



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0104740
(43) 공개일자 2016년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/16 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/16 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7023450(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년06월24일
심사청구일자 2016년08월25일
(62) 원출원 특허 10-2010-7028866
원출원일자(국제) 2009년06월24일
심사청구일자 2014년06월13일
(85) 번역문제출일자 2016년08월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/057883
(87) 국제공개번호 WO 2009/156430
국제공개일자 2009년12월30일
(30) 우선권주장
08158893.1 2008년06월24일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/129,402 2008년06월24일 미국(US)

(71) 출원인
옥타파마 아게
스위스 씨에이치-8853 라첸 자이텐스트라췌2
(72) 발명자
보르그발 카린
스웨덴 에스-11275 스톡홀름 노르텐플뤼츠배겐 55
에릭손 울리카
스웨덴 에스-11275 스톡홀름 노르텐플뤼츠배겐 55
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **응고 인자 V I I I 을 정제하는 방법**

(57) 요약

높은 이온 강도를 갖는 수용액 중에 FVIII을 함유한 분획을 제공하는 단계; 상기 FVIII을 함유한 분획을 다중모드 수지(multimodal resin)와 접촉시키는 단계; 선택적으로, 흡착된 FVIII을 갖는 상기 다중모드 수지를 수성 세척 완충액으로 세척하는 단계; pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 수성 용리 완충액으로 FVIII 함유 분획을 용리시키는 단계; 및 선택적으로, 정제되거나 또는 농축된 형태로 FVIII 함유 분획을 수집하는 단계를 포함하는, 크로마토그래피를 이용하여 응고인자 FVIII을 정제 또는 농축(enrich)하는 방법.

대표도 - 도1



라인 1 2

(52) CPC특허분류

A61K 38/57 (2013.01)

C07K 1/36 (2013.01)

C07K 14/755 (2013.01)

(72) 발명자

길리암 구스타브

스웨덴 에스-11275 스톡홀름 노르덴폴뤼츠배겐 55

예른베르그 매츠

스웨덴 에스-11275 스톡홀름 노르덴폴뤼츠배겐 55

빙게 스테판

스웨덴 에스-11275 스톡홀름 노르덴폴뤼츠배겐 55

명세서

청구범위

청구항 1

크로마토그래피를 이용하여 응고인자 FVIII을 정제 또는 농축(enrich)하는 방법에 의해 수득가능한 정제된 재조합 FVIII을 포함하는 조성물로서, 상기 방법은 높은 이온 강도를 갖는 수용액 중에 FVIII을 함유한 분획을 제공하는 단계;

- 상기 FVIII을 함유한 분획을 양이온 다중모드 수지와 접촉시키는 단계;
- 흡착된 FVIII을 갖는 상기 양이온 다중모드 수지를 수성 세척 완충액으로 세척하는 단계; 및
- pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 수성 용리 완충액으로 FVIII 함유 분획을 용리시키는 단계를 포함하고, 정제 순서는 하기 단계들을 더 포함하고:

- i. 양이온 교환 수지에서의 크로마토그래피;
 - ii. 음이온성 막에서의 크로마토그래피;
 - iii. 지질 외막(lipid enveloped) 바이러스를 위한 화학적 불활성화 단계;
 - iv. 효모에서 발현된 항체 단편으로 구성된 단백질 리간드에 기반한 친화도 수지에서의 크로마토그래피;
 - v. 20 nm의 평균 세공 크기에 의한 병원균 여과 제거 단계;
 - vi. 음이온 교환 수지에서의 크로마토그래피;
 - vii. 크기 배제 크로마토그래피 수지에서의 크로마토그래피를 포함하고,
- 마지막 정제 단계 후에, 순도가 4000 IU/mg보다 높고, DNA 함량은 1000 pg/1000 IU FVIII 미만인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 음이온성 막은 Sartobind Q로서 특히, DNA 감소를 위한 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 양이온 다중모드 수지는 Capto MMC인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 양이온 교환 수지는 SP Sepharose FF인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 지질 외막 바이러스를 위한 화학적 불활성화 단계는 트리-n-부틸 포스페이트 및 트리톤 X-100을 이용한 용매/디터전트-불활성화인 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 단백질 리간드에 기반한 친화도 수지는 VIIISelect이고, 그 VIIISelect는 효모에서 발현된 항체 단편으로 구성된 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 병원균 여과 제거 단계는 특히 Planova 20N과 같은 약 20 nm의 명목상 평균 세공 크기를 갖는 필터로 수행되는 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 음이온 교환 수지는 Q Sepharose FF인 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 크기 배제 크로마토그래피 수지는 Superdex 200pg인 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 제조합 FVIII는 인간 배아 신장 세포 293의 유도체에서 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 제조합 FVIII는 B-도메인 결실된 FVIII인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 고염 농도 용액 중에 FVIII를 포함하는 수용액은 25℃에서 약 25 내지 약 200 mS/cm의 전도도에 해당하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 아미노산은 라이신; 아르기닌, 히스티딘 및 이들의 조합과 같은 아미노산을 포함하는 아미노기의 군으로부터 선택되고, 특히 0.4M보다, 특별히 0.5M보다 높은 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 용리 완충액은 알코올과 같은 하나 이상의 히드록시기 함유 유기 화합물, 아미노산과 같은 하나 이상의 아미노기 함유 유기 화합물, Ca^{2+} 이온을 제공하는 하나 이상의 공급원, 무기염과 같이 완충액의 이온 강도를 조절하기 위한 하나 이상의 화합물, 하나 이상의 비-이온성 디터전트 및 pH를 약 6 내지 약 8, 특히 중성값 정도로 조절하기 위한 하나 이상의 완충 물질을 추가적으로 포함하는 조성물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 정제 순서는 병원균 제거/불활성화 단계를 더 포함하는데 이는 제거될 병원균에 대한 상이한 생리적 특성에 기반한 크로마토그래피 단계들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 마지막 정제 단계 후에, 순도가 9000 IU/mg을 초과하고, 바람직하게는 10000 IU/mg 단백질을 초과하며, DNA 함량은 100 pg/1000 IU FVIII 미만이고, 바람직하게는 10 pg/1000 IU FVIII 미만인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 응고 인자 VIII(FVIII로 약칭됨)을 정제하는 방법 및 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 FVIII를 함유한 분획에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈우병은 혈액 응고 또는 응집을 제어하는 신체의 능력을 손상시키는 유전성 유전질환의 군이다. 그의 가장 흔한 형태인 혈우병 A의 경우, 응고 FVIII이 결손되며, 혈우병 A는 5,000 내지 10,000명의 남아 출생 당 약 1명에서 발생한다. FVIII 단백질은 다중기능성을 갖는, 혈액 응고에서 필수적인 보조인자이다. FVIII의 결손은 FVIII의 혈장-유래 농축물 또는 제조합에 의해 제조된 FVIII로 치료될 수 있다. FVIII 농축물에 의한 치료는 혈우병 환자의 정상화된 삶을 가져왔다. 역사적으로, 혈우병 A는 인간 혈장으로부터 기원한 FVIII에 의해 치료되었다. 혈장에서, 정상적인 조건 하에서, FVIII 분자는 항상 그의 보조 인자; 폰 빌브란트 인자(von Willebrandt factor, vWf)와 결합하고, 이는 상이한 형태의 분해로부터 FVIII 분자를 안정화시킨다.

- [0003] 상이한 순도 및 약간량의 내포된 vWf를 갖는 혈장 유래 FVIII 제품이 시판되고 있다. 통상적으로, 소량의 vWf를 갖는 제품은 첨가된 인간 알부민 및/또는 FVIII 분자를 안정화시키기 위한 증가된 염 농도를 포함한 기타 안정화제를 포함한다. FVIII를 정제하기 위해 이용되는 방법은 통상적으로 동결 침전(cryo precipitation), 수산화알루미늄 침전 등과 같은 상이한 침전 방법, 및 크로마토그래피 단계, 주로, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 및 겔 여과 단계의 조합이었다.
- [0004] FVIII 제품을 향상시키기 위해, 친화도 크로마토그래피를 이용하였고, 이는 vWf를 감소시킬 가능성을 포함하여, 오염물을 FVIII의 고순도까지 제거하였다(Farrugia et al., Biotechnology and plasma fractionation industry; The impact of advances in the production of coagulation FVIII. Biotechnology, Vol. 3, No. 1, February 1993). 면역 친화도 크로마토그래피의 단점은 비교적 비싸고, 친화도 리간드로서 사용된 단일클론 항체가 동물 기원이라는 것이었다.
- [0005] 80년대 중반에, 혈장 유래 FVIII 제품과 연관된 일부 바이러스 전파가 있었다. 이 문제가 특정한 바이러스 감소(virus reduction) 단계의 실행을 통해 해소되었으나, 이것이 재조합 FVIII 제품(rFVIII) 개발의 출발점이었다. 90년대에, 최초의 rFVIII 제품이 시판되었고, 현재까지 높은 순도를 갖는 3종의 상이한 rFVIII 제품이 있다(모두 vWf 불포함)(2개의 전장 분자 및 숙주 세포의 생산성을 증가시키기 위해 FVIII 분자의 불활성 부분이 제거된 것인 1종의 B-도메인 결실 분자)(Eriksson et al., The manufacturing process for B-domain deleted recombinant FVIII. Seminars in Hematology, Vol 38, No 2, Suppl. 4 (April), 2000:pp24-31)).
- [0006] rFVIII를 정제하기 위해 이용되는 정제 방법들은 모두 상이한 크로마토그래피 기법의 조합이었다(ref. Bhattacharyya et al., Review article; Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol.4, No.3, July-September 2003). 하나는 혈장 VIII를 위해 이용된 공지된 면역 친화도 기법(예를 들면, 펩티드 친화도(Kelly et al., Development and validation of an affinity chromatography step using a peptide ligand for cGMP production of FVIII.) 또는 효모 유래 항체 단편(VIISelect FVIII 친화도 수지- GE Health care, Cat. No.17-5450가 현재 시판 중임)에 의해 이를 해소하는 제품이 있음)이다.
- [0007] 모든 rFVIII 제품에 vWf가 존재하지 않기 때문에, FVIII 분자를 활성 상실(응집, 프로테아제, 계면 흡착 등)에 대해 안정화시키기 위해 특정한 조치가 취해져야 한다. 이 제품들 중 하나에서, FVIII를 메탈로프로테아제에 의한 분해로부터 보호하기 위해 킬레이트제(EDTA 등)가 첨가된다(US-A-5,831,026). 알부민, 아프로티닌(aprotinin), 인슐린을 첨가하거나, 또는 rFVIII와 vWf를 동시-발현시키는 것(및 정제 사이클에서 이를 하류에서 제거하는 것)이 rFVIII 분자의 안정성을 증가시키기 위해 수행된 전략들이다(ref. Bhattacharyya et al., Review article; Recombinant FVIII for Haemophilia "An overview of production technologies". CRIPS Vol.4, No.3, July-September 2003).
- [0008] (포유동물 첨가제 및 킬레이트제를 포함하지 않는 방법을 유지하기 위한) 또 다른 전략이 EP-A-1 707 634에 게시되며, 상기에서 증가된 양의 염의 조합이 rFVIII 제품의 안정성 및 높은 회수율에 기여한다(Wang et.al, Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15.). 그러나, 이 기법은 특정한 단점을 갖는다. 예를 들면, 비교적 높은 염 함량은 회석 없이 이온 교환기에 직접 적용하기에 적합하지 않다(및 불안정화 초래 가능. Parti et al., In vitro stability of recombinant FVIII. Haemophilia (2000), 6, 513-522. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 87, No. 3, Aug 5, 2004.).
- [0009] WO-A-2009/007451은 혼합-모드 또는 다중 모드 수지(multimodal resin)을 이용한 FVIII의 정제 방법을 개시한다. 정제 방법은 소수성 부분과 음으로 하전된 부분을 포함하는 리간드를 함유한 다중 모드 수지 또는 혼합-모드 수지를 FVIII 단백질과 접촉시키는 단계, 및 1.5 M 이상의 염 및 40% (w/v) 이상의 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 또는 이들의 혼합물, 및 칼슘 이온을 함유한 용리 완충액으로 상기 FVIII 단백질을 용리하는 단계에 기반한다.
- [0010] EP-A-1707634는 예를 들면, 면역-친화도 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 단백질 침전, 완충액 교환, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 혼합-모드 소수성/이온 교환 크로마토그래피 매질, 킬레이트 크로마토그래피(chelating chromatography), 렉틴과 같은 탄수화물 친화도 또는 헤파린 친화도 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 전기영동, 투석, 폴리에틸렌 글리콜, 암모늄 술페이트, 에탄올과 같은 상이한 침전제, 히드록시 아파타이트(hydroxy apatite) 흡착, 필터 막 흡착, 자성 입자에 결합된 리간드 등과 같은 다양한 방법에 의해 재조합에 의해 제조된 단백질을 제조하는 방법을 개시한다. 그러나, 특정한 크로

마토그래피 정제 단계를 파악하는 것이다.

