



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0063354
(43) 공개일자 2021년06월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) B01D 15/38 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
B01D 15/3804 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7010141
- (22) 출원일자(국제) 2019년09월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년04월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/052199
- (87) 국제공개번호 WO 2020/061478
국제공개일자 2020년03월26일
- (30) 우선권주장
62/734,566 2018년09월21일 미국(US)
62/742,821 2018년10월08일 미국(US)

- (71) 출원인
테네오바이오, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94560, 뉴어크, 스위트 320, 게이트웨이 블러바드 7999
- (72) 발명자
조르겐센, 브렛
미국, 캘리포니아 94560, 뉴어크, 스위트 320, 게이트웨이 블러바드 7999
셸렌베르거, 유테
미국, 캘리포니아 94560, 뉴어크, 스위트 320, 게이트웨이 블러바드 7999
- (74) 대리인
김성남

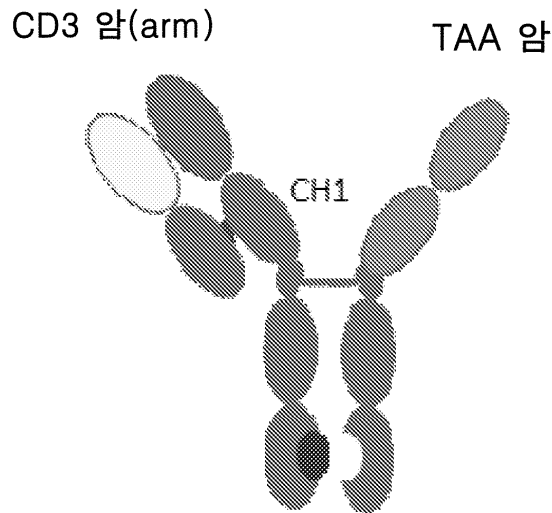
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 이중이량체 다중특이적 항체의 정제 방법

(57) 요약

용액으로부터 이중이량체 다중특이적 항체를 정제하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 1/22 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

친화성 크로마토그래피에 의해 혼합물로부터 다중특이적 IgG 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은:

상기 IgG 항체의 중쇄 불변 도메인에 대해 결합 특이성을 갖는 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼에 혼합물로부터의 다중특이적 IgG 항체를 고정시키는 단계; 및

항-응집성 조성물을 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 항체를 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 항-응집성 조성물은 하나 이상의 폴리올을 포함하는, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 폴리올은 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 25% w/v 범위의 농도를 갖는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 글리세롤을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 글리세롤은 약 10% w/v의 농도를 갖는, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 수크로스를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 수크로스는 약 10% w/v의 농도를 갖는, 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스 w/v를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 수지를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 용출 완충액은 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 용출 완충액은 시트레이트를 약 20mM 내지 약 30mM 범위의 농도로 포함하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 용출 완충액은 시트레이트를 약 25mM의 농도로 포함하는, 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 3.2 내지 약 4.2 범위의 pH를 갖는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 3.8 범위의 pH를 갖는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는, 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 25mM 시트레이트, 약 10% 글리세롤, 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼은 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 용출 완충액은 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충액을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 용출 완충액은 아세트산을 약 45mM 내지 약 55mM 범위의 농도로 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 용출 완충액은 아세트산을 약 50mM의 농도로 포함하는, 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 4.4의 pH를 갖는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 3.8 내지 약 4.2의 pH를 갖는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 4.0의 pH를 갖는, 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 용출 완충액은 약 50mM 아세트산, 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 약 4.0의 pH를 갖는, 방법.

청구항 25

친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 IgG 항체의 응집을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은:

상기 다중특이적 IgG 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에 고정시키는 단계; 및

25mM 시트레이트, 10 w/v% 글리세롤 및 10 w/v% 수크로스를 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 단백질 A 친화성

크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 IgG 항체를 용출하는 단계로서, 상기 용출 완충액은 3.6의 pH를 갖는, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 IgG 항체의 응집을 감소시키는 방법으로써, 상기 방법은:

상기 다중특이적 IgG 항체의 CH1 도메인에 대해 결합 친화성을 갖는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼 상에, 상기 다중특이적 IgG 항체를 고정시키는 단계; 및

50mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 IgG 항체를 용출하는 단계로서, 상기 용출 완충액은 4.0의 pH를 갖는, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제1항, 제25항 및 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 IgG 항체는 제1 결합 단위 및 제2 결합 단위를 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하고, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 제1 결합 단위는 종양-관련 항원에 대해 결합 친화성을 갖는, 방법.

청구항 32

제27항에 있어서, 상기 제2 결합 단위는 효과기 세포에 대해 결합 친화성을 갖는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 효과기 세포는 T 세포인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 제2 결합 단위는 T 세포 상의 CD3 단백질에 대해 결합 친화성을 갖는, 방법.

청구항 35

제1항, 제25항 및 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 IgG 항체는 이중특이적 IgG 항체인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원들에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2018년 9월 21일자 제출된 미국 임시 특허출원 제62/734,566호, 뿐만 아니라 2018년 10월 8일자 제출된 미국 임시 특허출원 제62/742,821호에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 상기 문헌들의 기재 내용은 본원에 전체가 인용되어 포함된다.

[0003] 본 발명의 기술 분야

[0004] 본 발명은 용액으로부터 이중이량체 다중특이적 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 이중특이적 항체(BsAb)는 새로운 부류의 중요한 단백질 치료제이다. BsAb는 종종 면역 효과기 세포를 재표적화하여 암세포를 죽이려는 목적으로, 2개의 상이한 항원들을 인식하고 이에 결합하도록 고안된다. 최근에, 2개의 BsAb는 유럽 의학청(EMA: European Medicines Agency)에 의해, 그리고 하나는 미국 식품의약국(FDA)에 의해 치료제로 승인받았다. 종종 이중이량체 다중특이적 항체의 정제 동안, 포획을 위해 종래의 단백질 A 크로마토그래피를 사용하면, 부분적으로, 미정제 BsAb 혼합물 중의 Fc-함유 생성물 변이체의 존재 때문에 문제가 있었다. 추가로, 다량체 단백질, 예컨대 항체는 응집되는 경향이 강하여, 불순물 수준이 유의하게 증가되는데 기여하였다. 이런 이유로, 생성물-특이적 (응집물 또는 분해 생성물) 및 공정 관련 불순물(배지 성분, HCP, DNA, 정제에 사용된 크로마토그래피 매체, 내독소, 바이러스 등)을 효과적으로 제거하고, 정확하고 완전한 충분한 양의 다중특이적 항체를 얻는 정제 방법을 개발할 필요성이 있다. 항체의 정제를 위한 다양한 방법들이 당업계에 알려져 있으나, 예를 들어, 공정-유발 변형 또는 제조 조건의 결과로서 형성될 수 있는 응집물 및 복합체로부터 다중특이적 항체를 분리 및 정제할 수 있는 대안적인 크로마토그래피 공정에 대한 필요성이 여전히 만족되지 못한 채로 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 개요

[0007] 본 발명의 양태는 친화성 크로마토그래피에 의해 혼합물로부터 다중특이적 IgG 항체를 정제하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은: IgG 항체의 중쇄 불변 도메인에 대해 결합 특이성을 갖는 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼에 혼합물로부터의 다중특이적 IgG 항체를 고정시키는 단계; 및 항-응집성 조성물을 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 다중특이적 항체를 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하되, 상기 항-응집성 조성물은 하나 이상의 폴리올을 포함하는 단계를 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 25% w/v 범위의 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 글리세롤을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 글리세롤은 약 10% w/v의 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 수크로스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 수크로스는 약 10% w/v의 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스 w/v를 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 시트레이트를 약 20mM 내지 약 30mM 범위의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 시트레이트를 약 25mM의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 3.2 내지 약 4.2 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 3.8 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 25mM 시트레이트, 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는다.

[0010] 일부 구현예에서, 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼은 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 완충액을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 아세트산을 약 45mM 내지 약 55mM 범위의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 아세트산을 약 50mM의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 4.4 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 3.8 내지 약 4.2 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 4.0의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 50mM 아세트산, 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 약 4.0의 pH를 갖는다.

- [0011] 본 발명의 양태는 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀 내에서 다중특이적 IgG 항체의 응집을 감소시키는 방법을 포함하는데, 상기 방법은: 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼에 다중특이적 IgG 항체를 고정시키는 단계; 및 25mM 시트레이트, 10 w/v% 글리세롤 및 10 w/v% 수크로스를 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 IgG 항체를 용출하되, 상기 용출 완충액은 3.6의 pH를 갖는 단계를 갖는다.
- [0012] 본 발명의 양태는 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀 내에서 다중특이적 IgG 항체의 응집을 감소시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은: 다중특이적 IgG 항체의 CH1 도메인에 대해 결합 친화성을 갖는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼에, 다중특이적 IgG 항체를 고정시키는 단계; 및 50mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하는 용출 완충액에 의해 상기 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 IgG 항체를 용출하되, 상기 용출 완충액은 4.0의 pH를 갖는 단계를 포함한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 상기 다중특이적 IgG 항체는 제1 결합 단위와 제2 결합 단위를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하고, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 종양-관련 항원에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 효과기 세포에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 효과기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 T 세포 상의 CD3 단백질에 대해 결합 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 다중특이적 IgG 항체는 이중특이적 IgG 항체이다.
- [0015] 이들 및 추가적인 양태는, 실시예들을 포함하는 본 기재 내용의 나머지에서 추가로 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 일부 구현예에 의한 BsAb 분자를 나타낸다.
- 도 2는 BsAb의 비-제한적인 예시를 나타낸다. 이러한 도시된 구현예는 제1 VH 도메인과 제2 VH 도메인을 포함하는 CD3-결합 암(arm)과 TAA-결합 암을 포함한다. 도시된 구현예에서, 제1 VH 도메인과 제2 VH 도메인은 동일하고, 둘 다 TAA에 대해 결합 친화성을 갖는다.
- 도 3은 도 2에 도시된 BsAb의 활성 형태 및 불활성 형태를 나타낸다. 활성 형태는 이중이량체인데 반해(패널 A), 불활성 형태는 TAA 동종이량체, 절반-Ab, CD3 동종이량체, 과잉 경쇄(LC) 및 응집물을 포함한다.
- 도 4는 SEC 분석을 위한 시간 함수로서의 흡광도 단위(AU)의 그래프를 나타낸다. 상기 그래프는 BsAb 이중이량체가 단지 CD3-결합 암만을 함유하는 CD3 동종이량체와 크기가 유사하다는 것을 나타낸다(도 3, 패널 B에 도시됨).
- 도 5는 BsAb 이중이량체, CD3 동종이량체 및 TAA 동종이량체가 상이한 등전점(pI)을 갖는다는 것을 나타내는 IEF 겔 분석을 도시한다.
- 도 6은 pH 3.6에서의 단백질 A 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출 특성을 나타낸다. 그 결과는 용출된 피크가 총 통합 면적의 96%라는 것을 나타낸다. 로딩, 평형화 및 용출 조건이 기재되어 있다.
- 도 7은 SEC 분석을 위한 시간 함수로서의 흡광도 단위(AU)의 그래프를 도시하는데, 이는 BsAb가 pH 3.6에서의 단백질 A 용출 이후 응집된다는 것을 입증한다. 완충액 및 유속 조건이 기재되어 있다.
- 도 8은 고분자량 분획이 BsAb 생성물에 해당한다는 것을 확인하는 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.
- 도 9는 첨가제가 단백질 A 용출된 BsAb의 응집을 감소시킬 수 있다는 것을 입증하는 일련의 그래프들을 나타낸다. 조사된 첨가제는 만니톨, 글리세롤, 수크로스 및 트레할로스를 다양한 조합으로 포함하였다.
- 도 10에서, 패널 A는 CH1 도메인을 포함하는 활성 BsAb 분자를 나타내고, 패널 B는 불활성 TAA 동종이량체를 나타낸다.
- 도 11은 단백질 A 풀과 CaptureSelect CH1(CH1-XL) 풀을 비교하는 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 상기 분석은 TAA 동종이량체가 CH1-XL 통과액(flow through)에 존재한다는 것을 입증한다.

도 12는 BsAb에 대한 단백질 A 포획 및 용출 특성(패널 A)과 CH1-XL 포획 및 용출 특성(패널 B)을 비교한 결과이다. 단백질 A 용출은 3.3의 pH에서 실시되었으나, CH1-XL 용출은 4.66의 pH에서 실시되었다.

도 13은 용출이 pH 4에서 실시될 때의 BsAb의 CH1-XL 포획 및 용출 특성을 나타낸다. 그 결과는 BsAb가 효과적으로 용출되었으며, 통합된 피크 면적의 93%를 차지한다는 것을 나타낸다.

도 14는 SEC 분석을 위한 시간 함수로서의 흡광도 단위(AU)의 그래프를 도시하는데, CH1-XL로부터 용출된 BsAb가 최소 응집물을 함유한다는 것을 입증한다. CH1-XL 풀은 낮은 HMW 함량(2.2%)을 함유하나, 수확된 세포 배양 유체(HCCF)에서 효과적인 생성물 결합을 한다.

도 15는 CH1-XL 크로마토그래피 수지의 체류 시간 및 동적 결합력을 나타내는 표이다. 그 결과는 동적 결합력(DBC)이 4분(9.3 mg/mL)에서 평탄부를 이룬다는 것을 입증하였다

도 16은 BsAb의 제조 공정과 관련된 다양한 상류 및 하류 유닛 가동을 예시하는 흐름도이다.

도 17은 BsAb 정제 공정의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 바람직한 구현예의 상세한 설명
- [0018] 본 발명의 실행은 달리 지정된 바 없는 경우 당업계의 기술 범위 내에 속하는 분자생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 및 면역학의 종래의 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술들은 문헌["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 제2판(Sambrook 등, 1989)]; 문헌["Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984)]; 문헌["Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987)]; 문헌["Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.)]; 문헌["Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel 등, eds., 1987, and periodic updates)]; 문헌["PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis 등, ed., 1994)]; 문헌["A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988)]; 문헌["Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas 등, 2001)]; 문헌[Harlow, Lane 및 Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998)]; 문헌[Harlow 및 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)]; 및 문헌[Uwe Gottschalk, "Process Scale Purification of Antibodies" (2017)]과 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다.
- [0019] 다양한 값들이 제공되는 경우, 문맥에서 달리 명백히 규정된 바 없는 때, 지정된 범위의 상한과 하한 사이에서 하한 단위로부터 열 번째까지의 중간값, 및 그 지정된 범위 내의 임의의 지정된 값 또는 중간값은, 각각 본 발명 내에 속한다고 이해된다. 이러한 더 작은 범위들의 상한과 하한은 더욱 작은 범위들 내에 독립적으로 포함될 수 있고, 또한 지정된 범위 내에서 특히 배제된 임의의 제한값을 제외하고는 본 발명 내에 포함된다. 지정된 범위가 한계값들 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이러한 포함된 한계값들 중 어느 하나 또는 둘 다를 배제하는 범위도 또는 본 발명에 포함된다.
- [0020] 달리 지정된 바 없는 경우, 본원에서 항체 잔기는 Kabat 번호지정 시스템 (예를 들어, 문헌[Kabat 등, Sequences of Immunological Interest. 5판. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)])에 따라 번호가 부여된다.
- [0021] 이하의 설명에서, 다수의 구체적인 상세 사항들은 본 발명의 이해를 더욱 철저히 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 당업계의 숙련자에게 본 발명이 이러한 하나 이상의 구체적인 상세사항 없이도 실시될 수 있다는 사실은 명백할 것이다. 다른 경우에, 잘 알려진 특징들과 당업계의 숙련자들에게 잘 알려진 과정은, 본 발명을 모호하게 하는 것을 피하기 위해 기재하지 않았다.
- [0022] 특허 출원과 간행물을 포함하는 본 기재 내용 전반에서 인용된 모든 참고 문헌들은, 본원에 전체가 인용되어 포함된다.
- [0023] I. 정의
- [0024] "포함하는(comprising)"은, 조성물/방법/키트에서 열거된 요소들이 요구되나, 본 발명의 범주 내에서 조성물/방법/키트 등을 형성하기 위해 다른 요소들도 포함될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0025] "로 본질적으로 이루어지는(consisting essentially of)"은, 조성물 또는 방법의 범주의 한계가 본 발명의 기본적인 신규한 특성(들)에 현저히 영향을 주지 않는 지정된 물질 또는 단계들에 대해 기재되었다는 것을 의미한다

다.

- [0026] "로 이루어지는(consisting of)"은, 본 청구항에 특정되지 않은 어떠한 요소, 단계 또는 성분도 조성물, 방법 또는 키트로부터 배제된다는 것을 의미한다.
- [0027] 본원에 사용된 용어 "결합 단위(binding unit)"는, 연결된 항체 경쇄 가변 도메인(V_L) 서열이 있거나 없는, 결합 표적에 결합하는 적어도 하나의 가변 도메인 서열 (V_H)을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 단일 V_H 도메인을 포함한다. 다른 구현예에서, 결합 단위는 V_H 도메인 및 V_L 도메인을 포함한다.
- [0028] "정제된(purified)" 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)는, 항체의 순도가 증가하여, 이것이 자연 환경에서 존재할 때 및/또는 실험 조건 하에 처음에 합성되고/되거나 증폭될 때보다 더욱 순수한 형태로 존재한다는 것을 의미한다. 순도는 상대적인 용어이며, 반드시 절대적인 순도를 의미하지는 않는다. 용어 "정제하는(purifying)" 또는 "분리하는(separating)"은, 본원에서 상호교환적으로 사용되는데, 원하는 분자와 하나 이상의 불순물을 포함하는 조성물 또는 샘플로부터 원하는 분자(예컨대, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)의 순도의 정도를 증가시키는 것을 지칭한다. 전형적으로, 원하는 분자의 순도의 정도는 조성물로부터 적어도 하나의 불순물을 (완전히 또는 부분적으로) 제거함으로써 증가한다.
- [0029] 본 발명의 방법에 따라 정제될 수 있는 항체는, 다중-특이적 항체를 포함한다. 다중-특이적 항체는 하나 초과와 결합 특이성을 갖는다. 용어 "다중-특이적(multi-specific)" 또는 "다중특이적"은, 특히 "이중특이적(bispecific)" 및 "삼중특이적(trispecific)"은 물론 고-차원의 독립적이고 특이적인 결합 친화성, 예컨대 고-차원의 폴리에피토프 특이성을 포함할 뿐만 아니라, 4가 항체 및 그 항체 절편들도 포함한다. "다중-특이적" 항체는 특히 상이한 결합 엔티티(entity)들의 조합을 포함하는 항체, 뿐만 아니라 하나 초과와 동일한 결합 엔티티를 포함하는 항체를 포함한다. 용어 "다중-특이적 항체", "다중-특이적 중쇄-단독 항체(multi-specific heavy chain-only antibody)", "다중-특이적 중쇄 항체" 및 "다중-특이적 UniAb™"는, 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되어, 하나 초과와 결합 특이성을 갖는 모든 항체를 아우른다. 비-제한적인 예에서, 본 발명에 의해 정제된 다중-특이적 항체는, 특히 CD3 단백질, 예컨대 인간 CD3 및 BCMA 단백질, 예컨대 인간 BCMA에 면역특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.
- [0030] 본원에 사용된 용어 "응집물(aggregate)"은, 단백질 응집물, 예를 들어, 동종이량체를 지칭한다. 이것은 정제된 다중특이적 항체 및/또는 이들의 하위 단위의 다량체(예컨대 이량체, 사량체 또는 고차원 응집물)를 포괄하며, 예를 들어, 고분자량 응집물을 생성할 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 "항-응집성 조성물(Anti-aggregation composition)"은, 둘 이상의 단백질, 예를 들어, 다중특이적 항체, 또는 이의 하위 단위들의 원치않는 결합을 감소시키는 조성물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 항-응집성 조성물은 하나 이상의 폴리올을 포함한다.
- [0032] "폴리올(polyol)"은 다수의 히드록실 기를 갖는 물질인데, 당(환원당 및 비-환원당), 당 알콜 및 당 산을 포함한다. 폴리올의 비-제한적인 예는, 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스 및 소르비톨을 포함한다.
- [0033] "로딩 밀도>Loading density)"는, 예를 들어, 일정 부피, 예컨대 리터의 크로마토그래피 물질과 접촉되는, 예를 들어, 조성물의 양, 예컨대 그래프를 지칭한다. 일부 예에서, 로딩 밀도는 g/L로 표현된다.
- [0034] "샘플(sample)"은 더 많은 양의 물질 중 일부 부분을 지칭한다. 일반적으로, 본원에 기재된 방법에 따른 시험은 샘플에 대해 실시된다. 샘플은 통상 예를 들어 본원에서 "생산 세포주(product cell lines)"로도 지칭되는 포획된 재조합 폴리펩티드-발현 세포주나, 배양된 숙주 세포로부터 얻은 재조합 폴리펩티드 제제를 포함하는 "혼합물(mixture)"로부터 얻는다. 샘플은 정제 과정의 특정 단계에서의 공정 중의 풀로부터, 또는 최종 정제된 생성물로부터 수확된 세포 배양 유체를 포함하나 이에 제한되지 않는 혼합물로부터 얻을 수 있다. 샘플은 또한 원하는 분자(예컨대, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)와 혼합되어 발견되는 희석제, 완충액, 계면활성제 및 오염 중, 찌꺼기 등도 포함할 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 "숙주 세포(host cell)"는, 관심 대상인 재조합 폴리펩티드의 발현을 위한 유전자 및 생성물은 포함하지 않으나, 오히려 예를 들어, 형질감염에 의해 도입될 이러한 유전자에 대한 수용성 숙주로서의 역할을 한다.
- [0036] 본원에 기재된 용어 "생성물(product)"은, 본 발명의 방법에 의해 정제될 물질; 예를 들어, 폴리펩티드(예를 들

어, 다중특이적 항체)이다.

