

**【발명의 설명】****【발명의 명칭】**

단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용한 생리활성 펩티드의 정제 방법

**【기술분야】**

본 발명은 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용한 Fc-함유 생리활성 펩티드의 정제 방법에 대한 것으로, 보다 상세하게는 Fc-함유 생리활성 펩티드에 포함된 인간 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 단백질 A와의 결합력 차이를 이용하여 펩티드 혼합물에서 특정 펩티드를 고순도로 정제하는 방법에 대한 것이다.

**【배경기술】**

특정 펩티드를 분리하기 위해서 다양한 정제 방법이 사용된다. 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피 등이 사용된다.

하지만 유사한 구조의 펩티드의 경우, 등전점, 소수성(hydrophobicity), 크기 차이 및 친화도 차이가 크지 않아 보편적인 정제 방법으로는 고순도의 특정

펩티드를 수득하기 어렵다. 이런 경우 인위적으로 서열에 변화를 주어 목적으로 하는 특정 펩티드와 이외에 생성될 수 있는 펩티드 사이의 등전점 및 친화도 차이를 발생시켜 이를 정제 방법에 이용하는 방법이 많이 알려져 있다. 두 경우 모두 등전점이나 친화도 차이를 크게하기 위한 인위적인 서열 변화를 따라, 특정 펩티드의 이화학적 특성이 변하며 이로부터 예상할 수 없는 면역원성 등이 유발될 수 있다.

#### 【발명의 상세한 설명】

#### 【기술적 과제】

본 발명은 생리활성 펩티드 혼합물에 포함된 Fc-함유 생리활성 펩티드들의 인간 VH3 도메인 개수 차이에 의한 단백질 A의 결합력 차이를 이용하여, 친화성 크로마토그래피를 통해 펩티드 혼합물 또는 항체 혼합물로부터 Fc-함유 생리활성 펩티드 또는 항체를 고순도로 정제하는 방법을 제공하는 것을 일 목적으로 한다. 더욱 구체적으로는, 친화성 또는 등전점 특성의 차이가 크지 않으나 VH3 도메인의 개수의 측면에서 상이한 펩티드들이 함께 제조되는 경우, 펩티드에 포함된 VH3 도메인의 개수에 따라 전장 도메인 (full domain) 단백질 A와의 친화성이

달라지므로, VH3 도메인의 개수가 상이한 펩티드들의 전장 도메인 단백질 A와의 친화도 차이를 이용한 친화성 크로마토그래피를 통해 펩티드들을 VH3 도메인의 개수에 따라 분리함으로써 목적하는 펩티드를 고순도로 수득하는 방법을 제공하는 것을 일 목적으로 한다.

특히 비대칭 이종 이량체 (asymmetric heterodimer) 단백질의 제조 과정에서 원치 않는 동종 이량체 (symmetric homodimer) 단백질이 함께 생성되는 경우, 각각의 단백질에 포함되는 VH3 도메인의 개수 차이에 근거하여 비대칭 이종 이량체 단백질과 동종 이량체 단백질을 분리 정제하는 방법을 제공하는 것을 일 목적으로 한다.

#### 【기술적 해결방법】

본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다.

또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

본 명세서에서 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제1 구성요소는 제2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성요소도 제1 구성요소로 명명될 수 있다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 용어 (기술 용어 및 과학 용어 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에서 정의된 용어와 같은 용어는 관련 기술의 맥락에서 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하고, 이상적인 또는 지나치게 형식적인 의미로 해석되지 않는 한, 명시적으로 여기에서 정의된다.

"포함" 또는 "함유" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는

그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

"및/또는"은 연관된 구성들이 정의할 수 있는 하나 이상의 조합을 모두 포함한다.

본 발명에서 사용된 용어 “생리활성 펩티드”는 하나 이상의 생리활성을 나타내는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 단백질의 일부 및 융합 단백질 등을 모두 포함하는 개념이며, 특정 분자량 내지 아미노산의 길이, 종류 등에 의해 한정되지 않는다.

본 발명에서 사용된 용어 “Fc-함유 생리활성 펩티드”란, 항체에서 발견되는 Fc 영역 (fragment crystallizable region)을 포함하는 생리활성 펩티드를 뜻한다. 예를 들어, 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc 영역을 함유하는 항체를 포함하는 물질이다.

본 발명은, Fc-함유 생리활성 펩티드의 혼합물에서 Fc-함유 생리활성 펩티드들을 분리 및/또는 정제하는 방법을 제공할 수 있다.

본 명세서에서, 생리활성 펩티드는 생물체에 전달되어 생체의 기능을

조절하는 펩티드를 의미하는 것으로, 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액 인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질 또는 수용체 등의 생체 기능을 조절하는 펩티드들이 생리활성 물질로 정의될 수 있으며, 예를 들어 상술한 펩티드들이 Fc의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 형태일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) Fc-함유 생리활성 펩티드의 혼합물을 단백질 A 리간드가 함유된 친화성 매트릭스를 포함하는 컬럼에 로딩하는 단계로서, 상기 생리활성 펩티드의 혼합물은 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드 및 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드를 포함하고, 여기서 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드에 비해 인간 VH3 도메인을 적어도 하나 더 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 컬럼에 용출액을 로딩하여, 상기 생리활성 펩티드의 혼합물에 포함된 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드들 각각이 포함하는 인간 VH3 도메인의 개수에 따라 서로 상이한 pH에서 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드들을 분리 용출하는 단계를 포함하는 Fc-함유 생리활성 펩티드의 정제 방법을 제공할 수 있다.

일 실시예에서, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드에 비해 인간 VH3 도메인을 적어도 하나 더 포함하거나, 또는 인간

VH3 도메인과 95% 이상, 90% 이상, 80% 이상 또는 70% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 적어도 하나 더 포함하는 것일 수 있다. 인간 VH3 도메인이란 VH3 계열 인간 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR2와 CDR3 사이에 위치하는 아미노산 서열로서, SEQ ID No.23 내지 SEQ ID No.37 중 어느 하나의 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 통상의 기술자라면 단백질 내에 포함된 인간 VH3 도메인 서열을 용이하게 파악할 수 있다. 상기 인간 VH3 도메인은 VH3 계열 인간 항체에 주로 존재하나, 드물게 마우스 등 포유류 (또는 키메라) 항체의 프레임워크에서도 발견된다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서 사용된 hu11F11은 인간 VH3 도메인을 포함하는 항체이고, ch1E4 및 anti-BACE 항체는 인간 VH3 도메인을 포함하지 않는 항체이다. 다만 예외적으로 ch11F11은 키메라 항체임에도 인간 VH3 도메인을 포함하는 항체이다.

상기 단백질 A 리간드는 전장 도메인 단백질 A 리간드일 수 있다. 즉, 단백질 A 리간드는 전장 도메인(E, D, A, B 및 C 도메인)을 모두 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 실시예가 이에 한정되는 것은 아니며 상기 단백질 A 리간드는 E 도메인 및 D 도메인 중 선택되는 하나 이상의 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

예를 들어, 상기 단백질 A 리간드는 E 도메인 및 D 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

상기 친화성 매트릭스에서 단백질 A 리간드를 지지하는 지지체는 구(spherical)형 등 비드(bead) 형태를 갖는 입자일 수 있다. 상기 친화성 매트릭스에서 상기 지지체의 평균 입자 사이즈는 예를 들어, 약 90  $\mu\text{m}$  미만일 수 있으며, 예를 들어 약 80  $\mu\text{m}$  이하 또는 75  $\mu\text{m}$  이하일 수 있다. 또한 상기 친화성 매트릭스에서 상기 지지체의 평균 입자 사이즈는 예를 들어, 약 1  $\mu\text{m}$  이상 또는 5  $\mu\text{m}$  이상일 수 있다. 상기 친화성 매트릭스에서 상기 지지체의 사이즈가 전술한 범위를 만족할 경우 생리 활성 펩티드의 분리능이 더욱 우수할 수 있다.

상기 단계 (b)는 (b1) 제1 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계; 및 (b2) 상기 제1 pH 범위보다 낮은 제2 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 제1 pH 범위를 갖는 용출액 및 상기 제2 pH 범위를 갖는 용출액은 각각 별도로 또는 순차적으로

컬럼에 로딩되거나, 또는 상기 용출액이 컬럼에 연속적으로 로딩되면서 로딩 시간에 따라 제1 pH 범위에서 제2 pH 범위로 농도 구배를 변화시키는 것일 수 있다.

상기 생리활성 펩티드의 혼합물은, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드에 비해 인간 VH3 도메인을 적어도 하나 더 포함하는 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드를 더 포함하는 것일 수 있다.

본 발명의 정제 방법에 따르면 각각 VH3 도메인의 개수가 상이한 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드, 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드 및 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드를 서로 분리하여 정제할 수 있으며, 이들 중 어느 것을 정제 목적으로 하더라도 고순도로 정제가 가능한 장점이 있다.

더욱이 본 발명은 정제 대상 물질의 구성에서 Fc를 배제하지 않으며, Fc와 단백질 A 간의 결합 또한 정제 공정에서 고려되어 있다. Fc는 그 자체로서 단백질 A에 대한 친화성을 가지기 때문에, Fc와 단백질 A간의 친화성을 이용한 정제방법에서는 Fc 외 구성요소의 친화성을 배제하고자 하고, 반대의 경우에는 Fc의 친화성을 배제하고자 하는 것이 일반적이다. 반면 본 발명에서는 중쇄 Fc와 VH3 도메인 모두를 구성요소로 가지는 Fc-함유 생리활성 펩티드를 VH3 도메인의

개수에 따라 정제할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

상기 생리활성 펩티드의 혼합물은, 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n$ 개( $n$ 은 0 이상의 정수)의 인간 VH3 도메인을 포함하고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n+1$ 개 내지  $n+9$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하며, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n+2$ 개 내지  $n+10$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n$ 개( $n$ 은 0 이상의 정수)의 인간 VH3 도메인을 포함하고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n+1$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하며, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드가  $n+2$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하는 것일 수 있다.

