(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월16일
(11) 등록번호 10-1858598
(24) 등록일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/52 (2006.01) *C07K 1/16* (2006.01)
C12N 15/21 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7023051
(22) 출원일자(국제) 2011년01월31일
심사청구일자 2016년01월20일
(85) 번역문제출일자 2012년09월03일
(65) 공개번호 10-2012-0125641
(43) 공개일자 2012년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/ES2011/070057
(87) 국제공개번호 WO 2011/092367
국제공개일자 2011년08월04일
(30) 우선권주장
10382019.7 2010년02월01일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
US20060188477 A1
KR1019990072037 A
Journal of biotechnology, 1995, Vol.39, pp.56-65

(73) 특허권자
디그나 비오테크, 에스.엘.
스페인, 이-31008 빰쁠로나-나바라, 22 오피씨나 2, 아베니다 삐오 12
(72) 발명자
부메리스, 블라다스 알지르다스
리투아니아, 엘티-02241 빌니우스, 브이. 에이. 그라이시우노 스트라스. 8, 시초르 비오테흐 유에이비
(74) 대리인
특허법인주원

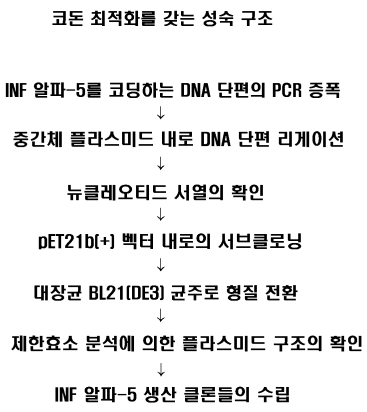
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **인터페론 알파 5의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 IFNa5 생산 대장균(*Escherichia coli*) 숙주 세포에서의 발현에 의한 인터페론 알파 5(IFNa5) 단백질의 제조방법을 제공하며, 여기에서 폴리펩티드 사슬의 N-터미널 말단에서 추가의 메티오닌 잔기의 혼입(incorporation) 및 그의 산화종들의 생성은 최소화된다. IFNa5 단백질은 생물학적으로 활성인 IFNa5를 제공하는데 효율적인 방법에 의하여 정제될 수 있다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계들을 포함하는 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에서의 발현에 의한 인터페론 알파 5 (IFNa5) 단백질의 생산 방법:

a) IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를 제공하는 단계;

b) 상기 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를, 상기 재조합 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에 의해 상기 IFNa5 단백질을 발현할 수 있는 조건 하에서, 탄소 공급 용액이 첨가된 발효 배지 중에 배양하는 단계, 여기에서

- 상기 발효 배지는 동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분들이 없고;

- 상기 탄소 공급 용액은 탄소원 및 첨가된 탄소 공급 용액 1리터당 90 내지 111 mg 염화철(III) 6수화물, 12.15 내지 14.985 mg 염화칼슘 2수화물, 20.25 내지 24.975 mg 황산아연(II) 7수화물, 4.5 내지 5.55 mg 황산망간 (II) 1수화물, 9 내지 11.1 mg 황산구리(II) 5수화물, 3.42 내지 4.218 mg 황산코발트 (II) 6수화물, 0.9 내지 1.11 mg 몰리브덴화 나트륨 2수화물 및 2.07 내지 2.553 mg 보론산을 포함함; 및

c) 발현된 IFNa5 단백질을 분리하는 단계,

여기에서, 상기 탄소 공급 용액의 첨가 결과 상기 발효 배지 1리터당 농도 28.5 내지 36.9 mg 염화철(III) 6수화물, 3.8475 내지 4.9815 mg 염화칼슘 2수화물, 6.4125 내지 8.3025 황산아연(II) 7수화물, 1.425 내지 1.845 mg 황산망간 (II) 1수화물, 2.85 내지 3.69 mg 황산구리(II) 5수화물, 1.083 내지 1.4022 mg 황산코발트 (II) 6수화물, 0.285 내지 0.369 mg 몰리브덴화 나트륨 2수화물 및 0.6555 내지 0.8487 mg 보론산이 됨.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 IFNa5 단백질은 분리 및 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 대장균 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에서 IFNa5 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 벡터를 이용하여 형질전환되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대장균 숙주 세포는 대장균 프로테아제 결핍 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 대장균 프로테아제 결핍 균주는 대장균 $lon^-/ompT^-$ 프로테아제 결핍 숙주 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 대장균 $lon^-/ompT^-$ 프로테아제 결핍 숙주 균주는 대장균 BL21 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 대장균 BL21 균주는 대장균 BL21(DE3) 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 대장균 숙주 세포는 대장균 BL21 (DE3) 균주이고, 상기 단계 b)의 조건들은 IPTG를 이용

한 유도를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 유도후 평균 특정-배양 성장률(μ)은 0.17 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 재접힘 후 산화된-MET IFNa5 의 양은 1% 이하인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 IFNa5 단백질은 hIFNa5 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 IFNa5 단백질은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 2항에 있어서, 상기 IFNa5 단백질을 봉입체들(IBs)의 형태의 상기 IFNa5 단백질을 포함하는 혼합물로부터 분리 및 정제함에 있어, 상기 IBs을 가용화시켜 변성된 IFNa5 함유 혼합물을 제공하고, 이는 이후 산화 복원처리되어 복원된 IFNa5 함유 혼합물을 제공하고, 정제된 IFNa5를 수득하기 위하여, 상기 복원된 IFNa5 함유 혼합물을 정제 공정에 투입하는 것에 의하여 분리되고 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 복원된 IFNa5 함유 혼합물은 상기 혼합물을 다음을 포함하는 4-단계 크로마토그래피 처리에 투입함으로써 정제되는 것을 특징으로 하는 방법:

1) 복원된 IFNa5를 포함하는 혼합물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)에서 수득된 용액을 음이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계;

3) 상기 단계 2)에서 수득된 용액을 제 1의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계; 및

4) 상기 단계 3)에서 수득된 용액을 제 2의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계로, 상기 용액은 메티오닌 함유 버퍼로 희석됨.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IFNa5 생산 대장균(*Escherichia coli*) 숙주 세포에서의 발현에 의한 인터페론 알파 5(IFNa5) 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 여기에서 폴리펩티드 사슬의 N-터미널 끝에서 추가의 메티오닌 잔기의 혼입(incorporation) 및 그의 산화종들의 생성은 최소화된다. IFNa5 단백질은 생물학적으로 활성인 IFNa5를 제공하는데 효율적인 방법에 의하여 정제될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 인터페론들(IFNs)은 시토카인들(cytokines)로서 알려진, 천연적으로 생산되는 다면성(pleiotropic) 당단백질들의 군으로, 일련의 자극들(바이러스, 박테리아, 세포들, 암종들 및 거대분자들) 로부터의 유도에 의해 상이한 종류들의 세포들(상피세포들, 섬유아세포들, 림프구들, 마크로파지들)로부터 분비되고, 항바이러스성, 항-증식성 및 면역-조절성들 및 진통억제작용을 선천적으로 갖는다. 이의 내생의 생산 또는 그의 투여 후, 인터페론은 세포 표면에서 특정 수용체들과 상호작용하고, 핵까지 세포질을 통한 신호의 변환(transduction)을 시작하여, 항바이러스 작용 및 면역-자극(immuno-stimulating) 작용을 갖는 특정 단백질들을 코드화하는 유전자들의 발현을 유도한다. IFN1a (Rebif, Avonex), IFN1b (Betaseron)와 같이 다발성 경화증의 치료용 약으로서, 그리고 재조합 인간 IFNa2a (Roferon A) 및 IFNa2b (Intron A)와 같이 악성(암) 및 바이러스성 질환들의 치료용 약으로서, 인간에서의 이용에 대해 일부 상이한 형태의 IFNs의 승인에 의해 증명된 것과 같이, IFNs의 의약 가능성

은 알려져 왔다.

[0003] IFNs은 수용체를 통해 신호하는데, 이러한 수용체의 유형에 기초하여, 인간 IFNs는 3 개의 주요 유형들, 즉 (i) IFN 유형 I [모든 유형 I의 IFNs는 IFN-알파 수용체(IFNAR)로서 알려진 특이적 세포 표면 수용체 복합체에 결합되고 - 인간에서 유형 I IFNs는 IFN 알파(IFN-α, IFN 베타(IFN-β) 및 IFN 오메가 (IFN-ω)이다], (ii) IFN 유형 II [유형 II IFN은 IFN-감마 수용체(IFNGR)에 결합한다 - 인간에서 유형 II IFN는 IFN 감마(IFN-γ)], 및 IFN 유형 III [유형 III IFNs는 IL10R2 및 IFNLR1로 이루어지는 수용체 복합체를 통해 신호한다]로 분류된다. 유형 I IFNs로서 알려져 있는 IFNs 알파 및 베타는 구조적으로 연관되어 있으며, 산성 pH에서 안정하고, 모든 세포-수용체(IFNAR)에 대해 경쟁한다.

[0004] 현재, IFNs 알파, 베타 및 감마는 재조합 형태 하에 제조될 수 있으며, 이는 천연 공급원들(백혈구들, 섬유아세포들, 림프구들)로부터의 분리를 통해 얻는 것들에 비해 보다 많은 양을 수득하고, 정제 공정의 복잡성 및 제품의 안전성 확인을 줄여주는 이중의 장점이 있다. 사실, 대부분의 시판되는 약제학적 등급의 재조합 IFN이 대장균으로부터 제조 및 정제된다.

[0005] 상기 대장균 재조합 단백질 발현 시스템은 예전부터 현재까지 IFN의 제조에 선택되는 시스템이다. 실제로, IFN 유전자들은 인트론들을 갖지 않으며, 단백질 생성물들은 일반적으로 글리코실화되지 않는다. 또한, 대장균은 높은 세포 밀도로 급속하게 성장할 수 있으며, 재조합 단백질에 사용된 균주들은, 일반적으로 대규모 발효에 안전한 것으로 여겨지도록 유전학적으로 변경된다.

[0006] IFN cDNA의 발현은 처음 클로닝된 후, 곧 대장균에서 직접 달성되었다[Goedell 등, Nature., 287, 411~416, 1980; Pestka, S. Arch. BioChem. Biophys., 221 (1), 1~37, 1983; Mizoguchi 등 DNA., 4, 221~32, 1985; Pestka 등 Ann. Rev. BioChem., 56, 727~777, 1987; Baron and Narula. Critical reviews in Biotechnology, 10 (3), 179~190, 1990]. 사실, IFN 알파(IFNa)는 DNA 재조합 기술을 이용하여 대장균을 통해 생산되는 최초의 단백질들 중 하나이다 [Derynck 등, Nature, 287, 193~197, 1980; Nagata 등, Nature, 284, 316~320, 1980].

[0007] 그러나, 대장균에서 IFNs의 발현은 일부 문제점들을 나타낸다. 대장균에서 다량으로 발현된 IFNs는 종종 봉입체(inclusion bodies: IBs)라고 명명되는 불용성 집합체들로 침전되며 [Swaminathan 등, Prot Express. Purif., 15, 236~242, 1999; Bedarrain 등, Biotechnol. Appl. BioChem., 33, 173~182, 2001; Srivasta 등 Prot. Express. Purif 41, 313~322, 2005], 이는 일반적으로 단백질들이 잘못 접혀서(misfolded) 생물학적으로 비활성이다 [Villaverde and Carrio, Biotechnol. Lett., 25, 1385~1395, 2003]. 이러한 단백질들을 천연 형태로 수득하기 위해서는, 상기 IBs를 변성 상으로, 이어서 다시 복원 상(renaturaton phase)으로 제공하는 것이 필요하며, 이황화물 브릿지(bridges)가 천연 단백질에서와 같이 형성되어야만 하는 경우 산화시킨다. 나아가, 타겟 단백질 서열(예로서, IFN)의 N-터미널 말단에서 추가의 메티오닌 잔기의 혼입은 대장균에서의 단백질 발현의 특징적인 부분이다. 알려져 있는 바와 같이, 단백질 서열 내에 분포된 메티오닌 잔기들은 산화되기 쉽다. 이러한 과정은 단백질 제조과정 동안 또는 상기 단백질을 포함하는 약학 조성물(상기 단백질이 약물로서 사용될 수 있는 경우, 예로서 IFN) 의 제조과정 동안 일어날 수 있으며, 상승된 온도에서 장기 저장동안 더욱 현저하다.

[0008] 박테리아에서 IBs와 같은 IFNs의 몇몇 제조 및 정제 방법들이 개발되어 왔지만[예로서, Thatcher and Panayotatos, Methods Enzymol. 119, 166~177, 1986; US 4511502; US 4765903; US 4845032; EP 1310559; 또는 EP 1990349], IFNs, 즉 치료제 등급의 IFN의 성공적인 제조 및 정제에 대한 장애들이 존재할 수 있는 인자들이 추가적으로 존재하는데, 예컨대 목적 IFN의 N-터미널에서의 추가의 메티오닌의 혼입 및 제거되어야 할 그의 산화종들의 생성(생성물이 약물로서 사용되는 경우)은, IFN 생산에서의 전체 수율을 감소시키고, 정제과정의 복잡성을 증가시켜, 치료제 급의 알파 IFNs의 생산 및 정제 공정을 어렵게 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 따라, 대장균 숙주 세포로부터 치료제 등급의 IFNa, 특히 IFNa5의 제조를 높은 수율 및 비용효과적인 방식으로 가능하게 하는 방법에 대한 요구가 남아있다.

과제의 해결 수단

[0010] 발명의 요약

[0011] 본 발명자들은 놀랍게도, 이제 발효 배지 중에서 미량성분들(미량원소들)의 농도가 IFNa5의 번역후 변경들(post-translation modifications)에서 중요한 역할을 함을 발견하였다. 따라서, 발효 배지에서 미량성분들의 농도를 조절하여, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에서 생산된 IFNa5의 N-터미널 말단에서 추가의 메티오닌 잔기의 혼입을 최소화하는 것과, 그의 산화종들의 생성을 최소화하는 것이 가능하며, 이는 생산율을 증가시키고 정제 과정을 단순화시켜, IFNa5 생산 대장균 숙주세포에서 생산된 IFNa5, 즉 치료제 등급의 IFNa5의 생산 및 정제 공정을 비용효과적이면서 덜 복잡하게 만든다.

