



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0035936
(43) 공개일자 2018년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/18 (2013.01)
C07K 1/16 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7008767(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년08월06일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7005754
원출원일자(국제) 2010년08월06일
심사청구일자 2015년08월06일
- (85) 번역문제출일자 2018년03월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/044760
- (87) 국제공개번호 WO 2011/031397
국제공개일자 2011년03월17일
- (30) 우선권주장
61/231,811 2009년08월06일 미국(US)

- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
메타, 아미트
미국 94536 캘리포니아주 프레몬트 페랄타 불러바
드 4421
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

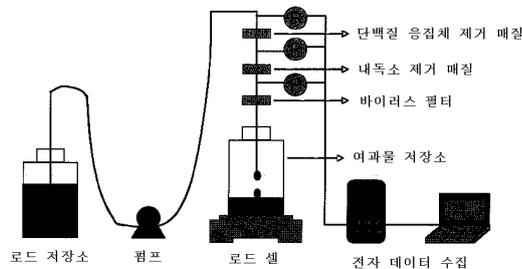
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 정제 시의 바이러스 제거의 개선방법**

(57) 요약

본 발명은 단백질 정제 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 예비여과 공정에서 내독소 제거 매질과 양이온-교환 매질을 병용하여, 바이러스 필터의 여과용량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



바이러스 여과 연구에 사용된 실험 설비의 모식도

(52) CPC특허분류

C07K 16/06 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단백질 정제 동안 바이러스 필터의 여과 용량을 개선시키는 방법으로서,

정제될 단백질을 포함하는 조성물을 상기 바이러스 필터에 통과시키기 전에, 해당 조성물에 양이온 교환 단계 및 내독소 제거 단계를 동시에 또는 순차로 실시하는 단계를 포함하는, 단백질 정제 시의 바이러스 필터의 여과 용량의 개선방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 정제 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 예비여과 공정에 내독소 제거 매질과 양이온 교환 매질(endotoxin removal and cation-exchange media)을 병용하여, 바이러스 필터의 여과 용량(filtration capacity)을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 포유류의 세포주들은 글라이코실화와 같은 번역후 수식(post translational modification) 및 적절한 단백질 접힘(protein folding)에 대한 그들의 능력으로 인해 재조합 단백질 치료제를 제조하기 위한 1차 선택지로 되어왔다(Chu and Robinson Current Opinion in Biotechnology 12:180-187, 2001). 그러나, 상기 세포주들은 레트로 바이러스 유사 입자들을 함유하는 것으로도 알려져 있으며(Lieber et al., Science 182:56-59, 1973; Lubiniecki et al., Dev Biol Stand 70:187-191, 1989), 잠재적인 우발성 바이러스 오염의 위험을 지니고 있다(Garnick, Dev Biol Stand. Basel: Karger 93:21-29, 1998). 재조합 단백질 약물을 제조하는 바이오약제 산업은 양호한 안전성 기록을 지니는 반면, 혈장으로부터 유래되는 혈액 및 혈액 산물들에 의한 바이러스 감염이 과거에 일어났었다(Brown, Dev. Biol. 81, 1993; Thomas, Lancet 343:1583-1584, 1994). 재조합 단백질 제조 동안 바이러스 오염의 위험을 경감시키기 위해, 다운스트림 정제 공정들은 내인성 바이러스 및 우발성 바이러스를 제거하는 공정단계들을 포함하도록 설계된다. 적절한 바이러스 제거는 공정 피드 스트림(process feed stream)으로부터 바이러스 불활성화 또는 바이러스 제거를 제공하는 여러 공정단계들의 조합에 의해 얻어진다. 바이러스 불활성화가 세정제, 및 낮은 pH, 열처리에서의 배양 같은 기술을 이용해서 수행되는 반면, 바이러스 제거는 통상적으로 크로마토그래피 및 여과를 이용해서 수행된다(Curtis et al., Biotechnology and Bioengineering 84(2): 179-186, 2003).

[0003] 순 전하와 같은 물리화학적 성질들에 기초하여 바이러스들을 제거하는 크로마토그래피 매질(혹은 매체)과 달리, 바이러스 여과는 크기 배제에 의해 바이러스들을 제거하므로, 보다 강인한 기술인 것으로 여겨진다. 지금까지는, 포유류 세포주들로부터 유래된 바이오치료제의 다운스트림 정제 동안 바이러스 여과는, 60nm 미만의 공칭 공극 직경을 지닌 고 처리량 멤브레인(high throughput membrane)의 부재로 인해, 레트로바이러스(직경 80 내지 100nm) 제거에 국한되어 왔었다.

[0004] 최근 멤브레인 기술의 진보로 인해, 20nm의 공칭 공극(pore) 직경을 지닌 고 처리량 멤브레인들을 제조할 수 있게 되었다. 이들 바이러스 필터들은 파보바이러스(직경 18 내지 26nm)들을 보유하고, 예컨대, 모노클론 항체(monoclonal antibody: mAb)들과 같이 160kD(~8nm) 정도의 큰 단백질들을 통과시킨다.

[0005] 파보바이러스 필터들에 의한 높은 선택성 및 높은 처리량은 미공성 기재 상에 보유성 박막층을 캐스팅함으로써 얻어진다. 보유성 박막층은 단백질과 바이러스들의 매우 미세한 분리를 허용하는 반면, 공정 피드스트림내 불순물들에 의해 오염되기 쉬워, 필터 용량과 유효성을 낮춘다. 바이러스 필터들의 오염은 단백질 응집체들 및 변성 단백질과 같은 오염물질에서 기인되어 왔다. Bohonak 및 Zydney(Bohonak and Zydney, Journal of Membrane Science 254(1-2):71-79, 2005)는 필터 용량 손실이 케이크 형성 또는 공극 차단에서 연유될 수 있음을 제시하였다. 다른 최근의 보고들(Bolton et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 43:55-63, 2006; Levy et al., Filtration in the Biopharmaceutical Industry. (Meltzer, T.H. and Jornitz, M.W., eds.) pp. 619-646

Marcel Dekker, New York, 1998)은 필터 오염의 있음직한 원인이 공극 벽에 불순물들이 흡착하는 것에 기인된 것임을 나타내고 있다. 여러 간행물들(Bolton et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42:133-142, 2005; Hirasaki et al., *Polymer Journal* 26(11): 1244-1256, 1994; Omar and Kempf, *Transfusion* 42(8):1005-1010, 2002)은 또한, 필터 용량 감소 또는 공극의 막힘이 유닛 조작의 강건성에 영향을 주는 소수의 크기의 정도에 의해 바이러스 보유를 감소시킬 수 있음을 입증하고 있다.

[0006] 따라서, 최근의 많은 연구들은 바이러스 필터 오염을 최소화하기 위해 공정 피드스트림으로부터 오염원을 제거하고, 고용량, 고 처리량 및 강건한 바이러스 보유를 보장하기 위하여 전치-필터(pre-filter)를 검증하는데 집중되어 왔다. Bolton 등(Bolton et al. 2006)은 여러 멤브레인을 전치필터로서 시험하는 단계를 포함하는 철저한 연구를 수행하여, Viresolve(상표명) 텡스 필터(depth filter)를 전치필터로서 사용하여 대체로 크기의 순으로 NFP(normal flow parvovirus) 멤브레인의 용량을 증가시킬 수 있었음을 입증하였다. Brown 등(Brown et al. 2008, *Use of Charged Membranes to Identify Soluble Protein Foulants in order to Facilitate Parvovirus Filtration*. IBC's 20th Antibody Development and Production, San Diego, CA)은 파보바이러스 보유 필터에 대한 전치-필터로서 강한 양이온 교환 멤브레인 흡착제를 평가하고, 바이러스 필터의 용량이 11개의 다른 mAb 스트림에 대해서 수배까지 증가될 수 있었음을 제시하였다. 이들 저자는 양이온 교환 멤브레인 흡착제가 경쟁적인 흡착에 의해 피드스트림으로부터 고분자량(~600 내지 1500kD) 단백질 응집체들을 제거하여, 바이러스 필터가 막히는 것을 방지한다고 추정했다. 미국 특허 제7,118,675호(Siwak et al.) 공보는 전하-변경 멤브레인을 사용하여 단백질 용액으로부터 단백질 응집체들을 제거하여, 바이러스 필터의 오염을 방지하는 방법을 개시하고 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은, 파보바이러스 필터의 오염이 상기 문헌에 언급된 것들과 다른 불순물들에 기인할 수 있고, 바이러스 여과 용량을 개선시키기 위해 보다 포괄적인 예비여과 해결책이 필요하다고 하는 실험적인 확인결과에 적어도 부분적으로 기초를 두고 있다. 따라서, 본 발명은 상기 문헌에 언급된 최상의 예비여과 접근법(양이온 교환 멤브레인 흡착제)보다 상당히 양호하게 수행하는 새로운 예비여과 해결책을 제공한다.

[0008] 일 양상에 있어서, 본 발명은, 정제될 단백질을 포함하는 조성물을 바이러스 필터에 통과시키기 전에, 해당 조성물에 양이온 교환 단계 및 내독소 제거 단계를 임의의 순서로 실시하는 단계를 포함하는, 단백질 정제 동안 바이러스 필터의 여과 용량을 개선시키는 방법에 관한 것이다.

[0009] 일 실시형태에서, 상기 바이러스 필터의 공극 크기는 직경이 약 15nm 내지 약 100nm이다.

[0010] 다른 실시형태에서, 상기 바이러스 필터의 공극 크기는 직경이 약 15nm 내지 약 30nm이다.

[0011] 또 다른 실시형태에서, 상기 바이러스 필터의 공극 크기는 약 20nm이다.

[0012] 추가의 실시형태에서, 제거될 바이러스는 파보바이러스이다.

[0013] 다른 실시형태에서, 상기 파보바이러스의 직경은 약 18nm 내지 약 26nm이다.

[0014] 다른 실시형태에서, 상기 단백질은 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 항체 또는 그의 단편이다.

[0015] 다른 실시형태에서, 상기 항체는 치료용 항체이다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 상기 재조합 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어, 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary: CHO) 세포와 같은 포유류 숙주 세포에서 생산된다.

[0017] 다른 실시형태에서, 상기 정제될 단백질을 포함하는 조성물은, 바이러스 여과 전에, 먼저 양이온 교환 단계가 실시되고 나서 내독소 제거 단계가 실시된다.

[0018] 또 다른 실시형태에서, 상기 정제될 단백질을 포함하는 조성물은, 바이러스 여과 전에, 먼저 내독소 제거 단계가 실시되고 나서 양이온 교환 단계가 실시된다.

[0019] 다른 실시형태에서, 상기 정제될 단백질을 포함하는 조성물은, 2개의 매질을 단일 모듈에 함께 유지하면서, 바이러스 여과 전에, 양이온 교환 단계 및 내독소 제거 단계가 동시에 실시된다.

[0020] 또 다른 실시형태에서, 상기 내독소 제거 단계 후에 바로 바이러스 여과가 수행된다.