$n$ 은 예를 들어 0 이상 10 이하, 0 이상 8 이하, 0 이상 6 이하, 0 이상 5 이하, 0 이상 3 이하, 1 이상 10 이하, 1 이상 8 이하, 1 이상 6 이하, 1 이상 5 이하, 1 이상 3 이하, 2 이상 10 이하, 2 이상 8 이하, 2 이상 6 이하, 2 이상 5 이하일 수 있다.  $n$ 은 예를 들어 0, 1, 2, 또는 3일 수 있다.

상기 단계 (b)는, (b1) 제1 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계; 및 (b2) 상기 제1 pH 범위

보다 낮은 제2 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계; 및 (b3) 상기 제2 pH 범위 보다 낮은 제3 pH 범위를 갖는 용출액을 이용하여 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 여기서 상기 단계 (b1) 내지 (b3)은 연속적으로 수행되는 것일 수 있다 (linear gradient). 즉 상기 제1 내지 제3 pH 범위는 각각의 pH 범위가 단속적인 것이 아니라 제1 pH 범위의 시작값과 제3 pH 범위의 말단값 사이의 연속적인 pH 범위에 포함되며, 최초에 제1 pH 범위를 갖는 용출액을 컬럼에 로딩하고, 연속적으로 로딩되는 용출액의 pH를 점차 낮춤으로써 용출액의 pH가 점차 제2 pH 범위 및 제3 pH 범위로 이행하는 것에 의해 상기 단계 (b1) 내지 (b3)가 수행되는 것일 수 있다. 또한, 정제 대상 생리활성 펩티드의 종류에 따라 용출되는 pH 범위가 상이할 수 있다.

또는, 상기 단계 (b1) 내지 (b3)는 단계적으로 수행되는 것일 수 있다 (step gradient).

상기 Fc는 야생형(wild type) 단백질 A와의 결합력에 영향을 미치는 돌연변이가 도입되지 않은 것일 수 있다. 상기 돌연변이는 Fc의 폴리펩티드 서열과

비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기에 삽입, 결실, 부가 및/또는 치환이 발생한 폴리펩티드를 의미한다. 즉, 일 실시예의 Fc는 단백질 A와의 결합력을 저해하는 돌연변이 또는 단백질 A와의 결합력을 상승시키는 돌연변이가 도입되지 않은 것일 수 있다.

상기 제1, 제2 및/또는 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 Fc에 결합된 펩티드 약물을 포함할 수 있다. 여기서 상기 "펩티드 약물 (peptide drug)"이란, 상기 생리활성 펩티드와 동일하거나 상이한 생리활성을 가지면서 상기 생리활성 펩티드에 결합된 독립된 펩티드를 의미한다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드들은 상기 Fc의 N- 또는 C-말단에 상기 펩티드 약물이 결합된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드들은 상기 Fc의 두 개의 중쇄가 가지는 두 개의 N-말단 및 두 개의 C-말단으로부터 선택되는 하나 이상에 상기 펩티드 약물이 결합된 것일 수 있다.

본 명세서에서 용어 "결합"은 두 대상체가 물리 또는 화학적으로 직접 결합된 것 및 링커를 통해 결합 또는 연결된 것을 모두 포함하는 의미로 정의된다.

일 실시예에서, Fc와 펩티드 약물이 링커를 통해 연결되는 경우, 상기 링커는 예를 들어 펩티드일 수 있으나 당 분야에서 펩티드를 연결시키기 위해 사용되는 통상의 재료라면 특별히 한정되지 않음은 물론이다.

상기 펩티드 약물은 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액 인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 약물은 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩티드, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 콜로니 자극인자류, GLP-1과 같은 글루카곤-유사 펩티드류, G 단백질 관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 효소류, 인터루킨 결합 단백질류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩티드, B 세포인자, T 세포인자, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민,  $\alpha$ -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자, 고당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류,

헤모글로빈, 크롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩티드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성인자, 피브린-결합 펩티드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 랩틴, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오펙틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자류, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩티드, 가스트린 방출 펩티드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 수용체류, 수용체 길항물질, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편류로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있다.

상기 글루카곤 유사 펩티드는 엑세나타이드, 리라글루타이드(Liraglutide),

타스포글루타이드(Taspoglutide), 알비글루타이드(Albiglutide)  
릭시세나타이드(Lixisenatide) 및 GLP-1 중 선택되는 적어도 하나, 예를 들어 GLP-1일 수 있다.

상기 제1 또는 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드가 VH3 도메인을 포함하는 경우, 상기 제1 및 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 각각 독립적으로 SEQ ID No.1의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.2의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.3의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.4의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.5의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.6의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.7의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.8의 경쇄 가변 서열; 또는 SEQ ID No.9의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.10의 경쇄 가변 서열 중 어느 하나의 VH 도메인-함유 가변 영역 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열은 scFv의 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열일 수 있다.

상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 SEQ ID No.1의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.2의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.3의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.4의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.5의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.6의 경쇄 가변 서열; SEQ

ID No.7의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.8의 경쇄 가변 서열; 또는 SEQ ID No.9의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.10의 경쇄 가변 서열 중 어느 하나의 VH 도메인-함유 가변 영역 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열은 scFv의 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열일 수 있다.

다만 VH3 도메인은 중쇄 가변 서열 내에 포함된 것이므로, 상술한 서열들 중에서 선택되는 중쇄 가변 서열 및 다른 경쇄 가변 서열로 구성되는 scFv, 또는 상술한 서열들 중에서 선택되는 중쇄 가변 서열만으로 구성된 단쇄 항체 또한 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드에 포함될 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 면역 글로불린 G(이하, IgG)를 포함하는 항체인 것일 수 있다.

본 명세서에서 "항체"는 임의의 아이소타입의 온전한 면역글로불린, 표적 항원에의 결합을 위해 완전한 항체와 경쟁을 할 수 있는 항원 결합 단편, 또는 이들의 조합을 의미할 수 있다. 예를 들면, 마우스, 키메라, 인간화, 완전 인간 항체, 이들의 항원 결합 단편 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 항체는 그 자체로 항원 결합 단백질의 일종일 수 있다. 항체는 일반적으로 적어도 2개의 전장

중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하지만, 일부 경우에 항체가 단지 중쇄만을 포함할 수도 있다. 상기 항체는 하나의 타겟에 특이적으로 결합하는 단일 특이적 항체, 및 복수의 타겟들에 특이적으로 결합하는 다중 특이 항체 (예를 들어, 이중 특이적 항체 및 삼중 특이 항체)를 포함할 수 있다.

상기 항체는 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체도 포함하며, 상기 모노클로날 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체인, IGF1R에 특이적으로 결합하는 분리된 항체일 수 있다. 상기 모노클로날 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 형인, IGF1R에 특이적으로 결합하는 분리된 항체일 수 있다.

본원에서 "경쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변영역 서열을 갖는 전장의 경쇄 및 이의 단편을 포함할 수 있다. 전장 경쇄는 가변영역 도메인 VL, 및 불변영역 도메인 CL을 포함할 수 있다. 경쇄의 가변영역 도메인은 경쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재할 수 있다. 경쇄의 종류에는 카파 및 람다 사슬이 포함될 수 있다.

본 명세서에서, "상보성 결정 영역 (Complementarity-determining regions, CDR)"라 함은, 항체의 가변 영역 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위를

의미할 수 있다.

본원에서 "중쇄"는 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성을 제공하기에 충분한 가변영역 서열을 갖는 전장 중쇄 및 이의 단편을 포함할 수 있다. 전장 중쇄는 가변영역 도메인 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함할 수 있다. 가변영역(VH) 도메인은 중쇄 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하고, 불변영역(CH) 도메인은 카복시 말단에 존재하며, CH3가 카복시-말단에 가장 가깝게 위치할 수 있다. 중쇄는 IgG (IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 서브타입 포함), IgA (IgA1 및 IgA2 서브타입 포함), IgM 및 IgE의 아이소타입을 포함할 수 있다.

상기 항체는 모든 서브타입의 면역글로불린(예컨대, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, 등)에서 선택된 것일 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 서브타입, 예컨대 IgG1 또는 IgG2 서브타입 형태일 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄를 포함하고, 각각의 중쇄 및 경쇄는 다이설파이드 결합을 통하여 결합되어 두 개의 중쇄-경쇄 구조체(dimer)를 형성하고, 상기 형성된 두 개의 중쇄-경쇄는 중쇄의 Fc 부위에서 다이설파이드 결합을 통하여 연결된 형태를 가질 수 있다. 상기 IgG 형태의 항체는

양쪽 중쇄-경쇄 구조체에 동일한 항원에 대한 항원 결합 부위를 포함하여 하나의 항원을 표적으로 하는 단일 표적 항체 또는 양쪽 중쇄-경쇄 구조체에 서로 다른 항원에 대한 항원 결합 부위를 포함하여 두 개의 항원을 표적으로 하는 이중 특이적 항체일 수 있다.

본 발명에 따른 항체는 이중 특이적 항체, 완전 항체 (whole antibody), 미니바디, 도메인 항체, 항체 모방체(또는 합성 항체), 항체 융합체(또는 항체 접합체), 이의 단편 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 다양한 항체의 구조가 이하 본 발명에서 추가로 개시된다.

본 발명에서 예를 들면 항원 결합 단편, 단백질, 또는 항체와 같은 펩티드의 "변이체"는 다른 펩티드 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기에 삽입, 결실, 부가 및/또는 치환이 발생한 펩티드이며, 융합 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 일부는 상기 중쇄 또는 경쇄, 가변 영역 또는 CDR 서열의 하나 이상의 잔기에서 보존적(conservative) 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여, 목적하는 항체가 형질전환 동물 (예를 들어, 유전자도입 마우스)로부터 생성되고 선택될 수 있다.

