



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월29일  
(11) 등록번호 10-0808149  
(24) 등록일자 2008년02월21일

(51) Int. Cl.

C07K 1/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7010624

(22) 출원일자 2002년08월14일

심사청구일자 2005년11월24일

번역문제출일자 2002년08월14일

(65) 공개번호 10-2003-0001358

(43) 공개일자 2003년01월06일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2001/000666

국제출원일자 2001년01월22일

(87) 국제공개번호 WO 2001/62774

국제공개일자 2001년08월30일

(30) 우선권주장

00103692.0 2000년02월22일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

W01990002757 A1

W01990009800 A1

전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자

라보라토리스 세로노 에스.에이.

스위스, 바우드, 1267 코인신스, 센트레 인더스트리엘

(72) 발명자

파라디시장프랑코

이탈리아아이-00016몬테로톤도5비아마르티리데비아화니

로지마라

이탈리아아이-00179로마비아포쩌드'오로21

스카그리아로라

이탈리아아이-00155로마비아에프토바그리에리213

(74) 대리인

서만규

심사관 : 손영희

(54) 정제된 L H

(57) 요약

CHO 세포의 상등액에서 조 재조합 황체형성호르몬으로부터 재조합 인간 황체형성호르몬(황체형성호르몬)의 정제 방법은 이온 교환 크로마토그래피 및 역상 HPLC의 혼합 사용을 포함한다. 이온 교환 크로마토그래피 및 역상 HPLC는 두 번씩 수행되고 겔 투과 칼럼의 최종 사용은 오염물의 잔여 흔적으로부터 정제를 할 수 있다. 본 방법으로 수득된 고도로 정제된 황체형성호르몬의 특정 생물활성은 약 25.000IU/mg의 양으로 특히 높다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 모로코, 모잠비크, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 우간다, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) DEAE 세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼(Sepharose ion-exchange chromatography column)을 통한 샘플 용리;
- (b) Q-세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼을 통한 용리;
- (c) 실리카 C18 역상 HPLC 칼럼을 통한 용리;
- (d) 다시 실리카 C18 역상 HPLC 칼럼을 통한 용리; 및
- (e) 겔 투과 칼럼을 통한 용리 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 DEAE 세파로스 이온 교환 크로마토그래피를 통한 용리 단계가 pH8의 인산나트륨 완충액에서 수행되는 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 Q-세파로스 이온 교환 크로마토그래피를 통한 용리 단계가 pH7.5의 암모늄 아세테이트 완충액에서 수행되는 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 역상 HPLC 단계(c)가 이동상으로 2-프로판올 및 암모늄 아세테이트로 수행되는 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 역상 HPLC 단계(d)가 이동상으로 2-프로판올 및 트리스-HCl로 수행되는 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 황체형성호르몬이 인간 황체형성호르몬인 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 샘플이 CHO 세포의 배양 배지인 황체형성호르몬의 정제법.

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

## 명세서

### 기술분야

- <1> 본 발명은 황체형성 호르몬(LH)의 정제 방법에 관한 것으로, 특히 이온 교환 크로마토그래피와 역상 HPLC의 조합 사용을 포함하는 조 재조합 황체형성호르몬의 샘플로부터 재조합 황체형성호르몬(r-LH)의 정제 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- <2> 황체형성 호르몬(LH)은 다른 고나도트로핀, 여포-자극 호르몬(FSH)와 함께 시상의 앞쪽 엽에서 분비된 고나도트로핀이다. 이들 호르몬은 비-공유결합된  $\alpha$  및  $\beta$  서브유닛(subunits)으로 구성된 헤테로다имер이다.
- <3> 이들 고나도트로핀은 성선의 정상적 기능과 남성 및 여성의 성호르몬 분비를 자극한다. 여성에 있어, 여포 자극 호르몬은 여포 및 난자의 발생과 성숙을 자극한다. 여포가 발생함에 따라, 이것은 중기에 황체형성호르몬의 방출을 자극하는 양으로 에스트로겐을 생산한다. 이는 여포의 파열로 배란을 일으키고 여포를 프로게스테론을 분비하는 황체로 전환한다. 남성에 있어, 황체형성 호르몬은 정소의 간질세포를 자극하여 테스토스테론을 분비하고, 다음으로 이것은 곡정세관의 직접적 영향을 미친다. 황체형성 또는 여포자극 활성 또는 양자를 갖는 고나도트로핀 기질은 주로 여성에 있어서 뿐 아니라, 남성에 있어, 불임 질환의 치료에 사용된다. 이런 기질은 LH 활성을 갖는 융모막 고나도트로핀과 LH 및 FSH 활성을 갖는 인간의 폐경기 고나도트로핀을 포함한다. 재조합 DNA-유도 인간 황체형성 호르몬(rechLH)은 융모막 고나도트로핀에 대한 대안으로 또는 FSH와 연합한 투여를 위해 조사되고 있다.
- <4> 이온 교환, 겔 여과 및 이뮤노어피니티 크로마토그래피(잭, 지.더블유., 블라썸, 알., 제임스, 케이., 보이드, 제이.이. 및 미클렘, 엘.알. 인간 하수체 글리코프로테인 호르몬 티로트로핀, 폴리트로핀 및 류트로핀의 이뮤노어피니티 크로마토그래피에 의한 자동화 생산, 저널 오브 케미칼 테크놀로지 앤드 바이오테크놀로지 39, 45-58, 1987)와 같은 다양한 방법이 황체형성호르몬을 분리하고 정제하기 위해 사용되어 왔다.
- <5> 이온 교환 크로마토그래피는 이들 호르몬의 분리를 위해 사용되어 왔으나, 이 방법은 하수체 조직 내의 황체형성호르몬의 상당한 전하 불균일성에 기인한 몇몇 상관된 문제점을 가짐이 나타났다. 첫째로, 이들 글리코프로테

