



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월19일  
(11) 등록번호 10-1840064  
(24) 등록일자 2018년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)  
C07K 16/06 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0029551  
(22) 출원일자 2013년03월20일  
심사청구일자 2015년10월26일  
(65) 공개번호 10-2013-0106792  
(43) 공개일자 2013년09월30일  
(30) 우선권주장  
P201230413 2012년03월20일 스페인(ES)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO1999064462 A1\*  
Human Antibodies 19 (2010) 1-6\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
그리폴스, 에스.에이.  
스페인 바르셀로나 헤수스 이 마리아 6 08022  
(72) 발명자  
리스틀 디바트, 페레  
스페인 바르셀로나 헤수스 이 마리아 6 08022  
그란차 게이몬, 살바도르  
스페인 바르셀로나 헤수스 이 마리아 6 08022  
(74) 대리인  
청운특허법인

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 열처리를 통해 IgG 조성물을 획득하는 방법

(57) 요약

열처리를 통하여 IgG 조성물을 얻는 방법.

본 발명은 인간 혈장으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액으로부터 IgG 조성물을 획득하는 새로운 방법에 관한 것으로, 상기 방법에서, 중간 열처리를 적용하지만, 고분자량 응집체/중합체 및/또는 단백질을 침전시키는 시약의 사용하지 않고, 상기 방법 동안에 발생된 IgG 중합체의 사실상 총 제거가 달성된다.

더군다나, 본 방법은 공지의 방법과 비교하여 높은 생산성, 낮은 생산비용을 제공하며, 실행이 쉽다. 이에 부가하여, 본 방법을 사용하여 안정한 액상의 최종 생성물을 얻을 수 있다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) 총 단백질량의 95%를 초과하는 IgG 함량을 갖는 인간 혈장으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액을 투석여과시키는 단계;
- (b) 단계 (a)에서 얻은 상기 용액을 안정화시키는 단계;
- (c) 단계 (b)에서 얻은 상기 용액을 열처리하는 단계, 여기에서, 발생하는 응집체 및 중합체는 3%를 초과하지 않으며,
- (d) 양이온 크로마토그래피를 통하여 단계 (c)에서 처리된 상기 용액으로부터 적어도 85%의 고분자량 응집체 및 중합체를 선택적으로 흡착시키는 단계; 및
- (e) 단계 (d)에서 얻는 상기 용액을 투석여과 및 액상 제제화시키는 단계를 포함하는, 인간 혈장으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액으로부터 액상의 IgG 조성물을 획득하는 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 방법은 총 단백질량의 97%를 초과하는 IgG 함량을 갖는 인간 혈장으로부터 정제된 IgG 용액으로 출발하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)는 에탄올 농도가 0.5% (중량/부피) 미만까지 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)는 PEG, 옥탄산, 상용성 비-이온성 계면활성제 또는 이의 혼합물의 변성 침전제의 농도가 2% (중량/부피) 미만까지 수행되고, 어떤 경우라도 단계 (c) 이후에 중합체의 3%를 초과하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)는 상기 IgG 용액의 이온 강도가 1 mS/cm 미만까지 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 단계 (a)의 말단에서의 pH 값은 4.2 내지 6.0 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)는 주사용 물 또는 저 이온 강도의 완충용액으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 저 이온 강도의 완충용액은, 4.0 및 5.0 사이의 pH를 갖는,  $\leq 5\text{mM}$  용액의 아세트산 또는 아세트산나트륨인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)는 10 kDa 및 100 kDa 사이의 분자 분획을 갖는 막을 가로지르는 접선류 모드에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (a)에서, 상기 단백질은 5% (중량/부피)를 초과하지 않는 농도로 농축된 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 안정화 단계 (b)에서 안정화제로서 술비톨이 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 안정화 단계 (b)에서 사용된 술비톨의 농도는 50% (중량/중량) 미만인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 안정화 단계 (b)에서 pH는 4.6 및 5.2 사이로 조정되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 열처리 단계 (c)는  $55^{\circ}\text{C}$  및  $63^{\circ}\text{C}$  사이의 온도에서, 1 및 24 시간 사이의 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 16

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 열처리 단계 (c)는  $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서, 10-11 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 17

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 선택적 흡착 단계는 강한 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 18

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 양이온 크로마토그래피에서는 강한 양이온 교환수지가 사용되며, 상기 강한 양이온 교환 수지는 20 및 100  $\mu\text{m}$  사이에서 변하는 입자 크기의 폴리메타크릴레이트 또는 폴리스티렌을 포함하는 불용성 합성 관류 매트릭스에 공유결합된 설포닐, 설포닉, 또는 설포프로필기의 양이온 설포닐기의 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는

방법.

#### 청구항 19

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 선택적 흡착 단계에서, 분사 흐름은 5-30 컬럼 부피/시간인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 20

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

단계 (c)에서 열처리된 용액에 염화나트륨이 0.2 및 0.5 M (몰/리터) 사이의 최종 농도까지 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 염화나트륨의 첨가 후에, 단계 (c)에서의 용액의 pH는 4.2 및 5.5 사이로 조정되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 22

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 선택적 흡착 단계에서, 정제를 요구하는 건조 중량을 기준으로 IgG 의 각 kg에 대해 1 및 10 리터 사이의 수지가 사용되며, 이는 100-1000 mg IgG/ml 수지의 로딩에 상당하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 23

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 선택적 흡착 단계에서, 용출은 감소하는 염수 구배를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 24

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 방법은 적어도 하나의 부가적인 바이러스 불활성/제거 처리 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25

제 22항에 있어서,

상기 열처리 단계 전 또는 후에 바이러스 불활성/제거 처리 단계가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 26

제 25항에 있어서,

상기 바이러스 불활성/제거 처리 단계는 펩신의 존재 또는 부재하의 산 pH에서 배양, 또는 비-이온성 계면활성제, 이온성 용매로 처리 또는 나노여과에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 27

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (e)는 주사용 물 또는 저 이온 강도의 완충용액으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 28

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (e)에서, 최종 제제에 대해 안정제가 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 29

제 28항에 있어서,

상기 최종 제제의 pH는 4.6 및 5.8 사이인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 30

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (e)는 10 kDa 및 100 kDa 사이의 분자 분획을 갖는 막을 통한 집선류 모드에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 31

제 1항 또는 제 3항에 있어서,

상기 투석여과 단계 (e)에서, 상기 단백질을 5% 및 22% (중량/부피) 사이의 값으로 농축되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 인간 혈장 (human plasma)으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액으로부터 IgG 조성물을 획득하는 새로운 방법에 관한 것으로, 상기 방법에서, 중간 열처리를 적용하지만, 고분자량 응집체/중합체 및/또는 단백질을 침전시키는 시약을 사용하지 않고, 상기 방법 동안에 발생된 IgG 중합체의 거의 완전한 제거가 달성된다. 이에 부가하여, 본 방법은 공지된 방법과 비교하여 높은 생산성, 낮은 생산비용을 제공하며, 실행이 쉽다. 또한, 본 방법을 사용하여 안정한 액상의 최종 생성물을 얻을 수 있다.

### 배경 기술

- [0002] 면역 글로불린 (Immunoglobulin) G (IgG)는 모든 면역 글로불린의 대략 80%를 포함하는, 인간 혈청 (8-16 mg/ml)에서 가장 풍부한 면역 글로불린의 이소타입 (isotype)이다. IgG은 1차 면역결핍, 특히 선천성 무감마글로불린혈증 (congenital agammaglobulinaemia) 및 저감마글로불린혈증 (hypogammaglobulinaemia), 특발 혈소판 감소성 자반증 (idiopathic thrombocytopenic purpura)과 같은 다양한 질병의 치료, 가와사키 질병 (Kawasaki's Disease)의 치료 및 골수 이식 (transplant of bone marrow)에서 보조제 (adjuvant), 이 중에서도, 소아환자에서 HIV 감염의 치료의 일부분으로 만성 림프구성 백혈병 (chronic lymphocyte leukaemia) 과 연관된 저감마글로불린혈증의 치료에 효과를 나타낸다.
- [0003] 현재, 넓은 스펙트럼의 인간 항체에 관해 다가 (polyvalent)이고, 인태트 분자 (결정체가 가능한 Fc 분획의 무결성)에 관해 중합 기능성(중화능(neutralising capacity), 옵소닌화 (opsonisation), 보존된 평균수명 (average life conserved)), 특히 소수의 서브클래스 (minority subclasses) (IgG3 및 IgG4)에 대해 천연의 혈장과 동일하거나 등가인 IgG 서브클래스의 정상 분포를 갖는 면역 글로불린 G (IgG)에 대한 높은 수요가 있다.
- [0004] IgG의 치료적 투여에 대한 경로는 정맥주사 (intravenous), 피하주사 (subcutaneous) 및 근육주사 (intramuscular)일 수 있고, 이것에 부가하여, 구강 (oral), 흡입 (inhaled) 또는 국소적 경로 (topical routes)와 같은 종래의 경로와 다른 것에 의해 투여될 수 있다.
- [0005] 그럼에도 불구하고, 정맥주사 투여는 1차 면역 결핍에 대한 치료 또는 변이성 일반 면역결핍 (IgG 및 IgA 서브클래스의 결손)에 대한 치료에 가장 유용한 치료적 효과를 제공한다 (Espanol, T. "Primary immunodeficiencies". Pharmaceutical Policy and Law 2009; 11(4): 277-283), 2차 또는 후천적 면역결핍 (예를 들어, 거대세포바이러스 (cytomegalovirus), 대상포진 (herpes zoster) 바이러스, 사람 면역결핍 바이러스와 같은 바이러스에 의한 감염) 및 자가면역 유래의 질병 (예를 들어, 혈소판 감소성 자반증 (thrombocytopenic purpura), 가와사키 신드롬 (Kawasaki's Syndrome) (Koski, C. "Immunoglobulin use in management of inflammatory neuropathy". Pharmaceutical Policy and Law 2009; 11(4): 307-315)).
- [0006] 정맥주사 사용 (IGIV)에 대한 이상적인 IgG은 고농도의 액상으로 제제화될 수 있고, 바람직하게는 생성물 및 즉

시 주입을 촉진화하기 위하여 대략 30℃에서 저장될 수 있다.

