(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0027136
(43) 공개일자 2016년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/36 (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01) *C07K 1/30* (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01) *C07K 16/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/36 (2013.01)
B01D 15/363 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7002716
(22) 출원일자(국제) 2014년07월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년01월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/063939
(87) 국제공개번호 WO 2015/000886
국제공개일자 2015년01월08일
(30) 우선권주장
13174521.8 2013년07월01일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
체에스엘 베링 아게
스위스 베른 3014 방크도르프슈트라쎄 10
(72) 발명자
엘 메냐위 이브라힘
스위스 체하-3008 베른 슐로쓰슈트라쎄 117
지게문트 도렌
스위스 체하-4912 아르방겐 할덴슈트라쎄 48
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **방법**

(57) 요 약

본 발명은 생성물의 품질을 손상시키지 않으면서 출발 물질 1리터당 IgG의 수율을 개선시키는, IgG의 정제를 위한 변형된 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C07K 1/18 (2013.01)
C07K 1/30 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
C07K 16/06 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

IgG, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 용액으로부터 정제 과정에서 IgG의 수율을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은

(a) IgG, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 산성 용액을 3.5 내지 5.2의 pH 및 적어도 10g/l의 총 단백질 농도로 제공하는 단계

(b) 1.5mS/cm 미만의 전도도를 유지하면서, 상기 용액을 pH 5.2 내지 6.2로 조정하는 단계;

(c) 상기 용액을 적어도 15분 동안 항온처리하는 단계; 및

(d) 모든 침전물을 제거하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 IgG를 포함하는 용액이 혈장 유래 항체를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 IgG를 포함하는 용액이 사람 혈장 또는 사람 저온침전물-결핍 혈장(human cryo-poor plasma)의 에탄올 분획화에 의해 수득되는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 IgG를 포함하는 용액이 옥탄산 침전으로부터의 상청액인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서의 용액이 한외정용여과(ultradiafiltration)에 의해 정화되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서의 용액의 pH가 3.9 내지 5.0, 바람직하게는 3.9 내지 4.6, 가장 바람직하게는 3.9 내지 4.3인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서의 단백질 농도가 10 내지 50g/l, 바람직하게는 20 내지 25g/l인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 pH가 pH 5.6 내지 6.0, 바람직하게는 5.8 내지 6.0으로 조정되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 pH 조정이 카복실 그룹의 존재 또는 부재 하에 적어도 하나의 다중-하이드록실화된 아민 화합물의 첨가에 의해 수행되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 전도도가 250mM 초과, 바람직하게는 500mM 초과, 더 바람직하게는 750mM 초과, 가장 바람직하게는 대략 1M 농도의 트리스에 의해 조정되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 전도도가 1.0mS/cm 미만, 바람직하게는 0.8mS/cm 미만, 더 바람직하게는 0.2 내지 0.5mS/cm인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서의 pH가 pH 5.6 내지 6.0으로 조정되고 상기 전도도가 0.2 내지 0.5mS/cm인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서의 항온처리 시간이 72시간 이하, 48시간 이하, 24시간 이하, 바람직하게는 12시간 이하, 더 바람직하게는 6시간 이하, 가장 바람직하게는 15분 내지 90분인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서의 항온처리가 주위 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (d)에서의 침전물이 심층 여과(depth filtration)에 의해 제거되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (d) 후, 이온 교환 크로마토그래피 단계가 수지에 오염물질이 결합될 수 있지만 IgG는 결합되지 않는 조건 하에 수행되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피가 음이온 교환 크로마토그래피인, 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피가 상기 용액의 전도도를 추가로 조정하지 않고 수행되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 불활성화 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 바이러스 불활성화 단계가 낮은 pH 처리인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 낮은 pH 처리가 단계 (a) 전에 수행되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IgG의 정제를 위한 개선된 방법에 관한 것이다. 특히, 개선된 방법은 이전 방법보다 더 높은 수율을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 익히 알려진 바와 같이, 면역글로불린은 포유동물의 면역계에서 중요한 역할을 한다. 면역글로불린은 혈장, 림프 및 기타 신체 분비물에서 발견되는 B-림프구에 의해 생성된다. 면역글로불린은 사람에서 혈장 단백질 중 대략 20%를 구성한다. 면역글로불린의 기본 단위는 디설파이드 결합에 의해 연결된 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 함유하는 헤테로테트라머이다. 이들 쇄 각각은 이의 N-말단에 위치하면서 항원 결합 부위를 형성하는 가변 영역, 및 면역글로불린의 효과기 기능을 담당하는 불변 영역을 갖는다.

[0003] 생화학적 및 생리학적 특성이 상이한 5가지 주요 부류의 면역글로불린이 있다: IgG (γ 중쇄), IgA (α), IgM (μ), IgD (δ) 및 IgE (ε). 사람 IgG는 혈장에서 가장 풍부한 면역글로불린인 반면, IgA는 외부 분비물, 예를 들면, 타액, 누액 및 기도 및 장관의 점액에서의 주요 항체 부류이다. IgM은 단연코 사람 순환계에서 물리적으로 가장 큰 항체이며, 통상적으로 기본 면역글로불린 단위의 5량체로서 존재하며, 감염 과정에서 초기에 출연한다.

[0004] 초기에, 사람 혈장 기원 IgG 제제는 다양한 감염 질환의 예방 및 치료에 성공적으로 사용되었다. 초기 제품은 비교적 조악한 방법(에탄올 분획법)에 의해 생산되었으며 상기 IgG 제제가 근육내로만 투여될 수 있을 정도로 불순물 및 응집체를 함유했다. 정제 방법의 개선은 이의 개선된 순도 및 품질로 인해 정맥내 투여에 적합한 IgG 제제(IVIG로 불림), 및 또한 개발된 피하 투여용 제제(SCIG로 불림)로 이어졌다.

[0005] 혈장으로부터 IgG를 정제하는데 통상적으로 사용된 산업적 방법은 콘(Cohn)에 의해 고안된 최초 방법을 토대로 하며(참조: Cohn E., et al., (1946), J Am Chem Soc, 68, 459-475, Oncley et al., (1949), J Am Chem Soc, 71, 541-550), 상기 방법은 역사가 1940대로 거슬로 올라가며, 혈장 단백질의 차가운 분획화 침전에 의존한다. 이온 강도, pH 및 온도의 조절된 조건 하에 에탄올의 점진적인 부가 후, 이러한 혈장 분획화 방법에 의해 풍부하거나 농축된 치료적으로 유용한 혈장 단백질(응고 인자, 알부민, 면역글로불린, 항트롬빈 III) 분획을 얻는다. 콘 분획화를 적용하여, 변형된 에탄올 분획화 방법을 개발한 키스틀러(Kistler) 및 니트슈만(Nitschmann)에 따라 분획 II + III, I+II+III 또는 상응하는 침전물 A(NA 침전물로 불림)로부터 IgG를 수득한다(참조: Kistler P and Nitschmann HS, (1952), Vox Sang, 7, 414-424).

