



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월11일
(11) 등록번호 10-1877352
(24) 등록일자 2018년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/14 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0080176
(22) 출원일자 2013년07월09일
심사청구일자 2016년08월12일
(65) 공개번호 10-2014-0013925
(43) 공개일자 2014년02월05일
(30) 우선권주장
61/675,560 2012년07월25일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02002068455 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
그리폴스, 에스.에이.
스페인 바르셀로나 헤수스 이 마리아 6 08022
(72) 발명자
오운비 데이비드
미국 노스 캐롤라이나 27527 클레이턴 디어 트레일 2036
짐머만 토마스 피
미국 캐롤라이나 27612 롤리 브래스 미도우 6209
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **세포 배양물 유래 알파1 프로테아제 억제제의 정제**

(57) 요약

재조합 세포 배양물 유래 알파₁-프로테아제 억제제(recombinant cell culture derived alpha1-protease inhibitor, recA1PI)를 정제하고 recA1PI 단백질과 공동 정제되는 착색 물질(colored species)을 제거하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 또한, 세포 배양물 유래 알파₁-프로테아제 억제제 중 철을 감소시키는 방법이 기재된다.

대표도 - 도1

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA EDPQGDAAQKTDTSHHQDQDHPFNKITPNLAEFAFSLYR
QLAHQSNSTNIFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTL
NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQG
KIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEDDFHVDQVTVKVPMMKRLGMFNIQH
CKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDII TKFLENEDRRSASLHLPKLSITG
TYDLKSVLGLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKAVLTI DEKGTEAAGAMFLEAIPMS
IPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

- 1-24 신호 펩티드
- E25-K418 성숙 펩티드
- N70 글리코실화
- N107 글리코실화
- N271 글리코실화
- C256 S-니트로실화
- G368-K392 반응 중심 루프
- F376 단백질분해 절단 부위
- M382-S383 반응성 결합

(72) 발명자

헌트 제니퍼 에이.

미국 노쓰 캐롤라이나 27615 롤리 화이트스톤 로드
10405

밀러 찰스

미국 노쓰 캐롤라이나 27539 에이펙스 브리아후르
스트 웨이 4124

랑가나단 셴틸

미국 노쓰 캐롤라이나 27513 캐리 텔리아 포인트
406

데소울세스 토니

미국 노쓰 캐롤라이나 27614 롤리 크립스 드라이브
10521

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 세포 배양물로부터 세포 배양물 유래 알파₁ 프로테아제 억제제(recA1PI)와 공동 정제(co-purify)되는 착색 물질(colorant)을 recA1PI와 분리하는 방법:

(a) 샘플을 환원제로 배양하는 것에 의해 recA1PI, 착색 물질 및 환원제의 혼합물을 얻는 단계로서, 이때 상기 샘플은 recA1PI 및 착색 물질을 포함하고, 상기 환원제는 시스테인 및 디티오프레이톨로 구성된 군으로부터 선택되는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 혼합물에서 착색 물질 및 환원제로부터 recA1PI를 제거하는 것에 의해 recA1PI와 착색 물질을 분리하는 단계.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 환원제가 상기 단계 (a)의 혼합물 중에 10mM의 농도로 존재하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 배양을 1 내지 24시간동안 수행하는 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 배양을 2°C 내지 60°C의 온도에서 수행하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 환원제가 상기 단계 (a)의 혼합물 중 10mM 농도의 시스테인이고, 상기 배양을 실온에서 하룻밤동안 수행하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제거를 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 크로마토그래피에 의해 수행하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 단계 (a)의 혼합물이 샘플의 철 농도보다 더 낮은 철 농도를 갖는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 단계 (a)의 혼합물의 철 농도가 샘플의 철 농도보다 2배 내지 100배 더 낮은 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 단계 (a)의 혼합물의 철 농도가 샘플의 철 농도보다 5배 내지 50배 더 낮은 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 단계 (a)의 혼합물의 철 농도가 10 μM 이하인 방법.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 상기 단계 (a)의 혼합물의 철 농도가 1 μM 이하인 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 인간 재조합 세포 배양물 유래 알파1-프로테아제 억제제(recombinant cell culture derived alpha1-protease inhibitor, recA1PI)를 정제하고 recA1PI 단백질과 공동 정제(co-purify)되는 착색 물질(colored species)을 제거하는 방법이 본 명세서에 기재된다.

배경 기술

[0002] 알파₁-프로테아제 억제제(본 명세서에서 A1PI로 약칭됨; 특히, 알파-1 프로테아제 억제제, 알파-1 PI, A₁PI, α-1 PI, α₁PI, 알파-1 트립신 억제제, 알파₁ 안티트립신, 알파-1 안티트립신, 알파1AT, A1A, 및 A1AT, AAT로도 알려져 있음)는, 인간에서 주요한 세린 프로테아제 억제제(serine protease inhibitor, serpin)이다. A1PI는 신호 펩타이드인 1 내지 24번째 잔기(residue)를 갖는, 418개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 발현된다. 25 내지 418번째 잔기로 구성된 성숙한 단백질은 약 51 kD의 분자량을 갖는 단일 사슬 당단백질이다. 도 1을 참조한다. A1PI는 이황화 결합을 포함하지 않지만, 이 단백질은 고도로 구조화되어 있어, 80%의 아미노산이 8개의 잘 정의된(well-defined) 알파-나선 및 세 개의 거대한 베타-시트에 존재한다. 세 개의 아스파라긴-결합 탄수화물은 Asn 70, Asn 107, 및 Asn 271 (전장 단백질 기준으로 번호를 매긴 것)에서 발견된다. 이는 4.0 내지 5.0의 등전점을 갖는, 다수의 A1PI 동종체(A1PI isoform)를 생성한다. 글리칸 단당류는 N-아세틸글루코사민, 만노

스, 갈락토스, 푸코스, 및 시알산을 포함한다.

[0003] A1PI의 정상 혈장 농도는 1.3 내지 3.5 mg/mL 범위이다. A1PI는 응고 및 염증에 관여하는 프로테아제로부터 세포를 보호하는 것에 의해 기능한다. 그 중에서도, A1PI는 트립신, 키모트립신, 여러 형태의 엘라스타제, 피부 콜라게나제, 레닌(renin), 유로키나제, 및 다형핵 림프구의 프로테아제를 억제한다. A1PI는 Met 358-Ser 359 잔기 간 결합을 절단함으로써 A1PI 분자의 반응 중심 루프(reactive center loop)(Gly 368 내지 Lys 392 잔기)를 공격하여 A1PI-프로테아제 복합체를 형성하는, 이들 프로테아제에 대한 유사-기질로 작용한다. 이 복합체는 혈액 순환으로부터 신속하게 제거된다. A1PI의 고유 역할 중 하나는 외래 단백질을 분해하고 폐에 존재하는 원형 조직(native tissue)에 손상을 주는 호중구 엘라스타제의 활성을 조절하는 것이다. 충분한 양의 A1PI가 결여된 경우, 엘라스타제는 폐 조직을 분해하여, 시간이 지나면 만성 폐 조직 손상 및 폐기종을 야기한다.

[0004] A1PI는 종종 혈장으로부터 정제된다. 예를 들면, 미국 특허 제6,284,874호; 제6,462,180호; 제6,093,804호; 제7,879,800호; 및 WO 1998/000154; WO 2002/048176; WO 2010/009388을 참조한다. 또한, 재조합 A1PI(recA1PI)는 여러 공급원으로부터 발현되고 정제될 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제4,931,373호 및 제5,134,119호; 미국 특허출원 공개 US 2004/0124143 및 US 2007/0218535; PCT 공보 WO 2005/047323 및 WO 2010/127939; 및 Archibald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5178-5182 (1990); Wright et al., *Nat. Biotechnology* 9: 830 (1991)을 참조한다.

[0005] 치료적 사용을 위해 인간 재조합, 세포 배양물 유래 A1PI를 발현하고 정제하는 방법이 본 명세서에 기술된다. 정제 후, A1PI 용액은 의사 및/또는 환자에게 불쾌할 수 있는 황색 또는 호박색을 갖는다. 이 착색을 감소시키는 방법도 본 명세서에 기술된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 명세서에 기술된 일 구체예는 세포 배양물 유래 알파₁ 프로테아제 억제제(recA1PI)를 포함하는 용액을 환원제와 인큐베이션시키는 단계 및 착색 물질(colorant)로부터 상기 reA1PI를 분리하는 단계를 포함하는, recA1PI를 포함하는 용액 중 착색 물질의 양을 감소시키는 방법이다.

[0008] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인 또는 DTT이다.

[0009] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인이다.

[0010] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM 내지 약 100 mM이다.

[0011] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 10 mM이다.

[0012] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM이다.

[0013] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제와 인큐베이션시키는 단계(reducing incubation step)는 약 1 내지 약 24 시간 동안 수행된다.

[0014] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제와 인큐베이션시키는 단계는 약 2°C 내지 약 60°C의 온도에서 수행된다.

[0015] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 10 mM 시스테인이고 상기 인큐베이션은 약 실온에서 밤새도록 수행된다.

[0016] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 착색 물질로부터 recA1PI를 분리하는 단계는 크로마토그래피를 포함한다.

[0017] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을

포함한다.

- [0018] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 방법은 철 농도를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0019] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 2 내지 100배 감소된다(즉, 낮아진다).
- [0020] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 5 내지 50배 감소된다(즉, 낮아진다).
- [0021] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 10 μM 이하이다.
- [0022] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 1 μM 이하이다.
- [0023] 본 명세서에 기술된 다른 구체예는 (a) recA1PI를 함유하는 용액에 대해 바이러스 불활성화 단계를 수행하는 단계; (b) 바이러스를 불활성화시킨 용액을 음이온 교환체를 통해 통과시켜 recA1PI를 음이온 교환체에 결합시키는 단계; (c) 음이온 교환 수지로부터 recA1PI를 용출시켜 recA1PI를 함유하는 음이온 교환 용출액을 획득하는 단계; (d) 상기 recA1PI를 함유하는 음이온 교환 용출액에 환원제를 첨가하여 환원액을 획득하는 단계; (e) 상기 환원액을 인큐베이션시키는 단계; (f) 상기 환원액을 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 수지를 통해 통과시켜 recA1PI를 HIC 수지에 결합시키는 단계; 및 (g) 상기 HIC 수지로부터 recA1PI를 용출시켜 recA1PI를 함유하는 HIC 용출액을 획득하는 단계를 포함하는, recA1PI를 포함하는 수용액으로부터 세포 배양물 유래 인간 A1PI를 정제하는 방법이다.
- [0024] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 바이러스 불활성화는 용매/세제(detergent) 인큐베이션을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 용매는 0.01% 내지 약 0.5%로 첨가된다.
- [0026] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 세제는 생성된 혼합물(resulting mixture)의 부피 당 중량으로 약 0.5% 내지 약 2.0%로 첨가된다.
- [0027] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 용매/세제 인큐베이션은 약 0.5% 폴리소르베이트 20 및 약 0.03% 트리(n-부틸 포스페이트)를 약 pH 8 및 약 30°C의 온도에서 첨가하는 것을 포함한다.
- [0028] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 음이온 교환체는 4차 암모늄 수지이다.
- [0029] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 4차 암모늄 수지는 Capto™ Q이다.
- [0030] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인 (Cys); 시스테인아민; 디티오프라이톨 (DTT); 디티오 에리트ريت올 (DTE); 글루타치온 (GSH); 2-메르캅토에탄올 (2-ME); 2-메르캅토에틸아민 (2-MEA); 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP); 옥살산; 포름산; 아스코르브산; 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 (NADH); 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADPH); 또는 이들의 조합이다.
- [0031] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인 또는 DTT이다.
- [0032] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인이다.
- [0033] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM 내지 100 mM이다.
- [0034] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 10 mM이다.
- [0035] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM이다.
- [0036] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원액을 인큐베이션시키는 단계는 약 1 내지 24 시간 동안 수행된다.
- [0037] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원액을 인큐베이션시키는 단계는 약 2°C 내지 60°C의 온도에서 수행된다.
- [0038] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 10 mM 시스테인이고 상기 인큐베이션은 약 실온에서 밤새도록 수행된다.
- [0039] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 HIC 수지는 Octyl Sepharose™ 또는 Capto™ Octyl이다.
- [0040] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 방법은 철 농도를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0041] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 2 내지 100배 감소된다(즉, 낮아진다).

