(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월15일
(11) 등록번호 10-2729723
(24) 등록일자 2024년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01) *C07K 1/20* (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/00 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)
(21) 출원번호 10-2019-7018192
(22) 출원일자(국제) 2017년12월08일
심사청구일자 2020년12월02일
(85) 번역문제출일자 2019년06월24일
(65) 공개번호 10-2019-0095929
(43) 공개일자 2019년08월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/065397
(87) 국제공개번호 WO 2018/107079
국제공개일자 2018년06월14일
(30) 우선권주장
62/432,402 2016년12월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2013543483 A*
WO2016073917 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
글리크닉 인코포레이티드
미국 메릴랜드 21201 볼티모어 스위트 501에이 801 웨스트 볼티모어 스트리트
(72) 발명자
블록 데이비드 에스.
미국, 메릴랜드 21201, 볼티모어, 스위트 501 에이, 801 웨스트 볼티모어 스트리트, 글리크닉 인코포레이티드 내
매어리진 엠마누엘 와이.
미국, 메릴랜드 21201, 볼티모어, 스위트 501 에이, 801 웨스트 볼티모어 스트리트, 글리크닉 인코포레이티드 내
올슨 헨릭
미국, 메릴랜드 21201, 볼티모어, 스위트 501 에이, 801 웨스트 볼티모어 스트리트, 글리크닉 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인한얼

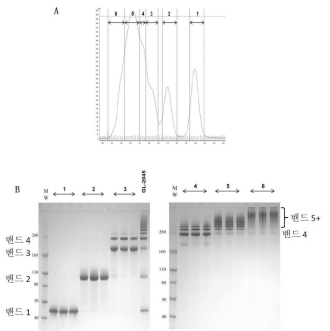
전체 청구항 수 : 총 27 항 심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 **다합체화 스트라도머인 GL-2045의 제조 최적화**

(57) 요 약

본 개시내용은 최적으로 제조된 스트라도머라 칭하는 생물학적 활성 단백질의 제조를 위한 최적화된 방법을 수반한다. 본 개시내용은 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 감염성 질환을 포함하는 질환 및 병태의 치료에서 유용한 조성물 및 방법을 추가로 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 37/02 (2018.01)
C07K 1/18 (2013.01)
C07K 1/20 (2013.01)
C07K 1/22 (2013.01)
C07K 16/18 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0686 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

동종이합체 및 상기 동종이합체의 다합체를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서, 여기서 상기 동종이합체는 각각 서열번호 4의 아미노산 21-264로 이루어진 2개의 단량체를 포함하고, 상기 동종이합체는 항원 결합 도메인을 포함하지 않고, 상기 동종이합체가 조성물의 전체 단백질 함량의 20% 미만을 차지하며,

상기 방법은,

(a) 5±1일 동안, 37℃±1℃에서 서열번호 4를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질감염된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 배양하는 단계;

(b) 성장 온도를 37℃±1℃에서 32.5℃±1℃로 변화시키는 단계; 및

(c) 배양 배지로부터 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 수확하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 5일째에 pH를 7.1에서 7.0으로 변화시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 세포가,

(a) 상기 성장 온도 변화 전에 1,000만개 내지 2,500만개 세포/㎖의 밀도;

(b) 상기 성장 온도 변화 전에 1,000만개 내지 1,500만개 세포/㎖의 밀도;

(c) 상기 성장 온도 변화 전에 1,500만개 내지 2,000만개 세포/㎖의 밀도; 또는

(d) 상기 성장 온도 변화 전에 500만개 내지 3,000만개 세포/㎖의 밀도

로 성장되는, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 배양은 기본 배양 배지(base culture media)에서 수행되고, 상기 기본 배양 배지는 가수분해물 및 동물-유래 성분이 없으며, 여기에 글루타민이 첨가되어 기본 배양 배지가 완성되고, 상기 기본 배양 배지는 ActiCHO P 또는 ActiPro 기본 배양 배지, 또는 ActiCHO P 또는 ActiPro와 동일한 성분을 갖는 기본 배

양 배지인, 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 CHO 세포는 (i) 아미노산, 비타민, 염, 미량 원소 및 글루코스를 함유하고 pH가 6.45 - 6.8인, 투명한 멸균 용액으로서, HyClone Cell Boost 7a인 투명한 멸균 용액, 및 (ii) 농축 아미노산 용액을 함유하고 pH가 11.0 - 11.4인, 투명한 멸균 용액으로서, HyClone Cell Boost 7b인 투명한 멸균 용액이 배양 동안 공급되는, 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 서열번호 4를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 서열번호 1의 리더 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 발현 벡터가 20개 미만의 게놈 삽입을 초래하는, 방법.

청구항 13

제6항의 서열번호 4를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 발현 벡터.

청구항 14

동종이합체 및 상기 동종이합체의 다합체를 포함하는 조성물을 제조하는 방법으로서, 여기서 상기 동종이합체는 각각 서열번호 4의 아미노산 21-264로 이루어진 2개의 단량체를 포함하고, 상기 동종이합체는 항원 결합 도메인을 포함하지 않고, 상기 동종이합체가 조성물의 전체 단백질 함량의 20% 미만을 차지하며,

상기 방법은,

(a) 서열번호 4를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 형질감염시키는 단계;

(b) 5±1일 동안 37℃±1℃의 성장 온도에서 기본 배양 배지로 생물반응기에서 (a)로부터의 상기 CHO 세포를 배양하는 단계로서, 상기 기본 배양 배지는 가수분해물 및 동물-유래 성분이 없으며, 여기에 글루타민이 첨가되어 기본 배양 배지가 완성되고, 상기 기본 배양 배지는 ActiCHO P 또는 ActiPro 배지인 단계,

(c) (i) 아미노산, 비타민, 염, 미량 원소 및 글루코스를 함유하고 pH가 6.45 - 6.8인, 투명한 멸균 용액으로서, HyClone Cell Boost 7a인 투명한 멸균 용액, 및 (ii) 농축 아미노산 용액을 함유하고 pH가 11.0 - 11.4인, 투명한 멸균 용액으로서, HyClone Cell Boost 7b인 투명한 멸균 용액을 (b)의 배양물에 공급하는 단계;

(d) 성장 온도를 37℃±1℃에서 32.5℃±1℃로 변화시키는 단계; 및

(e) 상기 배양 배지로부터 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 수확하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 방법은 >7g/L의 수확 전 최종 단백질 역가를 초래하고, 이 중 다합체의 >30%가 더 높은 차수의 다합체인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 5일째에 pH를 7.1에서 7.0으로 변화시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 수확 전 최종 단백질 역가가 7.5g/L 초과, 8g/L 초과 또는 9g/L 초과인, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 세포 생존능력이 배양 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 또는 그 이상에서 85%를 초과하는, 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

제6항 또는 제14항의 방법으로 제조된 조성물을 정제하는 방법으로서,

(a) 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 상청액으로부터 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 정제하는 단계; 및

(b) 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상에 의해 동종이합체 및 동종이합체의 다합 체를 연마하는(polishing) 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 친화도 크로마토그래피가 아미노산 서열에 시스테인을 갖는 재조합 단백질 A의 배향된 커플링을 갖는 고-유동(high-flow) 아가로스 매트릭스를 포함하고, 상기 고-유동 아가로스 매트릭스가 MabSelect SuRe 단백질 A 컬럼인, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 친화도 크로마토그래피에 의한 정제는 친화도 크로마토그래피 컬럼으로부터 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 용리시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 동종이합체 및 동종이합체의 다합체가 아세트산 나트륨 및 NaCl을 포함하는 용리 완충액을 사용하여 친화도 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리되는, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 단백질 A 컬럼이 적어도 0.5M의 NaOH 완충액으로 재생되는, 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계가 크로마토그래피를 통한 음이온 교환 흐름을 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 크로마토그래피를 통한 음이온 교환 흐름이, 4차 암모늄 강 음이온 교환기(quaternary ammonium strong anion exchange group)가 있는 가교결합된 6% 아가로스 비드로 구성된 친수성 기본 매트릭스를 갖는 강 음이온 교환체(strong anion exchanger)를 포함하고, 크로마토그래피를 통한 음이온 교환 흐름이 Q 세파로스 고속 흐름 컬럼인, 방법.

청구항 26

제19항에 있어서, 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계가 양이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피가, 입자 크기는 50 μm이고, 설포프로필 작용기를 가지며, 가교결합된 폴리(스티렌-디비닐벤젠) 매트릭스를 포함하는, 강 양이온 교환 수지(strong cation exchange resin)를 포함하며, 상기 양이온 교환 크로마토그래피가 POROS XS 컬럼인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피가 아세트산 나트륨 용리 완충액을 사용하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 용리 완충액이 36.5 내지 38.5%의 1M NaCl 완충액을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제19항에 있어서, 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 소수성 상호작용 크로마토그래피는, 하전되지 않은 화학적으로 안정한 에테르 결합을 통해 표준 방향족 페닐기로 변형된, 가교 결합된 6% 아가로스 비드를 사용하는 것을 포함하며, 여기서 소수성 상호작용 크로마토그래피는 부틸 FF 수지 또는 페닐 HP 수지인, 방법.

청구항 32

제6항 또는 제14항의 방법에 의해 제조된 조성물을 정제하고 연마하는 방법으로서, 상기 방법은,

(a) 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 상청액으로부터 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 정제하는 단계로서, 단백질 A 컬럼은 알칼리 저항 매질(medium)을 사용하고, 알칼리 저항 매질은 MabSelect SuRe 매질이고, 상기 정제는 적어도 2회의 세척 사이클에 의해 수행되는, 단계;

(b) 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계로서, 양이온 교환 컬럼은 고용량, 고분해능 수지를 포함하고, 상기 고용량, 고분해능 수지는 POROS XS이고, 용리 완충액은 36.5% 내지 38.5%의 1M NaCl 완충액으로 구성된 아세트산 나트륨 완충액인, 단계;

(c) 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계로서, 음이온 교환 컬럼은 음이온 교환 매질을 포함하고, 상기 음이온 교환 매질은 Q 세파로스 고속 흐름 매질인, 단계; 및

(d) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 동종이합체 및 동종이합체의 다합체를 연마하는 단계로서, HIC 매질은 하전되지 않은 화학적으로 안정한 에테르 결합을 통해 표준 방향족 페닐기로 변형된, 가교결합된 6% 아가로스 비드이고, 상기 HIC 매질은 부틸 FF, 페닐 HP, 또는 옥틸 FF 수지이고, 연마 이외에 동종이합체의 다합체의 특정 분획을 분리하거나 제거하기 위해 선택되는, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 조성물의 최종 단백질 역가가 4 g/L 초과인, 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2016년 12월 9일자로 출원된 US 가출원 제62/432,402호(이의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] **전자로 제출된 텍스트 파일의 설명**

[0004] 본 명세서와 전자로 제출된 텍스트 파일의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능한 포맷 카피(파일명: GLIK_017_01WO_ST25.txt, 기록된 날짜: 2017년 12월 8일, 파일 크기 15kb).

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 면역학, 자가면역, 염증 및 종양 면역학의 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 GL-2045를 제조하는 최적화된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 최적으로 제조된 GL-2045를 포함하는 신규한 조성물 및 GL-2045 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 병리학적 병태, 예컨대 자가면역 질환 및 염증성 질환을 치료하거나 예방하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 혼주된 인간 정맥내 면역글로불린(intravenous immunoglobulin: IVIG)은 면역 결핍 장애 및 더 최근의 10년에는 자가면역 및 염증성 질환을 치료하기 위해 1950년대 초기 이후로 사용되고 있다. IVIG는 보체 C1q 및 Fc 감마 수용체(FcγR)에 대한 IVIG 응집체의 결합 및 면역 세포, 예컨대 NK 세포(예를 들어, FcγRIIIa), 마크로파지(예를 들어, FcγRIIa), B 세포(예를 들어, FcγRIIb), 단핵구 및 단핵구 유래된 세포, 예를 들어 수지상 세포 상의 이 수용체의 가교결합을 포함하는 몇몇 기전을 통해 관용원성 면역 효과를 매개한다. IVIG는, 적은 다양한 양의 IgA 또는 IgM인 다합체 면역글로불린으로, 90% 초과의 비변형된 IgG를 통상적으로 함유하는 혼주된 인간 혈장으로부터 제조된 무균의 정제된 면역글로불린 G(IgG) 생성물의 제제이다(Rutter A *et al.*, J Am Acad Dermatol, 2001, Jun; 44(6): 1010-1024).

[0008] 실질적인 공개된 데이터는 hIVIG의 작은 응집된 IgG 분획, 구체적으로 이 응집체의 Fc 부분이 병리학적 면역 복합체에 의해 매개된 소정의 질환의 치료에서 불균형적으로 효과적이라는 것을 제안한다. 미량(1% 내지 5%)의 IgG가 IVIG 내에 응집된 형태로 존재하고, IgG 이합체가 hIVIG의 5% 내지 15%를 구성할 수 있다는 것이 관찰되었다. IVIG 응집체와 유사한, Fc 수용체 및 보체 성분 C1q에 열렬히 결합하는 재조합으로 재조된 Fc 다합체를 사용한 IVIG 치료에 대한 대안은 기재되어 있다(미국 특허 출원 공보 제2010/0239633호, US 제2013/0156765호, US 제2015/0218236호 및 PCT 공보 WO 제2015/132364호 참조).

[0009] GL-2045인 하나의 이러한 Fc 다합체는 이전에 개시되어 있다(미국 특허 출원 공보 제2013/0156765호). GL-2045는 IVIG의 재조합 모방체인 다합체화 일반 스트라도머(stradomer)이다. GL-2045는 면역글로불린 IgG1 Fc가 결합하는 대부분의 또는 모든 리간드에 결합한다. 추가로, GL-2045는 모든 정규 수용체 및 보체 C1q에 높은 친화도 및 결합도로 결합하고, IVIG와 비교하여 10배 내지 1,000배 더 높은 시험관내 효율을 갖는다. 추가적으로, GL-2045, 또는 이의 쥣과 균등물은 콜라겐 유도된 관절염, 실험 자가면역 신경병증, 특발성 혈소판감소성 자반증 및 실험 자가면역 중증 근무력증을 포함하는 자가면역 질환의 많은 동물 모델에서 효과적이다. 그러므로,

GL-2045는 또한 특발성 혈소판감소성 자반증, 만성 염증성 다발성 신경염, 다초점 운동 신경병증, 중증 근무력증, 장기 이식, 및 류마티스성 관절염(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 광범위한 자가면역 질환을 치료하는데 있어서 잠재적인 임상 이용성을 갖는다.

[0010] 효력 및 효율에서 IVIG에 비해 GL-2045의 이점 이외에, GL-2045는 제조 공정에서의 몇몇 이점을 나타낸다. IVIG는 혼주된 인간 혈액 생성물이고, 이는 수만개의 도너의 혈액으로부터 유래되고, 이의 혈청이 이후 함께 혼합되고 후속하여 정제되어 바이러스 및 다른 감염성 물질, 및 응집된 IgG를 제거한다는 것을 의미한다. 그러므로, 접근 및 공급은 제한되고, 제조 비용은 높다. 추가적으로, IVIG의 로트 사이에 유의미한 정도의 가변성이 존재한다. 반대로, GL-2045는 재조합으로 제조되고, 따라서 제조 공정에 대해 큰 제어를 제공하면서 공급 및 제조 비용의 어려움을 제거한다.

[0011] GL-2045 동종이합체는 Fc 감마 수용체 및 보체 C1q를 포함하는 Fc 리간드에 친화도로 및 실질적인 결합도 없이 결합한다. 이것은 또한 자연스럽게 결합도로 정규 수용체에 결합할 수 있는 더 높은 차수의 다합체를 형성한다. IVIG의 다합체 분획의 증대된 효율을 모방하는 것은 GL-2045의 이 더 높은 차수의 다합체이다. 그러나, 표준 세포 배양 조건은 다양한 수준의 세포 생존능력, 다합체화 단백질의 정도 및 단백질 역가를 생성한다. 따라서, 한정된 다합체 패턴을 생성시키는 GL-2045, 및 특히 세포 생존능력 및 단백질 역가를 최적화하면서 더 높은 차수의 다합체의 백분율의 증가를 발생시키는 것을 제조하는 방법에 대한 당해 분야의 수요가 존재한다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 표준 제조 기법에 비해 개선된 세포 생존능력, 개선된 높은 단백질 역가 및 더 높은 차수의 다합체의 백분율의 놀랍고 실질적인 증가 중 모든 3개를 제공한다. 이 최적화된 제조 방법은 따라서 비최적으로 제조된 GL-2045 조성물과 비교하여 염증성 질환을 치료하기 위한 증대된 효율에 의해 최적으로 제조된 GL-2045 조성물을 제공한다. GL-2045의 최적화된 제조는 최적화된 상류 제조 방법 및 몇몇 실시형태에서 최적화된 하류 방법을 포함한다. 최적화된 상류 제조 방법은 a) 높은 단백질 역가를 생성하고, b) 세포 부스러기를 유지시키도록 높은 세포 생존능력을 유지시키고, c) GL-2045의 기능화에 필수적인 동종이합체의 고차의 다합체 및 원하는 경우 동종이합체 둘 다를 보유한다. 최적화된 하류 제조 방법은 GL-2045의 선택된 다합체 프로파일을 유지시키도록 구체적으로 이용되는 다양한 정제 기법을 포함한다. 이에 따라, 몇몇 실시형태에서, 한정된 다합체 프로파일을 갖는 GL-2045 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0013] 몇몇 실시형태에서, CHO 세포가 약 500만개 내지 약 3000만개의 세포/㎖의 세포 밀도에 도달할 때까지, 37℃±1℃에서 GL-2045를 암호화하는 발현 벡터에 의해 안정하게 형질주입된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 배양하는 단계; 성장 온도를 37℃±1℃로부터 32.5℃±1℃로 이동시키는 단계; 및 배양 배지로부터 GL-2045를 수확하는 단계를 포함하는, GL-2045를 생산하는 방법이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 세포는 성장 온도의 이동 전에 약 1000만개 내지 약 2500만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 몇몇 실시형태에서, 세포는 성장 온도의 이동 전에 약 1000만개 내지 약 1500만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 몇몇 실시형태에서, 세포는 성장 온도의 이동 전에 약 1500만개 내지 약 2000만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 몇몇 실시형태에서, 이중 온도 이동은 약 3일에 37℃±1℃로부터의 34℃±1℃로의 이동과 생물반응기 배양의 약 7일에 34℃±1℃로부터의 31℃±1℃로의 제2 온도 이동에 의해 이용된다.

[0014] 몇몇 실시형태에서, CHO 세포는 ActiCHO P 기본 배양 배지에서 배양된다. 몇몇 실시형태에서, CHO 세포에 ActiCHO 공급물 A 및 ActiCHO 공급물 B가 배양 동안 공급된다. 몇몇 실시형태에서, CHO 세포에 격일로 공급된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 암호화하는 발현 벡터는 서열 번호 1의 리더 펩타이드를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 암호화하는 발현 벡터는 piggyBac 트랜스포사제 인식 서열을 추가로 포함하고, piggyBac 트랜스포사제를 암호화하는 벡터와 함께 형질주입된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 암호화하는 발현 벡터는 20개 미만의 게놈 삽입을 생성시킨다.

[0015] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045 발현 카세트를 포함하는 GL-2045를 암호화하는 발현 벡터가 제공되고, 여기서 GL-2045 발현 카세트는 piggyBac 최소 역위 반복 요소가 측접(flanked)한다.

[0016] 몇몇 실시형태에서, CHO 세포를 본 명세서에 기재된 발현 벡터와 함께 형질주입시키는 단계, 37℃±1℃의 성장 온도에서 ActiCHO P 배지를 갖는 생물반응기에서 CHO 세포를 배양하는 단계, 배양물이 약 1000만개 내지 약 1500만개의 세포/㎖의 세포 밀도에 도달할 때까지, 37℃±1℃의 성장 온도에서 매일 Acti CHO 공급물 A 및 Acti CHO 공급물 B에 의해 CHO의 배양물을 공급하는 단계, 37℃±1℃로부터 32.5℃±1℃로 성장 온도를 이동시키는

단계, 및 배양 배지로부터 GL-2045를 수확하는 단계를 포함하는, GL-2045를 생산하는 방법이 제공되고, 여기서 상기 방법은 21일에 80% 초과의 세포 생존능력 및 9,000mg/mℓ 초과의 최종 단백질 역가를 발생시키고, 이들 중, GL-2045의 70% 초과는 다합체로서 존재하고, 다합체의 30% 초과는 더 높은 차수의 다합체 GL-2045이다. 몇몇 실시형태에서, 세포 생존능력은 배양의 18일에 95%를 초과한다. 몇몇 실시형태에서, 다합체의 퍼센트는 80%를 초과한다.

[0017] 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 상청액으로부터 GL-2045를 정제하는 단계 및 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 중 하나 이상에 의해 GL-2045를 연마하는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 GL-2045를 정제하는 방법이 제공된다.

[0018] 몇몇 실시형태에서, 심층 여과는 친화도 크로마토그래피 전에 이용된다. 몇몇 실시형태에서, 깊이 필터는 X0HC(Millipore)이다. 몇몇 실시형태에서, 심층 여과 유닛은 상청액으로부터 높은 백분율의 DNA를 제거한다. 몇몇 실시형태에서, 그 심층 여과 유닛은 Emphaze(상표명) AEX Hybrid Purifier(3M)이다.

[0019] 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피는 단백질 A 칼럼을 이용한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 칼럼은 NaOH 내성 수지를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 수지는 MabSelect SuRe 수지이다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피에 의한 정제는 정제 조건을 최적화하도록 3개의 상이한 세척 완충제 중 하나의 이용을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피에 의한 정제는 친화도 크로마토그래피 칼럼으로부터 GL-2045를 용리시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 용리는 pH 구배에 의한 용리를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 용리는 pH 구배가 없는 용리를 포함한다. 일 실시형태에서, 용리는 글라이신 완충제를 사용하여 수행된다. 또 다른 실시형태에서, 용리는 아세트산 완충제를 사용하여 수행된다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피 칼럼은 결합된 GL-2045를 제거하도록 재생된다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피 칼럼은 제조사에 의해 제안된 것보다 더 자주 재생된다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피 칼럼은 각각의 정제 사이클 전에 재생된다. 몇몇 실시형태에서, 친화도 크로마토그래피 칼럼은 0.5M NaOH 완충제에 의해 재생된다.

[0020] 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 연마는 크로마토그래피를 통한 음이온 교환 흐름을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 크로마토그래피를 통한 음이온 교환 흐름은 Q Sepharose Fast Flow 칼럼을 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 연마는 양이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 POROS XS 칼럼을 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 아세트산나트륨 용리 완충제를 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 36.5% 내지 38.5%의 1M NaCl 완충제를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 용리 방법은 단계 용리이고, 또 다른 실시형태에서, 용리는 구배 용리이다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 연마는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피는 뷰틸 FF 수지를 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피는 페닐 HP 수지를 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피("HIC")는 페닐 Sepharose 6 Fast Flow High Sub 수지를 사용하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, HIC 방법은 관류 방식으로 있고, 또 다른 실시형태에서, HIC 방법은 결합 방식으로 있다. 몇몇 실시형태에서, HIC 수지는 GL-2045 동종이합체의 단리를 발생시킨다. 몇몇 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피는 옥틸 FF 수지를 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 칼럼은 GL-2045의 무질서한 응집체의 제거를 발생시킨다.

[0021] 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 상청액으로부터 GL-2045를 정제하는 단계를 포함하는, GL-2045를 정제하는 방법이 제공되고, 여기서 단백질 A 칼럼은 알칼리 내성 배지, 예컨대 MabSelect SuRe 배지를 사용하고, 정제는 적어도 2개의 세척 사이클에 의해 수행되고, 제자리 세정(clean in place: CIP) 절차는 높은 NaOH 재생 단계, 예컨대 0.5M NaOH 완충제에 의해 실행된 각각의 정제 후 실행된다.

[0022] 몇몇 실시형태에서, 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 GL-2045를 연마하는 단계(여기서, 양이온 교환 칼럼은 고역량, 고해상 수지, 예컨대 POROS XS를 함유하고, 용리 완충제는 36.5% 내지 38.5%의 1M NaCl 완충제로 이루어진 아세트산나트륨 완충제임)를 포함하는, GL-2045를 정제하는 방법이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 정제하는 방법은 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 GL-2045를 연마하는 단계(여기서, 음이온 교환 칼럼은 높은 화학 안정성을 가져서, 제자리 세정 및 위생시설 프로토콜(clean-in-place and sanitation protocol)을 허용하는 강한 음이온 교환 배지, 예컨대 Q Sepharose Fast Flow 배지를 함유함)를 추가로 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 정제하는 방법은 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 GL-2045를 연마하는

단계(여기서, 소수성 상호작용 배지는 뷰틸 FF, 페닐 HP 또는 옥틸 FF 수지이고, 연마 이외에 GL-2045의 특정한 분획을 단리하거나 제거하도록 선택됨)를 추가로 포함한다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045를 정제 및/또는 연마하는 방법은 모든 여과 및 크로마토그래피 단계(즉, 최종 약물 물질) 후 4g/ℓ 초과의 GL-2045의 최종 단백질 역가를 생성시킨다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 최종 단백질 조성물은 70% 초과의 다합체를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 다합체의 28% 초과는 분석용 SEC-HPLC에 의해 분석된 바대로 더 높은 차수의 다합체이다.

[0023] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조되고 정제된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조되고 정제된 GL-2045는 동종이합체 및/또는 동종이합체의 이합체의 백분율을 최소화하거나, 그렇지 않으면 동종이합체, 더 낮은 차수의 다합체, 더 높은 차수의 다합체 및 가장 높은 차수의 다합체의 백분율을 균형화시키는 한정된 다합체 패턴을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 재조합으로 제조되고 정제된 GL-2045에 의해 이를 요하는 대상체에서 염증성, 자가면역 또는 감염 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 질환 또는 장애는 특발성 혈소판감소성 자반병, 만성 염증성 다발성 신경염, 다초점 운동 신경병증, 중증 근무력증, 장기 이식 및 류마티스성 관절염으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 정맥내로, 피하로, 경구로, 복강내로, 설하로, 협측으로, 경피로, 피하 이식을 통해 또는 근육내로 투여된다.

[0024] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체 분획이 전체 조성물의 약 20% 미만을 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 조성물의 12% 내지 19%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 조성물의 14% 내지 19%를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 조성물의 15.5% 내지 17.5%를 차지한다. 또 다른 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 조성물의 약 16.2%를 차지한다.

[0025] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체의 이합체 분획이 전체 조성물의 약 7% 내지 약 12%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 이합체 분획은 전체 조성물의 약 9% 내지 약 11%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체의 이합체 분획은 전체 조성물의 약 10%를 차지한다.

[0026] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체의 삼합체 분획이 전체 조성물의 약 5.5% 내지 약 11%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 삼합체 분획은 전체 조성물의 약 6.5% 내지 약 8%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체의 삼합체 분획은 전체 조성물의 약 7%를 차지한다.

[0027] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체의 사합체 분획이 전체 조성물의 약 10% 내지 약 16%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 사합체 분획은 전체 조성물의 약 13% 내지 약 15%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체의 사합체 분획은 전체 조성물의 약 14%를 차지한다.

[0028] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체의 오합체 분획이 전체 조성물의 약 6% 내지 약 9%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 오합체 분획은 전체 조성물의 약 7% 내지 약 8%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체의 오합체 분획은 전체 조성물의 약 7%를 차지한다.

[0029] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 조성물의 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 10% 내지 약 14%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 12% 내지 약 13%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 12.7%를 차지한다.

[0030] 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체(즉, 동종이합체의 7합체 및 이것 초과 분획에서의 것)가 전체 조성물의 적어도 약 28%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체는 전체 조성물의 35% 이하를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 조성물의 약 30% 내지 약 34%를 차지한다. 다른 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 조성물의 약 31.4%를 차지한다.

[0031] 몇몇 실시형태에서, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공되고, 여기서

[0032] (a) 동종이합체 분획은 전체 조성물의 약 20% 미만을 차지하거나;

[0033] (b) 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 조성물의 적어도 약 28%를 차지하거나;

[0034] (c) 동종이합체의 이합체 분획은 전체 조성물의 약 7% 내지 약 12.5%를 차지하거나;

[0035] (d) 동종이합체의 삼합체 분획은 전체 조성물의 약 5.5% 내지 약 11%를 차지하거나;

[0036] (e) 동종이합체의 사합체 분획은 전체 조성물의 약 10% 내지 약 16%를 차지하거나;

[0037] (f) 동종이합체의 오합체 분획은 전체 조성물의 약 6% 내지 약 10%를 차지하거나;

[0038] (g) 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 10% 내지 약 14%를 차지하거나;

[0039] (h) 동종이합체의 이합체 내지 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 40% 내지 약 60%를 차지하거나;

[0040] (i) 동종이합체의 삼합체 내지 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 32% 내지 약 50%를 차지하거나;

[0041] (j) 동종이합체의 사합체 내지 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 26% 내지 약 39%를 차지하거나;

[0042] (k) 동종이합체의 오합체 내지 동종이합체의 육합체 분획은 전체 조성물의 약 18% 내지 약 23%를 차지하거나; 또는

[0043] (l) (a)-(k)의 임의의 조합이다.

[0044] 몇몇 실시형태에서, 전체 조성물의 대략 80%가 더 높은 차수의 다합체(이는 동종이합체의 이합체 및 이것 초과(즉, 밴드 2 및 이것 초과)를 의미함)를 포함하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 전체 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물의 대략 60% 내지 80%는 동종이합체의 삼합체 및 이것 초과(즉, 밴드 3 및 이것 초과)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 전체 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물의 약 54% 내지 72%는 사합체 및 이것 초과(즉, 밴드 4 및 이것 초과)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 전체 조성물의 대략 44% 내지 57%가 오합체 및 이것 초과(즉, 밴드 5 및 이것 초과)를 포함하는 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 전체 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물의 약 38% 내지 51%는 육합체 및 이것 초과(즉, 밴드 6 및 이것 초과)를 포함한다

[0045] 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물의 밴드 2 내지 6(즉, 동종이합체의 이합체 내지 동종이합체의 육합체)이 상기 조성물의 약 39% 내지 61%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물의 밴드 3 내지 6(즉, 동종이합체의 삼합체 내지 동종이합체의 육합체)이 상기 조성물의 약 32% 내지 50%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물의 밴드 4 내지 6(즉, 동종이합체의 사합체 내지 동종이합체의 육합체)이 상기 조성물의 약 26% 내지 39%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물의 밴드 5 내지 6(즉, 동종이합체의 오합체 내지 동종이합체의 육합체)이 상기 조성물의 약 16% 내지 23%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1A 내지 도 1B는 크기 배제 크로마토그래피(도 1A) 및 비환원 겔에 의해 생성된 분획의 분석(도 1B)에 의한 GL-2045 분별화를 예시한다.

도 2는 GL-2045 분획의 바이오층 간섭측정 분석을 예시한다.

도 3a 내지 도 3b는 GL-2045에 대한 겔 분석(도 3a) 및 크기 배제 분별화 결과(도 3b)를 예시한다.

도 4a 내지 도 4d는 보체 의존적 세포 사멸 검정에서의 GL-2045 분획의 효과를 예시한다.

도 5a 내지 도 5c는 용리 크로마토그램(도 5a) 및 FcγRIIIa 결합 검정에서 사용하기 위한 GL-2045의 SDS-Page 분석(도 5b 및 도 5c)을 예시한다.

도 6a 내지 도 6b는 FcγRIIIa에 대한 도 5에 도시된 용리된 분획의 결합(도 6a) 및 베스트 피트 곡선(도 6b)을 예시한다.

도 7은 음이온 교환 분획의 SDS-Page 분석을 예시한다: GL-GLM-01= 재조합, 비분별화된 Fc(G001), GL-GLM-02 = 비분별화된 GL-2045, GL-GLM-05 = 분별화된 GL-2045(pH 6.0), GL-GLM-06 = 분별화된 GL-2045(pH 6.5), GL-GLM-07 = 분별화된 GL-2045(pH 7.0), GL-GLM-08 = 분별화된 GL-2045(pH 7.5).

도 8은 비분별화된 또는 분별화된 GL-2045: GL-GLM-01= 재조합, 비분별화된 Fc(G001), GL-GLM-02 = 비분별화된

GL-2045, GL-GLM-05 = 분별화된 GL-2045(pH 6.0), GL-GLM-06 = 분별화된 GL-2045(pH 6.5), GL-GLM-07 = 분별화된 GL-2045(pH 7.0), GL-GLM-08 = 분별화된 GL-2045(pH 7.5)의 존재 하의 화학유인물질로서 C5a에 의한 호중구 주화성 검정의 결과를 예시한다.

도 9는 배양의 4일, 8일 및 10일에 상이한 배지의 패널에서 성장한 CHO 세포의 세포 밀도(백만개/㎖)를 예시한다.

도 10은 배양의 4일, 8일 및 10일에 상이한 배지의 패널에서 성장한 CHO 세포의 세포 생존능력(%)을 예시한다.

도 11은 배양의 10일에 상이한 배지의 패널에서 성장한 CHO 세포의 단백질 역가(㎎/㎖)를 예시한다.

도 12a 내지 도 12b는 도 9 내지 도 11에 예시된 배지의 패널에서 성장한 CHO 세포로부터 생성된 GL-2045 단백질의 겔 분석을 예시한다.

도 13a 내지 도 13b는 PowerCHO3 CD, ADCF-Mab Hyclone 및 ActiCHO P 배지에 대한 피딩 스케줄(도 13a) 및 Cellvento, BalanCD CHO Growth A, CD FortiCHO Life 및 CD4MCHO Hyclone 배지에 대한 피딩 스케줄(도 13b)을 예시한다.

도 14는 배양의 0일 내지 11일에 상이한 배지 + 공급물 조합의 패널에서 성장한 CHO 세포의 세포 밀도(e^6 세포/㎖)를 예시한다.

도 15는 배양의 0일 내지 11일에 상이한 배지 + 공급물 조합의 패널에서 성장한 CHO 세포의 세포 생존능력(%)을 예시한다.

도 16은 배양의 0일 내지 11일에 상이한 배지 + 공급물 조합의 패널에서 성장한 CHO 세포로부터의 GL-2045의 단백질 역가(㎎/㎖)를 예시한다.

도 17은 GL-2045 다합체화에 대한 도 13a 내지 도 13b에 예시된 배지 + 공급물 조합 및 스케줄의 효과의 SDS-PAGE 분석을 예시한다.

도 18a 내지 도 18d는 세포 밀도(도 18a), 세포 생존능력(도 18b), 배양 pH(도 18c) 및 GL-2045 단백질 역가(도 18d)에 대한 ActiCHO-P 배지 + 매일의 공급(적색) 및 ActiCHO-P 배지 + 격일의 공급(청색)의 효과를 예시한다.

도 19는 GL-2045 단백질 역가에 대한 ActiCHO-P 배지 + 매일의 공급(적색) 및 ActiCHO-P 배지 + 3일마다의 공급(청색)의 효과를 예시한다

도 20a 내지 도 20b는 ActiCHO-P 기본 배지를 갖는 ActiCHO 공급물 A(청색)를 사용하는 것과 비교하여 세포 생존능력(도 20a) 및 GL-2045 단백질 역가(도 20b)에 대한 ActiCHO 공급물 A를 PowerCHO2(적색) 기본 배지와 조합하는 것의 효과를 예시한다.

도 21a 내지 도 21c는 세포 밀도(도 21a), 세포 생존능력(도 21b) 및 GL-2045 단백질 역가(도 21c)에 대한 최적화된 진탕 플라스크 조건의 효과를 예시한다.

도 22는 단백질 A 정제된 GL-2045의 SDS-PAGE 분석을 예시한다.

도 23a 내지 도 23b는 pH 구배 용리에 의한 GL-2045의 용리 후 단백질 A 칼럼(도 23a) 및 단리된 분획의 SDS-PAGE 분석(도 23b)으로부터의 용리 프로파일을 예시한다.

도 24는 용리 크로마토그램 및 비환원 SDS-PAGE 분석을 예시한다.

도 25는 용리 크로마토그램 및 비환원 SDS-PAGE 분석을 예시한다.

도 26은 실행 C1-C3의 용리 크로마토그램을 예시한다.

도 27은 실행 C1-C3으로부터 용리 피크 38% 내지 39%의 비환원 SDS-PAGE 분석을 예시한다.

도 28은 이온 크로마토그래피 정제된 GL-2045의 농도계 분석을 예시한다.

도 29a 내지 도 29b는 HIC 칼럼(상부 패널) 및 용리 및 관류 분획(FT)의 SDS-PAGE 분석(하부 패널)으로부터의 용리 프로파일을 예시한다.

도 30은 M045의 HIC 칼럼 연마(오른쪽 패널) 및 Nu-PAGE 분석(오른쪽 패널)으로부터의 용리 프로파일을 예시한

다.

도 31은 M045의 HIC 칼럼 연마로부터의 용리 프로파일을 예시한다.

도 32는 M045 및 SDS-PAGE 분석의 HIC 칼럼 연마로부터의 용리 프로파일을 예시한다.

도 33은 최적으로 제조된 GL-2045 조성물의 한정된 다합체 패턴을 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 본 명세서에 기재된 최적화된 재조합 GL-2045의 제조에 대한 접근법은 세포 생존능력 및 단백질 역가를 최적화하면서 증대된 GL-2045 다합체화를 생성시키는 최적화된 상류 제조 방법을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 최적화된 상태는 최적화된 하류 제조에 의해 약물 물질을 통해 운반된다. 추가로, 한정된 다합체 패턴을 갖는 GL-2045를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공된 조성물은 자가면역 질환, 염증성 질환, 알레르기, 항체 매개된 질환 및 보체 매개된 질환을 치료하기 위한 이용성을 갖는다.

[0048] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "약물 물질"은 제조사에 의해 제조된 바와 같은 GL-2045의 최종 투여형을 의미한다.

[0049] 본 명세서에 사용된 바대로, 단어 "일" 또는 "하나"의 사용은, 청구항 및/또는 본 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용될 때, "하나"를 의미할 수 있지만, 이것은 또한 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와 일치한다.

[0050] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "생물모방체", "생물모방체 분자", "생물모방체 화합물", 및 관련된 용어는 또 다른 화합물, 예컨대 혼주된 인간 정맥내 면역글로불린("hIVIG"), 단일클론 항체 또는 항체의 Fc 단편의 기능을 모방하는 인간 제조 화합물을 의미한다. "생물학적 활성" 생물모방체는 이의 천연 발생 대응물과 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 보유하는 화합물이다. "천연 발생"이란 유기체에서 보통 발견되는 분자 또는 이의 부분을 의미한다. 천연 발생이란 또한 실질적으로 천연 발생을 의미한다. "면역학적 활성" 생물모방체는 천연 발생 면역학적 활성 분자, 예컨대 항체, 사이토카인, 인터류킨, 및 당해 분야에 공지된 다른 면역학적 분자와 동일하거나 유사한 면역학적 활성을 나타내는 생물모방체이다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 생물모방체는 본 명세서에 정의된 바와 같은 최적화된 다합체화 스트라도머(예를 들어, 최적으로 제조된 GL-2045)이다.

[0051] "직접적으로 연결된"이란 DNA 또는 클로닝 단편에서 제한 효소 인식 부위의 삽입으로부터 유래된 아미노산 서열과 같은 개재하는 또는 무관한 서열 없이 서로에 연결된 2개의 서열을 의미한다. 당업자는 "직접적으로 연결된"이 다합체화 역량이 실질적으로 영향을 받지 않는 한 아미노산의 부가 또는 제거를 포함한다고 이해할 것이다.

