



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0084431
 (43) 공개일자 2017년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/30 (2006.01) *A61K 38/36* (2006.01)
B01J 20/08 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01) *C07K 14/75* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 1/30 (2013.01)
A61K 38/363 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0003475
 (22) 출원일자 2016년01월12일
 심사청구일자 2016년01월12일

(71) 출원인
주식회사 녹십자홀딩스
 경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107 (보정동)

(72) 발명자
김준식
 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

김효진
 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **피브리노겐의 정제방법**

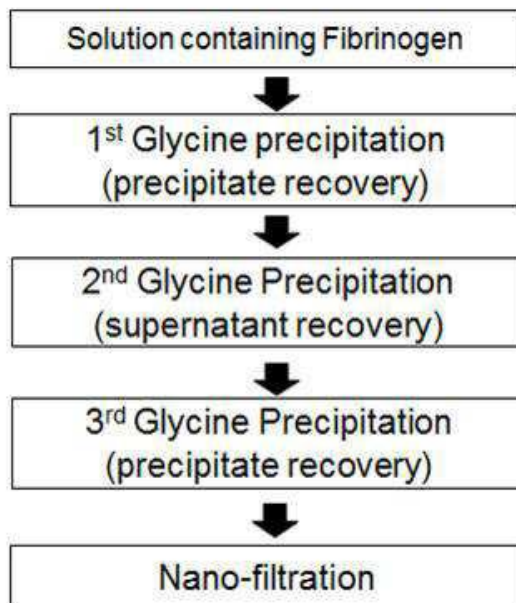
(57) 요약

본 발명은 피브리노겐의 정제방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는

(a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



(b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));

(c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및

(d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계;

를 포함하는 피브리노겐의 정제방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 피브리노겐 단백질의 새로운 정제방법은 병원성 동물 유래 성분(바이러스)의 유입이 원천적으로 차단되어 안전성이 우수한 방법이며, 간단한 공정으로 회수율이 높은 고순도의 피브리노겐 단백질을 정제할 수 있으므로 매우 경제적이고 효율적일 뿐 아니라, 기존의 방법으로 정제된 피브리노겐에 비해 순도가 높아 국소작용력이 증가하는 장점이 있어, 혈액 관련 질환, 특히 혈액응고 질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

B01J 20/08 (2013.01)

C07K 1/34 (2013.01)

C07K 1/36 (2013.01)

C07K 14/75 (2013.01)

손재운

경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

신용원

경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

(72) 발명자

박지윤

경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

이주호

경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107 (보정동)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 피브리노겐의 정제방법:

- (a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));
- (b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));
- (c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및
- (d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, (b) 단계 및 (d) 단계에서의 침전물의 용해화를 위해 사용되는 용해 버퍼는 pH 6 ~ 9, 10 ~ 100mM 구연산 나트륨(Sodium citrate)을 포함하는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계의 나노여과는 20 ~ 37℃ 및 0.5 ~ 2.5bar 하에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 피브리노겐을 함유하는 용액은

- (i) 피브리노겐(fibrinogen)이 함유된 저온 페이스트(cryopaste)로부터 적절한 용해 버퍼를 이용하여 용해화하는 단계;
- (ii) 상기 용해액에 흡착제를 첨가하여, 불순물을 흡착하여 제거하는 단계; 및
- (iii) 용매/세정제 처리(S/D treatment)를 통해 상기 저온 페이스트에 포함될 수 있는 바이러스를 불활성화하는 단계;

를 포함하는 공정을 통해 수득되는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 5

제4항에 있어서, (i) 단계에서의 저온 페이스트는 부피비로 1:2 ~ 1:6의 부피를 갖는 용해 버퍼를 사용하여 용해화되는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 6

제4항에 있어서, (i) 단계에서의 용해 버퍼는 20mM 구연산 나트륨(Sodium citrate), 100mM NaCl 및 100mM 글리신(Glycine)이 함유된 버퍼인 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 7

제4항에 있어서, (ii) 단계에서의 흡착제는 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide, Al(OH)₃)인 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 수산화 알루미늄은 저온 페이스트 대비 중량비로 0.05 내지 0.5로 사용되는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 (iii) 단계에서의 용매/세제(Solvent/Detergent, S/D) 처리는 비이온성 세제(non-ionic detergent) 및 TNBP(Tri-N-butyl phosphate)가 포함된 용매/세제 용액을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 비이온성 세제(non-ionic detergent)는 폴리소르베이트 80(트윈(Tween) 80), 폴리소르베이트 20(트윈(Tween) 20), 트리톤 X-100 및 트리톤 X-45 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에,
 (c') 상기 (c) 단계에서 수득된 침전물을 용해버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 (a) 단계에서의 글리신 농도와 동일하게 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(4차 글리신 침전(4th glycine precipitation));
 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

