



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월04일
 (11) 등록번호 10-1414897
 (24) 등록일자 2014년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 1/18 (2006.01) C07K 14/505 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0148026
 (22) 출원일자 2013년11월29일
 심사청구일자 2013년11월29일
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2011024024 A1*
 American Laboratory. Improved column
 chromatography performance using
 Arginine.(2007.02.01.).
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
씨제이헬스케어 주식회사
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동, 씨제이제
 일제당빌딩)
 (72) 발명자
이윤정
 경기 용인시 기흥구 동백2로 11, 4201동 1003호
 (중동, 어은목마을벽산블루밍아파트)
김경화
 부산 해운대구 좌동순환로468번다길 40-6, (중
 동, 영림빌라)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 16 항

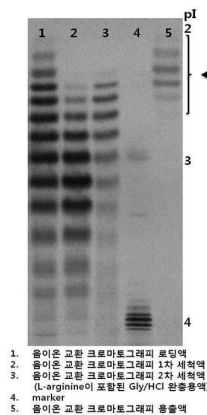
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **다베포에틴 알파의 정제 방법**

(57) 요약

본 발명은 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파의 구조적 아형들의 혼합물로부터 시알산 함량이 높은 구조적 아형만을 선택적으로 분리하는 다베포에틴 알파의 정제 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 생산 적용이 편리하고 간편한 신규한 다베포에틴 알파의 정제 방법으로, 본 발명에 의해 다베포에틴 알파의 대량 제조시 고순도의 다베포에틴 알파의 수득은 물론 공정 효율 개선에 따른 비약적인 생산성의 증대가 가능하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

양유희

경기 용인시 기흥구 용구대로2469번길 180, 136호
(보정동, 대산인하스빌)

유정민

서울 도봉구 노해로70길 54, 1906동 306호 (창동,
주공19단지아파트)

김세준

경기 과천시 관문로 128, 112동 504호 (중앙동, 주
공아파트)

문지현

서울특별시 관악구 남현동 499-620 콤팩트하우스
809호

오후근

경기 수원시 권선구 세화로168번길 15, 110동 130
3호 (서문동, 센트라우스아파트)

이동익

서울 송파구 문정로 83, 129동 1903호 (문정동, 문
정래미안아파트)

이원정

서울 송파구 동남로8길 30-21, 402호 (문정동)

이정록

부산 사하구 낙동대로233번길 1, 2005호 (괴정동,
새보람더존빌)

이정민

경기도 용인시 기흥구 구성읍 보정리 솔피마을현대
홈타운 107동 603호

최은영

서울 성동구 행당로 79, 123동 404호 (행당동, 대
림아파트)

하경식

경기 수원시 영통구 영통로 498, 126동 1602호 (영
통동, 황골마을주공1단지아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파를 포함하는 혼합물을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 크로마토그래피 컬럼을 아르기닌(Arginine)을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계로서, 목적하는 등전점을 가지는 구조적 아형(isoform)인 다베포에틴 알파를 수득하기 위하여, 목적하는 등전점 보다 높은 등전점을 가지는 구조적 아형 다베포에틴 알파를 세척하는 것을 특징으로 하는 단계; 및
- (c) 상기 크로마토그래피 컬럼에 결합이 유지된 다베포에틴 알파를 컬럼으로부터 용출하는 단계를 포함하는, 등전점이 pH 2.0 이상 4.0 이하인 시알산 함량을 갖는, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아르기닌을 포함한 세척 완충액은 pH 3.0 이상 내지 5.0 이하인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아르기닌을 포함한 세척 완충액은 아르기닌을 포함하며, NaCl 및 우레아(Urea)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세척 완충액은 NaCl을 5mM 이상 90 mM 이하로 포함하는 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 세척 완충액은 우레아를 3M 이상 8M 이하로 포함하는 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계 전 또는 후에 아르기닌을 포함하거나 포함하지 않는 세척 완충액으로 세척하는 단계를 추가로 포함하는, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계 전에 pH 6 이상 pH 8 이하인 세척 완충액으로 상기 컬럼을 1차 세척하는 단계를 추가로 포함하며;

상기 (b) 단계는 pH 3 이상 pH 5 이하인 아르기닌이 포함된 세척 완충액으로 컬럼을 2차 세척하는 단계인 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 1차 세척하는 단계의 세척 완충액은 소듐 포스페이트 용액이고;

상기 2차 세척하는 단계의 세척 완충액은 글라이신-HCl 용액인 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 혼합물은 효모, 식물세포 또는 동물세포 배양액인 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼을 구성하는 수지의 작용기가 Q (Quaternary amine), DEAE (DiEthylAminoEthyl) 및 QAE (Quaternary Amino Ethyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, (d) 상기 (c) 단계에서 수득한 음이온 교환 크로마토그래피 용출액을 겔 여과 크로마토그래피에 적용하여 분획하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 14

(a) 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 생성된 용출액을 흡착 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 생성된 용출액을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키는 단계;

(d) 단계 (c)에서 상기 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계로서, 목적하는 등전점을 가지는 구조적 아형(isoform)인 다베포에틴 알파를 수득하기 위하여, 목적하는 등전점 보다 높은 등전점을 가지는 구조적 아형 다베포에틴 알파를 세척하는 것을 특징으로 하는 단계; 및

(e) 단계 (d)에서 상기 컬럼에 결합이 유지된 다베포에틴 알파를 컬럼으로부터 용출하는 단계를 포함하는, 등전점이 pH 2.0 이상 4.0 이하인 시알산 함량을 갖는, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 흡착 크로마토그래피의 고정상은 하이드록시아파타이트 수지인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, (f) 상기 (e) 단계에서 수득한 음이온 교환 크로마토그래피 용출액을 겔 여과 크로마토그래피에 적용하여 분획하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 (a) 단계는 평형화된 음이온 교환 수지에 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 가하여 흡착시킨 후, 0 내지 100 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 세척 완충액으로 세척한 후, 100 내지 300 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 용출 완충액으로 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계인 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 (b) 단계는 평형화된 하이드록시아파타이트 수지에 (a) 단계로부터 회수된 용출액을 로딩한 후, 0 내지 100 mM 소듐 포스페이트가 포함된 pH 6 내지 8의 세척 완충액으로 세척한 후, 로딩과 세척에서 수지에 붙지 않고 빠져나온 액에서 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 수득하는 단계인 것인, 다베포에틴 알파의 정제 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파의 구조적 아형들의 혼합물로부터 시알산 함량이 높은 구조적 아형만을 선택적으로 분리하는 다베포에틴 알파의 정제 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다베포에틴 알파 (Darbepoetin Alfa, NESP)는 에리스로포이에틴 (EPO)의 분자 내 아미노산 5개를 치환하여 2개의 N-당쇄를 추가시킨 EPO의 유사체이다(국제공개 WO2001076640호 참조). EPO와는 분자량, 등전점 등 생화학적 특성이 구별되나 EPO와 같은 적혈구 생성 촉진 단백질이다.