- [0021] 다른 실시형태에서, 상기 양이온 교환 단계 후에 바로 바이러스 여과가 수행된다.
- [0022] 다른 실시형태에서, 바이러스 여과는 약 4 내지 약 10의 pH에서 수행된다.
- [0023] 다른 실시형태에서, 정제될 조성물내 단백질 농도는 약 1 내지 40g/ℓ 이다.
- [0024] 또 다른 실시형태에서, 정제될 항체는 HER1 (EGFR), HER2, HER3, HER4, VEGF, CD20, CD22, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4, VCAM, IL-17A 및/또는 F, IgE, DR5, CD40, Apo2L/TRAIL, EGFL7, NRP1, 미토겐 활성화 단백질 키나제(mitogen activated protein kinase: MAPK) 및 D 인자(Factor D)로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 항원들에 대한 것이다.
- [0025] 또 다른 실시형태에서, 상기 항체는 항-에스트로겐 수용체 항체, 항-프로게스테론 수용체 항체, 항-p53 항체, 항-카텝신 D 항체, 항-Bcl-2 항체, 항-E-카드헤린 항체, 항-CA125 항체, 항-CA15-3 항체, 항-CA19-9 항체, 항-c-erbB2 항체, 항-P-당단백질 항체, 항-CEA 항체, 항-레티노블라스토마 단백질 항체, 항-ras 종양단백질 항체, 항-루이스 X 항체, 항-Ki-67 항체, 항-PCNA 항체, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 항-CD5 항체, 항-CD7 항체, 항-CD8 항체, 항-CD9/p24 항체, 항-CD10 항체, 항-CD11c 항체, 항-CD13 항체, 항-CD14 항체, 항-CD15 항체, 항-CD19 항체, 항-CD23 항체, 항-CD30 항체, 항-CD31 항체, 항-CD33 항체, 항-CD34 항체, 항-CD35 항체, 항-CD38 항체, 항-CD41 항체, 항-LCA/CD45 항체, 항-CD45RD 항체, 항-CD45RA 항체, 항-CD39 항체, 항-CD100 항체, 항-CD95/Fas 항체, 항-CD99 항체, 항-CD106 항체, 항-유비퀴틴 항체, 항-CD71 항체, 항-c-myc 항체, 항-사이토케라틴 항체, 항-비멘틴 항체, 항-HPV 단백질 항체, 항-카파 경쇄 항체, 항-람다 경쇄 항체, 항-멜라노솜 항체, 항-프로스테이트 특이 항원 항체, 항-S-100 항체, 항-타우 항원 항체, 항-피브린 항체, 항-케라틴 항체 및 항-Tn-항원 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 바이러스 여과 연구에 사용된 실험 설비의 모식도;
- 도 2는 멸균 및 탭스 필터가 Viresolve Pro 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과를 나타낸 도면으로, 실험들은 pH 5.5 및 전도율 8.5 mS/cm에서 수행되었으며, mAb 농도는 약 13g/ℓ 였음;
- 도 3(a) 및 도 3(b)는 양이온-교환 멤브레인 흡착제 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제가 전치-필터로서 Viresolve Pro 파보바이러스 필터의 용량에 미치는 효과를 나타낸 도면으로, 도 3(a) 및 도 3(b)의 데이터는 각각 pH 5.0 및 6.5에서 MAb1에 의해 발생되었음;
- 도 4(a) 및 도 4(b)는 양이온-교환 멤브레인 흡착제 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제의 양쪽 모두를 수용하는 신규한 예비여과 트레인(prefiltration train)이 MAb1에 의한 Viresolve Pro 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과를 나타낸 도면으로, 도 4(a) 및 도 4(b)의 데이터는 각각 pH 5.0 및 pH 6.5에서 발생된 것임;
- 도 5는 양이온-교환 멤브레인 흡착제 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제의 양쪽 모두를 수용하는 신규의 예비여과 트레인이 양이온-교환 예비-여과 매질과 비교해서 MAb2에 의한 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과를 나타낸 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] I. 정의들
- [0028] "단백질"이란 사슬 길이가 높은 수준의 3차 및/또는 4차 구조를 생산하기에 충분한 아미노산 서열을 의미한다. 따라서, 단백질은 또한 이러한 구조를 갖지 않는 분자들에 기초한 아미노산인 "펩타이드"와 구별된다. 전형적으로, 본 명세서에서 사용된 단백질은 적어도 약 15 내지 20kD, 바람직하게는 적어도 약 20kD의 분자량을 가질 것이다.
- [0029] 본 정의 내에 포함되는 단백질들의 예로는, 포유류 단백질, 예를 들어, CD4, 인테그린 및 이들의 서브유닛, 예컨대, 베타7, 인간 성장호르몬과 소 성장 호르몬을 포함하는 성장호르몬; 성장호르몬 분비인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질; α-1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 난포자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성호르몬; 글루카곤; 응고인자, 예를 들어, 제8C 인자, 제9 인자, 조직 인자 및 폰 빌레브란트(von Willebrands) 인자; 항-응고 인자, 예를 들어, 단백질 C; 심방 나트륨 이뇨인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예를 들어, 우로키나제 또는 조직-타입 플라스미노겐 활성화제(t-PA, 예를 들어, Activase (등록상표), TNKase(등록상표), Retevase(등록상표)); 봄바진(bombazine); 트롬빈; 종양괴사인자-α 및 종양괴

사인자-β; 엔케팔리나제; RANTES(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-α); 혈청 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민; 밀러리안 억제 물질(mullerian-inhibiting substance); 마우스 생식샘자극호르몬-관련 펩타이드; DNase; 인히빈(inhibin); 액티빈; 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor: VEGF); IgE, 호르몬 또는 성장인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양인자, 예를 들어, 골-유래 신경영양 인자(bone-derived neurotrophic factor: BDNF), 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 뉴로트로핀-5 또는 뉴로트로핀-6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경성장인자, 예를 들어, NGF-8; 혈소판-유래 성장인자(platelet-derived growth factor: PDGF); 섬유아세포 성장인자, 예를 들어, aFGF 및 bFGF; 상피 성장인자(epidermal growth factor: EGF); 전환 성장인자(transforming growth factor: TGF), 예를 들어, TGF-α 및 TGF-β(TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5 포함); 인슐린-유사 성장인자-I 및 -II(IGF-I 및 IGF-II); 테스(1-3)-IGF-I(또는 IGF-I); 인슐린-유사 성장인자 결합 단백질; 기타 CD 단백질, 예를 들어, CD3, CD8, CD19 및 CD20; 적혈구형성인자(erythropoietin: EPO); 트롬보포이에틴(thrombopoietin: TPO); 골유도성 인자(osteoinductive factor); 면역독소; 골 형태형성 단백질(bone morphogenetic protein: BMP); 인터페론, 예를 들어, 인터페론-α, 인터페론-β 및 인터페론-γ; 콜로니 자극 인자(colony stimulating factor: CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨(interleukin: IL), 예를 들어, IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase); T-세포 수용체; 표면 멤브레인 단백질; 붕괴가속인자(decay accelerating factor: DAF); 바이러스 항원, 예를 들어, AIDS 엔벨로프의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체(homing receptor); 아드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예를 들어, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양관련항원, 예를 들어, HER1(EGFR), HER2, HER3 또는 HER4 수용체; Apo2L/TRAIL 및 위에서 열거된 폴리펩타이드들 중 어느 하나의 단편들뿐만 아니라 여기에 결합하는 항체들 및 면역드립합체(immunoadhesin); 및 위에서 열거된 단백질들의 어느 하나의 생물학적 활성 단편들 또는 변이체들을 들 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 정의된 바와 같이, "단백질"의 정의 내에는 구체적으로는 하기 항원들, 즉, HER1(EGFR), HER2, HER3, HER4, VEGF, CD20, CD22, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4, VCAM, IL-17A 및/또는 F, IgF, DR5, CD40, Apo2L/TRAIL, EGFL7, NRP1, 미토겐 활성화 단백질 키나제(MAPK) 및 인자 D 및 이들의 단편들 중 하나 또는 그 이상에 대한 항체들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 치료용 항체 및 면역접합체가 포함된다.

[0031] 다른 항체들의 예로는 항-에스트로겐 수용체 항체, 항-프로게스테론 수용체 항체, 항-p53 항체, 항-카텝신 D 항체, 항-Bcl-2 항체, 항-E-카드헤린 항체, 항-CA125 항체, 항-CA15-3 항체, 항-CA19-9 항체, 항-c-erbB-2 항체, 항-P-당단백질 항체, 항-CEA 항체, 항-망막모세포종 단백질 항체, 항-ras 종양단백질 항체, 항-루이스 X 항체, 항-Ki-67 항체, 항-PCNA 항체, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 항-CD5 항체, 항-CD7 항체, 항-CD8 항체, 항-CD9/p24 항체, 항-CD10 항체, 항-CD11c 항체, 항-CD13 항체, 항-CD14 항체, 항-CD15 항체, 항-CD19 항체, 항-CD23 항체, 항-CD30 항체, 항-CD31 항체, 항-CD33 항체, 항-CD34 항체, 항-CD35 항체, 항-CD38 항체, 항-CD41 항체, 항-LCA/CD45 항체, 항-CD45RO 항체, 항-CD45RA 항체, 항-CD39 항체, 항-CD100 항체, 항-CD95/Fas 항체, 항-CD99 항체, 항-CD106 항체, 항-유비퀴틴 항체, 항-CD71 항체, 항-c-myc 항체, 항-사이토케라틴 항체, 항-비멘틴 항체, 항-HPV 단백질 항체, 항-카파 경쇄 항체, 항-람다 경쇄 항체, 항-멜라닌소체 항체, 항-전립선 특이 항원 항체, 항-S-100 항체, 항-타우 항원 항체, 항-피브린 항체, 항-케라틴 항체 및 항-Tn-항원 항체로부터 선택되는 항체들이 있으며, 여기에 국한되지 않는다.

[0032] 항체와 같은, "단리된"(isolated) 단백질은 그의 자연환경의 성분으로부터 식별 및 단리 및/또는 회수되는 단백질이다. 그의 자연환경의 오염성분들은 항체와 같은 단백질에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질들이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체와 같은 단백질은 (1) Lowry 방법에 의해 측정된 바와 같은 95중량% 이상, 가장 바람직하게는 99중량% 이상 까지, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기들을 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 사용한 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 균질도(homogeneity)까지 정제될 것이다.

[0033] 단백질은 바람직하게는 본질적으로 순수하고, 바람직하게는 본질적으로 균질하다(즉, 단백질 오염이 없다). "본질적으로 순수한" 단백질이란, 조성물의 전체 중량을 기준으로, 적어도 약 90중량%, 바람직하게는 적어도 약 95중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다.

[0034] "본질적으로 균질한" 단백질이란, 조성물의 전체 중량을 기준으로, 적어도 약 99중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다.

- [0035] "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 특히 모노클론 항체(면역글로불린 Fc 영역을 지닌 전체 길이 항체들을 포함), 폴리에피토프 특이성을 지닌 항체 조성물, 이중특이성 항체(bispecific antibody), 다이아바디(diabody), 및 단쇄 분자뿐만 아니라 항체 단편들(예컨대, Fab, F(ab')₂ 및 Fv)를 포함한다.
- [0036] 기본적인 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경(Low: L)쇄 및 2개의 동일한 중(Heavy: H)쇄로 이루어진 헤테로테트라머 당단백질이다. IgM 항체는 J쇄라 불리는 추가의 폴리펩타이드와 함께 5개의 기본 헤테로테트라머 단위로 구성되며, 10개의 항원결합 부위를 포함하는 반면, IgA 항체들은 J쇄와 조합하여 다가 집합체(assembly)를 형성하기 위해 중합할 수 있는 2 내지 5개의 기본 4-쇄 단위로 구성된다. IgG의 경우, 4-쇄 단위는 보통 대략 150,000 달톤이다. 각 L쇄는 1개의 공유 이황화 결합에 의해 H쇄에 연결되는 반면, 2개의 H쇄들은 H쇄 동종형(isotype)에 따라서 1개 또는 그 이상의 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 각 H 및 L쇄는 또한, 규칙적으로 이간된 사슬간 이황화 가교를 지닌다. 각 H쇄는, N-말단에서, 각 α쇄 및 γ쇄에 대해서 가변 도메인(variable domain)(V_H) 후 3개의 불변 도메인(constant domain)(C_H) 및 μ 및 ε 동종형에 대해서 4개의 C_H 도메인들을 가진다. 각 L쇄는, N-말단에서, 타단부에서 가변 도메인(V_L) 후 불변 도메인을 가진다. V_L은 V_H와 함께 정렬되어 있으며, C_L은 중쇄(C_{H1})의 제1불변 도메인과 함께 정렬되어 있다. 특정 아미노산 잔기들은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인들 사이에 인터페이스를 형성하는 것으로 생각되고 있다. V_H 및 V_L의 짝짓기(pairing)는 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 다른 부류의 항체들의 구조 및 특성들에 대해서는, 예를 들어, 문헌[*Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 및 Chapter 6]을 참조할 수 있다.
- [0037] 임의의 척추동물 종들로부터의 L쇄는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 및 람다라 불리는 2개의 명확하게 구분되는 종류 중 하나에 할당될 수 있다. 이들의 중쇄(CH)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 의존하여, 면역글로불린은 다른 부류들 또는 동종형에 할당될 수 있다. 5부류의 면역글로불린들, 즉, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 표시되는 중쇄들을 갖는다. γ 및 μ 부류들은 CH 서열 및 기능에서 비교적 미소한 차이에 기초하여 아류들, 즉, 서브클래스들로 더욱 세분화되며, 예를 들어, 인간은 하기 서브클래스, 즉, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.
- [0038] "가변"이라는 용어는, 가변 도메인의 특정 세그먼트가 항체들 간에 서열에 있어서 광범위하게 다르다는 사실을 의미한다. V 도메인은 항원결합을 매개하며, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인들의 전체 범위에 걸쳐서 균등하게 분포되어 있지 않다. 대신에, V 영역들은 길이가 각각 대략 9 내지 12개의 아미노산 잔기인 "초가변 영역" 또는 때때로 "상보성 결정영역"(complementarity determining region: CDR)이라고 불리는 매우 짧은 극 가변성 영역에 의해 분리된 약 15 내지 30개의 아미노산 잔기들의 프레임워크 영역(framework region: FR)이라고 불리는 비교적 불변의 신장부(strech)들로 구성된다. 본래의 중쇄 및 경쇄들의 가변 도메인들은, 루프 연결을 형성하고 어떤 경우에는 β-시트 형태의 일부를 형성하는 3개의 초가변 영역들에 의해 연결된, 주로 β-시트 형태를 채용하는 4개의 FR들을 각각 포함한다. 각 사슬의 초가변 영역들은 FR에 밀접하게 근접하여 함께 고정되며, 다른 사슬로부터의 초가변 영역들은 항체들의 항원결합 부위의 형성에 기여한다(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 참조). 불변 도메인들은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 연루되지 않지만, 항체 의존형 세포성 세포독성(ADCC)의 관여와 같은 다양한 반응기 기능을 나타낸다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 "초가변 영역"(또한 "상보성 결정영역" 또는 CDR이라고도 알려짐)이라는 용어는 항원-결합 바위를 형성하고, 항원특이성의 주 결정요인인 면역글로불린의 V-영역 도메인 내에 (통상 3 또는 4개의 짧은 극 서열 가변성 영역) 있는 항체의 아미노산 잔기들을 의미한다. CDR 잔기들을 확인하기 위한 방법에는 적어도 두 가지 방법, 즉, (1) 교차-중 서열 가변성에 근거한 접근법(즉, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 근거한 접근법(Chothia, C. et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))이 있다. 그러나, 두 가지 잔기 확인 수법들이 동일한 영역이 아닌, 중첩 영역들을 정의하는 정도로, 이들은 혼성 CDR을 규정하기 위해 조합될 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "모노클론 항체"라는 용어는 실질적으로 균일한 항체들의 개체군으로부터 얻어진 항체를 의미하며, 즉, 이 개체군을 구성하는 각 항체들은 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고는 동등하다. 모노클론 항체는 단일 항원성 부위에 대항하여 지향되어 있는 고도로 특이적이다.

