출 용액을 사용하여 단백질을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0767] 실시예 16

[0768] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 로딩 유체를 수집하는데, 여기서 로딩 유체는 관심 단백질을 포함한다. 그 다음 로딩 유체를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하는데, 여기서 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 관심 단백질에 결합한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척한다. 그 다음 결합된 관심 단백질을 용출하고, 용출물을 수집하는데, 여기서 용출물은 관심 단백질을 함유한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0769] 실시예 17

[0770] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 단백질을 포함하는 로딩 유체를 수집한다. 그 다음 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액을 공급한다. 그 다음 결합된 관심 단백질을 용출하고, 관심 단백질을 함유하는 용출물을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0771] 실시예 18

[0772] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 접합 단백질을 수집하되, 여기서 접합 단백질은 접합 중합체에 결합된 항체를 포함한다. 그 다음 접합 단백질을 관심 접합 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩하고, 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척한다. 그 다음, 접합 단백질을 용출하고, 접합 단백질을 함유하는 용출물을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0773] 실시예 19

[0774] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 세척하되, 이 세척은 카오트로픽 염을 포함하는 완충제를 사용한다. 그 다음 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집한다. 그 다음 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0775] 실시예 20

[0776] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저 관심 표적 단백질에 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충제로 세척한다. 그 다음 카오트로픽 염을 제거하고, 칼럼을 용출하여 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 수집한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0777] 실시예 21

[0778] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 단백질로 구성된 로딩 유체를 수집한다. 그 다음, 로딩 유체를 관심 단백질에 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 염을 포함하는 완충 용액으로 세척한다. 그 다음 관심 표적 단백질을 함유하는 용출물을 용출 및 수집한다. 그 다음 용출물로부터 바이러스성 오염물질을 제거한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0779] 실시예 22

[0780] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 제1 세척 완충제로 세척한다. 그 다음 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척한다. 그 다음 카오트로픽 염을 제거하는 제3 세척 완충제로 세척한다. 그 다음 용출 완충제로 용출하되, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0781] 실시예 23

[0782] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 회수한다. 그 다음 세포 배양 상등액을 관심 단백질을 포함하는 용리제로 가공한다. 그 다음 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 Tris 또는 인산나트륨을 포함하는 제1 세척 완충제로 세척한다. 그 다음 카오트로픽 염을 포함하는 제2 세척 완충제로 세척한다. 그 다음 용출 완충제로 용출하되, 여기서 용출물이 수집되며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함한다. 그 다음 용출물에 존재하는 바이러스성 오염물질을 저 pH 바이러스 완충제로 불활성화하여 바이러스 불활성화 용출물을 수득한다. 그 다음 바이러스 불활성화 용출물을 여과하고, 바이러스 불활성화 용출물에 대해 적어도 1회의 이온 교환 크로마토그래피를 수행하고, 바이러스 불활성화 용출물을 여과하여 관심 단백질을 포함하는 잔류물을 수득한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0783] 실시예 24

[0784] 본 실시예는 친화성 크로마토그래피를 사용한 단백질 정제 방법을 나타낸다. 먼저 로딩 유체를 관심 단백질과 결합하는 친화성 크로마토그래피 매트릭스인 매체와 접촉시킨다. 그 다음 매체를 염인 카오트로픽 제제를 포함하는 완충 용액으로 세척한다. 그 다음 관심 단백질을 용출시키는데 적합한 조건 하에서 세척된 매체를 용출 용액과 접촉시킨다. 따라서, 본 실시예는 단백질 정제 방법을 입증한다.

[0785] 실시예 25

[0786] 본 실시예는 생산물 생산 방법을 나타낸다. 먼저, 관심 단백질을 함유하는 용액을 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 적용한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제1 완충제로 세척한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 카오트로픽 제제를 함유하는 제2 완충제로 세척한다. 그 다음 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제3 완충제로 세척하여 상기 카오트로픽 제제를 제거한다. 그 다음 용출 완충제로 용출하되, 여기서 용출물을 수집하며, 여기서 용출물은 단백질 생산물을 포함한다. 따라서, 본 실시예는 생산물 생산 방법을 입증한다.

[0787] 실시예 26

[0788] 본 실시예는 단백질 정제 시스템을 나타낸다. 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼, 인산나트륨 및 염을 포함하는 인산 세척 완충제, Tris를 포함하는 중간 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척

완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하며, 이 시스템은 HCP 종을 감소시키고 단백질을 정제하도록 이루어진다. 단백질이 수집되며 여기서 HCP 종이 상기 시스템의 사용에 따라 감소된다. 따라서, 본 실시예는 단백질 정제 시스템을 입증한다.

[0789] 실시예 27

[0790] 본 실시예는 단백질 정제 시스템을 나타낸다. 이 시스템은 결합된 제1 항원 결합 단백질을 갖는 칼럼, Tris 및 염을 포함하는 제1 Tris 세척 완충제, 중간 Tris 세척 완충제, 염화마그네슘을 포함하는 제2 세척 완충제 및 포름산나트륨을 포함하는 용출 완충제를 포함하며, 이 시스템은 HCP 종을 감소시키고 단백질을 정제하도록 이루어진다. 단백질이 수집되며 여기서 HCP 종이 상기 시스템의 사용에 따라 감소된다. 따라서, 본 실시예는 단백질 정제 시스템을 입증한다.

[0791] 실시예 28

[0792] 본 실시예는 항체 정제 시스템을 나타낸다. 이 시스템은 항체에 결합된 단백질 A 수지를 갖는 칼럼을 포함한다. 여기서 항체는 각각 서열번호 91 내지 93, 28 내지 30 중 적어도 하나 및 서열번호 7 내지 13, 19 내지 27, 89, 90, 256 내지 262 중 적어도 하나의 경쇄 및 중쇄를 포함하며, 카오트로픽 세척 완충제는 카오트로픽 염을 포함하고, 용출 완충제는 포름산나트륨을 포함한다. 이 시스템은 HCP 종을 감소시키고 단백질을 정제하도록 이루어진다. 단백질이 수집되며 여기서 HCP 종이 상기 시스템의 사용에 따라 감소된다. 따라서, 본 실시예는 항체 정제 시스템을 입증한다.

[0793] 실시예 29

[0794] 본 실시예는 생산물 처리 방법을 나타낸다. 먼저, 용리제를 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 로딩한다. 그 다음 카오트로픽 염을 포함하는 세척 완충제로 세척하여 용출물을 수집하되, 여기서 카오트로픽 염의 농도는 제1 농도에서 제2 농도로 증가하고, 여기서 용출물은 적어도 하나의 분획에 수집되고, 여기서 적어도 하나의 분획은 관심 생산물을 포함한다. 따라서, 본 실시예는 용출물의 분획으로부터 관심 단백질을 용출 및 수집하는 방법을 입증한다.

[0795] 실시예 30

[0796] 표 6H에 제시된 단계에 따라 OG1950 및 바이러스 불활성화 OG1950를 정제하는 참조 실행을 수행하고, 표 6I에 제시된 단계에 따라 OG1950 및 바이러스 불활성화 OG1950를 정제하는 실험 실행 세트를 수행하였다.

[0797] 참조 실행의 경우, 100mM NaOH를 사용하여 제자리 청소 단계를 실행한 다음 pH 7에서 50mM Na-인산염, 250mM NaCl을 사용하여 평형화하였다. 그 다음 단백질 시료를 칼럼에 로딩하였다. 그 다음 표 6H에 따라 세척 1 내지 3을 순차적으로 수행하였다. 그 다음 pH 3.5에서 10mM Na-포름산염을 사용하여 용출한 후, 스트립 및 제자리 청소 공정을 수행하였다. CV 및 흐름 속도 조건은 표 6H에 언급되어 있다. 100mM NaOH를 사용하여 제자리 청소 단계를 실행한 다음, pH 7에서 50mM Na-인산염, 250mM NaCl을 사용하여 평형화하였다. 그 다음 단백질 시료를 칼럼에 로딩하였다. 그 다음 표 6I에 따라 세척 1 내지 6을 순차적으로 수행하였다. 그 다음 pH 3.5에서 10mM Na-포름산염을 사용하여 용출한 후, 스트립 및 제자리 청소 공정을 수행하였다.

[0798] 표 6J는 배수 HCP 감소 및 수집된 단백질의 농도(OG1950 농도[mg/mℓ])를 나타낸다. 염화마그네슘-기반 세척 완충제를 사용한 실험 실행은 HCP 함량을 참조 실행 조건에 비해 대략적으로 5배 감소시켰다.

