

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0037425
(43) 공개일자 2020년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 21/00 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7008828(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2013년03월14일
 심사청구일자 없음
 (62) 원출원 특허 10-2014-7026772
 원출원일자(국제) 2013년03월14일
 심사청구일자 2018년03월12일
 (85) 번역문제출일자 2020년03월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2013/031383
 (87) 국제공개번호 WO 2013/148249
 국제공개일자 2013년10월03일
 (30) 우선권주장
 61/616,297 2012년03월27일 미국(US)

- (71) 출원인
 제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 스샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
 레이드, 마이클 더블유.
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
 엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 에스티. 존, 리차드
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
 엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 장덕순, 이귀동

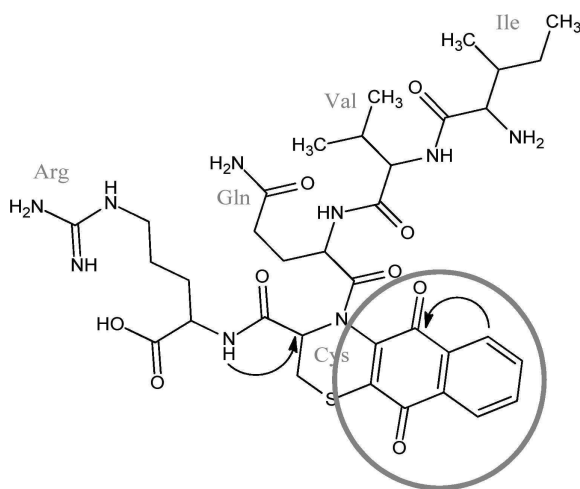
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 재조합 단백질을 위한 개선된 수확 작업

(57) 요약

본 발명은 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, 상기 재조합 단백질을 dO₂ 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출 가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 벌크로 정제하는 것을 포함하는, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다. 또한, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 menE 유전자-결실 원핵 숙주 세포를 발효시키고, 상기 재조합 단백질을 수확하고, 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 벌크로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 재조합 단백질 수율은 약 20% 이상 증가되는 것인, 재조합 단백질을 생산하는 방법이 고려된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12M 41/40 (2013.01)

C12M 41/42 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

(72) 발명자

건슨, 제인 브이.

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

칼레아스, 킴

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

나다라자, 디파

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

아담스, 레이첼

캐나다 엔1에이치 7알2 온타리오주 구엘프 스티븐
드라이브 142

스넬데코어, 브래들리 알.

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 *menE* 유전자-결실 원핵 숙주 세포의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2012년 3월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 61/616,297의 우선권의 이익을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 원핵 숙주 세포에서 재조합 단백질을 배양하는 개선된 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 실용적인 생명공학 산물에는 단백질의 경제적인 대규모 정제가 요구된다. 일반적으로, 단백질은 관심 단백질에 대한 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드를 삽입함으로써 그 단백질을 생산하도록 조작된 포유동물 또는 박테리아 세포주를 사용하여 세포 배양에 의해 생산된다. 사용된 세포주는 살아있는 유기체이기 때문에, 이것은 통상적으로 염, 당, 아미노산, 비타민, 미량 원소 및 펩톤의 혼합물을 함유하는 복합 성장 배지를 공급받아야 한다. 세포에 공급된 화합물의 혼합물 및 세포 자체의 부산물로부터 목적하는 단백질을 인간 치료제로서 사용하기에 충분한 순도로 분리하는 것은 어려운 도전을 제기한다.

[0006] 재조합 치료 단백질은 통상적으로 포유동물 숙주 세포, 예컨대 예를 들어 뮤린 골수종 NS0 및 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 포함하는 몇몇 숙주 세포주 (문헌 [Anderson, D. C and Krummen, L. (2002) Curr. Opin. Biotech. 13: 117-123; Chu, L. and Robinson, D. K. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:180-187] 및 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) (이. 콜라이(*E. coli*))를 포함하는 박테리아 숙주 세포에서 생산된다. 각각의 세포주는 세포에 의해 생산되는 단백질의 생산성 및 특징의 관점에서 이점 및 단점을 갖는다. 에스케리키아 콜라이는 생물활성을 위한 복합 글리코실화가 요구되지 않는 치료 단백질의 대규모 생산을 위해 가장 광범위하게 사용되어 왔다. 이. 콜라이에 의해 발현된 이종 단백질은 가용성 산물 또는 불용성 응집체로서 축적될 수 있다. 일반적으로, 단백질을 분리시키기 위해, 세포를 주변세포질 추출을 위한 처리에 적용시키거나 또는 용해시켜 달리 접근하기 어려운 세포내 산물을 방출시킬 수 있다. 발효 및 세포 배양 기술에서의 진전은 표적화된 재조합 단백질의 역할을 크게 증가시켰다.

[0007] 상업적 생산 세포주의 선택은 종종 높은 생산성에 대한 필요성과 주어진 제품에 요구되는 제품 품질 속성의 전달 능력 사이에서 균형을 맞춘다. cGMP 발효 절차 하에, 품질은 관리 기관 요건이 안전성, 제품 정체, 품질 및 순도의 관점에서 충족되는 것을 보장하는 전체 공정의 일부가 된다. 그러나, 때때로 주어진 제품이 그의 사양을 충족시키지 못하는 문제가 발생한다. 과제는, 문제를 확인하고 분리시킨 다음, 문제를 경감시켜 공정 제어가 확립된 파라미터 범위 내에서 유지될 수 있게 하고, 공정이 제품 사양을 충족시키는 제품을 일관되게 생산하는 것을 확실하게 하는 건실한 공정을 개발하는 것이다. 사양을 충족시키지 못하는 제품의 발생률을 경감시키거나 또는 제거할 필요성이 당업계에 존재한다.

발명의 내용

[0008] 발명의 개요

[0009] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 용존 산소 (dO_2) 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) 검정에 의해 측정 시 검출가능한 1,4-디히드록시-2-나프토에이트 (DHNA)-재조합

단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하는, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다. 상기에 기재된 방법의 한 실시양태에서, 분석 검정은 HPLC, RP HPLC, HIC HPLC, NMR, 질량 분광측정법 또는 UV 분광분석법에 의한 것이다.

[0010] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 dO_2 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 상기 재조합 단백질은 재조합 폴리펩티드 또는 단리된 항체인, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다.

[0011] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 dO_2 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 발효는 규모-독립적인 것인, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다.

[0012] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 dO_2 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 상기 원핵 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이 (이. 콜라이), 엔테로박터(*Enterobacter*), 아조토박터(*Azotobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 바실루스(*Bacillus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*), 시겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*) 및 파라코쿠스(*Paracoccus*)인, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다.

[0013] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 dO_2 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 상기 dO_2 는 단계 (b)의 수확 작업 전반에 걸쳐 연속적으로 0% 초과 수준으로 유지되는 것인, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다. 상기에 기재된 방법의 한 실시양태에서, 수확 작업은 균질화 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, dO_2 는 균질화 전에 약 30% 내지 약 75%로 유지된다. 또 다른 실시양태에서, dO_2 는 균질화 전에 75% 초과 수준으로 유지된다. 또 다른 실시양태에서, dO_2 는 균질화 후에 약 50%로 유지된다. 또 다른 실시양태에서, dO_2 는 균질화 후에 50% 초과 수준으로 유지된다. 한 실시양태에서, dO_2 는 1.5시간 이상의 기간 동안 유지된다. 또 다른 실시양태에서, dO_2 는 2시간 이상의 기간 동안 유지된다.