[0003] 다베포에틴 알파는 시알산 함량이 높아 에리스로포이에틴에 비해 마우스, 랫트, 개 및 인간 등에서 혈장 반감기가 약 3배 길기 때문에 (Pedrazzoli P, Cinieri S, Lorusso V, Gamucci T, Secondino S, Silvestris N 2007 Nov-Dec, 27(6C), 4419-24; Anticancer Res.) 생체 내 분해가 억제됨에 따라 자연상태인 EPO보다 높은 생물학적 활성을 가진다고 알려져 있다.

[0004] 다베포에틴 알파는 당쇄화에 의한 시알산 함량의 차이로 인해 최대 22개의 구조적 아형(isoform)을 가지며, 시알산 함량이 높을수록 높은 등전점을 보이고 높은 치료적 가치를 보유한다. 따라서, 시알산 함량이 높은 구조적 아형들만을 선택적으로 분리 정제하는 것은 다베포에틴 알파를 이용하는 단백질 치료 분야에서 중요한 문제이다.

[0005] 종래 EPO 및 EPO 유사체를 정제하는 방법으로는 음이온 교환 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호반응(hydrophobic-interaction), 크기배제(size-exclusion) 크로마토그래피 등이 개시되어 있다. 구체적으로는, WO2010/027869에는 소수성 상호반응, 음이온 교환, 양이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피를 순차적으로 적용하여 EPO를 정제하는 방법이 개시되어 있다. WO2003/045996에는 역상 크로마토그래피, 음이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피를 행하여 재조합 인간 EPO를 정제하는 방법이 개시되어 있다.

[0006] 특히 다베포에틴 알파를 정제하는 방법으로서, WO1995/005465에는 음이온 교환 수지 및 C4 수지를 적용하는 방법이 개시되어 있으며, WO2010/008823에는 등전점 4.5 이하의 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 정제하기 위하여 목적하는 단백질이 양이온 교환수지의 컬럼에 흡착되지 않고 크로마토그래피 처리 용액에 흘러나오도록 하는 플로우스루(flow through) 공정을 제시하고 있다. 그러나 상기 방법들의 경우 여러 단계의 수지를 이용함

으로 인해 비용과 시간이 막대하게 소요되며, 따라서 대량 생산 적용에 적합하지 않은 단점이 있다.

- [0007] 한편 대한민국 공개특허 10-2013-0042107에서는, 상기 4단계의 공정보다 단순화된 공정을 구현하기 위하여 음이온, 하이드록시아파타이트, 음이온 교환 크로마토그래피를 순차적으로 적용하는 3단계의 공정을 채용하고, 등전점이 낮은 아형을 선택적으로 분리하기 위하여 2차 음이온 교환수지 크로마토그래피 적용시 특정의 pH 조건 하에 흡착 및 세척을 행하는 방법을 개시하고 있다. 특히 낮은 등전점을 가지는 아형을 얻기 위하여 pH 4.0~5.0 조건에서 다베포에틴 알파를 컬럼에 흡착시킨 후 pH 2.0~2.4의 완충액으로 세척하는 방법을 개시하고 있다.
- [0008] 상기 제안된 방법은 기존의 공정보다 다소 단계가 간이화되었다는 점에서 대량 생산 공정 적용시 시간 및 비용 측면에서 유리할 수 있지만, 상기 공개특허에서 제시하는 바와 같이 낮은 pH(pH 2.2~2.4) 조건을 대량 생산 조건에서 구현하려면 HCL 등 유독성 산성용액을 대량으로 사용하여야 하므로 안전성 측면에서 바람직하지 않다. 또한 스케일 업 시 컬럼의 처리 용량이 증가할 때 주어진 pH 조건에서 아형의 반응이 일정하지 않기 때문에, 완충액의 pH 조건을 제어하여 원하는 등전점 범위의 아형을 얻으려는 할 경우 대량 생산에서의 재현 가능성이 낮다.
- [0009] 즉, 기존의 다베포에틴 알파의 정제 방법을 이용할 경우 여러 단계의 수지를 이용한 크로마토그래피를 사용하는 복잡한 공정을 거쳐야 하므로 그로 인한 비용과 시간이 막대하게 소요되거나, 기존의 공정단계를 줄여서 정제할 경우 공정 간소화로 인해 감소될 수 있는 정제효과를 보상하기 위해 pH 등 정제 조건을 정밀하게 제어해야 하지만 생산규모가 대형화될 될수록 이를 제어하기가 용이치 않음을 알 수 있다.
- [0010] 이에, 기존 정제 방법보다 공정 단계가 간소하면서도 공정 조건을 제어하기가 용이하여 대량 생산 적용시 비용 및 시간이 절감되면서도 안정적으로 성공 공정 조건을 재현할 수 있는 개선된 다베포에틴 알파의 정제 방법에 대한 수요가 높다.

