



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0111487
 (43) 공개일자 2008년12월23일

(51) Int. Cl.
C07K 1/18 (2006.01) *C07K 1/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7025424
 (22) 출원일자 2008년10월17일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년10월17일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/006015
 국제출원일자 2007년03월09일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/108955
 국제공개일자 2007년09월27일
 (30) 우선권주장
 60/784,311 2006년03월20일 미국(US)

(71) 출원인
메다텍스, 인코포레이티드
 미국 08540-1437 뉴저지주 프린스턴 스테이트 로드 707
 (72) 발명자
아루나쿠마리 알라하리
 미국 뉴저지주 08534 페닝톤 비치우드 드라이브 #1
피레이라 지셀라 마리아 마르케스
 미국 펜실베니아주 18015 파운테인 힐 아파트먼트 씨 델라웨어 에비뉴 407
 (74) 대리인
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 단백질 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 단백질의 정제 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 공정중 접선 흐름 여과 단계의 사용 없이 2 단계 비친화성 이온 교환 크로마토그래피 공정을 사용한다.

특허청구의 범위

청구항 1

표적 단백질 및 하나 이상의 오염물질을 포함하는 혼합물의 정제 방법으로서,

- (a) 혼합물에 대해 양이온 교환 크로마토그래피 단계 후 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행하는 단계, 및
- (b) 표적 단백질을 분리하는 단계

를 포함하는 정제 방법.

청구항 2

표적 단백질 및 하나 이상의 오염물질을 포함하고, 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 부분 정제한 혼합물의 정제 방법으로서,

- (a) 혼합물에 대해 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 수행하는 단계, 및
- (b) 표적 단백질을 분리하는 단계

를 포함하는 정제 방법.

청구항 3

항체 및 하나 이상의 오염물질을 포함하는 혼합물의 정제 방법으로서,

- (a) 혼합물에 대해 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피 후 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계, 및
- (b) 표적 단백질을 분리하는 단계

를 포함하는 정제 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 오염물질은 숙주 세포 단백질, 숙주 세포 대사산물, 숙주 세포 구조 단백질, 핵산, 내독소, 생성물 관련 오염물질, 지질, 배지 첨가물 및 배지 유도체로부터 선택되는 것인 정제 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 표적 단백질은 숙주 세포 단백질 약 100 ppm(백만분율) 이하 및 핵산 약 10 pg/mg 이하의 순도로 정제되는 것인 정제 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 바이러스 불활성화 및 바이러스 제거로부터 선택된 하나 이상의 부가 단계를 추가로 포함하는 것인 정제 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피는 pH 약 4~약 10 및 전도도 약 0.1~약 10 mS/cm에서 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피는 pH 약 6.0~약 9.0 및 전도도 약 0.5~약 5 mS/cm에서 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피는 막을 사용하는 것인 정제 방법.

청구항 10

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피는 pH 약 3~약 10 및 전도도 약 0.1~약 40 mS/cm에서 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 11

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피는 pH 약 4.0~약 9.0 및 전도도 약 0.5~약 15 mS/cm에서 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 12

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 설포네이트, 카르복실산, 카르복시메틸 설포산, 설포이소부틸, 설포에틸, 카르복실, 설포프로필, 설포닐, 설포시에틸 및 오르소포스페이트로부터 선택된 리간드를 사용하는 것인 정제 방법.

청구항 13

제1항 또는 제3항에 있어서, 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 포로스(Poros) HS, 포로스 S, 카르복시-메틸-셀룰로스, 사르토바인드(Sartobind) S, BAKERBOND ABXTM, 아가로스 상에 고정화된 설포프로필 및 아가로스 상에 고정화된 설포닐, 모노S(MonoS), 미니S(MiniS), 소스(Source) 15S, 30S, 캡토(Capto) S, SP 세파로스(Sepharose), CM 세파로스, BAKERBOND 카르복시-설포, WP CBX, WP 설포닉, 히드로셀(Hydrocell) CM, 히드로셀 SP, 유노스피어(UNOsphere) S, 매크로-프렙 하이(Macro-Prep High) S, 매크로-프렙 CM, 세라믹 하이퍼D(Ceramic HyperD) S, 세라믹 하이퍼D CM, 세라믹 하이퍼D Z, 트리스아크릴 M CM, 트리스아크릴 LS CM, 트리스아크릴 M SP, 트리스아크릴 LS SP, 스페로덱스(Spherodex) LS SP, 도웁스 파인 메쉬 강산 양이온 수지(DOWEX Fine Mesh Strong Acid Cation Resin), 도웁스 MAC-3, 메트렉스 셀루파인(Matrex Cellufine) C500, 메트렉스 셀루파인 C200, 프락토겔(Fractogel) EMD SO3-, 프락토겔 EMD SE, 프락토겔 EMD COO-, 엠버라이트 약 및 강 양이온 교환제(Amberlite Weak and Strong Cation Exchangers), 디아이온(Diaion) 약 및 강 양이온 교환제, TSK 겔 SP-5PW-HR, TSK 겔 SP-5PW, 토요펠 CM(650S, 650M, 650C), 토요펠 SP(650S, 650M, 650C), CM(23, 32, 52), SE(52, 53), P11, 익스프레스-이온 C 및 익스프레스-이온 S로부터 선택되는 수지 또는 막에서 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 4차 암모늄 또는 아민, 디에틸아민, 디에틸아미노프로필, 아미노, 트리메틸암모늄에틸, 트리메틸벤질 암모늄, 디메틸에탄올벤질 암모늄, 폴리아민으로부터 선택된 리간드를 사용하는 것인 정제 방법.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 DEAE 셀룰로스, 사르토바인드 Q, 모노Q, 미니Q, 소스 15Q, 소스 30Q, ANX 세파로스 패스트 플로우, Q 세파로스 고 성능(high Performance), 캡토 Q, QAE SEPHADEXTM, FAST Q SEPHAROSETM, WP PEI, WP DEAM, WP QUAT, 히드로셀 DEAE, 히드로셀 QA, 유노스피어 Q, 매크로-프렙 DEAE, 매크로-프렙 하이 Q, 세라믹 하이퍼D Q, 세라믹 하이퍼D DEAE, 스페로덱스 LS DEAE, QMA 스페로실(Spherosil) LS, QMA 스페로실 M, 무스탕(Mustang) Q, 도웁스 파인 메쉬 강염기 I형 음이온 수지(Fine Mesh Strong Base Type I Anion Resins), 도웁스 파인 메쉬 강염기 II형 음이온 수지, 도웁스 모노스피어(MONOSPHER) E 77, 약 염기 음이온(Dow Liquid Separations 사), 인터셉트(Intercept) Q 막, 메트렉스 셀루파인 Q500, 메트렉스 셀루파인 A500 및 메트렉스 셀루파인 Q800, 프락토겔 EMD TMAE, 프락토겔 EMD DEAE 및 프락토겔 EMD DMAE, 및 엠버라이트로부터 선택되는 수지 또는 막을 사용하여 수행하는 것인 정제 방법.

청구항 16

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적 단백질은 항체 또는 항체 단편인 정제 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 항체는 단일 클론 항체인 정제 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 항체는 완전 인간 항체인 정제 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 항체 또는 이의 단편은 단쇄 항체, 디아바디(diabody), 선형 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 탈푸코실화된(defucosylated) 항체, 펩티바디(peptibody), Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv로부터 선택되는 것인 정제 방법.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표적 단백질은 면역접합체(immunoadhesin)인 정제 방법.

청구항 21

표적 단백질을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 배양하는 단계, 혼합물 내 표적 단백질을 회수하는 단계 및 제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 따라 혼합물을 정제하는 단계를 포함하는 관심 단백질의 제조 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 관심 단백질은 항체 또는 항체 단편인 제조 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 정제된 단백질을 약학 조성물로 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 제조 방법.

명세서

기술 분야

<1> 관련 출원

<2> 본 출원은 미국 가출원 번호 제60/784,311호(2006년 3월 20일 출원)를 우선권으로 주장하며, 이는 전문이 본 명세서에 참고 인용된다.

<3> 기술 분야

<4> 본 발명은 공정중 집선 흐름 여과 단계를 이용하지 않고 2개의 이온 교환 단계를 포함하는 2 단계 비친화성 공정을 사용하여 높은 수준의 순도를 달성하는 단백질 정제 방법에 관한 것이며, 이는 인간 치료에 사용하기 위해 이루어질 수 있다. 특히, 본 발명은 폴리펩티드(예, 재조합 단백질, 항체, 항체 단편, Fab 및 Fv 관련 생성물, 단쇄 항체, 디아바디(diabody), 선형 항체, 이중특이적 항체, 항체 단편 유래의 것들을 포함한 다중특이적 항체, Fc 유사 영역을 갖는 융합 단백질 및 항체 유사 분자, 예컨대 면역접합체(immunoadhesin) 또는 펩티바디(peptibodies) 및 하나 이상의 오염물질을 포함하는 조성물로부터 상기 폴리펩티드를 정제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<5> 단백질의 대규모 경제적 정제는 생물약제학적 산업에 있어서 그 중요성이 점차 증가하고 있는 과제이다. 치료 단백질은 전형적으로 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로부터 관심 단백질을 발현하도록 조작된 원핵 또는 진핵 세포주를 이용하여 생산된다. 세포에 공급된 성분들 및 세포내 부산물의 혼합물로부터 목적하는 단백질을 적당한 순도로, 예를 들어 인간 치료제로서 사용하기 충분한 순도로 분리하는 것은 여러가지 이유에서 생물학 제품 제조자에게 방대한 양의 도전을 제시한다.

<6> 단백질계 약학적 제품의 제조자들은 극히 엄격한 순도 요건을 비롯한 엄격한 규제 표준에 따라야 한다. 안전성을 확보하기 위해, 미국 식품의약국(FDA)과 같은 규제 당국은, 단백질계 약학적 제품에 재조합 단백질의 응집물, 단편 및 변이체와 같은 생성물 관련 오염물질, 및 숙주 세포 단백질, 배지 성분, 바이러스, DNA 및 내독소와 같은 공정 관련 오염물질을 모두 포함한 불순물이 실질적으로 없도록 요구한다. 각종 단백질 정제 방식

들이 이용가능하고 생물약학적 산업에서 광범위하게 이용되나, 그 방식들은 통상 약학적으로 허용가능한 순도에 도달하기 위해서는, 항체의 경우 단백질 A 정제와 같은 친화성 정제 단계를 포함하게 된다.

