

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/KR2016/013506
International filing date:	23 November 2016 (23.11.2016)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: KR
	Number: 10-2015-0168196
	Filing date: 30 November 2015 (30.11.2015)
Date of receipt at the International Bureau:	29 November 2016 (29.11.2016)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

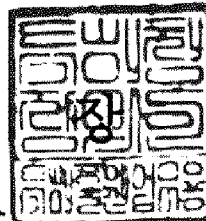
출 원 번 호 : 10-2015-0168196
Application Number

출 원 년 월 일 : 2015년 11월 30일
Filing Date NOV 30, 2015

출 원 인 : 주식회사 대웅
Applicant(s) DAEWOONG CO., LTD.

2016 년 11 월 25 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	142
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 대웅
【특허고객번호】	1-1998-000709-3
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인번호】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2013-057330-7
【대리인】	
【성명】	장제환
【대리인번호】	9-2011-000081-3
【포괄위임등록번호】	2013-057331-4
【발명의 국문명칭】	보툴리눔 독소의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Methods for Preparing Botulinum Toxin
【발명자】	
【성명】	김경윤
【성명의 영문표기】	Kim, Kyoung-Yun
【주민등록번호】	740122-1XXXXXX
【우편번호】	560-741
【주소】	전라북도 전주시 완산구 화산천변로 50, 103동 1303호 (중 화산동2가, 현대에코르아파트)
【국적】	KR
【발명자】	

【성명】	김청세
【성명의 영문표기】	Kim, Chung Sei
【주민등록번호】	720530-1XXXXXX
【우편번호】	08097
【주소】	서울특별시 양천구 목동동로 50, 1221동 903호 (신정동, 목 동신시가지아파트12단지)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	김명섭
【성명의 영문표기】	Kim, Myung Seob
【주민등록번호】	850625-1XXXXXX
【우편번호】	16698
【주소】	경기도 수원시 영통구 영통로290번길 26, 847동 605호 (영 통동, 벽적골주공휴먼시아8단지)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명】	설혜영
【성명의 영문표기】	Sul, Hye-Young
【주민등록번호】	841124-2XXXXXX
【우편번호】	463-776
【주소】	경기도 성남시 분당구 중앙공원로 17, 326동 302호 (서현동, 시범단지한양아파트)
【국적】	KR
【출원언어】	국어
【심사청구】	청구

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 이처영 (서명 또는 인)

대리인 장제환 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】	0 면	46,000 원
【가산출원료】	55 면	0 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	27 항	1,331,000 원
【합계】	1,377,000 원	

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

보툴리눔 독소의 제조방법{Methods for Preparing Botulinum Toxin}

【기술분야】

- <1> 본 발명은 동물 유래 성분을 포함하지 않는(Animal Product Free, APF) 공정을 통한 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는
- <2> (a) 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 산 침전시키는 단계;
- <3> (b) 상기 (a) 단계의 보툴리눔 독소를 포함하는 침전물에 완충용액을 첨가한 다음, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화(clarification)하는 단계;
- <4> (c) 상기 (b) 단계의 정화된 보툴리눔 독소를 포함하는 용액을 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전, 또는 염산 침전을 수행한 다음, 상기 UF 다이아필트레이션의 투석유물(retentate)을 완충용액에 희석하거나, 황산암모늄 침전 또는 염산 침전의 침전물을 완충용액에 용해시키는 단계; 및
- <5> (d) 상기 (c) 단계의 희석된 투석유물, 황산암모늄 침전물의 용해물, 또는 염산 침전물의 용해물을 음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange chromatography: AEX)를 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 단계;

<6> 를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것이다.

【배경기술】

<7> 신경독성을 지닌 독소를 분비하는 다양한 클로스트리디움 속 균주들이 1890년대부터 지금까지 발견되었으며,

<8> 지난 70년간 이들 균주들이 분비하는 독소에 대한 특성 규명이 이루어져 왔다(Schant, E. J. *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 56:80, 1992).

<9> 상기 클로스트리디움 속 균주들에서 유래한 신경독성을 지닌 독소, 즉 보툴리눔 독소(botulinum toxin)는 그 혈청학적 특징에 따라 A 내지 G형의 7가지 형으로 구분된다. 각 독소는 약 150kDa 정도의 독소 단백질을 가지고 있는데, 자연적으로는 여러 비독성 단백질들과 결합되어 있는 복합체로 이루어져 있다. 중간(Medium) 복합체(300kDa)는 독소 단백질과 비독성-비헤마글루티닌 단백질로 이루어져 있고, 큰(Large; 450kDa) 복합체 및 거대(Large-Large; 900kDa) 복합체는 중간 복합체가 헤마글루티닌과 결합되어 있는 형태를 띠고 있다(Sugiyama, H., *Microbiol. Rev.*, 44:419, 1980). 이러한 비독성 비헤마글루티닌 단백질들은 장내에서 낮은 pH와 각종 단백질 가수분해 효소로부터 독소를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

<10> 상기 독소는 세포 내에서 분자량이 약 150kDa인 하나의 폴리펩티드로 합성된 후, 세포내 단백질 분해 효소의 작용이나 트립신과 같은 인위적인 효소처리에 의하

여 N 말단으로부터 1/3 되는 위치에서 절단되어 2개의 단위체인 경쇄(L: 경쇄(light chain))(분자량: 50kDa) 및 중쇄(H: 중쇄(heavy chain))(분자량: 100kDa)로 나누어진다. 이렇게 나누어진 독소는 단일 폴리펩티드일 때에 비해 그 독성이 크게 증가한다. 두 단위체는 이황화결합으로 서로 연결되어 있으며, 각각은 서로 다른 기능을 갖는다. 중쇄는 표적(target)이 되는 세포의 수용체(receptor)와 결합하고 (Park. M.K. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:243, 1990), 낮은 pH(pH4)에서 생체막과 반응하여 채널(channel)을 형성하는 기능을 가지며(Mantecuccio, C. *et al.*, *TIBS.*, 18:324, 1993), 경쇄는 약리활성을 가지고 있어 세제(detergent)를 사용하여 세포에 투과성을 부여하거나, 전기천공(electroporation) 등으로 세포 내 투입되었을 때 신경전달물질의 분비를 방해한다(Poulain, B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:4090, 1988).

<11> 상기 독소는 신경근육종말(neuromuscular junction)의 콜린성 전시냅스(cholinergic presynapse)에서 아세틸콜린의 엑소시토시스(exocytosis)를 저해하여 전신 무력증을 일으킨다. 극미량의 독소를 처리해도 독성이 나타나는 것으로 보아 이 독소는 어떤 효소 활성을 가질 것으로 생각되어져 왔다(Simpson, L. L. *et al.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26:427, 1986).

<12> 최근에 밝혀진 바에 의하면, 독소는 메탈로펩티다제 활성(metallopeptidase activity)을 갖고 있으며 그 기질은 엑소시토시스 장치 복합체(exocytosis machinery complex)를 이루는 단위 단백질들인 시냅토프레빈(Synaptobrevin), 선택신(Syntaxin), 25kDa의 시냅토솜 연계 단백질(Synaptosomal associated protein of

25kDa)(SNAP25) 등이다. 각 형의 독소는 이 세 가지 단백질들 중 하나를 기질로 삼고 있는데, B, D, F 및 G형은 시냅토프레빈을, A와 E형은 SNAP25를, C형은 신택신을 특정 부위에서 절단하는 것으로 알려져 있다(Binz, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:9153, 1994).

<13> 특히, 보툴리눔 독소 A형은 pH 4.0~6.8의 묽은 수용액에 용해성인 것으로 알려져 있다. 약 7 이상의 pH에서 안정화 비-독소 단백질이 신경독소로부터 분리되어, 그 결과 독성이 점진적으로 손실되는데, 특히 pH 및 온도가 상승함에 따라 독성이 감소하는 것으로 알려져 있다.

<14> 상기 보툴리눔 독소는 소량으로 인체에 치명적이고 대량생산이 용이하므로 탄저균(*Bacillus anthracis*), 페스트(*Yersinia pestis*), 천연두(smallpox virus)와 더불어 4대 생물테러 무기로 사용될 수 있는 독소이다. 그러나, 상기 보툴리눔 독소 중 A형 독소의 경우에는 전신적으로는 인체에 영향을 미치지 않는 용량 이하로 주사하면 상기 주사 부위의 국소 근육을 마비시킬 수 있는 것으로 밝혀졌는데, 이러한 특성을 이용하여 주름살 제거제, 경직성 편마비 및 뇌성마비의 치료제 등으로 광범위하게 사용할 수 있으므로, 수요가 급증하고 있으며 수요에 맞추어 보툴리눔 독소의 생산방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

<15> 현재 대표적으로 상용화되어 있는 제품은 미국 알러간(Allergan)사의 BOTOX (보툴리눔 독소 A형 정제된 신경독소 복합체)로, 각각의 BOTOX 의 100 유닛 바이알은 약 5ng의 정제된 보툴리눔 독소 A형 복합체, 0.5mg 인간 혈청 알부민, 및 0.9mg

염화 나트륨으로 구성되고 진공-건조 형태로 제공되며, 보존제 없이(0.9% 염화 나트륨 주입) 멸균 생리식염수를 이용하여 복원시킨다. 다른 상용화된 제품은 영국 Ipsen사의 Dysport(보툴리눔 독소 약제학적 조성물 중에 락토오스 및 인간 혈청 알부민을 가지는 클로스트리디움 보툴리눔 A형 독소 헤마글루티닌 복합체, 사용 전에 0.9% 염화 나트륨을 이용하여 복원됨) 및 Solstice Neurosciences사의 MyoBloc(보툴리눔 독소 B형, 인간 혈청 알부민, 숙신산 나트륨, 및 염화 나트륨을 포함하는 약 pH 5.6 주사 용액) 등이 있다.

<16> 종래의 보툴리눔 독소의 제조를 위해서는 산 침전법, 염에 의한 석출법 및 크로마토그래피법 등이 이용되었다.

<17> 예를 들어, 일본공개특허 제1994-192296호에는 클로스트리디움 보툴리눔 균주를 배양한 다음 산침전, 추출, 핵산분해제 첨가 및 결정화단계를 거쳐 결정형(crystalline)의 보툴리눔 A형 독소를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 미국 등록특허 제5696077호에는 클로스트리디움 보툴리눔 균주를 배양하고 이를 산침전, 추출, 이온교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피 및 결정화 단계를 거쳐 보툴리눔 B형 독소를 제조하는 방법이 개시되어 있다.

