



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월18일

(11) 등록번호 10-1769634

(24) 등록일자 2017년08월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/18 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01) C12N 9/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7004995

(22) 출원일자(국제) 2010년08월02일

심사청구일자 2015년07월30일

(85) 번역문제출일자 2012년02월27일

(65) 공개번호 10-2012-0053013

(43) 공개일자 2012년05월24일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/061192

(87) 국제공개번호 WO 2011/012726

국제공개일자 2011년02월03일

(30) 우선권주장

61/230,308 2009년07월31일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20060246589 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

박스알타 인코퍼레이티드

미국, 일리노이즈 60015, 배독번, 1200 레이크사이드 드라이브

박스엘타 게엠베하

스웨스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우에 르슈트라쎄 130

(72) 발명자

하슬라허 마인하르트

오스트리아 아-1020 비엔나 포르가르텐슈트라쎄 221/1/7

미테리 아르투르

오스트리아 아-2304 오르트/도나우 슈바르체케르 베크 10

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 류현경

전체 청구항 수 : 총 25 항

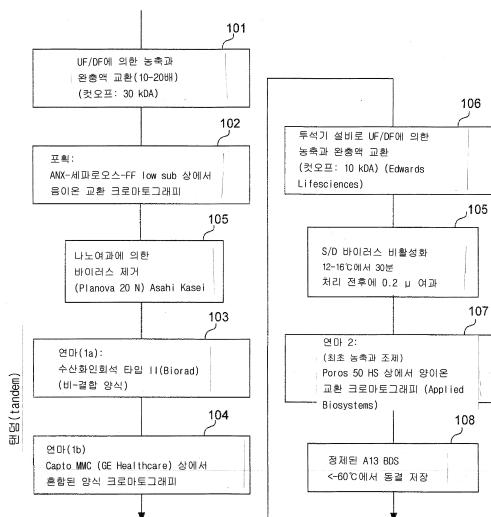
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 재조합 ADAMTS13 및 기타 단백질을 정제하는 방법, 그리고 이들의 조성물

(57) 요약

본 발명에서는 샘플로부터 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질을 정제하는 방법이 제시된다. 상기 방법은 ADAMTS13 단백질이 수산화인회석으로부터 용출액 또는 상층액 내에 나타날 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 농화하는 단계를 포함한다. 이들 방법은 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와의 텐덤 크로마토그래피를 더욱 포함할 수 있다. 추가의 선택적 단계는 한의여과/정용여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 그리고 바이러스 비활성화를 수반한다. 또한, 본 발명에서는 단백질 샘플에서 바이러스 오염물질을 비활성화시키는 방법이 제시되고, 여기서 상기 단백질은 서포트 상에 고정화된다. 또한, 본 발명에서는 이들 방법에 따라 준비된 ADAMTS13의 조성물이 제시된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

피에들러 크리스티안

오스트리아 아-1100 비엔나 라베르반가쎄 18/36

마이어 크리스타

오스트리아 아-2412 블프스탈 반호프슈트라쎄 2

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 비-ADAMTS13 불순물은 수산화인회석에 보유되는 반면 ADAMTS13 단백질은 수산화인회석에 결합하지 않음으로써 상기 ADAMTS13 단백질이 상기 수산화인회석으로부터 관류 분획(flow through fraction) 내에 나타나도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계;
- (b) 이어서, 상기 관류 분획을 상기 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계; 및
- (c) 용리 완충액으로 상기 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계

를 포함하는, 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질을 ADAMTS13 단백질 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플로부터 정제하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 단계 (a) 이전에 상기 샘플을 음이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계 및 상기 음이온 교환 수지로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 단계 (a) 이전에 상기 샘플 중 상기 ADAMTS13 단백질을 한외여과에 의해 농축하는 단계 및 칼슘 이온과 아연 이온을 포함하는 완충액으로 정용여과 교환에 의해 상기 ADAMTS13 단백질을 안정화시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 단계 (a)에서의 접촉, 또는 상기 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와의 크로마토그래피 접촉 단계 (b)에서의 접촉 이후에, 완충액 전도도를 감소시킴으로써 양이온 교환에 대해 상기 ADAMTS13 단백질을 준비하는 준비 단계 (d)를 더 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 준비 단계 (d)는 한외여과/정용여과에 의해 수행되는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 준비 단계 (d)는 투석에 의해 수행되고, 상기 투석은 1회 또는 2회 수행되는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 준비 단계 (d)는 겔 여과에 의해 수행되는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제5항에 있어서,

- (e) 상기 ADAMTS13 단백질을 적어도 하나의 바이러스 비활성화 또는 바이러스 제거 단계에 적용하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 바이러스 비활성화 단계 (e)는 비이온성 세정제 및 유기 용매를 포함하는 용매-세정제 혼합물을 상기 ADAMTS13 단백질에 첨가하는 것을 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 ADAMTS13 단백질은 상기 바이러스 비활성화 단계 (e) 동안 고정화 되는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 ADAMTS13 단백질은 단계 (e)에서 양이온 교환 수지 상에 고정화 되는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 용매-세정제 혼합물을 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 및 0.3% 폴리소르베이트 80을 포함하는 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 바이러스 제거 단계 (e)는 바이러스, 바이러스 입자, 또는 바이러스 및 바이러스 입자 둘다를 제거하는 나노필터로 상기 ADAMTS13 단백질을 여과하는 것을 포함하는 방법.

청구항 15

제5항에 있어서, (e) 상기 ADAMTS13 단백질을 적어도 하나의 바이러스 비활성화 또는 바이러스 제거 단계에 적용하는 단계를 더 포함하고, 상기 바이러스 비활성화 또는 바이러스 제거 단계 (e)는 상기 준비 단계 (d) 이후에 수행되는 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 구배 용리(gradient elution)를 이용하여 상기 양이온 교환 수지로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더 포함하고, 상기 구배 용리는 낮은 염 험량을 갖는 첫 번째 완충액 및 더 높은 염 험량을 갖는 두 번째 완충액을 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 스텝 용리(step elution)를 이용하여 상기 양이온 교환 수지로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 스텝 용리는 저장 완충액으로 상기 양이온 교환 수지로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 것을 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 저장 완충액은 7.0 초과의 pH를 가지며, 10 mM 미만의 칼슘 이온, 완충 화합물, 0.05% 비이온성 세정제, 및 염을 포함하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 저장 완충액에 의한 양이온 교환 수지로부터의 용리 단계 이후에 한외여과, 정용여과, 또는 완충액 교환 단계가 없는 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

제11항에 있어서, 상기 ADAMTS13 단백질은 단계 (e)에서 서포트 상에 고정화 되는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 용매-세정제 혼합물은 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 및 0.3% 폴리소르베이트 80을 포함하는 방법.

청구항 27

제10항에 있어서, 상기 ADAMTS13 단백질은 상기 용매-세정제 혼합물에서 30분 내지 1시간 동안 항온처리되는 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 저장 완충액으로 상기 서포트로부터 상기 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 저장 완충액은 7.0 초과의 pH를 가지며, 10 mM 미만의 칼슘 이온, 완충 화합물, 0.05% 비이온성 세정제, 및 염을 포함하는 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 서포트가 양이온 교환 수지이고, 저장 완충액에 의한 양이온 교환 수지로부터의 용리 단계 이후에 한외여과, 정용여과, 또는 완충액 교환 단계가 없는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조

본 출원은 2009년 7월 31일 제출된 U.S. 특허가출원 No. 61/230,308에 우선권을 주장하고, 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0003] 본 발명의 기술 분야

본 발명은 전반적으로, 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질 및 기타 단백질을 정제하는 방법, 그리고 이런 정제된 단백질을 포함하는 조성물에 관계한다.

배경 기술

[0005] 본 발명의 배경 기술

금속단백분해효소 유전자 패밀리, ADAM (디스인테그린 및 금속단백분해효소)에는 다양한 기능을 갖는 막-고정된 프로테아제인 구성원이 포함된다. ADAMTS 패밀리 구성원은 C-말단에서 하나 또는 그 이상의 트롬보스폰딘 1-유사 (TSP1) 도메인(들)의 존재, 그리고 ADAM 금속단백분해효소에서 전형적으로 관찰되는 EGF 반복부, 막통과 도

메인 및 세포질 꼬리의 부재에 의해 ADAM으로부터 구별된다.

[0007] 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13)는 ADAMTS 패밀리의 구성원이다. ADAMTS13은 8개의 트롬보스폰딘 도메인을 보유하고 소수성 막통과 도메인을 보유하지 않는다. 따라서 이것은 분비된다. ADAMTS13은 Tyr^{1605} - Met^{1606} 결합에서 폰 빌레브란트 인자를 절단하고, 그리고 기능하기 위하여 칼슘과 아연 이온 둘 모두를 필요로 한다. ADAMTS13은 또한, "폰 빌레브란트 인자-절단 프로테아제" 및 "VWFCP"로 알려져 있다.

[0008] 결합성 ADAMTS13 발현은 일부 질환, 예를 들면, 혈전성 혈소판감소성 자반병 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)과 같은 혈전성 장애의 병인에 관련된다 (참조: U.S. Patent Publication No. 20070015703). TTP에서, ADAMTS13의 결합 및/또는 저해는 신체 전반에서 작은 혈관 내에 형성되는 광범위한 현미경적 혈전 (microscopic thrombus) (혈전성 미소혈관증)을 유발한다. 이를 현미경적 혈전을 통과하는 적혈구 세포는 전단 스트레스 (shear stress)를 경험하고, 이는 적혈구 세포 막에 손상을 유발하고, 그리고 이는 차례로, 혈관내 용혈 (intravascular hemolysis) 및 분열적혈구 (schistocyte) 형성을 초래한다. 혈전은 또한, 감소된 혈류를 유발하고, 이는 말단 기관 손상을 초래할 수 있다. 증상에는 전형적으로, 신경학적 문제점, 예를 들면, 환각, 기행, 정신 상태 변화, 뇌졸중, 또는 두통; 신부전; 열병; 그리고 피멍 또는 자반병을 유발하는 혈소판감소증 (thrombocytopenia) (적은 혈소판 수); 그리고 빈혈과 황달을 수반하는 미세혈관병성 용혈성 빈혈 (microangiopathic hemolytic anemia)이 포함된다. 현재의 요법은 ADAMTS13에 대한 순환 항체를 감소시키는 혈장사혈 (plasmapheresis) 및/또는 상기 효소의 혈액 수준 보충을 수반한다.

[0009] 이런 이유로, 치료제로서 이용될 수 있는 재조합 ADAMTS13을 특히, 상업적 생산 규모에서 정제하는 방법이 강하게 요구된다. ADAMTS13의 정제는 어려운 것으로 증명되었고, 그리고 크로마토그래피를 비롯한 다양한 접근법이 시도되었다. 비-ADAMTS13 단백질에 결합하여 ADAMTS13 단백질이 용출액 또는 상층액 내에 나타날 수 있도록 하는 크로마토그래피 물질은 정제를 위한 유용한 접근법을 제공할 것이다. ADAMTS13 단백질에 결합하지만 비-ADAMTS13 불순물이 용액 내에 남아있거나, 또는 훨씬 강하게 결합하는 크로마토그래피 물질 역시 매력적인 접근법을 제공하고, 그리고 다른 접근법과 동시에 이용될 수 있다. 본 발명에서는 이를 접근법을 제시한다.

[0010] 더 나아가, 바이러스 오염물질은 ADAMTS13 단백질, 그리고 다른 단백질과 재조합 단백질의 정제에서 추가적인 과제를 발생시킨다. 한 가지 전통적인 접근법은 정제되는 샘플을 용해 상태의 용매-세정제 혼합물로 처리하는 것을 수반하였다. 용매-세정제 화학물질과 함께 샘플의 항온처리 (incubation)는 지질-외피 바이러스의 불활성화를 유발하였다. 하지만, 이러한 용해 상태 처리는 예로써, 처리후 용매-세정제 화학물질의 제거를 용이하게 하기 위하여, 샘플의 적어도 하나의 다른 용기로의 이전을 비효율적으로 요구하였다. 게다가, ADAMTS13을 비롯한 일부 단백질은 용매-세정제 화학물질에 민감하고 접합체 형성이 초래된다. 본 발명에서는 이런 바이러스 비활성화의 문제점을 해결하기 위하여, 용매-세정제 처리 동안 단백질의 고정화 (immobilization)를 수반하는 접근법을 제시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

본 발명의 요약

[0011] 본 발명의 한 측면은 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질 (특히, 인간 ADAMTS13)을 ADAMTS13 단백질 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플로부터 정제하는 방법에 관계한다. 놀랍게도, 수산화인회석 크로마토그래피는 비-ADAMTS13 불순물로부터 ADAMTS13 단백질을 정제하는데 적합한 조건 하에 이용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 방법은 ADAMTS13 단백질이 수산화인회석으로부터 용출액 내에 나타날 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 농화 (enrichment)하는 단계를 포함한다. 다시 말하면, 샘플은 ADAMTS13 단백질, 바람직하게는 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 수산화인회석에 결합하지 않도록 하면서, 불순물이 존속하도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종속된다. 일부 바람직한 구체예에서, 재조합 ADAMTS13 단백질은 재조합 ADAMTS13 핵산을 포함하는 CHO 세포의 배양으로부터 수집된 상층액으로부터 정제된다. 일부 바람직한 구체예에서, 상층액 또는 용출액에서 수율 퍼센트는 놀랍게도, 50% 내지 100%이다. 상기 방법은 수산화인회석으로부터 용출액을 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 것을 포함하는 탠덤 크로마토그래피를 더욱 포함할 수 있다. 일부 바

람직한 구체예에서, 텐덤 크로마토그래피에 의한 농화 이후에 ADAMTS13 수율 퍼센트는 놀랍게도 적어도 60%이다.

[0013] 일부 구체예에서, 상기 방법은 샘플 내에 ADAMTS13을 농축하고 및/또는 ADAMTS13 단백질을 음이온 교환 수지에 결합시키는 선택적 전-농화 단계를 더욱 포함한다. 가령, 상기 방법은 샘플을 음이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키고 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 음이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하고; 및/또는 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 샘플 내에 ADAMTS13 단백질을 한외여파에 의해 농축하고; 및/또는 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 ADAMTS13 단백질을 칼슘 이온 및 아연 이온을 포함하는 완충액으로 정용여파 교환에 의해 안정화시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 샘플은 10-배 내지 20-배 한외여파에 의해 농축되고, 그리고 완충액은 30 kDa의 분자 컷오프를 갖는 정용여파에 의해 칼슘과 아연 이온을 내포하는 낮은-전도도 완충액으로 교환되고, 그리고 ADAMTS 13은 텐덤 크로마토그래피에 앞서, 음이온 교환 수지, 예를 들면, ANX 세파로오스 Fast Flow, POROS 50D, 또는 POROS 50PI에 결합되고 이로부터 용리된다. 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 용출액 풀은 일부 바람직한 구체예에서, 수산화인회석으로 크로마토그래피, 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 수산화인회석으로부터 용출액을 이용한 크로마토그래피를 포함하는 수산화인회석으로 텐덤 크로마토그래피 이전에 전도도를 6 mS/cm로 감소시키기 위하여 수산화인회석-회석 완충액으로 1:4 희석된다. 일부 바람직한 구체예에서, 전-농화 단계(들)로부터 용출액은 놀랍게도, 적어도 75%의 수율 퍼센트를 제공할 수 있다.

[0014] 일부 구체예에서, 상기 방법은 수산화인회석 또는 혼합 양식 수지와의 크로마토그래피 접촉 이후에, 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 선택적 손질 (polishing) 단계를 더욱 포함한다. 이런 구체예에서, 수산화인회석 또는 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와의 접촉 이후에, 상기 방법은 완충액 전도도를 감소시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 양이온 교환에 준비시키는 단계를 더욱 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 준비 단계는 한외여파/정용여파에 의해, 투석에 의해, 및/또는 젤 여파에 의해 수행된다. 한외여파/정용여파가 이용되는 일부 구체예에서, 컷오프는 10 kDa이다. 일부 구체예에서, 완충액 교환은 ANX 세파로오스-FF low sub에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행된다. 투석이 이용되는 일부 구체예에서, 투석은 단일 투석 모듈을 통한 단지 2회 통과로 구성될 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 양이온 교환 크로마토그래피는 Source S 칼럼 또는 POROS S 칼럼에서 수행된다. 일부 바람직한 구체예에서, 완충액 전도도를 감소시킨 이후에 ADAMTS13 수율 퍼센트는 놀랍게도, 적어도 90%이고, 그리고 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질 이후에, 놀랍게도 적어도 70%이다.

[0015] 일부 구체예에서, 상기 방법은 예로써, 바이러스를 불활성화시키고 및/또는 바이러스와 바이러스 입자를 제거하기 위하여, ADAMTS13 단백질을 선택적 바이러스 비활성화 단계에 종속시키는 단계를 더욱 포함한다. 일부 구체예에서, 바이러스 비활성화 단계는 비-이온성 세정제 및 유기 용매를 포함하는 용매-세정제 혼합물을 ADAMTS13 단백질에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, ADAMTS13 단백질은 고정화된다, 예를 들면, 양이온 교환 수지 상에 고정화된다. 일부 구체예에서, 용매-세정제 혼합물은 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 그리고 0.3% TWEEN 80을 포함하고; 및/또는 용매-세정제 처리는 12°C 내지 16°C에서 30분 동안 지속된다. 대안으로 또는 부가적으로, 바이러스 비활성화 단계는 ADAMTS13 단백질을 바이러스 및/또는 바이러스 입자를 제거하는 나노필터로 여과하는 것을 포함할 수 있다. 일부 이와 같은 구체예에서, 나노여과는 용매-세정제 처리 이전에 및/또는 이후에, 20 N 또는 35 N 필터를 통해 수행된다. 일부 구체예에서, 바이러스 비활성화 단계는 앞서 기술된 준비 단계 이후에 및/또는 텐덤 크로마토그래피 단계 이후에; 및/또는 앞서 기술된 손질 양이온 교환 크로마토그래피 이후에 수행된다. 일부 바람직한 구체예에서, 바이러스 비활성화 이후에 ADAMTS13 수율 퍼센트는 놀랍게도 적어도 95%이다.

[0016] 일부 구체예에서, 상기 방법은 양이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더욱 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 구배 용리, 예를 들면, 낮은 염 농도를 갖는 첫 번째 완충액 및 더욱 높은 염 농도를 갖는 두 번째 완충액을 포함하는 구배 용리가 이용된다. 더욱 바람직한 일부 구체예에서, 계단 용리가 이용되고, 이보다 더욱 바람직하게는, 계단 용리는 저장 완충액으로 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하는 것을 수반한다. 가령, 저장 완충액은 7.0 이상의 pH를 가지고, 그리고 10 mM 이하 칼슘 이온, 완충 화합물, 0.05% 비-이온성 세정제, 그리고 염을 포함할 수 있다. 더욱 바람직한 일부 구체예에서, 상기 방법은 저장 완충액으로 수지로부터 용리 이후에, 차후 농축 또는 완충액 교환 단계를 포함하지 않는다.

[0017] 특히 바람직한 구체예에서, 재조합 ADAMTS13 단백질을 ADAMTS13 단백질 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플로부터 정제하는 방법이 제시되고, 상기 방법은 ADAMTS13 단백질이 수산화인회석으로부터 용출액 또는 상충액 내에 나타날 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시키고; 이후, 바람직

하계는 텐덤 크로마토그래피로서, 상기 용출액을 ADAMTS13 단백질에 결합하는 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0018] 다른 특히 바람직한 구체예에서, 앞서 기술된 크로마토그래피 단계는 샘플을 음이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키고 음이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하고; 및/또는 샘플 내에 ADAMTS13 단백질을 한외여과에 의해 농축하고, 그리고 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 칼슘 이온 및 아연 이온을 포함하는 완충액으로 정용여과 교환에 의해 ADAMTS13 단백질을 안정화시키는 단계가 선행한다.

