



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월10일

(11) 등록번호 10-2408260

(24) 등록일자 2022년06월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/577 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/577 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7032543
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월12일
 심사청구일자 2020년04월10일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월09일
- (65) 공개번호 10-2018-0129927
- (43) 공개일자 2018년12월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/058775
- (87) 국제공개번호 WO 2017/178526
 국제공개일자 2017년10월19일
- (30) 우선권주장
 62/322,621 2016년04월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 W02015038888 A1
 W02005071410 A1
 Catherine EM Hogwood et al, Current Opinion
 in Biotechnology (2014), vol 30, pp 153-160.
 Zhu shimoni J et al, Biotechnology and
 Bioengineering (2014), vol 111, no 12, pp
 2367-2379.
- (73) 특허권자
 론자 리미티드
 스위스 3930 비스프 론자슈트라체
- (72) 발명자
 마오, 귀지에
 영국 에스엘1 슬라우 버크셔 배스 로드 228 론자
 바이올로지스 피엘에스
- (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 13 항

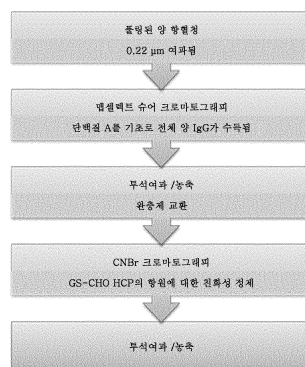
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 숙주 세포 단백질의 검출을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

산물, 예를 들어, 재조합 단백질, 예를 들어, 항체의 생산 동안 숙주 세포 단백질을 검출 및/또는 정량화하는데 유용한 방법 및 조성물이 본원에서 특히 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/065 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리클로날 항-숙주 세포 단백질 (HCP) 항체 제제를 제조하는 방법이며,

- a) 숙주 세포의 HCP로 면역화된 양 또는 염소로부터 항체를 포함하는 샘플을 취득하고;
- b) 샘플을 단백질 A 친화성 시약과 접착시킴으로써 샘플로부터 항체를 분리하여 항체 제제를 제공하고;
- c) 항체 제제를 기관에 커플링된 HCP를 포함하는 HCP-친화성 시약과 접착시킴으로써 항체 제제로부터 항-HCP 항체를 분리하는 것

을 포함하는 것이고,

이로써 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 생산하는 것

을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, HCP에 커플링된 기관이 브롬화시안 (CNBr)-유도체화 기관 또는 N-히드록시숙신이미드 (NHS)-유도체화 기관인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, HCP에 커플링된 기관이 브롬화시안 (CNBr)-유도체화 기관인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

- i) 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 비-HCP 특이적 IgG, 또는
- ii) 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과 비-HCP 특이적 IgG

를 제거하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리클로날 항-HCP 항체 제제가

- i) 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유하거나, 또는
- ii) 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 방법에 의해 생산된 정제된 폴리클로날 항-HCP 항체 제제.

청구항 9

제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플 내의 HCP를 검출, 모니터링, 식별 또는 정량화하는 방법이며,

- a) 제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 제공 또는 수득하고;
- b) 샘플을 제1항 또는 제2항의 방법에 의해 생산된 폴리클로날 항-HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션 하고;
- c) 고정화된 항체-HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고;
- d) 고정화된 항체-HCP 복합체를 HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고;
- e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 항체에 결합된 HCP의 존재를 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 검출가능한 항체는 i) 직접적으로 검출가능하거나, ii) 형광계 시약에 의해 증폭되거나, 또는 iii) 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, HCP는 CHO 세포 HCP인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, i) 제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래되거나, ii) 샘플은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래되거나, iii) 샘플은 제조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래되거나, 또는 iv) 방법은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 제조합 폴리펩티드는 모노클로날 항체, 예를 들어 치료용 항체인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2016년 4월 14일에 출원된 미국 가출원 번호 62/322,621을 우선권 주장하며, 그 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 개시내용은 산물, 예를 들어, 재조합 단백질, 예를 들어, 항체의 생산 동안 숙주 세포 단백질 불순물을 검출 및/또는 정량화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 숙주 세포 단백질 (HCP)은 다양한 제조 공정 후에 최종 산물 내에 존재할 수 있는 숙주 단백질들의 원치 않는 복합적인 혼합물이다. 특히, 이러한 HCP들은 산물 효능 및 환자 안전성에 위험을 일으킬 수 있다. 따라서, 최종 생물제약 산물 내의 HCP를 검출 및 정량화하는 방법이 요구된다.

발명의 내용

[0006] 본 개시내용은, 특히, HCP의 검출을 위한 고도로 감수성인 방법을 제공한다. 한 측면에서, 재조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플 내의 GS-CHO 숙주 세포 단백질 (HCP)을 검출, 모니터링, 식별 또는 정량화하는 방법이며, a) 재조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 항체에 결합된 GS-CHO HCP의 존재를 검출하고; f) 임의적으로, 검출된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; g) 임의적으로, 검출된 GS-CHO HCP 중 하나 이상을 식별하고; h) 임의적으로, 식별된 GS-CHO HCP 중 하나 이상을 정량화하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 개시된다.

[0007] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토카인, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.

[0008] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은

재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0009] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) 재조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; f) GS-CHO HCP의 수준이 미리 선택된 참조 수준 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하고, 이로써 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 가공은 폴리펩티드 제제를 제형화하는 것; 폴리펩티드 제제를 약물 제품으로 가공하는 것; 폴리펩티드 제제를 제2 성분, 예를 들어, 부형제 또는 완충제와 조합하는 것; 제제 내의 폴리펩티드의 농도를 변화시키는 것; 폴리펩티드 제제를 동결건조시키는 것; 제1 및 제2 분취량의 폴리펩티드를 조합하여 제3의 더 큰 분취량을 제공하는 것; 폴리펩티드 제제를 더 작은 분취량으로 분할하는 것; 폴리펩티드 제제를 용기, 예를 들어, 기체 또는 액체 밀폐 용기 내로 배치하는 것; 폴리펩티드 제제를 패키징하는 것; 폴리펩티드 제제를 포함하는 용기를 라벨과 회합시키는 것 (예를 들어, 라벨링); 폴리펩티드 제제를 다른 장소로 운송하는 것 또는 이동시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 가공 단계는 폴리펩티드 제제를 부형제 또는 완충제와 조합하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 약 100ppm (예를 들어, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 ppm 미만)이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm 내지 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 적어도 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm 이하이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준 미만의 GS-CHO HCP 수준은 약물 제품의 상업적 발매를 위한 사양이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준 미만의 GS-CHO HCP 수준은 공중 보건 서비스 (Public Health Service: PHS) 법령의 섹션 351(a) 하의 약물 제품의 상업적 발매를 위한 사양이다. 일부 실시양태에서, GS-CHO HCP의 수준은 1개, 2개, 또는 그 초과 샘플 또는 배치에 대해 취득된다.

[0012] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킴, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.

[0013] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0014] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) 재조합 폴리펩티드의 생산, 예를 들어, 발현 및 분비에 적합한 조건 하에 배양된 GS-CHO 세포를 배양하고; b) 분비된 재조합 폴리펩티드를 숙주 세포로부터 분리하고; c) 분비된 재조합 폴리펩티드를 하나 이상의 정제 단계에 적용하여 재조합 폴리펩티드 제제를 생산하고; d) 재조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; e) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; f) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO

HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; g) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; h) GS-CHO HCP의 수준이 미리 선택된 참조 수준 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하고, 이로써 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 가공은 폴리펩티드 제제를 제형화하는 것; 폴리펩티드 제제를 약물 제품으로 가공하는 것; 폴리펩티드 제제를 제2 성분, 예를 들어, 부형제 또는 완충제와 조합하는 것; 제제 내의 폴리펩티드의 농도를 변화시키는 것; 폴리펩티드 제제를 동결건조시키는 것; 제1 및 제2 분취량의 폴리펩티드를 조합하여 제3의 더 큰 분취량을 제공하는 것; 폴리펩티드 제제를 더 작은 분취량으로 분할하는 것; 폴리펩티드 제제를 용기, 예를 들어, 기체 또는 액체 밀폐 용기 내로 배치하는 것; 폴리펩티드 제제를 패키징하는 것; 폴리펩티드 제제를 포함하는 용기를 라벨과 회합시키는 것 (예를 들어, 라벨링); 폴리펩티드 제제를 다른 장소로 운송하는 것 또는 이동시키는 것 중 하나 이상을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 가공 단계는 폴리펩티드 제제를 부형제 또는 완충제와 조합하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 약 100ppm (예를 들어, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 ppm 미만)이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm 내지 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 적어도 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm 이하이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준 미만의 GS-CHO HCP 수준은 약물 제품의 상업적 발매를 위한 사양이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준 미만의 GS-CHO HCP 수준은 공중 보건 서비스 (PHS) 법령의 섹션 351(a) 하의 약물 제품의 상업적 발매를 위한 사양이다. 일부 실시양태에서, GS-CHO HCP의 수준은 1개, 2개, 또는 그 초과 샘플 또는 배치에 대해 취득된다.

[0017] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킨, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오티닐화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0019] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) GS-CHO 세포의 배양물로부터 재조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플 내의 GS-CHO 숙주 세포 단백질 (HCP)에 대한 값을 취득하며, 여기서 이러한 값은 폴리클로날 GS-CHO 항체가 샘플에 결합하는 것의 함수이거나, 이에 비례하거나, 또는 이에 의해 수득된 것이고, 이로써 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은, 예를 들어, 취득된 값을 참조 값과 비교함으로써, 취득된 값을 평가하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 평가에 반응하여, 제제를 분류하거나, 선별하거나, 수락하거나, 발매하거나, 약물 제품으로 가공하거나, 운송하거나, 다른 장소로 이동시키거나, 제형화하거나, 라벨링하거나, 패키징하거나, 상업용으로 발매하거나, 판매하거나, 또는 판매용으로 제공하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 값은 본원에 기재된 방법에 의해 결정되었다.

[0020] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킨, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다.

일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0022] 한 측면에서, 본 개시내용은 GS-CHO 숙주 세포에서 재조합 폴리펩티드를 제조하는 공정을 평가하는 방법이며, a) 재조합 폴리펩티드의 생산, 예를 들어, 발현 및 분비에 적합한 조건 하에 배양된 GS-CHO 세포를 배양하고, b) 분비된 재조합 폴리펩티드를 숙주 세포로부터 분리하여 제1 폴리펩티드 제제를 제공하고; c) 임의적으로, 제1 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; d) 제1 폴리펩티드 제제를 정제 단계에 적용하여 제2 폴리펩티드 제제를 생산하고; e) 제2 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; f) 임의적으로, 제2 폴리펩티드 제제를 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 정제 단계에 적용하여 후속 폴리펩티드 제제를 제공하고; g) 임의적으로, 단계 f)에서 제공된 임의의 후속 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; h) 각각의 취해진 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; i) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 각각의 샘플을 분리하고; j) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; k) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; l) 상기 정량화를 기반으로, 공정에 대한 결정을 내리고, 이로써 재조합 폴리펩티드의 제조 공정을 평가하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 방법은 GS-CHO HCP의 수준을 참조 수준에 비교하는 것, 예를 들어, 여기서 GS-CHO HCP의 수준이 참조 수준 미만이면, 공정을 재조합 폴리펩티드의 생산에서 사용하기 위해 검증하는 것을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 참조 수준은 i) 1ppm 내지 1000ppm, ii) 적어도 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm, 또는 iii) 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm 이하이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킨, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.

[0026] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0027] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드의 정제 공정을 평가하는 방법이며, a) 제1 폴리펩티드 제제를 정제 단계에 적용하여 제2 폴리펩티드 제제를 생산하고; b) 제2 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; c) 임의적으로, 제2 폴리펩티드 제제를 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 정제 단계에 적용하여 후속 폴리펩티드 제제를 제공하고; d) 임의적으로, 단계 c)에서 제공된 임의의 후속 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; e) 각각의 취해진 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; f) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 각각의 샘플을 분리하고; g) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; h) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; i) 상기 정량화를 기반으로, 공정에 대한 결정을 내리고, 이로써 재조합 치료제의 정제 공정을 평가하는 것을 포함하는 방법을

제공한다.

- [0028] 일부 실시양태에서, 방법은 GS-CHO HCP의 수준을 참조 수준에 비교하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, GS-CHO HCP의 수준이 참조 수준 미만이면, 공정을 재조합 폴리펩티드의 생산에서 사용하기 위해 검증한다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm 내지 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 적어도 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm이다. 일부 실시양태에서, 참조 수준은 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm 이하이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 정제 단계는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 이온 교환 크로마토그래피 (IEX), 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC), 역상 크로마토그래피 (RPC), 고정화된 금속 킬레이트 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 황친화성 흡착, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 단백질 L 크로마토그래피, 및 친화성 크로마토그래피 중 하나 이상 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 정제 단계는 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 단백질 A 크로마토그래피 및 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 단백질 A 크로마토그래피 및 CNBr 크로마토그래피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 단백질 A 크로마토그래피 및 후속 CNBr 크로마토그래피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 단백질 A 크로마토그래피 및 NHS 크로마토그래피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 정제 단계는 단백질 A 크로마토그래피 및 후속 NHS 크로마토그래피를 포함한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 정제 단계는 i) 단백질 A 크로마토그래피 및 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 단계, ii) 단백질 A 크로마토그래피 및 CNBr 크로마토그래피, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피 및 후속 CNBr 크로마토그래피, 또는 iii) 단백질 A 크로마토그래피 및 NHS 크로마토그래피, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피 및 후속 NHS 크로마토그래피를 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킨, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 1에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 표 2에 개시된 것이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 치료용 항체이다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 직접적으로 검출가능하다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 형광계 시약에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.
- [0034] 한 측면에서, a) 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체; b) 임의적으로, 검출가능한 항체; c) 임의적으로, 세척 완충제; 및 d) 임의적으로, 검출 시약을 포함하는 키트가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 검출 시약은 포획 시약과 동일하다. 일부 실시양태에서, 검출 시약은 형광계 시약에 의해 증폭되도록 단지 변형된 포획 시약과 동일하다. 일부 실시양태에서, 검출 항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.
- [0035] 한 측면에서, 폴리클로날 항-GS-CHO 항체의 정제된 제제가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 항-GS-CHO 항체는 양 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-GS-CHO 항체는 염소, 말, 토끼, 소, 뿔, 햄스터, 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 제제는 비-HCP 특이적 IgG를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제제는 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다. 일부 실시양태에서, 제제는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다. 일부 실시양태에서, 단백질 A 크로마토그래피, 및 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 단계 (예를 들어, CNBr 크로마토그래피, NHS 크로마토그래피)를 포함하는 방법에 의해 정제된다.
- [0036] 한 측면에서, 항-GS-CHO 항체의 폴리클로날 제제 (예를 들어, 본원에 기재된 폴리클로날 제제) 및 표 1 또는 표

2로부터 선택된 제조합 폴리펩티드를 포함하는 반응 혼합물이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 항-GS-CHO 항체에 결합하는 항체를 포함한다.

[0037] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드 약물 제품의 배치 또는 로트가 GS-CHO HCP의 미리 선택된 참조 수준인 발매 사양을 만족 또는 충족시키는지 여부를 결정하는 방법이며, a) 제조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; f) GS-CHO HCP의 수준이 발매 사양을 만족시키거나, 충족시키거나, 또는 발매 사양 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하고, 이로써 제조합 폴리펩티드 약물 제품의 배치 또는 로트가 발매 사양을 만족 또는 충족시키는지 여부를 결정하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 가공은 제제를 분류하거나, 선별하거나, 수락하거나, 발매하거나, 약물 제품으로 가공하거나, 운송하거나, 다른 장소로 이동시키거나, 제형화하거나, 라벨링하거나, 패키징하거나, 상업용으로 발매하거나, 판매하거나, 또는 판매용으로 제공하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 값은 본원에 기재된 방법에 의해 결정되었다.

[0038] 한 측면에서, 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 제조하는 방법이며, a) 숙주 세포 (예를 들어, 세포주, 예를 들어, 포유동물, 설치류, 또는 곤충 세포 또는 세포주, 예를 들어, CHO, SP2, NSO 숙주 세포)의 HCP로 면역화된 동물 (예를 들어, 양, 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 염소 등)로부터 항체를 포함하는 샘플, 예를 들어, 항혈청을 취득하고; b) 예를 들어, 샘플을 HCP-친화성 시약과 접촉시킴으로써, 항-HCP 항체를 샘플로부터 분리하고, 이로써 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 생산하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 개시된다.

[0039] 일부 실시양태에서, 단계 b)는 b.1) 항체, 예를 들어, IgG 항체를 샘플로부터 분리하여 항체 제제를 제공하는 것; 및 b.2) 항-HCP 항체를 항체 제제로부터 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체를 분리하는 것은 항체를 친화성 시약, 예를 들어, 단백질 A와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체를 분리하는 것은 단백질 A 크로마토그래피를 포함하는 정제 방법을 통해 항혈청으로부터 폴리클로날 항-HCP 항체를 정제하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-HCP 항체를 항체 제제로부터 분리하는 것은 항체 제제를 HCP-친화성 시약과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, HCP-친화성 시약은 기관, 예를 들어, 불용성 또는 고체 기관, 예를 들어, 아가로스 비드, 예를 들어, 세파로스, 예를 들어, 브롬화시안 (CNBr) 또는 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 크로마토그래피) 유도체화 기관에 커플링된 HCP를 포함한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 정제는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 적어도 99%의 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과와 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 99% 초과와 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 비-HCP 특이적 IgG를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다.