- [0042] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 5 내지 50배 감소된다(즉, 낮아진다).
- [0043] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 10 μM 이하이다.
- [0044] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 1 μM 이하이다.
- [0045] 본 명세서에 기술된 다른 구체예는 세포 배양물 유래 알파₁-프로테아제 억제제(recA1PI)를 포함하는 용액을 환원제와 인큐베이션시키는 단계 및 환원제 및 환원된 물질(reduced species)로부터 상기 reA1PI를 분리하는 단계를 포함하는, recA1PI를 정제하는 방법이다.
- [0046] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인 또는 DTT이다.
- [0047] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 시스테인이다.
- [0048] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM 내지 약 100 mM이다.
- [0049] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 10 mM이다.
- [0050] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제의 농도는 약 1 mM이다.
- [0051] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제와 인큐베이션시키는 단계는 약 1 내지 약 24 시간 동안 수행된다.
- [0052] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제와 인큐베이션시키는 단계는 약 2°C 내지 약 60°C의 온도에서 수행된다.
- [0053] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제는 약 10 mM 시스테인이고 상기 인큐베이션은 약 실온에서 밤새도록 수행된다.
- [0054] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원제 및 환원된 물질로부터 recA1PI를 분리하는 단계는 크로마토그래피를 포함한다.
- [0055] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0056] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 환원된 물질은 철을 포함한다.
- [0057] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 2 내지 100배 감소된다(즉, 낮아진다).
- [0058] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 5 내지 50배 감소된다(즉, 낮아진다).
- [0059] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 10 μM 이하이다.
- [0060] 본 명세서에 기술된 일부 양상에서, 상기 철 농도는 1 μM 이하이다.
- [0061] **상세한 설명**
- [0062] 본 명세서에 기술된 것은 재조합, 세포 배양물 유래 알파₁-프로테아제 억제제를 정제하고 recA1PI 단백질과 공동 정제되는 착색 물질을 제거하기 위한 방법이다.
- [0063] 본 명세서에 기술된 일 양상은 recA1PI를 함유하는 수용액으로부터, 재조합, 세포 배양물 유래 인간 A1PI를 정제하는 방법이다.
- [0064] 본 명세서에 기술된 다른 방법은 recA1PI 용액을 환원제와 인큐베이션시키는 단계 및 환원제와 착색 물질로부터 상기 reA1PI를 분리하는 단계를 포함하는, 재조합, 세포 배양물 유래 A1PI 용액의 착색을 감소시키는 방법이다.
- [0065] 본 명세서에 기술된 다른 방법은 recA1PI 용액을 환원제와 인큐베이션시키는 단계 및 환원제와 환원된 물질로부터 상기 reA1PI를 분리하는 단계를 포함하는, 재조합, 세포 배양물 유래 A1PI를 정제하는 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0066]

도 1은 인간 A1PI의 1차 서열 및 중요한 변형 부위를 나타낸다.

도 2는 황색을 갖는 정제된 recA1PI 용액을 얻게 되는, recA1PI를 정제하는데 이용되는 정제 방법의 흐름도를 나타낸다.

도 3은 면역친화성 크로마토그래피(즉, ATT 셀렉트 수지, GE Healthcare Life Sciences)에 의해 정제된 recA1PI 시료의 크로마토그램을 나타낸다.

도 4는 면역친화성 크로마토그래피(즉, ATT 셀렉트 수지, GE Healthcare Life Sciences)에 의해 정제된 recA1PI 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 Superdex™ 200 prep 등급 수지 (GE Healthcare Life Sciences)를 이용한 겔 여과(즉, 크기 배제(size exclusion)) 크로마토그래피에 의해 정제된 recA1PI 시료의 크로마토그램을 나타낸다.

도 6은 Superdex™ 200 prep 등급 수지 (GE Healthcare Life Sciences)를 이용한 겔 여과(즉, 크기 배제) 크로마토그래피에 의해 정제된 recA1PI 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다.

도 7은 3개의 황색을 갖는, 인간 재조합, 세포 배양물 유래 A1PI 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다. 시료 1은 4 M 구아니딘 염산염(Gdn·HCl)을 포함한다; 시료 2는 50 mM 디티오프레이톨 (DTT)을 포함한다; 시료 3은 4 M Gdn·HCl 및 50 mM DTT를 모두 포함한다.

도 8은 50 mM DTT에 의한 처리 후 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제된 recA1PI의 크로마토그램을 나타낸다.

도 9는 DTT 처리 없이 겔 여과 크로마토그래피에 의해 정제된 recA1PI의 크로마토그램을 나타낸다.

도 10은 recA1PI, 50 mM DTT로 처리된 recA1PI, 및 고도로 정제된, 혈장 유래 A1PI 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다.

도 11은 recA1PI, 50 mM DTT로 처리된 recA1PI, 및 10 mM DTT로 처리된 A1PI 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다.

도 12는 PBS 중 50 mM DTT로 실행된 겔 여과 크로마토그래피로부터 얻은 크로마토그램을 나타낸다.

도 13은 PBS 중 50 mM DTT로 처리된 recA1PI로 실행된 겔 여과 크로마토그래피로부터 얻은 크로마토그램을 나타낸다.

도 14는 10 mM DTT로 처리된 정제된 혈장 유래 A1PI로 실행된 겔 여과 크로마토그래피로부터 얻은 크로마토그램을 나타낸다.

도 15는 10 mM 시스테인으로 처리된 recA1PI의 겔 여과 크로마토그래피 컬럼으로부터 얻은 크로마토그램을 나타낸다.

도 16은 시스테인 인큐베이션 단계를 포함하는 수정된 recA1PI 정제 과정의 흐름도를 나타낸다. 이 방법에서 시스테인 인큐베이션은, 소수성 상호작용 크로마토그래피 후 또는 양이온 교환 막 통과 후(붉은 화살표)와 같은 기타 단계에서 수행될 수 있다는 점을 유의한다.

도 17은 시스테인으로 처리되지 않은 recA1PI에 의한 Octyl Sepharose™ 상 소수성 상호작용 크로마토그래피의 크로마토그램을 나타낸다.

도 18은 10 mM 시스테인에 의한 처리 후 recA1PI에 의한, Octyl Sepharose™ 상 소수성 상호작용 크로마토그래피의 크로마토그램을 나타낸다.

도 19는 recA1PI, 10 mM 시스테인으로 처리된 recA1PI, 또는 고도로 정제된 혈장-유래 A1PI의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067]

실시예 1

[0068]

세포 성장 및 인간 재조합 A1PI의 발현

[0069]

요약

[0070] 글리코실화된 인간 recA1PI를 발현시키기 위한 pAATopST3 플라스미드 구조체를 함유하는 인간 PER.C6[®] 세포 (Cruce11, Leiden, Netherlands)를 배양함으로써 재조합 인간 A1PI의 발현을 시작한다. 이들 세포는 높은 수준의 글리코실화된 recA1PI, 즉, 1일 세포 당(per cell per day, pcd) recA1PI를 22 pg까지 생성할 수 있다. PER.C6[®]/recA1PI 배양물은 10 L 웨이브 바이오리액터 및 목표 실사용 부피(target working volume) 150 L를 갖는 200 L 바이오리액터를 통한 일련의 규모-확장(scale-up) 단계를 통해 얻었다. recA1PI를 함유하는 배양 상층액을 13 내지 14일 후 Celeros Centrifuge(Celeros Separations, Foxboro, MA)에서 6,000 rpm의 원심분리 및 뒤이은 정제 전 여과에 의해 회수(harvest)하였다.

[0071] **바이알 해동 및 진탕 플라스크 이노쿨럼 트레인(inoculum train)**

[0072] 글리코실화된 인간 recA1PI를 발현시키기 위한 pAATopST3 플라스미드 구조체를 함유하는 PER.C6[®] (Cruce11) 인간 세포의 동결용 바이알(cryovial) 해동에 의해 세포 배양 과정을 시작하였다. 인간 재조합 알파₁ 프로테아제 억제제 클론, 발현, 및 발현된 재조합 A1PI의 분석에 대한 설명은, 그와 같은 개시에 대해 본 명세서에 참조로서 통합되는 WO 2010/127939 및 미국 특허 출원 제13/138,912호에 기술되어 있다. 세포의 바이알을 해동시킨 후, 세포를 125 mL의 넓적-바닥(flat-bottom) 진탕 플라스크로 옮기고 표적 생균 밀도(target viable cell density) $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 위해 CDM4PERMAb[™] 기본 배지(Hyclone)의 최종 부피를 15 내지 25 mL로 만들었다. 125 mL 진탕 플라스크(계대(passage) #1)를 96 ± 4 시간 동안 90 rpm, 36.5°C, 5.0% CO₂에서 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 표적 부피(target volume) 100 mL 및 생균 밀도 $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 갖는 250 mL의 넓적-바닥 진탕 플라스크로 옮겼다. 250 mL의 넓적-바닥 진탕 플라스크(계대 #2)를 72 내지 96시간(± 4 시간) 동안 125 rpm, 36.5°C, 5.0% CO₂에서 인큐베이션 하였다. 그 후 세포를 표적 부피 250 mL 및 생균 밀도 $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 갖는 500 mL의 넓적-바닥 진탕 플라스크로 옮겼다. 500 mL의 넓적-바닥 진탕 플라스크(계대 #3)를 72 내지 96시간(± 4 시간) 동안 125 rpm, 36.5°C, 5.0% CO₂에서 인큐베이션 하였다. 그 후 세포를 표적 부피 600 mL 및 생균 밀도 $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 갖는 1 L의 넓적-바닥 진탕 플라스크로 옮겼다. 1 L의 넓적-바닥 진탕 플라스크(계대 #4)를 72 내지 96시간(± 4 시간) 동안 125 rpm, 36.5°C, 5.0% CO₂에서 인큐베이션 하였다.

[0073] **웨이브 바이오리액터 이노쿨럼 트레인**

[0074] 1 L 진탕 플라스크로부터 내용물(volume)을 20/50EH Wave[™] 바이오리액터 상의 10 L Cellbag[®] (GE Healthcare Life Sciences)으로 옮겨, 실사용 부피 3.0 내지 4.0 L 및 생균 밀도 $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 달성 하였다. 10 L Cellbag[®]을 25 rpm, 7° -흔들림 각(rocking angle), 분당 0.2 리터(lpm)의 기류 속도, 36.5°C, 및 3.0% CO₂에서 72 내지 96시간(± 4 시간) 동안 작동시켰다. 10 L Cellbag[®]으로부터 내용물을 20/50EH Wave[™] 바이오리액터 상의 50 L Cellbag[®]으로 옮겨, 실사용 부피 22 내지 25 L 및 생균 밀도 $0.5 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 세포/mL를 달성하였다. 50 L Cellbag[®]을 22 rpm, 7° -흔들림 각, 0.3 lpm의 기류 속도, 36.5°C, 및 3.0% CO₂에서 72 내지 96시간(± 4 시간) 동안 작동시켰다.

