(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월15일
(11) 등록번호 10-2795000
(24) 등록일자 2025년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
G01N 30/62 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7006246
(22) 출원일자(국제) 2019년08월16일
심사청구일자 2022년08월05일
(85) 번역문제출일자 2021년03월02일
(65) 공개번호 10-2021-0045413
(43) 공개일자 2021년04월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/046769
(87) 국제공개번호 WO 2020/037182
국제공개일자 2020년02월20일
(30) 우선권주장
62/719,323 2018년08월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2015520667 A*
JP2017524740 A*
Tustian, Andrew D. et al., Biotechnology progress, 2018, Vol. 34, pp 650-658. 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
페론 마이클
미국 뉴욕 10591 테리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
로드리게즈 오드리
미국 뉴욕 10591 테리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

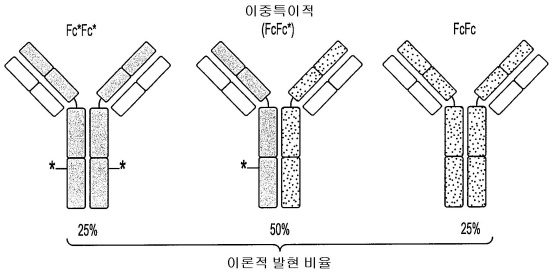
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **다량체 단백질의 양 및 순도를 측정하기 위한 방법 및 크로마토그래피 시스템**

(57) 요 약

발명은 샘플 중의 다량체 단백질의 양 및/또는 순도를 평가하기 위한 크로마토그래피 시스템 및 방법에 관한 것으로, 크로마토그래피 시스템은 스위피 밸브를 통해 연결된 2개의 상이한 친화성 크로마토그래피를 포함한다.

대 표 도



도 1

(52) CPC특허분류
G01N 30/62 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
(72) 발명자
투스티안 앤드류
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
바크 한느
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

헤테로다이머 항체, 제1 호모다이머 항체 불순물, 및 제2 호모다이머 항체 불순물의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 헤테로다이머 항체의 양 및 순도를 정량화하는 방법으로서,

헤테로다이머 항체 및 제1 호모다이머 항체는 제1 친화성 매트릭스에 결합하고, 제2 호모다이머 항체는 제1 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않고 제2 친화성 매트릭스에 결합하며, 헤테로다이머 항체는 제1 친화성 매트릭스에 대해 제1 호모다이머 항체 불순물보다 낮은 친화성을 가지고,

헤테로다이머 항체는 하나의 비치환 CH3 도메인 및 하나의 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 포함하는 이중특이적 항체(FcFc* 항체)이고, 제1 호모다이머 항체 불순물은 2개의 비치환 CH3 도메인을 포함하는 단일특이적 항체(FcFc 항체)이며, 제2 호모다이머 항체 불순물은 2개의 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 포함하는 단일특이적 항체(Fc*Fc* 항체)이고, 제1 친화성 매트릭스는 단백질 A를 포함하고(단백질 A 친화성 매트릭스), 제2 친화성 매트릭스는 단백질 G를 포함하며(단백질 G 친화성 매트릭스), 비치환 CH3 도메인은 단백질 A 및 단백질 G 모두에 결합하고, H435R/Y436F 치환 CH3 도메인은 단백질 G에는 결합하지만 단백질 A에는 실질적으로 결합하지 않으며, Fc는 비치환 CH3 도메인을 갖는 중쇄를 나타내고, Fc*는 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 갖는 중쇄를 나타내며,

상기 방법은:

a. FcFc* 항체 및 FcFc 항체가 단백질 A 친화성 매트릭스에 결합하는 조건 하에서 크로마토그래피 시스템 중의 단백질 A 친화성 매트릭스에 샘플을 적용하는 단계로서, 크로마토그래피 시스템은 단백질 A 친화성 매트릭스, 단백질 G 친화성 매트릭스, 스위치 밸브 및 검출기를 포함하고, 단백질 A 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 단백질 G 친화성 매트릭스와 연속적으로 연결되어 있는 단계;

b. 스위치 밸브가 관통 흐름이 단백질 G 친화성 매트릭스 상에 직접 적용되고 관통 흐름 속의 Fc*Fc* 항체가 단백질 G 친화성 매트릭스에 결합하는 위치로 설정된 제1 세트의 조건 하에 단백질 A 친화성 매트릭스를 세척하는 단계;

c. 스위치 밸브를 전환하여 단백질 G 친화성 매트릭스로부터 단백질 A 친화성 매트릭스의 연결을 차단하고, 단백질 A 친화성 매트릭스가 검출기에 직접적으로 연결되도록 하며, 그리고 나서 FcFc 항체가 단백질 A 친화성 매트릭스 상에 유지되는 동안 제2 세트의 조건 하에 단백질 A 친화성 매트릭스로부터 FcFc* 항체를 용출시키고 용출된 FcFc* 항체의 양을 측정하는 단계;

d. 제3 세트의 조건 하에 단백질 A 친화성 매트릭스로부터 유지된 FcFc 항체를 검출기를 통해 용출시키고 용출된 FcFc 항체의 양을 측정하는 단계;

e. 스위치 밸브를 다시 되돌려서 단백질 A 친화성 매트릭스는 단백질 G 친화성 매트릭스에, 그리고 단백질 G 친화성 매트릭스는 검출기에 연속적으로 연결되도록 하고, 그리고 나서 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 단백질 G 친화성 매트릭스로부터 Fc*Fc*를 용출시키고, 용출된 Fc*Fc* 항체의 양을 측정하는 단계; 및

f. 단계 (c)와 같이 샘플 중의 헤테로다이머 항체의 양을, 그리고 샘플 중의 헤테로다이머 항체의 순도를 정량화하는 단계로서, 헤테로다이머 항체의 순도는 FcFc 항체, FcFc* 항체 및 Fc*Fc* 항체의 양의 총합 대비 FcFc* 항체의 양의 비율에 의해 결정되는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 세트의 조건은 제1 pH를 포함하고, 제2 세트의 조건은 제2 pH를 포함하며, 제3 세트의 조건은 제3 pH를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮고, 제3 pH는 제2 pH보다 낮은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 제1 pH는 pH 5.0 내지 pH 7.4이고, 제2 pH는 pH 4.3 내지 pH 5.6이며 제3 pH는 pH 2.0 내지 pH 2.8인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 세트의 조건, 제2 세트의 조건, 및 제3 세트의 조건은 이동상 변형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 이동상 변형제는 LiCl, NaCl, KCl, $MgCl_2$, 및 $CaCl_2$ 완충제로부터 선택된 염 완충제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

헤테로다이머 항체, 제1 호모다이머 항체 불순물, 및 제2 호모다이머 항체 불순물의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 헤테로다이머 항체의 양 및 순도를 정량화하기 위한, 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템으로서,

제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스 및 검출기 각각은 스위치 밸브를 통해 연결되고, 헤테로다이머 항체 및 제1 호모다이머 항체 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 결합하고, 제2 호모다이머 항체 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않고 제2 친화성 매트릭스에 결합하며, 헤테로다이머 항체는 제1 친화성 매트릭스에 대해 제1 호모다이머 항체 불순물보다 낮은 친화성을 가지며, 헤테로다이머 항체는 하나의 비치환 CH3 도메인 및 하나의 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 포함하는 이중특이적 항체(FcFc* 항체)이고, 제1 호모다이머 항체 불순물은 2개의 비치환 CH3 도메인을 포함하는 단일특이적 항체(FcFc 항체)이며, 제2 호모다이머 항체 불순물은 2개의 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 포함하는 단일특이적 항체(Fc*Fc* 항체)이고, 제1 친화성 매트릭스는 단백질 A를 포함하고(단백질 A 친화성 매트릭스), 제2 친화성 매트릭스는 단백질 G를 포함하며(단백질 G 친화성 매트릭스), 비치환 CH3 도메인은 단백질 A 및 단백질 G 모두에 결합하고, H435R/Y436F 치환 CH3 도메인은 단백질 G에는 결합하지만 단백질 A에는 실질적으로 결합하지 않으며, Fc는 비치환 CH3 도메인을 갖는 중쇄를 나타내고, Fc*는 H435R/Y436F 치환 CH3 도메인을 갖는 중쇄를 나타내며, 단백질 A 친화성 매트릭스, 단백질 G 친화성 매트릭스, 검출기 각각은 스위치 밸브를 통해 연결된, 크로마토그래피 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 검출기는 UV 검출기, 전하 에어로졸 검출기, 및/또는 질량 분석기가 장착된 HPLC 칼럼을 포함하는 것을 특징으로 하는, 크로마토그래피 시스템.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 샘플 중의 다량체 단백질의 양 및/또는 순도를 평가하기 위한 크로마토그래피 시스템 및 방법에 관한 것이며, 여기서 크로마토그래피 시스템은 스위치 밸브를 통해 연결된 2개의 상이한 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 이중특이적 항체는 동일 또는 상이한 항원 상의 2개의 상이한 유형의 에피토프에 동시에 그리고 선택적으로 결합할 수 있는 항체이다. 다중 표적의 단일 분자와의 결합은, 특히 종양학 및 자가면역 질환 분야에서 매력적인 치료 개념이다. 가장 광범위하게 사용된 용도는 암 면역요법에서이며, 이중특이적 항체는 세포독성 세포 및 파괴될 종양 세포와 같은 표적에 동시에 결합하도록 조작된다. 추가적으로, 하나 이상의 분자를 표적화하는 것은 병렬 경로의 조절을 피하고 치료에 대한 저항성을 회피하는 데 유용할 수 있다. 경로의 다중 표적에 결합하거나 차단하는 것은, 대부분의 상태가 신체 전체에 복잡한 다면적 효과를 나타내기 때문에 질환을 중단시키는 데 유익할 수 있다.

[0003] 다중 이중특이적 항체 포맷이 제안되었고 현재 개발 중에 있다. 한 가지 그러한 포맷은 **도 1**에서 개략적으로 도시된, 개선된 약동학적 프로파일 및 최소 면역원성을 가지는 표준 전체 인간 IgG 항체를 토대로 한다 (미국 특허 제 8,586,713호, 및 WO2016/018740 참조). 단일 공통 경쇄 및 2개의 별개의 중쇄는 그러한 이중특이성을 형성하기 위하여 조합된다. 중쇄 중 하나는 CH3 도메인에서의 H435R/Y436F (EU 넘버링 시스템에 의함; IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면 H95R/Y96F) 치환으로 인해 단백질 A에 대한 치환된 Fc 서열 (이하 "Fc*")의 결합을 크게 감소시키는 Fc*을 함유한다. Fc*와 Fc 중쇄 및 공통 경쇄의 공동 발현의 결과로서, 3개의 생성물이 생성된다: 그 중 2개 (FcFc 및 Fc*Fc*)는 중쇄와 관련하여 호모다이머이고, 그 중 하나 (FcFc*)가 원하는 헤테로다이머 이중특이적 생성물이다. Fc* 서열은 Fc-결합 단백질, 예컨대 단백질 A에 대해, 고친화성 FcFc 중쇄 호모다이머, 또는 약하게 결합하는 Fc*Fc* 호모다이머와 비교하여 중간 결합 친화성으로 인해, 상업적으로 이용 가능한 친화성 크로마토그래피 칼럼 상에서 FcFc* 이중특이적 생성물의 선택적 정제를 가능하게 한다.

[0004] 다른 항체 포맷은 소위 **도 2A**에서 개략적으로 도시된, WO2013/166604에서 기술된 소위 "한팔(one-arm)" 항체이다. 이 헤테로다이머 항체는, 예컨대, 2개의 별개의 중쇄 및 단지 하나의 경쇄로 이루어진다. 한 그런 예에서, 경쇄에 결합된 중쇄는 Fc* 서열을 함유하는 한편, 경쇄가 없는 중쇄는 규칙적인 Fc 서열을 함유한다. 초기 반응 혼합물은 따라서 3개의 생성물, 즉 2개의 호모다이머 ((FcFc 및 Fc*Fc*) 및 원하는 헤테로다이머 FcFc* 생성물을 함유하며, 이것들은 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리될 수 있다.