- <7> 진보된 크로마토그래피 및 여과 방법의 출현에도 불구하고, 친화성 크로마토그래피는 치료 등급의 순도를 달성하기 위한 생물약학적 항체 정제를 위한 순도, 수율 및 산출량 요건을 충족하기 위한 포획(capture) 단계로서 여전히 이용된다. 친화성 크로마토그래피는 항체에 대한 단백질 A 크로마토그래피의 높은 결합 친화도(인간 IgG의 경우, 약 10^{-8} M), 및 불순물의 99.5%의 상당량을 제거하는 능력을 가짐에도 불구하고, 상업적 규모로 치료 단백질을 정제하는데 사용하기 위한 고가의 정제 단계이다. 단백질 A는 비친화성 매질보다 훨씬 더 고가일 뿐만 아니라, 수지 불안정성, 세정 곤란성, 리간드 누출, 및 정제된 생성물을 오염시키는 단백질 A 관련 화합물 또는 단백질 A의 잠재적 면역원성과 같은 문제도 또한 가진다. 그러나, 친화성 매질의 고비용 및 불안정성은 단백질계 치료제, 특히 고용량 및/또는 만성 투여를 필요로 하는 단백질계 치료제의 최종 비용을 증가시킨다. 크로마토그래피 단독은 하류 공정 비용의 2/3을 차지할 수 있고, 단일 클론 항체의 경우, 친화성-포획 칼럼에 대한 수지 비용이 원료 비용을 압도할 수 있다([Rathore 등, Costing Issues in the Production of Biopharmaceuticals, BioPharm International, 2004년 2월 1일] 참조).
- <8> 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하더라도, 여러가지 정제 단계들을 조합하지 않는 한, 적당한 순도가 종종 달성되지 않으며, 이로써 비용이 증가하고 생성물 수율이 감소된다. 항체는, 시판 중이고 암, 자가면역 질병, 감염성 질병, 심혈관계 질병 및 이식 거부반응의 치료를 위해 개발 중인 치료 생물학 제품이 차지하는 퍼센티지가 점점 증가하고 있어, 보다 적은 수의 단계를 이용하고 이에 따라 보다 적은 비용을 실현하면서 단백질을 정제할 수 있는 공정이 필요하다.
- <9> 본원에 전문이 참고 인용되는 미국 특허 공보 제2003/0229212호는 비친화성 크로마토그래피 정제 단계 후 고성능 접선 흐름 여과(HPTFF) 단계를 이용하는, 숙주 세포 단백질을 함유하는 혼합물로부터 항체를 정제하는 방법을 기술하고 있다. CHOP(차이니스 햄스터 난소 세포 단백질)의 감소에 의해 측정되는 바와 같이, 그 정제 공정은 양이온 교환 정제 후, 약 144,780 ppm CHOP의 오염물질 수준을 초래하였고, 음이온 교환 정제 후에는 약 410 ppm CHOP의 오염물질 수준을 초래하였으며, HPTFF 정제(최종 단계) 후에는 약 17~21 ppm CHOP의 오염물질 수준을 초래하였고, 이로써 3 단계 비친화성 공정이 제공된다. (상대적 크기가 제한되지 않는) 불순물, 예컨대 단백질, DNA 및 내독소를 분리하고, 항체를 함유하는 혼합물로부터 단백질 올리고머 및 분해 생성물을 제거하기 위해 하전 막을 이용하는 HPTFF의 정제 단계는, 최종 순도를 달성하기 위해 필수적이었다.
- <10> 또한, HPTFF 및 기타 기존의 TFF 단계들은 결점들을 가지는데, 즉 (1) 그것은 단백질 치료제의 개발, 최적화 및 스케일업에 있어서 별도의 추가 단계인데, 이는 막 세정, 밸리데이션, (HPTFF에 대해서 아직 이용가능하지 않은) 대규모 GMP 카세트의 상업적 이용 가능성, 그리고 추가의 완충제, 장비 및 긴 공정 시간을 요하며, (2) 그것은 (분자 활성에 영향을 주는 분해 또는 응집, 또는 기타 분자 변화에 의해) 항체 완전성을 저해함으로써 생성물의 잠재적 손실에 대한 위험 부담에 따라 비용을 증가시킨다.
- <11> 그러므로, 친화성에 기초한 정제 및 기타 다중 단계 정제 공정과 비교하였을 때, 감소된 비용으로, 공정중 TFF 단계를 사용하지 않는 2 단계 비친화성 공정으로부터 고순도의 단백질 치료제를 수득하는 것이 바람직할 것이다. 비친화성 정제 공정이 숙주 세포 단백질, 핵산, 내독소, 생성물 관련 오염물질, 예를 들어 응집, 산화, 탈아미드화 또는 분해 형태의 단백질, 및 배지 첨가제, 예를 들어 지질, 비타민, 인슐린, 메토티렉세이트, 아미노산, 탄소 공급원, 예컨대 포도당 등을 제거할 경우, 유리할 것이다.
- <12> 각종 유형의 단백질들에 대해 적용가능하고, 증감가능하며(scalable), 조절가능하고, 또한 보다 저렴하고 재사용가능한 수지를 이용하는 정제 방식의 개발로, 전반적 약물 개발에 있어 매우 조기의 단계에서 제품 개발이 완전해질 수 있다. 정제 방식의 설계를 위한 이러한 접근법은 승인 후, 다른 방식으로는 약물 개발에 있어 나중에 필요할 수 있거나 더 나쁠 수 있는 제조 공정에 대한 비용이 많이 드는 변화를 최소화할 수 있다. 공정이 스케일-업되고 GMP 생산 조건에 접근하는 경우, 수지 충전 및 완충액 제조와 관련된 문제를 비롯한, 부가적 고유의 복잡성 문제가 생긴다. 제조 공정, 및 그것의 용량은, 공정 단계들을 제거하고 산출량 및 생산율을 최대화하면서, 정제되는 분자의 완전성 및 순도를 유지함에 의해, 정제 방식을 단순화함으로써 향상될 수 있다. 그러므로, 통상적인 정제 방법과 비교하였을 때, 감소된 비용으로 고품질 및 안전성의 약물 물질을 생산할 수 있는 간단하고 효율적인 공정으로 시작하는 것이 바람직하고 유리할 것이다.

발명의 상세한 설명

<13> **발명의 개요**

<14> 본 발명은 폴리펩티드 및 단백질, 특히 단일 클론 항체와 같은 재조합 단백질이 친화성 크로마토그래피 단계 또는 공정중 완충액 교환 단계(예, TFF 또는 HPTFF)를 포함하지 않는 2 단계 정제 공정을 이용함으로써, 오염물질, 예컨대 숙주 세포 단백질 및 배지 성분을 함유하는 오염된 혼합물로부터 정제될 수 있다는 예상 외의 발견에 기초한다. 오히려, 제1 단계에서 제2 단계까지 단지 pH 조작 및/또는 희석만이 필요하다. 그러므로, 본 발명의 2 단계 공정은, 유사하게 높은 수준의 단백질 순도를 달성하기 위해 전형적으로 친화성 크로마토그래피 또는 다중 단계 방법에 의존하는 단백질의 정제에 있어 비용을 실질적으로 감소시킨다.

<15> 본 발명에 있어서, 경미한 양의 불순물(예, 100 백만분율(ppm) 미만의 양의 숙주 세포 단백질, 예컨대 CHOP 및 10 pg/mg 미만의 핵산)을 함유하는 단량체 95% 이상의 고순도 단백질 조성물을 생성시키기 위해, 단백질을 양이온 교환 크로마토그래피(CEC) 및 음이온 교환 크로마토그래피(AEC)를 이용하여, 친화성 크로마토그래피 또는 공정중 TFF 단계를 사용하지 않으면서, 치료 등급으로 고도로 정제한다. 또한, 본 발명의 정제 공정은 내독소, 생성물 관련 오염물질, 예컨대 응집, 산화, 탈아미드화 또는 분해 형태의 단백질, 및 배지 첨가물, 예를 들어 지질, 비타민, 인슐린, 메토타렉세이트, 아미노산, 포도당과 같은 탄소 공급원 등을 제거한다.

<16> CEC 후 AEC를 사용하는 본 발명의 정제 방법의 특정 구체예에 있어서, 이것은 공정중 TFF 단계가 없어서, 대규모 정제에 대해 보다 큰 용량을 갖고, 더 많은 오염물질을 결합시키는 능력이 있으며 공정 시간을 현저하게 감소시키는 것이 유리하다.

<17> 본 발명은 치료 등급의 조성물을 제조하는데 사용하기에 적당한 고순도 단백질 조성물을 달성하기 위해, 항체, Fc 유사 영역을 갖는 융합 단백질, 및 항체 유사 분자, 예를 들어 면역접합체를 포함하나 이에 한정되지 않는 재조합 단백질의 정제 방법을 제공한다. 결과적으로, 본 발명의 방법의 이점은, 고순도 단백질 조성물이 치료 등급의 약물을 제조하는데 사용하기에 적당하다는 것이다.

<18> 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 (a) 혼합물에 대해 CEC 정제 단계 후 AEC 정제 단계를 수행하는 단계(이 때, 공정중 TFF 단계가 없음), 및 (b) 표적 단백질을 분리하는 단계에 의해 표적 단백질 및 하나 이상의 오염물질을 함유하는 혼합물을 정제하는 방법이다. 특정 구체예에서, AEC 단계는 음이온 교환 막을 사용한다.

<19> **발명의 상세한 설명**

<20> 정의

<21> 본원에 사용되는 "단백질"은 일반적으로 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 적어도 5개 이상의 아미노산을 가지는 펩티드 및 단백질을 말한다. 단백질은 전형적으로 항체, 수용체, 리간드 융합 단백질(천연 상태에서는 융합되지 않은 2개 이상의 폴리펩티드 중 적어도 일부분을 포함함), 이의 단편 및 변이체 등일 수 있는 복합 폴리펩티드이고, 이에 대해서는 예를 들어, 본원에 전문이 참고 인용되고 본 발명의 방법에 따라 정제될 수 있는 각종 단백질들을 열거하고 있는 US 2003022921호 및 US 20030166869호를 참조한다. 본 발명의 방법에 따라 정제된 단백질은 임의의 유기체(원핵 또는 진핵), 특히 포유동물 유래일 수 있다.

<22> 용어 "항체"는, 단일 클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체(예, 이중특이적 항체), 면역접합체 및 항체 단편을 포괄하는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 항체는 관심 "항원", 예컨대 생물학적으로 관련된 치료 표적일 수 있는 폴리펩티드, 또는 비폴리펩티드 항원(예, 중앙 관련 당지질 항원; 미국 특허 제5,091,178호 참조)에 대해 작용할 수 있다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 질병 또는 질환을 앓는 포유동물에게 그 항체를 투여함으로써, 그 포유동물에게 치료적 이익을 초래할 수 있다. 폴리펩티드 항원에는 막횡단 분자(예를 들어, 수용체) 및 리간드, 예컨대 성장 인자가 포함된다. 예시적 항원에는 상기 논의된 폴리펩티드들이 포함된다. 항체 생성을 위한 항원의 제조 및 항체 생산은 당업계에 공지되어 있다. 가용성 항원, 또는 다른 분자에 임의적으로 접합된 그 항원의 단편은 항체 생성을 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체, 이의 단편(예, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수도 있다. 그러한 세포는 천연원(예, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 막횡단 분자를 발현하기 위한 재조합 기법에 의해 형질전환된 세포일 수 있다.

<23> "항체 단편"에는 전장(full length) 항체의 일부분 이상, 및 전형적으로는 이의 항원 결합 또는 가변 영역이 포함된다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 단쇄 항체 분자; 디아바디; 선형 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

<24> 용어 "단일 클론 항체"는, 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체로서, 그 집단을 포함하는 개별

항체가, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 변이를 제외하고는 동일하도록 하는 항체를 말한다. 단일 클론 항체는 단일 항원 부위에 지정되는, 매우 특이적 항체이다. 이는 전형적으로 항원의 상이한 결정자(에피토프)에 대해 지정된 다양화된 항체를 포함하는 다클론 항체 제조와 대조적이고, 한편 단일 클론 항체는 항원에 있는 단일 결정자에 대해 지정된다. 항체를 기술함에 있어 용어 "단일 클론"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 가리키며, 이는 임의의 특별한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 사용되는 단일 클론 항체는 문헌[Kohler 등, Nature 256:495 (1975)]에 처음 기재된 통상적 하이브리도마 기술을 이용하여 생산되거나, 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수 있다(예, 미국 특허 제4,816,567 호 참조). 단일 클론 항체는 또한 예를 들어, 문헌[Clackson 등, Nature 352:624-628 (1991); Marks 등, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); 및 미국 특허 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,580,717호; 제5,969,108호; 제6,172,197호; 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호; 및 제6,593,081]에 기재된 기법을 이용하여, 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.

<25> 본원에 기재된 단일 클론 항체에는 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한, "키메라" 및 "인간화" 항체(이때, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 한 특별한 중으로부터 유래하거나 한 특별한 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체 내 상응하는 서열과 동일하거나 그 서열과 동종성이고, 한편 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종에서 유래하거나 또 다른 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체 내 상응하는 서열과 동일하거나 그 서열과 동종성임), 및 그러한 항체의 단편이 포함된다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). "인간화" 형태의 인간의(예, 쥐과 동물) 항체는 인간의 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인간화 항체는, 수용자의 초가변 영역 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 용량을 갖는 인간의 중(공여자 항체), 예컨대 마우스, 쥐, 또는 인간의 영장류의 초가변 영역 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 예들에서, 인간 면역글로불린의 Fv 골격 영역(FR) 잔기는 상응하는 인간의 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 항체 성능을 개량하기 위해, 이 변형들을 추가로 가할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함할 것이며, 여기서 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간의 면역글로불린의 그것에 상응하고, FR 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 임의적으로 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 일부분 이상을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용에 대해서는, [Jones 등, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]를 참조한다.

<26> 키메라 또는 인간화 항체는 상기 기술된 바와 같이 제조된 쥐과 단일 클론 항체의 서열에 기초하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA는 관심 쥐과 하이브리도마로부터 수득되어, 표준 분자생물학 기법을 이용하여 쥐과의 동물(예, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성시키기 위해, 쥐과 가변 영역을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 인간 불변 영역에 연결할 수 있다(예, 미국 특허 제4,816,567호(Cabilly 등) 참조). 인간화 항체를 생성시키기 위해, 쥐과 CDR 영역을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 인간 골격에 삽입할 수 있다(예, 미국 특허 제5,225,539호(Winter), 및 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호; 및 제6,180,370호(Queen 등) 참조).

<27> 본원에 기재된 단일 클론 항체에는 또한 예를 들어 인간 환자의 혈액으로부터 비롯되거나, 형질전환 동물을 이용하여 재조합에 의해 제조된 각종 공급원들로부터 단리될 수 있는 "인간" 항체가 포함된다. 그러한 형질전환 동물의 예에는, 인간 중쇄 형질전환 유전자 및 인간 경쇄 형질도입 염색체를 가지는 KM-Mouse[®](Medarex, Inc., 미국 뉴저지주 프린스턴 소재)(WO 02/43478 참조), Xenomouse[®](Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아주 프레몬트 소재)(예, 미국 특허 제5,939,598호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6,150,584호 및 제6,162,963호(Kucherlapati 등)에 기재됨); 및 HuMAb-Mouse[®](Medarex, Inc.)(예, [Taylor, L. 등(1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. 등(1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon 등(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi 등(1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. 등(1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon 등(1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. 등(1994) *International Immunology* 6: 579-591; 및 Fishwild, D. 등(1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호; 제5,545,807호; 및 PCT 공보 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO

97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962, WO 01/14424(Korman 등)에 기재됨]이 포함된다. 본 발명의 인간 단일 클론 항체는 또한 SCID 마우스를 이용하여 제조될 수 있고, 그 마우스에서는 인간 항체 반응이 면역 시에 발생될 수 있도록 인간 면역 세포가 재구성되어 있다. 그러한 마우스는, 예를 들어 미국 특허 제5,476,996호 및 제 5,698,767호(Wilson 등)에 기술되어 있다.