[0012] 유효하게, 하기 실시예 4는, 1리터(L)의 탄소 공급 용액이 약 3.0mL 내지 약 3.7mL의 미량성분 원료용액(stock solution)을 포함하는 경우, 산화된 메티오닐화 인간 IFN 알파-5(hIFNa5) 형태의 형성을 제거하고, 아세틸화된 hIFNa5 형태들의 양이 2배로 감소됨(즉, 반으로), 및 바람직하게는 유도 후 평균 특정-배양 성장률(μ)는 0.17 이상임을 보여준다.

[0013] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 다음 단계들을 포함하는 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에서의 발현에 의한 인터페론 알파 5 (IFNa5) 단백질의 제조공정에 관한 것이다:

[0014] a) IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0015] b) 상기 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를, 상기 재조합 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에 의해 상기 IFNa5 단백질을 발현할 수 있는 조건 하에서, 탄소 공급 용액이 첨가된 발효 배지 중에 배양하는 단계, 여기에서

[0016] - 상기 발효 배지는 동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분들이 없고;

[0017] - 상기 탄소 공급 용액은, 탄소원 및 첨가된 탄소 공급 용액 1리터 당 약 3.0mL 내지 약 3.7mL의 미량성분들의 용액을 포함함; 및

[0018] c) 발현된 IFNa5 단백질을 분리, 및 선택적으로 정제하는 단계.

[0019] 특정 구체예에서, 상기 대장균 숙주 세포는 대장균 프로테아제 결핍 균주로, 예컨대 대장균(*E. coli*) $Ion^-/ompT^-$ 프로테아제 결핍 숙주 균주, 바람직하게는 *E. coli* BL21 균주, 가장 바람직하게는 *E. coli* BL21 (DE3) 균주이다.

[0020] 또다른 특정 구체예에서, 상기 대장균 균주는 *E. coli* BL21 (DE3) 균주이고, 상기 단계 b)의 조건들은 IPTG를 이용한 유도를 포함한다.

[0021] 또다른 특정 구체예에서, 단계 c)의 상기 발현된 IFNa5 단백질의 분리 및 정제는, 상기 대장균 숙주 세포들의 용균 후, 봉입체들(IBs)의 형태의 상기 IFNa5 단백질을 연속적으로 분리하는 것을 포함하는데, 이는 상기 IBs를 가용화시키고, 결과의 혼합물을 산화 복원 및 정제된 IFNa5를 수득하기 위하여, 다음 단계들을 포함하는 진행되는 일련의 크로마토그래피 처리시킴으로써 가능하다:

[0022] 1) 복원된 IFNa5를 포함하는 혼합물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 처리하는 단계;

[0023] 2) 상기 단계 1)에서 수득된 용액을 음이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계;

[0024] 3) 상기 단계 2)에서 수득된 용액을 제 1의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계; 및

[0025] 4) 상기 단계 3)에서 수득된 용액을 제 2의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계로, 상기 용액은 선택적으로 메티오닌 함유 버퍼로 희석된다.

[0026] 특정 구체예에서, 상기 IFNa5는 바람직하게는 인간 IFNa5 (hIFNa5)이다.

발명의 효과

[0027] 본 발명자들은 놀랍게도, 이제 발효 배지 중에서 미량성분들(미량원소들)의 농도가 IFNa5의 번역후 변경들(post-translation modifications)에서 중요한 역할을 함을 발견하였다. 따라서, 발효 배지에서 미량성분들의 농도를 조절하여, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에서 생산된 IFNa5의 N-터미널 말단에서 추가의 메티오닌 잔기의 혼입을 최소화하는 것과, 그의 산화종들의 생성을 최소화하는 것이 가능하며, 이는 생산율을 증가시키고 정제 과정을 단순화시켜, IFNa5 생산 대장균 숙주세포에서 생산된 IFNa5, 즉 치료제 등급의 IFNa5의 생산 및 정제 공정을 비용효과적이면서 덜 복잡하게 만든다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 IFNa5 생산 균주 구축의 흐름도를 나타낸다.

도 2는 일차 플라스미드 DNA pET28-IFN 알파-5의 제한효소 분석(restriction analysis) 결과를 나타낸다. 래인들(lanes) 1~3 및 5~7: pET28-IFN 알파-5의 제한효소 분석; 래인들 1 및 5: pET28-IFN 알파-5/BamHI; 래인들 2 및 6: pET28-IFN 알파-5/NdeI; 래인들 3 및 7: pET28-IFN 알파-5/NdeI+BamHI; 래인들 4 및 8: pET28-IFN 알파-5, 분열되지 않음(uncleaved). 킬로염기쌍(kilobase pairs: kbp) 단위의 마커 DNA(Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania)의 크기 밴드들이 표지되었다.

도 3은 중간체 플라스미드 IFN 알파-5의 제한효소 분석 결과를 나타낸다. 상기 플라스미드는 단일의 클론으로부터 유래된다. kbp 단위의 마커 DNA(Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania)의 크기 밴드들이 표시되었다. 예측된 단편 크기들(bp 단위)은 괄호 안에 나타내었다. 래인 1: pUC57-IFN 알파-5/PstI (28; 3197); 래인 2: pUC57-IFN 알파-5/PvuII (455; 406; 2364); 래인 3: pUC57-IFN 알파-5/NdeI (250; 2975).

도 4는, 대장균에서 일부 코돈들을 가장 적은 빈도로 사용된 코돈들로 치환하므로써 대장균에서의 발현에 대해 최적화된 인간 IFN 알파-5 (hIFNa5) 코딩 단편의 완전한 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 뉴클레오티드 치환들은 밑줄표시하였다.

도 5는 플라스미드 pET21-IFN 알파-5의 제한효소 분석 결과들을 나타낸다. 상기 플라스미드는 단일 클론으로부터 유래되었다. kbp 단위의 마커 DNA(Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania)의 크기 밴드들이 표시되었다. 예측된 단편 크기들(bps 단위)을 괄호 안에 나타내었다. 래인 1: pET21-IFN 알파-5/PagI (673; 817; 1008; 3423); 래인 2: pET21-IFN 알파-5/PstI (1352; 4569); 래인 3: pET21-IFN 알파-5/NdeI+BamHI (516; 5405).

도 6은 재조합 IFNa5 단백질의 발현을 나타낸다. 9개의 콜로니들(래인들 1~9)로부터 채취한 세포 배양 대장균 BL21(DE3) pET21-IFN 알파-5를 750mL 플라스크 내(LB 배지, 부피 250mL) 37℃에서 약 1.2의 OD_{600} 으로 배양하였다. 타겟 단백질 발현은 1mM IPTG를 이용하여 2.5시간 동안 유도되었다. 총 세포 단백질 샘플들을 BioRad 단백질 마커들(좌측에 kDa으로 표시됨)와 함께 15% SDS-PAGE 상에서 가동시킨 후, 쿠마씨 블루(Coomassie blue)로 염색하였다.

도 7은 재조합 hIFNa5의 생합성 순서도를 나타낸다.

도 8은 본 발명에 따라 가공 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 나타내며, 이는 상기 hIFNa5 단백질의 환원(도 8A) 및 비-환원(도 8B)의 두 조건들 모두 하에서 SDS-PAGE (14%)에 의해 결정된 바와 같다(상기 도는 hIFNa5 단백질의 3개의 대규모 정제 배치들의 결과를 보여준다).

도 9는 본 발명에 따라 가공 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 나타내며, 이는 "역상 고성능 액체 크로마토그래피"(RP-HPLC) 분석에 의해 결정된 바와 같다(상기 도는 재조합 hIFNa5의 3개의 대규모 배치들의 결과를 보여준다).

도 10은 본 발명에 따라 가공 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 나타내며, 이는 "크기배제-HPLC"(SE-HPLC) 분석에 의해 결정된 바와 같다(상기 도는 재조합 hIFNa5의 3개의 대규모 배치들의 결과를 보여준다).

도 11은 본 발명에 따라 가공 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 나타내며, 이는 등전점 전기영동(isoelectric focusing) 분석에 의해 결정된 바와 같다(상기 도는 재조합 hIFNa5의 3개의 대규모 배치들의 결과를 보여준다). 래인들 1, 11: pI 표준물질들(Amersham Pharmacia); 래인들 2, 3, 4: 재조합 hIFNa5, 15㎍; 래인들 5, 6, 7: 재조합 hIFNa5, 5㎍; 래인들 8, 9, 10: 재조합 hIFNa5, 1㎍.

도 12는 본 발명에 따라 정제 및 조제된 3개의 재조합 hIFNa5 제제들의 대규모 배치들의 펩타이드 맵핑(mapping) 크로마토그램들을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] **발명의 상세한 설명**

[0030] 정의들

[0031] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 문맥에서 사용된 것과 같은 몇몇 용어들 및 표현들의 의미를

여기 제공한다.

[0032] 본 명세서에서 사용된 것과 같은, "인터페론 알파 5"(또는 "IFN 알파 5" 또는 "IFNa")라는 용어는, 백혈구에 의해 생산된 단백질로, 바이러스 감염에 대항하는 선천성 면역 반응에 주로 연관되며, IFNa 수용체(IFNAR)로서 알려진 특정 세포 표면 수용체 복합체에 결합할 수 있다.

[0033] IFNa5 단백질들은 예로서,WO 83/02459 (hIFNa5)에서 설명되어 있다.

[0034] "I FNa5"라는 용어는 (i) 천연의 IFNa5 단백질의 아미노산 서열에 적어도 실질적으로 동일한 아미노산 서열 및 (ii) 천연의 IFNa5과 같은 생물학적 활성을 갖는 단백질들을 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열은, 상기 서열들이 동일하거나 또는 합성 단백질과 천연의 IFNa5간의 역기능성 차이를 생성하지 않는 하나 이상의 아미노산 변경들(즉, 결실, 부가, 치환)에 의해 상이하다는 것을 의미하며, 예로서 인용된 IFNa5 단백질들 중 하나와 적어도 70%의 상동성(identity)을 갖는 IFNa5 단백질들이 있다. IFNa5 단백질(P)과 참조 IFNa5 단백질(R)간에 X%의 상동성이라 함은, 2개의 서열들이 배열된 경우, P의 아미노산들의 X%가 서열 R에서의 대응 아미노산과 동일하거나 또는 예컨대, 하기 나타낸 바와 같은 동일 군의 아미노산에 의해 치환됨을 의미한다:

[0035] - 비극성 R기들을 갖는 아미노산들: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌;

[0036] - 비하전된 극성 R기들을 갖는 아미노산들: 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민;

[0037] - 하전된 극성 R기들을 갖는 아미노산들(pH 6.0에서 음으로 하전됨): 아스파르트산, 글루탐산;

[0038] - 극성 아미노산들(pH 6.0에서 양으로 하전됨): 리신, 아르기닌, 히스티딘(pH 6.0에서);

[0039] - 페닐기들을 갖는 아미노산들: 페닐알라닌, 트립토판, 티로신.

[0040] 특히 바람직한 보존성 치환들은:

[0041] 양전하가 유지될 수 있도록, Arg의 Lys으로의 치환 및 Lys의 Arg으로의 치환;

[0042] 음전하가 유지될 수 있도록, Asp의 Glu로의 치환 및 Glu의 Asp로의 치환;

[0043] 유리 -OH가 유지될 수 있도록 Thr의 Ser로의 치환; 및

[0044] 유리 NH2가 유지될 수 있도록 Asn의 Gln로의 치환.

[0045] 서열 상동성의 이들 퍼센트들은 BLAST 프로그램을 이용하므로써 수득될 수 있다 (blast2seq, 디폴트(default) 파라미터) [Tatutsova and Madden, FEMS Microbiol. Lett., 174, 247~250 (1990)].

[0046] 본 명세서에서 사용된 것과 같은, "IFNa5 생산 대장균 숙주 세포"라는 용어는, IFNa5와 연관된 생물학적 활성을 갖는 단백질을 생산하도록 유전공학처리된 대장균 숙주 세포를 의미한다. 특정 구체예에서, 상기 대장균 숙주 세포는 대장균 프로테아제 결핍 균주로, 예로서 대장균 $Ion^{-}/ompT^{-}$ 프로테아제 결핍 숙주 균주, 바람직하게는 대장균 BL21 균주, 가장 바람직하게는 대장균 BL21 (DE3) 균주가 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 것과 같은, "IFNa5의 생물학적 활성"이라는 용어는 상기 IFNa5의 치료활성을 포함한, 상기 IFNa5의 생물학적 활성을 의미한다. WO 83/02459호는, IFNa5가 DNA 및 RNA바이러스들에 대하여 항바이러스 활성, 세포 성장 활성 및 세포간 효소들 및 기타 세포-생산된 물질들을의 생산을 조절하는 능력을 나타낸다는 것을 개시하고 있다; 따라서, IFNa5는 바이러스 감염(예로서, 만성 B형 간염 감염), 종양들 및 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 사용된 것과 같은, 발효 배지에는 "동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분이 없다"라는 표현은 해면상 뇌증(Spongiform Encephalopathy) 유발 성분들이 의약 제품들을 통해 전달될 위험이 없고, 약학 제품들과 관련된 BSE 오염의 어떤 증거 또는 vCJD의 경우도 없음을 의미하는 것이다. 생성물에는 효모 세포들로부터의 미량의 단백질 오염물질도 없다.