[0005] 또 다른 가능한 항체 포맷은 **도 2B**에서 개략적으로 도시된, C-말단 단일 사슬 가변 단편 (ScFv)을 가진 항체 구성물이다. 이들 항체는 단일특이적이거나 이중특이적이며, 단일 공통 경쇄 및 2개의 별개의 중쇄를 포함한다. 한 예에서, 중쇄 중 하나는 Fc* 서열을 가지며 ScFv에 결합되는 한편, 다른 중쇄는 천연 Fc 서열을 가지면 ScFv에 결합되지 않는다. 다른 예에서, ScFv를 가진 중쇄 구성물은 천연 Fc 서열을 가지며, Fc* 중쇄는 ScFv를 갖지 않는다. 친화성 칼럼에의 결합을 없애는 추가 돌연변이가 Fc* 돌연변이를 가진 동일한 사슬 상의 중쇄 가변 영역 (VH)에 대한 돌연변이 (IMGT 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 90으로서 기술된 VH3

및 Fc의 돌연변이)인 추가의 예는 예컨대 U. S. 9,493,563 (그 전문이 참조로 포함됨)에서 제공된다. 상기 예에서처럼, FcFc* 헤테로다이머 및 FcFc 및 Fc*Fc* 호모다이머의 3-구성요소 혼합물은 차등 결합 친화성 크로마토그래피를 사용하여 분리될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이중특이적 항체의 상업적 규모 생산 분야에서 항체 제조 및 정제의 다양한 단계에서 헤테로다이머의 상대적 및 절대적 양과 순도를 평가할 필요성이 있다. 이것을 위해, 헤테로다이머와, 2개의 호모다이머 불순물 사이의 효과적인 분해가 바람직하다. 더욱이, 세포 배양 과정뿐만 아니라 항체의 정제 과정 중에 품질 제어 측정의 속도 및 효율이 바람직하다. 본 발명은 이런 필요성 및 다른 필요성을 신규한 크로마토그래피 시스템 및 방법을 제공함으로써 해결한다.

[0007] 전술한 논의는 기술분야가 맞닥뜨린 문제의 본질을 더 잘 이해하기 위해서만 제공되며 어떠한 방식으로든 선행기술로서 인정한 것으로 해석되지 않아야 하며 본원의 어떠한 참고문헌의 인용도 그러한 참고문헌이 본 출원에 대한 "선행 기술"을 구성하는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 발명의 다양한 비제한적인 측면 및 구체예가 아래에서 기술된다.

[0009] 본 발명은 스위치 밸브를 포함하는 신규한 크로마토그래피 시스템 및 샘플 중의 헤테로다이머 분획의 양 및/또는 순도를 정성적으로 평가하는 방법을 기술한다.

[0010] 한 측면으로, 본 발명은 단백질, 제1 단백질 불순물, 및 제2 단백질 불순물의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 방법을 제공하며, 단백질 및 제1 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 결합하고 제2 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않으며 제2 친화성 매트릭스에 결합하고, 상기 방법은:

[0011] a. 샘플을 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템에 적용하는 단계로, 제1 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 제2 친화성 매트릭스에 연속적으로 연결되어 있는 것인 단계;

[0012] b. 제2 불순물을 제1 친화성 매트릭스로부터 제1 세트의 조건 하에 제2 친화성 매트릭스 위로 용출시키는 단계;

[0013] c. 제2 친화성 매트릭스를 우회하기 위하여 스위치 밸브를 전환하고, 제2 세트의 조건 하에 검출기를 통해 단백질을 용출시키며, 용출된 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0014] d. 제1 불순물을 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고 용출된 제1 불순물의 양을 측정하는 단계;

[0015] e. 제2 불순물을 제2 친화성 매트릭스로부터 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고, 용출된 제2 불순물의 양을 측정하는 단계; 및

[0016] f. 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 단계

[0017] 를 포함한다.

[0018] 한 구체예에서 단백질은 다량체 단백질, 예컨대 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 관심 있는 항체이고, 제1 및 제2 단백질 불순물은 다량체 단백질, 예컨대, 관심 있는 항체와 구조적으로 관련이 있을 수 있거나 없을 수 있는 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 이중특이적 항체, 즉, 헤테로다이머 단백질이고, 제1 단백질 불순물은 제1 호모다이머 단백질이며, 제2 단백질 불순물은 제2 호모다이머 단백질이다. 일부 경우에, 다량체 단백질의 혼합물은 다수의 진핵 세포, 예컨대, 예를 들자면, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 세포 배양으로 생성된다.

[0019] 한 구체예에서, 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 대해 제1 불순물보다 낮은 친화성을 가진다. 한 구체예에서 단백질은 헤테로다이머 단백질이고, 제1 단백질 불순물은 제1 호모다이머 단백질이며, 제2 단백질 불순물은 제2 호모다이머 단백질이고, 헤테로다이머 단백질 및 제1 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 결합하며 제2 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에는 실질적으로 결합하지 않고 제2 친화성 매트릭스에 결합한다.

[0020] 한 구체예에서, 단백질은 제1 면역글로불린 CH3 도메인 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인을 포함하며, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인은 제1 친화성 매트릭스에 대한 그것들의 친화성이 상이하고, 샘플은 상기 단백질, 2개의 제1 CH3 도메인을 포함하는 단백질, 및 2개의 제2 CH3 도메인을 포함하는 단백질을 포함하는 혼합물을 포함한다.

[0021] 한 구체예에서, 제2 CH3 도메인은 H435R 및 Y436F (EU 넘버링 시스템에 의한 것임; IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면 H95R/Y96F) 아미노산 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, 제2 CH3 도메인은 H435R (EU 넘버링 시스템에 의한 것임; IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면 H95R) 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 CH3 도메인은 H435R (EU 넘버링 시스템에 의한 것임; H95R IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면) 아미노산 치환을 포함하고 Fc-결합 리간드, 예컨대 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L, 또는 이것들의 유도체에 대한 약한 또는 검출할 수 없는 결합을 나타낸다.

[0022] 한 구체예에서, 단백질은 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 이중특이적 항체이다.

[0023] 한 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스는 단백질 A를 포함하고 제2 친화성 매트릭스는 단백질 G를 포함한다.

[0024] 한 구체예에서, 제1 세트의 조건은 제1 pH를 포함하고, 제2 세트의 조건은 제2 pH를 포함하며, 제3 세트의 조건은 제3 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮고, 제3 pH는 제2 pH보다 낮다. 한 구체예에서, 제1 pH는 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.4이고, 제2 pH는 약 pH 4.3 내지 약 pH 5.6이며, 제3 pH는 약 pH 2.0 내지 약 pH 2.8이다.

[0025] 한 구체예에서, 제1 세트의 조건, 제2 세트의 조건, 및 제3 세트의 조건은 이동상 변형제를 포함한다. 한 구체예에서, 이동상 변형제는 LiCl, NaCl, KCl, $MgCl_2$, 및 $CaCl_2$ 완충제로부터 선택된 염 완충제이다.

[0026] 다른 측면으로, 헤테로다이머 단백질, 제1 호모다이머 단백질, 및 제2 호모다이머 단백질의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 헤테로다이머 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 방법이 제공되며, 여기서 헤테로다이머 단백질 및 제1 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 결합하고 제2 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않으며 제2 친화성 매트릭스에 결합하고, 상기 방법은:

[0027] a. 샘플을 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템에 적용하는 단계로, 제1 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 제2 친화성 매트릭스에 연속적으로 연결되어 있는 것인 단계;

[0028] b. 제2 호모다이머 단백질을 제1 친화성 매트릭스로부터 제1 세트의 조건 하에 제2 친화성 매트릭스 위로 용출시키는 단계;

[0029] c. 제2 친화성 매트릭스를 우회하기 위하여 스위치 밸브를 전환하고, 제2 세트의 조건 하에 검출기를 통해 헤테로다이머 단백질을 용출시키며, 용출된 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0030] d. 제1 호모다이머 단백질을 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고 용출된 제1 불순물의 양을 측정하는 단계;

[0031] e. 제2 호모다이머 단백질을 제2 친화성 매트릭스로부터 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고, 용출된 제2 불순물의 양을 측정하는 단계; 및

[0032] f. 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 단계

[0033] 를 포함한다.

[0034] 또 다른 측면으로, 헤테로다이머 단백질, 제1 호모다이머 단백질, 및 제2 호모다이머 단백질의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 헤테로다이머 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 방법이 제공되며, 여기서 헤테로다이머 단백질 및 제1 호모다이머 단백질은 단백질 A 매트릭스에 결합하고 제2 호모다이머 단백질은 단백질 A 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않으며 단백질 G 매트릭스에 결합하고, 상기 방법은:

[0035] a. 샘플을 단백질 A 매트릭스, 단백질 G 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템에 적용하는 단계로, 단백질 A 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 단백질 G 매트릭스에 연속적으로 연결되어 있는 것인 단계;

[0036] b. 제2 호모다이머 단백질을 단백질 A 매트릭스로부터 제1 세트의 조건 하에 단백질 G 매트릭스 위로 용출시키는 단계;

[0037] c. 단백질 G 매트릭스를 우회하기 위하여 스위치 밸브를 전환하고, 제2 세트의 조건 하에 검출기를 통해 헤테로다이머 단백질을 용출시키며, 용출된 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0038] d. 제1 호모다이머 단백질을 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고 용출된 제1 불순물의 양을 측정하는 단계;

[0039] e. 제2 호모다이머 단백질을 단백질 G 친화성 매트릭스로부터 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고, 용출된 제2 불순물의 양을 측정하는 단계; 및

[0040] f. 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 단계

[0041] 를 포함한다.

[0042] 한 구체예에서, 헤테로다이머 단백질은 FcFc*를 포함하고, 제1 호모다이머 단백질은 FcFc를 포함하며, 제2 호모다이머 단백질은 Fc*Fc*를 포함한다.

[0043] 또 다른 측면으로, 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템이 제공되며, 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스 및 검출기의 각각은 스위치 밸브를 통해 연결되어 있다.

[0044] 또 다른 측면으로, UV 검출기, 방출 에어로졸 검출기, 및/또는 질량 분석계가 장착된 HPLC 칼럼을 포함하는 (i) 단백질 A 크로마토그래피 칼럼, (ii) 단백질 G 크로마토그래피 칼럼, 및 (iii) 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템이 제공되며, 단백질 A 크로마토그래피 칼럼, 단백질 G 크로마토그래피 칼럼 및 검출기의 각각은 스위치 밸브를 통해 연결되어 있다.

[0045] 이들 및 다른 측면은 첨부된 청구범위를 포함한, 다음의 발명의 상세한 설명을 판독한 후에 기술분야의 숙련된 사람들에게 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0046] **도 1**은 단일 공통 경쇄 및, 하나는 Fc* 돌연변이를 포함하고 하나는 천연 (Fc) 서열을 가지는 2개의 별개의 중쇄를 가지는 표준 전체 인간 IgG 항체를 토대로 한 발명의 방법으로 분리하기에 적합한 이중특이적 항체 포맷을 개략적으로 도시한다. 하나의 대표적인 예가 도시된 것이며, Fc* 돌연변이는 제1 또는 제2 중쇄 중 어느 하나에 포함될 수 있음이 주지된다.

도 2A 및 2B는 발명의 구체예에 따르는 분리에 적합한 2개의 추가적인 항체 포맷을 개략적으로 도시한다: **도 2(A)**는 2개의 별개의 중쇄 및 단지 하나의 경쇄로 이루어지는 헤테로다이머 "한팔" 항체를 도시하며, 한 중쇄는 Fab 단편을 함유하지 않는다 (예컨대 중쇄 불변 도메인만을 함유한다). **도 2(B)**는 C-말단 단일 사슬 가변 단편 (ScFv)을 가진 2개의 예시 항체 구성물을 도시한다. Fc* 돌연변이는 제1 또는 제2 중쇄 (불변 도메인) 폴리펩타이드 중 어느 하나에 포함될 수 있다.

도 3은 개시의 방법에 다르는 이중특이적 항체 및 모노머 불순물의 혼합물의 분리를 예시하며 개시의 구체예에 따르는 시스템을 이용하는 역가 크로마토그램을 도시한다.

도 4(A) 및 4(B)는 개시의 구체예에 따르는 예시의 크로마토그래피 시스템을 개략적으로 도시한다. **도 4(A)**에서 도시된 한 예시 시스템에서, 자동 샘플러는 제1 친화성 매트릭스 (칼럼)에 연결되며, 그것은 스위치 밸브를 통해 제2 친화성 매트릭스 (칼럼) 및 검출기에 연결된다. 도시된 구성에서, 스위치 밸브는 제1 칼럼을 제2 칼럼과 연속적으로 연결시키기 위해 배치되며, 용리액은 제1 칼럼을 통해 제2 칼럼 위로 흐르고, 계속해서 정량화를 위해 검출기를 통해 흐른다. **도 4(B)**에서 도시된 다른 예시 시스템에서, 자동 샘플러는 제1 친화성 매트릭스 (칼럼)에 연결되고, 그것은 스위치 밸브를 통해 제2 친화성 매트릭스 (칼럼)에 연결된다. 검출기는 우회 (칼럼 없음) 구성에서 스위치 밸브를 통해 연결된다. 여기서, 스위치 밸브는 제1 칼럼을 제2 칼럼에 연결하고, 그것을 추가로 검출기에 연결시키거나, 또는 제2 칼럼을 우회하고 제1 칼럼을 직접 검출기에 연결시킨다.

도 5는 개시의 구체예에 다르는 이중특이적 항체 역가/순도 셋업을 도시한다. 개략도는 용매 탈기 장치, 용매 관리기, 샘플 관리기, 칼럼 구획 관리기, 및 검출기를 도시한다.

