



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월13일
(11) 등록번호 10-1243425
(24) 등록일자 2013년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01J 41/04 (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *B01D 15/32* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7009033

(22) 출원일자(국제) 2005년10월21일
심사청구일자 2010년10월21일

(85) 번역문제출일자 2007년04월20일

(65) 공개번호 10-2007-0072532

(43) 공개일자 2007년07월04일

(86) 국제출원번호 PCT/SE2005/001591

(87) 국제공개번호 WO 2006/043895
국제공개일자 2006년04월27일

(30) 우선권주장
0402558-1 2004년10월21일 스웨덴(SE)
0402910-4 2004년11월26일 스웨덴(SE)

(56) 선행기술조사문헌

US6702943 A

전체 청구항 수 : 총 40 항

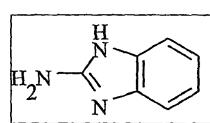
심사관 : 김지우

(54) 발명의 명칭 **항체의 정제 방법**

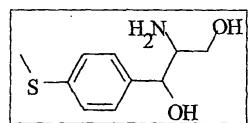
(57) 요약

본 발명은 액체 샘플 중 다른 화합물(들)로부터 항체를 분리하는 방법에 관한 것이고, 여기에서 상기 샘플을 포함하는 이동상은 항체를 액체 중에 유리된 채로 두면서 목적하지 않는 화합물을 흡착시키도록 다중-모드 분리 매트릭스와 접촉되고, 상기 다중-모드 분리 매트릭스는 표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함한다. 본 발명은 또한 상기한 다중-모드 분리 매트릭스로 충전된 크로마토그래피 컬럼, 및 그의 표면에 흡착된 상기 다중-모드 기를 갖는 필터에 관한 것이다.

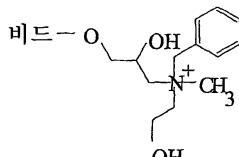
대 표 도 - 도1



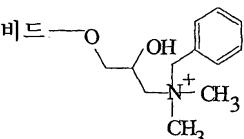
(a) 2-아미노벤즈이미다졸



(b) 티오미카민



(c) N-벤질-N-메틸에탄올아민



(d)-N,N- 디 메틸벤질아민

(72) 발명자

글라드, 군나르

스웨덴 에스-751 84 업살라 바가탄 30 아머샴 바이
오사이언시스에이비

요한슨, 보-렌나르트

스웨덴 에스-751 84 업살라 바가탄 30 아머샴 바이
오사이언시스에이비

요한슨, 한스, 제이.

스웨덴 에스-751 84 업살라 바가탄 30 아머샴 바이
오사이언시스에이비

말루아셀, 장-뤼크

스웨덴 에스-751 84 업살라 바가탄 30 아머샴 바이
오사이언시스에이비

특허청구의 범위

청구항 1

액체 샘플 중 1종 이상의 항체를 1종 이상의 다른 화합물로부터 분리하는 방법으로서, 상기 액체 샘플을 포함하는 이동상을 다중-모드 분리 매트릭스와 접촉시킴으로써 항체는 이동상 내에 유리된 채로 두면서 1종 이상의 표적 화합물을 흡착시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 다중-모드 분리 매트릭스는 표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹과 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 것인, 액체 샘플 중 1종 이상의 항체를 1종 이상의 다른 화합물로부터 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 다중-모드 분리 매트릭스가 크로마토그래피 컬럼 내에 제공되고, 이동상이 중력 및/또는 펌핑에 의해 상기 컬럼을 통과하며, 항체가 컬럼의 유출물 (flow-through)에서 회수되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 액체 샘플이 세포 발효로부터 얻은 상등액을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 다중-모드 분리 매트릭스와 접촉시키는 단계 이전에 기계적 여과 단계 및/또는 크로마토그래피 단계를 수행하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 액체 샘플이 조질 공급물 (crude feed)을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 표적 화합물이 숙주 세포 단백질이고, 상기 단백질의 80% 이상이 다중-모드 분리 매트릭스에 흡착되는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 액체 샘플이 분리 매트릭스로부터의 용출액을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 용출액이 얻어지는 분리 매트릭스가 프로테인 A(protein A) 리간드 및 프로테인 G(protein G) 리간드를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 프로테인 A 리간드 및/또는 프로테인 G 리간드가 다중-모드 분리 매트릭스에 흡착된 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 이동상의 전도도가 0 내지 25 mS/cm인 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 그룹이 4급 아민인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 제2 그룹이 수소-결합기인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 제2 그룹이 소수성 기인 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 분리 매트릭스가 동일 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 그룹 및 제2 그룹이 1 내지 3개 탄소 원자의 탄화수소 쇄에 의해 서로 이격된 것인 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 리간드가 다중-모드 분리 매트릭스의 제1 그룹을 통해 지지체에 고정되는 것인 방법.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 분리 매트릭스가 상이한 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 분리 매트릭스가 입자형이고, 제1 그룹을 포함하는 리간드가 고정된 제1 입자 및 제2 그룹을 포함하는 리간드가 고정된 제2 입자의 혼합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 분리 매트릭스가 제1 그룹을 포함하는 제1 리간드 및 제2 그룹을 포함하는 제2 리간드의 혼합물이 고정된 필터인 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 분리 매트릭스가 표적 화합물과 제3의 상호작용을 할 수 있는 제3 그룹을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 분리된 항체가 치료 등급의 모노클로날 항체인 방법.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서, 다중-모드 분리 매트릭스가 1회용 크로마토그래피 컬럼 내에 제공되는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 1회용 컬럼이 이동상과의 접촉 전에 멸균된 것인 방법.

청구항 26

제1 분리 매트릭스로 충전된 제1 크로마토그래피 컬럼,

표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스로 충전된 제2 크로마

토그래피 컬럼,

1종 이상의 완충제, 및

다중-모드 분리 매트릭스의 유출물로부터의 항체 정제를 교시하는 서면 지침서

를 별개의 구획 내에 포함하는, 액체 중에서 항체를 1종 이상의 다른 성분으로부터 정제하기 위한 키트.

청구항 27

제26항에 있어서, 제1 크로마토그래피 컬럼 중의 분리 매트릭스가 프로테인 A 리간드 또는 프로테인 G 리간드를 포함하는 것인 키트.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 분리 매트릭스가 동일 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 키트.

청구항 29

제26항 또는 제27항에 있어서, 분리 매트릭스가 상이한 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 키트.

청구항 30

제26항 또는 제27항에 있어서, 제1 크로마토그래피 컬럼 및/또는 제2 크로마토그래피 컬럼이 1회용 컬럼인 키트.

청구항 31

표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스로 충전된 크로마토그래피 컬럼,

1종 이상의 완충제, 및

서면 지침서

를 별개의 구획 내에 포함하는, 액체 중에서 항체를 1종 이상의 다른 성분으로부터 포획하기 위한 키트.

청구항 32

제26항, 제27항 및 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 그룹이 4급 아민인 키트.

청구항 33

제26항, 제27항 및 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 그룹이 소수성 기 및/또는 수소-결합기인 키트.

청구항 34

제26항, 제27항 및 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 분리 매트릭스가 동일 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 키트.

청구항 35

제26항, 제27항 및 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 분리 매트릭스가 상이한 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함하는 것인 키트.

청구항 36

표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스를 포함하는 크로마토그래피 컬럼.

청구항 37

음으로 하전된 표적 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스를 포함하고, 이때 상기 그룹들은 다공성 지지체의 표면에 커플링되어 있는 것인, 항체를 정제하기 위한 1회용 크로마토그래피 컬럼.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 분리 매트릭스가 전도도 0 내지 25 mS/cm의 이동상으로부터 항체 이외의 단백질을 흡착할 수 있는 것인 크로마토그래피 컬럼.

청구항 39

음으로 하전된 표적 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하고, 이때 상기 그룹들은 필터 표면에 커플링되어 있는 것인, 항체 정제를 위한 1회용 필터.

청구항 40

제39항에 있어서, 전도도 0 내지 25 mS/cm의 이동상으로부터 항체 이외의 단백질을 흡착할 수 있는 필터.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 항체 정제 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 예를 들어, 조질 공급물 (crude feed)에서, 또는 남아 있는 오염물질 및 친화도 수지로부터 누출된 물질을 제거하기 위해 친화도 크로마토그래피의 후속 단계로서 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 항체 정제용 키트를 포함한다.

배경 기술

[0002]

면역계는 공동으로 세균, 기생충, 진균, 바이러스 감염 및 종양 세포의 성장으로부터 신체를 보호하는 많은 상호의존적인 세포 종류로 구성된다. 면역계의 보초는 그들의 숙주의 혈류를 계속 배회하는 대식세포이다. 감염 또는 면역화에 의해 공격받을 때, 대식세포는 항원으로 알려진 외래 분자로 표식된 침입자를 포식함으로써 반응한다. 헬퍼 T 세포에 의해 매개되는 상기 사건은 B-세포를 자극하는 복잡한 연쇄 반응을 설명한다. 이들 B-세포는 다시 외래 침입자에 결합하는 항체로 불리는 단백질을 생산한다. 항체와 항원 사이의 결합 사건은 식균작용 또는 보체계의 활성화를 통해 파괴하기 위해 외래 침입자를 표식한다. 많은 상이한 클래스의 항체 (면역글로불린으로도 알려짐), 예를 들어 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다. 이들은 그들의 생리학적 역할뿐만 아니라 구조에서 상이하다. 구조적 관점에서, IgG 항체가 아마도 성숙 면역 반응에서의 우세한 역할 때문에 광범위하게 연구되었다. 폴리클로날 항체는 표준 방법에 따라 적절한 항원으로 동물을 면역화시켜 생산된다. 응답시, 동물은 폴리클로날인 항체를 생산할 것이다. 그러나, 많은 목적을 위해, 모노클로날 항체로서 공지된 특정 항체의 단일 클론을 갖는 것이 요망된다. 모노클로날 항체 (Mab)는 단일 항체만을 생산하는 정상 B-세포와 비정상 골수종 종양 세포 사이의 융합체로 이루어진 융합된 세포 또는 하이브리드 (hybrid)에 의해 생산된다. 하이브리도마 (hybridoma)로서 공지된 생성된 하이브리드는 오늘날 항체 생산을 위한 표준 방법에서 사용된다.

[0003]

면역글로불린이 갖는 생물학적 활성은 오늘날 인간 및 수의학 진단, 보건 및 치료 부문에서 다양한 상이한 용도로 활용된다. 실제로, 지난 수년 동안, 모노클로날 항체 및 재조합 항체 구성체는 현재 임상 시험으로 연구되고 치료제 및 진단제로서 FDA 승인을 받는 단백질의 가장 큰 클래스가 되었다. 발현 시스템 및 생산 계획에 보완적으로, 간단하고 비용 효율적인 방식으로 고도로 순수한 항체를 얻기 위해 효율적인 정제 프로토콜이 요구된다.

[0004]

면역글로불린 단리를 위한 전통적인 방법은 다른 군의 단백질을 용액 중에 남기면서 면역글로불린을 포함하는 단백질 분획의 선택적이고 가역적 침전에 기반한다. 전형적인 침전제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 리오토로픽 (lyotropic) 염, 예를 들어 황산암모늄 및 인산칼륨, 및 카트릴산이다. 대개, 이들 침전 방법은 매우 불순

한 생성물을 제공하면서, 동시에 시간 소모적이고 수고롭다. 또한, 원료 물질에 침전제를 첨가하면 상등액을 다른 목적에 사용하기가 어렵게 되고, 폐기 문제를 일으키며, 이는 면역글로불린의 대규모 정제를 이야기 할 때 특히 관련된다.

[0005]

면역글로불린 단리를 위한 대안적인 방법은 크로마토그래피이고, 이는 밀접하게 관련된 분리 방법의 종류를 포함한다. 크로마토그래피를 대부분의 다른 물리적 및 화학적 분리 방법과 구분하는 특징은 2개의 상호 불혼화상을 접촉시키는 것이고, 여기서 하나의 상은 정지상이고 다른 것은 이동상이다. 이동상 내로 도입된 샘플 혼합물은 이동상에 의해 시스템을 통해 운반되는 동안 정지상 및 이동상과 일련의 상호작용을 겪는다. 상호작용은 샘플 중의 성분들의 물리적 또는 화학적 특성의 차이를 활용한다. 이들 차이는 정지상을 함유하는 컬럼을 통해 이동하는 이동상의 영향 하에 개별 성분들의 이동 속도를 좌우한다. 분리된 성분은 정지상과의 상호작용이 증가하는 순서로 빠져나온다. 가장 적게 지연된 성분이 처음에 용출하고, 가장 강하게 보유된 물질이 마지막에 용출한다. 샘플 성분들이 컬럼으로부터 용출할 때 한 성분이 인접한 용질 구역과 겹치는 것을 방지하기 위해 충분히 지연될 때 분리가 이루어진다. 각각의 특수한 분리 목적을 위한 최적 정지상을 설계하기 위한 노력이 계속 이루어지고 있다. 상기 정지상은 일반적으로 관능기, 즉 결합기를 포함하는 리간드가 부착되는 지지체 또는 베이스 (base) 매트릭스로 구성된다. 이용하는 상호작용의 원리를 기초로 각각의 종류의 크로마토그래피, 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피를 일반적으로 참조한다.

[0006]

이온 교환 크로마토그래피는 종종 면역글로불린 단리를 위한 프로토콜에서 사용된다. 음이온 교환 크로마토그래피에서, 면역글로불린의 음으로 하전된 아미노산 측쇄는 크로마토그래피 매트릭스의 양으로 하전된 리간드와 상호작용할 것이다. 반면, 양이온 교환 크로마토그래피에서, 면역글로불린의 양으로 하전된 아미노산 측쇄는 크로마토그래피 매트릭스의 음으로 하전된 리간드와 상호작용할 것이다.

[0007]

소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC)는 면역글로불린의 단리를 위한 프로토콜에서 설명되고 사용된 다른 방법이다. 고도로 순수한 면역글로불린 생성물이 목적이면, HIC를 하나 이상의 추가 단계와 혼합하는 것이 일반적으로 권장된다. HIC에서, 면역글로불린을 HIC 매트릭스에 효율적으로 결합시키기 위해, 이동상에 리오토로프 염을 첨가하는 것이 요구된다. 결합된 면역글로불린은 리오토로프 염의 농도를 저하시킴으로써 매트릭스로부터 후속적으로 방출된다. 따라서, 상기 절차의 단점은 원료 물질에 리오토로프 염을 첨가할 필요성이고, 이는 문제를 일으킬 수 있으므로 결과적으로 대규모 사용자에게 비용을 증가시킨다. 예를 들어, 유장, 혈장 및 난황과 같은 원료 물질에 대해, 리오토로프 염을 원료 물질에 첨가하는 것은 염이 면역글로불린 고갈된 원료 물질의 임의의 경제적으로 실행가능한 이용을 방해할 수 있으므로, 많은 경우 대규모 용도에서 금지될 것이다. 대규모 용도에서 추가의 문제는 수천 리터의 폐기물의 처리일 것이다.

[0008]

친화도 크로마토그래피는 자물쇠-열쇠 인식 원리의 표적 생체분자와 생물특이적 리간드 사이의 특이적 상호작용에 기반한다. 따라서, 표적물 및 리간드는 친화도 쌍, 예를 들어 항원/항체, 효소/수용체 등을 구성할 것이다. 단백질-기반 친화도 리간드, 예를 들어 항체의 단리 및 정제를 위해 널리 이용되는 방법인 프로테인 A(Protein A) 및 프로테인 G(Protein G) 친화도 크로마토그래피가 잘 알려져 있다. 프로테인 A 크로마토그래피는 특히 모노클로날 항체에 대한 현저한 특이성을 제공하고, 결과적으로 고순도를 얻을 수 있음이 잘 알려져 있다. 이온 교환, 소수성 상호작용, 히드록시아파타이트 및/또는 겔 여과 단계와 조합 사용되어, 프로테인 A-기반 방법은 많은 생물의약품 회사에서 선택되는 항체 정제 방법이 되었다 (예를 들어 WO 8400773 및 US 5,151,350 참조). 그러나, 단백질의 웹티드 결합 때문에, 프로테인 A 매트릭스는 일정 정도의 알칼리 감도를 나타낸다. 또한, 프로테인 A 매트릭스가 세포 배양 배지로부터 항체를 정제하기 위해 사용될 때, 세포로부터 기원하는 프로테아제는 프로테인 A 또는 그의 웹티드 단편의 누출을 일으킬 수 있다.

[0009]

친화도 크로마토그래피 매트릭스로부터 리간드 누출을 감소시키기 위한 시도는 WO 03/041859 (베링거 인겔하임 파마 카게 (Boehringer Ingelheim Pharma KG))에 제시되었고, 여기서 리간드 누출을 감소시키기 위해 예를 들어 프로테인 A 매트릭스를 1종 이상의 계면활성제로 예비처리하는 것이 제안되었다. 친화도 매트릭스는 예를 들어 5-15 베드 (bed) 부피의 계면활성제로 처리할 수 있다. 접촉 시간은 공정의 효과를 위해 중대하다. 예를 들어, 실온에서, 누출의 감소를 위해 16 시간 이상의 접촉 시간이 요구된다.

