



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0117728
(43) 공개일자 2012년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/505 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7009211
(22) 출원일자(국제) 2010년09월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/005839
(87) 국제공개번호 WO 2011/035914
국제공개일자 2011년03월31일
(30) 우선권주장
09 012 120.3 2009년09월23일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
바이오제너릭스 에이지
독일 89079 울름 그라프-아르코-스트라쎄 3
(72) 발명자
힌더러 왈터
독일 63110 로드가우 데칸-슈스터-스트라쎄 25
아놀드 스테판
독일 68723 슈베트징겐 마슈탈스트라쎄 49에이
(74) 대리인
특허법인태평양

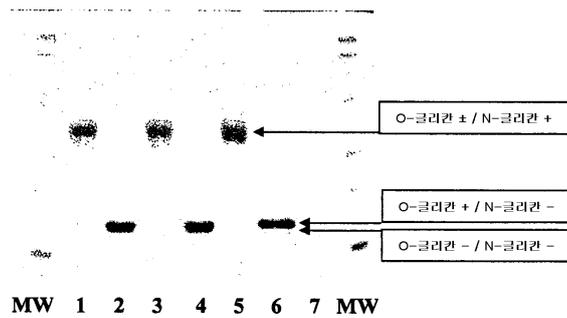
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 인간 에리트로포이에틴(EPO)의 정제 방법, 이렇게 정제된 EPO 및 이를 포함하는 약학적 조성물**

(57) 요약

에리트로포이에틴(EPO), 특히 매우 정제된 형태의 정의된 조성의 당형태, 즉 높은 양의 0-당화된 EPO 아형을 갖는 재조합 인간 EPO(rhEPO)의 정제 방법이 제공된다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

복합 단백질 혼합물로부터 당화된 에리트로포이에틴(EPO) 아형을 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 역상(RP) 크로마토그래피 단계에 의해 분리된 음이온 교환 크로마토그래피 단계 및 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

- (a) 포획 단계로서 친화 크로마토그래피 단계;
- (b) 음이온 교환 크로마토그래피 단계;
- (c) 역상(RP) 크로마토그래피 단계; 및
- (d) 양이온 교환 크로마토그래피 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

- (e) 크기 배제 크로마토그래피 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 크로마토그래피 단계에서의 EPO의 용출은 계단 또는 구배 용출에 의해 수행되는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 작용기로서 디에틸아미노에틸기(DEAE), 4차 아미노에틸기(QAE), 4차 암모늄기(Q), 디메틸아미노에틸기(DMAE) 및/또는 트리메틸아미노에틸기(TMAE)를 함유하는 음이온 교환 수지 또는 막을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 상업적으로 입수가능한 Q-세파로오즈를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 역상(RP) 크로마토그래피 단계는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 RP-HPLC는 작용기로서 메틸-, 부틸-, 페닐-, 프로필- 및/또는 옥틸기를 함유하는 수지를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 RP-HPLC는 상업적으로 입수가 가능한 C4 역상 크로마토그래피 물질을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 설포프로필 양이온 교환 물질을 함유하는 수지를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 상업적으로 입수가 가능한 Macro-Prep High S를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 12

청구항 2 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 친화 크로마토그래피 단계는 염료 크로마토그래피 수지를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 친화 크로마토그래피 단계는 상업적으로 입수가 가능한 블루-세파로오즈를 이용하여 수행되는 방법.

청구항 14

청구항 3 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피 단계는 수퍼텍스, 세파크릴, 세파텍스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요펠 및 Bio-Gel로 이루어진 군으로부터 선택되는 겔 여과 매질을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 크기 배제 크로마토그래피 단계는 상업적으로 입수가 가능한 수퍼텍스-S200을 이용하여 수행되는 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 음이온 교환 크로마토그래피는 EPO 아형을 선별하는데 사용되는 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

약 7.0의 pH에서 20 mM Tris-HCl을 포함하는 버퍼 내의 0 내지 200 mM NaCl의 선형 염 구배가 사용되는 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 역상 크로마토그래피 단계는 0-당화된 EPO를 선별하기 위해 사용되는 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 EPO는 유기용매의 선형 구배를 이용하여 용출되는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 선형 구배는 물 내의 0 내지 70% 아세트니트릴이 사용되고, 상기 용매는 약 0.1% FTA를 함유하는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

아세트니트릴을 함유하는 용매 및 물 내의 약 0.1% TFA를 이용한 EPO의 등용매 용출이 사용되는 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 크로마토그래피 단계들 이전에 한외여과 단계, 및 선택적으로 최종 단계로서 나노여과 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 포획 단계로서 친화 크로마토그래피 단계;
- (b) 음이온 교환 크로마토그래피 단계;
- (c) 역상(RP) 크로마토그래피 단계;
- (d) 양이온 교환 크로마토그래피 단계;
- (e) 크기 배제 크로마토그래피 단계;
- (f) 나노여과 단계; 및
- (g) 단계 (a), (b) 및/또는 (c) 이전의 한외여과 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

상기 EPO는 인간 재조합 EPO인 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 EPO는 CHO 세포에서 생산된 인간 재조합 EPO인 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항의 방법에 의해 정제된 당화된 EPO 아형의 제조물.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 EPO는 인간 재조합 EPO인 제조물.

청구항 28

청구항 26 또는 청구항 27에 있어서,

비-0-당화된 EPO 아형이 실질적으로 없는 제조물.

청구항 29

청구항 27 내지 청구항 29 중 어느 한 항의 EPO 제조물을 포함하는 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 에리트르포이에틴(EPO), 특히 매우 정제된 형태의 정의된 조성의 당형태(glycoform), 즉 높은 양의 0-당화된 EPO 아형(isoform)을 갖는 재조합 인간 EPO(rhEPO)의 생산 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 특정한 조합의 크로마토그래피 단계를 이용함으로써 달성된다.

배경기술

[0002] 에리트르포이에틴은 적혈구계 전구 세포(erythroid progenitor cell)의 증식 및 분화와 순환하는 적혈구의 생리학 적 레벨의 유지를 조절하는 주된 호르몬이다. 태아에서, EPO는 1차적으로 간에서 생산되며, 출생 후 그 생산의 약 90%는 신장으로 변경된다. 만성 또는 급성 신부전으로 인해 EPO 레벨이 떨어지면, 빈혈의 발생을 방지하기 위하여 외부에서 EPO를 투여해야만 한다. EPO 유전자의 발견과 설치류 세포에서의 그의 발현으로 인하여 치료학적으로 활성형인 인간 에리트르포이에틴이 이용가능하게 되었다. 자연형 인간 에리트르포이에틴은 7번 염색체의 7q11-q22 상의 유전자에 의해 코딩된다(Law et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986), 6920-6924). 재조합 인간 EPO는 FDA가 만성 신부전과 연관되는 빈혈의 치료 용도로 승인한 1989년에 시장에 나왔다. 약으로 사용되는 다른 재조합 당단백질의 경우와 마찬가지로, EPO의 당화 패턴은 당단백질의 생체이용성, 생체활성, 면역원 특성에 현저한 영향을 미친다. rhEPO의 생산에 있어서, 중국 햄스터 난소(CHO) 및 어린 햄스터 신장(BHK-21) 숙주 세포가 발현 시스템으로서 중요한 역할을 하며, 따라서 철저히 연구되어 왔다(Sasaki et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 12059-12076; Takeuchi et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 3657-3663; Nimtz et al., Eur. J. Biochem. 213 (1993), 39-56; Tsuda et al., Biochemistry 27 (1988), 5646-5654). 이들 세포주가 인간 당형태와 가장 많이 닮은 당형태를 생산한다는 것은 잘 확립되어 있다. 또한, 탄수화물이 당단백질의 표적화 및 제거(clearance)에 중요한 역할을 한다는 것도 잘 알려져 있다(Drickamer et al., Annu. Rev. Cell. Biol. 9 (1003), 237-264; Helenius et al., Science 291 (2001), 2364-2369). 최근, 아르네스피[®](ARANESPI[®])라고 불리는 2개의 추가적인 N-당화 부위를 갖는 신규한 형태의 에리트르포이에틴이 EMEA 및 FDA에 의해 승인되었다.

[0003] 인간 EPO 유전자는 27개 아미노산의 신호 펩티드 및 166개 아미노산의 단백질을 코딩하며, 분자량은 18,369 달톤으로 계산된다. 성숙한 단백질은 보통 N-말단의 1개 아미노산이 결실되어 165개 아미노산의 길이이다. 상기 신호 서열은 상기 펩티드가 올바른 당화에 관여하는 세포 구획(compartment)으로 향하도록 하여, 3개의 N- 및 0-글리칸을 갖는 성숙한 단백질이 되도록 한다. 총 분자량의 약 40%를 차지하는 상기 당 모이어티(moiety)는 생체내에서 EPO의 완전한 생물학적 활성에 필수적이다. 몇 가지 연구는, 비록 시험관내 활성, 즉 수용체에 대한 결합은 당화되지 않거나 부분적으로 당화된 형태에서 가장 높지만, 말단 시알산 잔기의 수가 생체내 반감기에 긍정적인 영향을 준다는 것을 보여주었다(Takeuchi and Kobata, Glycobiology 1 (1991), 337-346). 시알산화(sialylation)의 정도는 반감기에 직접적으로 비례하는데, 시알산이 적은 아형은 생명체로부터 훨씬 빨리 제거되고, 따라서 낮은 활성을 보인다. 이와 관련하여, 러쉬 등(Rush et al., Anal. Chem. 67 (1995), 1442-1452)은 에리트르포이에틴의 시알산 잔기의 0-아세틸화와 순환 시간의 증가에 대한 그의 효과에 대해 개시하였는데, 시알산 잔기의 0-아세틸화 정도가 높으면 간에서의 제거를 감소시킴으로써 순환 시간을 증가시킨다는 것을 보여주었다.

[0004] 전형적으로, 포유동물 세포, 특히 CHO 세포에서의 재조합 발현에 의해 얻어지는 EPO 제조물(preparation)은 0-글리칸이 없는 EPO 아형을 50%까지 함유하며, 따라서 분자당 2개의 추가적인 시알산 잔기를 위한 잠재력을 상실한다. 따라서, 이러한 결합, 즉 비-0-당화된 아형이 실질적으로 없는 EPO 제조물과 이의 제조 방법을 제공하는 것이 바람직할 것이다.

[0005] 과학 및 특허 문헌에 공지된 EPO의 분리/정제 방법은 상이한 크로마토그래피 단계를 포함한다. 가장 흔히 사용되는 것은 음이온 교환 크로마토그래피(AEX)와 역상(reverse phase) HPLC(RP-HPLC)이다. 또한, 다른 크로마토그래피 방법, 예를 들면 히드록시아파타이트(hydroxyapatite), 소수성 상호작용(HIC, hydrophobic interaction), 양이온 교환(CEX, cation exchange), 친화(즉, 면역친화 또는 염료 리간드) 및 크기 배제(겔 여과) 크로마토그래피(SEC, size exclusion chromatography)도 사용된다. 또한, 농축, 투석여과(diafiltration), 한외여과(ultrafiltration), 투석, 에탄올, 염 등을 이용한 침전과 같은 일부 중간 단계는

공통이다.