청구항 12

제1항에 있어서, (d) 단계에 따른 나노 여과(Nano-Filtration) 단계 이후에,
 (e) 한외여과/투석여과(Ultrafiltration/Diafiltration; UF/DF) 단계; 및
 (f) 제형화 공정(formulation) 단계;에서 선택된 하나 이상의 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 피브리노겐의 정제방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 피브리노겐의 정제방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는
- [0002] (a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));
- [0003] (b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));
- [0004] (c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및
- [0005] (d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계;
- [0006] 를 포함하는 피브리노겐의 정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 응고인자 I(clotting factor I)으로도 알려진, 피브리노겐(fibrinogen)은 지혈(haemostasis) 및 상처 치유에 주요한 역할을 수행한다. 피브리노겐은 340kDa의 겔보기 분자량(apparent molecular weight)으로 간에서 합성되는 당단백질이며, 이황화물 다리(disulfide bridge)로 연결된 A α , B β 및 γ 로 지칭되는 동일하지 않은 폴리펩티드 체인 3쌍으로 각각 이루어진, 두개의 이량체(dimer)로 구성된다. 이는 약 150-400 μ g/ml의 농도로 혈류 내에서 순환한다. 혈관의 손상시, 혈소판이 활성화되고 플러그(plug)가 형성된다. 피브리노겐은 활성화된 혈소판의 교차-결합(cross-linking)에 기여함으로써 일차 지혈에 관여한다.
- [0008] 동시에, 응고 캐스케이드의 활성이 개시된다. 종점으로, 트롬빈에 의한 피브리노펩티드 A 및 더 느린 속도로 피브리노펩티드 B의 단백질 가수분해성 방출에 따라 피브리노겐은 피브린으로 전환된다. 가용성 피브린 단량체는 이중 가닥의 꼬인 원섬유(fibril)로 조립된다. 후속적으로 상기 원섬유는 측방향(lateral manner)으로 배열되어, 더 두꺼운 섬유를 야기한다. 뒤이어 이 섬유는 FXIIIa에 의하여 피브린 그물망(fibrin network)으로 교차결합되어, 활성화된 혈소판과 피브린의 상호작용으로 혈소판 플러그를 안정화시켜서, 안정된 응고를 야기한다.
- [0009] 장애 및 결핍
- [0010] 선천성 섬유소원결핍혈증(Congenital afibrinogenaemia)은 환자가 피브리노겐의 부족 또는 기능 부전에 따라 불충분한 혈액 응고를 겪는, 희귀한 출혈 장애이다. 상기 질병은 경미한 외상(traumata) 후 또는 중재 시술(interventional procedure) 중에 자발적인 출혈 또는 과다 출혈로 이어질 수 있다.
- [0011] 피브리노겐의 후천성 결핍은 선천성 섬유소원결핍혈증에 비하여 훨씬 더 일반적이며, 혈액 희석(hemodilution) 또는 수술 중 실혈(blood loss), 외상, 파종성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation, DIC) 또는 패혈증과 같은 기타 현상에 의해 유도될 수 있다.
- [0012] 피브리노겐 결핍은 신선동결혈장(fresh frozen plasma) 또는 동결침전물(cryoprecipitate)의 정맥내 주입에 의한 대체요법에 의해 혈장 중 약 1.5 내지 3g/l의 정상 피브리노겐 수준으로 교정될 수 있다. 그러나, 이러한 치료는 병원균, 예를 들면 바이러스 또는 프리온을 환자에게 도입시킬 수 있고, 그에 따라 추가적인 장애를 발생시킬 수 있는 위험성을 갖는다. 따라서 안전한 방식으로 피브리노겐을 생리적 수준으로 회복시키기 위하여 바이러스가 불활성화된(virus inactivated) 피브리노겐 조성물을 정맥으로 적용하는 것이 바람직하다.

[0013] 피브리노겐 정제

- [0014] 사람 혈장은 100개 이상의 단백질과, 단백질 총량의 약 2%를 차지하는 피브리노겐의 복합 혼합물을 함유한다. 따라서, 피브리노겐의 정제 및 분리는 일반적으로 다수의 단계를 필요로 하며, 이러한 개별적 공정 단계를 위해

다양한 조합이 가능하다.

- [0015] 사람 혈장으로부터 피브리노겐 정제의 한가지 중요한 요소는 통상적으로 침전이다. 공지된 침전 방법은 글리신 또는 알라닌과 같은 아미노산(참조: EP 제0 383 234호; 국제 공개공보 WO 제01/48016호; Jakobsen & Kierulf, *Thrombosis Research*, 3:145-159, 1973), 황산암모늄(참조: 미국 특허 제5,773,033호; 미국 특허 제6,037,457호; Takeda, Y, *Journal of Clinical Investigation*, 45:103-111, 1966), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 중합체(참조: 국제 공개공보 WO 제95/25748호; Vila *et al.*, *Thrombosis Research* 39:651-656, 1985), 에탄올(참조: EP 제0 408 029호(여기서, 피브리노겐이 침전되고, 다른 혈장 단백질로부터 5% 내지 10% 에탄올을 사용하여 분리됨); Blomback & Blomback, *Arkiv For Kemi*, 10:415-443, 1956), 황산화된 다당류(PS(sulphated polysaccharide), 예를 들어, 헤파린)(참조: 국제 공개공보 WO 제99/37680호; 미국 특허 제4,210,580호) 및 낮은 이온 강도 용액(참조: 미국 특허 제4,188,318호)을 사용한다.
- [0016] 인간 피브리노겐 정제 공정에서 글리신 침전 관련 종래 기술을 살펴보면, 병원성 입자(예컨대, 바이러스) 제거용 열처리 공정(pasteurization)에서 생성된 불순물을 제거하고, 피브리노겐을 농축시키는 2단계의 글리신 침전 공정(CSL, Behring, 2009)과, 1.5 ~ 1.7M의 고농도 글리신만을 이용하여 피브리노겐 침전물을 수득하는 3단계의 글리신 침전 공정(참조: 미국 특허 제7,442,308호; Grifols, ES)이 개시된 바 있다. 그러나 상기 공정에서 사용되는 글리신의 농도보다 2 ~ 4배 낮은 농도의 글리신을 이용하여 침전 공정을 수행함으로써, 불순물과 불용해성 물질이 포함된 글리신 침전물을 제거하고 수득한 상등액을 고농도의 글리신으로 침전시키고, 상기 침전물이 용해된 피브리노겐 용해액을 나노여과 시 나노여과 효율을 향상시켜 고순도 피브리노겐의 회수율을 증가시킨다는 내용은 지금까지 보고된 바 없다.
- [0017] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 바이러스에 노출될 위험성을 예방하고, 피브리노겐의 순도 및 회수량을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과,
- [0018] (a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));
- [0019] (b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));
- [0020] (c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및
- [0021] (d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계;
- [0022] 를 통해 피브리노겐을 정제할 경우 여과 효율이 2배 이상 증가하였고, 이를 통하여 바이러스가 제거된 고순도 피브리노겐을 회수할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0023] 본 발명의 목적은 나노여과(nanofiltration)의 효율을 증가시킬 수 있는 고순도의 피브리노겐의 정제방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0025] (a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));

