



등록특허 10-2664829



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월09일
(11) 등록번호 10-2664829
(24) 등록일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류 (Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 5/16* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
C12N 5/163 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7035852

(22) 출원일자(국제) 2018년05월08일
심사청구일자 2021년03월23일

(85) 번역문제출일자 2019년12월04일

(65) 공개번호 10-2020-0004355

(43) 공개일자 2020년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/031542

(87) 국제공개번호 WO 2018/208743
국제공개일자 2018년11월15일

(30) 우선권주장
62/503,615 2017년05월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
mAbs, 제5권, 제6호, 제974-981면 (2013년)*
mAbs, 제6권, 제3호, 제679-688면 (2014년)*
Journal of Pharmaceutical Sciences, 제94권,
제304-316면 (2005년)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
브리스톨-마이어스 스큘 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로비анс 라인 로드

(72) 발명자
두, 챕
미국 01434 매사추세츠주 데번스 잭슨 로드 38 브리스톨-마이어스 스큘 컴퍼니 내
보르완카르, 아메야 우메쉬
미국 94102 켈리포니아주 샌프란시스코 뷰캐넌 스트리트 8 유닛 707
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 이귀동

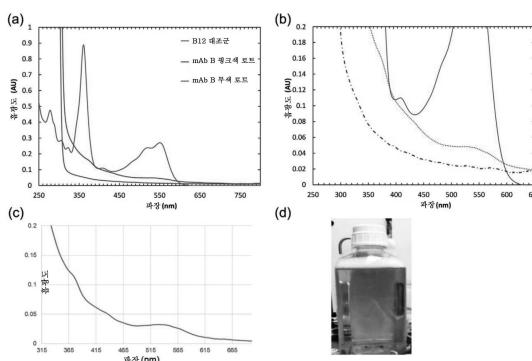
전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 항체 제작 동안 핑크색의 형성을 제어하는 방법

(57) 요약

본 발명은 항체 제작 및 수거 동안 항체의 환원을 방지하거나 항체 제작 및 수거 동안 시아노코발라민 (CN-Cb1)의 히드록소코발라민 (HO-Cb1)으로의 전환을 억제함으로써 항체 제작 동안 핑크색의 생성을 방지하는 방법이다. 세포 배양 배지 제조 및 저장 영역에서 백색광의 적색광으로의 대체는 CN-Cb1의 HO-Cb1로의 전환을 억제한다. 수거 시 정화된 벌크에 페옥사이드의 첨가는 항체 디솔파이드 결합의 환원을 억제한다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

C07K 2317/14 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

(72) 발명자

이, 준 총

미국 01720 매사추세츠주 액튼 포크너 힐 로드 16

탄, 지준

미국 01434 매사추세츠주 데벤스 잭슨 로드 38 브
리스틀-마이어스 스냅 컴퍼니 내

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 목적 항체를 생성하는 세포를 배양하는 단계,
- b) 세포 배양물로부터 목적 항체를 수거하는 단계, 및
- c) 수거 시 정화된 벌크에 과산화수소를 첨가하는 단계

를 포함하는, 항체 생성을 위한 세포 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 (mAb), 인간 항체 (HuMAb), 인간화된 항체 및 키메라 항체로부터 선택되는 것인 세포 배양 방법.

청구항 3

수거 동안 페옥사이드를 정화된 벌크에 첨가하는 단계를 포함하는 항체 디슬파이드 결합 환원을 방지하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 페옥사이드가 과산화수소인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 수거 시 정화된 벌크의 과산화수소 농도가 $\leq 10 \text{ mM}$ 로 유지되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 수거 시 정화된 벌크의 과산화수소 농도가 3 mM 내지 10 mM로 유지되는 것인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 페옥사이드가 무기 또는 유기 페옥사이드인 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 페옥사이드가 과탄산나트륨 또는 과붕산나트륨인 방법.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체 (mAb), 인간 항체 (HuMAb), 인간화된 항체 및 키메라 항체로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경기술

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 5월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/503615의 이익을 주장하며, 이는 전부 본원에 포함된다.

[0003] 배경

[0004] 모노클로날 항체 (mAb) 치료제는 다수의 인간 질환의 치료에서 더 인기를 끌고 있다. mAb는 거대 분자로서 광범위한 해독후 변형으로 인해 특정한 이질성을 보유한다. 제작 공정의 성공적인 제어는 치료 단백질의 제품 품질 및 안전성 및 로트간 일관성을 보장하는데 중요하다. 실제로, ICH Q6B 지침은 제품 외관 사양을 요구한다.

[0005] 정상적인 항체 제작은 일반적으로 허용되는 약간의 색상 변화를 갖는다 (Derfus GE, et al., MAbs 2014, 6(3):679-688, Prentice KM, et al., MAbs 2013, 5(6):974-981, Vijayasankaran N, et al., Biotechnol Prog 2013, 29(5):1270-1277, Xu J, et al., Process Biochemistry 2014, 49:130-1394). 그러나, 공정 중 불순물로 인한 색상 변화는 공정 제어 부재의 문제이다. 최종 약물 물질에서 핑크색/적색의 주요 원인 중 하나는 비타민 B₁₂-mAb 복합체로 확인되었다 (Derfus, 2014, Prentice, 2013). 상호작용의 특성은 밝혀지지 않았지만, 단백질에 대한 비타민 B₁₂의 부착은 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 낮은 pH 바이러스 불활성화, 다양한 폴리싱 크로마토그래피 및 한외여과 및 투석여과를 포함하는 다수의 다운스트림 정제 단계를 통해 공동용출하기에 충분히 강력해 보인다.

[0006] 항체는 일반적으로 포유동물 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 생성되며, 세포 배양 배지 내로 세포의 분비된다. 배양 공정 말에, 수거 유체를 정화하기 위해 원심분리, 심층 여과 또는 솜털침전과 같은 방법을 이용하여 1차 회수 단계 동안 배양 배지로부터 세포를 분리시킨다. 이 공정 동안, 세포는 종종 기계적 전단, 낮은 용존 산소 (DO) 환경, 온도 및 pH 변화에의 노출을 포함하여 다양한 스트레스를 겪는다. 이들 스트레스는 세포 손상을 유발하여 바람직하지 않은 세포내 성분을 정화된 유체로 방출시킨다. 이들 세포질 성분, 예컨대 지질 및 효소는 잠재적으로 제품 품질에 영향을 줄 수 있으며, 주의 깊게 모니터링하거나 제거해야 한다. 예컨대, 세포내 환원체의 방출은 항체 디슬파이드 결합의 환원을 이끌 수 있다 (Mun M., et al. Biotechnol Bioeng 2015;112:734-742; Ruaudel J, et al. BMC Proceedings 2015;9 (Suppl 9):P24; Mullan B, et al. BMC Proc. 2011;5(Suppl 8):P110; Trexler-Schmidt M, et al. Biotechnol Bioeng. 2010;106:452-461; Kotterba, KL, et al. J Biotechnol. 2012;157:261-267; Handlogten MW, et al. Biotechnol Bioeng. 2017;114:1469-1477; Hutchinson N, et al. Biotechnol Bioeng. 2006;95:483-491).

[0007] 제작 공정 동안, 수거 작업 및/또는 단백질 A 크로마토그래피 후에 항체의 광범위한 환원이 관찰되었다. 다수의 공정 파라미터가 항체 환원 정도에 영향을 미칠 수 있다. 예컨대, 수거 동안 높은 수준의 용존 산소 (DO)를 유지하는 것은 항체 분자를 무손상으로 유지하는데 중요하다 (Mun M. 2015; Trexler-Schmidt M, 2010). 세포 용해 및 세포 성분이 수거 유체로 누출되게 하는 기계적 전단력도 환원에 크게 기여한다 (Kao YH, et al.

Biotechnol Bioeng. 2010;107:622-632; Hutterer KM, et al. MAbs. 2013;5:608-613). 다른 공정 파라미터, 예컨대 수거물 유지 시간 (Chung WK, et al. Biotechnol Bioeng. 2017;114:1264-12741), 배지 성분 (예컨대, 구리 이온, 시스테인/시스테인) 및 pH 및 온도 (Trexler-Schmidt M, 2010; Chung, 2017)도 디솔파이드 환원의 정도에 영향을 끼친다.

[0008] 항체 제품 품질을 보장하기 위해, 항체 디솔파이드 결합의 환원으로부터 형성되는 저분자량 (LMW) 총을 제어하기 위해 제작 공정 중 제어가 필요하다. 그 결과, 최근에 디솔파이드 환원을 제어하기 위한 수개의 전략이 제안되었다. 환원방지제, 예컨대 황산구리 (Chaderjian WB, et al. Biotechnol Prog. 2005;21:550-553), 에틸렌 디아민테트라아세트산 (EDTA), 티오로데신 억제제 (미국 특허 번호 8,574,869) 시스테인, 메틸 블루 (WO 2015/085003) 및 코엔자임 Q 유사체 (Li WW, et al. J Am Chem Soc. 2005;127:6140-614)로의 수거전 및 수거후 처리를 포함하는 화학적 억제제가 항체 환원을 방지하기 위해 시험되었다. 완화 전략을 둘러싼 지식과 방법이 수년에 걸쳐 증가했지만, 생성에서 이를 방법을 수행하는데 크로마토그래피 단계에 의해 제거해야 하는 화학적 부산물의 도입, 증가된 처리 시간 및 항체 생성물에 대한 표적외 변형 또는 손상의 위험과 같은 어려움이 없는 것이 아니다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 1) 항체 제작 및 수거 동안 항체의 환원을 방지 또는 2) 항체 제작 및 수거 동안 시아노코발라민 (CN-Cb1)의 히드록소코발라민 (HO-Cb1)으로의 전환을 억제, 또는 3) 항체 제작 및 수거 동안 항체의 환원을 방지하고 시아노코발라민의 히드록소코발라민으로의 전환을 억제함으로써, 항체 제작 동안 핑크색의 생성을 방지하는 방법이다.

[0010] 본 발명의 한 실시양태에서, CN-Cb1의 HO-Cb1로의 전환은 배지 제조, 배지 저장, 항체 생성 및 항체 수거로부터 선택되는 하나 이상의 시기 동안 가시광에 대한 배지 노출을 방지함으로써 억제된다.

[0011] 본 발명의 한 실시양태에서, CN-Cb1은 배지 제조, 배지 저장, 항체 생성 및 항체 수거로부터 선택되는 하나 이상의 시기 동안 UVA 광에만 노출된다.

[0012] 본 발명의 한 실시양태에서, CN-Cb1은 배지 제조, 배지 저장 동안, 및 임의적으로 항체 생성, 및 항체 수거 동안 적색광 (>600 nm)에만 노출된다.

[0013] 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 디솔파이드 결합의 환원은 수거 시 정화된 벌크에 과산화수소를 첨가함으로써 방지된다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시양태는 1) 제작 및 수거 동안 항체 디솔파이드 결합의 환원을 방지하는 단계, 또는 2) 세포 배양 배지 제조, 배지 저장, 세포 배양 공정 또는 항체 수거 동안 CN-Cb1의 HO-Cb1로의 전환을 억제하는 단계를 포함하는, 제작 동안 비타민 B₁₂가 항체에 결합하는 것을 억제하는 방법이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시양태는 1) 세포 배양 배지를 적색광 (>600 nm) 조건 하에 제조 및 저장하는 단계, 2) 목적 항체를 생성하는 세포를 적색광 조건 하에 배양하는 단계, 3) 세포 배양물로부터의 항체를 적색광 조건 하에 수거하는 단계, 및 4) 과산화수소를 수거 용액에 첨가하는 단계를 포함하는, 항체 생성 방법이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시양태는 1) 세포 배양 배지를 적색광 (>600 nm) 조건 하에 제조 및 저장하는 단계, 2) 목적 항체를 생성하는 세포를 적색광 조건 하에 배양하는 단계, 및 3) 세포 배양물로부터의 목적 항체를 적색광 조건 하에 수거하는 단계를 포함하는, 항체 생성 방법이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시양태는 1) 목적 항체를 생성하는 세포를 배양하는 단계, 2) 세포 배양물로부터 목적 항체를 수거하는 단계, 및 3) 과산화수소를 수거 용액에 첨가하는 단계를 포함하는, 항체 생성 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a-1d는 비타민 B₁₂ 및 2개의 mAb B 로트의 스펙트럼 흡수를 도시한다. 1a는 250 내지 800 nm에서의 비타민 B₁₂ 및 2개의 mAb B 로트 (PBS 중 5 mg/L의 비타민 B₁₂ (시아노코발라민) (청색 라인), 핑크색 로트 (적색 라인) 및 무색 로트 (자주색 라인))의 흡수 스펙트럼이다. 1b는 (1a)로부터 재축적된 플롯으로서 세부 사항을 도시한다. 1d는 가시적인 핑크색을 갖는 mAb B에 대한 단백질 A 용출물의 병이다.

도 2a-2d는 항체에 비타민 B₁₂의 부착이 2차 반응임을 도시한다. (2a) 2개의 무색의 mAb A 로트, 검출된 환원

된 항체 분자가 없는 로트 ("굳" 로트) 및 다수의 환원된 항체를 갖는 다른 로트 ("배드" 로트)를 CN-Cb1 또는 HO-Cb1과 혼합하였다. 인큐베이션 후, 과잉의 유리 비타민 B12를 제거하였다. 좌측부터 우측으로의 샘플, 굳 로트 및 CN-Cb1; 배드 로트 및 CN-Cb1; 굳 로트 및 HO-Cb1; 배드 로트 및 HO-Cb1; 배드 로트를 먼저 과산화수소로 처리한 후, HO-Cb1과 혼합하였다. (2b) 과산화수소는 환원된 항체를 산화시켜 CE SDS에 의해 나타낸 바와 같이 항체 단량체를 재형성할 수 있다. (2c) 2b에 나타낸 과산화수소 처리된 및 비처리된 mAb에서 mAb 단량체 및 다양한 저분자량 종의 정량화. (2d) 비타민 B₁₂ 부착 전 (청색 라인) 및 후 (흑색 라인)의 mAb A 배치 2 물질의 비환원된 CE-SDS 분석. 각각의 피크 패턴은 비타민 B₁₂와의 인큐베이션 전 및 후에 아마도 공기 중 유리 슬프히드릴 기의 산화 및 디슬파이드 결합의 재형성에 기인하여 변화되었다.

도 3a-3c는 비타민 B₁₂ 친구제이션의 확인을 위한 질량 스펙트럼 데이터를 도시한다. (3a) HO-Cb1로부터의 m/z = 664.79 및 CN-Cb1으로부터의 m/z = 678.29의 MS/MS 스펙트럼. (3b) 웨티드-코발라민 복합체 L19-코발라민 및 L18-19-코발라민의 MS/MS 스펙트럼. (3c) IgG4 항체 디슬파이드 결합의 도해. 비타민 B₁₂에 결합하는 시스테인 잔기는 청색으로 표시되고 디슬파이드 결합을 형성하는 시스테인 잔기 쌍은 적색으로 동그라미 표시된다.

