

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. ⁸ C07K 1/16 (2006.01) C07K 1/18 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년01월20일 10-0543612 2006년01월09일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2004-7011825(분할)	(65) 공개번호	10-2004-0077917
(22) 출원일자	2004년07월30일	(43) 공개일자	2004년09월07일
(62) 원출원	특허10-1997-0708469		
	원출원일자 : 1997년11월25일	심사청구일자	2001년02월27일
번역문 제출일자	2004년07월30일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1996/000449	(87) 국제공개번호	WO 1996/37515
국제출원일자	1996년02월29일	국제공개일자	1996년11월28일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 아이슬란드, 일본, 북한, 대한민국,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 케냐,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄,

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

(30) 우선권주장	378,859	1995년05월25일	미국(US)
------------	---------	-------------	--------

(73) 특허권자	델타 바이오테크놀로지 리미티드 영국, 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드 59, 캐슬코어트
-----------	---

(72) 발명자	구디앤드류로버트 영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오테크놀로지 리미티드
----------	--

슬립다렐
영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오테크놀로지 리미티드

반어크헨드릭
영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오테크놀로지 리미티드

베레젠코스티븐
영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오테크놀로지 리미티드

우드로우존로드니

영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드

존슨리차드알란

영국 엔지2 5엔에이 노팅햄, 웨스트 브리지포드, 캠브리지 로드 15

우드파트리시아캐롤

영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오 테
크놀로지 리미티드

버튼스티븐제임스

영국 엔지7 1에프티 노팅햄, 캐슬 블러바드, 캐슬 코어트, 델타 바이오 테
크놀로지 리미티드

쿼이크알란빅토

영국 엘리2 6엑스에이치 레스터셔, 코스톡, 마널 클로스 19

(74) 대리인

신영무

심사관 : 박정웅

(54) 고 순도 알부민 제조방법

요약

착색제, 금속이온, 인간 단백질, 숙주 단백질, 알부민 단편, 알부민의 중합체 또는 집합체 및 비루스의 함량이 극히 낮거나 또는 사실상 없으며, 실제로 비-글리코실화 되며, 비교적 유리 티올량이 높고 C-말단이 온전한 알부민의 제조방법이 제공된다. 그 방법은, 알부민(바람직하게는 형질전환 효모에 의하여 발현 및 분비된)을 양성 모드 양이온 교환 및 이어서 양성 모드 음이온 교환 크로마토그래피에 통과시키는 단계를 포함한다. 기타 단계도 채택될 수 있는데, 예를들면, 한외여과, 겔 투과 크로마토그래피, 알부민을 결합시키는 친화성 크로마토그래피(예를들면 블루 염료를 이용하여) 및 오염물질을 결합시키는 친화성 크로마토그래피(예를들면 아미노페닐붕산 수지를 이용하여)가 있다. 알부민에 대한 특이적 친화성이 없는 물질로부터, 알부민에 대한 친화성을 지닌 화합물로 알부민을 용리시키는 방법도 개시되며, 반대-이온으로 암모늄 이온의 제거방법도 개시된다.

색인어

고순도, 알부민, 정제방법, 암모늄 이온

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은, 미생물을 인간 혈청으로부터 추출된 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 혈청 알부민의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 암호화 서열로 형질전환 시킴으로써 제조된 재조합 인간 알부민(rHA) 단백질의 정제 방법에 관한 것이다. 본 명세서에서, “알부민”이라는 용어는 총괄적으로 HSA 및/또는 rHA를 가르킨다.

알부민은 심한 화상, 쇼크 또는 혈액 상실증 환자의 치료에 사용된다. 알부민은 또한 보다 높은 진핵 세포의 성장에 사용되는 매체의 보충 및 치료용 단백질 배합에 있어서 의약품 첨가제로서 사용된다. 현재, 그 제품에 대한 수요는 인간 혈액으로부터 추출된 알부민에 의하여 충당되고 있다. 추출 및 분리 기술의 예로는 다음에 개시된 것들이 포함된다: 양이온 교환기의 이용에 관한 JP 03/258 728; 음이온 교환 이용 후 양이온 교환을 이용하는 EP 428 758; 및 가열, 염 첨가 및 다이아필터(diafiltering)의 이용에 관한 EP 452 753.

미생물에서의 rHA의 제조방법은 EP 330 451 및 EP 361 991호에 개시되어 있다. rHA에 대한 정제 기술은 다음에 개시되어 있다: WO 92/04367, 기재-유도 염료의 제거; EP 464 590, 효모-유도 색소의 제거; 및 EP 319 067, 알칼리성 침전 및 알부민에 대한 특이적 친화성을 지닌 친유성 상에 대한 rHA의 후속 적용.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 고도로 정제된 알부민을 제공한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 하나의 관점에 있어서, 알부민의 정제방법을 제공하는데, 그 방법은, 알부민이 결합할 정도로 특이적 친화성을 지니고 있지 않은 크로마토그래피 재질에, 비교적 불순한 알부민 용액을 적용 및 알부민에 대한 특이적 친화성을 지닌 화합물 용액을 적용함으로써 재질로부터 결합 알부민을 용리시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 크로마토그래피 재질은, 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, SP-세파로즈(Sepharose) FF, SP-스페로실(Spherosil) 등과 같은 양이온 교환기이다. 알부민에 대한 특이적 친화성을 지닌 화합물은 옥탄산염 (예를들면 옥탄산 나트륨), 기타 긴 사슬($C_6 \sim C_{22}$) 지방산, 살리실산염, 옥틸숙신산염, N-아세틸트립토판 또는 이들 중 둘 이상의 혼합물일 수 있다.

제2 관점에서 본 발명은 알부민 정제방법을 제공하는데, 그 방법은 알부민이 양이온 교환 재질에 결합되는 양이온 교환 크로마토그래피 및 알부민이 음이온 교환 재질에 결합되는 음이온 교환 크로마토그래피에 알부민 용액을 적용시키는 단계를 포함한다.

양이온 교환 재질로부터 용리된 알부민은, 상기 음이온 교환 크로마토그래피에 처리되기 전에, 계속하여 친화성 크로마토그래피, 한외여과 및 겔 투과중 하나 이상의 방법으로 처리될 수 있다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 그 방법은 하기 (a) ~ (g) 단계를 포함한다:

- (a) 알부민이 기재에 결합하게 되는 조건하에서, 양이온 교환 기재를 통하여 알부민 용액을 통과시키는 단계;
- (b) 상기 기재로부터 알부민-함유 양이온 교환 용출액을 용리시키는 단계;
- (c) 알부민 결합 화합물을 포함하는 친화성 기재를 통하여 상기 용출액을 통과시키는 단계;
- (d) 상기 기재로부터 알부민-함유 친화성 기재 용출액을 용리시키는 단계;
- (e) 알부민 부유화 유분을 얻기 위하여 선택적으로 한외여과 후에 겔 투과 기재를 통하여 상기 용출액을 통과시키는 단계;
- (f) 알부민이 기재에 결합하게 되는 조건하에서, 음이온 교환 기재를 통하여 상기 알부민 부유화 유분을 통과시키는 단계; 및
- (g) 상기 음이온 교환 기재로부터, 정제된 알부민-함유 생성물을 용리시키는 단계.

선택적인 방법으로, 양이온 교환 재질로부터 용리된 알부민은 어떠한 중간처리도 없이(희석 이외의) 상기 음이온 교환 재질에 적용될 수 있다. 따라서, 제2의 바람직한 구체예는, 하기 (a) ~ (g) 단계를 포함하는 알부민 정제 방법을 제공한다:

- (a) 알부민이 기재에 결합하게 되는 조건하에서, 양이온 교환 기재를 통하여 알부민 용액을 통과시키는 단계;
- (b) 상기 기재로부터 알부민-함유 양이온 교환 용출액을 용리시키는 단계;

(c) 알부민이 기재에 결합하려는 조건하에서, 음이온 교환 기재를 통하여 양이온 교환 용출액을 통과시키는 단계;

(d) 음이온 교환 기재로부터 알부민-함유 음이온 교환 용출액을 용리시키는 단계;

(e) 알부민-결합 화합물을 포함하는 친화성 기재를 통하여 음이온 교환 용출액을 통과시키는 단계;

(f) 친화성 기재로부터 알부민-함유 친화성 기재 용출액을 용리시키는 단계; 및

(g) 알부민 부유 유분을 얻기 위하여 겔 투과 기재를 통하여 친화성 기재 용출액을 통과시키는 단계.

바람직하게는, 양이온 교환 단계 전에, 약 1 ~ 10mM의 최종 농도로 옥탄산염 및/또는 기타 알부민 안정제(예를들면 아세틸트립토판 나트륨)를 첨가하고 pH를 약 4.0 ~ 5.0으로 조정함으로써 알부민 용액을 조절한다.

유리하게도, 양이온 교환 단계에서 보유된 알부민은 용리되기 전에 높은 염용액(예를들면 10 ~ 100mM, 바람직하게는 20 ~ 40mM, 예를들면 27mM 아세트산 나트륨으로 pH4.0으로 완충된 0.5 ~ 2.0M NaCl)으로 세척된다.

바람직하게, 양이온 교환 용출액이 음이온 교환기로 직접 통과되는 공정에 있어서, 알부민은, 알부민에 대하여 특이적 친화성을 지닌 화합물, 특히 산 또는 그들 염, 예를들면 옥탄산염 또는 기타의 긴사슬($C_6 \sim C_{22}$) 지방산, 살리실산염, 옥틸숙신산염 또는 N-아세틸트립토판을 함유하는 완충제를 사용하여, 양이온 교환단계에서 용리된다.

적절하게, 알부민은 높은 함량(50mM 이상, 바람직하게는 50 ~ 200mM, 예를들면 80 ~ 150mM)의 붕산염, 예를들면 테트라붕산 나트륨 또는 테트라붕산 칼륨을 함유하는 완충제로 음이온 교환기로부터 용리된다.

본 발명에 따라 정제된 알부민은 다음에, 중간 공정단계가 있거나 또는 없이, 아미노페닐붕산(PBA)과 같은 당-공액화물(글리코콘쥬게이트) 및 당류들을 선택적으로 결합하는 고정화된 화합물을 함유하는 지지상에서 크로마토그래피에 처리된다.

친화성 크로마토그래피와 관련되는 본 발명의 임의의 공정에 있어서, 친화성 크로마토그래피는 바람직하게는 1,4-디아미노부탄과 같은 스페이서 또는 $C_{1\sim 8}$, 바람직하게는 $C_{1\sim 6}$, 예를들면 $C_{1\sim 5}$ 및 가장 바람직하게는 C_4 길이의 다른 스페이서이며, 바람직하게는 α , ω -디아미노 치환을 지닌 다른 스페이서를 통하여 지지상에 고정화된, 시바크론 블루(Cibacron Blue)형 염료와 같은 고정화된 알부민-특이적 염료를 포함하는 수지를 바람직하게 사용한다. 놀랍게도, 본 발명자들은 상기와 같은 염료들은 전장(全長)의 알부민 분자에 대하여 보다도, HA-분비 미생물의 배양에서 생성될 수 있는 45kD 알부민 단편에 대하여 보다 큰 친화력을 갖는다는 것을 발견하였다. 45kD 단편은 전형적으로 1-403 ~ 1-409 영역으로 구성되며, 슬리입(Sleep) 등 (1990)의 Bio/Technology 8, 42 ~ 46 및 WO 95/23857호에 개시되어 있다.

본 발명의 방법에 의하여 제조된, 정제 알부민 용액은 그 예정 용도에 따라 다시 가공처리 될 수 있다. 예를들면, 그것은 리터당 약 80g 이상의 알부민 농도를 지니는 한외여과 잔류물을 얻기 위하여, 한외여과막을 통하여 한외여과될 수 있는데, 한외여과 잔류물은 5 잔류물 당량 이상의 물에 대하여 다이아필터된 것이다. 이것은 소정의 크로마토그래피 단계, 예를들면, 고정화 아미노페닐 붕산염을 포함하는 단계에서 암모늄 이온을 내포하는데 유리할 수 있다. 놀랍게도 본 발명자들은 암모늄 이온이 알부민에 비교적 견고하게 결합한다는 것을 발견하였다. 상기 암모늄 이온은 알부민으로부터 제거되는 것이 바람직한데, 본 발명자들은 이것이 반대-이온(counter-ion)을 이용함으로써 달성될 수 있다는 것을 발견하였다. 종래의 방법은 암모늄 이온과 관련이 없어서, 암모늄 이온이 알부민에 의하여 결합된다는 가정을 할 이유가 없었기 때문에, 당 분야에 있어서는 알부민을 반대-이온에 노출시킬 필요성은 발생되지 않았었다.

따라서, 본 발명은 또다른 관점에서, 암모늄 이온이 알부민으로부터 치환되어 용액으로부터 제거될 수 있도록 용액을 반대-이온 용액에 노출시키는 단계를 포함하는 알부민 용액의 정제방법을 제공한다.

반대-이온(바람직하게는, 나트륨 이온과 같은 금속 이온)은 알부민 용액에 첨가될 수 있으며 암모늄 이온은 투석에 의하여 제거될 수 있거나 또는 암모늄 이온은 반대-이온 용액으로부터 알부민을 분리시키는 반투막을 통하여 다이아필터 되어 버릴 수 있거나, 또는 겔 투과 크로마토그래피에 의하여 제거될 수 있다. 5잔류물 용적 이상의 50mM 염화나트륨에 대한 다이아필터가 일반적으로 적절하다.

얻어진 알부민은 착색제, 락트산염, 시트르산염, 금속, 면역글로브린, 칼리크레인 전구체 활성화제, 트란스페린, α_1 -산, 글리코단백질, 헤모글로빈 및 혈액응고인자, 원핵 단백질, 알부민의 단편, 알부민 집합체 또는 폴리머, 균체 내독소, 빌리루빈, 헤모, 효모 단백질 및 비루스와 같은 인간 단백질들의 양이 극히 낮거나 또는 거의 없는 것으로 판명되었다. “거의 없는”이라는 용어는 검출 가능한 양 이하라는 것을 의미한다. 여기서 사용된 “착색제”라는 용어는 알부민을 착색시키는 임의의 화합물을 의미한다. 예를들면, 피그먼트는 재조합 알부민을 제조하는데 사용되는 유기물, 특히 효모로부터 발생하는 착색제인 반면에, 염료는 알부민을 정제하는 크로마토그래피 단계에서 발생하는 착색제이다. 본 발명의 방법에 의하여 정제된 알부민 제조물내의 99중량% 이상, 바람직하게는 99.9중량% 이상의 단백질이 알부민이다. 이와같이 고도로 순수한 알부민은 좀처럼 부작용을 일으키지 않는다.

본 발명의 방법에 의하여 제조된 알부민은 환원 SDS PAGE에 의하여 99.5% 이상, 바람직하게는 실제로 100% 단량체성인 것으로 판명되었으며, 하나 이상의 하기 특징을 지니고 있다. 알루미늄 이온 함량이 150ng 미만, 바람직하게는 100ng 미만; 철 이온 함량이 3,000ng 미만, 바람직하게는 1,000ng 미만; 구리 이온 함량이 10,000ng 미만, 바람직하게는 5,000ng 미만; 마그네슘 이온 함량이 3,000ng 미만, 바람직하게는 1,500ng 미만; 아연 이온 함량이 5,000ng 미만, 바람직하게는 3,000ng 미만; 망간 이온 함량이 50ng 미만(모두 알부민 1그램 기준); 글리코실화(glycation) 정도가 0.6 미만, 바람직하게는 0.15 미만(좀더 바람직하게는 0.05 미만) 물 핵소스/물 단백질; 하기 실시예 9에서와 같이 측정할 때, 저분자량 오염물질의 양이 20 V.sec 이하, 바람직하게는 10 V.sec 미만; 모세관 지역 전기영동도상의 단일 피크; 완전한 즉 균일한 C-말단 및 N-말단; 유리 티올 함량이 0.85 몰 SH/몰 단백질 이상; 및 0.3몰/ $C_{10} \sim C_{20}$ 지방산 몰 이하이며 및 실질적으로 C_{18} 또는 C_{20} 지방산이 없다.