[0006] 1960년대에, 짧은 지방산(C6-C12)이 α- 및 β-글로불린과 불용성 복합체를 형성하는 반면, γ-글로불린은 쉽게 침전되지 않는 것으로 나타났다(참조: Chanutin et al., (1960) Arch. Biochem. Biophys. 89; 218).

[0007] 슈타인부흐(Steinbuch) 및 오드란(Audran)(참조: (1969) Arch. Biochem. Biophys. 134, 279-294)은 침전제로서 카프릴레이트(즉, C8-포화된 지방산인, 옥타노에이트)를 사용한 IgG의 정제 방법을 기재하였다. 비-면역글로불린은 4.8의 최종 pH에 도달하도록 아세테이트 완충제에 의한 희석 후 사람 혈장으로부터 침전되었다. 격렬한 교반하에 카프릴레이트의 첨가 후, IgG 풍부 용액이 수득되었다. 순도 및 수율은 카프릴산의 양, pH, 완충제의 몰농도 및 희석 인자에 의존적이었다.

[0008] 광범위한 비-면역글로불린 침전은 약간 산성인 pH, 그러나 pH 4.5 이상에서 최고로 얻어졌다. 혈장을 0.06M 아세테이트 완충제, pH 4.8을 사용하여 2:1로 희석한 후 2.5중량% 카프릴레이트로 처리하여 침전을 개시했다. DEAE-셀룰로스 위의 상청액의 배치 흡착을 사용하여 단리된 IgG 분획으로부터 추가의 불순물을 정화시켰다. 슈타인부흐 등에 의한 이후 연구는 콘 에탄올 분획 III에 존재하는 (면역글로불린 이외의) 대부분의 단백질 및 지질단백질을 침전시키기 위해 카프릴산을 사용함을 보여주었다(참조: Steinbuch et al., (1973), Prep. Biochem. 3, 363-373).

[0009] 동일한 방법이 2.16중량% 카프릴레이트를 사용하여 희석된 사람 혈장에 적용되었다(참조: Habeeb et al., (1984) Prep. Biochem. 14, 1-17). 하비브(Habeeb) 등은 DEAE 셀룰로스상의 분획화에 의한 카프릴산 침전을 따랐다. 수득된 혈장-유래 IgG는 본질적으로 응집체, 플라스민 및 플라스미노겐이 없었다. 또한, 수득된 IgG는 항보체 활성이 낮고 저장 동안 비교적 안정했다. 따라서, 카프릴레이트 침전 단계는 매우 유용한 것으로 인식되었고 혈장으로부터 IgG 생산을 위한 다수의 최신 방법에 도입되었다.

[0010] 알코올, PEG 및 카프릴산 분획화 방법 이외에, 몇몇 크로마토그래피 방법이 IVIG의 정제를 위한 기본적인 분획화 방법과 함께 사용되었다.

[0011] 대부분의 통상적으로 사용되는 크로마토그래피 방법은 단백질 및 이온 교환 매체 둘 모두에 대한 표면 분포 및 전하 밀도를 이용하는 이온 교환 크로마토그래피이다. 음이온 교환 수지는 양으로 하전된 표면을 나타낸다. 전하 밀도는 수지에 따라 특이적이고 일반적으로 (수지의 작용 범위 내에서) pH와 독립적이다. 전형적인 음이온 교환기는 순 음전하를 갖는 단백질과 결합할 것이다(즉, 용액의 pH가 단백질의 등전점을 상회하는 경우). 사실상, 단백질의 표면은 단일의 전하를 나타내지 않으며; 그보다는 양전하와 음전하, 그리고 중성 영역의 모자

이크이다. 표면 구조는 주어진 단백질에 따라 특이적이며 용액 조건, 예를 들면, 이온 강도 및 pH에 의해 영향을 받을 것이다. 이러한 독특함은 개별 단백질이 음이온 교환 수지와 결합하고 이로부터 방출되는 특유의 조건을 확립하는데 활용될 수 있다. 이들 조건들을 확립함으로써, 표면 또는 전하 특성이 단지 약간 다른 단백질을 높은 수율(>95%)로 효율적으로 분리할 수 있다.

[0012] 크로마토그래피 수지 지지체의 구조에서의 개선은 대규모 크로마토그래피를 위해 더 통상적인 정제 방법에 대한 실제적인 대안을 만들었다. 고정된 수지는 다용량을 신속하게(<5시간) 처리할 수 있게 하고, 고 리간드 밀도는 다용량 처리에 필요한 수용력을 증가시킨다. 고수율, 고 생성물 순도 및 방법 단순성과 결합된 이들 인자들은 대규모 제조에서의 크로마토그래피의 사용에 유리하다.

[0013] 특히, 양이온 및/또는 음이온 교환 크로마토그래피는, 때때로 독립적인 단계들로 또는 연속적으로 조합되어, 혈장 또는 이의 분획으로부터 IgG를 정제하는데 사용되었다(예를 들면, WO 99/64462에 기재된 바와 같음). 대부분의 방법에서, 음이온 교환 크로마토그래피는 음성 방식으로 사용되며, 즉, 오염 단백질, 예를 들면, IgA, IgM, 알부민, 피브리노겐, 트랜스페린과 결합할 수 있게 하는 조건이 사용되는 반면, IgG는 비-흡착된 분획에서 회수된다.

[0014] IgG의 정제를 위해 카프릴레이트 침전법에 뒤이은 이온-교환 크로마토그래피의 조합은 다수의 공보에 기재되었다. 슈타인부흐 및 오드란(참조: (1969) Arch Biochem Biophys 134, 279-284)은 DEAE-셀룰로스에 의한 카프릴레이트의 침전 후 IgG의 추가 정제를 기재하였다. 레빙(Lebing) 등(US 5,886,157)은 IgM, IgA, 알부민 및 기타 불순물의 제거를 위해 연속적으로 사용된 2개의 음이온-교환 컬럼을 기재하였다. 레빙 등은 카프릴레이트 매개된 효과들, 즉, 침전, 이에 의한 바이러스 분배를 사용하여 비-IgG 단백질의 필수적인 감소, 및 독립적인 항온처리 단계에서 지방산의 외피보유 바이러스 불활성화 특성 둘 모두를 조합했다. pH 4.2에서 IgG 함유 페이스트/침전물의 재구성으로부터 출발하는 소위 "pH-스윙(pH-swing)"의 중요성, 및 pH 5.2로 조정할 때 차후의 카프릴레이트 첨가는 IgG 농축 절차에 필수적인 것으로 강조되며, 따라서 비-IgG 단백질을 효과적으로 감소시키는 것이 필요하다. IgA 및 IgM과 같이 몇몇 다른 불순물 뿐만 아니라 카프릴레이트는 상기 언급된 이온 교환 크로마토그래피 단계들에 의해 차후에 감소되었다.