[0014] 본 발명은 (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 dO_2 수준이 0% 초과인 조건 하에 수확하고, (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 저장용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 dO_2 는 오버레이 또는 살포된 공기, 증가된 배압, 또는 교반에 의해 유지되는 것인, 재조합 단백질을 생산하는 방법을 고려한다. 한 실시양태에서, 오버레이 공기는 약 0.4 vvm 내지 약 0.8 vvm이다. 또 다른 실시양태에서, 오버레이 공기는 0.6 vvm을 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 증가된 배압은 약 1.0 내지 30 psi이다. 한 실시양태에서, 증가된 배압은 19 psi를 표적으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 교반 속도는 약 6 와트/L 내지 약 8 와트/L이다. 또 다른 실시양태에서, 교반 속도는 적어도 6 와트/L이다. 또 다른 실시양태에서, 교반 속도는 6 와트/L를 표적으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면에서, (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 *menE* 유전자-결실 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 수확하고; (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 정제용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하는, 재조합 단백질을 생산하는 방법이 고려된다. 상기에 기재된 방법에 대한 추가 실시양태로서, 재조합 단백질 수율은 대조 원핵 숙주 세포를 사용한 수율과 비교하여 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상 증가된다.

[0016] 본 발명의 또 다른 측면에서, (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 *menE* 유전자-결실 원핵 숙

주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 수확하고; (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 정제용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 재조합 단백질 수율은 대조 원핵 숙주 세포를 사용한 수율과 비교하여 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상 증가되고, 발효는 규모-독립적인 것인, 재조합 단백질을 생산하는 방법이 고려된다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면에서, (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 *menE* 유전자-결실 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 수확하고; (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 정제용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 재조합 단백질 수율은 대조 원핵 숙주 세포를 사용한 수율과 비교하여 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상 증가되고, 상기 재조합 단백질은 재조합 폴리펩티드 또는 단리된 항체인, 재조합 단백질을 생산하는 방법이 고려된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면에서, (a) 재조합 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환시킨 *menE* 유전자-결실 원핵 숙주 세포를 발효시키고, (b) 상기 재조합 단백질을 수확하고; (c) 상기 재조합 단백질을, 310 nm에서 IEC 검정에 의해 측정 시 검출가능한 DHNA-재조합 단백질 부가물을 함유하지 않는 여과된 정제용 벌크 (FBS)로 정제하는 것을 포함하며, 여기서 재조합 단백질 수율은 대조 원핵 숙주 세포를 사용한 수율과 비교하여 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상 증가되고, 상기 원핵 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이 (이. 콜라이), 엔테로박터, 아조토박터, 에르위니아, 바실루스, 슈도모나스, 클레브시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 세라티아, 시겔라, 리조비아, 비트리오실라 및 파라코쿠스인, 재조합 단백질을 생산하는 방법이 고려된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 산물의 3가지의 제조 실행의 COC 검정 결과를 나타낸 것이고, 여기서 실행 2 및 실행 3의 2가지 실행은 COC 검정에 대한 예상 결과를 충족시키지 못하였다. PW = 정제수, C = 개발 실행 대조군, 1 = 실행 1, 2 = 실행 2, 및 3 = 실행 3.

도 2a는 실행 1-3에 대한 UV/vis 스펙트럼 (10 cm)을 나타낸 것이고 - 실행 1-3은 근 UV에서 나타났다. 새로운 흡광도 피크는 대략 320 nm 및 460 nm에서 관찰되었고, 이는 실행 1에 대해서는 명백하지 않았다. 도 2b는 실행 3 - 실행 1에 대한 UV/vis 스펙트럼을 나타낸 것이고, 여기서 실행 2 및 3에 대한 흡광도 피크의 차이는 실행 1과 구별될 수 있다.

도 3은 310 nm에서 실행 1-3에 대해 모니터링한 IEC 검정을 나타낸 것이다. 주요 피크 뒤의 약한 솔더 피크가 실행 2 및 3에 대해 관찰된 반면, 실행 1에 대한 프로파일은 참조 물질과 비슷하였다.

도 4는 280 nm 및 310 nm에서 모니터링한 무손상 실행 1-3의 2D LC-MS 분석을 나타낸 것이다. 실행 1에 대해서는 예상 질량이 관찰된 반면, 실행 2 및 3에 대해서는 예상 질량 및 157 Da의 추가 질량이 관찰되었다.

도 5는 갈색 부가물의 수집된 분획 - IEC 검정으로부터 부수적 피크가 수집됨 - 의 MS 검출을 포함하는 트립신 펩티드 지도에 의한 2D-LC MS 및 질량 확인을 나타낸 것이다. 2D LC-MS 분석으로부터, 예상 질량 이외에, +156 Da 질량이 분획화된 솔더 피크에 대해 관찰되었다.

도 6은 310 nm에서 48.8분에 관찰된 신규 갈색 부가물 피크의 LC-MS-MS 분석을 나타낸 것이고, 이는 +154.006 Da의 변형된 Cys182를 갖는 T20 펩티드인 것으로 결정되었다. 변형된 (시스테인에서, +154.006 Da) 및 무함유 T6 및 T16 펩티드가 또한 질량 추출에 의해 검출되었다.

도 7은 산물의 1H-15N HSQC 데이터를 합성 펩티드 (NH₂-IVQCR-COOH)와 비교한 것이고, Cys NH 상관관계는 산물 샘플에서 상실된 것으로 나타났다.

도 8은 Cys의 CH와 아르기닌의 NH 사이에서 관찰된 강한 nOe에 의해 확인된 제안된 구조를 나타낸 것이다.

수집된 NMR 데이터에 기반하여, 갈색 부가물의 제안된 구조를 도 9에 나타내었다.

도 10은 메나퀴논을 제조하기 위한 원핵 세포에서의 생합성 경로를 나타낸 것이다.

도 11은 갈색 부가물 형성에 대해 310 nm에서 이온 교환 크로마토그래피에 의해 시험된 대표적인 여과된 벌크 재조합 산물을 나타낸 것이고, 측정가능한 부가물 형성은 나타나지 않았다.