[0075] **200 L 바이오리액터**

[0076] 50 L Cellbag[®]의 내용물(contents)을 멸균 Kleenpak[™] 관(connection)을 통해 Xcellerex 200 L 바이오리액터로 옮겼다(Xcellerex, Marlborough, MA). 200 L 바이오리액터는 최소량(100 L)의 CDM4PERMAb[™] 기본 배지(Hyclone)를 담고 접종물 첨가 전에 36.5°C, 120 rpm, pH 7.2 \pm 0.4에서 작동되어야 한다. 목표 실사용 부피는 0.6×10^6 세포/mL \pm 0.1×10^6 세포/mL의 생균 밀도에서 150 L이었다. pH 불감대(dead band) (아무 작용도 일어나지 않는 신호 면적의 범위)는 7.2 \pm 0.4이고 용존 산소의 설정값은 50%이었다. 1 N 탄산나트륨 또는

CO₂ 기체를 첨가함으로써 pH를 유지하였다. 96시간(±4 시간) 차에, PerMAB™ 공급 배지(feed media)(Hyclone)를 매일 바이오리액터 초기 실사용 부피의 0.3%와 동일한 1회분 샷(bolus shot)으로 첨가하였다; 공급 배지를 100 내지 300 mL/분의 유속으로 첨가하였다. 실행되는 동안 공급 배지를 실온으로 유지하고 빛에 의한 분해를 막기 위해 덮어두었다. 실행 개시시 소포체를 12 ppm으로 첨가하고 소량씩 첨가하여 바이오리액터에서 2인치 이하의 거품 수준(foam level)을 유지하였다. 200 L 바이오리액터를 308 내지 340 시간(12.8 내지 14.2일)차에 회수하였다.

[0077] **원심분리 및 여과**

[0078] 200 L 바이오리액터로부터 얻은 물질을 Celeros APD-75 1 L 보울(bowl)에 0.5 lpm의 유속으로 6,000 rpm 속도의 원심분리에 의해 옮겼다(Celeros Separations, Foxboro, MA). 옮기기 전에 고체의 퍼센트 값(percent solids value)을 계산하여 필요한 보울 토출(bowl discharge)의 개수를 결정하였다(1 L 보울은 1 kg의 고체를 보유할 수 있음). 센트레이트(centrate)(원심분리 후 정화된 용액)를 2장의 1.1 m² A1HC 필터를 포함하는 Millipore Pilot POD 홀더(holder)에 1 lpm으로 옮겼다(EMD Millipore, Billerica, MA). 침출 여과 후, 0.5/0.2 μm Millipore SHC 필터를 통해 물질을 여과하였다.

[0079] **실시예 2**

[0080] **세포 배양 상층액으로부터 인간 재조합 A1PI의 정제**

[0081] **요약**

[0082] 바이러스 불활성화를 위한 3 시간 용매/세제 처리에 의해 recA1PI의 정제를 시작한다. 그 후 recA1PI를 포획하고 Capto™ Q 컬럼(GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ)으로부터 용출하였다. 다음날, Octyl Sepharose™ 컬럼 상에서 정제를 계속하였다. HIC 용출액을 한외여과(ultrafilter)하고 정용여과(diafilter)하여 S-멤브레인 정제를 실시하고 그 후 추가적인 바이러스 제거를 위해 나노여과를 실시하였다. 이 물질의 완충 용액을 최종 제제 완충용액으로 교체하고 단백질 농도를 조정하여 제제화된 벌크(formulated bulk)를 제조하였다.

[0083] **세포 배양 상층액의 바이러스 불활성화**

[0084] 침출-여과된 세포 배양 상층액의 무게를 측정하고, A₂₈₀을 판독하고, 샘플링을 위해 분취하였다. 이 바이러스 불활성화 단계를 위한 온도 및 pH 설정값은 28°C ± 2°C 및 pH 7.8 ± 0.2이었다. 1 L의 혼합물을 제조하기 위해 폴리소르베이트 20 0.5 kg, 트리-(n-부틸)포스페이트(TNBP) 0.06 kg, 및 주사용수(water for injection, WFI)를 혼합함으로써 제조된 TNBP/폴리소르베이트 20의 100-X 표준용액(stock)을 처리에 이용하였다. 이 표준용액을 세포 배양 상층액에 100-배 희석하여 첨가하고 처리를 2.5시간 동안 교반하며 수행하였다. 최종 농도는 폴리소르베이트 20에 대해 0.5% 및 TNBP에 대해 0.03%였다. TNBP/폴리소르베이트 20 처리 후, 세포 배양 상층액을 여과하였다.

[0085] **여과**

[0086] Cuno 120ZA 필터 디스크(3M, St. Paul, MN)를 고온 주사용수(HWFI)로 1 L/분 이하로 10분 이상 세척하였다. 그 후 2 L 이상의 냉주사용수(CWFI)로 세척하고 최종적으로 20 psi에서 자연 건조시켰다. TNBP/폴리소르베이트 20-처리된 세포 배양 상층액을 20 psi 이상의 기압 및 1 L/분 이하의 기류를 이용하여 이 필터를 통해 통과시켰다. 샘플링 및 보관을 위해 분취를 채취하였다.

[0087] **음이온 교환 크로마토그래피**

[0088] 이 단계는 통과액(flow-through)에서 recA1PI를 포획하고 숙주 세포 단백질(host cell protein, HCP)을 제거하기 위해 제공된다. 30 cm 내경 × 14 cm 베드 높이(bed height) 컬럼을 이용하였다(10 L 베드 부피). TNBP/폴

리소르베이트 20-처리된 세포 배양 상층액의 pH를 7.0 ± 0.1 로 다시 조정하였다. 컬럼에 로딩하기 전 용매/세제-처리된 상층액의 전도도를 측정하였다. 주변(ambient)온도 WFI 희석제의 양을 전도도가 인라인 희석(inline dilution)이 있는 컬럼 로딩 동안 4 mS/cm보다 높지 않도록 결정하였다.

[0089] Unicorn 프로그램(GE Healthcare Life Sciences)을 이용하여 Capto™ Q 컬럼(GE Healthcare Life Science)을 실행하고 크로마토그래피 시스템의 유입 라인을 적절한 완충용액 탱크 내에 두었다. Durapore 0.3 μ m 인-라인 필터(Millipore)를 매 크로마토그래피 실행시 교체하였다. Capto™ Q 컬럼을 0.5 M 빙초산 1 컬럼 부피(CV)로 미리 평형화(pre-equilibrated)한 후 20 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0의 5 CV로 평형화하였다. 주사용수(WFI)에 의한 인-라인 희석으로 세포 배양 상층액을 Capto™ Q 컬럼에 로딩하였다. 크로마토그래피 스킴(skid)를 300 cm/h의 선형 유속에서 4 mS/cm 이하의 전도율로 로딩을 수행하도록 프로그래밍하였다. 로딩 후 WFI로 짧은 추적(brief chase)을 수행하였다. 컬럼을 20 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0으로 2 CV 재-평형화하기 전에, 8 CV의 세척 완충용액(20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaCl pH 6.0)으로 세척하였다. 25 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, pH 7.0로 종료되는 8 CV 구배 (gradient)를 이용하거나 NaCl 농도의 단계적 증가에 의해 용출을 달성하였다. recAPI의 단일 용출 피크를 4 CV의 개시에서 구배로 수집하였고 0.10 AU의 UV-주시 게이트(watch gate)에 의해 수집을 종료한다. 용출 분획을 시험하기 위해 샘플링하고 보관하였다. L-시스테인을 10 mM의 농도로 용출액 풀에 첨가하고 실온에서 밤새도록 혼합하였다.

[0090] **Octyl Sepharose™ FF를 이용한 소수성 상호작용 크로마토그래피**

[0091] 45 cm 내경 \times 9 cm 베드 높이 컬럼(15 L 베드 부피)인 Octyl Sepharose™ 4 FF 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 HIC 평형화 완충용액(25 mM Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl, 1.75 M 암모늄 설페이트, pH 7.0) 8 CV로 평형화하였다. API 및 시스테인을 함유한 Capto Q 용출액을 옥틸 희석 완충용액 (25 mM Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl, 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0)으로 인라인 희석에 의해 150 cm/h의 유속으로 로딩하여, 로딩 물질 중 1.75 M의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 최종 농도를 달성하였다. 로딩 후, 컬럼을 5 CV의 HIC 평형화 완충용액으로 세척하였다. 세척 완충용액 중 1.75 M의 암모늄 설페이트로부터 용출 완충용액(20 mM Na_2HPO_4 , pH 6.0)으로 10 CV에 걸친 역상 염도 구배(reverse salt gradient)로 용출을 수행하였다. 앞쪽 0.05 AU 및 뒷쪽 0.10 AU의 UV 흡광도 주시(watch) 명령을 이용하여 용출액 풀을 수집하였다.

[0092] **HIC 용출액의 한외여과 및 정용여과**

[0093] 세 개의 30 kDa 분자량 컷오프(MWCO) 0.1 m² 멤브레인을 투과물 및 잔류물의 pH가 5 내지 7이 될 때까지 40 내지 50°C에서 WFI로 플러싱시켰다. 공급 압력은 25 psig(예를 들면, 24 내지 28의 범위)를 목표로 설정하고, 유출 압력을 5 psig(예를 들면, 4 내지 8 psig의 범위)로 설정하였다. 시스템을 10분 이상 HIC 용출 완충용액 1 내지 2 L로 평형화하였다. HIC 용출액을 혼합하고 온도를 15 내지 25°C로 유지하였다. 투과물 부피를 모니터링 하여 농도가 A₂₈₀ 목표 값 30에 도달할 경우 UF를 중단하였다. 공급 부피의 감소 후, 정용여과를 양이온 평형화 완충용액(10 mM 소듐 시트레이트, pH 5.4) 6 디아볼륨(diavolume, DV)으로 수행하였다. 잔류물의 A₂₈₀을 조사하여 그 값이 30 이하인 것을 확인하고, 잔류물을 깨끗한 용기(clean vessel)로 배출시켰다. 두 개의 1 L 부피의 양이온 평형화 완충용액을 각각 5분 이상 10 내지 15 psig의 공급 압력으로 재순환시켰다. 세정액(rinse)을 잔류물과 혼합하였다.

[0094] **S 멤브레인을 이용한 양이온 교환 크로마토그래피**

[0095] 2500 cm²의 멤브레인 표면적을 갖는 Sartobind® S-멤브레인 1회용 캡슐(Sartorius, Gottingen, Germany)을 양이온 평형화 완충용액(10 mM 소듐 시트레이트 디하이드레이트, pH 5.4)으로 평형화시켜 배출액(effluent)의 전도도가 4 mS/cm를 초과하지 않는 것을 확인하였다. UF/DF-처리된 HIC 용출액을 연동 펌프를 이용하여 25 L/h로 S-멤브레인에 로딩하고 뒤이어 A₂₈₀이 0.1 AU를 초과하지 않을 때까지 양이온 평형화 완충용액으로 세척하였다. 통과액을 수집하고 pH 7.0 ± 0.1 로 조정하였다.