그리고, 상이한 결정원(에피토프)에 대항하여 지향된 상이한 항체들을 전형적으로 포함하는 종래의 (폴리클론) 항체 제제들과 비교하여, 각 모노클론 항체는 항원 상의 단일 결정원에 대항하여 지향되어 있다. 이들의 특이성에 부가해서, 모노클론 항체들은, 다른 면역글로불린들에 의해 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성된다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클론"은 실질적으로 균질한 항체들 개체군으로부터 얻어지는 항체의 형질을 가리키며, 임의의 특수한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 파악되지는 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클론 항체들은 우선 문헌[Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975)]에 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법들(예컨대, 미국 특허 제4,816,567호 공보 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클론 항체"는 또한, 문헌[Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에 설명된 기술들을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.

[0041] 본 명세서에서의 모노클론 항체는, 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종로부터 유래되는 항체 또는 특정 항체 부류 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열들과 동등하거나 또는 동종인 반면, 사슬(들)의 나머지가 다른 종으로부터 유래된 항체들 또는 다른 항체 부류 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열들과 동등하거나 또는 동종인 "키메라" 항체들(면역글로불린)뿐만 아니라 이러한 항체들의 단편들이, 목적으로 하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이들을 포함한다(미국 특허 제4,816,567호 공보; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

[0042] "온전한"(intact) 항체는 항원-결합 부위뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 도메인들, 즉, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 항체이다.

[0043] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부, 특히 온전한 항체의 항원결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편들의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편들; 다이아바디(diabody); 직쇄형 항체들(미국 특허 제5,641,870호 공보, 실시예 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995] 참조); 항체 단편들로부터 형성된 다중 특이성 항체들 및 단쇄 항체 분자들이 포함된다.

[0044] 항체들의 파파인 소화(papain digestion)는 쉽게 결정화할 수 있는 능력을 반영하는 표시인 "Fab" 단편들 및 잔기 "Fc" 단편이라고 불리우는 2개의 동일한 항원-결합 단편들을 생성한다. Fab 단편은 H쇄(VH)의 가변 영역 도메인 및 1개의 중쇄(CH1)의 제1 불변 도메인에 따른 전체 L쇄로 구성된다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해서 1가이며, 즉, 단일 항원-결합 부위를 가진다. 항체의 펩신 처리에 의해, 다른 항원-결합 활성을 지닌 2개의 이황화 결합된 Fab 단편들에 대체로 대응하고, 또한 항원을 가교시킬 수 있는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편이 수득된다. Fab' 단편들은 항체 힌지 영역(antibody hinge region)으로부터 1개 이상의 시스테인들을 포함하는 C_H1 도메인의 카복시 말단에 몇 개의 추가 잔기를 갖는 것에 의해 Fab 단편들과는 상이하다. Fab'-SH는 여기서는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리(free) 티올기를 담지하는(bear) Fab'에 대한 표시이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 이들 사이의 힌지 시스테인들을 가진 Fab' 단편들의 짝으로서 생성되었다. 항체 단편들의 다른 화학적 결합들도 또한 공지되어 있다.

[0045] Fc 단편은 이황화물들에 의해 함께 고정된 두 H쇄의 카복시-말단부들을 포함한다. 항체들의 이펙터(effector) 기능은 Fc 영역의 서열들에 의해 결정되며, 이 영역은 특정 종류의 세포들에서 발견된 Fc 수용체(Fc receptor: FcR)에 의해 또한 인식되는 영역이다.

[0046] "Fv"는 완전한 항원-인지 및 항원-결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 타이트한 비공유 결합에 있어서 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역의 다이머로 구성된다. 이들 2개의 도메인의 중첩으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 부여하고, 항체에 항원결합 특이성을 수여하는 6개의 초 가변 루프(H 및 L쇄로부터 각각 3개의 루프)가 발생한다. 그러나, 전체 결합부위보다 낮은 친화도에도 불구하고, 단일 가변 도메인(또는 항원에 대하여 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)은 항원을 인식하고 결합시키는 능력을 지닌다.

[0047] "단일-쇄 Fv", 또는 약어 "sFv" 혹은 "scFv"는 단일 폴리펩타이드 사슬 내로 연결되는 VH 및 VL 항체 도메인들을 포함하는 항체 단편들이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 검토에 대해서는, 문헌[Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)]을 참조할 수 있다.

[0048] 용어 "다이아바디"란 V 도메인들의 사슬내 짝짓기가 아닌, 사슬간 짝짓기가 이루어져서, 2가 단편, 즉, 2개의

항원-결합 부위를 지니는 단편으로 되도록, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 짧은 링커(약 5 내지 10개의 잔기)를 가진 sFv 단편들(이전의 단락 참조)을 구축함으로써 제조된 작은 항체 단편들을 의미한다. 이중특이성 다이아바딘은 두 항체의 V_H 도메인과 V_L 도메인이 상이한 폴리펩타이드 사슬 상에 존재하는 2개의 "크로스오버" sFv 단편의 헤테로다이머이다. 다이아바딘은 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448(1993)]에 보다 상세히 설명되어 있다.

[0049] 목적으로 하는 분자 표적 또는 항원을 "결합시키는" 항체는, 항체가 항원을 발현하는 세포를 표적화하는데 유용하도록 충분한 친화도를 갖는 그 항원을 결합시킬 수 있는 항체이다.

[0050] 특정 폴리펩타이드 또는 특정 폴리펩타이드 상의 에피토프에 특이적으로 결합하거나" 또는 "에 특이적인" 항체는, 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩타이드 상에서 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 결합하는 것이다. 이러한 실시형태에서, 이들 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 대한 항체의 결합도는 표적 폴리펩타이드 또는 에피토프에 대한 결합에 관하여, 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting: FACS) 분석법 또는 방사면역침강법(radioimmunoprecipitation: RIA)에 의해 결정된 바와 같이, 10% 미만일 것이다.

[0051] 비-인간(예컨대, 쥐과) 항체들의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는, 대부분 인간 서열들의 키메릭 면역글로불린, 면역글로불린 사슬들 또는 이들의 단편들(예컨대, 항체의 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항원-결합 서열들)이다. 대부분, 인간화 항체들은 수용자의 추가 변 영역(또한 CDR)으로부터의 잔기들이 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 지닌 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종(공여자 항체)의 추가 변 영역으로부터의 잔기들로 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기들은 대응하는 비-인간 잔기들에 의해 대체된다. 그리고, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "인간화 항체들"은 또한, 수용자 항체에서도 공여자 항체에서도 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수도 있다. 이들 변형은 항체 성능을 개선하고 최적화하기 위해 이루어진다. 인간화 항체는 또한, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 영역을 포함할 것이다. 보다 상세에 대해서는, 문헌들[Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)]을 참조할 수 있다.

[0052] 항체 "이펙터 기능"이란 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이 Fc 영역)에 기여가능한 생물학적 활성을 의미하며, 항체 동종형에 의해 다양하다. 항체 이펙터 기능들의 예로는 C1q 결합 및 상보의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예컨대, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 들 수 있다.

[0053] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 ADCC란, 특정 세포독성 세포(예컨대, 자연살해(natural killer: NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합된 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙트 세포로 하여금 항원-담지 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 표적 세포를 세포독성으로 살해할 수 있게 하는 세포독성의 형태를 의미한다. 항체들은 세포독성 세포들을 "무장시키고"(arm), 이 메커니즘에 의해 표적 세포를 살해하는데 필요하다. ADCC, NK 세포들을 매개하기 위한 1차 세포들은 Fc γ RIII만 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상에서의 Fc 발현은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 목적으로 하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호 공보에 개시된 것과 같은 시험관내(즉, 생체외) ACDD 분석평가가 수행될 수 있다. 이러한 분석평가에 유용한 이펙터 세포들은 말초혈액 단핵구(PBMC) 및 자연살해(NK) 세포들을 포함한다. 선택적으로 또는 추가적으로, 목적으로 하는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예컨대, 문헌[Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델 내에서 평가될 수 있다.

[0054] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 서열을 지닌 인간 FcR이다. 게다가, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하여 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것이며, 이들 수용체의 대립유전자 변종 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함하고, Fc γ R II 수용체들은 Fc γ RIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")를 포함하며, 이는 주로 그의 세포질 도메인에 있어서 다른 유사한 아미노산 서열들을 가진다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-계 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-계 억제 모티프(ITIM)를 포함한다(M. Daeron, *Annu.*

Rev. Immunol. **15**:203-234 (1997) 참조). FcR은 문헌들[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 457-92(1991); Capel et al., *Immunomethods* **4**:25-34 (1994); 및 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* **126**: 330-41(1995)]에 검토되어 있다. 장차 확인될 것들을 비롯한 기타 FcR들은 본 명세서에서 "FcR"이라는 용어에 의해 망라된다. 또한, 상기 용어는 모계 IgG를 태아에 전달할 책임이 있는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다[Guyer et al., *J. Immunol.* **117**: 587(1976) 및 Kim et al., *J. Immunol.* **24**: 249(1994)].

[0055] "인간 이펙터 세포들"은 1개 이상의 FcR을 발현하고, 이펙터 기능들을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 상기 세포들은 적어도 Fc γ R1을 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈액 단핵세포(PBMC), 자연살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 들 수 있고, PBMC 및 MNK 세포들이 바람직하다. 이펙터 세포들은 예컨대 혈액과 같은 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다.

[0056] "CDC"(complement dependent cytotoxicity)인 "보체 의존적 세포독성"이란 보체의 존재 하의 표적 세포의 용해(lysis)를 의미한다. 고전적인 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합되는 (적절한 서브클래스의) 항체들에 보체 시스템(C1q)의 제1 성분을 결합시킴으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 문헌[Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* **202**: 163(1996)]에 기술된 CDC 분석평가가 수행될 수 있다.

[0057] "컨쥬게이트", "컨쥬게이트된" 및 "컨쥬게이션"이란 용어는 공유결합 또는 비공유결합의 임의의 모든 형태들을 의미하며, 직접적인 유전적 또는 화학적 융합, 링커 또는 가교제를 통한 결합 및 예를 들어 류신 지퍼(leucine zipper)를 사용한 비-공유 결합을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 항체 컨쥬게이트는 항체 또는 항체 단편에 부착된, 세포독성 화합물, 약물, 조성물, 화합물, 방사성 원소 또는 검출가능한 표지와 같은 다른 실체를 지닌다.

[0058] "치료"란 치료학적 처치와 예방적 또는 예방학적 조치의 모두를 의미한다. 치료를 요하는 자들은 장애를 이미 갖고 있는 자들뿐만 아니라 장애가 예방될 자들을 포함한다.

[0059] 치료 목적을 위한 "포유류"란 인간, 비-인간 고급 영장류, 가내 및 농장 동물, 그리고 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예를 들어, 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 마우스, 고양이 등을 비롯한 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유류는 인간이다.

[0060] "질병"은 단백질에 의한 치료로부터 효험을 보는 병태이다. 이는 포유동물이 당해 질병에 걸리기 쉽게 하는 병리학적 상태를 비롯한 민성 및 급성 질병 또는 질환을 포함한다.

[0061] "치료상 유효량"은 특정 질병의 예측가능한 개선 및 예방을 가져오는데 필요한 적어도 최소의 농도이다. 공지된 단백질들의 치료상 유효량은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 이하의 단백질들의 유효량은 통상의 의사와 같은 당업자에게 잘 알려진 표준 수범들에 의해 결정될 수 있다.

[0062] **II. 발명을 실시하기 위한 형태**

[0063] A. 단백질 제조

[0064] 본 발명에 따라서, 단백질은, 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있는 바와 같은, 예를 들어, 해당 단백질을 코드화(encoding)하는 핵산을 함유하는 벡터에 의해 형질전환되거나 또는 감염된 세포들을 배양하는 것과 같은 제조합 DNA 수범들에 의해 생성된다.