[0041] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드 제제 내의 HCP를 검출하기 위한 ELISA에서 사용하기 위한 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 제조하는 방법이며, a) 숙주 세포 (예를 들어, 세포주, 예를 들어, 포유동물, 설치류, 또는 곤충 세포 또는 세포주, 예를 들어, CHO, SP2, NSO 숙주 세포)의 HCP로 면역화된 동물 (예를 들어, 양, 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 염소 등)로부터 항체를 포함하는 샘플, 예를 들어, 항혈청을 취득하고; b) 항혈청을 단백질 A 친화성 시약과 접촉시킴으로써 항체를 항혈청으로부터 분리하여 항체 제제를 제공하고; c) 항체 제제를 HCP-친화성 시약과 접촉시킴으로써 항-HCP 항체를 항체 제제로부터 분리하고, 이로써 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 생산하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0042] 일부 실시양태에서, 정제는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 적어도 99%의 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과와 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 정제는 99% 초과와 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 비-HCP 특이적 IgG를 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다. 일부 실시

양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다.

[0043] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플 내의 숙주 세포 단백질 (HCP) (예를 들어, CHO HCP)을 검출, 모니터링, 식별 또는 정량화하는 방법이며, a) 제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-HCP 항체 (예를 들어, 항-CHO HCP 항체)와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-HCP 복합체를 형성하며, 여기서 폴리클로날 항체는 임의의 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 것이고; c) 고정화된 항체-HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 항체에 결합된 HCP의 존재를 검출하고; f) 임의적으로, 검출된 HCP의 수준을 정량화하고; g) 임의적으로, 검출된 HCP 중 하나 이상을 식별하고; h) 임의적으로, 식별된 HCP 중 하나 이상을 정량화하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0044] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드, 예를 들어, 치료용 폴리펩티드를 포함하는 샘플 내의 GS-CHO 숙주 세포 단백질 (HCP)을 검출, 모니터링, 식별 또는 정량화하는 방법이며, a) 제조합 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 지지체, 예를 들어, 불용성 또는 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 검출가능한 시약, 예를 들어, GS-CHO HCP에 결합하는 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 항체에 결합된 GS-CHO HCP의 존재를 검출하고; f) 임의적으로, 검출된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; g) 임의적으로, 검출된 GS-CHO HCP 중 하나 이상을 식별하고; h) 임의적으로, 식별된 GS-CHO HCP 중 하나 이상을 정량화하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0045] 일부 실시양태에서, i) 제조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킴, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이거나, 또는 ii) 제조합 폴리펩티드는 표 1 또는 2에 개시된 것이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 제조합 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체, 예를 들어, 치료용 항체이다.

[0047] 일부 실시양태에서, i) 샘플은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래되거나, ii) 샘플은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래되거나, iii) 샘플은 제조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래되거나, 또는 iv) 방법은 제조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 i) 직접적으로 검출가능하거나, ii) 형광계 시약에 의해 증폭되거나, 또는 iii) 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.

[0049] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드 약물 제품, 예를 들어, 치료용 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) 제조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; f) GS-CHO HCP의 수준이 미리 선택된 참조 수준 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하며, 임의적으로 여기서 가공은 폴리펩티드 제제를 제형화하는 것; 폴리펩티드 제제를 약물 제품으로 가공하는 것; 폴리펩티드 제제를 제2 성분, 예를 들어, 부형제 또는 완충제와 조합하는 것; 제제 내의 폴리펩티드의 농도를 변화시키는 것; 폴리펩티드 제제를 동결건조시키는 것; 제1 및 제2 분취량의 폴리펩티드를 조합하여 제3의 더 큰 분취량을 제공하는 것; 폴리펩티드 제제를 더 작은 분취량으로 분할하는 것; 폴리펩티드 제제를 용기, 예를 들어, 기체 또는 액체 밀폐 용기 내로 배치하는 것; 폴리펩티드 제제를 패키징하는 것; 폴리펩티드 제제를 포함하는 용기를 라벨과 회합시키는 것 (예를 들어, 라벨링); 폴리펩티드 제제를 다른 장소로 운송하는 것 또는 이동시키는 것 중 하나 이상을 포함하는 것이고, 이로써 제조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

- [0050] 한 측면에서, 재조합 폴리펩티드 약물 제품, 예를 들어, 치료용 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) 재조합 폴리펩티드의 생산, 예를 들어, 발현 및 분비에 적합한 조건 하에 배양된 GS-CHO 세포를 배양하고, b) 분비된 재조합 폴리펩티드를 숙주 세포로부터 분리하고; c) 분비된 재조합 폴리펩티드를 하나 이상의 정제 단계에 적용하여 재조합 폴리펩티드 제제를 생산하고; d) 재조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 취하고; e) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; f) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; g) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; h) GS-CHO HCP의 수준이 미리 선택된 참조 수준 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하며, 임의적으로 여기서 가공은 폴리펩티드 제제를 제형화하는 것; 폴리펩티드 제제를 약물 제품으로 가공하는 것; 폴리펩티드 제제를 제2 성분, 예를 들어, 부형제 또는 완충제와 조합하는 것; 제제 내의 폴리펩티드의 농도를 변화시키는 것; 폴리펩티드 제제를 동결건조시키는 것; 제1 및 제2 분취량의 폴리펩티드를 조합하여 제3의 더 큰 분취량을 제공하는 것; 폴리펩티드 제제를 더 작은 분취량으로 분할하는 것; 폴리펩티드 제제를 용기, 예를 들어, 기체 또는 액체 밀폐 용기 내로 배치하는 것; 폴리펩티드 제제를 패키징하는 것; 폴리펩티드 제제를 포함하는 용기를 라벨과 회합시키는 것 (예를 들어, 라벨링); 폴리펩티드 제제를 다른 장소로 운송하는 것 또는 이동시키는 것 중 하나 이상을 포함하는 것이고, 이로써 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 참조 수준은 i) 약 100ppm (예를 들어, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 ppm 미만), ii) 1ppm 내지 1000ppm, iii) 적어도 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm, 또는 iv) 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, 또는 1000ppm 이하이다.
- [0052] 일부 실시양태에서, 참조 수준 미만의 GS-CHO HCP 수준은 약물 제품의 상업적 발매를 위한 사양, 예를 들어, 공중 보건 서비스 (PHS) 법령의 섹션 351(a) 하의 것이고, 임의적으로 여기서 GS-CHO HCP의 수준은 1개, 2개, 또는 그 초과 샘플 또는 배치에 대해 취득된다.
- [0053] 일부 실시양태에서, i) 재조합 폴리펩티드는 동종중합체성 또는 이종중합체성 폴리펩티드, 예를 들어, 호르몬, 성장 인자, 수용체, 항체, 시토킨, 수용체 리간드, 전사 인자 또는 효소, 바람직하게는 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 그의 단편, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양 또는 소 항체로부터 유래된 인간화 항체 또는 그의 단편, 전형적으로 토끼 기원의 것이거나, 또는 ii) 재조합 폴리펩티드는 표 1 또는 2에 개시된 것이다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체, 예를 들어, 치료용 항체이다.
- [0055] 일부 실시양태에서, i) 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하류 가공 단계로부터 유래되거나, ii) 샘플은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 상류 가공 단계로부터 유래되거나, iii) 샘플은 재조합 폴리펩티드의 최종 산물로부터 유래되거나, 또는 iv) 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 하나 이상의 단계로부터 유래된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 10개 초과 샘플을 포함한다.
- [0056] 일부 실시양태에서, 검출가능한 항체는 i) 직접적으로 검출가능하거나, ii) 형광계 시약에 의해 증폭되거나, 또는 iii) 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘이다.
- [0057] 한 측면에서, 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 방법이며, a) GS-CHO 세포의 배양물로부터 재조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플 내의 GS-CHO 숙주 세포 단백질 (HCP)에 대한 값을 취득하고; c) 임의적으로, 예를 들어, 취득된 값을 참조 값과 비교함으로써, 취득된 값을 평가하고; d) 임의적으로, 평가에 반응하여, 제제를 분류하거나, 선별하거나, 수락하거나, 발매하거나, 약물 제품으로 가공하거나, 운송하거나, 다른 장소로 이동시키거나, 제형화하거나, 라벨링하거나, 패키징하거나, 상업용으로 발매하거나, 판매하거나, 또는 판매용으로 제공하며, 여기서 이러한 값은 폴리클로날 GS-CHO 항체가 샘플에 결합하는 것의 함수이거나, 이에 비례하거나, 또는 이에 의해 수득된 것이고, 이로써 재조합 폴리펩티드 약물 제품을 제조하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 값은 임의의 본원에 기재된 방법에 의해 결정되었다.
- [0059] 한 측면에서, a) 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체; b) 임의적으로, 검출가능한 항체; c) 임의적으로, 세척 완충제; 및 d) 임의적으로, 검출 시약, 예를 들어, 포획 시약과 동일하거나 또는 형광계 시약에 의해 증폭되도록 단지 변형된 포획 시약과 동일한 검출 시약을 포함하는 키트이며, 임의적으로 여기서 검출

항체는 비오틴화되고, 검출 수단은 아비딘 또는 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘인 키트가 본원에 개시된다.

[0060] 한 측면에서, 폴리클로날 항-GS-CHO 항체의 정제된 제제이며, 임의적으로 여기서 항-GS-CHO 항체는 양, 염소, 말, 토끼, 소, 무린, 햄스터 또는 인간 항체인 제제가 본원에 개시된다.

[0061] 일부 실시양태에서, 제제는 비-HCP 특이적 IgG를 실질적으로 함유하지 않고, 예를 들어, 제제는 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유하거나 또는 제제는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다.

[0062] 한 측면에서, 제조합 폴리펩티드 약물 제품의 배치 또는 로트가 GS-CHO HCP의 미리 선택된 참조 수준인 발매 사양을 만족 또는 충족시키는지 여부를 결정하는 방법이며, a) 제조합 폴리펩티드 제제의 샘플을 제공 또는 수득하고; b) 샘플을 고체 지지체에 고정화된 폴리클로날 항-GS-CHO HCP 항체와 접촉시키고 그와 함께 인큐베이션하여 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 형성하고; c) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체로부터 샘플을 분리하고; d) 고정화된 항체-GS-CHO HCP 복합체를 GS-CHO HCP에 결합하는 검출가능한 항체와 접촉시키고; e) 검출가능한 항체에 대한 검출 수단을 사용하여 포획 시약에 결합된 GS-CHO HCP의 수준을 정량화하고; f) GS-CHO HCP의 수준이 발매 사양을 만족시키거나, 충족시키거나, 또는 발매 사양 미만이면, 제제의 적어도 일부분을 약물 제품으로서 가공하며, 임의적으로 여기서 가공은 제제를 분류하거나, 선별하거나, 수락하거나, 발매하거나, 약물 제품으로 가공하거나, 운송하거나, 다른 장소로 이동시키거나, 제형화하거나, 라벨링하거나, 패키징하거나, 상업용으로 발매하거나, 판매하거나, 또는 판매용으로 제공하는 것을 포함하는 것이고, 이로써 제조합 폴리펩티드 약물 제품의 배치 또는 로트가 발매 사양을 만족 또는 충족시키는지 여부를 결정하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0063] 한 측면에서, 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 제조하는 방법이며, a) 숙주 세포 (예를 들어, 세포주, 예를 들어, 포유동물, 설치류, 또는 곤충 세포 또는 세포주, 예를 들어, CHO, SP2, NSO 숙주 세포)의 HCP로 면역화된 동물 (예를 들어, 양, 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 염소 등)로부터 항체를 포함하는 샘플, 예를 들어, 항혈청을 취득하고; b) 예를 들어, 샘플을 HCP-친화성 시약, 예를 들어, 단백질 A와 접촉시킴으로써, 항-HCP 항체를 샘플로부터 분리하고, 임의적으로 여기서 b)는 b.1) 항체, 예를 들어, IgG 항체를 샘플로부터 분리하여 항체 제제를 제공하는 것; 및 b.2) 예를 들어, 항체 제제를 HCP-친화성 시약과 접촉시킴으로써, 항-HCP 항체를 항체 제제로부터 분리하는 것을 포함하는 것이고, 이로써 폴리클로날 항-HCP 항체 제제를 생산하는 것을 포함하는 것인 방법이 본원에 개시된다.

[0064] 일부 실시양태에서, 정제는 i) 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 비-HCP 특이적 IgG, 예를 들어, 적어도 99%의 비-HCP 특이적 IgG, 또는 ii) 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과인 비-HCP 특이적 IgGs, 예를 들어, 99% 초과인 비-HCP 특이적 IgG를 제거한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 폴리클로날 항체 제제는 비-HCP 특이적 IgG를 실질적으로 함유하지 않고, 예를 들어, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하의 비-HCP 특이적 IgG를 함유하거나 또는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 미만의 비-HCP 특이적 IgG를 함유한다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 양 GS-CHO HCP 항체에 대한 예시적인 정제 공정을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 제조합 생물제약 단백질이 인간 환자에게 투여하는 것에 대해 허용될 수 있기 위해, 제조 및 정제 공정으로부터 초래되는 잔류 오염물이 최종 생물학적 산물로부터 제거되는 것이 중요하다. 이러한 공정 오염물은 배양 배지 단백질, 면역글로불린 친화성 리간드, 바이러스, 내독소, DNA, 및 숙주 세포 단백질 (HCP)을 포함한다. HCP는 면역 반응, 아주번트 활성, 직접적인 생물학적 활성 또는 산물 상호작용/분해를 포함하는 산물의 안전성 프로파일에 영향을 미칠 수 있는 광범위한 바람직하지 않은 효과를 생성시킬 수 있다. 이러한 숙주 세포 오염물은 공정-특이적 HCP를 포함하고, 이는 제조합 DNA 기술로부터 유래된 생물제제 내의 공정-관련 불순물/오염물이다.

[0068] 미국 및 외국 규정은 종종 이같은 오염물의 제거를 요구한다. 예를 들어, 미국 식품의약청(Food and Drug Administration) (FDA)은 생체내 인간 용도로 의도되는 생물약제에 외래 면역글로불린 및 비-면역글로불린 오염물이 가능한 한 없어야 하는 것을 요구하고, 잠재적인 오염물, 예컨대 HCP의 검출 및 정량화를 위한 테스트를

요구한다. 국제 조화 협의회(International Conference on Harmonization) (ICH)는 생물공학적/생물학적 산물용 테스트 절차 및 허용 기준에 대한 지침을 제공한다. 이러한 지침은 HCP에 대해, 광범위한 단백질 불순물을 검출할 수 있는 감수성 면역검정법을 이용할 것을 제안한다. 면역글로불린, DNA, 내독소, 바이러스 등을 검출하는데 이용가능한 상업적인 검정법 및 시약이 있지만, 현재는 세포주 특이적 GS-CHO HCP의 검출 및 정량화에 이용가능한 상업적인 시약 또는 분석 방법이 없다.

[0069] 본 개시내용은, 특히, 다중 발현 시스템 (예를 들어, 포유동물 발현 시스템, 예를 들어, CHOK1SV 발현 시스템을 포함함)을 지지하기 위한 강건하고 감수성인 HCP ELISA 플랫폼 검정법 및 사용 방법을 제공한다. HCP ELISA 방법의 품질은 2개의 파라미터인 (1) 정량 한계 (LOQ), 및 (2) 오염물로서 존재할 수 있는 HCP의 백분율 커버리지에 의해 주로 정의된다. 현재 이용가능한 HCP ELISA는 스팟 카운팅에 의해 200 ng/ml - 1000 ng/mg의 LOQ 및 40% - 60%의 커버리지를 제공한다. 본원에 기재된 ELISA는 스팟 매칭 (스팟 카운팅보다 더 양호한 접근법임)에 의해 2 ng/mg의 LOQ 및 71% 커버리지를 제공하여, 이러한 파라미터들 둘 다를 만족시킨다. 이러한 플랫폼 검정법은 안정적인 세포주 및 공정 (예를 들어, GS-CHO)으로부터의 상이한 산물들 내의 HCP 검출을 지지할 수 있다.

[0070] 정의

[0071] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행에서 및/또는 본 발명의 테스트를 위해 사용될 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법이 본원에 기재된다. 본 발명을 기재하고 청구하는데 있어서, 정의가 제공되는 경우에, 하기의 전문용어가 어떻게 정의되는지에 따라 사용될 것이다.

[0072] 본원에 사용된 전문용어는 특정한 실시양태만을 기재하기 위한 것이고, 제한적으로 의도되지 않는다는 것을 또한 이해하여야 한다.

[0073] 단수형은 1개 또는 1개 초과 (즉, 적어도 1개)의 문법적 대상물을 지칭하도록 본원에서 사용된다. 예를 들어, "세포"는 1개의 세포 또는 1개를 초과하는 세포를 의미할 수 있다.

[0074] 본원에서 사용된 경우, 용어 "숙주 세포 단백질" 또는 "HCP"는 재조합 폴리펩티드 산물을 생산하는데 사용된 생물에 의해 생산 또는 코딩되고, 의도된 재조합 산물에 관련되지 않은 임의의 단백질을 지칭한다. HCP는 최종 약물 물질에서 바람직하지 않다.

[0075] 본원에서 사용된 경우, 용어 "GS-CHO"는 재조합 글루타티온 신테타제 (GS)를 발현하는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 지칭한다. 예를 들어, CHO-K1SV GS (론자 바이올로지스 인크.(Lonza Biologics, Inc.)).

[0076] 본원에서 사용된 경우, 용어 "GS-CHO HCP"는 GS-CHO 세포로부터 유래된 숙주 세포 단백질을 지칭한다.

[0077] 본원에서 사용된 경우, 용어 "내인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의 것이거나 또는 그의 내부에서 천연적으로 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0078] 본원에서 사용된 경우, 용어 "외인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로 도입되거나 또는 그의 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다. 따라서, "외인성 핵산"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로 도입되거나 그의 외부에서 생산되는 핵산을 지칭한다. 한 실시양태에서, 외인성 핵산의 서열은 외인성 핵산이 도입되는 생물, 세포, 조직 또는 시스템의 내부에서 천연적으로 생산되지 않거나 또는 천연적으로 발견될 수 없다. 한 실시양태에서, 외인성 핵산의 서열은 비-천연 발생 서열이거나, 또는 비-천연 발생 산물을 코딩한다.