[0052] "상동성"이란 소정의 핵산 또는 아미노산 서열의 전체 서열에 걸친 동일성을 의미한다. 예를 들어, "80% 상동성"이란 소정의 서열이 청구된 서열과 약 80%의 동일성을 공유하고 삽입, 결실, 치환 및 프레임 이동을 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 당업자는 서열의 전체 길이에 걸친 동일성을 결정하도록 삽입 및 결실을 고려하도록 서열 정렬이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0053] hIVIG가 신생 Fc 수용체(FcRn)에 결합하고 이를 완전히 포화시키고, FcRn의 이러한 경쟁적 저해가 hIVIG의 생물학적 활성에서 중요한 역할을 할 수 있다고 기재되어 있다(예를 들어, F. Jin *et al.*, Human Immunology, 2005, 66(4)403-410). Fcɣ 수용체에 강하게 결합하는 면역글로불린이 적어도 FcRn에 약간의 정도로 또한 결합하므로, 숙련된 당업자는 하나 초과의 Fcɣ 수용체에 결합할 수 있는 스트라도머가 또한 FcRn에 결합하고 이를 완전히 포화시킨다고 인식할 것이다.

[0054] DEL 및 EEM 다형이라 불리는 IgG1의 2개의 인간 다형이 존재한다. DEL 다형은 356번 위치에서 D 및 358번 위치에서 L을 갖고; EEM 다형은 356번 위치에서 E 및 358번 위치에서 M을 갖는다(Kabat 넘버링, 서열 번호 2 및 3, 각각 EEM 및 DEL 다형). 본 명세서에 제공된 스트라도머는 DEL 또는 EEM IgG1 다형을 포함할 수 있다. 따라서, 특정한 돌연변이체에 대한 문장이 DEL 다형현상의 맥락에서 명확히 생성되더라도, 당업자는 동일한 결과를 생성하기 위해 EEM 다형에 동일한 돌연변이가 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0055] US 제2010/0239633호는 자가면역 질환 및 다른 염증성 병태를 포함하는 병리학적 병태의 치료를 위해 스트라도머의 개별 성분 사이에 제한 부위 및 친화도 태그를 포함하는 짧은 서열을 포함하는 hIVIG의 질서화된 다합체화된 면역글로불린 Fc 생물모방체(스트라도머로 공지된 순서화된 생물학적 활성 다합체)를 생성하도록 연결된 면역글로불린 Fc 도메인을 사용하는 것을 개시한다. US 제2010/0239633호(그 전문이 참고로 포함됨)를 참조한다.

미국 특허 출원 공보 제2013/0156765호는 개별 성분이 제한 부위 또는 친화도 태그에 의해 분리되기보다는 직접적으로 연결된 스트라도머를 개시한다. US 제2013/0156765호는 개별 성분이 제한 부위 또는 친화도 태그에 의해 분리되기보다는 직접적으로 연결된 스트라도머를 개시한다. US 제2013/0156765호는 또한 N 말단 연결된 작제물(US 제2010/0239633호에 기재된 GL-2019)에 비해 증대된 다합체화 및 보체 결합을 나타내는 C 말단에 직접적으로 연결된 IgG2 힌지 다합체화 도메인을 갖는 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 다합체화 스트라도머(GL-2045)를 구체적으로 개시한다. US 제2013/0156765호(그 전문이 참고로 포함됨)를 참조한다. GL-2045의 구조는 IgG1 힌지 - IgG1CH2 IgG1 CH3 - IgG2 힌지이고, GL-2045는 서열 번호 4 및 5(각각 EEM 및 DEL 다형)로서 제공된다.

[0056] *스트라도머 단위 단량체*

[0057] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "스트라도머 단위 단량체"는 적어도 제2 스트라도머 단위 단량체와 회합될 때 적어도 하나의 Fc 도메인, 및 GL-2045의 경우에 IgG2 힌지 다합체화 도메인을 포함하는 동종이합체 "스트라도머 단위"를 형성하는 단일의 인접한 펩타이드 분자를 의미한다. 바람직한 실시형태에서, GL-2045의 스트라도머 단위는 2개의 회합된 스트라도머 단위 단량체로 이루어진다. 그러나, GL-2045 스트라도머는 또한 3개의 이상 스트라도머 단위 단량체를 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머(최적으로 제조된 GL-2045)는 IgG1 Fc 단량체의 N 말단과 리더 펩타이드의 C 말단 사이(서열 번호 1) 및 IgG1 Fc의 C 말단과 다합체화 도메인 IgG2 힌지의 N 말단 사이(서열 번호 6)에 직접 연결을 함유한다.

[0059] 명확한 예로서, 숙련된 당업자는 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머 분자가 Fc 도메인 단량체 및 다합체화 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 분자를 제조함으로써 작제될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 분자는 박테리아의 집단을 형질전환시키거나 포유류 세포의 집단을 형질주입시키도록 사용될 수 있는 발현 벡터로 삽입될 수 있다. 이후, 스트라도머 단위 단량체는 적절한 배양 조건 하에 형질전환된 박테리아 또는 형질주입된 포유류 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 안정하게 형질주입된 세포의 풀을 지속시키는 클론성 세포주는 제네테신/G418에 의해 세포를 선택함으로써 성취될 수 있다. 대안적으로, 세포는 CMV 촉진자의 제어 하에 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머를 암호화하는 DNA(예를 들어, 서열 번호 4 또는 5에 따른 스트라도머를 암호화하는 DNA)에 의해 일시적으로 형질주입될 수 있다. 이후, 발현된 스트라도머 단위 단량체는 스트라도머 단량체 또는 단위의 자가 응집 또는 스트라도머간 단량체 연결을 이용하여 스트라도머 단량체의 회합 시 기능적 스트라도머 단위 및 스트라도머를 형성할 수 있다. 이후, 발현된 스트라도머는 본 명세서에 기재된 하류 제조 방법(예를 들어, 친화도 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피)에 의해 세포 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 당업자는 핵산 작제물에 포함된 리더 펩타이드가 스트라도머 단위 단량체 펩타이드의 생성을 촉진하도록 오직 사용되고 성숙 단백질의 발현 시 절단된다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 생물학적 활성 생물모방체는 리더 펩타이드를 포함하지 않는다.

[0060] *클러스터 스트라도머*

[0061] 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따라 제조된 최적으로 제조된 GL-2045는 클러스터 스트라도머이다. "클러스터 스트라도머"는 중앙 모이어티 "헤드" 및 2개 이상의 "레그"(여기서, 각각의 레그는 적어도 하나의 Fc 감마 수용체 및/또는 보체에 결합할 수 있는 하나 이상의 Fc 도메인을 포함함)를 갖는 방사상 형태를 갖는 생물모방체이다. 클러스터 스트라도머는 또한 스트라도머의 다합체화를 발생시키는 다합체화 도메인의 존재에 의해 "다합체화 스트라도머"로 공지되어 있다. 따라서, 하나의 스트라도머 단량체 분자에서 다수의 Fc 도메인을 함유하는 시리얼 스트라도머는, 그 분자가 또한 적어도 하나의 다합체화 도메인을 함유하는 한, 클러스터 스트라도머 또는 다합체화 스트라도머로 여전히 분류될 수 있다. 각각의 클러스터 스트라도머는 각각 "클러스터 스트라도머 단위"라 칭하는 하나 초과의 동종이합체 단백질로 이루어진다. 각각의 클러스터 스트라도머 단위는 다합체화하는 적어도 하나의 영역 및 적어도 하나의 기능적 Fc 도메인을 포함하는 "레그" 영역으로 이루어진다. 다합체화 영역은 또 다른 클러스터 스트라도머 단위와 다합체화되면 클러스터 스트라도머 "헤드"를 생성한다. 레그 영역은 각각의 레그 영역에 Fc 도메인이 있는 것만큼 많은 보체 분자에 결합할 수 있다. 예를 들어, 레그 영역은 각각의 레그 영역에서 Fc 도메인이 있는 것만큼 많은 많은 C1q 분자에 결합할 수 있다. 따라서, 클러스터 스트라도머는 2개 이상의 C1q 분자에 결합하여서 보체 의존적 세포독성(Complement Dependent Cytotoxicity: CDC)으로도 공지된 보체 매개된 용해를 방지할 수 있는 생물모방체 화합물이다.

[0062] 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머 내에 함유된 다합체화 영역은 IgG2 힌지 영역이다. 당해 분야에 공지된 바대로, 인간 IgG2의 힌지 영역은 공유 이합체를 형성할 수 있다(Yoo, E.M. *et al*. J. Immunol. 170, 3134-

3138 (2003); Salfeld Nature Biotech. 25, 1369-1372 (2007)). IgG2의 이합체 형성은 잠재적으로 C-C 결합에 의해 IgG2 힌지 구조를 통해 매개되어서(Yoo *et al* 2003), 힌지 구조는 단독으로 이합체 형성을 매개할 수 있다는 것을 제안한다. 그러나, 인간 혈청에서 발견된 IgG2 이합체의 양은 제한된다. 동종이합체의 이합체로서 존재하는 IgG2의 양이 전체 IgG2의 10% 미만인 것으로 예측된다(Yoo *et al*. 2003). 더욱이, 동종이합체의 이합체 뒤로 IgG2의 다합체화의 정량적 증거가 없다(Yoo *et al*. 2003). 즉, 네이티브 IgG2는 인간 혈청에서 더 높은 차수의 다합체를 형성하는 것으로 발견되지 않았다. IgG2 힌지 함유 스트라도머(예를 들어, 최적으로 제조된 GL-2045)는 더 높은 차수의 다합체로서 존재하고, IgG2 힌지 상호작용이 가변적이고 동적인 인간 혈청에서의 네이티브 IgG2와 달리, GL-2045는 37℃에서 100% 습도에서 비환원 SDS-PAGE 겔, 분석용 초원심분리 및 3개월 안정성 연구에서 입증된 고도로 안정한 다합체를 형성하는 것으로 입증되었다. 더욱이, IgG2 힌지 함유 스트라도머 제제에서의 다합체의 양이 이합체의 대략 10%보다 유의미하게 더 높고, 인간 혈청에서 다합체가 IgG2에 관찰되지 않았다는 것이 놀랍다. 예를 들어, 동종이합체의 이합체, 삼합체, 사합체 및 고도로 질서화된 다합체를 포함하는 다합체인 스트라도머의 퍼센트는 20%를 초과하고, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 심지어 90%를 초과할 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 동종이합체로서 존재하는 GL-2045의 퍼센트는 10 내지 20%이고, 동종이합체의 더 높은 차수의 다합체로서 존재하는 GL-2045의 상응하는 퍼센트는 70% 초과이다.

[0063] 아미노산 서열 GL-2045는 서열 번호 4 및 5에 기재되어 있다.

[0064] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "단리된" 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 천연 발생 대응물이 없거나, 예를 들어 조직, 예컨대 췌장, 간, 비장, 난소, 고환, 근육, 연결 조직, 신경 조직, 위장 조직, 또는 유방 조직 또는 종양 조직(예를 들어, 유방암 조직), 또는 체액, 예컨대 혈액, 혈청 또는 뇨에서 천연에서 이것을 동반하는 성분으로부터 분리되거나 정제된 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 의미한다. 통상적으로, 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 이것이 천연에서 연관된 단백질 및 다른 천연 발생 유기 분자로부터 이것이 건조 중량 기준으로 적어도 70%일 때 "단리된다"고 생각된다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩타이드(또는 펩타이드)의 제제는 건조 중량 기준으로 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 본 발명의 폴리펩타이드(펩타이드)이다. 화학적으로 합성된 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 본래 천연에서 이것을 동반하는 성분으로부터 분리되므로, 합성 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 "단리된다".

[0065] 본 발명의 단리된 폴리펩타이드(또는 펩타이드)는 예를 들어 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화하는 재조합 핵산의 발현에 의해 또는 화학 합성에 의해 얻어질 수 있다. 이것이 천연에서 기원한 소스와 상이한 세포 시스템에서 제조된 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 천연에서 이것을 동반하는 성분이 반드시 없으므로 "단리된다". 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 단리된 폴리펩타이드는 IgG1 Fc 단량체 및 IgG2 힌지 다합체화 도메인에 상응하는 서열(서열 번호 6)을 오직 함유하고, 단백질의 클로닝 또는 정제를 도울 수 있는 추가의 서열(예를 들어, 도입된 제한 효소 인식 부위 또는 정제 태그)을 함유하지 않는다. 단리 또는 순도의 정도는 임의의 적절한 방법, 예를 들어, 칼럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 HPLC 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0066] ***제조 방법***

[0067] GL-2045는 동종이합체의 순서화된 다합체를 형성하고, 동종이합체 및 모든 다합체 분획에서 활성이다. 제조 공정이 최적화된 다합체 프로파일을 생성시킨다는 것이 GL-2045 기능에 중요하다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "최적화된 다합체 프로파일" 또는 "최적화된 다합체화 프로파일"은 IVIG 모방체로서 GL-2045에 대한 원하는 생물학적 결과를 발생시키는 GL-2045의 동종이합체 및 고도로 질서화된 다합체의 조합을 의미한다(예를 들어, 이론에 의해 제한되지 않으면서, C3/C3b의 수준에서, 예를 들어 보체 시스템의 초기 활성화, 및/또는 후속하는 보체 활성화의 저해 및 CDC의 방지에 의한 C1q에 대한 증대된 결합). 숙련된 당업자는 다른 치료학적 목적을 포함한, 단독으로 또는 다른 요소와 조합되어, 별개의 생성물로서 최적으로 제조된 GL-2045로부터 다양한 다합체 분획을 단리하는 것이 유리할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 예에 제공된 바대로, GL-2045의 더 큰 다합체 분획은 C1q에 대한 결합 및 하류 보체 매개된 효과기 기능의 조정에서 및 저친화도 FcɣR에 대한 결합에 있어서 더 작은 다합체 분획보다 활성이다. 본 발명의 방법은 따라서 최적화된 다합체 프로파일을 포함하는 GL-2045 조성물뿐만 아니라, 원하는 효과기 기능에 기초하여 선택 다합체를 오직 함유하는 GL-2045 조성물에 관한 것이다. 이러한 실시형태에서, 하나의 원하는 생물학적 결과를 발생시키는 GL-2045의 최적화된 다합체 프로파일은 또 다른 원하는 생물학적 결과를 발생시키는 최적화된 다합체 프로파일과 상이할 수 있다.

[0068] 이론에 구속됨이 없이, 동종이합체가 비응집된 IgG1과 유사한 수용체 및 리간드 완충제로서 작용한다고 생각된다. 더 높은 차수의 다합체는 저친화도 Fcɣ 수용체 및 보체 인자(예를 들어, 육합체인 C1q)에 증가하는 결합도

로 결합하고, 본 명세서에 기재된 바대로, 동종이합체 또는 더 낮은 차수의 다합체(예를 들어, GL-2045 동종이합체의 이합체, 삼합체 및/또는 사합체)와 비교하여 증대된 생물학적 효율을 나타낸다. 따라서, 다합체화의 정도는 임상적으로 효율적인 GL-2045의 제조에서 중요한 상류 및 하류 제조 고려사항이다. 그러므로, 최적화된 상류 제조 방법을 통해 GL-2045의 최적 세포 생존능력, 높은 단백질 역가 및 최적 다합체화 프로파일을 유지시킬 뿐만 아니라, 최적화된 하류 제조 방법을 통해 GL-2045의 최적 다합체화 프로파일을 유지시키고/시키거나 증대시키는 것이 바람직하다.

[0069] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 최적화된 제조 방법은 GL-2045의 적어도 70% 또는 적어도 80%가 비동종이합체(예를 들어, 동종이합체의 이합체, 동종이합체의 삼합체 등)로서 존재하는 GL-2045 단백질 조성물을 생성시킨다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 70% 초과 또는 80% 초과는 비동종이합체로서 존재한다. 예를 들어, 최적화된 제조 방법은 GL-2045의 80%, 85%, 90%, 95% 또는 이것 초과가 비동종이합체로서 존재하는 GL-2045 단백질 조성물을 생성시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 조성물은 가장 높은 차수의 다합체(즉, 동종이합체의 7합체 및 이것 초과)로서 존재하는 GL-2045의 적어도 28% 또는 적어도 30%를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 조성물은 가장 높은 차수의 다합체로서 존재하는 GL-2045의 35% 이하를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 조성물은 사합체, 오합체, 육합체 및 7합체로서 존재하는 GL-2045의 적어도 약 35%를 포함한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 4 내지 6으로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 삼합체 및 이것 초과로 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 3 및 이것 초과로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 삼합체, 사합체, 오합체 또는 육합체로서 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 3-6으로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 사합체 및 이것 초과로 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 4 및 이것 초과로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 사합체 및 오합체로서 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 4 및 5로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 오합체 및 이것 초과로 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 5 및 이것 초과로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 오합체 및 육합체로서 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 5 및 6으로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 육합체 및 이것 초과로 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 6 및 이것 초과로 이루어짐). 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 약 35%는 동종이합체의 7합체 및 이것 초과로 존재한다(즉, 전체 GL-2045 조성물의 적어도 35%는 분획 7 및 이것 초과로 이루어짐). 예를 들어, 본 명세서에 기재된 최적화된 제조 방법은 GL-2045의 40%, 45%, 50%, 55% 또는 이것 초과가 동종이합체의 오합체 및 이것 초과로서 존재하는 GL-2045 단백질 조성물을 생성시킬 수 있다. Fc 함유 치료제(예를 들어, 단일클론 항체)에 대한 본 제조 방법은 하류 여과 단계를 통해 증가된 단백질 역가 및 수율에 초점을 둔다. 이 방법은 일반적으로 Fc 함유 단백질의 다합체화에 대한 제조 공정의 효과를 고려하지 않고, 본 명세서에 기재된 방법과 극명한 대조로, 단백질 응집 및 다합체화를 최소하고자 추구한다. 놀랍게도, GL-2045의 가장 높은 단백질 수율을 생성시키는 배양 조건은 다합체로서 존재하는 GL-2045의 가장 높은 백분율을 반드시 생성시키지는 않는다. 그러므로, 본 명세서에 기재된 데이터는 전체 단백질 역가에 영향을 미치는 제조 변수가, 적어도 부분적으로, 다합체화 프로파일에 영향을 미치는 변수와 독립적이라는 것을 나타낸다. 따라서, 당업자는 상류 제조 조건이 현재 최신 기술에 기초하여 GL-2045 다합체화에 영향을 미치는지를 예측할 수 없을 것이다.

[0070] 예를 들어, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포에 의한 재조합 단백질 제조에 대한 확립된 프로토콜은 배양의 특정한 일자에 37℃로부터 31℃로의 온도 이동을 제공한다(Ouguchi *et al*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson and Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)). 그러나, 본 발명자들은 Ouguchi 등에서 기재된 것과 반대로 37℃로부터 32.5℃로의 온도 이동이 단백질 역가를 최적화하면서 높은 세포 생존능력 및 세포 밀도의 유지를 발생시킨다는 것을 발견하였다. 추가로, 본 발명자들은 이전에 기재된 바와 같은 배양의 소정의 날짜보다는 세포 밀도에 기초한 온도의 이동이 거의 10g/ℓ의 증대된 GL-2045 단백질 역가를 생성시킨다는 것을 발견하였다.

[0071] 더욱이, 본 발명자들은 최적화된 상류 제조 방법으로부터 생긴 최적화된 다합체화 프로파일의 제조가 부분적으로 최적화된 하류 제조 방법(예를 들어, 친화도 크로마토그래피 및/또는 이온 교환 크로마토그래피)에 의존한다는 것을 발견하였다. 단일클론 항체(mAb) 및 Fc 융합 단백질 여과 및 정제 기법은 광범위하게 기재되어 있고 흔히 사용된다. 그러나, GL-2045에 적용될 때, 이 기법은 GL-2045 다합체화 프로파일의 예상치 못한 변형을 발생시킨다. 예를 들어, 본 발명자들은 대부분의 단백질 A 칼럼이 실시예 8에 입증된 바대로 mAb 및 Fc 융합 단백질을 정제하는 데 있어서 이의 일상적인 사용에도 불구하고 GL-2045를 정제하는 데 적합하지 않다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 단백질 A는 단일 약물의 우수 의약품 제조 관리 기준(good manufacturing practice: GMP) 정제

에 부합하여 사용하기에 수백만 달러가 들고, 경제적으로 실행 가능하도록 100배 이상만큼 많이 재사용될 필요가 있는, 극도로 비싼 시약이다. mAb 및 Fc 융합 단백질과 같이, GL-2045는 단백질 A에 결합하지만; mAb 및 Fc 융합 단백질과 달리, GL-2045는 단백질 A에 대한 GL-2045의 격렬한 결합으로 인해 일반 용리 단계에 의해 단백질 A로부터 완전히 해리되지 않는다. 본 발명자들은 GL-2045의 정제에 대한 단백질 A 칼럼의 이용(여기서, 최적 다합체화 프로파일을 유지됨)이 더 빈번한 칼럼 클리닝 스케줄을 요한다는 것을 예상치 못하게 발견하였다.

[0072] 본 발명자들은 당해 분야에서 흔히 사용된 단백질 A 칼럼 제자리 세정(CIP) 절차가 GL-2045 다합체화 프로파일을 예상치 못하게 변경시킨다는 것을 추가로 발견하였다. 일반 CIP 절차는 칼럼을 통과하는 단백질 상청액의 많은 사이클을 수반할 수 있는 정제 실행의 끝에서 칼럼 클리닝을 수반한다. 그러나, 본 발명자들은 GL-2045의 높은 결합도가 단백질 A로부터의 GL-2045 해리의 결여를 발생시킨다는 것을 발견하였다. 그 결과, 단백질 A의 결합 부위는 점유된 채 있어서, 후속하는 사이클에서 GL-2045 결합을 방지하고 동종이합체의 소실을 발생시킨다. 따라서, mAb 또는 Fc 융합 단백질과 사용되는 프로토콜과 반대로, 본 발명자들은 GL-2045에 의해 단백질 A 칼럼의 CIP 클리닝이 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질에 의해 및 고도로 엄격한 재생 완충제, 예컨대 0.5M NaOH에 의해 수행되는 것보다 더 빈번히 수행되어야 한다는 것을 예상치 못하게 발견하였다.

[0073] pH 용리 구배는 정제 동안 단백질 수율을 최적화하도록 단백질 A 칼럼과 흔히 사용된다. 본 발명자들은 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질의 단백질 A 칼럼 수율을 최적화하기 위해 당해 분야에서 사용된 pH 용리 구배가 GL-2045의 동종이합체 또는 더 높은 차수의 다합체 성분의 원치 않는 손실을 야기할 수 있어서, (실시예 10에서 입증된 바대로) GL-2045의 다합체화 프로파일을 변경한다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 그러므로, 본 발명자들은 GL-2045의 수율 및 다합체화의 조합을 최적화하기 위해 용리 구배 기법을 이용하는 수단을 또한 결정하였다. 추가적으로, 본 발명자들은 pH 용리 구배가 신규한 목적을 위해, 즉 (실시예 11에서 입증된 바대로) 동종이합체 응집체로부터 가장 큰 고도로 질서화된 GL-2045 다합체를 분리시키기 위해 단백질 A 칼럼에 적용될 수 있다는 것을 놀랍게도 발견하였다.

[0074] 본 발명자들은 단일클론 항체 및 Fc 융합 단백질을 정제하기 위해 당해 분야에서 흔히 사용되는 이온 교환 칼럼, 예컨대 음이온 교환 및 양이온 교환을 사용할 때 pH 및/또는 염의 변화가 실시예 12에서 입증된 바대로 GL-2045의 다합체화 프로파일을 변경할 수 있다는 것을 또한 발견하였다. 이것은 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질과의 극명한 대조에 유용하고, 여기서 염 또는 pH의 변화는 약물의 조성의 변화 없이 단백질의 소량의 손실을 발생시킬 수 있다. 추가적으로, 본 발명자들은 신규한 목적을 위해 유사한 분자 질량을 가질 수 있는 동종이합체의 응집체로부터 가장 큰 고도로 질서화된 GL-2045 다합체를 분리시키기 위해 염 및/또는 pH의 조정이 이용될 수 있다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 실시예 13에서 입증된 바대로, 본 발명자들은 가장 높은 차수의 다합체 분획으로부터의 무질서한 응집체의 제거가 더 높은 효력 및 더 고도로 정제된 GL-2045 생성물과 연관된다는 것을 입증하는 기능적 검정을 이용한다.

[0075] 소수성 상호작용(hydrophobic interaction: HIC) 칼럼은 고수율 포획, 연마 단일클론 항체, 전장 형태로부터의 절두된 종의 제거, 불활성 형태로부터의 활성 형태의 분리 및 바이러스의 제거를 포함하는 다양한 기전을 통해 단일클론 항체 및 Fc 융합 단백질을 정제하기 위해 당해 분야에서 흔히 사용된다. 그러나, GL-2045의 맥락에서 사용될 때, 본 발명자들은 표준 HIC 칼럼이 예측 불가능하다는 것을 발견하였다. 실시예 14에서 입증된 바대로, 상이한 매트릭스로 이루어진 7개의 HIC 칼럼은 모든 칼럼과 사용되는 동일한 상청액 및 동일한 완충제에도 불구하고 16% 내지 62%의 범위의 광범위하게 다른 포획 속도와 연관된다.

[0076] 추가로, 본 발명자들은 완충제의 변화가 GL-2045의 다합체화 프로파일을 변경시킬 수 있다는 것을 예측한다. 이것은 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질과의 극명한 대조에 유용하고, 여기서 완충제의 변화는 약물의 기본 조성의 변화 없이 단백질의 소량의 손실 또는 덜 완벽한 연마를 발생시킬 수 있다.

[0077] 더욱이, 본 발명자들은, GL-2045 동종이합체가 고도로 질서화된 다합체가 형성되게 하는 다합체화 도메인 및 IgG1 Fc로 이루어지므로, GL-2045가 네이티브 IgG1 Fc 동종이합체에 대한 결합도 없이 결합하는 모든 또는 거의 모든 많은 리간드 및 표적에 친화도로 결합한다는 것을 발견하였다. 이것은 놀랍지 않게도 모든 저친화도 Fc 수용체 및 보체 C1q, 및 정제 칼럼에서 흔히 사용된 단백질 A 및 단백질 G를 포함한다. 그러나, 이 격렬한 결합은 또한 덜 바람직한 가능한 표적 결합, 예를 들어 내독소를 발생시킨다. 이 이유로, 본 발명자들은 단백질 A에 의한 GL-2045의 정제, 및 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 관류 및 소수성 상호작용 칼럼의 적어도 하나 이상에 의한 단백질 A 정제된 GL-2045의 연마를 포함하는 다수의 단계 정제 공정이 바람직하다는 것을 결정하였다. 바람직한 실시형태에서, 단백질 A에 의한 GL-2045의 정제 및 결합 방식의 양이온 교환 크로마토그래피, 관류 방식의 음이온 교환, 및 결합 또는 관류 방식의 소수성 상호작용 칼럼의 모든 3개에 의한 단백질 A 정제된

GL-2045의 연마를 포함하는 4단계 정제 공정이 바람직하다. 이 4단계 정제 공정은 실시예 15에 기술되어 있다. 당업자는 심층 여과 및 한외여과 단계를 포함하는 추가적인 여과 단계가 GL-2045 조성물을 추가로 정제하기 위해 실시예 15에 기재된 공정 전에, 동안에 또는 후에 임의의 시점에서 첨가될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다.

[0078] *상류 제조*

[0079] 일반적으로 말해서, 상류 제조 방법은 소정의 유형의 단백질 생물학적 생성물(예를 들어, GL-2045)을 제조하기 위해 제어된 조건 하에 생물학적 재료가 접종되고 배양물 중에 성장하는 방법이다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "상류 제조 방법"은 하류 제조 방법으로 일반적으로 분류된 후속하는 정제 및 여과 단계를 언급하지 않으면서 단백질의 재조합 제조를 위한 방법을 구체적으로 의미한다. 특정한 단백질 특징(예를 들어, 다합체화 효율)의 최적화를 목표로 한 변경 또는 변화를 갖는 상류 제조 방법은 본 명세서에서 "최적화된 상류 제조 방법"이라 칭해진다. 상류 단백질 제조의 몇몇 양태는 특정한 특징을 갖는 최종 단백질 생성물을 생성시키도록 최적화(예를 들어, 원하는 결과를 달성하도록 변경 또는 변화)될 수 있다. 최적화될 수 있는 상류 재조합 단백질 제조의 양태는 단백질을 암호화하는 발현 벡터의 조성, 세포 유형, 기본 배지, 공급물을 포함하는 배지 첨가제, 공급물 스케줄, 계대배양 스케줄, 배양 온도, 온도 이동, 습도, 통풍의 정도, pH, 시딩 세포 밀도, CO_2 수준, 및/또는 산소 수준을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 최적화된 상류 제조 방법은 비최적화된 상류 제조 방법에 의해 제조된 GL-2045와 비교하여 더 높은 차수의 다합체의 증가된 백분율로 GL-2045의 고역가를 생성시킨다.

[0080] 본 발명의 몇몇 양태에서, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 GL-2045를 암호화하는 발현 벡터와 함께 형질주입된다. 몇몇 양태에서, 게놈으로의 GL-2045 발현 카세트의 삽입은 piggyBac 트랜스포손에 의해 매개되고, 여기서 GL-2045 발현 카세트는 piggyBac 최소 역위 반복 요소에 의해 측접된다. 이 GL-2045 발현 벡터와 piggyBac 트랜스포사제를 암호화하는 벡터와의 동시발현은 활발히 전사된 게놈의 영역으로의 유전자 통합을 매개하여서, 표준 형질주입 방법과 비교하여 안정한 및 증대된 유전자 발현을 갖는 세포주를 생성시킨다(US 2010/0311116 및 문헌[Matasci *et al*, Biotechnol. Bioeng. V. 108, pp 2141-2140, (2011)](본 명세서에 참고로 포함됨) 참조). piggyback 시스템은 보통 적어도 부분적으로 높은 수의 통합된 전이유전자로 인해 단백질 제조를 증가시킨다. 그러나, 본 발명자들은 고역가의 높은 생존능력 클론성 세포주를 선택하였고, 여기서 전이유전자 삽입 속도는 비교적 낮지만(예를 들어, UV 분광광도법에 의해 결정된 대략 11개의 카피); 당업자는 선택적 항생제 압박의 사용이 약 50개 초과의 삽입된 카피 또는 약 100개 초과의 삽입된 카피의 전이유전자 삽입 속도의 사용을 또한 허용한다는 것을 이해할 것이다. 몇몇 양태에서, 발현 벡터는 리더 펩타이드를 암호화하는 핵산(예를 들어, 서열 번호 1)을 포함한다. 몇몇 양태에서, 발현 벡터는 성공적으로 형질주입된 CHO 세포의 선택을 허용하도록 항생제 내성 유전자를 추가로 포함한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 성공적으로 형질주입된 CHO 세포는 항생제 선택의 부재 하에 생성된다(US 제2010/0311116호 참조). 몇몇 양태에서, 발현 벡터는 GL-2045의 높은 수준 발현을 촉진하기 위한 전사 촉진자(예를 들어, CMV 촉진자)를 추가로 포함한다.

[0081] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포는 생물반응기에서 배양된다. 몇몇 실시형태에서, 많은 변이체가 존재하는 CHO 세포주는 우선적으로 전사적으로 활성인 부위에서 삽입을 발생시키는 기법을 이용하여 GL-2045 발현 벡터와 함께 일단 안정하게 형질주입되도록 조심스럽게 선택된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 형질주입된 선택 CHO 세포주에 적용된 배양 조건은 세포 생존능력에 불리하게 영향을 미치지 않으면서 표준 제조 방법에 의해서보다 더 길게 지속하는 배양 프로토콜을 허용한다. 표준 제조 방법은 생물반응기에서 평균 12일일 수 있고, 이 지점에서 배양에 존재하는 세포 부스러기의 증가로 인해 세포 생존능력이 감소한다. 세포 생존능력의 손실과 연관되는 것 이외에, 세포 부스러기는 여과 및 정제와 연관된 도전을 극적으로 증가시킨다. 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 세포는 미리 결정된 세포 밀도로 생물반응기에서 시딩되고 12일 초과 동안 배양된다. 몇몇 실시형태에서, 세포는 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일 이상 동안 허용가능한 생존가능 세포 밀도로 생물반응기에서 배양된다.

[0082] 몇몇 실시형태에서, ActiCHO P는 최적으로 제조된 GL-2045의 최적화된 상류 제조를 위한 기본 배지로서 사용된다. 본 명세서에서 상호 교환되어 사용되는 바와 같은, 용어 "ActiCHO P" 및 "최적화된 배지"는 상업적으로 이용 가능한 ActiCHO(등록상표) 기본 배지("ActiCHO P," GE Healthcare), 이의 임의의 실질적인 카피, 또는 ActiCHO P와 실질적으로 동일한 분량의 동일한 구성성분을 실질적으로 포함하는 배지를 의미한다. ActiCHO P는 ActiCHO P와 거의 동일한 제품이고 본 개시내용의 목적을 위한 동등한 시약인 Hyclone "ActiPro"로서 GE에 의해 또한 최근에 판매된다. 몇몇 실시형태에서, ActiCHO(등록상표) 공급물 A 및 공급물 B(ActiCHO(등록상표) 공급물

A 및 공급물 B와 동일한 제품이고 본 개시내용의 목적을 위한 동등한 시약인 Hyclone "Cell Boost 7a" 및 Hyclone "Cell Boost 7b"로서 GE에 의해 또한 최근에 판매됨)는 기본 배지 이외에 사용된다. 본 명세서에서 상호 교환되어 사용되는 바와 같은, 용어 "ActiCHO 공급물 A" 또는 "최적화된 공급물 A" 및 본 명세서에서 상호 교환되어 사용되는 바와 같은, "ActiCHO 공급물 B" 또는 "최적화된 공급물 B"는 상업적으로 이용 가능한 ActiCHO(등록상표) 공급물(GE Healthcare), 이의 실질적인 카피, 또는 ActiCHO 공급물 A 및/또는 ActiCHO 공급물 B와 실질적으로 동일한 분량의 동일한 구성성분을 실질적으로 포함하는 공급물을 의미한다. 본 발명의 몇몇 양태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포에 매일 ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B가 공급된다. 본 발명의 몇몇 양태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포에 격일로 ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B가 공급된다. 본 발명의 몇몇 양태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포에 연속 공급물을 통해 ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B가 공급된다.

[0083] 최적화된 상류 제조 방법의 몇몇 실시형태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포는 온도 이동 전에 특정한 세포 밀도로 성장한다. 몇몇 양태에서, CHO 세포는 온도 이동 전에 약 500만개 내지 3000만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 몇몇 양태에서, 세포는 온도 이동 전에 약 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개, 2500개 또는 약 3000만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 몇몇 양태에서, CHO 세포는 온도 이동 전에 약 1000만개 내지 2500만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다. 최적화된 제조 방법의 몇몇 양태에서, CHO 세포는 온도 이동 전에 약 1000만개 내지 1500만개의 세포/㎖의 밀도로 성장한다.

[0084] 몇몇 실시형태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포는 미리 결정된 세포 밀도에 도달할 때까지 37℃±1℃에서 배양된다. 몇몇 양태에서, 온도는 세포가 미리 결정된 세포 밀도에 도달한 후 32.5℃±1℃로 이동한다. 이 양태는 재조합 단백질 제조에 대한 이전에 기재된 배양 방법과 반대이고, 여기서 세포는 미리 결정된 일수 동안 37℃에서 배양되고, 이후 온도는 대개 31℃로 이동한다(Ouguchi *et al*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson and Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)). 본 발명자들은 배양 시간보다는 세포 밀도에 기초하여 37℃±1℃로부터의 32.5℃±1℃로의 온도 이동이 표준 상류 제조 방법에 비해 증가된 생존능력, 개선된 세포 밀도 및 실질적인 단백질 역가 증가의 조합을 예상치 못하게 제공한다는 것을 결정하였다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045 발현 벡터와 함께 형질주입된 CHO 세포는 이중 온도 이동으로 처리된다. 일 실시형태에서, 형질주입된 CHO 세포는 37℃±1℃에서 배양되고, 피크 생존가능 세포 밀도에 도달하기 전에 34℃±1℃로 이동하였다. 바람직한 실시형태에서, 이 온도 이동이 발생하는 한편, CHO 세포는 대수 증식기에 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 초기 온도 이동은 배양의 3일 또는 4일에 발생한다. 또 다른 실시형태에서, 형질주입된 CHO 세포는 미리 결정된 세포 밀도에 도달할 때까지 37℃±1℃에서 배양되고, 이때 온도는 34℃±1℃로 이동한다. 바람직한 실시형태에서, 세포 밀도는 제1 온도 이동에서 ㎖당 500만개 내지 2000만개의 세포이다. 특히 바람직한 실시형태에서, 세포 밀도는 제1 온도 이동에서 ㎖당 800만개 내지 1500만개의 세포이다. 몇몇 실시형태에서, 제2 온도 이동은 7일±1일에 생긴다. 몇몇 실시형태에서, 온도는 이후 31℃로 더 이동한다. 몇몇 실시형태에서, 이 제2 온도 이동은 초기 온도 이동 후 약 4일에 수행된다.

[0085] *하류 제조 방법*

[0086] 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 수확은 하류 제조 방법에 의해 달성된다. 몇몇 실시형태에서, 하류 제조 방법은 특정한 단백질 분획(예를 들어, 동종이합체 GL-2045의 무질서한 고분자량 응집체의 제거)을 제거 또는 단리시키기 위해 본 명세서에 기재된 최적화된 상류 제조 방법과 조합되어 사용된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "하류 제조 방법"은 원하는 순도 및/또는 농도의 단백질 조성을 생성시키도록 단백질 상청액에서 수행된 단백질 정제 및 여과 단계이다. 몇몇 실시형태에서, 하류 제조 방법은 본 명세서에서 "최적화된 하류 제조 방법"이라 칭하는 GL-2045의 특정한 다합체화 프로파일을 생성시키고/시키거나 유지시키도록 GL-2045의 정제 및 여과에 최적화된다.

[0087] 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 단백질 A 칼럼을 이용하여 정제된다. 상기 기재된 바대로, 단백질 A 칼럼은 매우 비싸고, 상업적으로 실행 가능하게 되도록 상당한 회수가 재사용된다. 단백질 A 칼럼의 재사용은 단백질 결합능을 유지시키도록 단백질 A 칼럼의 "재생"을 필요로 한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "재생하는" 또는 "재생시킨다"는 용리 공정 동안 제거되지 않은 단백질 A 칼럼로부터의 비결합 단백질의 제거를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 칼럼은 제조사 지시에서 표시된 것보다 GL-2045 정제 동안 더 자주 또는 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질을 정제하기 위해 당해 분야에서 보통인 것보다 더 자주 재생되어야 한다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 칼럼은 제조사에 의해 추천된 것만큼 자주 적어도 2회 재생되어야 한다. 추가의 실시형태에서, 단백질 A 칼럼은 칼럼 위로 GL-2045 상청액의 각각의 연속 통과 회수 사이에 재생되어야 한다. 이러한 실시형태에서, 단백질 A 친화도 칼럼에 의한 GL-

2045의 정제는 단백질 A 칼럼으로부터 격렬히 결합된 GL-2045 다합체를 제거하기 위해 그리고 단백질 A 칼럼의 완전 결합능을 재생시키기 위해 높은 엄격한 재생 완충제의 사용을 필요로 한다. 바람직한 실시형태에서, 높은 엄격한 재생 완충제는 단백질 A 칼럼의 분해를 야기하지 않거나 칼럼의 아주 적은 분해와 연관된다. 몇몇 실시형태에서, 고도로 엄격한 재생 완충제는 가용성 염기를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 염기는 수산화나트륨(NaOH)이다. 몇몇 실시형태에서, 재생 완충제는 0.3M NaOH 초과의 NaOH 농도를 갖는다. 예를 들어, 높은 엄격한 재생 완충제는 0.35M 초과, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M, 0.8M, 0.9M, 1.0M 이상의 NaOH일 수 있다. 특히 실시형태, 재생 완충제 중의 NaOH의 농도는 0.5M NaOH이다.