- [0037] 용어 "중쇄-단독 항체" 및 "중-쇄 항체"는, 본원에 상호교환적으로 사용되는데, 가장 넓은 의미에서 종래의 항체의 경쇄가 결핍된 항체를 지칭한다. 중쇄-단독 항체는 예를 들어 WO 2018/119215에 기재되어 있는데, 상기 문헌의 기재 내용은 전체가 본원에 인용되어 포함된다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "단일클론 항체(monoclonal antibody)"는, 실질적으로 동일한 항체들의 집단으로부터 얻은 항체를 지칭하는데, 즉, 개별 항체들을 포함하는 집단은 경미한 양으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생적인 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 매우 특이적이다. 추가로, 통상 상이한 결정기들(에피토프)에 대한 상이한 항체들을 포함하는 종래의 (다중클론) 항체 제제와 달리, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대한 것이다. 본 발명에 의한 단일클론 항체는, 문헌[Kohler 등 (1975) Nature 256:495]에 먼저 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있으며, 또한 예를 들어, 재조합 단백질 생산 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참고)을 통해 제조될 수도 있다.
- [0039] 본원에 사용된 "무손상 항체 사슬(intact antibody chain)"은, 전체 길이의 가변 부위와 전체 길이의 불변 부위(Fc)를 포함하는 것이다. "종래의(conventional)" 무손상 항체는, 무손상 경쇄와 무손상 중쇄, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL)과 중쇄 불변 도메인, CH1, 힌지, 분비형 IgG에 대해서는 CH2와 CH3를 포함한다. 무손상 항체는 하나 이상의 "효과기 기능(effector function)"을 가질 수 있는데, 이는 항체의 Fc 불변 부위(자연적 서열 Fc 부위 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 부위)에 기인한 이들의 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는, C1q 결합; 보체 의존성 세포 독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포 독성(ADCC); 대식 작용; 및 세포 표면 수용체의 하향 조절을 포함한다. 불변 부위 변이체는 Fc 수용체에 결합하는 등의 효과기 특성을 변화시키는 것들을 포함한다.
- [0040] 이들의 중쇄의 Fc(불변 도메인)의 아미노산 서열에 따라서, IgG 부류 유래의 항체 및 다양한 항원-결합 단백질은 상이한 하위 부류들로서 제공될 수 있다. IgG 부류의 항체는 추가로 4개의 "하위 부류(subclass)"(동형체), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 나누어질 수 있다. IgG 부류의 항체에 상응하는 Fc 불변 도메인은, γ (감마)로 언급될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로블린들의 하위 단위 구조 및 3-차원 배치는 잘 알려져 있다. Ig 형태들은 힌지-변형되거나, 힌지없는 형태를 포함한다(문헌[Roux 등 (1998) J. Immunol. 161:4083-4090]; 문헌[Lund 등 (2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256]; US 2005/0048572; US 2004/0229310). 어느 척추동물 중 유래의 항체의 경쇄도, 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, κ 및 λ 로 불리는 두 가지 타입 중 하나에 할당될 수 있다. 본 발명의 구현예에 따른 방법은, (본원에 추가로 기재된) 이들의 변이체 서열을 포함하는 임의의 하위 부류의 IgG 항체, 즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4과 함께 사용될 수 있다.
- [0041] "작용성 Fc 부위(functional Fc region)"는, 자연적-서열 Fc 부위의 "효과기 기능"을 갖는다. 효과기 기능의 비-제한적인 예는, C1q 결합; CDC; Fc-수용체 결합; ADCC; ADCP; 세포-표면 수용체(예를 들어, B-세포 수용체)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 효과기 기능은, 일반적으로 수용체, 예를 들어, Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIAA; Fc γ RIIIB 수용체, 및 저 친화성 FcRn 수용체와 상호작용하는 Fc 부위를 필요로 하며; 당업계에 알려진 다양한 검정법들을 사용하여 평가될 수 있다. "죽은(dead)" 또는 "침묵(silenced)" Fc는, 예를 들어, 혈장 반감기를 연장시키는 것에 관한 활성을 보유하나, 고친화성 Fc 수용체를 활성화시키지 않도록 돌연변이화된 것이다.
- [0042] "자연적-서열 Fc 부위(native-sequence Fc region)"는, 자연에서 발견되는 Fc 부위의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 자연적-서열 인간 Fc 부위는, 예를 들어, 자연적-서열 인간 IgG1 Fc 부위(비-A 알로 타입 및 A 알로타입); 자연적-서열 인간 IgG2 Fc 부위; 자연적-서열 인간 IgG3 Fc 부위; 및 자연적-서열 인간 IgG4 Fc 부위, 뿐만 아니라 이들의 자연발생적인 변이체를 포함한다.
- [0043] "변이체 Fc 부위(variant Fc region)"는, 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)에 의해, 자연적-서열 Fc 부위와 다른 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 부위는 자연적-서열 Fc 부위 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위에 비해, 자연적-서열 Fc 부위 또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위 내에 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서, 변이체 Fc 부위는 바람직하게는 자연적-서열 Fc 부위 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 부위와 적어도 약 80%의 동일성, 가장 바람직하게는 이와 적어도 약 90%의 동일성, 더욱 더 바람직하게는 이와 적어도 약 95%의 동일성을 가질 것이다.
- [0044] 변이체 Fc 서열은 CH2 부위에 3개의 아미노산 치환을 포함하여, EU 지수 위치 234, 235 및 237에서의 Fc γ RI 결

합을 감소시킬 수 있다(문헌[Duncan 등, (1988) Nature 332:563] 참고). EU 지수 위치 330 및 331에서의 보체 C1q 결합 영역 내의 2개의 아미노산 치환은, 보체 고정을 감소시킨다(문헌[Tao 등, J. Exp. Med. 178:661 (1993)] 및 문헌[Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)] 참고). 위치 233-236에서의 IgG2 잔기 및 위치 327, 330 및 331에서의 IgG4 잔기를 인간 IgG1으로 치환하면, ADCC 및 CDC를 크게 감소시킨다(예를 들어, 문헌[Armour KL. 등, 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24]; 및 문헌[Shields RL. 등, 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604] 참고). 인간 IgG1 아미노산 서열(UniProtKB No. P01857)은 본원에서 서열번호 43으로 제공된다. 인간 IgG4 아미노산 서열(UniProtKB No. P01861)은 본원에서 서열번호 44로 제공된다. 침묵 IgG1은 예를 들어, 문헌[Boesch, AW., 등, "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions". MAbs, 2014. 6(4): p. 915-27]에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 기재 내용은 본원에서 전체가 인용되어 포함된다.

[0045] 디설파이드 결합을 형성할 수 있는 부위가 결실되거나, 특정 아미노산 잔기가 자연적 Fc의 N-말단에서 제거되거나, 메티오닌 잔기가 첨가된 다른 Fc 변이체도, 제한 없이 가능하다. 따라서, 일부 구현예에서, 결합 화합물의 하나 이상의 Fc 부위는 힌지 부위에 하나 이상의 돌연변이를 포함하여, 디설파이드 결합을 없앨 수 있다. 또 다른 구현예에서, Fc의 힌지 부위는 전부 제거될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 결합 화합물은 Fc 변이체를 포함할 수 있다.

[0046] 추가로, Fc 변이체는 아미노산 잔기를 치환(돌연변이화), 결실 또는 첨가함으로써 효과기 기능을 제거하거나, 실질적으로 감소시켜, 보체 결합 또는 Fc 수용체 결합에 영향을 주도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 결실은 보체-결합 부위, 예컨대 C1q-결합 부위에서 발생할 수 있다. 이러한 이뮤노글로블린 Fc 절편의 서열 유도체를 제조하는 기술은, 국제 특허 공보 WO 97/34631 및 WO 96/32478에 개시되어 있다. 추가로, Fc 도메인은 인산화, 황산화, 아실화, 글리코실화, 메틸화, 파르네실화(farnesylation), 아세틸화, 아미드화 등에 의해 변형될 수 있다.

[0047] Fc는 자연적인 당 사슬, 자연적 형태에 비해 증가된 당 사슬, 또는 자연적 형태에 비해 감소된 당 사슬을 갖는 형태일 수 있거나, 비글리코실화 또는 탈글리코실화된 형태일 수 있다. 당 사슬의 증가, 감소, 제거 또는 다른 변형은, 당업계의 통상적인 방법, 예컨대 화학적 방법, 효소적 방법에 의해, 또는 유전자 조작된 생산 세포주에서 이를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 세포주는 미생물, 예를 들어, 피치아 파스토리스(*PiChia Pastoris*), 및 포유류 세포주, 예를 들어 글리코실화 효소를 자연적으로 발현하는 CHO 세포를 포함할 수 있다. 추가로, 미생물 또는 세포는 글리코실화 효소를 발현시키도록 조작될 수 있거나, 글리코실화 효소를 발현시킬 수 없게 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Hamilton, 등, Science, 313:1441 (2006)]; 문헌[Kanda, 등, J. Biotechnology, 130:300 (2007)]; 문헌[Kitagawa, 등, J. Biol. Chem., 269 (27): 17872 (1994)]; 문헌[Ujita-Lee 등, J. Biol. Chem., 264 (23): 13848 (1989)]; 문헌[Imai-Nishiya, 등, BMC Biotechnology 7:84 (2007)]; 및 WO 07/055916 참고). 시알릴화(sialylation) 활성이 변화되도록 조작된 세포의 한 예로서, 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제(sialyltransferase) 1 유전자는 중국 햄스터 난소 세포 및 sf9 세포 내로 조작되었다. 따라서, 이러한 조작된 세포들에 의해 발현된 항체는, 외인성 유전자 생성물에 의해 시알화된다. 복수의 자연적 분자들에 비해 당 잔기의 양이 변화한 Fc 분자를 얻기 위한 추가적인 방법은, 예를 들어, 렉틴 친화성 크로마토그래피를 사용하여, 상기 복수의 분자들을 글리코실화 분획과 비-글리코실화 분획으로 분리하는 단계를 포함한다(예를 들어, WO 07/117505 참고). 특정 글리코실화 모이어티의 존재는 이뮤노글로블린의 기능을 변경시키는 것으로 나타났다. 예를 들어, Fc 분자로부터 당 사슬을 제거하면, 제1 보체 요소 C1의 C1q 부분에 대한 결합 친화성을 급격히 감소시키고, 항체-의존성 세포-매개 세포 독성(ADCC) 또는 보체-의존성 세포 독성(CDC)을 감소 또는 상실시킴으로써, 생체 내에서 불필요한 면역 반응들을 유도하지 않는다. 추가적인 중요한 변형은 시알릴화 및 푸코실화(fucosylation)를 포함한다: IgG 내의 시알산의 존재는 항-염증 활성과 관련되나(예를 들어, 문헌[Kaneko, 등, Science 313:760 (2006)] 참고), IgG로부터 푸코스를 제거하면 ADCC 활성이 향상된다(예를 들어, 문헌[Shoj-Hosaka, 등, J. Biochem., 140:777 (2006)] 참고).

[0048] 대안적인 구현예에서, 본 발명에 의해 정제된 결합 화합물들은 예를 들어, Fc γ RIIIA에 대한 이들의 결합력을 증가시키고, ADCC 활성을 증가시킴으로써, 효과기 기능이 향상된 Fc 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, Fc의 Asn-297에서 N-연결된 글리칸에 부착된 푸코스는 Fc와 Fc γ RIIIA의 상호작용을 입체적으로 방해하며, 당-조작에 의해 푸코스를 제거하면 Fc γ RIIIA에 대한 결합을 증가시킬 수 있는데, 이는 야생형 IgG1 대조군에 비해 >50-배 더 높은 ADCC 활성으로 해석된다. IgG1의 Fc 부위에서의 아미노산 돌연변이를 통한 단백질 조작은, Fc γ RIIIA에 대한 Fc 결합의 친화성을 증가시키는 다수의 변이체들을 생성하였다. 주목할만하게도, 삼중 알라닌 돌연변이체 S298A/E333A/K334A는 Fc γ RIIIA에 대한 결합이 2배 증가하였고, ADCC 기능을 나타내었다. S239D/1332E (2X) 및

S239D/1332E/A330L (3X) 변이체는 시험관내 및 생체내에서 Fc γ R11A에 대한 결합 친화성이 유의하게 증가하였고, ADCC 능력이 증가하였다. 효모에 의해 식별된 다른 Fc 변이체는, 마우스 이중이식 모델에서 Fc γ R11A에 대한 결합성 개선과 종양 세포 사멸의 향상도 또한 나타낸다. 예를 들어, 본원에 전체가 특히 인용되어 포함된 문헌[Liu 등 (2014) JBC 289(6):3571-90]을 참고한다.

[0049] 용어 "Fc-부위-포함 항체(Fc-region-comprising antibody)"는, Fc 부위를 포함하는 항체를 지칭한다. Fc 부위의 C-말단 리신(EU 번호지정 시스템에 의할 때 잔기 447)은, 예를 들어, 항체를 정제하는 동안, 또는 항체를 암호화하는 핵산을 재조합 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 의한 Fc 부위를 갖는 항체는, K447를 갖거나 갖지 않는 항체를 포함할 수 있다.

[0050] 다가 인공 항체의 생산을 위한 다양한 방법들은, 둘 이상의 항체의 가변 도메인들을 재조합에 의해 융합시킴으로써 개발되었다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 상의 제1 항원-결합 도메인과 제2 항원-결합 도메인은 폴리펩티드 링커에 의해 연결된다. 이러한 폴리펩티드 링커의 하나의 비-제한적인 예는, 4개의 글리신 잔기와 그 이후 하나의 세린 잔기의 아미노산 서열을 갖는 GS 링커인데, 상기 서열은 n번 반복되고, 여기에서 n은 1 내지 약 10, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9의 정수이다. 이러한 링커의 비-제한적인 예는, GGGGS(서열번호 1)(n=1) 및 GGGSGGGGS(서열번호 2)(n=2)를 포함한다. 다른 적절한 링커들도 또한 사용될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Chen 등, Adv Drug Deliv Rev. 2013년 10월 15일; 65(10): 1357-69]에도 또한 기재되어 있는데, 상기 문헌의 기재 내용은 본원에서 전체가 인용되어 포함된다.

[0051] 용어 "이중특이적 3-쇄 항체 유사 분자(bispecific three-chain antibody like molecule)" 또는 "TCA"는, 본원에서 3개의 폴리펩티드 하위 단위들을 포함하거나, 이를 필수적으로 포함하거나, 이로서 이루어지되, 그 중 2개는 단일클론 항체의 하나의 중쇄와 하나의 경쇄, 또는 항원-결합 부위와 적어도 하나의 CH 도메인을 포함하는 이러한 항체 사슬들의 작용성 항원-결합 절편들을 포함하거나, 이를 필수적으로 포함하거나, 이로서 이루어지는 항체-유사 분자를 지칭하는데 사용된다. 이러한 한 쌍의 중쇄/경쇄는 제1 항원에 대해 결합 특이성을 갖는다. 제3 폴리펩티드 하위 단위는 CH1 도메인 없이 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4 도메인을 포함하는 Fc 부위, 및 제2 항원의 에피토프 또는 제1 항원의 상이한 에피토프에 결합하고 항원 결합 도메인을 포함하는 중-쇄 단독 항체를 포함하거나, 이를 필수적으로 포함하거나, 이로서 이루어지며, 여기에서 이러한 결합 도메인은 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 부위로부터 유래하거나, 이와 서열동일성을 갖는다. 이러한 가변 부위의 일부는 VH 및/또는 VL 유전자 세그먼트, D 및 JH 유전자 세그먼트, 또는 JL 유전자 세그먼트에 의해 암호화될 수 있다. 가변 부위는 재배열된 VHDJH, VLDJH, VHJL 또는 VLJL 유전자 세그먼트에 의해 암호화될 수 있다.

[0052] TCA 결합 화합물은 중쇄 불변 부위 CH2 및/또는 CH3 및/또는 CH4를 포함하나 CH1 도메인은 포함하지 않는 단일 사슬 항체를 의미하는, 본원에 사용된 "중쇄 단독 항체" 또는 "중쇄 항체" 또는 "중쇄 폴리펩티드"를 이용한다. 일 구현예에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 부위의 적어도 일부, 및 CH2 도메인과 CH3 도메인으로 구성된다. 다른 구현예에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 부위의 적어도 일부, 및 CH2 도메인으로 구성된다. 추가적인 구현예에서, 중쇄 항체는 항원-결합 도메인, 힌지 부위의 적어도 일부, 및 CH3 도메인으로 구성된다. 또한, CH2 및/또는 CH3 도메인이 잘려나간 중쇄 항체도 본원에 포함된다. 추가적인 구현예에서, 중쇄는 항원 결합 도메인, 및 적어도 하나의 CH(CH1, CH2, CH3, 또는 CH4) 도메인으로 구성되나, 힌지 부위는 없다. 중쇄 단독 항체는 이량체의 형태일 수 있는데, 여기에서 2개의 중쇄는 서로 디설파이드 결합을 하거나, 그렇지 않으면 공유결합 또는 비-공유결합에 의해 서로 부착되고, 선택적으로 하나 이상의 CH 도메인들 사이에 비대칭 계면을 포함하여, 폴리펩티드 사슬들 간의 적합한 짝맞춤을 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 구현예에 의해 정제된 중-쇄 항체는, IgG 부류에 속한다. 특정 구현예에서, 중쇄 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위 부류, 특히 IgG1 하위타입 또는 IgG4 하위타입이며, (본원에 추가로 기재된) 이들의 변이체를 포함한다.