- [0096] **나노여과**
- [0097] Viresolve[®] PreFilter(0.11 m²)를 갖는 Viresolve[®] NFP(0.085 m²; Millipore)를 이용하여 나노여과를 수행하였다. 50 psi 이하에서 압력 캔(pressure can)에 의한 여과를 수행하였다. 나노필터를 네 개의 500 mL 양이온 평형화 완충용액으로 세정하였다.
- [0098] **최종 한외여과/정용여과**
- [0099] 이 단계에서 0.3 m²의 멤브레인 면적을 갖는 10 kDa MWC0 멤브레인을 이용하였다. 홀더 및 멤브레인을 투과물 및 잔류물의 pH가 5 내지 7이 될 때까지 40 내지 50°C에서 WFI로 플러싱시켰다. 공급 압력은 25 psig(예를 들면, 24 내지 28 psi의 범위)를 목표로 설정하고, 유출 압력을 5 psig(예를 들면, 4 내지 8 psi의 범위)로 설정하였다. 시스템을 10분 이상 1 내지 2 L의 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0로 평형화시켰다. 나노여과물을 잘 혼합하고 온도를 15 내지 25°C로 유지하였다. 280 nm에서 투과물의 흡광도(즉, A₂₈₀)가 0.04 미만임을 측정함으로써 recA1PI 손실을 주기적으로 조사하였다. 이 값을 초과할 경우, UF/DF를 중단하였다. 투과물 부피를 모니터링하고 농도가 약 30의 A₂₈₀ 목표 값에 도달할 경우 UF를 중단하였다. 공급 부피의 감소 후, 정용여과 완충용액(20 mM Na₂HPO₄, 120 mM NaCl, pH 7.0) 5 DV로 정용여과를 수행하였다. 잔류물의 A₂₈₀을 조사하여 그 값이 30 이하인 것을 확인하고 잔류물을 깨끗한 용기로 배출시켰다. 잔류물에 첨가할 경우, 50 내지 56 mg/mL의 최종 농도를 만들 수 있는 정용여과 완충용액 세정의 양을 계산하였다. 이 세정 부피를 반으로 나누고 각 부피를 3 내지 5분 동안 20 psig 이하의 공급 압력으로 재순환시켰다. 세정액을 잔류물과 혼합하였다.
- [0100] **저장**
- [0101] 농축된 벌크 제조용 A1PI를 Flexel[®] bags(Sartorius) 내로 멸균 여과시키고 최종 충전(filling) 전 -70°C에서 저장하였다.
- [0102] 진술한 방법에 의해 제조된 recA1PI는 짙은 황색을 갖는 것으로 확인되었다. 황색 물질의 정체는 알려지지 않았다. recA1PI가 높은 순도를 갖고 활성이 있음에도 불구하고, 심미적 이유에서 황색 착색 물질의 제거를 소망하였다.
- [0103] **실시예 3**
- [0104] **알파-1 안티트립신 셀렉트 레진에 의한 면역친화성 크로마토그래피**
- [0105] 황색 물질이 정제된 recA1PI로부터 분리될 수 있는지 결정하기 위해 A1PI-특이적 면역친화성 컬럼을 수행하였다. 혈장-유래 HIPI에 특이적인, 알파-1 안티트립신 셀렉트 레진(AAT-Select; GE Healthcare Life Science)의 1.6 cm 내경 × 10 cm 베드 높이의 컬럼(20 mL 컬럼 부피)을 충전하였다. 상기 컬럼을 20 mM Tris · HCl, pH 7.4로 평형화시켰다. 이 컬럼 상에 약 200 mg의 10 mg/mL recA1PI를 5 mL/분으로 로딩하였다. 컬럼을 20 mM Tris · HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl로 세척하고 20 mM Tris · HCl, pH 7.4, 2 M NaCl로 용출시켰다(도 3 참조). 피크 분리에 기반하여 분획을 수집하였다. 용출 피크 하의 분획을 폴링하고 Amicon UltraCel[™] 30 kDa MWC0 농축기(EMD Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 농축하였다. 농축된 시료로부터 UV-Vis 스펙트럼을 얻었다.
- [0106] 농축 후, 용출액은 분명히 황색이었다. UV-Vis 분광법으로 분석할 경우(도 4 참조), 스펙트럼은 면역친화성 컬럼을 실행하기 전 recA1PI에 대해 관찰되었던 것과 매우 유사하였다. 이 결과로부터 얻은 결론은 면역-친화성 크로마토그래피가 recA1PI에서 황색을 분리하는데 효과가 없었다는 점이었다.
- [0107] **실시예 4**

- [0108] **Superdex™ 200 레진에 의한 겔 여과 크로마토그래피**
- [0109] recA1PI로부터 황색 물질을 제거하기 위해 겔 여과 실험(size exclusion chromatography; SEC로도 알려짐)도 시도하였다. Superdex™ 200 prep 등급 레진의 1.6 cm 내경 × 90 cm 컬럼(181 mL 베드 부피)를 충전하였다(GE Healthcare Life Sciences). 상기 컬럼을 인산염 완충 식염수(PBS; 12 mM 인산염, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 평형화시켰다. recA1PI를 컬럼 부피의 5%(9 mL)로 로딩하고 2 mL/분(60 cm/h)으로 실행하였다. 12 mL 부피의 분획을 분석용으로 수집하였다.
- [0110] 이 컬럼에 대한 크로마토그램이 도 5에 나타난다. 그러나, 로드(load)는 99% recA1PI이고, 아마도 UV 검출기의 포화로 인해 피크 쪼개짐이 관찰되었다. 이 피크 하의 분획은 UV-Vis 분광법으로 분석하였다(도 6). recA1P 분획은 분명히 황색이고 이들 분획의 UV-Vis 스펙트럼은 로딩 물질의 스펙트럼과 유사하였다. 따라서, 겔 여과 컬럼은 recA1PI로부터 황색을 제거하지 않았다.
- [0111] **실시예 5**
- [0112] **변성제 및 환원제 분석**
- [0113] 변역친화성 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피가 recA1PI로부터 황색을 제거하는 데 성공적이지 않았기 때문에, 변성제 및/또는 환원제를 황색을 제거 또는 감소시킬 가능성이 있는 수단으로 시도하였다.
- [0114] 약 1 mL의 recA1PI를 8 M 구아니딘 염산염 또는 500 mM DTT와 혼합하여 각각, 4 M 구아니딘 염산염 또는 50 mM DTT 최종 농도를 달성하였다. 제3 시료를 두 시약과 혼합하였다. 시료를 약 2시간 동안 50°C에서 인큐베이션하고 PD-10 탈염 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 통해 개별적으로 통과시켰다. 이 컬럼으로부터 얻은 통과액을 1,000×g에서 5분 동안 원심분리에 의해 수집하였다.
- [0115] 구아니딘 염산염은 감소에 도움이 되지 않았고 이것은 이 시료의 UV-Vis 스펙트럼에 반영되었다(도 7). 50 mM DTT를 처리한 시료는 구아니딘 염산을 처리한 시료에 비해 옅은 황색을 띠었다. 이 시료는 recA1PI에 대해 특징적으로 관찰되는 405 nm에서의 스펙트럼 특성(spectral signature)를 갖지 않았다(도 7). 구아니딘 및 DTT의 조합으로 처리된 시료는 거의 무색이고 300 내지 400 nm 범위에서 스펙트럼 특징이 없어졌다. 구아니딘 염산염 및 DTT가 모두 황색을 감소시키는데 요구된다는 사실은, 황색 물질이 recA1PI에 공유결합되어 있음을 나타낼 수 있다.
- [0116] **실시예 6**
- [0117] **환원 및 겔 여과 크로마토그래피**
- [0118] DTT 환원 및 PD-10 컬럼에 의해 수행된 겔 여과 크로마토그래피에 이어 추가 실험을 수행하였다. 실험 목적은 길이가 더 긴 컬럼을 이용하여 DTT-처리된 시료의 더 나은 해상도를 달성하고 더 많은 양의 환원된 recA1PI를 분석을 위해 처리하는 것이었다.
- [0119] Superdex™ 200 prep 등급 레진의 1.6 cm 내경 × 90 cm 베드 높이(181 mL 컬럼 부피) 컬럼을 준비하였다(GE Healthcare Life Sciences). 이 컬럼을 5 mM DTT를 함유하는 PBS로 미리-평형화시켰다. 9 mL 부피의 recA1PI 시료를 주위 온도에서 밤새도록, 50 mM 농도의 DTT로 처리하였다. 이 시료를 컬럼에 로딩하였다; 로드는 컬럼 부피의 5%를 구성하였고 컬럼을 2 mL/분(60 cm/h)으로 실행하였다. 14.5 mL의 일정한 부피의 분획을 분석용으로 수집하였다. 적절한 분획을 플링하고 Amicon UltraCel™ 30 kDa MWCO 스핀 농축기(Millipore)를 이용하여 약 50 mg/mL까지 농축하였다. DTT로 처리되지 않은 대조군 시료도 동일한 조건에서 실행하였다.
- [0120] 50 mM DTT로 처리된 시료의 크로마토그램이 도 8에 나타나고 대조군 시료는 도 9에 나타난다. DTT-처리된 시료로 실행된 SEC에서 보여지는, 별개의 더 작은, 제2 피크가 있다. recA1PI를 함유하는 분획 B1 내지 B3를 플링하고 30 kDa MWCO 스핀 농축기를 이용하여 약 50 mg/mL로 농축하였다. 농축된 시료를 UV-Vis 분광법으로 분석하였다. 도 10에서 나타난 UV-Vis 스펙트럼은, 황색 출발 물질인 recA1PI의 특징적 스펙트럼 특성이 환원된, 겔 여과 용출액으로부터 얻은 농축물에서 유의미하게 감소한다는 것을 밝힌다. 고도로 정제된, 혈장-유래 인간 A1PI를 대조군으로 이용하였다.

- [0121] **실시예 7**
- [0122] **DTT 농축 분석**
- [0123] recA1PI를 DTT와 인큐베이션시키고, 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 시료를 정제한 후, 농축된 정제 시료의 UV-Vis 스펙트럼을 얻음으로써, 더 낮은 농도의 DTT의 효과를 분석하였다. Superdex™ 200 prep 등급 레진의 1.6 cm 내경 × 90 cm 베드 높이(181 mL 컬럼 부피) 컬럼을 이용하였다(GE Healthcare Life Sciences). 이 컬럼을 5 mM DTT를 함유하는 PBS로 미리-평형화시켰다. 9 mL 부피의 recA1PI 시료를 주위 온도에서 밤새도록, 적절한 농도의 DTT로 처리하였다. 로드는 컬럼 부피의 5%를 구성하였고 컬럼을 2 mL/분(60 cm/h)으로 실행하였다. 14.5 mL의 일정한 부피의 분획을 수집하였다. 적절한 분획을 폴링하고 30 kDa MWCO 스핀 농축기를 이용하여 약 50 mg/mL으로 다시 농축하였다.
- [0124] 100 mM DTT 및 50 mM DTT로 처리된 시료의 UV-Vis 스펙트럼은, 황색의 recA1PI의 특징적 스펙트럼 특성을 감소시키는데 있어서 10 mM DTT 농도가 50 mM DTT만큼 효과적이라는 것을 나타낸다(도 11).
- [0125] **실시예 8**
- [0126] **DTT-처리되고 겔 여과-정제된 recA1PI에서 생물 분석(bioanalytical analysis)**
- [0127] **MALDI TOF 분석**
- [0128] 매트릭스-지원 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량분석(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) 실험을 recA1PI에 대해 수행하였다. 황색을 갖는 DTT 처리에 의해 생성된 작은 피크가 질량분석기로 확인가능한 물질을 포함할 수 있다고 예상하였다. 그러나, 이들 시료에서는 아무것도 확인되지 않았다. 매트릭스 효과는 100 내지 10,000 Da 범위에서 분자의 이온화를 방해했을 수 있다.
- [0129] **철 농축**
- [0130] 황색의 가능한 공급원으로 철 이온을 의심하였다. 철은 세포 배양에서 필수적인 전이 금속이고 구연산 철 염모늄 $Fe_x(NH_4)_yC_6H_5O_7$ 으로 상류(upstream) 세포 배양 배지에 첨가된다. 철 분석은 66 μ M의 철을 갖는 출발 물질에 비교하여 겔 여과 컬럼으로부터의 DTT-환원된 recA1PI의 폴링된 분획의 철 함량에서 약 30-배 감소를 나타내었다. 도 13을 참조한다. 크로마토그램에서 화살표로 표시된 황색 물질은 로딩된 양으로부터의 철의 약 50%를 가졌다.
- [0131] **활성 분석**
- [0132] 주요 피크 분획 이외에, 더 작은 피크 분획 중 어느 것도 recA1PI 활성을 갖지 않았다.
- [0133] **실시예 9**
- [0134] **DTT 겔 여과 분석**
- [0135] recA1PI의 부재하에 DTT 단독에 의한 크로마토그래피 실험을 완료하여 recA1PI 부재시 DTT의 크로마토그래피 프로파일을 관찰하였다. recA1PI 시료에 의한 테스트 실험에서 관찰된, 동일 용출 부피의, 최종 피크에 해당하는 단일 피크가 201 mL의 용출 부피로 관찰되었다(도 12). 도 13에서 화살표로 표시된 피크에 해당하는 열은 황색 분획은 DTT-처리된 recA1PI 시료에서 유일하고 DTT로만 실행된 대조군에는 존재하지 않는다.
- [0136] **실시예 10**
- [0137] **정제된 혈장-유래 A1PI의 10 mM DTT에 의한 처리**
- [0138] 황색 외관을 갖는 혈장-유래 A1PI 생성물을 테스트하여 환원제에 의한 처리도 황색의 유사한 감소를 초래하는지 여부를 결정하였다. 약 50 mg/mL의 혈장-유래 A1PI의 10 mL 분획을 최종 농도 10 mM의 DTT에 의해 처리하였다.

