



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0029732  
(43) 공개일자 2022년03월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/81 (2006.01) C07K 1/18 (2006.01)  
C07K 1/20 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/8121 (2013.01)  
C07K 1/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7003722
- (22) 출원일자(국제) 2020년07월03일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년02월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/068787
- (87) 국제공개번호 WO 2021/001525  
국제공개일자 2021년01월07일
- (30) 우선권주장  
19184303.6 2019년07월04일  
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
체에스엘 베링 게엠베하  
독일 35041 마르부르크 에밀-폰-베링 슈트라세 76
- (72) 발명자  
아난트 룩제  
독일 35041 마르부르크 마그테부르거 슈트라세 8  
아  
후네커-보그트 자브리나  
독일 35094 란탈 보르 덴 뢰더른 11  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 7 항

**(54) 발명의 명칭 C1-INH를 정제하는 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 C1-에스테라제 억제제(C1-Inh), 보다 특히 C1-Inh 농축물을 정제하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*C07K 1/20* (2013.01)

(72) 발명자

**크롭카-클루즈 예니퍼**

독일 35041 마르부르크 회헨백 39

**베이 마틴**

독일 35039 마르부르크 하인리히-하인-슈트라세 5

**슐츠 노베르트**

독일 65795 하터스하임 라인슈트라세 72하

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

소수성 상호작용 크로마토그래피를 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 단계를 포함하는 선행 공정에 의해 혈장으로부터 얻은 C1-INH 제제로부터 1-안티키모트립신 (ACT)을 고갈시키는 방법으로서, 여기서, 상기 C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈은 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 수행되고,

(i) C1-INH 및 ACT가 정지상에 결합하는 제1 조건 하에 정지상을 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 상기 C1-INH 제제를 로딩하는 단계;

(ii) 충전된 컬럼을 세척하는 임의의 단계;

(iii) 이동상에 의해 ACT를 용출하기 위한 제2 조건의 적용;

(iv) 이동상에 의해 C1-INH를 용출하기 위한 제3 조건의 적용을 포함하고,

- 상기 제2 조건이 이온 강도 A의 용출 완충액을 사용하고,

- 상기 제3 조건이 이온 강도 B의 용출 완충액을 사용하고, 여기서, 이온 강도 A와 B가 상이함을 특징으로 하고,

여기서, 이온 강도 A로부터 이온 강도 B로의 전환은 염 농도 구배에 의해, 또는 상이한 염 농도  $c_A$  및  $c_B$ 를 갖는 용출 완충액  $EB_A$  및  $EB_B$ 를 사용하는 단계 용리에 의해 달성되고,

여기서:

(i) 용출 완충액  $EB_A$ 는 25°C에서 18.7 내지 20.2mS/cm, 바람직하게는 25°C에서 18.9 내지 19.8mS/cm, 가장 바람직하게는 25°C에서 19.2mS/cm의 전도도를 갖고,

(ii) 용출 완충액  $EB_B$ 는 25°C에서 21.6mS/cm 초과인 전도도를 갖고, 여기서, 용출 완충액  $EB_B$ 는 용리 단계 (i) 후에 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 여전히 결합되어 있는 C1-INH를 용출하는, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

(i) 용출 완충액  $EB_A$ 는 10mM Tris, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl, pH 7.2로 이루어지고,

(ii) 용출 완충액  $EB_B$ 는 25°C에서 25.3mS/cm 초과인 전도도를 갖고, 여기서, 용출 완충액  $EB_B$ 는 용리 단계 (i) 후에 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 여전히 결합되어 있는 C1-INH를 용출하는, 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

(i) 용출 완충액  $EB_A$ 는 10mM Tris, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl, pH 7.2로 이루어지고,

(ii) 용출 완충액  $EB_B$ 는 10mM Tris, 1M NaCl, pH 7.2로 이루어지는, 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 정지상 물질은 Capto® DEAE(GE에서 판매, 작용기로서 디아미노에틸 사용)와 같은 약한 음이온 교환기 유형 또는 바람직하게는 Q HP 수지, Capto® Q Impres 수지, Capto® Q 수지(모두 GE에서 판매, 모두 작용기로서 4급 암모늄을 가짐) 또는 Fractogel® TMAE, Eshmun® H(Merck에

서 판매, 작용기로서 트리메틸아미노에틸 사용)와 같은 강한 음이온 교환기 유형에 속하는, 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C1-INH 제제는 인간 혈장으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C1-INH 제제는 배지에 용해된 C1-INH 및 ACT로 본질적으로 이루어지는, 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 방법을 사용하여 얻을 수 있는 C1-INH 제제.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 C1-에스테라제 억제제(C1-esterase inhibitor) (C1-INH), 보다 특히 C1-INH 농축물을 정제하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 보체 활성화 경로의 단백질인 C1-INH는 활성화된 C1r 및 C1과 공유 복합체를 형성하여 C1 활성화를 제어하는 혈장에 존재하는 프로테아제의 억제제이다. 또한 혈장 프리칼리크레인, 인자 XI 및 XII 뿐만 아니라 플라스민과 같은 중요한 혈액 응고 효소를 "조절"한다.

[0003] C1-INH 결핍은, 예를 들어, C1-INH (HAE 유형 I)의 결여 또는 C1-INH (HAE 유형 II)의 감소된 활성으로 야기된 유전성 혈관부종(hereditary angioedema) (HAE)과 관련이 있다. C1-INH 결핍은 또한 혈액이 심장-폐 기계와 같은 표면과 접촉할 때 생성되는 효소의 중화로 인한 C1-INH의 소모로 야기될 수 있지만 또한 만성, 특히 류마티스 장애의 맥락에서 나타나는 면역 복합체와 같은 응고 캐스케이드를 시작하는 질환 과정에서도 야기될 수 있다. 현재, C1-INH 단백질 대체는 급성 HAE의 예방 또는 치료에 있어 최적 표준(gold standard)으로 간주될 수 있다. 이것은 인간 C1-INH 단백질과 동일하지 않은 형질전환 토끼에서 생산된 상업적으로 입수 가능한 재조합 C1-INH보다 더 자연적인 기능을 갖는 것으로 보고된, 상업적으로 입수 가능한 인간 혈장 유래 C1-INH에 특히 해당된다 (Feussner et al., Transfusion 2014 Oct; 54(10):2566-73, doi: 10.1111/trf.12678). 고려된 추가 치료 적용은 허혈 재관류 손상의 예방, 감소 및/또는 치료에서 C1-INH의 사용을 포함한다(WO 2007/073186 참조).

[0004] 인간 혈장으로부터 C1-INH의 분리 및/또는 정제는 알려져 있지만 다소 비싸고 특히 가장 흔히 시간이 많이 소요되는 과정이다. 혈장으로부터 C1-INH를 생산하기 위한 상이한 방법은 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 침전 및 소수성 상호작용 크로마토그래피와 같은 다양한 분리 방법을 포함한다. 이들 방법 중 임의의 방법을 단독으로 사용하는 것은 일반적으로 C1-INH, 특히 C1-INH 농축물을 충분히 정제하기에 불충분하므로, 이들의 다양한 조합이 선행 기술에서 제안되었다.