[0010]

친화도 크로마토그래피 매트릭스로부터 리간드 누출 문제에 대한 대안적인 방안은 US 4,983,722 (마일즈 인크. (Miles Inc.))에 제공되고, 여기서 프로테인 A는 항체 및 프로테인 A를 함유하는 액체로부터 이를 음이온 교환 물질에 노출시켜 선택적으로 단리된다. 두 성분은 모두 음이온-교환 물질에 흡착되고, 이어서 항체 및 프로테인 A는 증가하는 이온 강도 조건 하에 순차적으로 용출된다. 예시적인 음이온 교환체는 디에틸아미노에틸

(DEAE) Trisacryl M 또는 DEAE 세파로스(Sepharose) TM이다.

- [0011] WO 2004/076485 (론자 바이올로지스 피엘씨. (Lonza Biologics Plc.))는 프로테인 A 및 이온 교환 크로마토그래피에 의한 항체 정제에 관한 것이다. 이온 교환 단계는 프로테인 A 상에서 정제된 항체를 프로테인 A의 결합을 허용하는 조건 하에 이온 교환 물질 상에 로딩하고, 항체를 유출물 (flow-through)로 수거하는 것을 포함한다. 음이온 교환체는 4급 아민-기반 음이온 교환체, 가장 바람직하게는 세파로스™ Q (아머샴 바이오사이언스 (Amersham Biosciences), 현재 지이 헬쓰케어 (GE Healthcare))이다.
- [0012] US 5,429,746 (스미쓰클라인 비참 코오퍼레이션 (SmithKline Beecham Corp.))은 항체가 먼저 프로테인 A 크로마토그래피 지지체에 흡착되고 용출된 후; 양이온 교환 크로마토그래피 지지체에 흡착되고 그로부터 선택적으로 용출되고; 마지막으로 HIC 지지체에 흡착되고 용출되는 공정에 관한 것이다. 친화도 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피 이후 HIC 컬럼에 적용된 혼합물은 면역글로불린 응집체, 잘못 폴딩된 (misfolded) 물질종, 숙주 세포 단백질 및 친화도 크로마토그래피 단계로부터의 잔류 물질을 함유할 수 있다.
- [0013] US 6,498,236 (Upfront Chromatography)은 단백질-기반 친화도 리간드와 표적 면역글로불린 사이의 분자량의 작은 차이에 의해 야기된 특수한 문제에 관한 것이다. 따라서, 하이브리도마 세포 배양 상동액, 동물 혈장 또는 혈청과 같은 용액으로부터 면역글로불린의 단리 또는 정제를 위한 방법이 개시되고, 상기 방법은 프로테인 A, 프로테인 G, 합성 웨티드 및 다른 비교적 고분자량 리간드의 사용에 대한 대안으로서 제안된다. 개시된 방법에 사용된 고상 매트릭스는 식 M-SP1-X-A-SP2-ACID {여기서, M은 매트릭스 백본을 나타내고, SP1은 스페이서 (spacer)를 나타내고, X는 O, S 또는 NH를 나타내고, A는 단환 또는 이환의 임의로 치환된 방향족 또는 헤테로방향족 잔기를 나타내고, SP2는 선택적인 스페이서를 나타내고, ACID는 산성기를 나타낸다}에 의해 규정된다. 구체적인 친화체는 매트릭스가 면역글로불린에 효율적으로 결합될 지에 관하여 결정적인 것으로 진술된다.
- [0014] US 5,945,520 (Burton et al)에서는 결합 pH에서 소수성 특성을 나타내고, 탈착 pH에서 친수성 및/또는 정전 특성을 나타내는 혼합 모드 (mixed mode) 크로마토그래피 수지를 개시한다. 수지는 구체적으로 저 및 고 이온 강도 모두에서 수용액으로부터의 표적 화합물에 결합하도록 설계된다. 따라서, 흡착 단계는 HIC를 이용하는 반면, 탈착은 전하 반발에 기반한다.
- [0015] US 6,702,943 (Johansson et al)에서는 음이온-교환기 및 소수성 구조를 포함하는 복수의 리간드를 갖는 매트릭스에 그의 흡착에 의한 액체로부터의 표적 물질의 제거 방법을 개시한다. 보다 구체적으로, 리간드는 양으로 하전된 음이온-교환기에 근접한 방향족 고리를 포함한다. 전자 공여체-전자 수용체 상호작용을 할 수 있는 다른 기를 포함하면 기질과 흡착제 사이의 상호작용 강도를 향상시킬 수 있는 것으로 진술된다. 목적하는 물질은 세포, 세포의 일부, 및 웨티드 구조를 포함하는 물질인 것으로 진술된다. 매트릭스의 돌파점 (break-through) 용량은 참조 단백질, 예를 들어 소 혈청 알부민 및 IgG에 대해 규정된다. 개시된 리간드는 0.25M NaCl과 같은 고농도의 염에서 표적 물질을 흡착시키는 능력 때문에 "고 염 리간드"로 표시된다.
- [0016] 또한, WO 01/38228 (Belew et al.)에서는 혼합 모드 음이온-교환 리간드를 포함하는 매트릭스에 대한 그의 결합에 의해 액체로부터 음으로 하전된 물질 제거를 위한 다른 방법을 개시한다. 각각의 리간드는 양으로 하전된 질소, 및 상기 전하를 띤 질소로부터 1-7개 원자의 거리에서 티오에테르 연결기를 포함한다. 상기한 것과 유사하게, 목적하는 물질, 예를 들어 세포, 세포의 일부, 및 웨티드 구조를 포함하는 물질은 0.25M NaCl의 구역의 염 농도에서 흡착된다.
- [0017] 세라믹 히드록시아파타이트는 면역글로불린 폴리싱 (polishing)에 유용한 것으로 제안되었다. 보다 구체적으로, 문헌 [Chromatography, tech note 2849; S.G. Franklin, Bio-Rad Laboratories, Inc., 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 USA]에 IgG1은 CHT 세라믹 히드록시아파타이트 (Bio-Rad) 상에서 비분획화 매질에서 IgG1-프로테인 A 복합체로부터 분해될 수 있는 것으로 기록되어 있다. 보다 구체적으로, 히드록시아파타이트 ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)는 인산칼슘 형태이고, 이는 독특한 분리 특성을 갖는 것으로 나타났다. 그러나, 히드록시아파타이트-기반 매트릭스는 또한 일부 단점을 갖는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, Ca-누출로 인해, 이들은 산성 pH값에서 불안정하고, EDTA와 같은 칼레이팅제에 민감하다. 또한, 예를 들어, 히드록시아파타이트를 충전하고 큰 컬럼에서 성능을 유지하기 어렵기 때문에 히드록시아파타이트-기반 매트릭스를 사용하여 강건하고 재현가능한 정제 방법을 개발하고 규모 증가 (scale up)가 어려운 것으로 나타났다. 마지막으로, 금속 이온 오염 및 칼슘 이온의 교환에 의해 유발된 수지 특성의 변경의 위험이 있고, 상기 변경은 규제 당국에 심각한 문제가 된다.
- [0018] 문헌 [Johansson et al (Journal of Chromatography A, 1016 (2003) 21-33: "Preparation and

characterization of prototypes for multi-modal separation media aimed for capture of negatively charged biomolecules at high salt conditions")]에서는 고전도도 이동상으로부터 음으로 하전된 단백질의 포획을 위한 다중-모드 리간드의 프로토타입 (prototype)의 스크리닝을 설명한다. 약한 이온 교환 리간드 (1급 및 2급 아민)에 기반한 비-방향족 다중-모드 음이온 교환 리간드가 고 염 조건에서 흡착에 의한 단백질의 포획에 최적인 것으로 밝혀졌다.

[0019] <발명의 간단한 설명>

본 발명의 한 측면은 선행 기술의 방법보다 시간과 공정 단계를 덜 필요로 하는, 액체의 다른 성분들로부터 항체를 분리하는 방법을 제공하는 것이다. 이는 항체를 포함하는 액체가 다중-모드 분리 매트릭스와 접촉되고, 실질적으로 순수한 항체가 비-결합 방식으로 회수되는 방법에 의해 달성할 수 있다. 예를 들어, 액체가 상기 매트릭스를 포함하는 크로마토그래피 컬럼에 적용되면, 항체는 유출물로부터 쉽게 회수된다.

[0021] 본 발명의 다른 측면은 액체의 다른 성분들로부터 항체를 분리하는 방법을 제공하는 것이고, 여기서 선행 기술의 방법에 비해 신규한 특이성이 얻어진다.

[0022] 본 발명의 추가 측면은 액체의 다른 성분들로부터 항체를 분리하는 방법을 제공하는 것이고, 여기서 조절 공급물 내에 존재하는 오염물질, 예를 들어 숙주 세포 단백질의 제거율이 개선된다.

[0023] 본 발명의 추가 측면과 잇점은 아래 상세한 설명으로부터 분명해질 것이다.

발명의 상세한 설명

[0041] 제1 측면에서, 본 발명은 액체 샘플 중의 항체를 1종 이상의 다른 화합물들로부터 분리하는 방법에 관한 것이고, 여기에서 상기 액체 샘플을 포함하는 이동상은 항체를 이동상 내에 유리된 채로 두면서 1종 이상의 표적 화합물을 흡착시키도록 다중-모드 분리 매트릭스와 접촉되고, 상기 다중-모드 분리 매트릭스는 표적 화합물(들)에서 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물(들)과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함한다. 본 발명은 또한 제3 또는 추가의 그룹이 제1 그룹 및 제2 그룹에 추가하여 첨가되는 방법을 포함한다.

[0042] 유리한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 액체 크로마토그래피의 원리를 이용하여, 즉 이동상을 다중-모드 분리 매트릭스를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 상으로 통과시킴으로써 수행한다. 지지체는 다공성 또는 비-다공성 입자, 예를 들어 본질적으로 구형 입자, 모노리쓰 (monolith), 필터, 멤브레인, 표면, 모세관, 또는 임의의 다른 일반적으로 사용되는 포맷의 형태일 수 있다. 별도의 실시태양에서, 본 발명의 방법은 팽창상 (expanded bed) 크로마토그래피의 원리를 이용하여, 즉 이동상을 고밀도 충전제를 포함하는 입자, 예를 들어 본질적으로 구형 입자 형태의 분리 매트릭스의 팽창상에 첨가함으로써 수행한다. 다른 별도의 실시태양에서, 본 발명의 방법은 배치식 (batch-wise) 공정을 이용하여 수행하고, 여기서 분리 매트릭스는 액체 샘플을 포함하는 용기에 첨가된다.

[0043] 따라서, 본 발명에 따른 항체의 정제 방법에서, 1종 이상의 목적하지 않는 화합물은 분리 매트릭스에 흡착되는 반면, 목적하는 항체는 흡착되지 않은 상태로 이동상 내에 남는다. 본 발명의 방법의 맥락에서, 용어 "표적" 화합물은 분리 매트릭스에 흡착되는 화합물을 나타내는 것이 이해된다. 명백하게, 흡착된 화합물의 성질 및 정체는 액체 샘플의 기원에 따를 것이다. 표적 화합물의 예는 세포 및 세포 파쇄물; 단백질 및 웹티드; 혼산, 예를 들어 DNA 및 RNA; 내독소 및 바이러스이다.

[0044] 본 발명의 한 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스는 크로마토그래피 컬럼 내에 제공되고, 이동상은 중력 및 /또는 펌핑에 의해 상기 컬럼을 통과하고, 항체는 컬럼의 유출물에서 회수된다. 본 발명의 방법의 잇점은 컬럼으로부터 항체의 임의의 용출을 요구하지 않는 것이다. 보다 적은 단계가 보다 신속한 정제 프로토콜을 제공하고 결과적으로 공정 비용을 감소시킬 것이므로, 특이적 용출 단계를 피하는 것이 공정 관점에서 유리하다. 또한, 항체는 그들의 접힘 패턴을 손상시키거나; 그들의 웹티드 결합을 공격하여 파괴할 수 있는 특정 조건에 감수성이다. 음이온 교환체에 대한 용출 조건은 일반적으로 임의의 극한적 화학물질을 수반하지 않지만, 염 및 pH의 모든 변화는 감수성 항체에 영향을 줄 수 있고, 그 효과는 pI, 전하 분포 등에 따라 종마다 다르다. 결과적으로, 본 발명의 방법의 다른 잇점은 항체에 대한 용리액의 첨가 및 용출 조건의 적용을 피하는 것이다.

[0045] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명에 따른 방법에서, 항체를 분리시키기 원하는 표적 화합물은 다중-모드 분리 매트릭스에 흡착된다. 표적 화합물의 흡착을 위한 가장 적합한 조건을 얻기 위해, 액체 샘플은 적합한 완충제 또는 다른 액체와 협해져서 이동상을 제공한다. 본 발명의 방법은 유리하게는 일반적으로 비교적 저 염 농도에서

의 흡착을 포함하는 음이온-교환 크로마토그래피에 통상적인 조건 하에 실행된다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 실시태양에서, 이동상의 전도도는 0-25, 예를 들어 10-15 mS/cm 범위이다. 한 실시태양에서, 이동상의 pH는 약 5-6이다. 당업계의 숙련인은 예를 들어 정제시킬 항체의 전하 및 전하 분포에 따를 pH 또는 전도도의 조정에 의해 항체의 유출물을 얻기 위해 조건을 변경할 수 있다. 필요한 경우, 하나 이상의 세척 단계가 임의의 상기 통과(들) 전에 또는 사이에 적용될 수 있다. 예를 들어 매트릭스의 재사용을 위해 흡착된 화합물을 후속적으로 방출시키기를 원하는 경우, 용출은 예를 들어 증가하는 염 구배를 사용하여 보다 고 염 농도에서 수행할 수 있다. 흡착된 화합물을 용출시키기 위해 pH값이 또한 또는 별법으로 예를 들어 감소하는 pH 구배에 의해 이동될 수 있다.

[0046] 상기 언급한 바와 같이, 다중-모드 분리 매트릭스는 표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함한다. 이러한 측면에서, 분리 매트릭스의 그룹들의 상이한 상호작용 방식이 동일한 표적 화합물에 지정되는 것이, 즉 각각의 표적 화합물은 2가지 이상의 상호작용 방식에 의해 이상적으로 흡착되는 것이 이해된다. 양으로 하전되거나 대전가능한 음이온-교환기를 포함하는 다중-모드 리간드는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 US 6,702,943 (Johansson et al), WO 01/38228 (Belew et al), 및 WO 02/053252 (Belew et al) 참조).

[0047] 한 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스의 제1 그룹, 즉 음이온-교환기는 강한 음이온 교환제이다. 이러한 측면에서, 용어 "강한" 음이온 교환제는 넓은 pH 범위 내에서 전하를 띤 상태로 유지되는 기로서 이해된다. 유리한 실시태양에서, 강한 음이온 교환기는 또한 Q기로서 공지된 4급 아민이다. 별도의 실시태양에서, 다중모드 분리 매트릭스의 제1 그룹은 약한 이온 교환제이다. 이러한 측면에서, 용어 "약한" 음이온 교환제는 특정 pH값에서 전하를 띠지만 pH 스위치에 의해 전하를 잃을 수 있는 기를 의미하는 것이 이해된다. 특정 실시태양에서, 제1 그룹은 음이온-교환기 및 추가의 관능기의 혼합물, 예를 들어 음이온 교환제 및 수소-결합기를 포함한다. 따라서, 본 실시태양에서, 제1 그룹은 TRIS (트리스(히드록시메틸)아미노메탄)일 수 있다.

[0048] 한 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스의 제2 그룹은 방향족 기 및/또는 수소-결합기를 포함한다. 한 실시태양에서, 상기 방향족 기는 방향족 또는 헤테로방향족 구조를 갖는 고리계를 포함한다. 유리한 실시태양에서, 제2 그룹은 폐닐기를 포함한다. 별법으로, 제2 그룹은 방향족 및 비방향족 소수성 기, 예를 들어 알킬기의 혼합물을 포함할 수 있다. 따라서, 특정 실시태양에서, 제1 그룹은 알킬기를 포함한다. 본 발명에 따라 사용된 분리 매트릭스는 동일한 종류의 2 이상의 관능기, 예를 들어 2 이상의 상이한 종류의 소수성 기; 또는 2 이상의 상이한 종류의 다중-모드 음이온 교환제를 포함할 수 있다.

[0049] 당업계의 숙련인이 이해하는 바와 같이, 본 발명의 방법에 사용되는 분리 매트릭스의 관능기는 동일 리간드 상에 존재할 수 있거나 (이 경우에 각각의 리간드는 다중-모드이다), 상이한 리간드 상에 존재할 수 있다 (이 경우에 분리 매트릭스의 전체 성질이 다중-모드이다).