[0015] 미국 특허 제5,164,487호는 응집체, 혈관작용 물질 및 단백질분해 효소가 없는 정맥내 허용되는 IgG 제제의 제조를 위한 카프릴산의 사용에 관한 것이다. 상기 방법은 이온 교환 또는 소수성 매트릭스를 사용한 크로마토그래피 정제 전에 IgG를 함유하는 출발 물질을 0.4% 내지 1.5% 카프릴산과 접촉시킴을 포함한다.

[0016] 정제 방법에서의 지속적인 개선으로 인해, 수년간 IgG 제품에 진화가 있었다. 상기 언급된 바와 같이, 첫 번째 IgG 제품은 단지 근육내 사용에 적합했으며, 그 이유는 상기 제품이 정맥내로 투여될 때 너무 많은 유해 사례를 유발했기 때문이다. 정맥내 사용에 적합한 제1 세대 IgG 제품(IVIG)은 출발 물질(콘 분획 II)의 펩신 절단에 의해 제조되었으며, 절단의 목적은, 심각한 유해 사례, 예를 들면, 보체 활성화를 유발하고 초기 제품이 정맥내로 투여되는 것을 불가능하게 만들었던 면역글로불린 응집체를 제거하기 위한 것이다. 컬럼 크로마토그래피 단계는 상기 방법에 포함되지 않았다. 상기 제품은 적당한 기간 동안 안정하게 유지시키기 위해 동결-건조시켜야 했고 사용 직전 용해시켰다.

[0017] 낮은 항보체 활성 및 고 안정성을 갖는 제2 세대의 비절단 및 비변형 면역글로불린 분자를 토대로 하는 IVIG가 1980년대 중반에 도입되었지만, 여전히 동결-건조된 제품 형태였다. 이러한 IVIG는 몇몇 크로마토그래피 단계들을 포함하는 공정에 의해 정제되었다. 펩신 절단을 피하고, 응집체 및 입자들을 침전으로 제거하고, 추가 정제는 컬럼 크로마토그래피 이온 교환 방법에 의해 달성되었다.

[0018] 제3 세대의 IVIG의 경우, 전용의 바이러스 불활성화 단계들이 공정에 포함되었다. 특히 정제 공정에서의 침전 단계는 다수의 바이러스를 제거하였지만, 그럼에도 불구하고 혈액 제제로 처리된 몇몇 환자들은 HIV에 감염되었고, 이는 이들 제품으로부터 바이러스를 불활성화시키고 제거하기 위한 추가의 전용 단계들의 채택을 필요로 하게 하였다.

[0019] 상기 방법들은, 안정한 액체 제품이 이용가능하게 제작될 수 있게 하기 위해, 단백질의 우수한 순도 및 품질을 달성하고 이들 제품의 환자에 대한 안전성 및 내약성을 개선시키기 위해 계속해서 추가로 정제되었다. 또한, 피하 제형이 개발되었다.

[0020] IgG 제품은 현재 다수의 임상 분야에 사용된다. 원발성 또는 후천성 면역결핍 및 감염 질환의 치료를 위한 전통적인 용도 이외에, 이들 제품은 또한 자가면역 질환 및 특정 신경계 장애, 예를 들면, CIDP의 치료에 효과적인 것으로 나타났다. 또한, IgG 제제의 추가의 치료적 사용에 초점을 둔 연구의 수가 현저하게 증가하였다.

따라서, IgG 제품의 수요가 증가하였다. 현재 IgG 제품은 세계 시장에서 가장 수요가 많은 혈장 제품이며; 2008년에는 시장이 대략 82 메트릭 톤(미국에서의 37톤, 유럽에서의 21톤 그리고 아시아에서의 17톤 포함)에 도달했으며, 매년 대략 7%의 속도로 성장하는 경향을 나타냈다(2013년의 예측 수요는 110 메트릭 톤이다)(참조: The Worldwide Plasma Fractions Market 2008. The Marketing Research Bureau, Inc. April 2010 Edition). 사람 혈장은 귀중하고, 제한된 공급원이기 때문에, 혈장으로부터 IgG의 정제 방법은 제품의 품질을 손상시키지 않으면서 현재 가능한 수율보다 더 높은 수율을 달성하도록 추가로 개선될 필요가 있다. 현재 방법은 혈장 1리터당 3.7 내지 4.2g IgG의 평균 수율을 가지며, 이는 혈장에 존재하는 IgG 중 최대 55%만을 나타낸다.

발명의 내용

[0021] 본 발명은 생성물의 품질을 손상시키지 않으면서 출발 용액(바람직하게는 혈장) 1리터당 IgG의 수율을 개선시키는, IgG 및 기타 단백질을 포함하는 혈장 또는 기타 용액으로부터 IgG의 정제를 위한 변형된 방법에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 제1 측면은 IgG, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 용액으로부터의 정제 공정에서 IgG의 수율을 증가시키는 방법이며, 상기 방법은

[0023] (a) IgG, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 산성 용액을 3.5 내지 5.2의 pH 및 적어도 10g/l의 총 단백질 농도로 제공하는 단계

[0024] (b) 1.5mS/cm 미만의 전도도를 유지하면서, 상기 용액을 pH 5.2 내지 6.2로 조정하는 단계;

[0025] (c) 상기 용액을 적어도 15분 동안 항온처리하는 단계; 및

[0026] (d) 모든 침전물을 제거하는 단계

[0027] 를 포함한다.

[0028] 바람직하게는, IgG를 포함하는 용액은 혈장-유도된 항체를 포함하고, 더 바람직하게는, IgG를 포함하는 용액은 사람 혈장 또는 사람 저온침전물-결핍 혈장(human cryo-poor plasma)의 에탄올 분획화에 의해 수득된다. 본 발명의 또 다른 바람직한 양태에서, IgG를 포함하는 용액은 옥탄산 침전으로부터의 상청액이다.

[0029] 전형적으로, 단계 (a)의 용액은 한외정용여과(ultradiafiltration)에 의해 정화되었다. 바람직하게는, 단계 (a)의 용액의 pH는 3.9 내지 5.0, 더 바람직하게는 3.9 내지 4.6, 더욱 더 바람직하게는 3.9 내지 4.3이다. 바람직하게는, 단계 (a)의 단백질 농도는 10 내지 50g/l, 더 바람직하게는 20 내지 25g/l이다.