도 4a-4e는 실시예 1에서 사용된 컬러 필터의 광 투과도 스펙트럼을 도시한다 (4a). (4b) 표준의 CN-Cb1 및 HO-Cb1; (4c) mAb A에 대한 새로운 배양 배지; (4d) 적색광에 노출된 배지; (4e) 녹색광에 노출된 배지의 RP-UPLC 상에서의 분리 및 360 nm에서의 검출에 대한 크로마토그램. (4d 및 4e)에서, 흑색, 청색 및 적색 라인은 각각 30만, 60만 및 120만 lux hr에서의 노출 에너지를 나타내었다.

도 5a-5c는 CB에서 유리 슬프히드릴 수준 및 저분자량 (LMW)을 도시한다. (5a) 상응하는 단백질 A 정제된 샘플 (PAVIB)에서 mAb 1 CB 샘플의 유리 티올 수준 및 LMW 존재의 상관관계. PAVIB는 LMW 중에 대해 NR_캘리퍼에 의해 분석되었다. LMW $\geq 5\%$ 인 샘플은 "예스"로 표시되고 그렇지 않으면 "노"로 표시된다. JMP 소프트웨어로 분석을 수행하였다. (5b) 상이한 수거 처리 하에 CB에서 유리 티올 수준의 측정. mAb 1을 함유하는 실험실 규모 생물반응기 (5-L)로부터의 정화된 수거 벌크 (CB)를 텍스트란 술페이트의 부재 또는 존재 하에 pH를 4.8로 낮춤으로써 처리하였다. CB 샘플을 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 샘플을 심층 여과하였다. 심층 여과 후, 각각의 샘플의 분취량을 1 mM NAPDH를 첨가하거나 첨가하지 않고 37°C에서 75분 동안 인큐베이션한 후, 유리 슬프히드릴 함량을 측정하였다. LMW 퍼센트가 높은 제작 로트 및 대표 로트 (정상 로트)도 비교를 위해 포함되었다. (5c) (5b)의 샘플에 대한 무손상 항체의 퍼센트. 무손상 항체는 단백질 A 정제 후 NR_캘리퍼에 의해 측정되었다.

도 6a-6f는 산화환원 지시약 DCPIP 처리 및 LMW 생성에 대한 예측 마커로서 색상 변화의 관찰을 도시한다. (6a) DCPIP의 구조 및 반응. (6b) >95% LMW (항체 단백질당 3.1개 슬프히드릴 기)를 갖는 좌측의 mAb2 정제된 DS 샘플은 DCPIP로 처리 시 무색을 나타내었다. 98% 초파의 무손상 항체 (항체 단백질당 0.4개의 슬프히드릴)를 갖는 우측의 mAb2 샘플은 DCPIP의 존재 하에 자주색 (pH 5.5)을 나타내었다. (6c) 상이한 배양 조건으로부터의 mAb 2의 CB에서 DCPIP의 색상 변화. 좌측 2개의 튜브에서 DCPIP는 완전히 무색이 되었으며, CB에 대해 존재하는 더 높은 환원 잠재력을 나타내고; 가운데 2개의 튜브에서 DCPIP는 청색을 띠었으며, 환원 이벤트가 없음을 나타내고; 오른쪽 튜브에서 DCPIP는 부분적으로 환원되었다. (6d) 세포 용해물의 mAb 2 퍼센트의 함수로서의 유리 티올 농도. mAb 2의 100% 세포 용해물을 정규의 CB와 혼합하여 세포 용해물의 희석 곡선을 생성하고, 유리 티올 농도를 측정하고, 중복 샘플의 평균으로 보고하였다. 선형 회귀 방정식 및 R 스퀘어를 엑셀로 계산하였다. (6e) DCPIP의 색상 변화 순서 및 유리 티올 양을 시험하기 위한 연구 설계. (6f) 표 7의 연구의 DCPIP 시험 결과의 이미지. 상단 패널의 샘플은 1차 회수 전 및 동안 공기와 접촉되었다. 하단의 샘플은 1차 회수 전 및 동안 질소 가스 풀러싱을 가졌다. 좌측에서 우측으로 시험 튜브의 순서는 표 7에서 위에서 아래로와 동일한 순서였다.

도 7a-7k는 디슬파이드 결합 환원을 방지하기 위해 과산화수소를 사용하는 것을 도시한다. mAb 2의 실험실 규모로 생성된 CB를 다양한 농도의 과산화수소를 갖는 용기에 분취하였다. 용기 내부의 공기가 없는 (airless) 상태는 질소 풀러싱에 의해 생성되었고, 실온에서 1일 동안 유지되었다. 생성된 샘플을 단백질 A 정제 없이 비환원 (7a, 7c, 7e, 7g, 7i) 및 환원된 (7b, 7d, 7f, 7h, 7j) 캘리퍼에 의해 직접적으로 분석하였다. (7a 및 7b) 과산화수소를 첨가하지 않은 CB를 대조군으로서 공기에 노출시켰다. 0 mM (7c 및 7d), 0.33 mM (7e 및 7f), 1 mM (7g 및 7h) 및 3 mM (7i 및 7j)의 과산화수소를 갖는 CB를 공기가 없는 조건에서 유지하였다. (7k) mAb 단편화의 비환원된 캘리퍼 결과의 요약. 숙주 세포로부터 분비된 이 mAb의 과량의 경쇄가 존재하였다. 경쇄의 양은 단편으로 포함되지 않았다. LMW 중에 사용된 약어: LC, 경쇄; HC, 중쇄; HL, 1개의 경쇄 및 1개의

중쇄를 갖는 반 항체 (half antibody); HHL, 1개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 부분 항체.

도 8a-8f는 최악의 경우에서 디슬파이드 결합 환원을 방지하기 위해 과산화수소를 사용한 평가를 도시한다. 시험된 mAb 2 CB는 실시예 2에 기재된 바와 같이 100% 세포 용해를 가졌다. 공기가 존재하거나 존재하지 않는 유지 조건은 도 7에서와 동일하였다. (8a) 과산화수소 처리가 없고 공기와 접촉된 CB 샘플은 대조군으로 사용된다. (8b) 과산화수소 처리가 없고 공기가 없는 조건에서 유지된 CB 샘플. (8c) 공기가 없는 조건에서 유지하기 전에 5 mM 과산화수소를 CB 샘플에 첨가하였다. (8d) 공기가 없는 조건에서 유지하기 전에 10 mM 과산화수소를 CB 샘플에 첨가하였다. 생성된 CB 샘플 (8a 내지 8d)을 단백질 A 정제 없이 비활원된 캘리퍼에 의해 직접적으로 분석하였다. (8e) 정제되지 않은 CB로부터의 mAb 단편화의 비활원된 캘리퍼 결과의 요약. (8f) 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제되고 비활원된 캘리퍼에 의해 분석된 샘플 8a 내지 8d로부터의 무손상 항체 순도의 요약.

도 9a-9d는 항체 디슬파이드 결합 환원을 방지하기 위한 대안적인 페옥사이드의 사용을 도시한다. 과탄산나트륨 및 과붕산나트륨을 100% 세포 용해를 갖는 mAb 2 CB의 최악의 경우에 사용하였다. (9a) 어떠한 페옥사이드도 없이 공기와 접촉된 CB 샘플. (9b) 어떠한 페옥사이드도 없이 공기가 없는 조건에서 유지된 CB 샘플. (9c) 5 mM 과탄산나트륨-처리된 CB 샘플의 대표적인 결과. 공기가 없는 조건에서 유지하기 전에 과탄산나트륨을 첨가하였다. 결과는 정제되지 않은 CB에 대한 비활원된 캘리퍼로부터의 것이다 (9a 내지 9c). (9d) 과탄산나트륨 및 과붕산나트륨 처리의 요약. 결과는 정제되지 않은 CB에 대한 비활원된 캘리퍼로부터의 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

생물제제 제작의 공정 제어는 치료 단백질의 제품 품질 및 안전성 및 로트간 일관성을 보장하는데 중요하다. 제작 동안 색상 생성 메커니즘의 이해는 제어 전략을 개발하는데 중요하다. 본 발명자들은 항체 제작 동안 핑크색의 생성이 환원된 항체의 유리 술프히드릴 기 및 비타민 B₁₂의 활성 형태인 히드록소코발라민 둘 다의 농도에 의존적인 2차 반응임을 밝혀내었다. 두 반응물 모두가 필요하며, 단독으로는 핑크색을 생성하기에 충분하지 않다. 본 발명은 1) 항체 제작 및 수거 동안 항체의 환원을 방지하거나 2) 항체 제작 및 수거 동안 시아노코발라민 (CN-Cb1)의 히드록소코발라민 (HO-Cb1)으로의 전환을 억제함으로써 항체 제작 동안 핑크색의 생성을 방지하는 방법이다. 대안적으로, 본 발명은 1) 항체 제작 및 수거 동안 항체의 환원을 방지하고 2) 항체 제작 및 수거 동안 시아노코발라민의 히드록소코발라민으로의 전환을 억제함으로써 항체 제작 동안 핑크색의 생성을 방지하는 방법이다.

[0020]

본 발명자들은 비타민 B₁₂의 활성 형태가 중쇄 134 (HC134), 경쇄 214 (LC214), 중쇄 321 (HC321), 중쇄 367 (HC367) 및 중쇄 425 (HC425)에 위치된 시스테인의 유리 술프히드릴 기에 부착한다는 것을 밝혀내었다. 5개의 시스테인 잔기는 Fab 및 Fc 영역 둘 다에 분포된다. 이들 5개의 시스테인 잔기 사이에 2쌍의 디슬파이드 결합, LC214와 HC134 및 HC367과 HC425가 있다 (도 3c). 이들 특정 디슬파이드 결합이 제작 및 수거 동안 환원되는 경우, 디슬파이드 쌍 내의 두 시스테인 잔기는 히드록소코발라민 부착에 대해 동일한 접근성을 갖는다.

[0021]

본원에 사용된 "시아노코발라민" 및 "CN-Cb1"은 상호교환적으로 사용되며, 세포 배양 배지의 비타민 B₁₂ (VB12) 성분을 지칭한다. 유사하게, "히드록소코발라민" 및 "HO-Cb1"은 상호교환적으로 사용되며, 제작 및 수거 동안 환원된 항체에 결합하는데 이용가능한 세포 배양 배지 중의 비타민 B₁₂ (VB12)의 활성 형태를 지칭한다.

[0022]

항체는 일반적으로 포유동물 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 생성되며, 세포 배양 배지로 세포외로 분비된다. 세포 배양 공정 말에, 세포는 수거 유체를 정화하기 위해 원심분리, 심층 여과 또는 솜털 침전과 같은 방법을 이용하여 1차 회수 단계 동안 배양 배지로부터 분리된다.

[0023]

본원에 사용된 "정화된 벌크" 및 "CB"는 상호교환적으로 사용되며, 세포 배양액을 정화하기 위해 이용되는 원심 분리, 심층 여과 또는 솜털 침전과 같은 방법을 이용하여 1차 회수 단계 후에 수집되는 용액을 지칭한다.

[0024]

본원에 사용된 "세포 배양 배지 제조" "세포 배양 배지 저장", "세포 배양 공정" "항체 제작", "항체 생성" 및 "항체 수거", "수거"는 항체를 생성하는데 필요한 많은 단계들을 지칭한다. 각각의 단계는 제작 시설 내의 상이한 위치에서 일어날 수 있다.

[0025]

핑크색의 제어 전략으로서 제작 환경에서 적색광의 사용

[0026]

히드록소코발라민 및 환원된 항체 둘 다가 핑크색 생성물의 생성에 요구되기 때문에, 하나 또는 두 요인의 제어

가 핑크색 생성을 방지할 것이다.

[0027] 광-유도된 비타민 B₁₂ 전환은 배지 제조, 배지 저장 및 세포 배양 처리 동안 발생할 수 있다. 유리 생물반응기에서 배지 제조, 저장 기간 및 세포 배양 기간에 투명한 일회용 바이오프로세싱 백의 사용은 비타민 B₁₂ 광 노출 및 전환의 위험을 증가시킨다. 일반적 제어 전략, 예컨대 적합한 용기 (예컨대, 스테인리스 강 용기)의 사용, 추가 층 물질로 피복, 불필요한 광 노출 회피는 광으로부터 보호를 제공할 수 있다. 그러나, 이를 전략은 도전 없이는 실행되지 않으며, 종종 추가 비용을 포함한다.

[0028] 실시예 1은 적색광이 CN-Cbl의 H0-Cbl로의 전환을 유도하지 않는다는 것을 나타낸다. 환원된 mAb A를 백색광 또는 적색광 또는 녹색광에 노출되거나 암실에 보관된 배양 배지에 스파이킹하였다. 밤새 인큐베이션한 후, mAb를 단백질 A 컬럼에 의해 정제하고, 결합된 비타민 B₁₂를 ELISA 검정에 의해 측정하였다. 표 7에 나타난 바와 같이, 비타민 B₁₂ 컨주케이션 비율의 순서는 백색광 > 녹색광 > 적색광 및 암실 대조군이었다.

[0029] 본 발명의 한 실시양태에서, 시아노코발라민의 히드록소코발라민으로의 전환은 세포 배양 배지가 제조되고 저장되는 영역에서 및 임의적으로 세포 배양물 제작 및 수거 영역에서 백색광을 적색광 (파장 >600 nm)으로 대체함으로써 억제, 감소 또는 방지된다.

[0030] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 시아노코발라민의 히드록소코발라민으로의 전환은 세포 배양 배지가 제조되고 저장되는 영역에서 및 임의적으로 세포 배양물 제작 및 수거 영역에서 백색광 전구를 적색 LED 광 전구 (파장 >600 nm)로 대체함으로써 억제, 감소 또는 방지된다.

[0031] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 시아노코발라민의 히드록소코발라민으로의 전환은 세포 배양 배지가 제조되고 저장되는 영역에서 및 임의적으로 세포 배양물 제작 및 수거 영역에서 백색광 전구 상에 적색 플라스틱 시트 또는 대안적으로 적색광 튜빙을 배치함으로써 억제, 감소 또는 방지된다.

[0032] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지가 제조 및 저장되는 영역 및 또한 세포 배양물 제작 및 수거 영역에서 백색광은 백색광 전구를 적색 LED 광 전구 (파장 >600 nm)로 대체하거나 백색광 전구 상에 적색광 플라스틱 시트 또는 대안적으로 적색광 튜빙을 배치함으로써 적색광으로 대체된다.