도 6은 개시의 구체예에 따르는 예시의 크로마토그래피 시스템을 도시한다. 시스템의 이 예시의 칼럼 구획에서, 샘플은 제1 친화성 매트릭스를 함유한 다수의 연속적으로 연결된 칼럼을 통해 이동하고, 이어서 제2 친화성 매트릭스를 함유한 다수의 연속적으로 연결된 칼럼을 통해 이동한다. 스위치 밸브는 제1 세트의 칼럼을 제2 세트의 칼럼에 연결시킨다.

도 7은 개시의 구체예에 따르는 예시의 크로마토그래피 시스템의 대체 개략도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 본 발명의 상세한 구체예가 본원에서 개시된다; 그러나, 개시된 구체예는 단지 다양한 형태로 구현될 수 있는 발명을 예시하는 것이 이해되어야 한다. 더불어, 발명의 다양한 구체예와 함께 제공된 각각의 실시예는 예시하기 위해 의도되며, 제한하는 것이 아니다. 그러므로, 본원에 개시된 특정 구조적 및 기능적 상세한 내용은 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하고, 단지 기술분야에 숙련된 사람에게 본 발명을 다양하게 사용하기 위한 교시를 위한 대표적인 기초사항으로서 해석되어야 한다.

[0048] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적이고 과학적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에서 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 특정 방법 및 물질이 이제 기술된다.

[0049] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 것과 같이, 단수의 것을 나타내는 단어형태는 맥락상 분명하게 다른 것을 나타내지 않는 한 복수의 대상물을 포함한다. 그러므로, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은 하나 이상의 방법, 및/또는 본원에 기술된 및/또는 본 개시를 판독할 때 기술분야에 숙련된 사람들에게 분명해질 유형의 단계를 포함한다.

[0050] 발명에 따르는 방법으로 분리하기에 적합한 단백질의 비제한적인 예로는, 제한 없이, 헤테로다이머 항체, 예컨대, 이중특이적 항체, 한팔 항체, 및 ScFv 항체를 들 수 있다. 이중특이적 항체는 일반적으로 2개의 상이한 중쇄를 포함하며, 각각의 중쇄는 2개의 상이한 분자 (예컨대, 2개의 상이한 항원 또는 항원과 T-세포 수용체) 상의 또는 동일한 분자 (예컨대, 동일한 항원) 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 만약 이중특이적 항체가 2개의 상이한 에피토프 (제1 에피토프 및 제2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있다면, 제1 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화성은 일반적으로 제2 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화성보다 적어도 1 내지 2 또는 3 또는 4배 더 낮을 것이고, 그 역도 마찬가지이다. 이중특이적 항체에 의해 인식된 에피토프는 동일한 또는 상이한 표적 상에 (예컨대, 동일한 또는 상이한 단백질 상에) 있을 수 있다. 이중특이적 항체는, 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄를 조합함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열은 상이한 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열에 융합될 수 있고, 그러한 서열은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이적 항체는 각각 3개의 중쇄 CDR과, 이어서 (N-말단에서 C-말단 쪽으로) CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 가지는 2개의 중쇄, 및 항원 결합 특이성을 부여하지는 않지만 각각의 중쇄와 회합할 수 있는, 또는 각각의 중쇄와 회합할 수 있고 중쇄 항원 결합 영역에 의해 결합된 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있는, 또는 각각의 중쇄와 회합할 수 있고 하나 또는 둘 다의 중쇄의 하나 또는 둘 다의 에피토프에의 결합을 가능하게 하는 면역글로불린 경쇄를 가진다.

[0051] 구절 "Fc-함유 단백질"은 항체, 이중특이적 항체, 면역부착소(immunoadhesin), 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능성 부분을 포함하는 다른 결합 단백질을 포함한다. "기능성 부분"은 Fc 수용체 (예컨대, FcγR; 또는 FcRn, 즉, 신생아 Fc 수용체)에 결합할 수 있는, 및/또는 보체의 활성화에 참여할 수 있는 CH2 및 CH3 영역을 나타낸다. 만약 CH2 및 CH3 영역이 그것을 임의의 Fc 수용체에 결합할 수 없게 만들고 또한 보체를 활성화할 수 없게 만드는 결실, 치환, 및/또는 삽입 또는 다른 변형을 함유한다면, CH2 및 CH3 영역은 기능적이지 않다.

[0052] Fc-함유 단백질은 변형이 결합 단백질의 하나 이상의 이펙터 기능에 영향을 미치는 경우를 포함하여, 면역글로불린 도메인에 변형 (예컨대, FcγR 결합, FcRn 결합 및 그로써 반감기, 및/또는 CDC 활성에 영향을 미치는 변형)을 포함할 수 있다. 이러한 변형으로, 한정하는 것은 아니지만, 면역글로불린 불변 영역의 EU 넘버링을 참조로 한 다음의 변형 및 그것들의 조합을 들 수 있다: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, 및 439.

[0053] 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 결합 단백질은 Fc-함유 단백질이고 향상된 혈청 반감기 (인용된 변형(들)이 없는 동일한 Fc-함유 단백질과 비교하여)를 나타내며 위치 250 (예컨대, E 또는 Q); 250 및 428 (예컨대, L

또는 F); 252 (예컨대, L/Y/F/W 또는 T), 254 (예컨대, S 또는 T), 및 256 (예컨대, S/R/Q/E/D 또는 T)에서 변형; 또는 428 및/또는 433 (예컨대, L/R/SI/P/Q 또는 K) 및/또는 434 (예컨대, H/F 또는 Y)에서 변형; 또는 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 307 또는 308 (예컨대, 308F, V308F), 및 434에서의 변형을 가진다. 다른 예에서, 변형은 428L (예컨대, M428L) 및 434S (예컨대, N434S) 변형; 428L, 2591 (예컨대, V259I), 및 308F (예컨대, V308F) 변형; 433K (예컨대, H433K) 및 434 (예컨대, 434Y) 변형; 252, 254, 및 256 (예컨대, 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형 (예컨대, T250Q 및 M428L); 307 및/또는 308 변형 (예컨대, 308F 또는 308P)을 포함할 수 있다.

[0054] 용어 "별 치환", "Fc*", 및 "HC*"는 면역글로불린의 Fc 도메인에 결합하는 것으로 알려져 있는 박테리아 단백질, 예컨대 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L 또는 이것들의 유도체에 대한 결합을 없애는 돌연변이를 함유하는 임의의 분자, 면역글로불린 중쇄, Fc 단편, Fc-함유 분자 등을 포함한다 (예를 들어 Choe, W., et al. 2016, *Materials* 9, 994, doi:10.3390/ma9120994 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 SpA 및 SpA 모방 친화성 리간드 참조). 면역글로불린 또는 다른 Fc-함유 단백질은, 예컨대 WO2016/018740 및 미국 특허 제 8,586,713호에서 기술된 것과 같이, 예를 들어, 단백질 A에 대한 결합을 크게 감소시키는 CH3 도메인 내의 변형된 서열을 함유할 수 있다. Fc 도메인의 돌연변이는 다이머의 한 폴리펩타이드가 돌연변이를 함유하고, 하나는 함유하지 않는 것을 쉽게 주지시키기 위해 명세서 전체에서 "별 치환" 또는 Fc*로서 표시될 수 있다. 그러므로, Fc*Fc*는 두 모노머가 Fc*를 포함하고 있는 호모다이머를 나타내고, FcFc*, 또는 Fc*Fc는 Fc* 치환과 관련하여 헤테로다이머를 나타낸다. 용어 FcFc* 및 Fc*Fc는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0055] 구절 "이동상 변형제"는 단백질 사이의 비특이적 (즉, 비친화성) 이온성 및 다른 비-공유 상호작용의 효과를 감소시키는, 또는 상호작용을 파괴하는 모이어티를 포함한다. "이동상 변형제"로, 예를 들어, 제I족 및 제II족 금속과 아세테이트, 중탄산염, 카보네이트, 할로겐 (예컨대, 염화물 또는 플루오라이드), 니트레이트, 포스페이트, 또는 설페이트와의 염, 이온성 조합을 들 수 있다. "이동상 변형제"의 비제한적인 예시 목록은 아세테이트의 베릴륨, 리튬, 나트륨, 및 칼륨 염; 중탄산 나트륨 및 칼륨; 리튬, 나트륨, 칼륨, 세슘 카보네이트; 리튬, 나트륨, 칼륨, 세슘, 및 마그네슘 염화물; 나트륨 및 칼륨 플루오르화물; 나트륨, 칼륨, 및 칼슘 질화물; 나트륨 및 칼륨 포스페이트; 및 칼슘 및 마그네슘 설페이트를 포함한다.

[0056] "이동상 변형제"는 또한 비공유 힘을 약화시키거나 그렇지 않으면 간섭하고 생체분자 시스템 내의 엔트로피를 증가시키는 카오트로픽제를 포함한다. 카오트로픽제의 비제한적인 예로는 부탄올, 염화 칼슘, 에탄올, 염화 구아니디늄, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화 마그네슘, 페놀, 프로판올, 도데실 황산 나트륨, 티오우레아, 및 우레아를 들 수 있다. 카오트로픽제는 단백질의 용해도에 영향을 미치는 염을 포함한다. 더 많은 카오트로픽 음이온은 예를 들어 염화물, 질산염, 브롬화물, 염소산염, 요오드화물, 과염소산염, 및 티오시아네이트를 포함한다. 더 많은 카오트로픽 양이온은 예를 들어 리튬, 마그네슘, 칼슘, 및 구아니디늄을 포함한다.

[0057] "이동상 변형제"는 pH 구배 또는 단계에 첨가될 때, 또는 "이동상 변형제" 중의 단백질 A 지지체의 평형 및 pH 단계 또는 구배의 적용시에 호모다이머 IgG와 헤테로다이머 IgG (예컨대, 야생형 인간 IgG 및 본원에 기술된 것과 같이 동일하지만 그것의 CH3 도메인에 하나 이상의 변형을 포함하는 IgG)의 용출 사이에 pH 단위 거리의 확장을 초래하는 이온성 또는 다른 비공유성 상호작용에 영향을 미치는 그런 모이어티를 포함한다. "이동상 변형제"의 적합한 농도는 최대 pH 거리가 주어진 pH 단계 또는 pH 구배에 도달할 때까지 "이동상 변형제"의 농도를 증가시키면서, 동일한 칼럼, pH 단계 또는 구배를 사용하여 그것의 농도에 의해 결정될 수 있다. "이동상 변형제"는 또한 예를 들어 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 등을 포함하여, 비극성 변형제를 포함할 수 있다.

[0058] 친화성 매트릭스는 그 위에 친화성 단백질, 예컨대, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 L, 단백질 Z, 또는 이것들의 재조합 유도체가 부착하는 고체 지지체 비수성 매트릭스이다 (Choe, W., et al, 2016 상기 동일). 이러한 지지체로는 아가로스, 세파로스, 유리, 실리카, 폴리스티렌, 니트로셀룰로스, 챠콜, 모래, 셀룰로스 및 임의의 다른 적합한 물질을 들 수 있다. 이러한 물질은 기술분야에 잘 알려져 있다. 임의의 적합한 방법이 제2 단백질을 고체 지지체에 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 단백질을 적합한 고체 지지체에 부착시키는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다. 예컨대 Ostrove, Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990을 참조한다. 단백질 A가 고정되었거나 고정되어 있지 않은 이러한 고체 지지체는 Vector Laboratory (Burlingame, Calif.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), BioRad (Hercules, Calif.), Amersham Biosciences (part of GE Healthcare, Uppsala, Sweden), Pall (Port Washington, NY) 및 EMD-Millipore (Billerica, Mass.)와 같은 곳을 포함한 많은 상업적 공급처로부터 쉽게 입수 가능하다. 기공 유리 매트릭스에 고정된 단백질 A는 PROSEP®-A (Millipore)로서 상업적으로 입수 가능하다. 고체상은 또한 아가로스-기반 매트릭스일 수 있다. 아가로스 매트릭스 상에 고정된 단백질 A는 예컨대, MABSELECTTM (GE Amersham

Biosciences)으로서 상업적으로 입수 가능하다. 면역글로불린- 또는 Fc-결합 단백질을 함유한 친화성 칼럼은 SpA 또는 유사 SpA 리간드 중 임의의 것을 고체 지지체에 부착시킴으로써 제조될 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 바, "친화성 크로마토그래피"는 크로마토그래피 분리를 이루기 위해 등전점, 소수성, 또는 크기와 같은 생체분자의 일반적 특성보다는 오히려 생체분자 사이의 특이적인, 가역적 상호작용을 사용하는 크로마토그래피 방법이다. "단백질 A 친화성 크로마토그래피" 또는 "단백질 A 크로마토그래피"는 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 대한 단백질 A의 IgG 결합 도메인의 친화성을 사용하는 특정 친화성 크로마토그래피 방법을 나타낸다. 이런 Fc 부분은 인간 또는 동물 면역글로불린 불변 도메인 CH2 및 CH3 또는 이것들에 실질적으로 유사한 면역글로불린 도메인을 포함한다.