- <28> 용어 "초가변 영역"은 항원 결합의 원인이 되는 항체의 아미노산 잔기를 기술하는데 사용된다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"(즉, 경쇄 가변 도메인 내 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인 내 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3))으로부터의 아미노산 잔기([Kabat 등, Sequences of Protein of Immunological Interest, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(즉, 경쇄 가변 도메인 내 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3), 및 중쇄 가변 도메인 내 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3))(Chothia 및 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 참조)를 포함한다. "골격" 또는 "FR" 잔기는 초가변 영역 잔기 외의 상기 가변 도메인 잔기이다.
- <29> 본원에 사용되는 용어 "면역접합체"는 이중성 "접착" 단백질(예, 수용체, 리간드 또는 효소)의 "결합 도메인"을 면역글로불린 불변 도메인의 작동자 기능과 조합하는 항체 유사 분자를 나타낸다. 구조적으로, 면역접합체는 항체의 항원 인식 및 결합 부위(항원 조합 부위) 이외의 목적하는 결합 특이성(즉, "이중성")을 갖는 접착 아미노산 서열과 면역글로불린 불변 도메인 서열을 융합하는 것을 포함한다. 면역접합체 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 바람직하게는 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄로부터 유래되는데, 그 이유는 이 영역을 포함하는 면역접합체가 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있기 때문이다(Lindmark 등, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 면역접합체는 본 발명의 방법에 따라 정제될 수 있다.
- <30> "펩티바디"는 Fc 도메인과 하나 이상의 펩티드를 포함하는 분자를 말한다. 이러한 펩티바디는 다량체 또는 이량체 또는 이의 단편일 수 있으며, 이들은 유도체화될 수 있다. 펩티바디는 미국 특허 공보 번호 20040214190, WO 00/24782 및 WO 01/83525에 보다 상세하게 기재되어 있으며, 상기 공보들은 본 명세서에 전문을 참고 인용한다.
- <31> 용어 "리간드 결합 도메인"은 상응하는 본연의 수용체의 적어도 정성적 리간드 결합성을 유지하는 임의의 본연의 세포-표면 수용체 또는 이의 임의의 영역 또는 유도체를 말한다. 한 특정 구체예에서, 수용체는 면역글로불린 슈퍼 유전자 패밀리(super gene family)의 구성원과 동종성인 세포의 도메인을 갖는 세포-표면 폴리펩티드로부터 유래한 것이다. 면역글로불린 슈퍼 유전자 패밀리의 구성원이 아니나, 그럼에도 불구하고 본 정의에 의해 특별히 포괄되는 다른 수용체는 사이토킨에 대한 수용체, 특히 티로신 키나제 활성(수용체 티로신 키나제)을 갖는 수용체, 헤마토포이에틴 및 신경 성장 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원, 및 세포 접착 분자, 예를 들어 (E-, L- 및 P-) 셀렉틴이다.
- <32> 용어 "수용체 결합 도메인"은, 상응하는 본연의 리간드의 적어도 정성적 수용체 결합 능력을 보유하는 그와 같은, 본연의 리간드의 세포 접착 분자 또는 이의 임의의 영역 또는 유도체를 포함한, 수용체에 대한 임의의 본연의 리간드를 나타내는데 사용된다. 무엇보다, 이 정의는 구체적으로 상기 언급된 수용체에 대한 리간드로부터의 결합 서열을 포함한다.
- <33> "항체-면역접합체 키메라"는, (본원에 정의된) 항체의 하나 이상의 결합 도메인을 (본 출원에 정의된) 하나 이상의 면역접합체와 조합하는 분자를 포함한다. 예시적 항체-면역접합체 키메라는 [Berg 등, PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) 및 Chamow 등, J. Immunol. 153:4268 (1994)]에 기술된 이중특이적 CD4-IgG 키메라이다.
- <34> 본원에 사용되는 "혼합물"은 (정제가 바람직한) 관심 폴리펩티드, 및 하나 이상의 오염물질, 즉 불순물을 포함한다. 혼합물은 폴리펩티드를 생산하는 숙주 세포 또는 유기체로부터 직접 수득될 수 있다. 제한하고자 함은 아니나, 본 발명의 방법에 따라 정제될 수 있는 혼합물의 예에는 수확된 세포 배양 유체, 세포 배양 상등액, 및 컨디셔닝된 세포 배양 상등액이 포함된다. "부분 정제된" 혼합물은 이미 크로마토그래피 단계, 예를 들어 비친화성 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등에 적용되었다. "컨디셔닝된 혼합물"은 예를 들어 혼합물을 완충액 교환, 희석, 염 첨가, pH 적정 또는 여과 중 하나 이상에 적용하여, 목적하는 크로마토그래피 성능을 달성하기 위한 pH 및/또는 전도도 범위 및/또는 완충액 매트릭스를 설정함으로써, 본 발명의 방법에 사용되는 크로마토그래피 단계를 위해 제조된 세포 배양 상등액과 같은 혼합물을 포함한다. "컨디셔닝된 혼합물"은 제1 크로마토그래피 칼럼에 로딩 조건을 표준화하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 혼합물은 당업계에 공지된 각종 분리 수단을 통해, 예를 들어 여과 또는 원심분리를 이용하여 생물 반응 장치(bioreactor) 수행 종료 시 배양액(broth) 내 다른 성분들로부터 사멸 세포 및 생육 세포를 물리적으로 분리하거나, 세포 배양 상등액을 pH, 전도도 및 완충액 중 농도의 특정 범위로 농축 및/또는 투석여과함으로써 수득될 수 있다.

- <35> 용어 "불순물" 및 "오염물질", 및 이의 문법적 변형 표현은 관심 단백질을 포함하는 조성물로부터 제거되는 것이 바람직한, 관심 단백질 외의 임의의 물질을 의미하기 위해 상호 혼용된다. 오염물질에는 임의의 생물학적 거대분자, 예컨대 숙주 세포 단백질(예를 들어, CHOP), 관심 단백질 외의 폴리펩티드, 핵산(예, DNA 및 RNA), 지질, 당류, 내독소, 세균, 또는 효모와 같은 기타 미생물, 배지 성분, 및 크로마토그래피 중에 샘플로 걸러질 수 있는, 크로마토그래피에 사용되는 흡착제의 부분인 임의의 분자 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.
- <36> 용어 "관심 단백질" 및 "표적 단백질"은 본 발명의 방법에 따라 혼합물로부터 정제하는 것이 바람직한, 상기 기재된 바와 같은 단백질, 예를 들어 항체를 지칭하기 위해 상호 혼용된다.
- <37> 용어 "숙주 세포 단백질" 또는 "HCP"는 제조함 발현되는 단백질 또는 숙주세포의 계놈으로부터 발현되는 임의의 단백질을 포함한, 표적 단백질을 발현하는 숙주 세포의 대사(세포내 및 세포외)로부터 유래된 단백질로서, 표적 단백질로 간주되지 않는 임의의 단백질을 말한다. 숙주 세포는 표적 단백질을 발현할 수 있는 임의의 세포, 특히 포유동물 세포주(예, CHO 및 쥐과 골수종 세포주, 예컨대 NSO), 곤충 세균 세포주, 식물 세포주 및 효모 세포주일 수 있다. 본 발명의 한 특별한 구체예에서, HCP는 차이나이즈 햄스터 난소("CHO") 세포 배양물로부터 유래된 숙주 세포 단백질("HCP") 중 임의의 것을 지칭하는 "차이나이즈 햄스터 난소 세포 단백질" 또는 "CHOP"이다. HCP는 일반적으로 관심 단백질을 함유하는 세포 배양 배지 또는 분해물[(예, 수확된 세포 배양 유체("HCCF"))] 내 불순물로서 존재한다. 관심 단백질을 포함하는 혼합물 내에 존재하는 HCP의 양은 관심 단백질의 순도의 척도를 제공한다. 전형적으로, 단백질 혼합물 내 HCP의 양은 혼합물 내 관심 단백질의 양에 대한 백만분율로 표시된다.
- <38> 용어 "백만분율" 또는 "ppm"은 본 발명의 방법에 의해 정제된 관심 단백질 순도의 척도를 지칭하기 위해 본원에 상호 혼용된다. 단위 ppm은 용액 중 관심 단백질의 밀리그램/밀리리터 당, HCP의 나노그램/밀리리터의 양을 말한다[즉, 하기 실시예에 기술된 바와 같이, $HCP\ ppm = (CHOP\ ng/ml) / (관심\ 단백질\ mg/ml)$ 임]. 단백질을 예컨대, 동결건조에 의해 건조시키는 경우, ppm은 $(HCP\ ng) / (관심\ 단백질\ mg)$ 을 말한다.
- <39> 용어 "정제하다" 및 이의 문법적 변형 표현들은, 단백질 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 혼합물로부터 하나 이상의 불순물을, 모두 또는 일부를 제거하는지에 상관없이 제거함으로써, 조성물 내 단백질의 순도 수준을 높이는 것(즉, 조성물 내 불순물(들)의 양(ppm)을 감소시키는 것)을 의미하기 위해 사용된다. 본 발명에 따라, 정제는 두 비친화성 크로마토그래피 단계를 이용하되, 단 공정중 TFF 단계를 이용하지 않고 수행된다. 본 발명의 방법은 ELISA에 의해 결정된 바와 같이, 100 ppm 미만의 HCP, 바람직하게는 90 ppm 미만, 80 ppm 미만, 70 ppm 미만, 60 ppm 미만, 50 ppm 미만, 40 ppm 미만, 30 ppm 미만 또는 20 ppm 미만의 HCP를 포함하는 조성물을 달성하도록 관심 단백질을 정제할 수 있다.
- <40> 본원에 사용되는 용어 "단리하다" 및 이의 문법적 변형 표현들은, 오염물질, 불순물 및 기타 물질이 실질적으로 없는 관심 단백질을 함유하는 동종성 조성물을 달성하기 위해, 부가 물질로부터, 예를 들어 관심 단백질을 정제하는데 사용되는 칼럼 또는 수지로부터 정제된 관심 단백질을 분리하는 것을 말한다.
- <41> 용어 "크로마토그래피"는, 혼합물 내 관심 용질, 예를 들어 관심 단백질이, 공정의 특별한 완충 조건 하에서, 용질의 성질, 예컨대 pI, 소수도, 크기 및 구조로 인해, 더 강하게 또는 덜 강하게 용질을 흡수하거나 보유하는 흡착제를 통해 혼합물을 삼출함으로써 혼합물 내 다른 용질로부터 분리되도록 하는 공정을 말한다.
- <42> "흡착제"는 관심 분자와의 직접적 상호작용, 또는 흡착제에 부착된 화합물과의 상호작용에 의해, 그 표면에 또 다른 물질을 접촉에 의해 흡착시킬 수 있는 임의의 고체 및 고착 물질이다. 각종 유형의 크로마토그래피에 유용한 흡착제가 당업계에 공지되어 있고, 상업적 공급원을 통해 용이하게 입수가능하다.
- <43> 용어 "친화성 크로마토그래피" 및 "단백질 친화성 크로마토그래피"는, 통상 공간 상보성 및 하나 이상 유형의 화학적 상호작용, 예를 들어 결합 부위에서의 정전기력, 수소결합, 소수력 및/또는 반데르발스의 힘의 조합으로서, 관심 단백질이 가역적으로 또한 특이적으로 생체특이적 리간드에 결합되도록 하는 단백질 분리 기법을 말하기 위해 상호 혼용된다. 이 상호작용은 등전점, 소수도 또는 크기와 같은 분자의 일반적 성질로 인한 것이 아니며, 예를 들어 단백질 A 및 항체 상호작용을 위한 소수성 및 정확한 단백질 도메인 핏과 같은 리간드와 관심 분자로부터의 특이적 상호작용의 결과이다. 단백질 A는 Fc 영역을 포함하는 결합 분자를 고체 지지체, 예를 들어 세파로스에 고정될 수 있는 흡착제의 한 예이다. 본원에 전문이 참고 인용되는 [Ostrove (1990), Guide to Protein Purification, Methods of Enzymology 182: 357-379]를 참조.
- <44> 임의의 리간드가 그것의 각각의 특이적 결합 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 생체특이적 리간드는 크로마토그래피 고체상 물질에 공유 결합되어, 용액이 크로마토그래피 고체상 물질과 접촉될 때, 용액

내 관심 단백질(예를 들어, 항체, 효소 또는 수용체 단백질)에 접근가능하다. 관심 단백질은 생체특이적 리간드(예, 항원, 기질, 보조 인자 또는 호르몬)에 대한 특이적 결합 친화성을 보유하고, 한편 혼합물 내 용질 및/또는 단백질은 리간드에 인식가능하게 또는 특이적으로 결합하지 않는다. 고정화 리간드에 대한 관심 단백질의 결합은, 관심 단백질을 고체상 물질 상의 고정화 리간드에 특이적으로 결합된 상태로 유지하면서, 크로마토그래피 매질에 오염 단백질 또는 기타 불순물을 통과시킨다. 이어서, 특이적으로 결합된 단백질이 낮은 pH, 높은 pH, 저농도 염, 고농도 염, 경쟁 리간드 등에서 고정화 리간드로부터 제거되어, 용출 완충액을 이용하는 크로마토그래피 칼럼을 통과한다. 보다 이전에 칼럼을 통과하게 되었던, 관심 단백질에 비해 더 낮은 상대 농도를 갖는 오염 단백질, 그리고 핵산 및 내독소와 같은 다른 유형의 오염물질도 존재할 수 있다.