[0065] 제조합 수단에 의한 단백질의 제조는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터에 의해 적절한 숙주 세포들을 감염시키거나 형질전환을 시킴으로써 수행될 수 있으며, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나 또는 원하는 서열들을 코드화하는 유전자들을 증폭시키기 위하여 적절하게 변형된(혹은 수식된) 종래의 영양 배지에서 배양될 수 있다. 배양조건, 예를 들어, 배지, 온도, pH 등은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양액의 생산성을 최대화시키기 위한 원칙들, 프로토콜, 및 실제 수범들은 문헌들[*Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, Ed. (IRL Press, 1991) 및 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press]에서 발견할 수 있다. 감염 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, CaPO₄ 및 CaCl₂ 감염, 전기영동, 미량주사 등을 포함한다. 적절한 수범들이 Sambrook 등의 위 문헌에 또한 기재되어 있다. 또 다른 감염 수범은 또한 문헌들[Shaw et al., *Gene* **23**: 315 (1983)]; WO 89/05859; 문헌[Graham et al., *Virology* **52**: 456-457 (1978); 및 미국 특허 제 4,399,216호 공보]에 기재되어 있다

[0066] 원하는 단백질을 코드화하는 핵산은 클로닝 또는 발현을 위한 복제 벡터 내에 삽입될 수 있다. 적합한 벡터는

공공연하게 사용가능하며, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태를 취할 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 과정들에 의해 벡터 내에 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당해 기술 분야에 공지된 수법들을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내에 삽입된다. 벡터 성분들은 일반적으로 1개 이상의 단일 서열, 복제 기원, 1개 이상의 마커 유전자, 및 인핸서(enhancer) 요소, 프로모터 및 전사종결서열을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이들 성분들 중 하나 이상을 함유하는 적절한 벡터들의 구축은 당업자에게 공지된 표준 결찰 수법들을 이용한다.

[0067] 단백질의 형태들은 배양배지로부터 회수될 수 있거나, 또는 숙주 세포 용해물(lysate)로부터 회수될 수 있다. 멤브레인-결합된다면, 적절한 세정제를 사용하거나 또는 효소적 절단(enzymatic cleavage)을 통해 멤브레인으로부터 유리될 수 있다. 발현에 사용되는 세포들은 동결-용해 순환법, 초음파 처리법, 기계적 붕괴법 또는 세포 용해제(cell lysing agent)와 같은 다양한 물리적 또는 화학적 수단들에 의해 붕괴될 수도 있다.

[0068] 단백질의 정제는 당해 분야에 공지된 적절한 수법, 예를 들어, 이온-교환 칼럼상 분획법, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온-교환 수지(예컨대, DEAE) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산 암모늄 침전법, IgG와 같은 오염원들을 제거하기 위한 단백질 A 세파로즈 칼럼(예컨대, Sephadex(등록상표) G-75)을 사용한 겔 여과법 및 에피토프-표지된 형태를 결합시키기 위한 금속 킬레이트화 칼럼 등에 의해 실시될 수 있다.

[0069] B. 항체 제조

[0070] 본 발명의 특정 실시형태에서, 선택된 단백질은 항체이다. 폴리클론 항체, 모노클론 항체, 인간화 항체, 이중특이성 항체 및 헤테로컨쥬게이트 항체를 비롯한 항체들의 제조 수법은 다음과 같다.

[0071] (i) 폴리클론 항체

[0072] 폴리클론 항체들은 일반적으로, 관련 항원 및 면역보강제를 다수회 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사함으로써 동물 내에서 증가된다. 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 갑상선글로불린 또는 대두 트립신 억제제와 같이, 면역화될 중에 있어서 면역원성인 단백질에 관련 항원을 컨쥬게이트하는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 보강제의 예로는 프로인트의 완전 면역보강제(Freund's complete adjuvant) 및 MPL-TDM 보강제(모노포스포릴 리피드 A, 합성 트레할로스 다이코리노미콜레이트)가 포함된다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험 없이 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에 의해 선택될 수 있다.

[0073] 1개월 후, 동물들은 여러 부위에의 피하주사에 의해 프로인트의 완전 보강제에서의 펩타이드 혹은 컨쥬게이트의 원래 양의 1/5 내지 1/10으로 추가 주사된다. 7 내지 14일 후, 동물들을 채혈하여, 그 혈청을 항체 역가에 대하여 분석한다. 해당 역가가 평평해질 때까지 동물들은 추가 주사된다. 바람직하게는, 동물들은 동일 항원의 컨쥬게이트로 추가 주사되지만, 다른 가교제를 통해 및/또는 다른 단백질에 컨쥬게이트된다. 컨쥬게이트는 또한, 단백질 융합으로서 재조합 세포 배지에서 이루어질 수도 있다. 또한, 백반과 같은 응집제는 면역반응을 증강시키기 위해 적절하게 사용된다.

[0074] (ii) 모노클론 항체

[0075] 모노클론 항체는 실질적으로 균일한 항체들의 개체군으로부터 얻어지고, 즉, 해당 개체군을 구성하는 개별의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클론"은 별개의 항체들의 혼합물이 아닌, 항체의 형질을 가리킨다.

[0076] 예를 들어, 모노클론 항체들은 우선 문헌[Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호 공보)에 의해 제조될 수 있다.

[0077] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어, 햄스터는 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체들을 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 추출하기 위해 상기 설명된 바와 같이 면역화된다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수도 있다. 그 후, 림프구는 폴리에틸렌 글라이콜과 같은 적절한 융합제를 사용하여 골수종 세포와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

[0078] 면역제는 전형적으로 조제될 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 유래의 세포들을 원한다면, 말초혈액 림프구("PBL")가 사용되고, 비-인간 포유동물 공급원을 원한다면, 비장세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 그 후, 림프구는 적절한 융합제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글라이콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합되어 하이브리

도마 세포를 형성한다[Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 통상 설치류, 소 및 인간 유래의 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 골수종 세포이다. 통상, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 따라서, 이와 같이 해서 제조된 하이브리도마 세포는, 바람직하게는 미융합된 모체의 골수종 세포들의 성장 또는 생존을 억제하는 물질을 1종 이상 포함하는 적절한 배양 배지에 과중되어, 배양된다. 예를 들어, 모체의 골수종 세포가 효소인 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(HGPRT 또는 HPRT)를 결여하고 있다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는, 전형적으로, HGPRT-결핍 세포들의 성장을 방해하는 하이포크산틴, 아미놉테린 및 티미딘(HAT 배지)을 포함할 것이다.

- [0079] 바람직한 골수종 세포들은 유효하게 융합하고, 선택된 항체-생산 세포들에 의해 항체의 안정한 고수준 생산을 지원하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는, Salk Institute Cell Distribution Center(미국 캘리포니아주의 샌디에이고시에 소재)에서 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것 및 American Type Culture Collection(미국 메릴랜드주의 록빌시에 소재)에서 입수가 가능한 SP-2 세포들로부터 유래된 것과 같은 쥐과 골수종이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종은 또한 인간 모노클론 항체들을 생산에 대해서 설명되어 있다[Kozbor, *J. Immunol.*, **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].
- [0080] 하이브리도마 세포들이 성장하는 배양 배지는 항원에 대항하여 지향된 모노클론 항체들의 생산에 대해서 분석 평가된다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포들에 의해 생산된 모노클론 항체들의 결합 특이성은 면역침강법에 의해, 또는 시험관내 결합분석법, 예를 들어, 방사면역분석법(RIA) 또는 효소-결합된 면역흡착분석법(enzyme-linked immunoabsorbent assay: ELISA)에 의해 결정된다.
- [0081] 모노클론 항체의 결합 친화도는 문헌[Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, **107**:220(1980)]의 Scatchard 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0082] 하이브리도마 세포들이 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 지닌 항체들을 생산하는 것으로 확인된 후, 클론들은 희석과정들을 한정시킴으로써 서브클로닝되고, 표준방법들(Goding, 위에서 기재됨)에 의해 성장된다. 이 목적을 위한 적절한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포들은 동물에서의 복수 종양(ascites tumor)으로서 생체내 성장될 수 있다.
- [0083] 면역제는 전형적으로 항체가 결합하는 에피토프 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 말초혈액 림프구("PBL")는 인간 유래의 세포들을 원할 경우 사용되며, 또는 비-인간 포유동물 소스를 원할 경우엔 비장세포 또는 림프절 세포들이 사용된다. 그 후, 림프구는 적절한 융합제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글라이콜을 사용하여 불멸화 세포주와 함께 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103].
- [0084] 불멸화 세포주는 통상 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 유래의 골수종 세포이다. 통상, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 따라서, 상기 하이브리도마 세포는 미융합된 불멸화 세포들의 성장 또는 생존을 억제하는 물질을 1종 이상 함유하는 적절한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 모체 세포가 효소인 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(HGPRT 또는 HPRT)를 결여하고 있다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는, HGPRT-결핍 세포들의 성장을 방해하는, 하이포크산틴, 아미놉테린 및 티미딘("HAT 배지")을 포함할 것이다.
- [0085] 바람직한 불멸화 세포주들은, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포들에 의해 항체의 안정한 고수준 생산을 지원하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다. 보다 바람직한 불멸화 세포주들은, 예를 들어, Salk Institute Cell Distribution Center(캘리포니아주의 샌디에이고시에 소재) 및 American Type Culture Collection(메릴랜드주의 록빌시에 소재)로부터 얻어질 수 있는 쥐과 골수종 세포주들이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주들은 또한 인간 모노클론 항체들의 생산에 대해서 설명되어 있다[Kozbor, *J. Immunol.*, **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) pp.51-63].
- [0086] 하이브리도마 세포들이 배양되는 배양 배지는 조제될 단백질에 대항하여 지향된 모노클론 항체들의 존재에 대하여 분석 평가될 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포들에 의해 생산된 모노클론 항체들의 결합 특이성은 면역침강법에 의해, 또는 시험관내 결합분석법, 예를 들어, 방사면역분석법(RIA) 또는 효소-결합된 면역흡착분석법(ELISA)에 의해 결정된다. 이러한 수법들 및 분석 평가법들은 당해 분야에 공지되어 있다. 모노클론 항체의

결합 친화도는, 예를 들어, 문헌[Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980)]의 Scatchard 분석에 의해 결정될 수 있다.

- [0087] 원하는 하이브리도마 세포들이 확인된 후, 클론들은 희석과정들을 한정시킴으로써 서브클로닝되고, 표준방법들에 의해 증식된다(Goding, 위에서 기재됨). 이 목적을 위해 적절한 배양 배지는, 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포들은 동물 내의 복수(ascites)로서 생체내 배양될 수 있다.
- [0088] 서브클론들에 의해 분비된 모노클론 항체들은 배양배지, 복수액, 또는 혈청으로부터, 종래의 면역글로불린 정제 방법들, 예를 들어, 단백질 A-세파로즈, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 적절하게 분리된다.
- [0089] 모노클론 항체를 코드화하는 DNA는 종래의 절차들을 사용하여(예컨대, 쫓과 항체들의 중쇄 및 경쇄를 코드화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브들을 사용하여) 쉽게 단리 및 서열결정된다. 하이브리도마 세포들은 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 역할한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내에 배치될 수 있고, 해당 벡터는 이어서 대장균(*E.coli*) 세포들, 유인원 COS 세포들, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포들 또는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포들과 같은 숙주 세포에 감염시켜서, 재조합 숙주 세포내에서 모노클론 항체들의 합성을 얻는다. 항체를 코드화하는 DNA의 박테리아내 재조합 발현에 대한 검토 논문은 문헌들[Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188(1992)]을 포함한다.
- [0090] 추가의 실시형태에서, 문헌[McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554(1990)]에 기재된 수법들을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 항체들이 단리될 수 있다. 문헌들[Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]은 파지 라이브러리를 사용하여 쫓과 항체 및 인간 항체를 각각 단리하는 것을 기재하고 있다. 후속의 공보들은 체인 서플링에 의한 고 친화도(nM 범위) 인간 항체들의 생산뿐만 아니라(Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)), 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합적 감염 및 생체내 재조합(Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993))을 기재하고 있다. 따라서, 상기 수법들은 모노클론 항체들을 단리하기 위한 전통적인 모노클론 항체 하이브리도마 수법들에 대한 실천가능한 대안이 된다.
- [0091] DNA는 또한, 상동성의 쫓과 서열들 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인들을 위한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 제4,816,567호 공보; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)), 또는 비-면역글로불린 폴리펩타이드를 위한 코딩 서열 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형될 수 있다.
- [0092] 전형적으로, 이러한 비-면역글로불린 폴리펩타이드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나, 또는 항원에 대해 특이성을 지닌 1개의 항원-결합 부위 및 다른 항원에 대하여 특이성을 지닌 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메릭 2가 항체를 형성하기 위해 항체의 1개의 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대하여 치환된다.
- [0093] 키메릭 또는 하이브리드 항체들은 또한, 가교제들을 내포하는 것들을 비롯한, 합성 단백질 화학에서 공지된 방법들을 사용하여 시험관내에서 제조될 수도 있다. 예를 들어, 면역독소는 이황화물-교환 반응을 이용해서 또는 티오에터 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이 목적을 위해 적절한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트가 포함된다.
- [0094] (iii) 인간화 및 인간 항체
- [0095] 상기 조제 방법을 조건으로 하는 항체들은 인간화 또는 인가 항체들을 추가로 포함할 수 있다. 인간화 형태의 비-인간(예컨대, 쫓과) 항체들은 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 포함하는, 키메릭 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 그들의 단편들(예컨대, 항체들의 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항원-결합 서열들)이다. 인간화 항체들은 수용자의 상보성 결정영역(CDR)으로부터의 잔기들이 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 지닌 마우스, 쥐 또는 토끼와 같은 비-인간 종(공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체되어 있는 인간 면역 글로불린(수용자 항체)을 포함한다. 몇몇 경우, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기들은 대응하는 비-인간 잔기들에 의해 대체된다. 인간화 항체들은 또한, 수용자 항체에서도, 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열들에서도 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수도 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개 및 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, CDR 영역들 중 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린의 영역에 대응하며, FR 영역들 중 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 영역이다. 인

간화 항체는 최적으로는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로, 인간 면역글로불린의 일부를 포함할 것이다[Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329(1988) 및 Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)].