[0050] 따라서, 한 실시태양에서, 분리 매트릭스는 동일 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함한다. 상기 논의된 제1 그룹 및 제2 그룹 중의 임의의 하나, 예를 들어 4급 아민기 및 폐닐기가 본 실시태양에서 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 리간드는 제1 그룹을 통해, 예를 들어 아민을 통해 지지체에 커플링되어 4급 아민을 생성한다. 한 실시태양에서, 제1 그룹 및 제2 그룹은 1-6개, 예를 들어 1 내지 3개, 바람직하게는 1 내지 2개의 탄소 원자를 포함하는 탄화수소 쇄에 의해 서로 이격되어 있다. 특정 실시태양에서, 리간드는 N-벤질-N-메틸 에탄올아민; N,N-디메틸벤질아민; 2-아미노벤즈이미다졸; 티오미카민; 및 Q 폐닐로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0051] 별도의 실시태양에서, 분리 매트릭스는 상이한 리간드에 커플링된 제1 그룹 및 제2 그룹을 포함한다. 상기 논의된 제1 그룹 및 제2 그룹 중 임의의 하나, 예를 들어 4급 아민기 및 폐닐기가 본 실시태양에서 사용될 수 있다. 본 실시태양에서, 입자형 분리 매트릭스의 경우에, 상기 상이한 리간드는 상이하거나 동일한 입자에 실질적으로 동일하거나 상이한 양으로 고정될 수 있다. 별법으로 또는 부가적으로, 입자형 분리 매트릭스는 상이한 입자 상에 고정된 상이한 종류의 제1 그룹; 또는 상이한 종류의 제2 그룹을 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 방법에서 사용된 다중-모드 크로마토그래피 매트릭스는 당업계의 숙련인에 의해 쉽게 제조된다. 간단히 설명하면, 매트릭스는 직접 또는 지지체 표면과 상호작용 그룹 사이에 적절한 거리를 제공하도록 통상적인 스페이서를 통해 간접적으로 지지체 (당업계에서 베이스 매트릭스로서 또한 공지됨)에 커플링된 리간드로 구성된다. 높은 흡착 용량을 얻기 위해, 지지체는 바람직하게는 다공성이고, 따라서 리간드는 외부 표면 및 공극 표면에 커플링된다. 리간드를 다공성 또는 비-다공성 표면에 고정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna

Mallia and Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992] 참조). 한 실시태양에서, 지지체의 표면에서 리간드 밀도는 통상적인 이온 교환 매트릭스에 흔히 사용되는 것에 가까운 범위 내에 있다. 리간드는 단순히 사용된 화학으로부터 생성된 링커 성분을 통해; 또는 연장제 (extender), 촉수 (tentacle) 또는 가요성 아암 (arm)으로 공지된 보다 긴 성분을 통해 지지체에 직접 커플링될 수 있다 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 US 6,428,707 참조). 간단히 설명하면, 연장제는 중합체, 예를 들어 단일중합체 또는 공중합체 형태일 수 있다. 친수성 중합성 연장제는 합성 기원, 즉 합성 골격을 갖거나, 생물학적 기원, 즉 천연 골격을 갖는 생체중합체일 수 있다. 전형적인 합성 중합체는 폴리비닐 알코올; 폴리아크릴- 및 폴리메타크릴아미드; 및 폴리비닐 에테르로 이루어진 군 중에서 선택된다. 전형적인 생체중합체는 다당체, 예를 들어 전분; 셀룰로스; 텍스트란; 및 아가로즈로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0053] 지지체는 유기 또는 무기 물질로부터 제조될 수 있다. 한 실시태양에서, 지지체는 천연 중합체, 예를 들어 가교결합된 탄수화물 물질, 예를 들어 아가로즈, 아가, 셀룰로스, 텍스트란, 키토산, 곤약, 카라기난, 갤란, 알기네이트 등으로부터 제조된다. 천연 중합체 지지체는 표준 방법, 예를 들어 역상 혼탁 갤화에 따라 쉽게 제조되고 임의로 가교결합된다 (S Hjerten: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1964)). 특히 유리한 실시태양에서, 지지체는 그의 유동 특성을 향상시키는 방법에 의해 제조된, 비교적 경질이지만 다공성인 아가로즈의 일종이다 (예를 들어, US 6,602,990 (Berg) 또는 SE 0402322-2 (Berg et al.) 참조). 별도의 실시태양에서, 지지체는 합성 중합체 또는 공중합체, 예를 들어 가교결합된 합성 중합체, 예를 들어 스티렌 또는 스티렌 유도체, 디비닐벤젠, 아크릴아미드, 아크릴레이트 에스테르, 메타크릴레이트 에스테르, 비닐 에스테르, 비닐 아미드 등으로부터 제조된다. 상기 합성 중합체는 표준 방법에 따라 쉽게 제조되고 임의로 가교결합된다 (예를 들어 문헌 ["Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988)] 참조). 천연 또는 합성 중합체 지지체는 또한 상업적인 공급원, 예를 들어 지이 헬쓰케어 (GE Healthcare, 스웨덴 옵살라)로부터 예를 들어 다공성 입자 형태로 입수 가능하다. 또다른 별도의 실시태양에서, 지지체는 무기 중합체, 예를 들어 실리카로부터 제조된다. 무기 다공성 및 비-다공성 지지체는 당업계에 잘 알려져 있고, 표준 방법에 따라 쉽게 제조된다.

[0054] 본 발명의 분리 매트릭스의 적합한 입자 크기는 직경이 5-500 μm , 예를 들어 10-100 μm , 예를 들어 20-80 μm 일 수 있다. 본질적으로 구형 입자의 경우에, 평균 입자 크기는 5-1000 μm , 예를 들어 10-500 μm 일 수 있다. 특정 실시태양에서, 평균 입자 크기는 10-200 μm 이다. 당업계의 숙련인은 사용될 공정에 따라 적합한 입자 크기 및 다공도를 쉽게 선택할 수 있다. 예를 들어, 대규모 공정에서, 경제적인 이유로, 보다 다공성이지만 경질인 지지체가 특히 포획 단계를 위해 큰 부피의 처리를 허용하도록 바람직할 수 있다. 크로마토그래피에서, 컬럼의 크기 및 형태와 같은 공정 파라미터가 선택에 영향을 줄 것이다. 팽창상 공정에서, 매트릭스는 일반적으로 고밀도 충전제, 바람직하게는 스테인레스강 충전제를 포함한다. 다른 공정에 대해, 다른 기준이 매트릭스의 특성에 영향을 줄 수 있다.

[0055] 본 발명에 따라 분리되는 항체는 임의의 일반적으로 사용되는 원료, 예를 들어 표면에서 배양된 세포로부터 또는 발효 탱크 또는 용기 내의 배치식 또는 연속 세포 배양물로부터 기원할 수 있다. 따라서, 한 실시태양에서, 액체는 세포 발효로부터 얻은 상등액이다. 흡착되는 화합물의 예는 단백질, DNA, 바이러스, 내독소, 영양소, 세포 배양 배지의 성분, 예를 들어 소포제 및 항생제, 및 생성물-관련 불순물, 예를 들어 잘못 풀딩된 물질종 및 응집체이다. 이동상과 다중-모드 분리 매트릭스 사이의 접촉 단계, 즉 흡착 단계 전에 기계적 여과, 원심분리 및/또는 크로마토그래피 단계가 수행될 수 있다. 예를 들어, 액체 샘플이 발효 브로쓰인 경우, 다중-모드 크로마토그래피 전에 세포 파쇄물, 전체 세포 및 다른 비교적 큰 성분을 기계적으로 제거하는 것이 유리하다.

[0056] 한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 정제 프로토콜의 포획 단계를 구성한다. 특정 실시태양에서, 액체 샘플은 다중-모드 크로마토그래피 매트릭스와 접촉하기 전에 여과되는 조절 공급물이다. 결과적으로, 액체 샘플이 기계적 수단에 의해 예비정제되더라도, 상기 실시태양은 여전히 포획 단계를 구성할 것이다. 잘 공지된 바와 같이, 항체를 생산하는 숙주 세포는 또한 숙주 세포 단백질 (HCP)로서 일반적으로 알려진 많은 다른 단백질을 포함할 것이다. 상기 HCP는 효소, 예를 들어 프로테아제, 및 숙주 세포에 의해 생산된 다른 단백질을 포함한다. 본 발명에 따라, 숙주 세포 단백질은 다중-모드 분리 매트릭스에 흡착될 수 있는 반면, 항체는 이동상에 유리된 상태로 남는 것이 예기치 않게 밝혀졌다. 따라서, 한 실시태양에서, 액체 샘플의 실질적으로 모든 숙주 세포 단백질은 다중-모드 분리 매트릭스에 흡착된다.

[0057] 별도의 실시태양에서, 본 발명의 방법은 세정 프로토콜에서 제2, 제3 또는 심지어 제4 단계, 예를 들어 중간 정제 또는 폴리싱 단계로서 사용된다. 따라서, 한 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스에 적용되는 이동상은 분리 매트릭스로부터의 항체-함유 용출액을 포함한다. 한 실시태양에서, 액체 샘플은 선행 친화도 크로마토그

래피 매트릭스로부터의 용출액이다. 유리한 실시태양에서, 그로부터 용출액이 얻어지는 분리 매트릭스는 1종 이상의 Fc-결합 단백질 리간드, 예를 들어 프로테인 A 리간드를 포함한다. 용어 프로테인 A 리간드는 이러한 측면에서 천연 및 재조합 프로테인 A, 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 이러한 측면에서, 용어 "기능적" 단편은 단백질의 원래의 결합 특성을 보유하는 단편을 의미한다. 상기 친화도 매트릭스는 예를 들어 지이 헬쓰케 어로부터 Mab셀렉트(MabSelect)TM로 상업적으로 입수가능하다. 결과적으로, 본 실시태양에서, 흡착된 화합물은 방출된 프로테인 A; 프로테인 A와 항체 사이에 형성된 복합체, 예를 들어 프로테인 A 1 분자당 많은 항체, 예를 들어 하나의 프로테인 A 분자와 복합된 2 내지 4개의 항체를 포함할 수 있는 프로테인 A-MAb 복합체; 및 방출된 프로테인 A 또는 항체의 응집체로 이루어진 군 중에서 1종 이상 선택될 수 있다. 당업계의 숙련인이 이해할 바와 같이, 선행 단계, 예를 들어 친화도 크로마토그래피에서 사용되는 구체적인 조건에 따라, 용출액은 적합한 첨가 또는 조정에 의해 조건화시킬 필요가 있을 수 있다. 따라서, 용출액은 적합한 완충제 또는 액체와 합해져서 이동상을 제공한다. 프로테인 A 컬럼으로부터의 용출액을 정제해야 하는 경우, 실제적인 이유로 바람직할 수 있지만, 본 발명의 방법은 반드시 친화도 크로마토그래피에 바로 이어서, 또는 심지어 동일한 설비에서 수행될 필요가 없음을 알아야 한다.

[0058] 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법은 상기 설명된 바와 같이 친화도 크로마토그래피 매트릭스, 예를 들어 프로테인 A 크로마토그래피 매트릭스 상의 포획 단계, 및 다중-모드 분리 매트릭스 상의 폴리싱 단계를 포함하는 다중-단계 공정이다. 친화도 크로마토그래피 매트릭스에 적용되는 액체 샘플은 세포 배양 액체 또는 발효 브로쓰일 수 있고, 이는 이동상을 제공하도록 임의로 전처리되고, 예를 들어 여과 및/또는 pH 및/또는 전도도의 조정에 의해 조건화된다. 상기 공정에서, 포획 단계는 1종 이상의 숙주 세포 단백질 및 숙주 세포 잔류물, 예를 들어 세포 파쇄물 및 단백질, DNA, 내독소 등을 제거할 것이다. 후속 폴리싱 단계에서, 포획 단계로부터의 잔류물 형태의 화합물, 예를 들어 프로테인 A-항체 응집체가 주로 흡착될 것이다.

[0059] 본 발명의 방법은 임의의 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 예를 들어 포유동물 숙주, 예를 들어 마우스, 설치류, 영장류 및 인간에서 유래한 항체, 하이브리도마에서 유래한 항체의 회수에 유용하다. 한 실시태양에서, 회수되는 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 유리한 실시태양에서, 항체는 단량체 항체이다. 항체는 임의의 클래스일 수 있고, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어지는 군 중에서 선택될 수 있다. 한 실시태양에서, 정제할 항체는 프로테인 A, 또는 Fc-함유 항체 단편 또는 융합 단백질에 결합할 수 있는 항체이다. 특정 실시태양에서, 회수된 항체는 면역글로불린 G (IgG), 예를 들어 IgG1이다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 pH가 6-9, 예를 들어 7-8인 항체를 정제하기 위해 사용된다. 특정 실시태양에서, 정제된 항체의 pH는 약 9이다. 상기 측면에서, 용어 "항체"는 또한 항체 단편, 및 항체 또는 항체 단편을 포함하는 임의의 융합 단백질을 포함함을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 언급된 항체 및 상기 항체를 포함하는 융합 단백질의 임의의 하나의 단편의 정제를 포함한다. 한 실시태양에서, 항체는 모노클로날 항체이다.

[0060] 상기에서 분명한 바와 같이, 본 발명의 방법에서, 목적하지 않는 화합물은 다중모드 분리 매트릭스에 흡착되고, 비흡착된 항체의 실질적으로 순수한 분획이 회수된다. 이러한 측면에서, 용어 "실질적으로 순수한"은 실질적으로 모든 비항체 화합물이 제거되었음을 의미하는 것이 이해된다. 가장 유리하게는, 오염물질의 총량의 약 80% 이상, 예를 들어 약 95% 이상, 즉 95-100% 사이, 예를 들어 약 98% 이상, 즉 98-100% 사이, 바람직하게는 약 99% 이상, 즉 99-100% 사이가 다중-모드 분리 매트릭스 상에서 제거된다. 그러나, 당업계의 숙련인이 이해하는 바와 같이, 가능한 순도는 분리 매트릭스에 적용되는 액체 샘플 내의 항체의 농도, 및 사용되는 다른 조건에 따라 결정될 것이다. 따라서, 한 실시태양에서, 본 발명의 방법에 따라 분리된 항체는 치료 등급의 항체이다. 따라서, 본 발명에 따라 정제된 항체는 연구에서 유용하고, 항체 의약품, 예를 들어 MAb 약물의 제조에도 유용하다. 정제된 항체의 별도의 용도는 진단 용도이다. 또한, 정제된 항체는 인간을 위한 식품에서 예를 들어 식품 첨가제로서 유용하다. 예를 들어, 본 발명에 따라 정제된 소 항체는 식품에서 유용하다.

[0061] 본 발명의 방법의 특정 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스는 1회용 크로마토그래피 컬럼 또는 필터로서 제공된다. 치료 화합물, 예를 들어 항체의 정제 방법에서 1회용 제품 사용의 잇점은 사용 후 분리 매트릭스를 폐기함으로써 2가지 상이한 공정 사이의 교차-오염의 위험이 제거되는 것이다. 상기 많은 방법에서, 무균 상태를 유지하는 것이 요구된다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 실시태양에서, 다중-모드 분리 매트릭스는 멸균 처리되고, 멸균 다중-모드 분리 매트릭스는 멸균 포장된 크로마토그래피 컬럼 또는 필터로서 제공된다. 한 실시태양에서, 본 발명의 방법은 배치식 공정으로 수행되고, 여기서 1회용 분리 다중-모드 매트릭스는 그로부터 항체가 회수되는 액체를 포함하는 용기에 첨가된다. 유리한 실시태양에서, 1회용 분리 매트릭스는 수성 액체에 접촉시 쉽게 팽창하는 전조된 입자, 예를 들어 전조된 아가로즈 입자로 구성된다. 적당한 시간은 표적 화합물이 매트릭스에 흡착되도록 하고, 이후에 항체를 포함하는 액체상을 용기로부터 제거한다. 이어서, 사용된 매트릭스는

흡착된 화합물을 방출시키지 않으면서 폐기될 수 있고, 이는 화합물, 예를 들어 내독소; 프리온 및/또는 특정 속주 세포 단백질을 임의로 추가로 처리할 필요가 없기 때문에 안전성 관점에서 유리할 수 있다.

