



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년04월18일  
(11) 등록번호 10-1120130  
(24) 등록일자 2012년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 1/18* (2006.01) *C07K 1/22* (2006.01)

*C07K 1/32* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-7004785

(22) 출원일자(국제) 2003년09월22일

심사청구일자 2008년08월26일

(85) 번역문제출일자 2005년03월19일

(65) 공개번호 10-2005-0046011

(43) 공개일자 2005년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2003/029546

(87) 국제공개번호 WO 2004/026251

국제공개일자 2004년04월01일

(30) 우선권주장

10/646,798 2003년08월25일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US5153265 A

WO199640731 A1

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **피이지화 단백질의 응집률 수준을 감소시키기 위한 공정**

**(57) 요약**

앞서 언급한 바와 같이, 감소된 수준의 바람직하지 않은 응집률 및/또는 이성체 불순물을 포함하는 재조합 PEG화 폴리펩티드 성장 호르몬 작용제, 재조합 PEG화 폴리펩티드 인간 성장 호르몬 작용제, 재조합 PEG화 폴리펩티드 성장 호르몬 대항제 및/또는 재조합 PEG화 폴리펩티드 인간 성장 호르몬 대항제를 제조하는 향상된 방법의 요구와 관련하여, 본 발명은 감소된 수준의 응집률, 데-프 및/또는 트리설파이드 이성체 불순물을 포함하는 재조합 PEG화 폴리펩티드 성장 호르몬(인간성장 호르몬을 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음) 및 재조합 PEG화 폴리펩티드 성장 호르몬 대항제(인간 성장 호르몬 대항제를 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음)의 생산을 위한 향상된 방법을 제공한다.

상기 재조합 성장 호르몬(hGH를 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음)과 관련하여, (1) 칠레이트제(chelating agent) 또는 (2) 금속 염(metal salt)을 각각 충분히 첨가함에 따라 상기 성장 호르몬의 데-프 이성체 불순물의 형성을 감소시킬 수 있다.

상기 재조합 성장 호르몬 대항제(인간 성장 호르몬 대항제를 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음)와 관련하여, (1) 머캅토 화합물(mercapto compound), (2) 칠레이트제, (3) 금속 염, (4) 머캅토 화합물 및 금속염을 함께, 또는 (5) 칠레이트제를 접촉시킨 후, 칠레이트제의 부재(不在)하에 머캅토 화합물을 각각 트리설파이드 이성체 불순물과 충분히 접촉시킴으로써 상기 트리설파이드 이성체 불순물을 감소시킬 수 있다.

상기 재조합 성장 호르몬 대항제(인간 성장 호르몬 대항제를 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음)와 관련하여, (1) 칠레이트제 또는 (2) 금속염을 각각 첨가함에 따라 상기 성장 호르몬 대항제의 데-프 이성체 불순물의 형성을 감소시킬 수 있다.

상기 재조합 PEG화 단백질(PEG화 호르몬, PEG화 성장 호르몬 대항제, PEG화 인간 성장 호르몬 대항제, PEG화 성장 호르몬 및/또는 PEG화 인간 성장 호르몬을 포함, 그러나 이에 한정되지는 않음)과 관련하여, 응집률의 수준은 PEG화 이성체를 분리하는 동안 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)에 의하여 원하는 수준 또는 그 이하로 유지하거나 감소된다.

(72) 발명자

존슨 개리 브이

미국 미조리주 63304 찰스 웨스트포드 코트 스트릿  
4

스테인미어 레이비드 이

미국 미조리주 63014 클락선 벨리 트롯팅 트레일  
1645

토울 마이클

미국 미조리주 63017 체스터필드 웨스트미드 드라  
이브 1807

에이켄트 세르다

미국 미조리주 63017 체스터필드 웨스트 매노 드리  
아브 349

래도르 아누래그 에스

미국 캘리포니아 91361 사우전드 옥스 그린리 257

(30) 우선권주장

10/662,884 2003년09월16일 미국(US)

60/412,227 2002년09월20일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 이성체들을 제공하는 단계;
- (b) PEG화 성장 호르몬 (GH) 대항체 및 상기 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체의 트리설파이드화 이성체 (trisulfide isoform)인 불순물 또는 데-페 이성체(des-phe isoform)인 불순물 및 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체의 응집물을, 10mS/cm 이하의 로딩 전도도, 약 5 내지 약 10의 pH 및 음이온 교환(AEX) 수지의 농축 충전-부피(packed bed volume)의 리터 당 10g 단백질 농도 이하의 조건으로 상기 음이온 교환(AEX) 수지에 로딩하는 단계; 및
- (c) 상기 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 및 이의 이성체들을 음이온 교환 (AEX) 크로마토그래피로 분리하는 단계를 포함하는 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 및 이의 이성체들의 응집물 수준을 감소시키기 위한 공정.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AEX 수지는 ANX4<sup>TM</sup>, DEAE<sup>TM</sup>, Q-Sepharose<sup>TM</sup>, Q-Sepharose FF<sup>TM</sup>, Q Sepharose HP<sup>TM</sup> 및 Q-Sepharose XL<sup>TM</sup>로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b)단계는 약 5mS/cm 이하의 AEX 로딩 전도도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b)단계는 약 2.4mS/cm 이하의 AEX 로딩 전도도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b)단계는 약 6.6 내지 약 9의 AEX 로딩 pH(AEX loading pH)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (b)단계는 약 6.9내지 약 7.1의 AEX 로딩 pH(AEX loading pH)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 및 이들의 이성체들은 하나 또는 그 이상의 사이트들이 PEG화 된 성장 호르몬(GH) 대항체 및 이들의 이성체들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 8

제1항에 있어서, (d) 모세관 전기영동(capillary electrophoresis: CE)을 이용하여 상기 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 이성체들의 이산 양들(discrete amounts)을 풀링하여 모아진(pooled) PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체를 수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 및 이들의 이성체들은,  
 PEG-1 (PEG 또는 이의 변형체를 1 문자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 문자),  
 PEG-2 (PEG 또는 이의 변형체를 2 문자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 문자),  
 PEG-3 (PEG 또는 이의 변형체를 3 문자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 문자),

PEG-4 (PEG 또는 이의 변형체를 4 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자),  
 PEG-5 (PEG 또는 이의 변형체를 5 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자),  
 PEG-6 (PEG 또는 이의 변형체를 6 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자),  
 PEG-7 (PEG 또는 이의 변형체를 7 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자),  
 PEG-8 (PEG 또는 이의 변형체를 8 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자), 및  
 PEG-9 (PEG 또는 이의 변형체를 9 분자 포함한 B-2036 (SEQ ID 번호 1) 1 분자), 및

이들의 응집물, 트리설파이드 불순물(상기 분자 내에 "트리설파이드 브릿지"를 형성하는 여분의 황 원자를 함유하는 성장 호르몬(GH) 대항체 분자) 및 데-페 불순물(아미노-말단 폐닐알라닌(amino-terminal phenylalanine)이 소실된 성장 호르몬(GH) 대항체 분자), 상기 성장 호르몬(GH) 대항체의 PEG화 되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 이성체들인 것을 특징으로 하는 공정.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 풀링하여 모아진 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체는 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 풀링하여 모아진 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체의 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 중량이 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9의 PEG화 성장 호르몬(GH) 대항체 이성체들 및 이들의 응집물의 총 중량에 대하여 적어도 70% 이상의 중량을 가지는 것을 특징으로 하는 공정.

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 응집물의 상기 감소된 수준이 상기 이성체들 및 상기 응집물의 총 중량의 10% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 요구되는 PEG화 폴리펩ти드(pegylated polypeptide)를 만들 수 있는 재조합(recombinant) 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에 의하여 감소된 수준의 응집물 및/또는 특정 이성체 불순물들(isoform impurities)을 포함하는 PEG화 폴리펩티드 산물을 수득할 수 있다. 보다 상세하게 본 발명은 (1) 감소된 응집물 및/또는 이성체 불순물을 포함하는 성장 호르몬을 제조하기 위한 재조합 방법 및 (2) 감소된 응집물 및/또는 이성체 불순물을 포함하는 성장 호르몬 대항체(즉, 페그비소만트(pegvisomant), 및 이의 단백질 중간체(protein intermediate)와 같은 것)를 제조하기 위한 재조합 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 방법에 따라 감소된 상기 이성체 불순물들은 각각 성장 호르몬 및 성장 호르몬 대항제(혹은 이의 중간물)의 트리설파이드(trisulfide) 및 데-페 이성체 (des-phe isoform) 불순물이다. 또한, 상기 응집물은 일반적으로 PEG화 성장 호르몬, PEG화 성장 호르몬 대항체, 또는 PEG화 단백질의 바람직하지 않은 응집물이다.

## 배경 기술

[0002]

본 출원은 2002년 9월 20일에 미국 특허청에 출원된 출원번호 제60/412,227호를 우선권 주장의 기초로 하는 출원이다. 본 출원은 2003년 8월 25일에 출원된 미국 특허출원 가출원 번호 제P-107,891호의 일부 계속 출원(continuation-in-part)이다.

[0003]

페그비소만트(pegvisomant)(소마베르트(Somavert?); 파마시아 社(Pharmacia Corp.))는 인간 성장 호르몬 수용기 대항제(human growth hormone receptor antagonist)이다. 이것은 구조적으로 변경된 인간 성장 호르몬("hGH") 유사체이다. 페그비소만트의 단백질 성분/중간체(component/intermediate) (B-2036)의 아미노산 서열은 9개의 위치에서 hGH의 아미노산 서열과 다르다. 구체적인 아미노산 치환들은 다음과 같다: H18D, H21N, G120K, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S 및 I179T. 널리 알려진 바와 같이, 첫 번째 문자(즉, H18D에서 H)는 숫자로 표시된 위치(즉, H18D에 나타난 바와 같이 18번째 아미노산 위치)에서 두 번째 문자(즉, H18D에서의 D)로 표시되는 아미노산에 의하여 치환된 hGH 서열의 아미노산을 나타낸다. 따라서, H18D는 야생형(wild-type) hGH 아미노산 서열의 18번째 아미노산 위치에서 히스티딘(his) 아미노산이 아스파르트산(asp) 아미노산으로 치환되었음을 나타낸다.

[0004]

도 1A는 페그비소만트(PEG B-2036 또는 B-2036 PEG)의 단백질 성분/중간체(B-2036)의 아미노산 서열 구조를 개략적으로 보여주며, 별표는 폴리에틸렌 글리콜 폴리머(polyethylene glycol polymer) ("PEG" 단위)가 부착할 수 있는 잠재적인 위치를 나타낸다. 또한, 페그비소만트의 단백질 성분/중간체(B-2036- PEG 단위가 부착되지 않음)의 아미노산 서열 목록(listing)은 서열 번호 1(SEQ. ID. NO. 1)에 나타나 있다. 또한, 비교를 위하여 인간 성장 호르몬의 아미노산 서열 목록은 서열번호 2(SEQ. ID. NO. 2)에 나타나 있다. 상기 서열 목록들은 본 출원서에 첨부되어 있다. hGH의 서열을 알기 위해서는 Jorgensen et al.의 "Quantifying biosynthetic human growth hormone in *Escherichia coli* with electrophoresis under hydrophobic conditions," J. Chromatography A 817:205-214 (1998)를 참조할 수도 있다.

[0005]

구조적으로, 페그비소만트는 주로 4 내지 6개의 PEG 단위들이 공유결합된 단백질(191개의 아미노산 잔기들을 포함)이다. 상기 페그비소만트의 단백질 성분/중간체(B-2036)의 분자량은 21998 달톤(Daltons)이다. 페그비소만트의 각 PEG 단위의 분자량은 대략 5000 달톤이다. 따라서, 페그비소만트의 주된 분자량은 대략 42000(4 PEG 단위/molecule), 47000(5 PEG 단위/molecule), 및 52000(6 PEG 단위/molecule)달톤이다.

[0006]

이론에 얹매이지 않고 작용제(agonist)를 고려하면, 내재(内在; endogenous) hGH는 하나의 hGH 분자에 두 개의 상기 hGH의 분자에 인접한(혹은 동일한) 수용기 분자들이 결합되는 경우 호르몬-매개 수용체 호모다imer라이제이션(hormone-mediated receptor homodimerization)을 유발하며 hGH의 수용기들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이와 관련하여, 미합중국 특허 제5,849,535호 및 제6,057,292호를 참조할 수 있다. 상기 hGH의 활성도는 동일한 hGH 분자에서 두 개의 분리된 결합 위치(binding sites)들(위치 1 및 위치 2)에 두 개의 인접한(그리고 동일한) 수용기 분자들을 결합시키는 능력에 달려 있다. 위치 1 및 위치 2로 표시되는 이러한 hGH 결합 위치들은 1 및 2의 숫자로 표시되며, 이는 hGH-의존성 호모다imer라이제이션을 매개하는 두 개의 인접한(그리고 동일한) hGH 수용체들에 결합하는 순서를 나타낸다.

[0007]

또한, 이론에 얹매이지 않고, 페그비소만트는 세포 표면에서 선택적으로 인간 성장 호르몬 수용체("GH 수용체")에 결합하며, 이는 내재 인간 성장 호르몬의 결합을 차단함으로써 인간 성장 호르몬 단일 형질 도입(human growth hormone signal transduction)을 방해하는 것으로 알려져 있다. 페그비소만트(hGH와 관련하여)의 단백질 부분("성분(component)" 또는 "중간체(intermediate)"라고도 할 수 있다.)에 대한 구조적 변형은 페그비소만트가 hGH 분자와 hGH 수용체 사이의 상호 작용을 경쟁적으로 차단할 수 있도록 한다. 페그비소만트는 GH 수용체에 결합하여 상기 수용체를 점유함으로써 GH 결합을 차단하게 된다. 상기 구조적 변형은 단일 형질 도입이 발생하지 않은 결과로써 수용체 이합체화(dimerization)를 막게 된다. 상기 페그비소만트 요구되는 hGH 분자 및 hGH 수용체 사이의 가까운 상호작용을 차단함으로써, hGH 수용체들의 hGH-매개 호모다imer라이제이션을 막게 되므로 대항제 능력을 갖게 된다.

[0008]

이러한 대항제는 이에 한정되지는 않지만, 수술이나 방사선 요법 및/또는 다른 통상적인 의학적 치료에 적절히 반응하지 않거나, 이러한 치료들을 견디지 못하는 말단비대증 환자를 치료하는데 사용된다. 또한, 페그비소만트의 단백질 부분(B-2036)에 대한 구조적 변형은 상기 페그비소만트가 hGH의 결합 친화력보다 낮은 프로락틴 수용체(prolactin receptor)에의 결합 친화력을 나타내도록 하여, 상기 페그비소만트를 사용함에 따른 바람직하지 않은 젖분비-관련 부작용(lactation-related side effect)을 최소화한다.

- [0009] 상기 페그비소만트의 단백질 매개 부분(protein intermediate portion of pegvisomant)(B-2036)은 성장 호르몬 수용체 대항체(B-2036)를 위한 유전자를 운반할 수 있는 플라즈미드(plasmid)를 첨가하여 유전적으로 변형된 대장균(*Escherichia coli*) 박테리아의 균주(strain)에 의하여 합성된다. 이어서, 상기 B-2036은 미생물 세포(microbial cell)로부터 회복되고 정제된다. 이후, 상기 정제된 B-2036을 PEG화시켜(pegylated) 페그비소만트(PEG B-2036)를 형성한다. 미합중국 특허 제5,849,535호 및 제6,057,292호는 상기 B-2036의 제조 방법 및 하나 이상의 PEG 단위를 B-2036에 결합시키는 방법이 개시되어 있지만, 수용할 수 없을 정도로 높은 수준의 트리설파이드(trisulfide) 및 데-프 이성체 불순물들(des-phe isoform impurities)의 형성을 어떻게 감소시키거나, 줄이거나, 제거하거나, 반전시키거나 및/또는 방지할 지에 대해서는 상세히 언급하고 있지 않다.
- [0010] B-2036을 제조하기 위하여 사용되는 통상적인 재조합 제조 방법에서 발생되는 문제들 중 하나는 상기 B-2036의 데-프(des-phe) 및 트리설파이드 이성체들(trisulfide isoform) 등과 같은 이성체 불순물들의 형성이다. B-2036으로부터 B-2036 PEG(즉, 페그비소만트와 같은 PEG화 B-2036)를 제조하기 위하여 사용되는 통상적인 제조 및 정제 방법에서 발생되는 다른 문제는 바람직하지 않은 B-2036 PEG의 "응집물"의 형성이다.
- [0011] 상기 데-프 이성체(des-phe isoform) 불순물은 아미노 말단의 페닐alanine(phenylalanine)기가 결여된 B-2036 분자를 의미한다. 이와 관련하여 B-2036의 -NH<sub>2</sub> 종단에 인접한 아미노 말단의 페닐alanine 잔기(phenylalanine residue)(즉, "F" 문자로 표시되는 부분)를 나타낸 도 1A를 참조할 수 있다. 상기 트리설파이드 이성체 불순물은 분자 내에 "트리설파이드 브리지(trisulfide bridge)"를 형성하는 추가의 황 원자(sulfur atom)를 더 포함하는 B-2036 분자를 의미한다. 이와 관련하여, 도 1B의 박스 부분을 참조할 수 있다. 또한, Andersson et al.의 "Isolation and characterization of a trisulfide variant of recombinant human growth hormone formed during expression in *Escherichia coli*," Int. J. Peptide Protein Res. 47:311-321(1996) 및 A. Jesperson et al.의 "characterisation of a trisulphide derivative of biosynthetic human growth hormone produced in *Escherichia coli*," Eur. J. Biochem. 219:365-373(1994)을 참조할 수도 있다. 이론에 얹매이지 않고, 이러한 이성체 불순물들은 통상적으로 유전적으로 변형된 숙주 세포들(host cells)에서 B-2036이 세포 성장(즉, 발효(fermentation)) 및 발현(expression)(즉, 합성 및 분비(secretion))하는 동안 및/또는 상기 B-2036 단백질을 추출(extraction) 및 정제(purification)하는 동안 발생한다고 알려져 있다.
- [0012] "응집물(aggregate)"에 대한 문제와 관련하여, 이러한 "응집물"의 형성은 요구되는 단백질 수율의 감소 및 생산비용의 증가를 야기한다. 또한, 만약 "응집물"의 수준이 지나치게 높으면, 최종 단백질이 낮은 순도를 갖게 되어 치료적 사용으로 적합하지 않게 된다.
- [0013] 이러한 불순물들과 관련하여, 국제출원(International Application) 제WO 94/24157호(1994년 10월 27일 공개)에는 자연(native) hGH와 비교하여 추가의 황 원자를 포함하는 소수성의 hGH 유도체가 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 국제출원 제WO 94/24157호 제3쪽 3-10줄을 참조할 수 있다. 상기 hGH의 소수성 유도체에 포함된 추가의 황 원자는 "트리설파이드 브리지(trisulfide bridge)"를 형성하며, hGH 트리설파이드 변이형을 생산한다. 구체적으로, 상기 국제출원 제WO 94/24157호 제7쪽 11-16줄을 참조할 수 있다. 또한, 상기 WO 94/24157 문헌에는 상기 hGH 트리설파이드 변이형을 시스테인(cysteine), 글루타티온(glutathione), 2-머캅토 에탄올(2-mercpto ethanol) 또는 디티오타이톨(dithiothreitol) 등과 같은 머캅토 화합물(mercpto compound)로 처리함으로써 상기 hGH 트리설파이드 변이형을 다시 자연 hGH 형태로 전환시킬 수 있다고 언급되어 있다. 구체적으로, 상기 국제출원 제WO 94/24157호 제4쪽 및 제5쪽을 참조할 수 있다.
- [0014] 국제출원 제WO 96/02570호(1996년 2월 1일 공개)에는 아황산 나트륨(sodium sulfite), 아황산 칼륨(potassium sulfite), 아황산 암모늄(ammonium sulfite), 또는 아황산 마그네슘(magnesium sulfite), 아황산 칼슘(calcium sulfite) 등과 같은 아황산 알칼리 토금속(alkaline-earth metal sulfite) 등을 사용하여 상기 hGH 트리설파이드 변이형을 자연 hGH의 형태로 전화시키는 다른 방법이 개시되어 있다. 구체적으로, 상기 국제출원 제WO 96/02570호 제4쪽의 17 내지 21줄을 참조할 수 있다.
- [0015] 2000년 1월 20일 공개된 국제출원 제WO 00/02900호(발명의 명칭: "Method for the production of recombinant peptides with a low amount of trisulfide")에서는 단백질 및 보다 작은 웨프티드(smaller peptides)와 같은 재조합 웨프티드의 생산에 있어서 트리설파이드 양을 감소시키는 방법에 대해 논의하고 있다. 상기 발명은 재조합 웨프티드의 생산에 있어서 일찍이 제안된 바와 같이 기형성된 성장 호르몬의 트리설파이드를 자연 형태(native form)로 전환시키는 것이 아니라 발효(fermentation) 동안이나 발효 후에 금속염을 바람직하게는 과도한 양으로 첨가함에 따라 트리설파이드의 양을 감소시킬 수 있다"(Emphasis added)는 신규하고 기대치 못한 발견에 근거한 것이다. 이와 관련하여 상기 국제출원 제WO 00/02900호 제2쪽 21-27줄을 참조하라. 또한,

상기 WO 00/02900 문헌은 "상기 단백질은 어떠한 재조합 단백질일 수도 있지만, 바람직하게는 인간 성장 호르몬, 소(bovine) 성장 호르몬 및 돼지(porcine) 성장 호르몬과 같은 인간 및 동물 성장 호르몬일 수 있는 재조합 성장 호르몬이다."라고 언급하고 있다. 이와 관련하여 상기 국제출원 제WO 00/02900호 제3쪽 4-6줄을 참조하라.

[0016] 2002년 7월 25일 공개된 국제출원 제WO 02/057478호(발명의 명칭:"Methods and Composition For Extracting Proteins From Cells")은 환원제(reducing agent) 및 세제(detergent)를 숙주 세포에 접촉시켜 숙주로부터 단백질을 방출시키는 방법에 관한 것이다. 상기 문헌에서 상기 환원제의 목적은 자연 형태(native conformation)의 단백질로의 회복을 촉진시키는 것이라고 설명되어 있다. 이와 관련하여 상기 국제출원 제WO 02/057478호 제2쪽 16-18줄을 참조하라. 또한, WO 02/057478호는 "하나 또는 그 이상의 환원제는 디설파이드 결합들(disulfide bonds)의 감소 및/또는 설프하이드릴 잔기들(sulphydryl residues)을 환원된 형태로 유지하는 물질..."이라고 설명하고 있다. 어떠한 환원제 또는 물질들이라도 사용될 수 있다. 바람직한 실시예에 따르면, 상기 사용되는 하나 또는 그 이상의 환원제는 디티오프레이톨(dithiothreitol; DTT), 디티오에리트리올(dithioerythriol; DTE), 시스테인(cysteine; Cys) 및 트리 2-카르복시에틸포스핀(Tris 2-carboxyethylphosphine; TCEP)으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 이와 관련하여 국제출원 제WO 02/057478호의 제3쪽 제24줄부터 제4쪽 제4줄까지를 참조하라.

[0017] 정제(purification)와 관련하여 다른 참조문헌들은 미합중국 특허 제6,265,542호 (Fahrner et al. entitled "Purification of Molecules); 미합중국특허 제6,333,398호(Blank entitled "Protein Purification"), 미합중국 특허 제5,747,639호(Seely entitled "Use of Hydrophobic Interaction Chromatography to Purify Polyethylene Glycols"); 국제 출원 제PCT/US96/19459(Ibrahim et al. entitled "Activated Linkers and Methods for Making and Purifying the Same"); 및 미합중국 특허출원 제U.S. 2002/002271호(Rinderknecht et al. entitled "Antibody Purification") 등이 있다.

[0018] 그러나, 상기 문헌들은 폐그비소만트 또는 폐그비소만트의 단백질 부분인 B-2036과 같은 성장 호르몬 대항제의 형성 및/또는 PEG화 단백질, 즉 폐그비소만트의 응집물의 형성과 관련하여 이성체 불순물의 형성을 방해, 반전, 감소 또는 제거하는 방법에 관하여는 개시하고 있지 않다. 따라서, B-2036의 이성체 불순물(트리설파이드 및/또는 데-프) 및/또는 PEG화 단백질의 응집물의 형성을 감소, 경감, 방해, 최소화, 반전 및/또는 제거 할 수 있는 향상된 B-2036의 제조 방법이 필요하다. 이와 마찬가지로, 상기 문헌들은 성장 호르몬의 데-프 이성체 불순물(des-phe isoform impurity)의 형성 및/또는 PEG화 성장 호르몬 또는 PEG화 인간 성장 호르몬과 같은 PEG화 단백질의 응집물 형성을 탐지, 경감, 최소화, 반전, 감소 또는 제거하는 방법에 관해서도 개시하고 있지 않다. 따라서, 상기 데-프 이성체 불순물의 형성 및/또는 PEG화 성장 호르몬 또는 PEG화 인간 성장 호르몬과 같은 PEG화 단백질의 응집물 형성을 감소, 경감, 방해, 최소화, 반전 및/또는 제거할 수 있는 개선된 성장 호르몬 제조 방법도 필요하다.