표 6H: 참조 실행

단계	완충제	CV	흐름 속도[cm/h]
CIP 1	100 mM NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	400
평형화	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	5	400
로딩		n/a	400
세척 1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	2	400
세척 2	50 mM Na-인산염, 2 M NaCl, pH 7.0	4	400
세척 3	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	2	400
용출	10 mM Na-포름산염, pH 3.5	5	400
스트립	100 mM 구연산, pH 2.1	2	400
CIP 2	100 mM NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	400

[0799]

표 6I: 실험 실행

단계	완충제	CV	흐름 속도[cm/h]
CIP 1	100 mM NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	400
평형화	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	5	400
로딩		n/a	400
세척 1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	2	400
세척 2	50 mM Tris, pH 8.8	4	400
세척 3	100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	4	100
세척 4	50 mM Tris, pH 8.8	1.2	100
세척 5	50 mM Tris, pH 8.8	2.8	400
세척 6	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	2	400
용출	10 mM Na-포름산염, pH 3.5	5	400
스트립	100 mM 구연산, pH 2.1	2	400
CIP 2	100 mM NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	3	400

[0800]

표 6J: HCP 및 단백질 농도 결과

시료 설명	OG1950 농도 [mg/mL]	HCP [ng/mg]
Mab Select Sure 용출물 – 참조 실행	13.42	>1001
바이러스 불활성화된 것 – 참조 실행	11.76	1023
Mab Select Sure 용출물 - MgCl2 세척	13.24	266
바이러스 불활성화된 것 - MgCl2 세척	11.57	215

[0801]

[0802] 실시예 31

[0803] 이전에 사용된 플랫폼 공정은 표 7A에 나타낸 바와 같다. 본 개시내용의 추가 실시형태는 표 7B에 나타낸 바와 같다.

표 7A: 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 위한 플랫폼 공정

단계	인렛	완충제	펌프 B[%]	CV	흐름 속도[cm/h]	아웃렛
린스 1	B4	Milli Q H20	100%	2	200	W
CIP 1	A3	0.1M NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	0%	3	300	W
평형화	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	5	300	W
로딩	S3		186.2	mL(LV)	200	W
세척 1	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	2	200	W
세척 2	A4	50 mM Na-인산염, 2.0 M NaCl, pH 7.0	0%	4	300	W
세척 6	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	2	300	W
용출	B1	10 mM Na-포름산염, pH 3.5	100%	5	300	C1
용출 후	B3	100 mM 구연산, pH 2.1	100%	2	300	W
CIP 2	A3	0.1M NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	0%	3	300	W

[0804]

표 7B: 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 위한 플랫폼 공정 2

단계	인렛	완충제	펌프 B[%]	CV	흐름 속도[cm/h]	아웃렛
린스 1	B4	Milli Q H20	100%	2	200	W
CIP 1	A3	0.1M NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	0%	3	300	W
평형화	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	5	300	W
로딩	S3		186.2	mL(LV)	200	W
세척 1	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	2	200	W
세척 2	A4	50 mM Tris, pH 8.8	0%	4	300	W
세척 3	A2	100 mM Tris 염기, pH 7.7; 2.8M MgCl2	0%	4	100	W
세척 4	A4	50 mM Tris, pH 8.8	0%	1.2	100	W
세척 5	A4	50 mM Tris, pH 8.8	0%	2.8	300	W
세척 6	A1	50 mM Na-인산염, 250 mM NaCl, pH 7.0	0%	2	300	W
용출	B1	10 mM Na-포름산염, pH 3.5	100%	5	300	C1
용출 후	B3	100 mM 구연산, pH 2.1	100%	2	300	W
CIP 2	A3	0.1M NaOH (2 CV 후 15 분 유지)	0%	3	300	W

[0805]

[0806] 표 7B에 개요로 나타낸 공정은 본 명세서에 기술된 바와 같이 더 개선되었다. 결정화가 문제가 되는 용액의 경우, 표 7B에 나타난 공정이 바람직한 공정이 될 것이다. 예를 들어, 용액에 염화마그네슘이 사용된 경우 빠른 결정화를 유도하는 인산염 완충제와 마그네슘염 사이의 상호작용을 막기 위해 세척 단계의 수는 더 많다. 칼슘염을 사용한 경우에도 인산염 완충제와 칼슘염 사이의 상호작용을 막기 위해 세척 단계의 수는 많다. 그러나, 구아니디늄염의 경우, 결정화가 심각한 문제가 되는 것으로 관찰되지 않으므로, 표 7A에 나타낸 바와 같은 공정을 사용할 수 있으며, 여기서 제2 세척 단계는 1M GuHCl로 대체된다.

[0807] *평형화 및 세척 완충제 매개변수에 대한 범위 설정*

[0808] 표 8A에 나타낸 바와 같이, 생리학적 조건에서 단백질 A 친화성 수지에 항체 작제물을 적용하여 플랫폼 공정을 수행하였다.

표 8

표 8A:

실행	단백질	수지	정제 전략	크로마토그래피 용출물		바이러스 불활성화 단백질 용액			
				SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	효능 (pM)	상대적 효능 (%)
1b	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척 1: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 250 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.4	241	98.3	193	304	121
2	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척 1: 5 mM Na-인산염, pH 7.0, 50 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.1	386	98.1	355	n/a	n/a
3	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척 1: 200 mM Na-인산염, pH 7.0, 2000 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.2	410	98.1	279	n/a	n/a
4	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척 1: 50 mM Na-인산염, pH 6.0, 250 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.2	259	98.2	254	n/a	n/a
5	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척 1: 50 mM Na-인산염, pH 9.0, 250 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	97.9	327	98.2	311	n/a	n/a
6	OG2072	MSS LX	평형화 + 세척들(Tris 단독): 50 mM Tris, pH 7.2, 250 mM NaCl 세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	97.9	340	97.8	296	336	110
22 b	OG2072	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척 (모든 세척 완충제에 MgCl2 없음)	98.4	1285	98.5	562	330	114

[0809]

[0810] 평형화 및 세척 1 완충제는 50mM Na-인산염, 250mM NaCl, pH 7.0으로 이루어졌다. 그 다음 고염 세척 완충제 2(50mM Na-인산염, 2.0M NaCl, pH 7.0)를 적용하여 수지를 세척하고 그 다음 항체 용출(10mM Na-포름산염 pH 3.5) 전 제1 완충제를 사용하여 수지를 재-평형화하였다. 이 플랫폼 공정의 용출물에서 HCP 수준을 완화하려고 시도하였다. 염화마그네슘이 HCP를 추가적으로 제거하는데 효과적인 것으로 나타났다. 마그네슘은 인산염의 존재 하에서 결정을 형성하기 때문에, 마그네슘-함유 완충제를 적용하기 전에 인산염을 제거하기 위한 세척을 도입하였다(50mM Tris, pH 8.8). 마그네슘-함유 완충제를 사용한 세척을 완료한 후, 인산나트륨 완충제를 적용하기 전에 칼럼에서 마그네슘을 제거하기 위해 같은 세척을 다시 적용하였다. 이러한 조치는 기존 플랫폼 공정에 도입되는 마그네슘 세척을 가능하게 하기 위해 필요하였다. 2.8M의 MgCl2 농도가 이 목적에 적합한 것으로 나타났다(실행 1b). 실험의 초기 세트에서, 완충제 시스템 및 염 농도에 적합한 작동 범위를 정의하기 위해 완충제 농도 및 염 농도를 시험하였다.

[0811] 실행 2 및 3에서, 평형화 및 로딩-후 세척에 대해 5mM Na-인산염, 50mM NaCl, pH 7.0 및 200mM Na-인산염, 2.0M NaCl, pH 7.0을 시험하였으며, 세척 3 단계를 위해 100mM Tris 염기, 2.8M MgCl2를 유지하였다. 더 높고 더 낮은 완충제 농도뿐만 아니라 NaCl 농도는 친화성 크로마토그래피 단계의 용출물에 대해 비슷한 수준의 HCP를 나타냈고 HCP 제거 효율에는 영향을 미치지 않았다. 이는 완충제 시스템의 경우 5mM 내지 200mM의 범위가 작동하고 NaCl의 경우 50mM 내지 2.0M의 범위가 작동함을 보여준다.