[0030] 단계 (b)에서, pH는 pH 5.2 내지 6.2, 바람직하게는 pH 5.6 내지 6.0, 더 바람직하게는 pH 5.8 내지 6.0으로 조정된다. 바람직하게는, 단계 (b)의 pH 조정은 적어도 하나의 다중-하이드록실화된 아민 화합물의 첨가에 의해 수행된다. 바람직하게는, pH 조정은 250mM 초과, 더 바람직하게는 500mM 초과, 더욱 더 바람직하게는 750mM 초과, 가장 바람직하게는 대략 1M의 농도에서의 트리스에 의해 수행된다. 바람직하게는, pH 조정은 적어도 15분의 기간에 걸쳐 수행된다. 단계 (b)의 전도도는 1.5mS/cm 미만, 바람직하게는 1.2mS/cm 미만, 더 바람직하게는 1.0mS/cm 미만, 더욱 더 바람직하게는 0.8mS/cm 미만, 가장 바람직하게는 0.2 내지 0.5mS/cm이다. 가장 바람직하게는, 단계 (b)의 pH는 pH 5.6 내지 6.0으로 조정되고, 전도도는 0.2 내지 0.5mS/cm이다.

[0031] 단계 (c)의 항온처리 시간은 72시간 이하, 48시간 이하, 24시간 이하, 바람직하게는 12시간 이하, 더 바람직하게는 6시간 이하, 가장 바람직하게는 15분 내지 90분이다. 바람직하게는, 단계 (c)의 항온처리는 주위 온도에서 수행된다.

[0032] 단계 (d)의 침전물은 바람직하게는 심층 여과(depth filtration)에 의해 제거된다. 침전물을 제거하는 다른 방법, 예를 들면, 다른 여과법 또는 원심분리도 가능하다.

[0033] 단계 (d) 후, 크로마토그래피 방법과 같은 추가의 정제 단계, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피가 수행될 수 있다. 바람직하게는, 이온 교환 크로마토그래피 단계는 수지에 오염물질이 결합될 수 있지만 IgG는 결합되지 않는 조건 하에 수행된다. 바람직하게는, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피이다. 바람직하게는, 이온 교환 크로마토그래피는 용액의 전도도의 추가 조정 없이 수행된다.

[0034] 상기 방법은 추가로 바이러스 불활성화 단계를 포함할 것이다. 바람직하게는, 바이러스 불활성화 단계는 낮은 pH 처리이다. 바람직하게는, 바이러스 불활성화를 위한 낮은 pH 처리는 단계 (a) 이전에 수행된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명은 IgG 항체, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 출발 용액, 바람직하게는 현재 방법의 중간체로부터 정제 공정에서 IgG의 수율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은

[0036] (a) IgG, 기타 면역글로불린 및/또는 기타 단백질 오염물질을 포함하는 산성 용액을 3.5 내지 5.2, 바람직하게는 4.0 내지 5.0, 더 바람직하게는 4.6 내지 4.8의 pH, 및 적어도 10g/l, 바람직하게는 약 10 내지 50g/l, 더 바람직하게는 약 10 내지 40g/l, 더욱 더 바람직하게는 15 내지 30g/l, 가장 바람직하게는 20 내지 25g/l의 총 단백질 농도로 제공하는 단계

[0037] 를 포함한다.

[0038] IgG 포함 조성물은 임의의 물질일 수 있고, 바람직하게는 IgG를 함유하는 생물학적 유체이다. 바람직하게는, IgG 포함 조성물은 혈액, 혈장 또는 혈청이거나 이들로부터 유래한다. 그러나, 다른 IgG 함유 출발 물질이 본 발명에 또한 사용될 수 있다. 예를 들면, IgG는 또한 다른 생물학적 유체, 예를 들면, 세포 배양물 상청액으로부터 본 발명의 방법을 사용하여 농축될 수 있다.

[0039] IgG 포함 조성물은 페이스트 또는 침전물 용액, 바람직하게는 냉각 에탄올 분획화 방법으로부터의 분획, 예를 들면, 콘/온클레이(Oncley) 등 또는 이의 변형에 기재된 (FII+III), (F I+II+II) 또는 FIII, 또는 키스틀러 및 니트슈만 방법 또는 이의 변형에 기재된 침전물 A(PPT-A), 침전물 B(PPT-B) 및 침전물 G(PPT-G)일 수 있다.

[0040] 그러나, 바람직하게는, IgG 포함 용액은 상기 기재된 에탄올 분획, 또는 임의의 IgG 함유 중간체로부터 출발하여 옥탄산-, 폴리에틸렌 글리콜- 및/또는 황산암모늄 침전을 사용하는 IgG의 정제 동안 수득된 중간 침전물 용액 또는 중간 용액이다. 혈장 분획으로부터 출발하는 경우, 옥탄산 침전이 IgG가 풍부한 중간체를 생성하기 위한 바람직한 방법이다. 옥탄산을 중간 용액, 예를 들면, 가용화된 에탄올 침전물에, 슈타인부흐 및 오드란(참조: (1969) Arch. Biochem. Biophys. 134, 279-294)에 의해 기재된 바와 같이 대략 5%(w/w)의 최종 농도로 첨가할 수 있다. 고농도의 옥탄산도 사용될 수 있다. 옥탄산은 한정된 조건, 예를 들면, pH, 전도도 및 항온처리 시간하에 주위 온도에서 서서히 첨가되어야 한다. 고농도의 옥탄산이 사용되는 경우, 인산칼슘도 또한 첨가될 수 있으며, 추가의 항온처리 기간이 뒤따른다. 오염 단백질, 지질 및 카프릴레이트의 침전물이 형성되고, 반면 대부분의 면역글로불린, 특히 IgG는 용액에 남는다. 침전된 단백질, 지질 및 카프릴레이트는 주위 온도(예를 들면, 18℃ 내지 26℃)에서 여과에 의해 제거될 수 있다. 예를 들면, 여과 보조제의 존재 하의 심층 여과가 사용될 수 있다(예를 들면, 규조토를 사용함, 그러나 다른 여과 보조제가 사용될 수 있다). 용액은 정상 흐름 여과를 사용하여 여과될 수 있다. 그러나, 침전물을 제거하고 용액을 정화하는 다른 방법도 예상된다. 이어서, 정화된 용액은 pH, 전도도 및 단백질 농도를 조정하기 위해 정용여과(diafiltration)/한외여과에 적용될 수 있다.

[0041] 바람직하게는 출발 용액은 이미 면역글로불린이 풍부한 중간 용액이고 상기 기재된 산성 조건에서 혈장 또는 혈장 분획으로부터 IgG의 정제 공정 동안 한외여과/정용여과에 의해 정화된다.