[0053] "에피토프(epitope)"는 결합 화합물의 항원-결합 부위가 결합하는 항원 분자의 표면 영역이다. 일반적으로, 항원은 몇몇 또는 많은 상이한 에피토프들을 갖고, 많은 상이한 결합 화합물들(예를 들어, 많은 상이한 항체들)과 반응한다. 상기 용어는 특히 선형 에피토프와 입체적인 에피토프를 포함한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "원자가(valent)"는, 항체 분자 또는 결합 화합물 내의 결합 부위의 구체적인 수를 지칭한다.

[0055] "다-가(multi-valent)" 결합 화합물은, 둘 이상의 결합 영역을 갖는다. 따라서, 용어 "2가(bivalent)", "3가(trivalent)" 및 "4가(tetravalent)"는, 각각 2개의 결합 영역, 3개의 결합 영역 및 4개의 결합 영역의 존재를 지칭한다. 따라서, 본 발명에 의한 방법에 따라 정제된 이중특이적 항체는 적어도 2가이고, 3가, 4가, 또는 그렇지 않은 경우 다가일 수도 있다. 매우 다양한 방법과 단백질 배치가 공지되어 있으며, 이중특이적 단일클론

항체(BsMAB), 삼중-특이적 항체 등의 제조에 사용된다.

- [0056] 본원에 사용된 용어 "효과기 세포(effector cell)"는, 면역 반응의 인지 및 활성화 단계 외에, 면역 반응의 효과기 단계에 관련된 면역 세포를 지칭한다. 일부 효과기 세포는 특이적인 Fc 수용체를 발현하고, 특이적인 면역 기능을 수행한다. 일부 구현예에서, 효과기 세포, 예컨대 내추럴 킬러 세포(natural killer)는, 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 유발할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현하는 단핵구와 대식세포는, 표적 세포의 특이적인 사멸, 및 면역계의 다른 요소들에 대한 항원의 제시 또는 항원을 제시하는 세포에 대한 결합에 관여한다. 일부 구현예에서, 효과기 세포는 표적 항원 또는 표적 세포를 포식할 수 있다(phagocytose).
- [0057] "인간 효과기 세포(Human effector cell)"는, 수용체, 예컨대 T 세포 수용체 또는 FcR를 발현시키고, 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 상기 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현시키고, ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는, 내추럴 킬러(NK) 세포, 단핵구, 세포 독성 T 세포 및 호중구를 포함하고; NK가 바람직하다. 효과기 세포는 이의 천연 공급원, 예를 들어, 혈액 또는 본원에 기재된 PBMC로부터 분리될 수 있다.
- [0058] 용어 "면역 세포(immune cell)"는, 본원에서 제한 없이 넓은 의미로 사용되는데, 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구(예컨대, B 세포, 및 세포용해성 T 세포(CTL)를 포함하는 T 세포), 킬러 세포, 내추럴 킬러(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예컨대 호중구, 과립구, 비만 세포, 및 호염기구를 포함한다.
- [0059] 항체 "효과기 기능(effector function)"은, 항체의 Fc 부위(자연적 서열 Fc 부위 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 부위)에 기인하는 이러한 생물학적 활성들을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는, C1q 결합; 보체 의존성 세포 독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포 독성(ADCC); 대식 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다.
- [0060] "항체-의존성 세포-매개 세포 독성(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)" 및 "ADCC"는, 세포-매개 반응으로써, Fc 수용체(FcR)를 발현하는 비특이적인 세포 독성 세포(예를 들어, 내추럴 킬러(NK) 세포, 호중구, 및 대식세포)가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식한 후, 표적 세포를 용해시키는 것을 지칭한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌[Ravetch 및 Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464 페이지의 표 3에 요약되어 있다. 흥미 대상인 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정법, 예컨대 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 것을 실시할 수 있다. 이러한 검정법에 유용한 효과기 세포는, 말초혈 단핵구(PBMC)와 내추럴 킬러(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 흥미 대상인 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어, 문헌[Clynes 등 *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 기재된 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0061] "보체 의존성 세포 독성(Complement dependent cytotoxicity)" 또는 "CDC"는, 보체의 존재 하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 동족 항원(cognate antigen)과 복합체를 이룬 분자(예를 들어, 항체)에 대해 보체계의 제1 요소(C1q)가 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어, 문헌[Gazzano-Santoro 등, *J. Immunol. 방법* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정법을 실시할 수 있다.
- [0062] 본원에서 용어 "치료(treatment)", "치료하는(treating)" 등은, 일반적으로 원하는 약학적 효과 및/또는 생리적 효과를 얻는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 그 효과는 질병 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하기 위한 측면에서는 예방적이고/이거나, 질병 및/또는 질병에 기인하는 유해 효과를 부분적으로 또는 완전히 치유하는 측면에서는 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 "치료"는, 포유류에서 질병의 어떠한 치료도 포함하며, 이하의 것들을 포함한다: (a) 질병에 취약할 수 있으나, 아직 질병으로 진단되지 않은 대상체에서의 질병 발생 방지; (b) 질병의 억제, 즉, 이의 발달의 저지; 또는 (c) 질병의 완화, 즉, 질병의 퇴행 유발. 치료제는 질병 또는 부상의 발병의 이전, 도중 또는 이후에 투여될 수 있다. 진행 중인 질병의 치료는, 그 치료가 환자의 원치 않는 임상적 증상을 안정화시키거나 감소시키는 경우, 특히 관심의 대상이다. 이러한 치료는 바람직하게는 발병된 조직의 기능이 완전히 상실되기 전에 수행된다. 해당 치료는 질병의 증상 발생 단계 동안, 일부의 경우 질병의 증상 발생 단계 이후에 투여될 수 있다.
- [0063] 용어 "대상체(subject)", "개체(individual)", 및 "환자(patient)"는, 본원에서 상호교환적으로 사용되는데, 치료를 위해 평가되고/되거나 치료 중인 포유류를 지칭한다. 일 구현예에서, 포유류는 인간이다. 용어 "대상

체", "개체" 및 "환자"는, 제한 없이 암(cancer)을 갖는 개체, 및/또는 자가면역 질병을 갖는 개체 등을 포함한다. 대상체는 인간일 수 있으나, 또한 다른 포유류, 특히 인간 질병에 대한 실험 동물로서 유용한 포유류, 예를 들어, 마우스, 래트 등도 포함할 수 있다.

[0064] 용어 "약학적 제제(pharmaceutical formulation)"는, 활성 성분의 생물학적 활성을 유효하게 하는 형태이며, 제제가 투여될 대상체에 대해 허용불가능할 정도로 독성을 갖는 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균된다. "약학적으로 허용가능한(Pharmaceutically acceptable)" 부형제(비히클, 첨가제)는, 대상 포유류에 적절히 투여되어, 이용될 활성 성분의 유효 용량을 제공할 수 있는 것이다.

[0065] "멸균(sterile)" 제제는, 살균되거나, 또는 살아있는 모든 미생물과 이들의 포자를 포함하지 않거나 본질적으로 포함하지 않는다. "동결(frozen)" 제제는 0°C 미만의 온도에 있는 것이다.

[0066] "안정한(stable)" 제제는, 저장시 그 내부의 단백질이 이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 필수적으로 유지하는 것이다. 바람직하게는, 상기 제제는 저장시 이의 물리적 안정성과 화학적 안정성, 뿐만 아니라 이의 생물학적 활성을 필수적으로 유지한다. 저장 기간은 일반적으로 상기 제제의 의도된 저장 수명에 기초하여 선택된다. 단백질 안정성을 측정하는 다양한 분석 기술들이 당업계에 이용가능하며, 예를 들어 문헌[Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)] 및 문헌[Jones. A Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에서 검토되어 있다. 안정성은 선택된 시기 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 안정성은 다양한 상이한 방식들에 의해 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있는데, 이는 (예를 들어 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 탁도를 측정함으로써, 및/또는 육안 검사에 의한) 응집체 형성의 평가; 양이온 교환 크로마토그래피, 이미지 모세관 등전점 전기영동(icIEF: image capillary isoelectric focusing) 또는 모세관 구역 전기영동(capillary zone electrophoresis)을 사용하여 전하 이질성(charge heterogeneity)을 평가함으로써; 아미노-말단 또는 카르복시-말단 서열 분석; 질량 분광측정 분석; 환원된 무손상 항체에 비교한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 맵(예를 들어, 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능의 평가 등을 포함한다. 불안정성은 이하의 것들 중 임의의 하나 이상과 관계될 수 있다: 응집, 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화), 이성질화(예를 들어, Asp 이성질화(isomeriation)), 클리핑(clipping)/가수분해/절편화(예를 들어, 힌지 부위 절편화), 숙신이미드 형성, 짝짓지 않은 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 가공, 글리코실화 차이 등.

[0067] II. 상세한 설명

[0068] 다중특이적 항체의 정제 방법

[0069] 종종, 예를 들어, 이중특이적 항체(BsAb)를 포함하는 이중이량체 다중특이적 항체의 정제 과정에서, 포획을 위한 단백질 A 크로마토그래피를 사용하면, 미정제 BsAb 혼합물 중 원치않는 Fc-함유 생성물 변이체(예를 들어, 원치않는 동종이량체 종)의 존재 때문에 문제가 발생한다. 추가로, 다량체 단백질, 예컨대 항체는 응집되는 경향이 더 강하여, 불순물 수준을 유의하게 증가시킨다. 따라서, BsAb에 대한 제조 공정을 디자인할 때, 포획을 위한 대안적인 친화성 방법이 요구된다. 단백질 A 크로마토그래피 유닛 가동, 뿐만 아니라 대안적인 포획 방법의 특성 및 성능이 본원에서 논의된다.

[0070] 본 발명의 구현예에 의한 방법은, 친화성 크로마토그래피 과정을 사용하여 혼합물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 것에 관한 것으로, 이는 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼을 혼합물과 접촉시키는 단계, 다중특이적 항체를 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼과 용출 완충액을 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 항-응집성 조성물을 포함하는 단계, 및 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 항체를 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0071] 다른 양태에서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 항체의 응집을 감소시키는 방법을 제공하는데, 이는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼을 다중특이적 항체를 포함하는 혼합물과 접촉시키는 단계, 상기 다중특이적 항체를 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용출 완충액과 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 25mM 시트레이트, 10 w/v% 글리세롤 및 10 w/v% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 3.6의 pH를 갖는 단계, 및 상기 다중특이적 항체를 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.

- [0072] 또 다른 양태에서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 항체의 응집을 감소시키는 방법을 제공하는데, 이는 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼을 다중특이적 항체를 포함하는 혼합물과 접촉시키는 단계, 상기 다중특이적 항체를 상기 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용출 완충액과 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 50mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 4.0의 pH를 갖는 단계, 상기 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 항체를 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0073] 본 발명의 방법은 복수의 결합 단위들을 포함하는 다중특이적 항체를 정제하는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체는 제1 결합 단위와 제2 결합 단위를 포함한다(comprises comprises). 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위와 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 다중특이적 항체는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하는 제1 결합 단위와, 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함하는 제2 결합 단위를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 다중특이적 항체는 중쇄-단독 항체이다. 상기 중쇄-단독 항체는 예를 들어 WO 2018/119215에 기재되어 있으며, 상기 문헌의 기재 내용은 전체가 본원에 인용되어 포함된다.
- [0074] 특정 구현예에서, 상기 다중특이적인 항체는 이중특이적 항체이다. 일부 구현예에서, BsAb는 임의의 하위 부류로부터의 IgG 타입 항체(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)이며, 효과기 기능 활성이 감소되거나 향상된, Fc 부위가 변화된 조각된 하위 부류를 포함한다. 본 발명의 구현예에 의한 BsAb는 어떠한 종으로부터도 유래될 수 있다. 일 양태에서, BsAb는 대개 인간 기원이다. 일부 구현예에서, BsAb는 IgG4 하위타입이고, CD3와 조합된 종양 관련 항원(TAA)(CD3-TAA)에 대한 것이다. 본 발명의 구현예에 의한 BsAb의 비-제한적인 예는, 도 1과 도 2에 도시되어 있다. 불활성 및 활성 종은 도 3에 도시되어 있다.
- [0075] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체의 제1 결합 단위는, 종양-관련 항원(TAA)에 결합한다. 종양-관련 항원(TAA)은 상대적으로 종양 세포에 제한되는 반면, 종양-특이적 항원(TSA)은 종양 세포에 고유한 것이다. TSA 및 TAA는 전형적으로 주요 조직적합성 복합체의 일부분으로서 세포 표면 상에 발현되는 세포내 분자의 일부이다. 종양-관련 항원의 비-제한적인 예는, CD38, CD19, CD22 및 BCMA를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 다중특이적 항체의 제2 결합 단위는, 효과기 세포에 결합한다. 일부 구현예에서, 효과기 세포는 T 세포이다. 특정 구현예에서, 제2 결합 단위는 CD3에 결합한다.
- [0076] 용어 "CD3"는 인간 CD3 단백질 다중-하위 단위 복합체를 지칭한다. CD3 단백질 다중-하위 단위 복합체는, 6개의 별개의 폴리펩티드 사슬들로 구성된다. 이들은 CD3 γ 사슬(SwissProt P09693), CD3 δ 사슬(SwissProt P04234), 2개의 CD3 ϵ 사슬(SwissProt P07766), 및 하나의 CD3 ζ ; 사슬 동종이량체(SwissProt 20963)를 포함하며, 이는 T 세포 수용체 α 및 β 사슬과 연결된다. 용어 "CD3"은 달리 언급되지 않은 경우, 세포(T 세포 포함)에 의해 자연적으로 발현되거나, 이러한 폴리펩티드들을 암호화하는 유전자 또는 cDNA에 의해 형질감염된 세포 상에 발현될 수 있는 임의의 CD3 변이체, 동형체 및 종 상동체(homolog)를 포함한다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "BCMA"는, BCMA, CD269 및 TNFRSF17라고도 알려진 B-세포 성숙 항원을 지칭하는데, 이는 분화된 형질 세포에서 우선적으로 발현되는 종양 괴사 수용체 슈퍼패밀리의 일원이다. 본원에 사용된 용어 "인간 BCMA"는, 이의 공급원이나 제조 모드와는 무관한, 인간 BCMA(UniProt Q02223)의 임의의 변이체, 동형체 및 종 상동체를 포함한다. 따라서, "인간 BCMA"는 세포에 의해 자연적으로 발현되는 인간 BCMA, 및 인간 BCMA 유전자로 형질전환된 세포 상에 발현되는 BCMA를 포함한다.
- [0078] 일부 구현예에서, BsAb는 구조적으로 삼량체인데, 여기에서 하나의 암(arm)(예를 들어, CD3-결합 암)은 완전한 인간 중쇄 및 경쇄를 둘 다 포함하나, UniRat™ 기술로부터 얻은 다른 암(예를 들어, TAA 암)은, (예를 들어, 힌지-CH2-CH3를 포함하며, CH1 도메인은 결핍된) CH 도메인에 직접 융합된 하나 이상의 VH 도메인을 갖는 인간 중쇄로 이루어진다. 이 BsAb의 독특한 구조 때문에, 단지 이종이량체 생성물만이 인간 중쇄의 CH1 도메인(CD3-결합 암의 일부)을 함유한다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "CD38"은, 또한 ADP-리보실 사이클라제(ribosyl cyclase)/사이클릭 ADP-리보스 하이드롤라제(ribose hydrolase) 1이라고도 알려진, 세포의 활성을 갖는 단일-통과 타입 II 막투과 단백질을 지칭한다. 용어 "CD38"은 임의의 인간 또는 비-인간 동물 종의 CD38 단백질을 포함하며, 특히 인간 CD38 뿐만 아니라 비-인간 포유류의 CD38도 포함한다. 본원에 사용된 용어 "인간 CD38"는, 인간 CD38(UniProt P28907)의 임의의

변이체, 동형체 및 중 상동체를 포함하며, 이의 공급원이나 제조 모드와는 무관하다. 따라서, "인간 CD38"은 세포에서 자연적으로 발현되는 인간 CD38, 및 인간 CD38 유전자에 의해 형질감염된 세포 상에 발현되는 CD38를 포함한다. 용어 "항-CD38 중쇄-단독 항체", "CD38 중쇄-단독 항체", "항-CD38 중-쇄 항체" 및 "CD38 중-쇄 항체"는, 본원에서 상호교환적으로 사용되는데, 본원에서 상기 정의된 인간 CD38을 포함하는 CD38에 면역특이적으로 결합하는, 본원에서 상기 정의된 중쇄-단독 항체를 지칭한다. 상기 정의는 제한 없이, 본원에서 상기 정의된 바와 같이 인간 항-CD38 UniAb™ 항체를 생산하는 UniRats™을 포함하는, 인간 이뮤노글로블린을 발현하는 형질전환 동물, 예컨대 형질전환 래트 또는 형질전환 마우스에 의해 생산된 인간 중쇄 항체를 포함한다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "CD19" 및 "분화의 집단 19(cluster of differentiation 19)"는, 형질 세포로의 분화가 끝날 때까지의 B 세포 발생의 모든 단계 동안 발현되는 분자를 지칭한다. 용어 "CD19"는 임의의 인간 및 비-인간 동물 종의 CD19 단백질을 포함하고, 특히 인간 CD19 뿐만 아니라 비-인간 포유류의 CD19도 포함한다. 본원에 사용된 용어 "인간 CD19"는, 인간 CD19(UniProt P15391)의 임의의 변이체, 동형체 및 중 상동체를 포함하며, 이의 공급원이나 제조 모드와는 무관하다. 따라서, "인간 CD19"는 세포에 의해 자연적으로 발현되는 인간 CD19, 및 인간 CD19 유전자로 형질감염된 세포 상에 발현되는 CD19를 포함한다. 용어 "항-CD19 중쇄-단독 항체", "CD19 중쇄-단독 항체", "항-CD19 중쇄 항체" 및 "CD19 중쇄 항체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되는데, 본원에서 상기 정의된 인간 CD19를 포함하는 CD19에 면역특이적으로 결합하는, 본원에서 상기 정의된 중쇄-단독 항체를 지칭한다. 상기 정의는 본원에서 상기 정의된 바와 같이 인간 항-CD19 UniAb™ 항체를 생산하는 Unirat™를 포함하는, 인간 이뮤노글로블린을 발현하는 형질전환 동물, 예컨대 형질전환 래트 또는 형질전환 마우스에 의해 생산된 인간 중쇄 항체를 제한 없이 포함한다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "CD22" 및 "분화의 집단-22(cluster of differentiation-22)"는, 성숙한 B 세포 및 적은 정도로 일부 미성숙 B 세포의 표면에서 발견되는, 렉틴의 SIGLEC 패밀리에 속하는 분자를 지칭한다. 용어 "CD22"는 인간 및 임의의 비-인간 동물 종의 CD22 단백질을 포함하고, 특히 인간 CD22 뿐만 아니라 비-인간 포유류의 CD22도 포함한다. 본원에 사용된 용어 "인간 CD22"는, 인간 CD22(UniProt P20273)의 임의의 변이체, 동형체 및 중 상동체를 포함하며, 이의 공급원이나 제조 모드와는 무관하다. 따라서, "인간 CD22"는 세포에 의해 자연적으로 발현되는 인간 CD22, 및 인간 CD22 유전자에 의해 형질전환된 세포 상에 발현되는 CD22를 포함한다. 용어 "항-CD22 중쇄-단독 항체", "CD22 중쇄-단독 항체", "항-CD22 중쇄 항체" 및 "CD22 중쇄 항체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되는데, 본원에서 상기 정의된 인간 CD22를 포함하는 CD22에 면역특이적으로 결합하는, 본원에서 상기 정의된 중쇄-단독 항체를 지칭한다. 상기 정의는 본원에서 상기 정의된 바와 같은 인간 항-CD22 UniAb™ 항체를 생산하는 Unirat™를 포함하는, 인간 이뮤노글로블린을 발현하는 형질전환 동물, 예컨대 형질전환 래트 또는 형질전환 마우스에 의해 생산되는 인간 중쇄 항체를 제한 없이 포함한다.