[0019] 다른 특히 바람직한 구체예에서, 수산화인회석 또는 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와의 접촉 이후에, 상기 방법은 완충액 전도도를 감소시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 양이온 교환에 준비시키는 단계를 더욱 포함하고, 여기서 준비 단계는 한외여과/정용여과에 의해; 및/또는 단일 투석 모듈을 통한 단지 2회 통과로 구성되는 투석에 의해; 및/또는 겔 여과에 의해 수행된다.

[0020] 또 다른 특히 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 재조합 ADAMTS13 핵산을 포함하는 CHO 세포의 배양으로부터 수집된 상층액으로부터 샘플을 획득하고; 샘플을 음이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키고, 그리고 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 음이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하고; 및/또는 샘플 내에 ADAMTS13 단백질을 한외여과에 의해 농축하고; 그리고 수산화인회석과의 크로마토그래피 접촉 이전에 칼슘 이온 및 아연 이온을 포함하는 완충액으로 정용여과 교환에 의해 ADAMTS13 단백질을 안정화시키고; 그 이후에 ADAMTS13 단백질이 수산화인회석으로부터 용출액 또는 상층액 내에 나타날 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시키고; 이후, 용출액을 ADAMTS13 단백질에 결합하는 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키고; 그 이후에 예로써, 한외여과/정용여과에 의해; 및/또는 단일 투석 모듈을 통한 단지 2회 통과로 구성되는 투석에 의해; 및/또는 겔 여과에 의해 완충액 전도도를 감소시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 양이온 교환에 준비시키는 단계를 포함하고, 하나 또는 그 이상의 바이러스 비활성화 단계를 선택적으로 더욱 포함한다. 일부 이와 같은 구체예에서, 바이러스 비활성화 단계는 비-이온성 세정제 및 유기 용매를 포함하는 용매-세정제 혼합물을 ADAMTS13 단백질에 첨가하는 것을 포함하고, 여기서 ADAMTS13 단백질은 양이온 교환 수지 상에 고정화되고, 그리고 용매-세정제 혼합물은 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 그리고 0.3% TWEEN 80을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 바이러스 비활성화 단계는 용매-세정제 처리에 더하여 또는 용매-세정제 처리 대신에, 바이러스 및/또는 바이러스 입자를 제거하는 나노필터를 이용한다. 일부 바람직한 구체예에서, 앞서 개설된 전체 절차의 ADAMTS13 수율 퍼센트는 놀랍게도 22-24% 또는 그 이상이고, 그리고 이보다 더욱 바람직한 구체예에서, 집합체는 놀랍게도 50% 감소한다.

[0021] ADAMTS13이 양이온 교환 수지 상에 고정화되는 일부 구체예에서, 상기 방법은 7.0 이상의 pH를 갖고 10 mM 이하 칼슘 이온, 완충 화합물, 0.05% 비-이온성 세정제, 그리고 염을 포함하는 저장 완충액으로 계단 용리를 이용하거나; 또는 낮은 염 함량을 갖는 첫 번째 완충액 및 더욱 높은 염 함량을 갖는 두 번째 완충액을 포함하는 구배 용리를 이용하여 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하는 단계를 더욱 포함한다.

[0022] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에서 기술되는 방법의 임의의 구체예에 따라 준비된 재조합 ADAMTS13 단백질을 포함하는 조성물에 관계한다. 일부 구체예에서, 조성물은 제약학적 조성물, 예를 들면, 정제된 ADAMTS13 단백질 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 측면은 단백질 샘플 내에 바이러스 오염물질을 비활성화시키는 방법에 관계하고, 여기서 단백질은 바이러스 오염물질을 갖는 출처로부터 임의의 단백질일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 단백질은 재조합 단백질, 특히 유기 용매 및 세정제에 노출될 때, 집성 (aggregation)에 민감한 단백질이다. 일부 구체예에서, 단백질은 ADAMTS13 단백질, 특히 재조합 ADAMTS13, 또는 상이한 단백질 (특히, 상이한 재조합 단백질)일 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 단백질은 혈액 응고 인자이다. 일부 구체예에서, 단백질은 예로써, 인자 VIII, 인자 II, 인자 VIIa, 인자 IX, 트롬빈, 폰 빌레브란트 인자, 항-MIF 항체, 또는 크로마토그래피에 의해 정제되는 다른 단백질 중에서 하나 또는 그 이상이다. 바이러스 비활성화는 단백질 정제와 공동으로 수행되거나, 또는 수행되지 않을 수도 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 단백질을 서포트 상에 고정화시키고; 그리고 고정화되는 단백질을 비-이온성 세정제 및 유기 용매를 포함하는 세정제-용매 혼합물로 처리하는 단계를 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 서포트는 크로마토그래피 수지이다. 이보다 더욱 바람직한 구체예에서, 세정제-용매 혼합물은 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 그리고 0.3% 폴리소르베이트 80 (Tween 80)을 포함한다. 용매-세정제 혼합물 처리는 연장된 시간, 예를 들면, 30분 내지 1시간 동안 지속될 수 있고, 반면 단백질은 크로마토그래피 수지, 예를 들면, 양이온 교환 수지 상에 고정화된 상태로 남아있고; 및/또는 용매-세정제 처리는 2°C 내지 10°C에서 일어날 수 있다. 바이러스 비활성화에 대한 이러한 접근법은 놀랍게도, 용매-세정제 혼합물로 처

리와 비교하여, 세정제-용매 혼합물로 처리 동안 단백질 집합체의 형성을 상당히, 예를 들면, 50% 이상 감소시킬 수 있으면서, 단백질이 용액 내에서 고정화되지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 절차 이후에 완충액, 예를 들면, 구배 용리로 서포트로부터 단백질이 용리되고, 따라서 형성되는 소량의 집합체가 후기 용리 분획에서 더욱 제거된다. 일부 바람직한 구체예에서, 상기 절차 이후에 저장 완충액으로 단백질이 용리된다. 더욱 바람직한 일부 구체예에서, 용리 완충액은 0.1% Tween 80의 농도를 포함한다. 이보다 더욱 바람직한 일부 구체예에서, 상기 방법은 저장 완충액으로 수지로부터 용리 이후에, 차후 농축 또는 완충액 교환 단계를 포함하지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 집합체는 놀랍게도, 50% 감소한다.

[0024] 또 다른 특히 바람직한 구체예에서, 단백질 샘플 내에 바이러스 오염물질을 비활성화시키는 방법이 제시되고, 상기 방법은 단백질을 크로마토그래피 수지 상에 고정화시키고; 그리고 고정화되는 단백질을 1% Triton X-100, 0.3% Tri-N-부틸 인산염, 그리고 0.3% 폴리소르베이트 80을 포함하는 용매-세정제 혼합물로 30분 내지 1시간 동안 처리하는 단계를 포함한다. 일부 이와 같은 구체예에서, 상기 방법은 7.0 이상의 pH를 갖고 10 mM 이하 칼슘 이온, 완충 화합물, 0.05% 비-이온성 세정제, 그리고 염을 포함하는 저장 완충액으로 단백질을 용리하는 단계를 더욱 포함한다.

[0025] 본 발명의 이들 목적 및 다른 목적은 하기에 더욱 상세하게 기술된다.

과제의 해결 수단

상세한 설명

[0027] 본 발명의 한 측면은 샘플로부터 트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질의 정제를 위한 방법에 관계하고, 상기 샘플은 비-ADAMTS13 불순물을 포함할 수도 있다. 단백질 샘플은 또한, 바이러스 오염물질을 포함할 수 있는데, 이들 오염물질은 하나 또는 그 이상의 바이러스 비활성화 단계에 의해 제거되고 및/또는 비활성화될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서, "트롬보스폰딘 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소", "ADAMTS13", "ADAMTS13 단백질", "ADAMTS13 폴리펩티드" 및 "재조합 ADAMTS13"은 호환되고 (달리 명시되지 않으면), 그리고 재조합 포유동물 ADAMTS13 단백질을 지칭하고, 이것은 또한, 전장 ADAMTS13 단백질의 생물학적 활성 유도체 또는 단편일 수 있다. 전장 인간과 뮤린 ADAMTS13 단백질의 아미노산 서열은 Q76LX8과 Q769J6의 개별 UniProtKB® 수탁 번호를 갖는다. 인간 ADAMTS13에 관한 구조 상세 및 서열 정보는 Zheng et al. ((2001) *J. Biol. Chem.* 276:41059-63)에서 찾아볼 수 있다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 "이의 생물학적 활성 유도체 또는 단편"은 ADAMTS13의 생물학적 기능과 유사하거나, 또는 실질적으로 유사한 생물학적 기능을 갖는 임의의 폴리펩티드를 의미한다. 이의 생물학적 활성 유도체 또는 단편의 폴리펩티드 서열은 부재, 존재, 및/또는 치환이 각각, ADAMTS13 단백질의 하나 또는 그 이상의 생물학적 활성에 대한 임의의 실질적인 부정적인 영향을 주지 않는 하나 또는 그 이상의 아미노산의 결실, 부가, 및/또는 치환을 포함할 수 있다. 가령, 대안적 절단접합 (alternative splicing)은 전장 단백질의 생물학적 활성 단편인 130kDa 종을 발생시킨다. 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성은 널리 공지된 방법, 예를 들면, 폰 빌레브란트 인자 (vWF)에 대한 ADAMTS13의 단백분해 활성, 및/또는 하류 효과에서 차후 감소 및/또는 지연을 조사하는 방법에 의해 측정될 수 있다. "하류 효과"는 이러한 효과가 ADAMTS13 기능의 직접적인 원인, 또는 이의 간접적인 원인, 예를 들면, ADAMTS13 활성 이후에 일련의 사건에 기인하는 효과인 지에 상관없이, 고유 기질(들)에 대한 ADAMTS13 단백질의 작용의 하나 또는 그 이상의 생물학적, 생화학적, 또는 생리학적 표명을 의미한다. 검사법에는 제한 없이, 내피에 혈소판 부착의 감소 및/또는 지연, 혈소판 집성의 감소 및/또는 지연, 혈소판 스트링 (platelet string)의 형성의 감소 및/또는 지연, 혈전 형성의 감소 및/또는 지연, 혈전 성장의 감소 및/또는 지연, 혈관 폐색 (vessel occlusion)의 감소 및/또는 지연, vWF (가령, FRETS-VWF73 (Peptides International, Louisville, KY))의 단백분해 절단 (proteolytical cleavage), 및/또는 혈전의 붕괴를 조사하는 방법이 포함된다 (참조: U.S. Patent No. 7,270,976, "Methods for measuring ADAMTS13 activity and protein on platelets and in plasma," 칼럼 6, 라인 55 내지 칼럼 10, 라인 34, 칼럼 12, 라인 1 내지 칼럼 18, 라인 25 및 7,468,258, "Self-quenching homofluorophore compositions for detecting enzyme activity" 칼럼 11, 라인 26 내지 칼럼 16, 라인 50; U.S. Patent Publication No. 20070015703, "ADAMTS13-containing compositions having thrombolytic activity" 단락 [0036], [0043]-[0045], [0053] 및 20070065895 "Substrates specific to von willebrand factor cleaving protease and method of assaying the activity"; 그리고 European Application No. 1990421A1, "Method for Detection of Condition in Consciousness Disorder Patient and

Kit for the Detection", 이들은 ADAMTS13 폴리펩티드 및 이들의 유도체 및/또는 단편에 대한 검사법과 관련하여 본 발명에 참조로서 편입된다).

[0030] 재조합 ADAMTS13, 예를 들면, 재조합 인간 ADAMTS13은 당분야에 공지된 임의의 방법에 의해 발현될 수 있다. 한 가지 특정한 실례는 WO 02/42441에서 개시되는데, 상기 문헌은 재조합 ADAMTS13 뉴클레오티드 서열을 제조하는 방법과 관련하여 본 발명에 참조로서 편입된다 (참조: 페이지 14, 라인 6 내지 페이지 18, 라인 4). 일부 구체 예에서, 재조합 ADAMTS13은 하기 공정에 따라 생산된다: (i) 예로써, 유전자 조작, 예를 들면, RNA의 역전사 및/또는 DNA의 증폭으로 재조합 ADAMTS13 뉴클레오티드 서열을 제조하고; (ii) 예로써, 형질감염, 예를 들면, 전기천공 또는 미세주입에 의해 진핵 세포 내로 재조합 ADAMTS13 뉴클레오티드 서열을 도입하고; (iii) 형질전환된 세포를 예로써, 연속 방식 또는 배치(batch-wise) 방식으로 배양하고; (iv) 예로써, 구성적으로 또는 도입 이후에 재조합 ADAMTS13의 발현을 가능하게 하고; 그리고 (v) 예로써, 배양 배지로부터 또는 형질전환된 세포를 수확함으로써 발현된 재조합 ADAMTS13을 포함하는 샘플을 분리하고; 그리고 (vi) 본 명세서에 개시되는 방법에 따라, 샘플로부터 ADAMTS13 단백질을 정제한다.

[0031] 재조합 ADAMTS13은 적절한 숙주 시스템, 바람직하게는 진핵 숙주 시스템, 그리고 더욱 바람직하게는 약리학적으로 효과적인 ADAMTS13 분자를 생산할 수 있는 것으로 특징되는 시스템에서 발현에 의해 생산될 수 있다. 진핵 세포의 실례에는 제한 없이, 포유동물 세포, 예를 들면, CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, 그리고 HepG2가 포함된다. 바람직한 구체예에서, CHO 세포가 이용되고, 그리고 이들 세포는 재조합 ADAMTS13 단백질을 배양 배지 내로 분비한다.

[0032] ADAMTS13을 재조합 방식으로 발현하는데 이용되는 시약 또는 조건에는 특정한 제약이 없고, 그리고 당분야에 공지되었거나 상업적으로 가용한 임의의 시스템이 이용될 수 있다.

[0033] 본 명세서에서, "샘플"은 ADAMTS13 단백질 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 임의의 조성물을 지칭한다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 본 명세서에서 샘플은 앞서 기술된 바와 같은 재조합 ADAMTS13 생산의 결과일 수 있다. 따라서 샘플은 재조합 ADAMTS13을 발현하는 형질전환된 세포의 배양으로부터 수집된 상층액; 배양 배지로부터 재조합 ADAMTS13 단백질을 정제하는 공정의 하나 또는 그 이상의 단계에서 ADAMTS13을 포함하는 완충액; 및/또는 세포 배양으로부터 수확된 형질전환된 세포를 포함할 수 있다. 대안으로, 샘플은 혈액, 혈장, 또는 혈액 또는 혈장의 분획일 수 있다.

[0034] 일부 구체예에서, ADAMTS13은 100 ℓ 세포 배양 상층액을 포함하는 샘플로부터 정제된다. 하지만, 당업자가 인지하는 바와 같이, 본 발명의 방법은 적절하게는 예로써, 대규모 생산을 위하여 증률 증가될 수 있다. 따라서 일부 구체예에서, 상기 방법은 상업적 생산 규모에서, 예를 들면, 적어도 대략 250 ℓ 샘플, 적어도 대략 500 ℓ 샘플, 또는 적어도 대략 1,000 ℓ 샘플로부터 ADAMTS13 단백질을 정제하는 단계를 포함한다.

[0035] 본 명세서에서, "비-ADAMTS13 불순물"은 일반적으로, 공정-관련된 불순물을 지칭한다. 불순물에는 예로써, 숙주 세포 불순물 (가령, 숙주 세포 항원으로 지칭되는 오염 숙주 세포 단백질) 및 기타 생체분자 불순물, 예를 들면, DNA, RNA, 그리고 세포 잔해; 배지 성분(들); 용매; 세정제 등이 포함될 수 있다. 부가적으로, 비-ADAMTS13 불순물에는 또한, 산물-관련된 불순물, 예를 들면, 생물학적 활성이 없는 ADAMTS13 단백질의 유도체 또는 단편, 또는 ADAMTS13 단백질의 집합체가 포함된다. 혈액 또는 혈장의 경우에, 비-ADAMTS13 불순물에는 혈액 또는 혈장 내에서 정상적으로 관찰되는 다른 단백질, 예를 들면, 알부민, 면역글로불린 등이 포함될 수 있다. 본 명세서에서, "집합체"는 하나 이상의 ADAMTS13 폴리펩티드 분자, 또는 고분자량 구조 또는 소중합체 구조, 예를 들면, 거대분자의 이합체 (dimer), 삼합체 (trimer), 그리고 기타 다합체 (multimer)에 상응하는 임의의 다른 단백질 분자 중에서 하나 이상을 포함하는 구조를 지칭한다. "비-ADAMTS13 불순물"에는 또한, 바이러스 오염물질이 포함될 수 있다. "바이러스 오염물질"은 예로써, 바이러스 입자, 바이러스 단백질, 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 또는 이들의 단편을 비롯하여, 바이러스로부터 발생되고 및/또는 유래되는 임의의 불순물을 지칭한다.

[0036] 용어 "정제하는", "정제된", "정제한다" 등은 비-ADAMTS13 불순물로부터 ADAMTS13을 이전하거나, 분리하거나, 또는 분류하는 것을 지칭한다. 가령, 식물, 세균, 효모, 또는 포유동물 숙주 세포에서 발현된 재조합 ADAMTS13 단백질은 예로써, 숙주 세포 단백질을 포함하는 비-ADAMTS13 불순물의 제거에 의해 정제될 수 있다. 순도 퍼센트는 ADAMTS13 단백질 대(對) 숙주 세포 단백질 (가령, CHO 단백질)의 퍼센트를 지칭한다. "실질적으로 정제된" 재조합 ADAMTS13은 비-ADAMTS13 불순물이 적어도 대략 60%, 바람직하게는 적어도 대략 75%, 그리고 더욱 바람직하게는 적어도 대략 90% (또는 대략 95%, 대략 99%, 또는 대략 99.9%) 없다. 특히, "실질적으로 정제된" 재조합 ADAMTS13은 숙주 세포 단백질이 적어도 대략 60%, 바람직하게는 적어도 대략 75%, 그리고 더욱 바람직하게는 적

어도 대략 90% (또는 대략 95%, 대략 99%, 또는 대략 99.9%) 없다. 숙주 세포 단백질은 예로써, 하기에 더욱 상세하게 논의된 바와 같이 다중클론 항혈청을 이용한 면역화학 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0037] 오염물질의 제거는 또한, ADAMTS13 단백질의 농화 (enrichment)를 유발할 수 있다. 본 명세서에서, "농화", "농화하는" 및 "농화한다"는 샘플 내에 재조합 ADAMTS13의 퍼센트에서 증가를 지칭한다. 따라서 ADAMTS13 단백질의 농화는 ADAMTS13의 퍼센트가 샘플의 일정한 조작 이후에, 예를 들면, 샘플을 하나 또는 그 이상의 크로마토그래피 단계에 종속시킨 이후에 샘플에서 증가될 때 발생한다. 한 구체예에서, ADAMTS13은 비-ADAMTS13 불순물, 특히 숙주 세포 단백질이 적어도 대략 10-배 감소 내지 대략 115-배 감소할 때 충분히 농화된다. 한 구체예에서, ADAMTS13은 비-ADAMTS13 불순물이 적어도 대략 20-배 (가령, 대략 30-배, 대략 40-배, 대략 50-배, 대략 60-배, 대략 70-배, 대략 80-배, 대략 90-배, 대략 100-배 등) 감소하고, 그리고 특히, 이러한 감소가 숙주 세포 단백질에 대하여 발생할 때 충분히 농화된다.