- [0026] (b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));
- [0027] (c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및
- [0028] (d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계;
- [0029] 를 포함하는 피브리노겐의 정제방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 피브리노겐 단백질의 새로운 정제방법은 병원성 동물 유래 성분(바이러스)의 유입이 원천적으로 차단되어 안전성이 우수한 방법이며, 간단한 공정으로 회수율이 높은 고순도의 피브리노겐 단백질을 정제할 수 있으므로 매우 경제적이고 효율적일 뿐 아니라, 기존의 방법으로 정제된 피브리노겐에 비해 순도가 높아 국소작용력이 증가하는 장점이 있어, 혈액 관련 질환, 특히 혈액응고 질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명에 따른 피브리노겐(fibrinogen)의 정제방법을 나타낸 도면.
 도 2는 본 발명에 따른 피브리노겐 정제방법을 이용한 저온 페이스트(cryopaste)로부터 피브리노겐 제품의 제형화를 위한 구체적인 제조방법을 나타낸 도면.
 도 3은 2차 글리신 침전 공정 없이 1차와 3차 글리신 침전공정만을 수행한 경우의 피브리노겐의 순도를 나타낸 도면.
 도 4는 1차 내지 3차 글리신 침전공정을 모두 수행한 경우의 피브리노겐의 순도를 나타내는 도면(20℃, 0.75M, 15mg/mL 조건).
 도 5는 1차 내지 3차 글리신 침전공정을 모두 수행한 경우의 피브리노겐의 순도를 나타내는 도면(25℃, 0.8M, 20mg/mL 조건).
 도 6은 1차 내지 3차 글리신 침전공정을 모두 수행한 경우의 피브리노겐의 순도를 나타내는 도면(15℃, 0.8M, 10mg/mL 조건).
 도 7은 1차 내지 3차 글리신 침전공정을 모두 수행한 경우의 피브리노겐의 순도를 나타내는 도면(15℃, 0.5M, 20mg/mL 조건).
 도 8은 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 공정 유무에 따른 Planova 20N filter로 여과된 피브리노겐의 양을 나타낸 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0033] 본 발명에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "공정", "정제" 또는 "분리"는 정제 공정에서 특정 결과(예컨대, 피브리노겐의 정제)를 달성하기 위한 하나 이상의 방법 또는 장치의 이용을 지칭한다.
- [0034] 본 발명의 일 양태에서,

- [0035] (a) 피브리노겐을 함유하는 용액에 포함된 피브리노겐을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시킨 다음, 상등액을 제거하고, 침전물을 수득하는 단계(1차 글리신 침전(1st glycine precipitation));
- [0036] (b) 상기 (a) 단계의 1차 글리신 침전 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 상기 용해액을 0.2 ~ 1.2M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고, 상등액(supernatant)을 회수하는 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation));
- [0037] (c) 상기 (b) 단계의 상등액을 1.5 ~ 2.5M의 글리신 농도가 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)); 및
- [0038] (d) 상기 (c) 단계의 침전물을 용해 버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 나노필터로 나노여과(nanofiltration, NF)하는 단계;
- [0039] 를 포함하는 피브리노겐의 정제방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에 따른 피브리노겐 정제 방법, 특히 통상적으로 글리신을 이용한 침전 공정에서 침전물을 수득하는 단계를 거치는 것과는 달리, 비교적 낮은 농도의 글리신을 이용한 침전 공정을 거친 후, 침전물이 아닌 상등액을 수득하고, 이를 나노여과하는 공정을 이용할 경우, 매우 높은 순도를 가지는 피브리노겐을 수득할 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 피브리노겐 정제방법을 이용할 경우, 나노필터의 여과 효율이 2배 이상 증가하여, 표 2 및 도 3 내지 도 8에 도시된 바와 같이, 98% 순도의 피브리노겐 회수율을 나타내며, 또한, 글리신의 농도를 낮게 하여 침전 공정을 수행하면 바이러스 불활성화 과정에서 생성된 불순물을 제거할 뿐만 아니라, 나노필터의 여과 효율을 증대하는 효과가 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서의 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation)에서의 글리신 농도는 1.5 ~ 2.5M, 바람직하게는 1.8 ~ 2.2M, 가장 바람직하게는 1.9 ~ 2.1M이며,
- [0042] 상기 (b) 단계(2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation)에서의 글리신 농도는 0.2 ~ 1.2M, 바람직하게는 0.3 ~ 1.1M, 가장 바람직하게는 0.5 ~ 0.9M이고,
- [0043] 상기 (c) 단계(2차 글리신 침전(3rd glycine precipitation)에서의 글리신 농도는 1.5 ~ 2.5M, 바람직하게는 1.8 ~ 2.3M, 가장 바람직하게는 1.9 ~ 2.2M이다.
- [0044] 상기 (b) 단계 및 (d) 단계에서의 침전물의 용해화를 위해 사용되는 용해 버퍼는 당업계에서 통상적으로 사용되는 용해 버퍼를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 10 ~ 100mM, 보다 바람직하게는 30 ~ 70mM의 구연산 나트륨(Sodium citrate)을 포함하며 pH가 6 ~ 9, 바람직하게는 7 ~ 8, 가장 바람직하게는 7.5인 버퍼를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 글리신 침전 및 침전물의 수득은 각 단계에 적합한 적정 농도의 글리신을 첨가하고, 4 ~ 30℃에서 200 ~ 1,000rpm으로 교반한 다음, 4 ~ 25℃에서 3,000 ~ 10,000rpm으로 원심분리하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 상기 (d) 단계에서의 나노 여과는 상용화된 나노여과(nanofiltration) 시스템을 이용하여 수행될 수 있으며, 사용될 수 있는 필터의 종류는 Pall 사의 SV4 20N와 Asahi Kasei 사의 Planova 20N 등이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 적절한 버퍼를 이용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는 10 ~ 30mM 구연산 나트륨(sodium citrate), 50 ~ 150mM NaCl, 1 ~ 7%, 바람직하게는 2 ~ 5%의 아르기닌(Arginine)을 포함하며, pH가 6 ~ 9, 바람직하게는 7 ~ 8, 가장 바람직하게는 7.2 ~ 7.8인 버퍼를 이용하여 수행되며, 20 ~ 37℃, 바람직하게는 28 ~ 35℃, 가장 바람직하게는 25 ~ 35℃, Pall 20N(SV4)을 사용할 경우 1 ~ 2bar, Planova 20N을 사용할 경우 0.5 ~ 1bar 압력 조건에서 수행되는 것을 특징으로 한다.