출발물질은 알부민-함유 발효 배지일 수 있거나 또는 불순 알부민 용액이, 예를들면 스톨츠(Stoltz) 등 (1991)의 Pharmaceut. Tech. Int. 1991년 6월, 60-65 페이지 및 모어 및 하아베이(More & Harvey)(1991)의 “혈액분리 및 플라스마 분류”(“Blood Separation and Plasma Fractionation”) 하리스(Harris), 윌레이-리스(Wiley-liss) 출판, 261-306 페이지에 개시된 바와 같이, 지난 50년간에 걸쳐 개발된 임의의 다혈증의 추출 및 정제방법에 의하여 혈청으로부터 얻은 용액일 수 있다.

특히, 알부민이 프로테아제-결핍 효모 또는 기타 유기물에서 생성된 rHA일 때, 공정은 정제 단계의 일부로서 열처리 단계를 통상적으로 포함하지 않는다(EP 428 758 및 EP 658 569호와와는 대조적으로). 마찬가지로, 미생물로부터 (인간이 아니라) 제조된 경우, 통상적으로 최종 저온 살균단계(통상적으로 60°C에서 1시간)를 요구하지 않는다.

최종 제품은 제형화되어 안정성이 부가될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 고도로 순수한 알부민 제품은 100g 이상, 좀더 바람직하게는 1Kg 이상 또는 10Kg의 알부민을 함유하는데, 이것은 복수의 약병으로 나뉘어질 수 있다.

본 발명의 방법이, 혈청과 같이, 다수의 공급원으로부터의 불순한 알부민 용액으로부터 보다 정제된 알부민을 얻는데 이용될 수 있기는 하나, 재조합 인간 알부민(rHA)을 정제하는데 특히 적용할 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 알부민은, 쥐, 소 또는 양 알부민과 같은 임의의 포유동물 알부민일 수 있으나, 바람직하게는 인간 알부민이다. 알부민 암호화 DNA는 적절한 숙주에서 발현되어 알부민을 생성할 수 있다. 따라서, DNA는 공지의 기술에 따라서 발현 벡터를 구축하기 위하여 사용될 수 있는데, 이것은 계속해서 알부민의 발현 및 생성을 위하여 적절한 숙주세포를 형질전환시키는 데 이용된다. 상기와 같은 기술에는 EP-A-73 646, EP-A-88 632, EP-A-201 239 및 EP-A-387 319에 개시되어 있는 것들이 포함된다.

박테리아(예를들면, 대장균 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를들면 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)), 점사상 균류(예를들면 아스페길러스(*Aspergillus*)), 식물세포, 동물세포 및 곤충세포를 포함하는, 많은 발현 시스템이 알려져 있다. 바람직한 미생물은 효모 사카로미세스 세레비시에이다.

본 발명의 실시예 유용할 것으로 예상되는 효모의 종류를 예시하면 피치아(한세놀라), 사카로미세스, 클루이베로미세스, 칸디다(*Candida*), 토룰롭시스(*Torulopsis*), 토룰라스포라(*Torulaspora*), 시조사카로미세스, 시테로미세스(*Citeromyces*), 파치솔렌(*Pachysolen*), 데바로미세스(*Debaromyces*), 메추니코위아(*Metchunikowia*), 로도스포리디움(*Rhodospiridium*), 류코스포리디움(*leucosporidium*), 보트리오아스커스(*Botryosascus*), 스포리디오보롤스(*Sporidiobolus*), 엔도마이콕시스(*Endomycopsis*) 등이 있다. 바람직한 종류는 피치아(한세놀라), 사카로미세스, 클루이베로미세스, 야로우위아(*Yarrowia*) 및 한세놀라(*Hansenula*)로 구성되어 있는 군으로부터 선택된 것들이다. 사카로미세스 종의 예로는 S. 세레비시에, S. 이탈리아스(*italicus*) 및 S. 로옥시(*rouxii*)가 있다. 클루이베로미세스 종의 예로는 K. 프

라길리스(fragilis) 및 K. 락티스(lactis)가 있다. 피치아(한세놀라)의 예는 P. 안구스타(angusta)(종전에는 H. 폴리모르파(polymorpha)), P. 아노마라(anomala), P. 파스토리스(pastoris) 및 P. 캡슐라타(capsulata)이다. Y. 리폴리티카(lipolitica)는 적절한 야로우위아종의 예이다.

하나 이상의 프로테아제에서 결핍되어 있는 효모 균주를 사용하는 것이 유리하다. 이와같은 균주에는 우울포드(Woolford) 등 (1993)의 J. Biol. Chem. 268, 8990-8998 페이지, 카베존(Cabezón) 등 (1984)의 P.N.A.S 81, 6594-6598 페이지, EP-A-327 797 및 존스(Jones) 등 (1982)의 Genetics 102, 665-677 페이지에서와 같은, 공지의 pep4-3 돌연변이체 및 PRAI 및/또는 PRBI 유전자에서 돌연변이한 균주가 포함된다. 선택적인 방법으로, 발효배지에서의 프로테아제는 가열에 의하여 불활성화 될 수 있다. 프로테아제가 존재하면 전반적인 공정에 있어서 알부민의 수율을 감소시킨다.

바람직하게는, 효모는, 예를들면, 각각 WO 95/23857 및 WO 95/33833으로 공고된 본 발명자들의 특허출원에서 교시한 바와 같이 봉쇄된 각각의 유전자를 갖는 결과로서, 낮은(또는 제로의) 양의 Yap3p 프로테아제 및/또는 hsp150 열충격 단백질질을 갖는다. Yap3p는 하기 언급한 45kD 알부민 단편의 형성을 일으키며 일부 분리단계에서 hsp150은 알부민과 함께 공정제된다.

효모는 사카로미세스 세레비시에 2 μ m 플라스미드를 기초로 하여 발현 플라스미드로 형질전환될 수 있다. 효모를 형질전환시킬 때에, 플라스미드는 세균성 복제 및 절제될 수도 있는 선별 서열을 함유하고, 형질전환 후 EP 286 424에 제시된 바에 따라 내부 재조합이 뒤따른다. 플라스미드는 다음을 포함하는 발현 카세트도 함유할 수 있다: EP 431 880에 개시된 바와 같은 효모 촉진제(사카로미세스 세레비시에 PRBI 촉진제와 같은); WO 90/01063에 제시된 바와 같이, 예를들면 대부분의 천연 HSA 분비 리더에 더하여 S. 세레비시에 α -접합 인자 분비 리더의 약간의 부분을 포함하는 것인, 분비리더 암호화 서열; 인간 유전자에 대응하는 cDNA를 유리시키는 기존의 방법에 의하여 얻을 수 있으며, 예를들면 EP 73 646 및 EP 286 424에도 개시되어 있는, HSA 암호화 서열; 및 EP 60 057에 개시된 바와 같이, 예를들면 사카로미세스 ADHI로부터의 터미네이터와 같은 전사 터미네이터.

상술한 플라스미드의 다양한 요소가 제품의 수율을 개선시키는데 기여할 수 있기는 하나, 제조된 알부민 생성물의 순도에 직접 관련이 있는 것으로는 생각되지 않는다.

본 발명의 바람직한 관점이 하기 실시예 및 첨부된 도면을 참고로 하여 기재된다.

제1도는 rHA의 제조에 사용된 발효장치의 개략도이다.

제2도는 C18 PTH 가역상 HPLC 칼럼(Applied Biosystems Inc.)으로부터의 UV 트레이스인데, 본 발명의 알부민에 있어서의 낮은 함량의 저분자량 오염물질을 나타내고 있다.

제3도는 제2도와 유사하나, 종래 기술의 알부민에 있어서의 저분자량 오염물질을 나타낸다.

제4도는 상업적으로 구입 가능한 알부민의 지방산 함량을 나타내는 가스 크로마토그램이다.

제5도는 제4도에 해당하나, 본 발명의 알부민을 나타내며; 및

제6a 및 6b도는 각각 본 발명의 알부민 및 종래 기술의 알부민에 대한 전기 분사 질량분석을 나타낸다.

실시예 1: 불순 알부민 용액의 제조

알부민 생성 미생물의 구축을 위한 클론화 전략은 EP 431 880에 개시된 바와 같다. 힌넨(Hinnen) 등 (1978)의 P.N.A.S. 75, 1929에 기재된 방법에 의하여, (MATa, leu 2, pep4-3, [cir⁺]) 사카로미세스 세레비시에 균주에 플라스미드 pAYE 316이 도입되었다. 류신이 결핍된 최소 배지상에서 형질전환체가 선별되었다(효모 질소 기재, Difco). 10ml 복합물(YEP, 1%(w/v) 효모 추출물, 2%(w/v) 박토펙톤(bactopeptone) 및 2%(w/v) 수크로우스)이나, 또는 규정된 (아미노산 및 황산 암모늄이 없는 0.15%(w/v) 효모 질소 기재, 0.5%(w/v) 황산 암모늄, 0.1M 시트르산/Na₂HPO₄·12H₂O pH6.5, 2%(w/v) 수크로우스) 액상 배지를 함유하는 50ml 플라스크에서 형질전환체가 200rpm으로 30℃에서 72시간 성장되었을 때, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 및/또는 로켓 겔 면역 전기 영동법에 의하여, 무세포 배양주 중에서 rHA가 검출될 수 있었다.

규정된 액상배지내의 원료 주 배양주(완충된 최소배지(BMM) 염 배지: 효모 질소 기재[아미노산 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 없는 것, Difco] 1.7g/l; 시트르산 일수화물 6.09g/l; 무수 Na_2HPO_4 , 20.16g/l, pH 6.5 ± 0.2 , 수크로우스가 20g/l로 첨가된다)가 사용되어, 20%(w/v) 트레할로오스 존재하에 배양주의 일정량을 냉동시킴으로써 진동 플라스크 배양주를 제조하기에 적절한 공정 효모의 가동 원료 (제조자의 작업 셀 뱅크)를 제조한다.

발효

이 부분은, 원료 배양주로부터 최종 발효까지 rHA의 제조에 관한 것이며 rHA 발효공정의 일반적인 정의인데, 이것은 특정 장치나 규모의 별도 제한을 받는 것이 아니다.

진동 플라스크 배양

과피의 접종에 생리학적으로 알맞은 순수배양으로서, 효모[cir^o, pAYE316]이 성장된다. 과피의 타이밍이 재현성이 있도록 하려면, 성장의 상(1차 탄수화물 과잉) 및 접종물 생물량(10리터의 배지당 100ml의 접종물을 요구하는 $12 \pm 2\text{mg/l}$)을 규정할 필요가 있다. 하나의 원료 약병이 100ml의 BMM+ 2%(w/v) 수크로우스를 함유하는 진동 플라스크로 접종되고, 플라스크는, 세포 건조 중량(cdw)이 0.6 ~ 1.2g/l(600nm에서의 광학밀도에 의하여 평가)될 때까지, 속도 진동기(분당 200rpm 회전) 상에서 30℃로 배양되었다. 이 배양주는 다음에 종자 발효 용기를 $12 \pm 2\text{mg/l}$ 의 수준으로 접종시키는데 사용된다.

종자발효

생산유기체, 바람직하게는 S. 세레비시에[cir^o, pAYE 316]를 종자 발효장치(본 실시예에서는 20L의 작업용량)에서 약 100g/L의 높은 세포건조중량(cdw)으로 성장시킴으로써, 주 생산 발효장치를 위한 접종물이 준비된다. 에탄올 및 아세트산염의 축적을 최소화하여 세포 수율이 최대화 되도록 유가 배양(fed-batch) 체제가 뒤따른다. 브라운(B. Braun, 독일)사로부터 구입 가능한 다중-발효장치 컴퓨터 시스템(Multi-Fermenter Computer System, MFCS) 소프트웨어와 같은 컴퓨터 조절 시스템을 통하여 각 발효의 전 과정이 감시되고, 조절된다. 브라운사가 공급하는 소프트웨어는 관리 조절 및 데이터 획득 패키지(Supervisory Contron & Data Acquisition Package)인데; 유사한 패키지가 다른 회사로부터 구입 가능하다. 공급 조절 연산은, 크라브트리(Crabtree) 효과를 피함으로써 최대 생물량을 달성하여, 에탄올 및/또는 아세트산염의 생성을 최소화 하도록 수크로우스의 첨가량을 조절하는 것이다. 발효 용기는 열 NaOH 세척 및 열이 없는(가열되지 않은) 물(PFW) 린스 처리된다. 열 살균 용기는 혼적량의 성분이 더해진 약 10l의 무균 MW10 배지(표 1) 뱃치염을 함유한다. rHA 제조용 배지는 한외여과 (10,000 분자량 절삭)되어 균체 내독소를 제거할 수 있다.

[표 1]

MW10 배지		
구성성분	배치 배지	공급 배지
염		
KH ₂ PO ₄	2.74g/L	10.9g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.58g/L	2.3g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.06g/L	0.24g/L
H ₃ PO ₄ (85% w/w)	0.88ml/L	1.76ml/L
비타민		
Ca 판토텐산	20mg/L	180mg/L
니코틴산	33.3mg/L	300mg/L
m-인노시톨	20mg/L	180mg/L
d-바이오틴	0.133mg/L	0.8mg/L
티아민·HCl	16mg/L	32mg/L
혼적량 성분원료	10mg/L	20ml/L
수크로우스	0*	500g/L
혼적량 성분원료 구성성분		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3g/L	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10g/L	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.2g/L	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079g/L	
H ₃ BO ₃	1.5g/L	
KI	0.2g/L	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.5g/L	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.56g/L	

혼적량 성분은 순수에 첨가되고, 35ml/ℓ의 98% H₂SO₄로 산성화된다.

* 20g 수크로우스/ℓ는 20ℓ 종자 발효장치 단계에서 배치 배지에 첨가된다. 임의의 탈열화(depyrogenation) 방법과 같이, 예를들면 한외여과와 같은 임의의 편리한 살균방법이 사용될 수 있다. 비타민은 항상 여과 살균된다.

배지가 용기에 첨가된 후, 작동온도가 30℃로, 최소 교반기 속도는 통상적으로 400 ~ 500rpm으로 설정되었다. 초기 pH는 pH 조절기를 사용하여 암모니아 용액(비중 0.901)으로 5.7± 0.2로 조정되었다. pH 보정제로서 2M H₂SO₄도 사용되었다. 수크로우스가 20g/ℓ로, MW10 배치 비타민, 및 브레옥스(Breox) FMT30 소포제가 0.04g/ℓ로 용기에 첨가되었다.

살균 여과 공기가 0.5 v/v/m (즉 분당 배지 리터당 0.5리터의 비압축 공기)로 용기에 도입되고, 배지는 무균 진동 플라스크 배양주로부터 12± 2mg 건조세포중량/ℓ로 접종되고, MFCS 컴퓨터 시스템이 개시되었다. 배치 상의 성장이 완료(용해된 산소압력의 증가가 30분에 >15%로 되는 것이 신호가 됨)된 후, MFCS 시스템 조절하에, 공급배지의 첨가가 개시된다. 조절방법은 생산 발효에 대하여 아래에 기술한 바와 동일하게 효율적이다. 발효 중에 공기의 흐름은, 약 1v/v/m의 흐름을 유지하기 위하여 두 단계에서 증가된다. 용해된 산소압력(DOT)은 교반기 속도를 변화시킴으로써 20% 공기 포화상태에서 조절된다. 일단 교반기 속도가 더 이상 증가될 수 없고, 공기 유속이 그 최대치에 도달하면, 공급 조절 연산은 발효 생성물의 형성을 최소화하기 위하여 공급 속도를 조절한다. 공급의 종점에서, 배양주는 생산 용기로 이전된다.