Superdex™ 200 prep 등급 레진 상의 겔 여과 크로마토그래피를 본 명세서에 기술된 바와 같이 수행하였다(GE Healthcare Life Sciences). DTT-처리된 혈장-유래 A1PI에 의한 실험에서 얻은 크로마토그램이 도 14에 나타난다.

[0139] 주요 피크 하의 recA1PI에 해당하는 분획을 폴딩하고 50 mg/mL로 농축하였다. 시료의 색은 처리하지 않은 시료의 색과 차이가 없었다. 이는, 세포 배양물-유래 recA1PI의 황색 공급원(source)이 혈장-유래 A1PI의 황색 공급원과 다르다는 것을 나타낸다.

[0140] 실시예 11

[0141] 환원제로서 시스테인의 분석

[0142] 시스테인은 저렴하고 용이하게 이용가능하기 때문에 대체 환원제로서 검토하였다. 또한, 아미노산으로서 시스테인은 허용가능한 부형제이다. recA1PI의 분획을 10 mM 시스테인으로 처리하고 겔 여과 컬럼 상에서 가공한 것인 실험을 완료하였다. 이 실험의 크로마토그램이 도 15에서 나타난다. recA1PI에 해당하는 분획을 폴딩하고 50 mg/mL로 농축하였다. 시스테인도 환원제로서 허용가능했다.

[0143] 실시예 12

[0144] 색 분석

[0145] 10 mM 농도의 DTT 또는 시스테인으로 처리된 시료의 색 비교는 유사한 단백질 농도(약 50 mg/mL)에서 황색의 상당한 감소를 나타낸다. A_{280}/A_{405} 비율을, 405 nm에서 용액의 흡광도가 황색의 정량적 척도인 이유로, 시료의 황색 지표로 이용하였다. 더 높은 A_{280}/A_{405} 비율은 시료의 더 옅은 황색에 상응한다. 처리하지 않은 시료 중 유의미한 황색은 DTT 또는 시스테인에 의한 처리로 대부분 제거되었다. 그러나, 황색의 제거는 완벽하지 않았고 황색 기운이 처리된 시료에 남는다. A_{280}/A_{405} 비율은 이 경향을 잘 추적하고 일반적으로 환원제에 의한 처리 후 3-배 감소가 관찰된다. 고도로 정제된 혈장-유래 A1PI는 428의 A_{280}/A_{405} 비를 가지며 실제로 투명하다.

[0146] 재조합 세포 배양물 유래 A1PI의 활성 회복

[0147] 크기 배제 크로마토그래피 및 환원제에 의한 처리를 수반한 실험으로부터 recA1PI의 활성 회복률은 80 내지 100%였다(표 1 참조).

표 1

[0148]

DTT 또는 시스테인에 의한 처리 후 크기 배제 크로마토그래피로부터 재조합 세포 배양물 유래 A1PI 활성의 회복		
시료	A_{280}/A_{405}	활성 회복률(activity recovery)
recA1PI # 4	64	100 %
recA1PI # 4+ 50 mM DTT	281	78%
recA1PI # 6	66	100 %
recA1PI # 6 + 50 mM DTT	186	108%*
recA1PI # 6 + 10 mM DTT	194	87%
recA1PI # 6 + 10 mM 시스테인	171	90%
*100%를 초과하는 측정 활성은 분석 대 분석의 변이로 인한 것이고 활성의 손실이 없다는 의미로 해석되었다.		

[0149] 철 함량

[0150] 처리된 시료의 철 농도는 환원제에 의한 처리 및 크로마토그래피 정제 후 상당히 감소하였다. 환원 및 정제된 시료를 유도 결합 플라즈마 원자 흡광 광도법(inductively coupled plasma atomic absorption spectroscopy, ICP-AA)을 이용하여 분석하였다. 이온 농도의 감소 범위는 처리하지 않은 시료와 비교할 경우, 시스테인 처리된 시료에 대해 약 14배 내지 10 mM DTT-처리된 시료에 대해 27배였다.

표 2

DTT 또는 시스테인에 의한 처리 후 크기 배제 크로마토그래피로부터의 A1PI 시료의 철 농도	
시료	이온 농도 (μM)
recA1PI # 4	66.4
recA1PI # 4+ 50 mM DTT	3.0
recA1PI # 6	12.6
recA1PI # 6 + 10 mM DTT	0.5
recA1PI # 6 + 10 mM 시스테인	0.8

[0152] 실시예 13

[0153] 수정된 recA1PI 정제 과정: 음이온 교환 크로마토그래피 후 환원제 첨가 및 인큐베이션

[0154] 도 16은, 시스테인이 풀링된 음이온 교환 용출액에 첨가되는 것인, 수정된 recA1PI 정제 과정의 흐름도를 나타낸다. 수정된 과정은 하기와 같다. 용매/세제 바이러스 불활성화 단계 이후, 질량 11.2 kg을 갖는 세포 배양 상층액을 5 cm 내경 × 25 cm 베드 높이(500 mL) Capto™ Q 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)에서 300 cm/h으로 정제하였다. 상기 컬럼을 20 mM Na₂HPO₄, pH 6.0으로 평형화시키고; 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaCl, pH 6.0로 세척하고; 8 CV에 걸쳐 25 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, pH 7.0로 용출시켰다. Q-용출액의 A₂₈₀은 2.4였고, 이는 약 2 g/L의 효능(potency)에 상응했다. 활성 기준으로 약 1 g의 recA1PI를 함유하는 이 Q-용출액의 500 mL 분획을 10 mM 시스테인(Acros Chemicals; Thermo Fisher Scientific; New Jersey)으로 처리하고 실온에서 밤새도록 인큐베이션시켰다(약 25°C, 약 16 h). 처리한 시료를 HIC 회석 완충용액, 25 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0에 의해 42:58로 회석하고, 5 cm 내경 × 10.3 cm 베드 높이(202 mL 베드 부피) 크기의 Octyl Sepharose™ 컬럼을 로딩하는데 이용하였다. 상기 컬럼을 25 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 1.75 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0으로 평형화시키고 20 mM Na₂HPO₄, pH 6.0의 구배로 10 CV에 걸쳐 용출하였다. 용출물 부피 620 mL를 LabScale™ TFF 시스템 및 Pellicon® 30 kDa, 3 × 50 cm² 필터(Millipore)를 이용하여 50 mL로 농축하였다. 시료를 Amicon UltraCel™ 30 kDa MWCO 농축기(Millipore)를 이용하여 3,500 rpm으로 4°C에서 원심분리에 의해 더 농축하였다. 그 후 농축된 시료를 10 mM 소듐 시트레이트 완충용액, pH 5.4로 평형화시킨 Sartobind® S-멤브레인 캡슐(Sartorius, Gottingen, Germany)을 통해 통과시켰다. 이 시료를 PBS 5-컬럼 부피로 정용여과하였다.

[0155] 또한 시스테인의 부재하에 동일한 방식으로, 동일한 부피의 Q-용출액을 이용하여 HIC 컬럼을 통과시켜 대조군 실험을 수행하였다. 대조군과 시스테인-처리된 테스트 시료의 HIC 크로마토그래피 프로파일은 유사하였다(도 17 및 도 18 비교). 이는, 시스테인의 첨가가 소수성 상호작용 컬럼 상에서 recA1PI의 정제 프로파일을 변화시키지 않았다는 것을 나타낸다. 시료를 약 50 mg/mL로 농축시켰을 경우, A₂₈₀/A₄₀₅ 비율에서 3.4배 향상된 것(즉, 73 vs. 245)에 상응하는 황색의 상당한 감소가 관찰되었다. UV-Vis 스펙트럼도 이 차이를 반영하여, 시스테인-처리된 시료의 프로파일은 고도로 정제된 혈장-유래 A1PI의 프로파일과 유사하였다; 도 19 참조.

[0156] 따라서, 제조 규모(preparative-scale) 실험에서 음이온 교환 컬럼과 소수성 상호작용 크로마토그래피 간의 오버나잇 시스테인 인큐베이션은(도 16 참조) 황색의 제거 및 A₂₈₀/A₄₀₅ 비율의 상응하는 향상 측면에서 벤치-규모(bench-scale)의 실험과 유사한 결과를 생성한다.

[0157] 본 명세서에 기술된 장치 및 방법의 범위는 본 명세서에 개시된 구체예, 양상, 실시예, 단계, 및 바람직한 예의 모든 조합을 포함한다.

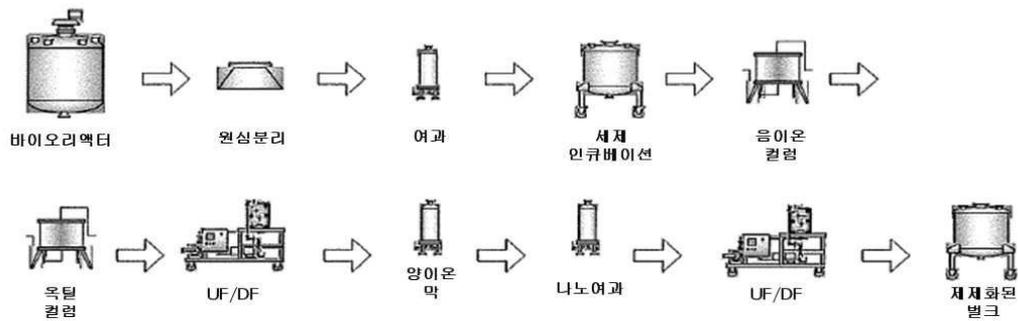
도면

도면1

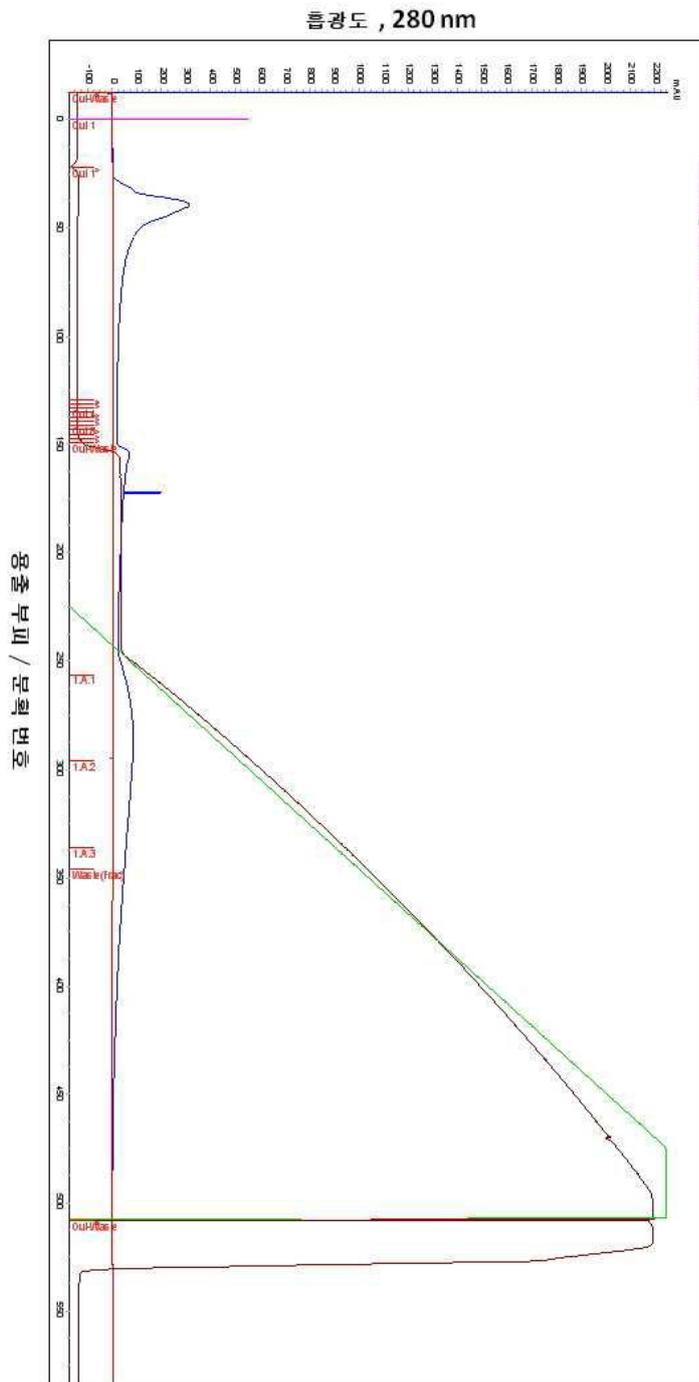
MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLA EDPQGDAAQKTDTSHHQDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYR
 QLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTL
 NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFKLELVKLYHSEAVTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQG
 KIVDLVKELDRTVFALVNYIFFKQWERPFVVDTEEDFHVQVTTVKVPMKRLGMFNIQH
 CKKLSSVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITG
 TYDLKSVLGQLGITKVFNSGADLSGVTEEAPLKLKAVHKAVLTI DEKGTEAAGAMFLEAIPMS
 IPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