[0042] 침전물이 출발 물질로 사용되는 경우, IgG는 침전물을 완충제에 몇 시간 동안 재현탁시켜 침전물(공정 분획 또는 부 분획(side fraction))로부터 추출될 수 있다. 바람직하게는, 가용화는 1 내지 15mS/cm, 더 바람직하게는 5 내지 15mS/cm의 전도도를 갖는 용액을 사용하여 수행된다. 가용화에 사용되는 용액의 pH는 3.5 내지 6, 바람직하게는 4.0 내지 5.5, 더 바람직하게는 4.5 내지 5.2, 가장 바람직하게는 대략 4.8이다. 예를 들면, 가용화는 pH 4.8의 0.2M 아세테이트를 사용하여 수행될 수 있다. 그러나, 숙련가는 추가의 적합한 완충제를 식별할 수 있을 것이다. 완충제와 침전물의 비는 약 1:5 내지 1:10일 수 있지만, 다른 비가 또한 사용될 수 있다. 가용화는 적합한 혼합기를 사용하여 강한 진탕하에 적어도 2시간, 바람직하게는 적어도 4시간 동안 수행된다.

[0043] 본 발명의 방법의 다음 단계에서, 단계 (a)의 용액의 pH는 약 5.2 내지 6.2, 바람직하게는 5.4 내지 6.0, 더 바람직하게는 5.6 내지 6.0, 더욱 더 바람직하게는 5.7 내지 5.9, 가장 바람직하게는 대략 5.8로 추가로 조정된다. pH에 의존적인 이 용액의 전도도는 1.5mS/cm 미만, 예를 들면, 0.2 내지 1.5mS/cm, 바람직하게는 1.0mS/cm 미만, 예를 들면, 0.2 내지 1.0mS/cm, 더욱 더 바람직하게는 0.8mS/cm 미만, 예를 들면, 0.2 내지 0.8mS/cm, 또는 심지어 0.5mS/cm 미만, 가장 바람직하게는 0.2 내지 0.5mS/cm이다.

[0044] 바람직하게는 pH 및 전도도를 조정하는데 사용된 시약은 아민 화합물, 바람직하게는 다중-하이드록실화된 아민 화합물, 예를 들면, 2-아미노-1-에탄올(C_2H_7NO), 비스(하이드록시에틸)-아민($C_4H_{11}NO_2$), 트리스(2-하이드록시에틸)아민($C_6H_{15}NO_3$), 바람직하게는 (비스(2-하이드록시에틸)-아미노-트리스(하이드록시메

틸)-메탄)($C_8H_{19}NO_5$), N,N 비스(2-하이드록시에틸)글리신($C_6H_{13}NO_4$), 1,3-비스(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)프로판($C_{11}H_{26}N_2O_6$), 가장 바람직하게는 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-디올($C_4H_{11}NO_3$)(트리스 염기)이거나 이들을 포함한다.

[0045] 본 발명자는 유리하게도, 카복실 그룹의 존재 또는 부재하에 다중-하이드록실화된 아민 화합물을 사용하면 제2 pH 조정(IgG의 안정화) 동안 IgG의 손실을 적게 유도한다는 것을 발견하였다. 단백질 오염물질은 침전되고, 한편 전도도는 원하는 값, 예를 들면, 0.2 내지 0.5mS/cm에서 여전히 일정하다.

[0046] 단계 (c)에서, 이러한 IgG-포함 용액은 이후 적합한 혼합기를 사용한 격렬한 혼합하에 적어도 15분 동안 항온처리된다. 숙련가는 이 단계에 필요한 시간을 혼합에 사용되는 방법에 따라 조정할 수 있을 것이다. 항온처리 시간은 72시간 이하, 바람직하게는 48시간 이하, 더 바람직하게는 12 내지 24시간, 가장 바람직하게는 15분 내지 12시간일 수 있다. 그러나, 다른 항온처리 시간도 사용될 수 있으며; 숙련가는 더 긴 항온처리 시간을 위해, 더 낮은 온도, 예를 들면, 4 내지 8℃를 사용하는 것이 필요할 수 있으며, 반면, 더 짧은 항온처리 시간을 위해, 주위 온도가 선택될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다.

[0047] 단계 (d)에서, 단계 (c)의 pH-전환(pH-shift) 동안 형성된 침전된 단백질을, 예를 들면, 주위 온도(예를 들면, 18 내지 26℃)에서 심층 여과에 의해 제거한다. 심층 여과는 숙련가에게 공지된 여과 보조제의 첨가를 필요로 한다. 용액을 정상 흐름 여과를 사용하여 여과할 수 있다. 그러나, 침전된 단백질을 제거하기 위한 다른 방법, 예를 들면, 다른 여과 방법, 원심분리도 사용될 수 있다. 숙련가는 침전물을 제거하는 다른 적합한 방법을 잘 알고 있다. 이 단계는 IgM 및 IgA의 상당한 감소를 초래한다.

[0048] 이어서, 정화된 용액은 IgG를 추가로 정제하기 위해 처리될 수 있다. 한가지 바람직한 옵션은 이 용액을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 것이다. 바람직하게는, 상기 용액을, 남아있는 IgA, IgM 및 다른 오염물질은 결합되지만, IgG는 통과액에 잔류하는 조건 하에 음이온 교환기 위로 로딩한다. 바람직하게는, 정화된 용액을 컬럼 위로 직접 로딩할 수 있다. 유리하게는, pH 또는 전도도를 조정할 필요가 없다.

[0049] 이 단계에 사용된 음이온 교환기는 강 음이온 교환기 또는 약 음이온 교환기일 수 있다. 바람직하게는, 음이온 교환기는 음이온 교환 리간드, 예를 들면, 4급 암모늄, 4급 아미노에틸, 디에틸아미노에틸, 트리메틸아미노에틸 또는 디메틸아미노에틸을 포함한다. 더 바람직하게는, 음이온 교환기는 DEAE 세파로즈(Sepharose) FF, Q-세파로즈(HP 및 FF), ANX 세파로즈 FF(저치환된 및 고치환된), 캡토(Capto) Q, 캡토 Q XP, 캡토 DEAE, 소스(Source) 30 Q 및 15 Q, 가장 바람직하게는 프랙토겔(Fractogel) DEAE 및 MPHQ로부터 선택된다.

[0050] 상기 언급된 바와 같이, 로딩은 바람직하게는 남아있는 IgA, IgM 및 다른 오염물질이 음이온 교환기에 결합될 수 있는 조건하에 수행된다. 전형적으로, 음이온 교환기는 사용전, 종종 2가지 완충계(평형 완충제 1 및 2)로 평형화되며, 여기서 평형 완충제 2는 로딩 전에 사용된다. 평형 완충제는 사용된 음이온 교환기에 맞춰진 통상의 완충계이다. 평형 완충제 1의 전도도는 10 내지 20mS/cm, 더 바람직하게는 11 내지 15mS/cm이다. pH는 7 내지 8, 더 바람직하게는 7.1 내지 7.5이다. 적합한 완충제의 예는 포스페이트 또는 아세테이트 완충제 또는 이들의 배합물이다. 바람직하게는, 완충제는 포스페이트-믹스(일염기성 및 이염기성)이다.