[0038] 당업자는 비-ADAMTS13 불순물, 특히 숙주 세포 단백질의 배수적 감소 (fold reduction)를 결정하기 위하여 당분야에서 가용한 방법을 이용할 수 있을 것이다. 가령, 비-ADAMTS13 불순물에 대한 검사법이 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 샘플은 재조합 ADAMTS13을 발현하는 형질전환된 세포의 배양으로부터 수집된 조건화된 상층액이고, 그리고 비-ADAMTS13 불순물의 배수적 감소를 결정하는 검사법은 숙주 세포 단백질의 수준을 측정하는 것이다. 특정 구체예에서, 형질전환된 세포는 형질전환된 CHO 세포이고, 그리고 검사법은 CHO 단백질을 측정하는 효소-결합-면역흡착 혈청학적 검사 (enzyme-linked-immunosorbent serologic assay)이다. 비-ADAMTS13 불순물의 배수적 감소는 예로써, 용리된 비-ADAMTS13 불순물의 양에 비하여 샘플 내에 비-ADAMTS13 불순물의 양으로서, 용출액 내에 불순물 수준 (가령, ppm)으로 나눗셈된 하중 (load) 내에 불순물 수준 (가령, ppm)으로서 계산될 수 있다.

[0039] 숙주 세포 단백질은 예로써, ADAMTS13을 제조하는데 이용되는 숙주 세포 및/또는 재조합 벡터 시스템의 단백질 성분에 대한 다중클론 항혈청을 이용한 면역화학 방법에 의해 검출될 수 있다. 일반적으로, 항혈청은 숙주 세포로부터 유래된 항원에 대하여 발생되고, 여기서 숙주 세포는 제조 공정에 이용되지만 ADAMTS13을 코딩하는 유전자가 없는 발현 벡터를 포함한다. 숙주 세포 불순물은 본 명세서에서 기술되는 방법과 동일한 및/또는 실질적으로 유사한 방법(들)을 이용하여 추출될 수 있다. 본 명세서에서 기술되는 방법과 동일한 및/또는 실질적으로 유사한 방법(들)을 이용하여 획득되는 정제된 (또는 부분적으로 정제된) 숙주 세포 항원은 이후, ADAMTS13을 제조하는데 이용되는 숙주 세포와 재조합 벡터 시스템의 단백질 성분에 대한 항혈청의 제조에 이용될 수 있다. 숙주 세포 단백질은 면역검사, 예를 들면, ELISA에서 항혈청을 이용하여, 또는 웨스턴 블로트 분석 (western blot analysis)에 의해 검출될 수 있다. 숙주 세포 단백질 불순물은 또한, 존재하는 단백질을 검출하는 2D 겔 전기영동과 은 염색 및/또는 콜로이드성 금 염색에 의해 분석되는 샘플을 분류함으로써 검출될 수 있다. HPLC 역시 숙주 세포 불순물의 수준을 정량하는데 이용될 수 있다; 하지만, HPLC 방법은 면역검사 또는 은 염색 방법만큼 민감하지 않다. 바람직하게는, 숙주 세포 불순물은 예로써, 이를 분석 방법 중에서 한 가지 또는 그 이상을 이용하여 검출가능 수준 이하로 감소된다.

[0040] 본 명세서에서, 용어 "대략"은 특정된 값으로부터 플러스 또는 마이너스 10%의 근사 범위를 의미한다.

ADAMTS13의 농화

[0042] 일반적으로, 본 발명에서는 ADAMTS13 단백질 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플로부터 재조합 ADAMTS13 단백질 (바람직하게는 인간 ADAMTS13 단백질)을 정제하는 방법을 제시하고, 여기서 상기 방법은 샘플 내에 ADAMTS13의 양을 농화하기 위하여 샘플을 (i) 수산화인회석 또는 (ii) 동시에, 수산화인회석 및 혼합 양식 양이 온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 명세서에서, "크로마토그래피적으로 접촉시키는"은 본 명세서에서 기술되고 및/또는 당분야에 공지된 임의의 양식의 크로마토그래피를 이용하여, 분류되는 샘플 또는 기타 혼합물을 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 것을 지칭한다. 양식에는 제한 없이, 배치-양식 (batch-mode)과 칼럼 크로마토그래피가 포함된다. 접촉은 수지 상에서, 수지에서 또는 수지 내에서 샘플을 노출시키고 및/또는 항온처리함으로써, 수지를 통해 샘플을 여과함으로써, 또는 임의의 다른 수단에 의해 달성된다. 크로마토그래피에 이용되는 완충액은 종종, 인산염 완충액이다.

[0043] 일부 구체예에서, 샘플은 ADAMTS13 단백질이 수산화인회석으로부터 용출액 내에 나타날 수 있도록 하는 조건 하에, 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉된다. "조건 하에"는 예로써, 칼럼 높이, 패킹 (packing), 완충액 (pH, 염 농도, 이온 강도 등), 온도, 압력 등을 비롯하여, 크로마토그래피가 수행되는 하나 또는 그 이상의 파라미터 또는 변수를 지칭한다. 다시 말하면, 샘플은 샘플 내에 ADAMTS13 단백질, 바람직하게는 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 수산화인회석에 결합하지 않도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종

속된다. 칼럼 크로마토그래피가 이용되면, ADAMTS13 단백질, 바람직하게는 이의 실질적인 부분은 칼럼을 관류 (flow-through)하고, 따라서 ADAMTS13은 칼럼을 벗어나는 완충액에서 관류 (flow-through) 분획 또는 용출액으로서 농화되는 반면, 비-ADAMTS13 불순물은 존속된다. 배치 (batch) 크로마토그래피가 이용되면, 상층액 또는 상층액 분획은 ADAMTS13 단백질, 또는 이의 실질적인 부분을 포함할 것이다. "용출액"은 본 명세서에서 "관류", "관류 분획", "상층액", 또는 "상층액 분획"과 동의어로서 이용된다. 용출액 (또는 상층액)은 수집될 수 있다. 이런 수집은 예로써, 샘플이 수지에 노출되고 항온처리가 완결된 이후에, 크로마토그래피 수지의 원심분리, 침강, 여과 등에 의해 수행된다. 용출액 (또는 상층액)으로부터 수집된 수산화인회석은 본 발명에 따른 하나 또는 그 이상의 단계에 더욱 종속될 수 있다.

[0044] 일부 구체예에서, 예로써, 상기 방법은 수산화인회석으로부터 용출액을 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 수지, 예를 들면, 양이온 교환/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키는 단계를 더욱 포함한다. 다시 말하면, ADAMTS13 단백질 샘플은 먼저, 바람직하게는 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 수산화인회석에 결합하지 않도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로, 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피에 종속될 수 있다. 수산화인회석 크로마토그래피 단계, 그리고 양이온 교환/소수성 상호작용 수지를 이용한 혼합 양식 크로마토그래피의 선택적 텐덤 단계에 관한 추가 상세는 하기에 제공된다.

[0045] (a) 수산화인회석 크로마토그래피

[0046] 수산화인회석 크로마토그래피 단계는 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 당분야에 공지된 바와 같이, 또는 특히, 본 발명의 내용에 비추어 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 수산화인회석으로 임의의 크로마토그래피 방법을 수반한다. 수산화인회석으로 크로마토그래피 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 수산화인회석은 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 화학식을 갖고, 그리고 다른 생물학적 구조뿐만 아니라 뼈와 치아 무기질의 주요 성분이다. 수산화인회석은 이런 자연 공급원으로부터 획득되거나, 또는 널리 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다. 수산화인회석은 특히, 단백질의 크로마토그래피 분류를 위한 크로마토그래피 매체 또는 서포트로서 폭넓게 이용된다, 입자 크기는 일반적으로, 중요하지 않고 폭넓게 변할 수 있다. 전형적인 입자 크기는 대략 $1 \mu\text{m}$ 내지 대략 $1,000 \mu\text{m}$ 직경, 바람직하게는 대략 $10 \mu\text{m}$ 내지 대략 $100 \mu\text{m}$ 직경의 범위에서 변한다. 다공성 (porosity) 역시 폭넓게 변할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 평균 구멍 직경은 대략 100 \AA 내지 대략 $10,000 \text{ \AA}$, 더욱 바람직하게는 대략 500 \AA 내지 대략 $3,000 \text{ \AA}$, 이보다 더욱 바람직하게는 500 \AA 내지 $3,000 \text{ \AA}$ 범위에서 변한다.

[0047] 다양한 수산화인회석 크로마토그래피 매체는 상업적으로 구입가능하고, 그리고 임의의 가용한 형태의 물질은 본 명세서에 개시되는 방법의 실시에 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 상업적으로 구입가능한 세라믹 수산화인회석 물질의 무제한적 실례에는 MACRO-PREPTM, 수산화인회석 타입 I과 II (Biorad, Hercules, CA), 그리고 HA ULTROGEL[®] (PALL, Ann Arbor, MI)이 포함된다. 한 구체예에서, 샘플은 수산화인회석 타입 II (Biorad, Hercules, CA)로 크로마토그래피에 종속된다.

[0048] 놀랍게도, 샘플을 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉시킨 이후에, 샘플 내에 비-ADAMTS13 불순물 중에서 상당한 또는 실질적인 부분이 수산화인회석에 결합하는 반면, ADAMTS13 단백질의 상당한 또는 실질적인 부분은 용해 상태로 남아있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 앞서 논의된 바와 같이, 수산화인회석으로 샘플의 처리는 널리 공지된 방법에 따라 배치-양식 또는 칼럼 크로마토그래피 양식으로 수행될 수 있고, 그리고 충분히 농화된 ADAMTS13 단백질은 각각, 상층액 또는 용출액에서 수집된다.

[0049] 본 명세서에서, "실질적인 부분"은 수산화인회석 크로마토그래피 단계 이전과 비교하여, 샘플로부터 재조합 ADAMTS13 단백질의 대략 30% 내지 대략 100% (가령, 대략 40% 내지 대략 90%, 예를 들면, 대략 50% 내지 대략 80%, 예를 들면, 대략 60% 내지 대략 70%)의 상층액 또는 용출액에서 회수 수율을 지칭한다. 가령, 대략 50% 내지 대략 100%의 상층액 또는 용출액에서 회수 수율은 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 관류될 수 있도록 하는 조건 하에, 샘플이 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종속되었다는 것을 지시한다.

[0050] 바람직한 구체예에서, 수산화인회석 크로마토그래피에 종속되는 샘플은 낮은 전도도, 예를 들면, 실온에서 대략 3 mS/cm 내지 대략 15 mS/cm , 바람직하게는 실온에서 대략 10 mS/cm 이하의 전도도를 갖는다. 한 구체예에서, 샘플은 실온에서 6 mS/cm 의 전도도를 갖는다. 다른 구체예에서, 샘플은 실온에서 7 mS/cm 의 전도도를 갖는다. 당업자는 인지하는 바와 같이, 샘플의 전도도는 중성 염 (neutral salt), 예를 들면, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 인산나트륨, 인산칼륨 등을 포함하는 염 용액으로 조정될 수 있고, 그리고 대략 20 mM 인산염 완충액으로 적절하게 완충될 수 있다. 샘플은 바람직하게는, 대략 6.5 내지 대략 9.0의 pH를 갖고, 그리고 바람직하게

는, 7 내지 8의 pH를 갖는다. 샘플은 비-ADAMTS13 불순물의 충분한 결합을 가능하게 하는 임의의 기간 동안, 예를 들면, 대략 5분 내지 대략 24시간 동안 수산화인회석과 접촉 상태로 남아있을 수 있다. 농화된 ADAMTS13은 차후 세척, 특히 첫 번째 세척으로부터 용출액을 포함할 수 있는 상층액 분획 또는 관류 분획에서 수집될 수 있다.

[0051] 한 구체예에서, ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 상층액 또는 용출액 내에 남아있을 수 있도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로 크로마토그래피에 샘플을 종속시키는 것은 수산화인회석으로 크로마토그래피 이전의 샘플과 비교하여, 농화된 ADAMTS13, 예를 들면, 비-ADAMTS13 불순물, 특히 숙주 세포 단백질의 대략 10-배 감소 내지 대략 115-배 감소를 유발한다. 한 구체예에서, 수산화인회석으로 크로마토그래피는 샘플 내에 숙주 세포 단백질을 적어도 대략 20-배 (가령, 대략 30-배, 대략 40-배, 대략 50-배, 대략 60-배, 대략 70-배, 대략 80-배, 대략 90-배, 예를 들면, 대략 100-배 등) 감소시킨다.

[0052] 바람직한 구체예에서, ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 상층액 또는 용출액 내에 남아있을 수 있도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로 크로마토그래피에 샘플을 종속시키는 것은 비-ADAMTS13 불순물, 특히 숙주 세포 단백질의 대략 90% 내지 대략 99% 제거를 유발한다. 한 구체예에서, 수산화인회석으로 크로마토그래피에 샘플을 종속시키는 것은 비-ADAMTS13 불순물, 특히 숙주 세포 단백질의 적어도 대략 90% (가령, 대략 91%, 대략 92%, 대략 93%, 대략 94%, 대략 95%, 대략 96%, 대략 97%, 대략 98%, 대략 99%, 대략 99.5% 등) 제거를 유발한다. 따라서 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 상층액 또는 용출액 내에 남아있을 수 있도록 하는 조건 하에 수산화인회석으로 크로마토그래피에 샘플을 종속시킴으로써 ADAMTS13 단백질을 농화하는 단계를 포함하는 본 명세서에 개시되는 방법은 또한, 실질적으로 정제되는 ADAMTS13 단백질을 포함하는 완충액을 제공할 수 있다.

[0053] ADAMTS13의 실질적인 부분이 수산화인회석 크로마토그래피 칼럼을 관류할 수 있도록 하는 예시적인 칼럼 조건은 하기 실시예에서 제공된다. 일반적으로, ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 수산화인회석으로 크로마토그래피 동안 관류할 수 있도록 하기 위하여, 크로마토그래피 칼럼은 바람직하게는, 대략 5 cm 내지 대략 30 cm, 예를 들면, 20 cm 내지 30 cm의 층 높이 (bed height)를 가질 것이다. 부가적으로, 수산화인회석으로 크로마토그래피에 샘플을 종속시키기 이전에, 예를 들면, 수산화인회석 칼럼 상에 샘플을 적하시키기 이전에, 칼럼은 먼저, 널리 공지된 세척, 활성화 및/또는 평형 완충액, 특히 수산화인회석의 제조업체에 의해 제안된 것들로 각각 세척되고, 활성화되고 및/또는 평형화될 수 있다. 한 구체예에서, 칼럼은 동일한 완충액, 예를 들면, 20 mM Na/K PO₄를 포함하고, 7.0의 pH를 갖고, 그리고 실온에서 5.5. mS/cm의 전도도를 갖는 완충액으로 활성화되고 평형화된다.

[0054] (b) 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 크로마토그래피

[0055] 한 구체예에서, ADAMTS13 단백질은 수산화인회석, 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피에 의해 농화된다. 놀랍게도 ADAMTS13은 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 결합하는 반면, 비-ADAMTS13 불순물은 용해 상태에서 남아있거나, 또는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 훨씬 강하게 결합하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 수산화인회석으로 샘플의 처리, 그 이후에 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 처리는 널리 공지된 방법에 따라 연속 배치-양식 또는 연속 칼럼 크로마토그래피 양식으로 수행되고, 그리고 충분히 농화된 ADAMTS13 단백질은 샘플을 텐덤 배치-양식 크로마토그래피 또는 텐덤 칼럼 크로마토그래피에 각각 종속시킨 이후에, 최종 상층액 분획 또는 최종 용출액 풀에서 수집될 수 있다. 따라서 본 명세서에서 기술되는 바와 같이, ADAMTS13 단백질은 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 상층액 내에 남아있거나, 또는 수산화인회석을 포함하는 칼럼을 용출액으로서 관류할 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종속시킴으로써 농화된다. 수산화인회석으로 처리후, 농화된 ADAMTS13을 포함하는 수집된 상층액 또는 용출액은 선택적으로, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 배치-양식 또는 칼럼 크로마토그래피에 종속된다. 한 구체예에서, 수산화인회석 단계로부터 상층액 또는 용출액은 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지를 포함하는 크로마토그래피 칼럼 내로 공급된다. 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 배치-양식 또는 칼럼 크로마토그래피는 본 명세서에서 기술된, 당분야에 공지된, 또는 특히, 본 발명의 내용에 비추어 당업자에 의해 인식될 수 있는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 수산화인회석으로 크로마토그래피 이후에 이용하기 적합한 바람직한 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지는 친수성 링커를 포함하는 세파로즈-기초된 매트릭스 (sepharose-based matrix)이다. 친수성 링커는 예로써, 티오-에테르 기를 거쳐 기능성 리간드를 포함할 수 있다. 친수성 리간드는 음으로 하전되고 소수성 기, 예를 들면, 탄화수소를 더욱 포함할 수 있다. 소수성 기를 더욱 포함하는 친수성 리간드는 본 명세서에서 기술되는 바와 같이, 혼합 양식 크로마토그래피를 수행하는데 적합한 혼합 양식

리간드, 다시 말하면, 다중양식 기능성 (multimodal functionality)을 갖는 리간드를 발생시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지는 대략 $0.07 \text{ mM}/\text{m}\ell$ 내지 대략 $0.09 \text{ mM}/\text{m}\ell$ 의 이온 능력 (ionic capacity) 및 대략 2 내지 대략 14의 pH 안정성을 가질 수 있다. 일반적으로, ADAMTS13은 이온, 수소, 및/또는 소수성 결합을 통해 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 결합할 것이다.

[0056] 본 명세서에서 기술되는 방법에 따라 이용될 수 있는 상업적으로 구입가능한 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지의 실례에는 제한 없이, CAPTOTM MMC 매체 (GE Healthcare) 및 SampliQ SAX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)가 포함된다. 바람직한 구체예에서, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지는 CAPTOTM MMC이다. CAPTOTM MMC는 대략 $75 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 크기를 갖는 딱딱하고, 고도로 교차-연결된 구슬모양 아가로즈에 기초된 다중양식 약한 양이온 교환체이다. 이것은 높은 염 농도에서 단백질에 결합하는 다중양식 기능성을 갖는 리간드를 포함한다. 이것은 대략 1 m 직경 칼럼에 대한 대략 $600 \text{ cm}/\text{h}$ 의 전형적인 유속 (flow velocity) 및 대략 20°C 에서 대략 10 cm 내지 대략 20 cm 층 높이를 갖고, 대략 3 bar (대략 0.3 MPa) 이하에서 물과 대략 동일한 점성을 갖는 공정 완충액을 이용한다.

[0057] 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 크로마토그래피 동안, ADAMTS13은 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 결합하고 비-ADAMTS13 불순물 (가령, 샘플 전-농화에서 존재하는 숙주 세포 단백질)로부터 더욱 분리된다. 혼합 양식 크로마토그래피 단계가 칼럼 상에서 수행되는 경우에, 양이온 교환/소수성 상호작용 수지는 ADAMTS13 단백질을 흡수하는 반면, 오염 비-ADAMTS13 불순물은 공정 흐름으로부터 제거되고, 그리고 크로마토그래피 칼럼을 관류함으로써 샘플 내에 ADAMTS13 단백질로부터 분류된다.