[0011] WO-A-2005-082483은 액체 중의 하나 이상의 불순물로부터 항체를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 액체를 항체를 수지에 흡착하기 위해 고정화된 다중모드 리간드(multimodal ligand)를 갖는 지지체를 포함하는 제1 크로마토그래피 수지와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 각 다중모드 리간드는 하나 이상의 양이온-교환기 및 하나 이상의 방향족 또는 헤테로방향족 고리 시스템을 포함하는 것인 방법을 개시한다. 수지로부터 항체를 방출시키기 위해 용리액이 첨가되고 용출액이 제2 크로마토그래피 수지와 접촉된다.

[0012] WO-A-2005/121163은 단백질 용액으로부터 하나 이상의 단백질을 분리하는 방법을 개시한다. 상기 방법은 하나 이상의 특정한 단백질을 포함하고 미리 정해진 pH 및 미리 정해진 이온 강도 또는 전도도를 갖는 단백질 용액을 제공하는 단계를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 일 목적은 신규한 방법을 제공하는 것에 의해 종래 기술의 정제 방법의 단점을 회피하는 것이었다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 FVIII을 정제하는 방법, 특히, 그들이 제조함 FVIII의 제조에서 이용될 때, 특히 높은 염 함량을 갖는 공급원(source)으로부터 FVIII을 정제하는 방법을 제공하는 것이었다.

과제의 해결 수단

[0015] 이는 하나 이상의 크로마토그래피가 다중모드 수지를 이용하여 수행되는 것인 크로마토그래피를 이용하는 정제 순서(purification sequence)에서 응집 FVIII을 정제하는 방법에 의해 달성된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "다중모드 수지(multimodal resin)"는 지지체 및 상기 지지체에 결합된 모이어티를 가지며, 상기 모이어티는 분리될 물질의 화학적 작용기와 상호작용하는 것인 크로마토그래피 물질을 의미한다. 본 발명의 특정한 구체예에서, 다중모드 수지는 매트릭스에 결합된 모이어티를 포함하고 상기 모이어티는 이온성 상호작용 및 수소 결합 및/또는 소수성 상호작용과 같은 다른 종류의 상호작용에 의해 혼합물 중의 FVIII과 상호작용할 수 있다.

[0016] 본 발명에 따르면, 크로마토그래피를 이용하여 응고인자 FVIII을 정제 또는 농축(enrich)하는 방법으로서,

[0017] - 높은 이온 강도를 갖는 수용액 중에 FVIII을 함유한 분획을 제공하는 단계;

[0018] - 상기 FVIII을 함유한 분획을 다중모드 수지(multimodal resin)와 접촉시키는 단계;

[0019] - 선택적으로, 흡착된 FVIII을 갖는 상기 다중모드 수지를 수성 세척 완충액으로 세척하는 단계;

[0020] - pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 수성 용리 완충액으로 FVIII 함유 분획을 용리시키는 단계; 및

[0021] - 선택적으로, 정제되거나 또는 농축된 형태로 FVIII 함유 분획을 수집하는 단계를 포함하는 것인 방법이 제공된다.

[0022] 다중 모드(또는 혼합 모드) 크로마토그래피는 단백질을 정제하기 위한 도구이다. 예를 들면, 제조사 데이터 쉬트 GE Health Care (11-0035-45AA) Capto Adhere, 제조사 데이터 쉬트 GE Health Care (28-9078-88AA) Capto MMC 및 특허출원 EP 07114856.3 "A process for the isolation and purification of a target protein, free of prion proteins"에 개시된다.

[0023] 이 기법들은 장점 및 단점을 갖는다. 하나의 장점은 보다 자주 이용되는 이온 교환 크로마토그래피에 비해, 보다 높은 염 농도 내에서 단백질을 결합할 가능성이다. 단점은 용리가 종종 단독으로 또는 다른 용리 파라미터와 조합된, 비교적 가혹한 조건, 예를 들면, 중성 pH보다 낮거나 또는 높은 pH를 포함한다는 것이다. FVIII은 비교적 불안정한 단백질이고, 예를 들면, 중성 값을 벗어난 pH, pH 6-8에서 비교적 불안정하다(Wang et.al, Coagulation FVIII, structure and stability. International Journal of Pharmaceuticals, 259 (2003), 1-15.). 본 발명은 FVIII 분자의 활성을 유지하고 예를 들면, EP-A-1 707 634에 기재된, 증가된 염 농도의 안정화 효과와 조합된 다중 모드 크로마토그래피의 사용을 촉진하는 중성값 주위의 pH 범위에서 온건한(mild) 용리 조건에 의해 이 문제를 해결한다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 다중 모드 크로마토그래피가 크로마토그래피 컬럼에서 수행될 수 있다. 이것이 제1 획득(capture) 단계로 간주될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 배치 모드(batch mode)로 수행될 수 있다.

본 발명은 또한 인간 또는 동물 유래 안정화 첨가제(단일클론 항체 기반 면역 친화도 수치)의 첨가를 포함하지 않는 정제 방법 및 이들을 포함하지 않는 전체 공정의 이용을 촉진한다. 다중모드 수지의 이용, 특히, 획득 단계로서의 이용은 통상적인 이온 교환기 대비 보다 높은 결합능을 촉진하며, 이는 상기 단계로부터 보다 농축된 생성물 용출액을 생성하고, 이는 생성물 안정성을 위해 유리하다.

- [0025] 본 발명의 방법은 통상적으로 재조합 FVIII (FVIII), 특히, B-도메인 결실 재조합 FVIII의 정제와 관련된다. 통상적으로 용액은 25℃에서 약 25 내지 약 200 mS/cm의 전도도에 해당하는 고염 농도 용액 중에 FVIII를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구체예에서, FVIII가 다중모드 수지에 적용되고 상기 다중모드 수지로의 결합 후에, 뒤이어 적합한 완충액에 의해 용리된다.
- [0027] FVIII를 포함하는 혼합물의 적용 및 FVIII의 다중모드 수지로의 결합 후에, FVIII 분자는 pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 용리 완충액을 이용하여 다중모드 수지로부터 용리되고, 특히, pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 아미노산은 라이신, 아르기닌 및/또는 히스티딘이다.
- [0028] 추가적으로, 상기 완충액은 알코올과 같은 하나 이상의 히드록시기 함유 유기 화합물, 아미노산과 같은 하나 이상의 아미노기 함유 유기 화합물, Ca^{2+} 이온을 제공하는 하나 이상의 공급원(source), 무기염과 같은, 완충액의 이온 강도를 조절하기 위한 하나 이상의 화합물, 예를 들면, NaCl, 특히, 1M 이하의 NaCl, 하나 이상의 비-이온성 디터전트(detergent) 및 pH를 약 6 내지 약 8, 특히, 중성 값 정도로 조절하기 위한 하나 이상의 완충 물질을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 알코올은 메탄올, 프로판올, 및 에틸렌 글리콜의 군으로부터 선택될 수 있고; 상기 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘의 군으로부터 선택될 수 있으며; 상기 Ca^{2+} 이온을 제공하는 공급원은 $CaCl_2$ 일 수 있고; 상기 무기염은 KCl 및 NaCl의 군으로부터 선택될 수 있으며; 상기 비-이온성 디터전트는 트윈(Tween) 20, 트윈 80 및 플루로닉(Pluronic) F68의 군으로부터 선택될 수 있고; 상기 완충 물질은 6 내지 8의 pH의 소듐 시트레이트, 히스티딘, HEPES, MES 및 소듐 아세테이트의 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0030] 특히, pH 6 내지 8에서 양전하를 띠는 아미노산의 농도는 적어도 $> 0.4M$, 특히, $> 0.5M$ 의 양으로 존재한다. 1M 보다 높은 농도의 특정한 아미노산이 이용되는 경우, 이는 추가적인 장점을 가져오지 않는다. 통상적으로, 아르기닌의 양은 약 0.4M 내지 약 1.0M의 범위, 특히, 약 0.7M 내지 약 0.9M의 범위이다. 알코올, 예를 들면, 에틸렌 글리콜과 같은, 히드록시기 함유 유기 화합물은 특히 0 % (v/v) 내지 30 % (v/v), 특히 약 5% 내지 15%의 양으로 존재한다. 칼슘 이온 농도는 0.0001M 내지 약 0.1M, 특히 약 0.001M 내지 약 0.03M의 범위이어야 한다. 완충액의 이온 강도를 조절하는 화합물의 농도는 25℃에서 약 15 내지 약 200 mS/cm의 전도도를 제공하기 위한 범위이어야 한다. 비이온성 디터전트의 양은 통상적으로 약 0.001% 내지 1%의 범위이다.
- [0031] 본 발명의 방법의 일 구체예에서, 세척 완충액이 다중모드 수지에 적용된다. 이 완충액은 FVIII가 방출되기 전에, 오염물을 세척하고 FVIII를 유지하기 위해 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 방법의 또 다른 구체예에서, 상기 "다중모드(multimodal)" 크로마토그래피 수지는 하기 모이어티(moiety) 중 하나 이상을 포함한다:
- [0033] a. 양전하를 띠는 N-벤질-N-메틸 에탄올아민 리간드,
- [0034] b. 음전하를 띠는 2-(벤조일아미노) 부탄산 리간드,
- [0035] c. 페닐프로필 리간드,
- [0036] d. N-헥실 리간드,
- [0037] e. 4-머캅토-에틸-피리딘 리간드,
- [0038] f. 3-((3-메틸-5-((테트라히드로퓨란-2-일메틸)-아미노)-페닐)-아미노)-벤조산 리간드 또는 이들의 조합.
- [0039] 특히, 본 발명의 방법에서, 상기 "다중모드" 크로마토그래피 수지는 하기의 상업적으로 입수가능한 수지 HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™로부터 선택된다.
- [0040] 본 발명의 방법의 또 다른 구체예에서, 다중모드 크로마토그래피 단계가 FVIII 친화도 크로마토그래피 단계와

조합되고, 상기에서 친화도는 효모에서 발현되는 항체 단편과 같은 단백질 리간드에 의해 제공된다.

- [0041] 본 발명의 방법에 따르면, 정제 순서는 화학적 불활성화 단계, 크기 기반 제거 단계, 크로마토그래피 단계 또는 이들의 조합을 포함하는 병원균 제거/불활성화 단계를 포함하고, 각 단계는 제거 대상 병원균에 대한 상이한 생리학적 특성에 기초한다.
- [0042] 본 발명의 방법의 특정한 구체예에서, 정제 순서는 하기 단계들을 더 포함한다:
- [0043] i. Sartobind Q와 같은 음이온성 막, 특히, DNA 감소를 위한 음이온성 막의 이용;
- [0044] ii. Capto MMC와 같은 양이온 다중모드 수지;
- [0045] iii. SP Sepharose FF와 같은 양이온 교환 수지;
- [0046] iv. Sartobind Q와 같은 이차적인 음이온성 막, 특히, 추가적인 DNA 감소를 위한 음이온성 막의 이용;
- [0047] v. 지질 외막(lipid enveloped) 바이러스를 위한 화학적 불활성화 단계, 특히, EP-A-131 740에 개시된, 트리-*n*-부틸 포스페이트 및 트리톤 X-100을 이용한 용매/디터전트-불활성화;
- [0048] vi. VIISelect와 같은 효모에서 발현된 단백질 리간드에 기반한 친화도 수지 또는 Capto Adhere와 같은 음이온 다중모드 크로마토그래피 수지;
- [0049] vii. Planova 20N과 같은 약 20 nm의 평균 세공 크기를 갖는 병원균 여과 제거 단계;
- [0050] viii. Q Sepharose FF와 같은 음이온 교환 수지;
- [0051] ix. Superdex 200pg와 같은 크기 배제 크로마토그래피.
- [0052] 특히, 본 발명의 방법에서, 이 양이온 교환 단계의 용리 조건은 0.15-0.25 M 범위의 Ca^{2+} 이온 및 25℃에서 25 mS/cm를 넘지 않는 용리 완충액의 총 전도도에 기반한다.
- [0053] 본 발명의 방법이 이용되는 경우, 수득가능한 산물의 순도는 최종 정제 단계 후에 4000 IU/mg을 초과하고, 바람직하게는 9000 IU/mg을 초과하며, 보다 바람직하게는 10000 IU/mg을 초과하며, 및 DNA 오염과 관련하여, 1000 pg/1000 IU FVIII 미만이고, 바람직하게는 100 pg/1000 IU FVIII 미만이며, 보다 바람직하게는 10 pg/1000 IU FVIII 미만이다.
- [0054] 따라서, (알부민 또는 단일클론 항체 기반 면역 친화도 리간드와 같은 인간 또는 동물 유래 첨가제의 첨가 또는 이용을 포함하지 않는)본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 정제된 재조합 FVIII을 포함하는 조성물 (composition of matter)이 본 발명의 대상이다.
- [0055] 부록(Appendix) 1은 획득 단계가 다중모드 수지 상에서 수행되는 것인 본 발명에 따른 방법의 흐름도(flow sheet)를 보여준다. 세포 현탁액이 염의 첨가, 세포의 분리 및 뒤이은 DNA 감소 단계, 바람직하게는 Q 막 상에서의 DNA 감소 단계에 의해 처리된다. Q 막(예를 들면, Sartorius의 Sartobind Q)은 음이온 교환 모이��티로서 4차 암모늄 기를 갖는 강한 염기성 이온 교환기이다. 특정한 범위의 pH 및 전도도 내에서, Q 막은 특이적으로 DNA에 결합하고, 산물(및 숙주 세포 단백질)은 통과액(flow through)에 남는다. 통상적인 이온 교환 컬럼 크로마토그래피와 대조적으로, 하전된 리간드가 높은 효율(throughput) 및 이용 용이성을 촉진하는 막 지지체에 결합된다. 획득 단계는 다중모드 수지를 이용한 본 발명의 방법을 포함한다. 획득 단계는 양이온 교환기, SP Sepharose FF™ (GE HealthCare) 상에서의 분리 및 뒤이은 Q 막 상에서의 추가적인 DNA 감소로 이어진다. 예를 들면, EP-A-131740에 개시된 바와 같이, 용매 디터전트 방법(S/D 방법)에 의한 바이러스 불활성화 처리가 수행되고 예를 들면, VIII Select™ 친화도 수지 상에서의 추가적인 정제 단계가 수행된다. 음이온 교환 컬럼, 예를 들면, Q Sepharose FF™ (GE HealthCare) 상에서 추가적인 농축/연마(polishing) 단계가 수행된다. 그 후, 농축된 생성물이 완충액을 교환하고 잠재적인 응축물 및 단편을 제거하기 위해 겔 여과 컬럼(예를 들면, Superdex 200 p.g.™ (GE HealthCare)) 상에서 처리된다. 결과물인 생성물, GE 용출액이 수집된다. 개별적인 단계가 실시예에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0056] 부록 2 및 3은 부록 1에 기재된 것과 같은 특정한 친화도 단계(VIIISelect™ (GE HealthCare))가 다중모드 크로마토그래피;Capto Adhere™ (GE HealthCare)에 의해 대체된 것인 대안적인 구체예를 보여준다. 놀랍게도, 부록 2에 기재된 정제 순서는 첨부 1에 기재된 정제 순서(특이적 항체 기반 친화도 단계 포함)와 동일한 순도를 갖는다. 이 결과는 첨부 3에 기재된 바와 같이, 동일한 출발 물질로 반복된다. 이는 본 발명에 따라, FVIII을 위한 특이적 용리 조건을 이용하는 1가지 이상의 다중모드 정제 기법(획득 단계; Capto MMC™ (GE HealthCare) 및 첨