- [0006] EP 205 564는 양이온 교환 크로마토그래피 방법과 이후의 RP-HPLC를 이용한 EPO의 정제에 대해 개시한다.
- [0007] EP 228 452 및 US4,667,016은 음이온 교환기와 이후의 RP 크로마토그래피 및 겔 크로마토그래피에 의한 EPO의 정제에 대해 개시한다.
- [0008] EP 428 267은 RP 크로마토그래피 후에 추가로 음이온 교환기를 이용함으로써 (특히 산성의) 아형을 분리하는 EP 228 452에 따른 방법의 개선에 대해 개시한다.
- [0009] EP 1 394 179는 염료 친화 크로마토그래피, HIC, 히드록시아파타이트, RP-HPLC 및 음이온 교환기를 포함하는 정제 방법에 대해 개시한다.
- [0010] EP 1 428 878은 포획 단계(capture step)로서 제1 음이온 교환 크로마토그래피 단계 및 선택적인 산 세척 단계, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 및 제2 음이온 교환 크로마토그래피 단계와 산 세척 단계를 이용하는 고-시알산화된 EPO 아형의 정제 방법에 대해 개시한다.
- [0011] WO99/28346은 탄수화물 구조 내의 N-아세틸-락토사민 단위 및/또는 테트라-안테나성(tetra-antennary) 분지의 정도가 높은 EPO의 정제에 대해 개시한다. 상기 정제 단계는 세포 배양 상등액으로부터 시작하며, 친화 크로마토그래피에 의한 포획, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 히드록시아파타이트 및 역상 크로마토그래피에 의한 정제를 포함한다.
- [0012] WO03/045996은 세포 배양 배지로부터 rhEPO를 회수 및 정제하는 방법에 대해 개시하며, 그 중에서도 음이온 교환 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피의 단계를 포함한다.
- [0013] WO03/080852는 적어도 염료 친화 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하고, 선택적으로는 추가로 겔 여과 크로마토그래피를 포함하는 EPO의 생산 방법에 대해 개시한다.
- [0014] 미야케 등(Miyake et al., J. Biol. Chem 252 (1977), 5558-5564)은 이온 교환 크로마토그래피, 에탄올 침전, 겔 여과 및 흡착 크로마토그래피를 포함하는 7 단계 절차에 의한 소변 EPO의 정제에 대해 개시한다.
- [0015] 브로우디 등(Broudy et al., Arch. Biochem. Biophys. 265 (1988), 329-336)은 형질감염된(transfected) BHK 세포주를 사용하여 Affi-Gel Blue 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피에 의해 EPO를 정제하였다.
- [0016] 고카나 등(Gokana et al., J. Chromatography 791 (1997), 109-118)은 DEAE 크로마토그래피와 이후의 전술한 면역친화에 의한 EPO의 정제에 의한 재조합 인간 EPO 아형의 분리에 대해 개시한다. 상기 EPO 아형의 분리는 아형들의 상이한 pI에 기반한다.
- [0017] 고토 등(Goto et al., Bio/Technology 6 (1988), 67-71)은 면역친화, 겔 크로마토그래피 및 히드록시아파타이트에 의한 EPO의 정제에 대해 개시한다.
- [0018] 호케 등(Hokke et al., Eur. J. Biochem.228 (1995), 981-1008)은 N-글리칸 및 O-글리칸의 별도 분석을 위한 PNGase 처리를 포함하는 EPO의 글리칸 분석에 대해 개시한다.
- [0019] 키시노 및 미야자키(Kishino and Miyazaki, J. Chromatography 699 (1997), 371-381)는 최종(terminal) RP 크로마토그래피를 이용하여 소변으로부터 EPO를 정제하는 단계를 포함하는 당단백질의 분석 방법을 리뷰한다.
- [0020] 님츠 등(Nimtz et al., Eur. J. Biochem. 213 (1993), 39-56)은 PNGase F 소화를 포함하는 EPO 당화의 분석에 대해 개시하며, 어린 햄스터 신장(BHK) 세포 내에서 발현 및 얻어진 재조합 인간 EPO는 단지 60%만 O-당화됨을 보여준다.
- [0021] 켈레 등(Quelle et al., Blood 74 (1989), 652-657)은 곤충 세포로부터의 EPO의 정제에 대해 개시하며, 상기 정제 방법은 음이온 교환 크로마토그래피 및 RP-HPLC와 이후의 렉틴 친화 크로마토그래피를 포함한다.
- [0022] 사사키 등(Sasaki et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 12059-12076) 및 사사키 등(Sasaki et al., Biochemistry 27 (1988), 8618-8626)은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 내에서 발현 및 얻어진 재조합 인간 EPO의 탄수화물 구조의 분석에 대해 개시한다. EPO는 다른 방법들 중에서 RP-HPLC에 의해 정제되었다.
- [0023] 스킨벨 등(Skibell et al., Blood 98 (2001), 3626-3634)은 재조합 EPO와 비교하여 인간 혈청 유래 EPO의 글리

칸 구조의 조사에 대해 개시하며, O-당화가 혈액을 순환하는 EPO에서도 일어난다는 것을 나타낸다.

- [0024] 시트코우스키 및 도나휴(Sytkowski and Donahue, J. Biol. Chem. 262 (1987), 1161-1166)는 단일클론 항체 (mAb)의 도움으로 (중화(neutralization)에 의해 간접적으로) 결정된 EPO 수용체 결합 부위를 결정하였다. 표 2는 EPO 아미노산 서열 111-129에 대한 mAb가 가장 강력한 중화 효과를 나타낸다는 것을 보여주는데, 이는 Ser126에 위치한 O-글리칸이 수용체 결합에 관여할수 있음을 나타낸다.
- [0025] 따라서, EPO의 당화의 중요성에 대해서는 알려져 있지만, 전술한 문헌들 중 어느 것도 (i) 비 O-당화된 아형이 실질적으로 없고, (ii) 약학적 등급으로 정제되고, (iii) 바이러스 오염이 없고, 및 (iv) 대규모 생산에 적용할 수 있는 EPO 제조물의 제공 방법에 대해서는 개시하고 있지 않다. 이러한 기술적 문제는 청구항에서 특정되는 것과 같은 구현예에 의해 해소되며, 아래에 추가로 개시된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0026] 본 발명은 제조함 세포 유래의 세포 배양 배지로부터 인간 에리트로포이에틴(rhEPO)의 회수 및 정제 방법을 제공하며, 상기 방법은 역상(RP) 크로마토그래피 단계, 바람직하게는 RP-HPLC 및 이후의 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 단계를 포함하며, 상기 RP-HPLC 단계는 바람직하게는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 단계 이후에 수행된다.
- [0027] 본 발명의 방법에 따라 정제된 제조함 인간 에리트로포이에틴(rhEPO)에 대해 몇 가지 분석 절차를 수행하여 상기 EPO의 N- 및 O-당화 상태의 특성을 분석한다. 전술한 [배경기술] 부분에서 개시한 바와 같이, EPO는 S126에 하나의 O-당화 부위와, N24, N38 및 N83에 3개의 N-당화 부위를 갖는다. 본 발명의 EPO 제조물의 전체적인 당화 패턴은 국제 BRP 표준 및 시판되는 참조 제품에서 발견되는 것과 상당히 유사한 것으로 나타났다. 그러나, O-결합된 올리고사카라이드의 경우, BRP 표준과 비교하여 비-당화된 형태의 EPO의 상대적인 양은, 존재한다 하더라도, 현저히 낮은 것으로 관찰되었다. 이로부터 본 발명은 다른 상업적인 제품과 비교하여 개선된 EPO를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0028] 이론에 의존하지 않더라도, 전체 O-당 사슬이 없다는 사실로 인하여 상기 HPLC 내에서 상기 O-탈당화된(Des-O) EPO 형태가 사실상 선별적으로 분리되는 기능을 할 것으로 여겨진다. N-글리칸의 경우, 차이가 확연하지는 않다. 여기서, 단지 가끔있는 안테나(antenna)가 결여되어 있으며, 있다고 하더라도, 전체 글리칸의 결여는 드물다. N-글리칸이 없는 아형(글리칸 당 4개의 시알산이 적음)은 이미 음이온 교환 크로마토그래피(AEX) 단계에서 매우 고갈되었을 것이다. O-사슬이 결여된 경우, 보통 당 사슬에 의해 가려지는 소수성 패치(대략 아미노산 121-130)가 노출된다. 사실, O-당화 부위를 보다 면밀히 살펴보면, 세린126을 둘러싸는 소수성 아미노산의 조밀한 축적이 포착될 수 있다. 4개의 알라닌이 상기 세린126을 직접 둘러싸고 있고, 3개의 프롤린(121, 122, 129)이 두드러진 소수성 영역을 정의한다. 아울러, 루이신130도 소수성이며, 이러한 효과에 기여한다. EPO에서의 상기 추가적인 소수성 부위는 HPLC 칼럼의 C4 매트릭스에 대한 전체적인 결합력을 향상시킨다. 따라서, 상기 Des-O 형태는 시간적으로 나중의 시점에서 용출된다.
- [0029] 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, EPO를 약 물질(drug substance)로서 적합한 정제된 형태로 정제하기 위하여 5가지 칼럼 크로마토그래피 방법이 제공되며, 상기 방법은
- [0030] (a) 상기 EPO 함유 용액을 포획 및 농축하고 잠재적인 오염물의 주된 감소를 제공하기 위한 염료 친화 크로마토그래피;
- [0031] (b) EPO의 산성 아형을 인리치(enrich)하고, 추가로 오염물(예컨대, DNA, HCP)을 제거 및 상기 첫 번째 칼럼으로부터 침출될 수 있는 임의의 염료 리간드를 제거하기 위한 음이온 교환 크로마토그래피;
- [0032] (c) Ser126 잔기에서 당화되지 않은 EPO 분자를 제거하고 오염물을 제거하기 위한 조건 하의 RP-HPLC;
- [0033] (d) RP-HPLC 용매 및 응집된 종을 제거하고, 버퍼를 교환하며, EPO 분획을 농축하기 위한 양이온 교환 크로마토그래피; 및
- [0034] (e) 임의의 가능한 잔류 응집물 및 다른 오염물을 제거하기 위한 최종 크로마토그래피 단계로서 도입되는 크기 배제 크로마토그래피.

- [0035] 아울러, 상기 EPO 제조 방법에서는 2가지 특이적인 바이러스 제거/불활성화 단계가 포함된다. 첫 번째로, 상기 RP-HPLC 단계 후, 상기 용출물을 산성의 아세트오니트릴:물 + 0.1%(v/v) TFA 혼합물 내에서 22±3°C에서 60 내지 180분 동안 유지한다. 두 번째로, 상기 약 물질의 바이러스 안정성을 증가시키기 위하여 최종 크로마토그래피 단계 후에 나노여과 단계가 포함된다. 아울러, 상기 음이온 교환 크로마토그래피도 바이러스의 제거를 위한 효과적인 단계인 것으로 나타났다. 결과물인 EPO 약 물질은, 예를 들면 연동 펌프를 이용하여 250 ml 또는 30 ml 부피의 벌크(bulk) 약 물질 저장 용기 내로 분배될 수 있고, -70°C 이하에서 보관될 수 있다.
- [0036] 따라서, 본 발명의 방법은 EPO의 프로필-지향성 생산과 높은 품질의 매우 균일한 제품을 제공한다. 아울러, 본 발명은 높은 순도와 원하는 프로필의 O-당화된 EPO 아형을 갖는 고함량의 생물학적으로 활성인 EPO를 대규모로 제조할 수 있게 한다.
- [0037] 상기 EPO의 순도는 HPLC 및 겔 전기영동에 의해 측정될 때 총 단백질의 적어도 99%를 초과하는, 유리하게는 총 단백질의 99.9%를 초과하는 순도에 도달할 만큼 높다. 아울러, 바이러스 등에 의한 오염의 위험과, 이로 인한 제품의 임상적 안정성은 감염의 위험성을 낮춤으로써 개선된다. 이와 관련하여, EPO 샘플을 용출 및 보관하기 위해 상기 정제 방법에서 다음 단계에 앞서서 RP-HPLC 및 유기용매를 사용하는 유리한 부수 효과는, 그렇지 않다면 예를 들면 소수성 상호작용 또는 이온 교환 크로마토그래피에서 사용되는 다른 용매 내에서 살아있는 채로 남아 있을 수 있는 바이러스를 불활성화하는데 있다.
- [0038] 이와 관련하여, 본 기술분야의 숙련자는 본 발명의 중요한 한 특성은 RP-HPLC 및 이후의 CEX 크로마토그래피 단계의 수행으로 구성되며, 임의의 다른 크로마토그래피 단계는 변경되거나 완전히 생략될 수 있다는 점을 인지할 것이다. 또한, 이것은, 본 발명의 방법에 포함되는 것이 바람직하지만, 상이한 정제 단계에 의해 교체되거나, 적용되는 EPO 샘플에 따라 생략될 수 있는 AEX 단계, 및/또는 예를 들면 O-당화된 EPO 제조물이지만 이형의 (heterologous) 또는 저-시알산화된 것을 제공하는 것이 바람직한 경우에도 적용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 방법에 따라 단리된 EPO의 O-당화가 BRP 표준보다 더 완전하다는 사실은 상기 EPO 제조물의 반감기가 상당히 개선될 수 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 EPO 제조물의 생체내 반감기는 지금까지 상업적으로 입수가능한 재조합 EPO 제품보다 개선되지는 않더라도 적어도 유사할 것이 신중히 예상된다. 이것은 또한 그 외의 약동학적 및 약역학적 특성은 시판되는 제품의 것과 유사할 것임을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 EPO는 인간의 의료에 사용하기에 특히 적합하다.