[0058] ADAMTS13이 흡수되는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지는 이후, 예로써 느슨하게 결합된 오염물질 또는 불순물을 제거하고 및/또는 수지로부터 ADAMTS13의 용리를 위한 준비에서 완충액 전도도를 조정하기 위하여 세척된다. 다시 말하면, 샘플이 수산화인회석과 크로마토그래피적으로 접촉되고, 그리고 ADAMTS13을 포함하는 수집된 상층액 또는 용출액이 혼합 양식 양이온/소수성 상호작용 수지와 크로마토그래피적으로 접촉되고 여기에 흡수된 이후에, 혼합 양식 양이온/소수성 상호작용 수지는 세척 완충액으로 세척된다. 일반적으로, 세척 완충액은 완충 이온 인산염 및 중성 염을 포함하고, 그리고 완충액의 관련 파라미터가 예로써, 완충액의 증가하는 염 농도 및/또는 pH에서 증가함에 따라서 혼합 양식 양이온/소수성 상호작용 수지에 대한 ADAMTS13의 결합이 약화되도록 높은 pH를 가질 것이다. 한 구체예에서, ADAMTS13-결합된 혼합 양식 양이온/소수성 상호작용 수지는 먼저, 평형 완충액, 예를 들면, 대략 20 mM 인산염 및 대략 25 mM NaCl을 포함하고 실온에서 대략 7.0의 pH를 갖는 평형 완충액으로 세척된다. 차후 세척은 예를 들면, 대략 20 mM 인산염 및 대략 80 mM NaCl을 포함하고 실온에서 대략 8.0의 pH를 갖는 세척 완충액으로 수행될 수 있다. ADAMTS13-결합된 혼합 양식 양이온/소수성 상호작용 수지는 예로써, 50 mM Na/K PO₄ 및 160 mM NaCl을 포함하고, 그리고 실온에서 8.0의 pH 및 16.5 mS/cm의 전도도를 갖는 완충액으로 최종 세척에 종속될 수 있다.

[0059] 수산화인회석 크로마토그래피, 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 혼합 양식 크로마토그래피, 그리고 선택적 세척 이후에, 재조합 ADAMTS13 단백질은 용리 완충액으로 혼합 양식 크로마토그래피 수지로부터 용리된다. 일반적으로, 용리 완충액은 대략 5 mM 내지 대략 100 mM 완충 이온, 예를 들면, 20 mM 내지 50 mM 완충 이온을 포함할 것이다. 예시적인 완충액에는 인산염, tris, HEPES, 이미다졸, 히스티딘, MES, 구연산염, Gly-Gly, tris/아세트산염 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 또한, 용리 완충액은 일반적으로, 바람직하게는 높은 농도에서 염 형태 (가령, Cl, PO₄, SO₄, 또는 OAc 음이온 등과의)로 일가 또는 이가 양이온, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘 이온을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 용리 완충액은 높은 농도에서 나트륨 이온, 예를 들면, 대략 700 mM 이상의 Na⁺를 포함한다. 용리 완충액은 대략 7 내지 대략 11 범위의 pH를 가질 수 있다. 한 구체예에서, 용리 완충액은 50 mM Na/K PO₄ 및 1,000 mM NaCl을 포함하고, 그리고 실온에서 8.0의 pH 및 93 mS/cm의 전도도를 갖는다.

[0060] 수산화인회석 칼럼으로부터 획득된 농화된 ADAMTS13이 칼럼 내에 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 결합하고 비-ADAMTS13 불순물로부터 분리될 수 있도록 하는 예시적인 조건은 하기 실시예에서 제공된다. 일반적으로, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 크로마토그래피 칼럼의 층 높이는 샘플 부피에 따라 대략 1 cm 내지 대략 100 cm, 또는 이보다 더욱 높을 수 있다. 게다가, 수산화인회석 크로마토그래피 칼럼 부피 대(對) 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼의 칼럼 부피의 비율은 예로써, ADAMTS13의 양과 비교하여 샘플 내에 비-ADAMTS13 불순물의 양에 따라 대략 10:1일 수 있다.

[0061] 부가적으로, 당업자가 인지하는 바와 같이, 수산화인회석 및 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피를 포함하는 구체예의 경우에, 세척, 활성화, 및/또는 평형화에 이용되는 수지와 완충액은 일정한 구체예에서, 양쪽 칼럼 모두에 적합하도록 선택될 것이다. 한 구체예에서, 이들 칼럼은 별개로 활성화된다. 다른 구체예에서, 이들 칼럼은 평형화되고, 적하되고, 그리고 한 번에 동시에 세척되고, 그 이후에 하나 또는 그 이상의 두 번째 또는 차후 세척(들) 및 용리(들)가 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에만 적용된다. 한 구체예에서, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼을 활성화시키고 평형화시키는 완충액은 수산화인회석 칼럼을 활성화시키고 평형화시키는데 이용되는 것들과 동일하다. 한 구체예에서, 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼을 활성화시키고 평형화시키는 완충액은 20 mM Na/K PO₄를 포함하고 실온에서 7.0의 pH 및 5.5. mS/cm의 전도도를 갖는 완충액이다.

[0062] 바람직한 구체예에서, 샘플은 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 수산화인회석 수지를 판류할 수 있도록 하는 조건 하에 수산화인회석 및 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피에 종속되고, 그 이후에 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지에 결합되고 이로부터 유리된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 이러한 텐덤 크로마토그래피는 충분히 농화된 ADAMTS13을 유발한다. 일부 구체예에서, 샘플, 예를 들면, 전-농화될 수 있는 재조합 ADAMTS13을 발현하는 형질전환된 숙주 세포의 배양으로부터 수집된 조건화된 상충액을 본 명세서에서 기술되는 텐덤 크로마토그래피에 종속시키는 것은 대략 40% 내지 대략 80% ADAMTS13 (가령, 대략 45% 내지 대략 75%, 예를 들면, 대략 50% 내지 대략 70%, 예를 들면, 대략 55% 내지 대략 65%) 및/또는 대략 40% 내지 대략 90% 활성 (가령, 대략 45% 내지 대략 85%, 예를 들면, 대략 50% 내지 대략 80%, 예를 들면, 대략 55% 내지 대략 75%)을 산출한다.

[0063] 일부 구체예에서, 텐덤 크로마토그래피는 대략 90% 내지 대략 99% 숙주 세포 불순물을 제거한다. 한 구체예에서, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 텐덤 크로마토그래피는 샘플을 텐덤 크로마토그래피에 종속시키기 이전의 ADAMTS13의 순도와 비교하여, ADAMTS13의 순도를 적어도 대략 600-배, 예를 들면, 적어도 대략 650-배, 예를 들면, 적어도 대략 700-배, 예를 들면, 적어도 대략 800-배, 예를 들면, 적어도 대략 900-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,000-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,100-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,200-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,300-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,400-배, 또는 적어도 대략 1,500-배 증가시킨다.

[0064] 일부 구체예에서, 샘플, 예를 들면, 바람직하게는 UF/DF 및/또는 음이온 교환에 의해 전-농화될 수 있는 재조합 ADAMTS13을 발현하는 형질전환된 숙주 세포의 배양으로부터 수집된 조건화된 상충액을 본 명세서에서 기술되는 텐덤 크로마토그래피에 종속시키는 것은 대략 600 내지 대략 1,500 ppm 비-ADAMTS13 불순물 (가령, 숙주 세포 항원)을 갖는 샘플을 유발한다. 가령, 텐덤 크로마토그래피는 대략 750 내지 대략 1250 ppm 비-ADAMTS13 불순물을 갖는 샘플, 바람직하게는 대략 1,000 ppm 이하 비-ADAMTS13 불순물을 갖는 샘플을 유발할 수 있다.

[0065] 일부 구체예에서, 텐덤 크로마토그래피는 텐덤 크로마토그래피 이전의 샘플과 비교하여, 비-ADAMTS13 불순물 (특히, 숙주 세포 항원)의 대략 1,000-배 감소 내지 대략 3,000-배 감소를 유발한다. 일부 구체예에서, 전-농화될 수 있는 재조합 ADAMTS13을 발현하는 형질전환된 숙주 세포의 배양으로부터 수집된 조건화된 상충액을 본 명세서에서 기술되는 텐덤 크로마토그래피에 종속시키는 것은 비-ADAMTS13 불순물 (가령, 숙주 세포 항원)을 적어도 대략 1,000-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,300-배, 예를 들면, 적어도 대략 1,500-배, 예를 들면, 적어도 대략 2,000-배, 예를 들면, 적어도 대략 2,500-배, 예를 들면, 적어도 대략 3,000-배 감소시킨다.

[0066] 따라서 바람직한 구체예에서, 재조합 ADAMTS13을 포함하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로부터 용리 완충액은 실질적으로 정제되는 ADAMTS13 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0067] 샘플의 전-농화 준비

[0068] 일부 구체예에서, 본 명세서에 개시되는 방법은 수산화인회석으로 크로마토그래피 또는 수산화인회석 및 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피에 의한 농화를 위하여 ADAMTS13을 포함하는 샘플을 준비하는 단계를 더욱 포함한다. 이러한 선택적 전-농화 단계에서, 샘플 내에 ADAMTS13은 (a) 한외여과/정용여과 (UF/DF)에 의해 농축되고; 및/또는 (b) ADAMTS13이 결합하고 차후에 용리되는 이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉될 수 있다.

[0069] (a) 전-농화 한외여과/정용여과 (UF/DF)

[0070] 선택적 전-농화 단계에서, 샘플 내에 ADAMTS13은 전-농화 한외여과에 의해 농축되고, 그리고 샘플의 완충액은 정용여과에 의해 교환된다. 전-농화 한외여과/정용여과 단계는 전형적으로, 앞서 기술된 바와 같은 수산화인회석으로 크로마토그래피 또는 수산화인회석, 그 이후 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로

마토그래피에 의한 ADAMTS13의 농화 이전에 수행된다. 전-농화 한외여과/정용여과 단계는 전형적으로, 임의의 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피 (수행되면) 이전에 수행된다. 이러한 전-농화 한외여과/정용여과 (UF/DF) 단계는 작은-분자량 성분, 예를 들면, 세포 배양 배지의 작은-분자량 성분을 제거하는데 효과적일 수 있다. 이런 성분은 차후 크로마토그래피 칼럼에 결합하고 ADAMTS13에 대한 칼럼의 수용력을 감소시킬 수 있다. 따라서 전-농화 UF/DF는 후기 크로마토그래피 단계를 위한 적하를 최적화시킬 수 있다. 한 구체예에서, 대략 30 kDa 이하의 작은-분자량 성분, 또는 이들의 적어도 실질적인 부분이 제거된다. 일부 구체예에서, 제거되는 (또는 실질적으로 제거되는) 작은-분자 성분은 대략 60 kDa 이하, 대략 55 kDa 이하, 대략 50 kDa 이하, 대략 45 kDa 이하, 대략 40 kDa 이하, 대략 35 kDa 이하, 대략 30 kDa 이하, 대략 25 kDa 이하, 대략 20 kDa 이하 등의 성분이다.

[0071] 전-농화 한외여과/정용여과 단계는 또한, 일정한 구체예에서 차후 가공을 위하여 및/또는 샘플을 더욱 농축하기 위하여 ADAMTS13을 적절한 완충액 용액으로 교환하는데 이용된다. 한 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 음이온 교환 크로마토그래피가 수행되면, 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피에 적합한 낮은 전도도 완충액이다. 가령, 농화 완충액은 20 mM Na/K PO₄를 포함하고 실온에서 대략 7의 pH를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 또한, 칼슘 및/또는 아연 이온을 포함하고, 이들 중에서 한쪽 또는 양쪽이 ADAMTS13 단백질을 안정화시킨다. 한 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 대략 10 mM 이하, 예를 들면, 2 mM의 농도에서 칼슘 이온을 포함한다. 다른 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 대략 50 μM 이하, 예를 들면, 5 μM의 농도에서 아연 이온으로 보충된다.

[0072] 다른 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지 상에서 크로마토그래피가 뒤따르는 수산화인회석으로 크로마토그래피에 의한 농화에 적합한 농화 완충액이다. 가령, 농화 완충액은 20 mM Na/K PO₄를 포함하고 실온에서 대략 7의 pH를 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 또한, 칼슘 및/또는 아연 이온을 포함하고, 이들 중에서 한쪽 또는 양쪽이 ADAMTS13 단백질을 안정화시킨다. 한 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 대략 10 mM 이하, 예를 들면, 2 mM의 농도에서 칼슘 이온을 포함한다. 다른 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 대략 50 μM 이하, 예를 들면, 5 μM의 농도에서 아연 이온으로 보충된다.

[0073] 일부 구체예에서, 적절한 완충액 용액은 대략 7.0에 동등한 또는 그 이상의 pH를 갖는 용액에서 완충 능력을 갖는 완충제를 포함한다. 한 구체예에서, 완충제는 인산염, tris, HEPES, 이미다졸, 히스티딘, MES, 구연산염, Gly-Gly, Tris/아세트산염 등으로 구성된 군에서 선택된다.

[0074] 이러한 전-농화 UF/DF 단계 이후에 획득된 샘플은 차후 정제 단계에 이용될 수 있다. 가령, 샘플은 수산화인회석으로 크로마토그래피, 또는 수산화인회석 크로마토그래피, 그 이후 양이온 교환/소수성 상호작용 수지 상에서 혼합 양식 크로마토그래피에 의해 제거되는 숙주 세포 단백질을 포함하는 UF/DF 농축된 풀일 수 있다. 일부 구체예에서, 전-농화 UF/DF 단계 이후의 샘플은 전-농화 UF/DF 단계 이전의 샘플과 비교하여, 대략 10배 내지 대략 20배, 예를 들면, 대략 15배 농축되었다.

[0075] (b) 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피

[0076] 다른 선택적 전-농화 단계는 전-농화 크로마토그래피를 포함하는데, 이것은 수산화인회석으로 크로마토그래피 또는 수산화인회석, 그 이후 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피에 의한 ADAMTS13의 농화 이전에 수행될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 전-농화 크로마토그래피는 선택적 전-농화 한외여과/정용여과 단계 이후에 수행될 수 있다. 대안으로, 전-농화 크로마토그래피는 단독으로, 다시 말하면, 선택적 전-농화 한외여과/정용여과 단계 없이 수행될 수도 있다.

[0077] 일부 구체예에서, 전-농화 크로마토그래피 단계는 ADAMTS13을 포함하는 샘플을 음이온 교환 수지와 크로마토그래피적으로 접촉시키고, 그리고 음이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하는 것을 포함한다. 다시 말하면, ADAMTS13은 음이온 교환 수지에 결합되고 차후에 이로부터 용리된다. 본 명세서에서, 용어 "음이온 교환 수지"는 음이온 교환 크로마토그래피에 적합하고, 그리고 예로써, 양으로 하전된 기에 기인한 순 양성 전하 (net positive charge) (중성 pH에서)를 갖는 임의의 수지를 지칭한다. 실례에는 디에틸아미노에탄 (DEAE), 디메틸에탄올아민 (DMAE), 폴리에틸렌아민 (PEI), 제4 아미노에탄 (QAE), 트리메틸아미노에틸 (TMAE), 제4 암모늄 (Q) 등, 그리고 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0078] 한 구체예에서, 음이온 교환 수지는 또한, 하기 특징 중에서 하나 또는 그 이상을 갖는다: 큰 구멍, 살포 유동 습성 (perfusion flow behavior), 그리고 대류 유동 습성 (convective flow behavior). 본 명세서에 개시되는 전-농화 단계에 이용될 수 있는 상업적으로 구입가능한 음이온 교환 수지의 무제한적 실례에는 Q-세파로오스 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ), ANX-세파로오스 Fast Flow low sub (GE Healthcare), DEAE-세파로오스 Fast Flow (GE Healthcare), DEAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC, Grove City, OH), QAE-Toyopearl (Tosoh Bioscience LLC), POROS[®] Q (Applied Biosystems, Foster City, CA), POROS[®] 50D (Applied Biosystems, Foster City, CA) 등이다.

Biosystems), POROS® 50PI (Applied Biosystems), Convective Interaction Media (CIM®; BIA Separation), Fractogel-DMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Fractogel EMD-TMAE (Capitol Scientific Inc., Austin, TX), Matrex Cellufine DEAE (Chisso Corp., Rye, NY) 등이 포함된다.

[0079] 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피 동안, ADAMTS13은 음이온 교환 수지에 결합하고 비-ADAMTS13 불순물(가령, 전-농화 UF/DF 농축된 풀 내에 존재할 수 있는 숙주 세포 성분)로부터 분리된다. 일반적으로, 음이온-교환 수지는 ADAMTS13 단백질을 흡수하는 반면, 작업 pH 이상의 등전점 (isoelectric point)을 갖는 비-ADAMTS13 불순물은 음이온 교환 칼럼을 관류함으로써 공정 흐름 (process stream)으로부터 제거된다. 작업 pH 이하의 등전점을 갖는 비-ADAMTS13 불순물은 수지에 더욱 강하게, 바람직하게는 훨씬 강하게 결합하고, 이들은 바람직하게는, ADAMTS13 단백질과 공동-용리되지 않는다. ADAMTS13이 흡수되는 칼럼은 이후, 예로써 느슨하게 결합된 불순물 또는 오염물질을 제거하고 및/또는 용리를 위한 준비에서 완충액의 전도도를 조정하기 위하여 용리에 앞서 세척된다. 전형적으로, 결합된 ADAMTS13은 완충액의 이온 강도를 증가시킴으로써 음이온 교환 수지로부터 용리된다. 한 구체예에서, ADAMTS13은 계단 용리에 의해 용리된다. 일반적으로, 적하된 샘플 및 세척 완충액은 대략 7 내지 대략 9, 예를 들면, 7.7의 pH, 그리고 실온에서 대략 10 mS/cm 이하 (가령, 6.5 mS/cm)의 전도도를 갖는다. 용리 완충액(들)은 대략 6 내지 대략 9 (가령, 7)의 pH 및 실온에서 대략 10 mS/cm 이상 (가령, 16.5 mS/cm)의 전도도를 가질 수 있다.

[0080] 전형적으로, 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 용출액은 대략 60% 내지 대략 120% ADAMTS13 활성 (가령, 대략 70% 또는 대략 80% 내지 대략 107% ADAMTS 활성)을 산출하고 및/또는 대략 20% 내지 대략 70%의 순도 (가령, 대략 30%, 대략 40%, 대략 50%, 대략 60% 등의 순도)를 갖는 재조합 ADAMTS13을 포함한다. 한 구체예에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 비-ADAMTS13 불순물을 대략 2-배 내지 대략 5-배 감소시킨다. 바람직한 구체예에서, 전-농화 준비후 수율 퍼센트는 대략 75%일 수 있다.

[0081] 이후, 용리된 ADAMTS13은 앞서 기술된 바와 같이, ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 관류할 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종속시킴으로써, 또는 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 관류할 수 있도록 하는 조건 하에 샘플을 수산화인회석, 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 크로마토그래피의 텐덤 크로마토그래피에 종속시킴으로써 농화될 수 있다.

바이러스 비활성화

[0083] 당업자가 인지하는 바와 같이, 바이러스 비활성화의 방법은 바이러스 오염물질 (예로써, 바이러스 입자, 바이러스 단백질, 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 그리고 이들의 단편을 비롯하여, 바이러스로부터 발생하고 및/또는 유래되는 불순물)을 포함하거나 잠재적으로 포함하는 샘플로부터 재조합 ADAMTS13을 정제하는데 특히 유용할 수 있다. 따라서 한 구체예에서, 본 명세서에 개시되는 방법은 적어도 하나의 바이러스 비활성화 단계를 더욱 포함한다. 용어 "바이러스 비활성화"는 바이러스가 용액 내에 유지되지만 불활성화되거나 비활성화되는 (가령, 예로써 지질-외피 바이러스의 지질 코트 (lipid coat)를 용해시킴으로써 비-생존성으로 되는) 상황; 그리고 샘플로부터 바이러스 및/또는 바이러스 오염물질의 물리적 제거 (가령, 크기 배제에 의해) 중에서 어느 한쪽 또는 양쪽을 지칭한다. 따라서 본 발명의 문맥에서 "바이러스 비활성화"는 바이러스 불활성화와 바이러스 제거 중에서 어느 한쪽 또는 양쪽을 지칭한다.

[0084] 수행되면, 바이러스 비활성화는 전체 정제 공정 동안 1회 또는 그 이상 일어날 수 있다. 부가적으로, 샘플을 수산화인회석으로 크로마토그래피에 종속시키기 이전에 또는 차후에 일어날 수 있다. 일부 구체예에서, 바이러스 비활성화는 하기에 더욱 상세하게 기술된 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질의 선택적 단계 이전에 및 차후에 일어난다. 하지만, 당업자가 인지하는 바와 같이, 바이러스 비활성화는 선택적으로, 정제 공정 동안 임의의 단계에서 일어날 수도 있다. 게다가, 당업자는 바이러스 비활성화를 위한 적절한 시점을 인식할 수 있다.