[0060] 단백질 A는 단일 폴리펩타이드 사슬로 이루어진, 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 여러 스트레인에 의해 생성된 세포벽 구성요소이다. 단백질 A 유전자 생성물은 병원체의 세포벽에 나란한 방식으로 부착된 5개의 상동성 반복부로 이루어진다. 5개의 도메인은 대략 58개 아미노산 길이이며 EDABC로 표시되고, 각각은 면역글로불린 결합 활성을 나타낸다 (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481. 3중 나선 번들로 접혀진 5개의 상동성 면역글로불린 결합 도메인. 각 도메인은 많은 포유류 종으로부터의 단백질, 가장 주목할만하게는 IgG에 결합할 수 있다 (Hober S et al., (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 848(1): 40-47). 단백질 A는 인간 VH3 패밀리의 경우 Fc 영역 내에 있는 것뿐만 아니라 Fab 영역 내의 대부분의 면역글로불린의 중쇄에 결합한다 (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). 단백질 A는 인간, 마우스, 토끼, 및 기니아 피그를 포함한 다양한 종으로부터의 IgG에 결합하지만 인간 IgG3에는 결합하지 않는다 (Hober S et al., (2007) 상기 동일). 단백질 A에 결합하지 못하는 인간 IgG3의 무능력은 인간 IgG3 Fc 영역에서의 H435R 및 Y436F 치환에 의해 설명된다 (EU numbering, Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34). IgG 외에, 단백질 A는 또한 IgM 및 IgA와 상호작용한다.

[0061] 단백질 A가 이러한 고치환성으로 항체에 결합하는 능력은 생물학적 의약품에서 그것을 산업적 규모로 사용하기 위한 원동력이다. 생물-의약품에서 항체의 생성을 위해 사용된 단백질 A는 보통 대장균에서 재조합에 의해 생성되고 천연 단백질 A와 본질적으로 동일하게 기능한다 (Liu H F et al., (2010) MAbs, 2(5): 480-499). 가장 일반적으로, 재조합 단백질 A는 항체의 정제를 위해 고정상 크로마토그래피 수지에 결합된다. 최적의 결합은 pH 8.2에서 일어나지만, 결합은 또한 중성 또는 생리적 조건 (pH 7.0-7.6)에서도 양호하다. 용출은 보통 산성 pH (글리신-HC1, pH 2.5-3.0) 쪽으로의 pH 이동을 통해 이루어진다. 이것은 대부분의 단백질-단백질 및 항체-항원 결합 상호작용을 영구적으로 단백질 구조에 영향을 미치지 않으면서 효과적으로 분해한다. 그럼에도 불구하고, 일부 항체 및 단백질은 낮은 pH에 의해 손상되고, 일부 경우에는 낮은 pH 조건에서의 시간 지속기간을 최소화하기 위하여 1 M Tris-HC1, pH 8.0과 같은 1/10 부피의 알칼리성 완충액을 첨가함으로써 회수 직후에 중성화하는 것이 가장 좋을 수 있다.

[0062] 다양한 상업적으로 입수 가능한 단백질 A 크로마토그래피 수지가 있다. 이들 매질 사이의 주된 차이는 지지체 매트릭스 유형, 단백질 A 리간드 변형, 기공 크기 및 입자 크기이다. 이들 요인의 차이는 압축성, 화학적 및 물리적 견고성, 확산 저항성 및 흡착제의 결합 능력의 차이를 유발한다 (Hober S et al., (2007), 상기 동일). 단백질 A 크로마토그래피 수지의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, GE Healthcare로부터의 MabSelect SuReTM 단백질 A 수지 및 MabSelectTM 단백질 A 수지, BioRad로부터의 EconoPac 단백질 A, Applied Biosystems로부터 입수 가능한 rProA, 및 Thermo Fisher로부터의 POROS® A를 들 수 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 바 단백질 A는 스타필로코쿠스 아우레우스의 세포벽으로부터의 천연 단백질, 재조합 또는 합성 방법에 의해 생성된 단백질 A, 및 Fc 영역에 결합하는 능력을 보유한 변이체를 다 포함한다. 조작된 단백질 A는 Z-도메인 테트라머, Y-도메인 테트라머, 또는 D 및 E 도메인이 없는 조작된 단백질 A일 수 있다. 이들 조작된 단백질 A의 보기는 면역글로불린의 VH3 도메인에 결합할 수 없지만 (또는 있다면 매우 낮은 친화성으로 결합함), IgG1, IgG2 및 IgG4의 CH3 도메인에는 여전히 결합할 수 있다. 실제로, 단백질 A 크로마토그래피는 고체 지지체에 고정된 단백질 A를 사용하는 것을 포함한다. Gagnon, Protein A Affinity Chromotography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996을 참조한다.

[0064] 단백질 G는 그룹 C 및 G 스트렙토코쿠스로부터 분리된 박테리아 세포벽 단백질이다. 상이한 스트렙토코쿠스로부터 분리된 천연 단백질 G의 DNA 서열분석으로 면역글로불린 결합 도메인뿐만 아니라 알부민 및 세포 표면 결합을 위한 부위가 확인되었다. 스트레인에 따라 면역글로불린 결합 영역 및 알부민 결합 영역 두 가지는 2-3개의 독립적으로 접혀지는 단위로 구성된다 (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4):

471-481). 스트레인 G148로부터의 단백질 G는 각각 ABD1, ABD2, 및 ABD3, 및 C1, C2, 및 C3로 표시된 3개의 알부민 및 면역글로불린 결합 도메인으로 이루어진다 (Olsson A et al., (1987) Eur. J. Biochem., 168(2): 319-324.). C1, C2, 및 C3으로 표시된 각각의 면역글로불린 결합 도메인은 대략 55개의 잔기이며 약 15개의 잔기로 된 링커에 의해 분리된다. 단백질 G 면역글로불린 결합 도메인의 모든 실험적으로 분해된 3D 구조는 임의의 이황화 가교 또는 단단하게 결합된 보결 기(prosthetic group)가 없는 고도로 압축된 구형 구조를 보여준다 (Sauer-Eriksson A E et al., (1995) Structure, 3(3): 265-278; Derrick J P & Wigley D B (1992) Nature, 359(6397): 752-754; Derrick J P & Wigley D B (1994) J. Mol. Biol., 243(5): 906-918; Lian L Y et al., (1994) Nat. Struct. Biol., 1(6): 355-357). 구조는 알파-나선에 의해 연결된 2개의 역평행 베타-헤어핀으로 구성된 4-가닥의 베타 시트를 포함한다.

[0065] 그룹 C 및 G로부터의 스트렙토코쿠스 스트레인은 단백질 A와는 대조적으로 IgG3을 포함한 IgG의 모든 인간 하위부류에 결합하는 것으로 나타난다. 단백질 G는 또한 마우스, 토끼, 및 양을 포함한 여러 동물 IgG에 결합한다 (Bjorck L & Kronvall G (1984) J. Immunol., 133(2): 969-974; Akerstrom B et al., (1985) J. Immunol., 135(4): 2589-2592; Akerstrom B & Bjorck L (1986) J. Biol. Chem., 261(22): 10240-10247; Fahnestock S R et al., (1986) J. Bacteriol., 167(3): 870-880). 그러므로, 단백질 G는 단백질 A와 비교하여 상이한 종의 하위부류에 대해 더 넓은 결합 스펙트럼을 나타낸다. 더불어, 단백질 G는 IgG의 Fab 부분에 고친화성으로 결합한다. 스트렙토코쿠스 단백질 G의 결합 도메인의 구조는 단독으로 (NMR에 의해, Lian L Y et al., (1994) 상기 동일), 및 IgG1 Fab와 함께 (x-선 결정학에 의해, Derrick J P & Wigley D B (1992) 상기 동일 및 Derrick J P & Wigley D B (1994) 상기 동일) 측정되었다. 실험적으로 분해된 모든 3D 구조는 IgG 중쇄의 CH1 도메인 내에서의 결합을 나타냈다.

[0066] 본원에서 사용되는 단백질 G는 자연적으로 발생하는 또는 변형된 스트렙토코쿠스 단백질 G이거나, 또는 조작된 단백질 G일 수 있다. 조작된 단백질 G는 B1 도메인 (GB1으로도 불림)을 포함할 수 있고 콘쥬게이션되거나 콘쥬게이션되지 않을 수 있다. 다른 구체예에서, 제2 친화성 매트릭스는 단백질 L 리간드 및 고체 기질에 부착된 그것의 유도체를 포함한다. 단백질 A와 유사하게, 대장균에서 생성된 재조합 단백질 G는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 알부민 및 세포 표면 결합 도메인은 비특이적 결합을 감소시키기 위해 재조합 단백질 G로부터 제거되었고, 그러므로, 미정제 샘플로부터 IgG를 분리하기 위해 사용될 수 있다. 단백질 A와 유사하게, 재조합 단백질 G는 항체의 정제를 위해 고정상 크로마토그래피 수지에 결합된다. 최적의 결합은 pH 5에서 일어나지만, 결합은 또한 pH 7.0-7.2에서도 양호하다; 단백질 A에 대해서처럼, 용출은 또한 산성 pH (글리신-HCl, pH2.5-3.0) 쪽으로의 pH 이동을 통해 이루어진다. 단백질 G 크로마토그래피 수지의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 단백질 G Sepharose™ 4 패스트 플로우 수지 및 GE Healthcare로부터의 HiTrap™ 단백질 G HP 칼럼을 들 수 있다.

[0067] 단백질 A와 유사하게, 대장균에서 생성된 재조합 단백질 G는 항체를 정제하기 위해 일상적으로 사용된다. 알부민 및 세포 표면 결합 도메인은 비특이적 결합을 감소시키기 위해 재조합 단백질 G로부터 제거되었고, 따라서, 미정제 샘플로부터 IgG를 분리하기 위해 사용될 수 있다. 단백질 A와 유사하게, 재조합 단백질 G는 항체의 정제를 위해 고정상 크로마토그래피 수지에 결합된다. 최적의 결합은 pH 5에서 일어나지만, 결합은 또한 pH 7.0-7.2에서도 양호하다; 단백질 A에 대해서처럼, 용출은 또한 산성 pH (글리신-HCl, pH2.5-3.0) 쪽으로의 pH 이동을 통해 이루어진다. 단백질 G 크로마토그래피 수지의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, 실시예에서 나타낸 것과 같이, 단백질 G SepharoseTM 4 패스트 플로우 수지 및 GE Healthcare로부터의 HiTrapTM 단백질 G HP 칼럼, Applied Biosystems로부터 입수 가능한 rProG, 및 Thermo Fisher로부터의 POROS® G를 들 수 있다.

[0068] 다른 단백질, 예컨대 단백질 L, M1 단백질, 및 단백질 H 또한 본 발명의 친화성 크로마토그래피에 사용될 수 있다. 단백질 L은 원래 박테리아 펩토스트렙토코쿠스 마그너스(*Peptostreptococcus magnus*)로부터 유래되지만, 이제는 재조합에 의해 생성되는 면역글로불린 결합 단백질이다 (Bjorck L (1988) J. Immunol., 140(4): 1194-1197; Kastern W et al., (1992) J. Biol. Chem., 267(18): 12820-12825). 단백질 L은 항체의 항원 결합 부위를 간섭하지 않으면서 카파 경쇄 상호작용을 통해 결합하는 독특한 능력을 가진다 (Nilson B H et al., (1993) J. Immunol. Methods, 164(1): 33-40). 이것은 단백질 L에 다른 항체 결합 단백질보다 더 넓은 범위의 면역글로불린 부류 및 하위부류에 결합하는 능력을 부여한다. 단백질 L은 모든 부류의 면역글로불린 (IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD)에 결합할 것이다. 단백질 L은 또한 단일 사슬 가변 단편 (scFv) 및 Fab 단편에 결합할 것이다 (Nilson B H et al., (1993) 상기 동일; Bottomley S P et al., (1995) Bioseparation, 5(6): 359-367). 단백질 L은 카파 I, III, 및 IV 하위부류의 인간 가변 도메인 및 마우스 카파 I 하위부류에 결합한다 (Nilson B H et al., (1992) 상기 동일). 단백질 L 크로마토그래피 수지의 예로는, 한정하는 것은 아니지만 실시예에서 사용

되는 것과 같은, Genescript사로부터의 단백질 L 수지를 들 수 있다.

