



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월29일
(11) 등록번호 10-2437202
(24) 등록일자 2022년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/775 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/775 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7006225
(22) 출원일자(국제) 2014년08월08일
심사청구일자 2019년08월07일
(85) 번역문제출일자 2016년03월08일
(65) 공개번호 10-2016-0040299
(43) 공개일자 2016년04월12일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2014/000790
(87) 국제공개번호 WO 2015/017888
국제공개일자 2015년02월12일
(30) 우선권주장
13179755.7 2013년08월08일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
Biotechnol. & Bioprocess Engineering, Vol.
16, pp.785-792 (2011.)*
Transfusion, Vol. 41, pp. 382-389 (2001. 3.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
시에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플러 로드 45
(72) 발명자
워런 게리
미국 일리노이주 60914 부르보네 게임 트레일 에스. 1129
부시카 이븐느
스위스 3006 베른 루테르나우백 1
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
장훈

전체 청구항 수 : 총 11 항

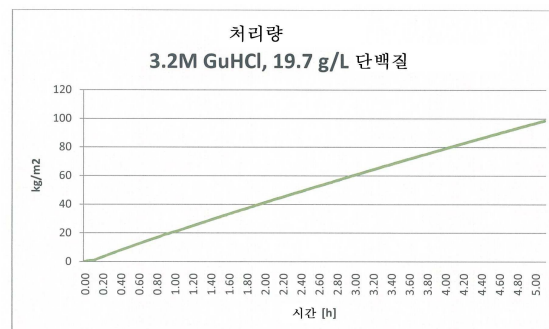
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 오염 제거 방법

(57) 요약

Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드를 포함하는 용액을 제공하는 단계 및 상기 용액을 15nm 내지 35nm의 범위의 기공 크기를 갖는 필터를 통해 여과하여 Apo A-I의 바이러스 오염을 감소시키는 단계를 포함하는, Apo A-I를 정제하는 방법이 제공된다. 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값); 및/또는 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV; 및/또는 지질 외피 바이러스에 대한 적어도 8.5 로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제가 제공된다. Apo A-I를 포함하는 약제학적 조성물 및 재구성된 고밀도 지단백질 제형, 및 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 1/34 (2013.01)

(72) 발명자

캄프 크리스토프

스위스 3036 데틀리겐 뢰츠리백 17

슈투키 마르틴

스위스 체하-3177 라우펜 바제르마트백 7

명세서

청구범위

청구항 1

아포지단백질 A-I(Apo A-I)를 정제하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

- a) Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 제공하는 단계; 및
- b) 상기 용액을 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기를 갖는 필터를 통해 여과하는 단계를 포함하고,

상기 용액은 GuHCl을 1.3 내지 3.2M 범위 내의 농도로 포함하는, 아포지단백질 A-I(Apo A-I)를 정제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 용액이 5 내지 30g/L, 또는 5 내지 20g/L, 또는 7 내지 12g/L 범위 내의 Apo A-I 단백질 농도를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 용액이 GuHCl을 1.5 내지 2.0M 범위 내의 농도로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 용액의 pH가 7.1 내지 7.5 범위 내에 있는, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 여과가 0.2 내지 3.4bar 범위 내의 압력 및 18 내지 26℃ 범위 내의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 용액이,

- 1) Apo A-I 침전물을 4.0 내지 4.6M GuHCl 중에 현탁시키는 단계; 및
- 2) 상기 현탁액을 5 내지 30g/L 범위 내의 Apo A-I 단백질 농도 및/또는 1.3M 내지 3.2M 범위 내의 GuHCl 농도로 희석시키는 단계

중 하나 이상의 단계에 의해 제조되는, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 a) 전에, 열 처리 단계가 바이러스 불활성화를 위해 수행되거나, 또는 단계 b) 후에, 열 처리 단계가 바이러스 불활성화를 위해 수행되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 열 처리가, 상기 용액의 pH를 6.6 내지 8.0 범위 내로 조정하는 단계; 및 후속적으로 상기 용액을 55 내지 61℃의 온도로 30분 내지 4시간 동안 가열하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 상기 용액이 2.7M 내지 3.9M 범위 내의 GuHCl 농도를 포함하는, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 상기 용액의 pH가 7.0 내지 8.0 범위 내에 있는, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 상기 용액이,

- 1) Apo A-I 침전물을 4.0 내지 4.6M GuHCl 중에 현탁시키는 단계; 및
 - 2) 상기 GuHCl 농도를 2.7M 내지 3.9M 범위 내로 조정하고 pH를 6.6 내지 8.0 범위 내로 조정하는 단계
- 에 의해 제조되는, 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 아포지단백질을 정제하는 방법, 특히, 아포지단백질 A-I(Apo A-I) 함유 용액으로부터 바이러스 병원체를 제거하기 위한 그리고 Apo A-I 제제를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아포지단백질들은, 고밀도 지단백질(HDL) 입자에서의 주요 단백질 성분인 아포지단백질 A-I(Apo A-I)을 갖는 가

용성 지단백질 복합체에서의 주요 단백질 성분이다.

- [0003] A, C 및 E 패밀리들의 아포지단백질들은 공통된 조상 유전자로부터 진화했고 구조적으로 유사하다. 이들 단백질 분자는 일반적으로, 프롤린 잔기에 의해 종종 분리되어 있는 일련의 22개 아미노산 탠덤 반복체를 함유한다. 상기 반복하는 22개 아미노산 절편은 지질 및 물 표면 둘 다에 결합할 수 있는 양쪽성 α -헬릭스를 형성한다. 인간 Apo-A-I(243개 아미노산; 28.1kDa)의 경우에, 8개 22량체 및 2개의 11량체 양쪽성 헬릭스가 있다(참조: Lund-Katz & Phillips, 2010, Subcell Biochem. 51, 183-227). 아포지단백질의 양쪽성 α -헬릭스는 지단백질을 안정화시키는데 중요한 역할을 한다. 이들은 주요 소수성 나선 면(face)이 복합체에서 소수성 지질과 상호작용하고 아포지단백질의 주요 반대 친수성 면이 주변 수성 환경과 상호작용할 수 있도록 아포지단백질을 배향 시킴에 의해 이를 수행한다. 그러나, 이들 단백질이 지질 성분으로부터 분리되는 경우, 소수성 아미노산 잔기의 수성 환경으로의 노출은 이들을 취급하기 어렵게 한다. 특히, α -헬릭스의 소수성 면은 자가 회합하여 응집체 형성 및 일부 조건에서 침전을 유도하는 경향을 갖는다. 예를 들면, Apo A-I 밀라노를 함유하는 1mg/mL 용액은 pH 7.4에서 50mM 인산 완충액 중에 저장되는 경우 응집된 형태로 80%의 단백질을 함유하는 것으로 추정된다(참조: Suurkuust & Hallen, 2002, Spectroscopy 16, 199-206).
- [0004] Apo A-I은 간 및 장에 의해 합성되고, 혈액 내 HDL의 생리학적 기능, 말초 조직으로부터 콜레스테롤의 제거, "역 콜레스테롤 수송"(RCT: reverse cholesterol transport)으로서 공지된 기작에 의해 콜레스테롤을 간으로 또는 다른 지단백질로 운반하는데 관여한다. 결과로서, HDL 입자는 일정 범위의 크기로 혈장 내에 존재하고, 이들 RCT 지질 전달 활성으로 인해 계속 리모델링되고 있다. 따라서, HDL 입자는 고밀도(> 1.063g/ml) 및 약 5 내지 20nm(스토크 직경) 범위의 크기를 특징으로 한다. 혈청 콜레스테롤의 상승된 수준과 관상 심장 질환(CHD: coronary heart disease)의 발병 간의 명백한 상호관계는 역학적 및 종단적(longitudinal) 연구를 기반으로 반복적으로 확인되었다. 따라서, HDL 내 Apo A-I는 소염 기능을 갖고 CHD의 발생 및 발병을 억제하는 것으로 사료된다. 추가로, Apo A-I는 혈액 내에서 저밀도 지단백질(LDL) 수준을 감소시키는 것으로 나타났고, 리포폴리사카라이드 또는 내독소에 결합함에 따라서 HDL의 항-내독소 기능에서 주요 역할을 갖는 것으로 공지되어 있다. 1차 단백질 성분으로서 HDL 및 Apo A-I의 "보호" 역할은 다수의 연구에서 확인되었다. 높은 혈장 수준의 Apo A-I는 CHD의 감소된 위험 및 관상 병변의 존재와 관련된다. 따라서, Apo A-I는 급성 관상동맥 증후군, 죽상동맥경화증 치료, 소염 치료, 항독소 치료, 간-표적화 약물 등에 적용하기 위해 재구성된 HDL과 같은 약물에 적용하기 위해 전망이 있다.
- [0005] 재조합 또는 혈장 기원의 생물학적 치료제는 통상적으로, 바이러스와 같은 병원체로 본질적으로 오염된 생물학적 공급-스톡을 사용하여 제조된다. 또한, 일부 제조 공정은 고유적으로 외적인 공급원으로부터의 병원체 오염에 민감하다. 따라서, 생물학적 치료제의 제조업체는, 이들의 생성물에 오염물이 포함되지 않도록, 이들의 제조 공정에 충분한 바이러스 제거 단계를 포함시킬 필요가 있다.
- [0006] 생물공학 생성물(전형적으로 단백질 또는 DNA)은 세포 배양물, 유전자전이 동물 또는 유전자전이 식물에서 재조합 DNA로 생산된다. 생산을 위해 사용되는 통상의 세포는 차이니스 햄스터 난소(CHO: Chinese Hamster Ovary) 세포, 이. 콜라이 세균, 및 효모를 포함한다. 세포 기반 생산 시스템은 전형적으로 배치 방식으로 수행되지만 소수의 관류 시스템이 또한 사용되고 있다. 최종 상업적 규모의 발효는 8,000 내지 25,000L 규모의 주요 CHO 기반 발효기와 함께 1,000 내지 100,000L 규모로 수행된다.
- [0007] 인간 혈장은 오늘날 대량으로 수거되고(예를 들면, 2010년에 3000만 리터의 혈장이 전세계적으로 수거되는 것으로 추정되었다), 개별 분획으로 가공되고; 이들 분획의 일부는 아포지단백질인 Apo A-I를 함유한다. 상기 혈장 분획의 예는 코혼 상청액(Cohn Supernatant) I, 코혼 분획(Cohn Fraction) II+III, 및 코혼 분획 IV(예를 들면, 코혼 분획 IV-1) 또는 이의 변이(예를 들면, Kistler/ Nitschmann 분획 IV이다)를 포함한다. 혈액 및 혈장은 잠재적으로 수혈-전파성 병원체를 함유하기 때문에, 상기 병원체, 특히 바이러스는 혈액 또는 혈장 유래된 성분이 치료제로서 또는 치료학적 전달을 위한 비히클로서 사용되는 경우 제거되거나 불활성화되어야만 한다. 그러나, 바이러스는 종종 용이하게 제거되지 않고, 이들이 고도로 정제되는 경우에도, 혈장 유래된 성분 여전히 존재할 수 있다. 특히, 소형의 비-외피 바이러스, 예를 들면, 약 27 내지 32nm의 크기를 갖는 피코나비리데(Picornaviridae)(예를 들면, A형 간염 바이러스) 및 약 18 내지 26nm의 크기를 갖는 파르보바이러스(Parvovirus)가 특정 관심 대상이다. 이것은 이들의 소형 크기 및 이들의 높은 물리화학적 안정성 둘 다로 인한 것이다. 따라서, 혈장-유래된 단백질 치료제의 효율적인 바이러스 제거 또는 불활성화를 가능하게는 방법들의 개발이 계속 요구되고 있다.
- [0008] 통상의 바이러스 불활성화 기술은 물리적 방법, 예를 들면, 전형적 파스퇴르화 과정(10시간 동안 60°C 가열),

단파장 자외선 광 조사 또는 감마 조사, 및 화학적 방법, 예를 들면, 용매 세제 또는 낮은 pH 항온처리를 포함한다. 바이러스 제거 기술은, 종종 나노여과로서도 언급되는 바이러스 여과와 같은 크기 배제 방법을 포함한다. 이들 바이러스 여과 방법은 단백질 용액으로부터 바이러스를 제거하기 위한 효과적인 방법인 것으로 나타났다.