[0085] 지질-외피 바이러스를 비-생존성으로 만드는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 샘플 내에 지질-외피 바이러스를 불활성화시키는 (또는 비활성화시키는) 방법은 용매-세정제 혼합물을 샘플에 첨가하는 단계를 포함한다 (참조: Edwards, et al. (1987) "Tri(n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives" Vox Sang 52: 53-59 (특히, 페이지 54-55); 그리고 U.S. Patent No. 4,540,573 (칼럼 7, 라인 9 내지 칼럼 12, 라인 42); 4,764,369 (칼럼 7, 라인 17 내지 칼럼 12, 라인 47); 4,939,176 (칼럼 3, 라인 59 내지 칼럼 10, 라인 14); 5,151,499 (칼럼 2, 라인 59 내지 칼럼 11, 라인 38); 6,090,599 (칼럼 4, 라인 20 내지 칼럼 8, 라인 67); 6,468,733 (칼럼 5, 라인 12 내지 칼럼 9, 라인 36); 그리고 6,881,573 (칼럼 5, 라인 63 내지 칼럼 14, 라인 9); 이들 각각은 본 발명에 참조로서 편입된다). 지질-외피 바이러스를 불활성화시키는데 이용되는 용매-세정제 조합은 당분야에 공지된 임의의 용매

-세정제 조합일 수 있고, 바람직하게는 비-이온성 세정제 및 유기 용매를 포함한다. 무제한적 실례에는 Tri-N-부틸 인산염 (TnBP)과 TRITON X-100TM, 그리고 TWEEN 80TM (CAS 9005-65-6), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트, 나트륨 콜산염 등이 포함된다. 용매(들) 및/또는 세정제(들)의 농도는 당분야에 통상적으로 이용되는 것들, 예를 들면, 대략 0.1% 이상 TnBP 및 대략 0.1% 이상 TRITON X-100TM일 수 있다.

[0086] 일부 구체예에서, 용매-세정제 혼합물이 바이러스를 비활성화시키는 조건은 대략 5 내지 대략 8 범위의 pH 수준, 그리고 대략 2°C 내지 대략 37°C, 바람직하게는 대략 12°C 내지 대략 25°C 범위의 온도에서, 대략 30분 내지 대략 24시간, 바람직하게는 대략 30분 내지 대략 1시간 동안 대략 10 내지 대략 100 mg/ml의 용매-세정제를 포함한다. 일부 구체예에서, 혼합물은 처리 동안 약하게 진탕되거나 교반된다. 한 구체예에서, 바이러스 비활성화 단계는 15°C 내지 25°C에서 적어도 1시간 동안, 용매-세정제 혼합물 (가령, 0.3% TnBP, 1% TRITON X-100TM, 그리고 0.3% TWEEN 80TM을 포함하는 용매-세정제 혼합물)을 샘플에 첨가하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 샘플은 12°C 내지 16°C에서 30분 동안, 0.3% TnBP, 1% TRITON X-100TM, 그리고 0.3% TWEEN 80TM을 포함하는 용매-세정제 혼합물로 처리된다. 당분야의 숙련자에게 명백한 다른 용매-세정제 조합 및/또는 적절한 조건, 예를 들면, 폴리소르베이트 또는 콜산염 및 tri-n-부틸 인산염의 조합이 이용될 수도 있다. 이런 조합은 더욱 긴 처리 시간, 예를 들면, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 또는 그 이상을 필요로 할 수 있다.

[0087] 비활성화는 당분야에 공지된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 가령, 비활성화는 희석, 바람직하게는 차가운 희석 완충액으로 희석에 의해 중단될 수 있다. 가령, 일부 구체예에서, 비활성화는 대략 20 mM MES를 포함하고, 그리고 실온에서 대략 6의 pH를 갖는 1 부피의 차가운 희석 완충액으로 희석에 의해 중단된다.

[0088] 지질-외피 바이러스를 용매-세정제 조합으로 불활성화시킨 이후에, 용매-세정제 혼합물이 제거될 수 있다. 가령, 용매-세정제 혼합물은 크로마토그래피 또는 다른 적절한 수단에 제거될 수 있다. 일부 구체예에서, 용매-세정제 제거 (SDR) 수지, 예를 들면, HyperDTM 수지 (Biosepra Inc., MA)로 크로마토그래피가 이용된다 (참조: U.S. Patent No. 6,468,733 (칼럼 5, 라인 12 내지 칼럼 9, 라인 36), 이는 본 발명에 순전히 참조로서 편입됨).

고정화되는 단백질로 바이러스 오염물질의 비활성화

[0089] 일부 구체예에서, 바이러스 비활성화는 단백질이 고정화되는 용매-세정제로 바이러스 불활성화를 포함한다. 이런 절차는 본 명세서에서 기술되는 ADAMTS13 폴리펩티드, 그리고 기타 단백질의 바이러스 비활성화에 이용될 수 있다. 다른 단백질에는 제한 없이, 면역계 단백질 (항체, 단일클론 항체, 융합 단백질, Fc 융합체, 주요 조직적 합성 항원, T 세포 수용체), 효소 (산화환원효소, 전이효소, 가수분해효소, 리아제, 이성화효소, 리가아제), 구조 단백질, 섬유성 단백질 (가령, 세포골격 단백질, 예를 들면, 액틴, Arp2/3, 코로닌 (coronin), 디스트로핀, 케라틴, 미오신, 스페트린, Tau 단백질, 튜불린 및 세포외 매트릭스 단백질, 예를 들면, 콜라겐, 엘라스틴, F-스폰дин (spondin)), 구형 단백질, 혈장 단백질 (혈청 알부민 및 혈청 아밀로이드 P 성분), 혈액응고 인자 (가령, 보체 단백질, 인자 VIII, 인자 XIII, 섬유소, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-관련된 프로테아제 저해물질, 트롬빈, 폰 빌레브란트 인자), C-반응성 단백질, 햄단백질, 세포 부착 단백질 (카데린, 에펜디민 (ependymin), 인테그린, NCAM, 셀렉틴), 막통과 수송 단백질 (CFTR, 글리코포린 D, 스크람블라제 (scramblase)), 이온 채널 (아세틸콜린 수용체 칼륨 채널), 신포트 (synport)/안티포트 (antiport) 단백질 (글루코오스 트랜스포터), 호르몬 및 성장 인자 (표피 성장 인자 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자, 옥시토신), 수용체 (막통과 수용체, G-단백질-결합된 수용체, 로돕신, 세포내 수용체 유사 애스트로겐 수용체), DNA-결합 단백질 (히스톤), 전사 조절 단백질 (c-myc FOXP2, FOXP3, MyoD, p53), 영양소 저장/수송 단백질 (페리틴), 샤페론 단백질, 거대분자 복합체 (뉴클레오솜, 리보뉴클레오단백질, 신호 인식 입자, 이어맞추기복합체) 등을 비롯하여, 바이러스 오염물질을 갖는 근원으로부터 임의의 단백질 또는 생물학적 약제가 포함될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 단백질은 재조합 단백질, 특히 유기 용매 및 세정제에 노출될 때 집성에 민감한 단백질이다. 일부 구체예에서, 단백질은 ADAMTS13 단백질, 특히 재조합 ADAMTS13, 또는 상이한 단백질 (특히, 상이한 재조합 단백질)이다. 일부 구체예에서, 재조합 단백질은 혈액 응고 인자이다. 일부 구체예에서, 단백질은 예로써, 인자 VIII, 인자 II, 트롬빈, 인자 VIIa, 인자 IX, 폰 빌레브란트 인자, 항-MIF 항체, 그리고 특히 크로마토그래피 정제가 가능한 단백질 및/또는 용매-세정제로 처리에 민감한 단백질 중에서 하나 또는 그 이상이다. 따라서 본 발명의 다른 측면은 고정화되는 단백질의 바이러스 비활성화에 관계한다. 바람직하게는, 바이러스 비활성화는 단백질 정제 절차와 공동으로 수행되고, 따라서 이러한 절차는 정제되는 단백질을 고정화시킴으로써 단백질 제

조물의 바이러스 비활성화를 수반한다.

[0091] 다양한 단백질, 예를 들면, 앞서 기술된 것들을 정제하기 위한 하류 공정에서 적용되는 전통적인 용매-세정제 바이러스 비활성화 단계는 일반적으로, 예로써 배치 절차 (batch procedure) 동안, 용해 상태에서 용매-세정제 혼합물을 정제되는 샘플에 첨가하는 것을 수반한다. 이러한 배치 절차에서, 단백질을 포함하는 샘플은 교반 용기 (가령, 대규모 정제를 위한 탱크)에서 용매-세정제 혼합물 (가령, 대략 1% Triton X-100, 대략 0.3% tri-N-부틸 인산염, 그리고 대략 0.3% 폴리소르베이트 80을 포함하는 혼합물)로 처리된다. 용매-세정제 화학물질의 용해후, 처리된 샘플 용액은 두 번째 교반 용기 내로 펌핑 (pumping)될 수 있고, 여기서 정의에 의해, 실제 바이러스 비활성화가 일어나는데, 그 이유는 여기에서 단백질 용액이 이런 불활성화가 일어날 수 있도록 항온처리되기 때문이다 (가령, 대략 30분 내지 대략 1시간 동안).

[0092] 대조적으로, 본 발명의 일부 구체예는 단백질, 예를 들면, 정제되는 단백질을 포함하는 조성물의 바이러스 비활성화를 수반하고, 여기서 상기 단백질은 고정화된다. 이러한 과정은 목적 단백질이 용해 상태에 있는 것보다는 고정화되는 동안, 목적 단백질을 포함하는 조성물을 용매-세정제 혼합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 단백질은 크로마토그래피 수지 상에 고정화된다. 단백질이 크로마토그래피 수지, 예를 들면, 크로마토그래피 칼럼 상에 고정화되는 바이러스 비활성화는 본 명세서에서, "온-칼럼" 바이러스 비활성화로 지칭된다. 하기 실시예에서 기술된 Poros S 상에서 ADAMTS13의 정제는 바이러스 비활성화가 온-칼럼에서 수행되는 이러한 과정의 한 가지 구체예를 제공한다. 당업자는 단백질이 다양한 수단에 의해 다양한 서포트 상에 고정화될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 가령, 단백질은 유리 슬라이드, 구슬, 매트릭스, 또는 막을 비롯한 임의의 고형 또는 반-고형 서포트에 결합될 수 있다. 고정화 (immobilization)는 단백질이 단백질 용액의 다른 성분에 비하여 서포트에 고정되는 임의의 과정으로부터 일어날 수 있다. 고정화는 서포트 상에 기와 단백질 상에 기 사이에 하나 또는 그 이상의 유형의 결합, 예를 들면, 공유 연쇄, 수소 결합, 정전 상호작용, 판 데르 발스 힘 등, 또는 이들의 조합으로 인하여 일어날 수 있다.

[0093] 크로마토그래피 칼럼 상에서 고정화되는 단백질의 바이러스 비활성화는 정제를 단순화시킬 수 있다. 가령, 크로마토그래피 정제 및 바이러스 비활성화는 하나 이상의 용기 (가령, 대규모 정제에 이용되는 2개의 탱크 시스템)를 필요로 하기 보다는, 동일한 용기 내에서, 예를 들면, 동일한 크로마토그래피 칼럼 상에서 수행될 수 있다. 이것은 단백질 정제의 하류 공정을 단순화시켜 예로써, 시간을 감소시키고, 시약을 보존하고, 및/또는 효율을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 크로마토그래피 칼럼은 양이온 교환 수지이다. 일부 구체예에서, 크로마토그래피 칼럼은 음이온 교환 수지이다.

[0094] 고정화되는 단백질의 바이러스 비활성화의 일정한 구체예의 추가적인 놀라운 이점은 집합체 형성에서 감소이다. 일부 단백질은 용매-세정제 혼합물에 대하여 민감성을 보이고, 예로써 용해 상태에서 용매-세정제 시약과 접촉될 때 집합체를 형성한다. 특정 이론 또는 가설에 한정됨 없이, 민감한 단백질이 고정화되는 동안, 예를 들면, 민감한 단백질이 크로마토그래피 수지에 결합되는 동안 상기 단백질을 용매-세정제 혼합물과 접촉시키는 것은 단순히, 고정화되는 단백질 분자가 물리적으로 서로 접촉할 수 없음에 기초하여, 집합체의 형성을 예방할 수 있다. 일부 구체예에서, 비활성화는 대략 20% 이하 집합체, 대략 18% 이하, 대략 15% 이하, 대략 12% 이하, 대략 10% 이하, 또는 대략 5% 이하 집합체의 형성을 유발한다. 그리고, 일정한 구체예에서, 집성 수준은 단백질이 고정화되지 않는 바이러스 비활성화에 단백질 제조물이 종속될 때의 집성 수준과 비교하여, 적어도 대략 10%, 대략 20%, 대략 50% 또는 대략 100% 감소한다.

[0095] 바람직한 구체예에서, 단백질은 크로마토그래피 수지 상에 적하되고, 그리고 용매-세정제 처리는 세척 단계, 바람직하게는 지질-외피 바이러스의 비활성화를 가능하게 할 만큼 충분히 긴 항온처리 기간 동안 계속되는 세척 단계로서 이용된다. 가령, 세척 단계는 바람직하게는, 대략 30분 내지 대략 1시간 동안 계속된다. 용매-세정제 혼합물은 앞서 기술된 바와 같이, 이런 바이러스 비활성화를 달성하는데 적합한 농도로 비-이온성 세정제 및 유기 용매를 포함할 것이다. 가령, 일부 구체예에서, 용매-세정제 혼합물은 1% Triton X-100, 0.3% tri-N-부틸 인산염, 그리고 0.3% 폴리소르베이트80을 포함한다. 일부 특정 구체예에 대한 추가의 상세는 ADAMTS13 정제와 관련하여, 하기에 제공된다.

[0096] 바이러스 비활성화은 또한, 예로써 여과, 예를 들면, 나노필터를 이용한 나노여과에 의한 바이러스 제거를 포함한다. 이런 바이러스 제거는 단독으로, 또는 바이러스 불활성화 (비활성화), 예를 들면, 앞서 기술된 바와 같은 용매-세정제 혼합물로 처리를 포함하는 바이러스 불활성화 단계와 공동으로 일어날 수 있다. 바이러스 비활성화가 바이러스 불활성화 및 바이러스 제거 둘 모두를 포함할 때, 바이러스 제거는 용매-세정제 처리에 의한 바이러스 불활성화 이후에 및/또는 차후에 일어날 수 있다. 일반적으로, 샘플로부터 바이러스 제거는 샘플을 여과하

는, 예를 들면, 샘플 내에 ADAMTS13을 유지하면서 바이러스와 바이러스 오염물질이 관류될 수 있도록 하는 구멍 크기를 갖는 필터에 샘플을 통과시키는 것을 수반한다. 한 구체예에서, 필터의 구멍 크기는 대략 15 nm 내지 대략 50 nm이다. 여과는 또한, 20 N 또는 35 N 필터 (Planova, Asahi Kasei)를 이용한 나노여과에 의해 수행될 수 있다. 일부 구체예에서, 나노필터의 오염 (fouling)을 예방하기 위하여 프리-필터, 예를 들면, 대략 2 μ M 필터, 또는 0.2 μ PVDF 또는 PES 막이 이용될 수 있다.

[0097] 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질

[0098] 일부 구체예에서, 상기 방법은 수산화인회석으로 크로마토그래피 (또는 수산화인회석, 그 이후 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피) 이후에, ADAMTS13을 포함하는 샘플을 양이온 교환 수지상에서 크로마토그래피에 의해 손질하는 선택적 단계를 더욱 포함한다. 이러한 단계에서, ADAMTS13을 포함하는 완충액의 전도도는 양이온 교환 크로마토그래피를 위한 적절한 전도도를 달성하기 위하여 필요한 경우에, 손질에 앞서 감소될 수 있다.

[0099] (a) 완충액 전도도 감소

[0100] 수산화인회석으로 크로마토그래피 또는 수산화인회석, 그 이후 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지로 텐덤 크로마토그래피 이후에, ADAMTS13 단백질을 포함하는 완충액은 완충액의 전도도를 감소시킴으로써, 예를 들면, 이온 성분 (가령, 염화나트륨)을 제거함으로써 양이온 교환에 대하여 준비될 수 있다. 일부 구체예에서, 완충액 전도도는 대략 5 mS/cm 이하로 감소되고 및/또는 pH는 대략 6.0으로 감소된다. 완충액의 전도도는 당분야에 공지된, 본 명세서에서 기술된, 또는 특히, 본 발명의 내용에 비추어 당업자에 의해 인식될 수 있는 임의의 방법에 의해 감소될 수 있다. 무제한적 실례에는 한외여과/정용여과 (가령, 직교류 카세트 (crossflow cassette) 또는 유공섬유 모듈로), 젤 여과, 투석 등이 포함된다.

[0101] 한 구체예에서, ADAMTS13 단백질은 양이온 교환 평형 완충액 (가령, 실온에서 20 mM MES, pH 6.0을 포함하는 완충액)에 대하여, 대략 10 kDa 컷오프 (cutoff)를 갖는 막으로 한외여과/정용여과에 의한 양이온 교환에 준비된다. 일부 구체예에서, 한외여과/정용여과 막은 대략 10 kDa 내지 대략 50 kDa 컷오프, 예를 들면, 대략 20 kDa 컷오프, 대략 30 kDa 컷오프, 대략 40 kDa 컷오프 등을 갖는 PES 막이다. 이런 접근법을 이용하면, 완충액 pH는 대략 8.0에서 대략 6.0으로 감소될 수 있고; 및/또는 완충액의 전도도는 실온에서 대략 2 mS/cm 이하로 감소될 수 있다. 일부 이와 같은 구체예에서, 정용여과를 위한 완충액은 20 mM MES를 포함하고, 그리고 실온에서 6.0의 pH 및/또는 실온에서 0.6 mS/cm의 전도도를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 정용여과를 위한 완충액의 전도도는 이용되는 양이온 교환 평형 완충액에 동일하거나, 또는 실질적으로 동일할 수 있다.

[0102] 한 구체예에서, ADAMTS13을 포함하는 완충액을 양이온 교환에 준비시키는 것은 예로써, 혈액투석 모듈, 예를 들면, 유공섬유 혈액투석 모듈 (Aquamax series, PES chemistry of the Hollowfibers, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Germany)을 포함하는 투석기 설비 (dialyzer hardware)를 이용한 투석에 의해 수행된다. 일반적으로, 대략 2 m^2 의 필터 면적이 대략 5 ℓ 의 샘플에 이용된다; 그리고 샘플 완충액 및 투석 완충액은 서로에 대하여 역류 (reverse flow)로 이동된다. 일부 구체예에서, 투석은 단일 투석 모듈을 통한 단지 2회 통과로 구성된다. "단일 투석 모듈"은 투석이 수행되는 하나의 단위 또는 구조를 의미한다. 투석 모듈은 일반적으로, 각각 입구와 출구 포트 액세스 (port access)를 갖는 2개의 상이한 흐름 챔버 (flow chamber) (내강 (lumen) 및 모세혈관외성 (extracapillary))를 발생시키기 위하여 관 하우징 (tubular housing) 내에 넣어진 유공섬유 막의 열린-단부 번들 (open-ended bundle)을 포함한다. 반-투과성 유공섬유 막은 이들 두 챔버를 분리하고, 그리고 용질의 크기와 농도 구배에 기초된 통과를 선별적으로 허용하지만 다른 용질이 이들 두 챔버 사이를 통과하지 못하도록 제한한다. 상기 모듈을 향류 양식 (counter-current flow mode)으로 작동함으로써, 막을 통과하는 용질은 빠르게 씻겨 내려가고 큰 부피의 투석액 용액 ("스윕 (sweep)") 내로 희석되고, 가능한 최대 농축 구배를 유지한다. 따라서 투석은 단일 투석 모듈을 통한 단일 통과 스윕에서 수행될 수 있다.