이러한 항체는 적절한 벡터 및 숙주 세포를 사용하여 클로닝되고 발현되거나, 또는 상기 항체는 배양된 하이브리도마 세포로부터 수확될 수 있다. 또한, 상기 항체는 파지-디스플레이 라이브러리(phage-display library)로부터 유래될 수 있다. 파지 디스플레이 기술은 필라멘트(filamentous) 박테리오파지의 표면 상에서 항체 레퍼토리를 디스플레이하여, 이로부터 목적하는 항원에 결합하는 파지를 선별하는 일종의 면역 선택(immune selection)을 모방한 방법이다. 이러한 한 가지 기술은 본 발명의 실시예 또는 PCT 공개공보 WO 99/10494호를 참조할 수 있다.

항체 또는 이의 항원 결합 단편은 오직 단일 원(source)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 키메라일 수 있다, 키메라 항체는 2 종류의 상이한 항체로부터 유래된 부분을 포함하며, 아래 보다 상세하게 기술된다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하이브리도마, 재조합 DNA 기술 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 다른 언급이 없다면, 본원에서 용어 항체는 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체는 물론, 이들의 유도체, 변이체, 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편, 돌연변이체 및 이들의 조합을 포함하며, 예를 들어 2개의 전장 중쇄와 2개의 전장 경쇄 외에 1 개 또는 2 개의 scFv를

포함할 수 있고, 이들의 예는 아래 기술된 바와 같다.

본 명세서에 기재된 "항원 결합 단편"은 항원에 대한 특이적 결합능을 갖는 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩티드를 의미할 수 있다. 예컨대, 항원결합단편은 항원(예컨대, 에피토프)과 상호작용하여, 항체에 항원에 대한 특이성 및/또는 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단편은 전장 경쇄 또는 중쇄 내에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 포함하고, 일부 구현예에서, 단쇄 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 생물학적 활성 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 생산되거나, 또는 예를 들면 온전한 항체를 효소적 또는 화학적 절단하여 생산될 수 있다.

면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편에는 이로 제한하는 것은 아니나, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 도메인 항체 및 단쇄 항체 (예컨대, scFv, Fc-scFv 등)를 포함한다. 또한 이로 제한하는 것은 아니나, 인간, 마우스, 랫트, 카멜리드 또는 토끼를 포함하는 임의의 포유동물에서 유래될 수 있다. 본 명세서에 개시된 하나 이상의 CDR과 같은 항체의 기능적인 부분은 제2의 단백질 또는 저분자 화합물과

공유결합으로 연결되어 특정 표적에 대한 표적 치료제로서 사용될 수 있다.

본원에서 "단쇄 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변영역이 유연한 링커에 의해 연결된 항원 결합 영역의 단일 폴리펩티드 사슬이다. 예컨대, 상기 단쇄 항체는 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 단일 사슬 형태로 연결된 scFv, 중쇄가변영역, 경쇄가변영역, 및 Fc가 단일사슬 형태로 연결된 Fc-scFv 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 단쇄 항체는 예를 들면 미국 특허 제5,260,203호를 참조할 수 있다.

본 명세서에서 "친화성 또는 친화도 (affinity)"는 항체 또는 이의 항원 결합단편과 항원 사이의 상호작용의 강도이며, 항체 또는 항원결합 단편의 CDR 서열, 및/또는 항체 또는 항원결합 단편의 물리화학적 특성 (친수성/소수성, 정전기적 특성 등), 항원의 크기, 모양, 및/또는 전하와 같은 항원의 특징 등에 의해 결정될 수 있다. 이러한 친화도를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 통상적으로 해리 상수 (dissociation constant, KD)로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본원에서 "다중 특이적 항원 결합 단백질" 또는 "다중 특이적 항체"는 두 개

이상의 항원 또는 에피토프를 표적으로 하는 것이다.

본원에서 "이특이적," "이중 특이적" 항원 결합 단백질 또는 항체는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 하이브리드 항원 결합 단백질 또는 항체이다. 이러한 이특이적 항체는 다중 특이적 항원 결합 단백질 또는 다중 특이적 항체의 일종으로, 공지된 다양한 방법 예를 들면 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편 혹은 scFv 단편의 연결에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 1990, 79:315-321; Kostelny et al. J. Immunol. 1992, 148:1547-1553 등을 참조할 수 있다. 이특이적 항원 결합 단백질 또는 항체의 2개의 항원 결합 부위가 결합하는 2개의 서로 상이한 에피토프는 동일 또는 상이한 단백질 표적에 위치할 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 중쇄 Fc와 항원 결합 단편이 결합된 항체 단백질을 포함할 수 있고, 예를 들어 상기 중쇄 Fc는 IgG에 포함된 것일 수 있으며, 상기 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역을 포함하는 scFv 또는 단쇄 항체로서 상기 중쇄 Fc의 C-말단에 연결된 것일 수 있다.

예를 들어, 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG와 scFv가 결합된 IgG-scFv

이중 항체인 것일 수 있다. 상기 IgG-scFv 이중 항체는 IgG에 scFv가 한 개 결합된 일가 이중 특이적 항체거나 또는 scFv가 두 개 결합된 이가 이중 특이적 항체인 것일 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc에 결합된 펩티드 약물을 포함할 수 있다. 여기서, 상기 펩티드 약물은 전술한 펩티드 약물과 동일하게 정의될 수 있다. 상기 펩티드 약물은 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드의 Fc의 N-말단 또는 C-말단에 결합된 것일 수 있다. 상기 펩티드 약물은 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드의 Fc의 두 개의 중쇄 중 하나 이상의 중쇄의 N-말단에 결합된 것일 수 있다.

상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드는 면역 글로불린 G(이하, IgG)를 포함하는 항체이고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG-scFv 이중 항체인 것일 수 있다. 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드는 scFv를 포함하지 않고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc의 두 개의 중쇄 중 어느 하나의 C-말단에 연결된 서열번호 SEQ ID No.11로 구성되는 한 개의 scFv를 포함할 수 있다.

상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드는 면역 글로불린 G(이하, IgG)를 포함하는 항체인 것이고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG-scFv 일가 이중

특이적 항체인 것이고, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG-scFv 이가 이중 특이적 항체일 수 있다. 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드는 scFv를 포함하지 않고, 상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc의 두 개의 중쇄 중 어느 하나의 C-말단에 연결된 서열번호 SEQ ID No.11로 구성되는 한 개의 scFv를 포함하고, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc의 두 개의 중쇄 모두의 C-말단에 각각 연결된 서열번호 SEQ ID No.11로 구성되는 두 개의 scFv를 포함하는 것일 수 있다.

상기 제1 내지 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG이고, 상기 IgG 항체의 가변 영역이 인간 VH3 도메인을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 이 경우 상기 제1 내지 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는, 모두 IgG 내에는 각각 동일하게 2 개씩의 VH3 도메인 (가변 영역의 중쇄 내)을 가지나 IgG 부분 외의 영역에서는 포함하는 VH3 도메인의 개수가 다른 것일 수 있다.

상기 제1 내지 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG이고, 상기 IgG 항체의 가변영역이 인간 VH3 도메인을 포함하지 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 이 경우 상기 제1 내지 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드 모두 동일하게 IgG 내에는 VH3 도메인이 없고, IgG 부분 외의 영역에 포함된 VH3 도메인의 개수가 다른 것일 수

있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드가 인간 VH3 도메인을 포함하는 경우, 상기 인간 VH3 도메인은 상기 Fc 함유 생리활성 펩티드의 중쇄 가변 영역에 포함된 것일 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드가 인간 VH3 도메인을 포함하는 경우, 인간 VH3 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 단편이 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드에 적어도 한 개 이상 결합될 수 있다. 예를 들면, 인간 VH3 도메인을 포함하는 scFv가 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드에 결합될 수 있다.

상기 제1 또는 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드가 인간 VH3 도메인을 포함하는 경우, 상기 인간 VH3 도메인은 상기 제2 Fc 함유 생리활성 펩티드의 중쇄 가변 영역에 포함되며, 인간 VH3 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 단편이 상기 생리활성 펩티드에 적어도 한 개 이상 결합될 수 있다.

전술한 IgG-scFv 이중 항체에서 IgG 및 scFv 중 적어도 하나가 인간 VH3 도메인을 포함하는 것일 수 있다. IgG 및 scFv가 모두 인간 VH3 도메인을 포함할 경우, IgG의 인간 VH3 도메인과 scFv의 인간 VH3 도메인의 서열은 서로 동일하거나

또는 상이할 수 있다. 전술한 IgG-scfv 이중 항체는 하나 이상의 생리활성을 가질 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드가 IgG 항체를 포함하는 경우, 상기 IgG 항체는 제1 중쇄 및 제2 중쇄 중 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다. 여기서 상기 제1 중쇄는 VH-CH1-CH2-CH3-scfv로 구성될 수 있고, 상기 제2 중쇄는 VH-CH1-CH2-CH3로 구성될 수 있다.

상기 제1 중쇄와 제2 중쇄의 이량체화 확률을 높여 일가 이중 특이적 항체의 제조를 용이하게 하기 위한 목적으로, 하나의 중쇄의 중쇄 불변 영역의 특정 위치는 hole mutation(예를 들어, T366S, L368A 또는 Y406V)되고, 다른 중쇄의 중쇄 불변 영역의 특정 위치는 knob mutation(예를 들어, T366W) 된 것일 수 있다. 상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 항  $\alpha$ -시누클레인 IgG 항체 또는 항-BACE 항체를 포함하는 것일 수 있다.