[0033] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지가 제조 및 저장되는 영역 및 또한 세포 배양물 수거 영역에서 백색광은 백색광 전구를 적색 LED 광 전구 (파장 >600 nm)로 대체하거나 백색광 전구 상에 적색광 플라스틱 시트 또는 대안적으로 적색광 튜빙을 배치함으로써 적색광으로 대체된다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지가 제조 및 저장되는 영역 및 또한 세포 배양물 제작 영역에서 백색광은 백색광 전구를 적색 LED 광 전구 (파장 >600 nm)로 대체하거나 백색광 전구 상에 적색광 플라스틱 시트 또는 대안적으로 적색광 튜빙을 배치함으로써 적색광으로 대체된다.

핑크색의 제어 전략으로서 단백질 수거 및 1차 회수 동안 항체 환원의 방지

[0035] 환원된 항체 및 히드록소코발라민 둘 다가 핑크색 생성물의 생성에 요구되기 때문에, 하나 또는 두 요인의 제어가 핑크색 생성을 방지할 것이다.

[0036] mAb 제작 동안 디슬파이드 결합의 환원은 효소적 산화환원 반응이며, 항체 제작 공정 동안 저분자량 종 (LMW) 형성의 근본 원인이다. LMW 생성의 원인은 잘 이해되지 않지만, LMW의 출현은 항체에 대해 환원 환경을 생성하는 세포 배양 조건, 예컨대 온도, 용존 산소 (DO), pH, 생존율, 세포 밀도 및 용해 퍼센트 등의 조합된 효과로부터 초래된다고 믿어진다. 이는 환원 환경에서 항체를 보유하는 정화된 벌크 (CB) 유지 조건 (예컨대, 온도, 지속기간, 통기)에 의해 더 악화된다. LMW의 검출은 일반적으로 정화된 벌크 또는 단백질 A 용출물 풀 단계에서 시각화된다.

[0037] 실시예 2는 유리 티올 수준이 100 mM 미만이면 LMW 생성의 위험이 낮고; 100-200 mM의 유리 티올 수준은 경고 신호이며; 200 mM 초과의 유리 티올 수준은 LMW 생성에 대한 높은 위험임을 나타낸다. 산화환원 반응에 수반되는 효소를 억제시키거나 중요한 효소 보조인자, 예컨대 NADPH (Mun M 2015, Trexler-Schmidt M 2010)를 산화 및 고갈시키기 위해 항체 환원을 방지하기 위한 많은 완화 전략이 제안되었다. 공기 스파징이 항체 환원을 방지하기 위한 강력한 방법으로 알려졌다. 그러나, 총 유리 티올 수준은 여전히 제작 동안 마이크로몰 수준에서 공기 없이 CB를 유지한 후 밀리몰 수준까지 다양할 수 있다 (표 7). 도 8은 정화된 벌크 조건의 최악의 경우에서 공기 노출이 항체 환원을 완전히 억제할 수 없음을 나타낸다.

[0039] 본 발명자들은 수거 동안 페옥사이드의 정화된 벌크에의 첨가가 항체 디슬파이드 결합의 환원 및 LMW 종의 생성을 방지한다는 것을 밝혀내었다. 페옥사이드를 사용하는 것의 이점은 1) 페옥사이드는 임의의 비유로 물과 혼합될 수 있고, 2) 과량의 페옥사이드의 제거는 다운스트림 정제에 부담이 되지 않을 것이라는 것을 포함한다. 그러나, 10 mM 과산화수소 (H_2O_2) 용액의 물 및 산소로의 완전한 분해로 이론적으로는 5 mM 산소를 생성하지만, 이 공정은 촉매의 부재 하에서 느린다.

[0040] 실시예 2는 과산화수소, 또는 대안적인 무기 또는 유기 페옥사이드, 예컨대 과탄산나트륨 또는 과붕산나트륨을 정화된 벌크에 첨가함으로써 항체 디슬파이드 결합 환원을 효과적으로 방지할 수 있음을 나타낸다.

[0041] 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 디슬파이드 결합 환원은 수거 시 과산화수소를 정화된 벌크에 첨가함으로써 방지된다.

[0042] 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 디슬파이드 결합 환원은 수거 시 무기 또는 유기 페옥사이드, 예컨대 과탄산나트륨 또는 과붕산나트륨을 정화된 벌크에 첨가함으로써 방지된다.

[0043] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 항체 디슬파이드 결합 환원은 수거 시 정화된 벌크의 과산화수소 농도를 $\leq 10\text{mM}$ 로 유지함으로써 방지된다.

[0044] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 항체 디슬파이드 결합 환원은 수거 시 정화된 벌크의 과산화수소 농도를 3 mM 내지 10 mM로 유지함으로써 방지된다.

[0045] 실시예

[0046] 실시예 1

[0047] 비타민 B12의 **mAb**와의 화합

[0048] 단백질 스톡

[0049] 2개의 상이한 치료 IgG4 분자 (**mAb A** 및 **B**)를 이 연구에 사용하였다. 이들 모두는 IgG1 쇄간 디슬파이드 결합 구조와 유사하도록 원래의 IgG4의 헌지 영역 모티프 CPSC에서 세린의 프롤린으로의 단일 포인트 돌연변이를 갖는다 (Liu H et al.: Mabs 2012, 4(1):17-23; Aalberse RC et al. Immunology 2002, 105(1):9-19). IgG4 항체를 CHO 세포에서 생성하였으며, 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 추가의 폴리싱 크로마토그래피 및 히스티딘-기반 완충액에 대한 최종 UF/DF 여과를 이용하여 정제하였다. 약물 물질 (DS)의 단백질 농도를 280 nm에서의 흡광도로 결정하였다.

[0050] 비타민 *B*₁₂ ELISA

[0051] 정제된 단백질과 회합된 비타민 *B*₁₂ (VB12)의 양의 측정은 제조업자의 권장 절차와 함께 상업적 VB12 측정 키트 (모노бин드 인크. (Monobind Inc.), 캘리포니아주 레이크 포레스트)를 사용하였다.

[0052] 약물 물질에 대한 시험관내 비타민 *B*₁₂ 결합

[0053] 히스티딘 기반 완충액 중의 **mAb A** 또는 **mAb B** 용액 (50 mg/ml)을 CN-Cb1 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), V2876, 스톡 용액 1 mg/ml 물) 또는 HO-Cb1 (시그마-알드리치, V5323, 스톡 용액 1 mg/ml 물)과 4:1 내지 2:1 (단백질:VB12)의 물비로 혼합하였다. 반응을 실온 및 암실에서 1일 동안 수행하였다. 포스페이트 식염수 완충액 (PBS, 시그마-알드리치, D5652)으로의 완충액 교환을 통과액에 더 이상 가시적인 색상이 없을 때까지 50 kDa 컷-오프 아미콘 원심분리 필터를 통해 달성하였다. 완충액-교환된 반응 용액을 펩티드 매핑 분석하였다.

[0054] 환원된 항체의 과산화수소 산화

[0055] 하나의 **mAb A** 로트는 제작 동안 부분적으로 환원된 디슬파이드 결합을 가졌다. 약물 물질을 4시간 동안 실온에서 0.1% 과산화수소 (30 mM)와 혼합하고, 과량의 과산화수소를 상기 언급된 바와 같이 완충액 교환에 의해 제거하였다.

[0056] 광 노출 연구

[0057] **mAb A**를 위해 새로 제조된 배지를 광 노출 연구에 사용하였다. CN-Cb1을 (1 mg/ml 스톡 용액으로부터) 10 mg/L의 최종 농도로 첨가하였다.

[0058] 13W의 백색광 소형 형광 전구 (CFL)를 가시광원으로 사용하였다. 360 nm에 집중된 13W의 상업적으로 구입가능

한 블랙광 전구를 UV-광원으로 사용하였다. 램프를 용액의 가열을 피하기 위해 분당 200 입방 피트의 유속으로 가스 배출 후드에 설치하였다. 벤치 표면을 광 반사를 피하기 위해 어둡게 하였다. 일반적인 실내 광 조건 (500-1,000 lux)를 가장하기 위해 샘플을 램프로부터 약 12-13 인치 떨어지게 배치하였다 (평균 강도는 투브 표면에서 672 lux였다). 광 강도를 광도계 (UVA 및 가시광 각각에 대해 스퍼 사이언티픽 (Sper Scientific) UVA/B 광도계 모델 850009 및 엑스텍 (Extech) HD400)에 의해 측정하였다. 색상 필터를 아버 사이언티픽 (Arbor Scientific) (키트 33-0190)으로부터 구입하였다. 필터의 투과도 스펙트럼이 도 4에 나타나 있다. 폴리카르보네이트 플라스틱 시트 (2.4 mm 두께)를 하드웨어 스토어에서 구입하고 UVA 광을 여과시키는데 사용하였다.

[0059] 모든 배지 샘플을 광원에 노출시키고, 가시광의 경우 30만, 60만 및 120만 lux hr (강도 × 노출 시간) 또는 UVA 광의 경우 평방 미터당 71 및 212 와트에서 샘플링하였다.

[0060] 유리 술프하이드릴 기 검정

[0061] 상기 방법은 문헌 (Arner ES et al. Methods Enzymol 1999, 300:226-239)으로부터 약간의 변형과 함께 엘만 시약, 3,3'-디티오-비스(6-나트로벤조산), 3-카복시-4-나트로페닐 디술파이드; 2,2'-디니트로-5,5'-디티오벤조산 (DTNB)을 사용한다. 간단히 설명하면, 10 μ L의 약물 물질 샘플을 96-웰 플레이트에서 15 μ L의 TE 완충액 (50 mM 트리스-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.6)과 혼합하였다. DTNB 용액 (에탄올 중 5 mg/ml, 시그마-알드리치, D8130)을 사용 전에 0.2 M 트리스 (pH 8) 중의 8 M 구아니딘-HCl과 1:9의 부피비로 새로 혼합하였다. 이어서, 100 μ L의 DTNB/구아니딘 용액을 각각의 웰에 첨가하고 혼합하였다. 412 nm에서의 스펙트럼 흡수를 측정하고, 13,600 $M^{-1} cm^{-1}$ 의 몰 흡광 계수 값을 계산에 사용하였다.

[0062] 항체 변성 시험

[0063] 열 변성을 위해, 1 mL의 **mAb A** (단백질 A 친화성 컬럼 정제 후 및 트리스로 중화)를 80°C에서 20분 동안 에펜도르프 시험 투브에서 가열하였다. 가열 및 냉각 후 가시적인 침전이 형성되었다. 투브를 18,000 xg에서 20분 동안 원심분리하였다. 상청액을 단백질 검정 (OD 280) 및 비타민 B₁₂ ELISA 검정에 사용하였다. SDS 변성을 위해, 0.25 mL의 약물 물질을 포스페이트 식염수 용액 (PBS) 중의 0.75 mL의 0.3% 나트륨 도데실 슬레이트 (SDS)와 혼합하고, 실온에도 1일 동안 방치하였다. 여분의 SDS를 50 kDa 컷-오프 아미콘 원심분리 필터를 통해 PBS로 완충액 교환에 의해 제거하였다.

[0064] LC/MS/MS를 사용한 약물 물질-비타민 B12 반응 혼합물의 웨티드 매핑 분석

[0065] **mAb A** 및 비타민 B₁₂를 함유하는 샘플을 사전 환원 또는 알킬화 없이 트립신으로 분해하였다. 트립신을 1:25 (중량/중량)의 효소 대 단백질 비율로 첨가하기 전에, 완충액 교환된 반응 혼합물을 분해 완충액 (50 mM 트리스-HCl, 10mM 염화칼슘 및 2M 우레아, pH7.6)을 사용하여 1 mg/mL로 희석하였다. 37°C에서 인큐베이션한 후, 분해된 혼합물을 직접적으로 LC/MS/MS 분석하였다. 써모피셔 Q-엑사티브 플러스 오비트랩 (ThermoFisher Q-EXACTIVE PLUS Orbitrap) 질량 분광계로 분석하기 전에, 약 10 μ g의 트립신 분해물을 워터스 액큐티 (Waters Acuity)TM UPLC를 사용하여 크로마티그라피로 분리하였다. 워터스 액큐티 BEH CSHTM C18 컬럼 (1.7 μ m, 2.1x100 mm)을 분리에 사용하였다 (45°C). 60분에 걸쳐 1% 내지 80% 이동상 B의 선형 구배를 사용하여 0.2 mL/min의 유속으로 웨티드를 용출하였다 (이동상 A: 물 중 0.1% 포름산 및 5 mM 포름산암모늄; 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산 및 5 mM 포름산암모늄). 오비트랩 질량 분광계를 3.0 kV의 스프레이 전압으로 양이온 모드로 작동하였다. 히터 온도 및 모세관 온도를 각각 300°C 및 275°C로 설정하였다. MS 획득을 70,000의 분해능으로 수행하였으며, 각각의 뉴티 사이클에서 10개의 가장 강한 이온을 17,500의 분해능으로 MS/MS 분석을 위해 선택하였다. 동적 제외 기능이 활성화되었다. 25의 정규화된 충돌 에너지를 사용하여 단편화 스펙트럼을 수득하였다.

[0066] 디술파이드 환원된 **mAb** 및 HO-Cb1 둘 다가 핑크색 생성에 필요하다. **mAb** 제작 동안, 핑크색은 일반적으로 단백질 A 용출 단계에서 나타나는 것으로 관찰되었으며, 여기서 **mAb**는 농축되고 배지 조성물로부터의 배경 색상이 제거되었다. 본 발명자들은 ELISA 방법에 의해 비타민 B₁₂ 함량을 분석하였으며, 핑크색 로트가 무색 배치보다 약 20배 높게 비타민 B₁₂를 갖는다는 것을 밝혀내었다 (표 1, 배치 1 대 2).

[0067]

<표 1>

mAb B의 비타민 B₁₂ (VB12) 부착 및 유리 티올

mAb B의 조건	VB12 (pg/ml)	단백질 (mg/ml)	VB12 (pg/mg)	# 유리 술프히드릴 기 / 단백질 분자*
배치 1, 핑크색 없음	1.10E+05	12.3	8.90E+03	0.2
배치 2, 핑크색	2.70E+06	14.8	1.80E+05	2.2
배치 2, 열 변성됨 85°C x 20 분/상정액	9.50E+04	0	NA	ND
배치 2, 0.3% SDS로 처리 및 완충액 교환 후	1.00E+06	3.2	3.10E+05	ND

[0068]

[0069]

비타민 B₁₂ 및 mAb의 분자량 및 농도에 기초하여, 착색된 물질은 47개의 mAb 분자에 약 1개의 비타민 B₁₂ 분자를 가졌다. 비타민 B₁₂는 360, 420, 및 550 nm 근처에서 3개의 주요 흡수 피크를 갖는다. 스펙트럼 스캐닝은 핑크색 배치가 320 nm 이상에서 무색 배치보다 더 높은 흡수를 갖는다는 것을 보여주었다 (도 1a 및 1b, 적색 라인 대 자주색 라인).