생산발효

무균 배양주인 효모[cir °, pAYE316]가, 세포의 rHA의 생산을 위한 높은 cdw(>80g/ℓ)로의 유가배양 발효에 의하여 제조된다. 본 실시예에서 작업 용량이 8,000ℓ인, 생산 발효장치가, 종자 발효 장치에서 성장된 배양주로 접종되고, 그 세포 건조 중량은 바람직하게는 >80g/ℓ이다. 종자 발효장치 배양주의 전환에서 생산발효 장치내의 초기 세포 건조 중량 농도는 바

람직하게는 0.25 ~ 1.00 g/l이다. 1시간 이내에 공급을 개시하는 것이 바람직하기는 하나, 필요할 경우 지연될 수 있다. 공급 상태의 초기 부분 중의 매우 낮은 OUR 및 CER 값 및 이에따른 그 측정 에러 때문에, RQ를 이용하는 공급 속도의 자동 조절은 초기에는 불가능하게 된다. 공급 체제는, 세포 및 생성물 수율이 최대가 되도록, 에탄올 및 아세트산염을 최소화하기 위한 것이다.

발효는, 이상적인 가스 용해 및 벌크 혼합을 제공하도록 설계된, 제1도에 도시한 바와 같은 발효장치에서 수행된다. 열 NaOH 세척 및 PFW 린스 처리되는 용기는 약 4,000ℓ의 무균 MW10(표 1), बै치염 및 혼적량 성분을 함유하게 된다. 이 배지는 열 또는 여과살균에 의하여 용기를 독립적으로 살균될 수 있다. 본 발명에 따라, MW10과 같은 발효배지가 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA), 또는 그들 염 또는 기타 강 금속 킬레이트제가 없는 것이 유리하다는 것이 판명되었는데, 그것은 그들이 존재하면 생성된 알부민에 현저하게 높은 정도로 착색된 오염물질을 발생시키기 때문이다.

작동온도는 30℃로 설정되며, 교반기 속도는 균일 용액을 유지하는데 충분하도록, 통상적으로는 약 50rpm으로 조절된다. 초기 pH는 암모니아 용액(비중 0.901)으로 조정된다(조절장치 설정 5.7 ± 0.2). 제2 pH 보정제로서 2M H₂SO₄가 사용될 수도 있다. 필요에 따라, 적절한 소포제로서, MW10 बै치 비타민이 첨가된다(예를들면, 브레옥스 FMT 30을 0.125g/ℓ로).

살균여과 공기는, 배출공기 분석의 정밀도를 극대화하기 위하여 초기에 0.5 v/v/m으로 용기에 첨가되고, MFCS 컴퓨터 시스템이 작동 개시된다. 예를들면, 연속 질량 분석기(예를들면 피손스(Fisons) VG 가스 분석기)를 사용함으로써 배출가스가 분석된다. 용기는 전체 종자 용기 배양주(최소 0.4% v/v)로 접종된다. 용적으로 MW10 공급량은 बै치 용적과 동일하다. 공급이 개시되고, OUR 및 CER 값이 충분히 높아서 효율적으로 조절할 때까지 RQ 조절은 불가능하게 된다. 공급속도는, RQ가 시종일관하여 >1.2가 되면, RQ 조절없이 그 기간동안 수작업으로 조정된다. 하기 연산식에 따라, 컴퓨터 조절을 통하여 공급속도는 증가된다:

$$\text{공급속도(FR)} = ke^{\mu t}$$

여기서 k는 초기 공급속도, μ 는 지수 성장속도 및 t는 시간이다. k값은, 에탄올 및 아세트산염의 축적을 최소화시키는 성장속도를 달성하는데 필요한 초기 공급속도로서, 경험적으로 결정된다. 본 실시예에 있어서, k는 배양주 리터당 분당 0.08ml의 MW10 공급배지 값을 갖는 것으로 결정되었다. μ 값은 완전한 호흡기관의 최대성장속도와 관련되는데, 본 실시예에서는 0.1/h가 된다.

t는 영(제로)에서 시작한 다음, RQ>1.2 또는 DOT<15%가 아닌 한 매분마다 1씩 증가하는, 변화 가능한 수치이다. 이들 경우에 있어서, t값은 감소한다.

용기는 OTR을 강화시킬 필요에 따라 과잉 가압될 수 있다. 배양주는 공급의 종점에서 다운스트림 가공처리를 위하여 고정된다.

이 고정시간은 최소화 되도록 유지되어야 하나, 48시간까지 연장될 수 있으며 필요한 경우 그 이상일 수 있다. 고정상태 중에, 배양주의 온도는 가능한 최소로, 통상적으로는 4 ~ 15℃, 바람직하게는 4℃로 저하되며, DOT는 0%로 떨어지도록 허용된다. 공급이 중단되고 통기를 끄고 과잉 가압이 저하된다. 그러나 pH 조절은 유지된다. 세포들을 현탁 상태로 유지하고, 냉각 및 pH 균일성을 용이하게 하기 위하여, 바람직하게는 약 50rpm으로 충분한 교반이 유지된다.

상기 공정에 따른 예상 수율은: 생물량>80g세포건조중량/ℓ배양주; rHA>1.5g 단량체/ℓ 배양주(SDS-PAGE에 의하여 측정, 전 배양주에 관련됨).

알부민이 rHA일 경우, 본 발명에 따라 정제 처리용 불순 알부민 용액을 제조하기 위하여, 미생물 세포가 발효 배지로부터 제거된다. 상술한 바와 같이, 정제공정의 시작전에 세포가 제거되는 것이 바람직하기는 하나, 예를들면, 제1 정제단계가 유체화된 베드에서 수행되는 경우와 같은 일정 조건하에서는, 제1 단계와 동시에 수행될 수 있다. 고정상태 중에, 발효장치에서 통기없이 15℃이하로 냉각된 발효 배양주는 탱크로 이전되는데 여기서 생물량 농도가 180 ~ 210g/Kg이 되도록 희석되며, 필요하면 더욱 냉각된다. 희석된 배양주는 통기없이 가능한 짧은 시간동안 저하된 온도에서 충분히 저으면서 고정하여 효모 세포 침적을 방지한다.

세포 및 상청액은, 예를들면 5,700rpm으로 작동하는 알파 라발(Alfa Laval) BTUX510 연속 방출 노즐과 같은 임의의 적절한 원심분리기에서의 마이크로여과 또는 원심분리와 같은 1차 분리단계에서 처리된다. 이와같이 생성된 원심분리물은, 전체 잔류물 및 파괴된 효모세포와 기타 입자를 제거하기 위하여, 쿠노(Cuno)사에서 공급하는 심부 필터(1μm 가공크기)를

사용하여 일렬로 여과될 수 있다. 회석된 배양주에 존재하는 75% 이상의 rHA가 단일 통과 원심분리 조작에서 회수된다. 선택적으로, 이 조작으로부터 나온 세포 슬러리는 물 또는 완충제에 재부유 되고, 제2 원심분리물을 제공하기 위하여 재원심분리되어, 생성물 회수를 강화시킬 수 있다. 얻어진 용액은 다음에 본 발명의 방법에 의하여 처리되어, 실시예 2에 기재된 바와같이, 그 내부에 함유된 알부민을 정제한다.

실시예 2: 본 발명에 따른 알부민의 정제

알부민을 중합반응으로부터 보호(옥탄산염을 내포함으로써)하고 및 프로테아제 활성으로부터 보호(가열하거나 또는 가해할 정도의 프로테아제가 없는 효모를 선택함으로써)하면서, 발효로부터의 원심분리물(실시예 1에 기재된 바와 같은), 또는 임의의 기타 공급원(플라스마와 같은)으로부터의 불순 알부민 용액이 양이온 교환 기재상의 크로마토그래피용으로 준비되었다. 바람직하게는, 알부민을 안정화하기 위하여, 옥탄산 나트륨이 첨가되어(크로마토그래피 용액 13(CS13)-표 2), 최종 농도가 1 ~ 10mM, 예를들면 약 5mM이 된다. pH는 아세트산(CS09)으로 조정되어 4.3 ~ 4.8, 바람직하게는 4.50±0.1(가장 바람직하게는 ± 0.05)이 되고, 전도도는 <5.5mS/cm가 되도록 조정된다.

일부 숙주 균주로부터의 배양 상청액은, 후속 공정중에 rHA를 분해시킬 수 있는 프로테아제를 함유한다. 이와같은 경우, 이 프로테아제 활성은, rHA를 함유하는 배양 상청액을 열처리 함으로써 파괴될 수 있다. 통상적으로, 열변성으로부터 rHA를 보호하는데는, 1 ~ 10mM 옥탄산 나트륨이면 충분하며, 프로테아제를 불활성화하는데는, 60 ~ 80℃에서 30초 ~ 10분이 적당하다. 계속하여 상청액은 상술한 바와같이 다시 조정된다. 프로테아제에 의한 분해현상이 일어나지 않으면, 열처리가 제외되는 것이 바람직하다.

크로마토그래피

모든 작동은 주위온도(20±5℃)에서 수행될 수 있다. 크로마토그래피 칼럼에 대한 알부민 적재량(g 알부민/ℓ 기재)은, SDS-PAGE(SP-FF 칼럼의 경우)나 또는 GP-HPLC(기타 모든 칼럼에 대하여)에 의한 알부민의 적정량(g/ℓ)에 의하여 측정된다. 각 단계의 진행과정은, 측정 UV 흡광도, 예를들면 254 또는 280nm에 의하여 감시된다.

여기에 개시된 일련의 크로마토그래피 단계는 새로운 것으로 많은 관점에 있어서 발명성이 있다. 제1 정제 단계에서 양이온 기재를 사용하면, 효모 발효로부터 유도된 대부분의 저분자량의 착색된 부류가 직접 칼럼을 통과하도록 허용되는 반면에, 기재와 결합하는 것들은 약하게 결합되어, 1M NaCl와 같은 고 이온 강염 세척으로 제거될 수 있다. 그리하여, 이들 형태의 분자를 비가역적으로 흡수하는 음이온 기재와는 달리, 양이온 기재는 재생성될 수 있으며, 정제의 제1 단계와 같이 다수의 크로마토그래피 사이클에 사용될 수 있다. 따라서 이 단계는 건실한 상업적 크로마토그래피 공정을 위한 토대를 형성한다.

본 실시예의 제2 단계로서 시마크론 블루형 칼럼을 사용하는 것은, 예를들면 크기 및 pI와 같은 그 물리화학적 성질이 온전한 분자와 유사하기 때문에 알부민으로부터 제거하는 것이 매우 어려운 알부민의 45kDa 단편을 제거하기 위하여 명확하게 사용된다는 점에서 신규성이 있다. 놀랍게도, 단편이 전장의 알부민보다 염료에 보다 강하게 결합하는데, 따라서 그 분리가 가능해진다.

알부민 정제중에 사용된 크로마토그래피 용액은 표 2에 상세히 기재되어 있다. 대규모의 알부민 제조 및 상대적인 저비용 생산을 위하여는 이들 완충제 염이 본 공정에 최적인데, 그것은 상기 완충제 염을 공업적 규모로 고순도 형태로 얻을 수 있으며, Tris, HEPES 또는 MOPS와 같은 기타 통상적으로 사용된 완충제에 비하여 비용이 낮기 때문이다. 표 2에서 사용된 것들 대신에 별도의 완충제가 사용될 수 있는데, 예를들면 유사한 pKa의 완충제(아세트산염에 대신 말레산염)가 있으나, 대부분의 경우에 있어서 비용 및 대규모 획득성에 있어서 그 사용이 제한을 받게 된다. 다른 염 형태도, 그들이 가용성이며 공업적 규모로 공급이 가능하며 저 비용이면 사용될 수 있다. 그러나, CS06 및 CS10에 테트라붕산염 이온이 내포되면 특히 유리한데, 그것은 그들이, 마크로분자내에서 탄수화물 성분과 복합체를 이루고, 그들을 기재상의 음이온 그룹과 견고하게 결합시키는데 있어서 특정 역할을 수행하기 때문이다. 이와같은 현상은 용출액중의 알부민의 순도를 높히게 된다.

파아마시아(Pharmacia)사로부터 구입 가능한 것들과 같은 축류 칼럼이나, 또는 세프라젠(Sepragen)사로부터 구입 가능한 것들과 같은 방사상류 칼럼을 사용하여 크로마토그래피가 수행될 수 있다. 본 실시예에서는 칼럼이 축류이다.

완충제 용액은 다음에 기술하는 농도로 제조될 수 있거나, 또는 농축원료 용액이 제조되어 즉각적인 용도로 혼합 또는 회석될 수 있다.

[표 2]

실시에 2의 알부민 정제용 크로마토그래피 용액

용액	성분	농도 (g L^{-1})	pH	전기전도도 (mS cm^{-1})
CS01	SP-FF 평형액	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ CH_3COOH (결정상)	3.69 0.220	5.45-5.65 1.9-2.2
CS02	SP-FF 용출액	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ CH_3COOH (결정상)	13.6 0.750	5.45-5.65 6.5-7.5
CS03	DBA 용출액	NaCl $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ NaOH	117 3.84 0.680	9.0-9.4 125-165
CS04	0.5M NaOH	NaOH	20.0	>12 80-120
CS05	겔 투과	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ CH_3COOH (결정상) 옥탄산 NaOH	4.94 0.380 0.721 0.190	5.4-5.6 2.9-3.3
CS06	DE-FF 용출액	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ NaCl	7.62 5.84	8.9-9.3 11.7-13.5
CS07	20mM NaOH	NaOH	0.800	>12 3.5-5.5
CS08	DE-FF 평형액	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ CH_3COOH (결정상) 옥탄산 NaOH	4.94 0.380 0.721 0.190	5.4-5.6 2.9-3.3
CS09	아세트산	CH_3COOH	결정상	- -
CS10	DE-FF 세척	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	7.62	9.0-9.4 2.3-2.9
CS11	DE-FF 사전 -평형액	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ CH_3COOH (결정상)	61.8 2.98	5.5-5.7 24-28
CS12	DBA 평형액/세척	NaCl $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ NaOH	11.7 0.960 0.150	8.8-9.2 18-22
CS13	2M 나트륨 옥탄산	옥탄산 NaOH	288 76.0	7.7-8.2 -
CS14	1.73M 인산	H_3PO_4 (85% (w/w))	200	<1.2 -
CS15	2M 암모니아	NH_4OH (30% NH_3 (w/w))	113ml	- -

이 특정 실시예에 있어서, 모든 계량은 $\pm 2\%$ 이다.

양이온 교환 크로마토그래피

알부민이 농축되어, 최소한 효모 단백질(알부민이 효모 발효에 의한 rHA인 경우) 및 기타 항원, 저분자량 오염물질 및 착색 화합물에 관하여, 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 정제된다. 이 방법은 SP-세파로우스 FF, SP-스페로실, CM-세파로우스 FF, CM-셀루로우스, SE-셀루로우스 또는 S-스펙토릭스와 같은 공업적 양이온 교환 기재를 사용한다. 바람직한 기재는 SP-세파로우스 FF(파라마시아사)인데 베드 높이가 5 ~ 25cm, 바람직하게는 10 ~ 15cm이며 본 실시예에서는 12.5cm이고, 칼럼 적재량이 10 ~ 50g 알부민/ ℓ , 바람직하게는 $40 \pm 10\text{g}$ 알부민/ ℓ 기재이다. 기재는 알칼리 저장 용액을 제거하기 위하여 완충제로 평형을 이루는데; 바람직하게는 완충제는 pH를 약 pH 6.0으로 저하시키기에 충분할 정도로 강해야 한다. 칼럼으로부터 저장 용액 CS07을 제거하기 위하여 CS01과 같은 완충제가 사용된다; 그러나, $\text{pH} < 6.0$ 인 임의의 완충제가 사용될 수 있다. 칼럼 유출액의 pH가 약 pH 6.0일 때 평형이 도달된 것으로 판정된다.

