



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월30일  
(11) 등록번호 10-2826635  
(24) 등록일자 2025년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/065 (2013.01)  
C07K 1/165 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7025000(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2017년06월16일  
심사청구일자 2023년08월18일  
(85) 번역문제출일자 2023년07월20일  
(65) 공개번호 10-2023-0113662  
(43) 공개일자 2023년07월31일  
(62) 원출원 특허 10-2019-7001176  
원출원일자(국제) 2017년06월16일  
심사청구일자 2020년06월16일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/038007  
(87) 국제공개번호 WO 2017/218977  
국제공개일자 2017년12월21일  
(30) 우선권주장  
62/351,908 2016년06월17일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020160044023 A\*  
WO2015070068 A1\*  
WO2016018740 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1  
(72) 발명자  
기스, 글렌 스콧  
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰샌프란시스코 디  
엔에이 웨이1 제넨테크, 인크. 내  
로젠베르그, 에바  
스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
프만 라-로슈아게 내  
(74) 대리인  
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 30 항

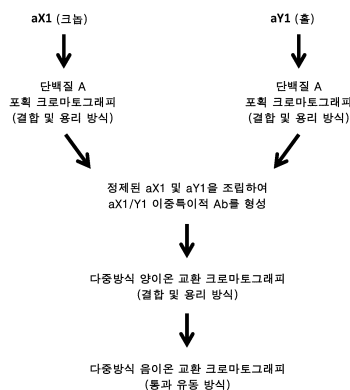
심사관 : 문영준

(54) 발명의 명칭 다중 특이적 항체의 정제

(57) 요약

본 발명은 다중특이적 항체를 정제하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피를 수행하는 순차 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 다중 특이적 항체의 조성물을 제공하고, 상기 조성물은 감소된 수준의 하나 이상의 생성물-특이적 불순물 및/또는 공정-특이적 불순물을 갖는다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**C07K 1/18** (2013.01)  
**C07K 1/22** (2013.01)  
**C07K 1/36** (2013.01)  
**C07K 16/22** (2013.01)  
**C07K 2317/31** (2013.01)  
**C07K 2317/526** (2013.01)  
**C07K 2317/54** (2013.01)  
**C07K 2317/76** (2013.01)

(72) 발명자

**살리에르, 베르나르드**

스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
 프만 라-로슈아게 내

**콘라드, 수잔**

스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
 프만 라-로슈아게 내

**코엔라인, 볼프강**

스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
 프만 라-로슈아게 내

**빌만, 스테펜**

스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
 프만 라-로슈아게 내

**비알라스, 아가테**

스위스 4070 바젤 그렌차허스트라쎄 124 에프. 호  
 프만 라-로슈아게 내

**칼레아스-캐롤, 킴벌리 앤**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰샌프란시스코 디엔  
 에이 웨이1 제넨테크, 인크. 내

**이그조, 잉게스**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰샌프란시스코 디엔  
 에이 웨이1 제넨테크, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

이중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물로부터 이중특이적 항체를 정제하는 방법이며, 상기 이중특이적 항체는 다중 아암을 포함하고, 각 아암은 VH/VL 단위를 포함하고, 상기 항체의 각 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은,

- 상기 조성물을 포획 크로마토그래피에 적용하여 상기 항체의 각 아암에 대한 포획 크로마토그래피 용리액을 생산하는 단계,
  - 상기 이중특이적 항체의 각 아암의 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하여 상기 이중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하는 단계,
  - 상기 이중특이적 항체를 포함하는 조성물을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계,
  - 상기 제1 혼합 방식 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계, 및
  - 상기 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계
- 의 순차적 단계를 포함하고,

상기 조성물로부터 생성물-특이적 불순물의 양을 감소시키며,

상기 생성물-특이적 불순물은 비-쌍형성 항체 아암 및 항체 동종이량체 중 하나 이상이고,

(a) 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피이고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피이거나; 또는

(b) 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피이고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피이고;

상기 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 4차 아민 및 소수성 모이어티를 포함하고, 상기 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 N-벤질-n-메틸 에탄올아민을 포함하고,

상기 이중특이적 항체는 크롭-인-홀 (KiH) 이중특이적 항체, CrossMab KiH 이중특이적 항체, 또는 이중 작용 Fab (DAF) 항체인, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제1 혼합 방식 크로마토그래피 이전에 이온 교환 크로마토그래피 또는 HIC 크로마토그래피에 적용되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피가 단백질 L 크로마토그래피, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 또는 단백질 A 및 단백질 G 크로마토그래피인 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 인접하는 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

(a) 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식으로 수행되고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동(flow through) 방식으로 수행되거나, 또는

(b) 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동 방식으로 수행되고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식으로 수행되는 것인,

방법.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식으로 수행되고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동 방식으로 수행되며, 상기 용리는 구배 용리인 방법.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동 방식으로 수행되고, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식으로 수행되며, 상기 용리는 구배 용리인 방법.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 용리액을 한외여과에 적용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 9

제3항에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피가 단백질 A 크로마토그래피이고, 상기 단백질 A 크로마토그래피는 단백질 A 평형 완충제, 단백질 A 로딩 완충제 또는 단백질 A 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하고, 상기 평형 완충제, 로딩 완충제, 및/또는 세정 완충제가 pH 7 내지 pH 8인 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단백질 A 평형 완충제가 25 mM Tris 및 25 mM NaCl을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 단백질 A 크로마토그래피가 로딩 후 평형 완충제로 세정되는 것인 방법.

#### 청구항 12

제3항에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피가 단백질 A 크로마토그래피이고, 상기 이중특이적 항체가 pH 단계적 용리에 의해 또는 낮은 pH를 갖는 단백질 A 용리 완충제를 상기 단백질 A 크로마토그래피에 적용함으로써 단백질 A 크로마토그래피로부터 용리되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 pH 단계적 용리가, 낮은 pH를 갖는 단백질 A 용리 완충제를 상기 단백질 A 크로마토그래피에 적용하는 것을 포함하는 단계적 용리를 적용하는 것을 포함하고, 상기 단백질 A 용리 완충제가 150 mM 아세트산, pH 2.9를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 14

제3항에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피가 단백질 A 크로마토그래피이고, 상기 단백질 A 용리액이 폴링되고, 상기 용리액의 OD<sub>280</sub>이 0.5 초과인 방법.

#### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

(a) 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 pH 6 내지 pH 7이거나,

(b) 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 pH 5 내지 pH 8이거나, 또는

(c) 상기 (a) 및 (b) 둘 다인,

방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제가 500 mM 아세테이트 또는 50 mM 아세테이트를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 17

제15항에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피 또는 상기 제1 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피 둘 다가 로딩 후 세정 완충제로 세정되는 것인 방법.

#### 청구항 18

제6항에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 pH 구배에 의해 또는 낮은 pH를 갖는 혼합 방식 용리 완충제를 상기 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피에 적용함으로써 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 또는 상기 제1 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피 둘 다로부터 용리되는 것인 방법.

#### 청구항 19

제2항에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피가 음이온 교환 크로마토그래피이고, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 또는 음이온 교환 로딩 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 및/또는 음이온 교환 로딩 완충제는 pH 6 내지 pH 8인 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서,

(a) 상기 음이온 교환 사전-평형 완충제가 50 mM Tris, 500 mM 아세트산나트륨을 포함하는 것,

(b) 상기 음이온 교환 평형 완충제가 50 mM Tris를 포함하는 것,

(c) 상기 음이온 교환 크로마토그래피가 로딩 후 음이온 교환 평형 완충제로 세정되는 것, 및

(d) 상기 이중특이적 항체가 염 구배에 의해 또는 증가된 염 농도를 갖는 음이온 교환 용리 완충제를 상기 음이온 교환 크로마토그래피에 적용함으로써 상기 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리되는 것

중 하나 이상을 특징으로 하는 것인 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 (d)의 이중특이적 항체가 pH 8.5에서 50 mM Tris, 100 mM 아세트산나트륨을 포함하는 음이온 교환 용리 완충제를 적용함으로써 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리되는 것인 방법.

#### 청구항 22

제19항에 있어서, 상기 음이온 교환 용리액이 폴링되고, 상기 용리액의 OD<sub>280</sub>이 0.5 초과인 방법.

#### 청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이중특이적 항체의 아암이 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 생산되는 것인 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 포획 크로마토그래피 이전에 상기 세포가 용해되어 이중특이적 항체 또는 이중특이적 항체의 아암을 포함하는 세포 용해물을 생성하는 것인 방법.

#### 청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물 중의 숙주 세포 단백질 (HCP), 침출된 단백질 A, 핵산, 세포 배양 배지 성분, 또는 바이러스성 불순물 중 어느 하나의 양을 감소시키는 방법.

#### 청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 크롭-인-홀 (KiH) 이중특이적 항체 또는 CrossMab KiH 이중특이적 항체인 방법.

#### 청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 분획이 적어도 95%의 이중특이적 항체를 함유하는 것인 방법.

#### 청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 분획이

(a) 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암, 또는

(b) 5% 이하의 항체 동종이량체

중 하나 이상을 함유하는 것인 방법.

#### 청구항 29

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 분획이

a) 적어도 95% 내지 100%의 이중특이적 항체,

b) 1% 내지 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암, 및

c) 1% 내지 5% 이하의 항체 동종이량체

를 함유하는 것인 방법.

#### 청구항 30

제23항에 있어서, 진핵 세포가 CHO 세포인 방법.

#### 청구항 31

삭제

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

삭제

#### 청구항 35

삭제

### 발명의 설명

## 기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호참조
- [0002] 본 출원은 2016년 6월 17일 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 62/351,908에 대한 우선권 이점을 청구하며, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] ASCII 텍스트 파일 상의 서열목록의 제출
- [0004] ASCII 텍스트 파일 상에서의 하기 제출된 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태(CRF) (파일명: 146392036340SEQLIST.TXT, 기록된 날짜: 2017년 6월 9일 금요일, 크기: 32 KB).
- [0005] 본 발명의 기술분야
- [0006] 적어도 하나의 생성물-특이적 불순물을 포함하는 적어도 하나의 불순물 및 다중특이적 항체를 포함하는 조성물로부터 다중특이적 항체를 정제하기 위한 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 생성물-특이적 불순물은, 예를 들어, 다중특이적 항체의 전구체, 응집물 및/또는 변이체이다. 상기 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체, 및 이러한 다중특이적 항체를 포함하는 조성물 및 제형이 또한 제공된다.

## 배경 기술

- [0007] 제조할 생물약제학적 단백질이 인간 환자에 투여에 대해 허용가능하도록 하기 위해, 제조 및 정제 공정에서 생기는 잔류 불순물을 최종 생물학적 제제에서 제거하는 것이 중요하다. 이들 공정 성분은 배양 배지 단백질, 면역글로불린 친화성 리간드, 바이러스, 내독소, DNA 및 숙주 세포 단백질 (HCP)을 포함한다. 다중특이적 항체와 같은 신규한 항체 포맷의 개발은, 종래의 제조 및 정제 공정이 비-쌍형성 항체 아암 및 조립 오류 항체를 포함하는 생성물-특이적 불순물을 충분히 제거하기에 부적합하기 때문에, 신규한 과제를 제공한다.
- [0008] 표준 항체의 정제와 비교하여, 생산 배지로부터 다중특이적 항체의 정제는 특유의 과제를 제공한다. 표준 단일-특이적 2가 항체가 동일한 중쇄/경쇄 하위단위의 이량체화로부터 유래되지만, 다중특이적 항체의 생산은 각각 상이한 중쇄 뿐만 아니라 상이한 경쇄를 포함하는 적어도 2개의 상이한 중쇄/경쇄 하위단위의 이량체화를 필요로 한다. 최소량의 쌍형성 오류, 조립 오류 또는 불완전 분자를 갖는 최종적인 정확하고 완전한 다중특이적 항체의 생산과 정제는 상이한 과제를 제공한다. 상이한 항체 사슬의 불균형 숙주 세포 발현으로 인한 불완전한 단백질 조립체와 같이, 사슬 쌍형성오류 (예를 들어, 동일한 중쇄 펩타이드의 동중-이량체화 또는 부적절한 중쇄/경쇄 회합)가 종종 관찰된다. 통상적으로 관찰된 생성물-특이적 불순물은 절반 ( $\frac{1}{2}$ ) 항체 (단일 중쇄/경쇄 쌍 포함), 4분의 3 ( $\frac{3}{4}$ ) 항체 (단일 경쇄가 결여된 완전한 항체 포함), 및 동중이량체를 포함한다. 추가의 생성물-특이적 불순물은 사용된 다중특이적 포맷에 따라 관찰될 수 있다. 예를 들어, 다중특이적 항체의 하나의 가변 도메인이 단일-쇄 Fab (scFab)로서 작제되는 경우, 5/4 항체 부산물 (추가의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 포함)이 관찰될 수 있다. 상응하는 생성물-특이적인 그러한 불순물은 표준 항체 생산에서 발생하지 않을 것이다.
- [0009] 공정-관련 불순물, 예를 들어, HCP, DNA, 내독소, 및 항체와 매우 상이한 특징 및 특성을 갖는 다른 물질을 제거하기 위해 설계된 종래의 정제 기술은 다중특이적 항체와 더 유사한 불순물을 제거하기 위해 시행될 때 부적절할 수 있다. 이와 같이, 생성물-특이적 불순물을 효과적으로 제거하고 충분한 양의 정확하고 완전한 다중특이적 항체를 생산하는 제조 및 정제 전략을 개발할 필요가 있다.
- [0010] 특허 출원 및 공보를 포함한, 본원에 인용된 모든 참조는, 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

## 발명의 내용

- [0011] 발명의 개요
- [0012] 본원에 기재되고 예시된 바와 같이, 출원인은 초기 포획 크로마토그래피 단계 후에 적어도 2종의 혼합 방식 (본원에서 다중-방식 또는 다중방식으로서 지칭되기도 함)을 사용하면 생성물-특이적 불순물을 더 많이 제거하고 다중특이적 항체의 개선된 정제 방법을 유도한다는 것을 발견했다. 따라서, 특정 구현예에서, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 다중특이적 항체가 각 아암이 VH/VL 단위를 포함하는 다중 아암을 포함하고, 상기 방법이: a) 조성물을 포획 크로마토그래피에 적용하여 포획 크로마토그래피 용리액을 생성하는 단계; b) 상기 포획 크로마토그래피 용리액을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; c) 상기 제1 혼합 방식 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및 d) 다중특이적 항체를 포함하는 분획을 수

집하는 단계인 순차 단계를 포함하고, 상기 방법이 조성물로부터 생성물-특이적 불순물의 양을 감소시키는, 방법이 제공된다. 상기 구현예 중 어느 것에 따라서 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 용리액은 제1 혼합 방식 크로마토그래피 이전에 이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, 음이온 교환) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피로 적용된다. 상기 구현예 중 어느 것에 따라서 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 용리액은 이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, 음이온 교환) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피로 적용된다.

[0013] 특정 구현예에서, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 다중특이적 항체가 각 아암이 VH/VL 단위를 포함하는 다중 아암을 포함하고, 여기서 상기 다중특이적 항체의 각 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법이 a) 다중특이적 항체의 각 아암을 포획 크로마토그래피에 적용하여 다중특이적 항체의 각 아암에 대한 포획 용리액을 생산하는 단계, b) 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하는데 충분한 조건 하에서 다중특이적 항체의 각 아암의 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하는 단계, c) 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계, 및 d) 상기 제1 혼합 방식 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및 e) 다중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계인 순차 단계를 포함하고, 상기 방법이 조성물로부터 생성물-특이적 불순물의 양을 감소시키는, 방법이 제공된다. 상기 구현예 중 어느 것에 따라서 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 용리액은 제1 혼합 방식 크로마토그래피 이전에 이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, 음이온 교환) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피로 적용된다. 상기 구현예 중 어느 것에 따라서 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 용리액은 이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, 음이온 교환) 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피로 적용된다.

[0014] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 L 크로마토그래피, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 단백질 A 및 단백질 G 크로마토그래피이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 크로마토그래피이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식으로 수행된다.

[0015] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 인접한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피이다.

[0016] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식 또는 통과 유동 방식으로 수행된다. 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식으로 수행되며, 그리고 용리는 구배 용리이다.

[0017] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식 또는 통과 유동 방식으로 수행된다. 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식으로 수행되며, 그리고 용리는 구배 용리이다.

[0018] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 제2 혼합 방식 용리액을 한외여과로 적용시키는 단계를 추가로 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 한외여과는 순차적으로 제1 한외여과, 정용여과 및 제2 한외여과를 포함한다.

[0019] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 크로마토그래피는 아가로스에 연결된 단백질 A를 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 크로마토그래피는 MAbSelect™, MAbSelect™ SuRe 및 MAbSelect™ SuRe LX, Prosep-VA, Prosep-VA 울트라 플러스(Ultra plus), 단백질 A 세파로스 패스트 플로우(fast flow), 또는 Toyopearl 단백질 A 크로마토그래피이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 단백질 A 크로마토그래피가 하나 이상의 단백질 A 평형 완충제, 단백질 A 로딩 완충제 또는 단백질 A 세정 완충제를 사용하고, 상기 평형 완충제, 로딩 완충제, 및/또는 세정 완충제가 약 pH 7 내지 약 pH 8이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또



는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 평형 완충제는 약 pH 7.7이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 평형 완충제는 약 25 mM Tris 및 약 25 mM NaCl을 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 크로마토그래피는 로딩 후 평형 완충제로 세정된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 낮은 pH를 갖는 단백질 A 용리 완충제를 단백질 A 크로마토그래피에 적용함으로써 단백질 A로부터 용리된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 단백질 A 용리 완충제는 약 pH 2.9의 약 150 mM 아세트산을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 pH 구배에 의하여 단백질 A 크로마토그래피로부터 용리된다.

[0020] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 4차 아민 및 소수성 모이어티를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 높은 정도로 가교결합된 아가로스 및 연결된 소수성 모이어티 및 4차 아민을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 크로마토그래피는 Capto™ Adhere 크로마토그래피 또는 Capto™ Adhere ImpRes 크로마토그래피이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 N-벤질-n-메틸 에탄올아민을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 크로마토그래피는 Capto™ MMC 크로마토그래피 또는 Capto™ MMC ImpRes 크로마토그래피이다.

[0021] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 약 pH 6 내지 약 pH 7이다. 일부 구현예에서, 음이온 혼합 방식 평형 완충제는 약 pH 6.5 내지 약 pH 8이다.

[0022] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 약 pH 5 내지 약 pH 8이며, 선택적으로 약 pH 5 내지 약 pH 7, 또는 약 pH 5 내지 약 pH 6, 또는 약 pH 6 내지 약 pH 7이다.

[0023] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 약 pH 5.5이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 사전-평형 완충제는 약 500 mM 아세테이트를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 평형 완충제는 약 50 mM 아세테이트를 포함한다.

[0024] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 로딩 후 세정 완충제로 세정된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 로딩 후 완충제로 세정된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 염 구배 및/또는 pH 구배 또는 pH 단계적 용리에 의하여 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 낮은 pH를 갖는 혼합 방식 용리 완충제를 혼합 방식 교환 크로마토그래피에 적용시킴으로써 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 염 구배 및/또는 pH 구배 또는 pH 단계적 용리에 의하여 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 낮은 pH를 갖는 혼합 방식 용리 완충제를 혼합 방식 교환 크로마토그래피에 적용시킴으로써 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 혼합 방식 용리 완충제는 약 pH 5.5, 약 25 mM 아세테이트를 포함한다.

[0025] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 4차 아민을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 가교결합된 아가르스에 결합된 4차 아민을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 QSFF 크로마토그래피이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 또는 음이온 교환 로딩 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환

환 평형 완충제 및/또는 음이온 교환 로딩 완충제는 약 pH 8 내지 약 pH 9이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 및/또는 음이온 교환 로딩 완충제는 약 pH 8.5이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 사전-평형 완충제는 약 50 mM Tris, 500 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 평형 완충제는 약 50 mM Tris를 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 로딩 후 음이온 교환 평형 완충제로 세정된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 염 구배에 의해 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 증가된 염 농도를 갖는 음이온 교환 용리 완충제를 음이온 교환 크로마토그래피에 적용함으로써 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 음이온 교환 용리 완충제는 약 pH 8.5, 100 mM 아세트산나트륨, 약 50 mM Tris를 포함한다.

[0026] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체의 아암은 세포 내에서 생산된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 세포는 원핵세포이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 원핵세포는 *E. 콜라이* 세포이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 샤페론(chaperone)을 발현하도록 조작된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 샤페론은 FkpA, DsbA 또는 DsbC 중 하나 이상이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 샤페론은 *E. 콜라이* 샤페론이다. 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 세포는 진핵세포이다. 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 진핵 세포는 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포이다. 상기 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 진핵세포는 CHO 세포이다.

[0027] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 이전에 상기 세포가 용해되어 상기 다중특이적 항체 또는 상기 다중특이적 항체의 아암을 포함하는 세포 용해물을 생성한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 세포는 미세유동화기를 사용하여 용해된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 폴리에틸렌이민 (PEI)은 크로마토그래피 이전에 세포 용해물에 첨가된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, PEI는 약 0.4%의 최종 농도로 용해물에 첨가된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 세포 용해물은 원심분리에 의하여 정화된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포유동물 세포, *예컨대*, CHO 세포 유래의 세포 용해물은 하기 처리 중 하나 이상에 적용된다: 열 불활성화, 낮은 pH 불활성화, 계면 활성제의 첨가에 의한 바이러스성 불활성화.

[0028] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 방법은 조성물 내 공정-특이적 불순물, 예컨대 숙주 세포 단백질 (HCP), 침출 단백질 A, 핵산, 세포 배양 배지 성분, 또는 바이러스 불순물 중 어느 것의 양을 감소시킨다.

[0029] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 크립-인-홀 (KiH) 항체, *예컨대*, KiH 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다.

[0030] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 분획은 최종 크로마토그래피 단계 후 수집되며, 이는 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100%의 다중특이적 항체를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 분획은 최종 크로마토그래피 단계 후 수집되며, 이는 생성물-특이적 불순물의 감소된 양을 포함하며, 여기서 상기 생성물-특이적 불순물은 비-쌍형성 항체 아암, 항체 동종이량체, 고분자량 종 (HMWS), 저분자량 종 (LMWS), 또는 ⅓ 항체 중 하나 이상이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 분획은 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 비-쌍형성 항체 아암을 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 분획은 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 항체 동종이량체를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 분획은 약 1% 이하 또는 약 2% 이하의 HMWS를 함유한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 분획은 약 2% 이하 또는 약 1% 이하의 LMWS를 함유한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 분획은 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는

약 1% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유한다.

[0031] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 분획은 하기를 포함한다:

[0032] a) 적어도 약 95% 내지 100%의 다중특이적 항체;

[0033] b) 약 1% 내지 5% 미만의 비-쌍형성 항체 아암;

[0034] c) 약 1% 내지 5% 미만의 항체 동종이량체;

[0035] d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS;

[0036] e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및/또는

[0037] f) 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체.

[0038] 특정 구현예에서, 상기 기재된 방법 중 임의의 하나의 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0039] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 조성물은 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 약 100%의 다중특이적 항체를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 조성물은 생성물-특이적 불순물의 감소된 양을 포함하며, 여기서 상기 생성물-특이적 불순물은 비-쌍형성 항체 아암, 항체 동종이량체, 고분자량 중 (HMWS), 저분자량 중 (LMWS), 또는  $\frac{3}{4}$  항체 중 하나 이상이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 조성물은 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 비-쌍형성 항체 아암을 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 조성물은 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만의 항체 동종이량체를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 조성물은 약 1% 이하 또는 약 2% 이하의 HMWS를 함유한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 조성물은 약 2% 이하 또는 약 1% 이하의 LMWS를 함유한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 특정 구현예에서, 조성물은 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 조성물 내 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 크롭-인-홀 (KiH) 항체, 예컨대, KiH 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 ANG-2 및 VEGF에 결합한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체된다.

[0040] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 조성물은 하기를 함유한다: a) 적어도 약 95% - 100%의 다중특이적 항체; b) 약 1%- 5% 미만의 비-쌍형성 항체 아암; c) 약 1%- 5% 미만의 항체 동종이량체; d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS; e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및/또는 f) 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 조성물 내 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 크롭-인-홀 (KiH) 항체, 예컨대, KiH 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 ANG-2 및 VEGF에 결합한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체된다.

[0041] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 암 또는 안질환의 치료를 위한, 상기 기술된 방법 중 어느 것에 의하여 정제된 다중특이적 또는 이중특이적 항체 (예컨대 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체)를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0042] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 기술된 방법 중 어느 것에 의하여 정

제된 다중특이적 또는 이중특이적 항체 (예컨대 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체)를 포함하는 것의, 암 또는 안질환의 치료용 약제 제조를 위한 용도가 제공된다.

- [0043] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드의 정제용으로 사용된다.
- [0044] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 조성물에서 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드-관련 불순물의 감소를 위한 본원에 제공된 임의의 방법의 용도가 제공된다.
- [0045] 특정 구현예에서, 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드를 정제하기 위한 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 친화성 크로마토그래피 단계 이후 2개 상이한 다중방식 이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하고, 이로써 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드를 정제하는 것을 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 (i) 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계; 또는 (ii) 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함한다.
- [0046] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다단계 크로마토그래피 방법은 정확히 3개 크로마토그래피 단계를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 통과 유동 방식으로 수행된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 7 mS/cm 미만의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 6 mS/cm 내지 약 2 mS/cm 범위의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 약 7의 pH에서 수행된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도 및 약 7의 pH를 갖는 용액 내 적용된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 크로마토그래피 물질의 리터 당 약 100g 내지 약 300g 범위로 적용된다.
- [0047] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 다중방식 강 음이온 교환 크로마토그래피 물질이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 고-유동 아가로스의 매트릭스, 리간드로서의 다중방식 강 음이온 교환제, 36 내지 44  $\mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기, 및 0.08 내지 0.11 mmol  $\text{Cl}^-/\text{ml}$  매질의 이온 용량을 갖는다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 다중방식 약 양이온 교환 크로마토그래피 매질이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 고-유동 아가로스의 매트릭스, 리간드로서 다중방식 약 양이온 교환제, 36 내지 44  $\mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기 및 25 내지 39  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 의 이온 용량을 갖는다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 결합 및 용리 방식으로 수행된다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피에 의하여 수행된다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피, 또는 단일 사슬 Fv 리간드 친화성 크로마토그래피, 또는 CaptureSelect 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계, 또는 CaptureSelect FcXL 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 단백질 A 크로마토그래피 단계이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 CaptureSelect™ 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계이다.
- [0048] 상기 구현예중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드



드는 항체, 이중특이적 항체 또는 Fc-융합 단백질이다. 상기 구현예중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 이중특이적 항체이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 CrossMab이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체이며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체된다.

[0049] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 ANG2 및 VEGF에 결합한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, CrossMab은 ANG2 및 VEGF에 결합한다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 바누시주맙 (vanucizumab)이다. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 1, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄, 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄.

[0050] 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 5, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 6을 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위. 상기 구현예 중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄.

[0051] 상기 구현예중 어느 하나에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 5% 이하의 ⅔ 항체를 함유한다.

[0052] 특정 구현예에서, 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하기 위한 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하고, 이로써 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하는 것을 포함하며, ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 1, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위를 포함하거나; 또는 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 5, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 6을 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용되는) 일부 구현예에서, ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0053] 일부 구현예에서, 상기 구현예 중 어느 것에 따른 (또는 이에 적용되는) 방법 중 어느 것의, Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드 관련 불순물의 감소를 위한 용도가 제공된다.

[0054] 일부 구현예에서, 암 또는 안질환의 치료용 약제 제조를 위한, 상기 구현예 중 어느 것에 따른 (또는 이에 적용되는) 방법으로 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드가 제공된다.

[0055] 일부 구현예에서, 암 또는 안질환을 치료하는데 사용하기 위한, 상기 구현예 중 어느 것에 따른 (또는 이에 적용되는) 방법으로부터 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드가 제공된다.

[0056] 특정 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 생산하기 위한 방법이 제공된다: (i) Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계; (ii) 세포 또는 배양 배지로부터 상기 Fc-함유 이중이량체 단백질을 회수하는 단계; (iii) 상기 구현예 중 어느 것에 따라 (또는

이에 적용하여) Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 정제하고, 이로써 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 생산하는 단계.

- [0057] 특정 구현예에서, 하기의 단계를 포함하는, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 생산하는 방법이 제공된다: (i) 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계; (ii) 세포 또는 배양 배지로부터 이중특이적 항체를 회수하는 단계; (iii) 상기 구현예 중 어느 것에 따른 (또는 이에 적용되는) 방법을 사용한 이중특이적 항체를 정제하고, 이로써 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 생산하는 단계.

### 도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1a는 실시예 1에서 사용된 제1 정제 전략을 도시한다.  
 도 1b는 실시예 1에서 사용된 제2 정제 전략을 도시한다.  
 도 1c는 실시예 1에서 사용된 제3 정제 전략을 도시한다.  
 도 2는 실시예 2에서 사용된 정제 전략을 도시한다.  
 도 3a는 실시예 3에서 사용된 제1 정제 전략을 도시한다.  
 도 3b는 실시예 3에서 사용된 제2 정제 전략을 도시한다.  
 도 4는 실시예 4에서 사용된 정제 전략을 도시한다.  
 도 5a는 실시예 6에서 사용된 제1 정제 전략을 도시한다.  
 도 5b는 실시예 6에서 사용된 제2 정제 전략을 도시한다.  
 도 6a는 실시예 7에서 사용된 제1 정제 전략을 도시한다.  
 도 6b는 실시예 7에서 사용된 제2 정제 전략을 도시한다.  
 도 7a는 실시예 8에서 기술된 제1 정제 전략을 도시한다.  
 도 7b는 실시예 8에서 기술된 제2 정제 전략을 도시한다.  
 도 7c는 실시예 8에서 기술된 제3 정제 전략을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체 또는 2가 F(ab')<sub>2</sub>)를 정제하기 위한 방법이 제공되며, 이는 하기의 순차 단계를 포함한다: 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 a) 포획 크로마토그래피, b) 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 및 c) 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하는 단계. 일부 양태에서, 다중특이적 항체를 정제하는 방법이 제공되고, 여기서 다중특이적 항체의 개별 아암은 각각 별도의 배양물에서 생산되고, 각각 포획 크로마토그래피에 의해 별도로 정제된다. 이어서, 정제된 항체 아암을 조립하여 다중특이적 항체를 생산한다. 이어서, 조립된 다중특이적 항체를 제1 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피에 이어 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용한다. 이하 더욱 상세하게 기재된 바와 같이, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및/또는 제2 혼합 방식 크로마토그래피 각각은 선택적으로 하나 이상의 추가의 크로마토그래피 단계가 선행되고/되거나 후속된다. 용어 혼합 방식 크로마토그래피 및 다중방식 크로마토그래피는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0060] 일부 양태에서, 비-쌍형성 항체 아암, 동종이량체, 응집물, 저분자량 종, 산성 및 염기성 변이체와 같은 하나 이상의 공정 특이적 및/또는 생성물 특이적 불순물의 수준이 감소된 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 양태에서, 예를 들어, 원핵 숙주 세포 단백질, 진핵생물 숙주 세포 단백질(예를 들어, CHO 단백질 또는 "CHOP"), 핵산, 및 사페론(예를 들어, 원핵 사페론, 예를 들어, FkpA, DsbA 및 DsbC)과 같은 하나 이상의 공정 특이적 불순물의 수준이 감소된 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 본원에 제공된 방법을 사용하여 수득된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 당해 분야에서 공지된 방법을 사용하여 수득된 조성물보다 감소된 수준의 하나 이상의 공정 특이적 및/또는 생성물 특이적 불순물을 갖는다.
- [0061] 일부 양태에서, Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드의 정제 및 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드-관련 불순물을

감소시키기 위한 본원에 보고된 방법의 용도가 제공된다. 개선된 생성물-특이적 불순물의 감소가 달성된다. CrossMab-특이적 불순물의 경우, 예를 들어, ¼ 항체의 감소가 달성된다.

[0062] 정의

[0063] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 나타내는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 그리고 이는 비-아미노산에 의하여 저해될 수 있다. 상기 용어는 또한 천연적으로 또는 처치(intervention); 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예를 들어, 표지화 성분을 사용한 콘주게이트에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 예를 들면, 아미노산 (예컨대, 비천연 아미노산 등 포함)의 하나 이상의 유사체, 뿐만 아니라 당해기술에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드가 또한 상기 정의내에 포함된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어들 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 구체적으로 항체를 포괄한다.

[0064] "정제된" 폴리펩타이드 (예컨대, 항체 또는 면역접합체)는, 폴리펩타이드의 순도가 증가되어, 이로써 이것이 천연 환경 및/또는 실험실 조건 하에서 초기 합성되고/되거나 증폭될 경우에서 존재하는 것보다 더욱 순수한 형태로 존재한다는 것을 의미한다. 순도는 상대적인 용어이며, 절대적인 순도를 필연적으로 의미하지 않는다. 본원에서 상호교환적으로 사용된 용어 "정제하는", "분리하는" 또는 "단리시키는"은 목적하는 분자 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 조성물 또는 샘플로부터 목적하는 분자(예를 들어, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)의 순도를 증가시키는 것을 지칭한다. 전형적으로, 목적 분자의 순도의 정도는 상기 조성물로부터 적어도 하나의 불순물을 제거(완전히 또는 부분적으로)함에 의해 증가된다.

[0065] "관심 있는 항원에 결합하는" 다중특이적 항체는 다중특이적 항체가 단백질을 발현하는 세포 또는 조직을 표적화하는 데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하고, 다른 단백질과 충분히 가교 결합하지 않도록 충분한 친화도로 항원, 예를 들어, 단백질에 결합하는 것이다. 이러한 구현예에서, "비-표적" 단백질에 대한 다중특이적 항체의 결합의 정도는, 예를 들어, 형광 활성화된 세포 분류 (FACS) 분석, 방사선면역침강 (RIA), 또는 ELISA 등에 의해 측정된 이의 특정 표적 단백질에 대한 다중특이적 항체의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 대한 다중특이적 항체의 결합과 관련하여, 특정 폴리펩타이드 표적 상의 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프의 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적인"이란 용어는 비특이적 상호작용과 측정 가능하게 상이한 결합을 의미한다(예를 들어, 비특이적 상호작용은 소 혈청 알부민 또는 카세인에 결합할 수 있다). 특이적 결합은 예를 들어, 대조군 분자로의 결합과 비교하여 분자로의 결합을 계측함에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적, 예를 들어 과량의 비표지된 표적과 유사한 조절 분자와의 경쟁에 의해 계측될 수 있다. 이 경우에, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 저해되는 경우 특이적 결합이 나타난다. 본원에 사용된 바와 같은 특정 폴리펩타이드 표적상의 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 대한 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "에 대해 특이적"은 예를 들어, 표적에 대해 적어도 약 200nM, 대안적으로 적어도 약 150nM, 대안적으로 적어도 약 100nM, 대안적으로 적어도 약 60nM, 대안적으로 적어도 약 50nM, 대안적으로 적어도 약 40nM, 대안적으로 적어도 약 30nM, 대안적으로 적어도 약 20nM, 대안적으로 적어도 약 10nM, 대안적으로 적어도 약 8nM, 대안적으로 적어도 약 6nM, 대안적으로 적어도 약 4nM, 대안적으로 적어도 약 2nM, 대안적으로 적어도 약 1nM 또는 이를 초과하는 친화도의 Kd를 갖는 분자에 의해 나타낼 수 있다. 일 구현예에서, 용어 "특이적 결합"은 다중특이적 항원-결합 단백질이 임의의 다른 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 에피토프에 실질적으로 결합하는 것 없이 특정 폴리펩타이드 상의 특정 폴리펩타이드 또는 에피토프에 결합하는 경우의 결합을 지칭한다.

[0066] "결합 친화도"는 일반적으로 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위 및 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 간의 비공유 상호작용의 총합 강도를 지칭한다. 다르게 명시되지 않으면, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍 (예를 들면, 항체 및 항원)의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 그 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 나타낼 수 있다. 예를 들어, Kd는 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 30 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 8 nM 이하, 약 6 nM 이하, 약 4 nM 이하, 약 2 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하일 수 있다. 친화도는 본원에 기술된 것을 포함하여 당해분야에서 공지된 공통의 방법으로 측정될 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 서서히 결합하고 쉽게 해리하는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 더 빨리 결합하고 더 오래 결합된 채 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법은 당해분야에 공지되어 있고, 이들 중 어느 것이 본원에 제공된 방법 및 조성물의 목적을 위해 사용될 수

있다.

- [0067] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 -10 반응 단위(RU)에서 고정된 표적(예를 들어, 항원) CM5 칩으로 25℃에서 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIAcore Inc.)은 이의 공급업체의 설명서에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원은 pH 4.8, 10 mM 아세트산나트륨으로 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 0.2 \mu\text{m}$ )으로 희석되고, 그 다음 5  $\mu\text{l}$ /분의 유속으로 주입되어 커플링된 단백질의 대략 10 공명 단위(RU)를 달성한다. 항원의 주사 후, 1M 에탄올아민을 미반응 군을 차단하기 위하여 주사하였다. 역학적 측정을 위해, 2배 연속 희석된 Fab (예컨대, 0.78 nM 내지 500 nM)를 대략 25  $\mu\text{l}$ /분의 유속으로 25℃에서 PBS 중에서 0.05% Tween 20 (PBST)와 함께 사용한다. 결합 속도 ( $k_{\text{on}}$ ) 및 해리 속도 ( $k_{\text{off}}$ )를 결합 및 해리 센서그램의 동시 피팅(simultaneously fitting)에 의하여 단순한 일 대 일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (BIAcore 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 산출하였다. 평형 해리 상수(Kd)는  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  비율로서 산출된다. 참고: 예를 들면, Chen 외, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). 만일 온-레이트(on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  를 초과하면, 분광기, 예컨대 정지-유동 구비된 분광광도계 (Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳을 갖춘 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같이 항원의 증가 농도의 존재하에 25℃에서 pH 7.2, PBS내 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 방출 세기 (여기 = 295nm; 방출 = 340nm, 16nm 대역통과)에서의 증가 또는 감소를 측정하는 형광성 쉼터 기술을 이용함으로써 온-레이트가 측정될 수 있다.
- [0068] 본 명세서의 목적상 "활성인" 또는 "활성"은 천연 또는 천연 발생 폴리펩타이드의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 보유하는 폴리펩타이드 (예컨대 다중특이적 항체)의 형태(들)를 지칭하고, 여기서 "생물학적" 활성은 천연 또는 천연 발생 폴리펩타이드에 의해 보유된 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유도하는 능력 이외의 천연 또는 천연 발생 폴리펩타이드에 의해 야기된 생물학적 작용 (저해 또는 자극 중 어느 하나)을 지칭하고 "면역학적" 활성은 천연 또는 천연 발생 폴리펩타이드에 의해 보유된 항원성 에피토프에 대한 항체의 생산을 유도하는 능력을 지칭한다.
- [0069] 본원에 제공된 다중특이적 항원-결합 단백질, 예를 들어, 항체, 단편 또는 이의 유도체와 관련하여 "생물학적으로 활성" 및 "생물학적 활성" 및 "생물학적 특징"은 달리 명시되는 경우를 제외하고 생물학적 분자에 결합하는 능력을 가짐을 의미한다.
- [0070] 본 명세서에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고 구체적으로 단클론성 항체, 다클론성 항체, 적어도 2 종의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 항체), 및 이들이 목적 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 용어 "면역글로불린" (Ig)는 본원에서 "항체"와 상호교환적으로 사용된다.
- [0071] 항체는 전부 면역글로불린 접합을 기반으로 가변 구조를 갖는 천연 발생 면역글로불린 분자이다. 예를 들면, IgG 항체는 작용성 항체를 형성하도록 디설파이드-결합된 2개의 "중"쇄 및 2개의 "경"쇄를 갖는다. 각 중쇄 및 경쇄 자체는 "상수"(C) 및 "가변"(V) 영역을 포함한다. V 영역은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하는 반면, C 영역은 면역 효과기와 비-항원-특이적 상호작용에서 구조적 지지 및 작용을 제공한다. 항체의 항원 결합 특이성 또는 항체의 항원-결합 단편은 특정한 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 능력이다.
- [0072] 항체의 항원 결합 특이성은 V 영역의 구조적 특징에 의해 측정된다. 가변성은 가변 도메인의 110-아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은 각각 9-12 아미노산 길이인 "초가변성 영역(hypervariable region)"이라 불리는 극단적인 가변성의 짧은 영역에 의해 분리된 15-30 아미노산의 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 상대적으로 비변이적인 연신부로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 각각은 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 크기는  $\beta$ -시트 입체배치를 채택한 4개의 FR을 포함하여,  $\beta$ -시트 구조를 연결하고, 그리고 일부 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 사슬의 초가변성 영역은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 그리고 다른 사슬로부터의 초가변성 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (참고: Kabat 외, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 불변 도메인은 항원에 항체를 결합하는 것에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 작용을 나타낸다.
- [0073] 각 V 영역은 전형적으로 3개의 상보성 결정 영역 ("CDR", 각각은 "초가변성 루프"를 포함함) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함한다. 특정한 목적 항원에 실질적인 친화도로 결합하는데 요구되는 최소 구조 단위인 항체 결합 부위는 따라서 전형적으로 적절한 형태로 CDR을 보유하고 존재하도록 그 사이에 산재된 3개의 CDR, 및 적어도 3



개, 바람직하게는 4개의 프레임워크 영역을 포함할 것이다. 전통적 4개의 사슬 항체는 협력하여  $V_H$  및  $V_L$  도메인에 의해 정의되는 항원 결합 부위를 갖는다. 낙타 및 상어 항체와 같은 특정 항체는 경쇄를 결핍하고 중쇄에 의해서만 형성된 결합 부위에 의존한다. 단일 도메인으로 가공된 면역글로불린은  $V_H$  와  $V_L$  사이의 협력의 부재로 중쇄 또는 경쇄 단독으로 결합 부위가 형성되어 제조될 수 있다.

- [0074] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 중에 서열에서 광범위하게 상이하고 그리고 그것의 특정한 항원에 대한 각각의 특정한 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체를 통해 고르게 분포되어 있지 않다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변성 영역으로 불리는 3 개 절편에 집중된다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 각각은 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 크게는  $\beta$ -시트 입체배치를 채택한 4개의 FR을 포함하여,  $\beta$ -시트 구조를 연결하고, 그리고 일부 경우에는  $\beta$ -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 사슬의 초가변성 영역은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 그리고 다른 사슬로부터의 초가변성 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (참고: Kabat 외, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 불변 도메인은 항원에 항체를 결합하는 것에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 작용을 나타낸다.
- [0075] 본 명세서에서 사용될 때 용어 "초가변성 영역"은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변성 영역은 하기를 포함할 수 있다: "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 유래의 아미노산 잔기 (예컨대,  $V_L$  내에 대략 약 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및  $V_H$  내에 대략 약 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) (Kabat 외, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 및/또는 "초가변성 루프" 유래의 이들 잔기 (예컨대  $V_L$  내 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및  $V_H$  내 26-32 (H1), 52A-55 (H2) 및 96-101 (H3) (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))).
- [0076] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기들은 본원에 정의된 바와 같이 초가변 영역 잔기들 이외의 다른 가변 도메인 잔기들이다.
- [0077] 항체 또는 절반-항체의 맥락에서, "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216로부터 Pro230까지 연신되는 것으로 정의된다 (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역이 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫 번째와 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치 내에 배치함으로써 IgG1 서열과 함께 정렬될 수 있다.
- [0078] Fc 영역의 "보다 낮은 힌지 영역"은 잔기가 C-말단으로부터 힌지 영역으로 바로 연신되는, 즉 Fc 영역의 잔기 233으로부터 239까지 연신되는 것으로 일반적으로 정의된다. 본 출원에 앞서, Fc  $\gamma$ R 결합은 일반적으로 IgG Fc 영역의 보다 낮은 힌지 영역 내의 아미노산 잔기로 인하여 발생한다.
- [0079] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 보통, IgG의 잔기 약 231로부터 약 340까지 연신된다. CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는 독특한 것이다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬이 손상되지 않은 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재되어 있다. 탄수화물은 도메인-도메인 쌍형성을 위한 치환체를 제공하고, CH2 도메인을 안정화하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 고려된다. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985).
- [0080] "CH3 도메인"은, Fc 영역 내 잔기 C-말단으로부터 CH2 도메인으로의 연신 (즉, IgG의 아미노산 잔기 약 341로부터 아미노산 잔기 약 447까지)을 포함한다.
- [0081] "항체 단편"은 바람직하게는 이들의 항원-결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 탠덤 디아바디 (taDb), 선형 항체(예를 들면, 미국 특허 번호 5,641,870, 실시예 2; Zapata 외, *Protein Eng* 8(10):1057-1062 (1995)); 일편 항체, 단일 가변 도메인 항체, 미니바디, 단일-사슬 항체 분자; 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들면, 비제한적으로, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)<sub>4</sub>-Fc, di-scFv, bi-scFv, 또는 탠덤 (di,tri)-scFv를 포함함); 및 이중특이적 T-세포 연관체 (BiTE)를 포함한다.
- [0082] 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생산하고, 그리고 쉽게 결정화하

는 능력을 반영하는 명칭인 잔여 "Fc" 단편을 생산한다. Fab 단편은 H 사슬(VH)의 가변 영역 도메인, 및 하나의 중쇄 (CH1)의 제1 불변 도메인과 함께 전체 L 사슬로 이루어진다. 항체의 펩신 처리는 단일의 큰 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 산출하고, 이는 일상적으로 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 이황화 연결된 Fab 단편에 상응하고, 여전히 항원과 가교결합할 수 있다. Fab' 단편은 항체-힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 추가의 소수 잔기를 가짐에 의하여 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0083] "Fv"는 완벽한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하고 비-공유 회합으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면에 항원-결합 부위를 정의하기 위해 각 가변 도메인의 3개의 초가변성 영역이 상호 작용하는 것이 이 입체배치에 있다. 종합적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)조차도, 비록 전체 결합 부위보다 낮은 친화도로 이지만, 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0084] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 또는 그 초과 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 잔기를 첨가함으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 본 명세서에서의 지정사항이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0085] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체(면역글로불린) "경쇄"는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로 불리는 2개의 명확히 구별되는 유형 중 하나에 배정될 수 있다.