[0096] 비-인간 항체들을 인간화하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "유입"(import) 잔기들이라고도 하며, 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 주로 문헌들[Winter and co-workers, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)]의 방법에 따라 수행될 수 있거나, 또는 인간 항체의 대응하는 서열들 대신에 설치류 CDR들 혹은 CDR 서열들을 치환함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체들은 키메릭 항체들(미국 특허 제4,816,567호 공보)이며, 실질적으로 보다 적은 온전한 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 대응하는 서열에 의해 치환되었다. 실제로, 인간화 항체들은 전형적으로, 일부 CDR 잔기들 및 아마도 일부의 FR 잔기들이 설치류 항체내 유사 부위로부터의 잔기들에 의해 치환된 인간 항체들이다.

[0097] 인간화 항체들을 제조하는데 사용될 인간 가변 도메인들(경쇄 및 중쇄 모두)의 선택은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "최적합화"(best-fit) 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열들의 전체 라이브러리에 대해서 스크리닝된다. 그후, 설치류의 서열과 가장 근접한 인간 서열은 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크(FR)로서 수용된다[Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]. 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체들의 컨센서스 서열로부터 유도된 특정 프레임워크를 사용한다. 여러 개의 상이한 인간화 항체들을 위해, 동일한 프레임워크가 사용될 수 있다[Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)].

[0098] 항체들은 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성들을 보유하면서 인간화되는 것이 더욱 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체들은 부모 서열 및 인간화 서열들의 3차원 모델들을 이용해서 부모 서열 및 각종 개념적 인간화 산물들의 분석방법에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델들은 상업적으로 입수되고 있으며(즉, 시판되고 있으며), 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열들의 개연성 있는 3차원 입체형태 구조들을 제시하여 디스플레이(즉, 표시)하는 컴퓨터 프로그램들이 사용 가능하다. 이들 디스플레이를 조사하면, 그의 항원을 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석과 같은, 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 잔기의 유사한 역할의 분석이 허용된다. 본 방법에서, FR 잔기들은 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택되어 조합될 수 있어서, 목적하는 항체 특성들, 예를 들어, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성된다. 일반적으로, CDR 잔기들은 항원 결합에 영향을 주는데 직접 및 가장 실질적으로 관여된다.

[0099] 대안적으로, 이제, 면역화 시, 내인성 면역글로불린 제조의 부재 시에 인간 항체들의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 유전자 이식 동물들(예컨대, 마우스)을 생산하는 것이 가능하다. 예를 들어, 키메릭 및 생식계 돌연변이 마우스 내에 항체 중쇄 결합영역(J_H) 유전자가 동형접합성 결실되면, 내인성 항체 생산이 완전히 억제된다고 기재되어 있다. 이러한 생식계 돌연변이 마우스에서 인간 생식계 면역글로불린 유전자 어레이가 전달되면, 항원 접촉 시 인간 항체가 생산될 것이다. 이에 대해서는, 예를 들어, 문헌들[Jakovovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakovovits et al., *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]을 참조할 수 있다. 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수도 있다(Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)).

[0100] 인간 항체들은 또한, 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하는, 당해 분야에 공지된 각종 수법들을 이용해서 제조될 수 있다(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Cole 등 및 Boerner 등의 수법들은 또한 인간 모노클론 항체들을 제조하는데 유용하다(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77(1985) 및 Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991)). 마찬가지로, 인간 항체들은, 유전자 이식 동물들 내에, 예컨대, 내인성 면역글로불린 유전자들이 부분적으로 또는 완전히 불활성화되는 마우스 내에, 인간 면역글로불린 유전자좌(loci)를 도입시킴으로써 제조될 수 있다. 도입 시, 인간 항체 생성이 관찰되며, 이는 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 측면에서 인간에게서 볼 수 있는 것과 매우 유사하다. 이 접근법은, 예를 들어, 미국특허 제5,545,807호; 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호 공보 및 하

기 문헌들[Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783(1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994), Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826(1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

- [0101] (iv) 항체 의존성 효소-매개 프로드럭 요법(Antibody Dependent Enzyme-Mediated Prodrug Therapy: ADEPT)
- [0102] 본 발명의 항체들은 또한 프로드럭(예컨대, 펩티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 프로드럭-활성화 효소에 항체를 컨주게이팅함으로써 ADEPT에 사용될 수 있다. 이에 대해서는, 예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호 공보를 참조할 수 있다.
- [0103] ADEPT에 이용가능한 면역 컨주게이트의 효소 성분으로는 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키도록 하는 방식으로 프로드럭 상에서 작용할 수 있는 효소라면 어떠한 것이라도 들 수 있다.
- [0104] 본 발명의 방법에 이용가능한 효소들로는 글라이코시다제, 글루코스 옥시다제, 인간 라이소좀, 인간 글루쿠로니다제, 포스페이트-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키기 위해 이용가능한 알칼리 포스파타제; 비독성 5-플루오로사이토신을 항암 약물인 5-플루오로유라실로 전환시키기 위해 이용가능한 사이토신 데아미나제; 펩타이드-함유 프로드럭을 유리 약물들로 전환시키기 위해 이용가능한, 세라티아 프로테아제, 썬모라이신, 서브틸리신, 카복시펩티다제(예컨대, 카복시펩티다제 G2 및 카복시펩티다제 A) 및 카텡신(예컨대, 카텡신 B 및 L) 등의 프로테아제; D-아미노산 치환체를 함유하는 프로드럭을 전환시키기 위해 이용가능한 D-알라닐카복시펩티다제; 글라이코실화 프로드럭을 유리 약물로 전환시키기 위해 이용가능한 β-갈락토시다제 및 뉴로아미니다제와 같은 탄수화물-절단 효소; β-락탐으로 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키기 위해 이용가능한 β-락타마제; 및 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기를 각각 지닌 아민 질소에서 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키기 위해 이용가능한 페니실린 바미다제 또는 페니실린 G 아미다제와 같은 페니실린 아미다제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 대안적으로, 당해 분야에 "항체효소(abzyme)"라고 알려져 있는, 효소활성을 지닌 항체들은 본 발명의 프로드럭을 유리 활성 약물들로 전환하는데 사용될 수 있다(예컨대, Massey, *Nature* 328: 457-458(1987) 참조). 항체-항체효소 컨주게이트는 항체효소를 종양세포 군집으로 전달하기 위해 본 명세서에 기술된 바에 따라 제조될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 효소들은 전술한 헤테로 이중작용기성 가교제를 사용하는 것과 같이, 당해 분야에 잘 알려진 수법들에 의해 항-IL-17 또는 항-LIF 항체들에 공유결합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적으로 활성인 부분에 연결된 본 발명의 항체의 항원결합영역을 적어도 포함하는 융합 단백질은 당해 분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기술들을 사용하여 제조될 수 있다(예컨대, Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984) 참조).
- [0106] (iv) 이중특이성 및 다중특이성 항체들
- [0107] 이중특이성 항체(BsAb)들은 적어도 2개의 다른 에피토프들에 대한 결합 특이성들을 지닌 항체들이다. 이러한 항체들은 전장(full length) 항체들 또는 항체 단편들(예컨대, F(ab')₂ 이중특이성 항체들)로부터 유래될 수 있다.
- [0108] 이중특이성 항체들을 제조하는 방법들은 당해 분야에 공지되어 있다. 전장 이중특이성 항체들의 전형적인 제조는 2개의 사슬이 다른 특이성을 지닌 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 짝의 동시발현에 기초하고 있다[Millstein et al., *Nature*, 305:537-539(1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 조합 때문에, 이들 하이브리도마(퀴드로마)는 10개의 다른 항체분자의 잠재적 혼합물을 생성하며, 이중 하나만 정확한 이중특이성 구조를 가진다. 친화도 크로마토그래피 단계들에 의해 통상적으로 실시되는, 정확한 분자의 정제는 오히려 다루기 어려워, 생성물 수율이 낮다. 유사한 방법들이 WO 93/08829 및 문헌[Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.
- [0109] 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합부위)을 지닌 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합될 수 있다. 융합은, 바람직하게는 힌지된 CH2 및 CH3 영역들 중 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한 것이다. 융합 중 적어도 하나에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1중쇄 불변 영역(CH1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및, 필요한 경우, 면역글로불린 경쇄를 코드화하는 DNA는 별도의 발현벡터를 내로 삽입되어, 적절한 숙주 유기체 내로 동시-감염된다. 발생하는 이중특이성 항체들의 보다 상세한 설명에 대해서는, 예를 들어, 문헌[Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210(1986)]을 참조할 수 있다.

- [0110] 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합부위)을 지니는 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역들 중 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한 것이다. 융합 중 적어도 하나에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 상수 영역(CH1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및, 필요한 경우, 면역글로불린 경쇄를 코드화하는 DNA는 별도의 발현벡터를 내로 삽입되며, 적절한 숙주 유기체 내로 동시-감염된다. 이는 구축에 사용된 3개의 폴리펩타이드 사슬의 불균등 비율이 최적의 수율을 제공할 때 실시형태에서 3개의 폴리펩타이드 단편의 상호 비율을 조정함에 있어서 큰 유동성을 제공한다. 그러나, 적어도 2개의 폴리펩타이드 사슬을 같은 비율로 발현함으로써 높은 수율이 얻어질 경우, 또는 비율이 특히 중요하지 않을 경우, 2 또는 3개의 폴리펩타이드 사슬 모두에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터 내에 삽입하는 것이 가능하다.
- [0111] WO 96/27011에 기술된 다른 접근법에 따르면, 1쌍의 항체 분자들 사이의 인터페이스는 재조합 세포 배양액으로부터 회수된 헤테로다이머들의 비율을 극대화시키기 위해 유전공학적으로 조작될 수 있다. 바람직한 인터페이스는 항체 불변 도메인의 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 방법에서, 제1항체 분자의 인터페이스로부터 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄는 큰 측쇄(예컨대, 티로신 또는 트립토판)에 의해 대체된다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일한 또는 유사한 크기의 상보적 "공동부"(cavity)는 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체시킴으로써 제2항체 분자의 인터페이스 상에 형성된다. 이는 호모다이머 등과 같은 다른 원치 않는 최종 산물에 비해서 헤테로다이머의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.
- [0112] 본 접근법의 바람직한 실시형태에서, 이중특이성 항체들은 하나의 암(arm)에 제1결합 특이성을 지닌 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 쪽 암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 짝(제2결합특이성을 제공)으로 구성된다. 이중특이성 분자의 1/2에 면역글로불린 경쇄가 존재함으로써 분리가 더욱 손쉬워지므로, 상기 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬조합으로부터 원하는 이중특이성 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것을 발견하였다. 이러한 접근법은 1994년 3월 3일자 공개된 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이성 항체들을 생성하는 것의 추가의 상세에 대해서는, 예를 들어, 문헌[Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)]을 참조할 수 있다.
- [0113] 이중특이성 항체들은 가교된 또는 "헤테로컨쥬게이트" 항체들을 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨쥬게이트내 항체들 중 하나는 아비딘에 결합되고, 다른 하나는 비오틴에 결합될 수 있다. 이러한 항체들은, 예를 들어, 면역 시스템 세포들을 원치 않는 세포들에 대해서 표적화하기 위하여(미국 특허 제4,676,980호 공보) 그리고 HIV 감염의 치료를 위하여(WO 91/00360, WO 92/200373) 제안되어 있었다. 헤테로컨쥬게이트 항체들은 임의의 편리한 가교방법들을 사용하여 제조될 수 있다. 적절한 가교제들이 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 다수의 가교 수법과 함께 미국 특허 제4,676,980호 공보에 개시되어 있다.
- [0114] 항체 단편들로부터 이중특이성 항체들을 생성하기 위한 수법들도 상기 문헌에 기재되어 있다. 반드시 이중특이성일 필요가 없는 2가 항체 단편들을 제조하기 위하여 하기 방법들이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 대장균으로부터 회수된 Fab' 단편들은 시험관내에서 화학적으로 결합되어 2가 항체들을 형성할 수 있다. 이에 대해서는 문헌[Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)]을 참조할 수 있다.
- [0115] 이중특이성 항체들은 전장 항체들 또는 항체 단편들(예컨대, F(ab')₂ 이중특이성 항체들)로서 제조될 수 있다. 항체 단편들로부터 이중특이성 항체들을 생성하는 수법들은 상기 문헌에 기재되어 있었다. 예를 들어, 이중특이성 항체들은 화학적 결합을 사용하여 제조될 수 있다. 문헌[Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)]에는 온전한 항체들이 단백질 가수분해적으로 절단되어, F(ab')₂ 단편들이 생성되는 과정을 기재하고 있다. 이들 단편은 다이티올 착화제 아르센하나트륨의 존재 하에 환원되어, 인접한 다이티올을 안정화시켜 분자간 이황화물 형성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편들은 티오나이트로벤조에이트(thionitrobenzoate: TNB) 유도체들로 전환된다. 그 후, Fab'-TNB 유도체들 중 하나는 Fab'-TNB 유도체로 재전환되어 이중특이성 항체를 형성한다. 형성된 이중특이성 항체들은 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.
- [0116] Fab' 단편은 대장균으로부터 직접 회수될 수 있으며, 화학적으로 결합되어 이중특이성 항체들을 형성할 수 있다. 문헌[Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225(1992)]에는 완전히 인간화된 이중특이성 항체 F(ab')₂ 분자들의 제조를 기재하고 있다. 각 Fab' 단편은 대장균으로부터 별도로 분비되어서, 시험관내에서 직접 화학적 결합이 이루어져, 이중특이성 항체를 형성한다. 이와 같이 해서 형성된 이중특이성 항체는 ErbB2 수용체를 과잉 발현하는 세포들 및 정상 인간 T 세포들에 결합할 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 타겟에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수 있었다.