[0062] 제2 측면에서, 본 발명은 액체 중의 1종 이상의 다른 성분으로부터 항체를 정제하기 위한 키트에 관한 것이고, 상기 키트는 제1 분리 매트릭스로 충전된 제1 크로마토그래피 컬럼; 표적 화합물의 음으로 하전된 부위와 상호 작용할 수 있는 제1 그룹, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스로 충전된 제2 크로마토그래피 컬럼; 1종 이상의 완충제; 및 서면 지침서를 별개의 구획 내에 포함한다. 유리한 실시태양에서, 지침서는 다중-모드 분리 매트릭스의 유출물로부터의 항체 정제를 교시한다. 다중-모드 분리 매트릭스의 리간드; 지지체 및 다른 상세 내역은 상기 설명한 바와 같을 수 있다. 지침서는 유리하게는 상기 정의된 방법을 설명한다. 키트의 한 실시태양에서, 제1 분리 매트릭스는 친화도 크로마토그래피 매트릭스이고, 바람직하게는 단백질 리간드, 예를 들어 프로테인 A 리간드 또는 프로테인 G 리간드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 제1 크로마토그래피 컬럼 및/또는 제2 크로마토그래피 컬럼은 멸균 컬럼 및/또는 1회용 컬럼이다.

[0063] 마지막으로, 본 발명은 또한 항체 정제를 위한 1회용 크로마토그래피 컬럼에 관한 것이고, 상기 컬럼은 음으로 하전된 표적 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹 및 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스를 포함한다. 다중-모드 분리 매트릭스의 리간드; 지지체 및 다른 상세 내역은 상기 설명한 바와 같을 수 있다. 한 실시태양에서, 분리 매트릭스는 전도도가 0-50, 예를 들어 0-25, 예를 들어 0-15 mS/cm인 이동상으로부터 항체 이외의 단백질을 흡착할 수 있다. 상기 측면의 별도의 실시태양은 항체 정제용 1회용 필터에 관한 것이고, 상기 필터는 음으로 하전된 표적 부위와 상호작용할 수 있는 제1 그룹 및 전하-전하 상호작용 이외의 1종 이상의 상호작용을 할 수 있는 제2 그룹을 포함하고, 상기 그룹들은 필터 표면에 커플링되어 있다. 특정 실시태양에서, 본 발명의 필터는 전도도가 0-50, 예를 들어 0-25, 예를 들어 0-15 mS/cm인 이동상으로부터 항체 이외의 단백질을 흡착할 수 있다.

[0064] <도면의 상세한 설명>

[0065] 도 1에서, a)는 프로토타입 다중-모드 리간드 2-아미노벤즈이미다졸을 보여주고; b)는 프로토타입 다중-모드 리간드 티오미카민을 보여주고; c)는 비드 형태의 지지체에 고정된 프로토타입 다중-모드 리간드 N-벤질-N-메틸에탄올아민을 보여주고; d)는 프로토타입 다중-모드 리간드 N,N-디메틸벤질아민을 보여준다. 실험 파트에서는, 프로토타입 리간드를 6% 아가로즈 매트릭스 세파로스™ 6 FF에 커플링시켰다.

[0066] 도 2는 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 (901035A); 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N,N-디메틸벤질아민 (901035B)의 리간드; 및 25 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl (약 12 mS/cm), pH 6.5 중의 Q 세파로스™ FF를 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스에 적용된 50 mg Mab1을 포함하는 샘플의 크로마토그램을 보여준다. 용출은 25 mM Bis-Tris, 0.5 M NaCl, pH 6.5를 사용하여 수행하였다.

[0067] 도 3a) 및 b)는 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이, 프로토타입 및 참조물 상에 로딩된 20 mg MAb2를 함유하는 샘플의 크로마토그램을 보여준다. 평형화 및 로딩을 위한 완충제는 25 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl (약 12 mS/cm), pH 6.0이었다. 용출 완충제는 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0이었다. 3a) 티오미카민 (1282004, 녹색), 65 μ mol/mL, 티오미카민 (1282002, 청색), 128 μ mol/mL, 및 Q 세파로스™ FF (흑색). 3b) 2-아미노벤즈이미다졸 (1282045, 청색), 65 μ mol/mL, 2-아미노벤즈이미다졸 (1282030, 녹색), 146 μ mol/mL, 및 Q 세파로스™ FF (흑색).

[0068] 도 4a)-g)는 mAb1-r프로테인 A를 사용하여 프로토타입 상에서 수행한 크로마토그래피의 결과를 도시한 것이다. A-완충제는 25 mM Bis-Tris, 50 mM NaCl, pH 6.0이었다. 전도도는 약 7 mS/cm이었다. 용출을 위해 B-완충제, 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0을 사용하였다. 유속은 0.5 mL/분 (150 cm/시간)이었다. 샘플은 4 mg/mL mAb1 및 1% r프로테인 A (w/w) 농도의 10 mg mAb1, 0.10 mg rPrA이었다. 4a) 티오미카민, 65 μ mol/mL (1282004); b) 티오미카민, 128 μ mol/mL (1282002); c) 참조 Q 세파로스™ FF; d) 2-아미노벤즈이미다졸, 65 μ mol/mL (1282045); e) 2-아미노벤즈이미다졸, 146 μ mol/mL (1282032); f) N-벤질-N-메틸에탄올아민, 146 μ mol/mL (901035A); 및 g) N,N-디메틸벤질아민, 175 μ mol/mL (901035B).

[0069] 도 5a)-h)는 MAb 1, 1% rPrA를 갖는 샘플 및 도 4의 크로마토그래피 실행으로부터의 모아진 유출물 및 용출액 분획에 대한 분석적 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)의 결과를 도시한 것이다. 청색 곡선은 유출물 (FT) 분획이고, 적색은 용출액이다. 보다 구체적으로, 도 5a)는 1% (w/w)를 제공하는 4 mg/mL mAb1, 0.04 mg/mL rPrA의 샘플을 도시하고; 5b)는 도 4a) 티오미카민, 65 μ mol/mL (1282004)로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5

c)는 도 4b) 티오미카민, 128 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (1282002)로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5d)는 도 4c) Q 세파로스™ FF로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5e)는 도 4d) 2-아미노벤즈이미다졸, 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (1282045)로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5f)는 도 4e) 2-아미노벤즈이미다졸, 146 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (1282032)로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5g)는 도 4f) N-벤질-N-메틸에탄올아민, 146 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (901035A)로부터의 FT 및 용출액을 도시하고; 5h)는 도 4g) N,N-디메틸벤질아민, 175 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (901035B)로부터의 FT 및 용출액을 도시한다.

[0070] 도 6은 하기 실시예 5의 결과를 도시한다. 보다 구체적으로, Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우에 적용된 50 mg Mab를 함유하는 샘플로부터 생성된 크로마토그램을 도시한다. 용출은 25 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 8.0을 사용하여 수행하였다. 도 6으로부터, 구배 용출에서 크로마토그램에서 매우 작은 피크만이 관찰되었으므로 모노클로날 항체 분자가 Q 페닐 세파로스™ 패스트 플로우에 흡착되지 않은 이유를 알 수 있다.

실험 파트

[0072] 본 실시예는 예시의 목적으로만 제공되고, 어떠한 식으로도 청구의 범위에 의해 규정되는 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 아래 및 본 명세서에서 제공되는 모든 참조문은 본원에 참고로 포함된다.

처리

[0074] 비-결합 조건 하에, 약 50 mg mAb1을 포함하는 샘플을 프로토타입 901035 A (N-벤질-N-메틸 에탄올아민) 및 901035 B (N,N-디메틸벤질아민) 상에 약 5 및 12 mS/cm에서 로딩하였다. 유출물 분획 (FT)는 5, 10 및 15 컬럼 부피 (CV)에서 수거하였다. 용출 피크로부터의 분획을 모았다. FT 분획을 HCP 및 프로테인 A 함량에 대해 분석하였다.

[0075] 다중-모드 리간드 2-아미노벤즈이미다졸 및 티오미카민에 대해 높은 및 낮은 리간드 밀도를 갖는 프로토타입을 제조하였다. pH 6.5에서, 20 mg의 mAb1을 포함하는 샘플을 컬럼에 약 5 및 12 mS/cm에서 로딩하였다. 프로토타입의 성능은 먼저 분석적 SEC로 평가하였다. 선택된 분획을 HCP 및 프로테인 A 함량에 대해 분석하였다. 분획을 SEC로 스크리닝한 후, 선택된 분획을 HCP 및 프로테인 A 분석을 위해 보냈다.

[0076] 크로마토그래피 성능이 하나의 특정 mAb에 대해 독특하지 않음을 확인하기 위해, mAb2를 포함하는 샘플을 사용하여 pH 6.0 및 약 12 mS/cm에서 크로마토그래피 실행을 반복하였다. 프로토타입의 성능을 먼저 분석적 SEC로 분석하였다. 선택된 분획을 HCP 및 프로테인 A 함량에 대해 분석하였다. 분획을 SEC로 스크리닝한 후, 선택된 분획을 HCP 및 프로테인 A 분석을 위해 보냈다.

[0077] 어떤 프로토타입이 최상의 r프로테인 A 제거율을 제공하는지 보다 쉽게 구분하기 위해, MAb1을 1% (w/w) 재조합 프로테인 A (rPrA)로 스파이킹(spiking)하였다. 각각의 프로토타입을 10 mg MAb1, 1% r프로테인 A에 상응하는 샘플 부피로 pH 6.0 및 약 7 mS/cm의 전도도에서 주입하였다. 유출물 및 용출액 분획을 따로 모으고, SEC로 분석하였다.

재료/조사된 유닛

[0079] 컬럼 및 젤은 지이 헬쓰케어로부터 입수하였다.

[0080] 하이프렙(HiPrep)™ 26/10 탈염, 카탈로그 번호: 17-5087-01, CV= 53.09 mL

[0081] 트리콘(Tricorn)™ 5/50, 카탈로그 번호: 18-1163-09, CV= 1 mL

[0082] HR 5/5™, 카탈로그 번호: 18-0338-01, CV= 1 mL

[0083] 수퍼덱스(Superdex)™ 200 10/300 GL, 카탈로그 번호: 17-5175-01, CV= 23.56 mL

기구

[0085] 크로마토그래피 시스템: AEKTA익스플로러(AEKTAExplorer)™ 10

[0086] 분광광도계: 스펙트라 맥스 플러스(Spectra MAX plus)

화학물질

[0088] 사용된 모든 화학물질은 분석 등급이었다. 물은 밀리큐(MilliQ)-여과된 것이었다.

크로마토그래피 매질

[0090] 참조 매트릭스는 Q 세파로스™ 패스트 플로우 (FF) (지이 헬쓰케어)였다. 다중-모드 분리 매트릭스 프로토타입

은 하기 표 1에 설명된 리간드를 가졌다:

표 1

[0091] 다중모드 음이온 교환 리간드

프로토타입	리간드	Cl ⁻ 용량 (μmol/mL)
901035A	N-벤질-N-메틸 에탄올아민	146
901035B	N,N-디메틸벤질아민	175
1282002	티오미카민	128
1282004	티오미카민	65
1282032	2-아미노벤즈이미다졸 (ABI)	146
1282045	2-아미노벤즈이미다졸 (ABI)	65

[0092] 프로토타입 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 세파로스™ 패스트 플로우의 제조

A. 매트릭스 상에 알릴기의 도입

세파로스™ 6 패스트 플로우 (지이 헬쓰케어)를 알릴 글리시딜 에테르로 다음과 같이 활성화시켰다: 100 mL의 세파로스™ 6 패스트 플로우를 흡인 건조시키고, 0.3 g의 NaBH₄, 12 g의 Na₂SO₄ 및 35 mL의 NaOH 50% 수용액과 혼합하였다. 혼합물을 1시간 동안 50°C에서 교반하였다. 100 mL의 알릴 글리시딜 에테르의 첨가 후, 혼탁액을 추가로 16시간 동안 격렬하게 교반하면서 50°C에서 유지시켰다. 혼합물의 여과 후, 젤을 500 mL 중류수, 500 mL 에탄올, 200 mL 중류수, 200 mL 0.2 M 아세트산 및 500 mL 중류수로 연속적으로 세척하였다.

적정은 0.22 mmol 알릴/mL 젤의 치환도를 제공하였다.

B. 브롬화를 통한 알릴 세파로스™ 6 패스트 플로우의 활성화

지속적인 황색이 얻어질 때까지 50 mL의 알릴 활성화된 세파로스™ 6 패스트 플로우 (0.22 mmol 알릴기/mL 수분제외 (drained) 젤), 1 g의 아세트산나트륨 및 15 mL의 중류수의 교반 혼탁액에 브롬을 첨가하였다. 이어서, 혼탁액이 완전히 탈색될 때까지 포름산나트륨을 첨가하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 젤을 500 mL의 중류수로 세척하였다. 이어서, 활성화된 젤을 반응 용기에 직접 옮기고 N-벤질-N-메틸에탄올아민과 추가로 반응시켰다.

C. 활성화된 매트릭스 상에 BMEA (N-벤질-N-메틸에탄올아민) 기의 도입

아민기를 아민기의 질소 원자를 통해 직접 매트릭스 상에 도입하였다. 전형적인 과정에서, 매트릭스에 대한 커플링은 알릴기의 브롬화 및 염기성 조건 하의 친핵 치환을 통해 실현되었다. 25 mL의 브롬 활성화된 젤 (0.22 mmol 알릴기/mL 수분제외 젤)을 N-벤질-N-메틸에탄올아민 (16.0 mL)의 용액을 포함하는 반응 바이알에 옮겼다. 5 mL의 물을 첨가하고, 수산화나트륨 용액으로 반응 용액의 pH를 12.0으로 조정하였다. 반응물을 50°C에서 교반하면서 16시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물의 여과 후, 젤을 3 x 10 mL의 중류수, 3 x 10 mL의 수성 0.5 HCl 및 마지막으로 3 x 10 mL의 중류수로 연속적으로 세척하였다. 0.15 mmol 아민/mL 젤의 치환도를 갖는 BMEA 세파로스™ 패스트 플로우 젤을 얻었다.

높은 및 낮은 리간드 밀도를 갖는 2-아미노벤즈이미다졸 및 티오미카민 프로토타입을 표준 절차에 따라 제조하였다 (US 6,702,943 (Johansson et al), WO 01/38228 (Belew et al), 및 WO 02/053252 (Belew et al) 참조).

샘플

흡광 계수가 각각 1.46 및 1.50인 2가지 상이한 인간화 IgG 항체, 서브클래스 1 (MAb 1 및 MAb 2로 나타냄)을 사용하였다. 두 항체를 CHO 배양물에서 발현시키고, 본 실험에 앞서 통상적인 프로테인 A 친화도 크로마토그래피를 이용하여 후속적으로 정제하였다.

완충제 교환은 수퍼루프(Superloop)™ (지이 헬쓰케어)로 적절한 부피 (5 - 15 mL)를 주입함으로써 관심있는 완충제로 평형화시킨 하이프렙™ 탈염 컬럼 (지이 헬쓰케어) 상에서 이루어졌다. 유속은 5 mL/분이고, 5 mL의 분획을 수거하였다. 용출된 퍼크를 함유하는 분획을 모으고, 하기 식 1에 따라 농도를 계산하기 위해 280 nm에서의 흡광도를 이중으로 결정하였다:

[0104] $A_{280} = \epsilon \cdot C \cdot l$ (식 1)

[0105] 상기 식에서, A_{280} 은 280 nm에서의 흡광도이고,

[0106] ϵ ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)은 특정 단백질에 대한 흡광 계수이고,

[0107] C (mg/mL)는 단백질의 농도이고,

[0108] l (cm)은 경로 길이이다.

[0109] 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 수퍼텍스™ 200 10/300 컬럼 (지이 헬쓰케어) 상에서 0.5 mL/분의 유속에서 수행하였다. 완충제는 타블렛 (시그마 (Sigma), P-4417)로부터 제조한 PBS (인산염-완충 염수); 10 mM 인산염, 0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4이었다.

[0110] 방법

[0111] 평형화 2/0.1 CV; 제1회 사용시 2 CV; 실행 사이에 0.1 CV

[0112] 샘플 주입 50 μl

[0113] 등용매 (isocratic) 용출 1.5 CV

[0114] mAb를 사용하여 프로토타입 상에서 크로마토그래피

[0115] A-완충제는 25 mM Bis-Tris, pH 6.0 또는 6.5이었다. 목적하는 전도도, 약 5 또는 12 mS/cm에 따라, 35 또는 100 mM NaCl을 포함시켰다. 프로토타입 901035 A 및 901035 B에 대해, 용출 완충제 (B-완충제)는 25 mM Bis-Tris, 0.5 M NaCl, pH 6.5이었다. 리간드로서 티오미카민 및 ABI를 갖는 프로토타입에 대해, 용출 완충제 (B-완충제)는 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0이었다. 유속은 0.5 mL/분 (150 cm/시간)이었다.