인 및 FSH는 중복하는 전하를 가지기 때문에, 이들의 완전한 분리는 어렵고 힘들다. 둘째로, 단일 분획으로 이들 호르몬의 정제는 어렵다(스톡켈 하트리, 에이., 토마스, 엠., 퍼니발, 비.이., 번스, 티.더블유. 및 랑글레이, 피., 인간 갑상선 자극호르몬의 정제분의 갑상선 자극 및 지방분해 활성, 저널 오브 엔도크리놀로지 53, 95-100, 1972). 결과적으로, 어떤 변형된 형태의 호르몬이 황체형성호르몬의 경우에 제안된 정제에서 선택될 수 있다(스토링, 피.엘. 자이디, 에이.에이., 미스트리, 와이.지. 린드버그, 엠., 스탠닝, 비.이. 및 디즈팔루시, 이.. 고도로 정제된 인간 황체형성호르몬의 제조의 비교;생체내 바이오어세이, 생체의 바이오어세이 및 이뮤노어세이에 의해 결정된 황체형성호르몬 역가의 차이(A comparison of preparations of highly purified human pituitary luteinising hormone: differences in the luteinising hormone potencies as determined by *in vivo* bioassays, *in vitro* bioassay and immunoassay). Acta Endocrinologica 101, 339-347, 1982). 선택적인 정제는 이들의 탄화수소 화합물의 구조적 분석을 포함하는 이들 비균질한 특성으로 더욱 복잡하게될 것이다. 시아릴(sialyl) 및 셀레이트 기를 포함하는 음이온성 올리고당류의 함량 변화가 황체형성호르몬 내의 전하 비균질성의 주요 원인일 수 있다.

<6> 전통적인 분획화 방법은 라디오이뮤노어세이(radioimmunoassay)에 의해 1166 i.u. 및 생물학적 어세이에 의해 982 i.u.의 역가를 갖는 인간 뇨의 황체형성호르몬(LH)의 제조에 대해 기술되어 있다(도니니 에스. 및 도니니 피. Acta endocr., Copenh. 63, Suppl. 142, 257-277, 1969). 인간 융모막 고나도트로핀(HCG)을 정제하기 위한 래빗 항혈청의 면역흡착은 폐경기 뇨로부터 여포자극호르몬(FSH)의 제조간에 수득된 주 및 부 분획으로부터 황체형성호르몬을 정제하는데 사용된다(반 헬, 에치., 슈우르스 에이.에치.더블유.엠. 및 덴 홀란더르, 에프.씨.. 고나도트로핀에 대한 심포지움(In Symposium on gonadotrophins), New York, 17 June 1971. 에드스비.비. 삭제나, 씨.지. 베링 및 에치.엠. 간디. New York: John Wiley & Son, Inc, 1972). 수득된 제조물은 높은 황체형성호르몬 역가를 가지며, 또한 도니니 및 도니니(1969)에 의해 제조된 것에 비해 높은 FSH:LH 비율을 가진다.

<7> 제조합 LH는 FSH 및 TSH와 같은 기타 고나도트로핀 호르몬을 회피하는 이점이 있다. 그러나, 제조합 황체형성호르몬의 조 산물은 이의 제조합 생산에 사용된 세포의 모든 기타 단백질과 오염원을 포함하여 제조합 황체형성호르몬의 절대적 순도를 달성하는 방법이 아주 바람직하다.