[0069] M1 단백질 및 단백질 H는 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)의 특정 스트레인의 표면에 동시에 존재하는 표면 단백질이다. 단백질 H는 IgG의 Fc 영역에 대해 친화성을 가진다 (Akesson P et al., (1990) Mol. Immunol., 27(6): 523-531; Akesson P et al., (1994) Biochem. J., 300 (Pt 3): 877-886). 단백질 H는 인간, 원숭이 및 토끼로부터의 IgG의 Fc 영역에 결합한다 (Akesson P et al., (1990), 상기 동일; Frick I M et al., (1995) EMBO J., 14(8): 1674-1679). M 단백질은 또한 피브리노겐에 결합하는 것으로 알려져 있고 (Kantor F S (1965) J Exp Med, 121: 849-859), 이전의 작업은 API 스트레인으로부터의 M1 단백질이 또한 알부민 및 다클론성 IgG에 대해 친화성을 가지는 것을 입증하였다 (Schmidt K H & Wadstrom T (1990) Zentralbl. Bakteriol., 273(2): 216-228).

[0070] 친화성 크로마토그래피는 또한 항체, 항체의 단편, 또는 면역글로불린 도메인 및/또는 서열을 함유하는 키메라 융합 단백질에 선택적으로 결합하고 따라서 그것들을 정제하기 위하여 사용될 수 있는 매질을 포함한다. 항체는 IgG, IgA, IgM, IgY, IgD 및 IgE 유형을 포함한다. 항체는 또한 낙타과 항체, 조작된 낙타과 항체, 단일 사슬 항체, 단일-도메인 항체, 나노바디, 등과 같은 단일 사슬 항체를 포함한다. 항체 단편은 VH, VL, CL, CH 서열을 포함한다. 항체 서열을 함유하는 항체 단편 및 융합 단백질은 예를 들어 F(ab')3, F(ab')2, Fab, Fc, Fv, dsFv, (scFv)2, scFv, scAb, 미니바디, 디아바디, 트라이아바디, 테트라바디, Fc-융합 단백질, 트랩 분자, 등을 포함한다 (Ayyar et al., Methods 56 (2012): 116-129 참조). 이러한 친화성 크로마토그래피 매질은 항체, 그것의 단편, 및 그런 단편들을 함유하는 융합 단백질에 선택적으로 결합하는 리간드를 함유할 수 있다. 이러한 리간드로는 항체 결합 단백질, 박테리아에서 유래된 수용체, 항원, 렉틴 또는 표적 분자에 대해 지시된 항-항체를 들 수 있다. 항체는 정제를 필요로 한다. 예를 들어, IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgGl, LC-카파, LC-람다, IgG3/4, IgA, IgM, 등 중의 임의의 하나 이상에 대해 지시된 낙타과-유래 친화성 리간드는 친화성 리간드로서 사용될 수 있다 (CAPTURESELECT 크로마토그래피 수지 (Life Technologies, Inc., Carlsbad, Calif.)로서 상업적으로 이용 가능함).

[0071] 친화성 시약에 대한 헤테로다이머의 차등 친화성을 토대로 호모다이머로부터 헤테로다이머의 회수를 용이하게 하는 기법이 기술되어 있다. 차등 친화성 기법의 첫 번째 예는 2개의 상이한 동물 종으로부터의 2개의 상이한 중쇄의 사용을 포함하였고, 그 중 하나는 단백질 A에 결합하지 않는다 (Lindhofer H et al., (1995) J Immunol., 155(1): 219-225). 동일한 저자가 또한 2개의 상이한 인간 면역글로불린 아이소타입 (IGHG1 및 IGHG3)으로부터 기원하는 2개의 상이한 중쇄의 사용을 기술하였는데, 그 중 하나는 단백질 A에 결합하지 않는다 (IGHG3; 미국 특허 제 6,551,592호 (Lindhofer H et al.) 참조). 후자의 기술을 변형한 것이 WO10/151792 (Davis S et al.)에 기술되어 있고 헤테로다이머 중쇄 중 하나에서 단백질 A에 대한 친화성을 크게 감소시키기 위해 Jendeberg 등에 의해 기술된 (Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34) 2개의 아미노산 치환 H435R/Y436F의 사용을 포함하였다.

[0072] 본원에서 사용되는 바, 용어 "검출기"는 크로마토그래피 칼럼에서 용출되는 혼합물의 구성요소를 검출하고 및/또는 평가하기 위한 수단이 장착된 크로마토그래피 칼럼을 포함한다. 2가지 일반적인 유형의 검출기가 기술분야에 알려져 있다: 파괴성 및 비파괴성 검출기. 파괴성 검출기는 결과적으로 얻어지는 물질 (혈장, 에어로졸 또는 반응 혼합물)의 일부 물리적 특성을 후속적으로 측정하면서 칼럼 유출물의 연속적인 변환 (연소, 증발 또는 시약과의 혼합)을 수행한다. 비파괴성 검출기는 칼럼 용리액의 일부 특성 (예를 들어 UV 흡수)을 직접적으로 측정하고 그로써 추가의 분석 회수의 토대를 제공한다. 파괴성 검출기의 예로는 하전 에어로졸 검출기 (CAD), 플레임 이온화 검출기 (FID), 에어로졸-기반 검출기 (NQA), 플레임 광도측정 검출기 (FPD), 원자 방출 검출기 (AED), 질소 인 검출기 (NPD), 증발 광 산란 검출기 (ELSD), 질량 분석기 (MS), 전해 전도성 검출기 (ELCD), 소환(summon) 검출기 (SMSD), 및 미라(mira) 검출기 (MD)를 들 수 있다. 비파괴성 검출기의 한 예로는 다이오드 어레이 검출기 (DAD) 또는 광다이오드 어레이 (PDA) 검출기를 포함한 고정 및 가변 길이 UV 검출기를 포함한 UV 검출기를 들 수 있다. 유출물의 UV 흡수는 단일 또는 다중 파장에서 연속적으로 측정될 수 있다. 비파괴성 검출기의 다른 예로는 열 전도성 검출기 (TCD), 형광 검출기 (FLR), 전자 포획 검출기, 광 이온화 검출기 (PID), 및 굴절률 검출기 (RI 또는 RID)를 들 수 있다. 한 예에서, DAD/UV 검출기가 시스템의 칼럼 구획으로부터 흐르는 용출 물질을 검출하고 정량화하기 위해 이용될 수 있다. 이중특이적 FcFc* 항체, FcFc 호모다이머, 및 Fc*Fc* 헤테로다이머는 크로마토그래피 시스템으로부터 선택적으로 용출되며, 신호는 280 nM에서의 UV 검출에 의해 수집된다. 단백질 물질의 더 나은 안정성을 허용하기 위해 온도 제어 시스템, 예컨대 냉각 기능을 가진 온도 제어된 유동 셀을 연결시키기 위해 임의의 검출기가 조정될 수 있다.

[0073] 본 발명은 크로마토그래피 시스템, 예컨대 상업적으로 이용 가능한 크로마토그래피 시스템, 예컨대 Shimadzu

Corporation, Agilent Technologies, Waters Corporation, 등으로부터 이용 가능한 HPLC 시스템의 일부로서 설정될 수 있다. 한 비제한적인 구체예에서, 이러한 시스템은, 무엇보다도, 용매 및/또는 시약 보유 장치, 용매 관리기/펌프, 샘플 관리기, 칼럼 구획 관리기, 및 검출기 장치를 포함한다. 한 비제한적인 구체예가 **도 5**에 도시된다.

[0074] 보유 장치는 크로마토그래피 적용에서 사용된 용매 및 완충제를 하우징하고, 용매 탈기 장치를 선택적으로 포함한다. 한 구체예에서, 용매 및 완충제는 용매 관리기로 흐르기 전에 용매 탈기 장치를 통과한다.

[0075] 용매 관리기는 용매 전달을 담당하며 분리 및 분해를 개선하기 위하여 각각의 특별한 구체예에 따르는 분석 시스템의 필요성을 해결하기 위해 구성될 수 있는 컴퓨터 플랫폼을 포함할 수 있고, 예컨대 이원(binary) 또는 4차 구배 모듈을 포함한다. 용매 관리기는, 무엇보다도, HPLC 시스템의 용매 속도, 완충제조성, 및 압력 한계를 제어할 수 있다.

[0076] 샘플 관리기는 칼럼에 로딩하기 전에 온도를 변경시킬 수 있거나 (예컨대, 냉각 및/또는 가열), 또는 샘플의 온도를 일정하게 유지할 수 있는 (예컨대, 샘플을 일정한 온도로 냉각심으로써) 온도 제어 장치를 선택적으로 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 샘플은 주입을 대기하면서 샘플 관리기 구획에서 4℃에서 유지된다. 샘플은 자동 샘플러로 이동하고 거기서 주사바늘이 대기열에 표시된 샘플로 직접 이동한다. 한 구체예에서, 자동 샘플러는 주입된 용매 및/또는 샘플의 넘침을 처리하기 위한 압력 조절기를 추가로 포함한다. 그런 후 샘플은 자동 샘플러 바늘로부터 칼럼 구획으로 이동한다.

[0077] 분획의 단백질의 양, 또는 정량은 단백질을 검출기를 통해 용출시키고 기술분야에 알려져 있는 계산 방법을 사용함으로써 측정될 수 있다. 시스템은 시스템 제어 장치, 또는 다른 컴퓨터-보조 장치를 추가로 포함할 수 있다.

[0078] 순도 및/또는 품질 제어 분석은 샘플에 존재하는 3가지 단백질 종의 비율을 분석하고 정량화함으로써 수행된다. 혼합물 중의 단백질의 순도는 각 단백질 분획의 양을 측정하고 혼합물의 모든 단백질의 양의 합에 대한 관심의 단백질의 양의 비율을 계산함으로써 계산될 수 있다. 예를 들자면, 헤테로다이머 단백질과 둘 이상의 단백질 불순물을 포함하는 혼합물에서 헤테로다이머 단백질의 순도는 각 단백질 분획의 양을 측정하고 헤테로다이머 단백질 및 둘 이상의 단백질 불순물의 합에 대한 헤테로다이머 단백질의 양의 비율을 계산함으로써 정량화될 수 있다.

[0079] 계량된 이중특이적 순도는 하기 **식 1**에 의해 정의된, 총 항체 양과 비교한 이중특이적 항체의 백분율을 제공한다. 예를 들자면, FcFc, FcFc*, 및 Fc*Fc*를 포함하는 혼합물 중의 FcFc*의 순도는 다음과 같이 정량화될 수 있다:

[0080] **식 1**: 이중특이적 항체의 순도의 정량화

$$\text{FcFc*의 순도} = \frac{\text{FcFc*의 양}}{(\text{FcFc의 양} + \text{FcFc*의 양} + \text{Fc*Fc*의 양})}$$

[0081]

[0082] 본원에서 사용되는 스위치 밸브, 유동 스위치 밸브, 또는 흐름 제어 밸브는 크로마토그래피 칼럼의 흐름 경로를 지시, 변경, 또는 차단하기 위한 수단이다. 스위치 밸브는 다방향, 예컨대, 양방향, 3-방향, 4-방향, 등일 수 있다, 즉 스위치 밸브는 흐름을 2, 3, 또는 그 이상의 상이한 리셉터클로 지시할 수 있다. 리셉터클은 임의의 기원, 예컨대, 크로마토그래피 칼럼, 친화성 크로마토그래피 칼럼, 검출기, 또는 폐기물 처리 통의 것일 수 있다. 리셉터클의 변경은 상이한 위치 사이의 스위치 밸브를 전환함으로써 이루어진다.

[0083] 예를 들어, 크로마토그래피 시스템에서 스위치 밸브는 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 연속적 또는 비연속적 방식으로 연결할 수 있다. 예컨대 **도 5-7**에서 도시된 비제한적인 구체예에서, 스위치 밸브는 제1 친화성 매트릭스를 제2 친화성 매트릭스에 연속적으로 연결시킬 수 있다. 이 예시 시스템에서, 한 스위치 밸브 위치는 용리액이 제1 친화성 매트릭스로부터 제2 친화성 매트릭스로 흐르고, 계속해서 검출기로 흐르도록 할 것이다. 또 다른 위치로 스위치 밸브를 전환시키는 것은 용리액이 제1 친화성 매트릭스로부터, 제2 친화성 매트릭스를 우회하여, 직접 검출기로 흐르도록 할 것이다. 제2 친화성 매트릭스로부터의 용리액은 제1 친화성 매트릭스와 연관되거나 연관되지 않고 검출기로 흐를 수 있다. 제2 친화성 매트릭스는 자동 샘플러에 직접 연결될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. **도 4B**에 도시된 또 다른 비제한적인 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스로부터의 용리액은 제2 친화성 매트릭스를 우회하여 검출기로 직접 흐를 수 있다.

[0084] 한 측면으로, 본 발명은 스위치 밸브를 포함하는 신규한 크로마토그래피 시스템을 이용함으로써 헤테로다이머 분획의 양 및/또는 순도를 정량적으로 평가하는 방법을 기술한다.