- <45> 용어 "특이적 결합" 및 "결합 특이성", 및 이의 문법적 변형 표현들은, 결합 부위에서의 정전기력, 수소 결합, 소수력, 및/또는 반데르발스력 중 하나 이상의 유형으로 결합된 결합 부위에 있는 단백질 및 리간드 구조의 공간 상보성의 조합 효과를 필요로 하는 리간드와 관심 단백질 간의, 일반적으로 특이적이고 가역적인 상호작용을 기술한다. 리간드는 결합 활성을 파괴하지 않으면서 매트릭스에 결합되도록 하는 화학적으로 변형된 기를 가져야 한다. 리간드는 이상적으로 유리 용액 내 10^{-4} 내지 10^{-8} M 범위로 결합 물질에 대한 친화도를 가져야 한다. 결합 부위에서의 공간 상보성이 크고 기타 힘이 더 강해질수록, 각각의 리간드에 대한 단백질의 결합 특이성이 더 커질 것이다. 특이적 결합의 비제한적 예에는 항체-항원 결합, 효소-기질 결합, 효소-보조 인자 결합, 금속 이온 킬레이트화, DNA 결합 단백질-DNA 결합, 조절 단백질-단백질 상호작용 등이 포함된다.
- <46> 용어 "비친화성 크로마토그래피" 및 "비친화성 정제"는, 친화성 크로마토그래피를 사용하지 않고 용질(예, 관심 단백질)과 흡착제 매트릭스 간의 비특이적 결합 상호작용을 필요로 하는 정제 단계를 말한다.
- <47> 본원에 사용되는 용어 "비특이적 결합"은, 상호작용 부위에서의 비특이적 상호작용을 통해, 예를 들어 정전기력, 수소 결합, 소수력, 및/또는 반데르발스력을 통해 고체상 매트릭스에 결합되어 있으나 친화성(특이적) 결합에서와 같이 비구조적 힘의 영향을 증진시키는 구조적 상보성이 결여된 관심 단백질과 리간드 또는 기타 화합물 간의 상호작용을 말한다. 친화성이 아닌 비특이적 결합에 의존하는 크로마토그래피 공정의 예에는 이온성 교환 크로마토그래피(예, 음이온 및 양이온 교환) 및 소수성 전하 유도 크로마토그래피가 포함된다.
- <48> 용어 "소수성 전하 유도 크로마토그래피(hydrophobic charge induction chromatography)" (또는 "HCIC")는, 부가 염(예, 농도 전이형(lyotropic) 염)의 부재 하에 온화한 소수성 상호작용을 통해, 혼합물 내 관심 단백질이 이중 모드(즉, 하나의 결합 모드 및 또 다른 하나의 용출 모드가 있음), 이온화가능한 리간드([Boschetti 등, 2000, Genetic Engineering News 20(13)] 참조)에 결합되도록 하는, 한 유형의 혼합 모드 크로마토그래피 공정이다. "소수성 전하 유도 크로마토그래피 수지"는 친황성(thiophilic) 효과(즉, 친황성 크로마토그래피의 성질 이용), 소수성, 및 분리 용량을 위한 이온화가능한 기의 조합된 성질을 가지는 리간드를 포함한 고체상이다. 따라서, 본 발명의 방법에 사용되는 HCIC 수지는 중성(생리학적) 또는 약산성 pH, 예를 들어 약 pH 5 내지 10, 바람직하게는 약 pH 6 내지 9.5에서 온화하게 소수성이고 이온화가능한 리간드를 포함한다. 이 pH 범위에서, 리간드는 우세하게 비대전되고, 온화한 비특이적 소수성 상호작용을 통해 관심 단백질에 결합한다. pH가 감소됨에 따라, 리간드는 전하를 얻고, 소수성 결합은 pH 이동으로 인한 용질쪽으로의 정전기 하전 반발에 의해 방해받는다.
- <49> HCIC에 사용하기 위한 적당한 리간드의 예에는 임의의 이온화가능한 방향족 또는 복소환 구조 및 염료, 및 이들의 유도체가 포함되고[Burton and Harding, Journal of Chromatography A 814: 81-81 (1998) 및 Boschetti, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 49: 361-389 (2001)참조], 이들은 링커 압 및/또는 리간드 구조에 지방족 쇠 및 하나 이상의 황 원자를 포함한다. HCIC 수지의 예에는 MEP HYPERCEL(Pall Corporation; 미국 뉴욕주 이스트힐즈 소재)이 포함된다.
- <50> 용어 "이온 교환" 및 "이온 교환 크로마토그래피"는 pH 및 전도도의 적당한 조건 하에서 이온화가능한 관심 용질(예, 혼합물 내 관심 단백질)이 고체상 이온 교환 물질에 (예를 들어, 공유 결합에 의해) 연결된, 반대로 하전된 리간드와 상호작용하여, 관심 용질이 혼합물 내 용질 불순물 또는 오염물질보다 더하거나 덜한 정도로 하전된 화합물과 비특이적으로 상호작용하도록 하는 크로마토그래피 공정을 말한다. 혼합물 내 오염 용질은 관심 용질보다 더 빠르게 또는 더 느리게 이온 교환 물질의 칼럼으로부터 세정되어 제거될 수 있거나, 수지에 결합되거나, 수지로부터 배제된다. "이온 교환 크로마토그래피"에는 구체적으로 양이온 교환, 음이온 교환 및 혼합 모드 크로마토그래피가 포함된다.
- <51> 문구 "이온 교환 물질"은 음으로 하전된 고체상(즉, 양이온 교환 수지) 또는 양으로 하전된 고체상(즉, 음이온 교환 수지)을 말한다. 한 구체예에서, 전하는 하나 이상의 하전된 리간드 (또는 흡착제)를 예를 들어 공유 연결

에 의해 고체상에 부착시킴으로써 제공될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 전하는 (예를 들어, 전반적 음 전하를 가지는 실리카에 대한 경우에서와 같이) 고체상의 고유 성질일 수 있다.

<52> "양이온 교환 수지"는 음으로 하전되고 고체상 위로 또는 고체상을 통해 통과하는 수용액 내 양이온과 교환하기 위한 유리 양이온을 가지는 고체상을 말한다. 양이온 교환 수지를 형성하기에 적당한 고체상에 결합된 임의의 음으로 하전된 리간드, 예를 들어 카르복실레이트, 설포네이트 및 하기 기재되는 기타 리간드들이 사용될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 양이온 교환 수지에는 예를 들어 설포네이트계 기를 가지는 것들[예, 모노S(MonoS), 미니S(MiniS), 소스(Source) 15S 및 30S, SP Sepharose Fast Flow™, SP 세파로스 고 성능(Sepharose High Performance)(GE Healthcare사), 토요펠(Toyopearl) SP-650S 및 SP-650M(Tosoh사), 마크로-프렙 하이(Macro-Prep High) S(BioRad 사), 세라믹 하이퍼D(Ceramic HyperD) S, 트리스아크릴(Trisacryl) M 및 LS SP 및 스페로텍스(Spherodex LS) SP(Pall Technologies 사)]; 설포에틸계 기를 가지는 것들[예, 프락토겔(Fractogel) SE(EMD사), 포로스(Poros) S-10 및 S-20(Applied Biosystems 사)]; 설포프로필계 기를 가지는 것들(예, TSK 겔 SP 5PW 및 SP-5PW-HR(Tosoh 사), 포로스 HS-20 및 HS 50(Applied Biosystems)]; 설포이소부틸계 기를 가지는 것들[예, 프락토겔 EMD SO₃(EMD 사)]; 설포시아에틸계 기를 가지는 것들[예, SE52, SE53 및 익스프레스-이온(Express-Ion) S(Whatman 사)]; 카르복시메틸계 기를 가지는 것들(예, CM 세파로스 패스트 플로우(GE Healthcare 사), 히드로셀(Hydrocell) CM(Biochrom Labs Inc. 사), 마크로-프렙 CM(BioRad 사), 세라믹 하이퍼 D CM, 트리스아크릴 M CM, 트리스아크릴 LS CM(Pall Technologies 사), 매트렉스 셀루파인(Matrex Cellufine) C500 및 C200(Millipore 사), CM52, CM32, CM23 및 익스프레스-이온 C(Whatman 사), 토요펠 CM-650S, CM-650M 및 CM-650C(Tosoh 사)]; 설포산 및 카르복실산계 기를 가지는 것들[예, BAKERBOND 카르복시-설포(J.T. Baker 사)]; 카르복실산계 기를 가지는 것들(예, WP CBX(J.T. Baker 사), 도웁스(DOWEX) MAC-3(Dow Liquid Separations 사), 앰버라이트 약 양이온 교환제(Amberlite Weak Cation Exchangers), 도웁스 약 양이온 교환제 및 디아이온(Diaion) 약 양이온 교환제(Sigma-Aldrich 사) 및 프락토겔 EMD COO-(EMD 사)]; 설포산계 기를 가지는 것들(예, 히드로셀 SP(Biochrom Labs Inc. 사), 도웁스 파인 메쉬 강산 양이온 수지(DOWEX Fine Mesh Strong Acid Cation Resin)(Dow Liquid Separations 사), 유노스피어(UNOsphere) S, WP 설포닉(J.T. Baker 사), 사르토바인드 S 막(Sartorius 사), 앰버라이트 강 양이온 교환제, 도웁스 강 양이온 및 디아이온 강 양이온 교환제(Sigma-Aldrich 사)]; 및 오르토포스페이트계 기를 가지는 것들(예, P11(Whatmann 사)]이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

<53> 필요에 따라, 양이온 교환 막이 양이온 교환 수지, 예컨대 사르토바인드 S(Sartorius 사; 뉴욕주 에지우드 소재) 대신에 사용될 수 있다.

<54> "음이온 교환 수지"는 양으로 하전되고, 이로써 하나 이상의 양으로 하전된 리간드가 부착되어 있는 고체상을 말한다. 음이온 교환 수지를 형성하기에 적당한 고체상에 부착된 임의의 양으로 하전된 리간드, 예컨대 4급 아미노기가 사용될 수 있다. 예를 들어, AEC에 사용된 리간드는 4차 암모늄, 예컨대 4차 알킬아민 및 4차 알킬알칸올아민, 또는 아민, 디에틸아민, 디에틸아미노프로필, 아미노, 트리메틸암모늄메틸, 트리메틸벤질 암모늄, 디메틸에탄올벤질 암모늄, 및 폴리아민일 수 있다. 대안적으로, AEC의 경우, 상기 기술된 리간드와 같은 양으로 하전된 리간드를 갖는 막이 음이온 교환 수지 대신에 사용될 수 있다.

<55> 상업적으로 입수가능한 음이온 교환 수지에는 DEAE 셀룰로스, 포로스 PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50(Applied Biosystems 사), 모노Q, 미니Q, 소스 15Q 및 30Q, Q, DEAE 및 ANX 세파로스 패스트 플로우, Q 세파로스 고 성능, QAE SEPHADEX™ 및 FAST Q 세파로스™(GE Healthcare 사), WP PEI, WP DEAM, WP QUAT(J.T. Baker 사), 히드로셀 DEAE 및 히드로셀 QA(Biochrom Labs Inc.), 유노스피어 Q, 마크로-프렙 DEAE 및 마크로-프렙 하이 Q(Biorad 사), 세라믹 하이퍼D Q, 세라믹 하이퍼D DEAE, 트리스아크릴 M 및 LS DEAE, 스페로텍스 DEAE, QMA 스페로실(Spherosil) LS, QMA 스페로실 M 및 무스탕(Mustang) Q(Pall Technologies 사), 도웁스 파인 메쉬 강 염기 I형 및 II형 음이온 수지(Fine Mesh Strong Base Type I and Type II Anion Resins) 및 도웁스 모노스피어(MONOSPHER) E 77, 약염기 음이온(Dow Liquid Separations 사), 매트렉스 셀루파인 A200, A500, Q500 및 Q800(Millipore 사), 프락토겔 EMD TMAE, 프락토겔 EMD DEAE 및 프락토겔 EMD DMAE(EMD 사), 앰버라이트 약 및 강 음이온 교환제 I형 및 II형(Amberlite weak and strong anion exchanger type I and II), 도웁스 약 및 강 음이온 교환제 I형 및 II형, 디아이온 약 및 강 음이온 교환제 I형 및 II형, 듀오라이트(Duolite)(Sigma-Aldrich), TSK 겔 Q 및 DEAE 5PW 및 5PW-HR, 토요펠 슈퍼Q(SuperQ)-650S, 650M 및 650C, QAE-550C 및 650S, DEAE-650M 및 650C(Tosoh 사), 및 QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, 익스프레스-이온 D 및 익스프레스-이온 Q(Whatman 사)가 포함되나, 이에 한정하지 않는다.