[0103] 일부 구체예에서, 이들 접근법의 조합이 이용된다, 예를 들면, 투석과 함께 UF/DF가 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질에 대한 준비에서 샘플의 농축 및 완충액 교환을 달성하기 위하여 이용될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 완충액 교환은 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행될 수도 있다.

[0104] (b) 양이온 교환 크로마토그래피

[0105] 앞서 지시된 바와 같이, 본 명세서에 개시되는 방법은 양이온 교환 수지 상에서 크로마토그래피에 의해 샘플을 손질하는 단계를 선택적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "양이온 교환 수지"는 양이온 교환 크로마토그래피에 적합하고, 그리고 예로써, 음으로 하전된 기로 인하여 순 음성 전하 (net negative charge) (중성 pH

에서)를 갖는 임의의 수지를 지칭한다. 실례에는 카르복실 기, 카르복시메틸 (CM) 기, 설포알킬 기 (SP, SE), 메틸설포네이트(들) 기, 셀룰로오스의 황화 에스테르, 헤파린 등, 그리고 이들의 조합이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이러한 단계는 일반적으로, ADAMTS13 산물을 농축하고, 산물을 선-조제 (pre-formulation) 완충액에 넣고, 그리고 공정-관련된 불순물 (가령, 숙주 세포 단백질, 예를 들면, CHO 단백질, 숙주 세포 DNA, 예를 들면, CHO DNA, 용매-세정제 혼합물의 시약 등) 및 산물-관련된 불순물 (가령, ADAMTS13의 집합체와 비-생물학적 활성 단편)을 비롯한 비-ADAMTS13 불순물을 더욱 감소시키기 위하여 설계된다.

[0106] 한 구체예에서, 양이온 교환 수지는 또한, 하기 특징 중에서 하나 또는 그 이상을 갖는다: 큰 구멍, 살포 유동 습성 (perfusion flow behavior), 그리고 대류 유동 습성 (convective flow behavior). 본 명세서에 개시되는 손질 단계에 이용될 수 있는 상업적으로 구입가능한 양이온 교환 수지의 무제한적 실례에는 POROS® S (Applied Biosystems), Convective Interaction Media (CIM®; BIA Separation), Toyopearl Gigacap S (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA), Toyopearl Gigacap CM (Tosoh), Toyopearl SP (Tosoh), Toyopearl CM (Tosoh), MacroPrep S (Bio-rad, Hercules, CA), UNOsphereS (Bio-rad, Hercules, CA), MacroprepCM ((Bio-rad, Hercules, CA), Fractogel EMD S03 (Merck), Fractogel EMD COO (Merck), Fractogel EMD SE Hicap (Merck), Cellufine Sulfate (Chisso), CM과 SP Trisacryl (Pall), CM과 S HyperD (Pall), Mustang S (Pall), S와 CM 세파로오스 CL (GE Healthcare), S와 CM 세파로오스 FF (GE Healthcare), S와 CM CAPTO™ (GE Healthcare), MonoS (GE Healthcare), Source S (GE Healthcare) 등이 포함된다.

[0107] 양이온 교환 수지 상에서 크로마토그래피는 당분야에 널리 공지된 방법이다. 일부 구체예에서, 양이온 교환 칼럼은 대략 0.2 내지 대략 0.5 mg ADAMTS13/ml의 최대 하중을 갖는다. 바람직한 구체예에서, 칼럼은 적어도 0.3 mg ADAMTS13/ml로 적하된다. 일반적으로, 양이온 교환 수지 상에서 크로마토그래피 동안, ADAMTS13은 양이온 교환 수지에 결합되고, 그리고 완충액 및 일정한 불순물은 관류된다. ADAMTS13이 흡수되는 칼럼은 이후, 예로써 느슨하게 결합된 오염물질 또는 불순물을 제거하고 및/또는 양이온 교환 수지로부터 ADAMTS13의 용리를 위한 준비에서 완충액을 조정하기 위하여 세척될 수 있다. ADAMTS13은 이후, 용출액에서 용리될 수 있다.

[0108] 일부 구체예에서, 양이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 획득되는 용출액은 요망되는 것보다 많은 양의 ADAMTS13 집합체를 내포한다. 일부 구체예에서, 가령, 용출액은 대략 15% 이상의 집합체를 포함하는데, 이들은 농축 및 완충액 교환 이후에, 투석기 단계, 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피 단계로 도입되는 것으로 생각된다.

[0109] 훨씬 낮은 비율의 집합체를 갖는 ADAMTS13의 생산을 가능하게 하기 위하여, 양이온 교환 수지 Poros S와 관련하여 도 2에서 더욱 상술된 바와 같이, 일정한 조건이 양이온 교환 수지에 이용될 수 있다. 가령, 일부 구체예에서, 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제, 그 이후에 온-칼럼 용매-세정제 바이러스 비활성화를 포함하는 조합이 예로써, 상기에서 상세하게 기술된 바와 같이 이용된다. 이러한 조합은 바람직하게는, 용출액 내에서 더욱 적은 양의 집합체가 ADAMTS13 폴리펩티드와 함께 나타나도록 유발한다. 더욱 바람직한 구체예에서, 용리 절차는 구배 용리 (계단 용리 대신에)를 포함하고, 이것은 예로써, 용리 피크의 하향 부분 (descending part)에서 ADAMTS13의 집합체를 더욱 제거할 수 있다. 이보다 더욱 바람직한 구체예에서, 용리 완충액 내에 Tween 80의 농도는 대략 0.05% 이상, 예를 들면, 대략 0.06%, 대략 0.07%, 대략 0.08%, 대략 0.09%, 바람직하게는 대략 0.1%, 대략 0.11%, 대략 0.12%, 대략 0.13%, 대략 0.14%, 또는 대략 0.15%이다. 증가된 농도는 ADAMTS13에 대한 추가의 안정화 효과를 갖는 것으로 생각되고, 그리고 수지로부터 ADAMTS13의 용리 동안 고분자량 구조의 형성을 더욱 예방한다. "ADAMTS13 단백질을 안정화시키고" 또는 "ADAMTS13에 대한 안정화 효과"는 단편화된 또는 집합된 형태 보다는 특히, 온전한 및/또는 단량체 형태, 또는 실질적으로 온전한 및/또는 단량체 형태에서 ADAMTS13의 고유 구조를 촉진하는 성향을 갖는다는 것을 의미한다. 안정화는 또한, 획득된 ADAMTS13이 다른 점에서 불안정화 조건, 예를 들면, 변하는 온도, 변하는 pH, 이온 강도 등에 직면하여 단편화, 고유 구조의 상실, 및/또는 집성에 저항하는 성향을 지칭한다.

[0110] ADAMTS13 단백질은 또한, 수화 동안, 예를 들면, 용매-세정제 처리에 의한 바이러스 비활성화가 농축된 수화물 상에서 수행되는 경우에, 이용되는 매트릭스에 의해 안정화될 수 있다. 게다가, 형성되는 집합체는 후기 정제 단계, 예를 들면, 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (가령, 본 명세서에서 기술되는 같은 ANX 세파로오스) 상에서 포획; 및/또는 크로마토그래피 (가령, 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 수산화인회석/Capto MMC로 텐덤 크로마토그래피)에 의한 손질에 의해 제거될 수 있다.

[0111] 앞서 기술된 하나 또는 그 이상의 변형을 이용하여 ADAMTS13 폴리펩티드의 더욱 적은 양의 집합체를 포함하는

용출액을 산출할 수 있다. 가령, 바람직한 구체예에서, 양이온 교환 칼럼으로부터 용출액은 대략 20% 이하, 대략 18% 이하, 대략 15% 이하, 대략 12% 이하, 대략 10% 이하, 또는 대략 5% 이하 집합체를 포함할 수 있다.

[0112] 양이온 교환 수지 상에서 크로마토그래피의 최종 단계는 용리 완충액으로 ADAMTS13 단백질을 용리하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 결합된 ADAMTS13은 완충액의 이온 강도를 증가시킴으로써 양이온 교환 수지로부터 용리된다. 양이온 교환 수지를 크로마토그래피에 의해 접촉시키는데 이용되는 ADAMTS13을 포함하는 완충액은 일반적으로, 실온에서 대략 10 mS/cm 이하, 예를 들면, 5 mS/cm 이하의 전도도를 갖는다. 게다가, 양이온 교환 수지를 크로마토그래피에 의해 접촉시키는데 이용되는 ADAMTS13을 포함하는 완충액은 일반적으로, 실온에서 대략 7.0 이하, 예를 들면, 6.0의 pH를 갖는다. 양이온 교환 수지로부터 ADAMTS13 단백질을 용리하는데 이용되는 용리 완충액은 이들 완충액보다 낮은 이온 강도를 가질 수 있다. 수지는 또한, 의도된 저장 완충액의 pH에 동등하거나, 또는 실질적으로 동등한 pH를 갖는 완충액으로 세척될 수 있다.

[0113] 바람직한 구체예에서, ADAMTS13 단백질은 저장 완충액으로 양이온 교환 수지로부터 용리된다. 일반적으로, 저장 완충액은 실온에서 대략 5 내지 대략 9의 pH를 갖고, 그리고 칼슘, 완충 화합물, 그리고 염을 포함하는 완충액을 의미한다. 저장 완충액의 pH는 실온에서 대략 7.0 이상 (가령, 대략 7.5)일 수 있다. 저장 완충액은 대략 10 mM 이하 Ca^{++} (가령, 2 mM Ca^{++})를 포함할 수 있다; 완충 화합물은 인산염, tris, HEPES, 히스티딘, 이미다졸, gly-gly, MES, 트리신, 아세트산염 등으로 구성된 군에서 선택될 수 있다; 그리고 염은 NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2 등으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 저장 완충액은 7.0 이상의 pH를 갖고 10 mM 이하 칼슘 이온, 완충 화합물, 그리고 염을 포함한다. 더욱 바람직한 구체예에서, 저장 완충액은 비-이온성 세정제, 예를 들면, 대략 0.01 내지 대략 0.5% 비-이온성 세정제, 예를 들면, 0.05% 비-이온성 세정제를 더욱 포함한다. 이보다 더욱 바람직한 구체예에서, 용출액은 저장 완충액으로 양이온 교환 수지로부터 용리 이후에, 차후 농축 및 완충액 교환 단계에 종속되지 않는다.

[0114] 특정 구체예에서, Source S (GE healthcare), 예를 들면, 대략 20 cm의 층 높이를 갖는 Source S 칼럼이 손질 단계의 양이온 교환 수지로서 이용된다. 이런 구체예에서, 칼럼은 대략 2 칼럼 부피의 대략 2 M NaCl 로 활성화되고, 그리고 대략 20 mM MES, 대략 10 mM NaCl , 그리고 대략 2 mM CaCl_2 를 포함하고 실온에서 대략 6의 pH를 갖는 대략 6 칼럼 부피의 완충액으로 평형화될 수 있다. ADAMTS13을 포함하는 완충액은 실온에서 대략 5 mS/cm 이하의 전도도에서 칼럼과 접촉될 수 있고, 그리고 상기 칼럼은 차후에 평형 완충액, 그리고 최종적으로, 수집된 ADAMTS13 단백질을 포함하는 용출액으로 세척될 수 있다. 수집후, 예로써 음이온 교환 크로마토그래피, 정용여과, 한외여과, 투석 등에 의해 용출액은 농축되고 완충액은 저장 완충액으로 교환될 수 있다.

[0115] 다른 특정 구체예에서, POROS[®] S가 ADAMTS13 단백질을 포함하는 샘플의 손질에서 양이온 교환 수지로서 이용된다. 이러한 구체예에서, 양이온 교환 수지를 크로마토그래피에 의해 접촉시키는데 이용되는 ADAMTS13을 포함하는 완충액은 대략 5 mS/cm 이하의 전도도 및 대략 6.1 내지 대략 6.4의 pH를 가질 수 있다. ADAMTS13은 비록 계단 용리가 오히려 더욱 농축된 산물을 제공할 수 있지만, 구배 용리를 이용하여 용리될 수 있다. 구배 용리가 수행되면, 2가지 완충액, 예를 들면, 낮은 염 함량 (가령, 염이 거의 또는 전혀 없음)을 갖는 첫 번째 완충액 및 높은 염 함량 (가령, 대략 500 mM)을 갖는 두 번째 완충액이 이용될 수 있고, 따라서 용출액 풀은 대략 200 mM의 염 농도를 가질 수 있다. 계단 용리가 수행되면, 용리 완충액은 저장 완충액, 예를 들면, 대략 300 mM NaCl , 대략 2 mM CaCl_2 , 대략 20 mM 히스티딘, 대략 0.05% Tween 80을 포함하고 실온에서 대략 7.5의 pH를 갖는 저장 완충액을 포함할 수 있다. 일부 이와 같은 구체예에서, POROS[®] S 단계후 완충액 교환이 필요하지 않다, 다시 말하면, POROS[®] S로부터 획득된 ADAMTS13 분획은 이미 완충액 내에, 그리고 저장에 적합한 농도로 존재한다. 또 다른 구체예에서, POROS[®] S 칼럼으로부터 획득된 ADAMTS13 분획은 추가의 농축 및/또는 완충액 교환 단계에 종속될 수 있다.

[0116] 일반적으로, 본 명세서에 개시되는 방법의 일부 구체예에 따라 재조합 ADAMTS13 단백질을 정제하는 것은 순수한 ADAMTS13 단백질의 조성물을 산출한다. 한 구체예에서, 본 명세서에 개시되는 방법에 따라 재조합 단백질을 정제하는 것은 적어도 대략 90% 순수한, 예를 들면, 적어도 대략 95% 순수한, 예를 들면, 적어도 대략 98% 순수한, 예를 들면, 또는 적어도 대략 99% 순수한 ADAMTS13 단백질을 산출한다. 적어도 대략 20%의 수율이 본 명세서에 개시되는 방법의 일부 구체예에 따라 획득될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 방법은 적어도 대략 5%, 예를 들면, 대략 30%, 예를 들면, 대략 10%, 예를 들면, 대략 20%, 예를 들면, 대략 40%, 예를 들면, 대략 50%, 예를 들면, 대략 60%, 예를 들면, 대략 70%, 예를 들면, 대략 80%, 예를 들면, 대략 90%, 또는 예를 들면, 대략

95%의 수율을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대략 500 단위/mg ADAMTS13 내지 대략 1,000 단위/mg ADAMTS13 범위의 비 활성 (specific activity)을 갖는 ADAMTS13 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 대략 1,200 단위/mg ADAMTS13 UV 280 단백질 내지 대략 2,400 단위/mg ADAMTS13 UV 280 단백질 범위의 비 활성을 갖는 ADAMTS13 단백질을 제공한다. 다른 구체예에서, 재조합 ADAMTS13 단백질이 재조합 ADAMTS13 핵산으로 형질전환된 CHO 세포에 의해 생산되는 경우에, 본 명세서에 개시되는 방법에 따라 재조합 ADAMTS13을 정제하는 것은 대략 1,000 ppm 이하의 숙주 세포 불순물을 갖는 조성물을 생산한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 저장 완충액에서 적어도 대략 2 mg/ml ADAMTS13 단백질을 제공한다.

[0117] 재조합 ADAMTS13 단백질을 포함하는 조성물

본 발명에서는 또한, 본 명세서에 개시되는 방법에 따라 정제된 재조합 ADAMTS13을 포함하는 조성물을 제시한다. 본 명세서에 개시되는 조성물은 정제된 재조합 ADAMTS13의 저장에 유용할 수 있다. 가령, 일부 구체예에서, 정제된 ADAMTS13 단백질은 동결 저장된다, 예를 들면, 대략 -60°C 이하에서 저장된다. 본 명세서에 개시되는 조성물은 또한, ADAMTS13 단백질의 치료적 투여, 및/또는 치료적 투여, 특히, 비경구 투여를 위한 조성물의 제조에 유용할 수 있다. 가령, 일부 구체예에서, 본 명세서에서 기술되는 방법에 따라 획득된 정제된 ADAMTS13은 원료 의약품 (bulk drug substance)의 형태, 다시 말하면, 치료적 투여를 위한 조성물로의 조제가 용이한 형태이다.

[0119] 따라서 본 발명의 다른 측면은 정제된 재조합 ADAMTS13 단백질이 부형제(들) 또는 기타 제약학적으로 허용되는 담체와 혼합되는 제약학적 조성물에 관계한다. 바람직한 구체예에서, 제약학적으로 허용되는 담체는 제약학적으로 비활성이다. 제약학적으로 비활성 담체는 활성 약물과 반응하지 않거나, 또는 실질적으로 반응하지 않고, 및/또는 특히, 활성 약물의 요망되는 제약학적 특성에 영향을 주지 않거나, 또는 실질적으로 영향을 주지 않는 것이다. 제약학적 조성물은 당분야에 공지된 임의의 방식으로, 예를 들면, 전통적인 혼합, 용해, 과립화 (granulating), 당의정 만들기 (dragee-making), 가루 만들기 (levigating), 유화 (emulsifying), 캡슐화 (encapsulating), 포집 (entrapping), 냉동 건조 (lyophilizing) 등에 의해 제조될 수 있다.

[0120] 치료되는 질환에 따라, 이들 제약학적 조성물은 전신 또는 국소 조제되고 투여될 수 있다. 조제와 투여 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co, Easton Pa.)의 최신판에서 찾아볼 수 있다. 적절한 경로에는 예로써, 경구 또는 경첨막 투여; 그리고 근육내 투여, 피하 투여, 수내 투여, 척수강내 투여, 심실내 투여, 정맥내 투여, 복막내 투여, 비내 투여 등을 비롯한 비경구 전달이 포함된다.

[0121] 본 발명에 이용하기 적합한 제약학적 조성물에는 의도된 목적을 달성하는 효과량의 ADAMTS13을 활성 성분으로서 포함하는 조성물이 포함된다. 본 명세서에서, ADAMTS13의 "효과량"은 고유 ADAMTS13의 생물학적 효과를 증대, 강화, 향상, 증가 또는 산출하는 양을 지칭할 수 있다. 고유 ADAMTS13의 생물학적 효과에는 혈액 응고에 관여하는 대형 단백질인 폰 벨레브란트 인자를 절단하는 ADAMTS13의 작용에 기초된 vWF-절단 프로테아제 활성이 포함된다. "효과량"은 혈소판 집성의 감소된 수준을 유발하는, 예를 들면, 혈액 응고 질환을 앓는 개체에서 수준을 혈액 응고 질환을 앓지 않는 개체에 더욱 필적하는 수준으로 감소시키는 ADAMTS13의 양을 포함할 것이다. 혈액 응고 질환에는 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP 또는 Moschcowitz syndrome), 업쇼-슐만 증후군 (Upshaw-Schulman syndrome) (TTP의 가족성 형태), 그리고 뇌출증이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. "효과량"은 또한, 하나 또는 그 이상의 혈액 응고 질환 및 연관된 장애의 치료에서 예방적 및/또는 치료적 이익을 달성하는 양을 포함한다. 일정한 효과량의 결정은 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0122] 본 발명에서는 동물 개체에서 혈액 응고 질환 및 연관된 장애를 치료하고 및/또는 예방하기 위한 방법, 제약학적 조성물, 그리고 키트를 제시한다. 본 명세서에서, 용어 "동물 개체"에는 인간 및 기타 포유동물이 포함된다.