### 발명의 상세한 설명

<8> 본 발명자 등은 제조합 과정 후 수득된 배양 배지의 샘플로부터 또는 폐경기 후 뇨의 조 농축물로부터 유래된 황체형성호르몬의 조 제조산물은 얻어진 LH가 실용적으로 조 LH 제조산물에 포함된 단백질 및/또는 기타 오염물질이 없는 정도로 정제될 수 있다는 것을 알아냈다. 출발 물질에 의존하여, 단백질 및 기타 오염물질은 인간 유래의 것(출발물질; 인간 폐경기의 고나도트로핀) 또는 호스트 셀 유래의 것, 예를 들어 CHO 호스트 셀의 경우 CHO이다.

<9> 정제법은 이온 교환 크로마토그래피와 역상 HPLC의 사용에 기초한다. 더욱이 겔 투과 컬럼의 선택적 사용은 순수 LH 조제물로 부터 어떠한 오염 잔여물의 흔적도 제거할 수 있게한다. 두 단계의 이온 교환 크로마토그래피와 두 단계의 역상 HPLC가 수행될 때 최적의 결과가 수득된다.

<10> 본 발명의 방법은 제조합 과정 후 수득된 배양배지의 샘플로부터 출발하여 얻어진 고도로 정제된 LH가 실질적으로, 예를 들어 배양 배지 내에 포함된 FBS 단백질, 핵산 또는 제조합 과정에서 사용된 호스트 셀에 존재하는 기타 오염물질이 없는 제조합 LH의 정제에 사용될 수 있다.

<11> 본 발명의 방법은 폐경기 후 뇨의 농축물로부터 출발하여 뇨의 LH 정제뿐 아니라, 기타 종, 예를 들어 소과 동물, 말, 돼지, 양, 랫트, 마우스 및 몽키를 포함하는 특히 포유동물로부터 LH의 정제에 사용될 수 있다.

<12> 따라서, 본 발명의 목적은 이온 교환 크로마토그래피와 역상 HPLC의 혼합 사용을 포함하는 샘플로부터 LH의 정제법을 제공하기 위한 것이다. 이 방법은 샘플을 이온 교환 크로마토그래피하는 단계와 역상 HPLC에 용리하는 단계를 포함한다. 더욱이 겔 투과 컬럼에 용리하는 단계가 부가적으로 수행될 수 도 있다.

<13> 출발 준비물의 순도에 의존하여, 정제과정으로 최적의 결과를 얻기 위해 바람직하기로는 이온 교환 크로마토그래피와 역상 HPLC를 두번 사용한다. 이런 과정은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

<14> (a) DEAE 세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼(Sephrose ion-exchange chromatography column)을 통한 샘플 용리;

<15> (b) Q-세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼을 통한 용리;