### 발명의 상세한 설명

[0024]	본 출원에서는 하기와 같은 약자들이 사용된다.	
[0025]	AC 친화 크로마토그래피(affinity chromatography)	
[0026]	AEX 음이온 교환(anion exchange)	
[0027]	API 활동성 제약(製藥)성분(active pharmaceutical ingredient)	
[0028]	BI	벌크 중간체(bulk intermediate; B-2036(PEG화되지 않음))
[0029]	B-2036 PEG	PEG화 B-2036
[0030]	PEG B-2036	PEG화 B-2036
[0031]	CE	모세관 전기이동(capillary electrophoresis)
[0032]	CEX	양이온 교환(cation exchange)
[0033]	cm	센티미터(centimeter)
[0034]	CV	컬럼 부피(column volume)

[0035]	DEAE	디에틸아미노에틸(diethylaminoethyl)
[0036]	HEPES	N-(2-하이드록시에틸)피페라진 N-(2-에탄) 솔fonyl(N-(2-hydroxyethyl)piperazine N-(2-ethane) sulfonic acid)
[0037]	HIC	소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)
[0038]	IEX	이온 교환(ion exchange)
[0039]	kDa	킬로달톤(kiloDaltons)
[0040]	L	리터(liters)
[0041]	LPM	분당 리터(liter per minute)
[0042]	mL or ml	밀리리터(milliliter)
[0043]	mM	밀리몰라(milliMolar)
[0044]	mS	밀리지멘즈(milliSiemen)
[0045]	MWCO	분자량 차단(molecular weight cutoff)
[0046]	$\mu\text{m}$	마이크로미터(micrometer)
[0047]	N	노르말농도(Normality)
[0048]	NaCl	염화나트륨(sodium chloride)
[0049]	NaOH	수산화나트륨(sodium hydroxide)
[0050]	NWP	노르말 물 투과성(normalized water permeability)
[0051]	PEG	폴리에틸렌 글리콜 분자 또는 이의 변형체(polyethylene glycol molecule or variant thereof)
[0052]	PEG-1	1몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 1 molecule of PEG or variant thereof)
[0053]	PEG-2	2몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 2 molecule of PEG or variant thereof)
[0054]	PEG-3	3몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 3 molecule of PEG or variant thereof)
[0055]	PEG-4	4몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 4 molecule of PEG or variant thereof)
[0056]	PEG-5	5몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 5 molecule of PEG or variant thereof)
[0057]	PEG-6	6몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 6 molecule of PEG or variant thereof)
[0058]	PEG-7	7몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 7 molecule of PEG or variant thereof)
[0059]	PEG-8	8몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 8 molecule of PEG or variant thereof)
[0060]	PEG-9	9몰의 PEG로 PEG화된 1몰의 B-2036 또는 이의 변형체(one molecule of B-2036 pegylated with 9 molecule of PEG or variant thereof)
[0061]	RPHPLC	역상 고효율 액체 크로마토그래피(reversed phase high performance liquid chromatography)
[0062]	SD	표준 편차(standard deviation)

[0063]	SDS-PAGE	소듐 도데실 살레이트 폴리아크릴아미드 겔 전기이동(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
[0064]	SEHPLC	크기별 배제 고효율 액체 크로마토그래피(size exclusion high performance liquid chromatography)
[0065]	TMP	막관통 성능(trans membrane performance)
[0066]	TRIS	tris-(2-하이드록시메틸)아미노메탄(tris-(2-hydroxymethyl)aminomethane)
[0067]	UF/DF	초미세여과(ultrafiltration)/투석여과(diafiltration)
[0068]	UV	자외선(ultraviolet)
[0069]	WFI	주사용 증류수(water for injection)

[0070] "PEG화 단백질"은, 이에 한정되지는 않지만 호르몬, 성장 호르몬, 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 대항제, 인간 성장 호르몬 대항제, 항체(antibody)(또는 이들의 단편들(fragments)) 및 B-2036 PEG를 포함한다. "PEG화 단백질"은 또한, 이에 한정되지는 않지만 하나 또는 그 이상의 부위에서 PEG화된 하나 또는 그 이상의 관심 단백질 (one or more proteins of interest pegylated at one or more sites)을 포함한다.

[0071] 특별한 언급이 없는 한, "응집물(aggregate)"이라는 용어는 PEG화되거나 혹은 PEG화되지 않은 간에 하나 또는 그 이상의 관심 단백질의 스파게티 모양(spaghetti-like)의 응괴(clump)를 의미한다. "응집물"은 입체적 상호작용(steric interaction) 또는 그 외의 이유로 서로 무리 지어진(become grouped) 단백질 분자의 다수(multiplicity)를 의미한다. "응집물"의 예로는, 이에 한정되지는 않지만, (1) PEG화 단백질 분자의 다수, (2) PEG화되지 않은 단백질 분자의 다수, 및/또는 (3) 적어도 하나의 PEG화 단백질 분자 및 적어도 하나의 PEG화되지 않은 단백질 분자 사이에 얹혀 있는 것(entangling)을 포함한다.

[0072] 특별한 언급이 없는 한, "PEG화되지 않은 단백질 불순물"은, 이에 한정되지는 않지만 PEG화되지 않은 단백질, 즉 부착된 PEG분자가 없는 단백질 또는 이의 변이형을 포함한다.

[0073] 특별한 언급이 없는 한, "화학량적 질량 비(stoichiometric weight ratio)"라는 용어는, 이에 한정되지는 않지만, PEG화되지 않은 관심 단백질 분자의 양(amount)에 대한 자유(free) PEG 분자들의 양(amount)을 의미한다.

[0074] 특별한 언급이 없는 한, "PEG화 단백질 이성체(들)"이란 용어는 관심 단백질에 부착된, 바람직하게는 공유결합되어 부착된 하나 또는 그 이상의 PEG 부분들(moieties)을 갖는 관심 단백질을 의미한다. 예를 들어, "PEG-1"이라는 용어는 바람직하게는 라이신(lysine) 아미노산 잔기 및/또는 아미노 말단과 같은 위치에 부착된 1개의 PEG 분자를 갖는 B-2036을 의미한다. 이와 마찬가지로, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9는 B-2036 한 분자에 부착된 PEG 분자의 수를 의미한다. 따라서, PEG-2는 B-2036에 부착된 두 개의 PEG 분자들을 갖는 하나의 B-2036을 의미하며, PEG-3은 하나의 B-2036 분자에 부착된 세 개의 PEG 분자들을 의미한다.

[0075] 특별한 언급이 없는 한, "농축 충전 부피(packed bed volume)"는 제조자에 의하여 제안된 작동 조건(operating condition)에 따라 농축된 특정 수지(resin)의 농축 충전 부피를 의미한다.

[0076] 특별한 언급이 없는 한, "이성체 불순물(isoform impurity)"이란 용어는 적어도 트리설파이드 이성체 불순물(trisulfide isoform impurity), 또는 데-프 이성체 불순물(des-phe isoform impurity)을 의미한다. 또한, "이성체 불순물"은 기술 분야에서 알려진 다른 불순물들을 의미할 수 도 있다.

[0077] "CE 풀링 전도도(CE pooling conductivity)"라는 용어는 CE가 진행된(being subjected to CE) 수집된 CV 부분(collected CV fraction)의 전도도 측정치(conductivity measurement)를 의미한다.

[0078] "성장 호르몬 대항제(growth hormone antagonist)" 및 "성장 호르몬 수용체 대항제(growth hormone receptor antagonist)"와 같은 용어는 성장 호르몬의 성장 호르몬 수용체와의 결합을 억제하거나 중화시켜 성장 호르몬의 생물학적 효과를 차단시키는 PEG화 폴리펩티드(pegylated polypeptides) 및 폴리펩티드를 의미한다(그러나, 이에 한정되지는 않는다.). 바람직하게, 상기 PEG화 "성장 호르몬 대항제" 혹은 PEG화 "성장 호르몬 수용체 대항제"는 PEG화 B-2036, B-2036 또는 이의 변이형(variant)이다. 상기 "변이형"은 동족(同族)체(homologues)(특히, B-2036에 대하여 보존성 아미노산 치환(conservative amino acid substitution), 부가(addition) 또는 삭제(deletion)한 동족체), 유사체(analogue), 조각(fragment), 가성(假

性)펩티드(pseudopeptides), 항체(antibodies) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않으며, 이들 각각은 성장 호르몬 수용체 대항제 활성 능력(growth hormone receptor antagonist activity)을 갖고 있다.

[0079] "성장 호르몬 작용제(growth hormone agonist)" 및 "성장 호르몬 수용체 작용제(growth hormone receptor agonist)"와 같은 용어는 성장 호르몬 수용체와 결합하고 이를 활성화시키는 PEG화 폴리펩티드(pegylated polypeptides) 및 폴리펩티드를 의미한다(그러나, 이에 한정되지는 않는다.). 바람직하게, 상기 "성장 호르몬 작용제" 혹은 "성장 호르몬 수용체 작용제"는 PEG화 인간 성장 호르몬, 인간 성장 호르몬 또는 이의 변이형이다. 상기 "변이형"은 동족체(homologues)(특히, 인간 성장 호르몬에 대하여 보존성 아미노산 치환, 부가 또는 삭제한 동족체), 유사체(analogue), 조각(fragment), 가성(假性)펩티드(pseudopeptides), 항체(antibodies) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않으며, 이들 각각은 성장 호르몬 수용체 작용제 활성 능력(growth hormone receptor agonist activity)을 갖고 있다.

[0080] "및(그리고)"이라는 관련 불순물(즉, 트리설파이드 또는 데-프 이성체 불순물 및/또는 응집물)을 요구되는 수준까지 감소시키기 위한 공정을 설명하기 위하여 적절히 또는 필요하게 "및(그리고)" 또는 "또는(혹은)"을 의미할 수 있다.

[0081] "또는(혹은)"이라는 관련 불순물(즉, 트리설파이드 또는 데-프 이성체 불순물 및/또는 응집물)을 요구되는 수준까지 감소시키기 위한 공정을 설명하기 위하여 적절히 또는 필요하게 "및(그리고)" 또는 "또는(혹은)"을 의미할 수 있다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 "감소시키다"라는 용어(또는 상기 용어의 명백한 변형들)는 특별한 언급이 없는 한, 그리고 관련 이성체 불순물이 트리설파이드 이성체 불순물 또는 데-프 이성체 불순물이든지 간에, PEG화 관심 단백질 및/또는 관련 이성체 불순물의 양을 유지하다, 제거하다, 최소화하다, 줄이다, 막다, 반전시키다 및/또는 경감하다를 의미한다.

[0083] 특별한 언급이 없는 한, "숙주 세포(host cell)"라는 용어(또는 상기 용어의 명백한 변형들)는 재조합 B-2036 또는 재조합 hGH를 형성할 수 있는 숙주 세포를 의미한다. 따라서, 상기 숙주 세포는 포유류(mammalian) 숙주 세포, 식물(plant) 숙주 세포, 또는 대장균(E. coli.)과 같은 미생물 숙주 세포나 심지어 효모(yeast) 세포일 수도 있다. 상기 숙주 세포는 바람직한 재조합 B-2036 단백질 성분이나 재조합 hGH를 상기 숙주세포 내에서 성장시키기에 충분한 것일 수 있음을 주의해야한다. 이러한 관점에서, 관심 대상인 상기 B-2036 단백질 성분이나 재조합 hGH 또는 이들의 "변형체"를 재조합 적으로 생산할 수 있을 것을 제외하고는 숙주 세포가 어떤 것 이어야 한다는 특별한 제한은 없다.

[0084] 또한, 본 명세서에서 사용되는 "성장함"이라는 용어(또는 상기 용어의 명백한 변형들, 즉 성장)는 특별한 언급이 없는 한, 발효 및 배양함, 또는 숙주세포가 상기 재조합 B-2036 단백질 성분이나 재조합 hGH의 요구되는 양을 충분히 생산할 수 있을 정도로 증식하는 것을 야기함을 의미하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0085] 나아가, 본 발명이 재조합 B-2036 및 재조합 B-2036 PEG에 대하여 설명하고 있지만, 특별한 언급이 없는 한, 본 발명은 포유류 성장 호르몬 또는 이의 대항제, 인간 성장 호르몬 또는 이의 대항제, 소 성장 호르몬 또는 이의 대항제 등과 같은 어떠한 재조합 성장 호르몬 작용제, 및 재조합 성장 호르몬 대항제에도 적용할 수 있다.

[0086] (PEG B-2036 또는 B-2036 PEG와 관련하여) 페그비소만트(pegvisomant)는 재조합 숙주 세포(즉, 재조합, 유전적으로 변형된 대장균(E. coli.) 숙주세포)에서 생산된 재조합 단백질(B-2036)의 PEG화(pegylated) 형태이다.

[0087] B-2036 단백질은 세포 성장(즉, 발효(fermentation)에 의하여) 및 발현(expression)(합성(synthesis) 및 분비(secretion)) 동안 생성된다. B-2036이 생성된 후, 상기 B-2036은 분리되고(isolated)(즉, 균질화(homogenization)에 의하여), 이어서 정제(purification)(즉, 추출(extraction), 원심분리(centrifugation), 역상(reverse phase) 및 음이온 교환 크로마토그래피(anion-exchange chromatography), 및 완충액 교환(buffer exchange)에 의하여) 된다. 그러나, 상기 B-2036 단백질이 재조합 생성되는 동안에 바람직하지 않은 B-2036 이성체 불순물들이 형성되며, 이러한 불순물들은 B-2036의 트리설파이드 및 데-프 이성체 불순물들이다.

[0088] 앞서 언급한 바와 같이, 도 1A는 B-2036의 아미노산 서열을 설명하기 위한 도면이며, 도 1A에 있어서 약어(abbreviation)는 특정 아미노산이 약어가 표시된 위치에 존재하는지를 나타낸다. 상기 약어 및 약어에 상응하는 아미노산을 나타내는 하기 표1을 참조하라.

[0089]

[표 1]

[0090]

폴리펩티드 아미노산 (Polypeptide Amino Acid)
Ala(A)
Glu(E)
Gln(Q)
Asp(D)
Asn(N)
Leu(L)
Gly(G)
Lys(K)
Ser(S)
Val(V)
Arg(R)
Thr(T)
Pro(P)
Ile(I)
Met(M)
Phe(F)
Tyr(Y)
Cys(C)
Trp(W)
His(H)

[0091]

또한, 상기 B-2036의 아미노산 서열은 서열번호 1(SEQ. ID. NO. 1)에 나타나 있으며, hGH의 아미노산 서열은 서열번호 2(SEQ. ID. NO. 2)에 나타나 있다.

[0092]

### 1. 재조합 성장 호르몬 대항체 및 이의 트리설파이드 이성체 불순물

[0093]

도 1B는 B-2036의 트리설파이드 이성체 불순물의 아미노산 서열 구조를 나타낸다. 구체적으로, 상기 트리설파이드 이성체 불순물은 B-2036 단백질 성분의 182번 및 189번 위치의 시스테인 사이의 브리지에 추가의 황원자(extra sulfur atom)를 포함한다.

[0094]

#### a. 머캅토 화합물(Mercapto Compound(s))을 이용한 트리설파이드 이성체 불순물의 감소

[0095]

이론에 얹매이지 않고, 재조합 성장 호르몬 대항체 B-2036의 트리설파이드 이성체 불순물과 선택된 머캅토 화합물을 접촉시키면 시스테인-S-S-S-시스테인 트리설파이드 브리지(bridge)가 시스테인-S-S-시스테인의 자연 형태로 전환되는 것으로 알려져 있다. 또한, 역시 이론에 얹매이지 않고, 상기 머캅토 화합물의 존재는 트리설파이드 브리지 자체가 더 형성되는 것을 방지할 수 있다.

[0096]

통상적으로, 상기 머캅토 화합물(들)은 숙주 세포(들)에 침가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 B-2036 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 B-2036 단백질을 정제하는 것이 바람직하다. 이후, 정제된 단백질은 바람직하게 PEG화(pegylated)되어 PEG B-2036(페그비소만트)을 수득할 수 있다. 상기 PEG화 과정은 미합중국특허 제5,849,535호 및 미합중국특허 제5,672,662호에 나타나 있다.

[0097]

B-2036 단백질 성분 및 이의 트리설파이드 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 B-2036의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 트리설파이드 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 머캅토 화합물도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 머캅토 화합물은 살파이트(sulfite), 글루타티온(glutathione), 베타-머캅토에탄올(beta-mercptoethanol), 디티오프레이톨(dithiothreitol), 머캅토에틸아민(mercptoethylamine), 디티오에리트리톨(dithioerythritol), 트리(2-카르복시에틸) 포스핀 하이드로클로라이드(tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride), 시스테인(cysteine) 및 시스테인과 결합한 시스테인(cysteine in combination with

cysteine) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0098]

본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 머캅토 화합물과 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) J. Houk and G.M. Whitesides, "Structure-Reactivity Relations for Thiol-Disulfide Interchange," J.M. Chem. Soc., 109:6825-6836(1987); (2) Sigmund, M., The Chemistry & Biochemistry of the Sulphydro Group in Amino Acids, Peptides and Proteins, 1<sup>st</sup> Ed. Pergamon, New York(1973). 구체적으로, 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 머캅토 화합물의 예시적인 목록이 상기 Houk et al.의 항목(item)(1)의 표 II에 나타나 있다.

[0099]

상기 적합한 머캅토 화합물 중, 시스테인 또는 시스테인과 결합한 시스테인(중합된(dimerized) 시스테인)이 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 시스테인 또는 시스테인과 시스테인의 결합(중합된(dimerized) 시스테인, 어떤 것이라도)의 양은 트리설파이드 이성체 불순물을 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 평형 농도(highest average equilibrium concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 트리설파이드 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 가장 높은 평균 평형 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 시스테인 또는 임의의 시스테인의 초기 결합 농도(combined concentration)는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.1mM, 약 0.1mM 내지 약 10mM 혹은 약 1mM 내지 약 5mM이다.

[0100]

상기 머캅토 화합물을 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게 상기 완충액은 트리스이다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 4 내지 약 9, 약 7.5 내지 약 8.5 혹은 약 7.5 내지 약 8.0으로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다. 명백히, 보다 높은 농도의 머캅토 화합물을 사용하면, 보다 높은 pH 수준, 예를 들어 약 9.5 정도의 pH도 허용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 아주 과도한 양의 시스테인이나 B-2036에 사용되면, 완충액의 pH는 약 9.5 정도로 높을 수도 있다.

[0101]

앞서 주지한 바와 같이, 상기 머캅토 화합물을 완충액에 제공하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 완충액에서 머캅토 화합물의 양은 B-2036 단백질의 몰(moles)에 대한 머캅토 화합물 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 0.5 내지 약 1000일 수 있다. 이는 특히 사용된 머캅토 화합물이 시스테인의 결합 및 임의로(optionally), 시스테인과 결합한 시스테인일 경우이다. 선택적으로, 상기 B-2036 단백질의 몰에 대한 머캅토 화합물 몰의 몰비는 각각 약 1 내지 약 1000, 약 1 내지 약 500, 또는 약 1 내지 약 10일 수 있다.

[0102]

통상적으로, 상기 머캅토 화합물과 상기 B-2036 단백질 성분 사이에 충분한 접촉(상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여)이 있은 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 B-2036 단백질 성분은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 30mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 20mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 10mg/ml의 농도를 갖는다.

[0103]

개다가, 상기 머캅토 화합물이 숙주 세포(들) 혹은 상기 B-2036 단백질 성분을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 머캅토 화합물 및 B-2036, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 25°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 B-2036 성분을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 8°C로 유지되는 것이 바람직하다. 상기 B-2036 단백질의 변성은 약 40°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 머캅토 화합물들 및 B-2036 등을 포함하는)의 온도는 상기 B-2036 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0104]

또한, 상기 B-2036 성분과 상기 머캅토 화합물의 접촉 시간은 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 24시간, 또는 약 1시간 내지 약 4시간이다.

[0105] 일반적으로, 상기 머캅토 화합물과 상기 B-2036 성분을 충분히 접촉시킨 후, 상기 머캅토 화합물과 상기 B-2036 성분을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 10리터 내지 약 500리터, 또는 약 100리터 내지 약 300리터의 부피를 갖는다. 160리터 내지 500리터 사이의 다른 적합한 부피도 가질 수 있다.

[0106] 상기 머캅토 화합물과 상기 B-2036 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(하나의 성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 머캅토 화합물(들), B-2036 성분 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, B-2036 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

#### b. 킬레이트제(Chelating Agent(s))를 이용한 트리설파이드 이성체 불순물의 감소

[0108] 이론에 얹매이지 않고, 선택된 킬레이트제를 (1) 트리설파이드 이성체 불순물, (2) 재조합 성장 호르몬 대항제 B-2036, (3) (대항제의 재조합 생산을 위한) 숙주 세포 세포 성분(들)(host cell cellular component(s)), 및 (4) (1) 내지 (3)의 모든 성분의 결합과 접촉시키면 시스테인-S-S-S-시스테인 트리설파이드 브리지(bridge)가 시스테인-S-S-시스테인의 자연 형태로 전환되거나, 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한, 역시 이론에 얹매이지 않고, 상기 킬레이트제의 존재는 트리설파이드 브리지 자체가 더 형성되는 것을 방지할 수 있다.

[0109] 통상적으로, 상기 킬레이트제(들)는 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 B-2036 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 B-2036 단백질을 정제하는 것이 바람직하다. 이후, 상기 정제된 단백질은 바람직하게 PEG화(pegylated)되어 PEG B-2036(페그비소만트)을 수득할 수 있다. 상기 PEG화 과정은 미합중국특허 제5,849,535호에 나타나 있다.

[0110] B-2036 단백질 성분 및 이의 트리설파이드 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 B-2036의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 트리설파이드 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 킬레이트제도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 킬레이트제는 EDTA, EGTA 및 DTPA 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 또 다른 사용할 수 있는 킬레이트제의 예로는 데페록사민(Deferoxamine), 디티오카브 소듐(Ditiocarb Sodium), 에데트산 칼슘 디소듐(Edetate Calcium Disodium), 에데트산 디소듐(Edetate Disodium), 에데트산 소듐(Edetate Sodium), 에데트산 트리소듐(Edetate Trisodium), 페니실라민(Penicillamine), 펜테이트 칼슘 트리소듐(Pentetate Calcium Trisodium), 펜테틱 산(Pentetic Acid), 석시머(Succimer), 및 트리엔틴(Trientine) 등을 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 상기 에데트산 소듐은 EDTA의 염의 형태임을 주의하라.

[0111] 본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 킬레이트제와 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0112] 상기 적합한 킬레이트제들 중, EDTA가 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 킬레이트제의 양은 트리설파이드 이성체 불순물을 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 평형 농도(highest average equilibrium concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 트리설파이드 이성체 불순

물 양의 감소는 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 가장 높은 평균 평형 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 EDTA의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.01mM, 약 0.01mM 내지 약 100mM, 약 0.1mM 내지 약 20mM, 약 2mM 내지 약 10mM 또는 약 2mM 내지 약 5mM이다.

[0113] 상기 킬레이트제를 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게 상기 완충액은 트리스이다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 6 내지 약 9, 약 6.5 내지 약 7.5 혹은 약 7.2 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0114] 앞서 주지한 바와 같이, 상기 킬레이트제를 완충액에 제공하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 완충액에서 킬레이트제의 양은 B-2036 단백질의 몰(moles)에 대한 킬레이트제 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 1000일 수 있다. 선택적으로, 상기 B-2036 단백질의 몰에 대한 킬레이트제 몰의 몰비는 각각 약 20 내지 약 1000, 약 50 내지 약 250, 또는 약 60 내지 약 110일 수 있다.

[0115] 통상적으로, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 단백질 성분 사이에 (상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있은 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 B-2036 단백질 성분은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0116] 게다가, 상기 킬레이트제가 숙주 세포(들) 혹은 상기 B-2036 단백질 성분을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 킬레이트제 및 B-2036, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 B-2036 성분을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 바람직하게, 약 4°C의 온도를 갖는 킬레이트제(즉, EDTA)를 첨가함에 따라, B-2036을 포함하는 상기 균등질(homogenate)이 균질화 되는 동안 B-2036을 포함하는 상기 균등질의 온도는 약 30°C까지 올라간다는 점을 유념하라. 상기 B-2036 단백질의 변성은 약 40+°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 킬레이트제 및 B-2036 등을 포함하는)의 온도는 상기 B-2036 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0117] 또한, 상기 B-2036 성분과 상기 킬레이트제의 접촉 시간은 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0118] 일반적으로, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분을 충분히 접촉시킨 후, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 10리터 내지 약 500리터, 또는 약 100리터 내지 약 300리터의 부피를 갖는다. 160리터 내지 500리터 사이의 다른 적합한 부피도 가질 수 있다.