[0085] 한 측면으로, 본 발명은 단백질, 제1 단백질 불순물, 및 제2 단백질 불순물의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 방법을 기술하며, 여기서 단백질 및 제1 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 결합하고 제2 불순물은 제1 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않으며 제2 친화성 매트릭스에 결합하고, 상기 방법은:

[0086] a. 샘플을 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템에 적용하는 단계로, 제1 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 제2 친화성 매트릭스에 연속적으로 연결되어 있는 것인 단계;

[0087] b. 제2 불순물을 제1 친화성 매트릭스로부터 제1 세트의 조건 하에 제2 친화성 매트릭스 위로 용출시키는 단계;

[0088] c. 제2 친화성 매트릭스를 우회하기 위하여 스위치 밸브를 전환하고, 제2 세트의 조건 하에 검출기를 통해 단백질을 용출시키며, 용출된 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0089] d. 제1 불순물을 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고 용출된 제1 불순물의 양을 측정하는 단계;

[0090] e. 제2 불순물을 제2 친화성 매트릭스로부터 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고, 용출된 제2 불순물의 양을 측정하는 단계; 및

[0091] f. 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 단계

[0092] 를 포함한다.

[0093] 한 구체예에서 단백질은 다량체 단백질, 예컨대 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 관심 있는 항체이고, 제1 및 제2 단백질 불순물은 다량체 단백질, 예컨대, 관심 있는 항체와 구조적으로 관련이 있을 수 있거나 없을 수 있는 항체이다. 한 구체예에서, 단백질은 이중특이적 항체, 즉, 헤테로다이머 단백질이고, 제1 단백질 불순물은 제1 호모다이머 단백질이며, 제2 단백질 불순물은 제2 호모다이머 단백질이다. 일부 경우에, 다량체 단백질의 혼합물은 다수의 진핵 세포, 예컨대, 예를 들자면, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에 의해 세포 배양으로 생성된다.

[0094] 한 구체예에서, 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 대해 제1 불순물보다 낮은 친화성을 가진다. 한 구체예에서 단백질은 헤테로다이머 단백질이고, 제1 단백질 불순물은 제1 호모다이머 단백질이며, 제2 단백질 불순물은 제2 호모다이머 단백질이고, 헤테로다이머 단백질 및 제1 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에 결합하며 제2 호모다이머 단백질은 제1 친화성 매트릭스에는 실질적으로 결합하지 않고 제2 친화성 매트릭스에 결합한다.

[0095] 한 구체예에서, 단백질은 제1 면역글로불린 CH3 도메인 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인을 포함하며, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인은 제1 친화성 매트릭스에 대한 그것들의 친화성이 상이하고, 샘플은 상기 단백질, 2개의 제1 CH3 도메인을 포함하는 단백질, 및 2개의 제2 CH3 도메인을 포함하는 단백질을 포함하는 혼합물을 포함한다.

[0096] 한 구체예에서, 제2 CH3 도메인은 H435R 및 Y436F (EU 넘버링 시스템에 의한 것임; IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면 H95R/Y96F) 아미노산 치환을 포함한다.

[0097] 한 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스는 고체 기질에 부착된 단백질 A 리간드 및 그것의 유도체를 포함한다. 일부 경우에, 기질은 비드 또는 입자여서, 친화성 매트릭스는 단백질 A가 부착된 복수의 입자이다. 단백질 A는 자연적으로 발생하거나 변형된 스타필로코쿠스 단백질 A이거나, 또는 조작된 단백질 A일 수 있다. 조작된 단백질 A는 예를 들어 Z-도메인 테트라머, Y-도메인 테트라머, 또는 D 및 E 도메인이 없는 조작된 단백질 A일 수 있다. 이들 조작된 단백질 A 보기는 면역글로불린의 VH3 도메인에 결합할 수 없지만 (또는 결합한다면 매우 낮은 친화성으로 결합함), 여전히 IgG1, IgG2 및 IgG4의 CH3 도메인에는 결합할 수 있다.

[0098] 한 구체예에서, 제2 친화성 매트릭스는 고체 기질에 부착된 단백질 G 리간드 및 그것의 유도체를 포함한다. 일부 경우에, 기질은 비드 또는 입자여서, 친화성 매트릭스는 단백질 G가 부착된 복수의 입자이다. 단백질 G는 자연적으로 발생하거나 변형된 스트렙토코쿠스 단백질 G이거나, 또는 조작된 단백질 G일 수 있다. 조작된 단백질 G는 B1 도메인을 포함할 수 있고 (GB1로도 불림) 콘쥬게이션되거나 콘쥬게이션되지 않을 수 있다. 다른 구체예에서, 제2 친화성 매트릭스는 고체 기질에 부착된 단백질 L 리간드 및 그것의 유도체를 포함한다.

[0099] 한 구체예에서, 용출 조건은 특정 pH 범위 및 이동상 변형제, 예컨대, 카오트로픽제를 포함하는 완충제를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 제2 불순물, 예컨대, 제2 호모다이머 단백질을 용출하기 위한 제1 세트의 용출 조건은 제1 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 단백질, 예컨대, 헤테로다이머 단백질을 용출하기 위한 제2 세트의 용출 조건은 제2 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 제1 불순물, 예컨대, 제1 호모다이머 단백질을 용출하기 위한 제3 세트의 용출 조건은 제3 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮을 수 있다. 한 구체예에서, 제3 pH는 제2 pH보다 낮을 수 있다. 한 구체예에서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮을 수 있고, 제3 pH는 제2 pH보다 낮을 수 있다. 다른 구체예에서, 제1 pH는 pH 5보다 크거나, 또는 약 pH 5 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 5.2 내지 약 pH 7.4, 또는 pH 6.4일 수 있다. 한 구체예에서, 제2 pH는 약 pH 3.5 내지 약 pH 6, 또는 약 3.8 내지 약 5.6일 수 있다. 한 구체예에서, 제3 pH는 pH 4 미만, 또는 약 pH 1.5 내지 약 pH 3.6, 또는 약 pH 2.0 내지 약 pH 2.8, 또는 약 pH 2.2일 수 있다.

[0100] 한 구체예에서, 제1, 제2, 및 제3 세트의 용출 조건은 적합한 완충제, 예컨대, 시트레이트, 아세테이트, 4-모르폴린에탄설포네이트 (MES), 포스페이트, 석시네이트, 등과, 뿐만아니라 이것들의 조합 및 혼합물을 포함한다. 한 구체예에서, 제1, 제2, 및 제3 세트의 용출 조건은 카오트로픽제를 포함한다. 카오트로픽제는 리튬, 마그네슘, 칼슘, 및 구아니디늄으로부터 선택된 양이온, 및 염화물, 질산염, 브롬화물, 염소산염, 요오드화물, 과염소산염, 및 티오시아네이트로부터 선택된 음이온을 가지는 염일 수 있다. 한 특정 구체예에서, 카오트로픽제는 $CaCl_2$, 예를 들어 250 - 500 mM $CaCl_2$이다. 다른 특정 구체예에서, 카오트로픽제는 $MgCl_2$, 예를 들어 250 - 500 mM $MgCl_2$이다.

[0101] 한 구체예에서, 헤테로다이머는 이중특이적 항체이다. 여기서, 제1 폴리펩타이드는 단백질 A에 결합할 수 있는 CH3 도메인을 포함하고 ("Fc") 제2 폴리펩타이드는 단백질 A에 결합할 수 없는 CH3 도메인을 포함한다 ("Fc*"). 일부 경우에, 제2 폴리펩타이드는 그것의 CH3 도메인에 H435R/Y436F (EU 넘버링 시스템에 의한 것임; IMGT 엑손 넘버링 시스템에 의하면 H95R/Y96F) 치환 ("Fc*" 또는 "별 치환"으로도 불림)을 포함한다. 그러므로, 일부 구체예에서, 제1 호모다이머는 2개의 비치환 CH3 도메인 (즉, FcFc)을 가지는 단일특이적 항체이고; 제2 호모다이머는 2개의 H435R/Y436F 치환된 CH3 도메인 (즉, Fc*Fc*)을 가지는 단일특이적 항체이며; 헤테로다이머는 하나의 비치환 CH3 도메인 및 하나의 H435R/Y436F 치환 도메인 (즉, Fc*Fc)을 가지는 이중특이적 항체이다.

[0102] 또 다른 측면으로, 본 발명은 헤테로다이머 단백질, 제1 호모다이머 단백질, 및 제2 호모다이머 단백질의 혼합물을 포함하는 샘플 중의 헤테로다이머 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 방법을 기술하며, 여기서 헤테로다이머 단백질 및 제1 호모다이머 단백질은 단백질 A 매트릭스에 결합하고 제2 호모다이머 단백질은 단백질 A 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않으며 단백질 G 매트릭스에 결합하고, 상기 방법은:

[0103] a. 샘플을 단백질 A 매트릭스, 단백질 G 매트릭스, 및 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템에 적용하는 단계로, 단백질 A 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 단백질 G 매트릭스에 연속적으로 연결되어 있는 것인 단계;

[0104] b. 제2 호모다이머 단백질을 단백질 A 매트릭스로부터 제1 세트의 조건 하에 단백질 G 매트릭스 위로 용출시키는 단계;

[0105] c. 단백질 G 매트릭스를 우회하기 위하여 스위치 밸브를 전환하고, 제2 세트의 조건 하에 검출기를 통해 헤테로다이머 단백질을 용출시키며, 용출된 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0106] d. 제1 호모다이머 단백질을 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고 용출된 제1 불순물의 양을 측정하는 단계;

[0107] e. 제2 호모다이머 단백질을 제2 친화성 매트릭스로부터 제3 세트의 조건 하에 검출기를 통해 용출시키고, 용출된 제2 불순물의 양을 측정하는 단계; 및

[0108] f. 샘플 중의 단백질의 양 및/또는 순도를 정량화하는 단계

[0109] 를 포함한다.

[0110] 제1 호모다이머 및 헤테로다이머의 제2 친화성 매트릭스에 대한 차등 결합은 무엇보다도 친화성 매트릭스를 통과하는 용액의 pH 및/또는 이온 강도를 변경시킴으로써 조작될 수 있다. 카오트로픽제의 용액에의 첨가는 제2 친화성 매트릭스로부터의 각 다이머 종의 중복되지 않는 분획으로의 용출을 향상시키고, 그로써 각각의 다이머 종의 순도를 증가시킨다. 한 구체예에서, 제1 호모다이머, 예컨대 Fc*Fc*는 제1 pH를 가지는 완충액에서 제1 친화성 매트릭스로부터 제2 친화성 매트릭스 위로 용출된다. 한 구체예에서, 헤테로다이머, 예컨대 FcFc* 헤테로

다이머는 제2 pH 범위를 가지는 완충액에서 제1 친화성 매트릭스로부터, 제2 친화성 매트릭스를 우회하여 직접 검출기로 용출된다. 한 구체예에서, 제2 호모다이머, 예컨대 FcFc는 제3 pH 범위를 가지는 완충액에서 제1 친화성 매트릭스로부터, 제2 친화성 매트릭스를 우회하여 검출기로 직접 용출된다. 한 구체예에서, 제1 호모다이머, 예컨대 Fc*Fc*는 제3 pH를 가지는 완충액에서 제2 친화성 매트릭스로부터 검출기 위로 용출된다. 여기서, 제1 pH 범위는 제2 pH 범위보다 높은 pH를 포함하고, 제2 pH 범위는 제3 pH 범위보다 높은 pH를 포함한다.

[0111] 한 구체예에서, 제2 불순물, 예컨대, 제2 호모다이머 단백질을 용출하기 위한 제1 세트의 용출 조건은 제1 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 단백질, 예컨대, 헤테로다이머 단백질을 용출하기 위한 제2 세트의 용출 조건은 제2 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 제1 불순물, 예컨대, 제1 호모다이머 단백질을 용출하기 위한 제3 세트의 용출 조건은 제3 pH를 포함한다. 한 구체예에서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮을 수 있다. 한 구체예에서, 제3 pH는 제2 pH보다 낮을 수 있다. 한 구체예에서, 제2 pH는 제1 pH보다 낮을 수 있고, 제3 pH는 제2 pH보다 낮을 수 있다. 다른 구체예에서, 제1 pH는 pH 5보다 크거나, 또는 약 pH 5 내지 약 pH 8, 또는 약 pH 5.2 내지 약 pH 7.4일 수 있다. 한 구체예에서, 제2 pH는 약 pH 4 내지 약 pH 5, 또는 약 4.2 내지 약 5.0일 수 있다. 한 구체예에서, 제3 pH는 pH 4 미만, 또는 약 pH 2 내지 약 pH 3.6, 또는 약 pH 2.2 내지 약 pH 2.8일 수 있다.