- <16> (c) 실리카 C18 역상 HPLC 칼럼을 통한 용리;
- <17> (d) 다시 실리카 C18 역상 HPLC 칼럼을 통한 용리[선택적으로 단계(c)와 다른 용리액으로]; 및
- <18> (e) 겔 투과 칼럼을 통한 용리.
- <19> 본 발명의 바람직한 실시형태에서 DEAE 세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼을 통한 용리는 pH8에서 소듐 포스페이트 버퍼에서 수행된다.
- <20> 바람직하기로는 Q-세파로스 이온 교환 크로마토그래피 칼럼을 통한 용리는 pH7.5에서 암모늄 아세테이트 버퍼에서 수행된다.
- <21> 역상 HPLC 단계(c)는 바람직하기로는 이동상으로 2-프로판올 및 암모늄 아세테이트로 수행된다.
- <22> 역상 HPLC 단계(d)는 바람직하기로는 이동상으로 2-프로판올 및 트리스-HCl로 수행된다.
- <23> 본 발명의 LH는 재조합 과정에서 사용된 포유류 세포(바람직하기로는 CHO 세포)의 배양 배지로 부터 유도되는 바람직하기로는 인간 LH 및 가장 바람직하기로는 재조합 인간 LH이다.
- <24> 더욱이 본 발명의 목적은 상술한 바와 같은 재조합 과정에 의해 제조된 재조합 LH의 치료적 유효량을, 동결건조 산물의 안정화를 위해 필요하다면 슈크로스과 같은 적당한 부형제와 함께 포함하는 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다. 재조합 LH의 약학적 조성물은 특히 피하 투여에 적당하다.
- <25> 본 발명은 재조합 과정의 배양배지 내의 조 산물로 부터 LH의 정제, 특히 재조합 LH의 정제방법을 제공한다. r-hLH는 배양 배지 내에 포함될 수 있는 송아지 태아 혈청(FBS) 단백질 및 재조합 과정에서 사용된 호스트 셀에 포함된 핵산 또는 기타 오염물질이 없는 고도의 순도와 높은 특정 활성으로 수득된다.
- <26> 본 발명은 출발 물질 샘플로 생물학적 물질, 특히 여기서 언급된 기타 오염 단백질 및 LH를 포함하는 조 혼합물을 사용하기 위한 것이다. 아래에 자세하게 기술된 실시예는 생물반응조로 부터 배양 상등 배지에서 수득된 r-hLH를 포함하는 출발 물질 샘플을 사용한다. 대안적으로, 이 샘플은 폐경기후 뇨의 조 농축물인 인간 폐경기 고 나도트로핀(hMG)이다.
- <27> 이 샘플은 생물반응조를 통해 확산된 신선하게 수집한 세포 배양 상등 배지로 구성된다. 이것은 바람직하기로는 여과를 통해 분류된다. 그런 다음 조 용액은 필요하다면 농축될 수 있고, 10보다 적은 분자량을 갖는 물질을 제거하기 위한 한외여과를 할 수 있다. 한외여과는 또한 버퍼가 pH8 소듐 포스페이트로 변화되도록 한다.
- <28> 예비 단계 후, 샘플은 그리고 나서 이온 교환 크로마토그래피와 역상 HPLC의 대상이 되고, 바람직하기로는 각각 두번씩 수행된다. 제 일 이온 교환 단계는 바람직하기로는 DEAE 세파로스로 수행된다. 이는 필수적으로 대부분의 비-LH 단백질이 제거되는 LH"흐름-관통(flow-through)" 단계이다. 제 이 이온 교환 단계는 바람직하기로는 Q-세파로스 칼럼으로 수행된다. 이는 또한 LH"흐름-관통" 단계이고 잠정적 DNA 및 호스트 셀 또는 배지 단백질 오염물질을 제거하기 위한 것이다. 바람직한 실시형태로 이 단계는 약 5℃에서 pH7.5에서 암모늄 아세테이트 버퍼로 용리하여 수행된다.
- <29> 실리카 C18상에서 역상 크로마토그래피는 또한 바람직하기로는 두 번 수행되고 FBS, 세포 단백질 및 외독소 오염물질의 잔량을 제거하는데 유효하다. 첫번째 역상 HPLC 단계는 바람직하기로는 이동상으로 2-프로판올 및 암모늄 아세테이트로 수행된다. 두번째 역상 HPLC 단계는 바람직하기로는 이동상으로 2-프로판올 및 트리스-HCl을 사용하여 수행된다. 그런 다음 유지된 용액은 농축되고 pH8의 암모늄 하이드로젠 카보네이트로 회수될 수 있다. 농축된 산물은 바람직하기로는 세파실 S100 HR로 겔 투과 크로마토그래피된다. 이 단계에서, 분자 크기에 기초한 분리는 pH8의 암모늄 하이드로젠 카보네이트로 용리하여 달성되고 그리고 나서 이 용리액은 바람직하기로는 여과하여 바이러스성 오염물질을 제거하고 나서 pH8 소듐 포스페이트 버퍼에서 10 KD 컷-오프로 멤브레인상에서 한외여과된다. 여과 후, 정제된 LH 벌크는 바람직하기로는 저온에서 멸균된 병에 보관된다.

## 실시예

- <30> 실시예1
- <31> 시약
- <32> 초산(glacial), 분석 등급 (Ph.Eur.)

- <33> 암모늄 아세테이트, 분석 등급
- <34> 암모늄 하이드로젠 카보네이트, 분석 등급 (B.P.)
- <35> 이염기성 소듐 포스페이트, 분석 등급
- <36> 염산, 분석 등급 (Ph.Eur.)
- <37> 인산, 분석 등급 (Ph.Eur.)
- <38> 2-프로판올, 분석 등급 (Ph.Eur.)
- <39> 소듐 크로라이드, 분석 등급 (Ph.Eur.)
- <40> 일염기 소듐 포스페이트, 분석 등급
- <41> 수산화나트륨 펠릿(pellets), 분석 등급 (Ph.Eur.)
- <42> 트리플루오로초산(TFA), HPLC 등급
- <43> 트리스-(하이드록시메틸) 아미노메탄, 분석 등급
- <44> 주사용수 (WFI) (Ph.Eur.)
- <45> **정제과정 요약 흐름도**
- <46> 표 1은 각 중간 단계의 주요한 조작을 개략적으로 나타낸 r-hLH 정제과정을 요약한 흐름도이다.