[0086] 이의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체가 상이한 "부류"에 배정될 수 있다. 하기 5개 주요 부류의 항체가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM [이들 중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2 로 추가 구분될 수 있음]. 항체의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 및  $\mu$  로 지칭된다. 면역글로불린의 상이한 부류의 하부단위 구조 및 3차원 입체배치가 잘 알려져 있다.

[0087] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 일부 구체예에서, Fv 폴리펩타이드는 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub> 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 더욱 포함하는데, 이것은 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다. scFv의 재고를 위해, 하기를 참고한다: Pluckthün *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0088] 용어 "디아바디(diabody)"는 2 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내며, 이 단편은 동일한 폴리펩타이드 사슬(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)에서 경쇄 가변 도메인(V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V<sub>H</sub>)을 포함한다. 동일한 사슬 상에서 2 개의 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 이용함으로써, 도메인은 또 하나의 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루고 2 개의 항원-결합 부위를 생성하도록 유도된다. 디아바디는 하기에 더욱 충분히 기술된다: 예를 들면, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

[0089] 본원에 사용된 용어 "절반-항체(half-antibody)" 또는 "헤미머(hemimer)"는 1가 항원 결합 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 구현예에서, 절반 항체 또는 헤미머는 VH/VL 단위 및 선택적으로 면역글로불린 불변 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 특정 구현예에서, 절반 항체 또는 헤미머는 하나의 면역글로불린 경쇄와 관련된 하나의 면역글로불린 중쇄, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 절반 항체 또는 헤미머는 단일-특이적, 즉, 단일 항원 또는 에피토프에 결합한다. 당해 분야의 숙련가는 절반-항체가, 예를 들어, 낙타과로부터 유래하는 단일 가변 도메인으로 이루어지는 항원 결합 도메인을 가질 수 있음을 쉽게 인식할 것이다.

[0090] 용어 "VH/VL 단위"는 적어도 하나의 VH HVR 및 적어도 하나의 VL HVR을 포함하는 항체의 항원-결합 영역을 지칭한다. 특정 구현예에서, VH/VL 단위체는 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 3개 모두의 VH HVR, 및 적어도 1개, 적

어도 2개, 또는 3개 모두의 VL HVR을 포함한다. 특정 구현예에서, VH/VL 단위는 프레임워크 영역 (FR)의 적어도 일부분을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, VH/VL 단위는 3개의 VH HVR 및 3개의 VL HVR을 포함한다. 상기 일부 구현예에서, VH/VL 단위체는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 4개 모두의 VH FR, 및 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 4개 모두의 VL FR을 포함한다.

[0091] 용어 "다중특이적 항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 특히 폴리에피토프 특이성을 갖는 (즉 하나의 생물학적 분자 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나 또는 2개 이상의 상이한 생물학적 분자 상의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는) 항원-결합 도메인을 포함하는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 항체 또는 2가 F(ab')<sub>2</sub>)의 항원-결합 도메인은 두 VH/VL 단위를 포함하고, 여기서 제1 VH/VL 단위는 제1 에피토프에 특이적으로 결합하고 그리고 제2 VH/VL 단위는 제2 에피토프에 특이적으로 결합하고, 여기서 각 VH/VL 단위는 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함한다. 상기 다중특이적 항체는 전장 항체, 2개 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, Fab, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디 및 트리아바디와 같은 항체 단편, 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 항체 단편을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 적어도 일부분의 중쇄 불변 영역 및/또는 적어도 일부분의 경쇄 불변 영역을 더 포함하는 VH/VL 단위는 또한 "헤미머" 또는 "절반 항체"로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 절반 항체는 단일 중쇄 가변 영역의 적어도 일부분 및 단일 경쇄 가변 영역의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 2개의 절반 항체를 포함하고 2개의 항원에 결합하는 이중특이적 항체는 제1 항원 또는 제1 에피토프에 결합하지만 제2 항원 또는 제2 에피토프에는 결합하지 않는 제1 절반 항체 및 제2 항원 또는 제2 에피토프에 결합하나 제1 항원 또는 제1 에피토프에 결합하지 않는 제2 절반 항체를 포함한다. 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 5 M 내지 0.001 pM, 3 M 내지 0.001 pM, 1 M 내지 0.001 pM, 0.5 M 내지 0.001 pM, 또는 0.1 M 내지 0.001 pM의 친화도로 각 항원 또는 에피토프에 결합하는 IgG 항체이다. 일부 구현예에서, 헤미머는 충분한 부분의 중쇄 가변 영역을 포함하여 분자내 디설파이드 결합이 제2 헤미머 내에 형성되도록 한다. 일부 구현예에서, 헤미머는, 예를 들면, 상보적 홀 돌연변이 또는 크롭 돌연변이를 포함하는 제2 헤미머 또는 절반 항체와 이중이량체화가 가능하도록 크롭 돌연변이 또는 홀 돌연변이를 포함한다. 크롭 돌연변이 및 홀 돌연변이는 아래에 추가로 논의된다.

[0092] "이중특이적 항체"는 하나의 생물학적 분자 상의 2개의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하거나 또는 2개의 상이한 생물학적 분자 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 다중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 또한 본 명세서에서 "이중 특이성"을 가지는 것으로 또는 "이중 특이적"인 것으로 지칭될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 이중특이적 항체에 의해 결합된 항원이 이중특이적 항체명칭으로 열거되는 순서는 임의적이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 절반 항체를 포함하며, 각각의 절반 항체는 단일 중쇄 가변 영역 및 선택적으로 중쇄 불변 영역의 적어도 일부, 및 단일 경쇄 가변 영역 및 선택적으로 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 절반 항체를 포함하며, 각각의 절반 항체는 단일 중쇄 가변 영역 및 단일 경쇄 가변 영역을 포함하고 하나를 초과하는 단일 중쇄 가변 영역을 포함하지 않으며 하나를 초과하는 단일 경쇄 가변 영역을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 절반 항체를 포함하며, 각각의 절반 항체는 단일 중쇄 가변 영역 및 단일 경쇄 가변 영역을 포함하고, 제1 절반 항체는 제1 항원에 결합하고 제2 항원에는 결합하지 않으며 제2 절반 항체는 제2 항원에 결합하고 제1 항원에는 결합하지 않는다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "크롭-인투-홀(knob-into-hole)" 또는 "KiH"는, 돌출부(크롭)를 일 폴리펩타이드에 도입되고, 공동(홀)을 다른 폴리펩타이드에 그들이 상호작용하는 계면에 도입함으로써 시험관내 또는 생체내 2개의 폴리펩타이드를 함께 쌍형성하도록 유도하는 기술을 지칭한다. 예를 들어, KiH는 항체의 Fc:Fc 결합 계면, CL:CH1 계면 또는 VH/VL 계면 내에 도입된다 (예를 들어, 참고: US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431, 및 Zhu 외, 1997, *Protein Science* 6:781-788). 일부 구현예에서, KiH는 특히 다중 특이적 항체의 제조 동안 2개의 상이한 중쇄를 함께 쌍형성하는 것을 촉진하는데 유용하다. 예를 들어, 이들의 Fc 영역 내 KiH를 갖는 다중특이적 항체는 추가로, 각 Fc 영역에 연결된 단일 가변 도메인을 포함하거나, 또는 추가로, 유사하거나 상이한 경쇄 가변 도메인과 쌍을 이루는 상이한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. KiH 기술은 또한, 2개의 상이한 수용체 세포의 도메인을 함께, 또는 상이한 표적 인식 서열 (예컨대, 에피바디, 펩티바디, 및 기타 Fc 융합)을 포함하는 임의의 기타 폴리펩타이드 서열을 쌍형성하는데 사용될 수 있다.

[0094] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "크롭 돌연변이"는 폴리펩타이드가 또 다른 폴리펩타이드와 상호 작용하는 계면에서 폴리펩타이드 안으로 돌출부 (크롭)를 도입하는 돌연변이를 지칭한다. 일부 구현예에서, 다른 폴리펩타이드는 홀 돌연변이를 갖는다(참조: 예를 들어, US 5,731,168, US 5,807,706, US 5,821,333, US

7,695,936, US 8,216,805, 각각은 그 전문이 본원에 참고로 편입된다).

- [0095] 본원에 사용된 용어 "홀(hole) 돌연변이"는, 폴리펩타이드가 또 다른 폴리펩타이드와 상호작용하는, 계면에서 폴리펩타이드로 공동 (홀)을 도입시키는 돌연변이를 지칭한다. 일부 구현예에서, 다른 폴리펩타이드는 크롭 돌연변이를 갖는다(참조: 예를 들어, US 5,731,168, US 5,807,706, US 5,821,333, US 7,695,936, US 8,216,805, 각각은 그 전문이 본원에 참고로 편입된다).
- [0096] 표현 "단일 도메인 항체" (sdAbs) 또는 "단일 가변 도메인 (SVD) 항체"는 일반적으로 단일 가변 도메인 (VH 또는 VL)이 항원 결합을 부여할 수 있는 항체를 지칭한다. 환언하면, 단일 가변 도메인은 표적 항원을 인식하기 위해 또 다른 가변 도메인과 상호작용할 필요가 없다. 단일 도메인 항체의 예는 낙타과 (라마 및 낙타) 및 연골 어류 (예를 들면, 수염 상어) 및 인간과 마우스 항체로부터 재조합 방법으로 유도된 것들을 포함한다 (*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56; *Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235; *Trends Biotechnol* (2003):21:484-490; WO 2005/035572; WO 03/035694; *FEBS Lett* (1994) 339:285-290; WO00/29004; WO 02/051870).
- [0097] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 상기 집단을 포함하는 개별 항체는, 단클론성 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체 항체 (상기 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정인자 (에피토프)에 관련된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 제조와 대조되게, 각각의 단클론성 항체는 항원에서 단일 결정인자에 관련된다. 이들의 특이성에 부가하여, 단클론성 항체는 이들이 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "단클론성"은 실질적으로 균질 한 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법에 따라 사용되는 단일클론 항체는 우선 하기에 의해 기재된 혼성세포 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다: Kohler 외, *Nature* 256:495 (1975). 단클론성 항체는 또한 예를 들면 하기에 기재된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다: Clackson 외, *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks 외, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).
- [0098] 본원의 단클론성 항체는 구체적으로 "키메라" 항체(면역글로불린)를 포함하고, 여기서, 중쇄 및/또는 경쇄 부분은 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 상동성이거나 특정 항체 부류 또는 아부류에 속하고, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편 뿐만 아니라 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속한다(미국 특허 번호 4,816,567; Morrison 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). 본 명세서에서 흥미 있는 키메라성 항체는 비-인간 영장류 (예를 들면 구대륙 원숭이, 예컨대 개코원숭이, 레수스 또는 사이노몰구스 원숭이)로부터 유도된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화된 (primatized)" 항체를 포함한다 (미국 특허번호 5,693,780).
- [0099] 비인간 (예를 들어, 쥐과) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래하는 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수령체의 초가변성 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도, 및 수용력을 가지는 비-인간 종 (공여체 항체) 예컨대 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변성 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수령체 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 만들어졌다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 1개, 그리고 전형적으로는 2개의 모든 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변성 루프는 비-인간 면역글로불린의 것과 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다 (상기 주지된 FR 치환(들) 제외). 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 부분을 포함할 것이다. 추가 세부사항에 대해서는, 하기를 참조한다: Jones 외, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 외, *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).
- [0100] 본 명세서에서의 목적상, "무손상 항체(intact antibody)"는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인, 뿐만 아니라 Fc 영역을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들면, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그것의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 효과기 작용을 갖는다.
- [0101] "천연 항체(native antibody)"는 보통 2개의 동일한 경 (L) 쇄 및 2개의 동일한 중 (H) 쇄로 구성된, 약



150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 반면 디설파이드 연결기의 수는 상이한 면역글로불린 아이소타입의 중쇄 중에서 다변한다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 디설파이드 가교를 갖는다. 각 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 ( $V_H$ )과 그 다음 수많은 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인을( $V_L$ ) 그리고 그 다른 말단에 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 간 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0102] "네이키드(naked) 항체"는 (본원에 정의된) 이형 분자, 예컨대 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 콘주게이트되지 않은 항체이다.

[0103] 본원에서 사용된 용어 "면역접합체(immunoadhesin)"는, 이형 단백질 ("접합체")의 결합 특이성을 면역글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합하는 분자를 가리킨다. 구조적으로, 면역접합체는 목적 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열의 융합을 포함하고, 이의 아미노산은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 (즉, 항체의 불변 영역과 비교하여 "이중성"임) 및 면역글로불린 불변 도메인 서열 (예를 들어, IgG의 CH2 및/또는 CH3 서열) 이외의 것이다. 예시적인 접합체 서열은 관심 단백질에 결합하는 수용체 또는 리간드의 부분을 포함하는 인접 아미노산 서열을 포함한다. 접합체 서열은 또한 관심 단백질에 결합하는 서열일 수 있으나, 수용체 또는 리간드 서열 (예를 들어, 펩티다 내 접합체 서열)이 아니다. 상기 폴리펩타이드 서열은 다양한 방법에 의해 선택되거나 확인될 수 있고, 파지 디스플레이 기술 및 고출력 분류법을 포함한다. 면역접합체 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD, 또는 IgM으로부터 취득될 수 있다.

[0104] 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 항체, 이중특이적 항체 또는 Fc-융합 단백질이다.

[0105] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 생산된 Fc-융합 단백질은 표적화된 면역사이토카인이다. 특정 구현예에서, 표적화된 면역사이토카인은 CEA-IL2v 면역사이토카인이다. 특정 구현예에서, CEA-IL2v 면역사이토카인은 RG7813이다. 특정 구현예에서, 표적화된 면역사이토카인은 FAP-IL2v 면역사이토카인이다. 특정 구현예에서, FAP-IL2v 면역사이토카인은 RG7461이다.

[0106] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 생산된 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)는 CEA 및 적어도 하나의 추가의 표적 분자에 결합한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 생산된 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)는 중앙 표적화된 사이토카인 및 적어도 하나의 추가의 표적 분자에 결합한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 생산된 다중특이적 항체는 IL2v (즉, 인터루킨 2 변이체) 및 적어도 하나의 추가의 표적 분자에 융합된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 생산된 다중특이적 항체는 T-세포 이중특이적 항체 (즉, 이중특이적 T-세포 연관체 또는 BiTE)이다.

[0107] 일부 구현예에서, 항체 "효과기(effector) 작용"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 이들 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 가변한다. 항체 효과기 기능의 실행에는 하기가 포함된다: C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절.

[0108] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 동축 항원으로 복합된 분자 (예컨대 폴리펩타이드 (예컨대, 항체))에 대한 보체체 (C1q)의 제1 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들면 하기에 기술된 CDC 검정이 수행될 수 있다: Gazzano-Santoro 외, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0109] "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR) (예를 들면 자연 살해 (NK) 세포, 중성구, 및 대식세포)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포에서 결합된 항체를 인식하고 그리고 차후에 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC, NK 세포 매개용 1차 세포는 Fc $\gamma$ RIII 만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RRII 및 Fc $\gamma$ RIII을 발현한다. 조혈 세포상의 FcR 발현은 다음 문헌의 464 페이지 상의 표 3에 요약되어 있다: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). 해당 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된, 시험관내 ADCC 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정을 위한 유용한 효과기 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 해당 분자의 ADCC 활성은 예를 들면, 문헌[Clynes 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기술된 바와 같은 동물 모델과 같이 생체내 평가된다.

- [0110] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현시키고 ADCC 효과기 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예에는 말초 혈액 단핵구(PBMC), 자연 살해(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구가 포함되며; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다.
- [0111] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 게다가, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고 그리고, 대립유전자 변이체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이스된 형태를 포함하여, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, 및 Fc $\gamma$ RIII 하위부류의 수용체를 포함한다. Fc $\gamma$ RII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이는 이의 세포질 도메인 내에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프(ITIM)를 함유한다. (참고: Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR은 하기에 검토된다: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel 외, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 및 de Haas 외, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). 향후 확인될 것들을 포함하는 다른 FcR이 본원에서 용어 "FcR"에 포괄된다. 상기 용어에는 또한 신생아 수용체, FcRn이 포함되며, 이는 모계 IgG의 태아로의 전달에 관여한다 (Guyer 외, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 및 Kim 외, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).
- [0112] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고 상기 세포의 후손을 포함하는, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 1차 형질전환된 세포 및 계대 횃수와 상관없이 이로부터 유래된 후손을 포함하는 "형질전환체(transformant)" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량에 있어서 친계 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해 선별되거나 선택된 바와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본원에 포함된다.
- [0113] "불순물"은 목적 폴리펩타이드 생성물과 상이한 물질을 지칭한다. 불순물은 생성물-특이적 폴리펩타이드, 예를 들어, 1-아암 항체 및 조립오류 항체, 염기성 변이체 및 산성 변이체를 포함하는 항체 변이체, 및 응집물을 지칭할 수 있다. 다른 불순물은 비제한적으로 다음을 포함하는 공정 특이적 불순물을 포함한다: 숙주 세포 물질, 예를 들어, 숙주 세포 단백질(HCP); 침출된 단백질 A; 핵산; 또 다른 폴리펩타이드; 내독소; 바이러스성 오염물질; 세포 배양 배지 성분 등. 일부 예에서, 불순물은, 예를 들어, 비제한적으로, 박테리아 세포, 예를 들어, *E. coli*, *콜라이* 세포(ECP), 곤충 세포, 원핵 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포, 진균 세포로부터의 HCP일 수 있다. 일부 예에서, 불순물은 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포, 즉, CHO 세포 단백질(CHOP) 유래의 HCP일 수 있다. 불순물은 다중특이적 항체의 발현, 접합 또는 조립을 용이하게 하기 위해 사용된 보조 단백질, 예를 들어, 원핵 샤페론, 예를 들어, FkpA, DsbA 및 DsbC를 지칭할 수 있다.
- [0114] 본원에 사용된 "복합체" 또는 "복합체화된"은 펩타이드 결합이 아닌 결합 및/또는 힘(예를 들어, 반 데르 발스, 소수성, 친수성 힘)을 통해 서로 상호작용하는 2종 이상의 분자의 회합을 지칭한다. 일 구현예에서, 복합체는 이종다량체이다. 본원에 사용된 용어 "단백질 복합체" 또는 "폴리펩타이드 복합체"는 단백질 복합체(예를 들어, 비제한적으로, 화학적 분자, 예를 들어, 독소 또는 검출제를 포함) 중 단백질에 접합된 비-단백질 독립체를 갖는 복합체를 포함한다는 것이 이해되어야 한다.
- [0115] "단리된(isolated)" 핵산은 자연 환경 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 말한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 원래 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에, 또는 이의 자연 염색체 위치와는 다른 염색체 위치에 존재한다.
- [0116] 표준 폴리펩타이드 서열과 관련하여 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 성취하기 위해 정렬한 후 표준 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존성 치환을 고려하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 목적으로의 정렬은, 예를 들면, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 재량 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업계의 숙련가들은 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대의 정렬을 달성하는데 필요한 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적합한 파라미터를 결정할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 상동성 값(%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제조사 (Genentech, Inc.)에 의해 개발되었고, 소스 코드는 사용자 기록문서와 함께 하기와 같이 제출되었다: 미국 저작권 청, 워싱턴 D.C., 20559, 미국 저작

권 등록 번호 TXU510087 하에서 등록됨. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 Genentech, Inc.로부터 공개적으로 이용 가능하거나, 또는 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 예컨대 디지털 UNIX V4.0D 상에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 바뀌지 않는다.

- [0117] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 A 내지, 및, 또는 소정의 아미노산 서열 B(이것은 소정의 아미노산 서열 B에 대해 특정의 아미노산 서열 동일성%를 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)의 아미노산 서열 동일성%는 다음과 같이 계산된다:
- [0118] 분수 X/Y의 100배
- [0119] 상기 식 중, X는 A 및 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 동일한 매치로서 스코어링되는 아미노산 잔기의 수이고 Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의% 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의% 아미노산 서열 동일성은 동일하지 않음을 인식할 것이다. 달리 구체적으로 기재하지 않은 경우, 본원에 사용된 모든% 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 직전의 문단에 기재된 바와 같이 수득한다.
- [0120] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 나타낸다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각, VH 및 VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다. (참고: *예컨대*, Kindt 외, *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 더욱이, 특정 항원에 결합하는 항체는 항원에 결합하여 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브리리를 스크리닝하는 항체로부터 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 참고: *예를 들면*, Portolano 외, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 외, *Nature* 352:624-628 (1991).
- [0121] 본원에 사용된 용어 "백터"는, 이것이 연결된 또 다른 핵산을 증가시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라 이것이 도입되는 숙주 세포의 게놈에 삽입되는 백터를 포함한다. 특정 백터는 이들이 작동적으로 연결되는 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 상기 백터는 본원에서 "발현 백터"로서 지칭된다.
- [0122] 크로마토그래피와 관련하여 본원에 사용된 용어 "순차적인"은, *예를 들어*, 제1 크로마토그래피 단계, 이어서 제2 크로마토그래피 단계, 이어서 제3 크로마토그래피 단계 등의 특정 순서의 크로마토그래피 단계를 지칭한다. 추가적인 단계가 순차적인 크로마토그래피 단계 사이에 포함될 수 있다.
- [0123] 크로마토그래피에 관해 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "연속적인"은 제1 크로마토그래피 그 다음 제2 크로마토그래피를, 직접적으로 연결하여, 또는 상기 2개 크로마토그래피 물질 사이의 연속적 유동을 가능케하는 일부 기타 기전으로 갖는 것을 지칭한다.
- [0124] "로딩 밀도"는 크로마토그래피 물질의 용적, *예를 들면* 리터와 접촉하는 조성물의 양, *예를 들면* 그램을 지칭한다. 일부 예에서, 로딩 밀도는 g/l 로 표시된다.
- [0125] "샘플"은 더 많은 양의 물질 중 작은 일부분을 지칭한다. 일반적으로, 본 명세서에서 기재된 방법에 따른 시험은 샘플에 대해 수행된다. 샘플은 전형적으로, *예를 들면* 또한 본 명세서에서 "생성물 세포주(product cell line)"라고도 지칭되는 배양된 재조합 폴리펩타이드-발현 세포주 또는 배양된 숙주 세포로부터 수득된 재조합 폴리펩타이드 제제로부터 수득된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "숙주 세포"는 관심 재조합 폴리펩타이드 또는 생성물의 발현을 위한 유전자를 함유하지 않는다. 샘플은, *예를 들면* 비제한적으로, 수확된 세포 배양액, 정제 공정의 특정 단계에서의 공정 중 풀 또는 최종 정제된 생성물로부터 수득될 수 있다. 샘플은 또한 목적하는 분자(*예를 들어*, 다중특이적 항체, *예를 들어*, 이중특이적 항체)와 혼합되어 발견된 회색제, 완충제, 세제, 및 오염 중, 잔해 등을 포함할 수 있다.
- [0126] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 변형을 포함한다 (그리고 이를 기술한다). *예를 들면*, "약 X"를 언급하는 기재사항은 "X"의 기재사항을 포함한다.
- [0127] 본원에 기재된 발명의 양태 및 구현에는 "포함하는(comprising)", "~로 이루어지는(consisting) 및 "~로 본질적으로 구성되는"의 양태 및 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0128] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 이용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "or" 및 "the")는 문맥에서 달리 유도되지 않으면, 복수 유도대상을 포함한다. 본원에 기재된 발명의 양태 및 구현에는 "~로 이루어지는

(consisting)" 및/또는 "~로 본질적으로 구성되는"의 양태 및 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.

[0129] 특허 출원 및 공보를 포함한, 본원에 인용된 모든 참조는, 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

[0130] **다중특이적 항체의 정제 방법**

[0131] 다중특이적 항체의 정제 방법이 본원에서 제공된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체는 제1 표적에 결합하는 제1 F(ab) 및 제2 표적에 결합하는 제2 F(ab)를 포함하는 2가 F(ab')<sub>2</sub> 이다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체는 이중-특이적 항체, 즉, 아미노산 서열이 동일한 2개의 항원-결합 아암을 갖는 항체이고, 여기서 각각의 Fab 아암은 2개의 항원(예를 들어, 이중 작용 Fab 항체)을 인식할 수 있다.

[0132] 일부 양태에서, 다중특이적 항체의 정제는 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피의 순차 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 포획 크로마토그래피 이전에 조립된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 포획 크로마토그래피 후 조립된다.

[0133] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 2가 F(ab')<sub>2</sub>)는 상이한 항체 아암이 상이한 에피토프에 결합하는 2종 이상의 항체 아암을 포함한다. 특정 구현예에서, 상이한 에피토프는 동일한 항원 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 각각의 에피토프는 상이한 항원 상에 존재한다. 특정 구현예에서, 항체 아암은 VH/VL 단위를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 아암은 절반-항체로서 공지되기도 한 헤미머를 포함한다. 조립을 용이하게 하기 위해, 특정 구현예에서, 하나의 항체 아암의 중쇄는 "크롭"을 포함하도록 변형되고, 또 다른 항체 아암의 중쇄는 제1 중쇄의 크롭이 제2 중쇄의 홀에 적합하도록 "홀"을 포함한다.

[0134] 특정 구현예에서, 다중특이적 항체의 각각의 아암은 별개의 세포 배양물에서 생산된다. 숙주 세포에서 항체 아암의 발현 후, 전체 세포 액체배지를 수집하여 균질화하고, 항체 아암을 추출시킨다. 특정 구현예에서, 폴리에틸렌이민(PEI)은 크로마토그래피 이전에 세포 용해물에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 이전에 원심분리시킨다. 이어서, 다중특이적 항체의 각각의 아암은 (각각의 아암이 별개의 크로마토그래피 칼럼 또는 막 상에서 정제되도록) 포획 크로마토그래피로 정제된다. 특정 구현예에서, 포획 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 G 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A/G 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 L 크로마토그래피이다. 포획 크로마토그래피 후, 정제된 항체 아암은, 예를 들어, SDS-PAGE, SEC 크로마토그래피, 질량 분광분석법 등으로 분석할 수 있다. 다중특이적 항체의 정제된 아암은, 본원의 다른 곳에 추가적으로 상세하게 검토된 바와 같이, 이후 조합되고, 조립되도록 한다.

[0135] 기타 구현예에서, 다중특이적 항체의 각각의 아암은 별개의 세포 배양물에서 생산된다. 숙주 세포에서 항체 아암의 발현 후, 전체 세포 액체배지를 수집하여 균질화한다. 이어서, 각각의 배양물로부터의 세포 균질물을 혼합하고, 조합된 항체 아암을 추출시킨다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌이민(PEI)은 크로마토그래피 이전에 세포 용해물에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 이전에 원심분리시킨다. 이어서, 다중특이적 항체의 조합된 아암을 친화성 크로마토그래피로 정제시킨다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 크로마토그래피이다. 이러한 시점에서, 정제된 항체 아암은, 예를 들어, SDS-PAGE, SEC 크로마토그래피, 질량 분광분석법 등으로 분석할 수 있다. 다중특이적 항체의 정제된 아암은, 본원에 기술된 방법에 의하여, 이후 조합되고, 조립되도록 한다.

[0136] 기타 구현예에서, 다중특이적 항체의 각각의 아암은 상동한 세포 배양물에서 생산된다. 숙주 세포에서 항체 아암의 발현 후, 전체 세포 액체배지를 수집하여 균질화하고, 항체 아암을 추출시킨다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌이민(PEI)은 크로마토그래피 이전에 세포 용해물에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 이전에 원심분리시킨다. 이어서, 다중특이적 항체의 아암을 친화성 크로마토그래피로 정제시킨다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 크로마토그래피이다. 이러한 시점에서, 정제된 항체 아암은, 예를 들어, SDS-PAGE, SEC 크로마토그래피, 질량 분광분석법 등으로 분석할 수 있다. 다중특이적 항체의 정제된 아암은, 본원에 기술된 방법에 의하여, 조립되도록 한다.

[0137] 일부 구현예에서, 세포 용해물 내 PEI의 최종 농도는 적어도 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 또는 5.0 중 어느 것이다. 일부 구현예에서, 세포 용해물 중 PEI의 최종 농도는 0.1% 내지 5%, 0.1% 내지 1%, 0.1% 내지 0.5%, 0.5% 내지 5%, 0.5% 내지 1%, 또는 1% 내지 5% 중 어느



하나이다. 일부 구현예에서, PEI를 포함하는 세포 용해물은 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 또는 24시간 초과 중 어느 것 동안 유지된다. 일부 구현예에서, PEI를 포함하는 세포 용해물은 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 6시간, 6시간 내지 12시간, 12시간 내지 18시간, 18시간 내지 24시간 중 임의의 기간 동안 유지된다. 일부 구현예에서, PEI를 포함하는 세포 용해물은 10시간 내지 14시간 중 임의의 기간 동안 유지된다. 일부 구현예에서, PEI를 포함하는 세포 용해물은 약 4℃ 내지 37℃에서 유지된다. 일부 구현예에서, PEI를 포함하는 세포 용해물은 대략 주위 온도에서 유지된다.

[0138] 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 이전에 원심분리에 의하여 정화된다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 이전에 여과된다. 일부 구현예에서, 세포 용해물은 크로마토그래피 전에 0.22  $\mu$ m 필터를 통하여 여과된다.

[0139] 친화성 크로마토그래피의 예는 비제한적으로, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 단백질 A/G 크로마토그래피, 또는 단백질 L 크로마토그래피를 포함한다. 친화성 크로마토그래피 물질의 예는, 비제한적으로, ProSep<sup>®</sup>-vA, ProSep<sup>®</sup> 울트라 플러스(Ultra plus), 단백질 A Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우, Toyopearl<sup>®</sup> AF-r단백질(AF-rProtein) A, MabSelect<sup>™</sup>, MabSelect SuRe<sup>™</sup>, MabSelect SuRe<sup>™</sup> LX, KappaSelect, CaptureSelect<sup>™</sup> 및 CaptureSelect<sup>™</sup> FcXL을 포함한다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 물질은 칼럼 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 "결합 및 용리 방식" (대안적으로 "결합 및 용리 공정"으로 지칭됨)으로 수행된다. "결합 및 용리 방식"은 샘플 중 생성물(예를 들어, 다중특이적 항체)이 친화성 크로마토그래피 물질에 결합하고, 후속적으로 친화성 크로마토그래피 물질로부터 용리되는 생성물 분리 기술을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용리는 단계적 용리이며, 여기서 이동상의 조성물은 용리 공정 동안 1회 또는 수차례 경우에서 단계적으로 변화된다. 특정 구현예에서, 용리는 구배 용리이며, 여기서 이동상의 조성물은 용리 공정 동안 계속적으로 변화된다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 물질은 막이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 단백질 A 크로마토그래피는 MabSelect SuRe 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 CaptureSelect 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 CaptureSelect FcXL 크로마토그래피이다.

[0140] 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계 유래의 용리액은 후속하여 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용된다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 하기 작용성 중 하나 이상이 가능한 작용기를 포함한다: 음이온성 교환, 양이온성 교환, 수소 결합, 파이-파이(pi-pi) 결합 상호작용, IL1RAPL1, 친황성(thiophilic) 상호작용, 및 소수성 상호작용. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 음이온성 교환 및 소수성 상호작용일 수 있는 작용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 양이온성 교환 및 소수성 상호작용일 수 있는 작용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 N-벤질-N-메틸 에탄올 아민, 4-메르캅토-에틸-피리딘, 2-벤즈아미도-4-메르캅토부탄산, 핵실아민, 또는 페닐프로필아민, 또는 가교결합된 폴리알릴아민을 함유한다. 혼합 방식 물질의 예는 Capto<sup>™</sup> Adhere 수지, Capto<sup>™</sup> MMC 수지, MEP HyperCel<sup>™</sup> 수지, HEA HyperCel<sup>™</sup> 수지, PPA HyperCel<sup>™</sup> 수지, Eshmuno<sup>®</sup> HCX, Capto<sup>™</sup>adhere ImpRes, Capto<sup>™</sup>MMC Impres, Nuvia<sup>™</sup>cPrime<sup>™</sup> 막을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 Capto<sup>™</sup> Adhere 수지이다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 Capto<sup>™</sup> Adhere 수지이다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 Capto<sup>™</sup> MMC이다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 세라믹 수산화인회석 크로마토그래피를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, 용리는 단계적 용리이다. 특정 구현예에서, 용리는 구배 용리이다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 "통과 유동" 방식으로 수행된다. 상기의 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 칼럼에 존재한다. 상기의 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 물질은 막 내에 존재한다.

[0141] 특정 구현예에서, 포획 크로마토그래피 및 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 연속적이고, 예를 들어, 포획 크로마토그래피 물질 및 제1 혼합 방식 물질은 직접 연결되거나, 포획 크로마토그래피 물질과 제1 혼합 방식 물질 사이에 연속 흐름을 가능하게 하는 일부 다른 기전에 의해 연결된다. 특정 구현예에서, 포획 크로마토그래피 및 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 인접하며, 여기서 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 포획 크로마토그래피 후 직접적으로 수행된다.

[0142] 특정 구현예에서, 포획 크로마토그래피로부터의 용리액은 제1 혼합 방식 수지에 적용되기 전에 하나 이상의 추가의 크로마토그래피 단계에 적용된다. 예를 들어, 포획 크로마토그래피로부터 용리액을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하기 전에 임의의 하나 이상의 하기 크로마토그래피 단계에 임의의 순서로 및/또는 임의의 조합

으로 적용할 수 있다: 소수성 상호작용 (HIC) 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 세라믹 수산화인회석(hydroxyapatite) (CHT) 크로마토그래피, 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피 (HILIC) 등.

[0143] 소수성 상호작용 크로마토그래피는 소수성에 따라 생체분자를 분리하는 액체 크로마토그래피 기술이다. HIC 크로마토그래피 물질의 예시는 비제한적으로 하기를 포함한다: 예컨대, Toyopearl<sup>®</sup> 헥실-650, Toyopearl<sup>®</sup> 부틸-650, Toyopearl<sup>®</sup> 페닐-650, Toyopearl<sup>®</sup> 에테르-650, HiTrap<sup>®</sup> 세파로스, 옥틸 Sepharose<sup>®</sup>, 페닐 Sepharose<sup>®</sup> 또는 부틸 Sepharose<sup>®</sup>. 일부 구현예에서, HIC 크로마토그래피 물질은 페닐 세파로스를 포함한다. 특정 구현예에서, HIC 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, HIC 크로마토그래피는 "통과 유동(flow through)" 방식으로 수행된다. 상기의 일부 구현예에서, HIC 크로마토그래피 물질은 칼럼 내에 존재한다. 상기의 일부 구현예에서, HIC 크로마토그래피 물질은 막 내에 존재한다.

[0144] 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 양으로 하전되고, 고체 상 위로 지나가거나 고체 상을 통해 통과되는 수용액(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)에서 음이온과의 교환을 위한 자유 음이온을 갖는 고체 상이다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법 중 일부 구현예에서, 음이온 교환 물질은, 막, 모놀리스(monolith), 또는 수지일 수 있다. 일 구현예에서, 음이온 교환 물질은 수지일 수 있다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 물질은 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 또는 4급 암모늄 이온 작용기, 폴리아민 작용기, 또는 디에틸아미노에틸 작용기를 포함할 수 있다. 음이온 교환 물질의 예는 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 Poros<sup>®</sup> HQ 50, Poros<sup>®</sup> PI 50, Poros<sup>®</sup> D, Mustang<sup>®</sup> Q, Q Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우 (QSFF), Accell<sup>™</sup> 플러스 4차 메틸 아민 (QMA) 수지, Sartobind STIC<sup>®</sup>, 및 DEAE-Sepharose<sup>®</sup>를 포함한다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 "통과 유동" 방식으로 수행된다. 상기의 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 칼럼 내에 존재한다. 상기의 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 막이다.

[0145] 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 음으로 하전되고, 고체 상 위로 지나가거나 고체 상을 통해 통과되는 수용액(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)에서 양이온과의 교환을 위한 자유 음이온을 갖는 고체 상이다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법 중 일부 구현예에서, 양이온 교환 물질은, 막, 모놀리스(monolith), 또는 수지이다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 물질은 수지일 수 있다. 양이온 교환 물질은 카르복실산 작용기 또는 설폰산 작용기 예컨대, 비제한적으로, 설포네이트, 카르복실, 카르복시메틸 설폰산, 설포이소부틸, 설포에틸, 카르복실, 설포프로필, 설포닐, 설포시에틸, 또는 오르토포스페이트를 포함할 수 있다. 상기의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼이다. 상기의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 양이온 교환 크로마토그래피 막이다. 양이온 교환 물질의 예는 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 Mustang<sup>®</sup> S, Sartobind<sup>®</sup> S, SO<sub>3</sub> 모놀리스 (예를 들어, 예를 들어, CIM<sup>®</sup>, CIMultus<sup>®</sup> 및 CIMac<sup>®</sup> SO<sub>3</sub>), S 세라믹 HyperD<sup>®</sup>, Poros<sup>®</sup> XS, Poros<sup>®</sup> HS 50, Poros<sup>®</sup> HS 20, 설포프로필(sulphopropyl)-Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우 (SPSFF), SP-Sepharose<sup>®</sup> XL (SPXL), CM Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우, Capto<sup>™</sup> S, Fractogel<sup>®</sup> EMD Se Hicap, Fractogel<sup>®</sup> EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 또는 Fractogel<sup>®</sup> EMD COO<sup>-</sup>를 포함한다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 "통과 유동" 방식으로 수행된다. 상기의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 칼럼 내에 존재한다. 상기의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 막 내에 존재한다.

[0146] 수산화인회석 (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) 크로마토그래피 물질의 작용기는 양으로 하전된 결정 칼슘 이온 (C-부위) 쌍, 및 결정 포스페이트 (P-부위)의 삼중항과 관련된 6개의 음으로 하전된 산소 원자의 클러스터를 포함한다. C-부위, P-부위, 및 하이드록실은 결정 표면에 고정된 패턴으로 분포된다. 단백질은, 물, 염수 또는 비인산염 완충제가 로딩되면 특정 산성 단백질이 흡착될 수 있지만, 전형적으로 저농도(예를 들어, 10-25mM)의 인산염 완충제에서 수산화인회석에 흡착된다. 단백질은, 예를 들어, 염기성 단백질의 선택적 용리를 위해 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 또는 Cl<sup>-</sup> 이온의 구배가 또한 사용될 수 있지만, 일반적으로 증가하는 인산염 구배에 의해 용리된다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법 중 일부 구현예에서, 수산화인회석 크로마토그래피는 수지일 수 있다. 일부 구현예에서, 수산화인회석 크로마토그래피는 수지일 수 있다. 상기의 일부 구현예에서, 수산화인회석 크로마토그래피 물질은 칼럼 내

에 존재한다. 수산화인회석 크로마토그래피 물질의 예는 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 CHT™ 세라믹 수산화인회석, CHT 세라믹 수산화인회석 유형 I 지지체, CHT 세라믹 수산화인회석 유형 II 지지체를 포함한다. 일부 구현예에서, 수산화인회석 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, 수산화인회석 크로마토그래피는 "통과 유동" 방식으로 수행된다.

[0147] 일 구현예에서, 본원에서 보고된 방법은 또한 상기 이중특이적 항체를 포함하는 용액으로부터 Fc 도메인을 포함하는 이중특이적 항체를 분리하는 방법을 포함할 수 있고, 상기 방법은 (a) 상기 용액을 수산화인회석 크로마토그래피 매질과 접촉시키는 단계, (b) 상기 이중특이적 항체를 상기 수산화인회석 크로마토그래피 매질에 흡착시키는 단계 및 (c) 상기 이중특이적 항체를 염화물 이온의 존재하에 상기 수산화인회석 크로마토그래피 매질로부터 용리시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 용액은 상기 이중특이적 항체의 하나 이상의 단편을 추가로 포함하고, 이 하나 이상의 단편은 Fc 도메인을 포함하고/하거나; 상기 용액은 상기 이중특이적 항체의 분자량보다 큰 분자량을 갖는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 이중특이적 항체의 2개의 중쇄 중 적어도 하나를 포함하고, 상기 하나 이상의 폴리펩타이드는 W02015024896에서 지칭된 Fc 도메인을 추가로 포함한다.

[0148] 특정 구현예에서, 포획 크로마토그래피 유래의 용리액은 음이온 교환 크로마토그래피에 적용된다. 특정 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 Q Sepharose® 패스트 플로우 (QSFF)이다. 특정 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다.

[0149] 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 후 수집된 용리액을 후속적으로 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용한다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 하기 작용 중 하나 이상을 할 수 있는 작용기를 포함한다: 음이온성 교환, 양이온성 교환, 수소 결합, pi-pi 결합 상호작용, 친수성 상호작용, 친화성 상호작용, 및 소수성 상호작용. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 음이온성 교환 및 소수성 상호작용일 수 있는 작용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 양이온성 교환 및 소수성 상호작용일 수 있는 작용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 N-벤질-N-메틸 에탄올 아민, 4-메르캅토-에틸-피리딘, 2-벤즈아미도-4-메르캅토부탄산, 핵시아민, 또는 페닐프로필아민, 또는 가교결합된 폴리알릴아민을 함유한다. 혼합 방식 물질의 예는 Capto™ Adhere 수지, Capto™ MMC 수지, MEP HyperCel™ 수지, HEA HyperCel™ 수지, Eshmuno® HCX, Capto™Adhere ImpRes, Capto™MMC Impres, Nuvia™cPrime™ 막을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 Capto™ Adhere 수지이다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 Capto™ Adhere 수지이다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 Capto™ MMC이다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 세라믹 수산화인회석 크로마토그래피를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 "결합 및 용리" 방식으로 수행된다. 일부 구현예에서, 용리는 단계적 용리이다. 특정 구현예에서, 용리는 구배 용리이다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 "통과 유동" 방식으로 수행된다. 상기의 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 칼럼에 존재한다. 상기의 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 물질은 막이다.

[0150] 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 연속적이고, 예를 들어, 포획 크로마토그래피 물질 및 제1 혼합 방식 물질은 직접 연결되거나, 포획 크로마토그래피 물질과 제1 혼합 방식 물질 사이에 연속 흐름을 가능하게 하는 일부 다른 기전에 의해 연결된다. 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 인접하며, 여기서 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 제1 혼합 방식 크로마토그래피 후 직접적으로 수행된다.

[0151] 특정 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터의 용리액은 제2 혼합 방식 수지에 적용되기 전에 하나 이상의 추가의 크로마토그래피 조작에 적용된다. 예를 들어, 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터의 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하기 전에 하기 크로마토그래피 단계 중 어느 하나에 임의의 순서로 및/또는 임의의 조합으로 적용할 수 있다: 소수성 상호작용 (HIC) 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 세라믹 수산화인회석 (CHT) 크로마토그래피, 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피 (HILIC) 등.

[0152] 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터의 용리액은 하나 이상의 추가의 크로마토그래피 단계에 적용된다. 예를 들어, 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터의 용리액을 임의의 하나 이상의 하기 크로마토그래피 단계에 임의의 순서로 및/또는 임의의 조합으로 적용할 수 있다: 소수성 상호작용 (HIC) 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 세라믹 수산화인회석 (CHT) 크로마토그래피, 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피

피 (HILIC), 혼합 방식 크로마토그래피 등.