- [0009] 바이러스 여과는 단백질 용액으로부터 바이러스를 제거하기 위한 온화한 방법이라는 이점을 갖고, 일반적으로 고수준의 단백질 회수를 가능하게 하고 단백질의 생물학적 활성이 완전히 보존되도록 한다. 최적의 바이러스 필터는 용량, 처리량(throughput) 및 선택성을 최대화해야만 한다. 바이러스 필터의 용량은 정압 여과 동안에 플럭스(flux)가 허용가능하지 않은 낮은 수치로 감소하기 전에 가공될 수 있는 필터 표면적 1m^2 당 여과물의 총 용적이다. 처리량은 공급물이 여과될 수 있는 속도(최대 지속성 투과 플럭스)를 언급한다. 선택성은 높은 생성물 회수 및 높은 바이러스 입자 보유를 수득하는 능력을 언급한다. 이들 필터는 허용가능한 여과물 플럭스로 전체 벌크 공급물을 처리하고, 바이러스 입자를 거부하고 단백질 통과를 최대화할 수 있어야 한다. 바이러스 여과 동안에 오염(fouling)은 전형적으로 단백질 응집체, DNA, 부분적으로 변성된 생성물 또는 기타 파쇄물(debris)이 지배적이다.
- [0010] 필터 제조업체는 종종 명목상 또는 평균 기공 크기 등급과 같은 용어를 상업적 필터에 할당하고 이는 일반적으로 실제 기공의 기하학적 크기보다는 차라리 입자 또는 미생물에 대해 특정 보유 기준을 충족함을 지칭한다.
- [0011] 바이러스 제거를 위해, 제거되어야만 하는 바이러스의 유효 직경보다 작은 명목상 기공 크기를 갖는 필터 막을 통해 여과를 수행한다. 단지 소수의 비정상적으로 큰 기공(300kDa 이상의 명목상 분자량 컷오프, NMWCO)은 과도한 바이러스 누출을 허용할 것이다. 따라서, 바이러스 필터는 모든 마크로-결함(macro-defect)을 제거하도록 제조되어야만 한다. 이것은 전형적으로 바이러스 보유 및 기계적 안정성의 요구되는 조합을 제공하는 복합 막의 사용을 통해 성취된다. 바이러스-제거 필터 막은 전형적으로 문헌[참조: Manabe, S, Removal of virus through novel membrane filtration method., Dev. Biol. Stand., (1996) 88: 81-90.; Brandwein H et al., Membrane filtration for virus removal., Dev Biol (Basel)., (2000) 102: 157-63.; Aranha-Creado et al., Clearance of murine leukaemia virus from monoclonal antibody solution by a hydrophilic PVDF microporous membrane filter., Biologicals. (1998) June; 26 (2): 167-72.; Moce-Llivina et al., Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions, Journal of Virological Methods, (2003) April, Vol. 109, Issue 1, Pages 99-101]에 기재된 바와 같이, 재생 셀룰로스, 예를 들면, 쿠프르암모늄-재생 셀룰로스와 같은 물질, 또는 친수성 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 또는 친수성 폴리에테르-설폰(PES)과 같은 합성 중합체 물질로부터 제조된다.
- [0012] 기재된 바이러스 여과 방법은, 염을 적어도 0.2M의 수준으로 첨가함에 의해 거대분자(즉, 단백질)를 함유하는 용액을 바이러스-여과하는 방법에 관한 WO96/00237을 포함한다. 출원인은 호프마이스터 시리즈(Hofmeister series)의 고가품(high end)의 특징인 높은 염석 효과를 나타내는 염, 특히, 시트레이트, 타르트레이트, 설페이트, 아세테이트 또는 포스페이트 음이온 및 나트륨, 칼륨, 암모늄 또는 칼슘 양이온을 사용할 것을 추천한다. 염화나트륨이 특히 바람직하고 상기 시리즈의 저가품에서 낮은 염석 효과를 나타내는 염(예를 들면, GuHCl)은 사용되지 않는다.
- [0013] WO96/00237과 일관되게, 문헌[참조: Kim et al (Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2011, 16, 785-792)]은 염화나트륨의 존재(250mM NaCl, 30mM Tris, pH 8) 하에 Apo A-I의 바이러스 여과를 기재하고 있다. 이러한 단계는 DEAE-FF 칼럼으로부터 용출 후 즉시 수행한다. 그러나, Apo A-I가 응집하는 경향은, 여과 단계는 Apo A-I가 칼럼으로부터 용출되거나 또는 대안적으로 Apo A-I가 매우 낮은 단백질 농도(예를 들면, 0.1mg/mL)의 염의 존재하여 저장될 필요가 있어 이상적으로 완료될 필요가 있다는 점에서 제조 한계를 부과한다. 이러한 후자의 접근법은 과도하게 큰 여과 용적을 요구한다는 단점을 갖는다. 바이러스 필터의 비용은 상당하다. 따라서, 예를 들면, 아포지단백질 응집 또는 과도하게 큰 여과 용적으로 인한 필터 용량의 임의의 감소는 상업적 규모에서 상당히 보다 높은 처리 비용을 유도할 수 있다.
- [0014] WO03/105989는 폴리올 당 또는 당 알콜(즉, 슈크로스 및 소르비톨)과 같은 클라스레이트 개질제(clathrate modifier)의 용도에 관한 것이고, 여과될 필요가 있는 단백질의 자가-회합에 대한 경향을 감소시킬 뿐만 아니라, 필터 막 표면의 소수성을 증가시키고 단백질의 수역학적 반경을 감소시키는 것을 목표로 한다.
- [0015] US 2003/232969 A1은 나노여과에 의한 피브리노젠(340kDa)과 같은 고분자량 단백질의 용액으로부터 바이러스를 제거하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0016] 비교적 작은(28kDa) Apo A-I와 같은 아포지단백질은 바이러스 여과에 용이하게 적용될 수 있어야 한다. 그러나, 이미 상기 기재된 바와 같이 응집체를 형성하는 이들의 부적당한 경향을 갖는 이들의 소수성 성질은, 필터 표면 상에 그리고 필터 기공을 폐색하는 단백질 클러스터의 형성을 촉진시킨다. 필터 자체와 관련하여, 이것은 기공 차단 및/또는 케이크 또는 침적물의 형성 둘 다에 의해 막의 상부 표면 및 또한 막 기공 구조 내에 존재할 수 있다. 오염은 정압 작동 동안 유속의 감소를 유발하고, 일정한 여과물 플럭스에서 작동을 위한 압력을 증가시킨다. 필터 오염의 결과로서, 여과의 선택성을 감소시킬 수 있어 보다 낮은 단백질 회수 및/또는 보다 낮은 바이러스 보유를 유도한다. 또한, 필터 오염은 용량 및 처리량을 감소시켜 보다 긴 여과 시간 및/또는 증가된 필터 면적에 대한 요건을 유발한다. 추가로, 아포지단백질 용해도를 유지하고 응집을 예방하기 위해 최적인 작동 조건은 높은 바이러스 제거를 보장하기 위해 최적일 아닐 수 있다. 특히, 아포지단백질을 안정화시키기 위해 사용될 수 있는 카오트로픽 물질은 병원체(예를 들면, 바이러스) 및 가능하게는 또한 필터 막의 여과능 성질을 변화시킬 수 있다. 결과로서, 특정 농도의 카오트로픽 물질의 존재는 또한 필터 막을 통과하는 원치 않는 바이러스 침투를 허용하고, 따라서 아포지단백질을 포함하는 용액을 처리하기 위한 단계의 유용성을 무효화시킨다.

[0017] 따라서, 본 발명의 목적은, 바이러스, 특히 작은 비외피 바이러스, 예를 들면, 파르보비리데(parvoviridae)를 안전하게 제거하기 위한 여과 방법을 제공하는 것으로, 상기 방법은 Apo A-I와 같은 아포지단백질을 포함하는 용액에 적합하고 또한 산업적 적용을 위해 적합하다.

발명의 내용

[0018] 요약

[0019] 이러한 목적은 광범위하게는, Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 적합한 기공 크기를 갖는 필터를 통해 여과시킴을 포함하는 아포지단백질 A-I(Apo A-I)를 정제하기 위한 방법에 의해 성취된다.

[0020] 본 발명의 측면에 따라, a) Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 제공하는 단계; 및 b) 상기 용액을 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기를 갖는 필터를 통해 여과하는 단계를 포함하는, 아포지단백질 A-I(Apo A-I)를 정제하기 위한 방법이 제공된다.

[0021] 하나의 양태에서, 상기 방법은 Apo A-I의 바이러스 오염을 감소시키기 위한 것이다. 본 발명의 일부 양태에서, 상기 방법은 Apo A-I의 바이러스 오염을 감소시키기 위한 것이고, 여기서, 바이러스 오염은 파르보(parvo) 바이러스를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 파르보바이러스는 마우스의 극히 작은 바이러스(MVM: minute virus of mice)이다. 본 발명의 일부 양태에서, 상기 방법은 Apo A-I의 바이러스 오염을 감소시키기 위한 것이고, 여기서, 바이러스 오염은 피코나비리데 바이러스를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 피코나비리데 바이러스는 뇌척수심근염(EMCV) 바이러스 또는 A형 간염 바이러스이다.

[0022] 바람직한 양태에서, 용액은 5 내지 30g/L 범위, 특히, 5 내지 20g/L, 예를 들면, 7 내지 12g/L 범위 내의 Apo A-I 단백질 농도를 포함한다.

[0023] 바람직한 양태에서, 용액은 Apo A-I의 응집을 감소시키거나 억제하는 GuHCl 농도를 포함한다. 상기 용액은 특히 1.3 내지 3.2M, 특히 1.5 내지 2.0M의 범위 내의 GuHCl 농도를 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는 용액 내의 GuHCl 농도는 1.7M이다.

[0024] 하나의 양태에서, 용액의 pH는 7.1 내지 7.5 범위 내에 있고, 예를 들면, 7.3이다.

[0025] 하나의 양태에서, 용액은 1) Apo A-I 침전물을 4.0 내지 4.6M GuHCl 중에 현탁시키는 단계; 및/또는 2) 상기 현탁액을 5 내지 30g/L의 범위 내의 Apo A-I 단백질 농도 및/또는 1.3M 내지 3.2M의 범위 내의 GuHCl 농도로 희석시키는 단계 하나 이상에 의해 제조된다.

[0026] 하나의 양태에서, 단계 b) 후, 열 처리 단계는 바이러스 불활성화를 위해 수행된다. 열 처리는 용액의 pH를 6.6 내지 8.0의 범위 내로 조정하는 단계; 및 후속적으로 상기 용액을 55 내지 61℃의 온도로 약 30분 내지 약 4시간 동안 가열하는 단계를 포함할 수 있다.

[0027] 또 다른 양태에서, 단계 a) 전, 열 처리 단계는 바이러스 불활성화를 위해 수행된다. 열 처리는 6.6 내지 8.0의 범위 내의 pH의 GuHCl 및 Apo A-I를 포함하는 용액을 제공하는 단계; 및 후속적으로 상기 용액을 약 30분 내지 약 4시간 동안 55 내지 61℃의 온도로 가열하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0028] 바람직한 양태에서, 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 용액은 2.7 내지 3.9M의 범위 내, 보다 바람직하게는 3.5M의 GuHCl 농도를 포함한다.
- [0029] 발명의 양태에서, 6.6 내지 8.0의 범위 내의 pH를 갖는 용액의 pH는 바람직하게는 7.0 내지 8.0 범위 내에 있다. 특정 양태에서, pH는 7.3이다.
- [0030] 본 발명의 하나의 측면은 또한, 본 발명의 방법에 의해 정제된 Apo A-I를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 한 측면은 또한, 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(log reduction value: 로그 감소 값) 및/또는 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV, 및/또는 지질 외피 바이러스에 대한 적어도 8.5 로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제를 제공한다. 특정 양태에서, Apo A-I 제제는 약제학적 사용을 위해 적합하다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 상기 언급된 측면에 따라 Apo A-I 또는 Apo A-I 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 측면의 방법에 따라 Apo A-I를 제조하고 Apo A-I를 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 합하거나 또는 상기 언급된 측면의 Apo A-I 제제를 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 합하여 약제학적 조성물을 제조함을 포함하는, 약제학적 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 추가의 측면은, 지질과 함께 상기 언급된 측면에 따라 Apo A-I 또는 Apo A-I 제제를 포함하는 rHDL 제형을 제공한다.
- [0035] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 측면의 방법에 따라 Apo A-I를 제조하고 Apo A-I를 지질과 배합하거나, 또는 상기 언급된 측면의 Apo A-I 제제를 지질과 배합하여 재구성된 HDL 제형을 제조함을 포함하는, 재구성된 HDL 제형의 제조 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 추가의 측면은, 상기 언급된 측면들 중 어느 하나에 따라 Apo A-I, Apo A-I 제제, 약제학적 조성물 또는 rHDL 제형을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는, 포유동물에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1: 3.2M GuHCl, 19.7g/L 단백질의 조건과 함께 나노여과 동안에 용액의 처리량[kg/m²]을 나타낸다.
- 도 2: 1.7M GuHCl, 8.9g/L 단백질의 조건과 함께 나노여과 동안에 용액의 처리량[kg/m²]을 나타낸다.
- 도 3: 1.7M GuHCl, 5.8g/L 단백질의 조건과 함께 나노여과 동안에 용액의 처리량[kg/m²]을 나타낸다.
- 도 4: 나노여과 전반에 걸친 부하량 및 플럭스를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본원 명세서 전반에 걸쳐, 달리 요구되지 않는 경우, 용어 "포함하다", 또는 변형어구, 예를 들면, "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급된 요소 또는 정수 또는 요소들 또는 정수들 그룹의 내포를 의미하지만, 임의의 다른 요소 또는 정수 또는 요소들 또는 정수들 그룹을 배제하는 것이 아닌 것으로 이해되어야만 한다.
- [0039] 임의의 이전 공개물 (또는 이로부터 유래된 정보) 또는 공지된 임의의 과제에 대한 상기 명세서 내 참조는 이전의 공개물 (또는 이로부터 유래된 정보) 또는 공지된 과제가 본원과 관련된 분야에 통상의 일반적 지식의 일부를 형성함을 인지하거나 인정하거나 임의의 제안 형태가 아니고 간주되지 말아야 한다.
- [0040] 본 발명의 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 명백히 달리 진술되지 않는 한, 복수 측면을 포함함을 주지되어야 한다. 따라서, 예를 들면, "단백질"에 대한 언급은 2개 이상의 단백질 뿐만 아니라 단일 단백질을 포함한다.
- [0041] 수치 x와 관련된 용어 "약"은, 예를 들면, $x \pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0042] 발명이 다수의 후속적 단계들을 포함하는 공정을 제공하는 경우, 본 발명은 또한, 총수 미만의 단계들을 포함하는 공정을 제공할 수 있다. 상이한 단계들은 상이한 장소(예를 들면, 상이한 나라)에서 상이한 사람들에 의해 매우 상이한 시점에 수행될 수 있다.