[0079] 본원에서 사용된 경우, 용어 "이종성"은 상이한 종으로부터의 생물, 세포, 조직 또는 시스템에 도입될 때의 한 종으로부터의 임의의 물질을 지칭한다.

[0080] 본원에서 사용된 경우, 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드", 또는 "핵산 분자"는 상호교환가능하게 사용되고, 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 또는 그의 DNA 또는 RNA의 조합물, 및 단일- 또는 이중-가닥 형태의 그의 중합체를 지칭한다. 용어 "핵산"은 유전자, cDNA, 또는 mRNA를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 합성이거나 (예를 들어, 화학적으로 합성되거나 또는 인공적임), 또는 재조합이다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이러한 용어는 참조 핵산과 결합 성질이 유사하고 천연 또는 비-천연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는, 천연 뉴클레오티드의 유사체 또는 유도체를 함유하는 분자를 포괄한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 명백하게 지시된 서열뿐만 아니라, 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 또는 오르토로그, SNP, 및 상보적 서열을 또한 함축적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는

테옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성시킴으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).

[0081] 본원에서 사용된 경우, 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 상호교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 또는 펩티드 결합 이외의 수단에 의해 공유결합으로 연결된 아미노산 잔기들로 이루어진 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유하여야 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 이룰 수 있는 아미노산들의 최대 개수는 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 단백질은 1개 초과, 예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 초과인 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서 각각의 폴리펩티드는 공유 또는 비-공유 결합/상호작용에 의해 서로 회합된다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 또는 펩티드 결합 이외의 수단에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용된 경우, 이러한 용어는 짧은 사슬 (예를 들어, 통상적으로 관련 기술분야에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 지칭됨), 및 더 긴 사슬 (일반적으로 관련 기술분야에서 단백질로 지칭되고, 다수의 유형이 있음) 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는, 예를 들어, 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질 등을 특히 포함한다.

[0082] 본원에서 사용된 경우, "산물"은 산물을 생산하도록 변형 또는 조작된 세포에 의해 생산된, 예를 들어, 발현된 분자, 핵산, 폴리펩티드, 또는 그의 임의의 하이브리드를 지칭한다. 한 실시양태에서, 산물은 천연 발생 산물 또는 비-천연 발생 산물, 예를 들어, 합성 산물이다. 한 실시양태에서, 산물의 일부는 천연 발생인 한편, 산물의 또 다른 일부는 비-천연 발생이다. 한 실시양태에서, 산물은 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 산물은 진단 또는 전-임상 용도에 적합하다. 또 다른 실시양태에서, 산물은 치료 용도, 예를 들어, 질환 치료에 적합하다. 한 실시양태에서, 산물은 표 1 또는 표 2로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 변형 또는 조작된 세포는 발현을 제어하거나 또는 산물을 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 변형 또는 조작된 세포는 세포 내에서의 산물의 발현 또는 구축을 제어하는 다른 분자, 예를 들어, 핵산이 아닌 것을 포함한다.

[0083] 한 실시양태에서, 세포의 변형은 내인성 핵산 서열, 예를 들어, 내인성 유전자의 발현을 제어하거나 변경시키는, 예를 들어, 증가시키는 핵산 서열을 포함하는 외인성 핵산의 도입을 포함한다. 이같은 실시양태에서, 변형된 세포는 세포에 의해 천연적으로 또는 내인성으로 발현되는 내인성 폴리펩티드 산물을 생산하지만, 변형이 미변형 세포에 비교하여, 예를 들어, 폴리펩티드의 내인성 생산 또는 품질에 비교하여 산물의 생산 및/또는 산물의 품질을 증가시킨다.

[0084] 또 다른 실시양태에서, 세포의 변형은 본원에 기재된 바와 같은 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산의 도입을 포함한다. 이같은 실시양태에서, 변형된 세포는 천연 발생 또는 비-천연 발생일 수 있는 재조합 폴리펩티드 산물을 생산한다. 이같은 실시양태에서, 변형된 세포는 세포에 의해 내인성으로 또한 생산될 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있는 재조합 폴리펩티드 산물을 생산한다. 재조합 폴리펩티드 산물이 세포에 의해 내인성으로 또한 발현되는 실시양태에서, 변형은 미변형 세포에 비교하여, 예를 들어, 폴리펩티드의 내인성 생산 또는 품질에 비교하여 산물의 생산 및/또는 산물의 품질을 증가시킨다.

[0085] 본원에서 사용된 경우, "재조합 폴리펩티드" 또는 "재조합 단백질"은 본원에 기재된 세포에 의해 생산될 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 재조합 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 발현을 제어하는 서열의 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 (세포 또는 전구체 세포의) 유전자 조작에 의해 형성된 것이다. 예를 들어, 적어도 하나의 뉴클레오타이드가 변경되었고, 예를 들어, 세포 내로 도입되었거나 또는 유전자 조작 재배열의 산물이다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 서열은 폴리펩티드 또는 단백질의 천연 발생 이소형과 상이하지 않다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 또는 단백질의 천연 발생 이소형의 서열과 상이하다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드 및 세포는 동일한 종으로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 세포에 대해 내인성이고, 달리 말하면, 세포가 제1 종으로부터의 것이고, 재조합 폴리펩티드가 이러한 제1 종에 대해 선천적이다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 세포의 내인성 게놈이 코딩하는 폴리펩티드와 동일하거나 또는 실질적으로 동일하거나, 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 이하만큼 상이하다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드 및 세포는 상이한 종들로부터의 것이고, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드이고, 세포는 비-인간, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, CHO, 또는 곤충 세포이다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 세포에 대해 외인성

이고, 달리 말하면, 세포는 제1 종으로부터의 것이고, 재조합 폴리펩티드는 제2 종으로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 합성 폴리펩티드이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 비-천연 발생 공급원으로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드 또는 단백질의 천연 발생 이소형과 아미노산 서열 면에서 상이하지 않은 인간 폴리펩티드 또는 단백질이다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드 또는 단백질의 천연 발생 이소형과 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 또는 20개 이하의 아미노산 잔기에서 상이하다. 한 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드는 인간 폴리펩티드의 천연 발생 이소형과 그의 아미노산 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 15% 이하만큼 상이하다.

[0086] 본원에서 사용된 경우의 용어 "취득하다" 또는 "취득하는 것"은 물리적 실체 또는 값을 "직접적으로 취득하는 것" 또는 "간접적으로 취득하는 것"에 의해 물리적 실체, 또는 값, 예를 들어, 수치를 입수하는 것을 지칭한다. "직접적으로 취득함"은 물리적 실체 또는 값을 수득하는 공정을 수행하는 것 (예를 들어, 합성 또는 분석 방법을 수행하는 것)을 의미한다. "간접적으로 취득하는 것"은 또 다른 단체 또는 공급원 (예를 들어, 물리적 실체 또는 값을 직접적으로 취득한 제3자의 실험실)으로부터 물리적 실체 또는 값을 수여받는 것을 지칭한다. 물리적 실체를 직접적으로 취득하는 것은 물리적 물질, 예를 들어, 출발 물질의 물리적 변화를 포함하는 공정을 수행하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 2개 이상의 출발 물질로부터 물리적 실체를 제조하는 것, 물질을 전단하거나 단편화시키는 것, 물질을 분리 또는 정제하는 것, 2개 이상의 별개의 실체를 혼합물로 조합하는 것, 공유 또는 비-공유 결합을 절단하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 값을 직접적으로 획득하는 것은 샘플 또는 또 다른 물질의 물리적 변화를 포함하는 공정을 수행하는 것, 예를 들어, 물질, 예를 들어, 샘플, 피분석물 또는 시약의 물리적 변화를 포함하는 분석 공정 (때때로 본원에서 "물리적 분석"으로 지칭됨)을 수행하는 것, 분석 방법, 예를 들어, 하기 중 하나 이상을 포함하는 방법을 수행하는 것을 포함한다: 물질, 예를 들어, 피분석물 또는 그의 단편 또는 다른 유도체를 또 다른 물질로부터 분리 또는 정제하는 것; 피분석물 또는 그의 단편 또는 다른 유도체를 또 다른 물질, 예를 들어, 완충제, 용매 또는 반응물과 조합하는 것; 또는, 예를 들어, 피분석물의 제1 원자와 제2 원자 사이의 공유 또는 비-공유 결합을 절단하거나 형성함으로써, 피분석물 또는 그의 단편 또는 다른 유도체의 구조를 변화시키는 것; 또는, 예를 들어, 시약의 제1 원자와 제2 원자 사이의 공유 또는 비-공유 결합을 절단하거나 형성함으로써, 시약 또는 그의 단편 또는 다른 유도체의 구조를 변화시키는 것.

[0087] 본원에서 사용된 경우의 용어 "샘플을 취득하는 것"은 샘플을 "직접적으로 취득하는 것" 또는 "간접적으로 취득하는 것"에 의해 샘플, 예를 들어, 조직 샘플 또는 핵산 샘플을 입수하는 것을 지칭한다. "샘플을 직접적으로 취득하는 것"은 샘플을 수득하는 공정을 수행하는 것 (예를 들어, 물리적 방법 예컨대 수술 또는 추출을 수행하는 것)을 의미한다. "샘플을 간접적으로 취득하는 것"은 또 다른 단체 또는 공급원 (예를 들어, 샘플을 직접적으로 취득한 제3자의 실험실)으로부터 샘플을 수여받는 것을 지칭한다. 샘플을 직접적으로 취득하는 것은 물리적 물질, 예를 들어, 출발 물질, 예컨대 조직, 예를 들어, 인간 환자 내의 조직 또는 이전에 환자로부터 단리된 조직의 물리적 변화를 포함하는 공정을 수행하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 출발 물질로부터 물리적 실체를 제조하는 것, 조직을 절개하거나 끊어내는 것; 물질 (예를 들어, 샘플 조직 또는 핵산 샘플)을 분리 또는 정제하는 것; 2개 이상의 별개의 실체를 혼합물로 조합하는 것; 공유 또는 비-공유 결합을 절단하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 샘플을 직접적으로 취득하는 것은, 예를 들어, 상기에서 기재된 바와 같이, 샘플 또는 또 다른 물질의 물리적 변화를 포함하는 공정을 수행하는 것을 포함한다.

[0088] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "하류 가공 단계"는 선택된 분리 단계 후/뒤에, 예를 들어, 재조합 단백질 산물을 함유하는 배지로부터 세포를 분리한 후/뒤에 이어지는 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 임의의 단계를 지칭한다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "상류 가공 단계"는 선택된 분리 단계에 선행하거나 그 전인, 예를 들어, 세포 함유 배지로부터 재조합 단백질 산물을 분리하기 전인 재조합 폴리펩티드의 생산 공정의 임의의 단계를 지칭한다.

[0090] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "최종 산물"은 다른 세포 성분으로부터 실질적으로 정제된 재조합 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 최종 산물은 보관, 운송 및/또는 약물로서의 사용을 위해 제형화된 재조합 폴리펩티드이다.

[0091] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생산 공정"은 재조합 폴리펩티드를 생산하는 방법 또는 일련의 단계를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 생산 공정은 재조합 폴리펩티드를 생산하도록 디자인된 제조 공정이다. 일부 실시양태에서, 생산 공정은 재조합 폴리펩티드를 정제하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 생산 공정은 평가 단계, 분

석 단계, 및/또는 상기 평가 및 분석을 기반으로 하는 결정 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생산 공정의 최종 산물은 약물로서 사용하기 위해 제형화된 제조합 폴리펩티드이다.

[0092] 본원에서 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시내용은 이에 의해 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명이 구체적인 측면들을 참조로 개시되었지만, 본 발명의 다른 측면 및 변형이 본 발명의 진정한 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 의해 구상될 수 있다는 것이 명백하다. 첨부된 특허청구범위는 모든 이같은 측면 및 등가의 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

[0093] **공정의 일반적인 설명**

[0094] 본원에 기재된 방법은 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA)으로 특징화될 수 있다. 일반적인 ELISA 방법 및 ELISA 변형이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 하기는 본원에 기재된 방법의 일반적인 설명이고, 이는 단지 방법에서 수반되는 단계들의 시각표를 설명하기 위한 것이다. 개시내용은 어떠한 방식으로든 이러한 설명에 제한 또는 한정되지 않아야 한다. 성분들은 단지 설명을 목적으로 기재된다.

[0095] 코팅제 (예를 들어, 항-GS-CHO HCP 항체)가 고체 지지체 (예를 들어, 미량역가 플레이트) 상에 고정화된다. 코팅제가 고체 지지체 상에 고정화되었으면, 고체 지지체 상의 나머지 결합 부위가 차단 완충제 (예를 들어, 1X DPBS 내의 0.2% 카세인)를 사용하여 차단된다. 차단 완충제는 고체 지지체에 비-특이적으로 결합하여 개방 결합 부위를 포화시킬 수 있는 성분을 함유하고, 따라서 유리 리간드가 고체 지지체 상의 임의의 과량의 부위에 결합하는 것을 방지한다. 코팅 및 차단 인큐베이션 기간의 구체적인 조건은 고체 지지체의 코팅을 최대화하도록 선택되고, 변동이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 고체 지지체의 코팅 및 차단 후, 분석될 표준물질 및/또는 샘플 (예를 들어, HCP에 대해 테스트 중인 샘플)이 적합한 희석 완충제 (예를 들어, 1X DPBS 내의 0.2% 카세인)에 적절하게 희석되고, 고정화된 지지체에 첨가된다. 표준물질/샘플 인큐베이션 기간의 구체적인 조건은 검정법의 감수성을 최대화하고 해리를 최소화하도록 선택되고, 변동이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0096] 고체 지지체를 적합한 세척 완충제 (예를 들어, 1X DPBS 내의 0.05% 트윈(Tween)® 20)로 적합한 횟수 (예를 들어, 300 μ l로 3X)로 세척함으로써 임의의 고정화되지 않은 표준물질/샘플 (예를 들어, HCP)이 제거된다. 임의의 세척 단계에서의 구체적인 세척 완충제 및 세척 횟수는 배경을 최소화하고 감수성을 최대화하도록 선택되고, 변형이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 그 후, 임의의 고정화된 표준물질/샘플이 간접적으로 또는 직접적으로 검출될 수 있다. 간접 검출을 위해, 표준물질/샘플 내의 관심 항원에 대한 항체 (1차 항체) (예를 들어, 항-GS-CHO HCP 항체)가 고체 지지체에 첨가되고, 인큐베이션 조건은 신호 증폭을 최대화하도록 선택된다. 그 후, 고체 지지체를 적합한 세척 완충제로 적합한 횟수로 세척함으로써 임의의 고정화되지 않은 항체가 제거된다. 그 후, 일부 수단 (검출 항체)에 의해 검출가능한 모이어티에 접합되고, 샘플 내의 고정화된 표준물질 또는 HCP에 결합할 수 있는 항체가 고체 지지체에 첨가된다. 그 후, 고체 지지체를 적합한 세척 완충제로 적합한 횟수로 세척함으로써 임의의 미결합 검출 항체가 제거된다. 사용된 검출 항체와 상용성인 검출 시스템을 사용하여 코팅제에 결합된 표준물질/샘플 내의 관심 항원 (예를 들어, HCP)의 수준을 결정할 수 있다. 적합한 검출 수단이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다.

[0097] 표준물질/샘플 내의 관심 항원의 직접적인 검출이 사용되는 경우, 1차 항체가 일부 수단에 의해 검출가능한 모이어티에 접합되고, 따라서 또한 검출 항체이며, 즉, 1차 항체 및 검출 항체가 동일하다. 그 후, 고체 지지체를 적합한 세척 완충제로 적합한 횟수로 세척함으로써 임의의 미결합 검출 항체가 제거된다. 사용된 1차/검출 항체와 상용성인 검출 시스템을 사용하여 코팅제에 결합된 표준물질/샘플 내의 관심 항원 (예를 들어, HCP)의 수준을 결정할 수 있다. 적합한 검출 시스템이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다.

[0098] 결과는, 특허, 다중 숙주 세포 발현 시스템 (예를 들어, CHOK1SV 발현 시스템 및 GS-CHO 발현 시스템을 포함함)을 지지하기 위한 강건하고 감수성인 HCP ELISA 플랫폼 검정법을 입증한다. 이러한 ELISA 검정법의 개선된 감수성은 본원에 기재된 바와 같이 정제된 폴리클로날 HCP 항체를 사용하지 않는 HCP ELISA 방법보다 적어도 약 40배 더 양호하다. HCP 항체 정제 동안, 총 IgG의 99% 초과가 HCP에 대한 면역반응을 나타내지 않았고, 따라서 최종 HCP 항체로부터 제거되었다. 업계 및 규정에 걸쳐 정량화에 대한 정확하게 매칭되는 표준이 없기 때문에, HCP 검정법의 감수성은 세포주 및 공정에 대해 공정 특이적이다. 본원에 기재된 방법은 예를 들어 포유동물 숙주 세포 (예를 들어, CHO, 예를 들어, GS-CHO), 진핵생물 숙주 세포, 원핵생물 숙주 세포, 곤충 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 제조합 숙주 세포에 대한 강건하고 감수성인 HCP ELISA 플랫폼 검정법을 생성 시키는데 사용될 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 방법은 제조합 단백질의 생산에 대한 규제 요건과 함께 사용될 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법은 0.1-100, 0.5-100, 1-100, 1.5-100, 2-100, 2.5-100, 3-100, 0.1-90, 0.5-90, 1-90, 1.5-90, 2-90, 2.5-90, 3-90, 0.1-80, 0.5-80, 1-80, 1.5-80, 2-80, 2.5-80, 3-80, 0.1-70, 0.5-70, 1-70, 1.5-70, 2-70, 2.5-70, 3-70, 0.1-60, 0.5-60, 1-60, 1.5-60, 2-60, 2.5-60, 또는 3-60 ng/ml를 포함하는 농도 범위에서 강건하고 신뢰할 수 있는 HCP 검출을 위한 허용가능한 정확도, 정밀도 및 선형성을 입증한다. 일부 실시양태에서, HCP ELISA 검정법은 2 내지 60 ng/ml를 포함하는 농도 범위에서 강건하고 신뢰할 수 있는 HCP 검출을 위한 허용가능한 정확도, 정밀도 및 선형성을 입증한다. 일부 실시양태에서, HCP ELISA 검정법은 3 내지 80 ng/ml를 포함하는 농도 범위에서 강건하고 신뢰할 수 있는 HCP 검출을 위한 허용가능한 정확도, 정밀도 및 선형성을 입증한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법의 검출 한계는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법의 검출 한계는 0.5 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법의 검출 한계는 2 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법의 정량 한계는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 HCP ELISA 검정법의 검출 한계는 3 ng/ml이다.