[0082] 본 발명의 구현예에 의한 방법을 사용하여 정제될 수 있는 다른 이중특이적 항체의 비-제한적인 예는, 이하의 것들을 포함한다: 블리나투모맵(blinatumomab)(CD19 x CD3, Amgen); 카투막소맵(catumaxomab)(EpCAM x CD3, Trion Pharma); 에미시주맵(emicizumab)(인자 IXa x 인자 IX, Roche, Chugai); ABT-981 (IL-1알파 x IL-1베타, AbbVie); AFM13(CD30 x CD16a, Affimed); 이스티라투맵(istiratumab)(IGF-1R x HER3, Merrimack Pharmaceuticals); SAR156597(IL-4 x IL-13s, Sanofi); MP0250(VEGF x HGF, Molecular Partners); MCLA-128(HER3 x HER3, Merus); MCLA-117(CLEC12A x CD3, Merus); ALX-0761(IL-1 7A x IL-17F, Ablynx); AMG 570(BAFF x ICOSL, Amgen); AMG 211(CEA x CD3, Amgen/MedImmune); AMG 330(CD33 x CD3, Amgen); AMG 420(BCMA x CD3, Amgen); ABT-165(DLL x VEGF, AbbVie); AFM11(CD19 x CD3, Affimed); MEDI4276(HER2 x HER2, AstraZeneca/MedImmune); JNJ-61178104(Johnson & Johnson/Genmab(표적은 개시되지 않음)); JNJ-61186372(EGFR x cMET, Johnson & Johnson/Genmab); MDG006(CD123 x CD3, Macrogenics); MGD007(gpA33 x CD3, Macrogenics); duvortuzumab(MDG011) (CD19 x CD3, Macrogenics/Johnson & Johnson); MDG009(B7-H3 x CD3, Macrogenics); MDG010(CD32B x CD79B, Macrogenics); REGN1979(CD20 x CD3, Regeneron); RG7386(FAP x DRS, Roche); RG7828(CD20 x CD3, Roche/Genentech); RG7802(CEA x CD3, Roche); RG7992(FGFR1 x KLB, Roche/Genentech); XmAb14045(CD123 x CD3, Xencor/Novartis); 및 JNJ-63709178(CD123 x CD3, Johnson & Johnson/Genmab).

[0083] 혼합물

[0084] 본 발명의 양태는 친화성 크로마토그래피 과정을 사용하여 다중특이적 항체와 하나 이상의 오염물을 포함하는 혼합물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법을 포함한다. 혼합물은 일반적으로 예를 들어, 배양된 재조합 폴리펩티드-발현 세포주 또는 배양된 숙주 세포로부터 다중특이적 항체를 재조합 생산함으로써 생성된다. 샘플 또는 혼합물은 제한 없이 예를 들어 수확된 세포 배양 유체(HCCF)로부터, 정제 공정의 특정 단계에서의 공정 중인

폴로부터, 또는 최종 정제된 생성물로부터 얻을 수 있다. 샘플은 또한 원하는 분자(예컨대, 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체)와 혼합되어 발견되는 희석제, 완충액, 계면활성제 및 오염 중, 찌꺼기 등도 포함할 수 있다.

[0085] 폴리펩티드의 제조를 위하여, 이를 암호화하는 핵산을 분리하여, 추가적인 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가 가능한 벡터에 삽입한다. 폴리펩티드를 암호화하는 DNA는 용이하게 분리되고, (예를 들어, 폴리펩티드가 항체인 경우, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 종래의 과정을 사용하여 서열을 분석한다. 많은 벡터들이 이용가능하다. 벡터 요소는 일반적으로 이하의 것들 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: (예를 들어, 특히 본원에 인용되어 포함된 미국 특허 제5,534,615호에 기재된) 신호 서열, 복제의 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.

[0086] 본원에서 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현시키기에 적절한 숙주 세포는, 원핵동물, 효모 또는 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적절한 원핵동물은, 진정세균, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 장내세균(*Enterobacteriaceae*), 예컨대 대장균(*Escherichia*), 예를 들어, *E. coli*, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실러스(*Bacilli*), 예컨대 *B. 서브틸리스(subtilis)* 및 *B. 리체니포르미스(licheniformis)*, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 *P. 에루기노사(aeruginosa)*, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 바람직한 *E. coli* 클로닝 숙주는 *E. coli* 294(ATCC 31,446)이나, 다른 균주, 예컨대 *E. coli* B, *E. coli* X1776(ATCC 31,537), 및 *E. coli* W3110(ATCC 27,325)도 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.

[0087] 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는, SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CVI 세포(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포 (현탁 배양액에서 성장하기 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌[Graham 등, *J. Gen. Viral.* 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌[Urlaub 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌[Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포(CVI ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁 경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(문헌[Mather 등, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포(Hep G2)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 숙주 세포는 폴리펩티드 생산을 위한 상기-기재된 발현 또는 클로닝 벡터에 의해 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 원하는 서열들을 암호화하는 유전자를 증폭시키기 위해 적당하게 변형된 종래의 영양 배지에서 배양되었다.

[0089] 본 발명의 폴리펩티드를 생산하는데 사용된 숙주 세포는, 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대 햄스(Ham's) F10(Sigma), 최소 필수 배지((MEM)(Sigma), RPMI-1640(Sigma) 및 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium)(DMEM), Sigma)가, 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 추가로, 문헌[Ham 등, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)], 문헌[Barnes 등, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 임의의 배지를, 숙주 세포를 위한 배양 배지로 사용할 수 있다. 이러한 임의의 배지는 필요한 경우 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액(예컨대, HEPES), 뉴클레오티드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소(통상 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 포도당 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 당업계의 숙련자들에게 알려진 임의의 다른 필요한 보충제도, 또한 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은, 발현을 위해 선택된 숙주 세포에서 이미 사용된 것들이며, 이는 당업계의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0090] 제조를 사용할 때, 폴리펩티드는 세포 내의 원형질막 주위 공간에서 생산될 수 있거나, 배지로 직접 분비될 수 있다. 폴리펩티드가 세포 내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 미립자 찌꺼기, 숙주 세포 또는 (예를 들어, 균질화로부터 발생하는) 용해된 세포 중 하나는, 예를 들어, 원심분리 또는 한외여과(ultrafiltration)에 의해 제거된다. 폴리펩티드가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 상업

적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축된다.

[0091] 특정 구현예에서, 다중특이적 항체 혼합물은 친화성 크로마토그래피를 포함하는 정제 이전에, 계면활성제로 처리된다. 다중특이적 항체 혼합물은 본원에 기재된 하나 이상의 정제 단계를 거친다.

[0092] 친화성 크로마토그래피

[0093] 본원에 기재된 정제 공정을 디자인할 때, 일부 BsAb는 낮은 pH에 노출될 때 응집체를 형성하는 경향이 있다는 사실이 밝혀졌다. 따라서, 낮은 pH에서의 용출과 단백질 A 크로마토그래피를 함께 사용하면 특히 문제가 있어서, 이러한 경우에 단백질 A에 대한 적절한 대안으로 작용할 수 있는 친화성 수지의 연구가 촉구된다. 본원에 기재된 단백질 A 용출 완충액 중에 첨가제를 포함될 때 응집 수준의 감소가 관찰됨에도 불구하고, 원치않는 동종이량체 중(예를 들어, TAA 동종이량체 중)의 공동-정제도 여전히 관찰되었다. 추가로, BsAb의 산 취약성은 낮은 pH의 바이러스 불활성화 유닛 가동의 사용을 불가능하게 만든다. 따라서, 본 발명의 구현예에 의한 방법은 단백질 A 친화성 수지를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 타입의 친화성 수지들을 이용하는 크로마토그래피 유닛 가동을 포함한다. 특정 구현예에서는, 단백질 A 용출 완충액에 본원에 기재된 항-응집성 조성물이 보충되어, 용출물 내의 원치않는 동종이량체 응집물을 감소시킨다.

[0094] 본 발명의 다른 양태는 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피를 이용하고, 공정 불순물로서의 중쇄 동종이량체에 비해 이중이량체 다중특이적 항체 생성물에 선택적으로 결합하는 크로마토그래피 유닛 가동을 포함한다. 특정 구현예에서, 도메인-특이적 크로마토그래피 수지는 CaptureSelect™ 친화성 수지이다. 일부 구현예에서, 도메인-특이적인 크로마토그래피 수지는 CaptureSelect™ CH1-XL 친화성 수지이다.

[0095] 친화성 크로마토그래피 수지 또는 물질은, 항체가 크로마토그래피 지지체 상에서 친화성-기반으로 유지할 수 있게 한다. 친화성 크로마토그래피의 예는, 예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피, 단백질 A/G 크로마토그래피, 또는 단백질 L 크로마토그래피를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 친화성 크로마토그래피 물질의 예는, ProSep®-vA, ProSep® Ultra Plus, 단백질 A Sepharose® Fast Flow, Toyopearl® AF-rProtein A, MabSelect™, MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe™ LX, KappaSelect, CaptureSelect™, CaptureSelect™ FcXL, 및 CaptureSelect™ CH1-XL를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 물질은 컬럼의 형태로 제공된다. 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 "결합 및 용출(bind and elute) 모드"(대안적으로, "결합 및 용출 공정이라고도 지칭됨")로 실시된다. "결합 및 용출 모드"는 샘플 내의 생성물(예컨대, 다중특이적 항체)이 친화성 크로마토그래피 물질에 결합한 후, 친화성 크로마토그래피 물질로부터 용출되는 생성물 분리 기술을 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 용출은 이동상의 조성물이 용출 공정 동안 하나 또는 몇몇 경우로 단계별로 변화되는 단계식 용출(step elution)이다. 특정 구현예에서, 상기 용출은 용출 공정 동안 이동상의 조성물이 연속적으로 변화되는 구배식 용출(gradient elution)이다.

[0096] CH1-XL 크로마토그래피 수지의 일반적인 특성은, 이것이 Ig 중쇄 CH1-특이적 나노바디 리간드를 포함하고; 모든 4개의 하위 부류의 IgG(즉, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)를 인지하고; 65 μm의 크기를 갖는 아가로스에 리간드 고정되고; 20 mg/mL 미만으로 IgG에 대한 결합력을 갖고; 5-200 cm/hr의 유속 조건 하에서 사용될 수 있고; 위생 처리를 위한 염기(25-50 mM NaOH)에서 안정되며; 상업적으로 이용가능하다는 것이다. BsAb를 정제하려는 목적으로, CH1-XL 수지는 CH1 도메인을 포함하는 이중특이적 이중이량체에는 결합하나, 중쇄 동종이량체 중(예를 들어, TAA 동종이량체)에는 결합하지 않는다. 도 10에 나타난 바와 같이, 단지 활성 중만이 CH1 도메인을 포함한다. 추가로, CH1-XL 수지는 덜 엄격한 산성 용출 조건(pH 4) 하에서 사용될 수 있다. 이러한 좀 더 온화한 용출 조건은 용출 플에서의 항체의 응집 감소에 기여한다.

[0097] "로딩물(load)"은 크로마토그래피 물질에 로딩되는 조성물을 지칭한다. 로딩 완충액은 조성물(예를 들어, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물, 또는 항체 암 및 불순물을 포함하는 조성물)을 크로마토그래피 물질(예컨대, 본원에 기재된 크로마토그래피 물질들 중 어느 하나)에 로딩하는데 사용된 완충액이다. 크로마토그래피 물질은 정제될 조성물을 로딩하기 전에, 평형화 완충액으로 평형화될 수 있다. 세척 완충액은 조성물을 크로마토그래피 물질에 로딩한 후 사용된다. 용출 완충액은 고체상으로부터 관심 대상인 폴리펩티드를 용출하는데 사용된다.

[0098] 일부 구현예에서, 다중특이적 항체 조성물은 약 9mg/mL, 10mg/mL, 11mg/mL, 12mg/mL, 13mg/mL, 14mg/mL, 15mg/mL, 16mg/mL, 17mg/mL, 18mg/mL, 또는 19mg/mL의 다중특이적 항체의 로딩 밀도로 친화성 크로마토그래피

물질(예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피 물질, CaptureSelect™ CH1-XL 크로마토그래피 물질)에 로딩된다. CH1-XL 수지의 동적 결합력(DBC)을 조사하였고, 그 결과는 도 15에 제공되어 있다. 그 결과는 동적 결합력이 9.3 mg/mL의 값으로 4분에 평탄부에 도달한다고 나타났다. HCCF를 사용하는 이후의 파일럿 규모의 작업에서, 로딩 밀도를 최대 19 mg/mL, 예컨대 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 약 18 mg/mL까지 증가시킬 가능성이 입증되었다. 이런 이유로, 대상 방법의 일부 구현예에서, CH1-XL 크로마토그래피 단계는 약 9 내지 약 19 mg/mL, 예컨대 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 약 18mg/mL의 범위의 로딩 밀도를 포함한다.

[0099] 용출

[0100] 본원에 사용된 용출(elution)은, 생성물, 예를 들어, 다중특이적 항체를 크로마토그래피 물질로부터 제거 또는 분리하는 것을 지칭한다. 용출 완충액은 다중특이적 항체를 크로마토그래피 물질로부터 용출하는데 사용된 완충액이다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 등을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단백질 A를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 시트레이트를 약 5mM 내지 약 50mM, 예컨대 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 약 45 mM 범위의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액 중 시트레이트의 농도는 약 20mM 내지 약 30mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 시트레이트를 약 25mM의 농도로 포함한다. 특정 구현예에서, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 아세트산을 약 5mM 내지 최대 약 60mM, 예컨대 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 55 mM 범위의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액 중 아세트산의 농도는 약 45mM 내지 약 55mM의 범위이다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 아세트산을 약 50mM의 농도의 농도로 포함한다.

[0101] 용출 완충액의 pH는 다중특이적 항체 응집에 영향을 미친다고 밝혀졌다. 따라서, 일 구현예에서, 단백질 A를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 약 3.2 내지 약 4.2 범위, 예컨대 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 또는 4.2의 pH를 갖는다. 특정 구현예에서, 단백질 A를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 약 3.4 내지 약 3.8 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 약 3.4 내지 약 4.4, 예컨대 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 또는 4.4의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 3.8 내지 약 4.2 범위의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 다중특이적 항체를 용출하는데 사용된 용출 완충액은, 약 4.0의 pH를 갖는다.

[0102] 항-응집성 조성물

[0103] 초기 연구에서, 단백질 A 수지가 낮은 pH에서 용출될 때, 단백질 A 수지에 의한 BsAb 정제는 고분자량 응집물을 생성한다는 사실이 밝혀졌다. 용출 완충액에 첨가제를 보충함으로써, BsAb 응집물의 양이 감소된다고 밝혀졌다. 따라서, 특정 바람직한 구현예에서, 항-응집성 조성물은 다중특이적 항체가 용출되기 전에 용출 완충액에 첨가된다. 일부 구현예에서, 항-응집성 조성물은 하나 이상의 폴리올을 포함한다. 상기 폴리올의 비-제한적인 예는, 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스, 및 소르비톨을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 하나 이상의 폴리올을 포함하는 항-응집성 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 이하의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된다: 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 25% w/v 범위, 예컨대 5%, 10%, 15%, 또는 20% w/v의 농도를 갖는다. 다른 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 글리세롤을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 10% w/v의 농도의 글리세롤을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 수크로스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 10% w/v의 농도의 수크로스를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 용출 완충액은 약 10% 글리세롤 및 약 10% w/v 수크로스를 포함한다. 본 발명의 구현예에 의한 방법은, 본원에 기재된 임의의 pH에서 본원에 기재된 첨가제들의 임의의 조합을 포함하는 용출 완충액을 사용하는 단백질 A 크로마토그래피를 포함한다. 추가로 본 발명의 구현예에 의한 방법은, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피를 포함하며, 본원에 기재된 임의의 pH에서 본원에 기재된 첨가제들의 임의의 조합을 포함하는 용출 완충액을 사용한다. 특정 구현예에서, IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-

특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피는, CaptureSelect™ 수지이다. 일부 구현예에서, CaptureSelect™ 수지는 CaptureSelect™ CH1-XL이다.