[0116] 방법: 평형화 5 CV A-완충제

[0117] 샘플 주입 5-25 mL 샘플 농도 20 또는 50 mg mAb

[0118] 세척 5 CV A-완충제

[0119] 구배 용출 10 CV 0-100% B-완충제

[0120] 용출 10 CV 100% B-완충제

[0121] 재생 5 CV A-완충제

[0122] MAb-r프로테인 A를 사용하여 프로토타입 상에서 크로마토그래피

[0123] A-완충제는 25 mM Bis-Tris, pH 6.0이었다. 50 mM NaCl을 첨가하여 전도도는 약 7 mS/cm이었고, B-완충제는 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0이었다. 유속은 0.5 mL/분 (150 cm/시간)이었다. 샘플 농도는 1% (w/w)를 제공하는 4 mg/mL MAb 1-0.04 mg/mL rPrA이었다.

[0124] 방법: 평형화 5 CV A-완충제

[0125] 샘플 주입 2.5 mL 10 mg MAb, 1% rPrA

[0126] 세척 5 CV A-완충제

[0127] 구배 용출 10 CV 0-100% B-완충제

[0128] 용출 10 CV 100% B-완충제

[0129] 재생 5 CV A-완충제

[0130] CIP (정치 설정)

[0131] 각각의 크로마토그래피 실행 후, 프로토타입 및 참조 매트릭스 Q 세파로스™ FF를 다음 CIP 과정으로 처리하였다;

[0132] 30% 이소프로판을 5 CV (컬럼 부피)

[0133]	H ₂ O	5 CV
[0134]	1.0 M NaOH	4 CV (15 분. 휴지 포함)
[0135]	H ₂ O	5 CV
[0136]	A-완충제	5 CV
[0137]	H ₂ O	5 CV
[0138]	20% EtOH	5 CV

프로테인 A 분석

[0140] 선택된 분획을 SPA 샘플 희석액과 800 μl SPA 샘플 희석액 + 200 μl 샘플의 비율로 혼합하였다. 혼합 후, 분획을 가열 블록 상에서 99°C에서 10분 동안 가열한 후, 다시 혼합하였다. 이어서, 샘플을 재조합 프로테인 A에 대해 분석하였다.

숙주 세포 단백질 (HCP) 분석

[0142] 샘플 (분. 600 μl)을 HCP 함량에 대해 분석하였다. 검출 하한은 10 ng/mL이다.

실시예

[0143] 실시예 1:

[0144] 프로토타입 리간드 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 (901035A) 및 N,N-디메틸벤질아민 (901035B) 상에서 정제된 MAb1-함유 샘플

[0145] 실시예 1에서, 50 mg MAb1을 함유하는 샘플을 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 (901035A), 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N,N-디메틸벤질아민 (901035B), 및 25 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl (약 12 mS/cm), pH 6.5 중의 참조 매트릭스 Q 세파로스™ FF에 적용하였다. 용출은 25 mM Bis-Tris, 0.5 M NaCl, pH 6.5를 사용하여 수행하였다.

[0146] 실시예 1의 크로마토그램을 도 2에 도시하고, 이는 Q 세파로스™ FF에 비교한 2가지 프로토타입 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 세파로스™ 6 FF (901035A) 및 N,N-디메틸벤질아민 세파로스™ 6 FF (901035B)를 보여준다. 분석을 위해 선택된 유출물 (FT) 분획을 화살표로 표시한다. 하기 표 2 및 3에 나타낸 HCP 및 프로테인 A 제거율에 대한 결과는 프로토타입이 상기 면에서 Q 세파로스™ FF보다 우수함을 밝힌다.

표 2

[0147] HCP 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)	FT3 (ng/mL)
Q 세파로스™ FF (참조)	6.5	890	160	200	180
N-벤질-N-메틸에탄올아민, 146 $\mu\text{mol/mL}$ (901035A)	6.5	890	10	20	35
N,N-디메틸벤질아민, 175 $\mu\text{mol/mL}$ (901035B)	6.5	890	27	39	45

표 3

[0148]

PrA 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)	FT3 (ng/mL)
Q 세파로스™ FF (참조)	6.5	0.40	0.69	0.46	0.31
N-벤질-N-메틸에탄올아민, 146 $\mu\text{mol/mL}$ (901035A)	6.5	0.40	0	0	0
N,N-디메틸벤질아민, 175 $\mu\text{mol/mL}$ (901035B)	6.5	0.40	0.11	0.10	0.08

[0149]

실시예 2:

[0150]

프로토타입 리간드 티오미카민 및 2-아미노벤즈이미다졸 상에서 정제된 MAb1-함유 샘플

[0151]

본 실시예에서, 20 mg MAb1을 함유하는 샘플을 프로토타입 및 참조 분리 매트릭스 상으로 로딩하였다. 평형화 및 로딩을 위한 완충제는 25 mM Bis-Tris, 35 mM NaCl (약 5 mS/cm), pH 6.5이었다. 용출 완충제는 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0이었다. a) 티오미카민, 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282004), b) 티오미카민 128 $\mu\text{mol/mL}$ (1282002), c) Q 세파로스™ FF, d) 2-아미노벤즈이미다졸 (ABI), 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282045) 및 e) 2-아미노벤즈이미다졸 (ABI), 146 $\mu\text{mol/mL}$ (1282032). HCP 및 프로테인 A 분석에 대한 결과를 하기 표 4 및 5에 나타낸다.

표 4

[0152]

HCP 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)
티오미카민, 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282004)	6.5	351	≤ 10	≤ 10
Q 세파로스™ FF	6.5	351	11	11
2-아미노벤즈이미다졸 (ABI), 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282045)	6.5	351	≤ 10	≤ 10

표 5

[0153]

PrA 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)
티오미카민, 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282004)	6.5	0.39	0.00	0.00
Q 세파로스™ FF	6.5	0.39	0.09	0.21
2-아미노벤즈이미다졸 (ABI), 65 $\mu\text{mol/mL}$ (1282045)	6.5	0.39	0.00	0.00

실시예 3:

[0154]

프로토타입 리간드 티오미카민 및 2-아미노벤즈이미다졸 상에서 정제된 MAb2-함유 샘플

[0155]

20 mg MAb2를 함유하는 샘플을 프로토타입 및 참조용에 적용하였다. 완충제는 25 mM Bis-Tris, 100 mM NaCl (약 12 mS/cm), pH 6.0이었다. 용출은 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0을 사용하여 수행하였다. 생성되는 크로마토그램을 도 3에 도시한다.

[0156]

3a) 티오미카민 (1282004, 녹색), 65 $\mu\text{mol/mL}$, 티오미카민 (1282002, 청색), 128 $\mu\text{mol/mL}$, 및 Q 세파로스™

FF (흑색), 3b) 2-아미노벤즈이미다졸 (1282045, 청색), 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 2-아미노벤즈이미다졸 (1282030, 녹색), 146 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 및 Q 세파로스™ FF (흑색). 하기 표 6 및 7에 나타낸 바와 같이 HCP 및 프로테인 A 분석을 위한 분획을 선택하기 위해 분석적 SEC를 사용하였다.

표 6

[0158] HCP 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)
티오미카민, 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (1282004)	6.0	170	≤ 10	≤ 10
Q 세파로스™ FF	6.0	170	66	55

표 7

[0159] PrA 분석 결과

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)
티오미카민, 65 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (1282004)	6.0	5.42	0.00	0.24
Q 세파로스™ FF	6.0	5.42	3.90	4.93

[0160] 실시예 4:

[0161] 프로토타입 리간드 N-벤질-N-메틸에탄올아민, N,N-디메틸벤질아민, 티오미카민 및 2-아미노벤즈이미다졸 상에서 MAb1 및 재조합 프로테인 A (rPrA)를 포함하는 샘플로부터 MAb1의 정제

[0162] 본 실시예에서, mAb1-rPrA를 함유하는 샘플을 사용하여 프로토타입 상에서 크로마토그래피를 수행하였다. A-완충제는 25 mM Bis-Tris, 50 mM NaCl, pH 6.0이었다. 전도도는 약 7 mS/cm이었다. B-완충제는 0.5 M Na-아세테이트, pH 4.0이었다. 유속은 0.5 mL/분 (150 cm/시간)이었다. 샘플은 4 mg/mL mAb1 및 1% rPrA (w/w)의 농도에서 10 mg mAb1, 0.10 mg rPrA이었다. 결과를 도 4에 나타낸다.

[0163] 마지막으로, mAb1, 1% rPrA를 갖는 샘플 및 도 4의 크로마토그래피 실행으로부터의 모아진 유출물 및 용출액 분획에 대한 분석적 SEC를 수행하였다. 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5a에서, 빛금친 피크는 MAb1-프로테인 A의 복합체이다. 청색 곡선은 유출물 (FT) 분획이고, 적색은 용출액이다.

[0164] 실시예 5: Q 페닐 세파로스 6 패스트 플로우 상에서 항체 정제

[0165] 처리

[0166] 비-결합 조건 하에, 약 50 mg mAb를 함유하는 샘플을 프로토타입 Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 상으로 로딩하였다. 유출물 분획 (FT)은 5, 10 및 15 컬럼 부피 (CV)에서 수거하였다. 용출 피크로부터의 분획을 분석하였다.

[0167] Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우는 표준 절차 (하기 참조)에 따라 Q-기 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$)를 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 (45 μmol 페닐기/mL 젤)에 부착시켜 제조하였다. Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우의 이온 교환 용량은 108 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 젤이었다. pH 7.0 또는 8.0에서, 50 mg mAb를 함유하는 샘플 (Mab셀렉트 정제된)을 컬럼 상으로 로딩하고, Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우의 성능은 선택된 유출물 분획을 숙주 세포 단백질 (HCP) 및 프로테인 A 함량의 면에서 분석함으로써 평가하였다.

[0168] 재료/조사된 유닛

[0169] 컬럼 및 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우는 지이 헬쓰케어로부터 입수하였다.

[0170] HR 5/5™, 카탈로그 번호: 18-0338-01, CV= 1 mL

[0171]

기구

[0172]

크로마토그래피 시스템: AEKTA익스플로러™ 10

[0173]

분광광도계: 스펙트라 맥스 플러스

[0174]

화학물질

[0175]

사용된 모든 화학물질은 분석 등급이었다. 물은 밀리큐-여과된 것이었다.

[0176]

Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우의 제조

[0177]

가교결합된 아가로즈 겔 (페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 (high sub), 지이 헬쓰케어)을 출발 물질로 사용하여, 본 발명에 따른 분리 매트릭스를 제조하기 위한 한 방법을 아래 예시한다.

[0178]

페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 (high sub) 상에 Q기의 도입:

[0179]

Q기 ($-N(CH_3)_3$)는 다음과 같이 글리시딜 트리메틸암모늄 클로라이드 (G-MAC)와의 반응을 통해 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 (high sub) 상에 도입하였다: 15 g의 흡인 건조된 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 (high sub)를 5 mL의 물, 5 mL의 NaOH 50% 수용액, 0.02 g의 NaBH₄, 및 40 mL의 G-MAC와 혼합하였다. 혼합물을 16시간 동안 30°C에서 교반하였다. 혼합물의 여과 후, 겔을 100 mL 중류수, 100 mL 에탄올, 및 100 mL 중류수로 연속적으로 세척하였다.

[0180]

적정은 0.11 mmol 아민/mL 겔의 치환도를 제공하였다.

[0181]

샘플

[0182]

사용된 모노클로날 항체는 CHO 배양물에서 발현시키고, 본 실험에 앞서 통상적인 프로테인 A 친화도 크로마토그래피를 이용하여 후속적으로 정제하였다.

[0183]

mAb의 농도 결정

[0184]

mAb 샘플을 완충제로 10배 희석하였다. 샘플 용액의 2개의 복사물을 A280에서 측정하였다. 램버트 비어 (Lambert Beer)의 법칙에 따라 농도를 계산하기 위해 평균값을 사용하였다:

[0185]

$$C = A/(1 \times \epsilon)$$

[0186]

$$C = IgG \text{의 농도}$$

[0187]

$$A = 280 \text{ nm} \text{에서의 흡광도}$$

[0188]

$$l = \text{경로 길이}$$

[0189]

$$\epsilon = mAb \text{에 대한 물 흡광 계수, } \text{mg}^{-1} \text{mL} = 1.46.$$

[0190]

Q 페닐 세파로스™ 6 패스트 플로우 상의 크로마토그래피

[0191]

숙주 세포 단백질 및 프로테인 A로부터 mAb의 분리를 비-결합 조건 하에 시험하였다. 컬럼에 적용된 샘플은 Mab셀렉트 정제된 mAb이었다. 유속은 0.5 mL/분 (150 cm/시간)이었다. 모든 실행 동안 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 2가지 상이한 완충제 (하기 참조)를 시험하였다. 각각의 실행 전에 A-완충제로의 완충제 교환을 수행하였다. 샘플 부피에 따라 하이프렙 탈염 및 HiTrap 탈염 컬럼을 사용하였다.

[0192]

완충제: A-완충제: 25 mM Tris/HCl pH 8.0

[0193]

B-완충제: 25 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0

[0194]

A-완충제: 25 mM 인산염 완충제 pH 7.0

[0195]

B-완충제: 25 mM 인산염 완충제, 0.5 M NaCl, pH 7.0

[0196]

방법: Mab셀렉트로부터의 pH 조정된 용출액을 출발 물질로서 사용하였다.

[0197]

평형화 5 CV A-완충제

[0198]

샘플 주입 16 CV (50 mg mAb)

- [0199] 세척 5 CV A-완충제
- [0200] 구배 5 CV 100% B-완충제
- [0201] 구배 후 세정 5 CV A-완충제
- [0202] 샘플 주입, 세척 및 용출 동안 1 mL 분획을 수거하였다.
- [0203] 1 M NaOH를 사용하는 CIP (정치 세정)를 각각의 실행 후 수행하였다. 체류 시간은 약 25 분이었다.
- [0204] 프로테인 A 분석
- [0205] 선택된 분획을 SPA 샘플 희석액과 800 μ l SPA 샘플 희석액 + 200 μ l 샘플의 비율로 혼합하였다. 혼합한 후, 분획을 가열 블록 상에서 99°C에서 10분 동안 가열한 후, 다시 혼합하였다. 이어서 샘플을 재조합 프로테인 A에 대해 분석하였다.
- [0206] 숙주 세포 단백질 (HCP) 분석
- [0207] 샘플 (분. 600 μ l)을 HCP 함량에 대해 분석하였다. 검출 하한은 10 ng/mL이었다.
- [0208] 결과
- [0209] 비-결합 조건 하에, 약 50 mg mAb를 Q 페닐 세파로스™ 패스트 플로우로 충전된 HR 5/5 컬럼 상에 2가지 상이한 pH (pH 7.0 및 8.0)에서 로딩하였다. 유출물 분획은 도 1에 따라 5, 10 및 15 컬럼 부피 (CV)에서 수거하였다. 표 8 및 9는 유출물 분획의 프로테인 A 및 HCP 분석의 결과를 보여준다. 분획 내에 나머지 프로테인 A가 검출될 수 없었다. 또한, 숙주 세포 단백질은 8.0의 샘플 pH를 사용할 때 FT1 및 FT2에서 검출될 수 없었다. 7.0의 샘플 pH를 사용할 때 소량의 숙주 세포 단백질이 관찰되었지만, HCP에서 감소는 샘플 중의 HCP-함량에 비해 약 50배이었다. 도 6은 또한 구배 용출에서 크로마토그램에서 매우 작은 피크만이 관찰되므로 (도 6) 모노클로날 항체 분자가 Q 페닐 세파로스™ 패스트 플로우에 흡착되지 않음을 보여준다.

표 8

- [0210] 프로테인 A 분석 결과.

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)	용출액 (ng/mL)
Q 페닐 세파로스™ FF	8.0	6.98	0.00	0.00	48.25
Q 페닐 세파로스™ FF	7.0	5.03	0.00	0.00	36.15

- [0211] 샘플 부피는 16 mL이고, FT1-FT3은 1 mL 분획이었다. 모아진 용출 부피는 2 mL이었다.

표 9

- [0212] 숙주 세포 단백질 분석 결과.

컬럼	pH	출발 (ng/mL)	FT1 (ng/mL)	FT2 (ng/mL)	FT3 (ng/mL)	용출액 (ng/mL)
Q 페닐 세파로스™ FF	8.0	1100	<10	<10	12	4900
Q 페닐 세파로스™ FF	7.0	1200	16	23	26	5100

- [0213] 샘플 부피는 16 mL이고, FT1-FT3은 1 mL 분획이었다. 모아진 용출 부피는 2 mL이었다.