도 12는 수확 작업에 걸쳐 구현된 Hi-dO 공정 증진의 예시적인 개략도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] I. 정의
- [0021] 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 하기 용어 및 어구는 하기 의미를 갖는 것으로 의도된다.
- [0022] 용어 "교반 속도"는 전형적으로 분당 회전수 (rpm)로서 측정되는 배양 브로쓰 또는 균질물의 혼합이다. 한 실시양태에서, 교반 속도는 "단위 부피당 전력"에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 1,000 리터 발효기에서 200 rpm일 때, 교반 속도는 대략 6 와트/L의 값을 갖는다.
- [0023] 본원에서의 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중 특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 항체는 무린, 인간, 인간화, 키메라, 또는 다른 종으로부터 유래된 것일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 또한 전장 이뮤노글로불린 분자 또는 전장 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 관심 표적의 항원 또는 그의 일부에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭하며, 이러한 표적은 암 세포 또는 자가면역 질환과 연관된 자가면역 항체를 생산하는 세포를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 이뮤노글로불린은 이뮤노글로불린 분자의 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA), 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류일 수 있다. 이뮤노글로불린은 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 한 측면에서, 이뮤노글로불린은 인간, 무린 또는 토끼 기원의 것이다.
- [0024] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타 입 (항-Id) 항체, CDR (상보성 결정 영역), ECD (세포외 도메인) 및 상기 중 임의의 것의 에피토프-결합 단편을 포함하며, 이들은 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원, 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체에 면역특이적으로 결합한다.
- [0025] "투명성, 유백광 및 착색 (COC) 검정"은 평평한 바닥 및 15-25 mm의 내부 직경을 갖는 무색 투명한 중성 유리로 된 동일한 시험 튜브를 사용하여, 층의 깊이가 40 mm인 하기에 기재된 바와 같이 새롭게 제조한 참조 현탁액과 검사할 액체를 비교하는 것으로서 정의된다. 미국 약전 2012 (USP 모노그래프 631, 유색 및 무색) 또는 유럽 약전 5.0 (EP 방법 2.2.2, 액체의 착색 정도)에 나열된 표준 색상 용액을 적절한 색상 지정의 확인에 사용할 수 있다.
- [0026] 용어 "1,4-디히드록시-2-나프토에이트 (DHNA)"는 이. 콜라이 세포로부터 유래된 화학적 산물이다 (문헌 [Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, et al. (2006) Gut 55: 681-8]). DHNA는 이. 콜라이 세포의, 비타민 K2로도 공지된 메나퀴논 (MK) 생합성 경로에서의 중간체이다 (문헌 [Neidhardt, F.C. (2010) Escherichia coli and Salmonella (online version: Module 3.2.2 pgs. 36-37); Inledew, W.J. & R.K. Poole (1984) The respiratory chains of Escherichia coli. Microbiological reviews. 48: 222-271; Nowicka, B. & J. Cruck (2010) Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. Biochimica et Biophysica Acta 1797: 1587-1605]).
- [0027] 용어 "용존 산소" (dO₂)는 주어진 배지 중에 용해되거나 또는 보유된 산소의 양의 상대 측정치이다. 이것은 액체 배지에서의 용존 산소 프로브, 예컨대 산소 센서로 측정될 수 있다.
- [0028] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "발효시키다" 또는 "발효"는 관심 제조합 단백질의 생산을 유도하도록 형질전환 시킨 원핵 숙주 세포를 배양하는 과정을 의미한다.
- [0029] 용어 "여과된 벌크" 또는 "여과된 벌크 물질 (FBS)"은 수확 및 정제 후의 관심 산물의 제조합 단백질을 의미하며, 여기서 단백질은 숙주 세포로부터 방출되고, 임의의 세포 잔해를 제거하기 위해 원심분리되고/거나 여과되고, 적합한 크로마토그래피 칼럼 상에서 정제되고, 후속적으로 여과 과정에 의해 농축된다.
- [0030] HCCF로도 나타낸 용어 "수확된 세포 배양액"은 원심분리 또는 여과를 포함하는 수단에 의해 세포를 제거하는 원핵 또는 진핵 세포 배양액을 의미한다. 세포 배양은 원핵 또는 진핵 세포를 제어된 조건 하에서 성장시키는 과정이다. 용어 "세포 배양"은 동물 세포를 포함하는 다세포 진핵생물 또는 박테리아 및 효모를 포함하는 단세포 원핵생물로부터 유래된 세포의 배양을 지칭한다. 진핵 세포 배양물은 포유동물 세포, 예컨대 차이니스 햄스터 난소 세포, 하이브리도마 및 곤충 세포를 포함한다. 적절한 세포 배양 용기를 사용하여, 분비된 단백질을 부착

의존성 세포 또는 현탁 세포주로부터 수득할 수 있다. 포유동물 세포 배양물은 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 NSO 세포를 포함한다.

- [0031] 용어 "수확 작업" 또는 "수확"은 제한 없이, 관심 재조합 단백질의 단리 및 정제를 시작하기 위해, 상기 관심 단백질을 생산하도록 형질전환시킨 발효된 원핵 숙주 세포 배양물을 용해 또는 균질화한 다음, 원심분리 및/또는 여과하는 것을 포함하는 과정을 의미한다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Hi-dO"는 수확 작업 동안 용존 산소 수준을 0% 초과로 유지시키는 본원에 기재된 바와 같은 증진된 공정을 지칭한다. 이를 달성하기 위해, 본 발명은 설정점에서의 또는 그 초과 dO₂ 수준, 즉 0% 초과, 또는 약 30% 내지 약 75%, 또는 75% 초과 수준, 또는 약 50%, 또는 50% 초과 수준을 유지시키는데 사용될 수 있는 오버레이 공기, 배압 및 교반 속도의 조합을 고려한다. 또 다른 실시양태에서, 당업자는 또한 0% 초과 용존 산소 수준의 Hi-dO를 달성하기 위해 직접적으로 브로쓰 내에 공기 또는 순수한 산소를 살포할 수 있다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "균질화"는 원핵 숙주 세포로부터 관심 재조합 단백질을 방출시키기 위해 상기 단백질로 형질전환시킨 숙주 세포의 용해 과정 또는 기계적 세포 용해를 의미한다.
- [0034] 용어 "증가된 배압"은 배양 브로쓰를 통한 산소 전달 속도를 증가시키는데 사용된다. 배압은 전형적으로 psi 또는 bar로 측정된다.
- [0035] "메나퀴논 (MK)"은 비타민 K₂ 상동체이고, 미세호기성 및/또는 혐기성 조건 중에 막 결합 단백질 복합체 사이의 호흡 연쇄에서 전자 서를 분자로서 작용한다. 용어 "menE"는 메나퀴논을 제조하기 위한 생합성 경로에서의 유전자이다.
- [0036] 용어 "미생물 발효"는 단백질 및 소분자 (예를 들어, 2차 대사물)를 생산하도록 유전자 조작된 박테리아 또는 효모의 세포 배양을 의미한다. 발효는 제조용 박테리아 및 효모 뿐만 아니라 다른 미생물을 증식시키고, 가치 있는 단백질을 생산하는데 사용된다. 이들 유기체의 세포 생산성 및 성장은 특정한 성장 배지를 공급하고 다양한 환경 요인 (예컨대, pH, 온도 및 통기)을 제어함으로써 최대화된다. 박테리아 발효액은 이. 콜라이 배양물로부터 유래될 수 있다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 즉 상기 집단에 포함된 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 또한, 다양한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 다양한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 그의 특이성 뿐만 아니라, 모노클로날 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않으면서 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것임을 가리키며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 제조가 필요하다는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al. (1975) Nature 256:495]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조될 수도 있다. "모노클로날 항체"는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.
- [0038] 용어 "오버레이 공기"는 배양 브로쓰를 함유하는 발효기의 상부로부터 들어오는 공기를 의미한다. 전형적으로, 미세 버블 분산액을 제조하기 위한 격렬한 교반에 종종 동반되는, 액체 배양 배지를 통한 공기의 버블링에 의해 산소가 발효기에 공급된다.
- [0039] 본 발명에 사용된 바와 같은 용어 "원핵 숙주 세포"는 메나퀴논 생합성 경로를 이용하는 것을 포함하여야 한다. 한 실시양태에서, 원핵 숙주 세포는, 예를 들어 아르카에박테리아(Archaeobacteria) 및 유박테리아(Eubacteria), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리키아 (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스 (예를 들어, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)), 엔테로박테리아(*Enterobacteria*), 슈도모나스 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라, 프로테우스, 시겔라, 리조비아, 비트레오실라 또는 파라코쿠스를 포함한다. 한 실시양태에서는, 그람-음성 세포가 사용된다. 또 다른 실시양태에서는, 본 발명을 위한 숙주로서 이. 콜라이 세포 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.:

American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체, 예컨대 유전자형 W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3$ $lacIq$ $lacL8$ $\Delta ompT$ $\Delta (nmpC-fepE)$ $degP41$ kan^R 을 갖는 균주 33D3 (미국 특허 번호 5,639,635)이 사용된다. 물론 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이_X 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)도 적합하다. 이들 예는 제한적이지 않고 예시적이다. 정의된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 박테리아의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Bass et al. (1990) Proteins, 8: 309-314]에 기재되어 있다. 물론, 박테리아 세포에서의 레플리콘의 복제가능성을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 익히 공지된 플라스미드가 레플리콘을 공급하는데 사용된 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 "재조합 단백질"은 일반적으로 항체를 비롯한 펩티드 및 단백질을 지칭한다. 이러한 재조합 단백질은 "이종", 즉 이용된 숙주 세포에 대해 외래인 것, 예컨대 이. 콜라이에 의해 생산된 인간 단백질을 지칭한다. 폴리펩티드는 주변세포질 공간 또는 세포질에서 불용성 응집체로서 또는 가용성 폴리펩티드로서 생산될 수 있다.