부 2 및 3에 기재된 바와 같은 Capto Adhere™ (GE HealthCare)에 의한 추가적인 하류 정제 단계 모두)을 이용할 충분한 가능성을 보여준다.

발명의 효과

[0057] FVIII을 정제하는 방법, 특히, 그들이 재조합 FVIII의 제조에서 이용될 때, 특히 높은 염 함량을 갖는 공급원(source)으로부터 FVIII을 정제하는 방법을 제공하는 것이었다. 보다 자주 이용되는 이온 교환 크로마토그래피에 비해, 보다 높은 염 농도 내에서 단백질을 결합할 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 출발 물질(라인 1) 및 친화도 크로마토그래피 단계 후 VIIISelect 용출액(라인 2)에 대한 순도 프로파일을 보여주는 실버 염색된 SDS-PAGE이다.

도 2는 표 12에 기재된 시료의 SDS PAGE 실버 염색을 보여준다.

도 3은 실시예 9(표 18 및 19)에 따라 정제된, 제제화(formulation)의 전(라인 3- BPP083, 라인 7 - BPP084) 및 후(라인 6 - C810A139, 라인 8 - C811A139) 최종 생성물의 SDS-PAGE 실버 염색 패턴을 보여준다.

도 4는 다중클론 항-인간 FVIII 항체를 이용한 FVIII의 웨스턴 블롯팅을 보여준다.

도 5는 배치 BPP079 및 BPP083의 최종 제제화된 생성물, 실시예 9(표 17 및 18)에 따라 정제된, 배치 BPP079 GF 용출액 및 BPP083 GF 용출액의 최종 생성물(GF-용출액)의 실버-염색 및 웨스턴 블롯팅 후 2-D-PAGE를 나타낸다.

도 6은 실시예 10에 따라 정제된 파일럿 배치 BPP071로부터의 시료의 SDS-PAGE 실버 염색 겔을 보여준다.

도 7은 실시예 10에 따라 정제된 파일럿 배치 BPP071로부터의 시료의 웨스턴 블롯 겔을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 본 발명은 하기의 비-한정적인 실시예에 의해 더 설명된다.

[0060] 모든 실시예에서, M (Molar)의 실제 값은 mol/Kg (즉, 10 그램의 염이 1000 그램의 물에 첨가되는 것이고, 10 그램의 염이 1000 mL의 물에 첨가되는 것이 아니다).

[0061] 실시예 1: FVIII 함유 세포 현탁액의 제조.

[0062] 세포

[0063] 사용된 세포는 무혈청 증식에 적응된, 인간 배아 신장(human embryonic kidney) 세포 293(HEK 293)의 유도체이다. 이 숙주세포, HEK 293F를 강력한 프로모터의 제어 하에 있는 B-도메인 결실 인간 FVIII에 대한 유전자를 갖는 발현 카세트에 안정적으로 형질감염시켰다(EP-A-1 739 179).

[0064] 배양 방법

[0065] 세포를 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 일반적 방법에 따라 일반적인 장치에서, 예를 들면, 회분(batch), 유가(fed-batch), 관류(perfusion), 또는 연속 배양(continuous chemostat culture)으로 운전되는 t-플라스크, 진탕 플라스크 및 생물반응기(일회용 시스템 및 통상적인 교반 탱크)에서의 진탕 또는 교반 배양으로 무혈청 배지에서 배양하였다(Freshney, R I (2000), Culture of animal cells: a manual of basic technique, 4th ed, Wiley-Liss; Spier, R E ed (2000), Encyclopedia of cell technology, Wiley, New York; Enfors, S-O and Haggstrom, L (2000), Bioprocess technology: fundamentals and applications, Hogskolestryckeriet, Royal Institute of Technology, Stockholm; Vinci, V A and Parekh, S R (2003), Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells, Humana Press, USA). 일반적으로, 배지의 관류가 세포 갯수 및 생성물 역가(product titer)를 표준 회분 배양 수준 이상으로 증가시키기 위해 이용되었다. 생성물 수율 및 숙주 세포 단백질의 양은 배양 방식에 따라 상이하다:

[0066] - 생성물 역가는 일반적으로 세포 갯수에 따라 증가할 것이다.

[0067] - 총 단백질 함량 및 DNA 함량은 일반적으로 세포 갯수에 따라 증가할 것이다.

[0068] - 총 단백질 함량 및 DNA 함량은 또한 배양물 수명(culture longevity)에 따라 증가할 수 있다.

- [0069] - 회분 배양은 단백질 및 DNA를 축적시킨다; 어느 것도 외부로부터 첨가되지 않고, 제거되지 않는다.
- [0070] - 관류 공정은 세포 배양물을 대사산물, 단백질, DNA 및 다른 불순물로부터 세정한다; 필터 또는 세포 원심분리기는 통상적으로 세포 유지(cell retention)를 위해 사용되지 않았다.
- [0071] 제조합 생성물이 세포와 결합하지 않기 때문에, 세포 현탁액이 회수물(harvest)이다. 회수물의 특성(전술된 바와 같은 생성물 역가 및 불순물)은 배양 방식에 따라 상이하다.

[0073] 실시예 2: 세포 불포함 FVIII 출발 물질의 제조

[0074] 크로마토그래피 정제를 위한 세포 불포함 FVIII 출발 물질을 하기와 같이 준비하였다. 염화나트륨 및 염화칼슘의 스톡 용액을 실시예 1에 따라 제조된 세포 현탁액에 첨가하여 각각 0.3M 및 30mM의 최종 농도 및 25℃에서 30-40 mS/cm의 전도도를 달성하였다. 용액을 약 30분 동안 혼합하고, 세포를 원심분리에 의해 제거하고 (이후의 컬럼 단계의 막힘(clogging)을 방지하기 위해) 그 후 여과 단계에 의해 나머지 세포 파쇄물(cell debris)을 제거하였다.

[0076] 실시예 3: 다중모드 양이온 수지 Capto MMC의 용리 조건

[0077] 다중모드 양이온 수지 Capto MMC 상에서 상이한 용리 조건을 비교하기 위해 하기의 일련의 실험을 수행하였다.

[0078] 실시예 3a, Capto MMC 수지로부터 FVIII를 용리시키기 위한 상이한 염 농도 및 pH의 평가(기준예)

[0079] *컬럼 및 수지

[0080] Capto MMC 수지를 C10/20 컬럼 (1 컬럼 용량(column volume, CV) = 8mL)의 10 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 획득하였다.

[0081] 출발 물질

[0082] 사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII를 함유한 단백질 용액이었다.

[0083] 평형화 완충액(Equilibration buffer)

[0084] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 25℃에서의 전도도 31 ± 3 mS/cm.

[0085] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 5 mL/분의 유속으로 출발 물질을 적체시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액(column flow through)에서 FVIII를 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 표 1에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 FVIII:C 방법으로 분석하고 적용된 FVIII의 양 대비 %로 계산하였다.

표 1

용리 조건	용리된 부피(CV)	용출액(eluate) 중 발견된 FVIII:C
0.1M NaCl, pH 6.5*	10	0
0.3 NaCl, pH 7.0*	90	0
0.1M NaCl, pH 6.5**	20	0
2M NaCl, pH 6.5** (OgH07-626)	15	0

[0087] * 용리 완충액은 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂ 및 0.02% w/w 폴리소르베이트 80을 포함함.

[0088] ** 용리 완충액은 0.05 M L-히스티딘, 0.05 M CaCl₂ 및 0.02% w/w 폴리소르베이트 80을 포함함.

[0089] 결론 기준예(Conclusion Reference Example) 3a

[0090] 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, FVIII의 Capto MMC 컬럼으로의 결합은 이온성 상호작용이 아니다.

- [0091] 기준에 3b, Capto MMC를 위한 용리 조건, 50% 에틸렌 글리콜 함량을 갖는 상이한 NaCl 농도 평가.
- [0092] 컬럼 및 수지
- [0093] Capto MMC 수지를 C10/20 컬럼 (1 컬럼 용량(CV) = 4mL)의 2 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 수득하였다.
- [0094] 출발 물질
- [0095] 사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다.
- [0096] 평형화 완충액
- [0097] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 전도도 31 ± 3 mS/cm at 25°C.
- [0098] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 1 mL/분의 유속으로 출발 물질을 적재시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액에서 FVIII를 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 표 2에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 FVIII:C 방법으로 분석하고 적용된 FVIII의 양 대비 %로 계산하였다.

표 2

[0099]	용리 조건*	용리된 부피(CV)	용출액 중 발견된 FVIII:C, (%)
	0.5M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜 pH 6.5	3	23
	1M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜 pH 6.5	6	52
	1.5M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜 pH 7.5	4	73
	1.5M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜 pH 6.5	2	82
	2.5M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜 pH 6.5	3	84

- [0100] *모든 용리 완충액은 0.02 M L-히스티딘, 0.02 M CaCl₂, 및 0.02% w/w 폴리소르베이트 80을 포함함.
- [0101] 결론 기준에 3b
- [0102] 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, FVIII의 Capto MMC 컬럼으로의 결합은 에틸렌 글리콜과 NaCl의 조합에 의해 억제되지 않을 수 있다. 50% 에틸렌 글리콜이 통상적인 단백질 기반 친화도 수지를 위한 용리 완충액으로 이용된다. FVIII의 용리는 에틸렌 글리콜이 1.5 M까지의 증가된 염화나트륨 농도와 조합된 경우 개선되었다. 테스트된 두 개의 상이한 pH(pH 6.5 및 7.5)는 FVIII 회수율을 변화시키지 않으며, 이는 pH가 단백질에 대한 안정성 한계 내에서(약 6 내지 8), FVIII를 위한 용리 파라미터로 이용될 수 없다는 것을 나타낸다. 2.5M까지의 NaCl 농도의 증가는 용리액에서 FVIII:C의 회수율을 개선시키지 않았다.
- [0103] 실시예 3c Capto MMC를 위한 용리 성분으로서 아르기닌의 변화
- [0104] 컬럼 및 수지
- [0105] Capto MMC 수지를 Tricorn 5/100 컬럼 (1 컬럼 용량(CV) = 1.6mL)의 8 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 수득하였다.
- [0106] 출발 물질
- [0107] 사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다.
- [0108] 평형화 완충액
- [0109] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 25°C에서의 전도도 31 ± 3 mS/cm.
- [0110] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 0.6 mL/분의 유속으로 출발 물질을 적재시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액에서 FVIII를 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 표 3에 기재된 상이한 순차적 용리 조건(각각 약 10 컬럼 부피(CV))에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양

을 FVIII:C 방법으로 분석하고 적용된 FVIII의 양 대비 %로 계산하였다.

표 3

용리 조건*	용출액에서 발견된 FVIII, (%)
20% 에틸렌 글리콜	0
0.1M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	0
0.2M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	0
0.3M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	0
0.4M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	1
0.5M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	10
0.6M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	37
0.7M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	32
0.8M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	8
0.9M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	1
1.0M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	0

* 모든 용리 완충액은 0.01M L-히스티딘, 0.3M NaCl, 0.01M CaCl₂ 및 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5를 포함함.