[0123] 본 명세서에서, 용어 "치료하는 및/또는 예방하는"은 각각, 치료적 이익 및/또는 예방적 이익을 달성하는 것을 포함한다. 치료적 이익은 치료되는 기초 혈액 응고 질환의 반전 (reversal) 또는 개선 (amelioration)을 의미한다. 가령, TTP 환자에서, 치료적 이익에는 환자가 기초 질환 (underlying disorder)으로 여전히 고통받고 있다는 사실에도 불구하고 환자에서 개선이 관찰될 만큼 TTP와 연관된 장애 및/또는 증상 중에서 하나 또는 그 이상의 소멸 또는 개선이 포함된다. 가령, 치료는 혈전의 형성이 감소되거나 소멸될 때뿐만 아니라 TTP에 동반되는 증상과 관련하여 환자에서 개선, 예를 들면, 감소된 두통, 약화된 열병, 및/또는 지연된 신부전이 관찰될 때 치료적 이익을 제공할 수 있다.

[0124] 예방적 이익의 경우에, 본 발명의 제약학적 조성물은 예로써, 비록 진단이 아직 내려지지는 않았지만 혈액 응고 질환, 예를 들면, TTP와 통상적으로 연관되는 증상 또는 장애 중에서 하나 또는 그 이상을 보고하는 환자를 비

롯하여, 혈액 응고 질환의 발병 위험이 있는 환자에 투여될 수 있다.

[0125] 활성 성분 이외에, 제약학적 조성물은 적절한 제약학적으로 허용되는 담체, 예를 들면, 활성 화합물의 제약학적으로 이용될 수 있는 제조물로의 가공을 가능하게 하는 부형제와 보조제를 포함할 수 있다.

[0126] 비경구 투여를 위한 제약학적 제제는 일반적으로, 물-용해성 형태에서 활성 성분의 수용액을 포함한다. 일부 구체예에서, 활성 물질의 혼탁액이 적절한 유성 주사 혼탁액으로서 제조될 수 있다. 적절한 친유성 용매 또는 운반제에는 오일, 예를 들면, 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들면, 에틸 올리에이트 또는 트리글리세리드, 또는 리포좀이 포함된다. 수성 주사 혼탁액은 혼탁액의 점성을 증가시키는 물질, 예를 들면, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 또는 텍스트란을 포함할 수 있다. 선택적으로, 혼탁액은 적절한 안정화제, 또는 예로써, 고도로 농축된 용액의 제조를 가능하게 하기 위하여 활성 물질의 용해도를 증가시키는 작용제 역시 포함할 수 있다.

[0127] 주사의 경우에, 본 발명의 제약학적 조성물은 수용액에서, 바람직하게는 생리학적으로 적합한 완충액, 예를 들면, Hank 용액, 링거액, 또는 생리학적으로 완충된 염수에서 조제될 수 있다. 조직 또는 세포 투여의 경우에, 침투되는 특정 장벽에 적합한 침투제 (penetrant)가 조제에 이용된다. 이런 침투제는 당분야에 널리 공지되어 있다.

[0128] 경구 이용을 위한 제약학적 제조물은 활성 물질을 고형 부형제와 합동시키고, 결과의 혼합물을 선택적으로 분쇄하고, 그리고 원하는 경우에, 정제 또는 당의정 코어를 획득하기 위하여 적절한 보조제를 첨가한 이후에 과립 혼합물을 가공함으로써 획득될 수 있다. 적절한 부형제에는 탄수화물 또는 단백질 충전제, 예를 들면, 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 또는 소르비톨을 비롯한 당; 옥수수, 밀, 쌀, 감자 등으로부터 전분; 셀룰로오스, 예를 들면, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸-셀룰로오스, 또는 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스; 아라비아와 트래거캔스를 비롯한 검; 그리고 단백질, 예를 들면, 젤라틴과 콜라겐이 포함된다. 원하는 경우에, 봉해제 또는 용해제, 예를 들면, 교차-연결된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 알긴산, 또는 이의 염, 예를 들면, 알긴산 나트륨이 첨가될 수 있다. 제약학적 조성물이 치료되는 환자에 의한 경구 및/또는 코 섭취를 위한 정제, 알약, 캡슐, 지질, 젤, 시럽, 슬러리, 용액, 혼탁액, 당의정 등으로 조제될 수 있도록 하는 담체 역시 이용될 수 있다.

[0129] 경구 이용될 수 있는 제약학적 제조물에는 젤라틴으로 만들어진 푸시-핏 (push-fit) 캡슐, 그리고 젤라틴 및 코팅, 예를 들면, 글리세롤 또는 소르비톨로 만들어진 연성 밀봉 캡슐이 포함된다. 푸시-핏 (push-fit) 캡슐은 충전제 또는 접합제, 예를 들면, 락토오스 또는 전분; 윤활제, 예를 들면, 활석 또는 마그네슘 스테아레이트; 그리고, 선택적으로, 안정화제와 혼합된 활성 물질을 내포할 수 있다. 연성 캡슐에서, 활성 화합물은 안정화제와 함께 또는 안정화제 없이, 적절한 액체, 예를 들면, 오일, 액상 파라핀, 또는 액상 폴리에틸렌 글리콜에서 용해되거나 혼탁될 수 있다.

[0130] 본 명세서에서 기술되는 방법에 따라 준비된 ADAMTS13 또는 기타 단백질을 포함하는 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체로 조제되고, 적절한 용기 (또는 키트) 내에 배치되고, 그리고 지시된 장애의 치료에 대하여 표지될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도면의 간단한 설명

도 1에서는 본 발명에 따라서, 트롬보스톤던 타입 1 모티프 13을 갖는 디스인테그린-유사 및 금속단백분해효소 (ADAMTS13) 재조합 단백질을 ADAMTS13 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플로부터 정제하는 방법의 예시적인 단계의 흐름도를 도시한다. 본 명세서에서 개시되고 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 도 1에 제시된 단계의 순서는 재-정렬되고 및/또는 하나 또는 그 이상의 단계가 생략될 수 있다.

도 2A-D에서는 양이온 교환 칼럼 상에서 정제 작업에서 변형을 도시한다. 도 2A에서는 바이러스 비활성화 이후에, 계단 용리를 이용한 양이온 교환 크로마토그래피를 수반하는 절차를 도시한다; 도 2B에서는 계단 용리를 이용한 양이온 교환 크로마토그래피를 수반하지만, 선행 바이러스 비활성화가 없는 절차를 도시한다; 도 2C에서는 구배 용리를 이용한 양이온 교환 크로마토그래피, 그 이후에 크로마토그래피 칼럼 상에서 바이러스 비활성화를 수반하는 절차를 도시한다; 그리고 도 2D에서는 구배 용리를 이용한 양이온 교환 크로마토그래피를 수반하지만, 선행 바이러스 비활성화가 없는 절차를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] **실시예**

[0133] 하기 실시예는 예시의 목적으로 제공되고 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.

[0134] **실시예 1**

[0135] 도 1에서는 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 본 발명의 일정한 구체예에 따라, ADAMTS13 단백질을 정제하는 예시적인 방법을 제시한다. 제시된 실시예에서, 재조합 ADAMTS13 단백질은 재조합 ADAMTS13 뉴클레오티드 서열을 포함하는 CHO 세포의 배양으로부터 수집된 상층액으로부터 정제된다. 본 실시예에서, 샘플은 대략 2 단위/ml (거의 2 μ g/ml) ADAMTS13 단백질을 포함하는 세포 배양 상층액이다.

[0136] 도 1에서 도시된 바와 같이, ADAMTS13 및 비-ADAMTS13 불순물을 포함하는 샘플은 먼저, 선택적 전-농화 준비에 종속될 수 있다: (a) 단계 101에서 도시된 바와 같이, 샘플은 한외여과에 의해 농축되고 (대략 10-배 내지 대략 20-배), 그리고 완충액은 정용여과 (대략 30 kDa의 분자량 컷오프)에 의해 교환되고; 그리고 (b) 단계 102에서 도시된 바와 같이, ADAMTS13 단백질은 추가 농화에 앞서, 음이온 교환 수지에 결합되고 이로부터 용리될 수 있다.

[0137] **샘플의 전-농화 준비**

[0138] (a) 전-농화 한외여과/정용여과 (UF/DF)

[0139] 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피를 위한 적하를 최적화시키는 도 1, 단계 101에서 도시된 바와 같이, 세포 배양 상층액은 대략 10-배 내지 대략 20-배 농축되고, 그리고 PES 막 (대략 30 kDa 내지 대략 50 kDa 컷오프; Pall Omega)을 이용하여, ADAMTS13을 안정화시키는 것으로 생각되는 칼슘과 아연 이온을 내포하는 낮은-전도도 완충액에 정용여과되었다. 실온에서 7.7의 pH를 갖는, 세포 배양 상층액 정용여과를 위한 완충액은 20 mM Tris, 0.1% 폴리소르베이트 80, 85 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 μ M ZnCl₂이다.

[0140] (b) 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피

[0141] 도 1, 단계 102에서 도시된 바와 같이, 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피는 GE Healthcare로부터 ANX 세파로 오스 Fast Flow low sub을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 음이온 교환 수지는 아래의 조건에 따라 이용될 수 있다 (표 1-2).

[0142] 칼럼 하중: 최대 0.5 mg ADAMTS13 Ag/ml 수지; 층 높이: 20 cm

표 1

단계	완충액	칼럼 부피 (CV)	유속 (cm/h)
칼럼 활성화	ANX-HS	2	100
평형	ANX-평형	6	100
하중	농축되고 정용여과된 CCS		
세척 1	ANX-W1	2,5	100
세척 2	12.5% ANX-EluB/87.5%A NXEluA	3	100
용리 구배	12.5% ANX-EluB/87.5%A NXEluA 내지 100% ANX-EluB	11	100
용리후	ANX-HS	3	100

[0143]

[0144] 대안으로, 계단 용리는 표 2에서 상술된 바와 같이, 48% ANX-EluB와 52% ANX-EluA를 포함하는 2.8 칼럼 부피의 완충액으로 이용될 수 있다. 다른 잠재적으로 적절한 완충액 역시 지시된다.

표 2

완충액	배합
ANX-평형	20 mM Tris, 0.1% 폴리소르베이트 80, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 5μM ZnCl ₂ , pH=7.7 (실온)
ANX-W1	20 mM Tris, 0.1% 폴리소르베이트 80, 50 mM NaCl, pH=7.7 (실온)
ANX-EluA	20 mM Na/K PO ₄ , pH=7.0 (실온)
ANX-EluB	20 mM Na/K PO ₄ , 400 mM NaCl, pH=7.0 (실온)
ANX-HS	2 M NaCl

[0145]

[0146] 도 1, 단계 102에서 지시된 것과 상이한 수지가 이용될 수도 있다. 가령, POROS 50D와 POROS 50PI (Applied Biosystems, Foster City, CA)가 이용될 수 있다. 이러한 수지를 이용한 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용출액은 대략 20% 내지 대략 70%의 순도로 재조합 ADAMTS13을 제공할 수 있고, 그리고 샘플의 이러한 전-농화 준비후 수율 퍼센트는 적어도 대략 75%일 수 있다.

[0147] *ADAMTS13의 농화*

[0148] 각각, 도 1, 단계 103과 104에서 도시된 바와 같이, ADAMTS13은 이후, 순질 단계 (a)와 (b)를 거쳐 농화될 수 있다. ADAMTS13을 포함하는 샘플은 먼저, 수산화인회석 타입 II 칼럼 (Biorad, Hercules, CA) 상에서 수산화인회석 (단계 103), 그 이후 양이온 교환/소수성 상호작용 수지 CAPTOTM MMC (GE Healthcare) 상에서 혼합 양식 크로마토그래피 (단계 104)의 텐덤 크로마토그래피에 종속된다. 더욱 구체적으로, 단계 102의 전-농화 음이온 교환 크로마토그래피로부터 용출액 풀은 전도도를 대략 6 mS/cm로 감소시키기 위하여 수산화인회석-회석 완충액으로 1:4 회석된다. 회석된 용출액 풀은 ADAMTS13 단백질의 실질적인 부분이 관류할 수 있도록 하는 조건 하에 수산화인회석 (단계 103), 그 이후 ADAMTS13 단백질에 결합하는 혼합 양식 양이온 교환/소수성 상호작용 수지 (단계 104)로 텐덤 크로마토그래피에 종속된다. 텐덤 크로마토그래피를 위한 조건은 하기 및 표 3-4에서 제시된다.

[0149] 칼럼 1: 수지: 수산화인회석 타입 II (Biorad) (HA); 하중: 최대 2 mg 총 단백질/ml 수지; 층 높이: 20-30 cm.

[0150] 칼럼 2: 수지: Capto MMC (GE Healthcare); 하중: 3 - 6 mg ADAMTS13/ml 수지; 층 높이: 10 cm.

[0151] 칼럼 부피 비율 HA:MMC = 10:1.

표 3

단계	완충액	칼럼 (CV)	부피 (CV)	유속 (cm/h)
활성화 (MMC)	MMC-용리	3 (MMC)	50 (MMC)	
평형	HA-평형	4 (HA)	50 (HA)	
평형	HA-평형	1(HA)	50 (HA)	
하중	회석된 포획 용출액 (HA-평형으로 1:5 회석됨) < 6mS/cm 전도도	20 - 30 L	30 (HA)	
재평형	HA-평형	0.5 (HA)	30 (HA)	
세척 ¹ (MMC)	MMC-평형	3 (MMC)	50 (MMC)	
세척 ² (MMC)	MMC-세척	4 (MMC)	50 (MMC)	
용리 (MMC)	75% MMC 용리 완충액/ 25% MMC 세척 완충액	4 (MMC)	50 (MMC)	

[0152]

표 4

완충액	배합	전도도
HA-희석	20 mM Na/K PO ₄ , pH 7.0 (실온)	
탠덤-평형	20 mM Na/K PO ₄ , 25 mM NaCl, pH 7.0 (실온)	대략 5.5 mS/cm (실온)
MMC-세척	50 mM Na/K PO ₄ , 160 mM NaCl, pH 8.0 (실온)	대략 16.5 mS/cm (실온)
MMC-용리	50 mM Na/K PO ₄ , 1000 mM NaCl, pH 8.0 (실온)	대략 93 mS/cm (실온)
HA-용리	300 mM K PO ₄ , pH 7.0 (실온)	대략 33 mS/cm (실온)

[0153]

[0154] 텐덤 크로마토그래피에 의한 농화후 ADAMTS13 수율 퍼센트는 적어도 60%일 수 있다.

바이러스 비활성화

[0155] [0156] 도 1, 단계 105에서 도시된 바와 같이, 샘플은 오염 바이러스 또는 바이러스 입자를 비활성화시키기 위하여 용매-세정제 처리에 종속될 수 있고; 및/또는 샘플은 이런 바이러스 또는 바이러스 입자를 제거하기 위하여 여과된다. 또한, 도 1에 도시된 바와 같이, 바이러스 비활성화 단계 105는 절차 동안 다양한 시점에서, 예를 들면, 텐덤 크로마토그래피 단계 103과 104 이전에, 또는 하기에 기술된 농축과 완충액 교환을 수반하는 단계, 단계 106 이후에 수행될 수 있다.

[0157] 용매-세정제 처리에 의한 바이러스 비활성화를 위하여, 샘플은 대략 12°C 내지 대략 16°C에서 30분 동안, 1% TRITON X-100®, 0.3% Tri-N-부틸인산염, 그리고 0.3% 폴리소르베이트 80를 포함하는 용매-세정제 혼합물로 처리된다 (구체적으로, 지질-외피 바이러스를 비활성화시키기 위하여). 추가의 상세는 하기 실시예 2에서 제공된다.

[0158] 대안으로, 또는 부가적으로, 샘플은 여과, 예를 들면, 0.2 μm 입자 필터를 통한 나노여과에 종속된다. 가령, 용매-세정제 처리후 혼합물은 하기에 기술된 1 부피의 손질 평형 완충액으로 희석되고, 그리고 0.2 μm PVDF 또는 PES 막을 통해 여과된다. 여과는 용매-세정제 처리 이전에 및/또는 이후에 수행될 수 있다. 처리후 여과는 처리 동안 형성될 수도 있는 미립자 물질을 제거하는데 이용될 수 있다. 여과는 또한, 도 1에서 도시된 바와 같이, 20 N 필터 (Planova, Asahi Kasei)를 이용한 나노여과에 의해 수행될 수 있고, 여기서 바이러스 비활성화 단계 105는 텐덤 크로마토그래피 단계 103과 104 이전에 수행된다. 하기에 기술된 바와 같이, 샘플이 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 손질된 이후에, 추가의 바이러스 비활성화 단계 105가 수행될 수 있다.

[0159] 이러한 바이러스 비활성화로부터 ADAMTS13 수율 퍼센트는 적어도 95%일 수 있다.

양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질

[0160] [0161] 농화 이후에, ADAMTS13은 양이온 교환 수지 상에서 크로마토그래피에 의해 손질될 수 있고, 그리고 ADAMTS13을 포함하는 완충액의 전도도는 양이온 교환 크로마토그래피에 적합한 전도도를 달성하기 위하여 손질에 앞서 감소될 수 있다. 따라서 농화후 단계는 (a) 완충액 전도도 감소; 그 이후에 (b) 양이온 교환 크로마토그래피를 수반 할 수 있다.

[0162] (a) 완충액 전도도 감소

[0163] 도 1, 단계 106에서 도시된 바와 같이, 양이온 교환 크로마토그래피를 위한 준비는 10 kDa의 컷오프를 갖는 UF/DF, 그리고 투석기 설비를 이용한 농축과 완충액 교환을 수반할 수 있다. 예시된 구체예에서, 완충액 교환에 이용되는 투석기 설비는 0.3 - 1.9 m^2 필터 면적을 갖는 유공섬유 혈액투석 모듈 (Aquamax series, PES chemistry of the Hollowfibers, Edwards Lifesciences, Unterschleißheim, Germany)을 수반한다. 작업 동안, 하기 파라미터가 온라인으로 모니터링된다: 압력 (모듈 이전에, 모듈 이후에, 그리고 막투과 압력), 전도도, 그리고 온도. 투석기 카트리지가 2개의 펌프와 연결되는데, 하나는 샘플 (유공섬유를 관통하여)을 공급하고, 그리고 다른 하나는 투석 완충액 (역류 방향으로, 유공섬유를 둘러쌈)을 공급한다. 거의 2 m^2 의 필터 면적이 대략 5 ℓ 의 샘플에 이용되고; 그리고 유체 흐름은 하기 방식으로 고정된다: 40 mL/min (샘플 흐름 또는 20 $\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$ 필터 면적), 60 mL/min (투석 완충액 흐름, 역류). 투석 전후에, 유공섬유 모듈은 투석 완충액으로 행구되고, 그리고 투석후 린스 (rinse)가 수집 산물에 첨가된다. 투석후, 샘플은 비록 약간 농축되긴 하지만, 이전과 거의 동일한 부피를 갖는다.

[0164] 이러한 방식으로 완충액 전도도를 감소시킨 이후에 ADAMTS13 수율 퍼센트는 대략 90%일 수 있다.

[0165] 다른 구체예에서, 완충액 교환은 단계 102에서처럼, ANX 세파로오스-FF low sub 상에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다.

양이온 교환 크로마토그래피

[0167] 도 1, 단계 107에 도시된 바와 같이, ADAMTS13 단백질의 농화 (그리고, 선택적 농축과 완충액 교환 단계 106 및 /또는 바이러스 비활성화 단계 105) 이후에, 샘플은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 손질될 수 있다. ADAMTS13 단백질을 포함하는 완충액은 Source S 칼럼 (GE Healthcare) 또는 POROS[®] S 칼럼, 예를 들면, POROS[®] 50 HS 칼럼 (Applied Biosystems) 상에서 손질된다.

[0168] Source 30S 칼럼 상에서 손질을 위한 조건은 표 5에 제시되고, 그리고 손질 단계를 위한 완충액은 표 6에 제시된다.