[0041] 용어 "규모-독립적"은 본 발명의 발효 공정의 부피 용량이 임의의 규모, 예컨대 예를 들어 약 1 리터 이상, 또는 약 10 리터 이상, 또는 약 100 리터 이상, 또는 약 500 리터 이상, 또는 약 1,000 리터 이상, 또는 약 10,000 리터 이상, 또는 약 100,000 리터 이상을 사용하여 달성될 수 있음을 의미한다.

[0042] II. 발명의 수행 방식

[0043] 본 발명은 원핵생물계에서의 단백질의 재조합 생산의 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 사양을 충족시키지 못하는 제품의 특정 로트를 야기하는 재조합 단백질의 제조 동안 발견된 갈색 부가물 형성을 방지하는 것에 기반한다. 본원에 제공된 실시예에서 예시된 바와 같이, 갈색 부가물의 문제는 수확 작업 동안의 일관되지 않은 산화환원 전위로부터 초래되었다. 본 발명에 이르러 놀랍게도, 수확 작업 동안 0 초과의 용존 산소 환경을 유지함으로써 또는 대안적으로 관심 재조합 단백질을 재조합적으로 생산하는데 사용되는 원핵 숙주 세포 계통에서 *menE* 유전자를 유전자 결실시킴으로써 갈색 부가물 형성을 방지할 수 있음을 발견하였다.

[0044] 원핵 세포에서의 재조합 단백질의 재조합 생산

[0045] 상기 공정의 제1 단계에서, 관심 재조합 단백질을 생산하는데 사용되는 이종 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 박테리아에 적합한 프로모터의 제어 하에 박테리아에서 발현시키기 위한 복제가능한 벡터 내로 적합하게 삽입된다. 상기 목적을 위해 다수의 벡터가 이용가능하고, 적절한 벡터의 선택은 벡터 내로 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정한 숙주 세포에 주로 좌우될 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (DNA의 증폭 또는 DNA의 발현) 및 그와 상용성인 특정한 숙주 세포에 좌우되는 다양한 성분을 함유한다. 박테리아 형질전환을 위한 벡터 성분은 이종 폴리펩티드에 대한 신호 서열을 포함할 수 있고, 신호 서열을 포함할 것이고, 이종 폴리펩티드에 대한 유도성 프로모터도 포함할 것이다. 이것은 일반적으로 본원에 기재된 복제 기점 및 하나 이상의 마커 유전자도 포함한다.

[0046] 이종 폴리펩티드가 분비되는 경우에, 본원에서의 관심 이종 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 신호 서열, 예컨대 성숙 이종 폴리펩티드의 N-말단에서의 것을 함유한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 그것은 벡터 내에 삽입된 이종 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 천연 이종 폴리펩티드 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 박테리아 숙주 세포에 대해서는, 신호 서열을 임의의 통상적으로 공지된 박테리아 신호 서열에 의해 치환한다.

[0047] 발현 벡터는 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 벡터를 복제시킬 수 있는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아에 대해 익히 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하다.

[0048] 발현 벡터는 또한 일반적으로 선택 마커로도 명명되는 선택 유전자를 함유한다. 상기 유전자는 선택 배양 배지에서 성장시키는 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환되지 못한 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 못할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토포렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양소를 공

급하는 단백질을 코딩하는 것이고, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다. 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 이들 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다.

[0049] 이중 폴리펩티드를 생산하기 위한 발현 벡터는 또한 숙주 박테리아 유기체에 의해 인식되고 관심 이중 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 유도성 프로모터를 함유한다. 이것은 또한 용해 효소를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 별개의 유도성 또는 낮은 기저 발현 프로모터를 함유한다. 박테리아 숙주와 함께 사용하기에 적합한 유도성 프로모터는 .베타.-락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 (문헌 [Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)]), araBAD 프로모터를 비롯한 아라비노스 프로모터 시스템 (문헌 [Guzman et al., J. Bacteriol., 174: 7716-7728 (1992); Guzman et al., J. Bacteriol., 177: 4121-4130 (1995); Siegele and Hu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8168-8172 (1997)]), 람노스 프로모터 (문헌 [Haldimann et al., J. Bacteriol., 180: 1277-1286 (1998)]), 트립토판 (trp) 프로모터 시스템인 알칼리성 포스파타제 프로모터 (문헌 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980)] 및 EP 36,776), P.sub.LtetO-1 및 P.sub.lac/are-1 프로모터 (문헌 [Lutz and Bujard, Nucleic Acids Res., 25: 1203-1210 (1997)]), 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터 (문헌 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)])를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 유도성 프로모터 및 낮은 기저 발현 프로모터도 적합하다. 그의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있으며, 이로써 당업자가 그것을 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터를 사용하여 관심 이중 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 용해 효소를 코딩하는 핵산 (문헌 [Siebenlist et al., Cell, 20: 269 (1980)])에 작동가능하게 라이게이션할 수 있다. 강한 고도의 누출성 프로모터, 예컨대 trp 프로모터가 사용되는 경우에, 그것은 일반적으로 이중 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현을 위해서만 사용되고, 용해-효소-코딩 핵산을 위해서는 사용되지 않는다. tac 및 P_L 프로모터는 어느 하나에 대해서 사용되고, 둘 다에 대해서는 사용될 수 없다. 한 실시양태에서, 알칼리성 포스파타제 (phoA) 프로모터는 산물에 대해 사용되고, 아라비노스 (ara) 프로모터는 용해 효소에 대해 사용된다.

[0050] 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 일반적으로 관심 이중 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) (SD) 서열을 함유한다. 프로모터는 제한 효소 소화에 의해 박테리아 공급원 DNA로부터 제거되어, 목적하는 DNA를 함유하는 벡터 내로 삽입될 수 있다. phoA 프로모터는 제한 효소 소화에 의해 박테리아-공급원 DNA로부터 제거되어 목적하는 DNA를 함유하는 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0051] 상기에 나열된 성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 구축에는 당업자에게 통상적으로 공지된 표준 라이게이션 기술이 사용된다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편은 요구되는 플라스미드를 생성하기 위해 목적하는 형태로 절단, 조정 및 재-라이게이션된다.

[0052] 본 발명에 적합한 원핵 숙주 세포는 본원에 정의된 바와 같은 메나퀴논을 제조하기 위한 생합성 경로를 이용하는 임의의 것을 포함한다. 일부 비제한적 예는, 예를 들어 에스케리키아 콜라이 (이. 콜라이), 엔테로박터, 아조도박터, 에르위니아, 바실루스, 슈도모나스, 클레브시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 세라티아, 시겔라, 리조비아, 비트리오실라 및 파라코쿠스를 포함할 수 있다.

[0053] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입시키는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 대해 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0054] 본 발명의 폴리펩티드를 생산하는데 사용되는 원핵 세포는, 당업계에 공지되어 있고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 루리아-베르타니(Luria-Bertani) (LB) 브로쓰 + 필수 영양보충물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구축에 기반하여 선택되는 선택 작용제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위한 배지에 첨가된다. 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물은 또한 단독으로 또는 또 다른 보충물 또는 배지, 예컨대 복합 질소 공급원과의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다.