상기 항  $\alpha$ -시누클레인 항체는 제1 중쇄 또는 제2 중쇄 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 제1 중쇄는 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 중쇄 가변

영역; 인간 중쇄 불변 영역; 및 상기 중쇄 불변 영역의 C-말단에 결합된 항 IGF1R 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 항 IGF1R scFv)를 포함할 수 있고, 상기 제2 중쇄는 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 중쇄 가변 영역 및 인간 중쇄 불변 영역을 포함하고, 전술한 항 IGF1R 항체를 포함하지 않을 수 있다.

상기 항  $\alpha$ -시누클레인 항체는 상기 제1 중쇄를 두 개 포함하거나, 또는 상기 제2 중쇄를 두 개 포함할 수 있다. 또는 상기  $\alpha$ -시누클레인 항체는 상기 제1 중쇄 및 상기 제2 중쇄를 각각 하나씩 포함할 수 있다.

상기 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 제1 중쇄 및 상기 제2 중쇄를 각각 하나 포함하고, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 제1 중쇄를 두 개 포함하고, 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드는 상기 제2 중쇄를 두 개 포함하는 생리활성 펩티드를 포함할 수 있다.

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드의 혼합물은 상기 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 두 개의 중쇄 각각의 C-말단에 상기 항 IGF1R 항체 또는 이의 단편이 결합되지 않은

제1 Fc-함유 생리활성 펩티드, 상기 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 두 개의 중쇄 중 어느 하나의 중쇄의 C-말단에 상기 항 IGF1R 항체 또는 이의 단편이 결합된 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드 및 상기 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 두 개의 중쇄 각각의 C-말단에 상기 항 IGF1R 항체 또는 이의 단편이 결합된 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드를 포함하는 것일 수 있다.

본 명세서에서, ch11F11에 대해서는 모순되지 않는 한 PCT 공개 공보 W02019-117684에 기재된 ch11F11에 대한 설명이 동일하게 적용되고, hu11F11에 대해서는 모순되지 않는 한 PCT 공개 공보 W02019/117684에 기재된 hu11F11에 대한 설명이 동일하게 적용될 수 있다. ch11F11 및 hu11F11에 대한 서열은 전술한 PCT 공개 공보를 참조할 수 있다.

상기 생리활성 펩티드는 ch11F11, ch1E4, anti-BACE 및 hu11F11로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항  $\alpha$ -시누클레인 항체이고, 상기 항 IGF1R 항체 또는 이의 단편은 SEQ ID No.1의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.2의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.3의 중쇄 가변 서열

및 SEQ ID No.4의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.5의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.6의 경쇄 가변 서열; SEQ ID No.7의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.8의 경쇄 가변 서열; 또는 SEQ ID No.9의 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.10의 경쇄 가변 서열로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

일 실시예의 Fc-함유 생리활성 펩티드의 분리 방법에 따르면, 친화성 크로마토그래피를 이용하여 Fc-함유 생리활성 펩티드의 혼합물로부터 목적으로 하는 Fc-함유 생리활성 펩티드를 쉽게 분리할 수 있다. 특히, 일 실시예에 따른 Fc-함유 생리활성 펩티드의 정제 방법에 따르면, 공정 단순화를 달성할 수 있으며 동일 또는 유사한 구조를 가지는 생리활성 펩티드들을 고순도로 정밀하게 분리할 수 있다.

또한, 일 실시예의 Fc-함유 생리활성 펩티드의 분리 방법에 따르면, Fc에 특정 돌연변이를 도입하여 단백질 A 리간드와의 친화력을 인위적으로 조절하지 않으면서도 동일 또는 유사한 구조를 가지는 생리활성 펩티드들을 고순도로 정밀하게 분리할 수 있다. 또한, 일 실시예의 Fc-함유 생리활성 펩티드의 분리 방법에 따르면, 돌연변이가 도입되지 않은 야생형 단백질 A 리간드 또는 기존의

단백질 A 리간드를 사용하면서도 생리활성 펩티드들을 분리할 수 있다. 따라서, 일 실시예의 제조 방법에 따르면 Fc 영역과의 친화도가 상승하도록 돌연변이가 도입된 고가의 단백질 A 리간드를 사용하지 않으면서도 Fc-함유 생리활성 펩티드들을 고순도로 정밀하게 분리할 수 있다.

본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 항체 혼합물에서 항체를 정제 하는 방법이 제공될 수 있다. 생리활성 펩티드의 정제 방법에 대한 실시 형태에 대해 설명한 내용은, 모순되지 않는 한 후술할 항체의 정제 방법에 대한 실시 형태에 대해서도 적용될 수 있음은 물론이다.

본 발명의 일 실시예에 따르면 (a-1) 항체 혼합물을 단백질 A 리간드가 함유된 친화성 매트릭스를 포함하는 컬럼에 로딩하는 단계로서, 상기 항체 혼합물은 단일 특이적 항체, 상기 단일 특이적 항체의 두 개의 중쇄 불변 영역 중 어느 하나의 C-말단에 인간 VH3 도메인을 포함하는 하나의 항원 결합 단편이 결합된 일가 이중 특이적 항체 및 상기 단일 특이적 항체의 두 개의 중쇄 불변 영역의 C-말단에 상기 항원 결합 단편이 각각 하나씩 결합된 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 것인 단계; (b-1) 제1 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에

로딩하여 상기 단일 특이적 항체를 용출하는 단계; (c-1) 상기 제1 pH 범위 보다 낮은 제2 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 일가 이중 특이적 항체를 용출하는 단계; 및 (d-1) 상기 제2 pH 범위 보다 낮은 제3 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 이가 이중 특이적 항체를 용출하는 단계를 포함하는 항체의 정제 방법이 제공될 수 있다.

상기 단일 특이적 항체의 가변 영역은 인간 VH3 도메인을 포함하는 것일 수도 있고, 포함하지 않는 것일 수 있다.

상기 항원 결합 단편은 scFv일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 서열 번호 SEQ ID No.11의 아미노산 서열을 포함하는 scFv일 수 있다.

즉, 본 발명에 따른 예시적 이중 특이적 항체는 중쇄 조합물 (Heavy Component) 및 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 경쇄를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 중쇄 조합물은 (1) 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 중쇄 및 (2) 항 IGF1R 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것일 수 있다. 다르게 말하면, 본 발명에 따른 이중 특이적 항체는 scFv 형태의 항 IGF1R항체가, IgG 형태의 항  $\alpha$ -시누클레인 항체의 c-

말단의 어느 하나 또는 양쪽 (monovalent(일가) 또는 bivalent(이가)로 각각 지칭함)에 결합되는 형태일 수 있다.

상기 제1 pH 범위는 3.4 이상 5.0 이하이고, 상기 제2 pH 범위는 3.3 이상 4.1 이하이고, 상기 제3 pH 범위는 3.0 이상 4.0 이하인 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 pH 범위는 3.4 이상 4.5 이하이고, 상기 제2 pH 범위는 3.3 이상 4.1 이하이고, 상기 제3 pH 범위는 3.0 이상 4.0 이하인 것일 수 있다.

다만, 상기 제1 내지 제 3 pH 범위는 예시적인 범위에 불과하며, 당 분야 통상의 기술자라면, 생리활성 펩티드의 종류에 따라 달라지는 상기 제1 내지 제3 pH 범위를 본원 명세서 기재를 참조하여 쉽게 도출할 수 있을 것이다.

특히 비대칭 이종 이량체(Asymmetric Hetero dimer) 형태의 단백질의 경우, 생산과정에서 발생할 수 있는 동종 이량체(homo dimer)를 정제과정에서 제거하기가 매우 어렵다. 이종 이량체와 동종 이량체 사이에는, 단백질 정제 공정에서 일반적으로 사용하는 친화성 컬럼 또는 이온 교환 컬럼을 이용하여 정제할 수 있을 만큼의 친화도(affinity) 및 등전점(pI)의 차이가 나타나지 않기 때문이다.

이종 이량체 형태의 항체의 분리와 관련하여 미국 특허 등록 공보 US8586713

B2 등에서는 Fc 서열을 인위적으로 치환하여 친화도 및 등전점 차이를 키우는 방법이 시도되었으나, 이와 같이 인위적으로 아미노산을 치환 할 경우 면역원성(immunogenicity)이 발생하게 되는 문제점이 있다. 또한, VH3 서열이 동시에 존재할 경우 친화성 레진을 반드시 두 번 사용해야 하며, 이가 이중 특이적 항체를 먼저 제거해야만 일가 이중 특이적 항체와 단일 특이적 항체를 분리할 수 있다. 따라서, 공정이 복잡하여 분리에 많은 시간과 비용이 소요된다.

그러나, 일 실시예에 따른 항체의 정제 방법에 따르면, 이중 이량체와 동중 이량체와 같이 등전점 차이가 매우 작아(예를 들어, 0.1 이하) 일반적인 친화성 크로마토그래피 또는 이온교환 크로마토그래피로 정제하기 어려운 펩티드에 인위적인 아미노산 치환을 하지 않으면서도, 85% 내지 90% 이상의 고순도로 이중 이량체를 정제할 수 있다. 또한, 일 실시예의 분리 방법에 따르면, 항체의 단편뿐만 아니라 Fc 영역을 포함하는 전체 항체 또한 효과적으로 분리할 수 있으며, VH3 도메인의 개수에 따라 세밀하게 분리 가능하다.

#### 【발명의 효과】

일 실시예에 따른 Fc-함유 생리활성 펩티드 또는 항체의 정제 방법은 Fc-

함유 생리활성 펩티드 또는 항체 혼합물에 포함된 펩티드들의 VH3 도메인 개수 차이에 의한 전장 도메인 단백질 A 리간드의 결합력 차이를 이용하여 펩티드 또는 항체를 고순도로 정제할 수 있다. 또한, 일 실시예에 따른 Fc-함유 생리활성 펩티드 또는 항체의 정제 방법은 Fc와 단백질 A 리간드의 결합력을 조절하기 위해 Fc 또는 단백질 A 리간드에 별도의 돌연변이를 도입할 필요가 없으므로 공정 비용 절감 및 공정 단순화를 달성하면서도, 고순도로 단백질을 정제할 수 있다.

