



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월05일
(11) 등록번호 10-1150050
(24) 등록일자 2012년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/16 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7017113
(22) 출원일자(국제) 2005년02월25일
심사청구일자 2010년02월25일
(85) 번역문제출일자 2006년08월25일
(65) 공개번호 10-2007-0001968
(43) 공개일자 2007년01월04일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2005/000293
(87) 국제공개번호 WO 2005/082483
국제공개일자 2005년09월09일
(30) 우선권주장
0400501-3 2004년02월27일 스웨덴(SE)
0402558-1 2004년10월21일 스웨덴(SE)
(56) 선행기술조사문헌
J.Chem. Soc, Dalton Trans., 2001,
pp1306-1318.
W02001038227 A1

(73) 특허권자
지이 헬스케어 바이오-사이언시스 에이비
스웨덴 업살라 84, 바가탄 30 (우:에스이-751)
(72) 발명자
그웬베르크, 안나
스웨덴 업살라 84 바가탄 30 아머샴 바이오사이
언시스 에이비(우: 에스이-751)
요한손, 보-레나르트
스웨덴 업살라 84 바가탄 30 아머샴 바이오사이
언시스 에이비(우: 에스이-751)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 주성민

전체 청구항 수 : 총 25 항

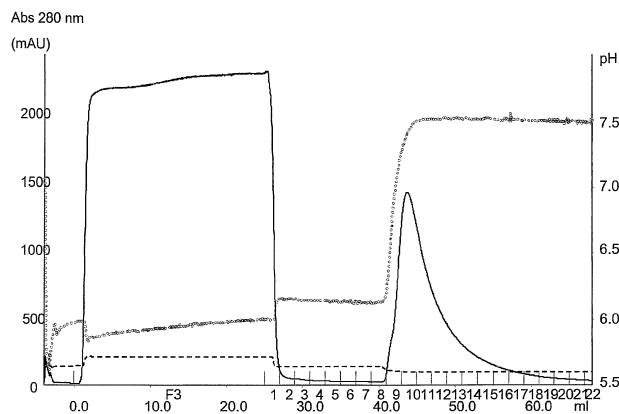
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 항체 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 액체를, 각각의 다중 양식(multi-modal) 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것인 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키는 단계, 용리액을 첨가하여 수지로부터 항체를 방출시키는 단계, 및 이로써 얻어진 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계를 포함하는, 액체 중의 하나 이상의 불순물로부터 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족의 고리 형성 원자는 C, S 및 O로 이루어진 군으로부터 선택되고, 양이온 교환기는 약한 양이온 교환제이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

요한손, 한스, 제이.

스웨덴 엽살라 84 바가탄 30 아머샴 바이오사이언
시스 에이비(우: 에스이-751)

말로이셀, 장-루

스웨덴 엽살라 84 바가탄 30 아머샴 바이오사이언
시스 에이비(우: 에스이-751)

테베닌, 니콜라스

스웨덴 엽살라 84 바가탄 30 아머샴 바이오사이언
시스 에이비(우: 에스이-751)

특허청구의 범위

청구항 1

액체를, 다중 양식(multi-modal) 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키는 것을 포함하는 방법으로, 각각의 다중 양식 리간드는 하나 이상의 양이온 교환기, 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하며, 상기 고리계의 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 액체로부터의 하나 이상의 항체의 포획 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고리 형성 원자가 탄소(C) 및 황(S) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 고리 형성 원자가 탄소(C) 원자인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 뒤이어 하나 또는 추가 정제 단계를 수행하는 방법.

청구항 5

액체를 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키고, 여기서, 각각의 다중 양식 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것이며;

용리액을 첨가하여 수지로부터 항체를 방출시키고;

이로써 얻어진 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 것

을 포함하는 액체로부터의 하나 이상의 항체의 정제 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중 양식 크로마토그래피 수지와 접촉하는 액체가 세포 배양 액체 또는 발효 브로쓰인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 다중 양식 리간드의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계의 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중 양식 리간드의 양이온 교환기가 카르복실기를 포함하는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 제 2 크로마토그래피 단계가 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC) 및 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제 2 크로마토그래피 단계가 이온 교환 크로마토그래피인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제 2 크로마토그래피 단계가 음이온 교환 크로마토그래피인 방법.

청구항 12

제5항에 있어서, 상기 제 2 크로마토그래피 단계가 다중 양식 음이온 교환 크로마토그래피인 방법.

청구항 13

제5항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 제 2 크로마토그래피 수지의 통과 유체로부터 회수되는 것인 방법.

청구항 14

제5항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 불순물 또는 양쪽 모두가 제 2 크로마토그래피 수지로부터 용리된 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 다클론 항체인 방법.

청구항 17

액체를 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키는 것을 포함하는 방법으로, 수지가 다중 양식이고 리간드가 고정화된 지지체를 포함하며, 동일하거나 상이한 리간드 상에 존재하는 양이온 교환기, 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하고, 상기 고리계의 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 액체로부터의 하나 이상의 항체의 포획 방법.

청구항 18

액체를 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키고, 여기서, 수지는 다중 양식이고 리간드가 고정화된 지지체를 포함하며, 동일하거나 상이한 리간드 상에 존재하는 양이온 교환기, 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것이며;

용리액을 첨가하여 수지로부터 항체를 방출시키고;

이로써 얻어진 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 것

을 포함하는 액체로부터의 하나 이상의 항체의 정제 방법.

청구항 19

수지가 다중 양식이며 리간드가 고정화된 지지체를 포함하고, 양이온 교환기 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계가 동일하거나 상이한 리간드 상에 존재하는 것인 크로마토그래피 수지로 패키징된 제 1 크로마토그래피 컬럼;

크로마토그래피 수지로 패키징된 제 2 크로마토그래피 컬럼;

항체의 흡착 또는 용리 또는 이들 양쪽 모두를 위한 하나 이상의 완충제; 및

항체 정제법을 2단계 방법으로 교시하는 서면 지침을

별도의 구획으로 포함하는

액체 중 하나 이상의 항체의 정제용 키트.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 다중 양식 리간드의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계의 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 키트.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제 1 크로마토그래피 컬럼이 멸균 컬럼인 키트.

청구항 22

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제 1 크로마토그래피 컬럼이 폐기가능한(disposable) 컬럼인 키트.

청구항 23

동일하거나 상이한 리간드 상에 양이온 교환기 및 방향족 및 헤테로방향족 고리계로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 다중 양식 크로마토그래피 수지를 포함하는 항체 정제용 폐기가능한 크로마토그래피 컬럼.

청구항 24

각각의 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것인 다중 양식 크로마토그래피 수지를 포함하는 항체 정제용 폐기가능한 크로마토그래피 컬럼.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 다중 양식 리간드의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계의 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 폐기가능한 컬럼.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 항체, 예를 들면 단일클론 항체의 정제 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 항체의 포획 방법, 2 개 이상의 크로마토그래피 단계를 사용한 항체의 정제 방법, 본 발명의 방법을 사용한 항체 정제용 키트, 및 크로마토그래피 컬럼에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

면역계는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스 감염 및 종양 세포의 성장으로부터 신체를 총괄적으로 보호하는 많은 상호의존적 세포 유형들로 구성된다. 면역계의 파수꾼은 숙주의 혈류를 계속 떠도는 매크로파지이다. 매크로파지는 감염 또는 면역화에 의해 공격받는 경우, 항원으로 공지된 외래 분자로 표지 침입자를 집어삼킴으로써 반응한다. 헬퍼(helper) T 세포에 의해 매개되는 이러한 사건은 B 세포를 자극시키는 복잡한 연쇄 반응을 나타낸다. 이로써, 이 B 세포는 외래 침입자에 결합하는 항체로 불리는 단백질을 생산한다. 항체와 항원 사이의 결합 사건은 식균작용 또는 보체 계의 활성화를 통해 파괴할 외래 침입자를 표지화한다. 다수의 상이한 부류의 항체, 또는 면역글로불린, 예를 들면 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다. 이들은 생리학적 역할, 뿐만 아니라 구조가 상이하다. 구조적 측면에서, IgG 항체는 아마도, 성숙한 면역 반응에서 지배적인 역할을 수행하기 때문에 널리 연구된 특정 부류의 면역글로불린이다.

[0003]

오늘날, 면역글로불린이 갖는 생물학적 활성은 인간 및 수의학적 진단, 건강 관리 및 치료 분야의 광범위한 다양한 적용분야에서 연구되고 있다. 사실상, 최근 수년간, 단일클론 항체 및 재조합 항체 구성체는 현재 임상 시험에서 조사되고, 치료제 및 진단제로서 FDA의 승인을 받은 가장 큰 부류의 단백질이 되었다. 발현 시스템 및 생산 전략을 보완하여, 정제 프로토콜은 매우 순수한 항체를 간단히 경제적으로 얻도록 설계된다.

[0004]

면역글로불린을 분리시키는 통상적인 방법은 용액 중에 단백질의 다른 기들은 남겨두면서 면역글로불린을 포함하는 단백질 분획을 선택적으로 가역적으로 침전시키는 것에 기초한다. 전형적 침전제로는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 농도전이상(lyotropic) 염, 예를 들면 황산암모늄 및 인산칼륨 및 카프릴산이 있다. 전형적으로, 이러한 침전 방법은 매우 불순한 생성물을 제공하며, 동시에 시간과 노동력이 많이 소모된다. 또한, 원료에 침전제를 첨가하면, 상청액을 다른 목적으로 사용하기 어렵고, 특히 면역글로불린의 대규모 정제시 관련되는 폐기 문제를 일으킨다.