[0011] 상기와 같은 배경 하에 본 발명자들은 기존의 공정보다 간소하면서도 공정 제어가 용이한 다베포에틴 알파의 정제 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 놀랍게도 음이온과 아르기닌을 이용한 간이한 공정만으로 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 단시간에 분리할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파의 구조적 아형들의 혼합물로부터 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파의 정제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파의 구조적 아형들의 혼합물로부터 다베포에틴 알파의 정제 방법을 제공한다.
- [0014] 구체적으로, 다베포에틴 알파의 다양한 아형들의 혼합물로부터 시알산 함량이 높은 구조적 아형만을 선택적으로 분리하기 위해, 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 다베포에틴 알파를 정제하는 방법을 제공한다.
- [0015] 바람직하게, 본 발명에 의한 다베포에틴 알파를 정제하는 방법은 하나 이상의 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하고, 상기 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하는 단계는 다베포에틴 알파의 다양한 구조적 아형들의 혼합물을 음이온 교환 수지에 결합시키는 단계, 아르기닌을 포함한 완충액으로 상기 수지를 세척하는 단계 및 크로마토그래피 컬럼으로부터 컬럼에 결합된 다베포에틴 알파를 용출하는 단계를 포함한다.
- [0016] 바람직한 일 양태로, 본 발명은 (a) 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파를 포함하는 혼합물을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키는 단계; (b) 상기 크로마토그래피 컬럼을 아르기닌(Arginine)을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계; 및 (c) 상기 크로마토그래피 컬럼에 결합이 유지된 다베포에틴 알파를 컬럼으로부터 용출하는 단계를 포함하는, 다베포에틴 알파의 정제 방법일 수 있다.
- [0017] 바람직한 일 양태로, 본 발명은 (a) 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계; (b) 단계 (a)에서 생성된 용출액을 하이드록시

아파타이트 수지 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계; (c) 단계 (b)에서 생성된 용출액을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 상기 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계; 및 (e) 단계 (d)에서 상기 컬럼에 결합이 유지된 다베포에틴 알파를 컬럼으로부터 용출하는 단계를 포함하는, 다베포에틴 알파의 정제 방법일 수 있다.

[0018] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어, "다베포에틴 알파 (Darbepoetin alfa)"는 당단백질인 에리스로포이에틴 (erythropoietin, EPO)의 재조합 형태로서, 에리스로포이에틴의 분자 내 아미노산 5개를 치환하여 2개의 N-당쇄를 추가시킨 당단백질이다. 에리스로포이에틴과는 분자량, 등전점 등 생화학적 특성이 구별된다. 다베포에틴 알파는 적혈구 생성을 유도하여, 신부전증 또는 암의 화학치료와 관련된 빈혈 치료제로 이용된다. 다베포에틴 알파는 당쇄의 추가로 인하여 에리스로포이에틴에 비해서 혈장 반감기가 약 3배 이상 길며, 시알산 함량에 따른 구조적 아형 (isodorm)이 다양하게 존재할 수 있다. 다베포에틴 알파의 당쇄 및 시알산 함량이 높은 구조적 아형들은 낮은 등전점을 가지며, 이러한 구조적 아형은 생체 내 높은 생물학적 활성을 가진다. 따라서, 당쇄 및 시알산 함량이 높은 구조적 아형들만을 선택적으로 고순도로 분리 정제하는 것은 상기 다베포에틴 알파를 이용하는 단백질 치료제에서 중요한 문제이나, 현재까지도 기존의 정제 공정은 여러 단계의 수지를 이용하므로 비용과 시간이 막대하게 들어가는 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 간단한 공정으로 원하는 당쇄화가 높은 다베포에틴 알파만을 단시간에 분리 정제하는 방법을 개발하였다.

[0020] 다베포에틴 알파는 EPO 대비 당쇄화 정도가 높기 때문에 1몰당 시알산 함량이 최대 13몰에 그치는 EPO보다 1몰당 시알산 함량이 높으며 그 이론적 최대치는 최대 22몰인 것으로 알려져 있다(Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), British Journal of Cancer (2001) 84 (Supplement 1), 3-10).

[0021] 특히, 본 발명의 정제 방법에 의해 분리 정제되는 다베포에틴 알파는 당쇄 함량 및 시알산 함량이 높은 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 등전점이 pH 2.0 내지 4.0로 낮은 등전점을 갖는 구조적 아형을 갖는 다베포에틴 알파일 수 있고, 더 바람직하게는 등전점이 3.5 이하일 수 있다.

[0022] 본 발명에서 "생물학적 유액"은 세포, 세포 구성요소 또는 세포 산물을 함유하거나 그로부터 유래된 모든 배양액을 말하며, 이에 한정되는 것은 아니나 세포 배양물, 세포 배양 상등액, 세포 용해물, 세포 추출물, 조직 추출물, 혈액, 혈장, 혈청, 밀크, 뇨, 이들의 분획 등을 포함한다. 본 발명의 정제 방법에서는 상기와 같은 다양한 형태의 생물학적 유액을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 효모, 식물 세포 또는 동물 세포의 배양액일 수 있으며, 더 바람직하게는 다베포에틴 알파를 코딩하는 뉴클레오티드가 유전자 재조합 방식으로 형질 전환된 동물 세포 배양액을 사용하며, 더욱 바람직하게는 상기 동물세포가 CHO (중국햄스터 난소)인 동물 세포 배양액일 수 있다. 동물 세포 배양액 등을 이용하는 경우, 당해 분야에 공지된 바와 같이, 배양액을 원심분리하여 그 상등액을 이용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0023] 바람직하게는, 본 발명의 생물학적 유액은 한외여과법을 이용한 정용여과를 수행하여 수득할 수 있다. 본 한외여과법을 이용한 정용여과는 배양액 내의 10,000 M.W.C.O.(Molecular weight cut off) 이하의 저분자 물질 (예를 들어, 계면활성제 (surfactant), 염색약, 저분자 펩타이드 (small peptide), 당성분 등)을 제거할 뿐만 아니라, 이후의 크로마토그래피 평형 완충액으로 완충액을 교환하여 컬럼 흡착 효율을 향상시키는 것이 가능하다.

[0024] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 다베포에틴 알파를 포함하는 벡터로 형질전환된 CHO 세포를 배양한 후 배양액의 상등액을 한외 여과 시스템(10 mM 소듐 포스페이트 완충액 이용)으로 정용여과 (diafiltration)하여 생물학적 유액으로 이용하였다.

[0025]

[0026] 본 발명에서 "음이온 교환 크로마토그래피"란 양으로 하전된 지지체에 음으로 하전된 (또는 산성) 분자를 결합시키는 것에 의해 분자들을 이들의 전하에 따라 분리할 수 있는 것으로서, 분자들의 동족체 (산성, 염기성 및 중성)는 이 기법에 의해 쉽게 분리할 수 있다. 본 발명의 음이온 교환 크로마토그래피에 사용될 수 있는 수지로

는 강음이온 교환 수지와 약음이온 교환 수지를 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 세파텍스, 세파로즈, 소스, 모노, 미니 (상품명, GE healthcare) 등일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 상기 수지의 작용기가 Q (Quaternary amine), DEAE (DiEthylAminoEthyl) 또는 QAE (Quaternary Amino Ethyl) 등인 수지를 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 수지의 작용기가 Q 또는 DEAE 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 강음이온 교환 수지인 Q-세파로즈를 사용할 수 있다.