- [0104] 하류 정제 공정
- [0105] 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피로부터의 용출물은 하나 이상의 추가적인 정제 단계를 거친다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 용출물은 이후 예를 들어, 음이온-교환 크로마토그래피 과정 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피 과정을 적용받는다.
- [0106] 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 양전하를 띄며, 고체상을 지나가거나 통과하는 수용액(예컨대, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물) 중에서 음이온과 교환되는 자유 음이온을 갖는 고체상이다. 본원에 기재된 어느 방법의 일부 구현예에서, 음이온 교환 물질은 막, 모놀리스(monolith) 또는 수지일 수 있다. 일 구현예에서, 음이온 교환 물질은 수지이다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 물질은 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 또는 4차 암모늄 이온 관능기, 폴리아민 관능기, 또는 디에틸아미노아틸 관능기를 포함할 수 있다. 음이온 교환 물질의 예는 당업계에서 알려져 있는데, Poros® HQ 50, Poros® PI 50, Poros® D, Mustang® Q, Q Sepharose® Fast Flow(QSFF), Acce11™ 플러스 4차 메틸아민(QMA) 수지, Sartobind STIC®, 및 DEAE-Sepharose®을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 "결합 및 용출" 모드로 수행된다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 "통과(flow through)" 모드로 수행된다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 컬럼의 형태로 제공된다. 일부 구현예에서, 음이온 교환 크로마토그래피 물질은 막을 포함한다.
- [0107] 양이온 교환 크로마토그래피 물질은, 음전하를 띄며, 고체상을 지나가거나 통과하는 수용액(예컨대, 다중특이적 항체 및 불순물을 포함하는 조성물) 중에서 양이온과 교환되는 자유 음이온을 갖는 고체상이다. 본원에 기재된 어느 방법의 일부 구현예에서, 양이온 교환 물질은 막, 모놀리스 또는 수지일 수 있다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 물질은 수지이다. 양이온 교환 물질은 예컨대, 설포네이트, 카르복실, 카르복시메틸 설포산, 설포이소부틸, 설포에틸, 카르복실, 설포프로필, 설포닐, 설포시에틸, 또는 오르토포스페이트를 포함하나 이에 제한되지 않는 카르복실산 관능기 또는 설포산 관능기를 포함할 수 있다. 상기한 것의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼이다. 상기한 것의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 양이온 교환 크로마토그래피 막이다. 양이온 교환 물질의 예는 당업계에서 알려져 있는데, Mustang® S, Sartobind® S, S03 모놀리스(예컨대, CIM®, CIMultus® 및 CIMac® S03), S Ceramic HyperD®, Poros® XS, Poros® HS 50, Poros® HS 20, sulphopropyl-Sepharose® Fast Flow (SPSFF), SP-Sepharose® XL (SPXL), CM Sepharose® Fast Flow, Capto™ S, Fractogel® EMD Se Hicap, Fractogel® EMD S03, 또는 Fractogel® EMD COO를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 "결합 및 용출" 모드로 수행된다. 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 "통과" 모드로 수행된다. 상기한 것의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 컬럼 내에 있다. 상기한 것의 일부 구현예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 물질은 막을 포함한다.
- [0108] 일부 구현예에서, 음이온-교환 또는 양이온-교환 크로마토그래피로부터의 용출물은 혼합 모드 크로마토그래피를 거친다.
- [0109] 혼합 모드 크로마토그래피는 혼합 모드 매체, 예컨대, 이에 제한되지 않지만 GE Healthcare로부터 이용가능한 Capto Adhere™을 이용하는 크로마토그래피이다. 이러한 매체는 혼합 모드 크로마토그래피 리간드를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 리간드는 적어도 2개의 상이하지만 협력적인 영역들을 제공할 수 있는 리간드를 지칭하는데, 이는 결합될 물질과 상호작용을 한다. 이러한 영역들 중 하나는 리간드와 관심대상 물질들 간에 끌어당기는(attracting) 타입의 전하-전하 상호작용을 제공한다. 다른 영역은 전형적으로 전자 수여자-공여자 상호작용 및/또는 소수성 및/또는 친수성 상호작용을 제공한다. 전자 공여자-수여자 상호작용은 수소-결합, π - π , 양이온- π , 전하 이동, 쌍극자-쌍극자, 유도 쌍극자 등과 같은 상호작용을 제공한다.
- [0110] 특정 구현예에서, 혼합 모드(MM) 크로마토그래피 매체는 때때로 기본 매트릭스를 나타내는 유기 또는 무기 지지체에 직접 또는 스페이서를 통해 커플링된 혼합 모드 리간드로 구성된다. 상기 지지체는 입자, 예컨대 본질적으로 구형 입자, 모놀리스, 필터, 막, 표면, 모세관 등의 형태일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 지지체는 천연 중합체, 예컨대 가교된 탄수화물 물질, 예컨대 아가로스, 아가, 셀룰로스, 텍스트란, 키토산, 곤약, 카라기난, 젤란, 알기네이트 등으로부터 제조된다. 높은 흡착능을 얻기 위하여, 상기 지지체는 다공성일 수 있고, 리간드는 이후 외부 표면 뿐만 아니라 기공 표면에도 커플링된다. 이러한 천연 중합체 지지체는 표준 방법, 예컨대 역현탁 겔화(inverse suspension gelation)(문헌[S Hjerten: BioChIm Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964)]에

따라 제조될 수 있다. 대안적으로, 지지체는 합성 중합체, 예컨대 가교된 합성 중합체, 예를 들어 스티렌 또는 스티렌 유도체, 디비닐벤젠, 아크릴 아미드, 아크릴레이트 에스테르, 메타크릴레이트 에스테르, 비닐 에스테르, 비닐 아미드 등으로부터 제조될 수 있다. 이러한 합성 중합체는 표준 방법에 따라 생산될 수 있으며, 예를 들어 문헌["Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: CHMica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988))]을 참고한다. 다공성 천연 또는 합성 중합체 지지체는 또한 상업적인 공급원, 예컨대 GE Healthcare(스웨덴 옘살라 소재)로부터도 이용가능하다.

[0111] 특정 구현예에서, 혼합 모드 수지는 음전하성 부분과 소수성 부분을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 음전하성 부분은 양이온 교환을 위한 음이온성 카르복실레이트 기 또는 음이온성 설펜기이다. 이러한 지지체의 예는, Capto Adhere®(GE Healthcare)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. Capto Adhere®은 전통적인 음이온 교환제에 비해 수지에 대한 상이한 선택성을 부여하는, 다중모드 관능성을 갖는 강한 음이온 교환제이다. Capto Adhere® 리간드(N-벤질-N-메틸 에탄올아민)은, 이온성 상호작용, 수소 결합 및 소수성 상호작용을 포함하는 다중 모드의 단백질-상호작용의 화학적 성질을 나타낸다. 수지의 다중모드 관능성은, 항체 이량체와 응집물, 침출된 단백질 A, 숙주 세포 단백질(HCP), 항체/HCP 복합체, 공정 잔여물과 바이러스를 제거하는 능력을 부여한다. 수지는 오염물은 흡착되거나 다중특이적 항체가 컬럼을 바로 통과하도록 디자인된 가동상의 변수를 이용하는 생산 규모의 마무리 단계(polishing step)의 맥락에서 통과 모드에 이용될 수 있다.

[0112] 특정 구현예에서, 정제된 다중특이적 결합 화합물은 바이러스 여과 단계를 거친다. 바이러스 여과는 전체 정제 공정 중에서도 전용 바이러스 감소 단계이다. 이 단계는 통상 크로마토그래피 후의 마무리 단계로 수행된다. 바이러스 감소는 Planova 20N™, Asahi Kasei Pharma 사의 50 Nor BioEx, EMD Millipore 사의 Viresolve™ 필터, Sartorius 사의 ViroSart CPV, Sartorius 필터, CUNO 사의 Zeta Plus VR™ 필터, 또는 Pall Corporation 사의 Ultipor DV20 or DV50™ 필터를 포함하나, 이에 제한되지 않는 적합한 필터를 사용함으로써 달성될 수 있다. 당 업계의 숙련자에게는 원하는 여과 성능을 얻는데 적합한 필터를 선택하는 것이 명백할 것이다.

[0113] 본 발명의 특정 구현예는 한외여과(UF) 단계 및/또는 투석(DF: diafiltration) 단계들을 이용하여, 항체 샘플을 추가로 정제 및 농축한다. 전형적으로, 이것은 본원에 기재된 하나 이상의 정제 단계를 따라 수행된다. 한외여과는 문헌[Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman 및 A Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996)]; 및 문헌[Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)]에 기재되어 있다. 바람직한 여과 공정은 명칭 "Pharmaceutical Process Filtration Catalogue"의 Millipore 카탈로그 pp. 177-202 (Bedford, Mass., 1995/96)에 기재된 바와 같은 접선 유동 여과이다. 한외여과는 일반적으로(예를 들어) 50 kDa 이하의 평균 크기를 갖는 단백질을 이동하게 하는 기공 크기를 갖는 필터를 사용한 여과를 의미하는 것으로 간주된다. 이러한 작은 기공 크기를 갖는 필터를 이용함으로써, 필터를 통해 샘플 완충액을 투과시킬 때 샘플의 부피가 감소될 수 있으나, 항체는 상에 필터에 유지된다.

[0114] 투석은 결합된 종으로부터 자유로이 분리하기 위하여, 저 분자량 물질을 제거하고/거나, 이온 및/또는 pH 환경의 신속한 변화를 야기하기 위하여, 염, 당 및 비-수성 용매를 제거 및 교환하기 위해 한외 필터(ultrafilter)를 사용하는 방법이다. 미세용질(Microsolute)은 한외여과될 용액에 한외여과 속도와 대략 동일한 속도로 용매를 첨가함으로써 대부분 효과적으로 제거된다. 이것은 일정한 부피의 용액으로부터 미세종을 세척하여, 유지된 항체를 효과적으로 정제한다. 본 발명의 특정 구현예에서, 투석 단계는 선택적으로 추가적인 크로마토그래피 또는 다른 정제 단계 이전에 본 발명과 관련되어 사용된 다양한 완충액들을 교환할 뿐만 아니라, 다중특이적 결합제로부터 불순물을 제거하는데도 이용된다.

[0115] 본 발명의 구현예에 의해 BsAb를 생산하는데 사용될 수 있는 제조 공정의 개략적인 흐름도는, 도 16에 제공되어 있다. 흐름도는 대표적인 상류 및 하류 유닛 가동을 나타낸다. 정제 공정의 각각의 단계에서 발견되는 BsAb 종의 분석은, 도 17에 제공되어 있다. 그 결과는, CH1-XL 크로마토그래피 단계 이후 TAA 동종이량체 종이 제거되었음을 나타낸다. 본 발명의 구현예에 따른 제조 공정에 대한 전체 수율은, 약 70% 내지 약 90%의 범위, 예컨대 약 75%, 80%, 또는 약 85%이다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 정제 방법은 적어도 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%의 다중특이적 항체 생성물의 전체 수율을 생성한다.

[0116] 약학적 조성물

[0117] 본 발명의 다른 양태는 적절한 약학적으로 허용가능한 담체와의 혼합물 중의, 본 발명의 방법에 의해 정제된 하나 이상의 다중특이적 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 본원에 사용된 약학적으로 허용가능한 담체는, 어주버트, 고체 담체, 물, 완충액, 또는 치료 성분들을 함유하기 위해 당업계에서 사용하는 다른 담

체, 또는 이들의 조합을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0118] 본 발명에 의해 정제된 다중특이적 항체의 약학적 조성물은, 저장을 위해, 원하는 정도의 순도를 갖는 단백질을, 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16판, Osol, A Ed. (1980) 참고]와 혼합함으로써 제조되며, 예컨대 동결건조화 제제 또는 수용액 형태이다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는, 이용된 용량과 농도에서 수여체에게 무독성이며, 완충액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저 분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로블린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 포도당, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어 Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

[0119] 비경구 투여용 약학적 조성물은 바람직하게는 멸균되고, 실질적으로 등장성이며, 우수의약품제조관리기준(GMP: Good Manufacturing Practice) 조건 하에 제조된다. 약학적 조성물은 단위 제형(즉, 단일 투여용 용량)으로 제공될 수 있다. 제제화는 선택된 투여 경로에 따라 달라진다. 본원에 기재된 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체는, 정맥내 주사 또는 주입에 의해 또는 피하로 투여될 수 있다. 주사 투여를 위하여, 본원에 기재된 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체는, 수용액, 바람직하게는 생리학적으로 양립가능한 완충액 중에 제제화되어, 주사 부위의 불편감을 감소시킬 수 있다. 용액은 상기 논의된 담체, 부형제 또는 안정화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 다중특이적 항체는 사용 전에 적절한 비히클, 예를 들어, 멸균된 발열원-불포함수를 포함하는 구조를 위해 동결건조화 형태일 수 있다.

[0120] 제조 물품

[0121] 본원에 기재된 방법에 의해 정제된 다중특이적 항체 및/또는 본원에 기재된 방법에 의해 정제된 폴리펩티드를 포함하는 제제가, 제조 물품 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 정제된 하나 이상의 다중특이적 항체를 함유하는 제조 물품 또는 "키트(kit)"는, 본원에 기재된 질병 및 장애의 치료에 유용하다. 일 구현예에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같이 정제된 다중특이적 항체, 예를 들어, 이중특이적 항-CD3 항체를 포함하는 용기를 포함한다. 키트는 용기 상의 또는 이에 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 용어 "포장 삽입물(package insert)"은, 치료용 생성물의 상업용 포장에 관례상 포함되는 설명서를 지칭하는데, 여기에는 지시사항, 사용, 용량, 투여, 이러한 치료용 생성물의 사용에 관한 사용 금지 사유 및/또는 경고에 대한 정보가 포함된다. 적절한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 블리스터 팩(blister pack) 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질들, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 본원에 기재된 하나 이상의 다중특이적 항체 또는 이들의 제제, 예를 들어, 질환을 치료하는데 효과적이며 멸균된 접근 포트를 가질 수 있는 둘 이상의 다중특이적 항체들의 조합 제제를 담고 있을 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 주머니, 또는 마개에 피하 주사 바늘이 관통된 바이알일 수 있음). 라벨 또는 포장 삽입물은 그 조성물이 선택된 질환, 예컨대 암 또는 면역 장애를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용가능한 완충액, 예컨대 정균적주사용멸균수(BWFI: bacteriostatic water for injection), 포스페이트-완충된 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하는, 상업적인 사용자 관점에서 볼 때 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0122] 키트는 하나 이상의 다중특이적 항체, 및 존재하는 경우, 이들의 조합 제제의 투여를 위한 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트가 제1 다중특이적 항체를 포함하는 제1 약학적 조성물과, 제2 다중특이적 항체를 포함하는 제2 약학적 조성물을 포함하는 경우, 키트는 제1 약학적 조성물과 제2 약학적 조성물을 이것이 필요한 환자에게 동시에, 순차적으로 또는 별도로 투여하기 위한 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 키트가 둘 이상의 조성물을 포함하는 경우, 키트는 별도의 조성물들을 함유하는 용기, 예컨대 분리된 병 또는 분리된 포일 팩킷을 포함할 수 있으나, 분리된 조성물들은 또한 단일의 비분리 용기 내에 함유될 수도 있다. 키트는 분리된 요소들의 투여, 또는 이들의 조합된 제제의 투여를 위한 안내서를 포함할 수 있다.

[0123] 사용 방법

- [0124] 특정 양태에서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 과정을 사용하여 혼합물로부터 다중특이적 항체를 정제하는 방법을 제공하는데, 이는 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼과 혼합물을 접촉시키는 단계, 다중특이적 항체를 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용출 완충액과 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 항-응집성 조성물을 포함하는 단계, 및 상기 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 항체를 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0125] 특정 구현예에서, 항-응집성 조성물은 하나 이상의 폴리올을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리올은 이하의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된다: 만니톨, 글리세롤, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합. 특정 구현예에서, 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 25% w/v 범위의 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 글리세롤을 포함한다. 특정 구현예에서, 글리세롤은 약 10% w/v의 농도를 갖는다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 폴리올은 약 5% 내지 약 15% w/v 범위의 농도를 갖는 수크로스를 포함한다. 일부 구현예에서, 수크로스는 약 10% w/v의 농도를 갖는다. 다른 구현예에서, 용출 완충액은 약 10% 글리세롤 및 약 10% w/v 수크로스를 포함한다.
- [0126] 특정 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 단백질 A 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 이하의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된다: 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트 (MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 시트레이트를 약 20mM 내지 약 30mM 범위의 농도로 포함한다. 다른 구현예에서, 용출 완충액은 시트레이트를 약 25mM의 농도로 포함한다. 이러한 특정 구현예들에서, 용출 완충액은 약 3.2 내지 약 4.2 범위의 pH를 갖는다. 다른 구현예에서, 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 3.8 범위의 pH를 갖는다. 특정 구현예에서, 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 약 25mM 시트레이트, 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 용출 완충액은 약 3.6의 pH를 갖는다.
- [0127] 다른 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함한다. 이러한 특정 구현예들에서, 용출 완충액은 이하의 것들로 이루어진 군으로부터 선택된 완충액을 포함한다: 시트레이트, 아세테이트, 아세트산, 4-모르폴린에탄설포네이트(MES), 시트레이트-포스페이트, 숙시네이트 및 이들의 조합. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 아세트산을 약 45mM 내지 약 55mM 범위의 농도로 포함한다. 특정 구현예에서, 용출 완충액은 아세트산을 약 50mM의 농도로 포함한다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 약 3.4 내지 약 4.4의 pH를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 용출 완충액은 약 3.8 내지 약 4.2의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, 용출 완충액은 약 4.0의 pH를 갖는다. 특정 구현예에서, 용출 완충액은 약 50mM 아세트산, 약 10% 글리세롤 및 약 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액 약 4.0의 pH를 갖는다.
- [0128] 다른 양태에서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 항체의 응집을 감소시키는 방법을 제공하는데, 이는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼과 다중특이적 항체를 포함하는 혼합물을 접촉시키는 단계, 상기 다중특이적 항체를 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용출 완충액과 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 25mM 시트레이트, 10% 글리세롤 및 10% w/v 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 3.6의 pH를 갖는 단계, 및 상기 다중특이적 항체를 상기 단백질 A 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0129] 또 다른 양태에서, 본 발명은 친화성 크로마토그래피 과정에 의해 용출 풀에서 다중특이적 항체의 응집을 감소시키는 방법을 제공하는데, 이는 IgG 항체의 CH1 도메인에 결합하는 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼과 다중특이적 항체를 포함하는 혼합물을 접촉시키는 단계, 상기 다중특이적 항체를, 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼에 고정시키는 단계, 상기 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼을 용출 완충액과 접촉시키되, 상기 용출 완충액은 50mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하고, 상기 용출 완충액은 4.0의 pH를 갖는 단계, 및 상기 도메인-특이적 크로마토그래피 수지를 포함하는 친화성 크로마토그래피 컬럼으로부터 상기 다중특이적 항체를 용출하여, 상기 혼합물로부터 상기 다중특이적 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0130] 모든 양태에서, 다중특이적 항체는 제1 결합 단위와 제2 결합 단위를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 단위들 중 하나는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위 및 상기 제2 결합 단위는 둘 다 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함한다. 다른 구현예에서, 결합 단위들 중 하나는 항체의 중쇄 가변 부위와 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 제1 결합 단위와 상기 제2

결합 단위는 둘 다 항체의 중쇄 가변 부위와 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하고, 상기 제2 결합 단위는 항체의 중쇄 가변 부위 및 항체의 경쇄 가변 부위를 포함한다.

[0131] 일부 구현예에서, 상기 제1 결합 단위는 종양-관련 항원에 대한 결합 친화성을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 효과기 세포에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, 효과기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 제2 결합 단위는 T 세포 상의 CD3 단백질에 대해 결합 친화성을 갖는다.

[0132] 본 발명의 모든 양태에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체일 수 있다.

[0133] 본원에 개시된 정제된 다중특이적 항체 또는 다중특이적 항체, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물은, 이후 다양한 진단, 치료 용도 또는 이러한 다중특이적 항체 및 조성물에 대해 알려진 다른 용도로 사용된다. 예를 들어, 다중특이적 항체는 치료 유효량의 다중특이적 항체를 포유류에 투여함으로써, 포유류에서 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0134] 본 발명은 이제 완전히 설명되었으며, 본 발명의 사상 또는 범주로부터 벗어나지 않고도 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 사실은 당업계의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0135] **실시예**

[0136] **실시예 1: 항-CD3-BCMA 이중특이적 항체의 정제**

[0137] 도 2에 도시된 BsAb CD3-BCMA는 이하와 같이 정제되었다. BsAb CD3-BCMA는 이중특이적 항체이고, 구조적으로는 삼량체인데, 여기에서 하나의 암(arm)(예를 들어, CD3-결합 암)은 전체 인간 중쇄 및 κ 경쇄를 둘 다 포함하나, UniRat™ Technology에서 얻은 다른 암(예를 들어, BCMA 암)은, (예를 들어, 힌지-CH2-CH3를 포함하나 CH1 도메인이 결핍된 CH 도메인에, 하나 이상의 VH 도메인이 직접 융합된) 인간 중쇄로 이루어진다. BsAb CD3-BCMA를 포함하는 가변 도메인 서열은, 이하의 표 1에 나타나있다. 특히, BsAb CD3-BCMA는 2개의 중쇄(HC-I 및 HC-2) 및 하나의 카파 경쇄(κ LC)를 갖는 완전한 인간 IgG4 이중특이적 단일클론 항체이며, 산에 불안정하다. 중쇄들의 정확한 짝지움(pairing)은 knob-into-hole 기술을 통해 달성된다. CD3 암은 HC-I 및 κ LC를 포함하고, T-세포 수용체 CD3에 결합한다. TAA 암 또는 BCMA 암은 HC-2만을 포함하고, BCMA를 인지하는 2개의 동일한 VH 도메인들로 이루어진다. TAA 암은 결합능(avidity) 증가(<I nM)를 위해 2가이며, UniRat™ Technology로부터 얻었다. 이러한 BsAb의 특유의 구조 때문에, 단지 이중이량체 생성물만이 인간 중쇄의 CH1 도메인(CD3-결합 암의 일부)을 함유한다.