- [0007] 가능한 IgG 비내성 반응 (intolerance reactions)을 감소시키기 위하여, 혈액 그룹 응집소 (agglutinins)뿐 아니라, 면역 글로불린 A (IgA) 및 면역 글로불린 M (IgM)이 없거나, 또는 검출되지 않는 양으로 존재하는 것이 필수적이라는 것이 개시되었다. 이것은 또한 생성물이 플라스민 (plasmin) 또는 플라스미노겐 (plasminogen), 또는 프리칼리크레인 (prekallikrein), 또는 이것의 활성화제 (activator), 키닌 (kinins) 또는 키니노오겐 (kininogen), 특히, 인자 XI /인자 XIa와 같은 응고 인자 (coagulation factors)의 존재를 통해서도 어떠한 효소활성이 사실상 없는 것이 필수적이다.
- [0008] 반면 다가의 IgG를 획득하기 위한 인간 유래의 개시 (starting) 혈장은 바이러스 또는 병원균의 최소 전염을 통해 감염의 위험을 감소시키는 것이 필요하다. Fernandes et al. (ES 500121) 및 Hirao, Y. et al. (EP 196761 및 EP 253313)에 개시된 바와 같이, 용액 (액상)에서 IgG의 열처리, 또는 저온 살균 (pasteurisation)은, IgG의 변성에 대해 보호제(protector) (예를 들어, 자당, 솔비톨, 아미노산)의 존재하에서 효과적으로 수행될 수 있다. 이런 목적을 위하여 상기 용액은 적어도 약 10 시간 동안 대략 60 ℃의 온도까지 상승시켜, 가장 위험한 병원균을 활성화 또는 감속 (attenuating)시킨다. 이러한 병원균은 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus) (HCV) 및 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus) (HBV)과 같은 지질 피막 (lipid coat)을 가질 수 있거나, 또는 이 중에서도 폴리오바이러스 (poliovirus), A형 간염 바이러스 (hepatitis A virus) (HAV) 및 파보바이러스 (parvovirus)와 같은 지질 피막이 없을 수도 있다. (Uemura Y. et al. "Inactivation and elimination of viruses during the fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation". Vox Sang. 1989; 56: 155-161).
- [0009] 그럼에도 불구하고, 안정화제의 존재 및 최선의 공정 조건에서도, 저온살균은 필연적으로 개시 IgG의 순도에 의 존하여 더 크거나 작은 비율로, IgG 중합체 및/또는 다른 부수적인 단백질의 중합체와 같은 비가역적 고분자량 단백질 응집체의 형성을 초래한다 (Hirao, Y. et al., above; 및 Ristol, P. et al. EP 1225180 및 ES 2091161).
- [0010] 1960년에서 1970년의 10년 동안, IgG 중합체로써 알려진 비가역적 고분자량 응집체의 존재는 IgG의 정맥주사 투여 동안 동일 활성화에 대한 보체(항보체 활성화 (anticomplement activity), ACA)의 소비와 관련되고, 이러한 현상은 심각한 비내성 (severe intolerance) 또는 관찰된 과민증 반응 (anaphylaxis reactions)에 연결된다 (Barandum, S. et al. Vox Sang. 7: 157-174, 1962).
- [0011] 보건 당국 (health authorities)이 IGIV에서 중합체의 최대 함량, 또는 이량체보다 더 큰 분자형태의 규제를 최대 3%로 제한된다 (Eur.Ph. Monograph 6.3; 및 정맥주사 투여용 정상 면역 글로불린에 대한 CMP Core SPC: CPMP/BPWG/859/95 rev.2). 이러한 고려는 액상 제제 (formulation)에 대해 특히 중요한데, 이는 상기 3% 제한이 반드시 상기 생성물에 대해 유효 기간까지 유지되어야 하기 때문이다. 따라서, 이런 IgG 중합체의 사실상 전체적인 부존재는 상기 생성물이 긴 기간에 걸쳐 악화되지 않는 것을 보장하고, 저장가능한 최대 온도를 보장하기 위해, 저온살균 후 및 획득된 최종 산물 모두에서 달성되어야만 한다.
- [0012] 현재 시장에서 이용가능하고, 아미노산으로 제제화된 대부분의 액상 IgG는 응집을 피하기 위한 산성 pH (Uemura, Y. "Dissociation of aggregated IgG and denaturation of monomeric IgG by acid treatment". Tohoku J. Exp. Med., 1983; 141: 337-349), 바람직하게는 만약 상표명 Gamunex<sup>®</sup> (Grifols SA, 스페인), Kiovig<sup>®</sup> 또는 Gammagard<sup>®</sup> 액상 (상기 두 제품은 미국, Baxter사로부터 구입)으로 알려진 바와 같이, 0.2 M 또는 0.25 M 글리신으로 안정화된다면, 4.0-5.0의 pH (Tenold, R. et al. US-4396608호) 및 2-8℃의 온도를 반드시 유지, 또는 만약 저장 동안 분자 응집을 최소화하기 위하여 (Jolles, S. et al. "Clinical uses of intravenous immunoglobulin". Clin. Exp. Immunol. 2005 October; 142(1): 1-11; Hooper, J.A. "Intravenous immunoglobulins": evolution of commercial IVIG preparations". Immunol Allergy Clin. North Am. 2008; 28(4): 765-778), Privigen<sup>®</sup> (CSL Behring, 독일)과 같은 프로린 (proline) 0.25 M로 안정화한다면 25℃ 까지 반드시 유지해야 한다.
- [0013] 이것은 과도한 산성 pH에서 긴 기간 동안의 노출이, 예를 들어, pH의 4.5 이하 및 상대적으로 높은 온도, 예를 들어, 30℃에서 (Vermeer, A. et al. "Thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein". Biophys. J. 2000; 78: 394-404; Shukla, A. et al. "Strategies to address aggregation during protein A chromatography". Bioprocess International, May 2005) IgG의 단편화 (fragmentation)이 일어나는 것을 입증했다. 따라서 예를 들어, L-프롤린으로 4.8±0.2의 pH에서 제조된 10%

IGIV 조성물이 분자 응집에 대해 효과적으로 안정하지만, 노출 시간에 대해 단편화의 경향이 관찰되어진다고 문헌에서 보고되었다. 따라서, 25℃의 온도에서, 단편화의 양은 36 개월 후 평균 3.9%이다 (Cramer, M. et al. "Stability over 36 months of a new liquid 10% polyclonal immunoglobulin product (IgPro10, Privigen<sup>®</sup>) stabilised with L-proline", Vox Sang. 2009. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01143.x).

[0014] 폴리올 또는 폴리-알코올, 예를 들어, 말토즈 및 솔비톨을 갖는, IgG 제제는 응집을 예방하고 (Katakam, M. et al.: Aggregation of proteins and its prevention by carbohydrate excipients: Albumins and globulin. J. Pharm. Pharmacol. 1995; 47: 103-107), (상표명 Octagam<sup>®</sup>, 10% 말토오스로) 25℃까지 안정한 이러한 IgG 용액 특성 때문에, (상표명 Flebogamma<sup>®</sup> DIF, 5% 솔비톨로) 30℃까지는 약한 산성 pH범위인 5.0 및 6.0 사이 (Hirao, Y. et al., 특허 EP-278422호)에서 제조되었다고 개시되었다.

[0015] 그러나 IgG 제제에서 몇몇 당 또는 유도체의 존재는 최근에 몇몇 경우의 심각한 신부전증 (serious kidney failure)이 자당을 함유하는 IgG 제제의 주입 (infusion)과 연관된다는 의문을 제시하고 있다 (Szenczi, A. et al.: The effect of solvent environment on formation and stability of human polyclonal in solution. Biologicals, 2006; 34(1): 5-14).

[0016] 특별한 당 (자당) 및 몇몇 고농도의 폴리올 (10% 말토즈)를 갖는 몇몇 면역 글로불린 조성물에 의해 제공될 수 있는 다른 단점은 용액으로 주입될 경우 혈액 점도가 상대적으로 증가할 수 있고, 이것은, 이전에 질병이 있거나 또는 환자가 위험에 처한 경우, 혈관내 혈전형성 (intravascular thrombosis) 및 급성 심근경색 (acute myocardial infarction)의 매우 심각한 경우와 연결될 수 있다 (Radosevich, M. and Burnouf, T. "Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance. Vox Sang., 2009; 1-17; Katz, U. and Shoenfeld, Y.: Review: intravenous immunoglobulin therapy and thromboembolic complications. Lupus, 2005; 14(10): 802-808).

[0017] 이는 또한 몇몇 상업적 IGIV 제품이 현저한 혈전색전증 효과 (thromboembolic effect) (TEE)를 갖는, 이들의 정제 공정으로부터의 잔여물 (remnants)인 활성 응고 촉진 효소 (active procoagulating enzymes)를 함유하는 것을 확인하였고, TEE 및 인자 XI/XIa 및/또는 다른 응고 촉진성 인자 (procoagulant factors) (예를 들어, 칼리크레인 (kallikrein) 또는 이와 유사한)의 존재 사이의 연관 (association)이 입증되었다. 혈전색전증능 (thromboembolic capacity)의 제거는 내성 및 안정성을 최대한 보장하도록, IGIV 주입에 대해 반드시 실행되는 것이 중요하다.

[0018] 어떤 특정한 원리에 제한되는 것은 아니지만 본 발명자들은 최근 시판하고 있는 IGIV 사이의 주요 차이점이 상기 제제 (아미노산, 당 및 폴리올, 및 pH)뿐만 아니라, 예를 들어, 다른 특성들 가운데, 저장 동안 응집 및 단편화를 방지하기 위해, 액상에서 생산하기 위한 최종 보존 상태 (온도-시간)에 영향을 미칠 수 있는, IgG 획득을 위한 공정에서도 원인이 될 수 있다고 믿는다. 액상 IgG 제제의 안정성 및 이들의 정제 공정 사이 의존도는 다른 연구자들에게서도 관찰되었다 (Cramer, M. et al. 상기 참조).

[0019] 따라서 본 발명은 종래의 기술에서 언급된 문제를 극복하는 IgG 제조를 획득하기 위한 공정을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 종래의 방법으로 정제된 IgG를 함유하는 물질로 출발하여, 안정화제, 단백질 농도, 전도율, pH 및 단백질 및 단백질 분해 효소 불순물을 가능한 감소시키기 위한, 이전 침전 단계 유래의 잔여 시약의 농도의 특정한 조건하에서, 저온살균으로 잘 알려진 열처리에 의해 또한 정제된다. 상기 불순물 및 효소의 감소는 상기 처리 동안 및/또는 응집된 단백질의 선택적 흡착단계 동안 일어나지만, 여하튼 이런 두 단계만이 침전을 이용하는 분리 기술을 도입하지 않고 최종 정제로 사용된다.

[0020] 종래의 기술은, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 사용한 침전 공정, 사용된 공정에 따라 광범위하게 변화하는, IgG 단량체/이량체 (공침전)의 높은 회수 손실을 유발하는 선택성이 낮은 방법을 개시하는, 예를 들어, Coval, L. (특허 US-4093606호 및 US-4165370호) 및 Uemura, Y. et al. (특허 ES-506679호 및 EP-246579호)에 의해 기술된 바와 같은, 응집체/중합체 침전 및 크로마토그래피 분리의 조합을 사용한 산업적 규모를 포함한다.

[0021] 예를 들어, 만약 충분히 정제되지 않은 IgG를 갖는 IgG 용액에서 열처리가 수행된다면, 회수율 (단량체/이량체)은 통상 70 및 80% 사이일 것이다 (Uemura, Y. et al. above). 정제된 IgG 용액의 경우에 있어서, 더 좋은 회수 결과는 80 - 90%로 얻어질 수 있지만, 이런 경우에는 종래의 기술 (Ristol, P. et al., above)에서 기술된 바와 같이, 접선류 미세여과 (tangential flow microfiltration) (TFF)와 같은, 복합 분리 기술을 사용하는 것이 필수적이다. 그러나 상기 TFF 공정은 침전제 (PEG), 안정제 (솔비톨) 및 주사용 물의



과다 소비, 및 장비를 필수적으로 재사용하는 경우, 다수의 세정-위생 작업 (cleaning-sanitisation operations)이 고려될 수 있다. 게다가, 긴 공정시간은 조작이 어려울 수 있고, 소모되는 비용 및/또는 에너지가 높고, IgG 단량체/이량체 회수율은 항상 90% 미만이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0022] 본 발명자들은, 종래의 기술에 기술된 바와 같은, 고 분자량 응집체/중합체 및/또는 단백질을 침전시키기 위한 시약의 사용이 필요없는 방법을 개발하였고, 상기 방법은 놀랍게도 종래의 기술 공정과 비교하여 높은 생산력, 낮은 생산 비용 및 실행이 용이하게, 발생된 중합체의 사실상 총 제거를 달성하였다. 게다가, 이런 방법의 사용을 통해, 액상에서 최종 생성물에 대한 안정성이 달성되었고, 바람직하게는 아미노산 또는 폴리알코올에서 제제화될 수 있으며, 2 및 30℃ 사이의 온도 및 4.6 이상 및 5.8까지의 pH에서 적어도 1년 동안 액상으로 보관될 수 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0023] 따라서 본 발명은:
- [0024] a) 인간 혈장으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액을 투석여과시키는 단계;
- [0025] b) 단계 a)에서 얻은 상기 용액을 안정화시키는 단계;
- [0026] c) 단계 b)에서 얻은 상기 용액을 열처리하는 단계;
- [0027] d) 양이온 크로마토그래피를 통하여 단계 c)에서 처리된 상기 용액으로부터 고분자량 응집체 및/또는 중합체를 선택적으로 흡착시키는 단계; 및
- [0028] e) 단계 d)에서 얻은 상기 용액을 투석여과 및 제제화시키는 단계를 포함하는 인간 혈장으로부터 부분적으로 정제된 IgG 용액으로부터 IgG 조성물을 획득하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 이러한 방법의 사용을 통해, 약한 산성 매체에서 제제화될 수 있고, 주목할 만한 불안정성의 징후 없이 대기 온도에서 액상으로 보관될 수 있는 IgG 단량체/이량체를 필수적으로 함유하는 용액에 일어나는, 고분자량, 즉, 상기 IgG의 단량체 및 다른 불안정한 단백질보다 더 큰 분자량의 응집체/중합체 함량에서 상당한 감소는 달성되며, 바람직하게는 이의 정맥주사, 또는 피하주사 또는 근육주사제로의 사용을 위한 기준 항목을 준수할 수 있다.
- [0030] 바람직하게는 본 발명에 따른 방법은, 유럽 약전에 기술된 방법에 따라, 셀룰로오스 아세테이트 (cellulose acetate), 녹말 블랙 틱션 (starch black tinction), 및 정량화된 밀도계에서 전기영동 (electrophoresis)에 의해 결정된 바와 같이, 총 단백질과 관련하여 95%를 초과하는 IgG 함량, 좀더 바람직하게는 97%를 초과하는 IgG 함량을 갖는 인간 혈장으로부터 정제된 IgG 용액으로 출발하여 수행된다.

## 발명의 효과

[0031] 본 발명은 고 분자량 응집체/중합체 및/또는 단백질을 침전시키기 위한 시약을 사용하지 않고, 높은 생산력, 낮은 생산 비용 및 실행이 용이하게, 발생된 중합체를 사실상 전부를 제거할 수 있다. 게다가, 본 방법의 사용을 통해, 액상에서 최종 생성물에 대한 안정성이 달성되었고, 바람직하게는 아미노산 또는 폴리알코올에서 제제화될 수 있으며, 2 및 30℃ 사이의 온도 및 4.6 이상 및 5.8까지의 pH에서 적어도 1년 동안 액상으로 보관될 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 출발 물질로써 본 발명은 IgG-풍부 분획(당 기술분야에서 알려진 종래의 방법에 의해 알부민을 얻기 위하여 인간 혈장의 분획으로부터 분리된)의 사용, 그 후의 본 발명에 의한 방법을 시작하기 위한 이들의 적절한 정제를 고려한다.