[0005]

면역글로불린을 분리시키는 별법은 크로마토그래피이며, 이는 한 속의 밀접하게 관련된 분리 방법을 포함한다. 대부분의 다른 물리적 화학적 분리 방법과 구별되는 크로마토그래피의 특징은 한 상이 정지성이고 다른 상이 이동성인 두 상호 혼화가능하지 않은 상들이 접촉한다는 점이다. 이동상으로 도입된 샘플 혼합물은 정지상 및 이동상이 이동상에 의해 시스템을 통해 운반되기 전에 다수 회 일련의 상호작용을 한다. 이러한 상호작용은 샘플 중 성분들의 물리적 또는 화학적 성질 차이를 이용한다. 이러한 차이는 정지상을 함유하

는 컬럼을 통해 이동하는 이동상의 영향 하에서 개개의 성분의 이동률을 지배한다. 분리된 성분은 정지상과의 상호작용이 큰 순서대로 출현한다. 가장 적게 지체되는 성분이 먼저 용리되고, 가장 강하게 보유되는 물질이 마지막으로 용리된다. 샘플 성분이 컬럼으로부터 용리됨에 따라, 한 성분이 인접 용질의 대역과의 중첩을 방해하도록 충분히 지체되는 경우 분리가 일어난다. 각각의 특수한 분리 목적에 걸맞은 최적 정지상을 설계하기 위한 끊임없는 노력이 이루어지고 있다. 통상, 이러한 정지상은 관능기 즉, 결합기를 포함하는 리간드가 부착된 지지체 또는 기저 매트릭스를 포함한다. 통상, 활용되는 상호작용의 원리를 기초로 한 각각의 종류의 크로마토그래피를 참조로 한다. 종종, 공업용 크로마토그래피 방법은, 조 공급물 또는 정화된 공급물로부터의 표적 분자의 초기 정제인 포획 단계로 출발한 후, 중간 정제 단계 및 최종 폴리싱(polishing) 단계를 수행하는 하나를 초과하는 단계를 포함한다. 이온 교환 크로마토그래피는 면역글로불린의 단리에 흔히 사용된다. 음이온 교환 크로마토그래피에서, 면역글로불린의 음하전된 아미노산 측쇄는 크로마토그래피 매트릭스의 양하전된 리간드와 상호작용한다. 한편, 양이온 교환 크로마토그래피에서, 면역글로불린의 양하전된 아미노산 측쇄는 크로마토그래피 매트릭스의 음하전된 리간드와 상호작용한다.

[0006] 또한, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)는 면역글로불린의 단리에 대해 널리 기재되는 방법이다. 그러나, 소수성 매트릭스는 농도전이성 염을 원료에 첨가하여 면역글로불린이 효과적으로 결합하게 할 것을 필요로 한다. 결합된 항체는 연속적 또는 단계식 구배로 농도전이성 염의 농도를 낮춤으로써 매트릭스로부터 방출된다. 매우 순수한 생성물이 대상인 경우, 소수성 크로마토그래피를 추가 단계와 합칠 것을 권장한다. 이 절차의 단점은 농도전이성 염을 원료에 반드시 첨가하여야 하기 때문에 문제를 일으켜 대규모 사용자의 경우 비용이 증가된다는 점이다. 세포 배양 상청액 이외의 원료, 예를 들면 유장, 혈장 및 난황의 경우, 원료에 농도전이성 염을 첨가하면, 많은 경우 이 염이 면역글로불린 고갈된 원료를 경제적으로 실행가능하게 사용할 수 없게 하기 때문에 대규모 적용분야에서는 사용이 금지된다. 대규모 적용분야에서의 추가적인 문제점은 수천 리터의 폐기물을 폐기하는 것이다.

[0007] 단백질 A 및 단백질 G 친화성 크로마토그래피는 주로, 사용 편이성 및 고 순도의 수득으로 인해 면역글로불린을 분리 및 정제하는, 특히 단일클론 항체를 분리시키는 대중적인 널리 보급된 방법이다. 이온 교환, 소수성 상호작용과 병용하여, 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 및(또는) 젤 여과 단계, 특히 단백질 A 기재 방법은 많은 생물의약 회사들에게 선택가능한 항체 포획 방법이 되었다(예를 들면, WO 8400773 및 US 5,151,350 참조).

[0008] 단백질 크로마토그래피를 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)와 조합하는 것이 제안되었다. US 5,429,746 (스미스클라인 비참 코퍼레이션(SmithKline Beecham Corp.))은 항체의 정제시 소수성 상호작용 크로마토그래피를 한 단계로 적용하는 것에 관한 것이다. 여기에는, 예를 들면, 단백질 A를, 임의적으로 중간 양이온 교환 크로마토그래피 단계와 함께 사용하여 친화성 크로마토그래피 후 어떻게 HIC를 사용할 수 있는지 개시하고 있다. 양이온 교환 크로마토그래피는 약한 양이온 교환제(CM 세파로오스(Sepharose)TM FF)로 예시되며, 여기서 이는 흡착시 pH 5.5로 조정되고, 100 mM 염화나트륨, 40 mM 시트레이트의 용리 완충제로 용리된다(pH 6). 친화성 및(또는) 양이온 교환 크로마토그래피 후 HIC 컬럼에 가해지는 혼합물은 불순물, 예를 들면 면역글로불린 응집물, 미스폴딩된(misfolded) 종, 숙주 세포 단백질 및 친화성 크로마토그래피 단계로부터의 잔여 물질을 함유할 수 있다. 이러한 방법에서, 항체를 먼저 단백질 A 크로마토그래피 지지체에 흡착시키고 용리시킨 다음, 양이온 교환 크로마토그래피 지지체에 흡착시키고, 이로부터 선택적으로 용리시키고, 마지막으로 HIC 지지체에 흡착시키고 용리시킨다.

[0009] 항체 정제에 대해, 단백질 기재 친화성 컬럼에 대한 대안으로, 순수한 화학 수지, 예를 들면 상이하지만 협동적인 부위들이 표적과 상호작용하는 다중 양식(multi-modal) 수지가 제안되었다. 한 상업적으로 입수가 가능한 예로는 머캅토-벤즈이미다졸-술폰산 리간드를 포함하고 소수성, 뿐만 아니라 항체와 이온성 상호작용을 제공하는 것으로 알려진 흡착제인 MBI 하이퍼셀(Hypercel)[®](바이오세프라(BioSeptra))이 있다. 소수성 상호작용은 방향족 고리계로 인한 것이라 추측되며, 이온성 상호작용은 강한 양이온 교환제로 공지된 SO₃⁻ 치환체로 인한 것이다. 또한, MBI 리간드의 방향족 시스템의 질소 원자는 특정한 조건 하에서 하전될 수 있어 음하전된기와 이온성 상호작용을 제공할 수 있다.

[0010] US 6,498,236(업프론트 크로마토그래피(Uprfront Chromatography))은 용액, 예를 들면 하미브리도마(hybridoma) 세포 배양 상청액, 동물 혈장 또는 혈청으로부터 면역글로불린을 분리 또는 정제하는 방법을 개시하고 있다. 이 방법은 리간드 및 면역글로불린의 분자량 간의 적은 차이, 뿐만 아니라 서로 결합하려는 자연적 경향으로 인한 결점을 포함하는 것으로 알려져 있는 단백질 A, 단백질 G, 합성 펩티드 및 다른 비교적

고 분자량 리간드 사용에 대한 대안으로서 제안되고 있다. US 6,498,236에 따르면, 리간드, 예를 들면 벤젠 고리에 존재하는 치환체의 특성은 면역글로불린을 유효하게 결합시키는 데 결정적이다. 더욱 구체적으로, 개시된 방법에 사용된 고체상 매트릭스는 화학식 M-SP1-X-A-SP2-ACID(여기서, M은 매트릭스 골격을 나타내고, SP1은 스페이서(spacer)를 나타내고, X는 O, S 또는 NH를 나타내고, A는 임의적으로 치환된 모노시클릭 또는 바이시클릭 방향족 또는 헤테로방향족 잔지를 나타내고, SP2는 임의적인 스페이서를 나타내고, ACID는 산기를 나타냄)에 의해 설명된다. 바람직하게는, 리간드는 벤즈이미다졸, 벤조티아졸 및 벤조옥사졸로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물로부터 유도된다.

[0011] WO 97/10887(노보 노르디스크(Novo Nordisk) A/S)은 단백질 물질, 예를 들면 면역글로불린, 인슐린, 팩터(Factor) VII 또는 인간 성장 호르몬 또는 그들의 유사체, 유도체 및 단편의 정제에 유용한 친화성 리간드-매트릭스 공액화물에 관한 것이다. WO 97/10887 발명은 소수성 성분의 복잡도 및 공간 기하를 증가시킴으로써 소수성 리간드의 선택성이 증가될 수 있다는 개념에 기초한다. 이 개념으로 인해 하나 이상의 고리 형성 원자가 질소인 헤테로방향족을 갖는 구조로 한정되는 친화성 리간드의 일반적 기를 발견하였다.

[0012] 또한, 다중 양식 양이온 교환제 배지를 합성하는 방법이 WO 03/024588(스웨덴 옅살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences))에 개시되어 있다. 더욱 구체적으로, 두 관능가를 포함하는 스캐폴드(scaffold), 바람직하게는 호모시스테인 티오락톤을 유도체화시키고, 고체 기저 매트릭스와 반응시킨다. 더욱 구체적으로, 두 관능가 중 하나, 바람직하게는 황은 매트릭스에 커플링하는 데 사용되고, 두 번째 관능가는 이온성기로 변환될 수 있는 것이다. 따라서, 이로써 생성된 다중 양식 배지는 이온성 상호작용, 뿐만 아니라 유도체화의 특성에 따라 추가의 상호작용, 예를 들면 소수성 상호작용을 할 수 있게 된다. 실험부에서는, 생성된 양이온 교환제를 세 모델 단백질, 즉 시토크롬(Cytochrome) C(Cyt C), 소 혈청 알부민(BSA) 및 면역글로불린 G(IgG)를 사용하여 시험한다.

발명의 상세한 설명

[0013] 발명의 간단한 설명

[0014] 한 측면에서, 본 발명은 강건한 항체 정제 방법을 제공한다. 이는 첨부되는 청구범위에서 상세히 정의되는 바와 같이, 항체를 포함하는 액체를 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계, 수지로부터 항체를 방출시킴으로써 항체를 용리시키는 단계, 및 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계에 의해 얻어질 수 있다.