[0005] EP 0 698 616 B는 음이온 교환 크로마토그래피에 이어 양이온 교환 크로마토그래피의 사용에 대해 설명한다. EP 0 101 935 B는 약 20%의 수율로 90% 순수한 C1-INH 제제에 도달하기 위한 침전 단계 및 음성 모드 소수성 상호작용 크로마토그래피의 조합을 설명한다. US 5 030 578은 PEG 침전 및 자칼린(jacalin)-아가로스에 대한 크로마토그래피 및 음성 모드 소수성 상호작용 크로마토그래피를 설명한다.

[0006] WO 01/46219는 C1-INH-함유 출발 물질이 산성 조건(pH는 각각 pH 5.5로 설정됨) 하에 음이온 교환기로 2회 처리되는 방법을 설명한다. 제1 이온 교환 단계는 PEG 침전 다음으로 제2 이온 교환 단계가 이어지며 이는 Cinryze<sup>®</sup>의 제조에서와 같이 여전히 ACT를 구성하는 것으로 알려져 있다 (Feussner et al., Transfusion 2014 Oct;54(10):2566-73, doi: 10.1111/trf.12678).

[0007] 혈관부종 치료를 위한 상업적으로 입수 가능한 4개의 C1-INH 농축물 중 3개가 혈장 유래이다. 후자는 Berinert<sup>®</sup>, Cinryze<sup>®</sup> 및 Ceter<sup>®</sup>라는 상표명으로 판매된다. 이러한 C1-INH 농축물은 상이한 독점 공정에 따라 제조된다 (Feussner et al., Transfusion 2014 Oct;54(10):2566-73, doi: 10.1111/trf.12678). 이러한 독점

공정은 각각 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 일련의 단계를 포함하는 것으로 알려져 있다: 동결침전, 이온-교환 크로마토그래피, 침전, 저온살균, 한외여과 및/또는 정용여과, 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피. 이러한 다단계 공정은 잘 확립되어 있고 강력하며 신뢰할 수 있다. 이들은 특히 알파-1-안티키모트립신 (ACT)과 같이 그 안에서 검출 가능한 단지 소량의 수반되는 단백질을 갖는 벌크 제품을 생산한다.

- [0008] C1-INH의 절반에 불과한 분자량에도 불구하고, ACT는 상기 언급된 Berinert<sup>®</sup> 뿐만 아니라 HAEGARDA<sup>®</sup>, Cinryze<sup>®</sup> 또는 Cetor<sup>®</sup>와 같은 혈장 유래 C1-INH 제제를 제조하는 동안 공동 정제된다. 상기 언급된 것 중에서, Berinert<sup>®</sup> (및 HAEGARDA<sup>®</sup>)는 가장 낮은 ACT 수준 (Feussner et al., *Transfusion* 2014 Oct;54(10):2566-73, doi: 10.1111/trf.12678), 즉 5 $\mu$ g/IU C1-INH보다 훨씬 낮은 수준을 갖는다.
- [0009] 분명히, 제조업체는 가능한 한 순수한 제품을 제공하기 위해 노력한다. 소량의 수반되는 단백질은 실제 최종 제품의 효과와 안전성에 부정적인 영향을 미치지 않는 한 허용된다. 그러나, 원칙적으로 소량의 수반되는 단백질도 원하지 않는다.
- [0010] 실험실 규모의 상응하는 제제로부터 100% 순수한 C1-INH를 단리하는 것이 가능할 수 있다. 그러나, 산업적 규모로 그러한 높은 순도를 달성하는 것은 경제적인 이유로 쉽지 않고 안정적으로 실현 가능하지 않은데, 이는 단지 시간-소모적인 공정과 관련된 제품의 손실 때문이다. 그러한 제제가 유도되는 원료, 즉 혈액은 다시 말해 극도로 높은 정도의 순도를 달성하기 위해서만 활성 물질의 과도한 손실을 허용하기에 충분히 풍부하지 않다.
- [0011] 이와 상관없이, 제조업체는 각각의 공정을 개선하기 위해 계속 노력한다. Berinert<sup>®</sup>의 제조에 사용된 것과 같이 확립된 다단계 공정을 개선하려는 상응하는 노력은 개별 단계를 검토하고 변경함을 의미할 수 있다. 그러한 변화는, 예를 들어, 더 높은 수율, 더 빠른 처리 시간 등을 야기할 수 있다. 또는, 공급망의 변화(예를 들어, 공정에 사용되는 제3의 재료의 가용성 등)와 같은 다른 이유 때문에 작은 변화가 단순히 필요할 수 있다. 모든 작은 변화에는 불편함이 따를 수 있다. 예를 들어, 수반되는 단백질의 양은 비록 매우 작게 남아 있지만 상응하는 변화 전보다 적게 발생할 수 있다.
- [0012] C1-INH 제제에 소량의 ACT가 존재하는 것은 오랫동안 해를 끼치지 않는 것으로 간주되어 왔으며 여전히 그렇다. 그러나, 가능한 한 순수한 C1-INH 제제를 제공하여 다단계 공정을 통해 혈장으로부터 얻은 C1-INH 제제에서 ACT-함량을 더 감소시키는 것이 여전히 바람직하다.
- [0013] ACT 단백질은 성숙한 단백질로부터 절단되는 아미노 말단에서 25개 잔기의 신호 펩티드를 포함하는 423개의 아미노산으로 구성된다. ACT의 총 분자량은 여러 부위에서 심한 글리코실화로 인해 대략 55 내지 66 kDa이다. 이는 전형적인 세르핀 구조를 갖는다 (Baker et al., *SERPINA3 (aka alpha-1-antichymotrypsin)*, *Front. Biosci.* 2007 (12), 2821-2835). ACT는 동족(cognate) 프로테아제를 찾아 세르핀 프로테아제 복합체를 형성하며, 이는 ACT 단독보다 10 내지 50배 더 빠른 속도로 간에 의해 순환하는 혈장으로부터 제거된다 (Mast et al., *Biochem.* 1991 (30), 1723-1730). ACT는 급성기(acute phase) 단백질로 이때 염증에 반응하여 혈장 수준이 증가한다. 급성기 반응에서 이의 역할은 여러 세린 프로테아제, 가장 현저하게는 백혈구 카텡신 G의 억제제로서 작용하는 것이다 (Crispe, J. *Immunol.* 2016 (196), 17-21). 카텡신 G는 염증 부위에서 방출되어 병원체를 죽이거나 분해하고 조직을 리모델링하며 전염증성 사이토카인과 수용체를 활성화한다. 카텡신 G의 과도하거나 연장된 활성화와 발생하는 조직 손상은, 예를 들어, ACT와 같은 세르핀 조절에 의해 방지된다. 인간 혈장에서 ACT의 농도는 일반적으로 약 400mg/L 범위이다 (Hollander et al., *BMC Pulm. Med.* 2007 (29), 7).
- [0014] 상업적으로 입수 가능한 ACT 제제는 Cinryze<sup>®</sup>의 경우 31 $\mu$ g/IU C1-INH 범위 또는 Berinert<sup>®</sup> 또는 HAEGARDA<sup>®</sup>의 경우 5 $\mu$ g/IU C1-INH 미만 범위의 농도로 ACT를 포함하는 것으로 알려져 있다.
- [0015] 5 $\mu$ g/IU C1-INH 미만 또는 그 보다 더 낮은 ACT 수준을 보장하기 위해, C1-INH 생성물의 손실을 최소화하면서 다단계 공정에 의해 혈장으로부터 얻은 C1-INH 제제의 추가 정제 또는 "연마"를 가능하게 하는 수단이 필요하다. 인간 혈장은 일반적으로 기존 요구를 충족시키기에 충분한 양으로 얻기 어렵다. 확립되고 최적화된 다단계 공정에서 얻은 C1-INH 제제는 고도로 농축되어 있다. 따라서, 혈장으로부터 얻은 기존 C1-INH 제제의 추가 정제 또는 연마는 생성물 손실, 불필요한 희석 등과 같은 불편을 수반하지 않아야 한다.
- [0016] 이 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 여러 단계를 포함하는 선행 공정에 의해 혈장으로부터 얻은 C1-INH 제제로부터 1-안티키모트립신(ACT)을 고갈시키기 위한 방법을 제공하며, 여기서 C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈은 음이온 교환 크로마토그래피로 수행된다.