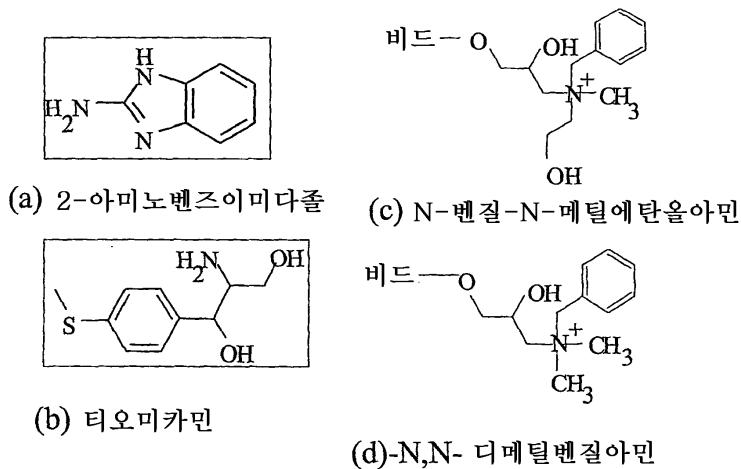
도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a)-d)는 본 발명의 방법에서 유용한 다중-모드 음이온 교환 리간드의 예시적인 선택을 도시한 것이다: N-벤질-N-메틸 에탄올아민, N,N-디메틸벤질아민, 2-아미노벤즈이미다졸 및 티오미카민.

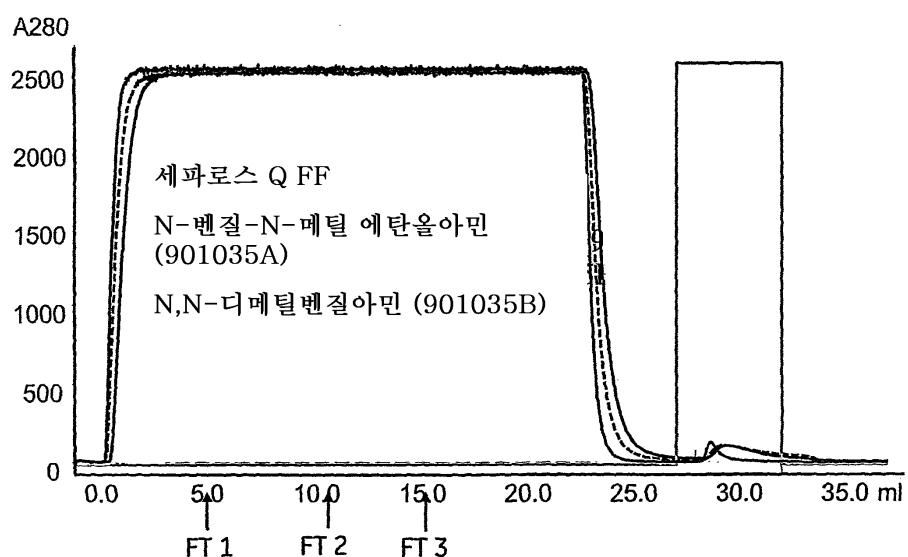
- [0025] 도 2는 하기 실시예 1에 설명된 바와 같이, 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N-벤질-N-메틸 에탄올아민; 세파로스™ 6 FF 상에 고정된 N,N-디메틸벤질아민; 및 참조용으로 강한 음이온 교환체 Q 세파로스™ FF5를 포함하는 다중-모드 분리 매트릭스 상에서의 모노클로날 항체의 분리 크로마토그램을 보여준다.
- [0026] 도 3a) 및 b)는 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이, 세파로스™ 6 FF 상에 상이한 밀도로 고정된 티오미카민 및 2-아미노벤즈이미다졸을 포함하는 분리 매트릭스 상에 로딩된 모노클로날 항체의 크로마토그램을 보여준다.
- [0027] 도 4a)-g)는 mAb1-r프로테인 A의 혼합물을 사용하여 프로토타입 상에서 수행한 크로마토그래피의 결과를 도시한 것이다.
- [0028] 도 5a)-h)는 MAb1, 1% rPrA를 갖는 샘플 및 도 4의 크로마토그래피 실행으로부터의 모아진 유출물 및 용출액 분획에 대한 분석적 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)의 결과를 도시한 것이다.
- [0029] 도 6은 실시예 5에 설명된 바와 같은, 다중-모드 매트릭스 Q 페닐 세파로스™ 패스트 플로우(Fast Flow)를 사용하는 모노클로날 항체 분자의 분리를 보여준다.
- [0030] <정의>
- [0031] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0032] 용어 "분리 매트릭스"는 본원에서 관능기를 포함하는 1종 이상의 리간드가 커플링된 지지체로 구성된 물질을 나타내도록 사용된다.
- [0033] 용어 "다중-모드" 분리 매트릭스는 결합될 화합물과 상호작용하는 2종 이상의 상이하지만 동시-작용성인 부위를 제공할 수 있는 매트릭스를 나타낸다. 예를 들어, 이들 부위 중 하나는 리간드와 관심있는 물질 사이의 인력 유형의 전하-전하 상호작용을 제공할 수 있다. 다른 부위는 전자 수용체-공여체 상호작용 및/또는 소수성 및/또는 친수성 상호작용을 제공할 수 있다. 전자 공여체-수용체 상호작용은 수소-결합, $\pi-\pi$, 양이온- π , 전하 전달, 쌍극자-쌍극자, 유도 쌍극자 등과 같은 상호작용을 포함한다. "다중-모드" 분리 매트릭스는 "혼합 모드" 분리 매트릭스로서 또한 공지된다.
- [0034] 용어 "표면"은 본원에서 모든 외부 표면을 의미하고, 다공성 지지체의 경우에 외부 표면 및 공극 표면을 포함한다.
- [0035] 어구 "전자 공여체-수용체 상호작용"은 유리 전자쌍을 갖는 음전기 원자가 공여체로서 역할을 하고, 공여체의 전자쌍에 대한 수용체로서 작용하는 전자-결핍 원자에 결합하는 것을 의미한다. (예를 들어, 문헌 [Karger et al., An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) page 42.] 참조).
- [0036] 용어 "음이온 교환기"는 본원에서 양으로 하전되거나 대전가능한 기를 의미한다.
- [0037] 용어 "용리액"은 당업계에서 그의 통상적인 의미로 사용되고, 즉 분리 매트릭스로부터 1종 이상의 화합물을 방출시키기 위해 적합한 pH 및/또는 이온 강도의 완충제를 의미한다.
- [0038] 용어 "포획 단계"는 액체 크로마토그래피의 맥락에서 분리 절차의 초기 단계를 나타낸다. 가장 일반적으로, 포획 단계는 정화, 농축, 안정화, 및 가용성 불순물로부터의 유의한 정제를 포함한다. 포획 단계 후, 남아있는 양의 불순물, 예를 들어 숙주 세포 단백질, DNA, 바이러스, 내독소, 영양소, 세포 배양 배지의 성분, 예를 들어 소포체 및 항생제, 및 생성물-관련 불순물, 예를 들어 응집체, 잘못 풀딩된 물질종 및 응집체를 추가로 제거하는 중간 정제가 이어질 수 있다.
- [0039] 용어 "폴리싱 단계"는 액체 크로마토그래피의 맥락에서 최종 정제 단계를 나타내고, 여기서 미량의 불순물이 제거되어 활성의 안전한 생성물을 남긴다. 폴리싱 단계 동안 제거된 불순물은 종종 표적 분자 또는 의심되는 누출 생성물의 이형태체 (conformer)이다.
- [0040] 용어 "Fc-결합 단백질"은 항체의 결정화가능 부분 (Fc)에 결합할 수 있는 단백질을 의미하고, 예를 들어 프로테인 A 및 프로테인 G, 또는 상기 결합 특성을 유지하는 그의 임의의 단편 또는 융합 단백질을 포함한다.