- [0043] 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 2개 이상의 성분들을 혼합하는 단계를 포함하는 공정은 임의의 특정 혼합 순서를 요구하지 않는다. 따라서, 성분들은 임의의 순서로 혼합될 수 있다. 3개의 성분이 있는 경우, 2개의 성분이 서로 배합될 수 있고, 이어서 상기 배합물은 제3 성분 등과 배합될 수 있다.
- [0044] 필터와 관련된 용어 "기공 크기"는 전형적으로 필터에서의 기공 크기를 의미한다. 전형적으로, 상기 기공 크기는 필터에 의해 제거될 수 있는 가장 작은 바이러스 크기보다 더 작다. 이러한 맥락에서, 본 발명의 특정 양태가 기공 크기(예를 들면, 직경)의 기하학적 성질을 언급할 수 있지만, 기공 크기는 이후 보다 상세하게 기재된 바와 같이 기능적으로 정의될 수 있는 것으로 인지된다.
- [0045] 놀랍게도, 본 발명에 따른 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)(이따금 구아니딘 클로라이드로도 언급되거나 GdHCl, GdmCl 또는 GndCl로서 약칭됨)를 사용하는 경우, Apo A-I 용액은 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기의 기공을 갖는 필터를 통해 여과하여 단백질의 응집 및 필터의 폐색 없이 바이러스 제거의 실질적이거나 완전한 제거를 성취할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 특정 양태에서, 필터는 15nm 내지 35nm; 또는 15nm 내지 35nm 미만; 또는 15nm 내지 30nm; 또는 15nm 내지 25nm; 또는 15nm 내지 20nm; 또는 20nm 내지 25nm; 또는 18nm 내지 23nm; 또는 15nm 내지 26nm; 또는 18nm 내지 26nm; 또는 27nm 내지 32nm; 또는 25nm 내지 30nm; 또는 20nm 내지 30nm 범위의 기공 크기를 갖는다.
- [0046] 본 발명의 양태에서, 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기를 갖는 필터는 15nm 내지 35nm 범위의 평균 기공 크기를 갖는다. 일부 양태에서, 상기 필터는 15nm 내지 35nm 미만; 또는 15nm 내지 30nm; 또는 15nm 내지 26nm; 또는 18nm 내지 26nm; 또는 15nm 내지 25nm; 또는 15 내지 20nm; 또는 20nm 내지 25nm; 또는 18nm 내지 23nm; 또는 27nm 내지 32nm; 또는 25nm 내지 30nm; 또는 20nm 내지 30nm 범위의 평균 기공 크기를 갖는다. 특정 양태에서, 평균 기공 크기는 약 15nm; 또는 약 20nm; 또는 약 25nm; 또는 약 30nm; 또는 약 35nm이다.
- [0047] GuHCl의 사용은 2개의 관점에서 유익하다: 1) 이의 카오토로픽 성질로 인해, GuHCl은 항-응집제로서 기능하고, 따라서, 예를 들면, 용액 중 Apo A-I 단백질에 대한 응집체 클러스터의 형성을 억제한다; 2) 그러나, 이것은 아포단백질 구조에 비가역적인 영향을 미치지 않아 일단 GuHCl이 제거되면, Apo A-I 헬릭스가 재형성되고 상기 단백질은 지질과 회합하여 재구성된 HDL과 같은 입자를 형성할 수 있다. 또한, 상기 아포단백질은 약제학적 물질로서 생성물의 추가의 용도를 위해 매우 중요한 이의 생물학적 활성을 유지한다.
- [0048] 본 발명의 이점은 유속을 증가시키고, 여과를 위해 요구되는 필터 면적 및 공정 시간 뿐만 아니라 지질 용적을 감소시킬 수 있다는 것이다. 결과로서, 대량의 Apo A-I 용액은 단시간 내에 여과되어 상기 공정 효율을 실질적으로 증가시킬 수 있다.
- [0049] 본 발명으로 효율적으로 제거될 수 있는 바이러스는 약 300nm보다 작은 크기를 가질 수 있다. 적합하게 제거될 수 있는 바이러스의 크기는 약 200nm보다 작다. 상기 바이러스의 예는 사이토메갈로바이러스(약 180 내지 200nm, 혈장 제품); 헤르페스 심플렉스 바이러스(약 150 내지 200nm, 제조합 제품); 및 엡슈타인-바르 바이러스(약 120 내지 200nm, 제조합 항체 제품)를 포함한다. 제거될 수 있는 바이러스의 크기는 바람직하게는 약 120nm보다 작다. 상기 바이러스의 예는 HIV(약 80 내지 120nm, 혈장 유래된 제품)을 포함한다. 정상적으로, 제거될 수 있는 바이러스는 약 20nm보다 큰, 즉, 파르보바이러스의 대략적인 크기(15 내지 26nm, 혈장 및 제조합 유래된 제품)보다 크다. 크기가 약 18 내지 26nm인 B19(혈장 제품)형 파르보바이러스는 치료학적 단백질 공급원으로부터 제거하기 어려워서, 나노여과는 전형적으로 20nm 범위의 필터 기공 크기가 파르보바이러스의 공지된 크기에 가깝기 때문에 바이러스 제거를 위해 평가하기 위한 중요한 제조 단계로서 고려된다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 공정은 파르보바이러스 패밀리 및 A형 간염 바이러스(약 27 내지 32nm, 혈장 제품), B형 간염 바이러스(약 42nm, 혈장 제품), C형 간염 바이러스(약 30 내지 60nm, 혈장 제품) 및 뇌척수심근염 바이러스(약 25 내지 30nm; 제조합 제품)의 구성원과 같은 작은 바이러스의 안전하고 효율적인 제거를 가능하게 한다. 이것은 당업계의 상태에 따라, 종종 작은 바이러스의 통과를 유도하는 단백질의 응집 및 필터의 폐색을 예방하기 위해 희석을 위한 과량의 액체가 요구되기 때문에 특히 주지할만 하다.
- [0050] 발명의 특정 양태에서, 필터는 Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액으로부터 파르보바이러스, 예를 들면, MVM 또는 B19; 및/또는 A형 간염 바이러스; 및/또는 피코나비리대 바이러스, 예를 들면, 뇌척수심근염 바이러스를 제거할 수 있는 기공 크기를 갖는다.
- [0051] 바이러스 보유는 적합하게는 여과물에서의 바이러스 농도에 대한 공급물에서의 바이러스 농도의 비의 로그(밑수 10)로서 정의되는 로그 감소 값(LRV) 측면에서 특징화 된다: $LRV = -\log_{10}S$; 여기서, S는 바이러스를 위한 체질 계수(sieving coefficient)이다. 총 요구되는 LRV는 출발 물질의 바이러스 오염에 대한 성질 및 전위에 의

존한다. 바이러스 여과 단계는 전형적으로는 최소의 4-로그 바이러스 제거(LRV)를 제공하도록 디자인한다. 바이러스 제거 연구는 고역가 감염성 바이러스(상당한 물리적 특성을 가짐)를 스케일 다운 모듈로 스파이킹하고 LRV를 평가함에 의해 수행한다. 외피 및 비외피 바이러스 둘 다의 제거는 입증될 수 있다. 통상의 모델 바이러스는 동물 파르보바이러스(예를 들면, MVM, B19), 폴리오바이러스(비특이적 모델 바이러스), 뇌척수심근염 바이러스(EMCV)(A형 간염 바이러스와 같은 피코나비리대 바이러스를 위한 모델), 시미안 바이러스 40(SV40, 비특이적 모델 바이러스), 신드비스 바이러스(C형 간염 바이러스에 대한 모델), 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV, C형 간염 바이러스와 같은 플라비비리대 바이러스에 대한 모델), 오리 B형 간염 바이러스(B형 간염 바이러스에 대한 모델), 일본 뇌염 바이러스(C형 간염 바이러스에 대한 모델) 및 레오바이러스(비특이적 모델 바이러스)를 포함한다. 초기 디자인 연구는 또한, 보다 높은 순도 및 역가로 수득될 수 있고 분석하기 훨씬 쉬운 (및 보다 저렴한) 박테리오파아지로 수행될 수 있다.

- [0052] 바이러스 여과 입증 연구는 일반적으로 13 내지 47mm 디스크를 갖는 전형적으로 자가-함유된 장치를 사용하는 소규모로 수행된다. 모든 공정 파라미터는 선형 양상으로 스케일 다운하고 바이러스 제거와 관련하여 최악의 사례 조건을 나타내야만 한다. 또한 최악의 사례 공정 조건하에 입증을 확실히 하기 위해 산업적 규모 공정 디자인과 비교하여 표면적당 대량의 공급 스트림을 처리하는 것이 중요하다. 바이러스 제거는 여러 분획에서 측정되어야만 한다. 여러 최근 연구는 바이러스 제거가 파르보형 바이러스 필터(20nm 기공 크기)를 사용하는 경우 막 오염(침투성의 감소) 정도와 함께 감소할 수 있음을 입증하였다.
- [0053] 본 발명의 방법은 바이러스를 불활성화하고/하거나 제거하기 위해 매우 효율적인 방식을 제공한다. 원칙적으로, 상기 높은 바이러스 함량이 실제로 존재하는 경우, 본 발명은 매우 작은 비외피 바이러스, 예를 들면, 파르보바이러스 함량을 적어도 3 로그 LRV(바이러스 수를 1000배 저하시킴), 적합하게는 적어도 4 로그 LRV(10,000배 감소), 적합하게는 적어도 5 로그(100,000배 감소) 및 바람직하게는 적어도 6 로그 LRV(바이러스 수의 1,000,000배 감소)로 감소시킨다.
- [0054] 추가로, 본 발명에 따른 여과 방법은 심지어 보다 높은 바이러스 고갈을 확실히 하기 위해, 열 처리 단계와 같은 다른 바이러스 제거 또는 불활성화 과정과 용이하게 조합될 수 있다.
- [0055] 임의로, 사전 여과 또는 세정 여과 단계는 바이러스 여과 전에 마이크로-크기의 입자를 제거하기 위해 수행될 수 있다. 상기 사전 여과는 또한, 바이러스-제거 막의 직경보다 큰 기공 직경을 갖는 막을 포함하는 필터로 수행될 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 사전 필터는 0.05 내지 0.5 μ m 범위의 기공 크기를 갖는다. 특정 양태에서, 사전 필터는 Pall 나일론 막 필터(SKL 7002 NTP 0.1 μ m 또는 FTKNI) 또는 사르토키공(Sartopore) 2 필터로부터 선택된다. 특정 양태에서, 사전 필터 크기는 출발 물질 Apo A-I 침전물 1kg당 적어도 0.025m²의 필터 표면적을 사용하여 선택된다. 다른 양태에서, 사전 필터 크기는 출발 물질 Apo A-I 침전물 1kg당 적어도 0.014m²의 필터 표면적을 사용함에 의해 선택된다. 특정 양태에서, 사전 필터 크기는 출발 물질 Apo A-I 침전물 1kg당 약 0.014m² 내지 약 0.035m²의 필터 표면적 범위에 있다. 사전 여과는 바이러스 필터에 일치하게 또는 바이러스 필터의 범위를 벗어나 수행될 수 있다. 특정 양태에서, 사전 여과는 바이러스 필터에 일치하게 수행된다. 특정 양태에서, 사전 필터는 바이러스 제거 필터와 동일한 막 물질로부터 제조된다.
- [0056] 본 발명에 따른 바이러스 여과 방법에 적합한 필터는 시판중이며, 예를 들면, 특히, Planova BioEx(Asahi Kasei Corporation)와 같은 상표명하에 구입할 수 있다. 이러한 필터는 때로는 '작은 바이러스' 제거 필터로서 언급된다.
- [0057] 특정 양태에서, 바이러스 제거 필터는 쿠프라암모늄 재생 셀룰로스, 친수성 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF), 복합 PVDF, 표면 개질된 PVDF, 나일론, 및 폴리에테르 설폰으로부터 선택된 하나 이상의 물질로부터 제조된 막을 포함한다.
- [0058] 발명의 양태에서, 필터 막은 편평한 시트 또는 중공 섬유 막이다. 편평한 시트 막의 예는 PegasusTM 등급 SV4 작은 바이러스 제거 필터(Pall Corporation)와 같은 친수성화된 PVDF 필터 막을 포함한다. 하나의 양태에서, 필터는 PVDF 편평한 시트 막을 포함한다. 하나의 양태에서, 필터는 친수성 PVDF 편평한 시트 막 또는 복합 PVDF 편평한 시트 막 또는 표면 개질된 PVDF 편평한 시트 막을 포함한다. 특정 양태에서, 필터는 PegasusTM 등급 SV4이다.
- [0059] 다른 양태에서, 필터는 중공 섬유 막이다. 중공 섬유 막 포맷은 전형적으로는, 미세 모세관에 의해 상호연결된 보이드로 구성된 기공의 3차원 웹 구조를 함유하는 각각의 중공 섬유의 벽을 갖는 스트로우형(straw-shaped) 중

공 섬유 번들을 함유한다. 중공 섬유 필터의 예는 중공 섬유 막 포맷에서 친수성 개질된 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF)가 혼입된 Planova™ BioEX 필터(Asahi Kasei Corporation)를 포함한다. 하나의 양태에서, 필터는 중공 섬유 막 포맷에서 PVDF 막을 포함한다. 하나의 양태에서, 필터는 친수성 PVDF 중공 섬유 막 포맷, 또는 복합 PVDF 중공 섬유 막 포맷, 또는 표면 개질된 PVDF 중공 섬유 막 포맷을 포함한다. 특정 양태에서, 필터는 Planova™ BioEX이다.

[0060] 매우 상이한 구조를 가질 수 있는 필터 막을 비교하기 위해, 현미경 같은 가시적 방법들을 사용하여 기공 크기를 조사하는 것은 적당하지 않다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같이, 기공 크기에 대한 언급은 가시적 방법들 보다는 기능적 방법들로 평가된 필터의 구조적 성질을 설명한다. 필터 기공 크기의 평가는 기능적 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법들은 버블 포인트 측정, 액체-액체 기공율, 침투 다공성 측정, 거대분자(예를 들면, 박테리오파지) 및/또는 한정된 크기의 입자의 체질을 포함한다.

[0061] 평균 유동 버블 포인트는 ASTM E1294-89('Standard Test Method for Pore Size Characteristics of Membrane Filters Using Automated Liquid Porosimeter')에 따라 측정될 수 있다. 간략하게는, 상기 방법은 필터를 퍼플루오로헥산(예를 들면, Fluorinert™ FC-72)으로 습윤화시킨 다음, 차압을 적용하여 유체를 제거함을 포함한다. 습윤 유동물이 건조 유동물(습윤 용매가 없는 유동물) 절반과 동일한 차압을 사용하여 평균 유동물 기공 크기를 계산한다.