[0015] 추가의 측면에서, 본 발명은 선행 기술 방법보다 작은 부피의 공급물로부터 항체를 정제하는 것을 제공한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 공정 공급물 중의 염 농도를 희석할 필요없이 공정 공급물로부터 항체를 포획하는 것을 제공한다. 이는 상기한 방법에 의해 얻어질 수 있으며, 여기서 다중 양식 리간드는 "고 염 리간드"로서 공지된 염 내성 리간드이다. 이러한 제 1 단계 후, 임의적으로, 음이온 교환기를 포함하는 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 크로마토그래피 수지를 사용하여 제 2 크로마토그래피 단계를 수행할 수 있다.

[0016] 구체적인 측면에서, 본 발명은 제 2 크로마토그래피 단계가 비결합 조건 하에서 수행되는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 측면 및 이점은 하기의 상세한 개시내용으로부터 명백해질 것이다.

실시예

[0058] 실험부

[0059] 본 실시예는 오직 예시의 목적으로 제공되며, 첨부되는 청구범위에 의해 정해진 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에서 하기 및 다른 곳에서 제공된 모든 참고문헌은 본 명세서에 참고문헌으로써 포함된다.

[0060] 실시예 1: 다중 양식 양이온 교환 수지의 제조(제 1 단계)

[0061] 이하 제공되는 매트릭스의 부피는 고정층 부피를 기준으로 한다. 그램 단위로 제공된 매트릭스의 중량은 흡인(물 펌프) 건조 중량을 기준으로 한다. 이 매트릭스는 여전히 수 용매화된 물질인 것으로 이해된다. 이하 지칭되는 교반은, 자성 막대 교반기를 사용하면 비드에 손상을 주기 때문에 현탁된 모터 구동 교반기에 의한 것이었다. 관능가의 분석 및 알릴화도, 에폭시화도, 또는 비드 상의 이온 교환제 기의 치환도의 결정은 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 기준으로 한다. 하기 방법은 특히, 황 원자의 경우 최종적으로 겔의 추가적

인 원소 분석에 의해 보완되었다.

표 1

다중 양식 리간드 원형의 화학 구조

| 리간드 구조 | 원형 번호 |
|--------|----------|
| | U1012054 |
| | U790P73 |
| | U790P65 |

| | |
|--|---------|
| | U790P71 |
|--|---------|

실시예 1(a): 다중 양식 리간드 원형 U1012054

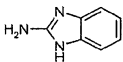
본 실시예에서는 3-아미노-4-(프로필술포닐)티오펜-2-카르복실산이 어떻게 NHS 활성화 아가로오스 담체에 커플링되었는지 기재한다.

티오프로피온산 세파로오스TM의 제조: 지속적인 황색 색상이 얻어질 때까지 브롬을 100 ml의 알릴 활성화된 (0.3 mmol 알릴/ml) 세파로오스TM 6 페스트 플로우(Fast Flow) 겔(스웨덴 옵살라 소재의 아머삼 바이오사이언 시즈), 4 g의 AcONa 및 100 ml의 증류수의 교반된 현탁액에 첨가하였다. 그 다음, 현탁액이 완전히 탈색될 때까지 포름산나트륨을 첨가하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 겔을 500 ml의 증류수로 세척하였다. 그 다음, 활성화된 겔을 바로 반응 용기에 옮기고, 첨가 전 50 % NaOH 수용액으로 pH를 11.5로 조정한 17.5 ml의 티오프로피온산(알릴기 당 6 당량) 및 12 g의 NaCl의 수용액(50 ml의 증류수)으로 처리하였다. 반응물을 50 °C에서 교반하면서 18 시간 동안 두었다. 반응 혼합물을 여과하고, 500 ml의 증류수로 세척하여 겔 1 ml 당 CO₂H 기 0.29 mmol의 치환도를 갖는 티오프로피온산 세파로오스TM 겔을 생성하였다.

N-히드록시숙신이미드를 사용한 겔의 활성화: 그 다음, 100 ml의 생성되는 티오프로피온산 세파로오스TM를 300 ml 1 M NaCl, 500 ml 0.1 MHC1, 500 ml 50% 수성 아세톤, 500 ml 아세톤으로 연속적으로 세척하였다. 세척 후, 겔이 아세톤에 침전되게 하고, 상청액을 사이펀으로 빨아내고, 20 ml의 아세톤의 도움으로 침전된 비드를 반응 용기로 옮겼다. 그 다음, 80 ml의 아세톤 중의 15.2 g의 N-히드록시숙신이미드(NHS)의 용액 및 80 ml의 아세톤 중의 디시클로헥실카르보디이미드의 또다른 용액을 첨가하였다. 반응 슬러리를 30 °C에서 18 시간 동안 교반하면서 두었다. 여과 후, 겔을 전체 작업일 동안 150 ml 이소프로판올로 천천히 10 회 세척하였다(중력류). NH₄OH와의 반응 후 NHS-활성화도는 약 80%인 것으로 평가되었고, 이는 겔 1 ml 당 약 0.23 mmol의 NHS 관능의 활성화에 대응하는 것이다.

NHS 활성화 티오프로피온산 세파로오스TM에 대한 다중 양식 리간드의 커플링: 3-아미노-4-(프로필술포닐)티오펜-2-카르복실산을 WO 02/05959(리간드 12)에 기재된 바와 같이 제조하였다. 2 ml의 증류수, 2 ml의 1M NaHCO₃ 및 2 ml의 에탄올 중의 565 mg의 3-아미노-4-(프로필술포닐)티오펜-2-카르복실산(2.27 mmol)의 용액의 가용성 혼합물을 제조하고, 50% 수성 NaOH를 조심스럽게 첨가하여 pH를 8.5로 조정하였다.

- [0069] NHS 활성화 티오프로피온산 세파로오스™(10 ml)를 20 ml 얼음 냉각된 1 mM HCl 용액으로 신속하게 세척하였다. 그 다음, 겔을 티네일 세린(thineyl serine) 용액이 첨가되는 에를렌마이어(Erlenmeyer)에 옮겼다. 반응 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 진탕대(150 rpm)에 올려놓았다.
- [0070] 반응 혼합물을 여과한 후, 겔을 40 ml 증류수, 20 ml 에탄올, 20 ml 0.25 M aq. 에탄올아민, 20 ml의 증류수, 20 ml 1M aq. NaCl, 및 20 ml의 증류수로 연속적으로 세척하였다.
- [0071] 실시예 1(b)-(d)
- [0072] 다음의 실시예 1(b)-(d)에서, WO 03/024588에 기재된 바와 같이 스캐폴드로서 D,L-호모시스테인 티오락톤을 사용하여 다중 양식 리간드 원형 U790P65, U790P71 및 U790P73을 제조하였다. 간략히, 호모시스테인 티오락톤을 아실 클로리드 또는 무수물과 반응시킴으로써 결합된 아마이드를 형성시킨 후, 염기성 가수분해로 티오락톤 고리를 개환시키고, 생성되는 화합물을 활성화된 세파로오스™ 6 FF(스웨덴 옉살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)에 추가 커플링시켰다.
- [0073] 실시예 1(b): 다중 양식 리간드 원형 U790P73: 30 ml DCM 중의 벤조일 클로리드(8.7 ml, 75 mmol)의 용액을 0 °C에서 디클로로메탄(DCM, 120 ml) 중의 D,L-호모시스테인 티오락톤(11.5 g, 75 mmol) 및 디이소프로필아민(DIPEA)(26 ml, 150 mmol)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 하에서 증발시키고, 반응 잔여물을 에틸 아세테이트(300 ml)로 추출하였다. 유기상을 aq. 시트르산 10%(w/w, 200 ml), aq. K₂CO₃ 10 %(200 ml), 물(200 ml)로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과 후, 용매를 제거하여 백색 고체(13.8 g, 83%)를 얻었다. 0 °C에서, 5N 수산화나트륨 용액(5 ml)을 276 mg(1.25 mmol)의 백색 고체에 첨가하고, 혼합물을 2 시간 동안 실온에서 추가 교반하였다. 알릴화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(250 µmol/ml)로부터 출발하여 공지된 절차를 따라 얻어진 브롬화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(10 ml)(스웨덴 옉살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)를 리간드의 알칼리 용액(상기와 같음)과 혼합시키고, 밤새 50 °C로 가온하였다. 반응 후, 겔을 여과하고, 물(2×150 ml), 에탄올(2×150 ml), 아세트산 0.2M(2×150 ml) 및 물(2×150 ml)로 세척하였다. 그 다음, 겔의 이온 용량을 산기를 적정함으로써 측정하고, 이는 겔 1 ml 당 103 µmol을 제공하였다.
- [0074] 실시예 1(c): 다중 양식 리간드 원형 U790P65: 4 ml DCM 중의 3,4,5-트리메톡시-벤조일 클로리드(2.37 g, 10.3 mmol)의 용액을 0 °C에서 디클로로메탄(DCM, 6 ml) 중의 D,L-호모시스테인 티오락톤(1.58 g, 10.3 mmol) 및 디이소프로필아민(DIPEA)(3.58 ml, 20.6 mmol)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 하에서 증발시키고, 반응 잔여물을 에틸 아세테이트(50 ml)로 추출하였다. 유기상을 aq. 시트르산 10%(w/w, 30 ml), aq. K₂CO₃ 10 %(30 ml), 물(30 ml)로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과 후, 용매를 제거하여 백색 고체(2.21 g, 69%)를 얻었다. 0 °C에서, 5N 수산화나트륨 용액(5 ml)을 389 mg(1.25 mmol)의 백색 고체에 첨가하고, 혼합물을 2 시간 동안 실온에서 추가 교반하였다. 알릴화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(250 µmol/ml)로부터 출발하여 공지된 절차를 따라 얻어진 브롬화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(10 ml)(스웨덴 옉살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)를 리간드의 알칼리 용액(상기와 같음)과 혼합시키고, 밤새 50 °C로 가온하였다. 반응 후, 겔을 여과하고, 물(2×150 ml), 에탄올(2×150 ml), 아세트산 0.2M(2×150 ml) 및 물(2×150 ml)로 세척하였다. 그 다음, 겔의 이온 용량은 겔 1 ml 당 59 µmol로 측정되었다.
- [0075] 실시예 1(d): 다중 양식 리간드 원형 U790P71
- [0076] 4 ml DCM 중의 페닐 글루타르산 무수물(1.96 g, 10.3 mmol)의 용액을 0 °C에서 디클로로메탄(DCM, 6 ml) 중의 D,L-호모시스테인 티오락톤(1.58 g, 10.3 mmol) 및 디이소프로필아민(DIPEA)(3.58 ml, 20.6 mmol)의 용액에 적가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 하에서 증발시키고, 반응 잔여물을 바로 5N 수산화나트륨 용액(10 ml)으로 처리하고, 2 시간 동안 실온에서 추가 교반하였다. 알릴화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(250 µmol/ml)로부터 출발하여 공지된 절차를 따라 얻어진 브롬화된 세파로오스™ 6 패스트 플로우(10 ml)(스웨덴 옉살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)를 상기와 같은 1.4 ml의 리간드의 알칼리 용액과 혼합시키고, 밤새 50 °C로 가온하였다. 반응 후, 겔을 여과하고, 물(2×150 ml), 에탄올(2×150 ml), 아세트산 0.2M(2×150 ml) 및 물(2×150 ml)로 세척하였다. 그 다음, 겔의 이온 용량은 겔 1 ml 당 110 µmol로 측정되었고, 이는 겔 1 ml 당 55 µmol의 리간드 치환 수준에 대응한다.