[0049] IFNa5 생산 방법

[0050] 한 측면에서, 본 발명의 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에서 발현에 의해 인터페론 알파 5 (IFNa5) 단백질의 생산 방법에 관한 것으로, 이하에서 본 발명의 방법은 다음을 포함한다:

[0051] a) IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를 제공하는 단계;

[0052] b) 상기 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포를, 상기 재조합 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에 의해 상기 IFNa5 단백질

을 발현할 수 있는 조건 하에서, 탄소 공급 용액이 첨가된 발효 배지 중에 배양하는 단계, 여기에서

[0053] *- 상기 발효 배지는 동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분들이 없고;

[0054] - 상기 탄소 공급 용액은, 탄소원 및 첨가된 탄소 공급 용액 1리터 당 약 3.0mL 내지 약 3.7mL의 미량성분들의 용액을 포함함; 및

[0055] c) 발현된 IFNa5 단백질을 분리, 및 선택적으로 정제하는 단계.

[0056] 본 발명의 방법에 따라 제조될 수 있는 상기 재조합 IFNa5는 앞서 정의되었다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에 따라 제조될 수 있는 상기 재조합 IFNa5는 천연 IFNa5과 실질적으로 동일한 IFNa5 단백질, 즉 (1) 천연의 IFNa5의 아미노산 서열과 적어도 실질적으로 동일한 아미노산 서열 및 (2) 천연의 IFNa5과 동일한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는, IFNa5 암호화 유전자를 이용하여 형질전환된 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포 또는 그의 변형이다. 바람직한 구현예에서, 상기 IFNa5는 hIFNa5이다.

[0057] *보다 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법에 따라 생산된 재조합 IFNa5는 서열번호: 1(도 4)에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 IFNa5로, 이는 폴리펩티드 사슬의 N-터미널 말단에서의 추가의 메티오닌 잔기를 갖는 성숙(mature) hIFNa5에 대응한다.

[0058] 본 발명의 방법에 따라, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포가 제공된다[단계 a)]. 원칙적으로, 임의의 대장균 균주가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있으나, 바람직한 구체예에서, 상기 대장균 숙주 세포는 대장균 프로테아제 결핍 균주로, 예컨대 상기 대장균 Ion-/ompT- 프로테아제 결핍 숙주 균주, 바람직하게는 대장균 BL21 균주, 가장 바람직하게는 대장균 BL21 (DE3) 균주이다.

[0059] 상기 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포는 IFNa5의 클로닝 및 발현을 위한 통상의 방법들 및 프로토콜들에 의해 수득될 수 있다[예로서, Sambrook 등, Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second ed., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1~3 (Ausubel F.M. 등, ed.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994~1998]. 특정 구체예에서, IFNa5 암호화 유전자의 클로닝 및 발현, 및 재조합 IFNa5 단백질 생산 박테리아 균주 (즉, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포)의 구축은 IFNa5를 암호화하는 cDNA의 클로닝, 대장균에서 그의 발현을 최적하기 위한 상기 유전자의 DNA 서열의 변경, 발현 플라스미드의 구축, 선발된 플라스미드를 적당한 대장균 균주로의 형질전환 및 발현/유도 조건들의 선택을 포함하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 실시예 1은 hIFNa5 생산 대장균 숙주 세포의 구축을 개시한다.

[0060] 특정 구체예에서, 상기 대장균 숙주 세포가 대장균 프로테아제 결핍 균주, 예컨대 대장균 BL21 (DE3) 균주인 경우, 상기 숙주 세포는 유도성 프로모터의 조절 하에서 IFNa5 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된다; 이러한 경우, 단백질의 발현은, 예로서 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)와 같은 유도물질(inducer)의 첨가를 필요로 한다. 따라서, 특정 구체예에 따라, 대장균 숙주 세포가 대장균 BL21 균주, 예컨대 대장균 BL21 (DE3) 균주인 경우, 단계 b)의 조건들은 IPTG를 이용한 유도를 포함한다.

[0061] 본 발명의 단계 b)에서, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포는, 상기 재조합 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포에 의해 상기 IFNa5 단백질을 발현하는데 유효한 조건 하에서, 탄소 공급 용액이 첨가된 발효 배지 중에서 배양되며, 여기에서

[0062] - 상기 발효 배지는 동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분들이 없고;

[0063] - 상기 탄소 공급 용액은, 탄소원 및 첨가된 탄소 공급 용액 1리터 당 약 3.0mL 내지 약 3.7mL의 미량성분들의 용액을 포함한다.

[0064] IFNa5 생산 대장균 숙주 세포가 상기 IFNa5 단백질을 발현하기 위해서 배양되어야 하는 유효 조건은, 일반적으로 본 기술분야의 당업자에게 알려져 있다. 상기 조건들은, 상기 발효 배지가 합성 화학 발효 배지와 같이 동물 기원 또는 효모 기원으로부터의 성분이 없다는 조건 하에, 배양될 대장균 숙주 세포에 적당한, 질소원, 탄소원 및 금속원을 포함하는 발효 배지를 포함한다.

[0065] 특정 구체예에서, 이염기 인산암모늄 및 암모니아가, 단독으로 또는 병용하여, 질소원으로서 사용될 수 있다. 또다른 특정 구체예에서, 탄소원은 시트르산, 글루코오스 또는 이의 조합일 수 있다.

[0066] 실시예 2는 IFNa5 생산 대장균 BL21 (DE3) 균주를 배양하기 위한 발효 배지를 개시하고 있으며, 상기 배지는 이염기성 인산암모늄, 황산마그네슘, 이수소이산칼륨, 시트르산, D(+)-글루코오스 및 미량성분들 원료용액을 포함하고, 여기에서 상기 미량성분들 원료용액은 철, 칼슘, 아연, 망간, 구리, 코발트, 몰리브덴, 보론 및 이의 조합들로 이루어지는 미량성분들의 군으로부터 선택되는 미량성분들을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 발효 배지는 염화철(III), 염화칼슘, 황산아연(II), 황산망간(II), 황산구리(II), 염화코발트(II), 몰리브덴화 나트륨, 보론산 및 이들의 조합들로 이루어지는 미량성분들의 공급원들의 군으로부터 선택된 미량성분들의 공급원을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 미량성분들(미량원소들) 원료용액은 다음(g/L 단위)을 포함한다: 6수화 염화철(III) (30.0), 2수화 염화칼슘 (4.05), 7수화 황산아연(II) (6.75), 1수화 황산망간(II) (1.5), 5수화 황산구리(II) (3.0), 6수화 염화코발트(II) (1.14), 2수화 몰리브덴화 나트륨 (0.3) 및 보론산(0.69) [실시예 4].

[0067] 본 발명의 방법의 또다른 특징은, 탄소 공급 용액이 탄소원을 포함하고, 첨가된 탄소 공급 용액 1리터 당 약 3.0mL 내지 약 3.7mL의 미량성분들의 용액을 포함한다는 사실에 있다. 상기 미량성분 용액의 상세한 내용은 앞서 정의되었다. 특정 구체예에서, 상기 탄소 공급 용액은 탄소원(예로서, 시트르산 및/또는 글루코오스), 황산마그네슘 및 본 발명에 따라, 첨가된 탄소 공급 용액 1리터 당 미량성분 용액 약 3.0mL 내지 약 3.7mL 농도의 농축된 미량성분 용액을 포함한다. 상기 언급된 것과 같이, 실시예 2 및 실시예 4는 철, 칼슘, 아연, 망간, 구리, 코발트, 몰리브덴, 보론 및 그의 조합들로 이루어지는 미량성분들의 군으로부터 선택되는 미량성분들을 포함하는 미량성분들의 원료용액을 개시하고 있으며, 특정 구체예에서, 상기 미량성분들 원료용액은 염화철(III), 염화칼슘, 황산아연(II), 황산망간(II), 황산구리(II), 황산코발트(II), 몰리브덴화 나트륨, 보론산 및 이들의 조합들을 포함한다. 특정 구체예에서, 탄소 공급 용액 1리터 당 약 3.0mL 내지 3.7mL의 미량성분 용액의 농도로 포함된 상기 미량성분 원료용액은 실시예 2 및 실시예 4에서 개시된 미량성분 원료용액이다. 실시예 2는 생산균주에 의한 hIFNa5의 생합성 과정을 개시한다.

[0068] 본 발명자들에 의해 수행된 상이한 연구들은 재조합 IFNa5(예로서, hIFNa5)의 번역후 변형(post-translational modification)들에 대한 미량성분들의 영향을 보여주며, 즉 대장균에서 생산된 재조합 IFNa5(예로서, 재조합 hIFNa5)의 정제된 API에서 발견된 산화된-Met의 상대량은 폴리펩티드 사슬의 N-터미널 말단에서 "가공되지 않은(not processed) 메티오닌"의 양과 밀접한 관련이 있음을 보여주는 것이다. N-터미널 말단에서 상기 가공되지 않은 메티오닌을 10% 미만으로 수득하기 위해서는, 재접힘(refolding) 후 산화된-Met IFNa5의 양 (RP-HPLC에 의해 측정됨)은 1%를 넘지 않아야 한다.

[0069] 조합 hIFNa5 생합성 과정의 최적화 동안, 본 발명자들은 발효 배지 중의 미량성분들의 농도가 hIFNa5의 번역후 변경들에 대해 중요한 영향을 갖는다는 것을 관찰하였다. 실제로, 탄소 공급 용액 1L가 상기 미량성분들 원료용액 3.0mL~3.7mL을 포함하는 경우 또는 0.0048mL/L/o.u.~0.0070 mL/L/o.u. [o.u.: 광학단위]의 한계 내에 있는 경우, 산화된 메티오닐화 hIFNa5 형태(산화된-Met hIFNa5)의 형성은 제거되며, 아세틸화 hIFNa5 형태들의 양은 2배로 감소된다(절반으로 됨).

[0070] 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은, 유도 후 "평균 특정-배양 성장률(average specific culture growth rate)"(μ)이 0.17 [μ: ((In OD2 - In OD1)/T2-T1) 이상인 조건 하에서 수행되며, 여기에서 OD는 "광학 밀도"(광학 단위, o.u.)이고, T는 "시간"]이다. 본 발명자들에 의해 수행된 연구들은 배양 성장 및 미량성분들의 농도가, 특히 미량성분들의 농도가 매우 낮고/거의 제한적인 경우, 밀접하게 상호의존적이라는 것을 보여주었다. 배양 배지에서 미량성분들의 농도가 0.95mL/최종 현탁액 부피 L (실시예 4, 표 3)보다 낮거나 또는 3.0mL/탄소 공급 용액 L 미만인 경우, 유도 후 평균 μ는 0.121~0.158, 즉 0.17 미만이다(M-83, M-84, M-85, M-86). 그러나, 평균 μ가 0.17 미만인 경우, 산화된 메티오닐화 IFNa5 형태의 존재는 실제적으로 보장된다. 배양 배지 중 미량성분들의 농도가 1.23 mL/최종 현탁액 부피 L 보다 높은 농도이면 보다 빠른 성장(M-89, M-90), 보다 큰 WCW 및 보다 많은 양의 아실화 IFNa5 형태 + 미지의 단백질이라는 결과를 초래한다. 그러나, 유도 후 평균 μ가 0.17 이상인 경우, 미량성분들의 농도가 0.123mL/최종 현탁액 부피 L 보다 높거나 또는 3.7mL/탄소 공급 용액 L이 넘을때 까지 과정은 더욱 잘 진행된다.

[0071] 본 발명의 방법의 단계 c)는 발현된 IFNa5 단백질의 분리 및 선택적으로 정제하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포들의 용균 후, IFNa5 단백질이 봉입체들(IBs)의 형태로 분리되는데, 상기 IBs을 가용화시켜 변성된 IFNa5 함유 혼합물을 그 후 산화 복원처리하여 복원된 IFNa5 함유 혼합물을 제공하고, 이는, 대응하는 정제된 IFNa5를 수득하기 위하여 그 후 정제 공정에 투입된다. 특정 구체예에서, 상기 IFNa5는 바람직하게는 hIFNa5이다.

[0072] 본 발명의 방법에 따라 발현된 IFNa5를 분리 및 정제하기 위해서는, 봉입체(IBs) 형태의 상기 재조합 IFNa5을

분리하기 위하여, 먼저 상기 IFNa5 생산 대장균 숙주 세포들을 용균시킨다. 간단하게는, 특정 구체예에서, IFNa5 생산 대장균 숙주 세포들의 세포막들은 균질화, 초음파처리 또는 압력 순환(pressure cycling)과 같은 통상의 기술들을 이용하므로써 용균된다. 바람직한 방법들은 포터(Poter's) 균질화기(테플론/유리)를 이용하여 초음파처리 또는 균질화를 포함한다. 세포들을 용균시킨 후, IFNa5 함유 IBs를 액상의 용균물로부터, 예로서 원심분리, 및 적절한 버퍼 용액에 재현탁시키므로써 분리시킨다. 상기 IBs는 선택적으로 세척되어, 그 안에 있는 임의의 수용성 대장균을 제거할 수 있다.

[0073] 그 후, 상기 IBs는, 변성 IFNa5를 포함하는 혼합물을 제공하기 위하여, 카오트로프제(chaotropic agent)와 같은 가용화제, 예로서, 일반적으로 수성 버퍼용액 중에서, 수소결합들을 해리시키고 단백질의 3차 및 2차 구조에 영향을 미쳐 펼침(unfolding)을 유발하는 단백질 변성제 존재 하에서 용해된다. 예시적이고, 비제한적인 카오트로프제들의 예들은, 우레아 및 구아니디늄(guanidinium) 염산염(GdmHCl), 바람직하게는 폴리펩티드 사슬의 카바모일화(carbamoylation)(진한 우레아 용액이 사용된 경우 일어날 수 있음)를 방지하는 강한 카오트로프제인 구아니디늄 염산염을 포함한다. 상기 카오트로프제의 농도는 사용된 특정 카오트로프제 및 존재하는 세포성 물질의 양에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는 6~7M, 가장 바람직하게는 6M의 농도를 갖는 구아니디늄 염산염 용액이 사용된다. pH는, 카오트로프제를 포함하는 적당한 버퍼들을 첨가하므로써 조절될 수 있으며, 바람직하게는 pH는 7 초과일 것이며, 전형적으로 약 8 이상, 바람직하게는 8.6 이상, 더욱 바람직하게는 9.55 내지 9.65이다. 일반적으로, 바람직한 구체예에서, IBs 가용화는 재접힘 단계에서와 동일한 pH에서 수행되어, 이에 따라 재접힘 단계를 위한 가용화물 pH의 추가적인 조정을 피할 수 있다.