[0112] 한 측면으로, 샘플 중의 FcFc* 단백질의 양 및/또는 순도를 측정하기 위한 방법이 개시되며, 여기서 상기 FcFc* 단백질은 제1 면역글로불린 CH3 도메인 (Fc), 그것의 단편 및/또는 유도체, 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인 (Fc*), 그것의 단편 및/또는 유도체를 포함하고, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 CH3 도메인은 제1 단백질 친화성 매트릭스에 대한 그것의 친화성이 상이하며, 샘플은 상기 FcFc* 단백질, 2개의 제1 CH3 도메인을 포함하는 단백질 (FcFc 단백질), 및 2개의 제2 CH3 도메인을 포함하는 단백질 (Fc*Fc* 단백질)을 포함하는 혼합물을 포함하고, 상기 방법은:

[0113] (a) 샘플을 제1 세트의 조건 하에 제1 단백질 친화성 매트릭스에 적용하는 단계로, 상기 FcFc* 단백질 및 상기 FcFc 단백질은 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스에 결합하고 상기 Fc*Fc* 단백질은 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스에 실질적으로 결합하지 않는 것인 단계;

[0114] (b) 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스를 제1 세트의 조건 하에 세척하는 단계;

[0115] (c) 단계 (a)로부터의 관통 흐름 및 단계 (b)로부터의 세척을 Fc*Fc* 단백질이 상기 제2 단백질 친화성 매트릭스에 결합하는 세트의 조건 하에서 제2 단백질 친화성 매트릭스에 적용하는 단계;

[0116] (d) 상기 제2 단백질 친화성 매트릭스를 단계 (c)에서와 동일한 세트의 조건 하에서 세척하는 단계;

[0117] (e) Fc*Fc* 단백질을 상기 제2 단백질 친화성 매트릭스로부터 용출하고 상기 용출된 Fc*Fc* 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0118] (f) 나머지 결합된 Fc*Fc* 단백질을 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스로부터 제2 세트의 조건 하에 용출하고, 상기 용출된 Fc*Fc* 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0119] (g) 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스에 결합된 FcFc* 단백질을 제3 세트의 조건 하에 용출하고, 상기 용출된 FcFc* 단백질의 양을 측정하는 단계;

[0120] (h) 상기 제1 단백질 친화성 매트릭스에 결합된 FcFc 단백질을 제4 세트의 조건 하에 용출하고, 상기 용출된 FcFc 단백질의 양을 측정하는 단계, 및

[0121] (i) 샘플 중의 FcFc* 단백질의 양 및/또는 순도를 측정하는 단계를 포함하며,

[0122] 단계 (d) 및/또는 단계 (e)는 단계 (f)-(h)와 함께, 전에 또는 후에 수행될 수 있다.

[0123] 한 측면으로, 샘플 중의 이중특이적 항체 (예컨대, FcFc* 항체)의 양 및/또는 순도를 측정하는 방법이 개시되며, 여기서 상기 FcFc* 항체는 제1 면역글로불린 중쇄 (Fc) 및 제2 면역글로불린 중쇄 (Fc*)를 포함하고, 상기 제1 및 제2 면역글로불린 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화성이 상이하며, 샘플은 상기 FcFc* 항체, 2개의 제1 중쇄를 포함하는 항체 (FcFc 항체), 및 2개의 제2 중쇄를 포함하는 항체 (Fc*Fc* 항체)를 포함하는 혼합물을 포함하고, 상기 방법은:

[0124] (a) 샘플을 제1 세트의 조건 하에 단백질 A 친화성 칼럼 (단백질 A 칼럼)에 적용하는 단계로, 상기 FcFc* 항체 및 상기 FcFc 항체는 상기 단백질 A 칼럼에 결합하는 한편, 상기 Fc*Fc* 항체는 상기 단백질 A 칼럼에 실질적으로 결합하지 않고, 단백질 A 칼럼은 단백질 A 칼럼으로부터의 관통 흐름이 단백질 G 칼럼에 직접 적용될 수 있도록 스위치 밸브를 통해 단백질 G 친화성 칼럼 (단백질 G 칼럼)에 연결되며, 단백질 G 칼럼은 추가로 HPLC 칼

럼에 연결되어 있는 것인 단계;

[0125] (b) 상기 단백질 A 칼럼을, 단백질 A 칼럼으로부터의 관통 흐름이 단백질 G 칼럼에 직접 적용되도록 배치된 스위치 밸브를 포함한 제1 세트의 조건 하에 세척하는 단계;

[0126] (c) 단백질 G 칼럼을 단계 (b)에서와 동일한 조건 하에서 세척하는 단계;

[0127] (d) Fc*Fc* 항체를 단백질 G 칼럼으로부터 용출하고 상기 용출된 Fc*Fc* 항체의 양을 측정하는 단계;

[0128] (e) 스위치 밸브를, 단백질 A 칼럼을 단백질 G 칼럼과의 연결을 중단시키고 상기 단백질 A 칼럼을 HPLC 칼럼과 연결시키는 위치에 놓는 단계;

[0129] (f) 나머지 결합된 Fc*Fc* 항체를 단백질 A 칼럼으로부터 제2 세트의 조건 하에 용출시키고, 상기 용출된 Fc*Fc* 항체의 양을 측정하는 단계;

[0130] (g) 상기 단백질 A 칼럼에 결합된 FcFc* 항체를 제3 세트의 조건 하에 용출시키고, 상기 용출된 FcFc* 항체의 양을 측정하는 단계;

[0131] (h) 상기 단백질 A 칼럼에 결합된 FcFc 항체를 제4 세트의 조건 하에 용출시키고, 상기 용출된 FcFc 항체의 양을 측정하는 단계, 및

[0132] (i) 샘플 중의 FcFc* 단백질의 양 및/또는 순도를 측정하는 단계를 포함하며,

[0133] 단계 (c) 및/또는 단계 (d)는 단계 (e)-(h)와 동시에, 전에 또는 후에 수행될 수 있다.

[0134] 다른 측면으로, 단백질의 양 및/또는 순도를 정제, 분석, 및/또는 평가하기 위한 크로마토그래피 시스템이 제공된다. 한 구체예에서, 크로마토그래피 시스템은 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기를 포함하며, 여기서 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스 및 검출기의 각각은 스위치 밸브를 통해 연결된다. 한 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스는 단백질 A 크로마토그래피 칼럼일 수 있다. 한 구체예에서, 제2 친화성 매트릭스는 단백질 G 또는 단백질 L 크로마토그래피 칼럼일 수 있다.

[0135] 한 구체예에서, 검출기는 UV 검출기, 전하 에어로졸 검출기, 및/또는 질량 분석기가 장착된 HPLC 칼럼일 수 있다. 한 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스 및 제2 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 연속적으로 연결된다. 다른 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스, 제2 친화성 매트릭스, 및 검출기는 모두 스위치 밸브를 통해 연속적으로 연결된다. 한 구체예에서, 제1 친화성 매트릭스 및 제2 친화성 매트릭스는 스위치 밸브를 통해 연속적으로 연결되지만, 검출기는 제1 친화성 매트릭스 및 제2 친화성 매트릭스에 비연속적으로 연결된다.

[0136] 한 구체예에서, (i) 단백질 A 크로마토그래피 칼럼, (ii) 단백질 G 크로마토그래피 칼럼, 및 (iii) UV 검출기, 전하 에어로졸 검출기, 및/또는 질량 분석기가 장착된 HPLC 칼럼을 포함하는 검출기를 포함하는 크로마토그래피 시스템이 제공되며, 여기서 단백질 A 크로마토그래피 칼럼, 단백질 G 크로마토그래피 칼럼의 각각은 스위치 밸브를 통해 검출기에 연결된다.

[0137] **실시예**

[0138] 다음의 실시예는 본 발명의 특정 측면을 예시한다. 실시예는 단순히 구체예 및 그것의 다양한 측면의 구체적인 이해 및 실시를 제공하기 때문에 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.

[0139] 크로마토그래피 실험을, 본원에 기술된 방법을 수행하기 위해 필요한 구성에 적응된 HPLC 시스템을 사용하여 수행하였다. InfinityLab Quick Change 밸브는 Agilent Technologies사로부터 입수 가능하다. 적합한 밸브의 예로는, 한정하는 것은 아니지만, Agilent Quick Change Valve G4231A/C, G4232C/D, G4234A/C, G4236A/B, 및 G4238A/B를 들 수 있다. 발명의 실시에 적합한 밸브의 비제한적인 예는 월드 와이드 웹 agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4232-90009_ValveKit_TN_EN.pdf, 및 또한 2D Technology Capabilities Guide를 포함한 Acquity UPLC 시스템, Revision A, Waters Corporation, 2012 (이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 제공된다.

[0140] **실시예 1**

[0141] 2개의 오염 호모다이머를 포함하는 혼합물 중의 이중특이적 항체의 순도 및 양을 다음과 같이 측정하였다 (역가 크로마토그램을 **도 1**로서 도시함). 2개의 중쇄 폴리펩타이드 (IgG4 Fc- 및 IgG4-Fc*-함유) 및 공통 경쇄 폴리펩타이드를 CHO 세포에서 공동 발현시켰다. 결과적으로 얻어진 호모다이머 및 헤테로다이머의 혼합물을 포함하는 세포 상층액 샘플에 대해 고속 원심분리를 수행하여 당백질 응집체를 제거하였고, 상층액에 대해 2016년 2월 4

일에 공개된 PCT 공보 제 WO2016/018740호 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 정제 방법에 따라 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. FcFc* 헤테로다이머 및 임의의 불순물 생성물인, FcFc 및 Fc*Fc* 호모다이머를 함유하는 정제 생성물의 샘플을, 0.5 M NaCl을 함유한 pH 6.4 이동상으로 3 x 0.1 mL POROS® A 20 μm 단백질 A 칼럼 (rProA, Applied Biosystems사로부터 얻음, # 2-1001-00) 위로 로딩하였다. 단백질 A 칼럼을 **도 4A**에서 개략적으로 도시된 것과 같이 2 x 0.1mL POROS® G 20 μm 단백질 G 칼럼 (rProG, Applied Biosystems사로부터 얻음, # 2-1002-00) 및 표준 UV 검출기 (2.0 mL/분 유량, UV@280 nm 피크 검출)에 스위치 밸브를 통해 연속적으로 연결하였다.

[0142] 일련의 세척을 CHO DNA 또는 숙주 세포 단백질 (HCP)과 같은 과정-관련 오염물을 제거하기 위해 적용하였다. 혼합물을 0.5M $CaCl_2$를 함유한 pH 5.6 이동상을 사용하여 용출시켰다. Fc*Fc* 호모다이머가 Fc 영역으로부터 결실된 두 단백질 A 결합 부위를 가지고 있기 때문에, 이 생성물-관련 불순물은 rProA를 통해 rProG 위로 흐를 것으로 예상된 한편, 이중특이적 FcFc* 및 FcFc 호모다이머는 rProA 상에 보유될 것으로 예상되었다.

[0143] 그런 후 스위치 밸브를 rProG가 오프라인이 되도록 전환하여, rProA를 직접 검출기에 연결시켰다. 그런 후 이중특이적 FcFc* 항체를 rProA로부터 검출기로 0.5 M 염화 칼슘을 함유한 pH 3.8 - 5.6 (분자 특이적) 이동상을 사용하여 선택적으로 용출하는 한편, FcFc 불순물은이중특이적 FcFc* 항체 에 비해 그것의 더 강력한 결합으로 인해 보유되었다. FcFc*의 양을 계산하였다. 그런 후, FcFc 불순물을 rProA로부터 검출기로 0.5 M 염화 칼슘을 함유한 pH 2.2 이동상을 사용하여 선택적으로 용출하였고, FcFc의 양을 계산하였다.

[0144] 그런 후 스위치 밸브를 연속적으로 rProG와 온라인으로 연결시키기 위해 다시 전환시켜서, rProA를 rProG에, 그리고 rProG를 검출기에 연결시켰다. 그런 후 Fc*Fc* 불순물을 0.5 M 염화 칼슘을 함유한 pH 2.2 이동상을 사용하여 검출기로 용출하였고, Fc*Fc*의 양을 계산하였다.

[0145] FcFc* 이중특이적 항체의 양 및 순도를, FcFc, FcFc*, 및 Fc*Fc* 분획의 합에 대한 FcFc* 분획의 비율을 계산함으로써 측정하였다.

[0146] 방법의 용출 단계에서 방법 유량, 세척 길이, 이중특이적 용출 길이, 및 % 완충제 C는 연구되고 전부 3개의 항체 총의 회수에 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 간주되는 연속 요인였다. 하기의 표 1은 방법에서 연구된 파라미터, 그것들의 역할, 및 값을 나타낸다.