- [0033] 지금까지 IgG-풍부 분획을 분리하기 위하여 Cohn (Cohn, E.J. et al. Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components. J. Am. Chem. Soc. 1946; 68: 459-475)에 의한 방법 6에 기초하여, 에탄올로 혈장의 냉각 분획은 계속적으로 사용되고 있고, 산업적 규모에서 지속되고 있다. 다양한 순도 (통상적으로 다른 단백질과 관련하여 35 및 65% 사이의 IgG)의 IgG 및 대부분 (90%) 혈장을 함유하는, 이런 분획 (Fr-II+III) 또는 등가물 (Fr-I+II+III)은 농축된 면역 글로불린 분획 (Fr-II, 또는 농축된 Fr-III의 상층액)이 얻어질 때까지 Cohn-Oncley 방법 9 (Oncley, J.L. et al.: The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-1 lipoprotein into subfractions of human plasma. J. Am. Soc. 1949; 71: 541-550)으로 알려진 에탄올을 이용한 침전을 통해 더욱 대규모로 정제되지 않으면 안된다. 또 다른 실행 가능한 선택은 침전물 A (또는 등가 침전물 A+I)에 관한 한 Kistler-Nistchmann 방법 (Kistler, P. and Nistchmann, Hs. Large Scale Production of human plasma Fractions. Vox Sang. 1962; 7: 414-424)을 사용하고 그 다음 GG 침전물, 또는 침전물 B의 농축된 상층액 (한외여과)을 얻기 위해 이를 정제하는 것이다.
- [0034] 에탄올로의 침전 과정 모두를 사용하여, (Fr-III 상층액, Fr-I+III, Fr-II, 침전된 GG 또는 침전물 B의 상층액으로부터) IgG 용액을 얻는 것이 가능하고, (셀룰로오즈 아세테이트상에서 전기영동을 통해) IgG  $\geq$  95% 및 바람직하게는 IgG의  $\geq$  97%의 최소 순도 특징을 따르며, 이것은 본 발명에 따른 공정에서 출발물질로 사용되는 것이 요구된다. 이것은 정맥 주사 경로 (intravenous route)에 대해 내성이 있는 제제로 근육내 (intramuscular) 또는 피하지방 (subcutaneous) 경로에 대해 허용가능한 IgG를 전환시킨다.
- [0035] 어떤 경우에 있어서, 본 발명에서, 다른 바람직한 조합은, 예를 들어, 주요 오염원의 침전 및/또는 음이온성 수지 (anionic resins)상에 흡착 및/또는 무기 흡착제 (폴리에틸렌 글리콜, 옥탄산 (octanoic acid), 이온교환 크로마토그래피 (ion exchange chromatography), 벤토나이트 (bentonite), 펄라이트 (perlite))에 흡착의해, 출발물질 (예를 들어, Fr-II+III 또는 침전물 A)의 순도를 증가시키는데 사용된다. Documents Ristol, P. et al. EP-1225180; Lebing, W. et al. EP-0893450; Teschner, W. et al.: 새로운 액상의, 정맥주사 면역 글로불린 생성물 (10% IGIV)은 최첨단 공정에 의해 고순도로 정제된다. Vox sang. 2007; 92(1): 42-55는 본 발명에서 정제 처리에 처리 전에 중간 IgG 분획 (예를 들어, Fr-II+III)의 순도를 IgG  $\geq$  95%, 및 바람직하게 IgG  $\geq$  97% 까지 증가시키기 위해 이온 교환 크로마토그래피와 조합된, 에탄올, PEG 또는 옥탄산으로의 침전을 통해 정제하기 위한 유효한 공정에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에 따른 방법의 단계에서 투석 여과 (diafiltration)는 표준 IgG 정제 공정으로부터 발생하는 원하지 않는 성분의 농도가 본 발명에 따른 공정에 영향을 미칠 수 있는 농도값 이하로 감소되는 것을 목표로 수행된다. 예를 들어, 어떤 원하지 않는 성분은 에탄올이고, 이러한 투석 여과 단계 (a)를 통해, 이는 0.5% (중량/부피) 이하의 농도, 바람직하게는 0.1% 이하의 농도로 감소될 것이다. 만약 PEG, 옥탄산, 상용성 비-이온성 계면활성제 또는 이의 혼합물과 같은 다른 비변성침전 시약이 존재한다면, 그들 농도는 또한 2% (중량/부피) 미만으로 감소되어야 하고, 어떤 경우라도 단계 (c)이후에 3% 초과 중합체를 초래하지 않을 때까지 저감되지 않으면 안된다.
- [0037] 더군다나, 이런 투석 여과 단계에서 상기 출발 IgG 용액은 전도성이 1 mS/cm 미만인 이온 강도로 조정될 수 있고, 상기 pH는 4.0 및 5.5 사이로 조정될 수 있으며, 두 경우 모두가 바람직하다. 투석 여과는 주사용 물 또는 바람직하게는 알칼리 또는 묽은 산으로 pH 4.0 - 5.0에 조정된  $\leq$  5 mM 아세트산 용액 또는 아세트산 나트륨 용액과 같은 저 이온 강도의 완충 용액으로 수행될 수 있다.
- [0038] 투석 여과 단계 (a)는 바람직하게는 예를 들어, 폴리에테르설폰 (polyethersulfone) 또는 등가의, 10 kDa 및 100 kDa 사이의 분자 분획을 갖는, 한외여과 막 (ultrafiltration membrane)을 가로지르는 접선류 모드에서 수행된다. 본 발명에 따른 공정에서 유익하게, 투석 여과 단계 (a)는 또한 5% (중량/부피)를 초과하지 않는, 바람직하게는 2% 및 4% (중량/부피) 사이의 농도로 농축된 단백질 농도로 제공한다.
- [0039] 상기 용액 단계 (a)가 획득될 때, 이는, 예를 들어, 안정화제로서 솔비톨의 농도를 최대 농도 50% (중량/중량) 미만, 바람직하게는 30% 및 35중량% 사이로 첨가하여 안정화시킨다. 부가적으로 상기 pH는 기술분야에서 알려진 방식으로 산 (예를 들어, 염산 또는 아세트산) 또는 알칼리 (예를 들어, 수산화나트륨)의 첨가를 통해 pH 4.6 및 6.0 사이, 바람직하게는 pH 4.6 및 5.2로 조정된다.
- [0040] 본 발명에 따른 공정의 단계 (c)에서 상기 열처리 또는 용액의 가열은 또한 저온살균으로 알려진 특별한 과정이고, 55°C 및 63°C 사이의 온도에서, 1 및 24 시간 사이의 시간 동안 수행된다. 상기 용액이 상술된 범위 이내의 특정한 온도 및 특정한 시간동안 열처리 될 수 있지만, 열처리는 바람직하게는 60 $\pm$ 1°C의 온도에서, 10-11 시간 동안 수행된다. 어떤 경우라도 고분자량 중합체/응집체의 3%를 초과하여 발생되어서는 안되며, 바람직하

게는 1% 및 2% 사이이다.

- [0041] 마찬가지로 기술분야에서 (실시 예 3 참조)에서 기술된 바와 같이 다른 기질 (S-2302, S-2288 및 S-2238)에 대해 발색기 (chromogenically)로 측정된, 응혈촉진 인자, 예를 들어, XI/XI 인자 또는 다른 단백질분해효소 (proteases)의 가능한 존재 때문에 단백질 분해 활성도 (proteolytic activity)는 이것의 개시 함량과 비교하여 적어도 5 배 감소된다.
- [0042] 그 다음, 상기 용액은 바람직하게는 18°C-30°C 사이에서 냉각되고, 바람직하게는 주사용 물 또는 좀더 바람직하게는  $\leq 20$  mM 농도인 상용성 염 (예를 들어, 아세트산 나트륨, 인산, 구연산 또는 이와 유사한)을 함유하는 완충 용액의 적어도 33 중량%로 희석된다. 희석되면, 용액은  $\geq 5$  중량%의 술비톨 농도, 및  $\geq 5$  mg/ml의 단백질 농도를 함유한다.
- [0043] 고형 또는 농축된 용액, 예를 들어 3 M (mol/litre)로, 전체적으로 이온화가능한 상용성 염, 바람직하게는 염화나트륨은 0.20 M (mol/litre) 및 0.50 M (mol/litre) 사이, 바람직하게는 0.25 M (mol/litre) 및 0.40 M (mol/litre) 사이의 염화나트륨 용액을 얻을 때까지 용액에 첨가된다. 만약 필요하다면 상기 pH는 바람직하게는 묽은 염산 또는 아세트산 및/또는 염화나트륨을 첨가하여 4.2 및 5.5 사이, 바람직하게는 4.5 및 5.0 사이로 다시 조정될 수 있다.
- [0044] 상술한 방식으로 조절된, 즉, 희석 후에, 염 농도 및 pH의 조정되어 최대 5%의 이량체를 함유하는 상기 용액은, 폴리메타아크릴레이트 또는 폴리스티렌의 단단한 입자를 포함, 바람직하게는 20 - 100  $\mu$ m 사이의 폴리스티렌, 폴리비닐 벤젠의 입자의 지지체 또는 매트릭스를 포함하는 합성의 불용성 및 실질적으로 비압축성 관류 매트릭스 (incompressible perfusion matrix)에 공유결합된 적어도 하나의 양이온 설포기 (설포닐, 설포닉 또는 설포 프로필: S, HS, SP기)을 갖는 강한 양이온 교환 관류 수지 (cation exchange perfusion resin)를 함유하는 크로마토그래피 컬럼안으로 주입된다. 상기 수지는 바람직하게는 수지의 높이가 약 5 - 20 cm 사이를 차지하며, 패키징을 위해 적절한 직경의 원통형 축 유동 컬럼 (cylindrical axial flow column), 또는 바람직하게는 10 - 15 cm 사이의 통로를 갖는 방사류 컬럼 (radial flow column)에 채워질 수 있다. 두 경우 모두에 있어서, 적어도 1 리터 및 바람직하게는 1 및 10 리터 사이의 수지는 100 및 1000 mg 사이의 IgG/젤의 ml의 로딩에 상당하는, 정제된 IgG의 각 kg(건조중량 기준)에 대해 사용된다. 바람직하게는 상기 사용된 컬럼에 채워진 수지의 양은 (200 - 500 mg의 IgG/젤의 ml의 로딩에 상당하는) IgG의 kg당 2 및 5 사이이다. 상기 생성물을 주입하기 전에 상기 컬럼은 바람직하게는 대략 5 및 50 mM (millimolar), 좀더 바람직하게는 10 mM (millimol/litre)의 아세트산 나트륨, 및 상기 생성물의 농도와 거의 같거나 등가인 염화나트륨 농도 (만약 그것이 상기 생성물에 첨가된 선택 염인 경우)를 함유하는 완충 용액으로 평형을 맞춘다. 바람직한 주입 흐름은 50 컬럼 부피/시간을 넘지않고, 좀더 바람직하게는 5-30 컬럼 부피/시간, 바람직한 온도는 18°C - 30°C이다. IgG 단량체/이량체는 상기 유출물 (effluent) (흡착은 단량체/이량체의 <10%이다)에서 회수될 상기 총 단량체 더하여 적용된 이량체의 90 % 이상으로, 상기 컬럼을 자유롭게 통과하고, 바람직하게는  $\geq 93\%$ 의 회수율은 적절한 부피까지 풀 (pool)에서 회수될 유출물에서 달성된다.
- [0045] 동시에 응집체/폴리머는 열처리에서 유래하는 물질 중의 초기 함량의 1/5을 초과하는 저감, 바람직하게는  $\geq 95\%$  ( $\geq 20$  배) 감소에 상당하는, 응집체/폴리머의 초기 함량의 85% 이상의 양까지 수지에 의해 포착되고, 0.3% 이하의 폴리머, 바람직하게는 0.1% 이하 또는 0.06% 이하가 컬럼 유출액 풀 중에서 발견된다(미흡착). 유사하게, 상기 컬럼에서 로딩을 적절하게 증가시키고, 후-세척을 적용, 예를 들어, 상기 컬럼을 평형화하기 위해 사용된 동일 또는 등가의 용액의 적어도 두 배의 컬럼 부피로, 후-세척을 적용하여, 단량체/이량체 회수율은 좀더 바람직하게  $\geq 95\%$ 까지 증가될 수 있다. 따라서  $\geq 95\%$ 의 회수율은, 초기 로딩 또는 약한 이온 강도에서 사용된 조건으로 적절하게 희석 및 조정된 동일한 컬럼안으로 재발생 분획에 재주입하여, 달성될 수 있다. 이미 나타낸 바와 같이, 감소 구매에 의한 주입은 또한 IgG 단량체/이량체의 회수율을 촉진하고, 당업자에게는 유사한 공정을 사용하여 또는 이런 방식으로  $\geq 95\%$ 의 생성물 회수율을 쉽게 달성할 수 있다. 이렇게 하기 위해, 로딩은, 상기 로딩 부피가 완성될 때까지, 상기 이온 강도가 감소함에 따라 수지의 용량이 점진적으로 증가하는, 적용된 제1 부피에서 초-흡착 현상을 최소화하기 위하여 pH에 따른 최대 염 농도로 시작된다. 예를 들어, 로딩의 시작에서 선택된 생성물의 염 농도와 이의 종료와 비교하여, 농도 사이에 15% 까지의 감소 구매는 바람직하게는 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 방법에서 선택적으로, 상기 용액의 열처리를 보완하는 하나이상의 바이러스성 불활성/제거 처리를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 공정에서 사용될 수 있는 바이러스성 불활성 처리 가운데, 산성 pH (예를 들어, 펩신, Pluronic, Triton, Tween 및 이와 유사한 것과 같은 비-이온성 계면활성제의 존재 또는 부재에서