<18> 한편, Simpson 등은 중력 흐름 크로마토그래피를 사용한 보툴리눔 신경독소의 정제, HPLC, 친화성 수지를 사용한 포획 단계, 크기 배제 크로마토그래피, 및 두 가지의 상이한 이온 교환 컬럼의 사용을 포함하는 이온(음이온 및 양이온) 교환 크로마토그래피를 사용하여 보툴리눔 A형 독소를 제조한바 있으며(*Method in*

Enzymology, 165:76, 1988), Wang 등은 보툴리눔 독소 A 형을 정제하기 위한 침전과 이온 크로마토그래피방법을 사용하였다(*Dermatol Las Faci Cosm Surg.*, 2002:58, 2002).

<19> 또한, 미국등록특허 제6818409호에는 보툴리눔 독소를 정제하기 위한 이온교환 및 락토오스 컬럼의 사용이 개시되어있고, 미국등록특허 제7452697호에는 이온교환 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 사용하여 보툴리눔 A형 독소를 제조하는 방법이 개시되어 있다. 대한민국공개특허 제2009-0091501호에는 산 침전 및 음이온교환 크로마토그래피 방법을 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 방법이, 미국공개특허 제2013-0156756호는 음이온교환 크로마토그래피 및 양이온교환 크로마토그래피방법을 이용한 보툴리눔 독소의 정제방법이 개시되어 있다.

<20> 하지만, 기존 방법들에서의 음이온교환 크로마토그래피의 사용은 보툴리눔 독소의 겔 밴딩 패턴(gel banding pattern)에 유해한 영향을 미치며(미국등록특허 제7452697호), 정제기간이 길어 상업적으로 적용하기 등의 문제점이 남아있으며, 보툴리눔 독소 생산 균주인 클로스트리디움 보툴리눔은 혐기성 균주이므로 발효를 혐기성 시설 내에서 수행하여야 하기 때문에 대량생산이 어려운 문제점이 있으며, 상기 정제방법에 의하여 정제된 유효성분인 상기 보툴리눔 독소가 명확하게 분리 동정이 되지 않아 불순물이 포함되는 문제점이 있었다. 또한, 종래의 보툴리눔 독소의 제조방법은 고순도의 보툴리눔 독소를 정제하기 위해 여과 또는 투석 공정 등이 필수적으로 포함되어 정제 과정이 복잡하고 어려운 문제가 있다.

<21> 또한, 기존의 보툴리눔 독소의 제조공정에서는 DNA나 RNA와 같은 핵산의 제거를 위해 DNase나 RNase 등의 효소를 사용하였다(대한민국 등록특허 제10-1339349호 및 도 1의 보툴리눔 독소의 기존 제조방법 등 참조). 하지만 DNase나 RNase 등의 효소는 동물 유래의 것이기 때문에, 각종 질병의 원인이 되는 물질들, 특히 전염성해면상뇌증 유발인자로 알려진 동물 유래의 변형 프리온(abnormal prion) 등이 포함되어 있을 가능성을 배제할 수 없어 안전성 측면에서의 문제점을 가지고 있다.

<22> 전염성해면상뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE)은 치명적인 신경의 퇴행성 질환을 일으키는 일종의 퇴행성 신경 질환으로, BSE(Bovine Spongiform Encephalopathy, 소해면상뇌증(광우병)), 스크래피(Scrapie), 크로이츠펔트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob Disease, CJD), 게르스트만-스트라우슬러-샤인커 신드롬(Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome), 쿠루(Kuru), 전염성 밍크뇌증(Transmissible Mink Encephalopathy), 사슴의 만성소모성질병(Chronic Wasting Disease), 고양이 해면상뇌증(Feline Spongiform Encephalopathy) 등 사람 및 동물에서 발병되며, 소해면상뇌증의 경우 종간 장벽(species barrier)을 넘어 사람에게도 발병되는 것으로 보고되고 있다.

<23> 전염성해면상뇌증의 원인체는 면역원성이 없고, 긴 잠복기를 갖는 특징이 있다. 소해면상뇌증, 즉 광우병에 감염된 소의 뇌의 사후 분석으로부터 신경세포의 파괴와 비정상 단백질 섬유의 침적으로 인하여 뇌에 스펀지(해면상) 형태의 특이한 패턴의 공포(空胞)가 형성되었음을 확인할 수 있다.

<24> 전염성해면상뇌증의 원인으로 여겨지는 병원체는 변형프리온(abnormal

prion)이라 불리는 감염 단백질이다. 핵산을 필요로 하는 일반 바이러스의 경우와 달리, 변형프리온은 핵산을 포함하지 않고 단백질로만 이루어진 감염 입자이다. 전염성해면상뇌증은 정상프리온(PrPc)에 감염성 인자인 변형프리온(PrPsc)이 결합하게 되면 병원성프리온으로 전환되어 이러한 병원성프리온이 뇌에 축적되는 것으로 알려져 있다(Prusiner SB, *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 3:52-78, 1989).

<25> 크로이츠펔트-야콥병은 사람 전염성해면상뇌증(전염성해면양뇌증, Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE)의 드문 신경퇴행성 질환으로, 전염성 물질은 프리온 단백질의 비정상적인 이형체임이 분명하다. 크로이츠펔트-야콥병이 있는 개체는 명백히 완전한 건강 상태에서부터 6개월 이내에 무동성무언증(akinetic mutism)으로 악화될 수 있다. 그러므로 동물 유래 산물을 사용하여 얻어지는 보툴리눔 독소와 같은 생물제제를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 경우, 크로이츠펔트-야콥병과 같은, 프리온 매개 질환을 얻게 될 위험성이 존재한다. 따라서, 동물 유래 성분을 사용하여 생산한 원액을 이용하여 의약품을 제조할 경우, 환자가 다양한 병원체 또는 감염성 물질을 받아들이게 되는 위험성이 존재한다.

<26> 따라서, 전세계적으로 이러한 동물 유래 성분으로 인한 전염성 해면상뇌증 감염 등의 안전성 문제 해결을 위하여 동물 유래 성분이 포함되지 않은(Animal Product Free: APF) 공정을 통한 보툴리눔 독소의 제조방법에 대한 필요성이 절실하게 요구되고 있는 상황이다.

<27>

이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 프리온 매개 질환(전염성해면상 뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE))에 노출될 위험을 예방하고, 보툴리눔 독소의 순도를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 보툴리눔 독소를 산 침전시킨 다음, 형성된 침전물을 전처리 공정인 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용한 보툴리눔 독소의 정화(clarification)와 더불어 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전 또는 염산 침전에서 선택되는 한 가지 방법과 음이온/양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제하면, 동물 유래 산물이 이용되는 효소처리 단계의 생략이 가능하여 프리온 매개 질환을 얻게 될 위험성이 없고, 보툴리눔 독소의 순도를 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

<28>

본 발명의 목적은 동물 유래 산물이 없는(APF(Animal Product Free)) 조건에서 수행될 수 있는 보다 효율적이고 안전한 보툴리눔 독소의 제조방법을 제공하는 것이다.

<29> 보다 구체적으로는 전처리 공정에서 AP(Animal Product)를 사용하는 효소처리 단계를 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용한 보툴리눔 독소의 정화(clarification)와 더불어 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전 또는 염산 침전에서 선택되는 한 가지 방법으로 대체하고, 이어서 음이온 교환 크로마토그래피를 추가로 수행함으로써, 매우 높은 수율로 안전성이 담보되는 보툴리눔 독소를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

【과제의 해결 수단】

<30> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<31> (a) 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 산 침전시키는 단계;

<32> (b) 상기 (a) 단계의 보툴리눔 독소를 포함하는 침전물에 완충용액을 첨가한 다음, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화(clarification)하는 단계;

<33> (c) 상기 (b) 단계의 정화된 보툴리눔 독소를 포함하는 용액을 UF 다이아필

트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전, 또는 염산 침전을 수행한 다음, 상기 UF 다이아필트레이션의 투석유물(retentate)을 완충용액에 희석하거나, 황산암모늄 침전 또는 염산 침전의 침전물을 완충용액에 용해시키는 단계; 및

<34> (d) 상기 (c) 단계의 희석된 투석유물, 황산암모늄 침전물의 용해물, 또는 염산 침전물의 용해물을 음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange chromatography: AEX)를 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 단계;

<35> 를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법을 제공한다.

【발명의 효과】

<36> 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 새로운 제조방법은 동물 유래 성분의 유입이 원천적으로 차단되어 안전성이 우수하며, 간단한 공정으로 고순도의 보툴리눔 독소를 제조할 수 있으므로 매우 경제적이고 효율적일 뿐 아니라, 기존의 방법으로 생산된 보툴리눔 독소에 비해 순도가 높아 국소작용력이 증가하므로 부작용으로 나타날 수 있는 보툴리눔 독소의 전신순환성이 낮아져 안전성이 증가하는 장점이 있어, 신경근육 장애의 치료, 주름살 제거제, 경직성 편마비 및 뇌성마비의 치료제 등에 다양하게 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

<37> 도 1은 본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 제조과정과 기존 제조과정을 비교한

모식도이다.

도 2는 보툴리눔 독소의 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 3은 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계 후 보툴리눔 독소의 순도를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 보툴리눔 독소의 1차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계, 2차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX, binding mode) 단계 및 양이온교환 크로마토그래피 정제(CEX) 단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 5는 1차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계, 2차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX, binding mode) 단계 및 양이온교환 크로마토그래피 정제(CEX) 단계 후 보툴리눔 독소의 순도를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 보툴리눔 독소의 1차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계, 2차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX, flow through mode) 단계 및 양이온교환 크로마토그래피 정제(CEX) 단계의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 7은 1차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX) 단계, 2차 음이온교환 크로마토그래피 정제(AEX, flow through mode) 단계 및 양이온교환 크로마토그래피 정제(CEX) 단계 후 보툴리눔 독소의 순도를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<38> 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

<39> 본 발명은 APF(Animal Product Free) 및 저분자 보툴리눔 독소 공정 개발을 위해 기존 공정 중 AP(Animal Product)를 사용하는 효소처리 단계를 대체할 공정을 개발하고자 하였다. 따라서, 심층 필터(Depth filter)를 이용한 여과(filtration) 및 기존의 염산침전 공정 외에 황산암모늄을 이용한 공정 및 UF 시스템을 이용한 공정을 같이 수행한 결과, 기존의 방법으로 생산된 보툴리눔 독소에 비해 순도가 높은 것으로 나타나, 상기 방법을 이용하면 TSE-프리(TSE-free)한 조건에서 안전하게 균주의 배양물로부터 고순도의 보툴리눔 독소를 제조할 수 있었다.