[0062] 본 발명의 특정 양태에서, 필터는 100psi, 또는 120psi 초과 퍼플루오로헥산으로 측정된 평균 유동물 버블 포인트를 갖는다.

[0063] 본 발명의 다른 양태에서, 필터의 기공 크기는 콜로이드성 금 입자 용액을 필터(예를 들면, AGPTS - Asahi Kasei Corporation, gold particle test system)에 적용함에 의해 평가될 수 있다. 시험 개시 전에, 인-라인 가시적 과장 분광측정기는 초기 흡광도를 측정한다. 금 입자 용액이 필터를 통과함으로써 제2 흡광도 판독 값은 금 입자 제거율을 평가하고, 기공 크기 분포 결과는 흡광도 값의 LRV 계산을 기초로 결정된다.

[0064] 아포지단백질은 천연의 HDL 또는 재구성된 고밀도 지단백질(rHDL)의 기능성의 생물학적 활성 성분인 임의의 아포지단백질일 수 있다. 특정 아포지단백질은 A, C 및 E 패밀리의 구성원을 포함한다. 전형적으로, 아포지단백질은 혈장 유래되거나 재조합 아포지단백질, 예를 들면, Apo A-I, Apo A-II, Apo A-V, pro-Apo A-I 또는 변이체, 예를 들면, Apo A-I 밀라노 또는 소위 산화 내성 형태, 예를 들면, 4WF이다. 특정 양태에서, 아포지단백질은 Apo A-I이다. 일부 양태에서, Apo A-I는 혈장으로부터 유래된다. 다른 양태에서, Apo A-I는 재조합 Apo A-I이다. 바람직하게는, 야생형 서열 또는 밀라노 서열을 포함하는 Apo A-I는 재조합적으로 유래되거나 사람 혈장으로부터 정제된다. Apo A-I는 단량체, 이량체 또는 삼량체 또는 다량체 또는 이들의 혼합물 형태일 수 있다. 아포지단백질은 아포지단백질의 생물학적 활성 단편 형태일 수 있다. 이러한 단편은 천연이거나, 화학적으로 합성되거나 재조합체일 수 있다. 단지 예로서, Apo A-I의 생물학적 활성 단편은 바람직하게는 Apo A-I의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 내지 100% 또는 100% 초과 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(LCAT: lecithin-cholesterol acyltransferase) 자극 활성을 갖는다.

[0065] Apo A-I와 같은 아포지단백질을 함유하는 출발 물질은, 예를 들면, 키슬러 및 니슈만 분획화 방법(Kistler and Nitschmann fractionation method)에 따른 침전물 IV로부터 유래될 수 있고, 이는, 예를 들면, 냉각 에탄올 침전에 의해 추가로 정제되었다. 대안적인 양태에서, Apo A-I형 아포지단백질을 함유하는 상기 출발 물질은 세포 배양물/발효 추출물이다. 양태에서, Apo A-I는 이. 콜라이 숙주/백터 시스템 또는 차이니즈 햄스터 난소(예를 들면, CHO-K1 또는 CHO-S), VERO, BHK, BHK 570, HeLa, COS-I, COS-7, MDCK, 293, 3T3, PC12 및 W138, 또는 골수종 세포 또는 세포주(예를 들면, 쥐 골수종 세포 또는 세포주) 기원의 것들 포함하지만, 이에 제한되지 않는 포유동물 숙주 세포에서 세포 배양에 의해 제조된다. 특정 양태에서, 세포 배양물은 무혈청 배지에서 배양될 수 있다. 양태에서, 세포 배양물은 동물 유래된 성분이 없는 무혈청 배지에서 배양될 수 있다.

[0066] 사용 전에, Apo A-I 침전물은 냉동기에서 -20℃ 미만의 온도에서 저장될 수 있다.

[0067] Apo A-I 침전물을 현탁시키기 위해, Apo A-I 침전물 대 용액의 용적 비는 1:2 내지 1:5 범위일 수 있다. 일부 양태에서, Apo A-I 침전물 대 용액의 용적 비는 1:3 내지 1:4의 범위이다. 특정 양태에서, Apo A-I 침전물 대 용액의 용적 비는 1:3, 또는 1:3.1, 또는 1:3.2, 또는 1:3.3, 또는 1:3.4, 또는 1:3.5이다.

[0068] 재현탁을 촉진시키기 위해, 동결된 Apo A-I 침전물은 동결된 Apo A-I 침전물을 용액으로 첨가하기 전에, 예를 들면, 혈장-해머를 사용함에 의해 폴리에틸렌 백 내부에서 작은 조각(< 5cm의 직경)으로 부서질 수 있다.

- [0069] 현탁액은 후속적으로 용액 중에서 Apo A-I 단백질 농도 및 GuHCl 농도를 목적하는 범위로 조정하기 위해 WFI(주사용수)로 희석될 수 있다.
- [0070] 일부 양태에서, Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 상기 용액은 PCT/AU2014/000584에 기재된 바와 같이 정제된 Apo A-I로부터 유래된다.
- [0071] 본 발명의 맥락에서, 표현 "5 내지 30g/L의 Apo A-I" 및 유사 표현은 5 내지 30g의 아포지단백질 A-I(Apo A-I) 단백질이 1L 용액 중에 용해됨을 의미한다. 여과 단계를 위한 아포지단백질 농도는 전형적으로 0.5g/L 내지 50g/L 범위에 있다. 특정 양태에서, 단계 a)의 용액 중 Apo A-I 단백질 농도는 5 내지 25g/L; 또는 5 내지 20g/L; 또는 5 내지 15g/L; 또는 5 내지 12g/L; 또는 7 내지 12g/L; 또는 5 내지 11g/L; 또는 7 내지 11g/L; 또는 5 내지 10g/L; 또는 7 내지 10g/L 범위에 있다. 본 발명의 일부 양태에서, Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액의 단백질 농도는 280nm에서 흡광도를 측정한 다음, 실시예 1에 기재된 바와 같이 단백질 농도를 계산함에 의해 측정된다. 일부 양태에서, Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액의 단백질 농도는 비탁법(nephelometry) 또는 고성능 모세관 전기영동(실시예 1에 기재된 방법을 사용하여)에 의해 측정한다.
- [0072] 단계 a)의 용액의 GuHCl 농도는 1.3 내지 3.2M의 범위 내에 있는 것이 특히 바람직하다. 특정 양태에서, GuHCl 농도는 1.3 내지 3.0M; 또는 1.3 내지 2.75M; 또는 1.3 내지 2.5M; 또는 1.5 내지 3.0M; 또는 1.5 내지 2.75M; 또는 1.5 내지 2.5M; 또는 1.5 내지 2.25M; 또는 1.5 내지 2.0M; 또는 1.5 내지 1.9M의 범위 내에 있다. 보다 바람직하게는, GuHCl 농도는 1.6 내지 1.9M의 범위 내에 있고, 가장 바람직하게는 GuHCl 농도는 1.7M이다. 이러한 농도는 용액에서 Apo A-I 단백질의 응집체 형성을 억제하고, 여과능(즉, 용량 및 처리량)을 개선시키고, 필터 막에서 바이러스의 최대 보유(즉, 선택성)를 확실히 하기 위해 이상적이다. 본 발명의 양태에서, Apo A-I 및 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액의 GuHCl의 농도는 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 측정한다. 본 발명의 특정 양태에서, 구아니딘 함량은 적합한 양이온 교환 칼럼(예를 들면, IonPac CS19 분석 칼럼, 4 x250mm(Thermo Scientific, Dionex))을 갖는 이온 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 측정한다. Dionex IonPac CS19 칼럼은 전도도 검출과 함께 자동 메탄설폰산(MSA) 용출 생성 및 전해질 용출 억제에 대한 Reagent-Free™ 이온 교환 크로마토그래피(RFIC™) 시스템과 함께 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 이동상(예를 들면, 메탄 설폰산, MSA)으로부터의 이온으로 인한 배경은 억제되고, 구아니딘의 검출은 전도도를 측정함에 의해 수행될 수 있다. Apo A-I 및 구아니딘을 함유하는 샘플은 내부 표준물(예를 들면, 포름아미딘 아세테이트)과 혼합될 수 있고, 물에서 희석하여 구아니딘 농도는 0.1 내지 2.0mg/mL이다. 크로마토그래피는 등장성 또는 농도 구배 방식으로 전개될 수 있다. 정량은 5개 포인트 보정(0.1 내지 2.0mg/mL)과 내부 표준물과 함께 표면적을 기준으로 할 수 있다.
- [0073] 하나의 양태에 따라, 바이러스 여과 단계 전 용액의 pH는 약 7 내지 약 10; 약 7 내지 약 9; 또는 약 7 내지 약 8의 범위 내 있다. 특정 양태에서, 바이러스 여과 단계 전 용액의 pH는 7.1 내지 7.5 범위 내에 있다. 추가의 양태에서, 바이러스 여과 단계 전 용액의 pH는 7.3이다. 상기 pH 범위는 생리학적 pH(약 7.35 내지 7.45) 또는 거의 생리학적 pH이다. 이상적으로 pH는 아포지단백질의 등전점으로부터 벗어난 적어도 하나의 pH 단위일 것이다. 특정 양태에서, pH는 아포지단백질의 등전점으로부터 벗어난 적어도 하나의 pH 단위이다. 인간 Apo A-I 및 이의 변이체의 경우에, 등전점은 전형적으로 약 pH 5.2 내지 5.8 범위에 있다. 아포지단백질의 등전점은 등전점 포커싱(IEF: isoelectric focusing)에 의해, 예를 들면, 문헌[참조: Contiero *et. al.* (1997) Electrophoresis 18(1), 122-126]에 기재된 방법에 의해 측정할 수 있다. 다중 아포지단백질 이소형 피크가 IEF 프로필에 존재하는 경우, 평균 등전점이 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 맥락에서, 용액의 pH가 소정의 pH 범위, 예를 들면, 7.1 내지 7.5 범위 내에 있는 경우, 이것은 용액이 상기 범위의 pH, 예를 들면, 7.1 내지 7.5 pH를 "가짐"을 의미한다. 이것은 용액이 7.1 내지 7.5의 pH에서 형성되거나 이의 형성 후 7.1 내지 7.5의 pH로 됨을 의미한다.
- [0075] 일반적으로, 상기 pH는 Apo A-I 단백질을 상기 용액에 첨가하기 전에 용액에서 측정되거나; 상기 용액을 Apo A-I 단백질과 혼합한 후 직접 측정한다. 전형적으로, 단계 a)의 용액의 pH는 전구체 성분을 혼합한 직후 측정한다. 대안적으로, 혼합물의 pH는 또한 혼합물 중에 계획된 양 및 농도를 기준으로 계산함에 의해 측정할 수 있다.
- [0076] 본 발명에서, 용액은 임의로 메탄올 또는 에탄올과 같은 하나 이상의 용매를 포함하는 적어도 50중량%의 물을 함유하는 용액을 언급한다. 용매는 임의의 약제학적 등급의 용매일 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, 용매

는 에탄올, 예를 들면, 95%의 약제학적 등급의 에탄올(예를 들면, 5% 메탄올을 함유하는 3A)이다. 추가의 양태에서, 용액은 약 20% 에탄올을 포함한다.