- [0017] 출발 물질을 구성하는 C1-INH 제제에서 ACT-농도는, 예를 들어, 100, 50, 35, 30, 25, 20, 15 $\mu$ g/IU C1-INH 미만, 바람직하게는 35 $\mu$ g/IU C1-INH 미만, 보다 바람직하게는 10 미만, 가장 바람직하게는 5 $\mu$ g/IU C1-INH 미만이다.
- [0018] 본 발명자들은 C1-INH 생성물의 손실 또는 불필요한 희석을 수반하지 않고 본질적으로 C1-INH 제제에 여전히 존재하는 ACT-함량의 실질적인 감소를 달성할 수 있었고, 약제로서 사용하도록 의도된 기존 C1-INH 제제의 순도 및 안전성을 향상시키는 효율적인 연마 단계를 제공할 수 있었다.
- [0019] 바람직하게는, C1-INH 제제는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 단계를 포함하는 선행 공정에 의해 혈장으로부터 얻은 제제이다: 동결침전, 이온-교환 크로마토그래피, 침전, 저온살균, 한외여과 및/또는 정용여과, 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피.
- [0020] 상용하는 C1-INH 제제는 상표명 Berinert<sup>®</sup>, Haegarda<sup>®</sup>, Cinryze<sup>®</sup> 및 Cetor<sup>®</sup>로 알려져 있다. 이들을 생성하는 데 사용되는 제조 공정은 이미 ACT 함량이 매우 낮은 제제를 산출한다.
- [0021] 맥락에서 Cinryze<sup>®</sup> 및/또는 Cetor<sup>®</sup>의 제조는 보고에 따르면 동결침전, 다양한 이온-교환 크로마토그래피 단계, PEG 침전, 저온살균, 여과, 및 동결건조를 포함하는 반면, Berinert<sup>®</sup>의 제조는 보고에 따르면 동결침전, 이온-교환 크로마토그래피, 4차 아미노에틸 흡착, 황산암모늄 침전, 저온살균, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 여과 및 동결건조를 포함한다는 것에 주목한다. 후자가 전자보다 훨씬 더 순수한 생성물을 생성하기 때문에, 즉 ACT 함량이 더 낮기 때문에, 후자로부터 ACT의 추가 고갈은 더 적은 자원으로 Berinert<sup>®</sup>-제조 공정의 경우에 이미 얻은 것보다 혈장으로부터 얻은 훨씬 더 나은 C1-INH 제제를 생성할 수 있으므로 특히 바람직하다.
- [0022] 따라서, C1-INH 제제는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 단계를 포함하는 선행 공정에 의해 혈장으로부터 얻은 제제인 것이 특히 바람직하다.
- 발명의 내용**
- [0023] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0024] (i) C1-INH 및 ACT가 정지상에 결합하는 제1 조건 하에 정지상을 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 상기 C1-INH 제제를 로딩하는 단계;
- [0025] (ii) 충전된 컬럼을 세척하는 임의의 단계;
- [0026] (iii) 이동상에 의해 ACT를 용출하기 위한 제2 조건의 적용;
- [0027] (iv) 이동상에 의해 C1-INH를 용출하기 위한 제3 조건의 적용.
- [0028] 바람직하게는, 상기 언급된 단계(iii)에서 제2 조건은 이온 강도 A의 용출 완충액의 사용으로 이루어지며, 상기 언급된 단계(iv)에서 제3 조건은 이온 강도 B의 용출 완충액의 사용으로 이루어지며, 여기서, 이온 강도 A 및 B는 상이하다.
- [0029] 이온 강도 A로부터 이온 강도 B로의 전환은 바람직하게는 염 농도 구배에 의해, 또는 상이한 염 농도  $c_A$  및  $c_B$ 를 갖는 용출 완충액  $EB_A$  및  $EB_B$ 를 사용하는 단계 용리에 의해 달성된다.
- [0030] 바람직하게는, 용출 완충액  $EB_A$ 는 전도도가 25 $^{\circ}$ C에서 18.7 내지 20.20mS/cm, 바람직하게는 25 $^{\circ}$ C에서 18.9 내지 19.8mS/cm, 가장 바람직하게는 25 $^{\circ}$ C에서 19.2mS/cm, 또는 보다 바람직하게는 10mM Tris, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl, pH 7.2를 갖는 완충액으로 이루어진다.
- [0031] 용출 완충액  $EB_A$ 는 C1-INH가 충전된 컬럼에 결합된 상태로 유지되도록 선택되고, 여기서, 적어도 하나 이상의 오염 단백질은 충전된 컬럼에 결합하지 않고, 용출 완충액  $EB_B$ 는 충전된 컬럼에 결합된 본질적으로 모든 C1-INH가 더 이상 결합되지 않고 용출액에 수집될 수 있도록 선택된다.
- [0032] 용출 완충액  $EB_A$  및  $EB_B$ 를 정확하게 선택함으로써 ACT와 같은 오염 단백질을 C1-INH의 손실 없이 또는 최소 손실만으로 제거할 수 있다.
- [0033] 용출 완충액  $EB_B$ 는 25 $^{\circ}$ C에서 25.3mS/cm 초과, 또는 25 $^{\circ}$ C에서 30.4mS/cm 초과, 또는 25 $^{\circ}$ C에서 38.5mS/cm 초과,

또는 25℃에서 47.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 54.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 63.4mS/cm 초과, 또는 25℃에서 69.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 77.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 84.4mS/cm 초과의 전도도를 갖고, 여기서, 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 음이온 교환 크로마토그래피에 여전히 결합되어 있는 모든 C1-INH를 본질적으로 용출하고 있다. 숙련가는 필요한 조건을 쉽게 결정할 수 있다.

[0034] 보다 바람직하게는, 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 10mM Tris, 250mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 300mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 400mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 600mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 700mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 800mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 900mM NaCl, pH 7.2, 또는 10mM Tris, 1M NaCl, pH 7.2로 이루어진다.