- [0047] 바람직하게는 상기 (a) 단계의 피브리노겐을 함유하는 용액은
- [0048] (i) 피브리노겐(fibrinogen)이 함유된 저온 페이스트(cryopaste)로부터 적절한 용해 버퍼를 이용하여 용해화하는 단계;
- [0049] (ii) 상기 용해액에 흡착제를 첨가하여, 불순물을 흡착하여 제거하는 단계; 및
- [0050] (iii) 용매/세정제 처리(S/D treatment)를 통해 상기 저온 페이스트에 포함될 수 있는 바이러스를 불활성화하는 단계;
- [0051] 를 포함하는 공정을 통해 수득될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 (i) 단계에서의 저온 페이스트는 부피비로 1:2 ~ 1:6, 바람직하게는 1:3 ~ 1:5, 가장 바람직하게는 1:4의 부피를 갖는 용해 버퍼를 사용하여 용해화될 수 있으며, 용해 버퍼는 10~30mM, 바람직하게는 20mM의 구연산 나트륨(Sodium citrate), 50~150mM, 바람직하게는 100mM NaCl, 및 50~150mM, 바람직하게는 100mM 글리신(Glycine)이 함유된 버퍼가 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 상기 (ii) 단계에서의 흡착제로는 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide, Al(OH)₃)을 사용하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 불순물이 흡착된 흡착침전물인 Al(OH)₃ 흡착 겔(Al(OH)₃ adsorption gel)을 원심분리 후 제거할 수 있다. 흡착제인 수산화 알루미늄은 1~5%, 바람직하게는 1.5~3%, 가장 바람직하게는 2% 농도로 만든 수산화 알루미늄을 사용하여 저온 페이스트 대비 중량비로 0.05 내지 0.5, 바람직하게는 0.07 내지 0.3, 가장 바람직하게는 0.9 ~ 0.15의 비율로 사용될 수 있다.
- [0054] 그리고, 상기 단계 (iii)에서의 용매/세정제 처리(S/D treatment)에 사용될 수 있는 용매 및 세정제는 바이러스, 특히 지질외피바이러스를 불활성화시킬 수 있는 특성을 가진 것이거나 제한 없이 사용 가능하다. 세정제는 비이온성 및 이온성 세정제로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있으며, 실질적으로 비변성인 것이 바람직하다. 특히, 제거의 용이성 측면에서, 비이온성 세정제가 바람직하며, 용매는 미국등록특허 제 4,764,369호에 개시된 바와 같이 트리(n-부틸)포스페이트(TNBP : Tri-n-butyl phosphate)이 가장 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 바람직하게는 상기 단계 (iii)에서의 용매/세정제 처리(S/D treatment)는 비이온성 세제(non-ionic detergent) 및 TNBP(Tri-N-butyl phosphate)가 포함된 용매/세제 용액을 이용하여 수행될 수 있는데, 본 발명을 수행하는데 특히 바람직한 바이러스-비활성화제는 폴리소르베이트 80(트윈(Tween) 80), 폴리소르베이트 20(트윈(Tween) 20), 트리톤 X-100 및 트리톤 X-45 중에서 선택되는 하나 이상과, TNBP의 혼합물이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 바람직한 용매/세정제 혼합물은 피브리노겐 함유 용액 중 TNBP 농도가 0.2 내지 0.6 중량% 이내, 바람직하게는 0.24 내지 0.36 중량%가 되도록 첨가되며, 트윈 80의 농도는 0.5 내지 1.5 중량% 범위 이내, 바람직하게는 0.8 내지 1.2 중량%의 농도가 되도록 첨가한다.
- [0057] 또한, 본 발명은 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에,
- [0058] (c') 상기 (c) 단계에서 수득된 침전물을 용해버퍼에 용해화하여 용해액을 수득하고, 이를 (a) 단계에서의 글리신 농도와 동일하게 되도록 글리신을 첨가하여 침전시키고 침전물을 수득하는 단계(4차 글리신 침전(4th glycine precipitation));
- [0059] 를 더 포함할 수 있으며,
- [0060] 선택적으로 (d) 단계에 따른 나노 여과(Nano-Filtration) 단계 이후에,
- [0061] (e) 한외여과/투석여과(Ultrafiltration/Diafiltration; UF/DF) 또는 한외여과 단계; 및/또는
- [0062] (f) 제형화 공정(formulation) 단계;를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, "한외여과(UF diafiltration)"는 표적 물질(용액)에 포함된 성분(예컨대, 입자)을 제거하거나 수득하는 기법으로 성분의 분자량(분자 크기)에 따라 분리 가능한 투과성 필터(permeable filter)를 이용하

는 것을 특징으로 하는, 표적 물질의 순도를 높이는 기법을 의미한다. 상기 (e) 단계에서의 한외여과/투석여과(Ultrafiltration/Diafiltration; UF/DF)는 통상적인 UF/DF 시스템을 이용하며, 일정 삼투압으로 변경, 버퍼의 교환 및 농도를 조절하는 것을 특징으로 한다.

[0064] "피브리노겐(fibrinogen)"이란 용어는 바람직하게는, 예를 들어, 피브리노겐을 함유하고 사람 혈액으로부터 수득된 혼합물로부터 정제될 수 있는 사람 피브리노겐을 의미한다. "혈액으로부터 수득된 혼합물"이란 용어는, 예를 들어, 전혈, 혈장, 혈장 분획 또는 혈장 침전물을 의미한다. 사람 혈장, 또는 동결침전물로부터 수득된 피브리노겐, 특히 큰 분획 I(Cohn Fraction I)로부터 수득된 피브리노겐이 바람직하다. 피브리노겐은 수집된 혈장 공여체 및 개별적 공여체 모두로부터 분리될 수 있다.

[0065] 사람 피브리노겐은 또한, 유전자전이 동물(transgenic animals)의 체액(예컨대, 밀크)(미국 특허 제5,639,940호), 또는 세포 배양물의 재조합 발현으로 수득될 수 있다(미국 특허 제6,037,457호). 아울러, 적합한 발효 상등액 또는 이로부터 생성된 분획으로부터 피브리노겐을 분리시킬 수 있다. 한편, 피브리노겐을 함유하는 동물 혈액, 바람직하게는 포유동물(예: 돼지, 말, 소, 염소, 양 및 개) 유래 혈액으로부터 피브리노겐을 분리시킬 수 있다.

[0066] 본 발명에서 불순물 또는 불용해성 단백질은 피브리노겐 이외에 혈장에 존재하거나 유전자전이 동물의 체액(예컨대, 밀크) 또는 세포 배양물 상등액에 포함되는 모든 단백질을 의미하며, 바람직하게는 피브리노겐을 분해시킬 수 있는 피브리노겐-분해 단백질, 또는 피브리노겐의 단백질 분해를 위해 먼저 활성화되는 피브리노겐-분해 단백질의 전구체(전구효소(proenzymes)), 또는 피브리노겐-분해 프로테아제의 활성화제, 및 낮은 분자량을 가지는 피브리노겐 분해 단편이 포함된다.