과제의 해결 수단

- [0040] 본 발명은, 존재한다 하더라도, 단지 미량의 비-O-당화된 아형만을 갖고 실질적으로 응집물이 없는 개선된 EPO 제제물의 단리 및 정제 방법을 제공한다. 상기 목적은 적절한 조건 하에 역상(RP)-고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 이후의 양이온 교환 크로마토그래피(CEX) 단계를 적용하여 비-O-당화된 EPO 아형의 함량을 줄임으로써 달성된다. 보다 구체적으로, 본 발명은 복잡한 단백질 혼합물로부터 당화된 에리트로포이에틴(EPO) 아형의 정제 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 역상(RP) 크로마토그래피 단계에 의해 분리되는 음이온 교환(AEX) 크로마토그래피 단계 및 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 단계를 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 사용된 것과 같은 "아형"이란 용어는 동일한 아미노산 서열을 갖지만, 예를 들면 등전점 초점화(IEF, isoelectric focussing) 겔에 의해 밝혀지는 것과 같은 구별된 등전점을 갖거나, 예를 들면 모세관 구역 전기영동(CZE, capillary zone electrophoresis)에 의해 밝혀지는 것과 같은 구별된 수의 전하를 갖는 당단백질을 함유하는 당단백질 제조물/분획을 나타낸다. 이러한 차이는 당화 패턴에서의 이질성(heterogeneity)을 반영한다. 개별 EPO 분자는 부착된 당화기, 시알산기 및 아세틸기의 정도, 복잡성, 성질, 안테나성(antennarity) 및 순서에 관해 상이할 수 있다. 심지어 포스페이트 및 설페이트와 같은 전하를 갖는 비유기기도 특정 아형의 본성에 기여할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 당단백질의 아형은 그 구별되는 등전점 및 동일한 아미노산 서열에 의해 정의되며, 따라서 각각의 아형은 실제로 엄격한 화학적 의미에서는 다수의 상이한 EPO 분자를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 방법에 따르면, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 바람직하게는 EPO 아형, 특히 고-시알산화된 산성 EPO 아형을 선별하기 위해 사용된다: 도 1 참조. 본 발명에 따르면, EPO의 "산성 아형"은 당화기 및 바람직하게는 시알산기의 정도 또는 함량이 높고, 따라서 낮은 (산성) pI를 갖는 것으로 보이는 아형을 포함한다. 재조합 인간 EPO는, 세포 배양 상등액으로부터 IEF에 의해 분석될 때, pI 3-9 범위에 걸쳐서 최대 14가지 상이한 아형을 갖는 넓은 등전점(pI) 아형 프로필을 보여준다(Gokana et al., J. Chromatogr. 791 (1997), 109-118).

상기 EPO 아형은 주로 다양한 당화기 성분과 다수의 음전하를 띤 말단 시알산 잔기로 인해 발생한다. 시알산 잔기가 더 많고 따라서 보다 산성인 pI를 갖는 EPO 아형은 더 높은 생물학적 활성과 치료학적 가치가 있는 것으로 알려져 있는데, 그 이유는 당구조 상의 말단 시알산 잔기는 EPO가 아시알로-수용체 경로를 통해 생체내에서 빠르게 제거되는 것을 방지하기 때문이다.

[0043] 상기 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 디에틸아미노에틸기(DEAE), 4차 암미노에틸기(QAE), 4차 암노늄기(Q), 디메틸아미노에틸기(DMAE) 및/또는 트리메틸아미노에틸기(TMAE)를 작용기로 함유하는 음이온 교환 수지 또는 막을 이용하여 수행될 수 있다. 예시적인 음이온 교환 물질은 DOW Chemical Company로부터 입수가능한 Dowex.RTM. 1, BioRad Laboratories로부터 입수가능한 AG.RTM.(예컨대, 타입 1, 2, 4), Bio-Rex.RTM. 5, DEAE Bio-Gel 1, Macro-Prep.RTM. DEAE, Eichrom Technologies Inc.로부터 입수가능한 음이온 교환 수지 타입 1, GE Healthcare로부터 입수가능한 Source Q, ANX Sepharose 4, DEAE Sepharose(예컨대, 타입 CL-6B, FF), Q Sepharose, Capto Q, Capto S, PerkinElmer로부터 입수가능한 AX-300, Shoko America Inc.로부터 입수가능한 Asahipak ES-502C, AXpak WA(예컨대, 타입 624, G), IEC DEAE, Tosoh Bioscience GmbH로부터 입수가능한 Amberlite.RTM. IRA-96, Toyopearl.RTM. DEAE, TSKgel DEAE, Pall Corporation으로부터 입수가능한 Mustang Q 이다. 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 Q-세파로오즈를 이용하여 수행된다; 실시예 참조. 전술한 바와 같이, 저-시알산화된 염기성 EPO 아형의 고갈 및 고-시알산화된 산성 EPO 아형의 선별은 각각 약 7.0의 pH에서 20 mM Tris-HCl을 포함하는 버퍼 내에서 0 내지 200 mM NaCl의 선형 염 구배를 이용하여 수행되는 것이 바람직하다.

[0044] 아울러, 본 발명의 방법에 따르면, 역상 크로마토그래피 단계는 0-당화된 EPO 아형을 선별하기 위해 사용된다. 실시예에 개시된 바와 같이, 이러한 EPO 아형은 유기용매의 선형 구배, 바람직하게는 물 내에서 약 0.1% TFA를 함유하는 0 내지 70% 아세토니트릴을 이용하여 용출될 수 있다. 아울러, 또는 다른 한편으로, 물 내에서 아세토니트릴 및 약 0.1% TFA를 함유하는 용매를 이용한 EPO의 등용매 용출이 사용된다. 역상(RP) 크로마토그래피를 수행하기 위한 수단 및 방법은 본 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다; 전술한 [배경기술] 부분에서 인용된 선행문헌 참조. 바람직하게는, 상기 RP 크로마토그래피 단계는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 포함한다. 전형적으로, 상기 RP-HPLC는 작용기로서 메틸-, 부틸-, 페닐-, 프로필- 및/또는 옥틸기를 함유하는 수지를 이용하여 수행된다. 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 RP-HPLC는 상업적으로 입수가능한 C4 역상 크로마토그래피 물질을 이용하여 수행된다. 예시적인 역상 물질은 Grace Davison으로부터 입수가능한 Vydac 214TPB1015, C4; DAISO Fine Chem. GmbH로부터 입수가능한 Daisopak SP-300-15-C4-BIO; YMC Europe GmbH로부터 입수가능한 YMC Gel Butyl Spharisch C4, 15 μ, 300A; Phenomenex로부터 입수가능한 Jupiter 15 μ, C4, 300A이다.

[0045] 가장 바람직하게는, 실리카 겔 입자로 이루어지고, 그 표면에 C4-알킬 사슬을 운반하는 Vydac C4(Vydac)가 사용된다. 단백질질 불순물로부터의 EPO의 분리는 소수성 상호작용 강도의 차이에 기반한다. 용출은 희석된 트리플루오로아세트산의 존재 하에 물 내에서 아세토니트릴 구배를 이용하여 수행된다. 보통, "EPO 피크" 부분은 분획화에 의해 잘려져야 한다. 예를 들면, EPO를 함유하는 9 또는 10개의 용출물 분획에서, 전형적으로 전체 EPO 피크의 40%까지를 구성할 수 있는 마지막 1 내지 4개 샘플은 버려야 하고, 남아있는 용출물 풀(pool)은 이후의 단계에서 추가로 정제된다; 도 2 참조.

[0046] 본 발명에 따르면, 조제용(preparative) RP-HPLC는 10 bar 이상의 고압(30-40 bar까지 조제용 규모 확대(scale up))에서 작은 비드(5-10 μm), 보통 실리카 겔을 이용하여 수행되며, 더 나은 분리를 도출한다. 바람직하게는, TFA를 이용하여 산성화된 상기 용매의 pH는 약 2이다. 낮은 아세토니트릴 농도(예컨대, 10% 또는 수수한 물) 및 증가하는 아세토니트릴 농도 구배에 AEX 용출물을 적용하면 상기 EPO 아형이 용출될 것이다.

[0047] 이와 관련하여, 본 발명의 방법에 따라 사용되는 것과 같은 RP-HPLC는 실질적으로 저압(또한 중간 압력 방법으로도 나타냄, < 10 bar, 보통 3-5 bar)에서 수행되는 보통의 RP 크로마토그래피(RP)와 상이한 것으로 관찰된다. 예를 들면, RP는 국제출원 W003/045996(RP-Source 30)에서 개시된 것과 같이 전형적으로 15 μ 비드 또는 30 μ 비드를 이용하여 수행된다. 아울러, HPLC와 마찬가지로 유기 용매가 이용될 수 있지만, W003/045996에 개시된 RP 단계는 이어서 샘플 내에서 0.24 M 암모늄 설페이트를 이용하여 암모늄 설페이트 침전을 시작하는데, 이것은 HPLC 용으로는 바람직하지 않지만 HIC(hydrophobic interaction chromatography) 용으로는 매우 적합하며, 이때 전형적으로 용출을 위하여 감소하는 염 구배가 적용된다. 따라서, 국제출원 W003/045996에 개시된 것과 같은 RP는 완전한 수성용매 시스템, 즉 pH 7의 Tris/HCl 버퍼 내에서 수행되는데, 그 이유는 지금까지 상기 유기용매를 신속하게 분리하고 상기 EPO 제조물 내에 응집체가 형성/끌리는 것(dragging)을 방지하기 위한 적절한 방법이 개시되어 있지 않았기 때문이다. 그러나, 유기용매를 이용한 HPLC

단계의 수행은, 예를 들면 RPC에서 사용되는 더 큰 비드 입자 및 덜 엄격한 분리 조건으로 인한 EPO 아형의 덜 효과적인 분리의 대가로서 이루어진 것이다. 어쨌든, RP-HPLC의 분리 성능은 RPC의 성능보다 뛰어나다.