4-24 시간 동안  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 pH 3.8 - 4.2로)에서 배양되고; 알칼리 인산 유기 용매 (0.3% 트리-n-부틸 인산 또는 TNBP)로 처리되며; 계면활성제 (1% Triton X-100 또는 Triton X-45) (Neurath et al. 특허 US-514375호), 바람직하게는 pH 4.2 - 6.0 및  $4 - 30^\circ\text{C}$  온도에서 IgG 용액을 조정하여, 1-12 시간 동안 배양하고, 좀더 바람직하게는 약 6 시간 동안  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 배양하는 계면활성제; 및 카세트 (cassette) 또는 샌드위치 (sandwich) (평평한 표면), 카트리지 (접힌 (folded), 시트 (sheet), 디스크 (disks)) 또는 바람직하게는 기공 크기  $\leq 50$  nm를 통해, 대략 10-50 nm 사이 및 바람직하게는 약 15-35 nm 사이 및 바람직하게는  $20 \pm 2$  nm 기공 크기인, 중공섬유 (hollow fibre)의 형태에서, 접선 (tangential) 또는 말단 (terminal) 흐름을 통해, 말단 나노여과를 갖는, 바이러스성 보유 막 나노여과 (재발생된 셀룰로우스, 폴리에테르설폰, 폴리비닐리덴 불화물)이다. 이런 불활성/제거 단계는 나노여과를 사용한 경우를 제외하고, 열처리 단계의 전 또는 후에 수행될 수 있고, 바람직하게는 열처리 전에 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 공정의 단계 (d)가 완료된 후, 상기 얻어진 용액은 주사용 물 또는 예를 들어 pH 4.0-5.5에서  $\leq 5$  mM의 아세트산을 함유, 및 최종 제제에 대한 선택적으로 안정제 또는 부형제를 함유할 수 있는 낮은 이온 강도의 바람직한 완충 용액으로 투석 여과된다. 상기 최종 투석 여과는 분자 분획 바람직하게는 10 kDa 및 100 kDa 사이의 분자 분획, 좀더 바람직하게는 30 kDa 및 50 kDa 사이의 분자 분획을 사용하여, 등가의 또는 폴리에테르설폰의 한외여과 막을 통하여 접선류에 의해 수행된다. 적절한 수의 투석 여과 부피가 상기 염 농도, 바람직하게는  $\leq 2$  mS/cm의 전도성을 감소시킨 후, 단백질은 바람직하게는 명목상 농도의 5%, 10%, 16% 또는 20%, 또는 대략 5% 및 22% (w/w)사이의 어떤 다른 중간 농도에서 농축된다. 상기 용액은 바람직하게는 폴리알코올 (폴리올) 또는 아미노산의 첨가를 통해 안정화된다. 어떤 경우에 있어서, 상기 최종 용액의 몰랄 삼투압 농도는  $\geq 240$  mOsm/kg일 수 있고 거의 등장 삼투압일 수 있다. 바람직하게는 pH는  $5.2 \pm 0.6$ 로 조정되고, 만약 필요하다면 묽은 산 또는 알칼리로 재조정하여, 4.6 및 5.8 사이에 놓이도록 검수된다.

[0048] 상기 조정된 용액은 기술분야에서 알려진 방식으로  $0.2\mu\text{m}$  기공 크기의 무수막(absolute membrane)을 통해 멸균 여과된다. 상기 얻어진 액상 용액은 적절한 컨테이너안에서 무균상태로 계량하고, 바람직하게는 각각 개별적인 계량된 단위에서 불안정성 또는 오염의 어떤 징후를 관찰하기 위하여,  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 14일 미만으로 배양 (격리소 (quarantine)된다. 상기 담겨진 생성물은 격리소 (대기 온도  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ) 또는 찬 챔버 ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ )에 대한 동일한 조건하에서 저장된다. 본 발명에 따른 공정에 의해 얻어진 생성물은 이의 물리적 특성 (외관, 색, 혼탁도, 침전물, 입자 또는 섬유) 또는 예를 들어 유럽 약전에 따른 분석적 파라미터의 세부목록 (고분자량 응집체, 분획, 항보체 활성, 또는 ACA, 프리칼리크레인 활성화자 (prekallikrein activator) 또는 PKA, IgG의 서브클래스, 등)에서 어떤 분해 징후가 없이  $2-30^\circ\text{C}$ 의 온도에서 적어도 1년 동안 안정하게 (필수적으로 불변) 유지한다.

[0049] 이하 본 발명은 하기 실시 예를 참조하여 더욱 상세히 기술된다. 그러나 이러한 실시 예가 본 발명의 기술적 범주를 제한하는 것은 아니다.

[0050] 실시 예

[0051] 실시 예 1

[0052] 분획(fractionation)을 위해 적절한 냉동 인간 혈장의 혼합물로 출발하여, 0 및  $4^\circ\text{C}$  사이의 온도에서 동결 침전된다. 상기 동결 침전물은 동일한 동결 침전 온도에서 연속 유동 원심분리 (Westfalia centrifuge)에 의해 분리된다. 상층액은 Fr-II+III이 획득할 때까지 냉각 에탄올을 사용하여 Cohn 분획 방법 6 (상기 Cohn et al.)에 따라 가공 처리된다. 획득한 페이스트 (paste) 또는 침전물 (Fr-II+III)은 압축 여과 (press filtration)에 의해 분리되고  $\leq 20^\circ\text{C}$ 에서 냉동된다. 그 다음, Fr-II+III은 Fr-II가 획득될 때까지 Cohn-Oncley 분획 방법 9 (상기 Oncley, J. et al.)에 의해 실시된다. 상기 획득한 Fr-II는  $\leq 20^\circ\text{C}$ 에 저장된다.

[0053] 상기 Fr-II는 글리신 및 염화나트륨의 이온 전해질 용액에서 현탁되고, 대략 중성 pH로 조정된다. 상기 용액은 무기 흡착제로 처리되고, 원심분리 (RINA 원심분리기)에 의해 분리되며, 그 다음  $\leq 0.5\mu\text{m}$ 의 기공 깊이의 여과를 통해 정화된다.

[0054] 상기 여과물은 0.5 M HCl을 사용하여 5.5 및 6.0 사이의 pH에 조정되고, 명목상의 분자 컷 오프(nominal molecular cut-off) 10 kDa를 갖는 폴리설폰 막을 통해 한외여과된다. 먼저, 부피는 먼저 감소되고, 그 다음 투석 여과는  $2-8^\circ\text{C}$ 에서 주사용 물로 일정한 부피에서 시작된다. 이것이 완료된 후, 상기 한외여과 장비는 후-세척되고, 상기 용액은 (280 nm에서) 단백질의  $60 \pm 5$  AU의 광학 밀도로 조정된다. 고형 솔비틀은 상기 존재 용액의 각 kg당 0.5 kg의 양으로 첨가되고, 용해한 후 상기 용액의 pH는 0.5 M HCl을 사용하여  $5.5 \pm 0.5$ 로 조

정된다.

[0055] 상기 용액의 열처리는 상기 생성물이 60 및 61℃ 사이로 상승되고, 10-11시간동안 유지되는 이러한 방식으로 자켓을 통해 유체를 가열하여 재순환하는 항온 (thermostatic) 컨테이너에서 수행된다. 상기 용액은 그 다음 2-8℃로 냉각된다.

[0056] 3개의 별개 로트(separate lots)의 평균에 대해 얻어진 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

상기 공정에서의 단계	총 단백질 (%) (O.D.280nm)	순도 (%IgG 전기영동)	중합체 (%)	에탄올 (% v/v)	전도성 (mS/cm)
현탁액 Fr-II	6	≥97	~0.2	3.3 (3.2-3.4)	~10
한외여과된 용액	4	≥97	0.21 (0.19-0.23)	≤0.1	≤0.5
열처리된 용액 (10시간, 60-61℃)	3	≥97	1.58 (1.30-1.86)	≥0.1	≤0.5

[0058] 상기 결과는 Fr-II+III (전기영동에 의해 FrII 현탁액 ≥ 97%)의 사전 정제 및 열 처리 동안 응집체에서 변성제 (에탄올) 감소효과를 보여주며, 폴리머는 불과 1.58%이며, 합성 양이온성 수지에 의한 후속 흡착을 가능하게 한다.

[0059] 실시 예 2

[0060] 인간 혈장의 풀 (pool)로 시작하여, 상기 공정은 Fr-II+III이 획득되고 (시험 a) Fr-II (시험 b)에 계속될 때까지 실시 예 1에 기술된 바와 같이 동일하다. 열처리 동안에, 중합에 대한 정제의 효과뿐만 아니라, 변성제의 존재를 확립하기 한 절차는 하기와 같다:

[0061] a) Fr-II+III은 중량비 1 : 3.5에서 2 - 8℃로 주사용 물에서 현탁되고, 균질화된 현탁액은 획득된 후에, 상기 pH는 0.5 M HCl로 5.25 ± 0.25로 상승된다. 그 다음 이것은 디칸터 (decanter) (원심분리력 200 g - 1000 g 사이)에서 원심분리하여 정제된 현탁액을 얻는다.

[0062] b) Fr-II는 정화된 용액이 침층여과를 통해 획득될 때까지 실시 예 1과 같이 실시된다.

[0063] 상기 용액의 각각은 출발 상층액의 kg당 0.5 kg의 양으로 고품 솔비톨의 첨가를 통해 안정화된다. 상기 솔비톨이 용해된 후에 상기 pH는 만약 필요하다면 5.5 ± 0.5로 조정된다. 각 용액은 60 - 61℃로 10 - 11 시간동안 가열된다. 상기 용액은 그 다음 2 - 8℃로 냉각된다.

[0064] 실시 예 1과 비교하여 시험 a) 및 b)에서 저온살균된 생성물로부터의 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

시험 또는 공정	총 단백질 (%) (O.D.280nm)	IgG 순도 (%)	중합체(%)	에탄올(% v/v)	전도성 (mS/cm)
시험 a)	4	75	15	2.5	2
시험 b)	4	≥97	5.03	2.5	≤0.5
실시 예 1 공정	4	≥97	1.58	≤0.1	≤0.5

[0066] 시험 a) 및 b)의 결과는 출발 IgG의 순도의 효과 및 값 ≥97%를 달성할 필요를 입증한다. 한편, 실시 예 1의 공정과 시험 b)를 비교하여, 에탄올 분획로부터 유래한 잔여 에탄올의 효과 및 이를 제거하기 위한 필요는 명백하다. 따라서 실시 예 1의 조건만이 본 발명에 따른 공정을 위해 허용가능하다는 것이 밝혀졌다.

[0067] 실시 예 3

[0068] 상기 혈장은 Fr-II+III 관한 한 실시 예 1과 같은 방법으로 분획되고, 상기 물질은 충분히 순수한 생성물이 획득될 때까지 PEG 또는 음이온 교환 수지로 정제된다.



[0069] 특허 EP 1225180호의 상세한 설명에서 기술된 바와 같은 조건에서 동일한 공정은 Fr-II+III의 초기 정제를 위해 적용된다. 좀더 상세하게는, 상기 실시 예에서 Fr-II+III는 모든 IgG가 효과적으로 용해될 때까지, 솔비톨, 인산 2 나트륨, 및 아세트산을 함유한 수성 용액에서 현탁된다. 상기 주요 수반되는 단백질은 4%까지의 PEG의 첨가에 의해 침전된다. 그 다음, 상기 무기 흡수제 및 여과 공보조제 (filtration coadjuvant)는 첨가된다. 압축 여과 (셀룰로오스 압축 여과기)에 의해 침전물을 분리하기 전에 상기 pH는 5.0±0.5로 재조정된다. 상기 페이스트는 분리되고 여과액 풀은 수집된다. 주입은 상기 컬럼으로 도입하기 전에 pH의 조정을 수반하고, ≤ 0.5μm까지의 구배 여과를 정화하는, DEAE-Sepharose® (Amersham Biosciences, 스웨덴)형 음이온 교환 수지를 함유하는 크로마토그래피 컬럼으로 도입된다. 모든 상기 유출물은 수집된 정제된 IgG를 함유하는 생성물을 로딩하는 동안 획득된다.