[0070]

디슬파이드 결합의 환원 및 유리 술프히드릴 기의 생성은 핑크색의 출현과 연관이 있다고 제안되었다 (Derfus GE et al.: Mabs 2014, 6(3):679-688). mAb B의 핑크색 로트로부터의 유리 술프히드릴 함량은 무색 배치보다 더 높은 유리 술프히드릴 수준을 가졌다 (표 1). 다른 한편, 높은 수준의 유리 술프히드릴 함량을 갖는 일부 배치 (mAb A에 대해 $N = 4$ 및 mAb B에 대해 $N = 2$)는 약물 물질에 핑크색을 나타내지 않았다. 예컨대, mAb A의 배치 2는 배치 1의 것보다 더 높은 수준의 유리 술프히드릴 기를 함유하였으나, 두 배치 모두 무색이었으며 유사한 수준의 비타민 B₁₂를 가졌다 (표 2). 이들 결과는 유리 술프히드릴 기가 필요하지만 단독으로는 핑크색 생성물을 생성하기에 충분하지 않다는 것을 나타낸다.

[0071]

<표 2>

mAb A의 비타민 B₁₂ 부착 및 유리 티올

mAb A의 조건	비타민 B ₁₂ (pg/mL)	단백질 (mg/ml)	VB12 (pg/mg)	유리 술프히드릴 기 / 단백질*
배치 1, 무색	2.00E+06	50	4.00E+04	0.4
배치 1 + CN-Cbl	4.61E+06	41.1	1.12E+05	ND
배치 1 + HO-Cbl	1.92E+07	44.5	4.32E+05	ND
배치 2, 무색	1.32E+06	50	2.64E+04	3.1
배치 2 + CN-Cbl	1.03E+07	42.1	2.45E+05	ND
배치 2 + HO-Cbl	1.39E+08	44.1	3.15E+06	ND
H ₂ O ₂ 처리된 배치 2 + HO-Cbl	7.18E+06	33.6	2.14E+05	0.3

[0072]

[0073]

비타민 B₁₂는 포유동물 세포 배양에 필수적인 보조인자이다. 가장 안정한 형태의 비타민 B₁₂인 CN-Cbl은 세포 배양 공정에서 사용되는 유일한 공급원이다. 광이 CN-Cbl을 mAb에 고도로 반응성인 HO-Cbl으로 전환시킬 수 있음이 보고되었다 (Prentice KM et al.: Mabs 2013, 5(6):974-981). 단백질로부터의 유리 티올 및 반응성 HO-Cbl 둘 다가 약물 물질에서 핑크색을 생성하는데 필요하다는 것을 입증하기 위해, CN-Cbl 또는 HO-Cbl을 낮은 (배치 1) 또는 높은 (배치 2) 수준의 유리 술프히드릴 함량을 갖는 mAb A와 인큐베이션함으로써 시험 패널을 설정하였다. 비타민 B₁₂ 이소형 및 mAb를 혼합하고, 실온에서 1일 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 이어서 유리 비타민 B₁₂를 여과에 의해 제거하였다. 보유된 비타민 B₁₂ 양 (표 2)은 (1) HO-Cbl이 동일한 배치 mAb와의 복합화에 대해 CN-Cbl보다 훨씬 더 활성적이고, (2) 더 높은 수준의 유리 술프히드릴 기를 갖는 약물 물질이 더 낮은 수준의 유리 술프히드릴 기를 갖는 약물 물질보다 더 반응적이고, (3) 가장 높은 비타민 B₁₂ 삼입이 HO-Cbl 및 높은 수준의 유리 술프히드릴 기를 갖는 약물 물질의 존재 하에서 발생함을 나타내었으며, 비타민 B₁₂가 100배 초과로 증가하였다. 각각의 샘플에서 비타민 B₁₂ 양으로부터 나오는 색상의 차이는 육안으로

분명했다 (도 2a).

[0074] 유리 술프히드릴 기는 단백질의 환원된 디슬파이드 결합으로부터 나온다. mAb 배치 2 약물 물질은 단백질 분자당 평균 3.1개의 유리 술프히드릴 기를 가졌으며 (표 2), 95% 초과의 항체 분자가 환원되었다 (도 2b 및 2c). 과산화수소 (0.1% v/v)를 배치 2 물질에 첨가하고, 저분자량 종 (LMW)의 대다수 (86.6%)를 항체 단량체로 전환시켰다 (도 2b 및 2c). 재산화된 물질은 더 낮은 유리 술프히드릴 수준 (H2O2 처리 후 및 HO-Cb1과의 인큐베이션 전에 측정됨) 및 HO-Cb1에 대해 더 낮은 반응성을 가졌다. 이들 결과는 핑크색의 발생이 2차 반응이며, 이의 속도가 두 반응물, 즉 유리 술프히드릴 기 및 HO-Cb1의 농도에 의존한다는 것을 입증한다.

[0075] **비타민 B₁₂는 항체에 공유적으로 결합한다.** 이전 문헌은 비록 비-공유적 특성은 제안하였지만 (Derfus et al., 2014) 비타민 B₁₂ 부착의 특성의 실험적 입증을 제공하지는 않는다. 추정된 비-공유적 회합은 비타민 B₁₂에 대한 항체 구조 및 전하 상보성을 필요로 하므로, 천연 단백질 구조의 파괴는 결합된 비타민 B₁₂를 방출시킬 것이다. 2가지의 변성 방법, 가열 및 SDS 처리가 사용되었다. 85°C에서 20분 동안 가열함으로써 mAb B의 핑크색 물질이 변성되고 침전되었다. 약간의 단백질을 함유하는 상청액은 출발 단백질 용액에 대해 단지 약 3.5%의 총 비타민 B₁₂를 가졌다 (표 1). SDS는 웨티드 골격에 결합하고 용액에 가용화된 변성된 단백질을 유지함으로써 단백질을 변성시킨다. 비타민 B₁₂ 검정은 전부는 아니지만 대부분의 비타민 B₁₂ 가 여전히 변성된 단백질과 회합되었음을 나타내었다 (표 1). 착색된 물질의 이동성 이동은 비환원된 모세관 전기영동-SDS (CE-SDS)에서 검출되었다. 초기 mAb A 약물 물질 및 mAb A-비타민 B₁₂ 착색된 복합체 둘 다는 디슬파이드 환원에 기인하여 비환원된 CESDS 상에서 다수의 밴드를 가졌다. 초기 물질에서 상응하는 피크와 중첩된 피크 이외에, 착색된 물질은 더 높은 분자량 측으로 이동하는 추가 피크를 가졌으며, 이동은 저분자량 피크, 예컨대 단일 경쇄 및 중쇄에서 더욱 분명하였다 (도 2d). 이 관찰은 mAb에 대한 비타민 B₁₂ 분자의 첨가로 쉽게 설명될 수 있다. 종합적으로, 이들 결과는 비타민 B₁₂가 변성된 단백질과 회합되고 변성 조건 하에서 단백질과 공동-이동한다는 것을 입증한다. 따라서, 비타민 B₁₂와 mAb 사이의 상호작용이 비-공유적 특성인 것 같지는 않다.

[0076] CN-Cb1 및 HO-Cb1 둘 다는 LC/MS/MS 분석에 의해 트립신 분해에서 관찰되었다. CN-Cb1 및 HO-Cb1에 대한 이론적 분자 질량은 각각 1254.567 및 1345.567 Da이다. CN-Cb1에 대해 관찰된 우세한 이온은 m/z 678.293에서의 이중 하전된 이온이며, 2개의 양성자 첨가를 갖는 CN-Cb1에 상응한다. 그러나, HO-Cb1에 대해 관찰된 가장 우세한 이온은 m/z 664.789에서의 이중 하전된 이온이며, 배위 화합물로부터 이탈하고 양성자를 첨가하는 OH 리간드를 갖는 B12-OH에 상응한다. HO-Cb1로부터의 m/z 664.789 종 및 CN-Cb1으로부터의 m/z 678.293의 MS/MS 스펙트럼이 각각 도 4a 및 4b에 나타나 있다. 147.09, 359.10, 456.72, 912.44, 및 1124.45의 m/z 값을 포함하여 2개의 MS/MS 스펙트럼으로부터 많은 공통된 단편 이온이 있다. CN-Cb1의 MS/MS 스펙트럼에서의 m/z 997.48 및 1209.49는 CoCN 기를 잃지 않으면서 m/z 912.44 및 1124.45을 갖는 종으로부터 유래된다.

[0077] 코발라민 및 IgG 사이의 배위 공유 결합은 트립신 분해물의 LC/MS/MS 분석에 의해 수개의 시스테인 잔기와의 배위를 통해 밝혀졌다. 각각의 경쇄에 5개의 시스테인 잔기 및 각각의 중쇄에 11개의 시스테인 잔기가 있다. 그러나, 이들 중 단지 5개 (L-C214, H-C134, H-C321, H-367, H-C425)가 표 3에 열거된 바와 같이 MS에 의해 코발라민과 배위 복합체를 형성하는 것으로 관찰되었다. L-C214는 경쇄의 C-말단에 위치되고, 이는 배위 공유 결합 형성에 관여되는 유일한 경쇄 시스테인 잔기이다.

[0078] <표 3>

IgG-비타민 B₁₂ 반응 혼합물의 트립신 분해물에서 관찰된 시스테인 함유 웨티드-코발라민 복합체

시스테인 잔기 위치	웨티드	웨티드 서열	계산된 웨티드 질량	코발라민-웨티드 복합체에 대한 계산된 질량	코발라민-웨티드 복합체에 대한 관찰된 이온	코발라민-웨티드 복합체에 대한 관찰된 질량
L-C214	L18-19	SFNRGEC	811.328	2139.893	713.970 (3+)	2139.894
L-C214	L19	GEC	307.084	1635.648	818.327 (2+)	1635.646
H-C134	H10	GPSVFLAPCSR	1229.623	2558.187	853.402 (3+)	2558.190
H-C321	H24	CK	249.115	1577.679	789.345 (2+)	1577.682
H-C367	H31	NQVSLTCLVK	1103.601	2432.165	811.395 (3+)	2432.169
H-C425	H36	WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	2744.222	4072.787	1018.953 (4+)	4072.801

[0080] 이는 2 ppm 질량 정확도 내에서 C-말단 L₁₈₋₁₉-Cb1 복합체 (1635.646 Da) 및 불완전 분해된 웨티드 L₁₈₋₁₉-Cb1 복합

체 (2139.894 Da)에 대해 관찰된 질량에 의해 입증된다. 이들 배위 복합체는 또한 MS/MS 분석에 의해 확인되었다. 이들 2개의 웹티드-Cb1 복합체의 MS/MS 스펙트럼은 매우 유사하며, 주로 코발라민으로부터의 단편으로 이루어진다. MS/MS 단편의 대부분은 HO-Cb1으로부터의 m/z 664.789 종의 MS/MS 스펙트럼과 비교함으로써 확인될 수 있다. 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, m/z 147.09, 359.10, 486.24는 HO-Cb1의 MS/MS 스펙트럼에서와 정확히 동일하다. 또한, m/z 971.47 및 1183.48을 갖는 종은 m/z 912.44 및 1124.45와 코발트 (원자 질량 58.93 Da)을 갖는 동일한 구조로 이루어진다.

[0081] 유사하게, 중쇄 상의 4개의 시스테인은 코발라민과 배위 결합을 형성하는 것으로 확인되었다. H-C134는 FAB 영역에서 L-C214와의 디슬파이드 결합의 카운터 파트이다. 다른 3개의 시스테인 잔기 H-C321, HC-C367 및 H-C425는 중쇄 Fc 영역 상의 3개의 C-말단 시스테인이다. 추가로, HC-C367 및 H-C425는 천연 IgG4에서 짹형성 디슬파이드 브릿지이다.

[0082] CN-Cb1의 HO-Cb1로의 광 전환 및 핑크색 생성물의 공정 제어. 상기 논의된 바와 같이, 핑크색 반응은 환원된 항체 분자 및 HO-Cb1의 농도에 의존하는 2차 반응이다. 따라서, 공정 제어 전략은 항체 분자의 환원 및/또는 HO-Cb1의 생성을 방지하는 것을 요구한다. 항체 생성물의 환원 제어는 항체 재설계 (Peters SJ et al. J Biol Chem 2012, 287(29):24525-24533; Aalberse RC et al., 2002), 배양 배지 조성 (Trexler-Schmidt M et al. Biotechnol Bioeng 2010, 106(3):452-461), 공정 파라미터 (Mun M et al. Biotechnol Bioeng 2015, 112(4):734-742) 및 수거 처리 (Trexler-Schmidt M et al., 2010)를 수반할 수 있는 매우 복잡한 공정이다. 가시광 노출을 포함으로써 HO-Cb1의 양을 제어하는 것은 대안적 전략이다. 그러나, 이를 옵션은 조작상의 불편을 초래할 수 있고 세포주 특이적일 수 있다.

[0083] 본 발명자들은 CN-Cb1 전환을 일으키는 파장을 확인함으로써 이 문제에 접근하고 광원으로부터 손상 파장을 제거함으로써 제어 전략을 설정하였다. 비타민 B₁₂는 UVA 및 가시광 모두를 흡수한다 (도 1). 새로 제조된 mAb A 배양 배지를 (1) 500-1,000 lux의 강도를 갖는 백색 형광 튜브로부터 제공되는 일반 실험실 광, 또는 (2) CFL 형광 전구에 의해 제공되는 강화된 가시광, 또는 (3) 360 nm에 집중된 강화된 UVA 광 하에 노출시켰다. CN-Cb1 및 HO-Cb1을 RP-UPLC에 의해 분리하고 정량화하였다 (도 4b). 결과는 주로 CN-Cb1을 HO-Cb1으로 전환시킨 것은 가시광이었으며 UVA 광이 아니었음을 나타낸다 (표 4). 전환율은 일반 실험실 광 및 고강도 가시광 모두로부터의 전체 조명 (강도 × 시간)의 함수였다.

표 4

CN-Cb1 전환을 담당하는 광은 가시광이며 UVA 광이 아님

조건	총 에너지 *	VB12	
		CN-B12 %	HO-B12 %
광 없음, 대조	0	100	0
Rm 광 (672 lux), 4일	64.5	74.0	26.0
Rm 광 (672 lux), 7일	113	63.8	36.2
Rm 광 (672 lux), 11일	177	55.0	45.0
Rm 광 (672 lux), 14일	226	47.8	52.2
가시광 (7.3 klux), 1일	175	64.0	36.0
가시광 (7.3 klux), 4일	701	32.7	67.3
가시광 (7.3 klux), 7일	1226	23.8	76.2
UVA 광 (2.95 와트/평방 미터), 1일	70.8	83.4	16.6
UVA 광 (2.95 와트/평방 미터), 3일	212.4	79.0	21.0

* 에너지 단위는 가시광의 경우 Klux hr^{0.5} 고, UVA 광의 경우 와트/평방 미터이다.