[0119] 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(하나의 성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 킬레이트제(들), B-2036 성분 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, B-2036 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

#### [0120] c. 금속염(Metal Salt(s))을 이용한 트리설파이드 이성체 불순물의 감소

[0121] 이론에 얹매이지 않고, 선택된 금속염(들)을 (1) 트리설파이드 이성체 불순물, (2) 재조합 성장 호르몬 대항제 B-2036, (3) (대항제의 재조합 생산을 위한) 숙주 세포 세포 성분(들)(host cell cellular

component(s)), 및 (4) (1) 내지 (3)의 모든 성분의 결합과 접촉시키면 시스테인-S-S-시스테인 트리설파이드 브리지(bridge)가 시스테인-S-S-시스테인의 자연 형태로 전환되거나, 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한, 역시 이론에 얹매이지 않고, 상기 금속염(들)의 존재는 트리설파이드 브리지 자체가 더 형성되는 것을 방지할 수 있다.

[0122] 통상적으로, 상기 금속염(들)은 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 B-2036 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 B-2036 단백질을 정제하는 것이 바람직하다. 이후, 상기 정제된 단백질은 바람직하게 PEG화(pegylated)되어 PEG B-2036(페그비소만트)을 수득할 수 있다. 상기 PEG화 과정은 미합중국특허 제5,849,535호에 나타나 있다.

[0123] B-2036 단백질 성분 및 이의 트리설파이드 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 B-2036의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 트리설파이드 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 금속염도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 금속염은 알칼리 금속 염(들)(alkali metal salt(s)), 알칼리 토금속 염(들)(alkaline earth metal salt(s)), 전이 금속 염(transition metal salt(s)) 및 이들의 조합(combination) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에서 사용할 수 있는 바람직한 금속염은 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 소듐 아세테이트(sodium acetate), 징크 클로라이드(zinc chloride) 및 이들의 조합(combination)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 않는다.

[0124] 본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 금속염과 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0125] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 적합한 금속염들 중, 소듐 포스페이트,  $ZnCl_2$  및 이들의 조합(combination)이 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염의 양은 트리설파이드 이성체 불순물을 상기 트리설파이드 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 농도(highest average concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 트리설파이드 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 농도(또는, 가장 높은 평균 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염(즉, 소듐 포스페이트)의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.1mM, 약 1mM 내지 약 500mM, 약 1mM 내지 약 200mM, 약 5mM 내지 약 175mM, 약 10mM 내지 약 150mM, 또는 약 25mM 내지 약 100mM이다.

[0126] 상기 금속염을 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 그러나, 상기 소듐 포스페이트는 완충액 및 적합한 금속염 모두로 작용할 수 있다. 하지만, 추가의 적합한 금속염이 소듐 포스페이트 완충액에 첨가될 수 있다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 7.5 혹은 약 5.5 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0127] 상기 금속염을 완충액(또는, NaP의 경우, NaP 용액이 금속염 및 완충액으로 모두 작용하는 경우)에 제

공한 후, 상기 완충액(또는 완충액으로서도 작용하는 NaP 용액)에서 금속염의 양은 B-2036 단백질의 몰(moles)에 대한 금속염 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 10000일 수 있다. 선택적으로, 상기 B-2036 단백질의 몰에 대한 금속염 몰의 몰비는 각각 약 300 내지 약 10000, 약 500 내지 약 5000, 또는 약 500 내지 약 2500일 수 있다.

[0128] 통상적으로, 상기 금속염과 상기 B-2036 단백질 성분 사이에 (상기 트리실파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있는 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 B-2036 단백질 성분은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0129] 게다가, 상기 금속염이 숙주 세포(들) 혹은 상기 B-2036 단백질 성분을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 금속염 및 B-2036, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 B-2036 성분을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 상기 금속염(즉, NaP)과 함께 균질화 되는 동안, 상기 균등질(homogenate)의 온도는 상승할 수 있다는 점을 유념하라. 상기 B-2036 단백질의 변성은 약 40+°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 금속염 B-2036, 및 선택적으로 머캅토 화합물 등을 포함하는)의 온도는 상기 B-2036 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0130] 또한, 상기 B-2036 성분과 상기 금속염의 접촉 시간은 상기 트리실파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 트리실파이드 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0131] 일반적으로, 상기 금속염과 상기 B-2036 성분을 충분히 접촉시킨 후, 상기 금속염과 상기 B-2036 성분을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 100리터 내지 약 2000리터, 또는 약 200리터 내지 약 1500리터의 부피를 갖는다.

[0132] 상기 금속염과 상기 B-2036 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 금속염(들), B-2036 성분 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, B-2036 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

## 2. 제조합 성장 호르몬 대항제 및 이의 데-프 이성체 불순물(Des-Phe Isoform Impurity)

### a. 킬레이트제(Chelating Agent)를 이용한 데-프 이성체 불순물의 감소

[0134] 이론에 얹매이지 않고, 제조합 성장 호르몬 대항제 B-2036에 킬레이트제(들)를 첨가하면 데-프 이성체 불순물 수준의 실질적 감소에 의해 및/또는 데-프가 더 형성되는 것을 방지함에 따라 상기 데-프 이성체 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다.

[0135] 통상적으로, 상기 킬레이트제(들)는 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 제조합 B-2036 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 B-2036 단백질을 정제하는 것이 바람직하다. 이후, 정제된 단백질은 바람직하게 PEG화(pegylated)되어 PEG B-2036(페그비소만트)을 수득할 수 있다. 상기 PEG화 과정은 미합중국특허 제5,849,535호에 나타나 있다.

[0136] B-2036 단백질 성분 및 이의 데-프 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 B-2036의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 데-프 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 킬레이트제도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 킬레이트제는 EDTA, EGTA 및 DTPA 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 또 다른 사용할 수 있는 킬레이트제의 예로는 데페록사민(Deferoxamine), 디티오카브 소듐(Ditiocarb Sodium), 에데트산 칼슘 디소듐(Edetate Calcium Disodium), 에데트산 디소듐(Edetate Disodium), 에데트산 소듐(Edetate

Sodium), 에데트산 트리소듐(Edetate Trisodium), 페니실라민(Penicillamine), 펜테테이트 칼슘 트리소듐(Pentetate Calcium Trisodium), 펜테틱 산(Pentetic Acid), 석시머(Succimer), 및 트리엔틴(Trientine) 등을 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 상기 에데트산 소듐은 EDTA의 염의 형태임을 주의하라.

[0138]

본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 킬레이트제와 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0139]

상기 적합한 킬레이트제들 중, EDTA가 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 킬레이트제의 양은 데-프 이성체 불순물을 상기 데-프 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 평형 농도(highest average equilibrium concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 데-프 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 가장 높은 평균 평형 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 EDTA의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.01mM, 약 0.01mM 내지 약 100mM, 약 0.1mM 내지 약 20mM, 약 2mM 내지 약 10mM 또는 약 2mM 내지 약 5mM이다.

[0140]

상기 킬레이트제를 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게 상기 완충액은 트리스이다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 6 내지 약 9, 약 6.5 내지 약 7.5 혹은 약 7.2 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0141]

앞서 주지한 바와 같이, 상기 킬레이트제를 완충액에 제공하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 완충액에서 킬레이트제의 양은 B-2036 단백질의 몰(moles)에 대한 킬레이트제 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 1000일 수 있다. 선택적으로, 상기 B-2036 단백질의 몰에 대한 킬레이트제 몰의 몰비는 각각 약 20 내지 약 1000, 약 50 내지 약 250, 또는 약 60 내지 약 110일 수 있다.

[0142]

통상적으로, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 단백질 성분 사이에 (상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있는 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 B-2036 단백질 성분은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0143]

게다가, 상기 킬레이트제가 숙주 세포(들) 혹은 상기 B-2036 단백질 성분을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 킬레이트제 및 B-2036, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 B-2036 성분을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 바람직하게, 약 4°C의 온도를 갖는 킬레이트제(즉, EDTA)를 첨가함에 따라, B-2036을 포함하는 상기 균등질(homogenate)이 균질화 되는 동안 B-2036을 포함하는 상기 균등질의 온도는 약 30°C까지 올라간다는 점을 유념하라. 상기 B-2036 단백질의 변성은 약 40+°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 킬레이트제 및 B-2036 등을 포함하는)의 온도는 상기 B-2036 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0144] 또한, 상기 B-2036 성분과 상기 킬레이트제의 접촉 시간은 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0145] 일반적으로, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분을 충분히 접촉시킨 후, 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 10리터 내지 약 500리터, 또는 약 100리터 내지 약 300리터의 부피를 갖는다. 160리터 내지 500리터 사이의 다른 적합한 부피도 가질 수 있다.

[0146] 상기 킬레이트제와 상기 B-2036 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 킬레이트제(들), B-2036 성분 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, B-2036 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

#### b. 금속염(Metal Salt(s))을 이용한 데-프 이성체 불순물의 감소

[0148] 이론에 얹매이지 않고, 금속염(들)을 재조합 성장 호르몬 대항제 B-2036에 첨가하면 데-프 이성체 불순물의 실질적 감소에 의하여 및/또는 데-프가 더 형성되는 것을 방해함에 따라 데-프 이성체 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다.

[0149] 통상적으로, 상기 금속염(들)은 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 B-2036 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 B-2036 단백질을 정제하는 것이 바람직하다. 이후, 상기 정제된 단백질은 바람직하게 PEG화(pegylated)되어 PEG B-2036(페그비소만트)을 수득할 수 있다. 상기 PEG화 과정은 미합중국특허 제5,849,535호에 나타나 있다.

[0150] B-2036 단백질 성분 및 이의 데-프 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 B-2036의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 데-프 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 금속염도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 금속염은 알칼리 금속 염(들)(alkali metal salt(s)), 알칼리 토금속 염(들)(alkaline earth metal salt(s)), 전이 금속 염(transition metal salt(s)) 및 이들의 조합(combination) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에서 사용할 수 있는 바람직한 금속염은 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 소듐 아세테이트(sodium acetate), 징크 클로라이드(zinc chloride) 및 이들의 조합(combination)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0151] 본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 금속염과 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0152] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 적합한 금속염들 중, 소듐 포스페이트,  $ZnCl_2$  및 이들의 조합(combination)이 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염의 양은 데-프 이성체 불순물을 상기 데-프 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 농도(highest average concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 데-프 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 농도(또는, 가장 높은 평균 농도)의 각각 적어도 약 20%,

30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염(즉, 소듐 포스페이트)의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.1mM, 약 1mM 내지 약 500mM, 약 1mM 내지 약 200mM, 약 5mM 내지 약 175mM, 약 10mM 내지 약 150mM, 또는 약 25mM 내지 약 100mM이다.

[0153] 상기 금속염을 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 그러나, 상기 소듐 포스페이트는 완충액 및 적합한 금속염 모두로 작용할 수 있다. 하지만, 추가의 적합한 금속염이 소듐 포스페이트 완충액에 첨가될 수 있다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 7.5 혹은 약 5.5 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0154] 상기 금속염을 완충액(또는, NaP의 경우, NaP 용액이 금속염 및 완충액으로 모두 작용하는 경우)에 제공한 후, 상기 완충액(또는 완충액으로서도 작용하는 NaP 용액)에서 금속염의 양은 B-2036 단백질의 몰(moles)에 대한 금속염 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 10000일 수 있다. 선택적으로, 상기 B-2036 단백질의 몰에 대한 금속염 몰의 몰비는 각각 약 300 내지 약 10000, 약 500 내지 약 5000, 또는 약 500 내지 약 2500일 수 있다.

[0155] 통상적으로, 상기 금속염(들)과 상기 B-2036 단백질 성분 사이에 (상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있은 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 B-2036 단백질 성분은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0156] 게다가, 상기 금속염이 숙주 세포(들) 혹은 상기 B-2036 단백질 성분을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 금속염 및 B-2036, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 B-2036 성분을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 상기 금속염(즉, NaP)과 함께 균질화 되는 동안, 상기 균등질(homogenate)의 온도는 상승할 수 있다는 점을 유념하라. 상기 B-2036 단백질의 변성은 약 40+°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 금속염 B-2036, 및 선택적으로 머캅토 화합물 등을 포함하는)의 온도는 상기 B-2036 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0157] 또한, 상기 B-2036 성분과 상기 금속염의 접촉 시간은 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0158] 일반적으로, 상기 금속염과 상기 B-2036 성분을 충분히 접촉시킨 후, 상기 금속염과 상기 B-2036 성분을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 100리터 내지 약 2000리터, 또는 약 200리터 내지 약 1500리터의 부피를 갖는다.

[0159] 상기 금속염과 상기 B-2036 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 금속염(들), B-2036 성분 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, B-2036 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

### 3. 제조합 성장 호르몬 및 이의 데-프 이성체 불순물(Des-Phe Isoform Impurity)

#### a. 퀼레이트제(Chelating Agent)를 이용한 데-프 이성체 불순물의 감소

[0162] 이론에 얹매이지 않고, 재조합 성장 호르몬에 킬레이트제(들)를 첨가하면 데-프 이성체 불순물 수준의 실질적 감소에 의해 및/또는 데-프가 더 형성되는 것을 방지함에 따라 상기 데-프 이성체 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져 있다.

[0163] 통상적으로, 상기 킬레이트제(들)는 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 성장 호르몬 단백질을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 성장 호르몬 단백질을 정제하는 것이 바람직하다.

[0164] 상기 성장 호르몬 단백질 및 이의 데-프 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 상기 성장 호르몬의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 데-프 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 킬레이트제도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 킬레이트제는 EDTA, EGTA 및 DTPA 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 또 다른 사용할 수 있는 킬레이트제의 예로는 데페록사민(Deferoxamine), 디티오카브 소듐(Ditiocarb Sodium), 에데트산 칼슘 디소듐(Edetate Calcium Disodium), 에데트산 디소듐(Edetate Disodium), 에데트산 소듐(Edetate Sodium), 에데트산 트리소듐(Edetate Trisodium), 페니실라민(Penicillamine), 펜테테이트 칼슘 트리소듐(Pentetate Calcium Trisodium), 펜테틱 산(Pentetic Acid), 석시머(Succimer), 및 트리엔틴(Trientine) 등을 들 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 상기 에데트산 소듐은 EDTA의 염의 형태임을 주의하라.

[0165] 본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 킬레이트제와 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0166] 상기 적합한 킬레이트제들 중, EDTA가 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 킬레이트제의 양은 데-프 이성체 불순물을 상기 데-프 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 평형 농도(highest average equilibrium concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 데-프 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 평형 농도(또는, 가장 높은 평균 평형 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 EDTA의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.01mM, 약 0.01mM 내지 약 100mM, 약 0.1mM 내지 약 20mM, 약 2mM 내지 약 10mM 또는 약 2mM 내지 약 5mM이다.

[0167] 상기 킬레이트제를 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직하게 상기 완충액은 트리스이다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 6 내지 약 9, 약 6.5 내지 약 7.5 혹은 약 7.2 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0168] 앞서 주지한 바와 같이, 상기 킬레이트제를 완충액에 제공하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 완충액에서 킬레이트제의 양은 성장 호르몬 단백질(즉, hGH)의 몰(moles)에 대한 킬레이트제 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 1000일 수 있다. 선택적으로, 상기 성장 호르몬 단백질(즉, hGH)의 몰에 대한 킬레이트제 몰의 몰비는 각각 약 20 내지 약 1000, 약 50 내지 약 250, 또는 약 60 내지 약 110일 수 있다.

[0169] 통상적으로, 상기 킬레이트제와 상기 성장 호르몬 단백질(즉, hGH) 사이에 (상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있은 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터),

상기 완충액에서 상기 성장 호르몬 단백질(즉, hGH)은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0170] 계다가, 상기 킬레이트제가 숙주 세포(들) 혹은 상기 성장 호르몬 단백질을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 킬레이트제 및 성장 호르몬 단백질, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 성장 호르몬 단백질을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 바람직하게, 약 4°C의 온도를 갖는 킬레이트제(즉, EDTA)를 첨가함에 따라, 상기 성장 호르몬을 포함하는 상기 균등질(homogenate)이 균질화(homogenization)되는 동안 상기 균등질의 온도는 약 30°C까지 올라간다는 점을 유념하라. 상기 성장 호르몬 단백질의 변성은 약 40°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 킬레이트제 및 성장 호르몬 단백질 등을 포함하는)의 온도는 상기 성장 호르몬 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0171] 또한, 상기 성장 호르몬 단백질과 상기 킬레이트제의 접촉 시간은 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0172] 일반적으로, 상기 킬레이트제와 상기 성장 호르몬 단백질을 충분히 접촉시킨 후, 상기 킬레이트제와 상기 성장 호르몬 단백질을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 10리터 내지 약 500리터, 또는 약 100리터 내지 약 300리터의 부피를 갖는다. 160리터 내지 500리터 사이의 다른 적합한 부피도 가질 수 있다.

[0173] 상기 킬레이트제와 상기 성장 호르몬 단백질이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 킬레이트제(들), 성장 호르몬 단백질 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, 성장 호르몬 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

#### b. 금속염(Metal Salt(s))을 이용한 데-프 이성체 불순물의 감소

[0175] 이론에 얹매이지 않고, 금속염(들)을 재조합 성장 호르몬에 첨가하면 데-프 이성체 불순물의 실질적 감소에 의하여 및/또는 데-프가 더 형성되는 것을 방해함에 따라 데-프 이성체 불순물의 수준이 감소되는 것으로 알려져있다.

[0176] 통상적으로, 상기 금속염(들)은 숙주 세포(들)에 첨가되어 숙주 세포(들)의 성장 동안 혹은 성장 후(또는, 성장 동안 및 성장 후) 원하는 재조합 성장 호르몬 단백질 성분을 합성한다. 또한, 성장 및 접촉 단계가 수행된 후, 상기 성장 호르몬 단백질을 정제하는 것이 바람직하다.

[0177] 성장 호르몬 단백질 성분 및 이의 데-프 이성체 불순물과 함께 접촉되는 경우(바람직하게는 적절히 혼합하여), 바람직하게는 성장 호르몬의 수율을 저하시키지 않고(또는 실질적으로 저하시키지 않고) 데-프 이성체 불순물의 양을 충분히 저하시키는 것이라면 본 발명과 관련하여 어떠한 금속염도 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 금속염은 알칼리 금속 염(들)(alkali metal salt(s)), 알칼리 토금속 염(들)(alkaline earth metal salt(s)), 전이 금속 염(transition metal salt(s)) 및 이들의 조합(combination) 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에서 사용할 수 있는 바람직한 금속염은 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 포타슘 아세테이트(potassium acetate), 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 소듐 아세테이트(sodium acetate), 징크 클로라이드(zinc chloride) 및 이들의 조합(combination)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 않는다.

[0178] 본 발명에서 사용할 수 있는 다른 적합한 금속염과 관련하여 하기 문헌들을 참조할 수 있다: (1) The Merck Index, 12<sup>th</sup> Edition, S. Budavari (Editor), Merck & Co., Inc., Therapeutic Category and Biological Activity Index, p. THER-19 (under "CHELATING AGENT"), Whitehouse Station, NJ (1996) and each and every

subsequent edition to date thereof; (2) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> Ed., Arthur Osol (Editor), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1980) and each and every subsequent edition to date thereof; (3) The United States Pharmacopeia, 21<sup>st</sup> Revision (16<sup>th</sup> edition), United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland (1985) and each and every subsequent edition to date thereof; (4) SIGMA, Biochemicals and Reagents for Life Science Research Catalogue, St. Louis, Missouri (2002-2003); 및 (5) Aldrich, Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, Milwaukee, Wisconsin (2000-2001) and (2002-2003) editions thereof.

[0179]

본 발명에서 사용할 수 있는 상기 적합한 금속염들 중, 소듐 포스페이트,  $ZnCl_2$  및 이들의 조합(combination)이 바람직하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염의 양은 데-프 이성체 불순물을 상기 데-프 이성체 불순물의 형성된 가장 높은 농도(또는, 다수의 배치를 평균한 가장 높은 평균 농도(highest average concentration)의 적어도 약 10% 정도를 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 바람직하게, 상기 데-프 이성체 불순물 양의 감소는 형성된 가장 높은 농도(또는, 가장 높은 평균 농도)의 각각 적어도 약 20%, 30%, 40%, 또는 50%이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 적합한 금속염(즉, 소듐 포스페이트)의 초기 농도는 바람직하게는 각각 적어도 약 0.1mM, 약 1mM 내지 약 500mM, 약 1mM 내지 약 200mM, 약 5mM 내지 약 175mM, 약 10mM 내지 약 150mM, 또는 약 25mM 내지 약 100mM이다.

[0180]

상기 금속염을 완충액(buffer)에 제공하는 것이 바람직하다. 그러나, 상기 소듐 포스페이트는 완충액 및 적합한 금속염 모두로 작용할 수 있다. 하지만, 추가의 적합한 금속염이 소듐 포스페이트 완충액에 첨가될 수 있다. 바람직하게, 상기 완충액은 본 발명에서 적합하게 사용할 수 있는 것, 즉, B-2036 단백질 성분의 형성을 방해하거나, 한번 형성된 B-2036 단백질 성분을 저하시키지(degrade) 않는 것이어야 한다. 본 발명과 관련하여 적합하게 사용할 수 있는 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 초기 완충액의 농도는 약 1mM 내지 약 200mM, 보다 바람직하게는 약 5mM 내지 약 100mM, 보다 더 바람직하게는 약 8mM 내지 약 70mM, 가장 바람직하게는 약 10mM 내지 약 50mM이다. 다른 적합한 완충액도 사용될 수 있다. 이러한 완충액들은 성장 배지(growth medium) 어느 곳에서도 pH를 각각 약 4 내지 약 9, 약 4.5 내지 약 7.5 혹은 약 5.5 내지 약 7.5로 유지할 수 있도록 충분한 것이 바람직하다.

[0181]

상기 금속염을 완충액(또는, NaP의 경우, NaP 용액이 금속염 및 완충액으로 모두 작용하는 경우)에 제공한 후, 상기 완충액(또는 완충액으로서도 작용하는 NaP 용액)에서 금속염의 양은 성장 호르몬 단백질(즉, hGH)의 몰(moles)에 대한 금속염 몰(mole)의 몰비(molar ratio)로서 약 1 내지 약 10000일 수 있다. 선택적으로, 상기 성장 호르몬 단백질(즉, hGH)의 몰에 대한 금속염 몰의 몰비는 각각 약 300 내지 약 10000, 약 500 내지 약 5000, 또는 약 500 내지 약 2500일 수 있다.

[0182]

통상적으로, 상기 금속염(들)과 상기 성장 호르몬 단백질(즉, hGH) 사이에 (상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위한) 충분한 접촉이 있은 후(숙주세포가 완전해지기 이내에, 혹은 완전해진 후로부터), 상기 완충액에서 상기 성장 호르몬 단백질은 각각 약 0.1mg/ml 내지 약 20mg/ml, 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml의 농도를 갖는다.

[0183]

게다가, 상기 금속염이 숙주 세포(들) 혹은 상기 성장 호르몬 단백질을 포함하는 숙주 세포의 용해질(lysate)에 첨가된 후, 상기 완충액, 상기 금속염 및 성장 호르몬 단백질, 이에 한정되지는 않지만, 등을 포함하는 다른 성분들과 함께 상기 성장 배지의 온도 범위는 바람직하게 약 0°C 내지 약 35°C로 유지되는 것이 바람직하다. 또한, 상기 숙주 세포(들) 및/또는 상기 성장 호르몬 단백질을 포함하는 상기 숙주 세포로부터의 용해질의 온도는 각각 약 1°C 내지 약 15°C, 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 15°C로 유지되는 것이 바람직하다. 상기 금속염(즉, NaP)과 함께 균질화 되는 동안, 상기 균등질(homogenate)의 온도는 상승할 수 있다는 점을 유념하라. 상기 성장 호르몬 단백질의 변성은 약 40°C에서 일어난다는 것을 주의하여야 한다. 따라서, 상기 균등질(homogenate)(즉, 숙주 세포들, 성장 배지, 완충액, 금속염, 성장 호르몬 단백질, 및 선택적으로 면역화합물 등을 포함하는)의 온도는 상기 성장 호르몬 단백질의 변성온도보다 낮게 유지하는 것이 바람직하다.

[0184]

또한, 상기 성장 호르몬 단백질과 상기 금속염의 접촉 시간은 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분하여야 한다. 예를 들어, 상기 데-프 이성체 불순물의 수준을 감소시키기 위하여 적합한 접촉 시간은 각각 적어도 약 30분, 약 1시간 내지 약 48시간, 또는 약 5시간 내지 약 15시간이다.

[0185]

일반적으로, 상기 금속염과 상기 성장 호르몬 단백질을 충분히 접촉시킨 후, 상기 금속염과 상기 성장

호르몬 단백질을 포함하는 완충액은 각각 약 1리터 내지 약 5000리터, 약 100리터 내지 약 2000리터, 또는 약 200리터 내지 약 1500리터의 부피를 갖는다.