- [0077] 임의로, 단계 a)에 사용된 필터는 용액을 여과하기 전에 WFI 및/또는 GuHCl 용액으로 미리 세척한다. 상기 사전 세척 단계는 필터를 통한 단백질의 침투성을 증가시킨다. 특정 양태에서, 필터는 1.3 내지 2.0M의 GuHCl로 사전 세척한다.
- [0078] 바이러스 여과를 통한 단백질의 상실을 최소화하기 위해, 여과 후 일부 양태에서, 필터는 GuHCl로 사후 세척(post-wash)한다. 특정 양태에서, 상기 필터는 1.3 내지 2.0M GuHCl로 사후 세척한다.
- [0079] 바이러스 여과는 접선 유동 여과(TFF: tangential flow filtration) 또는 '데드-엔드(dead-end)' 여과(또한 정상 또는 직접 유동 여과로도 공지되어 있음)를 사용하여 수행할 수 있다. 바이러스 필터는 본래에 비대칭 막의 상부 스킨 층에 인접한 공급물 유동과 함께 TFF에 사용하기 위해 디자인하였다. TFF는 농도 편중 및 오염을 감소시키기 위해 막 표면을 스위핑(sweeping)함에 의해 높은 플럭스를 제공한다. 그러나, 데드 엔드 여과의 단순함 및 보다 낮은 자본 비용은, 특이적으로 데드 엔드 여과를 위해 디자인된 바이러스 필터의 광범위한 사용을 유도한다. TFF와는 대조적으로, 이들 데드 엔드 필터는 전형적으로 공급 스트림과 직면한 막의 보다 개방 측면(open side)과 함께 작동하여 단백질 응집체 및 다른 큰 압축물이 거대공극 구조 내에 포획되도록 함으로써 바이러스-보유 스킨 층을 보호한다. 단일-사용 데드 엔드 필터를 사용하는 이점은 이들이 시스템 디자인 및 타당성을 둘 다 단순화시켜 노동력과 자본 비용을 감소시킬 것을 포함한다.
- [0080] 데드-엔드 여과는 전형적으로, 유체가 표면으로부터 막을 통과하도록 하는 단일 펌프를 사용함을 포함한다.
- [0081] 접선 유동은 일반적으로 필터 막의 표면에 일정한 유속을 유지하기 위해 제1 펌프를 필요로 하고, 제2 펌프는 막의 뒷면(back)에 부압(negative pressure)을 생성시킴에 의해 막을 통해 단백질을 인출한다.
- [0082] 특정 양태에서, 여과는 데드-엔드 여과에 의해 수행된다.
- [0083] 특정 양태에서, 데드-엔드 여과 공정은 정압 여과 또는 등속 여과를 사용하여 수행된다. 특정 양태에서, 데드-엔드 여과 공정은 정압 여과를 사용하여 수행한다.
- [0084] 여과는 막이 견딜 수 있는 수준과 동일하거나 수준 미만인 여과 압력과 함께 수행하고, 이는 본원에 사용될 바이러스 제거 막의 물질에 의존하고, 예를 들면, 압력은 약 0.2 내지 약 3.4bar이다. 특정 양태에서, 여과 압력은 약 0.2bar 내지 약 3.4bar 사이에 유지된다. 양태에서, 여과 압력은 약 1 내지 약 3bar에서, 또는 약 1.5 내지 약 3bar; 또는 약 1.7 내지 약 3bar; 또는 약 2 내지 약 3bar; 또는 약 2.2 내지 약 3bar; 또는 약 2.2 내지 약 2.7bar에서 유지된다. 양태에서, 여과 압력은 약 1.7bar 내지 약 2.4bar, 또는 약 2.2bar 내지 약 2.4bar에서 유지된다.
- [0085] 온도는 단백질 용액의 점도에 영향을 미치며, 또한 바이러스-제거 막으로 여과시의 플럭스에 영향을 미친다. 여과 단계에 사용될 용액은 0℃에서 관련 단백질이 변성되는 온도까지 범위 내의 온도를 가져야만 한다. 용액의 온도는 적합하게는 약 10℃에서 약 50℃까지의 범위 내에 있다. 특정 양태에서, 용액의 온도는 약 18℃ 내지 약 35℃의 범위 내에 있다. 일부 양태에서, 상기 용액은 약 18℃ 내지 약 26℃의 실온에서 여과된다.
- [0086] 특정 양태에서, 2개 이상의 필터는 연속적으로 사용된다. 특정 양태에서, 여과는 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기를 갖는 일련의 2개의 필터를 사용하여 수행한다. 일부 양태에서, 2개 이상의 필터는 15nm 내지 35nm 미만; 또는 15nm 내지 30nm; 또는 15nm 내지 25nm; 또는 15 내지 20nm; 또는 20nm 내지 25nm의 범위의 기공 크기를 갖는다. 특정 양태에서, 2개 이상의 필터는 약 15nm; 또는 약 20nm; 또는 약 25nm; 또는 약 30nm; 또는 약 35nm의 그룹으로부터 선택된 평균 기공 크기를 갖는다.
- [0087] 본 발명의 양태에서, 바이러스 필터 용량은 필터 표면적 $1m^2$ 당 Apo A-I 및 GuHCl을 포함하는, 적어도 200kg 또는 적어도 300kg 또는 적어도 340kg 또는 적어도 500kg 또는 적어도 750kg 또는 적어도 1000kg의 용액이다.
- [0088] 단계 a)의 용액은 4.0 내지 4.6M의 GuHCl을 포함하는 용액 중에 Apo A-I 침전물을 현탁시키고, 후속적으로 상기 현탁액을 5 내지 30g/L의 범위 내의 목적하는 Apo A-I 단백질 농도 및 1.3 내지 3.2M의 범위 내의 목적하는 GuHCl 농도로 희석함에 의해 제조될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 특정 양태에서, 아포지단백질(Apo A-I)을 정제하는 방법은, 약 7 내지 약 8의 pH의 5 내지 30g/L의 Apo A-I 및 1.3 내지 3.2M 농도의 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 여과함을 포함한다. 여기서, 필터는 15nm 내지 35nm 범위의 기공 크기를 갖고, 여과는 약 1 내지 약 3bar의 압력 및 약 18℃ 내지

약 35℃의 온도에서 데드-엔드 여과이다.

- [0090] 본 발명의 특정 양태에서, 아포지단백질(Apo A-I)을 정제하기 위한 방법은, 약 7 내지 약 8의 pH의 5 내지 20g/L의 Apo A-I 및 1.5 내지 3.0M의 농도의 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 여과함을 포함한다. 여기서, 상기 필터는 15nm 내지 35nm 미만 범위의 기공 크기를 갖고, 여과는 약 1 내지 약 3bar 및 약 18℃ 내지 약 35℃의 온도에서 데드-엔드 여과이다.
- [0091] 본 발명의 특정 양태에서, 아포지단백질(Apo A-I)을 정제하기 위한 방법은, 약 7 내지 약 8의 pH의 5 내지 20g/L의 Apo A-I 및 1.5 내지 2.0M 농도의 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl)를 포함하는 용액을 여과함을 포함한다. 여기서, 필터는 15nm 내지 26nm 범위의 기공 크기를 갖고, 여과는 약 1 내지 약 3bar 및 약 18℃ 내지 약 35℃의 온도에서 데드-엔드 여과이다.
- [0092] 통상적인 관행에 따라, 바이러스 필터는 완전성을 위해 필터가 요구되는 수준의 성능을 성취하는지를 확실히 하기 위해 사전 및 사후 시험된다. 이를 촉진시키기 위해, 필터 제조업체는 다양한 파괴적 및 비파괴적 물리적 완전성(physical integrity) 시험을 개발했다. 이들 물리적 완전성 시험의 목적은, (1) 바이러스 필터가 적절히 설치되는지; (2) 필터가 결함 및 손상이 없는 것인지; 그리고 (3) 필터의 성능이 제조업체의 명세서 및 사용자의 바이러스 보유 연구 둘 다와 일관성이 있는지를 확인하는 것이다. 가장 통상적으로 사용되는 비파괴적 시험은 버블 포인트 시험, 전진 유동 시험(forward flow test)(예를 들면, Palltronic Flowstar XC (Pall)), 물 내포 시험(water intrusion test) 및 이원 가스 시험(binary gas test)을 포함한다. 버블 포인트 시험 및 전진 유동 시험 둘 다는 가스의 자유 유동에 대한 장벽으로서 습윤 막을 평가한다. 소위 HydroCorr 시험으로 불리우는 물 내포 시험은 물, 비-습윤 유체의 자유 유동에 대한 장벽으로서 무수 소수성 막을 사용한다. 이원 가스 시험은 침투성에 있어서 높은 차이를 갖는 2개 가스의 혼합물을 사용하고, 시험은 가스 혼합물 업스트림 및 물-습윤된 막의 다운스트림의 조성물의 측정을 기준으로 한다. Planova(AsahiKasei Corporation) 필터와 함께 사용되는 사용후 완전성 시험(post-use integrity test)인 금 입자 시험은 파괴적 완전성 시험이다. 일반적으로, 비파괴적 시험은 초기 시험이 실패하는 경우 필터 완전성을 재시험하는 옵션으로 인해 사용된다. 사용후 완전성 시험 및 재시험이 실패하는 경우, 재여과는 바이러스 여과 단계를 위한 통상의 관행이다. 이들 시험은 상기 기재된 바와 같은 필터 기공 크기를 평가하기 위해 추가로 사용될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 특정 양태에 따라, 방법은 추가의 바이러스 고갈을 위한 열 처리 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 열 처리 단계는 단계 a) 전에 수행한다(옵션 I). 대안적인 양태에서, 상기 처리 단계는 단계 b) 후에 수행된다(옵션 II).
- [0094] 열 불활성화 단계 동안 아포지단백질 농도는 전형적으로 0.5 내지 50g/L 범위 내에 있다. 특정 양태에서, Apo A-I 단백질 농도는 5 내지 30g/L 범위 내에 있다.
- [0095] 상기 양태의 옵션 I에 따라, 열 처리 단계는 단계 a) 전, 따라서 바이러스 여과 전에 수행된다. 이러한 경우에, 예를 들면, 2.7 내지 3.9M의 농도로 GuHCl 및 6.6 내지 10.0의 pH에서, 특정 양태에서 6.6 내지 8.0의 pH의 Apo A-I를 포함하는 용액은 제1 단계에 제공된다. 이어서, 상기 용액은 용액 중에 여전히 존재할 수 있는 바이러스를 불활성화시키기 위해 55 내지 61℃의 온도로 약 30분 내지 약 4시간 동안 후속적으로 가열한다.
- [0096] 상기 양태의 옵션 II에 따라, 열 처리 단계는 단계 b) 후, 따라서 바이러스 여과 후에 수행한다. 이러한 경우에, 단계 b) 후 용액 중 GuHCl 농도는, 예를 들면, 2.7 내지 3.9M의 농도 및 6.6 내지 8.0의 pH의 GuHCl을 포함하는 용액을 제공하도록 조정된다. 이어서, 상기 용액은 용액 중에 여전히 존재할 수 있는 바이러스를 불활성화시키기 위해 55 내지 61℃의 온도로 약 30분 내지 약 4시간 동안 후속적으로 가열한다.
- [0097] 옵션 I 및 옵션 II의 옵션 둘 다에 대해, 6.6 내지 8.0의 pH와 함께 용액의 GuHCl 농도는 바람직하게는 3.0 내지 3.9M의 범위 내에 있고, 가장 바람직하게는 3.5M이다. 상기 농도 범위 내에서, 상기 용액 중 단백질의 응집체 형성은 억제된다.
- [0098] 하나의 양태에서, 6.6 내지 8.0의 pH와 함께 용액의 pH는 7.0 내지 8.0의 범위 내에 있다. 특정 양태에서, 용액의 pH는 7.3 또는 약 7.3이다. 이것은 본 발명에 따른 방법이 표적 단백질의 변성 및 이들의 생물학적 활성을 상실시킬 위험을 감소시키는 생리학적 pH(약 7.35 내지 7.45) 또는 거의 생리학적 pH에서 수행된다.
- [0099] 옵션 I의 경우에, 열 처리 단계가 바이러스 여과 전에 수행되는 경우, 6.6 내지 8.0의 pH를 갖는 용액은 바람직하게는 Apo A-I 침전물을 4.0 내지 4.6M의 GuHCl 중에 현탁시킨 다음, 후속적으로 GuHCl 농도를 2.7 내지 3.9M의 범위 내로 조정하고, pH를, 예를 들면, 희석에 의해 6.6 내지 8.0의 범위 내로 조정함에 의해 제조된다.

GuHCl 농도는 특히, 2.7 내지 3.5M의 범위 내에 있을 수 있다.

- [0100] 열 처리 후, 단계(a)에 대한 용액은 Apo A-I 단백질 농도 및 GuHCl 농도를 예를 들면, 상기 용액을 WFI로 희석 시킴에 의해 목적하는 범위의 용액(A)으로 조정함에 의해 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 용액으로부터 제조한다.
- [0101] 옵션 II의 경우에, 열 처리 단계가 바이러스 여과 후 수행되는 경우, 6.6 내지 8.0의 pH를 갖는 용액은 바람직하게는 상기 용액의 Apo A-I 단백질 농도를 5 내지 30g/L의 범위 내로 조정하고, 상기 용액의 GuHCl 농도를 1.3 내지 3.2M 범위로 조정함에 의해 단계 b) 후 용액으로부터 제조된다.
- [0102] GuHCl을 포함하고 6.6 내지 8.0 범위 내의 pH를 갖는 용액의 특정 조합은 이전에 공지된 파스퇴르 과정에 따른 것보다 바이러스 제거를 보다 신속하게 하고, 즉 널리 확립된 10시간 방법들 대신 60℃로 약 30분 내지 약 4시간 내이다.
- [0103] 바이러스 제거를 성취하기 위해 요구되는 감소된 시간으로 인해, 본 발명의 방법은 특히 시간이 주요 인자인 산업적 응용에 사용하기에 매우 적합하다.
- [0104] 추가로, 표적 단백질이 상승된 온도에 노출되는 단축된 시간으로 인해, 단백질이 비가역적으로 변성된 위험은 안정화제의 첨가 없이, 그리고 따라서 단백질 기능을 손상시킬 위험 없이 크게 저하된다. 이것은 본 발명의 방법이 치료학적 사용 또는 치료학적 전달을 위한 비히클로서 의도된 단백질로부터 바이러스 제거에 적합하게 한다.
- [0105] 상기 열 처리 방법이 바람직하지만, 열 처리 단계는 또한 60℃에서 적어도 10시간 동안 Apo A-I 용액을 가열하는 것과 같은 보다 통상적인 방법을 포함할 수 있는 것으로 인지된다.
- [0106] 열 처리 및 여과 단계의 조합은 MVM과 같은 파르보바이러스에 대한 적어도 LRV 12 로그 LRV, EMCV와 같은 비외피 바이러스에 대한 적어도 LRV 9 로그, 및 BVD와 같은 지질 외피 바이러스에 대한 적어도 LRV 8.5 로그로 Apo A-I를 제조될 수 있게 하는 잠재력을 갖는다.
- [0107] 본 발명은, 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값) 및/또는 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV; 및/또는 지질 외피 바이러스에 대한 적어도 8.5로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 파르보바이러스에 대한 12 로그 LRV(로그 감소 값); 및/또는 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제를 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은, 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값)를 갖는 Apo A-I 제제를 제공한다. 특정 양태에서, 파르보바이러스는 MVM이다. 특정 양태에서, 비외피 바이러스는 피코나비리드 바이러스, 예를 들면, EMCV이다. 특정 양태에서, 지질 외피 바이러스는 플라비리드 바이러스이다. 특정 양태에서, Apo A-I 제제는 약제학적 용도를 위해 적합하다. 본 발명의 특정 양태에서, Apo A-I 제제에 대한 MVM 및/또는 EMCV LRV는 실시예 6의 방법에 의해 측정한다.
- [0108] 본 발명에 사용되는 용액은 첨가제, 예를 들면, EDTA를 추가로 포함할 수 있다. 특정 양태에서, EDTA는 약 1mM의 농도로 첨가된다.
- [0109] 본 발명의 방법은 연구실 규모로 수행될 수 있지만 이들은 조건에 대한 상당한 변화 없이 산업적 규모로 스케일업될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 양태에서, 본 발명의 방법은 산업적 또는 상업적 규모로 수행된다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 인간 아포지단백질 A-I(Apo A-I)의 상업적 규모의 제조를 위해 적합하다. 예를 들면, 본 발명의 방법에서 출발 물질로서 혈장 분획을 사용하는 경우, 상업적 규모의 제조는 적어도 약 500kg의 혈장으로부터 유래된 혈장 분획의 사용을 포함한다. 보다 바람직하게는, 출발 혈장 분획은 배치당 적어도 약 5,000kg, 7,500kg, 10,000kg 및/또는 15,000kg의 혈장으로부터 유래한다.
- [0110] 정제된 아포지단백질은 후속적으로 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 예를 들면, 재구성된 HDL(rHDL)을 제조하기 위해 다른 성분과 제형화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 정제된 아포지단백질을 지질과 혼합하여 rHDL 제형을 제조하는 추가의 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, rHDL 제형은 임의의 인위적으로 제조된 아포지단백질 제제 또는 조성물일 수 있고, 이는 전형적으로 혈장에 존재하는 고밀도 지단백질(HDL)과 기능적으로 유사하거나, 동일하거나, 상응하거나 모사체이다. rHDL 제형은 이들의 범위 내에 "HDL 모사체" 및 "합성 HDL 입자"를 포함한다. 적합하게는, rHDL 제형은 아포지단백질, 지질 및 임의로 세제를 포함한다.
- [0111] 발명의 rHDL 제형은 콜레스테롤을 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 일부 경우에 US 5,652,339에 기재된 바와 같은 제형을 제조하는 경우 지질 성분(예를 들면, 포스포타일콜린)을 용해시키기 위해 사용되는 유기 용매를

사용하여 제조될 수 있다. 그러나, 아포지단백질 제형은 유기 용매의 부재하에 제조되는 것이 바람직하다.