[0085] [0086] 다음으로, 본 발명자들은 에너지의 함수로서 CN-Cb1의 전환을 유발할 수 있는 가시 광상 (또는 색상)의 범위를 조사하였다. 선택된 색상 필터를 사용하여 특정 광상 컷오프를 갖는 광을 생성하여 광 스펙트럼의 특정 영역을 분리하였다 (도 4a). 표 5에 나타난 바와 같이, CN-Cb1 전환 정도는 상이한 색상 광에 대한 노출 시간의 함수이다. 폴리카르보네이트 유리는 대부분의 UVA 광은 차단할 수 있으나 가시광에는 투명하므로, CN-Cb1 전환을 방지하지 못했다. 광상이 600 nm를 초과하는 적색광에 대한 노출은 CN-Cb1 전환율이 가장 느렸다 (도 4d). 대

조적으로, 녹색광 (도 4e) 및 청색광 둘 다는 훨씬 높은 CN-Cb1 전환율을 갖는다. CN-Cb1은 이 연구에 사용된 청색 및 녹색 광 스펙트럼과 중첩되는 420 nm 및 500-550 nm 영역에서 흡수 피크를 갖는다. 이를 결과는 상이한 색상의 광이 CN-Cb1 전환에 상이한 영향을 가지며 < 600 nm 보다 큰 파장만이 CN-Cb1 전환을 유발할 수 있다는 우리의 견해를 뒷받침하는 확실한 증거를 제공한다.

[0087]

<표 5>

CN-Cb1 전환에 대한 색상 광의 영향

필터	조건	B12-CN %	B12-OH %
대조군, 어둠에 싸임	모든 샘플을 분석할 준비가 될 때까지 4°C에서 저장	95	5
어둠에 싸임	실온, 14일	93	7
어둠에 싸임	실온, 26일	84	16
CFL 백색 광	30만 lux hr	57	43
CFL 백색 광	60만 lux hr	25	75
CFL 백색 광	120만 lux hr	6	94
CFL 광, 폴리카르보네이트 시트	40만 lux hr	41	59
CFL 광, 폴리카르보네이트 시트	60만 lux hr	17	83
CFL 광, 폴리카르보네이트 시트	170만 lux hr	0	100
기본 적색 필터	30만 lux hr	88	12
기본 적색 필터	60만 lux hr	83	17
기본 적색 필터	120만 lux hr	76	24
기본 녹색 필터	30만 lux hr	52	48
기본 녹색 필터	60만 lux hr	23	77
기본 녹색 필터	120만 lux hr	7	93
진한 청색 필터	30만 lux hr	3	97
짙은 호박색 필터	30만 lux hr	57	43
짙은 호박색 필터	60만 lux hr	52	48
짙은 호박색 필터	120만 lux hr	23	77

[0088]

[0089]

평크색의 제어 전략으로서 제작 환경에서 적색광의 사용. 일반적 백색 형광 대신 적색광의 사용을 실험실 환경에서 시험하였다. 환원된 mAb A (표 2에서 배치 2 생성물)를 수거 시 실제 세포 배양에서와 유사한 mAb A 농도로 배양 배지로 스파이킹하였다. 배양 배지를 미리 백색광, 적색광 또는 녹색광 (120만 lux hr)에 노출시켰다. 암실에서 밤새 (20시간) 인큐베이션한 후, mAb를 단백질 A 컬럼에 의해 정제하고, 결합된 비타민 B₁₂를 ELISA 검정으로 측정하였다. 표 6에 나타난 바와 같이, 적색광 노출 및 암실 대조군에서의 것보다 백색광 및 녹색광 노출된 배지 둘 다에서 비타민 B₁₂ 부착이 더 많았다. 이를 결과는 적색광이 실제로 CN-Cb1을 전환으로부터 보호할 수 있음을 나타낸다.

[0090]

<표 6>

다양한 색상의 광에 노출된 CB로 스파이킹된 mAb A 약물 물질

조건	단백질 (mg/ml)	VB12 (pg/mL)	VB12 (pg/mg)
대조군 CB (암실 대조군, 26 일) + DS	1.57	1.38E+04	8813
백색 CFL 광 CB (1.2 mluxhr) +DS	1.58	1.17E+05	73861
적색 필터 CB (1.2 mluxhr) + DS	1.56	1.36E+04	8704
녹색 필터 CB (1.2 mluxhr)+ DS	1.74	5.51E+04	31646

[0091]

실시예 2

제작 공정 동안 항체 디슬파이드 결합 환원을 방지하기 위한 과산화수소의 사용

[0094]

단백질 스톡

[0095]

2개의 IgG4 분자 (1 및 2) 및 2개의 IgG1 분자 (3 및 4)를 이 연구에 사용하였다. IgG4 분자는 IgG1 쇄간 디슬파이드 결합 구조 CPPC와 유사하도록 원래의 IgG4의 헌지 영역 모티프 CPSC에서 세린의 프롤린으로의 단일 포인트 돌연변이를 갖는다 (Liu H et al. MAbs. 2012;4:17-23, Aalberse RC et al. Immunology 2002;105:9-19). 모든 mAb는 50 내지 90% 범위의 세포 생존율로 CHO 세포 배양으로 생성되었다. 정화된 벌크 (CB)는 일반적으로 달리 명시되지 않는 한 심층 여과로 생성되었으며, 이 경우 원심분리에 의해 생성되었다. 일부 경우에 mAb 1 세포 배양물을 심층 여과 전에 낮은 pH와 텍스트란 술페이트로 처리하였다. 다운스트림 정제를 단백질 A 크로마토그래피, 추가의 폴리싱 크로마토그래피 단계 및 히스티딘-슈가-기반 완충액에서의 최종 한외여과/투석여과 단계에 의해 달성하였다. 단백질 농도를 드롭센스-96 (Dropsense-96) 분광계 (트리닌 NV (Trinean NV), 벨기에 젠트 9050)에 의해 280 nm (A280)에서의 흡광도에 의해 결정하였다.

[0096]

유리 솔프하드릴 함량 (티올) 검정

[0097]

상기 방법은 문헌 (Arner ES et al. Methods Enzymol 1999, 300:226-239)으로부터 약간의 변형과 함께 2,2'-디니트로-5,5'-디티오벤조산 (DTNB)을 사용하였다. 간단히 설명하면, 10 mL의 정화된 벌크 또는 약물 물질 (DS) 샘플을 96-웰 플레이트에서 15 mL의 TE 완충액 (50 mM 트리스-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.6)과 혼합하였다. DTNB 용액 (에탄올 중 5 mg/ml, 시그마-알드리치, D8130)을 사용 전에 0.2 M 트리스 (pH 8) 중의 8 M 구아니딘-HCl과 1:9의 부피비로 새로 혼합하였다. 100 mL의 DTNB/구아니딘 용액을 각각의 웰에 첨가하고 혼합하였다. 이중 샘플을 시험하였다. 412 nm에서의 스펙트럼 흡수를 측정하고, $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 의 몰 흡광 계수 값을 유리 티올 함량의 계산에 사용하였다.

[0098]

산화환원 지시약 검정

[0099]

2,6-디클로로페놀린도페놀 (D2932, 스펙트럼 케미컬 MFG 코포레이션 (Spectrum Chemical MFG Corp), 캘리포니아 주)을 물 중에 용해시켜 새로운 1% 스톡 용액을 제조하였다. 2,6-디클로로페놀린도페놀의 산화된 형태는 중성 pH에서 청색이었으며, 환원 시 무색이 되었다. 산성 pH에서, 2,6-디클로로페놀린도페놀의 산화된 형태는 자주색이었으며, 환원 시 무색으로 변하였다. 환원된 및 비환원된 샘플에 대한 DCPIP 색상 범위를 결정하기 위해서, 100% mAb 2 세포 용해물을 원심분리에 의해 생성된 정규의 정화된 벌크와 혼합하여 세포 용해물의 일련의 0, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 및 70% 희석물을 생성하였다. 각각의 희석물의 유리 티올 함량을 즉시 측정하고, 희석의 함수로서 플로팅하였다 (도 6d). DCPIP (10 mL)를 세포 용해물의 일련의 희석물 (1 mL, 실온)에 첨가하여 수초 내지 수분의 기간 내에 육안 검사에 의해 어떤 희석물이 색상 변화를 나타내는지를 결정하였다.

[0100]

비환원된 및 환원된 캘리퍼

[0101]

LabChip GXII 터치 (Touch) HT 시스템 (퍼킨엘머 (PerkinElmer)을 환원 (R_캘리퍼) 및 비환원 (NR_캘리퍼) 둘 다의 조건 하에 제조업자의 권장에 따라 mAb 순도 분석에 사용하였다. NR_캘리퍼는 2개의 중쇄 1개의 경쇄 (HHL), 1개의 중쇄 1개의 경쇄 (HL), 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC)를 포함하는 항체 단편을 분리하고 정량화하는 가장 편리한 고처리량 수단이었다. 크기-배제 크로마토그래피를 이용하여 무손상 mAb 및 고분자량 (HMW) 종을 모

니터링하였다.

[0102] *mAb*에 대한 항체 산화의 질량 분광분석 측정

[0103] *mAb 2 및 3*으로부터의 샘플을 디티오트레이톨에 의해 환원시키고, 아이오도아세트아미드에 의해 알킬화시키고, 트립신으로 분해하였다. 트립신 분해물을, 써모 사이언티픽 오비트랩 Q-엑삭티베텀 플러스 (Thermo Scientific Orbitrap Q-EXACTIVETM PLUS) 질량 분광계 (브레멘 (Bremen), 독일)로 분석하기 전, 워터스 액큐티 UPLC 시스템 (밀포드 (Milford), 미국 메사추세츠주)을 사용하여 크로마토그래피로 분리하였다. 워터스 액큐티 BEH C18 컬럼 (1.7 mm, 2.1 × 150 mm)을 분리에 사용하였다 (40°C). 110분에 걸쳐 2% 내지 80% 이동상 B의 선형 구배를 사용하여 0.2 mL/min의 유속으로 펩티드를 용출하였다 (이동상 A: 물 중 0.1% 포름산; 이동상 B: 아세토니트릴 중 0.1% 포름산).

[0104] Q 엑삭티브 플러스 질량 분광계를 MS와 MS/MS 획득 간의 스위칭을 위해 데이터-의존적 방식으로 작동하였다. 40의 쉬스 (sheath) 가스 유속, 10의 보조 가스 유속, 3 kV의 스프레이 전압, 275°C의 모세관 온도 및 60의 S-렌즈 (S-Lens) RF 수준을 이용하여 이온을 발생시켰다. 해상도는 조사 스캔 및 MS/MS 이벤트 각각에 대해 70,000 (AGC 표적 3e6) 및 17,500 (AGC 표적 1e5)으로 설정되었다. 10초의 동적 제외 기간을 단일 반복 카운트와 함께 사용하였다. 상대적 정량화는 조사 스캔의 선택된 이온 크로마토그램에서 산화된 펩티드의 퍼크 영역을 천연 펩티드 및 산화된 펩티드의 합으로 나눔으로써 달성되었다.

[0105] 과산화수소 및 다른 페옥사이드 처리

[0106] 과산화수소의 30% 스톡 (시그마-알드리치 카달로그 216763, 1.11 g/mL의 밀도)을 사용 전에 물로 3% 스톡 (v/v, 980 mM과 동일)로 회석하였다. 3% 스톡을 세포 배양물 또는 CB에 목적하는 바에 따라 0.1 내지 20 mM의 최종 농도로 첨가하였다. 항체 디슬파이드 환원에 대한 과산화수소의 영향을 시험하기 위해, 과산화수소 스톡을 0, 0.1, 0.33, 1, 3, 5, 10 또는 20 mM의 최종 농도로 CB에 첨가하였다.

[0107] 또한, 과산화수소를 함유하는 2개의 무기 화합물질, 과탄산나트륨 (시그마-알드리치, 카달로그 371432, 2Na2CO3 3H2O2) 및 과붕산나트륨 (시그마-알드리치, Cat. 372862, NaB03 H2O)을 시험하였다. 과탄산나트륨 및 과붕산나트륨은 둘 다 물과 접촉 시 가수분해되어 과산화수소, 및 각각 카보네이트 또는 보레이트를 생성한다.

[0108] 디슬파이드 결합 환원의 소규모 모델

[0109] 흡인 캡 (플렉스바이오시스 (FlexBioSys), 카달로그 FXB-500M-0005)을 갖는 500 mL 병을 300 mL의 정화된 벌크로 충전하였다. 대안적으로, 50 mL 바이오프로세스 (BioProcess) 백 (써모피셔, 카달로그 SH30658.11)을 30 mL의 정화된 벌크로 충전하였다. 용기를 순수 질소 가스 공급 라인에 연결하고, 질소 가스 (≤5 psi)로 실온에서 1 내지 2시간 동안 풀려싱한 후, 공기가 없는 조건에서 1일 동안 밀폐를 유지하였다. 유지 후, 샘플을 유리 티울 검정으로 즉시 분석하거나 NR_캘리퍼로 분석하기 전에 아이오도아세트아미드 (최종 농도 20 mM)와 혼합하였다.

[0110] 항체 디슬파이드 결합 환원에 대한 최악의 경우를 생성하기 위해, 100% 세포 파괴를 기계적 파괴에 의해 인위적으로 유도하였다. 세포 배양물을 원심분리시키고 (500 g, 20분 동안), 세포 펠렛을 RIPA 완충액 (써모피셔, 카달로그 8990, 25 mM 트리스, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 1% NP-40, pH 7.6) 중 최초 부피의 1/10로 재현탁시키고, 실온에서 30분 동안 진탕시키면서 용해시킨 후, 얼음 상에서 냉각시키고, 조직 균질화기를 통해 3분 동안 고속으로 통과시켰다. 이들 단계로 총 세포 용해를 달성한 것으로 가정하였다. 이어서, 용해된 물질을 다시 원심분리된 상청액에 첨가하였다. 이 세포 용해물을 과산화수소를 갖거나 갖지 않는 50 mL 백에 충전한 후, 질소 가스로 풀려싱하고, 상기 기재된 바와 같이 공기가 없는 조건에서 실온에서 1일 동안 유지하였다. 인큐베이션 후, 세포 용해물을 3,000 g에서 60분 동안 4°C에서 2회 원심분리하고, 0.2 마이크론 필터를 통과시키고, 상기 기재된 바와 같이 분석하였다.