(본 발명에 따른) 결론 실시예 3c

표 3에서 알 수 있는 바와 같이, FVIII의 Capto MMC 컬럼으로의 결합은 놀랍게도 에틸렌 글리콜과 아르기닌의 조합에 의해 억제될 수 있다. 20%(w/w) 에틸렌 글리콜과 함께 0.9M 이하의 아르기닌을 함유하는 용출액에서 FVIII의 용리가 관찰된다.

(본 발명에 따른) 실시예 3d, Capto MMC를 위한 용리 성분으로서 아르기닌과 라이신의 비교

컬럼 및 수지

Capto MMC 수지를 Tricorn 50/100 또는 C10/20 컬럼 (1 컬럼 용량(CV) = 1.6-3 mL)의 4-8 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 획득하였다.

출발 물질

사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 획득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다.

평형화 완충액

0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 25°C에서의 전도도 31 ± 3 mS/cm.

컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 1 내지 2분의 접촉 시간을 나타내는 유속으로 출발 물질을 적재시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액에서 FVIII를 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 표 4에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 FVIII:C 방법으로 분석하고 적용된 FVIII의 양 대비 %로 계산하였다.

표 4

용리 조건*	용리된 부피(CV)	용출액 중 발견된 FVIII:C, (%)
0.5M 라이신 + 20% 에틸렌 글리콜	40	3
0.65M 라이신 + 20% 에틸렌 글리콜	40	16
0.75M 라이신 + 20% 에틸렌 글리콜	40	13
0.4M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	20	4
0.75M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	20	89

*모든 용리 완충액은 0.01M L-히스티딘, 0.3M NaCl, 0.01M CaCl₂, 및 0.02% w/w 폴리소르베이트 80을 포함함.

[0125] (본 발명에 따른) 실시예 3d

[0126] 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, FVIII의 Capto MMC 컬럼으로의 결합을 상이한 농도의 라이신 및 아르기닌과 조합된 20% 에틸렌 글리콜로 연구하였다. 아르기닌은 라이신보다 FVIII를 더 잘 용리시키고, 0.75M의 농도는 약 90%의 회수를 가져오는 것으로 보인다. FVIII를 예를 들면, 0.75M의 아르기닌으로 용리시키기 전에, FVIII 분자로부터 불순물을 제거하기 위한 세척 단계로서, 에틸렌 글리콜과 함께 보다 낮은 양의 아르기닌 또는 라이신을 이용하는 것이 가능한 것으로 보인다.

[0127] 실시예 3e, Capto MMC 수지를 위한 상이한 세척 및 용리 조건을 이용한 순도 및 회수율의 평가.

[0128] 컬럼 및 수지

[0129] Capto MMC 수지를 상이한 컬럼 크기(2-9 cm 베드 높이, 용량 1.6 내지 48 mL)의 4-8 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 취득하였다.

[0130] 출발 물질

[0131] 사용된 출발 물질은 (실시예 9, 표 18에서 알 수 있는 바와 같이) 약 100 IU FVIII/mg 단백질의 통상적인 순도로, 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII를 함유한 단백질 용액이었다.

[0132] 평형화 완충액

[0133] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 25°C에서의 전도도 31 ± 3 mS/cm.

[0134] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 (컬럼 크기에 따라, 약 3 내지 300 cm/h)적합한 유속으로 출발 물질을 적재시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액에서 FVIII를 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 표 5에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 FVIII:C 방법으로 분석하고 적용된 FVIII의 양 대비 %로 계산하였다.

표 5

세척 완충액	용리 완충액	FVIII 회수율, (%)	순도** 용출액, (IU/mg)
20% 에틸렌 글리콜 + 0.4M 아르기닌, 40 CV	0.8M 아르기닌 + 20% 에틸렌 글리콜	83	5741
20% 에틸렌 글리콜 + 0.45M 아르기닌, 20 CV	0.8M 아르기닌	69	na

[0136] * 모든 완충액은 0.01M L-히스티딘, 0.3M NaCl, 0.01M CaCl₂ 및 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5를 포함함.

[0137] ** Bradford 방법으로 측정함.

[0138] 결론 실시예 3e

[0139] 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 용리 완충액 중 보다 높은 농도의 아르기닌의 적용 전에 세척 단계에서 20% 에틸렌 글리콜과 0.4M 아르기닌의 조합은 고 수율 및 순도의 생성물을 가져오고, 세척 완충액 중 아르기닌의 농도는 비교적 낮은 FVIII 회수율 때문에 0.4M을 초과해서는 안 된다.

[0140] 결론 실시예 3

[0141] 양이온 다중모드 수지(Capto MMC)는 통상적인 이온-교환 용리 조건 (고 염) 또는 소수성 상호작용 수지(저 염)를 이용하여 용리될 수 없다는 것이 명백해진다. 단독의 또는 에틸렌 글리콜과 조합된 하전된 아미노산의 증가된 양이 놀랍게도 Capto MMC 수지로부터 결합된 FVIII 분자를 방출시킬 수 있었다. 또한, Capto MMC 용출액의 회수율 및 순도를 최적화하기 위해, 수지의 세척 및 용리 동안 NaCl, 아르기닌, 라이신 및 에틸렌 글리콜 농도를 변화시킬 수 있다.

- [0143] 실시예 4: 다중 모드 음이온 수지 Capto Adhere를 위한 용리 조건 (비교)
- [0144] 다중 모드 음이온 수지 Capto Adhere 상에서 상이한 용리 조건을 평가하기 위해 하기의 일련의 실험을 수행하였다.
- [0145] 컬럼 및 수지
- [0146] Capto Adhere 수지를 C10/20 컬럼의 13.5 cm 베드 높이까지 충전시켰다. 충전시켰다. Capto Adhere 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5444)로부터 획득하였다.
- [0147] 출발 물질
- [0148] 사용된 출발 물질은 실시예 6C에 기재된 바와 같이 획득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다.
- [0149] 평형화 완충액
- [0150] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 30 ± 3 mS/cm.
- [0151] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 출발 물질을 적재시켰다. 그 후, 수지를 표 6에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 분석하였다.

표 6

[0152]	시료	용량, ml	FVIII, IU/ml	총 FVIII, IU	총 FVIII, (%)
	출발 물질 (적재)	184	140	25760	100
	A (평형 완충액)	159	0.0	0	0
	B (고염)	212	0.0	0	0
	C (저염)	53	0.0	0	0
	D (저 아미노산 + 저 에틸렌 글리콜)	212	3.5	935	4
	E (아미노산)	32	701	22432	87

- [0153] 용리 조건 A
- [0154] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 30 ± 3 mS/cm.
- [0155] 용리 조건 B (고염)
- [0156] 0.05 M L-히스티딘, 0.05 M CaCl₂, 2.0 M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 140 ± 5 mS/cm.
- [0157] 용리 조건 C (저염)
- [0158] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 13 ± 3 mS/cm.
- [0159] 용리 조건 D (저 아미노산 + 저 에틸렌 글리콜)
- [0160] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.3M 아르기닌 히드로클로라이드, 20% w/w 에틸렌 글리콜, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 28 ± 3 mS/cm.
- [0161] 용리 조건 E (아미노산)
- [0162] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.8M 아르기닌 히드로클로라이드, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 53 ± 2 mS/cm.
- [0163] 결론 실시예 4
- [0164] 음이온 다중모드 수지(Capto Adhere)는 통상적인 이온-교환 용리 조건 (고 염) 또는 소수성 상호작용 수지(저

염)를 이용하여 용리될 수 없다는 것이 명백해진다. 단독의 또는 에틸렌 글리콜과 조합된 하전된 아미노산의 증가된 양이 놀랍게도 Capto MMC 수지로부터 결합된 FVIII 분자를 방출시킬 수 있었다.

[0165] 실시예 5, 정제 단계(획득 단계)로서 양이온 다중 모드 수지(Capto MMC)와 통상적인 양이온 교환 단계(SP Sepharose FF)의 비교.

[0166] 컬럼 및 수지

[0167] Capto MMC 수지를 C10/20 컬럼 (1 컬럼 용량(CV) = 8.5 mL)의 11 cm 베드 높이까지 충전시켰다. Capto MMC 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5317)로부터 획득하였다.

[0168] SP Sepharose FF 수지를 XK26/20 컬럼 (1 컬럼 용량(CV) = 100 mL)의 18 cm 베드 높이까지 충전시켰다. SP Sepharose FF 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-0729)로부터 획득하였다.

[0169] 출발 물질

[0170] 사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 획득된, rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다(두 실험 모두에 대해 동일한 출발 물질을 사용함). SP 세파로오스 FF 수지의 경우, 출발 물질을 FVIII이 결합할 수 있게 하기 위해 수지에 적용하기 전에 12 mS의 전도도까지 희석 완충액으로 희석시켰다.

[0171] 희석 완충액 SP

[0172] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.07M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5

[0173] 평형화 완충액 MMC

[0174] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.3M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 7.0, 25°C에서의 전도도 31 ± 3 mS/cm.

[0175] 평형화 완충액 SP

[0176] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 12 ± 2 mS/cm.

[0177] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 5 mL/분 및 40 mL/분의 유속으로 출발 물질을 적재시켰다. 이 완충액 조건 동안 FVIII가 수지에 결합되었다(컬럼 통과액에서 FVIII을 검출할 수 없었다). 그 후, 수지를 상이한 세척 및 용리 조건에 적용시켰고, 원칙은 Capto MMC 단계에 대해 실시예 3d (세척 0.75M 라이신 + 20% 에틸렌 글리콜) 및 실시예 3b(용리 1.5M NaCl + 50% 에틸렌 글리콜)에 기재되고, SP Sepharose FF 단계에 대해 실시예 6b(세척 0.15M 및 용리 0.36M NaCl)에 기재되었다. 표 7에서, 두 개의 정제 단계의 차이가 연구될 수 있다.

표 7

획득 수지	적재 물질의 25°C에서의 전도도, mS/cm	적재 물질의 부피, mL	총 적용된 FVIII, IU	FVIII/mL 획득 수지	FVIII 회수*, %	순도**, IU/mg	DNA/FVIII, ng/IU
Capto MMC OgH07-648	35	1235	29022	3400	68%	2414	2.3
SP-Seph FF OgH07-647	12	5759	20147	202	59%	596	22.1

[0179] * 희석되지 않은 출발 물질로부터 계산됨.

[0180] ** Bradford법으로 측정함.

[0181] 결론 실시예 5 (비교)

[0182] 표 7의 결과는 FVIII을 위한 획득/정제 단계로서 Capto MMC 단계의 이용이 하기를 포함한 여러 장점을 발휘한다는 것을 보여준다:

- [0183] - 보다 우수한 FVIII 회수율
- [0184] - 숙주 세포 단백질의 보다 높은 순도
- [0185] - DNA의 보다 높은 순도
- [0186] - 단위 mL 수지 당 보다 높은 FVIII 결합능
- [0187] - 보다 낮은 희석에 따른 보다 짧은 공정 시간(MMC 수지가 보다 높은 전도도로 처리될 수 있음)
- [0188] 실시예 6, 양이온 교환 수지 (SP Sepharose FF) 상에서 FVIII를 위한 특정한 용리 성분 (Ca) 및 세척 성분 및 FVIII의 정제 (비교). SP Sepharose FF 수지 상에서의 상이한 용리 조건을 비교하기 위해 하기의 일련의 실험을 수행하였다.
- [0190] 실시예 6a, 양이온 교환 수지 (SP Sepharose FF) 상에서 이용된 특정한 용리 및 세척 성분으로부터의 염화나트륨 및 아르기닌.
- [0191] 컬럼 및 수지
- [0192] SP Sepharose FF 수지를 XK16 컬럼의 15 cm 베드 높이까지 충전시켰다. SP Sepharose FF 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-0729)로부터 획득하였다.
- [0193] 출발 물질
- [0194] 사용된 출발 물질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII를 함유한 단백질 용액이었고, 실시예 9에 기재된 바와 같이, Capto MMC 수지 상에서 더 처리하였다. 표적 단백질의 SP Sepharose FF 수지로의 결합을 가능하게 하기 위해, 전도도를 약 12 mS/cm까지 낮추기 위해 Capto MMC 컬럼으로부터의 용출액을 희석 완충액으로 12 배 희석시켰다.
- [0195] 희석 완충액
- [0196] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.07M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5
- [0197] 평형화 완충액
- [0198] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 12 ± 2 mS/cm.
- [0199] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 출발 물질을 적재시켰다. 그 후, 수지를 표 8에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 분석하였다.