- [0077] 실시예 2: 다중 양식 음이온 교환 수지의 제조(제 2 단계)
- [0078] 일반
- [0079] 매트릭스의 부피는 고정층 부피를 기준으로 한다.
- [0080] 그램 단위로 제공된 매트릭스의 중량은 흡인 건조 중량을 기준으로 한다. 이 매트릭스는 여전히 수 용매화된 물질인 것으로 이해된다.
- [0081] 대규모 반응의 경우, 교반은 자성 막대 교반기를 사용하면 비드에 손상을 주기 때문에 현탁된 모터 구동 교반기를 기준으로 한다. 소규모 반응(20 ml 또는 g 이하의 겔)은 밀폐된 바이알에서 수행하였고, 교반은 진탕대를 사용하는 것을 기준으로 한다.
- [0082] 관능기의 분석 및 알리화도, 에폭시화도, 또는 비드 상의 이온 교환제 기의 치환도의 결정은 통상적인 방법을 기준으로 한다.
- [0083] 1. 알릴기의 매트릭스 도입
- [0084] 전형적 절차에서, 알릴화는 알릴 글리시딜 에테르를 사용하여 수행되었지만, 고체 지지체 상에 알릴기를 도입하는 것은 알릴 브로미드를 사용하여 용이하게 수행될 수 있다.
- [0085] 알릴 글리시딜 에테르를 사용한 세파로오스™의 활성화
- [0086] 100 g의 세파로오스™ 6 FF를 80 g이 되게 흡인 건조시키고, 0.4 g의 NaBH_4 , 12 g의 Na_2SO_4 및 45 ml의 50% NaOH 수용액과 혼합시켰다. 혼합물을 1 시간 동안 50 °C에서 교반하였다. 100 ml의 알릴글리시딜 에테르를 첨가한 후, 현탁액을 50 °C에서 추가적인 20 시간 동안 격렬하게 교반하면서 두었다. 혼합물의 여과 후, 겔을 500 ml의 증류수, 500 ml 에탄올, 200 ml의 증류수 200 ml 0.2 M 아세트산 및 500 ml의 증류수로 연속적으로 세척하였다. 적정하여 겔 1 ml 당 알릴 0.32 mmol의 치환도를 얻었다.
- [0087] 2. 매트릭스 상의 리간드 커플링
- [0088] 매트릭스에 대한 커플링을 염기성 조건 하에서 친핵성 치환 및 알릴기의 브로화를 통해 수행하였다.
- [0089] 브로화를 통한 알릴 세파로오스™의 활성화:
- [0090] 지속적인 황색 색상이 얻어질 때까지 브롬을 100 ml의 알릴 활성화된 세파로오스™ 6 FF(0.32 mmol 알릴기/ml 배수된 겔), 4 g의 AcONa 및 100 ml의 증류수의 교반된 현탁액에 첨가하였다. 그 다음, 현탁액이 완전히 탈색될 때까지 포름산나트륨을 첨가하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 겔을 500 ml의 증류수로 세척하였다. 그 다음, 활성화된 겔을 바로 반응 용기에 옮기고, 적합한 다중 양식 음이온 교환 리간드와 추가 반응시켰다.
- [0091] 2-아미노벤즈이미다졸-세파로오스™
- [0092] 상기와 같이 얻어진 10 g의 브롬 활성화된 겔(배수된 겔 1 ml 당 0.32 mmol 알릴기)을 50 % NaOH 수용액을 첨가함으로써 pH가 12로 조정된 물(6 ml) 및 에탄올(3 ml) 중의 2-아미노벤즈이미다졸(2 g)의 용액을 함유하는 반응 바이알에 옮겼다. 반응물을 55 °C에서 교반 하에서 17 시간 동안 두었다. 반응 혼합물의 여과 후, 겔을 3×10 ml의 증류수, 3×10 ml 수성 0.5 HCl 및 마지막으로 3×10 ml의 증류수로 연속적으로 세척하였다. 겔 1 ml 당 아민 기 0.17 mmol의 치환도를 갖는 2-아미노벤즈이미다졸 세파로오스™ 겔을 얻었다.
- [0093] 
- [0094] 2-아미노벤즈이미다졸
- [0095] 실시예 3: 다중 양식 양이온 교환제에 대한 항체 포획
- [0096] 물질 및 방법
- [0097] 크로마토그래피 컬럼에서, 상기 실시예 1과 같이 제조된 리간드 U790P73(N-(2-옥소-테트라히드로-티오펜-3-일)-벤즈아미드)을 포함하는 원형 수지인 트리콘(Tricorn)™ 5/50을

40 $\mu\text{mol/ml}$ 겔의 치환 수준으로 세파로오스™ 6 FF에 커플링시키고, 1 ml의 컬럼 부피로 패키징하였다.

[0098] 출발 물질은 표준 방법에 따라 제조된 차이나스 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포 정화된 공급물이었다. 이 공급물은 인간화된 IgG1을 함유하고, 염기성이고, 0.8 g mAb/L의 농도에 대해 소광 계수(ϵ) 1.7 및 pI 값 9.1을 제공하였다.

[0099] 25 ml의 공급물을 다중 양식 양이온 교환 컬럼에 충전시키기 전에 진한 아세트산을 첨가함으로써 공급물의 pH를 6으로 조정하였다. 50 mM 포스페이트 완충제(pH 6)를 충전 완충제로 사용하고, 충전 동안의 유속은 100 cm/h였다. 14 컬럼 부피의 세척 기간 후, 결합된 단백질을 25 mM 포스페이트 완충제(pH 7.5)를 사용하여 pH 단계에 의해 용리시켰다. 세척물로부터의 통과 유체 분획 및 2 ml 분획 및 용리물을 수집하였다.

[0100] **분석 겔 여과 분석**

[0101] 겔 여과를 수행하여 용리된 분획의 순도를 평가하였다. 출발 물질, 뿐만 아니라 통과 유체 및 크로마토그래피 러닝으로부터의 풀링된 용리액을 분석하였다. 50 μl 의 샘플을 러닝 완충제로서 10 mM 포스페이트 완충제, 0.14 M NaCl(pH 7.4)을 사용하여 슈퍼덱스(Superdex)™ 200 10/300 GL 컬럼에 0.5 ml/분의 유량으로 가하였다.

[0102] **회수율 결정을 위한 풀링된 용리액 중 단백질 농도의 분석**

[0103] 용리로부터 얻은 총 풀을 용리 완충제 중에서 5배 희석시켰다. 280 nm에서의 흡광도를 분광광도계에서 측정하고, 3 회 반복된 흡광도의 평균을 하기 수식 1에 따라 단백질 농도를 결정하는 데 사용하였다. 용리된 단백질의 총량을 계산하고, 회수율 계산을 위해 컬럼에 가한 IgG의 총량으로 나누었다.

수식 1

[0104] $C = A * \text{희석 계수} / (1 * \epsilon)$

[0105] 상기 식 중,

[0106] C = IgG의 농도(mg/ml)

[0107] A = 280 nm에서의 흡광도

[0108] l = 경로 길이(cm)

[0109] ϵ = MAb에 대한 몰 소광 계수(mg ml^{-1})

[0110] **결과**

[0111] pH 6의 결합 완충제를 사용하여 IgG를 컬럼에 결합시키고, pH 7.5를 사용하여 용리시킬 수 있었다. 용리로부터 얻은 풀링된 분획(9-16)은 출발 물질의 IgG 순도에 비해 높은 IgG 순도를 함유하였다. 매우 적은 표적 단백질(< 5%)이 통과 유체에서 발견되었고, 회수율은 > 95%인 것으로 평가되었다. 다중 양식 양이온 교환제의 정제로부터 얻은 크로마토그램은 도 1에 도시되고, 출발 물질(공급물) 및 포획 단계로부터 풀링된 용리액에 대한 분석 겔 여과로부터의 크로마토그램은 도 2 및 도 3에 도시된다.

[0112] 더욱 구체적으로, 먼저, 공급물의 pH를 6으로 조정한 후, CHO 세포 정화된 공급물을 다중 양식 양이온 교환 크로마토그래피 배지(U1128042)에 충전시켰다. 50 mM의 포스페이트, 20 mM의 Na-숙시네이트(pH 6)를 결합 완충제로서 사용하고, 결합된 단백질을 pH 단계를 사용하여 용리시켰다. 25 mM 포스페이트 완충제(pH 7.5)를 용리에 사용하였다. 분획 9 내지 16을 수집하고, 분석물을 겔 여과에 의해 풀링하였다. 회수율은 > 95%인 것으로 결정되었다. 도 1에서, 280 nm에서의 UV 흡광도를 실선으로 나타내고, 전도성을 파선으로 나타내고, pH를 점선으로 나타낸다.