[0812] 실행 4 및 5에서, 평형화 및 로딩-후 세척에 대해 50mM Na-인산염, 250mM NaCl, pH 6.0 및 50mM Na-인산염, 250mM NaCl, pH 9.0을 시험하였으며, 세척 3 단계를 위해 100mM Tris 염기, 2.8M MgCl2를 유지하였다. 더 낮고 더 높은 pH 값을 평형화 및 세척에 적용한 실행의 용출물들은 비슷한 HCP 수준을 나타냈다. HCP의 효율에는 영향이 없으며 완충 시스템을 위해 pH 6.0 내지 9.0의 범위가 잘 작동함을 보여준다.

[0813] 현재의 플랫폼은 평형화 및 로딩-후 세척 단계에 50mM Na-인산염, 250mM NaCl, pH 7.0을 사용한다. Tris 완충제만을 사용한 크로마토그래피 단계의 타당성을 시험하기 위해 실험(실행 6)을 수행하였다. 이 실험에서 평형화 및 세척에 50mM Tris, 250mM NaCl, pH 7.2를 사용하였다(50mM Na-인산염, 250mM NaCl, pH 7.0 대신). 결과는 비슷하게 나타났고 Tris 완충액만을 사용하여 친화성 크로마토그래피 단계를 수행하는 경우 마그네슘 이온을 적용하기 전 인산염 이온을 제거하기 위한 추가 세척(50mM Tris, pH 8.8)을 피할 수 있음이 입증되었다. 이는 크로마토그래피 레이아웃을 단순화하고 완충제 부피를 줄인다.

[0814] 요약하면, 평형화 및 세척 단계에 대한 더 높고 더 낮은 완충제 농도 및 NaCl 농도뿐만 아니라 더 높고 더 낮은 pH 값은 비슷한 HCP 제거 효율을 보여주었다. 이는 (1) 5mM 내지 200mM의 완충제 시스템의 강도; (2) NaCl에 대한 50mM 내지 2.0M의 NaCl 농도; (3) 6.0 내지 9.0의 pH 및 (4) Tris 및 인산염 완충제의 작동 범위를 사용할 수 있음을 확립한다. 세척 3: 0.1M Bis-Tris, pH 6.0, 2.8M MgCl2를 사용한 추가 실험을 수행하였으며 단계 수율이 낮기는 하지만 잘 작동하였다. 이러한 완충제 시스템의 경우 더 낮은 MgCl2를 확립할 필요가 있다.

[0815] *염화마그네슘 농도에 대한 범위 설정*

[0816] 이후, 본 발명자들은 표 8B에 나타낸 바와 같이 용출물의 HCP 함량에 대한 세척 3 단계 MgCl2 농도의 영향을 시험하였다.

표 8B:

실행	단백질	수지	정제 전략	크로마토그래피 용출물		바이러스 불활성화 단백질 용액			
				SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	효능 (pM)	상대적 효능 (%)
7	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 1.5 M MgCl2	97.8	415	97.8	368	n/a	n/a
9	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.0 M MgCl2	98.2	255	98.1	230	n/a	n/a
10	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.5 M MgCl2	98.3	276	98.2	221	n/a	n/a
1b	OG2072	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.4	241	98.3	193	304	121
11	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 3.0 M MgCl2	98.5	158	98.3	136	314	117
22 b	OG2072	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl로 세척	98.4	1285	98.5	562	330	114

[0817]

[0818] 실행 7 내지 실행 11은 세척 단계의 MgCl2 농도와 용출물의 HCP 함량의 역상관관계가 있음을 보여주었다. 실행 11을 제외하고 모든 실행의 경우 수율은 좋았는데, 이는 3.0M MgCl2는 다소 너무 높고 친화성 크로마토그래피 단계에서 수율이 66%였기 때문이다. 다른 모든 실행은 수율이 85%를 초과하였다. SEC-HPLC 순도는 모든 실행에서 비슷하였다. 3.5M MgCl2는 너무 높고 세척 분획에서 OG2072가 용출되었기 때문에 실행 12의 데이터는 나타내지 않았다. MgCl2 및 농도의 영향을 사용한 이러한 실험 결과로부터, 본 발명자들은 농도의 영향이 있지만, 마그네슘(나트륨 대신)의 존재가 농도보다 더 중요하다는 것을 관찰하였다. 발명자들은 1.5M MgCl2가 2.0M NaCl보다 용출물에서 더 낮은 HCP를 나타냈다는 결론을 내렸다.

[0819] pH 6.0의 Bis-Tris 완충 세척 완충제에 보충된 2.8M MgCl2를 사용하여 실행 13을 수행하였다. HCP 함량은 용출물 풀 및 VI 후 각각 94 및 ng/mg이다. 이는 플랫폼 조건에 비해 12 및 5배 낮은 것이다. 그러나, 세척 단계에

서 상당한 양의 OG2072가 용출되었기 때문에 수율은 48.4%로 낮았다. 따라서 이는 경제적으로 실행가능한 세척 단계가 아니다. 마그네슘/함유 세척 완충제가 pH 6.0인 경우 MgCl2 함량을 더 낮추고 미세 조정해야 한다. 실행 8은 pH 7.0의 100mM Tris 완충제에 보충된 2.8M MgCl2를 사용하여 수행되었고 좋은 단계 수율이 관찰되었다.

[0820] 세척 3 완충제의 MgCl2 농도와 용출물의 HCP 함량의 역상관관계가 있었다. MgCl2 농도를 증가시킴(2.0M MgCl2 초과)에 따른 HCP 제거의 추가적 효율은 다소 보통이었다. 항체의 일부가 세척 완충제에 용출된, 세척 3 완충제에서 3.0M MgCl2를 실행한 경우를 제외하고 모든 실행에서 수율은 좋았다. SEC-HPLC 순도는 모든 실행에서 비슷했다. MgCl2 및 농도의 영향을 사용한 이러한 실험 결과로부터, 본 발명자들은 농도의 영향이 있지만, 마그네슘(나트륨 대신)의 존재가 농도보다 더 중요하다는 것을 관찰하였다. 발명자들은 1.5M MgCl2가 2.0M NaCl보다 용출물에서 더 낮은 HCP를 나타냈다는 결론을 내렸다.

[0821] 실시예 32: 다양한 카오트로픽 강도의 염의 스크리닝

[0822] 그 다음, HCP의 제거가 호프마이스터 시리즈(Hofmeister series)에 따른 카오트로프의 강도와 상관관계가 있는지를 결정하기 위한 시험을 실행하였다.

[0823] *카오트로픽 양이온의 스크리닝*

[0824] 실험 조건은 표 9A에 나타낸 바와 같았다.

표 9

표 9A:

[0825]

실행	단백질	수지	정제 전략	크로마토그래피 용출물		바이러스 불활성화 단백질 용액			
				SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	효능 (pM)	상대적 효능 (%)
19	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.8 M Li-아세트산염	98.1	444	98.1	390	321	117
14	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.8 M LiCl	98.1	408	97.8	353	n/a	n/a
1b	OG2072	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.4	241	98.3	193	304	121
23	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.0 M CaCl2°	97.6	157	98.1	147	299	126
29	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 1.0 M 염화구아니디늄*	98.9	86	98.7	86	n/a	n/a
22 b	OG2072	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	98.4	1285	98.5	562	330	114

[0826] 이를 위해, Tris 염기에 보충된 5.0M CaCl2를 사용하여 세척 단계를 수행하였지만, OG2072가 세척 분획에 용출되어 수율이 낮았는데 이는 5.0M에서 카토트로픽 효과가 너무 강하다는 것을 입증한다. 세척 완충제에 2.0M CaCl2를 보충하여 후속 실행을 수행하였다. 이 실행은 친화성 크로마토그래피 단계에서 좋은 수율을 보여주었다. 2.0M CaCl2의 존재로 인한 응집의 증거는 없었다. HCP 함량은 세척 단계에서 2.0M NaCl을 사용하는 플랫폼 공정에 비해 훨씬 더 낮았다. 이는 CaCl2 세척의 이점이 칼슘 성분에서 나온다는 것을 보여준다. 칼슘은 나트륨보다 더 카오트로픽 양이온이다. 중요한 것은 2.0M CaCl2를 사용하여 실행한 용출물의 HCP 함량이 세척 단계에서 2.8M MgCl2를 사용하여 실행한 용출물보다 더 낮았다는 것이다. 호프마이스터 시리즈에 따르면 칼슘이 마그네슘보다 더 강한 카오트로프이므로 이러한 결과는 더 강한 카오트로프가 HCP 제거에서 더 유리한 효과를 갖는다는 가설을 지지한다.