[0117] 재조합 세포 배양액으로부터 2가 항체 단편들을 직접 제조하고 단리하기 위한 각종 수법들이 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 2가 헤테로다이머들은 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다[Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)]. Fos 단백질 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩타이드들은 2개의 다른 항체의 Fab' 부분들에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 호모다이머들은 힌지 영역에서 환원되어, 모노머를 형성하고, 재산화되어 항체 헤테로다이머를 형성하였다. 문헌[Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)]에 의해 기재된 "다이아바디" 수법은 이중 특이성/2가 항체 단편들을 제조하기 위한 선택적 메커니즘을 제공하였다. 단편들은 너무 짧아 동일한 사슬 상에서 2개의 도메인 간에 짝짓기를 허용할 수 없는 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(V_L)에 접속된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 도메인 및 V_L 도메인은 다른 하나의 단편의 상보적 V_L 도메인 및 V_H 도메인과 강제로 짝짓기됨으로써, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 단쇄 Fv(sFv) 다이머를 사용하여 이중특이성/2가 항체 단편들을 제조하기 위한 다른 전략이 또한 보고되어 있었다. 이에 대해서는 문헌[Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368(1994)]을 참조할 수 있다.

[0118] 2개 이상의 원자가를 갖는 항체들이 상정된다. 예를 들어, 삼중특이성 항체들이 제조될 수 있다[Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60(1991)].

[0119] 예시적인 이중특이성 항체들은 주어진 분자 상에서 2개의 다른 에피토포에 결합할 수도 있다. 대안적으로, 항-단백질 암(arm)은 Fc γRI(CD64), Fc γRII(CD32) 및 Fc γRIII(CD16) 등과 같은 IgG(Fc γR)에 대한 Fc 수용체, 또는 T-세포 수용체 분자(예컨대, CD2, CD3, CD28 또는 B7) 등과 같은 백혈구 상에 유발 분자에 결합하는 암과 조합될 수 있어서, 특정 단백질을 발현하는 세포에 대한 세포성 방어 메커니즘에 집중할 수 있다. 이중특이성 항체들은 특정 단백질을 발현하는 세포에 세포독성 제제를 국한시키기 위해 사용될 수도 있다. 이러한 항체는 EOTUBE, DPTA, DOTA 또는 TETA 등과 같은, 세포독성 제제 또는 방사성핵종 킬레이터를 결합하는 암과 단백질-결합 암을 가진다. 다른 이중특이성 항체는 목적으로 하는 단백질을 결합하고, 조직인자(tissue factor: TF)를 추가로 결합한다.

[0120] (v) 헤테로컨쥬게이트 항체

[0121] 헤테로컨쥬게이트 항체들도 본 발명의 범주 내이다. 헤테로컨쥬게이트 항체들은 2개의 공유결합된 항체로 구성된다. 이러한 항체는, 예를 들어, 원치않는 세포들에 대하여 면역 체계 세포들을 표적화하기 위하여(미국특허 제4,676,980호 공보) 그리고 HIV 감염을 치료하기 위하여(WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP03089) 제안되어 있었다. 가교제들을 포함하는 방법을 비롯하여, 합성 단백질 화학 분야에서 공지된 방법들을 사용하여 항체들이 시험관내에서 제조될 수 있음이 상정되어 있다. 예를 들어, 면역 독소는 이황화물 교환 반응을 사용하여 또는 티오에터 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이 목적을 위한 적절한 제제들의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티리이미데이트, 그리고 예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호 공보에 개시된 것들을 들 수 있다.

[0122] C. 항체들을 포함하는, 단백질의 정제

[0123] 표적 폴리펩타이드가 인간 유래의 세포와는 다른 재조합 세포에서 발현되는 경우, 해당 표적 폴리펩타이드에는 인간 유래의 단백질 또는 폴리펩타이드가 전혀 없다. 그러나, 표적 폴리펩타이드와 실질적으로 상동성인 제제를 얻기 위하여, 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩타이드로부터 표적 폴리펩타이드를 정제할 필요가 있다. 제1 단계로서, 배양 배지 또는 용해물은 전형적으로 특정 세포 잔해를 제거하기 위해 원심분리된다. 그 후, 멤브레인 및 가용성 단백질 분획물들이 분리된다. 이어서, 표적 폴리펩타이드는, 표적 폴리펩타이드가 멤브레인 결합되는지의 여부에 따라서, 가용성 단백질 분획물 및 배지 용해물의 멤브레인 분획물로부터 정제될 수 있다. 적절한 정제 방법들의 예시로는 하기 과정들, 즉, 면역친화도 혹은 이온-교환 칼럼에 대한 분획법; 에탄올 침전법; 역상 HPLC; 실리카 상에서 혹은 DEAE 등과 같은 양이온 교환 수지 상에서의 크로마토그래피법; 크로마토포커싱법; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전법; 예를 들어, Sephadex G-75를 사용한 겔 여과법; 및 IgG 등과 같은 오염물질을 제거하기 위한 단백질 A 세파로즈(Sepharose) 칼럼법 등을 들 수 있다.

[0124] 현재 모노클론 항체(MAb)들을 생산하고 있는 대부분의 회사들은 산물 포획을 위한 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 이어서, 숙주 세포 단백질(host cell protein: HCP), 내독소, 숙주 DNA 및 침출된 단백질 A 등과 같은 음 하전된 오염물질을 추출하기 위한 유체 통과 방식(flow-through mode)의 음이온 교환 크로마토그래피를 실시하고 나서, 잔류 HCP 및 산물 응집체들을 포함하는 양 하전된 오염물질 층을 제거하기 위한 보유 방식에서의 양이온 교환 크로마토그래피 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography: HIC)를 실시하는 것을 포함하는 3-칼럼 플랫폼 접근법을 사용한다.

- [0125] 단백질 용액 내에 존재할 수도 있는 이들 바이러스들은 단백질 자체보다 더 크다. 따라서, 바이러스들은 여과에 의해 크기에 따라 단백질들로부터 제거될 수 있는 것으로 추정된다.
- [0126] 바이러스 여과는, 전형적으로 약 60nm의 공칭 공극 직경을 지닌 고 처리량 멤브레인을 사용하여, 보다 큰 것, 예컨대, 레트로바이러스(직경 80 내지 100nm)를 제거할 수 있다. 20nm의 공칭 공극 직경을 지닌 고 처리량 멤브레인은 또한 시판되고 있으므로, 예를 들어, 파보바이러스(직경 18 내지 26nm) 등과 같은 보다 작은 바이러스들을 여과에 의해 제거할 수 있는 반면, 예컨대, 모노클론 항체와 같이 160kD(~8nm)만큼 큰 단백질의 통과를 허용할 수 있다. 본 발명은 주로 보다 작은 공극 직경의 바이러스 제거 필터를 사용하여, 전형적으로 이러한 보다 작은 바이러스들의 여과와 관련된 문제들을 해결하기 위해 의도되어 있다.
- [0127] 전형적으로, 바이러스 여과 단계는 주어진 다운스트림 공정에서 여러 지점들 중 임의의 한 지점에서 구현될 수 있다. 예를 들어, 전형적인 모노클론 항체 정제 공정에서, 바이러스 여과는, 저 pH 바이러스 불활성화 단계 이후, 또는 중간 칼럼 크로마토그래피 단계 이후, 또는 최종 칼럼 크로마토그래피 단계 이후에 일어날 수도 있다.
- [0128] 본 발명에 따르면, 바이러스 여과 유닛 조작용 다운스트림 공정 중 어느 단계에서나 실시될 수 있었다. 모노클론 항체의 다운스트림 처리 동안 바이러스 여과는 전형적으로 친화도 크로마토그래피 단계(포획단계) 및 이온-교환 정제단계(폴리싱 단계) 후에 수행된다.
- [0129] 본 명세서에서 개시된 실험들에 사용된 실험 설비가 도 1에 예시되어 있다. 그러나, 본 발명이 그와 같이 제한되지 않는 것임을 역설할 수 있다. 당해 분야에 잘 알려진 다른 배치 구성들도 적합하며, 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.
- [0130] 접선 흐름(tangential flow) 바이러스 여과에서, 단백질 용액은 통상 보유 측 상에서 일정한 유속에서 펌핑된다. 바이러스 제거 필터를 통해 발생하는 차압에 의해 단백질 용액이 필터를 통해 투과될 수 있는 반면, 바이러스들은 보유액 측 상에 남아있게 된다.
- [0131] 소위 "직각-흐름 방식"(normal-flow) 또는 "전량 방식"(dead-end)의 바이러스 여과의 경우, 접선 방식의 바이러스 여과에 사용된 것과 같은 바이러스 필터가 사용될 수 있지만, 주변 장비 및 조작과정들은 접선 흐름 방식의 바이러스 여과의 경우보다 훨씬 더 간단하고 덜 비싸다. 따라서, 원칙적으로, "직각-흐름 방식" 여과는 여과 이전에 압력용기에 거대분자-함유 용액을 넣는 단계, 및 압력원, 적절하게 질소(가스) 또는 공기의 도움으로 바이러스 제거 필터를 통해 그 용액을 통과시키는 단계를 포함한다. 대안적으로, 펌프는 미리 결정된 유속으로 바이러스 제거 필터를 통해 액체를 여과시키기 위해 보유액 측 상에 사용될 수 있었다.
- [0132] 필터의 미세도는 일반적으로, 분자들이 필터에 의해 정지되는, 소위 컷-오프(cut-off)되는 대략의 분자량(상대 분자량) 또는 공극 크기로 통상 표현된다.
- [0133] 바이러스 필터는 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 그 중에서 Millipore(미국 매사추세츠주에 소재) 및 Asahi Chemical Industry Co., Ltd(일본에 소재)에서 공급된다. 적절한 파보바이러스 보유 필터는 Viresolve(등록상표) Pro(Millipore Corp., 매사추세츠주의 빌레리카시에 소재)를 포함한다. Viresolve(등록상표) Pro 멤브레인은 비대칭 이중층 구조를 가지며, 폴리에테르설폰(PES)으로 제조되어 있다. 멤브레인 구조는, 크기가 20nm 이상인 바이러스들을 보유하는 한편 180kDa 미만의 분자량을 지니는 단백질들은 해당 멤브레인을 통해 투과시키도록 설계된다. 단백질 용액으로부터 파보바이러스를 비롯한, 작은 바이러스들을 제거하기에 적절한 다른 필터로는 Novasip(상표명) DV20 및 DV50 바이러스 제거필터 캡슐(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트힐스시에 소재), Virosart(등록상표) CPV, Planova 20N(Asahi Kasei) 및 BioEX(Asahi Kasei)를 들 수 있다. Novasip DV20 등급 캡슐 필터는 5 내지 10리터까지의 단백질 용액으로부터 파보바이러스 및 20nm만큼 작은 다른 바이러스들을 제거하기 위해 Ultipor VF-급 DV20 등급 주름진 멤브레인 카트리지를 사용한다. Novasip DV50 등급 캡슐 필터는 40 내지 50nm 이상의 바이러스들을 제거하기 위한 Ultipor VF DV50 등급 Ultipleat(등록상표) 멤브레인 카트리지를 포함한다. Novasip Ultipor VF 캡슐 필터는 비멸균 상태로 공급되며, 감마-조사될 수도 있다. Virosart(등록상표) CPV는 이중층 폴리에테르설폰 비대칭 멤브레인을 사용하고, 4로그 이상의 파보바이러스 및 6로그의 레트로바이러스를 보유한다.
- [0134] 공급액의 예비여과는 필터 성능에 극적인 영향을 줄 수 있다. 예비여과는 전형적으로 단백질 응집체, DNA 및 다른 미량 물질들과 같은 바이러스 필터들을 오염시킬 수도 있는 불순물들 및 오염물질들을 제거하기 위한 것이다.
- [0135] 본 발명에 따르면, 바이러스 필터의 효능을 현저하게 개선시키는 것은 양이온 교환 매질과 내독소 제거 매질의