- [0112] 적합하게는, 아포지단백질은 약 5 내지 100g/L, 바람직하게는 10 내지 50g/L 또는 보다 바람직하게는 25 내지 45g/L의 농도로 있다. 이것은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 및 100g/L 및 이들 양 사이의 임의의 범위를 포함한다. 다른 양태에서, 아포지단백질은 약 5 내지 20g/L, 예를 들면, 약 8 내지 12g/L의 농도로 있을 수 있다.
- [0113] 지질은 천연에 존재하는 HDL 또는 재구성된 고밀도 지단백질(rHDL)의 성분인 임의의 지질일 수 있다. 상기 지질은 인지질, 콜레스테롤, 콜레스테롤-에스테르, 지방산 및/또는 트리글리세리드를 포함한다. 바람직하게는, 지질은 인지질이다. 인지질의 비제한적인 예는 포스파티딜콜린(PC)(레시틴), 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민(PE)(세팔린), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스파티딜세린(PS), 포스파티딜이노시톨(PI) 및 스펡고마이엘린(SM), 스펡고신-1 포스페이트 또는 이들의 천연 또는 합성 유도체를 포함한다. 천연 유도체는 예그 PC, 예그 PG, 대두 PC, 수소화된 대두 PC, 대두 PG, 뇌 PS, 스펡고지질, 뇌 SM, 갈락토세레브로시드, 갱글리오시드, 세레브로시드, 세팔린, 카디올리핀, 및 디세틸포스페이트를 포함한다. 합성 유도체는 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디데카노일포스파티딜콜린(DDPC), 디에루코일포스파티딜콜린(DEPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디라우릴포스파티딜콜린(DLPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일미리스토일포스파티딜콜린(PMPC), 팔미토일스테아로일포스파티딜콜린(PSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디라우로일포스파티딜글리세롤(DLPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디미리스토일포스파티드산(DMPA), 디팔미토일포스파티드산(DPPA), 디스테아로일포스파티드산(DSPA), 디미리스토일포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스파티딜세린(DMPS), 디팔미토일포스파티딜세린(DPPS), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE) 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 디팔미토일스펙고마이엘린(DPSM) 및 디스테아로일스펙고마이엘린(DSSM)을 포함한다. 인지질은 또한 임의의 상기 인지질의 유도체 또는 유사체일 수 있다.
- [0114] 일부 양태에서, rHDL의 지질 성분은 적어도 2개의 상이한 포스파티딜콜린을 포함한다. 특정 양태에서, 적어도 2개의 포스파티딜콜린은 팔미토일-올레오일-포스파티딜콜린(POPC) 및 디-팔미토일-포스파티딜콜린(DPPC)이다. 특정 양태에서, 본 발명의 재구성된 HDL 제형은 POPC 및 DPPC를 포함한다. 특정 양태에서, POPC:DPPC의 비는 약 75:25; 또는 약 50:50이다.
- [0115] 다른 특정 양태에서, 지질은 포스파티딜글리세롤(예를 들면, 1,2-팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)]과 같은 음전하 인지질과 조합된 스펡고마이엘린이고, 이를 포함한다. 스펡고마이엘린 및 포스파티딜글리세롤(특히, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)]의 조합은 구체적으로 지질로서 사용하기 위해 고려된다. 이들 양태에서, 스펡고마이엘린 및 포스파티딜글리세롤은 적합한 비, 예를 들면, 90:10 내지 99:1(w:w), 전형적으로 95:5 내지 98:2 및 가장 전형적으로 97:3으로 존재할 수 있다.
- [0116] 바람직하게는, 인지질은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 인지질과 조합된 포스파티딜콜린이거나 이를 포함한다. 또 다른 인지질의 예는 스펡고마이엘린이다. 일부 양태에서, 아포인지질 제제는 세제를 포함할 수 있다.
- [0117] 전형적으로, 배타적인 것은 아니지만 지질은 10 내지 100g/L, 또는 바람직하게는 30 내지 60g/L의 농도로 존재할 수 있다.
- [0118] 상기 세제는 임의의 이온성(예를 들면, 양이온성, 음이온성, 양쪽성) 세제 또는 비이온성 세제일 수 있고, rHDL 제형에 사용하기에 적합한 담즙산 및 이의 염을 포함한다. 이온성 세제는 담즙산 및 이의 염, 폴리소르베이트(예를 들면, PS80), CHAPS, CHAPSO, 세틸 트리메틸-암모늄 브로마이드, 라우로일사르코신, n-옥틸-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판 설페이트, n-데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판 설페이트 및 4'-아미노-7-벤즈아미도-타우로콜산을 포함할 수 있다.
- [0119] 담즙산은 전형적으로 24개의 탄소를 갖는 디하이드록실화되거나 트리하이드록실화된 스테로이드이고, 이는 콜산, 데옥시콜산 케노데옥시콜산 또는 우르소데옥시콜산을 포함한다. 바람직하게는, 세제는 콜레이트, 데옥시콜레이트, 케노데옥시콜레이트 또는 우르소데옥시콜레이트 염과 같은 담즙염이다. 특히 바람직한 세제는 나트륨 콜레이트이다.
- [0120] 그러나, 높은 수준의 세제는, 예를 들면, 0.3g/g Apo AI 또는 6g/L rHDL 제형(20g/L의 Apo-AI)의 수준으로서

일부 시스템에서 간 독성과 관련된 것으로 입증되었다. 따라서, 세제의 상기 수준의 5 내지 10%는 발명에 사용하기 위해 바람직하고, 즉, 0.015 내지 0.03g/g Apo-AI 또는 0.5 내지 0.9g/L rHDL 제형(30g/L Apo-AI)이다. 세제의 "수준"은 세제의 절대량, 세제의 농도(예를 들면, rHDL 제형의 단위 용적당 질량) 및/또는 rHDL 제형의 성분의 또 다른 양 또는 농도에 상대적인 세제의 양 또는 농도일 수 있다. 단지 예로서, 세제의 수준은 rHDL 제형 중에 존재하는 아포지단백질(예를 들면, Apo-AI)의 총 질량 측면으로 표현될 수 있다. 30g/L의 아포지단백질과 함께 rHDL 제형의 약 0.45g/L 이상의 세제 농도는 안정성 및 비-독성 둘 다의 관점에서 최적이다. 안정성은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 유리하게 측정될 수 있지만, rHDL 제형의 탁도는 바람직한 척도이다. 특정 양태에서, 세제 농도는 rHDL 제형에서 0.5 내지 1.5g/L이다. 상기 세제 농도는 비색측정 분석을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 반응 바이엘에 첨가된 혈장(1mL 반응 용적의 125 μ L 혈장)과 함께 골사우렌(Gallsauren) 시험 키트 및 골사우렌 스토프레젠(Gallsauren Stoppreagens)을 사용한다.

[0121] 보다 일반적으로, 본 발명의 rHDL 제형 중에 존재하는 경우 세제의 수준은 간 독성을 나타내는 것의 약 5 내지 35%이다. 상기 범위는, 예를 들면, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 및 35%를 포함한다. 보다 바람직하게는, 세제의 수준은 간 독성을 나타내는 것의 약 5 내지 20%이다. 유리하게 상기 수준은 간 독성을 나타내는 것의 약 5 내지 10%이다. 바람직하게는, 이들 수준은 간 독성을 나타내는 세제의 최소 또는 역치 수준과 관련하여 표현된다. 간 독성은 다양한 시험관내 및 생체내 모델에 의해 평가될 수 있다. 시험관내 모델의 한 예는 HEP-G2 세포를 사용한다. 본 발명은 HEP-G2 세포를 로그 단계로 성장시킴을 포함한다. 이어서, 상기 세포는 배양 배지로부터 제거하고, 10mL의 배양 배지(90% DMEM, 10% 불활성화된 FCS, 1% 비필수 아미노산, 1% Pen/Strep) 중에서 트립신 처리 및 재현탁 전에 PBS 중에서 세척하였다. 세포 성장 및 생존능은 뉴바우어(Newbauer) 혈구측정기 및 트립판 블루 염색을 사용하여 모니터링한다. 10×10^4 C/mL를 함유하는 100 μ L의 적정액을 후속적으로 96 웰 F-바닥 플레이트에 씨딩하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% H₂O에서 밤새 항온처리하였다. 시험 제품(예를 들면, rHDL 제형)을 함유하는 샘플(700 μ L)은 배양 배지를 첨가함에 의해 제조한다. 제1 열의 웰로부터의 배지를 제거하고, 200 μ L의 시험 제품 용액을 첨가하였다. 일련의 1:2 희석 시리즈를 플레이트 상에 완료한다. 이어서, 플레이트는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% H₂O에서 72시간 동안 항온처리한다. 이후, 세포 생존능을 결정한다. 이것은 50 μ L의 3 \times 뉴트럴 레드 용액(Neutral Red Solution)(100mL의 PBS 중 70mg 뉴트럴 레드)를 각각의 웰에 첨가함에 의해 수행할 수 있다. 상기 플레이트는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% H₂O에서 시간 동안 항온처리하고, 웰은 200 μ L의 PBS로 1회 세척하였다. 이후, 100 μ L의 에탄올을 각각의 플레이트에 첨가하고, 상기 플레이트는 540nm에서 판독하기 전에 20분 동안 진탕시킨다. 생체내 간독성 모델의 예는 의도적인 토끼 모델이다. 상기 모델은 억류 장치(토끼 홀더)에 위치한 토끼를 사용하고, 정맥내 카테터는 이들의 귀 정맥에 삽입하였다. 시험 제품은 40분 정맥내 주입으로서 투여한다. 혈액 샘플은 귀 동맥으로부터 채혈하고, 혈청 및 스트렙토키나제-혈장(5%) 바이엘에 수거한다. 혈액 샘플은 -20 $^{\circ}$ C에서 저장된 혈청, 및 혈장으로 처리하고, -80 $^{\circ}$ C에서 저장한다. 이어서, 샘플은 시판되는 효소적 광측정 시험 키트를 사용하여 ALT 및 AST 활성 수준에 대해 평가할 수 있다(Greiner Biochemica). 인간 Apo A-I 수준은 비탁측정 분석 또는 고성능 모세관 전기영동을 사용하여 측정할 수 있다.

[0122] 추가의 바람직한 양태에서, rHDL 제형은 간 독성을 유발하지 않는 수준으로 지질을 포함한다. 적합하게는, 지질의 수준은 간 독성을 유발하거나 이와 연관된 것의 약 20 내지 70%이다. 특정 양태에서, 지질의 수준은 바람직하게는 간 독성을 유발하거나 이와 연관된 것의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65% 및 이들 양 사이의 임의의 범위이다. 바람직하게는, 이들 수준은 간 독성을 나타내는 지질의 최소 또는 역치 수준과 관련하여 표현된다. 예를 들면, 간 독성과 관련된 것으로 나타난 지질의 수준은 84g/L이다. 따라서, 지질은 바람직하게는 약 30 내지 60g/L의 농도이다. 이것은 30, 35, 40, 45, 50, 55 및 60g/L 및 이들 양 사이의 임의의 범위를 포함한다. 지질의 특히 유리한 농도는 약 30 내지 50g/L이거나, 특정 양태에서, 약 34 또는 47g/L이다. 지질의 "수준"은 지질의 절대 양, 지질의 농도(예를 들면, rHDL 제형의 단위 용적당 질량) 및/또는 고정된 투여량의 아포지단백질 제제 성분의 또 다른 양 또는 농도에 상대적인 지질의 양 또는 농도의 비일 수 있다. 단지 예로서, 지질의 수준은 고정된 투여량 rHDL 제형 중에 존재하는 아포지단백질(예를 들면, Apo A-I)의 몰 비와 관련하여 표현될 수 있다.

[0123] 하나의 바람직한 양태에서, 본 발명의 rHDL 제형 중에 아포지단백질:지질의 몰 비는 1:20 내지 1:100의 범위에 있다. 상기 범위는 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80 및 1:90과 같은 몰 비를 포함한다. 보다 바람직하게는, 아포지단백질:지질의 몰 비는 1:40 내지 1:80; 또는 1:40 내지 1:75; 또는 1:45 내지 1:70; 또는 1:40 내지 1:65; 또는 1:40 내지 1:60; 또는 1:40 내지 1:55; 또는 1:40 내지 1:50; 또는 1:45 내지 1:80; 또는 1:45 내지 1:75; 또는 1:45 내지 1:70; 또는 1:45 내지 1:65; 또는 1:45 내지 1:60; 또는 1:45 내지 1:55; 또는

1:50 내지 1:80; 또는 1:50 내지 1:75; 또는 1:50 내지 1:65; 또는 1:50 내지 1:60의 범위에 있다. 아포지단백질:지질의 특히 유리한 비는 약 1:40; 또는 약 1:45; 또는 약 1:50; 또는 약 1:55; 또는 약 1:60이다.