[0048] 상기 정제 계획(scheme)의 효과를 위한 추가적인 중요한 인자는 HPLC 직후에 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)가 3번째 단계로 수행되는 것이다. 상기 단계는 적용 모드 측면에서 신규하다. RP 크로마토그래피 후, EPO는 신속하게 버퍼를 교환해야만 하는데, 그 이유는 EPO는 산성의 아세트오니트릴에서 안정하지 않기 때문에, 즉 시간의 경과와 온도의 증가에 따라 응집체가 점진적으로 형성되기 때문이다. 아울러, 이후의 최종 연마 단계(polishing step)에서 사용되는 겔 크로마토그래피에 있어서, 샘플 부피는 매우 작아야 하며, 즉 RP 풀 내의 EPO의 농도는 매우 증가되어야 한다. 반면에, 상기 RP-HPLC 풀은 Des-0-형태의 분리에 필요한 상대적으로 무난한(flat) 구배로 인해 다소 큰 부피를 갖는다. 본 발명에 따르면, 일반적인 것 하지만 매우 시간-소모적인 방법인 표준 한외/투석여과 단계를 이용하는 대신에 선별적인 물질(Macroprep S)을 이용한 CEX 크로마토그래피 단계가 개발되었다. 상기 CEX 크로마토그래피는 특히 높은 유속을 허용하고, 고농도에서 산성의 아세트오니트릴을 용인한다. 산성 환경에서 양전하를 띠는 사실로 인하여, EPO는 강한 결합제이고, 원하는 버퍼 내에서 작은 부피 및 고농도에서 매우 가파른 구배로 용출된다. 놀랍게도, 상기 CEX 크로마토그래피는 또한 아세트오니트릴 내에서 필연적으로 형성되는 EPO 응집물도 분리하게 되는데, 그 이유는 EPO 응집물은 용출되지 않고 칼럼 상에 남아 있고, 이어서 상기 재생물(regenerate) 내에서 CIP 용액으로 용출되는 것으로 판명되었기 때문이다. 따라서, 본 발명에 따르면, 상기 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 버퍼 교환, EPO의 농축 및 EPO 응집물의 제거를 위하여 RP 크로마토그래피, 특히 RP-HPLC 후에 사용된다; 도 1 참조.

[0049] 또한, 상이한 유형의 양이온 교환 물질이 BioRad Laboratories로부터 입수가 가능한 Bio-Rex.RTM.(예컨대, 타입 70), Chelex.RTM.(예컨대, 타입 100), Macro-Prep.RTM.(예컨대, 타입 CM, High S, 25 S), AG.RTM.(예컨대, 타입 50W, MP); CIPHERGEN으로부터 입수가 가능한 WCX 2, Dow Chemical Company로부터 입수가 가능한 Dowex.RTM. MAC-3, Pall Corporation으로부터 입수가 가능한 Mustang C 및 Mustang S, Whatman plc.로부터 입수가 가능한 Cellulose CM(예컨대, 타입 23, 52), hyper-D, PartiSphere, Tosoh Bioscience GmbH로부터 입수가 가능한 Amberlite.RTM. IRC(예컨대, 타입 76, 747, 748), Amberlite.RTM. GT 73, Toyopearl.RTM.(예컨대, 타입 SP, CM, 650M), BioChrom Labs로부터 입수가 가능한 CM 1500 및 CM 3000, GE Healthcare로부터 입수가 가능한 SP-Sepharose.TM., CM-Sepharose.TM., PerSeptive Biosystems로부터 입수가 가능한 다공성 수지, Shoko America Inc.로부터 입수가 가능한 Asahipak ES(예컨대, 타입 502C), CXpak P, IEC CM(예컨대, 타입 825, 2825, 5025, LG), IEC SP(예컨대, 타입 420N, 825), IEC QA(예컨대, 타입 LG, 825), Eichrom Technologies Inc.로부터 입수가 가능한 50W 양이온 교환 수지와 같은 다수의 회사로부터 상이한 상표명으로 이용가능하다. 바람직하게는, 상기 양이온 교환 물질은 Macro-Prep.RTM. High S 또는 25S, MacroCap SP, Toyopearl.RTM. SP 650M, Source S, SP Sepharose 또는 POLYCAT A와 같은 강한 양이온 교환 물질이다. 한 구현예에서, 상기 양이온 교환 물질은 설포프로필 양이온 교환 물질이다. 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 Macro-Prep High S를 이용하여 수행된다; 실시예 참조.

[0050] 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 전술한 크로마토그래피 단계는 포획 단계로서 친화 크로마토그래피 단계 뒤에 수행된다. 보통, 상기 친화 크로마토그래피 단계는 염료 크로마토그래피 수지, 예를 들면 상업적으로 입수가 가능한 블루-세파로오즈를 이용하여 수행된다; 실시예 참조. 바람직하게는, 본 발명의 방법에 있어서 상기 크로마토그래피 단계는 하기 순서로 수행된다:

- [0051] (a) 포획 단계로서 친화 크로마토그래피 단계;
- [0052] (b) 음이온 교환 크로마토그래피 단계;
- [0053] (c) 역상(RP) 크로마토그래피 단계; 및
- [0054] (d) 양이온 교환 크로마토그래피 단계; 도 1 및 실시예 참조.

[0055] 첫 번째 단계에서, 상기 염료 크로마토그래피는 주로 프로테아제에 의한 오염을 제거한다. Cibachron® 블루와 같은 블루 트리아진 염료가 상기 염료로서 사용되는 것이 바람직하다. 다른 트리아진 염료 또한 적합하다. 상기 염료 크로마토그래피를 위한 지지 물질은 핵심적이지는 않지만, 예컨대 세파로오즈, 바람직하게는 세파로오즈 6 패스트 플로우(Fast Flow)와 같은 폴리사카라이드에 기반한 지지 물질이 사용되는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 고-시알산화 및 0-당화된 EPO 아형의 인리치는 이후의 크로마토그래피 단계에서 수행된다; 도 1 참조.

[0056] 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 단계에서의 EPO의 용출은 계단 또는 구배

용출에 의해 수행된다. 본 명세서에서 교환가능하게 사용되는 "계단 용출(step elution)" 및 "계단 용출 방법"이란 용어는 물질로부터 결합된 화합물을 해리시키는 용출을 일으키는 물질의 농도가 직접적으로 한 값/레벨로부터 다음의 값/레벨로 즉시 높아지거나 낮아지는 방법을 나타낸다. 상기 "계단 용출"에 있어서, 예를 들면 pH, 이온 강도, 염의 농도, 유기 화합물의 농도 및/또는 크로마토그래피의 흐름과 같은 하나 이상의 조건이 첫 번째, 예컨대 출발 값으로부터 두 번째, 예컨대 최종 값으로 갑자기 변화된다. 이것은 상기 조건들이, 꾸준히 선형으로 또는 비선형으로 변화하는 것과 대조적으로, 증가하여, 즉 계단식으로 변화하는 것을 의미한다. 상기 "계단 용출 방법"에 있어서, 이온 강도 또는 유기 용매의 함량에서의 각각의 증가 후에 새로운 분획이 수집된다. 상기 분획은 각각 이온 강도 및 소수성에서의 상응하는 증가를 갖는 상기 이온 교환 물질로부터 회수된 화합물을 함유한다. 각각의 증가 후, 상기 조건들은 상기 용출 방법에서의 다음 단계가 수행될 때까지 유지된다. 전형적으로, 대규모 생산이 가능한 경우에 있어서, 구배 용출은 계단 또는 등용매 용출에 의해 대체된다.

[0057] 이와 관련하여, 본 발명의 방법에 따라 수행된 임의의 크로마토그래피 단계는 구배 또는 등용매 방식 중 하나로 수행될 수 있다; 리뷰를 위하여, 예컨대 셸링거 및 카르(Schellinger and Carr, J. Chromatography, 1109 (2006), 253-266) 참조. 특히, RP-HPLC 및 음이온 크로마토그래피(AEX) 단계에 있어서, 선형 구배를 등용매 용출로 교체하는 것이 예측된다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 구현예에서, 상기 RP 및/또는 AEX 단계는 등용매 용출에 의해 수행된다.

[0058] 본 발명의 방법의 추가적인 크로마토그래피 단계에서, 상기 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)로부터 얻어진 EPO 제조물은 잠재적인 다이머(dimer), 더 큰 응집물 및 공정과 연관된 불순물과 같은 원하지 않는 작은 분자를 제거하는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 연마되고, 또한 적절한 경우에 최종 형성을 위한 버퍼 교환을 수행한다. 전형적으로, 상기 크기 배제 크로마토그래피 단계는 슈퍼덱스(Superdex), 세파크릴(Sephacryl), 세파덱스(Sephadex), 세파로오즈(Sepharose), 프락토젤(Fractogel), 토요펠(Toyopearlo) 및 Bio-Gel로부터 선택되는 겔-여과 매질을 이용하여 수행된다.

[0059] 상기 CEX 크로마토그래피 후 얻어진 EPO 제조물의 더 높은 생성물 농도를 달성하기 위하여, 상기 용출물은 겔-여과(SEC) 전에 추가로 농축되는 것이 바람직하다. 이것은 보통 5-10 kDa UF 막을 이용한 한외여과 단계에 의해 수행되며, mL 당 대략 5 내지 20 mg EPO를 갖는 약 10배 농축된 UF-투석물을 도출하여 SEC 풀을 제공한다; 실시예 참조.

[0060] 잠재적인 바이러스 로딩을 제거하기 위하여, 본 발명의 방법에서는 추가적인 막다른(dead-end) 바이러스-여과 단계가 시행된다. 상기 여과는 15 nm만큼 작은 입자를 제거하기 위해 디자인된, 예컨대 Planova 15N(Asahi)과 같은 특수한 막을 이용하여 수행된다. 대안적인 막다른 나노여과 단위는 PALL Ultipor VF Grade DV20 또는 Millipore Viresolve NFP 카트리지 또는 캡슐이다. 특히, 작은 비-외피 바이러스(예컨대, 파르보바이러스)의 경우, 바이러스를 제거 또는 불활성화하기 위한 다른 수단은 거의 없다. 상기 평균 여과된 SEC-풀은 적절한 막을 갖는 막다른 필터를 통과하며, 상기 여과물은 최종적인 벌크 약 물질을 나타낸다. 다른 한편으로, 상기 나노여과는 상기 UF-농축 및 크기 배제 크로마토그래피 사이에 삽입될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 상기 하나 이상의 크로마토그래피 단계 이전에 한외여과 단계, 선택적으로는 나노여과 단계를 포함할 수 있으며, 후자는 최종 단계인 것이 바람직하다; 도 1 참조.

[0061] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0062] (a) 포획 단계로서 친화 크로마토그래피 단계;

[0063] (b) 음이온 교환 크로마토그래피 단계;

[0064] (c) 역상(RP) 크로마토그래피 단계;

[0065] (d) 양이온 교환 크로마토그래피 단계;

[0066] (e) 크기 배제 크로마토그래피 단계;

[0067] (f) 나노여과 단계; 및

[0068] (g) 단계 (a), (b) 및/또는 (c) 이전의 한외여과 단계.

[0069] 상이한 분획의 함량은 공정내 조절(in-process control)로서 SDS-PAGE에 의해 결정될 수 있으며, 선택된 분획은 적절하게 조합 또는 버려질 수 있다; 예컨대, 상기 RP-HPLC 단계로부터의 EPO 용출물의 조절의 경우, 도 2

참조.