[0055] 발현된 유전자 산물의 축적을 위해, 숙주 세포는 유전자 산물의 축적에 충분한 조건 하에 배양된다. 이러한 조건은, 예를 들어 세포에 의한 단백질 발현 및 축적을 허용하는 온도, 영양소 및 세포-밀도 조건을 포함한다. 또한, 당업자에게 공지된 바와 같이, 이러한 조건은 세포가 그 조건 하에 전사, 번역, 및 분비된 단백질을 위한

하나의 세포 구획으로부터 또 다른 곳으로의 단백질 통과와 기본 세포 기능을 수행할 수 있는 것이다.

- [0056] 원핵 숙주 세포는 적합한 온도에서 배양된다. 예를 들어, 이. 콜라이 성장을 위한 전형적인 온도는 약 20℃ 내지 약 39℃의 범위이다. 한 실시양태에서, 온도는 약 25℃ 내지 약 37℃이다. 또 다른 실시양태에서, 온도는 약 30℃이다.
- [0057] 배양 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5-9의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이에 대해, pH는 약 6.8 내지 약 7.4, 또는 약 7.0이다.
- [0058] 유도를 위해, 전형적으로 세포는 특정 광학 밀도, 예를 들어 약 80-100의 A₅₅₀이 달성될 때까지 배양되고, 이 시점에 (예를 들어, 유도제의 첨가, 리프레서, 억제인자 또는 배지 성분의 고갈 등에 의해) 유도를 개시하여 이중 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현을 유도한다.
- [0059] 산물 축적 후에, 임의로는 산물 회수 전에, 브로쓰 용해물은 세포에 함유된 이중 폴리펩티드를 방출하는데 충분한 기간 동안 인큐베이션된다. 대안적 실시양태에서, 또는 상기 이후에, 배양물에 존재하는 세포는 숙주 세포로부터 상기 단백질을 방출시키기 위해, 예를 들어 화학적 용해 또는 삼투 쇼크를 포함할 수 있는 당업계에 공지된 임의의 기계적 수단을 사용하여 기계적으로 용해될 수 있다.
- [0060] 용해되었으면, 용해물 또는 균질물은 유지 탱크로 전달될 수 있고, 여기서 용해물/균질물의 더 많은 배치의 첨가를 기다릴 수 있고/거나 추가의 가공, 예컨대 예를 들어 물로의 희석, 완충제 또는 응집제의 첨가, pH 조정, 또는 후속적 회수 단계를 위한 제제 중 용해물/균질물의 온도 변경 또는 유지를 수행할 수 있다.
- [0061] 후속 단계에서, 세포 매트릭스로부터 방출된 가용성 또는 불용성 산물로서의 이중 폴리펩티드는 세포 잔해와 산물의 공-회수를 최소화하는 방식으로 용해물 또는 균질물로부터 회수된다. 회수는 임의의 수단에 의해 수행될 수 있지만, 한 실시양태에서는 이중 폴리펩티드를 함유하는 굴절 입자를 침강시키거나 또는 가용성 산물을 함유하는 상청액을 수집하는 것을 포함할 수 있다. 침강의 예는 원심분리이다. 이 경우에, 회수는 외부 세포벽을 파괴하여 투과성을 증가시키고, 더 많은 고체가 회수되도록 하는 작용제의 존재 하에, 팽창층 흡착 (EBA) 또는 침강 전에 수행된다. 이러한 작용제의 예는 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 또는 쓰비터이온, 예컨대 예를 들어 쌍극 이온성 세제, 예컨대 쓰비터젠트(ZWITTERGENT) 316™ 세제를 포함한다. 한 실시양태에서, 회수는 EDTA의 존재 하에 수행된다.
- [0062] 원심분리가 회수에 사용되는 경우에는, 상대 원심력 (RCF)이 중요한 인자이다. RCF는 용해 시 세포벽으로부터 방출된 굴절 입자와 세포 잔해의 공-침강을 최소화하기 위해 조정된다. 상기 목적을 위해 사용되는 특정한 RCF는, 예를 들어 회수되는 산물의 유형에 따라 달라질 것이지만, 적어도 약 3000 x g, 보다 바람직하게는 약 3500-6000 x g, 또는 약 4000-6000 x g이다.
- [0063] 원심분리의 지속기간은 몇몇 인자에 좌우될 것이다. 침강 속도는, 예를 들어 굴절 입자의 크기, 형상 및 밀도, 및 유체의 밀도 및 점도에 좌우될 것이다. 고체에 대한 침강 시간은, 예를 들어 침강 거리 및 속도에 좌우될 것이다. 연속 디스크-스택(disc-stack) 원심분리가 대규모의 방출된 이중 폴리펩티드 응집체의 회수 또는 세포 잔해의 제거에 대해 양호하게 작동할 것으로 예상하는 것이 타당한데, 이는 상기 원심분리가 그의 상대적으로 큰 원심력 및 상대적으로 짧은 침강 거리로 인해 높은 유속으로 처리할 수 있기 때문이다.
- [0064] 이어서, 초기 회수 단계에서 포획된 이중 폴리펩티드를 오염 단백질로부터 추가로 정제할 수 있다. 한 실시양태에서는, 미국 특허 번호 5,288,931에 개시된 바와 같이, 응집된 이중 폴리펩티드를 단리한 후, 폴리펩티드의 동시 가용화 및 재폴딩을 수행한다. 대안적으로는, 가용성 산물을 하기에 기재된 바와 같은 표준 기술에 의해 회수한다.
- [0065] 일반적인 크로마토그래피 방법 및 그의 용도는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Chromatography, 5th edition, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Chromatography Today, Poole, C. F., and Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); Scopes, Protein Purification Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 또는 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York]을 참조한다. 하기 절차는 주변세포질 또는 세포질로부터 방출된 가용성 이중 폴리펩티드에 적합한 정제 절차의 예

시이고, 이는 당업계에 익히 공지되어 있다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 및 예를 들어 세파덱스(SEPHADEX)TM G-75를 사용한 겔 여과.

[0066] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이들 발효기는 교반기 임펠러를 사용하여 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배한다. 소규모 발효는 일반적으로 부피 용량이 대략 20 리터 이하인 발효기에서의 발효를 지칭한다.

[0067] 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명은, 예를 들어 항체를 비롯한 펩티드 및 단백질을 포함하는 재조합 단백질을 생산하는데 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있는 재조합 펩티드 및 단백질의 예는, 예를 들어 레닌, 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬; 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; α1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 트롬보포이에틴; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체화 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방성 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-역제 물질; 텔락신 A-쇄; 텔락신 B-쇄; 프로텔라신; 마우스 고나도트로핀-연관 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-β; 카디오토로핀 (심장 비대증 인자), 예컨대 카디오토로핀-1 (CT-1); 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타, 예컨대 TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-13; 항-HER-2 항체; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질과 같은 분자를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0069] 본 발명에 의해 생산된 항체는 특정한 항원 결정기 (예를 들어, 암 세포 항원, 바이러스 항원, 미생물 항원, 단백질, 펩티드, 탄수화물, 화합물, 핵산 또는 그의 단편)에 대한 항체의 동종 집단인 모노클로날 항체일 수 있다. 관심 표적에 대한 모노클로날 항체 (MAb)는 세포주의 연속 배양에 의해 항체 분자의 생산을 제공하는 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용함으로써 생산될 수 있다. 이들은 본래 문헌 [Koehler and Milstein (1975) Nature 256:495-497]에 기재된 하이브리도마 기술, 인간 B 세포 하이브리도마 기술 (문헌 [Kozbor et al (1983) Immunology Today 4:72]) 및 EBV-하이브리도마 기술 (문헌 [Cole et al (1985) in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96])을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 이뮤노글로불린 부류 및 그의 임의의 하위부류일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 MAb를 생산하는 하이브리도마는 시험관내 또는 생체내 배양될 수 있다.