- [0027] 음이온 교환 크로마토그래피는 칼럼 크로마토그래피에 의해 수행하거나, 또는 배치 모드(batch mode)로 수행할 수 있다. 상업적 제조인 경우, 배치 모드를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 본 발명의 음이온 교환 크로마토그래피에 사용되는 음이온 교환 수지는 배양액을 흡착시키기 전에 수성 완충액으로 평형화시킬 수 있으며, 완충액으로는 Tris-HCl, 소듐 포스페이트(sodium phosphate) 완충액 등을 사용할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 음이온 교환 수지 크로마토그래피에 사용되는 음이온 교환 수지는 배양액을 흡착시키기 전에 수성 완충액으로 평형화시킬 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 이용되는 흡착 크로마토그래피의 고정상은 실리카, 알루미늄, 마그네슘 옥사이드 및 하이드록시아파타이트를 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 하이드록시아파타이트일 수 있다. 하이드록시아파타이트의 경우, 통상 DNA 등 핵산의 제거용으로 많이 사용하고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 다베포에틴 알파의 분획물로부터 생물학적 불순물을 제거한 뒤, 다양한 시알산 함량의 구조적 아형을 포함하고 있는 상기 다베포에틴 알파의 분획물에 음이온 교환 크로마토그래피를 적용하여 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 선택적으로 분리한다. 본 발명의 정제 방법에서 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계는 목적하는 등전점을 가지는 구조적 아형(isoform)인 다베포에틴 알파를 수득하기 위하여, 목적하는 등전점 보다 높은 등전점을 가지는 구조적 아형 다베포에틴을 세척하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 목적상, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 아르기닌을 포함하는 세척 완충액을 사용하여 세척한다.
- [0032] 본 발명에서 아르기닌을 포함하는 세척 완충액은 바람직하게는 pH 3.0 이상 5.0 이하인 것일 수 있으며, 또한, 아르기닌을 포함하며, NaCl 및 우레아(Urea)로 구성된 균에서 선택된 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 특히, 상기 세척 완충액은 NaCl을 5mM 이상 90 mM 이하로 포함 및/또는 우레아를 3M 이상 8M 이하로 포함하는 것일 수 있다.
- [0033] 바람직하게는, 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파를 포함하는 혼합물을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키고, 상기 크로마토그래피 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하기 전 또는 후에 아르기닌을 포함하거나 포함하지 않는 세척 완충액으로 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 크로마토그래피 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하기 전에 pH 6 이상 pH 8 이하인 세척 완충액으로 상기 컬럼을 1차 세척하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 크로마토그래피 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계는 pH 3 이상 pH 5 이하인 아르기닌이 포함된 세척 완충액으로 컬럼을 2차 세척하는 단계인 것일 수 있다.
- [0034] 상기 세척하는 단계에서 사용되는 세척 완충액으로는 소듐 포스페이트 (sodium phosphate) 완충액, 소듐 아세테이트 (sodium acetate) 완충액, 사이트레이트 (citrate) 완충액, 글라이신-HCl (glycin-HCl) 완충액, 사이트릭 에시드-소듐 포스페이트 (citric acid-sodium phosphate) 완충액 등이 사용될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 1차 세척시의 세척 완충액은 pH 6 내지 8의 소듐 포스페이트 용액일 수 있고, 2차 세척시의 세척 완충액은 pH 3 내지 5의 글라이신-HCl 용액일 수 있으며, 목적하는 pH 범위나 이동상의 이온세기를 달성하기 위하여 NaCl, Urea 등을 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 아르기닌을 포함한 세척 완충액의 적용은 시알산 함량이 낮은 다베포에틴 알파를 제거하는 중요한 역할을 한다. 도 2는 세척 완충액으로서 아르기닌이 포함된 글라이신-HCl을 사용한 경우의 크로마토그래피 결과를, 도 3은 아르기닌이 포함된 소듐 아세테이트 완충액을 사용한 경우의 크로마토그래피 결과를 보여준다. 양 경우 모두 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파가 용출됨이 확인된다. 즉, 아르기닌이 포함된 pH 완충액을 적용한 경우 2-3 사이의 등전점을 갖는 시알산 함량이 높은 고품질의 다베포에틴 알파가 특히 등전점 2 주변에 집중되어 용출된다(도 2 및 도 3 상 화살표 참조).
- [0036] 반면, 다른 조건은 동일하게 유지하되 세척 완충액 내에 아르기닌을 포함시키지 않은 경우에는 다베포에틴 알파의 분획물로부터 시알산 함량이 낮은 구조적 아형들이 등전점 3 주변 및 등전점 3 이후에서 다량 용출되어, 다베포에틴 알파의 구조적 아형들에 대한 정제 효과가 현저히 떨어졌음을 확인할 수 있었다(도 4).