[0070] 상기 유출물은 0.5 M HCl로 pH 4.4±0.2로 조정되고, 명목상 분자 컷오프 100 kDa를 갖는 폴리설폰 막을 통해 한외여과된다. 초기에, 상기 부피는 단백질의 2% 농도를 얻기 위해 약 4배 감소되고, 그 다음 0.5 M NaOH로 pH 4.2 ± 0.2까지 조정된 4 mM 아세트산 (밀리몰/리터) 및 5% 솔비톨로 주사용 물의 4배 부피를 갖는 일정한 부피에서 투석 여과는 2-8℃에서 시작된다. 이것이 완료된 후, 상기 한외여과 장비는 후-세척되고, 단백질의 55 ± 5 AU의 광학 밀도 (280 nm에서)의 용액을 생산한다. 그 다음 0.5 M HCl은 37 ± 1℃로 4 시간 동안 배양을 수반하는 pH 4.0 ± 0.1까지 첨가된다.

[0071] 고형 솔비톨은 상기 용액 (33% 중량/중량)의 kg당 0.43 kg의 양으로 첨가되고, 이것이 용해된 후에 상기 용액의 pH는 0.5 M NaOH로 4.9 ± 0.1까지 조정된다.

[0072] 열처리는 상기 생성물이 60 및 61℃ 사이로 상승하기 위하여 자켓을 통해 유체를 가열하여 재순환하는 항온형 (thermostatic) 용기에서 수행되고 10-11시간동안 거기에 유지된다. 그 다음 상기 용액은 2 - 8℃로 냉각된다. 상기 공정을 모니터링하기 위해 조성물을 분석한 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3

공정에서 단계	총 단백질 (%)	IgG 순도 (%)	중합체 (%)	에탄올 (% v/v)	PEG (%)	전도성 (mS/cm)
Fr-II+III 현탁액	n.d	70	12	1	0	1.5
정제된 컬럼 유출물 용액	n.d	≥98	≤0.06	0.8	4	1.2
한외여과된 용액	4.0	≥98	≤0.06	≤0.1	0.8	≤0.5
열처리된 용액 (10시간, 60℃)	2.8	98	1.5	≤0.1	0.5	≤0.5

[0074] n.d.: 측정되지 않음

[0075] 표 3에서 결과는 0.8%의 잔여 PEG 함량이 열처리 (중합체의 1.5%) 동안 중합의 정도에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 유사하게 이러한 중합은, 상기 달성된 순도가 동일한 절차 (IgG ≥97%)인 것을 전제로, 에탄올 단독 또는 에탄올 + PEG + 음이온 크로마토그래피 (실시 예 1 및 2 참조)를 사용한 경우, 이전의 정제 방법에 의해 영향을 받지 않았다.

[0076] 마찬가지로, 다른 발색 기질상에 분석적 측정은 불활성 단백질 분해 효소, 주로 응혈원 (procoagulants)을 비활성화하는 능력을 가지는 단계를 평가하기 위하여, 본 실시 예 3에서 전술한 바와 같은 동일한 방법으로 실시된 예비 스케일상에 다른 개별적 실험으로 수행된다. 기질 S-2302, S-2288 및 S-2238 (프로트롬빈 복합체 (prothrombin complex), 트롬빈 (thrombin), 플라스미노젠/플라스민, FXI/FXIa, FXII, PKA, 등에 대한 응고 인자 (coagulation factors)에 대해 특이적)은 상기 적용된 단백질 농도 (g/ml)에 관련하여 분당 광학적 밀도 (O.D.) 흡착 단위에서 상기 발색 반응의 동력학의 구배를 계산하는, 첨단기술에 따라 기술된 기술에 기초하여 사용된다. 저온살균 전 및 후의 단계에서의 비율 (O.D./min)/(g/ml)는 표 4에 나타내었다.

표 4

공정에서의 단계	단백질 분해 활성도 (O.D./min)/(g/ml)		
	S-2302	S-2208	S-2238

정제된 컬럼 유출물 용액	1.69	2.03	0.23
한외여과된 용액	0.87	1.1	0.14
열처리된 용액 (10시간, 60℃)	0.12	0.14	0.017

[0078] 저온 살균 공정의 특별한 조건하에서 단백질 분해 활성도 (주로 응고 촉진 인자)가 세 가지 다른 발색 기질을 사용하여 얻은 값에 따르면, 초기 함량 (한외여과된 용액)과 비교하여 5배 이상 감소될 수 있다는 것을 표 4에 결과로부터 알 수 있다.

[0079] 실시 예 4

[0080] 각각에 대해 저온살균된 용액이 얻어질 때까지 실시 예 3에서와 같은 방법으로 실시된, 3개의 다른 생산 로트가 이용가능하다. 각 용액은 0.4 M (몰/리터)의 최종 농도로 상기 생성물을 생성하기 위해 요구된 NaCl의 양을 첨가하여, 광학 밀도 (280 nm에서) 10 AU 및 약 8 중량%의 술비톨 농도를 달성하기 위해 약 20-25℃에서 10 mM (밀리몰/리터) 아세트산 나트륨 용액으로 4회 희석된다. 상기 용액은 묽은 HCl (0.1 M - 0.5 M)의 첨가를 통해 pH 4.5까지 조정된다.

[0081] 상기 용액은 약 8 mL (높이 10 cm x 0.8 cm<sup>2</sup> 단면) 부피의, 강한 폴리스티렌 양이온 크로마토그래피 컬럼 (POROS HS<sup>®</sup> 50μm, Applied Biosystems, United States)으로 주입된다. 상기 컬럼은 로딩될 생성물의 그것과 동일한 pH 및 NaCl 농도에서 아세트산 나트륨 용액의 10 mM 완충 용액의 약 10 컬럼 부피로 평형화된다. 상기 생성물은 주입의 시작으로부터 수집될 컬럼의 모든 유출물로, 약 20 컬럼 부피/시간의 흐름에서 주입된다. 약 IgG의 155 mg/겔의 mL의 로딩에 상응하는 16 컬럼 부피의 고정된 부피에서 상기 유출물의 샘플은 얻어지고, IgG (단량체/이량체)의 % 회수율 및 중합체에서 % 감소를 계산하기 위하여, O.D. (280 nm)에 의해 측정될 단백질 및 HPLC에 의한 중합체 함량은 달성된다. 표 5에 얻어진 결과를 나타내었다.

표 5

공정	O.D. (280 nm) 희석된 용액 (AU)	단백질 회수율 (%)	개시 중합체 (%)	최종 중합체 (%)	중합체에서 감소 (%)
개별적 실험 A	10	n.d.	1.90	0.11	94
개별적 실험 B	10	n.d.	1.82	0.09	95
개별적 실험 C	10	96	2.51	0.15	94

[0083] n.d.: 측정되지 않음

[0084] 이전의 결과와 같이, 94% 및 95% 사이의 중합체 함량에서 매우 현저하고 지속적인 감소는 얻어지고, 1.8% 및 2.5% 사이의 초기 중합체 함량에 대해 0.09 및 0.15 사이의 최종 함량이 얻어진다. 반면, 100 mg IgG/겔의 mL를 초과하는 로딩 용량으로 함께, 96%의 IgG 회수 (단량체/이량체) 및 2 시간 미만의 공정 시간 (평형화 및 로딩)에 주의하여야 한다.

[0085] 실시 예 5

[0086] 사용된 공정은 실시 예 4와 같지만, 실시 예 4에서 설정된 조건하에서 다른 주입 부피로 로딩 용량이 조사된다. 다르게 적용된 부피에 대한 유출물의 샘플은 다른 로딩 값 (IgG의 mg/겔의 mL)에 대해 달성된 IgG (단량체/이량체)의 % 회수율 및 중합체에서 % 감소를 계산하기 위해 O.D. (280 nm)에 의한 단백질 및 HPLC에 의한 중합체 함량을 측정하여 얻는다. 상기 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

적용된 컬럼 부피(CV)	주입된 로딩 (mg IgG/mL gel)	중합체 (유출물)(%)	중합체에서 감소 (%)	단백질 회수율(IgG) (%)
초기 로딩 용액	0	2.51	0	100
2	14	≤0.06	≥98	87
16	115	0.15	94	95

32	230	0.19	92	95
50	360	0.25	90	97

[0088] 상기 결과는 겔 1ml 당 IgG 360 mg의 로딩 값이 1 시간당 최대 20 컬럼 체적의 통상 유량 조건 하에서 최대의 IgG 회수율을 수반하여 달성할 수 있고, 지속적인 양식으로 최대 50 적용 컬럼 체적까지 폴리머를 0.3%의 한도 미만으로 감소시키는 능력을 유지하는 것이 매우 유의하게 실증되었다. 이용한 로딩을 위한 공정 소요시간은 3 시간을 초과하지 않았다.

[0089] 실시 예 6

[0090] 설정된 pH 4.5에서 NaCl 농도의 작동범위를 알고, 최대 IgG 회수율에 의해 중합체 제거를 최적화하기 위하여, 본 공정은 실시 예 4에서와 같지만, 0.35 및 0.425 M 사이의 다른 NaCl 농도는 단백질의 % 회수율 및 중합체 감소를 계산하기 위해, HPLC에 의해 중합체 및 O.D. (280 nm)에 의한 단백질을 결정하는, 2 CV, 25 CV 및 50 CV에서 상기 컬럼 유출물을 샘플링하여, 연구된다. 상기 얻어진 결과는 표 7에 나타내었다.

표 7

적용된 컬럼 부피 (CV)	주입된 로딩 (mg IgG/ml gel)	다른 NaCl 농도에서 유출물 중합체 (%)			
		0.425 M	0.40 M	0.375 M (n=2)	0.35 M
초기 로딩 용액	0	1.88	2.12	2.13-2.14	1.99
2	14	0.10	n.d.	≤0.06	≤0.06
25	180	0.27	0.11	≤0.06	≤0.06
50	360	0.33	0.31	≤0.06	≤0.06
50 CV에서 로딩 유출물 풀	360	n.d.	n.d.	≤0.06	≤0.06

[0092] n.d.: 측정되지 않음

[0093] 표 8은 상기 최종 최대 적용된 로딩 값 (50 CV)에 대한 상기 유출물에서 IgG 회수율 및 중합체 감소의 결과를 나타낸다.

표 8

pH 4.5에서 NaCl 농도	IgG 회수율 (%)	중합체에서 감소
0.425	95.2	n.d.
0.40	93.0	n.d.
0.375 (n=2)	94.2-93.2	≥97
0.35	90.8	≥97

[0095] n.d.: 측정되지 않음

[0096] 상기 결과는 최선의 NaCl 농도 조건하에서 상기 중합체의 감소가 50 CV (또는 360 mg IgG/겔의 ml)까지 적용된 로딩을 증가시킴으로써, 감소되지 않음을 보여준다. 유사하게, 0.40 M 내지 0.35 M 범위의 NaCl이 최소 중합체 함량 (≤0.06% - 0.31%) 및 90.8% 및 94.2% 사이의 IgG 회수율 (단량체/이량체)을 갖는 최대 로딩 용량을 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0097] 상기 최선의 결과는 pH 4.5로, 0.375 M의 NaCl 농도에서, O.D. (280 nm)에 의한 10 AU의 농도 및 20 CV/h의 주입 흐름으로 얻는다. 잔여 중합체는 93.2% - 94.2%의 IgG 회수율을 갖는 50 CV (360 mg IgG/ml 겔)에서 ≤0.06% (이중 시험)라는 것을 나타낸다. 상기 공정 시간은 3 시간을 초과하지 않는다.

[0098] 실시 예 7

[0099] 0.35 M의 안정한 NaCl 농도를 사용할 수 있는 pH 범위를 알아, IgG 회수율을 최대화 함으로써 중합체 제거를 최적화하기 위하여, 실시 예 4에서와 같은 공정은 사용되고, 4.5 및 5.0 사이의 pH 범위에서 시험되고, 상기 컬럼 유출물의 샘플은 O.D. (280 nm)에 의한 단백질 및 HPLC에 의한 중합체를 측정하기 위해 2 CV, 21 -25 CV 및 50



CV의 말단에서 얻어진다. 상기 얻어진 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

사용된 컬럼 부피(CV)	주입된 로딩 (mg IgG/ml 겔)	다른 pH값에서 중합체 (%) 유출물			
		pH 4.96	pH 4.88	pH 4.76	pH 4.50
초기 로딩 용액	0	2.25	1.72	1.95	1.99
2	14	0.45	0.20	0.17	≤0.06
21-25	151-180	1.06	0.59	0.24	≤0.06
50	360	1.25	0.66	n.d.	≤0.06
50 CV까지 총 로딩 유출물	360	1.13	0.63	n.d.	≤0.06

n.d.: 측정되지 않음.

표 10은 상기 최종 최대 적용된 로딩 값 (50 CV)에서 상기 유출물에서 중합체 감소, 및 상기 최대 로딩 (대략 25 CV)의 절반에서 유출물에서 중합체 감소, 및 IgG 회수율을 계산한 결과를 나타낸다.