[0100] 항-GS-CHO HCP 항체

[0101] 본원에 기재된 방법은 HCP 검출을 위한 항-GS-CHO HCP 항체를 제공할 수 있다. 표준 분자생물학 기술에 의해 항-GS-CHO HCP 항체를 제조할 수 있다. 항체는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날, 또는 본원에 기재된 "항체"의 임의의 변형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 양에서 제조된 폴리클로날 항체이다. 항체는 검출가능한 라벨의 부착, 예를 들어, 화학적 변형, 효소 접합, 형광 염료 라벨, 발광 라벨 등을 통해 직접적으로 검출가능할 수 있다. 항체는 또한 직접적으로 검출가능하지 않을 수 있고, 2차 검출 수단을 필요로 할 수 있다. 이러한 다양한 성질이 있는 항체를 구입할 수 있거나, 또는 표준 분자생물학 기술에 의해 제조할 수 있다.

[0102] 샘플

[0103] 샘플은 재조합 단백질 생산 동안의 임의의 기간, 예를 들어, 상류 또는 하류 가공 동안의 임의의 시점에 세포 배양물로부터 취해진 샘플을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 샘플을 (예를 들어, 재조합 단백질 산물의 분리 전에) 세포 배양물로부터 취할 수 있다. 하류 가공 공정 동안에, 예를 들어, 재조합 단백질 산물을 함유하는 배지로부터 세포를 분리한 뒤에 샘플을 취할 수 있다. 정제 공정 동안의 임의의 시점 및 다중 시점에 샘플을 취할 수 있다. 샘플은 최종 산물의 샘플을 포함할 수 있다. 따라서, 샘플은 공정 중의 산물 (최종 제형화 이전) 및 최종 산물 (예를 들어, 모든 정제 단계 뒤의 최종으로 제형화된 산물) 둘 다를 포함할 수 있다.

[0104] 고체 지지체

[0105] 고체 지지체는 코팅제, 예를 들어, 항-GS-CHO HCP 항체, 또는 그의 등가물이 표면 상에 고정화될 수 있는 임의의 표면을 포함할 수 있다. 고정화에 사용된 고체 지지체는, 예를 들어, 표면, 입자, 다공성 매트릭스 등의 형태의 지지체를 포함하여, 본질적으로 수-불용성이고 면적측정 검정법에서 유용한 임의의 불활성 지지체 또는 담체일 수 있다. 통상적으로 사용되는 지지체의 예는 소형 시트, 세파텍스, 폴리비닐 클로라이드, 플라스틱 비드, 및 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌 등으로부터 제조된 검정법 플레이트 또는 시험관 (96-웰 미량역가 플레이트를 포함함), 뿐만 아니라 입상 물질 예컨대 여과지, 아가로스, 가교 텍스트란, 및 다른 다당류를 포함한다. 대안적으로, 반응성 수-불용성 매트릭스 예컨대 브롬화시안-활성화 탄수화물이 코팅 시약 고정화에 적합하게 사용된다. 고정화된 코팅제는 미량역가 플레이트, 예를 들어 여러 샘플을 한번에 분석하는데 사용될 수 있는 다중-웰 미량역가 플레이트 상에 코팅될 수 있다. 고체 지지체 표면은 막, 예를 들어, 니트로셀룰로스 막, 폴리테트라플루오르에틸렌 막, 셀룰로스 아세테이트 막, 셀룰로스 니트레이트 막, 소수성 기를 함유하는 분자로 코팅된 고체 표면, 친수성 기를 함유하는 분자로 코팅된 고체 표면을 또한 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 고체 지지체 표면은 미량역가 플레이트, 예를 들어, 폴리스티렌 미량역가 플레이트, 세포 배양 플레이트, 또는 그의 임의의 변형의 형태일 수 있다.

[0106] 포획 시약

[0107] 용어 "포획 시약"은 관심 항원 (예를 들어, GS-CHO HCP)에 직접적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 포획 항체는 단백질 변형, 예를 들어, 비오틴화가 있는 검출 항체일 수도 있다. 이러한 항체는 인간, 토끼, 마우스, 래트, 양, 염소, 닭, 인간, 말, 개, 고양이, 햄스터, 원숭이, 침팬지, 양류, 말류, 돼지류, 소류, 영장류 등을

포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 종들로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 양에서 생산되고 친화력 정제된 항-GS-CHO HCP 항체이다.

[0108] 검출 시약

[0109] 용어 "검출 시약"은 "항원" 또는 "항체"를 검출하는데 사용되는 라벨링된 항체를 지칭한다. 검출 항체는 또한 1차 항체일 수 있다. 이러한 항체는 인간, 토끼, 마우스, 래트, 양, 염소, 닭, 인간, 말, 개, 고양이, 햄스터, 원숭이, 침팬지, 양류, 말류, 돼지류, 소류, 영장류 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 상이한 종들로부터 유래될 수 있다. 검출 항체 상에서 사용되는 라벨은 HCP가 항체에 결합하는 것을 방해하지 않는 임의의 검출가능한 관능기일 수 있다. 적합한 라벨의 예는 직접적으로 검출될 수 있는 모이어티, 예컨대 형광색소, 화학발광, 및 방사성 라벨, 뿐만 아니라 검출되기 위해 반응 또는 유도체화되어야 하는 모이어티, 예컨대 효소를 포함하여, 면역검정법에서 사용하기 위해 공지된 다수의 라벨이다. 본 발명에서 사용될 수 있는 적합한 라벨링 방법은 동위원소 라벨링, 화학적 변형, 효소 접합, 형광 염료 라벨링, 발광 라벨링, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 공지된 다른 라벨링 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0110] 광범위한 항원에 대한 시판되는 항체가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 항체 또는 다른 검출제에 대한 다양한 라벨링 방법을 인지할 것이다. 라벨링 방법은 효소 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), 베타-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 옥시다제, 예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 헤테로고리형 옥시다제 예컨대 유리카제 및 잔틴 옥시다제 (과산화수소를 사용하여 염료 전구체를 산화시키는 효소 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링됨), 비오틴/아비딘, 비오틴/스트렙타비딘, 비오틴/스트렙타-β-갈락토시다제와 MUG, 스핀 라벨, 박테리오파지 라벨, 안정적인 유리 라디칼, 또는 다른 효소 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 검출제는 또한 방사성 동위원소, 예를 들어, ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³H, 및 ¹³¹I, 또는 다른 동위원소로 라벨링될 수 있다. 형광 라벨은 형광단 예컨대 회토루 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라제, 예를 들어, 초파리 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 알렉사(Alexa)488, Cy5, Cy3, 알렉사610, 7-AAD, 아이오딘화프로피듐, Cy7, 피코에리트린 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 검출제는 형광 플레이트 판독기, 형광 현미경, 형광계, 카메라 또는 스캐너에 의해 검출될 수 있는 형광색소 (형광 염료)에 의해 라벨링될 수 있다. 검출제는 발광 방법에 의해 검출될 수 있는 발광색소로 라벨링될 수도 있다. 대안적으로, 검출제는 라벨링된 비오틴일 수 있고, 이는 아비딘 또는 스트렙타비딘에 결합할 수 있다. 아비딘 또는 스트렙타비딘은 비오틴, 비오틴닐화 항체 또는 비오틴닐화 폴리펩티드에 결합할 수 있는 검출제로서 사용될 수 있다.

[0111] 통상적인 방법이 이러한 라벨을 단백질 또는 폴리펩티드에 공유결합으로 결합시키는데 이용가능하다. 예를 들어, 커플링제 예컨대 디알데히드, 카르보디이미드, 디말레이미드, 비스-이미데이트, 비스-디아조화 벤지딘 등을 사용하여, 항체에 상기 기재된 형광, 화학발광 및 효소 라벨을 태그부착시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 3,940,475 (형광측정법) 및 3,645,090 (효소); 문헌 [Hunter et al. Nature 144:945 (1962)]; [David et al. Biochemistry 13:1014-1021 (1974)]; [Pain et al. J. Immunol. Methods 40:219-230 (1981)]; 및 [Nygren J. Histochem. and Cytochem. 30:407-412 (1982)]을 참조한다. 본원에서의 바람직한 라벨은 증폭 및 감수성을 8 pg/ml로 증가시키도록 형광성이고, 더욱 바람직하게는 신호를 증폭시키기 위해 비오틴과 스트렙타비딘-β-갈락토시다제 및 MUG이다.

[0112] 효소를 포함하는 이같은 라벨을 항체에 접합시키는 것은 면역검정법 기술의 통상의 기술자에게 표준 조작 절차이다. 예를 들어, 문헌 [O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", Methods in Enzymology, ed. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166]을 참조한다.

[0113] 검출 시스템

[0114] 용어 "검출 시스템"은 샘플 내의 단백질 또는 작용제의 양 또는 상대적인 양에 관련된 정보를 포함하는 판독물을 제공하는데 사용될 수 있는 수단을 지칭한다. 검출 시스템의 선택은 사용된 검출 항체의 선택에 좌우된다. 예를 들어, 검출 항체가 효소로 라벨링되고, 화학 반응이 색 또는 화학발광 신호를 초래할 수 있으면, 검출 시스템이 화학 반응과 연관된 적합한 기질 및 임의의 필수적인 시약, 및 화학 반응을 검출하는 수단, 예를 들어, 시각적 검사, 신호를 검출할 수 있는 장치, 예를 들어, 흡광 플레이트 판독기, 화학발광 플레이트 판독기, CCD 카메라 등을 포함할 수 있고; 대안적으로, 검출 항체가 형광으로 라벨링되면, 형광 현미경, 형광 플레이트 판독

기, 형광 세포 분류기, 형광 스캐너, 카메라 등이 사용될 수 있으며; 대안적으로, 검출 항체가 동위원소로 라벨링되면, X선 필름 또는 다른 동위원소 감수성 물질이 사용될 수 있다.

[0115] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 사용하기에 적합한 상이한 검출 시스템들을 인지할 것이다. 이러한 검출 시스템은, 예를 들어, 리포터 효소 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 또는 알칼리성 포스파타제 (AP) 등의 발색 반응을 사용하는 검출 시스템을 포함할 수 있다. 리포터 효소는 발색 검출을 위해 상이한 기질들을 사용할 수 있고, 예를 들어, HRP는 4 CN (4-클로로-1-나프톨), DAB/NiCl₂ (3,3'-디아미노벤지딘/NiCl₂) 또는 TMB를 발색 검출용 기질로서 사용할 수 있다. 형광 라벨은 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 로다민, 텍사스 레드, 알렉사488, Cy5, Cy3, 알렉사610, 7-AAD, 아이오딘화프로피듐, Cy7, 피코에리트린 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다양한 적절한 정지제가 검출 반응을 종결시키는데 사용될 수 있다. 사용되는 구체적인 정지제는 사용되는 검출제에 좌우될 것이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들어, 1 M 황산이 양고추냉이 퍼옥시다제 효소를 사용하는 검출 시스템에 대한 정지 기질로서 사용될 수 있다.

[0116] 차단 완충제

[0117] 코팅제와의 인큐베이션 후 고체 지지체 상의 임의의 잔여 결합 부위를 차단하는데 사용되는 차단 완충제를 사용할 수 있다. 차단 완충제의 예는 카세인, 예를 들어, 1XPBS 내의 카세인, 1XPBS 내의 0.1-1% 카세인, 1XPBS 내의 0.1-0.5% 카세인, 1XPBS 내의 0.2% 카세인; BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 1% BSA, 1XPBS 내의 1-10% BSA, 1XPBS 내의 1-20% BSA, 1XPBS 내의 1-50% BSA; 무지방 밀크, 어류 젤라틴, 또는 다른 화학 시약을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 상기 기재된 시약 또는 다른 적합한 화학 시약 중 임의의 것을 임의의 적합한 완충제, 예를 들어, 포스페이트 완충 염수 (PBS) 또는 트리스 완충 염수 (TBS)에 희석할 수 있다.

[0118] 다양한 단계에서 미결합 성분을 제거하기 위해 세척 완충제를 사용할 수 있다. 세척 완충제의 예는 카세인, 예를 들어, 1XPBS 내의 카세인, 1XPBS 내의 0.1-1% 카세인, 1XPBS 내의 0.1-0.5% 카세인, 1XPBS 내의 0.2% 카세인; BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 1% BSA, 1XPBS 내의 1-10% BSA, 1XPBS 내의 1-20% BSA, 1XPBS 내의 1-50% BSA; 트윈® 20을 함유하는 1XPBS 내의 BSA, 예를 들어, 0.05% 트윈® 20을 함유하는 1XPBS 내의 BSA, 0.05% 트윈® 20을 함유하는 1XPBS 내의 1% BSA, 0.05-1% 트윈® 20을 함유하는 1XPBS 내의 1% BSA; 트윈® 20, 예를 들어, 1XPBS 내의 트윈® 20, 예를 들어, 1XPBS 내의 0.05% 트윈® 20; 무지방 밀크, 카세인, 어류 젤라틴, 또는 다른 화학 시약을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세척 완충제는 트리톤 (Triton) X 100 또는 트윈® 20 등이 있는 용액 내의 BSA, 무지방 밀크, 카세인, 어류 젤라틴, 또는 다른 화학 작용제 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 이러한 용액은 포스페이트 완충 염수 (PBS), 트리스 완충 염수 (TBS)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 완충제에 희석될 수 있다.

[0119] 세척 단계는 다수회 수행될 수 있고, 사용되는 세척 완충제에 좌우될 것이다. 예를 들어, 세척 단계가 소정의 세척 기간에 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 또는 10회 초과로 반복될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 사용된 세척 완충제 및 다른 실험 조건을 기반으로 필요한 세척 단계의 수를 결정할 수 있을 것이다.

[0120] 임의의 표준물질, 샘플, 항체, 또는 검출제를 희석하는데 사용되는 완충제는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이고, 카세인, 예를 들어, 1XPBS 내의 카세인, 1XPBS 내의 0.1-1% 카세인, 1XPBS 내의 0.1-0.5% 카세인, 1XPBS 내의 0.2% 카세인; BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 BSA, 예를 들어, 1XPBS 내의 1% BSA, 1XPBS 내의 1-10% BSA, 1XPBS 내의 1-20% BSA, 1XPBS 내의 1-50% BSA; 무지방 밀크, 어류 젤라틴, 또는 다른 화학 시약을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 임의의 표준물질, 샘플, 항체, 또는 검출제를 희석하는데 사용되는 완충제는 차단 완충제로서 사용된 작용제와 동일할 것이다.

[0121] 인큐베이션 기간 및 온도

[0122] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 다양한 단계들에 대한 적절한 인큐베이션 기간이 결정될 수 있다. 특정한 인큐베이션 단계에 대한 기간은 이러한 인큐베이션 단계의 온도의 변화로 인해 변경될 수 있고, 마찬가지로 인큐베이션 단계의 시간의 변화는 이러한 인큐베이션 단계의 온도의 변화를 필요로 할 수 있다. 코팅 단계는, 예를 들어, 약 4℃에서 철야로, 약 2-10℃에서 철야로, 약 37℃에서 4시간 동안, 약 37℃에서 2-4시간 동안, 약 37℃에서 1-4시간 동안, 약 32℃에서 4시간 동안, 약 32℃에서 2-4시간 동안, 약 32℃에서 1-4시간 동안 수행될 수 있다. 차단 단계는, 예를 들어, 약 32℃에서 1시간 동안; 약 32℃에서 1-2시간 동안; 약 4℃에서 철야로 수행될 수 있다. 표준/샘플 인큐베이션 단계는, 예를 들어, 약 32℃에서 2시간 동안; 약 32℃에서 1-2시간 동안;

약 4℃에서 철야로 수행될 수 있다. 1차 항체 또는 1차/검출 항체 인큐베이션 단계는, 예를 들어, 약 32℃에서 1시간 동안; 약 32℃에서 1-2시간 동안; 약 4℃에서 철야로 수행될 수 있다. 임의의 검출 시스템의 인큐베이션 기간 및 온도는 정확한 사용된 검출 항체에 좌우될 것이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다.

[0123] **키트**

[0124] 본원에 기재된 방법을 수행하는데 유용한 하나 이상의 성분을 포함하는 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하는데 필요한 임의의 필요한 성분, 시약 또는 물질, 및/또는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 임의의 추가적인 세척제, 인큐베이션 용기, 고체 지지체 표면 등을 임의적으로 포함할 수 있다.

[0125] 키트는 코팅제용 고체 지지체를 포함할 수 있고, 이는 별개의 요소로서 제공될 수 있거나 또는 코팅제가 지지체 상에 이미 고정화되어 있을 수 있다. 따라서, 코팅제 내의 키트는 고체 지지체 상에 고정화되어 있을 수 있거나, 또는 키트 내에 포함되거나 키트와 별개로 제공되는 지지체 상에 고정화될 수 있다. 미량역가 플레이트 상에 코팅제가 코팅될 수 있다. 1차 항체는 미라벨링 또는 라벨링될 수 있다. 1차 항체는 라벨링될 수 있고, 검출 항체 내에 있을 수도 있다. 라벨이 효소인 경우, 키트는 효소가 필요로 하는 기질 및 보조인자를 포함할 수 있고, 라벨이 형광단인 경우, 키트는 검출가능한 발색단을 제공하는 염료 전구체를 포함할 수 있다. 키트는 검정법을 수행하기 위한 설명서, 및/또는 참조 표준물질, 뿐만 아니라 다른 첨가물 예컨대 안정화제, 세척 및 인큐베이션 완충제 등을 또한 함유할 수 있다.