[0113] 공급물(컬럼 U1128042 상의 출발 물질)의 분석 겔 여과 크로마토그램의 경우, 샘플 부피는 50 μl 이고, 용리액은 PBS 완충제였다(pH 7.4, 유량 0.5 ml/분). 샘플을 0 ml에서 주입하였고, IgG 피크는 13 ml에서 나타났다. 도 2에서, 10 ml에서의 피크는 IgG 응집물이고, 잔여 피크는 숙주 세포 단백질이다.

[0114] U1128042로부터 용리된 풀링된 분획 9-16의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도 3에 나타낸다. 제 1 크로마토그래피 단계 후, 오염 단백질을 상당히 감소시켰다. 샘플 0 ml를 주입하였고, 13 ml에서의 피크는 IgG이고, 10 ml에서의 피크는 IgG 응집물이다. 다른 피크는 용리된 샘플 중의 숙주 세포 단백질이다.

[0115] 실시예 4: 음이온 교환에 의한 폴리싱

[0116] **물질 및 방법**

[0117] 170 $\mu\text{mol/ml}$ 겔의 치환 수준으로 세파로오스™ 6 FF에 커플링된 리간드 2-아미노벤즈이미다졸을 포함하는 배지(238092)를 크로마토그래피 컬럼, HR5/5에 컬럼 부피 1 ml로 패킹하였다.

[0118] 실시예 2로부터의 폴링된 용리액, 분획 9-16을 이 정제 단계에 출발 물질로 사용하였다. 10% 아세트산을 첨가함으로써 용리액의 pH를 6으로 조정하였다. 대략 10 mg의 IgG에 대응하는 8 ml의 pH 조정된 용리액을 충전 완충제로서 25 mM 포스페이트(pH 6)를 사용하여 컬럼 238092에 가하였다. 완충제 조건, pH 및 전도성을 IgG에 대해 비결합 조건이 되도록 선택하였다. 0.5 ml/분의 유량을 사용하고, 1 ml의 분획을 샘플 적용 및 세척 동안 수집하였다.

[0119] 통과 유체로부터의 폴링된 분획(3-10)의 IgG 순도를 분석 겔 여과에 의해 분석하였다. 용리된 단백질의 양을 결정하고, 회수율을 결정하였다. 분석 겔 여과 방법 및 단백질 농도의 결정 및 회수율의 계산은 실시예 2의 물질 및 방법에서 설명한다.

[0120] **결과**

[0121] 포획 단계의 정제로부터의 용리된 IgG 분획을 다중 양식 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가 정제하였다. 이 폴리싱 단계에서, IgG를 비결합 조건을 사용하여 컬럼에 충전시켰다. 이 폴리싱 단계에서 통과 유체로부터의 폴링된 분획의 IgG 순도는 분석 겔 여과에 의해 매우 높은 것으로 평가되었다. 일부 IgG는 비결합 조건이 사용되었음에도 컬럼에 결합하였고, 회수율은 80%로 결정되었다.

[0122] 다중 양식 음이온 교환제에 대한 정제로부터의 크로마토그램을 도 4에 도시하고, 통과 유체 분획에 대한 분석 겔 여과로부터의 크로마토그램을 도 5에 도시한다.

[0123] 도 6을 얻기 위해, pH를 6으로 조정한 후, 제 1 정제 단계(실시예 3)에서 용리로부터 폴링된 분획(9-16)을 컬럼에 가하였다. 통과 유체로부터 폴링된 분획 3-10에서의 IgG 순도는 분석 겔 여과에 의해 매우 높은 것으로 평가되었다(도 5 참조). pH 6을 사용시, IgG가 결국 통과 유체 중에 존재할 것으로 예상하였다. 그러나, 크로마토그램의 형상은 일부 단백질이 컬럼에 결합함을 시사한다. 또한, 이는 크로마토그래피 러닝 후 회수율이 80%로 계산됨으로써 확인되었다. 러닝 완충제를 사용한 세척 개시시 발견되는 가외 피크는 아마도 컬럼 밖으로 떨어져 나온 느슨하게 결합된 단백질일 것이다.

[0124] 컬럼 238092 상에 가해진 통과 유체(분획 3-10)의 분석 겔 여과 크로마토그램인 도 7에 대해, 13에서의 피크는 IgG이고, 10에서의 피크는 응집물이다. 이 분석 방법에 의해서는 실제적인 오염 숙주 세포 단백질이 검출될 수 없다. 척도는 도 2 및 도 3과 동일하지 않으며, 훨씬 더 확대한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 다중 양식 양이온 교환 크로마토그래피 배지 상에서 IgG를 함유하는 공급물을 정제한 것으로부터의 크로마토그램을 도시한다.

[0019] 도 2는 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 공급물의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다. 13 ml에서의 피크는 표적 MAb이고, 잔여 피크는 응집물 및(또는) 숙주 세포 단백질이다.

[0020] 도 3은 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 U1128042로부터 용리된 폴링된(pooled) 분획 9-16의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다.

[0021] 도 4는 하기 실시예 4에 설명된 바와 같이, 본 발명에 따른 방법의 단계 2, 더욱 구체적으로 다중 양식 음이온 교환 크로마토그래피를 사용한 폴리싱 단계로부터의 크로마토그램을 도시한다.

[0022] 도 5는 하기 실시예 4에 설명된 바와 같이 컬럼 238092 상에 가해진 통과 유체(flow through)(분획 3-10)의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다.

[0023] 정의

[0024] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0025] 용어 "용리액"은 당 분야에서의 그의 통상적인 의미, 즉 분리 매트릭스로부터 하나 이상의 화합물을 방출시키

기 적합한 pH 및(또는) 이온 강도로 된 완충제로 사용된다.

- [0026] 용어 "친화성 크로마토그래피"는 락키(lock-key) 인식을 원리로 하는 표적 생체분자와 생체특이적 리간드 간의 특이적 상호작용에 기초한 크로마토그래피를 의미한다. 따라서, 표적 및 리간드는 친화성 쌍, 예를 들면 항원/항체, 효소/수용체 등을 구성하게 된다.
- [0027] 용어 "방향족" 기는 식 $(4n + 2)$ (여기서, n 은 양의 정수 또는 0임)에 의해 허클(Huckel)의 법칙에 따라 정해진 기를 지칭한다.
- [0028] 용어 "크로마토그래피 수지"는 본 명세서에서 리간드로서 공지된 관능기가 커플링된 지지체를 나타내는 것으로 사용된다. 용어 "메트릭스"는 때때로 지지체를 나타내는 데 사용된다.
- [0029] 용어 "다중 양식 크로마토그래피 리간드"는 결합되는 물질과 상호작용하는 2 개 이상의 상이하지만, 협동적인 부위를 제공할 수 있는 리간드를 지칭한다. 이들 부위 중 하나는 리간드와 해당 물질 사이에 인력 유형의 전하-전하 상호작용을 제공한다. 전형적으로, 다른 부위는 전자 수용체-공여체 상호작용 및(또는) 소수성 및(또는) 친수성 상호작용을 제공한다. 전자 공여체-수용체 상호작용은 수소 결합, π - π , 양이온- π , 전하 전이, 쌍극자-쌍극자, 유도된 쌍극자 등과 같은 상호작용을 포함한다. 또한, 다중 양식 크로마토그래피 리간드는 "혼합된 양식" 크로마토그래피 리간드로도 공지되어 있다. 본 출원에서는, 리간드가 전하-전하 상호작용기가 음하전된 다중 양식 리간드인 크로마토그래피 수지를 "다중 양식 양이온 교환 수지"로 나타내며, 리간드가 전하-전하 상호작용기가 양하전된 다중 양식 리간드인 크로마토그래피 수지를 "다중 양식 음이온 교환 수지"로 나타낸다.
- [0030] 구 "전자 공여체-수용체 상호작용"은 전자의 자유 쌍을 갖는 전기음성 원자가 공여체로 작용하고, 공여체의 전자 쌍에 대한 수용체로 작용하는 전자 결핍 원자에 결합하는 것을 의미한다(예를 들면, 문헌[Karger et al., An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) page 42] 참조).
- [0031] 용어 "양이온 교환기"는 본 명세서에서, 음하전되거나 또는 음하전가능한 기를 의미한다.
- [0032] 액체 크로마토그래피와 관련하여, 용어 "포획 단계"는 분리 절차의 초기 단계를 지칭한다. 가장 통상적으로, 포획 단계는 정화, 농축, 안정화 및 가용성 불순물로부터의 상당한 정제를 포함한다. 포획 단계 후, 중간 정제를 수행할 수 있으며, 이는 잔량의 불순물, 예를 들면 숙주 세포 단백질, DNA, 바이러스, 내독소, 영양분, 세포 배양 배지의 성분, 예를 들면 소포체 및 항생제, 및 생성물 관련 불순물, 예를 들면 응집물, 미스폴딩된 종 및 응집물을 추가로 감소시킨다.
- [0033] 액체 크로마토그래피와 관련하여, 용어 "폴리싱 단계"는 미량의 불순물을 제거하여 안전한 활성 생성물을 남기는 최종 정제 단계를 지칭한다. 종종, 폴리싱 단계 동안 제거되는 불순물은 표적 분자 또는 의심되는 누출 생성물의 콘포머(conformer)이다.
- [0034] 용어 "Fc 결합 단백질"은 항체의 결정성 부(Fc)에 결합할 수 있는 단백질을 의미하고, 예를 들면, 단백질 A 및 단백질 G, 또는 상기 결합 성질을 유지한 그의 임의의 단편 또는 융합 단백질을 포함한다.
- [0035] 발명의 상세한 설명
- [0036] 본 발명은 각각의 다중 양식 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기, 및 고리 형성 원자가 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것인 액체를 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키는 것을 포함하는, 액체로부터 하나 이상의 항체를 포획하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 방법의 유리한 실시양태에서, 고리 형성 원자는 탄소(C) 및 황(S) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 고리 형성 원자는 탄소(C) 원자이다. 본 방법은 바람직하게는 예를 들면, 여과에 의해 정화되어 세포 파편 등이 제거된 발효 액체에 사용될 수 있다. 가장 통상적으로, 포획 형식에서는, 선행하는 크로마토그래피가 없다. 바람직하게는, 고 순도의 생성물을 얻기 위해, 본 방법 후 예를 들면, 크로마토그래피, 막 여과 또는 임의의 다른 통상적인 정제 방법에 의해 추가 정제를 실시한다. 따라서, 한 실시양태에서, 다중 양식 크로마토그래피 포획 단계 후 하나 또는 추가의 정제 단계를 실시한다.
- [0038] 한 측면에서, 본 발명은 액체를 다중 양식 리간드가 고정화된 지지체를 포함하는 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 수지에 흡착시키는 단계 (여기서, 각각의 다중 양식 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함함), 용리액을 첨가하여 수지로부터 항체를 방출시키는 단계, 및 이로써 얻어진 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계를 포함하는, 액체로부터 하나