[0051] 본 방법에 포함될 수 있는 추가의 단계들은 바이러스 불활성화/제거 단계들, 예를 들면, 나노여과, 용매/세제 처리, 낮은 pH 처리 또는 저온살균이다. 숙련가는 적합한 바이러스 불활성화 및 제거 방법을 잘 알고 있을 것이다. 이들 단계들은 본 방법의 임의의 적합한 단계에 포함될 수 있다.

[0052] 전형적으로, 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 안정화제가 첨가될 수 있다.

[0053] 본 발명의 방법이 성공적으로 시행되는 공정의 하나의 특히 바람직한 예는 냉각 에탄올 분획화를 포함하고 키스틀러 및 니트슈만에 따르는 염기 분획화의 중간체인 침전물 A, 또는 콘 등에 따라 수득된 침전물 II+III (PPT II+III) 및/또는 키스틀러-콘 방법의 변형에 따라 수득된 침전물 I+II+III 중 어느 하나를 사용하는 공정이다.

[0054] 생산 중간체는 하기 단계들에 의해 본질적으로 처리된다:

[0055] (1) 옥탄산(OA) 분획화,

[0056] (2) 낮은 pH 항온처리,

[0057] (3) pH-전환 및 심층 여과,

[0058] (4) 음이온 교환 크로마토그래피,

[0059] (5) 바이러스 여과, 및

[0060] (6) 한외여과/정용여과에 의한 농축

[0061] 본 발명에 따르는 방법 변경은

[0062] (i) 심층 여과 전에 pH의 변화(pH-전환)를 통한 예비-정제. 이 단계는 대부분의 IgA 및 IgM을 침전시키고 폴리싱(polishing) 크로마토그래피 단계 전에 IgG의 공침전을 최소화하기 위해 매우 낮은 전도도에서 수행된다;

[0063] (ii) 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 위한 완충계의 변경

[0064] 중 하나 이상을 포함한다.

[0065] 유리하게는, pH 전환은 (바람직하게는) 용액의 전도도를 증가시키지 않는 트리스 완충제를 사용하여 수행되며; 따라서 심층 여과후 생성된 여액은, 예를 들면, 포스페이트 완충제로 적절하게 평형화된 음이온 교환 컬럼 위로 직접 로딩할 수 있다. 낮은 전도도는 이 단계에서 IgG의 침전을 감소시키는데 중요하다.

[0066] 상기 방법의 두 변형 모두를 사용하여, IgG 수율은 이들 변형이 없는 동일한 방법과 비교하여 적어도 5% 증가한다.

[0067] 실시예

[0068] 본 발명은 이제 예시될 것이다. 본 실시예는 예시되지만, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 하기 도면을 참고한다:

[0069] 도 1: 단백질 수율 (밝은 회색 막대) 및 IgG 수율(검은색 막대)에 대한 단계 (b)의 pH 조정의 효과를 도시하는 막대 다이아그램(bar diagram).

[0070] 도 2: 3가지 상이한 출발 물질: (a) 회수된 혈장 유래 출발 물질 NA PPT, (b) 공급원 혈장 유래 출발 물질 NA PPT, (c) 공급원 혈장 유래 PPT II+III에 대해 IgG 수율(검은색 막대) 또는 손실(회색 막대)에 대한 pH 5.8로의 pH 전환에 사용된 트리스의 농도의 효과를 도시하는 막대 다이아그램.

[0071] 실시예 1

[0072] (a) 슈타인부흐 및 오드란에 따르는 선행 기술 방법(참조: (1969) Arch. Biochem. Biophys. 134, 279-294).

[0073] 동결 NA 침전물(PPT) 1부를 적절한 양의 아세트산나트륨 완충제에 재현탁시키고, NA PPT 현탁액을, pH가 4.8로 일정하게 유지되면서 대부분의 IgG가 주위 온도에서 용해될 때까지 몇 시간 동안 교반시켰다.

[0074] 현탁액에 옥탄산(OA)을 첨가하여 탈지를 수행하고 이후 240분 동안 항온처리했다. 이어서 인산칼슘을 첨가하고 현탁액을 추가로 60분 내지 90분 동안 교반시켰다. 침전된 단백질, 지질 또는 지질 단백질 복합체 및 이들 조건 하에 침전된 기타 오염물질을 여과에 의해 제거했다.

[0075] OA-여액을 한외여과에 적용하여 단백질 농도가 3%에 도달했고, 이어서 주사용 수(Water for Injection: WFI)에 대해 정용여과를 수행했다. 정용여과 동안 pH는 0.2mol/L HCl에 의해 계속해서 pH 4.1 쪽으로 전환되었다. 정용여과 후, 단백질 용액을 WFI로 희석하여 20g/L 단백질이 되었고, pH는 pH 4.0 ± 0.1로 조정되었고 23.5mg/kg 폴리소르베이트 80(P80)을 첨가했다. 여과 및 여과후 세척 후, pH 4.0 항온처리를 약 20g/L의 단백질 농도에서 37℃에서 몇 시간 동안 수행했다. 이어서, pH 4-항온처리된 물질을 실온으로 냉각시켰다.

[0076] NaOH를 사용하여 pH를 pH 6.5로 증가시키고 이어서 약 90분 동안 항온처리했다. pH 조정 및 항온처리는 침전에 의해 상당한 부분의 IgA 및 IgM을 제거시켰다. 침전된 불순물을 여과에 의해 제거했다. 전도도의 조정 후, 투명한 용액을 인라인 여과하고 컬럼에 적용하였으며, 상기 컬럼은 10mM 아세트산나트륨, pH 6.5로 컨디셔닝(conditioning)되고 평형화되었으며, 강 음이온 교환기(Macroprep High Performance; MPHQ)로 채워졌다. 주어진 조건 하에, 남아있는 IgA 및 IgM 뿐만 아니라 기타 단백질 불순물은 음이온 교환 (AIEX) 수지에 결합하였고, 반면 IgG는 통과액 및 세척 분획에서 발견되었다. 수집 동안, IgG를 함유하는 AIEX 통과액 및 세척액의 pH를 pH 4.8 ± 0.1로 낮추고 이 pH를 유지했다.