[0827] 산업에서 사용되는 가장 강한 카오트로프는 구아니디늄이다. 실행 16은 3.0M 염화구아니디늄이 세척 단계에 너무 높다는 것을 보여주었다. 이는 수율이 낮았고 상승된 응집 수준을 초래하였다. SEC-HPLC 상에 영향을 받지 않았고 플랫폼 공정과 비슷한 조건에서 SEC-HPLC 순도가 대략적으로 98%인 것에 비해, 실행 24는 SEC-HPLC 순도가 95.8%이므로 1.65M이 여전히 약간 너무 높은 염화구아니디늄 농도라는 것을 보여주었다. 실행 29는 SEC-HPLC로 측정한 수율 및 순도가 좋은 것으로 나타나 1.0M 염화구아니디늄이 적절하다는 것을 보여주었다. 용출물의 HCP 함량은 86ng/mg으로 플랫폼 공정보다 약 15배 더 낮았다.

[0828] 결론적으로, 세척 완충제에서 염의 일부로서 카오트로픽 양이온으로서 나트륨을 사용하는 것은 1285ng/mg의 HCP 함량을 나타냈으며, 세척 완충제에서 염의 일부로서 카오트로픽 양이온으로서 리튬을 사용하는 것은 408ng/mg의 HCP 함량을 나타냈고, 세척 완충제에서 염의 일부로서 카오트로픽 양이온으로서 마그네슘을 사용하는 것은 241ng/mg의 HCP 함량을 나타냈고, 세척 완충제에서 염의 일부로서 카오트로픽 양이온으로서 칼슘을 사용하는 것은 157ng/mg의 HCP 함량을 나타냈고, 세척 완충제에서 염의 일부로서 카오트로픽 양이온으로서 구아니디늄을 사용하는 것은 86ng/mg의 HCP 함량을 나타냈다. 이는 호프마이스터 시리즈에서 기술된 바와 같은 카오트로픽 강도를 따르며 HCP 제거가 세척 완충제에 사용된 염의 일부로서 카오트로픽 양이온의 강도의 함수임을 제시한다. 다시 말해, 더 강한 카오트로픽 제제가 더 높은 HCP 제거 효율을 갖는다(Na+ < Li+ < Mg2+ < Ca2+ < 구아니디늄+). 주목할 점은 Li-아세트산염 및 LiCl이 HCP 제거에서 비슷한 효율을 보였고 염화물이 약간 더 나은 효율을 보였지만, 음이온의 영향은 덜 두드러진 것으로 나타났다는 점이다.

[0829] *카오트로픽 음이온의 스크리닝*

[0830] 실험 조건은 표 9B에 나타낸 바와 같았다.

표 9B:

실행	단백질	수지	정제 전략	크로마토그래피 용출물		바이러스 불활성화 단백질 용액			
				SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	효능 (pM)	상대적 효능 (%)
19	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.8 M Li-아세트산염	98.1	444	98.1	390	321	117
14	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.8 M LiCl	98.1	408	97.8	353	n/a	n/a
22 b	OG2072	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	98.4	1285	98.5	562	330	114
18	OG2072	MSS LX	세척 3 구배: 0.1 M Tris 염기, 7.0 M NaNO3	98.0	471	98.0	306	283	130
17 b	OG2072	MSS LX	세척 3: 0.1 M Tris 염기, 2.8 M MgSO4	98.1	412	97.9	319	325	113
1b	OG2072	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.4	241	98.3	193	304	121

[0831]

[0832] 그 다음, HCP의 제거에서 음이온의 영향을 결정하기 위한 시험을 실행하였다. HCP 함량 상에서의 유익한 효과가 마그네슘에 의해 또는 염화물로부터 기인하는지를 확인하기 위해, 염으로 MgSO4를 시험하였다. 황산염은 강한 코스모트로픽(kosmotropic) 음이온이며 종종 더 고차의 올리고머 구조를 유도하기 위해, 예를 들어 단백질의 침전 또는 결정화를 위해 황산암모늄 또는 황산나트륨으로 사용된다. 반면, 카오트로프는 용액에서 분자를 유지하고 불리하거나 비특이적인 상호작용을 막기 위해 사용될 수 있다. 실행 17b에서 2.8M MgSO4를 사용한 세척 단계를 적용하였고 이 용출물에는 플랫폼 공정보다 낮은 HCP 함량 및 2.8M MgCl2를 사용한 참조 실행과 비슷한 HCP 함량과 함께 OG2072이 함유되었다. 이 실행은 또한 SEC-HPLC로 측정한 것으로서 좋은 수율 및 순도를 나타냈다. 이러한 결과는 MgCl2 세척의 주요 이점이 염화물 성분에 따른 것이 아닌 마그네슘 성분에 따른 것임을 제안한다. 마그네슘은 나트륨보다 더 강한 카오트로픽 양이온이며 이것이 이 세척 전략이 플랫폼 전략보다 더 좋은 이유일 가능성이 높다. 중요하게도, 이는 주요 이점이 음이온이 아닌 양이온으로부터 나온다는 것을 보여

준다. 황산염 음이온의 코스모트로픽 특성은 마그네슘의 카오트로픽 효과를 되돌릴 수 없다.

[0833] 실행 18에서, 세척 단계는 염으로서 7.0M NaNO3을 포함하며, 여기서 질산염은 플랫폼 공정의 염화물보다 더 카오트로픽이다. 이 용출물은 플랫폼 공정보다 더 낮은 HCP 함량과 함께 OG2072를 함유하였지만, 7.0M NaNO3의 더 높은 농도를 적용하였음에도 불구하고 2.8M MgCl2를 사용한 참조 실행에 비해 더 높은 HCP 함량을 보였다. 이러한 결과는 음이온에 비해 양이온이 HCP 제거에서 더 강력한 매개변수라는 가설을 더욱 뒷받침한다. 이러한 가설을 더 시험하기 위해, 실행 19에서 2.8M Li-아세트산염을 포함하는 세척 완충제를 준비하였다. 리튬은 나트륨에 비해 더욱 카오트로픽인 양이온이지만, 아세트산염은 염화물보다 덜 카오트로픽이다. 이 용출물은 NaCl을 사용한 플랫폼 공정보다 낮은 HCP 함량과 함께 OG2072를 함유하였다. 이는 존재하는 더 코스모트로픽인 음이온에 의해 역전되지 않는 양이온의 유리한 효과를 보여준다.

[0834] 요약하면, 세척 완충제 보충제로서 2.8M MgSO4를 사용함에 따라 플랫폼 공정보다는 낮고 세척 완충제 보충제로서 2.8M MgCl2를 사용한 실행에 비해서는 다소 높은 HCP 함량을 갖는 용출물이 생성되었다. 이러한 결과는 HCP 제거의 주요 이점이 음이온이 아닌 양이온으로부터 나온다는 것을 보여준다. 황산염 음이온의 코스모트로픽 특성은 마그네슘의 카오트로픽 효과를 되돌릴 수 없다. 유사한 결과가 Li-아세트산염을 LiCl과 비교한 경우에 관찰되었다. 또한, 세척 완충제 보충제로서 7.0M NaNO3를 사용함(여기서 질산염은 염화물보다 더 카오트로픽임)에 따라 플랫폼 공정보다는 낮지만, 7.0M NaNO3의 더 높은 농도를 적용하였음에도 불구하고 2.8M MgCl2를 사용한 참조 실행에 비해 더 높은 HCP 함량을 갖는 용출물이 생성되었다. 이러한 결과는 음이온에 비해 양이온이 HCP 제거에서 더 강력한 매개변수라는 가설을 더욱 뒷받침한다.

[0835] 친화성 크로마토그래피 단계에 카오트로픽 염을 포함시키면 HCP 수준을 줄이는데 도움이 되며 이 효과는 주로 양이온의 특성에 의해 결정된다는 결론이 내려졌다. 본 발명자들은 이러한 결과가 다른 분자 및 수지에서도 적용될 수 있는지를 평가하고자 하였다.