<40> 본 발명에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "공정" 또는 "분리"는 정제 공정에서 특정 결과(예컨대, 보툴리눔 독소 정제)를 달성하기 위한 하나 이상의 방법 또는 장치의 이용을 지칭한다.

<41> 본 발명의 일 양태에서, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리

(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화 (clarification)한 후, UF 다이아필트레이션(UF diafiltration) 또는 산 침전을 수행한 경우, 음이온교환 크로마토그래피 정제(Anion exchange chromatography: AEX) 공정만으로도 만족할만한 수준의 순도를 갖는 보툴리눔 독소를 제조할 수 있었다.

<42> 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는

<43> (a) 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 산 침전시키는 단계;

<44> (b) 상기 (a) 단계의 보툴리눔 독소를 포함하는 침전물에 완충용액을 첨가한 다음, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화(clarification)하는 단계;

<45> (c) 상기 (b) 단계의 정화된 보툴리눔 독소를 포함하는 용액을 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전, 또는 염산 침전을 수행한 다음, 상기 UF 다이아필트레이션의 투석유물(retentate)을 완충용액에 희석하거나, 황산암모늄 침전 또는 염산 침전의 침전물을 완충용액에 용해시키는 단계; 및

<46> (d) 상기 (c) 단계의 희석된 투석유물, 황산암모늄 침전물의 용해물, 또는 염산 침전물의 용해물을 음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange

chromatography: AEX)를 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 단계;

<47> 를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것이다.

<48> 본 발명의 제조방법에 따라 정제된 보툴리눔 독소는 7S 또는 19S의 구성형태 (분자량으로는 약 150~900kDa)를 가지는 것을 특징으로 한다.

<49> 본 발명에 있어서, 보툴리눔 독소 생산 균주는 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*) 또는 이의 변이체인 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 보툴리눔 독소 생산이 가능한 어떠한 균주라도 사용가능함은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

<50> 본 발명의 '보툴리눔 독소'는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 또는 이의 변이체에 의해 생성된 신경독소(Neurotoxins, NTXs)뿐만 아니라 변형, 재조합, 하이브리드 및 키메라 보툴리눔 독소를 의미한다. 재조합 보툴리눔 독소는 비-클로스트리디움 종에 의하여 재조합으로 제조된 경쇄 및/또는 중쇄를 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 '보툴리눔 독소'는 보툴리눔 독소 혈청형 A, B, C, D, E, F 및 G를 포괄하며, 보툴리눔 독소 복합체(즉 300, 600 및 900kDa 복합체) 뿐만 아니라 순수 보툴리눔 독소(즉 약 150kDa 신경독성 분자) 두 가지 모두를 포괄하고, 이들 모두 본 발명의 실시에서 유용하다.

<51> 보툴리눔 독소의 주성분인 NTXs(7S)는 균주 배양용 배지 또는 식품에서 비독소 성분과 결부되어 큰 복합체를 이룬다(Oguma *et al.*, "Structure and function

of *Clostridium botulinum* progenitor toxin.", *J. Toxicol-Toxin Reviews*, 18:17-34, 1999). 보툴리눔 독소 혈청형 A을 생성하는 A형 균주(Type A strain)는 3가지 구성형태(form)의 전구체 독소(progenitor toxins)를 생성하며, 이는 LL(19S, 900kDa), L(16S, 500kDa), 및 M(12S, 300kDa) 독소이고, 이들 모두는 완전하게 활성화된 것으로 간주되는 반면, B형, C형, 및 D형 균주는 2가지 구성형태인 L 및 M을 생성한다. 또한, E형, F형 및 G형은 단일 형태의 독소만을 생성하는데, E형 및 F형은 M 독소를 생성하고, G형은 L 독소를 생성한다. M 독소는 NTX(7S, 150kDa) 및 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 활성을 나타내지 않는 비독소 성분(Non-Toxic Non-HA, NTNH)으로 구성되어 있다.

<52> 본 발명의 '제조된 보툴리눔 독소'는 보툴리눔 독소가 배양 또는 발효 공정으로부터 수득될 때 보툴리눔 독소에 동반할 수 있는 다른 단백질 및 불순물로부터 분리되거나 실질적으로 분리된 순수 보툴리눔 독소 또는 보툴리눔 독소 복합체를 의미한다. 따라서, 제조된 보툴리눔 독소는 최소한 90%, 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 순도를 가지며, 특히 바람직하게는 본 발명에 있어서, 제조된 보툴리눔 독소는 순도 98% 이상의 보툴리눔 독소 A형 단백질인 것을 특징으로 할 수 있다.

<53> 보툴리눔 독소를 제조하기 위한 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양은 당 업계에 공지된 통상의 방법을 사용하여 이루어질 수 있으며, 배양을 위해 사용될 수 있는 통상적인 배지를 이용하여 배양이 가능하다.

<54> 비제한적인 예로서, 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양을 위한 배지에는

카세인가수분해물(Casein hydrolysate), 효모추출물(Yeast extract), 포도당(glucose) 등이 포함될 수 있으며, 25 내지 40℃의 온도에서 90 내지 180시간, 바람직하게는 100 내지 150시간 배양한다.

<55>

본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서의 산 침전 단계는 배양을 종료한 뒤 pH가 3.0 내지 4.5, 바람직하게는 pH가 3.3 내지 4.0, 가장 바람직하게는 pH가 3.4 내지 3.6이 되도록 산, 바람직하게는 황산 또는 염산을 첨가함으로써 이루어질 수 있다.

<56>

본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에 따른 산 침전 단계는 보툴리눔 균주를 배양한 뒤 남아있는 균주를 모두 사멸시키며, 많은 종류의 단백질 용액에 산을 가함으로써 pH를 저하시켜 단백질이 등전점에 이르게 되어 침전되는 원리를 이용한 것이다. 넓은 의미에서 결정화도 포함되며, 순수하게 정제하는데 중점을 둔 결정화에 비하여 침전법은 혼합된 상태에서 목적물을 거칠게 분리하는 방법이다. 보통 침전법은 목적 물질과 구조적으로 유사한 불순물이 함께 침전된다. 이때, pH를 약 3.0 내지 4.5로 조절하며, 상기 보툴리눔 독소의 회수율은 pH가 낮을수록 높아지나 pH가 3.0 이하로 되는 경우 상기 보툴리눔 독소 자체에 영향을 미치며, pH가 4.5 이상이 되는 경우 상기 보툴리눔 독소의 회수율이 낮아지므로 상기 범위 내에서 이루어짐이 바람직하다. 특히, pH가 3.4 내지 3.6 일 때 상기 보툴리눔 독소의 회수율이 가장 높으므로 가장 바람직하다. 보툴리눔 균주 배양액에 산을 서서히 가한 다음 pH가 적합한 범위에 도달하면 더 이상의 pH 변화를 나타내지 않을 때까지 침가한 후 상온에서 15시간 내지 30시간 동안 방치한 다음 상등액을 제거한다.

<57> 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 산 침전은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

<58> 본 발명에 사용된 용어 "정화(clarification)"는 침전물 등을 완충용액을 이용하여 재용해 시킨 후, 재용해된 용액 내에 포함된 불순물을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 "정화" 단계는 일반적으로 이하의 단독 또는 그의 다양한 조합을 포함하는, 예컨대, 여과, 석출, 응집 및 침강의 하나 이상의 단계, 더욱 상세하게는, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외 여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용하여 수행될 수 있으며, 본 발명에서의 정화 단계를 통해 재용해된 독소 침전물 등에 포함되어 있는 불순물, 특히 핵산 불순물, HCD, 세포 파쇄물(cell debris) 및 내독소(endotoxin) 등이 제거될 수 있다.

<59> 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명은 다양한 정제 계획에서 일반적으로 사용되는 통상의 정화 단계에 대하여 개선점을 제공한다. 정화 단계는 일반적으로 하나 이상의 바람직하지 않은 개체를 제거하는 것을 포함하며 또 소망하는 표적 분자의 포획을 포함하는 단계 이전에 전형적으로 실시된다. 정화의 다른 주요 요지는 나중에 정제 공정에서 멸균 필터의 막힘을 초래할 수 있는 샘플 중의 가용성 및 불

용성 성분을 제거하여, 전체 정제 공정을 더욱 경제적으로 만드는 것이다. 또한, 정화 효율을 향상시키는 방법, 예컨대 석출이 이용될 수 있다. 불순물의 석출은 응집, pH 조절(산 석출), 온도 변동, 자극-감응성 중합체 또는 소분자로 인한 상 변화와 같은 다양한 방법 또는 이들 방법의 조합에 의해 실시될 수 있다.

<60>

본 발명에서 "심층 여과(depth filtration, DF)"란 감소하는 기공의 크기에 따른 일련의 필터(filters)를 이용하여 용액으로부터 입자(예컨대, 불순물)를 제거하는 것으로, 본 발명에 사용된 용어 "심층 필터(depth filter)"는 필터 물질의 심층 내에서 여과를 달성한다. 상기 필터는 유동채널의 복잡하고 구불구불한 미로를 형성하는 임의의 섬유 매트릭스로 구성되어 있으며, 상기 섬유 매트릭스에 의한 포획 또는 섬유 매트릭스에 대한 흡착으로부터 입자 분리는 기인한다. 세포 배양 브로쓰 및 기타 공급원료를 바이오가공(bioprocessing)하기 위해 가장 흔히 사용되는 심층 필터 매질은 셀룰로오스 섬유, DE와 같은 필터 조제, 및 양으로 하전된 수지 결합제로 이루어진다. 절대 필터와 달리, 심층 필터 매질은 다공성 매질을 통하여 입자를 유지하여, 기공 크기보다 더 크고 또 더 작은 입자의 체류를 허용한다. 입자 체류는 크기 배제 및 소수성, 이온성 및 기타 상호작용을 통한 흡착 양쪽을 포함할 수 있다. 상업적으로 구매가능한 심층 필터는 Millistak+ Pod depth filter system, XOHC media(Millipore Corporation), Zeta Plus™ Depth Filter(3M Purification Inc.) 등이 있다. 본 발명에서 심층 여과는 2개 이상의 심층 필터를 배열하여 겹으로 사용할 수 있으며, 이 경우, 상업적으로 구매가능한 Millistak+

mini DOHC(Millipore Corporation) 및 XOHC filters(Millipore Corporation)를 사용할 수 있다.