표 10

pH	IgG 회수율(50CV) (%)	중합체 감소(50CV) (%)	중합체 감소(25CV) (%)
4.96	96.8	49.8	52.9
4.88	96.6	63.3	65.7
4.76	94.3(*)	n.d.	87.7
4.5	90.8	≥97	≥97

(\*) 21 CV에서 유출물에서 측정됨; n.d.: 측정되지 않음.

상기 결과는 최소 IgG 손실로 유효한 중합체 감소에 대해서, pH와 NaCl 사이의 강한 의존성을 입증한다. 0.35 M의 NaCl 농도에서 시험된 범위내의 가장 적절한 pH는 대략 4.76 및 4.50 사이라는 것이 판명되어, 그 결과, 상기 잔여 중합체는 0.06% - 0.24% (21-50 CV를 적용)이고, IgG 회수율은 90.8% 및 94.3% 사이였다. 상기 공정 시간은 2 내지 4 시간 사이이다.

실시 예 8

본 공정은 실시 예 6과 동일하지만, 4.85 및 4.88의 pH를 설정함으로써, 0.1 M 및 0.4 M사이의 최선의 NaCl 농도 조건이 조사되었다. 상기 결과는 표 11에 나타내었다.

표 11

컬럼 부피 (CV)	주입된 로딩 (mg IgG/ml gel)	다른 NaCl 농도에서 유출물						
		0.4M (n=2)	0.375M	0.35M	0.325M	0.3M (n=3)	0.275M	0.1M
초기 로딩용액	0	1.55 2.19	1.71	1.72	1.28	1.94 1.33 1.57	2.11	1.51
2	14	0.52 0.56	0.25	0.20	0.06	≤0.06 ≤0.06 ≤0.06	≤0.06	≤0.06
25	180	0.98 1.18	0.84	0.59	0.25	0.10 0.13 0.12	≤0.06	≤0.06
50	360	1.23 1.34	0.94	0.66	0.25	0.13 0.16 0.15	≤0.06	≤0.06

50CV에서로 딩 용출물	360	n.d.	0.87	0.63	0.17	≤0.06 n.d. 0.13	≤0.06	≤0.06
------------------	-----	------	------	------	------	-----------------------	-------	-------

[0109] n.d.: 측정되지 않음

[0110] 표 12는 상기 최종 최대 적용된 로딩 값 (50 CV)에서 유출물에서 중합체 감소 및 IgG 회수율을 계산한 결과를 나타낸다.

표 12

[0111]

pH 4.85-4.88에서 NaCl 농도(몰/리터)	(%) IgG 회수율	(%) 중합체 감소
0.4M	95-97	n.d.
0.375M	96.3	49.1
0.35M	96.6	63.4
0.325M	94.9	86.7
0.3M	93.7	≥97
	93.6	n.d.
	93.7	91.7
0.1M	76.0	≥96

[0112] n.d.: 측정되지 않음.

[0113] 상기 결과는 상기 공정이 92.5% 및 94.9% 사이의 IgG 회수율 (단량체/이량체) 및 최소 잔여 중합체 함량 (≤ 0.06%-0.17%)으로, 최대 로딩 용량 (50 CV, 또는 360 mg IgG/ml 겔)을 위해 NaCl의 0.325 M 내지 0.275 M의 범위 이내로 pH 4.85-4.88로 실행가능하다는 것을 나타낸다. 상기 최선의 결과는 93.7%의 회수율 및 상기 유출물에서 0.13%의 최대 잔여 중합체가 달성되는 0.3M의 NaCl 농도에서 얻어진다. 더 낮은 NaCl에서 0.1 M 중합체의 농도는 완전히 감소되지만, IgG 회수율은 90% 미만이다.

[0114] 실시 예 8 및 실시 예 6에서 결과를 비교하면, pH 및 NaCl 사이의 강한 의존성은 명백하고, 이들 파라미터는 최적 중합체 감소 및 IgG 회수 값을 달성하기 위해 적절한 범위 이내로 조정되어야만 한다. 상기 실시 예는 잔여 중합체 ≤0.3% 및 감소 ≥85%에 대해 원하는 결과, 및 IgG 회수율 (단량체/이량체) ≥90%은 0.275 M 내지 0.4 M의 NaCl 농도로 pH 4.5 및 pH 4.9 사이에서 얻어진다는 것을 입증한다.

[0115] 실시 예 9

[0116] 본 시험의 목적은 종래의 크로마토그래피 공정을 사용한 경우, POROS HS<sup>®</sup> 수지 (Applied Biosystems, United States)의 로딩 용량을 평가하는 것으로, 이는 본 발명의 이전 구체 예에서 얻어진 결과와 비교를 수반하는, 이후 용출을 위한 모든 IgG 흡착을 의미한다. 상기 종래의 크로마토그래피 공정은 다른 주입 흐름에서, 수지의 포화에 총 IgG 흡착을 위한 조건하에서 수행된다.

[0117] 저온 살균 용액으로 얻어지는 실시 예 3에서와 같은 방식으로 가공 처리된 개별적 실험 생산으로부터 출발하여, 상기 용액은 대략 8% (w/w)의 솔비톨로 광학 밀도 (280 nm에서)의 10 AU를 제공하기 위하여 약 20 - 25°C에서 10 mM(밀리몰/리터)의 아세트산 나트륨 용액의 4배로 희석된다. 상기 용액은 묽은 HCl (0.1 M 0.5 M)의 첨가를 통해 pH 4.5로 조정된다.

[0118] 주입은 약 4 ml 부피 (높이 4 cm 및 단면 1 cm<sup>2</sup>)의 강한 폴리스티렌 합성 수지 음이온 크로마토그래피 컬럼 (POROS HS<sup>®</sup> 50μm, Applied Biosystems, United States)에서 이루어진다. 상기 컬럼은 pH 4.5로 10 mM 아세트산 나트륨 완충 용액의 약 10 컬럼 부피로 평형화된다. 상기 생성물은 5 및 20 컬럼 부피/시간 사이의 다른 로딩 흐름에서 주입된다. 컬럼 유출물의 샘플은 상기 주입된 용액에서 대략 5%의 단백질 값의 동적 흐름 (dynamic flow) 조건하에서 최대 로딩 용량을 계산하기 위하여 초기 주입로부터 0.D. (280 nm)에 의해 단백질을 결정하는 다른 컬럼 부피까지 취한다. 얻어진 상기 결과는 표 13에 나타내었다.

표 13

주입 흐름 (CV/시간)	로딩 용량 (IgG의 mg/겔의 ml)
5	63
10	58
20	55

상기 결과로부터 종래의 크로마토그래피 공정에서 최적의 동적 흐름 조건하의 IgG의 총 흡착을 위해 사용된 상기 수지의 최대 용량이 수지의 ml당 약 60 mg IgG으로 확인될 수 있고, 5 - 20 CV/h의 연구된 상기 주입 흐름에 걸쳐 사실상 변화되지 않게 유지되는 것이 검토된다.

이러한 결과는 본 발명에 따른 공정 조건에 적용된 실시 예 6 및 8에서 얻어진 >360 mg IgG/겔의 ml보다 매우 차이 (약 6배 정도 낮음)라는 것이고, 이는 본 발명에 따른 공정의 생산성이 종래 기술에서 기술된 종래의 크로마토그래피의 그것보다 훨씬 우수하다는 것을 입증하는 것이다.

실시 예 10

본 실시 예에 있어서, 시험은 IgG (종래의 크로마토그래피)의 총 흡착을 갖는 완전한 크로마토그래피 순환 조건 (로딩, 세척 및 용출)하에서 크로마토그래피 해상도 (chromatographic resolution) (중합체 분리) 및 IgG 회수율을 측정하고, 본 발명에 따른 공정의 이전 실시 예에서 얻어진 결과와 비교하기 위해 설계되었다.

상기 절차는 실시 예 9와 동일하지만, 약 5 CV/h의 흐름으로 이것의 최대 용량 (약 50 mg IgG/겔의 ml)의 80%와 등가인 IgG 용액의 초기량이 컬럼으로 주입된다. 모든 생성물이 로딩된 후에 후-세척은 pH 4.5의 10 mM 아세트산 나트륨을 포함하는 평형화된 초기 용액과 동등한 완충 용액의 약 8 CV로 수행된다. 상기 IgG는 총 25 CV에서 pH 4.5로 0.5 M 글리신을 함유하는 0 내지 1M (몰/리터)의 NaCl 농도 구배를 적용하여 그 후에 용출된다. 상기 용출된 IgG는 다음의 단백질 분석 (O.D. 280 nm) 및 분자 분포 (HPLC)의 분석을 위해 분획으로 수집된다. 상기 결과는 표 14에 나타내었다.

표 14

분획	부피 (CV)	중합체 (%)	총 IgG 회수율 (%)
적용된 용액	14	2	100
로딩+후-세척 유출물	22	n.d.	n.d.
1 <sup>ST</sup> 유동성분획	16	≤0.06	64
2 <sup>ND</sup> 유동성 분획 (TAIL)	2.5	19	6
2 <sup>ND</sup> 피크	4	57	16
재발생	5	50	4

n.d.: 측정되지 않음.

상기 결과에 따르면, 50 mg IgG/겔의 ml 로딩에 대한 64% IgG (단량체/이량체)의 최대 회수율이 중합체 함량 ≤ 0.06%에 대해 얻어지고, IgG의 대부분은 테일 분획 및 2<sup>ND</sup> 용출 피크에서 발견될 회수되지 않은 중합체와 혼합된다는 것을 입증했다. 상기 회수율 값은 중합체의 만족스러운 제거 및 90% IgG 이상의 회수율이 입증된, 본 발명에 따른 공정을 적용한 이전 실시 예에서 얻어진 것과 비교할 수 없다.

실시 예 11

부가적인 시험은 로딩에서 IgG 농도의 효과를 알기 위해 사용될 수 있는 pH 제한 및 이온 강도 (NaCl)를 연구하기 위해 설계되었다.

다양한 시험은 실시 예 3에서와 동일한 방법으로 다른 개별적 실험을 실시하는 것에서 유래된 저온살균된 IgG으로 수행된다. 그럼에도 불구하고 대략 10 mM 아세트산 나트륨 용액을 사용하여, 시험중 하나는 4-배 희석 (O.D. 280 nm = 10 AU로)이 사용되고, 나머지는 1.5-2 배 희석 (O.D. 280 nm = 20-23 AU로)하며, 이들 중 각각

은 0.275 M 및 0.45 M 사이의 원하는 최종 농도에 달성하기 위해 NaCl이 첨가되고 각각 최종 pH 4.2 및 5.5로 조정된다. 이들 pH 조정은 묽은 아세트산을 사용한다. 상기 조정된 용액은 실시 예 4에서 기술된 바와 같이 독립적인 순환에서 POROS® HS 50 column (Applied Biosystems, United States)안으로 주입되지만, 이런경우에 있어서, 상기 시험에서 대략 150 및 750 mg IgG/겔의 mL 사이를 사용하여 수행된다.

[0131] 중합체 및 이량체 함량 (%)는 HPLC에 의해 측정되고, IgG 회수율 (%)은 다른 로딩 값에 대해 측정된다. 상기 얻어진 값은 표 15에 나타내었다.

표 15

pH	[NaCl] (M)	개시 O.D.280	용도 (CV)	로딩 (mg IgG / mL gel)	개시		최종 중합체 (%)	IgG 회수율 (%)	중합체 감소 (%)
					중합체 (%)	이량체 (%)			
4.2	0.45	10	32	230	2.45	≤1	≤0.06	91.0	≥98
5.0	0.275	23	20	330	2.61	N.D	≤0.06	n.d.	≥98
			35	580			0.07	92.6	97
4.85	0.275	20.6	10	147	1.76	2.5	≤0.06	92.5	≥96
			25	369			≤0.06	99.5	≥96
			40	590			0.12	97.2	93
			50	737			0.61	96.0	65
5.5	0.20	22.4	2	32	2.76	4.5	≥0.06	80.1	≥98
			25	403			0.38	96.9	86
			50	806			1.34	94.5	51

[0133] N.D.: 검출되지 않음

[0134] n.d.: 측정되지 않음

[0135] 3% 미만 및 증가의 초기 중합체 함량을 갖는 다른 저온살균된 개별적 실험을 기초로하여, 본 실시 예에서 노출된 제한 이내 (pH 4.2 - 5.5 및 NaCl 0.20 - 0.45 M)의 어떤 조정 값에 대해, ≤0.06% - 0.12% 사이의 값에서 선택적으로 중합체를 흡수하고, 93% 및 ≥98% 사이의 감소에 상당하며, 80% (pH 4.2 및 5.0 사이에서 달성된 91.0 - 99.5%)을 초과하는 IgG 회수율이 가능하다.