[0836] 실행 25 및 26에서 OG1950을 MabSelect Sure에 적용하였다(위에 기술된 모든 다른 실험은 MabSelect Sure LX를 사용하여 수행하였음). OG1950은 1가의 보다 고전적인 항체인 반면 OG2072는 2가 융합 항체이다. 실행 26에서, 2.0M NaCl을 포함한 세척 단계로 플랫폼 공정을 적용하였지만, 실행 25에서는, 2.8M MgCl2-함유 세척 완충제를 적용하였다. 2.8M MgCl2를 사용한 실행의 용출물(100ng/mg)은 세척 완충제에 2.0M NaCl을 사용한 실행(423ng/mg)에 비해 4배 더 낮은 HCP를 보였다. 두 실행 모두 비슷한 SEC-HPLC 순도 및 효능을 보였는데 이는 MgCl2가 OG1950 항체의 구조 및 기능 상에 부정적인 영향을 미치지 않았다는 것을 입증한다. 비교를 위해, 높은 pH 세척을 사용한 실행(50mM Na-인산염, 2.0M NaCl, pH 9.0를 사용한 실행)을 수행하였으며 2.8M MgCl2-함유 세척 완충제와 비교하였을 때 HCP 제거 상의 비슷한 효과는 발견되지 않았다(341ng/mg). 이러한 결과는 HCP 제거 효과가 카오트로픽 염의 특성과 연결되며 높은 pH에 의해 보충될 수 없음을 보여준다. 실행 25의 경우, 일부 OG1950이 세척 단계에 용출되었는데 이는 2.8M MgCl2가 다소 너무 높다는 것을 제시한다. 실행 28에서, 2.0M MgCl2가 적용되었으며, 이의 결과 2.0M MgCl2가 OG1950에 적합한 농도인 것으로 나타났고 2.0M MgCl2 세척 단계에서 A280은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 MgCl2가 분자 기초마다 최적화되어야 함을 제시한다. 더 낮은 MgCl2는 용출물의 HCP 수준 상에서 유의한 영향을 미치지 않았다(138ng/mg). 이 실행의 경우 SEC-HPLC 순도는 2.8M MgCl2-함유 세척 완충제를 사용한 실행에 비해 더 낮았다. 이러한 결과는 예상하지 못했다.

[0837] 실행 31 및 32에서, MabSelect Sure LX 수지에 아플리베르셉트를 적용하였다. 아플리베르셉트는 IgG의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체의 리간드-결합 요소를 결합한 가용성 융합 단백질이다. 실행 31에서, 2.0M NaCl을 포함한 세척 단계로 플랫폼 공정을 적용하였으며, 실행 32에서는, 세척 완충제에 2.8M MgCl2를 보충하였다. MgCl2를 사용한 실행의 용출물은 세척 완충제에 NaCl을 사용한 실행에 비해 적어도 3배 더 낮은 HCP를 보였다. 두 실행 모두 비슷한 SEC-HPLC 순도를 보였는데 이는 MgCl2가 아플리베르셉트의 구조 상에 부정적인 영향을 미치지 않았다는 것을 입증한다. 2.8M MgCl2 세척 단계에서 A280 활성은 관찰되지 않았으며 2.8M MgCl2는 이 분자에 적합했다.

[0838] 실행 33 및 34에서, MabSelect Sure LX 수지에 OG2127을 적용하였다. OG2127 또한 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체의 리간드-결합 요소를 결합한 가용성 융합 단백질이다. 실행 33에서, 2.0M NaCl을 포함한 세척 단계로 플랫폼 공정을 적용하였으며, 실행 34에서는, 세척 완충제에 2.8M MgCl2를 보충하였다. MgCl2를 사용한 실행의 용출물은 세척 완충제에 NaCl을 사용한 실행에 비해 적어도 5배 더 낮은 HCP를 보였다. 두 실행 모두 비슷한 SEC-HPLC 순도를 보였는데 이는 MgCl2가 OG2127의 구조 상에 부정적인 영향을 미치지 않았다는 것을 입증한다. 2.8M MgCl2 세척 단계에서 A280 활성은 관찰되지 않았으며 2.8M MgCl2는 이 분자에 적합했다.

[0839] 이들 실험 결과는 이 개념이 1가 및 2가 항체 작제물 및 Fc 융합 단백질과 같은 다른 항체 유형 및 작제물에 작

동함을 보여주었다. 또한 2가지 다른 유형의 친화성 수지도 시험하였다. 이러한 결과는 개념이 OG2072에 대해서만이 아닌 일반적으로 적용될 수 있음을 입증한다.

[0840] 실시예 33: 다른 단백질 및 수지의 스크리닝

[0841] 그 다음, 표 10에 나타낸 바와 같이, 2가지 다른 친화성 수지 및 다양한 항체 및 단백질을 사용하여 본 명세서에 기술된 바와 같은 친화성 크로마토그래피 공정을 결정하기 위한 시험을 실행하였다.

표 10

표 10:

[0842]

실행	단백질	수지	정제 전략	크로마토그래피 용출물		바이러스 불활성화 단백질 용액			
				SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 순도 (%)	HCP (ng/mg)	효능 (pM)	상대적 효능 (%)
22 b	OG2072	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	98.4	1285	98.5	562	330	114
1b	OG2072	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.4	241	98.3	193	304	121
26	OG1950	MSS	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	96.2	423	96.5	281	1607	96
25	OG1950	MSS	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	96.3	100	96.3	63	1755	88
28	OG1950	MSS	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.0 M MgCl2	93.9	138	93.9	94	1610	96
31	Aflibercept	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	98.8	n/a	98.7	> *21,538°*	n/a	n/a
32	Aflibercept	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.2	n/a	98.1	*7,611°*	n/a	n/a
33	OG2127I	MSS LX	플랫폼 공정: 50 mM Na-인산염, pH 7.0, 2.0 M NaCl 로 세척	100.0	n/a	99	> *66,667°*	n/a	n/a
34	OG2127	MSS LX	세척 3: 100 mM Tris 염기, 2.8 M MgCl2	98.8	n/a	98.8	*12,482°*	n/a	n/a

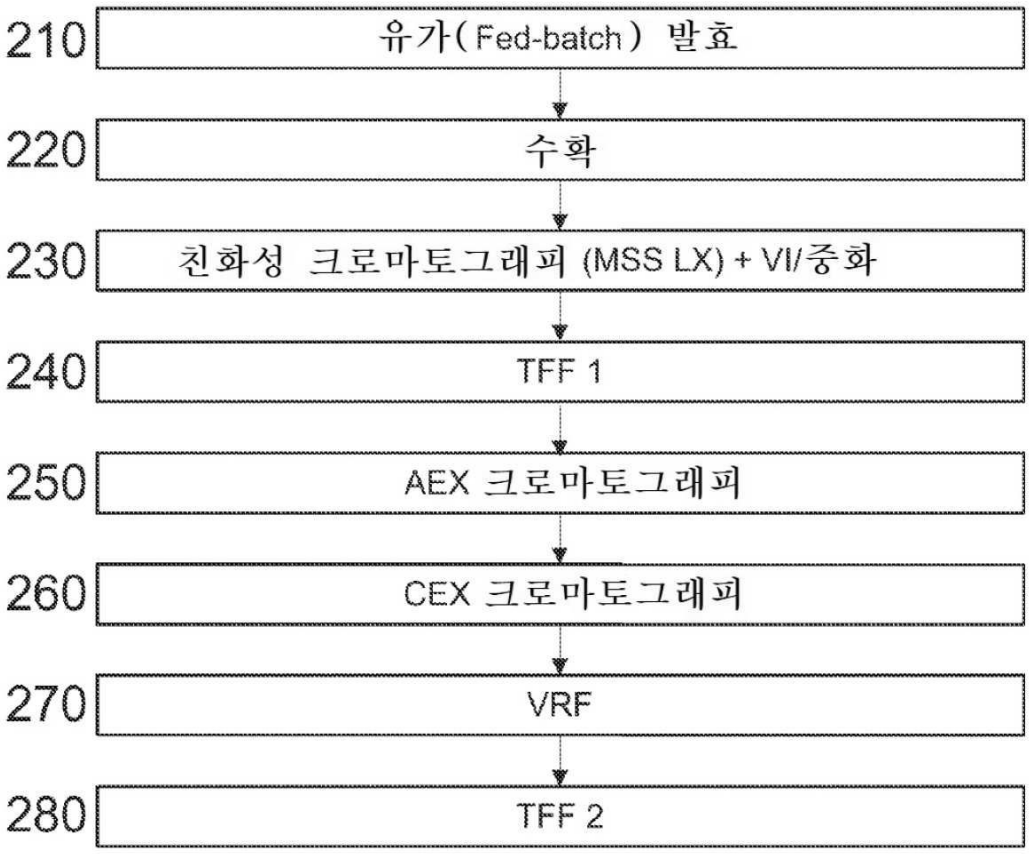
[0843] 상기 표 10에 나타낸 바와 같이, 본 명세서에 개시된 방법론은 다양한 항체 및 단백질에 걸쳐 광범위하게 효과적이었다. 개선된 세척 전략은 1가 및 2가 항체 작제물 모두에 대해서 뿐만 아니라 다른 Fc 융합 단백질에 대해서도 작동하였다. 따라서, 본 발명자들은 이 세척 전략이 모든 유형의 항체 및/또는 단백질에 일반적으로 적용될 수 있다고 생각한다.