[0186] 상기 금속염과 상기 성장 호르몬 단백질 성분이 접촉하는 동안 관심을 가질만한 다른 변수로서 혼합율(mixing rate) 등을 들 수 있다. 상기 혼합율은 형성될 수 있는 기포(foaming)의 양을 최소화하면서 충분히 균질한 혼합물(homogeneous mixture)(성장 배지에 포함된 숙주 세포(들), 숙주 세포의 용해질, 완충액, 금속염(들), 성장 호르몬 단백질 및 다른 성분들)을 형성할 수 있어야 한다. 해당 기술의 통상의 지식을 가진 자들은 충분한 혼합율은 어떠해야 할지 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 명백히, 상기 혼합율은 상술한 범위의 온도를 유지할 수 있으며, 상기 성장 호르몬 단백질 성분의 어떠한 분해(degradation)도 최소화할 수 있는 것이어야 한다.

#### 4. PEG화 폴리펩티드 및 이의 응집물(Pegylated Polypeptide and its Aggregate)

[0188] a. 음이온 교환 크로마토그래피를 이용한 응집물의 감소(Decrease of Aggregate With Anion Exchange Chromatography)

[0189] B-2036 PEG의 제조(manufacturing) 및 정제(purifying)에 있어서, 별크 중간체(bulk intermediate) 또는 B-2036 분자는 상술한 바와 같이 제조된다. 이 후, 상기 B-2036 분자는 하기의 6단계의 공정을 거쳐 관심 B-2036 PEG 단백질인 최종 API를 수득할 수 있다. 6개의 단계는 다음과 같다:

[0190] 1. PEG화하여 PEG화 B-2036을 수득(pegylation to yield pegylated B-2036),

[0191] 2. HIC 크로마토그래피(선택적 단계)를 통한 HIC 풀의 수득(HIC chromatography (optional step) to yield an HIC pool),

[0192] 3. 초미세여과/투석여과(선택적 단계)를 통한 투석여과 풀의 수득(ultrafiltration/diafiltration (optional step) to yield a diafiltration pool),

[0193] 4. 풀링(pooling)과 함께 AEX 크로마토그래피를 통한 AEX 풀의 수득(AEX chromatography together with pooling to yield an AEX pool),

[0194] 5. AEX 풀의 투석여과를 통한 투석여과 풀의 수득(diafiltration of the AEX pool to yield a diafiltration pool), 및

[0195] 6. API 여과(멸균의 목적, 바람직하게 0.22 마이크론 필터를 통하여 냉동을 위한 수집병들로)를 통한 최종 API의 수득(API filtration (for sterilization purposes, preferably, through a 0.22 micron filter into collection bottles for freezing) to yield a final API).

[0196] 상기 1 내지 6의 단계는 예시적인 것이며 플로우차트 1 및 실험예 1(Example 1)에 나타나 있다.

[0197] 단계 1을 참조하면, 상기 PEG화 단계(pegylation step)는 관심 PEG화 단백질 이성체들(pegylated protein isoforms of interest)을 제공하는, 본 명세서에 포함된 청구항의 첫 번째 단계를 달성하게 한다. 이후, 선택적인 단계로 간주되는 HIC 단계 2 및 후속의 투석여과단계 3은 바람직하게 단계 2 동안 제거될 수 있었던 PEG화되지 않은 단백질(any unpegylated protein), 자유 PEG 분자들(free PEG molecules), 또는 다른 불순물들을 제거하기 위하여 수행된다. 단계 3 이후, 단계 3의 투석여과 풀(diafiltration pool)에 단계 4의 음이온 교환 크로마토그래피가 진행되어 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 이성체들을 분리하며, 이들은 이후, 바람직하게 단계 5의 투석을 수행하기 위한 최종 산물에 있어서 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 이성체들의 수준을 높이기 위하여 모아지며(pooled), 상기 단계 5 이후에 단계 6의 멸균 여과(sterilization filtration)가 수행되어 최종 API 산물을 수득할 수 있다.

[0198] 다시 PEG화 단계 1을 참조하면, B-2036 분자는 상기 B-2036 분자 자체를, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 이성체들을 포함하는 B-2036 PEG로 PEG화시킬 수 있는 충분한 조건 하에 놓여진다. 바람직한 PEG화 조건(parameter)들은 플로우차트 1 및 실험예 1에 나타나 있다. 바람직하게는 공유결합(covalent attachment)에 의하여 PEG 분자들이 부착되는 B-2036 분자 및 다른 분자들은 PEG-N-hydroxysuccinimide-5K, PEG-succinimidyl carbonate-5K, PEG-succinimidyl propionate-5K, PEG2-maleimide-40K (2×20K), PEG2-N-hydroxysuccinimide-40K (2×20K) 및 PEG2-aldehyde-40K (2×20K)로 구성된 군으로부터 선택된 PEG 분자들이다. PEG화를 위하여 B-2036 분자(또는 PEG화될 필요가 있는 다른 관심 단백질)에 첨가되는

PEG 분자들의 양에 있어서, PEG화되지 않은 단백질 분자들의 양에 대한 (속박되지 않은(unbound)) 자유 PEG 분자들의 양의 화학량적 질량 비(stoichiometric weight ratio)는 약 0.5 내지 100, 바람직하게는 약 1.5 내지 2.5, 보다 바람직하게는 약 1.9 내지 2, 가장 바람직하게는 약 1.95 내지 2.05이어야 한다. PEG화되는 동안, B-2036 분자(또는, PEG화되는 다른 관심 단백질)는 약 3 내지 10, 바람직하게는 약 7.2 내지 7.8, 보다 바람직하게는 약 7.4 내지 7.8, 가장 바람직하게는 약 7.40 내지 7.80의 PEG화 pH(pegylating pH) 하에서 PEG화된다. PEG화 단계가 수행되는 온도를 PEG화 온도(pegylating temperature)라 한다. 상기 PEG화 온도는 약 0°C 내지 약 40°C, 바람직하게는 약 10°C 내지 약 30°C, 보다 바람직하게는 약 18°C 내지 약 25°C이다.

[0199] 다시 선택적인 HIC 단계 2를 참조하면, 본 단계를 수행하기 위한 바람직한 조건(parameters)들은 실험 예 1 및 플로우차트 1에 나타나 있다. 상기 선택적인 HIC 크로마토그래피 단계 2를 수행하는 동안, 상기 PEG화된 단백질 및 PEG화되지 않은 단백질은 HIC 수지의 농축 충전 부피 리터 당 약 10g 단백질 이하의 HIC 로드로 (at an HIC load of  $\leq$  about 10g protein per liter of packed bed volume of HIC resin), 바람직하게는 HIC 수지의 농축 충전 부피 리터 당 약 5g 단백질 이하의 HIC 로드로 ( $\leq$  about 5g protein per liter of packed bed volume of HIC resin), 또는 HIC 수지의 농축 충전 부피 리터 당 약 4.1g 단백질 이하의 HIC 로드 ( $\leq$  about 4.1g protein per liter of packed bed volume of HIC resin))로 HIC 수지에 로드된다(loaded). 또한, HIC 로딩 전도도(HIC loading conductivity)는 약 30 내지 약 60mS/cm, 바람직하게 약 40 내지 52mS/cm, 또는 더욱 바람직하게는 약 45 내지 약 51mS/cm이다. 나아가, 상기 HIC 단계는 약 10 내지 40°C, 바람직하게는 약 15 내지 30°C, 및 가장 바람직하게는 약 18 내지 25°C의 HIC 온도에서 수행된다. 상기 선택적인 HIC 단계 2는 HIC 로딩에 존재하는(present on HIC loading) 적어도 일부의 자유 PEG, PEG화되지 않은 단백질 및 응집물을 각각 제거한다.

[0200] HIC 단계 2에 따라, HIC 풀(HIC pool)을 얻을 수 있다. 이어서, 상기 HIC 풀에 초미세여과/투석여과 단계 3이 수행되며, 상기 초미세여과/투석여과 단계 3은 상기 HIC 단계 2가 수행되는 경우 이어서 초미세여과/투석여과 단계도 역시 수행되는 선택적인 것이다. 그러나, 만약 상기 HIC 단계 2가 수행되지 않는다면, 상기 초미세여과/투석여과 단계 3은 수행될 필요가 없다. 선택적으로, 상기 초미세여과/투석여과 단계 3은 선택적인 HIC 단계가 없더라도 수행될 수도 있다. 초미세여과/투석여과 단계 3이 수행되는 바람직한 조건들(conditions)은 실험 예 1 및 플로우차트 1에 나타나 있다. 여기서, 우리는 본 단계를 UF/DF #3라 한다. 상기 UF/DF #3 단계는 약 3kDa 내지 약 20kDa, 바람직하게는 약 8kDa 내지 약 15kDa, 더욱 바람직하게는 약 10kDa 내지 12kDa, 및 가장 바람직하게는 약 10kDa의 분자량 차단(molecular weight cutoff(MWCO))을 갖는 UF/DF #3 막(membrane)을 사용하여 수행된다.

[0201] 상기 단계 3의 수행 후의 시점에서 수득한 산물을 투석여과 풀이라 한다. 이어서, 상기 투석여과 풀에 음이온 교환 크로마토그래피 및 풀링 단계인 단계 4가 수행된다. 본 AEX 크로마토그래피 및 풀링 단계를 수행하기 위한 바람직한 조건들은 실험 예 1 및 플로우차트 1에 나타나 있다. 이전 단계(즉, 단계 3)의 투석여과 풀 또는 PEG화 단백질(즉, 단계 1의 B-2036 PEG, 단계 2 및 3이 수행되지 않은 경우)에 단계 4가 수행된다. 사실상, 단계 2의 HIC 처리 없이, B-2036 PEG 또는 단계 1의 B-2036 PEG를 포함하는 단계 3의 투석여과 풀은 자유 PEG, PEG화 단백질, PEG화되지 않은 단백질, 부분적으로 PEG화 단백질 및 불순물(트리설파이드 불순물 또는 테-프 불순물 등과 같은 것들) 및 이의 응집물과 함께 음이온 교환수지(anion exchange resin)에 로드된다.

[0202] 바람직하게, 사용되는 상기 수지는 음이온 교환 수지이다(anion exchange (AEX) resin). 바람직한 AEX 수지는, 이에 한정되지는 않지만 ANX4, DEAE, Q-Sepharose, Q-Sepharose FF, Q-Sepharose HP, 및 Q-Sepharose XL을 포함한다. 바람직한 AEX 수지는 Q-Sepharose FF이다.

[0203] 바람직하게, 상기 AEX 수지는 1차(primary), 2차(secondary), 3차(tertiary), 4차(quaternary) 아민 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기들을 포함한다. 또한, 상기 AEX 수지는 디에틸아미노에틸(diethylaminoethyl), 디에틸아미노프로필(diethylaminopropyl), 디메틸에탄올아민(dimethylethanolamine), 트리메틸-암모늄-에틸(trimethyl-ammonium-ethyl), 트리메틸벤질 암모늄(trimethylbenzyl ammonium), 디메틸에탄올 벤질(dimethylethanol benzyl) 및 폴리아민 작용기들(polyamine functional groups)로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기들을 포함한다. 또한, 상기 AEX 수지는 바람직하게 친수성 폴리에테르(hydrophilic polyether), 가교결합된 디비닐 벤젠 폴리스티렌(crosslinked divinyl benzene polystyrene), 가교결합된 아가로즈(crosslinked agarose), 폴리프로필렌(polypropylene), 친수성 아크릴아미도비닐(hydrophilic acrylamidovinyl), 메타크릴릭(methacrylic), 세라믹 비드 베이스와 중합된 하이드로겔(polymerized hydrogel with a ceramic bead base), 실리카-덱스트란 물질 복합물(composite silica-dextran material), 폴리머 그래프트 실리카(polymer grafted silica), 디비닐 벤젠 스티렌(divinyl benzene styrene), 디비닐 벤젠 폴리아크

릴릭(divinyl benzene polyacrylic), 가교결합된 셀룰로즈(crosslinked cellulose), 메타아크릴레이트 공중합체(co-polymer methacrylate), 폴리스티렌(polystyrene), 아크릴릭(acrylic), G5000 친수성 젤(G5000 hydrophilic gel) 및 셀룰로즈(cellulose)로 이루어진 군으로부터 선택된 지지 물질(support material)을 포함한다. 또한, 다공성(macroporous) 수지 또는 젤형(gel) 수지를 포함하는 AEX 수지를 사용하는 것이 바람직하다. 통상적으로, 상기 지지 물질은 약 10 내지 약 500 $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 약 30 $\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

[0204] 상기 AEX 로딩은 약 10mS/cm 이하, 바람직하게는 약 5mS/cm 이하, 및 가장 바람직하게는 약 2.4mS/cm 이하의 AEX 로딩 전도도(at an AEX loading conductivity which is  $\leq$  about 10mS/cm, preferably  $\leq$  about 5mS/cm, and most preferably  $\leq$  about 2.4mS/cm)에서 수행된다. 상기 AEX 수지는 약 5 내지 10, 바람직하게는 약 6.6 내지 9, 더욱 바람직하게는 약 6.9 내지 7.1의 AEX 로딩 pH에서 로드된다.

[0205] 트리설파이드 불순물 또는 데-프 불순물 또는 응집물 등과 같은 불순물을 포함하는 PEG화 단백질의 로드는 AEX 수지의 농축 충전 부피의 리터 당 10g 단백질 이하, 바람직하게는 AEX 수지의 농축 충전 부피의 리터 당 5.5g 단백질 이하, 보다 바람직하게는 AEX 수지의 농축 충전 부피의 리터당 4.1g 단백질 이하의 AEX 로드와 같다.

[0206] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0207] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0208] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0209] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0210] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0211] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0212] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함한다.

[0213] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 PEG화 단백질의 PEG화되지 않은 불순물을 포함한다.

[0214] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물을 포함한다.

[0215]

본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물을 포함한다.

[0216]

본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 AEX 수지에 로드된, 또는 PEG화 단백질을 공급하는 첫 단계에 제공된 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG화 단백질 이성체들, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 및 이의 응집물을 포함한다.

[0217]

PEG화 단백질의 응집물, 트리설파이드, 및/또는 데-프 불순물, PEG화되지 않은 또는 부분적으로 PEG화 단백질 및 자유 PEG와 함께 PEG화 단백질은 AEX 수지에 로드된 후, 용리 단계(eluting step) 동안 용리 용액(eluting solution)으로 용리되며(eluted), 상기 용리 단계 후 다수 부분(multiple fractions)에 있어서 용리 액(eluent)의 수집이 수행된다. 상기 부분들(fractions)은 컬럼 부피(column volume)의 부피 부분(volume fractions)들이다. 상기 용리 단계는 pH의 증감(pH gradient) 또는 이온강도의 증감(ionic strength gradient)에 의하여 수행될 수 있다. 만약, 용리(eluting)가 이온 강도의 증감으로 수행된다면, 상기 용리는 상기 AEX 수지로부터 로드된 PEG화 단백질(loaded pegylated protein)을 용리시키기에 충분한 염 농도(salt concentration)를 갖는 이온 염(ionic salt)을 포함하는 용리 완충액(eluting buffer)에서의 염 용액(salt solution)을 사용하여 수행된다. 바람직하게, 상기 이온 염은 염화물 염(chloride salt)이다. 보다 바람직하게 상기 이온 염은 NaCl, 리튬 클로라이드(lithium chloride), Na 포스페이트(Na phosphate), Na 홀페이트(Na sulfate), 암모늄 클로라이드(ammonium chloride), 암모늄 홀페이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), KI 및 KC1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 적합한 이온 염들도 AEX 수지에 사용될 수 있으며, 본 명세서에 언급된 것처럼 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기 이온 염은 완충액(buffer)에 제공된 소듐 클로라이드(sodium chloride)이다. 용리 완충액에 제공된 염액으로 용리하는 동안, 상기 염 농도 기울기(즉, NaCl 염액을 위한)는 약 2 내지 약 50mM/CV, 바람직하게는 약 5 내지 약 25mM/CV, 및 더욱 바람직하게는 약 10 내지 약 20mM/CV, 및 가장 바람직하게는 약 10 내지 약 12.5mM/CV이다. 상기 염액이 제공된 용리 완충액은 약 5 내지 약 10, 바람직하게는 약 6.6 내지 약 9, 및 가장 바람직하게는 약 6.9 내지 약 7.1의 pH를 갖는다. 나아가, 상기 용리 단계는 약 50°C 이하, 바람직하게는 약 35°C 이하, 보다 바람직하게는 약 2 내지 30°C, 보다 더 바람직하게는 약 15 내지 30°C 및 가장 바람직하게는 약 18 내지 25°C의 용리 온도에서 수행된다.

[0218]

상기 염액을 포함하는 용리 완충액은 AEX 수지 컬럼(AEX resin column)으로 도입되고(introduced) 약 300cm/hr 이하, 바람직하게는 약 10 내지 약 150cm/hr, 보다 바람직하게는 약 30 내지 약 100cm/hr, 보다 더 바람직하게는 약 50 내지 100cm/hr, 보다 더욱 바람직하게는 약 50 내지 70cm/hr, 보다 더더욱 바람직하게는 약 60 내지 65cm/hr, 및 가장 바람직하게는 약 60cm/hr의 선형 속도로 컬럼을 통해 흘려진다(flowed).

[0219]

AEX 수지로부터 용리액(eluent)을 수집하는 경우, 약 0.1 내지 5 컬럼 부피(CV), 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1 CV 부분들(CV fractions), 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 약 0.5 CV, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 내지 0.2 CV의 다수의 부피 부분들에서 용리액을 수집하는 것이 바람직하다. 따라서, 예를 들어, 100개의 분리된 부분들을 수집하여 다양한 CV 부분들을 수집할 수 있으며, 이 숫자는 AEX 수지를 통하여 나온(sent) 염액 및 용리 완충액의 총 양에 따라 작을 수도 있고 클 수도 있다. 상기 CV 부분들은 용리액이 유출구(통상적으로는 AEX 컬럼의 바닥부분)에서 수집됨에 따라 연속적으로 수집될 수 있다.

[0220]

수집된 CV 부분들 각각은 바람직하게는 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9와 같은 주어진 PEG화 단백질 이성체를 포함할 수 있다. 상기 수집된 CV 부분들에는 풀링 단계가 수행되어 어떠한 부분이 어떠한 PEG 단백질 이성체를 포함하는지를 판단할 수 있으며 이어서, 이렇게 수집된 원하는 PEG화 단백질 이성체들과 선택적으로 결합할 수 있도록 허용된다.

[0221]

### b. 풀링(Pooling)

[0222]

따라서, PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9와 같은 PEG화 단백질 이성체들의 분리된 양을 선택하기 위하여 상기 AEX 수지로부터 수집된 CV 부분들에 풀링 단계를 수행한다. 원하는 PEG화 단백질 이성체들을 선택적으로 모으기(pool) 위하여 다양한 분석 기술들이 사용될 수 있다. 이러한 기술들은, 이에 한정되지는 않지만, CE, SDS-PAGE, IEX 크로마토그래피(IEX chromatography), HIC 크로마토그래피(HIC chromatography), AEX 크로마토그래피(AEX chromatography), CEX 크로마토그래피(CEX chromatography), RPHPLC, SEHPLC, 친화 크로마토그래피(affinity chromatography(AC)), 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기

SDS-PAGE에 비하여 CE 또는 RPHPLC가 더 바람직하다. 또한, 이론에 얹매이지 않고, 상기 SDS-PAGE에 사용되는 시약(reagent)(즉, 소듐 도데실 살레이트(sodium dodecyl sulfate))은 형성된 응집물의 측정을 불명료하게 하는 것으로 알려져 있다. 상기 SDS-PAGE 분석(assay)에 사용되는 소듐 도데실 살레이트( SDS)는 응집물을 파괴하기 때문에 감소된 응집물의 양이 측정되게 하거나, 또는 응집물의 양이 측정되지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나, 상기 SDS-PAGE는 개개의 PEG화 단백질들을 펑거프린트(fingerprint)(즉, 수집된 부분의 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9의 질적(qualitative), 양적(quantitative) 조성을 판단(e.g., determining the PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 and PEG-9 qualitative and quantitative composition of a collected fraction))하는 데에는 성공적으로 사용될 수 있다. 풀링을 위하여 CE에 의한 분석이 수행되는 경우, 상기 분석은 약 5 내지 약 50°C, 바람직하게는 약 5 내지 약 45°C, 보다 바람직하게는 약 20 내지 약 40°C, 및 가장 바람직하게는 약 30 내지 약 32°C의 CE 온도에서 수행된다.

[0223] 또한, CE가 사용되는 경우, 상기 CE는 약 0 내지 약 60mS/cm 및 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 10mS/cm의 CE 풀링 전도도(샘플 부분의 전도도를 의미한다)에서 수행된다. 이어서, 상술한 CE 풀링 전도도 범위 내의 전도도를 갖는 샘플 부분은 PEG화 단백질 펑거프린팅(fingerprinting)을 위하여 CE 모세관(CE capillary)으로 도입된다. 이렇게 수득된 관련 CV 부분의 PEG화 단백질 이성체 펑거프린트를 표준 규격(reference standard)과 비교하여 샘플에 존재하는 특정 PEG화 단백질 이성체를 확인할 수 있게 된다.

[0224] 각 펑거프린트 피크(fingerprint peak)에 의하여 얻어진 면적 퍼센트(area percent)는 그 부분의 피크에 상응하는 이성체의 질량%(weight %)에 비례한다. 이어서, CE에 의하여 원하는 이성체의 질량 %로 원하는 PEG화 단백질 이성체를 포함하는 것으로 확인된 부분은 유사하게 선택된 다른 부분들과 선택적으로 혼합되어 원하는 이성체 혼합물(isoform mixture)을 수득한다. 이러한 처리로 API 조성물(API composition)을 수득할 수 있다.

[0225] 예를 들어, Swapan K. Chowdhury et al.,의 "Fingerprinting Proteins Coupled with Polymers by Mass Spectrometry: Investigation of Polyethylene Glycol-Conjugated Superoxide Dismutase." *American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 6, pp. 478-487, 1995를 참조하라.

[0226] 수집된 상기 CV 부분에 CE 분석(CE analysis)을 수행하기 위하여, 완충액에서의 PEG화 단백질의 농도는 각각 적어도 약 0.2mg/ml, 적어도 0.5mg/ml, 약 0.1 내지 약 100mg/ml, 약 0.5 내지 약 10mg/ml, 혹은 약 2 내지 3mg/ml이다. CE 또는 상술한 풀링을 위한 분석 기술들을 사용하여 다양한 PEG화 단백질 이성체들이 결합되어 원하는 PEG화 단백질 풀을 수득할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모아진(pooled) PEG화 단백질은 각각 하나 또는 그 이상의 PEG-1 내지 PEG-9, 하나 또는 그 이상의 PEG-2 내지 PEG-9, 하나 또는 그 이상의 PEG-3 내지 PEG-9, 하나 또는 그 이상의 PEG-3 내지 PEG-8, 하나 또는 그 이상의 PEG-3 내지 PEG-7, 하나 또는 그 이상의 PEG-3 내지 PEG-6, 하나 또는 그 이상의 PEG-4 내지 PEG-6, 하나 또는 그 이상의 PEG-4 및 PEG-5, 하나 또는 그 이상의 PEG-5 및 PEG-6, 및 PEG-5를 포함할 수 있다.

[0227] 상술한 풀들(pools) 중에서, PEG화 단백질의 다양한 풀들이 바람직하다(various pools of pegylated proteins are preferred). 예를 들어, PEG-4, PEG-5, 및 PEG-6의 풀에 있어서, 상기 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 풀은 특정 풀의 PEG화 단백질 이성체들의 총 중량에 대하여 적어도 70 중량%의 PEG-4, PEG-5, 및 PEG-6을 포함하는 것이어야 한다. 바람직하게, 상기 PEG-4, PEG-5, 및 PEG-6의 PEG화 단백질 부분은 상기 풀에 존재하는 PEG화 단백질 이성체들의 총 중량에 대하여 적어도 약 75 중량%이다. 이러한 값은 각각 적어도 80중량%, 적어도 85중량%, 적어도 90중량%, 적어도 94중량%, 적어도 95중량%, 적어도 96중량%, 적어도 97중량%, 적어도 98중량%, 적어도 99중량%, 적어도 99.5중량% 및 적어도 99.9중량%인 것이 바람직하다.

[0228] 풀링에 있어서, 상기 풀링은 CV 부분들에서 수집된 PEG화 단백질 이성체들에서 수행되며, 이 경우 상기 PEG화 단백질 이성체들은 완충액에 제공된다. 상기 PEG화 단백질 이성체들이 제공되어 있는 상기 완충액은 약 5 내지 약 10, 바람직하게는 약 6.6 내지 약 9, 및 더욱 바람직하게는 약 6.9 내지 약 7.1의 pH를 갖는다. 또한, 상기 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(Phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine) 및 히스티딘(histidine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있다.

[0229] 이 시점에서, 상술한 방법(하기의 실험예 1, 3 및 4에서도 논의될 것임)에 따라 처리된 모아진(pooled) PEG화 단백질 이성체들에 있어서, 모아진(pooled) 산물의 응집물 수준은 선택적인 단계 2 및 3을 포함하는 상술한 단계 1 내지 5가 수행된 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물의 총 중량에 대하여 약 10 중량% 이하이어야 한다. 바람직하게, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 각각 9중량%, 8중량%, 7중량%, 6중량%, 5중량%, 4중량%, 3중량%, 2중량%, 1.5중량%, 1중량%, 0.9중량%, 0.8중량%, 0.7중량%, 0.6중량%, 0.5중량%, 0.4중

량%, 0.3중량%, 0.2중량%, 0.1중량%, 0.05중량% 및 0.01중량%이다.