양쪽 모두의 이용을 포함하는 예비여과 단계에 의해 달성될 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "매질"(혹은 매체) 또는 "매질들"은 양이온 교환 단계 및 내독소 제거 단계를 각각 수행하기 위한 임의의 수단을 포함하도록 사용된다. 이와 같이 해서, "양이온 교환 매질"이란 용어는 구체적으로 양이온 교환 수지, 기질, 흡착제 등을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. "내독소 제거 매질"이란 용어는, 예를 들어, 크로마토그래피 내독소 제거 매질, 내독소 친화도 제거 매질 등을 포함하는 임의의 양 하전된 멤브레인 표면을 포함하지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0136] 본 발명의 예비여과 단계에 사용하기에 적합한 양이온 교환 매질로는, 시판가능한, Mustang(등록상표) S, Sartobind(등록상표) S, Viresolve(등록상표) Shield, SPFF, SPXL, Capto(등록상표) S, Poros(등록상표) 50HS, Fractogel(등록상표) S, Hypercel(등록상표) D 등을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0137] 본 발명의 예비여과 단계에 사용하기에 적합한 내독소 제거 매질로는, 시판 가능한, Mustang(등록상표) E., Mustang(등록상표) Q, Sartobind(등록상표) Q, Chromasorb(등록상표), Possidyne(등록상표), Capto(등록상표) Q, QSFF, Poros(등록상표) Q, Fractogel(등록상표) Q 등을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0138] 예비여과 단계는, 예를 들어, 공정 크로마토그래피 풀(pool)에 넣고, 내독소 제거 매질 및 양이온 교환 매질과 파보바이러스 필터를 포함하는 여과 트레인 상에서 풀을 처리함으로써 수행될 수 있다. 내독소 제거 매질 및 양이온 교환 매질은 예비여과 단계로서 작용하며, 파보바이러스 필터의 용량은 여과 트레인에서 2단계의 수순과는 독립적이다. 여과 트레인은 단일 단계로서 연속적으로 가동할 수 있거나, 또는 다른 유닛 조합으로서 작동될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 크로마토그래피 풀은 우선 내독소 제거 매질 위에서 먼저 처리되고, 수집된 풀은 양이온 교환 매질 위에서 처리되며, 후속의 풀은 파보바이러스 필터를 이용해서 여과된다. 상기 언급된 바와 같이, 공정 수순에 있어서 양이온 교환 매질과 내독소 제거 매질을 적용하는 순서는 파보바이러스 여과 용량에 영향을 주지 않는다. 그 공정은 예를 들어 4 내지 10의 pH 범위 내와 같은 넓은 pH 범위에 걸쳐서 작동될 수 있으며, 최적 필터 용량은 표적 불순물 프로파일 및 산물 속성에 의존한다. 마찬가지로, 단백질 농도는, 예를 들어, 1 내지 40g/l 등과 같은 넓은 범위에 걸쳐서 다양할 수 있으며, 파보바이러스 필터의 질량 처리량을 제한하지 않는다.

[0139] 본 발명은 하기 실시예들을 참조하여 보다 완전하게 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 파악해서는 안된다. 상기 개시 내용 전체에 걸쳐 있는 모든 인용문헌은 명백히 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0140] **실시예**

[0141] **재료들 및 방법들**

[0142] **1. 단백질 용액**

[0143] 모노클론 항체의 다운스트림 처리 동안 바이러스 여과가 친화도 크로마토그래피(포획 단계) 및 이온-교환 단계(연마 단계) 후에 수행되기 때문에, 모든 여과 실험은 공정 이온교환(양이온 또는 음이온-교환) 크로마토그래피 풀과 상업적으로 연관되어 수행되었다. 양이온 교환 풀과 음이온 교환 풀을 위한 mAb 농도 및 풀 전도성은 각각 10mg/ml 및 10mS/cm와 8mg/ml 및 4mS/cm였다. 여과 실험을 신선한 공급원료(제조 후 24시간 이내에 사용됨)에 의해 또는 제조 후 -70°C에서 동결시키고, 사용하기 전에 4 내지 8°C에서 해동시킨 공급원료에 의해 수행되었다. 신선한 공급원료 또는 동결-해동시킨 공급원료에 의해 얻어진 결과들 사이에는 어떠한 유의한 차이도 보이지 않았다. 단백질 농도는 UV-vis(자외-가시선) 분광광도계(NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, 텔라웨어주의 윌밍턴시에 소재)를 사용하여 280nm에서 측정된 흡광도로 구하였다.

[0144] **2. 멤브레인**

[0145] 여과 실험은 Viresolve(등록상표) Pro(Millipore Corp., 매사추세츠주의 빌레리카시에 소재) 파보바이러스 보유 필터에 의해 수행하였다. Viresolve(등록상표) Pro 멤브레인은 비대칭 이중 층 구조를 가지며, 폴리테터설폰(PES)으로 이루어져 있다. 멤브레인 구조는 크기가 20nm 이상인 바이러스들을 보유하는 한편 180kDa 미만의 분자량의 단백질이 해당 멤브레인을 통해 투과되도록 설계되어 있다. 본 연구에서 평가된 Viresolve(등록상표) Pro에 대한 전치-필터들은 Viresolve(등록상표) Optiscale 40덱스 필터(Millipore Corp., 매사추세츠주의 빌레리카시에 소재), Fluorodyne Ex Mini 0.2µm 멸균 필터(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트힐스시에 소재) 및 Mustang(등록상표) 계열(Pall Corp., 뉴욕주의 이스트힐스시에 소재)로부터의 멤브레인 흡착제를 포함했다. 멤브레인 흡착제들은 전체가 캡슐화된 Acrodisc(등록상표) 유닛의 판매사로부터 조달되었다. 표 1은 본 연구에 사

용된 모든 전치-필터들의 기본 특성들(작용기, 베드 체적, 공극 크기 등)을 요약하고 있다.

표 1

전치-필터들의 기본 특성들					
전치-필터	용도	베이스 기질	작용기	베드 체적/ 표면적	공극 크기
Viresolve	멤스 필터	규조토	---	---	---
Flurodyne EX	멤스 필터	폴리에터설폰	---	3.8cm ²	0.2 μ m
Mustang(등록상표) S	강양이온 교환기	폴리에터설폰	설폰산	0.18m ^l	0.8 μ m
Mustang(등록상표) Q	강음이온 교환기	폴리에터설폰	4차 아민	0.18m ^l	0.8 μ m
Mustang(등록상표) E	내독소 제거	폴리에터설폰	폴리에틸렌 이민	0.12m ^l	0.2 μ m

[0147] 3. 실험 장비

[0148] 여과 실험은 도 1에 도시된 주문제작한 장치에 의해 수행되었다. 즉, 공정 mAb 풀의 로드(load) 물질을 로드 저장소에 넣고, 전치-필터와 시판되는 파보바이러스 필터의 다른 조합으로 구성된 여과 트레인을 통해 여과하였다. 모든 여과 실험에서, 일정한 여과 유속(P_{max}) 방법을 사용하였다. 각 필터의 상류에 압력 변환기를 배치하고, Millidaq 또는 Netdaq 시스템에 결합시켜 시간 또는 질량 처리량의 함수로서 차압 데이터를 기록하였다. 파보바이러스 필터로부터의 여과물을 저장소에 수집하고, 로드 셀에 저장하여 시간의 함수로서 질량 처리량을 기록하였다.

[0149] 결과 및 논의

[0150] 포유동물 세포 배양액에서 발현된 mAb의 다운스트림 정제는 전형적으로 세포들 및 세포 잔해를 제거하기 위한 제1 단계로서 원심분리 및 멤스 여과를 행하고 나서, mAb 포획 및 숙주 세포 단백질(HCP)의 제거를 위한 친화도 크로마토그래피를 실시하고, 이어서 응집체, 바이러스, 침출된 단백질 A 및 HCP 등과 같은 불순물들을 추가로 제거하기 위한 양이온 교환 크로마토그래피, 바이러스 여과 및 음이온 교환 크로마토그래피를 실시하는 것을 이용한다. 본 연구에서 대부분의 실험은 양이온 교환 풀에 의해 수행되었고, 양이온 교환 크로마토그래피는 제2의 크로마토그래피 단계이다.

[0151] 도 2는 상이한 전치-필터들을 이용해서 치료용 mAb 공급 스트림으로 200 l/m²/hr의 일정 유량에서 Viresolve Pro를 통한 차압에 대한 실험 데이터를 도시하고 있다. X-축은 바이러스 필터의 평방미터당 반입된 mAb의 질량을 나타낸다. Y-축은 질량 처리량의 함수로서 바이러스 필터를 통한 차압을 나타낸다. 데이터는, 멤스 필터가 멤스 필터에 비해서 바이러스 여과 용량이 여러 가지 크기 증가의 정도를 제공하는 것을 명확하게 나타내고 있다. NFP 파보바이러스 보유 필터에 대한 전치-필터로서 Viresolve Prefilter(상표명)-멤스 필터 매질의 효과를 폴리클론 IgG 용액에 의해 평가한 경우, Bolton 등(Bolton et al. Appl. Biochem. 43:55-63, 2006)에 의해 유사한 관찰이 이루어졌다. 상기 저자들은, 성능(즉, 용량) 증가가 소수성 상호작용으로 인한 변성 단백질인 오염 물질의 선택적 흡착 때문이라고 여기고 있었다.

[0152] 멤스 필터가 전통적으로 세포 배양액의 명확화를 위해 성공적으로 사용되었다고 하더라도, 포획 단계의 다운스트림을, 예컨대, 파보바이러스 보유 필터에 대한 전치필터로서 사용했을 때, 필요 이상의 고려사항으로 되는 몇 가지 한계가 있다.

[0153] (a) 멤스 필터는 베이스가 안정하지 않아, 설치후 공정 트레인의 위생 처리를 방해하여, 개방형 처리로 바이오버든(bioburden)의 성장에 대한 잠재성이 있다.

[0154] (b) 멤스 필터의 조성은, 통상적으로 식품 등급이고 품질 관련 우려를 드러내는, 주요 성분으로서의 규조토를 포함한다.

[0155] (c) 규조토는 일반적으로 자연-명확한 화학 공정이 없는-으로부터 공급되며, 따라서 많은 편차를 지닐 수 있다.

[0156] (d) 멤스 필터는 금속, β-글리칸 및 다른 불순물들을 침출시키는 경향이 있으며, 그의 제거는 다운스트림 동작에서 입증되어 및 확인될 필요가 있다.

[0157] 이들 한계는, 멤스 필터의 다운스트림에서 유닛 조각이 침출물의 적절한 제거를 제공하도록 설계되어야만 하므로 공정 개발에 대한 필요 이상의 부담으로 되었다. 그러나, 침출물 제거의 요건이 충족되었다라도, 주요 성분이 자연으로부터 유래되므로, 즉, 주요 성분 에 대해서 명확한 화학 합성 공정이 결여되어 있으므로, 특히 많은

멤스 필터는 공정이 제거될 수 있는 것보다도 상당히 높은 침출가능성을 지닐 수 있다라고 하는 우려되는 이유가 있다.

[0158] 이와 같이 해서, 이들 한계를 나타내지 않는 전치-필터들을 개발하는 것이 큰 관심이 되어 왔다. 전술한 바와 같이, Brown 등(Brown et al. IBC's 20th Antibody Development and Production, San Diego, CA, 2008)은 최근, Mustang S, 강음이온 하전된 이온교환기가 전치-필터로 사용될 경우 파보바이러스 보유 필터의 용량을 수배로 증가시킬 수 있었음을 제시하였다. 따라서, Viresolve(등록상표) Pro에 대한 다른 예비여과 매질의 효과를 평가하기 위해 상기 실험들을 행하였다. pH 5.0 및 6.5에서의 실험 데이터는 도 3(a) 및 도 3(b)에 도시되어 있다. 이 데이터는 양이온 교환 매질이 pH 5.0에서 내독소 제거 흡수체에 비해서 약간의 이점을 나타내는 반면, pH 6.5에서는 그 이점이 사라진 것을 나타내고 있다. 두 매질을 이용하는 전체 용량은 멸균 필터의 용량보다 높은 반면(도 2); 그럼에도 불구하고, 이들은 제조규모에서 유닛 조작을 성공적으로 행하는데 필요한 용량이 상당히 부족하였다.