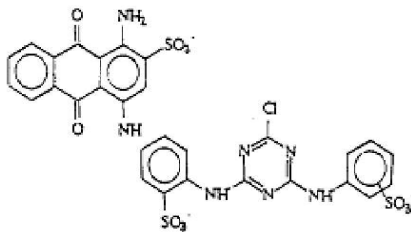
조건 설정된 원심분리액은 다음에, 예를들면 1.0 ~ 8.0cm/분, 바람직하게는 4.0 ~ 7.0cm/분, 본 실시예에서는 6.36cm/분의 유속으로 칼럼상에 적재된 후, 칼럼은 용액으로 세척되어 잔류 오염물질을 세척한다. 이 세척 용액은, 알부민의 유출을 방지하기 위하여, $\text{pH} < 6.0$ 및 전기 전도도 5mS/cm 미만, 바람직하게는 3mS/cm 미만이어야 한다. 적절한 용액은 CS01이다. 앞의 단계들은 모두 6.36cm/분으로 가동되는데; 용리 및 모두 후속 단계에 있어서는 용출액의 용적을 감소시키기 위하여, 유속이 0.5 ~ 5.0cm/분, 바람직하게는 2.0 ~ 4.0cm/분, 본 실시예에서는 3.18cm/분으로 저하된다. 알부민

의 용리는 이온 강도를 증가시킴으로써 달성되며; 전기전도도가 5 ~ 10mS/cm, 바람직하게는 6 ~ 8mS/cm의 범위에 있는 용액, 예를들면 CS02가 사용된다. 알부민의 수집은 UV 시그널이 1.0 A₂₈₀/cm 이상으로 상승할 때 개시되어, UV 시그널이 0.6 A₂₈₀/cm로 떨어질 때까지, 또는 최대용적인 6.5 칼럼 용적이 수집될 때까지 수집은 계속된다. 다음에 칼럼은 CS03 및 04를 사용하여 세척된 후 CS07에 저장된다.

친화성 크로마토그래피

이 단계는 45kDa N-말단 알부민 단편, 효모 항원(알부민이 효모로부터의 rHA인 경우) 및 피그먼트에 관하여 알부민을 다시 정제한다. 친화성 기제는 알부민과 결합하는 시바크론 블루형 염료, 예를들면 리액티브 블루(Reactive Blue) 2, 프로시온 블루(Procion Blue) HB, 블루 세파로우스(Blue Sepharose), 블루 트리사크릴(Blue trisacryl) 및 기타 안트라퀴논형 화합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 기제는 아래에 기재된 “델타 블루 아가로스”(“Delta Blue Agarose”) 기제이다. 이것은 기제에 의하여 생성된 블루 삼출액의 양을 감소시키고 기제의 알칼리 안정성을 강화시켜서 세척 및 탈염화를 용이하게 하는 것으로 판명되었다. 시중에서 유통되는 기제에 비하여 본 기제가 보다 개선된 점은 염료(리액티브 블루 2)와 기제 사이에 스페이서, 1,4-디아미노부탄이 첨합된다는 것이다. 이것은 용출액 알부민 순도에 관하여 최적 길이의 스페이서인 것으로 판명되었다.

리액티브 블루 2는 다음과 같이 표시되는 화학구조를 갖는다.



올토, 메타 또는 파라 이성체, 또는 임의의 그들 혼합물이 사용될 수 있다. 바람직한 이성체는 올토-SO₃⁻ 형태이나, 소정의 순도로 제조하기가 곤란하기 때문에, 메타 이성체가 사용된다. 분석적 HPLC로 측정할 때 최소 순도가 98% 총 피크 면적이 되는 아미노부틸-리액티브 블루 2가 제조된다. 이것은, 아미노부틸 유도체 염료의 정제를 필요로 하게 되는, 상업적으로 구입 가능한 조염료나, 또는 순수한 합성 염료를 이용하여 달성될 수 있다. 후자의 방법에 있어서, 출발 염료 물질은, 280nm에서의 분석적 HPLC에 의하여, 순도가 최소 98%가 되어야 한다. 이와같은 물질은 ACL 아이슬 오브 맨 (Isle of Man)으로부터 얻을 수 있다. 리액티브 블루 2는, 혼합물을 60℃로 가열함으로써 수중의 1,4-디아미노부탄과 반응하는데, 그 다음에 유도된 염료는 침전등과 같은 방법에 의하여 혼합물로부터 정제된다. 다음에 아미노부틸-리액티브 블루 2는 기제에, 예를들면 에피클로로하이드린-활성화 세파로우스 CL-6B(파라마시아사, 스웨덴)에 결합된다. 포라스(Porath) 등 (1971)의 J. Chromatog. 60, 167-177 페이지를 참조할 것. 이와같은 델타 블루 아가로스(DBA) 기제의 염료 함량은, 바람직하게는, 50± 5mmol/g 건조중량이 되어야 한다.

블루 기제의 사용

본 방법은 베드 높이 10 ~ 30cm, 바람직하게는 20 ~ 30cm(본 실시예에서는 25cm)에서 DBA를 사용하는데, 칼럼 적재량은 7 ~ 14g rHA/ℓ 기제, 바람직하게는 8 ~ 12g/ℓ(본 실시예에서는 10± 1g 알부민/ℓ 기제); 모든 단계는 유속 0.3 ~ 2.0cm/분, 바람직하게는 1.0 ~ 2.0cm/분, 본 실시예에서는 1.53cm/분으로 유동된다. DBA는 CS07로부터 CS01으로 평형을 이루는데, 칼럼 유출액의 pH가 약 pH9.5가 될 때 평형은 완료된다. 크로마토그래피 전에, SP-FF 용출액이 약 pH8.5 ~ 9.5로, 바람직하게는 pH9.0으로, 암모니아로 조정되어, 칼럼상에 적재된다. 적재가 완료되면, 칼럼은 오염물질을 제거하기 위하여, 1 ~ 5 용적의 완충제 10 ~ 30mS/cm, 바람직하게는 15 ~ 25 mS/cm, 예를들면 CS12, 바람직하게는 5 용적으로 세척된다. 알부민은, >100 mS/cm, 바람직하게는 125 ~ 165 mS/cm의 고 이온 강도 완충제, 예를들면 CS03을 사용하여 용리된다. UV 시그널 (A₂₈₀/cm)이 0.4 위로 상승할 때 용출액 수집이 개시되며, 시그널이 0.4 이하로 떨어질 때 정지된다. 다음에 칼럼은 CS04를 사용하여 세척되고, CS07에 저장된다.

중간단계 한외여과

이 단계는 겔 투과 크로마토그래피에 대하여 알부민을 농축시킨다. DBA 용출액을 잔류물 농도, 20 ~ 120g/l 알부민, 바람직하게는 80 ~ 110g/l로 농축시키기 위하여, 한외여과 장치내의 셀룰로우스형 막(30,000 이하, 예를들면 10,000인 미세 분자량 절삭)이 사용된다. 막은 사용 후, 물 또는 표 3의 CS03 또는 CS05로 잔류 단백질을 씻어내고, 0.1M 수산화나트륨으로 세척된다. 다음에 막은 20mM 수산화나트륨에 저장된다.

겔 투과 크로마토그래피

이 단계는 효모 항원(알부민이 효모 발효로부터의 rHA인 경우), 피그먼트 및 2량체화 알부민에 대하여 알부민을 정제하며 완충제 교환 단계를 수행한다. 본 발명은 세파덱스(Sephadex) G100, G150, G250, 세파크릴(Sephacryl) S-100, S-200 또는 S-300, 토요피얼(Toyopearl) HW50S 또는 수퍼로우스(Seperose) 6 또는 12와 같은 공업적 겔 투과 기재를 사용한다. 바람직하게는, 기제는 베드 높이가 60cm 이상, 바람직하게는 90± cm(3x30cm)인 세파크릴 S-200 HR(파아마시아)이다. 칼럼은 CS05에서 평형을 이루며, 0.1 ~ 1.5cm/분, 바람직하게는 0.5 ~ 1.0cm/분, 본 실시예에서는 0.75cm/분으로 유동되고; 다음에 칼럼은, pH9.5에 도달할 때 중간 UF 단계로부터 알부민으로 적재된다. 적재 용적은 칼럼 용적의 약 2 ~ 9%, 바람직하게는 5 ~ 8%, 예를들면 7.5%와 같다. 알부민 유분은 3부분으로 수집된다: A_{280}/cm 가 상승세로 10% 전면적 편향(Full Scale Deflection, FSD)에 도달할 때까지 초기의 소량 알부민 이량체는 폐기물이 된다: 이 시점에서 재순환 유분의 수집이 시작되어 90% FSD까지 계속된 후, 알부민이 주생성물 유분으로서 수집된다. 이것은 A_{280} 이 5% FSD를 통하여 떨어질 때까지 계속된 후, 유출액은 다시 폐기물이 된다. 재순환 및 주생성물 유분은 별도로 수집된다. 이 단계는, 모든 물질이 칼럼상에 적재될 때까지 반복된다.

S-200 HR 재순환 한외여과

한외여과 장치내의 셀룰로우스형 막(30,000 이하, 또는 본 실시예에서 사용된 10,000의 미세 분자량은 절삭)이 사용되어 수집된 재순환 유분을 잔류물 농도, 20 ~ 120g/l 알부민, 바람직하게는 80 ~ 110g/l 알부민으로 농축하였다. 막은 사용 후 중간 한외여과 단계에서 상술한 바와 같이 처리되었다.

별도의 방법으로, 본 방법에 있어서 임의의 한외여과 단계에서와 같이, 셀룰로우스형 막 대신에, ≤30,000이 절삭되는 폴리테트라플루오렌 또는 PVDF 막이 사용되었다. 이와같은 막은 아미콘(Amicon) 및 밀리포어(Millipore)로부터 구입 가능하다. 막의 저장 및 세척에 사용되는 NaOH와 혼화될 수 있는 막을 사용하는 것이 바람직하다.

S-200 HR 재순환 한외여과 잔류물의 정제

재순환 한외여과로부터의 잔류물이 1차 S-200 정제에서 사용된 것과 동일한 칼럼상에 적재되고, 생성물 유분이 각 피크로부터 수집된 후, 이미 수집된 부피가 큰 1차 생성물 유분과 혼합된다. 이 단계는, 모든 물질이 칼럼상에 적재될 때까지 반복된다.

음이온 교환 크로마토그래피

이 단계의 목적은, 적어도 효모 항원(알부민이 효모 발효로부터의 rHA인 경우) 착색된 알부민에 대하여 알부민을 정제하는 것이다. 본 방법은 QMA-세퍼로실, DEAE-세퍼독스, Q-하이퍼(Hyper) D, DEAE-셀룰로우스, QAE-셀룰로우스, 또는 TMAE, DMAE, 또는 DEAE 프락토겔(Fractogel)과 같은 음이온 교환기재를 사용한다. 바람직하게는, 기제는 높이가 5 ~ 25cm, 바람직하게는 10 ~ 15cm, 예를들면 12.5cm인 임의의 편리한 베드에서의, 공업적인 음이온 교환 기재 DEAE 세파로우스-FF(파아마시아)인데, 칼럼 적재량이 기재 l당 10 ~ 69g 알부민, 바람직하게는 35± 15g/l 기재이다. 칼럼은 우선, 예를들면 아세트산 나트륨 pH 4.5 ~ 6.0, 바람직하게는 약 pH5.5인 CS11과 같은 강 완충제에서 평형을 이루어 pH를 신속하게 작업 범위로 저하시킨다. 농축된 완충제 후에, 보다 낮은 전기전도의 용액, 말하자면 1 ~ 4mS/cm, 바람직하게는 2.5 ~ 3.5mS/cm, 예를들면 CS08이, 칼럼을 S200 용출액으로 적재하기 전에, 칼럼을 평형화하기 위하여 사용된다. 선형 유속 1.0 ~ 8.0cm/분, 바람직하게는 3.0 ~ 7.0cm/분, 본 실시예에서는 4.4cm/분이 이용될 수 있다. 적재가 완료되면, 칼럼은 5 ~ 30mM, 바람직하게는 15 ~ 25mM 범위의 테트라붕산 나트륨 용액, 예를들면 CS10으로 세척된다. 이것은 알부민 유분의 용리전에, 임의의 탄수화물 함유 오염물질을 칼럼에 보다 강력히 접촉시키게 된다. 용리는 10 ~ 20mS/cm 범위에서 임의의 고 이온 강도 용액, 바람직하게는 CS06으로 달성될 수 있다. 용출액은 A_{280}/cm 이 0.4에 도달할 때 수집되어 피크가 0.8을 통하여 하락할 때까지 계속된다.

따라서, 본 실시예에서는, 정제 단계의 순서는: 양이온 교환, 친화성 크로마토그래피, 한외여과, 겔 투과(재순환 유분의 한외여과) 및 음이온 교환이다.

DE-FF 칼럼으로부터의 용출액은, 10.0ml의 알부민을 함유하는 25.0 μ l의 용출액으로 적제된, TSK SW 3000 XL 칼럼을 사용하는 GP HPLC로 분석한 결과, 0.1% (w/w) 미만의 알부민 이량체 및 검출이 불가능할 정도의 알부민 중합체 또는 집합체를 갖는 것으로 판명되었다.

실시예 3: 정제된 알부민을 최종 제품으로 제형화

본 실시예는 고도로 정제된 알부민을 농축, 다이아필터 및 제형화하여 적절한 제품으로, 본 실시예에서는 25%(w/v) 알부민으로 제조하는 방법을 설명한다. 이 공정은 소위 최종 한외여과(UF) 및 제형화라는 두 단계에서 수행된다. 최종 UF는 DEAE 용출액(인산으로 pH7.0 \pm 0.3으로 조정된)이 최종 UF 공급 용기로 이전되는 것으로 시작하여, 잔류물 및 세척물(있을 경우)이 제형화 용기로 이전된 후에 종결된다. 알부민 함유 공정 흐름은, 미소분자량 절삭한계 10,000인 셀룰로우스, 좀더 바람직하게는 폴리에스테르술폰막이 장치된 한외여과 시스템에서 연속적으로 1차 농축, 다이아필터 및 2차 농축으로 처리된다. 초기 농축단계는 알부민 농도를 약 100g/l로 증가시키며, 즉시 연속적인 다이아필터 상태가 이어지는데, 여기서 알부민이 5 이상, 바람직하게는 7 이상의 사출용 물과 동등한 잔류물 용적에 대하여 다이아필터 된다.

본 발명의 일부 정제공정에 있어서, 예를들면 고정화된 아미노페닐붕산염을 이용하는 실시예 7에 제시된 단계에 있어서, 암모늄 이온이 이 단계에 존재할 수 있다. 놀랍게도, 본 발명자들은 이들 암모늄 이온이 알부민에 의하여 매우 견고하게 결합되며, 물에 대하여 다이아필터에 의하여 완전히 제거될 수 없다는 것을 알았다. 본 발명자들은 염 용액에 대한 다이아필터가 효과적이라는 것을 알았다. 알부민에 대한 염화 나트륨의 비율 0.5 ~ 10% w/w, 예를들면 1.0 ~ 5.0% 또는 약 3%가 사용될 수 있다. 염은 알부민 잔류물에 첨가될 수 있으며, 좀더 통상적으로는, 다이아필터수에 첨가된다. 궁극적인 5% (w/v) 제형에 있어서, 약 100g/l의 용액이 다이아필터 단계로부터 직접 회수될 수 있다. 최후의 25% (w/v) 배합에 있어서는, 약 275 ~ 325g/l의 용액이 추가의 농축 단계(UF)에 따라 얻어진다. 마지막으로, 용액은 벌크 생성물 제형화 용기로 이전된다.