[0136] 유사하게, 상기 컬럼의 로딩 용량 및 효율은 달성될 580 - 590 mg IgG/겔의 mL의 로딩로, 14.7 - 16.5 mg IgG/mL에 등가인 23 AU의 280 nm O.D. 값으로 증가하는 생성물 용액에서 단백질 농도따라 감소되지 않는다. 그러나, pH 범위의 상부 말단 (pH 5.5)에서 상기 염 용액은 중합체에서 상당한 감소를 달성하기 위해서 적절히 감소 (0.45 M 내지 0.2 M)되어야 한다. 유사하게 403 mg IgG/겔의 mL이 사용된 경우 더 큰 중합체 함량이 오직 86%의 감소로 측정되기 때문에, 더 낮은 pH 값보다 더 작은 로딩 용량이 관측된다. 이러한 효과는 pH 4.2와 비교하여, pH의 비를 증가한, pH 5.5에서 존재하는 이량체 분자의 더 큰 양의 존재 때문이라고 할 수 있다.

[0137] 실시 예 12

[0138] 이전의 실시 예 6, 8, 및 11로부터, 실험식 (1)은 사용된 pH의 함수로서 최종 중합체 및 회수율에 대한 원하는 결과를 얻기 위하여 필요한 NaCl 농도를 더욱 정확하게 설정하기 위해 가능한 POROS®-HS 50 폴리스티렌 관류 수지 (polystyrene perfusion resin)에 대해 결정된다. 상기 실험식: (1)  $[NaCl] = 0.24 + (5.2 - pH)/5 = 1.28 - 0.2 \times pH$ 는 수지 연구를 위해 설정된 pH 범위 (pH 4.2 - 5.5)이내의 원하는 값을 제공한다. 본 실시 예에서의 데이터를 기초로 하여, 바람직하게 ≤0.1%의 최종 중합체 및 90%인 회수율에 대해서 다른 pH (식에 따라 계산된 값 및 관측된 값)에 요구된 상기 NaCl 농도는 표 16에 나타내었다.

표 16

pH	관찰된 값(M)	계산된 값(M)
4.20	0.45	0.44
4.50	0.375	0.38
4.85-4.88	0.300-0.275	0.31
4.96	0.275	0.29
5.20	n.d.	0.24

5.50	0.20	0.18
------	------	------

[0140] 표 16의 결과는 최대 pH값을 포함하는, 식에 따라 계산된 값 및 관측된 값 사이에 상응하는 우수한 선형 관계를 나타낸다.

[0141] 실시 예 13

[0142] 혈장은 (Cohn-Oncley 방법에 따른) 에탄올 분획에 의한 정제된 다가의 IgG 용액 (순도  $\geq 97\%$  IgG)을 얻기 위하여 실시 예 1과 동일한 방법으로 실시된다. 상기 얻어진 Fr-II은 60 AU로 10 kDa 막을 통한 투석 여과되고, 그 다음 33% d-솔비톨 (중량/중량) 존재하에서 pH  $5.5 \pm 0.5$ 로 저온살균 (10-11시간 동안 60-61°C)된다. 상기 저온 살균된 용액은 280 nm O.D.가 42.8 AU로부터 10.7 AU까지 변화되고, 0.1 M HCl을 사용하여 pH 4.85로 조정하면서, 용액의 리터당 0.275 몰의 최종 농도가 얻어질 때까지 NaCl을 첨가하기 위하여, pH 4.85에서 10 mM 아세트산 나트륨 용액으로 대략 4번 희석된다. HPLC에 의해 측정된 중합체의 비는 0.88%이다. 이 이후 즉시 약 20 CV/hour의 흐름으로 8.0 ml (단면  $0.8 \text{ cm}^2 \times$  높이 10 cm)의 부피 및 폴리스티렌 음이온 교환 수지 (50 $\mu$ m POROS-HS<sup>®</sup>)를 갖는 컬럼으로 주입된다. 상기 컬럼 유출물의 샘플은 HPLC에 의해 분자 분포 (고분자량 중합체) 및 얻어진 감소를 측정하여, 다른 적용된 로딩 부피 (CV) 및 최종 풀에서 얻어진다. 확인된 값은 표 17에 나타내었다.

표 17

로딩		중합체 (%)	중합체 감소 (%)
로딩 부피 (CV)	mg IgG/ml 겔		
2	15	$\leq 0.06$	$\geq 93$
25	192	$\leq 0.06$	$\geq 93$
50	385	$\leq 0.06$	$\geq 93$
풀	385	$\leq 0.06$	$\geq 93$

[0144] 상기 얻어진 결과는 최선의 흡착 공정 조건에서 고 주입 로딩 (385 mg의 IgG/수지의 ml)를 갖는 에탄올 분획에 의해 이전에 정제된 IgG의 저온살균에서 형성된 모든 중합체 ( $\leq 0.06\%$ 까지)를 보유하는 것이 가능한 것을 나타낸다.

[0145] 실시 예 14

[0146] 본 시험은 다른 정제 단계가 단일 단계에 혼입된 경우 상기 공정의 유용성을 결정하기 위하여 설계된다. 중합체 흡착이 용매-계면활성제로 처리된 이전의 선택적 단계 및 그 다음 이들 시약의 흡착과 조합될 수 있는지 어떤지를 결정하기 위한 것이다.

[0147] 이렇게 하기 위하여 Fr-II+III은 출발물질이고, 대량 저온살균된 용액을 얻기 위해 실시 예 3과 동일한 방법으로 실시된다. 상기 용액은 각각  $0.3 \pm 0.1\%$  및  $1.0 \pm 0.3\%$ 의 최종 농도를 달성하기 위해 첨가된 트리-n-부틸 포스페이트 (tri-n-butyl phosphate) 및 Triton X-100을 포함하는 용매-계면활성제 용액의 농축된 용액 (x 10배) 및 280 nm O.D.의  $28 \pm 1$  AU (대략 2%의 단백질)으로 희석된다. 상기 용액은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 상승되고, 약 30분 동안 균질화된다. 그 다음 약 6 시간 동안  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 배양하기 위하여 다른 적절한 용기로 옮긴다. 처리 후에 상기 용액은 상기 최종 농도가 이들의 1/10이 첨가되며, 상기 단백질 농도가 16.5 mg/ml이 되도록 100 mM 아세트산 나트륨 및 2.75 M NaCl 용액으로 약 10% 희석된다. 상기 용액의 pH는 만약 필요하다면, 0.1 M HCl로  $4.85 \pm 0.05$ 로 조정되고, 167 ml의 부피를 얻는다.

[0148] 이것 이전에 부피 17.5 ml의 컬럼 및 높이 10 cm의 소수성 수지 (C8 탄화수소) 및 실라놀기 (SDR-HyperD<sup>®</sup> by Pall, United States)를 갖는 매트릭스 및 또 다른 POROS-HS<sup>®</sup> 양이온 수지 컬럼 (50 $\mu$ m, Applied Biosystems, United States)의 8.0 ml부피는 조절된다. 상기 두 개의 컬럼은 제1 (SDR-HyperD<sup>®</sup>) 공급 제2 (POROS-HS<sup>®</sup>) 방식으로 연결되고, 이것은 상기 제1 및 제2 컬럼 각각에 대해 6 CV/h 및 13 CV/h에 상당하는 흐름에서 pH  $4.85 \pm 0.05$ 로 10 mM 아세트산 나트륨, 0.275 M NaCl를 포함하는 평형화된 용액을 통해 유동시켜 조절된다.

[0149] 미리 제조된 IgG 용액 (167 ml)은 제 1 SDR-HyperD<sup>®</sup> 컬럼으로 주입되고, 후자로부터 유출물이 제 2 POROS-HS<sup>®</sup>

컬럼으로 주입된다. 각 컬럼에 대해 계산된 로딩 값은: 1) SDR-HyperD<sup>®</sup> 컬럼에 대해 167 ml/17.5 ml = 9.5 CV; 2) POROS-HS<sup>®</sup> 컬럼에 대해 167 ml/8.0 ml = 21 CV 이다. 공정을 통한 상기 주입 흐름은 각각 제 1 및 제 2 컬럼에 대해 6 및 13 CV/h이다. 로딩의 말단에서 후-세척은 풀에서 컬럼으로부터 유출물 모두를 수집하여, 평형화된 용액의 약 2 CV로 수행된다.

[0150] 각 단계에 대해서 분자 분포 (HPLC) 및 (280 nm O.D.에 의한) 단백질에 대한 결과는 표 18에 요약되었다.

표 18

단계	중합체(%)	단백질(%)	회수율(%)
저온살균된	2.22	2.75	100
SD 처리된	3.67	1.80	100
조정된	3.67	1.65	100
SDR+POROS 유출물	≤0.06	1.58	95.7

[0152] 상기 결과는 상기 중합체 흡착공정이 공정의 다른 단계와 완벽하게 혼입될 수 있고 동시에 수행될 수 있으며, 그 결과 이전 조건 및 이후에 세척에 소비되는 시약과 함께, 전체 시간이 감소되는 것을 보여준다.

[0153] 실시 예 15

[0154] 다른 상업적으로 유용한 양이온 수지의 중합체 보유능력은 IgG 단량체/이량체에 관하여 최적의 가능한 분리를 달성하기 위해 시험된다. 이렇게 하기 위하여 다른 유래의 수지 매트릭스는 특히 아크릴 (Toyopearl<sup>®</sup>) 대 아가로오스 (Sephacrose<sup>®</sup>)로 비교된다. 상기 수지는 수지 GigaCap Toyopearl-S 650<sup>®</sup> 및 SP-Sephacrose XL<sup>®</sup> 각각을 갖는 채워진 높이 100 mm (XK16<sup>®</sup> from GE-Healthcare)을 갖는 단면 1.75 cm<sup>2</sup>의 컬럼에 채워진다.

[0155] 상기 출발 물질은 NaCl이 0.275 M 및 0.20 M까지 첨가되고, 만약 필요하다면 0.1 M HCl로 pH 4.85 ± 0.05로 조정하여, 실시 예 3에서와 같이 처리된 저온살균된 IgG 용액의 다른 개별적 실험의 혼합물이다. 상기 용액은 약 22 AU의 단백질 농도를 갖고, 50 CV까지 시험 하에서 상기 IgG 용액과 같은 pH 농도 및 동일한 NaCl의 조건으로 제조되는 컬럼으로 약 15 CV/h의 흐름으로 주입된다.

[0156] 개시한 것과 비교하여 사용된 다른 컬럼 부피에 대해 얻어진 중합체 회수율 결과는 표 19에 나타내었다.

표 19

수지	로딩		(%) 중합체 회수율	
	CV	mg 단백질/ml 겔	NaCl (0.275M)	NaCl (0.200M)
GigaCap ToyoPearl-S 650 M	0	0	100	100
	10	158	97	15
	25	396	100	73
	40	633	104	97
	50	791	110	110
SP-Sephacrose XL	0	0	100	100
	10	158	98	89
	25	396	100	95
	40	633	103	95
	50	791	95	91

[0158] 총 단백질 회수율은 SP-Sephacrose XL 수지에 대해 98% 내지 100% 및 GigaCap-S 650M (10 CV 및 0.2M NaCl에서 약 98%)에 대해 90 내지 100%로 다양한다.

[0159] 상기 결과는 POROS-HS<sup>®</sup> (양이온 폴리스티렌)와 같은 (GigaCap-S 650M 형의) 아크릴 양이온 수지가 총 단백질 회수율 98% 및 158 mg/겔의 ml의 단백질 로딩에 대해 85% (15% 회수율)에 존재하는 중합체를 감소하기 위한 능력을 갖는 IgG의 저온 살균에 의해 형성된 중합체를 선택적으로 보유할 수 있다는 것은 보여준다. 명백히, 상기 얻어진 결과는, 예를 들어, 25 CV (396 mg 단백질/ml 겔)를 달성하기 위한 로딩 능력을 증가시키는, (이를



감소시키는) pH에 관련하여 최적화될 수 있다.