- [0153] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 본 방법은 완충제를 사용하는 것을 포함한다. 다양한 완충제는, 예를 들어, 목적하는 완충제의 pH, 목적하는 완충제의 전도도, 정제되는 다중특이적 항체의 특정 및 정제 방법에 따라 다중특이적 항체의 정제 동안 사용될 수 있다. 완충제는 로딩 완충제, 평형 완충제, 또는 세정 완충제일 수 있다. 특정 구현예에서, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제 중 하나 이상은 동일한 것이다. 특정 구현예에서, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제는 상이하다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 완충제는 염을 포함한다. 특정 구현예에서, 완충제는 하기를 포함한다: 염화나트륨, 아세트산나트륨, Tris HCl, Tris 아세테이트, 인산나트륨, 인산칼륨, MES, CHES, MOPS, BisTris, 아르기닌, 아르기닌 HCl, 또는 이의 혼합물. 특정 구현예에서, 완충제는 염화나트륨 완충제이다. 일부 구현예에서, 완충제는 아세트산나트륨 완충제이다. 특정 구현예에서, 완충제는 Tris, 아르기닌, 포스페이트, MES, CHES, 또는 MOPS 완충제이다.
- [0154] "로딩물(load)"은 크로마토그래피 물질에 로딩되는 조성물을 지칭한다. 로딩 완충제는 크로마토그래피 물질(예를 들어, 본원에 기재된 크로마토그래피 물질 중 어느 하나)에 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물 또는 항체 아암 및 불순물을 포함하는 조성물)을 로딩시키기 위해 사용되는 완충제이다. 크로마토그래피 물질은 정제되도록 되는 조성물을 로딩하기 전에 평형 완충제로 평형화될 수 있다. 세정 완충제는 조성물을 크로마토그래피 물질에 로딩 후에 사용된다. 용리 완충제는 고체 상으로부터 관심 있는 폴리펩타이드를 용리시키기 위해 사용된다.
- [0155] 본원에 기재된 임의의 크로마토그래피 물질에 다중특이적 항체를 포함하는 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)을 로딩하는 것은 불순물로부터 다중특이적 항체의 분리를 위해 최적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 물질에 다중특이적 항체를 포함하는 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)을 로딩하는 것은 상기 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식(예를 들어, 본원에서 지정된 바와 같은 친화성 크로마토그래피, 혼합 방식 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피)로 수행되는 경우 크로마토그래피에 대한 다중특이적 항체의 결합을 위해 최적화된다.
- [0156] 전도성은 두 전극 사이에 전류를 전도하는 수용액의 능력을 지칭한다. 용액에서, 전류는 이온 수송에 의해 흐른다. 따라서, 수용액에서 존재하는 이온의 양이 증가하므로, 용액은 보다 높은 전도도를 가질 것이다. 전도도에 대한 측정의 기본 단위는 시멘(Siemen, mS/cm) 또는 옴 (ohms, mho)이며, 전도도 측정기, 예컨대 오리온(Orion) 전도도 측정기의 다양한 모델을 사용하여 측정될 수 있다. 전해 전도도는 전류를 나르는 용액 내의 이온의 수용력이기 때문에, 용액의 전도도는 그 안의 이온의 농도를 변화함에 의해 변경될 수 있다. 예를 들면, 용액 내의 완충제의 농도 및/또는 염(예컨대, 염화나트륨, 아세트산나트륨, 또는 염화칼륨)의 농도는 목적 전도도를 달성하기 위해 변경될 수 있다. 바람직하게는, 다양한 완충제의 염 농도가 목적 전도도를 달성하기 위해 변형될 수 있다.
- [0157] 예를 들어, 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)은 로딩 완충제의 전도도가 일정한 다수의 상이한 pH 값에서 로딩 완충제 중 크로마토그래피 물질, 예를 들어, 본원에 기재된 크로마토그래피 물질 중 어느 하나를 포함하는 크로마토그래피 칼럼에 로딩된다. 대안적으로, 다중특이적 항체를 포함하는 용액은 다수의 상이한 전도도에서 로딩 완충제 내 크로마토그래피 물질 상에 로딩될 수 있으며, 한편 로딩 완충제의 pH는 일정하다. 다중특이적 항체를 포함하는 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물)의 크로마토그래피 물질에의 로딩 및 크로마토그래피 물질로부터 다중특이적 항체의 풀 분획으로의 용리 완료 후, 풀 분획에 남아있는 불순물의 양은 소정의 pH 및 전도도에서 불순물로부터 다중특이적 항체의 분리에 대한 정보를 제공한다. 마찬가지로, 다중특이적 항체가 크로마토그래피 물질을 통해 유동하는 크로마토그래피의 경우, 로딩 완충제는 다중특이적 항체가 크로마토그래피를 통해 유동하는 반면 불순물은 크로마토그래피 물질에 의해 유지되거나 다중특이적 항체와 다른 속도로 크로마토그래피 물질을 통해 유동하도록 pH 및 전도도에 대해 최적화된다.
- [0158] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 또는 항체 아암을 포함하는 용액의 로딩 밀도는 친화성 크로마토그래피 물질(예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피 물질)의 약 10g/ℓ, 20g/ℓ, 30g/ℓ, 40g/ℓ, 50g/ℓ, 60g/ℓ, 70g/ℓ, 80g/ℓ, 90g/ℓ, 100g/ℓ, 110g/ℓ, 120g/ℓ, 130g/ℓ, 140g/ℓ, 또는 150g/ℓ 초과 중 어느 것이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 또는 항체 아암을 포함하는 용액의 로딩 밀도는, 포획 크로마토그래피 물질(예컨대 친화성 크로마토그래피 물질, 예컨대, 단백질 A 크로마토그래피 물질, 단백질 G 크로마토그래피 물질, 단백질 A/G 크로마토그래피 물질, 또는 단백질 L 크로마토그래피 물질)의 약 10g/ℓ 내지 20g/ℓ, 20g/ℓ 내지 30g/ℓ,



30g/ℓ 내지 40g/ℓ, 40g/ℓ 내지 50g/ℓ, 50g/ℓ 내지 60g/ℓ, 60g/ℓ 내지 70g/ℓ, 70g/ℓ 내지 80g/ℓ, 80g/ℓ 내지 90g/ℓ, 90g/ℓ 내지 100g/ℓ 중 어느 것이다.

[0159] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피에 따라 수득된 용리액은 음이온 교환 크로마토그래피 물질 [예컨대, Q Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우 (QSFF)]로 로딩된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 후 수득된 용리액은, 음이온 크로마토그래피 물질 [예컨대, Q Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우 (QSFF)]의, 약 30g/ℓ, 40g/ℓ, 50g/ℓ, 60g/ℓ, 70g/ℓ, 80g/ℓ, 90g/ℓ, 100g/ℓ, 110g/ℓ, 120g/ℓ, 130g/ℓ, 140g/ℓ, 또는 150g/ℓ 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 음이온 교환 크로마토그래피 물질에 로딩된다. 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 후 수득된 용리액은 음이온 교환 크로마토그래피 물질 [예를 들어, Q Sepharose<sup>®</sup> 패스트 플로우 (QSFF)]의 임의의 약 10g/ℓ 내지 20g/ℓ, 20g/ℓ 내지 30g/ℓ, 30g/ℓ 내지 40g/ℓ, 40g/ℓ 내지 50g/ℓ, 50g/ℓ 내지 60g/ℓ, 60g/ℓ 내지 70g/ℓ, 70g/ℓ 내지 80g/ℓ, 80g/ℓ 내지 90g/ℓ, 90g/ℓ 내지 100g/ℓ의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 음이온 교환 크로마토그래피 물질에 로딩된다.

[0160] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 후 (선택적으로 포획 크로마토그래피 및 본원에 기술된 크로마토그래피 구동 중 어느 것을 포함하는 하나 이상의 추가적 크로마토그래피 단계 후) 수득된 용리액은, IL1RAPL1 물질 (예컨대, Capto<sup>™</sup> Adhere 크로마토그래피 물질 또는 Capto<sup>™</sup> MMC 크로마토그래피 물질)의, 약 30g/ℓ, 40g/ℓ, 50g/ℓ, 60g/ℓ, 70g/ℓ, 80g/ℓ, 90g/ℓ, 100g/ℓ, 110g/ℓ, 120g/ℓ, 130g/ℓ, 140g/ℓ, 또는 150g/ℓ 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩된다. 일부 구현예에서, 포획 크로마토그래피 후 수득된 용리액은 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질 (예컨대, Capto<sup>™</sup> Adhere 크로마토그래피 물질 또는 Capto<sup>™</sup> MMC 크로마토그래피 물질)의 약 10g/ℓ 내지 20g/ℓ, 20g/ℓ 내지 30g/ℓ, 30g/ℓ 내지 40g/ℓ, 40g/ℓ 내지 50g/ℓ, 50g/ℓ 내지 60g/ℓ, 60g/ℓ 내지 70g/ℓ, 70g/ℓ 내지 80g/ℓ, 80g/ℓ 내지 90g/ℓ, 90g/ℓ 내지 100g/ℓ 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩된다.

[0161] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 후 수득된 용리액은, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질 (예컨대, Capto<sup>™</sup> Adhere 크로마토그래피 물질 또는 Capto<sup>™</sup> MMC 크로마토그래피 물질)의, 약 30g/ℓ, 40g/ℓ, 50g/ℓ, 60g/ℓ, 70g/ℓ, 80g/ℓ, 90g/ℓ, 100g/ℓ, 110g/ℓ, 120g/ℓ, 130g/ℓ, 140g/ℓ, 또는 150g/ℓ 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩된다. 일부 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 후 수득된 용리액은 혼합 방식 크로마토그래피 물질 (예컨대, Capto<sup>™</sup> Adhere 크로마토그래피 물질 또는 Capto<sup>™</sup> MMC 크로마토그래피 물질)의 약 10g/ℓ 내지 20g/ℓ, 20g/ℓ 내지 30g/ℓ, 30g/ℓ 내지 40g/ℓ, 40g/ℓ 내지 50g/ℓ, 50g/ℓ 내지 60g/ℓ, 60g/ℓ 내지 70g/ℓ, 70g/ℓ 내지 80g/ℓ, 80g/ℓ 내지 90g/ℓ, 90g/ℓ 내지 100g/ℓ 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩된다.

[0162] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 후 수득된 용리액은, 후속 크로마토그래피 물질의 약 30g/ℓ, 40g/ℓ, 50g/ℓ, 60g/ℓ, 70g/ℓ, 80g/ℓ, 90g/ℓ, 100g/ℓ, 110g/ℓ, 120g/ℓ, 130g/ℓ, 140g/ℓ, 또는 150g/ℓ 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도에서, 후속 크로마토그래피 물질 (예컨대 소수성 상호작용 (HIC) 크로마토그래피 물질, 음이온 교환 크로마토그래피 물질, 양이온 교환 크로마토그래피 물질, 크기 배제 크로마토그래피 물질, 친화성 크로마토그래피 물질, 또는 추가 혼합 방식 크로마토그래피 물질) 상에서 로딩된다. 일부 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 후 수득된 용리액은, 후속 크로마토그래피 물질의 약 10g/ℓ 내지 20g/ℓ, 20g/ℓ 내지 30g/ℓ, 30g/ℓ 내지 40g/ℓ, 40g/ℓ 내지 50g/ℓ, 50g/ℓ 내지 60g/ℓ, 60g/ℓ 내지 70g/ℓ, 70g/ℓ 및 내지 80g/ℓ, 80g/ℓ 내지 90g/ℓ, 90g/ℓ 내지 100g/ℓ 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로, 후속 크로마토그래피 물질 (예컨대 소수성 상호작용 (HIC) 크로마토그래피 물질, 음이온 교환 크로마토그래피 물질, 양이온 교환 크로마토그래피 물질, 크기 배제 크로마토그래피 물질, 친화성 크로마토그래피 물질, 또는 추가 혼합 방식 크로마토그래피 물질)에 로딩된다.

[0163] 본 명세서에서 사용된 용리는 크로마토그래피 물질로부터의 생성물, 예를 들면 다중특이적 항체 또는 항체 아암의 제거이다. 용리 완충제는 크로마토그래피 물질로부터 관심 다중특이적 항체 또는 다른 생성물을 용리하기 위해 사용된 완충제이다. 많은 사례에서, 용리 완충제는 로딩 완충제와는 상이한 물리적 특징을 갖는다. 예를 들면, 용리 완충제는 로딩 완충제와는 상이한 전도도, 또는 로딩 완충제와는 상이한 pH를 가질 수 있다. 일부 구

현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제보다 낮은 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제보다 높은 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제보다 낮은 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제보다 높은 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제와는 상이한 전도도 및 상이한 pH를 갖는다. 용리 완충제는 더 높거나 더 낮은 전도도, 및 더 높거나 더 낮은 pH의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0164] 특정 구현예에서, 크로마토그래피 물질로부터의 다중특이적 항체의 용리는 최소 용리 용적 또는 풀 용적에서 최소의 불순물을 갖는 생성물의 수율을 위해 최적화된다. 예를 들어, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 항체 아암을 함유하는 조성물은 로딩 완충제 중 크로마토그래피 물질, 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼에 로딩될 수 있다. 로딩의 완료시, 다중특이적 항체 또는 항체 아암은 수많은 상이한 pH 값을 갖는 완충제로 용리되는 반면, 용리 완충제의 전도도는 일정하다. 대안적으로, 다중특이적 항체 또는 항체 아암은 수많은 상이한 전도도를 갖는 용리 완충제에 크로마토그래피 물질로부터 용리될 수 있는 반면, 본 용리 완충제의 pH는 일정하다. 크로마토그래피 물질으로부터의 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 항체) 또는 항체 아암의 용리가 완료되면, 풀 분획 내 불순물의 양은 소정의 pH 또는 전도도에 대해, 불순물로부터의 다중특이적 항체 또는 항체 아암의 분리에 관한 정보를 제공한다. 높은 수의 칼럼 용적(예컨대 8개 칼럼 용적)에서 다중특이적 항체 또는 항체 아암의 용리는, 용리 등고선의 "꼬리물기(tailing)"를 나타낸다. 일부 구현예에서, 용리의 꼬리물기는 최소화된다.

[0165] 예를 들어, 목적하는 완충제의 pH, 목적하는 완충제의 전도도, 관심 있는 단백질의 특징, 크로마토그래피 물질, 및 정제 방법(예를 들어, "결합 및 용리(bind and elute)" 또는 "통과 유동(flow through)" 방식)에 따라 다양한 완충제가 사용될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 완충제의 사용을 포함한다. 완충제는 로딩 완충제, 평형 완충제, 용리 완충제 또는 세정 완충제일 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 로딩 완충제, 평형 완충제, 용리 완충제 및/또는 세정 완충제(예를 들어, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가의 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가의 혼합 방식 크로마토그래피 등에 사용된 로딩 완충제, 평형 완충제 및/또는 세정 완충제)는 동일하다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제(예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제)는 상이하다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 완충제는 염을 포함한다. 로딩 완충제(예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제)는 염화나트륨, 아세트산나트륨, Tris, 아르기닌, 포스페이트, MOPS, MES, CHES, BisTris, 암모늄 설페이트, 황산나트륨, 시트레이트, 석시네이트, 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 완충제는 염화나트륨 완충제이다. 일부 구현예에서, 완충제는 아세트산나트륨 완충제이다. 특정 구현예에서, 완충제는 Tris, 아르기닌, 포스페이트, MES, CHES, 또는 MOPS 완충제이다. 일부 구현예에서, 완충제는 Tris를 포함한다. 일부 구현예에서, 완충제는 아르기닌을 포함한다.

[0166] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 로딩 완충제(예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제)는 약 1.0 mS/cm, 1.5 mS/cm, 2.0 mS/cm, 2.5 mS/cm, 3.0 mS/cm, 3.5 mS/cm, 4.0 mS/cm, 4.5 mS/cm, 5.0 mS/cm, 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 7.0 mS/cm, 7.5 mS/cm, 8.0 mS/cm, 8.5 mS/cm, 9.0 mS/cm, 9.5 mS/cm, 10 mS/cm 또는 20 mS/cm 초과 중 어느 것의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 전도도는 하기 중 어느 것일 수 있다: 약 1 mS/cm 내지 20 mS/cm, 4 mS/cm 내지 10 mS/cm, 4 mS/cm 내지 7 mS/cm, 5 mS/cm 내지 17 mS/cm, 5 mS/cm 내지 10 mS/cm, 또는 5 mS/cm 내지 7 mS/cm. 일부 구현예에서, 전도도는 하기 중 어느 것이다: 약 1.0 mS/cm, 1.5 mS/cm, 2.0 mS/cm, 2.5 mS/cm, 3.0 mS/cm, 3.5 mS/cm, 4 mS/cm, 4.5 mS/cm, 5.0 mS/cm, 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 7.0 mS/cm, 7.5 mS/cm, 8.0 mS/cm, 8.5 mS/cm, 9.0 mS/cm, 9.5 mS/cm, 10 mS/cm, 또는 20 mS/cm. 일 양태에서, 전도도는 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제의 전도도이다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및 세정 완충제(예를 들어, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및

/또는 임의의 추가의 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가의 혼합 방식 크로마토그래피 등에 사용된 로딩 완충제, 평형 완충제 및/또는 세정 완충제) 중 하나 이상의 전도도는 동일하다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제의 전도도는 세정 완충제 및/또는 평형 완충제의 전도도와 상이하다.

[0167] 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)는 로딩 완충제의 전도도 미만의 전도도를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예를 들어, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가의 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가의 혼합 방식 크로마토그래피 등을 위한 용리 완충제)는 약 0 mS/cm, 0.5 mS/cm, 1.0 mS/cm, 1.5 mS/cm, 2.0 mS/cm, 2.5 mS/cm, 3.0 mS/cm, 3.5 mS/cm, 4.0 mS/cm, 4.5 mS/cm, 5.0 mS/cm, 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 또는 7.0 mS/cm 중 어느 것 미만의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 전도도는 하기 중 어느 것일 수 있다: 약 0 mS/cm 내지 7 mS/cm, 1 mS/cm 내지 7 mS/cm, 2 mS/cm 내지 7 mS/cm, 3 mS/cm 내지 7 mS/cm, 또는 4 mS/cm 내지 7 mS/cm, 0 mS/cm 내지 5.0 mS/cm, 1 mS/cm 내지 5 mS/cm, 2 mS/cm 내지 5 mS/cm, 3 mS/cm 내지 5 mS/cm, 또는 4 mS/cm 내지 5 mS/cm. 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예를 들어, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가의 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가의 혼합 방식 크로마토그래피 등을 위한 용리 완충제)의 전도도는 약 0 mS/cm, 0.5 mS/cm, 1.0 mS/cm, 1.5 mS/cm, 2.0 mS/cm, 2.5 mS/cm, 3.0 mS/cm, 3.5 mS/cm, 4 mS/cm, 4.5 mS/cm, 5.0 mS/cm, 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 또는 7.0 mS/cm 중 어느 것이다.

[0168] 일부 구현예에서, 용리 완충제는 로딩 완충제의 전도도 초과 전도도를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)는 약 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 7.0 mS/cm, 7.5 mS/cm, 8.0 mS/cm, 8.5 mS/cm, 9.0 mS/cm, 9.5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17.0 mS/cm, 18.0 mS/cm, 19.0 mS/cm, 20.0 mS/cm, 21.0 mS/cm, 22.0 mS/cm, 23.0 mS/cm, 24.0 mS/cm, 25.0 mS/cm, 26.0 mS/cm, 27.0 mS/cm, 28.0 mS/cm, 29.0 mS/cm, 또는 30.0 mS/cm 초과 중 어느 것의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 전도도는 하기 중 어느 것일 수 있다: 약 5.5 mS/cm 내지 30 mS/cm, 6.0 mS/cm 내지 30 mS/cm, 7 mS/cm 내지 30 mS/cm, 8 mS/cm 내지 30 mS/cm, 9 mS/cm 내지 30 mS/cm, 또는 10 mS/cm 내지 30 mS/cm. 일부 구현예에서, 용리 완충제의 전도도는 임의의 약 5.5 mS/cm, 6.0 mS/cm, 6.5 mS/cm, 7.0 mS/cm, 7.5 mS/cm, 8.0 mS/cm, 8.5 mS/cm, 9.0 mS/cm, 9.5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17.0 mS/cm, 18.0 mS/cm, 19.0 mS/cm, 20.0 mS/cm, 21.0 mS/cm, 22.0 mS/cm, 23.0 mS/cm, 24.0 mS/cm, 25.0 mS/cm, 26.0 mS/cm, 27.0 mS/cm, 28.0 mS/cm, 29.0 mS/cm, 또는 30.0 mS/cm이다. 상기 구현예 중 어느 것의 일부 양태에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)의 전도도는 로딩 및/또는 세정 완충제로부터 단계적 구매에 의하여, 또는 선형 구매에 의하여 변화된다.

[0169] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 용액은 약 6.5 mS/cm 미만(<)의 전도도를 갖는 로딩 완충제 중 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩되며, 그리고 폴리펩타이드는 약 1.5 mS/cm의 전도도를 갖는 용리 완충제 중 제1 혼합 크로마토그래피 물질로부터 용리된다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 6.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 3 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 5.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 2 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 5.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 1 mS/cm의 전도도를 갖는다. 상기 구현예의 추가 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질은 Capto™ Adhere 수지이다. 상기 구현예의 추가 구현예에서, 제1 혼합 방식 크로마토그래피 물질은 Capto™ MMC 수지이다.

[0170] 임의의 상기 구현예의 일부 양태에서, 용리 완충제의 전도도는 단계적 구매 또는 선형 구매에 의해 로딩 및/또

는 세정 완충제로부터 변화된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 6.5 mS/cm 미만(<)에서 제1 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™Adhere 크로마토그래피 또는 Capto™MMC 크로마토그래피) 상에서 로딩되고, 그리고 다중특이적 항체는 약 1.5 mS/cm까지의 단계적 전도 구배에 의하여 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다.

[0171] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 용액은 약 6.5 mS/cm 미만(<)의 전도도를 갖는 로딩 완충제 중 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질에 로딩되며, 그리고 폴리펩타이드는 약 1.5 mS/cm의 전도도를 갖는 용리 완충제 중 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질로부터 용리된다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 6.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 3 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 5.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 2 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제는 약 5.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 용리 완충제는 약 1 mS/cm의 전도도를 갖는다. 상기 구현예의 추가 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질은 Capto™Adhere 수지이다. 상기 구현예의 추가 구현예에서, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 물질은 Capto™ MMC 수지이다.

[0172] 임의의 상기 구현예의 일부 양태에서, 용리 완충제의 전도도는 단계적 구배 또는 선형 구배에 의해 로딩 및/또는 세정 완충제로부터 변화된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 6.5 mS/cm 미만(<)로 제2 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™Adhere 크로마토그래피 또는 Capto™MMC 크로마토그래피)에 로딩되고, 그리고 다중특이적 항체는 약 1.5 mS/cm까지의 단계적 전도 구배에 의하여 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리된다.

[0173] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 2.5 mS/cm 미만(<)로 음이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, QSPF 크로마토그래피)에 로딩되고, 그리고 다중특이적 항체는 약 8.6 mS/cm까지의 단계적 전도 구배에 의하여 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리된다.

[0174] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 약 5.0 mS/cm로 양이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, POROS 50HS 크로마토그래피)에 로딩되고, 그리고 다중특이적 항체는 약 27.5 mS/cm까지의 단계적 전도 구배에 의하여 양이온 교환 크로마토그래피로부터 용리된다.

[0175] 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 로딩 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제)는 약 10, 9, 8, 7, 6, 또는 5 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것 미만의 pH를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 로딩 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제)는 약 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 초과 중 어느 것의 pH를 갖는다. 로딩 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제)는 약 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것의 pH를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제, 평형 완충제, 또는 세정 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제)의 pH일 수 있다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제, 평형 완충제, 및/또는 세정 완충제 중 하나 이상의 pH는 동일한 것이다. 일부 구현예에서, 로딩 완충제의 pH는 평형 완충제 및/또는 세정 완충제의 pH와 상이하다.

[0176] 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크



로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)는 로딩 완충제의 pH 미만의 pH를 갖는다. 본원에 기술된 상기 방법들의 일부 구현예에서, 용리 완충제는 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것 미만의 pH를 갖는다. 용리 완충제의 pH는 약 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 9, 6 내지 8, 6 내지 7 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)의 pH는 약 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 또는 9.0 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것이다.

[0177] 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)는 로딩 완충제의 pH 초과인 pH를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 용리 완충제 (예컨대 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)는 약 5, 6, 7, 8, 또는 9 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 초과 중 어느 것의 pH를 갖는다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 용리 완충제(예를 들어, 포획 크로마토그래피용 용리 완충제)은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 2, 4, 또는 4 중 어느 하나보다 큰 pH를 갖는다. 용리 완충제 (예를 들어, 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가의 크로마토그래피, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피 등을 위한 용리 완충제)의 pH는 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 2 내지 9, 3 내지 9, 4 내지 9, 2 내지 8, 3 내지 8, 4 내지 8, 2 내지 7, 3 내지 7, 4 내지 7, 2 내지 6, 3 내지 6 및 4 내지 6 중 어느 하나일 수 있다. 일부 구현예에서, 용리 완충제의 pH는 약 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 중 어느 것이다.

[0178] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 또는 항체 아암을 포함하는 용액을 약 pH 7에서 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피)에 로딩하고, 다중특이적 항체 또는 항체 아암을 약 2.9의 pH에서 단계적 구배로 친화성 크로마토그래피로부터 용리시킨다.

[0179] 상기 구현예 중 어느 것의 일부 양태에서, 용리 완충제 (예컨대 포획 크로마토그래피, 제1 혼합 방식 크로마토그래피, 제2 혼합 방식 크로마토그래피, 및/또는 임의의 추가 크로마토그래피, 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, HIC 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 추가 혼합 방식 크로마토그래피, 등을 위하여 사용되는 용리 완충제)의 pH는 로딩 및/또는 세정 완충제로부터 단계적 구배에 의하여, 또는 선형 구배에 의하여 변화된다.

[0180] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 유속은 약 50 CV/hr, 40 CV/hr, 또는 30 CV/hr 중 어느 것 미만이다. 유속은 약 5 CV/hr 내지 50 CV/hr, 10 CV/hr 내지 40 CV/hr, 또는 18 CV/hr 내지 36 CV/hr 중 어느 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 유속은 약 9CV/hr, 18CV/hr, 25CV/hr, 30CV/hr, 36CV/hr, 또는 40CV/hr 중 어느 것이다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 유속은 약 100cm/hr, 75cm/hr, 또는 50cm/hr 미만 중 어느 것이다. 유속은 하기 중 어느 것일 수 있다: 약 25cm/hr 내지 150cm/hr, 25cm/hr 내지 100cm/hr, 50cm/hr 내지 100cm/hr, 또는 65cm/hr 내지 85cm/hr.

[0181] 베드(bed) 높이는 사용된 크로마토그래피 물질의 높이이다. 본원에 기술된 방법 중 어느 일부 구현예에서, 베드 높이는 하기 중 어느 것의 초과이다: 약 5cm, 10cm, 15cm, 20cm, 25cm, 30cm, 35cm, 40cm, 45cm, 또는 50cm. 일부 구현예에서, 베드 높이는 하기일 수 있다: 약 5cm 내지 50cm. 일부 구현예에서, 베드 높이는 로딩 중 폴리펩타이드 또는 불순물의 양을 기준으로 측정된다.

[0182] 일부 구현예에서, 크로마토그래피는 약 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml, 9ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 40ml, 50ml, 75ml, 100ml, 200ml, 300ml, 400ml, 500ml, 600ml, 700ml, 800ml, 900ml, 1 l, 2 l, 3 l, 4 l, 5 l, 6 l, 7 l, 8 l, 9 l, 10 l, 25 l, 50 l, 100 l, 200 l, 300 l, 400 l, 500 l, 600 l, 700 l,

800 ℓ, 900 ℓ 또는 1000 ℓ 초과 용적을 갖는 칼럼 또는 용기에 존재한다.

- [0183] 일부 구현예에서, 분획은 크로마토그래피로부터 수집된다. 일부 구현예에서, 수집된 분획은 하기 초과인 것이다: 약 0.01 CV, 0.02 CV, 0.03 CV, 0.04 CV, 0.05 CV, 0.06 CV, 0.07 CV, 0.08 CV, 0.09 CV, 0.1 CV, 0.2 CV, 0.3 CV, 0.4 CV, 0.5 CV, 0.6 CV, 0.7 CV, 0.8 CV, 0.9 CV, 1.0 CV, 2.0 CV, 3.0 CV, 4.0 CV, 5.0 CV, 6.0 CV, 7.0 CV, 8.0 CV, 9.0 CV, 또는 10.0 CV.
- [0184] 특정 구현예에서, 정제 또는 부분 정제된 생성물, 예컨대, 다중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 항체 또는 2가 F(ab')<sub>2</sub>) 또는 항체 아암 또는 Fab를 함유하는 분획이 폴딩된다. 분획 내 폴리펩타이드의 양은 당해 분야의 숙련가에 의해 측정될 수 있으며; 예를 들면, 분획 내 폴리펩타이드의 양은 UV 분광법에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 분획은 OD<sub>280</sub>이 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 및 1.0 초과 중 어느 것일 경우 수집된다. 특정 구현예에서, OD<sub>280</sub>이 약 0.5 내지 1.0, 0.6 내지 1.0, 0.7 내지 1.0, 0.8 내지 1.0, 또는 0.9 내지 1.0 중 어느 것일 경우, 분획이 수집된다. 특정 구현예에서, 검출가능한 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 항체 아암을 함유하는 아암이 폴딩된다.
- [0185] 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 불순물은 생성물-특이적 불순물이다. 생성물 특이적 불순물의 예는, 비제한적으로, 비-쌍형성 절반-항체, 비-쌍형성 항체 경쇄, 비-쌍형성 중쇄, 항체 단편, 동종이량체 (예를 들어, 동일한 중쇄 및 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체의 쌍형성 절반-이량체), 응집물, 고분자량 중 (MHWS) (예를 들어, 초고분자량 중 (vHMWS)), 쌍형성 오류 디설파이드를 갖는 다중특이적 항체, 경쇄 이량체, 중쇄 이량체, 저분자량 중 (LMWS), 및 전하 변이체 (예를 들어, 항체의 산성 변이체 및 염기성 변이체)를 포함한다.
- [0186] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 비-쌍형성 절반-항체를 포함하는 조성물로부터 비-쌍형성 절반-항체의 수준을 감소시키거나 제거한다. 조성물 중 비-쌍형성 절반-항체의 존재 또는 수준을 측정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고; 예를 들어, 질량 분광분석법 (예를 들어, 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법), CE-SDS, 역상 IL1RAPL1, HIC IL1RAPL1이다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 비-쌍형성 절반-항체의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 비-쌍형성된 절반-항체의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 비-쌍형성 절반-항체의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 비-쌍형성된 절반-항체의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 비-쌍형성된 절반-항체의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 비-쌍형성된 절반-항체의 양을 비교함으로써 측정된다.
- [0187] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 동종이량체를 포함하는 조성물로부터 동종이량체의 수준을 감소시키거나 제거한다. 조성물 중 동종이량체의 존재 또는 수준을 측정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고; 예를 들어, 질량 분광분석법 (예를 들어, 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법, 역상 IL1RAPL1, 및 HIC IL1RAPL1이다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 동종이량체의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 동종이량체의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 동종이량체의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 동종이량체의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 동종이량체의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 동종이량체의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0188] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 HMWS 단백질을 포함하는 조성물 유래의 고분자량 중 (HMWS) 단백질의 수준을 제거하거나 감소시킨다. HMWS 단백질은 예컨대, 응집 폴리펩타이드 (예컨대 응집 다중특이적 항체, 응집 절반 항체, 응집 동종이량체, 등)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 응집 폴리펩타이드는 다중특이적 항체의 중쇄 다량체, 경쇄 다량체, 및/또는 다량체를 포함한다. HMWS 단백질은 중쇄 또는 경쇄의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 이상의 단량체, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 또는 그 이상의 응집된 다중특이적 항체를 포함할 수 있다. 응집된 단백질 (예를 들어, HMWS 단백질)을 측정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, WO 2011/150110에 기재되어 있다. 그와 같은 방법은, 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피, 모세관 전기영동-나트륨 도데실 설페이트 (CE-SDS) 및 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법 (LC-MS)을 포함한다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 HMWS 단백질의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 HMWS 단백질의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 HMWS 단백질의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, HMWS 단백질의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 HMWS 단백질의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 HMWS 단백질의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0189] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 LMWS 단백질을 포함하는 조성물로부터 저분자량 중 (LMWS) 단백질의 수준을 제거하거나 감소시킨다. LMWS 단백질은 단편화된 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단편화된 폴리펩타이드는 다중특이적 항체의 단편, 항체 아암의 단편, 중쇄 단편 또는 경쇄 단편이다. LMWS 단백질의 예는, 비제한적으로, Fab (즉, 단편 항원 결합), Fc (단편, 결합가능함), 둘 모두의 영역 또는 조합, 또는 관심 다중특이적 항체, 중쇄, 또는 경쇄의 임의의 무작위 단편화된 일부, 또는 1/2 항체 (하나의 항체 경쇄/중쇄 쌍을 함유) 또는 3/4 항체 (항체 중쇄 및 단일 항체 경쇄의 이중이량체 또는 동종이량체를 함유; 본원에서 HHL로 지칭되기도 함)를 포함한다. 단편화된 단백질 (예를 들어, LMWS 단백질)을 측정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, WO 2011/150110에 기재되어 있다. 그와 같은 방법은, 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피, 모세관 전기영동-나트륨 도데실 설페이트 (CE-SDS) 및 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법 (LC-MS)을 포함한다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 LMWS 단백질의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 LMWS 단백질의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 LMWS 단백질의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, LMWS 단백질의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 LMWS 단백질의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 LMWS 단백질의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0190] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 산성 및/또는 염기성 변이체를 포함하는 조성물로부터 산성 및/또는 염기성 변이체의 수준을 제거하거나 감소시킨다. 항체 (예를 들어, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)의 산성 변이체는 항체의 pI이 원상태 무손상 항체의 pI 미만인 변이체이다. 항체 (예를 들어, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)의 염기성 변이체는 항체의 pI이 원상태 무손상 항체의 pI 초과인 변이체이다. 이러한 전하 변이체 (예를 들어, 산성 및 염기성 변이체)는 산화, 탈아미드화, 라이신 잔기의 C-말단 처리, N-말단 피로글루타메이트 형성 및 항체의 글리코실화반응과 같은 자연적 과정의 결과일 수 있다. 전하 변이체를 측정하는 방법, 예를 들어, 이미지형성 모세관 등전점 전기영동 (iCIEF)이 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 하전된 변이체의 양은 이들 값 사이의

임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 하전된 변이체의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 하전된 변이체의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하전된 변이체의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 하전된 변이체의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 하전된 변이체의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0191] 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 불순물은 공정-특이적 불순물이다. 예를 들어, 공정-특이적 불순물은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 침출된 단백질 A; 숙주 세포 물질; 핵산; 다른 폴리펩타이드; 내독소; 바이러스성 오염물질; 세포 배양 배지 성분, 카르복시펩티다아제 B, 겐타마이신 등. 특정 구현예에서, 공정 특이적 불순물은, 예를 들어, 원핵 세포, 박테리아 세포(예를 들어, *이. 콜라이* 세포), 곤충 세포, 진핵 세포, 진균 세포, 효모 세포, 조류 세포, 또는 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포 유래의 숙주 세포 단백질 (HCP)일 수 있다.

[0192] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 침출 단백질 A를 포함하는 조성물로부터 침출된 단백질 A의 수준을 제거하거나 감소시킨다. 침출된 단백질 A는 이것이 결합된 고체 상으로부터 탈착되거나 세정된 단백질 A이다. 예를 들어, 침출된 단백질 A는 단백질 A 크로마토그래피 칼럼으로부터 침출될 수 있다. 단백질 A의 양은, 예를 들어, WO 2011/150110에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 침출 단백질 A의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 침출 단백질 A의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 침출 단백질 A의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0193] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 HCP를 포함하는 조성물로부터 숙주 세포 단백질 (HCP)의 수준을 감소시키거나 제거한다. HCP는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)가 생산되는 숙주 세포로부터의 단백질이다. 특정 구현예에서, HCP 단백질은 원핵 세포 유래의 단백질이다. 특정 구현예에서, HCP는 *이. 콜라이* 세포 유래의 단백질 (즉, *이. 콜라이* 단백질 또는 ECP)이다. 원핵 HCP(예를 들어, ECP)의 예는, 비제한적으로, 원핵 사포론, 예를 들어, FkpA, DsbA 및 DsbC를 포함한다. 특정 구현예에서, HCP는, 본원에서 다른 곳에 기술된 것들과 같이, 진핵 숙주 세포 유래의 단백질이다. 특정 구현예에서, HCP는 포유동물 세포 유래의 단백질, 예컨대 CHO 세포 단백질 (즉, 차이니즈 햄스터 난소 단백질 또는 CHOP)이다. 특정 구현예에서, HCP(예를 들어, ECP, FkpA, DsbA, 또는 DsbC, 또는, 예를 들어, CHOP)의 양은 효소-결합 면역흡착 검정("ELISA")에 의해 측정된다. 예를 들어, 항체는 FkpA, DsbA 또는 DsbC의 초순수 조성물에 대해 생성될 수 있다. 특정 구현예에서, FkpA, DsbA 및/또는 DsbC의 양은 질량 분광분석법에 의해 측정된다. 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, HCP(예를 들어, ECP, FkpA, DsbA, 또는 DsbC, 또는, 예를 들어, CHOP)의 양. 본원에 기술된 방법 중 임의의 특정 구현예에서, 하나 이상 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 HCP (예컨대, ECP, FkpA, DsbA, 또는 DsbC, 또는, 예컨대, CHOP)의 양은 약 100ppm, 75ppm, 50ppm, 25ppm, 20ppm, 10ppm, 5,ppm, 2ppm, 또는 1ppm (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 HCP (예컨대, ECP, FkpA, DsbA, 또는 DsbC, 또는, 예컨대, CHOP)의 양은 약 100ppm, 75ppm, 50ppm, 25ppm, 20ppm, 10ppm, 5,ppm, 2ppm, 또는 1ppm (상기 값들 사이의 임의의 범위 포함) 미만까지 감소된다. 특정 구현예에서, HCP (예컨대, ECP, FkpA, DsbA, 또는 DsbC, 또는, 예컨대, CHOP)의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 HCP의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 HCP의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0194] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 핵산을 포함하는 조성물로부터 핵산 (예컨대 숙주 세포 DNA 및/또는 RNA)의 수준을 제거하거나 감소시킨다. 핵산(예를 들어, 숙주 세포 DNA 및/또는 RNA)을 측정하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, WO 2011/150110에 기재되어 있다. 그와 같은 방법은, 예를 들어, 숙주 세포 DNA 또는 RNA에 대한 PCR을 포함한다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 핵산의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 하



나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 핵산의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 핵산의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 핵산의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 핵산의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 핵산의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0195] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체) 및 세포 배양 배지 성분을 포함하는 조성물로부터 세포 배양 배지 성분의 수준을 제거하거나 감소시킨다. "세포 배양 배지 성분"은 세포 배양 배지에 존재하는 성분을 지칭한다. 특정 구현예에서, "세포 배양 배지"는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 또는 이의 아암을 발현하는 숙주 세포(들)가 수확될 때의 세포 배양 배지를 지칭한다. 특정 구현예에서, 세포 배양 배지 성분은 인슐린, 또는 테트라사이클린이다. 특정 구현예에서, 인슐린, 또는 테트라사이클린의 양은 ELISA에 의해 측정된다. 본원에 기재된 임의의 방법의 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 세포 배양 배지 성분의 양은 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과 중 어느 것만큼 감소된다.

[0196] 특정 구현예에서, 하나 이상의 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물 (예컨대 크로마토그래피 분획) 내 세포 배양 배지 성분의 양은 약 10 내지 95%; 10% 내지 99%; 20% 내지 95%; 20% 내지 99%; 30% 내지 95%; 30% 내지 99%; 40% 내지 95%; 40% 내지 99%; 50% 내지 95%; 50% 내지 99%; 60% 내지 95%; 60% 내지 99%; 70% 내지 95%; 70% 내지 99%; 80% 내지 95%; 80% 내지 99%; 90% 내지 95%; 또는 90% 내지 99% 중 어느 것 만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 세포 배양 배지 성분의 양은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 중의 어느 것 만큼 감소된다. 특정 구현예에서, 세포 배양 배지 성분의 존재 또는 수준의 감소는 정제 단계(들)로부터 회수된 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 분획) 중 세포 배양 배지 성분의 양과 정제 단계(들) 이전의 조성물 중 세포 배양 배지 성분의 양을 비교함으로써 측정된다.

[0197] 특정 구현예에서, 제1 아암 및 제2 아암을 포함하는 이중특이적 항체를 정제하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 제1 및 제2 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은 하기를 포함한다: 제1 및 제2 아암을 결합 및 용리 방식으로 구동된 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서의 다른 곳에서 기술된 포획 크로마토그래피 중 어느 것 또는 이의 조합)에 적용시켜 제1 및 제2 포획 용리액을 생산하는 단계; 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하기에 충분한 조건 하에서 상기 제1 및 제2 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하고, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 결합 및 용리 방식으로 음이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, Q Sepharose® 패스트 플로우 (QSFF) 크로마토그래피)에 적용하여 음이온 교환 용리액을 생산하는 단계로서, 상기 용리는 구배 용리인, 단계; 상기 음이온 교환 용리액을 결합 및 용리 방식으로 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™Adhere 크로마토그래피)에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계로서, 상기 용리는 구배 용리인, 단계; 및 제1 혼합 방식 용리액을 결합 및 용리 방식으로 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™MMC 크로마토그래피)에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생산하고, 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계로서, 상기 용리는 구배 용리이며, 상기 방법은 제1 및 제2 아암을 포함하는 혼합물에 비해 분획 내 불순물의 양을 감소시키는, 단계.

[0198] 특정 구현예에서, 제1 아암 및 제2 아암을 포함하는 이중특이적 항체를 정제하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 제1 및 제2 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은 하기를 포함한다: 상기 제1 및 제2 아암을 결합 및 용리 방식으로 구동된 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서의 다른 곳에서 기술된 포획 크로마토그래피 중 어느 것 또는 이의 조합)에 적용시켜 제1 및 제2 포획 용리액을 생산하는 단계; 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하기에 충분한 조건 하에서 제1 및 제2 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하고, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 결합 및 용리 방식으로 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™MMC 크로마토그래피)에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계로서, 상기 용리는 pH 및 염 단계적 용리인, 단계, 및 상기 제1 혼합 방식 용리액을 통과 유동 방식으로 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™Adhere 크로마토그래피)에 적용시켜 제2 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계, 및 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계로서, 상기 방법은 제1 및 제2 아암을 포함하는 혼합물에 비해 분획 내 불순물의 양을 감소시키는, 단계.

- [0199] 특정 구현예에서, 제1 아암 및 제2 아암을 포함하는 이중특이적 항체를 정제하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 제1 및 제2 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은 하기를 포함한다: 제1 및 제2 아암을 결합 및 용리 방식으로 구동된 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서 다른 곳에서 기술된 포획 크로마토그래피 중 어느 것 또는 이의 조합)에 적용시켜 제1 및 제2 포획 용리액을 생산하는 단계; 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하기 충분한 조건 하에서 제1 및 제2 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하고, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 결합 및 용리 방식으로 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™ Adhere 크로마토그래피)로 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계로서, 상기 용리는 단계적 용리인, 단계; 및 상기 제1 혼합 방식 용리액을 결합 및 용리 방식으로 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™ MMC 크로마토그래피)에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생산하고, 상기 제2 혼합 방식 용리액을 통과 유동 방식으로 소수성 상호작용 크로마토그래피 (예컨대, 헥실-650C 크로마토그래피)에 적용하여 소수성 상호작용 용리액을 생산하는 단계로서, 상기 용리는 단계적 용리인, 단계; 및 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계로서, 상기 방법은 제1 및 제2 아암을 포함하는 혼합물에 비해 분획 내 불순물의 양을 감소시키는, 단계.
- [0200] 특정 구현예에서, 제1 아암 및 제2 아암을 포함하는 이중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 F(ab')<sub>2</sub>)를 정제하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 제1 및 제2 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은, 제1 아암을 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서 다른 곳에 기술된 포획 크로마토그래피 단계 중 어느 것 또는 이의 조합)에 결합 및 용리 방식으로 적용시켜 제1 포획 용리액을 생산하는 단계; 상기 제1 포획 용리액을 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™ MMC 크로마토그래피)에 결합 및 용리 방식으로 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 제2 아암을 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서 다른 곳에 기술된 포획 크로마토그래피 단계 중 어느 것 또는 이의 조합)에 결합 및 용리 방식으로 적용시켜 제2 포획 용리액을 생산하는 단계; 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하기에 충분한 조건 하에서 제1 혼합 방식 용리액 및 제2 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하고, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, 예컨대 Capto™ Adhere 크로마토그래피)에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 및 상기 제2 혼합 방식 용리액을 양이온 교환 크로마토그래피 (예컨대, 예컨대 POROS® 50 HS 크로마토그래피)에 결합 및 용리 방식으로 적용하여 양이온 교환 용리액을 생산하는 단계; 양이온 교환 용리액을 후속 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피에 결합 및 용리 방식으로 적용하여 제3 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 및 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 방법은 제1 및 제2 아암을 포함하는 혼합물에 비해 분획 내 불순물의 양을 감소시킨다.
- [0201] 특정 구현예에서, 제1 아암 및 제2 아암을 포함하는 이중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 F(ab')<sub>2</sub>)를 정제하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 제1 및 제2 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은, 제1 아암을 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서 다른 곳에 기술된 포획 크로마토그래피 단계 중 어느 것 또는 이의 조합)에 결합 및 용리 방식으로 적용시켜 제1 포획 용리액을 생산하는 단계; 상기 제1 포획 용리액을 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™ MMC 크로마토그래피)에 결합 및 용리 방식으로 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 제2 아암을 포획 크로마토그래피 (예컨대 본원에서 다른 곳에 기술된 포획 크로마토그래피 단계 중 어느 것 또는 이의 조합)에 결합 및 용리 방식으로 적용시켜 제2 포획 용리액을 생산하는 단계; 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하기에 충분한 조건 하에서 제1 혼합 방식 용리액 및 제2 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하고, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, 예컨대 Capto™ Adhere 크로마토그래피)에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 및 상기 제2 혼합 방식 용리액을 후속 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피 (예컨대, Capto™ MMC 크로마토그래피)에 결합 및 용리 방식으로 적용하여 제3 혼합 방식 용리액을 생산하는 단계; 및 이중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 방법은 제1 및 제2 아암을 포함하는 혼합물에 비해 분획 내 불순물의 양을 감소시킨다.
- [0202] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)는 바이러스성 여과에 의해 추가로 정제된다. 바이러스성 여과는 폴리펩타이드 정제 공급스트림에서 바이러스성 오염물질의 제거이다. 바이러스성 여과의 예는, 예를 들어, 한외여과 및 미세여과를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 파보바이러스 필터를 사용하여 정제된다.
- [0203] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 크로마토그래피 이후에 (예컨대, 제2 혼합 방식 크로마토그래피 이후에, 또는 제2 혼합 방식 크로마토그래피 이후에 수행된 하나 이상의 크로마토그래피 단계 이후에) 강화된다. 강화 방법의 예는 당해 기술 분야에 공지되어 있고, 비제한적으로, 예를 들어, 한외여과 및 정용여과 (UFD)를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 제1 한외여과, 정용여과 및 제2 한외여과에 의해 강화된다. 일부 구

현예에서, 한외여과 및/또는 정용여과는 약 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 또는 25 kDa 또는 30 kDa 중 어느 하나 미만의 컷 오프를 갖는 필터를 사용한다. 일부 구현예에서, 제1 한외여과의 보유물은 약제학적 제형으로 정용여과된다.