[0126] **산물 및 그를 코딩하는 핵산**

[0127] 산물을 생산할 수 있는 세포 또는 세포주를 식별, 선별 또는 제조하는 방법이 본원에서 제공된다. 본 개시내용에 포함되는 산물은 세포에서 생산될 수 있는, 예를 들어, 발현될 수 있는 분자, 핵산, 폴리펩티드 (예를 들어, 재조합 폴리펩티드), 또는 그의 하이브리드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 산물을 생산하도록 세포가 조작 또는 변형된다. 이같은 변형은 산물의 생산을 제어 또는 초래하는 분자를 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 도입함으로써 세포를 변형시키고, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 생산, 예를 들어, 발현 및 분비에 적합한 조건 하에 세포를 배양한다. 또 다른 예에서, 예를 들어, 미변형 세포에서, 내인성으로 생산되는 수준 또는 양보다 더 높은 수준 또는 양의 폴리펩티드를 세포가 생산하도록, 세포에 의해 내인성으로 발현되는 폴리펩티드의 발현을 제어하는, 예를 들어, 증가시키는 외인성 핵산을 도입함으로써 세포가 변형된다.

[0128] 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 식별, 선별 또는 생성된 세포 또는 세포주는 의학적 병태, 장애 또는 질환의 치료에 유용한 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 생산한다. 의학적 병태, 장애 또는 질환의 예는 대사 질환 또는 장애 (예를 들어, 대사 효소 결핍), 내분비 장애 (예를 들어, 호르몬 결핍), 지혈, 혈전증, 조혈 장애, 폐 장애, 위장 장애, 면역조절 (예를 들어, 면역결핍), 불임, 이식, 암, 및 감염성 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0129] 일부 실시양태에서, 산물은 외인성 단백질, 예를 들어, 세포에 의해 천연적으로 발현되지 않는 단백질이다. 산물은 치료용 단백질 또는 진단용 단백질 (예를 들어, 약물 스크리닝에 유용함)일 수 있다. 치료용 또는 진단용 단백질은 항체 분자, 예를 들어, 항체 또는 항체 단편, 융합 단백질, 호르몬, 시토카인, 성장 인자, 효소, 당단백질, 지질단백질, 리포터 단백질, 치료용 펩티드, 또는 이들 중 임의의 것의 구조적 및/또는 기능적 단편 또는 하이브리드일 수 있다.

[0130] 한 실시양태에서, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드는 항체 분자이다. 본원에 포함되는 산물은 진단용 및 치료용 항체 분자를 포함한다. 진단용 항체 분자는 영상화 기술에 유용한 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 치료용 항체 분자는 대상체에게 투여하는데, 예를 들어, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 적합하다.

[0131] 항체 분자는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자로부터 유래된 단백질, 또는 폴리펩티드 서열이다. 한 실시양태에서, 항체 분자는 전장 항체 또는 항체 단편이다. 항체 및 다중형식 단백질은 폴리클로날 또는 모노클로날, 다중 또는 단일 사슬, 또는 무손상 면역글로불린일 수 있고, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체는 면역글로불린 분자의 사량체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 항체는 인간 또는 인간화 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 IgA, IgG, IgD, 또는 IgE 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다.

[0132] "항체 단편"은 무손상 항체의 적어도 일부분, 또는 그의 재조합 변이체를 지칭하고, 항체 단백질이 표적, 예컨대 항원을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 것을 부여하는데 충분한, 항원 결합 도메인, 예를 들어, 무손상 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, scFv 항체 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체 예컨대 sdAb (VL 또는 VH), 낙타류 VHH 도메인, 및 항체 단편 예컨대 힌지 영역에서 디설피드 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 항체의 단리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항원 결합 단편은 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR 및 비스-scFv 내로 도입될 수도 있다 (예를 들어, 문헌 [Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005] 참조). 항원 결합 단편은 III형 피브로넥틴 (Fn3)과 같은 폴리펩티드를 기반으로 하는 스캐폴드에 그래프팅될 수도 있다 (피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디가 기재된 미국 특허 번호 6,703,199를 참조한다).

[0133] 본원에 기재된 방법 또는 세포에서 생산되는 예시적인 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드가 하기 표에서 제공된다.

[0134] 표 1. 예시적인 산물

치료용 산물 유형	산물	상표명
호르몬	에리트르포이에틴, 에포에인 - α 다르베포에틴 - α 성장 호르몬 (GH), 소마토트로핀 인간 여포-자극 호르몬 (FSH) 인간 용모성 고나도트로핀 루트로핀 - α 글루카곤 성장 호르몬 방출 호르몬 (GHRH) 세크레틴 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 티로트로핀	에포젠, 프로크리트 아라네스프 제노트로핀, 휴마트로프, 노르디트로핀, 노브아이비트로핀, 누트로핀, 옴니트로프, 프로트로핀, 시아젠, 세로시스템, 발트로핀 고날-F, 폴리스티م 오비드렐 루베리스 글카젠 제레프 키로시스템 (인간 펩티드), 세크레폴로 (돼지펩티드) 티로젠
혈액 응고 인자	인자 VIIa 인자 VIII 인자 IX 항트롬빈 III (AT-III) 단백질 C 농축물	노보세븐 바이오크레이트, 헬릭세이트, 코제네이트, 리콤비네이트, 리팩토 베네픽스 트롬베이트 III 세프로틴
시토카인/성장 인자	I 형 알파-인터페론 인터페론 - α n3 (IFN α n3) 인터페론 - β 1a (rIFN- β) 인터페론 - β 1b (rIFN- β) 인터페론 - γ 1b (IFN γ) 알테스류킨 (인터류킨 2(IL2), 표피 흉선세포 활성화 인자; ETAF 팔리페르민 (각질세포 성장 인자; KGF) 베카플레민 (혈소판-유래 성장 인자; PDGF) 아나킨라 (재조합 IL1 길항제)	인퍼젠 알페론 N 아보넥스, 레비프 베타세론 엑티문 프로류킨 케피반스 레그라넥스 안릴, 키네레트
항체 분자	베마시주맵 (VEGFA mAb) 세툽시맵 (EGFR mAb) 파니투무맵 (EGFR mAb)	아마스틴 에르비투스 벡터빅스

[0135]

	알렘투주맙 (CD52 mAb) 리톡시맙 (CD20 키메라 Ab) 트라스투주맙 (HER2/Neu mAb) 아바타셉트 (CTLA Ab/Fc 융합체) 아달리주맙 (TNF α mAb) 에타너셉트 (TNF 수용체/Fc 융합체) 인플리시맙 (TNF α 키메라 mAb) 알레파셉트 (CD2 융합 단백질) 에팔리주맙 (CD11a mAb) 나탈리주맙 (인테그린 α 4 서브유닛 mAb) 에칼리주맙 (C5mAb) 무로모납 -CD3	캄파트 리톡산 헤르셉틴 오렌시아 휴미라 엔브렐 레미케이드 아메비베 랍티바 티사브리 솔리리스 오르토클론, OKT3
기타: 융합 단백질/단백질 백신/펩티드	인슐린 B형 간염 표면 항원 (HBsAg) HPV 백신 OspA 항-레수스 (Rh) 이뮤노글로불린 G 엔푸비르티드 거미 실크, 예를 들어, 피브리온	휴몰린, 노보린 엔제릭스, 리콤비백스 HB 가다실 라임릭스 로필락 푸제온 큐모노스

[0136]

[0137]

또 다른 실시양태에서, 산물은 이중특이적 분자이다. 본원에 기재된 경우에, 이중특이적 분자는 2개 이상의 별개의 항원 또는 표적에 결합할 수 있는 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 분자는 항체 단편들을 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 분자는 이중특이적 항체, 이중특이적 항체 융합 단백질, 또는 이중특이적 항체 접합체, 이중특이적 T 세포 인게이지(Bi-specific T cell Engager) (BiTE) 분자, 이중 친화성 재표적화(Dual Affinity Re-Targeting) (DART) 분자, 이중 작용 Fab(Dual Action Fab) (DAF) 분자, 나노바디, 또는 2개의 별개의 항원을 인식하거나 이에 결합하는 능력이 있는 분자를 초래하는 다른 항체 단편 정렬을 포함한다.

[0138] 표 2. 예시적인 산물, 예를 들어, 이중특이적 분자

BsAb (다른 명칭, 스폰서 단체)	BsAb 양식	표적	제안된 작용 메카니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
카투막소맴 (리모맴®, 프레제니우스 바이오테크, 트리온 파마, 네오팜)	BsIgG: 트리오맴	CD3, EpCAM	T 세포를 종양에 재표적화함, Fc 매개 이펙터 기능	EU에서 승인됨	EpCAM 양성 종양에서의 약성 복수
에르투막소맴 (네오비이 바이오테크, 프레제니우스 바이오테크)	BsIgG: 트리오맴	CD3, HER2	T 세포를 종양에 재표적화함	I/II상	진행성 고형 종양
블리나투모맴 (블린사이토®, AMG 103, MT 103, MEDI 538, 암젠)	BiTE	CD3, CD19	T 세포를 종양에 재표적화함	미국에서 승인됨 II 및 III상 II상 I상	전구체 B-세포 ALL ALL DLBCL NHL
REGN1979 (리제네론)	BsAb	CD3, CD20			
솔리토맴 (AMG 110, MT110, 암젠)	BiTE	CD3, EpCAM	T 세포를 종양에 재표적화함	I 상	고형 종양
MEDI 565 (AMG 211, 메드이플, 암젠)	BiTE	CD3, CEA	T 세포를 종양에 재표적화함	I 상	위장 선암종
RO6958688 (로슈)	BsAb	CD3, CEA			
BAY2010112 (AMG 212, 바이엘, 암젠)	BiTE	CD3, PSMA	T 세포를 종양에 재표적화함	I 상	전립선암
MGD006 (마크로제닉스)	DART	CD3, CD123	T 세포를 종양에 재표적화함	I 상	AML
MGD007 (마크로제닉스)	DART	CD3, gpA33	T 세포를 종양에 재표적화함	I 상	결장직장암
MGD011 (마크로제닉스)	DART	CD19, CD3			
스콜피온 (이머전트 바이오솔루션즈, 트루비온)	BsAb	CD3, CD19	T 세포를 종양에 재표적화함		
AFM11 (어피메드)	TandAb	CD3, CD19	T 세포를 종양에	I 상	NHL 및 ALL

[0139]

BsAb (다른 명칭, 스폰서 단체)	BsAb 양식	표적	제안된 작용 메카니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
테라퓨틱스)			세포적화합		
AFM12 (어피메드 테라퓨틱스)	TandAb	CD19, CD16	NK 세포를 종양 세포에 세포적화합		
AFM13 (어피메드 테라퓨틱스)	TandAb	CD30, CD16A	NK 세포를 종양 세포에 세포적화합	II상	호지킨 림프종
GD2 (바바라 앤 카마노스 캔서 인스티튜트)	BsAb가 미리 로딩된 T 세포	CD3, GD2	T 세포를 종양에 세포적화합	I/II상	신경모세포종 및 골육종
pGD2 (바바라 앤 카마노스 캔서 인스티튜트)	BsAb가 미리 로딩된 T 세포	CD3, Her2	T 세포를 종양에 세포적화합	II상	전이성 유방암
EGFRBi-아암 자가 활성화 T 세포 (로저 윌리엄스 메디컬 센터)	BsAb가 미리 로딩된 T 세포	CD3, EGFR	EGFR-양성 종양에 대한 자가 활성화 T 세포	I상	폐 및 기타 고형 종양
항 -EGFR-아암 활성화 T-세포 (바바라 앤 카마노스 캔서 인스티튜트)	BsAb가 미리 로딩된 T 세포	CD3, EGFR	EGFR-양성 종양에 대한 자가 활성화 T 세포	I상	결장암 및 췌장암
rM28 (유니버시티 호스피탈 튀빙겐)	탠덤 scFv	CD28, MAPG	T 세포를 종양에 세포적화합	II상	전이성 흑색종
IMCgp100 (이뮤노코어)	ImmTAC	CD3, peptide MHC	T 세포를 종양에 세포적화합	I/II상	전이성 흑색종
DT2219ARL (NCI, 유니버시티 오브 미네소타)	디프테리아 독소 에 연결된 2개의 scFv	CD19, CD22	단백질 독소를 종양에 표적화합	I상	B 세포 백혈병 또는 림프종
XmAb5871 (젠코르)	BsAb	CD19, CD32b			
NI-1701 (노브이문)	BsAb	CD47, CD19			
MM-111 (메리맥)	BsAb	ErbB2, ErbB3			
MM-141 (메리맥)	BsAb	IGF-1R, ErbB3			
NA (메루스)	BsAb	HER2, HER3			

[0140]

BsAb (다른 명칭, 스폰서 단체)	BsAb 양식	표적	제안된 작용 메카니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
NA (메루스)	BsAb	CD3, CLEC12A			
NA (메루스)	BsAb	EGFR, HER3			
NA (메루스)	BsAb	PD1, 개시되지 않음			
NA (메루스)	BsAb	CD3, 개시되지 않음			
둘리고투주맵 (MEHD7945A, 제넨테크, 로슈)	DAF	EGFR, HER3	2개의 수용체의 차단, ADCC	I 및 II상 II상	두경부암 결장직장암
LY3164530 (일라이 릴리)	개시되지 않음	EGFR, MET	2개의 수용체의 차단	I상	진행성 또는 전이성 암
MM-111 (메리맥 파라슈티칼스)	HSA바디	HER2, HER3	2개의 수용체의 차단	II상 I상	위암 및 식도암 유방암
MM-141 (메리맥 파라슈티칼스)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	2개의 수용체의 차단	I상	진행성 고형 종양
RG7221 (RO5520985, 로슈)	크로스맵	Ang2, VEGF A	2개의 혈관형성유발제의 차단	I상	고형 종양
RG7716 (로슈)	크로스맵	Ang2, VEGF A	2개의 혈관형성유발제의 차단	I상	습식 AMD
OMP-305B83 (온코메드)	BsAb	DLL4/VEGF			
TF2 (이뮤노메딕스)	도크 & 락	CEA, HSG	PET 또는 방사선영상화를 위해 종양을 예비표적화함	II상	결장직장암, 유방암 및 폐암
ABT-981 (에브비)	DVD-Ig	IL-1 α , IL-1 β	2개의 염증유발 시토카인의 차단	II상	골관절염
ABT-122 (에브비)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	2개의 염증유발 시토카인의 차단	II상	류머티스성 관절염
COVA322	IgG-피노머	TNF, IL17A	2개의 염증유발 시토카인의 차단	I/II상	플라크 건설
SAR156597 (사노피)	4가 이중특이적 탠덤 IgG	IL-13, IL-4	2개의 염증유발 시토카인의 차단	I상	특발성 폐 섬유증

[0141]

BsAb (다른 명칭, 스폰서 단체)	BsAb 양식	표적	제안된 작용 메카니즘	개발 단계	질환 (또는 건강한 지원자)
GSK2434735 (GSK)	이중-표적화 도메인	IL-13, IL-4	2개의 염증유발 시토카인의 차단	I상	(건강한 지원자)
오조랄리주맵 (ATN103, 아블링스)	나노바디	TNF, HSA	염증유발 시토카인의 차단, HSA에 결합하여 반감기를 증가시킴	II상	류머티스성 관절염
ALX-0761 (머크 세로노, 아블링스)	나노바디	IL-17A/F, HSA	2개의 염증유발 시토카인의 차단, HSA에 결합하여 반감기를 증가시킴	I상	(건강한 지원자)
ALX-0061 (에브비, 아블링스)	나노바디	IL-6R, HSA	염증유발 시토카인의 차단, HSA에 결합하여 반감기를 증가시킴	I/II상	류머티스성 관절염
ALX-0141 (아블링스, 에딩팜)	나노바디	RANKL, HSA	골 흡수 차단, HSA에 결합하여 반감기를 증가시킴	I상	폐경 후 골 손실
RG6013/ACE910 (쥬가이, 로슈)	ART-Ig	인자 IXa, 인자 X	혈장 응고	II상	혈우병

[0142]

[0143]

다른 예시적인 치료용 또는 진단용 단백질은 문헌 [Leader et al., "Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification", Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7:21-39] (본원에 참조로 포함됨)의 표 1-10에 기재된 임의의 단백질; 또는 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드의 임의의 집합체, 변이체, 유사체, 또는 기능성 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0144]

다른 재조합 산물은 DARPin, 아피바디 및 애드벡틴과 같은, 그러나 이에 제한되지는 않는 비-항체 스캐폴드 또는 대안적인 단백질 스캐폴드를 포함한다. 이같은 비-항체 스캐폴드 또는 대안적인 단백질 스캐폴드는 1개 또는 2개, 또는 그 초과, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 또는 그 초과 상이한 표적 또는 항원을 인식하거나 이에 결합하도록 조작될 수 있다.

[0145]

산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 예를 들어, 외인성 핵산이 본원에서 또한 제공된다. 표준 기술을 사용하여, 예를 들어, 원하는 핵산 서열, 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터의 라이브러리를 스크리닝함으로써, 그를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 핵산 서열을 유도함으로써, 또는 그를 함유하는 세포 또는 조직으로부터 직접적으로 분리함으로써, 관련 기술분야에 공지된 재조합 방법을 사용하여 원하는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 획득할 수 있다. 대안적으로, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 클로닝하기보다는 합성에 의해 생산할 수 있다. 재조합 DNA 기술 및 기법이 고도로 발달되어 있고, 관련 기술분야에 잘 확립되어 있다. 따라서, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대한 지식이 있는 통상의 기술자는 재조합 폴리펩티드를 코딩할 핵산 서열을 용이하게 구상하거나 생성시킬 수 있다.