[0111] 과산화수소 처리 및 제품 품질 속성에 대한 이의 영향

[0112] *mAb 4*의 경우, 실험실 규모의 생물반응기로부터의 세포 배양액을 하기 2개의 실험에 사용하였다. 제1 실험에서, 정화된 벌크를 원심분리 및 0.2 마이크론 필터를 사용한 여과에 의해 생성하였다. 생성된 정화된 벌크를 (a) 4°C에서 4일 동안 대조군으로서 저장하거나 (b) 10 mM 페옥사이드의 최종 농도로 과산화수소와 배합하고 4°C에서 4일 동안 저장하였다. 제2 실험에서, 과산화수소를 세포 배양액 (세포를 가짐)에 첨가하고, 원심분리 전에 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 생성된 정화된 벌크를 (a) 4°C에서 4일 동안 대조군으로서 저장하거나 (b) 3일째에 실온에 두고 질소 가스로 풀려싱하고, 다른 날 동안 실온에서 유지하였다.

[0113] 모든 생성된 샘플을 공정 중심 포인트 조건을 이용하여 단백질 A 크로마토그래피에 이은 낮은 pH 바이러스 불활성화 및 중화 단계를 통해 처리하였다. 제품 품질 속성을 크기-배제 초고성능 액체 크로마토그래피로 평가하여 무손상 항체 및 응집체 수준을 전하 변이체 분포에 대해 이미지화된 모세관 등전점 포커싱에 의해 및 순도에 대해 환원 및 비환원 둘 다의 조건 하에 캘리퍼에 의해 분석하였다. 공정 불순물을 숙주 세포 단백질에 대해 ELISA에 의해 및 잔류 DNA에 대해 qPCR에 의해 추정하였다.

[0114] **mAb 2**에 대해, 과산화수소를 0, 3, 5 및 10 mM의 최종 농도로 정화된 벌크에 첨가한 후, 실온에서 1일 동안 질소 가스 풀러닝 하에 유지하였다. 생성된 샘플을 분석 전에 고처리량 단백질 A 크로마토그래피를 통해 처리하였다.

[0115] **제작 동안 디슬파이드 결합 환원**

[0116] **mAb**의 환원을 정화된 벌크 (CB) 또는 단백질 A 용출물 (PAE)에서 수개의 IgG1 및 IgG4 항체 분자에 대한 공정 개발에서 관찰하였다.

[0117] 다른 그룹과 마찬가지로, 본 발명자들은 수거 및 1차 회수 동안 정화된 벌크 중의 총 유리 티올의 축적을 관찰하였다 WO 2015/085003, Ruaudel J, et al. BMC Proceedings 2015;9(9):24). 디슬파이드 환원을 나타내지 않았던 샘플 대비 디슬파이드 환원을 나타내었던 **mAb 1** 정화된 벌크의 샘플들 간의 유리 티올 농도의 차이는 상당하였다 (도 5a). **mAb 1**의 경우, 정화된 벌크 중의 유리 티올 수준이 100 mM 미만일 때, 저분자량 생성 위험이 낮았으며; 100-200 mM의 유리 티올 수준은 잠재적인 위험을 제기했으며; 200 mM 초과의 유리 티올 수준은 저분자량 생성에 대한 위험이 높았다. 엘만 시약 (2,2'-디니트로-5,5'-디티오벤조산; DTNB)이 단백질의 유리 술프 히드릴 기 이외에 환원된 글루타티온, 시스테인 및 리포산과 같은 작은 술프히드릴-함유 분자로부터의 술프히드릴 기 모두와 반응한다는 점에 주목할 가치가 있다. 따라서, 유리 티올 수준의 기준선 수준은 세포주, 배양 배지 조성 (작은 술프히드릴-함유 분자) 및 세포 생존율에 의존한다. 그럼에도 불구하고, 디슬파이드 결합의 환원이 발생했을 때, 유리 티올 수준은 기준선보다 훨씬 더 높은 경향이 있었다.

[0118] 정화된 벌크에서 유리 티올 수준은 매우 동적이며 조성 및 취급 공정과 관련된다. 공기 노출 이외에, 다른 요인, 예컨대 저장 온도 및 pH가 또한 동역학에 기여한다. **mAb 1** 정화된 벌크의 pH를 7 내지 4.8로 조정하고 이어 심층 여과에 의해 세포를 제거하여 유리 티올 수준 및 관찰된 저분자량 퍼센트를 약간 감소시켰다 (도 5b 및 5c). 세포 수거물을 pH 4.8 및 텍스트란 술페이트 (0.05 g/L 및 60분 동안 혼합에 이어 원심분리 및 여과)의 조합으로 처리 시, 유리 티올 수준이 상당히 떨어졌으며, 솜털침전이 Trx/TrxR 및 G1u/GR를 포함하여 숙주 세포 단백질을 제거하고 또한 일부 작은 술프히드릴-함유 분자를 제거할 수 있다는 관찰과 일치한다. 유리 티올의 수준은 또한 온도에 따라 변하였다. 대조군 정화된 벌크의 37°C에서 75분 동안의 인큐베이션은 유리 티올 함량을 60% 떨어뜨렸다. 그러나, TrxR 및 GR 반응에 필수 성분인 1 mM NADPH가 37°C 인큐베이션 전에 용액에 첨가되는 경우, 유리 티올 수준의 증가가 대조군 및 pH 조정된 CB에서 나타났다 (도 5a). 이를 동적인 변화는 유리 티올 수준이 저분자량 발생의 위험을 보다 잘 예측하기 위해 수건전 내지 수거후 단계에서 모니터링되어야 한다는 것을 나타낸다.

[0119] **디슬파이드 결합 환원을 예측하기 위해 산화환원 지시약을 사용**

[0120] 디슬파이드 결합 환원은 산화환원 반응이므로, DTNB 시험을 대체하고 수거 및 회수 동안 저분자량 형성의 잠재적 위험을 예측하기 위한 간단하고 신속하며 강력한 방법으로 산화환원 지시약을 사용할 수 있다. 산화환원 지시약은 pH 지시약이 특정 pH에서 색상 변화를 겪는 것과 유사한 방식으로 특정 전극 전위에서 명확한 색상 변화를 겪는다. 적합한 산화환원 지시약을 발견하기 위해, 상업적으로 구입 가능한 산화환원 지시약의 어레이를 시험하였으며, 수개가 생물체제 제작 공정에 사용될 수 있는 최고의 잠재적 후보물로서 확인되었다.

[0121] 산화환원 지시약의 예는 2,6-디클로로페놀린도페놀이다 (DCPIP, 도 6a). 이의 색상은 높은 퍼센트의 저분자량을 갖는 **mAb 2** 정제된 약물 물질에서 변하였고 (도 6b), 이의 색상은 각각 고, 중 및 저 수준의 유리 티올을 갖는 정화된 벌크에서 완전히 또는 부분적으로 변하거나 또는 변하지 않을 수 있다 (도 6c). DCPIP 색상 변화 범위를 결정하기 위해, DCPIP 스톡 용액을 공지된 유리 티올 농도를 갖는 **mAb 2** 세포 용해물의 일련의 희석물에 첨가하였다 (도 6d). DCPIP는 3-5% 세포 용해물 및 80-100 mM 범위의 유리 티올 농도를 갖는 **mAb 2** CB에서 색상 변화를 겪었다. 따라서, 정화된 벌크 샘플이 100 mM보다 높은 유리 티올 농도를 가질 때, DCPIP는 색상을 변화시키며, 이 특징은 DCPIP가 제작 동안 디슬파이드 결합 환원의 위험을 예측하는데 신속하고 사용하기 쉬운 방법이 되게 한다.

[0122] DCPIP의 색상 변화가 유리 티올 수준과 상관관계가 있고 저분자량 생성을 정확히 예측할 수 있는지를 검사하기

위한 연구가 설계되었다 (도 6e). **mAb 3** 정화된 벌크를 처리 전에 필터 트레이의 공기 또는 질소 가스 플러싱과 함께 심층 여과에 의해 생성하였다. 질소 가스 플러싱을 사용하여 수거 공정 동안 유체에 노출된 산소가 없는 "공기가 없는" 상태를 생성하였다. 생성된 정화된 벌크를 액체 부피에 대해 0, 20, 50 및 100% 공기 오버레이 헤드스페이스 부피를 갖는 소형 용기로 분취하고, 4°C, 24°C 및 37°C에서 1일 동안 인큐베이션하였다. 표 7에 나타낸 바와 같이, 수거 및 회수 동안 공기의 존재는 저분자량 생성의 방지에 중요하였다. 이 경우, 출발의 정화된 벌크는 공기가 없는 조건 (207 mM)에 비해 더 낮은 유리 티올 농도 (51 mM)를 가졌으며, 용존 산소 (DO) 수준은 심지어 공기 오버레이 퍼센트의 유지 조건 동안 및 상이한 온도에서도 저분자량 생성을 억제하기에 충분하였다 ($\geq 37\%$).

[0123] <표 7>

다양한 공기 있는 조건 및 공기 없는 조건에서 생성되고 유지된 **mAb 3** 정화된 벌크에서 유리 티올 농도 및 DCPIP 색상 변화

수거 동안 공기 노출 (Y/N)	공기 오버레이 양 (액체에 대한 %)	저장 온도	공기 포화 %	CO2 포화 %	유리 SH 기 농도 (μM)	DCPIP 색상 변화	NR_캘리퍼 % 단량체
Y	NA	0	NA	NA	51	NA	96.5
N	NA	0	NA	NA	207	NA	96.5
Y	0	37	37	6.4	36	정색	95.1
Y	0	24	91.3	7.1	42	정색	96
Y	0	4	100	7.5	46	정색	96.3
Y	20	37	77.8	6.1	36	정색	94.9
Y	20	24	100	6.4	46	정색	96.4
Y	20	4	100	6.9	47	정색	96.6
Y	50	37	84.1	5.3	38	정색	95
Y	50	24	100	6.3	47	정색	96.3
Y	50	4	100	6.9	49	정색	96.5
Y	100	37	96.1	4.7	34	정색	94.9
Y	100	24	100	5.4	70	정색	95.8
Y	100	4	100	6.2	49	정색	96.2
N	0	37	38.2	6.4	38	정색	96
N	0	24	14.7	9.7	335	무색	81.6
N	0	4	36	7.3	171	무색	96.3
N	20	37	70.1	5.5	34	정색	95.4
N	20	24	62.9	7.5	84	부분적 변화	96.7
N	20	4	92.9	6.9	121	무색	96.6
N	50	37	85.5	4.7	33	정색	95.7
N	50	24	86.3	6.6	83	부분적 변화	96.1
N	50	4	100	6.2	133	무색	96.8
N	100	37	95.4	4	34	정색	95.6
N	100	24	96.6	5.4	81	부분적 변화	96.5
N	100	4	100	5.3	138	무색	96.2

NA: 적용되지 않음

[0124]

대조적으로, 유지 동안 공기 오버레이 %가 공기가 없는 상태에서 생성된 정화된 벌크에 중요해졌다. 최악의 경우는 공기가 없는 수거 및 공기가 없는 유지였으며, 여기서 무손상 **mAb** 단량체가 96.5%에서 81.6%로 감소하였다. 또한, 공기 오버레이가 20% 이상인 경우, 디슬파이드 환원은 발생하지 않았다. 인큐베이션 온도는 유리 티올 농도에 상이한 영향을 끼쳤다. 가장 높은 유리 티올 농도 및 최대 환원은 24°C 유지에서 발생하였다. 4°C 유지 후 유리 티올 양은 유지 전의 양에 근접하였다. 37°C에서의 유지가 TrxR 및 GR 효소 활성에 최적 온도인 것으로 추정되었다. 그러나, 보편적으로 모든 조건에서 유리 티올 양이 감소되었으며, 데이터는 도 5에 나타난 바와 같이 **mAb1** 결과와 일치하였다.

[0126] 1일 유지 연구 말에, 각각의 샘플을 DCPIP 스톡 용액과 혼합하였다. 색상 변화를 육안 관찰에 의해 평가하였다 (도 6f). 표 7은 색상 변화의 순서가 유리 티올 농도와 강한 상관관계를 갖는다는 것을 나타내었으며; 유리 티올 농도가 높을수록 DCPIP 색상 변화는 더 빨라졌다. 통기 조건에서 수거된 모든 샘플은 어떠한 색상 변화도 나타내지 않았다.

[0127] 상이한 표준 환원 전위를 갖는 추가의 산화환원 지시약을 또한 유사한 방식으로 시험하였으며, 티오닌 및 메틸렌 블루가 600-800 및 $>1,000$ mM 유리 티올 수준에서 색상을 변화시키는 것으로 밝혀졌다 (데이터 나타내지 않음). 이를 염료는 제작 동안 위험 수준을 신속히 예측하기 위한 지시약의 사다리를 포함하도록 조합될 수 있다.

[0128] 수거 및 1차 회수 동안 디슬파이드 결합 환원을 재현하기 위한 축소 모델

[0129] 많은 증거가 디슬파이드 결합 환원이 수거 작업 동안 세포 용해와 상관관계가 있고 정화된 벌크가 시간 경과에 따라 실온에서 충분량의 공기 없이 밀폐된 용기에 유지된다는 것을 제시한다 (Mun M et al. Biotechnol Bioeng 2015; 112: 734-742). 따라서, 밀폐가능한 용기에 소량의 정화된 벌크 (10 내지 300 mL)를 충전시키고 질소 가스로 플러싱함으로써 공기가 없는 상태를 생성하고 실온에서 유지함으로써 이 현상을 모방하도록 소규모 모델을 개발하고 이어 저분자량에 대해 NR_캘리퍼 분석하였다 (도 7).

[0130] 제작 작업 동안 정화된 벌크는 세포 손상 및 수거전부터 수거후까지의 다양한 단계에서 유지 시간이 로트마다

다를 수 있으므로, 저분자량 함량은 몇 퍼센트부터 거의 100%까지의 다양한 범위에 걸쳐 다양할 수 있다. 소규모 연구를 가장하기 위해, CHO 세포로부터의 세포 용해물을 100% 세포 용해를 가장하기 위해 원래 부피의 세포 배양물로부터의 상청액과 혼합하여 공기 존재 하에서도 저분자량을 생성하고 (도 8a), 밀폐가능한 용기에 충전하고, 질소 가스로 플러싱하고, 실온에서 1일 동안 인큐베이션하는 최악의 경우의 시나리오 (상기 재료 및 방법에서 기재됨)를 생성하였다. 이들 조건 하에서, 정화된 벌크 내의 모든 무손상 **mAb 2** 항체 분자는 완전히 단편화되었다 (도 8b 및 9b). 100% 세포 용해의 정화된 벌크 내의 유리 티올 함량은 1 내지 3 mM로 측정되었으며, 이는 정상 작업으로부터의 것보다 적어도 10배 높았다.