[0074] IFNa5 함유 IBs의 가용화 후, 불용성 미립 물질이 분리 및 폐기된다. 변성된 IFNa5 함유 혼합물에 존재하는 변성된 IFNa5는 복원 버퍼와 같은 복원 용액 내에서 상기 혼합물을 희석하므로써 복원된다. 특정 구체예에서, 상기 복원 버퍼는 불안정화제(labilizing agent)(예로서, L-아르기닌, 등), 산화환원쌍(예로서, GSH/GSSG, 등) 및 선택적으로 킬레이트화 화합물을, 7.0 초과, 전형적으로 약 8 이상, 바람직하게는 8.6 이상, 더욱 바람직하게는 9.55 내지 9.65의 pH를 갖는 버퍼 시스템 중에 포함한다. 복원 후, 정확하게 접힌 IFNa5를 함유하는 결과의 단백질 용액은, 임의의 미립 물질을 제거하기 위하여 통상의 기술들, 예로서 원심분리 또는 여과에 의해 정화된다. 그 후, 필요한 경우, 정화된 단백질 용액의 pH를 적당한 산(예로서, HCl)을 이용하여 8.0~8.20으로 조절하고, 복원된 IFNa5 (단백질 용액)을 포함하는 혼합물을 그 후 임의의 적당한 IFNa5 정제방법에 투입한다.

[0075] 실제적으로 임의의 IFNa5 정제 공정이 사용될 수 있으나, 본 발명은 IFNa5 정제를 위한 효율적인 과정을 더 제공하며, 이는 복원된 IFNa5를 다음 단계들을 포함하는 4단계 크로마토그래피 공정에 투입하는 것을 포함한다:

[0076] 1) 복원된 IFNa5를 포함하는 혼합물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 처리하는 단계;

[0077] 2) 상기 단계 1)에서 수득된 용액을 음이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계;

[0078] 3) 상기 단계 2)에서 수득된 용액을 제 1의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계; 및

[0079] 4) 상기 단계 3)에서 수득된 용액을 제 2의 양이온-교환 크로마토그래피 처리하는 단계로, 상기 용액은 선택적으로 메티오닌 함유 버퍼로 희석된다.

[0080] 간략하게는, 단계 1)에서, 다른 성분들, 예로서 잔류 카오트로프제들 등으로부터 복원된 IFNa5를 분리하기 위하여, 산화 복원 처리 후 수득된 단백질 풀(pool)을 포함하는 pH-조절된 정화된 단백질 용액이 페닐-세파로오스(Phenyl-Sepharose) 컬럼에 적용된다. 추가적으로, 복원된 IFNa5와 흡수제의 소수성 표면과의 접촉은 IFNa5의 성숙을 선호한다.

[0081] 그 후, 단계 2)에서, 단계 1)에서 수득된 단백질 풀은, IFNa5를 그의 응집된 형태로부터 분리하기 위하여, 전도율(예로서, 13.00~14.00mS/cm) 조정되고, pH를 8.75~8.85로 조정하고, Q-세파로오스(Q-Sepharose) 컬럼 (음이온 교환 크로마토그래피) 상에 적용한다. 특정 순도(예로서, 55% 이상)를 갖는 분획들은 추가의 정제를 위하여 합할 수 있다(pooled).

[0082] 이어서, 단계 3)에서, N-메티오닐-IFNa5 및 아세틸화 IFNa5과 같은 하전된 동족체들로부터 주요 IFNa5를 분리하기 위하여(번역후 변경 생성물들인 형태들), 단계 2)에서 수득된 단백질 풀은 전도율 조정되고(예로서, 6.00~7.00mS/cm), pH를 5.15-5.20로 조정하고, SP-세파로오스 컬럼(첫번째 양이온-교환 크로마토그래피) 상에 적용된다. 특정 순도(예로서, 70% 이상)를 갖는 분획들은 추가의 정제를 위해 합할 수 있다.

[0083] 최종적으로, 단계 4)에서, 단계 3)에서 수득된 단백질 풀은, 하전된 동족체들로부터 주요 IFNa5 형태를 분리하기 위하여, 전도율 조정되고(예로서, 6.00~7.00mS/cm), pH를 5.00~5.20로 조정하고, 제 2의 SP-세파로오스 컬

럼(두번째 양이온-교환 크로마토그래피) 상에 적용된다. 특정 구체예에서, 실온에서 수행되는 크로마토그래피 동안 IFNA5의 산화를 방지하기 위하여, 상기 로딩(loading) 용액에 L-메티오닌이 첨가된다. 분획들은, IFNa5의 순도가 95% 이상(≥) (RP-HPLC로 측정) 달성될 수 있도록 하는 방식으로 합할 수 있다.

[0084] 바람직한 경우, 이렇게 수득된 IFNa5는 약학적으로 허용가능한 비히클 및 부형제들 예로서, pH 6.80~7.20, 염화나트륨 함유, 인산나트륨과 함께 조제될 수 있다. 상기 단백질 용액은, 바람직한 경우 원하는 농도에 달하도록 농축될 수 있으며, 예로서 특정 구체예에서, 상기 단백질 용액은 10mg/mL에 달하도록, 예로서 1.0~1.5mg/mL 단백질 농도로 농축되며, 한외여과에 의해 버퍼 교환되고, 최대 공극크기 0.22㎛를 갖는 멸균 필터 단위를 통한 멸균 여과를 이용하여 멸균화된다.

[0085] 실시예 3은 hIFNa5 생산 균주로부터 hIFNa5를 분리 및 정제하는 과정을 개시한다.

[0086] 하기 실시예들은 본 발명의 구체예들을 더욱 예시하기 위하여 제공된다.

[0087] **실시예 1**

[0088] **IFNa5를 발현하는 대장균 균주의 구축**

[0089] 본 실시예는 재조합 인간 인터페론 알파-5(hIFNa5)를 생산하는 대장균 균주-5의 개발 및 구축을 개시한다. 간략하게는, 상기 hIFNa5 유전자의 클로닝 및 발현, 및 재조합 IFNa5 단백질을 생산하는 박테리아 균주의 구축은, 하기 단계들을 이용하여 아래 설명된 바와 같이 달성되었다: hIFNa5를 암호화하는 cDNA 유전자의 클로닝, 대장균에서 그의 발현을 최적화하기 위한 상기 유전자의 DNA 서열의 변형, 발현 플라스미드의 구축, 선택된 플라스미드의 적당한 대장균 균주로의 형질전환 및 발현/유도 조건의 선택.

[0090] **방법들**

[0091] 기존의 방법들 및 프로토콜들을 hIFNa5의 클로닝 및 발현에 사용하였다 [Sambrook 등 Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second ed., CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1~3 (Ausubel F.M. 등, ed.) John Wiley & Sons, Inc., Brooklyn, New York, 1994-1998].

[0092] 효소, DNA 및 단백질 마커들을 이용한 모든 조작들은 제조자 지시사항에 따라 수행하였다 [주로 Fermentas (Lithuania)].

[0093] **유전적 구축**

[0094] 상기 hIFNa5 생산 대장균의 구축은 도 1에 나타낸 유전적 구조체들의 개발 흐름도에 나타낸 단계들에 따라 수행하였다.

[0095] **일차 플라스미드**

[0096] 다음과 같이 비-간 병상으로 복부 수술을 받는 익명의 공여 환자로부터의 -동의 후- 정상의 간세포로부터, IFNa5 코딩 서열(신호 펩타이드 없음)을 클로닝하였다: 정상의 간세포를 1mL의 Ultraspec 용액(Biotex) 중에서 균질화하고, RnaseOUT (Gibco- BRL) 존재 하에서 M-MLV 역전사제(Gibco- BRL)를 이용하여 역전사하기 전에 총 RNA를 Dnase(Gibco-BRL, Paisley, U.K.)로 처리하였다. hIFNa5 코딩 서열(신호 펩타이드 없음)을, 하기 업스트림(upstream) 및 다운스트림(downstream primers)를 이용하여, 미리 수득된 상보성 DNA(cDNA)로부터 PCR 증폭하였다(5'-3'):

[0097] **GGAATTCCATATG**TGTGATCTGCCTCAGACCCA (서열번호: 2), 및

[0098] CGGGATCC**TTGAACCAGTTTTCATTCCTTC** (서열번호: 3).

[0099] 두 프라이머들 모두 hIFNa5 서열(진한 글씨체로 표시) 및 제한효소들에 대한 특정 서열들: NdeI 및 BamHI(밑줄 표시됨)을 포함한다. 상기 PCR 생성물을 아가로오스 겔 전기영동에 의해 분석하였으며, 상기 겔에서 밴드를 잘라내어 Gene Clean Kit (MP Biomedicals)로 정제하였다. 정제된 PCR 생성물을, TOPO TA Cloning Kit (Invitogen)를 이용하여 pCR 2.1 TOPO 플라스미드 내로 클로닝하였다. 상기 삽입물로부터의 클론들을 ABIPRISM 310 유전자 분석기(Genetic Analyzer) (Perkin Elmer)에서 염료 로다민 종결제 사이클 서열화 키트 (Rhodamine terminator cycle sequencing kit) (Perkin Elmer)를 이용하여 서열분석하여, 상기 삽입물이 hIFNa5 서열과 정확하게 대응됨을 확인하였다. 그 후, pCR 2.1 TOPO-IFN알파5를 NdeI 및 BamHI 제한효소들로 분해시키고, 534pb 밴드(IFNa5 코딩 서열에 대응)를, 동일한 효소들로 미리 분해시킨 pET28b 벡터 (Novagen)에

서 클로닝시켰다. 동일한 절차를 사용하여 상기 서열을 다시 확인하였다.

[0100] 상이한 콜로니들로부터의 일차 플라스미드 DNA pET28-IFN 알파-5를 제한효소 분석으로 분석하였다(도 2).

[0101] 플라스미드 pET28-IFN 알파-5를 ABI Prism 377 서열 분석기를 이용하여 두 DNA 가닥들을 서열분석하므로써 분석하였다. 이러한 분석으로 hIFNa5 코딩 서열을 확인하였다. 플라스미드 pET28-IFN 알파-5를 PCT 증폭을 위한 주형으로서 코돈 최적화된 성숙 구조의 구축에 사용하였다.

[0102] **코돈 최적화된 성숙 구조**

[0103] 코돈 최적화를 포함하는 hIFNa5 코딩 유전자의 PCR 증폭

[0104] 플라스미드 pET28-IFN 알파-5를 주형으로서 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 하기 올리고뉴클레오티드를 합성하였다:

[0105] 센스 프라이머(SP): 5'- CAT ATG TGT GAT CTG CCG CAG ACC CAC TCC CTG TCT AAC CGT CGT ACT CTG ATG ATC ATG GCA CAG ATG GGT CGT ATC TCT CCT TTC [서열번호: 4]

[0106] 안티센스 프라이머(ASP): 5'- CTG CAG TTA TTC CTT ACG ACG TAA ACG TTC TTG CAA G [서열번호: 5]

[0107] SP [서열번호: 4] 및 ASP [서열번호: 5] 프라이머들을 대장균에서 가장 적은 빈도로 사용되는 코돈들을 치환하는데 적용하였다. 코돈 최적화는 주로 아르기닌 코돈들 AGA 및 AGG에 관한 것이다.

[0108] PCR 단편의 중간체 플라스미드 내로의 클로닝

[0109] 신속 DNA 결찰 키트(Rapid DNA ligation Kit) (#K1421, Fermentas, Lithuania)를 이용하여 약 500 bp의 정제된 증폭 생성물들을 pUC57/T 플라스미드 (#SD0171 Fermentas, Lithuania) 내로 클로닝하고, 대장균 JM109 (ATCC 53323, ATCC Bacteria and Bacteriophages, 19th 판, 1996) 내로 형질전환시켰다. 재조합 클론들을 제한효소 분석에 의해 선발하였다(도 3). 2개의 클론들을 선발하여 추출된 플라스미드들을 서열분석하였다.

[0110] **중간체 플라스미드 IFN 알파-5의 서열분석 및 인간 IFN 알파-5 코딩 서열의** 플라스미드 pET21b (+)로의 재클로닝

[0111] 뉴클레오티드 서열분석으로 hIFNa5 코딩 부분의 서열을 확인하였으며 이를 도 4에 나타내었다.

[0112] 상기 hIFNa5 코딩 단편은 NdeI+BamHI 절제되었으며, 정제된 DNA 단편을 NdeI+BamHI 절제 벡터 pET21b(+) (Novagen) 내로 결찰하여 플라스미드 pET21-IFN 알파-5를 제공하였다. 대장균 JM109 균주 내로의 형질전환 후, 100㎍/mL의 암피실린을 첨가하므로써 박테리아를 선발하였다. 콜로니 PCR 시험법을 이용하여, 형질전환된 세포들로부터 얻은 콜로니들의 재조합 삽입물 분석을 수행하였다. PCR 양성 클론들로부터 정제된, 플라스미드 pET21-IFN 알파-5의 상세한 제한효소 분석은 예상된 제한 패턴을 결과로서 나타내었다 (도 5).