[0146]

일부 실시양태에서, 외인성 핵산은 숙주 세포에 의해 내인성으로 발현되는 산물의 발현을 제어한다. 이같은 실시양태에서, 외인성 핵산은 내인성 산물의 발현을 증가시키는 하나 이상의 핵산 서열 (본원에서 "내인성 산물 전사활성화 서열"로도 지칭됨)을 포함한다. 예를 들어, 내인성 산물의 발현을 증가시키는 핵산 서열은 구성적으로 활성인 프로모터, 또는 더 강력한, 예를 들어, 원하는 부위에서 전사를 증가시키는, 예를 들어, 원하는 내인성 유전자 산물의 발현을 증가시키는 프로모터를 포함한다. 내인성 산물 전사활성화 서열을 포함하는 외인성 핵산의 도입 후, 상기 외인성 핵산이, 예를 들어, 내인성 산물을 코딩하는 게놈 서열에 인접한 미리 선택된 장소에서, 세포의 염색체 게놈 내로 통합되어, 내인성 산물 전사활성화 서열이 원하는 내인성 산물의 전사활성화 또는 발현을 증가시킨다. 내인성 산물의 발현을 증가시키기 위해 세포를 변형시키는, 예를 들어, 외인성 핵산을 도입하는 다른 방법이, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,272,071에 기재되어 있고, 상기 특허는 이에 의해 전문이 참조로 포함된다.

[0147]

본원에 기재된 산물의 발현은 재조합 폴리펩티드 또는 그의 일부분을 코딩하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결시키고, 구축물을 발현 벡터 내로 혼입시킴으로써 전형적으로 달성된다. 벡터는 진핵생물 또는 원핵생물에서의 복제 및 통합체에 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 다른 조절 요소, 예컨대 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 원하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 함유한다.

- [0148] 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하거나 또는 내인성 산물의 발현을 제어할 수 있는 핵산 서열을 포함하는 본원에 기재된 핵산 서열이 다수의 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드를 포함하나 이에 제한되지는 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 흥미로운 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 시퀀싱 벡터를 포함한다. 실시양태에서, 바이러스 벡터의 형태로 발현 벡터가 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY], 및 다른 바이러스학 및 분자생물학 책자에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 생물에서 기능성인 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별가능 마커를 함유한다 (예를 들어, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193). 바이러스로부터 유래된 벡터는 트랜스진의 장기간의 안정적인 통합 및 딸 세포에서의 그의 번식을 허용하기 때문에 장기간의 유전자 전달을 달성하기 위한 적합한 도구이다.
- [0149] 또한 벡터는, 예를 들어, 분비를 용이하게 하는 신호 서열, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결인자 (예를 들어, 소 성장 호르몬 (BGH) 유전자로부터의 것), 에피솜 복제 및 원핵생물에서의 복제를 허용하는 요소 (예를 들어 SV40 기원 및 ColE1 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 요소) 및/또는 선별을 허용하는 요소, 예를 들어, 선별 마커 또는 리포터 유전자를 또한 포함할 수 있다.
- [0150] 한 실시양태에서, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 발현을 위한 전사 개시를 가능하게 하도록 폴리머라제를 동원하는 것을 담당하는 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 적합한 프로모터 서열은 일반적으로 인핸서와 회합되어, 다량의 전사를 구동시키고, 따라서 표적 외인성 mRNA의 다수의 카피를 전달한다. 한 실시양태에서, 프로모터는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 주요 극초기 프로모터 (Xia, Bringmann et al. 2006) 및 SV40 프로모터 (Chernajovsky, Mory et al. 1984)를 포함하고, 이들은 둘 다 동명의 바이러스 또는 이로부터 유래된 프로모터로부터 유래된다. 라우스 육종 바이러스 긴말단 반복부 (RSV-LTR) 및 모로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMLV) LTR을 포함하여, 몇몇 다른 덜 통상적인 바이러스 프로모터들이 발현 벡터에 포함되었을 때 전사를 구동시키도록 성공적으로 사용되었다 (Papadakis, Nicklin et al. 2004). 또 다른 실시양태에서, 특이적인 내인성 포유동물 프로모터가 관심 유전자의 구성적 전사를 구동시키는데 이용될 수 있다 (Pontiller, Gross et al. 2008). CHO 특이적 차이니즈 햄스터 신장 인자 1-알파 (CHEF1 α) 프로모터가 바이러스 기반 서열에 대안적으로 높은 수율을 제공하였다 (Deer, Allison 2004). 프로모터에 더하여, 본원에 기재된 벡터는 상기 기재된 바와 같은 인핸서 영역; 전사 속도를 상향조절하도록 전사 인자를 동원할 수 있는, 코어 프로모터에 인접한 특이적인 뉴클레오티드 모티프 영역을 추가로 포함한다 (Riethoven 2010). 프로모터 서열과 유사하게, 이러한 영역들은 종종 바이러스로부터 유래되고, 프로모터 서열 예컨대 hCMV 및 SV40 인핸서 서열 내에 포함되거나, 또는 아데노바이러스 유래 서열과 같이 추가적으로 포함될 수 있다 (Gaillet, Gilbert et al. 2007).
- [0151] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 산물, 예를 들어, 폴리펩티드, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 선별 마커를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 선별가능 마커는 글루타민 신테타제 (GS); 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR), 예를 들어, 메토티렉세이트 (MTX)에 대한 내성을 부여하는 효소; 또는 항생제 마커, 예를 들어, 히그로마이신, 네오마이신 (G418), 제오신, 퓨로마이신 또는 블라스티시딘과 같은 항생제에 대한 저항성을 부여하는 효소를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 선별 마커는 셀렉시스(Selexis) 선별 시스템 (예를 들어, 셀렉시스 에스에이(Selexis SA)가 시판하는 슈어테크놀로지 플랫폼 (SUREtechnology Platform)TM 및 셀렉시스 제네틱 엘러먼트즈(Selexis Genetic Elements)TM) 또는 카탈란트 (Catalant) 선별 시스템을 포함하거나, 또는 그와 상용성이다.
- [0152] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 재조합 산물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터는 본원에 기재된 재조합 산물을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포 또는 세포들을 식별하는데 유용한 선별 마커를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 선별 마커는 본원에 기재된 바와 같이 재조합 산물을 코딩하는 핵산 서열이 게놈 내로 통합된 것을 포함하는 세포 또는 세포들을 식별하는데 유용하다. 재조합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 통합된 세포 또는 세포들을 식별하는 것은 산물을 안정적으로 발현하는 세포 또는 세포주의 선별 및 조작에 유용할 수 있다.
- [0153] 사용하기 위한 적합한 벡터는 시판되고, GS 발현 시스템TM, GS 엑시드(Xceed)TM 유전자 발현 시스템, 또는 포텔리전트(Potelligent)[®] CHOK1SV 기술 (론자 바이올로지스 인크.로부터 입수가능함)과 연관된 벡터, 예를 들어,

문헌 [Fan et al., *Pharm. Bioprocess.* (2013); 1(5):487-502] (전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 벡터를 포함한다. GS 발현 벡터는 GS 유전자 또는 그의 기능성 단편 (예를 들어, GS 미니-유전자), 및 관심 유전자의 발현을 위한 하나 이상, 예를 들어, 1, 2 또는 3개, 또는 그 초과로 효율적인 전사 카세트, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다. GS 미니-유전자는 계능 CHO GS 유전자의 인트론 6을 포함하고, 예를 들어, 이것으로 이루어진다. 한 실시양태에서, GS 벡터는 SV40L 프로모터 및 1개 또는 2개의 폴리A 신호에 작동가능하게 연결된 GS 유전자를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, GS 벡터는 SV40E 프로모터, SV40 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호에 작동가능하게 연결된 GS 유전자를 포함한다. 이 같은 실시양태에서, 전사 카세트, 예를 들어, 본원에 기재된 관심 유전자 또는 재조합 폴리펩티드의 발현을 위한 카세트는 hCMV-MIE 프로모터, 및 제1 인트론을 포함하는 hCMV-MIE 유전자로부터의 5' 비번역 서열을 포함한다. GS 발현 벡터를 기반으로 다른 벡터가 구축될 수 있고, 예를 들어, 여기서 다른 선별 마커는 본원에 기재된 발현 벡터 내의 GS 유전자를 치환한다.

[0154] 본원에 기재된 방법에서 사용하기에 적합한 벡터는 다른 시판되는 벡터, 예컨대 pcDNA3.1/Zeo, pcDNA3.1/CAT, pcDNA3.3TOPO (써모 피셔(Thermo Fisher), 기존의 인비트로젠(Invitrogen)); pTarget, HaloTag (프로메가(Promega)); pUC57 (진스크립트(GenScript)); pFLAG-CMV (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)); pCMV6 (오리진(Origene)); pEE12 또는 pEE14 (론자 바이올로지스), 또는 pBK-CMV/ pCMV-3Tag-7/ pCMV-Tag2B (스트라타진(Stratagene))를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0155] **세포 및 세포 배양**

[0156] 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 다른 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 이외의 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 마우스, 래트, 차이니즈 햄스터, 시리안 햄스터, 원숭이, 유인원, 개, 말, 족제비, 또는 고양이이다. 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포 또는 설치류 세포, 예를 들어, 햄스터 세포, 마우스 세포, 또는 래트 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 오리, 앵무새, 어류, 곤충, 식물, 진균 또는 효모로부터의 것이다. 한 실시양태에서, 세포는 고세균이다. 한 실시양태에서, 세포는 악티노박테리아 종이다.

[0157] 한 실시양태에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 CHO-K1 세포, CHO-K1 SV 세포, DG44 CHO 세포, DUXB11 CHO 세포, CHOS, CHO GS 녹-아웃 포, CHO FUT8 GS 녹-아웃 세포, CHOZN, 또는 CHO-유래 세포이다. CHO GS 녹-아웃 세포 (예를 들어, GSKO 세포)는, 예를 들어, CHO-K1SV GS 녹아웃 세포 (론자 바이올로지스 인크.)이다. CHO FUT8 녹아웃 세포는, 예를 들어, 포텔리전트® CHOK1 SV (론자 바이올로지스 인크.)이다.

[0158] 한 실시양태에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 CHO-K1 세포, CHO-K1 SV 세포, CHO-GSKO 세포, CHO엑시드(Xceed) 세포이다. CHO GS 녹-아웃 세포 (예를 들어, GS-CHO 세포)는, 예를 들어, CHO-K1SV GS 녹아웃 세포 (론자 바이올로지스 인크.)이다. CHO FUT8 녹아웃 세포는, 예를 들어, 포텔리전트® CHOK1 SV (론자 바이올로지스 인크.)이다.

[0159] 또 다른 실시양태에서, 세포는 HeLa, HEK293, HT1080, H9, HepG2, MCF7, Jurkat, NIH3T3, PC12, PER.C6, BHK (베이비 햄스터 신장 세포), VERO, SP2/0, NS0, YB2/0, Y0, EB66, C127, L 세포, COS, 예를 들어, COS1 및 COS7, QC1-3, CHOK1, CHOK1SV, 포텔리전트 CHOK1SV, CHO GS 녹아웃, CHOK1SV GS-KO, CHOS, CHO DG44, CHO DXB11, 및 CHOZN, 또는 이들로부터 유래된 임의의 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 한 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 세포 중 임의의 것의 분화된 형태이다. 한 실시양태에서, 세포는 배양 중인 임의의 1차 세포로부터 유래된 세포이다.

[0160] 한 실시양태에서, 세포는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드, 예를 들어, 표 1 또는 2로부터 선택된 재조합 폴리펩티드를 발현하는 본원에 기재된 세포 중 임의의 것이다.

[0161] 한 실시양태에서, 세포 배양은 배치 배양, 페드-배치 배양, 배출 및 충전 배양, 또는 연속 배양으로서 수행된다. 한 실시양태에서, 세포 배양은 현탁 배양이다. 한 실시양태에서, 세포 또는 세포 배양은 재조합 폴리펩티드의 발현을 위해 생체 내에 놓이고, 예를 들어, 모델 생물 또는 인간 대상체 내에 놓인다.

[0162] 한 실시양태에서, 배양 배지는 무혈청이다. 예를 들어, 론자 바이올로지스로부터, 무혈청 및 무단백질 배지가 시판된다.

[0163] 예를 들어 미국 특허 번호 5,633,162에 기재된 바와 같이, 포유동물 세포주에 대한 적합한 배지 및 배양 방법이

관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 실험 플라스크 또는 저밀도 세포 배양을 위한 것이고 특정한 세포 유형의 요구에 따라 개조되고 있는 표준 세포 배양 배지의 예는, 예를 들어, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI) 1640 배지 (Morre, G., The Journal of the American Medical Association, 199, p. 519 f. 1967), L-15 배지 (Leibovitz, A. et al., Amer. J. of Hygiene, 78, 1p. 173 ff, 1963), 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM), 이글 최소 필수 배지 (MEM), 햄 F12 배지 (Ham, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sc.53, p288 ff. 1965), 또는 알부민, 트랜스페린 및 레시틴이 결합된 이스코베스 변형 DMEM (Iscoves et al., J. Exp. med. 1, p. 923 ff., 1978)이다. 예를 들어, 햄 F10 또는 F12 배지는 특히 CHO 세포 배양용으로 디자인되었다. CHO 세포 배양에 대해 특수하게 개조된 다른 배지가 EP-481 791에 기재되어 있다. 이같은 배양 배지에 소 태아 혈청 (FBS; 송아지 태아 혈청 (FCS)으로도 지칭됨)이 보충될 수 있는 것으로 공지되어 있고, 후자는 다량의 호르몬 및 성장 인자의 천연 공급원을 제공한다. 오늘날, 포유동물 세포의 세포 배양은 과학 교재 및 책자에 잘 기재되어 있는 일상적인 작업이고, 예를 들어, 문헌 [R. Ian Fresney, Culture of Animal cells, a manual, 4th edition, Wiley-Liss/N.Y., 2000]에 상세하게 다뤄진다.

[0164] 다른 적합한 배양 방법이 숙련된 기술자에게 공지되어 있고, 재조합 폴리펩티드 산물 및 사용된 숙주 세포에 좌우될 수 있다. 세포에 의해 발현될 재조합 폴리펩티드의 발현 및 생산에 적합한 조건을 결정 또는 최적화하는 것은 통상의 기술자의 기술 내에 속한다.

[0165] 한 측면에서, 세포 또는 세포주는 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 또는 세포주는 산물, 예를 들어, 치료용 또는 진단용 산물을 발현한다. 원하는 폴리펩티드 또는 단백질을 발현하도록 세포를 유전적으로 변형시키거나 조작하는 방법이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이는, 예를 들어, 형질감염, 형질도입 (예를 들어, 바이러스 형질도입), 또는 전기천공을 포함한다.

[0166] 핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 외인성 핵산 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 포격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY]을 참조한다.

[0167] 핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 외인성 핵산 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미세구체, 비드, 및 지질-기반 시스템 (수중유 에멀션, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함함)을 포함한다. 시험관-내 및 생체-내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다. 핵산의 다른 최신식 표적화 전달 방법, 예컨대 표적화 나노입자 또는 다른 적합한 서브마이크론 크기의 전달 시스템으로 폴리뉴클레오티드를 전달하는 것이 이용가능하다.

[0168] 실시양태에서, 외인성 핵산이 숙주 세포의 핵산, 예를 들어, 숙주 세포의 게놈 또는 염색체 핵산 내로 통합되는 것이 요망된다. 외인성 핵산이 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 것이 발생하였는지 여부를 결정하는 방법은 GS/MSX 선별 방법을 포함할 수 있다. GS/MSX 선별 방법은 재조합 GS 유전자에 의한 글루타민 영양요구성의 보완을 사용하여, 세포로부터의 단백질의 고수준 발현에 대해 선별한다. 간략하게, GS/MSX 선별 방법은 재조합 폴리펩티드 산물을 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 벡터 상에 글루타민 신테타제를 코딩하는 핵산을 포함시키는 것을 포함한다. 메티오닌 슬록시민 (MSX)의 투여로, 재조합 폴리펩티드 및 GS 둘 다를 코딩하는 외인성 핵산이 게놈 내로 안정적으로 통합된 세포를 선별한다. GS가 일부 숙주 세포, 예를 들어, CHO 세포에 의해 내인성으로 발현될 수 있기 때문에, MSX의 농도 및 MSX로 선별하는 기간을 최적화하여, 재조합 폴리펩티드 산물을 코딩하는 외인성 핵산이 숙주 게놈 내로 안정적으로 통합된 고-생산 세포를 식별할 수 있다. GS 선별 및 그의 시스템이 문헌 [Fan et al., *Pharm. Bioprocess.* (2013); 1(5):487-502]에 추가로 기재되어 있고, 이는 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0169] 외인성 핵산이 숙주 세포 게놈 내로 안정적으로 통합된 세포를 식별 및 선별하기 위한 다른 방법은 리포터 유전자를 외인성 핵산 상에 포함시키고 세포 내의 리포터 유전자의 존재를 평가하는 것, 및 외인성 핵산의 PCR 분석 및 검출을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0170] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 선별, 식별 또는 생성된 세포는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산의 안정적인 발현, 예를 들어, 통합에 대한 선별 방법만 사용하여 선별된 세포보다 더 높은 수율의 단백질 산물을 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 선별, 식별 또는 생성된 세포는 단백질 분해 억제제와 접촉되지 않은 세포, 또는 재조합 폴리펩티드를 코딩하는 외인성 핵산의 안정적인 발현, 예를 들어, 통합에 대해서만 선별된 세포에 비교하여, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10

배 또는 그 초과 배수의 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 생산한다.