도면

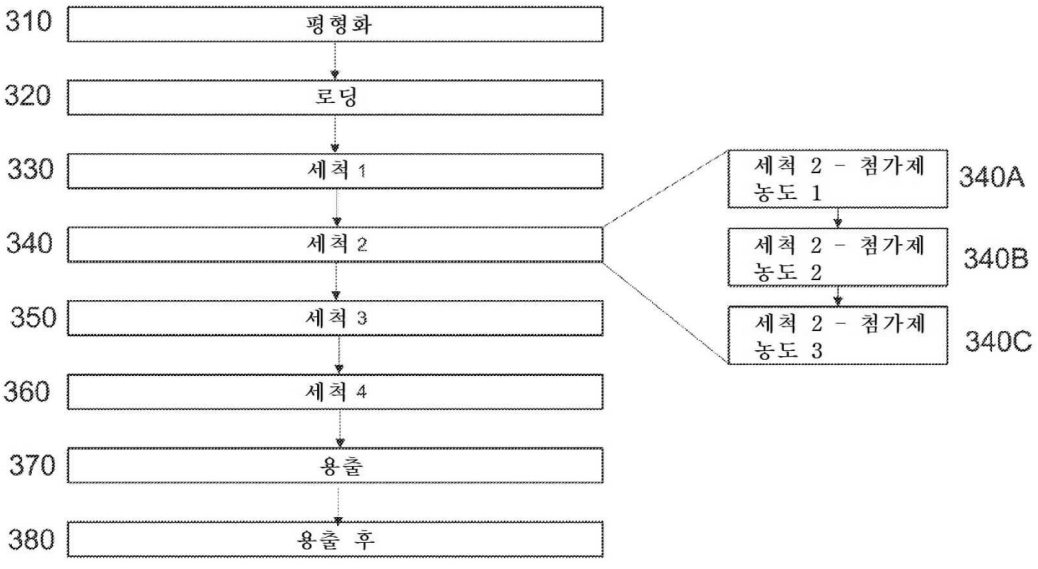
도면1


110
정화된 세포 배양 상등액
120
MabSelect SuRe LX 친화성 크로마토그래피
130
저 pH 바이러스 불활성화
140
중간 한외여과/투석여과
150
Sartobind Q 음이온 교환 크로마토그래피
160
POROS XS 양이온 교환 크로마토그래피
170
Planova 20N 바이러스 감소 여과
180
최종 한외여과/투석여과

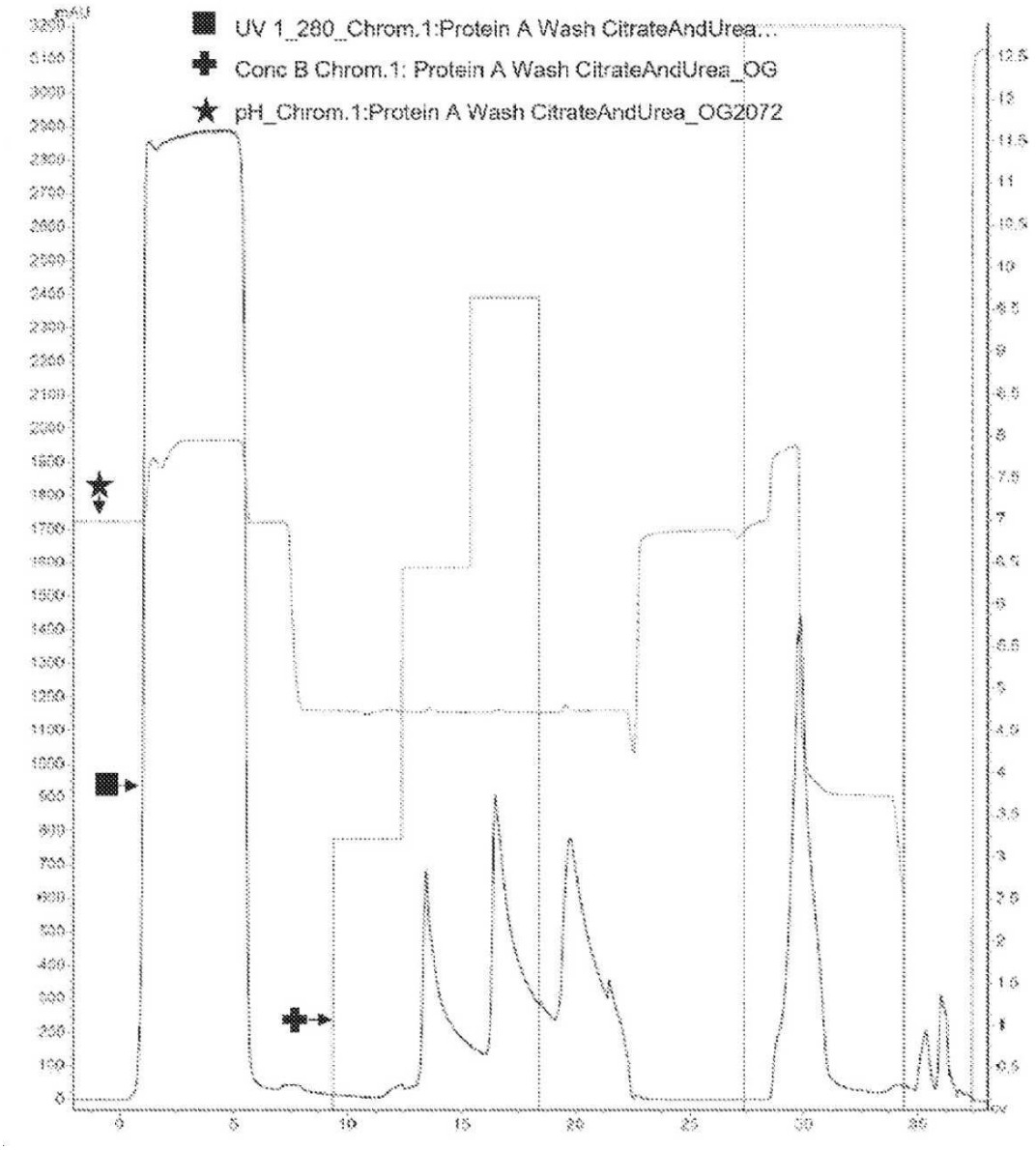
도면2


210
유가(Fed-batch) 발효
220
수확
230
친화성 크로마토그래피 (MSS LX) + VI/중화
240
TFF 1
250
AEX 크로마토그래피
260
CEX 크로마토그래피
270
VRF
280
TFF 2