[0088] 몇몇 실시형태에서, 단백질 A 친화도 칼럼으로부터의 GL-2045의 용리는 약물 물질로부터 GL-2045의 고분자량의 무질서한 응집체의 양을 제거하거나 감소시키도록 최적화된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 용리 구배(예를 들어, pH 용리 구배)에 의해 단백질 A 칼럼으로부터 용리된다.

[0089] 몇몇 실시형태에서, GL-2045에 대한 최적화된 하류 제조 방법은 친화도 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 친화도 크로마토그래피)에 의한 정제 및 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 칼럼으로부터 선택된 적어도 하나 이상의 연마 단계를 포함하는 다단계 정제 공정을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, GL-2045에 대한 4단계 정제 공정은 친화도 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 친화도 크로마토그래피)에 의한 정제 및 각각의 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 칼럼에 의한 연마를 포함하는 당해 분야에서 흔히 실행되는 2개 또는 3개의 단계 정제 공정 대신에 사용된다. 용어 "연마"는 전통적으로 응집체, 내독소, DNA, 및/또는 바이러스를 포함하는 남은 불순물의 단백질 A 정제 후 제거를 의미한다. 추가적으로, GL-2045와 관련하여, "연마"는 추가적으로 예컨대 이 동일한 크로마토그래피 기법의 사용을 통해 동종이합체 및 특정한 더 높은 차수의 다합체의 퍼센트를 제어하는 것을 의미한다.

[0090] 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 양이온 또는 음이온 교환)에 의해 연마된다. 몇몇 실시형태에서, 이온 교환 크로마토그래피에 의한 GL-2045의 연마는 단백질 A 정제 후 공정 동안 보유된 GL-2045 동종이합체의 무질서한 고분자량 응집체의 양을 감소시키고/시키거나 최소화하는 용리 완충제에 의해 수행된다. 몇몇 실시형태에서, 단계 용리는 단백질 A 칼럼으로부터 GL-2045를 용리시키도록 수행된다. 몇몇 실시형태에서, 구배 용리는 단백질 A 칼럼으로부터 GL-2045를 용리시키도록 수행된다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 아세트산나트륨 완충제이다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제 내의 아세트산나트륨의 농도는 적어도 25mM이다. 예를 들어, 용리 완충제 내의 아세트산나트륨의 농도는 아세트산나트륨의 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 100mM 이상일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 50mM 아세트산나트륨이다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 추가적인 염 완충제(예를 들어, NaCl 완충제)의 다양한 양의 첨가와 함께 50mM 아세트산나트륨이다. 몇몇 실시형태에서, 추가적인 완충제는 1M NaCl, pH 5 완충제("완충제 b")이다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 적어도 30%의 완충제 B를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 30% 내지 40%의 완충제 B를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 35% 내지 40%의 완충제 B를 포함한다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 용리 완충제는 37% 내지 39%의 완충제 B를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 용리 완충제는 38%±0.5%의 완충제 b이다.

[0091] 몇몇 실시형태에서, GL-2045는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 이용하여 연마된다. 몇몇 실시형태에서, HIC 칼럼(예를 들어, 옥틸 FF HIC 칼럼)은 GL-2045의 고분자량의 무질서한 응집체를 제거하도록 선택된다. 관류 방식 또는 결합 방식은 HIC 칼럼에 의해 GL-2045를 정제하도록 수행될 수 있다. 숙련된 당업자는 pH 및 염 조건과 같은 변수의 조정이 GL-2045가 HIC 수지에 결합하거나 칼럼을 통해 흐르는지를 결정한다는 것을 이해한다. 몇몇 실시형태에서, HIC 칼럼(예를 들어, 뷰틸 HP 및/또는 페닐 HP 칼럼)은 GL-2045의 특정한 분획, 예컨대 동종이합체 및/또는 더 높은 차수의 다합체를 정제하도록 선택된다. 몇몇 실시형태에서, 특정한 질환 적응증의 치료를 위해 GL-2045의 특정한 분획을 단리시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, HIC 칼럼은 특정한 GL-2045 분획으로 실질적으로 이루어진 약물 물질(예를 들어, GL-2045 동종이합체로 주로 이루어진 약물 물질, 동종이합체의 이합체로 주로 이루어진 약물 물질, GL-2045의 더 높은 차수의 다합체로 주로 이루어진 약물 물질 등)을 생성하도록 사용될 수 있다. 별개의 생성물으로의 GL-2045 분획의 분리는 소정의 질환 적응증에 유리할 수 있다. 예를 들어, GL-2045 동종이합체는 FcγRI에 결합하지만, 다른 FcR에 실질적으로 결합한다. 그러므로, GL-2045 동종이합체는 적어도 부분적으로 FcγRI 신호전달에 의해 매개되는 질환, 예컨대 복막염(Heller *et al.*, J. Immunol, V. 162, 1992) 또는 급성 폐 손상(Xie *et al*. J. Immunol., V 188, 2012)의 치료에 특히 유용할 수 있다. 유사하게, GL-2045의 삼합체, 및 잠재적으로 이합체 및 사합체는 자가면역 질환을 치료하는 데 특히 유용할 수 있다(WO 2015/168643 참조). C1q가 육합체이므로, 오합체, 육합체 및 칠합체는 보체 매개된 질환의 치료에서 특히 유용할 수 있다. 숙련된 당업자는 이들이 GL-2045 분획이 소정의 질환을 치료하기 위해 유리할

수 있다는 오직 몇몇 방식이라는 것을 인식할 것이다.

[0092] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 최적화된 하류 제조 방법은 개별 정제 및/또는 여과 기법의 조합일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 최적화된 하류 방법은 친화도 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 칼럼에 대한 최적화된 방법에 의한 정제)에 의한 GL-2045의 정제, 이어서 이온 교환 크로마토그래피 방법(예를 들어, 최적화된 양이온 교환 방법에 의한 연마) 및/또는 소수성 상호작용 칼럼에 의한 추가적인 연마를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 최적화된 하류 방법은 단백질 A, 양이온 교환, 음이온 교환 관류 및 소수성 상호작용 칼럼에 의한 정제를 포함하는 4단계 정제 공정을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 추가적인 심층 여과 및/또는 한외여과 단계를 또한 사용할 수 있다.

[0093] 따라서, 본 명세서에서 상호 교환되어 사용된 바와 같은, 용어 "최적 제조 방법" 또는 "최적화된 제조 방법"은 최적화된 상류 및/또는 최적화된 하류 제조 방법을 의미할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 최적화된 제조 방법은 최적화된 상류 및 하류 방법 둘 다를 포함한다. 그러므로, 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "최적으로 제조된 스트라도머" 또는 "최적으로 제조된 GL-2045"는 최적화된 상류 제조 조건 및/또는 최적화된 하류 제조 방법에 따라 제조된 높은 역가의 고차의 다합체 우세 GL-2045 조성물을 의미한다. 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물이 최적으로 제조된 GL-2045(즉, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 GL-2045)일 수 있지만, 당업자는 본 명세서에 기재된 한정된 다합체 패턴 내에 해당하는 GL-2045 조성물이 다른 수단에 의해 달성될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, "GL-2045 조성물" 또는 "재조합 GL-2045 조성물" 또는 "정제된 GL-2045 조성물"은, 조성물이 최적 제조 방법을 통해 제조되든 또는 아니든, GL-2045 약물 물질을 포함하는 GL-2045를 포함하는 조성물을 의미한다. 본 명세서에서, 용어 "다합체 패턴" 또는 "밴딩 패턴" 또는 임의의 유사한 용어는 상호 교환되어 사용되고, GL-2045 조성물의 분석 검정에서 관찰된 다합체의 패턴을 의미한다. 예시적인 다합체 패턴은 도 33에 도시되어 있다.

[0094] 몇몇 실시형태에서, 한정된 다합체 패턴을 갖는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "한정된 다합체 패턴" 또는 "한정된 다합체화 패턴" 또는 "한정된 밴딩 패턴"은 동종이합체, 더 높은 차수의 다합체, 및/또는 가장 높은 차수의 다합체로서 존재하는 전체 GL-2045 조성물의 백분율의 면에서 기재될 수 있고 재현 가능한 GL-2045 다합체화의 패턴을 의미한다. 당업자는 동종이합체의 절대 값 및/또는 다합체 백분율이 사용된 분석용 방법에 따라 변할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예로서, SDS-PAGE 겔의 디지털 소프트웨어 분석은 동일한 조성의 분석용 SEC-HPLC와 비교하여 약간 상이한 다합체 백분율을 생성시킬 것이다. 본 명세서에서 달리 기재되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물의 동종이합체 및 다합체의 백분율은 분석용 SEC-HPLC 방법에 의해 측정된 백분율로서 표시된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 80%가 비동종이합체 또는 "다합체"(예를 들어, 동종이합체의 이합체, 동종이합체의 삼합체 등)로서 존재하는, 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 80% 초과는 다합체로서 존재한다. 예를 들어, 최적화된 제조 방법, 예컨대 본 명세서에 기재된 것은 GL-2045의 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 이것 초과가 다합체로서 존재하는 GL-2045 단백질 조성물을 생성시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, GL-2045의 적어도 30%는 동종이합체의 7합체 및 이것 초과로 본 명세서에서 정의된 "가장 높은 차수의 다합체"로서 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 이하 재조합으로 제조된 GL-2045의 40%는 가장 높은 차수의 다합체로서 존재한다. 당업자는 또한, 본 발명자들이 "밴드" 또는 "분획"에 대해 이야기할 때, 달리 기재되지 않는 한, 밴드의 수가 분획에 존재하는 동종이합체의 수를 내포한다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 예를 들어 밴드 2는 동종이합체의 이합체를 포함하는 한편, 밴드 3은 동종이합체의 삼합체를 포함한다. 따라서, 예를 들어 밴드 2는 동종이합체의 이합체를 포함하고, 밴드 3은 동종이합체의 삼합체를 포함하고, 밴드 4는 동종이합체의 사합체를 포하하고, 기타 등등이다.

[0095] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "더 높은 차수의 다합체"는 동종이합체의 삼합체 및 이것 초과(즉, 분획 3에 존재하는 다합체 및 이것 초과)를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "가장 높은 차수의 다합체"는 분획 7에서의 다합체 및 이것 초과, 또는 동종이합체의 7합체 및 이것 초과를 포함하는 분획을 의미한다.

[0096] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획이 전체 조성물의 약 20% 미만을 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 12% 내지 약 19%, 약 14% 내지 약 19%, 약 15.5% 내지 약 17.5%, 또는 약 14% 내지 약 18.5%를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 15.9% 또는 약 16.2%를 차지한다.

[0097] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 이합체 분획이 전체 조성물의 약 7% 내지 약 13%, 약 7% 내지 약 12.5%, 약

7% 내지 약 12%, 약 9% 내지 약 11%, 또는 약 9.1% 내지 약 11.7%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 이합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 10% 또는 약 10.6%를 차지한다.

[0098] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 삼합체 분획이 전체 조성물의 약 5.5% 내지 약 11%, 약 5.5% 내지 약 10%, 또는 약 6.5% 내지 약 8%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 삼합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 7% 또는 약 7.3%를 차지한다.

[0099] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 사합체 분획이 전체 조성물의 약 10% 내지 약 16%, 약 11% 내지 약 16%, 약 13% 내지 약 15%, 또는 약 12.4% 내지 약 15.1%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 사합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 14% 또는 약 14.3%를 차지한다.

[0100] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 오합체 분획이 전체 조성물의 약 6% 내지 약 9%, 약 7% 내지 약 8%, 또는 약 7.1% 내지 약 8.2%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 오합체 분획의 이합체는 전체 단백질 조성물의 약 7% 또는 약 7.5%를 차지한다.

[0101] 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 10% 내지 약 14%, 약 12% 내지 약 13%, 또는 약 12.1% 내지 약 13.2%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체의 육합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 12.7% 또는 약 12.6%를 차지한다.

[0102] 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획이 전체 조성물의 적어도 약 28%를 차지하는 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 35% 이하를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 30% 내지 약 34%, 또는 약 28.6% 내지 약 35.1%를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 가장 높은 차수의 다합체 분획은 전체 단백질 조성물의 약 31.4% 또는 약 31.9%를 차지한다. 몇몇 실시형태에서, 동종이합체 분획이 전체 조성물의 약 20% 미만을 차지하거나; 가장 높은 차수의 다합체 분획이 전체 조성물의 적어도 약 28%를 차지하거나; 동종이합체의 이합체 분획이 전체 조성물의 약 7% 내지 약 13%를 차지하거나; 동종이합체의 삼합체 분획이 전체 조성물의 약 5% 내지 약 11%를 차지하거나; 동종이합체의 사합체 분획이 전체 조성물의 약 10% 내지 약 16%를 차지하거나; 동종이합체의 오합체 분획이 전체 조성물의 약 6% 내지 약 10%를 차지하거나; 동종이합체의 육합체 분획이 전체 분획의 약 10% 내지 약 14%를 차지하거나; 동종이합체의 이합체 내지 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 40% 내지 약 60%를 차지하거나; 동종이합체의 삼합체 내지 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 32% 내지 약 50%를 차지하거나; 동종이합체의 사합체 내지 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 30% 내지 약 37%를 차지하거나; 동종이합체의 오합체 내지 동종이합체의 육합체 분획이 전체 조성물의 약 18% 내지 약 23%를 차지하거나; 또는 상기의 임의의 조합인, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다.

[0103] 몇몇 실시형태에서, 전체 GL-2045 조성물의 대략 80%가 동종이합체의 이합체 및 이것 초과(즉, 밴드 2 및 이것 초과)를 포함하는, 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 전체 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물의 대략 60% 내지 80%, 62% 내지 80% 또는 60% 내지 78%는 동종이합체의 삼합체 및 이것 초과(즉, 밴드 3 및 이것 초과)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 전체 재조합으로 제조된 GL-2045 조성물의 약 54% 내지 76%, 약 54% 내지 72%, 약 56% 내지 76% 또는 약 54% 내지 67%는 사합체 및 이것 초과(즉, 밴드 4 및 이것 초과)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 전체 조성물의 대략 44% 내지 60%, 44% 내지 57% 또는 44% 내지 51%가 오합체 및 이것 초과(즉, 밴드 5 및 이것 초과)를 포함하는, GL-2045 조성물이 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 전체 조성물의 대략 38% 내지 51%가 육합체 및 이것 초과(즉, 밴드 6 및 이것 초과)를 포함하는, GL-2045 조성물이 제공된다.

[0104] 몇몇 실시형태에서, 조성물의 밴드 2 내지 6(즉, 동종이합체의 이합체 내지 동종이합체의 육합체)이 조성물의 약 39% 내지 61% 또는 약 44% 내지 60%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 조성물의 밴드 3 내지 6(즉, 동종이합체의 삽합체 내지 동종이합체의 육합체)이 조성물의 약 32% 내지 50% 또는 약 35% 내지 48%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 조성물의 밴드 4 내지 6(즉, 동종이합체의 사합체 내지 동종이합체의 육합체)이 조성물의 약 26% 내지 39% 또는 약 30% 내지 39%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다. 몇몇 실시형태에서, 조성물의 밴드 5 내지 6(즉, 동종이합체의 오합체 내지 동종이합체의 육합체)이 조성물의 약 16% 내지 23% 또는 약 18-23%를 차지하는, 재조합으로 제조된 GL-2045가 제공된다.

[0105] 이론에 구속됨이 없이, 저친화도 Fc 수용체 및 C1q에 결합하는 데 있어서 GL-2045의 가장 덜 활성인 성분은 동

종이합체 및 동종이합체의 이합체이다. 숙련된 당업자는 최종 생성물 내의 동종이합체 또는 동종이합체 및 이합체의 양을 감소시키기 위해 본 명세서에 기재된 최적화된 크로마토그래피 방법 또는 유사한 정제 기법을 이용할 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 숙련된 당업자는 따라서 그렇게 하는 것이 본 명세서에 개시된 다합체의 백분율을 변경할 것이라는 것을 알 것이다. 예로서, 상기의 일반성을 제한하지 않으면서, 숙련된 당업자가 정제 공정에서 동종이합체의 50%, 또는 동종이합체 및 이합체를 제거하려는 경우, 각각의 남은 다합체(즉, 삼합체, 사합체, 오합체, 육합체, 7합체 등)의 백분율이 상응하게 증가할 것이다. 동종이합체의 90% 및 이합체의 50%의 제거는 최종 생성물에 존재하는 전체 단백질을 대략 20%±5% 감소시킬 것이고, 전체 단백질의 퍼센트로서 표시된 삼합체, 사합체, 오합체, 육합체 및 7합체의 백분율을 따라서 증가시킬 것이다.

[0106] 더욱이, 당업자는 본 크로마토그래피 기법이, 약간의 정도로, 인접한 밴드, 예컨대 육합체 및 더 적은 정도로, 오합체를 동시에 제거하면서, 단일의 다합체 밴드, 예컨대 가장 높은 차수의 다합체의 제거 또는 감소를 일반적으로 허용하지 않는다는 것을 추가로 인식할 것이다. 따라서, 숙련된 당업자는 가장 높은 차수의 다합체의 제거 또는 감소의 결과로서 임의의 소정의 다합체 또는 동종이합체의 백분율의 관찰된 보정적인 증가가 소정의 다합체가 제거된 GL-2045의 분획으로부터인 것보다 훨씬 더 높은 정도로 증가할 것이라는 것을 알 것이다(예를 들어, 동종이합체의 백분율은 가장 높은 차수의 다합체가 제거되거나 감소될 때 육합체에 대해 관찰된 증가된 백분율보다 높은 정도로 증가할 것이다). 임의의 경우에, 남은 다합체의 다합체 백분율의 누적 증가는, 분석용 방법에 기인한 약간의 가변성으로 처리된, 제거된 분획에 대한 다합체 퍼센트와 동일해야 한다.

[0107] ***약제학적 조성물***

[0108] 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물의 투여는 임의의 흔한 경로를 통해, 경구, 비경구 또는 국소에 의할 수 있다. 예시적인 경로는 경구, 비강, 협측, 직장, 질내, 눈, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 동맥내, 종양내, 척추, 청추강내, 관절내, 동맥내, 지주막하, 설하, 경구 점막, 기관지, 림프, 자궁내, 피하, 종양내, 이식 가능한 장치, 예컨대 봉합사에서 또는 이식 가능한 장치, 예컨대 이식형 중합체에서 일체형, 경막내, 피질내 또는 진피를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 약제학적으로 허용 가능한 조성물로서 보통 투여될 것이다. 바람직한 실시형태에서, 단리된 최적으로 제조된 스트라도머는 정맥내 또는 피하로 투여된다.

[0109] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항세균제, 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 물질의 용도는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 관습적인 매질 또는 물질이 본 발명의 벡터 또는 세포와 적합하지 않는 한을 제외하고, 치료학적 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 보충적 활성 성분은 또한 조성물로 도입될 수 있다.

[0110] 본 발명의 GL-2045 조성물은 천연 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 염은 무기 산, 예를 들어 염산 또는 인산 등, 또는 유기 산, 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등에 의해 형성된 (단백질의 유리 아미노기에 의해 형성된) 산 부가염을 포함한다. 유리 카복실기에 의해 형성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화3가철 등, 및 유기 염기, 예를 들어 아이소프로필아민, 트라이메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래될 수 있다.

[0111] 무균 주사용 용액은 필요한 바대로 상기 열거된 다양한 다른 성분의 적절한 용매 중에 필요한 양의 최적으로 제조된 GL-2045를 도입한 후 무균 여과시킴으로써 제조된다. 몇몇 실시형태에서, 무균 주사용 용액은 근육내, 피하 또는 정맥내 투여를 위해 제제화된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 무균 비히클로 다양한 살균된 활성 성분을 도입함으로써 제조된다. 무균 주사용 용액의 제제를 위한 무균 분말의 경우에, 제조의 바람직한 방법은 이의 이전에 무균 여관된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결 건조 기법이다.

[0112] 추가로, 하나의 실시형태는 경구 투여에 적합한 GL-2045 조성물이고, 불활성 희석제와 함께 또는 이것 없이 약제학적으로 허용 가능한 담체에서 제공된다. 담체는 동화 가능 또는 식용이어야 하고, 액체, 반고체(예를 들어, 페이스트) 또는 고체 담체를 포함한다. 임의의 관습적인 매질, 물질, 희석제 또는 담체가 여기에 함유된 최적으로 제조된 스트라도머 제제의 치료학적 유효성 또는 수혜자에게 해롭지 않는 한을 제외하고, 본 발명의 방법을 실행하는 데 사용하기 위한 경구로 투여 가능한 최적으로 제조된 스트라도머 조성물에서의 이의 용도는 적절하다. 담체 또는 희석제의 예는 지방, 오일, 물, 식염수 용액, 지질, 리포솜, 수지, 결합제, 충전제 등, 또는 이들의 조합을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "경구 투여"는 경구, 협측, 장관 또는 위내 투여를 포함한다.

[0113] 일 실시형태에서, GL-2045 조성물은 임의의 편리하고 실용적인 방식으로, 즉 용해, 현탁, 유화, 혼합, 캡슐화, 마이크로캡슐화, 흡수 등에 의해 담체와 조합될 수 있다. 이러한 절차는 당업자에게 일상적이다.

[0114] 구체적인 실시형태에서, 분말 형태의 GL-2045 조성물은 반고체 또는 고체 담체와 완전히 조합되거나 혼합된다. 혼합은 임의의 편리한 방식으로, 예컨대 분쇄에 의해 수행될 수 있다. 안정화제는 (예를 들어, 위에서의 변성을 통해) 치료학적 활성의 손실로부터 조성물을 보호하도록 혼합 공정에서 또한 첨가될 수 있다. 경구로 투여 가능한 조성물에서 사용하기 위한 안정화제의 예는 완충제, 위산의 분비에 대한 길항제, 아미노산 예컨대 글라이신 및 라이신, 탄수화물, 예컨대 덱스트로스, 만노스, 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 수크로스, 말토스, 소르비톨, 만니톨 등, 단백질분해 효소 저해제 등을 포함한다. 더 바람직하게는, 경구로 투여된 조성물의 경우, 안정화제는 위산의 분비에 대한 길항제를 또한 포함할 수 있다.

[0115] 추가로, 반고체 또는 고체 담체와 조합되는 경구 투여를 위한 GL-2045 조성물은 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐, 정제 또는 환제로 추가로 제제화될 수 있다. 더 바람직하게는, 젤라틴 캡슐, 정제 또는 환제는 장용 코팅될 수 있다. 장용 코팅은 pH가 산성인 위 또는 대장에서 조성물의 변성을 방지한다. 미국 특허 제5,629,001호를 참조한다. 소장에 도달 시, 여기서의 염기성 pH는 코팅을 용해시키고 조성물이 방출되어 장 세포, 예를 들어 파이에르 패치 M 세포(Peyer's patch M cell)와 상호작용하게 한다.

[0116] 또 다른 실시형태에서, 분말 형태의 GL-2045 조성물은 면역학적 활성 생물모방체를 캡슐화하는 나노입자를 생성하거나 면역학적 활성 생물모방체가 부착된 재료와 완전히 조합되거나 혼합된다. 각각의 나노입자는 100마이크론 이하의 크기를 가질 것이다. 나노입자는 달리 경구로 생체 이용 가능하지 않은 면역학적 활성 생물모방체의 위장 흡수를 허용하는 점막접착 특성을 가질 수 있다.

[0117] 또 다른 실시형태에서, 분말화된 조성물은 안정화제에 의해 또는 이것 없이 액체 담체, 예컨대 물 또는 식염수 용액과 조합된다.

[0118] 사용될 수 있는 특정한 GL-2045 제제는 칼륨을 함유하지 않는 저장성 포스페이트계 완충제 중에 면역학적 활성 생물모방체 단백질의 용액이고, 여기서 완충제의 조성은 하기와 같다: 6mM 인산나트륨 일염기성 1수화물, 9 mM 인산나트륨 이염기성 6수화물, 50mM 염화나트륨(pH 7.0±0.1). 저장성 완충제 중의 면역학적 활성 생물모방체 단백질의 농도는 10㎍/㎖ 내지 100㎎/㎖의 범위일 수 있다. 이 제제는 임의의 투여 경로, 예를 들어 정맥내 투여(이들로 제한되지는 않음)를 통해 투여될 수 있다.

[0119] 추가로, 반고체 담체와 조합되는 국소 투여를 위한 GL-2045 조성물은 크림 또는 겔 연고로 추가로 제제화될 수 있다. 겔 연고의 형성을 위한 바람직한 담체는 겔 중합체이다. 본 발명의 겔 조성물을 제조하기 위해 사용된 바람직한 중합체는 카보폴, 카복시메틸-셀룰로스 및 플루로닉 중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 구체적으로, 분말화된 Fc 다합체 조성물은 피부에서의 또는 피부 밑의 질환의 치료를 위해 피부에 도포하기 위한 0.5% 내지 5중량%/용적의 농도에서 Carbopol 980과 같은 중합 물질을 함유하는 수성 겔과 조합된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "국소 투여"는 진피, 상피, 피하 또는 점막 표면에 대한 도포를 포함한다.

[0120] 추가로, GL-2045 조성물은 피하 또는 피하 이식을 위해 중합체로 제제화될 수 있다. 이식형 약물 점적주사된 중합체에 대한 바람직한 제제는 일반적으로 안전하다고 간주되는(Generally Regarded as Safe) 물질이고, 예를 들어 가교결합된 덱스트란(Samantha Hart, Master of Science Thesis, "Elution of Antibiotics from a Novel Cross-Linked Dextran Gel: Quantification" Virginia Polytechnic Institute and State University, June 8, 2009), 덱스트란-타이라민(Jin, *et al*. (2010) Tissue Eng. Part A. 16(8):2429-40), 덱스트란-폴리에틸렌 글라이콜(Jukes, *et al*. (2010) Tissue Eng. Part A., 16(2):565-73) 또는 덱스트란-글루타르알데하이드(Brondsted, *et al*. (1998) J. Controlled Release, 53:7-13)를 포함할 수 있다. 당업자는 많은 유사한 중합체 및 하이드로겔이 중합체 또는 하이드로겔 내에 고정된 스트라도머를 도입하고 원하는 직경으로 기공 크기를 제어함으로써 형성될 수 있다는 것을 알 것이다.

[0121] 조제 시, 용액은 투여량 제제와 상용성인 방식으로 및 증상의 개선 또는 관해를 발생시키기에 치료학적으로 효과적인 양으로 투여된다. 제제는 다양한 투여형, 예컨대 섭취용 용액, 약물 방출 캡슐 등에서 용이하게 투여된다. 치료되는 대상체의 병태에 따라 투약량의 약간의 변동이 생길 수 있다. 투여를 책임지는 사람은 임의의 사건에서 개별 대상체에 대한 적절한 용량을 결정할 수 있다. 더구나, 인간 투여를 위해, 제제는 FDA 생물학 평가 조사 표준 센터(FDA Center for Biologics Evaluation and Research standards)가 요구되는 바와 같은 무효, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 만족시킨다.

[0122] 투여 경로는 치료되는 질환의 위치 및 성질에 의해 자연히 변할 것이고, 예를 들어 피내, 경피, 진피하,

비경구, 비강, 정맥내, 근육내, 비강내, 피하, 피부경유, 기관내, 복강내, 종양내, 관류, 세척, 직접 주사, 직장내 및 경구 투여를 포함할 수 있다.

[0123] 일 실시형태에서, GL-2045 조성물은 정맥내, 피하로, 경구로, 복강내로, 설하로, 협측으로, 경피로, 직장으로, 피하 이식에 의해 또는 근육내 투여된다. 특정한 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 정맥내, 피하로 또는 근육내 투여된다. 일 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 약 0.005㎎/㎏ 내지 약 1000㎎/㎏의 용량으로 투여된다. 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 약 0.01㎎/㎏ 내지 약 100㎎/㎏으로 투여된다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 약 0.1㎎/㎏ 내지 약 20㎎/㎏으로 투여된다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 약 1㎎/㎏ 내지 약 10㎎/㎏으로 투여된다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 약 2㎎/㎏ 내지 약 5㎎/㎏으로 투여된다. 최적으로 제조된 스트라도머는 적어도 1일 1회, 주마다, 2주마다, 달마다 또는 때때로 더 긴 간격으로 투여될 수 있다. 이상성 투약량 섭생이 사용될 수 있고, 여기서 제1 투약량 단계는 제2 투약량 단계의 약 0.1% 내지 약 300%를 포함한다.

[0124] 추가의 실시형태에서, GL-2045 조성물은 하나 이상의 추가적인 약제학적 및/또는 치료학적 물질의 투여 전에, 동안에 또는 후에 투여된다. 추가의 실시형태에서, 추가적인 약제학적 활성 물질은 스테로이드; 생물학적 항-자가면역 약물, 예컨대 단일클론 항체, 융합 단백질 또는 항-사이토카인; 비생물학적 항-자가면역 약물; 면역억제제; 항생제; 및 항바이러스제; 사이토카인; 또는 달리 면역조정제로서 작용할 수 이는 물질을 포함한다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 스테로이드는 프레드니손, 프레드니솔론, 코티손, 덱사메타손, 모메타손 테스토스테론, 에스트로겐, 옥산드롤론, 플루티카손, 부데소나이드, 베클라메타손, 알부테롤 또는 레발부테롤이다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 단일클론 항체는 에쿨리주맙, 오크렐리주맙, 인플릭시맙, 아달리무맙, 리툭시맙, 토실리주맙, 골리무맙, 오파투무맙, LY2127399, 벨리무맙, 벨투주맙, 메폴리주맙, 네시투무맙, 니볼루맙, 디누툭시맙, 세쿠키누맙, 에볼로쿠맙, 블리나투모맙, 펨브롤리주맙, 라무시루맙, 베돌리주맙, 실툭시맙, 오비누투주맙, 아도트라스투주맙, 락시바쿠맙, 페르투주맙, 브렌툭시맙, 이필루무맙, 데노수맙, 카나키누맙, 우스테키누맙, 카투막소맙, 라니비주맙, 파니투무맙, 나탈리주맙, 베바시주맙, 세툭시맙, 에팔리주맙, 오말리주맙, 토이투모맙-I131, 알렘투주맙, 겜투주맙, 트라스투주맙, 팔리비주맙, 바실릭수맙, 달리주맙, 압식시맙, 무로노모맙, 베도틴, 이브리투모맙 티욱세탄, 모타비주맙 또는 세르톨리주맙이다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 융합 단백질은 에타네르셉트 또는 아바타셉트이다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 항-사이토카인 생물제는 아나킨라. 훨씬 추가의 실시형태에서, 항-류마티스 비생물학적 약물은 사이클로포스파마이드, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 하이드록시클로로퀸, 레플루노마이드, 미노사이클린, 유기 금 화합물, 포스타마티닙, 토파시티닙, 에토리콕시브 또는 설파살라진이다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 면역억제제는 사이클로스포린 A, 타크롤리무스, 시롤리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 에버롤리무스, OKT3, 항흉선세포 글로불린, 바실릭시맙, 다클리주무맙 또는 알렘투주맙이다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 화학치료제의 투여 전에, 동안에 또는 후에 투여된다. 훨씬 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머 및 추가적인 치료학적 물질은 함께 투여될 때 치료학적 시너지를 나타낸다. 일 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 추가적인 치료학적 물질의 투여 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 추가적인 치료학적 물질의 투여와 동시에 투여된다. 훨씬 또 다른 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 추가적인 치료학적 물질의 투여 후에 투여된다.

[0125] 일 실시형태에서, GL-2045 조성물은 이식형 장치에 공유로 고정되어 투여된다. 일 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 봉합사에 고정된다. 또 다른 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 이식편 또는 스텐트에 고정된다. 또 다른 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 심장 판막, 정형외과 관절 대체 또는 이식된 전자 리드에 고정된다. 또 다른 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 이식 가능한 매트릭스에 고정되거나 이것 내에 임베딩된다. 바람직한 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 이식 가능한 하이드로겔에 고정되거나 이것 내에 임베딩된다. 일 실시형태에서, 하이드로겔은 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 나트륨 폴리아크릴레이트 또는 아크릴레이트 중합체로 이루어진다. 추가의 실시형태에서, 최적으로 제조된 스트라도머는 면역 세포의 진입이 고정된 스트라도머와 상호작용하고 이후 순환으로 돌아가게 하기에 충분히 큰 기공 크기를 갖는 하이드로겔에서 고정되어 투여된다. 추가의 실시형태에서, 하이드로겔의 기공 크기는 5 내지 50마이크론이다. 바람직한 실시형태에서, 하이드로겔의 기공 크기는 25 내지 30마이크론이다.

[0126] 또 다른 실시형태에서, GL-2045 조성물은 종 특이적 또는 키메라 스트라도머 분자에 의해 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 개코원숭이 및 침팬지), 마우스, 래트, 소, 말, 고양이, 개, 돼지, 토끼, 염소, 사슴, 양, 페릿, 게르빌루스쥐, 기니아 피그, 햄스터, 박쥐, 조류(예를 들어, 닭, 칠면조 및 오리), 어류, 및 파충류를 치료하기 위해 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 인간은 성인 또는 어린이이다. 훨씬 또 다른 실시형태에서, 최적

으로 제조된 스트라도머는 보체 매개된 질환을 예방하도록 투여된다. 추가의 실시형태에서, 스트라도머는 반려동물 및 가축에서 백신 연관된 자가면역 병태를 예방하도록 투여된다.

[0127] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "비경구 투여"는 장을 통한 흡수를 수반하지 않으면서 화합물이 대상체에게 흡수되는 임의의 투여 형태를 포함한다. 본 발명에서 사용된 예시적인 비경구 투여는 피하, 근육내, 정맥내, 복강내, 종양내, 눈내, 비강 또는 관절내 투여를 포함하지만, 이들로 제한하지는 않는다.

[0128] 또한, 본 발명의 GL-2045 조성물은 또 다른 약제학적 물질 전에, 동안에 또는 후에 임의로 투여될 수 있다.

[0129] 구체적인 예시적인 질환에 대해 표시된 바와 같은 다양한 약제학적 제제 카테고리 및 바람직한 투여 경로의 특정한 예는 하기에 있다:

[0130] 협측 또는 설하 용해성 정제: 협심증, 결절성 다발동맥염.

[0131] 정맥내, 근육내, 또는 피하: 중증 근무력증, 용혈 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome: HUS), 비정형 용혈 요독 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS), 발작성 야간 혜모글로빈뇨(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: PNH), 막성 신장병증, 시신경 척수염, 동종이식편의 항체 매개된 거부, 루푸스 신염, 막성증식성 사구체신염(membranoproliferative glomerulonephritis: MPGN), 특발성 혈소판감소성 자반증, 봉입체 근염, 파라단백혈증 IgM 탈수초성 다발성 신경병증, 괴사 근막염, 천포창, 괴저, 피부근육염, 육아종, 림프종, 패혈증, 재생불량성 빈혈, 다발성 장기 부전, 다발성 골수종, 미분류의 단일클론 감마글로불린병증, 만성 염증성 탈수초 다발신경근병증, 염증성 근병증, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 근염, 빈혈, 신생물, 용혈성 빈혈, 뇌염, 척수염, 특히 인간 T 세포 림프친화성 바이러스-1과 연관된 척수병증, 백혈병, 다발성 경화증 및 시신경염, 천식, 표피 괴사용해, 이튼-람베르트 근무력증 증후군(Eaton-Lambert myasthenic syndrome), 신경병증, 포도막염, 갈랑 바레 증후군, 이식편 대 숙주 질환, 강직 인간 증후군, 항-Yo 항체를 갖는 방종양 소뇌 변성, 항-Hu 항체를 갖는 방종양 뇌척수염 및 감각 신경병증, 전신 혈관염, 전신 홍반 루푸스, 자가면역 당뇨병성 신경병증, 급성 특발성 자율신경실조 신경병증, 보그트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome), 다초점 운동 신경병증, 항-/GM1과 연관된 하부 운동 뉴런 증후군, 탈수초, 막성증식성 사구체신염, 심근병증, 가와사키병, 류마티스성 관절염 및 에반 증후군, CIDP, MS, 피부근육염, 근육 위축증. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "정맥내 투여"는 정맥내 주사 또는 점적주사를 통해 본 발명의 화합물 또는 조성물을 전신 순환으로 전달하는 모든 기법을 포함한다.

[0132] 진피 겔, 로션, 크림 또는 패치: 백반증, 대상포진, 여드름, 순염.

[0133] 직장 좌제, 겔 또는 점적주사: 궤양성 결장염, 치질성 염증.

[0134] 환제로서의 경우, 트로키, 캡슐화된 또는 장용 코팅에 의한: 크론씨병, 비열대성 스프루, 자극성 장 증후군, 염증성 간 질환, 바렛 식도.

[0135] 피질내: 뇌전증, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 파킨슨병, 헌팅턴병.

[0136] 복부내 점적주사 또는 임플란트: 자궁내막증.

[0137] 의학 장치: 관상 동맥 스텐트, 보철 관절에 코팅.

[0138] ***최적으로 제조된 GL-2045의 치료학적 용도***

[0139] 일 실시형태에서, 질환 또는 병태, 예컨대 자가면역 질환, 염증성 질환 또는 보체 매개된 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다.

[0140] 합리적인 설계 및 시험관내 및 생체내 검증에 기초하여, 본 발명의 최적으로 제조된 GL-2045는 염증성 질환 및 장애를 치료하는 것에 대해, 그리고 다양한 다른 맥락, 예컨대 알레르기, 암, 자가면역 질환, 감염성 질환 및 염증성 질환에 대한 생물면역치료에서 면역 기능을 변경하는 것에 대해 중요한 바이오의약품으로서 작용할 것이다. 본 명세서에 개시된 최적으로 제조된 면역학적 활성 GL-2045에 의한 치료에 적합한 의학 병태는 증가된 또는 비적절한 보체 활성을 포함하는 보체 활성화 또는 보체 매개된 효과기 기능에 의해 생기거나 이와 연관된 임의의 질환을 포함한다. 이러한 의학 병태는 보체 결합 약물, 예컨대 에쿨리주맙에 의해 현재 치료되거나 이전에 치료된 것을 포함한다. 에쿨리주맙은 보체 단백질 C5(전통적인 보체 경로에서 C1 및 C1q의 하류인 보체 단백질)에 결합하여서, 이의 절단 및 후속하는 보체 매개된 세포 용해를 저해한다. 본 발명의 생물모방체는 당해 분야에 공지된 다른 보체 결합 약물에 안전하고 효과적인 대안을 제공한다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 생물모방체는 전통적인 보체 경로의 C1 복합체에서 제1 하위단위인 C1q에 결합한다. 최적으로 제조된 면역

학적 활성 스트라도머에 의한 치료에 적합한 의학 병태는 중증 근무력증, 용혈 요독 증후군(HUS), 비정형 용혈 요독 증후군(aHUS), 발작성 야간 혜모글로빈뇨(PNH), 막성 신장병증, 시신경 척수염, 동종이식편의 항체 매개된 거부, 루푸스 신염, 황반 변성, 겸상 세포 질환 및 막성증식성 사구체신염(MPGN)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 기재된 최적으로 제조된 면역학적 활성 GL-2045에 의한 치료에 적합한 추가적인 의학 병태는 hIVIG를 포함하는 광범위하게 면역 억제 치료제에 의해 현재 일상적으로 치료되거나, hIVIG가 임상적으로 유용한 것으로 발견된 것, 예컨대 자가면역 혈구감소증, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 갈랑 바레 증후군, 중증 근무력증, 항-VIII 인자 자가면역 질환, 피부근육염, 혈관염 및 포도막염(문헌[F. G. van der Meche et al., N. Engl. J. Med. 326, 1123 (1992); P. Gajdos *et al*, Lancet i, 406 (1984); Y. Sultan, M. et al, Lancet ii, 765 (1984); M. C. Dalakas *et al*., N. Engl. J. Med. 329, 1993 (1993); D. R. Jayne et al., Lancet 337, 1137 (1991); P. LeHoang, et al., Ocul. Immunol. Inflamm. 8, 49 (2000)] 참조) 및 단일클론 항체가 임상 용도에서 사용될 수 있거나 이미 사용되는 암 또는 염증성 질환 병태를 포함한다. 본 발명의 대상인 화합물에 의해 효과적으로 치료될 수 있는 것 중에 포함된 병태는 사이토카인 네트워크의 불균형을 갖는 염증성 질환, 병원성 자가항체 또는 자가공격적 T 세포에 의해 매래된 자가면역 장애, 또는 만성 재발성 자가면역, 염증성 또는 감염성 질환 또는 과정의 급성 또는 만성 단계를 포함한다.