[0204] 일부 구현예에서, 강화 후 다중특이적 항체의 농도는 약 10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml, 110mg/ml, 120mg/ml, 130mg/ml, 140mg/ml, 150mg/ml, 160mg/ml, 170mg/ml, 180mg/ml, 190mg/ml, 200mg/ml, 또는 300mg/ml 중 어느 것이다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체의 농도는 약 10mg/ml 내지 20mg/ml, 20mg/ml 내지 30mg/ml, 30mg/ml 내지 40mg/ml, 40mg/ml 내지 50mg/ml, 50mg/ml 내지 60mg/ml, 60mg/ml 내지 70mg/ml, 70mg/ml 내지 80mg/ml, 80mg/ml 내지 90mg/ml, 90mg/ml 내지 100mg/ml, 100mg/ml 내지 110mg/ml, 110mg/ml 내지 120mg/ml, 120mg/ml 내지 130mg/ml, 130mg/ml 내지 140mg/ml, 140mg/ml 내지 150mg/ml, 150mg/ml 내지 160mg/ml, 160mg/ml 내지 170mg/ml, 170mg/ml 내지 180mg/ml, 180mg/ml 내지 190mg/ml, 190mg/ml 내지 200mg/ml, 200mg/ml 또는 300mg/ml 중 어느 것이다.

[0205] 본원에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 정제 방법의 정제된 폴리펩타이드를 약제학적으로 허용되는 담체와 조합시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 항체는 한외여과/정용여과에 의해 약제학적 제형으로 제형화된다.

[0206] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 순도 초과 중 어느 것의 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 조성물 중 다중특이적 항체는 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 하나의 것 이상의 순도를 갖는다.

[0207] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 비-쌍형성 항체 아암을 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 동종이량체를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 또는 5% 중 어느 것 이하의 응집 단백질을 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 35% HMWS 중 어느 것 이하를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 LMWS를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 중 어느 것 이하의 산성 변이체를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 35% 염기성 변이체 중 어느 것 이하를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 또는 10ppm 중 어느 것 이하의 침출 단백질 A를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm, 25ppm, 30ppm, 또는 35ppm 중 어느 것 이하의 HCP를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 약 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 또는 10ppm 중 어느 하나의 것 미만의 핵산을 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 0ppm 이하의 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물 중 핵산은 검출 수준 이하이다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 또는 35% 세포 배양 배지 성분 중 어느 것 이하를 함유하는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산한다.

[0208] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법 중 임의의 하나의 것에 따른 정제된 다중특이적 항체를 포함하는 조성물

이 제공된다.

- [0209] 특정 구현예에서, 조성물 중 다중특이적 항체는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 중 어느 하나의 것 이상의 순도를 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물 중 다중특이적 항체는 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 어느 하나의 것 이상의 순도를 갖는다.
- [0210] 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 비-쌍형성 항체 아암을 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 동종이량체를 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 또는 5% 중 어느 것 이하의 응집 단백질질을 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 함유하는 조성물은 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 HMWS를 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 LMWS를 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 중 어느 것 이하의 산성 변이체를 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 함유하는 조성물은 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 염기성 변이체를 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 또는 10ppm 중 어느 것 이하의 침출 단백질 A를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm, 25ppm, 30ppm, 또는 35ppm 중 어느 것 이하의 HCP를 포함한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물은 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm, 25ppm, 30ppm, 또는 35ppm 중 어느 하나의 것 이하의 핵산을 함유한다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 함유하는 조성물은 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 세포 배양 배지 성분을 함유한다.
- [0211] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공되고, 여기서 상기 조성물은 하기를 함유한다: a) 적어도 약 95% - 100%의 다중특이적 항체; b) 약 1% - 5% 미만의 비-쌍형성 항체 아암; c) 약 1% - 5% 미만의 항체 동종이량체; d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS; e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및/또는 f) 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체.
- [0212] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법 중 임의의 하나의 것에 따른 정제된 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 크ноп-인-홀 (Knob-in-Hole, KiH) 항체, 예를 들어, KiH 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다.
- [0213] 특정 구현예에서, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 초과 순도 중 어느 것인 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 조성물 중 이중특이적 항체는 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과 순도 중 어느 하나의 순도를 갖는다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 크ноп-인-홀 (KiH) 항체, 예를 들어, KiH 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다.
- [0214] 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 비-쌍형성 항체 아암을 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 동종이량체를 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%,



2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 또는 5% 중 어느 것 이하의 응집 단백질을 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 HMWS를 함유하는 이중특이적 항체를 함유하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 중 어느 것 이하의 LMWS를 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 중 어느 것 이하의 산성 변이체를 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 염기성 변이체를 함유하는 이중특이적 항체를 함유하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 또는 10ppm 중 어느 것 이하의 침출 단백질 A를 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm, 0.6ppm, 0.7ppm, 0.8ppm, 0.9ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm, 25ppm, 30ppm, 또는 35ppm 중 어느 것 이하의 HCP를 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 약 2ppm, 2.5ppm, 3ppm, 3.5ppm, 4ppm, 4.5ppm, 5ppm, 5.5ppm, 6ppm, 6.5ppm, 7ppm, 7.5ppm, 8ppm, 8.5ppm, 9ppm, 9.5ppm, 또는 10ppm 중 어느 하나의 것 미만의 핵산을 함유하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체를 포함하는 조성물은 0ppm 이하의 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체를 포함하는 조성물 중 핵산은 검출 수준 이하이다. 특정 구현예에서, 약 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 30%, 또는 35% 중 어느 하나의 것 이하의 세포 배양 배지 성분을 함유하는 이중특이적 항체를 함유하는 조성물이 제공된다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 크롭-인-홀 (KiH) 항체, 예를 들어, KiH 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다.

[0215] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 제공되고, 여기서 상기조성물은 다음을 함유한다: a) 적어도 약 95% - 100%의 이중특이적 항체; b) 약 1%- 5% 미만의 비-쌍형성 항체 아암; c) 약 1%- 5% 미만의 항체 동종이량체; d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS; e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및/또는 f) 약 5% 미만의 3/4 항체. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 크롭-인-홀 (KiH) 항체, 예를 들어, KiH 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체이다.

[0216] 본원에 보고된 바와 같은 일 양태는, 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 정제하기 위한 방법이 제공되며, 여기서 상기 방법은 친화성 크로마토그래피 단계 이후 2개 상이한 다중방식 이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하고, 이로써 Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 정제하는 것을 포함한다.

[0217] 특정 구현예에서, 상기 방법은 i. 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계, 또는 ii. 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함한다.

[0218] 본원에 보고된 일 측면은 i. Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계, ii. 세포 또는 배양 배지로부터 상기 Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 회수하는 단계, iii. 상기 Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 본원에 보고된 방법으로 정제하여 Fc-영역 함유 이종이량체 단백질을 생산하는 단계를 포함하는, Fc-영역 함유 이종이량체 단백질/폴리펩타이드를 생산하는 방법이다. 항체 정제 공정의 성능은 사용된 크로마토그래피 단계의 순서에 의존한다는 것으로 밝혀졌다. 크로마토그래피 단계의 특정 서열/순서를 선택함으로써, 개선된 공정이 획득될 수 있다.

[0219] 본원에 제공된 방법은, 적어도 부분적으로 (초기) 친화성 크로마토그래피 단계 후에, 그리고 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계 전에 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 (직접) 수행함으로써, 한외여과/정용여과 단계가 생략될 수 있다는 발견에 기초한다. 이 단계는, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계가 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계 전에 수행되는 경우에 필요하다.

[0220] 특정 구현예에서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 친화성 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이어서 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함한다.

- [0221] 본원에 기재된 방법을 사용하여 양호한 순도 및 수율이 단지 3개의 크로마토그래피 단계만으로 달성될 수 있음이 밝혀졌다.
- [0222] 특정 구현예에서, 다단계 크로마토그래피 방법은 정확히 3개의 크로마토그래피 단계를 포함한다.
- [0223] 숙주 세포 단백질의 제거는 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 방법/단계가 통과 유동 방식으로 수행되는 경우 개선될 수 있음이 밝혀졌다. 특정 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 방법/단계는 통과 유동 방식으로 수행된다.
- [0224] 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계의 로딩물의 pH는 HCP, 부산물 및 DNA 제거에 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다. 모든 양태 중 하나의 바람직한 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 약 7.0의 pH에서 수행된다.

표 1

		수율	SEC	HCP	캘리포		DNA
			$\Sigma$ HMW		사전-피크	HHL	
크로마토그래피 pH	전도도 [mS/cm]	[%]	[%]	[ng/mg]	[%]	[%]	[pg/mg]
6.5	5.75	85	3.34	139	8.132	2.428	<0.3
7.0	5.76	69	1.51	55	6.186	1.830	<0.4
7.5	6.73	67	1.23	35	5.671	1.555	22.1

- [0225]
- [0226] 용액의 전도도는 정제 공정 동안 상이한 파라미터에 영향을 미칠 수 있다. 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계의 로딩 (즉, 크로마토그래피 물질에 적용될 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드를 포함하는 용액)에서 낮은 전도도 값은 개선된 HCP 및 DNA 제거를 야기한다는 것이 본원에서 발견되었다.

표 2

로딩물의 전도도 [mS/cm]	HCP [ng/mg]	DNA [pg/mg]
16.92	303	78.6
5.86	35	22.1
3.64	14	0

- [0227]
- [0228] 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 7 mS/cm 미만의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 6 mS/cm 미만의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 6 mS/cm 내지 약 2 mS/cm 범위의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 5 mS/cm 내지 약 4 mS/cm 범위의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용된다.
- [0229] 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도를 갖고, 그리고 pH가 약 7인 용액 내 적용된다.
- [0230] 본원에 제공된 방법은 적어도 부분적으로 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계의 단백질 로딩량은 또한 정제 공정의 성능에 영향을 미칠 수 있다는 발견에 기초한다. 로딩물이 정의된 범위 내에 존재하면, 전체적인

정제 공정, 예를 들어, DNA 오염의 제거가 개선된다.

표 3

DNA 의 개시량: 80 pg/mg

Capto adhere ImpRes 물질 당 폴리펩타이드의 로딩량	220 g/L	180 g/L	150 g/L	120 g/L
크로마토그래피 단계 후 DNA 함량	0.8 pg/mg	0 pg/mg	0 pg/mg	0 pg/mg

[0231]

[0232]

특정 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 크로마토그래피 물질의 1 리터 당 약 100g 내지 약 300g의 범위로 적용되며, 즉, 로딩량은 약 100g/ℓ 내지 약 300g/ℓ의 범위이다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 크로마토그래피 물질의 1 리터 당 약 120g 내지 약 240g 범위로 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 크로마토그래피 물질의 1 리터 당 약 160g 내지 약 200g 범위로 적용된다.

[0233]

특정 다중방식 수지 물질이 본원에 보고된 방법에 적용될 때 특히 유용하다는 것이 밝혀졌다.

[0234]

특정 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 다중방식 강 음이온 교환 크로마토그래피 물질이다. 특정 구현예에서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은, 고-유동 아가로스 매트릭스, 리간드로서 다중방식 강 음이온 교환제, 36 내지 44 μm의 평균 입자 크기 및 0.08 내지 0.11 mmol Cl<sup>-</sup>/ml 매질의 이온 용량을 갖는다. 특정 구현예에서, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 "Capto adhere ImpRes"이다.

[0235]

특정 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 다중방식 약 양이온 교환 크로마토그래피 매질이다. 특정 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 고-유동 아가로스 매트릭스, 리간드로서 다중방식 약 양이온 교환제, 36 내지 44 μm의 평균 입자 크기 및 25 내지 39 μmol/ml의 이온 용량을 갖는다. 특정 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 "Capto MMC ImpRes"이다.

[0236]

특정 구현예에서, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 방법/단계는 결합 및 용리 방식으로 수행된다.

[0237]

특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 단백질 A 크로마토그래피 단계, 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피, 또는 단일 사슬 Fv 리간드 친화성 크로마토그래피, 또는 KappaSelect 크로마토그래피 물질을 사용하는 크로마토그래피 단계, 또는 CaptureSelect 크로마토그래피 물질을 사용하는 크로마토그래피 단계, 또는 CaptureSelect FcXL 크로마토그래피 물질을 사용하는 크로마토그래피 단계이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 단백질 A 크로마토그래피 단계이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 CaptureSelect™ 크로마토그래피 단계이다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계는 단백질 A 크로마토그래피 단계이다.

[0238]

특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 항체, 이중특이적 항체 또는 Fc-융합 단백질이다. 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 CrossMab이다. 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 Fc-융합 단백질이다. 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하는 이중특이적 항체이며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1은 서로 대체된다.

[0239]

특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, Fc-영역 함유 이중이량체 단백질/폴리펩타이드는 ANG2 및 VEGF에 결합하는 CrossMab이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 바누시주맙이다.

[0240]

특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 1, 및 경쇄 가

변 도메인(VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 5 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 6을 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄 및 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄. 서열 번호 1-16의 아미노산 서열은 하기 표 4에 제공된다.

표 4

서열 번호: 1	EVQLVESGGG LVQPQGSRL SCAASGYTF NYGMHWVRA PGKGLEWVGW INTYTSEPT AADFKRRFT SLDTSKSTAY LQMSLRAED TAVYYCAKYP HYGSSHWYF DVWGQGLTV VSS
서열 번호: 2	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQKPK GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTRVEIK
서열 번호: 3	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTF GYMHMWVRA PGQGLEWVGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRLSD TAVYYCARSP NFIYYDSSGY YYPGAFDIWG QSTKVTVS
서열 번호: 4	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQKPK QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG TGKVTVL
서열 번호: 5	EVQLVESGGG LVQPQGSRL SCAASGYDT HYGMHWVRA PGKGLEWVGW INTYTSEPT AADFKRRFT SLDTSKSTAY LQMSLRAED TAVYYCAKYP YYYGSHWYF DVWGQGLTV VSS
서열 번호: 6	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQKPK GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTRVEIK
서열 번호: 7	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTF GYMHMWVRA PGQGLEWVGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRLSD TAVYYCARSP NFIYYDSSGY YYPGAFDIWG QSTKVTVS
서열 번호: 8	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQKPK QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG GGTKLTVLQ
서열 번호: 9	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTF GYMHMWVRA PGQGLEWVGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRLSD TAVYYCARSP NFIYYDSSGY YYPGAFDIWG QSTKVTVS TASVVCLLNN FYPREKAVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDTYSLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECCKTH TCPPCPAPEL LGSPSVLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FHWYDGVGV HNAKTKREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPFS RDELTKHQVS LSCAVKGFPY SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLSL PGK
서열 번호: 10	EVQLVESGGG LVQPQGSRL SCAASGYTF NYGMHWVRA PGKGLEWVGW INTYTSEPT AADFKRRFT SLDTSKSTAY LQMSLRAED TAVYYCAKYP HYGSSHWYF DVWGQGLTV VSSASTKPS VFPLAPSSKS TSGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQYICNVNH KPSNTKVDKK VEKSCDKTH TCPPCPAPEL LGSPSVLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FHWYDGVGV HNAKTKREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPFS RDELTKHQVS LSCAVKGFPY SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLSL PGK
서열 번호: 11	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQKPK QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG TGKVTVLSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTRVDKRVK KSC
서열 번호: 12	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQKPK GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTRVEIKRTV AAPSVFIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWQV DNALQSGNSQ ESVTQDSKD STYLSLSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQ LSSPVTKSFN RGEC
서열 번호: 13	EVQLVESGGG LVQPQGSRL SCAASGYDT HYGMHWVRA PGKGLEWVGW INTYTSEPT AADFKRRFT SLDTSKSTAY LQMSLRAED TAVYYCAKYP YYYGSHWYF DVWGQGLTV VSSASTKPS VFPLAPSSKS TSGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQYICNVNH KPSNTKVDKK VEKSCDKTH TCPPCPAPEL AGGSPVLF PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FHWYDGVGV HNAKTKREE
서열 번호: 14	QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPFS RDELTKHQVS LSCAVKGFPY SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN AYTKSLSLSL PGK
서열 번호: 15	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTF GYMHMWVRA PGQGLEWVGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSLRLSD TAVYYCARSP NFIYYDSSGY YYPGAFDIWG QSTKVTVS TASVVCLLNN FYPREKAVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDTYSLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECCKTH TCPPCPAPEL AGGSPVLF PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FHWYDGVGV HNAKTKREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPFS RDELTKHQVS LSCAVKGFPY SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN AYTKSLSLSL PGK
서열 번호: 16	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQKPK GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTRVEIKRTV AAPSVFIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWQV DNALQSGNSQ ESVTQDSKD STYLSLSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQ LSSPVTKSFN RGEC



- [0242] 특정 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 5% 이하의 ¼ 항체를 함유한다. 특정 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4% 이하의 ¼ 항체를 함유한다. 특정 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 3% 이하의 ¼ 항체를 함유한다. 특정 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 2% 이하의 ¼ 항체를 함유한다. 특정 구현예에서, 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 1% 이하의 ¼ 항체를 함유한다.
- [0243] 본원에 보고된 바와 같은 일 양태는 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하기 위한 방법이며, 여기서 상기 방법은 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계, 및 이로써 ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하는 것을 포함하며, ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 1, 및 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위, 또는 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 5, 및 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서 서열 번호 6를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인 (VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인 (VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위.
- [0244] 일 구현예에서, ANG2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체는 a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄를 포함하며, 여기서 불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체된다.
- [0245] 본원에서 보고된 일 양태는 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드의 정제를 위한 본원에 보고된 방법의 용도이다.
- [0246] 본원에서 보고된 일 측면은 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드 관련된 불순물을 감소시키기 위한 본원에 보고된 방법의 사용이다.
- [0247] 본원에 보고된 바와 같은 일 양태는 암 또는 안질환의 치료용 약제 제조를 위한, 본원에 보고된 방법으로 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드이다.
- [0248] 본원에 보고된 바와 같은 일 양태는 암 또는 안질환을 치료하는데 사용하기 위한, 본원에 보고된 방법으로 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드이다.
- [0249] **폴리펩타이드**
- [0250] **단클론성 항체**
- [0251] 일부 구현예에서, 항체는 단클론성 항체이다. 단클론성 항체는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 얻어지며, 즉 집단을 포함하는 개별적인 항체는 단클론성 항체의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체를 제외하고 동일한 에피토프와 동일하고/하거나 또는 이에 결합하며, 이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 따라서, 수식어 "단클론성"은 구별되거나 다클론성 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특징을 나타낸다.
- [0252] 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같이, 단클론성 항체는 먼저 문헌 [Kohler 외, *Nature* 256:495 (1975)]에 의해 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제작될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제작될 수 있다.
- [0253] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물이 본원에 기술된 바와 같이 면역화되어 면역화를 위해 사용된 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 골수종 세포와 융합된다(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).
- [0254] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 바람직하게는 비융합된, 친계 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하고 성장시킨다. 예를 들어, 만약 친계 세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실전달효소 (HGPRT 또는 HPRT)가 부재하다면, 혼성세포를 위한 배양 배지는 전형적으로 하기를 포함할 것이다: HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 물질인, 하이포잔틴, 아미노프테린, 및 티미딘 (HAT 배지).
- [0255] 일부 구현예에서, 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 무변성 고 수준의 항체

생산을 지지하는 것들이고, 이는 예컨대 HAT 배지와 같은 배지에 민감성이다. 무엇보다도, 일부 구현예에서, 골수종 세포주는, 비제한적으로, 쥐과 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 솔크 연구소 세포 분배 센터로부터 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양, 및 메릴랜드주 록빌 소재의 미국 종균 협회로부터 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유도된 것들을 포함한다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종성골수종 세포주가 또한, 인간 단클론성 항체의 생산에 대해 하기와 같이 기술되었다: Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur 외, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0256] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 항원에 대해 지향된 단클론성 항체의 생성에 대해 검정된다. 일부 구현예에서, 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 단클론성 항체의 결합 특이성은 하기에 의하여 측정된다: 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사면역검정 (RIA) 또는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA).

[0257] 단클론성 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 하기에 의하여 측정될 수 있다: 스캐처드(Scatchard) 분석 (Munson 외, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980)).

[0258] 원하는 특이성, 친화도, 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론은 희석 절차를 제한함에 의해 서브클로닝되고 그리고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 본 목적을 위한 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로 생체내에서 성장될 수 있다.

[0259] 서브클론에 의하여 분비된 단클론성 항체는 기존 면역글로불린 정제 절차, 예컨대 폴리펩타이드 A-세파로오스 (sepharose), 하이드록실아퍼타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피, 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수 유체 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

[0260] 단클론성 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 방법을 사용하여 용이하게 분리시키고 서열화한다 (예를 들어, 특히 쥐과 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 결합될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써). 일부 구현예에서, 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 사용된다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터 내에 배치될 수 있으며, 그 다음 발현 벡터는 숙주 세포, 예컨대 *E. coli* 세포, 원숭이 COS 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 달리는 면역글로불린 폴리펩타이드를 생성하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체의 합성물을 얻는다. 항체를 암호화하는 DNA의 세균내 재조합 발현에 대한 검토 문헌은 하기를 포함한다: Skerra 외, *Curr. Opin. i ILIRAPL* 1993) 및 Pückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

[0261] 추가 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은, 예를 들면 하기에 기재된 기술을 사용하여 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다: McCafferty 외, *Nature* 348:552-554 (1990). 문헌[Claackson 외, *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks 외, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)]는 각각 파아지 라이브러리를 사용한, 쥐과 및 인간 항체의 단리를 기술한다. 후속의 공보는 매우 큰 파아지 라이브러리(문헌[Waterhouse 외, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)])에 대한 전략으로서 사슬 서플링(문헌 [Marks 외, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)])에 의한 고친화도(nM 범위) 인간 항체의 생산뿐만 아니라 조합 감염 및 생체내 재조합을 기술한다. 따라서, 이들 기술은 단클론성 항체의 단리를 위한 전통적인 단클론성 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행 가능한 대안이다.

[0262] DNA는 또한, 예를 들면, 상동성 쥐과 서열 (문헌 [미국 특허 번호 4,816,567; Morrison 외, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)]) 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 위한 암호화 서열을 치환함으로써, 또는 비-면역글로불린 폴리펩타이드를 위한 면역글로불린 암호화 서열 모두 또는 암호화 서열의 일부에 공유적으로 연결함으로써 변형될 수 있다.

[0263] 전형적으로 이러한 비-면역글로불린 폴리펩타이드는 또는 항체의 불변 도메인으로 치환되거나, 또는 그들은 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-조합 부위 및 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 다른 항원-조합 부위를 포함하는 키메라 2가 항원을 생성하기 위해 항체의 하나의 항원-조합 부위의 가변 도메인으로 치환된다.

[0264] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM이다. 일부 구현예에서, 항체는 IgG 단클론성 항체이다.

[0265] **항체 단편**

- [0266] 일부 구현예에서, 항체는 항체 단편이다. 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기법이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었다 (참고: 예를 들면, Morimoto 외, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 및 Brennan 외, *Science* 229:81 (1985)). 그러나, 이러한 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 고찰된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 *이. 콜라이*에서 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab)<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다(Carter 외, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근에 따르면, F(ab')<sub>2</sub> 단편은 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 기타 구현예에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. 참고: WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 미국 특허 번호 5,587,458. 항체 단편은 또한, 예를 들면, 미국 특허 5,641,870에서, 예를 들어 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 상기 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.
- [0267] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항체 단편이 제공된다. 일부 구현예에서, 항체 단편은 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, scFv, Fv, 및 디아바디로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0268] **폴리펩타이드 변이체 및 변형**
- [0269] 특정 구현예에서, 본원에서 단백질의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 상기 단백질의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성들을 증진시키는 것이 바람직한 것일 수 있다. 단백질의 아미노산 서열 변이체는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열로 적당한 변형을 도입하거나 펩타이드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들면, 단백질의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 작제물에 도달하도록 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있으며, 단 최종 작제물은 목적하는 특징, 예컨대, 항원-결합을 가져야 한다.
- [0270] "폴리펩타이드 변이체"는, 본 명세서에서 정의된 바와 같이 폴리펩타이드의 전장 천연 서열, 신호 펩타이드를 결합하는 폴리펩타이드 서열, 신호 펩타이드의 유무에 관계없이 폴리펩타이드의 세포외 도메인과 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드, 예를 들면, 활성 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 폴리펩타이드 변이체는, 예를 들면, 하나 이상의 아미노산 잔기가 전장 천연 아미노산 서열의 N 또는 C-말단에서 첨가되거나, 또는 결실된 폴리펩타이드를 포함한다. 통상적으로, 폴리펩타이드 변이체는 전장 천연 서열 폴리펩타이드, 신호 펩타이드를 결합하는 폴리펩타이드 서열, 신호 펩타이드의 유무에 관계없이 폴리펩타이드의 세포외 도메인에 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성, 대안적으로 적어도 약 임의의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 선택적으로, 변이체 폴리펩타이드는 천연 폴리펩타이드 서열에 비교하여 1 이하 보존적 아미노산 치환, 대안적으로 천연 폴리펩타이드 서열에 비교하여 약 임의의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 이하 보존적 아미노산 치환을 가질 것이다.
- [0271] 변이체 폴리펩타이드는 N-말단 또는 C-말단에서 절단될 수 있고, 또는 예를 들면, 전장 천연 폴리펩타이드와 비교될 때, 내부 잔기를 결합할 수 있다. 특정 변이체 폴리펩타이드는 목적 생물학적 활성을 위해 필수적이지 않은 아미노산 잔기를 갖지 결합할 수 있다. 절단, 결실 및 삽입을 갖는 이들 변이체 폴리펩타이드는 임의의 수의 종래의 기술에 의해 제조될 수 있다. 목적 변이체 폴리펩타이드는 화학적으로 합성될 수 있다. 또 다른 적합한 기술은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 목적 변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 단편을 단리하고 증폭하는 것을 포함한다. 핵산 단편의 목적 말단을 한정하는 올리고뉴클레오타이드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머에서 이용된다. 바람직하게는, 변이체 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 천연 폴리펩타이드와 적어도 하나의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 공유한다.
- [0272] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지는 백 개 이상의 잔기를 함유하는 함유하는 폴리펩타이드의 길이에 이르는 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리펩타이드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩타이드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.
- [0273] 예를 들어, 상기 폴리펩타이드의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성들을 증진시키는 것이 바람직한 일일 수 있다. 폴리펩타이드의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산에 도입하거나 펩타이드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은, 예를 들면, 폴리펩타이드의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 작제물에 도달하도록 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이루어지

며, 단 최종 작제물은 목적하는 특징, 예컨대, 항원-결합을 가져야 한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같은 폴리펩타이드(예컨대, 항체)의 번역 후 과정을 변화시킬 수 있다.

[0274] 목적 활성화에 부정적으로 영향을 미침이 없이 아미노산 잔기가 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는가를 예측하기 위한 지침은 폴리펩타이드의 서열을 동종의 공지된 폴리펩타이드 분자의 서열과 비교하고, 높은 상동성의 영역에서 만들어진 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함에 의해 알려질 수 있다.

[0275] 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치인, 폴리펩타이드 (예컨대, 항체)의 특정 잔기들 또는 영역들의 식별을 위해 유용한 방법은 다음 문헌에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다: Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989). 여기서, 잔기 또는 표적 잔기의 그룹이 식별되었고 (예컨대, 하전된 잔기 예컨대 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu) 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 치환에 대한 작용성 민감성을 입증하는 아미노산 위치는 그런 다음 치환의 부위에 대해 또는 치환 부위에 다른 변이체를 추가로 도입함에 의해 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변화를 도입하기 위한 부위가 사전결정되지만, 특히 돌연변이 특성은 사전결정될 필요가 없다. 예를 들면, 소정의 부위에서 돌연변이의 수행을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 그리고 과발현된 항체 변이체가 목적 활성화에 대해 스크리닝된다.

[0276] 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 상이한 잔기로 대체되는 항체 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이유발을 위한 가장 큰 관심 대상의 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경이 또한 상정된다. 만일 상기 치환이 생물학적 활성에서 변화를 초래한다면, 표 5에서 "치환"으로 명명된, 또는 아미노산 클래스를 참조하여 아래 추가로 기재된 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고 생성물이 스크리닝될 수 있다.

표 5

본래 잔기	예시적 치환	보존적 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0277]

[0278] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체배좌로서, 치환 영역에서 폴리펩타이드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지함에 있어서 그



들의 효과가 상당히 다른 치환을 선택함으로써 달성된다. 아미노산은 이들의 측쇄의 특성의 유사성에 따라 그룹화될 수 있다 (참고: A. L. Lehninger, Biochemistry 2판, pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

[0279] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0280] (2) 비하전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0281] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0282] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

[0283] 대안적으로, 천연 발생 잔기는 하기 공통의 측쇄 특성에 기초하여 이하의 그룹으로 분할될 수 있다:

[0284] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0285] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0286] (3) 산성: Asp, Glu;

[0287] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0288] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

[0289] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0290] 비보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0291] 항체의 적절한 형태 유지에 관여되지 않은 임의의 시스테인 잔기는 또한, 일반적으로 세린과 함께, 치환되어, 분자의 산화적 안정성을 개선할 수 있고 그리고 비정상적인 가교결합을 예방할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은, 특히 폴리펩타이드가 항체 단편 예컨대 Fv 단편인 경우, 항체에 부가되어 그 안정성을 개선할 수 있다.

[0292] 치환형 변이체의 한 예시는 친계 항체 (예를 들면, 인간화 항체)의 하나 또는 그 초과 초가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가적인 연구를 위해 선택된 얻어진 변이체(들)는 그들이 생성된 친계 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하기 위한 편리한 방법은 파지 디스플레이를 이용하는 친화도 성숙을 수반한다. 간단하게는, 몇 개의 초가변성 영역 부위(예컨대, 6-7 부위)가 돌연변이되어 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성한다. 이와 같이 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내 패키징된 M13의 유전자 III 생성물로서의 융합부로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 1가 양상으로 나타난다. 파아지-표시된 변이체는 그런 다음 본 명세서에서 개시된 바와 같은 이의 생물학적 활성(예컨대, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보 초가변 영역을 식별하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발은 항원 결합에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기들을 식별하기 위해 수행될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 항체와 표적 간의 접촉 지점을 식별하기 위한 항원-항체 착물의 결정 구조를 분석하는 것이 이점을 가질 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 본 명세서에 상세히 기재된 기법에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 스크리닝 대상이 되고, 그리고 하나 이상의 관련된 결정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택될 수 있다.

[0293] 폴리펩타이드의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 최초 글리코실화 패턴을 변경한다. 폴리펩타이드는 비-아미노산 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 글리코실화될 수 있다. 이러한 글리코실화는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 폴리펩타이드의 발현 중에 자연적으로 발생할 수 있거나 인간의 개입으로부터 의도적인 변형일 수 있다. 변경하는 것은 폴리펩타이드에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실하는 것 및/또는 폴리펩타이드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다.

[0294] 폴리펩타이드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. "N-연결됨"은 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 결합하는 것을 말한다. 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린, 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기에서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드에서 이들 트리펩타이드 서열 중 하나의 존재는 잠재적 글리코실화 부위를 생성한다. 비록 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록실리신이 또한 사용될 수 있어도, O-연결 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 당류 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스, 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭한다.

[0295] 폴리펩타이드에 글리코실화 부위의 부가는 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성되고 이로써 (N-연결 글리코실화 부위에 대한) 상기-기재된 트리펩타이드 서열 중 하나 이상을 함유한다. 변경은 또한 (O-연결 글리코

실화 부위에 대해) 본래의 항체의 서열에 대해 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다.

[0296] 폴리펩타이드 상에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 또는 글리코실화의 표적으로 작용하는 아미노산 잔기에 대해 암호화하는 코돈의 돌연변이 치환에 의해 달성될 수 있다. 폴리펩타이드 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 다양한 엔도- 및 엑소- 글리코시다아제의 사용에 의하여 달성될 수 있다.

[0297] 다른 변형은 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로 글루타미닐 및 아스파르기닐 잔기의 탈아미드화, 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 하이드록실 기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의  $\gamma$ -아미노 기의 메틸화, N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실 기의 아미드화를 포함한다.

#### [0298] 키메라성 폴리펩타이드

[0299] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 또 다른, 이중성 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열에 융합된 폴리펩타이드를 포함하는 키메라성 분자를 형성하는 방법으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 키메라성 분자는 항-태그 항체가 선택적으로 결합될 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩타이드를 갖는 폴리펩타이드의 융합을 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 폴리펩타이드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치된다. 폴리펩타이드의 이러한 에피토프-태그된 형태의 존재는 태그 폴리펩타이드에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 또한, 에피토프 태그의 제공은 폴리펩타이드가 에피토프 태그에 결합하는 항-태그 항체 또는 또 다른 유형의 친화도 매트릭스를 사용하여 친화도 정제에 의해 쉽게 정제되도록 할 수 있다.

#### [0300] 다중특이적 항체

[0301] 특정 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들면 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 최소한 두 개의 상이한 자리에 대해 결합 특이성을 갖는 단클론 항체이다. 특정 구현예에서, 상기 결합 특이성들 중 하나는 c-met에 대한 것이고, 다른 하나는 그 밖의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 c-met의 상이한 2개의 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이성 항체가 또한 c-met을 발현하는 세포에 세포독성 제제를 위치시키기 위해 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로 제조될 수 있다.

[0302] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 기술은 비제한적으로 하기를 포함한다: 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 제조함 공-발현 (참고: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, 및 Trautnecker 외, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), 및 "크롭-인-홀" 가공 (참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,731,168). 다중 특이적 항체는 또한 다음과 같이 제조될 수 있다: 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스티어링 효과를 가공함에 의해 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교 결합시킴에 의해 (참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 Brennan 외, *Science*, 229: 81 (1985)); 이중특이적 항체를 생산하기 위하여 류신 지퍼(leucine zipper)를 사용함에 의해 (참고: 예를 들어, Kostelny 외, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "디아바디" 기술을 사용함으로써 (참고: 예를 들어, Hollinger 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 및 단일쇄 Fv(sFv) 이량체를 사용함에 의해 (참고: 예를 들어, Gruber 외, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 및 문헌 [예를 들어, Tutt 외 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같이 3특이적 항체를 제조함에 의해.

[0303] 본원의 항체 또는 단편은 또한 WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, 및 WO 2010/145793에 기재된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0304] "옥토퍼스 항체"를 포함하는, 3개 이상의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 가공된 항체는 또한 본원에 포함된다 (참고: 예를 들어, US 2006/0025576A1).

[0305] 본원의 항체 또는 단편은 또한 제1 에피토프(예를 들어, 제1 항원 상에서) 뿐만 아니라 또 다른 상이한 에피토프(예를 들어, 제1 항원 상에서 또는 제2의 상이한 항원 상에서)에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용성 Fab" 또는 "이중 작용 Fab" (DAF)를 포함한다 (참고: 예컨대, US 2008/0069820; Bostrom 외 (2009) *Science*, 5921, 1610-1614).

[0306] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 본 분야에 알려져 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 제조함 생산은 전

장 이중특이적 항체의 전통적 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공-발현에 근거하며, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 집합으로 인하여, 이러한 하이브리도마 (4 혼성체(quadroma))는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이중 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화성 크로마토그래피 단계에 의하여 수행되는, 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 산출량은 낮다. 유사한 절차가 하기에 개시된다: WO 93/08829 (1993년 5월 13일 공보됨), 및 Traunecker 외, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

[0307] 상이하고 더욱 바람직한 접근에 따라, 목적 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 조합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열로 융합된다. 상기 융합은, 바람직하게는, 힌지, CH2, 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 상기 융합 중 적어도 하나에서 존재하는, 경쇄 결합에 대해 필요한 부위를 함유하는, 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및, 원할 시 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA는 개별 발현 벡터에 삽입되고, 적절한 숙주 유기체에 공-형질감염된다. 이것은 작제물에서 사용된 3개의 폴리펩타이드 사슬의 불균등 비가 최적의 수율을 제공하는 경우 구현예에서 3개의 폴리펩타이드 단편의 상호 분율 조정에서 큰 가요성을 제공한다. 그러나, 균등 비에서 적어도 2 폴리펩타이드 사슬의 발현이 고수율을 초래하는 경우 또는 비가 특정한 유의성이 없는 경우 한 발현 벡터에서 2 또는 모든 3개의 폴리펩타이드 사슬에 대한 암호화 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0308] 이러한 접근의 바람직한 구현예에서, 이중특이적 항체는 하나의 아암 내의 제1 결합 특이성을 갖는 혼성체 면역글로불린 중쇄 및 다른 아암 내의 혼성체 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 오직 1/2 내의 면역글로불린 경쇄의 존재가 분리의 용이한 방법을 제공하므로, 이러한 비대칭 구조는 비목적 면역글로불린 사슬 조합으로부터의 목적 이중특이적 화합물의 분리를 촉진하는 것으로 발견되었다. 이 접근은 WO 94/04690에서 개시된다. 이중특이적 항체 생성의 추가적인 세부사항에 대해서는, 예를 들어, 하기를 참조한다: Suresh 외, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

#### [0309] 크nob 인 홀 기술

[0310] 또 다른 접근에 따르면, 항체 분자 쌍 간의 계면은 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 이중이량체 백분율을 최대화하기 위해 가공될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄 (예컨대, 티로신 또는 트립토판) (크nob(knob) 또는 돌출부(protuberance))로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 것 (예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체하여 큰 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "내강"이 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예컨대 동종이량체 이상으로 이형이량체 수율을 증가시키기 위한 기전을 제공한다. 크nob(knob) 및 홀(hole)은 추가로 본원에 기술된다.

[0311] 다중특이적 항체 및/또는 외팔 항체 및/또는 면역접합체를 생성하는 방법으로 크nob 인투 홀(knobs into holes)의 사용은 당해 기술에 잘 알려져 있다. 하기를 참고한다: 미국 특허 번호 5,731,168 (1998년 3월 24일 Genentech에 수여됨), PCT 공보 번호 WO2009089004 (2009년 7월 16일 공보되고, Amgen에게 수여됨), 및 미국 특허 공보 번호 20090182127 (2009년 7월 16일 공보되고, Novo Nordisk A/S에게 수여됨). 또한 하기를 참고한다: Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658 및 Kontermann (2005) *Acta Pharacol. Sin.*, 26:1-9. 간략한 고찰이 본원에 제공된다.

[0312] "돌출부"는 이중다량체를 안정화하고, 그리고 그렇게 함으로써, 예를 들면 동종다량체 형성보다 이중다량체 형성에 유리하도록, 제1 폴리펩타이드의 계면로부터 돌출하고 그리고 따라서 인접한 계면 (즉 제2 폴리펩타이드의 계면) 내 보상성 공동에 위치할 수 있는 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 본 돌출부는 본래 계면에 존재할 수 있거나, (예컨대, 계면을 암호화하는 핵산을 변경시킴에 의해) 합성적으로 도입될 수 있다. 정상적으로, 제1 폴리펩타이드의 계면을 암호화하는 핵산은 돌출부(protuberance)를 암호화하도록 변형된다. 이를 성취하기 위해, 제1 폴리펩타이드의 계면에서 적어도 하나의 "본래의" 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산은 본래의 아미노산 잔기보다 큰 측쇄 용적을 갖는 적어도 하나의 "유입(import) 아미노산 잔기"를 암호화하는 핵산으로 대체된다. 하나 초과와 원래의 및 상응하는 유입 잔기가 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 대체되는 본래의 잔기들의 수에 대한 상한치는 제1 폴리펩타이드의 계면에서 잔기들의 총수이다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 용적은 하기 표에 나타난다.

표 6

아미노산의 특성

아미노산	1-글자 축약	질량 <sup>a</sup> (달톤)	용적 <sup>b</sup> (옹스트롬 <sup>3</sup> )	접근가능한 표면적 <sup>c</sup> (옹스트롬 <sup>2</sup> )
알라닌 (Ala)	A	71.08	88.6	115
아르기닌 (Arg)	R	156.20	173.4	225
아스파라긴 (Asn)	N	114.11	117.7	160
아스파르트산 (Asp)	D	115.09	111.1	150
시스테인 (Cys)	C	103.14	108.5	135
글루타민 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
글루탐산 (Glu)	E	129.12	138.4	190
글리신 (Gly)	G	57.06	60.1	75
히스티딘 (His)	H	137.15	153.2	195
이소류신 (Ile)	I	113.17	166.7	175
류신 (Leu)	L	113.17	166.7	170
라이신 (Lys)	K	128.18	168.6	200
메티오닌 (Met)	M	131.21	162.9	185
페닐알라닌 (Phe)	F	147.18	189.9	210
프롤린 (Pro)	P	97.12	122.7	145
세린 (Ser)	S	87.08	89.0	115
트레오닌 (Thr)	T	101.11	116.1	140
트립토판 (Trp)	W	186.21	227.8	255
티로신 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
발린 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0313]

[0314]

<sup>a</sup>아미노산 분자량 - 물 분자량 값. 상기 값은 Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961에서 유래됨.

[0315]

<sup>b</sup>값은 A.A. Zamyatin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:107-123, 1972에서 유래됨.

[0316]

<sup>c</sup>값은 C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1975에서 유래됨. 접근가능한 표면적은 이 참조문헌의 도 6 내지 20에서 정의된다.

[0317]

돌출부를 형성하기 위한 바람직한 유입 잔기는 일반적으로 천연 발생 아미노산 잔기이고 바람직하게 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)으로부터 선택된다. 가장 바람직한 것은 트립토판 및 티로신이다. 일 구현예에서, 돌출부의 형성에 대한 본래 잔기는 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌, 또는 발린과 같이 작은 측쇄 용적을 갖는다. 돌출부를 형성하기 위한 CH3 도메인 내의 예시적인 아미노산 치환은 비제한적으로 T366W 치환을 포함한다.

[0318]

"공동(cavity)"은 제2 폴리펩타이드의 계면으로부터 오목하고, 따라서 제1 폴리펩타이드의 인접한 계면 상에 상응하는 돌출부 ("크놉")을 수용하는 적어도 하나의 아미노산 측쇄를 지칭한다. 본 공동은 최초 계면에 존재할 수 있거나, (예컨대, 계면을 암호화하는 핵산을 변경시킴에 의해) 합성적으로 도입될 수 있다. 보통, 제2 폴리펩타이드의 계면을 암호화하는 핵산은 공동을 암호화하도록 변경된다. 이를 달성하기 위해, 제2 폴리펩타이드의 계면에서의 적어도 하나의 "원래의" 아미노산 잔기를 암호화하는 핵산이 원래의 아미노산 잔기보다 작은 부사슬 용적을 가지는 적어도 하나의 "유입" 아미노산 잔기를 암호화하는 DNA에 의해 대체된다. 하나 초과와 원래의 및 상응하는 유입 잔기가 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 대체되는 본래의 잔기들의 수에 대한 상한치는 제2 폴리펩타이드의 계면에서 잔기들의 총수이다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 용적은 상기 표 2에 나타난다. 공동을 형성하기 위한 바람직한 유입 잔기는 일반적으로 천연 아미노산 잔기이고 바람직하게 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 및 발린(V)으로부터 선택된다. 가장 바람직한 것은 세린, 알라닌 또는 트레오닌이다. 일 구현예에서, 공동의 형성에 대한 본래 잔기는 티로신, 아르기닌, 페닐알라닌 또는 트립토판과 같이 큰 측쇄 용적을 갖는



다. 공동을 형성하기 위한 CH3 도메인 내의 예시적인 아미노산 치환은 비제한적으로 T366S, L368A 및 Y407A 치환을 포함한다.

[0319] "본래의" 아미노산 잔기는 본래의 잔기보다 작거나 큰 측쇄 용적을 가질 수 있는 "유입" 잔기에 의해 대체되는 잔기이다. 유입 아미노산 잔기는 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노산 잔기일 수 있지만, 바람직하게는 전자이다. "천연 발생" 아미노산 잔기는 유전적 코드에 의하여 암호화되고, 상기 표 2에서 열거된, 그러한 잔기이다. "비천연 발생" 아미노산 잔기란 유전자 코드에 의해 암호화되지 않지만, 폴리펩타이드 사슬에서의 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유로 결합할 수 있는 잔기를 의미한다. 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린, 및 문헌 [예를 들어, Ellman 외, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991)]에 기재된 것들과 같은 다른 아미노산 잔기 유사체이다. 상기 비천연적으로 존재하는 아미노산 잔기를 생성하기 위해, 문헌[참조: Noren 외 *Science* 244: 182 (1989) 및 상기 Ellman 외]의 절차를 사용할 수 있다. 간단히 말하면, 이것은 비천연 발생 아미노산 잔기에 의한 억제자 tRNA의 화학적 활성화, 이어서 RNA의 실험실내 전사 및 번역을 포함한다. 본원에 제공된 방법은 적어도 하나의 본래의 아미노산 잔기를 대체함을 포함하지만 1 초과 본래의 잔기는 대체될 수 있다. 일반적으로, 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 계면에서 총수 이하의 잔기는 대체된 본래의 아미노산 잔기를 포함한다. 전형적으로, 대체를 위한 본래의 잔기는 "묻혀(buried)"있다. "묻혀" 있는 이란 용어는, 잔기가 근본적으로 용매에 접근불가능한 것임을 의미한다. 일반적으로, 유입 잔기는 이황화 결합의 가능한 산화 또는 오류쌍형성을 막기 위해 시스테인이 아니다.