[0070] 유용한 모노클로날 항체는 인간 모노클로날 항체, 인간화 모노클로날 항체, 항체 단편 또는 키메라 인간-마우스 (또는 다른 종) 모노클로날 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 인간 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 다수의 기술 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다 (문헌 [Teng et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7308-7312; Kozbor et al (1983) Immunology Today 4:72-79; 및 Olsson et al. (1982) Methods in Enzymology 92:3-16]).

[0071] 항체는 또한 이중특이적 항체일 수 있다. 이중특이적 항체는 한 아암에서는 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄를 갖고 다른 아암에서는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)을 가질 수 있다. 이중특이적 분자 중 단지 절반에만 존재하는 이뮤노글로불린 경쇄가 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 상기 비대칭 구조는 목적하는 이중특이적 화합물이 원치않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물

로부터 분리되는 것을 촉진시킨다 (WO 94/04690; 문헌 [Suresh et al (1986) Methods in Enzymology, 121:210; Rodrigues et al (1993) J. of Immunology 151:6954-6961; Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167; Carter et al (1995) J. of Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al (1998) Nature Biotechnology 16:677-681]). 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (문헌 [Milstein et al (1983) Nature 305:537-539]; WO 93/08829; [Trautner et al (1991) EMBO J. 10:3655-3659]). 이러한 기술을 사용하여, 이중특이적 항체는 본원에 정의된 바와 같은 질환의 치료 또는 예방에서의 항체 약물 접합체 (ADC)로서 접합되기 위해 제조될 수 있다.

[0072] 정의된 바와 같은 항체는 암 세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원, 또는 종양 세포 또는 매트릭스에 결합된 다른 항체에 면역특이적으로 결합하는 항체의 기능적 활성 단편, 유도체 또는 유사체일 수 있다. 이와 관련하여, "기능적 활성"은 단편, 유도체 또는 유사체가, 단편, 유도체 또는 유사체가 유래되는 항체가 인식하는 것과 동일한 항원을 인식하는 항-항-이디오타입 항체를 도출할 수 있음을 의미한다. 구체적으로, 예시적 실시양태에서, 이뮤노글로불린 분자의 이디오타입의 항원성은 항원을 특이적으로 인식하는 CDR 서열에 대해 C-말단인 프레임워크 및 CDR 서열의 결실에 의해 증진될 수 있다. 항원에 결합하는 CDR 서열을 결정하기 위해, CDR 서열을 함유하는 합성 펩티드를 당업계에 공지된 임의의 결합 검정 방법, 예를 들어 BIA 코어 검정에 의한 항원과의 결합 검정에서 사용할 수 있다 (문헌 [Kabat et al, (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat et al (1980) J. of Immunology 125(3):961-969]).

[0073] 다른 유용한 항체는 항체의 단편, 예컨대 비제한적으로 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생산될 수 있는 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유하는 F(ab')₂ 단편, 및 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 가교를 환원 시킴으로써 생성될 수 있는 Fab 단편을 포함한다. 다른 유용한 항체는 항체의 중쇄 및 경쇄 이량체, 또는 그의 임의의 최소 단편, 예컨대 Fv 또는 단일 쇄 항체 (SCA) (예를 들어, 미국 특허 번호 4,946,778; 문헌 [Bird (1988) Science 242:423-42; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883; 및 Ward et al (1989) Nature 334:544-54]에 기재된 바와 같은 것), 또는 항체와 동일한 특이성을 갖는 임의의 다른 분자이다.

[0074] 항체는 항체 또는 그의 기능적 활성 단편의 융합 단백질일 수 있으며, 예를 들어 항체는 N-말단 또는 C-말단에서 공유 결합 (예를 들어, 펩티드 결합)을 통해 항체가 아닌 또 다른 단백질 (또는 그의 일부, 예컨대 단백질의 적어도 10, 20 또는 50개 아미노산 부분)의 아미노산 서열에 융합된다. 항체 또는 그의 단편은 불변 도메인의 N-말단에서 다른 단백질에 공유적으로 연결될 수 있다.

[0075] 본원에서의 모노클로날 항체는 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정한 종으로부터 유래되거나 또는 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동인 반면, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851-6855]). 키메라 항체는 다양한 부분이 다양한 동물 종으로부터 유래되는 분자, 예컨대 무린 모노클로날로부터 유래된 가변 영역 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역을 갖는 것이다 (미국 특허 번호 4,816,567; 4,816,397). 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0076] 인간 및 비-인간 부분 둘 다를 포함하는 키메라 및 인간화 모노클로날 항체는 표준 제조법 DNA 기술 (WO 87/02671; EP 184,187; EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; 미국 특허 번호 4,816,567; EP 12023; 문헌 [Berter et al (1988) Science 240: 1041-1043; Liu et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 3439-3443; Liu et al (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 214-218; Nishimura et al (1987) Cancer. Res. 47: 999-1005; Wood et al (1985) Nature 314: 446-449; 및 Shaw et al (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison (1985) Science 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4: 214; 미국 특허 번호 5,225,539; [Jones et al (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al (1988) Science 239: 1534; 및 Beidler et al (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060])을 사용하여 제조될 수 있으며; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0077] 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있는 치료 모노클로날 항체는 트라스투주맵 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®, 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.)), 문헌 [Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:4285-4289]; 미