[0138] **표 1: BsAb CD3-BCMA 가변 도메인 서열**

항-CD3 중쇄 가변 도메인	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
항-CD3 경쇄 가변 도메인	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0139]

항-BCMA 중쇄 가변 도메인	<p>Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly</p> <p>Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr</p> <p>Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val</p> <p>Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val</p> <p>Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr</p> <p>Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys</p> <p>Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly</p> <p>Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu</p> <p>Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu</p> <p>Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp</p> <p>Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Gly Ile Arg</p> <p>Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe</p> <p>Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn</p> <p>Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Gly</p> <p>Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr</p> <p>Val Ser Ser</p>
------------------	---

[0140]

[0141]

도 3에 나타난 다양한 종의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석은, BsAb 이중이량체가 HC/LC 동중이량체 중(예를 들어, CD3 동중이량체 중)과 유사한 크기를 갖는다는 것을 입증하였다. SEC 변수(paramter)는 이하와 같다: 0.25 ml/분의 유속; 이동상: 0.1M 시트레이트, 0.2M 아르기닌, 0.5M NaCl, pH 6.2에 의한 MSS 폴의 TSKgel 10X300mm UHPLC SEC 분석. 이 결과들은 도 4에 나타나 있다. 게다가, 이러한 종들의 등전점(pI) 분석에서, 이중이량체 및 동중이량체가 구별되는 pI를 갖는다고 나타났다. 이 결과들은 도 5에 나타나있다. 레인 1은 등전점 전기영동(IEF) pI 기준이다. 레인 2는 CD3 동중이량체(뿔-뿔(knob-knob)), pI=8이다. 레인 3은 CD3/BCMA 이중 특이적 IgG, pI= 7.4-7.6이다. 레인 4는 BCMA 동중이량체 (홀-홀(hole-hole)), pI= 6.2이다. 5 µg/레이ンを 로딩 하였다. IEF 변수는 이하와 같다: pH 3-10 IEF 겔(Invitrogen); Instant Blue 염색(Expdedeon); Serva IEF 마커 3-10 믹스); IEF 겔 프로그램, 200V, 18mA, 2.0W에서 1 시간; 200V, 18mA, 3.5W에서 1 시간; 500V, 18mA, 9.0W에서 30분.

[0142]

초기의 연구들에서는 단백질 A 수지에 의한 BsAb 정제가 도 6에 나타난 바와 같이 효율적이라는 사실이 밝혀졌는데, 이는 용출된 피크가 총 통합 면적의 90%라는 것을 보여준다. 단백질 A 크로마토그래피 변수는 이하와 같다: 컬럼: 1ml MabSelect™ SuRe™ LX HiTrap®, GE Healthcare LiFc Sciences; 로딩물: 50mL Teneo-BsAb HCCF; 평형화/세척 완충액: 50mM Tris, pH 7.0; 용출 완충액: 25mM 시트레이트, pH 3.6; 중화 완충액: 1M Tris, pH 9.0.

[0143]

초기의 연구들에서는 또한 단백질 A 수지에 의한 BsAb 정제가 원치않는 고분자량(HMW) 응집물을 생성한다는 사실이 밝혀졌다(도 7). SEC 분석은 상당한 양의 응집체가 pH 3.6 용출 이후 생산된다는 것을 나타내었다. SEC 변수 이하와 같다: 컬럼: Superdex200i 10/30 GL; 완충액: 0.1M 시트레이트, 0.2M Arg, 0.5M NaCl, pH 6.2; 유속: 0.5ml/분; 샘플: TeneoBsAb Prot A 용출물 풀; 주입: 100 µl, 1.4 mg/mL; 분획 부피: 1mL.

[0144]

SDS-PAGE 분석은 HMW 분획이 BsAb 생성물을 포함한다는 사실을 확인하였다(도 8). 레인 A2-A5: 응집물; 레인 A6: 단량체. SDS-PAGE 변수는 이하와 같다: 4-12% NuPAGE 겔; MES 전개 완충액; 5 µg/레이넌 로딩물; Page Ruler 예비-염색; 마커(ThermoFisher Scientific); 쿠마시 염색된 겔.

[0145]

따라서, 첨가제는 BsAb 응집물의 양을 감소시킴으로써 단백질 A 정제가 개선될 수 있는지를 결정하기 위해 조사되었다. 이를 위해, 단백질 A 용출 완충액에 가변량의 상이한 폴리올들을 보충하였다. 이하의 세 가지 인자들을 실험계획법(DOE: design of experiments) 순열에서 시험하였다: 폴리올의 타입, 폴리올의 백분율, 및 용출 완충액의 pH. 조사한 폴리올의 타입은 만니톨, 글리세롤, 수크로스 및 트레할로스였다. 시험한 백분율은 0% 내지 30%의 범위, 예컨대 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25%였다. 용출 완충액의 pH는 3.4, 3.5, 또는 3.6이었다. 시험한 다양한 조합들의 결과는 도 9에 나타나 있다. 본 발명의 구현예에 따른 방법은, 상기 기재된 임의의 pH에서, 상

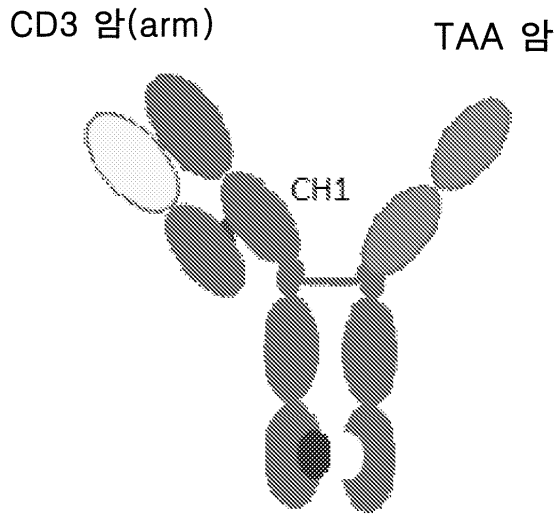
기 기재된 첨가제들의 임의의 조합을 포함하는 용출 완충액을 사용하는 단백질 A 크로마토그래피를 포함한다.

- [0146] 이 시험들의 결과는, 단백질 A 용출 완충액에 대한 첨가제가 BsAb 생성물의 응집을 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 응집의 최저 수준은, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하는 용출 완충액에서 관찰되었다. 이러한 용출 완충액 조성물은 시험한 조성물들 중에서 가장 최적이었다. 이런 이유로, 바람직한 일 구현예에서, BsAb를 정제하는 방법은 단백질 A 크로마토그래피 단계를 포함하되, 여기에서 단백질 A 용출 완충액은 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함한다.
- [0147] 단백질 A 용출 완충액에 상기-기재된 첨가제를 첨가할 때 응집 수준의 감소가 관찰됨에도 불구하고, 원치않은 동종이량체 종들(예를 들어, TAA 동종이량체 종)의 공동-정제도 여전히 관찰되었다. 추가로, BsAb의 산 취약성으로 인해 낮은 pH의 바이러스 불활성화 유닛 가동을 사용할 수 없게 된다.
- [0148] 따라서, 단백질 A에 대한 대안으로서 사용될 수 있는 크로마토그래피 수지에 대한 연구를 이룰 2가지 카테고리 가 있다: (a) 완화된(산성이 덜한) 조건 하에서 생성물을 용출하는 능력, 및 (b) 공정 불순물로서의 중쇄 동종이량체에 대비한 이종이량체 생성물에 대한 선택성. ThermoFisher로부터 상업적으로 이용가능한 CaptureSelect™ CH1-XL는, 인간 IgG의 중쇄 상의 CH1 도메인에 특이적으로 결합한 친화성 수지이며, 13 kDa의 라마(Llama) 중쇄 항체 절편에 의해 제공된 굳건하고 고품질의 친화성 매트릭스의 잇점을 갖는다.
- [0149] CH1-XL 수지의 일반적인 특성은, 이것이 1g 중쇄 CH1-특이적 나노바디 리간드를 포함하며; 모든 4개의 하위 부류의 IgG(즉, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)를 인식하며; 65 μm의 크기를 갖는 아가로스 리간드 고정되며; 20 mg/mL 미만의 IgG의 결합력을 갖고; 5~200 cm/hr의 유속 조건에서 사용될 수 있으며; 위생 처리를 위한 염기(25-50 mM NaOH)에 대해 안정하고; 상업적으로 이용가능하다는 것이다. BsAb를 정제하기 위해, CH1-XL 수지는 CH1 도메인을 포함하는 이종특이적 이종이량체에 결합하나, 중쇄 동종이량체 종(예를 들어, TAA 동종이량체)에는 결합하지 않는다. 도 10에 나타난 바와 같이, 단지 활성 종만이 CH1 도메인을 포함한다. 추가로, CH1-XL 수지는 덜 엄격한 산성 용출 조건(pH 4) 하에서 사용될 수 있다.
- [0150] CH1-XL 수지의 연구는, 중쇄 동종이량체가 CH1-XL 통과액(flow through)에 존재하며, 이는 기대한 바와 같이, 이러한 동종이량체가 상기 수지에 결합하지 않는다는 것을 입증한다(도 11). 도 11에 나타난 바와 같이, 라인 1은 분자량 기준 (5 μ1)이다. 라인 2는 이종특이적 IgG 단백질 A 풀 (2 μg)이다. 라인 3은 이종특이적 IgG CH1 통과액 (2 μg)이다. 라인 4은 CH1 염 세척액 (2 μg)이다. 라인 5는 CH1 NaOH 제거액(strip) (2 μg)이다. 라인 6은 CH1 풀 (2 μg)이다. SDS-PAGE 변수는 이하의 것들이다: 단백질 로딩물: 2 μg/라인; NuPAGE 4-12% Bis-Tris 겔; MES 전개 완충액; InstantBlue 염색 (Expedeon); PageRuler 사전염색된 단백질 래더; 전개 조건: 35분, 200V, 120mA, 25 와트.
- [0151] 포획 매체의 용출 pH에 대한 비교는 도 12에 제공되어 있다. 도 12는 제1 포획 단계로서 (단백질 A 대신) CH1-XL 수지를 사용하면, 단백질 A 포획에 비해 pH 4.6에서의 더 높은 pH 용출과, pH 3.3에서의 용출이 가능해진다는 것을 나타낸다. 이러한 더욱 온화한 용출 조건은 용출 풀에서의 항체 응집의 감소에 기여하였다. 도 12 패널 A에 나타난 변수는 이하와 같다: 컬럼: 1ml MabSelect™ SuRe™, GE Healthcare LiFc Sciences; 로딩물: 10mL HCCF; 평형화/세척 완충액: 50mM Tris, pH 7.0, 50mM 아세테이트, pH 3.0; 제거 완충액: 0.1M NaOH; 용출: 선형 구배, 10CV-100%B. 도 12 패널 B에 나타난 변수는 이하와 같다: 컬럼: 1mL CaptureSelect CH1-XL™; 로딩물: 10mL HCCF; 평형화/세척 완충액: 50mM Tris, pH 7.0, 50mM 아세테이트, pH 3.0; 제거 완충액: 0.1M NaOH; 용출: 선형 구배 10CV-100%B.
- [0152] CH1-XL 수지로부터 BsAb를 용출하는 것은, 50 mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하고, 4.0의 pH를 갖는 용출 완충액을 사용할 때 최적이었다. 이러한 조건들 하에서, BsAb는 효율적으로 용출되며, 통합 피크 면적의 93%가 2CV 풀 부피에 존재한다. 도 13. CaptureSelect™ 변수는 이하와 같다: 컬럼: 9mL CaptureSelect; 로딩물: 50mL BsAb 매체; 평형화/세척 완충액 #1: 50mM Tris, pH 7.0; 평형화/세척 완충액 #2: 50mM Tris, 0.5M NaCl pH 7.0; 용출 완충액: 50mM 아세트산, 10% 글리세롤, 10% 수크로스, pH 4.0; 중화 완충액: 1M Tris, pH 9.0.
- [0153] CH1-XL 풀의 추가 분석에서, 최소 BsAb가 응집되는 것으로 나타났다(2.2%의 HMW 함량을 갖고, HCCF로부터 효과적으로 BsAb에 결합한다). 도 14. 도 14에 나타난 변수는 이하와 같다: TSKgel 10x300mm; 유동: 0.75ml/분; 이동상: 0.1M 시트레이트; 0.2M 아르기닌, 0.5M NaCl, pH 6.2. 이런 이유로, 바람직한 일 구현예에서, BsAb를 정제하는 방법은 CH1-XL 크로마토그래피 단계를 포함하고, 여기에서 CH1-XL 용출 완충액은 50 mM 아세트산, 10% 글리세롤 및 10% 수크로스를 포함하고, 4.0의 pH를 갖는다.

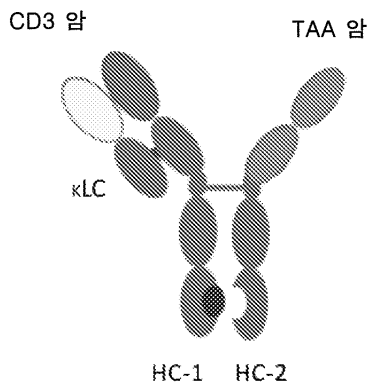
- [0154] CH1-XL 수지의 동적 결합력을 조사하였고, 그 결과는 도 15에 제공되어 있다. 도 15에 나타난 바와 같이, 변수는 1mL CH1-XL 컬럼 (0.7 x 2.5 cm); 로딩물: 정제된 BsAb 5 mg/ml; 체류 시간: 1, 2, 4, 8 분; 용출 전 10%의 손실(breakout); P.C.: 280 nm의 폴에 의한다. 그 결과는 동적 결합력이 4분에, 9.3 mg/mL의 값으로 평탄부에 도달한다는 사실을 입증하였다. HCCF를 사용하는 이후의 파일럿 규모의 작업은, 로딩 밀도가 최대 19 mg/mL, 예컨대 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 약 18 mg/mL로 증가될 가능성을 입증하였다. 이런 이유로, 해당 방법의 일부 구현예에서, CH1-XL 크로마토그래피 단계는 약 9 내지 약 19 mg/mL의 범위, 예컨대 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 약 18 mg/mL의 로딩 밀도를 포함한다.
- [0155] 본 발명의 구현예에 의해 BsAb를 생산하는데 사용될 수 있는 제조 공정의 개략적인 흐름도는, 도 16에 제공되어 있다. 흐름도는 대표적인 상류 및 하류 유닛 가동을 나타낸다. 정제 공정의 각 단계에서 발견되는 BsAb 중의 분석은, 도 17에 제공되어 있다. 레인 1: 분자량 기준; 레인 2: HCCF 5 µl; 레인 3: CH1 통과액 5 µl; 레인 4: CH1-XL1 풀 2 µg; 레인 5: 정제 단계 2 - 풀 2 µg; 레인 6: 정제 단계 3 - 풀 2 µg; 레인 7: 분자량 기준; 레인 8: 환원된 CH1 풀 2 µg; 레인 9: 환원된 정제 단계 2- 풀 2 µg; 레인 10: 환원된 정제 단계 3 - 풀 2 µg. 변수는 이하와 같다: NuPage 4-12% Bis-Tris 겔; MES 전개 완충액; InstantBlue 염색 (Expedeon); Page Ruler 사전염색된 단백질 래더; 단백질 로딩물: 2 µg/레인; 전개 조건: 35 분, 200V, 120mA, 25 와트. 그 결과는 CH1-XL 크로마토그래피 단계 이후의 TAA 동종이량체 종이 제거되었음을 입증한다. 본 발명의 구현예에 따른 제조 공정의 전체 수율은, 약 70% 내지 약 90%, 예컨대 약 75%, 80%, 또는 약 85%의 범위이다.
- [0156] **실시예 2: 중쇄-단독 결합 단위를 포함하는 이중특이적 항체의 정제**
- [0157] 중쇄-단독 항체의 중쇄 가변 부위를 포함하는 제1 결합 단위와 제2 결합 단위를 각각 포함하는 이중특이적 항체를, 본원에 기재된 방법에 의해 항체를 포함하는 혼합물로부터 정제하였다. 이중특이적 항체를 포함하는 혼합물을 제1 친화성 크로마토그래피 물질과 접촉시킴으로써, 항체를 고정시킨다. 항체를 본원에 기재된 바와 같은 폴리올을 포함하는 항-응집성 조성물을 포함하는 용출 완충액에 의해 용출함으로써, 용출 풀 내에서 이중특이적 항체의 응집을 감소시킨다.
- [0158] **실시예 3: 중쇄/경쇄 결합 단위를 포함하는 이중특이적 항체의 정제**
- [0159] 항체의 중쇄 가변 부위와 항체의 경쇄 가변 부위를 각각 포함하는 제1 결합 단위와 제2 결합 단위를 포함하는 이중 특이적 항체와, 제1 친화성 크로마토그래피 컬럼을 접촉시킴으로써, 항체를 고정시킨다. 상기 기재된 바와 같은 폴리올을 포함하는 항-응집성 조성물을 포함하는 용출 완충액에 의해 항체를 용출함으로써, 용출 풀 내에서 이중특이적 항체의 응집을 감소시킨다.
- [0160] 발명의 바람직한 구현예가 본원에 나타나 있고 기재되어 있으나, 당업계의 숙련자들에게 이러한 구현예가 단지 예시의 방식으로 제공된다는 사실은 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들은 본 발명에서 벗어나지 않고도 다수의 변형, 변화 및 치환이 가능할 것이다. 상기 기재된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안들이 본 발명의 실시예 이용될 수 있다고 이해해야 한다. 이하의 청구항은 본 발명의 범주를 정의하며, 이로 인해 청구항들 및 이들의 균등물의 범주 내의 방법 및 구조도 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1