이상의 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 따라서, 포획 단계인 제 1 단계에서, 결합 조건 하에서 항체를 포함하는 액체를 다중 양식 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 불순물을 흡착시킨다. 제 1 수지와 접촉하는 액체는 원하는 항체의 등전점 아래의 pH에서 유리하게 완충된다. 흡착 단계 후, 용리액으로 공지된 또다른 액체를 수지와 접촉시켜 흡수제에서 제거시키며, 즉 항체를 방출시킨다. 통상, 용리액은 완충제, 예를 들면 포스페이트 완충제이다. 한 실시양태에서, 용리는 pH의 증가에 의한 단계 용리이다. 그러나, 당업자는 예를 들면, 다른 pH 및(또는) 염 농도, 즉, 용액의 전도성을 조정함으로써 흡착 및 용리를 얻도록 하는 조건을 용이하게 적당시킬 수 있다는 것을 이해한다. 유리한 실시양태에서, 본 방법의 제 1 단계는 예를 들면, 중력 또는 펌핑에 의해 액체 및(또는) 용리액을 패킹된 크로마토그래피 컬럼에 통과시키는 것이다. 필요에 따라, 본 방법의 크로마토그래피 단계 사이에 하나 이상의 세척 단계를 적용할 수 있다. 유리하게는, 제 1 단계에 적용되는 액체는 공급물 스트림, 즉 임의적으로 전처리, 예를 들면 여과, pH 및(또는) 전도성 등의 조정에 의해 상태조절된 세포 배양액 또는 발효 브로쓰이다. 따라서, 제 1 크로마토그래피 포획 단계는 숙주 세포 잔여물, 예를 들면 세포 파편 및 단백질, DNA, 내독소 등을 제거한다. 공정 공급물에 본 방법을 직접 사용하는 것의 한 이점은 본 명세서에 사용된 특이적 다중 양식 리간드가 통상적인 수지보다 높은 염 농도에서 항체를 흡착할 수 있어, 공지된 공정 공급물을 회식시킬 필요를 크게 감소시키거나 심지어 제거하여 비교적 높은 전도성이 된다는 점이다. 공정 부피의 감소는 공정 효율을 개선시킬 것이며, 매우 큰 고가의 장치를 필요로 하지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 본 방법은 팽창상 공정으로 운전된다.

[0040] 본 방법에 사용되는 다중 양식 크로마토그래피 수지는 당업자에 의해 용이하게 제조된다. 간략히, 수지는 때때로 기저 매트릭스로 불리는 유기 또는 무기 지지체에 직접 또는 스페이서를 통해 커플링된 다중 양식 리간드를 포함한다. 지지체는 입자, 예를 들면 본질적으로 구형 입자, 모노리스(monolith), 필터, 막, 표면, 모세관 등의 형태로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 지지체는 천연 중합체, 예를 들면 가교결합된 탄수화물 물질, 예를 들면 아가로스, 한천, 셀룰로오스, 텍스트란, 키토산, 칸자크(konjac), 카라기닌, 겐란(gellan), 아르기네이트 등으로부터 제조된다. 고 흡착 능력을 얻기 위해서는, 지지체는 다공성이고, 리간드는 외부 표면, 뿐만 아니라 다공 표면에 커플링되는 것이 바람직하다. 이러한 천연 중합체 지지체는 표준 방법, 예를 들면 역 현탁 겔화(문헌[S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398(1964)] 참조)에 따라 용이하게 제조된다. 별법으로, 지지체는 합성 중합체, 예를 들면 가교결합된 합성 중합체, 예를 들면, 스티렌 또는 스티렌 유도체, 디비닐벤젠, 아크릴아미드, 아크릴레이트 에스테르, 메타크릴레이트 에스테르, 비닐 에스테르, 비닐 아미드 등으로부터 제조된다. 이러한 합성 중합체는 표준 방법(예를 들면, 문헌["Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75(1988)) 참조)에 따라 용이하게 제조된다. 또한, 다공성 천연 또는 합성 중합체 지지체도 상업적 공급처, 예를 들면 스웨덴 옉살라 소재의 아머삼 바이오사이언시즈로부터 입수가능하다. 다중 양식 리간드를 사용한 항체 정제에 유용한 수지의 구체적인 예로는 팽창상 흡착용 수지, 즉 고 밀도 충전제, 바람직하게는 스테인레스강 충전제를 함유하는 중합체 지지체가 있다.

[0041] 앞서 언급한 바와 같이, 본 방법에 사용되는 크로마토그래피 수지의 다중 양식 리간드는 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함한다. 별법의 실시양태에서, 제 1 단계에 사용되는 수지는 다중 양식이고, 두 가지 상이한 종류의 리간드, 즉 양이온 교환기 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 바람직하게는, 실질적으로 등가량으로 포함한다. 표적 분자와 소수성 상호작용을 할 수 있는 방향족 고리계는 하나 이상의 원자에 의해 분리되거나 또는 예를 들면, 나프틸기로서 하나 또는 2 개의 시클릭 구조를 포함할 수 있다. 또한, 임의적으로 고리계는 예를 들면, 알킬옥시기, 예를 들면 메톡시기로 치환된다. 한 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족 고리계는 질소 원자를 함유하지 않으며, 시클릭 구조의 구성 원자는 탄소 원자(들), 황 원자(들) 및(또는) 산소 원자(들)에 한정된다. 따라서, 이 실시양태에서, 제 1 단계 접촉은 고리 형성 위치에 질소를 갖지 않는 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 다중 양식 양이온 교환제와 이루어진다. 따라서, 한 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족의 고리 형성 원자는 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 유리한 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족의 고리 형성 원자는 탄소(C) 및 황(S)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족의 고리 형성 원자는 탄소(C) 원자이다.

[0042] 한 실시양태에서, 본 방법의 제 1 단계에 사용되는 수지는 다음과 같이 설명된다: Sup-스페이서-X-양이온 교환기-스페이서-방향족 또는 헤테로방향족 고리(여기서, Sup는 지지체이고, 스페이서는 임의적이고, X는 커플링 원자, 예를 들면 O, S 또는 N임). 적합한 스페이서 및 이러한 스페이서를 생성하는 커플링 화학작용은 당 분야에 공지되어 있다. 따라서, 이 실시양태는 양이온 교환기로 작용하는 산기가 방향족에 대한 치환체인 상

기 논의된 US 6,498,236과 상이하다. 따라서, 본 실시양태에 사용된 수지는 그 구조가 방향족과 양이온 관능 사이에 추가의 거리를 생성하기 때문에 표적 화합물에 대해 상이하고 더욱 공간적으로 연장되게 결합할 수 있을 것으로 예측될 수 있다.

[0043] 바람직하게는, 양이온 교환기는 즉, 특정한 pH 값에서 양자화될 수 있는 기인 약한 양이온 교환제이다. 강한 양이온 교환기는 약한 양이온 교환제와는 달리, 모든 pH 값에서 전하를 유지시키는 기를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 다중 양식 리간드는 카르복실기, 예를 들면 하나 또는 2 개의 카르복실기를 포함한다.

[0044] 그러나, 당업자가 이해하듯이, 상기한 다중 양식 리간드도 추가의 상호작용, 예를 들면 수소 결합을 제공할 수 있다. 또한, 본 방법에 사용된 다중 양식 크로마토그래피 리간드는 상기 논의된 기 외에도 불순물 및 항체와의 상호작용 각각에 기여할 수 있거나 없는 하나 이상의 술폰닐기, 아민 또는 카르보닐기를 포함할 수 있다.

[0045] 본 방법에 사용된 다중 양식 크로마토그래피 수지를 제조하기 위해 상기 논의된 담체에 커플링된 리간드는 예를 들면, 상기 논의된 WO 03/024588(스웨덴 옴살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)에 기재된 바와 같이 합성될 수 있고, 여기서 약한 양이온 관능을 포함하는 다중 양식 리간드는 호모시스테인 티오락톤으로부터 출발하여 합성된다. 다중 양식 리간드의 합성에 대한 추가 참조를 위해, 예를 들면, WO 02/059059(스웨덴 옴살라 소재의 아머샴 바이오사이언시즈)를 참조할 수 있다. 리간드를 스페이서로 알려진 적합한 이격화 요소를 통해 담체에 커플링시킬 수 있다. 이 목적에 유용한 커플링 방법의 검토시, 예를 들면, 문헌[Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia and Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992]을 참조할 수 있다. 당 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 매개변수, 예를 들면 리간드 밀도 또는 치환 수준, 지지체의 다공 크기 등을 변화시켜 원하는 성질을 갖는 크로마토그래피 수지를 제공할 수 있다.

[0046] 본 방법의 제 2 단계는 제 1 단계로부터 얻은 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 제 2 크로마토그래피 단계는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC) 및 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택된다. 모든 상기 방법 및 그들의 용도는 당업자에게 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능한 크로마토그래피 수지가 편리하게 사용된다. 지지체 및 리간드의 고정화에 대한 상기 논의된 원리는 이 단계에도 적용된다. 한 실시양태에서, 제 2 단계는 미세한 불순물을 제거하여 매우 순수한 생성물을 생성하는 폴리싱 단계이다. 별법의 실시양태에서, 제 2 단계는 중간 단계이며, 이 경우 본 발명에 따른 방법은 후속 폴리싱 단계도 포함한다. 유리한 실시양태에서, 제 2 단계는 이온 교환 크로마토그래피 단계, 바람직하게는 음이온 교환 크로마토그래피 단계이다. 음이온 교환 수지는 임의의 양하전된 리간드, 예를 들면 Q기를 제공할 수 있다.