[0320] 돌출부는 공동에서 "배치 가능"하고, 이것은 각각 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드의 계면 상의 돌출부 및 공동의 공간 위치 및 돌출부 및 공동의 크기가, 돌출부가 계면에서의 제1 및 제2 폴리펩타이드의 일반 회합을 상당히 방해하지 않으면서 공동에 배치될 수 있게 한다는 것을 의미한다. 돌출부, 예컨대 Tyr, Phe 및 Trp가 통상적으로 계면의 축으로부터 직각으로 연장되지 않고 바람직한 입체형태를 가지지 않으므로, 상응하는 공동에 의한 돌출부의 정렬은 예컨대 X선 결정학 또는 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance: NMR)에 의해 얻은 3차원 구조에 기초하여 돌출부/공동 쌍을 모델링하는 것에 의존한다. 이것은 당해 기술에서 널리 허용된 기술을 사용하여 달성될 수 있다.

[0321] "본래의 또는 주형 핵산"이란 불록한 부분 또는 강을 암호화하도록 "변형된"(즉, 유전학적으로 가공되거나 돌연변이된) 것일 수 있는 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 의미한다. 본래의 또는 개시 핵산은 천연적으로 존재하는 핵산일 수 있거나 사전 변형된 핵산(예를 들어, 인간화된 항체 단편)을 포함할 수 있다. 핵산을 "변형"시키는 것이란 본래의 핵산이 목적하는 아미노산 잔기를 암호화하는 적어도 하나의 코돈을 삽입하거나, 결실시키거나 대체함에 의해 돌연변이됨을 의미한다. 일반적으로, 본래의 잔기를 암호화하는 코돈은 유입 잔기를 암호화하는 코돈에 의해 대체된다. 이러한 방식으로 DNA를 유전적으로 변형시키기 위한 기술은 문헌 [Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991)]에 검토되며, 그리고 예를 들어, 부위-지향된 돌연변이생성, 카세트 돌연변이생성 및 폴리머라아제 사슬 반응 (PCR) 돌연변이생성을 포함한다. 본래/주형 핵산을 변이시킴으로써, 본래/주형 핵산에 의하여 암호화된 본래/주형 폴리펩타이드는 이에 따라 상응하여 변경된다.

[0322] 돌출부 또는 공동은 합성 수단에 의해, 예를 들어, 재조합 기술, 시험관내 펩타이드 합성, 이전에 기재된 비천연적으로 발생하는 아미노산 잔기들을 도입하기 위한 기술, 펩타이드의 효소적 또는 화학적 커플링에 의하여, 또는 이들 기술의 일부 조합에 의해 제1 또는 제2 폴리펩타이드의 계면으로 "도입"될 수 있다. 따라서, "도입된" 돌출부 또는 공동은 "비천연적으로 존재하거나", "비천연"이고, 이는 이것이 천연적으로 또는 본래의 폴리펩타이드(예를 들어, 인간화된 단클론성 항체)에 존재하지 않음을 의미한다.

[0323] 일반적으로, 돌출부를 형성하기 위한 유입 아미노산 잔기들은 비교적 소수의 "로타머" (예를 들어, 약 3-6)를 갖는다. "로타머"는 아미노산 측쇄의 에너지학적으로 우호적인 형태이다. 다양한 아미노산 잔기에 대한 로타머의 수는 문헌 [Ponders and Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987)]에서 검토된다.

[0324] 일 구현예에서, 제1 Fc 폴리펩타이드 및 제2 Fc 폴리펩타이드는 계면에서 계합/상호작용한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드가 계면에서 계합할 때, 제2 Fc 폴리펩타이드 (서열)의 계면은 돌출부 (또한 "크롭"이라고 불림)을 포함하고, 이는 제1 Fc 폴리펩타이드 (서열)의 계면 내에서 공동 (또한 "홀"이라고 불림) 내에서 위치가능하다. 일 구현예에서, 제1 Fc 폴리펩타이드는 공동을 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경되거나, 제2 Fc 폴리펩타이드는 돌출부, 또는 둘 다를 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경된다. 일 구현예에서, 제1 Fc 폴리펩타이드는 공동을 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경되고, 제2 Fc 폴리펩타이드는 돌출부를 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경된다. 일

구현예에서, 제2 Fc 폴리펩타이드의 계면은, 제1 Fc 폴리펩타이드의 계면 내 공동에서 위치가능한 돌출부를 포함하고, 공동 또는 돌출부, 또는 둘 다는 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드 각각의 계면으로 도입된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드가 계면에서 계합할 때, 제2 Fc 폴리펩타이드 (서열)의 계면은 돌출부를 포함하고, 이는 제1 Fc 폴리펩타이드 (서열)의 계면 내에서 공동 내에서 위치가능하다. 일 구현예에서, 제2 Fc 폴리펩타이드는 공동을 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경되거나, 제1 Fc 폴리펩타이드는 돌출부, 또는 둘 다를 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경된다. 일 구현예에서, 제2 Fc 폴리펩타이드는 공동을 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경되고, 제1 Fc 폴리펩타이드는 돌출부를 암호화하기 위하여 주형/본래 폴리펩타이드로부터 변경된다. 일 구현예에서, 제1 Fc 폴리펩타이드의 계면은, 제2 Fc 폴리펩타이드의 계면 내의 공동에서 위치가능한 돌출부를 포함하고, 공동 또는 돌출부, 또는 둘 다는 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드 각각의 계면으로 도입된다.

[0325] 일 구현예에서, 돌출부 및 공동은 각각 천연 발생 아미노산 잔기를 포함한다. 일 구현예에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 주형/본래 폴리펩타이드의 계면으로부터의 본래 잔기를, 본래 잔기보다 더 큰 측쇄 용적을 갖는 유입 잔기로 대체함으로써 생성된다. 일 구현예에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩타이드는, 상기 폴리펩타이드의 계면으로부터의 본래 잔기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 본래 보다 더 큰 측쇄 용적을 갖는 유입 잔기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 대체되는 단계를 포함하는 방법에 의하여 생성될 수 있다. 일 구현예에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 일 구현예에서, 본래 잔기는 T366이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 아르기닌 (R)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 페닐알라닌 (F)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 티로신 (Y)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 트립토판 (W)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 R, F, Y 또는 W이다. 일 구현예에서, 돌출부는 템플레이트/최초 폴리펩타이드에 2중 이상의 잔기를 대체함에 의해 생성된다. 일 구현예에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함하며, 이는 하기의 EU 넘버링에 따른 아미노산 넘버링에 따른다: Kabat 외 (pp. 688-696 in Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).

[0326] 일부 구현예에서, 공동 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 주형/본래 폴리펩타이드의 계면으로부터의 본래 잔기를, 본래 잔기보다 더 작은 측쇄 용적을 갖는 유입 잔기로 대체함으로써 생성된다. 예를 들어, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는, 상기 폴리펩타이드의 계면으로부터의 본래 잔기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 본래 보다 더 작은 측쇄 용적을 갖는 유입 잔기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 대체되는 단계를 포함하는 방법에 의하여 생성된다. 일 구현예에서, 본래 잔기는 트레오닌이다. 일 구현예에서, 본래 잔기는 류신이다. 일 구현예에서, 본래 잔기는 티로신이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 시스테인 (C)이 아니다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 알라닌 (A)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 세린 (S)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 트레오닌 (T)이다. 일 구현예에서, 유입 잔기는 발린 (V)이다. 공동은 주형/본래 폴리펩타이드의 하나 이상의 본래 잔기를 대체함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 트레오닌, 류신, 및 티로신으로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함한다. 일 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 알라닌, 세린, 트레오닌, 및 발린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 유입 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 트레오닌, 류신, 및 티로신으로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 본래 아미노산의 대체를 포함하고, 상기 본래 아미노산은 알라닌, 세린, 트레오닌, 및 발린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 유입 잔기로 대체된다. 일부 구현예에서, 대체된 본래 아미노산은 T366, L368 및/또는 Y407이다. 일 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 위치 366에서 트레오닌의 세린으로의 대체를 포함하며, 이는 하기의 EU 넘버링에 따른 아미노산 넘버링에 따른다: 상기 Kabat 외. 일 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 위치 368에서 류신의 알라닌으로의 대체를 포함하며, 이는 하기의 EU 넘버링에 따른 아미노산 넘버링에 따른다: 상기 Kabat 외. 일 구현예에서, 공동을 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 위치 407에서 티로신의 발린으로의 대체를 포함하며, 이는 하기의 EU 넘버링에 따른 아미노산 넘버링에 따른다: 상기 Kabat 외. 이러한 항체 단편의 일부 구현예에서, 돌출부를 포함하는 Fc 폴리펩타이드는 위치 366에서 트레오닌의 트립토판으로의 대체를 포함하며, 이는 하기의 EU 넘버링에 따른 아미노산 넘버링에 따른다: 상기 Kabat 외.

[0327] 일 구현예에서, 항체는, W02005/063816에서 기술된 바와 같이, "크롭" 및 "홀"을 구성하는 Fc 변이를 포함한다. 예를 들어, 홀 돌연변이는 Fc 폴리펩타이드 내의 T366A, L368A 및/또는 Y407V 중 하나 이상일 수 있으며, 크롭 돌연변이는 IgG1 또는 IgG4 골격 내 T366W일 수 있다. 다른 면역글로불린 이소형의 등가 돌연변이는 당해 분야의 숙련가에 의해 제조될 수 있다. 추가로, 숙련가는 바람직하게는, 이중특이적 항체에 사용된 2개 절반-항체가

동일한 이소형임을 쉽게 인식할 것이다.

[0328] **CrossMab 기술**

[0329] Schaefer 외 (Roche Diagnostics GmbH)는 하기를 기술한다: 기존의 항체로부터 유도된 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를, 인공 링커 없이 인간 2가 이중특이적 IgG 항체로 조립하는 방법을 기술한다 (PNAS (2011) 108(27): 11187-11192 및 US 2009/0232811). 상기 방법은 이중특이적 항체의 1/2의 항원-결합 단편 (Fab) 내의 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 도메인을 교환하는 것(CrossMab)을 포함한다. 경쇄와 이들의 동족 중쇄의 올바른 연합은 이중특이적 항체의 하나의 절반의 항원 결합 단편(Fab) 내 중쇄 및 경쇄 도메인의 교환에 의해 성취된다. 상기 "크로스오버"는 항원 결합 친화도를 보유하지만 경쇄 오류쌍형성이 더 이상 발생할 수 없도록 2개의 아암을 상이하게 한다. WO2009/080251, WO2009/080252, WO2009/080253, WO2009/080254, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, 및 WO 2010/145793을 참조하고, 각각은 그 전문이 본원에 참고로 편입된다. 예를 들어, "크립 인투 홀 (KiH) 또는 "CrossMab" 기술과 같은 방법론의 개발로 인한 이러한 최근 장점에도 불구하고, 다중특이적 항체의 발현은 여전히 그들의 생산과 구체적으로 관련된 생성물 특이적 불순물의 바람직하지 않은 형성을 유도할 것이다. 이들 생성물-특이적 불순물은, 예를 들어, 1/2 항체 (단일 중쇄/경쇄 쌍을 포함), 3/4 항체 (단일 경쇄가 결합된 완전한 항체를 포함) 또는 5/4 항체 부산물 (추가 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 포함)을 포함할 수 있다.

[0330] **BiTE 기술**

[0331] 이중특이적 T 세포 연관체 (BiTE) 분자를 위하여 사용된 또 다른 포맷 (참고: 예컨대, Wolf 외 (2005) Drug Discovery Today 10:1237-1244))은, 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 모듈을 기준으로 한다. scFv는 일반적으로 적절하게 중첩될 수 있고 영역이 동족 항원에 결합할 수 있도록 가요성 링커를 통해 융합된 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역으로 구성된다. BiTE는 단일 사슬 상에서 서로 상이한 특이성을 갖는 두 개의 scFv를 연결한다. 이 배치형태는 동일한 중쇄 가변 영역의 두 개의 카피를 갖는 분자의 생산을 배제한다. 또한, 링커 배치형태는 각각의 경쇄 및 중쇄의 정확한 쌍형성을 보장하도록 설계된다.

[0332] **다른 이중특이적 항체 포맷**

[0333] Strop 외 (Rinat-Pfizer Inc.), 2개의 관심 항체를 별도로 발현 및 정제함으로써, 그리고 이후 특정 산화환원 조건 하에서 이들을 함께 혼합함으로써 안정한 이중특이적 항체를 생성하는 방법을 기술한다 (J. Mol. Biol. (2012) 420:204-19).

[0334] 동종이량체에 비해 이종이량체를 형성하는 것에 대해 강한 선호도를 갖는 다른 이종이량체화 도메인은 본 발명의 다중특이적 항원-결합 단백질에 편입될 수 있다. 예시적 예시는 예를 들어, 하기를 비제한적으로 포함한다: WO2007147901 (Kjærgaard 외 - Novo Nordisk: 이온 상호작용을 기술함); WO 2009089004 (Kannan 외 - Amgen: 정전 스티어링 효과를 기술함); WO 2010/034605 (Christensen 외 - Genentech: 코일형 코일을 기술함). 또한, 예를 들어, 류신 지퍼를 기재하는 문헌[참조: Pack, P. & Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992)] 또는 헬릭스-턴-헬릭스 모티프를 기재하는 문헌[참조: Pack 외, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993)]을 참조한다. 어구 "हे테로다량체화 도메인" 및 "이종이량체화 도메인"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항원-결합 단백질은 하나 이상의 이종이량체화 도메인을 포함한다.

[0335] [Zhu 외 (Genentech)]는 불변 도메인이 완전히 없는 변이체 도메인 항체 단편으로 구성된 디아바디 작제물의 VL/VH 계면에서의 돌연변이체를 가공하였고, 이종이량체 디아바디를 생성하였다 (Protein Science (1997) 6:781-788). 유사하게, [Igawa 외 (Chugai)]는 또한 디아바디의 배좌 이성질화를 억제하고 선택적 발현을 촉진하기 위한, 단일쇄 디아바디의 VL/VH 계면에서의 돌연변이체를 가공하였다 (Protein Engineering, Design & Selection (2010) 23:667-677).

[0336] 미국 특허 공보 번호 2009/0182127 (Novo Nordisk, Inc.)는 한 쌍의 경쇄가 다른 한 쌍의 중쇄와 상호작용하는 능력을 감소시키는, 경쇄-중쇄 쌍의 Fc 계면 및 CH1:CL 계면에서의 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 이중특이적 항체의 형성을 기술한다.

[0337] 이중특이적 항체에는 가교 또는 "이중 콘주게이트" 항체가 포함된다. 예를 들어, 상기 이중 콘주세이트 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링된다. 그러한 항체는, 예를 들어, 면역계 세포를 원치 않는 세포로 표적화하는데 제안되어 왔다 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료에 대하여 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089). 이중 콘주게이트 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여



제조될 수 있다. 적합한 가교결합 제제 및 기술은 당해기술에서 잘 알려지고, 그리고 미국 특허 번호 4,676,980에 기재된다 (다수의 가교결합 기술과 함께).

[0338] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 하기 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조될 수 있다. [Brennan 외, *Science* 229: 81 (1985)]는 무손상 항체가  $F(ab')_2$  단편을 생성하기 위하여 단백질가수분해적으로 절단되는 절차를 기술한다. 이러한 단편은 이웃한 디티올을 안정화하고 분자간 이황화 형성을 방지하기 위하여 디티올 복합화제 아비산나트륨의 존재 하에서 환원된다. 생성된  $Fab'$  단편은 이후 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다.  $Fab'$ -TNB 유도체 중 하나는 이후 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의하여  $Fab'$ -티올로 재전환되고, 기타  $Fab'$ -TNB 유도체의 등몰량으로 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.

[0339] 제조합 세포 배양물로부터 직접 유래한 이중특이적 항체 단편을 제조하고 단리하는 다양한 기술이 또한 기술되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다. Kostelny 외, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Fos 및 Jun 단백질 유래의 류신 지퍼 펩타이드는 유전자 융합에 의한 2개의 상이한 항체의  $Fab'$  부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 모노머를 형성하고, 이후 재-산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 이러한 방법이 또한 항체 동종이량체의 생산을 위하여 이용될 수 있다. "디아바디" 기술은 문헌[Hollinger 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 의하여 기술되며, 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 기전을 제공하였다. 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL) 과 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH) 을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적 VH 및 VL 도메인과 쌍형성하도록 유도되어 두 항원-결합 부위를 형성한다. 단일 사슬 Fv (scFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 참고: Gruber 외, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

[0340] 다양한 이중특이적 및 다중특이적 항체 포맷의 검토는 하기에 제공된다: Klein 외, (2012) *mAbs* 4:6, 653-663; Spiess 외 (2015) "Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies." *Mol. Immunol.* Published online January 27, 2015; doi:10.1016/j.molimm.2015.01.003; 및 Kontermann 외 (2015) *Drug Discovery Today* 20, 838-847.

[0341] **폴리뉴클레오타이드, 벡터, 숙주 세포 및 제조합 방법**

[0342] 본원에 기재된 정제 방법에서 사용되는 다중특이적 항체는 제조합 방법을 포함하는 본 기술분야에 널리 알려진 방법을 사용하여 수득될 수 있다. 하기 섹션은 이들 방법에 관한 지침을 제공한다.

[0343] **폴리뉴클레오타이드**

[0344] "폴리뉴클레오타이드", 또는 "핵산"은, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다.

[0345] 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는, 비제한적으로, 폴리펩타이드 mRNA를 가지며 이를 검출가능한 수준으로 발현시키는 것으로 여겨지는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리를 포함하는 임의의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 간편하게 수득될 수 있다. 폴리펩타이드-암호화 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 공지된 합성 절차 (예컨대, 자동화된 핵산 합성)에 의해 수득될 수 있다.

[0346] 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 전체 면역글로불린 분자 사슬, 예컨대 경쇄 또는 중쇄를 암호화할 수 있다. 완전한 중쇄는 중쇄 가변 영역 ( $V_H$ )뿐만 아니라 중쇄 불변 영역 ( $C_H$ )을 포함하며, 상기 중쇄 불변 영역은 전형적으로 3개의 불변 도메인:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ ; 및 "힌지" 영역을 포함한다. 일부 상황에서, 불변 영역의 존재가 바람직하다.

[0347] 상기 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있는 다른 폴리펩타이드는 항원-결합 항체 단편, 예컨대 단일 도메인 항체 ("dAb"), Fv, scFv,  $Fab'$  및  $F(ab')_2$  및 "미니바디"를 포함한다. 미니바디는  $C_{H1}$  및  $C_K$  또는  $C_L$  도메인이 절제된 (전형적으로) 2가 항체 단편이다. 미니바디는 종래의 항체보다 작기 때문에 임상/진단 용도에서 더 우수한 조직 투과를 달성할 것이지만, 2가이므로, 이들은 dAb와 같은 1가 항체 단편보다 더 높은 결합 친화도를 보유할 것이다. 따라서, 문맥이 달리 지칭하지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "항체"는 전체 항체 분자뿐만 아니라 상기 논의된 유형의 항원-결합 항체 단편을 포함한다. 바람직하게는 암호화된 폴리펩타이드에 존재하는 각각의 프레임워크 영역은 상응하는 인간 수용자 프레임워크와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을



포함할 것이다. 따라서, 예를 들어, 프레임워크 영역은 수용자 프레임워크 영역과 비교하여 총 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0348] 적합하게, 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 단리되고/되거나 정제될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 단리된 폴리뉴클레오타이드이다.

[0349] 용어 "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 분자가 이의 정상적 또는 천연 환경으로부터 제거 또는 분리되거나 이의 정상적 또는 천연 환경에 존재하지 않는 방식으로 생산되었음을 나타내기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 정제된 폴리뉴클레오타이드이다. 용어 정제된은 적어도 일부 오염 분자 또는 물질이 제거되었음을 나타내기 위한것이다.

[0350] 적합하게, 폴리뉴클레오타이드는 관련된 폴리뉴클레오타이드가 조성물에 존재하는 우세한 (즉, 가장 풍부한) 폴리뉴클레오타이드를 구성하도록 실질적으로 정제된다.

#### [0351] **폴리뉴클레오타이드의 발현**

[0352] 하기 설명은 주로 폴리펩타이드 암호화 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터로 형질 전환되거나 형질 감염된 세포를 배양하여 폴리펩타이드를 생산하는 것에 관한 것이다. 물론, 당해 기술 분야에 익히 공지된 대안적인 방법을 사용하여 폴리펩타이드를 제조할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열, 또는 이의 부분은 고체-상 기술을 사용하여 직접적 펩타이드 합성에 의하여 생산될 수 있다 (참고: 예컨대, Stewart 외, *Solid-Phase Peptide Synthesis* W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). 시험관내 단백질 합성은 매뉴얼 기술을 이용하여 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화 합성은, 예를 들어, 제조자의 지침을 사용하여 Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, Calif.)를 사용하여 달성할 수 있다. 폴리펩타이드의 다양한 부분은 화학적으로 별도로 합성될 수 있고, 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 배합되어 목적하는 폴리펩타이드를 생산할 수 있다.

[0353] 본원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드를 생산하기 위한 발현 벡터(들)에 삽입된다. 용어 "조절 서열"은 특정한 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 나타낸다. 조절 서열은, 비제한적으로, 프로모터(예를 들어, 천연-관련된 또는 이종성 프로모터), 신호 서열, 인핸서 요소, 및 전사 종결 서열을 포함한다.

[0354] 폴리뉴클레오타이드는 또 다른 폴리뉴클레오타이드 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결된다". 예를 들어, 전구서열 또는 분비 리더에 대한 핵산은 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전구단백질로서 발현되는 경우에 폴리펩타이드에 대한 핵산에 작동 가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에 암호화 서열에 작동 가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진시키도록 위치할 경우에 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 핵산 서열이 인접해 있고, 그리고 분비 리더의 경우에, 인접하면서 관독기에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 절찰에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 관례에 따라 사용된다.

[0355] 항체에 있어서, 경쇄와 중쇄는 동일하거나 상이한 발현 벡터에서 클로닝될 수 있다. 면역글로불린 사슬을 암호화하는 핵산 분절은 면역글로불린 폴리펩타이드의 발현을 담보하는 발현 벡터(들)에서 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0356] 4개의 상이한 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 CrossMab의 경우, 4개의 발현 카세트가 사용된다. 이들은 2개 내지 4개의 상이한 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 면역글로불린 사슬을 암호화하는 핵산 분절 각각은 면역글로불린 폴리펩타이드의 발현을 담보하는 발현 벡터(들)에서 제어 서열에 작동가능하게 연결된다. 2종 이상의 발현 카세트가 동일한 발현 벡터 상에 포함되는 경우, 이들은 단방향 또는 양방향으로 조직화될 수 있다.

[0357] 폴리뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 가변성 중쇄 및/또는 가변성 경쇄 암호화 서열 및 선택적인 발현 조절 서열)을 함유하는 벡터는 세포 숙주의 유형에 따라 달라지는 익히 공지된 방법에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, 염화칼슘 형질감염이 원핵 세포를 위해 통상적으로 이용되는 반면, 인산칼슘 처리, 전기천공, 리포펙션, 바이오리스틱스 (biolistics), 또는 바이러스-기반 형질감염이 다른 세포성 숙주를 위해 사용될 수 있다. (참고: 일반적으로, Sambrook 외, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989)). 포유동물 세포를 변형하는데 사용되는 다른 방법들은 폴리브렌, 원형질 융합, 리포솜, 전기천공, 및 미세주사의 사용을 포함한다. 형질전환 동물의 생산을 위해, 이식유전자가 수정된 난모세포 내로 미세주사될 수 있거나 배아 줄기 세포의 계능 내로 혼입될 수 있고, 상기 세포의 핵이 제핵된 난모세포 내로 전

달릴 수 있다.

[0358] **백터**

[0359] 용어 "백터"는 발현 백터 및 형질 전환 백터 및 서플 백터를 포함한다.

[0360] 용어 "발현 백터"는 *생체내* 또는 *시험관내* 발현 가능한 작제물을 의미한다.

[0361] 용어 "형질 전환 백터"는 하나의 독립체로부터 또 다른 독립체로 전달될 수 있는 작제물을 의미하고, 이는 종일 수 있거나 상이한 종일 수 있다. 작제물이 *에스케리치아 콜라이* 플라스미드로부터, 예를 들어, *바실러스* 속의 박테리움으로와 같이 하나의 종으로부터 다른 종으로 전이될 수 있는 경우, 형질 전환 백터는 때때로 "서플 백터"라고 불린다. 이는 심지어 식물에서 *이. 콜라이* 플라스미드로부터 *아그로박테리움*으로 전이될 수 있는 작제물일 수 있다.

[0362] 백터는 이하 기재된 바와 같은 적합한 숙주 세포로 형질 전환되어 폴리펩타이드의 발현을 제공할 수 있다. 다양한 백터가 공공연하게 이용 가능하다. 백터는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자, 또는 파지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 절차에 의해 백터 속으로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 본 분야에 공지된 기술을 사용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 하나 이상의 이들 성분을 함유하는 적합한 백터의 작제는 당업자에게 공지된 표준 결찰 기술을 사용한다.

[0363] 백터는, 예를 들어, 복제 기원이 제공된 플라스미드, 바이러스 또는 파지 백터, 선택적으로 상기 폴리뉴클레오타이드 발현용 프로모터 및 선택적으로 프로모터의 조절자일 수 있다. 백터는 당해 기술 분야에 공지되어 있는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다.

[0364] 이러한 발현 백터는 통상적으로 에피솜 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 유기체에서 복제 가능하다.

[0365] 다중특이적 항체 생산을 위해, 다중특이적 항체 (또는 다중특이적 항체의 아암, 즉 중쇄/경쇄 쌍)를 암호화하는 핵산(들)은 전형적으로 단리되어 추가의 클로닝, 증폭 및/또는 발현을 위한 복제가능한 백터로 삽입된다. 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 단리되고 (예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 종래의 절차를 사용하여 서열분석된다. 많은 백터가 이용가능하다. 백터의 선택은 부분적으로 사용될 숙주 세포에 따라 달라진다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE를 포함하는, 임의의 이소형의 불변 영역이, 이러한 목적을 이용하여 사용될 수 있고, 그러한 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0366] **숙주 세포**

[0367] 숙주 세포는, 예를 들어, 박테리움, 효모 또는 다른 진균 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 또는 포유동물 세포일 수 있다.

[0368] 유전적으로 조작된 유전자도입 다중세포 숙주 유기체를 사용하여 폴리펩타이드를 생산할 수 있다. 유기체는, 예를 들어, 유전자도입 포유동물 유기체(예를 들어, 유전자도입 염소 또는 마우스 세포주)일 수 있다.

[0369] 적합한 원핵생물은 비제한적으로 하기를 포함한다: 진정박테리아, 예를 들어, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, *엔테로박테리아세아에*, 예를 들어, *이. 콜라이*. 다양한 *이. 콜라이* 균주, 예컨대 *이. 콜라이* K12 균주 MM294 (ATCC 31,446); *이. 콜라이* X1776 (ATCC 31,537); *이. 콜라이* 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)가 공개적으로 이용가능하다. 다른 적합한 원핵 숙주 세포는 *엔테로박테리아세아에*, 예를 들어, *에스케리치아*, 예를 들어, *이. 콜라이*, *엔테로박터(Enterobacter)*, *어위니아(Erwinia)*, *클렙시엘라(Klebsiella)*, *프로테우스(Proteus)*, *살모넬라(Salmonella)*, 예를 들어, *살모넬라 타이피뮤리움(Salmonella typhimurium)*, *세라티아(Serratia)*, 예를 들어, *세라티아 마르체칸스(Serratia marcescans)*, 및 *시겔라(Shigella)* 뿐만 아니라 *바실리(Bacilli)*, 예를 들어, *비. 서브틸리스(B. subtilis)* 및 *비. 리케니포르미스(B. licheniformis)*(예를 들어, *B. 리케니포르미스* 41P), *슈도모나스(Pseudomonas)*, 예를 들어, *P. 에어루기노사(P. aeruginosa)*, 및 *스트렙토마이세스(Streptomyces)*를 포함한다. 이러한 예시는 제한적이라기보다 예시적이다. 균주 W3110은 재조합 폴리뉴클레오타이드 생성물 발효를 위한 일반적인 숙주 균주이기 때문에 하나의 특히 바람직한 숙주 또는 모체 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주에 내인성인 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자에서 유전적 돌연변이를 수행하도록 변형될 수 있고, 이러한 숙주의 예는 완전한 유전자형 *tonA*를 갖는 *이. 콜라이* W3110 균주 1A2; 완전한 유전자형 *tonA ptr3*를 갖는 *이. 콜라이* W3110 균주 9E4; 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-*

*lac*)169 *degP ompT kan*'를 갖는 *이. 콜라이* W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244); 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)*169 *degP ompT rbs7 ilvG kan*'를 갖는 *이. 콜라이* W3110 균주 37D6; 비-칸나마이신 내성 *degP* 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 *이. 콜라이* W3110 균주 40B4; 및 돌연변이체 주변세포질 프로테아제를 갖는 *이. 콜라이* 균주를 포함한다. 대안적으로, 클로닝의 시험관내 방법, 예를 들어, PCR 또는 다른 핵산 폴리머라제 반응이 적합하다. 일부 구현예에서, 원핵 숙주 세포(예를 들어, *이. 콜라이* 숙주 세포)는 하나 이상의 샤페론을 발현하여 항체의 접힘 및 조립을 용이하게 한다. 일부 구현예에서, 샤페론은 하나 이상의 FkpA, DsbA 또는 DsbC 이다. 일부 구현예에서, 샤페론은 내인성 샤페론 유전자로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 샤페론은 외인성 샤페론 유전자로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 샤페론 유전자는 *이. 콜라이* 샤페론 유전자(예를 들어, *이. 콜라이* FkpA 유전자, *이. 콜라이* DsbA 유전자 및/또는 *이. 콜라이* DsbC 유전자)이다.

[0370] 이들 원핵 숙주에서, 전형적으로 숙주 세포(예를 들어, 복제의 기원)와 양립가능한 발현조절 서열을 함유하는 발현 벡터를 제조할 수 있다. 또한, 임의의 수의 여러 가지의 익히 공지된 프로모터, 예를 들어, 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템, 또는 파지 람다로부터의 프로모터 시스템이 제공될 것이다. 프로모터는 전형적으로 선택적으로 오퍼레이터 서열을 갖는 발현을 조절하고, 전사 및 번역을 개시하고 완료하기 위한 리보솜 결합 부위 서열 등을 가질 것이다.

[0371] 진핵 미생물이 발현용으로 사용될 수 있다. 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모는 폴리펩타이드-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 통상적으로 사용되는 하등 진핵생물 숙주 미생물이다. 기타는 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어, 예를 들어, 케이. 락티스(*K. lactis*)(MW98-8C, CBS683, CBS4574), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906), 케이. 썬토티라나스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 막시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*)(EP 402,226); 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*); 칸디다(*Candida*); 트리코데르마 리시아(*Trichoderma reesia*); 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*); 슈완니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예를 들어, 슈완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상균, 예를 들어, 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 펜실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어, 에이. 니들란스(*A. nidulans*), 및 에이. 니제르(*A. niger*)를 포함한다. 메탄올자화(Methylotropic) 효모가 본원에 적합하고, 비제한적으로, 한센울라(*Hansenula*), 칸디다(*Candida*), 클로엑케라(*Kloeckera*), 피치아(*Pichia*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 및 로도투물라(*Rhodotorula*)로 이루어진 속으로부터 선택된 메탄올 상에서 성장할 수 있는 효모를 포함한다. 사카로마이세스는 원하는 경우 발현 조절 서열 (예컨대, 프로모터), 복제 기점, 종결 서열 등을 갖는 적합한 벡터를 갖는 바람직한 효모 숙주이다. 전형적인 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 다른 당분해 효소를 포함한다. 유도성 효모 프로모터는, 다른 것 중에서도, 알코올 탈수소효소, 이소사이토크롬 C, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소로부터의 프로모터를 포함한다.

[0372] 미생물 이외에, 포유동물 조직 세포 배양물이 또한 사용되어 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 발현 및 생성시킬 수 있고, 일부 경우에, 바람직하다 (참고: Winnacker, *From Genes to Clones* VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)). 일부 구현예의 경우, 이중성 폴리펩타이드(예를 들어, 무손상 번역글로불린)을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당해 기술 분야에서 개발되었기 때문에 진핵 세포가 바람직할 수 있고, CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 바람직하게는, 골수종 세포주, 또는 형질 전환된 B-세포 또는 하이브리도마를 포함한다. 일부 구현예에서, 포유동물 숙주 세포는 CHO 세포이다.

[0373] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 척추동물 숙주 세포이다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는, SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁액 배양에서 성장을 위하여 서브클로닝된 293 또는 293 세포; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO 또는 CHO-DP-12 세포주); 마우스 세르톨리 세포; 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 비발로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간 종양 세포주(Hep G2)이다.

[0374] 원핵생물 숙주 세포를 사용하는 다중특이적 항체의 생성

[0375] **벡터 작제**

[0376] 본원에 제공된 방법에 따라 정제될 다중특이적 항체의 폴리펩타이드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 수득될 수 있다. 목적 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리 및 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 일단 수득되면, 폴리펩타이드(예를 들어, 2종 이상의 중쇄 및/또는 2종 이상의 경쇄)를 암호화하는 서열을 숙주 세포(예를 들어, *이. 콜라이* 세포)에서 이중성 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터에 삽입한다. 당해 분야에서 가용하고 공지된 많은 벡터가 본원에 제공된 방법 및 조성물의 목적에 이용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 벡터에 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 변형될 특정 숙주 세포에 따라 달라질 것이다. 각 벡터는 기능(이중성 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 이것이 체류하는 특정 숙주 세포와의 양립성에 따라 다양한 성분을 내포한다. 벡터 성분은 일반적으로, 비제한적으로 하기를 포함한다: 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위(RBS), 신호 서열, 이중성 핵산 삽입체 및 전사 종결 서열.

[0377] 일반적으로, 숙주 세포와 혼화성인 종으로부터 유래된 복제단위 및 조절 서열을 함유하는 플라스미드 벡터는 이러한 숙주와 연결되어 사용된다. 이러한 벡터는 본래, 복제 부위, 뿐만 아니라 변형된 세포 내 표현형 선택이 가능한 마킹(marking) 서열을 수반한다. 예를 들면, *이. 콜라이*는 *이. 콜라이* 종으로부터 유도된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 전형적으로 전환된다. pBR322는 암피실린(Amp) 및 테트라사이클린(Tet)을 내성을 암호화하는 유전자를 함유하며, 따라서 변형된 세포를 식별하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, *이*의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지는 또한, 내인성 단백질의 발현을 위하여 미생물 유기체에 의하여 사용될 수 있는 프로모터를 또한 함유하거나, 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위하여 사용된 pBR322 유도체의 예시는 하기에 자세히 기술된다: Carter 외, 미국 특허 번호 5,648,237.

[0378] 또한, 숙주 미생물과 호환가능한 복제단위 및 조절서열을 함유하는 파지 벡터는 이러한 숙주와 연결되어 변형 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 GEM™-11은 재조합 벡터의 제조에서 사용될 수 있으며, 이는 민감한 숙주 세포, 예컨대 *이. 콜라이* LE392를 변형시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0379] 발현 벡터는 폴리펩타이드 성분 각각을 암호화하는 2개 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 *이*의 발현을 조절하는 시스트론에 업스트림(5')에 위치한 비번역된 조절 서열이다. 원핵생물 프로모터는 전형적으로 2개 부류, 유도가능한 부류 및 구성적 부류로 분류된다. 유도가능한 프로모터는 배양 조건, 예를 들면, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에서 일부 변화에 반응하여 이들의 조절하에 시스트론의 증가된 전사 수준을 개시하는 프로모터이다.

[0380] 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 알려져 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통한 공급원 DNA로부터의 프로모터를 제거함으로써, 그리고 벡터로 단리된 프로모터 서열을 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 암호화하는 시스트론 DNA로 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이중성 프로모터 둘 다는 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 유도하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중성 프로모터가 이용되며, 이는 그들이 일반적으로, 천연 표적 폴리펩타이드 프로모터와 비교하여, 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 허용하기 때문이다.

[0381] 원핵생물 숙주와 함께 사용되기에 적절한 프로모터는, PhoA 프로모터, -락타마제 및 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터, 및 혼성체 프로모터 예컨대 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아(예컨대 기타 알려진 박테리아 또는 파지 프로모터) 내의 작용적인 다른 프로모터 또한 적절하다. 그것의 뉴클레오타이드 서열은 공개되었고, 이로써 숙련된 작업자가 작동가능하게 임의의 요구된 제한 부위를 공급하기 위해 링커 또는 어댑터를 사용하여 표적 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 시스트론에 이들을 결합하는 것을 가능하게 한다(Siebenlist 외, (1980) *Cell* 20: 269)(임의의 요구된 제한 부위를 공급하는 링커 또는 어댑터를 사용함).

[0382] 번역 개시 영역(TIR)은 단백질의 전체 번역 수준의 주요 결정 인자이다. TIR은 신호 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열의 바로 상류로부터 개시 코돈의 약 20개 뉴클레오타이드 다운스트림까지 연장된다. 일반적으로, 벡터는 TIR을 포함할 것이고, TIR 및 변이체 TIR은 본 분야에 알려져 있고, TIR을 생성하기 위한 방법은 본 분야에 알려져 있다 일련의 핵산 서열 변이체는 일정 범위의 번역 강도로 생성되어, 이로써 많은 상이한 폴리펩타이드의 최적 분비를 위하여 이러한 인자를 조정하는 용이한 수단을 제공할 수 있다. 이러한 변이체, 예컨대 PhoA에 융합된 리porter 유전자의 사용은, 상이한 번역 개시 영역의 상대적 번역 강도를 정량화하는 방법을 제공한다. 변이체 또는 돌연변이체 TIR은 플라스미드 벡터의 배경에서



제공되어, 이로써, 성숙 폴리펩타이드의 최대 발현을 위하여 최적 범위의 번역 강도를 수립하기 위하여 관심 유전자가 삽입되고, 이의 발현이 측정되는 플라스미드 세트를 제공할 수 있다. 변이체 TIR은 USP 8,241,901에 개시된다.

[0383] 일 양태에서, 재조합 벡터 내에 각 시스템은 막을 교차하여, 발현된 폴리펩타이드의 전위를 주동하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩타이드 DNA의 부분일 수 있다. 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 처리될 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 이중성 폴리펩타이드에 고유한 신호 서열을 인식 및 처리하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 원핵 신호 서열에 의해 치환된다. 상기 서열은 당해 기술에 공지되어 있다. 또한, 벡터는 알칼라인 알칼리포스파타제, 페니실린, Lpp, 또는 열-안정 엔테로톡신 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA, 및 MBP로 구성된 군으로부터 선택된 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0384] 일 양태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, 발현 벡터)는 총체적으로 항체를 암호화한다. 일 구현예에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 항체의 경쇄를 암호화하고, 개별 폴리뉴클레오타이드는 항체의 중쇄를 암호화한다. 일 구현예에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 (예컨대, 발현 벡터)는 총체적으로 단일-아암 항체를 암호화한다. 일 구현예에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 (a) 단일-아암(one-armed) 항체의 경쇄 및 중쇄, 및 (b) Fc 폴리펩타이드를 암호화한다. 일 구현예에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 단일-아암(one-armed) 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하고, 개별 폴리뉴클레오타이드는 Fc 폴리펩타이드를 암호화한다. 일 구현예에서, 개별 폴리뉴클레오타이드는 단일-아암(one-armed) 항체의 경쇄 성분, 단일-아암 항체의 중쇄 성분 및 Fc 폴리펩타이드를 각각 암호화한다. 단일-아암(one-armed) 항체의 생산은 예를 들어, W02005063816에 기술된다.

[0385] 항체를 발현하기에 적절한 원핵생물 숙주 세포는 고세균(Archaeobacteria) 및 진정세균(Eubacteria), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예시는 하기를 포함한다: 에세리키아(Escherichia) (예를 들어 *E. 콜라이*), 바실루스(Bacilli) (예를 들어 *B. 서브틸리스*), 엔테로박테리아(Enterobacteria), 슈도모나스(Pseudomonas) 중 (예를 들어 *P. 에어루기노사*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 쉬겔라(Shigella), 리조비아(Rhizobia), 비트리오실라(Vitreoscilla), 또는 파라코커스(Paracoccus). 일 구현예에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 일 구현예에서, *E. 콜라이* 세포는 숙주로서 사용된다. *E. 콜라이* 균주의 예시는 하기를 포함한다: 균주 W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC 수탁 번호 27,325) 및 이의 유도체 (유전자형 W3110  $\Delta$ fhuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$  (nmpc-fepE) degP41 kanR을 갖는 균주 33D3 (미국 특허번호 5,639,635) 및 균주 63C1 및 64B4를 포함). 일부 구현예에서, *E. 콜라이* 균주는 62A7 ( $\Delta$ fhuA ( $\Delta$ tonA) ptr3, lacIq, lacL8, ompT $\Delta$ (nmpc-fepE)  $\Delta$ degP ilvG 보수됨)로 명명된 W3110 유도체이다. 기타 균주 및 이의 유도체, 예컨대 *E. 콜라이* 294 (ATCC 31,446), *E. 콜라이* B, *E. 콜라이*  $\lambda$  1776 (ATCC 31,537) 및 *E. 콜라이* RV308(ATCC 31,608)가 또한 적합하다. 이러한 예시는 제한적이라기보다 예시적이다. 정의된 유전자형을 갖는 상기-지칭된 박테리아 중 어느 것의 유도체를 작제하는 방법은 본 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 하기에 기술된다: Bass 외, *Proteins*, 8:309-314 (1990). 일반적으로, 박테리아의 세포 내 복제 단위의 복제를 고려한 적절한 박테리아를 선택하는 것이 필요하다. 예를 들어, *E. 콜라이* 세라티아(*Serratia*) 또는 살모넬라(*Salmonella*) 종은, 잘 알려진 플라스미드, 예컨대 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410이 복제단위를 공급하는데 사용될 경우, 숙주 세포로 적절하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 단백질분해 효소의 최소량을 분비할 것이며, 추가의 프로테아제 억제제는 세포 배양물로 바람직하게 편입될 수 있다.

[0386] 박테리아 배양에서 폴리펩타이드의 생산 수율 및 품질을 개선하기 위해, 박테리아 세포가 변형될 수 있다. 예를 들면, 분비된 항체 폴리펩타이드의 적절한 조립 및 접합을 개선하기 위해, 박테리아 숙주 세포는 추가의 벡터 발현 사페론 단백질을 포함할 수 있고, 예컨대 FkpA 및 Dsb 단백질 (DsbB, DsbC, DsbD, 및/또는 DsbG)은 숙주 원핵 세포를 공동 형질전환하기 위해 사용될 수 있다. 사페론 단백질은, 박테리아 숙주 세포 내 생성된 이중성 단백질의 적절한 접합 및 용해성을 촉진하기 위한 것으로 예증되었다.

[0387] **다중특이적 항체 생산**

[0388] 숙주 세포는 상기 기술된 발현 벡터로 변형되고, 프로모터를 유도하거나, 변형체를 선택하거나, 또는 목적 서열을 암호화하는 유전자를 증폭하는데 적절한 것으로서 변형된 기존 영양 배지 내에서 배양된다.