**표 1**

- <47> **r-hLH 정제과정을 요약한 흐름도**

		바이오리액터로 부터 배양배지					
단계I							
			한외여과 (10 kD)				
		농축된 조 r-hLH 수득					
단계II							
		모아진 농축된 조 r-hLH 수득					
		DEAE 세파로스 CL-6B					
				비결합 분획은 r-hLH를 함유			
		한외여과 (100 kD)					
		한외여과 (10 kD)					
단계III			Q-세파로스 FF				
				비결합 분획은 r-hLH를 함유			
단계IV			1 <sup>st</sup> RP-HPLC				
				용리액은 r-hLH 함유			
단계 V			2 <sup>nd</sup> RP-HPLC				
				용리액은 r-hLH 함유			
		한외여과 (10 kD)					

단계VI			세파크릴 S100 HR			
				비결합 분획은 r-hLH를 함유		
				한외여과 (10 kD)		
				보유액은 r-hLH를 함유		
			r-hLH 벌크 용액			

<48> **수득물의 분류, 농축, 다이알리시스 및 여과 (단계 I)**

<49> 이 단계(단계 I)에서 버퍼는 조절된 조성물로 변하여 예비 농축물이 달성된다. 이 단계는 약 +5℃에서 수행되고 생물반응조의 생산주기 동안 각 수득물에 대해 개별적으로 반복된다. 바람직한 온도 범위는  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 이다.

<50> (i)수득물의 분류

<51> 생물반응조로 부터 신선하게 모아진 배양배지의 수용에 의해 물질은 바람직하기로는 여과에 의해 상등 용액의 분류로 출발이 진행된다.

<52> (ii)수득물의 농축 및 투석

<53> 뱃찌사이에서 0.05M 수산화나트륨에 보관된 멤브레인은 pH가 약 8까지 내려갈 때까지 WFI로 린스한다.

<54> pH8 0.025M 인산나트륨의 평형 완충액이 물을 대체한다. 생물반응조로 부터 조절된 조 r-hLH 용액이 농축되고 투석되어 10kD(멤브레인 컷-오프 10kD)보다 낮은 분자량을 갖는 물질이 제거된다.

<55> 얻어진 농축물은 약 -15℃에서 보관된다.

<56> **DEAE 세파로스 CL-6B 상에서 이온 교환 크로마토그래피(단계 II)**

<57> 크로마토그래피단계는 대부분의 비 r-hLH 단백질이 제거되는 LH"흐름-관통" 단계이고 더욱이 용액은 농축되고 투석된다. 산물이 컬럼을 통과하는 크로마토그래피 단계는 차가운 방에서 수행된다.

<58> (i)DEAE 세파로스 CL-6B 상에서 이온 교환 크로마토그래피

<59> 컬럼은 약하게 하전된 음이온 교환 수지인 디에틸 아미노 에탄(DEAE) 세파로스로 충전되고 첫번째 경우는 pH8 0.15M 인산나트륨의 평형된다. 바람직한 pH범위는  $8 \pm 0.3$ 이다.

<60> 그리고 나서 이 컬럼은 pH8 0.025M 인산나트륨의 러닝 버퍼 상태로 된다. 바람직한 pH범위는  $8 \pm 0.3$ 이다.

<61> r-hLH용액은 여과 장치를 통해 컬럼상에 적하되어 가드(guard)로 컬럼에 위치된다.

<62> 컬럼은 pH8 0.025M 인산나트륨으로 채워진다. 바람직한 pH범위는  $8 \pm 0.3$ 이다. 크로마토그래피의 과정은 280nm에서 스펙트로포토메트리로 모니터링된다. 리딩 용출액은 바세린이 5% 흡수 표시를 지날 때까지 버린다. r-hLH를 포함하는 비결합된 분획은 바세린이 10%까지 내려갈때까지 모은다.

<63> (ii)한외여과

<64> 0.05M 수산화나트륨에 보관된 100kD 컷-오프 멤브레인을 장착한 한외여과 장치는 투과액의 pH가 약 8이 될 때까지 WFI로 린스한다.

<65> 물은 pH7.5의 평형 완충액 0.08M 암모늄 아세테이트로 대체된다. 바람직한 pH범위는  $7.5 \pm 0.3$ 이다.