<61> 본 발명에서 심층 필터는 일반적으로 0.01~20 μm , 바람직하게는 0.1~8 μm 의 공칭공경(nominal pore size)을 가지며, 이보다 더 큰 크기를 갖는 응집된 세포 파쇄물 및 콜로이드성 미립자 또는 그보다 작은 입자를 비롯한 응집된 세포성 바이오매스의 제거 및 복수의 등급화된 층을 갖는 다공성 심층 필터 매질을 포함할 수 있다.

<62> 따라서, 본 발명에서 심층 여과를 이용할 경우, 보툴리눔 독소 침전액에 포함된 불순물(예컨대, 핵산), 세포 파쇄물, 내독소(endotoxin) 등을 제거하는데 용이하다.

<63> 본 발명에서 "정밀여과(microfiltration, MF)" 또는 "한외여과(ultrafiltration, UF)"란 일정 압력하에 막(membrane)의 기공(pore)을 통해 혼합 용액의 구성요소인 용질(solute)의 크기 및 구조에 따라 표적 용질(예컨대, 보툴리눔 독소)을 분획하는 공정이다. 일례로, 0.1 μm 또는 750kDa 분획분자량(molecular weight cutoff, MWCO) 분리용 PS(polysulfone) 막을 5~40 psig, 및 4~60°C 조건에서 수행하여 용액의 정화가 가능하다.

<64> 일반적으로 정밀여과는 한외여과에 선행되는 공정으로 용액으로부터 0.1~10 μm 의 입자를 분리하는 데 사용되며, 이는 일반적으로 1×10^5 g/mol의 분자량을 가지

는 고분자를 분리하는데 이용된다. 또한, 정밀여과는 침전물(sediment), 원생동물, 큰 박테리아 등을 제거하는데 사용된다. 본 발명에서 정밀여과는 고분자, 세포 파쇄물 제거에 용이하게 사용될 수 있다. 일반적으로 정밀여과 공정은 용액을 0.1~5, 바람직하게는 1~3m/s의 속도, 50~600kPa, 바람직하게는 100~400kPa의 압력으로 압력펌프 또는 진공펌프를 이용하여 수행한다.

<65> 한외여과는 용액으로부터 0.01~0.1 μm 의 입자를 분리하는 데 사용되며, 이는 일반적으로 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5 \text{ Da}$ 의 분자량을 가지는 고분자에 대응된다. 한외여과는 단백질, 내독소(endotoxin), 바이러스, 실리카(silica) 등을 제거하는데 사용된다. 본 발명에서 MWCO 100~300K용 한외여과 분리용 막을 사용할 경우, 보툴리눔 독소 침전액에 포함된 불순물은 제거하고, 보툴리눔 독소는 농축시킬 수 있다.

<66> "멸균 여과(sterile filtration)"란 정밀여과 또는 멤브레인 필터를 이용하는 공정으로, 가열, 방사선 조사, 화학적 처리를 대체하고, 안전하게 표적물질이 포함된 용액(예컨대, 생물제(biologics), 보툴리눔 독소 등)을 정화시킬 수 있는 방법이다. 용액에 포함될 수 있는 미생물의 제거를 위해서는 0.1~0.3 μm , 바람직하게는 0.15~0.25 μm , 가장 바람직하게는 0.2 μm 의 기공을 가지는 정밀필터(microfilter)를 이용하여 제거하고, 바이러스의 제거 및 불활성화를 위해서는 20~50nm의 기공을 가지는 나노필터(nanofilter)을 이용한다. 멤브레인 필터의 경우에서도 마찬가지로 미생물, 바이러스 등의 제거를 위해서, 특정 기공을 가지고, 셀룰로우스 에스테르(cellulose ester) 또는 PES(polyethersulfone)로 구성된 멤브레

인 필터를 사용하여 정화 공정을 수행할 수 있다.

<67> 본 발명에서 "멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC)"란 "수지 크로마토그래피(resin chromatography)"와 대비되는 표적물질(예컨대, 보툴리눔 독소)의 분리방식을 가진다. 수지 크로마토그래피는 일반적으로 구형의 형태 및 기공(pore)을 가지는 수지를 이용하여 용액의 대류(convection) 대비 확산(diffusion)의 비중이 큰 분리방식을 이용하는 반면, 멤브레인 크로마토그래피는 평면 형태 및 거대 기공(macroporous)을 가지는 막을 이용하여 확산 대비 대류의 비중이 커서 용액의 분리효율이 높은 편이어서, 바이러스, 플라스미드, 거대 단백질복합체 등의 막으로의 접근이 용이해서 분리가 용이하다. 상업적으로 구매가능한 멤브레인 크로마토그래피는 Mustang Q membrane chromatography capsule(Pall Corporation), Sartobind Q(Sartorius Stedim Biotech GmbH) 등이 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<68> 본 발명에서 원심분리(centrifugation)는 바람직하게는 20,000 g, 더 바람직하게는 30,000 g, 더 바람직하게는 50,000 g, 더 바람직하게는 70,000 g, 가장 바람직하게는 90,000 g 이상의 원심력으로 수행될 수 있고, 다른 바람직한 실시양태에서 원심력은 200,000 g, 150,000 g, 120,000 g, 100,000 g, 또는 90,000 g 미만이다.

<69> 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에 따른 보툴리눔 독소 정화 단계는 상기 (a) 단계에서 얻은 독소를 인산완충액, 바람직하게는 인산나트륨 완충액(sodium

phosphate buffer)을 가하여 용해하고 침전을 정화하는 단계를 포함하는데, 이때, 인산완충액의 pH는 약 3.0 내지 약 8.0, 바람직하게는 4.0~7.0이며, 염기를 첨가하여 최종 pH를 4.5 내지 6.5, 바람직하게는 pH를 5.5 내지 6.2, 더욱 바람직하게는 pH 4.8 내지 pH 5.8로 조절하고, 독소 정화를 상기 pH 범위에서 수행할 수 있다.

<70>

본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에 따른 보툴리눔 독소의 회석 또는 용해 단계는 상기 (b) 단계에서 얻은 독소를 인산완충액, 바람직하게는 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer)을 가하여 투석유물을 회석하거나 침전물을 용해시키는 단계를 포함하는데, 이때, 인산완충액의 pH는 약 4.0 내지 약 8.5가 바람직하며, 염기를 첨가하여 최종 pH를 4.5 내지 8, 바람직하게는 pH를 5.5 내지 7.5, 더욱 바람직하게는 pH 6 내지 pH 7로 조절하고, 독소의 회석 또는 용해를 상기 pH 범위에서 수행할 수 있다.

<71>

본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 보툴리눔 독소의 심층 여과(depth filtration, DF)는 연동 펌프(peristaltic pump)를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 (c) 단계에서 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전 또는 염산 침전은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

<72>

본 발명에 있어서, "UF 다이아필트레이션(UF diafiltration)"이란 전술한 한 외여과(ultrafiltration, UF)를 이용하여 다이아필트레이션을 수행하는 것을 의미하나 이에 한정되는 것은 아니다. "다이아필트레이션"이란 표적 물질(용액)에 포함

된 성분(예컨대, 입자)을 제거하거나 수득하는 기법으로 성분의 분자량(분자 크기)에 따라 분리 가능한 투과성 필터(permeable filter)를 이용하는 것을 특징으로 하는, 표적 물질의 순도를 높이는 기법을 의미한다.

<73>

본 발명에 있어서, 상기 황산암모늄 침전단계는 염석(salting out)에 해당하는 것으로, 상기 염석은 물에 잘 용해하는 염(황산암모늄 등)을 단백질 혼합액에 가하여 이온 강도를 증가시켜 단백질을 침전시키는 것이다. 만약 목적으로 하는 단백질이 황산암모늄 30%(w/v) 포화 때 주로 침전하는 것을 알면 미리 30%(w/v) 포화 이하의 황산암모늄 농도로 목적 이외의 단백질을 침전시켜 제거하고 다음에 30%(w/v) 포화가 되도록 황산암모늄을 가하여 목적하는 단백질을 침전시키고 이것을 원심분리로 모을 수 있다. 염석 조작은 정제의 초기 수단으로 흔히 이용된다. 이때 사용되는 황산암모늄은 10 내지 50%(w/v), 바람직하게는 20 내지 40%(w/v) 농도의 용액을 사용할 수 있으며, 상기 (c) 단계에서 염산 침전은 pH 2~5, 바람직하게는 2.5 내지 4.5가 되도록 염산을 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

<74>

상기 (d) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 9, 바람직하게는 pH 3 내지 8, 전도도(conductivity)는 2 내지 40 mS/cm, 바람직하게는 3 내지 30 mS/cm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 (d) 단계에서 보틀리늄 독소는 음이온교환 크로마토그래피로부터 용출되는 FT(flow through)를 보틀리늄 독소가 포함된 분획(fraction)으로 수득하거나(flow through mode), 음이온교환 크로마토그래피의 수지(resin)에 결합된 보틀리늄 독소가 포함된 분획으로 수득

하는 것(binding mode)을 특징으로 할 수 있고, 최종 정제된 보툴리눔 독소는 7S 또는 19S의 구성형태를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

<75> 본 발명에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "FT(flow through)", "플로우 쓰루 공정" 또는 "플로우 쓰루 정제"는 하나 이상의 불순물과 함께 생물약학적 제제에 함유된 적어도 하나의 표적 분자(예컨대 보툴리눔 독소)가 하나 이상의 불순물과 결합하는 물질을 통하여 통과하며, 상기 표적 분자는 보통 결합하지 않는(즉, 플로우 쓰루하는) 분리 방법을 의미한다.