[0230] 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 및 PEG-8로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 PEG-7로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6으로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-4 및 PEG-5로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-5 및 PEG-6으로 이루어져 있다. 이렇게 모아진(so-pooled) PEG화 단백질은 바람직하게는 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-5로 이루어져 있다.

[0231] 상술한 풀링 방법(pooling methodology)은 상기 이성체들에 있어서 음이온 교환 크로마토그래피가 수행되었는지 여부와는 독립적으로 PEG화 단백질 이성체들을 풀링(pooling)하는 데에 사용될 수 있다.

[0232] 상기 PEG화 단백질이 PEG화 성장 호르몬 대항제(pegylated growth hormone antagonist)인 경우, 상기 응집물의 수준은 상기 풀 또는 수집된 CV 부분에 있어서 PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들 및 이들의 응집물의 총 중량에 대하여 약 6 중량% 이하인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 각각 약 5중량%, 4중량%, 3중량%, 2중량%, 및 1중량%이다. 또한, 상기 PEG화 단백질이 다양한 이성체들을 포함하는 PEG화 성장 호르몬 대항제인 경우, 트리설파이드 불순물, 데-프 불순물 및 응집물 합의 "총 수준(total level)"은 상기 풀 또는 수집된 CV 부분에 있어서 PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들, 트리설파이드 불순물, 데-프 불순물 및 응집물의 총 중량에 대하여 약 15 중량% 이하의 수준인 것이 바람직하다. 바람직하게 상술한 (트리설파이드 불순물, 데-프 불순물, 및 응집물의)의 총 수준은 각각 총 중량에 대하여 약 12중량%, 10중량%, 9중량%, 8중량%, 7중량%, 6중량%, 5중량%, 4중량%, 3중량%, 2중량% 및 1중량% 이하이다.

[0233] 또한 바람직하게, 상기 PEG화 단백질 성장 호르몬 대항제가 B-2036 PEG인 경우, 이의 폴리펩티드 골격(backbone)은 서열번호 1(SEQ. ID NO. 1.)의 B-2036이다. 이와 마찬가지로, 역시 바람직하게는, 상기 PEG화 단백질이 성장 호르몬 작용제인 경우, 이의 폴리펩티드 골격은 서열번호 2(SEQ. ID NO. 2.)의 폴리펩티드이다.

[0234] AEX 크로마토그래피 및 풀링(pooling)의 단계 4가 수행된 후, 추가의(follow-up) 초미세여과/투석여과 단계 5가 수행된다. 본 UF/DF 단계 5를 수행하기 위한 바람직한 조건들(parameters)은 실험예 1 및 플로우차트 1에 나타나 있다. 단계 5의 마지막에, 투석여과 풀(diafiltration pool)이 수집된다. 이후, 이러한 투석여과 풀에 상술한 투석여과 풀에서 얻어진 활동성 제약 성분을 취하고, 바람직하게는  $0.22\mu\text{m}$  필터를 통한 여과를 통해 이를 멸균하는 단계 6이 수행된다(This diafiltration pool is then subjected to step 6 which is to take the active pharmaceutical ingredients so obtained in the above-noted diafiltration pool and to sterilize it, preferably, by filtration through a  $0.22\mu\text{m}$  filter). 상기 API 여과 단계 6을 수행하기 위한 적합한 조건들은 실험예 1 및 플로우차트 1에 나타나 있다.

[0235] 마지막으로, 본 명세서의 청구항에서 청구되는 음이온 교환수지 크로마토그래피 단계를 사용하는 바람직한 과정은 상술한 각 단계 1 내지 6의 세세한 부분들을 자세히 기술하며 하기 실험예 1에 나타나 있다. 비교의 목적으로, 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 적절한 완충액 교환 단계(appropriate buffer exchange step)와 함께 양이온 교환 크로마토그래피 단계(cation exchange chromatography step)로 대체된 비교 실험예 2가 나타나 있다. 상기 실험예 2의 과정에 따른 결과는 표 2에 나타나 있으며, 표 2에 있어서, 응집물의 수준은 약 60 중량%의 응집물 정도로 높은 수준부터 아래로 약 6 중량% 응집물의 범위를 갖는다. 실험예 3은 실험예 1, 및 플로우차트 1의 과정 또는 CE 분석 기술과 비교되는 분석 기술로서 RPHPLC가 사용되는 실험예 2 및 플로우차트 2의 과정에 적용할 수 있는 풀링 방법(pooling methodology)을 설명하고 있다. 도 2, 3 및 4는 RPHPLC가 CE와 동등함을 보여주고 있다. 실험예 4는 CE 분석 기술에 바람직한 과정들을 설명하고 있다.

## 실시예

- [0236] 1. (a) PEG화 단백질 이성체들을 제공하는 단계; 및
- [0237] (b) 응집물 수준을 감소시킬 수 있는 충분한 조건들 하에서 음이온 교환 수지를 사용하는 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 상기 PEG화 단백질 이성체들을 분리하여 상기 응집물의 수준을 감소시키는 단계를 포함하는 PEG화 단백질 이성체의 응집물의 수준을 감소시키기 위한 공정.
- [0238] 2. 제1 실시예에 있어서, 상기 (a)단계는
- [0239] (a1) 상기 단백질의 PEG화되지 않은 형태(form) 또는 부분적으로 PEG화된 형태를 PEG화하거나, 또는 상기 단백질의 PEG화되지 않은 형태 및 부분적으로 PEG화된 형태 모두를 PEG화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0240] 3. 제2 실시예에 있어서, 상기 (a1)단계는 PEG-N-하이드록시숙신이미드-5K(PEG-N-hydroxysuccinimide-5K), PEG-숙신이미딜 카보네이트-5K(PEG-succinimidyl carbonate-5K), PEG-숙신이미딜 프로피오네이트-5K(PEG-succinimidyl propionate-5K), PEG2-말레미드-40K ( $2 \times 20K$ )(PEG2-maleimide-40K( $2 \times 20K$ )), PEG2-N-하이드록시숙시미드-40K ( $2 \times 20K$ )(PEG2-N-hydroxysuccimide-40K( $2 \times 20K$ )) 및 PEG2-알데히드-40K ( $2 \times 20K$ )(PEG2-aldehyde-40K( $2 \times 20K$ ))로 이루어진 군으로부터 선택된 자유 PEG를 사용하여 PEG화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0241] 4. 제3 실시예에 있어서, 상기 PEG화되지 않은 단백질에 대한 상기 자유 PEG의 화학량적 질량비는 약 0.5 내지 약 100인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0242] 5. 제4 실시예에 있어서, 상기 화학량적 질량비는 약 1.5 내지 약 2.5인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0243] 6. 제5 실시예에 있어서, 상기 화학량적 질량비는 약 1.9 내지 약 2인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0244] 7. 제6 실시예에 있어서, 상기 화학량적 질량비는 약 1.95 내지 약 2.05인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0245] 8. 제2 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단계 (a1)은 약 3 내지 약 10의 PEG화 pH에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0246] 9. 제8 실시예에 있어서, 상기 PEG화 pH는 약 7.2 내지 약 7.8인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0247] 10. 제9 실시예에 있어서, 상기 PEG화 pH는 약 7.4 내지 약 7.8 인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0248] 11. 제10 실시예에 있어서, 상기 PEG화 pH는 약 7.40 내지 약 7.80 인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0249] 12. 제2 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단계 (a1)은 약 0 내지 약 40°C의 PEG화 온도에서 수행되는

것을 특징으로 하는 공정.

[0250] 13. 제12 실시예에 있어서, 상기 PEG화 온도는 약 10 내지 약 30°C인 것을 특징으로 하는 공정.

[0251] 14. 제13 실시예에 있어서, 상기 PEG화 온도는 약 18 내지 약 25°C인 것을 특징으로 하는 공정.

[0252] 15. 제1 실시예에 있어서, HIC 수지를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)(HIC)에 의하여 상기 PEG화 단백질을 선택(select)하는 선택적인(optional) HIC 단계 (a2)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0253] 16. 제2 실시예에 있어서, HIC 수지를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography)(HIC)에 의하여 상기 PEG화 단백질을 선택(select)하는 선택적인(optional) HIC 단계 (a2)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0254] 17. 제16 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)는 상기 HIC 수지의 농축 충전-부피의 리터 당 약 10g 단백질 이하의 HIC 로드로 상기 PEG화 단백질 및 PEG화되지 않은 단백질을 상기 HIC 수지에 로딩하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0255] 18. 제17 실시예에 있어서, 상기 HIC 로드는 상기 HIC 수지의 농축 충전-부피 리터당 약 5g 단백질 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0256] 19. 제18 실시예에 있어서, 상기 HIC 로드는 상기 HIC 수지의 농축 충전-부피 리터당 약 4.1g 단백질 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0257] 20. 제17 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)에서, 상기 로딩은 약 30 내지 약 60mS/cm의 HIC 로딩 전도도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0258] 21. 제20 실시예에 있어서, 상기 HIC 로딩 전도도는 약 40 내지 약 52mS/cm인 것을 특징으로 하는 공정.

[0259] 22. 제21 실시예에 있어서, 상기 HIC 로딩 전도도는 약 45 내지 약 51mS/cm인 것을 특징으로 하는 공정.

[0260] 23. 제17 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)는 약 10 내지 약 40°C의 HIC 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0261] 24. 제23 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)는 약 15 내지 약 30°C의 HIC 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0262] 25. 제24 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)는 약 18 내지 약 25°C의 HIC 온도에서 수행되는 것

을 특징으로 하는 공정.

[0263] 26. 제16 실시예에 있어서, 상기 HIC 단계 (a2)로부터의 용리액(eluent)을 초미세여과/투석여과(UF/DF#3)하는 UF/DF#3 단계 (a3)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0264] 27. 제26 실시예에 있어서, 상기 UF/DF#3 단계 (a3)는 약 3kDa 내지 약 20kDa의 UF/DF#3 막 분자량 차단(UF/DF#3 membrane molecular weight cut-off(MWCO))을 갖는 UF/DF#3 막을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0265] 28. 제27 실시예에 있어서, 상기 UF/DF#3 막 MWCO는 약 8kDa 내지 약 15kDa인 것을 특징으로 하는 공정.

[0266] 29. 제28 실시예에 있어서, 상기 UF/DF#3 막 MWCO는 약 10kDa 내지 약 12kDa인 것을 특징으로 하는 공정.

[0267] 30. 제29 실시예에 있어서, 상기 UF/DF#3 막 MWCO는 약 10kDa인 것을 특징으로 하는 공정.

[0268] 31. 제1 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는

[0269] (b1) 불순물 및 응집물을 포함하는 상기 PEG화 단백질을 상기 음이온 교환(AEX) 수지에 로딩하여 로드된 PEG화 단백질을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0270] 32. 제31 실시예에 있어서, 상기 AEX 수지는 ANX4, DEAE, Q-Sepharose, Q-Sepharose FF, Q-Sepharose HP 및 Q-Sepharose XL로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0271] 33. 제32 실시예에 있어서, 상기 AEX 수지는 Q-Sepharose FF인 것을 특징으로 하는 공정.

[0272] 34. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b1)단계는 약 10mS/cm 이하의 AEX 로딩 전도도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0273] 35. 제34 실시예에 있어서, 상기 AEX 로딩 전도도는 약 5mS/cm 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0274] 36. 제35 실시예에 있어서, 상기 AEX 로딩 전도도는 약 2.4mS/cm 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0275] 37. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b1)단계는 약 5 내지 약 10의 AEX 로딩 pH(AEX loading pH)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0276] 38. 제37 실시예에 있어서, 상기 AEX 로딩 pH는 약 6.6 내지 약 9인 것을 특징으로 하는 공정.

- [0277] 39. 제38 실시예에 있어서, 상기 AEX 로딩 pH는 약 6.9 내지 약 7.1인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0278] 40. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b1)단계는 상기 AEX 수지의 농축 충전-부피의 리터 당 약 10g 단백질 이하의 불순물 및 상기 응집물을 포함하는 PEG화 단백질의 AEX 로드로 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0279] 41. 제40 실시예에 있어서, 상기 AEX 로드는 상기 AEX 수지의 농축 충전-부피 리터당 약 5.5g 단백질 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0280] 42. 제40 실시예에 있어서, 상기 AEX 로드는 상기 AEX 수지의 농축 충전-부피 리터당 약 4.1g 단백질 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0281] 43. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0282] 44. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0283] 45. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0284] 46. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0285] 47. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0286] 48. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0287] 49. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물 및 자유 PEG 분자들을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0288] 50. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체

PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물 및 상기 단백질의 PEG화되지 않은 불순물을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0289] 51. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9 및 이의 응집물, 트리설파이드 불순물 및 데-프 불순물을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0290] 52. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9 및 이의 응집물 및 트리설파이드 불순물을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0291] 53. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 상기 PEG화 단백질 이성체 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8, 및 PEG-9 및 이의 응집물을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0292] 54. 제1 실시예에 있어서, (c) 모세관 전기영동(CE), 소듐 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 젤 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 전기영동(SDS-PAGE), 이온 교환(IEX) 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피, 역-상 고압 액체 크로마토그래피(RPHPLC), 크기별 배제 고압 액체 크로마토그래피(SEHPLC), 친화 크로마토그래피(AC) 및 이들의 조합(combinations)들로 이루어진 군으로부터 선택된 기술에 의하여 상기 PEG화 단백질 이성체들의 이산 양(discrete amounts)을 풀링하여 모아진(pooled) PEG화 단백질을 수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0293] 55. 제42 실시예에 있어서, (c) 모세관 전기영동(CE), 소듐 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 젤 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 전기영동(SDS-PAGE), 이온 교환(IEX) 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피, 역-상 고압 액체 크로마토그래피(RPHPLC), 크기별 배제 고압 액체 크로마토그래피(SEHPLC), 친화 크로마토그래피(AC) 및 이들의 조합(combinations)들로 이루어진 군으로부터 선택된 기술에 의하여 상기 PEG화 단백질 이성체들의 이산 양(discrete amounts)을 풀링하여 모아진(pooled) PEG화 단백질을 수득하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0294] 56. 제54 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 약 5 내지 약 50°C의 CE 온도에서 CE에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0295] 57. 제55 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 약 5 내지 약 50°C의 CE 온도에서 CE에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0296] 58. 제56 실시예에 있어서, 상기 CE 온도는 약 5 내지 약 45°C인 것을 특징으로 하는 공정.

[0297] 59. 제58 실시예에 있어서, 상기 CE 온도는 약 20 내지 약 40°C인 것을 특징으로 하는 공정.

[0298] 60. 제59 실시예에 있어서, 상기 CE 온도는 약 30 내지 약 32°C인 것을 특징으로 하는 공정.

[0299] 61. 제56 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 약 0 내지 약 60mS/cm의 CE 풀링 전도도에서 CE에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0300] 62. 제61 실시예에 있어서, 상기 CE 풀링 전도도는 약 5 내지 약 10mS/cm인 것을 특징으로 하는 공정.

[0301] 63. 제54 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 적어도 약 0.2mg/ml의 단백질 농도로 완충액에 제공된 상기 PEG화 단백질 이성체들에 대하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0302] 64. 제56 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 적어도 약 0.5mg/ml의 단백질 농도로 완충액에 제공된 상기 PEG화 단백질 이성체들에 대하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0303] 65. 제54 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 약 0.1 내지 100mg/ml의 단백질 농도로 완충액에 제공된 상기 PEG화 단백질 이성체들에 대하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0304] 66. 제65 실시예에 있어서, 상기 단백질 농도는 약 0.5 내지 약 10mg/ml인 것을 특징으로 하는 공정.

[0305] 67. 제66 실시예에 있어서, 상기 단백질 농도는 약 2 내지 약 3mg/ml인 것을 특징으로 하는 공정.

[0306] 68. 제56 실시예에 있어서, 상기 풀링 단계 (c)는 약 0.1 내지 100mg/ml의 단백질 농도로 완충액에 제공된 상기 PEG화 단백질 이성체들에 대하여 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0307] 69. 제67 실시예에 있어서, 상기 단백질 농도는 약 0.5 내지 약 10mg/ml인 것을 특징으로 하는 공정.

[0308] 70. 제68 실시예에 있어서, 상기 단백질 농도는 약 2 내지 약 3mg/ml인 것을 특징으로 하는 공정.

[0309] 71. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0310] 72. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0311] 73. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0312]

74. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 및 PEG-8을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0313]

75. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 PEG-7을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0314]

76. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0315]

77. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0316]

78. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-4 및 PEG-5를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0317]

79. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 하나 또는 그 이상의 PEG-5 및 PEG-6을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0318]

80. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 PEG-5를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0319]

81. 제71 실시예에 있어서, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 모아진(pooled) PEG화 단백질 부분은 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물 총 중량에 대하여 적어도 약 70 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0320]

82. 제71 실시예에 있어서, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 모아진(pooled) PEG화 단백질 부분은 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물 총 중량에 대하여 적어도 약 75 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0321]

83. 제71 실시예에 있어서, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 모아진(pooled) PEG화 단백질 부분은 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물 총 중량에 대하여 적어도 약 80 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0322]

84. 제71 실시예에 있어서, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 모아진(pooled) PEG화 단백질 부분은 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물 총 중량에 대하여 적어도 약 90 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0323]

85. 제71 실시예에 있어서, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 모아진(pooled) PEG화 단백질 부분은 상기 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9 PEG화 단백질 이성체들 및 이들의 응집물 총 중량에 대하여 적어도 약 94 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0324]

86. 제64 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질이 제공된 상기 완충액은 약 5 내지 약 10의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0325]

87. 제86 실시예에 있어서, 상기 완충액은 약 6.6 내지 약 9의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0326]

88. 제87 실시예에 있어서, 상기 완충액은 약 6.9 내지 약 7.1의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0327]

89. 제64 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질이 제공된 상기 완충액은 트리스(Tris), 포스페이트(phosphate), HEPES, 시트르산(citric acid), 트리에틸아민(triethylamine), 및 히스티딘(histidine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0328]

90. 제1 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 이성체들 및 상기 응집물의 총 중량에 대하여 약 10 중량% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0329]

91. 제90 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 9% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0330]

92. 제91 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 8% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0331]

93. 제92 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 7% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0332]

94. 제93 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 6% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0333]

95. 제94 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 5% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0334]

96. 제95 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 4% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0335]

97. 제96 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 3% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

[0336]

98. 제97 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 2% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

- [0337] 99. 제98 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 1.5% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0338] 100. 제99 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 1% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0339] 101. 제100 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.9% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0340] 102. 제101 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.8% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0341] 103. 제102 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.7% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0342] 104. 제103 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.6% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0343] 105. 제104 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.5% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0344] 106. 제105 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.4% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0345] 107. 제106 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.3% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0346] 108. 제107 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.2% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0347] 109. 제108 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.1% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0348] 110. 제109 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.05% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0349] 111. 제110 실시예에 있어서, 상기 응집물의 수준은 상기 총 중량에 대하여 약 0.01% 이하인 것을 특징으로 하는 공정.

- [0350] 112. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는
- [0351] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,
- [0352] (b3) pH 변화도 또는 이온 강도의 변화도에 의하여 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리 용액(eluting solution)으로 용리하는 단계, 및
- [0353] (b4) 복수의 부피 부분들(multiple volume fractions)에서의 용리액(eluent)을 수집하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0354] 113. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는
- [0355] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,
- [0356] (b3) 상기 AEX 수지로부터 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리시키기에 충분한 염 농도 변화도(salt concentration gradient)의 이온 염을 포함하는 용리 완충액에서 염 용액(salt solution)으로 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0357] 114. 제113 실시예에 있어서, 상기 이온 염은 염화물 염(chloride salt)인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0358] 115. 제114 실시예에 있어서, 상기 이온 염은 NaCl인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0359] 116. 제115 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는 컬럼 부피(CV)를 갖는 컬럼에서 수행되며, 상기 염 농도 변화도는 1 CV 당 약 2 내지 약 50mM인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0360] 117. 제116 실시예에 있어서, 상기 염 농도 변화도는 1CV 당 약 5 내지 25mM인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0361] 118. 제117 실시예에 있어서, 상기 염 농도 변화도는 1CV 당 약 10 내지 약 20mM인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0362] 119. 제113 실시예에 있어서, 상기 용리 완충액은 약 5 내지 약 10의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0363] 120. 제119 실시예에 있어서, 상기 용리 완충액은 약 6.6 내지 약 9의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0364] 121. 제120 실시예에 있어서, 상기 용리 완충액은 약 6.9 내지 약 7.1의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0365] 122. 제113 실시예에 있어서, 상기 용리 단계 (b3)는 50°C 이하의 용리 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 공정.

- [0366] 123. 제122 실시예에 있어서, 상기 용리 온도는 35°C 이하인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0367] 124. 제123 실시예에 있어서, 상기 용리 온도는 2 내지 30°C인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0368] 125. 제123 실시예에 있어서, 상기 용리 온도는 15 내지 30°C인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0369] 126. 제123 실시예에 있어서, 상기 용리 온도는 18 내지 25°C인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0370] 127. 제113 실시예에 있어서, 상기 단계 (b)는 컬럼에서 수행되며, 상기 용리 완충액은 상기 컬럼을 통하여 약 300cm/hr 이하의 선형속도를 갖는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0371] 128. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 10 내지 약 150cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0372] 129. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 30 내지 약 150cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0373] 130. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 50 내지 약 100cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0374] 131. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 50 내지 약 70cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0375] 132. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 60 내지 약 65cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0376] 133. 제127 실시예에 있어서, 상기 선형 속도는 약 60cm/hr인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0377] 134. 제1 실시예에 있어서, 상기 PEG화 단백질은 호르몬, 성장 호르몬, 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 대항제, 인간 성장 호르몬 대항제, 항체 및 B-2036 PEG로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0378] 135. 제1 실시예에 있어서, 상기 음이온 교환(AEX) 수지는 1차, 2차, 3차, 4차 아민들 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0379] 136. 제1 실시예에 있어서, 상기 음이온 교환(AEX) 수지는 디에틸아미노에틸(diethylaminoethyl), 디에틸아미노프로필(diethylaminopropyl), 디메틸에탄올아민(dimethylethanolamine), 트리메틸-암모늄-에틸(trimethyl-ammonium-ethyl), 트리메틸벤질 암모늄(trimethylbenzyl ammonium), 디메틸에탄올 벤질(dimethylethanol benzyl) 및 폴리아민(polyamine) 작용기들로 이루어진 군으로부터 선택된 작용기를 포함하는

것을 특징으로 하는 공정.

[0380] 137. 제1 실시예에 있어서, 상기 음이온 교환(AEX) 수지는 친수성 폴리에테르(hydrophilic polyether), 가교결합된 디비닐 벤젠 폴리스티렌(crosslinked divinyl benzene polystyrene), 가교결합된 아가로즈(crosslinked agarose), 폴리프로필렌(polypropylene), 친수성 아크릴아미도비닐(hydrophilic acrylamidovinyl), 메타크릴릭(methacrylic), 세라믹 비드 베이스와 중합된 하이드로겔(polymerized hydrogel with a ceramic bead base), 실리카-덱스트란 물질 복합물(composite silica-dextran material), 폴리머 그레이프트 실리카(polymer grafted silica), 디비닐 벤젠 스티렌(divinyl benzene styrene), 디비닐 벤젠 폴리아크릴릭(divinyl benzene polyacrylic), 가교결합된 셀룰로즈(crosslinked cellulose), 메타아크릴레이트 공중합체(co-polymer methacrylate), 폴리스티렌(polystyrene), 아크릴릭(acrylic), G5000 친수성 겔(G5000 hydrophilic gel) 및 셀룰로즈(cellulose)로 이루어진 군으로부터 선택된 지지 물질(support material)을 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0381] 138. 제1 실시예에 있어서, 상기 음이온 교환(AEX) 수지는 다공성(macroporous) 수지를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0382] 139. 제1 실시예에 있어서, 상기 음이온 교환(AEX) 수지는 겔형(gel) 수지를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0383] 140. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0384] 141. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0385] 142. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0386] 143. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, 및 PEG-8로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0387] 144. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 PEG-7로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0388] 145. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5 및 PEG-6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0389] 146. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0390] 147. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의

PEG-4 및 PEG-5로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0391] 148. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 하나 또는 그 이상의 PEG-5 및 PEG-6으로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0392] 149. 제63 실시예에 있어서, 상기 모아진(pooled) PEG화 단백질은 필수적으로 PEG-5로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정.