[0113] **재조합 hIFNa5의 발현**

[0114] 플라스미드 pET21-IFN 알파-5를 비-발현 숙주 중에 구축(안정화)한 후, 이를 타겟 단백질들의 발현에 관련된 유전성분들을 갖는 대장균 BL21(DE3) 숙주 내로 형질전환하여 대장균 BL21 (DE3) pET21-IFN a-5 균주를 제공하였다. hIFNa5 발현을 1mM IPTG (이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드)를 이용하여 유도하고, 그 결과들을 도 6에 나타내었다.

[0115] SDS-PAGE에 따르면, hIFNa5의 분자량은 약 20 kDa이며, 이는 계산치 19.7 kDa과 상관된다.

[0116] 재조합 hIFNa5는 총 세포 용균물의 불용성 분획 중에서 검출되었다; 타겟 단백질 수율은 총 세포 단백질의 약 20%였다. hIFNa5은 세포 용균물의 거의 40%의 불용성 분획을 차지하였다. 수득된 발현 균주의 한 콜로니를 연구용 모세포 저장소(research master cell bank:RMCB)의 수립에 사용하였다.

[0117] **실시예 2**

[0118] **생산 균주에 의한 hIFNa5의 생합성 과정**

[0119] 대장균 BL21(DE3) pET21-IFN a-5 균주(실시예 1)를 하기 조성(g/L)을 갖는 배지 중에서 배양하였다:

[0120] a) 플라스크 중에서 접종물(배양균) 제조를 위해: 2나트륨 수소인산(17.0), 칼륨2수소인산(1.82), 황산암모늄(3.0), 황산마그네슘 6수화물(0.5), D(+)-글루코오스 1수화물(15.0) 및 미량성분 원료용액 e) (0.16mL);

[0121] b) 발효를 위해(g/L): 이염기성 인산암모늄(4.0), 황산마그네슘 6수화물(0.5), 칼륨2수소인산 (13.3), 시트르산 1수화물(1.6), D(+)-글루코오스 1수화물(30.0) 및 미량성분들 원료용액 e) (0.25mL);

[0122] c) 공급용액 A(g/L): D(+)-글루코오스 1수화물(700.0), 황산마그네슘 6수화물(20.7) 및 미량성분들 원료용액 e) (3.4mL/L);

[0123] d) 공급용액 B(g/L): 이염기성 인산암모늄(360.0) 및 칼륨2수소인산(306.7); 및

[0124] e) 미량성분들(미량원소들) 원료용액 (g/L): 염화철(III) 6수화물(30.0), 염화칼슘 2수화물(4.05), 황산아연(II) 7수화물(6.75), 황산망간(II) 1수화물(1.5), 황산구리(II) 5수화물(3.0), 황산코발트(II) 6수화물(1.14), 몰리브덴화 나트륨 2수화물(0.3) 및 보론산 (0.69).

[0125] 도 7은 인간 IFN 알파-5 생합성 과정의 전체 개요를 나타낸다.

[0126] 접종물 제조: 플라스크 중 배양[a)]을 위해 멸균 배지 500mL를 담고 있는 에를렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크에 0.25mL의 스톡(stock) 배양 WCB (working cell bank: 작업 세포 뱅크) 대장균 BL21 (DE3) pET21-IFN a-5을 접종하였다. 그 후, 상기 플라스크를 30℃에서 300rpm의 진탕속도로 21~22시간 동안 회전 교반기 중에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 광학밀도는 4.50 o.u.(광학단위) [λ= 595nm] 이상이어야만 한다.

[0127] 발효: 7.0L의 발효 배지 [b)]가 담긴 발효기(총 부피 13.7L)를 상기 접종 플라스크에서 수득된 1.5~1.6%의 배양물로 접종하였다. 자동제어되는 온도(37℃), pH (6.8) 및 pO_2 (20%)에서 발효를 수행하였다. pH 수정을 위해 25% 암모늄 용액을 사용하였다. 8~9시간의 배양 후, 추가의 공급을 시작하였다. 공급 용액 A [c)]를 특정 양으로 펌프하여 배양 배지 내 글루코오스의 농도를 약 3g/L 내지 22g/L로 유지하였다. 90~110 o.u. (λ= 595nm)에서 IPTG를 이용하여 유도를 수행하여 0.5mM의 최종 IPTG 농도를 제공하였다. 유도 후 충분한 특정-배양 성장률을 갖기 위하여, 유도시점에서 특정-배양 성장률은 0.45 보다 낮지 않아야 한다. 유도 후 평균 특정-배양 속도는 0.17보다 높아야 한다. 공급 용액 B [d)]를 별개의 투여량으로 펌프하였다: 60~70o.u.에서 150mL, 120~140o.u.에서 150mL, 유도 후 1.5시간(90분)에 75mL 및 2시간에 75mL. 유도 후 동일한 조건하에서 3시간 동안 발효를 계속하였다. 그 후, 세포 현탁액을 12~15℃에서 발효기에서 냉각시키고, 페리스태틱(peristatic) 펌프(35L/h)에 의해 원심분리기로 옮겼다. 세포 현탁액을 4℃, 5,000rpm에서 원심분리하였다.

[0128] 수확된 바이오매스(biomass)를 폴리에틸렌 백 내에 채집하여, 냉동 및 이후의 저장을 위해 (-33±5)℃ 냉장고 안에 넣었다. 총 단백질 및 hIFNa5 발현의 평가를 위하여 냉동된 바이오매스 일부를 취하였다.

[0129] **실시예 3**

[0130] **생산 균주로부터 hIFNa5를 분리 및 정제하는 방법**

[0131] **1. 바이오매스 균질화, 붕괴 및 봉입체들(IBs)의 분리**

[0132] 실시예 2에서 수득된 바이오매스 680.0~700.0g을 재현탁 버퍼(0.1 M Tris-HCl, pH 7.80-8.00, 2mM EDTA, 0.1% TritonX-100 및 1mM PMSF 함유) 중에서 1/10(w/v)의 비, 즉 1g의 습윤 바이오매스/10mL의 재현탁 버퍼 비율로 균질화시켰다.

[0133] 포터 균질화기(테플론/유리) 중에서 재현탁을 수행한 후, 세포들을 고압 균질화기로 600~800바(bar)의 압력으로 4~10℃의 온도에서 붕괴시켰다. 세포 붕괴 후, 봉입체들(IBs)을 8,000rpm에서 30~35분간 원심분리시켜 분리하였다.

[0134] **2. 봉입체들(IBs)의 세척**

[0135] 세척 버퍼 I~III을 이용하여 4개의 연속 단계 과정에 의해 분리된 IBs의 예비-세척을 수행하였다:

[0136] 세척 버퍼 I: 10mM Tris-HCl 버퍼, pH 7.45~7.55, 1M NaCl, 0.1% 폴리소르베이트-80(Polysorbate-80) 함유;

[0137] 세척 버퍼 II: 10mM Tris-HCl 버퍼, pH 8.00~8.20, 6M 우레아 함유;

[0138] 세척 버퍼 III: 10mM Tris-HCl 버퍼, pH 8.00~8.20.

[0139] 간략하게는, IBs의 세척을 하기와 같이 수행하였다:

[0140] a) 첫번째 2회 세척(단계 1 및 2), IBs를 세척 버퍼 I로 세척;

[0141] b) 3번째 세척 (단계 3), IBs를 세척 버퍼 II로 세척; 및

[0142] c) 4번째 세척 (단계 4), IBs를 세척 버퍼 III로 세척.

[0143] 10mL의 버퍼/1g의 습윤 바이오매스의, 세척 버퍼/습윤 바이오매스 비율을 전체 IBs 세척 절차동안에 걸쳐 유지하였다.

[0144] **3. IBs의 용해**

[0145] IBs를 용해시키기 위하여, 가용화 버퍼(50mM 글리신/NaOH 버퍼, pH 9.55~9.65, 6M GdmHCl 함유)를 사용하였다. 용해 비율: 1g의 바이오매스로부터 분리된 IBs을 6mL의 가용화 버퍼 중에서 2시간 동안 2~8℃ 용해한 후, 8,000rpm에서 25~30분 동안 원심분리.

[0146] **4. 복원**

[0147] 복원 버퍼: 50mM 글리신/NaOH 버퍼, pH 9.55~9.65, 1.2M NaCl, 0.22M L-아르기닌, 2.85mM GSH, 0.285mM GSSG 함유, 4~10℃에서 전도율 110~110mS/cm.

[0148] GdmHCl-변성된 인간 IFN 알파 5를, IBs 용해화물을 복원 버퍼(부피비 1:7) 에 적가하므로써 복원시켜, 0.2M L-아르기닌의 복원 혼합물 중 최종 농도2.5/0.25mM GSH/GSSG를 달성하였다. 복원 혼합물을 2~8℃에서 44~66시간 동안 연속적으로 교반하였다. 복원 후, 단백질 용액을 8,000rpm에서 30~35분 동안 원심분리하여 청정화하였다.

[0149] **5. 크로마토그래피**

[0150] hIFNa5를 하기 설명되는 바와 같은 4단계 크로마토그래피 과정에 의해 정제하였다.

[0151] 5.1 페닐-세파로오스 컬럼 상에서의 크로마토그래피(소수성 상호작용 크로마토그래피)

[0152] 상기 페닐-세파로오스 컬럼은 잔류 카오트로프제 GdmHCl로부터 복원된 hIFNa5를 분리하기 위한 것이다. 추가적으로, 복원된 hIFNa5와 흡착제의 소수성 표면과의 접촉은 hIFNa5의 성숙에 유리하다(favors).

[0153] *간략하게는, 청정화된 단백질 용액의 pH는 6M HCl을 이용하여 8.00~8.20로 조정되었으며, 상기 단백질 용액은 그 후 하기 공정 파라미터들을 갖는 크로마토그래피 페닐-세파로오스 컬럼 상에 적용되었다:

[0154] 크로마토그래피 매질: 페닐-세파로오스 패스트 플로우(Phenyl-Separose Fast Flow) (Amersham Pharmacia Biotech AB);

[0155] 사용된 컬럼: BPG 100×500mm, 직경 10cm;

[0156] 선형 유속: 60cm/시간;

[0157] 크로마토그래피 매질 층(bed) 부피: 2.7±0.3L

[0158] 평형 버퍼: 20mM Tris-HCl 버퍼, pH 8.00~8.20, 1.5M 염화나트륨 함유, 15~25℃에서 전도율 115~125mS/cm (4~10℃에서 110~120mS/cm);

[0159] 용리 버퍼: 10mM Tris-HCl 버퍼, pH 9.20~9.25, 15~25℃에서 전도율 0.1~0.2mS/cm;

[0160] 용리 버퍼를 이용한 6개 컬럼 부피(CV)[즉, 6CV]에 걸친 용리를 수행한다. 수집된 단백질 용액은 2~6 CV이다.

[0161] 5.2 Q-세파로오스 컬럼 상에서의 크로마토그래피 (음이온 교환 크로마토그래피)

[0162] hiFNa5 모노머를 그의 합하여진 형태들로부터 분리하기 위하여 Q-세파로오스 컬럼을 이용하였다.

[0163] 간략하게는, 이전 단계 (5.1)에서 수득된 단백질 풀의 전도율을, pH 8.75~8.85, 5M NaCl 함유, 20mM Tris-HCl 버퍼를 첨가하므로써 13.00~14.00mS/cm로 조정하고, pH를 6M HCl를 이용하여 8.75~8.85로 조정하였다. 이 단백질 용액을 그 후, 하기 파라미터들을 이용하여 Q-세파로오스 컬럼 크로마토그래피에 적용하였다:

[0164] 크로마토그래피 매질: Q-세파로오스 패스트 플로우 (Amersham Pharmacia Biotech AB);

[0165] 사용된 컬럼: BPG 140×500MM, 직경 14cm;

[0166] 선형 유속: 60cm/시간;

[0167] 크로마토그래피 매질 층 부피: 3.3±0.3L

[0168] 평형 버퍼: 20mM Tris-HCl 버퍼, pH 8.75~8.85, 0.12M 염화나트륨 함유, 15~25℃에서 전도율 13.00~14.00mS/cm;

[0169] 용리 버퍼: 20mM Tris-HCl 버퍼, pH 8.75~8.85, 0.23mM 염화나트륨, 15~25℃에서 전도율 23.00~25.00mS/cm;

[0170] 용리: 5컬럼 부피(5CV) 및 5CV 100% 용리 버퍼에 대하여, 100% 용리 버퍼로의 선형 구배.

[0171] 분획 부피는 400~1,000mL이었다.

[0172] 55% 이상(≥) hIFNa5 순도의 (RP-HPLC로 측정) 분획분들만을 추가의 정제를 위해 합하였다.

[0173] 5.3 SP-세파로오스 컬럼에 대한 첫번째 크로마토그래피 (양이온 크로마토그래피 I)

[0174] N-메티오닐-hIFNa5 및 아세틸화 hIFNa5와 같은, 하전된 동족체들(번역후 변형들의 생성물들인 형태들)로부터 주 hIFNa5 형태를 분리하기 위하여, SP-세파로오스 컬럼을 제 3 및 제 4의 크로마토그래피 단계들에 사용하였다.

[0175] 간략하게는, 이전 단계 (5.2)에서 수득된 단백질 풀의 전도율을, pH 4.95-5.05, 10mM 초산나트륨 버퍼를 첨가하므로써, 6.00~7.00mS/cm로 조정하고, pH를 4M 아세트산으로 5.15~5.20으로 조정하였다. 이 단백질 용액을 그 후, 하기 파라미터들을 이용하여 SP-세파로오스 컬럼 크로마토그래피에 적용하였다:

[0176] 크로마토그래피 매질: SP-세파로오스 패스트 플로우(Amersham Pharmacia Biotech AB);

[0177] 사용된 컬럼: BPG 100×500mm, 직경 10cm;

[0178] 선형 유속: 60cm/시간;

[0179] 크로마토그래피 매질 층 부피: 3.3±0.3L

[0180] 평형 버퍼: 20mM 초산나트륨 버퍼, pH 5.15~5.20, 50mM 염화나트륨 함유, 15~25℃에서 전도율 6.00~7.00mS/cm;

[0181] 용리 버퍼: 20mM 초산나트륨 버퍼, pH 5.15~5.20, 2mM L-메티오닌 및 0.1M NaCl, 15~25℃에서 전도율 11.00~13.00mS/cm;

[0182] 용리 버퍼를 이용하여 10 컬럼 부피(10CV)에 대한 용리를 수행하였다.