- [0389] 변형은 DNA를 원핵생물 숙주에 도입하여, 이로써 DNA가 염색체외 요소로서, 또는 염색체 구성성분에 의하여 복제가가능하도록 하는 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 따라서, 변형은 그러한 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 완료된다. 염화칼슘을 채용한 칼슘 처리는 일반적으로 실질적인 세포-벽 장벽을 함유한 박테리아 세포에 사용된다. 변형을 위한 또 다른 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 채용한다. 사용된 또 다른 기술은 전기천공이다.
- [0390] 본원에 제공된 방법에 따라 정제된 폴리펩타이드를 생성하는데 사용되는 원핵생물 세포는 본 분야에 알려지고 선택된 숙주 세포의 배양에 적절한 배지에서 성장한다. 적절한 배지의 예시는 루리아(Luria) 브로쓰 (LB)에 더하여 필수적인 영양 보충물을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는, 발현 벡터를 함유하는 원핵생물 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 작제를 기반으로 선택된, 선택 제제를 또한 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위한 배지에 첨가된다.
- [0391] 탄소, 질소, 및 무기 포스페이트 공급원을 제외한 임의의 필요한 보충물이 단독으로, 또는 다른 보충물 또는 배지 예컨대 복합 질소 공급원과의 혼합물로서 도입된 적절한 농도로 또한 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트ريت 및 디티오프레이톨로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 환원제를 함유한다.
- [0392] 원핵생물 숙주 세포는 적절한 온도에서 배양된다. *이. 콜라이* 성장을 위하여, 예를 들면, 바람직한 온도는 약 20℃ 내지 약 39℃, 더욱 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃, 더욱 더 바람직하게는 약 30℃ 범위이다. 배지의 pH는, 주로 숙주 유기체에 따라서, 약 5 내지 약 9의 범위의 pH일 수 있다. *이. 콜라이*에 대하여, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4이고, 더욱 바람직하게는 약 7.0이다.
- [0393] 유도성 프로모터가 발현 벡터로 사용될 경우, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적절한 조건 하에서 유도된다. 일 양태에서, PhoA 프로모터는 폴리펩타이드의 전사를 조절하게 위하여 사용된다. 따라서, 변형된 숙주 세포는 유도를 위하여 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지 (예컨대, 참고: Simmons 외, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147) 또는 W02002/061090에 기술된 배지이다. 본 분야에 알려진 바와 같이, 채용된 벡터 작제물에 따라, 다양한 유도제가 사용될 수 있다.
- [0394] 일 구현예에서, 본원에 제공된 방법을 사용하여 정제될 것인, 발현된 폴리펩타이드는 숙주 세포의 주변세포질로 분비되고 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 삼투압충격법, 음파처리 또는 용해와 같은 수단에 의하여 미생물을 교란하는 것을 포함한다. 일단 세포가 교란되면, 세포 파편 또는 전체 세포는 원심분리 또는 여과에 의하여 제거될 수 있다. 단백질은 예를 들어, 친화도 수치 크로마토그래피에 의하여 추가로 정제될 수 있다. 대안적으로, 단백질은 세포 배지에 이동되고, 그 안에 단리될 수 있다. 세포는 생성된 단백질의 추가의 정제를 위하여 여과되고 강화된 배양물 및 배양 상청액으로부터 제거될 수 있다. 발현된 폴리펩타이드는, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 알려진 방법을 사용하여 추가로 단리 및 식별될 수 있다.
- [0395] 일 양태에서, 항체 생산은 발효 과정에 의하여 다량으로 수행된다. 다양한 대규모 공급-배치(공급-배치) 발효 절차는 재조합 폴리펩타이드의 생산을 위하여 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이러한 발효기는 산소 및 영양분, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배하기 위하여 교반기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적 용량이 대략 100 리터 미만이고, 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있는 발효기 내에서의 발효를 지칭한다.
- [0396] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로, 세포가 초기 고정 상 단계에 있는, 목적 밀도, 예컨대 약 180-220의 OD550의 적절한 조건 하에서 성장한 후 개시된다. 본 분야에 알려지고 상기 기술된 바와 같이, 채용된 벡터 작제물에 따라, 다양한 유도제가 사용될 수 있다. 세포는 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 재배할 수 있다. 세포는 일반적으로 약 12-50시간 동안 유도되나, 보다 길거나 짧은 유도시간이 사용될 수 있다.
- [0397] 폴리펩타이드의 생산 수율 및 품질을 개선하기 위하여, 다양한 발효 조건이 변형될 수 있다. 예를 들면, 분비된 항체 폴리펩타이드의 적절한 조립 및 접합을 개선하기 위해, 샤페론 단백질, 예컨대 FkpA, DsbA 및/또는 DsbC을 발현하는 추가의 벡터는 숙주 원핵 세포를 공동 형질전환하기 위해 사용될 수 있다. 샤페론 단백질은, 박테리아 숙주 세포 내 생성된 이종성 단백질의 적절한 접합 및 용해성을 촉진하기 위한 것으로 예견되었다. 일부 구현예에서, FkpA, DsbA 및/또는 DsbC는 박테리아 숙주 세포 내에서 발현된다.
- [0398] 발현된 이종성 단백질 (특히 단백질분해적으로 민감한 것들)의 단백질분해를 최소화하기 위하여, 단백질분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주가 사용될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 알려진 박테리아 프로테아제, 예

컨대 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI, 및 이의 조합을 암호화하는 유전자 내에서 유전자 변이(들)을 초래하도록 변형될 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주는 예를 들어, 하기에 기술되며 이용가능하다: Joly 외, (1998), *상기*; Georgiou 외, 미국 특허 번호 5,264,365; Georgiou 외, 미국 특허 번호 5,508,192; Hara 외, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[0399] 일 구현예에서, 단백질가수분해 효소가 결핍되고, 하나 이상의 사페론 단백질을 발현하는 플라스미드로 변형된 이. 콜라이 균주가 발현 시스템에서 숙주 세포로서 사용된다.

[0400] **진핵생물 숙주 세포를 사용하는 다중특이적 항체의 생성**

[0401] **신호 서열 성분**

[0402] 진핵 숙주 세포에서 이용을 위한 벡터는 선택적으로 관심 성숙한 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩타이드를 함유할 수 있다. 선택된 이중 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더(viral secretory leaders), 예를 들면, 단순 헤르페스 gD 신호가 이용가능하다. 상기 전구체 영역에 대한 DNA는 요망된 이중다량체성 단백질(들) (예를 들면, 항체)를 암호화하는 DNA에 대한 판독 프레임에서 결정된다.

[0403] **복제 기점**

[0404] 일반적으로, 복제 성분의 기원은 포유동물 발현 벡터에 불필요하다. 예를 들어, SV40 기원은 전형적으로 사용될 수 있지만, 이는 단지 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0405] **선택 유전자 성분**

[0406] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 유전자, 또한 일명 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 하기인 단백질을 암호화한다: (a) 항생제 또는 기타 독소, 예컨대, 암피실린, 네오마이신, 메토폭세이트, 또는 테트라사이클린에 내성을 부여함, (b) 영양요구성 결핍을 보완함 (관련된 경우), 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 공급함.

[0407] 선택 전략의 하나의 예는 숙주 세포의 성장을 억제하기 위해 약물을 이용한다. 이중성 유전자로 성공적으로 변형된 상기 세포는 약물 내성을 부여한 단백질을 생산하고 따라서 선택 레지멘에 대해 생존한다. 상기 우세한 선택의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 이용한다.

[0408] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택가능한 마커의 또 다른 예는 항체 핵산, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 탈탄산효소, 등을 취할 능력이 있는 세포의 식별을 가능하게 하는 것들이다.

[0409] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 전환된 세포는 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토폭세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 형질전환체 전부를 배양함에 의해 먼저 식별된다. 야생형 DHFR이 이용되는 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들면, ATCC CRL-9096)이다.

[0410] 대안적으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택가능한 마커 예컨대 아미노글리코시드 3'-인산전달효소 (APH)를 암호화하는 DNA 서열로 전환된 또는 함께-전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)가 선택가능한 마커 예컨대 아미노글리코시드 항생제, 예를 들면, 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418에 대한 선택제를 함유하는 배지에서 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 4,965,199.

[0411] **프로모터 성분**

[0412] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 기술적으로 인식되고, 목적 힌지-함유 폴리펩타이드(들) (예컨대, 항체) 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되었다. 사실상 모든 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30 염기 업스트림에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사의 시작으로부터 70 내지 80 염기 업스트림에서 발견되는 또 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오타이드일 수 있는 CNCAAT 영역이다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는 암호화 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 모든 이들 서열은 진핵생물 발현 벡터에 적합하게 삽입된다.

- [0413] 포유동물 숙주 세포 내 벡터 유래의 목적 중쇄 및/또는 경쇄 전사는, 그러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 양립할 수 있다면, 예를 들면, 바이러스 예컨대, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 및 유인원 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터 수득된 프로모터에 의해, 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들면, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터, 또는 열-충격 프로모터로부터 제어된다.
- [0414] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 사이토메갈로바이러스의 즉각적인 초기 프로모터는 Hind III E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 벡터로서의 소 파필로마 바이러스를 사용한 포유동물 숙주 내 DNA를 발현하기 위한 시스템이 문헌 [미국 특허 번호 4,419,446]에 기술된다. 이러한 시스템의 변형이 문헌 [미국 특허 번호 4,601,978]에 기술된다. 단순 헤르페스 바이러스로부터 티미딘 키나아제 프로모터의 제어 하에 생쥐 세포에서 인간 b-인터페론 cDNA의 발현에 관해 문헌 [Reyes 외, *Nature* 297:598-601 (1982)]을 또한 참조한다. 대안적으로, 루 육종 바이러스 긴 말단 반복부가 프로모터로서 사용될 수 있다.
- [0415] **인헨서 구성요소 성분**
- [0416] 고등 진핵생물에 의한 목적하는 힌지-함유 폴리펩타이드(들)(예를 들어, 항체)를 암호화하는 DNA의 전사는 인헨서 서열을 벡터에 삽입함으로써 증가될 수 있다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (예컨대, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, a-태아단백, 및 인슐린 유전자)로부터 공지되어 있다. 또한, 진핵생물 세포 바이러스로부터 인헨서를 사용할 수 있다. 예는 복제 기원 (bp 100-270)의 후기 측면(late side) 상의 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기원의 후기 측면(late side) 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한 진핵생물 프로모터의 활성화를 증진시키는 요소에 대한 기술에 대하여 문헌 [Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는, 증진이 달성된다면, 항체 폴리펩타이드-암호화 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터로 스플라이싱될 수 있지만, 그러나 일반적으로 프로모터로부터 부위 5'에 위치할 수 있다.
- [0417] **전사 종결 성분**
- [0418] 전사 종결 성분 진핵생물 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5'의, 그리고 경우에 따라 3'의 미번역된 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 암호화하는 mRNA의 미번역된 부분에 폴리아데닐레이트화된 단편으로 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다. 일 유용한 전사 종료 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. 하기를 참고한다: WO 94/11026 및 그 안에 개시된 발현 벡터.
- [0419] **숙주 세포의 선택 및 변형**
- [0420] 본원에서 벡터내 DNA 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포는, 척추동물 숙주 세포를 포함한, 본원에 기술된 고등 진핵생물 세포를 포함한다. 배양물 (조직 배양물) 내 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 하기이다: SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 변형된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, 293개 세포 또는 현탁 배양물 내 성장을 위하여 하위-클로닝된 293개 세포, Graham 외, *J. Gen. Viral.* 36:59 (1977)); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포 /-DHFR (CHO, Urlaub 외, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 마우스 세르틀리 세포 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MOCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방암 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather 외, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2).
- [0421] 숙주 세포는 목적 힌지 함유 폴리펩타이드(들) (예를 들어, 항체) 생산을 위한 상기 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 변형되고, 프로모터를 유도하거나, 변형체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭하는데 적절한 것으로서 변형된 기존 영양 배지 내에서 배양된다.
- [0422] **숙주 세포 배양**
- [0423] 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 생산하는데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 가용한 배지, 예를 들면, Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640



(Sigma) 및 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지 ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 임의의 배지가 하기에 기술되며: Ham 외, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes 외, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기술된 배지 중 어느 하나가 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이러한 배지 중 어느 것은 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 버퍼 (예컨대 HEPES), 뉴클레오타이드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 상응하는 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 당해 분야의 숙련자에게 공지된 적절한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양 조건 (예를 들어, 온도, pH 등)은 앞서 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 사용된 것들이며, 통상의 숙련자에게는 명확할 것이다.

[0424] **다중특이적 항체 형성/조립**

[0425] 특정 구현예에서, 다중특이적 항체를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체는 별도로 절반-항체를 생성함으로써 생산되고, 각각의 절반 항체는 특정 에피토프(예를 들어, 단일 표적 상의 상이한 에피토프 또는 둘 이상의 표적 상의 상이한 에피토프)에 결합하는 VH/VL 단위를 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 절반-항체는 숙주 세포에서 별도로 생산된다. 일부 구현예에서, 각각의 절반-항체는 동일한 숙주 세포에서 생산된다. 절반-항체는 혼합되고, 다중특이적 항체로 조립되도록 한다. 일부 구현예에서, 각각의 절반-항체는 동일한 숙주 세포에서 함께 생산된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포 [예를 들어, 원핵 숙주 세포, 예를 들어, *IL1RAPL1E. coli* 세포]는 샤페론, 예를 들어, FkpA, DsbA 및/또는 DsbC를 발현하여 절반-항체의 접합을 용이하게 한다.

[0426] 일부 구현예에서, 크롭 또는 홀 돌연변이를 함유한 절반-항체는 박테리아성 숙주 세포, 예를 들면, *이. 콜라이*에서 중쇄 및 경쇄 작제물을 발현시킴으로써 별도 배양물에서 생성된다. 각 절반-항체는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 별도로 정제될 수 있다. 크롭 및 홀 절반-항체로부터 정화된 세포 추출물은 단백질 A 컬럼에 의해 정제될 수 있다. 상이한 특이성을 갖는 단백질 A 정제된 절반 항체는 환원화 제제의 존재하에 시험관내 산화환원 반응에서 이중특이적 항체를 형성하기 위해 조립될 수 있다.

[0427] 일부 구현예에서, 크롭 또는 홀 돌연변이를 함유하는 절반-항체는 동일한 박테리아 숙주 세포, 예를 들어, *이. 콜라이* 숙주 세포 또는 CHO 숙주 세포에서 중쇄 및 경쇄 작제물을 발현시킴으로써 동일한 배양물에서 생성된다. 절반-항체는 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 크롭 및 홀 절반-항체로부터 정화된 세포 추출물은 단백질 A 컬럼에 의해 정제될 수 있다. 상이한 특이성을 갖는 단백질 A 정제된 절반 항체는 환원화 제제의 존재하에 시험관내 산화환원 반응에서 이중특이적 항체를 형성하기 위해 조립될 수 있다.

[0428] 임의의 적합한 방법은 원하는 환원 조건을 만들기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 원하는 환원 조건은 반응 (예컨대 본원에 기술된 조립 혼합물)에 환원제/환원화 제제 부가에 의해 만들어질 수 있다. 적합한 환원제는 제한 없이 디티오프레이톨 (DTT), trisIL1RAPL1포스핀 (TCEP), 티오글리콜 산, 아스코르브산, 티올 아세트산, 글루타티온 (GSH), 베타-머캅토에틸아민, 시스테인/시스틴, GSH/글루타티온 디설파이드 (GSSG), 시스테인/시스틴, 글라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올, 바람직하게는 GSH를 포함한다. 임의의 특정 구현예에서, 환원제는 제한 없이 GSH, 베타-머캅토에틸아민, 시스테인/시스틴, GSH/GSSG, 시스테인/시스틴, 글라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올, 바람직하게는 GSH를 포함하는 약 환원제이다. 특정 바람직한 구현예에서, 환원제는 GSH이다. 특정 구현예에서, 환원제는 DTT가 아니다. 원하는 환원 조건을 반응에서 달성하기 위해 적합한 실험적인 조건하에 및 적합한 농도에서 적합한 환원제를 선택하는 것이 당해 분야의 숙련자의 능력 내이다. 예를 들어, 20 °C에서 10g/ℓ의 이중특이적 항체 단백질 농도를 갖는 용액내 10 mM L-환원된 글루타티온은 약 -400mV의 개시 산화환원 전위를 초래할 것이다. 예를 들어, 조립 혼합물에 부가된 글루타티온은 크롭-인투-홀 이중특이적 조립에 유리한 약 환원 조건을 창출한다. 유사한 부류 예컨대 BMEA (베타-머캅토에틸아민)에서 다른 환원제는 유사한 효과를 가질 수 있다. 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 WO2013/055958를 참조한다. 반응의 환원 조건은 당해 기술에서 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 추정 및 측정될 수 있다. 예를 들어, 환원 조건은 레사주린 인디케이터 (환원 조건에서 청색에서 무색으로 탈색)를 이용하여 측정될 수 있다. 더욱 정확한 측정을 위하여, 산화환원-포텐셜 계량기 (예컨대 BROADLEY JAMES®에 의하여 제조된 ORP 전극)가 사용될 수 있다.

[0429] 임의의 특정 구현예에서, 환원 조건은 약 환원 조건이다. 용어 "약 환원제" 또는 "약 환원 조건"은 본원에서 사

용된 바와 같이 25℃에서 음성 산화 포텐셜을 갖는 환원제에 의해 제조된 환원제 또는 환원 조건을 지칭한다. pH가 7 내지 9이고, 온도가 15℃ 내지 39℃인 경우, 환원제의 산화 포텐셜은 바람직하게는 -50 내지 -600 mV, -100 내지 -600 mV, -200 내지 -600 mV, -100 내지 -500 mV, -150 내지 -300 mV, 더욱 바람직하게는 약 -300 내지 -500 mV, 가장 바람직하게는 약 -400mV이다. 당해 분야의 숙련가는 원하는 환원 조건을 만들기 위하여 적합한 환원제를 선택할 수 있을 것이다. 숙련된 연구자는 강 환원제, 즉, 동일한 농도, pH 및 온도에 대하여 상기 지칭된 환원제보다 더욱 음성 산화 전위를 갖는 것이 더 낮은 농도에서 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 바람직한 구현예에서, 단백질은 상기-인용된 조건하에 항온처리된 경우 환원제의 존재하에 디설파이드 결합을 형성할 수 있을 것이다. 약 환원제의 예는 제한 없이 글루타티온, 베타-머캅토에틸아민, 시스틴/시스테인, GSH/GSSG, 시스테아민/시스타민, 글라이실시스테인, 및 베타-머캅토에탄올을 포함한다. 특정 구현예에서, GSH: 항체의 200X 몰비의 것과 유사한 산화 포텐셜은 다른 환원제를 이용한 효율적인 조립이 예상될 수 있는 약 환원 조건에 대한 참조의 요점으로서 사용될 수 있다.

[0430] 글루타티온 농도는 조립 혼합물에 존재한 절반-항체의 양에 관해 몰농도의 면으로 또는 몰비 또는 몰 과잉의 면으로 발현될 수 있다. 환원제의 표적 몰비 사용은 조립 혼합물에서 단백질 농도에 대해 제어하고; 이는 다양한 단백질 농도의 결과로서 과잉 환원 또는 과소 환원을 예방한다. 임의의 다른 구현예에서, 환원제는 절반 항체의 총량에 관해 2-600X, 2-200X, 2-300X, 2-400X, 2-500X, 2-20X, 2-8X, 20-50X, 50-600X, 50-200X, 또는 100-300X 몰 과량, 바람직하게는 50-400X 또는 50-150X, 더욱 바람직하게는 100-300X, 및 가장 바람직하게는 200X 또는 100X, 몰 과량으로 조립 혼합물에 추가된다. 특정 구현예에서, 조립 혼합물은 7 내지 9, 바람직하게는 pH 8.5 또는 8.3의 pH를 갖는다.

[0431] 또한, 예를 들어, 세포독성제, 예컨대 화학치료제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사콘주게이트)에 콘주게이트된 본원에 기술된 임의의 항체를 포함하는, "면역콘주게이트" ("항체-약물 콘주게이트" 또는 "ADC"와 상호교환가능하게 지칭됨)가 제공된다.

[0432] **항원/표적 분자**

[0433] 본원에 기술된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체에 의하여 표적화될 수 있는 분자의 예시는 비제한적으로 가용성 혈청 단백질 및 이들의 수용체 및 기타 막 결합 단백질(예를 들어, 부착소)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체는, 8MPI, 8MP2, 8MP38 (GDF10), 8MP4, 8MP6, 8MP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 ( $\alpha$ FGF), FGF2 ( $\beta$ FGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFN81, IFNG, IFNWI, FEL1, FEL1 (EPSELON), FEL1 (ZETA), IL 1A, IL 1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL 11, IL 12A, IL 12B, IL 13, IL 14, IL 15, IL 16, IL 17, IL 17B, IL 18, IL 19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL33, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFBb3, LTA (TNF- $\beta$ ), LTB, TNF (TNF- $\alpha$ ), TNFSF4 (OX40 리간드), TNFSF5 (CD40 리간드), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27 리간드), TNFSF8 (CD30 리간드), TNFSF9 (4-1 BB 리간드), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL 11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (렙틴), PTN, 및 THPO로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1개, 2개 또는 2개 초과와 사이토카인, 사이토카인-관련 단백질 및 사이토카인 수용체에 결합할 수 있다.

[0434] 특정 구현예에서, 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체는 CCL1 (1-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (에오타신), CCL 13 (MCP-4), CCL 15 (MIP-1 $\delta$ ), CCL 16 (HCC-4), CCL 17 (TARC), CCL 18 (PARC), CCL 19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL21 (SLC/엑소터스-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 /에오타신-2), CCL25 (TECK), CCL26 (에오타신-3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL 10 (IP 10), CXCL 11 (1-TAC), CXCL 12 (SDF1), CXCL 13, CXCL 14, CXCL 16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL 1 (SCYDI), SCYE1, XCL1 (림포타틴), XCL2 (SCM-1 $\beta$ ), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-IRB IRA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8

(CMKBR8/ TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8R $\alpha$ ), IL8RB (IL8R $\beta$ ), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HDF1, HDF1 $\alpha$ , DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, 및 VHL로 이루어진 군으로부터 선택된 케모카인, 케모카인 수용체, 또는 케모카인-관련 단백질에 결합할 수 있다.

[0435]

특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 표적에 결합할 수 있다: ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; 아그레칸 (Aggrecan); AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPTL; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (아연-a-당단백질); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLRI (MDR15); BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (플렉틴); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CA125; CA15-3; CA19-9; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6/JAB61); CCL1 (1-309); CCL11 (에오타신); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP1 $\delta$ ); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3 $\beta$ ); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ); CCL21 (MTP-2); SLC; 엑소터스-2; CCL22 (MDC/STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/에오타신-2); CCL25 (TECK); CCL26 (에오타신-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-I $\alpha$ ); CCL4 (MDP-I $\beta$ ); CCL5(RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1 / HM145); CCR2 (mcp-IR $\beta$ /RA); CCR3 (CKR/ CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/ DRY6); CCR7 (CKBR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD11a; CD13; CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD22; CD23; CD24; CD28; CD3; CD30; CD31; CD33; CD34; CD35; CD37; CD38; CD39; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD41; CD44; LCA/CD45; CD45RA; CD45RB; CD45RO; CD5; CD52; CD69; CD7; CD71; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CD95/Fas; CD99; CD100; CD106; CDH1 (E-카드헤린); CD9/p24; CDH10; CD11a; CD11c; CD13; CD14; CD19; CD20; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21/WAF1/Cip1); CDKN1B (p27/Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEA; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; 키티나제; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (클라우딘-7); CLN3; CLU (클루스테린); C-MET; CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL 18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA4; CTNNB1 (b-카테닌); CTSB (카텝신 B); CTSD (카텝신 D); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; 사이토케라틴; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFN2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; 에스트로젠 수용체; 프로게스테론 수용체; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 ( $\alpha$ FGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR1; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (엡실론); 피브린; FIL1 (제타); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (피브로넥틴); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRHI; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (Gelsolin); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HOP1; 히스타민 및 히스타민 수용체; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOXI ; HPV 단백질; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN감마; ITGB7; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; 인터류킨 에켄대 IL1-IL36 또는 이들의 수용체 (IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2, IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21 R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL33; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (당단백질 130)을 포함함); P-당단백질; EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 인테그린); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4 인테그린); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; 케라틴; KITLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10;

KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (케라틴 19); KRT2A; KHTHB6 (모발-특이적 유형 H 케라틴); 카파 경쇄; 람다 경쇄; LAMAS; LEP (렘틴); 링고(Lingo)-p75; 링고-트로이(Lingo-Troy); LPS; LTA (TNF-b); LTb; LTb4R (GPR16); LTb4R2; LTBR; LEWIS-xMACMARCKS; MAG 또는 Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; 펠라노솜 단백질; 미드카인; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (메탈로티오넥틴-111); MTSS1; MUC1 (뮤신); MYC; MYO88; NCK2; 뉴로칸; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-링고(Lingo); NgR- Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-트로이(Troy); NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR112; NR113; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZI; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; POGFA; POGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; 포스파칸; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSA; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; p53; RAC2 (p21 Rac2); RAS; Rb; RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (리포필린 B); SCGB2A1 (맘마글로빈2); SCGB2A2 (맘마글로빈 1); SCYE1 (내피 단백질-활성화 사이토카인); S-100 SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERP1NB5 (마스핀); SERPINE1(PAI-1); SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPPI; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCPIO; TOGFI; TEK; TGFA; TGFBI; 막투과성 또는 세포 표면 중앙 특이적 항원 (TAA), 예컨대 USP 7,521, 541에 기술된 TAA;TAU; TGFBI1I; TGFBI2; TGFBI3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; THIL; THBS1 (트롬보스폰딘-1 ); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1 ); TMP3; 조직 인자; TLR1; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TLR10; Tn 항원 TNF; TNF-a; TNFAEP2 (B94 ); TNFAIP3; TNFRSF1IA; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (OX40 리간드); TNFSF5 (CD40 리간드); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (CD27 리간드); TNFSFS (CD30 리간드); TNFSF9 (4-1 BB 리간드); TOLLIP; 톨(Toll)-유사 수용체; TOP2A (토포이소머라제 Ea); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; 유비퀴틴; VEGF; VEGFB; VEGFC; 베르시칸; VHL C5; 비멘틴; VLA-4; XCL1 (림포타틴); XCL2 (SCM-1b); XCRI(GPR5/CCXCRI); YY1; 및 ZFPM2.

[0436] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체용 표적 분자는 CD 단백질, 예를 들어, ErbB 수용체 계열, 예를 들어, EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체의 CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34; CD64, CD200 구성원; 세포 유착 분자, 예를 들어, LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 알파4/베타7 인테그린, 및 이의 알파 또는 베타 하위단위(예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18, 또는 항-CD11b 항체)를 포함하는 알파v/베타3 인테그린; 성장 인자, 예를 들어, VEGF (VEGF-A), FGFR, Ang1, KLB, VEGF-C; 조직 인자 (TF); 알파 인터페론 (알파IFN); TNF알파, 인터류킨, 예를 들어, IL-1 베타, IL-3, IL-4, IL-5, IL-S, IL-9, IL-13, IL 17 AF, IL-1S, IL13; IL-13R 알파1, IL13R 알파2, IL14 IL-4R, IL-5R, IL-9R, IgE; 혈액 그룹 항원; flk2/flt3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; RANKL, RANK, RSV F 단백질, 단백질 C, BR3 등을 포함한다.

[0437] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체를 위한 표적 분자는 하기를 포함한다: 저 밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 (LRP)-1 또는 LRP-8 또는 트랜스페린 수용체, 및 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 표적: 1) 베타-세크레타제 (BACE1 또는 BACE2), 2) 알파-세크레타제, 3) 감마-세크레타제, 4) 타우-세크레타제, 5) 아밀로이드 전구체 단백질 (APP), 6) 사멸 수용체 6 (DR6), 7) 아밀로이드 베타 펩타이드, 8) 알파-시누클레인, 9) 파르킨, 10) 헌팅틴, 11) p75 NTR, 및 12) 카스파제-6.

[0438] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 정제된 다중특이적 항체용 표적 분자는 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 2개의 표적 분자를 포함한다: IL-1 알파 및 IL- 1 베타, IL-12 및 IL-1S; IL-13 및 IL-9; IL-13 및 IL-4; IL-13 및 IL-5; IL-5 및 IL-4; IL-13 및 IL-1베타; IL-13 및 IL- 25; IL-13 및 TARC; IL-13 및 MDC; IL-13 및 MEF; IL-13 및 TGF-; IL-13 및 LHR 효능제; IL-12 및 TWEAK, IL-13 및 CL25; IL-13 및 SPRR2a; IL-13 및 SPRR2b; IL-13 및 ADAMS, IL-13 및 PED2, IL13 및 IL17; IL13 및 IL4; IL13 및 IL33; IL17A 및 IL 17F, CD3 및 CD19, CD138 및 CD20; CD138 및 CD40; CD19 및 CD20; CD20 및 CD3; CD3S 및 CD13S; CD3S 및 CD20; CD3S 및 CD40; CD40 및 CD20; CD-S 및 IL-6; CD20 및 BR3, TNF 알파 및 TGF-베타, TNF 알파 및 IL-1 베타; TNF 알파 및 IL-2; TNF 알파 및 IL-3; TNF 알파 및 IL-4; TNF 알파 및 IL-5; TNF 알파 및 IL6; TNF 알파 및 IL8; TNF 알파 및 IL-9, TNF 알파 및 IL-10, TNF 알파 및 IL-11, TNF 알파 및 IL-12, TNF 알파 및 IL-13, TNF 알파 및 IL-14, TNF 알파 및 IL-15, TNF 알파 및 IL-16, TNF 알파 및 IL-17, TNF 알파 및 IL-18, TNF 알파 및 IL-19, TNF 알파 및 IL-20, TNF 알파 및 IL-23, TNF 알파 및 IFN 알파, TNF 알파 및 CD4, TNF 알파 및



VEGF, TNF 알파 및 MIF, TNF 알파 및 ICAM-1, TNF 알파 및 PGE4, TNF 알파 및 PEG2, TNF 알파 및 순위 리간드, TNF 알파 및 Te38, TNF 알파 및 BAFF, TNF 알파 및 CD22, TNF 알파 및 CTLA-4, TNF 알파 및 GP130, TNF α 및 IL-12p40, FGFR1 및 KLB; VEGF 및 HER2, VEGF-A 및 HER2, VEGF-A 및 PDGF, HER1 및 HER2, VEGFA 및 ANG2, VEGF-A 및 VEGF-C, VEGF-C 및 VEGF-D, HER2 및 DR5, VEGF 및 IL-8, VEGF 및 MET, VEGFR 및 MET 수용체, EGFR 및 MET, VEGFR 및 EGFR, HER2 및 CD64, HER2 및 CD3, HER2 및 CD16, HER2 및 HER3; EGFR (HER1) 및 HER2, EGFR 및 HER3, EGFR 및 HER4, IL-14 및 IL-13, IL-13 및 CD40L, IL4 및 CD40L, TNFR1 및 IL-1 R, TNFR1 및 IL-6R 및 TNFR1 및 IL-18R, EpCAM 및 CD3, MAPG 및 CD28, EGFR 및 CD64, CSPGs 및 RGM A; CTLA-4 및 BTN02; IGF1 및 IGF2; IGF1/2 및 Erb2B; MAG 및 RGM A; NgR 및 RGM A; NogoA 및 RGM A; OMgp 및 RGM A; POL-1 및 CTLA-4; 및 RGM A 및 RGM B.

[0439] 다른 분자에 임의로 콘주게이트된, 가용성 항원 또는 이의 단편은 항체 생성용 면역원으로서 사용될 수 있다. 막투과성 분자, 예컨대 수용체에 대하여, 이들의 단편 (예를 들면 수용체의 세포외 도메인)은 면역원으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 막투과성 분자를 발현한 세포는 면역원으로서 사용될 수 있다. 상기 세포는 천연 공급원 (예를 들면 암 세포주)으로부터 유도될 수 있거나 또는 막투과성 분자를 발현시키기 위해 재조합 기술로 변형된 세포일 수 있다. 항체 제조에 유용한 다른 항원 및 이의 형태는 당해 기술의 숙련가에 명백할 것이다.

#### [0440] 제형 및 제형의 제조 방법

[0441] 본원에 제공된 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체를 포함하는 제형 및 제형의 제조 방법이 또한 본원에 제공된다. 예를 들어, 정제된 폴리펩타이드는 약제학적으로 허용되는 담체와 조합될 수 있다.

[0442] 폴리펩타이드 제형은, 일부 구현예에서, 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 목적 순도를 갖는 폴리펩타이드를 혼합시킴에 의하여 저장을 위하여 제조될 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))(동결건조 제형 또는 수성 용액의 형태로).

[0443] 본원에 사용된 바와 같이, "담체"는 하기를 포함한다: 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제 (이용된 투여량 및 농도에서 이에 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성임). 생리학적으로 허용가능한 담체는, 종종, 수성 pH 완충제이다.

[0444] 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수형체에 비독성이며, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 주기로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 짝이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONIC<sup>TM</sup>, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다.

[0445] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 제형 중 폴리펩타이드는 기능적 활성을 유지한다.

[0446] 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균되어야 한다. 이는 멸균된 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0447] 본원의 제형은 또한 치료되는 특정 명시를 위해 필요한 것으로서 둘 이상의 활성 화합물(바람직하게는 서로에게 부작용을 일으키지 않는 보완적 활성을 갖는 것)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드 이외에, 하나의 제형에 추가의 폴리펩타이드(예를 들어, 항체)를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 조성물은 추가로 화학치료제, 세포독성제, 시토키인, 성장 억제성 제제, 항-호르몬 제제, 및/또는 심장보호제를 포함할 수 있다. 이와 같은 분자는 의도하는 목적에 효과적인 양으로 병용하여 적절히 존재한다.

#### [0448] 제조물품

[0449] 본 명세서에서 기재된 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체 및/또는 본 명세서에서 기재된 방법에 의해 정제된 폴리펩타이드를 포함하는 제형은 제조 물품 내에 함유될 수 있다. 제조 물품은 폴리펩타이드 및/또는 폴리펩타이드 제형을 함유하는 용기를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 제조물품은 하기를 포함한다: (a) 용기 내 본원에 기술된 폴리펩타이드 제형 및/또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 포함하는 용기; 및 (b) 피험체에 상기 제

형을 투여하기 위한 설명서를 갖는 패키지 삽입물.

- [0450] 제조물품은 용기 및 그 용기에 또는 관련된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적절한 용기에는 예로서, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 상기 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 배합물을 보유 또는 함유하고, 멸균된 접근 포트를 가질 수 있다 (예컨대 용기는 피하 주사 니들로 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 폴리펩타이드이다. 표지 또는 포장 삽입물은, 제공되는 폴리펩타이드 및 임의의 다른 약물의 투여 양 및 간격에 관한 구체적인 설명서에 따라 피험체에서의 조성물이 사용된다는 것을 나타낸다. 상기 제조물품은 상업적으로 그리고 사용자 입장에서 목적 기타 재료들, 예를 들면 기타 완충제, 희석제, 여과제, 니들 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 용기는 주사기이다. 일부 구현예에서, 주사기는 주입 장치 내에 추가로 함유된다. 일부 구현예에서, 주사 장치는 자동주사기이다.
- [0451] "포장 삽입물"은 치료 생성물의 상업적 포장에 관례적으로 포함되는 유도사항을 가리키기 위해 사용되는데, 여기에는 명시, 용법, 복용량, 투여, 금기사항, 포장된 생성물과 병용되는 기타 치료 생성물, 및/또는 이와 같은 치료 생성물의 사용과 관련된 경고문 등이 포함된다.
- [0452] 본 명세서에 개시된 모든 특징은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 각 특징은 동일한, 동등한 또는 유사한 목적을 위한 대안적인 특징으로 대체될 수 있다. 따라서, 달리 명확히 지칭되지 않는 한, 개시된 각 특징은 단지 동등하거나 유사한 특징의 일반적인 시리즈의 예이다.
- [0453] 전술한 설명은 당업자가 방법을 실시하고/하거나 본원에 기재된 조성물을 수득할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 간주된다. 하기 실시예 및 상세한 기술은 예시하기 위한 것으로 제공되며, 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0454] 본 명세서의 모든 참조의 개시내용은 본 명세서에 참고로 명확히 편입된다.
- [0455] 서열 목록의 설명
- [0456] 서열 번호 1: 바누시주맵의 <VEGF>의 가변 중쇄 도메인 VH
- [0457] 서열 번호 2: 바누시주맵의 <VEGF>의 가변 경쇄 도메인 VL
- [0458] 서열 번호 3: 바누시주맵의 <ANG-2>의 가변 중쇄 도메인 VH
- [0459] 서열 번호 4: 바누시주맵의 <ANG-2>의 가변 경쇄 도메인 VL
- [0460] 서열 번호 5: RG7716의 <VEGF>의 가변 중쇄 도메인 VH
- [0461] 서열 번호 6: RG7716의 <VEGF>의 가변 경쇄 도메인 VL
- [0462] 서열 번호 7: RG7716의 <ANG-2>의 가변 중쇄 도메인 VH
- [0463] 서열 번호 8: RG7716의 <ANG-2>의 가변 경쇄 도메인 VL
- [0464] 서열 번호 9: 바누시주맵의 <ANG-2>의 중쇄
- [0465] 서열 번호 10: 바누시주맵의 <VEGF>의 중쇄
- [0466] 서열 번호 11: 바누시주맵의 <ANG-2>의 경쇄
- [0467] 서열 번호 12: 바누시주맵의 <VEGF>의 경쇄
- [0468] 서열 번호 13: RG7716의 <VEGF>의 중쇄
- [0469] 서열 번호 14: RG7716의 <ANG-2>의 중쇄
- [0470] 서열 번호 15: RG7716의 <VEGF>의 경쇄
- [0471] 서열 번호 16: RG7716의 <ANG-2>의 경쇄
- [0472] 실시예
- [0473] 실시예는 단지 설명하기 위하여 제공되고, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한할 의도는 아니다. 또한, 본원에 도시되고 설명된 것들 이외에 다양한 변형들이 상기 설명으로부터 당업계의 숙련자들에게 명백하고, 첨부된 청구항의 범위 내에 속할 것이다.

[0474] **실시예 1: 항-X1/항-Y1 이중특이적 항체의 조립 및 정제**

[0475] 표적 단백질 X1 및 Y1에 대한 이중특이적 항체 - 항-X1/항-Y1 이중특이적 항체 또는 aX1/Y1 이중특이적 항체-는 다음과 같이 조립된다. 각각의 절반-항체 [aX1 (크논) 및 aY1 (홀)]을 독립적으로 단백질 A 수지 (MabSelect SuRe, GE Healthcare)를 사용하는 친화성 크로마토그래피 단계에 적용했다. 단백질 A 단계는 유사한 공정 조건을 사용하지만, 상이한 로딩 밀도 표적을 사용하여 각각의 절반-항체에 대해 독립적으로 완료된다. 단백질 A 칼럼을 주위 온도(15 내지 30℃)에서 작동시키고, 로딩물을 12 내지 18℃로 냉각시켰다. 단백질 A 칼럼은 용리 완충제의 3개의 칼럼 용적에 이어, 재생 완충제의 3개의 칼럼 용적을 적용하여 제조했다. 이어서, 칼럼을 평형화시키고, 로딩하고, 3회 세정하고(평형 완충제 세정, 인산칼륨 세정, 평형 완충제 세정), 용리시키고, 로딩 물질을 처리하기 위해 충분한 사이클 동안 재생시켰다. 단백질 A 칼럼으로부터 풀링된 물질은, 필요할 경우, 용리 완충제를 첨가하여 pH 조정하여 pH ≤ 3.60을 달성하고, 최소 120분 동안 유유도켰다. 이 단계 후, 풀링된 물질의 pH는 추가의 처리를 위해 pH 5.0±0.3으로 조정했다.

[0476] 이어서, 단백질 A 크로마토그래피 단계로부터 수득된 절반-항체 풀을 1:1 물 비로 조합하고, pH를 pH 8.2로 조정했다. 200 mM의 L-글루타티온 (91/9% GSH/GSSG) 완충제를 조합된 풀에 첨가하여 형성된 이중특이성 1mol 당 165mol의 L-글루타티온의 비를 달성했다. 물질을 8-24시간 동안 32.0±2.0 ℃로 가열했다. 생성되는 조립된 풀을 15 내지 25℃로 풀링한 다음, pH 5.5로 조정했다.

[0477] pH 조정된 조립된 풀을 이후 결합 및 용리 방식으로 Capto™ MMC 수지를 사용하여 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피에 적용시켰다. 칼럼을 100 mM 아세트산나트륨, pH 5.5로 평형화했다. 조정된 조립 풀을 45g/l 수지로 칼럼 상에 로딩시키고, 그리고 이후 pH 8.0에서 25 mM 아세트산나트륨을 포함하는 50 mM HEPES의 제2 세정 상 및 평형 완충제로 세정하였다. 이중특이적 항체를, pH 8.0에서의 245 mM 아세트산나트륨을 포함하는 50 mM HEPES를 사용하여, 단계적 용리에서의 염 및 pH 둘 모두를 증가시킴으로써 칼럼으로부터 용리하였다. 양이온 교환 풀링을 280 nm에서의 흡광도에 기초하여 개시하고 종결시켰다.

[0478] 이어서, 다중방식 양이온 크로마토그래피 단계로부터의 용리액을 통과 유동 방식으로 Capto™ Adhere 수지를 사용하는 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피에 적용했다. Capto™ Adhere 칼럼을 50 mM Tris, 85 mM 아세트산나트륨, pH 8.0으로 평형화했다. 이전 단계로부터의 생성물 풀을 정제수를 사용하여 전도도 9.0 mS/cm로 조정하고, 칼럼에 로딩시켰다. 이중특이적 항체를 칼럼을 통해 유동시킨 다음, 평형 완충제로 세정했다. 음이온 교환 풀링을 280nm에서의 흡광도에 기초하여 개시하고 종결시켰다. 상기 기술된 정제 전략은 도 1a에 도시된다.

[0479] 제3 크로마토그래피 단계는 DNA, 숙주 세포 단백질, 및 내독소와 같은 잔류 불순물 뿐만 아니라 절반-항체, 동종이량체 및 응집물을 포함하는 생성물-변이체 를 제거했다. Capto™ Adhere 부착물을 20% aY1 동종이량체로 스파이킹한 경우, 크로마토그래피 공정은 aY1 동종이량체를 대략 2배 감소시켰다(MS에 의해 8% 및 생성물-관련 불순물을 검출하기 위한 세포 기반 검정에 의해 10%).

[0480] 기존 양이온 교환 (CEX) 수지 (POROS XS)를 사용한 정제 전략과의 (참고: 도 1b), 도 1a에 도시된 정제 전략의 비교는, 다중방식 수지의 사용이 생성물-관련 변이체, 특히 동종이량체로부터의 이중특이적 항체의 분리를 개선시킨 것으로 나타났다. 따라서, 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 풀링된 물질이 20% 홀 동종이량체로 스파이킹된 경우, 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피는 홀 동종이량체를 질량 분광분석법 (MS)에 의해 2% 미만으로, 생성물-관련 불순물을 위한 세포 기반 검정에 의해 0.5%의 정량 한계 미만으로 감소시켰다.

**표 7**

**숙주 세포 및 생성물-관련 불순물로부터의 항-X1/항-Y1 이중특이적 항체의 분리 (POROS XS 수지, 결합/용리 방식)**

풀	용리 완충제	수율 (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†			
로딩물	--	--	2060	8.8	80.5	6.9	3.8
풀	127 mM NaOAc, pH 6.5	90	654	0.3	90.3	8.0	1.4

[0481]

표 8

숙주 세포- 및 생성물-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분리 (Capto MMC 수지, 결합/용리 방식)

폴	용리 완충제	수율 (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†			
				8.4	89.3	1.4	0.3
로딩물	--	--	4080	8.4	89.3	1.4	0.3
폴	244 mM NaOAc, pH 8.0	80	236	0.9	98.5	0.5	0.1

[0482]

[0483]

CHOP = CHO 세포 단백질; HMWS = 고분자량 중; 150 kD = 이중특이적 및 동종이량체; 75kD = 절반 항체; LMWS = 저분자량 중

[0484]

기존 음이온 교환 (AEX) 수지 (QSFF) (참고: 도 1c)와 다중방식 AEX 수지 (Capto™Adhere) (참고: 도 1a)와의 비교는, 표 9 및 10에서 나타난 바와 같이, 다중방식 AEX 수지가 기존 AEX QSFF 수지에 비해 생성물-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분리가 유의미하게 더욱 양호하다는 것을 예측한다. 절반-항체 (75kD) 및 응집물, 즉 고분자량 중(HMWS)의 제거로 인해, QSFF는 1%만큼 주요 피크를 강화시키고(enriched), Adhere은 주요 피크를 10%만큼 강화시켰다. 동일한 Capto MMC 폴을 사용하여 Capto Adhere 및 QSFF를 직접 비교하면, Capto Adhere 수지가 QSFF와 비교하여 크기-변이체, 절반 항체를 포함하는 생성물 관련된 변이체, 및 숙주-세포 단백질 청소율의 더 나은 청소율을 달성했음을 나타냈다(표 11).