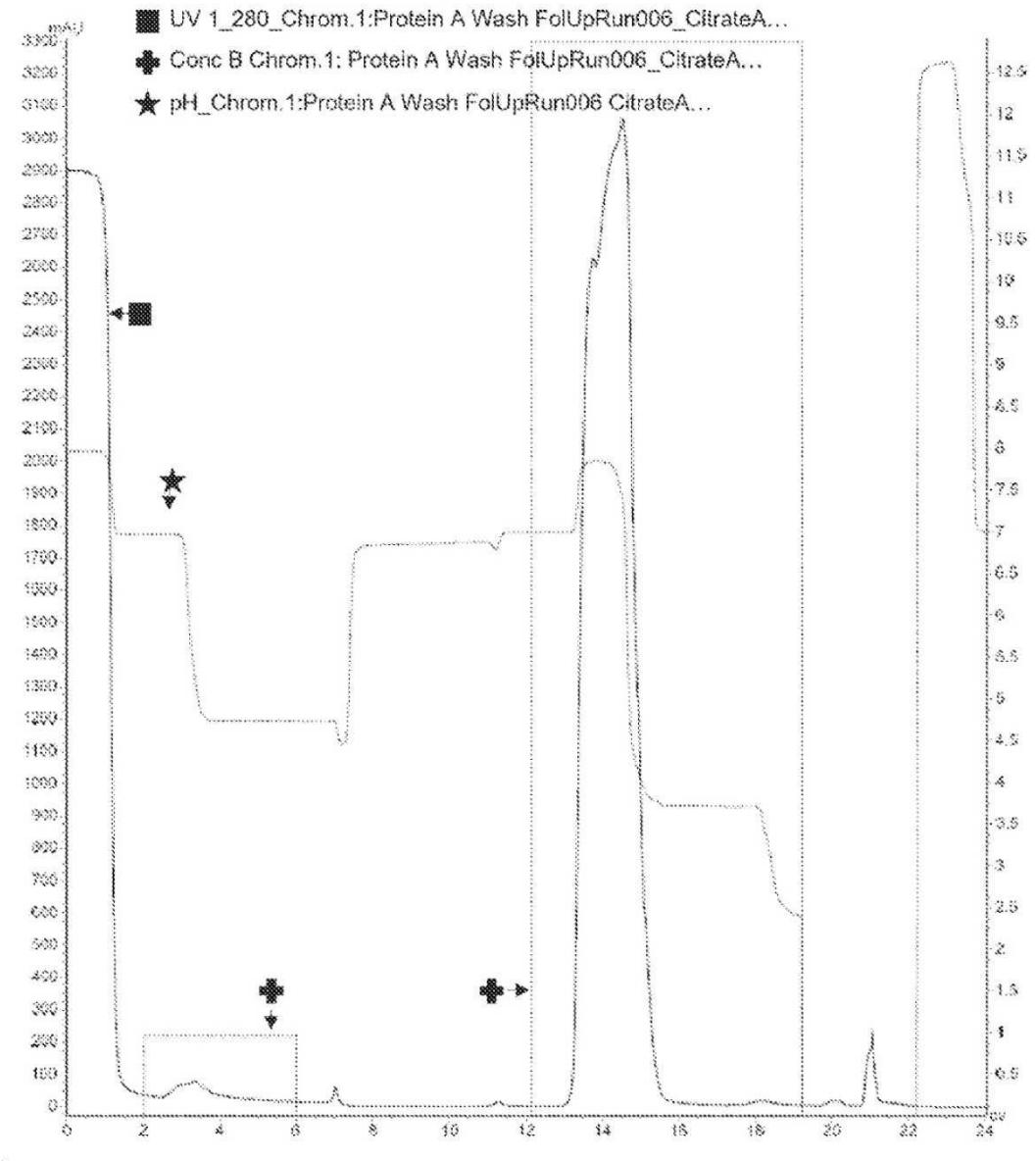
도면3


310
평형화
320
로딩
330
세척 1
340
세척 2
350
세척 3
360
세척 4
370
용출
380
용출 후
세척 2 - 첨가제 농도 1
340A
세척 2 - 첨가제 농도 2
340B
세척 2 - 첨가제 농도 3
340C

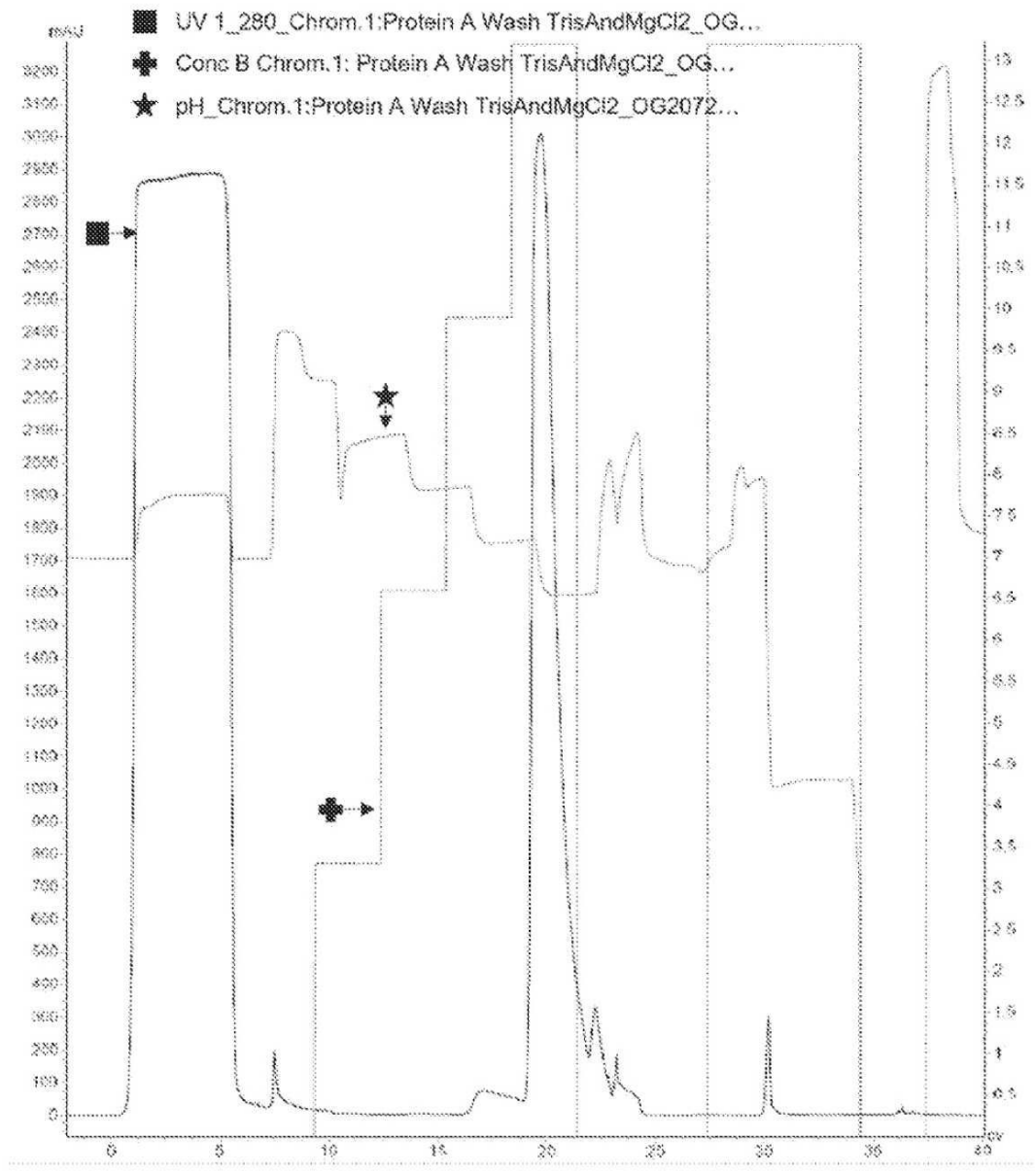
도면4


UV 1_280_Chrom.1:Protein A Wash CitrateAndUrea...
Conc B Chrom.1: Protein A Wash CitrateAndUrea_OG
pH_Chrom.1:Protein A Wash CitrateAndUrea_OG2072