[0124] 다른 양태에서, 본 발명의 rHDL 제형 중에 아포지단백질:지질의 몰 비는 약 1:80 내지 약 1:120의 범위에 있다. 예를 들면, 상기 비는 1:100 내지 1:115, 또는 1:105 내지 1:110일 수 있다. 이들 양태에서, 상기 몰 비는, 예를 들면 1:80 내지 1:90, 1:90 내지 1:100, 또는 1:100 내지 1:110일 수 있다.

[0125] 특정 양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 수득된 rHDL 제형을 제공한다.

[0126] 특정 양태에서, 본 발명은 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값); 및/또는 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV; 및/또는 지질 외피 바이러스에 대한 적어도 8.5 로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제를 포함하는 rHDL 제형을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값); 및/또는 비-외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV를 갖는 Apo A-I 제제를 포함하는 rHDL 제형을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV(로그 감소 값)을 갖는 Apo A-I 제제를 제공한다. 특정 양태에서, 파르보바이러스는 MVM이다. 특정 양태에서, 비외피 바이러스는 EMCV와 같은 피코나비리데 바이러스이다. 특정 양태에서, 지질 외피 바이러스는 플라비리데 바이러스이다. 본 발명의 특정 양태에서, rHDL 제형에 포함된 Apo A-I 제제에 대한 MVM 및/또는 EMCV LRV는 실시예 6의 방법에 의해 측정한다. 특정 양태에서, rHDL 제형은 약제학적 사용을 위해 적합하다.

[0127] 당업자는 바이러스 여과 및 열 불활성화의 2개의 전용 바이러스 감소 단계가 본 발명의 Apo A-I 제제 및 rHDL 제형에 대한 추가의 바이러스 제거 수준을 제공할 수 있는 것으로 이해할 것이다. 예를 들면, 종종 혈장으로부터 Apo A-I 풍부 분획을 수득하는 경우 종종 사용되는 높은 에탄올 농도는 바이러스를 불활성화시키는 것으로 밝혀졌다(참조: Henin et. al., 1988, Vox Sang. 54(2):78-83). 이러한 상황에서, 이들 단계의 LRV는 본 발명의 Apo A-I 제제 또는 rHDL 제형에 대한 총 LRV에 부가할 수 있다.

[0128] 이전 본원에 기재된 정제된 Apo A-I는 약제학적 조성물로, 예를 들면, 치료학적 용도(상기된 바와 같이 포함하는)를 위해 재구성된 HDL로 제형화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제의 비제한적인 예는 물, 유화제, 결합제, 충전제, 계면활성제, 완충제, 안정화제, 염, 알콜 및 폴리올, 세제, 단백질 및 펩타이드, 지질, 고무, 당 및 다른 탄수화물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0129] 재구성된 HDL은 Apo-AI 이외에, 지질, 세제 및 안정화제 중 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 지질의 비제한적인 예는 인지질, 콜레스테롤, 콜레스테롤-에스테르, 지방산 및/또는 트리글리세리드를 포함한다. 바람직하게는, 지질은 인지질이다. 인지질의 비제한적인 예는 포스파티딜콜린(PC)(레시틴), 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민(PE)(세팔린), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스파티딜세린(PS), 포스파티딜이노시톨(PI) 및 스펡고마이엘린(SM) 또는 이들의 천연 또는 합성 유도체를 포함한다. 안정화제는 당(예를 들면, 슈크로스) 또는 당 알콜(예를 들면, 만니톨 또는 소르비톨)과 같은 탄수화물일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 존재하는 경우, 상기 세제는 임의의 이온성(예를 들면, 양이온성, 음이온성, 양쪽성) 세제 또는 비이온성 세제일 수 있고, 이는 담즙산 및 이의 염, 예를 들면, 나트륨 콜레이트를 포함한다.

[0130] 특정 양태에서, 약제학적 조성물은 W02014/066943에 기재되어 있다.

[0131] 본 발명은 또한, 상기 언급된 측면 중 어느 하나에 따라 포유동물 Apo-A1, apo-A1 제제, 약제학적 조성물 또는 rHDL 제형을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하여 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는, 포유동물에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0132] Apo A-I 및/또는 재구성된 HDL 제형에 대한 치료학적 용도는 심혈관 질환(예를 들면, 급성 관상 동맥 증후군(ACS), 죽상동맥경화증 및 심근 경색) 또는 질환, 장애 또는 병태, 예를 들면, 당뇨병, 뇌졸중 또는 ACS 경향이 있는 심근 경색, 고콜레스테롤혈증(예를 들면, 상승된 혈청 콜레스테롤 또는 상승된 LDS 콜레스테롤) 및 탄지예르 질환(Tangier disease)의 증상과 같은 감소된 수준의 고밀도 지단백질(HDL)로부터 발생하는 저콜레스테롤 혈증의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다.

[0133] 본 발명의 특정 양태들은 현재 하기 실시예들을 참조로 기재되며, 실시예들은 단지 설명을 목적으로 의도되고 이전에 기재된 일반론의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

[0134] 실시예

- [0135] **실시예 1:**
- [0136] 하기의 실시예는 본 발명에 따른 공정의 바람직한 양태에 따른 공정 단계의 연속적 배열을 기재한다. 상기 공정은 분획 IV 침전물 유래된 출발 물질을 pH 조정, 열 처리, 회석 및 바이러스 여과 전에 필터 보조제를 제거하기 위해 여과된 GuHCl의 존재하에 용해시킴을 포함한다. 열 처리는 대안적으로 바이러스 여과 단계 후 수행될 수도 있다.
- [0137] **방법 및 재료**
- [0138] Apo A-I 단백질 농도
- [0139] 일반적으로, 용액 중 Apo A-I 단백질 농도는 회석제로서 WFI(주사용수)를 사용하여 280nm에서 흡광도를 결정함에 의해 측정하였고, 전형적으로 5 내지 30g/L이다. 단백질 계산은 다음과 같다:
- [0140]
$$\text{단백질 농도 [g/L]} = \frac{\text{측정된 흡광도} \times 0.885 \times \text{회석}}{1.0844}$$
- [0141] 대안적으로, Apo A-I 단백질 농도는 비탁법 또는 고성능 모세관 전기영동(Hewlett Packard 3D CE, Agilent Technology)을 사용하여 측정할 수 있다. 간략하게, 고성능 모세관 전기영동과 관련하여, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함했다- 대략적으로 2 내지 3mg/mL의 Apo A-I(필요한 경우 물로 회석시킴)를 함유하는 샘플(150 μ l)은 16% SDS(25 μ l) 및 페닐알라닌(25 μ l, 4mg/mL)과 함께 제조하였다. 이어서, 상기 샘플을 전기영동 완충액(50mM 붕소산나트륨, 0.2% SDS, 300 μ l) 중에서 회석 전에 3분 동안 수욕에서 항온처리하고, 여과(0.45 μ m)하였다. 이어서, 상기 샘플을 융합 실리카 모세관(56cm \times 50 μ m id, Agilent G1600-61232) 상에 로딩하였다. 전기영동은 25kV에서 수행하였다. 사용된 표준물은 국제 Apo A-I 표준물(BCR-393)이었다. 상기 방법은 특히, Apo A-I가 재구성된 HDL의 일부인 경우 유용하다.
- [0142] 4.6M 구아니딘 하이드로클로라이드 용액
- [0143] 1mM EDTA(Titriplex)와의 4.6M GuHCl 용액을 WFI(주사용수), GuHCl 염 및 EDTA로부터 제조하였다. 4.6M GuHCl 용액의 pH는 NaOH를 사용하여 pH 7.2 내지 7.4로 조정하였다.
- [0144] 1.7M 구아니딘 하이드로클로라이드
- [0145] 1mM EDTA(Titriplex)와의 1.7M GuHCl 용액을 WFI(주사용수), GuHCl 염 및 EDTA로부터 제조하였다. 1.7M GuHCl 용액의 pH는 NaOH를 사용하여 pH 7.2 내지 7.4로 조정하였다.
- [0146] 10mM NaCl 투석여과 용액
- [0147] 상기 투석여과 용액은 WFI 및 NaCl로부터 제조하였다. 투석여과 용액의 전도도는 1.0 내지 1.2mS/cm로 측정되었다.
- [0148] **실험 과정**
- [0149] **Apo A-I 침전물의 가용화**
- [0150] Apo A-침전물은 4.6M 구아니딘 하이드로클로라이드(GuHCl) 중에 용해시키고, 균질화시키고, pH는 pH 7.3 \pm 0.1로 조정하였다.
- [0151] **세정 여과**
- [0152] 여과 용액은 심층 여과(depth filtration)로 세정하여 잔여 필터 보조제를 제거하였다. 상기 필터는 주사용수(WFI)로 사전에 세척하고 4.6M GuHCl 용액으로 사후 세척하였다. 사후 세척물을 여과물과 합하여 여과물에서 GuHCl 농도가 약 3.5M이 되도록 한다. 합한 여과물을 수거하고, 0 내지 30g/L 범위의 Apo A-I 농도를 가졌다.
- [0153] 바이러스 여과 단계 전에, 열 처리 단계는 바이러스 불활성화를 제공하기 위해 수행하였다.
- [0154] **열 처리**
- [0155] 열 처리를 위해, pH는 7.1 내지 7.5로 조정하였다. GuHCl 농도는 하기식에 따라 계산하고 적어도 3.0M으로 조정하였다.
- [0156]
$$\text{GuHCl [M]} = -41.4 - (0.0170 \times \text{단백질 [g/L]}) + (41.5 \times \text{밀도 [g/cm}^3\text{]})$$

- [0157] 이어서, 혼합물은 약 60.0℃의 온도로 약 30분 내지 약 4시간 동안 항온처리하였다. 상기 혼합물은 실온으로 되돌리고, 바이러스 여과 단계에 적용하기 전에 희석하였다.
- [0158] **희석 단계**
- [0159] 바이러스 여과 단계 전에, 혼합물은 WFI로 희석하여 최종 GuHCl 농도가 1.5 내지 2.0M이 되도록 하고, Apo A-I 농도는 0 내지 30g/L의 범위이다.
- [0160] **바이러스 여과**
- [0161] 바이러스 여과 단계의 목적은 물리적으로 바이러스 입자를 제거하는 것이었다.
- [0162] 사전 여과는 PALL SKL 7002 NTP 0.1 μ m(Nylon)를 사용하여 수행하였다. 1m² 필터 면적을 갖는 살균된 Planova BioEx 나노필터(AsahiKasei Corporation)를 여과 단계를 위해 사용하였다. BioEx 필터는 필터 표면적의 1m² 당 적어도 340kg의 용액이 되도록 하였다. 사전 필터 및 바이러스-제거 필터 둘 다는 1.7M GuHCl로 실온에서 플러싱하였다. 데드 엔드 바이러스 여과 공정은 실온에서 수행하였다. 압력은 3.4bar 미만으로 유지하였다. 여과의 완료 후에, 필터는 1.7M GuHCl로 사후 플러싱하였다. 단계 전반에 걸친 Apo A-I의 회수는 95% 초과 및 전형적으로 약 100%로 탁월하다.
- [0163] **실시예 2**
- [0164] 상이한 GuHCl(1.7M & 3.2M) 및 Apo A-I 농도(5.8, 8.9, 19.7g/L)의 존재하에 BioEx 필터를 사용한 여과의 비교를 수행하였다(도 1 내지 3). 바이러스 여과 공정은 실시예 1에서 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 수행하였다.
- [0165] 추가의 여과 연구는, 보다 낮은 농도의 GuHCl(1.0M & 1.3M)이 이러한 시스템에서 필터 차단율 유발하는 불안정한 용액을 유도할 수 있음을 입증하였다. 이들 결과는 바이러스 여과를 촉진시키기 위해 GuHCl 농도 수준을 최적화하는 이점을 강조한다.
- [0166] **실시예 3:**
- [0167] Apo A-I 샘플은 1:1000의 비로 MVM으로 스파이킹하였다. 상기 스파이킹된 샘플은 약 2.4bar의 압력에서 데드 엔드 방식으로 Planova BioEX 바이러스 제거 필터를 통해 10 내지 12g/L의 단백질 농도에서 여과하였다. 여과물의 샘플을 제거하고, 잔류하는 바이러스 감염도에 대해 분석하였다(표 1). 결과는 완전한 바이러스 보유가 GuHCl 농도 범위에 걸쳐 성취됨을 입증하였다. 보다 낮은 GuHCl 농도는 증가된 MVM 로그 감소 값(LRV)을 유도하였다.

표 1

GuHCl mol/L	여과물 kg/m ²	LRV 로그 TCID ₅₀ /ml \pm s _e
2.0	460	≥ 4.3
2.5	422	≥ 4.0
3.0	502	≥ 3.9
3.5	267	≥ 3.6
2.0	402	≥ 4.2
2.5	354	≥ 4.0
3.0	308	≥ 3.9
3.5	311	≥ 3.7

- [0168]
- [0169] 유사한 조건하에서 수행된 추가의 바이러스 여과 연구에서, MVM 바이러스 통과(breakthrough)는 3.4M GuHCl의 존재하여 관찰되었다. 따라서, 약 3.0M 미만 농도의 GuHCl은 Apo A-I의 제제의 제조에서 바이러스 제거 필터(예를 들면, BioEx)를 사용하여 대략 20nm의 직경을 갖는 바이러스(예를 들면, 파르보바이러스)의 제거를 개선시키는 것으로 사료된다.
- [0170] **실시예 4**
- [0171] 상기 연구는 출발 물질로부터 MVM을 제거하기 위한 Apo A-I의 제조에서 바이러스 여과의 효과를 결정하기 위해

의도되었다. MVM은 B19V를 포함하는 매우 강한 작은 비외피 바이러스에 대한 모델 바이러스로서 사용되었다.

[0172] 연구 디자인

[0173] Apo A-I 샘플은 1000:1의 비로 MVM으로 스파이킹하였다. 상기 스파이킹된 샘플은 Planova BioEX 바이러스 제거 필터를 통해 여과하였다. 상이한 시점에서, 여과물의 샘플을 제거하고, 잔류 바이러스 감염도에 대해 분석하였다.