[0067] "피브리노겐(fibrinogen)이 함유된 저온 페이스트(cryopaste)"란 용어는 전술한 동물(바람직하게는, 인간) 유래 피브리노겐이 함유된 저온침전물(cryoprecipitate)을 의미한다.

[0068] 본 발명에서 용액(예컨대, 용해용액)의 "pH"는 물 샘플의 이온화와 관련하여 산성도 또는 알칼리도를 측정한다. 물의 pH는 중성, 즉 pH 7이다. 대부분의 pH 판독치는 0 내지 14의 범위이다. 물보다 더 높은 [H⁺]을 갖는 용액(pH 7 미만)은 산성이고, 물보다 더 낮은 [H⁺]을 갖는 용액(pH 7 초과)은 염기성 또는 알칼리성이다. pH는 pH 계측기를 이용하여 측정될 수 있다. 완충제 pH는 HCl 또는 NaOH와 같은 산 또는 염기를 사용하여 조정할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용해버퍼는 중성 pH 범위에 있는 것이 바람직하다.

[0069] 본 발명에 사용된 용어 "정제(purification)"는 "정화(clarification)"와 혼용하여 사용할 수 있으며, 침전물 등을 완충용액을 이용하여 재용해 시킨 후, 재용해된 용액 내에 포함된 불순물을 제거하는 것을 의미한다.

[0070] 본 발명의 방법으로 정제된 피브리노겐은 최소한 90%, 바람직하게는 93% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 순도를 가지며, 특히 바람직하게는 본 발명에 있어서, 제조된 피브리노겐 단백질은 순도 98% 이상의 피브리노겐 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0072] **실시예 1: 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste)의 용해 및 Al(OH)₃ 겔의 처리 공정**

[0073] 1) 4L의 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해버퍼(50mM 구연산 나트륨(sodium citrate) pH 7.5, 100mM 염화나트륨(sodium chloride, NaCl), 100mM 글리신(glycine))를 자켓 비커(jacketed beaker)에 준비한 다음, 서큘레이터(circulator)의 온도를 37°C로 조절하여 30분 이상 교반하였다. 이때, 버퍼온도가 37°C로 유지되도록 하였다.

- [0074] 2) 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 1kg을 4L 용해버퍼에 첨가한 다음(피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste):용해버퍼=1kg:4L), 교반기 속도를 150rpm으로 조절하여 37℃로 유지하며 2시간 동안 교반하였다.
- [0075] 3) 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액의 온도가 20 ~ 25℃가 되도록 조절한 다음, 1kg 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 당 150g의 수산화 알루미늄(aluminum hydroxide, Al(OH)₃)(바람직하게는 2% 수산화 알루미늄을 중량비로 0.5% 비율로 첨가)을 첨가한 다음, 교반기 속도를 150rpm으로 조절하여 20 ~ 25℃를 유지하며 1시간 동안 교반하였다.
- [0076] 4) 반응이 완료되면, 15℃를 유지하며 4000rpm으로 30분간 원심분리하였다.
- [0077] 5) 원심분리가 완료된 상등액을 Opticap XL2 Polysep II filter(Merck Millipore)로 여과하였다.

[0078] 바이러스 불활성화 공정: 용매/세제(Solvent/Detergent, S/D) 처리

- [0079] 상기 여과된 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액 1L 당 바이러스 불활성화 용액(1% Tween 80, 0.3% TNBP(Tri-N-butyl phosphate)) 55.7mL를 첨가한 다음, 25℃를 유지하며 150rpm으로 1시간 동안 교반하였다.
- [0080] 그 결과, 여과된 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액에 용매/세제(Solvent/Detergent, S/D)를 처리하여 바이러스 추정 성분이 불활성화된 용해액을 수득하였다.

[0081] **실시예 2: 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 공정**

- [0082] 1) 실시예 1에서 바이러스 추정 성분이 불활성화되고, 여과된 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액에 글리신(glycine)의 최종 농도가 1.9 ~ 2M이 되도록 칭량하여 첨가하였다. 이때, 글리신(glycine)이 첨가되고, 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액의 단백질 함유량은 20 ~ 30mg/mL이 되도록 하였다.
- [0083] 2) 교반기 속도를 300rpm으로 조절하여 4 ~ 25℃로 유지하며 90분 동안 교반하였다.
- [0084] 3) 2)의 교반된 글리신(glycine)이 첨가되고, 피브리노겐이 함유된 저온 페이스트(cryopaste) 용해액을 15℃로 유지하며 4000rpm으로 30분간 원심분리하였다.
- [0085] 4) 상등액은 제거하고, 침전물(이하 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물이라 한다)을 칭량한 다음, -70℃ 이하에서 냉동하여 보관하였다.

[0086] **실시예 3: 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 공정**

[0087] 3-1: 2차 글리신 침전 공정(20℃, 0.75M, 15mg/mL 조건)

- [0088] 1) 실시예 2의 냉동보관된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물을 용해하기 위해, 용해버퍼(dissolving buffer: 50mM 구연산 나트륨(sodium citrate), pH 7.5)를 자켓 비커(jacketed beaker)에 넣은 다음, 서클레이터(circulator)의 온도를 37℃로 조절하여 30분 이상 교반하였다. 이때, 버퍼의 온도를 37℃로 유지하였다.
- [0089] 2) 실시예 2의 냉동보관된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물을 상기 1)의 용해버퍼에 첨가한 후, 교반기 속도를 150rpm으로 조절하여 37℃를 유지하며 90분 동안 교반하였다.
- [0090] 3) 2)의 교반된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물 용해액을 Opticap XL2 Polysep II filter(Merck Millipore)로 여과하였다.
- [0091] 4) 3)의 여과된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물 용해액을 자켓 비커(jacketed beaker)에

넣은 후 서큘레이터(circulator)의 온도를 20℃로 조절하였다.