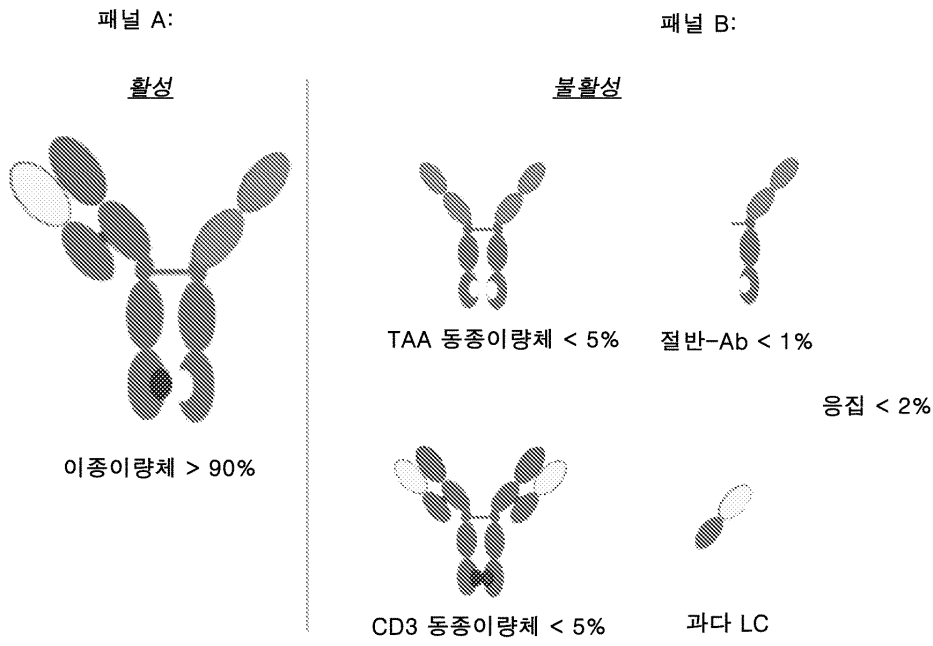
도면2



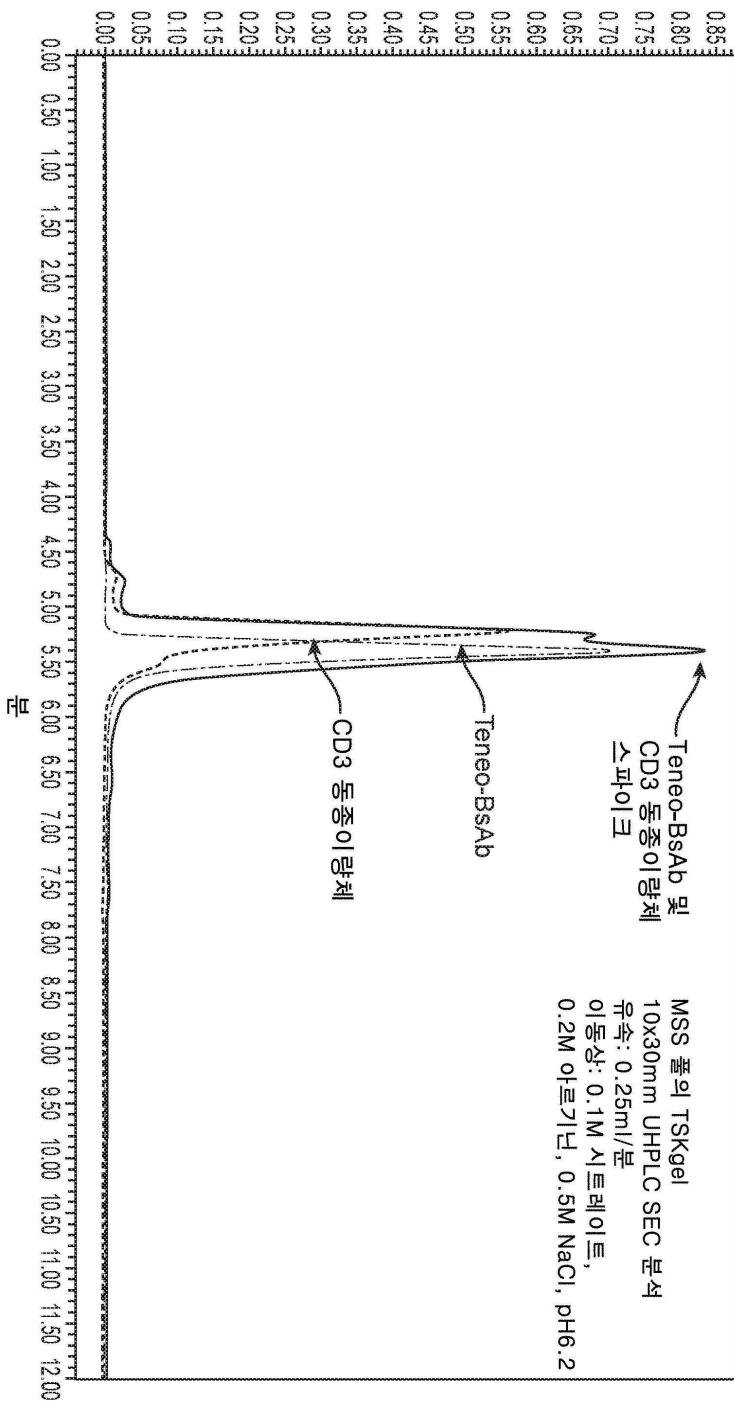
BsAb CD3-TAA
이중특이적 항체

- 완전한 인간 IgG4 이중특이적 단일클론 항체
 - 2개의 중쇄(HC-1 및 HC-2) 및 1개의 카파 경쇄(kLC)
 - 낱스 인투 홀스(knobs into holes) 기술
 - 산에 취약함
- CD3 암
 - HC-1 + κLC
 - T-세포 수용체 CD3
- TAA 암
 - HC-2 단독
 - TAA를 인식하는 2개의 동일한 VH 도메인으로 이루어짐
 - 결합능이 증가된(<1 nM) 2가임
 - Tenebio의 등록상표 UniRat™로부터 얻음

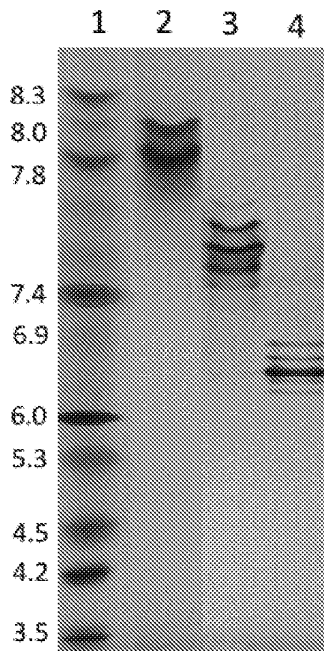
도면3



도면4



도면5



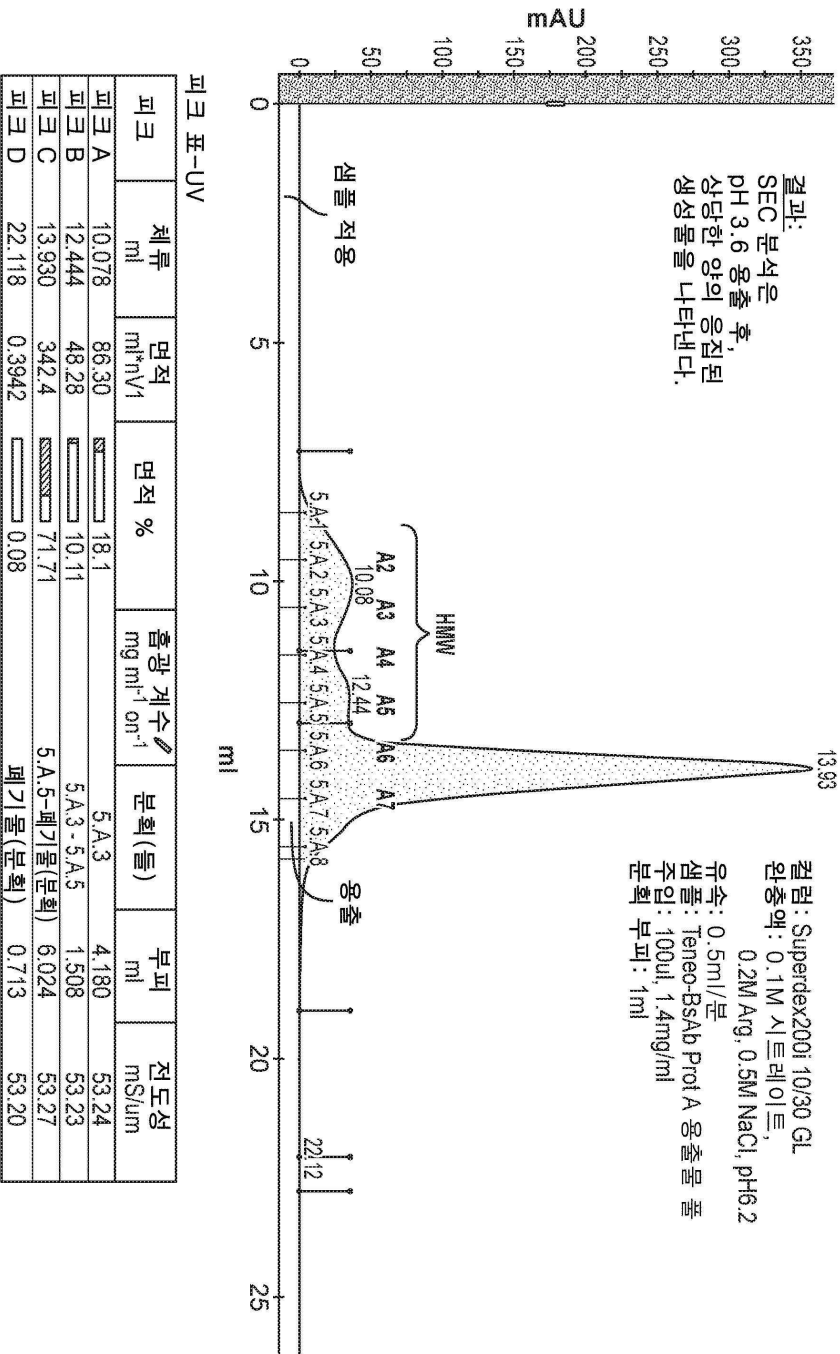
레인:

- 1) IEF, pI 기준
- 2) CD3 동종이량체(놉-놉), PI = 8
- 3) Teneo-BsAb (이종이량체), PI = 7.4-7.6
- 4) TAA 동종이량체(홀-홀), PI = 6.2

5ug/레인 로딩됨

pH 3-10 IEF 겔(Invitrogen)
인스턴트 블루 염색(Instant Blue Stain)(Expendeon)
Serva IEF 마커 3-10 mix
IEF 겔 프로그램
1시간 100V 18mA 2.0W
1시간 200V 18mA 3.5W
30분 500V 18mA 9.0W

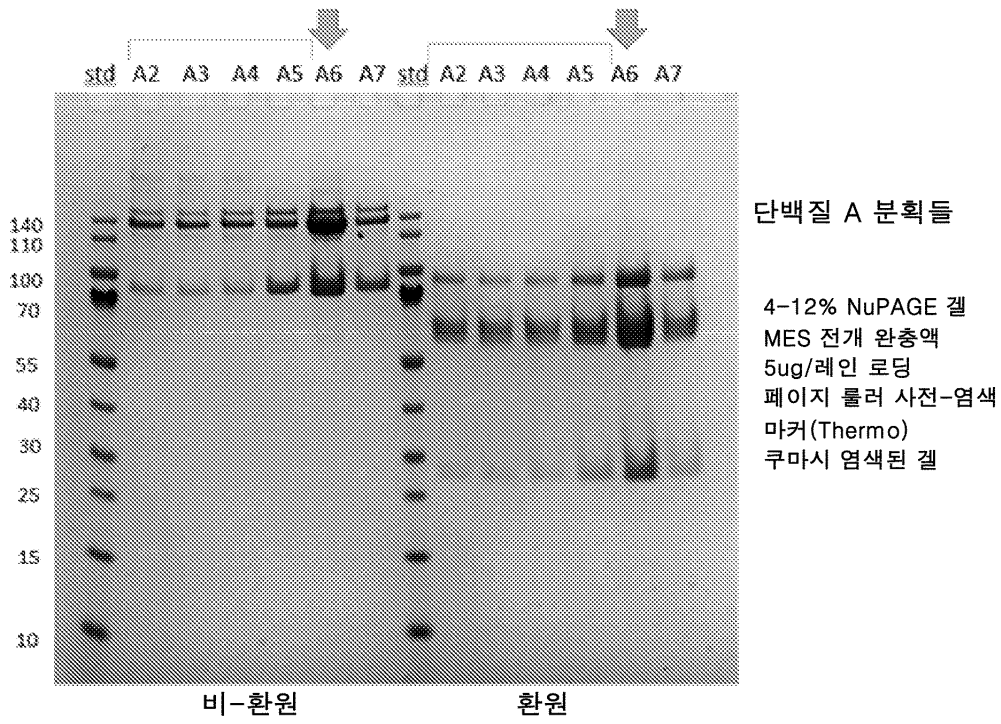
도면7



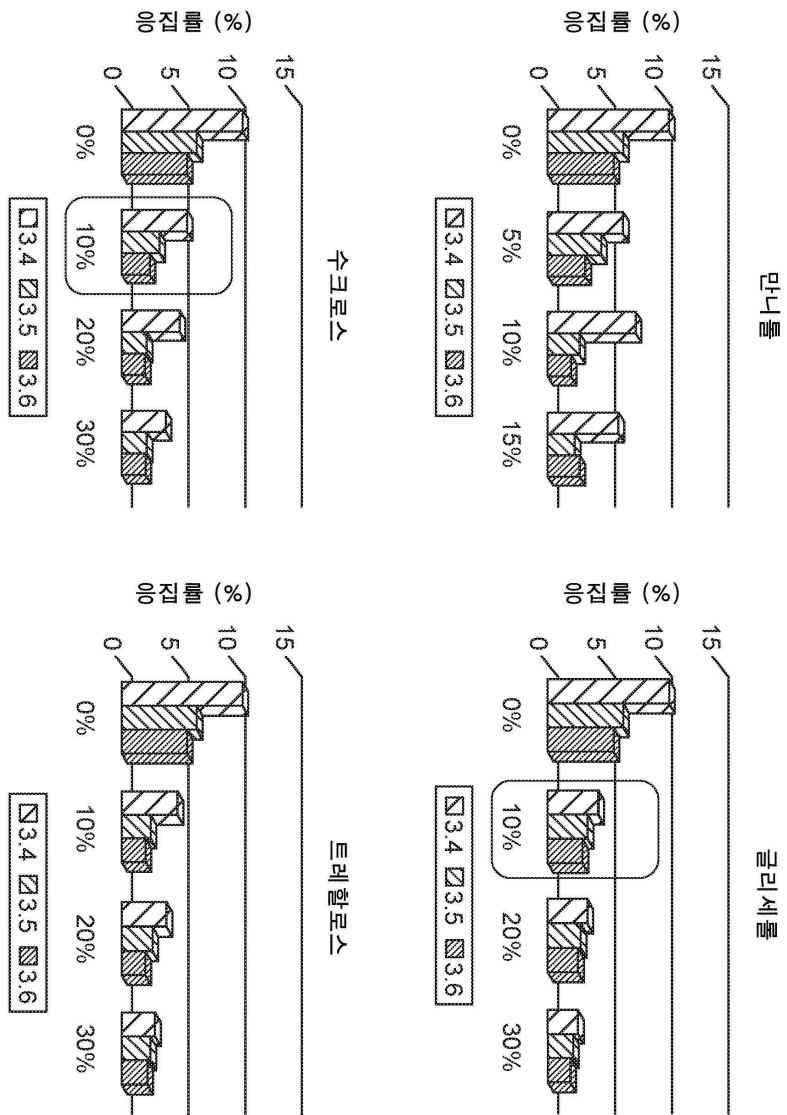
피크 표-UV

피크	체류 ml	면적 m ² UV ¹	면적 %	흡광 계수 mg ml ⁻¹ on ⁻¹	분획(들)	부피 ml	전도성 mS/um
피크 A	10.078	86.30	18.1		5.A.3	4.180	53.24
피크 B	12.444	48.28	10.11		5.A.3 - 5.A.5	1.508	53.23
피크 C	13.930	342.4	71.71		5.A.5-페기물(분획)	6.024	53.27
피크 D	22.118	0.3942	0.08		페기물(분획)	0.713	53.20

도면8

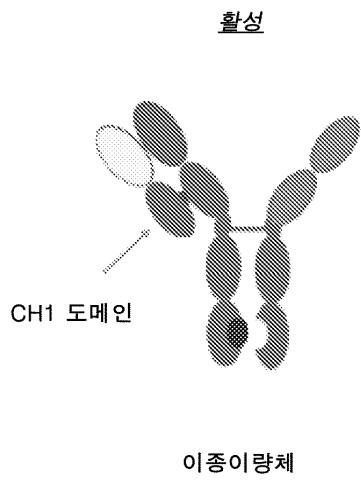


도면9

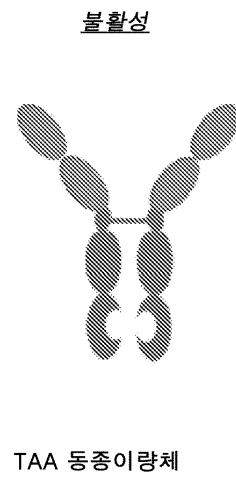


도면10

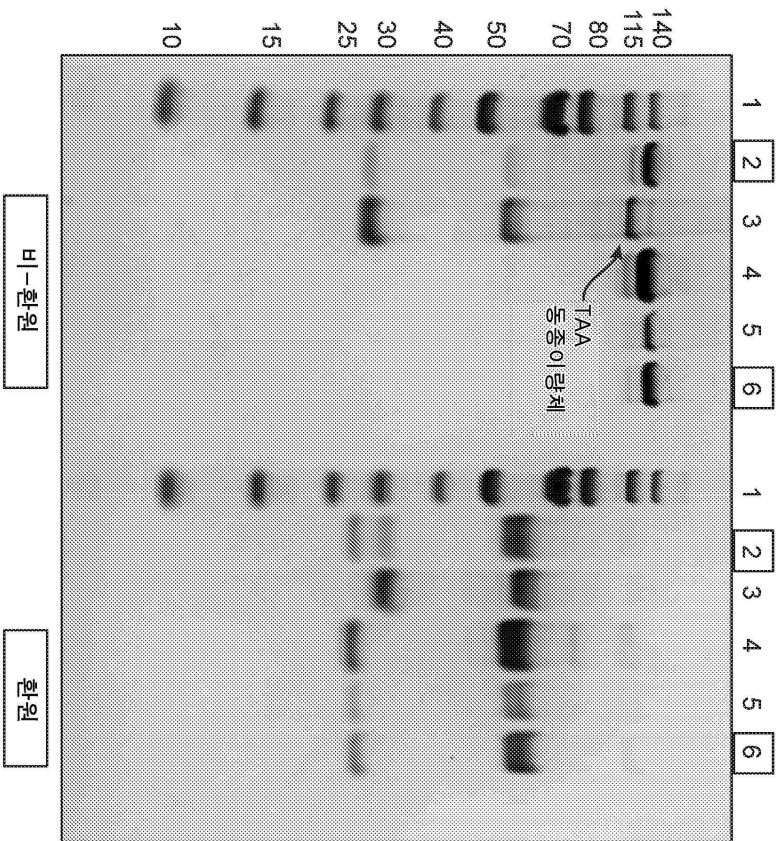
패널 A:



패널 B:



도면11



레인:

- 1) MW 기준
- 2) 이중특이적 IgG ProA 풀
- 3) 이중특이적 IgG CH1 통과액
- 4) CH1 염 세척
- 5) CH1 NaOH 제거
- 6) CH1 풀

NUPAGE 4-12% 비스-트리스 겔

MES 전개 완충액

인스턴트 블루 염색 (Expedeon)