[0131] **과산화수소는 디슬파이드 결합의 환원을 억제할 수 있다.**

mAb에서 디슬파이드 결합의 환원을 제어하기 위한 하나의 방법은 **mAb**가 환원되기 전에 정화된 벌크에 함유된 환원 잠재력을 제거시키는 것이다. 이 목적으로 H₂O₂의 사용이 시험되었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군 **mAb 2** 정화된 벌크는 공기가 없는 조건에서 실온에서 1일 동안 유지된 후 약 20% 저분자량을 생성하였다 (도 7c). 공기가 없는 유지 전에 과산화수소를 동일한 정화된 벌크에 0.33, 1 및 3 mM의 농도로 첨가하였다. 결과는 3 mM (약 0.01%) 과산화수소가 저분자량의 생성을 완전히 방지할 수 있음을 나타내었다 (도 7e, 7g 및 7i). 이들 결과는 과산화수소가 디슬파이드 결합 환원을 효과적으로 방지한다는 것을 나타낸다.

최악의 경우에서 저분자량 생성을 억제하는데 필요한 H₂O₂의 최소 농도를 결정하기 위해, 상기 기재된 100% 용해된 세포 배양 모델을 사용하였다. 이 연구에서, 100% 용해된 세포 배양물을 0, 5 또는 10 mM H₂O₂의 존재 하에 공기가 없는 조건에서 유지하였다. 1일 유지 후, 무손상 **mAb2** 항체 분자가 남아 있지 않았으며, 저분자량 종은 소량의 반량체 (halfmer)와 함께 경쇄 및 중쇄에 의해 지배되었으며, 이는 환원이 공기에 노출된 대조군 샘플과 비교하여 거의 완전하였다는 것을 제시한다 (도 9a 및 9b). 5 mM 및 10 mM의 H₂O₂ 첨가는 저분자량 생성을 각각 부분적으로 (도 8c) 및 완전히 (도 8d) 억제할 수 있다. 정제되지 않은 CB로부터의 이들 NR_캘리퍼 결과가 도 8e에 요약되어 있다. 단백질 A 정제 후, 0, 5 및 10 mM H₂O₂를 갖는 샘플은 NR_캘리퍼 결과로부터 각각 0, 10.1 및 98.3%의 순수한 항체 단량체를 가졌다 (도 8f). 공기에 노출된 샘플은 83%의 순수한 항체 단량체를 가졌다. 이들 결과는 10 mM H₂O₂가 정화된 벌크 처리의 최악의 경우에 **mAb** 환원을 효과적으로 방지할 수 있음을 확증한다.

[0134] 과산화수소를 대체할 수 있는 많은 페옥사이드-함유 무기 또는 유기 화합물이 있다. 2개의 무기 형태인 과탄산나트륨 및 과붕산나트륨을 과산화수소에 대한 대체물로서 시험하였다. 결과는 두 페옥사이드가 농도-의존적 방식으로 디슬파이드 결합의 환원을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다 (도 9).

[0135] **항체 분자의 과산화수소 처리 및 산화**

과산화수소 사용에 대한 하나의 주요 우려는 **mAb**를 산화시키는 이의 잠재력이다. 메티오닌 자기가 과산화수소 산화에 가장 영향을 받기 쉽다 (Luo Q, et al. J Biol Chem. 2011;286:25134-25144, Stracke J, et al. MAbs. 2014;6:1229-1242). **mAb 2 및 3** (각각 IgG4 및 IgG1 아부류에 속함)을 다양한 과산화수소 처리 후 메티오닌 산화에 대해 질량 분광분석에 의해 분석하였다. 두 분자에 대해, H₂O₂ (1 mM 내지 10 mM) 첨가 및 실온에서 1일 동안 인큐베이션 후, 기재된 과산화수소 처리 하에 있는 동일한 샘플 로트에서 H₂O₂ 농도에 의존적인 산화의 작은 증가가 관찰되었다 (표 8 및 9). 그러나, 트립신 처리된 웨티드 매핑 및 LC-MS/MS 방법이 1% 변화를 갖기 때문에, H₂O₂-유도된 산화 변화는 **mAb 2 및 3** 둘 다에 대해 유의하지 않았다.

[0137]

<표 8>

과산화수소 처리 후 mAb 2 메티오닌 잔기의 산화

생물반응기	CB 생성	유지	H2O2 (mM)	산화 %		
				H18ox % (M262)	H30ox % (M358)	H36ox % (M428)
1	원심분리	유지 없음	0	5.8	2.4	2.3
1	원심분리	공기 없음	0	6.1	2.7	2.3
1	원심분리	공기 없음	3	6.3	2.7	2.2
1	원심분리	공기 없음	5	6.3	2.8	2.3
1	원심분리	공기 없음	10	6.4	2.8	2.5
1	심층 여과	공기	0	5.4	2.5	2
1	심층 여과	공기 없음	0	5.6	2.6	2.1
1	심층 여과	공기 없음	5	5.8	2.7	2.2
1	심층 여과	공기 없음	10	5.9	2.7	2.2
2	원심분리	공기	0	3.7	2.7	4.3
2	원심분리	공기 없음	0	3.7	2.7	4.3
2	원심분리	공기 없음	5	3.7	2.8	4.7
2	원심분리	공기 없음	10	3.9	2.8	4.9
3	원심분리	공기	0	3.8	3.1	4.9
3	원심분리	공기 없음	0	3.9	3	5.3

[0138]

<표 9>

과산화수소 처리 후 mAb 3 메티오닌 잔기의 산화

생물반응기	CB 생성	유지	H2O2 (mM)	산화 %						
				H3ox %	H10ox %	H12ox %*	H13ox %	H22ox %	H36ox %	H42ox %
1	심층 여과	유지 없음	0	0.5	1.2	0.9	1.2	1.3	1.4	0.6
1	심층 여과	공기 없음	0	0.5	1.2	0.9	1.2	1.3	1.9	0.7
1	심층 여과	공기 없음	1	0.5	1.3	1	1.1	1.4	2	0.7
1	심층 여과	공기 없음	2	0.5	1.3	1	1.2	1.4	2	0.7
1	심층 여과	공기 없음	3	0.5	1.3	1	1.2	1.5	2	0.7
1	심층 여과	공기 없음	5	0.5	1.4	1.1	1.2	1.5	2.1	0.7
2	원심분리	공기	0	2.9	0.7	ND	0.9	1.5	1.7	0.5
2	원심분리	공기 없음	0	2.8	0.7	ND	1	1.9	1.7	0.5
2	원심분리	공기 없음	1	2.9	0.8	ND	0.9	1.9	1.7	0.5
2	원심분리	공기 없음	5	3.2	0.9	ND	1.3	1.6	1.8	0.5
2	원심분리	공기 없음	10	3.6	0.9	ND	1.2	1.7	1.9	0.6

[0140]

[0141] 이들 결과는, 최적 페옥사이드 농도 하에서, 과산화수소 또는 다른 페옥사이드에 의해 매개되는 mAb 산화는 유의한 증가를 나타내지 않고 산화 수준이 제어될 수 있음을 나타낸다.

[0142]

과산화수소 처리의 제품 품질 속성에 대한 영향

[0143]

산화 이외에, 다른 약물 물질 품질 속성 및 다운스트림 정제 공정에 대한 과산화수소의 잠재적 영향을 또한 실험실-규모 연구로 평가하였다. 실험실 설계는 두 mAb 2 (IgG4) 및 mAb 4 (IgG1)를 포함하였다. mAb 4에 대해, 과산화수소를 수거전 세포 배양액 및 수거후 정화된 벌크 (세포 없음)에 첨가하였다. 다양한 과산화수소 처리 후, 생성된 정화된 벌크를 분석 전에 중심 공정 포인트 조건을 이용하여 단백질 A 크로마토그래피에 이은 낮은 pH 바이러스 불활성화 및 중화 단계를 통해 처리하였다. 표 10에 나타난 바와 같이, mAb 4에 대한 분석 결과는 과산화수소 처리된 샘플과 비처리된 샘플 간에 시험된 모든 속성에서 주목할만한 변화가 없음을 나타내었다. 공정 불순물 (숙주 세포 단백질 및 잔류 DNA)도 대조군과 비슷했고 공정 범위 내에서 허용 가능했다 (자료 나타내지 않음). 유사한 결과가 또한 실온에서 1일 동안 0, 3, 5 및 10 mM H₂O₂로 처리된 mAb 2에 대해서도 수득되었다 (표 10).

[0144]

<표 10>

mAbs 2 및 4의 제품 품질 속성에 대한 과산화수소 처리

분자 조건*	조건*	화원	비화원	주요		산성	염기성	단량체	HMW	LMW	단백질 A 단계 수율 (%)	무손상 mAb (%)
				순도 (%)	하천 변형(%)							
mAb4	원심분리된 CB, 4°C, 4일	100	96.3	50.5	46.5	2.9	95.5	4.4	0.1	94.2		
	10 mM H ₂ O ₂ , 원심분리된 CB에 첨가됨, 4°C, 4일	100	96.5	49.6	47.4	3.0	95.7	4.2	0.1	94.4		
	10 mM H ₂ O ₂ , 수거전 배양액에 첨가됨, 원심분리됨, 4°C, 4일	100	96.7	50.3	46.4	3.2	95.5	4.4	0.1	92.6		
	10 mM H ₂ O ₂ , 수거전 배양액에 첨가됨, 원심분리됨, 4°C, 3일; N2 풀러싱, RT, 1일	100	96.5	49.5	47.4	3.1	95.4	4.5	0.1	98.4		
mAb2	원심분리된 CB, N2 풀러싱, RT, 1일	ND	99.2	49.0	18.0	33.1	98.8	1.2	0	ND		
	원심분리된 CB, 3 mM H ₂ O ₂ , N2 풀러싱, RT, 1일	ND	99.2	50.1	16.8	33.1	98.8	1.2	0	ND		
	원심분리된 CB, 5 mM H ₂ O ₂ , N2 풀러싱, RT, 1일	ND	99.2	46.4	19.1	34.5	98.7	1.2	0.1	ND		
	원심분리된 CB, 10 mM H ₂ O ₂ , N2 풀러싱, RT, 1일	ND	99.2	50.0	16.9	33.1	98.8	1.2	0	ND		

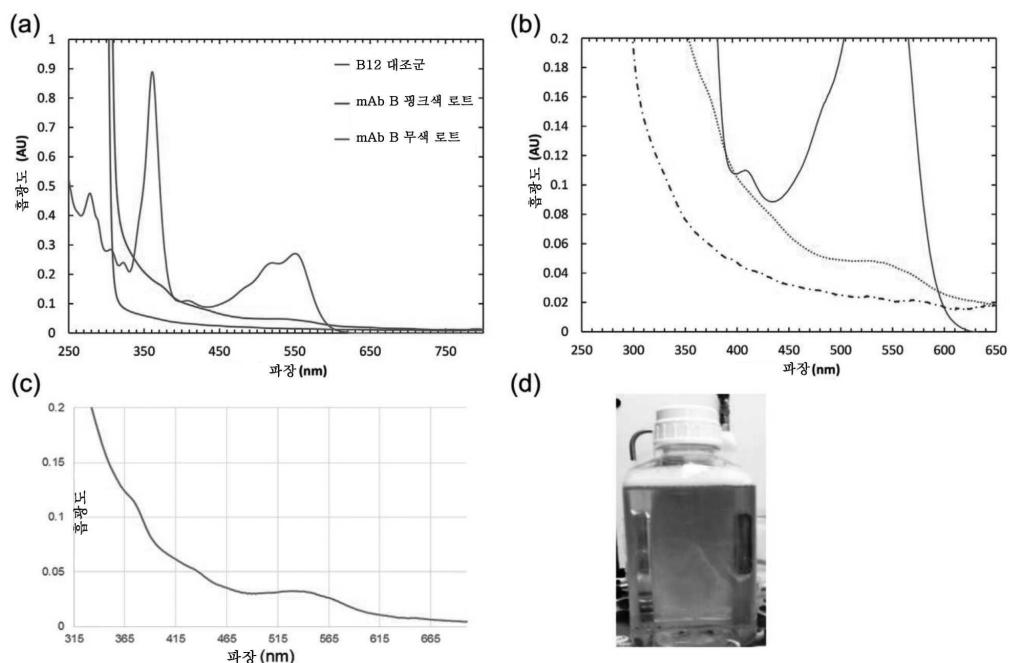
* mAb 4에 대해, 처리는 수거전 세포 배양액 또는 정화된 벌크 단계에서 이루어졌으며, 생성된 정화된 벌크는 공정 중심 포인트 조건을 이용하는 단백질 A 크로마토그래피 및 낮은 pH 바이러스 불활성화 및 중화 (PAVIB) 단계를 거쳤다. 분석 결과는 PAVIB 샘플로부터 나왔다. mAb 2에 대해, 과산화수소 처리된- 및 대조군- 정화된 벌크 샘플을 분석 전에 고치리량 단백질 A 컬럼으로 정제하였다. ND, 결정되지 않음

[0145]

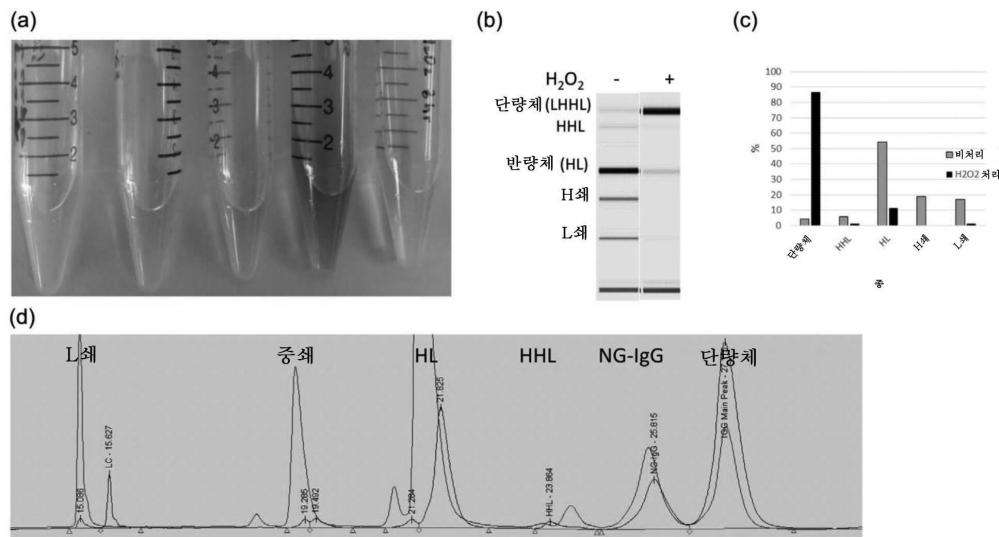
[0146] 따라서, 이들 결과는 과산화수소 처리 (10 mM 이하)가 세포 제거 전 및 후에 과산화수소로 처리된 샘플에서 시험된 모든 속성에 주목할만한 변화가 없음을 나타낸다.