- [0092] 5) 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물 용해액이 정해진 온도에 도달하면 글리신(glycine)의 최종 농도가 0.5 ~ 0.9M이 되게 칭량하여 첨가하였다. 이때, 글리신(glycine)이 첨가된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물 용해액의 단백질 함유량이 14 ~ 15mg/mL이 되도록 하였다.
- [0093] 6) 서큘레이터(circulator)의 온도를 20℃로 유지하며, 300rpm으로 90분 동안 교반하였다.
- [0094] 7) 6)의 교반된 글리신(glycine)이 첨가된 1차 글리신 침전(1st glycine precipitation) 침전물 용해액을 15℃로 유지하며 4000rpm으로 30분간 원심분리하였다.
- [0095] 8) 7)의 침전물은 제거하고, 상등액(이하 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 상등액이라 한다)의 액량을 확인하였다.
- [0096] 3-2: 2차 글리신 침전 공정(25℃, 0.8M, 20mg/mL 조건)
- [0097] 실시예 3-1와 동일 조건으로 실험을 진행하였으며, 다만 글리신 처리 농도를 0.8M, 온도는 25℃, 처리 단백질 농도는 19 ~ 20mg/mL 조건으로 하였다.
- [0098] 3-3: 2차 글리신 침전 공정 (15℃, 0.8M, 10mg/mL 조건)
- [0099] 실시예 3-1와 동일 조건으로 실험을 진행하였으며, 다만 글리신 처리 농도를 0.8M, 온도는 15℃, 처리 단백질 농도는 9 ~ 10mg/mL 조건으로 하였다.
- [0100] 3-4: 2차 글리신 침전 공정 (15℃, 0.5M, 20mg/mL 조건)
- [0101] 실시예 3-1와 동일 조건으로 실험을 진행하였으며, 다만 글리신 처리 농도를 0.5M, 온도는 15℃, 처리 단백질 농도는 19 ~ 20mg/mL 조건으로 하였다.
- [0102] **실시예 4: 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 공정**
- [0103] 1) 서큘레이터(circulator)의 온도를 20℃로 조절하고, 실시예 3에서 수득한 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 상등액의 온도가 20℃에 도달하면 글리신(glycine)의 최종 농도가 2.1M이 되게 칭량하여 상기 상등액에 첨가하였다.
- [0104] 여기서, 비교 실험으로 실시예 2에서 얻은 1차 글라이신 침전물을 50mM 구연산 나트륨(Sodium citrate) pH7.5 버퍼 중에서 35℃에서 90분 동안 녹였다. 그 다음, 글리신의 최종 농도가 2.1M이 되게 칭량하여 용해액에 첨가하였다.
- [0105] 2) 300rpm으로 90분 동안 교반하였다.
- [0106] 3) 2)의 교반된 글리신(glycine)이 첨가된 2차 글리신 침전 상등액을 15℃로 유지하며 4000rpm으로 30분간 원심 분리하였다.
- [0107] 4) 상등액은 제거하고, 침전물(이하 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 침전물)을 수득하여 칭량한 다음, -30℃ 이하에서 냉동보관하였다.
- [0108] SEC-LC를 이용한 시료 순도 분석
- [0109] 2차 글리신 침전 공정을 수행한 3차 글리신 침전물과 2차 글리신 침전 공정을 수행하지 않은 3차 글리신 침전물의 피브리노겐 순도를 다음과 같은 시험방법으로 측정하여 비교하였다.

- [0110] a. 검액준비: 시료 농도가 2mg/mL이 되게 보정하여 LC용 바이얼(vial)에 200 μL씩 준비하였다.
- [0111] b. 시험조건: 유속은 0.5mL/min, 컬럼 온도는 RT, Injection volume은 20 μL, 분석시간은 30분, 검출 파장은 UV 280nm 및 펌프 분배는 100% Isocratic 조건에서 수행하였다.
- [0112] c. 시험과정:
- [0113] 1) Waters 사 HPLC 사용지침에 준하여 HPLC system을 준비하였다.
- [0114] 2) TSK-gel G3000SW_{XL} 컬럼 및 TSKgel SWXL guard column을 액상의 흐름방향과 일치하게 설치하였다.
- [0115] 3) 컬럼의 평형: 이동상으로 최소한 30분 이상 0.5mL/min의 속도로 흘려주어 크로마토그램상 평형이 확인되면 완료하였다.
- [0116] 4) 상기 시험조건과 동일한 방법으로 분석하였다.

[0117] 표 1은 2차 글리신 침전 처리 유무에 따른 피브리노겐의 순도를 나타낸 것이다.

[0118] 또한, 2차 글리신 침전 공정 없이 1차와 3차 글리신 침전 공정만을 수행한 결과는 도 3에 나타내었고, 1차 내지 3차 글리신 침전 공정을 모두 수행한 결과는 도 4(실시에 3-1의 조건), 도 5(실시에 3-2의 조건), 도 6(실시에 3-3의 조건) 및 도 7(실시에 3-4의 조건)에 나타내었다.

[0119] 종합하면, 표 1 및 도 3 내지 도 7에 나타난 바와 같이, 2차 글리신 침전 공정 없이 1차와 3차 글리신 침전 공정만을 수행하는 경우에 비해 1차 내지 3차 글리신 침전 공정을 모두 수행하는 경우, 침전공정의 조건에 상관 없이 최종적으로 수득된 피브리노겐의 순도가 현저하게 높게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서, 글리신의 농도를 낮게 하여 침전 공정을 수행하면 바이러스 불활성화 과정에서 생성된 불순물을 제거하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

표 1

No.	정제 방법	polymer or impurity (%)	Fibrinogen (%)	비고
1	실시에 2 & 4 수행	5.7	94.21	실시에 3 수행하지 않음
2	실시에 2, 3 & 4 수행	1.96	98.04	실시에 3-1 수행
3	실시에 2, 3 & 4 수행	1.64	98.25	실시에 3-2 수행
4	실시에 2, 3 & 4 수행	1.33	98.67	실시에 3-3 수행
5	실시에 2, 3 & 4 수행	1.77	98.23	실시에 3-4 수행

[0121] **실시에 5: 선택적인 4차 글리신 침전(4th glycine precipitation) 공정**

[0122] 상기 실시에 1 내지 4에서와 같이 1차 내지 3차 글리신 침전공정을 모두 거친 경우에 매우 향상된 고순도의 피브리노겐을 수득할 수 있음을 확인하였다. 본 실시에에서는 반드시 필요한 공정은 아니지만, 선택적으로 (optionally) 추가적인 글리신 침전 공정을 수행할 경우 보다 피브리노겐의 순도가 향상될 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0123] 1) 실시에 4의 냉동보관된 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 침전물을 용해하기 위해, 용해버퍼 (50mM 구연산 나트륨(sodium citrate) pH7.5)를 자켓 비커(jacketed beaker)에 넣은 다음, 서큘레이터(circulator)의 온도를 37°C로 조절하여 30분 이상 교반하였다.