[0047] 구체적인 실시양태에서, 본 방법의 제 2 단계는 제 1 단계로부터 얻은 용리액을 다중 양식 음이온 교환 수지와 접촉시키는 것을 포함한다. 더욱 구체적으로, 다중 양식 음이온 교환 수지는 음이온 교환기, 뿐만 아니라 표적 항체와의 협동적 상호작용을 제공할 수 있는 하나 이상의 추가 기를 포함한다. 다중 양식 음이온 교환 수지는 표적 화합물의 음하전된 부위와 상호작용할 수 있는 제 1 기, 및 상기 표적 화합물과 전하-전하 상호작용 이외의 하나 이상의 상호작용을 할 수 있는 제 2 기를 포함한다. 이와 관련하여, 분리 매트릭스 기의 상이한 방식의 상호작용은 동일한 표적 화합물에 대한 것이며, 즉 각각의 표적 화합물은 2 가지 이상의 방식의 상호작용에 의해 이상적으로 흡착되는 것으로 이해된다. 당업자가 명확히 이해하듯이, 이러한 관능기는 동일한 리간드(이 경우, 각각의 리간드가 다중 양식임) 또는 상이한 리간드(이 경우, 분리 매트릭스 전체가 다중 양식임) 상에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 다중 양식 음이온 교환 수지의 음이온 교환기는 강한 이온 교환제이다. 별법의 실시양태에서, 다중 양식 음이온 교환 수지의 음이온 교환기는 약한 이온 교환제이다. 구체적인 실시양태에서, 다중 양식 음이온 교환 수지는 방향족 기를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 리간드는 N-벤질-N-메틸 에탄올아민, N,N-디메틸벤질아민, 2-아미노벤즈이미다졸 및 티오미카민으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 방법에 사용되는 다중 양식 음이온 교환 수지는 지지체 및 고정화에 대한 상기 논의에 따라 당업자에 의해 용이하게 제조된다. 다중 양식 음이온 교환기는 개시되었고, 예를 들면, 본 명세서에 참고문헌으로 인용되는 US 6,702,943(아머샴 바이오사이언시즈)을 참조할 수 있다. 최고의 실시양태에서, 본 방법의 제 2 단계는 비결합 조건 하에서 다중 양식 음이온 교환 수지에서 수행되는 음이온 교환 단계이다. 따라서, 이 실시양태에서, 제 1 단계로부터 생성된 용리액을 비결합 조건 하에서 제 2 크로마토그래피 수지에 가하여 항체가 통과 유체로부터 회수되는 동안, 불순물을 흡착시킨다.

[0048] 본 방법은 임의의 단일클론 또는 다클론 항체, 예를 들면 포유류 숙주, 예를 들면 마우스, 설치류, 영장류 및

인간으로부터 유래하는 항체, 또는 배양된 세포, 예를 들면 하미브리도마로부터 유래하는 항체를 회수하는 데 유용하다. 한 실시양태에서, 회수되는 항체는 인간 또는 인간화된 항체이다. 항체는 임의의 부류일 수 있으며, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 정제되는 항체는 단백질 A, 또는 Fc-함유 항체 단편 또는 융합 단백질에 결합할 수 있는 항체이다. 구체적인 실시양태에서, 회수되는 항체는 면역글로불린 G(IgG)이다. 이와 관련하여, 용어 "항체"가 항체 단편, 및 항체 또는 항체 단편을 포함하는 임의의 융합 단백질도 포함한다는 점이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 앞서 언급된 항체, 뿐만 아니라 이러한 항체를 포함하는 융합 단백질 중 하나의 단편을 정제하는 것도 포함한다. 본 발명에 따라 분리된 항체는 약물, 예를 들면 특정 개인용 활성 성분을 포함하는 개인별 맞춤 의약으로 유용하다. 본 발명에 따라 분리된 항체는 연구 및 진단 분야에도 유용하다.

[0049] 앞서 논의된 바와 같이, 통상 본 명세서에 논의된 다중 양식 양이온 교환 수지의 다중 양식 리간드는 양이온 교환기, 즉 음하전되거나 음하전가능한 기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함한다. 그러나, 당업자에 의해 용이하게 이해되는 바와 같이, 한 종류의 리간드는 양이온 교환기(들)를 포함하고, 또다른 종류는 방향족 또는 헤테로방향족 고리계(들)를 포함하는 2 개 이상의 상이한 종류의 리간드를 지지체에 부착시킴으로써 등가의 수지를 제조할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 논의된 관능기를 단일 커플링 기 또는 상이한 커플링 기를 통해 지지체에 커플링시킬 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 액체를 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 리간드에 흡착시키는 것을 포함하는 것인 액체로부터 하나 이상의 항체를 포획하는 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 수지는 다중 양식이고, 리간드가 고정화된 지지체를 포함하고, 동일하거나 상이한 리간드 상에 존재하는 양이온 교환기 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하며, 이 고리계에서 고리 형성 원자는 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 액체를 제 1 크로마토그래피 수지와 접촉시켜 항체를 리간드에 흡착시키는 단계 (여기서, 수지는 다중 양식이고, 리간드가 고정화된 지지체를 포함하고, 동일하거나 상이한 리간드 상에 존재하는 양이온 교환기 및 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함함), 용리액을 첨가하여 수지로부터 항체를 방출시키는 단계, 및 이로써 얻어진 용리액을 제 2 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 액체로부터 하나 이상의 항체를 정제하는 방법에 관한 것이다. 또한, 상기 논의는 제 2 크로마토그래피 단계가 다중 양식 음이온 교환 수지에서 수행되는 실시양태에서 다중 양식 음이온 교환 수지에 동등하게 적용된다.

[0050] 제 2 측면에서, 본 발명은 다중 양식 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것인 다중 양식 크로마토그래피 수지, 제 2 크로마토그래피 수지, 2 개 이상의 상이한 완충제, 및 항체 정제법을 기술하는 서면 지침을 별도의 구획으로 포함하는 키트이다. 한 실시양태에서, 방향족 또는 헤테로방향족의 고리 형성 원자는 탄소(C), 황(S) 및 산소(O)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 별법의 실시양태에서, 상이한 기는 상이한 리간드 상에 존재하며, 크로마토그래피 수지는 각각의 기를 거의 등가의 비율로 포함하고, 본질적으로 모든 기가 표적과의 상호작용에 이용가능하다. 본 키트를 상기 항체 정제 방법 중 하나에 사용할 수 있다. 유리한 실시양태에서, 수지는 임의의 통상적인 물질, 예를 들면 생체적합성 플라스틱, 예를 들면 폴리프로필렌 또는 유리로부터 제조된 컬럼에 존재한다. 컬럼은 항체의 실험실 규모 또는 대규모 정제에 적합한 크기로 이루어질 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 컬럼에 루어 어댑터(luer 어댑터), 튜빙 연결기(tubing connector) 및 둠근 천장형 너트(domed nut)를 제공한다. 유리한 실시양태에서, 다중 양식 크로마토그래피 수지는 폐기가능한 종류로 이루어진 크로마토그래피 컬럼에 존재한다. 수지를 사용 후 폐기함으로써, 상이한 방법 간의 상호 오염의 위험을 제거한다.

[0051] 마지막으로, 본 발명은 동일하거나 상이한 리간드 상에서 양이온 교환기 및 방향족 및(또는) 헤테로방향족 고리계를 포함하는 다중 양식 크로마토그래피 수지를 포함하는 항체 정제용 폐기가능한 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 한 실시양태에서, 폐기가능한 크로마토그래피 컬럼은 각각의 리간드가 하나 이상의 양이온 교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계를 포함하는 것인 다중 양식 크로마토그래피 수지를 포함한다. 폐기가능한 컬럼의 구체적인 실시양태에서, 다중 양식 리간드의 방향족 또는 헤테로방향족 고리계의 고리 형성 원자는 탄소(C), 황(S) 및 산소(O) 원자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 폐기가능한 크로마토그래피 컬럼은 통상적인 액체 크로마토그래피용 수지를 사용하여 패킹되거나 또는 팽창상 흡착, 즉 수지가 작동 동안 유동화되는 방법에 적합한 형태의 수지를 제공할 수 있다. 방금 전의 경우, 리간드를 운반하는 지지체에 일부 통상적인 고 밀도 충전제, 예를 들면 강철 또는 유리를 제공하였다.

[0052] 도면의 상세한 설명

[0053] 도 1은 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 다중 양식 양이온 교환 크로마토그래피 배지(U1128042)상에서 IgG를 함유하는 공급물을 정제한 것으로부터의 크로마토그램을 도시한다. 분획 9 내지 16을 수집하고, 겔 여과

에 의한 분석을 위해 풀링(pooling)하였다. 회수율은 > 95%인 것으로 결정되었다. 280 nm에서의 UV 흡광도를 실선으로 나타내고, 전도성을 파선으로 나타내고, pH를 점선으로 나타낸다.

[0054] 도 2는 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 공급물(컬럼 U1128042 상의 출발 물질)의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다. 샘플을 0 ml에서 주입하였고, IgG 피크는 13 ml에서 나타난다. 13 ml에서의 피크는 표적 MAb이고, 잔여 피크는 응집물 및(또는) 숙주 세포 단백질이다.