- <56> 필요에 따라, 음이온 교환 막이 음이온 교환 수지 대신에 사용될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 음이온 교환 막은, 사르토티바인드(Sartobind) A(Sartorius 사), 무스탕 Q(Pall Technologies 사) 및 인터셉트(Intercept) Q 막(Millipore 사)을 포함하나, 이에 한정하지 않는다.
- <57> "혼합 모드 이온 교환 수지"는 양이온, 음이온, 및/또는 소수성 부분으로 공유 변형된 고체상을 말한다. 혼합 모드 이온 교환 수지의 예에는 BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker; 미국 뉴저지주 필립스버그 소재), 세라믹 히드록시아파타이트 I형 및 II형 및 플루오라이드 히드록시아파타이트(BioRad 사; 미국 캘리포니아주 헤르클레스 소재), 및 MEP 및 MBI 히드로셀(Pall Corporation; 미국 뉴욕주 이스트힐즈 소재)이 포함된다.
- <58> 용어 "친황성"은 티오에테르기에 매우 근접하게 있는 설펜기에 대해 단백질이 가지는 선택성을 말한다(Porath 등, 1985). "친황성 흡착 크로마토그래피"로도 알려져 있는 "친황성 크로마토그래피"는 친황성 영역 및 방향족 아미노 잔기를 포함하는 관심 단백질이 황 함유 리간드에 결합하여 단백질을 분리하도록 하는 한 유형의 비친화성 크로마토그래피이다. 친황성 겔은 (세파로스 4B에 결합된) 디비닐설펜을 β-머캅토에탄올로 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 친황성 흡착 크로마토그래피는 전자 공여체-수용자 성질에 기초하며, 이는 소수성에 기초하는 크로마토그래피와 구분된다. 티오-에틸설펜 구조가 현저한 소수성 또는 이온성 전하를 가지지 않기 때문에, 친황성 흡수제로는 소수성 연합 및 이온성 상호작용이 일어나지 않는다. 상업적으로 입수가능한 친황성 크로마토그래피 수지의 예에는 프락토겔 EMD TA(Merck 사; 미국 뉴저지주 라웨이 소재), 유니플로우 및 슈퍼플로우(Uniflow and Superflow) 수지(Clontech 사) 및 T-겔(Pierce 사)가 포함된다.
- <59> 용어 "고체상"은 하나 이상의 리간드가 부착될 수 있는 임의의 비수성 매트릭스를 의미하기 위해 사용되거나, 또는 대안적으로 크기 배제 크로마토그래피의 경우, 이는 수지의 겔 구조를 말하는 것일 수 있다. 고체상은 이 방식으로 리간드를 부착시킬 수 있는 임의의 매트릭스, 예를 들어 정제 칼럼, 구분된 입자들의 불연속상, 막, 필터, 겔 등일 수 있다. 고체상을 형성하기 위해 사용될 수 있는 물질의 예에는 다당류(예컨대, 아가로스 및 셀룰로스) 및 기타 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 실리카(예를 들어, 조절된 세공 유리), 폴리(스티렌디비닐벤젠), 폴리아크릴아미드, 세라믹 입자 및 이들 중 임의의 것의 유도체가 포함된다. 본 발명은 크로마토그래피 단계에 사용하기 위한 임의의 특별한 고체상 물질에 제한되지 않고, 당업자라면 본 발명에 사용하기 위한 적당한 고체상 물질을 선택할 수 있을 것이다.
- <60> 한 유형의 크로마토그래피를 지칭하기 위해 본원에 사용된 "막"은 일반적으로 흡수 성질을 갖는 중합체 마이크로필터, 예컨대 셀룰로스 아세테이트 및 폴리비닐리덴 디플로라이드이다. 충전, 한정화, 밸리데이션 또는 유출물 세정 및 재활용 연구가 필요없기 때문에 크로마토그래피에서 수지 대신에 막을 사용하는 것이 유리하다. 또한, 막은 수지 대응물과 비교하였을 때 예컨대 200배 이상의 보다 높은 제거 능력값을 제공하고, 높은 유속 능력은 분 단위만의 주기를 초래하여, 오염물질 제거에 필요한 시간을 유의적으로 단축시킨다.
- <61> 막은 용리 단계를 이용하는 패스트 크로마토그래피 또는 매우 거대한 부피를 처리할 수 있는 통과액(flowthrough) 방식에서 사용될 수 있다. 수지와 비교하여 완충액의 사용을 최대 90%로 감소시킨 결과 비용 절감이 유의적으로 나타나게 된다. 또한, 막 크로마토그래피 기법은 기존의 크로마토그래피 방법보다 10배 정도 더 빠른 유속에서 DNA를 공정 규모로 제거하고, 제조 시프트 당 거대한 부피를 처리할 수 있다.
- <62> 실험의 관점으로, 공기 방울이 흡수기를 피해야만 하는 한편, 이들은 막 구조를 파괴하지 않는다. 이러한 필터의 구조를 고려하였을 때, 이들의 성능은 기본적으로 펌프 유형과 같은 장착된 장치 유형과는 독립적이다. 이들은 통상적인 크로마토그래피 칼럼과 같이 제한된 확산을 하지 않는다. 매우 거대한 생체 분자 및 바이러스의 결합력은, 막 거대다공성 구조로 인해 통상적인 겔보다 막 흡착기가 필연적으로 더 높다.
- <63> 용어 "세제"는 단백질의 응집을 방지하고 오염물질의 관심 단백질로의 비특이적 상호작용 또는 결합을 방지하는데 유용하면서, 정화(sanitization), 평형화, 로딩, 로딩후 세정액(들), 용출 또는 스트립 완충액을 비롯한 본 발명에 사용되는 각종 완충액에 존재할 수 있는 이온성, 쯔비터이온성 및 비이온성 계면활성제를 말한다. 특별한 구체예들에서, 세제가 세정 완충액에 첨가된다. 본 발명에 사용될 수 있는 세제의 예에는 폴리소르베이트(polysorbate)(예, 폴리소르베이트 20 또는 80); 폴록사머(poloxamer)(예, 폴록사머 188); 트리톤(Triton); 나트륨 도데실 황산염(SDS); 나트륨 라우릴 황산염; 나트륨 옥틸 글리코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아라아미도프로필-베타인(예, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아라아미도프로필-디메틸아민; 나트륨 메틸 코코일- 또는 이나트륨 메틸 올레일-타우레이트;

MONAQUAT™ 시리즈(Mona Industries, Inc., 미국 뉴저지주 패터슨 소재); Igepal) CA-630, 플루로닉(Pluronic), 트리톤(Triton), BRIJ, 아틀라스(Atlas) G2127, 제나폴(Genapol), HECAMEG, LUBROL PX, MEGA, NP, THESIT, TOPPS, CHAPS, CHAPSO, DDMAU, EMPIGEN BB, AWITTERGENT 및 C12E8이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 세제는 임의의 작용 완충액에 첨가될 수 있고, 또한 관심 분자를 함유하는 공급물 내에 포함될 수 있다. 세제는 단백질 정제 공정에 사용하기에 적당한 임의의 양, 예를 들어 0.001% 내지 약 20%, 전형적으로는 약 0.01% 내지 약 1%의 양으로 존재할 수 있다. 한 특별한 구체예에서, 폴리소르베이트 80은 CEXC를 위한 세정 완충액에 사용된다.

<64> 본 발명에 사용되는 "완충액"은 산 또는 염기를 첨가함으로써 산-염기 접합물 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 대한 내성을 가지는 용액이다. 각종 완충액들이 완충액의 목적하는 pH, 및 정제 공정 내 특별한 단계에 따라 본 발명의 방법에 이용될 수 있다([Buffers, A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975)] 참조). 본 발명의 방법에 바람직한 pH 범위를 조절하기 위해 사용될 수 있는 완충액 성분의 비제한적 예에는 아세테이트, 시트레이트, 히스티딘, 포스페이트, 암모늄 완충액, 예컨대 암모늄 아세테이트, 숙시네이트, MES, CHAPS, MOPS, MOPSO, HEPES, 트리스 등, 및 이들의 조합물로서, 트리스-말산-NaOH, 말레에이트, 클로로아세테이트, 포르메이트, 벤조에이트, 프로피오네이트, 피리딘, 피페라진, ADA, PIPES, ACES, BES, TES, 트리신, 비신, TAPS, 에탄올아민, CHES, CAPS, 메틸아민, 피페리딘, 0-붕산, 카르본산, 락트산, 부탄안디오산, 디에틸말론산, 글리실글리신, HEPPS, HEPPSO, 이미다졸, 페놀, POPSO, 숙시네이트, TAPS, 아민계, 벤질아민, 트리메틸 또는 디메틸 또는 에틸 또는 페닐 아민, 에틸렌디아민 또는 모르폴린이 포함된다. 부가적 성분(첨가제)이 필요에 따라 완충액 내에 존재할 수 있고, 예를 들어 염, 예컨대 염화나트륨, 황산나트륨 및 염화칼륨; 및 기타 첨가제, 예컨대 아미노산(예컨대, 글리신 및 히스티딘), 카오트로프제(chaotrope)(예컨대, 우레아), 알코올(예컨대, 에탄올, 만니톨, 글리세롤 및 벤질 알코올), 세제(상기 기재 참고) 및 당(예컨대, 수크로스, 만니톨, 말토스, 트레할로스, 글루코스 및 프룩토스)을 사용하여 완충액 이온 강도를 조정할 수 있다. 완충액 성분 및 첨가제, 및 사용 농도는 본 발명에서 수행되는 크로마토그래피의 유형에 따라 다양할 수 있다.

<65> 완충액의 pH 및 전도도는 정제 공정 내 완충액이 사용되는 단계에 따라 다양할 수 있다. 선택된 리간드 및 수지/막에 적합한 pH에서 임의의 적당한 완충액은 상기 기술된 완충액과 같은 관심 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다. CEC에서, 정제 단계 및 이용된 완충액에 따라, 완충액의 pH는 3 내지 10, 더욱 바람직하게는 약 4.0 내지 9.0의 pH일 수 있고; 전도도는 약 0.1 내지 40 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 15 mS/cm의 전도도일 수 있다. AEC에서, 정제 단계 및 이용된 완충액에 따라, 완충액의 pH는 약 4 내지 10, 더욱 바람직하게는 약 6.0 내지 9.0의 pH일 수 있고; 전도도는 약 0.1 내지 10.0 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 5 mS/cm일 수 있다. 정제 공정 전반에 걸쳐 사용되는 완충액은 각 크로마토그래피 단계에 대해 하기 더욱 상세히 기재되어 있다.

<66> "정화(sanitization)" 용액은 전형적으로 임의의 결합된 오염물질, 예를 들어 생물학적 기원의 그러한 물질을 정제 공정 전에 제거함으로써 칼럼 크로마토그래피에 사용된 수지를 세정하는데 사용된다. 임의의 바람직한 완충액이, 본 발명의 방법에 따라 선택되는 특별한 칼럼 및 수지와 상용적인 한, 상기 목적을 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 정화 용액의 pH는 높는데, 예를 들어 pH 10 이상, 더욱 바람직하게는 pH 1하나 이상, 더욱 더 바람직하게는 pH 12 이상일 수 있고; 대안적으로, 정화 용액의 pH는 낮을 수 있는데, 예를 들어 pH 4 이하, 더욱 바람직하게는 pH 3 이하일 수 있다. 한 특별한 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용된 수지를 1 N NaOH(pH > 12)를 포함하는 정화 용액을 이용하여 세정한다.

<67> "평형화 완충액"은 정제하기 위한 관심 단백질을 함유하는 혼합물을 칼럼에 로딩하기 전에, CEC 또는 AEC에 사용된, 크로마토그래피 매질, 예컨대 수지 또는 막의 pH 및 전도도를 조정하는데 사용된다. 이 목적을 위해 사용될 수 있는 적당한 완충액이, 예를 들어 상기 기재된 완충액과 같이, 당업계에 공지되어 있고, 이에 관심 단백질을 정제하기 위한 크로마토그래피 단계에 사용되는 선택된 수지와 상용적인 pH의 임의의 완충액이 포함된다. 특별한 구체예에서, CEC 및 AEC에 대한 평형 완충액 중은 포스페이트 또는 TRIS계이다.

<68> 평형화 완충액은, 관심 폴리펩티드가 수지에 결합되도록 하거나, 관심 단백질이 칼럼을 통과하여 흐르고, 한편 하나 이상의 불순물이 칼럼에 결합하도록 하는 전도도 및/또는 pH를 가진다. 한 바람직한 구체예에서, 평형화는, 크로마토그래피 매질의 pH 및 전도도가 각기 평형화 완충액의 ± 0.2 내지 ± 0.4 mS/cm 내, 더욱 바람직하게는 평형화 완충액의 ± 0.1 내지 ± 0.2 mS/cm 내에 있을 때 완료된다. CEC에서, 평형화 완충액의 pH는 약 3 내지 약 9, 더욱 바람직하게는 약 4.0 내지 8.0의 pH이고, 전도도는 약 0.1 내지 약 40 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 10.0 mS/cm이다. AEC에서, 평형화 완충액의 pH는 약 4 내지 약 10, 더욱 바람직하게는 약 6

내지 9의 pH이고, 전도도는 약 0.1(WFI) 내지 약 10 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 5 mS/cm의 전도도이다.