완충액 조성	@ 25 (± 0.5)°C 에서 측정된 전도도
10 mM Tris, 250 mM NaCl pH 7.2	25,3 mS/cm
10 mM Tris, 300 mM NaCl pH 7.2	30,4 mS/cm
10 mM Tris, 400 mM NaCl pH 7.2	38,5 mS/cm
10 mM Tris, 500 mM NaCl pH 7.2	47,7 mS/cm
10 mM Tris, 600 mM NaCl pH 7.2	54,8 mS/cm
10 mM Tris, 700 mM NaCl pH 7.2	63,4 mS/cm
10 mM Tris, 800 mM NaCl pH 7.2	69,7 mS/cm
10 mM Tris, 900 mM NaCl pH 7.2	77,8 mS/cm
10 mM Tris, 1000 mM NaCl pH 7.2	84,4 mS/cm

[0035] 본 발명의 방법은 하기 기재된 바와 같이 완충액 EB<sub>A</sub> 및 EB<sub>B</sub>를 결합한다:

[0037] a) (i) 용출 완충액 EB<sub>A</sub>는 25℃에서 18.7 내지 20.2mS/cm, 바람직하게는 25℃에서 18.9 내지 19.8mS/cm, 가장 바람직하게는 25℃에서 19.2mS/cm의 전도도를 갖고,

[0038] (ii) 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 25℃에서 25.3mS/cm 초과, 또는 25℃에서 30.4mS/cm 초과, 또는 25℃에서 38.5mS/cm 초과, 또는 25℃에서 47.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 54.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 63.4mS/cm 초과, 또는 25℃에서 69.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 77.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 84.4mS/cm 초과의 전도도를 갖고, 여기서, 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 용리 단계 (i) 후에 음이온 교환 크로마토그래피에 여전히 결합되어 있는 모든 C1-INH를 본질적으로 용출하고 있거나,

[0039] b) (i) 용출 완충액 EB<sub>A</sub>는 10mM Tris, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl, pH 7.2로 이루어지고,

[0040] (ii) 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 25℃에서 25.3mS/cm 초과, 또는 25℃에서 30.4mS/cm 초과, 또는 25℃에서 38.5mS/cm 초과, 또는 25℃에서 47.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 54.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 63.4mS/cm 초과, 또는 25℃에서 69.7mS/cm 초과, 또는 25℃에서 77.8mS/cm 초과, 또는 25℃에서 84.4mS/cm 초과의 전도도를 갖고, 여기서, 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 용리 단계 (i) 후에 음이온 교환 크로마토그래피에 여전히 결합되어 있는 모든 C1-INH를 용출하고 있거나,

[0041] c) (i) 용출 완충액 EB<sub>A</sub>는 10mM Tris, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl, pH 7.2로 이루어지고,

[0042] (ii) 용출 완충액 EB<sub>B</sub>는 10mM Tris, 250mM NaCl, pH 7.2 또는 10mM Tris, 300mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 400mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 600mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 700mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 800mM NaCl, pH 7.2; 또는 10mM Tris, 900mM NaCl, pH 7.2, 또는 10mM Tris, 1M NaCl, pH 7.2로 이루어진다.

[0043] 본 발명자들은 그러한 조건이 C1-INH의 본질적인 손실 없이 ACT의 고갈을 허용한다는 점에서 특히 유용하다는 것을 발견하였고, 즉, C1-INH 회수율은 그러한 상황 하에 90% 초과, 바람직하게는 적어도 95%인 반면, ACT는 실



질적으로, 즉 50% 이상 감소된다.

- [0044] 음이온 교환 크로마토그래피에 사용되는 정지상 물질은 Capto<sup>®</sup> DEAE(GE에서 판매, 작용기로서 디아미노에틸 사용)와 같은 약한 음이온 교환기 유형 또는 - 바람직하게는 - Q HP 수지, Capto<sup>®</sup> Q Impres 수지, Capto<sup>®</sup> Q 수지 (모두 GE에서 판매, 모두 작용기로서 4급 암모늄을 가짐) 또는 Fractogel<sup>®</sup> TMAE, Eshmuno<sup>®</sup> H(Merck에서 판매, 작용기로서 트리메틸아미노에틸 사용)와 같은 강한 음이온 교환기 유형에 속한다.
- [0045] 상기 언급된 것 중에서, 작용기로서 통상의 암모늄을 갖는 수지가 가장 바람직하다.
- [0046] C1-INH 제제는 인간 혈장으로부터 유래되는 것이 바람직하다.
- [0047] 혈장은 혈액으로부터 유래하는 것으로 이해되며, 여기서, 혈액은 인간 및 다른 동물에서 발견되는 체액을 의미한다. 이것은 본 발명에 따른 방법이 모든 종류의 인간 혈장, 더 바람직하게는 인간 혈장으로부터 유래된 C1-INH 제제를 연마하는 역할을 할 수 있고, 여기서, 인간 혈장으로부터 얻어진 C1-INH 제제는, 예를 들어, 이를 앓고 있는 인간의 혈우병 치료에서 이들의 중요성으로 인해 특히 바람직하다는 것을 의미한다.
- [0048] 또한 C1-INH 제제는 본질적으로 배지에 용해된 C1-INH 및 ACT로 이루어진 것이 바람직하다.
- [0049] 본 발명은 바람직하게는 그러한 제제가 수득되는 방식에 관계없이 추가 연마를 목적으로 한다. 바람직하게는, ACT 함량은 100, 50, 35, 30, 25, 20, 15 미만, 바람직하게는 35 미만, 보다 바람직하게는 10 $\mu$ g ACT/IU C1-INH 미만, 가장 바람직하게는 5 $\mu$ g ACT/IU C1-INH 미만이다.
- [0050] 본 발명은 추가로 상기 기재된 방법 중 임의의 하나에 따른 방법을 사용하여 얻어질 수 있는 혈장으로부터 유래되는 C1-INH 제제를 제공한다.
- [0051] 혈장으로부터 얻어진 C1-INH 제제는 원칙적으로 알려져 있지만, 현재 기재된 바와 같이 ACT가 고갈된 상응하는 제제는 선행 기술로부터 알려져 있지 않다. 원칙적으로 고도로 정제된 C1-INH, 즉 내부에 ACT의 존재하는 흔적이 없을 수 있지만, 본 발명에 따른 방법은 ACT 수준을 매우 실질적으로 감소시키지만 ACT를 완전히 배제하지는 않는다.

**도면의 간단한 설명**

- [0052] 하기에, 본 발명은 도면 및 실시예에 의해 보다 상세하게 기술될 것이며, 여기서, 도면은 하기를 도시한다:
  - 도 1: 선행 기술에 따라 상업적으로 입수 가능한 C1-INH 제제에서 ACT의 존재를 나타내는 전기영동 겔;
  - 도 2: 확립된 산업 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제 및 동일한 실험에서 얻어진 용출액 샘플의 SDS-page 겔에 대해 결합/용리 모드에서 수행된 AEX의 크로마토그램;
  - 도 3: 확립된 산업 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제에 대해 결합/용리 모드에서 수행된 AEX를 사용하여 얻어진 용출액 샘플의 SDS-page 겔;
  - 도 4: 다양한 용출 완충액을 비교하는 확립된 산업 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제에 대해 결합/용출 모드로 수행된 AEX로부터 얻어진 용리액 샘플의 SDS-page 겔;
  - 도 5: 25 $^{\circ}$ C에서 전도도가 18.7 내지 20.7mS/cm인 완충액에 해당하는 170 내지 195mM의 NaCl 농도에서 낮은 이온 강도 완충액을 사용하는 동일한 AEX 매트릭스로부터의 제1 용리에 사용된 용리액 완충액의 염 함량에 따라 높은 이온 강도 C1-INH의 완충액을 사용하는 제2 AEX 크로마토그래피 용출액에서 C1-INH 회수율 정도 및 순도를 요약한 다이어그램;
  - 도 6: 25 $^{\circ}$ C에서 전도도가 18.68 내지 20.7mS/cm인 완충액에 해당하는 170 내지 195mM의 NaCl 농도에서 낮은 이온 강도 완충액을 사용하는 동일한 AEX-매트릭스로부터의 제1 용리에 사용된 용리액 완충액의 염 함량에 따라 높은 이온 강도의 완충액을 사용하는 제2 AEX 크로마토그래피 용출액에서 C1-INH 및 ACT의 양을 나타내는 다이어그램.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0053] 본 발명의 맥락에서, 하기 정의가 적용된다:
- [0054] 청구범위 및 발명의 설명에서, "C1-INH", "C1-INH", "C1-INH 제제" 및 "C1-INH 제제"는 동시에 단백질 C1-에스



테라제 억제제를 함유하는 농축액 및 특히 단백질 C1-에스테라제 억제제를 함유하는 액체 농축액을 지정하는 데 사용된다. 기술적 배경 및/또는 선행 기술을 언급할 때, "C1-INH"는 또한, 예를 들어, C1-INH 결핍을 논의하는 맥락에서 단백질 자체를 의미할 수 있다.