[0171] **세포주 및 재조합 폴리펩티드 생산을 위한 방법**

[0172] 포유동물 및 미생물 선별 시스템 둘 다에서의 현재의 기술 상태는 DNA가 RNA로 전사되는 것의 수준에서 선별압을 적용하는 것이다. 관심 유전자를 선별 마커에 단단하게 연결시켜, 선별 마커의 높은 수준의 발현이 관심 유전자의 높은 발현을 초래하기 쉽게 한다. 선별 마커를 높은 수준으로 발현하는 세포는 생존 및 증식할 수 있고, 그렇지 않은 것은 생존 및 증식할 가능성이 더 낮고, 예를 들어, 아포토시스가 일어나고/나거나 사망한다. 이러한 방식으로, 선별 마커 및 함축적으로 관심 유전자를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 세포 집단이 강화될 수 있다. 이러한 방법은 수월한 단백질을 발현하는데 매우 성공적인 것으로 증명되었다.

[0173] 한 측면에서, 본 개시내용은 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위해 세포 또는 세포주를 생성시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 방법을 사용하여 식별, 분류, 선별 또는 생성된 세포를 사용하여 산물, 예를 들어, 본원에 기재된 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위한 방법을 제공한다. 임의의 상기 방법은, 예를 들어, 세포를 단백질 분해제 억제제와 접촉시킴으로써, 본원에 기재된 바와 같이 세포를 평가, 식별, 분류 또는 선별하여, 산물, 예를 들어, 재조합 폴리펩티드의 고도의 생산을 위한 능력이 있는 세포를 식별 또는 제조하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 방법은 재조합 폴리펩티드의 생산, 예를 들어, 발현 및/또는 분비를 증가시킨다.

[0174] 이론에 제한되기를 원치 않으면서, 생산성이 더 높을 수 있는 세포는 단백질 분해 억제제에 대해 덜 감수성인 것으로 여겨지고, 따라서, 본원에 기재된 외인성 핵산을 포함하는 세포를 단백질 분해 억제제와 접촉시키는 것은 생산성이 더 높을 수 있는 세포의 선별을 초래하는 것으로 여겨진다.

[0175] 일부 실시양태에서, 산물의 발현, 예를 들어, 산물의 전사, 번역 및/또는 분비, 또는 산물의 품질, 예를 들어, 1차 서열의 올바른 폴딩 및/또는 충실도를 개선하기 위해 추가적인 단계가 수행될 수 있다. 이같은 추가적인 단계는 산물 발현 또는 산물 품질을 개선하는 작용제를 도입하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 산물 발현 또는 산물 품질을 개선하는 작용제는 소형 분자, 폴리펩티드, 또는 단백질 폴딩을 개선하는 폴리펩티드, 예를 들어, 샤페론 단백질을 코딩하는 핵산일 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 핵산은 억제성 핵산, 예를 들어, 마이크로RNA 또는 lncRNA를 포함한다. 한 실시양태에서, 단백질 폴딩을 보조하는 작용제는 샤페론 단백질, 예를 들어, BiP, PD1, 또는 ERO1을 코딩하는 핵산을 포함한다 (Chakravarthi & Bulleid 2004; Borth et al. 2005; Davis et al. 2000). 산물의 수율 및 품질을 개선하기 위한 다른 추가적인 단계는 전사 인자 예컨대 SBP1 및 ATF6 (Tigges & Fussenegger 2006; Cain et al. 2013; Ku et al. 2008) 및 렉틴 결합 샤페론 단백질 예컨대 칼넥신 및 칼레티쿨린 (Chung et al. 2004)의 과발현을 포함한다. 본원에 기재된 단백질의 단백질 폴딩 및 산물 품질 및 수율을 보조하거나 개선시키는 작용제의 과발현은 단백질을 코딩하는 외인성 핵산의 도입에 의해 달성될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 산물 발현 또는 산물 품질을 개선시키는 작용제는 산물의 발현 또는 산물의 품질을 증가시키도록 세포 배양물에 첨가될 수 있는 소형 분자이다. 한 실시양태에서, 세포가 일반적으로 성장되는 온도보다 더 낮은 온도, 예를 들어, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 또는 10°C 더 낮은 온도에서의 세포 배양.

[0176] 임의의 본원에 기재된 방법은 생산성이 더 높거나 또는 고품질 산물을 생산하는 세포를 식별하기 위한 추가적인 선별 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, FACS 선별을 이용하여, 원하는 특성이 있는, 예를 들어, 단백질 폴딩 단백질, 예를 들어, 샤페론이 더 높게 발현되거나, 또는 산물 발현이 개선된 특정한 세포를 선별 또는 분리할 수 있다.

[0177] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 폴리펩티드 산물을 회수 또는 수거하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 재조합 폴리펩티드가 세포로부터 분비되는 실시양태에서, 방법은 세포, 세포 집단, 또는 세포가 배양된 배양 배지로부터 재조합 폴리펩티드를 수거, 수집 또는 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 폴리펩티드가 세포 내에 있는 실시양태에서, 재조합 폴리펩티드 산물의 정제는 세포에 의해 생산된 재조합 폴리펩티드를 하나 이상의 하기 중 임의의 것으로부터 분리하는 것을 포함한다: 숙주 세포 단백질, 숙주 세포 핵산, 숙주 세포 지질, 및/또는 숙주 세포로부터의 다른 잔해물.

[0178] 실시양태에서, 본원에 기재된 공정은 실질적으로 순수한 단백질 산물을 제공한다. 본원에서 사용된 경우, "실질적으로 순수한"은 발열원성 물질을 실질적으로 함유하지 않는 것, 핵산을 실질적으로 함유하지 않는 것, 및/또는 숙주 세포로부터의 내인성 세포 단백질, 효소 및 성분, 예컨대 폴리머라제, 리보솜 단백질 및 샤페론 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 것을 의미한다. 실질적으로 순수한 단백질 산물은, 예를 들어, 25%, 20%, 15%,

10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 오염성인 내인성 단백질, 핵산, 또는 숙주 세포로부터의 다른 거대분자를 함유한다.

[0179] 산물, 예를 들어, 제조합 폴리펩티드의 회수 및 정제 방법이 관련 기술분야에 잘 확립되어 있다. 제조합 폴리펩티드 산물을 회수하기 위해, 물리적 또는 화학적 또는 물리화학적 방법이 사용된다. 물리적 또는 화학적 또는 물리화학적 방법은 여과 방법, 원심분리 방법, 초원심분리 방법, 추출 방법, 동결건조 방법, 침전 방법, 결정화 방법, 크로마토그래피 방법, 또는 이들 중 2가지 이상의 방법의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 크로마토그래피 방법은 크기-배제 크로마토그래피 (또는 겔 여과), 이온 교환 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및/또는 다중모드 크로마토그래피 중 하나 이상을 포함한다.

[0180] 실시예

[0181] 하기의 실험적 실시예를 참조로 본 발명이 추가로 상세하게 기재된다. 이러한 실시예들은 설명을 목적으로만 제공되고, 달리 상술되지 않는 한 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 결코 하기의 실시예에 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하고, 오히려, 본원에서 제공된 교시내용의 결과로서 명백해지는 임의의 모든 변동을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0182] 추가의 설명 없이, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이전의 설명 및 하기의 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 이용할 수 있고 청구된 방법을 실행할 수 있는 것으로 여겨진다. 하기의 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 구체적으로 언급하고, 어떠한 방식으로든 나머지 개시내용을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0183] 실시예 1: 항-GS-CHO 숙주 세포 단백질 폴리클로날 항체의 제조

[0184] 이러한 실시예에서 제공되는 방법은 항-GS-CHO 숙주 세포 단백질 (HCP) 폴리클로날 항체의 제조에 관한 것이다. 이러한 항체를 실시예 2에 기재된 ELISA 실험에 사용하였다.

[0185] 항-GS-CHO HCP 항체 생산

[0186] 3마리의 양을 GS-CHO 무효 세포주 (즉, 블랭크 GS 벡터로 형질감염된 CHO-K1SV 세포)로부터의 HCP로 면역화시켰다. 항원으로서 사용된 HCP는 세포 추출물 (CE) 또는 세포 상청액 (SN)으로부터의 것이었다. 표준 방법에 따라 항원을 제조하였다 (예를 들어, 미국 약전(The United State pharmacopeia) (USP)에 공식적인 검정법 절차 및 지침에 대한 모든 지침이 공개되어 있다. 2015년 12월에 공개된 USP <1132>에 "Residual host cell protein measurement in biopharmaceuticals" (USP 38-NF 33에 대한 2차 보충물, 7647-7667)가 기재되었다).

[0187] 양 항혈청을 다양한 채혈일에 수집하였다. 비축된 양 항혈청을 항-GS CHO HCP 항체를 친화성 정제하는데 사용하였다.

[0188] 항-GS-CHO HCP 항체 정제

[0189] 정제 공정은 맵셀렉트 슈어(MabSelect SuRe) (MSS) 친화성 크로마토그래피, 농축/투석여과, 브롬화시안 (CNBr) 친화성 크로마토그래피 및 최종 투석여과 단계로 이루어졌다. 독특하게, 예시적인 본 공정은 2-단계 친화성 정제에서 단백질 A 및 CNBr 크로마토그래피를 조합한다. 이러한 2-단계 친화성 정제는 대부분의 비-특이적 IgG (즉, HCP에 결합하지 않는 IgG)를 제거하였다. 현재의 정제 방법은 미정제 항혈청 (즉, 정제되지 않음) 또는 전체 IgG의 혼합물로부터의 HCP 항체를 이용하고, 이는 약 99%의 비-특이적 IgG가 있다.

[0190] 1차 및 2차 라운드의 2회의 정제 라운드를 동일한 조건으로 수행하였다. 1차 라운드 정제에서 1800 ml의 양 항혈청으로 정제 방법을 테스트 및 확증하였다. 친화성 정제된 항-GS-CHO HCP 항체를 ELISA, SDS-PAGE, 웨스턴 블롯, 및 2D SDS-PAGE로 GS-CHO HCP에 대한 그의 이뮤노코버리지에 대해 테스트하였다. 8000 ml의 항혈청으로 시작한 2차 라운드 정제에서, 반복 로딩과 관류를 수행하여 MSS 및 CNBr 정제 둘 다에서 GS-CHO HCP 항체의 생산을 최대화하였다.

[0191] 미가공 양 항혈청의 IgG 역가를 PrA HPLC로 결정하였고, MSS 단계의 수율은 GS-CHO 무효 세포 추출물로 면역화된 CE 양 항혈청에 대해 1차 라운드 정제에서 96.33%, 2차 라운드 정제에서 122.86%였다 (100%를 초과하는 수율의 모순은 단백질 농도에 대한 상이한 방법에 의해 야기되었다). 전체적으로, 1차 라운드 정제에서의 10,315 mg의 IgG 및 2차 라운드 정제에서의 60,518 mg의 IgG가 MSS 크로마토그래피로부터 용출되었다. 용출된 MSS IgG는 농축 및 투석여과 후에 다음 단계의 CNBr 정제에 사용되어야 했다. CNBr 크로마토그래피에서, CNBr 수지를

GS-CHO 세포 추출물과 커플링시키고, CE MSS IgG로부터 항-GS-CHO HCP 항체를 친화성 정제하는데 사용하였다. 0.37%의 수율로 39.6 mg의 항-HCP 항체가 1차 라운드 정제에서 정제된 한편, 0.62%의 수율로 361.2 mg의 HCP 항체가 2차 라운드 정제에서 생산되었다. 1차 라운드 정제로부터의 항-GS-CHO HCP 항체를 2DE 웨스턴 블롯에 의해 이뮤노커버리지에 대해 테스트하였다. 스팟 카운팅을 가반으로, GS-CHO 무효 세포주 추출물에 대한 커버리지는 72%였고, GS-녹아웃 세포주로부터의 세포 추출물에 대해서는 82%였다.

[0192] 1차 및 2차 라운드로부터의 항-GS-CHO HCP 항체를 함께 폴링하여, 균일한 항-GS-CHO HCP 항체 제제를 생성시켰다. A280에 의해 결정된 총 391 mg의 항체를 전체 정제 공정에 대해 0.65%의 총 누적 수율로 수득하였다. 최종 항-GS-CHO HCP 항체를 2DE 웨스턴 블롯에 의해 이뮤노커버리지에 대해 테스트하였다. GS-CHO 무효 세포주 추출물에 대한 커버리지는 총 스팟 카운팅을 기반으로 GS-CHO 세포주로부터의 세포 추출물에 대해 77%였고, 스팟 매칭을 기반으로 71%였다.

[0193] 이러한 실시예에서 기재된 예시된 정제 공정이 도 1에서 도시된다. 최종 항-GS-CHO HCP 항체를 실시예 2에 기재된 ELISA에서 사용하였다. 또한 최종 항체는 실시예 2에 기재된 ELISA에서 사용하기 위해 비오티닐화되었다.

[0194] 실시예 2: GS-CHO HCP ELISA

[0195] 이러한 실시예에서 제공되는 방법은 GS-CHO HCP를 검출 및 정량화하기 위해 개발된 샌드위치 ELISA에 관련된다. ELISA 검정법 조건은 현재의 방법보다 우월한 성능을 위한 것이었다 (예를 들어, 실시예 3 참조).

[0196] 실시예 1에 기재된 친화성 정제된 GS-CHO HCP 항체로 ELISA를 최적화하였다. ELISA 플레이트를 웰 당 100 μ l 으로 카르보네이트/비카르보네이트 완충제 내의 2 μ g/ml GS-CHO HCP 항체로 코팅하고, 5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C에서 철야로 (18 $\pm$ 2시간) 인큐베이션하였다. 코팅된 플레이트를 300 μ l의 세척 완충제 (1X DPBS 내의 0.05% 트윈 20)로 3회 세척한 후, 웰 당 300 μ l의 차단 완충제 (1X DPBS 내의 0.2% 카세인)를 첨가하고, 300 $\pm$ 50 rpm으로 진탕하면서 60 $\pm$ 5분 동안 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다. 9개의 표준물질 (80 ng/ml 내지 0.31 ng/ml)을 GS-CHO HCP 표준 물질을 차단 완충제로 1/2 단계 희석하는 것에 의해 제조하였다. 예시적인 희석안이 표 3에서 제공된다.

[0197] 표 3. GS-CHO HCP ELISA 표준물질 제제

표준물질	농도	샘플 (μ l)	차단 완충제 (μ l)
N/A	1 mg/ml	40의 스톱 표준물질	208
N/A	10 μ g/ml	10의 1 mg/ml	990
Std 1	80 ng/ml	16의 10 μ g/ml	1984
Std 2	40 ng/ml	1000의 80ng/ml	1000
Std 3	20 ng/ml	1000의 40ng/ml	1000
Std 4	10 ng/ml	1000의 20ng/ml	1000
Std 5	5 ng/ml	1000의 10ng/ml	1000
Std 6	2.5 ng/ml	1000의 5ng/ml	1000
Std 7	1.25 ng/ml	1000의 2.5ng/ml	1000
Std 8	0.63 ng/ml	1000의 1.25ng/ml	1000
Std 9	0.31 ng/ml	1000의 0.63ng/ml	1000
블랭크 대조군	0 ng/ml	N/A	1000

[0198]

[0199] HCP 스파이킹 용액을 표 4의 예를 따라 제조하였다.

[0200] 표 4. GS-CHO HCP ELISA 스파이크 용액 제제

스파이크 용액	농도 (ng/ml)	샘플 (μ l)	차단 완충제 (μ l)
No 1	400	80의 10 μ g/ml	1920
No 2	200	1000의 400 ng/ml	1000
No 3	100	1000의 200 ng/ml	1000
No 4	40	800의 100 ng/ml	1200
No 5	20	1000의 40 ng/ml	1000

[0201]

[0202] 샘플을 미리 정해진 희석, 예를 들어, 1 / 5 희석, 1 / 10 희석 등으로 차단 완충제로 희석하였다. 플레이트를 300 μ l의 세척 완충제 (1X DPBS 내의 0.05% 트윈 20)로 3회 세척하였다. 100 μ l의 제조된 샘플, 및 샘플을

웰에 3중으로 로딩하였다. 그 후, 플레이트를 300 ± 50 rpm으로 진탕하면서 90 ± 5 분 동안 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 $300 \mu\text{l}$ 의 세척 완충제 (1X DPBS 내의 0.05% 트윈 20)로 3회 세척하고, 차단 완충제에 희석된 $2 \mu\text{g/ml}$ 의 비오틴화 SG-CHO HCP 항체를 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 으로 로딩하였다. 플레이트를 300 ± 50 rpm으로 진탕하면서 60 ± 5 분 동안 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 $300 \mu\text{l}$ 의 세척 완충제 (1X DPBS 내의 0.05% 트윈 20)로 3회 세척하고, 차단 완충제에 1 / 10,000 희석된 스트렙타비딘-HRP를 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 으로 로딩하였다. 플레이트를 300 ± 50 rpm으로 진탕하면서 60 ± 5 분 동안 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 $300 \mu\text{l}$ 의 세척 완충제 (1X DPBS 내의 0.05% 트윈 20)로 3회 세척하고, 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 의 TMB 1C를 로딩하였다. 플레이트를 300 ± 50 rpm으로 진탕하면서 10 ± 1 분 동안 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 웰 당 $50 \mu\text{l}$ 의 정지 용액 (실온에서 보관된 2.5 M 황산)을 첨가함으로써 반응을 정지시켰다. 630 nm 참조로 하여 450 nm 파장에서 플레이트 판독기에 의해 플레이트를 판독하였다. 데이터를 소프트맥스 프로(SoftMax Pro) (5.4.3 버전)로 분석하였고, 표준 곡선을 4-파라미터 로지스틱 피팅으로 플롯팅하였다.

[0203] **실시예 3: GS-CHO HCP ELISA의 평가**

[0204] 하기 실시예는 실시예 2에 기재된 GS-CHO HCP 샌드위치 ELISA의 평가를 제공한다. 평가 결과가 하기에서 기재된다.