- <69> "로딩 완충액"은 관심 단백질을 포함하는 혼합물을 칼럼에 로딩하는데 사용된다. 막이 크로마토그래피 매질로 사용되는 경우, 로딩 완충액은 당분야에 사용되는 통상적인 방법에 따라 막과 간단하게 접촉되는 것임을 알 것이다. 임의의 적당한 완충 용액이 로딩 완충액으로 사용될 수 있다. 특별한 구체예에서, 로딩 완충액은 포스페이트 또는 TRIS 완충액이다. CEC의 경우, 로딩 완충액의 전도도 및 pH는 관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되고, 한편 오염물질은 통과하여 흐를 수 있도록 선택된다. AEC의 경우, 로딩 완충액의 전도도 및 pH는 관심 단백질이 통과하여 흐를 수 있고, 한편 오염물질은 크로마토그래피 매질이 보유하도록 선택된다. 로딩 완충액으로 사용하기에 적당한 완충액은, 예를 들어 상기 기재된 것들과 같이 당업계에 공지되어 있다. CEC 및 AEC를 위한 로딩 완충액이 CEC 및 AEC를 위한 평형화 완충액에 대해 상기 기재된 바와 같은, (동일하지 않더라도) 상용적인 pH 및 전도도에서 사용될 수 있음은 당업자에 의해 인식될 것이다.
- <70> 본원에 사용되는 용어 "세정 완충액" 또는 "로딩후 세정액"은 관심 단백질을 용출하기 전에 (예를 들어, 칼럼 사용시) 크로마토그래피 수지로부터 불순물들을 제거하는데 사용되는 완충액을 말한다. 용어 "세정" 및 이의 문법적 변형 표현들은 적절한 세정 완충액이 크로마토그래피 수지를 통해 또는 그 위에 통과하는 것을 기술하기 위해 사용된다. 본 발명에서, 세정 완충액은 CEC에 사용되고 칼럼 밖으로 생성물을 "밀어내기" 위해 AEC에서 사용될 수 있으나, 이는 필요하지 않다. 세정 완충액은, AEC 막 매질에 의해 관심 단백질을 보유하고 있지 않기 때문에 AEC 막에 불필요하다. 편의상, 세정 완충액, 평형화 완충액 및 로딩 완충액은 동일할 수 있다. CEC에 사용되는 세정 완충액의 pH 및 전도도는, 하나 이상의 불순물이 수지로부터 용출되고, 한편 수지가 관심 폴리펩티드를 보유하도록 하는 것이다. 필요한 경우, 세정 완충액은 상기 기재된 바와 같은 세제, 예컨대 폴리소르베이트를 함유할 수 있다. 세정 완충액의 pH 및 전도도의 선택은 관심 단백질을 유의적으로 용출하지 않으면서 HCP 및 기타 오염물질을 제거하기 위해 중요하다. 평형화 및 로딩 완충액에 대해 상기 기술된 전도도 및 pH 조건은 이같은 목적을 달성하기 위해 충분하다. 전도도 및 pH는, 관심 단백질의 경우보다 더 친수성이고 더 산성이거나 염기성인 오염물질을 제거하고, 또한 용출 단계 전에 시스템의 전도도를 감소시키기 위해, 혼합물을 로딩한 후, CEC를 위한 후속 세정 단계에 사용되는 세정 완충액에서 감소, 유지 또는 증가될 수 있다.
- <71> 세정 완충액의 pH 및 전도도는 공정에 사용된 CEC 수지에서 관심 단백질을 보유하도록 선택된다. 세정 완충액으로 사용되기에 적당한 완충액의 예는 상기 기술되어 있다. 한 특별한 구체예에서, 세정 완충액은 포스페이트 또는 TRIS계이다.
- <72> CEC에 사용되는 세정 완충액의 pH는 약 3 내지 약 10, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 9의 pH일 수 있고; 전도도는 약 0.1 내지 약 40 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 약 5 mS/cm의 전도도일 수 있다.
- <73> 본원에 사용되는 용어 "용출 완충액"은 CEC 수지로부터 관심 단백질을 용출하는데 사용되는 완충액을 말한다. 용어 "용출하다" 및 이의 문법적 변형 표현들은, 적절한 조건을 이용하여, 예를 들어 크로마토그래피 물질을 둘러싸는 완충액의 이온 강도 또는 pH를 변경하거나, 리간드에 대한 경쟁적 분자를 첨가하거나, 분자의 소수성을 변경하거나, 리간드의 화학적 성질(예, 전하)을 변화시킴으로써, 관심 단백질이 수지에 결합할 수 없도록 하고, 이에 따라 크로마토그래피 칼럼으로부터 용출되도록 함에 의한, 크로마토그래피 물질로부터의 분자, 예를 들어 관심 폴리펩티드의 제거를 말한다. 용어 "용출액"은, 용출을 칼럼에 적용할 때, 관심 폴리펩티드를 포함하는 칼럼으로부터 나오는 유출액을 지칭한다. 관심 폴리펩티드의 용출 후, 칼럼을 필요에 따라 재생시키고 정화시키며 저장할 수 있다.
- <74> 용출 완충액의 pH 및 전도도는, 관심 단백질이 공정에 사용되는 CEC 수지로부터 용출되도록 선택된다. 용출 완충액으로 사용하기에 적당한 완충액은 상기 기재되어 있다. 한 특별한 구체예에서, 용출 완충액은 포스페이트 또는 TRIS계이다.
- <75> CEC에 사용되는 용출 완충액의 pH는 약 3 내지 약 10, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 9의 pH일 수 있고; 전도도는 약 0.1 내지 약 40 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 5 내지 약 15 mS/cm의 전도도일 수 있다.
- <76> 필요한 경우, 부가적 용액을 사용하여 재사용하기 위한 칼럼을 제조할 수 있다. 예를 들어, "재생 용액"을 사용하여, 정제 공정에 사용되는 칼럼으로부터 단단히 결합된 오염물질을 "스트립" 또는 제거할 수 있다. 전형적으로, 재생 용액은 수지로부터 실질적으로 임의의 잔존 불순물 및 관심 단백질을 제거하기에 충분한 전도도 및 pH를 가진다.
- <77> AEC 막은 관심 단백질을 결합시키기 못하여 재사용되지 못한다. 따라서, 사용 전에 평형화 완충액을 사용하여

평형화만을 필요로 하기 때문에 막 AEC를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 막 AEC에 사용된 평형화 완충액의 pH는 약 4 내지 약 10, 더욱 바람직하게는 약 6 내지 약 9의 pH일 수 있고; 전도도는 약 0.1 내지 약 10 mS/cm, 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 약 5 mS/cm의 전도도일 수 있다.

- <78> 본원에 사용되는 용어 "전도도"는 한 특별한 온도에서 양 전극 사이에 전류를 일으키는 수용액의 능력을 말한다. 전류는 용액 내 이온 수송에 의해 흐른다. 그러므로, 수용액 내 존재하는 이온의 양이 증가함에 따라, 용액은 보다 높은 전도도를 가질 것이다. 본 발명의 방법에 있어, 정제가 전형적으로 수행되는 온도는 특정화 pH 범위 내에서 약 4 내지 약 37°C, 더욱 바람직하게는 약 15 내지 약 25°C일 수 있다.
- <79> 전도도 측정을 위한 단위는 밀리시멘스/센티미터(mS/cm)이고, 표준 전도도 미터를 이용하여 측정될 수 있다. 용액의 전도도는 그 안의 이온 농도를 변화시킴으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 목적하는 전도도를 달성하기 위해, 용액 내 완충제 농도 및/또는 염(예, NaCl 또는 KCl) 농도를 변경시킬 수 있다. 바람직하게는, 이하 실시 예에 기술된 바와 같이, 바람직한 전도도를 달성하기 위해, 염 농도를 변형시킨다.
- <80> 폴리펩티드의 "pI" 또는 "등전점"은 폴리펩티드의 양 전하가 음 전하와 균형을 이루게 되는 pH를 말한다. pI는 각종 통상적 방법들에 따라, 예를 들어 폴리펩티드 상의 아미노산 및/또는 시알산 잔기의 순 전하로부터, 또는 등전 초점을 이용하여 계산될 수 있다.
- <81> 본원에 사용되는 "낮은 pH 유지(low pH hold)"는, 관심 단백질을 함유하는 용출액의 pH의 감소(여기에서, pH는 바이러스 불활성화(즉, 바이러스 역가의 2 로그 이상의 감소, 더욱 바람직하게는 3 로그 이상의 감소)를 달성하기 위해, 약 pH 5.0 미만, 바람직하게는 약 pH 4.0 미만, 더욱 바람직하게는 약 pH 3.7 미만, 가장 바람직하게는 약 pH 3.4 내지 약 3.6으로 감소됨)를 말하고, 그 후 pH를 증가시켜, 제2 크로마토그래피 단계를 위한 용출액을 제조하거나, 생성물을 관심 생성물의 분자 완전성에 안정성을 제공하는 매트릭스에 접촉시킨다. 임의의 적당한 산, 예컨대 1 N HCl 또는 빙초산을 관심 단백질을 함유하는 용출액에 적용하여, 저 pH 유지를 위해 pH를 감소시킬 수 있다. 임의의 적당한 염기, 예를 들어 1 N NaOH 또는 1 N 트리스를 용출액에 적용하여, 그것의 pH를 더욱 중성의 범위로 돌릴 수 있다.
- <82> "접선 흐름 여과(tangential flow filtration)" 또는 "TFF" 또는 "교차흐름(crossflow) 여과"는, 샘플 혼합물이 막 상단을 가로질러 순환하고, 한편 인가된 압력은 특정 용질 및 작은 분자가 막을 통과하도록 유발하는 여과 공정을 말한다. TFF에서, 전형적으로, 용액은 필터 막에 평행하게 흐른다. 막에 걸친 차압(pressure differential)은 유체 및 여과가능한 용질(이의 분자량은 막의 분자량보다 작거나, 그와 같이 양상을 띄고, 그 예로서 구상 단백질이 있음)이 필터를 통해 흐르도록 한다. 이는, 용액이 막 위를 반복해서 통과하고 한편으로는 필터를 통과하는 유체가 연속적으로 분리된 회로로 배출되게 되므로, 연속 흐름 공정으로 수행될 수 있다. 그러므로, HPTFF(고성능 접선 흐름 여과)에서, 오염물질을 분리시키기 위해 분자의 크기 및 전하를 모두 이용하여, 막이 하전된다(미국 특허 공보 제2003/0229212호 참조). 필요한 경우, 관심 단백질이 본 발명의 방법을 개시하기 전에 크로마토그래피 수지 상에 결합하기에 더 적당한 또 다른 완충액으로 가용화되는 완충액을 교환하기 위해 TFF를 사용할 수 있다. 하지만, 본 발명에서, 공정중 TFF 단계(즉, TFF가 양 크로마토그래피 단계 사이에 일어남)는, 크로마토그래피 동안 사용된 리간드 및 완충액의 성질이 한 정제 단계에서 다음 정제 단계로 바로 이동할 수 있기 때문에 불필요하다.
- <83> 본원에 사용되는 "공정중(in-process)"은 CEC를 사용하는 포획 단계 개시 후, 그리고 AEC 동안 관심 단백질의 수집을 완료하기 전에 수행되는 임의의 방법, 단계, 조작 등을 말한다. 공정중 방법은 순도의 변화를 직접 초래할 수 있지만(예, 공정중 TFF), 순도의 변화를 초래하는 것이 필요하지는 않다(예, pH 및/또는 전도도 조정).
- <84> 본 발명의 방법을 이용하여 치료 등급의 단백질 순도를 달성하는 것이 바람직할 수 있는데, 이러한 경우에는 당 업계에 잘 공지된 부가 단계가 경우에 따라 이용될 수 있다. 예를 들어, 우발성 및 내인성 바이러스 모두에 대한 바이러스 제거(clearance) 용량을 달성하기 위해, 하전 막 여과를 비롯한 낮은 pH 불활성화 및 바이러스 여과 방법[예, VR CUNO(CUNO 사), DV20(Pall Technologies 사) 및 Planova 필터(Asahi 사)]를 사용할 수 있다.
- <85> 본원에 사용되는 "다층 여과(depth filtration)"는, 전형적으로 필터 매트릭스 내에 입자를 보유하도록 하는 설계를 특징으로 하는 다층 필터들을 이용하는 여과 방법이다. 다층 필터의 용량은 전형적으로 깊어, 예를 들어 매트릭스의 10 인치 또는 20 인치, 및 이에 따른 고체의 고정 용량에 의해 정의된다. 본 발명의 방법에서, 다층 필터를 사용하여, 정제 방식의 바이러스 제거 용량을 향상시킬 수 있으나, 그것은 임의적 단계이며 본 발명의 방법의 순도 수준을 달성하기 위해 필요하지 않다. 바이러스 제거를 위한 다층 필터는 정제 방식 중 임의의 시점에서 사용될 수 있으나, 바람직하게는 필터 비용으로 인해, 낮은 공정 체적을 갖는 제1 크로마토그래피 단계

후에 사용된다.