- [0055] 본 출원/특허 전반에 걸쳐
- [0056] - "HIC"는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 의미하고;
- [0057] - "AEX"는 음이온 교환 크로마토그래피를 의미하고;
- [0058] - "AEX 수지"는 AEX에서 정지상으로 사용되는 수지를 의미하고;
- [0059] - "강한 AEX 수지"는 넓은 pH 범위에 걸쳐 사용될 수 있는 고도로 이온화된 AEX 수지를 의미하고;
- [0060] - "약한 AEX 수지"는 이온화 정도가 pH에 크게 의존하는 수지를 의미하고;
- [0061] - "BC"는 크로마토그래피 컬럼의 결합능을 의미하고;
- [0062] - "음성 모드" 또는 "유동 관통 모드(flow through mode)" 또는 "유동 관통"은 표적 화합물(예를 들어, C1-INH)이 크로마토그래피 컬럼의 정지상에 결합하지 않는 조건 하에 크로마토그래피를 수행하는 방식을 지정하고;
- [0063] - "결합 모드", "결합 및 용리" 또는 "양성 모드"는 크로마토그래피 컬럼의 정지상에 표적 화합물(예를 들어, C1-INH)이 결합된 다음, 동일한 화합물이 크로마토그래피 컬럼에서 용출되는 조건 하에 먼저 수행되는 크로마토그래피를 의미하고;
- [0064] - "화합물이 정지상에 결합"할 때, 이것은 바람직하게는 공유 결합이나 화학 흡착이 아니라 물리 흡착에 의해 영향을 받는 화합물의 구조적 완전성 없이 정지상에 의해 흡착되거나 유지됨을 의미하고;
- [0065] - "WFI"는 "주사용수"를 의미하고;
- [0066] - "농도 구배"는 용액에 용해된 물질의 농도가 더 높은 농도에서 더 낮은 농도로 점진적으로 변화하는 것을 나타내며;
- [0067] - "단계 용리"는 농도 구배에서와 같이 연속적인 전환 대신 제1 농도로부터 제2 농도로의 급격한 전환을 의미하고, 여기서, 농도는 점진적으로 낮아지고;
- [0068] - "%"는 달리 명시되지 않는 한 "중량%"를 의미하고;
- [0069] - "침전제"는 단백질 침전을 유발하는 제제이고;
- [0070] - "용출액 분획"은 그 안에 포함된 특정 분석물이 이전에 정지상에 결합되었거나 이에 유지되었는지(본원에 언급된 양성 모드에서와 같이) 또는 그렇지 않은지(본원에 언급된 바와 같이 음성 모드에서와 같이)에 관계없이 크로마토그래피 컬럼으로부터 나오는 이동상 스트림의 분획을 나타낸다.
- [0071] 이하, 본 발명은 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명될 것이다.
- [0072] 도 1은 선행 기술로부터 알려진 상업적으로 입수 가능한 C1-INH 제제의 전기영동 겔을 나타낸다. 점선은 C1-INH (105 kD)의 분자량을 나타낸다. 상표명 Berinert<sup>®</sup>, Cetor<sup>®</sup> 및 Cinryze<sup>®</sup>로 알려진 혈장으로부터 유래된 상업적으로 입수 가능한 C1-INH 제제 간의 차이점은 명확하게 구별될 수 있다. 이 겔에서 라인 1에서 5는 Berinert<sup>®</sup>, Cetor<sup>®</sup> 및 Cinryze<sup>®</sup>가 소량의 ACT를 포함한다는 것을 나타내고, 여기서, Berinert<sup>®</sup>는 Feussner 등에 의해 더 상세히 논의된 바와 같이 가장 적은 양을 함유한다 (도 1, 1). Berinert<sup>®</sup>, Cetor<sup>®</sup> 및 Cinryze<sup>®</sup> 뿐만 아니라 Haegarda<sup>®</sup>는 각각 여러 단계를 수반하는 공정을 통해 혈장으로부터 얻어진 C1-INH 제제이다. Berinert<sup>®</sup>, Cetor<sup>®</sup> 및 Cinryze<sup>®</sup>의 제조에 수반된 단계는 이전에 설명되었다 (Feussner et al., Transfusion 2014 Oct; 54(10):2566-73, doi: 10.1111/ trf.12678).
- [0073] 도 2는 본 발명에 따른 AEX 크로마토그래피 실험의 크로마토그램 및 그 실험으로부터의 용출액 샘플을 분석하는 SDS-page 겔을 나타내고; 컬럼 로드는 C1-INH 제제 Berinert<sup>®</sup>의 생산으로부터 취한 C1-INH 농축액, 즉 (1:25로 희석된) Berinert<sup>®</sup> 제조에서 마지막 소수성 상호작용 크로마토그래피 단계의 용출액이었고; 결합능 BC는 15mg 단백질/mL 수지였고; 분리는 30mM로부터 1000mM NaCl로의 염 구배에 의해 수행되었다. 피크 전 용출액 샘플은

도 2의 SDS-page 겔에서 볼 수 있는 것처럼 ACT를 명확하게 포함한다(라인 6 참조). 따라서, 도 2의 크로마토그램 및 SDS-page 겔은 AEX 크로마토그래피를 사용하여 이미 매우 낮은 농도의 ACT를 포함하고 여러 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈을 입증한다.

[0074] 도 3은 AEX 크로마토그래피 실험으로부터 얻은 용출액 샘플의 SDS-page 겔을 도 2에 나타낸 실험에서의 동일한 컬럼 로드 및 결합능으로 나타내지만 덜 가파른 염 구배, 즉 30mM에서 515mM NaCl을 사용한다. 도 3의 SDS-page 겔은 AEX 크로마토그래피를 사용하여 C1-INH 제제로부터 ACT가 고갈되었음을 입증한다.

[0075] 도 4는 정지상으로부터 ACT를 용출하도록 예정된 제1 용출 완충액의 다양한 염 농도를 갖는 단계 용리를 사용하여 AEX 크로마토그래피 실험으로부터 얻은 용출액 샘플의 SDS-page 겔을 나타낸다. "E1"은 각 용출액 1의 샘플에 해당하는 레인을 지정하고, "E2"는 각 용출액 2의 샘플에 해당하는 레인을 지정한다. C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈 정도는 염 농도가 증가함에 따라 증가하는 반면, 용출액 2에서 C1-INH 회수율 정도는 염 농도가 증가함에 따라 감소함을 분명히 알 수 있다.