- [0070] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 정제된 EPO는 인간 재조합 EPO이다. 따라서, 상기 EPO 분자는 숙주 세포에서 EPO를 코딩하는 유전자의 발현을 유도함으로써 제공되는 것이 바람직하다. "숙주 세포"는 그 계층 내에 활성형 EPO 유전자를 함유하는 동물 또는 인간 세포인 것으로 이해되며, 상기 EPO 유전자는 무혈청 배지에서 상기 세포를 배양하는 동안 전사 및 번역된다. 상기 EPO 유전자는 바람직하게는 조절 요소를 갖는 외인성(exogenous) 유전자로서 상기 숙주 세포 내로 도입될 수 있거나(예컨대, 유럽 특허 출원 EP-B 0 148 605 및 EP-B 0 209 참조), 활성형 내인성(endogenous) 유전자로서 상기 숙주 세포 내에 이미 존재할 수 있거나, 내인성 비활성형 유전자로서 활성화될 수 있다. 이러한 내인성 유전자의 활성화는, 예를 들면 특정한 조절 인자를 상동성 재조합에 의해 계층 내로 도입함으로써 달성될 수 있다. 국제 출원 W091/09955 및 W093/09222는 이러한 방법의 예를 개시한다.
- [0071] 보통 포유동물 세포가 숙주 세포로 사용된다. 외인성 인간 EPO 유전자가 도입된다면, 예컨대 CHO 또는 BHK 세포가 숙주 세포로 사용될 수 있다. 내인성 EPO 유전자가 발현에 사용된다면, 신장, 간 또는 림프 세포와 같은 인간 세포가 사용되는 것이 적절하다. 바람직하게는, 상기 EPO는 CHO 세포에서 생산되는 인간 재조합 EPO이다. 상기 CHO에서의 EPO의 재조합 생산은 보통 배양 배지 내에 우태아혈청과 선택적으로는 소 인슐린을 첨가함으로써 수행된다. 그 결과, 이러한 방식으로 생산된 EPO 제조물은, 정제 후라도 적어도 미량의 이러한 동물 유래 물질을 함유할 수 있으므로, 바이러스 또는 TSE-유도제로의 감염에 대한 위험성이 증가한다. EPO 유전자를 함유하는 재조합 CHO 세포의 무혈청 발효는 본 기술분야의 최신 방법을 이용함으로써 수행될 수 있음이 알려져 있다; 예컨대, 그 개시된 내용이 인용에 의해 본 발명에 포함되는 유럽 특허 출원 EP 1 394 179, EP 0 513 738 및 EP 0 267 678 및 일반적인 형태로는 Kawamoto et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, Kowar and Franek., Methods in Enzymology 421 (1986), 277-292, Bavister, Expcology 271 (1981), 45-51, 유럽 특허 출원 EP 0 248 656, EP 0 481 791, EP 0 307 247, EP 0 343 635 및 국제 출원 W088/00967 참조). 유사한 활성을 갖고 EPO 생산 숙주 세포를 배양한 후 생산되는 EPO의 유도체 및 절편 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 정제된 형태로 생산될 수 있다. 상기 인간 EPO의 DNA 및 단백질 서열은, 예를 들면 유럽 특허 출원 EP 0 205 564 및 EP 0 209 539에 개시되어 있다.
- [0072] EPO를 생산하기 위하여, 상기 EPO 유전자를 함유하는 숙주 세포는 저부피 배양액 내에서 계대배양함으로써 천연 소스(source) 유래의 단백질이 없는 배지에 적용될 수 있다. 상기 적용된 세포는 선택적으로 동결보존되고, 확립된 세포 은행으로부터 필요시 입수하며, 예컨대 유럽 특허 출원 EP 1 394 179에 개시되어 있는 것과 같은 무혈청 배지에서 확장된다. 정제를 위하여, 상기 숙주 세포의 무세포 배양 상등액은 단리되고, 여과 후 본 발명에 따른 정제 공정을 거치는 것이 바람직하다. 상기 정제 공정을 수행하기 이전에, 필요시 혼탁물(turbidity)이나 찌꺼기(debris)를 분리하거나 및/또는 한외여과에 의한 농축을 수행하기 위하여 추가적인 여과를 수행할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 추가적인 측면은 전술한 바와 같이, 바람직하게는 실시예에서 예시된 것과 같이 수행된 본 발명의 방법에 의해 정제된 당화된 EPO 아형의 제조물에 관한 것이다. 전형적으로, 상기 EPO는 인간 재조합 EPO이다. 유리하게는, 상기 본 발명의 EPO 제조물은 비-O-당화된 EPO 아형이 실질적으로 없다. "비-O-당화된 EPO 아형이 실질적으로 없는"이란 용어는 본 발명의 EPO 제조물이 전형적으로 10% 이하의 비-O-당화된 EPO 아형, 바람직하게는 5% 이하의 비-O-당화된 EPO 아형, 유리하게는 비-O-당화된 EPO 아형을 함유하는 것을 의미한다. 달리 말하면, 본 발명의 EPO 제조물은, 본 발명의 EPO 제조물이 본 기술분야에 알려진 방법에 따라 정제된 EPO 제조물로부터 구별될 수 있는 방식으로, 전형적으로 적어도 90%의 O-당화된 EPO 아형, 바람직하게는 적어도 95%, 가장 바람직하게는 적어도 99%의 O-당화된 EPO 아형을 함유한다; 예컨대, 도 2 및 도 3에 예시된 것과 같은 SDS-PAGE 참조. 상기 당화 상태를 특징짓는 주된 분석 기술은 MALDI/TOF-MS 및 HPAEC-PAD이다. 샘플을 특징짓기 위한 다른 기술은 SDS-PAGE, IEF, UV, CD, 형광 분광기 및 NMR을 포함한다. 예를 들면, EPO 제조물의 O-당화의 결정은 Eur. Pharm.의 논문에 따라 RP-HPLC C₄-phase를 통해 펩티드 혼합물을 분리한 후 상기 EPO 분자의 트립신 절단(tryptic) 펩티드를 MALDI/TOF-MS 분석함으로써 수행될 수 있다. Ser-126 모이어티를 함유하는 비-당화된 트립신절단 펩티드는 1,466.6의 매스(mass)를 갖지만, GalNAc 모이어티(Hex-NAc)를 갖는 대응하는 펩티드는 203의 매스 증가(m/z=1,669)를 가져야 하고, Gal-GalNAc(Hex-NAc-Hex) 유도체는 365의 매스 증가를 가져서 m/z = 1,830의 매스에 해당해야 한다. MALDI/TOF-MS 분석을 이용하여 본 발명의 범위 내에서 수행된 대응하는 실험에서는 폴리펩티드-N 글리코시다아제(PNGase)에 의한 N-글리칸 방출 후의 EPO 제조물의 SDS-PAGE 패턴이, 표준 EPO 제조물에서는 약 15%의 비-O-당화된 아형이 존재하는 것과 대조적으로, 실질적으로 단지 O-당화된 형태의 EPO 단백질만이 검출될 수 있다는 것을 확증하였다.

- [0074] 이와 관련하여, 특정 EPO 활성을 위한 최소값은 전형적으로 밀리그램(당단백질) 당 100,000 IU이다. 한 구현예에서, 본 발명의 EPO 제조물은 > 110,000 IU의 활성을 가지며, 이것은 고-시알산화된 EPO 아형의 인리치로 인해 달성될 수 있다.
- [0075] 따라서, 본 발명의 EPO 제조물은 치료학적 적용에 특히 적합하다. 따라서, 본 발명은 또한 전술한 바와 같은 본 발명의 EPO 제조물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명은 또한 약학적 조성물의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 전술한 바와 같이 당-아형 혼합물의 형태로 EPO를 제조 및 단리하는 단계; 및 이렇게 제조 및 단리된 EPO 혼합물을 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제공하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명은 안정화제로서 트리스-(히드록시메틸)-아미노메탄을 함유하는 EPO 제조물의 안정한 약학적 제형에 관한 것으로서, 상기 제형은 아미노산 또는 인간 혈청 알부민을 함유하지 않으며, 가장 바람직하게는 pH 버퍼화제인 나트륨 포스페이트 버퍼, 안정화제인 10 내지 200 mM 양의 트리스-(히드록시메틸)-아미노메탄 및/또는 20-150 mM의 양의 NaCl 및 약학적 용량의 정제된 EPO를 포함한다. 본 발명의 EPO 제형의 추가적인 구현예에 대해서는 그 개시된 내용이 인용에 의해 본 발명에 포함되는 유럽 특허 출원 EP 1 537 876을 참조. 본 발명의 약학적 조성물은 적어도 멸균 및 발열원-부재인 것으로 특징된다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, "약학적 조성물"은 인간 및 수의학적 용도를 위한 제형을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물의 제조 방법은, 예를 들면 그 개시된 내용이 인용에 의해 본 발명에 포함되는 Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 및 최신 버전의 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Science in Philadelphia, ISBN 0-683-306472에 개시된 것과 같이 본 기술분야의 숙련자의 범위 내이다.
- [0076] 이들 및 다른 구현예가 본 발명의 상세한 설명 및 실시예에 의해 개시 및 포괄된다. 본 발명에 따라 도입될 수 있는 물질, 방법, 용도 및 화합물의 임의의 하나에 관한 추가적인 문헌은 공공 도서관 및 데이터베이스로부터 검색될 수 있다. 예를 들면, 미국 국립 생명공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)에 의해 운영되는 공공 데이터베이스인 "Medline" 및/또는 미국 국립보건원(National Institutes of Health)에 있는 국립 의학도서관(National Library of Medicine)이 사용될 수 있다. 유럽 분자생물학 실험실(European Molecular Biology Laboratory, EMBL)의 일부인 유럽 생물정보학 연구소(European Bioinformatics Institute, EBI)와 같은 추가적인 데이터베이스 및 웹 주소는 본 기술분야의 숙련자에게 알려져 있으며, 인터넷 검색 엔진을 이용하여 입수될 수도 있다. 소급 검색 및 현재의 자각(awareness)에 유용한 생명공학에서의 특허 정보 및 특허 정보의 해당 공급원의 조사에 대한 개관(overview)은 Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-365에 제공된다.
- [0077] 전술한 내용은 본 발명을 일반적으로 개시하고 있다. 달리 언급하지 않는 한, 본 발명에서 사용된 것과 같은 용어는 옥스퍼드 생화학 및 분자생물학 사전(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revised 2000 and reprinted 2003, ISBN 0 19 850673 2)에서 제공되는 것과 같은 정의를 사용한다. 본 명세서의 문맥에 걸쳐서 몇 가지 문헌이 인용된다. 모든 인용된 문헌들의 내용(본 명세서에 걸쳐서 인용된 것과 같은 참고문헌, 등록된 특허, 공개된 특허 출원 및 제조사의 명세서, 지침 등을 포함함)은 이로써 인용에 의해 본 발명에 포함된다; 그러나, 인용된 모든 문헌이 실제로 본 발명의 선행문헌인 것을 인정하는 것은 아니다.
- [0078] 보다 완전한 이해는 단지 예시적인 목적을 위한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하기 위한 의도가 아닌 본 발명에서 제공되는 하기 특정 실시예를 인용함으로써 얻어질 수 있다. 특히, 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0079] 본 발명은 컬러로 작성된 하나 이상의 도면 및/또는 하나 이상의 사진을 포함할 수 있다. 본 발명의 컬러 도면(들) 및/또는 사진(들)의 사본은 유럽 특허청 또는 미국 특허상표청의 요구시 필요한 관납료의 납부와 함께 제공될 수 있다.

도 1은 고-시알산화 및 0-당화된 EPO 아형의 특정 혼합물을 단리하기 위한 정제 절차의 개략도이다. 개별 정제 단계의 의의 및 의도한 목적은 상세한 설명에 추가로 설명되어 있다.

도 2는 PNGase로 소화된 후의 HPLC 분획의 12.5% SDS-PAGE 겔의 쿠마시(Coomassie)-염색 사진이다. 슬롯 당 5 μg의 단백질을 로딩하였다. MW, 분자량 마커; BRP, BRP 표준 배치 1(= 생물학적 참조 제조물 = 에포에틴 알파 및 베타의 혼합물); 1 = 음이온 교환 크로마토그래피(AEX 풀) 후 및 RP-HPLC 단계를 거치기 전의 EPO 샘플; 2 -

10 = 상기 AEX 폴 내지 RP-HPLC를 거치고, 실시예에서 개시된 것과 같은 용매의 선형 구배에 적용한 후에 얻어진 EPO 용출물 분획의 샘플; 표 6 참조. 각각의 EPO 배치는 모든 N-글리칸을 제거하지만, 만일 존재한다면, O-글리칸은 부착된 채로 남겨두는 폴리펩티드 N-글리코시다아제(PNGase)로 소화시킨 후를 나타낸다. 아래의 얇은 밴드는 비-O-당화된(Des-0) 형태이다. 상기 효소 자체가 겔의 가운데에 흔적 밴드(trace band)로서 겔에서 검출될 수도 있다. 왼쪽 레인은 BRP 표준을 보여주고, 그 다음 레인은 칼럼에 적용한 것(BRP 표준처럼 상기 Des-0 형태를 함유함)을 보여주며, 이후의 9개 분획은 구배 용출물(gradient elution)을 보여준다. 처음 5개 분획은 분명히 Des-0 형태가 없고, 상기 Des-0 형태는 주로 마지막 3개 내지 4개 분획에 존재하는 것을 볼 수 있는데, 이는 상기 Des-0 아형이 크로마토그래피 물질에 결합된 채로 있고, 시간상 늦은 시점에서 상기 칼럼으로부터 용출된다는 것을 확인해 준다. 상기 폴 기준은 상기 Des-0 아형의 잔류 비율을 조절한다.