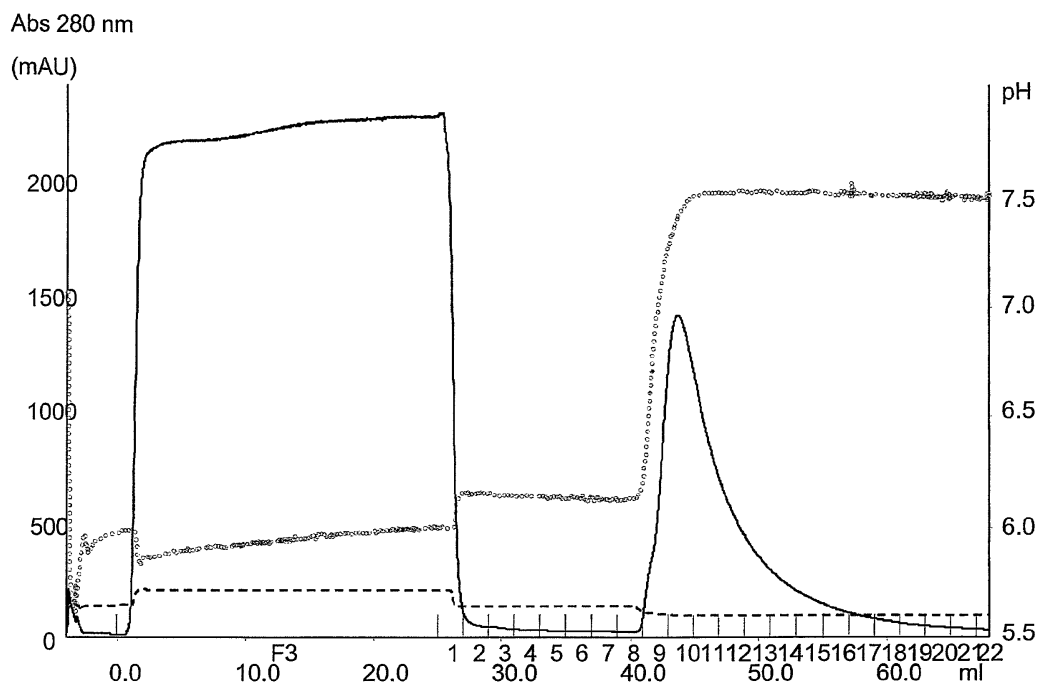
[0055] 도 3은 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 U1128042로부터 용리된 풀링된 분획 9-16의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다. 용리된 샘플에서 13 ml에서의 피크는 표적 MAb이고, 잔여 피크는 응집물 및(또는) 숙주 세포 단백질이다.

[0056] 도 4는 본 발명에 따른 방법의 단계 2, 더욱 구체적으로 하기 실시예 4에 설명된 바와 같이 다중 양식 음이온 교환 크로마토그래피를 사용한 폴리싱 단계로부터의 크로마토그램을 도시한다. pH를 6으로 조정한 후, 제 1 정제 단계(실시예 3)에서 용리로부터 풀링된 분획(9-16)을 컬럼에 가하였다. 통과 유체로부터의 풀링된 분획 3-10에서의 IgG 순도는 분석 겔 여과에 의해 매우 높은 것으로 평가되었다(도 5 참조). pH 6을 사용하여, IgG가 결국 통과 유체 중에 존재할 것으로 예상하였다. 그러나, 크로마토그램의 형상은 일부 단백질이 컬럼에 결합함을 시사한다. 또한, 이는 크로마토그래피 러닝(running) 후 회수율이 80%로 계산됨으로써 확인되었다. 러닝 완충제를 사용한 세척 개시시 발견되는 가외 피크는 아마도 컬럼 밖으로 떨어져 나온 느슨하게 결합된 단백질일 것이다.

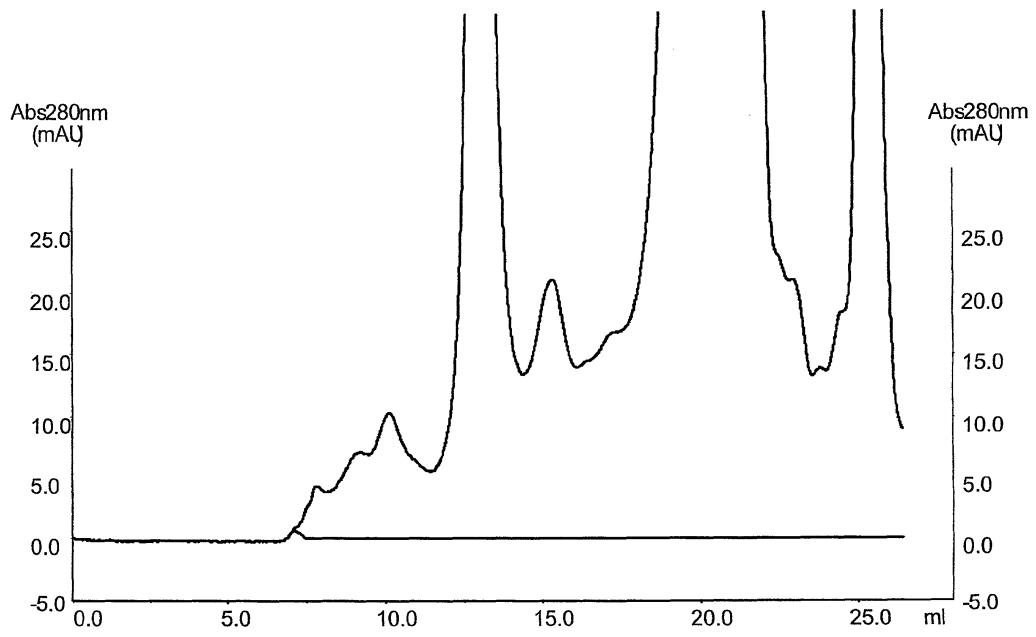
[0057] 도 5는 하기 실시예 4에 설명된 바와 같이 컬럼 238092 상에 가해진 통과 유체(분획 3-10)의 분석 겔 여과 크로마토그램을 도시한다. 13에서의 피크는 IgG이고, 10에서의 피크는 응집물이다. 이 분석 방법에 의해서는 실제적인 오염 숙주 세포 단백질이 검출될 수 없다. 척도는 도 2 및 도 3과 동일하지 않으며, 훨씬 더 확대한 것이다.

도면

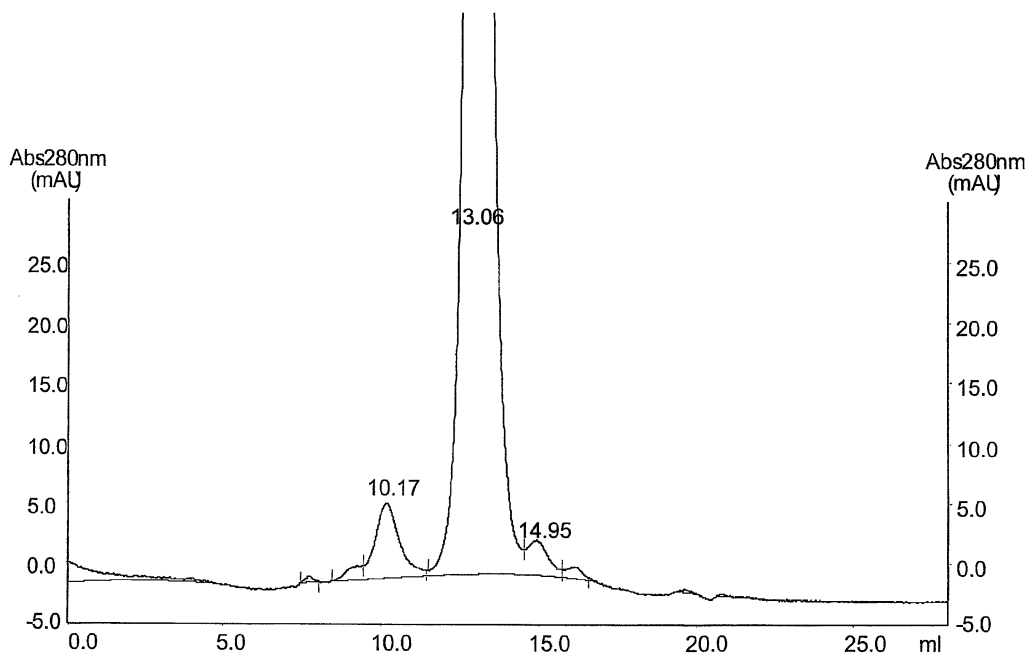
도면1



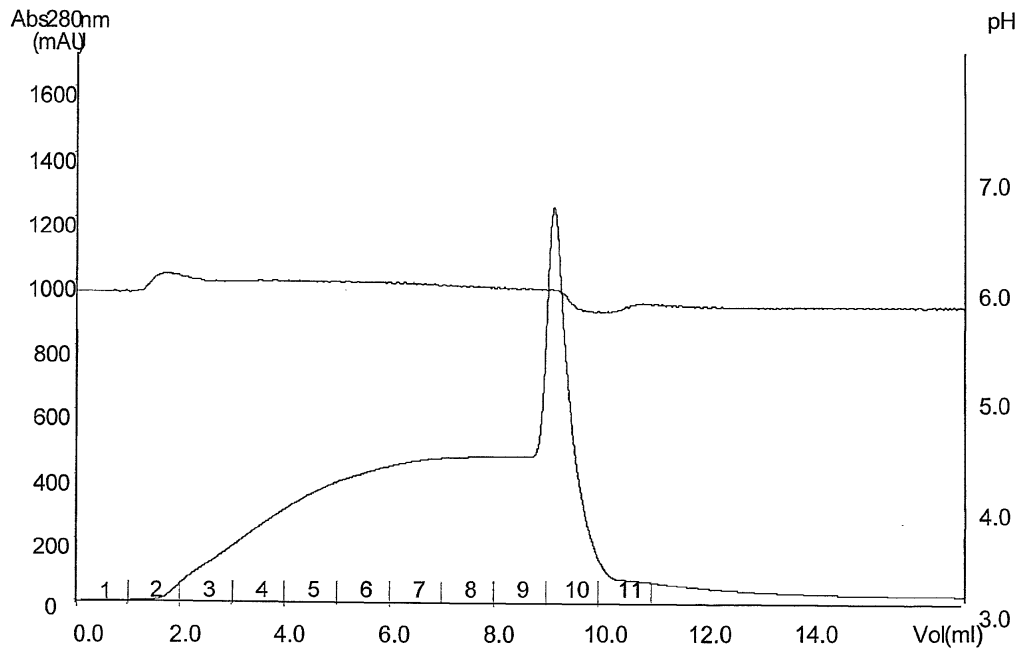
도면2



도면3



도면4



도면5