<76> 용어 "전도도"는 두 전극 사이의 전류를 통하게 하는 수용액의 능력을 의미한다. 용액 내에서는 이온 수송에 의해 전류가 흐른다. 따라서, 수용액 중 존재하는 이온량을 증가시키면, 용액은 더 높은 전도도를 갖게 될 것이다. 전도도의 기본 측정 단위는 지멘(Siemen)(또는 mho), mho(mS/cm)이며, 전도도 측정기, 예로서, 각종 모델의 오리온(Orion) 전도도 측정기를 사용하여 측정할 수 있다. 전기 전도도란 전류를 운반할 수 있는 용액 중 이온의 능력이기 때문에 용액의 이온 농도를 변화시킴으로써 용액의 전도도를 변경시킬 수 있다. 예를 들면, 원하는 전도도를 얻기 위해 용액 중 완충제의 농도 및/또는 염(예를 들면, 염화나트륨, 아세트산나트륨, 또는 염화칼륨)의 농도를 변화시킬 수 있다. 바람직하게는, 각종 완충액의 염 농도를 변경하여 원하는 전도도를 얻을 수 있다

<77> 본 발명에서 상기 (d) 단계의 음이온 교환 크로마토그래피의 컬럼 완충액으로는 인산나트륨, 구연산 또는 Tris-HCl 완충액을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 컬럼 완충액의 농도는 15 내지 70mM로 조절하며, 바람직하게는 약 20 내지 60mM로 조절한다. 컬럼 완충액의 pH 2 내지 9, 바람직하게는 pH 3 내지 8가 되도록 조절하며, 이동상의 유속은 0.5 내지 5.0mL/분으로 조절하며, 바람직하게는, 1.0 내지 3.0mL/분으로 조절한다. 이때, 완충액의 전도도는 2 내지 40mS/cm, 바람직하게는 3 내지 30mS/cm로 맞추고 컬럼의 평형화가 끝나면 시료를 주입한다.

<78> 또한, 본 발명에서는 상기 (a) 내지 (d) 단계의 공정을 통해 얻어진 보툴리눔 독소를 포함하는 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH를 상향조절하고, 다시 음이온 교환 크로마토그래피를 수행한 후, 양이온 교환 크로마토그래피(Cation exchange chromatography: CEX)를 수행할 경우, 매우 높은 순도의 보툴리눔 독소, 특히 저분자량의 보툴리눔 독소를 수득할 수 있음을 확인할 수 있었다.

<79> 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서는

<80> 상기 (d) 단계 이후,

<81> (e) 보툴리눔 독소가 포함되어 있는 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH를 상향조절하는 단계;

<82> (f) 상기 (e) 단계에서 pH가 상향조절된 음이온교환 크로마토그래피 분획을

음이온교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계;

<83> (h) 상기 (f) 단계에서 회석된 보툴리눔 독소를 양이온교환 크로마토그래피 (Cation exchange chromatography: CEX)를 이용하여 정제하는 단계;

<84> 를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법을 제공한다.

<85> 바람직하게는 상기 (f) 단계와 (h) 단계 사이에

<86> (g) 정제된 음이온교환 크로마토그래피 분획에 완충용액을 첨가하여 보툴리눔 독소를 회석하는 단계;

<87> 가 추가로 포함될 수 있다.

<88> 본 발명에서는 편의상 상기 (e) 단계 내지 (h) 단계가 추가로 사용되는 경우, 음이온 교환 크로마토그래피(AEX) 공정의 구분을 위해 상기 (d) 단계의 AEX 공정을 1차 음이온 교환 크로마토그래피, 상기 (f) 단계의 AEX 공정을 2차 음이온 교환 크로마토그래피 공정으로 칭하며, 아무런 설명이 없는 경우에는 (d) 단계의 AEX 공정을 1차 음이온 교환 크로마토그래피를 의미한다. 또한, 실시예 등에서의 TQ는 1차 음이온 교환 크로마토그래피 공정을, HQ 2차 음이온 교환 크로마토그래피 공정을, 그리고 XS는 양이온 교환 크로마토그래피 공정을 의미한다.

<89> 본 발명에서 용액의 "pH"는 물 샘플의 이온화와 관련하여 산성도 또는 알칼리도를 측정한다. 물의 pH는 중성, 즉 pH 7이다. 대부분의 pH 판독치는 0 내지 14

의 범위이다. 물보다 더 높은 $[H^+]$ 을 갖는 용액 (pH 7 미만)은 산성이고, 물보다 더 낮은 $[H^+]$ 을 갖는 용액 (pH 7 초과)은 염기성 또는 알칼리성이다. pH는 pH 계측기를 이용하여 측정될 수 있다. 완충제 pH는 HCl 또는 NaOH와 같은 산 또는 염기를 사용하여 조정할 수 있다.

<90>

본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH의 상향조절은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 (e) 단계에서 pH의 상향조절은 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), pH 적정(pH titration), 투석(dialysis) 및 완충용액 교환 컬럼 크로마토그래피(buffer exchange column chromatography)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 (e) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH의 상향조절은 Tris-HCl 완충용액을 이용하여 이루어지며, 이때 Tris-HCl 완충용액의 pH는 7.0~8.5, 바람직하게는 7.3~8.3의 값을 갖는다.

<91>

본 발명에 있어서, 상기 (f) 단계에서 2차 음이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 9, 바람직하게는 pH 3 내지 8, 전도도(conductivity)는 2 내지 40 mS/cm, 바람직하게는 3 내지 30 mS/cm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 (f) 단계에서 보툴리눔 독소는 음이온교환 크로마토그래피로부터 용출되는 FT(flow through)를 보툴리눔 독소가 포함된 분획(fraction)으로 수득하거나(flow through mode), 음이온교환 크로마토그래피의 수지(resin)에 결합된 보툴리눔 독소가 포함된 분획으로 수득하는 것(binding mode)을 특징으로 할 수 있다.

<92> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 (g) 단계의 완충용액은 인산나트륨 완충용액으로, pH는 6~8, 바람직하게는 6.5~7.5의 값을 갖는다.

<93> 본 발명에 있어서, 상기 (h) 단계의 양이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 9, 바람직하게는 pH 3 내지 8의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 (h) 단계의 양이온교환 크로마토그래피에서 보툴리눔 독소는 양이온교환 크로마토그래피의 수지(resin)에 결합된 보툴리눔 독소가 포함된 분획(fraction)으로 수득하는 것을 특징으로 할 수 있고, 최종 정제된 보툴리눔 독소의 구성형태는 7S (분자량: 150kDa)인 것을 특징으로 할 수 있다.

<94> 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 제조방법에 있어서, 음이온 교환 크로마토 그래피에 사용되는 레진은 디에틸아미노에틸(DEAE), 4급 아미노에틸(QAE) 및 4급 아민(Q) 그룹을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 TQ650, HQ, XQ 등이 사용될 수 있다.

<95> 본 발명에 따른 보툴리눔 독소 제조방법에 있어서, 양이온 교환 크로마토 그래피에 사용되는 레진은 카복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)를 포함하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 HS, XS 등이 사용될 수 있다.

<96> 셀룰로스 이온 교환 수지, 예를 들어, DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™,

CM-32™, 및 CM-52™은 제조원[GE Healthcare, Lindesnes, Norway]로부터 시판되고 SEPHADEX-기본 및 가교결합된 이온 교환제가 또한 공지되어 있다. 예를 들어, DEAE-, QAE-, CM-, 및 SP- SEPHADEX 및 DEAE-, Q-, CM- 및 S- SEPHAROSE 및 SEPHAROSE Fast Flow가 모두 제조원[GE Healthcare Bio-Sciences]으로부터 시판되고 있다. 추가로, DEAE 및 CM 유도체화된 에틸렌 글리콜-메타크릴레이트 공중합체 (예를 들어, TOYOPEARL™ DEAE-650S 또는 M 및 TOYOPEARL™ CM-650S 또는 M)는 제조원[Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA]으로부터 시판되고 있다.

<97> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<98> 실시예 1: 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양

<99> 보툴리눔 독소의 생산을 위한 클로스트리디움 보툴리눔 균주는 2% 카세인 가수분해물(Casein hydrolysate), 1% 효모추출물(Yeast extract), 1% 포도당 및 0.5% 티오글리콜산염배지(Thioglycollate medium)의 조성을 가지는 배지를 121℃에서 30 분간 멸균한 다음, 상기 배지 10mL가 들어있는 배양 용기에 20 μL의 클로스트리디움 보툴리눔(질병관리본부 관리번호: 4-029-CBB-IS-001)을 접종하여 35℃에서 혐기

적 조건으로 22~30시간 동안 1차 중 배양(정치 배양)을 하였다. 1차 중 배양에서 균주의 성장이 확인되면 같은 배지 조성을 가진 800mL의 멸균된 배지가 각각 들어 있는 배양 용기에 8mL의 1차 중 배양액을 접종하여 35℃에서 혐기적 조건으로 3일간 2차 중 배양(정치 배양)을 하였다.

<100> 실시예 2: 보툴리눔 독소의 제조

<101> 2-1: 황산침전 및 pH 중화

<102> 황산 침전 단계는 보툴리눔 균을 배양한 뒤 남아있는 균을 모두 사멸시키며, 많은 종류의 단백질이 포함된 배양액에 황산을 첨가함으로써 pH를 저하시켜 단백질이 등전점에 이르게 되어 침전시키는 단백질을 분리하는 방법으로, 실시예 1의 방법으로 본 배양을 실시하고, 배양이 완료되면 10L 배양 용기(10L SUS Pot)에 배양된 배양액을 모은 다음, pH 3.4 내지 3.6가 되도록 5N 황산을 첨가하고, 상온에서 12~20시간 동안 방치하여 상등액과 침전물이 분리되도록 하였다. 상기 상등액을 제거하고 황산침전액을 최종적으로 2.5~3.0L 남겼다.

<103> 상기 상등액이 제거된 황산침전액의 pH 중화방법은 다음과 같다. 즉, 황산침전액에 700mL의 pH 5.3의 1M 인산나트륨(sodium phosphate)을 첨가하고, 교반한 다음, 5N NaOH를 첨가하여 황산침전액의 pH를 5.9 내지 6.1로 조절하였다. 상기과 같이 pH를 중화시킨 황산침전액을 수득하여, 4등분 하였다.

<104> 2-2: 전처리 공정

<105> 1) 기존 공정

<106> 실시예 2-1의 4등분한 황산침전액 중 하나를 기존의 공정에 따라 전처리하였다. 즉, 침전물에 남아있는 DNA 및 RNA를 제거하기 위해 0.4M 벤자미딘 염산(benzamidinium HCl) 60mL, DNase 0.25g, RNase 0.25g을 첨가하고 보툴리눔 독소를 추출하기 위해 약 3~7시간 동안 반응시켰다. 상기 독소 추출 배양액을 4℃, 15분, 12,000 x g로 원심분리 후, 상등액을 수득하였다. 상기 상등액에 1N 염산을 첨가하여 pH를 3.4 내지 3.6까지 낮춰준 후 3 내지 5℃에서 12~20시간 방치하여 염산침전 과정을 수행하였다. 상기 과정으로 형성된 염산침전액을 4℃, 12000 x g에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 독소침전물(pellet)에 pH 6.5의 50mM 인산나트륨(sodium phosphate) 버퍼 30mL를 첨가하여 독소 침전물을 용해시켰다.