국 특허 번호 5,725,856); 항-CD20 항체, 예컨대 키메라 항-CD20 "C2B8" (미국 특허 번호 5,736,137); 리툭시맵 (리툭산(RITUXAN)®), 2H7 항체의 키메라 또는 인간화 변이체인 오크렐리주맵 (미국 특허 번호 5,721,108; WO 04/056312) 또는 토시투모맵 (벡사르(BEXXAR)®); 항-IL-8 (문헌 [St John et al (1993) Chest, 103:932] 및 WO 95/23865); 다른 인터류킨, 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13을 표적으로 하는 항체; 인간화 및/또는 친화도 성숙 항-VEGF 항체를 비롯한 항-VEGF 항체, 예컨대 인간화 항-VEGF 항체 huA4.6.1 베바시주맵 (아바스틴(AVASTIN)®, 제넨테크, 인크., 문헌 [Kim et al (1992) Growth Factors 7: 53-64], WO 96/30046, WO 98/45331); 항-PSCA 항체 (WO 01/40309); S2C6을 비롯한 항-CD40 항체 및 그의 인간화 변이체 (WO 00/75348); 항-CD11a (미국 특허 번호 5,622,700; WO 98/23761; 문헌 [Steppe et al (1991) Transplant Intl. 4:3-7; Hourmant et al (1994) Transplantation 58:377-380]); 항-IgE (문헌 [Presta et al (1993) J. Immunol. 151:2623-2632]; WO 95/19181); 항-CD18 (미국 특허 번호 5,622,700; WO 97/26912); E25, E26 및 E27을 비롯한 항-IgE (미국 특허 번호 5,714,338; 5,091,313; WO 93/04173; 미국 특허 번호 5,714,338); 항-아포-2 수용체 항체 (WO 98/51793); cA2 (레미케이드(REMICADE)®), CDP571 및 MAK-195를 비롯한 항-TNF-알파 항체 (미국 특허 번호 5,672,347; 문헌 [Lorenz et al (1996) J. Immunol. 156(4): 1646-1653; Dhainaut et al (1995) Crit. Care Med. 23(9):1461-1469]); 항-조직 인자 (TF) (EP 0 420 937 B1); 항-인간 알파 4 베타 7 인테그린 (WO 98/06248); 항-EGFR, 키메라화 또는 인간화 225 항체 (WO 96/40210); 항-CD3 항체, 예컨대 OKT3 (미국 특허 번호 4,515,893); 항-CD25 또는 항-tac 항체, 예컨대 CHI-621 시뮬렉트(SIMULECT)® 및 제나팍스(ZENAPAX)® (미국 특허 번호 5,693,762); 항-CD4 항체, 예컨대 cM-7412 항체 (문헌 [Choy et al (1996) Arthritis Rheum 39(1): 52-56]); 항-CD52 항체, 예컨대 캄파트-1H(CAMPATH-1H) (문헌 [Riechmann et al (1988) Nature 332: 323-337]); 항-Fc 수용체 항체, 예컨대 문헌 [Graziano et al (1995) J. Immunol. 155(10): 4996-5002]에서와 같은 Fc 감마 RI에 대해 지시된 M22 항체; 항-암배아성 항원 (CEA) 항체, 예컨대 hMN-14 (문헌 [Sharkey et al (1995) Cancer Res. 55(23 Suppl): 5935s-5945s]); huBrE-3, hu-Mc 3 및 CHL6을 비롯한 유방 상피 세포에 대해 지시된 항체 (문헌 [Ceriani et al (1995) Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s; 및 Richman et al (1995) Cancer Res. 55(23 Suppl): 5916s-5920s]); 결장 암종 세포에 결합하는 항체, 예컨대 C242 (문헌 [Litton et al (1996) Eur J. Immunol. 26(1):1-9]); 항-CD38 항체, 예를 들어 AT 13/5 (문헌 [Ellis et al (1995) J. Immunol. 155(2): 925-937]); 항-CD33 항체, 예컨대 Hu M195 (문헌 [Jurcic et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl): 5908s-5910s]) 및 CMA-676 또는 CDP771; 항-CD22 항체, 예컨대 LL2 또는 림포사이드(LymphoCide) (문헌 [Juweid et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl): 5899s-5907s]); 항-EpCAM 항체, 예컨대 17-1A (파노렉스(PANOREX)®); 항-GpIIb/IIIa 항체, 예컨대 압식시맵 또는 c7E3 Fab (레오포로(REOPRO)®); 항-RSV 항체, 예컨대 MEDI-493 (시나기스(SYNAGIS)®); 항-CMV 항체, 예컨대 프로토비르(PROTOVIR)®; 항-HIV 항체, 예컨대 PRO542; 항-간염 항체, 예컨대 항-Hep B 항체 오스타비르(OSTAVIR)®; 항-CA 125 항체 오바렉스(OvaRex); 항-이디오타입 GD3 에피토프 항체 BEC2; 항-인간 신세포 암종 항체, 예컨대 ch-G250; ING-1; 항-인간 17-1A 항체 (3622W94); 항-인간 결장직장 종양 항체 (A33); GD3 ganglioside에 대해 지시된 항-인간 흑색종 항체 R24; 항-인간 편평-세포 암종 (SF-25); 및 항-인간 백혈구 항원 (HLA) 항체, 예컨대 스마트(Smart) ID10 및 항-HLA DR 항체 온콜림(Oncolym) (Lym-1)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0078] III. 방법 및 검증

[0079] 분석 방법/검정

[0080] 투명성, 유백광 및 착색 (COC) 검증

[0081] 유백광의 정도는 또한 유백색 용액 및 현탁액의 균질성에서의 초현미경 광학 밀도로 인해 흡수되거나 또는 산란된 광의 기계적 측정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 기술은 비탁측정법 및 탁도측정법이다. 착색된 샘플의 탁도 측정을 위해, 비 선택을 이용하는 비 탁도측정법 및 비탁측정법이 사용된다. 현탁된 입자의 광 산란 효과는 투과광 (탁도측정법) 또는 산란광 (비탁측정법)의 관찰에 의해 측정될 수 있다. 비 탁도측정법은 비탁측정법 및 탁도측정법 둘 다의 원칙을 조합한다. 탁도측정법 및 비탁측정법은 약한 유백색 현탁액의 측정에 유용하다. 잘 정의된 조건 하에 제조된 참조 현탁액을 사용해야 한다. 표준 색상 용액은 적절한 색상 지정의 확인을 위한 미국 약전 2012 (USP 모노그래프 631, 유색 및 무색) 또는 유럽 약전 5.0 (EP 방법 2.2.2, 액체의 착색 정도)에 나열되어 있다. 현탁액의 광학 특성과 분산된 상의 농도 사이의 관계는 기껏해야 반-실험적이므로, 정량적 측정을 위해서는 보정 곡선의 구축이 필수적이다. 착색된 액체의 유백광 결정은, 색이 입사광 및 산란광 둘 다를 감소시키고 탁도 값을 저하시키는 음성 간섭을 제공하므로 비 선택을 이용하는 비 혼탁계 또는 비탁계로 수행된다. 효과는 통상의 비탁계를 사용할 수 없는 중간 정도로 착색된 샘플에 대해조차도 매우 우수하다. 투명성 및 유백광의 기계적 평가는 분석가의 시력에 좌우되지 않는 보다 차별적인 시험을 제공한다. 수치

결과는, 특히 안정성 연구에서의 품질 모니터링 및 공정 제어에 보다 유용하다. 예를 들어, 안정성에 대한 이전의 수치 데이터를 투여 제제 또는 활성 제약 성분의 주어진 배치가 만료일 전에 보관-수명 한계를 초과할 것 인지의 여부를 결정하는데 투영할 수 있다.

[0082] HPLC 검정

[0083] HPLC로서 약칭되는 고압 액체 크로마토그래피로도 공지되어 있는 고성능 액체 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피의 특수한 형태이고, 최근 생화학 및 분석 화학에서 빈번하게 사용된다. 분석물은 고압에서 액체 (이동상) 중 고정상의 칼럼으로 강제로 통과되고, 이는 분리된 성분이 고정상에 잔류하는 시간을 감소시킴으로써 그것이 칼럼 내에 확산되어야 하는 시간을 감소시킨다. 이는 LC와 비교하여 생성된 크로마토그램에서의 더 좁은 피크를 유도하고, 그로부터 더 우수한 해상도 및 감도를 유도한다. 이동상은 샘플 용질의 용해도를 보장하도록 선택된다. 고정상에 대해, 바람직하게는 마이크로미터급 실리카 (무표지 또는 화학적으로 변형된 것)가 사용되는데, 이는 그의 고표면적이 용질-고정상 상호작용에서의 차이를 강조하기 때문이다. 용질과 강하게 상호작용하는 고정상의 사용은 용질 이동상 상호작용과 비교하여 분석적으로 유용하지 않은 상황인 매우 긴 체류 시간을 유발할 것이다. 따라서, 고정상은 이동상에서 것과 비교하여 약한 내지 중간 정도의 용질 상호작용을 제공하도록 선택되어야 한다. 결과적으로, 용질의 특성은 선택되는 LC의 유형을 좌우한다. 고정상은 용질 사이에서의 보다 미묘한 차이에 대해 반응성이어야 하는 반면, 샘플 용해도 및 용이한 용리를 보장하기 위해 이동상에서는 보다 강한 상호작용이 발생해야 한다. 예를 들어, 극성 중성 화합물은 통상적으로 극성 이동상을 용질의 분산 특징에서의 미묘한 차이를 구별하는 비극성 고정상과 함께 사용하여 보다 우수하게 분석된다. HPLC의 강력한 측면 중 하나는 이동상을 변화시켜 체류 메커니즘을 변경할 수 있다는 것이다. 개질제가 체류를 제어하기 위해 이동상에 첨가될 수 있다. 예를 들어, pH는 수성 이동상에서의 중요한 변수이다.