[0124] 2) 실시에 4의 냉동보관된 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 침전물을 상기 1)의 버퍼에 첨가한 후, 교반기 속도를 290 ~ 310rpm으로 조절하여 30 ~ 35°C를 유지하며 90분 동안 교반하였다.

[0125] 3) 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 침전물 용해액의 온도가 25°C가 되도록 낮추고 글리신

(glycine)의 최종 농도가 2.1M이 되게 칭량하여 상기 용해액에 첨가하였다.

[0126] 4) 서큘레이터(circulator)로 온도를 25℃로 유지하며, 300rpm으로 90분 동안 교반하였다.

[0127] 5) 4)의 교반된 글리신(glycine)이 첨가된 3차 글리신 침전(3rd glycine precipitation) 침전물 용해액을 15℃로 유지하며 4000rpm으로 30분간 원심분리하였다.

[0128] 6) 5)의 4차 글리신 침전(4th glycine precipitation) 침전물을 수득하여 칭량한 다음, -30℃ 이하에 냉동보관하였다.

[0129] **실시예 6: 나노여과(Nano filtration) 공정에 대한 DoE 실험**

[0130] 1) 실시예 4 또는 실시예 5에서 얻은 3차 또는 4차 글리신 침전물을 250mg 이상 준비하였다.

[0131] 2) 상기 3차 또는 4차 글리신 침전물에 용해액(20mM 구연산 나트륨(sodium citrate) pH 7.5, 100mM 염화나트륨(sodium chloride, NaCl), 1 ~ 6% 아르기닌(arginine))을 첨가하고 최종 단백질 농도가 약 3mg/mL이 되게 상온(20 ~ 25℃)에서 2시간 동안 교반하여 용해하였다.

[0132] 3) 2)의 용해된 4차 글리신 침전(4th glycine precipitation) 침전물의 농도를 UV 280에서 측정된 다음, 용해액(20mM 구연산 나트륨(sodium citrate) pH 7.5, 100mM 염화나트륨(sodium chloride, NaCl), 1 ~ 6% 아르기닌(arginine))을 이용하여 0.7 ~ 3mg/mL 농도로 희석하고, UV 280에서 최종 농도를 측정하였다.

[0133] 4) 농도를 보정한 시료를 bottle top filter(0.2µm)로 여과하였다.

[0134] 5) 4)에서 여과된 시료를 Pall 100N filter(10cm² 면적)를 이용하여 상온(20 ~ 25℃), 2bar 압력하에서 여과하였다.

[0135] 6) 5)에서 여과된 시료를 다시 Pall 50N(또는 Planova 35N) filter(10cm² 면적)를 이용하여 여과하였다. 이때 여과는 상온(20 ~ 25℃) 및 2bar(Planova 35N의 경우, 1bar)하의 여과조건에서 수행되었다.

[0136] 7) 6)에서 여과된 시료를 Planova 20N(또는 SV4 20N)(10cm² 면적)로 여과하였다. 이때 여과는 25 ~ 35℃ 및 0.5 ~ 2bar(Planova 20N: 0.5 ~ 1bar; SV4 20N: 1 ~ 2bar)하의 여과조건에서 수행되었다(Nano-filtration 공정 시간: 15시간~20시간)(실시예 6을 수행한 다음, 추가 공정과정으로 UF/DF를 수행할 수 있음).

[0137] 표 2는 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 공정 유무에 따른 Planova 20N과 SV4 20N filter의 효율 및 회수율을 나타낸 것이다.

표 2

[0138]

	Planova 20N (Asahi)		Pall SV4 20N (Pall)	
	94% Purity	98% Purity	94% Purity	98% Purity
필터 효율 (g/m ²)	105.4	203.8	145.9	451.2
필터 회수율 (%)	76.1	92.3	90.5	92.1

[0139]

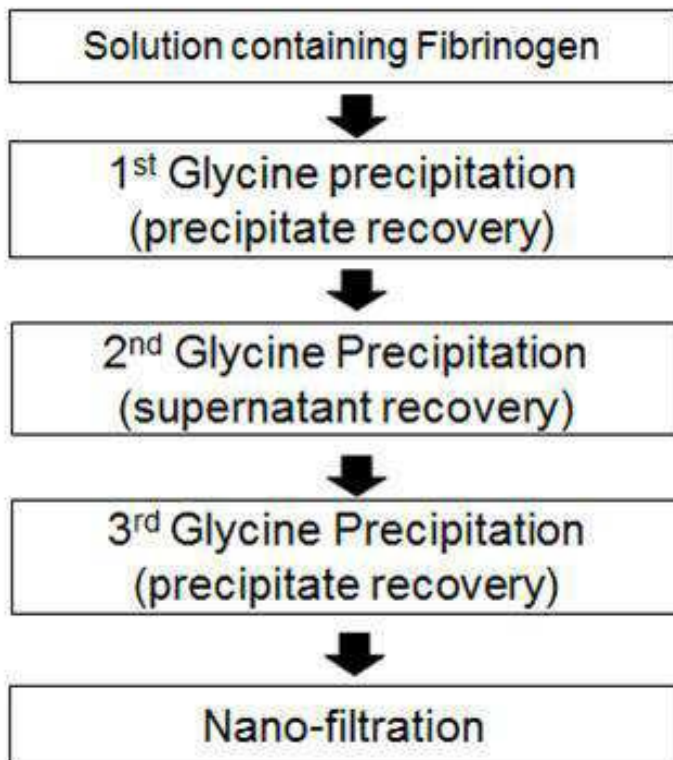
그 결과, 표 2 및 도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 3의 2차 글리신 침전(2nd glycine precipitation) 공정 유무에 따른 나노필터(Nano-filter)로 여과된 피브리노겐의 순도를 비교한 결과, 2차 글리신 침전 공정을 포함하면 98% 순도의 피브리노겐 회수율이 높은 것으로 확인되었다. 따라서, 글리신의 농도를 낮게 하여 침전 공정을 수행하면 바이러스 불활성화 과정에서 생성된 불순물을 제거할 뿐만 아니라, 나노필터의 여과 효율을 2배 이상

증대하는 효과가 있었다.