표 9

숙주 세포- 및 생성물-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분리 (QSFF 수지, 통과 유통 방식)

로딩물 pH	로딩물 전도도 (mS/cm)	수율 (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†				항-Y1 (홀-홀) 동종이량체 질량 분광분석 (%)
				0.5	92.5	5.9	1.1	
로딩	--	--	~300	0.5	92.5	5.9	1.1	--
8.0	5.1	93	<15	0.6	93.5	4.4	1.5	3
8.0	9.0	97	<9.8	0.6	92.4	5.3	1.7	3

[0485]

[0486]

CHOP = CHO 세포 단백질; HMWS = 고분자량 중; 150 kD = 이중특이적 동종이량체; 75kD = 절반 항체; LMWS = 저분자량 중



표 10

숙주 세포- 및 생성물-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분리  
(Capto™Adhere 수지, 통과 유동 방식)

칼럼 구동	로딩물 pH	로딩물 전도도 (mS/cm)	총 단백질 수율 (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD	홀-홀 동종이량체 질량 분광분석 (%)
1	로딩물	8.0	9.0	-	276	0.5	1.6
	풀	--	--	85	1.5	0.2	0.0
2	로딩물	8.5	9.0	--	276	0.3	1.5
	풀	--	--	76	2.0	0.1	1.4

[0487]

[0488] CHOP = CHO 세포 단백질; HMWS = 고분자량 중; 75kD = 절반 항체; LOQ = 정량화의 한계

표 11

Capto Adhere 및 QSFF의 비교

	로딩물 pH	로딩물 전도도 (mS/cm)	총 단백질 수율 (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD
로딩물	--	--	-	32	1.1	1.3
Capto Adhere 풀	8.0	9.0	91	0.9	0.55	0.48
QSFF 풀	8.0	9.0	100	< 8.5	1.4	1.4

[0489]

[0490] CHOP = CHO 세포 단백질; HMWS = 고분자량 중; 75kD = 절반 항체; LOQ = 정량화의 한계

[0491] 상기 기술된 실험은, 도 1a에 도시된 정제 전략이, 도 1b 또는 도 1c에서의 정제 전략에 비해, 생성물-관련 불순물로부터의 aX1/Y1 이중특이적 항체의 분리가 유의미하게 더욱 양호하다는 점을 예증하였다. 우선, 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 풀링된 물질이 20% 홀 동종이량체로 스파이킹된 경우, Capto MMC (즉, 다중방식 양이온 교환 수지)는 홀 동종이량체를 질량 분광분석법 (MS)에 의해 2% 미만으로, 생성물-관련 불순물을 위한 세포 기반 검정에 의해 0.5%의 정량 한계 미만으로 감소시켰다. (표 7 및 8 참조). 이러한 분리는 POROS XS, 즉, 전통적 양이온 교환 수지를 사용하여 달성되지 않았다. 추가로, CaptoAdhere (즉, 다중방식 음이온 교환 수지)는, 고분자량 중, 예컨대 절반-항체 (75 kD) 및 응집물의 제거로 인하여 주요 피크로 10% 강화되었고, 한편 QSFF (즉, 기존 음이온 교환 수지)는 주요 피크로 단지 1% 강화되었다. 또한, 2개의 다중방식 수지인 다중방식 양이온 수지 (CaptoMMC) 이후 다중방식 음이온 수지 CaptoAdhere의 조합은 다중방식 양이온 수지 이후 전통적 음이온 교환 수지 QSFF의 조합과 비교하여 크기-변이체, 절반 항체를 포함하는 생성물 관련 변이체, 및 숙주-세포 단백질 청소율에서 더 나은 청소율을 달성했다(참조: 예를 들어, 표 11).

[0492] 생성물-관련된 변이체 및 크기 변이체의 제거에서 유사한 개선은 다중방식 수지의 순서가 역전될 때 발견되었다: 별개의 실험에서, 생성물-관련 불순물로부터 aX1/Y1 이중특이적 항체의 더 나은 분리는 또한 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 풀링된 물질을 먼저 다중방식 음이온 수지에 이어 다중방식 양이온 수지에 적용함으로써 달성되었다.

[0493] 실시예 2:  $F(ab')_2$  이중특이적 항체의 조립 및 정제

- [0494] 90% 순도의  $F(ab')_2$  이중특이적 항체를 달성하기 위한 초기 시도는 저수율 (10% 미만 출발 물질)을 초래했다. 순도의 손실 없이 허용되는 수율을 유지하는 문제에 추가하는 것은 공정 중간체의 불안정성 및 생성물-관련 불순물, 예를 들어, 동종이량체, 유리 경쇄 및 중쇄, 및 미반응  $Fab'$  이탈기의 존재를 포함하는 몇 가지 과제였다. 신규한 단위 조작은 목적하는 이중특이적  $F(ab')_2$ 의 효과적인 조립 및 정제를 달성하기 위해 개발되었다. 2개의 상이한  $Fab'$  분자를 포함하는 이중특이적  $F(ab')_2$ 는 도 2에 제공된 도식에 묘사된 바와 같이 조립되고 정제되었다.
- [0495] 먼저, 포획 단계는 아래와 같이 시행되었다. 각각의  $Fab'$ 는 별개의 이. 콜라이 추출물 상청액으로부터 먼저 포획되었다. 2개의  $Fab'$  절반-분자 중 하나를 함유하는 상청액을 CaptoL 단백질 L 친화성 크로마토그래피 수지를 사용하는 포획 단계에 적용했다. 칼럼은 25mM Tris 염화나트륨 평형 완충제 (pH 7.7)을 사용하여 평형화한다. 칼럼으로의 로딩 물질의 적용 후, 칼럼을 평형 완충제 (pH 7.7)로 세정하고, 이후 0.4M 인산칼륨 (pH 7)으로 세정하고, 시스테인 캡을 제거하는 환원제로 세정하고, 그리고 평형 완충제 (pH 7.7)로 추가 세정하였다. 이어서, 관심  $Fab'$  생성물은 0.1M 아세트산 pH 2.9의 용리 완충제를 사용하여 CaptoL 칼럼으로부터 용리시켰다. 생성물은 280nm에서 흡광도를 사용하여 수집했다.
- [0496] 제1  $Fab'$  절반-분자 ( $Fab' A$ )를 함유하는 Capto L 크로마토그래피 단계로부터의 풀을 pH 5.5로 조정했다. DPDS (디피리딜 디설파이드)를 pH 5.5로 조정된 CaptoL 풀에 첨가했다. DPDS는  $Fab'$  분자 중 유리 힌지 시스테인과 반응하여 이용가능한  $Fab'$  유리 티올과 반응하는  $F(ab')_2$  이중이량체의 형성을 촉진시키는 피리딜화  $Fab'$ 를 형성한다. 일단 형성되면, 피리딜화  $Fab' A$ 를 정제용 제2 크로마토그래피 칼럼에 로딩했다.
- [0497] 피리딜화  $Fab'$ 가 불순물(즉,  $Fab'$  동종이량체, 고분자량 중 (HMWS),  $Fab'$  모노머)로부터 분리될 수 있는 크로마토그래피 조건을 식별하기 위해, Capto MMC 수지 상의  $Fab'$  동종이량체, 고분자량 중 (HMWS),  $Fab'$  모노머, 및 피리딜화  $Fab'$ (pyr- $Fab'$ )의 결합 거동을 크로마토그래피 수지 결합 조건의 96-점 분배 계수 스크린으로 특성화했다. 피리딜화  $Fab'$  풀을 Capto<sup>TM</sup> MMC 수지에 로딩했다.  $Fab'$  모노머는 pyr- $Fab'$ 의 구배에서 일찍 용리되는 것으로 예측된 반면에, HMWS 및  $Fab'$  동종이량체는 구배에서 나중에 용리될 것으로 예측되었다. 제2  $Fab'$  분자인  $Fab' B$ 는 CaptoL 크로마토그래피 수지로부터 용리된 다음 산화되었다.
- [0498] 이후, 피리딜화  $Fab' A$  및 산화된  $Fab' B$ 를 함유하는 2개의  $Fab'$  풀을  $F(ab')_2$  이중특이적 분자의 조립에 적합한 조건에 적용했다. 피리딜화  $Fab' A$  및 산화된  $Fab' B$  CaptoL 풀을 조합했다. 조합된 풀을 최소 조립시간 동안 유유도켜  $F(ab')_2$  이중특이체의 형성을 가능하게 했다. 이어서, 조립 풀을 다음 크로마토그래피 칼럼으로 로딩하기 위해 컨디셔닝했다.
- [0499] 저-해상도  $K_p$  (즉, 분배 계수) 스크린을 수행하여 상이한 크로마토그래피 수지 상의  $F(ab')_2$  조립 혼합물의 결합 거동을 특성화하였다. 조립 혼합물 (0% 응집물, 21.5%  $Fab' A$  동종이량체, 43.9%  $F(ab')_2$ , 10.3%  $Fab' A$  모노머, 8.8% 피리딜화  $Fab' A$ , 및 15.5%  $Fab' B$  모노머, SEC-IL1RAPL1에 의해 측정됨)을 5g/ℓ 수지 로딩 밀도로 하기 수지에 로딩하여 시험했다: Capto<sup>TM</sup> MMC 수지, Capto<sup>TM</sup> Adhere 수지, QSFF 수지, 또는 POROS® 50HS 수지. 각각의 통과 유동 플레이트의 단백질 조성 및 단백질 농도는 SEC-IL1RAPL1를 통해 분석했다. 이들 데이터는 디콘볼루션(deconvolution)되고, 시험 조건하에 4개의 수지 각각에서  $F(ab')_2$ ,  $Fab' A$  동종이량체,  $Fab' B$  동종이량체,  $Fab' A$  모노머, 및  $Fab' B$  모노머의 거동에 상응하는 등고선 플롯을 생성하기 위해 사용했다.
- [0500] 등고선 플롯에 기초하여, Capto<sup>TM</sup> Adhere은  $Fab' A$  모노머,  $Fab' A$  동종이량체, 및  $Fab' B$  동종이량체를 분해할 것으로 예측되었다. 구체적으로, Capto<sup>TM</sup> Adhere 수지에 대한 결합 및 pH-구배 용리에서,  $Fab' A$  모노머 및  $Fab' B$  동종이량체는  $F(ab')_2$  주요 피크 이전에 용리될 것으로 예측되며, 한편  $Fab' A$  동종이량체는 수지에 결합되어 유지될 것으로 예측된다. QSFF의 등고선 플롯은 시험한 pH 범위에 대해 어떠한 중도 QSFF 수지에 결합할 것으로 예측되지 않아 생성물 관련 불순물로부터  $F(ab')_2$ 의 분리가 QSFF 크로마토그래피를 통해 달성되지 않을 것임을 나타낸다는 것으로 보여주었다. 혼합 방식 수지는 실험 조건하에 생성물 관련 불순물로부터  $F(ab')_2$ 의 최상의 분리를 제공했다. Capto<sup>TM</sup> MMC 등고선 플롯은 Capto<sup>TM</sup> MMC가 pH 5.5에서  $F(ab')_2$ 를 이의 생성물-특이적 불순물로부터 효과적으로 분리할 것으로 예측되었음을 나타냈었다.
- [0501]  $F(ab')_2$  이중특이적의 조립 후, 조립 풀을 CaptoAdhere 수지를 사용하여 다중방식 AEX 크로마토그래피에 적용했다. 조립 풀은 pH 7.5까지 적정되고, 그리고 5.5 mS/cm 이하( $\leq$ )의 전도도까지 희석된다. 칼럼을 25mM 아세트산

나트륨 50mM Tris pH 7.5 평형 완충제로 평형화하였다. 조립 풀을 로딩 밀도 25g/ℓ 수지로 칼럼에 로딩한다. 칼럼을 이후 평형 완충제로 세정한다. 칼럼은 25mM 아세트산나트륨 45mM MES 5mM Tris pH 5.5 용리 완충제를 사용하여 용리시키고, 용리 풀은 A<sub>280</sub> 흡광도에 의해 풀링한다.

[0502] IL1RAPL1물질을 결합 및 용리 방식으로 작동된 Poros 50 HS 수지에 로딩한다. Poros 50 HS 칼럼은 52mM 아세트산나트륨 pH 4.9로 평형화한다. 로딩물을 pH 5 및 전도도 ≤3.3 mS/cm로 컨디셔닝한다. 칼럼은 평형 완충제로 세정한다. 이어서, 칼럼을 169 mM 아세트산나트륨 pH 4.9로 세정한다. 칼럼을 247 mM 아세트산나트륨 pH 4.9 용리 완충제를 사용한 단계적 용리를 사용하여 용리하였다. 풀은 A<sub>280</sub>으로 수집한다.

[0503] 이어서, POROS 50 HS 단계로부터의 풀을 CaptoMMC 수지를 사용하여 다중방식 CEX 크로마토그래피에 적용한다. 다중방식 CEX 단계는 결합 및 용리 방식으로 작동된다. 칼럼은 50 mM 아세트산나트륨 pH 5.5 평형 완충제를 사용하여 평형화한다. 로딩물 pH 5.0 및 5 mS/cm 이하(≤)의 전도도로 조정하고, 그리고 15g/ℓ의 로딩 밀도로 칼럼 상에서 로딩하였다. 칼럼은 평형 완충제로 세정한다. 칼럼을 이후 140mM 아세트산나트륨 pH 5.5 세정 2 완충제로 세정하였다. 칼럼을 평형 완충제 및 350mM 아세트산나트륨 pH 5.5 용리 완충제를 사용한 구배 용리를 사용하여 용리하였다. 풀은 A<sub>280</sub>으로 수집한다.

[0504] 표 12에 나타난 바와 같이, POROS®HS 수지를 사용하는 경우와 비교하여 Capto™ MMC 수지를 사용하는 경우 이. 콜라이 단백질로부터 목적하는(100 kD)의 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 생성물 및 71kD 형성오류(misformed) 디설파이드 생성물 관련된 변이체의 개선된 분리가 달성되었다. SEC에 의해 측정된 95% 초과 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적의 순도는 제4 칼럼으로서 CaptoMMC를 사용하여 달성되었다. 5% 미만의 71kD 형성오류 디설파이드 생성물 관련된 변이체도 또한 제4 칼럼으로서 CaptoMMC를 사용하여 달성되었다.

표 12

숙주 세포 및 생성물-관련 불순물로부터의 F(ab')<sub>2</sub>의 분리 (POROS® HS 수지, 결합 및 용리 방식 대 Capto™MMC, 결합 및 용리 방식)

풀	수율 (%)	%F(ab') <sub>2</sub> (SEC)	% 100 kD 종	% 71 kD 종	ECP (ppm)
로딩 물질 (Capto Adhere 풀)	--	72.7	66.6	4.7	547
Poros® 풀 (제4 칼럼)	72	93.9	90.1	5.2	42
Capto™ MMC 풀 (제4 칼럼)	60	96.0	93.1	4.5	21

[0505]

[0506] % F(ab')<sub>2</sub> = SEC에 의해 측정된 이중특이체(%); 100 kD = CE-SDS에 의해 측정된 관심 있는 F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 생성물; 71 kD = CE-SDS에 의해 측정된 형성 오류 디설파이드를 갖는 생성물 관련된 변이체; ECP = 이. 콜라이 단백질

[0507] 따라서, 하기에 도시된 정제 전략: 도 2는, 로딩 물질과 비교하여, 정제된 F(ab')<sub>2</sub> 풀 내 숙주 세포 단백질의 양을 99% 초과로 감소시키고, 그리고 순수 F(ab')<sub>2</sub>의 수율을 유의미하게 개선시켰다.

[0508] 실시예 3: 항-X2/항-Y2 이중특이적 항체의 조립 및 정제

[0509] 또 다른 예에서, 이중특이적 항체는 아래와 같이 정제했다. 각각의 절반 항체는 별도로 생산되어 친화성 크로마토그래피에 적용한 다음, 본원에 기재된 바와 같이 조립하였다. 조립 후, 조립 물질을 결합 및 용리 방식으로 Capto™ Adhere 수지를 사용하여 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피에 적용했다. 조립 물질을 pH 7.5로 조정하고, 150 mM 아세테이트/Tris 완충제, pH 7.5로 사전 평형화된 칼럼에 로딩했다. 로딩 후, 칼럼은 평형 완충제로 세정하고, 결합된 단백질은 25mM 아세테이트, pH 5.0으로 용리시켰다. 용리 풀의 수집은 A<sub>280nm</sub> 신호에 기초하여 유발시켰다. Capto™ Adhere 용리 풀을 이후 결합 및 용리 방식으로 Capto™ MMC 수지를 사용하여 다중방식

양이온 교환 크로마토그래피에 적용시켰다. Capto Adhere 용리 풀은 pH 6.5로 조정하고, 25mM 아세테이트, 25mM MES pH 6.5 완충제로 사전 평형화된 Capto MMC 칼럼에 로딩했다. 로딩 후, Capto™ MMC 칼럼을 평형 완충제로 세정하고, 결합된 단백질을 150mM Na-아세테이트, 25mM MES pH 6.5로 용리시켰다. Capto™ MMC 용리 완충제. Pool 수집은 A<sub>280nm</sub> 신호에 기초했다. 이러한 정제 전략은 도 3a에 도시된다.

하기 표 13 및 14에서 도시된 바와 같이, 공정-특이적 불순물 예컨대 이. 콜라이 단백질 및 샤페론 (예컨대, fkpA, dsbA, 및 dsbC)로부터의 이중특이적 항체의 보다 많은 분리는, Capto™ Adhere 크로마토그래피가 Capto™ MMC 크로마토그래피 (참고: 도 3a), Capto™ Adhere 크로마토그래피 이후 QSFF 크로마토그래피와 비교하여 (참고: 도 3b) 이후 수행될 경우 달성되었다. 또한, Capto™ Adhere 크로마토그래피에 Capto™ MMC 크로마토그래피가 이어질 경우, Capto™ Adhere 크로마토그래피 이후 QSFF 크로마토그래피와 비교하여 (참고: 도 3b), 초고분자량 중 (vHMWS), 고분자량 중 (HMWS), 및 저분자량 중 (LMWS)과 같은 생성물-특이적 불순물로부터 이중특이적 항체의 더 큰 분리가 달성되었다 (참고: 도 3a). 표 13 및 14 참조.

표 13

항-X2/Y2 공정에서의 Capto™ Adhere-QSFF 단계로 달성된 공정 및 생성물-특이적 불순물의 청소율

단계	수준 (ppm)				수준 (%)			
	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	주요	LMWS
항-X2 MSS	6872	3983	38	80	0.1	4.1	NA	NA
항-Y2 MSS	7640	2660	46	120	0.5	11.5	NA	NA
조립체	3441	1841	31	94	3.4	11.0	82	0.5
Capto™ Adhere	118	1689	5	35	1.6	5.8	95	0.0
QSFF	72	520	3	31	0.0	1.4	98	0.1

표 14

항-X2/Y2 공정에서의 Capto™ Adhere-Capto™MMC 단계로 달성된 공정 및 생성물-관련된 불순물의 청소율

단계	수준 (ppm)				수준 (%)			
	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	주요	LMWS
항-X2 MSS	27090.5	3124	17	59	0.35	5.6	NA	NA
항-Y2 MSS	5113.5	2632	23	79	3	11.6	NA	NA
조립체	1566	1782	18	39	6.1	8.2	83.7	2.1
Capto™ Adhere	49.5	1387	5	107	1.45	2.1	95.8	0.6
Capto™ MMC	15	96	1	2	0.15	0.25	99.55	0

상기 기술된 실험은 하기를 예증한다: 도 3a에 도시된 정제 전략 (즉, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피가 수행됨)은 도 3b에 도시된 정제 전략 (즉, 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 이후 기존 양이온 교환 크로마토그래피가 수행됨)과 비교하여 공정 및 생성물 관련 불순물로부터의 항-X2Y2 이중특이적 항체의 개선된 분리를 달성하였다. 추가적으로, 도 3a에 도시된 정제 전략은 또한 도 3b에 도시된 정제 전략과 비교하여 항-X2Y2 이중특이적 항체의 개선된 수율을 달성하였다.



[0514] **실시예 4: 항-X3/항-Y3 이중특이적 항체의 조립 및 정제**

[0515] 항-X3 크롭 절반 항체는 단백질 A 칼럼 상에서 포착되었다. 칼럼을 25mM Tris 25mM 염화나트륨 pH 7.7 평형 완충제를 사용하여 먼저 평형화하였다. 이어서, 항-X3 절반 항체를 함유하는 *이. 콜라이* 추출물 상청액을 칼럼에 로딩했다. 추출물 상청액의 로딩 후, 칼럼을 평형 완충제에 이어서, 0.4M 인산칼륨 pH 7 세정 완충제로 세정한 다음, 평형 완충제로 세정했다. 이어서, 항-X3 절반 항체는 0.15M 아세트산 pH 2.9 용리 완충제를 사용하여 용리시켰다. 용리 풀을 A<sub>280</sub>에 의하여 수집하였다. 용리 풀을 pH 5.0으로 적정한 다음, 항-Y3 홀 절반 항체와 조합할 때까지 저장했다. 항-Y3 홀 절반 항체는 항-X3 절반 항체에 대해 기재된 동일한 단백질 A 공정을 사용하여 포획했다.

[0516] 2개의 절반 항체는 1:1 질량비로 조합했다. 아르기닌을 조립 풀에 최종 농도 50mM으로 첨가한다. 조합된 절반 항체의 풀은 200mM 히스티딘, 8% PVP pH 8을 사용하여 1:1 희석했다. L-감소된 글루타티온을 200×의 몰 과량 (200mol 글루타티온/이중특이적 항체의 mol)으로 첨가하여 2개의 절반 항체를 조립했다. 조립 풀을 pH 8.0으로 적정한 다음, 6시간 동안 35℃로 가열했다. 이어서, 풀을 실온으로 냉각시키고, 다음 크로마토그래피 칼럼에 로딩하기 위해 조정했다.

[0517] 조립 풀을 QSFF 음이온 교환 칼럼에 로딩했다. 칼럼을 먼저 25mM Tris 350mM 염화나트륨 (pH 9.1)로, 이후 25mM Tris 70mM 염화나트륨 pH 9.1 평형 완충제로 사전-평형화하였다. 이어서, 조정된 로딩물을 pH 8.5 전도도 4.9 mS/cm 이하(≤)에서 칼럼에 적용했다. 칼럼을 이후 평형 완충제로 세정하였다. 이어서, 풀은 평형 완충제 및 25mM Tris 350mM 염화나트륨 용리 완충제를 사용하여 용리시켰다. 용리 풀을 A<sub>280</sub>에 의하여 수집하였다.

[0518] 이어서, QSFF 풀을 조정하여 다음 칼럼에 로딩했다. CaptoAdhere 다중방식 음이온 교환 칼럼은 500mM 아세트산 나트륨 pH 6.0 사전-평형 완충제로 사전 평형화한 후, 50mM 아세트산나트륨 pH 6.0 평형 완충제의 8개 칼럼 용적으로 평형화했다. pH 6.0에서의 전도도 12 mS/cm 이하(≤)의 조정된 하중을 칼럼에 적용하였다. 이어서, 칼럼을 평형 완충제에 이어, 0.1M 아르기닌 pH 7.0 전도도 7.5 mS/cm 세정 완충제로 세정한 다음, 평형 완충제로 세정했다. 칼럼을 이후 50mM 아세트산나트륨 pH 5.0 용리 완충제를 사용한 구매 용리를 사용하여 용리하였다. 용리 풀을 A<sub>280</sub>에 의하여 수집하였다.

[0519] 이어서, CaptoAdhere 풀을 조정하여 다음 칼럼에 로딩했다. CaptoMMC 다중방식 양이온 교환 칼럼은 350mM 아세트산나트륨 pH 6.0 사전-평형 완충제로 사전 평형화한 후, 50mM 아세트산나트륨 pH 6.0 평형 완충제로 평형화했다. pH 6.0에서의 전도도 6.5 mS/cm 이하(≤)의 조정된 하중을 칼럼에 적용하였다. 칼럼을 이후 80mM 아세트산나트륨 pH 6.0 세정 완충제로 세정하였다. 칼럼을 이후 350 mM 아세트산나트륨 pH 6.0 용리 완충제를 사용한 구매 용리를 사용하여 용리하였다. 용리 풀을 A<sub>280</sub>에 의하여 수집하였다. 이러한 정제 전략은 도 4에 도시된다.

[0520] 표 15에 나타난 바와 같이, 단지 하나의 다중방식 칼럼을 포함하는 3개-칼럼 공정(즉, 단백질 A, 이어서 QSFF, 이어서 Capto™ Adhere)은 충분한 ECP 제거를 달성하지 않았다. Capto™ Adhere 크로마토그래피의 용리액을 Capto™ MMC 크로마토그래피를 사용하는 제4 크로마토그래피 칼럼에 적용하면 *이. 콜라이* 단백질의 수준을 Capto™ Adhere 풀에 비해 3배 초과 감소시키고, HMWS를 1% 미만으로 낮추고, 이중특이적 함량을 100%로 증가시켰다.

표 15

단계	수율(%)	HMWS(%)	이중특이적(%)	ECP (ng/mg)
항-X3 MSS	101	4	-	1513
항-Y3 MSS	89	6	-	1864
조립체	100	11.4	88	2022
QSFF	65	1.6	96	597
CaptoAdhere	89	1.3	98	297
CaptoMMC	76	0.7	100	86

[0521]

- [0522] HMWS = SEC에 의해 측정된 고분자량 중; **이중특이적(%)** = 역상 IL1RAPL1에 의해 측정된 이중특이적 항체의%; ECP = 이. 콜리 숙주 세포 단백질
- [0523] **실시예 5: 실시예 6 및 7에 대한 물질 및 방법**
- [0524] **항체**
- [0525] 실시예 6-7은 하기를 포함하는 다양한 예시적 항체를 사용한다: WO 2011/117329에 기술된 바와 같은, Ang2 및 VEGF-A에 결합하는 이중특이적 항체 (항-Ang2/VEGF-A 항체; 바누시주맙; RG7221), 또는 서열 번호 1 내지 서열 번호 4, 또는 WO 2014/009465에 기술된 바와 같은, VEGF-A 및 Ang2 (항-VEGF-A/Ang2 항체; RG7716)에 대한 이중특이적 항체, 또는 서열 번호 5 내지 서열 번호 8. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 다수의 항체가 또한 본원에 포함된다.
- [0526] 본원에 기술 또는 참조된 기술 및 절차는, 본 분야의 숙련가에 의하여 기존의 방법, 예컨대 예를 들어, 하기 기술된 널리 이용되는 방법들을 사용하여 잘 이해되고, 통상적으로 채용될 것이다: Sambrook 외, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, 외 eds., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 외, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); 및 The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).
- [0527] **SE (크기 배제) IL1RAPL1에 의한 순도**
- [0528] SE IL1RAPL1는 항체 응집물, 모노머 및 단편을 분리하기 위해 SE IL1RAPL1 칼럼을 사용하여 천연 조건하에 크기 이질성을 모니터링하는 데 사용된다. 용리액은 UV 흡광도로 모니터링된다. 순도는, 검출된 모든 단백질 피크와 비교하여, 백분율 (영역) 주요 피크, HMWS 형태의 총합, 및 LMWS 형태의 총합으로서 계측된다.
- [0529] **IE (이온 교환) IL1RAPL1에 의한 순도**
- [0530] 구배 이온 교환 크로마토그래피는 샘플을 주요 피크, 산성 영역 및 염기성 영역으로 분리하기 위해 양이온 교환 칼럼을 사용함으로써 카복시펩티다아제 B로 처리된 샘플의 전하 불균질성을 정량적으로 모니터링하는데 사용된다. 검출은 UV 흡광도에 의해 수행된다. 순도는 검출된 모든 단백질 피크의 합계에 대한 주요 피크, 산성 영역 및 염기성 영역의 백분율 (면적)로 계측된다.
- [0531] **CE-SDS (캘리퍼스)에 의한 순도**
- [0532] 단백질의 전기영동 분리를 위한 종래의 SDS-PAGE 방법은, 캘리퍼스 GXII/LabChip GX 검정 시스템 (Caliper LifeScience, Inc./Perkin Elmer)에서 칩 포맷으로 전환되었다. 단백질은 그들의 각각의 크기에 의해 분리된다. 샘플은 제조업자의 지침에 따라 검출 및 분석될 수 있는 형광 염료로 표지함으로써 분리 전에 제조된다.
- [0533] 순도 및 항체 완전성은 미세유체 Labchip 기술 (Caliper Life Science, USA)을 사용하는 CE-SDS에 의한 각 정제 단계 후 분석되었다. 따라서, 분석물 용액을 제조하고, HT 단백질 발현 칩을 사용하여 LabChip GXII 시스템 상에서 분석했다. 데이터는 LabChip GX 소프트웨어를 사용하여 분석했다.
- [0534] **UV에 의한 단백질의 함량**
- [0535] 샘플의 단백질 농도는 UV에 의하여 계측된다. 단백질 흡수는 280nm에서의 흡수값으로부터 320nm에서의 흡수값을 빼서 보정한다. 이 흡광도 값은 단백질 농도에 직접 비례한다. 단백질 농도는  $1.5\text{ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 흡광 계수를 사용하여 계산된다.

- [0536] **숙주 세포 단백질 (HCP) 및 DNA 함량의 검출 방법**
- [0537] **a) CHO HCP 검정**
- [0538] 공정 샘플 중의 잔류 CHO HCP 함량은 cobas e 411 면역검정 분석기 (Roche Diagnostics GmbH, 독일 맨하임 소재) 상의 전기화학발광 면역검정 (ECLIA)에 의해 측정된다.
- [0539] 검정은 양의 다클론성 항-CHO HCP 항체를 사용하는 샌드위치 원리에 기초한다.
- [0540] 제1 배양: (순수한 및/또는 희석된) 15 $\mu$ l 샘플 및 비오틴 결합된 다클론성 CHO HCP 특이적 항체 유래의 차이니즈 햄스터 난소 숙주 세포 단백질 (CHO HCP)은 샌드위치 복합체를 형성하고, 이는 비오틴과 스트렙타비딘의 상호작용을 통해 스트렙타비딘 코팅된 미립자에 결합하게 된다.
- [0541] 제2 배양: 루테늄 복합체 [Tris(2,2'-바이피리딜)루테늄(II)-복합체]로 표지된 다클론성 CHO HCP-특이적 항체를 첨가한 후, 3원 샌드위치 복합체가 미립자 상에 형성된다.
- [0542] 반응 혼합물은 미립자가 전극의 표면에 자기적으로 포획되는 측정 셀 내로 흡인된다. 이어서, 결합되지 않은 물질은 세정 단계에서 제거된다. 이어서, 전극에 전압을 인가하면 광전자 증배관으로 측정되는 화학발광 방출을 유도한다.
- [0543] 시험 샘플 중 CHO HCP의 농도는 공지된 농도의 CHO HCP 표준 곡선으로부터 최종적으로 계산된다.
- [0544] **b) DNA 함량**
- [0545] q PCR 기반 검정은 CHO DNA의 검출 및 정량화용으로 사용된다. 샘플로부터 DNA는 실리카 겔 기반 막을 사용하는 상업적 RNA 추출 키트를 사용하여 추출된다. 추출된 DNA는 PCR 프라이머 및 서열 검출 시스템을 갖는 탐침을 사용하여 정량적 실시간 PCR에 적용한다. 앰플리콘 (증폭된 생성물)은 DNA 증폭 동안 연속적으로 측정된 형광 방출의 증가에 직접 비례하여 정량화된다. 표준 곡선은 샘플 중 CHO 세포 DNA의 양을 정량화하는 데 사용된다.
- [0546] **실시예 6: Ang2 및 VEGF-A (WO 2011/117329에 기재된 항-Ang2/항-VEGF-A 항체)에 결합하는 이중특이적 항체의 정제**
- [0547] CHO 발현 배양물로부터 수거된 세포 배양액 (HCCF)은 결합-용리 방식으로 MabSelect SuRe 친화성 크로마토그래피로 적용했다. HCCF를 최대 로딩 밀도 38 g<sub>mAb</sub>/ℓ<sub>수지</sub>로 칼럼에 로딩한 후, 칼럼을 5개의 칼럼 용적에 대해 25 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.2로 세정했다. 이어서, 5개의 칼럼 용적에 대해 0.7 M Tris/HCl, pH 7.2에 의한 추가의 세정을 수행했다. 제3 세정 단계는 고도로 정제된 물 또는 10 mM Tris/HCl pH 7.5를 사용하여 수행했다. 칼럼-결합된 항체는 50 mM 아세트산, pH 3.4를 사용하여 용리시켰다. 용리 풀을 최대 3개 칼럼 용적에 걸쳐 500 내지 250 mAU의 OD<sub>280</sub> (경로 길이 1cm)을 기준으로 하여 수집하였다.
- [0548] 친화도 용리 풀을 아세트산을 사용하여 pH 3.5로 조정하고, 30분 동안 유유도켰다. 이어서, 풀을 1.5 M Tris 염기를 사용하여 pH 5.0로 컨디셔닝하고, 침출 여과에 의해 제거했다. 침출 여과 풀을 1.5 M Tris 염기를 사용하여 pH 7로 컨디셔닝하고, 다중방식 음이온 교환 수지 Capto adhere ImpRes를 사용하는 제2 크로마토그래피 단계용 공급 원료로서 작용했다.
- [0549] Capto adhere ImpRes 칼럼을 50 mM Tris/아세트산, pH 7.0으로 평형화했다. 평형화 칼럼을 최대 로딩 밀도 180 g<sub>mAb</sub>/ℓ<sub>수지</sub>로 로딩하고, 20 mM Tris 아세트산, pH 7.0로 세정했다. 용리 풀을 1000 내지 4000 mAU (경로 길이 1cm)의 OD<sub>280</sub>에 기초하여 수집했다.
- [0550] 제2 크로마토그래피 단계의 풀을 아세트산을 사용하여 pH 5.0으로 컨디셔닝하고, 다중방식 양이온 교환 수지 Capto MMC ImpRes를 사용하는 최종 제3 크로마토그래피 단계용 공급 원료로서 작용했다. 제3 크로마토그래피 단계는 결합-및-용리 방식으로 수행했다. Capto MMC ImpRes 칼럼을 30mM Tris/아세트산 pH 5.0 (평형 완충제)으로 평형화했다. 평형화 칼럼을 최대 로딩 밀도 45 g<sub>mAb</sub>/ℓ<sub>수지</sub>로 로딩하고, 5개 칼럼 용적에 대해 평형 완충제로 세정했다. 제2 세정은 10개 칼럼 용적에 대해 30mM Tris/아세트산 pH 6.8을 사용하고, 이어서 5개 칼럼 용적에 대해 평형 완충제에 의해 수행하였다. 최종 세정 단계는 10개 칼럼 용적에 대해 30mM Tris/아세트산 pH 4.9, 500 mM 황산나트륨을 사용하여 수행하였다. 칼럼-결합된 항체를 30mM Tris/ 아세트산 pH 6.0, 500mM 황산나트륨을 사용하여 용리하였다. 용리 풀을 3600 내지 1000 mAU (경로 길이 1cm)의 OD<sub>280</sub>에 기초하여 수집했다.
- [0551] 제3 크로마토그래피 단계의 풀을 강화시키고, 제형 완충제로 완충제 교환하였다. 상기 기술된 정제 전략은 도

5a에 도시된다.

표 16

각각의 크로마토그래피 단계 이후의 생성물 및 공정-특이적 불순물의 분석 데이터

	캐리퍼 (감소되지 않음)		
Ang2/VEGF	% 항체 [%]	사전 피크 [%]	주요 피크 [%]
MabSelect SuRe 용리 풀	1.8	8.4	91.6
Capto adhere ImpRes 용리 풀	1.1	5.9	94.1
Capto MMC ImpRes (C3) 용리 풀	0.4	2	98
	SE-HPLC		
Ang2/VEGF	HMW [%]	주요 피크 [%]	LMW [%]
MabSelect SuRe 용리 풀	5.5	94.2	0.32
Capto adhere ImpRes 용리 풀	0.9	98.9	0.25
Capto MMC ImpRes (C3) 용리 풀	0.7	99.2	0.02
	IE-HPLC		
Ang2/VEGF	산성 [%]	주요 피크 [%]	염기성 [%]
MabSelect SuRe 용리 풀	29.8	29.8	29.8
Capto adhere ImpRes 용리 풀	24.4	24.4	24.4
Capto MMC ImpRes (C3) 용리 풀	26.4	26.4	26.4
	HCP	DNA	
Ang2/VEGF	HCP [ng/mg]	DNA [pg/mg]	
MabSelect SuRe 용리 풀	159	17	
Capto adhere ImpRes 용리 풀	11	1	
Capto MMC ImpRes (C3) 용리 풀	2	n.d.	

[0552]



표 17

친화성 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 4개 크로마토그래피 칼럼을 사용하는 공정(4개 칼럼 (4C) 공정)과의 비교

	Ang2/VEGF 3C 공정 (참고: 도 5a)	Ang2/VEGF 4C 공정 (참고: 도 5b)
총 수율 [%]	~ 50	~ 48
SE-HPLC 영역 [%]		
주요 피크	99.3	98.7
HMW 형태의 총합	0.7	1.1
HCP [ng/mg]	2	3
DNA [pg/mg]	<0.1	<0.1
주요 피크 [%] (캘리퍼)	98	96
IE-HPLC 면적 [%]		
주요 피크	57	57
산성 피크	26	30
염기성 피크	17	12

[0553]

[0554]

MabSelectSure, Capto adhere 및 Capto MMC ImpRes HHL을 포함하는 3개 칼럼 공정을 사용함에 의하여, 생성물-관련 불순물 예컨대 3/4 항체, 사전피크, HMWS, LMWS, 및 공정-관련 불순물 예컨대 HCP 및 DNA는 포획 크로마토그래피, 기존 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및 기존 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 4개 칼럼 공정을 사용함과 비교하여 감소될 수 있다.

[0555]

실시예 7: VEGF-A 및 Ang2 (WO 2014/009465에 기재된 항-VEGF-A/항-Ang2 항체)에 대한 이중특이적 항체의 정제

[0556]

CHO 발현 배양물로부터 수거된 세포 배양액 (HCCF)은 결합-용리 방식으로 Capture Select FcXL 친화성 크로마토그래피로 적용했다. HCCF를 최대 로딩 밀도 25 g<sub>mAb</sub>/ℓ 수지로 칼럼에 로딩한 후, 칼럼을 2개의 칼럼 용적에 대해 25 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, pH 7.2로 세정했다. 이어서, 5개의 칼럼 용적에 대해 정제수 PWII에 의한 추가의 세정을 수행했다. 칼럼-결합된 항체는 30 mM 아세트산, pH 3.2를 사용하여 용리시켰다. 용리 풀을 2500 내지 1000 mAU (경로 길이 1cm)의 OD<sub>280</sub>에 기초하여 수집했다.

[0557]

친화도 용리 풀을 아세트산을 사용하여 pH 3.4로 조정하고, 60분 동안 유유도켰다. 이어서, 풀을 1.5 M Tris 염기를 사용하여 pH 5.0로 컨디셔닝하고, 침출 여과에 의해 제거했다. 침출 여과 풀을 1.5 M Tris 염기를 사용하여 pH 7로 컨디셔닝하고, 다중방식 음이온 교환 수지 Capto adhere을 사용하는 제2 크로마토그래피 단계용 공급 원료로서 작용했다. 로딩물의 전도도가 <5 mS/cm이면, 전도도의 조정이 필요하지 않았다.

[0558]

Capto adhere 칼럼을 50 mM Tris/아세테이트, pH 7.0으로 평형화했다. 평형화 칼럼을 최대 로딩 밀도 170 g<sub>mAb</sub>/ℓ 수지로 로딩하고, 50 mM Tris 아세테이트, pH 7.0 (=평형 완충제)로 세정했다. 용리 풀을 최대 3회 CV 세정에

걸쳐 1000 내지 2500 mAU의 OD<sub>280</sub> (경로 길이 1cm)을 기초하여 수집하였다.

[0559]

제2 크로마토그래피 단계의 풀을 아세트산을 사용하여 pH 5.0으로 컨디셔닝하고, 다중방식 양이온 교환 수지 Capto MMC ImpRes를 사용하는 최종 제3 크로마토그래피 단계용 공급 원료로서 작용했다. 제3 크로마토그래피 단계는 결합-씻-용리 방식으로 수행했다. CaptoMMC ImpRes 칼럼을 30mM Tris/아세테이트, 30 mM Tris/시트레이트 (pH 5.0)로 평형화하였다. 평형화 칼럼을 최대 로딩 밀도 30 g<sub>mAb</sub>/ℓ 수지 로 로딩하고, 5개 칼럼 용적에 대해 평형 완충제로 세정했다. 제2 세정은 10개 칼럼 용적에 대해 30mM Tris/아세테이트, 30 mM Tris/시트레이트, 150mM NaCl pH 5.0을 사용하고, 이어서 5개 칼럼 용적에 대해 평형 완충제에 의해 수행하였다. 최종 세정 단계는 10개의 칼럼 용적에 대해 30mM Tris/아세테이트, 30 mM Tris/시트레이트, 500mM NaCl pH 4.5를 사용하여 수행했다. 칼럼-결합된 항체는 40개의 칼럼 용적에서 0-50% B로부터 pH/염 구배를 사용하여 용리시켰다. 완충제 A는 평형 완충제 30mM Tris/아세테이트, 30 mM Tris/시트레이트 pH 5.0이고, 완충제 B는 30mM Tris/아세테이트, 30 mM Tris/시트레이트, 1.5M NaCl, pH 8.5였다. 용리 풀을 250 내지 4500 mAU (경로 길이 1cm)의 OD<sub>280</sub>에 기초하여 수집했다.

표 18

각각의 크로마토그래피 단계 이후의 생성물 및 공정-특이적 불순물의 분석 데이터

	캘리퍼 (감소되지 않음)		
VEGF/Ang2	% 항체 [%]	사전피크 [%]	주요피크 [%]
포획 Select FcXL 용리 풀	2.57	8.43	91.16
Capto adhere용리 풀	1.64	5.84	94.16
Capto MMC ImpRes용리 풀	1.23	2.37	97.63
	SE-HPLC		
VEGF/Ang2	HMW [%]	주요피크 [%]	LMW [%]
포획 Select FcXL 용리 풀	10.1	89.5	0.5
Capto adhere용리 풀	2.1	97.3	0.55
Capto MMC ImpRes용리 풀	0.7	99.3	0.04
	IE-HPLC		
VEGF/Ang2	산성 [%]	주요 피크 [%]	염기성[%]
포획 Select FcXL 용리 풀	29.7	57.2	13.1
Capto adhere용리 풀	26.2	62.7	11.1
Capto MMC ImpRes용리 풀	25.8	67.3	7
	HCP	DNA	
VEGF/Ang2	HCP [ng/mg]	DNA [pg/mg]	
포획 Select FcXL 용리 풀	8615	210	
Capto adhere용리 풀	484	1.4	
Capto MMC ImpRes용리 풀	7	1.7	

[0560]

표 19

친화성 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 4 개 크로마토그래피 칼럼을 사용하는 공정(4 개 칼럼 (4C) 공정)과의 비교

	VEGF/Ang2 3C 공정	VEGF/Ang2 4C 공정
총 수율 [%]	~ 40	약 25-35
SE-HPLC 영역 [%]		
주요 피크	99.3	98.8
HMW 형태의 총합	0.7	
HCP [ng/mg]	7	1
DNA [pg/mg]	1.7	<0.1
주요피크 [%] (캘리퍼 / CE SDS)	97.6	94.6
IE-HPLC 면적 [%]		
주요 피크	67.3	72.2
산성 피크	25.8	23.1
염기성 피크	7.0	4.7

[0561]

[0562]

Capto Adhere 및 Capto MMC ImpRes를 사용함으로써, HHL, 생성물-관련 불순물, 예를 들어, 3/4 항체, 사전 피크, HMWS, LMWS, 및 공정-관련 불순물, 예를 들어, HCP 및 DNA가 감소될 수 있음을 알 수 있다.

[0563]

**실시예 8: 항-X1/항-Y1 이중특이적 항체의 조립 및 정제**

[0564]

표적 단백질 X1 및 Y1에 대한 이중특이적 항체 - 항-X1/항-Y1 이중특이적 항체 또는 aX1/Y1 이중특이적 항체-는 다음과 같이 조립하였다. 각각의 절반-항체(aX1 (크롭) 및 aY1 (홀))을, 실시예 1에 기술된 바와 같이, 독립적으로 단백질 A 수지 (MabSelect SuRe, GE Healthcare)를 사용하는 친화성 크로마토그래피 단계에 적용한다.

[0565]

이어서, 단백질 A 크로마토그래피 단계로부터 수득된 절반-항체 풀을 1:1 물 비로 조합하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 조립한다. 이어서, pH 조정된 조립된 풀은 통과 유동 방식으로 Capto™ Adhere 수지를 사용하는 다중 방식 음이온 교환 크로마토그래피에 적용한다. Capto™ Adhere 칼럼은 실시예 1에 기재된 바와 같이 평형화한다. 이중특이적 조립 단계로부터의 생성물 풀을 정제수를 사용하여 전도도 9.0 mS/cm로 조정하고, 칼럼에 로딩한다. 이중특이적 항체를 칼럼을 통해 유동시킨 다음, 평형 완충제로 세정한다. 음이온 교환 폴링을 280nm에서의 흡광도에 기초하여 개시하고 종결시킨다.

[0566]

다중방식 음이온 크로마토그래피 생성물 풀을 이후 결합 및 용리 방식으로 Capto™ MMC 수지를 사용하여 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피에 적용시켰다. 칼럼을 실시예 1에 기재된 바와 같이 평형화한다. 다중방식 음이온 크로마토그래피 생성물 풀을 실시예 1에 기재된 바와 같이 로딩하고, 세정한다. 이중특이적 항체는 실시예 1에 기재된 바와 같이 단계적 용리에서 염 및 pH를 증가시킴으로써 칼럼으로부터 용리된다. 양이온 교환 폴링을 280nm에서의 흡광도에 기초하여 개시하고 종결시킨다. 상기 기술된 정제 전략은 도 7a에 도시된다.

[0567]

도 7a에 도시된 정제 전략을 사용하여 달성된, 생성물-관련 및 공정-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분

리의 정도는, 도 7b 및 7c에 도시된 정제 전략을 사용하여 달성된 것과 비교된다.