[0141] 또한, 보체를 수반하는 염증성 성분을 갖는 다른 의학 병태, 예컨대 천식, 홍반 루푸스, 사구체신염, 사구체 신장병증, 관절염, 자가항체 매개된 질환, 예를 들어 자가면역 용혈성 빈혈 및 자가면역 심장 질환, 다발성 경화증, 근위축성 측색 경화증, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 염증성 장 질환, 발작성 야간 혈색뇨, 비정형 용혈 요독 증후군, 예로서 심근 경색, 척수 손상 및 뇌졸중을 포함하는 허혈-재관류 손상, 이식된 장기 또는 혈액의 거부, B형 간염, C형 간염, 인간 면역결핍 바이러스 연관된 염증, 부신백질이영양증, 및 간질 장애, 특히 라쉬무센 증후군(Rasmussen Syndrome), 웨스트 증후군(West Syndrome) 및 레녹스-가스토 증후군(Lennox-Gastaut Syndrome)을 포함하는 바이러스 후 뇌염과 연관된 것으로 생각되는 것은 GL-2045 조성물에 의한 치료로부터 이익일 것이다.

[0142] 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물을 사용한 치료에 대한 일반적인 접근법은 치료를 가져오는 GL-2045 조성물의 치료학적 유효량을 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여하는 것이다. 몇몇 실시형태에서, 질환 또는 병태는 광범위하게 사이토카인 네트워크의 불균형을 갖는 염증성 질환, 병원성 자가항체 또는 자가공격적 T 세포에 의해 매개된 자가면역 장애, 또는 만성 재발성 질환 또는 과정의 급성 또는 만성 단계로 분류될 수 있다.

[0143] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료하는" 및 "치료"는 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하여서 대상체가 질환 또는 병태, 또는 질환 또는 병태의 증상의 개선을 갖는 것을 의미한다. 개선은 질환 또는 병태, 또는 질환 또는 병태의 증상의 임의의 개선 또는 교정이다. 개선은 관찰 가능하거나 측정 가능한 개선이거나, 일반적으로 대상체의 웰빙의 느낌의 개선일 수 있다. 따라서, 당업자는 치료가 질환 병태를 개선할 수 있지만, 질환에 대한 완전한 치유가 아닐 수 있다는 것을 인식한다. 구체적으로, 대상체에서의 개선은 염증의 감소; 염증성 실험실 마커, 예컨대 C-반응성 단백질의 감소; 자가면역 마커, 예컨대 자가항체 또는 혈소판 수, 백혈구 수 또는 적혈수 수의 개선 중 하나 이상에 의해 입증된 바대로 자가면역의 감소, 발진 또는 자반증의 감소, 허약, 저림 또는 두근거림의 감소, 고혈당증을 갖는 환자에서의 당 수치의 증가, 관절 통증, 염증, 종창 또는 저하의 감소, 경련 및 설사 빈도 및 용적의 감소, 협심증의 감소, 조직 염증의 감소 또는 발작 빈도의 감소; 암 종양 부담의 감소, 종양 진행까지의 시간의 증가, 암 통증의 감소, 생존의 증가 또는 삶의 질의 개선; 또는 골다공증의 진행의 지연 또는 개선 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0144] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료학적 유효량"은 질환 또는 병태의 증상의 개선 또는 교정을 발생시키는 양을 의미한다. 당업자는 본 명세서에서 제조된 GL-2045의 치료학적 유효량이 최종 약물 물질에 따라 달라질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 예를 들어 모든 더 낮은 차수의 다합체를 제거하고자 할 때, 생성된 더 높은 차수의 다합체의 감소된 용량이 필요할 수 있다는 것이 고안 가능하다. 그러므로, GL-2045의 하나 초과의 "치료학적 유효 용량"이 존재한다.

[0145] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "예방책"은 질환의 증상의 완전한 예방, 질환의 증상의 발병의 지연 또는 후속하여 발생한 질환 증상의 중증도의 경감을 의미할 수 있다.

[0146] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 투여되는 임의의 포유류 대상체를 의미하도록 취해진다. 구체적인 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 인간 대상체를 치료하기 위해 사용된다. 본 개시내용의 방법은 종 특이적 또는 키메라 스트라도머 분자를 제조하기 위해 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 개코원숭이 및 침팬지), 마우스, 래트, 소, 말, 고양이, 개,

돼지, 토끼, 염소, 사슴, 양, 페릿, 게르빌루스쥐, 기니아 피그, 햄스터, 박쥐, 조류(예를 들어, 닭, 칠면조 및 오리), 어류, 및 파충류를 치료하기 위해 또한 사용될 수 있다.

[0147] 보체 저해는 항체 매개된 질환을 감소시키는 것으로 입증되었다(예를 들어, 문헌[Stegall *et al.*, American Journal of Transplantation 2011 Nov; 11(1):2405-2413-Epub 2011 Sept 22] 참조). 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머는 또한 항체 매개된 질환 또는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 자가항체는 많은 공지된 자가면역 질환을 매개하고, 많은 다른 자가면역 질환에서 역할을 할 것이다. 본 발명의 최적으로 제조된 스트라도머가 사용될 수 있는 인식된 항체 매개된 질환은 항사구체 기저막 항체 매개된 신염, 예를 들어 굿패스쳐(Goodpasture); 고형 장기 이식에서의 항-도너 항체(도너-특이적 동종항체); 시신경 척수염에서의 항-아쿠아포린-4 항체; 신경근긴장증, 변연계 뇌염 및 모반 증후군에서의 항-VGKC 항체; 중증 근무력증에서의 항-니코틴 아세틸콜린 수용체 및 항-MuSK 항체; 람베르트 이튼 근무력 증후군에서의 항-VGCC 항체; 종양과 대개 연관된 변연계 뇌염에서의 항-AMPAR 및 항-GABA(B)R 항체; 강직 인간 증후군 또는 병적놀람증에서의 항-GlyR 항체; 재발성 자연 유산, 휴즈 증후군(Hughes syndrome) 및 전신 홍반 루푸스에서의 항-인지질, 항-카르디올리핀 및 항-β_2 당단백질 I 항체; 강직 인간 증후군, 자가면역 소뇌 실조 또는 변연계 뇌염에서의 항-글루탐산 탈탄산효소 항체; 난소 기형종과 대개 연관되지만 비방종양일 수 있는 대개 청소년 및 어린이에서 현저한 이동 장애를 갖는 변연 및 피질하부 특징 둘 다를 포함하는 새로 기재된 증후군에서의 항-NMDA 수용체 항체; 전신 홍반 루푸스에서의 항-이중 가닥 DNA, 항-단일 가닥 DNA, 항-RNA, 항-SM 및 항-C1q 항체; 경피증, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome) 및 다발성 근염을 포함하는 연결 조직 질환에서의 항-핵 및 항-인 항체, 예를 들어 항-Ro, 항-La, 항-Scl 70, 항-Jo-1; 류마티스성 관절염에서의 항-류마티스성 인자 항체; 결절성 다발동맥염에서의 항-B형 간염 표면 항원 항체; CREST 증후군에서의 항-동원체 항체; 심내막염에서의 또는 이에 대한 위험으로서 항-스트렙토코커스 항체; 하시모토 갑상선염에서의 항-티로글로불린, 항-갑상선 과산화효소 및 항-TSH 수용체 항체; 혼합 연결 조직 질환 및 전신 홍반 루푸스에서의 항-U1 RNP 항체; 및 천포창에서의 항-데스모글레인 및 항-각질세포 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0148] 본 발멸의 GL-2045 조성물은 울혈성 심부전(congestive heart failure: CHF), 혈관염, 주사, 여드름, 습진, 심근염 및 심근의 다른 병태, 전신 홍반 루푸스, 당뇨병, 척추병증, 활막 섬유모세포 및 골수 간질; 골 손실; 파제트병, 파골세포종; 다발성 골수종; 유방암; 불용성 골감소증; 영양실조, 치주 질환, 고셔병(Gaucher's disease), 랑게르한스 세포 조직구증, 척수 손상, 급성 화농성 관절염, 골연화증, 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 단골성 섬유성 형성이상, 다골성 섬유성 형성이상, 치주 재건 및 골절; 사이코이드증(sarcoidosis); 골용해 골암, 폐암, 신장암 및 직장암; 골 전이, 골 통증 관리 및 체액성 악성 고칼슘혈증, 강직성 척추염 및 다른 척추관절병증; 이식 거부, 바이러스 감염, 혈액학적 신생물 및 신생물 유사 병태, 예를 들어 호지킨 림프종; 비호지킨 림프종(버킷 림프종, 소형 림프구성 림프종/만성 림프구성 백혈병, 균상 식육종, 외투 세포 림프종, 소포성 림프종, 산재성 대형 B 세포 림프종, 변연대 림프종, 모발 세포 백혈병 및 림프형질세포성 백혈병), 림프구 전구체 세포의 종양, 예를 들어 B 세포 급성 림프아구성 백혈병/림프종, 및 T 세포 급성 림프아구성 백혈병/림프종, 흉선종, 성숙 T 및 NK 세포의 종양, 예를 들어 말초 T 세포 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/T 세포 림프종 및 대형 과립 림프구성 백혈병, 랑게르한스 세포 조직구증, 골수성 신생물, 예컨대 급성 골수성 백혈병, 예를 들어 성숙을 갖는 AML, 분화가 없는 AML, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 및 급성 단구성 백혈병, 골수이형성 증후군, 및 만성 골수증식성 장애, 예를 들어 만성 골수성 백혈병, 중추 신경계의 종양, 예를 들어 뇌종양(신경교종, 신경모세포종, 성상세포종, 수모세포종, 상의세포종 및 망막모세포종), 고형 종양(비인두암, 기저 세포 암종, 췌장암, 담관, 카포시 육종, 고환암, 자궁, 질의 암 또는 자궁경부암, 난소암, 원발성 간암 또는 자궁내막암, 혈관계의 종양(혈관육종 및 혈관주위세포종)) 또는 다른 암(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0149] 본 발명의 GL-2045 조성물은 자가면역 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "자가면역 질환"은 80개 초과의 질환 및 병태의 다양한 군을 의미한다. 이들 질환 및 병태의 모두에서, 기초하는 문제는 신체의 면역계가 신체 자체를 공격한다는 것이다. 자가면역 질환은 연결 조직, 신경, 근육, 내분비계, 피부, 혈액 및 호흡기 및 위장 시스템을 포함하는 모든 주요 신체 시스템에 영향을 미친다. 자가면역 질환은 예를 들어 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 다초점 운동 신경병증, 전신 홍반 루푸스, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 중증 근무력증 및 1형 당뇨병을 포함한다.

[0150] 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료 가능한 질환 또는 병태는 혈액면역학적 과정, 예를 들어 겸상 세포 질환, 특발성 혈소판감소성 자반증, 동종면역/자가면역 혈소판 감소증, 후천성 면역 혈소판 감소증, 자가면역 백혈구 감소증, 자가면역 용혈성 빈혈, 파보바이러스 B19 연관된 적혈구 무형성증, 후천성 항-VIII 인자 자가면

역, 후천성 폰빌레브란트병, 다발성 골수종 및 미분류의 단일클론 감마글로불린병증, 패혈증, 재생불량성 빈혈, 순수한 적혈구 무형성증, 다이아몬드-블랙팬 빈혈(Diamond-Blackfan anemia), 신생아의 용혈성 질환, 면역 매개된 백혈구 감소증, 혈소판 수혈에 대한 불응성, 신생아, 수혈 후 자반증, 용혈 요독 증후군, 전신 혈관염, 혈전성 혈소판감소성 자반증 또는 이반 증후군(Evan's syndrome)(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0151] 질환 또는 병태는 또한 신경면역학적 과정, 예를 들어 갈랑 바레 증후군, 만성 염증성 탈수초 다발신경근병증, 파라단백혈증 IgM 탈수초성 다발성 신경병증, 람베르트 이튼 근무력 증후군, 중증 근무력증, 다초점 운동 신경병증, 항-/GM1, 탈수초와 연관된 하부 운동 뉴런 증후군, 다발성 경화증 및 시신경염, 강직 인간 증후군, 항-Yo 항체를 갖는 방종양 소뇌 변성, 방종양 뇌척수염, 항-Hu 항체를 갖는 감각 신경병증, 뇌전증, 뇌염, 척수염, 인간 T 세포 림프친화성 바이러스-1과 연관된 척수병증, 자가면역 당뇨병성 신경병증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 또는 급성 특발성 자율신경실조 신경병증(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0152] 질환 또는 병태는 또한 청각 소실 또는 시각 소실과 연관된 염증 또는 자가면역일 수 있다. 예를 들어, 질환 또는 병태는 자가면역 관련된 청각 소실, 예컨대 소음 유도된 청각 소실 또는 연령 관련된 청각 소실일 수 있거나, 청각 장치(예를 들어, 달팽이관 이식)와 같은 장치의 이식과 연관될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 장치의 이식 전에, 이와 동시에, 또는 이에 후속하여 대상체에게 투여될 수 있다.

[0153] 질환 또는 병태는 또한 류마티스 질환 과정, 예를 들어 가와사키병, 류마티스성 관절염, 팰타 증후군, ANCA 양성 혈관염, 자발적 다발성 근염, 피부근육염, 항인지질 증후군, 재발성 자연 유산, 전신 홍반 루푸스, 연소성 특발성 관절염, 레이노(Raynaud), 크레스트 증후군(CREST syndrome) 또는 포도막염(특히 스테로이드 의존적)(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0154] 질환 또는 병태는 또한 피부면역학적 질환 과정, 예를 들어 독성 표피 괴사용해, 괴저, 육아종, 자가면역 피부 물집 질환, 예를 들어 심상성 천포창, 수포성 유사천포창, 낙엽상 천포창, 백반증, 스트렙토코커스 독성 쇼크 증후군, 경피증, 전신 경화증, 예를 들어 산재성 및 제한된 피부 전신 경화증 또는 아토피성 피부염(특히 스테로이드 의존적)(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0155] 질환 또는 병태는 또한 근골격 면역학적 질환 과정, 예를 들어 봉입체 근염, 괴사 근막염, 염증성 근병증, 근염, 항-데코린(BJ 항원) 근육병, 방종양 괴사 근육병, X 연관 공포성 근육병, 페나실라민 유도된 다발성 근염, 죽상동맥경화증, 관상 동맥 질환 또는 심근병증(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0156] 질환 또는 병태는 또한 위장 면역학적 질환 과정, 예를 들어 악성 빈혈, 자가면역 만성 활동 간염, 원발성 담즙성 경변증, 셀리악병, 포진상 피부염, 잠복성 간경화증, 반응성 관절염, 크론씨병(Crohn's disease), 휘플병(Whipple's disease), 궤양성 결장염 또는 경화성 담관염(이들로 제한되지는 않음)일 수 있다.

[0157] 질환 또는 병태는 또한 이식편 대 숙주 질환, 이식편의 항체 매개된 거부, 골수 이식 후 거부, 감염성 질환 후 염증, 림프종, 백혈병, 신생물, 천식, 항-베타 세포 항체를 갖는 1형 진성 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 혼합 연결 조직 질환, 애디슨병(Addison's disease), 보그트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada Syndrome), 막성증식성 사구체신염, 굿패스쳐 증후군, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 베게너 육아종증, 마이크로다발동맥염, 척-스트라우스 증후군, 결절성 다발동맥염 또는 다발성 장기 부전일 수 있다.

[0158] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "알레르기"는 IgE에 의해 매개된 모든 면역 반응, 및 IgE 매개된 반응을 모방하는 반응을 포함한다. 알레르기는 IgE 또는 IgE 유사 면역 반응을 촉발하는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 및 이들의 조합을 포함하는 알레르겐에 의해 유도된다. 예시적인 알레르기는 견과 알레르기, 화분 알레르기 및 곤충 자상 알레르기를 포함한다. 예시적인 알레르겐은 덩굴옻나무 및 옻나무에서의 우루시올; 집먼지 항원; 꽃가루 성분 Bet v 1 및 Bet v 2; 셀러리에서의 15kD 항원; 사과 항원 Mal d 1; 복숭아에서의 Pru p3; 티모시 풀 꽃가루 알레르겐 Phl p 1; 독보리에서의 Lol p 3, Lol p I 또는 Lol p V; 우산잔디에서의 Cyn d 1; 집먼지 진드기 알레르겐 집먼지 진드기 Der p1, Der p2 또는 Der f1; 글루텐에서의 α-글리아딘 및 γ-글리아딘 에피토프; 벌독 포스포리파제 A2; 땅콩에서의 Ara h 1, Ara h 2 및 Ara h 3 에피토프를 포함한다.

[0159] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물은 프라이밍 시스템에서 사용될 수 있고, 여기서 혈액은 환자로부터 채혈되고, 환자에게 다시 도입되기 전 약 30분 내지 약 3시간의 시간 기간 동안 최적으로 제조된 스트라도머(들)와 일시적으로 접촉한다. 세포 치료의 이 형태에서, 환자의 자체의 효과기 세포는 최적으로 제조된 스트라도머에 대한 효과기 세포의 노출을 통해 효과기 세포를 조정하도록 생체외 매트릭스에 고정된 최적으로 제조된 스트라도머에 노출된다. 이후, 조정된 효과기 세포를 갖는 혈액은 환자에게 다시 점적주사된다. 이러한 프라이밍 시스템은 많은 임상 및 치료학적 분야를 가질 수 있다.

[0160] 본 명세서에 개시된 GL-2045 조성물은 면역 반응 프로파일의 특정한 변화에 영향을 미치도록 다양한 상황에서 면역계 반응을 변경시키도록 또한 용이하게 적용될 수 있다. 대상체에서의 면역 반응의 변경 또는 조정은 면역 반응의 비율 또는 성분을 증가, 감소 또는 변경시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 사이토카인 생성 또는 분비 수준은 보체에 결합하고 이 수용체와 상호작용하도록 설계된 스트라도머와 FcR의 적절한 조합과 함께 보체를 표적화함으로써 원하는 바대로 증가하거나 감소할 수 있다. 항체 생성은 또한 증가하거나 감소할 수 있고; 2개 이상의 사이토카인 또는 면역 세포 수용체의 비율은 변경될 수 있고; 또는 사이토카인 또는 항체의 추가적인 유형은 제조되게 될 수 있다.

[0161] 바람직한 실시형태에서, 자가면역 또는 염증성 질환을 갖는 대상체는 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 변경된 이의 면역 반응을 갖고, 여기서 GL-2045 조성물의 치료학적 유효량은 대상체에서의 면역 반응을 변경시킨다. 이상적으로는, 이 중재는 대상체에서의 질환 또는 병태를 치료한다. 변경된 면역 반응은 증가된 또는 감소된 반응일 수 있고, 임의의 IL-1RA 및 다른 IL-1 패밀리 구성원, IL-6, IL-10, IL-8, IL-23, IL-7, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, IL-1 수용체, TNF-α, 다른 TNF 패밀리 구성원 및 TNF 수용체, IFN-α, 다른 인터페론 패밀리 구성원 및 인터페론 수용체의 수준 또는 임의의 CCL, CXC, XC 및 FAM19 케모카인 패밀리 구성원의 수준을 포함하는 케모카인 수준을 포함하는 변경된 사이토카인 수준을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, IL-6 또는 IL-8은 치료에 반응하여 감소한다. 특히 바람직한 실시형태에서, IL-6 및 IL-8은 치료에 반응하고 감소하고/하거나, IL-10 또는 IL-1RA는 치료에 반응하여 증가한다. 그러나, 본 발명은 기재된 생물모방체의 임의의 특정한 작용 기전에 의해 제한되지 않는다. 변경된 면역 반응은 대상체에서의 변경된 자가항체 수준일 수 있다. 변경된 면역 반응은 대상체에서의 변경된 자가공격적 T 세포 수준일 수 있다.

[0162] 예를 들어, 자가면역 질환에서의 TNF-알파 생성의 양의 감소는 치료학적 효과를 가질 수 있다. 이의 실용적인 분야는 판상 건선, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 크론씨병, 궤양성 결장염 및 강직성 척추염을 치료하는 것으로 임상적으로 입증된 항-TNF-알파 항체 치료(예를 들어, REMICADE(등록상표))이다. 이 자가면역 질환은 병인론을 갖지만, 염증 및 면역 세포 활성과 관련된 질환 과정의 중요한 면역학적 성분을 공유한다. TNF-알파 생성을 감소시키도록 설계된 스트라도머는 이들 및 많은 다른 자가면역 질환에서 비슷하게 효과적일 것이다. 변경된 면역 반응 프로파일은 또한 항체 생성의 감소, 예를 들어 대상체의 자체의 조직을 표적화하는 자가항체, 또는 대상체에서의 변경된 자가-공격적 T 세포 수준을 가져오는 직접적인 또는 간접적인 조정일 수 있다. 예를 들어, 다발성 경화증은 인터페론 베타 치료에 의해 치료될 수 있는 자가반응성 T 세포를 수반하는 자가면역 장애이다. 예를 들어, 문헌[Zafranskaya M, *et al*., Immunology 2007 May;121(1):29-39-Epub 2006 Dec 18]을 참조한다. 자가반응성 T 세포 수준을 감소시키도록 설계된 최적으로 제조된 스트라도머는 다발성 경화증에서 비슷하게 효과적일 것이고, 자가반응성 T 세포를 수반하는 다른 자가면역 질환일 수 있다.

[0163] 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물은 수지상 세포, 마크로파지, 파골세포, 단핵구 또는 NK 세포를 포함하는 면역 세포로부터의 동시자극 분자의 발현을 조정하기 위해 또는 인터류킨-12(IL- 12)를 포함하는 이 동일한 면역 세포의 분화, 성숙 또는 사이토카인 분비를 저해하기 위해, 또는 인터류킨-10(IL- 10), 인터류킨-6(IL-6) 또는 IL1-RA를 포함하는 사이토카인 분비를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 숙련된 당업자는 면역 세포를 최적화된 면역학적 활성 생물모방체에 노출시키고 면역 세포 기능의 조정을 측정함으로써(여기서, 면역 세포는 수지상 세포, 마크로파지, 파골세포 또는 단핵구임) 최적화된 면역학적 활성 생물모방체의 효율을 또한 검증할 수 있다. 일 실시형태에서, 면역 세포는 시험관내 최적화된 면역학적 활성 생물모방체에 노출되어서, 세포 표면 수용체 또는 사이토카인 생성의 양을 결정하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 세포 표면 수용체 또는 사이토카인 생성의 양의 변화는 면역 세포 기능의 조정을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 면역 세포는 자가면역 질환에 대한 모델 동물에서 생체내 최적화된 면역학적 활성 생물모방체에 노출되어서, 자가면역 질환의 개선의 정도를 평가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0164] 본 명세서에 기재된 GL-2045 조성물은 장치의 성분으로서 또한 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 GL-2045는 의학 임플란트와 같은 장치에서 코팅될 수 있다. 예를 들어, 최적으로 제조된 스트라도머는 예를 들어 포도막염 또는 황반 변성에서 눈내 사용을 위해 침투를 증대시키고 약물 방출을 연장시키기 위해 관상동맥 스텐트에서 또는 나노입자 치료의 일부로서 코팅될 수 있다. 본 명세서에 기재된 최적으로 제조된 스트라도머는 진단학의 성분으로서 또한 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 숙련된 당업자는 어떠한 환자에서 스트라도머의 사용이 특히 유리할 수 있는지를 결정함으로써 치료를 개인화할 수 있다. 예를 들어, 숙련된 당업자는 환자의 면역 세포를 면역학적 활성 생물모방체에 노출시키고, 고반응자를 확인하기 위해 유세포분석법 또는 사이토카인 프로파일에 의해 면역 세포의 활성화 또는 성숙의 조정을 측정할 수 있다.

[0165] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 포함된다.

[0166] **실시예**

[0167] 제조 공정에서의 다양한 접근법은 높은 단백질 역가, 긴 생존능력과 수반된 낮은 세포 부스러기 및 GL-2045의 더 높은 차수의 다합체의 생성의 조합을 최적화하도록 취해졌다. 구체적으로, 상류 제조 공정의 하기 양태는 증가된 다합체화의 특성을 갖는 GL-2045 생성물에 대한 최적 조건을 결정하도록 변했다: 기본 배지, 공급물의 유형, 공급물의 시기, 온도 이동, 통풍 및 진탕 플라스크 조건. 각각의 경우에, 세포 밀도, 생존능력, 단백질 역가 및 다합체화는 최적 조건을 확인하도록 분석되었다. 추가로, 완충제, 세척 프로토콜 및 칼럼 선택을 포함하는 하류 제조 공정의 양태는 GL-2045의 정제 및 여과에 대한 최적 조건을 결정하도록 변하고, 여기서 GL-2045의 최적 다합체화 프로파일은 유지되었다. 하기 실시예는 제한의 방식이 아니라 오직 예시의 방식으로 제공된다.

[0168] **실시예 1 - GL-2045의 분별화 및 바이오층 간섭측정 분석**

[0169] 0.05M Tris-HCL + 0.15M NaCl 완충제(pH 7.5) 중의 GE Hi-Load 26/60 Superdex 200pg 칼럼(GE, 17-1071-01호)을 사용하여 GL-2045의 용액을 분별화하였다. 3.2㎖의 GL-2045 용액을 2.6㎖/분의 유속으로 로딩하였다. 6개의 분획(1 내지 6)을 2.0㎖ 용적으로 수집하고, 단백질 농도를 280nm에서 UV 측정에 의해 결정하였다(도 1A). 각각의 GL-2045 분획에 대한 다합체화를 평가하였다. 간단히, 각각의 분획 1 내지 6의 샘플을 4% 내지 12% 비환원 Nu-Page BT 겔(Invitrogen, NP0322BOX호)에 로딩하였다. 150볼트에서 대략 3시간 동안 샘플을 실행하였다. 결과는 도 1B에 제공되고, 분획 1과 분획 6 사이에 GL-2045의 더 높은 차수의 다합체의 존재 하의 명확한 차이를 나타낸다. 분획 1 내지 3은 더 낮은 차수의 다합체(예를 들어, 밴드 1 내지 4)로 이루어진다. 분획 1은 55KD의 겉보기 MW(밴드 1, 비환원 SDS-PAGE로부터의 MW 예상치)를 갖는 동종이합체로 거의 배타적으로 이루어진다. 분획 2는 110KD의 MW(밴드 2)를 갖는 대략 97% 동종이합체의 이합체로 이루어진다. 분획 3은 더 적은 양의 밴드 2와 함께 각각 165KD 및 220KD의 MW를 갖는 밴드 3 및 4, 5(MW = 275 KD), 6(MW = 330 KD) 및 7(MW = 385 KD)로 주로 이루어진다. 분획 4는 더 적은 양의 밴드 3, 7, 8(MW = 440 KD) 및 더 높은 차수의 밴드와 함께 밴드 4, 5 및 6으로 대개 이루어진다. 그러나, 분획 5 및 6은 더 높은 차수의 다합체(밴드 5+)로 대개 이루어진다.

[0170] 바이오층 간섭측정 동역학 결합 분석을 이용하여 FcγRIIIA 수용체에 대한 결합에 대해 GL-2045의 분획을 분석하였다. 바이오층 간섭측정은 바이오센서 선단 표면에 부동화된 리간드와 용액 중의 분석물질 사이의 결합을 검출한다. 결합이 발생할 때, 이것은 바이오센서 선단에서의 광학 두께의 증가를 생성하고, 이는 ("RU"의 반응 단위로서 검출된) 파장 이동을 발생시킨다. 최대 결합 수준(RU 최대)은 센서 표면 상의 리간드의 양을 포화시키는 평형에서 샘플 결합의 최대 가능한 양이다.

[0171] His 태그화된 수용체 단백질(5㎍/㎖)은 300초 동안 ForteBio로부터의 1X 동역학 분석 완충제(카탈로그 18-1092호) 중에 항-His 센서 선단(Anti-penta-His HIS1K, ForteBio 카탈로그 18-5121호)에 결합하였다. 로딩된 센서는 60초 동안 기준치 측정을 얻기 위해 표지된 수용체 또는 리간드 없이 1X 동역학 완충제로 옮겼다. 기준치를 얻은 후, 수용체/단백질의 결합 속도는 50㎍/㎖, 25㎍/㎖ 및 12.5㎍/㎖의 농도에서 60초 동안 선택된 정제된 스트라도머를 함유하는 1x 동역학 완충제에 센서 선단을 옮겨서 측정되었다. 분해 속도는 1X 동역학 완충제에 센서 선단을 옮겨서 300초 동안 측정되었고, RU 값, 결합 속도 값, 분해 속도 및 K_d 값은 ForteBio 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

[0172] 결합 곡선 결과는 도 2에 도시되어 있고, ForteBio Octet 소프트웨어에 의해 계산된 동역학 결합 데이터는 표 2에 제공된다. 이 결합 곡선은 더 낮은 분자량의 분획(예를 들어, 분획 1 및 2)에 대해 관찰된 것보다 더 높은 분자량의 GL-2045를 함유하는 분획(예를 들어, 분획 3, 4, 5 및 6)에 대해 점점 더 낮은 분해 속도로 더 높은 결합도를 나타내고, GL-2045의 고분자량 분획이 더 낮은 분자량의 분획보다 더 격렬히 결합한다는 것을 나타낸다.

[0173] [표 2]

GL-2045 분획에 대한 동역학적 결합 데이터의 요약

분획	K_D	K_{on}	K_{dis}	R_{max}	R^2	X^2
GL-2045	1.56E-11	4.73E+05	7.39E-06	0.830	0.999	0.0640
1	2.72E-07	1.00E+05	2.73E-02	0.507	0.986	0.0760
2	1.06E-08	3.34E+05	3.55E-03	0.673	0.995	0.0543
3	2.14E-10	5.94E+05	1.27E-04	0.786	0.997	0.1195
4	7.33E-12	5.99E+05	4.39E-06	0.852	0.991	0.2782
5	1.25E-12	1.18E+06	1.47E-06	0.853	0.993	0.1366
6	4.01E-11	1.08E+06	4.33E-05	0.930	0.994	0.0691

[0174]

[0175] **실시예 2 - GL-2045 분획에 의한 보체 의존적 세포(CDC) 사멸 검정**

[0176] 보체 활성화를 저해하는 GL-2045 분획의 능력을 평가하였다. GL-2045를 1 내지 6 분획에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분별화하고(도 3a), 각각은 비환원 겔에서 다합체화에 대해 분석되었다(도 3b). 보체 활성화에 대한 각각의 분획의 효과를 결정하기 위해, CD20 발현 Will-2 세포를 20분 동안 항-CD20 단일클론 항체와 항온처리하고, 이후 세포를 원심분리하고, 새로운 배지 중에 재현탁시켰다. 이후, 세포를 96웰 플레이트에서 본 명세서에 기재된 각각의 분획 1 내지 6, 및 100㎍/㎖, 50㎍/㎖, 20㎍/㎖, 10㎍/㎖, 5㎍/㎖ 또는 1㎍/㎖의 6개의 농도 중 하나에서 비교로서 비분별화된 GL-2045를 함유하는 배지에서 항온처리하였다. 혈청을 보체 의존적 세포 용해를 개시시키도록 세포 현탁액에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 3시간 동안 항온처리하였다. 세포사를 Promega Cytotox Glo Assay에 의해 정량화하였다. Cytotox Assay Reagent를 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 15분 동안 암소에서 항온처리하였다. 15분 후 발광을 Promega GloMax 광도계에서 판독하고, 세포사를 이 판독으로부터 계산하였다. 결과는 도 4a 내지 도 4d에 도시되어 이G고, (밴드 5 내지 13에서 더 높은 분자량의 다합체를 함유하는) 분획 5 및 6은 분획 1 내지 4에 존재하는 더 적은 분자량의 다합체보다 CDC의 더 극심한 저해를 보여준다는 것을 나타낸다. 밴드 4 및 이것 초과를 포함하는 분획이 오직, 더 높은 차수의 다합체 내지 육합체 C1q의 다가 Fc 결합과 일치하는, CDC의 효과적인 저해를 나타낸다는 것에 또한 주목한다.

[0177] **실시예 3 - FcγRIIIa에 대한 GL-2045 분획의 결합**

[0178] FcγRIIIa에 대한 GL-2045 분획의 결합을 결정하였다. GL-2045 상청액을 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제와 함께 단백질 A HiTrap MabSelect Sure(GE 11-0034-95호)에 의한 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 0.1M 글라이신(pH 2.7)에 의해 용리시켰다(도 5a). 친화도 크로마토그래피 정제된 GL-2045는 1X PBS(pH 7.2)(Quality Biological, Inc 119-069-101호)에서 저장되었다. 정제된 GL-2045의 풀은 50mM 아세트산나트륨(pH 5.0)에 대해 추가로 투석되고, 50mM 아세트산나트륨, 1M NaCl(pH 5.0)과 함께 50mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 및 용리 구배(0 내지 100% 용리 완충제)의 결합 완충제에 의해 POROS CIEX 칼럼(GOPURE 칼럼 1.2cm D x 10cm L, Poros XS, Life Technologies, 4448885호)에서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 연마되었다. 이 연마 단계는 최종 분획으로부터의 가장 높은 차수의 다합체 및/또는 무질서한 응집체의 제거 없이 수행되었다. 최종 단계로서, CIEX 연마된 GL-2045를 5㎖ 이하의 용적으로 농축시키고, 겔 여과 흐름 완충제에 대해 완충제 교환하고, 흐름 완충제(Tris HCL, pH 7.5 Teknova T1075호)로서 0.05M Tris-HCl + 0.15M NaCl(pH 7.5)을 사용하여 겔 여과 칼럼(Hiload 26/60 Superdex 200pg(GE 17-1071-01호))으로 주입하였다. 이후, 분획을 겔 분석에 의해 다합체화에 대해 분석하였다(도 5b 및 도 5c).

[0179] FcγRIIIa ELISA 결합 검정을 이용하여 FcγRIIIa에 대한 분별화된 GL-2045의 결합을 결정하였다. 간단히, 96 플레이트를 재조합 FcγRIIIa에 의해 코팅하고, GL-2045와 반응되게 하였다. 세척 후, ELISA 기반 검정에서 mAb를 검출하는 Fc를 사용하여 FcγRIIIa 결합된 재료의 양을 결정하였다(도 6a 및 도 6b). 각각의 분획에 대한 EC_{50} 값은 표 3에 기재되어 있다. 이 결과는 더 높은 차수의 다합체(분획 1C4, 1C5, 1C6, 1C7, 1C8, 1C9, 1C10 및 1C11)이 더 낮은 차수의 다합체(분획 1D9, 1E4 및 1F7)보다, 낮은 EC_{50}에 의해 표시된, FcγRIIIa에 대한 더 격렬한 결합, 및 놀랍게도, 가장 높은 분자량의 다합체(분획 1C3, 1C2, 1C1, 1B12, 1B11)보다 더 격렬한 결합을 나타낸다는 것을 입증한다. 매우 가장 높은 분자량의 분획은 고도로 기능적인 가장 높은 차수의 다합체(예를 들어, 분획 1B11, 1B12, 1C1, 1C2 및 1C3)와 함께 약간 더 낮은 효력의 고분자량 응집된 분획을 포함하는 것으로 여겨진다. 이 결과는 매우 놀랍게도 GL-2045의 모든 고분자량 분획이, 아마도 고도로 질서화된 고분자량 다합체의 형성과 반대로 동종이합체의 무질서한 응집의 효과로 인해, FcγR에 대한 결합을 증가시키지는 않는다는 것

을 나타낸다. 이 데이터는, 고분자량의 더 높은 차수의 다합체의 생성 및 보유 및, 표적 저친화도 수용체를 결합시키는 데 덜 효과적인, 무질서한 고분자량 응집체(예를 들어, 1B11 및 1B12)의 제거를 생성시키는 최적 상류 제조 방법과 조합된, 최적화된 하류 제조 방법(단백질 A 정제, 이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피에 대한 최적화된 조건을 포함)에 대한 수요를 나타낸다(표 3에서 1B11 및 1B12에 대한 EC_{50} 값 참조).

[0180] [표 3]

FcγRIIIa에 결합하는 GL-2045 분획에 대한 EC_{50} 값

분획	AC/CIEX EC50(ng/ml)
1B9	NT
1B10	NT
1B11	27.2
1B12	10.8
1C1	4.96
1C2	7.09
1C3	3.68
1C4	1.92
1C5	2.33
1C6	1.59
1C7	1.56
1C8	1.01
1C9	2.52
1C10	0.870
1C11	1.60
1D4	2.26
1D5	NT
1D9	3.15
1E4	3.82
1E8	NT
1F7	15.7
1F8	NT

NT= 시험되지 않음

[0181]

[0182] **실시예 4 - GL-2045 분획의 C5a 유도된 화학주성 분석**

[0183] L-글루타민(Lonza, 17-605E호) 및 HT 보충제(Life Technologies, 11067-030호)를 갖는 PowerCHO2 배지(Lonza, U21-070호)에서 GL-2045 세포 배양물을 성장시켰다. 단백질 A HiTrap MabSelect Sure(GE, 11-0034-95호)에 의한 친화도 크로마토그래피에 의해 GL-2045 상청액을 정제하고, 이후 상이한 pH 조건을 이용하여 AIEX HiScreen Q FF(GE, 28-9505-10호)에 의해 분별화하여 저분자 밴드를 고분자 밴드로 분리시켰다. 결과는 도 7에 도시되어 있다(GL-GLM-01 = 재조합, 비분별화된 Fc(G001), GL-GLM-02 = 비분별화된 GL-2045, GL-GLM-05 = 분별화된 GL-2045(pH 6.0), GL-GLM-06 = 분별화된 GL-2045(pH 6.5), GL-GLM-07 = 분별화된 GL-2045(pH 7.0), GL-GLM-08 = 분별화된 GL-2045(pH 7.5)). 마지막으로, 상이한 분획을 농축시키고, HBSS(Lonza, 10-527F호)에 대해 투석하였다.

[0184] 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제와 함께 단백질 A(pA) HiTrap MabSelect Sure(GE, 11-0034-95호)에 의한 친화도 크로마토그래피에 의해 GL-2045 상청액을 정제하였다. 결합 완충제에 의한 제1 세척 및 제2 세척 후, 1M NaCl, 5mM EDTA, 2M 우레아, 50mM 포스페이트(pH 7.0), pA에 결합된 단백질을 포함하는 완충제를 0.1M 글라이신(pH 2.7)에 의해 용리시켰다.