도면

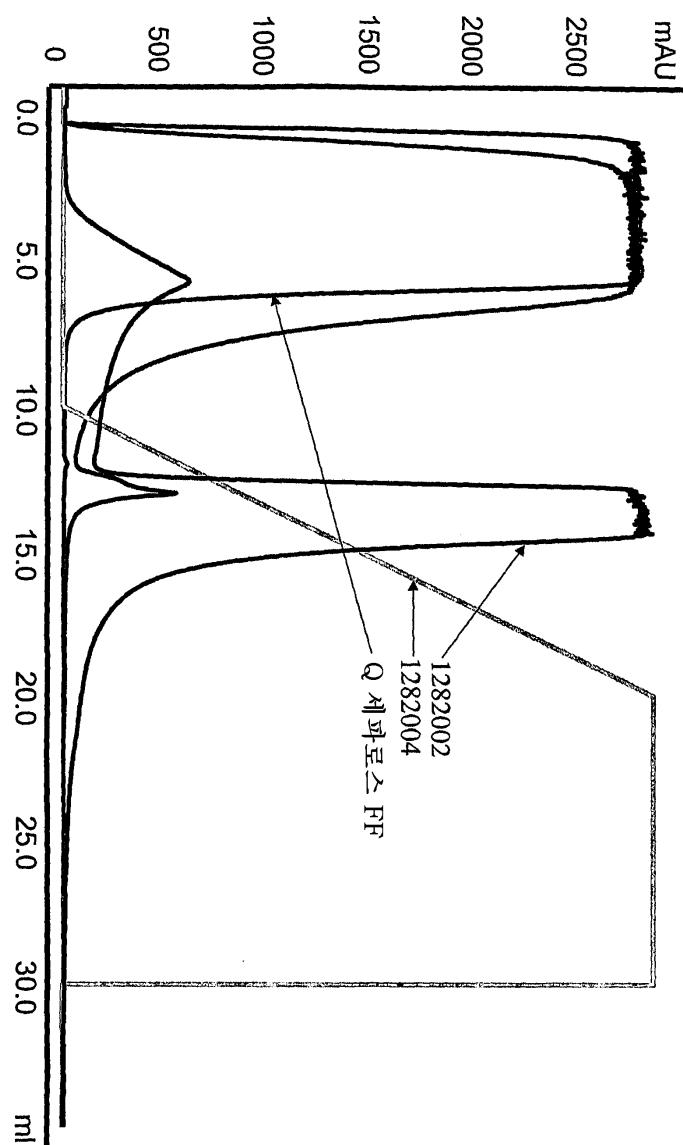
도면1



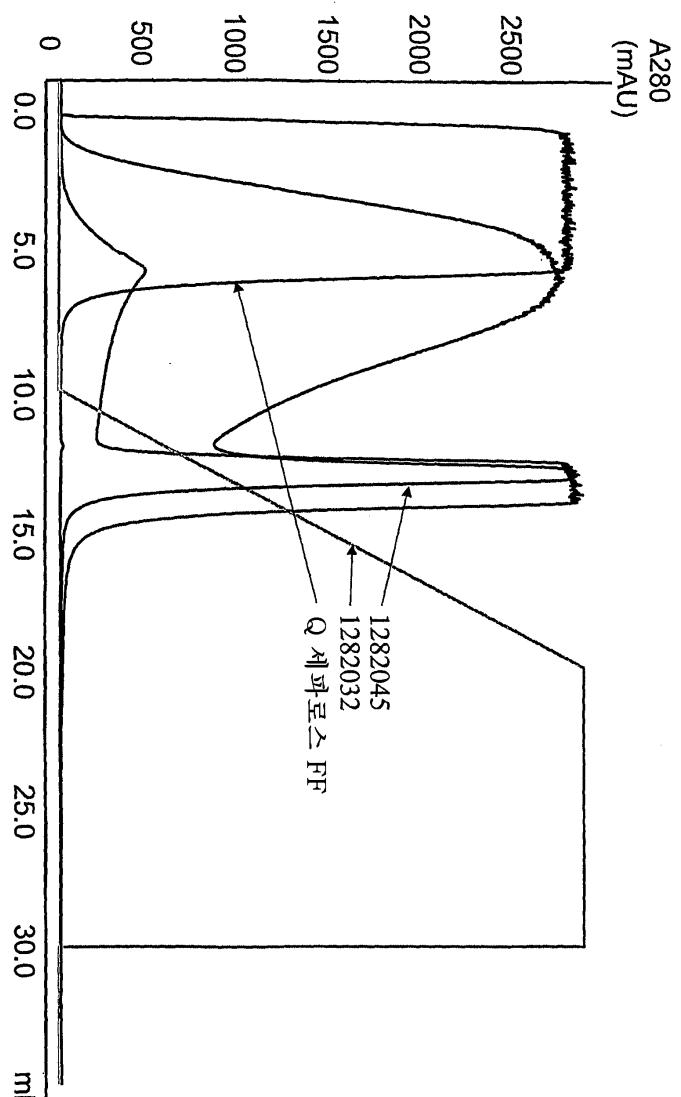
도면2



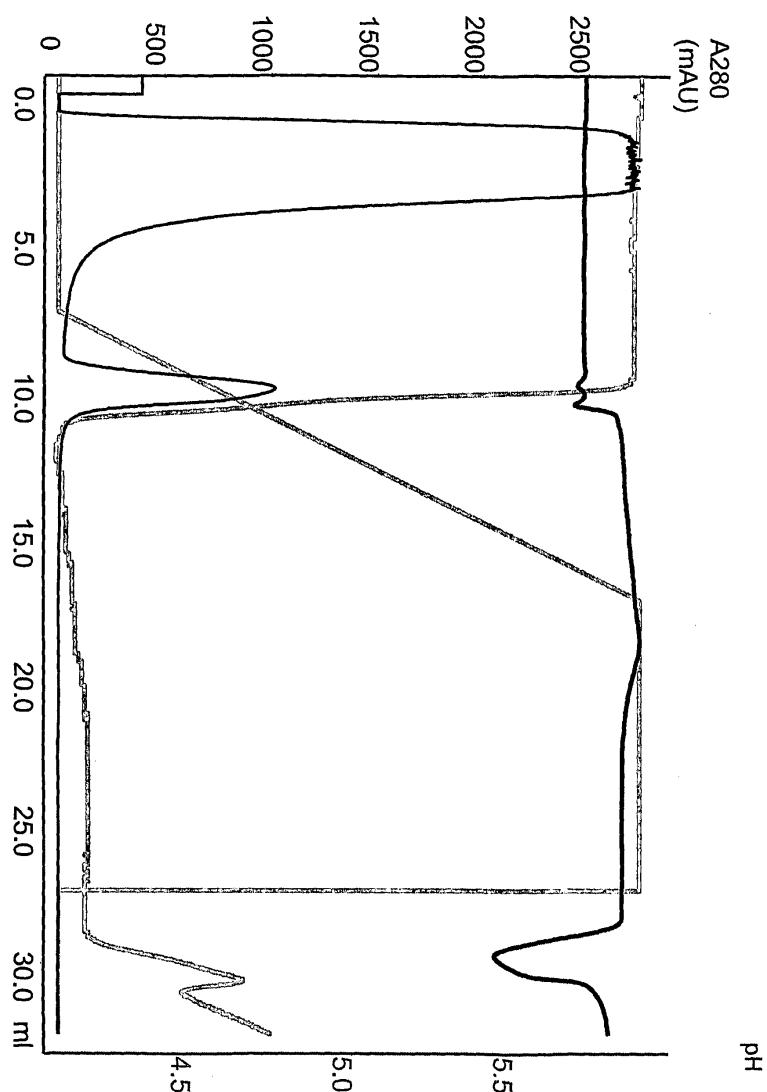
도면3a



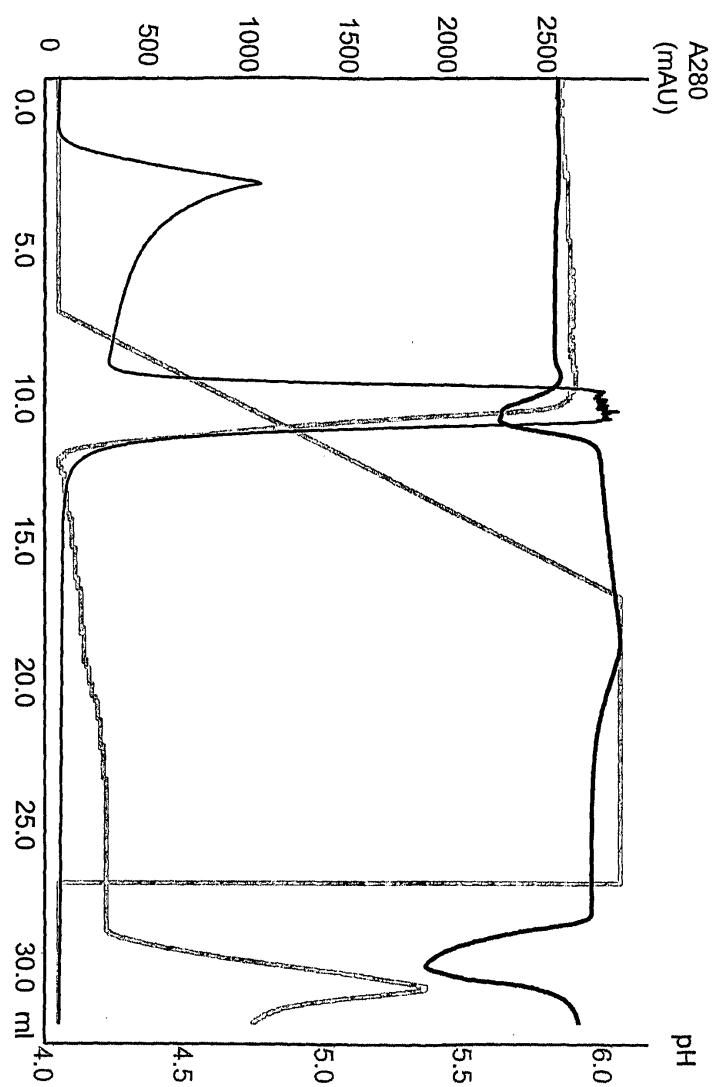
도면3b



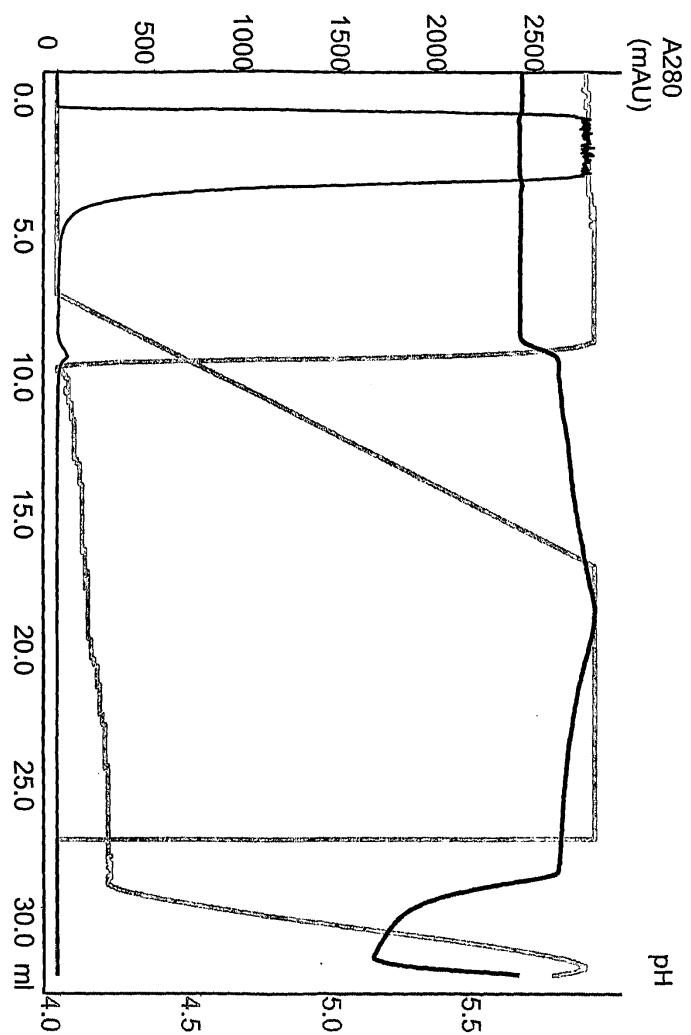
도면4a



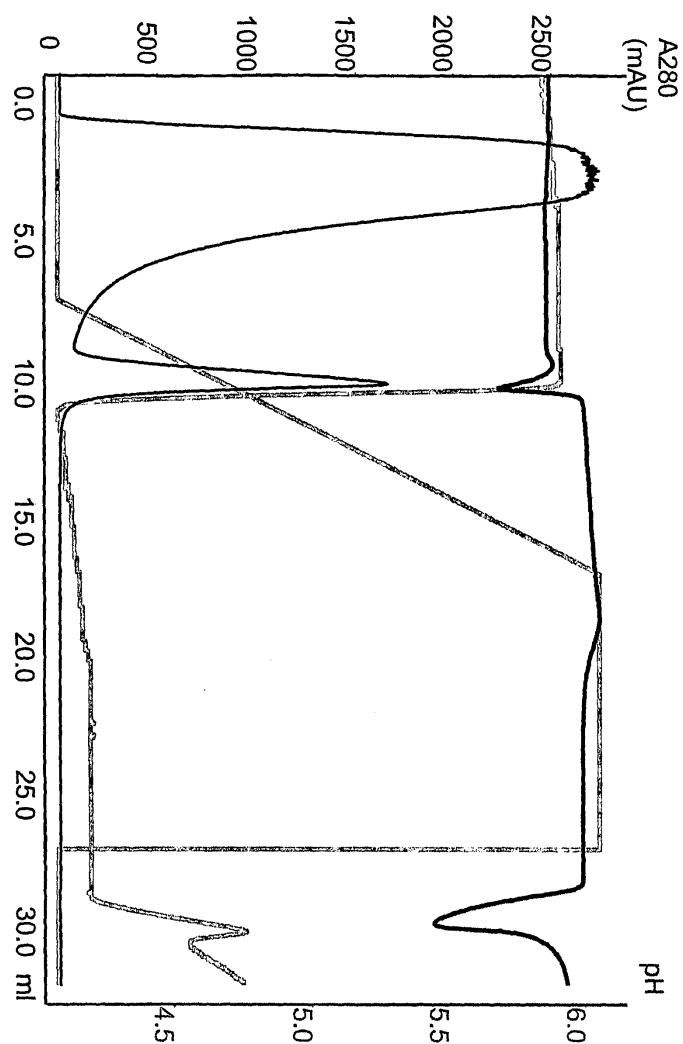
도면4b



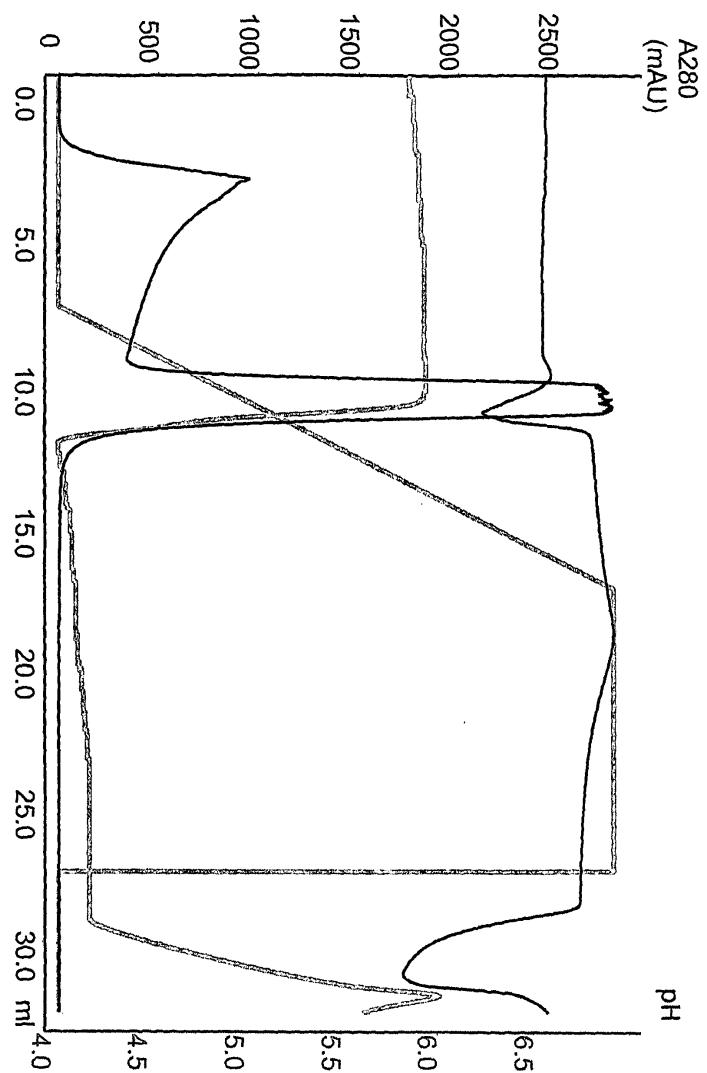
도면4c



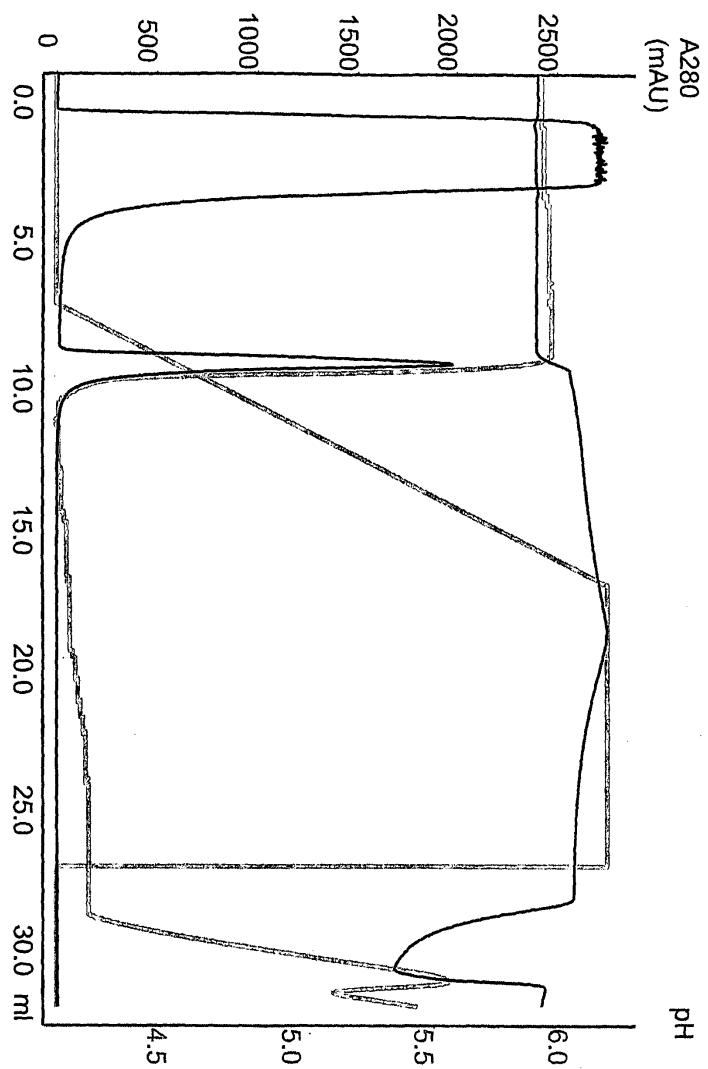
도면4d



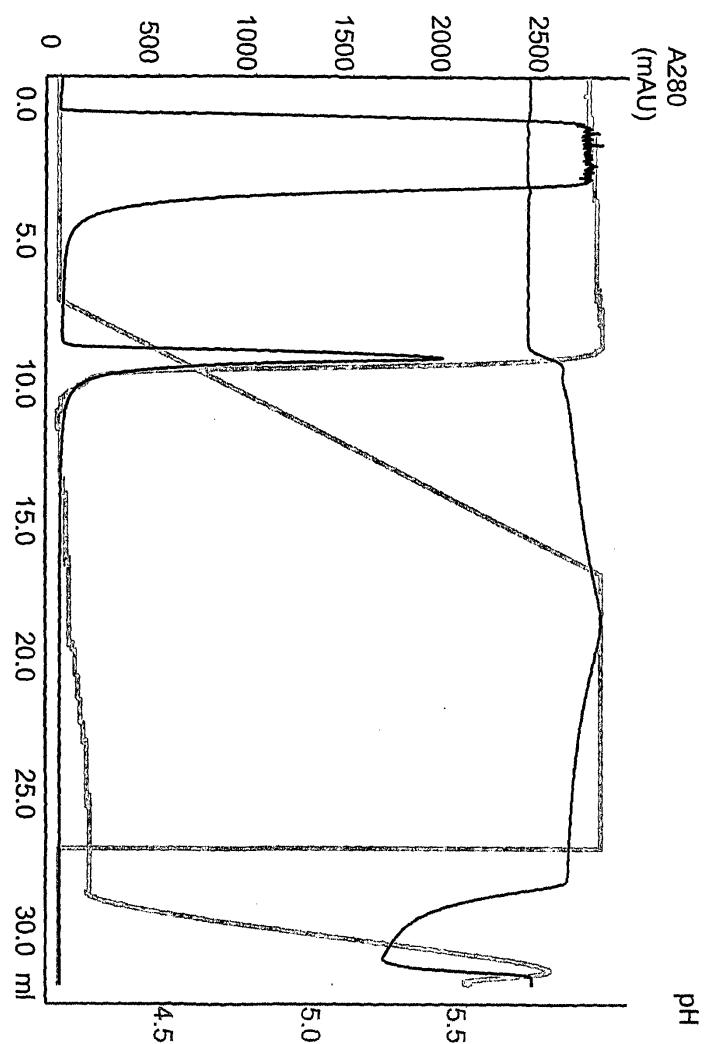