[0183] 분획 부피는 400~2,000mL였다.

[0184] 70% 이상(≥) hIFNa5 순도의 (RP-HPLC로 측정) 분획분들만을 추가의 정제를 위해 모았다.

[0185] 5.4 SP-세파로오스 컬럼에서의 두번째 크로마토그래피 (양이온 교환 크로마토그래피 II)

[0186] 간략하게는, 로딩 용액[첫번째 SP-세파로오스 컬럼으로부터 회수된 단백질 분획분의 풀 (단계 5.3)]을 5mM 초산나트륨 버퍼, pH 5.00-5.20, 2mM L-메티오닌 함유, 15~25℃에서 전도율 0.200~0.800mS/cm의 5mM 초산나트륨 버퍼로 희석하여, 15~25℃에서 전도율 6.00~7.00mS/cm로 하였다. 실온에서 수행되는 크로마토그래피 동안 hIFNa5의 산화를 방지하기 위하여, 2mM L-메티오닌의 로딩 용액 내로의 포함을 수행하였다. 상기 로딩 용액을 하기 파라미터들을 이용하여 SP-세파로오스 컬럼 크로마토그래피에 적용하였다:

[0187] 크로마토그래피 매질: SP-세파로오스 패스트 플로우 (Amersham Pharmacia Biotech AB);

[0188] 사용된 컬럼: BPG 100×500mm, 직경 10cm;

[0189] 선형 유속: 60cm/시간;

[0190] 크로마토그래피 매질 층 부피: 3.0±0.3L

[0191] 평형 버퍼: 20mM 초산나트륨 버퍼, pH 5.15~5.20, 50mM 염화나트륨 함유, 15~25℃에서 전도율 6.00~7.00 mS/cm;

[0192] 용리 버퍼: 20mM 초산나트륨 버퍼, pH 5.15-5.20, 0.1M NaCl 함유, 15-25℃에서 전도율 11.00~13.00mS/cm;

[0193] 용리 선형 유속: 45cm/시간;

[0194] 용리: 20 컬럼 부피(20CV)에 대하여 100% 용리 버퍼로 선형구배.

[0195] 분획분 부피는 400~2,000mL였다.

[0196] 분획분들을, hIFNa5이 RP-HPLC 순도가 95%(≥) 이상이 되도록 하는 방식으로 모았다.

[0197] **조제, 농축, 멸균 여과**

[0198] 조제 버퍼: 25mM 인산나트륨, pH 6.80~7.20, 0.1M 염화나트륨 함유, 15~25℃에서 전도율 10.00~14.00mS/cm.

[0199] 단백질 용액의 버퍼 교환/농축을, Biomax 10kDa 막을 통한 정용여과(diafiltration)/농축에 의해 1.00mg/mL(≥) 이상으로 수행하고, 멸균 0.22㎛ 필터(Millipak 20)를 통하여 멸균여과하고, 유리 바이알 내에 충전시켰다.

[0200] 도 8은 본 발명에 따라 처리 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 보여주며, 이는 3개의 대규모 정제 배치들의 재조합 hIFNa5 단백질의 환원 조건 및 비환원 조건 모두에서 SDS-PAGE(14%)에 의해 측정되었다.

[0201] 도 9는 본 발명에 따라 처리 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 보여주며, 이는 "역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC) 분석" (도들은 재조합 hIFNa5의 3개의 대규모 배치들의 결과들을 나타낸다)에 의해 측정되었다.

[0202] 도 10은 본 발명에 따라 처리 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 보여주며, 이는 3 개의 재조합 hIFNa5 대규모 배치들에 대한 "크기배제 HPLC (SE-HPLC) 분석"에 의해 측정되었다.

[0203] 도 11은 본 발명에 따라 처리 및 조제된 재조합 hIFNa5의 순도를 보여주며, 이는 3개의 재조합 hIFNa5 대규모 배치들에 대한 등전점 전기영동 분석들에 의해 측정된다. 래인들 1, 11: pI 표준(Amersham Pharmacia); 래인들 2, 3, 4: 재조합 hIFNa5, 15㎍; 래인들 5, 6, 7: 재조합 hIFNa5, 5㎍; 래인들 8, 9, 10: 재조합 hIFNa5, 1㎍.

[0204] 도 12는 본 발명에 따라 정제 및 제조된 3개의 재조합 hIFNa5 제제들의 펩티드 맵핑 크로마토그램을 나타낸다.

[0205] **실시예 4**

[0206] **재조합 인간 IFN 알파-5의 생합성에 대한 미량성분들 및 글루코오스 농도의** 영향에 대한 평가

[0207] 본 실시예의 목적은 재조합 인간 IFN 알파-5 (hIFNa5)의 번역후 변형들에 대한 미량성분들의 영향을 확인하고, 탄소 공급 용액 중 임계적(critical) 미량성분들 농도의 범위를 결정하고, 재조합 hIFNa5의 생합성에 대한 글루코오스 농도의 효과를 평가하기 위한 것이다. 따라서, 본 실시예는 본 연구동안 수행된 분석 및 수득된 결과들을 설명하며, 탄소 공급 용액 중 미량성분들 농도의 조정 및 재조합 hIFNa5의 생합성 과정에서 글루코오스 농도의 조정으로서 제공한다.

[0208] hIFNa5 생합성 과정의 최적화 동안, 발효 배지 중의 금속들 또는 미량성분들(미량원소들)의 농도는 hIFNa5 단백질의 번역후 변형들에 영향을 미쳤음이 검출되었다. 따라서, 본 연구의 목적은 hIFNa5 단백질의 번역후 변형에 대한 상기 미량원소들의 효과를 확인하고, 탄소 공급 용액에 대한 임계적 미량성분들 농도의 범위들을 결정하기 위한 것이었다. 이에 추가하여, 각 탄소 공급 투여량의 공급 후 발효 배지 중 글루코오스 농도(17g/L 및 22g/L)를 결정하였으며, 이는 배양 성장에 대한 영향(즉, 배양 성장 제한을 연루하여, 바이오매스 수율에 영향을 미치는 지의 여부 또는 배양 성장에 대해 어떠한 효과도 없는지의 여부) 및 타겟 단백질(재조합 hIFNa5)의 품질에 영향을 미치는지의 여부를 알기 위한 것이다.

[0209] 재료 및 방법

[0210] "실험 설계"(Design of Experiments: DOE)을 참조하여 실험 계획을 설계하고 모니터링하였으며, 이를 표 1에 나타내었다.

표 1

설계 및 수행된 실험들

쇼트배치 번호	탄소 공급 용액 중 미량성분 용액의 농도,mL/L	발효배지 중 글루코오스 농도의 상한치,g/L
M-83	2.2	17
M-84	2.2	22
M-85	2.7	17
M-86	2.7	22
M-87	3.7	17
M-88	3.7	22
M-89	4.2	17
M-90	4.2	22
M-92	3.2	22
M-80*; M-81*	3.0	22
M-82*	3.4	22
F-0030811*	4.0	22

[0211] **(*)동일한 조건하에서 예전에 미리 수행된 포함된 시험들**

[0212] 높은 세포 밀도 공급-배치 발효들을, 화학적으로 규정된 무기질염/글루코오스 배지 중에서 수행하였다.

[0213] - 플라스크 중 배양을 위한 무기염/글루코오스 배지의 조성(g/L): 2나트륨 수소인산 - 17.0, 칼륨2수소인산 - 1.82, 황산마그네슘 - 3.0, 황산마그네슘 6수화물- 0.5, D(+)-글루코오스 1수화물- 15.0, 미량성분 원료용액 - 0.16mL.

[0214] - 미량성분들 (미량원소들 또는 금속) 원료용액 (g/L): 염화철(III) 6수화물- 30.0, 염화칼슘 2수화물- 4.05, 황산아연(II) 7수화물- 6.75, 황산망간(II) 1수화물- 1.5, 황산구리(II) 5수화물- 3.0, 황산코발트(II) 6수화물- 1.14, 몰리브덴화 나트륨 2수화물- 0.3, 보론산 - 0.69.

[0215] - 발효용 무기염/글루코오스 배지 조성 (g/L): 이염기성 인산암모늄- 4.0, 황산마그네슘 6수화물- 0.5, 칼륨2수소인산- 13.3, 시트르산 1수화물- 1.6, D(+)-글루코오스 1수화물- 30.0, 미량성분들 원료용액- 0.25 mL.

[0216] - 탄소 공급 용액: 70.0% 글루코오스, 2.1% $MgSO_4x7H_2O$ 및 실험 계획에 따른 미량성분들 원료용액.

[0217] 8번째 배양 시간으로부터 출발하는 글루코오스 농도를 매일 (15-30)분 측정하고, 그 후 계산된(실험 계획에 따라 17g/L 또는 22g/L의 글루코오스 농도 상한치에 도달하기 위한) 투여량의 탄소 공급물을 추가하였다

[0218] 또한, 별개의 투여량의 70mL의 두 인산용액(이염기성 인산암모늄 - 25.0 g, 칼륨2수소인산 - 21.0, 3개의 투여량으로 나눔: 비 2:2:1 또는 28:28:14mL)들 모두를 60~75, 120~135 및 170~180 o.u.에 추가하였다.

[0219] 필요한 경우, 유입 공기는 용해된 산소 농도 20%를 유지하기 위하여 자동적으로 순수한 산소로 풍부화(총 발효기 부피 L 당 60%에 이름)되었다.

[0220] WCB (-70℃에서 저장됨) [실시예 2]로부터의 스톡 배양 대장균 BL21 (DE3) pET21-IFN a-5 0.25mL를, 궤도 진탕기에서(300rpm) 30℃에서 22시간 동안 인큐베이션된 500mL의 무기염/글루코오스 배지(pH 약 7.7)중에서 증식시켰다(multiplied).

[0221] 접종물은 실제 부피가 1.54%의 작업 발효기 부피의 약 1.0%였다(20mL).

[0222] 발효는 총 3L/2L 작업 부피 발효기 "Biostat B" 중, pH 6.8, pO_2- 20%, 온도- 37℃에서 수행되었다. 자동적으로 제어된 발효 과정 온라인 변수들(온도, 교반, pH, pO_2, 산/염기 소비) 및 오프라인(off-line) 변수- MFCS/윈(win) 플롯에서 추적된 광학밀도.

[0223] 35% 오르토-인산 및 25% 암모니아 용액을 pH 조정에 이용하였다.

[0224] 거품은 20% Pluronic® 31R1을 이용하여 제거하였다.

[0225] 유도는 IPTG를 이용하여 91.6~103.6o.u.(λ= 600nm)의 OD에서 수행하여, 최종 작업부피에 대하여 0.5mM의 최종 IPTG 농도를 만들었다. 발효를 별도 3시간동안 지속하였다.

[0226] 특이적-배양 성장률(μ), 유입(추가 공급) 및 배출(OD 및 글루코오스의 측정을 위한 샘플링) 부피들을 발효 전

체에 걸쳐 엄격하게 계산하였다.

[0227] **결과 및 데이터 분석**

[0228] 본 연구 동안 수행된 분석 및 수득된 결과들은 대장균에서 생산된 재조합 hIFNa5 단백질의 번역후 변형들이 배양 배지 중의 미량성분들의 농도에 따라 달라진다는 것을 확인시켜 준다.

[0229] 미량성분들 (원료용액)의 농도가 3.0 mL/탄소 공급 용액 L 초과 또는 0.95mL/실제 최종 현탁액 부피 L이고, 유도 후 평균 특정-배양 속도(μ)가 0.17 또는 초과(>)인 경우, 산화 메티오닐화 hIFNa5 관련 단백질이 제거되었다(표 2~3).

