

【청구범위】**【청구항 1】**

(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, 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 방법.

【청구항 2】

제1 항에 있어서,

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 것인, 정제 방법.

【청구항 3】

제2 항에 있어서,

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 $n+1$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하며, 상기 제3 Fc-함유 생리활성 펩티드가 $n+2$ 개의 인간 VH3 도메인을 포함하는 것인, 정제 방법.

【청구항 4】

제1 항에 있어서,

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 단계를 포함하는 것인 정제 방법.

【청구항 5】

제2항에 있어서,

상기 단계 (b)는

(b1) 제1 pH 범위를 갖는 용출액을 상기 컬럼에 로딩하여 상기 제1 Fc-함유 생리활성 펩티드를 용출하는 단계;

(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 것인, 정제 방법.

【청구항 6】

제1 항에 있어서,

상기 Fc는 야생형 단백질 A와의 결합력에 영향을 미치는 돌연변이가 도입되지 않은 것인, 정제 방법.

【청구항 7】

제1 항에 있어서,

상기 제1 또는 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드가 VH3 도메인을 포함하는 경우,
상기 제1 또는 제2 Fc-함유 생리활성 펩티드는 하기 서열로부터 선택되는 VH 도메인-함유 가변 영역 서열을 포함하는 것인, 정제 방법:

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.

【청구항 8】

제2 항에 있어서,

상기 제 3 Fc-함유 생리활성 펩티드는 하기 서열로부터 선택되는 VH 도메인-함유 가변 영역 서열을 포함하는 것인, 정제 방법:

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.9 중쇄 가변 서열 및 SEQ ID No.10의 경쇄 가변 서열.

【청구항 9】

제1 항에 있어서,

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG를 포함하는 항체인 것인, 정제 방법.

【청구항 10】

제1 항에 있어서,

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG-scFv 이중 항체인 것인, 정제 방법.

【청구항 11】

제1 항에 있어서,

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 Fc에 결합된 펩티드 약물을 포함하는 것인,

정제 방법.

【청구항 12】

제11 항에 있어서,

상기 펩티드 약물은 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자,

전사조절인자, 혈액 인자, 백신, 구조 단백질, 리간드 단백질 및 수용체로

이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 정제 방법.

【청구항 13】

제2 항에 있어서,

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; 및

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 것인, 정제 방법.

【청구항 14】

제1 항에 있어서,

상기 Fc-함유 생리활성 펩티드는 IgG이고,

상기 IgG 항체의 가변 영역이 인간 VH3 도메인을 포함하는 것인, 정제 방법.

【청구항 15】

(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, 정제 방법.

【청구항 16】

제15 항에 있어서,

상기 단일 특이적 항체의 가변 영역이 인간 VH3 도메인을 포함하는 것인,

정제 방법.

【청구항 17】

제15 항에 있어서,

상기 단일 특이적 항체의 가변 영역이 인간 VH3 도메인을 포함하지 않는

것인, 정제 방법.

【청구항 18】

제15 항에 있어서,

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

scFv인 것인, 정제 방법.

【청구항 19】

제15 항에 있어서,

상기 제1 pH 범위는 3.4 이상 5.0 이하이고,

상기 제2 pH 범위는 3.3 이상 4.1 이하이며,

상기 제3 pH 범위는 3.0 이상 4.0 이하인 것인, 정제 방법.