[0185] 친화도 크로마토그래피 정제된 GL-2045를 1X PBS(pH 7.0)(Quality Biological, Inc 119-069-101호)에서 저장하였다. 정제된 GL-2045의 4개의 뱃지를 pH 6.0, 6.5, 7.0 또는 7.5에서 50mM Tris-HCL에 의해 추가로 (6X) 희석하고, 50mM Tris-HCL(pH 6.0, 6.5, 7.0 또는 7.5)의 결합 완충제에 의해 HiScreen Q FF 칼럼에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하고, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5에서 50mM Tris-HCL + 1M NaCl에 의해 구배 용리(0 내지 100% 용리 완충제)에 의해 용리시켰다.

[0186] 호중구 화학주성에 대한 GL-2045 분획의 효과를 결정하도록 이 정제된 분획을 사용하였다. 간단히, 보체 C5a를 1nM의 농도로 Boyden 챔버의 하부 웰에 화학주성인자로서 첨가하였다. Boyden 챔버에 대한 첨가 이외에, 호중구(최종 농도 2.25 x 10^6개의 세포/㎖, PBMC로부터의 전혈로부터 정제됨)를 30분 동안 표시된 GL-2045 분획(0.02 내지 10㎍/㎖ 최종 농도 ㎍/㎖) 또는 재조합 Fc 대조군(GLM-001, G001)과 예비 항온처리하였다. 이후, 세포 현탁액을 Boyden 챔버의 상부 웰에 첨가하고 25분 동안 항온처리하였다. 항온처리 기간 후, 각각의 조건에 대해 하부 챔버에서 세포의 수를 계수함으로써 이동한 집단을 평가하고, 각각의 조건에 대한 화학주성 퍼센트를 결정하였다(도 8). GL-GLM-001(재조합 Fc 대조군, G001)에 대해 화학주성이 관찰되지 않았다. 더 높은 차수의 다합체(밴드 5 내지 13을 포함하는 분획 GL-GLM-002, GL-GLM-005, GL-GLM-006 및 GL-GLM-007)는 더 낮은 차수의 다합체(밴드 1 내지 4를 포함하는 분획 GL-GLM-008)보다 C5a 유도된 화학주성의 더 격렬한 저해를 나타냈다.

[0187] 실시예 1 내지 4에 제공된 데이터는 GL-2045에 대한 더 높은 차수의 다합체의 증대된 효율을 나타낸다. 상기 데이터에 기초하여, 상류 제조 프로토콜은 최대 생물학적 효율을 달성하기 위해 GL-2045의 더 높은 차수의 다합체(예를 들어, 도 1, 도 3, 도 5 및 도 7에서 밴드 5+)의 특정한 생성에 대한 최적 조건을 결정하기 위해 시험되었다.

[0188] **실시예 5 - GL-2045 제조에서의 기본 배지 스크리닝**

[0189] 이 실험의 목적은 GL-2045 단백질 역가, 세포 생존능력, 세포 밀도 및 GL-2045 다합체화에 대한 기본 배지의 패널의 효과를 시험하는 것이다.

[0190] GL-2045를 37℃ 및 5% CO_2에서 진탕기 항온처리기에서 L-글루타민(Lonza 17-605E호) 및 나트륨 하이포산틴 및 타이미딘(HT, Gibco 11067-030호)을 갖는 ProCHO5 배지(Lonza 12-766Q호)에서 성장시켰다. 계대배양 후, 세포를 세척하고, 50㎖의 Tube Spin으로 (표 4에 기재된) 선택된 배지에서 0.5 x10^6개의 세포/㎖로 이중으로 접종하였다. 각각의 관은 10㎖의 배양물을 함유하고, 37℃, 5% CO2, 80% 습도 및 180rpm 회전 속도에서 Kuhner 브랜드 maglev 진탕기 항온처리기에 배치하였다. 4일, 8일 및 10일에, 세포 밀도, 세포 생존능력 및 글루코스 수준을 측정하기 위해 각각의 배양물로부터 1밀리리터의 샘플을 취했다. 샘플을 원심분리하고, 상청액을 +4℃에서 저장하였다. 4mM L-글루타민 및 1X 나트륨 하이포산틴 및 타이미딘을 수록하지 않는 선택된 배지를 성분으로서 L-글루타민 및 HT에 의해 보충하였다. 선택된 배지에 대한 성장 조건은 표 4에 기재되어 있다.

[0191] [표 4]

선택된 배지 성장 조건

배지	제조사	L-글루타민	HT	% CO2	% 습도
CD FortiCHO	LifeTechnologies	4mM	1X	5	80
TC-42 (CHOMACS CD)	TeutoCell (Xell)	4mM	1X	5	80
Hyclone CDM4CHO	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
Hyclone ADCF MAB	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
PowerCHO3 CD	Lonza	4mM	1X	5	80
Ex-Cell CHO5	Sigma-Aldrich	4mM	-	5	80
BalanCD CHO Growth A	Irvine	4mM	1X	5	80
EX-CELL CD CHO	Sigma Aldrich	4mM	-	5	80
CHO-S-SFM II	LifeTechnologies	4mM	-	5	80
ExpiCHO Expression	LifeTechnologies	-	1X	5	80
GE Healthcare SFM4CHO	GE Healthcare	4mM	1X	5	80
ClonaCell-CHO CD	Stemcell Tech.	4mM	1X	5	80
GE Healthcare HYQ SFX-CHO LM	GE Healthcare	4mM	1X	5	80
Cell Vento CHO 210	Millipore	4mM	1X	5	80
ActiCHO P	GE	4mM	-	5	80
Cell Vento CHO 110	Millipore	4mM	1X		80
CD Hybridoma	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
CD OptiCHO	Thermo Scientific	4mM	1X	5	80
PowerCHO-GS	Sartorius AG	4mM	-		80

[0192]

[0193] 세포 밀도, 세포 생존능력, 단백질 역가 및 더 높은 차수의 다합체의 퍼센트에 대해 선택된 배지에서 성장한 GL-2045 세포 배양물을 평가하였다. 세포를 트립판 블루와 혼합함으로써 세포 밀도 및 세포 생존능력 평가를 수행하였다. 수동 세포 계수기를 사용하여 생존가능 세포 및 죽은 세포를 계수하였다. 세포 밀도(도 9, 표 5) 및 세포 생존능력(도 10, 표 6)에 대해 배양의 4일 및 8일에 대한 데이터가 기재되어 있다. 시험된 19개의 배지 중

에서, 4일에서의 가장 높은 세포 밀도는 ActiCHO P, CHOMACS CD 및 CD FortiCHO에 의해 관찰되었다. 8일째에, 세포 밀도의 경향은 4일과 비교하여 ActiCHO P, BalanCD CHO, ExpiCHO, Cell Vento CHO 210 및 Cell Vento CHO 210을 제외하고 모든 배지에 대해 음성이었다. 19개의 배지 중에서, 8일에서의 가장 높은 세포 생존능력은 ActiCHO P, 이어서 ExpiCHO, Cell Vento CHO 110 및 HYQ SFX-CHO LM에 의해 관찰되었다. 4일로부터 8일로 세포 생존능력에서 양성 트렌드를 갖는 것으로 시험된 19개의 배지 중 유일한 배지는 ActiCHO P이었다. 따라서, 4일에 높은 세포 밀도를 생성하고 8일에 세포 밀도에 대해 음성 트렌드를 갖지 않는 유일한 배지는 ActiCHO P이었다.

[0194] [표 5]

GL-2045 생성 CHO 세포 밀도

배지	4 일 (10^6/ml)	8 일 (10^6/ml)
CD FortiCHO	9.75	0.00
TC-42 (CHOMACS CD)	10.35	0.00
Hyclone CDM4CHO	4.70	0.00
Hyclone ADCF MAB	2.00	1.81
PowerCHO3 CD	3.72	1.34
Ex-Cell CHO5	4.20	1.20
ActiCHO P	11.40	23.30
BalanCD CHO Growth A	7.80	13.46
EX-CELL CD CHO	4.80	1.24
CHO-S-SFM II	7.10	0.00
ExpiCHO Expression	7.40	19.40
SFM4CHO	7.30	6.80
ClonaCell-CHO CD	6.10	3.80
HYQ SFX-CHO LM	1.70	2.80
Cell Vento CHO 210	6.90	16.50
Cell Vento CHO 110	7.70	17.40
CD Hybridoma	5.35	5.00
CD OptiCHO	6.45	4.70
PowerCHO-GS	2.80	1.25

[0195]

[0196] [표 6]

GL-2045 생성 CHO 세포 생존능력

배지	4 일 (% 생존가능)	8 일 (% 생존가능)
CD FortiCHO	99.5	0.0
TC-42 (CHOMACS CD)	99.4	0.0
Hyclone CDM4CHO	89.5	0.0
Hyclone ADCF MAB	98.5	78.6
PowerCHO3 CD	82.7	29.1
Ex-Cell CHO5	85.0	56.9
ActiCHO P	92.4	100.0
BalanCD CHO Growth A	98.5	91.0
EX-CELL CD CHO	92.2	27.3
CHO-S-SFM II	98.9	0.0
ExpiCHO Expression	99.5	98.8
SFM4CHO	99.7	80.0
ClonaCell-CHO CD	96.0	62.9
HYQ SFX-CHO LM	100.0	95.2
Cell Vento CHO 210	98.6	90.7
Cell Vento CHO 110	99.4	98.3
CD Hybridoma	99.1	82.6
CD OptiCHO	99.2	83.2
PowerCHO-GS	98.2	86.2

[0197]

[0198] 배양물을 10일에 스피닝하고, 0.2㎛에서 여과시키고, 단백질 A 친화도 칼럼을 사용한 정제까지 4℃에서 유지시켰다. 정제를 위해, 상청액 배양물을 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제와 함께 1㎖의 단백질 A 칼럼 HiTrap MabSelect SuRe(GE, 11-0034-93호)에 의한 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 칼럼 결합된 단백질을 결합 완충제에 의해 세척한 후, 1M NaCl, 5mM EDTA, 2M 우레아, 50mM 포스페이트(pH 7.0)에 의해 제2 세척을 하였다. 칼럼에 결합된 GL-2045를 0.1M 글라이신(pH 2.7)에 의해 용리시키고, pH 7.0 thru HiPrep 26/10 탈염 칼럼(GE, 17-5087-01호)에서 1X PBS 중에 탈염시켰다. 정제된 모든 샘플을 4℃에서 저장하였다. 바이오층 간섭측정(Octet)에 의해 단백질 역가의 측정을 수행하였다(도 11 및 표 7). 시험된 19개의 기본 배지 중에서, 10일에서의 가장 높은 단백질 역가는 Cell Vento CHO 110, 이어서 BalanCD CHO 성장 A 배지, ActiCHO P 및 ExpiCHO에 의해 관찰되었다. 유의미한 역가 하강이 다른 배지에 의해 생겼다.

[0199] [표 7]

GL-2045 역가

배지	단백질(mg/ℓ)
Cell Vento CHO 110	577.9
BalanCD CHO Growth A	542.0
ActiCHO P	514.4
ExpiCHO Expression	513.0
Cell Vento CHO 210	359.1
CD FortiCHO	323.7
CHO-S-SFM II	296.2
CD OptiCHO	295.8
SFM4CHO	295.8
PowerCHO-GS	269.9
TC-42 (CHOMACS CD)	232.4
CD Hybridoma	226.7
EX-CELL CD CHO	194.4
HYQ SFX-CHO LM	179.2
Ex-Cell CHO5	179.2
ClonaCell-CHO CD	170.9
Hyclone CDM4CHO	111.6
PowerCHO3 CD	105.5
Hyclone ADCF MAB	89.4

[0200]

[0201] 더 높은 차수의 다합체의 퍼센트를 결정하기 위해, SDS-PAGE 겔(NuPage 3% 내지 8% Tris-아세테이트 겔, Life Technologies, EA03752BOX호)로 각각의 정제된 배양을 (비환원된 형태로) 실행하였다. 2㎍의 단백질을 10㎕의 최종 용적으로 3㎕의 샘플 완충제(NuPage, LDS(4X), Life Technologies, NP0007호), 20μM의 요오도아세트아마이드(Bio Rad 163-2109호) 및 탈이온수(DI) 중에 희석하였다. 샘플을 80℃에서 10분 동안 가열하고, 겔에 로딩하고, 흐름 완충제(Tris-아세테이트 SDS(20X)(Life Technologies, LA0041호))를 사용하여 1시간 25분 동안 150V에서 흘렸다. 겔을 DI 물 중에 세척하고, SimplyBlue Safe(Life Technologies, LC6060호)에 의해 염색하고, DI 물 중에 탈색하였다. 완전한 탈색 후, Syngene로부터의 G:BOX 시스템을 사용하여 사진을 찍고, GeneTools, Syngene 소프트웨어에 의해 농도계에 의해 밴딩 패턴을 분석하였다. 각각의 레인에서의 각각의 개별 밴드에서의 강도를 측정하였다(도 12a 및 도 12b).

[0202] 예상치 못하게, 시험된 19개의 배지의 밴드 4 초과의 더 높은 차수의 다합체의 가장 높은 퍼센트는 ActiCHO P, 이어서 EX-CELL CD CHO 및 CH-S SFM2에 의해 관찰되었다(표 8). 이 데이터는 더 높은 차수의 다합체의 백분율의 증가가 제어되는 독립 변수이고, 전체 단백질 역가의 증가와 단순히 상관되지 않는다는 것을 나타낸다. ActiCHO P는 제3의 가장 높은 단백질 역가 및 가장 높은 다합체화 수준(밴드 5+에 존재하는 단백질의 45.9%)을 발생시키는 한편, Cell Vento CHO 110은 가장 높은 단백질 역가, 그러나 실질적으로 더 높은 다합체화 수준(밴드 5+에 존재하는 단백질의 32.6%)을 발생시켰다.

[0203] [표 8]

GL-2045 다합체화 분석

배지	% 밴드 (1-4)	% 밴드 (5+)
ActiCHO P	54.1	45.9
EX-CELL CD CHO	59.4	40.6
CHO- SSFM2	61.2	38.8
TC-42	64.0	36.0
SFM4CHO	64.1	35.9
Power CHO3 CD	65.3	34.7
Hyclone ADCF	66.1	33.9
Cell Vento 210	66.5	33.5
Cell Vento 110	67.4	32.6
CD OptiCHO	67.6	32.4
ExpiCHO	68.1	31.9
CD Hybridoma	68.6	31.4
Power CHO GS	68.7	31.3
Balance CD CHO	70.0	30.0
CDM4 CHO	70.2	29.8
Clonal Cell CHO	70.4	29.6
CD FortiCHO	70.4	29.6
HYQ SFX CHO	70.8	29.2
EX-CELL CHO 5	71.4	28.6

[0204]

[0205] **실시예 6 - 공급물에 의한 GL-2045의 배지 스크리닝**

[0206] *추천된 피딩 스케줄*

[0207] 실시예 5에서의 실험의 결과에 기초하여, 가장 높은 GL-2045 단백질 역가와 연관된 4개의 기본 배지 및 가장 낮은 GL-2045 단백질 역가와 연관된 3개의 기본 배지는 반복 실험으로 처리되었고, 여기서 상업적으로 이용 가능한 공급물은 배양 동안 제공되었다. 제조사 추천된 공급물이 확인되지 않았으므로, 높은 역가를 생성한 Cell Vento 110 및 ExpiCHO는 공급물 실험에 대해 선택되지 않았다. Cell Vento CHO 110은 공급물 없이 세포 적응에 사용되는 완전한 배지인 한편, Cell Vento 210은 공급물과 조합되어 배양에 사용되었다. 이 실험에서 사용된 배지 및 공급물 조합은 표 9에 기재되어 있다.

[0208] [표 9]

배지 + 공급물 조합

배지	공급물
Cell Vento CHO-210 EMD Millipore #1025531000	Cell Vento Feed-210 + 시스테인 / 타이로신 + 글루코스 EMD Millipore #1.02488
BalanCD CHO Growth A Medium IRVINE #91118	BalanCD CHO 공급물 1 IRVINE #91127
CD FortiCHO Life Technologies #A11483-01	CD EfficientFeed C AGT Nutriment Supplement Life Tech. #A13275-04
CDM4CHO Hyclone #SH30558.01	Cell Boost 4 (PS307) Hyclone SH30857
PowerCHO3 CD Lonza #12-772Q	Power Feed A + L-글루타민 #BE02-044Q
ADCF-Mab Hyclone #SH30349.02	Cell Boost 4 (PS307) Hyclone #SH30857
ActiCHO P 배지 PAA #U21-070	공급물 A, 공급물 B PAA #U15-072, PAA #U05-034*

[0209] *PAA는 후속하여 GE Lifesciences의 일부가 된다

[0210] GL-2045 클론 58을 37℃ 및 5% CO_2에서 진탕기 항온처리기에서 L-글루타민(Lonza 17-605E호) 및 나트륨 하이포

잔틴 및 타이미딘(HT, Gibco 11067-030호)을 갖는 "ProCHO5" 배지(Lonza 12-766Q호)에서 배양하였다. 계대배양 후, 세포를 세척하고, 0.5x10^{6}개의 세포/㎖에서 접종하고, 이후 밀도가 1x10^6 내지 3x10^{6}개의 세포/㎖ 및 80% 이상의 생존능력에 도달할 때까지 하위배양하였다. GL-2045 클론 58은 표 10에 기재된 선택된 배지로 직접적으로 적응되었다. 적응은 세포가 적어도 2회 내지 3회의 계대배양에 걸쳐 안정한 배가 시간(20 내지 30시간) 및 90% 이상의 생존가능 세포 밀도(VCD)를 획득할 때 완전한 것으로 생각된다. 세포를 선택된 배지(d0)로 0.5x10^{6}개의 세포/㎖에서 시딩하고, 37℃, 5% CO_2 및 높은 습도에서 150 rpm에서 설정된 항온처리기에서 표준 진탕 플랫폼에서 항온처리하였다. PowerCHO3 CD를 제외한 모든 배양물에 대해, 공급은 3일(d3)에 시작하였다. PowerCHO3 CD 배지에 대한 공급은 d1에 시작하였다. 전체 배양 용적은 120㎖이었다. 생존능력이 50%로 떨어질 때 배양물을 수확하였다. GL-2045 안정한 세포주를 추천된 프로토콜에 따라 제조사 추천된 공급물과 함께 7개의 배지의 각각에서 성장시켰다. 각각의 시험된 배지에 대한 공급 전략 및 스케줄은 도 13a 및 도 13b에 도시되어 있다.

[0211] 연구에 걸쳐 세포 밀도, 세포 생존능력 및 GL-2045 단백질 역가의 측정을 수행하였다. 단백질 역가에 대해, 샘플을 펠릿 세포로 원심분리하고, 실시예 6에 기재된 바대로 세포 상청액의 바이오층 간섭측정(Octet)에 의해 세포 상청액 중의 단백질의 측정을 수행하였다. 실시예 5에 기재된 바대로 단백질 A 정제 후 연구의 각각의 아암의 종료 시 GL-2045 다합체화를 평가하였다. 14일까지 또는 생존능력이 50% 아래로 떨어질 때 배양을 계속하였다.

[0212] 놀랍게도, 제조사 추천된 공급물을 갖는 ActiCHO P 중에 성장한 GL-2045는 제조사 추천된 공급물을 갖는 임의의 다른 배지 중에 성장한 GL-2045보다 훨씬 더 높은 피크 세포 밀도를 달성하였다. 이 탁월한 세포 밀도는 놀랍게도 Cell Vento 210을 제외하고 시험된 모든 다른 배지/공급물 조합과 비교하여 3배 이상이었다(도 14).

[0213] 추가로, 제조사 추천된 공급물을 갖는 ActiCHO P, CD FortiCHO 또는 ADCF MAB 중에 성장한 GL-2045는 10일에 제조사 추천된 공급물을 갖는 시험된 다른 배지 중에 성장한 GL-2045보다 훨씬 더 양호한(2배 내지 3배) 세포 생존능력을 달성하였다. 이것은 이들 3개의 배지가 시험된 몇몇 다른 배지/공급물 조합과 비교하여 탁월한 세포 생존능력을 발생시킨다는 것을 입증한다(도 15).

[0214] 추가적으로, 제조사 추천된 ActiCHO 공급물 A 및 ActiCHO 공급물 B를 갖는 ActiCHO P 배지 중에 성장한 GL-2045 CHO 안정한 세포주는 임의의 다른 배지 및 시험된 제조사 추천된 공급물보다 실질적으로 더 높은 역가를 생성하였다(도 16). ActiCHO P 배양물로부터 제조된 역가는 시험된 임의의 다른 배지로부터 적어도 4배 더 높아서, 12일에 Cell Vento CHO-210-에 대한 500mg/ℓ 미만 및 다른 배지에 대해 훨씬 더 적은 것과 비교하여 진탕 플라스크에서 10일에 2g/ℓ에 도달하였다.

[0215] 상이한 배양 조건으로부터 밴드 5 및 이것 초과(5+)에서 퍼센트 다합체에 의해 측정된 바와 같은 GL-2045의 다합체화는 실시예 5에 기재된 바대로 결정되었다(도 17, 표 10). 제조사 추천된 기본 배지 및 공급물을 사용한 GL-2045 다합체화의 가장 높은 속도는 CD FortiCHO, 이어서 ActiCHO 및 PowerCHO3이었다. ADCF-Mab 및 BalanCD는 다른 배양 조건과 비교하여 유의미하게 더 나쁜 GL-2045 다합체화를 나타냈다.

[0216] [표 10]

배지 + 공급물 조합에 의한 다합체 퍼센트

배지 + 공급물	% 밴드 1-4	% 밴드 5+
(1) ADCF-Mab + Cell Boost 4 Feed	76.2%	23.8%
(2) PowerCHO3 CD + PowerFeed A	70.3%	29.7%
(3) CDM4CHO + Cell Boost 4 Feed	74.8%	25.2%
(4) CD FortiCHO + CD Efficient Feed C	64.3%	35.7%
(5) BalanCD CHO Growth A + BalanCD CHO Feed1	76.1%	23.9%
(6) Cell Vento CHO-210 + Cell Vento Feed-210	72.2%	27.8%
(7) ActiCHO P + Feed A, Feed B	69.9%	30.1%

[0217]

[0218] 요약하면, ActiCHO P 배지는 세포 밀도, 생존능력 및 단백질 역가와 관련하여 시험된 다른 배지보다 유의미하게 더 양호하다. 농도계 분석은 CD FortiCHO 배지 + CD 효율적인 공급물 C가 35.7%에서 가장 활성인 다합체(표 10, 밴드 5+)의 가장 높은 퍼센트를 갖는다는 것을 나타낸다. 그러나, CD FortiCHO 배지 + CD 효율적인 공급물 C는 (도 17에서 겔의 상부에서 볼 수 있는 것처럼) 4.7%에서 겔로 이동하지 않는 고분자량 재료의 가장 높은 퍼센트를 가져서, 이 배지가 또한, ActiCHO P보다 더 적은 고도로 질서화되고 더 기능적인 다합체와 함께, 응집된 무질서한 다합체의 더 큰 분획을 생성한다는 것을 제안한다. ActiCHO P와 공급물 A 및 B는 무시할만한 양의 겔로

이동하지 않는 비특이적으로 응집된 고분자량 재료에 의해 30.1%에서 밴드 4 초과의 더 높은 차수의 다합체 밴드의 제2의 가장 높은 퍼센트를 갖는다. 따라서, ActiCHO P는 완전히 기능적인 더 높은 차수의 다합체 밴드의 가장 높은 퍼센트를 가질 것이다. 이 데이터는 상류 제조 조건이 세포 생존능력, 밀도, 및 전체 단백질 역가뿐만 아니라, GL-2045의 임상적으로 효율적인 더 높은 차수의 다합체의 생성에 영향을 미친다는 것을 놀랍게도 추가로 나타낸다. 실시예 3에서 입증된 바대로, 가장 높은 분자량 분획은 FcRnIIIa에 대한 결합의 감소를 나타내어서, 가장 높은 분자량 분획(예를 들어, 무질서화된 GL-2045 응집체)이 GL-2045의 고도로 질서화된 다합체보다 덜 생물학적으로 활성이라는 것을 제안한다. 본 명세서에 기재된 바대로, 매우 놀랍게도, 모든 시험된 기본 배지 중에서, 오직 ActiCHO-P가 높은 전체 GL-2045 단백질 역가, 높은 다합체화, 및 최소 양의 무질서화된 고분자량 GL-2045 응집체를 나타냈다.

[0219] *변경된 공급 프로토콜*

[0220] ActiCHO P 배지 + 공급물이 최적 단백질 역가 및 더 높은 차수의 다합체의 생성을 발생시키는지를 결정한 후, 격일로 공급함으로써 유사한 또는 최적화된 결과를 획득할 수 있는지를 결정하기 위해 변경된 공급 스케줄을 시험하였다. 도 18에서 입증된 바대로, 격일의 공급(청색)은 매일의 공급과 비교하여 세포 밀도(도 18a), 세포 생존능력(도 18b), 배양 pH(도 18c) 또는 단백질 역가(도 18d)를 현저하게 가져오지 않았다. 이 결과는 격일의 공급에 의해 유사한 결과가 얻어질 수 있고, 무결과를 유지시키고 제조 비용을 최소화하기 위해 바람직할 수 있다는 것을 놀랍게도 나타낸다. 그러나, 3일마다의 공급의 유사한 실험은 생존능력 및 단백질 생성이 2일마다 보다 덜 빈번한 공급에 의해 감소하기 시작할 수 있다는 것을 제안하였다(도 19).

[0221] ActiCHO P 공급물이 유사한 결과를 달성하기 위해 다른 비-ActiCHO 기본 배지와 사용될 수 있는지를 결정하기 위해 추가적인 실험을 수행하였다. 간단히, GL-2045 클론 58을 Power CHO-2 CD(Lonza, 12-771Q호) + 4mM L-글루타민(Lonza, 17-605E호) + 1X HT Supplement(Gibco, 11067-030호) 중에 배양하였다. 계대배양 후, 세포를 세척하고, ActiCHO P 완전 배지 ActiCHO P + 6mM L-글루타민(Lonza, 17-605E호) 또는 Power CHO-2 CD 완전 배지 중에 $0.3x10^6$개의 세포/㎖에서 접종하고, 온도 이동 없이 배양하였다. ActiCHO P PowerCHO 배양물을 + 1㎖의 ActiCHO 공급물-A(PAA, U15-072호) + 0.1㎖의 공급물-B(PAA, U05-034호)과 매일 공급하였다. 9일에, 세포 생존능력 및 단백질 역가를 배양에 걸쳐 실시예 5에 기재된 바대로 결정하였다(도 20). 결과는, 제조사의 추천에 따라 ActiCHO 공급물 A 및 B와 사용될 때, PowerCHO2 및 ActiCHO P 둘 다가 동일한 세포 생존능력 및 GL-2045 단백질 수율을 생성한다는 것을 보여준다. 따라서, 다합체 조성물이 ActiCHO P + A + B에 비해 변하지 않은 채 있는 경우, ActiCHO 공급물 A 및 B는 다른 선택 고성능 기본 배지와 사용될 수 있다.

[0222] **실시예 7 - GL-2045 제조를 위한 최적 시기 및 온도 이동의 정도**

[0223] 이 실험의 목적은 온도 이동의 최적 시기 및 정도를 평가하는 것이다. 많은 조사자들은 재조합 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주의 세포 주기, 아폽토시스 및 대사에 대한 온도 이동의 효과를 고려하였다. 그러나, 생존가능 세포 밀도에 대한 온도 이동의 효과가 일반적으로 고려되지만, 최적 온도 이동 결과에 대해 필요한 최소 세포 밀도에 주의가 있더라도 거의 기울이지 않았다. 추가로, 다합체화 스트라도머에서 온도 이동을 성공적으로 수행하기 위해 필요한 최소 세포 밀도는 고려되지 않았다.

[0224] 본 조사자들은 최적 GL-2045 발현 및 최대 역가를 위해 온도 이동의 시기에 1000만개의 세포/㎖의 최소 생존가능 세포 밀도가 필요하다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 추가로, 이 요건은 온도 이동이 일어나는 배양의 날짜보다 더 중요하다. 온도 이동의 시기는 놀랍게도 생존가능 세포 밀도가 대수 증식기에 있을 때, 일반적으로 생존가능 세포 밀도가 1000만개 내지 1500만개의 세포/㎖일 때 가장 성공적이다. 이것은 일반적으로 초기 시딩 밀도에 따라 생물반응기 배양의 4일 내지 5일에 해당한다.

[0225] 더욱이, 당해 분야에 기재된 것으로부터 벗어나서, 37섭씨온도(37℃)±1.0℃로부터 32.5℃±1.0℃로의 온도 이동은 GL-2045의 고역가 제조를 위한 최적 상류 조건에 31℃±0.5℃로의 온도 이동에 바람직하다. GL-2045 상청액의 2개의 별개의 풀은 온도 이동의 성질을 제외하고 동일한 조건을 이용하여 안정한 CHO 클론으로부터 생성되었다. CHO 세포를 5일에 7.1로부터 7.0으로의 pH 이동에 의해 10ℓ의 XDR-10 Single-Use Bioreactor System 생물반응기(Xcellerex, GE)에서 배양하였다. ActiCHO-P CD(카탈로그 U21-051호) 7 리터를 280㎖의 매일의 PAA 공급물 A(카탈로그 U15-053호) 및 28㎖의 매일의 PAA 공급물 B(카탈로그 U15-054호)와 함께 제조에 사용하였다. PAA 공급물 A 및 B는 ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B와 동등하였다. 32.5℃로의 온도 이동(A) 및 31.0℃로의 온도 이동(B)은 각각 5일에 생겼다. 결과는 표 11에 기재되어 있다.

[0226] [표 11]

CHO 세포 생존능력 및 GL-2045 수율에 대한 온도 이동의 효과

그룹	pA 정제된 수율	21 일 생존능력	22 일 생존능력	피크 세포 밀도
A	7.2g/ℓ	90.2%	88.8%	25.0 x 10^6 개의 세포/ml(9 일)
B	5.1g/ℓ	86.1%	83.8%	19.3 x 10^6 개의 세포/ml(9 일)

[0227]

[0228] **실시예 8 - GL-2045의 단백질 A 칼럼 정제는 더 빈번한 CIP 절차를 요한다**

[0229] GL-2045를 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제와 함께 단백질 A HiTrap MabSelect SuRe 칼럼(GE 11-0034-95호)에 의해 친화도 크로마토그래피(AC)에 의해 정제하고, 0.1M 글라이신(pH 2.7)에 의해 용리시켰다. AC 정제된 GL-2045를 1X PBS(pH 7.0)(Quality Biological, Inc. 119-069-101호) 중에 저장하였다. AC GL-2045 정제를 각각의 실행의 종료 시 칼럼 Cleaning In Place(CIP) 절차 없이 공정처리하였다. CIP 절차는 통상적으로 단백질 A 수지를 살균하면서 침착물을 가수분해하도록(이로써 단백질 A 칼럼의 결합 역가를 재생) 정제 사이클 사이에 칼럼을 통해 희석된 수산화나트륨(0.1 내지 0.5M NaOH)을 흐르게 하는 것을 수반한다(Boulet-Audet *et al*, Scientific Reports, Vol. 6, 2016). GL-2045를 4개의 별개의 단백질 A 친화도 칼럼(칼럼 1 내지 4, 실행 11.27.12)에서 정제하였다. 이후, 동일한 단백질 A 친화도 칼럼을, 100% 용리 완충제를 갖는 칼럼을 용리시킨 후, 제2 친화도 정제 실행(실행 11.28.12)에 사용하였다. 동일한 칼럼을 사용한 2회의 GL2045의 정제는 제2 정제 실행 후 동종이합체 및 동종이합체의 이합체 둘 다인 더 낮은 분자량의 종의 양의 감소를 보여주었다(도 22). 표 12에 기재된 바대로, SDS-PAGE의 농도계 분석은 동종이합체 및 이합체 밴드의 유의미한 손실을 나타내어서, 용리 완충제에 의한 용리에 의해 단백질 A 칼럼으로부터 완전히 제거되지 않는 GL-2045 단백질인 잔류하는 고도의 단백질 A-avid가 단백질 A 친화도 칼럼에 대한 결합에서 더 낮은 분자량의 밴드보다 우월하다는 것을 나타낸다.

[0230] [표 12]

단백질 A 정제된 GL-2045 의 농도계

동종이합체 밴드 1	실행 11.27.12	실행 11.28.12	% 차이 실행 1/2
칼럼 1	14.1	8.8	-37.6
칼럼 2	16.5	16.8	1.8
칼럼 3	21.8	18.5	-15.1
칼럼 4	22.2	21.3	-4.1
		평균	-13.8
이합체 밴드 2	실행 11.27.12	실행 11.28.12	% 차이 실행 ½
칼럼 1	24.9	19.8	-20.4
칼럼 2	17.5	15.3	-12.6
칼럼 3	17.1	14.5	-15.2
칼럼 4	15.5	11.7	-24.5
		평균	-18.2

[0231]

[0232] 더 낮은 분자량의 밴드의 소실은 친화도 칼럼에 대한 결합도 기반 결합이 존재하고, 이로써 다수의 단백질 A 결합 부위를 갖는 고분자량 다합체 GL-2045가 낮은 분자량 종보다 우월하여서, 더 낮은 분자량 종의 소실을 발생시키고 약물의 조성을 효과적으로 변경한다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 다수의 정제 실행에 단백질 A 칼럼을 사용할 때 GL-2045의 최적 정제에 더 빈번한 CIP 절차 및 이에 따라 더 빈번한 단백질 A 칼럼의 재생이 필요하다는 것을 제안한다. 이 결과는, 상기 기재된 바대로, 당해 분야에서 가장 흔히 사용된 단백질 A 칼럼을 분해하는 NaOH의 사용을 재생이 통상적으로 요하므로 예상치 못했다. 이러한 완충제의 더 빈번한 사용은 단백질 A 칼럼의 더 빠른 분해를 따라서 발생시킬 것이다. 그러므로, 고농도 NaOH 완충제, 예컨대 0.5M NaOH에 의한 빈번한 CIP 절차를 견딜 수 있는 단백질 A 칼럼은 온전한 GL-2045 약물의 최적 프로파일을 유지시키기 위해 GL-2045의 정제에서 반복적으로 사용된 단백질 A 칼럼의 재생에 사용되어야 한다.

[0233] **실시예 9 - GL-2045의 반복적인 정제 사이클에 대해 단백질 A를 재생하기 위한 CIP 절차는 0.5M NaOH를 요한다**

[0234] 실시예 8에 기재된 바와 같은 CIP 절차의 부재 하의 낮은 분자량 종의 손실은 또한 제1 칼럼 실행 후 단백질 A 친화도 칼럼에 결합된 채 있어서 결합 부위를 점유하고 후속하는 정제 실행에서 더 낮은 분자량 종의 결합을 방지하는 고분자량 종이 있다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 추가적인 CIP 절차가 단백질 A 정제된 GL-2045의 다합체 프로파일을 유지시키기 위해 사용되어야 한다는 것을 나타낸다.

[0235] 본 발명자들은 HiTrap MabSelect 칼럼(GE 28-4082-58호)을 사용한 정기적인 매일의 정제에 의해, 대략 6 내지 7 정제 실행 후, 동종이합체 및 이합체 분획의 미묘한 손실로 표시된, 정제된 GL-2045의 조성이 변했다는 것을 발견하였다. 예를 들어 단일클론 항체를 정제하는 숙련된 당업자는 6 내지 7의 단백질 A 정제 실행 후 정제된 생성물의 조성의 변화를 발견하도록 예상되지 않았다. 이 문제점을 해결하기 위해, 단백질 A 칼럼의 결합능을 재생시키도록 제조사의 추천된 0.1M NaOH에 의한 CIP 절차를 수행하였다. 각각의 정제 실행 후 당해 분야에 사용된 것보다 더 빈번한 이 CIP 절차를 수행하였다. 빈번한 CIP 절차의 이용은 약간의 개선을 발생시켰지만, 더 낮은 분자 중량 종의 소실의 문제점을 해결하지 않았다. 본 발명자들은 따라서 단백질 A에 대한 GL-2045의 격렬한 결합이 동종이합체 및 이합체의 보유를 촉진하기 위해 칼럼을 완전히 재생시키기 위해 숙련된 당업자가 보통 사용하는 것보다 더 엄격한 CIP 섭생을 요한다고 추정하였다.

[0236] 그러나, 단백질 A 칼럼(예를 들어, MabSelect)에서 흔히 사용된 수지는 NaOH 내성이 아니고, 따라서 더 엄격한 NaOH 완충제의 사용에 의해 빨리 분해할 것이고, 이러한 악화는 감소된 정제 역량 및 GL-2045 다합체 조성의 변화와 연관된다. 그러나, 덜 흔히 사용된 단백질 A 배지(예를 들어, MabSelect SuRe(General Electric 11-0034-95호))는 0.5 NaOH에서의 증대된 세정을 견딜 수 있다. 그러므로, 본 발명자들은 0.5M NaOH 완충제를 사용하는 매일의 CIP 절차에 의해 MabSelect SuRe 칼럼을 사용하였다. 더 빈번한 및 더 엄격한 CIP 절차의 실행 후, GL-2045의 단백질 A 정제는 GL-2045의 조성의 변화 없이 동종이합체 또는 이합체의 소실 없이 매일 기준으로 달성되었다.

[0237] 따라서, 본 발명자들은 GL-2045의 단백질 A 칼럼 CIP가 동종이합체 및 이합체, 및 이에 따라 온전한 GL-2045 약물의 최적 프로파일을 보유하기 위해 단일클론 항체 또는 Fc 융합 단백질에 의해 작업하는 숙련된 당업자가 보통 이용하는 것보다 더 엄격한 및 더 빈번한 CIP 절차를 요한다는 것을 발견하였다.

[0238] **실시예 10 - 단백질 A 칼럼 pH 용리 구배는 고도로 질서화된 다합체가 아닌 동종이합체 응집체의 GL-2045를 정제하도록 사용된다**

[0239] pH 용리 구배는 전체 단백질 수율을 최적화하기 위해 단백질 정제 동안 단백질 A 칼럼과 보통 사용되지만, 약물의 조성을 변화시키도록 통상적으로 사용되지 않는다. 본 발명자들은 더 높은 차수의 다합체로부터 GL-2045의 무질서한 응집체를 제거하기 위해 단백질 A 칼럼에서의 이러한 pH 용리 구배를 이용할 수 있다는 것을 발견하였다. 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제와 함께 단백질 A HiTrap MabSelect SuRe(GE 11-0034-95호)에 의한 친화도 크로마토그래피(AC), 이어서 결합 완충제에 의한 추가적인 세척에 의해 GL-2045 CHO 상청액을 정제하였다. 단백질 A에 결합된 GL-2045를 0% 내지 100%의 0.1M 글라이신(pH 2.7)을 포함하는 용리 완충제에 의해 용리시켜서, GL-2045 용리에 대한 단백질 A 친화도 칼럼으로부터의 pH 구배를 생성하였다. 용리물 분획을 96웰 플레이트(Greiner bio-one 780271호)로 수집하고, 각각의 겔로 Tris-HCl(pH 9.0)을 첨가함으로써 pH 7.5에서 중화시켰다. 이후, 각각의 분획의 동등한 단백질 양은 비환원 SDS-PAGE 겔(4% 내지 12% NuPage Bis-Tris, Invitrogen NP0322BOX호)에서 흘렀다.