제형화 단계는, 적절한 화학적 환경 및 벌크 생성물 살균여과(0.22 μ m 친수성 폴리비닐리덴-디플루오로라이드) 및 충전에 적절한 알맞은 농도에서 알부민을 제조한다. 이전된 용액은 분석되어 알부민, 나트륨 및 옥탄산염의 농도가 측정된다. 이들 양이 참작되어, 다시 임의의 필요한 양의 원료 염화나트륨 및 옥탄산 나트륨 부형제 용액 및 적당한 등급의 물이 첨가되어 벌크 제형화 규정이 완성된다. 최종 알부민 농도는 235 ~ 265g/l(즉 약 25%), 나트륨 농도는 130 ~ 160mM일 수 있다. 임의의 기타 가능한 알부민 농도가 만들어질 수 있으나, 예를들면, 최소농도 4% (w/v) 이상, 바람직하게는 4 ~ 25%(w/v) 일 수 있다. 제형화는, 인간 알부민에 대한 미국 또는 유럽 약국법에 규정된 바와 같은, 적절한 종래의 약학적으로 수용 가능한 부형제를 첨가함으로써 완성된다.

알부민 그람당 최종 농도 0.08mmol의 옥탄산 나트륨이 바람직하다. 생성물은 무균성 및 비발열성이다. 약 1%(w/w) 이량체 알부민이 있을 수 있으나, TSK SW 3000XL 칼럼을 사용하는 GP HPLC에 의하여 분석시, 좀더 큰 중합체 또는 집합체가 검출될 수 있다.

실시예 4: 양이온 교환 직후 음이온 교환

실시예 2의 방법의 변형으로서, 단계의 순서가 변경되고, 공정 조건에 있어 일부 변형이 가해졌다. 표 3과 같이, 크로마토그래피 용액에 대한 추가의 표가 제시된다. 또한 겔 투과 단계를 제외한 모든 크로마토그래피 칼럼이 반경방향 흐름이다.

[표 3]

실시예 4에 대한 크로마토그래피 용액

* 모든 계량은 $\pm 0.5\%$ 이다.					
용액		성분	농도(g L^{-1})	pH	(mS cm^{-1})
No.	이름				
CS20	SP-FF평형액/세척액/ DE-FF 평형액	CH_3COOH	1.85	5.45-5.65	1.9-2.2
		$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	4.00		
CS23	SP-FF 용출액/ DE-FF 사전-평형액	CH_3COOH	5.13	5.4-5.6	5.0-6.0
		$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	11.5		
		옥탄산	0.721		
CS24	SP-FF/DE-FF 염 세척액	NaCl	58.4	5-9	75-95
		트윈 80	5.00		
CS25	0.5M NaOH (UF 막 세척액)	$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	74.1	>12	80-120
CS26	20mM NaOH	$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	2.96	>12	3.5-5.5
CS27	DE-FF 세척액	$\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.80	9.0-9.4	2.5-3.5
CS29	DBA평형액/세척액	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	19.3	8.7-9.1	18-22
		$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	5.93		
CS30	DBA 용출액	NaCl	117	6.7-7.1	125-165
		$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	14.1		
		$\text{H}_3\text{PO}_4(85\%(\text{w/w}))$	5.79		
CS32	0.1M NaOH (UF 막 저장)	$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	14.8	>12	16-24
CS33	2M 옥탄산 나트륨	$\text{NaOH}(27\%(\text{w/w}))$	281	7.8-8.4	-
		옥탄산	288		
CS34	아세트산	CH_3COOH	1045	-	-
CS35	0.5M 인산	$\text{H}_3\text{PO}_4(85\%(\text{w/w}))$	59.0	<1	-

초기 양이온 교환 단계는 근본적으로 실시예 2와 동일하였으나, 다음과 같은 변형이 있다: 베드 유동 통로 길이가 $11.0 \pm 1.0\text{cm}$ 였다. 그런 다음, 크로마토그래피는 하기와 같이 수행되었다.

SP-FF(파아마시아) 칼럼이, 4용적의 10 ~ 100mM 아세트산염, 바람직하게는 20 ~ 40mM, 예를들면 CS20에서와 같이 30mM으로 평형을 이루고, 알부민 용액이, 분당 0.07 ~ 0.75 베드 용적, 바람직하게는 0.3 ~ 0.6 베드 용적, 본 실시예에서는 분당 0.5 베드 용적의 유속으로 적재되었다. 칼럼은 8용적의 10 ~ 100mM, 바람직하게는 30 ~ 70mM, 예를들면 50mM 아세트산염(CS21)으로 세척된 후, 10용적의 CS20 세척되고, 알부민이 수집의 시작 및 종점을 표시하기 위해서 0.6 및 0.36의 A_{254}/cm 를 이용하여, 아세트산염/옥탄산염 완충제(예를들면 40 ~ 120, 바람직하게는 60 ~ 100, 예를들면 85mM 아세트산염, 및 2 ~ 50, 바람직하게는 2 ~ 20, 예를들면 CS23에서와 같이 5mM 옥탄산염)로 용리되고 거기에 수집된다. 칼럼은 0.25 ~ 3.0M 염 및 0.05 ~ 2% 세척제(CS24)로 세척된 후 0.1 ~ 1.0M 부식제(CS 25)로 세척되고, 묽은 (10 ~ 50M) 부식제(CS26)에 저장된다. 본 실시예에서, 평형, 적재 및 세척단계를 위한 유속은 분당 0.5베드 용적이다. 알부민의 용리를 위해, 유속 0.04 ~ 0.6 베드용적/분, 바람직하게는 0.15 ~ 0.35 베드용적/분, 본 실시예에서는 0.25 베드 용적/분이 사용된다. rHA 단량체의 예상 회수율은 46 ~ 66%이다.

따라서 알부민은 옥탄산염의 용액과 함께 양이온 교환 칼럼으로부터 용리되어 양이온 교환기로부터 rHA의 신규 생물학적 특이성 용리현상을 달성한다. pH는 알부민의 pI에 근접하여, 옥탄산염의 결합은 현저한 전반적 전하 차이를 일으키는데: 예를들면 pH는 4.5이상, 바람직하게는 약 pH5.5이다.

다음에 양이온 교환기로부터의 용출액은, pH4.5 ~ 6.5, 바람직하게는 약 5.5 및 바람직하게는 1.5 ~ 5.0mS/cm, 예를들면 $2.5 \pm 0.5\text{mS/cm}$ 의 전기전도도에서 음이온 교환 수지상에 직접(즉, 실시예 2에서와 같이, 친화성 및 겔 투과 크로마토

그래피 대신에, 그러나 바람직하게는 회석 후에) 적재된다. 이것은 음이온 교환 크로마토그래피의 조건하에서 양이온 교환 크로마토그래피가 단량체 알부민으로 역전환되는 동안에 형성되는 임의의 이량체 알부민을 발생시키는 것으로 판명되었다. 이 단계에 걸쳐서 약 110%의 알부민 단량체 수율이 달성되었다.

줄더 상해하게는, 11.0 ± 1.0 cm 베드 유동 통로 길이 칼럼, DEAE-세파로우스 파스트 플로우(Fast Flow, 파아마시아)가 양이온 교환 용리 완충제(CS23)로 미리 평형상태를 이룬 후, 기재 리터당 30.0 ± 10.0 g 단량체 알부민으로 적재되기 전에 아세트산염 완충제(예를들면 CS20)로 평형을 이룬다.

칼럼은 다음에 실시예 2에서와 같이 봉산염 용액(CS27)으로 세척되고, 실시예 2에서와 같이(CS06) 용리되고 염/세정제(CS24), 부식제(CS25)로 세척되고, 모두 양이온 교환 칼럼에 대한 것과 같이 묶은 부식제(CS26)에 저장된다. 모든 단계에 대한 유속은 0.07 ~ 0.75 베드 용적/분, 바람직하게는 0.3 ~ 0.6 베드 용적/분, 본 실시예에서는 0.5 베드 용적/분이다.

음이온 교환 수지(예를들면 DE-FF)로부터의 용출액은 여전히 불순물을 함유하며 그 다음에 친화성 기재(예를들면, 실시예 2에 기술된 바와 같은 델타 블루 아가로우스)에 직접 적용된다. 베드 높이는 실시예 2의 25cm에서 11.0 ± 1.0 cm로 낮아지는데, 이것은 정상적인 가동 압력내에서 유속을 더 높히게 된다. 따라서, 베드 높이 11.0cm가 바람직하며, 알부민의 회수 또는 알부민 순도에 악영향을 미치지 않는다. 칼럼은 아세트산 암모늄(100 ~ 300mM, 바람직하게는 200 ~ 275, 예를들면 CS29에서와 같은 250mM)에서 평형을 이루며, 알부민은 기재 리터당 7.0 ~ 14.0g, 바람직하게는 8.0 ~ 12.0g, 본 실시예에서는 10.0 ± 1.0 g으로 적용된다. 평형, 적재 및 세척 단계가 0.05 ~ 0.30 베드 용적/분, 바람직하게는 0.15 ~ 0.27 베드 용적/분, 본 실시예에서는 0.25 베드 용적/분의 유속으로 수행되었다. 기타 모든 단계는 0.04 ~ 0.30, 바람직하게는 0.1 ~ 0.25 및 본 실시예에서는 0.20 베드 용적/분에서 수행된다. 감소된 베드 높이에 의하여 촉진된 유속의 증가는 4개의 요소에 의하여 작업 처리량을 개선시키는데, 상기 4개의 요소는 대규모 공장 설계에 유익하며, DBA의 최대 가동 능력과 근접하였다. 이 증가된 유속이 알부민의 회수 또는 알부민 순도에 악영향을 미치는 것으로 보이지 않기 때문에, 상기와 같은 높은 유속을 이용하는 것이 바람직하다.

칼럼은 5 칼럼 용적의 아세트산 암모늄 완충제(CS29)로 세척되고 알부민은 강염 및 인산염 용액(1.0 ~ 3.0M NaCl, 예를들면 1.5 ~ 2.5M 또는 2.0M NaCl 및 5 ~ 100mM, 예를들면 CS30에서와 같이, 50mM 인산염)으로 용리되었다.

이 변형 방법에 있어서의 용출액의 pH는 pH9.2로부터 pH 7.0으로 변경되었다. 이에 따라 완충제는 50mM 아세트산 암모늄으로부터 50mM 인산나트륨으로 변경되었는데, 이것은 pH 7.0에서의 완충 작용 및 상대적으로 저렴한 가격 때문에 바람직하다. pH가 낮은 용출액은 DBA 용출액 알부민 단량체 회수를 증가시키게 된다. 7.0 이하의 pH는 단편량을 증가시키며 pH 7.0 이상이면 알부민 단량체 회수가 감소되었다. 따라서 pH는 5.5 ~ 9.0, 바람직하게는 pH 7.0일 수 있다. 칼럼은 세척되어, 상기와 같이 부식제(CS25, CS26)에 저장되었다.

다음에 DBA 용출액(선택적으로, 셀룰로우스형 막(미소분자량 30,000 절삭)으로 한외여과하여 80 ~ 110g/l의 알부민을 부여한 후에)은 겔 투과 수지, 예를들면 S-200(HR)에 적용된다. S-200 유동 완충제는 40mM 인산 나트륨 pH 7.0으로 변경되었다. 옥탄산 나트륨은 비용관계로 이 완충제에서 제외되며, 대신에 다이아필터전에 용액에 첨가되었다(1 ~ 20mM, 바람직하게는 5mM의 농도로 첨가). 인산염은 순도를 개선시킨 유동 완충제에 고 전기 전도도를 부여한다. 전기 전도도를 증가시키기 위하여 고농도 염이 사용될 수 있으나, 용액을 완충화시키는 것이 여전히 바람직하다. pH 7.0이 바람직한데, 이것은 제형화를 위하여 요망되기 때문이다.

따라서, 본 실시예에 있어서, 정제 단계의 순서는 다음과 같다: 양이온 교환(알부민에 의하여 특이적으로 결합된 분자로 용리), 음이온 교환, 친화성 크로마토그래피 및 겔 투과.

제형화 전의 다이아필터 단계는, pH7.0의 알부민으로 출발함으로써 도움을 받을 수 있다. 알부민은 실시예 2의 방법으로 보다는 최종 용출액에서 더욱 농축되었는데, 이것은 제형화(실시예 3) 전의 최종 한외여과 단계를 지원하게 된다.

실시예 5: 양이온 교환기상에서의 높은 염 세척

또다른 변형 방법에 있어서, 하기를 제외하고는 실시예 2 또는 4의 방법을 따랐다. 양이온 교환 칼럼(예를들면 SP-세파로우스 FF, 파아마시아)상에 알부민을 적재한 후, 칼럼은 CS21(50mM 아세트산 나트륨, pH 3.9 ~ 4.1, 0.6 ~ 0.8mS/cm)로 세척된 후, CS20으로 최종 세척하기 전에, 아세트산 나트륨 완충제(예를들면 10 ~ 50mM, 바람직하게는 약 27mM의 아세트산 나트륨, pH3.5 ~ 4.5, 바람직하게는 pH4.0)에 1 ~ 3M NaCl, 바람직하게는 2M NaCl을 함유하는 높은 염 완충제로 다시 세척되었다. 이와같이 보다 엄격한 세척 공정은 비알부민 단백질 함량이 낮은 용출액을 발생시키며, 알부민이

효모 발효로부터의 rHA인 경우 특히 유용할 수 있다. 알부민은 실시예 4에 기재된 바와같이 용리되었다. 높은 염의 세척 전에 pH를 저하시키면 그 세척 기간중 칼럼상에 알부민을 유지시키는데 도움이 되며, 최종 세척 역시 알부민 회수를 극대화한다. 어떤 단계도 회수된 알부민의 순도에는 큰 영향을 미치지 않는 것이 바람직하다.

실시예 6: 음이온 교환기로부터 농축된 붕산염 용리

본 실시예에서, 실시예 2 또는 4의 공정이 다음과 같이 변하였다(실시예 5에 있어서는 변형이 있거나 또는 없다). 양이온 교환 칼럼으로부터의 용출액이 10mS/cm 이하, 바람직하게는 5mS/cm 이하로 희석된 후, 음이온 교환 기재(예를들면 DEAE 세파로우스 FF, 파아마시아)상에 적재되었다. 그런 다음, 음이온 교환 기재는 묽은 테트라붕산염 완충제(예를들면 15 ~ 25mM 테트라붕산 칼륨 또는 테트라붕산 나트륨)로 세척되는데, 이것은 pH를 약 9.2로 상승시키는 효과가 있으며, 다음에 알부민은 보다 농축된 테트라붕산염 완충제(예를 들면, 80 ~ 150mM의 테트라붕산 칼륨, 바람직하게는 110mM의 테트라붕산 칼륨)로 용리되었다. 실시예 2 및 4에 있어서, 알부민은 20mM 테트라붕산염, 100mM NaCl로 용리되었고; 80 ~ 150mM 테트라붕산염(예를들면 33.6g/l)에 의한 용리 결과, 이들 조건하에서 음이온 교환 기재에 대한 오염물질의 증가된 친화성 때문에 탄수화물 함유 오염물질, 예를들면 효모 글리코 단백질의 함량이 낮은 용출액이 발생되었다. 테트라붕산 칼륨이 테트라붕산 나트륨에 우선하여 사용되는데, 그것은 실온에서 그 용해도가 보다 높기 때문이다. 음이온 교환 기재로부터의 용출액은 실시예 2 또는 4에서와 같이 취급된다. 예를들면, 실시예 4의 공정에 있어서, 그런 다음 이것은 친화성 기재, 예를들면 델타 블루 아가로우스(DBA) 위에 직접 적재되는데, 이것은 실시예 4에 기재된 바와 같이 유동한다.