표 8

- | 시료 | 부피, ml | FVIII, IU/ml | 총 FVIII, IU | 총 % | 비활성**, IU/mg |
|-------------|--------|--------------|-------------|-----|--------------|
| 출발물질(적재) | 2830 | 5 | 14150 | 100 | 178 |
| 평형화 완충액, 세척 | 300 | 0.0 | 0 | 0 | na |
| 세척액 A | 600 | 0.0 | 0 | 0 | na |
| 용리 | 90 | 153 | 13770 | 97 | 362 |
- [0200]
- [0201] na- 미분석(Not analyzed)
- [0202] ** Bradford법으로 측정함.
- [0203] 완충액 A
- [0204] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.15 M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 16.5 - 18.0 mS/cm.
- [0205] 용리 완충액

- [0206] 0.01M L-히스티딘, 0.035M CaCl₂, 0.34M NaCl, 0.2M D-소르비톨, 0.045M 아르기닌 히드로클로라이드, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25℃에서의 전도도 36 ± 2 mS/cm.
- [0207] 결론 실시예 6a (비교)
- [0208] 36 mS/cm의 전도도를 갖는 용리 완충액이 이용되었을 때, 결합된 FVIII이 SP Sepharose FF 컬럼으로부터 효과적으로 용리되었다. 이 전도도는 NaCl의 농도 및 부분적으로 CaCl₂ 및 아르기닌 농도의 효과였다. 처리, 동결 및 해동 동안 FVIII 분자를 안정화시키기 위해 완충액 중에 소르비톨 및 아르기닌을 포함시켰다.
- [0209] 실시예 6b, 양이온 교환 수지 (SP Sepharose FF) 상에서 특정한 용리 및 세척 성분으로 사용된 염화나트륨.
- [0210] 컬럼 및 수지
- [0211] SP Sepharose FF 수지를 C10/20 컬럼에 15 cm의 베드 높이까지 충전시켰다. SP Sepharose FF 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-0729)로부터 획득하였다.
- [0212] 출발 물질
- [0213] 사용된 출발 물질은 실시예 2 및 실시예 9에 기재된 바와 같이 수득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다. 표적 단백질의 SP Sepharose FF 수지로의 결합을 가능하게 하기 위해, 전도도를 낮추기 위해 Capto MMC 컬럼으로부터의 용출액을 희석 완충액으로 12배 희석시켰다.
- [0214] 희석 완충액
- [0215] 0.01M-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.01M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5
- [0216] 평형화 완충액
- [0217] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25℃에서 전도도 12 ± 2 mS/cm.
- [0218] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 출발 물질을 적재시켰다. 그 후, 수지를 표 9에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 분석하였다.

표 9

[0219]	시료	부피, ml	FVIII, IU/ml	총 FVIII, IU	총 FVIII, %	비활성**, IU/mg
	출발 물질(적재)	540	12.8	6912	100	799
	세척 평형화 완충액	120	0.0	0	0	na
	세척액 B	490	0.0	0	0	na
	용리	27	221	5967	86	948

- [0220] ** Bradford법으로 측정됨.
- [0221] 세척액 B
- [0222] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.15 M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25℃에서의 전도도 16.5 - 18.0 mS/cm.
- [0223] 용리 완충액
- [0224] 0.01M L-히스티딘, 0.035 M CaCl₂, 0.36 M NaCl, 0.2M D-소르비톨, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25℃에서의 전도도 36 ± 2 mS/cm.
- [0225] 결론 실시예 6b
- [0226] 36 mS/cm의 전도도를 갖는 용리 완충액을 이용하였다. 실시예 5a에서 사용된 용리 완충액 대비, 아르기닌을 제외시켰고, 약간 더 높은 NaCl 농도를 추가하여 전도도를 36 mS/cm로 조정하였다. 용리된 FVIII 퍼센트는 실시예 5a에서보다 약간 더 낮아서, 아르기닌이 용리에서 긍정적인 기능을 갖는다는 것을 나타냈다.

[0228] 실시예 6c, 양이온 교환 수지상에서 사용된 특정한 용리 및 세척 성분으로서의 염화칼슘.

[0229] 컬럼 및 수지

[0230] SP Sepharose FF 수지를 XK26 컬럼의 15.5 cm 베드 높이까지 충전시켰다. SP Sepharose FF 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-0729)로부터 획득하였다.

[0231] 출발 물질

[0232] 사용된 출발 물질은 실시예 2 및 실시예 9에 기재된 바와 같이 획득된 rFVIII을 함유한 단백질 용액이었다. 전도도를 낮추기 위해 Capto MMC 컬럼으로부터의 용리액을 희석 완충액으로 12배 희석시켰고, 이는 표적 단백질의 SP Sepharose FF 수지로의 결합을 가능하게 했다.

[0233] 희석 완충액

[0234] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.05M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5

[0235] 평형화 완충액

[0236] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 12 ± 2 mS/cm.

[0237] 컬럼을 평형화 완충액으로 평형화시키고 뒤이어 출발 물질을 적재시켰다. 그 후, 수지를 표 10에 기재된 상이한 용리 조건에 적용시키고, 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 분석하였다.

표 10

[0238]	시료	부피, ml	FVIII, IU/ml	총 FVIII, IU	총 FVIII, %	비활성**, IU/mg
	출발 물질(적재)	2000	31.7	63400	10	578
	세척 평형화 완충액	830	0.0	0	0	na
	세척액 B	3320	0.0	0	0	na
	세척액 C(소르비톨)	249	0	0	0	na
	용리(염화칼슘)	410	149	61090	96	2811

[0239] ** Bradford법으로 측정함.

[0240] 세척액 B

[0241] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.15M NaCl, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 16.5-18.0 mS/cm.

[0242] 세척액 C (소르비톨)

[0243] 0.01M L-히스티딘, 0.01M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.2M D-소르비톨, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 12 ± 2 mS/cm.

[0244] 용리 완충액 (염화칼슘)

[0245] 0.02M L-히스티딘, 0.2M CaCl₂, 0.1M NaCl, 0.2M D-소르비톨, 0.02% w/w 폴리소르베이트 80, pH 6.5, 25°C에서의 전도도 18.7 (18.0-19.0) mS/cm.

[0246] 결론 실시예 6c (6a, 6b)

[0247] 본 실험(6c)에서, 용리 완충액에서 NaCl 농도를 낮추고 보다 높은 CaCl₂ 농도를 이용하였다. 이 변화는 18.7 mS/cm의 전도도를 가져왔다. SP Sepharose FF로부터 FVIII의 용리능(eluting capacity)은 실시예 5a에서와 동일하게 우수했고 용리 완충액의 전도도는 36 mS/cm였다. FVIII 회수가 거의 절반의 전도도를 갖는 용리 완충액에 의해 동일하거나 또는 더 우수하다는 것은 예상치 못한 발견이었다. 이온 교환 크로마토그래피에서, 일반적으로, 단백질의 용리는 전도도(이온 강도) 및/또는 pH에 강하게 의존적이다. 이 실시예에서, Ca²⁺ 이온이 FVIII

분자에 대해 이온 강도로부터의 효과 이상의 특이적 효과를 발휘하는 것으로 보인다. 이는 또한 순도에 의해서도 확인되며, 순도는 보다 낮은 전도도의 Ca-기반 용리를 이용하는 경우 더 높다(각각 6a 및 6b에서의 362 및 948 대비 2811).

[0249] 실시예 7, 효모 유래 FVIII 친화도 리간드에 의한 정제.

[0250] 하기의 실험은 친화도 수지 VIIISelect 상에서 용리 조건을 평가하기 위해 수행하였다.

[0251] 컬럼 및 수지

[0252] C10/20 컬럼을 VIIISelect 수지로 7 cm의 베드 높이까지 충전시켰다. VIIISelect 수지는 GE Healthcare (Cat. No.17-5450)로부터 수득하였다.

[0253] 출발 물질

[0254] 사용된 출발 물질은 SP Sepharose FF 단계를 위한 실시예 6b에 기재된 원리(세척 0.15M NaCl 및 용리 0.36M NaCl)에 따라 수득된 rFVIII을 함유한 SP Sepharose 용출액이었다.

[0255] 완충액 조성:

[0256] 완충액 A (첨가된 S/D 화합물을 포함하는 평형화 완충액)

[0257] 0.3 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg $\text{CaCl}_2 \cdot (2\text{xH}_2\text{O})$, 0.02 몰/kg L-히스티딘, 1% w/w 트리톤 X-100, 0.3% w/w TNBP, pH:6.5 \pm 0.1, +25°C에서의 전도도: 31 \pm 3 mS/cm.

[0258] 완충액 B (S/D 화합물 불포함 평형화 완충액)

[0259] 0.3 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl_2 , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, pH:6.5 \pm 0.1, +25°C에서의 전도도: 31 \pm 3 mS/cm.

[0260] 세척액 C (고염 농도 세척 완충액)

[0261] 1.0 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl_2 , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, pH:6.5 \pm 0.1, +25°C에서의 전도도: 85 \pm 3 mS/cm.

[0262] 완충액 D (용리 완충액)

[0263] 1.5 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl_2 , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, 50% (w/w) 에틸렌 글리콜 (EG), pH:6.5 \pm 0.1, +25°C에서의 전도도: 39 \pm 3 mS/cm.

[0264] 평형화 완충액, 세척 완충액 및 용리 완충액은 기재된 pH, 농도, 및 완충액, 염 또는 디터전트의 종류에 한정되지 않는다.

[0265] 컬럼을 평형화 완충액 A로 평형화시킨 후 뒤이어 출발 물질을 적재하였다. 그 후, 수지에 표 11에 기재된 상이한 세척 및 용리 조건을 적용하고 결과적으로 컬럼으로부터 방출된 FVIII의 양을 분석하였다.

[0266] VIIISelect 실험으로부터의 결과

표 11

시료	부피 (ml)	FVIII (IU/ml)	총 (IU)	총 (%)	비활성 (IU/mg 단백질)	DNA 함량 (pg/1000 IU)
출발 물질(적재)	45	483	21735	100	1959*	1681
세척액 B	127.5	0.1	13	0	-	-
세척액 C	55	0	0	0	-	-
용리	27.5	642	17655	81	8758*	1399

[0268] * Bradford법으로 측정함.

[0269] 도 1은 출발 물질(라인 1) 및 친화도 크로마토그래피 단계 후 VIIISelect 용출액(라인 2)에 대한 순도 프로파일을 보여주는 실버 염색된 SDS-PAGE이다.

[0270] 결론 실시예 7

[0271] VIIISelect 단계는 순수한 용출액을 생성하는 강력한 정제 단계이다.

[0272] 실시예 8, VIIISelect 친화도 수지 또는 다중 모드 수지(Capto Adhere)에 의한 정제 순서의 비교(부록 3).

[0273] 실시예 7 (VIIISelect) 및 실시예 10 (Capto Adhere)에 따라 소규모로 두 개의 상이한 정제 체계(scheme)를 수행하였다.

[0274] 표 12, FVIIISelect 또는 Capto Adhere 정제 단계의 이용에 의한 FVIII 회수율 및 순도의 비교.

표 12

VIIISelect 체계(scheme)	비활성 (IU/mg 총 단백질)	FVIII, IU 회수율 (%)	DNA 함량 (pg/1000 IU)	Capto Adhere 체계	비활성 (IU/mg 총 단백질)	FVIII, IU 회수율 (%)	DNA 함량 (pg/1000 IU)
출발 물질(Sp-여과액)	1588*	100	1442	출발 물질 (Sp-여과액)	1588*	100	1442
VIIISelect 용출액	8759*	81	1399	Adhere 용출액	5112*	86	504
Q-용출액 VIIISelect	na	106	840	Q-용출액 (Adhere)	na	105	82
GF-용출액 VIIISelect	10322**	88	214	GF-용출액 (Adhere)	10679**	103	181

[0276] n.a. = 미분석(Not analyzed)

[0277] * Bradford법으로 측정함.

[0278] ** 아미노산 분석으로 측정함.

[0279] 도 2는 표 12에 기재된 시료의 SDS PAGE 실버 염색을 보여준다; VIIISelect 정제 체계와 Capto Adhere 정제 체계의 비교.

[0280] 라인 1은 483 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, VIIISelect 컬럼 전 출발 물질(SP-여과액)의 순도를 보여준다.

[0281] 라인 2는 500 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, VIIISelect 용출액의 순도를 보여준다.

[0282] 라인 3은 500 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, 정제 순서 SP-VIIISelect-Q Seph 후 순도를 보여준다.

[0283] 라인 4는 385 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, 정제 순서 SP-VIIISelect-Q Seph-겔 여과 후 순도를 보여준다.

[0284] 라인 5는 493 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된 Capto Adhere 컬럼 전 출발 물질(SP-여과액)의 순도를 보여준다.

[0285] 라인 6은 500 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, Capto adhere 용출액의 순도를 보여준다.

[0286] 라인 7은 500 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, 정제 순서 SP-Capto Adhere-Q Seph후 순도를 보여준다.

[0287] 라인 8은 493 IU/ml의 FVIII 농도로 적재된, 정제 순서 SP-Capto Adhere-Q Seph-겔 여과 후 순도를 보여준다.

[0288] 라인 9는 분자 마커를 나타낸다.

[0290] 결론 실시예 8

[0291] 최종 생성물(GF-용출액)에서 순도가 비교되는 경우, VIIISelect 친화도 단계 또는 Capto Adhere 크로마토그래피 단계를 이용하여 동일한 순도가 달성될 수 있다. VIIISelect 단계 후 순도는 Capto Adhere 단계 후에 비해 더

높으나, 나머지 정제 단계(Q 및 GF) 후, 사용된 분석 방법으로 순도의 차이를 검출할 수 없다. Capto Adhere 단계를 이용한 회수율은 VIIISelect를 이용한 순서에 비해 약간 더 높다.