- 1-24 신호 펌프드
- E25-K418 성숙 펌프드
- N70 글리코실화
- N107 글리코실화
- N271 글리코실화
- C256 S-니트로실화
- G368-K392 반응 중심 루프
- F376 단백질분해 절단 부위
- M382-S383 반응성 결합

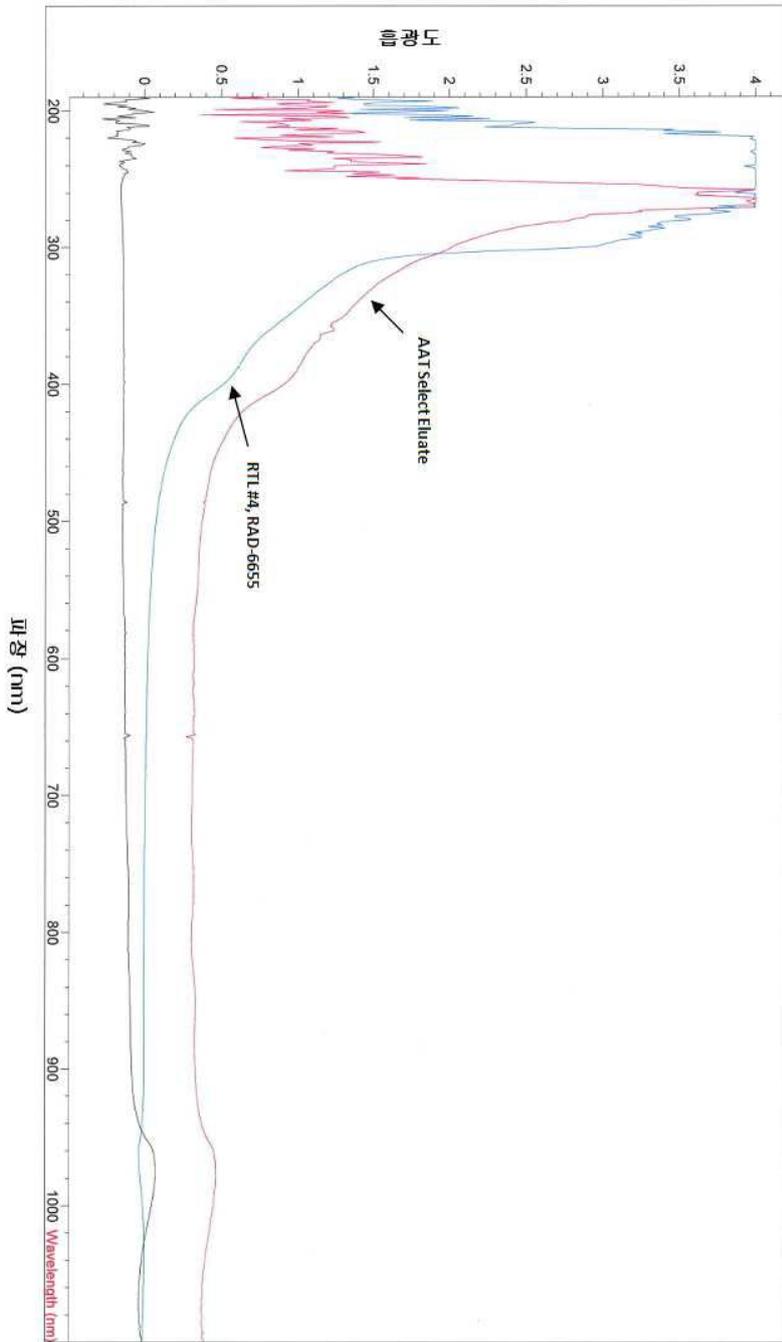
도면2



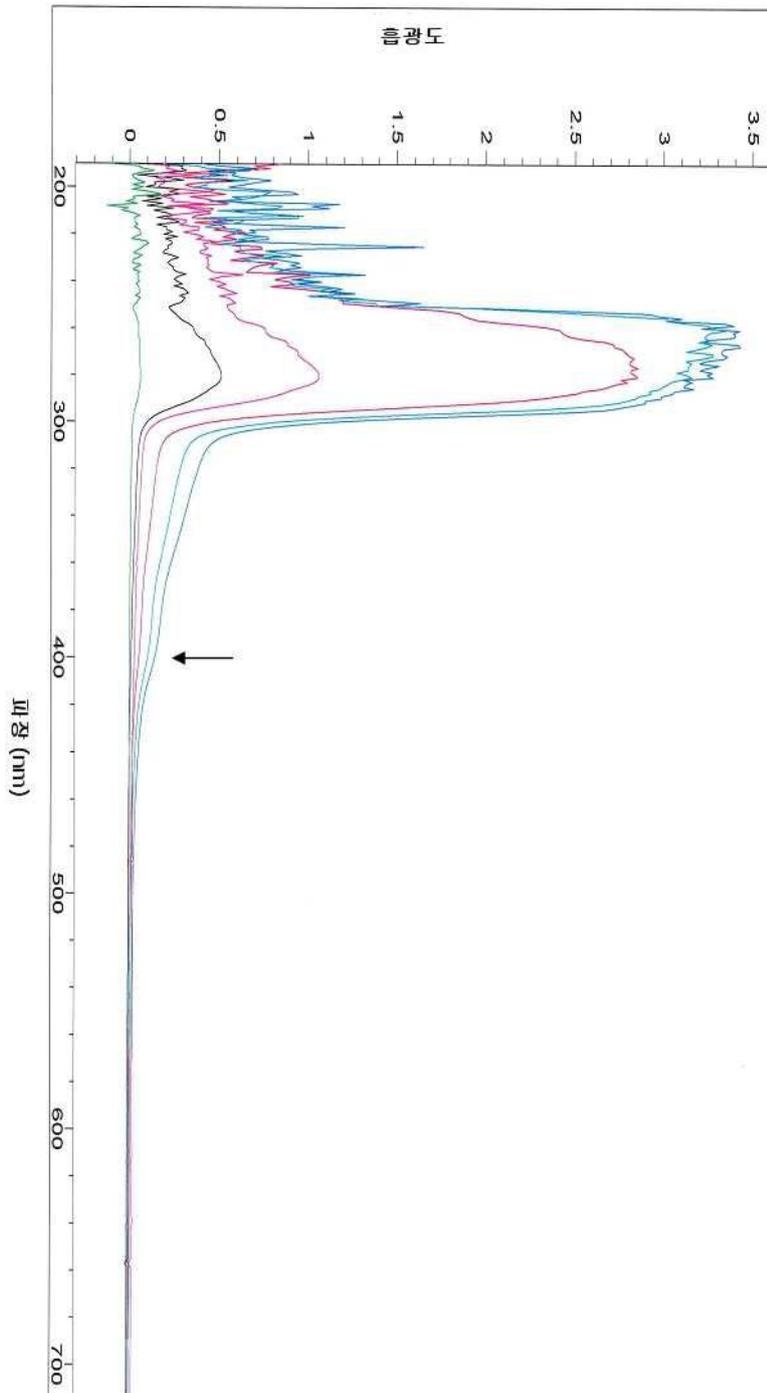
도면3