그런 다음 실시예 2 또는 4에서와 같이 겔 투과 단계가 이행된다.

실시예 7: 고정화된 아미노페닐붕산염

DBA 기재로부터의 용출액이 예를 들면, 세파크릴 S-200(HR)(파아마시아)와 같은 겔 투과 매체에 적용되고, 아세트산 암모늄 완충제(예를들면, 10 ~ 100mM, 바람직하게는 약 30mM)에서 평형을 이루며, 염화나트륨(20 ~ 2000mM, 바람직하게는 약 100mM) 및 옥탄산염(1 ~ 20mM, 바람직하게는 약 5mM 옥탄산염, pH9.0 ~ 9.5, 바람직하게는 9.2)을 함유한다. 이 완충제는 알부민을 최종 크로마토그래피 단계를 위한 적절한 용액으로 효과적으로 교환시키는데, 하기에 좀더 상세히 제시된다.

S-200 단계는 하기와 같이 수행된다. S-200 최소 베드 높이 90.0±3cm(예를들면 연속으로 3x30cm)에서 유동한다. (a) 중간 한외여과 단계로부터의 잔류물이 칼럼상에 적재된다. 재순환 및 생성물 유분이 수집된다. 이 단계는, 모든 물질이 칼럼상에 적재될 때까지 반복된다. (b) 수집된 재순환 유분은, 상기의 한외여과에 의하여 80 ~ 110g rHA/l로 농축된다. (c) 재순환 한외여과로부터의 잔류물은 동일 칼럼상에 적재되며, 각 피크로부터 생성물 유분이 수집된다. 이 단계는 모든 물질이 칼럼상에 적재될 때까지 반복된다. (d) 제1 및 제2 겔투과 크로마토그래피 단계 ((a) 및 (c))로부터의 생성물 유분은 S-200 용출액과 같이 수집된다.

최종 단계는 당단백질 및 당지방질과 같은 당-공액화물 및 폴리-, 올리고- 및 단당류를 제거하기 위한 친화성 단계로 구성된다. 이 단계는 리간드로서 고정화된 아미노페닐붕산(PBA)을 사용한다. 미국특허 제4,562,251호(여기서 참고로 인용)는 디보로트리아진 아가로우스 또는 모노보로트리아진 아가로우스의 적절한 제조방법을 기술하고 있다: (1) 트리아진은 우선 아가로우스에 O-연결된 후, 제2 반응에서 3-아미노페닐붕산(APBA)으로 연결된다. 만일 트리아진상의 X가 염소로 치환되면 분배된 수지가 생성된다 (2) 트리아진은 우선 APBA와 반응하여 모노-또는 디보로트리아진을 생성한다. 그런 다음, 이들은 트리아진상의 유리 염소를 통하여 -ONa 활성화 아가로우스에 O-연결되어 모노- 또는 디-치환 아가로우스를 생성한다. 본 출원에 있어서의 모든 실시예 및 설명은 O-연결을 발생시키는 -ONa 활성화 아가로우스를 사용한다.

이전의 미국특허 제4,269,605호는 본원에서 바람직한 아가로우스의 에피클로로히드린 활성화를 포함하는, 다양한 기재 활성화 방법을 시도하고 있다. 상업적으로 구입 가능한 기재에는 아미콘사의 PBA30과 시그마사의 아크릴 구슬형 아미노페닐 붕산염이 포함된다.

S-200 칼럼으로부터 수집된 알부민은, S-200 유동 완충제(상기 참조)에서 미리 평형을 이룬 PBA 기재를 통하여 크로마토그래피 처리되며, 이러한 조건하에서, 알부민은 기재에 별로 결합되지 않는 반면에, 탄수화물 기재 오염물질은, 알부민이 칼럼을 통과할 때 알부민으로부터 그들을 분리하기 위해서 충분히 저지된다. 크로마토그래피는 알부민에 대하여 이와 같이 네거티브 모드에 있다. 보다 상세한 것은 다음과 같다:

페닐붕산염 기재는 유동 통로 길이가 11.0±1.0cm이며, 암모늄 이온(10 ~ 50mM), 아세트산염(10 ~ 50mM) 및 1.0 ~ 10.0mM 옥탄산염(예를들면 CS36-하기 표 참조)을 함유하는 완충제로 평형을 이루었다. 그런 다음, 칼럼은 35±15g의

rHA/ℓ 기재에 적재되었다. PBA는 네거티브 단계로서 유동하며, 따라서 수집된 생성물은, 적재 및 계속되는 평형 완충제로의 세척 동안의 관통유체(flow through)이다. 모든 크로마토그래피 단계는 0.005 ~ 0.3 베드 용적/분의 유속으로 수행될 수 있다. 바람직하게는 칼럼의 평형 및 세척은, 알부민 용액의 적재 및 수집에서 보다 높은 유속, 예를들면 0.19 베드 용적/분에서 수행되는데, 알부민 용액의 적재 및 수집은 0.01 ~ 0.05, 바람직하게는 0.025 베드 용적/분의 유속으로 바람직하게 수행된다. 그런 다음 칼럼은 붕산염 완충제(CS37에서와 같은), 염(CS38) 및 부식제(CS25)로 세척되고, 이어서 붕산염 완충제(CS37)에 저장된다.

수집된 관통유체 및 세척액의 pH는 인산 용액(CS35)으로 7.0 ± 0.1 로 조정된다.

사용된 완충제는 하기와 같다:

[표 4]

실시예 7에 대한 크로마토그래피 용액

No.	용액	성분	농도(g/l)	pH	전기전도도 (mS.cm ⁻¹)
	이름				
CS36	PBA 평형액/세척	CH ₃ COONH ₄	2.31	9.0-9.4	12.0-15.0
		NaOH(27%(w/w))	2.55		
		NaCl	5.84		
		옥탄산	0.721		
CS37	붕산염 세척	K ₂ B ₄ O ₇ ·4H ₂ O	33.6	9.2-9.5	15.0-18.0
CS38	염 세척	CH ₃ COOH	1.62	3.9-4.1	125.0-165.0
		NaOH(27%(w/w))	1.19		
		NaCl	117.0		

PBA 완충제에서 암모늄 이온을 사용하기 때문에, 상기 실시예 3에서 설명한 바와 같이, 최종 한외여과 단계에서는 염을 사용하는 것이 유리하다.

특히 바람직한 공정에 있어서, 단계의 순서는 하기와 같다:

- (1) 실시예 1에서와 같은, 효모 발효.
- (2) 실시예 2에서와 같은, 원심분리물(centrate) 조건설정.
- (3) 실시예 5에서와 같은, 높은 염으로 세척되는 양이온 교환 칼럼(SP-FF) 및 실시예 4에서와 같은, 알부민-특이적 화합물로의 용리
- (4) 실시예 6에서와 같은, 희석 및 농축된 테트라붕산염 용리로 음이온 교환
- (5) 실시예 4에서와 같은, 친화성 크로마토그래피(DBA)
- (6) 실시예 7에서와 같은, 재순환 한외여과로 중간 한외여과 후에 겔투과(S-200)
- (7) 실시예 7에서와 같은, 고정화된 붕산염 상의 크로마토그래피
- (8) 실시예 3에서와 같은, 최종 한외여과 및 제형화

실시예 8: 고정화된 페닐 붕산염의 조기 사용

고정화된 페닐 붕산염을 수반하는 단계는 공정중 조기에 사용될 수 있는데, 예를들면 그러한 공정에서 단계의 순서는 다음과 같다: 양이온 교환기-음이온 교환기-친화성 물질-한외여과/다이하필터-고정화된 페닐 붕산염-겔투과.

각 단계에 대한 조건은, 하기를 제외하고는, 실시예 4 또는 7에서와 같다. DBA 용출액은 80 ~ 110g/l 알부민으로 농축되고, 실시예 7에서 사용된 종류의 아세트산 암모늄에 대한 다이하필터(5 용적)에 의하여 pH는 9.2로 조정된다. 그런 다음, 농축된 DBA 용출액은 다음에 PBA 상에서 크로마토그래피 처리되며, 관통유체는 수집되어 직접 겔 투과(예를들면 S200) 칼럼에 적용된다. 겔 투과 단계가 현재는 최종 단계이기 때문에, 이것은 제형화 단계에 적합한 완충제, 예를들면 20 ~ 130mM(바람직하게는 50 ~ 100mM)NaCl, pH7.0에서 유동될 수 있다.

실시예 9: 본 발명에 따라 제조된 알부민의 특성 부여

본 실시예는, 본 발명에 따라 정제된 알부민의 순도를 규정하기 위하여 수행되는 분석방법을 설명한다. 별도의 언급이 없는 한, 모든 분석은 최종 제품을 산출하기 위하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 제형화된 알부민에 대하여 수행된다.

rHA의 글리코실화

글리코실화 단백질의 마이크로분석 결과는 본 발명에 따라 정제된(rHA)가 비-효소 글리코실화(glycation)에 의하여 변형되지 않는 것을 보여주고 있다. 마이크로분석은, 아마도리 생성물(Amadori Product, AP)의 C-1 히드록실 그룹을 과요오드산염으로 산화함으로써 글리코실화 단백질의 안정한 AP형을 측정한다. 과요오드산염 산화에 의하여 방출된 포름알데히드는, 암모니아중 아세틸아세톤과의 반응에 의하여, 발색기, 디아세틸디히드로루티딘(DDL)으로의 전환에 의하여 정량된다. 그런 다음, DDL은 다음에 405nm에서 비색측정법으로 검출된다.

알부민 배치 몰 헥소우스/몰 단백질

A 0.092
B 0.116
C 0.090
D 0.132
E 0.060
G 0.04
H 0.01
I 0.07
J 0.07
K 0.05
L 0.740
M 0.70
N 0.96
O 0.78

배치 A ~ K는 실시예 2에 따라 정제된 rHA이다. 배치 L ~ O는 다른 공급원으로 상업적으로 구입 가능한 인간 혈청 알부민의 샘플이다. 실시예 7에 따라 정제된 8 배치의 rHA는, HSA(0.387 ± 0.012)에 비하여 무시할 수 있을 정도의 글리코실화 정도(0.042 ± 0.018 몰/몰)를 보였다.

저분자량 오염물질 분석

이론적 해석

이 분석의 목적은, 산성 유기 용매를 사용하여 rHA 및 HSA로부터 비공유 결합 저분자량 오염물질(LMC)를 제거하는 것이다. 다음에 HPLC "지문" 크로마토그램이 샘플의 비교용으로 제조될 수 있다.

방법

100 μ l의 최종제품(20mg; rHA 또는 HSA)에 순서적으로 50 μ l 포름산(98% v/v), 100 μ l 클로로포름 및 50 μ l 에탄올을 각각 첨가 후 교반하면서 가한다. 샘플은 정규적으로 혼합하면서 실온에서 5분간 유지된다. 그런 다음, 1ml의 아세톤을 첨가함으로써 단백질이 침전된다(30분, -20°C). 단백질 샘플은 원심분리에 의하여 펠렛화 되고 상청액을 따라내고, 진공하에서 회전 증발에 의하여 건조된다. 건조된 샘플은 25% 아세토니트릴/0.1% 트리플루오로아세트산에 재부유된다. 그런 다음, LMC들은 0.1% 트리플루오로아세트산 중의 선형 10% ~ 90% 아세토니트릴 구배를 이용하여 ABI PTH C18 가역상 칼럼(220x2.1mm)상에서 분리된다(유속=300 μ l/분). 샘플은 시마쯔(Shimadzu) UV 모니터를 이용하여 214 nm에서 조사된다.

결과

상업적으로 구입 가능한 인간 혈청 알부민 배치와 본 발명에 따라 정제된 rHA의 배치가 비교되었다. 본 발명의 샘플에서 2개의 주요 현저한 A₂₁₄nm 피크가 보인다(R_t=각각 31.1 및 42.8분 - 제2도 및 표 9 참조). 2.15분에서의 피크는 칼럼을 통과하는 불용성 또는 부분적 가용성 물질 때문인 것으로 생각되며, 56.5분에서의 큰 피크도 물 공시험의 흔적으로 존재하는데, 이것은 인위적 결과인 것으로 간주된다.

[표 5]

피크 결과

#	유지시간(분)	면적(uV.sec)	높이(uV)
1	0.800	3459686	219122
2	1.667	418606	33569
3	2.150	77883335	1963630
4	3.000	6293258	122295
5	20.433	297608	14424
6	22.900	205822	14601
7	27.567	150851	10835
8	31.117	2213883	170938
9	37.983	164710	15088
10	39.267	347946	29879
11	41.750	107515	8402
12	42.783	2303024	192911
13	43.217	139744	14141
14	43.457	254521	23979
15	50.467	152805	13226
16	50.950	162364	12577
17	56.533	5753796	83674

한편, 상업적으로 구입 가능한 HSA는 피크가 보다 많다(제3도 및 표 6 참조).

[표 6a]

피크 결과

#	유지시간(분)	면적(uV.sec)	높이(uV)
1	0.350	244385	23957
2	0.633	607880	45310
3	0.783	3239730	243477
4	0.983	1072033	158146
5	2.233	76773569	2038028
6	2.933	6634089	182363
7	3.733	2812688	95459
8	12.483	818540	20185
9	12.650	218748	22750
10	14.150	5423715	98336
11	16.333	423403	17460
12	16.633	688525	24538
13	17.550	2301309	84781
14	18.033	1145045	47806
15	19.750	672721	21562
16	20.233	87799	9760
17	20.700	272171	13003
18	21.100	862146	55792
19	21.967	166471	8928
20	22.883	1381445	97660
21	23.583	1112632	89851
22	24.000	4740347	419780
23	24.417	352486	26374
24	24.917	171279	14625
25	25.133	99734	11473
26	25.267	133911	10515
27	25.667	223556	11854
28	25.967	257295	17351
29	26.600	93906	7957

[표 6b]

#	유지시간(분)	면적(uV.sec)	높이(uV)
30	26.817	223113	18326
31	27.250	303831	29461
32	27.533	124218	12710
33	27.783	5747091	561629
34	28.550	1383761	119772
35	29.033	390986	33455
36	29.417	182131	12713
37	29.833	181333	12584
38	30.183	478320	30155
39	30.583	1048945	58465
40	31.067	3454425	214489
41	31.983	168275	8663
42	32.717	651406	43161
43	33.150	1142221	102588
44	34.017	420756	23883
45	35.100	115704	10008
46	37.033	166588	9468
47	38.267	145731	8078
48	38.983	781209	54029
49	41.800	86967	8868
50	48.883	95416	8522
51	50.267	174159	16737
52	50.483	176115	15573
53	51.267	158727	13701
54	52.183	297278	25795
55	56.533	5846645	85710

비 공유 결합 LMC라는 점에서, 본 발명의 알부민 품질은 임상적 HSA 보다 명백히 우수하다. 수치로 표현하면, 본 발명의 알부민에 대한 10분 ~ 55분 사이의 총 피크 면적은 약 6.4 V.sec인 반면에, 상업적으로 구입 가능한 물질에 대한 동일한 두 시간 사이의 총 피크 면적은 39.7 V.sec 였다.

유사한 분석이 수행되어 280nm에서 검출되었는데, 여기서 본 발명에 따라 정제된 알부민에 대한 피크 면적은 0.56 V.sec 인 반면에 HSA에 대한 것은 14.9 V.sec 였다.