- [0037] 아르기닌을 포함한 세척 완충액을 이용하여 세척을 진행한 후, 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 용출하는 단계에서 pH 6 내지 8 의 완충액을 이용하여 단계식 염구배(stepwise salt gradient)를 이용하여 용출시킨다.
- [0038] 또 다른 일 실시양태로서, 본 발명은 겔 여과 (gel filtration) 크로마토그래피를 추가로 이용하여 시알산 함량이 높은 구조적 아형만을 선택적으로 분리하는 다베포에틴 알파의 정제 방법을 제공한다. 즉, 상기 수득한 음이온 교환 크로마토그래피 용출액을 겔 여과 크로마토그래피에 적용하여 분획하는 단계를 추가로 포함하는 정제 방법일 수 있다.
- [0039] 겔 여과(gel-filtration) 크로마토그래피란 단백질의 크기(size)에 따라 단백질을 분리하는 방법으로 단백질 중합체의 분리에 사용될 수 있다. 본 발명의 겔 여과(gel-filtration) 크로마토그래피에 사용될 수지로는 수퍼텍스, 수퍼로스, 세파크틸(상품명: GE healthcare) 등이 사용될 수 있으며, 가장 바람직하게는 세파크틸 S-100, S-200, S-300을 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 아르기닌을 포함하는 세척 완충액을 이용한 음이온 크로마토그래피에 의하여 얻어진 용출액에 겔 여과 (gel-filtration) 크로마토그래피를 추가적으로 적용함으로써 더욱 높은 시알산 함량과 99% 이상의 순도를 가지는 다베포에틴 알파를 용출할 수 있다.
- [0041] 먼저 겔 여과 크로마토그래피를 완충액으로 충분히 평형화시킨 후, 평형화된 겔 여과 크로마토그래피에 아르기닌을 포함하는 세척 완충액을 이용한 음이온 크로마토그래피로부터 얻어진 용출액을 로딩시킨 후 분획하여, 목적하는 등전점을 가지는 용출액을 얻을 수 있다. 분획의 순서대로, 즉 먼저 용출되는 분획에서의 시알산 함량이 높은 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 약 1.7 L의 세파크틸 S-100 내지 200(GE Healthcare사) 수지를 XK-50/90컬럼 (GE Healthcare사)에 충전하여 140 mM NaCl이 포함된 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 6.2)을 충분히 흘려 겔 여과 컬럼을 평형화시켰다. 이에 다베포에틴 알파가 포함된 용액을 농축하여 약 60 ml을 7.5 ml/min의 유속으로 컬럼에 흘린 후, 140 mM NaCl이 포함된 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 6.2)을 충분히 흘려 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 포함한 용출액을 분획하였다(도 5). 용출액 분획의 순서대로 다베포에틴 알파의 시알산 함량이 높음을 확인하였다(표 1 및 도 6).
- [0043] 또 다른 양태로서 본 발명에 의한 다베포에틴 알파를 정제하는 방법은 (a) 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계; (b) 단계 (a)에서 생성된 용출액을 하이드록시아파타이트 수지 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계; (c) 단계 (b)에서 생성된 용출액을 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 로딩하여 다베포에틴 알파를 컬럼에 결합시키는 단계; (d) 단계 (c)에서 상기 컬럼을 아르기닌을 포함한 세척 완충액으로 세척하는 단계; 및 (e) 단계 (d)에서 상기 컬럼에 결합이 유지된 다베포에틴 알파를 컬럼으로부터 용출하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 각 단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0045] (a) 단계는 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 음이온 교환 크로마토그래피에 적용하여 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계로서, 바람직하게는 평형화된 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼에 다베포에틴 알파를 포함하는 생물학적 유액을 가하여 흡착시킨 후, 10 내지 100 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 세척 완충액으로 세척한 후, 100 내지 300 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 용출 완충액으로 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 용출하는 단계일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 음이온 교환 크로마토그래피 및 해당 컬럼을 이루는 수지는 상기 설명한 바와 동일하다.
- [0047] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 다베포에틴 알파를 포함하는 벡터로 형질전환된 CHO 세포로부터 다베포에틴 알파를 발현하여 얻은 배양액 약 1 L를 10 mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)으로 한외 여과 시스템(분자량 컷 오프 10,000)을 이용하여 정용여과 (diafiltration)한 생물학적 유액을, 10 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)으로 평형화한 음이온 교환(Q fast flow, GE Healthcare사) 수지가 충전된 XK-50컬럼에 적용한 후, 다시 10mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 약 2 CV (column volume)흘려 컬럼을 평형화하였다. 이후 0 내지 100 mM NaCl이 포함된 세척완충액으로 세척한 후, 100 내지 300 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 용출 완충액으로 용출하였다. 상기 음이온 교환 크로마토그래피 결과, 생물학적 유래의 불순물이 제거되고 다량의 다베포에틴 알

과를 포함하는 용액으로 정제되었음을 RP-HPLC를 통해 확인하였다(도 1의 B).

- [0048] (b) 단계는 평형화된 흡착 크로마토그래피의 고정상 더욱 바람직하게는 하이드록시아파타이트 수지에 (a) 단계로부터 회수된 용출액을 로딩한 후, 0 내지 100 mM 소듐 포스페이트가 포함된 pH 6 내지 8의 세척 완충액으로 세척한 후, 로딩과 세척에서 수지에 붙지 않고 빠져나온 액에서 다베포에틴 알파를 포함하는 분획을 수득하는 단계일 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 이용되는 흡착 크로마토그래피의 고정상은 실리카, 알루미늄, 마그네슘 옥사이드 및 하이드록시아파타이트를 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 하이드록시아파타이트일 수 있다. 본 발명에서 용어 "하이드록시아파타이트 수지 크로마토그래피" 또는 "하이드록시아파타이트 크로마토그래피" 는 하이드록시아파타이트 수지가 충전된 고정상을 가지는 흡착 크로마토그래피를 의미하며, "하이드록시아파타이트 컬럼"과 혼용될 수 있다.
- [0050] 상기 각 세척 및 용출단계에서 사용되는 완충용액으로는 바람직하게 소듐 포스페이트 (sodium phosphate) 완충용액, 칼륨 포스페이트 (potassium phosphate) 완충용액 또는 트리스 (Tris) 완충용액을 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 음이온 교환 수지 용출액을, 7 mM 소듐 포스페이트 완충용액 (pH 7.0)으로 평형화한 하이드록시아파타이트 수지가 충전된 XK-50컬럼에 적용한 후, 7 mM 소듐 포스페이트 완충용액 (pH 7.0)을 약 3 컬럼 용량으로 흘려서, 당쇄가 많이 붙어있는 다베포에틴 알파를 용출하였다. 상기 하이드록시아파타이트 수지 크로마토그래피 결과, 생물학적 유래의 불순물이 제거되고 다량의 다베포에틴 알파를 포함하는 용액으로 정제되었음을 RP-HPLC를 통해 확인하였다(도 1의 C).