[0076] 도 5는 상이한 용출액 완충액 1에 대한 용리액 완충액 1의 염 함량에 따른 용출액 2의 C1-INH 회수율 정도 및 순도를 비교하여 나타낸다. 도 5로부터 유추할 수 있는 바와 같이, NaCl 농도가 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl인 용리액 완충액 1은 C1-INH 제제로부터 C1-INH의 본질적 손실 없이 ACT의 최대 고갈에 가장 적합하다.

[0077] 도 6은 상이한 용출액 완충액 1에 대한 용리액 완충액 1의 염 함량에 따른 용출액 2의 C1-INH 및 ACT의 양을 비교하여 나타낸다. 도 6은 제1 용출에 사용된 완충액의 175mM NaCl 이상에서 용리액 완충액 1의 더 낮은 이온 강도와 비교하여 최종 생성물에서 ACT의 훨씬 더 나은 고갈이 달성되고 용리액 완충액 1의 190mM 초과 이온 강도에서 C1-INH의 수율이 너무 낮아져 상업적으로 실행 가능하다는 것을 나타낸다.

[0078] 동물 혈액, 특히 인간 혈액으로부터 유래된 C1-INH 제제는 오늘날 다양한 다단계 공정에 의해 얻어진다. 인간 혈장으로부터 출발하는 확립된 공정은 동결침전, 이온-교환 크로마토그래피, 4차 아미노에틸 흡착, 황산암모늄 침전, 저온살균 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 (Berinert<sup>®</sup>의 제조에 포함된 공정 단계, 문헌 (Feussner et al.) 또는 EP 0 101 935 참조) 또는 동결침전, 다양한 단계의 이온-교환 크로마토그래피, PEG (특히 PEG-4000)를 사용한 침전 및 저온살균 (Cinryze<sup>®</sup>/Cetor<sup>®</sup>의 제조에 포함된 공정 단계)을 포함한다. 이러한 공정은 침전 단계를 포함한다는 공통점을 갖는다. 추가 마지막 단계는 여과 및 동결건조이다. 본 발명은 상기 언급된 것과 같은 다단계 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제를 더 정제하기 위해 음이온 교환 크로마토그래피 단계를 추가하여 기존 제품의 안전성을 더 향상시킬 수 있는 "연마" 단계를 제공하는 것은 제안한다. 이 연마 단계는 여과 및 동결건조 전에 수행될 수 있지만, 그렇지 않으면 최종 제품에 거의 해당하는 C1-INH 농축물 또는 C1-INH 제제를 생성하는 일련의 다른 단계를 따르는 마지막 단계이다.

[0079] 놀랍게도, 추가 연마 단계에서 AEX 크로마토그래피의 사용은 C1-INH의 본질적 손실 없이 불필요한 희석 없이 C1-INH 제제로부터 ACT를 여전히 더 고갈시킬 수 있다. AEX 크로마토그래피가 오랫동안 알려져 왔으며 C1-INH 농축물의 제조에 사용되는 경우도 가끔 언급되지만 또한 수반되는 단백질로부터 C1-INH를 분리하는 맥락에서, 지금까지 여러 단계 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제로부터 ACT를 고갈시키는 특정 목적에 사용되지 않았고, 여기서, ACT는 본질적으로 순수한 C1-INH 제제를 얻기 위해 과거에 상당한 노력을 기울였음에도 불구하고 여전히 불순물로 존재한다.

[0080] 이러한 배경을 고려할 때 이것이 가능하다는 것은 예상할 수 없었다. 매우 놀랍게도, 그렇지 않으면 산업적 규모로 C1-INH 제제의 생산을 가능하게 하는 잘 확립된 공정은 해당하는 연마 단계를 포함해서 여전히 개선될 수 있는데, 즉, 각 공정의 비교적 늦은 단계에 있다.

[0081] 이하, 본 발명은 실시예를 참조하여 보다 상세하게 설명될 것이다.

[0082] **실시예**

[0083] 실시예 1

[0084] C1-INH 제제 Berinert<sup>®</sup>의 생산으로부터 취한 C1-Inh 농축물, 즉, Berinert<sup>®</sup>의 제조에서 마지막 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 단계의 용출액을 1:25로 희석하여 단백질 결합을 가능하게 하기 위해 선행 HIC에 사용된 카오토픽제 황산암모늄(AS)의 농도를 감소시켰다. 이어서, AEX 크로마토그래피는 결합/용출 모드로 수행되었는데, 즉, 결합 완충액을 사용하여 출발 물질을 컬럼에 로딩한 후 세척 완충액으로 세척하고 마지막으로 염

구배를 적용하여 용출시켰다. 완충액의 조성 및 구배 및 추가 세부 사항은 표 a-1에 개시되어 있으며 상응하는 크로마토그램 및 SDS page 겔은 도 2에 나타난다.

표 a-1:

결합 완충액	10 mM Tris, 32 mM AS, pH 7.2
BC	15 mg 단백질/mL 수지
세척 완충액	10 mM Tris, 30 mM NaCl, pH 7.2
용리 구배	10 mM Tris, 30 mM NaCl, pH 7.2로부터, 10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.2 까지

[0085]

[0086]

따라서, 실시예 1은 AEX 크로마토그래피를 사용하여 이미 매우 낮은 농도의 ACT를 포함하고 여러 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈을 입증한다.

[0087]

실시예 2

[0088]

AEX 크로마토그래피는 10mM NaCl로부터 515mM NaCl로의 용리 구배로 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행되었다. 상응하는 크로마토그램은 상기 본원에 논의된 도 3에 나타난다. 따라서, 실시예 2는 AEX 크로마토그래피를 사용하여 이미 매우 낮은 농도의 ACT를 포함하고 여러 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어진 C1-INH 제제로부터 ACT의 고갈을 입증한다.

[0089]

실시예 3

[0090]

출발 물질

[0091]

Berineret 공정에서 얻어진 생성물인 -20°C에서 보관된 Feussner 등(doi: 10.1111/trf.12678) (배치 번호 20181219-HW)에 의해 기재된 것과 유사한 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 얻어진 고도로 정제된 C1-INH 농축물이 사용되었다. 이 물질은 4°C에서 밤새 10mM Tris, 32mM AS pH 7.2에 대해 투석한 다음, 하기 표 b-1에 나타난 바와 같이 상이한 염 농도를 갖는 용출 완충액 1을 비교하는 음이온 교환 크로마토그래피 실험에 적용하였다.

표 b-1: 상이한 완충액 1을 사용한 실험

실험	완충액/ 용액	조성	전도도 (25(±0.5)°C mS/cm)	컬럼 로드
1-6	평형 완충액	10 mM Tris, 32 mM AS pH 7.2		
1-6	세척 완충액	10 mM Tris, 30 mM NaCl pH 7.2		
1	용출 완충액 1	10 mM Tris, 170 mM NaCl pH 7.2	18.7	c
2		10 mM Tris, 175 mM NaCl pH 7.2	18.9	c
3		10 mM Tris, 180 mM NaCl pH 7.2	19.2	b
4		10 mM Tris, 185 mM NaCl pH 7.2	19.8	b
5		10 mM Tris, 190 mM NaCl pH 7.2	20.2	c
6		10 mM Tris, 195 mM NaCl pH 7.2	20.7	a
1-6	용출 완충액 2	10 mM Tris, 1 M NaCl pH 7.2		
1-6	재생 용액	2 M NaCl		

[0092]

물질 및 장비

[0093]

물질:

[0094]

Milli-Q를 통해 얻어진 탈이온수.