도면

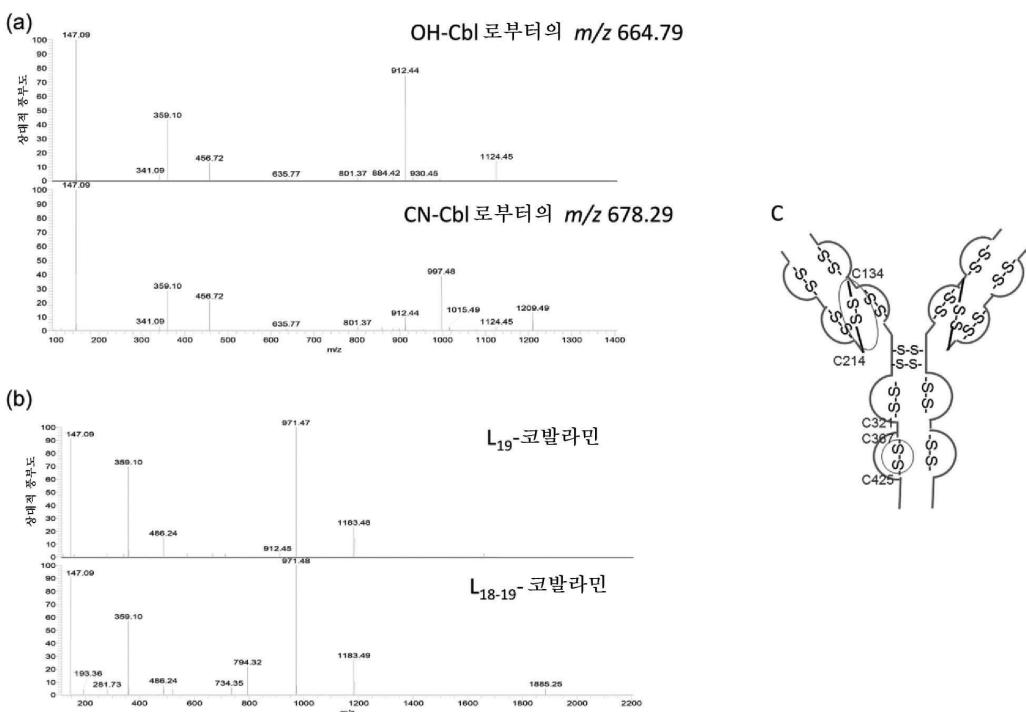
도면 1



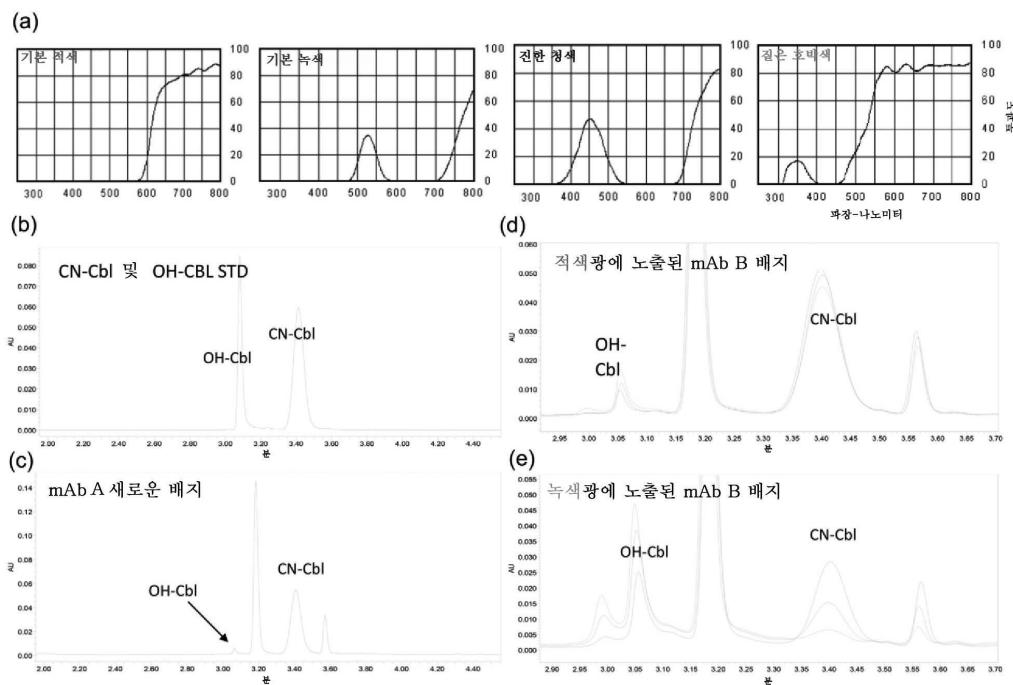
도면2



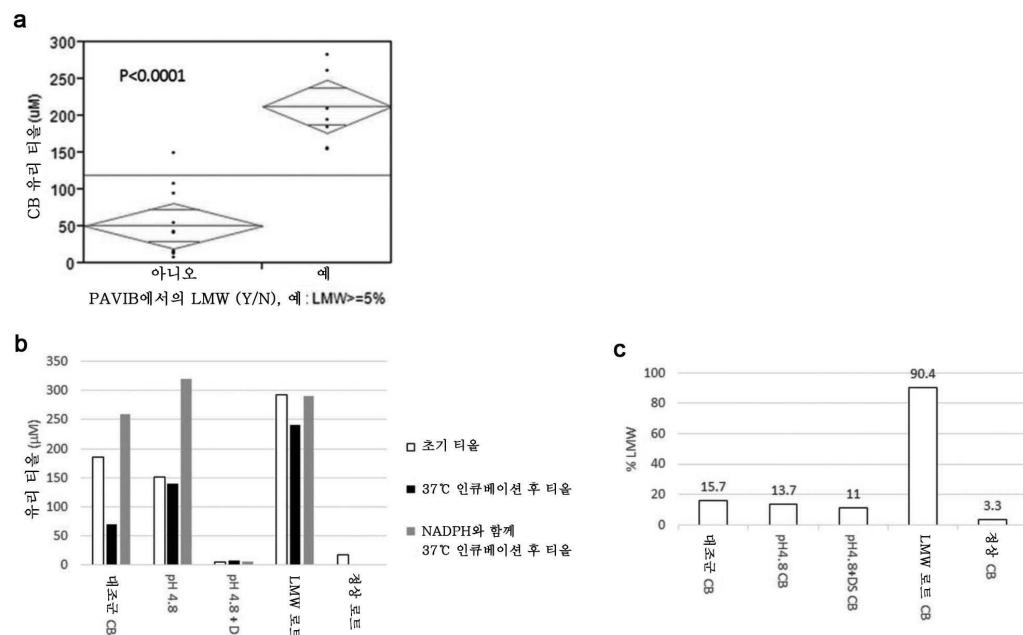
도면3



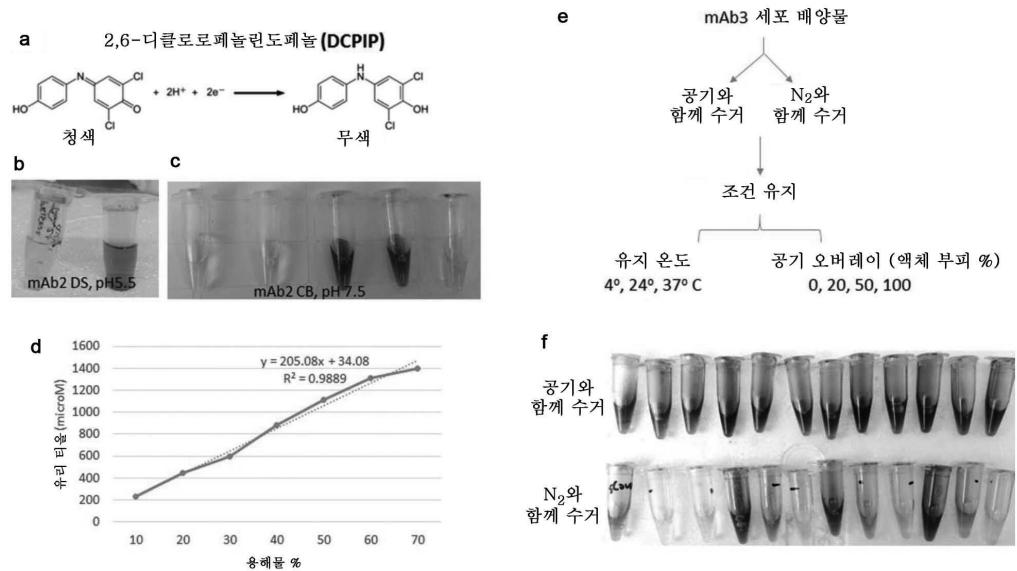
도면4



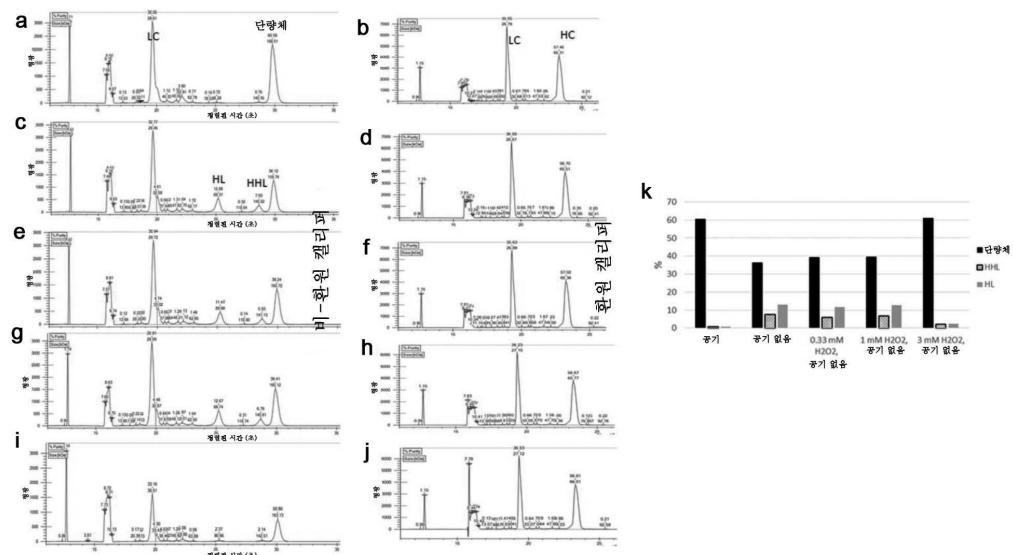
도면5



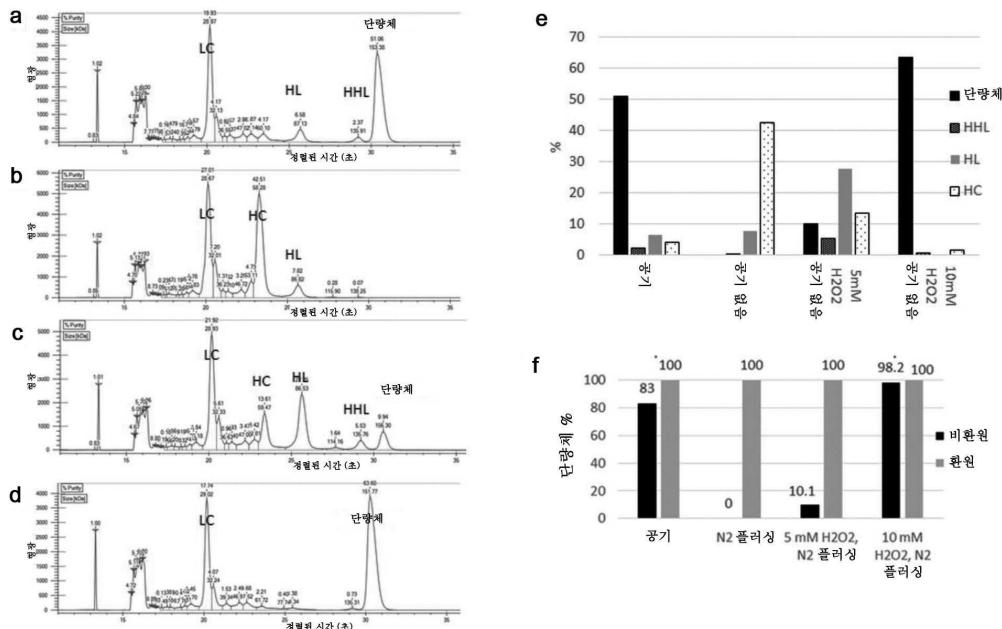
도면6



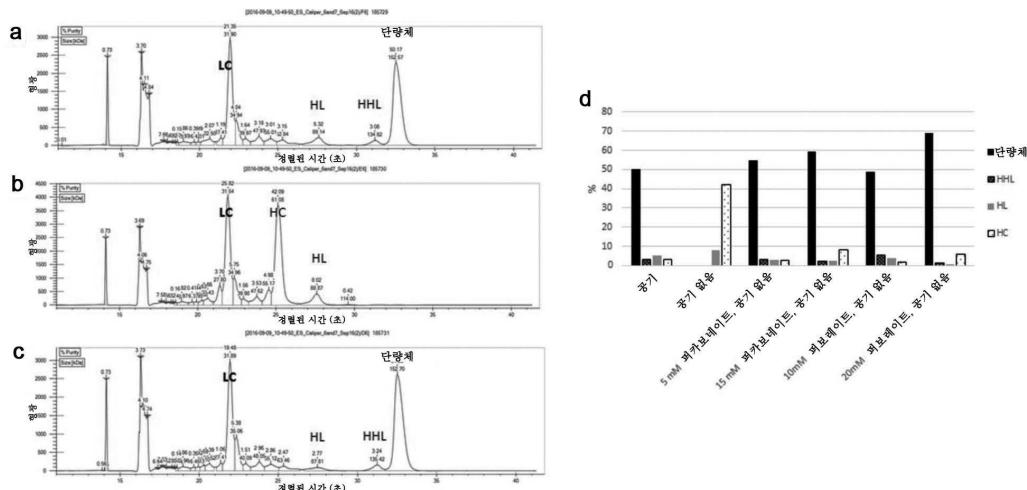
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol Myers Squibb

<120> METHOD OF CONTROLLING THE PINK COLOR GENERATED DURING ANTIBODY

MANUFACTURING

<130> 12928 WO PCT

<150> 62/503615

<151> 2017-05-09

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

1 5 10 15

His Asn His Tyr Thr Gln Lys

20