[0205] 따라서, GS-CHO HCP ELISA를 평가하기 위해 5개의 GS-CHO 벌크 정제 산물, 3개의 GS-CHO 공정-중 산물 및 1개의 최종 제형화 완충제를 테스트하였다. 이러한 테스트 샘플들은 GS-CHO HCP ELISA에 대한 산물 샘플을 대표하였다. GS-CHO 산물을 1/2 단계 희석을 사용하여 희석하고, 실시예 2에 기재된 ELISA에서 테스트하였다. 5개의 스파이크 수준인 1, 2, 5, 10, 및 20 ng/ml 을 이러한 산물 희석으로 테스트하였다. 스파이크 회수를 사용하여 각각의 산물에 대한 검정법 성능을 평가하였다.

[0206] 5개의 벌크 정제 산물 (BDS Mab DV, Mab BM, 산물 A15, Mab DU, 및 Mab DH) 및 3개의 공정 중 샘플 (Mab CZ, Mab BM, Mab MSS 용출물) 및 Mab BM 최종 제형화 완충제를 테스트하였다. 정확도, 정밀도, 선형성, 작업 범위, 검출 한계, 정량 한계, 및 특이도를 하기에서 분석 및 기재하였다.

[0207] 정확도

[0208] ELISA의 정확도를 5개 모두의 스파이크 수준의 회수에 의해 분석하였다. 스파이크 수준 5, 10, 및 20 ng/ml 의 정확도는 75% 내지 125% 회수의 허용가능한 범위 내였다. 2 ng/ml 의 경우, 대부분의 산물 희석이 75% 내지 125% 회수 내로 회수가 허용가능하였다. 높은 수준의 내인성 HCP 농도가 스파이크 2 ng/ml 의 정확도에 영향을 미쳤다. 1 ng/ml 의 스파이크 수준의 전체적인 정확도는 높은 내인성 HCP 수준의 효과로 인해 허용가능하지 않았다.

[0209] GS-CHO 산물, BDS MAb DV, MAb BM, MAb DU 및 MAb DH를 각각 3가지 희석으로 최종 ELISA 방법으로 테스트하였다. 2, 5, 10 및 20 ng/ml 의 스파이크 대조군의 회수에 대해, 모든 결과 ($n=38$)가 75% 내지 125% 이내였다. 1 ng/ml 의 스파이크 대조군에 대한 38개의 회수 중 5개가 허용가능한 회수를 벗어났다. 5개의 상이한 스파이크 수준으로부터의 스파이크 회수를 계산하고, 스파이크 회수를 기반으로 방법의 정확도를 평가하였다. 각각의 HCP 스파이크 수준에서의 전체적인 평균 백분율 회수가 75% 내지 125% 회수이면 검정법의 정확도가 허용가능한 것으로 간주되었다. 5, 10 및 20 ng/ml 의 HCP 스파이크 수준의 경우, 각각 3가지 상이한 희석의 4개의 테스트된 BDS 산물 모두의 전체적인 스파이크 회수가 75% 내지 125% 회수였고, 허용가능하였다. 테스트된 내인성 HCP는 1.395 ng/ml 내지 24.044 ng/ml 로 다양하였다.

[0210] 2 ng/ml 의 HCP 스파이크 수준의 경우, 각각 2가지 상이한 희석의 4개의 테스트된 BDS 산물 모두에 대한 스파이크 회수가, BDS 산물의 낮은 희석도 (예를 들어, BDS MAb DV에서의 1/2 희석 (1/2))를 제외하고는, 75% 내지 125% 회수였고, 허용가능하였다. 스파이크 회수가 실패한 BDS 산물 희석의 내인성 HCP 농도는 13.467 ng/ml 내지 24.044 ng/ml 로 다양하였다. 스파이크 회수가 허용가능한 BDS 산물 희석의 내인성 HCP 농도는 1.395 ng/ml 내지 4.536 ng/ml 범위였다.

[0211] 1 ng/ml 의 HCP 스파이크 수준의 경우, 상이한 희석의 4개의 테스트된 BDS 산물에 대한 스파이크 회수가 75% 내지 125% 회수였고, 허용가능하였다. 이들의 내인성 HCP 농도는 1.395 ng/ml 내지 4.536 ng/ml 범위였다. BDS 산물의 최저 희석, 예를 들어, MAb DV, MAb DU, MAb BM의 경우 1/2 희석 (1/2), MAb DH의 경우 1/32 희석 (1/32)에 대한 회수는 75% 내지 125%의 범위를 벗어났다. 스파이크 회수가 실패한 BDS 산물 희석의 내인성 HCP 농도는 13.467 ng/ml 내지 24.044 ng/ml 범위였다.

[0212] 스파이크 회수 및 스파이크 수준으로부터, 테스트 샘플 내에 존재하는 높은 수준의 내인성 HCP가 낮은 스파이크

수준, 예를 들어, 1 ng/ml 또는 2 ng/ml에서 스파이크 회수 측정의 신뢰도에 영향을 미쳤다는 결론을 얻었다. 따라서, 전반적으로, 정확도가 허용가능한 것으로 간주되었다.

[0213] 정밀도

[0214] 4개의 GS-CHO BDS (벌크 정제) 산물에 대한 HCP 측정을 반복성 정밀도 및 중간 정밀도에 대해 분석하였다. 반복성 및 중간 정밀도 둘 다 20% CV 미만이었다. GS-CHO 산물 내의 HCP 농도의 반복성은 20% CV의 허용가능한 범위의 상한에 있었다. 평가 전반에 걸쳐 검정법-간 대조군 및 스파이크 대조군으로부터의 HCP 측정으로 정밀도를 추가로 분석하였다. 고수준 및 저수준 검정법-간 대조군 (IAC) 둘 다에 대해 검정법-간 반복성 및 중간 정밀도가 15% CV 미만이었다. 1, 2, 5, 10 및 20 ng/ml의 스파이크 대조군의 경우, 반복성 정밀도 및 중간 정밀도가 모두 15% CV 미만이었다.

[0215] GS-CHO BDS 산물 내의 HCP 농도 측정에 대한 반복성 (검정법-내) 및 중간 (검정법-간) 정밀도를 BDS 산물 내의 내인성 HCP 불순물 측정의 6가지 경우로부터 각각 결정하였다. 각각의 BDS 산물 내의 내인성 HCP 농도를 검정법 회식 인자를 보정하면서 각각의 측정에서 스파이크되지 않은 샘플로부터 계산하였다. 각각의 측정에 대해, HCP를 각각의 산물에 대한 3가지 회식으로 부터 측정하였다. 각각의 산물 내의 HCP 농도의 반복성 % CV 및 중간 정밀도 % CV를 계산하였다. 4개 모두의 GS-CHO BDS 산물에 대한 반복성 정밀도 % CV는 10.7% 내지 15.0% 범위였다. $\leq 20\%$ 의 표적에 비교하여 반복성 정밀도 % CV가 허용가능하였다. 반복성이 모든 회식에 걸친 결과에 대해 계산되었음을 주지한다. 4개 모두의 GS-CHO BDS 산물에 대한 중간 정밀도 % CV는 7.5% 내지 16.2% 범위였고 ($n=18$), 이는 $\leq 20\%$ 의 표적에 비교하여 허용가능한 것으로 간주되었다.

[0216] 선형성

[0217] 선형성은 검정법 반응이 테스트 샘플 내의 피분석물 농도에 비례하고, 따라서 샘플로부터의 반응이 용량-반응 검정 곡선으로부터 직접적으로 해석될 수 있다는 것을 입증하는 중요한 검정법 파라미터이다. GS-CHO HCP ELISA의 선형성을 5가지 수준의 HCP-스�파이크 GS-CHO 산물로의 HCP 측정으로 평가하였다. 정확도 연구 및 4개의 테스트된 GS-CHO HCP 산물의 각각의 검정법에서 선형성 (r^2) 값이 0.984 내지 1.000 범위였다.

[0218] 작업 범위

[0219] GS-CHO HCP ELISA 표준 곡선의 작업 범위가 정확도가 허용가능한 2 ng/ml 내지 80 ng/ml의 범위로서 결정되었다. GS-CHO BDS 산물에 대한 HCP 측정으로 작업 범위를 또한 테스트 및 확증하였다.

[0220] 검출 한계

[0221] GS-CHO HCP ELISA의 검출 한계 (LOD)가 0.9 ng/ml로 결정되었고, 이는 4개의 GS-CHO BDS 산물에 대한 41개의 플레이트로의 6개 모두의 검정법 경우에서의 표준 곡선으로부터 계산된 최고 LOD였다. 블랭크 대조군 (0 ng/ml의 표준물질)의 평균 흡광도 플러스 유의하게 상이한 신호를 제공한 그의 표준 편차의 2.5배의 표준 곡선으로부터 해석된 HCP 농도로부터 각각의 검정법 (플레이트)의 LOD가 계산되었다. 모든 테스트된 플레이트로부터의 최고 LOD는 0.875 ng/ml였고, 이는 0.9 ng/ml로 반올림되었다. 0.9 ng/ml를 GS-CHO HCP ELISA의 LOD로서 정의하였다.

[0222] 정량 한계

[0223] GS-CHO HCP ELISA의 검출 한계 (LOQ)가 2 ng/ml로서 정의되었다. GS-CHO HCP ELISA의 정량 한계 (LOQ)는 테스트된 GS-CHO 산물에 대한 허용가능한 역계산 표준 및 허용가능한 정확도의 조합으로서 정의되었다. 허용가능한 역계산 (% RE $\leq 15\%$) 및 반복성 정밀도 (% CV $\leq 20\%$)의 GS-CHO HCP ELISA의 최저 표준은 1.25 ng/ml였다. 허용가능한 회수 (6개의 경우 중 적어도 3개에서 75% 내지 125%)의 각각의 산물에 대한 LOQ가 표 12에서 요약된다. 현재의 표준 CHO HCP ELISA에 대한 LOQ는 약 200 ng/ml이다.

[0224] 표 5. GS에 대한 정량 한계

GS-CHO 산물	희석	LOQ (ng/ml)	결정된 LOQ (ng/ml)
MAb DV	1 / 2	5	2
	1 / 16	2*	
	1 / 32	2*	
MAb DU	1 / 2	5	2
	1 / 16	2 *	
	1 / 32	2 *	
MAb BM	1 / 2	5	2
	1 / 8	2	
	1 / 16	1	
MAb DH	1 / 32	5	1
	1 / 128	1	
	1 / 256	1	
*1 ng/ml의 평균 회수가 허용가능하였지만, 6개의 경우 각각으로부터의 개별적인 결과가 가변적이었고, 따라서 허용가능하지 않았다.			

[0225]

[0226] 특이도

[0227] GS-CHO HCP ELISA의 특이도를 정제 공정 동안 CHP와 함께 정제되었을 수 있는 단백질 A 및 CHO DNA의 불순물에 대해 테스트하였다. 단백질 A 및 CHO DNA 둘 다에 대한 특이도 %가 97% 내지 103% 이내였다. 단백질 A 및 CHO DNA 둘 다에서 교차 반응성 %가 1% 미만이었다. 특이도 결과는 항체 산물 내의 HCP를 측정하는 동안 GS-CHO HCP ELISA에서 단백질 A 및 CHO DNA로부터의 잠재적인 음성 또는 양성 편향이 관찰되지 않았음을 시사하였다.

[0228]

요약하면, 본원에 기재된 예시적인 결과는 다중 발현 시스템 (예를 들어, 포유동물 발현 시스템, 예를 들어, CHOK1SV 발현 시스템을 포함함)을 지지하는 강건하고 감수성인 HCP ELISA 플랫폼 검정법을 입증한다. 양에서 생성된 폴리클로날 HCP 항체를 친화성 정제하였고, 모조 형질감염 무효 세포로부터의 세포 추출물에 대한 항체의 이뮤노커버리지가 2차원 (2D) 웨스턴 블롯의 스팟 매칭에 의해 71%로 평가되었다. 우수한 이뮤노커버리지 및 LOQ를 위해 ELISA 개발 동안 항체 농도, 완충제 시스템 및 검출 시스템을 최적화하였다.

[0229]

최종적인 강건하고 감수성인 HCP ELISA를 <International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use> (ICH) Q2(R1) 지침에 따라 평가하였다. HCP ELISA를 위한 검정법 파라미터를 미리 결정된 기준에 대해 평가하였다. 측정된 HCP 농도에 대한 이론적 HCP 농도의 정확도, 검정법-내 정밀도, 중간 정밀도 및 선형성이 허용가능하였다. 이러한 ELISA의 작업 범위는 2 ng/ml 내지 80 ng/ml으로서 결정되었다. HCP ELISA의 LOQ (정량 한계)는 다중 벌크 정제 산물을 기반으로 하는 허용가능한 스파이크 회수로 2 ng/ml로서 정의되었다. HCP와 함께인 주요 불순물 공급원인 단백질 A 및 CHO DNA에 대한 특이도 또한 허용가능한 것으로 증명되었다.

[0230]

HCP ELISA는 생물정제 공정 동안의 HCP 불순물 및 최종 벌크 약물 물질을 모니터링하는 플랫폼 검정법으로서의 역할을 할 수 있다. 이러한 검정법은 GS-CHO 발현 시스템에서 생산된 산물의 검증 및 배치 방출을 위해 역할을 할 수도 있다. 추가적으로, ICH Q6B 6.2 지침이 생물학적 산물 내에 존재할 수 있는 HCP의 스펙트럼을 검출하기 위해 적합하게 감수성인 면역검정법이 사용되어야 한다고 언급한 바와 같이, 본원에 기재된 방법은 재조합 단백질의 생산을 위한 규제 요건과 함께 사용될 수 있다.

[0231] 안정성

[0232] GS-CHO HCP ELISA 시약, 특히 HCP 피분석물을 보관 온도, 시간, 및 동결-해동 조건에 걸친 안정성에 대해 테스트하였다. MAb 샘플 내의 GS-CHO HCP 또는 MAb 샘플 내로 스파이킹된 추가적인 GS-CHO HCP의 안정성을 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 또는 -65°C 이하에서 보관한 후의 다양한 시점에 평가하였다. 결과는 $t=0$ 일 내지 $t=1$ 일의 보관 기간에 양쪽 온도에서 HCP 불안정성 및 분해 가능성을 가리켰지만, $t=1$ 일 내지 $t=85$ 일 보관 기간의 HCP 안정성을 가리켰다. 추가적인 HCP가 샘플 내로 스파이킹되지 않은 3개의 MAb 샘플 중 2개의 경우, HCP 변화가 양쪽 보관 온도에서 30% 이하였고, 허용가능하였다. 이는 MAb 샘플 내에 존재한 내인성 HCP가 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 또는 -65°C 이하에서의 85일 까지의 보관에 대해 안정적이었음을 입증하였다. HCP 테스트를 위한 -65°C 이하의 보관 온도가 벌크 정제 샘플의 테스트에 적합하였고, 샘플을 85일까지 -65°C 이하에서 보관할 수 있다는 결론을 얻었다.

- [0233] 강건성
- [0234] 샘플 제조 절차에서의 작은 변동이 방법의 성능에 영향을 미치지 않을 것이라는 것을 입증하기 위해, 검정법 변이, 검정법 인큐베이션 시간, 검정법 인큐베이션 온도, 및 검정법 시약 수명에서의 강건성을 평가하였다.
- [0235] 고수준의 샘플 pg/ml 또는 저수준의 샘플 pg/ml을 함유하는 검정법-간 대조군 (IAC)을 ELISA 플레이트의 웰에 적용하고, 5분 지연 후, 제2 세트의 IAC를 ELISA 플레이트에 적용하고, IAC 차이를 평가함으로써, 검정법 변이에서의 강건성을 검사하였다. HCP ELISA에서 상이한 시간에 샘플을 첨가하는 것은 검정법의 결과의 정확도 또는 정밀도에 영향을 미치지 않았고, 모든 결과가 정상적인 검정법 변동 내였으며, 샘플을 ELISA 플레이트에 첨가하는데 요구되는 시간 (최대 5분)에 대해 HCP ELISA가 강건한 것으로 정의되었다.
- [0236] 2개의 MAb 샘플 및 고수준의 샘플 pg/ml 또는 저수준의 샘플 pg/ml을 함유하는 IAC를 3개의 ELISA 플레이트의 웰에 적용한 후, ELISA 플레이트가 적용되는 검정법 단계의 인큐베이션 시간을 변화시킴으로써, 검정법 인큐베이션 시간에서의 강건성을 검사하였다. 3개의 플레이트에 대한 IAC 결과 및 MAb 샘플 결과가 허용가능하였다. 모든 결과가 정상적인 검정법 변동 내였고, 검정법 인큐베이션 시간에서의 변동에 대해 테스트 방법이 강건한 것으로 정의되었다.
- [0237] 2개의 MAb 샘플 및 고수준의 샘플 pg/ml 또는 저수준의 샘플 pg/ml을 함유하는 IAC를 3개의 ELISA 플레이트의 웰에 적용한 후, 1개의 플레이트는 17℃에서, 1개의 플레이트는 23℃에서, 1개의 플레이트는 27℃에서 테스트함으로써, 검정법 인큐베이션 온도에서의 강건성을 검사하였다. IAC 결과 및 MAb 결과가 허용가능하였다. MAb 샘플에서의 스파이크 대조군 및 HCP 스파이크에 대한 중간 정밀도가 3개 모두의 플레이트에 대해 허용가능하였다. 전체적으로, 모든 결과가 정상적인 검정법 변동 내였고, 17 ± 2 °C 내지 25 ± 2 °C의 검정법 인큐베이션 온도에서의 변동에 대해 테스트 방법이 강건한 것으로 정의되었다.
- [0238] 최초로 제조하고 나서 1주, 2주, 3주 또는 4주 후에 제조된 검정법 시약 (코팅 완충제, 차단 완충제, 및 세척 완충제)을 사용함으로써, 검정법 시약 수명에서의 강건성을 검사하였다. 전체적으로, 검정법 시약이 1개월까지 안정적이라는 결론을 얻었다.

도면

도면1