<107> 2) 심층 필터(Depth filter) 여과 공정

<108> 실시예 2-1의 4등분한 황산침전액 중 남은 3/4의 황산침전액은 연동 펌프(peristaltic pump)에 Zeta Plus™ Encapsulated Capsule depth filter effective filtration(3M, BC0025S60SP05A)을 연결해서 여과(filtration)하였다.

<109> i) 심층 필터(Depth filter) 여과 후 UF

<110> 심층 필터 여과액을 UF 시스템(PALL, TFF cassette 30kDa)을 이용하여 pH

6.5의 50mM 인산나트륨(sodium phosphate)로 다이아필트레이션(diafiltration)을 10회 수행한 다음, 최종 부피를 30mL로 맞춰줬다.

<111> ii) 심층 필터(Depth filter) 여과 후 황산암모늄(Ammonium sulfate) 침전

<112> 심층 필터 여과액에 황산암모늄을 30%(w/v)가 되도록 첨가하여 3 내지 5℃에서 12~20시간 방치하였다. 그 다음, 4℃, 15분, 12,000 x g로 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 원심분리 펠렛(pellet)을 30mL의 pH 6.5의 50mM 인산나트륨(sodium phosphate)로 재용해하였다.

<113> iii) 심층 필터(Depth filter) 여과 후 염산(Hydrochloric acid) 침전

<114> 심층 필터 여과액에 1N HCl(염산)을 첨가하여 pH를 3.4 내지 3.6까지 낮춰준 후 3 내지 5℃에서 12~20시간 방치하였다. 그 다음, 4℃, 15분, 12,000 x g로 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 원심분리 펠렛(pellet)을 30mL의 pH 6.5의 50mM 인산나트륨(sodium phosphate)로 재용해하였다.

<115> 2-3: 정제 공정

<116> TQ 공정(1차 음이온 교환 크로마토그래피 공정)으로 정제된 보툴리눔 독소의 순도 측정은 HPLC(Waters사 e2695)를 이용하여 SEC(size exclusion chromatography)방법으로 수행하였다. 여기서, 이동상은 pH6.5의 100mM 인산나트륨

용액을 사용하였으며, P/N 08542에 대한 가드컬럼(Tosoh Bioscience사, P/N 08543)에 TSKgel G4000SW_{XL}(Tosoh Bioscience사, P/N 08542) 컬럼을 연결하고 보툴리눔 독소단백질 20 µg을 로딩(loading)하여 1mL/min으로 30분간 흘려주었다.

<117>

TQ 공정(1차 음이온 교환 크로마토그래피 공정), HQ 공정(2차 음이온 교환 크로마토그래피 공정) 및 XS 공정(양이온 교환 크로마토그래피 공정)으로 정제된 보툴리눔 독소의 각 정제(공정) 단계에서 회수한 시료에 포함된 보툴리눔 독소의 혼합상태/순도/함량을 시각적으로 확인하기 위해 단백질 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였다. 즉, 보툴리눔 독소가 포함되는 것으로 추정되는 시료를 Bradford 방법으로 정량한 다음, 각 시료의 일정 정량(예컨대, 40 µg 단백질)을 취해, 적절하게 가열 및/또는 용해시켜 변성된 단백질을 사용하여 10%~12% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 젤은 적절한 염색제(질산은 또는 쿠마시 블루)로 염색한 다음, 각 정제 단계에서의 보툴리눔 독소의 순도를 시각적으로 확인하였다.

<118>

2-3-1: TQ 정제(음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange chromatography Flow-through: AEX FT))

<119>

실시에 2-2의 전처리 공정 완료 후 보툴리눔 독소를 제외한 대부분의 주요 불순물을 제거하기 위하여 이온교환수지를 이용하여 하기와 같이 크로마토그래피를 수행하였다.

<120>

(1) XK 26/40에 TQ 수지(resin)를 컬럼에 30~34cm 높이가 되도록 패킹

(packing)한 다음, AKTA Prime Plus에 장착하였다.

<121> (2) 평형/용출 완충액(50mM 인산나트륨(sodium phosphate), pH6.5, 10mS/cm)을 흘려 컬럼을 평형화하였다.

<122> (3) 실시예 2-2의 기존 공정대로 전처리된 시료를 상기 컬럼에 10mL씩 분획하고, 2mL/분으로 주입하였다. 주입이 끝나면 160~180mL의 평형/용출 완충액을 주입하고 UV 280nm 파장에서 피크의 상승 후 기준치(Baseline)로 떨어질 때까지의 분획(fraction)을 순차적으로 수득하였다(상기 분획은 HPLC 및 SDS-PAGE로 확인함).

<123> (4) 분획 수득 후 컬럼의 재생을 위하여, 세척 완충액(50mM 인산나트륨(sodium phosphate), pH 6.5, 1M NaCl)을 5mL/분으로 200mL 이상 주입하여 세척하였다.

<124> (5) 상기 (2)~(4)의 과정을 기존 공정대로 전처리된 시료 대신 다른 3가지 방법으로 전처리된 시료(심층 필터 여과 후 UF/황산암모늄 침전/염산 침전)를 이용하여 TQ 정제를 수행하였다. 이때 고순도 보툴리눔 독소의 정제를 위해 pH는 6.4~6.6, 전도도(conductivity)는 10 ± 5 mS/cm가 유지되도록 하였다.

<125> 그 결과, 보툴리눔 독소는 TQ 수지에 흡착되지 않고 대부분의 주요 불순물은 흡착되어 제거되며, 높은 순도를 가지는 보툴리눔 독소의 생산이 가능하며, 최종 보툴리눔 독소의 구성형태는 19S(분자량 약 900kDa)임을 확인하였다.

<126> 2-3-2: HQ 정제(음이온교환 크로마토그래피)(Anion exchange chromatography:

AEX, binding mode)

<127> TQ 정제 완료 후 보툴리눔 독소를 추가로 정제하기 위하여 HQ 이온교환수지를 이용한 크로마토그래피(이하 HQ 공정)를 수행하였다. 이때, HQ 공정은 바인딩 또는 FT(flow-through) 방식으로 TQ 정제 시료를 정제하였다. 본 발명에서, HQ(바인딩)이란 표적 물질(예컨대, 보툴리눔 독소)과 결합가능한 HQ 수지(resin)의 전하량 차이로 표적 물질을 분리(용출)하는 방식이며, 또한, HQ(FT)란 표적 물질(예컨대, 보툴리눔 독소)과 혼합될 수 있는 불순물과 결합가능한 HQ 수지(resin)의 전하량 차이로 HQ 수지와 결합하지 않고 흘러나오는(Flow-through, FT) 표적 물질을 시료로부터 분리하는 방식이다.

<128> HQ(바인딩) 정제(AEX, binding mode)

<129> (1) 기존공정대로 전처리 후 TQ 정제된 시료를 UF 시스템(PALL, TFF cassette 30kDa)을 이용하여 pH 7.8의 25mM Tris-HCl 완충액으로 다이아필트레이션(diafiltration)을 10회 수행하여 최종 pH는 7.7 내지 7.9, 부피는 30mL로 맞춰 준비하였다.

<130> (2) HQ 수지(resin)를 AKTA Prime Plus에 장착하였다.

<131> (3) 25mM Tris-HCl, pH7.8 완충액을 흘려 컬럼을 평형화하였다.

<132> (4) 12mL씩 분획 설정을 하고, 상기 (1)의 준비된 시료를 2.5mL/분으로 상기 평형화된 컬럼에 주입하고, pH 7.8의 25mM Tris-HCl 완충액 40mL로 세척한 다음,

20 CV, 10% 구배(gradient)로 용출(elution)하였다. 첫 번째 피크의 분획을 순차적으로 수득하였다(상기 분획은 SDS-PAGE로 확인함). 이때 고순도 보툴리눔 독소의 정제를 위해 pH는 7.8로 조절하였다.

<133> (5) 분획 수득 후 컬럼의 재생을 위하여, 세척 완충액(25mM sodium phosphate, pH7.8, 1M NaCl)을 2.5mL/분으로 120mL 이상 주입하여 세척하였다.

<134> (6) 상기 (1)~(5)의 과정을 기존공정대로 전처리 후 TQ 정제된 시료 대신 다른 3가지 방법으로 전처리되고 TQ 정제된 시료(심층 필터 여과 후 UF/황산암모늄 침전/염산 침전한 다음, TQ 정제된 시료)를 이용하여 수행하였다.

<135> 그 결과, 높은 순도를 가지는 보툴리눔 독소의 생산이 가능하며, 최종 보툴리눔 독소는 7S(분자량: 약 150kDa)임을 확인하였다(도 2 및 도 3).

<136> 2-3-3: HQ 정제(AEX, binding mode) 및 XS 정제(binding mode)

<137> 상기 실시예 2-3-2에 따른 HQ 정제 완료 후 보툴리눔 독소를 추가로 정제하기 위하여 XS 양이온 교환 크로마토그래피(Cation exchange chromatography: CEX, binding mode)를 추가적으로 수행하였다.

<138> 구체적인 XS 공정은 다음과 같다.

<139> (1) 실시예 2-2의 기존 공정대로 전처리 후 HQ 정제된 시료를 pH7.0의 50mM

Sodium phosphate 완충액을 이용하여 1/4로 희석하였다.

<140> (2) XS 수지(resin)를 AKTA Prime Plus에 장착하였다.

<141> (3) 평형/용출 완충액(50mM sodium phosphate, pH7.0)을 흘려 컬럼을 평형화 하였다.

<142> (4) 14mL씩 분획 설정을 하고, 상기 (1)의 희석된 HQ 정제된 시료를 1.6mL/분으로 상기 평형화된 컬럼에 주입하고, pH7.0의 50mM Sodium phosphate 완충액 50mL로 세척한 다음, 분획을 6mL로 설정하고, 20 CV, 12% 구배(gradient)로 용출(elution)하였다. 첫 번째 피크의 분획을 순차적으로 수득하였다(상기 분획은 SDS-PAGE로 확인함). 이때 고순도 보툴리눔 독소의 정제를 위해 pH는 7.0으로 조절하였다.

<143> (5) 분획 수득 후 컬럼의 재생을 위하여, 세척 완충액(50mM sodium phosphate, pH7.0, 1M NaCl)을 1.6mL/분으로 20mL 이상 주입하여 세척하였다.