도 3은 12.5% SDS-PAGE 겔의 쿠마시-염색 사진이다. MW, 분자량 마커; 1 - 4 = 실시예에서 예시된 것과 같은 방법에 의해 얻어진 EPO 제조물; 5 + 6 = BRP 표준 배치 1 (= 생물학적 참조 제조물 = 에포에틴 알파 및 베타의 혼합물); 7 = 블랭크(blank). 각각의 EPO 배치는 PNGase로 소화시키기 전(1, 3, 5) 및 후(2, 4, 6)를 보여준다. 상기 효소 자체가 흔적 밴드로서 겔에서 검출될 수도 있다. 상기 BRP 표준은 소화 후 2중 밴드를 나타낸다. 아래의 얇은 밴드는 비-O-당화된(Des-0) 형태이다. 본 발명의 방법에 따라 얻어진 EPO 제조물은 분명히 상기 아래 밴드가 없음을 볼 수 있는데, 이는 상기 Des-0 형태가 HPLC 단계 과정에서 제거되었음을 확인해 준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 기술분야(예컨대, 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 교잡 기술, 단백질 화학 및 생화학)의 통상의 숙련자에 의해 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 분자적, 유전학적 및 생화학적 방법(일반적으로, 인용에 의해 본 발명에 포함되는 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. - and the full version entitled *Current Protocols in Molecular Biology* 참조) 및 화학적 방법에 대한 표준 기술이 사용된다.

[0081] 출발 물질

[0082] EPO 단백질을 함유하는 배지는 본 기술분야에 개시된 것과 같은 증폭된 인간 EPO 유전자를 함유하는 형질전환된 중국 햄스터 난소 세포주(CHO dhfr⁻)의 대규모 관류 배양에 의해 제조하였다; 예컨대, 전술한 문헌들 참조. 상기 배양 배지에서의 EPO 단백질의 농도는 세포의 성장과 연관된다. 실제적으로, 생성물의 발현 레벨(mg/부피)은 달성되는 최대 세포 수에 의해 제한된다. 따라서, 연장된 배양 기간에 걸쳐서 고밀도의 세포 배양물을 허용하는 연속식 관류 배양 시스템을 이용함으로써 생산이 최대가 된다. 정의된 세포 밀도에서 관류를 개시하고, 정의된 범위 내에서 관류 속도를 유지하며, 상기 속도는 수동으로 세포 수에 대해 조정한다. 음향 세틀러(acoustic settler), 여과 및 원심분리와 같은 표준 절차에 의해 세포 유지(cell retention)를 달성한다. 냉동 온도에서 부분적으로 관류 수확물을 수집한다. 전체 캠페인은 전형적으로 수 주의 관류 배양으로 이루어지며, 5-10 수확물을 산출한다. 상기 관류물에서의 잔류 세포 및 찌꺼기를 심층 여과에 의해 관류 수확물로부터 제거하며, 상기 단백질은 30 kDa의 분자량 절단으로 접선 유통 한외여과에 의해 농축하는 것이 바람직하다. 농축물을 당량으로 분주하고, 모든 수확물이 수집될 때까지 -70℃ 이하에 보관한다. 농축된 수확물을 냉동고로부터 옮기고, 냉동-해동 단위에 넣는다. 모아서 녹인 수확물을 0.45 μm 깊이 필터를 통해 여과하여 투명하게 한다. 해동 후의 모든 하류 정제 단계들은 주위 온도(17 내지 25℃)에서 수행한다.

[0083] 버퍼 및 용액의 조성

[0084] 각 정제 단계를 위한 버퍼 용액은 하기 표 1에 개시되어 있다.

표 1

[0085]

버퍼 조성물

사용 단계	버퍼/용액	용도
친화 크로마토그래피	20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5	전-평형 버퍼
	20 mM Tris.HCl, pH 7.5	평형 버퍼
	20 mM Tris.HCl, pH 7.5	세척 버퍼
	20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5	용출 버퍼
	5 M 우레아(urea)	재생(regeneration)
	0.5 M NaOH	소독(sanitization)
	0.01 M NaOH	보관
투석여과	1 M NaOH	소독
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	평형 및 투석여과 버퍼
음이온 교환 크로마토그래피	20 mM Tris.HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.0	전-평형 버퍼
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	평형 및 세척 버퍼
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	용출 용액 A
	20 mM Tris.HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.0	용출 용액 B
	20 mM Tris.HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.0	재생 버퍼
	1 M NaOH	소독
	0.01 M NaOH	보관
RP-HPLC 크로마토그래피	0.1% (v/v) TFA	평형
	0.1% (v/v) TFA in WFI	용출 용액 A
	100% (v/v) 아세트오니트릴 + 0.1% (v/v) TFA	용출 용액 B
	100% (v/v) 아세트오니트릴	재생
	60% (v/v) 아세트오니트릴	청소 및 보관
양이온 교환 크로마토그래피	100 mM 글리신.HCl, pH 2.0	전-평형 버퍼
	20 mM 글리신.HCl, pH 2.0	평형 버퍼
	20 mM 글리신.HCl, pH 2.0	세척 버퍼
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	용출 버퍼
	10 mM NaPO ₄ , 1.0 M NaCl, pH 7.2	재생 버퍼
	0.01 M NaOH	보관
	1 M NaOH	소독
한외여과	1 M NaOH	소독
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	평형 버퍼
크기 배제 크로마토그래피	0.5 M NaOH	소독
	100 mM NaPO ₄ , pH 7.2	전-평형 버퍼
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	평형 버퍼
	1.0 M NaOH	소독
	0.01 M NaOH	보관
나노여과	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	평형 버퍼

[0086]

5가지 순차적인 칼럼 크로마토그래피 공정을 이용해 각각의 농축물 풀을 정제하여 치료학적 등급의 고-시알산화 및 0-당화된 EPO의 배치를 생성한다; 도 1 참조.

[0087]

실시예 1: 블루 세파로오즈 6FF를 갖는 친화 크로마토그래피에 의한 EPO의 포획 및 잠재적인 오염물의 감소

[0088]

블루 세파로오즈 6FF는 시바크론 블루(Cibacron Blue) 염료에 공유결합된 아가로오즈 수지이며, 바람직하게는 발효 수확물 내에 함유된 오염물의 존재 하에 EPO에 결합하기 위해 사용된다. 생성물 흐름은 먼저 표 2에 특정 된 것과 같은 친화 크로마토그래피에 의해 정제된다.

표 2

[0089]

블루 세파로오즈 크로마토그래피의 실행을 위한 파라미터

번호	생산 절차	조건	원하는 값/허용오차
1.	블루-세파로오즈 - 10×12 cm = 1 ℓ (BPG 100/500) - Installation: BioProcess - Application: 2.4 ℓ 농축물 = 최대 3,000 mg EPO (1 - 1.5 mg EPO/ml) - 용출물: 100 ml 스코트 플라스크 내의 ~ 500 ml 풀(~ 4 mg EPO/ml)		
1.1	칼럼 로딩 및 적격화(qualification)	HETP/비대칭	N > 2,500/m 0.7 < A _s <1.8
1.2	농축물의 해동	온도 시간	20±3℃ 2시간
1.3	농축물의 여과	큰 필터/평균 필터 Sartobran 300 캡슐	최적 구동으로부터
1.4	칼럼 소독	NaOH 농축 시간	0.1 N 1시간, 90 cm/h
1.5	실행 구동	유속 온도 로딩 계단 구매	7±0.5 ℓ/h 22±2℃ 최대 3 mg EPO/ml 겔 최대 3,000 mg EPO 1.5 M NaCl을 이용함
1.6	풀링 기준	풀의 시작 풀의 종료	OD > 0.15 OD < 0.15, 그러나 Vol. ≤ 0.5 CV
1.7	샘플 보관	온도 시간	RT = 22±2℃ 밤새, 최대 18시간
1.8	칼럼 후-처리	1. 우레아: 농도 시간 2. NaOH: 농도 시간	5 M 30분, 90 cm/분 0.1 N 1시간, 90 cm/분
구동 기간: 약 5시간			

[0090]

상기 칼럼을 블루 세파로오즈 6FF 수지로 패키징한다. 패키징 후, 상기 칼럼을 이론적인 판 및 비대칭 인자에 대해 적격화한다. 상기 칼럼을 0.5 M NaOH를 이용하여 1시간 동안 소독한 후, 주입용 물(WFI, Water for Injection)을 이용하여 세정한다. 로딩 전, 상기 칼럼을 20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5와, 이어서 20 mM Tris.HCl, pH 7.5를 이용하여 평형화한다. 샘플을 상기 칼럼에 로딩하고, 상기 칼럼을 20 mM Tris.HCl, pH 7.5를 이용하여 세척한다. 상기 샘플을 20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5를 이용하여 용출한다. 전-피크(pre-peak) 및 주된 피크(main peak) 사이의 최소 OD가 0.15 이상이 된 후에 샘플의 수집을 개시한다. 상기 OD가 0.15 또는 그 이하가 될 때 상기 수집을 종료한다. 상기 용출물을 멸균 1회용 백 내에 수집한다.

[0091]

용출 후, 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정하고, 이후 5 M 우레아를 이용하여 세척함으로써 스트립(strip)한다. WFI를 이용하여 추가로 세척한 후, 상기 칼럼을 0.5 M NaOH를 이용하여 소독한다. 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정하고, 0.01 M NaOH 내에 보관한다.

[0092]

상기 크로마토그래피 수지에 대한 추가적인 정보는 제조사의 규제 지원 파일(Representative GE Healthcare Blue Sepharose Regulatory Support File) 내에 제공된다.

[0093]

실시예 2: 투석여과에 의한 EPO의 농축

[0094]

한외여과 및 탄젠트 유동 여과 단위 상의 10 kDa 컷-오프 막을 이용한 투석여과에 의해 상기 용출물을 농축한다; 표 3 참조.

표 3

[0095] 투석여과의 실행을 위한 파라미터

번호	생산 절차	조절	원하는 값/허용오차
2.	투석여과 - Installation: Proflux - 0.1 m ² Hydrosart 10 kDa membrane - 500 ml BS 용출물, 300 ml로 농축, 6배 부피로 투석여과, 2×200 ml을 이용한 세정 = 700 ml 투석물		
2.1	막 적격화	수 당량	
2.2	막 소독	시약 시간	1 N NaOH 적어도 30분
2.3	실행 투석여과	투석물 흐름 온도 입구 압력 출구 압력 투석여과 부피	22±2℃ 1 bar 0.5 bar 6배
2.4	농축물 보관	온도 시간	4±2℃ 직접 재사용, 최대 24시간
2.5	막 후-처리	시약 시간	1 N NaOH 적어도 30분
2.6	IPC 방출	전도도	< 2.5 mS/cm
투석여과 기간: 약 2시간 + 2시간 전- 및 후-처리			

[0096] 상기 필터 단위를 사용하기 전에 정상화된 물 투과성(normalized water permeability) 테스트를 수행한다. 상기 필터 단위를 1 M NaOH를 이용하여 적어도 1시간 동안 소독한 후, WFI를 이용하여 세척한다. 세척 후, 상기 필터 단위를 20 mM Tris-HCl, pH 7.0을 이용하여 평형화한다. 이후, 상기 샘플을 로딩하고, 1 bar를 넘지 않는 투과막 압력에서 여과한다. 투과물의 전도도가 2.5 mS/cm 이하일 때 투석여과를 종료한다.