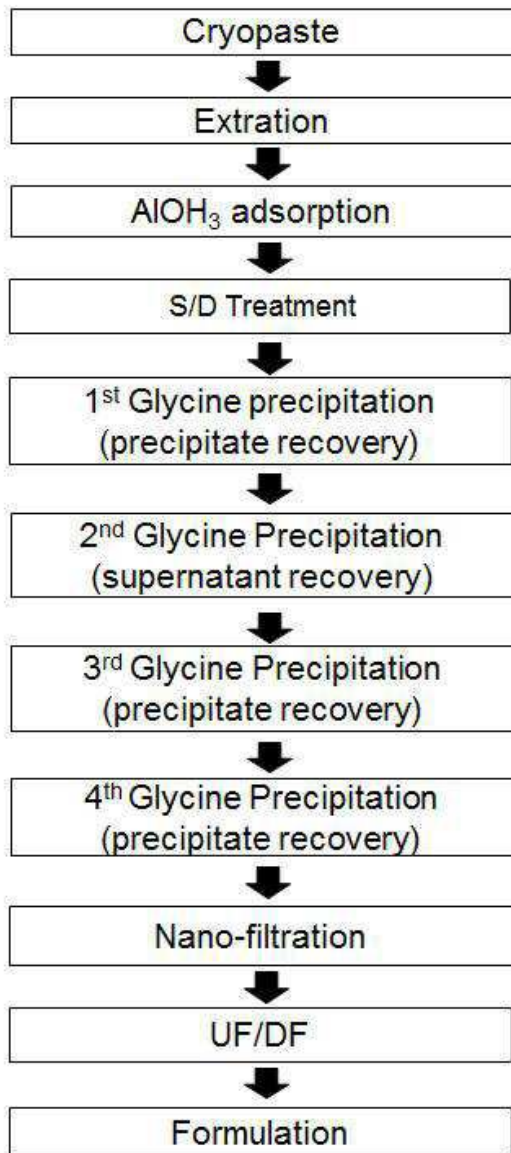
[0140] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

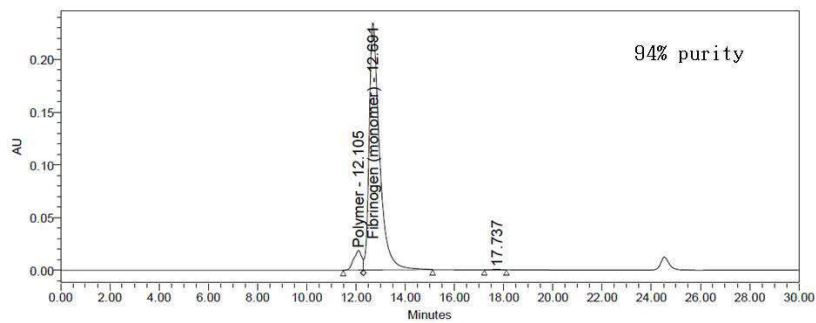
도면1



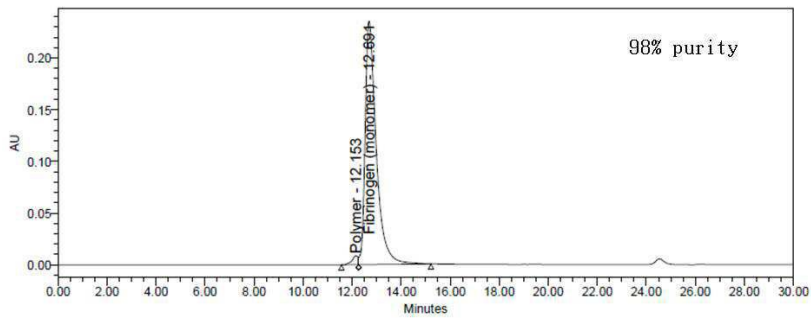
도면2



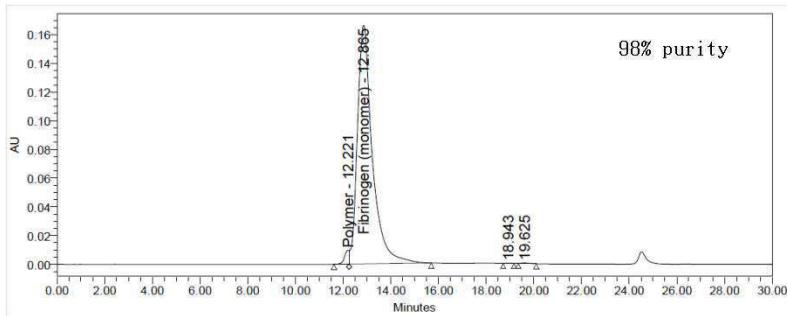
도면3



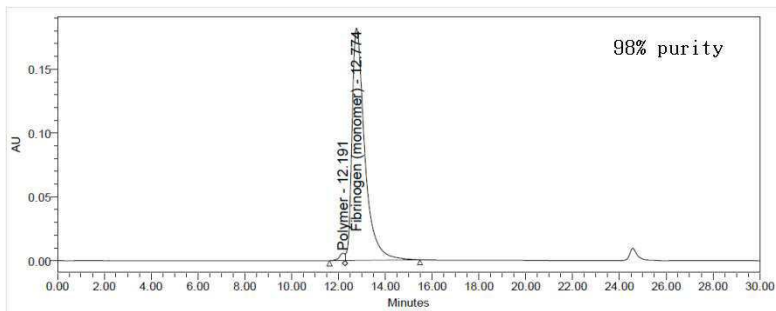
도면4



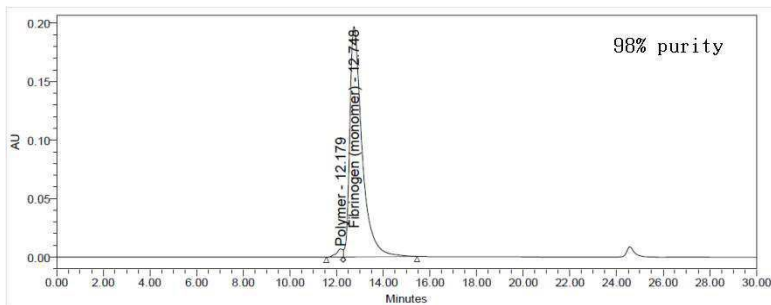
도면5



도면6



도면7



도면8