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 MabSelect Sure 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 2는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 MabSelect Prisma 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 3은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 Protein A FF 레진을 적용한

친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 4는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 MabSelect Xtra 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 5는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 MabSelect Xtra 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 6은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 MabSelect Xtra 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 7은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 Protein A HP 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 8은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 Protein A HP 레진을 적용한

정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 9는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 Protein A HP 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 10은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 11은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 12는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 13은 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 AbSolute High Cap 레진을

적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 14는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 AbSolute High Cap 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 15는 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 AbSolute High Cap 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 16은 Transient 방법으로 생산된 배양액(Harvested Cell Culture Fluid)과 해당 배양액을 Protein A로 정제한 시료를 각각 POROS A 20  $\mu$ m 분석컬럼을 이용하여 분석한 프로파일을 나타낸 것이다. Peak 1, peak 2, peak 3은 각각 정제된 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체를 POROS A 20  $\mu$ m 분석컬럼에 loading하여 각 물질의 retention time을 확인한 것이다.

도 17은 hu11F11 및 hu11F11-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 18은 hu11F11 및 hu11F11-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 19는 hu11F11 및 hu11F11-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 20은 ch1E4 및 ch1E4-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 21은 anti-BACE 및 anti-BACE-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 22는 ch1E4 및 ch1E4-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 23은 anti-BACE 및 anti-BACE-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에

대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 24는 ch1E4 및 ch1E4-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 25는 anti-BACE 및 anti-BACE-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 26은 Fc 및 Fc-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 27은 Fc 및 Fc-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 28은 Fc 및 Fc-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 29는 GLP-1-Fc 및 GLP-1-Fc-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에

대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 30은 GLP-1-Fc 및 GLP-1-Fc-F06을 포함하는 생리활성 펩티드 혼합물에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 31는 anti-BACE, anti-BACE-F06, hu11F11, 및 hu11F11-F06을 포함하는 시료에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

도 32은 anti-BACE, anti-BACE-F06, hu11F11, 및 hu11F11-F06을 포함하는 시료에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SE-HPLC로 확인한 것이다.

도 33은 anti-BACE, anti-BACE-F06, hu11F11, 및 hu11F11-F06을 포함하는 시료에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 SDS-PAGE로 확인한 것이다.

도 34은 anti-BACE, anti-BACE-F06, hu11F11, 및 hu11F11-F06을 포함하는

시료에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 정제 결과를 LC/MS로 확인한 것이다.

도 35는 ch1E4, ch1E4-F06, hu11F11 및 hu11F11-F06 을 포함하는 시료에 대하여 POROS MabCapture A Select 레진을 적용한 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 나타낸 것이다.

#### 【발명의 실시를 위한 형태】

이하부터는 하기의 실시예들을 참조하여 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법을 자세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것은 아니며, 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다. 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항에 의해 정의될 뿐이다.

#### 실시예 1: 일가 이중 특이적 항체의 제조

## (1) 일가 이중 특이적 항체 발현 벡터의 제작

일가 이중 특이적 항체(monovalent bispecific antibody) 발현 벡터를 제작하기 위해, pcDNA3.4(invitrogen) 벡터의 MCS(Multi cloning site) 내에 signal sequence를 포함한 항체의 뉴클레오티드 서열을 삽입하였다. 사용된 발현 벡터는 모노 시스트로닉 벡터로써, 중쇄 발현 벡터 및 경쇄 발현 벡터를 각각 제작하였다.

중쇄 발현 벡터는 제1 중쇄 서열을 갖는 중쇄 발현 벡터 1과 제2 중쇄 서열을 갖는 중쇄 발현 벡터 2를 제작하였다.

중쇄 발현 벡터 1은 항  $\alpha$ -시누클레인(anti  $\alpha$ -synuclein) 항체인 ch11F11 (국제공개번호 W02019/117684의 서열목록 참조), ch1E4(중쇄 서열번호 SEQ ID NO. 18 및 경쇄 서열 번호 SEQ ID NO. 19 참조), 또는 hu11F11(국제공개번호 W02019/117684의 서열목록 참조), 또는 anti-BACE (국제공개번호 W02019/094608의 hu2H8v29의 서열 참조) 항체의 중쇄 가변 영역 및 인간 중쇄 불변 영역이 연결된 이뮤노글로불린의 C-말단에 항 IGF1R scFv (1564, F06, VH5, VH9, VH16, 표 2 참조)가 링커로 연결된 형태이며, 중쇄 불변 영역 특정위치에 서열 치환(hole mutation: T366S, L368A, Y406V)이 되어있다.

중쇄 발현 벡터 2는 항  $\alpha$ - 시누클레인 항체 또는 anti-BACE 항체를 코딩하는 중쇄 가변 영역 및 인간 중쇄 불변 영역만 연결된 형태이며, 중쇄 불변 영역 특정 위치에 서열 치환(knob mutation: T366W)이 되어 있다.

경쇄 발현 벡터에 삽입된 경쇄 서열의 경우 항  $\alpha$ - 시누클레인 항체 또는 anti-BACE 항체를 코딩하는 경쇄 가변영역 및 인간 경쇄 불변영역이 연결된 형태이다.

실시에 1에서 중쇄 발현 벡터 1, 중쇄 발현 벡터 2 및 경쇄 발현 벡터 내에서 항체를 암호화하는 핵산 서열은 각각 SEQ ID NO. 20 내지 SEQ ID NO. 22에 나타나 있다.

본원의 일 실시예에 따른 일가 이중 특이적 항체의 예시인 hu11F11 x F06를 구성하는 아미노산 서열은 아래 표 1에 나타나 있다.

[표 1]

| 대표적 이중항체                             | 이중항체 경쇄                                        | 이중항체 중쇄조합물                                                | SEQ ID           | 이중항체 중쇄조합물 구성설명                                 | 아미노산 서열       |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------|---------------|
| <b>hu11F11 x F06</b><br>(monovalent) | Hu11F11-VL <sub>v3</sub> 4c<br>(WO2019/117684) | hu11F11(ver.2)(M428L)-<br>F06(de2)(StoP)<br>(HC 1, -hole) | SEQ ID<br>NO. 12 | hu11F11(ver.2)<br>(IgG) M428L,<br>HOLE MUTATION | WO2019/117684 |

|  |  |                                        |                  |                                                 |               |
|--|--|----------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------|---------------|
|  |  |                                        |                  |                                                 |               |
|  |  |                                        |                  | (G4S)3                                          | SEQ ID NO. 14 |
|  |  |                                        |                  | F06(de2)(StoP)<br>VL                            | SEQ ID NO. 15 |
|  |  |                                        |                  | (G4S)4                                          | SEQ ID NO. 16 |
|  |  |                                        |                  | F06(de2)(StoP)<br>VH                            | SEQ ID NO. 17 |
|  |  | hu11F11(ver.2)(M428L)<br>(HC 2, -knob) | SEQ ID<br>NO. 13 | hu11F11(ver.2)<br>(IgG) M428L,<br>KNOB MUTATION | WO2019/117684 |

일가 이중 특이적 항체 (monovalent bispecific antibody)는 항  $\alpha$ -  
 시누클레인 항체 또는 anti-BACE 항체의 중쇄 Fc 중 하나의 C 말단에 scFv가  
 연결되고 다른 중쇄 Fc에는 scFv가 연결되지 않은 이중 이량체 형태이다.

일반적으로 일가 이중 특이적 항체 생산 시 knob-knob 이량체, knob-hole  
 이량체, hole-hole 이량체 항체의 조합이 모두 생산된다. 순수한 이중 이량체(knob-  
 hole dimer)분리를 위한 정제 과정 시 정제 분리능 비교 및 대조물질의 용도로,  
 단일 특이적 항체(monospecific antibody, knob-knob dimer와 동일한 크기인 150kd)  
 및 이가 이중 특이적 항체(bivalent bispecific antibody, hole-hole dimer와  
 동일한 크기인 200kd)를 추가로 클로닝 하였다.

정제 분리능 비교 및 분석에 필요한 대조물질의 생산을 위한 단일 특이적 항체의 중쇄서열의 경우에는 항  $\alpha$ - 시누클레인 항체 또는 anti-BACE 항체를 코딩하는 중쇄가변영역 및 인간 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역만 있는 형태이며, 이가 이중 특이적 항체의 중쇄서열의 경우에는 단독항체와 동일한 중쇄서열 C 말단에 scFv가 링커로 연결되어 있지만, 중쇄 불변 영역에 어떠한 서열치환도 되어 있지 않은 형태이다. 단독항체, 이가 이중 특이적 항체 및 일가 이중 특이적 항체에서, 중쇄서열 부분은 모두 동일하다.

본 실시예에서 사용된 항 IGF1R scFv (1564, F06, VH5, VH9, VH16)의 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열은 하기 표 2에 표시하였다.