[0240] pH 용리 구배에 의한 단백질 A 칼럼의 용리에 의해 얻은 분획의 SDS-PAGE 분석은 매우 고분자량인 종이 분획 D6 및 D7에서 마지막에 용리된다는 것을 나타냈다(도 23a 및 도 23b). 놀랍게도, 바로 제1 분획(D1)은 또한 고분자량 종을 함유하였다. 그러므로, 이 결과는 고분자량 분획이 단백질 A 친화도 칼럼의 pH 구배 용리에 의해 GL-2045의 주요 종(예를 들어, 동종이합체, 이합체 및 더 높은 차수의 다합체)으로부터 분리될 수 있다는 것을 나타낸다. 실시예 1 내지 3에 기재된 바대로, 이 분획은 Fc 수용체 결합의 감소 및 CDC 저해의 감소로 나타난 더 적은 활성 종을 나타낼 수 있다.

[0241] 재생(0.5M NaOH에 의한 CIP 및 HCl에 의한 중화)에 의해 얻은 매우 고분자량인 분획은 겔(도 23b, 아주 오른쪽 레인)에 또한 도시되어 있다. 이 결과는 용리 후 단백질 A 칼럼에 남은 고분자량 종이 존재한다는 것을 나타내어서, 완전 칼럼 결합능을 재생시키기 위해 CIP 절차 동안 높은 엄격한 NaOH 완충제에 대한 수요를 다시 나타낸다.

[0242] 따라서, 이 목적에 보통 사용되지 않지만, pH 용리 구배는 생물학적으로 활성인 더 낮은 더 높은 차수의 다합체

로부터 GL-2045의 고분자량의 무질서한 응집체를 분리 제거하기 위해 이용될 수 있다. 이러한 분리는 정제된 GL-2045의 다합체 프로파일을 추가로 최적화하거나 유지시키기 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 단계 용리 구배는 최적화된 GL-2045 조성에 도달하도록 이용될 수 있다.

[0243] **실시예 11 - 이온 교환 칼럼 염 및 pH 조건은 GL-2045 다합체 조성을 변형시킨다**

[0244] GL-2045의 정제를 위한 중요한 목표는 최종 정제된 생성물의 다합체 조성물의 엄격한 제어이다. 이온 교환 칼럼(예를 들어, 양이온 및 음이온 교환)은 단일클론 항체 및 Fc 융합 단백질의 정제의 연마 단계에 일상적으로 이용된다. 본 발명자들은 상이한 농도의 염을 포함하는 용리 완충제를 갖는 POROS CIEX(Invitrogen GoPure XS(10 ㎖) 카탈로그 4448885호)인 양이온 교환 배지를 시험하였다. GL-2045를 처음에 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 이후 혼주하고 CIEX 칼럼에 로딩 전에 50mM 아세트산나트륨(pH 5.0) 중에 투석하였다. 50mM 아세트산나트륨(pH 5)을 평행 및 세척 완충제로서 사용하였다. GL-2045 연마에 대한 용리 완충제(EB) 염 함량의 효과를 다양한 양의 첨가된 완충제 B(1M NaCl(pH 5), 도 24에서 %로 표시)와 함께 50mM 아세트산나트륨 용리 완충제에 의해 시험하였다. AktaAvant에서 크로마토그래피 실행을 수행하였다. 간단히, Avant 방법은 10 칼럼 용적(cv)의 전체 용적에서 2㎖/분에서 50mM 아세트산나트륨(pH 5)에 의해 CIEX 칼럼을 평형화시키는 것을 포함한다. 50mM 아세트산나트륨(pH 5) 중에 이전에 투석된 65 내지 100㎎의 GL-2045를 칼럼에 로딩하였다. 칼럼을 2㎖/분에서 5cv의 결합 완충제에 의해 세척하였다. 이후, GL-2045를 2㎖/분에서 다양한 백분율의 NaCl(예를 들어, 30% 내지 50%의 완충제 B로 이루어진 용리 완충제)을 포함하는 9 내지 15cv의 완충제에 의해 용리시켰다.

[0245] 용리 완충제에 대한 염 농도의 최적 범위를 결정하기 위해 30%의 완충제 b, 40%의 완충제 b 및 50%의 완충제 b(각각 30% EB, 40% EB 및 50% EB)를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리된 GL-2045에 대해 GL-2045의 회수(%)를 결정하였다(도 24). 이 데이터는 용리 완충제 중의 염 함량의 변경이 GL-2045의 다합체 조성을 실질적으로 변형시킬 수 있다는 것을 나타냈다.

[0246] [표 13]

30-50% 완충제 b를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리된 GL-2045의 % 회수

용리 단계	% 완충제 B	분획	로드의 %
1	30	5A1-5A3	37.9
2	40	5B1-5B3	53.8
3	50	6A1-6A3	3.2
4	100	1A1-1B5	0.6
폐기물			4.2

[0247]

[0248] 실시예 11에 기재되고 표 13에 정량화된 바대로, SDS-PAGE 분석은 30% EB, 40% EB 또는 50% EB 용리 완충제에 의해 용리될 때 GL-2045 분자량 종의 분리에서의 극적인 차이를 나타냈다. 재료의 91.7%는 30% 내지 40%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리되고, 50%의 완충제 B를 포함하는 용리 완충제에 의해 회수된 재료는 오직 고분자량 재료이었다. 이 데이터는 용리 완충제의 변경이 GL-2045의 다합체 조성을 실질적으로 변형시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 이온 교환에 선택된 용리 완충제가 이 기술의 신규한 용도인 GL-2045의 다합체 조성을 변형시키도록 사용될 수 있다는 것이 명확하다. 동시에, 본 발명자들은, GL-2045의 조성의 변화가 이온 교환 연마 단계에서 바람직하지 않는 경우, 숙련된 당업자에 의해 보통 실행되는 정확도의 수준이 이온 교환 연마 단계에서 사용하기 위한 용리 완충제의 염 농도를 선택하는 데 필요하다는 것을 발견하였다.

[0249] **실시예 12 - 이온 교환 크로마토그래피는 동종이합체 또는 동종이합체의 이합체를 감소시키거나 제거하도록 사용될 수 있다**

[0250] 실시예 11에서 GL-2045 재료의 91.7%가 30% 내지 40%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리되고, 50%의 완충제 B를 포함하는 용리 완충제에 의해 회수된 재료가 오직 고분자량 재료이면서, 30% 내지 40%의 완충제 b 범위를 갖는 용리 완충제는 추가의 분석에 선택되었다. 이용된 방법은 실시예 11에 기재된 것과 유사하였다.

[0251] SDS-PAGE 분석은 35%, 36%, 또는 37% 또는 이것 초과의 완충제 b(각각 35% EB, 36% EB, 37% EB 등)를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리될 때 GL-2045 동종이합체의 분리에서의 극적인 차이를 나타냈다. 35% EB에서 명확히 보인 동종이합체 및 동종이합체의 이합체가 대조적으로 36% EB에서 크게 감소되고 37% EB 및 이것 초과에서 완전히 제거된다는 것에 주목한다(도 25). 유사하게, SDS-PAGE 분석은 35% EB, 36% EB 또는 37% EB에서 용리될 때 또는 더 높은 완충제 b 농도를 갖는 용리 완충제에 의해 용리될 때 GL-2045의 가장 높은 차수의 다합체 및 많은 무질서화된 응집체의 분리에서의 극적인 차이를 나타냈다. 따라서, 이온 교환에 선택된 용리 완충제가 이

기술의 신규한 용도인 GL-2045의 다합체 프로파일을 변형시키도록 사용될 수 있다는 것이 명확하다. 이 단계 용리로부터의 데이터가 원하는 GL-2045 프로파일을 얻기 위해 단일 단계 또는 다수 단계 용리를 선택하도록 숙련된 당업자에 의해 이용될 수 있다는 것이 또한 명확하다. 예를 들어, POROS CIEX 칼럼 및 36.5% 내지 38.5%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제를 사용한 GL-2045 연마는 모든 동종이합체, 이합체, 및 다합체 내지 다합체 10을 보유할 것이고, 큰 무질서화된 응집체 및 가장 높은 차수의 다합체를 용리시킬 것이다. 상이한 칼럼을 사용한 유사한 예는 실시예 4에 기재되어 있다.

[0252] **실시예 13 - 이온 교환 크로마토그래피는 큰 동종이합체 응집체 및 가장 높은 차수의 다합체를 감소시키거나 제거하도록 사용될 수 있다**

[0253] GL-2045의 최적 조성물의 제조는 가장 높은 차수의 GL-2045 다합체(예를 들어, 명확히 기술할 수 있는 밴드 10 초과의 밴드, 대략 600kD)의 양을 최소화하는 것 및 큰 동종이합체 응집체 및 가장 높은 차수의 다합체(이의 원자가 증가는 면역원성의 이론적 위험의 증가를 부여함) 둘 다를 제거하기 위해 1000kD 초과의 재료를 제거하는 것을 요한다. GL-2045는 상이한 백분율의 완충제 b(38%EB(C1), 39%EB(C2) 및 40%EB(C3))를 포함하는 용리 완충제에 의해 용리되었다(도 26). GL-2045에 대한 주요 용리 피크는 38%(C1), 39%(C2) 및 40%(C3)에서 관찰되었고(도 26), 이어서 50% 및 100%의 완충제 B에서 더 작은 용리 피크가 관찰되었다. 각각의 용리 완충제에 대한 GL-2045 회수의 %는 결정되고, 표 14에 표시되어 있다.

[0254] [표 14]

다양한 용리 완충제에 의한 GL-2045의 퍼센트 수율

C1 수율		
용리 단계	% 완충제 B	% 수율
1	38	85.1
2	50	10.7
3	100	0.6
폐기물		3.5
C2 수율		
용리 단계	% 완충제 B	% 수율
1	39	93.4
2	50	2.96
3	100	0.2
폐기물		3.6
C3 수율		
용리 단계	% 완충제 B	% 수율
1	40	93.8
2	50	1.97
3	100	0.6
폐기물		3.5

[0255]

[0256] 용리된 GL-2045 분획의 다합체 프로파일은 SDS-PAGE 분석의 시각 검사에 의해 결정되었다(도 27). 용리된 분획의 SDS-PAGE 분석의 시각 검사는 용리 완충제의 38%가 잔류 고분자량 재료의 가장 적은 양으로 GL-2045를 회수시킨다는 것을 나타낸다.

[0257] GL-2045 피크를 농도계에 의해 정량화하였다(도 28, SDS-PAGE 밴드에서 퍼센트 강도로서 표 15에 요약). 피크 11은 가장 낮은 분자량을 갖는 동종이합체를 나타내고, 피크 1은 바람직하게 제거된 가장 높은 분자량 재료를 갖는 재료를 나타낸다.

[0258] [표 15]

농도계 분석의 요약

피크	AC/CIEX 38% (C1)	AC/CIEX 39% (C2)	AC/CIEX 40% (C3)	AC (대조군)
1	2.87	2.64	2.7	4.93
2	1.73	0.83	0.62	0.8
3	1.55	1.11	0.58	1.09
4	3.34	3.43	3.39	3.29
5	5.08	4.9	5.34	5.16
6	10.04	9.55	10.05	9.86
7	11.27	11.1	11.55	10.13
8	20.22	19.52	20.89	17.35
9	10.12	12.1	11.6	9.2
10	11.47	12.4	11.43	9.29
11	13.68	16.36	14.75	14.67

[0259]

[0260] 이 결과는 pH 5에서 38% 또는 39%의 완충제 B를 포함하는 아세테이트 용리 완충제에 의한 단계 용리 프로토콜이 GL-2045의 바람직한 분획의 대략 85%를 생성시키고, 600kD 초과의 더 높은 분자량 분획을 감소시킨다는 것을 나타낸다. SDS-PAGE의 시각 검사가 고분자량 재료가 38%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제를 용리시킨 분획에서 가장 낮다는 것을 나타내지만, 농도계 분석은 가장 높은 분자량 분획의 가장 낮은 백분율이 39%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제에 의해 얻어진다는 것을 나타낸다. 그러나, 농도계 분석은 모든 CIEX 정제된 단백질 조성물이 친화도 크로마토그래피 단독에 의해 정제된 재료와 비교하여 고분자량 분획(밴드 1)에서 더 적은 양을 함유한다는 것을 나타냈다. 전체적으로, 용리물의 분석은 큰 응집체 및 가장 높은 차수의 다합체의 양이 Poros CIEX 칼럼에 의한 제어된 용리 조건을 적용함으로써 제어될 수 있다는 것을 제안한다. 따라서, 이온 교환에 선택된 용리 완충제가 이 기술의 신규한 용도인 GL-2045의 가장 큰 고도로 질서화된 다합체 조성물 및 큰 응집체를 변형시키도록 사용될 수 있다는 것이 명확하다. 상이한 칼럼을 사용한 유사한 예는 실시예 4에 기재되어 있다.

[0261] **실시예 14 - 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼에 의한 GL-2045 다합체 조성물의 변형**

[0262] GL-2045를 안정한 HEK 293F 세포주로부터 제조하고, Glutamax(Gibco 35050-061호) 및 Geneticin(Gibco 10131-027호)을 갖는 293 Freestyle Media(Gibco 12338-018호)에서 성장시켰다. 상청액을 1주 2회 수확하고, 0.2㎛에서 1ℓ 필터 시스템(Corning 431098호)으로 여과시켰다. 이후, GL-2045 상청액을 20mM 인산나트륨, 0.15M NaCl(pH 7.2)의 결합 완충제를 갖는 단백질 A HiTrap MabSelect SuRe(GE 11-0034-95호)에 의해 정제하고, 3.0 내지 3.6의 pH를 갖는 0.1M 시트르산나트륨 용리 완충제에 의해 용리시켰다. AC 정제된 GL-2045를 1X PBS(pH 7.0)(Quality Biological, Inc. 119-069-101호) 중에 저장하였다.

[0263] 이후, GL-2045를 HiTrap HIC 선택 키트(GE 28-4110-07호)를 사용하여 7개의 상이한 소수성 상호작용 칼럼(HIC)에서 정제하였다. 이 키트에 포함된 칼럼은 표 16에 기재되어 있다.

[0264] [표 16]

소수성 상호작용 칼럼

	칼럼	CV
1	HiTrap 옥틸 FF	1ml
2	HiTrap 뷰틸 HP	1ml
3	HiTrap 페닐 FF (낮은 Sub)	1ml
4	HiTrap 뷰틸 FF	1ml
5	HiTrap 뷰틸-S FF	1ml
6	HiTrap 페닐 FF (높은 Sub)	1ml
7	Hi Trap 페닐 FF	1ml

[0265]

[0266] HIC 칼럼을 50mM 인산나트륨, 1.0M 황산암모늄(pH 7.0)(Start 완충제)과 평형화시키고, (4 용적의 출발 완충제 중에 희석된) 3.5mg의 AC 정제된 GL-2045를 각각의 칼럼에 로딩하였다. 출발 완충제에 의해 세척한 후, 0% 내지

100% 50mM 인산나트륨(pH 7.0)을 사용하여 구배 용리를 수행하였다. SDS page에 의해 모든 분별화된 피크 및 관류를 시험하였다. 비환원 샘플을 15% Tris HCl(Bio-Rad 161-115호)에 로딩하였다. Invitrogen으로부터의 Silver Stain 키트(LC6100호)를 사용하여 염색을 수행하였다.

[0267] 7개의 상이한 HIC 칼럼은 GL-2045의 상이한 다합체 프로파일을 나타냈다. 예로서, 뷰틸 HP 칼럼은 A12에서 발견된 다합체 분자량 종으로부터 동종이합체 분획(분획 A10)을 분리시켰다. 동일한 효과가 페닐 HP 칼럼에 의해 보였다(분획 B8과 비교된 분획 B11). 로딩된 재료의 불과 16%는 옥틸 FF 칼럼에 의해 용리 분획에서 회수되어서, 이것이 GL-2045에 대한 관류 모드 연마에 매우 적합할 수 있다는 것을 나타낸다. 추가로, 옥틸 FF 칼럼으로부터의 용리된 분획은 더 높은 분자량 종을 함유하여서, 칼럼이 더 낮은 효력을 갖는 매우 고분자량인 동종이합체 응집체 종의 제거에 또한 매우 적합할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0268] MO45로 공지된 GL-2045의 젖과 버전에서 유사한 실험을 수행하고, MO45를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 이후 Hiload 26/10 Phenyl Sepharose High Performance(GE 17-1086-01)을 갖는 HIC에 의해 AKTA Avant(GE)에서 추가로 정제하였다. HIC 칼럼을 0.1M 인산나트륨, 1M 황산암모늄(pH 7.0)(Start 완충제)과 평형화시키고, MO45를 칼럼에 로딩한 후, Start 완충제에 의해 세척 단계를 하여서, 모든 비결합된 재료를 제거하였다. 이후, MO45를 구배 용리를 갖는 0.1M 인산나트륨(pH 7.0) 용리 완충제에 의해 용리시켰다(도 30 내지 도 31).

[0269] MO45의 HIC 정제된 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하여 MO45 다합체 프로파일에 대한 HIC 칼럼 연마의 효과를 결정하였다. 이 결과는 추가로, 동종이합체, 이합체, 삼합체 및 다합체 분획의 명확한 분리로 표시된 바대로, MO45의 다합체 조성을 변형시키기 위해 소수성 상호작용 칼럼이 사용될 수 있다는 것을 나타냈다(도 32).

[0270] **실시예 15 - 최적으로 제조된 GL-2045에 대한 예시적인 프로토콜**

[0271] 본 명세서에 기재된 데이터는 (1) 단백질 역가, (2) 배양에 걸친 세포 생존능력 및 (3) GL-2045의 다합체화 및 (4) 최종 GL-2045 약물 물질에서의 다합체 프로파일의 유지의 최적화를 발생시키는 GL-2045에 대한 상류 및 하류 제조 공정의 몇몇 변수에 대한 최적 조건을 나타낸다. 중요하게는, GL-2045의 다합체화의 수준은 스트라도머의 임상 효율에 중요하다(실시예 1 내지 4 참조). 본 배양 방법은 특정한 분획의 최적화된 제조 또는 특정한 다합체화 패턴의 증대를 반드시 목표로 하지 않는다. 그러므로, 상류 배양 시약 및 조건 및 하류 정제 배지 및 다합체화에 영향을 미치는 조건은 모두 공지되어 있지 않고, 본 최신 기술에 기초하여 예측될 수 없다.

[0272] 본 명세서에 기재된 데이터는 최적으로 제조된 GL-2045를 생성하기 위한 하기 프로토콜 요소의 발견을 생성시켰다:

[0273] (1) 최적으로 제조된 GL-2045를 생성하기 위한 최적 기본 배지는 ActiCHO P이다.

[0274] 본 명세서에 기재된 데이터는 최적 기본 배지가 ActiCHO P라는 것을 입증한다. ActiCHO P 기본 배지에서 생물반응기 내에 배양된 CHO 세포는 시험된 다른 기본 배지와 비교하여 단백질 역가의 증가를 최적화하면서 높은 세포 밀도 및 세포 생존능력을 발생시켰다. 놀랍게도, ActiCHO P 배지는 배양 프로토콜의 종료 시 존재하는 GL-2045의 더 높은 차수의 다합체의 백분율을 증가시켰다.

[0275] (2) 최적으로 제조된 GL-2045를 생성하기 위한 최적 공급물은 ActiCHO P이고, ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B이다.

[0276] 본 명세서에 기재된 데이터는 추가로 최적 공급물이 매일 또는 격일로 배양물에 첨가된 ActiCHO P 공급물 A 및 공급물 B라는 것을 입증한다. ActiCHO P 공급물 A 및 공급물 B는, 시험된 다른 배지/공급물 조합보다 4배 높은 단백질 역가를 생성시키면서, 높은 세포 밀도 및 높은 세포 생존능력을 유지시켰다. 중요하게는 예상치 못하게, 공급물 A 및 공급물 B를 갖는 ActiCHO P 배지는 고도로 질서화된 다합체의 높은 수준 및, 중요하게는, 시험된 다른 배지/공급물 조합과 비교하여 GL-2045의 고분자량의 무질서화된 응집체의 백분율의 감소를 발생시켰다. 이 데이터는 이 특정한 배지/공급물 조합이 증대된 임상 효율을 갖는 GL-2045 다합체의 더 높은 백분율(예를 들어, 고도로 질서화된 GL-2045 다합체의 더 높은 백분율)을 생성시킨다는 것을 나타낸다. 본 발명자들은 놀랍게도 격일의 공급물 A 및 공급물 B의 첨가에 대한 유사한 결과를 발견하여서, 이 특정한 배지/공급물 조합이 비용을 감소시키고 매일의 배양 조작과 연관된 오염의 위험을 완화시키도록 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0277] 추가로, 공급물 A 및 공급물 B를 갖는 ActiCHO P 배지는 GL-2045의 무질서한 고분자량 응집체의 백분율을 최소화하면서 더 높은 차수의 다합체로서 존재하는 GL-2045의 실질적인 백분율을 생성시켰다. 그러므로, 이 특정한 배지/공급물 조합은 놀랍게도 구체적으로 고도로 질서화된 다합체화된 GL-2045의 생물학적으로 기능적이고 임상

적으로 효율적인 분획에 대해 최적화시켜서, 따라서 추가의 하류 정제 단계에서 높은 차수의 응집체를 제거할 필요를 감소시키면서 GL-2045 다합체 프로파일의 보유를 최적화시킨다.

[0278] (3) 최적으로 제조된 GL-2045를 생성하기 위한 최적 온도 이동은 세포 밀도에 기초하여 37℃로부터 32.5℃로의 이동이다.

[0279] 본 명세서에 기재된 데이터는 추가적으로 세포 밀도에 기초하여 37℃로부터의 32.5℃로의 온도 이동이 최적 세포 밀도, 생존능력 및 단백질 역가를 발생시킨다는 것을 입증한다. 이 온도 이동 프로토콜은, 단순히 배양의 일자에 기초하여 37℃로부터 31℃로의 온도 이동을 기재하는, 확립된 프로토콜로부터의 일탈이다(Ouguchi *et al*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson and Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)). 본 발명자들은 예상치 못하게 세포가 약 10 내지 $15x10^6$개의 세포/㎖의 밀도에 도달한 후 32.5℃로의 온도 이동이 높은 세포 밀도 및 세포 생존능력의 유지뿐만 아니라, 이전에 확립된 프로토콜에 비교하여 단백질 역가의 실질적인 증가를 발생시킨다는 것을 발견하였다.

[0280] 본 명세서에서 입증된 데이터는 특정한 하류 정제 프로토콜이 최적화된 다합체화 프로파일을 갖는 GL-2045 조성물을 생성시킨다는 것을 나타낸다. 이 정제 방법을 수행하는 데 있어서, 칼럼 조건 및 완충제를 제어함으로써 GL-2045의 원하는 다합체 프로파일을 유지시키도록 엄격한 주의가 기울어져야 한다. 이것은 단일클론 항체, Fc 융합 단백질, 또는 순도 및 수율의 보유가 1차 목표인 유사한 CHO 유래된 단백질과 극명한 대조에 유용하다.

[0281] (4) GL-2045의 최적화된 단백질 A 정제는 빈번하고 엄격한 CIP 방법을 요한다.

[0282] GL-2045는 단백질 A에 격렬히 결합한다. 이 격렬한 결합은, mAb 정제에 보통 사용된 CIP 절차가 사용될 때, GL-2045가 칼럼에서 단백질 A 배지에 결합된 채 남게 하였다. 그 결과, 단백질 A 칼럼의 사용의 반복 사이클에 의해, GL-2045의 동종이합체 분획은 단백질 A에 결합할 수 없고, 칼럼을 통해 흘렀다. 이것은 최종 단백질 A 정제된 GL-2045 생성물의 다합체 프로파일에서의 실질적이고 기능적으로 중요한 변화를 생성시켰다. GL-2045의 격렬한 결합은 따라서 당해 분야에서 흔히 사용된 것(예를 들어, mAb 또는 Fc 융합 단백질 정제 동안)보다 더 빈번하고 더 엄격한(예를 들어, 0.5M NaOH 세척 완충제를 사용) CIP 절차에 대한 요건을 생성시켰다. 대부분의 흔히 사용된 단백질 A 칼럼이 GL-2045 다합체를 제거하고 단백질 A 칼럼을 완전히 재생하기 위해 필요한 엄격한 NaOH 세척을 견딜 수 없으므로, 이 결과는 예상되지 못했다. 따라서, 오직 약간의 단백질 A 칼럼, 특히 MabSelect SuRe는 GL-2045 정제에 사용될 수 있고, 원하는 GL-2045 다합체 프로파일을 유지시키기 위해 대략 0.5M NaOH에 의한 빈번한 CIP 절차를 요할 것이다.

[0283] (5) pH 용리 구배 또는 단계 용리는 더 낮은 및 더 높은 차수의 다합체로부터의 GL-2045의 가장 높은 분자량 분획의 분리를 수월하게 한다.

[0284] 단백질 A 정제에 의해 pH 용리 구배를 이용하는 것은 처음 및 마지막 용리 분획에 의해 용리되는 가장 높은 분자량의 성분을 생성시켰다. 이 데이터는 감소된 생물학적 활성을 갖는 것으로 이전에 나타난 무질서한 고분자량 응집체로 이루어진 분획으로부터 GL-2045의 생물학적 활성 분획(예를 들어, 동종이합체, 이합체 및 더 높은 차수의 다합체)을 분리시키기 위해 pH 구배가 이용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0285] (6) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 GL-2045를 연마하기 위한 최적 용리 완충제는 아세테이트 완충제 + 30-40%의 완충제 b, 특히 37.5%-39% +/ 0.5%이다.

[0286] 이온 교환 크로마토그래피는 제조 동안 불순물의 약물을 연마하기 위해 흔히 사용된다. 그러나, 본 발명자들은 최적 다합체화 프로파일이 달성되도록 GL-2045의 특정 분획(예를 들어, 가장 높은 차수의 다합체 및 동종이합체의 고분자량의 무질서한 응집체)을 제거하기 위해 이온 교환 크로마토그래피를 이용하였다. 특히, 본 발명자들은 30% 내지 40%의 완충제 b의 용리 완충제가 GL-2045의 고분자량의 무질서한 응집체의 양을 감소시켰다는 것을 발견하였다. 훨씬 더 구체적으로, 38% 내지 39%의 완충제 b의 용리 완충제는 무질서한 응집체의 감소된 양을 또한 최적화하면서 최종 GL-2045 생성물에 존재하는 동종이합체의 양을 특이적으로 유지시켰다.

[0287] (7) 소수성 상호작용 칼럼(HIC)은 특정한 GL-2045 다합체화 프로파일을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0288] 본 명세서에서 데이터는 다수의 HIC가 GL-2045를 정제하는 연마 단계에서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 옥틸 FF 칼럼으로부터의 관류물은 주로 고분자량 종을 함유하여서, 이 칼럼이 구체적으로 GL-2045의 고분자량 응집체의 제거에 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 대안적으로, 뷰틸 HP 칼럼은 분획 중 하나가 더 바람직한 결과를 달성할 수 있는 분야에 대해 다합체 분획으로부터 동종이합체 분획을 제거하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, HIC 칼럼은 결합 방식에서 사용될 수 있다.

[0289] *GL-2045에 대한 최적화된 제조 프로토콜*

[0290] 종합하면, 상기 기재된 모든 매개변수를 도입하여, 하기 프로토콜은 다합체로서 전체 집단의 가장 높은 백분율을 유지시키면서 GL-2045의 가장 높은 단백질 수율을 생성시켰다.

[0291] CHO 세포를 ExcellGene SA(Monthey, 스위스)에 의한 독점적 형질주입 시스템을 사용하여 piggyBac 트랜스포사제 표적화 서열에 의해 측접된 GL-2045 발현 카세트를 포함하는 하나의 GL-2045 발현 벡터 및 piggyBac 트랜스포사제를 포함하는 제2 벡터인 2개의 벡터로 형질주입하였다. PiggyBac 트랜스포손은 게놈의 고도로 전사된 영역으로의 우선적인 삽입을 갖고, 유전자 슬라이싱으로부터 격리를 제공하는 역위 말단 반복을 추가적으로 함유한다. 형질주입은 고도로 전사된 게놈 영역으로 발현 카세트의 통합을 발생시켜서, 전이유전자의 20개 미만의 게놈 삽입을 갖는 안정하게 형질주입된 CHO 세포의 뱅크를 확립하였다. 이후, 안정하게 형질주입된 CHO 세포를 37℃의 성장 온도에서 ActiCHO P 배지를 갖는 생물반응기에서 배양하였다. 이 배양 동안, 배양물이 약 1000만개 내지 약 1500만개의 세포/㎖의 세포 밀도에 도달할 때까지 세포에 37℃의 성장 온도에서 ActiCHO 공급물 A 및 공급물 B를 매일 공급하였다. 이러한 밀도가 도달한 후, 성장 온도는 37℃±1℃로부터 32.5℃±1℃로 이동하고, 배양 배지로부터의 최적으로 제조된 GL-2045는 배양의 최종 일에 배지로부터 수확되었다.

[0292] 이 프로토콜은 배양의 18일에 95% 초과 및 21일에 80% 초과의 세포 생존능력 및 9,000㎎/㎖ 초과의 최종 전체 단백질 역가를 발생시키고, 여기서 GL-2045의 70% 초과는 비동종이합체로서 존재하고, 30% 초과는 제5 다합체 초과의 더 높은 차수의 다합체로서 존재하였다.

[0293] GL-2045를 가장 큰 고도로 질서화된 다합체의 통과를 파괴하지 않아서, 상청액의 동종이합체 및 다합체 프로파일을 보유하는, 접선 흐름 여과 시스템을 갖는 배양 상청액으로부터 수확하였다. 이후, 하류 제조 방법은 GL-2045를 단리시키고, 불순물을 제거하고, GL-2045의 다합체 프로파일을 제어하도록 특정한 분획을 단리시키도록(예를 들어, 무질서한 고분자량 응집체의 제거) 이용되었다. GL-2045를 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 여기서 단백질 A 배지는 높은 알칼리도 재생을 견디는 능력에 대해 선택되었다. 추가로, 하나 초과의 세척 완충제를 사용하여 정제 공정에 걸친 추가의 제어가 가능하게 하였다. 추가적으로, CIP 절차를 최종 GL-2045 조성물 내의 동종이합체를 보유하는 데 필요한 바대로 단백질 A 칼럼의 결합능을 완전히 재생하기 위해 칼럼에 격렬히 결합된 GL-2045 다합체를 제거하도록 0.5M NaOH 완충제에 의해 보통 수행되는 것보다 더 빈번히 수행하였다. GL-2045는 pH 용리 구배에 의해 또는 이것 없이 단백질 A 칼럼으로부터 용리되었다. 단백질 A 칼럼 친화도 크로마토그래피에 의한 정제 후, 추가적인 연마 단계를 이용하였다. 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여, 37% 내지 39% ± 0.5%의 완충제 b를 포함하는 용리 완충제, 바람직하게는 CIEX POROS XS 수지에 의해 GL-2045의 고분자량의 무질서화된 응집체를 제거하였다. 몇몇 실시형태에서, HIC 칼럼을 이용하여 GL-2045를 추가로 정제하였다. GL-2045의 고분자량의 무질서화된 응집체를 제거하기 위해, 옥틸 FF 수지를 추가적인 연마 단계로서 사용하였다. 대안적으로, 뷰틸 HP 함유 칼럼을 이용하여 특정한 GL-2045 분획를 단리시켰다(예를 들어, 더 높은 차수의 다합체의 단리). 추가적으로, 음이온 교환 칼럼, 구체적으로 Q Sepharose Fast Flow 칼럼을 특히 관류 방식으로 추가적인 연마 단계로서 사용하였다.

[0294] 이들 추가적인 정제 단계가 개별적으로 사용될 수 있지만, 최종 GL-2045 약물 물질에 도달하도록 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의한 GL-2045의 정제가 음이온 교환, 양이온 교환 및 소수성 상호작용 크로마토그래피의 모든 3개와 조합되어 사용되는 것이 바람직하고, 여기서 최종 단백질 역가는 4g/ℓ 초과이고, GL-2045의 70% 초과는 다합체로서 존재하고, 다합체의 30% 초과는 오합체 다합체 또는 이것 초과이다.

[0295] **실시예 16 - 최적으로 제조된 GL-2045의 분석**

[0296] 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 최적으로 제조된 GL-2045를 추가로 규명하기 위해, GL-2045를 ActiPRO 기본 배지, 공급물, 본 명세서에 기재된 온도 이동을 이용하여 본 명세서에 기재된 상류 방법에 따라 생물반응기에서 제조하였다. 이후, 생성된 GL-2045 상청액을 Millipore X0HC 깊이 필터를 통해 통과시키고, 이후 0.2㎛ 필터를 통해 여과시키고, 다수의 하류 공정처리 방법을 이용하여 공정처리하였다. GL-2045 조성물의 다합체화 프로파일은 각각의 공정처리 단계 후 평가되고, 도 33에 도시되어 있다. 여과된 GL-2045 제제의 다합체화 프로파일은 도 33에서 적색 점으로 도시되어 있다. 이후, 여과된 GL-2045 제제를 단백질 A MabSelect Sure(GE. 11-0034-95호)에 의해 친화도 크로마토그래피로 처리하고(도 33에서 청색 점으로 도시된 다합체화 프로파일), 이후 Q Sepharose Fast Flow 칼럼을 사용하여 관류 방식으로 AIEX에 의해 정제하였다. 이후, 생성된 GL-2045를 pH 5.0±0.10으로 pH 조정하고, 0.2㎛ 필터를 통해 여과시켰다(도 33에서 녹색 점으로 도시된 다합체화 프로파일). 이후, GL-2045를 소수성 상호작용 크로마토그래피(도 33에서 오렌지색 점으로 도시된 다합체화 프로파일) 및 여과(도 33에서 자주색 점으로 도시된 다합체화 프로파일) 전에 50mM Na아세테이트 + 375mM NaCl(pH 5.0)을 포함

하는 용리 완충제를 사용하여 단계 용리에 의해 결합 방식에서 Poros XS 칼럼을 사용하여 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하여(도 33에서 황색 점으로 도시된 다합체화 프로파일), 최종 약물 물질에 도달하였다(33에서 검정색 점으로 도시된 다합체화 프로파일). 도 33에 대한 원시 데이터는 하기 표 17에 기재되어 있다.

[0297] [표 17]

분석 HPLC에 의해 결정된 다합체 백분율

실행	단계	7+ 합체	6 합체	5 합체	4 합체	3 합체	2 합체	동종 이합체	용기
HH RegTox 실행 1	1 MabSelect Load	35.4	13.3	7.4	13.6	7.7	8.4	13.0	SUB
HH RegTox 실행 1	2 MabSelect 풀	35.7	12.7	7.4	13.9	7.4	9.6	13.4	SUB
HH RegTox 실행 1	3 AEX 풀	36.4	12.5	7.2	13.8	7.3	9.4	13.1	SUB
HH RegTox 실행 1	4 CEX 풀	32.1	12.3	7.5	14.4	7.8	10.6	15.3	SUB
HH RegTox 실행 1	5 HIC 풀	31.7	12.4	7.4	13.7	7.4	10.8	16.6	SUB
HH RegTox 실행 1	6 UFDF 풀	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
HH RegTox 실행 1	7 DS	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
HH RegTox 실행 2	1 MabSelect Load	35.8	13.0	7.3	13.2	7.7	8.4	13.6	SUB
HH RegTox 실행 2	2 MabSelect 풀	35.2	12.7	7.5	13.8	7.5	9.7	13.7	SUB
HH RegTox 실행 2	3 AEX 풀	35.9	12.5	7.4	13.7	7.3	9.5	13.6	SUB
HH RegTox 실행 2	4 CEX 풀	30.8	12.3	7.7	14.4	8.1	10.9	15.8	SUB
HH RegTox 실행 2	5 HIC 풀	30.3	12.4	7.7	13.9	7.9	11.0	16.9	SUB
HH RegTox 실행 2	6 UFDF 풀	31.8	12.3	7.7	14.0	7.9	10.9	15.4	SUB
HH RegTox 실행 2	7 DS	31.1	12.4	7.8	14.2	8.0	11.0	15.6	SUB
HH 100L 실행 1	1 MabSelect Load	39.2	12.4	7.2	12.8	7.2	7.5	13.4	SS
HH 100L 실행 1	2 MabSelect 풀	38.8	12.3	7.3	13.1	7.0	8.1	13.5	SS
HH 100L 실행 1	3 AEX 풀	37.7	12.4	7.3	13.3	7.1	8.3	13.9	SS
HH 100L 실행 1	4 CEX 풀	33.0	12.7	7.7	14.2	7.8	9.2	15.5	SS
HH 100L 실행 1	5 HIC 풀	33.2	12.8	7.2	12.6	6.7	9.5	18.0	SS
HH 100L 실행 1	6 UFDF 풀	33.9	12.9	7.5	12.9	6.8	9.5	16.6	SS
HH 100L 실행 1	7 DS								SS
HH 100L 실행 2	1 MabSelect Load								SS
HH 100L 실행 2	2 MabSelect 풀	35.6	12.0	7.6	13.2	7.5	9.3	14.7	SS
HH 100L 실행 2	3 AEX 풀	35.4	11.9	7.6	13.4	7.6	9.4	14.7	SS
HH 100L 실행 2	4 CEX 풀	30.6	12.0	8.0	14.0	8.2	10.5	16.6	SS
HH 100L 실행 2	5 HIC 풀	30.0	12.1	7.7	13.0	7.5	10.9	18.8	SS
HH 100L 실행 2	6 UFDF 풀	30.6	12.3	7.9	13.2	7.7	10.9	17.5	SS
HH 100L 실행 2	7 DS								SS
HH 100L 실행 3	1 MabSelect Load	34.5	12.7	8.0	13.6	7.6	9.2	14.4	SS
HH 100L 실행 3	2 MabSelect 풀	36.1	12.4	7.8	13.2	7.4	9.2	13.9	SS
HH 100L 실행 3	3 AEX 풀	36.0	12.4	7.7	13.3	7.4	9.3	14.0	SS
HH 100L 실행 3	4 CEX 풀	29.5	12.3	8.1	14.2	8.3	10.8	16.7	SS
HH 100L 실행 3	5 HIC 풀	29.6	12.3	7.9	13.2	7.7	11.0	18.2	SS
HH 100L 실행 3	6 UFDF 풀	29.8	12.6	8.0	13.5	7.9	11.1	17.2	SS
HH 100L 실행 3	7 DS								SS

[0298]

HH 250L 실행	1 MabSelect Load								SUB
HH 250L 실행	2 MabSelect 풀	34.8	12.9	7.6	14.1	7.3	9.6	13.8	SUB
HH 250L 실행	3 AEX 풀	34.7	12.8	7.5	14.2	7.3	9.7	13.7	SUB
HH 250L 실행	4 CEX 풀	29.5	12.7	7.8	15.0	8.0	11.0	15.9	SUB
HH 250L 실행	5 HIC 풀	29.5	12.7	7.6	13.8	7.4	11.3	17.6	SUB
HH 250L 실행	6 UFDF 풀	30.1	12.9	7.8	14.1	7.6	11.3	16.2	SUB
HH 250L 실행	7 DS								SUB
JJ GMP 1	1 MabSelect Load								SS
JJ GMP 1	2 MabSelect 풀	33.6	13.17	7.54	14.66	7.22	9.49	13.88	SS
JJ GMP 1	3 AEX 풀	34.80	12.70	7.50	14.60	7.20	9.30	14.00	SS
JJ GMP 1	4 CEX 풀	33.00	12.40	7.40	14.80	7.40	10.00	14.80	SS
JJ GMP 1	5 HIC 풀	31.80	12.90	7.40	14.10	7.00	10.30	16.50	SS
JJ GMP 1	6 UFDF 풀	31.40	12.80	7.30	14.20	7.10	10.40	16.80	SS
JJ GMP 1	7 DS	32.90	12.60	7.30	14.10	7.20	10.40	15.50	SS
JJ GMP 2	1 MabSelect Load								SS
JJ GMP 2	2 MabSelect 풀	34.95	13.13	7.48	14.72	7.04	9.35	13.23	SS
JJ GMP 2	3 AEX 풀	34.40	12.80	7.40	14.90	7.20	9.50	13.80	SS
JJ GMP 2	4 CEX 풀	32.10	12.60	7.60	15.20	7.50	10.30	14.70	SS
JJ GMP 2	5 HIC 풀	31.00	13.00	7.40	14.50	7.10	10.60	16.50	SS
JJ GMP 2	6 UFDF 풀	30.60	13.00	7.50	14.50	7.10	10.70	16.60	SS
JJ GMP 2	7 DS	31.60	12.60	7.40	14.30	7.10	10.60	16.40	SS
JJ GMP 3	1 MabSelect Load								SS
JJ GMP 3	2 MabSelect 풀	34.23	13.17	7.54	14.49	7.18	9.50	13.86	SS
JJ GMP 3	3 AEX 풀	34.20	13.00	7.50	14.50	7.20	9.60	14.00	SS
JJ GMP 3	4 CEX 풀	32.30	12.70	7.50	14.90	7.50	10.20	14.80	SS
JJ GMP 3	5 HIC 풀	30.00	12.80	7.80	14.50	7.50	10.80	16.60	SS
JJ GMP 3	6 UFDF 풀	29.90	12.90	7.70	14.60	7.50	10.70	16.70	SS
JJ GMP 3	7 DS	31.30	12.60	7.70	14.40	7.50	10.70	15.90	SS

[0299]

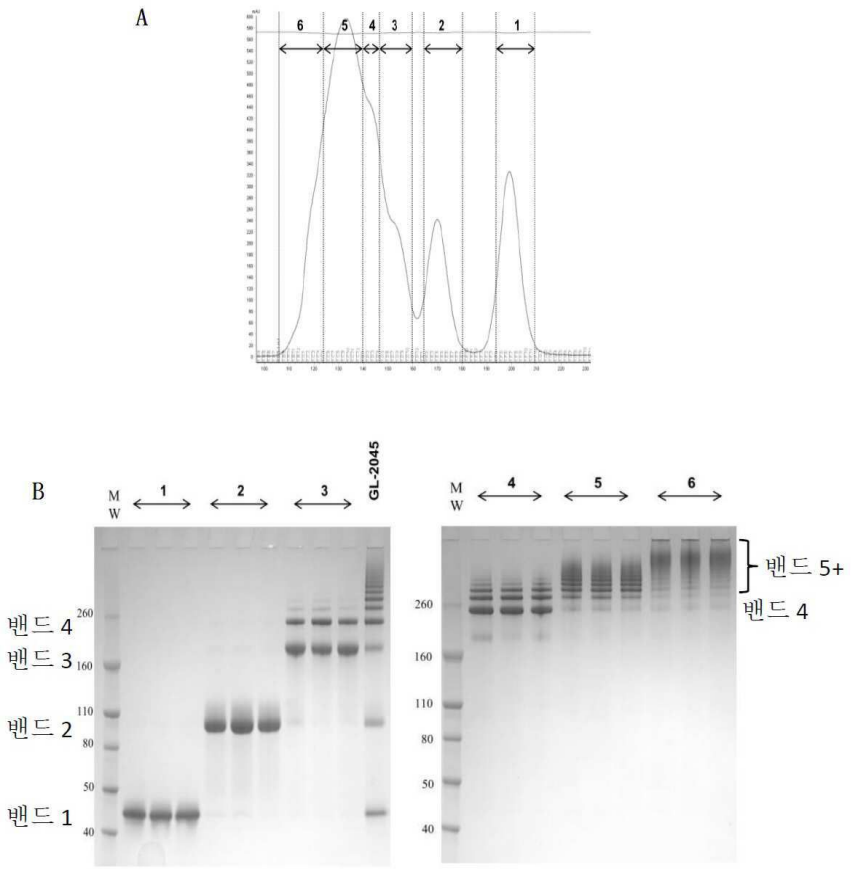
[0300] 분석용 HPLC에 의해 각각의 단계 후 동종이합체, 이합체, 삼합체, 사합체, 오합체, 육합체 및 7합체+ 분획의 백분율을 평가하였다. 간단히, GL-2045 안정하게 형질주입된 CHO로부터의 상청액을 본 명세서에 기재된 상류 방법에 따라 생성시켰다. 다음에, GL-2045를 본 명세서에 기재된 하류 방법에 따라 정제하였다. 정제의 하기 연속 단계에서 샘플을 얻었다: 단백질 A MabSelect SuRe 로드, 단백질 A MabSelect SuRe 풀, 음이온 교환 풀, 양이온 교환 풀, HIC 풀, UFDF 풀 및 약물 물질. 분석용 SEC-HPLC에 의해 샘플을 비교하였다. 간단히, 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Agilent 1100 HPLC 시스템)에서 280㎚에서의 UV 검출과 시리즈로 2개의 SEC 칼럼(Agilent Bio SEC(300Å))을 사용하여 HPLC에 의해 등용매 분리를 수행하였다. 60분의 실행 시간 및 0.5㎖/분의 유속에 의해 크로마토그래피를 수행하였다. 각각의 피크의 상대 면적 퍼센트를 계산한다.