형광성 저분자량 오염물질의 분석(280nm에서 여기, 350nm에서 검출) 결과는 다시 한번, 본 발명에 따라 정제된 알부민에 대한 총 피크 면적이 HSA에 대한 것보다 10% 미만이라는 것을 나타내었다.

rHA 및 HSA의 모세관 영역 전기영동법

모세관 전기영동법(Capillary electrophoresis, CE)은, 표준 SDS-PAGE에 대한 대안으로서, 본 발명의 정제된 rHA와 상업적으로 구입 가능한 HSA를 질적으로 비교하는데 사용된다. CE는 고 분해 전기영동 기술로서, 단지 미세한 차이만이 발견될 경우, 동일 단백질의 부집단을 분리시킬 수 있다.

방법

HSA(아모우어(Armour)) 및 본 발명에 따라 정제된 rHA의 샘플이 20mM $\text{PO}_4/\text{B}_4\text{O}_7$ 완충제, pH=7.4 중에서, 20KeV 및 30℃에서 분리되어 ABI 270 CE상에서 전기 영동법으로 처리되었다. 본 발명의 rHA는, 그 동질성을 나타내는 단일 피크

를 전기 영동도상에 제공하였다. 이와는 대조적으로, 상업적으로 구입 가능한 HSA 샘플에서는 다른 피크들이 관측되었다. 이들 피크는, 예를들면 차단된 유리 티올 그룹 또는 아미노 말단 분해상태의 알부민 분자의 존재를 나타내는 것으로 믿어진다.

C-말단의 분석

제조합 단백질의 품질 관리의 중요한 관점은, 예정된 1차 구조의 확인 및 안정성이다.

재료 및 방법

트립신 다이제스트: HSA(시판 제품- 하나는 -20℃에서 및 하나는 30℃에서 12주간 저장), 본 발명에 따라 정제된 rHA(4℃ 및 30℃에서 6개월 저장) 및 Des-Leu rHA(C-말단 류신을 뺀 절단형 rHA)(각 1mg)가 37℃에서 120분간 5mM 디티오프레이톨(칼비오켄(Calbiochem))로 환원된 후, 0.5M 트리스 HCl pH8.0의 6M 구아니딘 중에서, 37℃에서 90분간 10mM 이오도아세트아미드(시그마사)로 알킬화 되었다.

다음에 샘플은 3배로 희석되고 37℃에서 48시간 동안 트립신으로 다이제스트 되었다(시그마사로부터의 TPCK 처리 트립신, 48시간에 걸쳐 첨가된 1mg/ml 용액의 3x10 μ l 분취량).

펩티드 지도화: 25cm 파라마시아사의 SuperPac Pep-S 칼럼(5 μ m C₂/C₁₈)을 이용하여 길손(Gilson) HPLC 시스템상에서 가역상(RP) HPLC에 트립신 다이제스트가 지도화 되었다. 사용된 용출액은 A, 수중 0.1%(v/v) TFA(ABI); B, 70%(v/v) 아세토니트릴 (피손스 사이언티픽(Fisons Scientific) 중의, 0.09%(v/v) TFA이다 - 60분간의 선형 구배, 0.5ml/분. 214nm 및 280nm에서 UV 검출.

N-말단 서열 결정: ABI 477A 단백질 시퀀서(Sequencer) 상에서 수행.

질량분석(Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry, FAB-MS): 영국 아스콧의 엠-스칸사(M-Scan Limited)의 VG 오토스펙(Autospec)상에서 수행되었다.

펩티드 합성: 전장의 C-말단 트립신 펩티드 L V A A S Q A A L G L (질량 1012)가, 영국 워링톤의 ABI에 의하여 합성되고; 절단형 L V A A S Q A A L G (질량 899)은 영국 노팅햄의 노팅햄 대학 생화학부에 의하여 합성되었다.

결과

합성 마아커 펩티드를 이용하여, 전장의 C-말단 트립신 펩티드(질량 1012)가 RP-HPLC 상에서 37.5분에 용리되는 것으로 나타났다. 이 피크는 수집되어 HSA 및 rHA로부터의 FAB-MS 및 N-말단 서열결정에 대하여 확인되었다.

C-말단 류신을 제거하면 절단형 C-말단 펩티드(질량 899)가 발생하는데, 이것은 28.5분에서 용리되는 것으로 나타나는 데, 합성 마아커 펩티드를 사용하여 확인된다. 이 피크는 Des-Leu rHA의 트립신 다이제스트로부터 유리되어, N-말단 서열결정 및 FAM-MS에 의하여 확인된다. 2개의 기타 펩티드는, 이 28.5분 피크에 존재하는, A W A V A R (질량 673) 및 D L G E E N F K (질량 950)로 보인다.

28.5분 피크는 HSA의 트립신 다이제스트로부터 RP-HPLC에서 수집된다. HSA는 30℃에서 12주간 저장되고, 본 발명의 Des-Leu rHA는 4℃에서 6개월간 저장되며, 본 발명의 rHA는 30℃에서 6개월 저장된다.

각 다이제스트로부터의 피크는 계속하여 합성 마아커 펩티드와 함께 N-말단 서열결정 및 FAB-MS에 의하여 분석된다.

[표 7]

N-말단 서열결정에 의한 28.5분 피크에 존재하는 펩티드

샘플	서열
Des-Leu rHA	L V A A S Q A A L G A W A V A R D L G E E N F K
HSA 표준	A W A V A R D L G E E N F K +약 5% L V A A S Q A A L G
HSA 30℃ 12주	A W A V A R D L G E E N F K
rHA 4℃ 6개월	A W A V A R D L G E E N F K
rHA 30℃ 6개월	A W A V A R D L G E E N F K

FAB-MS에 의하여, 28.5분 피크에 존재하는 주 시그널((M+ H)⁺ 분자이온)은 표 8에 기재된 바와 같다.

[표 8]

28.5분 피크내의 (M+H)⁺ 이온

합성 전장 및 절단형 C-말단 펩티드의 혼합물	1013- L V A A S Q A A L G L 900- L V A A S Q A A L G
Des-Leu rHA	673- A W A V A R 900- L V A A S Q A A L G 951- D L G E E N F K 1028- ? 1140- ?
HSA 표준	673- A W A V A R 900- L V A A S Q A A L G 951- D L G E E N F K 1028- ? 1140- ?
rHA 30℃ 6개월	673- A W A V A R 900- L V A A S Q A A L G 1028- ? 1140- ? 951- 시그널 없음

1028 및 1140에서의 시그날은 단편 이온일 수 있으며; 그들은 서열 분석에 의하여 검출될 수 있는 펩티드가 아니다.

결론

Des-Leu C-말단 트립신 펩티드가 상업적 HSA에서 약 5 ~ 10%(양적인 것이 아님)로 검출되었으나, 본 발명의 rHA에서는 30℃에서 6개월 후에도 검출될 수 없었다. Des-Leu 펩티드는 12주 30℃의 HSA에서 검출될 수 없었고, 37.5분에서의 전장의 C-말단 펩티드에 대한 피크(유리되지는 않으나)는 기타 샘플에 비하여 매우 감소되었는데, 아마도 이것이 다시 C-말단 분해를 당한 것을 나타낸다.

이들 결과는, 본 발명에 따라 정제된 rHA가 안정되고 전장의 카르복시-말단을 갖는 반면에, 상업적 공급원으로부터 구입 가능한 종전의 HSA는 비교시 이질적인 것으로 나타났다.

정제된 인간 알부민내의 유리 티올에 대한 비색분석

서론

엘만 시약, 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조에이트)(DTNB)는 Cys-SH와 같은 유리 티올 그룹을 검출하는 특이하고 민감한 방법이다. 반응 후에는 412nm에서의 흡광도를 조사할 수 있는데, 이 값은 유리 Cys-SH를, rHA 분자당 하나의 잔기 이하의 수준으로 계산하는데 이용될 수 있다. 하기 용액 시약이 분석에 사용된다:

5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) DTNB, 시그마 제품번호 D8130.

TRIS PRE-SET pH 결정 pH8.0, 시그마 제품번호 T4753.

EDTA, 디소듐, 시그마 제품번호 ED2SS.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 분석용급.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 분석용급.

완충제 1: 0.1M(12.1g) 트리스-HCl; 0.01M(3.72g) EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH8.0, 예비설정 pH 결정. 500ml 물에 용해하여 정확히 1리터 용적으로 만든다. 실온에서 1개월간 안정.

완충제 2: 0.05M 인산나트륨 pH7.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.45g), 3.04g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 500ml 물에 용해하여 정확히 1ℓ 용적으로 만든다. 실온에서 1개월간 안정.

시약: 인산염 완충제 중의 0.01M(39.4mg) DTNB. 10ml 완충제 2에 용해, 매일 새로운 것을 제조.

샘플: 알부민을 완충제 1에 약 10.3μM로 희석(0.66mg/ml).

진행

1) 분광 광도계 셀 고정 장치 자동 온도 조절기를 25℃로 설정. 2) 1.25ml의 샘플을 하나의 큐벳에 및 1.25ml의 완충제 1을 10mm 감소된 용적의 다른 하나의 샘플 큐벳 및 대비 큐벳에 각각 놓는다. 3) 412nm에 제로 설정, 흡광도를 0.1 AU 풀 스케일로 설정. 4) 대비 큐벳에 50μl DTNB 시약을 첨가하고 세척된 플라스틱 교반기를 사용하여 간단히 혼합. 5) 샘플 큐벳에 50μl DTNB 시약을 첨가하고 상기와 같이 혼합. 6) 즉시 데이터 획득 작업을 개시(또는 차트 레코더를 개시하고 10분까지 반응을 계속). 7) 3회의 값을 얻기 위하여 각 샘플에 대하여 반복. 8) 지속적 흡광도 쇠퇴로부터 제로 시간까지 역으로 외삽법을 시행하고, 412nm에서의 흡광도를 판독(δA_{412})(제1도). 9) 몰소광계수 $\epsilon_{412}=13.9\text{cm}^2\text{mM}^{-1}$ 을 이용하여 술피드릴 함량을 계산.

결과

다수의 상업적 HSA 샘플이, 유리 티올 함량에 관하여 분석되었는데, 그 결과는 다음과 같이 요약된다.

HSA 자유티올

(몰 SH/몰 HSA)

1 0.29

2 0.22

3 0.35

4 0.05

5 0.08

6 0.46

7 0.36

이들 값은, 통상 0.85 ~ 0.9몰 SH/몰 rHA로 분석되는, 상기 실시예에 의하여 제조된 알부민에 대한 값보다 현저하게 더 낮다.

흑연로 분광기에 의한 인간 알부민내의 금속 이온 오염 측정

피로피복(pyrocoated) 흑연관으로부터 표준물질 및 샘플이 미립화된다. 샘플의 원자 흡광은 하기 조건을 사용하여 검출된다:

금속이온 파장 nm 미립화 온도 °C

Zn 213.9 1800

Cu 327.4 2300

Fe 248.8 2400

Al 309.8 2500

Mn 279.8 2200

퍼킨 엘머(Perkin Elmer) M2100 원자흡광 광도계, 퍼킨 엘머 HGA-700 흑연로, 샘플 컵 및 알루미늄 증공형 음극 램프를 지닌 퍼킨 엘머 AS-70 자동샘플 장치(Autosampler)를 사용하여 알루미늄이 측정되었다. 시약은 AR급 질산 마그네슘, 알루미늄 표준용액(1,000ppm) 및 AR급 농축 질산이었다. Milli-Q 물로, 1.00% w/v 질산 마그네슘 용액이 제조되었다. 자동 샘플 장치에 15 μ l의 알루미늄 표준용액을 피펫으로 옮기고 0.20% 질산용액으로 1,500 μ l로 희석하였다. 공정은 얻어진 15 μ l의 용액으로 반복된 후, 계속하여 얻어진 150 μ l의 용액으로 반복되어 10ppb(μ g/l) 알부민 용액을 제공하였다.

알부민 샘플은 0.20% 질산 용액으로 희석되어, 교정 그래프의 한계내에 있는 알부민 농도가 되었다. 1:2 희석이면 통상 충분하다.

퍼킨 엘머 AS-51 화염 자동샘플 장치 및 마그네슘 증공형 음극 램프를 이용하여 마그네슘이 유사하게 측정되었다. 1000ppm의 마그네슘 표준 용액이 Milli-Q 물로 희석되어 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0ppm 표준용액이 제공되었다. 샘플의 원자 흡광은 285.2nm에서 검출된다.

아연에 있어서는 10ppb 용액 대신에 1.0ppb(μ g/l) 표준용액이 사용되는 것을 제외하고는, 알루미늄과 동일한 방법으로, 구리, 철, 망간 및 아연이 측정된다. 금속 이온의 농도는 ng/l로 측정되며 알부민의 농도와 관련된다(ng 금속이온/g 알부민), 이들 데이터가 표 9에 제시된다.

[표 9]

본 발명에 따라 제조된 알부민의 오염물질 프로파일

농도 (ng/g 알부민)				
화학물질	배치 A	배치 B	배치 C	
알루미늄	-	85	-	
구리	3720	9080	1780	
철	460	810	440	
마그네슘	1200	850	800	
아연	4510	1490	1790	
망간	20	191	16	
화학물질	배치 D	배치 E	배치 F	배치 G
알루미늄	-	-	-	-
구리	660	2690	440	530
철	930	380	2720	1880
마그네슘	-	-	-	-
아연	1580	680	3520	2130
망간	42	14	58	27
화학물질	배치 H	배치 I	배치 J	배치 K
알루미늄	9	22	86	96
구리	520	590	9920	8820
철	1010	670	1030	100
마그네슘	600	<400	2000	2000
아연	1740	1040	4280	3520
망간	35	20	46	60

모든 결과는 총 금속이온 농도로서 표시된다.

표 10은 공업적 HSA내의 금속 이온의 대응량을 나타낸다.

[표 10]

농도 (ng 금속/g 알부민)

화학물질	공급원 A (영국)	공급원 B (영국)	공급원 C (일본)	공급원 D (일본)
알루미늄	790	970	915	420
구리	2020	4510	23840	580
철	41220	15200	23550	15240
마그네슘	4500	500	15000	54000
아연	7230	1650	930	4580
망간	940	190	135	240
화학물질	공급원 E (영국)	공급원 F (미국)	공급원 G (프랑스)	
알루미늄	350	3190	155	
구리	4830	1180	7910	
철	7910	25920	1850	
마그네슘	1500	500	500	
아연	1520	3940	2130	
망간	160	65	80	

본 발명의 생성물내의 평균 알부민량은 약 60ng/g인 반면에 상업적 공급원은 155 ~ 3190ng/g라는 것을 알 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 생성물은 평균 약 948ng/g 철(종래기술의 물질의 1,850 ~ 41,200ng/g과 비교), 평균 약 2,990ng/g 구리(종래기술의 물질의 580 ~ 23,840ng/g과 비교), 평균 약 1,120ng/g 마그네슘(종래기술의 물질의 500 ~ 54,000ng/g과 비교), 평균 약 2,390ng/g 아연(종래기술의 물질의 930 ~ 7,230ng/g과 비교) 및 평균 약 48ng/g 망간(종래기술의 물질의 65 ~ 940ng/g과 비교)을 갖는다.

중간 및 긴 사슬 지방산의 분석

본 발명에 의한 알부민 및 상업적으로 구입 가능한 HSA의 지방산 프로필이, C17:0 내부 표준을 이용하여 유리 지방산의 가스 크로마토그래피 및 산성 용매 추출에 의하여 분석되었다.