【표 2】

| 항체   | 구분                      | 서열                                                                                                                                    |
|------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1564 | 가변중쇄서열<br>(SEQ ID No.1) | EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS<br>AISYDNANTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>GVLTTLMNWF DYWGQGLTVTVSS |
|      | 가변경쇄서열<br>(SEQ ID No.2) | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLI<br>YANVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNA<br>YVFGCGTKLTVL                |
| F06  | 가변중쇄서열<br>(SEQ ID No.3) | EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS<br>AISYDNANTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>GVLTTLMNWF DYWGQGLTVTVSS |
|      | 가변경쇄서열<br>(SEQ ID No.4) | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLI<br>YANVNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWAGSLNA                                |

|      |                          |                                                                                                                                     |
|------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                          | YVFGCGTKLTVL                                                                                                                        |
| VH5  | 가변중쇄서열<br>(SEQ ID No.5)  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS<br>AISGDNASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>GVLTTLMNWFDSWGQGT LTVSS  |
|      | 가변경쇄서열<br>(SEQ ID No.6)  | QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLI<br>YANVNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNA<br>YVFGCGTKLTVL            |
| VH16 | 가변중쇄서열<br>(SEQ ID No.7)  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS<br>AISGSNANTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>GVLTTLMNWF DYWGQGT LTVSS |
|      | 가변경쇄서열<br>(SEQ ID No.8)  | QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLI<br>YANVNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNA<br>YVFGCGTKLTVL            |
| VH9  | 가변중쇄서열<br>(SEQ ID No.9)  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS<br>AISGDNGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>GVLTTLMNWFDSWGQGT LTVSS  |
|      | 가변경쇄서열<br>(SEQ ID No.10) | QSVLTQPPSASGTPGQ RVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLI<br>YANSNRPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLNG<br>YVFGCGTKLTVL             |

## (2) Transient expression

상기 제조된 벡터를 maxi-prep(Qiagen) 하여, 다량의 plasmid DNA를 확보 후, 다음과 같이 세포에 도입하였다. 일가 이중 특이적 항체를 생산하는 경우에는 hole type 중쇄 발현 벡터 DNA, knob type 중쇄 발현 벡터 DNA 및 경쇄 발현 벡터 DNA를 0.5 : 0.5 : 1의 비율로 형질 도입 하였고, 단일 특이적 항체 또는 이가 이중 특이적 항체를 생산하는 경우에는 중쇄 발현 벡터 DNA 및 경쇄 발현 벡터 DNA를 1 : 1의 비율로 형질 도입 하였다.

형질 주입 전날, ExpiCHO™ (Gibco, Cat: A29127)세포를 ExpiCHO™ expression medium (Gibco, Cat: A29100-01) 배지에  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  viable cells/mL로 농도를 맞춘 후, 8% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 120 rpm에서 1일 동안 배양하였다. DNA 형질 주입 당일  $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$  viable cells/mL, 생존율은 95% 이상으로 자란 세포를 신선한 배지를 이용하여  $6 \times 10^6$  viable cells/mL로 희석하여 준비하였다.

준비된 모세포에 형질 주입을 위해 ExpiFectamine™ CHO transfection kit(Gibco, Cat: A29129)를 사용하여, ExpiFectamine™ CHO & plasmid DNA 복합체를 준비하였다. 차가운 OptiPRO™SFM®(Gibco, Cat: 12309019) 배지를 각각 분주하여, 적정 농도로 준비한 DNA 및 ExpiFectamine™CHO 시약을 각각 접종 후, mix 하여 상온에서 5분간 정치하고, 모세포에 접종하여 형질주입 후 배양을 시작하였다. 형질주입 다음날에는 ExpiFectamine™ CHO transfection kit에 포함된 enhancer 및 feed를 형질주입 세포에 접종하였고, 5일 후에는 feed 를 추가 접종 후, 8% CO<sub>2</sub>,

37 °C, 120 rpm 조건에서 10일간 배양하여 생산을 완료하였다.

### (3) Culture medium harvest

생산이 완료된 배양액의 수득을 위해 원심 분리용 병에 배양액을 옮기고 4 °C, 6500 rpm에서 30분간 원심분리 후, 0.2 µm의 크기인 필터로 필터링을 진행하여, 부유물을 제외한 배양액을 시료로서 확보하였다. 이후, 정제과정을 진행하였다.

### 실시예 2: 친화성 크로마토그래피를 통한 일가 이중 특이적 항체의 정제

#### 공정 조건 확인을 위한 실험 준비

실시예 1의 방법에 따라 일가 이중 특이적 항체를 생산하였다. 이때 이중 특이적 항체 중 항- $\alpha$ - 시누클레인 항체로는 ch11F11 또는 hu11F11 클론을, 항-IGF-1R 항체로는 1564, VH5, VH9, VH16 또는 F06 클론을 사용하였으며, 둘 모두 VH3 계열 항체에 해당하여 각각의 중쇄 가변 영역이 VH3 도메인을 포함하였다.

실제 생산시 knob-in-hole에 의해 목적 항체인 일가 이중 특이적 항체가

주로 생성되며, 부수적 생성물인 이가 이중 특이적 항체 및 단일 특이적 항체는 상대적으로 적은 양으로 생성된다. 그러나 본 실시예에서는, 본 발명에 따른 정제 공정이 VH3 도메인의 개수에 따른 친화도 차이에 의해 항체들을 분리할 수 있다는 사실을 더욱 명백히 증명하기 위해, 당해 정제에서 부수적 생성물, 즉 불순물로 여겨지는 이가 이중 특이적 항체 및 단일 특이적 항체의 농도를 높인 조성물을 제조하여 (즉, 정제에 더 불리한 조건을 제공하여) 이 조성물을 대상으로 정제 공정을 수행하였다.

그와 같은 조성물은 knob 또는 hole을 포함하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체가 1:3:1의 비율로 포함되어 있다. 이러한 조성물은, 아래와 같은 정제 공정에 의해 분리된 항체들을 포함한다:

B (Z) 도메인만을 가지는 MabSelectSure (GE Healthcare, Cat. No. 17543803)를 레진으로 사용하는 친화성 크로마토그래피로 정제하여 Fc를 가지는 정제 대상 물질들을 분리하였다.

평형화 버퍼(50 mM Tris-HCl pH7.2, 100 mM NaCl)를 사용하여 평형화 시킨

후, 회수된 배양액을 컬럼에 로딩 하였다.

로딩이 완료되면 평형화 버퍼로 3 column volume 세척 후, 50 mM Sodium Citrate pH 3.4를 이용하여 용출을 하였다. 용출액에 1M Tris-HCl pH 9.0을 첨가하여 pH 7.0이 되도록 중화 후, 0.2um 제균필터하였다.

### 실시예 3: 다양한 단백질 A(Protein A) 레진을 이용한 항체 정제 효과 비교

일가 이중 특이적 항체의 정제에 적합한 단백질 A 레진을 선정하기 위해, 아래 표 3과 같이 다양한 스펙 및 도메인을 가지는 상용화된 단백질 A컬럼을 이용하여 ch11F11 단일 특이적 항체, ch11F11-F06 일가 이중 특이적 항체 및 ch11F11-F06 이가 이중 특이적 항체를 포함하는 시료로부터 정제를 수행하고 그 효과를 비교하였다.

**【표 3】**

| Resin    | MabSelect Sure | MabSelect PrismA | Hitrap Protein A FF | MabSelect Xtra | Hitrap Protein A HP | POROS MabCapture A Select | Absolute High Cap |
|----------|----------------|------------------|---------------------|----------------|---------------------|---------------------------|-------------------|
| Particle | 85             | 60               | 90                  | 75             | 34                  | 45                        | 35                |

| Size ( $\mu\text{m}$ ) |      |      |        |        |        |        |        |
|------------------------|------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Protein A domain       | B(Z) | B(Z) | 전장 도메인 | 전장 도메인 | 전장 도메인 | 전장 도메인 | 전장 도메인 |

각 레진 별 정제 방법 및 정제 방법에 대해서는 아래의 실시예 3-1 내지 3-7에 상세하게 기재하였다.

정제된 시료를 SE-HPLC (Size exclusion-high performance liquid chromatography), SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 또는 LC/MS(Liquid chromatography Mass spectrometer)로 분석하여 정제 결과를 확인하였다.

SE-HPLC 분석 시 이동상으로 40 mM Sodium phosphate, 400 mM Sodium perchlorate, pH 6.8을 사용하였고, 분석 시료 농도 1 mg/mL로 분석 시료 부피 20  $\mu\text{L}$ 를 주입했으며, 유속 0.8 mL/min으로 분석을 진행하였다. 분석 피크는 280 nm 파장에서의 흡광도로 측정하였다. SDS-PAGE에서는 NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel과 MOPS running buffer를 사용하여, non-reducing 및 reducing 조건으로 분석을 진행하였다. Reducing 조건의 경우, 5% 2-mercaptoethanol을 분석 시료에 넣고

70 °C에서 10분간 가열 후 분석을 진행하였다. LC/MS 분석의 경우, Waters Acquity Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC) 시스템과 Waters Synapt G2-S Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) mass spectrometer로 구성하였으며 PLRP-S 1000 Å BEH S-200 컬럼을 사용하여 분석하였다. 데이터는 Waters BiopharmaLynx V.1.3. 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

#### 실시예 3-1: MabSelect Sure

HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare, Cat. No. 29-0486-84) 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 머무름 시간(이하, residence time) 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 1에 실시예 3-1에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였다. 도 1에서 x 축은 시료 부피로서 단위는 mL 이고, y축은 280nm에서의 UV 파장을 의미하며 단위는 mAu 이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 실시예 3-1에서는 하나의 용출 피크만 나타났다. 이로부터, HiTrap MabSelect Sure 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이지 않음을 확인하였다.

### 실시예 3-2: MabSelect Prisma

MabSelect Prisma (GE Healthcare, Cat. No. 17-5199-01) 를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 2에 실시예 3-2에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였다. 도 2에 도시된 바와 같이 실시예 3-2에서는 하나의 용출 피크만 나타났다. 이로부터, MabSelect Prisma 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이지 않음을 확인하였다.

### 실시예 3-3: Protein A FF

HiTrap Protein A FF (GE Healthcare, Cat. No. 17-5079-01)를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 3에 실시예 3-3에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였다. 도 3에 도시된 바와 같이 실시예 3-3에서는 용출 피크가 뚜렷이

분리되어 나타나지 않았다. 이로부터, HiTrap Protein A FF 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 의미있는 친화성 차이를 보이지 않음을 확인하였다.