[0301] 결과는 도 33에 도시되어 있다. 도 33에서 명확한 것처럼, GL-2045의 하류 공정처리는 가장 작은 분획, 동종이합체 및 동종이합체의 이합체, 및 가장 큰 분획, 7합체 +의 수준을 변경하는 한편, 분획 3 내지 6은 꽤 안정하게 있었다. 더 적은 다합체와 관련하여, 최종 약물 물질을 통한 단백질 A 칼럼 로딩으로부터의 점진적인 하류 제조 단계는 동종이합체 및 동종이합체의 이합체의 회수를 증가시켰다. 그러나, 점진적인 하류 공정처리 단계는 이의 상대 백분율의 감소에서 생긴 가장 높은 차수의 다합체에 대한 반대의 효과를 가졌다.

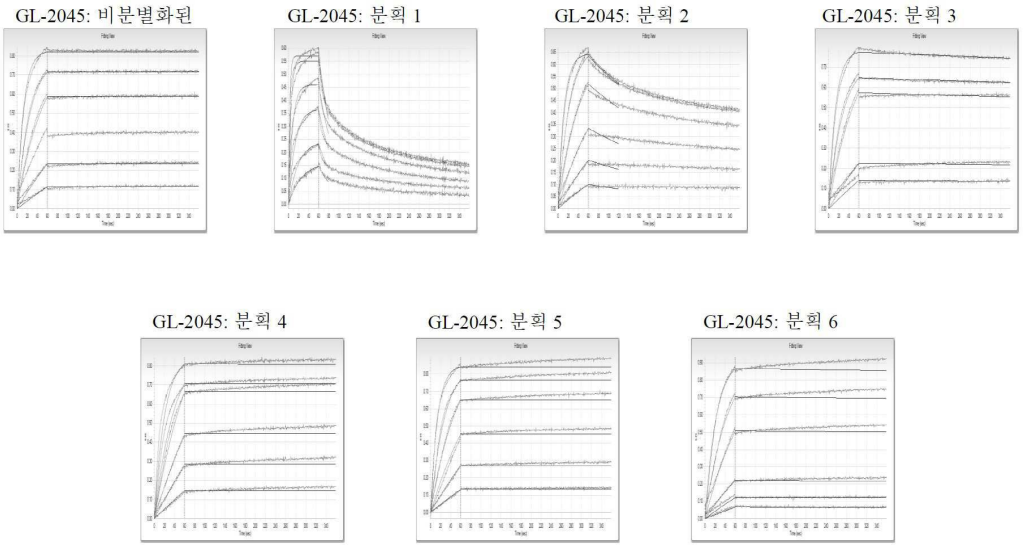
[0302] 생성된 GL-2045 약물 생성물은, 전체 조성물의 백분율로서, 약 20% 미만의 동종이합체, 및 약 28% 초과의 7합체 및 이것 초과를 포함하는 한정된 다합체 패턴을 갖는다. 상기 조성물은 또한 약 7-12%의 동종이합체의 이합체, 약 6% 내지 11%의 동종이합체의 삼합체, 약 10% 내지 16%의 동종이합체의 사합체, 약 6% 내지 9%의 동종이합체의 오합체, 및 약 10% 내지 14%의 동종이합체의 육합체를 포함한다.

도면

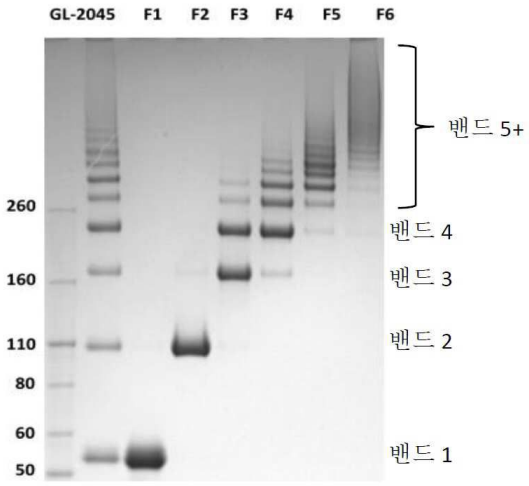
도면1


A
6
5
4
3
2
1
B
M
W
1
2
3
GL-2045
4
5
6
밴드 4
밴드 3
밴드 2
밴드 1
260
160
110
80
50
40
밴드 5+
밴드 4

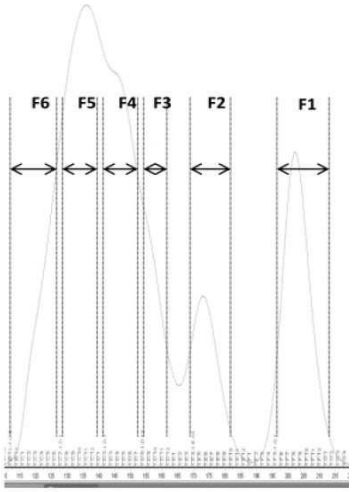
도면2


GL-2045: 비분별화된
GL-2045: 분획 1
GL-2045: 분획 2
GL-2045: 분획 3
GL-2045: 분획 4
GL-2045: 분획 5
GL-2045: 분획 6

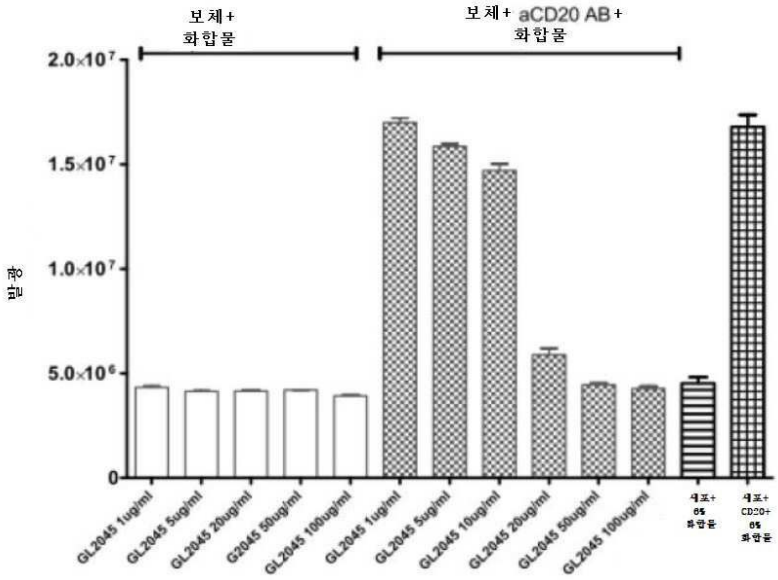
도면3a


GL-2045
F1
F2
F3
F4
F5
F6
260
160
110
80
60
50
밴드 5+
밴드 4
밴드 3
밴드 2
밴드 1

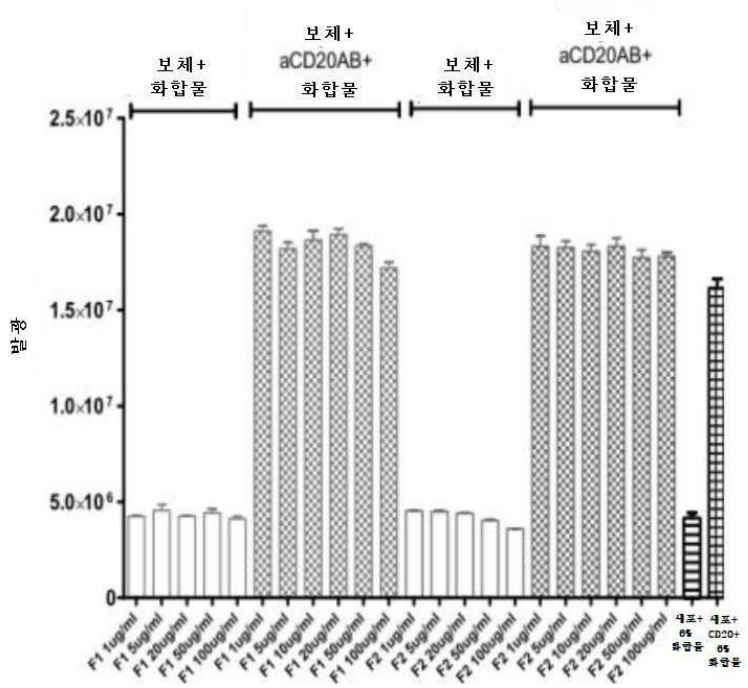
도면3b


F6
F5
F4
F3
F2
F1

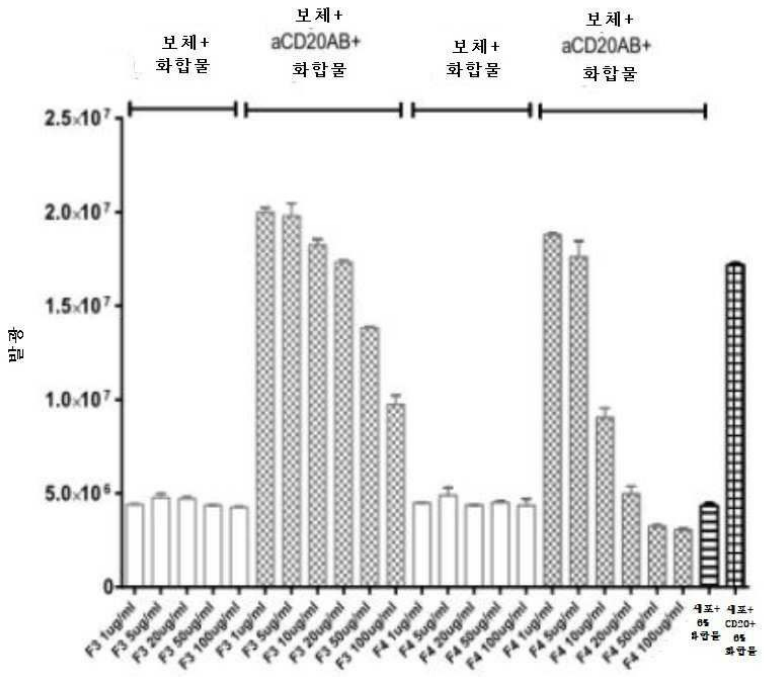
도면4a


보체+
화합물
보체+ aCD20 AB+
화합물
2.0×10⁷
1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
형광
GL2045 1ug/ml
GL2045 5ug/ml
GL2045 20ug/ml
G2045 50ug/ml
GL2045 100ug/ml
GL2045 1ug/ml
GL2045 5ug/ml
GL2045 10ug/ml
GL2045 20ug/ml
GL2045 50ug/ml
GL2045 100ug/ml
세포+
6%
화합물
세포+
CD20+
6%
화합물

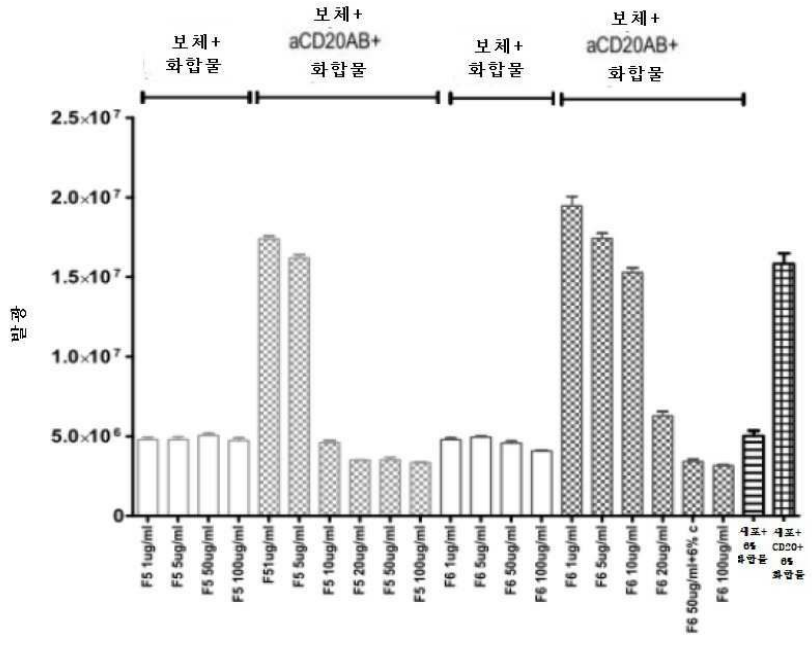
도면4b


보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
2.5×10⁷
2.0×10⁷
1.5×10⁷
1.0×10⁷
5.0×10⁶
0
형광
F1 1ug/ml
F1 5ug/ml
F1 20ug/ml
F1 50ug/ml
F1 100ug/ml
F1 1ug/ml
F1 5ug/ml
F1 10ug/ml
F1 20ug/ml
F1 50ug/ml
F1 100ug/ml
F2 1ug/ml
F2 5ug/ml
F2 20ug/ml
F2 50ug/ml
F2 100ug/ml
F2 1ug/ml
F2 5ug/ml
F2 10ug/ml
F2 20ug/ml
F2 50ug/ml
F2 100ug/ml
세포+
6%
화합물
세포+
CD20+
6%
화합물

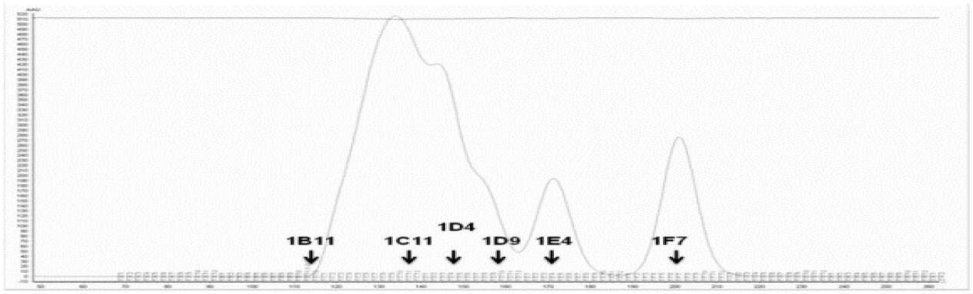
도면4c


보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
발광
2.5x10^7
2.0x10^7
1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0
F3 1ug/ml
F3 5ug/ml
F3 20ug/ml
F3 50ug/ml
F3 100ug/ml
F3 1ug/ml
F3 5ug/ml
F3 10ug/ml
F3 20ug/ml
F3 50ug/ml
F3 100ug/ml
F4 1ug/ml
F4 5ug/ml
F4 20ug/ml
F4 50ug/ml
F4 100ug/ml
F4 1ug/ml
F4 5ug/ml
F4 10ug/ml
F4 20ug/ml
F4 50ug/ml
F4 100ug/ml
세포+
6%
유안분
세포+
CD20+
6%
화합물

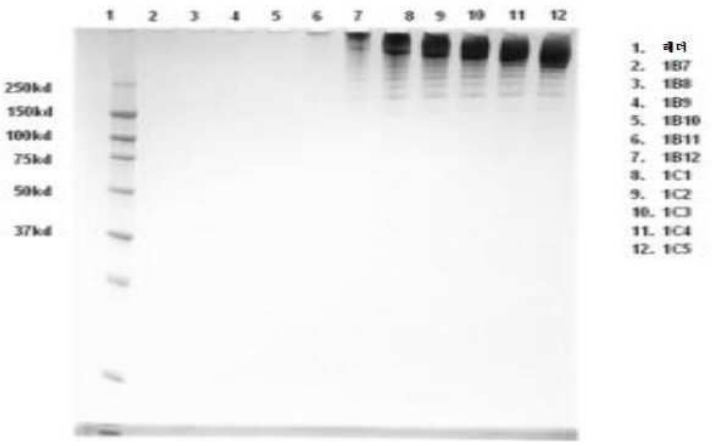
도면4d


보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
보체+
화합물
보체+
aCD20AB+
화합물
발광
2.5x10^7
2.0x10^7
1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0
F5 1ug/ml
F5 5ug/ml
F5 50ug/ml
F5 100ug/ml
F51ug/ml
F5 5ug/ml
F5 10ug/ml
F5 20ug/ml
F5 50ug/ml
F5 100ug/ml
F6 1ug/ml
F6 5ug/ml
F6 50ug/ml
F6 100ug/ml
F6 1ug/ml
F6 5ug/ml
F6 10ug/ml
F6 20ug/ml
F6 50ug/ml+6% c
F6 100ug/ml
세포+
6%
유안분
세포+
CD20+
6%
화합물

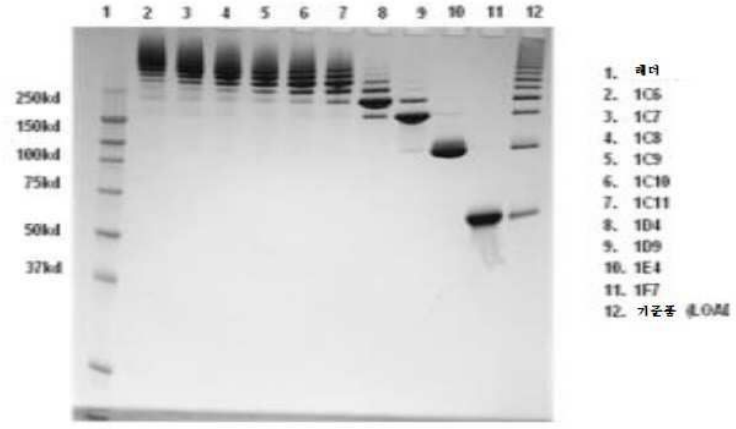
도면5a



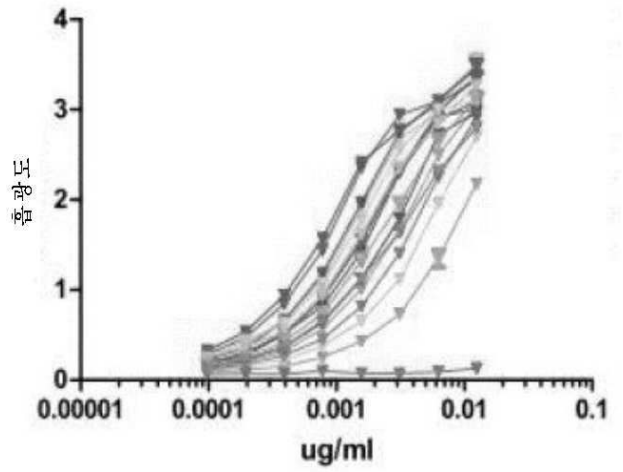
도면5b



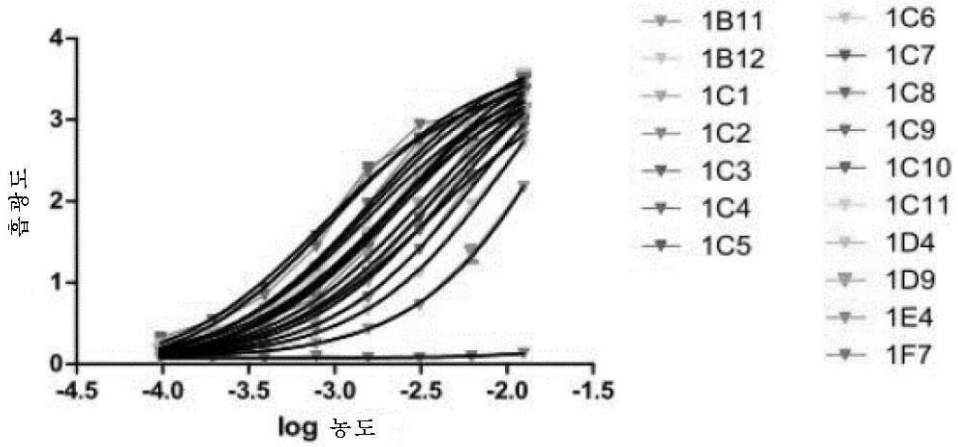
도면5c



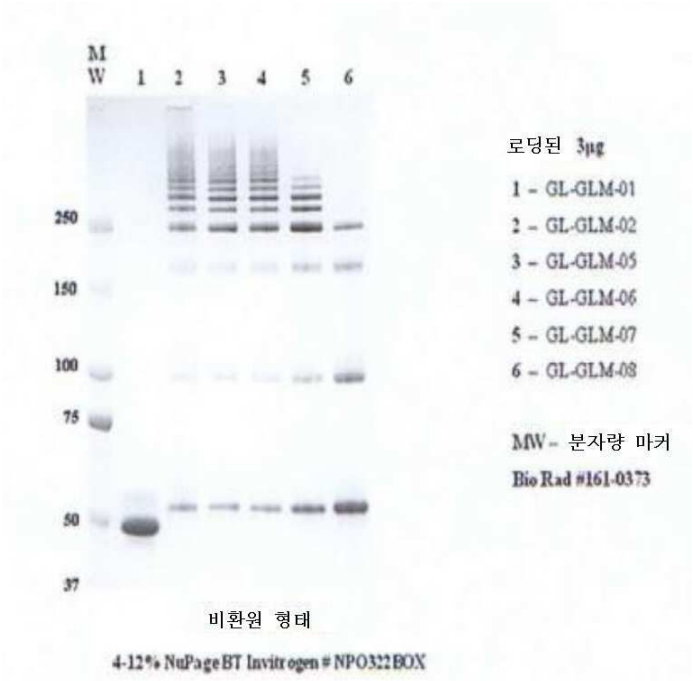
도면6a


흡광도
4
3
2
1
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
ug/ml

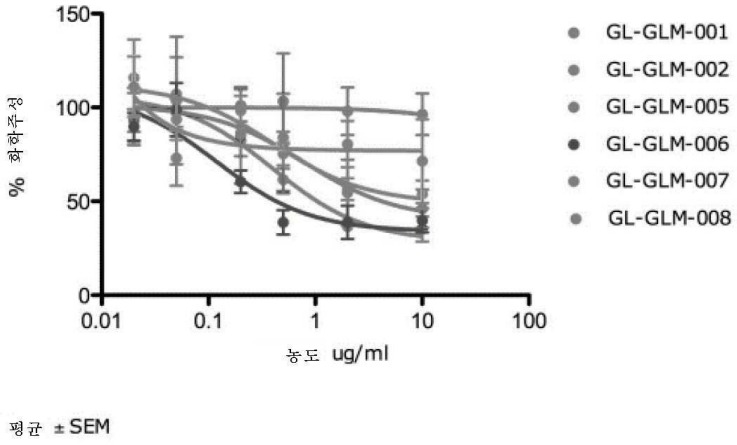
도면6b


흡광도
4
3
2
1
0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
-2.5
-2.0
-1.5
log 농도
1B11
1B12
1C1
1C2
1C3
1C4
1C5
1C6
1C7
1C8
1C9
1C10
1C11
1D4
1D9
1E4
1F7

도면7

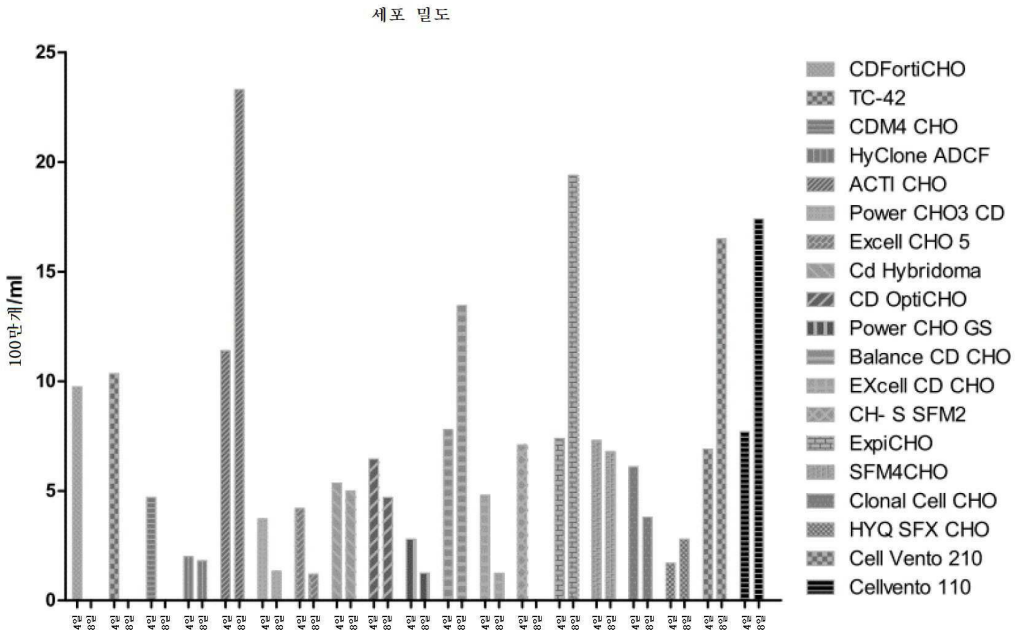


도면8

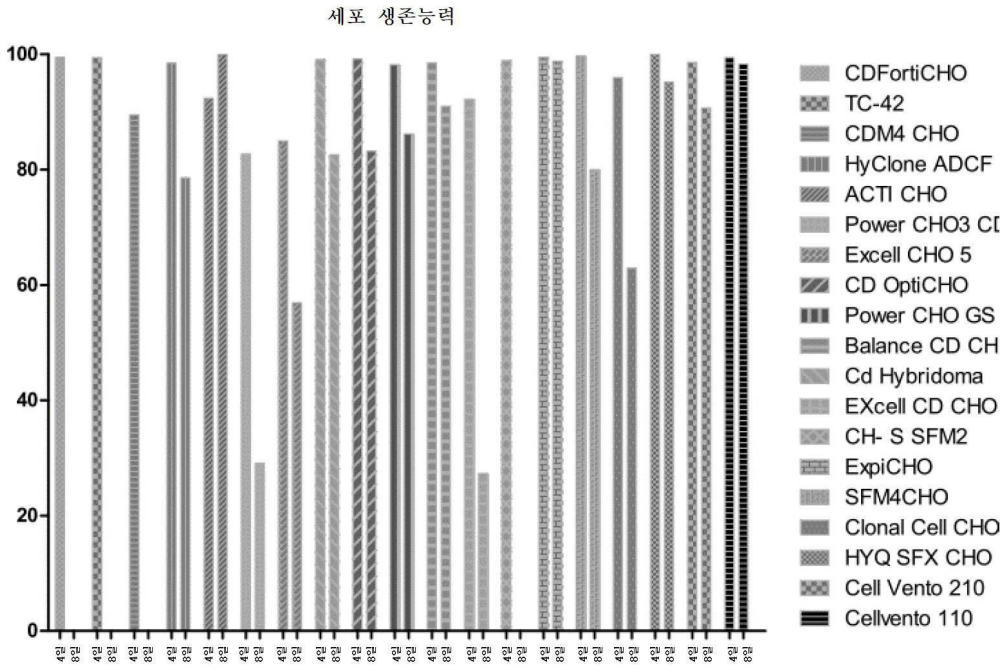


평균 ± SEM

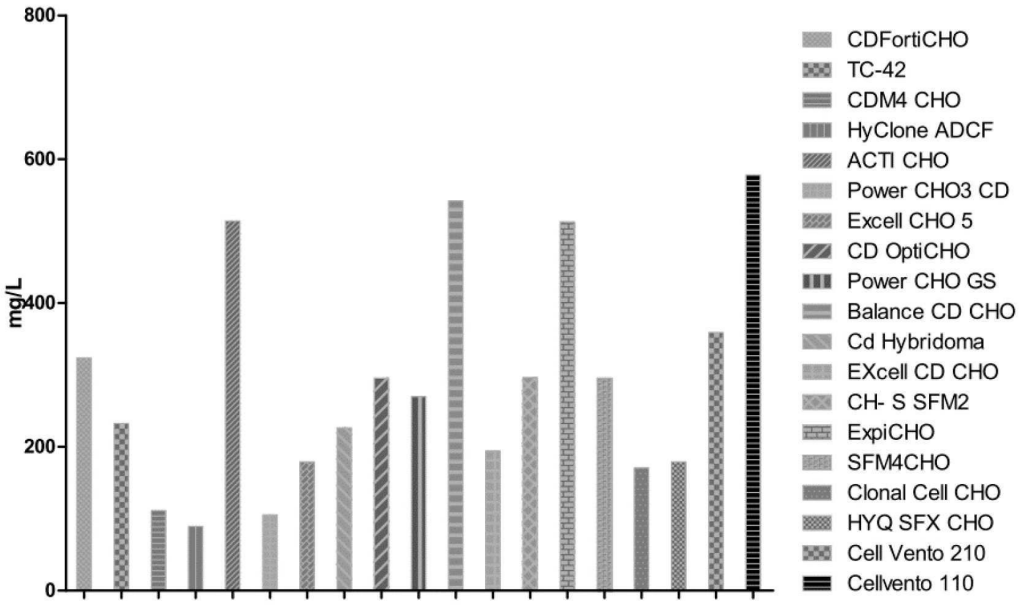
도면9


세포 밀도
100만개/ml
25
20
15
10
5
0
CDFortiCHO
TC-42
CDM4 CHO
HyClone ADCF
ACTI CHO
Power CHO3 CD
Excell CHO 5
Cd Hybridoma
CD OptiCHO
Power CHO GS
Balance CD CHO
EXcell CD CHO
CH- S SFM2
ExpiCHO
SFM4CHO
Clonal Cell CHO
HYQ SFX CHO
Cell Vento 210
Cellvento 110

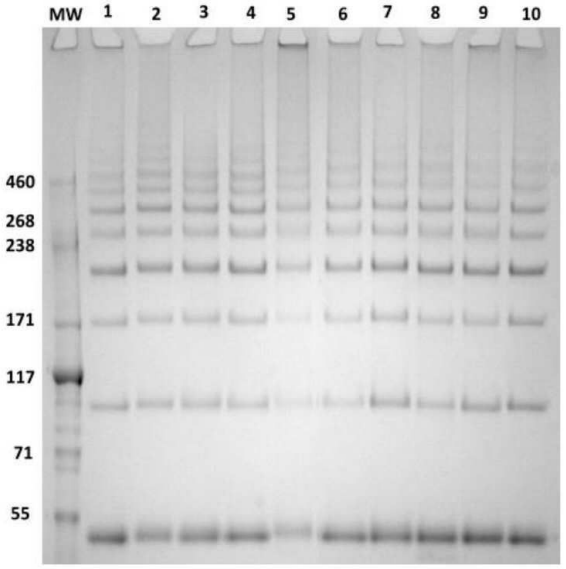
도면10


세포 생존능력
100
80
60
40
20
0
CDFortiCHO
TC-42
CDM4 CHO
HyClone ADCF
ACTI CHO
Power CHO3 CI
Excell CHO 5
CD OptiCHO
Power CHO GS
Balance CD CH
Cd Hybridoma
EXcell CD CHO
CH- S SFM2
ExpiCHO
SFM4CHO
Clonal Cell CHO
HYQ SFX CHO
Cell Vento 210
Cellvento 110

도면11

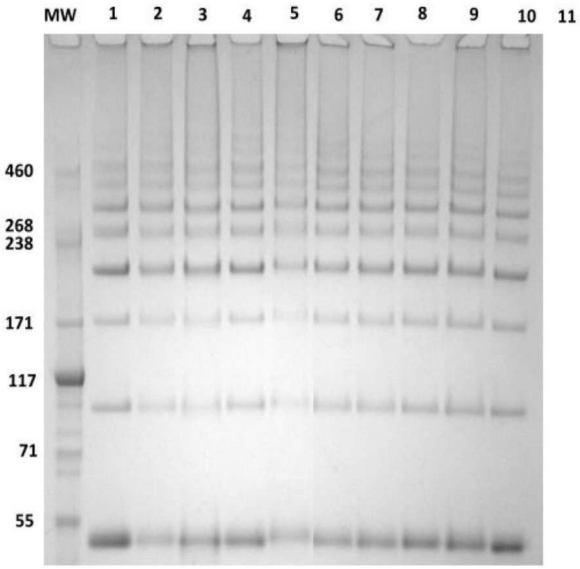


도면12a



1. CD FortiCHO 중의 GL-2045
2. TC-42 (CHOMACS CD) 중의 GL-2045
3. Hyclone CDM4CHO 중의 GL-2045
4. Hyclone ADCF MAB 중의 GL-2045
5. ActiCHO P 중의 GL-2045
6. PowerCHO3 CD 중의 GL-2045
7. Ex-Cell CHO5 중의 GL-2045
8. CD Hybridoma 중의 GL-2045
9. CD OptiCHO 중의 GL-2045
10. PowerCHO-GS 중의 GL-2045

도면12b



1. BalanCD CHO Growth A Medium 중의 GL-2045
2. EX-CELL CD CHO 무혈청 중의 GL-2045
3. CHO-S-SFM II 중의 GL-2045
4. ExpiCHO 중의 GL-2045
5. ActiCHO P 중의 GL-2045
6. SFM4CHO 중의 GL-2045
7. ClonaCell-CHO CD 중의 GL-2045
8. HYQ SFX-CHO LM 중의 GL-2045
9. Cellvento CHO 210 중의 GL-2045
10. Cellvento CHO 110 중의 GL-2045

도면13a

PowerCHO3 CD
Lonza

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Power 공급물 A	%	1		20		20											
	ml			24		29.088											
L-글루타민	%	2		2mM		2mM											
L-글루타민	ml			1.440		1.745											

ADCF-Mab Hyclone

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hyclone Cell Boost 4 (PS307)	%	1				5			5			5			5		
	ml					6.000			6.300			6.615			6.946		

ActiCHO P
배지

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Power 공급물 A	%	1				4	4	4	4	4	4	4	4	4			
	ml					4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8			
Power 공급물 B	%	2				0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4			
	ml					0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48			
글루코스		3	매일 모니터링하고 2g/ℓ 미만일 때 글루코스 수준을 4g/ℓ에 놓는다														

도면13b

Cellvento CHO-210

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cellvento™ 공급물-210	%	1				6		6		6		6		6		6	
	ml					7.200		7.632		8.090		8.575		9.090		9.635	
글루코스		2	매일 모니터링하고 4-6g/ℓ에서 유지시킨다														
시스테인/타이로신	%	3				0.2		0.2		0.2		0.2		0.2		0.2	
	ml					0.254		0.255		0.255		0.256		0.256		0.257	

BalanCD CHO Growth A 배지

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BalanCD 공급물 1	%	1				15%											
	ml					18											