<66> 이온 교환 크로마토그래피 단계로 부터 수득된 r-hLH 용액은 100kD 멤브레인을 통해 한외여과되고 투과 분획이 수집된다.

<67> 한외여과지는 pH7.5의 0.08M 암모늄 아세테이트의 적량으로 수세하고 모든 수세 분획은 투과용액에 수집된다.



- <68> (iii)농축 및 투석
- <69> 0.05M 수산화나트륨에 보관된 10kD 컷-오프 멤브레인을 장착한 한외여과 장치는 투과물의 pH가 약 8이 될 때까지 WFI로 린스한다.
- <70> 물은 평형 완충액인 pH7.5의 0.08M 암모늄 아세테이트로 대체된다.
- <71> r-hLH 용액은 농축된다. pH7.5의 0.08M 암모늄 아세테이트가 보유액에 부가되고 용액은 농축된다. 투석은 보유액의 pH와 전도성이 유입된 버퍼와 동일하게 될 때까지 지속된다. 수득된 보유액은 회수된다.
- <72> **Q 세파로스 패스트 플로우 상에서 이온 교환 크로마토그래피(단계 III)**
- <73> 이 단계는 또한 r-hLH "흐름-관통" 단계이고 잠정적 DNA와 호스트 셀 또는 배지 단백질 오염물질을 제거하기 위한 것이다.
- <74> (i)칼럼 평형화
- <75> 칼럼의 컨디셔닝은 러닝 버퍼인 pH7.5의 0.08M 암모늄 아세테이트로 수행된다. 바람직한 pH범위는  $7.5 \pm 0.3$ 이다.
- <76> (ii) Q 세파로스 FF 상에서 r-hLH 정제 단계
- <77> r-hLH용액은 가드로서 Q 세파로스 칼럼상에 위치된 여과 장치를 통해 칼럼상에 적하된다.
- <78> 칼럼은 더욱이 pH7.5의 0.08M 암모늄 아세테이트로 수세된다.
- <79> 리딩 용출액은 바세린이 5% 흡수 표시를 지날 때까지 버린다.
- <80> r-hLH를 포함하는 비결합된 분획은 바세린이 10%까지 내려갈때까지 모은다.
- <81> 단계III으로 부터의 r-hLH 용액은 계속된 사용을 위해 동결되어 보존될 수 있다.  $-15^{\circ}\text{C}$  또는 그 이하의 온도에서 보존되면, 역상 HPLC(단계IV)를 취하기 전에 r-hLH 중간체는  $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서, 전형적으로는 24  $\pm$  8시간에 걸쳐 해동된다.
- <82> **첫번째 제조공정의 역상 HPLC(단계IV)**
- <83> 실온에서 수행되는 이 단계는 혼적으로 남아있는 양의 FBS 및 CHO 단백질 및 외독소 오염물질을 제거하는데 유효하다.
- <84> (i)칼럼 충전 및 수지 활성화
- <85> 칼럼은 C18 와이드-포어 실리카로 충전되고, 새 것이라면 C18수지는 2-프로판올로 조절된다.
- <86> (ii)칼럼 평형화
- <87> 칼럼은 pH7의 0.05M 암모늄 아세테이트 버퍼 내 12.4%w/w 2-프로판올로 평형화된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <88> (iii)단계III으로 부터 r-hLH 용액의 pH 및 부피 조정
- <89> r-hLH 용액은 진한 초산으로 pH7로 조정된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <90> 그런 다음 r-hLH 용액의 부피는 12.4%w/w 에 해당하는 2-프로판올의 최종 농도를 얻기 위해 2-프로판올의 부가로 조정된다.
- <91> (iv)조정된 r-hLH 용액의 여과
- <92> 0.22 $\mu\text{m}$  여과지를 장착한 여과장치가 pH7의 0.05M 암모늄 아세테이트 버퍼 내 12.4%w/w 2-프로판올로 수세된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <93> 조정된 r-hLH 용액은 여과된다.
- <94> 용기는 pH7의 0.05M 암모늄 아세테이트 버퍼 내 12.4%w/w 2-프로판올 적량으로 수세된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <95> (v)첫번째 C18 RP-HPLC 칼럼 상에서 r-hLH 정제단계