#### 실시예 3-4: MabSelect Xtra

MabSelect Xtra (GE Healthcare, Cat. No. 17-5269-07) 를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 4에 실시예 3-4에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 5 및 도 6에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다. 도 4에서 확인되는 바와 같이 용출 완충액의 pH 범위에서 세 개의 피크가 확인되었다.

구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인의 개수가 적은 (2 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 3 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었으며, 더욱 낮은 pH에서 VH3 도메인을 가장 많이 가지는 (4 개) 이가 이중 특이적 항체가 마지막으로 용출되었다. 이로부터, MabSelect Xtra 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이며, 이러한 친화성 차이에 따라 ch11F11-F06를 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 클론 조합에서도 동일하게 나타났다.

또한, 도 5 및 도 6에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 통해, 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 펩티드들이 각각 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체에 해당한다는 사실을 재확인하였다.

### 실시예 3-5: Protein A HP

HiTrap Protein A HP (GE Healthcare, Cat. No. 17-0402-01) 를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate

pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 7에 실시예 3-5에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 8 및 도 9에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다. 도 7에서 확인되는 바와 같이 용출 완충액의 pH 범위에서 세 개의 피크가 확인되었다. 구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인의 개수가 적은 (2 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 3 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었으며, 더욱 낮은 pH에서 VH3 도메인을 가장 많이 가지는 (4 개) 이가 이중 특이적 항체가 마지막으로 용출되었다. 이로부터, HiTrap Protein A HP 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이며, 이러한 친화성 차이에 따라 ch11F11-F06를 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 클론

조합에서도 동일하게 나타났다.

또한, 도 8 및 도 9에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 통해, 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 펩티드들이 각각 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체에 해당한다는 사실을 재확인하였다.

#### 실시예 3-6: POROS MabCapture A Select

POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 10에 실시예 3-6에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 11 및 도 12에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다. 도

10에서 확인되는 바와 같이 용출 완충액의 pH 범위에서 세 개의 피크가 확인되었다. 구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인의 개수가 적은 (2 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 3 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었으며, 더욱 낮은 pH에서 VH3 도메인을 가장 많이 가지는 (4 개) 이가 이중 특이적 항체가 마지막으로 용출되었다. 이로부터, POROS MabCapture A Select 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이며, 이러한 친화성 차이에 따라 ch11F11-F06를 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 클론 조합에서도 동일하게 나타났다.

또한, 도 11 및 도 12에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 통해, 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 펩티드들이 각각 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체에 해당한다는 사실을 재확인하였다.

### 실시예 3-7: AbSolute High Cap

AbSolute High Cap (AGC)를 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 평형화

버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 실시예 1에서 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 5분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH 7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행되었다.

도 13에 실시예 3-6에 따른 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 14 및 도 15에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다. 도 13에서 확인되는 바와 같이 용출 완충액의 pH 범위에서 세 개의 피크가 확인되었다. 구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인의 개수가 적은 (2 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 3 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었으며, 더욱 낮은 pH에서 VH3 도메인을 가장 많이 가지는 (4 개) 이가 이중 특이적 항체가 마지막으로 용출되었다. 이로부터, AbSolute High Cap 레진은 시료 내에 존재하는 펩티드들의 VH3 도메인의 개수 차이에 따른 친화성 차이를 보이며, 이러한 친화성 차이에 따라 ch11F11-F06를 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 다른 클론

조합에서도 동일하게 나타났다.

또한, 도 14 및 도 15에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 통해, 친화성 크로마토그래피에 의해 분리된 펩티드들이 각각 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체에 해당한다는 사실을 재확인하였다.

#### 실시예 3-1 내지 실시예 3-7의 정제 결과 정리

실시예 3-4 내지 실시예 3-7에서 피크가 검출된 용출 완충액의 pH 농도 구배는 아래 표 4에 기재된 것과 같다.

**【표 4】**

| 실시예     | Peak 1 start pH | Peak 1 End pH | Peak 2 End pH | Peak 3 End pH |
|---------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 실시예 3-4 | 3.86            | 3.58          | 3.39          | 3.26          |
| 실시예 3-5 | 3.99            | 3.77          | 3.54          | 3.36          |
| 실시예 3-6 | 3.97            | 3.73          | 3.53          | 3.36          |
| 실시예 3-7 | 3.85            | 3.59          | 3.38          | 3.21          |

실시예 3-1 내지 실시예 3-7의 정제 결과를 정리하여 아래 표 5에 상세히 기재하였다.

**【표 5】**

| Resin                                             | MabSelect<br>Sure | MabSelect<br>PrismA | Hitrap<br>Protein A FF | MabSelect<br>Xtra   | Hitrap<br>Protein A<br>HP | POROS<br>MabCapture<br>A Select | Absolute<br>High Cap |
|---------------------------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Resolution*<br>[I~IV]<br>(Peak 1~2 /<br>Peak 2~3) | I                 | I                   | I                      | II<br>(1.08 / 0.82) | II<br>(1.01 / 0.91)       | III<br>(1.30 / 1.08)            | IV<br>(1.53 / 1.21)  |
| Alkaline<br>stability<br>[I~IV]                   | IV                | IV                  | II                     | II                  | I                         | III                             | IV                   |
| SE-HPLC<br>Purity (%)                             | Not<br>applicable | Not<br>applicable   | Not<br>applicable      | 85.7                | 94.9                      | 95.2                            | 97.7                 |
| Recovery<br>(%)**                                 |                   |                     |                        | 99                  | 100                       | 96                              | 99                   |
| Monovalent<br>Yield (%)***                        |                   |                     |                        | 73.3                | 79.9                      | 78.5                            | 79.2                 |
| Scalability                                       | Yes               | Yes                 | Yes                    | Yes                 | No                        | Yes                             | Yes                  |

각 실시예에서의 분리도(Resolution, Rs), 회수율(Recovery yield) 및 일가

항체 수율(Monovalent Yield)은 하기의 식과 같이 계산하였다.

$$Rs = 1.18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{1/22} + W_{1/21})}$$

\*

tR1: 피크 1의 retention time.

tR2: 피크 2의 retention time

W1/2<sub>1</sub>: 피크 1에서 half height 사이의 폭

W1/2<sub>2</sub>: 피크 2에서 half height 사이의 폭

\*\* Recovery (%) = Output (mg) / Input (mg) x 100

\*\*\* Monovalent Yield (%) = Monovalent Output (mg) x Purity (%) /

Monovalent Input (mg) x Purity (%) x 100

실험 결과, 실시예 3-4 내지 3-7에서 사용된 컬럼들만이 펩티드 내에 포함된 VH3 도메인의 개수에 따른 친화도 차이를 보이며, 그 결과 단일 특이적 항체, 일가 이중 특이적 항체 및 이가 이중 특이적 항체가 pH 농도 구배에 따라 효과적으로 분리되는 것이 확인되었다. 보다 구체적으로, 실시예 3-4 내지 3-7에서 분리되는 항체들은 가변 영역에 VH3 도메인을 포함하는 단일 특이적 항체의 Fc의 C 말단에 연결된 항 IGF1R scFv의 존재 및 개수에 따라 VH3 도메인의 개수가 각각 2개, 3개 및 4개로 상이하며, 실시예 3-4 내지 3-7에서 사용된 컬럼들은 단백질 A 레진이 전장 도메인을 가짐으로써 상기 항체들의 VH3 도메인의 개수 차이를 세밀하게 인식하여 항체들이 효과적으로 분리되었다. 이러한 효과는, Fc 결합력 및 염기

안정성 (alkaline stability) 향상을 위해 특정 도메인 B(Z)만을 사용하여 일반적으로 더욱 선호되는 MabSelect Sure 및 MabSelect Prisma 등의 개선된 컬럼들에 비해, 종래의 (특별한 변이를 도입하지 않은) 단백질 A를 포함하는 레진이, VH3 도메인을 포함하는 펩티드 혼합물로부터 VH3의 개수에 따라 펩티드들을 분리하는 데에 더 효과적으로 사용가능하다는 점에서 더욱 놀라운 것이다.

#### 실시에 4: 배양액으로부터의 항체 순도 분석

POROS A 20um (Thermo fisher, Cat. No. 1-5022-26) 를 사용하여, 단백질 A 정제 없이 배양액을 바로 이용하는 경우에도 목적하는 Fc-함유 생리활성 펩티드를 분석할 수 있는지 확인하였다. 평형화 버퍼(25 mM Citrate / 25 mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후 배양액(Harvested Cell Culture Fluid)을 직접 로딩하였다. 평형화 버퍼를 이용하여 2 column volume으로 unbound wash 하고, 용출 버퍼(25 mM Citrate / 25 mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 1분, gradient 조건 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 이와 동일한 방법으로 protein A로 전처리(pre-purified)한 시료도 분석하여 결과를

비교하였다.

도 16에 실시예 4에 따른 친화성 크로마토그래피의 분석 프로파일을 도시하였다. 도 16에 도시된 바와 같이 단백질 A컬럼을 거치지 않고 배양액을 직접 분석한 결과와 단백질 A로 전처리한(pre-purified) 시료를 분석한 결과 값이 각각 90.3%와 90.5%로 매우 유사하며, 용출 프로파일과 분리도(resolution) 또한 유사함을 확인하였다.

상기 결과로부터, 일 실시예의 분리 방법에 따른 경우 transient 배양액을 단백질 A로 1차 정제하지 않더라도 우수한 resolution으로 펩티드를 분리 및 분석할 수 있음이 확인된다. 따라서, 일 실시예에 따른 분리 방법은 세포주 개발 초기 단계에서 후보 세포주의 숫자가 많을 때에도 1차 정제 과정없이 배양액을 이용하여 바로 항체의 비율 및 순도를 확인할 수 있는 매우 효과적인 분석법으로도 활용될 수 있다.