- [0160] 이는 아가로스 형 (Sephacrose XL)의 비-합성 매트릭스로부터의 수지가 상기 로딩 유출물에서 형성된 것의 선택적인 흡착에 대한 명백한 조건하에서 IgG 단량체/이량체로부터 중합체를 분리하기 위한 충분한 해상도 능력 (resolution capacity)을 갖지 못한다는 것이 확인된 것이다.
- [0161] 유사하게 이것은 가장 적절한 pH 및 NaCl 농도 조건이 사용된 합성 관류 수지의 형에 특이적이라는 것을 나타낸다. 따라서, pH 4.85에서 GigaCap-S<sup>®</sup> 650M 형 아크릴 수지에 대해서 많아야 NaCl의 0.2 M이 요구되는 반면, 0.3 M의 NaCl은 POROS-HS<sup>®</sup> 50 $\mu$ m 수지에 대해 요구될 수 있다.
- [0162] 당업자에게는 합성 관류 수지의 각 형태에 대한 pH 및 NaCl의 농도 사이의 가장 적절한 관계를 확인할 수 있는 것은 자명하다.
- [0163] 실시 예 16
- [0164] 10% 단백질로 IGIV로서 제제화되고 농축된 상기 최종 생성물까지의 단계에서 공정의 확장성 (scaleability)은 상기 생성물의 조성적 특성을 조사하여, 검토된다.
- [0165] 1000 리터 이상의 혈장 풀은 Fr-II+III을 얻기 위해 에탄올로 분획되고, 정제는 실시 예 3에서 기술된 바와 같이 저온살균된 대량 용액이 얻어질 때까지 계속된다.
- [0166] (출발 혈장의 약 26.2 리터에 상당하는) 6.34 kg의 상기 저온살균된 용액은, 이의 pH가 4.65인 것은 확인하면서, 27.98 AU (280 nm)의 광학 밀도 및 0.26 mS/cm의 전도성으로 주사용 물로 희석 후 취한다. 3% 트리-n-부틸포스페이트의 농축된 용액 (x 10 배)의 0.70 kg 및 10% Triton X-100은 강하게 교반하면서 약 5-10분에 걸쳐 첨가된다. 상기 pH는 0.1 M NaOH의 첨가에 의해 4.79로 조정된다. 7.04 kg의 용액은 얻어지고 6시간 이상동안 대기 온도 (18 - 25°C)에서 배양된다. 상기 트리-n-부틸포스페이트 함량은 가스 크로마토그래피에 의해 0.28% (2800 ppm)로 결정된다.
- [0167] 그 후에 pH 4.85인 10 mM 아세트산 나트륨을 함유하는 1.5 M NaCl 용액은 최종 NaCl 농도가 0.275 M에 도달하기 위해 첨가된다. 상기 최종 pH는 4.81이다. 그 이후 6930.9 g의 용액은 얻어지고, 상기 수지 높이가 50 mm인, 770 ml의 SDR-HyperD<sup>®</sup> 수지 (Pall사)을 함유하는 140 mm 직경 컬럼으로 주입된다. 주입은 대기 온도 및 6.1 CV/hour에 상당하는 흐름에서 수행되고, 이러한 모든 용액은 2 시간 미만에서 로딩된다. 상기 최종 총 로딩 비는 9 CV (6.93 kg/0.770 L = 9.0 CV)이다. 그 후에 후-세척은 pH 4.85에서 0.275 M NaCl의 3 CV 및 10 mM 아세트산 나트륨 용액을 이용하여 수행된다. 상기 생성물 용액의 주입동안 회수된 6.93 kg의 컬럼 유출물은 pH 4.82 및 전도성 16.75 mS/cm인 것으로 획득된다. 상기 트리-n-부틸포스페이트 함량은 가스 크로마토그래피에 의해 분석적으로 측정된  $\leq 5$ ppm이다.
- [0168] 5.772 kg의 상기 유출물은 취하여, 컬럼 직경 50 mm 및 바닥 높이 113 mm인, POROS HS<sup>®</sup> 수지 (50 $\mu$ m)의 222 ml 컬럼으로 주입된다. 상기 용액은 상기 공정이 약 2.5 시간 지속하기 위하여 대략 10 CV/hour의 흐름으로 대기 온도에서 컬럼으로 주입된다. 상기 생성물에 로딩되는 동안 얻어진 컬럼 유출물 모두는 수집되고, pH 4.85에서 0.275 M NaCl로 후-세척의 1 CV, 10 mM 아세트산 나트륨, 및 17% 술비톨 (중량/중량)용액과 조합된다. 상기 생성물 용액의 주입동안 회수된 컬럼으로부터 776 kg의 유출물 풀은 광학밀도 18.508 AU (280 nm), pH 4.84 및 전도성 16.95 mS/cm로, 얻어진다.
- [0169] 상기 유출물 풀은 0.1  $\mu$ m을 통한 여과에 의해 정화되고, 그 다음 35 nm (Planova<sup>®</sup> 35N) + 20 nm (Planova<sup>®</sup> 20N)의 기공 구배로 연속적으로 나노여과된다. 상기 생성물의 나노여과가 완성된 때, 이것은 총 공정 시간이 18시간인, POROS HS<sup>®</sup> 컬럼에서 사용된 동일한 후-세척 용액의 회수된 부피의 5%에 상당하는 부피로 후-세척된다. 얻어진 나노여과의 양은 6.797 kg이고, pH는 4.83이며, 탁도 (turbidity)는 2.71 NTU 및 전도성은 17.1 nS/cm이다.
- [0170] 상기 나노여과된 용액은 명목상 분자 컷오프 100 kDa을 갖는 폴리에테르설폰 막을 통해 한외여과된다. 상기 생성물은 대략  $50 \pm 10$  AU (280 nm)에 광학 밀도 14.4 AU (280 nm)로부터, 먼저 3.3 배 농축되고, 그 다음 NaOH로 pH  $4.2 \pm 0.2$ 에 조정된 2 mM 아세트산을 포함하는 투석 용액의 대략 7 부피로 일정한 부피에서 투석 여과된다. 전도성 (220  $\mu$ S/cm)을 검토한 후 농축된 33% 술비톨 용액의 충분한 양은 대략 5% (중량/부피)에 최종 술비톨 농도를 생성하기 위해 첨가된다. 최종적으로 이것은 약 10%의 단백질에 상당하는, 광학 밀도의  $140 \pm$



5 AU (280 nm)을 달성하기 위해 약 3.5배로 농축되고, 상기 pH는 0.1 M NaOH로  $5.25 \pm 0.25$ 로 조정된다. 5.45 NTU의 혼탁도 (turbidity) 및 1.18 mS/cm의 전도성을 갖는, 최종 pH 5.26으로 용액 552.1 g을 얻었다. 이러한 용액은 0.22 $\mu$ m를 통해 여과되고, pH 5.34, 몰랄 삼투압농도 (osmolality) 330 mOsm/kg, 혼탁도 4.62 NTU 및 전도성 1.34 mS/cm을 갖는, 병 (bottle)으로 투여된다. 본 단계에 대한 공정 시간은 9.5 시간이다.

[0171] 상기 계량된 병은 겔화, 또는 혼탁도 또는 침전, 섬유 또는 입자의 외관 또는 색깔에서 변화의 어떤 표시도 보이지 않는 15일 이상동안  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  및  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 유지된다.

[0172] 표 20은 전체 획득 공정의 다른 단계에서 중합체, 이량체, 단량체 및 분획에 대한 결과를 나타낸다.

표 20

상기 공정의 단계	중합체(%)	이량체(%)	단량체(%)	분획(%)
저온살균된	2.0	3.2	94.8	0
SDR 유출물	2.7	2.6	94.1	0.6
POROS 유출물	$\leq 0.06$	1.9	98.1	0
나노여과물	$\leq 0.06$	3.0	96.5	0.5
최종 농도(0.2 $\mu$ )	$\leq 0.06$	4.3	95.6	0.1

[0174] 상기 결과로부터 (저온살균된 및 SDR 유출물에서) POROS 컬럼 전 생성물에서, pH 및 염 농도의 조정을 통한 이전 실시 예에서 설명된 바에 따라 달성된, 이량체 함량 ( $\leq 5\%$ )의 제어는 이량체 IgG (SDR 유출물에서 2.6% 및 POROS 유출물에서 1.9%)의 손실을 최소화하는, 가능한 중합체 존재 ( $\leq 0.06\%$ )의 우수한 흡착을 만든다는 것이 명확해 졌다.

[0175] 이것은 나노여과, 투석 여과 및 최종 제제와 함께, SD 처리 및 이것의 분리로 응집체/중합체를 제거하는 단계를 혼입하여, IGIV을 얻기 위한 전체 공정이 중합체 함량 ( $\leq 0.06\%$ ) 및 얻어질 분획 (0.1%)에 관하여 최종 생성물에 대해 전체적으로 실행가능하고, 규모적이며, 우수한 값일 수 있다는 결론이다.

[0176] 실시 예 17

[0177] 병당 10 ml씩 20 ml 유리병에 계량되고, 20 mm  $\Phi$  부틸 고무 스톱퍼 (rubber stopper)로 밀폐하여 봉인된, 실시 예 16에서 얻어진 생성물 (10% IGIV)은 주위 온도 ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ )에서, 빛으로 보호되어, 12 달 동안 저장된다.

[0178] 대략 1년으로 설정된 시간 후에, 그들은 시각적으로 (물리적 외관) 조사되고, 안정성의 가장 대표적인 파라미터는 분석적으로 결정된다. 저장의 출발 ( $t = 0$ ) 및 종료 ( $t = 1$ 년)에서 얻어진 값은 표 21에 나타내었다. 유사하게 최근의 기술 (특히 ES-200100101호)를 이용하여 산업적 규모상에서 얻어진 정상 값 또한 포함된다.

표 21

파라미터	시간 = 0	시간 = 1년 (T:20-30 $^\circ\text{C}$ )	내역 (Eur.Ph)
pH	5.34	5.28	4.0-7.4
혼탁도 (NTU)	4.62	7.09	n.e.
전도성 (mS/cm)	1.34	0.63	n.e.
몰랄삼투압농도 (mOs/kg)	330	357	$\geq 240$
중합체 (% HPLC)	$\leq 0.06$	0.27	$\leq 3.0$
분획 (% HPLC)	0.09	0.92	$\leq 5.0$
IgG <sub>1</sub> (%)	67.7	67.5	(혈장에 증가)
IgG <sub>2</sub> (%)	26.2	26.2	(혈장에 증가)
IgG <sub>3</sub> (%)	3.3	3.1	(혈장에 증가)
IgG <sub>4</sub> (%)	2.7	2.6	(혈장에 증가)
PKA (UI/ml)	$< 2$	$< 2$	$\leq 25$
ACA (CH <sub>20</sub> /mg)	0.79	0.89	$\leq 1$

[0180] n.e.: 설정되지 않음. Eur.Ph: 유럽 약전

[0181] 시각적 외관과 관련하여, 입자 (섬유 (fibres), 응고 (clots), 또는 침전물 (sediments)), 또는 혼탁도 (투명도) 또는 착색 (무색)의 존재의 결과로써 모든 샘플에서 저하되지 않는 것을 확인했다. 이것은 상기 얻어진 생성물이 유럽 약전 (Eur.Ph.)에서 공인된 값에 준하는,  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 대기 온도에서 1년 동안 필수적으로 변하지 않게 (PKA, ACA 등과 같은 중합체, 효소) 저장된다는 결론이다.

[0182] 실시 예 18

[0183] 한 개별적 실험은 바이러스성 불활성 단계의 순서에서 오직 하나의 변화를 갖도록 실시 예 16과 등가의 제조 규모 크기에서 가공 처리되는데, SD로 처리는 상기 개시 투석 여과 물질 상에서 수행되며, 그 다음 이런 시약은 SDR-HyperD<sup>®</sup> 수지로 흡착되고, 그 다음 상기 공정 단계의 나머지는 본 발명에 따른 생성물을 얻기 위하여 요구 되는데, 즉 POROS HS 관류 수지를 사용하여 분자 응집체의 포획 및 솔비톨의 존재하에서 저온살균은 실시 예 16에서와 같은 방법으로 수행된다. 최종적으로, 5% 솔비톨로 안정화된, 얻어진 상기 생성물은 IGIV의 10% 단백질 농도로 상승되고, 여과에 의해 살균되며, 20 ml 유리병안에서 계량된다. 부틸 고무 스톱퍼로 밀폐하여 봉인된 상기 병은 대략 1년 동안  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 로 냉장 챔버에 저장되고, 그 다음 가시적 검사를 포함하는, 안정성에 대한 가장 중요한 파라미터는 측정된다. 유럽 약전 상세 내역과 함께 시작 ( $t = 0$ ) 및 저장 후 ( $t =$  대략 1년)에서 얻어진 결과를 표 22에 나타내었다.

표 22

파라미터	시간 = 0	시간 = 1년 (T: $2-8^\circ\text{C}$ )	내역 (Eur.Ph.)
pH	5.23	5.18	4.0-7.4
혼탁도 (NTU)	7.6	6.0	n.e.
전도성 (mS/cm)	1.45	0.64	n.e.
몰랄삼투압농도 (mOs/kg)	384	399	$\geq 240$
중합체(% HPLC)	0.30	0.40	$\leq 3.0$
분획(% HPLC)	0	0.32	$\leq 5.0$
IgG1 (%)	67.6	70.2	(혈장에 증가)
IgG2 (%)	25.4	26.9	(혈장에 증가)
IgG3 (%)	4.2	4.0	(혈장에 증가)
IgG4 (%)	2.8	3.2	(혈장에 증가)
PKA (UI/ml)	$< 2$	$< 2$	$\leq 25$
ACA ( $\text{CH}_{20}/\text{mg}$ )	0.64	0.85	$\leq 1$

[0184] n.e.: 설정되지 않음; Eur.Ph: 유럽 약전

[0185] 시각적 외관에 관한 한, 입자 (섬유질 (fibres), 덩어리 (clots), 또는 침전물 (sediments)), 또는 혼탁도 (투명도) 또는 착색 (무색)의 존재를 통하여 샘플에서의 저하가 없음을 확인했다. 상기 얻어진 생성물은, 유럽 약전 (Eur.Ph.)에 명시된 값을 준수하여,  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 온도에서 대략 1년 이상동안 필수적으로 변하지 않게 (예를 들어, PKA와 같은 중합체/분획 및 단백질 분해 효소) 저장된다.