[0095]

장비:

[0096]

크로마토그래피 장치 AKTA avant 25

[0097]

소프트웨어 Unicorn 6.4

[0098]

- [0099] pH 측정기 Knick
- [0100] 전도도 측정기 Knick
- [0101] 칭량 저울 Sartorius
- [0102] 자기 교반기 Thermo Scientific
- [0103] 컬럼 GE Healthcare, 수지: Q HP, 로트 번호 10270237
- [0104] 컬럼 치수 내경 0.77cm, 베드 높이 10cm, 컬럼 체적 4.7mL

표 b-2: 컬럼 로드

	a	b	c
pH	7.18	7.16	7.15
전도도	9.18 mS/cm (22.1°C)	8.95 (21.7°C)	8.97 (22.9°C)
OD <sup>1</sup>	0.1026 (0.283 mg/mL)	0.0885 (0.244 mg/mL)	0.0911 (0.251 mg/mL)
체적 <sup>2</sup>	205.6 mL	241 mL	234 mL
총 단백질 <sup>3</sup>	58.1 mg	58.8 mg	58.7 mg
BC <sup>4</sup>	12.4 mg/mL	12.5 mg/mL	12.5 mg/mL

<sup>1</sup>: 1 OD = 2.76 mg/mL 단백질;

<sup>2</sup>: 체적 = 컬럼에 로딩하기 위해 사용된 체적으로, "컬럼 로드"라고도 지칭한다.

<sup>3</sup>: 총 단백질 = 로딩된 총 단백질 양

<sup>4</sup>: BC = 결합능 =  $\frac{\text{총 단백질 (mg)}}{\text{컬럼 체적 (mL)}}$

[0105]

표 b-3: ÄKTA 프로그램

펌프 A1 및 완충액	평형 완충액
펌프 A2	세척 완충액
펌프 A3, A4, A6	상이한 용출 완충액 1
펌프 B1	용출 완충액 2
펌프 A5	2 M NaCl
펌프 S1	컬럼 로드

[0106]

표 b-4: ÄKTA 프로그램의 예

단계	체적	주입구	유량 (cm/h; mL/min)	배출구
평형	5 CV	A1	150; 1.2	폐기물
샘플 적용	241 mL	S1	130; 1.0	폐기물
세척	5 CV	A2	130; 1.0	폐기물
용출 1	5 CV	A3	150; 1.2	배출구 2
용출 2	5 CV	B1	150; 1.2	배출구 3
재생	5 CV	A5	130; 1.0	폐기물

[0107]

[0108] 수율의 계산은 각 컬럼 로드 a-c (상기 표 b-1 참조)의 체적과 용출액 1 및 2 (각각 23.5 mL)의 체적을 기준으로 한다.

[0109]

분석론

[0110]

"컬럼 로드" (L), "용출액 1" (E1) 및 "용출액 2" (E2)로부터의 샘플을 SDS-PAGE로 분석하였다. 상응하는 SDS-PAGE 겔은 도 4에 나타난다. "컬럼 로드" 및 "용출액 2"로부터의 샘플은 품질 조절 실험실에서 C1-INH 활성에 대해 추가로 시험되었다.

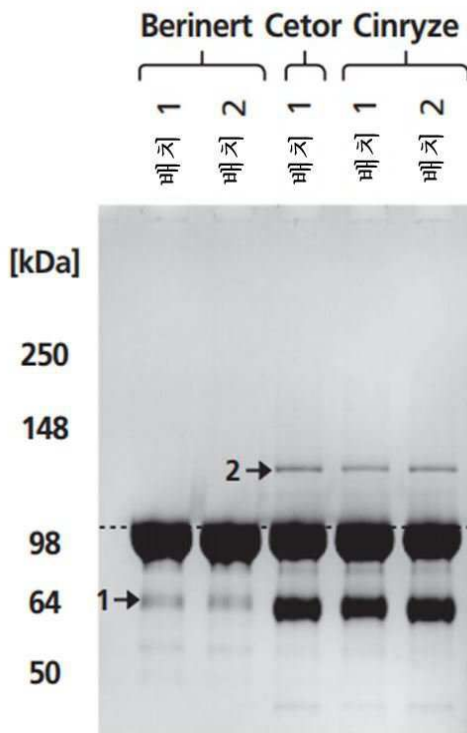
[0111] 비교 결과는 순도(%)와 비교하여 각각의 용출액 2에서 회수된 C1-INH의 수율을 나타내는 도 5에 나타낸 그래프에 요약되어 있다. 이에 따라, 175 내지 190mM NaCl, 바람직하게는 175 내지 185mM NaCl, 가장 바람직하게는 180mM NaCl 범위의 NaCl 농도를 갖는 용리액 완충액 1은 C1-INH 제제로부터 C1-INH의 본질적인 손실 없이 ACT의 최대 고갈에 가장 적합하다. 이는 25°C에서 18.7 내지 20.2mS/cm, 바람직하게는 25°C에서 18.9 내지 19.8mS/cm, 가장 바람직하게는 25°C에서 19.2mS/cm인 용리액 완충액 1의 전도도에 해당한다. 용리액 완충액 2는 여전히 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 결합된 모든 C1-INH를 용출할 수 있을 만큼 충분히 높아야 하며 25°C에서 21.6mS/cm보다 높아야 한다. 용리액 완충액 2에 대한 한 예는 10mM Tris, 1M NaCl, pH 7.2의 완충액 조성이다.

[0112] 도 6은 170mM NaCl(25°C에서 18.7mS/cm)의 용리액 완충액 1을 사용하면 이미 ACT가 약간 감소했지만 최종 생성물에는 여전히 ACT의 출발 양의 49%가 있는 반면, 175mM NaCl(25°C에서 18.9mS/cm)의 용리액 완충액 1을 사용하면 최종 생성물에는 ACT의 출발 양의 17%만이 있음을 나타낸다. 이것은 C1-INH의 최대 수율과 ACT의 최소 수율을 허용하기 위해 용리액 완충액 1의 이온 강도/전도도의 미세 조정이 얼마나 중요한지를 예시한다.