도면4e



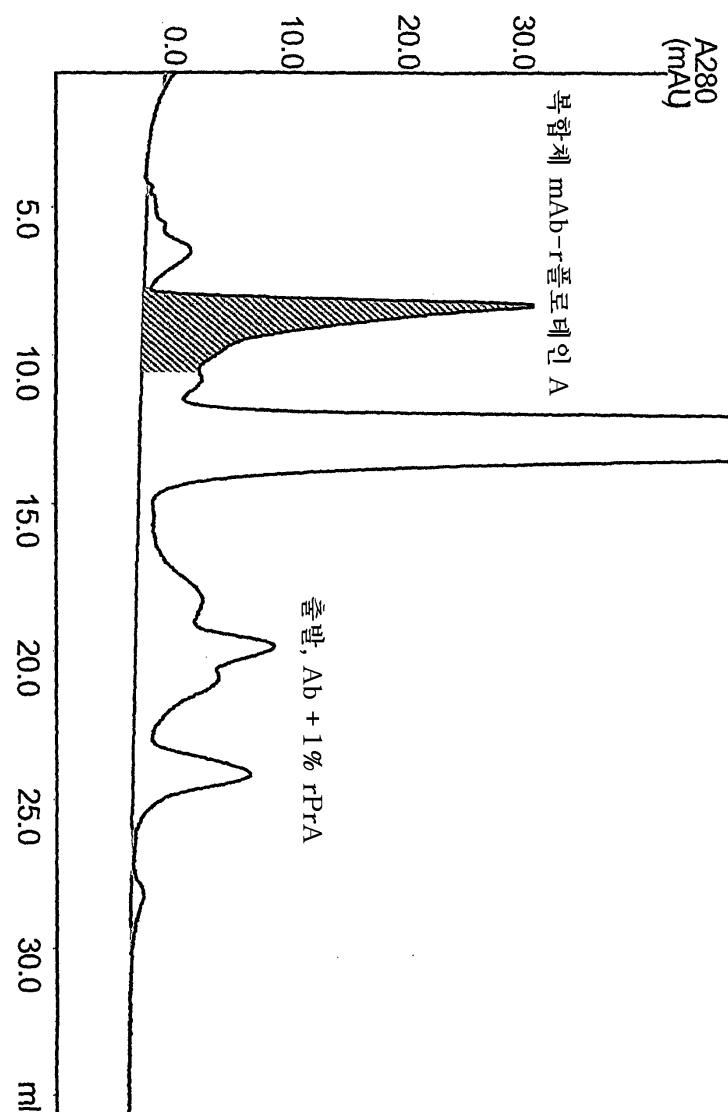
도면4f



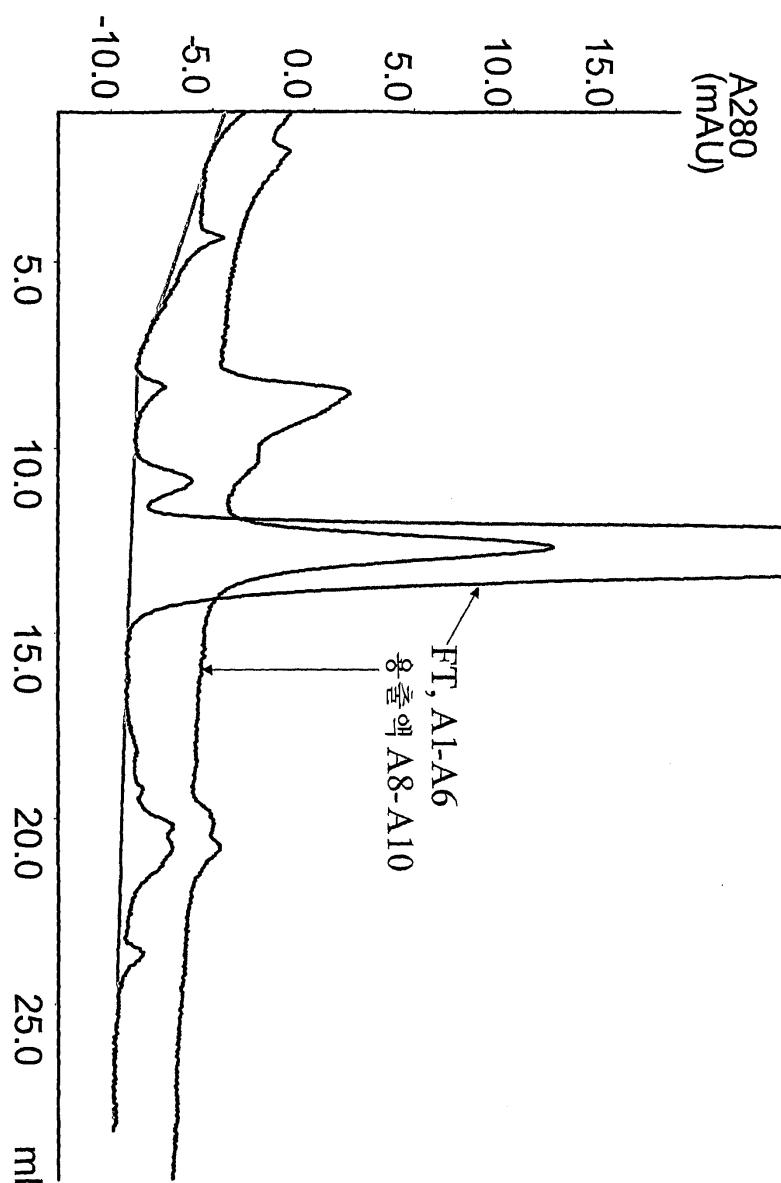
도면4g



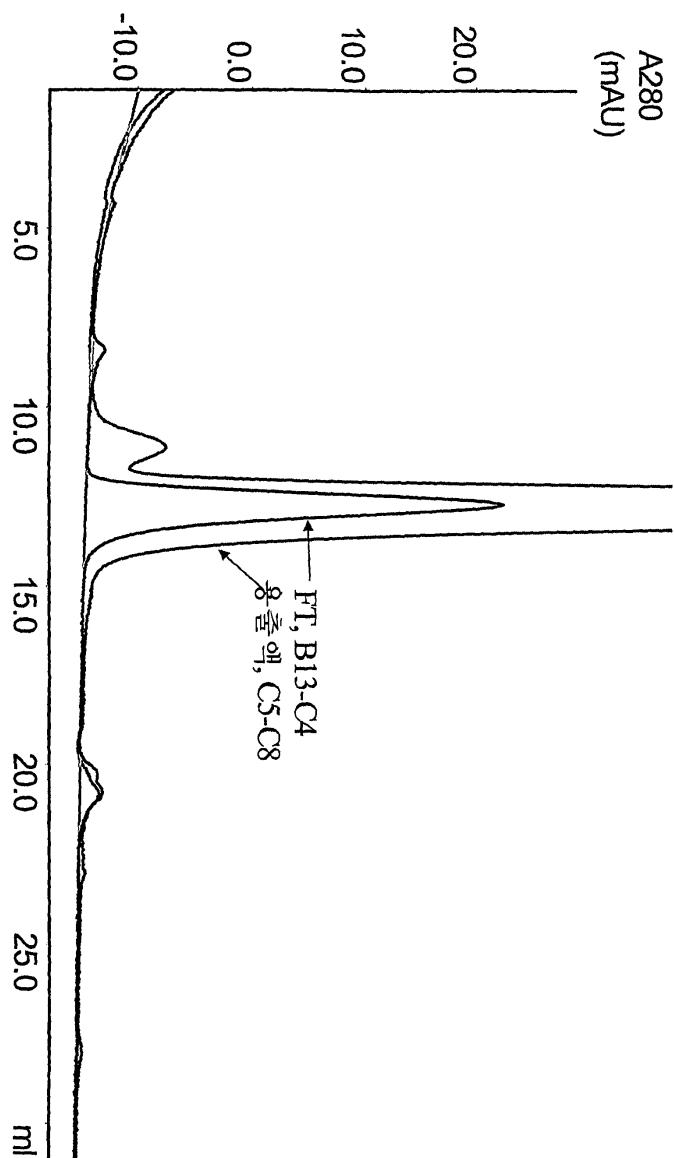
도면5a



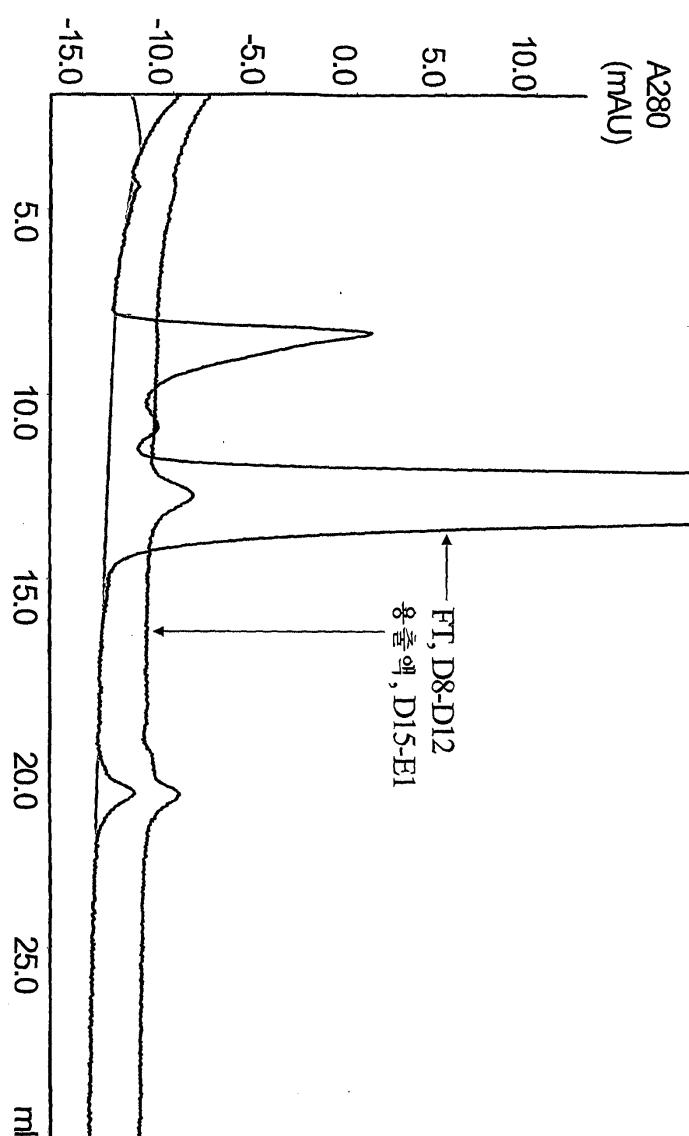
도면5b



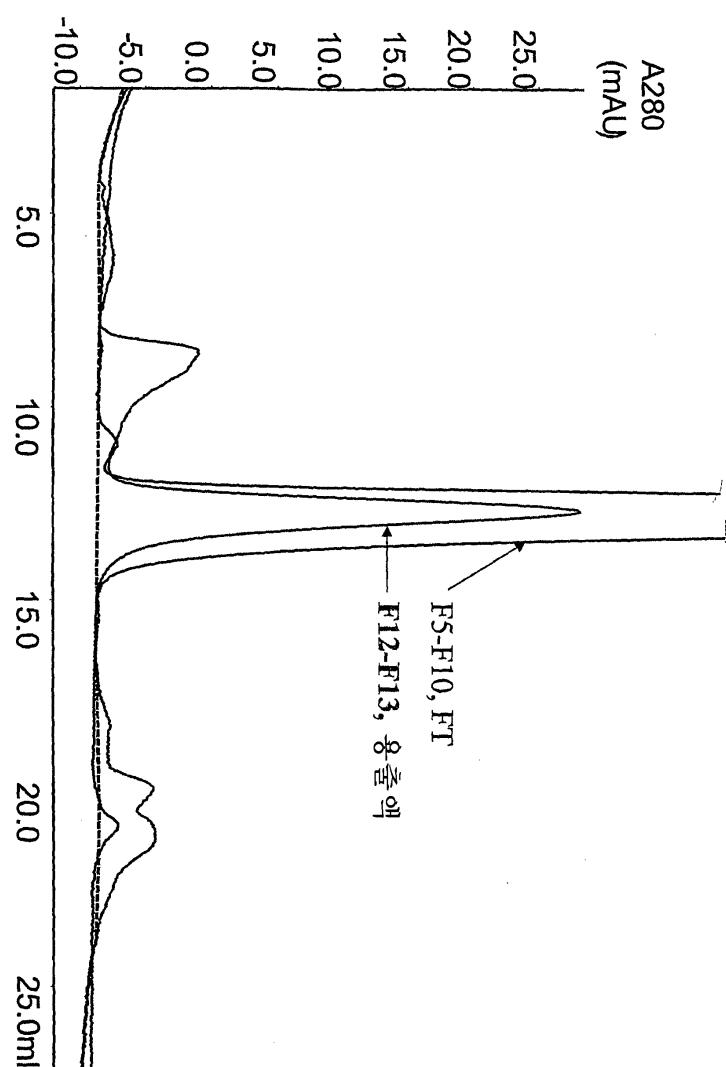
도면5c



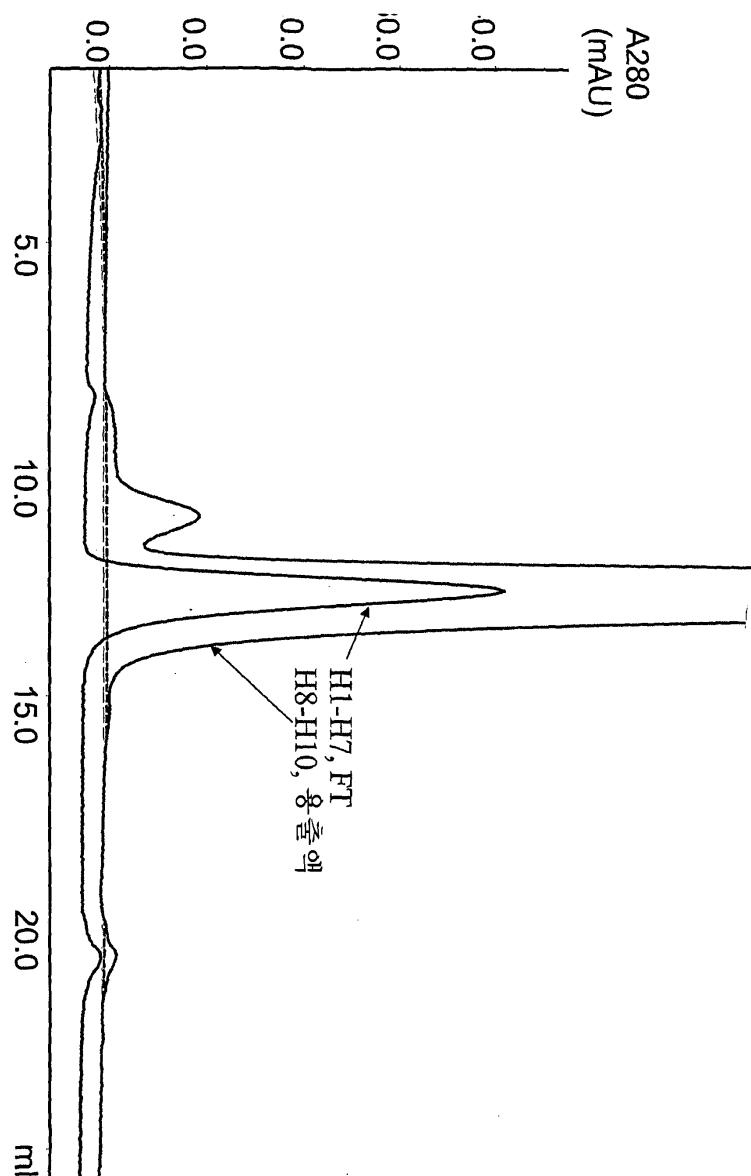
도면5d



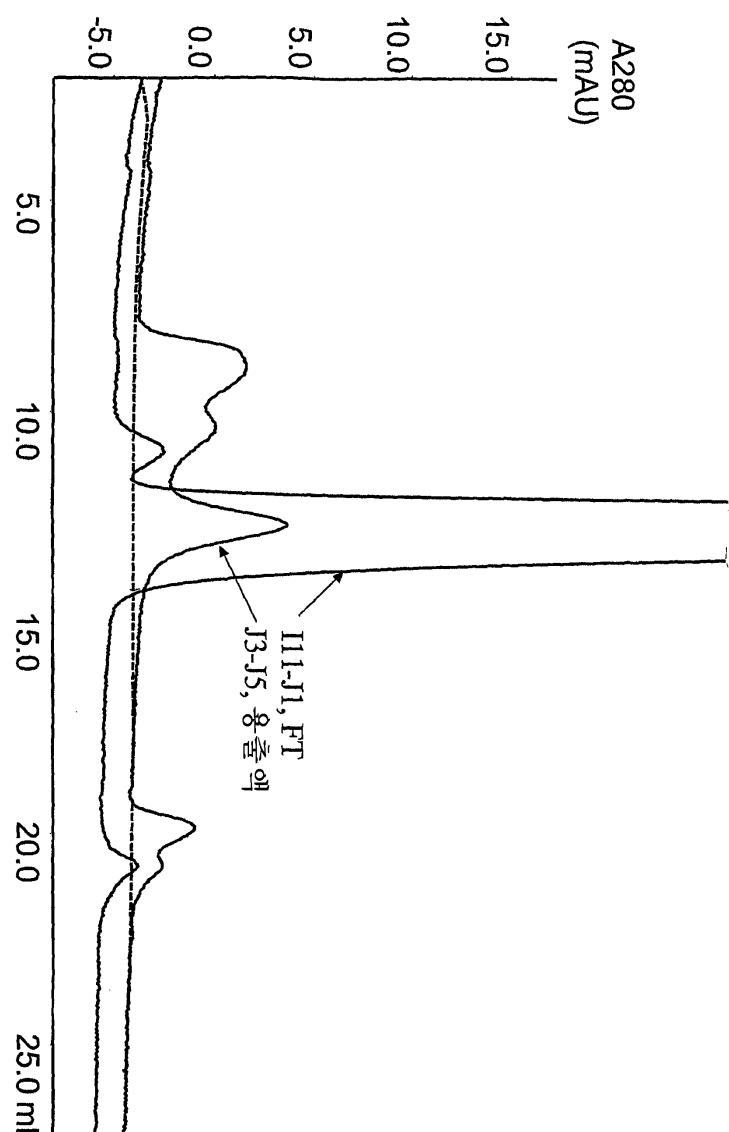
도면5e



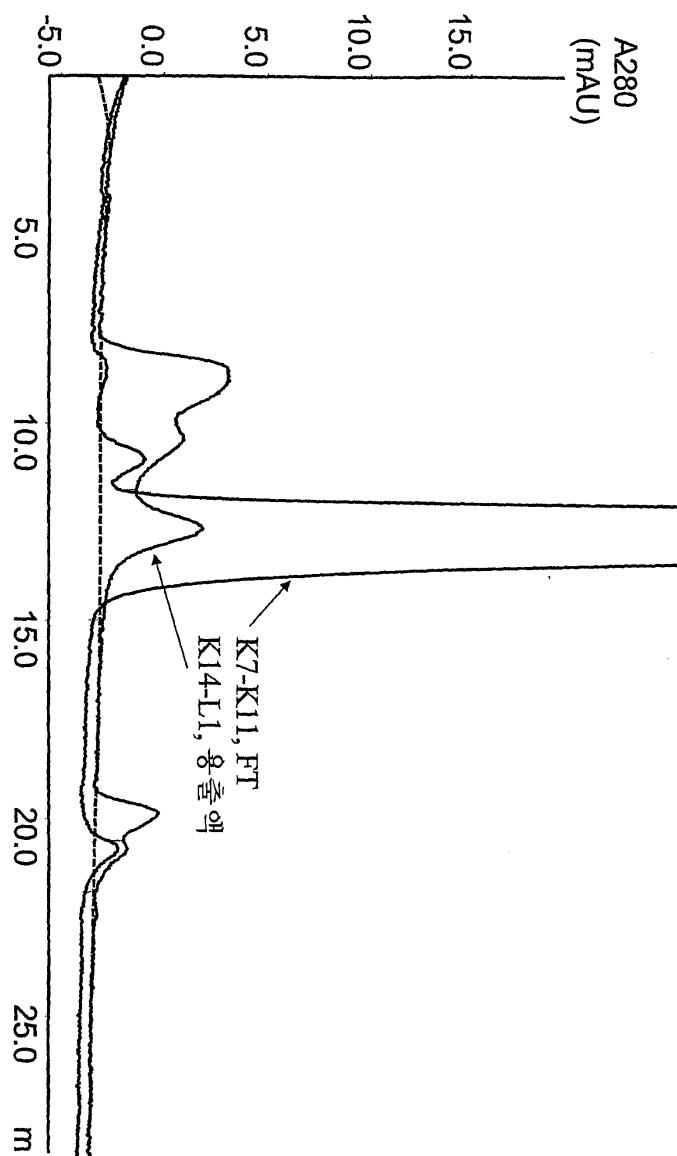
도면5f



도면5g



도면5h



도면6