[0077] 바이러스 제거는 0.1μm 예비-여과에 이어서 인라인 나노여과에 의해 달성되었다. 바이러스 여액을 폴리에테르 설폰 막을 사용하여 2 내지 3% 단백질이 되도록 농축시키고 WFI에 대해 정용여과했다. 정용여과 동안, pH는 계속해서 pH 4.1 쪽으로 전환되었다. 그 뒤에, 용액을 단백질 함량이 105 내지 135g/L가 되도록 농축시켰다. 약물 물질을 1리터당 100g IgG가 되도록 희석하고, 250mmol/L L-프롤린(최종 농도)으로 안정화시키고 pH를 4.80

± 0.10에서 유지시켰다. 제형화된 벌크는 0.2㎛ 막 필터를 통해 여과된 입자였다.

[0078] (b) pH 전환 및 크로마토그래피 완충계의 최적화를 포함하는 변형된 방법

[0079] (a)에 기재된 방법은 pH-전환 단계 및 본 발명에 따르는 크로마토그래피를 위한 완충계의 최적화의 실행에 의해 변형되었다.

[0080] NA PPT는 OA 침전 및 낮은 pH 바이러스 불활성화를 포함하여 상기 기재된 바와 같이 처리되었다.

[0081] 이어서 낮은 pH 4 항온처리된 용액의 pH는 1M 트리스 완충제를 사용하여 pH 5.8로 조정되었다. pH 조정을 90분의 시간에 걸쳐 수행하였고 이어서 주위 온도에서 90분 동안 항온처리하였다. 이어서 형성된 침전물을 여과에 의해 제거했다. pH 및 전도도는 예를 들면, 대략 5.8의 pH 및 대략 0.2 내지 0.5mS/cm의 전도도에서 제1항의 단계 (b)에 기재된 바와 같이 일정하게 유지되었다.

[0082] 포스페이트 완충제(0.12M 포스페이트, pH 7.3 ± 0.2)를 사용하는 컨디셔닝, 및 (5mM 포스페이트+10mM 아세테이트, pH 6.0 ± 0.1)을 사용하는 평형화 후, 강 음이온 교환기(Macroprep High Performance; MPHQ)로 채워진 크로마토그래피 컬럼에 70 내지 130cm/h의 선형 유동에서 수지 1리터당 ≤ 180g 단백질을 로딩했다. 주어진 조건하에 남아있는 IgA 및 IgM 뿐만 아니라 기타 단백질 불순물은 음이온 교환 (AIEX) 수지에 결합하였고, 반면 IgG는 통과액 및 세척 분획에서 발견되었다. 수집 동안, IgG를 함유하는 AIEX 통과액 및 세척액의 pH를 pH 4.8 ± 0.1로 낮추고 이 pH로 유지했다.

[0083] 하기 단계들은 (a)에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0084] 수율 비교(현재 방법 대 변형된 방법)

[0085] 동일한 출발 중간체로부터의 단백질 수율에 대한 2가지 방법의 비교는 표 1 내지 3에 나타난다. 낮은 pH 항온처리(pH 4) 후 IgG 수율을 100%로 설정했다.

표 1

선행 기술 방법과 변형된 방법간의 비교 - 회수된 혈장으로부터 생성된 출발 물질 NA

단계	선행 기술 방법	변형된 방법
혈장 상당량 (L)	11195	239.6
낮은 pH 항온처리 후		
단백질 수율 (%)	100	100
pH-전환 및 여과 후		
단백질 수율 (%)	90.7	94.5
크로마토그래피 후		
단백질 수율 (%)	78	84
벌크 형성 후		
단백질 수율 (%)	77.6	83.3

[0086]

표 2

선행 기술 방법과 변형된 방법간의 비교 - 공급원 혈장으로부터 생성된 출발 물질 NA

단계	선행 기술 방법	변형된 방법
혈장 상당량 (L)	13196	300.66
낮은 pH 항온처리 후		
단백질 수율 (%)	100	100
pH-전환 및 여과 후		
단백질 수율 (%)	91	96
크로마토그래피 후		
단백질 수율 (%)	78	84
벌크 형성 후		
단백질 수율 (%)	77	83

[0087]

표 3

선행 기술 방법과 변형된 방법간의 비교 - 공급원 혈장으로부터 생성된 출발 물질 PPTII+III

단계	현재 방법	변형된 방법
혈장 상당량 (L)	13494	304.2
낮은 pH 항온처리 후		
단백질 수율 (%)	100	100
pH-전환 및 여과 후		
단백질 수율 (%)	96	100
크로마토그래피 후		
단백질 수율 (%)	80	85
벌크 형성 후		
단백질 수율 (%)	79	84

[0088]

[0089] 방법의 변화 및 수율 증가의 결과로서 생성물 순도에서의 유의미한 변화가 일어나지 않았음을 보여주었다.

[0090] 실시예 2

[0091] 이 실시예는 6.5의 현재 pH-전환과 비교하여 IgG 수율에 대한 트리스 완충제를 사용하는 상이한 pH-조정의 영향을 입증한다.

[0092] 실시예 1에 기재된 바와 같이 PPT-NA로부터 출발하여, 낮은 pH 4 항온처리된 용액을 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 각각 1kg 8 분획을 취하고 1M 트리스 완충제를 사용하여 pH 5.2; 5.4; 5.6; 5.8; 6.0; 6.2; 6.4으로 조정했다. 마지막 분획의 pH를 현재 방법에 따라서 0.2M NaOH를 사용하여 조정했다. pH 조정을 90분의 기간에 걸쳐 수행하고 이어서 상기 기재된 바와 같이 주위 온도에서 90분간 항온처리했다. 이어서 형성된 침전물을 여과에 의해 제거했다. 이어서 여액을 실시예 1(b)에서 기재된 바와 같이 AIEX 컬럼 위로 로딩했다. 상이하게 로딩된 용액의 단백질 및 IgG-수율을 비교했다. 결과는 도 1에서 보여준다. IgG 수율에 대해, 실시예 1(a)에 기재된 선행 기술 방법에 사용된 0.2M NaOH와 비교하여 상이한 pH-전환에서의 1M 트리스 완충제의 영향은, 1M 트리스 완충제를 사용한 pH-전환(pH: 5.2 내지 6.2)이 증가할수록 IgG 수율의 손실이 최소화됨을 나타낸다.

[0093] 실시예 3

[0094] 이 실시예는 5.8로의 원하는 pH-전환에 사용된 트리스 완충제의 농도의 영향을 보여준다. 낮은 pH 4 항온처리된 용액으로부터 출발하여, pH를 각각 1M; 0.5M 및 0.25M 트리스 완충제를 사용하여 pH 4로부터 5.8까지 전환시켰다.

[0095] 상기 결과는 도 2에 도시된다. 출발 물질(공급원 PPT-II+III, NA 또는 회수된 NA)과 무관하게, IgG 손실은 사용된 트리스 완충제의 몰농도가 증가함에 따라 감소했다.