[0174] $\geq 115g$ 의 여과물이 수거된 경우, 시험 시스템은 100:1의 비로 MVM으로 재스파이킹하였다. 이어서, 여과를 계속하고 $\geq 8g$ 의 여과물이 수거된 경우 종료하였다. 여과물은 잔류 바이러스 감염도에 대해 검정하였다. 최종적으로, 필터는 적어도 $12g$ 의 $1.7mol/L$ GuHCl 용액으로 사후 세척하였다. 사후 세척 분석은 별도로 수거하고, 바이러스 감염도에 대해서도 분석하였다.

[0175] 각각의 실험에서:

[0176] - 시험 샘플의 세포독성을 측정하였고,

[0177] - 바이러스 스톱의 역가를 측정하였고,

[0178] - 바이러스의 안정성을 측정하였고,

[0179] - 간섭을 측정하였고,

[0180] - 제거율을 측정하였다.

[0181] 세포독성 효과의 평가

[0182] 세포독성은 샘플의 궁극적 세포독성 효과를 측정하기 위해 세포 배양 배지에서 연속으로 희석된, 바이러스 부재 시험 시스템을 사용한 비-방사활성 세포 생존을 검정에 의해 검정하였다. 양성 대조군의 60% 증식 활성을 유도하는 샘플은 세포 독성인 것으로 간주하였다.

[0183] 바이러스 간섭 분석

[0184] 바이러스 간섭은 스톱 바이러스의 연속 희석물에 대해 바이러스 부재의 시험 시스템의 비-세포독성 농도를 사용하는 TCID 50 종점 적정에 의해 수행하였다. 간섭은 배양 배지에서 수행된 스톱 바이러스의 표준 TCID 50 검정에서 수득된 바이러스 역가에 대한 간섭 검정에서 수득된 바이러스 역가의 직접 비교에 의해 평가하였다.

[0185] 바이러스 역가 측정(TCID50)

[0186] 바이러스 역가는 TCID50(조직 배양 감염성 용량 50%)에 의해 측정하였다. 탈염된(desalted) 샘플의 3배 연속 희석물을 사용하였다. 바이러스 감염도는 96웰 플레이트에서 지시기 세포에 대한 종점 적정에 의해 검정하였다.

[0187] 벨크 분석(BA)

[0188] BA는 바이러스 측정 검정의 검출 한계를 저하시키기 위해 사용하였다. 바이러스 감염도는 본래의 샘플의 3ml에 상응하는 각각 9ml의 탈염된 샘플을 지시기 세포에 대한 2개의 96웰 플레이트 상으로 분배함에 의해 검정하였다.

[0189] 데이터 처리

[0190] 미세역가 플레이트에 대한 TCID50에 의해 측정된 바이러스 역가의 계산

[0191] 바이러스 역가 및 이들의 오차는 Spearman & Kaber의 방법(Excel Makro: kaerber3_111.xls)을 사용하여 계산하였다. 입력 번호는 역가 측정으로부터의 결과였다.

[0192] 감소 인자의 계산

[0193] 공정의 바이러스 감소 인자(LRF: virus reduction factor)는 "바이러스 입증 연구: 바이러스의 불활성화 및 제거를 입증하는 디자인, 기여 및 해석"(CPMP/BWP/268/95/Final; 14 February 1996), 및 연방보건사무소 및 폴 에를리히 연구소의 요건[Bundesamt für Sera und Impfstoffe(4. Mai 1994)]에 따라 계산하였다.

[0194] 결과

[0195] 세포독성

[0196] 어떠한 세포독성도 바이러스 부재 시험 시스템의 둘 다의 로트에서 관찰되지 않았다.

[0197] 간섭 검정

Exp. Nr.	로그 TCID50/ml \pm s _e
12_001.1	8.40 \pm 0.12
12_001.2	8.40 \pm 0.11

[0198]

[0199] 어떠한 간섭도 관찰되지 않았다.

[0200] 벌크 분석

[0201] 3ml의 샘플을 사용한 벌크 분석은 검출 한계를 ≤ -0.0006 로그 TCID50/ml(95% 신뢰 한계)로 저하시킨다. 시험된 모든 샘플은 감염성 바이러스에 대해 음성이었다. 따라서, MVM의 완전한 제거는 2개의 실험에서 여과를 거쳐 성취하였다.

[0202] 토론 및 결론

[0203] 본 연구는 출발 물질로부터 MVM을 제거하기 위한 바이러스 여과의 효과를 측정하기 위해 의도되었다. MVM은 매우 강한 소형 비외피 바이러스 및 B19V에 대한 모델 바이러스로서 사용되었다.

[0204] Planova BioEX 바이러스 제거 필터에 의한 MVM의 완전한 제거를 관찰하였고 $\geq 6.21 \pm 0.11$ 의 평균 LRF를 나타낸다. 시험 시스템의 어떠한 세포 독성 및 바이러스 감염도와 함께 어떠한 간섭도 관찰되지 않았다.

[0205] 실시예 5

[0206] Apo A-I 용액에 대한 열 처리 단계의 효과를 조사하기 위해(실시예 1, 열 처리 하위섹션에서 기재된 바와 같이) $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 가열하고, 100:1의 비로 MVM으로 스파이킹하였다.

[0207] 스파이킹된 시험 시스템은 3시간 동안 상기 온도에서 유지하였다. 샘플은 상이한 시점에서 수거하고, 바이러스 감염도에 대해 분석하여 공정 전반에 걸쳐 바이러스 감소 및 불활성화 키네틱을 모니터링하였다.

[0208] 시험 시스템의 샘플은 $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 가온하고 전체 실험 전반에 걸쳐 상기 온도에서 유지시켰다. 상기 온도를 실험 동안에 모니터링하고 기록하였다. 표적 온도에 도달한 후, 시험 시스템은 100:1의 비로 $0.1\mu\text{m}$ 여과된 MVM으로 스파이킹하였다. 샘플 1은 스파이킹 후 즉시 취하였다. 추가의 샘플은 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120 및 180분 후 취하였다. 모든 샘플은 빙냉 세포 배양 배지로 1:10으로 희석하고, 추가의 처리 때까지 얼음 상에 저장하였다. 이어서, 1ml의 희석된 샘플은 GuHCl을 제거하기 위해 PD-10 크기 배제 칼럼(GE Healthcare)을 통해 통과시켰다. 간략하게, 1ml의 샘플은 칼럼에 적용시키고 통과물(flow through)을 버렸다. 이어서, 칼럼은 1ml의 PBS로 세정하고, 통과물을 버렸다. 최종적으로, 3ml의 PBS를 칼럼에 적용하고, 탈염된 분획은 3ml의 용적으로 수거하여 또 다른 1 내지 3회 희석시켰다. 이어서, 탈염된 샘플에서 바이러스 역가는 종점 적정(TCID50)에 의해 측정하였다. 추가의 샘플은 벌크 검정(BA)을 위해 30, 60, 120 및 180분에 취하고, 추가의 처리 때까지 빙상에 저장하였다. 각각의 샘플로부터 3회, 1ml를 이전에 기재된 바와 같이 탈염시켰다. 총 9ml의 탈염된 분획을 수거하였다. 하기의 파라미터는 실시예 4에서 상기 기재된 방법에 따라 측정하였다:

[0209] - 시험 시스템의 세포독성

[0210] - 바이러스 스톱의 역가

[0211] - 간섭

[0212] - 제거

[0213] 바이러스 감염도와 함께 어떠한 세포 독성 및 어떠한 간섭도 모든 시험된 샘플에서 관찰되지 않았다. 30분 이내에 MVM의 완전한 불활성화와 함께 신속한 불활성화 키네틱을 관찰하였다. $\geq 6.03 \pm 0.12$ 로그의 수득된 평균 LRF는 60°C 에서 30분 이내에 열 처리 동안에 MVM의 효율적인 제거를 나타낸다.

[0214] 실시예 6

[0215] 상기 연구는 2개의 전용 바이러스 감소 단계 - Apo A-I 용액으로부터 바이러스를 제거하기 위한 여과 및 열 처리 단계의 효과를 측정하기 위해 의도되었다. 이어지는 제조 공정 계획은 실시예 1에 기재된 바와 같고, 스파이킹 연구는 실시예 4(바이러스 여과) 및 실시예 5(열 처리)에 기재된 것과 유사한 방식으로 수행하였다. 상기

연구는 하기의 바이러스 감소 수준을 입증하였다:

	바이러스 여과 (LRV)	열 처리 (LRV)	조합 (LRV)
MVM (파르보바이러스)	$\geq 6.21 \pm 0.11$	$\geq 6.03 \pm 0.12$	$\geq 12.24 \pm 0.23$
EMCV (피코나바이러스, A형 간염 바이러스)	$\geq 4.69 \pm 0.14$	$\geq 4.75 \pm 0.12$	$\geq 9.44 \pm 0.26$
BVDV (플라비리데, C형 간염 바이러스)	$\geq 4.27 \pm 0.17$	$\geq 4.69 \pm 0.13$	$\geq 8.96 \pm 0.3$

[0216]

[0217]

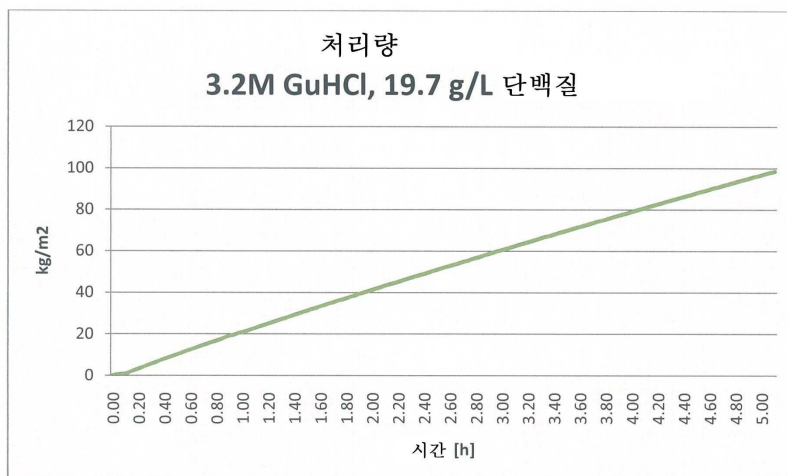
따라서, 본 발명의 방법은 Apo A-I가 MVM과 같은 파르보바이러스에 대한 적어도 12 로그 LRV, EMCV와 같은 비외피 바이러스에 대한 적어도 9 로그 LRV, 및 BVDV와 같은 지질 외피 바이러스에 대한 8.5 로그 LRV로 제조될 수 있게 한다.

[0218]

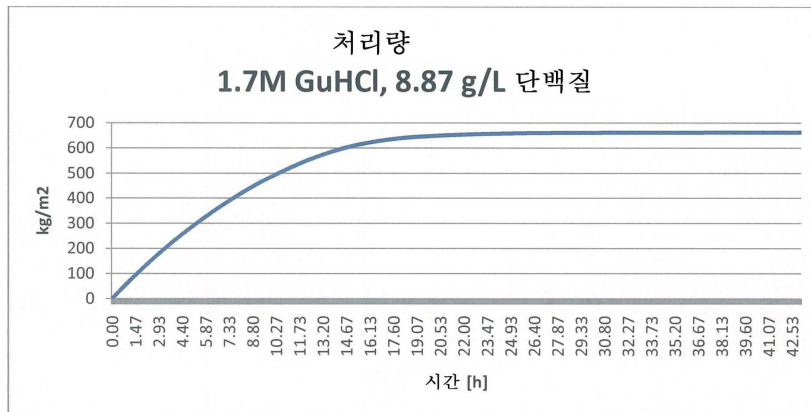
당업자는 본원에 기재된 발명이 구체적으로 기재된 것들 이외의 다른 변화 및 변형에 민감할 수 있음을 인지할 것이다. 본 발명은 취지 및 범위에 속하는 모든 상기 변이 및 변형을 포함하는 것으로 이해되어야만 한다. 본 발명은 또한, 개별적으로 또는 총체적으로 본 명세서에 언급되거나 나타난 단계, 특징, 조성물 및 화합물 모두, 및 상기 단계들 또는 특징들 중 임의의 2개 이상의 모든 조합을 포함한다.

도면

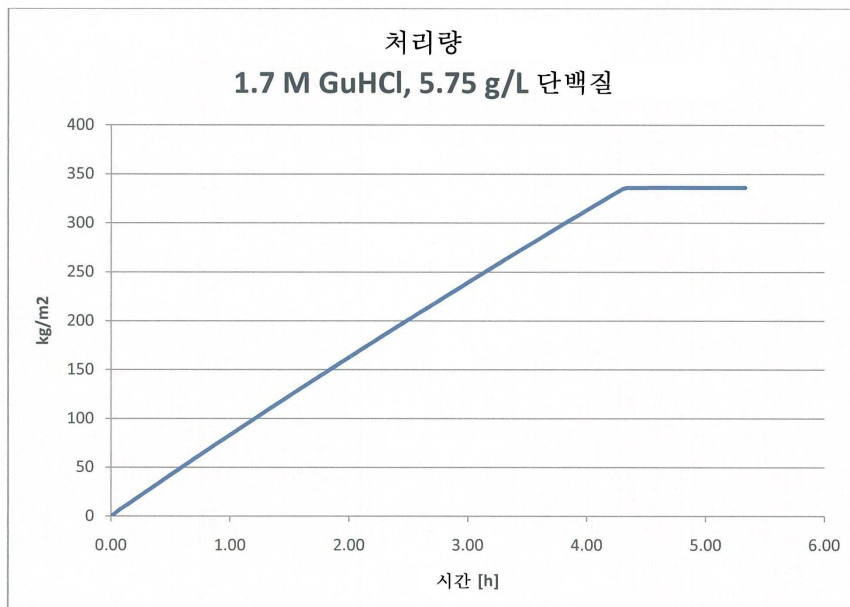
도면1



도면2



도면3



도면4