- [0568] 상기한 실험을 반복하고, 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 풀링된 물질을 20% 홀 동종이량체로 스파이킹한다. 도 7a에 도시된 정제 전략을 사용하여 달성된, 생성물-관련 및 공정-관련 불순물로부터의 이중특이적 항체의 분리의 정도는, 도 7b 및 7c에 도시된 정제 전략을 사용하여 달성된 것과 다시 비교된다.
- [0569] 구현예의 목록
- [0570] 1. 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 다중특이적 항체가 다중 아암을 포함하고, 각 아암이 VH/VL 단위를 포함하고, 상기 방법은 하기와 같은 순차 단계를 포함한다:
- [0571] a) 조성물을 포획 크로마토그래피에 적용하여 포획 크로마토그래피 용리액을 생산하는 단계;
- [0572] b) 포획 크로마토그래피 용리액을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및
- [0573] c) 제1 혼합 방식 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및
- [0574] d) 다중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계,
- [0575] (여기서, 상기 방법은 조성물로부터 생성물-특이적 불순물의 양을 감소시킨다).
- [0576] 2. 구현예 1에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피 용리액이 제1 혼합 방식 크로마토그래피 이전에 이온 교환 또는 HIC 크로마토그래피에 적용되는, 방법.
- [0577] 3. 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 다중특이적 항체가 다중 아암을 포함하고, 각 아암이 VH/VL 단위를 포함하며, 다중특이적 항체의 각 아암은 별도로 생산되며, 상기 방법은 하기와 같은 순차 단계를 포함하되:
- [0578] a) 다중특이적 항체의 각 아암을 포획 크로마토그래피에 적용하여 다중특이적 항체의 각 아암의 포획 용리액을 생산하는 단계;
- [0579] b) 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 생산하는데 충분한 조건 하에서 다중특이적 항체의 각 아암의 포획 용리액을 포함하는 혼합물을 형성하는 단계;
- [0580] c) 상기 다중특이적 항체를 포함하는 상기 조성물을 제1 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제1 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및
- [0581] d) 제1 혼합 방식 용리액을 제2 혼합 방식 크로마토그래피에 적용하여 제2 혼합 방식 용리액을 생성하는 단계; 및
- [0582] e) 다중특이적 항체를 포함하는 분획을 수집하는 단계;
- [0583] 상기 방법은 조성물로부터 생성물-특이적 불순물의 양을 감소시킨다.
- [0584] 4. 구현예 3에 있어서, 상기 다중특이적 항체를 포함하는 상기 조성물은 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피 이전에 이온 교환 또는 HIC 크로마토그래피에 적용되는, 방법.
- [0585] 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피인, 방법.
- [0586] 6. 구현예 5에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피가 단백질 L 크로마토그래피, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 단백질 A 및 단백질 G 크로마토그래피인, 방법.
- [0587] 7. 구현예 5 또는 구현예 6에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피가 단백질 A 크로마토그래피인, 방법.
- [0588] 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 포획 크로마토그래피가 결합 및 용리 방식으로 수행되는, 방법.
- [0589] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피 및 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 인접하는, 방법.
- [0590] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크



로마토그래피인, 방법.

- [0591] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피인, 방법.
- [0592] 12. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 양이온 교환 크로마토그래피인, 방법.
- [0593] 13. 구현예 1 내지 10 및 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피인, 방법.
- [0594] 14. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식으로 수행되는, 방법.
- [0595] 15. 구현예 14에 있어서, 상기 용리는 구배 용리인, 방법.
- [0596] 16. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동 방식으로 수행되는, 방법.
- [0597] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는 결합 및 용리 방식으로 수행되는, 방법.
- [0598] 18. 구현예 17에 있어서, 상기 용리는 구배 용리인, 방법.
- [0599] 19. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 통과 유동 방식으로 수행되는, 방법.
- [0600] 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 용리액을 한외여과에 적용하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0601] 21. 구현예 20에 있어서, 상기 한외여과가 순차적으로 제1 한외여과, 정용여과 및 제2 한외여과를 포함하는, 방법.
- [0602] 22. 구현예 7 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 A 크로마토그래피가 아가로스에 결합된 단백질 A를 포함하는, 방법.
- [0603] 23. 구현예 7 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 A 크로마토그래피는 MAbSelect™, MAbSelect™ SuRe 및 MAbSelect™ SuRe LX, Prosep-VA, Prosep-VA 울트라플러스(Ultra Plus), 단백질 A 세파로스 패스트 플로우, 또는 Toyopearl 단백질 A 크로마토그래피인, 방법.
- [0604] 24. 구현예 7 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 A 크로마토그래피가 하나 이상의 단백질 A 평형 완충제, 단백질 A 로딩 완충제 또는 단백질 A 세정 완충제를 사용하고, 상기 평형 완충제, 로딩 완충제, 및/또는 세정 완충제가 약 pH 7 내지 약 pH 8인, 방법.
- [0605] 25. 구현예 24에 있어서, 상기 단백질 A 평형 완충제가 약 pH 7.7인, 방법.
- [0606] 26. 구현예 24 또는 구현예 25에 있어서, 상기 단백질 A 평형 완충제가 약 25 mM Tris 및 약 25 mM NaCl을 포함하는, 방법.
- [0607] 27. 구현예 24 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 A 크로마토그래피가 로딩 후 평형 완충제로 세정되는, 방법.
- [0608] 28. 구현예 7 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체가 pH 단계적 용리에 의해 단백질 A 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0609] 29. 구현예 7 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 낮은 pH 를 갖는 단백질 A 용리 완충제를 상기 단백질 A 크로마토그래피에 적용함으로써 상기 단백질 A로부터 용리되는, 방법.
- [0610] 30. 구현예 29에 있어서, 상기 단백질 A 용리 완충제가 약 150 mM 아세트산, 약 pH 2.9를 포함하는, 방법.
- [0611] 31. 구현예 7 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질 A 용리액이 풀링되고(pooling), 상기 용리액의 OD<sub>280</sub>이 약 0.5 초과인, 방법.

- [0612] 32. 구현예 10 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 4차 아민 및 소수성 모이어티를 포함하는, 방법.
- [0613] 33. 구현예 32에 있어서, 상기 음이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피는 가교결합 수준이 높은 아가로스에 결합된 소수성 모이어티 및 4차 아민을 포함하는, 방법.
- [0614] 34. 구현예 33에 있어서, 상기 혼합 방식 크로마토그래피가 Capto™ Adhere 크로마토그래피 또는 Capto™ Adhere ImpRes 크로마토그래피인, 방법.
- [0615] 35. 구현예 11 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 양이온 교환 혼합 방식 크로마토그래피가 N-벤질-n-메틸에탄올아민을 포함하는, 방법.
- [0616] 36. 구현예 35에 있어서, 상기 혼합 방식 크로마토그래피가 Capto™ MMC 크로마토그래피 또는 Capto™ MMC ImpRes 크로마토그래피인, 방법.
- [0617] 37. 구현예 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피는, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 약 pH 6 내지 약 pH 7인, 방법.
- [0618] 38. 구현예 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피는, 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 혼합 방식 로딩 완충제, 또는 혼합 방식 세정 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제는 약 pH 5 내지 약 pH 8인, 방법.
- [0619] 39. 구현예 37 또는 구현예 38에 있어서, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제, 혼합 방식 평형 완충제, 및/또는 혼합 방식 세정 완충제가 약 pH 6.5인, 방법.
- [0620] 40. 구현예 37 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 혼합 방식 사전-평형 완충제가 약 500 mM 아세테이트를 포함하는, 방법.
- [0621] 41. 구현예 37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 상기 혼합 방식 평형 완충제가 약 50 mM 아세테이트를 포함하는, 방법.
- [0622] 42. 구현예 37 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피가 로딩 후 세정 완충제로 세정되는, 방법.
- [0623] 43. 구현예 37 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피가 로딩 후 세정 완충제로 세정되는, 방법.
- [0624] 44. 구현예 15 및 18 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체가 pH 구배에 의해 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0625] 45. 구현예 15 및 18 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 낮은 pH를 갖는 혼합 방식 용리 완충제를 상기 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피에 적용함으로써, 상기 제1 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0626] 46. 구현예 15 및 18 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체가 pH 구배에 의해 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0627] 47. 구현예 15 및 18 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 낮은 pH를 갖는 혼합 방식 용리 완충제를 상기 혼합 방식 교환 크로마토그래피에 적용함으로써 상기 제2 혼합 방식 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0628] 48. 구현예 2 및 4 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피가 4차 아민을 포함하는, 방법.
- [0629] 49. 구현예 48에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피이며, 그리고 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 가교결합된 아가로스에 결합된 4차 아민을 포함하는, 방법.
- [0630] 50. 구현예 49에 있어서, 상기 혼합 방식 음이온 교환 크로마토그래피가 CaptoAdhere 크로마토그래피인, 방법.

- [0631] 51. 구현예 48 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 또는 음이온 교환 로딩 완충제 중 하나 이상을 사용하며, 상기 음이온 교환 사전-평형 완충제, 음이온 교환 평형 완충제 및/또는 음이온 교환 로딩 완충제는 약 pH 6 내지 약 pH 8인, 방법.
- [0632] 52. 구현예 51에 있어서, 상기 음이온 교환 사전-평형 완충제, 상기 음이온 교환 평형 완충제 및/또는 상기 음이온 교환 로딩물이 약 pH 6.5인, 방법.
- [0633] 53. 구현예 51 또는 구현예 52에 있어서, 상기 음이온 교환 사전-평형 완충제가 약 50 mM Tris, 500 mM 아세트산나트륨을 포함하는, 방법.
- [0634] 54. 구현예 51 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 음이온 교환 평형 완충제가 약 50 mM Tris를 포함하는, 방법.
- [0635] 55. 구현예 51 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 로딩 후 음이온 교환 평형 완충제로 세정되는, 방법.
- [0636] 56. 구현예 51 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체가 염 구배에 의해 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0637] 57. 구현예 51 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 증가된 염 농도를 갖는 음이온 교환 용리 완충제를 음이온 교환 크로마토그래피에 적용함으로써 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용리되는, 방법.
- [0638] 58. 구현예 57에 있어서, 상기 음이온 교환 용리 완충제가 약 pH 8.5에서 약 50 mM Tris, 100 mM 아세트산나트륨을 포함하는, 방법.
- [0639] 59. 구현예 51 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 음이온 교환 용리액이 풀링되며, 상기 용리액의 OD<sub>280</sub>은 약 0.5 내지 약 2.0 초과인, 방법.
- [0640] 60. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중특이적 항체의 아암이 세포에서 생산되는, 방법.
- [0641] 61. 구현예 60에 있어서, 상기 세포는 원핵 세포인, 방법.
- [0642] 62. 구현예 61에 있어서, 상기 원핵 세포가 *이.콜라이(E.coli)* 세포인, 방법.
- [0643] 63. 구현예 61 또는 구현예 62에 있어서, 상기 세포가 하나 이상의 샤페론을 발현하도록 조작되는, 방법.
- [0644] 64. 구현예 63에 있어서, 상기 샤페론이 FkpA, DsbA 또는 DsbC 중 하나 이상인, 방법.
- [0645] 65. 구현예 63 또는 구현예 64에 있어서, 상기 샤페론은 *이.콜라이* 샤페론인, 방법.
- [0646] 66. 구현예 1 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 진핵 세포인, 방법.
- [0647] 67. 구현예 66에 있어서, 상기 진핵 세포가 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포인, 방법.
- [0648] 68. 구현예 66 또는 구현예 67에 있어서, 상기 진핵 세포가 CHO 세포인, 방법.
- [0649] 69. 구현예 60 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 포획 크로마토그래피 이전에 상기 세포가 용해되어 상기 다중특이적 항체 또는 상기 다중특이적 항체의 아암을 포함하는 세포 용해물을 생성하는, 방법.
- [0650] 70. 구현예 69에 있어서, 상기 세포가 미세유동화기를 사용하여 용해되는, 방법.
- [0651] 71. 구현예 69 또는 구현예 70에 있어서, 폴리에틸렌이민 (PEI)이 크로마토그래피 이전에 세포 용해물에 첨가되는, 방법.
- [0652] 72. 구현예 1 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 조성물 중의 숙주 세포 단백질 (HCP), 침출된 단백질 A, 핵산, 세포 배양 배지 성분, 또는 바이러스성 불순물 중 어느 하나의 양을 감소시키는, 방법.
- [0653] 73. 구현예 1 내지 72 중 어느 한 방법에 있어서, 상기 다중특이적 항체가 이중특이적 항체인, 방법.
- [0654] 74. 구현예 73에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 크립-인-홀 (KiH) 이중특이적 항체인, 방법.
- [0655] 75. 구현예 73 또는 구현예 74에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 CrossMab 이중특이적 항체인, 방법.
- [0656] 76. 구현예 1 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획이 적어도 약 95% 다중특이적 항체를 함유하는, 방법.

- [0657] 77. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 상기 생성물-특이적 불순물이 비-쌍형성 항체 아암, 항체 동종이량체, 응집물, 고분자량 중 (HMWS), 저분자량 중 (LMWS), 산성 변이체 또는 염기성 변이체 중 하나 이상인, 방법.
- [0658] 78. 구현예 77에 있어서, 상기 분획이 약 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암을 함유하는, 방법.
- [0659] 79. 구현예 77 또는 구현예 78에 있어서, 상기 분획이 약 5% 이하의 항체 동종이량체를 함유하는, 방법.
- [0660] 80. 구현예 77 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획은 약 2% 이하의 응집물 또는 고분자량 중 (HMWS)을 함유하는, 방법.
- [0661] 81. 구현예 77 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획이 약 2% 이하의 LMWS를 함유하는, 방법.
- [0662] 82. 구현예 77 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획이 약 50% 이하의 산성 변이체를 함유하는, 방법.
- [0663] 83. 구현예 77 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획이 약 35% 이하의 염기성 변이체를 함유하는, 방법.
- [0664] 84. 구현예 77 내지 83 중 어느 하나에 있어서, 상기 분획이 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유하는, 방법.
- [0665] 85. 구현예 77에 있어서, 상기 분획이 하기를 포함하는, 방법:
- [0666] a) 적어도 약 95% 내지 100%의 다중특이적 항체;
- [0667] b) 약 1% 내지 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암;
- [0668] c) 약 1% 내지 5% 이하의 항체 동종이량체;
- [0669] d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS;
- [0670] e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및
- [0671] f) 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체.
- [0672] 86. 구현예 1 내지 85 중 어느 하나의 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체를 포함하는, 조성물.
- [0673] 87. 암 또는 안질환을 치료하기 위한, 구현예 1 내지 85 중 어느 하나의 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체를 포함하는 조성물.
- [0674] 88. 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드를 정제하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 하기를 포함하는, 방법:
- [0675] 친화성 크로마토그래피 단계 이후 2개 상이한 다중방식 이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하고, 이로써 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드를 정제하는 단계.
- [0676] 89. 구현예 88에 있어서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 하기를 포함하는, 방법:
- [0677] i. 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계; 또는
- [0678] ii. 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계.
- [0679] 90. 구현예 88 또는 89에 있어서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하는, 방법.
- [0680] 91. 구현예 88 내지 90 중 어느 하나에 있어서, 상기 다단계 크로마토그래피 방법은 정확히 3개 크로마토그래피 단계를 포함하는, 방법.
- [0681] 92. 구현예 89 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 통과 유동 방식으로 수행되는, 방법.
- [0682] 93. 구현예 89 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 7 mS/cm 미만의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용되는, 방법.
- [0683] 94. 구현예 89 내지 93 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 6 mS/cm 내지 약 2 mS/cm 범위의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용되는,



방법.

- [0684] 95. 구현예 89 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도 값을 갖는 용액 내 적용되는, 방법.
- [0685] 96. 구현예 89 내지 95 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 약 7의 pH에서 수행되는, 방법.
- [0686] 97. 구현예 89 내지 96 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 4.5 mS/cm의 전도도를 갖고 pH가 약 7인 용액 내 적용되는, 방법.
- [0687] 98. 구현예 89 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계에서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 크로마토그래피 물질의 리터 당 약 100g 내지 약 300g 범위로 적용되는, 방법.
- [0688] 99. 구현예 89 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 다중방식 강 음이온 교환 크로마토그래피 물질인, 방법.
- [0689] 100. 구현예 89 내지 99 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 물질은, 고-유동 아가로스 매트릭스, 리간드로서 다중방식 강 음이온 교환제, 36 내지 44  $\mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기 및 0.08 내지 0.11 mmol  $\text{Cl}^-/\text{ml}$  매질의 이온 용량을 갖는, 방법.
- [0690] 101. 구현예 89 내지 100 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질이 다중방식 약 양이온 교환 크로마토그래피 매질인, 방법.
- [0691] 102. 구현예 89 내지 101 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 매질은 고-유동 아가로스 매트릭스, 리간드로서 다중방식 약 양이온 교환제, 36 내지 44  $\mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기 및 25 내지 39  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 의 이온 용량을 갖는, 방법.
- [0692] 103. 구현예 89 내지 102 중 어느 하나에 있어서, 상기 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 결합 및 용리 방식으로 수행되는, 방법.
- [0693] 104. 구현예 88 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피는 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피, 또는 단일 사슬 Fv 리간드 친화성 크로마토그래피, 또는 CaptureSelect 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계 또는 CaptureSelect FcXL 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계인, 방법.
- [0694] 105. 구현예 88 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 단계가 단백질 A 크로마토그래피 단계인, 방법.
- [0695] 106. 구현예 88 내지 105 중 어느 하나에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 단계는 CaptureSelect™ 크로마토그래피 물질에 의한 크로마토그래피 단계인, 방법.
- [0696] 107. 구현예 88 내지 106 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는, 항체, 이중특이적 항체, 또는 Fc-융합 단백질인, 방법.
- [0697] 108. 구현예 88 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드가 이중특이적 항체인, 방법.
- [0698] 109. 구현예 90 내지 108 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드가 CrossMab인, 방법.
- [0699] 110. 구현예 90 내지 109 중 어느 하나에 있어서, 상기 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드가 하기를 포함하는 이중특이적 항체인, 방법:
- [0700] a) 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및
- [0701] b) 제2 항원에 특이적으로 결합하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 (불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체됨).
- [0702] 111. 구현예 108 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 ANG2 및 VEGF에 결합하는, 방법.

- [0703] 112. 구현예 108 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 CrossMab이 ANG2 및 VEGF에 결합하는, 방법.
- [0704] 113. 구현예 108 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 바누시주맙인, 방법.
- [0705] 114. 구현예 108 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 하기를 포함하는, 방법: 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 1, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위.
- [0706] 115. 구현예 108 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 하기를 포함하는, 방법: 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄, 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄.
- [0707] 116. 구현예 108 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 하기를 포함하는, 방법: 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 5, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 6을 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위.
- [0708] 117. 구현예 108 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체는 하기를 포함하는, 방법: 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 제1 중쇄, 및 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 제2 중쇄, 및 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 제1 경쇄, 및 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 제2 경쇄.
- [0709] 118. 구현예 108 내지 117 중 어느 하나에 있어서, 상기 정제된 Fc-영역 함유 이중이량체 폴리펩타이드는 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유하는, 방법.
- [0710] 119. 다단계 크로마토그래피 방법에 의하여 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하기 위한 방법으로서, 상기 방법은
- [0711] 친화성 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계, 이후 다중방식 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하며,
- [0712] 이로써 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함하되,
- [0713] 여기서 상기 이중특이적 항체는 하기를 포함한다:
- [0714] 중쇄 가변 도메인 (VH)로서 서열 번호 1 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 2를 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 3, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 4를 포함하는 제2 항원-결합 부위, 또는
- [0715] 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 5, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 6을 포함하는 제1 항원-결합 부위; 및 중쇄 가변 도메인(VH)으로서 서열 번호 7, 및 경쇄 가변 도메인(VL)으로서 서열 번호 8을 포함하는 제2 항원-결합 부위.
- [0716] 120. 구현예 119에 있어서, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 상기 이중특이적 항체가 하기를 포함하는, 방법:
- [0717] a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및
- [0718] b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 (불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체됨).
- [0719] 121. 이중특이적 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 적어도 약 95%의 이중특이적 항체를 함유하는, 조성물.
- [0720] 122. 구현예 121에 있어서, 상기 조성물이 약 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암을 함유하는, 조성물.
- [0721] 123. 구현예 121 또는 122에 있어서, 상기 조성물이 약 5% 이하의 항체 동종이량체를 함유하는, 조성물.
- [0722] 124. CrossMab 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물이 적어도 약 95%의 CrossMab 항체를 함유하는, 조성물.
- [0723] 125. 구현예 121 내지 124 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 약 2% 이하의 응집물 또는 고분자량 중(HMWS)을 함유하는, 조성물.

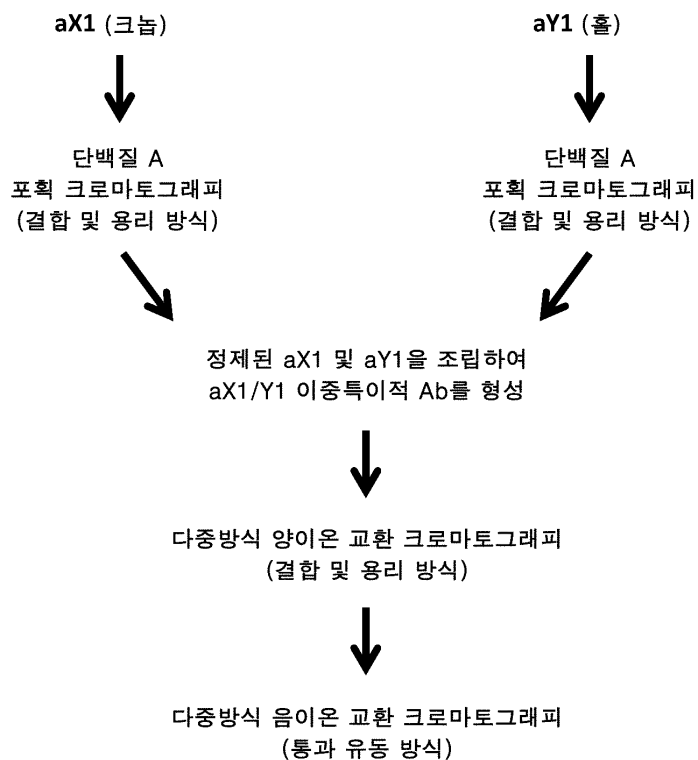
- [0724] 126. 구현예 121 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물이 약 2% 이하의 저분자량 중 (LMWS)을 함유하는, 조성물.
- [0725] 127. 구현예 121 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물이 약 50% 이하의 산성 변이체를 함유하는, 조성물.
- [0726] 128. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물이 약 35% 이하의 염기성 변이체를 함유하는, 조성물.
- [0727] 129. 구현예 121 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물이 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유하는, 조성물.
- [0728] 130. 구현예 121 또는 구현예 122에 있어서, 상기 조성물이 하기를 함유하는, 조성물:
- [0729] a) 적어도 약 95% 내지 100%의 다중특이적 항체;
- [0730] b) 약 1% 내지 5% 이하의 비-쌍형성 항체 아암;
- [0731] c) 약 1% 내지 5% 이하의 항체 동종이량체;
- [0732] d) 약 1% 또는 2% 이하의 HMWS;
- [0733] e) 약 1% 또는 2% 이하의 LMWS; 및
- [0734] f) 약 5% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체.
- [0735] 131. 구현예 121 내지 130 중 어느 하나에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 ANG-2 및 VEGF에 결합하는, 조성물.
- [0736] 132. 구현예 131에 있어서, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 상기 이중특이적 항체가 하기를 포함하는, 조성물:
- [0737] a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및
- [0738] b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 (불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체됨).
- [0739] 133. ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1% 이하의  $\frac{3}{4}$  항체를 함유하는, 조성물.
- [0740] 134. 구현예 133에 있어서, ANG-2 및 VEGF에 결합하는 상기 이중특이적 항체가 하기를 포함하는, 조성물:
- [0741] a) 제1 항원-결합 부위를 포함하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및
- [0742] b) 제2 항원-결합 부위를 포함하는 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 (불변 도메인 CL 및 CH1 은 서로 대체됨).
- [0743] 135. 구현예 133 또는 134에 있어서, 상기 조성물이 구현예 119의 방법을 사용하여 수득되는, 조성물.
- [0744] 136. Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드의 정제를 위한, 구현예 88 내지 118 중 어느 하나에 따른 방법의 용도.
- [0745] 137. Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드 관련 불순물의 감소를 위한, 구현예 88 내지 118 중 어느 하나에 따른 방법의 용도.
- [0746] 138. 암 또는 안질환 치료용 약제 제조를 위한, 구현예 88 내지 118 중 어느 하나에 따른 방법으로 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드, 또는 구현예 119 또는 120의 방법을 사용하여 수득된 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체.
- [0747] 139. 암 또는 안질환의 치료에서 사용하기 위한, 구현예 88 내지 118 중 어느 하나에 따른 방법으로부터 수득된 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드, 또는 구현예 119 또는 120의 방법을 사용하여 수득된 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체.
- [0748] 140. 하기 단계를 포함하는, Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 생산하기 위한 방법:
- [0749] i. Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계,
- [0750] ii. 세포 또는 배양 배지로부터 Fc-함유 이중이량체 단백질을 회수하는 단계,
- [0751] iii. Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 구현예 88 내지 118 중 어느 하나의 방법에 의하여 정제하고, 이에 의

해 Fc-함유 이중이량체 폴리펩타이드를 생산하는 단계.

- [0752] 141. 구현예 119 내지 120 중 어느 것의 방법을 사용하여 수득된 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 생산하기 위한 방법으로서, 하기 단계를 포함하는, 방법:
- [0753] i. 이중특이적 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 단계,
- [0754] ii. 세포 또는 배양 배지로부터 이중특이적 항체를 회수하는 단계,
- [0755] iii. 이중특이적 항체를 구현예 119 내지 120 중 어느 하나의 방법에 의하여 정제하고, 이로써 ANG-2 및 VEGF에 결합하는 이중특이적 항체를 생산하는 단계.

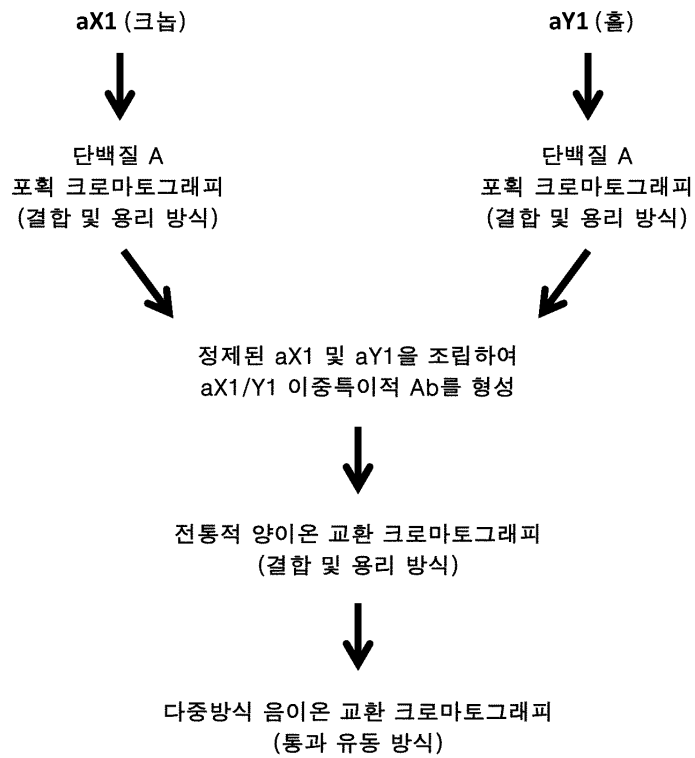
## 도면

### 도면1a

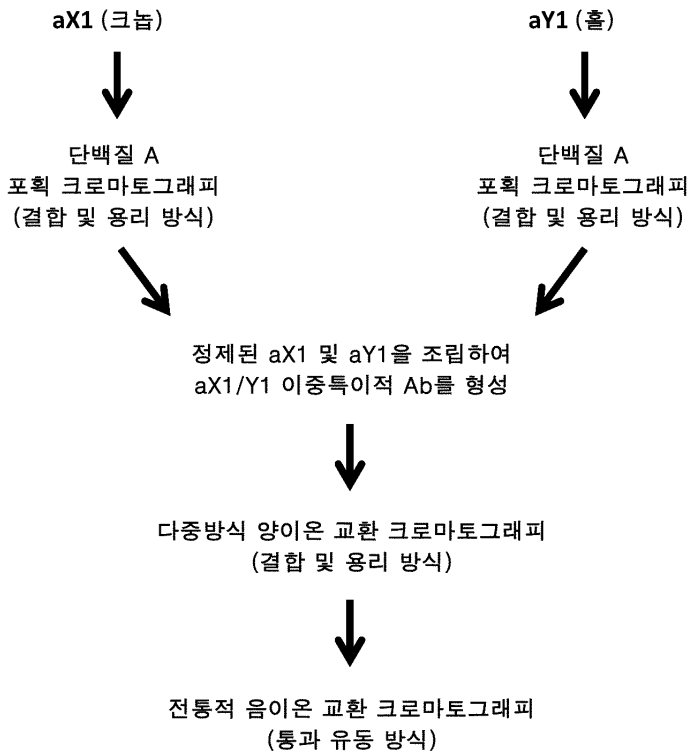




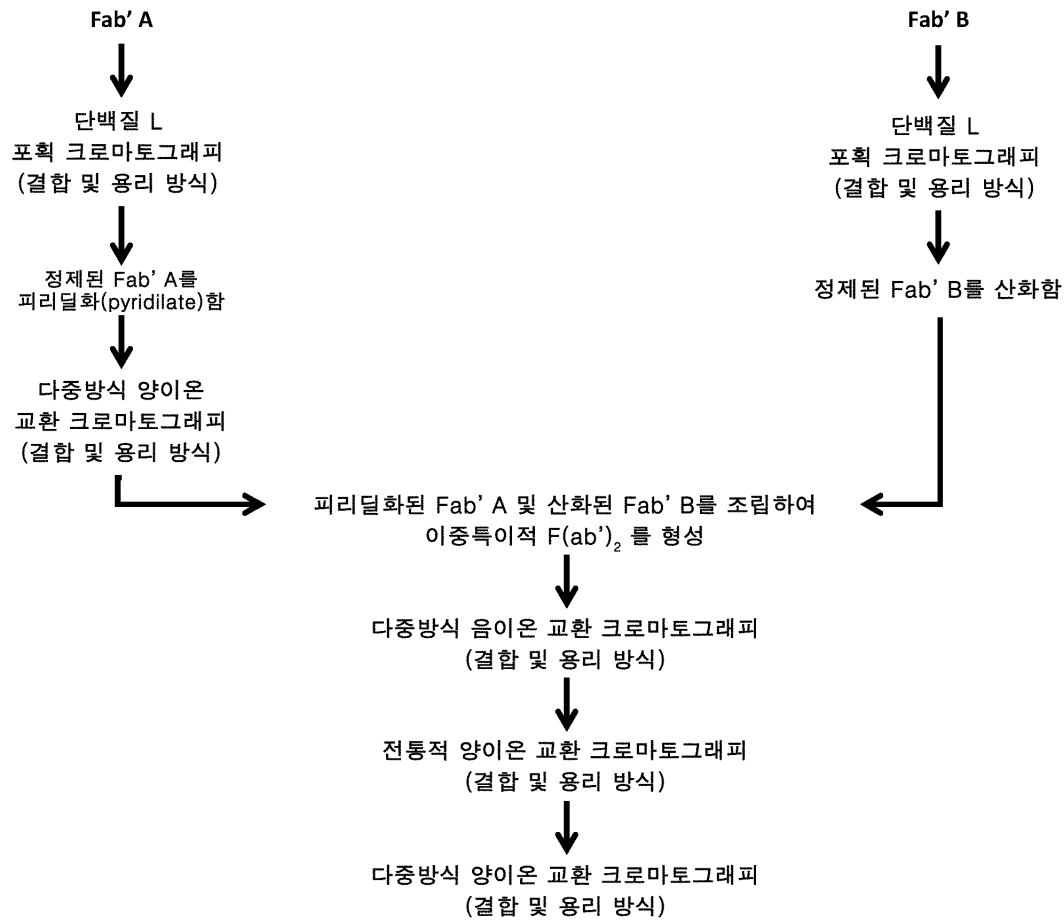
도면1b



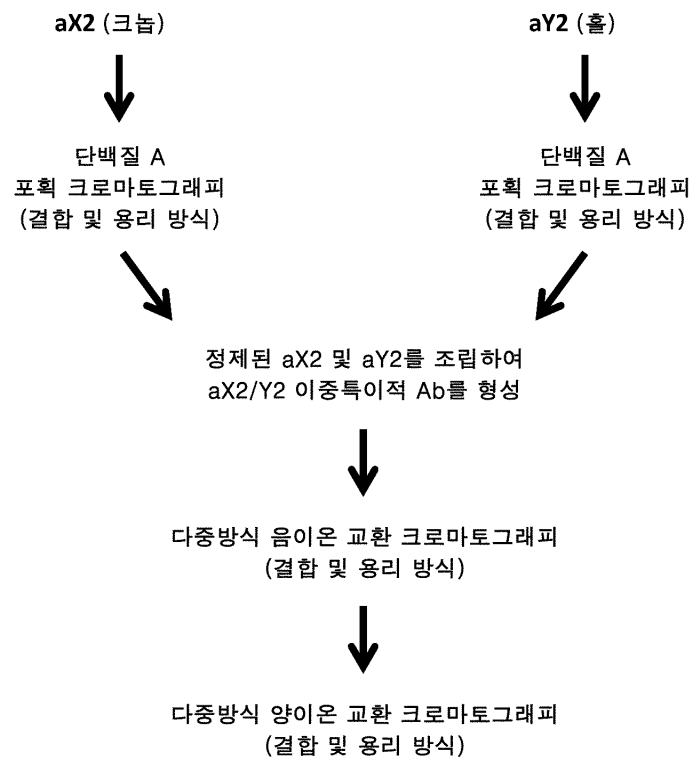
도면1c



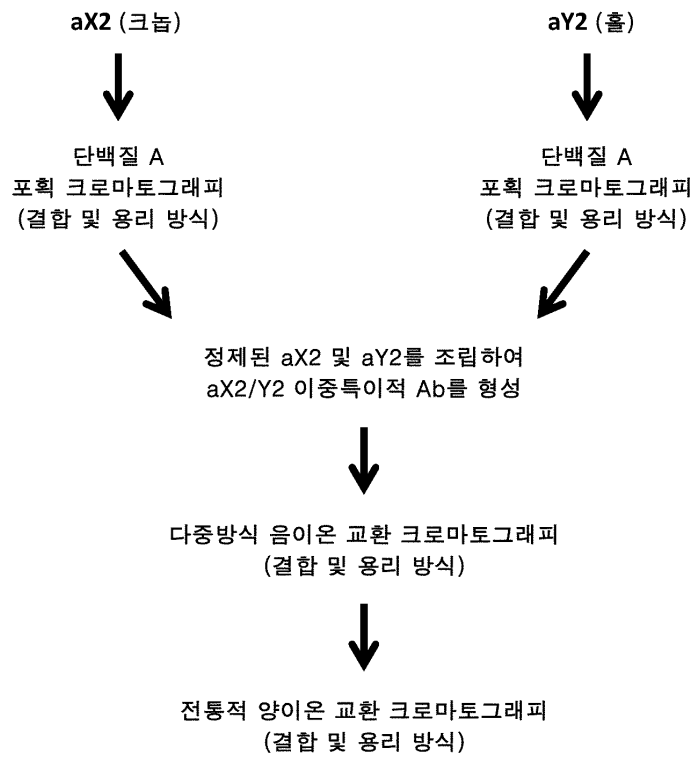
도면2



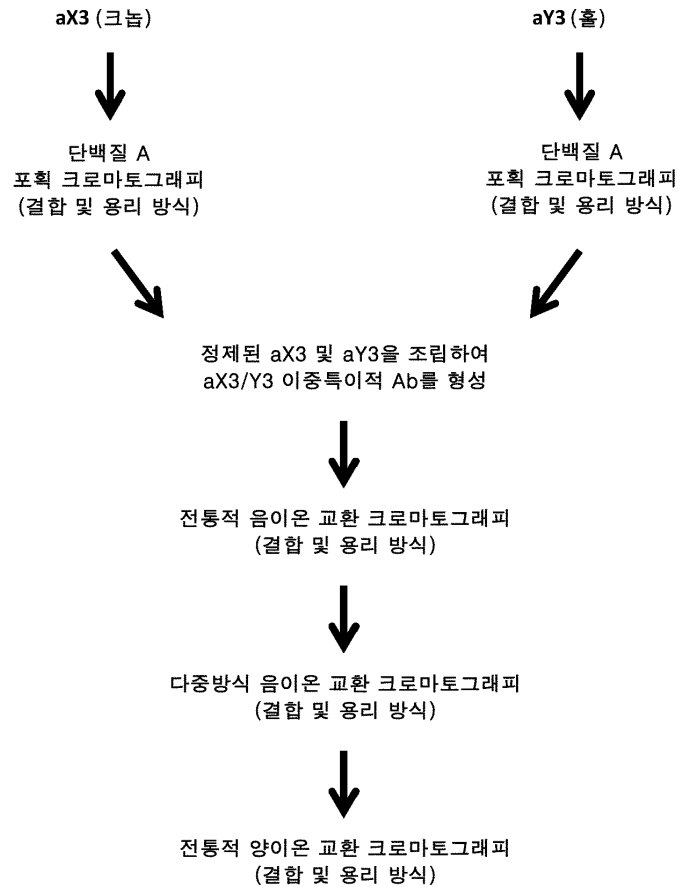
도면3a



도면3b



도면4



도면5a

항-Ang2/항-VEGF-A 이중특이적 항체를  
함유하는 CHO 발현 배양물 유래의 수거된  
세포 배양 유체 (HCCF)



단백질 A 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



다중 방식 음이온 교환 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



다중방식 양이온 교환 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)

도면5b

항-Ang2/항-VEGF-A 이중특이적 항체를  
함유하는 CHO 발현 배양물 유래의 수거된  
세포 배양 유체 (HCCF)



단백질 A 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



전통적 양이온 교환 크로마토그래피



소수성 상호작용 크로마토그래피



전통적 음이온 교환 크로마토그래피



도면6a

항-VEGF-A/항-Ang2 이중특이적 항체를 함유하는  
CHO 발현 배양물 유래의 수거된  
세포 배양 유체 (HCCF)



항-IgG 친화성 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



다중방식 음이온 교환 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



다중방식 양이온 교환 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)

도면6b

항-VEGF-A/항-Ang2 이중특이적 항체를 함유하는  
CHO 발현 배양물 유래의 수거된  
세포 배양 유체 (HCCF)



항-IgG 친화성 크로마토그래피  
(결합 및 용리 방식)



전통적 양이온 교환 크로마토그래피

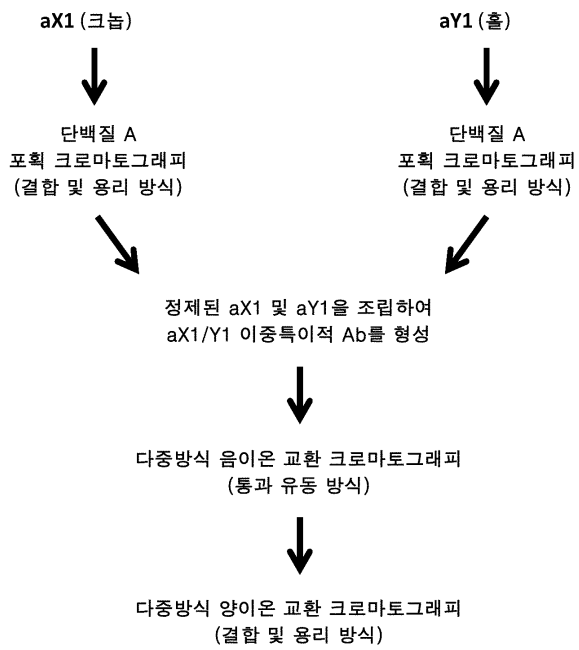


소수성 상호작용 크로마토그래피

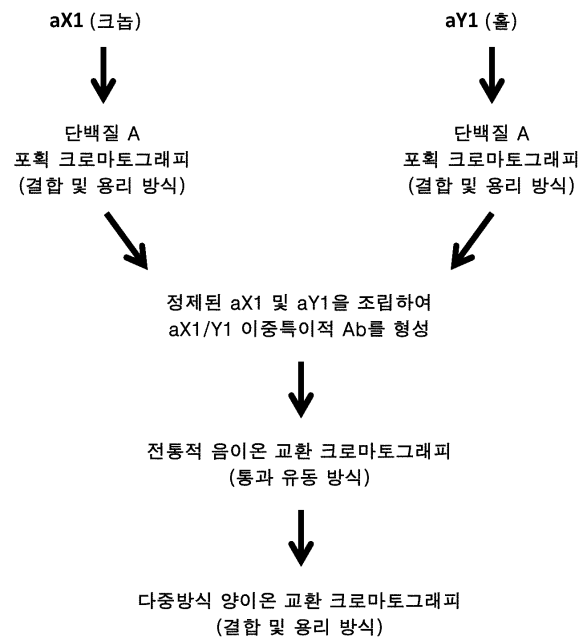


전통적 음이온 교환 크로마토그래피

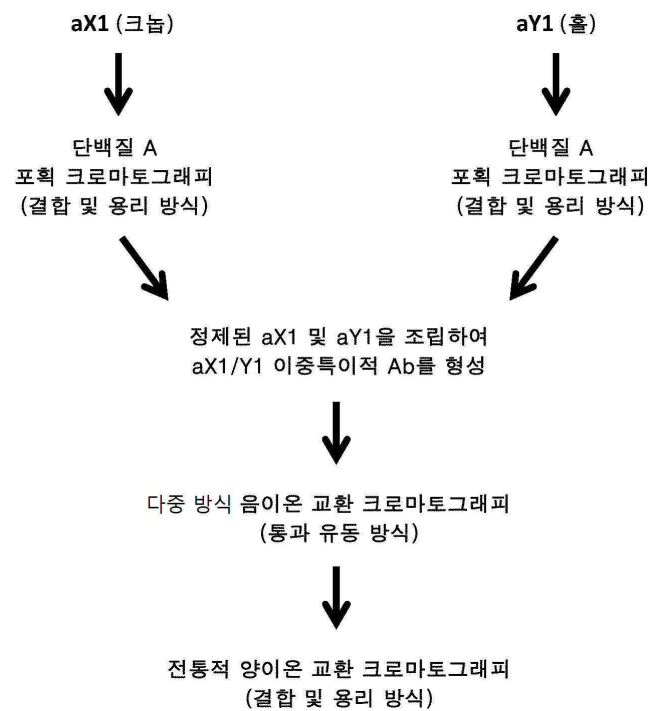
도면7a



도면7b



### 도면7c



### 서열 목록

- <110> Glen GIESE
- Eva ROSENBERG
- Bernard SALLIER
- Susanne KONRAD
- Wolfgang KOEHNLEIN
- Steffen WILLMANN
- Agathe BIALAS
- Kimberly KALEAS
- Yinges YIGZAW
- <120> PURIFICATION OF MULTISPECIFIC ANTIBODIES
- <130> 146392036340
- <150> US 62/351,908
- <151> 2016-06-17
- <160> 16
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400>

1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60



Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

115 120 125

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 4

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 6

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

115 120 125  
 Ser

<210> 8  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 8

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60



Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
85 90 95  
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110  
<210> 9  
<211> 463  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<400> 9  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30  
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60  
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr  
100 105 110  
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
115 120 125  
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
130 135 140  
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His  
 225 230 235 240  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 245 250 255  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 275 280 285  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 290 295 300  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 305 310 315 320  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 325 330 335  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 340 345 350  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
 370 375 380  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

					405						410									415
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg					
				420					425					430						
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu					
			435					440					445							
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	450						455					460								
<210>	10																			
<211>	453																			
<212>	PRT																			
<213>	Artificial Sequence																			
<220><223>	synthetic construct																			
<400>	10																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly					
1				5					10					15						
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr					
			20						25				30							
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val					
			35						40				45							
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe					
	50						55				60									
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr					
65						70					75				80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys					
				85					90				95							
Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val					
			100						105				110							
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly					
			115						120				125							
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly					
	130						135					140								

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

325 330 335

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

340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

355 360 365

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr



385                      390                      395                      400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
                             405                      410                      415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
                             420                      425                      430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
  
                             435                      440                      445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
                             450  
 <210>     11  
 <211>     213  
 <212>     PRT  
 <213>     Artificial Sequence  
 <220><223>     synthetic construct  
 <400>     11  
 Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
       1                      5                      10                      15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
                             20                      25                      30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
  
                             35                      40                      45  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
                             50                      55                      60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
       65                      70                      75                      80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His  
                             85                      90                      95  
 Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser  
                             100                      105                      110  
  
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
                             115                      120                      125  
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

130 135 140  
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val  
 145 150 155 160  
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

180 185 190  
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys

210

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

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

210  
 <210> 13  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 13  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
115	120	125	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
130	135	140	
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
145	150	155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
165	170	175	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
180	185	190	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
195	200	205	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys			
210	215	220	
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala			
225	230	235	240
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
245	250	255	
Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
260	265	270	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
275	280	285	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
290	295	300	
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu			
305	310	315	320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala			
325	330	335	
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
340	345	350	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln			

355                      360                      365  
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370                      375                      380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385                      390                      395                      400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405                      410                      415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420                      425                      430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435                      440                      445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 14  
 <211> 463  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic construct  
 <400> 14  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20                      25                      30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35                      40                      45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50                      55                      60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85                      90                      95  
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr



100	105	110	
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
195	200	205	
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
210	215	220	
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr			
260	265	270	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
275	280	285	
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
290	295	300	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
305	310	315	320
Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
325	330	335	
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
340	345	350	

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro  
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala  
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455 460

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 15

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 16  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> synthetic construct  
<400> 16

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His
				85					90					95	
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser
			100					105						110	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr
			115					120					125		
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			130					135					140		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
145					150					155					160
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
					165					170					175
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
					180				185					190	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
					195				200					205	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys											
					210										