장치:

화염 이온화 검출기를 지닌 가스 크로마토그래피(예를들면, 시마드주 GC9A); 자동 주입기(예를들면, 시마드주 AOC 14); 인테그레이터/프린터(예를들면, 시마드주 CR4A); HP-FFA 30X 0.53mm, 1.0 μ m 상 칼럼(휴렛트 팩카야드사(Hewlett Packard Ltd.); 직접 주입 라이너가 부착된 메가보어 인스톨레이션 키트(Megabore Installation kit, GC9A에 대한 J&W Scientific 220-1150).

시약:

물(Milli-Q); 디클로로메탄 초순도 용매(Romil Chemicals, Loughborough, Leics.); 아세트산 나트륨 3수화물 분석용급(BDH사, Poole); 아세트산 결정상 분석용급(BDH사, Poole); 인간 혈청 알부민 용액(ZenalbTM20, Bio Products Laboratory, Elstree, Herts.); 황산나트륨 무수물(분석용 시약); 시그마사의 표준 지방산.

용액:

0.5M 아세트산 나트륨 완충제 pH4.5; 100mℓ당 아세트산 3.30g 및 아세트산 나트륨 6.13g.

유리 지방산 표준 혼합물. 별도의 유리병에 각 지방산 5mg을 계량, 각 지방산을 1ml 디클로로메탄에 용해하여 짧은 사슬 ($C_6 \sim C_{14}$), 중간 사슬 ($C_{16} \sim C_{18}$) 및 긴 사슬 ($C_{20} \sim C_{22:1}$) 지방산에 대하여, 각각 3개의 12ml 파이렉스 배양 튜브로 이전. 질소 흐름하에 혼합물을 건조시켜서, 1ml 디클로로메탄에 용해, 혼합물 50 μ l 분취량을 라벨 부착된 유리병에 이전하고 질소하에서 건조, 뚜껑을 덮어 -20℃에서 저장.

내부 표준 용액 1mg/ml 헵타데칸산(25.0mg 헵타데칸산/25ml 디클로로메탄).

공정

1. 50 μ l의 내부 표준 용액을 6개의 라벨부착 40ml 파이렉스 튜브에 넣는다.
2. 5% rHA에 대하여 5ml 샘플 첨가. 25% rHA에 대하여 1ml 샘플 및 4ml 물을 사용, 블랭크(5ml 물) 및 혈청 알부민 샘플 (1.25ml ZenalbTM20 및 3.75ml 물)을 포함, 모든 샘플을 두 벌씩 준비.
3. 2.5ml의 아세트산 나트륨 완충제를 첨가한 후 모든 튜브에 10ml 디클로로메탄을 첨가.
4. 뚜껑을 덮은 튜브를 실온에서 2시간 동안 기계적 롤러 위에 놓는다.
5. Sorvall RT6000B 원심분리기에서 3,000rpm으로 5분간 20℃에서 모든 튜브를 원심분리.
6. 상부 수성상을 제거한 후, 튜브의 바닥으로부터 주의하여 하부 디클로로메탄상을 라벨 부착된 12ml 파이렉스 튜브에 이전. 단백질 소구체가 전체 디클로로메탄 상의 제거를 방해할 수도 있다. 만일 이같은 현상이 발생하면, 무수 황산 나트륨을 한 스패툴라 가득 첨가하여 뚜껑을 덮고 흔든다.
7. 질소 흐름하에서 디클로로메탄 상을 건조하여 분석시까지 질소하에 -20℃에서 저장.
8. 모세관 칼럼을 설치하고, 제조자의 지시에 따라 가스 크로마토그래프를 하기 조건에 설정;
검출기: 화염 이온화; 캐리어 가스: 30ml/분의 질소; 주입용적: 0.5 μ l; 칼럼 초기온도: 70℃; 고정: 1.5분; 구배 1: 20℃/분에서 150℃로; 구배 2: 4℃/분에서 240℃로; 고정: 7분; 검출기 온도: 280℃; 시마드주 GC9A에 대한 설정규정은, 검출기 범위: 10. ; 수소압력: 0.5Kg/cm²; 공기압력: 0.5Kg/cm²; 정지시간: 50분.
9. 제조자의 지시에 따라 가스 크로마토그래프로부터 데이터를 수집하기 위하여, 인테그레이터를 준비.
10. 오븐 온도를 245℃로 상승시켜서 지속적인 베이스라인이 달성될 때까지 방치.
11. 오븐 온도를 70℃로 내려서 평형을 이루도록 함.
12. 분취량의 긴, 중간 및 짧은 사슬의 지방산을 녹인다. 긴 사슬 지방산을 1ml 디클로로메탄에 용해. 그 용액을 중간 사슬 지방산으로 이전해서 용해, 짧은 사슬 지방산에 대하여 반복.
13. 지방산 유지 시간을 측정하기 위하여 표준 혼합물을 주입, 생성된 크로마토그램은 매우 작은 피크 꼬리 현상을 가져야 하며, 올바른 수의 잘 분석된 피크를 지닌 원만하게 서서히 상승하는 베이스라인을 갖는다. 캐프로산($C_6:0$)은 약 6분의 유지시간으로 용리되어야 하고 에루신산($C_{22:1}$)은 유지시간이 약 33분이어야 한다. 실시예의 표준 크로마토그램과 비교하여 모든 피크를 식별.
14. 샘플의 주입 및 데이터 수집.

계산

1. 공시험 샘플로부터 내부 표준 피크를 확인, 이것은 유지시간 약 23.5분의 주 피크일 것이다.

2. 하기 공식을 이용하여 모든 샘플에 있어서 집적된 모든 피크에 대한 피크 면적비를 계산.

$$\text{피크면적비} = \frac{\text{피크면적}}{\text{내부표준피크면적}}$$

3. 표준 샘플과 비교함으로써 유지시간을 기준으로 하여 rHA 및 HSA 샘플내의 지방산 피크를 확인.

4. 하기 인자를 사용하여, 모든 피크 면적비를 rHA 및 HSA 샘플 모두에 대한 대략 농도($\mu\text{g/g}$ 알부민)로 환산.

$$\text{농도}(\mu\text{g/g}) = \text{피크면적비} \times 200$$

5. 지방산으로서 확인된 피크에 대하여, 지방산의 분자량 및 하기 공식을 이용하여, $\mu\text{g/g}$ 알부민으로부터 몰/몰 알부민으로 농도를 전환:

$$\text{농도(몰/몰)} = \frac{\text{농도}(\mu\text{g/g}) \times 0.0665}{\text{지방산분자량}}$$

실시에 2에 의하여 제조된 알부민(제4도) 및 상업적 HSA(제5도)의 뱃치에 대하여 실시예 결과가 제시된다. 두 단백질에 대한 프로필이 현저한 차이를 보이기에는 하였으나, 본 방법에 의한 전자에 있어서는 어떤 비정상적 지방산도 검출되지 않았다. 예상된 바와같이, 양쪽은 모두 다량의 첨가된 안정제, 옥탄산염(C8:0)을 보였다. 이와는 별도로, 상업적 HSA는 주로 C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 및 C18:2라는 특징이 있는 반면에 본 발명의 알부민은 주로 C10:0, C12:0, C16:1 및 때때로 C14:0을 함유하였다. 더욱 시험한 결과, rHA 최종 제품의 C10:0 및 C12:0의 양은, 정제 공정의 후반단계에서 사용된 옥탄산염중의 오염물질량과 상호관련이 있는 것으로 판명되었다.

실시에 7에 따라 제조된 rHA에 대한 데이터는 하기와 같다:

[표 11]

본 발명의 방법에 의하여 정제된 rHA 및 상업적 HSA의 지방산 조성 비교

지방산 함량(몰/몰/단백질)		
지방산	rHA	HSA
C10:0	0.100	0.005
C12:0	0.020	0.011
C14:0	0.005	0.017
C16:0	0.013	0.152
C16:1	0.064	0.023
C18:0	0.002	0.024
C18:1	0.012	0.145
C18:2	ND	0.089
C18:3	ND	0.006
C20:0	ND	0.001
C20:1	ND	0.001
C20:2	ND	ND
C20:4	ND	0.006
합계	0.216	0.480

ND = 검출 안됨

바람직하게는, C18 지방산의 총량은 옥탄산염 량의 1.0%(몰/몰)을 초과하지 않으며, 바람직하게는 0.5%를 넘지 않는다. 또한, 본 발명의 알부민에 있어서, C18:2, C18:3 및 C20 지방산의 양은 일반적으로 검출 불가능하다. 상업적 HSA에 있어서는, 알부민 몰당 일반적으로 약 0.4몰의 C10 ~ C20 지방산이 존재할 수 있다. 본 발명의 제품에 있어서는, 전형적으로 C20 지방산을 검출 불가능하며, 알부민 몰당 단지 약 0.01 ~ 0.02몰 C18 지방산이 있다.

색채의 분석

1cm 큐벤테내의 최종제품의 5%(w/v) 용액의 흡광도를 350nm, 403nm 및 500nm에서 측정하여 cm 통로 길이당 알부민 g/l당 흡광도(즉 $\text{AL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)로 계산하였다. 본 발명의 알부민은 하기의 값을 갖는다:

파장 평균 흡광도 (n=10 뱃치)

(nm) ($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

350 4.74×10^{-3}

403 2.12×10^{-3}

500 0.58×10^{-3}

일반적으로, 본 발명의 알부민은, 상기 3개의 파장에서 각각의 흡광도가 6.0×10^{-3} , 2.5×10^{-3} 및 0.75×10^{-3} 을 초과하지 않는다.

상업적으로 구입 가능한 다수의 HSA의 분석결과는, 이들 파장에서 보다 높은 흡광도를 보였다(표 12 참조).

[표 12]

종래기술의 HSA 제품의 흡광도($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

샘플	A_{350}	A_{403}	A_{500}
1	9.95	4.10	0.8
2	9.25	5.36	1.1
3	7.40	3.26	0.6
4	7.20	3.60	0.6
5	8.68	4.08	0.8
6	11.45	6.26	1.2
7	7.20	3.70	0.8
8	6.82	4.78	1.8

SDS 환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

이 분석은, 환원제(β -메르캅토에탄올)로 처리될 때, SDS 환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 상에서 단일밴드(단량체)로서 이동하는 단일 폴리펩티드 사슬로서 rHA가 구성된다는 것을 나타내기 위하여 수행된다.

알부민 샘플이, 1mg/ml의 알부민과 함께 2mM EDTA, 5%(w/v) SDS 및 10%(v/v) β -메르캅토에탄올을 함유하는 SDS 환원 완충제(20mM 트리스-HCl pH8.0)에서 끓여진 후, 1 μ l 용액의 적재를 이용하여, SDS 균일(12.5%) 파스트젤스(Phastgels)(파아마시아사)상에서 분리된다. 쿠마시 블루 R250 착색에 의하여 단백질 밴드가 검출되고 시마드주 CS9000 자기농도 기록계상에서 조사되었다. 알부민의 분리결과 단일밴드의 쿠마시 착색을 보였는데, 이것은 단량체로 존재하는 알부민 부분이 99.9% 이상이라는 것을 나타낸다.

겔 투과 고압 액상 크로마토그래피

본 발명의 방법의 주요 구체예에 있어서, 음이온 교환 기재로부터의 용출액에 존재하는 10mg/ml 알부민 용액 25 μ l(여기서 음이온 교환 단계는 한외여과 및 제형화 전의 최종단계이다)가 시마드주 LC6A HPLC상의 TSK3000SWXL 칼럼 상에 주입된다. 생성물은 99.9% 이상의 단량체인 것으로 판명되었다.

본 발명에 따라 정제되어 25% w/v로 제형화된, 제2 10mg/ml 알부민 용액 25 μ l가 동일한 방법으로 분석되어 0.1% 미만의 중합체성 알부민을 함유하는 것으로 판명되었다. 이 결과는 본원에 기술된 제형화 방법이 정제된 알부민의 중합체/집합체 함량에 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 가르킨다.

2원적 겔 전기영동

본 발명의 방법에 의하여 제조된 알부민의 rHA 2 μ g이, 밀리포어 인베스티게이터 시스템(Millipore Investigator system)을 이용하여, 2원적 전기 영동법으로 처리되었다. 1차적 분리는 pH3 ~ 10의 전등점 전기 영동 겔이고 2차적 분리의 10% 폴리아크릴아미드/SDS겔이 이어졌다. 쿠마시 블루로 겔을 착색한 결과, 단지 한곳만 가시적인데, 이것은 오직 한 종류의 단백질이 존재한다는 것을 나타낸다.

전기분사 질량분석

m/z 범위 950 ~ 50 Da/e를 거쳐 말 심장 미오글로빈(시그마사의 16951Da)으로 교정된, VG 쿼트로(Quattro) 전기 분사 질량분석기를 사용하여 전기분사 질량분석(Electrospray Mass Spectrometry, ESMS)이 수행되었다. 상업적으로 구입 가능한 샘플 및 본 발명에 의하여 정제된 rHA의 샘플이, 트리플루오로아세트산을 함유하는 아세토니트릴 구매를 이용하여 가역상 HPLC에 의한 분석전에 탈염처리되었다. 제6a 및 6b도는 각각 본 발명의 알부민 및 종래기술의 HSA에 대한 스펙트럼을 도시하고 있다. 후자는 차단된 유리 티올 및 N-말단 분해를 나타내는 피크를 보여주고 있다.

본 발명의 알부민은 본 분석에서 실질적으로 균일한 것으로 볼 수 있는데, 환언하면, 이것은 약 66441Da의 질량에서 발생하는, 단일의 한정된 피크를 나타낸다.

장기간의 안정성

전기 영동법에 의하면, 2년 이상에 걸쳐 알부민의 분해가 검출되지 않는데, 이것은 프로테아제 활성이 존재하지 않음을 나타낸다.

발명의 효과

본 발명에 따른 알부민 정제방법은 고순도로 알부민을 정제할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

암모늄 이온이 알부민으로부터 대치되고 용액으로부터 제거될 수 있도록 반대-이온 용액에 알부민 용액을 노출시키는 단계를 포함하는 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 반대-이온 용액이 알부민 용액에 첨가되고 암모늄 이온은 투석에 의해 제거되는 것인 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 반대-이온 용액이 반투과성 막에 의해 알부민 용액으로부터 분리되고, 암모늄 이온이 다이아필터에 의해 제거되는 것인 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 암모늄 이온은 겔 투과 크로마토그래피에 의해 용액으로부터 제거되는 것인 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항중 어느 하나의 항에 있어서, 반대-이온 용액은 나트륨 이온을 포함하는 용액인 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 6.

암모늄 이온을 함유하는 완충제중의 크로마토그래피 재질에 알부민 용액을 노출시키는 단계; 선택적으로 추가의 정제 또는 제형화 단계후에 후속적으로 제 2항 내지 제 4항중 어느 하나의 항에 따른 방법에 의해 암모늄 이온을 제거하여 정제된 알부민 생성물을 얻는 단계를 포함하는 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 크로마토그래피 고정성 붕산염 이온을 포함하는 것인 알부민 용액의 정제 방법.

청구항 8.

알부민에 대하여 특이적 친화성을 지닌 고정화된 염료에 알부민 용액을 노출시키는 단계; 및 염료상에 45kD 단편만을 남겨둔 채로 알부민을 용리하는 단계를 포함하는 특정의 알부민-분리 미생물로부터 생성된 45kD 알부민 단편(1-403 내지 1-409)을 포함하는 알부민 용액을 정제하는 방법.

청구항 9.

제 8항에 있어서, 상기 염료는 고정화된 알부민-특이적 염료, 시바크론 블루형의 염료이고, 상기 염료는 스페이서를 통해 고정화되고, 상기 스페이서는 α, ω -(C₁₋₅-직쇄 알킬)그룹인 방법.

청구항 10.

제 6항에 있어서, 반대-이온 용액은 나트륨 이온을 포함하는 용액인 알부민 용액의 정제방법.