<86> 공정에 관한 설명

<87> 본 발명의 방법에서, CEC 후 AEC는 약 100 ppm HCP 이하, 10 pg/mg DNA 이하, 99% 이상의 단량체 순도를 달성하기 위해 관심 단백질을 정제시키는데 사용된다. 이렇게 높은 수준의 순도를 획득하기 위해서는 부가적 크로마토그래피 단계나 TFF가 필요하지 않다.

<88> 관심 단백질은 단백질을 생산하도록 유전적으로 조작된 살아있는 숙주 세포에 의해 생산되거나 발현될 수 있다. 단백질을 생산하기 위해 세포를 유전적으로 조작하는 방법이 당업계에서 공지되어 있다. 예를 들어, 각기 본원에 특별히 참고 인용되는 [Ausabel 등, eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology(Wiley, New York), 및 미국 특허 제5,534,615호 및 제4,816,567호]를 참조한다. 그러한 방법은 단백질을 살아있는 숙주 세포로 코딩하고 발현시키는 핵산을 도입하는 단계를 포함한다. 이 숙주 세포는 세균 세포, 진균 세포, 또는 바람직하게는 배양액 내 성장된 동물 세포일 수 있다. 세균 숙주 세포에는 대장균(*E. coli*) 세포가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 적당한 대장균 균주의 예에는 HB101, DH5 α , GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 및 외래 DNA를 절단하지 못하는 임의의 대장균 균주가 포함된다. 사용될 수 있는 진균 숙주 세포에는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 아스퍼길러스(*Aspergillus*) 세포가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 동물 세포주의 몇가지 예는 CHO, VERO, DXB11, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, NSO 및 WI138이다. 신규 동물 세포주는 당업계에 공지된 방법(예, 형질전환, 바이러스 감염 및/또는 선택)에 의해 확립될 수 있다. 특정 구체예들에서, 관심 단백질은 CHO 세포 내에서 생산된다(예, WO 94/11026 참조). 각종 유형의 CHO 세포들, 예를 들어 CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB11, CHO/dhfr⁻ 및 CHO-S가 당업계에 공지되어 있다. 단백질을 발현할 수 있는 당업계에 공지된 조건 하에 관심 단백질을 코딩하는 핵산으로 조작된 숙주 세포를 배양할 수 있다.

<89> 세포내 좌멸물(debris)로부터의 단백질 정제를 위한 혼합물의 제조는 처음에는 단백질의 발현 방식에 의존한다. 일부 단백질은 세포에서 주위 성장 배지로 직접 분비되도록 유발되고, 한편 다른 단백질은 세포내 보유된다. 세포내 생산된 그러한 단백질의 경우, 세포는 각종 방법들 중 임의의 방법, 예컨대 기계적 전단, 삼투 쇼크 및 효소 처리를 이용하여 붕괴될 수 있다. 붕괴는 세포의 전체 내용물을 균질 현탁액(homogenate)으로 방출하고, 또한 원심분리 또는 여과에 의해 제거될 수 있는 하위세포내 단편을 생산한다. 그와 유사한 문제가, 비록 그 정도는 덜하나, 단백질 생산 수행 과정 중에 세포의 자연사 및 세포내 숙주 세포 단백질의 방출로 인해 직접 분비된 단백질과 관련하여 일어난다.

<90> 제조합 기법을 이용할 경우, 관심 단백질은 세포내, 세포막 공간에서 생산되거나, 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 본 발명의 방법은 세포내 좌멸물을 제거하기 위한 임의의 특별한 방법에 의존하지 않는다. 이를 달성하기 위해, 숙련된 수행자에 의해 임의의 방법이 이용될 수 있다. 단백질이 제1 단계로서 세포내 생산되는 경우, 숙주 세포 또는 분해된 단편인 입상 좌멸물이 예를 들어 원심분리 또는 여과 단계에 의해 제거되어, 정제를 위한 혼합물을 제조할 수 있다. 단백질이 배지에 분비되는 경우, 제조합 숙주 세포가 예를 들어, 접선 흐름 여과(TFF) 또는 다층 여과에 의해 세포 배양 배지로부터 분리되어, 정제를 위한 혼합물을 제조할 수 있다.

<91> 본 발명에 따라, 일단 관심 단백질을 포함하는 혼합물이 수득되면(즉, 이 단백질이 적당한 숙주 세포 배양 조건 하에 발현 후 회수되면), 혼합물 내 오염물질로부터 이를 분리하는 것은, 상기 기재된 바와 같이, 적당한 조건 하에서, CEC 및 AEC의 조합을 이용하여 수행된다(도 1 참조). 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 순도 수준을 달성하기 위해, 어떠한 다른 공정중 정제 단계, 예를 들어 TFF 또는 HPTFF도 필요하지 않다. 필요한 경우 두 크로마토그래피 단계 사이에 단지 pH 조작 및/또는 희석 만을 수행하여, 크로마토그래피의 제2 단계에서 정제를 위한 혼합물을 제조한다.

<92> 한 특별한 구체예에서, AEC 단계는 4차 암모늄 이온 리간드를 사용하는 막을 사용하고 CEC 단계는 수지에 부착된 설포네이트계 리간드를 사용한다. 이러한 크로마토그래피 기법은 전하와 같은 각종 성질을 기초로 단백질의 혼합물을 분리시킨다.

<93> 낮은 pH 유지는 바람직한 경우 공정중 단계로서 본 발명에 혼입될 수 있음이 당업자에 의해 인식될 것이다. 치료 단백질의 생산을 위한 규제 당국의 바이러스 제거 요건으로 인해, 전형적인 낮은 pH 유지 및 바이러스 여과 단계인, 상이한 화학적 작용 방식에 기초한 바이러스 불활성화 및 제거의 적어도 두 분리된 단계이어야 한다. 본 발명은 임의의 시점, 및 AEC 단계 전 또는 후에 낮은 pH 유지를 허용한다. 전형적으로 낮은 pH 유지에 의해 달성되는 바이러스 제거를 이루기 위해, 두 크로마토그래피 단계 사이의 pH 유지는 당업계에 공지된 임의의 방

법을 이용하여 달성될 수 있고, 단 관심 단백질을 포함하는 혼합물은 AEC 단계의 적용하기 전에 적절하게 완충됨이 당업자에 의해 인식될 것이다.

- <94> 낮은 pH 유지는 전형적으로 0.5 mS/cm 이상의 전도도 증가를 초래한다. pH 유지 및 중화 후 생성된 pH는 약 4~약 10, 바람직하게는 약 6~약 9의 적당한 pH 범위 내에 있을 것이다. 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 순도 수준을 달성하기 위해 낮은 pH 유지 단계가 필수적이지 않음이 당업자에 의해 인식될 것이다.
- <95> 예를 들어, 제한하고자 의도하는 것은 아니나, 산 및 염기 시약 또는 pH 값과 관련하여, 낮은 pH 유지는 1 N HCl, 인산 또는 빙초산을 사용하여 CEC 용출액의 pH를 약 3.4 내지 3.6의 pH 범위로 감소시킨 후, 2 M 트리스 (pH 9.0)를 첨가하여 용출액의 pH를 약 7.0으로 증가시킴으로써 수행될 수 있다. 각종 산 및 염기를 적용할 수 있음이 당업자에 의해 인식될 것이다.
- <96> 당업자는 본 발명의 방법에 사용되는 낮은 pH 유지 단계를 위한 시간설정 조건을 인식할 것이다. 전형적으로, 낮은 pH 유지는 약 15분 이상, 바람직하게는 약 30분, 더욱 바람직하게는 약 45분, 더욱 더 바람직하게는 약 60분 이하, 가장 바람직하게는 약 90분 이하 동안 수행된다. 특정 정제 방식에서, 정제되는 단백질에 따라, 낮은 pH 유지를 최대 5시간 동안 수행하는 것이 바람직할 수 있다.
- <97> 치료 등급의 단백질 제형화가 바람직한 경우, 제2 바이러스 제거 단계, 예를 들어 바이러스 여과 단계를 이용할 수 있는데, 다만 이 단계는 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 순도 수준을 달성하기 위해 필요하지는 않다. 바이러스 제거에 유용한 여과 장치가 당업계에 공지되어 있다(예, Ultipor® VF 등급 DV20 또는 DV50 및 Filtron® TFF(Pall Corporation 사, 미국 뉴욕주 이스트 힐즈 소재); 비레솔브(Viresolve)(Millipore 사, 미국 메사추세츠주 빌러리카 소재); VR CUNO(CUNO 사; 미국 코네티컷주 메리든 소재); 및 Planova®(Asahi Kasei Pharma 사, 플라노바 지사, 미국 일리노이즈주 버팔로그로브 소재). 바이러스 및 기타 생물학적 물질을 제거하기 위해, 폴리오바이러스를 제거할 수 있는 세공 크기 20 nm 이하가 전형적으로 사용된다. 바이러스 여과는 공정 내 임의의 시점에서 포함될 수 있으나, 일단 생성물을 정제시키고 공정 체적을 최소화시키면 통상 수행된다.
- <98> 본 발명의 크로마토그래피 단계는 임의의 기계적 수단에 의해 수행될 수 있다. 크로마토그래피는 칼럼에서 수행될 수 있다. 칼럼은 압력의 존재 또는 부재 하에, 또한 상단에서 하단으로, 또는 하단에서 상단으로 운행될 수 있다. 필요한 경우, 칼럼 내 유체의 흐름 방향은 당업계에 공지된 경로 방법에 따라 크로마토그래피 공정 중에 역으로 될 수 있다. 크로마토그래피는 또한 중력, 원심분리 또는 여과를 포함한 임의의 적당한 수단에 의해 샘플을 로딩, 세정 및 용출하는데 사용되는 액체로부터 고체 지지체를 분리하는 배치 공정을 이용하여 수행될 수도 있다. 크로마토그래피는 또한 크로마토그래피 수지에 대해 기재된 것과 동일한 화학적 원리를 이용하여, 다른 것들보다 샘플 내 일부 분자를 더 강하게 흡수하거나 보유하는 하전된 필터와 샘플을 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 본 발명에 사용되는 칼럼의 제조에 있어 단계들은 수행자의 개별 필요에 맞게 조정될 수 있으나, 지도(guidance)로서 하기 설명이 제공되며, 당업자라면 본 발명의 취지에 벗어나지 않는 한 변경이 가해질 수 있음을 인식할 것이다. 칼럼 및 막은 제조자의 사용설명서에 따라 제조된다. 정제 전에, 칼럼은 전형적으로 정화 용액을 이용하여 정화된 후, 농도 전이형 염, 예를 들어 1 M NaCl을 이용하여 하전되고, 평형화 완충액을 이용하여 평형화된다. 정화 단계 중에, 전형적으로 정화 용액을 칼럼에 적용하여, 생물학적 기원의 오염물질을 포함한 임의의 결합된 오염물질을 갖는 수지를 세정한 후, 예를 들어 약 15~30분, 바람직하게 약 1시간 동안 유지(hold)가 있다. 하전 단계는 정화 용액을 교체함으로써 수지를 중화하고, 예를 들어 CEC에서, NaCl를 사용하여, 칼럼으로부터 NaOH를 제거하고 수지 리간드를 양으로 하전된 이온과 접촉되도록 유지시킨다. 칼럼이 하전된 후, 관심 단백질에 결합하는 수지의 pH 및 전도도를 만들기 위해, 칼럼을 평형하도록 평형화 완충액을 사용한다. 예를 들어, pH 및 전도도가 각기 평형화 완충액의 pH 및 전도도의 ± 0.1 및 ± 0.2 mS/cm 내일 때, 칼럼이 평형화된 것으로 간주될 수 있다.
- <99> 전형적으로 농축되고 적절한 완충된 염에서 완충액 교환된 세포 배양 상등액(즉 로딩 완충액)인 로딩 혼합물이 제조된다. 제조할 숙주 세포로부터 유래된 로딩 혼합물(즉, 정제가 바람직한 관심 단백질을 함유하는 혼합물)을, 임의적으로 평형화 완충액과 동일한 로딩 완충액을 이용하여, 평형화 칼럼(CEC)에 로딩한다. 혼합물이 칼럼의 고체상을 통해 흐를 때, 관심 단백질 및 기타 불순물(예, 단백질이 CHO 세포 내 생산되는 경우에는, HCP)은 고체상에 시차적으로 결합되고, 이로써 단백질 및 오염물질이 크로마토그래피 칼럼을 통과할 때 분리되어 일어나도록 한다.
- <100> 일단 혼합물이 칼럼에 로딩되어 관심 단백질이 수지에 결합되면, 전술된 세정 완충액을 이용한 세정 단계를 수행하여, 칼럼으로부터 오염물질을 소거한다. 임의적으로, 세정 단계를 다른 세정 및 용출 단계(이는 필요하지는 않음)에서보다 더 느린 유속으로, 예를 들어 수분(예, 2~30분) 체류 시간에 상응하는 유속을 이용하여 수행할

수 있다. 유속은 하기 더욱 상세히 논의된다. HCP 제거를 최대화하기 위해서는, 세정 완충액의 pH 및 전도도가 중요하다. 본 발명의 방법에서, CEC 내 세정 단계는 관심 단백질은 보유하면서 핵산 및 잔존 HCP를 제거한다.