[0096] 실시예 4

[0097] 이 실시예는 IgG 수율에 대한, 단계 (b)에서 pH의 조정에 사용된 상이한 시약들(아민 화합물, 바람직하게는 다중-하이드록실화된 아민 화합물 포함)의 영향을 입증한다.

[0098] 하기 시약이 사용되었다: 2-아미노-1-에탄올 (C2H7NO), 비스(하이드록시에틸)-아민(C4H11NO2), 트리스(2-하이드록시에틸)아민(C6H15NO3), 바람직하게는 비스(2-하이드록시에틸)-아미노-트리스(하이드록시메틸)-메탄(C8H19NO5), N,N 비스(2-하이드록시에틸)글리신(C6H13NO4), 1,3-비스(트리스(하이드록시메틸)메틸아미노)프로판(C11H26N2O6), 2-아미노-2-하이드록시메틸-프로판-1,3-디올(C4H11NO3)(트리스 염기), 뿐만 아니라 이들 시약의 배합물.

[0099] 실시예 1에 기재된 PPT-NA로부터 출발하여, 낮은 pH 4 항온처리된 용액을 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 각각 1kg 8 분획을 취하고 상기 기재된 시약의 1M 용액을 사용하여 pH를 5.75 내지 5.85로 조정했다. 마지막 분획의 pH를 현재 방법에 따라서 0.2M NaOH를 사용하여 조정했다. pH 조정을 90분의 기간에 걸쳐 수행하고 이어서 상기 기재된 바와 같이 주위 온도에서 90분간 항온처리했다. 이어서 형성된 침전물을 여과에 의해 제거했다. 상이한 여액의 IgG-수율을 비교했다.

[0100] 상기 결과는 표 4에서 보여준다. 상기 결과는 IgG 수율에 대해, 선행 기술 방법에 사용된 0.2M NaOH를 사용하는 것과 비교하여 단계 (b)에서의 pH-전환을 위해 상이한 시약(1M 용액으로서)을 사용하는 것의 영향을 보여준다. 상기 결과는 상이한 아민 화합물에 의해 IgG 수율이 선행 기술 방법과 비교하여 증가함을 나타낸다. 다중-하이드록실화된 아민 화합물을 사용하는 것이 특히 유리하다.

표 4

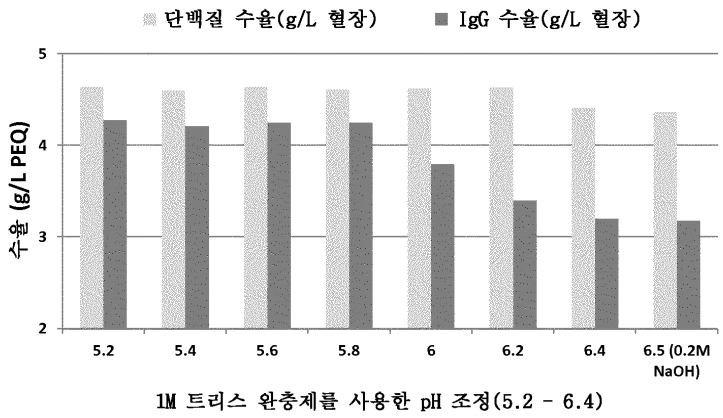
선행 기술 방법과 비교하여 상이한 중화 시약을 사용하는 변형된 방법과 선행 기술 방법간의 비교 - 공급원 혈장으로부터 생성된 출발 물질 NA

단계	선행 기술 방법 IgG 수율 (%)	변형된 방법 IgG 수율 (%)
낮은 pH 항온처리 후	100	100
하기를 사용한 pH-전환 및 여과 후		
0.2M NaOH	91	-
트리스	-	95.5
모노에탄올 아민	-	94.1
디에탄올아민	-	95
트리에탄올 아민	-	92.8
비스 트리스 메탄	-	95.2
비스 트리스 프로판	-	92.5
N,N 비스(2-하이드록시에틸) 글리신 + 모노에탄올 아민	-	98.8

[0101]

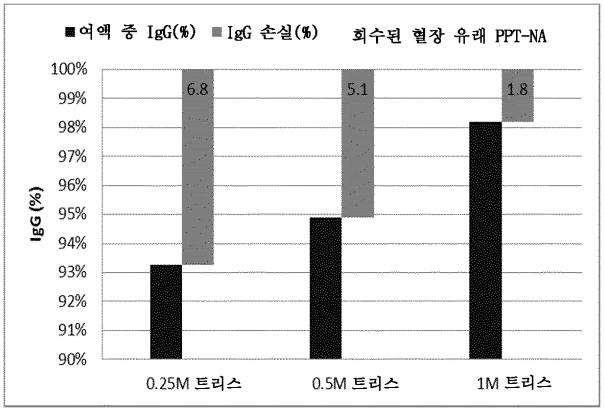
도면

도면1

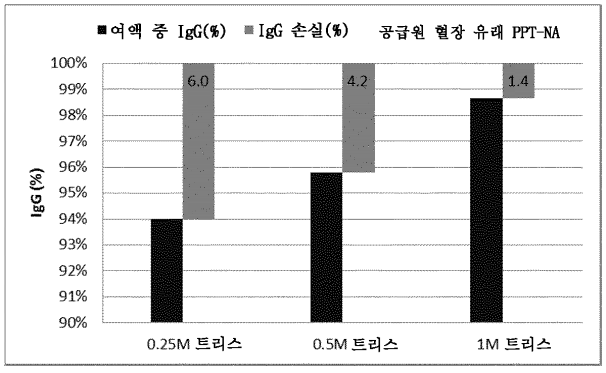


1M 트리스 완충제를 사용한 pH 조정(5.2 - 6.4)

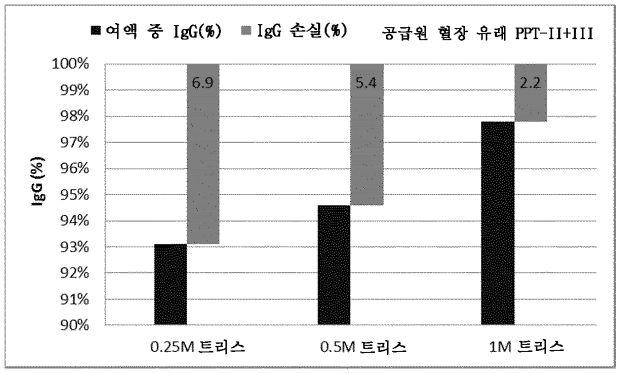
도면2a



도면2b



도면2c


여액 중 IgG(%)
IgG 손실(%)
공급원 혈장 유래 PPT-II+III
100%
99%
98%
97%
96%
95%
94%
93%
92%
91%
90%
IgG (%)
6.9
5.4
2.2
0.25M 트리스
0.5M 트리스
1M 트리스