발명의 효과

- [0052] 본 발명의 방법은 생산 적용이 편리하고 간편한 신규한 다베포에틴 알파의 정제 방법으로, 본 발명에 의해 다베포에틴 알파의 대량 제조시 고순도의 다베포에틴 알파의 수득은 물론 공정 효율 개선에 따른 비약적인 생산성의 증대가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 음이온 교환-하이드록시아파타이트 수지 크로마토그래피 정제를 통해 얻은 다베포에틴 알파의 용출액에 대하여 C4 HPLC 분석 크로마토그래피로 순도를 측정된 결과이다.
- 도 2은 아르기닌을 포함한 글라이신-HCL 완충액을 적용한 음이온 교환 크로마토그래피의 IEF 결과이다.
- 도 3은 아르기닌을 포함한 소듐-아세테이트 완충액을 적용한 음이온 교환 크로마토그래피의 IEF 결과이다.
- 도 4은 아르기닌 없이 글라이신-HCl 완충액을 포함한 완충액을 적용한 음이온 교환 크로마토그래피의 IEF 결과이다.
- 도 5는 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 얻어진 다베포에틴 알파의 분획물에 대하여 겔 여과 크로마토그래피를 수행한 결과이다.
- 도 6은 도 5의 각 분획별 등전점을 보여주는 IEF 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0055] 실시예 1: 음이온 교환 크로마토그래피 및 하이드록시아파타이트 흡착 크로마토그래피에 의하여 다양한 시알산 함량을 갖는 다베포에틴 알파 아형의 혼합물 수득

- [0056] 다베포에틴 알파를 포함하는 벡터로 형질전환된 CHO 세포로부터 다베포에틴 알파를 발현하여 얻은 배양액 약 1 L를 10 mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)으로 한외 여과 시스템(분자량 컷 오프 10,000)을 이용하여 정용여과

(diafiltration)하였다. 이를 음이온 교환 크로마토그래피 및 하이드록시아파타이트 흡착 크로마토그래피를 이용하여 두 개의 컬럼을 순차적으로 진행하였다.

[0057] 먼저, 음이온 교환 크로마토그래피는 구체적으로 다음과 같이 진행하였다. 약 100 ml의 음이온 교환 (Q fast flow, GE Healthcare사) 수지를 XK-50컬럼 (GE Healthcare사)에 충전하여 10 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다. 준비된 Q 세파로즈 FF 컬럼에 상기 정용여과액 약 0.1-0.2l를 15 ml/min의 유속으로 흘린 후, 다시 10mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 약 2 CV (column volume)흘려 컬럼을 평형화하였다. 이후, 10 내지 100mM NaCl이 포함된 세척완충액으로 세척한 후, 100 내지 300 mM NaCl이 포함된 pH 6 내지 8의 용출 완충액으로 용출하였다.

[0058] 상기 음이온 교환 크로마토그래피를 진행한 용출액에 대하여 하이드록시아파타이트 흡착 크로마토그래피는 구체적으로 다음과 같이 진행하였다. 약 100 ml의 하이드록시아파타이트 (GE Healthcare사)수지를 XK-50컬럼 (GE Healthcare사)에 충전하여 7 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다. 준비된 하이드록시아파타이트 컬럼에 상기 정용여과액 약 0.1 l를 10 ml/min의 유속으로 흘린 후, 다시 7 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 약 3 CV (column volume) 흘렸다.

[0059] 이때 로딩과 세척에서 수지에 붙지 않고 빠져나온 용액에 시알산 함량이 다양한 다베포에틴 알파가 포함되어 있으며, 이 용액들을 모아 다음 공정을 진행한다. 세척 후, 0.1 내지 0.7 M 칼륨 포스페이트 (potassium phosphate) pH 7 의 완충액을 수지에 흘려 당쇄가 적은 다베포에틴 알파 및 불순물을 함유하는 분획을 용출하여 수지에서 제거시켰다. 생물학적 유래의 불순물이 제거되고 다량의 다베포에틴 알파를 포함하는 용액으로 정제되었음을 RP-HPLC를 통해 확인하였다(도 1).

[0060] **실시예 2: 음이온 교환 크로마토그래피에 아르기닌을 적용하여 세척하는 방법으로 높은 시알산 함량의 다베포에틴 알파를 정제**

[0061] 약 20 ml의 Q 세파로즈 FF (GE Healthcare사) 수지를 XK-26컬럼 (GE Healthcare사)에 충전하여 10 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다.

[0062] 상기 실시예 1에서 얻은 다베포에틴 알파가 포함된 용액 약 0.2 l를 5 ml/min의 유속으로 컬럼에 흘린 후, 다시 평형화 완충용액인 10mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 약 2 CV (column volume) 흘려 컬럼을 평형화하였다. 이 후 50 mM NaCl이 포함된 10mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)으로 1차 세척한 후, 우레아, 아르기닌, NaCl이 포함된 pH 3 내지 5 이하의 글라이신-HCl 완충액으로 2차 세척하여 시알산 함량이 낮은 다베포에틴 알파를 함유하는 분획을 세척하였다. 당쇄화 정도가 크고 등전점이 낮은 다베포에틴 알파만을 함유하는 단백질은 190 mM NaCl이 포함된 소듐 포스페이트(pH 6.2) 완충액을 이용하여 용출하였다. 이 세척과정을 통한 높은 품질의 다베포에틴 알파는 IEF를 통해 확인되었다(도 2).

[0063] **실시예 3: 아르기닌 포함 세척액이 시알산 함량에 미치는 영향 측정**

[0064] 상기 실시예 2에서 아르기닌을 적용하는 세척 방법은 높은 시알산 함량의 다베포에틴 알파를 정제하는 데 있어서 중요한 요소가 됨을 하기 실시예로 확인하였다.

[0065] 실시예 2에서와 같은 방법으로 상기 실시예 1에서 얻은 다베포에틴 알파가 포함된 용액을 Q 세파로즈 FF에 흡착시킨 뒤, 다시 평형화 완충용액인 10mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.0)을 약 2 CV (column volume) 흘려 컬럼을 1차 세척하였다. 단 2차 세척시 실시예 2와 달리 글라이신-HCl 완충액 대신 pH 3 내지 5 이하의 소듐 아세테이트 완충액으로 세척하였다. 용출한 결과, 등전점이 2 내지 3 이하의 높은 시알산 함량의 다베포에틴 함량을 수득됨을 확인하였다(도 3의 화살표).

[0066] 또 다른 실시양태로, 실시예 2에서 같은 방법으로 1차 세척 및 2차 세척을 실시하되 단 아르기닌을 투입하지 않고 2차 세척하였다. 용출한 결과, 등전점이 2 내지 3 이상의 낮은 시알산을 포함하는 다베포에틴까지 용출되어 품질이 현저히 저하됨을 확인하였다(도 4의 화살표).