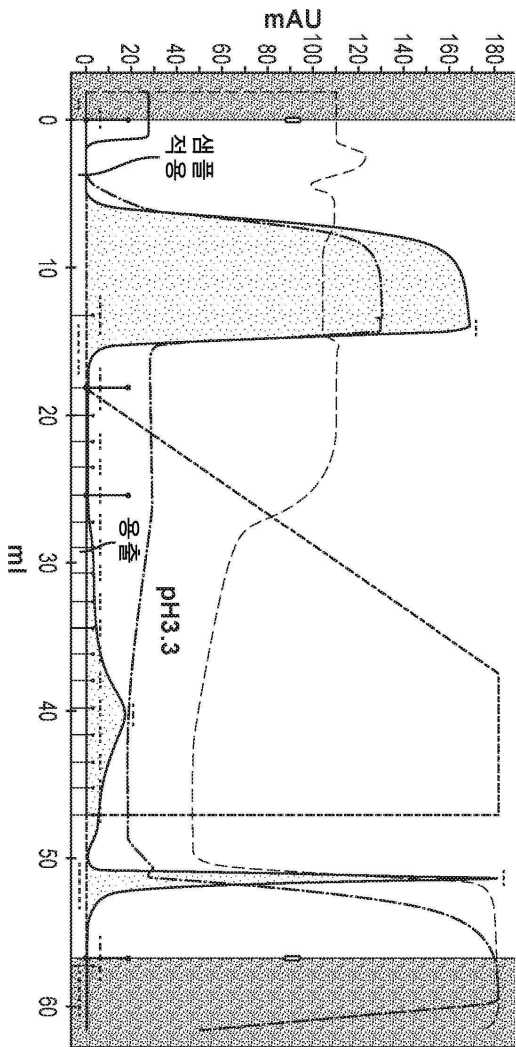
페이지롤러 사전염색된 단백질 레더

단백질 로딩: 2ug/레인

전개 조건:

- 35 분
- 200V
- 120mA
- 25watts

도면12a



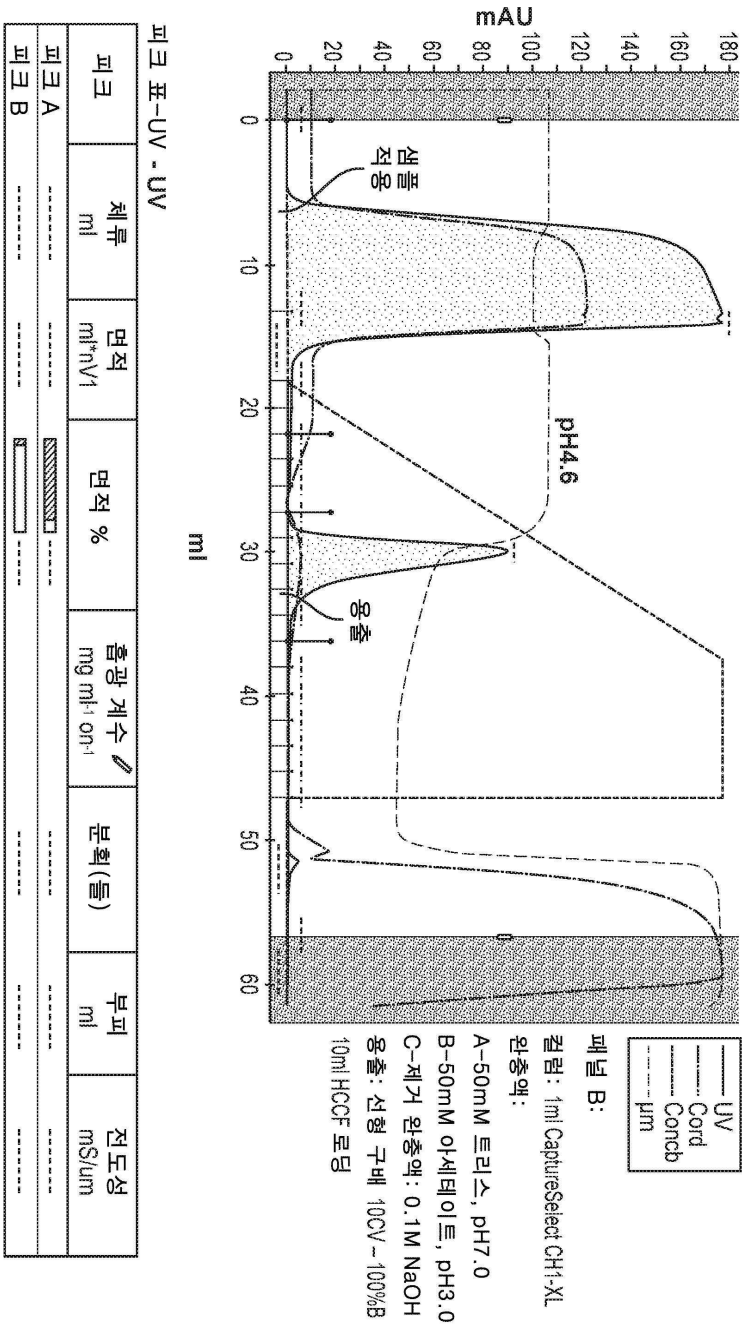
UV
Cord
Concb
µm

패널 A:
 컬럼 : 1ml Mab Select Sure 컬럼
 완충액 :
 A-50mM 트리스, pH7.0
 B-50mM 아세트레이트, pH3.0
 C-계거 완충액 : 0.1M NaOH
 용출 : 선형 구배 10CV - 100%B
 10ml HCCF 로딩

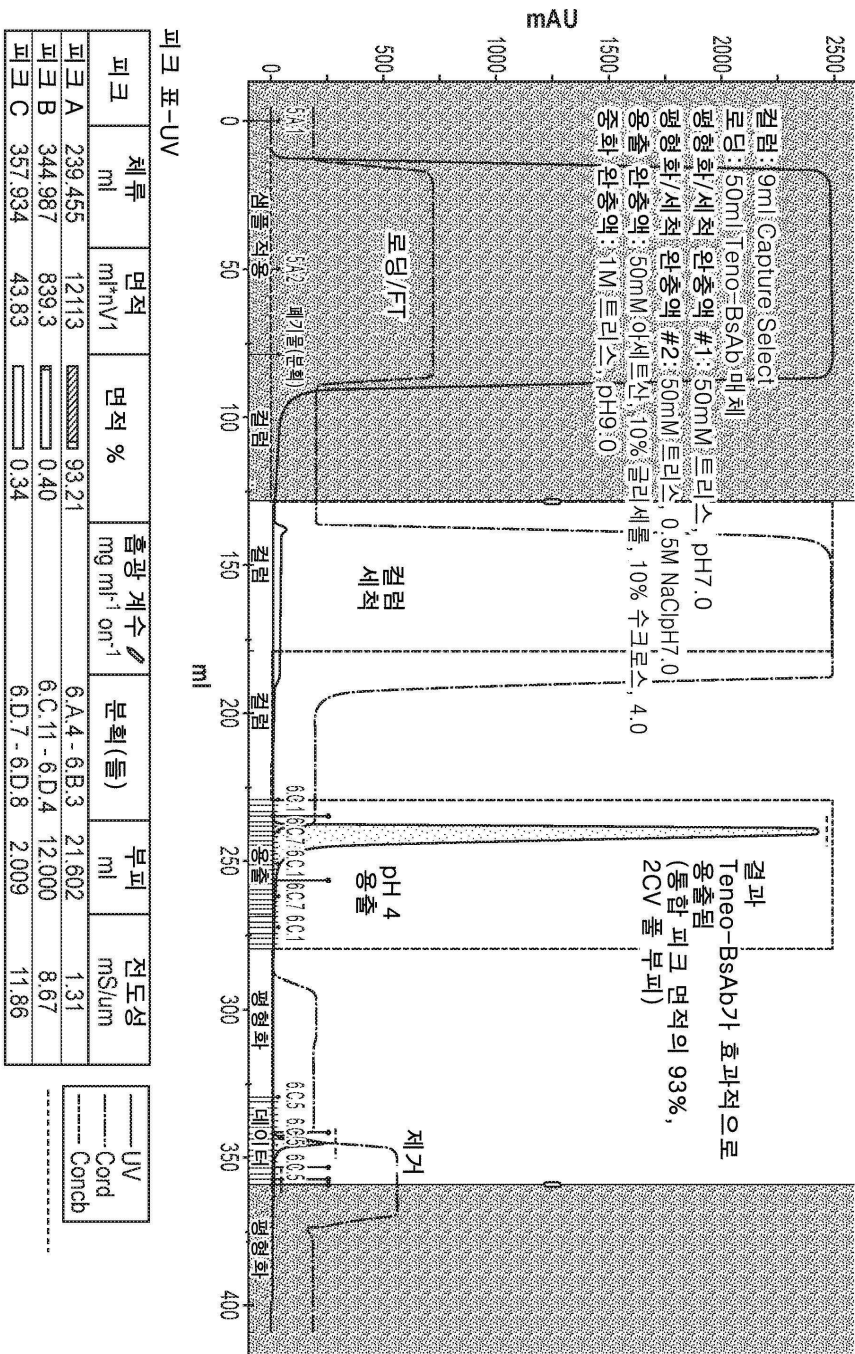
피크 표-UV

피크	체류 min	면적 m ² nV ¹	면적 %	흡광 계수 mg ml ⁻¹ cm ⁻¹	분획(들)	부피 ml	전도성 mS/cm
피크 A
피크 B
피크 C

도면12b

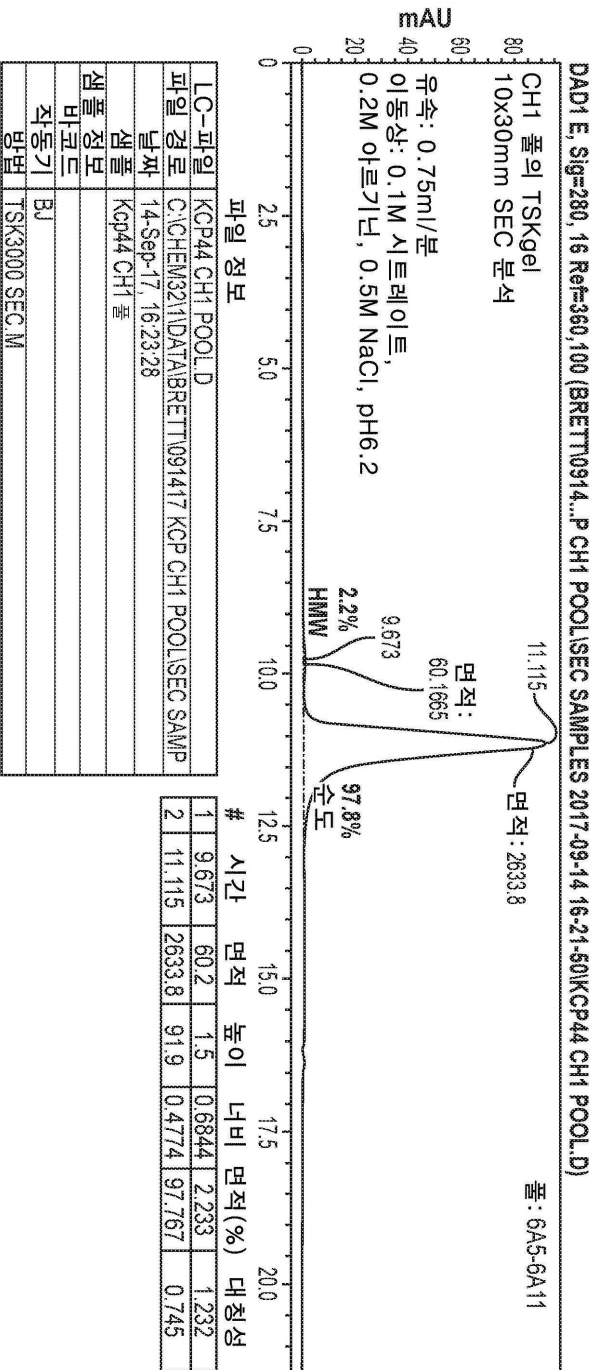


도면13



피크 포-UV

피크	체류 ml	면적 mV ²	면적 %	흡광 계수 mg ml ⁻¹ cm ⁻¹	분획(들)	부피 ml	전도성 mS/cm
피크 A	239.455	12113	93.21	6.A.4-6.B.3	21.602	1.31	8.67
피크 B	344.987	839.3	0.40	6.C.11-6.D.4	12.000	8.67	11.86
피크 C	357.934	43.83	0.34	6.D.7-6.D.8	2.009	11.86	



결과

CaptureSelect CH1-XL 풀은 2.2%의 낮은 HMW 함량을 갖고, HCCF에서 나온 생성물에 효과적으로 결합한다.

도면14

도면15

체류 시간 (분)	동적 결합 용량 (mg/mL)
1	3.6
2	8.4
4	9.3
8	9.4

1ml CH1-XL 컬럼 (0.7 X 2.5cm)
 로딩: 정제된 Teneo-BsAb 5mg/ml
 체류 시간: 1,2,4,8 분
 용출 전 10% 손실(breakout)
 P.C: 280nm의 폴에 의함

결과

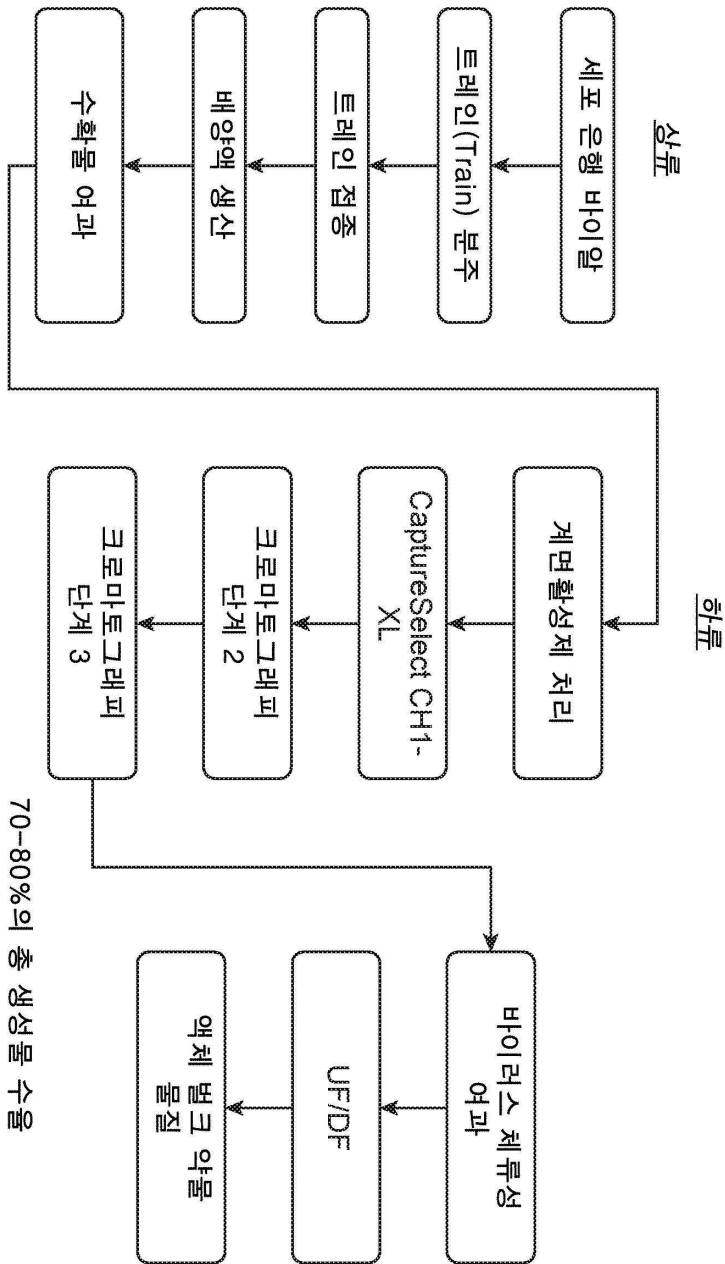
DBC는 4분(9.3 mg/mL)에 평탄부를 이룬다.

CaptureSelect CH1-XL의 로딩 동안 최소 4분의 체류 시간으로 설정한다.

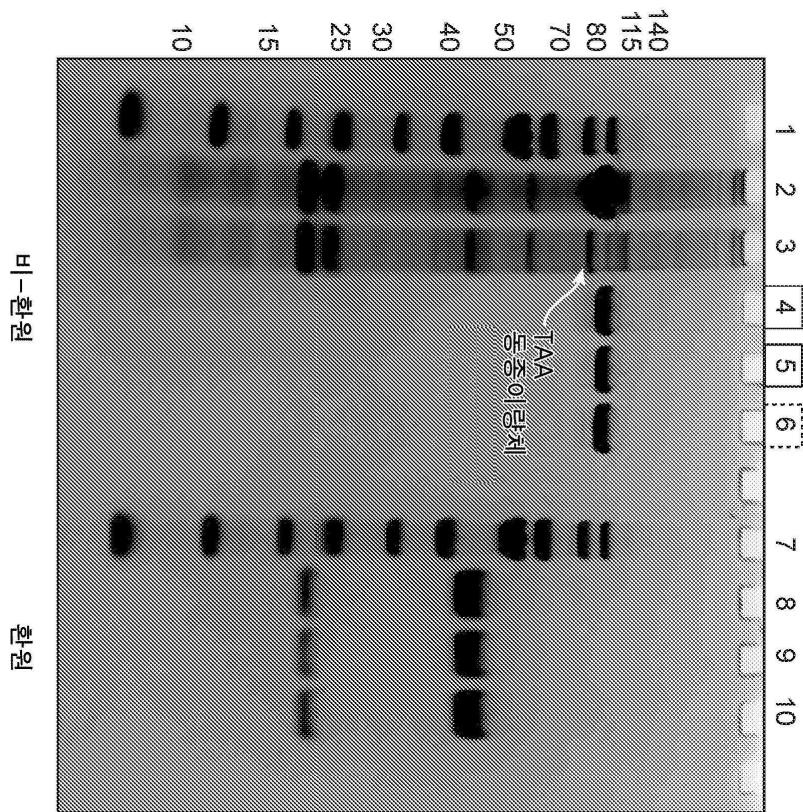
주의:

로딩시 HCCF를 사용한 추후의 파일럿-규모의 작업에서,
 로딩 밀도를 증가시킬 가능성(<19 mg/mL)이 입증되었다.

도면16



도면17



레인:

- 1) MWWS
- 2) HCCF 5 μ l
- 3) CH1 통과액 5 μ l
- 4) CH1-XL1 풀 2 μ g
- 5) 정제 단계 2- 풀 2 μ g
- 6) 정제 단계 3- 풀 2 μ g
- 7) MWWS
- 8) 환원된 CH1 풀 2 μ g
- 9) 정제 단계 2- 풀 2 μ g
- 10) 정제 단계 3- 풀 2 μ g

NUPAGE 4-12% 비스-트리스 겔
 MES 전개 완충액
 인스틴트블루 염색 (Expedeon)
 페이지블러 시전염색된 단백질 레더
 단백질 로딩: 2 μ g/레인
 전개 조건:

35분
 200V
 120mA
 25watts

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TENEOBIO, INC.

<120> METHODS FOR PURIFYING HETERODIMERIC, MULTISPECIFIC ANTIBODIES

<130> TNO-0015-WO

<140> PCT/US2019/052199

<141> 2019-09-20

<150> 62/742,821

<151> 2018-10-08
<150> 62/734,566
<151> 2018-09-21
<160> 8
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 1
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 2
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 4

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

<210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 5

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

 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 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><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 6
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Gly Ser

50