- <96> r-hLH 용액은 칼럼 상에 적하되고 크로마토그래피는 280nm에서 UV 스펙트로포토메터에 의해 모니터된다.
- <97> 칼럼은  $A_{280}$ 이 바세린으로 환원되어 이에 의해 비결합 분획이 버려질 때까지 pH7의 0.05M 암모늄 아세테이트 버퍼 내 12.4%w/w 2-프로판올로 충전된다.
- <98> r-hLH 용리는 연속하여 직선 기울기 14.7% 에서 20.7%w/w 2-프로판올을 통한 2-프로판올 및 암모늄 아세테이트 0.05M 이동상으로 수행된다.
- <99> r-hLH는  $A_{280}$ 이 증가하기 시작할때 분획된다. 20%의 폴 스케일보다 그 높이가 큰 r-hLH 피크의 모든 분획은 모아진다.
- <100> **두번째 제조공정의 역상 HPLC(단계 V)**
- <101> 실온에서 수행되는 이 단계는 혼적으로 남아있는 양의 FBS 및 CHO 단백질 및 외독소 오염물질을 제거하는데 유효하다.
- <102> (i)칼럼 충전 및 수지 활성화
- <103> 칼럼은 C18 와이드-포어 실리카로 충전되고, 새 것이라면 C18수지는 2-프로판올로 조절된다.
- <104> (ii)칼럼 평형화
- <105> 칼럼은 pH7의 0.5M 트리스-HCl 버퍼 내 14.7%w/w 2-프로판올로 평형화된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <106> (iii)단계IV로 부터 r-hLH 용액의 pH 및 부피 조정
- <107> 2-프로판올 농도를 칼럼 평형화 완충액(14.7%w/w)의 것과 대략 같게 낮추기 위해 pH7의 2M 트리스-HCl 버퍼가 r-hLH 샘플에 추가된다.
- <108> r-hLH 용액은 염산 12M로 pH7로 조정된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다.
- <109> (iv)두번째 C18 RP-HPLC 칼럼 상에서 r-hLH 정제단계
- <110> r-hLH 용액은 칼럼 상에 적하되고 크로마토그래피는 280nm에서 UV 스펙트로포토메터에 의해 모니터된다.
- <111> 칼럼은 pH7의 0.5M 트리스-HCl 버퍼 내 14.7%w/w 2-프로판올로 충전된다. 바람직한 pH범위는  $7 \pm 0.2$ 이다. 비결합 분획은 버려진다.
- <112> r-hLH 용리는 연속하여 직선 기울기 14.7% 에서 20.7%w/w 2-프로판올을 통한 2-프로판올 및 0.5M 트리스-HCl 이동상으로 수행된다.
- <113> r-hLH는  $A_{280}$ 이 증가하기 시작할때 분획된다. 20%의 폴 스케일보다 그 높이가 큰 r-hLH 피크의 모든 분획은 모아진다.
- <114> (v)투석
- <115> 두번째 C18 RP-HPLC 단계로 부터 r-hLH 용액은 WFI로 희석된다. 바람직하기로는 8배 부피의 WFI가 사용된다.
- <116> 희석된 r-hLH 용액은 WFI에 대해 10kD 멤브레인상에서 한외여과(단계VI 참고)에 의해 투석된다. 적량의 0.5M 암모늄 하이드로젠 카보네이트 pH8가 연속하여 추가되고 투석은 암모늄 하이드로젠 카보네이트 완충액의 특성이 만족될 때까지 계속된다.
- <117> 보유액은 최종 농도 약 1L로 농축되고 회수된다. 한외여과지는 0.5M 암모늄 하이드로젠 카보네이트 pH8로 수세되고 한외여과 수세액은 보유액으로 모아져 선택적으로 더욱 농축된다. 더욱이 이 농축액은 다음 단계, 즉 단계VI에서 사용된 칼럼의 사이즈에 의존한다.
- <118> **세파크릴 S100 HR 상에서 겔 투과 크로마토그래피 및 한외여과(단계VI)**
- <119> 이 단계에서, 분자 사이즈에 기한 분리가 달성되고 용액은 한외여과된다. 이 단계에서 수행된 모든 조작은 약  $+5^{\circ}\text{C}$ 에서 수행된다. 바람직한 온도 범위는  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3$ 이다.
- <120> (i)세파크릴 S100 HR 상에서 겔 투과 크로마토그래피
- <121> 칼럼은 세파크릴 S100 HR로 충전되고 첫번째로 WFI로 평형화된다.