[0393] 150. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는 컬럼 부피(CV)를 갖는 컬럼에서 수행되며, 또한 상기 (b)단계는

[0394] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,

[0395] (b3) pH 변화도 또는 이온 강도의 변화도에 의하여 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리 용액(eluting solution)으로 용리하는 단계, 및

[0396] (b4) 복수의 부피 부분들(multiple volume fractions)에서의 용리액(eluent)을 약 0.1 내지 약 5의 컬럼 부피(CV)로부터 수집하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0397] 151. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는 컬럼 부피(CV)를 갖는 컬럼에서 수행되며, 또한 상기 (b)단계는

[0398] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,

[0399] (b3) pH 변화도 또는 이온 강도의 변화도에 의하여 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리 용액(eluting solution)으로 용리하는 단계, 및

[0400] (b4) 복수의 부피 부분들(multiple volume fractions)에서의 용리액(eluent)을 약 0.1 내지 약 1의 컬럼 부피(CV)로부터 수집하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0401] 152. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는 컬럼 부피(CV)를 갖는 컬럼에서 수행되며, 또한 상기 (b)단계는

[0402] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,

[0403] (b3) pH 변화도 또는 이온 강도의 변화도에 의하여 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리 용액(eluting solution)으로 용리하는 단계, 및

[0404] (b4) 복수의 부피 부분들(multiple volume fractions)에서의 용리액(eluent)을 약 0.1 내지 약 0.5의 컬럼 부피(CV)로부터 수집하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

[0405] 153. 제31 실시예에 있어서, 상기 (b)단계는 컬럼 부피(CV)를 갖는 컬럼에서 수행되며, 또한 상기 (b)단계는

[0406] (b2) 상기 로드된 PEG화 단백질을 세척하고 이어서,

[0407] (b3) pH 변화도 또는 이온 강도의 변화도에 의하여 상기 로드된 PEG화 단백질을 용리 용액(eluting solution)으로 용리하는 단계, 및

[0408] (b4) 복수의 부피 부분들(multiple volume fractions)에서의 용리액(eluent)을 약 0.1 내지 약 0.2의 컬럼 부피(CV)로부터 수집하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공정.

- [0409] 154. 제113 실시예에 있어서, 상기 이온 염은 NaCl, 리튬 클로라이드(lithium chloride), Na 포스페이트(Na phosphate), Na 살레이트(Na sulfate), 암모늄 클로라이드(ammonium chloride), 암모늄 살레이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), KI 및 KCl로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정.
- [0410] 155. 제118 실시예에 있어서, 상기 염 농도 변화도는 1CV 당 약 10 내지 약 12.5mM인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0411] 156. (a) 모세관 전기영동(CE), 소듐 도데실 살레이트-폴리아크릴아미드 젤(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 전기영동(SDS-PAGE), 이온 교환(IEX) 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피, 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피, 역-상 고압 액체 크로마토그래피(RPHPLC), 크기별 배제 고압 액체 크로마토그래피(SEHPLC), 친화 크로마토그래피(AC) 및 이들의 조합(combinations)들로 이루어진 군으로부터 선택된 기술에 의하여 상기 PEG화 단백질 이성체들을 분리 및 수집하는 단계를 포함하는 PEG화 단백질 이성체들을 풀링하기 위한 공정.
- [0412] 157. 제140 실시예에 있어서, 상기 기술은 RPHPLC 또는 CE인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0413] 158. (a) PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들을 제공하는 단계; 및
- [0414] (b) 응집물 수준을 감소시키기에 충분한 조건들 하에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 음이온 교환(AEX) 수지 상의 상기 PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들을 분리하여 상기 응집물의 수준을 총 중량의 약 6 중량% 이하로 감소시키는 단계를 포함하는 이성체들 및 응집물의 총 중량을 갖는 PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체의 응집물의 수준을 감소시키기 위한 공정.
- [0415] 159. 제158 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 응집물의 수준을 약 5 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.
- [0416] 160. 제158 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 응집물의 수준을 약 4 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.
- [0417] 161. 제158 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 응집물의 수준을 약 3 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.
- [0418] 162. 제158 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 응집물의 수준을 약 2 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.
- [0419] 163. 제158 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 응집물의 수준을 약 1 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.
- [0420] 164. (a) PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들을 제공하는 단계; 및
- [0421] (b) 트리설파이드 불순물, 데-프 불순물 및 응집물의 총 수준을 감소시키기에 충분한 조건들 하에서 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 음이온 교환(AEX) 수지 상의 상기 PEG화 성장 호르몬 대항제 이성체들을 분리하여 상기 응집물의 수준을 약 1 중량% 이하로 감소시키기 위한 공정.

리하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 총 중량에 대하여 약 15 중량% 이하로 감소시키는 단계를 포함하는 이성체들, 불순물들 및 응집물의 총 중량을 갖는 PEG화 성장 호르몬 대항체 이성체의 트리설파이드 불순물, 데-프 불순물 및 응집물의 총량의 수준을 감소시키기 위한 공정.

[0422]

165. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 12 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0423]

166. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 10 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0424]

167. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 9 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0425]

168. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 8 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0426]

169. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 7 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0427]

170. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 6 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0428]

171. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 5 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0429]

172. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 4 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0430]

173. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 3 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0431]

174. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 2 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는

공정.

[0432] 175. 제164 실시예에 있어서, 상기 조건들은 상기 총 중량에 대하여 상기 트리설파이드 불순물, 상기 데-프 불순물 및 상기 응집물의 총 수준을 약 1 중량% 이하로 감소시키기에 충분한 것을 특징으로 하는 공정.

[0433] 176. 제134 실시예에 있어서, 상기 성장 호르몬 대항제는 B-2036 PEG이며, 상기 B-2036 PEG는 [서열 번호 1]의 성장 호르몬 대항제 폴리펩티드 골격을 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0434] 177. 제134 실시예에 있어서, 상기 성장 호르몬은 [서열번호 2]의 폴리펩티드의 PEG화 형태인 것을 특징으로 하는 공정.

[0435] 178. 제137 실시예에 있어서, 상기 지지 물질은 약 10 내지 500 $\mu$ m의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0436] 179. 제178 실시예에 있어서, 상기 직경은 약 90 $\mu$ m의 평균값을 갖는 것을 특징으로 하는 공정.

[0437] 180. (a) PEG화 단백질 이성체들을 선택된 이성체들로 분리하는 단계; 및

[0438] (b) 상기 선택된 이성체들을 결합하여 상기 선택된 이성체들의 농축(enriched) 풀을 수득하는 단계를 포함하는 PEG화 단백질 이성체를 풀링하기 위한 공정.

[0439] 181. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 ((PEG-4+ PEG-5+ PEG-6의 제1 중량)/(상기 농축 풀에 존재하는 PEG-1+ PEG-2+ PEG-3+ PEG-4+ PEG-5+ PEG-6+ PEG-7+ PEG-8+ PEG-9의 제2 중량))의 풀 중량 비를 갖는 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6이며, 상기 풀 중량 비는 약 70 중량% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0440] 182. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 75% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0441] 183. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 80% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0442] 184. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 85% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0443] 185. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 90% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0444] 186. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 94% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

[0445] 187. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 95% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.

- [0446] 188. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 96% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0447] 189. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 97% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0448] 190. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 98% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0449] 191. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 99% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0450] 192. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 99.5% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0451] 193. 제181 실시예에 있어서, 상기 풀 중량 비는 약 99.9% 이상인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0452] 194. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0453] 195. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0454] 196. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0455] 197. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0456] 198. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7 및 PEG-8인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0457] 199. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5, PEG-6 및 PEG-7인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0458] 200. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0459] 201. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4 및 PEG-5인 것을 특징으로 하는 공정.
- [0460] 202. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-5 및 PEG-6인 것을 특징으로 하는 공정.

[0461] 203. 제180 실시예에 있어서, 상기 선택된 이성체들은 하나 또는 그 이상의 PEG-4 및 PEG-6인 것을 특징으로 하는 공정.

[0462] 204. (a) 선택된 PEG화 단백질 이성체를 혼합물로부터 분리하는 단계를 포함하는 적어도 두 개의 PEG화 단백질 이성체들의 혼합물로부터 선택된 PEG화 단백질 이성체를 수득하기 위한 공정.

[0463] 205. (a) 적어도 하나의 부분에 있어서 PEG화되지 않은 B-2036 및 PEG화 B-2036 이성체들에 대하여 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 제1 부분 중량비는 적어도 다른 하나의 부분에 있어서 PEG화되지 않은 B-2036 및 PEG화 B-2036 이성체들에 대한 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6의 제2 부분 중량비와는 다르고, 출발 조성물(starting composition)을 다수의 부분들로 분리하는 단계,

[0464] (b) 각 부분들(each fractions)의 나머지의, 또는 부분들의 샘플링(sampling of fractions)에 있어서, PEG화되지 않은 B-2036 및 PEG화 B-2036 이성체들에 대한 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 이성체들의 중량비를 판단하는 단계, 및

[0465] (c) 상기 PEG화되지 않은 B-2036 및 PEG화 B-2036 이성체들에 대하여 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 이성체들의 농축(enriched) 부분 중량비는 출발 조성물에서보다 상기 농축 조성물에서 더 크고, 상기 부분들의 모두보다 적게 선택적으로 결합하여 상기 농축 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 PEG화되지 않은 B-2036 및 PEG-1, PEG-2, PEG-3, PEG-4, PEG-5, PEG-6, PEG-7, PEG-8 및 PEG-9로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 PEG화 이성체들을 포함하는 출발 조성물로부터 농축 조성물을 제조하기 위한 공정.

[0466] 본 명세서에 있어서 모든 수치 및 명시된 분자들은 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 한정하기 위한 것이 아니다. 이하 설명하는 내용들은 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명이 이에 한정되어 해석되어서는 안될 것이다. 본 명세서에서 언급된 책, 학술지, 신문기사, 특히 또는 그 밖의 출판물 등에 대한 인용들은 참조문헌으로서 본 명세서에 명백히 포함되어 있다.

## 4. 실험예

### 4.1. 실험예 1

[0469] 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 PEG화 성장 호르몬 대항제(B-2036-PEG)의 응집물 수준의 유지 또는 감소 (Maintain or Decrease Level of Aggregate of Pegylated Growth Hormone Antagonist (B-2036-PEG) by Anion Exchange Chromatography)

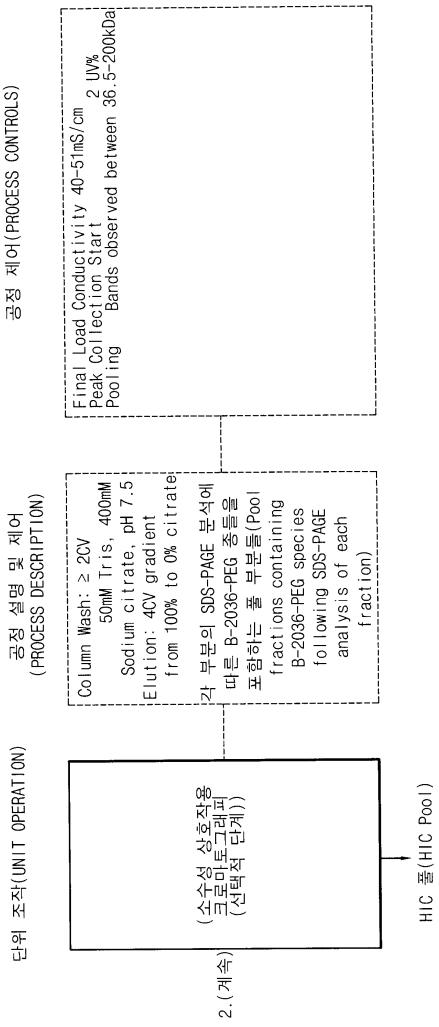
[0470] B-2036 PEG 응집물 수준의 유지(원하는 수준 이하로- 즉, 총 중량의 6중량% 이하로) 또는 감소는 미국 특허청에 2003년 8월 25일에 출원된 미합중국 특허 출원 가출원번호 제P-107,891호 "성장 호르몬 및 낮은 수준의 이성체 불순물들을 포함하는 성장호르몬의 대항제 제조 방법"에 나타난 바와 같이 제조된 BI(벌크 중간체 B-2036)를 출발물질(starting material)로 사용하여 달성될 수 있었다. (B-2036을 수득하기 위한) 발효(fermentation)는 Cunningham et al.의 미합중국 특허 제5,849,535호에 나타난 바와 같이 재조합 대장균 발현 시스템(recombinant *E. coli* expression system)에서 수행되었다. B-2036 BI의 정제는 상기 미합중국 특허 출원 제(P-107,891)호에 나타난 바와 같이 수행되었다. 이어서, 이 물질을 하기의 플로우차트 1에 나타난 바와 같이 초기 PEG화(initial pegylation) 및 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography) 단계를 사용하여 처리함에 따라 B-2036 PEG가 생산되었다. 상기 소수성 상호작용 크로마토그래피(단계 2)에 따르면, 상기 B-2036 PEG는 pH 7, 25mM의 트리스(TRIS) 완충액(실험에 2, 단계 3, 플로우차트 2의 공정에서와 같이 pH 4의 소듐 아세테이트(sodium acetate) 완충액 대신)으로 UF/DF되었다. 이어서, 이러한 보존물(retentate)에 Q Sepharose FF 컬럼 강 음이온 교환 크로마토그래피(Q Sepharose FF column strong anion exchange chromatography)가 수행된다. 본 단계는 각각 다르게 PEG화된 종들(species)을 풀링을 위한 부분들로 분리하여 API 방출(API release)에 요구되는 PEG화 종들의 분포(distribution)를 얻을 수 있다. 본 컬럼은 PEG화 BI(B-2036 PEG)의 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 산물들을 농축시킨다. 상기 산물은 25mM의 트리스(Tris)에 있어서 0 내지 250mM의 NaCl로부터의 20 CV 선형 변화도, pH 7.0 이어서 계속되는 평형 형성 단계 및 pH

7.0, 25mM 트리스를 사용한 2 CV 세척에 의하여 용리된다(The product is eluted with a 20 CV linear gradient from 0-250 mM NaCl in 25mM Tris, pH 7.0 following equilibration steps and a 2 CV wash with 25mM Tris, pH 7.0). 상기 부분들(fractions)의 분석은 실험에 2, 플로우차트 2에 나타난 바와 같이 SDS-PAGE 대신 CE를 사용하여 수행된다. 이와 관련된 이전의 논의를 참조하라. 폐그비소만트(Somavert? ; Pharmacia)가 크로마토그래피 프로파일로부터 75% 이상의 PEG4+5+6(제1 부분) 및 94% 이상의 PEG4+5+6(마지막 부분) 및 0.5mg/mL 이상의 풀링 기준(pooling criteria)의 CE에 의하여 분석된 부분들로부터의 풀로서 수집된다. 이후, 플로우차트 1에 나타난 바와 같이, 상기 결과물은 상기 B-2036 정제 공정의 나머지를 통하여 처리되었다(carried through the remainder of the B-2036 purification process). 상기 부분들(fractions)의 선택 및 풀링(pooling) 후, 상기 모아진(pooled) 물질 및 최종 API를 SEHPLC에 의해 분석한 경우, 어떠한 탐지 가능한 응집물도 발견되지 않았다. 이와 관련하여 아래의 표1을 참조하라.

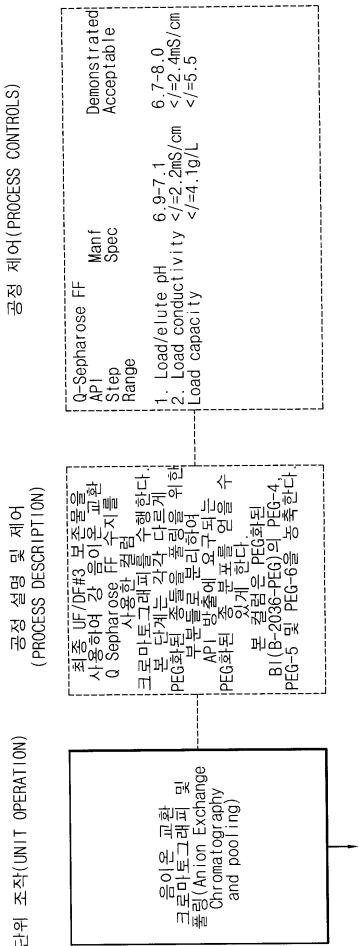
단위 조작(UNIT OPERATION)	음이온 교환 수지(Anion Exchange Resin)를 이용한 공정 (PROCESS DESCRIPTION)	공정 제어(PROCESS CONTROLS)		
		Manf Spec	Demonstrated Acceptable	
	<p>단계별로부터의 B-2036을 20g/gexcess of the PEGylation reagent, N-hydroxysuccinimidyl ester of methoxy (methoxylene glycol) propionic acid, MW 5000 (m-SPA-5000) in 100mM Hapes pH 7.65를 사용하여 PEG화합니다. 상기 PEG화된 상물을 상기 인리스스풀을 60-90분 동안 약 5000PSI의 반응시킨다. PH = 7.65 in B-2036 UF /D#2 buffer</p> <p>PEG화(PEGylation)</p>	<p>API Step Range</p> <p>PEGylation</p> <p>1. Temperature - low &amp; high 18-25° C</p> <p>2. pH - low &amp; high 7.40-7.80 9.3g/L</p> <p>3. BI 농도 - low &amp; high 7.20-8.00 9-10g/L</p>	<p>15-28.9° C</p>	

1

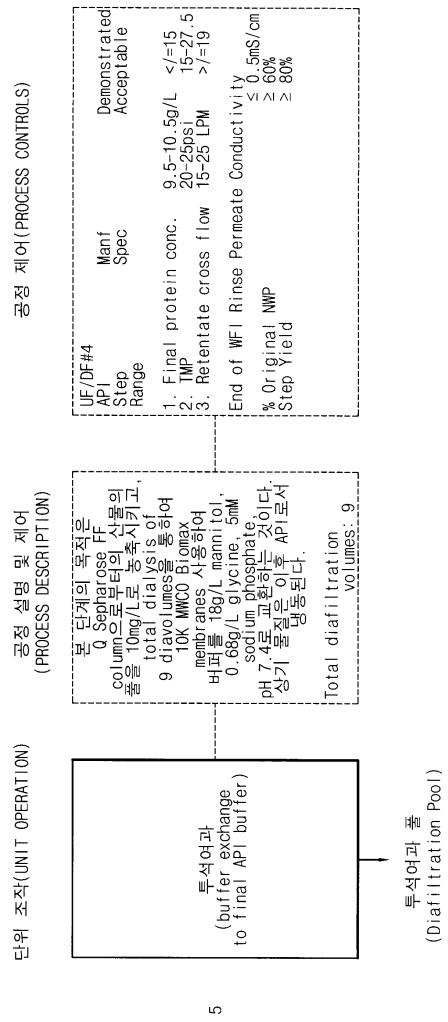
단위 조작(UNIT OPERATION)	공정 설명 및 제어 (PROCESS DESCRIPTION)	공정 제어(PROCESS CONTROLS)
수수성 산호차용 크로마토그래피 (Hydrophobic Interaction (선택적 단계))	<p>PEO와 백은 흑화물은 수수성 크로마토그래피 혼석(1:1)을 위해 0.800M sodium citrate, 50mM Tris, pH 7.6으로 처리된다. column은 phenyl 루드데고 400mM sodium citrate, 50mM Tris, pH 7.5로 처리된다. 산물은 400mM sodium citrate, 50mM Tris, pH 7.5 to 50mM Tris, pH 7.7로부터 reverse salt gradient에 의하여 수집되고, 단백질의 UV 분석되는 경우(즉, 흡광계) 농도와 UV 증가함(즉, 흡광계) 를 (fractions) 수집된다.</p> <p>Resin Type: Tosohads, Toyopearl Phenyl 650M resin load: 1:1 of PEGylation pool with buffer</p> <p>Flow rate: 60cm/hr</p>	<p>Toyopearl Phenyl 650M Manf Spec Step Range</p> <p>1. Load capacity &lt;/=4.1g/L resin ≤ 5g/L</p> <p>2. Gradient slope 4+/-0.06 CV 3.88-4.12</p> <p>3. Load conductivity 45-51mS/cm 40-51mS/cm</p> <p>Column end equil conductivity 40-51mS/cm</p>

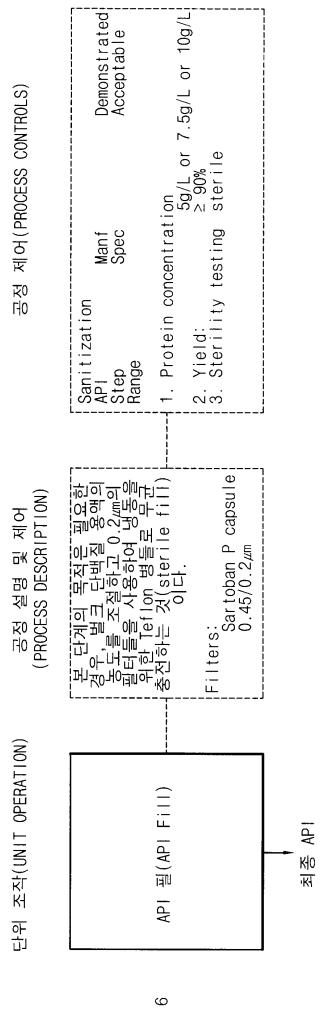


단위 조작(UNIT OPERATION)		공정 설명 및 제어 (PROCESS DESCRIPTION)		공정 제어(PROCESS CONTROLS)	
3	투석과(Diafiltration) (buffer exchange to anion exchanger buffer) (선택적 Diafiltration)	Toyopearl Phenyl CO 100E 부터의 다른 부터의 필터를 통과하고, Millipore 10K 면적을 통과하고, MWCO Biomax membrane 을 사용한 9 turnover volumes of 25mM Tris에 대하여 적어 과정이다.	UF/DF#3 API Step Range	Manf Spec	Demonstrated Acceptable
		DF(diafiltration) Buffer : 25mM Tris PH 7.0 Transmembrane pressure (TMP) : 20-25 psig Total diafiltration volumes : 9	1. Final protein conc. 5.4-6.6g/L 2. TMP 15-27.5 3. Retentate cross flow 53-80 LPM	1. End of WFI Rinses Conductivity % Original NWP Total g. B-2036 (Step Yield)	< 7.2 20-25g/L > 53 ≤ 0.5 mS/cm ≥ 60% ≥ 85%



단위 조작(UNIT OPERATION)	공정 설명 및 제어 (PROCESS DESCRIPTION)	공정 제어(PROCESS CONTROLS)
4.(계속) 크로마토그래피 풀링 4. (계속) 풀링 4. (계속) 풀링 4. (계속) 풀링	<p>상기 전율은 20 CV linear gradient from 0-25mM NaCl in 25mM Tris, pH 7.0 following equilibration steps and a 2 CV wash with 25mM Tris, pH 7.0으로 용리된다. 그 다음 소민트는 75% 이성의(부분) 및 PEG4+5+6(제1부분) 및 PEG4+5+6(마지막 부분) 및 0.5mg/ml 이성의(부분) 및 0.5mg/ml 이성의(마지막 부분)를 모두 풀어서 크로마토그래피 풀로프일로부터 수집된다.</p> <p>Resin type: Q Sephadex FF resin Flow rate: 60cm/hr Load, wash and elution</p> <p>Pre-equilibration: ≥ 3 CV 1.0M Tris, pH 7.0 Equilibration: ≥ 4 CV 25mM Tris, pH 7.0 Gradient: 20CV linear gradient</p>	<p>Final column Equil., PH 6.7-8.0 Equi. Conductivity End ≤ 2.4mS/cm Load Solution Conductivity ≤ 2.4mS/cm Elution UV at Start of Collection 1.0% Manf. Demonstrated Step Spec Range Acceptable</p> <p>Capillary Electrophoresis (fractions) ≥ 75% PEG4+5+6 (first fraction) ≥ 94% PEG4+5+6 (last fraction) ≥ 94% UV (fractions) ≥ 0.59/L</p>
		AEX 풀 (AEX Pool)





[0479] 상술한 실험에 1의 공정에 따라 하기의 데이터를 얻었다.