[0067] 이 실시예를 통하여 아르기닌이 낮은 등전점의 시알산 다베포에틴 알파를 얻는 중요한 요소임을 확인할 수 있었다.

[0068] **실시예 4: 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 높은 시알산 함량의 다베포에틴 정제**

[0069] 약 1.7 L의 세파크릴 S-100 내지 200(GE Healthcare사) 수지를 XK-50/90컬럼 (GE Healthcare사)에 충전하여 140 mM NaCl이 포함된 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 6.2)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다.

[0070] 상기 실시예 2에서 얻은 다베포에틴 알파가 포함된 용액을 농축하여 약 5ml을 7.5 ml/min의 유속으로 컬럼에 흘린 후, 140 mM NaCl이 포함된 20 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 6.2)을 충분히 흘려 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 포함한 용출액을 분획하였다(도 5). 용출액 분획의 순서대로 다베포에틴 알파의 시알산 함량이 높음을 확인하였다(표 1 및 도 6). 각 분획별 시알산 함량을 나타낸 Wax-HPLC 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0071]

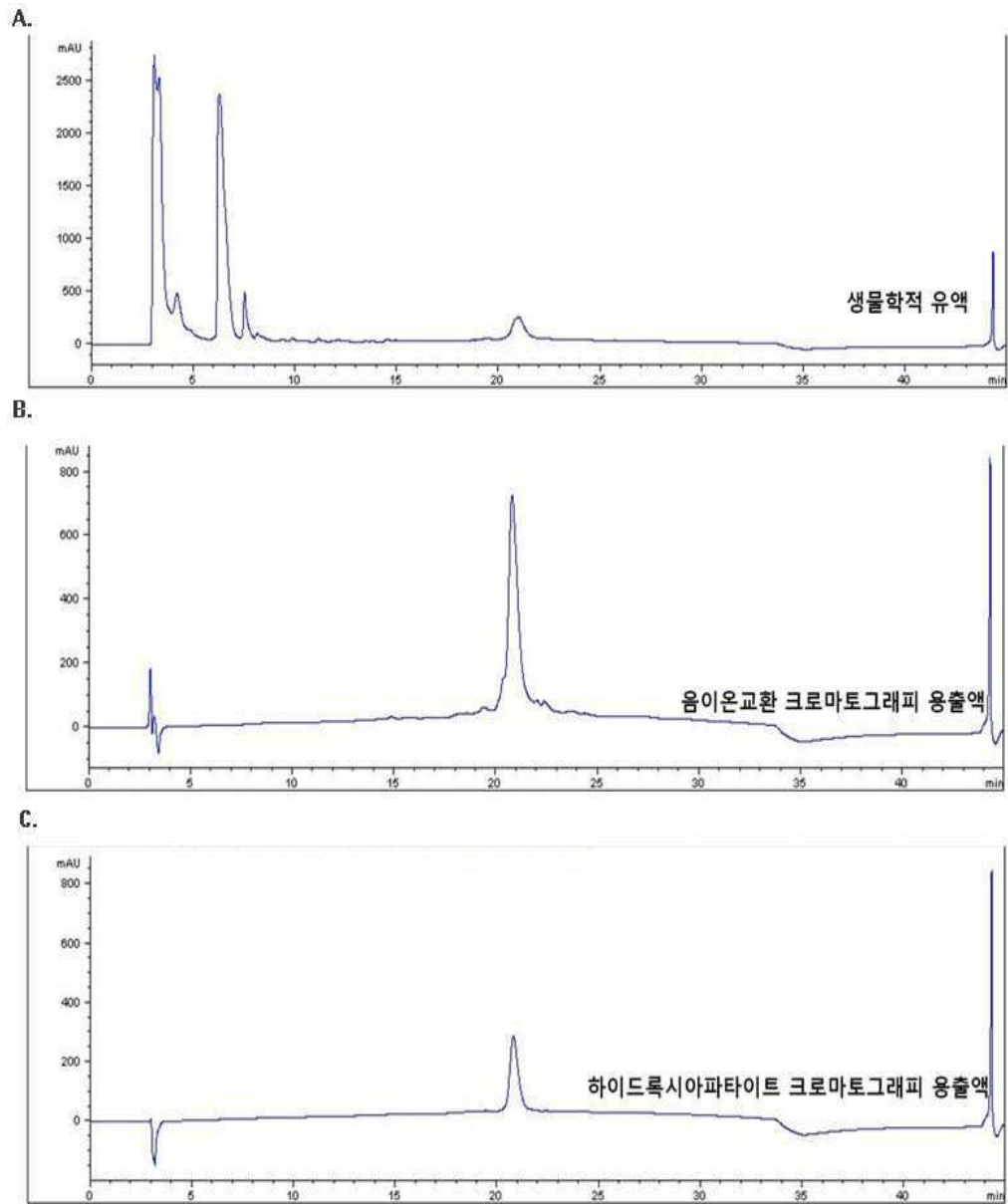
Tetra-sialyated N-Glycan(%)				
분획 1	분획 2	분획 3	분획 4	분획 5
53.6	71.1	70.7	64.9	46.7

[0072] 상기 결과들을 종합하면, 음이온 교환 컬럼을 이용한 경우에 있어서, 아르기닌을 포함하는 완충액을 이용하여 세척과정을 하는 것을 통하여 시알산 함량이 높은 다베포에틴 알파를 정제할 수 있음을 확인하였으며, 또한, 이후 겔 여과 크로마토그래피를 추가로 수행하여 분획한 결과 고순도의 높은 시알산 함량을 가지는 다베포에틴 알파를 정제할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 정제 방법을 이용하여 고순도의 높은 시알산 함량을 가지는 다베포에틴 알파를 정제할 수 있음을 확인하였다.