[0293] 실시예 9: VIIISelect 친화도 수지를 포함한, 산업적 규모 정제 순서

[0294] 회수 및 순도의 재현성을 연구하기 위해, 하기에 기재된 정제 단계 1 내지 9를 파일럿 규모로 3 내지 4개의 배치(batch)에 대해 수행하였다. 각 배치는 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 40 내지 100 L 세포 현탁액으로부터 유래되었다.

[0295] 단계 1 DNA 감소 단계 No. 1 (음이온 크로마토그래피)

[0296] DNA의 일차적 감소는 Q-막 (Sartobind Q, Sartorius)을 통한 여과에 의해 수행한다. 여과 전에 Q-막을 완충액으로 평형화시킨다(표 13).

표 13

[0297] Q-막을 위해 사용된 완충액

Q-막/DNA-감소	평형화 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 7
------------	---------	---

[0298] (실시예 2로부터의) 세포 여과액을 Q-막을 통해 처리하고 단백질 함유 통과액(flow-through)을 수집한다. 막 중에 남아있는 FVIII를 회수하기 위해 막을 평형화 완충액으로 세척한다.

[0299] 단계 2 획득 단계 (다중 모드 크로마토그래피, Capto MMC)

[0300] 일차 생성물 정제 및 농축(획득)을 다중-모드 양이온 교환 크로마토그래피(Capto MMC) 겔 ml 당 500 내지 10,000 IU에서 수행한다. 생성물 적용 전에 겔을 Capto MMC 평형화 완충액으로 평형화시킨다. 표 14에 기재된 바와 같이, 단계 1로부터의 여과액을 Capto MMC 컬럼에 적재하고 그 후 Capto MMC 평형화 완충액으로 세정하고 그 후 세척 완충액 1 내지 3으로 순차적으로 세척하고 뒤이어 FVIII를 용리시킨다.

표 14

[0301]

다중 모드 크로마토그래피/Capto MMC	평형화 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 7
	세척 완충액 1	1 몰/kg NaCl, 0.05 몰/kg CaCl ₂ , 0.05 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	세척 완충액 2	0.1 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	세척 완충액 3	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.4 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 10% (w/w) 에틸렌 글리콜, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	용리 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl ₂ , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.8 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 10% (w/w) 에틸렌 글리콜, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5

[0302] 단계 3 양이온 교환 크로마토그래피, SP Sepharose FF

[0303] 단계 2로부터의 FVIII-함유 용액(Capto MMC 용출액)을 SP-Sepharose FF 겔(GE Healthcare Cat. No.17-0729)을 이용하여 더 정제한다. 생성물 적용 전에, 컬럼을 SP-Sepharose 평형화 완충액으로 평형화시키고 FVIII가 겔에 결합될 수 있도록 하기 위해, 단백질 용액을 평형화 완충액의 이온 강도 및 pH를 충족시키도록 희석한다. 표 15에 기재된 바와 같이, 희석된 단백질 용액을 SP Sepharose 컬럼에 적용하고, 그 후, 컬럼을 평형화 완충액으로

세정하고 그 후 세척 완충액으로 세척하고 뒤이어 FVIII을 용리시킨다.

[0304] 양이온 교환 크로마토그래피를 위해 이용된 완충액

표 15

[0305] 양이온 교환 크로마토그래피(SP Sepharose FF)	평형화 완충액	0.1 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	세척 완충액	0.15 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	용리 완충액	0.34 몰/kg NaCl, 0.035 몰/kg CaCl ₂ , 0.045 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 0.2 몰/kg 소르비톨, 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5

[0306] 단계 4 DNA 감소 단계 No.2 (음이온 크로마토그래피)

[0307] DNA의 이차 감소를 Q-막 (Sartobind Q, Sartorius)을 통한 여과로 수행한다. 여과 전에 Q-막을 완충액으로 평형화시킨다 (표 16).

표 16

[0308] Q-막을 위해 이용된 완충액

Q-막/DNA-감소	평형화 완충액	0.34 몰/kg NaCl, 0.035 몰/kg CaCl ₂ , 0.045 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 0.2 몰/kg 소르비톨, 0.2 몰/kg 소르비톨, 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02% 폴리소르베이트 80 (w/w), pH 6.5
------------	---------	---

[0309] 단계 3으로부터의 SP-용출액을 Q-막을 통해 여과시키고, 추가적인 처리를 위해 생성물-함유 통과액을 수집한다. 막을 평형화 완충액으로 세척하여 막에 남은 FVIII을 회수한다.

[0310] 단계 5 바이러스 불활성화(용매/디터전트(S/D) 처리)

[0311] 단계 4로부터의 여과액을 1% Triton X-100 및 0.3% 트리-(N-부틸)-포스페이트(TNBP)에 의한 S/D(용매/디터전트) 처리를 통해 바이러스 불활성화시킨다. 바이러스 불활성화는 약 1시간 동안 실온에서 교반 하에 수행한다.

[0312] 단계 6 효모 유래 친화도 크로마토그래피 수지에 의한 정제.

[0313] 단계 5로부터의 바이러스 불활성화된 FVIII 용액을 실시예 7의 기재에 따라 VIIISelect 친화도 컬럼을 통해 처리한다. mL 수지당 약 5 내지 20,000 IU의 FVIII을 적재한다.

[0314] 단계 7 나노여과

[0315] Planova 20N 나노필터 (Asahi Kasei Medical)를 이용하여, 외막-불포함(non-enveloped) 바이러스와 같은 잠재적인 우발적 매개체(adventitious agent)의 제거를 위해 단계 6으로부터의 VIIISelect 용리액을 나노여과시킨다. 생성물 함유 통과액을 수집한다.

[0316] 단계 8 음이온 교환 크로마토그래피 단계 (Q-Sepharose FF)

[0317] Q Sepharose FF 수지를 GE Healthcare (Cat. No.17-0510)로부터 획득하였다. 사용된 출발 물질은 단계 7로부터 획득된 나노여과액이고, 반면에 염 및 pH를 표 17의 평형화 완충액과 유사하게 조정하였다. 표 7에 기재된 바와 같이, 희석된 단백질 용액을 5,000 내지 25,000 IU/mL 겔을 적재한 Q Sepharose FF 컬럼에 적용하고, 그 후, 평형화 완충액으로 세정하고, 그 후, 세척 완충액으로 세척하고 FVIII을 용리시킨다.

표 17

[0318]

음이온 교환 단계를 위해 사용된 완충액 (Q-Sepharose FF)

음이온 교환기/Q Sepharose FF	평형화 완충액	0.1 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl ₂ , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w)폴리소르베이트 80, pH 7.5
	세척 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl ₂ , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 7.5
	용리 완충액	0.4 몰/kg NaCl, 0.02 몰/kg CaCl ₂ , 0.02 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w)폴리소르베이트 80, pH 6.0

[0319]

단계 9 겔 여과 크로마토그래피 단계

[0320]

겔여과 수지(Superdex 200pg, GE Healthcare Cat. No.17-1043)를 60 내지 75 cm의 베드 높이까지 충전시켰다. 사용된 출발 물질은 단계 8로부터 수득된 Q-용출액이다. 컬럼을 생성물을 표면 흡착으로부터 보호하고, 동결, 보관, 동결 건조 등 동안 안정화시키는 생리학적으로 허용가능한 조성물로 평형화시킨다. Q-용출액을 총 컬럼 부피의 2 내지 8%의 부피로 겔여과 컬럼에 적용시킨다. 단편 및 응집물을 포함하지 않는, 체제화된 FVIII 함유 용리액을 컬럼으로부터 수집한다(GF-용출액).

[0321]

표 18, 4개의 파일럿 규모 정제 배치(약 50L (BPP077- 078) 및 100L (BPP080-081) 세포 현탁액 물질(실시에 1에 기재됨)로부터 유래됨)의, 단계 1 내지 4에 기재된 정제 단계에 대한 결과의 요약.

표 18

	BPP077	BPP078	BPP080	BPP081
(실시에 2에 기재된) 출발 물질				
중량 (kg)	81	72	162	160
총 FVIII (IU)	2327570	1699200	4032180	3870400
FVIII 수율 (%)	100	100	100	100
비활성 *(IU/mg)	83	67	107	107
DNA 함량 (pg/1000 IU)	1.4*10 ⁸	5.93*10 ⁹	5.3*10 ⁹	-
MMC-용출액 (단계 2)				
중량 (kg)	3.5	4.4	10.9	9.6
총 FVIII (IU)	412654	1023103	3844487	3428212
FVIII 수율 (%)	24	70	104	96
비활성 *(IU/mg)	846	512	578	646
DNA 함량 (pg/1000 IU)	1.8*10 ⁵	1.1*10 ⁶	4.6*10 ⁶	-
SP-여과액 (단계 4)				
중량 (kg)	3.1	3.3	5.0	4.6
총 FVIII (IU)	1524582	1025994	3430796	3000515
FVIII 수율 (%)	112	116	119	108
비활성 *(IU/mg)	1588	793	1362	1277
DNA 함량 (pg/1000 IU)	<206	4463	1313	-

[0322]

[0323] * Bradford법으로 측정함.

[0324] 획득 수집물(capture harvest) 배치 BPP077 및 BPP078을 하류 정제 배치 BPP079로 모으고, 배치 BPP080는 BPP083으로 표시하고 BPP081은 BPP084로 표시하였다.

[0325] 표 19, 3개의 파일럿 규모 정제 배치의 하류 부분에서, 단계 5 내지 9에 기재된 크로마토그래피 단계에 대한 결과의 요약.

표 19

	BPP079	BPP083	BPP084
출발 물질 (단계 4)			
중량 (kg)	5476	4928	4220
총 FVIII, (IU)	1642680	2389094	2022646
FVIII 수율, (%)	100	100	100
비활성 *** (IU/mg)	1107	1254	1210
DNA 함량 (pg/1000 IU)	3733	-	-
VIIISelect-용출액 (단계 6)			
중량 (g)	666	785	810
총 FVIII (IU)	1251414	2094380	1674270
FVIII 수율 (%)	76	88	83
비활성 *** (IU/mg)	8064	-	-
DNA 함량 (pg/1000 IU)	1554	-	-
나노여과액 (단계 7)			
중량 (g)	7680	8205	9555
총 FVIII, (IU)	1051392	1822331	1763853
FVIII 수율 (%)	94	88	97
비활성 (IU/mg)	-	-	-
DNA 함량 (pg/1000 IU)	<730	-	-
Q-용출액 (단계 8)			
중량 (kg)	281	291	263
총 FVIII (IU)	1002327	1755603	1857832
FVIII 수율* (%)	95	96	105
비활성 **** (IU/mg)	10975	-	10312
DNA 함량 (pg/1000 IU)	47	43	<14
GF-용출액 (단계 9)			
중량 (kg)	562	740	860
총 FVIII (IU)	627754	1124800	926220
FVIII 수율** (%)	79	116	101
비활성 **** (IU/mg)	12275	10000	10663
DNA 함량 (pg/1000 IU)	-	<66	-

[0326]

[0327] * Q 단계에 대해 계산된 수율

[0328] ** GF 단계에 대해 계산된 수율

[0329] *** Bradford법으로 측정함.

[0330] **** 아미노산 분석법으로 측정함.

[0331] 도 3은 실시예 9(표 18 및 19)에 따라 정제된, 제제화(formulation)의 전(라인 3- BPP083, 라인 7 - BPP084)

및 후(라인 6 - C810A139, 라인 8 - C811A139) 최종 생성물의 SDS-PAGE 실버 염색 패턴을 보여준다. 라인 2는 분자 마커를 보여주고, 라인 3은 FVIII 대조군 시료를 보여주며, 라인 4는 상업적으로 입수가 가능한 FVIII 제품(ReFacto® - Lot C66202)을 보여준다.

[0332] 도 4는 다중클론 항-인간 FVIII 항체를 이용한 FVIII의 웨스턴 블롯팅을 보여준다. 라인 1 및 10은 비어있고, 라인 2는 분자 질량 표준(Bio-rad의 Precision Plus Protein Western C)을 보여주며, 라인 3은 상업적으로 입수가 가능한 FVIII 제품 ReFacto® lot C66202을 보여주고, 라인 4 내지 6은 FVIII 대조군 시료를 보여주며, 라인 7 내지 9는 실시예 9(표 17 및 18)에 따라 정제된 배치 BPP079, BPP083 및 BPP084의 최종 제제화된 생성물을 보여준다. 웨스턴 블롯에 적용하기 전에 시료를 5 IU FVIII:C/ml에 해당하는 FVIII 농도까지 희석시켰다.

[0333] 도 5는 배치 BPP079 및 BPP083의 최종 제제화된 생성물, 실시예 9(표 17 및 18)에 따라 정제된, 배치 BPP079 GF 용출액 및 BPP083 GF 용출액의 최종 생성물(GF-용출액)의 실버-염색 및 웨스턴 블롯팅 후 2-D-PAGE를 나타낸다. 상업적으로 입수가 가능한 FVIII 제품(ReFacto®, Lot 70591)을 기준으로 이용하였다. 좌측 라인: BPP079 및 BPP083 GF-용출액과 ReFacto®를 포함하는 겔의 실버 염색 이미지. 우측 라인: BPP083 GF-용출액과 ReFacto®를 포함하는 웨스턴 블롯 이미지.