#### 실시예 5: 다양한 비대칭 형태 폴리펩티드의 정제

##### 실시예 5-1: IgG(VH3(+))-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는 실시예 1의 방법에 따라 생성된 2 개의 VH3 도메인을 가지는 단일 특이적 항체 (hu11F11) 및 3 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (hu11F11-F06)의 혼합물을 사용하였다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 loading 하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 17에 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 18 및 도 19에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 17에 도시된 바와 같이

피크가 두 개로 분리되었다. 구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인의 개수가 적은 (2 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 3 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었다 (Peak 2). 이러한 결과는 도 18 및 도 19에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과로부터 재확인되었다.

#### 실시예 5-2. IgG(VH3(-))-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는, IgG의 가변 영역에 VH3 도메인을 포함하지 않는 항체인 ch1E4 클론 또는 anti-BACE 항체를 사용하였다는 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법에 따라 생성된, VH3 도메인을 가지지 않는 단일 특이적 항체 (ch1E4 또는 anti-BACE) 및 1 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (ch1E4-F06 또는 anti-BACE-F06)의

혼합물을 사용하였다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 loading 하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 20 및 21에 친화성 크로마토그래피의 용출 피크를 각각 도시하였고, 도 22 및 도 23에 각각 SE-HPLC 결과를 도시하였으며, 도 24 및 도 25에 각각 SDS-PAGE 결과를 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 20 및 21에 도시된 바와 같이 피크가 두 개로 분리되었다. 구체적으로, 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인을 가지지 않는 (0 개) 단일 특이적 항체가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 1 개 가지는 일가 이중 특이적 항체가 다음으로 용출되었다 (Peak 2). 이러한 결과는 도 22 내지 도 25에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과로부터 재확인되었다.

실시예 5-3. Fc-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는, 단일 특이적 항체 (hu11F11) 및 일가 이중 특이적 항체 (hu11F11-F06)를 파파인(papain)으로 처리하여 Fab를 제거한 Fc 및 Fc-scFv(F06)를 준비하였다. 구체적으로, 파파인은 소화 완충액 (digestion buffer, 10 mM PBS, 20 mM EDTA, 10 mM cysteine-HCl, pH 7.4)로 희석하여, 준비된 시료에 1:100 (파파인:항체) 비율로 섞어 37 °C에서 4시간 반응시켰다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0~5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 26에 친화성

크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 27 및 도 28에 각각 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과를 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 26에 도시된 바와 같이 피크가 두 개로 분리되었다. 일반적인 항체는 Fc의 N 말단에 Fab이 연결되어 있는 것인 반면, 본 실시예에서 분리된 시료는 Fc의 N 말단에 Fab을 포함하지 않는다. 그럼에도 불구하고 도 26에 따르면 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인이 없는 (0 개) Fc가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 1 개 가지는 Fc-scFv(F06)가 다음으로 용출되었으며 (Peak 2), 이러한 결과는 도 27 및 도 28에 따른 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 결과로부터 재확인되었다. 이는, 본 발명에 따른 정제방법이 단순한 항체 정제뿐만 아니라, VH3 도메인의 개수에서 차이를 가지는 다양한 Fc-함유 펩티드, 예를 들어 Fc-scFv를 함유하는 다양한 펩티드 (예를 들어, 약물 또는 기능성 펩티드와 연결된 Fc-scFv)에도 폭넓게 적용될 수 있음을 시사하는 것이다.

#### 실시예 5-4. GLP-1-Fc-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는 Fc에 Fab 대신 GLP-1 (Glucagon-like Peptide-1)의 공지된 서열이 연결된 것을 제외하고 실시예 1의 방법과 동일한 방법에 따라 생성된 GLP-1-Fc (F06) 및 1 개의 VH3 도메인을 가지는 GLP-1-Fc-scFv (F06)의 혼합물을 사용하였다. 본 실시예에서 사용된 GLP-1은 펩티드 약물의 일종으로서 당뇨 및 알츠하이머 등의 질병과 관련하여 연구 및 임상이 활발하게 진행되고 있는 물질이다. 이와 같은 펩티드 약물을 포함하는 경우에도 VH3 도메인의 개수에 따른 분리가 가능한지를 본 실시예에서 시험하였다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0~5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은

용출 비퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 29에 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 30에 SE-HPLC 결과를 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 29에 도시된 바와 같이 피크가 두 개로 분리되었다. 일반적인 항체는 Fc의 N 말단에 Fab이 연결되어 있는 것인 반면, 본 실시예에서 분리된 시료는 Fc의 N 말단에 Fab 대신 GLP-1을 포함하는 융합 펩티드이다. 그럼에도 불구하고 도 29에 따르면 상대적으로 높은 pH에서 VH3 도메인이 없는 (0 개) GLP-1-Fc가 먼저 용출되었고 (Peak 1), pH가 낮아짐에 따라 VH3 도메인을 1 개 가지는 GLP-1-Fc-scFv(F06)가 다음으로 용출되었으며 (Peak 2), 이러한 결과는 도 30에 따른 SE-HPLC 결과로부터 재확인되었다. 이는, 본 발명에 따른 정제방법이 단순한 항체 정제 뿐만 아니라, VH3 도메인의 개수에서 차이를 가지는 다양한 Fc-함유 펩티드, 특히 항체의 구성요소 외의 다른 유효성분도 더 포함하는 생리활성 펩티드들의 분리에도 폭넓게 적용될 수 있음을 시사하는 것이다.

실시예 5-1 내지 실시예 5-4에서 용출 완충액의 pH 농도 구배는 아래 표 6에 기재된 것과 같다.

【표 6】

| 실시예                                        | Peak 1<br>start pH | Peak 1<br>End pH | Peak 2<br>start pH | Peak 2<br>End pH |
|--------------------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
| 실시예 5-1<br>(hu1F11 &<br>hu1F11-scFv)       | 3.51               | 3.41             | 3.41               | 3.32             |
| 실시예 5-2<br>(ch1E4 &<br>ch1E4-scFv)         | 4.23               | 4.08             | 3.96               | 3.76             |
| 실시예 5-2<br>(anti-BACE &<br>Anti-BACE-scFv) | 4.05               | 3.89             | 3.73               | 3.57             |
| 실시예 5-3 (Fc &<br>Fc-scFv)                  | 3.98               | 3.78             | 3.78               | 3.53             |
| 실시예 5-4 (GLP-1-<br>Fc & GLP-1-Fc-<br>scFv) | 4.17               | 3.95             | 3.83               | 3.61             |

#### 실시예 5-5. IgG(VH3(±))-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다.

단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는

실시예 1의 방법에 따라 생성된 2 개의 VH3 도메인을 가지는 단일 특이적 항체 (hu11F11) 및 3 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (hu11F11-F06), 그리고 IgG의 가변 영역에 VH3 도메인을 포함하지 않는 항체인 anti-BACE 항체를 사용하였다는 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법에 따라 생성된, VH3 도메인을 가지지 않는 단일 특이적 항체 (anti-BACE) 및 1 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (anti-BACE-F06) 총 4 종의 혼합물을 사용하였다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0 ~ 5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 31에 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였고, 도 32 내지 도 34에 각각 SE-HPLC, SDS-PAGE 및 LC/MS 결과를 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 31에 도시된 바와 같이 펩크가 네 개로 분리되었으며, VH3 도메인의 개수에 따라 펩티드들(anti-BACE 항체:

0개, anti-BACE-F06: 1개, hu11F11 항체: 2개, hu11F11-F06: 3개)의 피크가 명확히 분리되어, 원하는 펩티드를 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 결과는 도 32 내지 34의 SE-HPLC, SDS-PAGE 및 LC/MS 결과로부터 재확인되었다. 이로부터, 본원 분리 방법은 각각의 펩티드에 포함된 VH3 도메인의 개수에 따라 펩티드들을 매우 세밀하게 정제할 수 있음을 확인하였다.

#### 실시예 5-6. IgG(VH3( $\pm$ ))-scFv(VH3+)

실시예 3에서 사용한 단백질 A 레진을 사용하여 시료의 분리능을 확인하였다. 단백질 A 레진으로는 표 5에 기재된 분리능이 확인되는 모든 단백질 A 레진을 사용할 수 있음은 물론이나, 대표적으로 POROS MabCapture A Select (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Cat. No. A26458)를 사용하여 정제하였다. 정제를 위한 시료로는 실시예 1의 방법에 따라 생성된 2 개의 VH3 도메인을 가지는 단일 특이적 항체 (hu11F11) 및 3 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (hu11F11-F06), 그리고 IgG의 가변 영역에 VH3 도메인을 포함하지 않는 항체 클론인 ch1E4 항체를 사용하였다는 것을 제외하고 실시예 1과 동일한 방법에 따라 생성된, VH3 도메인을

가지지 않는 단일 특이적 항체 (ch1E4) 및 1 개의 VH3 도메인을 가지는 일가 이중 특이적 항체 (ch1E4-F06) 총 4 종의 혼합물을 사용하였다.

평형화 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH7.0)를 사용하여 평형화 시킨 후, 준비한 시료를 컬럼에 로딩하였다. 용출 버퍼(25mM Citrate / 25mM Sodium phosphate pH2.5)를 사용하여 residence time 6 분, wash 조건은 용출 버퍼 0% > 50% / 1 column volume으로 pH7.0~5.0 범위에서 수행되었다. gradient 조건은 용출 버퍼 50% > 100% / 30 column volume으로 수행하였다. 도 35에 친화성 크로마토그래피의 정제 프로파일을 도시하였다.

용출 완충액의 pH 농도구배를 적용한 결과, 도 35에 도시된 바와 같이 피크가 네 개로 분리되었으며, VH 도메인의 개수에 따라 펩티드들(ch1E4: 0개, ch1E4-F06: 1개; hu11F11: 2개, hu11F11-F06: 3개)의 피크가 명확히 분리되어, 원하는 펩티드를 VH3 도메인의 개수에 따라 선택적으로 정제할 수 있음을 확인하였다.