표 2

탄소 공급 용액 중의 미량성분들의 다른 농도에서의 생합성 파라미터들

쇼트 배치 번호	플라스크 OD (600 nm)	미량성분 스톡용액 (mL/L 탄소 공급)	글루코오스 상한치(g/L)	OD (600 nm) 유도전 결린 시간 (h)	OD (600 nm) 유도 시점	OD (600 nm) 발효 종료 시점	WCW (g/L)	DCW (%)	총 단백질 바이오매스 (mg/g biomass)	총 단백질로 부터의 hIFNa5 발현(%)
M-83	5.1	2.2	17	11.25	94.6	136.2	169.1	30.12	115.00	18.95
M-84	4.9	2.2	22	11.25	91.8	139.2	161.4	31.89	98.33	18.95
M-85	5.6	2.7	17	11.75	95.8	149.3	158.5	30.98	101.33	17.95
M-86	5.4	2.7	22	11.50	91.6	147.0	170.7	30.26	113.33	17.35
M-80	5.3	3.0	22	11.75	103.6*	180.6*	175.4	32.11	120.33	18.53
M-81	5.2	3.0	22	11.00	96.8*	184.0*	185.9	33.47	122.20	18.47
M-92	4.8	3.2	22	11.50	103.6	172.5	188.3	30.31	112.00	20.00
M-82	5.5	3.4	22	11.50	99.5*	184.6*	178.8	32.08	116.00	18.13
M-87	4.5	3.7	17	11.75	99.6	179.0	183.4	30.82	114.33	18.75
M-88	5.0	3.7	22	11.75	96.0	158.5	175.3	30.49	116.33	18.40
M-89	4.8	4.2	17	13.00	92.4	173.5	182.4	31.09	126.70	21.45
M-90	4.5	4.2	22	11.75	98.8	178.0	194.1	30.67	151.00	20.95

* - 초기 수행된 배치에서 BioPhotometer (Eppendorf, A=595nm)를 이용하여 측정된 OD, 기타 - Spectrometer EZ 150 (PerkinElmer, A=600nm)를 이용; WCW: 습윤 세포 중량(g/세포 현탁액 L); DCW: 건조 세포 중량(%)

[0230]

표 3

상이한 농도의 미량 성분들에서의 생합성 및 재접힘 파라미터들

쇼트배치 번호.	μ			미량원소 스톡 용액 (mL/L 탄소공급물)	총 미량 원소 (mL/L/o.u.) (최종)	총 미량 원소 (mL/L 현탁액) (acc.최종 부피)	hIFNa5 mg/mL 6M GdHCl	RP-HPLC, % 재접힘 후			
	유도시점	유도후 평균						OxidMet hIFNa5	정확하게 접힌 hIFNa5	아세틸라틴 hIFNa5	
										피크-1	피크-2
M-83	0.470	0.121		2.2	0.00581	0.790	1.84	12.60	50.35	3.02	4.08
M-84	0.457	0.139		2.2	0.00559	0.778	1.74	14.44	46.67	3.08	4.15
M-85	0.350	0.148		2.7	0.00627	0.935	1.95	15.48	41.10	2.93	4.38
M-86	0.427	0.158		2.7	0.00639	0.939	1.85	5.61	52.65	3.33	4.63
M-80	0.563	0.185		3.0	0.00543	0.980	2.52	0	62.01	4.08	5.07
M-81	0.578	0.214		3.0	0.00498	0.950	2.53	0	60.63	4.2	4.56
M-92	0.497	0.170		3.2	0.00641	1.105	2.26	0	66.58	4.07	5.45
M-82	0.452	0.194		3.4	0.00591	1.130	2.34	0	59.98	4.53	5.0
M-87	0.433	0.181		3.7	0.00687	1.229	2.02	0	63.04	5.22	5.52
M-88	0.575	0.163		3.7	0.00745	1.166	1.78	1.43**	63.15	2.61	3.47
F-0030811*	0.498	0.180		4.0	NT	NT	NT	0	48.36	7.75	7.11***
M-89	0.466	0.21		4.2	0.00787	1.365	1.82	0	54.06	7.25	5.99***
M-90	0.522	0.196		4.2	0.00788	1.403	1.68	0	55.57	7.66	5.94***

* 10L (작업 부피) 발효; ** 유도 후 보다 느린 성장률(희석,소포(antifoam) 센서가 고장나서, 84mL의 소포 용액을 첨가하였음). *** - 주 피크와 아세틸화된 형태의 2개의 피크들 사이에서 추가의(미지의) 형태의 형성이 관찰되었음. NT:시험하지 않음.

[0231]

[0232] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 표 2는 탄소 공급 용액 중 상이한 농도의 미량성분들에서의 생합성 파라미터들을 보여주는 반면, 표 3은 상이한 농도의 미량성분들에서의 생합성 및 재접힘 파라미터들을 보여준다.

[0233] 많은 연구들이 수행되었으며, 예컨대 (i) 탄소 공급 용액 중 또는 세포 현탁액 중 미량성분들의 농도에 대한 특정-배양 성장률(μ)의 의존성; (ii) 재접힘 후 산화된 메티오닐화된 hIFNa5 (OxidMet hIFNa5) 및 재접힘 후 총 아세틸화된 hIFNa5의, 유도후 평균 특정-배양 성장률(μ)에 대한 의존성; (iii) hIFNa5 단백질 번역후 변경들의 (재접힘 후 OxidMet hIFNa5, 재접힘 후 아세틸화 hIFNa5 및 재접힘 후 정확하게 접힌 hIFNa5)의, 탄소 공급 용액 중 미량성분들 중 농도에 대한 의존성; 및 (iv) hIFNa5 관련 형태들(재접힘 후 아세틸화된 hIFNa5 및 재접힘 후 OxidMet hIFNa5)의, 탄소 공급 용액 중 또는 세포 현탁액 중 미량성분들의 농도에 대한 의존성. 나아가, 모든 배치들을 재접힘 후 RP-HPLC에 투입하였다. 이들 결과들로부터, 특정-배양 성장률(μ) 및 바이오매스 수율은 배양 배지 중 미량성분들의 농도에 따라 달라진다는 것이 명백하였다 (표 2~3).

[0234] 요약하면, 수득된 결과들은 다음을 나타낸다:

[0235] - 아세틸화 hIFNa5의 최저 함량은 산화된 메티오닐화 hIFNa5의 양이 최고일 때 관찰되며, 그 반대도 적용된다 (쇼트 배치들 번호 M-83, M-84, M-85 및 M-86);

[0236] - 아세틸화된 hIFNa5의 양은, 미량성분들의 농도(원료용액)가 3.0~3.7mL/탄소 공급 용액 L의 범위 내인 경우, 또는 0.95~1.23mL/실제 최종 현탁액 부피 L (표 3)의 범위 내인 경우, 약 8~11%이다(쇼트 배치들 번호 M-80, M-81, M-92, M-82 및 M-87); 그리고

[0237] - 탄소 공급 용액 중 미량성분들의 농도가 4mL/L 보다 높거나 또는 1.23mL/실제 최종 세포 현탁액 부피 L 보다 높은 경우, 추가적인 미지의(확인되지 않은) 형태가 검출되었다[이는 주 피크와 아세틸화 형태의 2개의 피크들 이후에 관찰된다(데이터는 나타내지 않음)].

[0238] 수득된 결과들도, 글루코오스 농도의 상한치(17g/L 또는 22g/L)가 실제적으로 타겟 단백질(hIFNa5)의 품질 및

바이오매스 수율에 영향을 미치지 않으며, 수득된 실제 값들은 오차범위 내에 있음을 나타낸다(표 2).

[0239] 결론

[0240] - 본 연구 동안 수득된 결과들은, 재조합 hIFNa5의 생합성 과정에서 탄소 공급 용액 중 미량성분들 농도 및 글루코오스 농도의 조정으로서 제공된다.

[0241] - 산화 메티오닐화된 hIFNa5 단백질은, 미량성분들의 농도가 3.0mL/탄소 공급 용액 L 이상, 또는 0.95mL/실제 최종 현탁액 부피 L 이상 및 유도후 평균 특정-배양 성장률(μ)이 0.17 이상인 경우 제거된다.

[0242] - 미량성분들의 농도가 약 3.0mL/L 내지 3.7mL/탄소 공급 용액 L의 범위 내 또는 약 0.95 내지 약 1.23 mL/실제 최종 현탁액 부피 L 범위 내인 경우, 아세틸화된 hIFNa5 단백질은 약 8~11%이다.

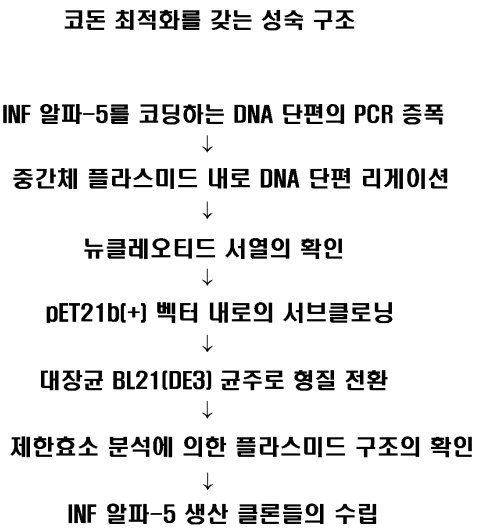
[0243] - 탄소 공급 용액 중 미량성분들의 농도가 3.7mL/L 초과이거나 또는 1.23mL/실제 최종 현탁액 부피 L 초과인 경우, 미지의(미확인) 단백질 형태가 합성된다.

[0244] - 미량성분들 결정 최대 수율의 최적 농도 및 타겟 hIFNa5 단백질의 최고 품질은 약 3.0 내지 약 3.7mL/탄소 공급 용액 L의 범위 내이다.

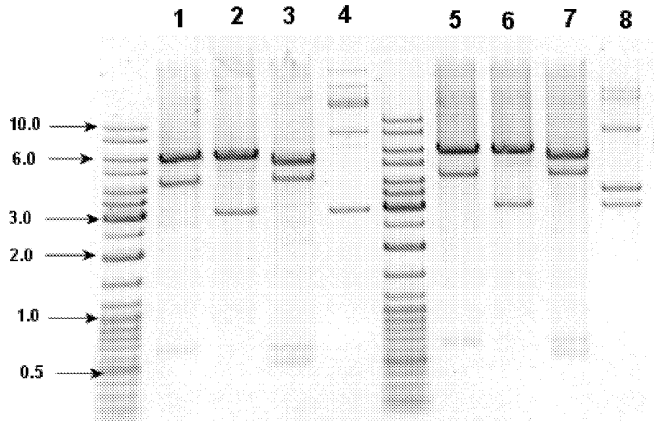
[0245] - 17g/L 내지 22g/L 범위의 글루코오스 용액은 실제적으로 타겟 단백질(재조합 hIFNa5)의 품질 및 바이오매스 수율에 영향을 미치지 않는다.

도면

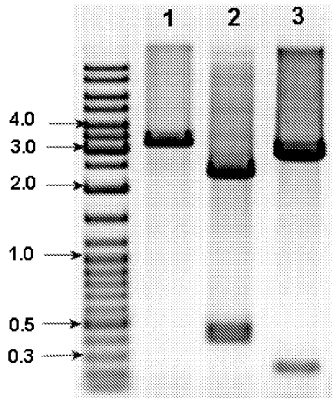
도면1



도면2



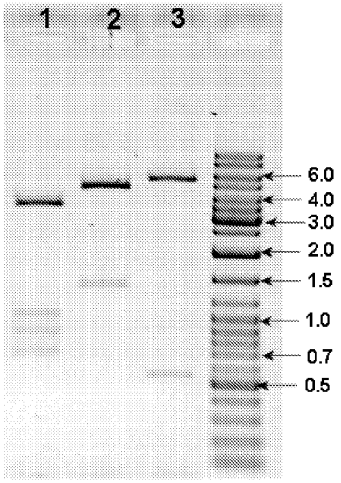
도면3



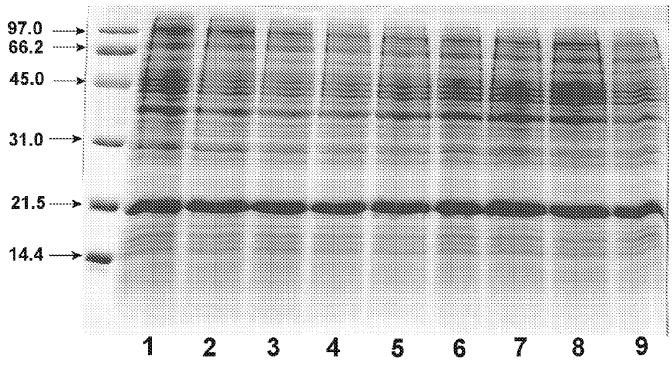
도면4

```
1     atg tgt gat ctg ccg cag acc cac tcc ctg tct aac cgt cgt act ctg atg atc atg gca
       M   C   D   L   P   Q   T   H   S   L   S   N   R   R   T   L   M   I   M   A
61    cag atg ggt cgt atc tct cct ttc tcc tgc ctg aag gac aga cat gac ttt gga ttt cct
       Q   M   G   R   I   S   P   F   S   C   L   K   D   R   H   D   F   G   F   P
121   cag gag gag ttt gat ggc aac cag ttc cag aag gct caa gcc atc tct gtc ctc cat gag
       Q   E   E   F   D   G   N   Q   F   Q   K   A   Q   A   I   S   V   L   H   E
181   atg atc cag cag acc ttc aat ctc ttc agc aca aag gac tca tct gct act tgg gat gag
       M   I   Q   Q   T   F   N   L   F   S   T   K   D   S   S   A   T   W   D   E
241   aca ctt cta gac aaa ttc tac act gaa ctt tac cag cag ctg aat gac ctg gaa gcc tgt
       T   L   L   D   K   F   Y   T   E   L   Y   Q   Q   L   N   D   L   E   A   C
301   atg atg cag gag gtt gga gtg gaa gac act cct ctg atg aat gtg gac tct atc ctg act
       M   M   Q   E   V   G   V   E   D   T   P   L   M   N   V   D   S   I   L   T
361   gtg aga aaa tac ttt caa aga atc act ctc tat ctg aca gag aag aaa tac agc cct tgt
       V   R   K   Y   F   Q   R   I   T   L   Y   L   T   E   K   K   Y   S   P   C
421   gca tgg gag gtt gtc aga gca gaa atc atg aga tcc ttc tct tta tca gca aac ttg caa
       A   W   E   V   V   R   A   E   I   M   R   S   F   S   L   S   A   N   L   Q
481   gaa cgt tta cgt cgt aag gaa taa 504
       E   R   L   R   R   K   E   -
```