표 1

[0147] **이중특이적 순도 견고성 요인**

명칭	역할	값
로드 유량 (mL/분)	연속적	0.5 - 2.5
세척 길이 (CV)	연속적	0 - 60
이중특이적 용출 길이 (CV)	연속적	10 - 130
% C	연속적	5 - 30
아이소타입	범주형	IgG1*, IgG4*A, IgG4*B

[0148] 하기의 표 2는 3개의 항체 샘플: IgG*1, IgG4*A 및 IgG4*B의 순도 및 양을 평가하는 발명의 방법에 대한 다양한 세트의 작동 조건을 나타낸다.

표 2

[0149] **이중특이적 순도 견고성 작동 조건**

조건 번호	유량 (mL/분)	세척 길이 (CV)	이중특이적 용출 길이 (CV)	% 완충제 C	아이소타입
1	0.5	0	10	5	IgG1*
2	0.5	0	10	17.5	IgG4* B
3	0.5	0	10	30	IgG4* A
4	0.5	0	130	5	IgG4* A
5	0.5	0	130	30	IgG1*
6	0.5	30	130	5	IgG4* B
7	0.5	60	10	5	IgG4* A
8	0.5	60	10	30	IgG1*

9	0.5	60	70	30	IgG4* B
10	0.5	60	130	5	IgG1*
11	0.5	60	130	30	IgG4* A
12	1.5	0	130	30	IgG4* B
13	1.5	30	10	5	IgG4* B
14	1.5	30	70	17.5	IgG4* A
15	1.5	60	130	5	IgG4* B
16	2.5	0	10	5	IgG4* A
17	2.5	0	10	30	IgG1*
18	2.5	0	70	5	IgG4* B
19	2.5	0	130	5	IgG1*
20	2.5	0	130	30	IgG4* A
21	2.5	30	10	30	IgG4* B
22	2.5	30	130	17.5	IgG4* B
23	2.5	60	10	5	IgG1*
24	2.5	60	10	17.5	IgG4* B
25	2.5	60	10	30	IgG4* A
26	2.5	60	130	5	IgG4* A
27	2.5	60	130	30	IgG1*

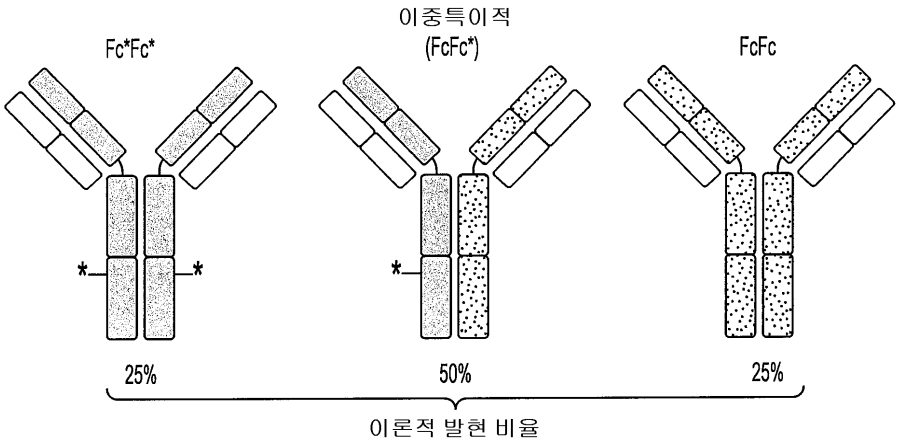
[0150] * * *

[0151] 본 발명의 범주 및 사상으로부터 벗어나지 않으면서 상기 기술된 주제에서 다양한 변화가 만들어질 수 있기 때문에, 상기 설명에서 함유된, 또는 첨부된 청구범위에서 정의된 모든 주제는 본 발명을 설명하고 예시하는 것으로서 해석되는 것으로 의도된다. 본 발명의 많은 변형 및 변화가 상기 교시의 관점에서 가능하다. 따라서, 본 설명은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 모든 그러한 대안, 변형, 및 변동을 포함하는 것으로 의도된다.

[0152] 본원에서 인용된 모든 특허, 출원, 출판물, 테스트 방법, 문헌, 및 기타 자료는 본 명세서에서 물리적으로 존재하는 것처럼 전체적으로 참조에 의해 본원에 포함된다.

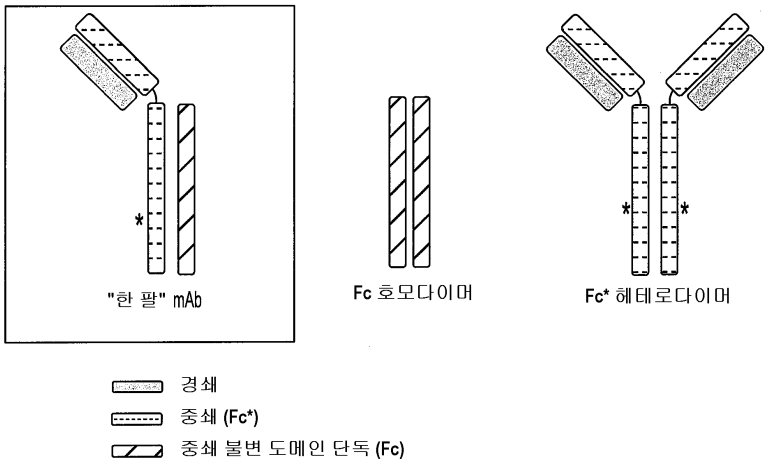
도면

도면1



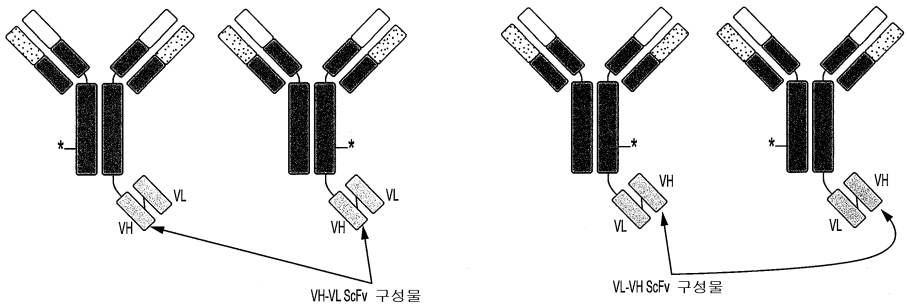
도 1

도면2a



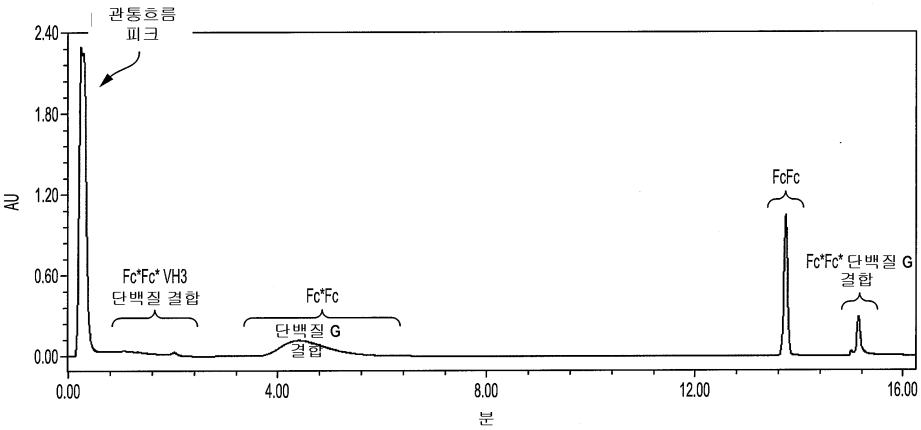
도 2A

도면2b



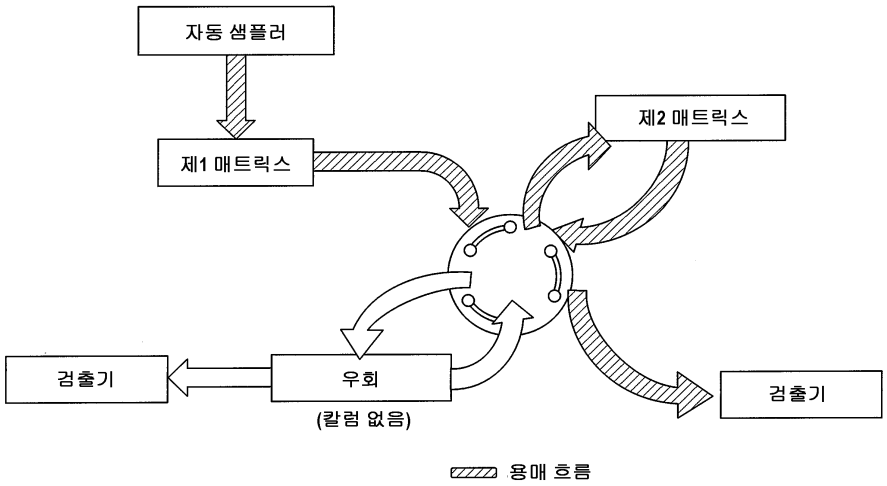
도 2B

도면3



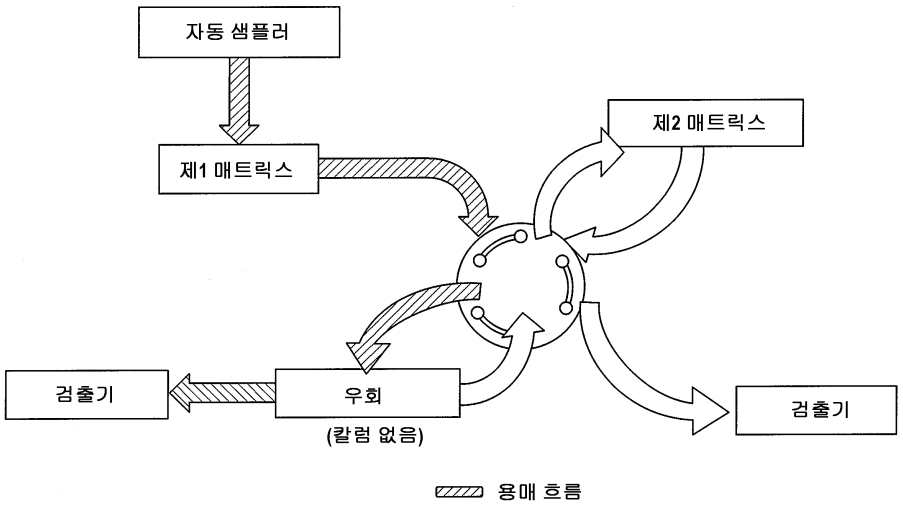
도 3

도면4a



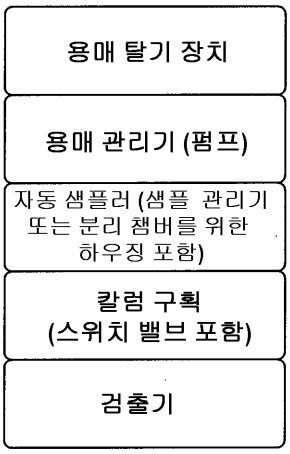
도 4A

도면4b



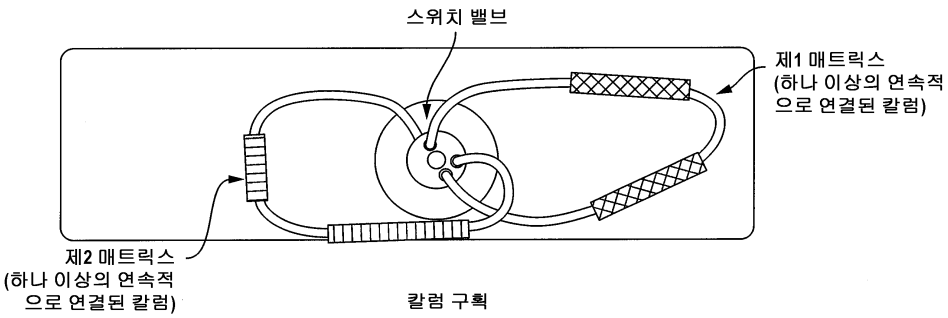
도 4B

도면5



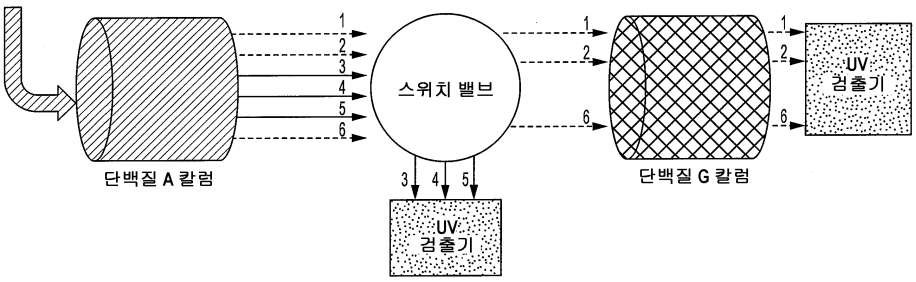
도 5

도면6



도 6

도면7



도 7