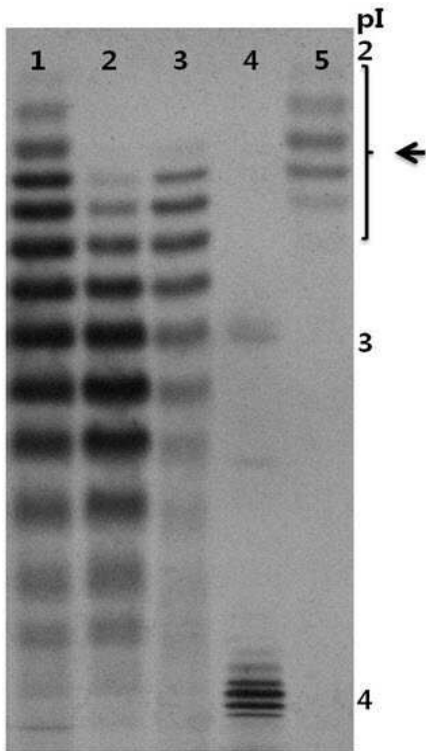
[0073] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

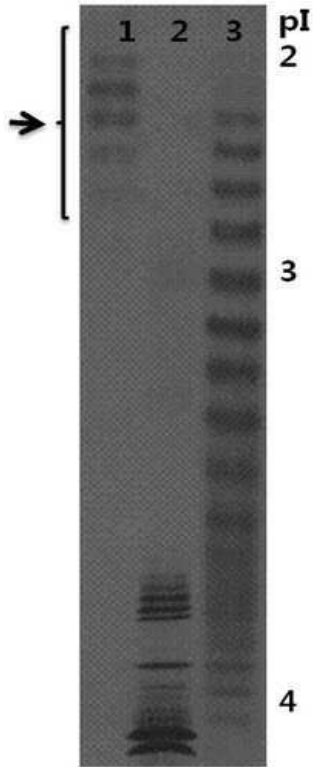


도면2



1. 음이온 교환 크로마토그래피 로딩액
2. 음이온 교환 크로마토그래피 1차 세척액
3. 음이온 교환 크로마토그래피 2차 세척액
(L-arginine이 포함된 Gly/HCl 완충용액)
4. marker
5. 음이온 교환 크로마토그래피 용출액

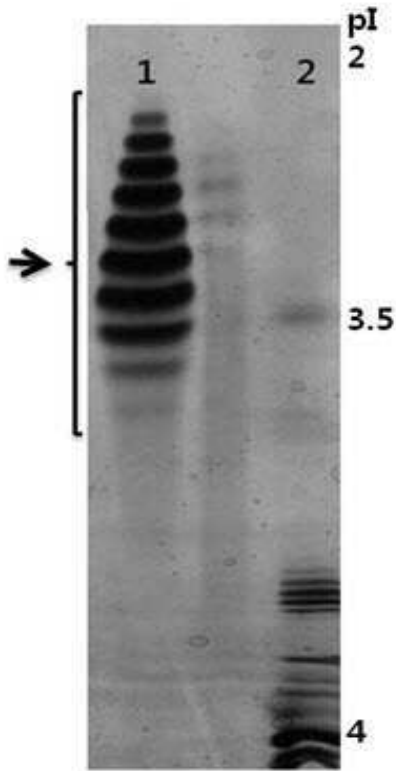
도면3



소듐 아세테이트 완충용액에 L-arginine 이 포함된 세척 용액 사용

1. 음이온 교환 크로마토그래피 용출액
2. marker
3. 음이온 교환 크로마토그래피 로딩액

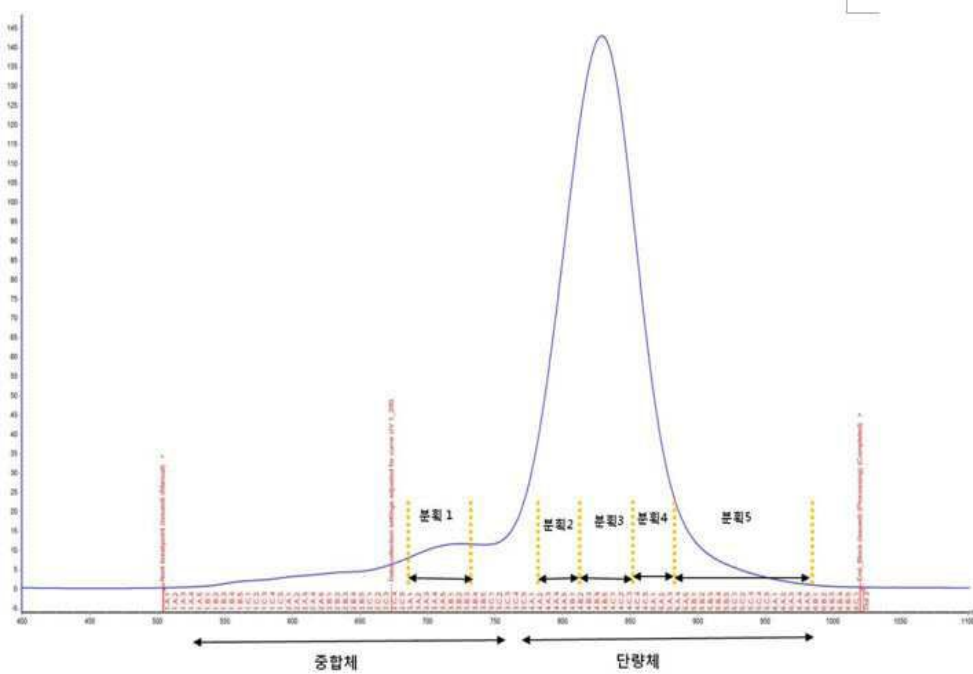
도면4



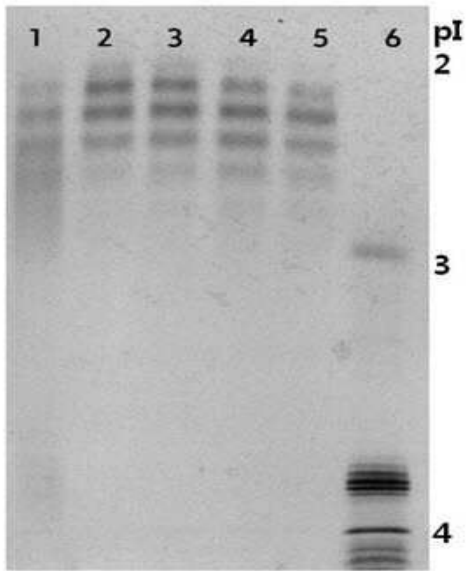
아르기닌이 포함되지 않은 글라이신-HCl 완충액으로 세척 용액 사용

1. 음이온 교환 수지 크로마토그래피 용출액
2. Marker

도면5



도면6



- 1. 분획 1
- 2. 분획 2
- 3. 분획 3
- 4. 분획 4
- 5. 분획 5
- 6. MARKER