- <122> 그리고 나서 칼럼은 0.5M 암모늄 하이드로젠 카보네이트 pH8로 평형화된다.
- <123> 칼럼은 0.5M 암모늄 하이드로젠 카보네이트 pH8로 충전된다. 크로마토그래피과정은 280nm에서 스펙트로포토메터에 의해 모니터된다.
- <124> r-hLH는  $A_{280}$ 이 증가하기 시작할때 분획된다. 20%의 풀 스케일보다 그 높이가 큰 r-hLH 피크의 모든 분획은 모아진다.
- <125> 세파크릴 S100 HR 칼럼으로 부터 용리된 r-hLH 용액은 그런다음 바람직하기로는 필터, 예를 들어, Virosolve<sup>TM</sup>를 통과하여 바이러스성 오염물질을 제거한다.
- <126> (ii)r-hLH의 투석 및 농축
- <127> 정제 간에 0.05M 수산화나트륨에 보관된 멤브레인(한외여과 멤브레인 10kD)은 pH가 약 8로 떨어질 때까지 WFI로 린스된다.
- <128> 회석된 r-hLH 용액은 WFI에 대해 (한외여과 멤브레인 10kD에 의해) 투석된다. 적량의 0.01M 인산나트륨 완충액 pH8이 연속하여 부가되고 투석은 인산나트륨 완충액의 특성이 만족될 때까지 계속된다.
- <129> 필요하다면 보유액은 최종 부피 약 500ml로 농축되고 회수된다. 한외여과지는 0.01M 인산나트륨 완충액 pH8로 수세되고 한외여과 수세액은 보유액으로 모아진다.
- <130> 더욱이 선택적인 LH농축 단계가 보관을 위한 선택된 조건에 의존하여 수행될 수 있다.
- <131> r-hLH 용액은 여과되고 여액은 멸균 용기에 수집된다.
- <132> 정제된 r-hLH 벌크는 바람직하기로는 약 -15℃에서 멸균 병에 보관된다.
- <133> **시약, 버퍼, 용출액 및 화합물질**
- <134> **크로마토그래피 수지**
- <135> 다음의 크로마토그래피 수지는 현재 정제 과정에 채용된다. 당량 수지(Equivalent resins)도 정제 과정에 채용된다.
- <136> 단계 II: DEAE 세파로스 CL-6B (Pharmacia)
- <137> 단계 III: Q-세파로스 패스트 플로우 (Pharmacia)
- <138> 단계 IV : C18 실리카 RP-HPLC (Waters)
- <139> 단계 V: C18 실리카 RP-HPLC (Waters)
- <140> 단계 VI: 세파크릴 S100 HR (Pharmacia)
- <141> **공급사는:**
- <142> 아머삼 파마시아 바이오텍 위터스 코포레이션
- <143> (Amersham Pharmacia Biotech,) (Waters Corporation)
- <144> 스웨덴 옐살라 S-751 84, 미국 MA 01757 마일드포드 34매플 스트리트
- <145> 브쥔르가탄 30
- <146> **결과**
- <147> **생물학적 활성**
- <148> 본 발명의 방법으로 정제 후 r-LH의 다른 뱃지의 생물학적 활성은 표 2에 나타난다. 단백질 농도(LH 단백질의 mg/ml)는 276.5nm에서 스펙트로포토메터에 의해, 아미노산 시퀀스 분석  $a=0.812$ 에 기해 실험적으로 유도된 흡수도를 사용하여 결정된다.
- <149> r-LH 수득물의 평균 비활성(specific activity)은 (LH의 단백질의) 약 25.000IU/mg의 양으로 특히 높다.

<150> r-hLH 벌크 뱃찌의 비활성

N° lot	비활성
	[ IU/mg ]
BLCA 9802	28173
BLCA 9803	25819
BLCA 9804	27472
BLCA 9805	31229
BLCA 9806	26995
BLCA 9808	26279
BLCA 9809	20522
BLCA 9810	22275
BLCA 9811	27642
BLCA 9812	29941
BLCA 9813	28345
BLCA 9814	27581
BLCA 9815	24541

<151> 제형화

<152> 동결건조된 제형은 본 발명의 고도로 정제된 재조합 황체형성호르몬로 전개된다.

<153> 전형적인 실시예로서, 75IU 강도의 동결건조 제형은 부형제(표 3)로 슈크로스를 사용하여 바이알 DIN 2R에 제조되어 4℃에서 몇개월 동안 안정하게된다.

표 3

<154>

성분명	단위 제형
활성성분 재조합 인간 황체형성호르몬	3.4 mcg (75IU)
기타 성분	
슈크로스	47.75 mg
트윈 20	0.05mg
디소듐 포스페이트 디하이드레이트	0.825 mg
모노소듐 포스페이트 모노하이드레이트	0.052 mg