<101> 칼럼으로부터 관심 단백질을 용출하기 위해, 상기 기재된 바와 같이, 적절한 용출 완충액을 사용하여, 관심 단백질이 칼럼에 결합하는 것을 역전시키도록 한다. 완충액 조성물 내 완충액, 염 및/또는 기타 화합물의 유형 및 농도는, 불순물(들)과 관련하여 시차적으로 관심 단백질을 용출한다. 로딩, 세정 및 용출 완충액을 위한 적절한 pH 및 전도도 범위는, 관심 단백질이 용출 동안 회수되도록 지도를 위해 본원에 제공된 실시예를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 관심 단백질을 함유하는 용출액 내 HCP를 최소화하기 위해, 하기 기재된 감소된 유속. 관심 단백질이 칼럼에서 제거될 때, 상승 A₂₈₀에서 하강 A₂₈₀까지의 피크 형성에 기초하여 수집된다. 기준선은 평형화 완충액이 칼럼을 통과하는 동안, 250~280 nm에서 평형화 완충액의 흡광도를 측정함으로써 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. HCP의 수집을 감소시켜 관심 단백질을 함유하는 정제된 조성물을 제조하기 위해, 관심 단백질을 함유하는 용출액을 최대 피크 높이의 25% 전에서 수집하는 것이 바람직하다.

<102> 본질적으로, 본 발명에 사용되는 분리 방법은 오염물질이 긴 칼럼 아래로 상이한 속도로 이동하도록 하여, 그것이 칼럼 아래로 더 지나감에 따라 증가하는 물리적 분리를 달성하고, 한편 관심 단백질은 크로마토그래피 매질에 부착된 후, 완충액에 따라 시차적으로 용출된다. 본 발명의 정제 방법에서, 혼합물이 칼럼 아래로 이동하는 감소된 속도는 약 2~10분의 체류 시간, 바람직하게는 30분 이하의 체류 시간이다. 본 발명의 한 특별한 구체예에서, 크로마토그래피 단계에서 유속은 약 6분 이하의 체류 시간과 상응하다. 유속은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 순도 수준을 달성하는데 필수적이지 않으나, 속도는 지도의 목적을 위해 제공된다. 당업자라면 필요에 따라 유속을 변형시킬 수 있다.

<103> 본 발명의 공정에 의한 단백질 정제 효율의 바람직한 척도는 숙주 세포 단백질 제거의 척도이다. 정제된 단백질은 바람직하게 상기 정의된 바와 같은 동종성 조성물이다. 임의의 정제 단계에서 샘플의 단백질 농도는 임의의 적당한 방법에 의해 결정될 수 있다. 그러한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 이에는 하기 것들이 포함된다: 1) 비색법, 예컨대 Lowry 검정법, Bradford 검정법, Smith 검정법, 및 콜로이드성 골드 검정법; 2) 단백질의 UV 흡수 성질을 이용하는 방법; 및 3) 동일 겔에 대한 기지 양의 단백질 표준 물질과의 비교에 의존하는 겔 상에 염색된 단백질 밴드에 기초한 가지적 평가. 예를 들어 문헌[Stoschek (1990), Quantitation of Protein, in Guide to Protein Purification, Methods in Enzymol. 182: 50-68]을 참조. 관심 단백질을 함유하는 동종성 조성물의 단백질 오염은 당업계에 공지된 각종 수단에 의해, 예를 들어 효소 결합 면역흡수 검정법(ELISA; 예컨대, 본원에 전문이 참고 인용되는 [Reen (1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA), in Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32: 461-466] 참조)에 의해 결정될 수 있다.

<104> 관심 단백질을 함유하는 동종성 조성물 내에 존재할 수 있는 핵산의 양은 임의의 적당한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 증합효소 연쇄 반응을 이용하는 검정법이 이용될 수 있다. 핵산은 10 pg/mg 미만의 수준으로 감소될 수 있다.

<105> 이에 따라 회수된 단백질은 당업계에 공지된 일상적인 제형 방법에 따라 생물약학적으로 허용가능한 조성물로 제형화될 수 있고, 상당히 정제된 단백질 조성물을 필요로 하는 각종 진단, 치료 및 기타 목적을 위해 사용된다.

<106> 관심 단백질을 함유하는 용출액을 수집한 후, 칼럼에 결합된 채로 유지될 수 있는 임의의 단백질을, 용액을 이용하는 크로마토그래피 매질을 스트리핑함으로써, 고 몰농도 또는 변형된 pH에서 방출할 수 있다. 이어서, 크로마토그래피 매질로부터 대부분 또는 모든 단백질을 방출하고, 크로마토그래피 매질 내 일어날 수 있는 임의의 미생물 오염물을 감소시키거나 제거하는 효과를 가질 용액(예, 재생액)을 이용하여, 칼럼을 재생할 수 있다. 이어서, 칼럼을 행구고, 미생물 성장을 억제하는 용액에 저장할 수 있다. 그러한 용액은 수산화나트륨을 포함할 수 있으나, 기타 시약들, 예컨대 에탄올, 나트륨 아지드, 벤질 알코올 또는 고 농도의 농도 전이형 염도 사용될 수 있다.

<107> 하기 실시예는 본 발명을 입증하기 위한 목적으로 제공된 것으로, 본 발명을 제한하는 것으로 간주되고자 함이 아니다.

실시예

<109> 본 발명의 실시예는 본 발명의 정제 방법을 이용하는 항체의 정제를 기술한다(도 1 참조). 종양 항원(TA)에 대한 완전 인간 항체를 제조하였다. CHO DG44 세포를 이용하여, 트랜스팩토마를 제조하였다. 중성 pH(7 내지 8)

및 10~20 mS/cm의 전도도에서 합성 무혈청 규정 배지를 사용하여 세포 배양을 수행하였다. DG44 CHO 세포를 약 2 내지 10x10⁶ 세포/ml의 밀도로 성장시켰다. 60MO2 CUNO 필터(미국 코넥티컷주 메리든 소재)를 이용하여 여과함으로써 세포 배양을 정화하였다. 생성된 세포 배양 상등액을 농축하고, 70 mM 인산나트륨(pH 6.2)에서 투석여과하였다.

<110>

표 1 및 2는 치료 등급의 단백질 물질을 생산하기 위한 본 발명의 2 단계 정제 방법을 조직적인 상세 사항으로 요약하여 제시한다. 제1 비친화성 크로마토그래피 단계는 포획을 위해 프락토겔 EMD SE HiCap 수지를 이용하는 양이온 교환 크로마토그래피이고, 이후, 1 N HCl 또는 빙초산을 이용하여 용출액의 pH를 3.4 내지 3.6으로 감소시키고, 2 M 트리스(pH 9.0)를 이용하여 분획의 pH를 7.0으로 증가시키는 낮은 pH 유지가 이어진다. 상기 방법은 하기 표 1에 제시된 바와 같이 각각의 수지에 대한 평형화, 로딩, 세정 및 용출 완충액을 이용하여 CEC 단계에서 수행되었다.

표 1

<111>

항체 포획을 위한 양이온 교환 크로마토그래피: 주요 작동 상세사항의 요약. 결합 용량은 40 mg/ml 수지였다. 유속은 보다 광범위한 실험 용통성을 제공하기 위해 상응 체류 시간으로 표시된다. 작동 온도는 15~25°C에서 변화된다. NaP = 인산나트륨.

단계	용액	pH	전도도 (mS/cm)	체적 (CV)	체류 시간(분)	진전 처리 기준/주해
정화	1 N NaOH	≥ 12	없음	≥ 3	≥ 6	용액이 칼럼에 적용된 시간으로부터 시작하여, 통상 1 시간 동안의 유지가 있음. 이 단계는 생물학적 기원의 것들을 포함한, 결합된 오염 물질로부터 수지를 정화하기 위한 것으로 간주됨.
전하	1 M NaCl	없음	≥ 69	≥ 3	≥ 6	NaCl은 나트륨 이온과 연결된 수지의 리간드를 중화하고 유지시키면서 칼럼으로부터 NaOH를 제거함.
평형화	70 mM NaP	6.2	~5.8	≥ 3	≥ 6	pH 및 전도도가 각기 평형화 완충액의 ±0.1 및 ±0.2 mS/cm일 때, 칼럼이 평형화됨. 전도도 및 pH 범위는 숙주 세포 단백질의 결합을 최소화하면서, 항체에 결합하는데 중요함.
로딩	컨디셔닝된 세포 배양 상등액	6.2	~5.8		≥ 6	로딩은 세포 배양 상등액이고, 이를 농축하며, 70 mM 인산나트륨(pH 6.2)에서 완충액 교환함.
로딩후 세정 1	10 mM NaP (0.1% 폴리소르베이트 80)	7.5	~1.6	≥ 3	≥ 6	폴리소르베이트 80을 함유하는 완충액의 보다 낮은 유속은, 최종 정제된 생성물의 DNA 함량을 감소시키는 것을 도움.
로딩후 세정 2	20 mM NaP	6.2	~1.7	≥ 7	≥ 6	pH 및 전도도가 각기 평형화 완충액의 ±0.1 및 ±0.2 mS/cm일 때, 칼럼이 평형화됨. 전도도 및 pH 범위는 숙주 세포 단백질의 결합을 최소화하면서 항체에 결합하는데 중요함.

용출	35 mM NaP + 75 mM NaCl	6.2	~10.5	~2.5	≥ 6	흡광도에서 초기 상승 후 0.50~0.75 칼럼 체적에서 수집을 시작하고, 흡광도가 최대 피크 높이의 35~25%에 도달하였을 때 수집을 종료함. 용출시 보다 낮은 CHOP 및 응집물(%) 수준을 확실하게 하기 위해 피크의 말기에는 수집하지 말 것.
스트립	1 M NaCl	없음	≥ 69	≥ 5	≥ 6	단단하게 결합된 오염물질을 제거함.
CIP	1 N NaOH	≥ 12	없음	≥ 3	≥ 6	정화와 유사한 단계
저장	0.1 N NaOH	≥ 12	없음	≥ 3	≥ 6	이 용액의 알칼리성은 미생물 성장을 허용하지 않으나, 저장 동안 수지 완전성을 유지시킴.

표 2

<112> 로딩 제조: 항체 연마(polishing)를 위한 음이온 교환 크로마토그래피 막: 주요 작동 상세사항의 요약. 결합 용량은 2100 mg/ml 막이었음. 유속은 보다 광범위한 실험 유효성을 제공하기 위해 상응한 상 체적으로 표시된다. 작동 온도는 15~25°C에서 변화된다.

단계	용액	pH	전도도 (mS/cm)	체적 (BV)	진전 처리 기준/주해
평형화	5 mM NaP	~7.0	~0.7	>28	pH가 6.9~7.1이고 전도도가 0.5~0.9 mS/cm일때 막은 평형화됨.
로딩	생성물 농도 < 6.0 mg/ml	~7.0	≤3.1	없음	로딩은 로딩 특이성을 충족시키기 위해 약 5배로 프락토겔 Bulk 희석후임.

<113> NaP: 인산나트륨

<114> BV: 세스팀의 상 체적

<115> 유속(ml/분) = [(선형 유속(cm/시))/(60분/시간)*[Frontal Surface Area(cm²)]

<116> 정제 방법은 공정중 완충액 교환 단계를 사용하지 않는데, 즉 샘플은 pH만으로 제1 크로마토그래피 단계에서 제2 크로마토그래피 단계를 진행하고 임의의 낮은 pH 유지를 수행하기 위해 희석 조작을 한다. 치료 등급의 단백질 조성물을 제조하기 위해 희석, 바이러스 불활성화, 바이러스 제거 및 제형 단계가 본 실시예에 사용되었다. 이러한 단계들 중 어느 것도 다른 유기 화합물과 관련한 단백질 생성물의 순도에 영향을 미치지 않음을 당업자라면 알 것이다.

<117> CHOP 수준을 확인하기 위해 표준 ELISA 검정법을, DNA 수준을 확인하기 위해 PCR을, 항체의 단량체 순도를 확인하기 위해 HPLC-SEC를 사용하여, 본 실시예의 정제 공정으로 100 ppm 미만의 숙주 세포 단백질(하기 표 3 참조). 10 pg DNA/mg 미만의 항체 및 99% 이상의 단량체를 함유하는 동종성 조성물을 달성하고, 이를 추가 가공하여 정제된 물질을 치료 등급의 제품으로 제형한다. 제1 단계 후 오염물질 농도는 CHOP 200~1500 ng/mg 및 단량체 95~100%로 변화였다. 그 결과를 하기 표 3에 제시한다.

표 3

공정	변수	(항-TA Ab)
CEC → AEC	전체 회수율(%)	≥85
	최종 CHOP(ng/mg)	<50
	최종 DNA(pg/mg)	<10
	최종 순도 (HPLC-SEC에 의한 단량체 %)	≥99

도면의 간단한 설명

<108>

도 1은 실시예 1에 수행된 본 발명의 2 단계 정제 공정의 순서도를 도시한다. 이러한 특별한 구체예에서, 정제 방법은 CEC 단계 후 바이러스 불활성화 단계 및 AEC 단계를 포함한다. CEC 및 AEC 단계 사이에는 CEC 용출 부피의 전도도를 감소시켜 AEC 단계에서 목적하는 바이러스 및 오염물질 제거율을 얻기 위한 희석 절차가 있다.

도면

도면1