<144> (6) 상기 (1)~(5)의 과정을 기존 공정대로 전처리 후 HQ 정제된 시료 대신 다른 3가지 방법으로 전처리되고 TQ 정제된 시료(심층 필터 여과 후 UF/황산암모늄 침전/염산 침전한 다음, TQ 정제 및 HQ 정제된 시료)를 이용하여 수행하였다.

<145> 그 결과, 고순도의 보툴리눔 독소의 생산이 가능하며, 최종 보툴리눔 독소의 구성형태는 7S(분자량: 약 150kDa)임을 확인하였다(도 4 및 도 5).

<146> 2-3-4: HQ 정제(AEX, FT mode) 및 XS 정제(binding mode)

<147> 상기 실시예 2-3-3과 같은 보툴리눔 독소의 제조방법에서, HQ 공정(AEX)을 통한 정제 방법에서, binding mode를 flow through mode로 대체하여 보툴리눔 독소를 제조하였다.

<148> HQ(AEX, FT mode) 공정

<149> HQ 정제(AEX, FT mode)는 다음과 같은 방법을 통해 수행되었다.

<150> 기존공정대로 전처리 후 TQ 정제된 시료를 UF 시스템(PALL, TFF cassette 30kDa)을 이용하여 pH7.8의 25mM Tris-HCl 완충액으로 다이아필트레이션(diafiltration)을 10회 수행하여 최종 pH는 7.7 내지 7.9, 부피는 30mL로 맞춰 준비한 다음, HQ(FT mode) 공정을 수행하였다.

<151> i. HQ를 AKTA Prime Plus에 장착하였다.

<152> ii. 25mM Tris-HCl, pH7, 전도도 7.8 mS/cm 완충액을 흘려 컬럼을 평형화 하였다.

<153> iii. 1mL씩 분획설정을 하고 TQ 시료를 1.5mL/분으로 주입하고 25mM Tris-HCl, pH7.8, 전도도 7.3mS/cm 완충액 40mL로 용출하였다. 피크의 분획을 모아 수거하였다(상기 분획은 SDS-PAGE로 확인함).

<154> iv. 분획 수득 후 컬럼의 재생을 위하여, 25mM Tris-HCl, pH7.8, 1M NaCl 완

충액을 1.5mL/분으로 40mL 이상 주입하여 세척하였다.

<155> HQ(FT) 시료를 이용한 XS 공정

<156> 보툴리눔 독소의 순도를 향상시키기 위하여 HQ(FT) 공정으로 정제된 시료에 XS(바인딩) 공정을 수행하여 정제하였다.

<157> (1) HQ(FT) 공정으로 정제된 시료를 50mM Sodium phosphate, pH7.0 완충액을 이용하여 1/4로 희석하였다.

<158> (2) XS를 AKTA Prime Plus에 장착하였다.

<159> (3) 50 mM Sodium phosphate, pH7.0 완충액을 흘려 컬럼을 평형화하였다.

<160> (4) 14 mL씩 분획설정을 하고, 상기 (1)의 희석된 HQ 정제된 시료를 1.5mL/분으로 주입하고 50mM Sodium phosphate, pH7.0 완충액 50mL로 세척해준 뒤, 분획을 6mL로 설정하고 60 CV, 12% 구배(gradient)로 용출(elution)하였다. 첫번째 피크의 분획(fraction)을 모아 수거하였다(상기 분획은 SDS-PAGE로 확인함).

<161> (5) 분획 수득 후 컬럼의 재생을 위하여, 50mM Sodium phosphate pH7.0, 1M NaCl 완충액을 1.5mL/분으로 20mL 이상 주입하여 세척하였다.

<162> 그 결과, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이 7S(분자량: 약 150kDa), 순도 98% 이상인 보툴리눔 독소를 제조할 수 있음을 확인하였다.

<163> 종합하면, 도 2~도 7에 나타난 바와 같이, 실시예 2의 기존 공정, 또는 심층

필터(depth filter)로 여과 후 염산 침전 공정을 수행한 다음, 음이온교환 크로마토그래피 정제(TQ(바인딩 또는 FT) 정제)로 수득한 보툴리눔 독소를 함유하는 시료는 독소 19S에서 본래 관찰되는 138kDa(NTNH), 98kDa(중쇄(Heavy chain)), 52kDa(경쇄(Light chain)), 50kDa(HA), 33kDa(HA), 20kDa(HA), 17kDa(HA) 이외의 불순물이 가장 적게 관찰되었다.

<164> 또한, 심층 필터(depth filter)로 여과 후 UF 공정(UF 다이아필트레이션(UF diafiltration)) 및 음이온교환 크로마토그래피 정제(TQ(바인딩 또는 FT) 정제)로 수득한 보툴리눔 독소를 함유하는 시료는 약 13kDa의 불순물 단백질 밴드가 관찰되었다.

<165> 또한, 심층 필터(depth filter)로 여과 후 황산암모늄 침전 및 음이온교환 크로마토그래피 정제(TQ(바인딩 또는 FT) 정제)로 수득한 보툴리눔 독소를 함유하는 시료는 37kDa의 불순물 단백질 밴드가 관찰되었다.

<166> 반면, 저분자 보툴리눔 독소를 정제하는 공정인 해리 후 HQ에서 XS로 이어지는 정제 결과에서는 4가지 전처리 공정(기존 공정 또는 심층 필터(depth filter) 여과 후 UF/황산암모늄 침전/염산 침전)의 종류에 상관없이 보툴리눔 독소를 함유하는 시료는 모두 불순물 단백질 밴드가 관찰되지 않았고, 98kDa(중쇄(Heavy chain)), 52kDa(경쇄(Light chain))의 저분자 보툴리눔 독소만이 관찰되었다.

<167> 특히, 보툴리눔 독소인 19S를 분리하기 위하여, 보툴리눔 독소를 함유하는 시료의 효소처리 및 추출 공정을 대체할 수 있는 가장 효율이 뛰어난 공정은 황산 침전 공정, 심층 필터(depth filter)를 이용한 여과(filtration) 및 염산 침전을

수행한 다음, 음이온교환 크로마토그래피 정제(TQ(바인딩 또는 FT) 정제)를 순차적으로 수행하는 것으로 나타났다.

<168>

반면, 보툴리눔 독소인 7S(저분자 보툴리눔 독소)를 분리하기 위한 공정은 4가지 전처리 공정(기존 공정 또는 심층 필터(depth filter) 여과 후 UF/황산암모늄 침전/염산 침전) 후 음이온교환 크로마토그래피(HQ(bindng mode 또는 FT mode))를 적용하고 이어서 양이온 교환 크로마토그래피(XS(bindng mode))를 적용할 경우 모두 정제효율이 우수한 것으로 나타났다.

<169>

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법:

(a) 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 산 침전시키는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 보툴리눔 독소를 포함하는 침전물에 완충용액을 첨가한 다음, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화(clarification)하는 단계;

(c) 상기 (b) 단계의 정화된 보툴리눔 독소를 포함하는 용액을 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전, 또는 염산 침전을 수행한 다음, 상기 UF 다이아필트레이션의 투석유물(retentate)을 완충용액에 희석하거나, 황산암모늄 침전 또는 염산 침전의 침전물을 완충용액에 용해시키는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계의 희석된 투석유물, 황산암모늄 침전물의 용해물, 또는 염산 침전물의 용해물을 음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange chromatography: AEX)를 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 단계.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 보툴리눔 독소 생산 균주는 클로스트리디움 보툴리눔

(Clostridium botulinum) 또는 이의 변이체인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 보툴리눔 독소 A, B, C, D, E, F 및 G로 구성된 군에서 선택되는 보툴리눔 독소인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 정제된 보툴리눔 독소는 순도 98% 이상의 보툴리눔 독소 A 형 단백질인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 산 침전은 pH 3.0 내지 pH 4.5가 되도록 황산 또는 염산을 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 산 침전은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 심층 여과(depth filtration, DF)는 연동 펌프(peristaltic pump)를 이용하는 것을 특징으로 하며, 심층여과에 사용되는 필터는 바람직하게는 0.01~20 μm 의 공칭공경(nominal pore size)을 갖는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 UF 디아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전 또는 염산 침전은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 황산암모늄 침전에서의 황산암모늄은 10% 내지 50%(w/v)의 농도가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 염산 침전은 pH 2 내지 pH 5가 되도록

염산을 첨가하여 수행되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 11】

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계 및 (c) 단계에서 완충용액은 인산나트륨 완충용액인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 인산나트륨 완충용액은 pH 4.5 내지 pH 6.5이고, 상기 (c) 단계에서 인산나트륨 완충용액은 pH 6 내지 pH 7인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 13】

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 pH 9, 전도도(conductivity) 2 내지 40 mS/cm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 14】

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 보툴리눔 독소는 음이온교환 크로마토그래피로부터 용출되는 FT(flow through)를 보툴리눔 독소가 포함된 분획(fraction)

으로 수득하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 15】

제1항에 있어서, 정제된 보툴리눔 독소는 7S 또는 19S의 구성형태를 가지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 16】

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계 이후, 다음 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법:

(e) 보툴리눔 독소가 포함되어 있는 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH를 상향조절하는 단계;

(f) 상기 (e) 단계에서 pH가 상향조절된 음이온교환 크로마토그래피 분획을 음이온교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하는 단계;

(h) 양이온교환 크로마토그래피(Cation exchange chromatography: CEX)를 이용하여 정제하는 단계.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH의 상향조절은 1회 또는 그 이상의 횟수로 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔

독소의 제조방법.