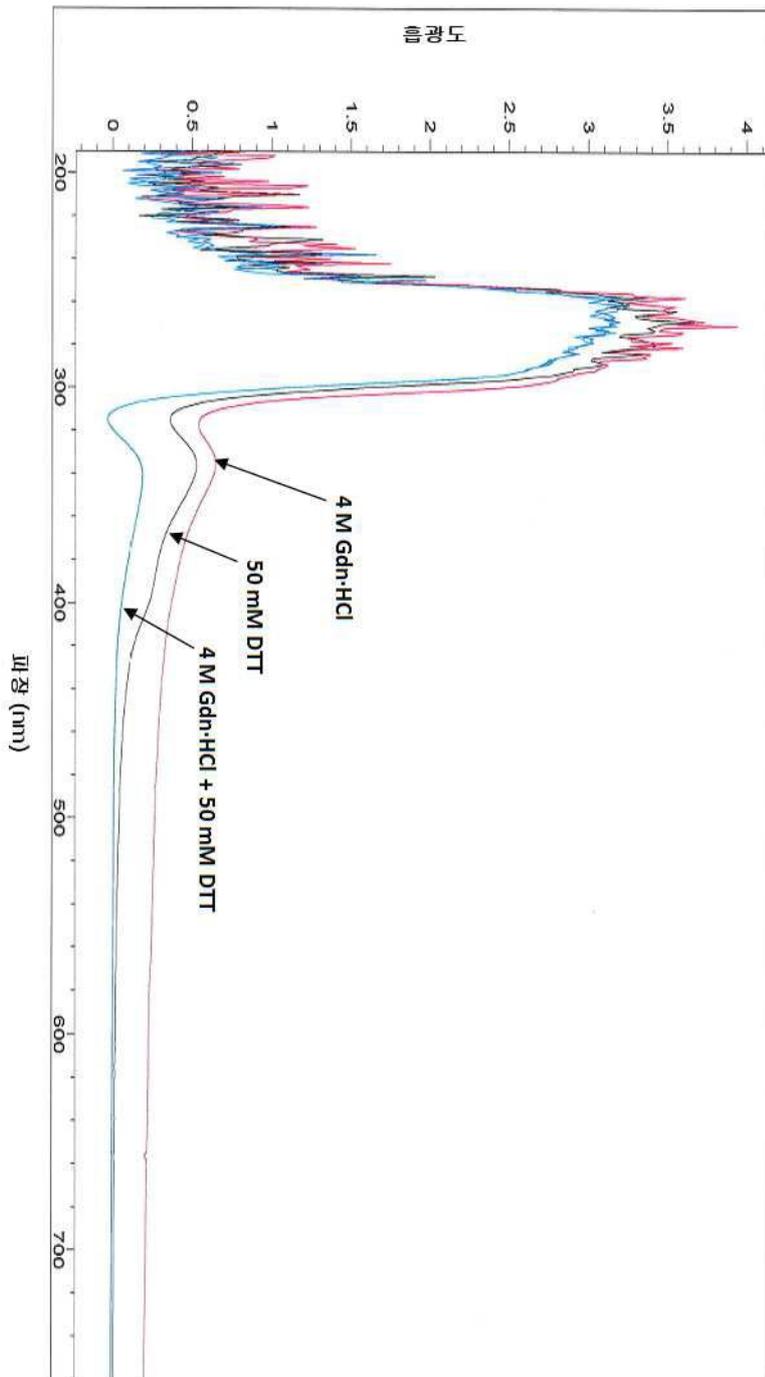
도면4



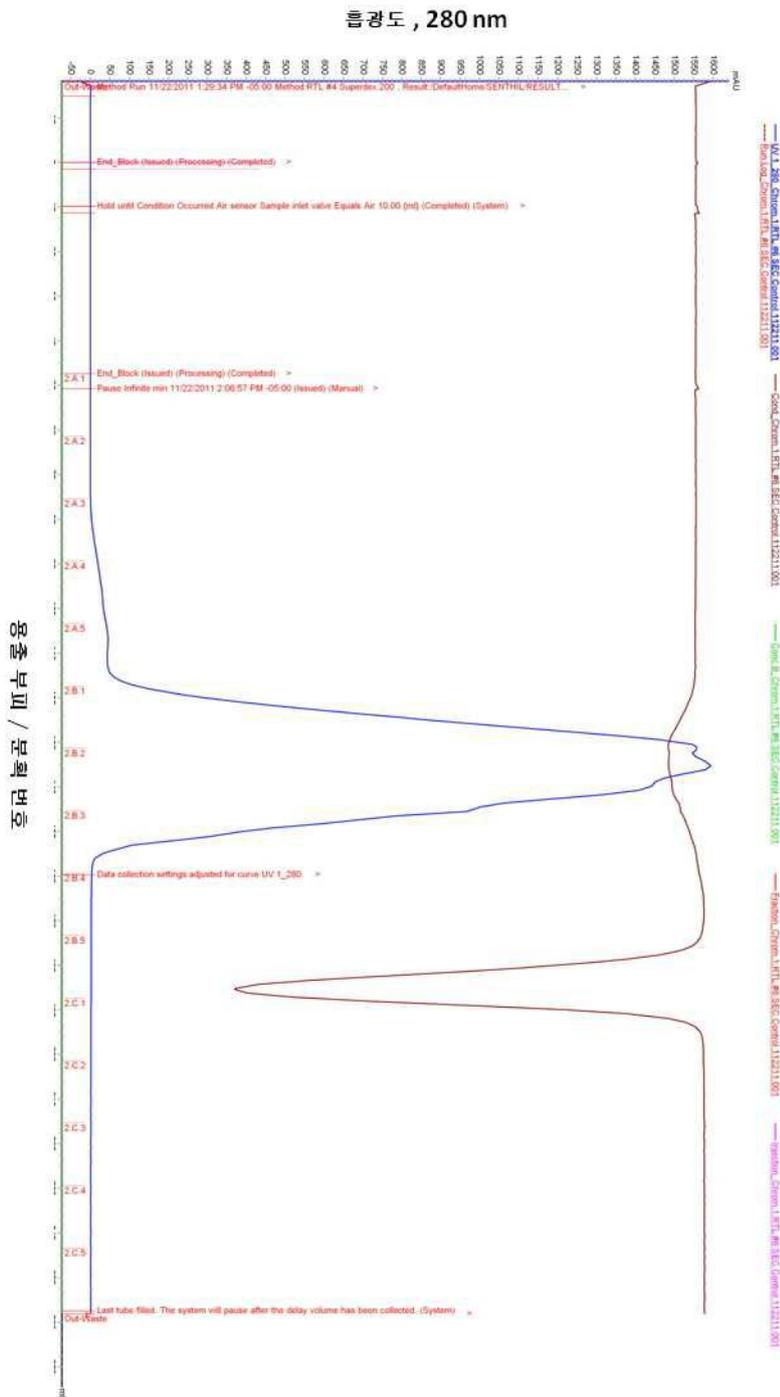
도면6



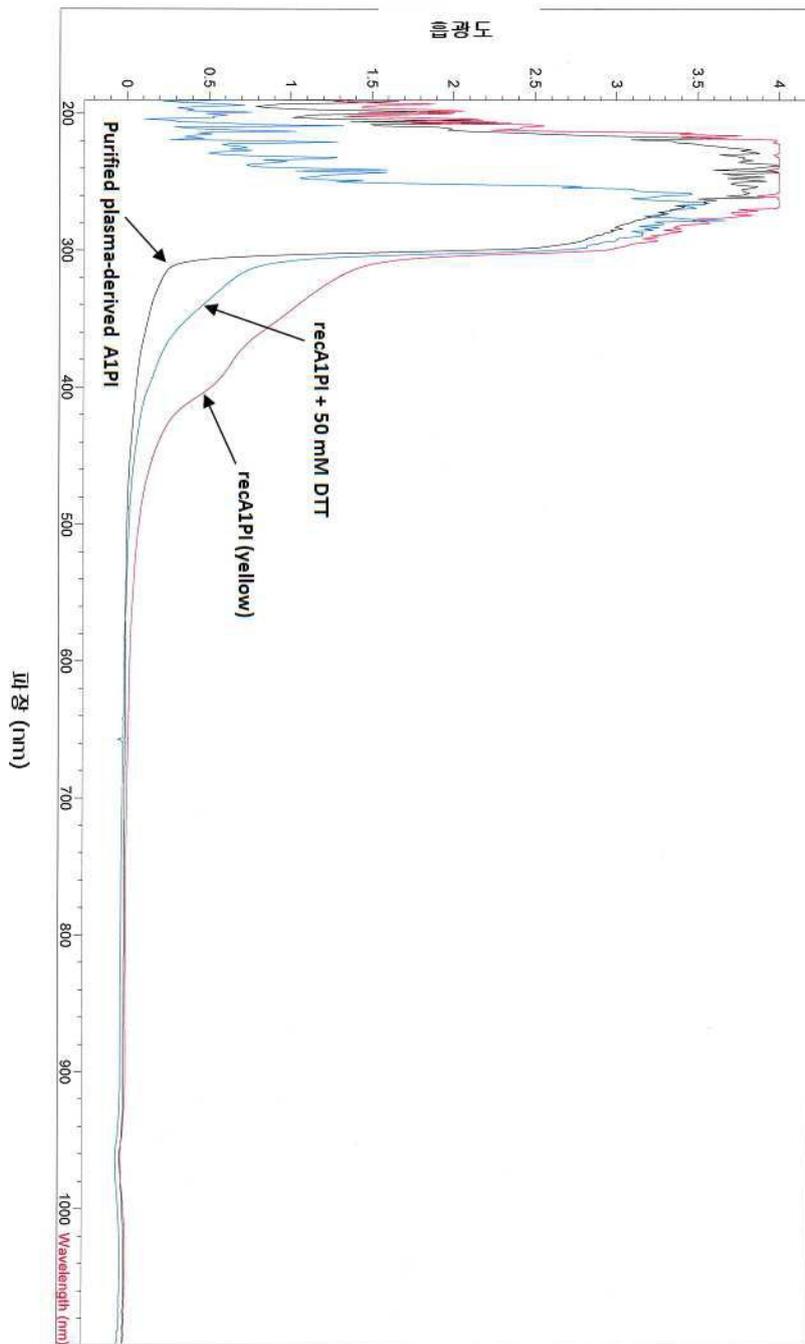
도면7



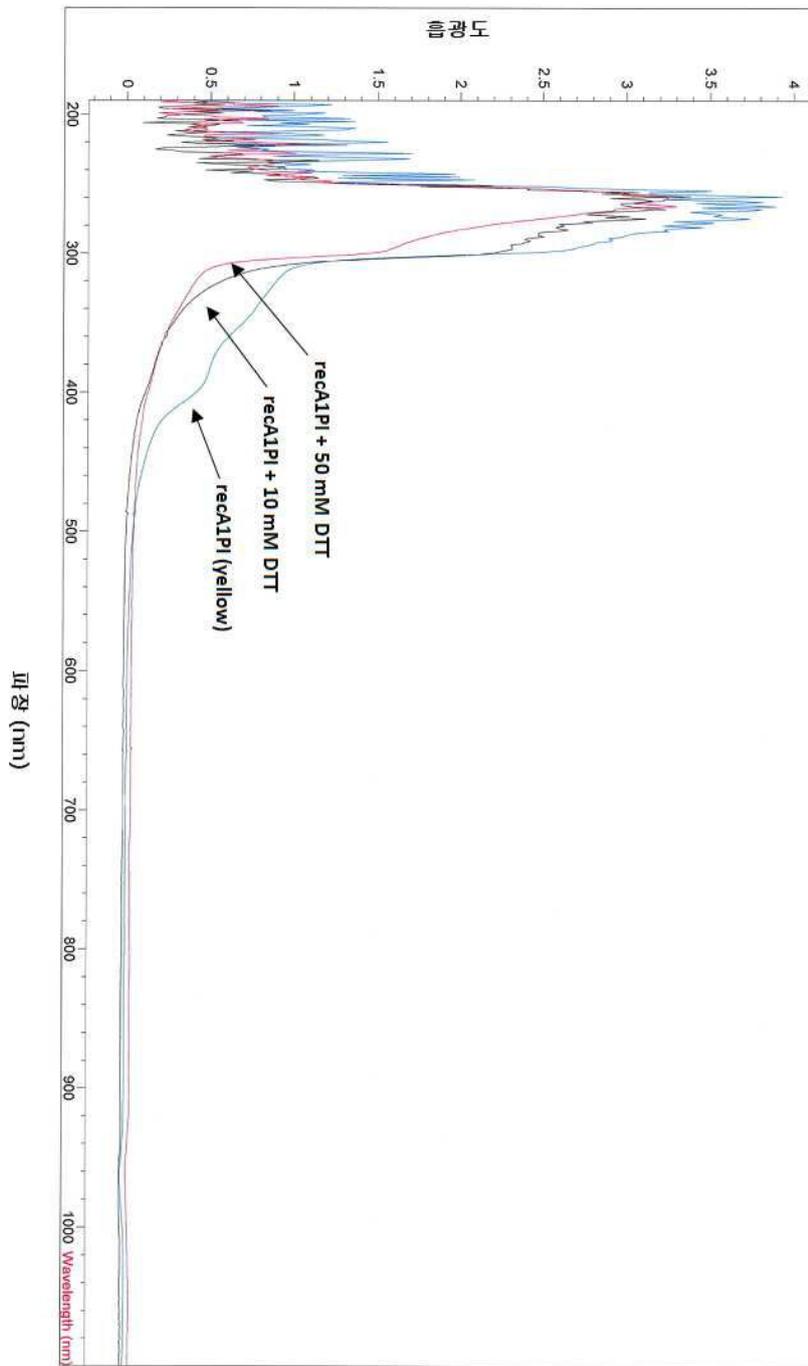
도면9



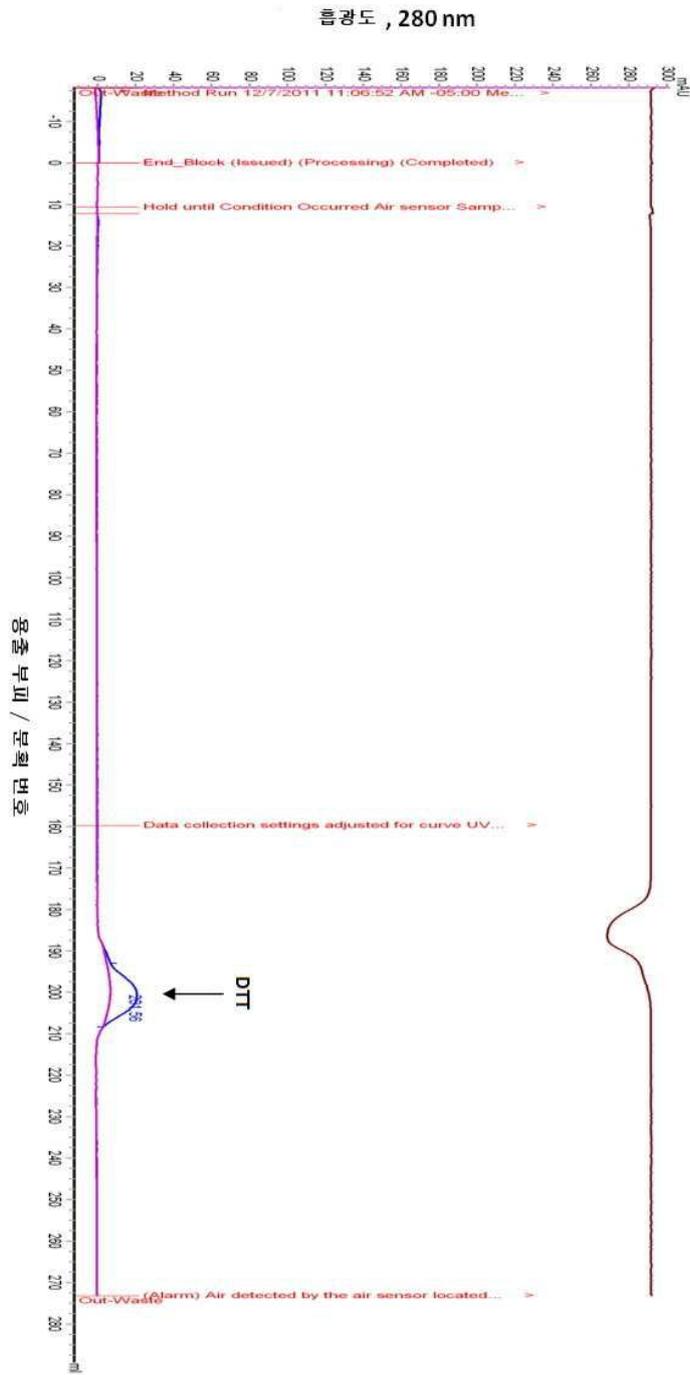