[0335] 결론 실시예 9

[0336] 진술된 정제 과정은 회수율, 순도 및 생성물 품질 측면에서 재현가능한 방식으로, 산업적 규모로 수행될 수 있다. 또한, 이 과정은 인간의 치료를 위해 이용할 수 있기 위한 순도에 대한 높은 요구를 충족시킨다.

[0338] 실시예 10: 특이적 친화도 리간드를 포함하지 않는 산업적 규모의 정제 순서 (음이온 다중모드 수지; Capto Adhere 대신)

[0339] 회수율 및 순도의 재현성을 연구하기 위해, 실시예 9에 기재된 바와 같은, 정제 단계 2-3(Capto MMC 및 SP Sepharose FF) 및 단계 5(바이러스 불활성화)를 파일럿 규모로 두 개의 배치(BPP068-069)에 대해 수행하였다. 그 후, 상기 두 개의 배치를 하나의 하류 배치(BPP071)로 모으고 단계 6(VIIISelect 겔)을 음이온 교환 다중 모드 크로마토그래피 단계(Capto Adhere)로 교환한 것을 제외하고는, 실시예 9의 단계 6-9에 따라 처리하였다. 전체 정제 순서가 부록(Appendix) 2에서 연구될 수 있다. 각 배치(BPP068-069)는 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같은, 약 50L 세포 현탁액으로부터 유래된다.

[0340] Capto Adhere 단계

[0341] 음이온 교환 다중 모드 컬럼(Capto Adhere, GE Healthcare, Cat. No.17-5444)을 5,000 내지 10,000 IU FVIII/mL 수지 범위로 충전시켰다. 생성물 적용 전에 겔을 평형화 완충액으로 평형화시킨다. 표 20에 기재된 바와 같이, 바이러스 불활성화 용액(실시예 9의 단계 5에 기재된 바와 같음)을 Capto Adhere 컬럼에 적재하고 그 후 평형화 완충액으로 세척하고 세척 완충액 1 내지 3으로 순차적으로 세척하고 FVIII를 용리시킨다.

표 20

다중 모드 크로마토그래피/Capto Adhere	평형화 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w)폴리소르베이트 80, pH 7
	세척 완충액 1	2 몰/kg NaCl, 0.05 몰/kg CaCl ₂ , 0.05 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	세척 완충액 2	0.1 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.02%(w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	세척 완충액 3	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.3 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 20%(w/w) 킬렌 글리콜, 0.02% (w/w) 폴리소르베이트 80, pH 6.5
	용리 완충액	0.3 몰/kg NaCl, 0.01 몰/kg CaCl ₂ , 0.01 몰/kg L-히스티딘, 0.8 몰/kg L-아르기닌 히드로클로라이드, 0.02%(w/w)폴리소르베이트 80, pH 6.5

[0343] 표 21. 두 개의 파일럿 규모 정제 배치의 두 개의 최초 크로마토그래피 단계(실시예 9, 단계 2 및 3에 따름)의 결과 요약.

표 21

	BPP068	BPP069
	(실시예 1 및 2에 기재된) 출발 물질	
중량 (kg)	98.6	110.5
총 FVIII (IU)	734 570	596 700
FVIII 수율 (%)	100	100
비활성 * (IU/mg)	43	52
DNA 함량 (pg/1000 IU)	2.1*10 ⁹	7.1*10 ⁸
	Capto MMC 용출액 (실시예 9의 단계 2)	
중량 (kg)	3.8	4.0
총 FVIII (IU)	500 813	389 814
FVIII 수율 (%)	68	65
비활성 * (IU/mg)	449	596
DNA 함량 (pg/1000 IU)	3.4*10 ⁷	3.5*10 ⁷
	SP 용출액 (실시예 9의 단계 3)	
중량 (kg)	2.2	3.1
총 FVIII (IU)	368 903	315 000
FVIII 수율 ¹⁾ (%)	88	79
비활성 * (IU/mg)	1490	2071
DNA 함량 (pg/1000 IU)	1.6*10 ⁷	4.3*10 ⁶

[0345] 1) 수율은 SP 단계에 대해 계산됨,

[0346] * Bradford법으로 측정함.

[0347] 표 22. 하나의 파일럿 규모 정제 배치의 하류 부분에서 크로마토그래피 단계(단계 5-실시에 9, Capto Adhere, 단계 8 및 9-실시에 9)의 결과 요약.

표 22

	BPP071
<u>출발 물질 (실시에 9의 단계 5)</u>	
중량 (kg)	5.2
총 FVIII (IU)	568 326
FVIII 수율 (%)	100
비활성 (IU/mg)	-
DNA 함량 (pg/1000 IU)	-
<u>Capto Adhere 용출액</u>	
중량 (g)	296
총 FVIII (IU)	543 752
FVIII 수율 ²⁾ (%)	96
비활성 * (IU/mg)	5117
DNA 함량 (pg/1000 IU)	2.5*10 ⁵
<u>Q 용출액 (실시에 9의 단계 8)</u>	
중량 (g)	244
총 FVIII (IU)	266212
FVIII 수율 ³⁾ (%)	52
비활성 (IU/mg)	-
DNA 함량 (pg/1000 IU)	1121
<u>GF 용출액 (실시에 9의 단계 9)</u>	
중량 (g)	12
총 FVIII (IU)	5610
FVIII 수율 ⁴⁾ (%)	84
비활성 * (IU/mg)	8061
DNA 함량 (pg/1000 IU)	836

[0348]

[0349] 2) Capto Adhere 단계에 대해 계산된 수율

[0350] 3) Q Sepharose 단계에 대해 계산된 수율

[0351] 4) 질 여과 단계에 대해 계산된 수율

[0352] * Bradford법으로 측정함.

[0353] 도 6은 실시예 10에 따라 정제된 파일럿 배치 BPP071로부터의 시료의 SDS-PAGE 실버 염색 겔을 보여준다. 라인

1은 상업적으로 입수가능한 FVIII 제품 (ReFacto[®])을 보여준다. 라인 2는 Capto Adhere 단계 전 출발 물질(SP-여과액)을 보여준다. 라인 3은 Capto Adhere 용출액의 순도 프로파일을 보여준다. 라인 4는 정제 순서 SP 여과액 - Capto Adhere - Q Seph 후 순도를 보여준다. 라인 5는 정제 순서 SP 여과액 - Capto Adhere - Q Seph - 겔 여과 후 순도를 보여준다.

[0354] 도 7은 실시예 10에 따라 정제된 파일럿 배치 BPP071로부터의 시료의 웨스턴 블롯 겔을 보여준다. 라인 1은 상업적으로 입수가능한 FVIII 제품 (ReFacto[®])을 보여준다. 라인 2는 Capto Adhere 용출액을 보여준다. 라인 3은 정제 순서 SP 여과액 - Capto Adhere - Q Seph의 결과를 보여준다. 라인 4는 정제 순서 SP 여과액 - Capto Adhere - Q Seph - 겔 여과의 결과를 보여준다.

[0356] 결론 실시예 10

[0357] VIlISelect 친화도 리간드 대신, 다중 모드 크로마토그래피 단계(Capto Adhere)를 포함한, 파일럿 규모의 정제 방법은 최종 GF-용출액에서 동일한 회수율, 순도 및 생성물 품질을 보인다.

[0359] 분석의 설명

[0360] FVIII:C, Coatest에 근거한 스크리닝 방법

[0361] 본 방법은 2-단계 원리에 근거하고, 마이크로 플레이트 기법을 이용하여 수행하였다. 단계 1에서, 활성화된 인자 X(Xa)를 FVIII:C가 보조 인자로 작용하는 내재적 경로(intrinsic pathway)를 통해 생성한다. 단계 2에서, 인자 Xa를 트롬빈에 의한 기질의 가수분해를 방지하기 위해 트롬빈 억제제 1-2581의 존재 하에, 합성 발색성(chromogenic) 기질, S-2222의 이용에 의해 측정한다. 반응을 산으로 중단시키고, pNA(파라-니트로아닐린)의 방출에 비례하는 VIII:C 활성을 시약 블랭크(reagent blank) 대비 405 nm에서 광도계에 의해 측정한다.

[0362] 본 방법은 유럽 약전(European Pharmacopoeia)의 요건을 충족한다. FVIII:C의 단위는 세계보건기구(WHO)에 의해 수립된 현재의 IS(International Concentrate Standard)에서 정의된 바와 같은 국제 단위(international unit, IU)로 표현된다. 측정을 위해 여러 친혈성 혈장(hemophilic plasma) 대신, 1% BSA를 포함하는 완충액을 이용하는 절차가 검증되었다. 참조 문헌을 참조한다(European Pharmacopoeia Supplement 2000, general Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosen S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. J, Haematol, Suppl 40, vol 33, 139-145, 1984; Carlebjork G, Oswaldsson U, Rosen S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. Thrombosis Research 47: 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A and Thorpe R. Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. Biological, 24, 351-362 (1996)).

[0364] Bradford에 따른 총 단백질 측정

[0365] Bradford에 다른 단백질 측정은 Coomassie Brilliant Blue G-250의 산성 용액에 대한 최대 흡광도가 단백질로의 결합이 일어난 경우 465 nm에서 595 nm로 이동된다는 관찰에 근거한다. 소수성 상호작용 및 이온성 상호작용은 염료의 음이온 형태를 안정화시켜서, 가시적인 색상 변화를 유발한다. 이 분석법은 염료-알부민 복합체 용액의 흡광 계수(extinction coefficient)가 10배 농도 범위에서 일정하기 때문에 유용하다. 추가적인 정보를 위해 참조 문헌 Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. 1976.을 참조한다.

[0367] 아미노산 분석(amino acid analysis, AAA)에 따른 총 단백질의 결정

[0368] AAA 전에 모든 단백질을 110°C에서 24시간 동안 6M HCl에 의해 가수분해시킨다. 아미노산을 술폰화 폴리스티렌 수지 상에서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리하고 지속적으로 용출액에서 검출한다. 검출은 프롤린과 히드록시프롤린을 위한 440 nm에서의 측정과 나머지 아미노산을 위한 570 nm에서의 동시 측정을 위한 듀얼 광도

계(dual photometer)를 이용한, 컬럼 통과 후 니히드린 유도체화(post-column ninhydrin derivatization)에 근거한다. 아미노산인 아스파라긴과 글루타민은 모두 AAA 동안 탈아민화되고 각각 아스파르트산과 글루탐산으로서 측정된다. 따라서, 아스파르트산과 글루탐산의 결과는 각각 최초의 시료 중의 아스파르트산/아스파라긴(Asx) 및 글루탐산/글루타민(Glx)의 합을 나타낸다. 트립토판은 이 방법을 이용하여 뚜렷한 반응을 생성하지 않고, 따라서, 정량되지 않는다. AAA는 참조 문헌에서 더 설명된다: Total protein AAA analytical method. Spackman, D. H., Stein, W. H., and Moore, S. (1958) Anal. Biochem. 30:1190-1206.

[0370] 순도 또는 비활성(specific activity)(FVIII:C/총 단백질)

[0371] FVIII:C 분석으로부터 달성된 값을 취하고 이를 총 단백질의 분석으로부터 달성된 값으로 나누는 것에 의해, 시료에 대한 순도(또는 비활성으로도 지칭됨)를 계산한다.

[0373] SDS-PAGE (분자량 분포)

[0374] SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)은 크기에 기반한 단백질의 분리를 포함한다. 이 방법은 환원 조건 하에 수행되는 단백질의 SDS-PAGE를 설명한다. 변성 및 환원 조건 하에 시료를 가열하는 것에 의해, 단백질이 폴리고(unfold) 음이온성 디터전트인 소듐 도데실 술페이트(SDS)로 코팅되어, 폴리펩티드 사슬의 길이에 비례한 높은 순 음전하를 얻는다. 폴리아크릴아미드 겔 매트릭스에 적재되고, 전기장에 배치되면, 음전하를 띤 단백질 분자는 양전하를 띤 전극을 향해 이동하고 분자 체질 효과(molecular sieving effect), 즉, 그들의 분자량에 의해 분리된다. 폴리아크릴아미드 겔은 보다 큰 분자가 보다 작은 분자만큼 빨리 이동하는 것을 제한한다. 전하-대-질량(charge-to-mass) 비가 SDS-변성 폴리펩티드간에 거의 동일하기 때문에, 단백질의 최종 분리는 거의 전적으로 폴리펩티드의 상대적 분자 질량의 차이에 의존적이다. 균일한 밀도의 겔에서, 단백질의 상대적 이동 거리(R_f)는 단백질의 질량의 로그값에 반비례한다. 공지된 질량의 단백질이 미지의 단백질과 동시에 전개되는 경우, R_f 와 질량 간의 관계가 플롯팅될 수 있고, 미지의 단백질의 질량이 추정될 수 있다. 전기영동에 의해 분리된 단백질 밴드는 실버 염색에 의해 가시화된다. 표준, 기준(대조군 시료), 및 분석된 시료의 출현을 판단하는 것에 의해 육안으로 평가가 수행된다.