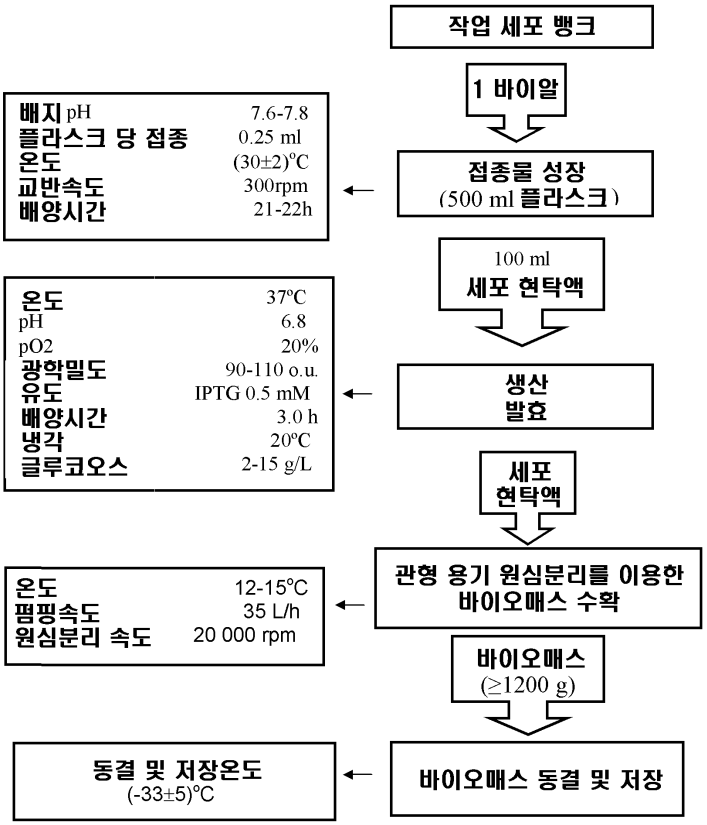
도면5



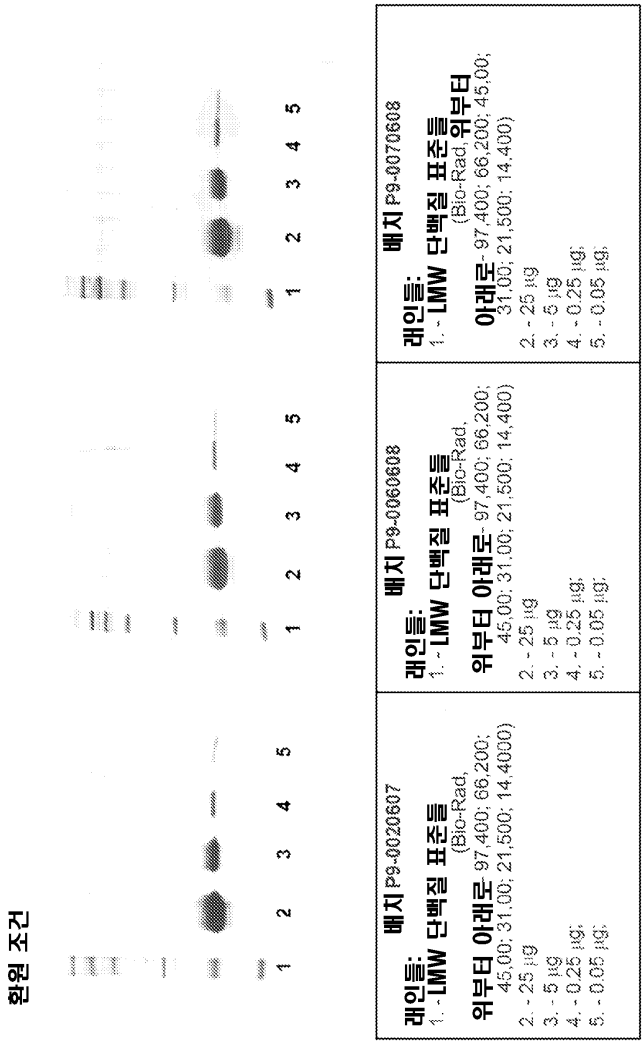
도면6



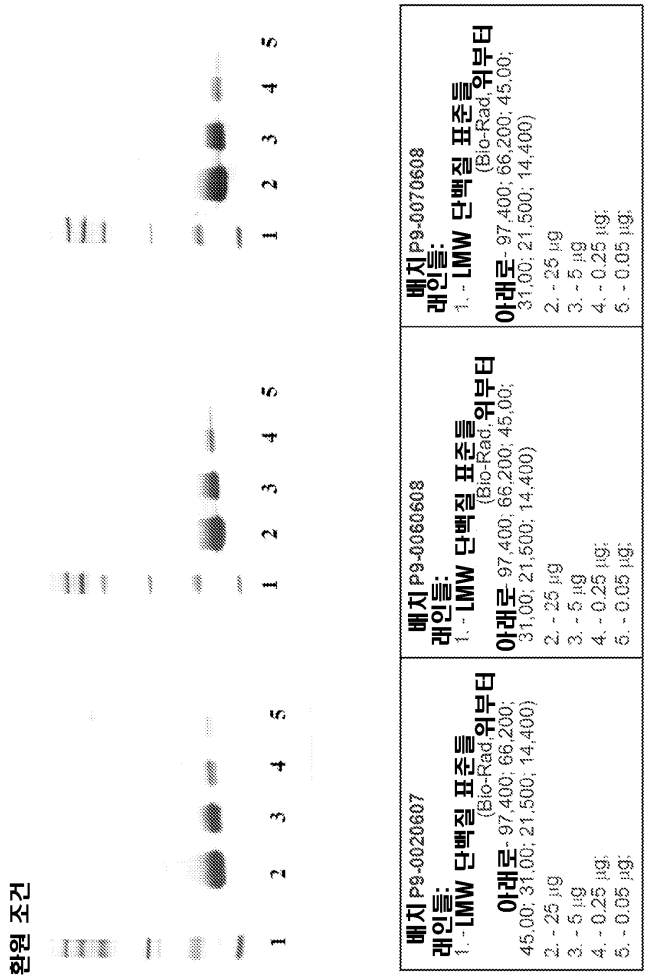
도면7


작업 세포 뱅크
1 바이알
배지 pH 7.6-7.8
플라스크 당 접종 0.25 ml
온도 (30±2)°C
교반속도 300rpm
배양시간 21-22h
접종물 성장
(500 ml 플라스크)
100 ml
세포 현탁액
온도 37°C
pH 6.8
pO2 20%
광학밀도 90-110 o.u.
유도 IPTG 0.5 mM
배양시간 3.0 h
냉각 20°C
글루코오스 2-15 g/L
생산
발효
세포
현탁액
관형 용기 원심분리를 이용한
바이오매스 수확
온도 12-15°C
펌핑속도 35 L/h
원심분리 속도 20 000 rpm
바이오매스
(≥1200 g)
동결 및 저장온도
(-33±5)°C
바이오매스 동결 및 저장

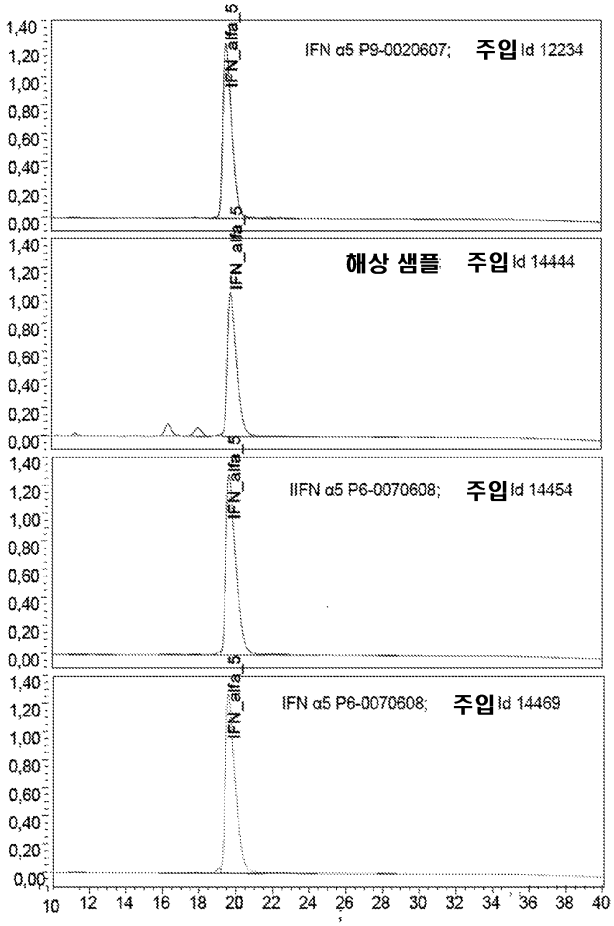
도면8a


환원 조건
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
레인들:
1. - LMW 단백질 표준들 (Bio-Rad, 위부터 아래로- 97,400; 66,200; 45,00; 31,00; 21,500; 14,400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
베지 P9-0020607
베지 P9-0060608
베지 P9-0070608

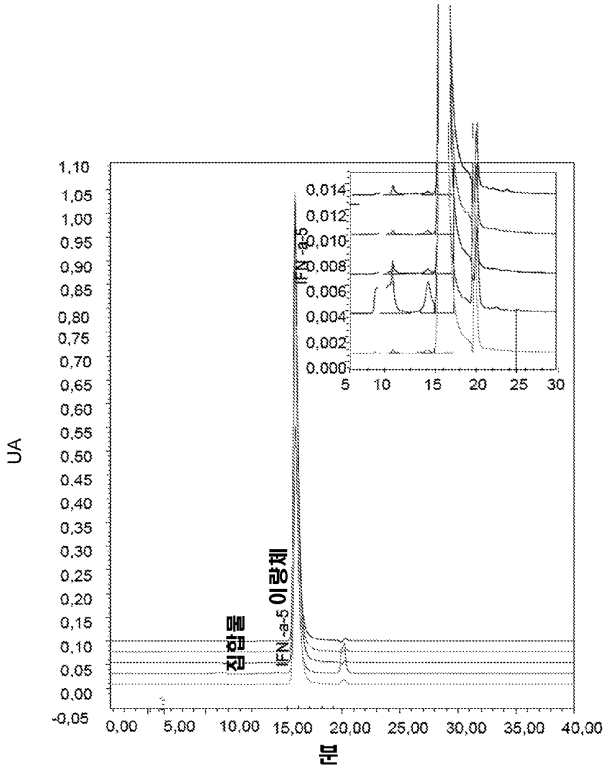
도면8b


환원 조건
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5
배치 P9-0020607
래인들:
1. - LMW 단백질 표준들 (Bio-Rad,위부터 아래로- 97,400; 66,200; 45,00; 31,00; 21,500; 14,400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
배치 P9-0060608
래인들:
1. - LMW 단백질 표준들 (Bio-Rad,위부터 아래로- 97,400; 66,200; 45,00; 31,00; 21,500; 14,400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;
배치 P9-0070608
래인들:
1. - LMW 단백질 표준들 (Bio-Rad,위부터 아래로- 97,400; 66,200; 45,00; 31,00; 21,500; 14,400)
2. - 25 µg
3. - 5 µg
4. - 0.25 µg;
5. - 0.05 µg;

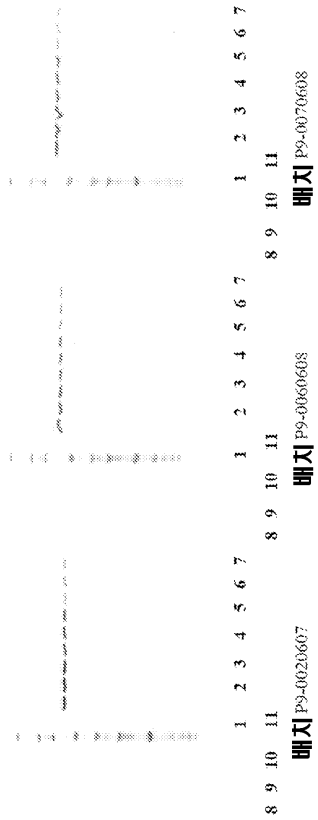
도면9


IFN_alfa_5
IFN α5 P9-0020607; 주입 Id 12234
해상 샘플 주입 Id 14444
IIFN α5 P6-0070608; 주입 Id 14454
IFN α5 P6-0070608; 주입 Id 14469

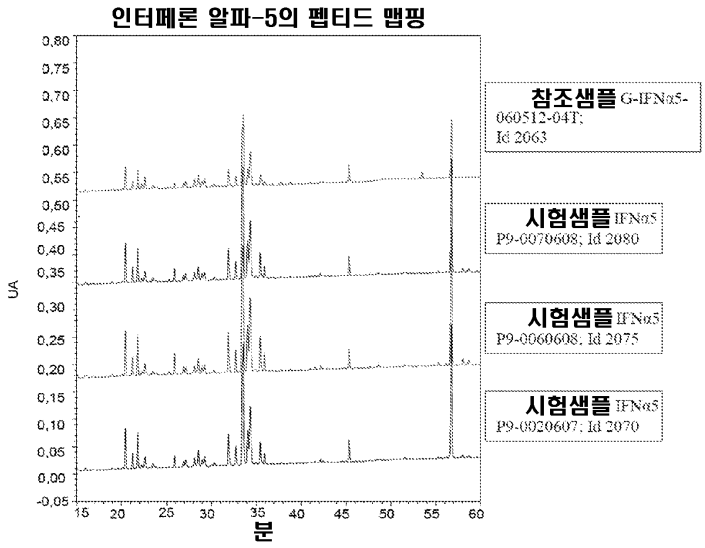
도면10


UA
분
IFN_a-5
집합물
이량체

도면11



도면12



서 열 목 록

<110> DIGNA BIOTECH,S.L.

<120> METHOD FOR PRODUCING INTERFERON ALPHA 5

<130> F12-6661

<150> EP 10382019.7

<151> 2010-02-01

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 167

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Ser Asn Arg Arg Thr Leu
1 5 10 15

Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Thr Trp Asp Glu
65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu Asp Thr Pro Leu
100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ala Asn Leu Gln
145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Upstream primer for amplyfing mature human IFN alpha 5

<400> 2

ggaattccat atgtgtgatc tgcctcagac cca 33

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Downstream primer for amplyfing mature human IFN alpha 5

<400> 3

cgggatcctt gaaccagttt tcattccttc 30

<210> 4

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sense primer used in PCR amplification of hIFNa5 coding gene including codon optimization

<400> 4

catatgtgtg atctgccgca gacccactcc ctgtctaacc gtcgtactct gatgatcatg 60

gcacagatgg gtcgtatctc tcctttc 87

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antisense primer used in PCR amplification of hIFNa5 coding gene including codon optimization

<400> 5

ctgcagttat tccttacgac gtaaacgttc ttgcaag 37