[0169] 수지: Source 30 S (GE Healthcare); 칼럼 하중: 최대 0.2 (0.5) mg ADAMTS13/ mL 수지; 총 높이: 20 cm.

표 5

단계	완충액	칼럼 부피 (CV)	유속 (cm.h)
칼럼 활성화	2 M NaCl	2	32
평형	SOS-평형	6	32
하중			32
세척	SOS-평형	3	32
용리 (구배)	100% SOS-평형/0% SOS-용리 내지 0% SOS-평형/100% SOS-용리	5	19
용리후	SOS-용리	3	32

[0170]

표 6

완충액	배합	논평
SOS-평형	20 mM MES, pH 6.0 (실온)	완충액은 10 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ 를 포함할 수 있다
SOS-용리	20 mM MES, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 6.0 (실온)	

[0171]

[0172] Source S 칼럼으로부터 용출액 풀은 농축되고 저장 완충액에 대하여 정용여과된다.

[0173] POROS[®] S 칼럼 상에서 손질을 위한 조건은 표 7에 제시되고, 그리고 손질 단계를 위한 완충액은 표 8에 제시된다.

[0174] 수지: POROS[®] S (Applied Biosystems, Foster City, CA); 칼럼 하중: 최대 12 mg ADAMTS13/ml 수지; 층 높이: 20 cm.

표 7

단계	완충액	칼럼 부피 (CV)	유속 (cm/h)
칼럼 활성화	2M NaCl	5 CV	50
평형	Poros 평형	10 CV (pH와 전도도가 굴곡없이 안정된 신호를 제공할 때까지)	50
하중	용매-세정제 처리 및 희석후 MMC-용출액	5 mS/cm (실온)보다 낮은 전도도	32
재평형	Poros 평형	5 CV	32
세척 1	Poros 세척 1	5 CV	32
세척 2	Poros 세척 2	7 CV	32
용리	Poros 용리	5 CV	19
용리후	2M NaCl	3 CV	32

[0175]

표 8

Poros 평형	20mM MES 산, 30mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 6.0 (실온), 25°C에서 대략 3.9 mS/cm 전도도
Poros 세척 1	20mM L-히스티딘, 5mM NaCl, 2mM CaCl ₂ , 0.05% Tween 80, pH 6.0 (실온), 25°C에서 대략 1.9 mS/cm 전도도
Poros 세척 2	20mM L-히스티딘, 5mM NaCl, 2mM CaCl ₂ , 0.05% Tween 80, pH 7.5 (실온), 25°C에서 1.9 mS/cm 전도도
Poros 용리	20mM L-히스티딘, 300mM NaCl, 2mM CaCl ₂ , 0.05% Tween 80, pH 7.5 (실온), 25°C에서 대략 18mS/cm 전도도

[0176]

[0177] POROS[®] S 칼럼으로부터 용출액 풀은 농축되고 저장 완충액에 대하여 정용여과된다.

[0178]

이러한 추가 손질 단계 이후에 ADAMTS13 수율 퍼센트는 적어도 대략 70%이고, 그리고 완충액 교환 이후에, 적어도 대략 90%일 수 있다.

[0179]

도 1, 단계 108에서 도시된 바와 같이, 정제된 ADAMTS13 단백질은 상기 기술된 방법에 따라 획득된다. ADAMTS는 동결되고 예로써, 대략 - 60°C 이하에서 저장된다. 전체 공정의 수율은 대략 22% 내지 대략 24% 또는 그 이상일 수 있다.

[0180]

실시예 2

[0181]

도 2에서는 도 1의 양이온 교환 크로마토그래피 단계 107에 이용될 수 있는 다양한 조건의 요약을 제시한다. 특히, 다양한 작업으로부터 획득된 ADAMTS13 산물의 비교는 도 2C의 조건이 오염 집합체를 감소시킨다는 것을 시한다.

[0182]

도 2A에 도시된 바와 같이, 변형 A는 하기에 더욱 상세하게 기술된 바와 같이 용매-세정제 (S/D) 처리를 이용한 바이러스 비활성화, 그 이후에 Poros S 상에서 계단 용리를 적용하는 양이온 교환 크로마토그래피의 조합이다. 도 2B에 도시된 바와 같이, 변형 B는 Poros 50S 상에서 단계 희석을 이용하지만 바이러스 비활성화가 선행하지 않는 양이온 교환 크로마토그래피를 수반한다. 변형 A와 B 둘 모두 표 9에 개설된 절차에 따라 수행될 수 있다.

표 9

	원충액 부피 (CV)	원충액 조성물	유속 (cm/h)	관찰
활성화	5	2 M NaCl	50	
평형	6	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	50	
산물 적하	대략 12	S/D 처리되고 희석된 산물 용액	32	칼럼 적하 최대 6 mg ADAMTS13/ml 수지
세척 1	10	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	32	
세척 2	8	20 mM 히스티딘, 30 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.05% Tween 80, pH 7.0 (실온)	32	
계단 용리	5	20mM 히스티딘, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.05% Tween 80, pH 7.5 (실온)	25	UV ₂₈₀ 신호가 현저하게 상승한 이후에 합동이 시작되고, 그리고 UV ₂₈₀ 신호가 피크 최대 (거의 1 CV)에서 UV ₂₈₀ 신호의 5% 이하로 하락한 이후에 합동이 종결된다

[0183]

변형 A에서, 단계 106으로부터 조건화된 (투석된) 용출액은 용매-세정제 바이러스 비활성화 단계 105에 적용된다. 용출액은 먼저, 미립자 물질을 제거하기 위하여 0.2 μ 구멍 크기를 갖는 필터를 통해 여과된다. 이후, 여과액은 저장 용액으로부터 1% Triton X-100, 0.3% tri-n-부틸 인산염 및 0.3% 폴리소르베이트 80 (Tween 80)의 최종 농도까지 용매-세정제 혼합물로 보충된다. 비활성화는 약한 교반 또는 진탕 하에 대략 30분 내지 대략 1시간의 시간 프레임 동안 대략 12°C 내지 대략 25°C 범위의 온도에서 수행된다. 비활성화는 상기 용액을 1 부피의 차가운 희석 원충액 (20 mM MES, pH 6.0, 실온)로 희석함으로써 중단된다. 칼럼을 보호하기 위하여, 용매-세정제 처리되고 희석된 용액은 예로써, 바이러스 비활성화 처리 동안 형성될 수도 있는 미립자 물질을 제거하기 위하여 0.2 μ 필터로 다시 한 번 여과된다.

[0185]

용매-세정제 비활성화되고 희석된 산물 용액은 이후, Poros 50HS 상에서 단계 희석을 이용한 양이온 교환 크로마토그래피 단계 107에 종속된다. 크로마토그래피 상세는 상기 표 9에 개설된다. 결과의 용출액 풀은 원료 의약품의 형태로 ADAMTS13 단백질을 제공하고, 이것은 -60°C 이하에서 동결 저장될 수 있다.

[0186]

변형 B에서, 양이온 교환 크로마토그래피 단계 107은 단계 106으로부터 조건화된 (투석된) 용출액 상에서, 용매-세정제 바이러스 비활성화 단계 105 없이 수행된다. 양이온 교환 크로마토그래피에 대한 상세는 상기에 기술된 바와 동일하다.

[0187]

도 2C에 도시된 바와 같이, 변형 C는 Poros 50HS 상에서 구배 용리를 이용한 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제, 그 이후에 온-칼럼 용매-세정제 바이러스 비활성화를 수반하는 조합이다. 이러한 변형은 놀랍게도, 정제된 ADAMTS13 단백질에서 그렇지 않으면 관찰되는 집합체를 감소시킨다. 변형 C에 이용될 수 있는 크로마토그래피 상세는 하기 표 10에 개설된다.

표 10

	완충액 부피 (CV)	완충액 조성물	유속 (cm/h)	논평
활성화	5	2 M NaCl	50	
평형	6	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	50	
산물 적하	대략 6	Capto MMC 정제의 투석된 용출액 풀	32	칼럼 적하 최대 6 mg ADAMTS13/ml 수지
세척 1	10	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	32	
세척 2	1,5	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.3% TNBP, 0.3% 0.3% Tween 80, pH 6.0 (실온)	32	
세척 3	2.1	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.3% TNBP, 0.3% 0.3% Tween 80, pH 6.0 (실온)	20	S/D 처리: S/D 화학물질과의 1시간 접촉 시간
세척 4	10	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	32	S/D 화학물질의 제거
세척 5 (완충액 A)	8	20 mM 히스티딘, 30 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.1% Tween 80, pH 7.0 (실온)	32	용리를 위한 조건화 칼럼
계단 용리	10	10 CV 내에서 100% 완충액 A에서부터 100% 완충액 B까지 구배 (20 mM 히스티딘, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.1% Tween 80, pH 7.5 (실온))	32	UV ₂₈₀ 신호가 현저하게 상승한 이후에 합동이 시작되고, 그리고 UV ₂₈₀ 신호가 피크 최대 (대략 2~3 CV)에서 UV ₂₈₀ 신호의 5% 이하로 하락한 이후에 합동이 종결된다

[0188]

변형 C에서, 적하 물질은 양이온 교환 손질 단계 104의 용출액 풀이고, 그리고 바람직하게는, 투석에 의해 또는 젤 여과에 의한 완충액 교환에 의해 달성되는 4.5 mS/cm 이하의 전도도를 갖는다. 특히, Poros S 상에서 양이온 교환 크로마토그래피는 앞서 기술된 바와 같이, 크로마토그래피 칼럼 상에 고정화된 바이러스의 바이러스 비활성화를 수반하는 온-칼럼 용매-세정제 처리를 포함하도록 개조된다. 온-칼럼 바이러스 비활성화는 2°C 내지 10°C에서 용매-세정제 혼합물로 1시간 동안 세척을 포함한다. 온-칼럼 처리후, 세척 완충액은 용리에 앞서 용매-세정제 화학물질을 효과적으로 씻어내기 위하여 교체된다.

[0189]

용리는 200 mM NaCl로 계단 용리에서 구배 용리로 변경되는데, 이는 특히, 용리 피크의 하향 부분에서 ADAMTS13의 단량체와 소중합체 종의 분리를 용이하게 하는 것으로 생각된다. 집합체는 후기 용리 분획에서 제거되고, 따라서 정제된 ADAMTS13 단백질에서 그렇지 않으면 관찰되는 집합체가 더욱 제거된다. 단량체 ADAMTS13 단백질을 안정화시키는 추가 개조로서, 용리 완충액에서 Tween 80의 농도는 세척 완충액 및 용리 완충액에서 0.05%에서 0.1%로 증가된다. 이것은 Poros S 수지로부터 ADAMTS13의 용리 동안 집합체의 형성을 더욱 예방하는 것으로 생각된다. 온-칼럼 용매-세정제 처리에 의한 바이러스 비활성화를 비롯하여, Poros S 상에서 크로마토그래피 절차의 상세는 하기 표 10에서 개설된다.

[0190]

도 2D에 도시된 바와 같이, 변형 D는 대조로서 기능한다. 변형 D에서, 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 손질 단계 107은 Poros 50 HS 상에서, 구배 용리 및 용리 완충액에서 증가된 Tween 80으로 다시 한 번 수행되지만 용매-세정제 처리에 의한 온-칼럼 바이러스 비활성화가 수행되지 않는다. 바이러스 비활성화 용매-세정제 처리 단계 105는 양이온 교환에 앞서, 농축된 수화물 상에서 대체 수행된다. 크로마토그래피 상세는 하기 표 11에서 제시된다.

표 11

	완충액 부피 (CV)	완충액 조성물	유속 (cm/h)	논평
활성화	5	2 M NaCl	50	
평형	6	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	50	
산물 적하	대략 6	Capto MMC 정제의 투석된 용출액 풀	32	칼럼 적하 최대 6 mg ADAMTS13/ml 수지
세척 1	10	20 mM MES 산, 30 mM NaCl, pH 6.0 (실온)	32	
세척 2 (완충액 A)	10	20 mM 히스티딘, 30 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.1% Tween 80, pH 7.0 (실온)	32	용리를 위한 조건화 칼럼
계단 용리	10	10 CV 내에서 100% 완충액 A에서부터 100% 완충액 B까지 구배 (20 mM 히스티딘, 300 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.1% Tween 80, pH 7.5 (실온))	32	UV ₂₈₀ 신호가 현저하게 상승한 이후에 합동이 시작되고, 그리고 UV ₂₈₀ 신호가 피크 최대 (대략 2-3 CV)에서 UV ₂₈₀ 신호의 5% 이하로 하락한 이후에 합동이 종결된다

[0192]

[0193] 변형 D에서, 적하 물질은 양이온 교환 손질 단계 104의 용출액 풀이고, 그리고 바람직하게는, 투석에 의해 또는 겔 여과에 의한 완충액 교환에 의해 달성되는 4.5 mS/cm 이하의 전도도를 갖는다. Poros S 상에서 양이온 교환 크로마토그래피 단계 107은 다시 한 번, 앞서 기술된 바와 같이 계단 용리 대신에 구배 용리, 그리고 세척 완충액 및 용리 완충액에서 0.1% Tween 80을 이용한다. Poros S 상에서 구배 용리를 이용한 크로마토그래피 절차의 상세는 상기 표 11에서 개설된다.

[0194]

실시예 3

[0195]

100 ℓ 빌효기 규모를 이용한 실험실 규모에서 실험은 양이온 교환 크로마토그래피 단계 107의 성과에 대한 이러한 절차의 잠재적 영향을 결정하기 위하여 온-칼럼 용매-세정제 바이러스 비활성화로 수행되었다. 획득된 데이터는 표 12에 제시된다.

표 12

샘플	용매-세정제 절차	Poros S* 수율		비활성	CHO HCP 불순물		집합체		
		A13 Ag %	A13 Frets 단위 %		단위/mg A13 Ag	ng CHO HCP/단위 A13 Ag	다합체 %	이합체 %	단량체 %
1	Poros S 상에서 크로마토그래피 직전에 용매-세정제 처리 (변형 A)	99	100	696	0.49	346	9.7	7.0	83.3
2	용매/세정제 처리 없음 (변형 B)	133	154	894	0.58	519	1.3	4.6	94.1
3	칼럼 (Poros S) 상에서 용매-세정제 처리 (변형 C)	89	95	931	0.60	561	1.0	2.3	96.7
4		87	117	905	0.39	354	1.0	3.7	95.3
5	농축된 수화물에서 용매-세정제 처리 (변형 D)	65	93	764	0.21	163	0.8	1.5	97.7
6		81	108	845	0.38	324	0.7	1.5	97.8
7		66	131	741	0.31	231	0.2	1.1	98.7

*100% 이상의 수율은 Poros 50S 상에서 크로마토그래피 적하 분획에서 검사 문제점을 반영한다.
A13 Ag: ADAMTS13 항원
A13 Frets: ADAMTS13 Frets 단위
CHO HCP: 중국 햄스터 난소 속주 세포 단백질

[0196]

표 12에 도시된 바와 같이, Poros S 상에서 양이온 교환 크로마토그래피에 앞서, 용해 상태에서 용매-세정제 처리로 바이러스 비활성화를 수행하면, 많은 양의 집합체가 형성될 수 있다 (도 2A의 변형 A 및 샘플 1). 용매-세정제 처리가 생략되고 동일한 절차가 수행되면, 집합체 형성이 현저하게 감소된다 (도 2B의 변형 B 및 샘플 2).

[0198]

온-칼럼 용매-세정제 처리를 수행하는, 다시 말하면, ADAMTS13이 수지의 표면 상에 고정화되는 동안 ADAMTS13을 용매-세정제 혼합물과 접촉시키는 경우에도 집합체의 형성이 예방될 수 있다. 이에 더하여, 형성되는 소량의 집합체는 후기 용리 분획에서 구배 용리에 의해 더욱 제거될 수 있다 (도 2C의 변형 C; 샘플 3과 4).

[0199]

비교를 위하여, 용해 상태에서 표준 용매-세정제 처리가 수행되고, 정제 과정, 그 이후에 Poros S 상에서 용매-세정제 처리 없는 양이온 교환 크로마토그래피가 직전 뿐만 아니라 온-칼럼에서도 수행되지 않는다 (도 2D의 변형 D, 샘플 5, 6, 그리고 7). 이러한 절차 역시 낮은 함량의 집합체를 갖는 ADAMTS13을 생산할 수 있다.

[0200]

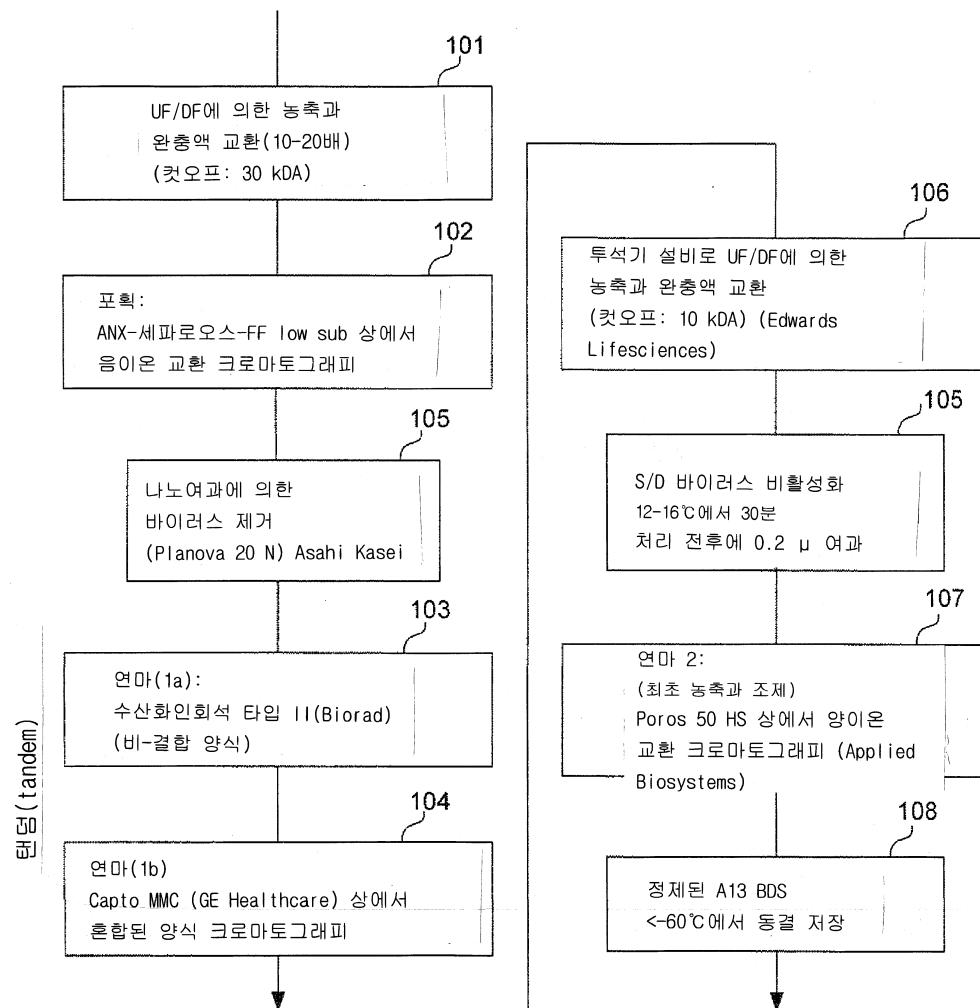
본 명세서에서 인용되는 모든 특허 및 특허 공개는 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0201]

상기 설명을 살펴본 이후에, 당업자는 일정한 변형과 개선을 구상할 것이다. 이와 같은 모든 변형과 개선은 간결함 및 가독성의 이유로 본 명세서에서 생략되지만 적절하게는, 하기 특허청구범위의 범위 내에 있는 것으로 이해되어야 한다.

도면

도면1



도면2