표1 : 음이온 교환 크로마토그레피 변수 및 응집물의 수율

Resin	pH		Gradient		Bed Ht	Load	In-process (mg/mL resin)	% aggreg ate	Av. PEG No.*
	Equilibrate	Load	Elute	buffer A	Slope (CV)				
ANX4FF	8.0	8.0	6.7	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 90 mM NaCl, pH 6.7	15	20	5.1	polled by SDS-PAGE
ANX4FF (40mL CV)	8.0	8.0	6.7	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 90 mM NaCl, pH 6.7	15	20	5.1	polled by SDS-PAGE
Q Sepharose FF	8.0	8.0	6.7	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6.7	20	20	3.6	polled by SDS-PAGE/ 1st use of CE
Q Sepharose FF 8.0/acid 3CV 1M Tris, pH pre-equil step	8.0	8.0	6.7	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 150 mM NaCl, pH 6.7	20	20	3.6	polled by SDS-PAGE/ 2nd use of CE
Q Sepharose FF 8.0/3CV 1M Tris, pH pre-equil step	8.0	8.0	8.0	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 90 mM NaCl, pH 8.0	20	20	3.6	polled by SDS-PAGE/ 3rd use of CE
Q Sepharose FF 7.0/3CV 1M Tris, pH pre-equil step	8.0	8.0	7.0	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.0	20	20	3.58	polled by SDS-PAGE/ 4th use of CE

[0480]

Resin	pH		Gradient		Bed Ht .6 cm col. (cm)	Load (mg/ml resin)	In-process analytical		% aggregate rate	Av. PEG No.*
	Equilibrate	Load	buffer A	buffer B			Slope (CV)	yield (%)		
Q Sepharose FF 9.0(3CV 1M Tris, pH 8.0 pre-equil. step)	9.0	9.0	25mM Tris pH 8.0	25mM Tris pH 9.0 NaCl, pH 9.0	20	20	3.58	polled by SDS-PAGE 5th use of CE	59.2	0 5.0
Q Sepharose FF 7.0(3CV 1M Tris, pH 7.0 pre-equil. step)	7.0	7.0	25mM Tris pH 7.0	25mM Tris pH 7.0 NaCl, pH 7.0	20	28	4.0	bridged with pooled by CE 5th use of SDS-PAGE CE criteria evaluated PEG 7.8 < 10% PEG-3	58.6	0 5.0
Q Sepharose FF 7.0(3CV 1M Tris, pH 7.0 pre-equil. step)	7.0	7.0	25mM Tris pH 7.0	25mM Tris pH 7.0 NaCl, pH 7.0	20	28	4.0	polled by CE criteria evaluated PEG-4+5+6	52.0	0 5.0
Q Sepharose FF 7.0(3CV 1M Tris, pH 7.0 pre-equil. step)	7.0	7.0	25mM Tris pH 7.0	25mM Tris pH 7.0 NaCl, pH 7.0	10	28	6.0	polled by CE criteria evaluated PEG-4+5+6	52.8	0 4.9
Q Sepharose FF 7.0(3CV 1M Tris, pH 7.0 pre-equil. step)	7.0	7.0	25mM Tris pH 7.0	25mM Tris pH 7.0 NaCl, pH 7.0	10	39	4.0	theoretical pool by CE evaluated PEG-4+5+6	72.0	0 4.9
Q Sepharose FF 7.0(3CV 1M Tris, pH 7.0 pre-equil. step)	7.0	7.0	25mM Tris pH 7.0	25mM Tris pH 7.0 NaCl, pH 7.0	10	39	4.0	CE of pool and pooling not completed	N/A	N/A

## [0481] 실험 예 2

### [0482] B-2036 PEG의 S-Sepharose FF 응집물(양이온 교환 크로마토그래피 수지)에의 첨가제에 의한 효과를 평가하기 위한 작은 스케일의 공정(Small Scale Procedure for Evaluation of the Effect of Additives on S-Sepharose FF Aggregation (Cation Exchange Chromatography Resin) of B-2036 PEG)

1.5mL의 S-Sepharose FF 수지(충전 부피로 세틀된(settled))가 15mL의 원심분리기 튜브에 첨가되었다. 상기 수지는 단백질 결합(protein binding)을 위하여 pH 4, 25mM의 소듐 아세테이트(sodium acetate)에서 평가된 1%의 첨가제 용액 10mL로 두 번 린스함에 따라 제조되었다. 각 린스 공정 후, 상청(上清)액(supernatant)은 (원심분리에 의해)수집되고, 따라지며(decanted), 폐기되었다. 상기 린스된 수지 첨전물(rinsed resin pellet)에 pH 4, 25mM의 소듐 아세테이트(sodium acetate)에서 평가된 1%의 첨가제 용액 2.5mL가 첨가되고, 단계 3으로부터의(플로우차트 2, 단계 1 내지 3의 방법에 의하여 제조된) B-2036 PEG 약 5mg을 포함하는 UF/DF 보존물 다량을 첨가하였다. 이어서, 상기 수지는 상기 용액에서 재-현탁되었으며 2-24 시간동안 부드럽게 혼합하여 배양되었다. 배양 후, 상기 용액은 원심분리 되었고, 상기 상청액은 따라지고 폐기되었다. 이어서, pH 4, 25mM의 소듐 아세테이트에서 평가된 1% 첨가제 용액 2.5mL 및 2.5mL의 소듐 클로라이드 0.25mL를 수지 첨전물에 첨가함에 따라 상기 수지로부터 상기 B-2036 PEG를 용리하였다. 상기 결과액(resulting solution)에서 상기 수지는 재-현탁되고 20분간 부드럽게 혼합하여 배양되었다. 배양 후, 상기 상청액은 원심분리에 의해 보존되고 (retained), 분석을 위하여 크기별 배제 크로마토그래피(즉, SEHPLC(size exclusion HPLC)에 의하여 따라진다

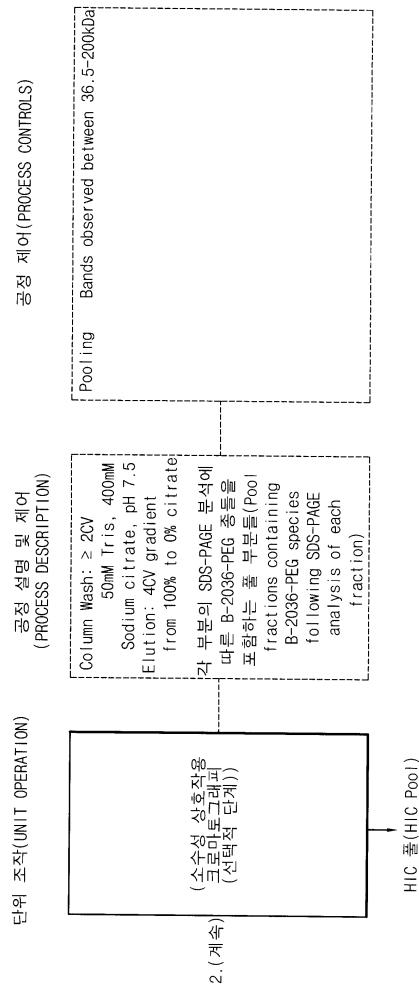
(decanted). 이어서, 상기 사용된 수지 침전물은 폐기된다. 상기 공정은 각 첨가제들이 양이온 교환 크로마토그래피 수지를 사용하여 평가될 수 있도록 반복되어 응집물의 형성을 배제하였거나 충분히 감소되었는지를 판단할 수 있도록 하였다. 상술한 방법을 사용한 결과가 하기 표 2에 나타나 있다. 표 2를 참조하면, 양이온 수지를 사용하여 테스트된 어떠한 첨가제도 음이온 수지로 대체한 경우에 비하여 형성된 응집물의 수준을 감소시키기에 성공적이지 않았음을 알 수 있다.

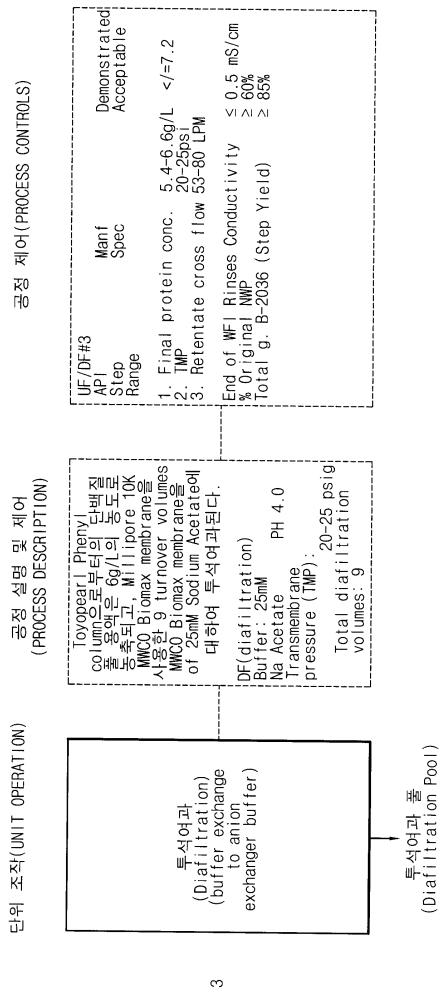
플로우차트 2		양이온 교환 수지(Cation Exchange Resin)를 이용한 비교 공정																
단위 조작(UNIT OPERATION)	공정 설명 및 제어 (PROCESS DESCRIPTION)	공정 제어 (PROCESS CONTROLS)																
PEG화(PEGylation)	<p>정제된 B1을 20g/g excess of the PEGylation reagent, N-hydroxysuccinimidyl ester of methoxy (polyethylene glycol) propionic acid (MW 5000 (m-Spa-500)) in 100mM Hepes, pH 7.65를 사용하여 PEG화한다. 상기 PEG화된 물을 상체에서 고온 스테인리스 스틸의 밸브에서 고온 60-90°C 동안 약 10분간 PEG를 풀어놓아 PH = 7.65 in B-2036 UF /DF#2 buffer.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>API Spec Range</th> <th>Half Spec</th> <th>Demonstrated Acceptable</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PEGylation</td><td></td><td></td></tr> <tr> <td>1. temperature - low &amp; high</td><td>18-25° C</td><td>15-28.9° C</td></tr> <tr> <td>2. pH - low &amp; high</td><td>7.40-7.80</td><td>7.20-8.00</td></tr> <tr> <td>3. BI 풍도</td><td>9.3g/L</td><td>9-10g/L</td></tr> </tbody> </table>	API Spec Range	Half Spec	Demonstrated Acceptable	PEGylation			1. temperature - low & high	18-25° C	15-28.9° C	2. pH - low & high	7.40-7.80	7.20-8.00	3. BI 풍도	9.3g/L	9-10g/L	
API Spec Range	Half Spec	Demonstrated Acceptable																
PEGylation																		
1. temperature - low & high	18-25° C	15-28.9° C																
2. pH - low & high	7.40-7.80	7.20-8.00																
3. BI 풍도	9.3g/L	9-10g/L																

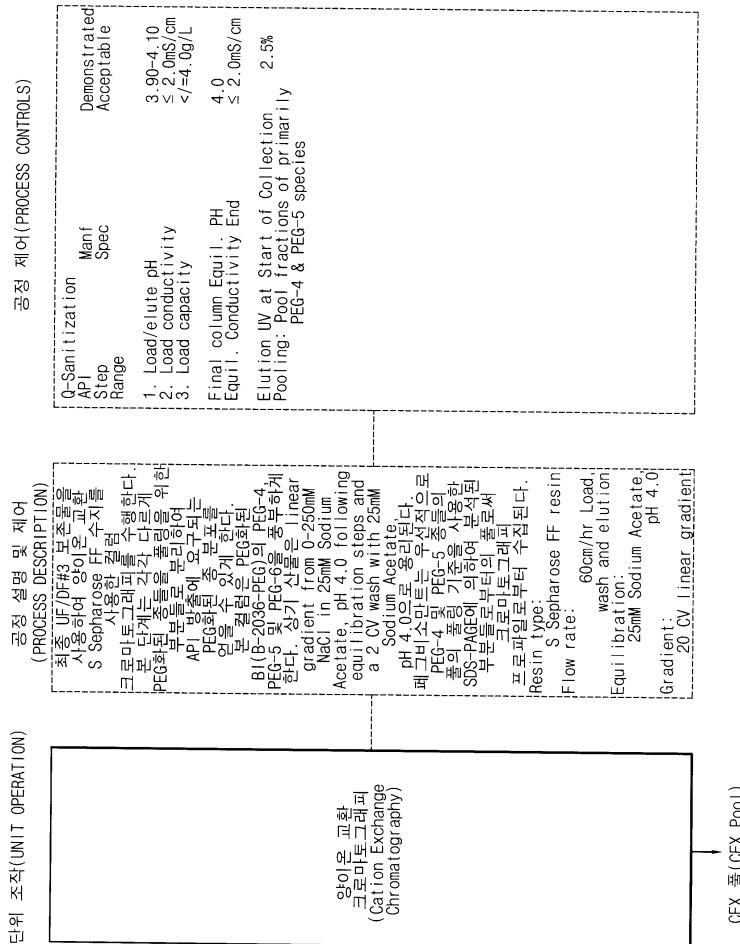
1

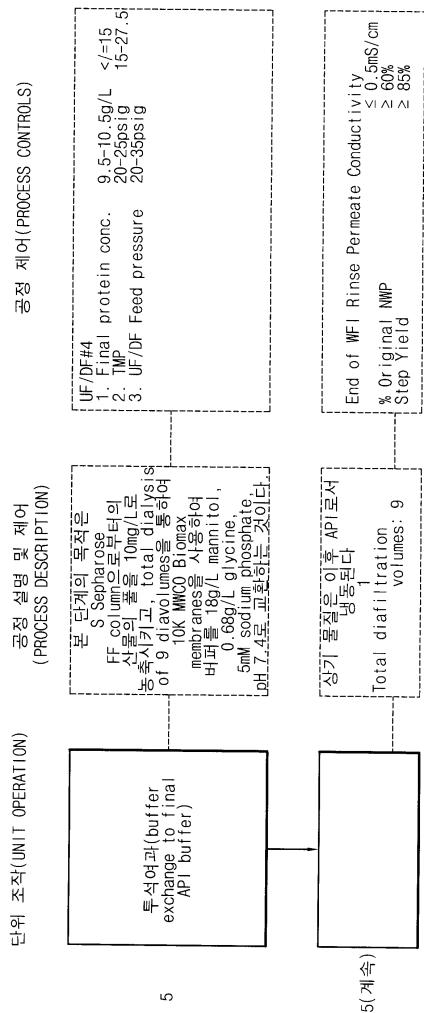
PEG화된 B-2036

단위 조작(UNIT OPERATION)	공정 설명 및 제어 (PROCESS DESCRIPTION)	공정 제어(PROCESS CONTROLS)
단위 조작(UNIT OPERATION)	<p>수수성 상호작용을 측정하는 HPLC (Hydrophobic Interaction Chromatography) 단계</p> <p>PEG화 바탕을 소수성 캐리어로 80 mM sodium citrate, 50 mM Tris pH 7.6으로 처리된다. column에 로드되고, 200 mM sodium citrate, 50 mM Tris pH 7.5로 세척되며, 200 mM citrate, 400 mM sodium citrate, 50 mM Tris, pH 7.5 to 50 mM Tris, pH 7.7로부터 reverse salt gradient에 의하여 수집되고, 단백질의 UV 분석되는 경우(증기총기) 부문들(fractions)은 수집된다.</p> <p>Resin Type: TosohHaas Toyparl Phenyl 650M resin load: 1:1 of PEGylation pool with buffer Flow rate: 60cm/hr</p>	<p>Toyparl Phenyl 650M API Step Range Acceptable Demonstrated</p> <p>1. Load capacity <math>\leq 4.1\text{g/L}</math> resin <math>\leq 5\text{g/L}</math></p> <p>2. Gradient slope <math>4\text{+/-0.06 CV}</math></p> <p>3. Load conductivity <math>45\text{-}51\text{mS/cm}</math> <math>40\text{-}51\text{mS/cm}</math></p> <p>Column end equil conductivity <math>40\text{-}51\text{mS/cm}</math></p> <p>Final Load Conductivity <math>40\text{-}51\text{mS/cm}</math></p> <p>Peak Collection Start 2 UV%</p>

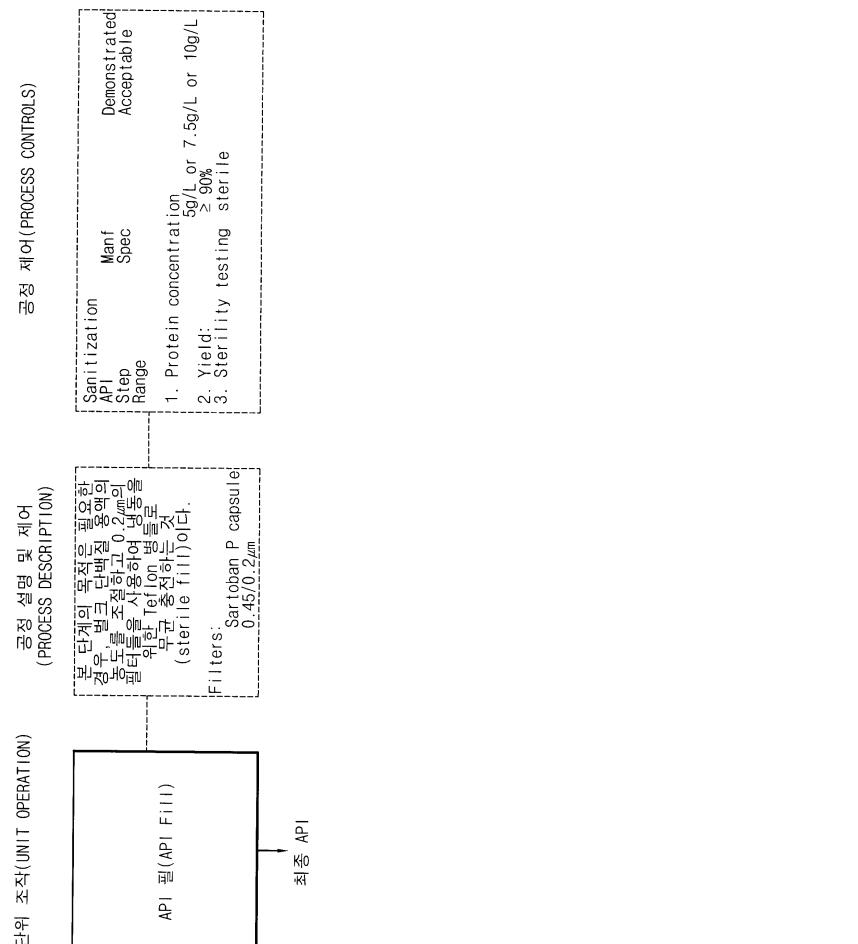








[0489]



[0490]

[0491]

표 2 (양이온 교환 수지를 사용하여 얻어진 결과)

[0492]

실험 예 2의 작은 규모(Small-Scale)의 공정

[0493]

<b>방법</b>	3.3g/l로 로드된 수지 실험마다 1.5ml의 수지 단백질 로드에 앞서 첨가제로 수지의 평형을 유지 2.5M NaCl/acetate pH 4, 1:10 v/v의 첨가에 의한 용리 24hr incubation all 1% except s noted
<b>Additive/Condition</b>	<b>% Aggregate</b>
control	21.5
6M urea	6.0
CHAPS	18.7
Sarcosyl	9.3
PEG 3350	20.3

Isopropanol	19.3
n propanol	24.7
n butanol	27.1
pH 7.7 50mM TRIS	30.3
control	32.2 overnight hold
7.5M urea	10.7
6M urea	8.1
3M urea	32.3
1.5M urea	35.0
tween 20	19.3
methanol	33.7
ethanol	33.5
5% sucrose	31.6
mannitol	30.8
1% polyphosphate	61.2
0.1% polyphosphate	42.5
0.01% polyphosphate	33.6
25mm phosphate pH 2.2	19.7
25mm phosphate pH 3	22.3
25mm phosphate pH 5.5	63.1
25mm phosphate pH 6.5	42.9
25mm formate pH 4	29.0
control 1	31.8
control 2	31.1

### [0494] 실험 예 3

### [0495] RPHPLC 분석 기술(RPHPLC Analytical Technique)

[0496] 페그비소만트의 음이온 교환 정제로부터의 Q-Sepharose 컬럼 부분들에서 발견되는 PEG화 종들(즉, PEG-4, PEG-5, 및 PEG-6)의 퍼센트(percentage)를 모니터하고 그 양을 평가하기 위하여 RPHPLC를 사용하였다.

[0497] 각 Q-Sepharose 25uL(음이온 교환 단계, 위의 실험 예 1 참조) 부분(0.5 내지 1.3mg/mL의 단백질 농도 범위를 가짐)이 Zorbax 300SB-CN 컬럼(4.6mm×150mm; 3.5 $\mu$ m; Part Number 863973-905; serial number USMJ001205)에 적용되었다. 이동상 A(Mobile Phase A)는 0.1%의 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)이며, 이동상 B는 아세토니트릴(acetonitrile)에서 0.085%의 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)으로 구성된다. 페그비소만트의 다른 PEG화 형태들을 분리하기 위하여 대기온도에서 1.0mL/min의 유량으로 20분간 40 내지 50 percent Buffer B의 선형 변화도(linear gradient)가 사용되었다. 흡광도(absorbance)는 214nm로 모니터되었다.

[0498] 아래 도 2 내지 4에 도시된 바와 같이 RPHPLC에 의하여 얻어진 결과는 모세관 전기영동(CE)에 의하여 유도된 결과와 유사하였다. 또한, 예시적인 CE 분석 기술을 위한 아래 실험 예 4를 참조하라

### [0499] 표 3

### [0500] 각 PEG화 종들의 퍼센트를 판단하기 위한 목적의 모세관 전기영동에 의한 페그비소만트의 Q-Sepharose 부분들의 분석

[0501] (부분들 7 내지 18은 RPHPLC에 의해서도 분석되었다-표 4 참조)

부분(fraction)	출발농도 (mg/mL)	% PEG-2	% PEG-3	% PEG-4	% PEG-5	% PEG-6	% PEG-7	% PEG-8
2	0.59	0.0	0.0	2.8	26.3	39.6	25.3	6.0
3	0.88	0.0	0.0	4.6	28.6	44.8	18.8	3.2
4	1.04	0.0	0.0	5.8	28.1	48.6	15.9	1.7
5	1.16	0.0	0.0	6.2	28.3	49.8	14.1	1.6

6	1.23	0.0	0.0	5.4	29.9	54.5	10.2	0.0
7	1.27	0.0	0.0	5.2	33.0	54.1	7.7	0.0
8	1.27	0.0	0.0	5.3	39.3	50.6	4.8	0.0
9	1.27	0.0	0.0	4.5	49.9	41.8	3.8	0.0
10	1.24	0.0	0.0	5.1	59.5	33.1	2.3	0.0
11	1.21	0.0	0.0	6.2	65.9	25.4	2.5	0.0
12	1.17	0.0	0.0	7.9	74.4	17.7	0.0	0.0
13	1.12	0.0	0.0	15.3	72.6	12.2	0.0	0.0
14	1.09	0.0	0.0	21.4	70.7	8.0	0.0	0.0
15	1.05	0.0	0.0	37.3	57.3	5.4	0.0	0.0
16	1.01	0.0	0.0	48.2	47.0	4.8	0.0	0.0
17	0.97	0.0	0.0	55.8	40.2	3.9	0.0	0.0
18	0.91	0.0	2.1	62.4	31.8	3.6	0.0	0.0
19	0.84	0.0	0.0	80.8	19.2	0.0	0.0	0.0
20	0.77	0.0	1.2	78.2	20.7	0.0	0.0	0.0
21	0.71	0.0	6.8	77.3	15.9	0.0	0.0	0.0
22	0.65	0.0	12.3	75.9	11.9	0.0	0.0	0.0
23	0.61	0.0	18.9	70.3	10.8	0.0	0.0	0.0
24	0.56	0.0	21.5	69.5	9.0	0.0	0.0	0.0

[0503] (어두운 영역(즉, 부분 7 내지 18)은 RPHPLC에 의해서도 분석된 부분들을 나타낸다.)

[0504]

표 4

[0505]

CE 및 RPHPLC에 의해 판단된 Q-Sepharose 부분들에 걸친 페그비소만트의 각각 다른 PEG화 형태들의 분포(Distribution of Different PEGylated Forms of Pegvisomant Across Q-Sepharose Fractions As Determined By CE and RPHPLC)

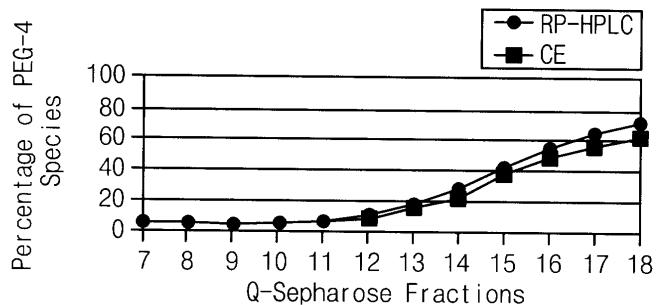
[0506]

fraction	% PEG-4		% PEG-5		% PEG-6		% PEG-7	
	CE	RPHPLC	CE	RPHPLC	CE	RPHPLC	CE	RPHPLC
7	5.2	5.8	33.0	30.3	54.1	55.6	7.7	8.3
8	5.3	6.5	39.3	39.4	50.6	48.6	4.8	5.5
9	4.5	5.5	49.9	52.6	41.8	37.3	3.8	4.6
10	5.1	6.1	59.5	63.3	33.1	27.5	2.3	3.1
11	6.2	6.5	65.9	71.6	25.4	19.5	2.5	2.3
12	7.9	11.4	74.4	72.7	17.7	13.9	0.0	2.0
13	15.3	17.2	72.6	71.2	12.2	11.6	0.0	0.0
14	21.4	28.4	70.7	63.7	8.0	7.9	0.0	0.0
15	37.3	42.6	57.3	51.6	5.4	5.8	0.0	0.0
16	48.2	54.0	47.0	41.8	4.8	4.1	0.0	0.0
17	55.8	64.1	40.2	32.5	3.9	3.4	0.0	0.0
18	62.4	71.5	31.8	25.2	3.6	3.1	0.0	0.0

[0507]

B-2036 PEG 4, B-2036 PEG-5 및 B-2036 PEG-6에 대한 CE 및 RPHPLC의 비교 결과들이 도 2, 3 및 4에 나타나 있다.