【청구항 18】

제16항에 있어서, 상기 (f) 단계와 (h) 단계 사이에

(g) 정제된 음이온교환 크로마토그래피 분획에 완충용액을 첨가하여 보툴리눔 독소를 회석하는 단계;

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 19】

제16항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 pH의 상향조절은 UF 다이아필트레이션 (UF diafiltration), pH 적정(pH titration), 투석(dialysis) 및 완충용액 교환 컬럼 크로마토그래피(buffer exchange column chromatography)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 20】

제18항에 있어서, 상기 (g) 단계의 완충용액은 인산나트륨 완충용액인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 21】

제19항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피 분획의 pH의 상향조절은 Tris-HCl 완충용액을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 22】

제21항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 Tris-HCl 완충용액은 pH 7.3 내지 pH 8.3이고, 상기 (g) 단계에서 인산나트륨 완충용액은 pH 6.5 내지 pH 7.5인 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 23】

제16항에 있어서, 상기 (f) 단계에서 음이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 pH 9, 전도도(conductivity) 2 내지 40mS/cm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 24】

제16항에 있어서, 상기 (f) 단계에서 보툴리눔 독소는 음이온교환 크로마토그래피로부터 용출되는 FT(flow through)를 보툴리눔 독소가 포함된 분획(fraction)으로 수득하거나, 음이온교환 크로마토그래피의 수지(resin)에 결합된

보툴리눔 독소가 포함된 분획으로 수득하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 25】

제16항에 있어서, 상기 (h) 단계에서 양이온교환 크로마토그래피는 pH 2 내지 pH 9, 전도도(conductivity) 2 내지 40 mS/cm의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 26】

제16항에 있어서, 상기 (h) 단계에서 보툴리눔 독소는 양이온교환 크로마토그래피의 수지(resin)에 결합된 보툴리눔 독소가 포함된 분획(fraction)으로 수득하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【청구항 27】

제16항에 있어서, 최종 정제된 보툴리눔 독소는 7S의 구성형태를 가지는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.

【요약서】

【요약】

본 발명은 동물 유래 성분을 포함하지 않는(Animal Product Free, APF) 공정을 통한 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 보툴리눔 독소 생산 균주 배양액에 산을 처리하여 산 침전시키는 단계; 보툴리눔 독소를 포함하는 침전물에 완충용액을 첨가한 다음, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 정화(clarification)하는 단계; 정화된 보툴리눔 독소를 포함하는 용액을 UF 다이아필트레이션(UF diafiltration), 황산암모늄 침전, 또는 염산 침전을 수행한 다음, 상기 UF 다이아필트레이션의 투석유물(retentate)을 완충용액에 희석하거나, 황산암모늄 침전 또는 염산 침전의 침전물을 완충용액에 용해시키는 단계; 및 희석된 투석유물, 황산암모늄 침전물의 용해물, 또는 염산 침전물의 용해물을 음이온교환 크로마토그래피(Anion exchange chromatography: AEX)를 이용하여 보툴리눔 독소를 정제하는 단계; 를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법에 대한 것이다.

본 발명에 따른 보툴리눔 독소의 제조방법은 동물 유래 성분의 유입이 원천적으로 차단되어, 전염성해면상뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE) 등과 같은 감염을 예방할 수 있다. 또한, 본 발명의 간단한 공정으로 고순도

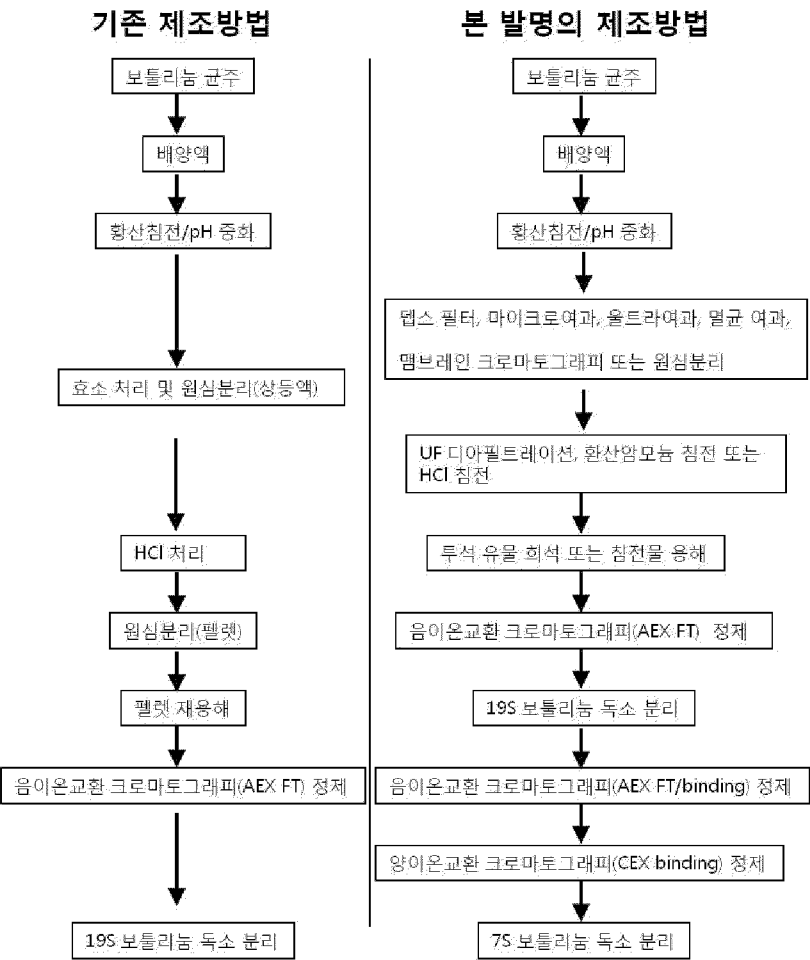
의 보툴리눔 독소를 제조할 수 있으므로 매우 경제적이고 효율적이며, 기존의 방법으로 생산된 보툴리눔 독소에 비해 순도가 높아 국소작용력이 증가하므로 부작용으로 나타날 수 있는 보툴리눔 독소의 전신순환성이 낮아져 안전성이 증가하는 장점이 있어, 신경근육 장애, 주름살 제거제, 경직성 편마비 및 뇌성마비의 치료 등에 다양하게 이용될 수 있다.

【대표도】

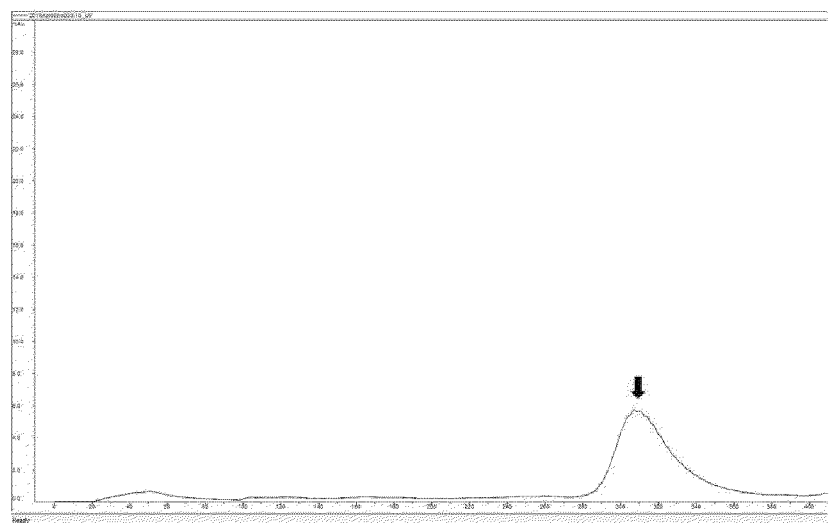
도 1

【도면】

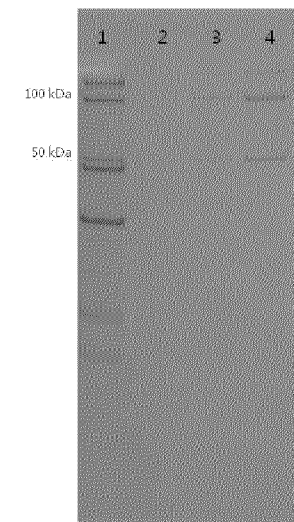
【도 1】



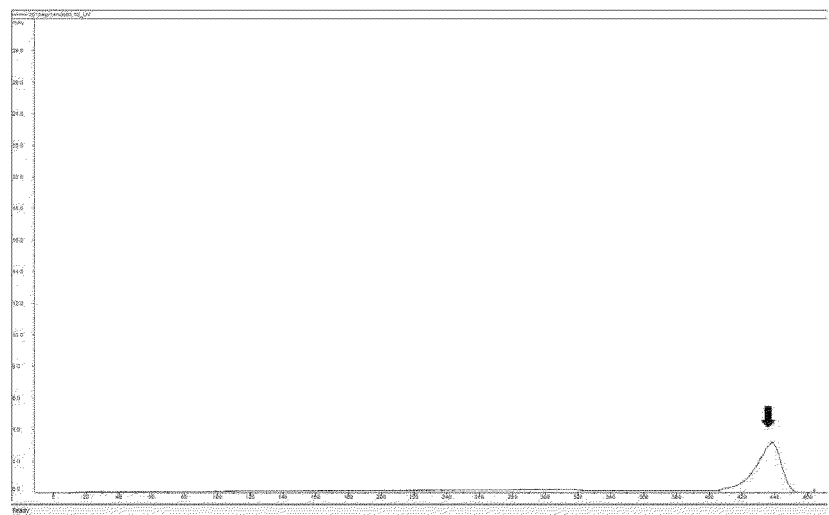
【도 2】



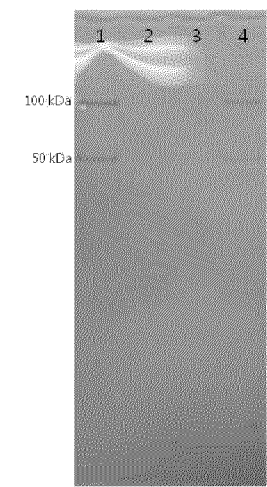
【도 3】



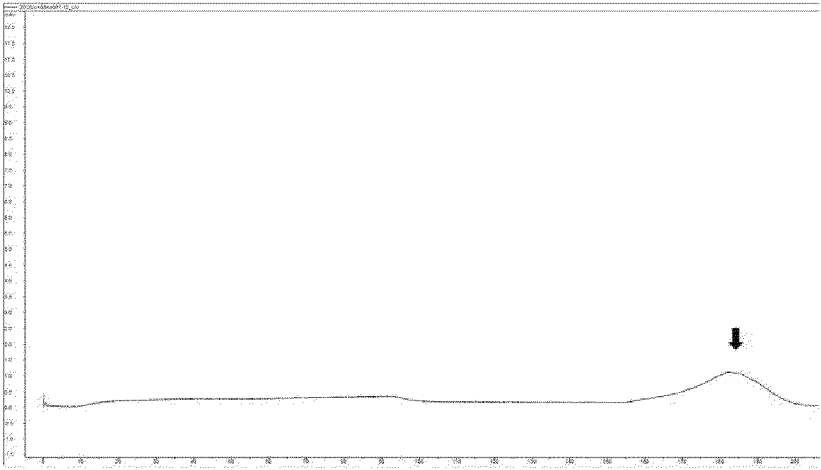
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