[0097] **실시예 3: Q-세파로오즈 HP를 갖는 음이온 교환 크로마토그래피를 통한 산성의 EPO 아형의 인리치 및 오염물의 추가적인 제거**

[0098] Q-세파로오즈 HP 수지를 갖는 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 산성의 EPO 아형을 인리치하고, 오염물 (예컨대, DNA, HCP)을 추가로 제거하며, 첫 번째 칼럼으로부터 침출될 수 있는 임의의 염료 리간드를 제거한다. 아울러, 상기 음이온 교환 크로마토그래피는 우발적인(adventitious) 바이러스를 제거하기 위한 효과적인 단계이다. 따라서, 표 4에 특정된 바와 같이 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 상기 투석여과를 진행한 후, Q 용출물 분획 및 분획 풀의 0.2 μm 여과를 진행한다.

표 4

[0099] 음이온 교환 크로마토그래피의 실행을 위한 파라미터

번호	생산 절차	조절	원하는 값/허용오차
3.	Q-Sepharose High Performance - 6.2×16.5 cm = 500 ml (Vantage VA 60×500) - Installation: AKTA Purifier - Application: 700 ml 투석여과 = 최대 1,500 mg EPO - 용출물: 250 ml 스코트 플라스크 내의 약 2,000 ml: 100 - 200 ml 분획		
3.1	칼럼 로딩 및 적격화	HETP/비대칭	N > 4,000/m 0.6 < A _s < 2.0
3.2	농축물의 해동	NaOH 농도 시간	1±0.05 N 1시간, 90 cm/시

3.3	농축물의 여과	평형 후의 pH 유속 온도 로딩 구배	7.0±0.1 45±3 ml/분 = 90 cm/시 22±2℃ 최대 3 mg EPO/ml 겔 최대 1,500 mg EPO 0 - 25 M NaCl in 30 CV
3.4	칼럼 소독	폴의 개시 폴의 종료	OD ~ 최대 피크의 85%, OD ~ 최대 피크의 25%, For both proteins/EPO
3.5	실행 구동	온도 시간	RT = 22±2℃ 밤새, 최대 18시간
3.6	폴링 기준	NaOH 농도 시간	1±0.05 N 1시간, 90 cm/h
3.7	샘플 보관	단백질/EPO to be determined	< 1.5 최적 구동 후
구동 기간: 약 6시간			

[0100] 상기 칼럼을 Q-세파로오즈 HP 수지를 이용하여 패킹한다. 패킹 후, 상기 칼럼을 이론적인 판 및 비대칭 인자에 대해 적격화한다. 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정한 후, 0.5 M NaOH를 이용하여 1시간 동안 소독한다. 소독 후, 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정한다. 로딩 전, 상기 칼럼을 20 mM Tris.HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.0과, 이어서 20 mM Tris.HCl, pH 7.0을 이용하여 평형화한다. 샘플을 상기 칼럼에 로딩하고, 상기 칼럼을 20 mM Tris.HCl, pH 7.0을 이용하여 세척한다. 상기 샘플을 20 mM Tris.HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.0을 이용한 선형 구배로 용출한다. 상기 선형 구배를 통한 분획으로서 EPO를 수집한다. 코어(core) 분획은 감소하는 기울기(UV)의 약 85% 내지 95% 최대 피크에서 시작되고, UV 값이 약 25% 최대 피크까지 떨어질 때 종료된다.

[0101] 각각의 음이온 교환 크로마토그래피 용출물 분획을 0.2 μm 필터 단위를 이용하여 여과한다. 공정내 테스트를 수행하면서, 폴링하기 전에 상기 분획을 22±3℃에서 20시간까지 멸균 1회용 백 내에서 유지한다(유지 단계 1). 원하는 아형 분포 사양을 얻기 위하여 선별된 분획을 조합한다. 어떤 분획을 모을 것인지를 결정하기 위하여, 상기 분획들의 소규모 샘플을 제조하고 모세관 구역 전기영동(CZE, capillary zone electrophoresis)에 의해 분석한다. 원하는 아형 분포 프로필에 가장 근접한 분획의 조합을 선택하는 것이 바람직하며, 추가로 정제하기 위하여 상기 분획을 모은다.

[0102] 사용하는 것 사이에, 20 mM Tris.HCl, 1 M NaCl, pH 7.0을 이용하여 세정한 후, WFI로 세척함으로써 상기 수지를 재생한다. 이후, 상기 칼럼을 1 M NaOH를 이용하여 1시간 동안 소독하고, WFI를 이용하여 세척한다. 상기 칼럼을 0.01 M NaOH 내에 보관한다.

[0103] 상기 크로마토그래피 수지에 대한 추가적인 정보는 제조사의 규제 지원 파일(Representative GE Healthcare Q-Sepharose Regulatory Support File) 내에 제공된다.

[0104] **실시예 4: C4 수지를 갖는 RP-HPLC에 의한 Ser126 잔기에서 당화되지 않은 EPO 분자의 고갈 및 추가 오염물의 제거**

[0105] C4 수지를 이용한 RP-HPLC는 소수성에 기반하여 잠재적인 오염물로부터 EPO를 분리하며, 필요시 Ser126 잔기에 당화되지 않은 EPO 분자의 양을 감소시킬 수도 있다. 아울러, 상기 단계는 첫 번째 칼럼으로부터 침출될 수 있는 임의의 잔류 염료 리간드를 제거한다. 표 5에 특정된 바와 같이 역상 크로마토그래피에 의해 여과된 음이온 교환 크로마토그래피 분획 폴을 정제한다.

표 5

[0106] RP-HPLC의 실행을 위한 파라미터

번호	생산 절차	조절	원하는 값/허용오차
4.	역상 칼럼 - 5×25 cm = 491 ml Vydac C ₄ 역상 칼럼(10-15 μm) - Installation: Waters Deltaprep 4000 - Application: 1,600 - 2,400 ml eluate of Q Sepharose = 최대 1,570 mg EPO - 용출물: 50 ml 펠콘 튜브 내의 약 500 ml (~ 2 mg EPO/ml)		
4.1	칼럼 적격화	HETP/비대칭	분리 표준 혼합물
4.2	칼럼 소독	-	-
4.3	수행 구동	평형 후 pH 유속 온도 로딩 구배	2.0±0.25 100±5 ml/분 = 300 cm/h 22±2℃ 최대 3.2 mg EPO/ml 겔 최대 1,570 mg EPO 50 - 80% 버퍼 B (70% 아세트오니트릴)
4.4	폴링 기준	폴의 개시 폴의 종료	OD ₂₈₀ > 0.01 최대 피크의 약 45%
4.5	샘플 보관	온도 시간	RT = 22±2℃ 밤새, 최대 18시간
4.6	칼럼 후-처리	아세트오니트릴 시간	100 % (V/V) 1시간
구동 기간: 약 6시간			

[0107] 상기 칼럼을 C4 수지로 패키징한다. 상기 칼럼을 WFI 내의 0.1%(v/v) TFA를 이용하여 평형화한다. 사용하기 전, 판의 수 및 비대칭 인자를 측정함으로써 상기 칼럼의 성능을 정의한다. 샘플을 상기 칼럼에 로딩한 후, 표 1 및 표 6에 개시된 선형 구배를 이용하여 용출한다. 일단 280 nm에서의 흡광도가 0.01 AU에 도달하면 용출물을 수집하고, 흡광도가 감소 기술기 상에서 최대 피크의 40% 내지 45%로 떨어질 때 종료한다. 상기 용출물을 유리 병 내에 수집한다.

[0108] 전술한 바와 같이, 상기 구배는 물/TFA 0.1%(용매 A) 및 물 30%/아세트오니트릴 70%(v/v)/TFA 0.1%(용매 B)에 의해 형성된다. 특히, Q 세파로오즈 HP 용출물의 해당 분획의 폴을 샘플로 사용하였고, 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다. 상기 칼럼을 2배 칼럼 부피(CV)의 Milli-Q 물을 이용하여 세정하고, 4 CV 용매 A를 이용하여 평형화한 후, 상기 샘플을 상기 칼럼 위에 로딩하였고, 표 6에 따라 상기 구배를 적용하였다.

표 6

[0109] RP-HPLC의 실행을 위한 구배

시간(분)	%A	%B
0	100	0
9.2	50	50
18.3	50	50
52.7	20	80
59.5	0	100
75.6	0	100
91.6	100	0
108.8	100	0
총 부피(ℓ)	~ 5	~ 6

[0110] 상기 용출물을 50 ml 분획으로 수집하고, -20℃에 보관한다.

[0111] 사용하는 것 사이에, 상기 수지를 재생하고, 상기 칼럼을 이론적인 판 및 비대칭 인자를 측정함으로써 적격화한

다. 먼저, 상기 칼럼을 70%(v/v) 아세토니트릴 내지 100%(v/v) 아세토니트릴의 구배를 이용하여 세척한다. 이후, 상기 칼럼을 100%(v/v) 아세토니트릴을 이용하여 세척한다. 상기 아세토니트릴 농도는 100%(v/v) 아세토니트릴 내지 60%(v/v) 아세토니트릴의 구배를 이용하여 세척함으로써 감소되며, 이후 상기 칼럼을 60%(v/v) 아세토니트릴 내에 보관한다.

[0112] 상기 크로마토그래피 수지에 대한 추가적인 정보는 제조사의 규제 지원 파일(Representative Vydac C4 Resin Regulatory Support File) 내에 제공된다.

[0113] **실시예 5: 아세토니트릴/TFA 내에서의 EPO의 배양에 의한 바이러스 불활성화**

[0114] RP-HPLC 단계 후, 상기 용출물을 22±3℃에서 60 내지 180분 동안 유지한다. 상기 용출물 내의 아세토니트릴의 농도는 대략 41%(v/v)이고, TFA의 농도는 대략 0.1%(v/v)이다. 상기 공정의 상기 단계 동안에, 온도의 유지와 시간의 유지를 조절한다.

[0115] **실시예 6: MacroPrep High S를 갖는 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 RP-HPLC 용매 및 응집된 EPO 종의 제거**

[0116] MacroPrep High S 수지를 갖는 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 RP-HPLC 용매 및 응집된 종을 제거하고, 다소 짧은 시간 내에 상기 버퍼를 교체한다. 상기 RP-HPLC 용출물을 표 7에 특정된 바와 같이 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 진행된 후, MacroPrep 용출물을 0.2 μm 여과한다.