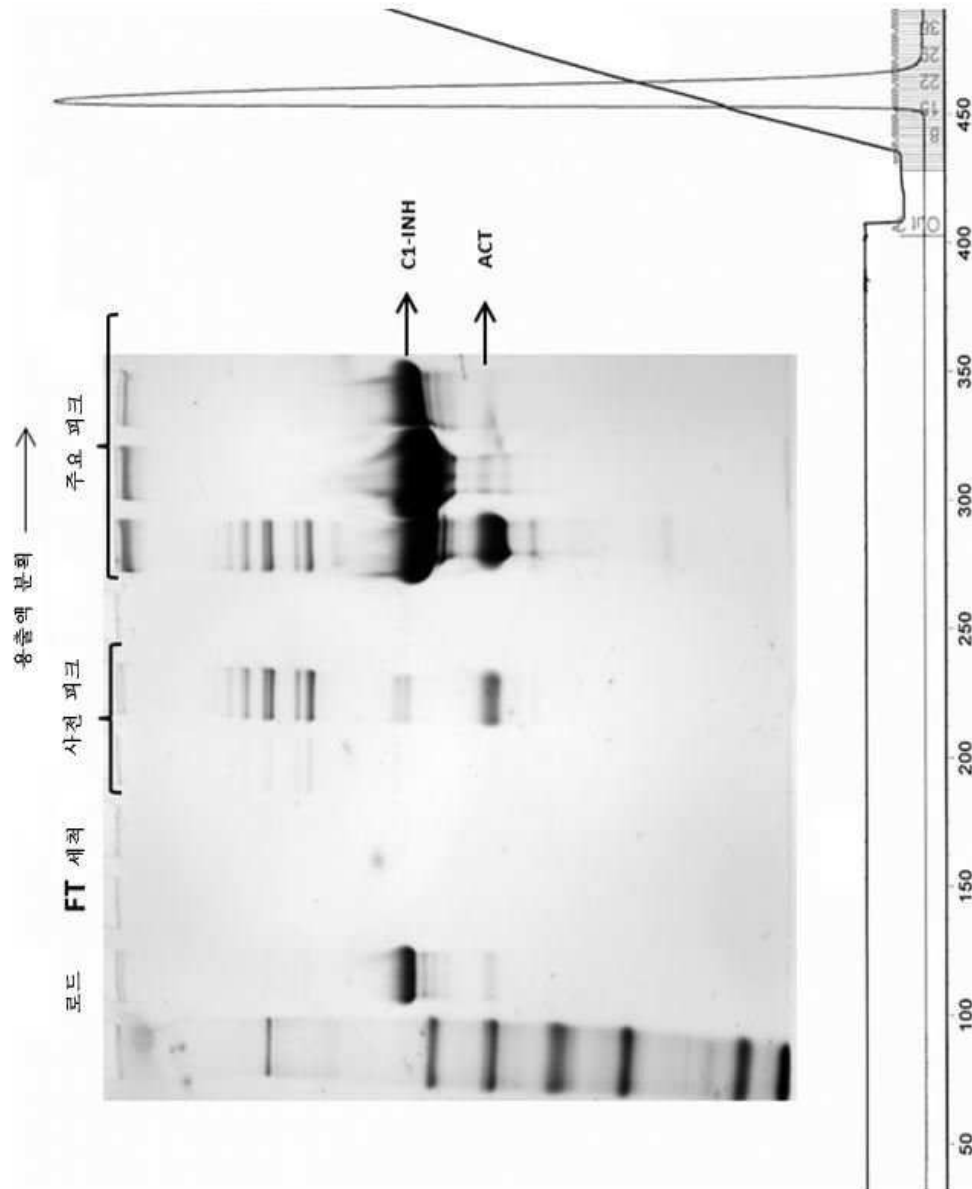
[0113] 본 발명은 구체적인 실시예를 참조하여 상기 설명되었다. 이들 실시예는 결코 본 발명을 제한하려는 것이 아니라 본 발명이 작동하는 방식을 예시하기 위한 것이다.

**도면**

**도면1**

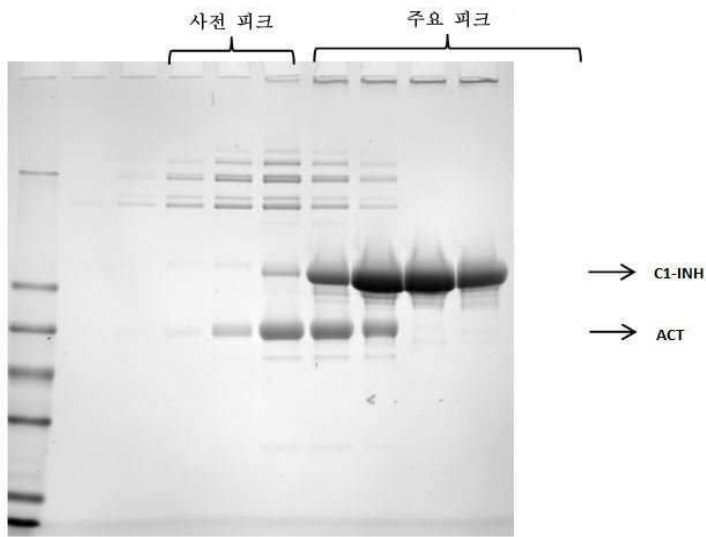


도면2

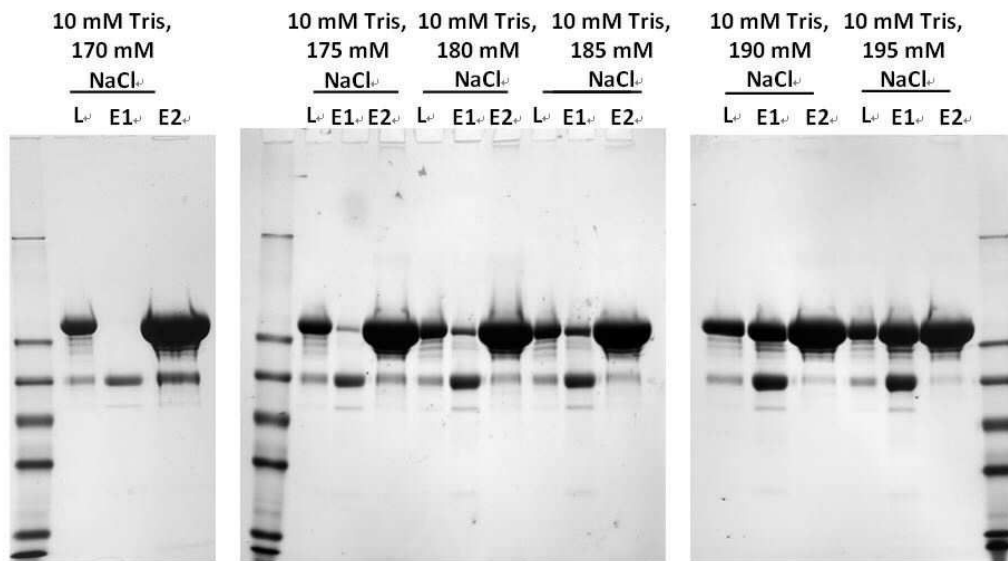




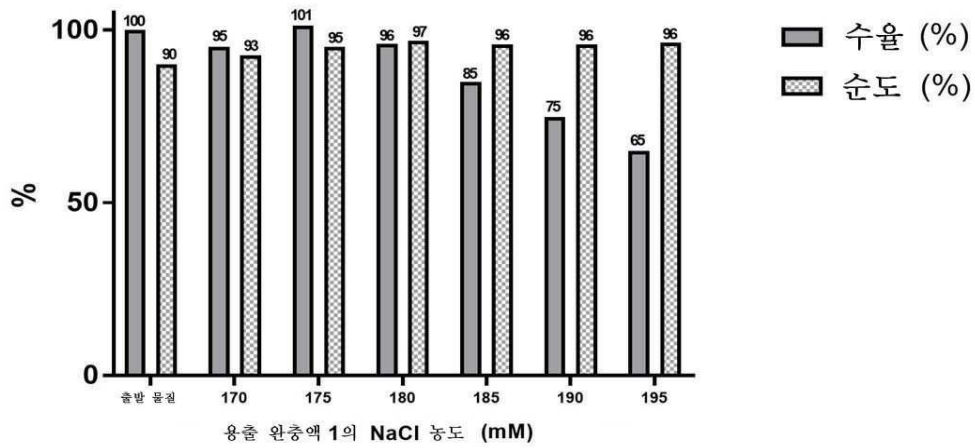
도면3



도면4



도면5



도면6