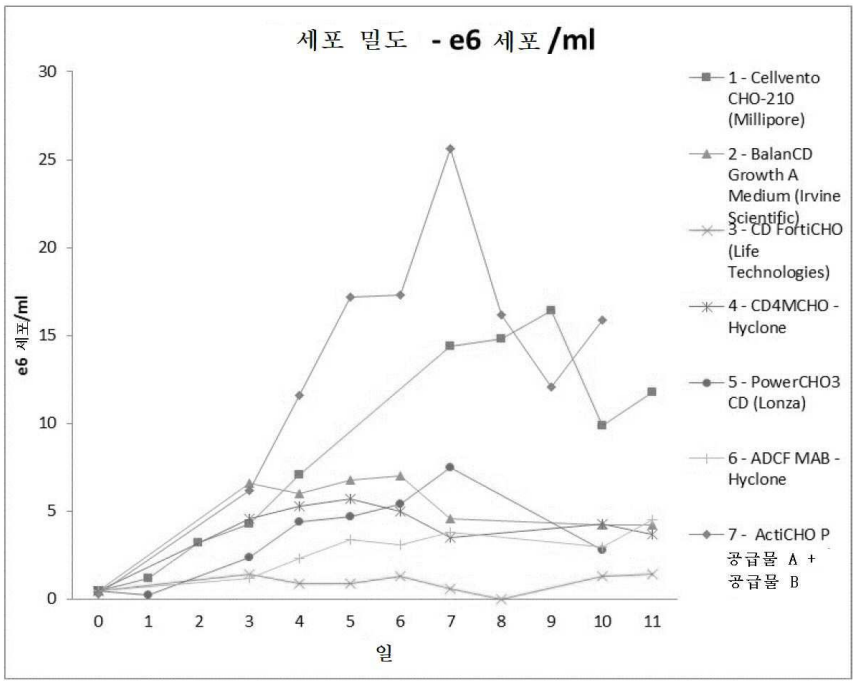
CD FortiCHO Life Technologies

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CD Efficient 공급물 C AGT	%	1				5			5			5			5		
	ml					6.000			6.300			6.615			6.946		

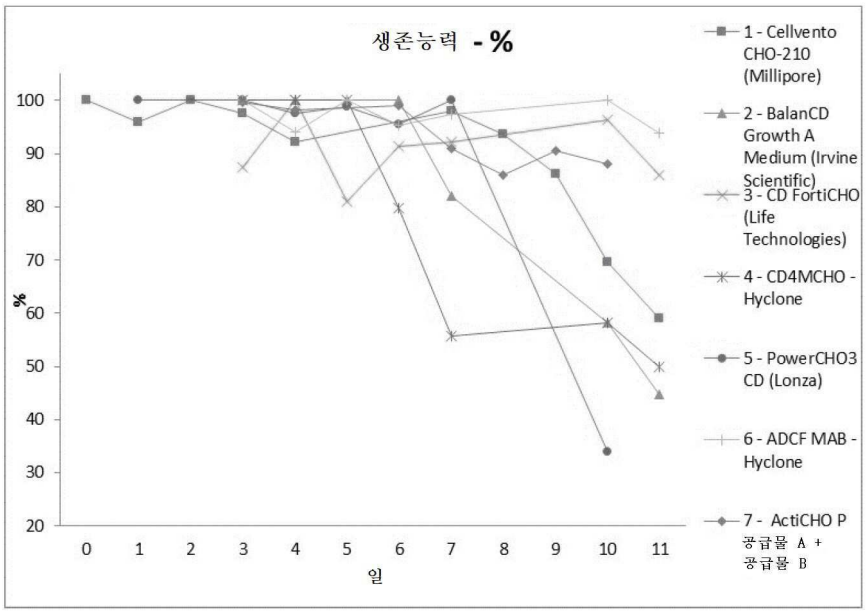
CD4MCHO Hyclone

배양일		첨가 순서	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hyclone Cell Boost 4 (PS307)	%	1				5			5			5			5		
	ml					6.000			6.300			6.615			6.946		

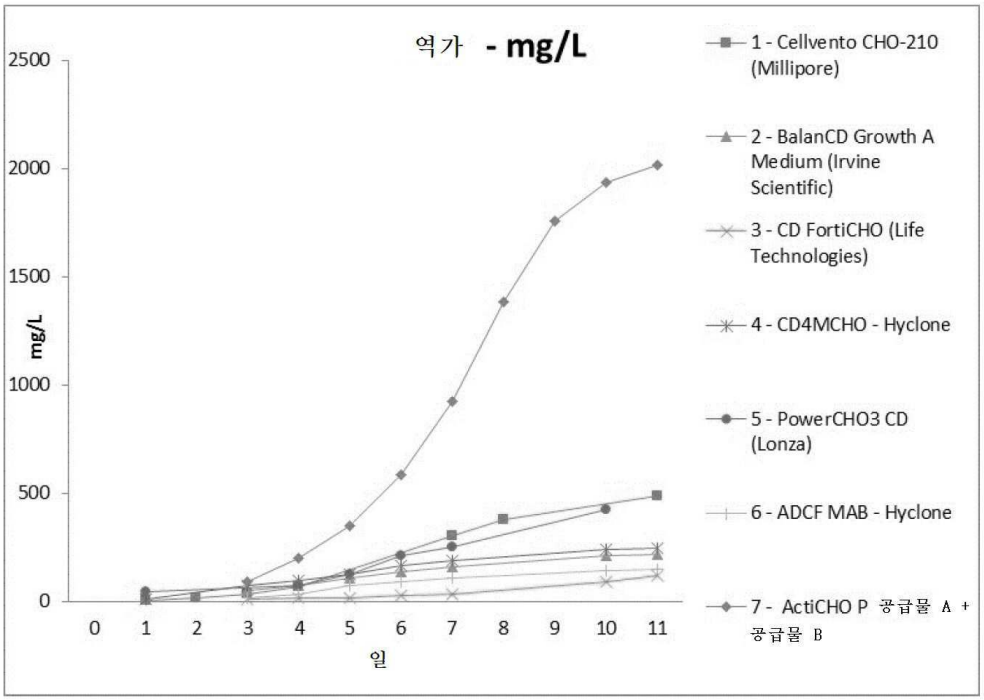
도면14



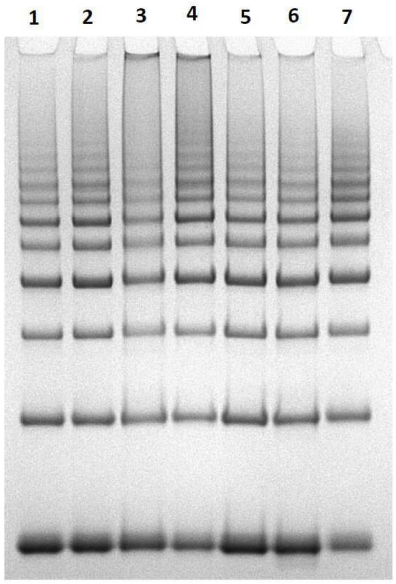
도면15


생존능력 - %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
일
1 - Cellvento CHO-210 (Millipore)
2 - BalanCD Growth A Medium (Irvine Scientific)
3 - CD FortiCHO (Life Technologies)
4 - CD4MCHO - Hyclone
5 - PowerCHO3 CD (Lonza)
6 - ADCF MAB - Hyclone
7 - ActiCHO P 공급물 A + 공급물 B

도면16

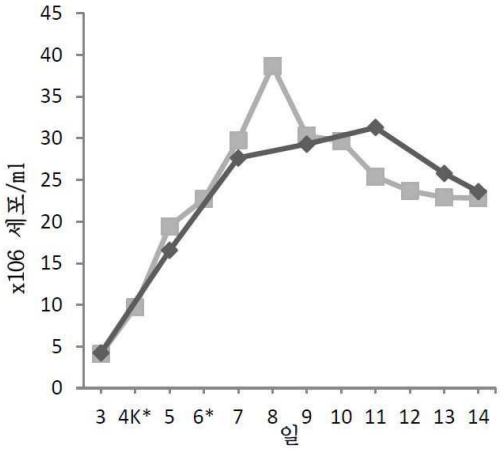

역가 - mg/L
2500
2000
1500
1000
500
0
mg/L
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
일
1 - Cellvento CHO-210 (Millipore)
2 - BalanCD Growth A Medium (Irvine Scientific)
3 - CD FortiCHO (Life Technologies)
4 - CD4MCHO - Hyclone
5 - PowerCHO3 CD (Lonza)
6 - ADCF MAB - Hyclone
7 - ActiCHO P 공급물 A + 공급물 B

도면17

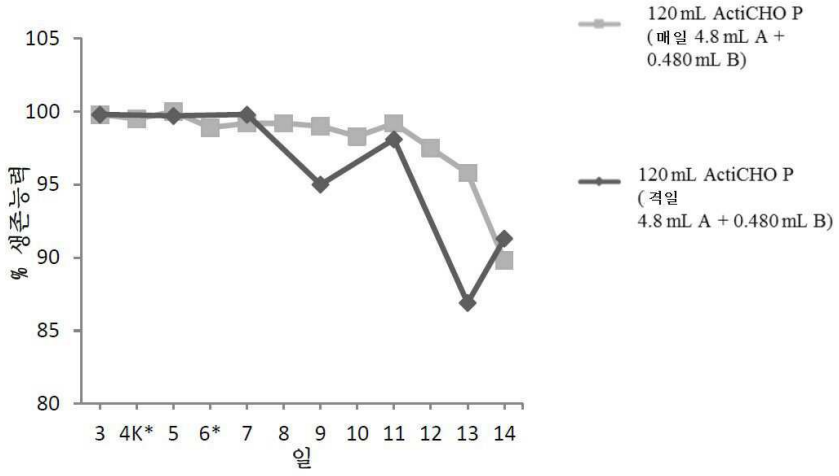


1 - ADCF MAb-Hyclone + Cell Boost 4
2 - PowerCHO3 CD + PowerFeed A
3 – CDM4CHO + Cell Boost 4
4 - CD FortiCHO Life Technologies + CD Efficient 공급물 C
5 - BalanCD CHO Growth A Medium Irvine + BalanCD Feed1
6 - Cell Vento CHO-210 + Cell Vento 공급물 - 210
7 – ActiCHO P + 공급물 A 및 공급물 B

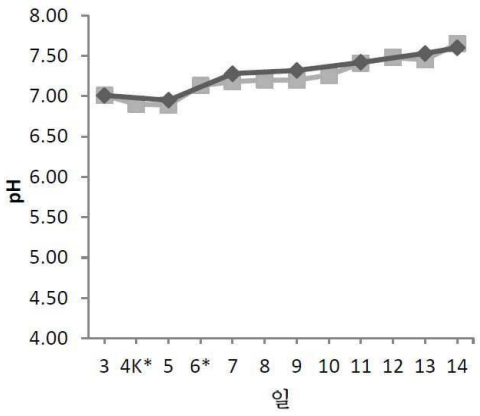
도면18a



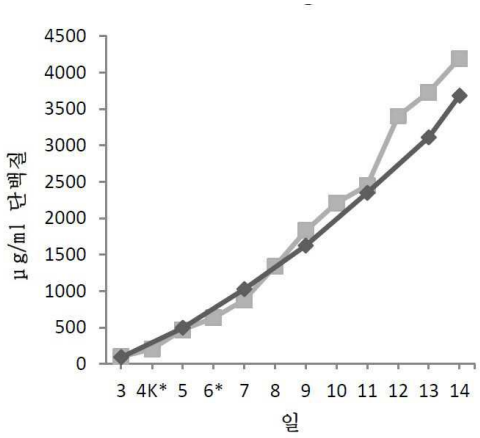
도면18b



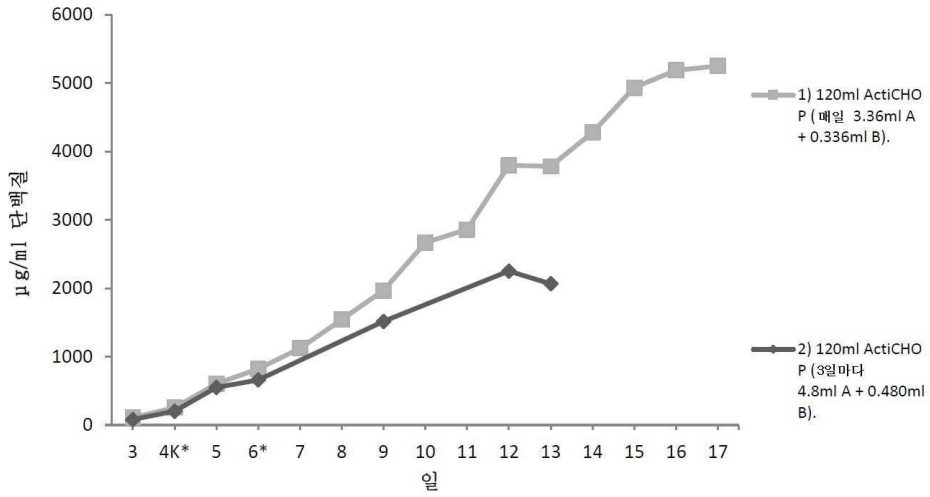
도면18c



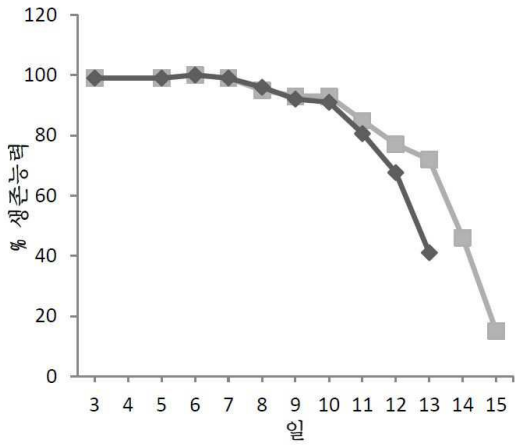
도면18d



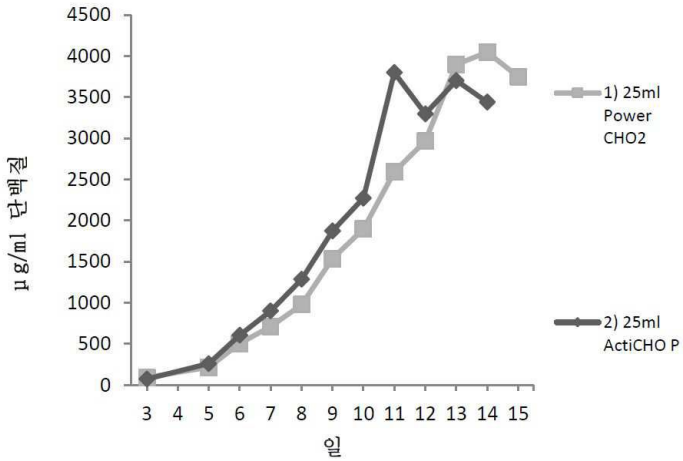
도면19



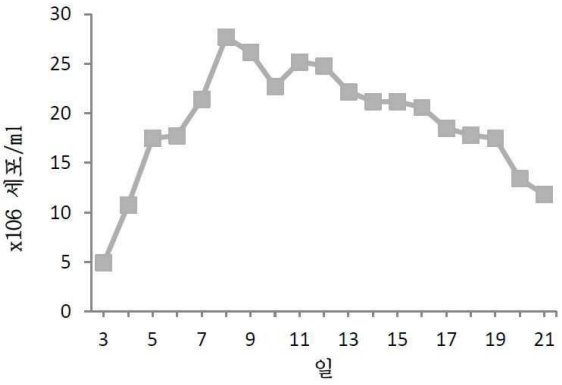
도면20a



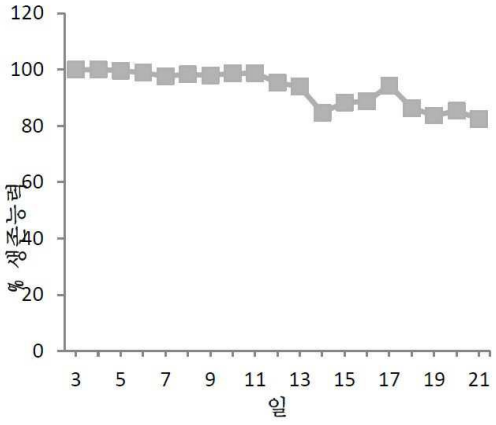
도면20b



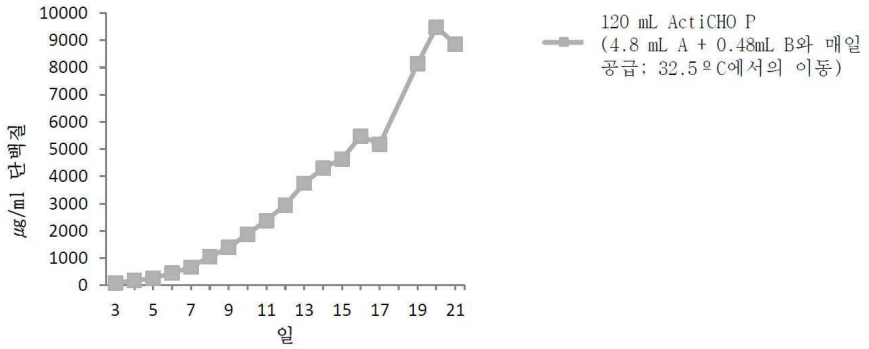
도면21a



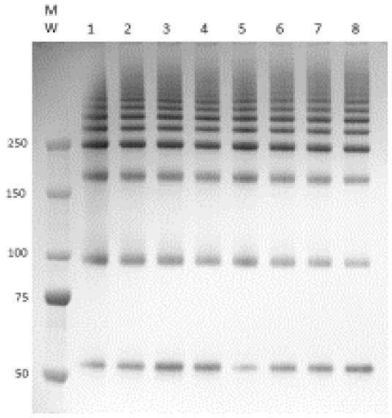
도면21b



도면21c



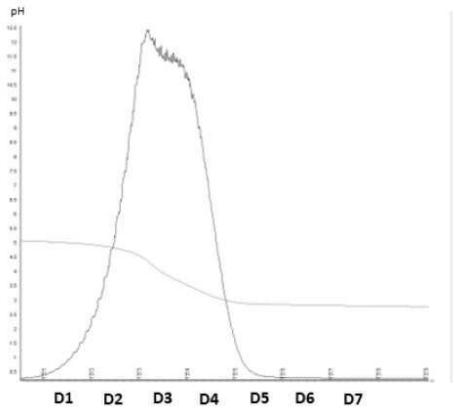
도면22



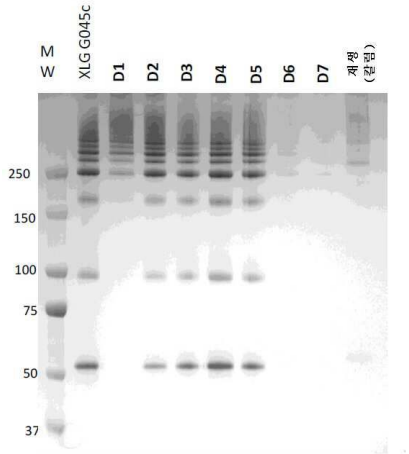
1 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 1 실행 11.27.12
2 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 2 실행 11.27.12
3 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 3 실행 11.27.12
4 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 4 실행 11.27.12
5 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 1 실행 11.28.12
6 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 2 실행 11.28.12
7 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 3 실행 11.28.12
8 – GL-2045 글론 58 AC 칼럼 4 실행 11.28.12

MW – 분자량 마커
Bio Rad #161-0373

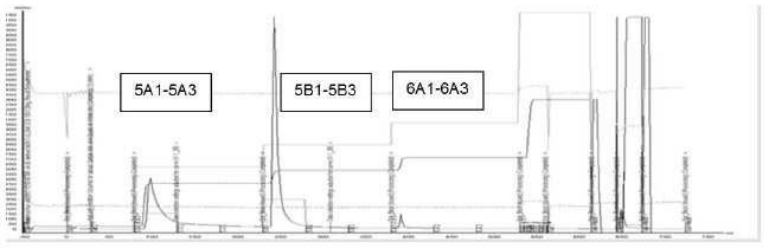
도면23a

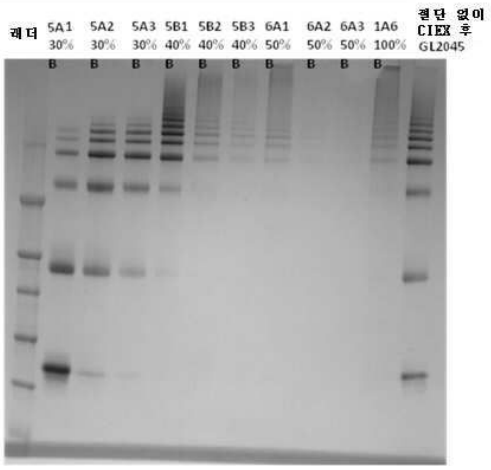


도면23b

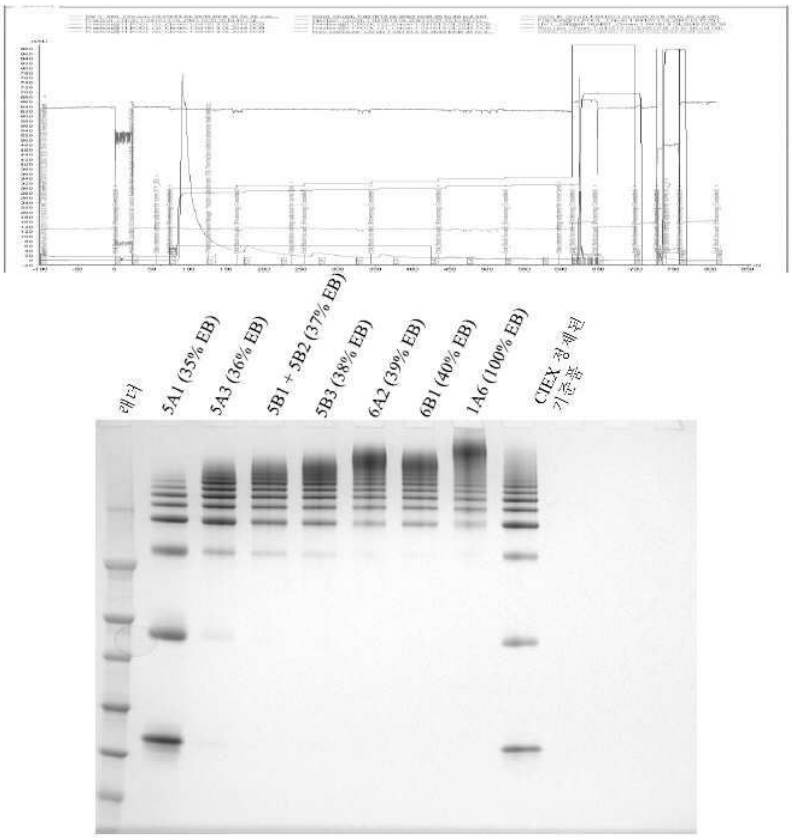


도면24

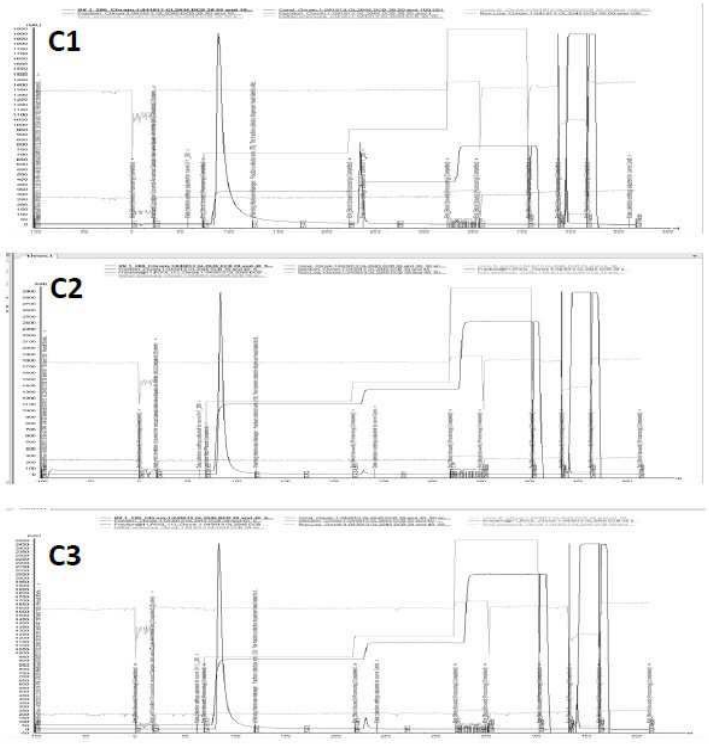

5A1-5A3
5B1-5B3
6A1-6A3


래더
5A1 30% B
5A2 30% B
5A3 30% B
5B1 40% B
5B2 40% B
5B3 40% B
6A1 50% B
6A2 50% B
6A3 50% B
1A6 100% B
젤단 없이 CIEX 후 GL2045

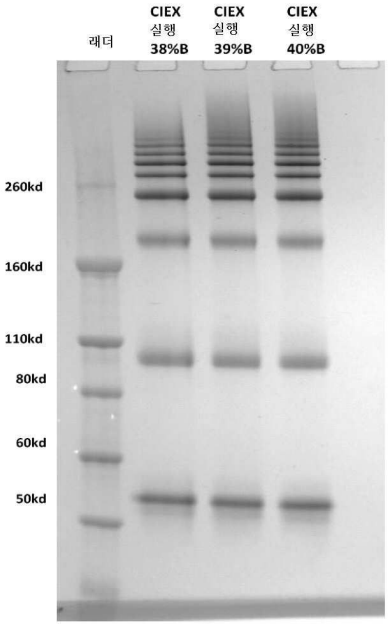
도면25


래더
5A1 (35% EB)
5A3 (36% EB)
5B1 + 5B2 (37% EB)
5B3 (38% EB)
6A2 (39% EB)
6B1 (40% EB)
1A6 (100% EB)
CIEX 정제된 기준 품

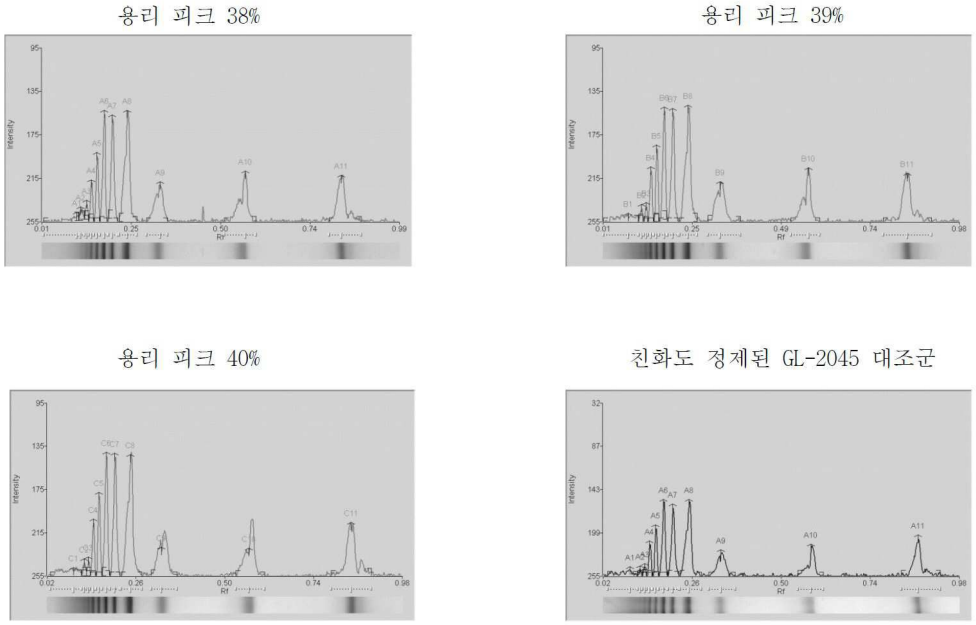
도면26


C1
C2
C3

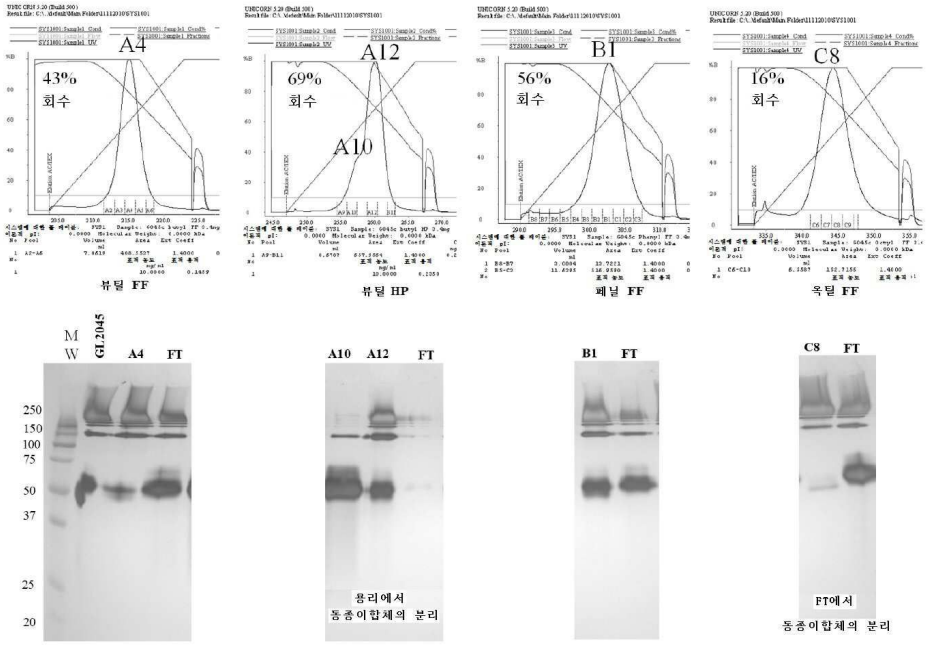
도면27


래더
CIEX 실행 38%B
CIEX 실행 39%B
CIEX 실행 40%B
260kd
160kd
110kd
80kd
60kd
50kd

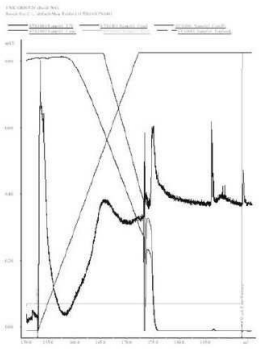
도면28


용리 피크 38%
용리 피크 39%
용리 피크 40%
친화도 정제된 GL-2045 대조군

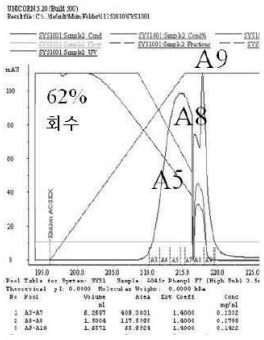
도면29a


A4
43%
회수
A12
69%
회수
A10
B1
56%
회수
C8
16%
회수
퓨딜 FF
퓨딜 HP
페닐 FF
옥딜 FF
M
W
GL2045
A4
FT
A10
A12
FT
B1
FT
C8
FT
250
150
100
75
50
37
25
20
용리에서
동종이합체의 분리
FT에서
동종이합체의 분리

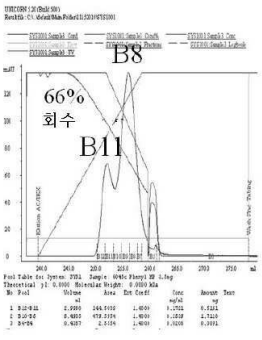
도면29b



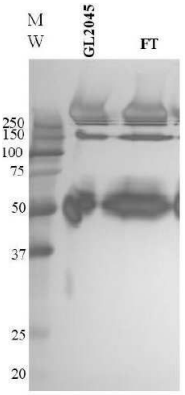
뷰틸 FF

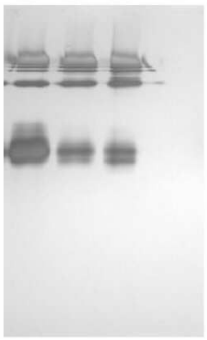


페닐 FF (High Sub)



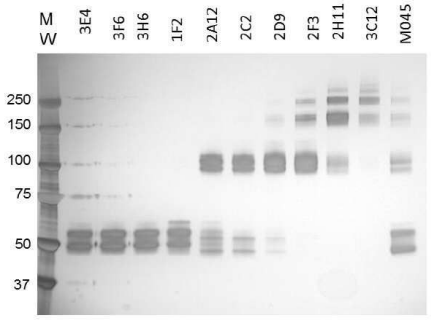
페닐 HP



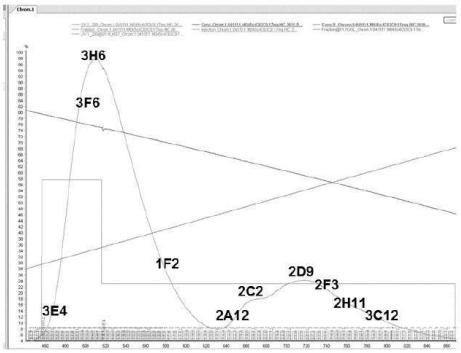




도면30

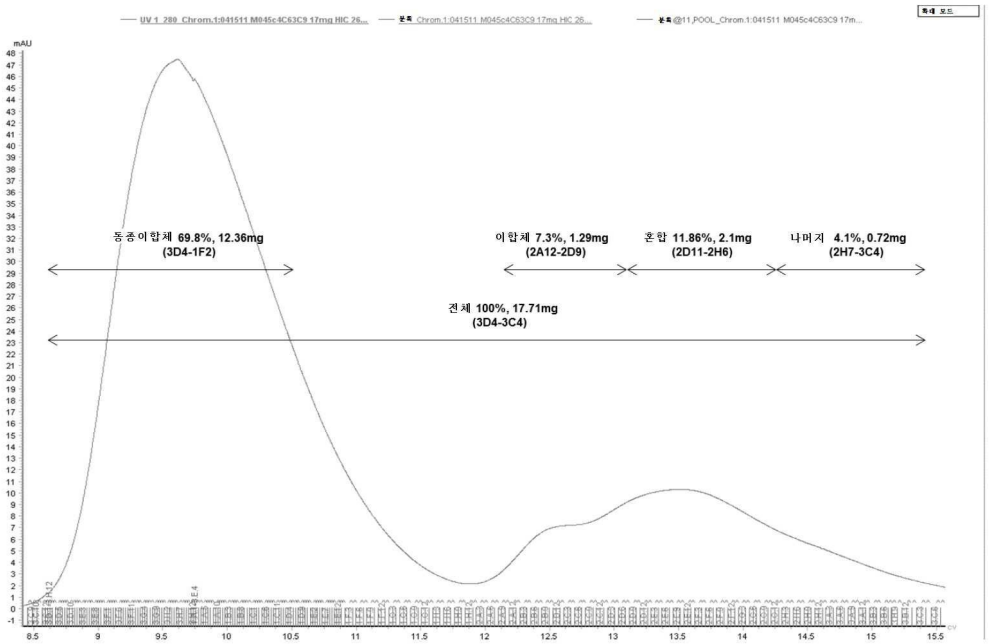


Nu Page 4-12% , Invitrogen # NP0322BOX.

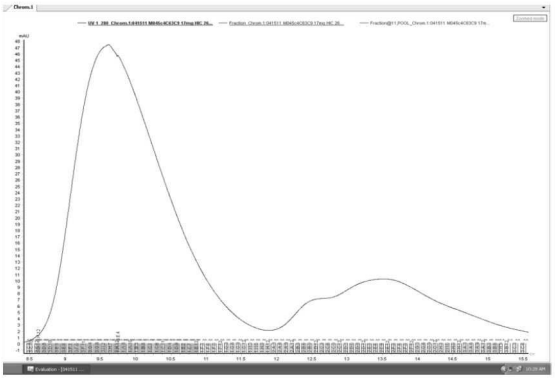


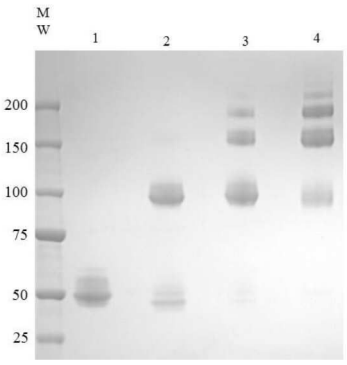
칼럼: GE, Hiload 페닐 세파로스 고성능 17-1066-01호
시작 완충제: 0.1M Na 포스페이트 + 1M 황산암모늄 pH 7.0
용리 완충제: 0.1M Na 포스페이트 pH 7.0
로딩: 17mg (+2V 시작 완충제).
유속: 3ml/분
분획 크기: 2ml
분량의 측정: 280nm에서 UV에 의함(AKTA Avant에 의해 직접적으로).

도면31



도면32





비환원 형태 (4-12% 겔)

쿠마시

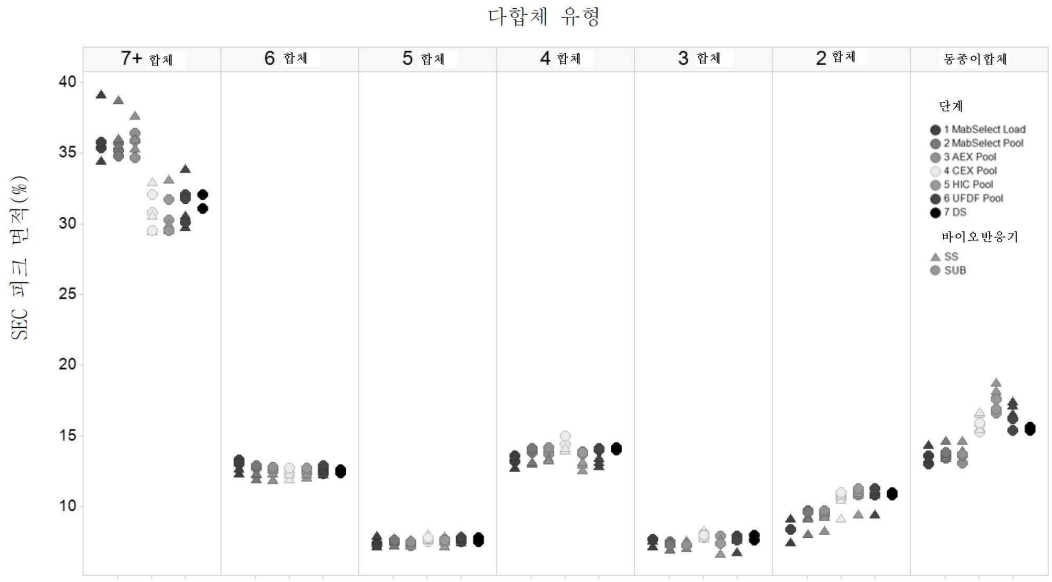
1 - MO45C Hic 4/21/11 단량체 (3D4-1F2)

2 - MO45C Hic 4/21/11 이합체 (2A12-2D9)

3 - MO45C Hic 4/21/11 삼합체 (2D11-2H6)

4 - MO45C Hic 4/21/11 다합체 (2H7-3C4)

도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Gliknik Inc.

<120> MANUFACTURING OPTIMIZATION OF GL-2045, A MULTIMERIZING STRADOMER

<130> IPA190591-US

<150> US 62/432,402

<151> 2016-12-09

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized leader sequence

<400> 1

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 3

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

145 150 155 160

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
165 170 175
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
180 185 190
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
195 200 205
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

210 215 220
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
225 230 235 240
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys
245 250 255
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260

<210> 5
<211> 264
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
50 55 60
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

65 70 75 80
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
85 90 95
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

145 150 155 160

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys

245 250 255

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

260

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10