[0159] 양이온 교환 매질과 내독소 제거 매질은 양쪽 모두 2개의 다른 오염물질을 제거할 수 있다는 가설에 기초하여, 이들 모두 필터 오염을 일으킬 수 있고, 양이온 교환 매질과 내독소 제거 매질의 양쪽 모두를 포함한 신규한 예비여과 트레인을 이용하여 하나의 실험이 설계되었다. 실험결과는 도 4(a) 및 도 4(b)에 pH 5.0 및 pH 6.5에서 각각 도시되어 있다. 데이터는 2개의 매질의 병용이 각 매질 자체보다 상당히 양호함을 보여준다. 예를 들어, pH 5.0에서, 양이온 교환 매질과 내독소 제거 매질의 병용은 20psi 차압에서 보다 큰 용량의 크기 개선 정도를 제공한다. pH 6.5에서 유사한 경향을 보인 반면, 전체 용량은 pH 5.0에서 얻은 것보다 낮았다. 이는 낮은 pH에서 불순물을 보다 많이 제거한 데서 기인할 수 있었다.

[0160] MAAb2에 의한 실험결과는 도 5에 도시되어 있다. 도 4의 데이터와 일치하여, 내독소 제거 매질과 양이온 교환 매질의 양쪽 모두를 함유하는 신규한 예비여과 트레인은 용량을 실질적으로 증가시켰으며, 이는 내독소 제거 매질과 양이온 교환 매질이 상승적으로 작용하여 2개의 다른 부류의 오염물질을 제거하는 것을 암시하고 있다.

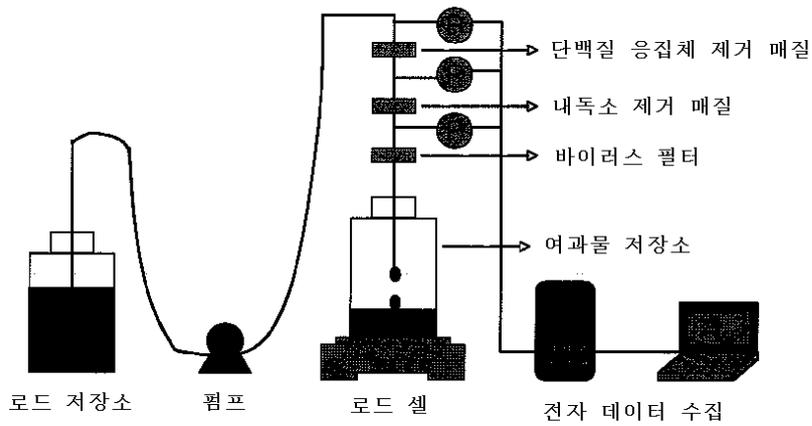
[0161] **결론**

[0162] 종래의 대다수의 연구는 파보바이러스 보유 필터의 용량을 증가시키기 위한 전치-필터로서 멤스 필터 또는 양이온 교환 멤브레인 흡착제를 사용하는데 집중하고 있었다. 멤스 필터가 바이러스 여과 용량을 증가시키기 위한 강인한 메커니즘을 제공하는 반면, 침출가능성 등과 같은 이들과 연관된 한계들은 다운스트림 정제 수순에서 특정 단계에 그들을 적용시키는 것을 제한한다. 양이온-교환 멤브레인 흡착제는 몇몇 모노클론 항체(mAb) 공급스트림에 대한 파보바이러스 필터 용량을 증가시킬 수 있는 반면, 본 연구의 데이터에서 나타내고 있는 바와 같이 보편적으로 적용할 수는 없으므로, 이는 다수의 오염물질이 존재할 수 있어, 파보바이러스 제거 필터의 성능을 추가로 개선시킬 필요성이 있음을 암시한다.

[0163] 본 발명에 의하면, 상기 실험결과에 의해 입증된 바와 같이, 하기 2가지 측면, 즉, (1) 내독소 제거 매질 자체는 예비여과에 사용될 경우 파보바이러스 필터의 용량을 유효하게 증가시킬 수 있는 측면 및 (2) 예비여과 트레인에서 내독소 제거 매질과 양이온 교환 매질의 결합은 파보바이러스 여과 용량을 수배 증가시킬 수 있어서, 제조규모에서 원료 비용을 낮추고, 바이러스 여과의 성공적인 조작을 용이하게 하는 측면이 부각된다.

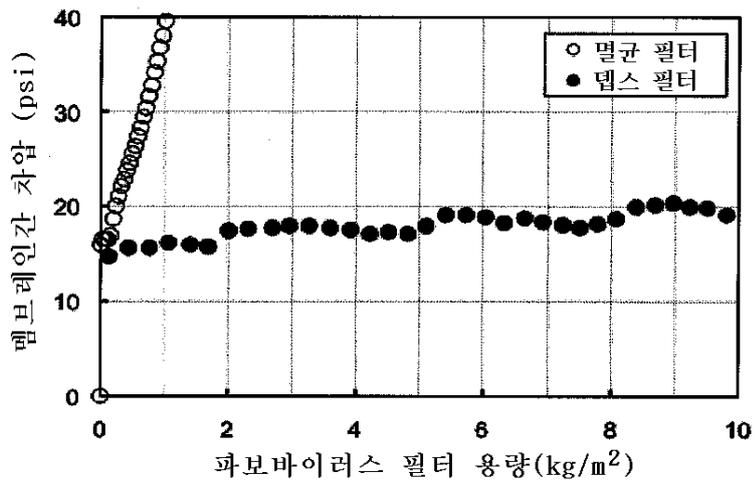
도면

도면1



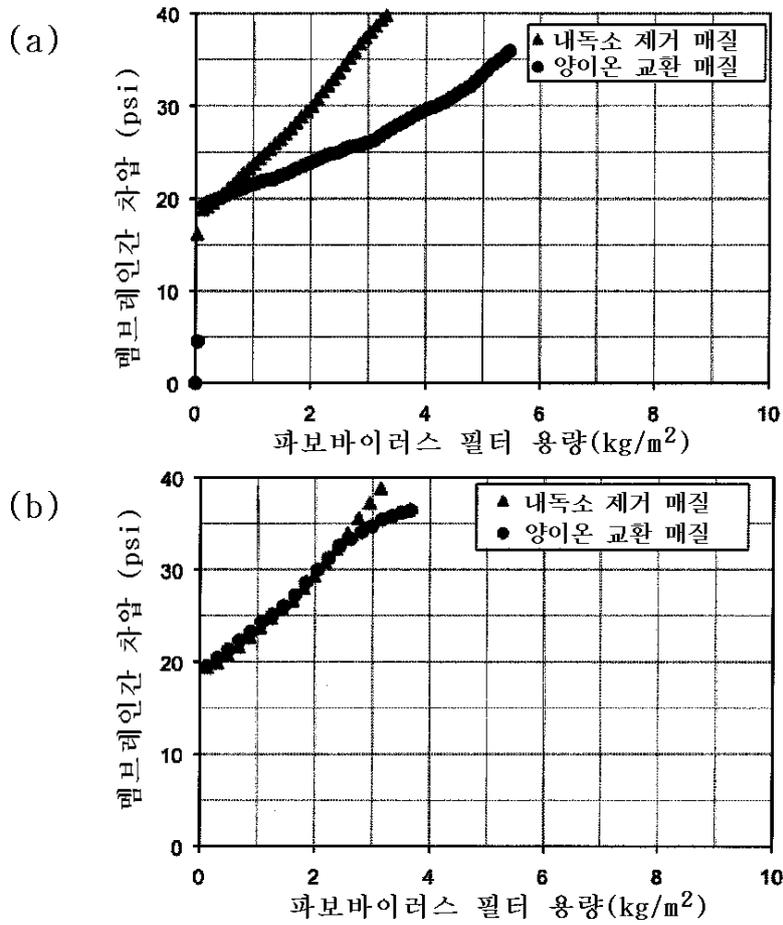
바이러스 여과 연구에 사용된 실험 설비의 모식도

도면2



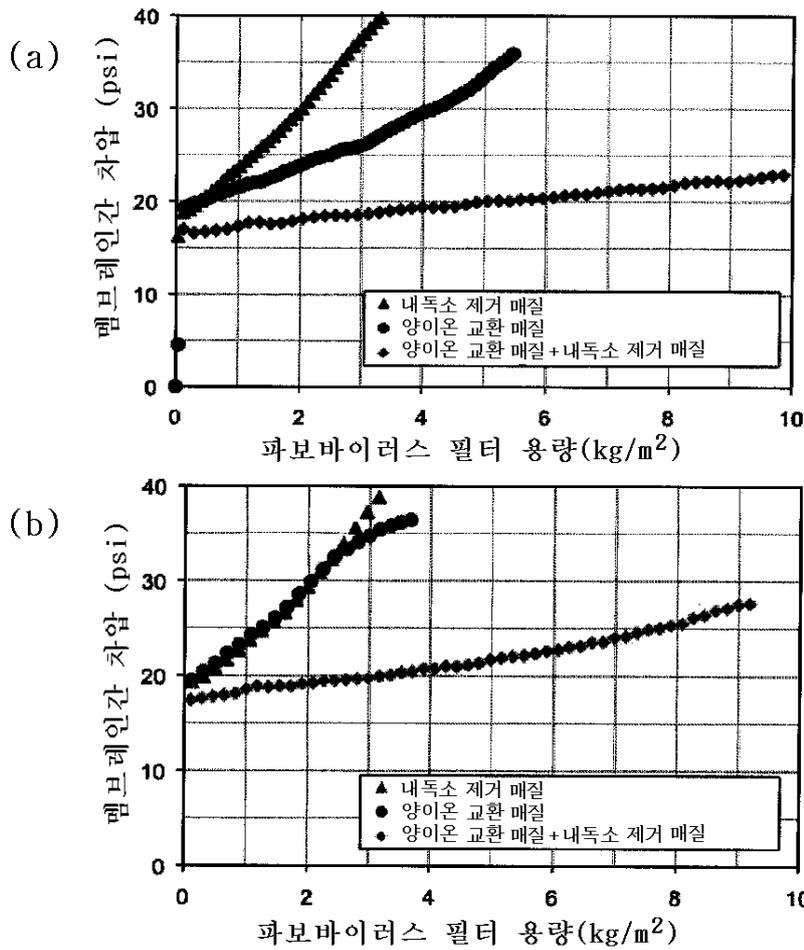
멸균 및 덱스 필터가 과보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과. 실험들은 pH 5.5 및 전도율 8.5 mS/cm에서 수행되었다. mAb 농도는 대략 13g/l 였다.

도면3



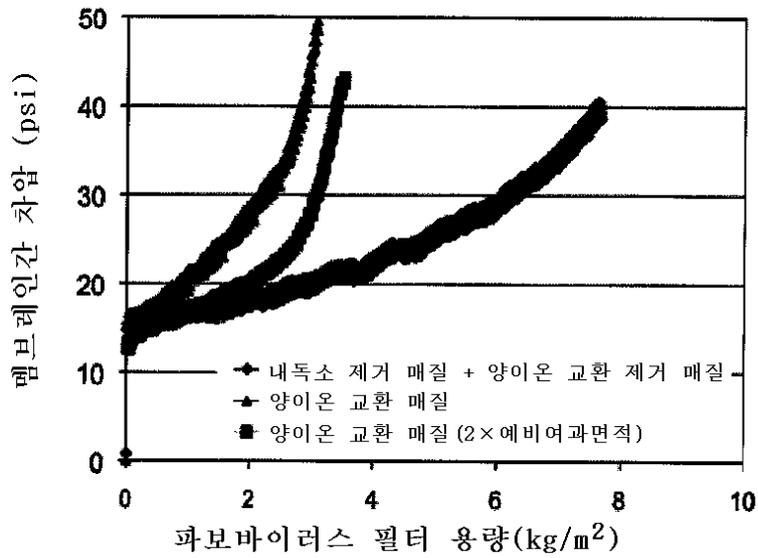
양이온-교환 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제가 예비여과 단계로서 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과.
 도 3(a) 및 도 3(b)의 데이터는 각각 pH 5.0 및 6.5에서 MAb1에 의해 발생되었다.

도면4



양이온-교환 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제 모두를 포함하는 신규한 예비 여과 트레인이 MAb1에 의한 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과. 도 4(a) 및 도 4(b)의 데이터는 각각 pH 5.0 및 pH 6.5에서 발생되었다.

도면5



양이온-교환 매질 및 내독소 제거 멤브레인 흡착제의 양쪽 모두를 포함하는 신규한 예비여과 트레인이 양이온-교환 예비-여과 매질 비해서 Mab2에 의한 파보바이러스 보유 필터의 용량에 미치는 효과.