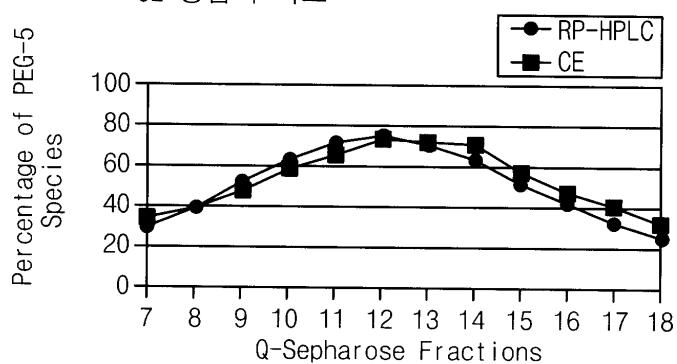
이온 교환 부분들에 있어서 PEG-4종들의 퍼센트의 양을 평가하기 위한 RP-HPLC 및 CE 방법의 비교



[0508]

도 2. 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose 부분들에서 발견되는 B-2036 PEG-4 종들의 퍼센트의 그래프적 비교

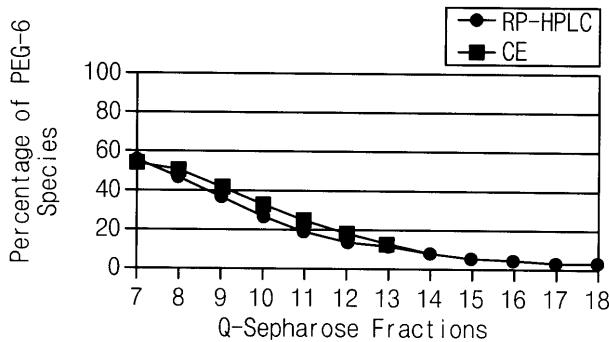
이온 교환 부분들에 있어서 PEG-5종들의 퍼센트의 양을 평가하기 위한 RP-HPLC 및 CE 방법의 비교



[0510]

도 3. 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose 부분들에서 발견되는 B-2036 PEG-5 종들의 퍼센트의 그래프적 비교

음이온 교환 부분들에 있어서 PEG-6종들의 퍼센트의 양을 평가하기 위한 RP-HPLC 및 CE 방법의 비교



[0512]

[0513]

도 4. 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose 부분들에서 발견되는 B-2036 PEG-6 종들의 퍼센트의 그래프적 비교

[0514]

#### 실험예 4

[0515]

#### CE 분석 기술

[0516]

Q-Sepharose 부분들이 다음과 같은 모세관 전기영동에 의하여 분석되었다.  $50\mu\text{m}$ 의 내부 직경 및  $37\text{cm}$ 의 유효 길이(effective length)를 갖는 모세관은  $20\text{psi}$  압력에서 10분간  $1.0\text{N NaOH}$ 로 린스하고 이어서 20분간 영동 완충액(running buffer)으로 린스하여 조절되었다(conditioned). 상기 영동 완충액,  $40\text{mM}$  포스포릭산(phosphoric acid),  $4\text{mg/mL}$   $0'0\text{-Bis}(2\text{-아미노프로필})$ 폴리에틸렌 글리콜( $0'0\text{-Bis}(2\text{-aminopropyl})$ polyethylene glycol),  $0.1\text{mg/mL}$  폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide), pH 1.9-2.0은  $10\text{X}$  원액( $10\text{X}$  stock solution)으로부터 제조되고 모세관 내에 뎅어리들(clogs)을 야기할 수 있는 입자들을 제거하기 위하여  $0.22\mu\text{m}$  필터를 통하여 여과된다.

[0517]

샘플 희석 완충액(sample dilution buffer)( $40\text{mM}$  포스포릭산(phosphoric acid),  $4\text{mg/mL}$   $0'0\text{-Bis}(2\text{-아미노프로필})$ 폴리에틸렌 글리콜( $0'0\text{-Bis}(2\text{-aminopropyl})$ polyethylene glycol), pH 1.9-2.2) 또는 영동 완충액과 접촉되는 경우에 응집물이 형성되는 것을 막기 위하여 샘플들을 실온으로 테웠다.  $0.5\text{mg/mL}$  미만의 샘플들은 분석되지 않았다.  $0.5\text{mg/mL}$  이상의 샘플들은 희석되지 않고(neat) 주입되었으며, 반면  $2.0\text{mg/mL}$  초과의 농도를 갖는 샘플들은 샘플 희석 완충액을 사용하여  $2.0\text{mg/mL}$ 로 희석되었다. 샘플들은  $0.5\text{psi}$  압력에서  $10\text{-}60\text{초}$  동안 모세관으로 주입되었다. 샘플 주입에 있어서, 상기 샘플을 농축시키기 위하여  $0.5\text{psi}$ 의 압력에서 영동 완충액을 3초간 주입하였다. 샘플들은 최소  $30^\circ\text{C}$ 의 온도,  $30\text{kV}$ 에서 25분간 분리되었으며,  $214\text{nm}$ 에서 관찰되었다. 상기 모세관은 일련의 각 샘플 주입에 앞서 상기 모세관 벽으로부터 남아있는 샘플들을 제거하기 위하여  $20\text{psi}$ 에서 적어도 1분간  $0.1\text{N NaOH}$  및 2분간 영동 완충액으로 린스되었다. 상기 샘플들은  $25\text{-}30^\circ\text{C}$ 의 온도에서 저장되었다.

[0518]

전기영동도(electropherogram)의 결과는 이웃하는 피크들 사이의 가장 낮은 지점의 피크를 분리함에 따라 적분되었으며, 수정된 면적 퍼센트(corrected area percent)가 계산되었다.

[0519]

실험예 1, 플로우차트 1, 단계 4에 개시된 바와 함께 상술한 방법을 사용하여, CE에 의하여 얻어진 결과는 상기 도 2 내지 도 4에 나타나 있다.

[0520]

#### 실험예 5

[0521]

#### 제1 풀링 실험예

[0522]

Q-Sepharose 부분들이 다음과 같은 CE에 의하여 분석되었다.  $50\mu\text{m}$ 의 내부 직경 및  $37\text{cm}$ 의 유효 길이

(effective length)를 갖는 모세관은 20psi 압력에서 10분간 1.0N NaOH로 린스하고 이어서 20분간 영동 완충액(running buffer)으로 린스하여 조절되었다(conditioned). 상기 영동 완충액, 40mM 포스포릭산(phosphoric acid), 4mg/mL O'0-Bis(2-아미노프로필)폴리에틸렌 글리콜(O'0-Bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol), 0.1mg/mL 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide), pH 1.9-2.0은 10X 원액(10X stock solution)으로부터 제조되고 모세관 내에 덩어리들(clogs)을 야기할 수 있는 입자들을 제거하기 위하여 0.22 $\mu$ m 필터를 통하여 여과되었다.

[0523] 샘플 희석 완충액(sample dilution buffer)(40mM 포스포릭산(phosphoric acid), 4mg/mL O'0-Bis(2-아미노프로필)폴리에틸렌 글리콜(O'0-Bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol), pH 1.9-2.2) 또는 영동 완충액과 접촉되는 경우에 응집물이 형성되는 것을 방지하기 위하여 샘플들을 실온으로 데웠다. 0.5mg/mL 미만의 샘플들은 분석되지 않았다. 0.5mg/mL 이상의 샘플들은 희석되지 않고(neat) 주입되었으며, 반면 2.0mg/mL 초과의 농도를 갖는 샘플들은 샘플 희석 완충액을 사용하여 2.0mg/mL로 희석되었다. 샘플들은 0.5psi 압력에서 10-60초 동안 모세관으로 주입되었다. 샘플 주입에 있어서, 상기 샘플을 농축시키기 위하여 0.5psi의 압력에서 영동 완충액을 3초간 주입하였다. 샘플들은 최소 30°C의 온도, 30kV에서 25분간 분리되었으며, 214nm에서 관찰되었다. 상기 모세관은 일련의 각 샘플 주입에 앞서 상기 모세관 벽으로부터 남아있는 샘플들을 제거하기 위하여 20psi에서 적어도 0.1N NaOH로 1분간 및 영동 완충액으로 2분간 린스되었다. 상기 샘플들은 25-30°C의 온도에서 저장되었다.

[0524] 전기영동도(electropherogram) 결과는 이웃하는 피크들 사이의 가장 낮은 지점의 피크를 분리함에 따라 적분되었으며, 수정된 면적 퍼센트(corrected area percent)가 계산되었다.

[0525] 실험 예 1, 플로우차트 1, 단계 4에 개시된 바와 함께 상술한 방법에 따라, CE에 의하여 얻어진 결과는 하기 표 5a에 나타나 있다. PEG화 이성체들의 농축 풀(pool)은 풀 부분들로서의 수용 기준(criterion of accepting as a pool fractions)을 사용하여 제조되며, 상기 부분들은 74% 이상의 PEG 4+5+6(제1 부분), 94% 이상의 PEG 4+5+6(마지막 부분) 및 0.5mg/mL 이상의 조성물을 사용한 CE에 의하여 분석된다. 6 내지 25의 부분(하기 표 5a 참조)은 이러한 기준들을 사용하여 선택되고 풀로 결합되었다. 상기 UF/DF#3 출발물질 및 결합되어 모아진(combined pooled) 부분들에 상술한 CE 분석이 수행되었다. 상기 부분들을 선택하고 풀링한 후, 상기 모아진(pooled) 물질의 분석 결과는 상기 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 이성체들이 농축되었음을 보여준다. 이를 나타내는 하기 표 5b를 참조하라.

표 5a

Fracti-o n #	Protein Conc. mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
1	0.23								
2	0.65								0
3	0.91			2	18	40	32	9	60
4	1.06			3	19	41	31	6	63
5	1.15			4	22	43	27	5	69
6	1.21			4	26	44	23	3	74
7	1.27			3	28	49	20		80
8	1.28			3	25	55	17		83
9	1.28			3	25	60	12		88
10	1.27			4	30	58	8		92
11	1.25			4	47	43	6		94
12	1.23			4	52	39	5		95
13	1.20			3	62	31	4		96
14	1.15			5	70	23	3		98
15	1.11			6	69	24	1		99
16	1.06			10	76	15			101
17	1.02			23	70	7			100
18	0.98			31	63	6			100
19	0.94			44	50	5			99
20	0.90			54	41	5			100
21	0.84			60	35	5			100
22	0.78			66	29	5			100

23	0.71			77	21	2			100
24	0.64			82	16	2			100
25	0.58		2	83	13	2			98
26	0.54		9	74	17	3			94
27	0.50		18	68	14	0			82

[0528]

표 5b

[0529]

Fraction #	Protein Conc. mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
UF/DF#3 pool	5.86		5	21	33	30	9	1	84
Pooled Fractions	1.04			25	38	30	7		93

[0530]

실험 예 6

[0531]

제2 풀링 실험 예

[0532]

Q-Sepharose 부분들이 다음과 같은 CE에 의하여 분석되었다. 50 $\mu$ m의 내부 직경 및 37cm의 유효 길이 (effective length)를 갖는 상기 모세관은 20psi 압력에서 1.0N NaOH로 10분간 린스하고 이어서 영동 완충액 (running buffer)으로 20분간 린스하여 조절되었다(conditioned). 상기 영동 완충액, 40mM 포스포릭산 (phosphoric acid), 4mg/mL O'0-Bis(2-아미노프로필)폴리에틸렌 글리콜(O'0-Bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol), 0.1mg/mL 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide), pH 1.9-2.0은 10X 원액(10X stock solution)으로부터 제조되고 모세관 내에 둉어리들(clogs)을 야기할 수 있는 입자들을 제거하기 위하여 0.22 $\mu$ m 필터를 통하여 여과되었다.

[0533]

샘플 희석 완충액(sample dilution buffer)(40mM 포스포릭산(phosphoric acid), 4mg/mL O'0-Bis(2-아미노프로필)폴리에틸렌 글리콜(O'0-Bis(2-aminopropyl)polyethylene glycol), pH 1.9-2.2) 또는 영동 완충액과 접촉되는 경우에 응집물이 형성되는 것을 막기 위하여 샘플들을 실온으로 데웠다. 0.5mg/mL 미만의 샘플들은 분석되지 않았다. 0.5mg/mL 이상의 샘플들은 희석되지 않고(neat) 주입되었으며, 반면 2.0mg/mL 초과의 농도를 갖는 샘플들은 샘플 희석 완충액을 사용하여 2.0mg/mL로 희석되었다. 샘플들은 0.5psi 압력에서 10-60초 동안 모세관으로 주입되었다. 샘플 주입에 있어서, 상기 샘플을 농축시키기 위하여 0.5psi의 압력에서 상기 영동 완충액을 3초간 주입하였다. 샘플들은 최소 30°C의 온도, 30kV에서 25분간 분리되었으며, 214nm에서 관찰되었다. 상기 모세관은 일련의 각 샘플 주입에 앞서 상기 모세관 벽으로부터 남아있는 샘플들을 제거하기 위하여 20psi에서 적어도 0.1N NaOH로 1분간 및 영동 완충액으로 2분간 린스되었다. 상기 샘플들은 25-30°C의 온도에서 저장되었다.

[0534]

전기영동도(electropherogram) 결과는 이웃하는 피크들 사이의 가장 낮은 지점의 피크를 분리함에 따라 적분되었으며, 수정된 면적 퍼센트(corrected area percent)가 계산되었다.

[0535]

실험 예 1, 플로우차트 1, 단계 4에 개시된 바와 함께 상술한 방법에 따라, CE에 의하여 얻어진 결과는 하기 표 6a에 나타나 있다. PEG화 이성체들의 농축 풀(pool)은 풀 부분들로서의 수용 기준(criterion of accepting as a pool fractions)을 사용하여 제조되며, 상기 부분들은 75% 이상의 PEG 4+5+6(제1 부분), 94% 이상의 PEG 4+5+6(마지막 부분) 및 0.5mg/mL 이상의 조성물을 사용한 CE에 의하여 분석된다. 3 내지 20의 부분들(하기 표 6a 참조)은 이러한 기준들을 사용하여 선택되고 풀로 결합되었다. 상기 UF/DF#3 출발물질(HIC 풀로 써 측정) 및 결합되어 모아진(combined pooled) 부분들에 대해 상술한 CE 분석이 수행되었다. 상기 부분들을 선택하고 풀링한 후, 상기 모아진(pooled) 물질의 분석 결과는 상기 PEG-4, PEG-5 및 PEG-6 이성체들이 농축되었음을 보여준다. 이를 나타내는 하기 표 6b를 참조하라.

[0536]

표 6a

[0537]

Fraction #	Protein Conc. mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
1	0.17								
2	0.59			3	26	40	25	5	69
3	0.88			5	29	45	19	3	78
4	1.04			6	28	49	16	2	83
5	1.16			6	28	50	14		98
6	1.24			5	30	55	10		100
7	1.27			5	33	54	8		100
8	1.27			5	39	51	5		100
9	1.27			5	50	42	4		100
10	1.24			5	60	33	2		100
11	1.21			6	66	25	3		100
12	1.17			8	74	18			100
13	1.13			15	73	12			100
14	1.09			21	71	8			100
15	1.05			37	57	5			100
16	1.01			48	47	5			100
17	0.97			56	40	4			100
18	0.91		2	62	32	4			98
19	0.84		0	81	19				100
20	0.77		1	78	21				99
21	0.71		7	77	16				93
22	0.66		12	76	12				88
23	0.61		19	70	11				81
24	0.57		22	70	9				79

[0538]

표 6b

[0539]

Fraction #	Protein Conc. mg/ml	PEG-2	PEG-3	PEG-4	PEG-5	PEG-6	PEG-7	PEG-8	PEG (4+5+6)
UF/DF#3 pool	3.51		9	27	37	22	4		86
Pooled Fractions	1.08			22	46	28	5		96

[0540]

본 발명에 있어서 재조합 B-2036 및 재조합 B-2036 PEG에 대하여 설명하였지만, 특별한 언급이 없는 한, 본 발명은 포유류 성장 호르몬 또는 이의 대항체, PEG화 인간 성장 호르몬 또는 이의 대항체, 또는 PEG화 소 성장 호르몬 또는 이의 대항체, PEG화 단백질, PEG화 호르몬, PEG화 항체(또는 조각(들)(fragment(s)))이든지 간에 어떠한 재조합 PEG화 성장 호르몬 작용제, 재조합 PEG화 성장 호르몬 대항체에도 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0019]

도 1A는 서열번호 1(SEQ. ID. NO. 1)에 상응하는 B-2036의 아미노산 서열을 나타내는 도면이다. 도 1A에 있어서, 별표(☆)는 B-2036 각 문자에 PEG 단위가 공유결합할 수 있는 9개의 잠재적 위치를 나타낸다. 비록 9개의 공유결합 가능한 위치가 나타나있지만, 9개의 위치 모두가 PEG 단위에 의해 공유결합 될 필요가 없음을 유의하여야 한다. 바람직하게는, 각 B-2036 문자 당 4 내지 6개의 PEG 단위가 공유결합된다.

[0020]

도 1B는 B-2036의 트리설파이드 이성체 불순물("Trisulphide(+32 amu")로 표시)의 구조를 상기 B-2036의 바람직한 형태("Native GHA"로 표시)와 비교하여 나타내는 도면이다.

[0021]

도 2는 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose FF 부분

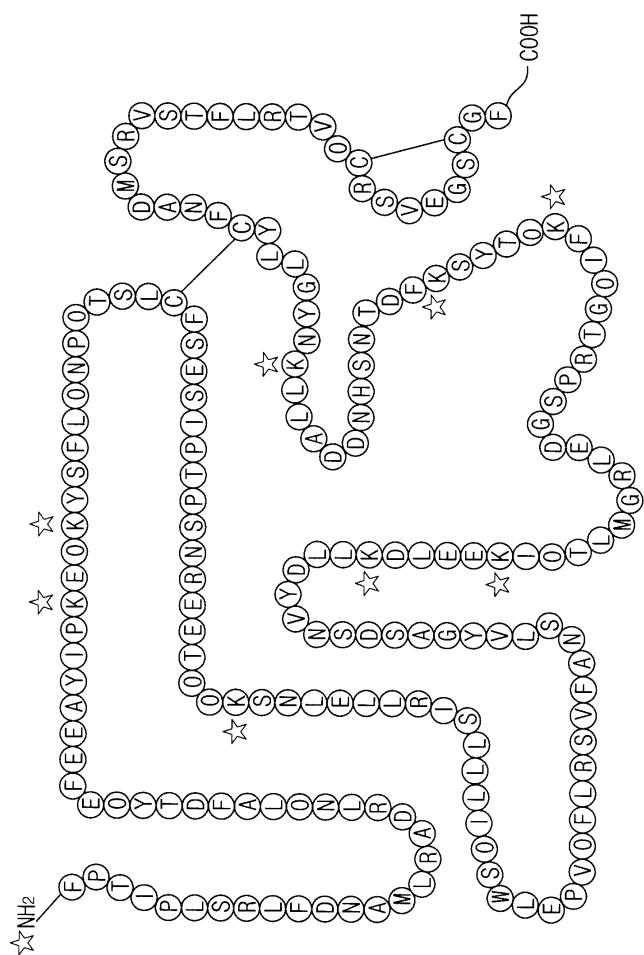
들에서 발견되는 B-2036 PEG-4 종들 퍼센트를 그래프적으로 비교한 도면이다.

[0022] 도 3은 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose FF 부분들에서 발견되는 B-2036 PEG-5 종들 퍼센트를 그래프적으로 비교한 도면이다.

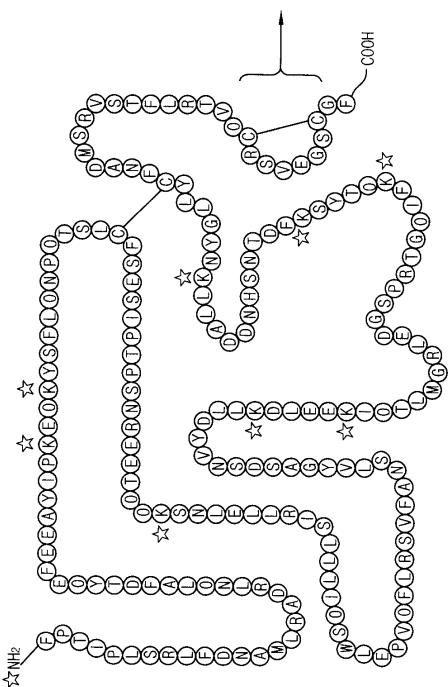
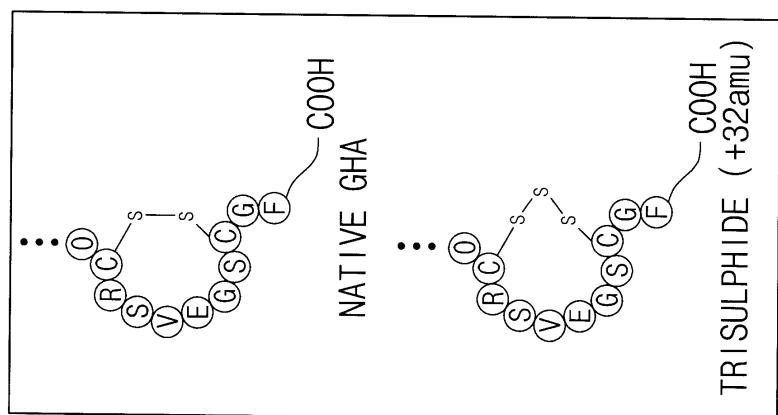
[0023] 도 4는 모세관 전기영동 및 역-상 HPLC에 의하여 판단되는 바와 같이 7 내지 18의 Q-Sepahrose FF 부분들에서 발견되는 B-2036 PEG-6 종들 퍼센트를 그래프적으로 비교한 도면이다.

## 도면

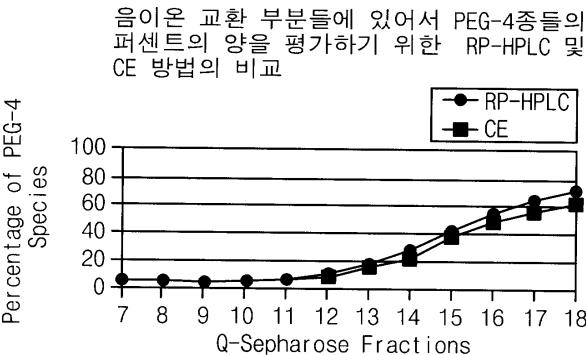
### 도면1a



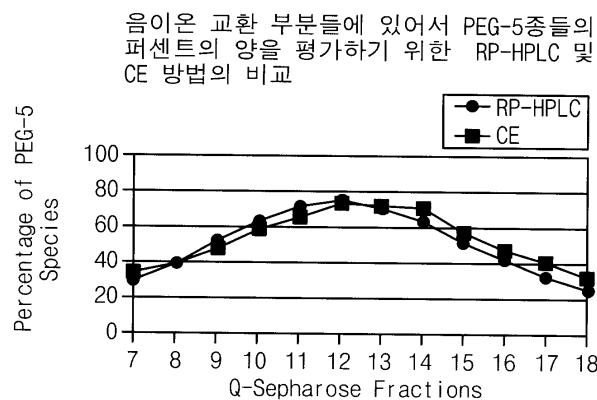
도면1b



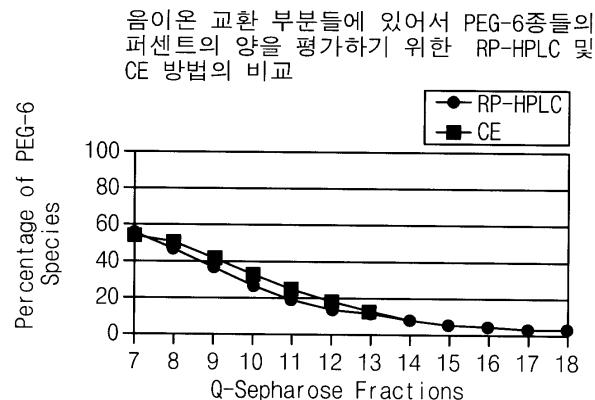
## 도면2



## 도면3



## 도면4



## 서 열 목 록

<110> BOYLE ET AL.  
<120> PROCESS FOR DECREASING AGGREGATE LEVELS OF PEGYLATED PROTEIN

<130> 161765.00521

<150> US 60/412,227  
<151> 2002-09-20

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
<211> 191  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
1 5 10 15

Ala Asp Arg Leu Asn Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Lys Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Asn Ala Asp Met Ser Arg Val Ser Thr Phe  
 165 170 175

Leu Arg Thr Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 180 185 190

<210> 2  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
 1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
 20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Gly Thr Phe  
 165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 180 185 190