표 7

양이온 교환 크로마토그래피의 실행을 위한 파라미터

[0117]

번호	생산 절차	조절	원하는 값/허용오차
5.	Macroprep High S - 5×12.5 cm = 250 ml - Installation: Purifier - Application: 400 - 500 ml eluate of the RP 칼럼 = 최대 1,250 mg EPO - 용출물: 50 ml 펠콘 튜브 내의 ~ 250 ml(~ 3 mg EPO/ml)		
5.1	칼럼 로딩 및 적격화	HETP/비대칭	N > 2,500/m 0.6 < A _s < 1.8
5.2	칼럼 소독	NaOH 농도 시간	1±0.05 N 1시간
5.3	실행 구동	평형 후 pH 유속 시간 로딩 구배	2.0±0.2 50±3 ml/분 = 150 cm/h 22±2℃ 최대 5 mg EPO/ml 겔 최대 1,250 mg EPO 최적 구동 후 pH 및 NaCl을 이용한 계단 구배
5.4	폴링 기준	폴의 개시 폴의 종료	OD ₂₈₀ > 0.03 OD ₂₈₀ < 0.03
5.5	샘플 보관	온도 시간	RT = 22±2℃ 구동 즉시 농축, 최대 24시간
5.6	칼럼 후-처리	NaOH 농도 시간	1±0.05 N 1시간
구동 기간: 약 3시간 + 3시간 전- 및 후-처리			

[0118] 상기 칼럼을 MacroPrep High S 수지로 패키징한다. 패키징 후, 상기 칼럼을 이론적인 판 및 비대칭 인자에 대해 적격화한다. 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정한 후, 1 M NaOH를 이용하여 적어도 1시간 동안 소독한다. 소독

후, 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세정한다. 로딩하기 전, 상기 칼럼을 100 mM 글리신.HCl, pH 2.0을 이용하여 전-평형화한 후, 20 mM 글리신-HCl, pH 2.0을 이용하여 평형화한다. 상기 샘플을 칼럼에 로딩하고, 상기 칼럼을 20 mM 글리신-HCl, pH 2.0을 이용하여 세척한다. 상기 샘플을 표 1에 개시된 가파른 구배를 이용하여 용출한다. 일단 280 nm에서의 흡광도가 0.03 AU에 도달하면 용출물을 수집하고, 흡광도가 0.03 AU에 도달할 때 종료한다. 상기 용출물을 멸균 1회용 백 내에 보관한다. 추가 정제를 위하여 상기 양이온 교환 크로마토그래피 용출물을 0.2 μm 필터 단위를 이용하여 여과하거나, 및/또는 멸균 1회용 백 내에서 22±3°C에서 20시간까지 유지 시간을 시작한다.

[0119] 사용하는 것 사이에, 상기 수지를 재생한다. 상기 칼럼을 10 mM NaPO₄, 1.0 M NaCl, pH 7.2를 이용하여 세척한 후, WFI를 이용하여 세정한다. 상기 EPO 응집물을 상기 재생물 내에서 용출한다. 상기 칼럼을 1 M NaOH를 이용하여 적어도 1시간 동안 소독하고, WFI를 이용하여 세정한다. 상기 칼럼을 0.01 M NaOH 내에 보관한다.

[0120] 상기 수지에 대한 추가적인 정보는 제조사의 규제 지원 파일(Representative BioRad MacroPrep High S Regulatory Support File) 내에 제공된다.

[0121] **실시예 7: 한외여과**

[0122] 선택적으로, 상기 여과된 양이온 교환 크로마토그래피 용출물을 10 kDa 컷-오프를 갖는 탄젠트 유동 여과 단위를 이용한 한외여과에 의해 추가로 농축하여 원하는 부피 감소를 달성한다. 여과 단계에 대한 정보는 표 8에 제공된다.

표 8

한외여과의 실행을 위한 파라미터

[0123]

번호	생산 절차	조건	원하는 값/허용오차
6.	한외여과 - Installation: Amicon Stirred Cell - 76 mm Flat Membrane YM-10 kDa - 250 ml을 80 ml로 농축, 2×10 ml을 이용한 세정 = 100 ml		
6.1	막 적격화	수 당량	
6.2	막 소독	시약 시간	0.1 N NaOH 적어도 1시간
6.3	실행 한외여과	온도 입구 압력 투석물 내의 UV ₂₈₀ 여과물 내의 UV ₂₈₀	22±2°C 1 bar < 0.05
6.4	농축물의 보관	온도 시간	RT = 22±2°C 밤새, 최대 18시간
6.5	막 후-처리	시약 시간	0.1 N NaOH 적어도 1시간
6.6	IPC 방출	EPO 농도 투석물의 부피	5 < X < 7 mg/ml ≤ 100 ml
투석여과의 기간: 약 1시간 + 2시간 전- 및 후-처리			

[0124] 상기 필터 단위를 1 M NaOH를 이용하여 소독한 후, WFI를 이용하여 세척한다. 세척 후, 상기 필터 단위를 10 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.2 버퍼를 이용하여 평형화한다. 이후, 상기 샘플을 로딩하고, 0.7 내지 1.1 bar의 공급 압력으로 22±3°C에서 여과한다. 상기 투석물을 멸균 1회용 백 내에 수집한다.

[0125] **실시예 8: Superdex S200 Prep Grade를 갖는 크기 배제 크로마토그래피를 통한 임의의 잔류 EPO 응집물 및 다른 오염물의 제거**

[0126] Superdex S200 prep 등급의 크기 배제 크로마토그래피는 최종(연마) 크로마토그래피 단계이며, 임의의 가능한 잔류 응집물을 제거하고, 약 물질 벌크 용액을 제형화하기 위해 도입된다. 한외여과 후의 농축물(실시에 7) 또는 CEX 크로마토그래피 후의 용출물(실시에 6)을 표 9에 특정된 바와 같이 크기 배제 크로마토그래피에 의해 진행한 후, 실시에 9에 개시된 것과 같은 SE-HPLC 용출물의 0.2 μm 여과를 진행한다.

표 9

[0127] 크기 배제 크로마토그래피의 실행을 위한 파라미터

번호	생산 절차	조건	원하는 값/허용오차
7.	수퍼덱스 200 pg - 10×70 cm = 5.5 L (BPG 100/950) - Installation: Purifier - Application: 100 ml Concentrate of the UF - 용출물: 50 ml 켈콘 튜브 내의 ~ 300 ml(~ 1.5 mg EPO/ml)		
7.1	칼럼 로딩 및 적격화	HETP/비대칭	N > 5,000/m 0.7 < A _s < 1.8
7.2	칼럼 소독	NaOH 농도 시간	0.5±0.05 N 적어도 1시간
7.3	실행 구동	평형 후 pH 유속 온도 적용시 EPO 농도 Vol. appl. X% v CV	7.2±0.2 32±2 ml/분 = 24 cm/시 22±2℃ 5 < X < 7 mg EPO/ml 최대 4%
7.4	폴링 기준	폴의 개시 폴의 종료	OD ₂₈₀ > 0.01 OD ₂₈₀ < 0.01, 최대 300 ml
7.5	폴 보관	온도 시간	동일한 날에 "나노필터됨"
7.6	칼럼 후-처리	NaOH 농도 시간	0.5±0.05 N 적어도 1시간
7.7	IPC 방출	EPO 농도	1 < X < 3 mg/ml
구동 기간: 약 3시간 + 12시간 전- 및 후-처리			

[0128] 상기 칼럼을 Superdex S200 prep 등급의 수지로 패킹한다. 패킹 후, 상기 칼럼을 이론적인 판 및 비대칭 인자에 대해 적격화한다. 상기 칼럼을 0.5 M NaOH를 이용하여 1시간 동안 소독한 후, WFI를 이용하여 세정한다. 로딩하기 전, 상기 칼럼을 100 mM NaPO₄, pH 7.2를 이용하여 전-평형화한 후, 10 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.2를 이용하여 평형화한다. 상기 샘플을 상기 칼럼 위에 로딩하며, 일단 280 nm에서의 흡광도가 0.01 AU 이상으로 증가되면 용출물을 수집하고, 흡광도가 0.01 AU에 도달할 때 종료한다. 상기 용출물을 멸균 1회용 백 내에 수집한다. 상기 크기 배제 크로마토그래피 용출물을 멸균 1회용 백 내에 여과한 후, 0.2 μm 필터를 이용하여 추가로 진행한다.

[0129] 사용 후, 상기 칼럼을 WFI를 이용하여 세척한다. 이후, 상기 칼럼을 0.5-1 M NaOH(0.6 CV)를 이용하여 1시간 동안 소독하고, 0.01 M NaOH 내에 보관한다.

[0130] 상기 수지에 대한 추가적인 정보는 제조사의 규제 지원 파일(Representative GE Healthcare Superdex Regulatory Support File) 내에 제공된다.

[0131] 실시예 9: 나노여과를 통한 EPO 제조물로부터의 바이러스 제거

[0132] 최종적으로, 상기 약 물질의 바이러스 안정성을 증가시키기 위하여 15 nm 나노여과 단계를 상기 정제 공정 내에 포함한다. 상기 크기 배제 크로마토그래피 용출물의 여과물을 상기 용출물로부터 우발적인 바이러스 물질을 제거하는 역할을 하는 Planova 15N 필터를 이용하여 나노여과한다. 150 ml의 10 mM NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.2

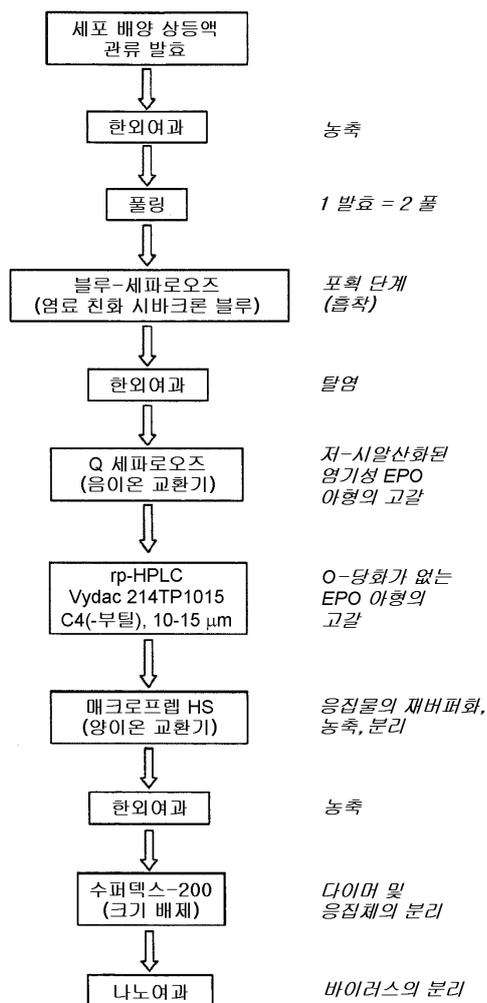
를 이용하여 씻어냄으로써 상기 나노필터 단위를 준비한다. 0.2 μm 여과된 크기 배제 크로마토그래피 용출물을 상기 나노필터를 통해 펌핑하고, 상기 여과물을 멸균 1회용 백 내로 모은다.

[0133] 실시예 10: 충전, 보관 및 이송

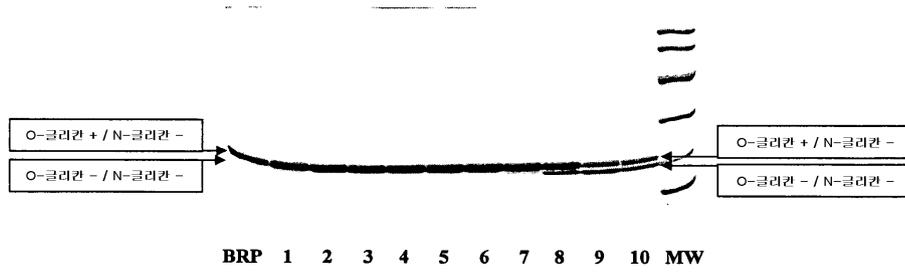
[0134] 충전 공정(filling process)은 EPO 약 물질 제조 공정의 최종 단계이다. 상기 최종 용기를 멸균하고, 충전하기 전에 발열원을 제거한다. 연동 펌프를 이용하여 상기 나노여과된 분획을 30 ml 부피 크기의 벌크 약 물질 보관 용기 내로 분배한다. 상기 조작을 주위 온도에서 충전실 내의 층류 후드(laminar flow hood)(국소 보호) 내에서 수행한다. 최종 생성물의 보관은, 예를 들면 테플론-코팅된 PP 튜브 내에서 70°C에서 수행될 수 있다. 상기 약 물질은 약 제품 제조 위치로 전달될 수 있고, 이송하는 동안에 상기 벌크 약 물질의 온도는 드라이아이스를 이용하여 -70°C 이하로 유지된다.

도면

도면1



도면2



도면3