도면10



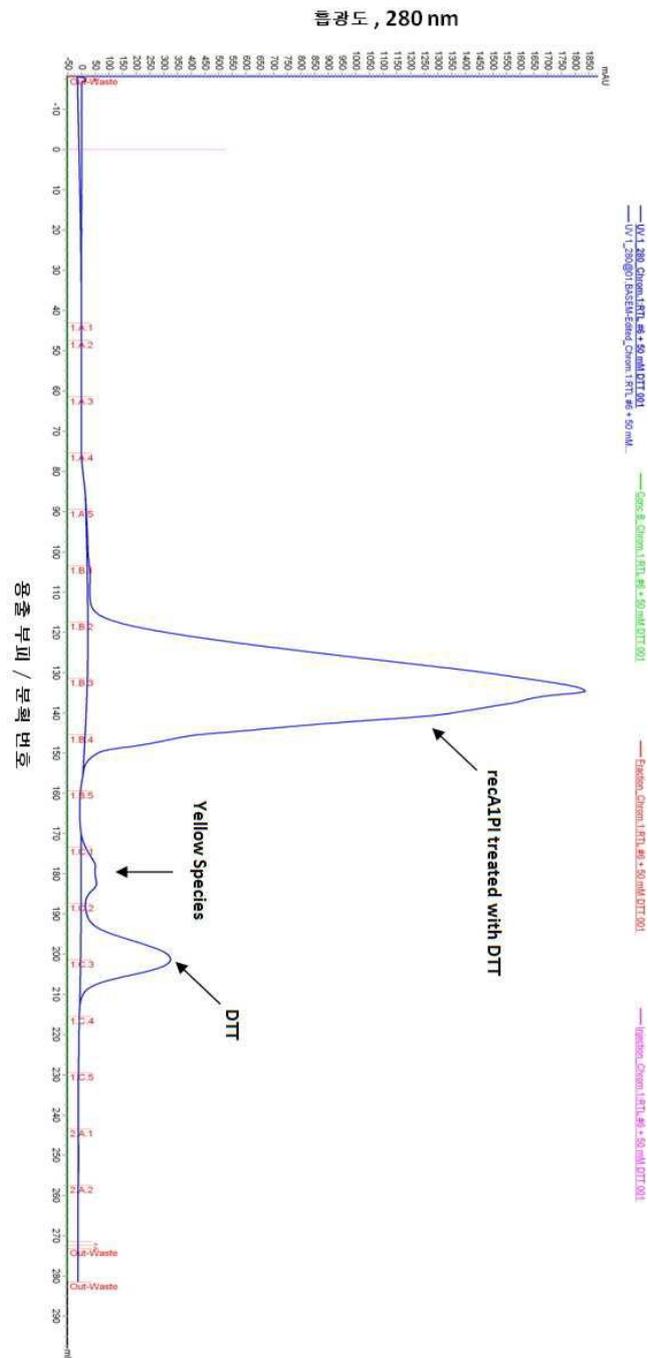
도면11



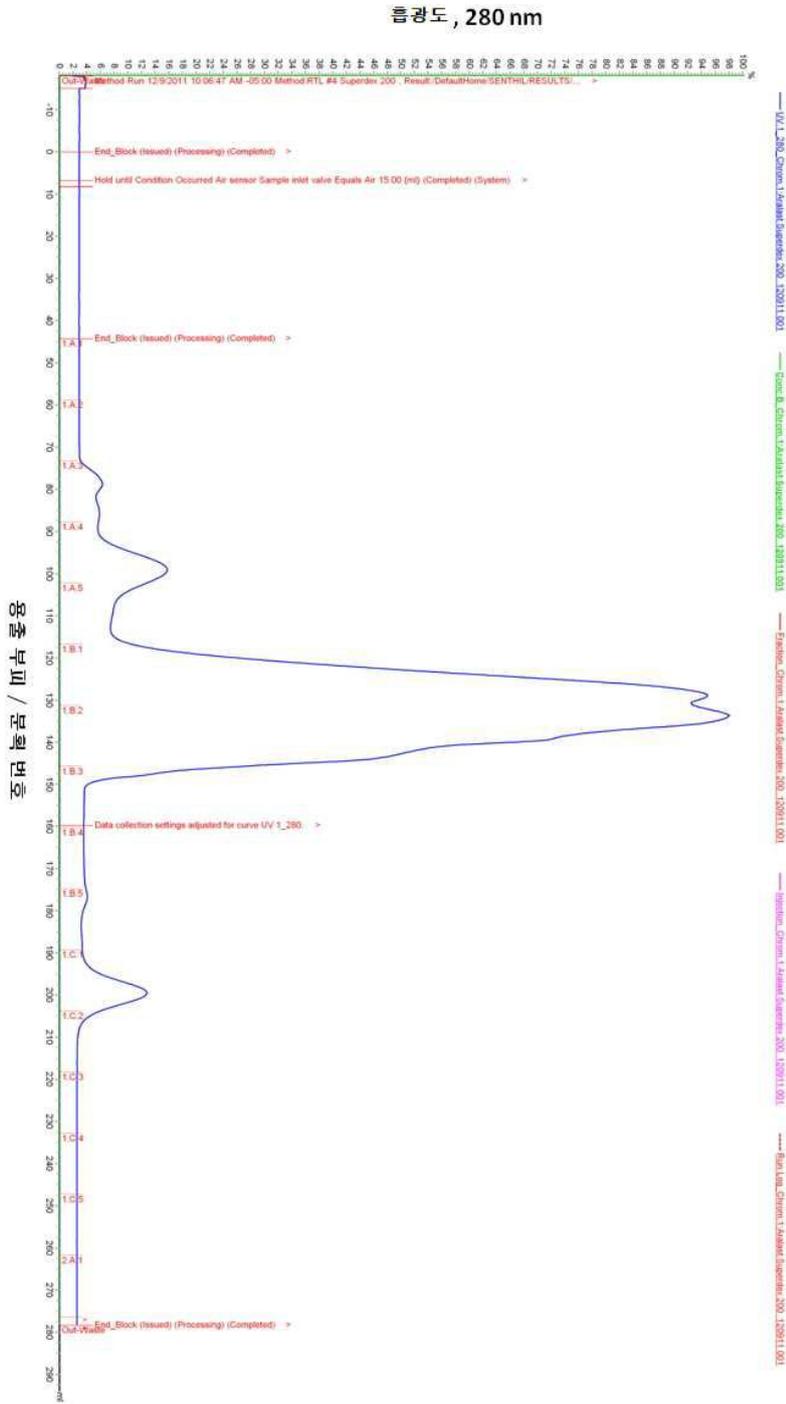
도면12



도면13

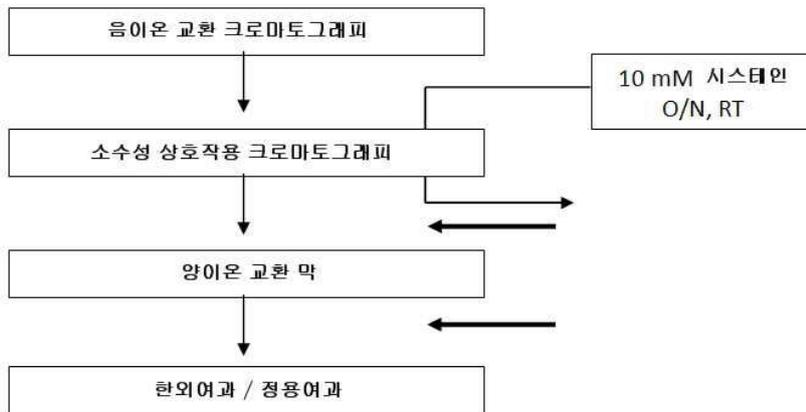


도면14

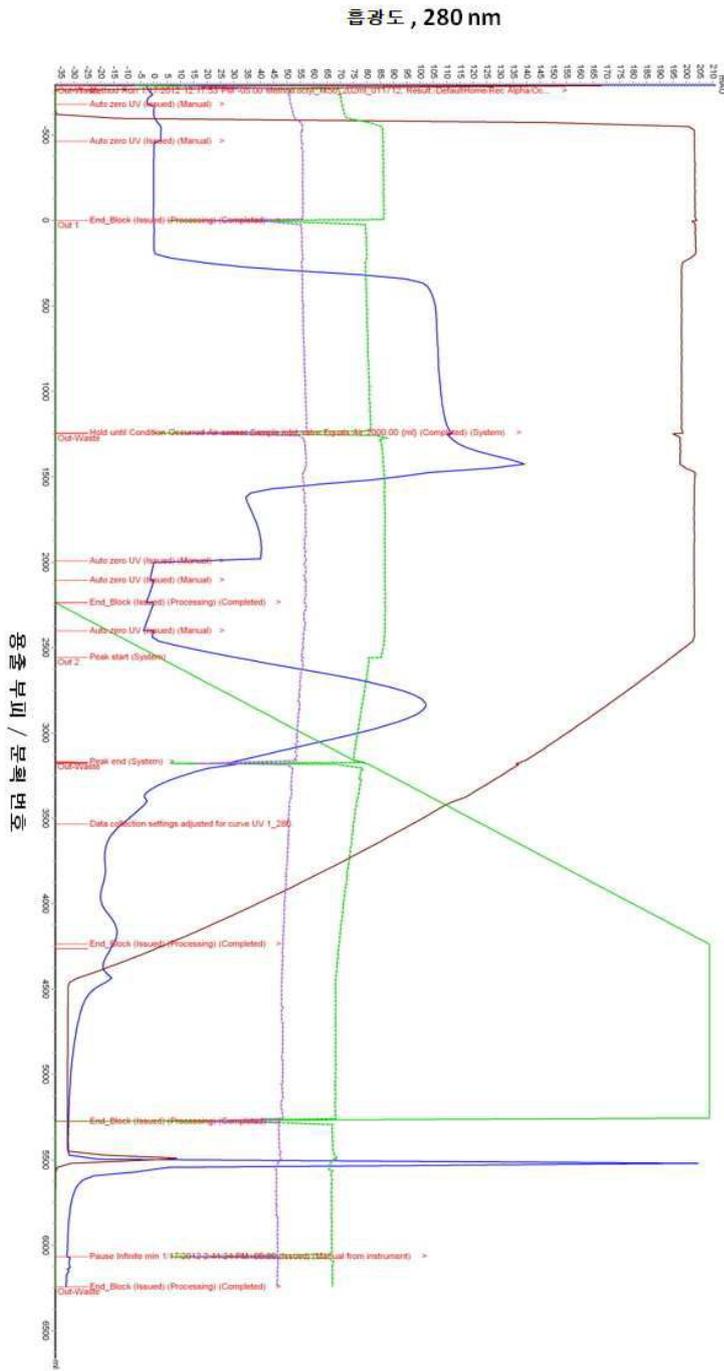


도면16

수정된 정제 방법 흐름도



도면17



도면19