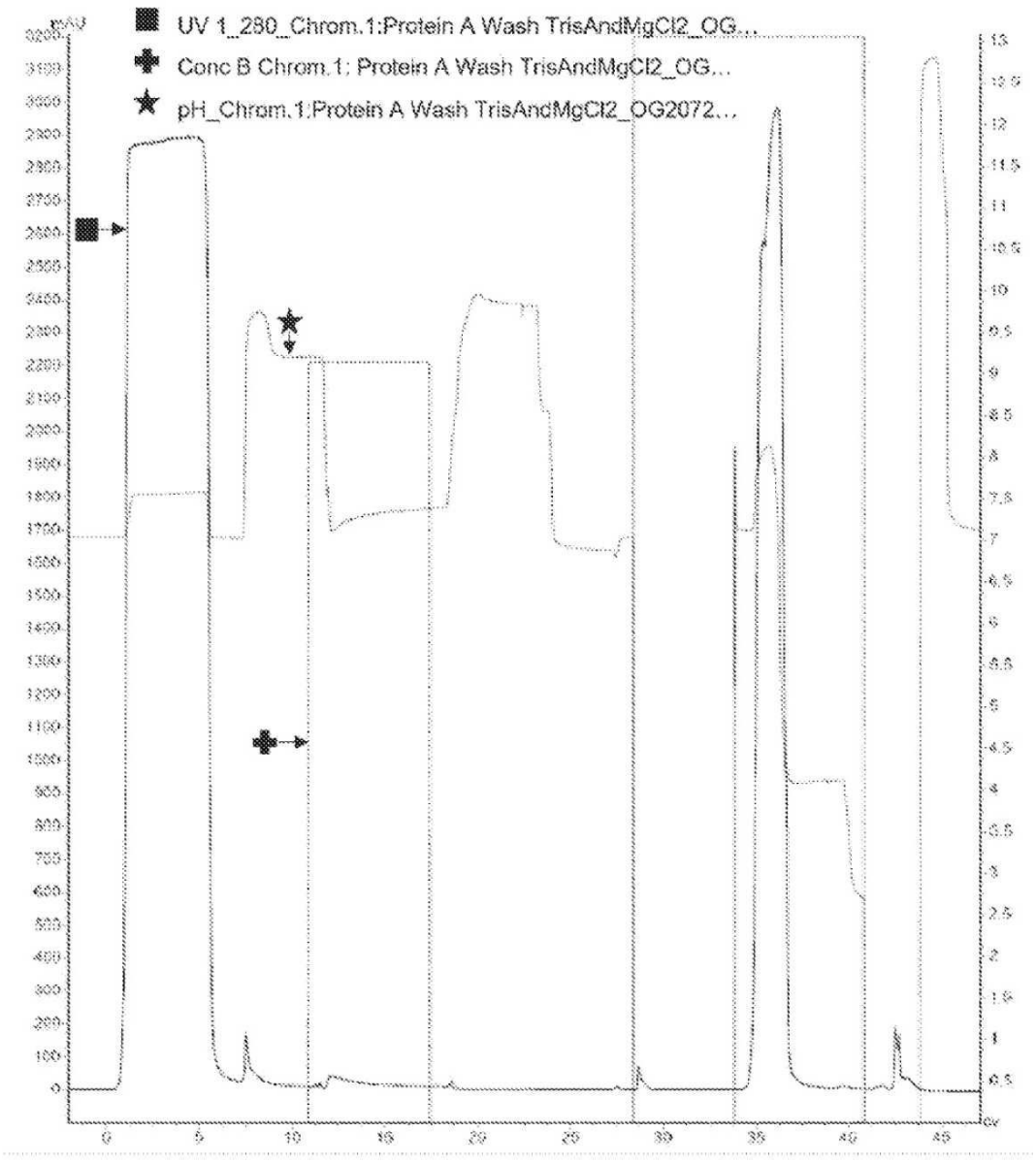
도면5


UV 1_280_Chrom.1:Protein A Wash FolUpRun006_CitrateA...
Conc B Chrom.1: Protein A Wash FolUpRun006_CitrateA...
pH_Chrom.1:Protein A Wash FolUpRun006 CitrateA...
mAU
CV

도면6


UV 1_280_Chrom.1:Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG...
Conc B Chrom.1: Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG...
pH_Chrom.1:Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG2072...
mAU
CV

도면7


mAU
UV 1_280_Chrom.1:Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG...
Conc B Chrom.1: Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG...
pH_Chrom.1:Protein A Wash TrisAndMgCl2_OG2072...
CV

도면8

항-VEGF 항체의 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGT
SHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC**SPGK** (서열번호 270)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGT
SHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC**SPG** (서열번호 271)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGT
SHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC**SP** (서열번호 272)

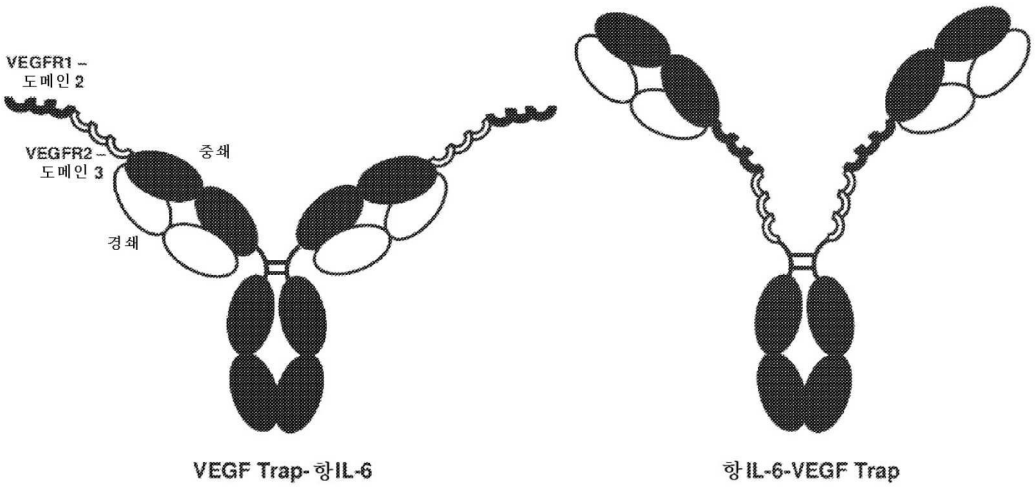
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGT
SHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC**S** (서열번호 273)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGT
SHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSC (서열번호 274)

항-VEGF-항체의 경쇄

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (서열번호 275)

도면9



VEGF Trap-항IL-6 항IL-6-VEGF Trap

도면10

> VEGF_trap_변이체_1 (서열번호 4)
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGI
DFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS
TFVRVHEK

> VEGF_trap_변이체_2 (서열번호 5)
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTIRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGI
DFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS
TFVRVHEK

> VEGF_trap_변이체_3 (서열번호 6)
SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIIRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGI
DFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS
TFVRVHEK

도면11

서열 번호	서열:
7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYYALDIWGQGTLVTVSS
8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYYALDIWGQGTLVTVSS
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYYALDIWGQGTLVTVSS
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQTWGYYALDIWGQGTLVTVSS
11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQVWGYYALDIWGQGTLVTVSS
12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQWGYYALDIWGQGTLVTVSS
13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYYALDIWGQGTLVTVSS

도면12

서열 번호	VEGF Trap 서열:
14	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
15	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
16	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTIRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
17	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIIRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNC TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK

서열 번호	VEGF Trap 서열:
18	GGGGSGGGGS

도면13

서열 번호	VEGF Trap 서열:
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQTWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAROVWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK

도면14

서열 번호	VEGF Trap 서열:
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK
27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYYSD TVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSCSPGK

도면15

서열 번호	경쇄 서열:
28	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDASSLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

도면16a

번호	중쇄 - Fab	중쇄 - Fc
5A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQAWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 31)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 40)
5B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQSWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 32)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 41)
5C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQGWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 33)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 42)
5D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQTWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 34)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 43)
5E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQVWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 35)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 44)

도면16b

번호	중쇄 - Fab	중쇄 - Fc
5F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQQWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 36)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 45)
5G	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQKWGYYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 37)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 46)
5H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 38)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 47)
5I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLE WVAKISPGGSWTYYSDTVIDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARQLWGYYALDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (서열번호 39)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (서열번호 48)

도면17a

번호	CDR1	CDR2	CDR3
I	(서열번호 49) GFTFSPFAMH	(서열번호 50) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 51) ARQAWGYYALDI
II	(서열번호 52) GFTFSPFAMH	(서열번호 53) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 54) ARQSWGYYALDI
III	(서열번호 55) GFTFSPFAMH	(서열번호 56) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 57) ARQGWGYYALDI
IV	(서열번호 58) GFTFSPFAMH	(서열번호 59) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 60) ARQTWGYYALDI
V	(서열번호 61) GFTFSPFAMH	(서열번호 62) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 63) ARQVWGYYALDI
VI	(서열번호 64) GFTFSPFAMH	(서열번호 65) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 66) ARQQWGYYALDI
VII	(서열번호 67) GFTFSPFAMH	(서열번호 68) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 69) ARQKWGYYALDI
VIII	(서열번호 70) GFTFSPFAIS	(서열번호 71) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 72) ARQLWGYYALDV
IX	(서열번호 73) GFTFSPFAWS	(서열번호 74) VAKISPGGSWTYYSDTVTD	(서열번호 75) ARQLWGYYALDV

도면17b

번호	CDR1	CDR2	CDR3
X	(서열번호 76) SASISVSYLY	(서열번호 77) LLIYDDSSLAS	(서열번호 78) QQWSGYPYT
XI	(서열번호 79) SASISVSYLY	(서열번호 80) LLIYDDSSLAS	(서열번호 81) QQWSGYPYT
XII	(서열번호 82) SASISVSYLY	(서열번호 83) LLIYDDSSLAS	(서열번호 84) QQWSGYPYT

도면18

서열번호	서열:
85	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLN CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK
86	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLN CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK
87	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYLIHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLN CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK
88	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNHGHLYKTNYLIIRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLN CTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTC AASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.