[0376] DNA 분석 방법 (정량적 중합효소 연쇄 반응, qPCR)

[0377] 분석은 SYBR Green 1 화학에 기반한 실시간 정량적 PCR (qPCR)이다. 이 분석은 일부 개선이 첨가된 Umetani 등의 발표에 기반한다 (Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ and Hoon DSB. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periapillary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. Clin Chem 2006;52: 1062-1069). 각 PCR 사이클 동안, ALU 서열 패밀리로부터의 115bp 단편을 프라이머, ALU115-F 및 ALU115-R에 의해 증폭시킨다. 고도로 풍부한 ALU 서열 패밀리는 호미니대(Hominidae) 과(침팬지, 고릴라, 인간 및 오랑우탄)의 게놈에 한정되나, 분석은 인간 기원의 DNA만을 증폭시킨다. 절차는 세포 불포함 조직 배양 배지 중의 잔류 HEK293F DNA의 고효율(high throughput) 분석 및 그의 하류 정제 공정을 가능하게 한다.

[0379] 웨스턴 블롯, FVIII 분자 질량 분포

[0380] FVIII 제제 중의 단백질 및 펩티드를 환원 조건 하에 소듐 도데실 술페이트(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)에 의해 분자 질량에 따라 분리한다. 그 후, 단백질을 전기영동에 의해 겔 매트릭스로부터 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고, 상기 니트로셀룰로오스 막을 블로킹제(blocking agent)와 인큐베이션시킨다. 전체 FVIII 분자에 대한 다중클론 양(sheep) 항체를 첨가하고 뒤이어 염소/양 항체의 Fc 부분에 대해 특이적인 이차 항체를 첨가한다. 제3 단계로서, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP)에 대한 염소 항체와 HRP의 가용성 복합체를 첨가한다. 그 후, 기질인 4-클로로-1-나프톨과의 인큐베이션 후, 청색 밴드의 출현에 의해 FVIII 폴리펩티드를 검출한다.

[0382] 이차원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (2-D PAGE)

[0383] 인간-cl rhFVIII의 단백질 사슬의 전기영동 밴드 패턴을 연구하기 위해 2-D-PAGE를 수행했다. pH 3 내지 10의 선형적 pH 구배를 이용하여 등전점 포커싱(isoelectric focusing)을 일차원으로 수행하였다. 이차원 SDS-PAGE를 폴리아크릴아미드 구배 (3-8%) 겔을 이용하여 수행하였다. 이차원 전개 후 겔을 실버-염색으로 염색하거나 또는 겔을 대상으로 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(O' Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021).

부록(Appendix) 1

세포 현탁액 (2-3e7 세포 / mL)

↓
염 첨가(Salting)

↓
세포 분리

↓
DNA 감소(Q 막)

↓
획득 단계
(Capto MMC)

↓
Sp Seph FF

↓
DNA 감소(Q 막)

↓
S/D- 처리

↓
VIIISelect 친화도 리간드

↓
Q-Seph FF

↓
GF- 용출액

[0385]

부록 2

세포 현탁액 (2-3e7 세포 / mL)

↓
염 첨가(Salting)

↓
세포 분리

↓
DNA 감소(Q 막)

↓
획득 단계
(Capto MMC)

↓
DNA 감소(Q 막)

↓
SP-Seph FF

↓
S/D- 처리

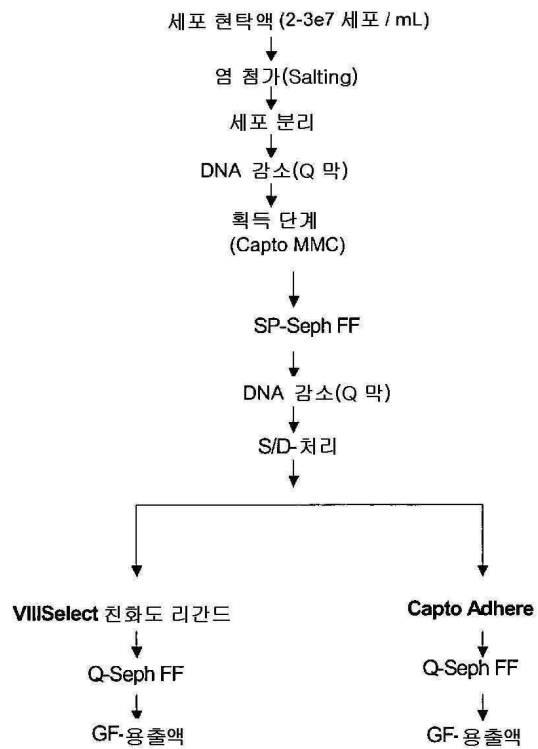
↓
Capto Adhere

↓
Q-Seph FF

↓
GF- 용출액

[0386]

부록 3



[0387]

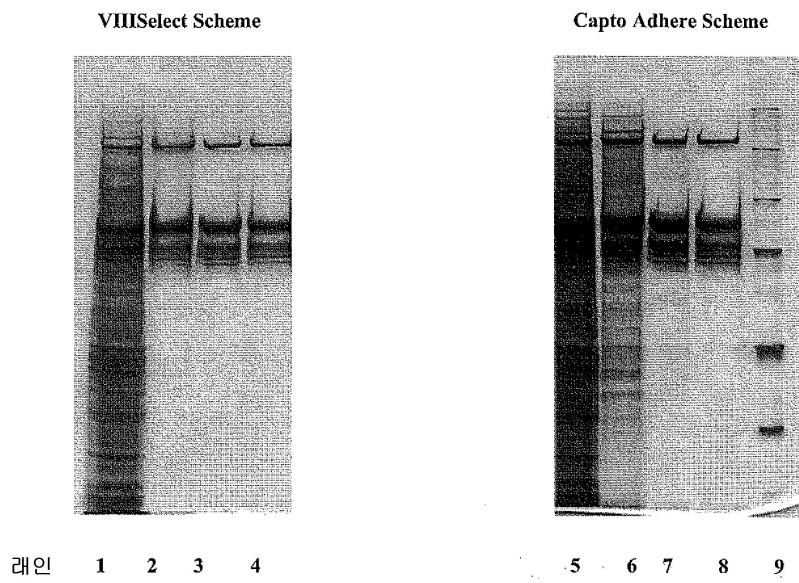
도면

도면1

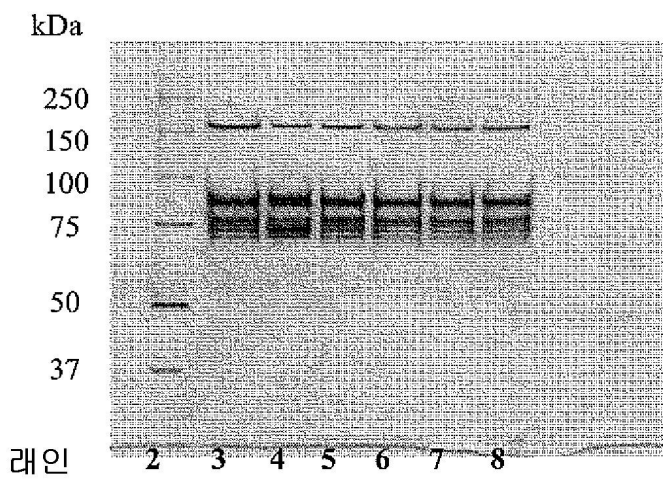


라인 1 2

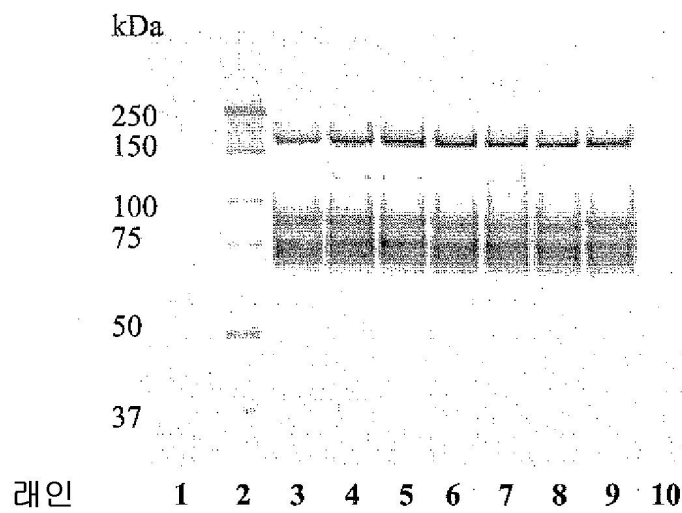
도면2



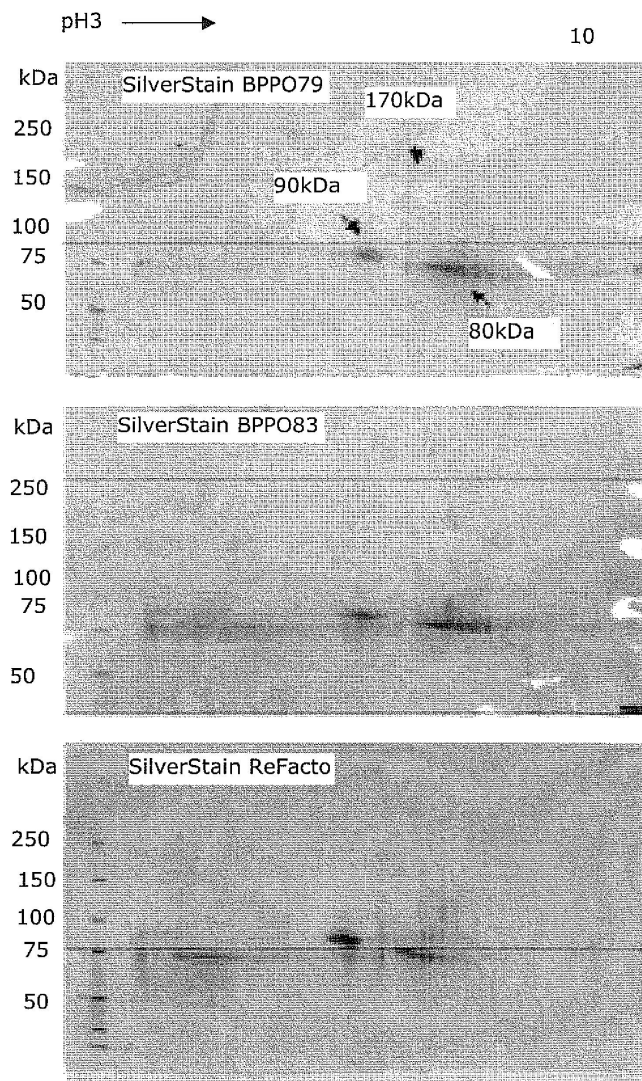
도면3



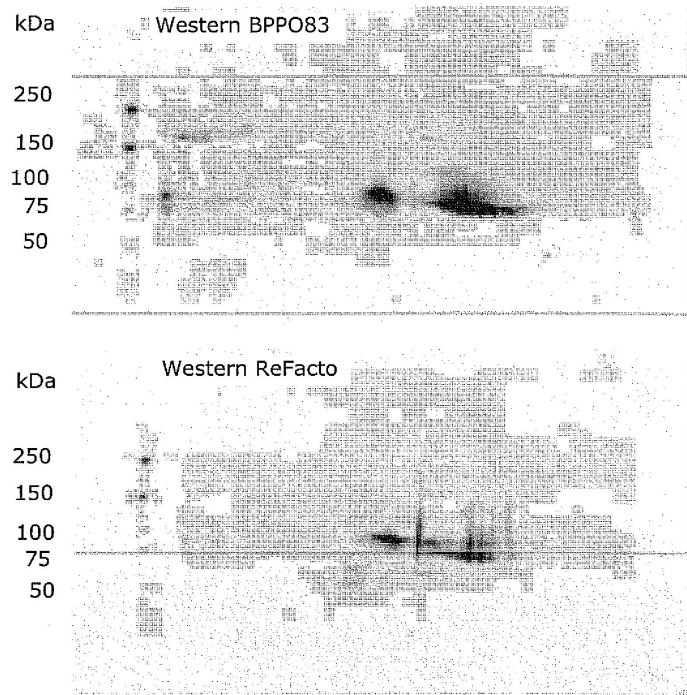
도면4



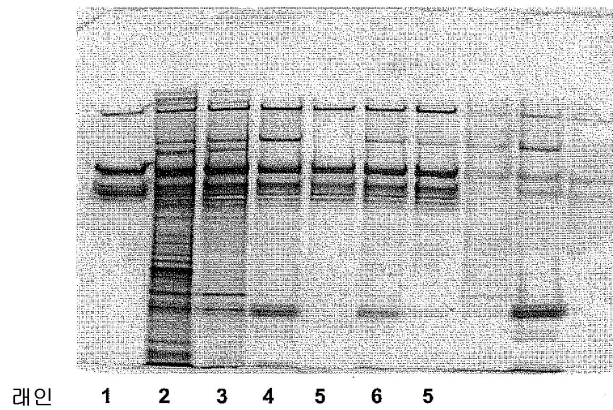
도면5a



도면5b



도면6



도면7