[0084] 역상 크로마토그래피 (RP-HPLC)에서는 비-극성 고정상 및 극성 이동상 (극성 용매, 예를 들어 물, 메탄올, 아세토니트릴 및 테트라히드로푸란 중 하나 이상으로 구성됨)의 사용이 요구된다.

[0085] 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) HPLC: 본 크로마토그래피 방법은 단백질 또는 항체/단백질 생체접합체를 그의 소수성에 기반하여 분석하는데 우수하다. 소수성 상호작용 크로마토그래피를 뒷받침하는 이론은 단백질이 수성 고염 이동상을 사용함으로써 수지에 결합된다는 것이다. 염 상태는 단백질이 소수성 리간드의 보다 좁은 표면 적용범위에 결합되도록 하는 액방성 효과에 기여한다. 단백질은 염 농도를 감소시키는 단순한 기술에 의해 용리된다. 대부분의 치료 표적은 저염 또는 무염 완충제에서 용리된다. 따라서, 화합물은 보다 극성이고 덜 변성인 환경에서 용리될 수 있다. 예를 들어, HIC는 항체-약물 또는 단백질-약물 접합체에서 약물 로딩을 분석하는데 광범위하게 사용되어 왔다.

[0086] NMR 검정

[0087] 핵 자기 공명 (NMR) 검출은 H 및 ¹³C를 비롯한 홀수 질량을 갖는 특정 핵이 무작위 방식으로 축에 대해 회전한다는 사실에 기반한다. 그러나, 강한 자석의 극 사이에 위치할 때, 스핀은 자기장에 대해 평행 또는 역평행으로 정렬되는데, 평행한 배양이 에너지가 약간 더 낮으므로 유리하다. 이어서, 흡수된 전자기 방사선이 핵에 조사되고, 평행한 핵은 보다 높은 에너지 상태로 이동하며; 그 결과로, 이것은 이제 방사선에 의해 "공명" 상태가 된다. 분자 내의 모든 핵이 주변의 자기장을 변화시킴으로써 흡수 주파수를 변경시키는 전자 구름에 의해 둘러싸여 있기 때문에, 각각의 H 또는 C는 화합물에서의 그의 위치 및 인접 분자 또는 원소에 따라 다양한 스펙트럼을 생성할 것이다.

[0088] 질량 분광측정법

[0089] 질량 분광측정법은 이온의 질량 대 전하 비 (m/z 또는 m/q)를 측정하는데 사용되는 분석 기술이다. 이것은 샘플 성분의 질량을 나타내는 질량 스펙트럼을 생성함으로써 물리적 샘플의 조성을 분석하는데 가장 일반적으로 사용된다. 상기 기술은, 화합물 및/또는 그의 단편의 질량에 의해 미지의 화합물을 확인하는 것, 화합물에서 하나 이상의 원소의 동위원소 조성을 결정하는 것, 화합물의 단편화를 관찰함으로써 화합물의 구조를 결정하는 것, 신중하게 설계된 방법을 사용하여 샘플에서 화합물의 양을 정량화하는 것 (질량 분광측정법은 본질적으로 정량적인 것은 아님), 기체 상 이온 화학 (진공 하의 이온 및 중성자의 화학)의 기초를 연구하는 것, 다양한 다른 접근법으로 화합물의 다른 물리적, 화학적, 또는 심지어 생물학적 특성을 결정하는 것을 비롯한 몇몇 용도를 갖는다.

[0090] 질량 분광계는 질량 분광측정법에 사용되는 장치이고, 샘플의 질량 스펙트럼을 생성하여 그의 조성을 분석한다. 이것은 일반적으로 샘플을 이온화하고, 다양한 질량의 이온을 분리하고, 이온 플럭스의 강도를 측정하여 그의

상대 존재비를 기록함으로써 달성된다. 전형적인 질량 분광계는 3가지 부분: 이온 공급원, 질량 분석기 및 검출기를 포함한다.

[0091] 상기와 같은 이온 공급원은 어떤 유형의 샘플이 질량 분광측정법에 의해 분석될 수 있는지에 강하게 영향을 미치는 기여 인자이다. 전자 이온화 및 화학적 이온화는 기체 및 증기에 사용된다. 화학적 이온화 공급원에서, 분석물은 공급원에서의 충돌 동안 화학적 이온-분자 반응에 의해 이온화된다. 액체 및 고체 생물학적 샘플에 종종 사용되는 2가지 기술은 전기분무 이온화 (ESI) 및 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 (MALDI)를 포함한다. 다른 기술은 고속 원자 충격 (FAB), 열분무, 대기압 화학적 이온화 (APCI), 2차 이온 질량 분광측정법 (SIMS) 및 열 이온화를 포함한다.

[0092] UV 분광분석법

[0093] 자외선-가시광선 분광분석법 또는 자외선-가시광선 분광광도측정법 (UV-Vis 또는 UV/Vis)은 자외선-가시광선 스펙트럼 영역에서의 흡수 분광분석법 또는 반사 분광분석법을 지칭한다. 이는 그것이 가시 및 인접 (근-UV 및 근-적외선 (NIR)) 범위에서 광을 사용함을 의미한다. 가시 범위에서의 흡수 또는 반사는 포함된 화학물질의 지각되는 색상에 직접적으로 영향을 미친다. 전자기 스펙트럼의 상기 영역에서, 분자는 전자 전이를 겪는다. 형광은 여기 상태에서부터 바닥 상태로의 전이를 다루는 반면, 흡수는 바닥 상태에서부터 여기 상태로의 전이를 측정한다는 점에서, 상기 기술은 형광 분광분석법에 대해 보완적이다. UV 분광계는 프리즘 또는 회절 격자에 의해 그의 성분 파장으로 분리되는 가시 및/또는 UV 광 공급원 (적색)으로부터의 광의 빔을 사용하는 기기이다. 각각의 단색 (단일 파장) 빔은 다시 반-거울 장치에 의해 2개의 동일 강도 빔으로 분할된다. 샘플 빔 (마젠타 색)인 하나의 빔은 투명한 용매 중 연구되는 화합물의 용액을 함유하는 작고 투명한 용기 (큐벳)를 통과한다. 참조물 (청색)인 다른 빔은 용매만을 함유하는 동일한 큐벳을 통과한다. 이어서, 이들 광 빔의 강도는 전자 검출기에 의해 측정되고 비교된다. 광 흡수를 거의 또는 전혀 겪지 않아야 하는 참조 빔의 강도는 10으로서 정의된다. 샘플 빔의 강도는 I로서 정의된다. 단기간에 걸쳐, 분광계는 기재된 방식으로 모든 성분 파장을 자동으로 스캐닝한다. 스캐닝되는 자외선 (UV) 영역은 일반적으로 200 내지 400 nm이고, 가시 부분은 400 내지 800 nm이다.

[0094] IV. 실시예

[0095] 하기는 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기에 제공된 일반적 설명을 고려하여, 다양한 다른 실시양태도 실시할 수 있는 것으로 이해된다.

[0096] 실시예 1: 부가물 검출

[0097] 특정한 제조합 단계를 위한 제조 동안에, 7개의 여과된 저장용 벌크 (FBS)를 제조하고, 여기서 7개의 벌크 중 5개에 대해 제품 외관 기준에 대한 전형적인 결과를 획득하였다. 제조 사양마다, 특정 제품 시험 지침서는 투명성/유백광의 정도, 착색의 정도 및 외관의 결정 방법인 COC 검정에 의한 제품 샘플의 평가에 대해 황색 (Y) 색상 시리즈의 사용을 요구한다. 그러나, 2개의 벌크 (실행 2 및 3)는 갈색을 나타내었고, COC 검정에 대한 ≤ Y7의 예상된 황색 시리즈 색상 기준을 충족시키지 못하였다. 실행 1-3에 대한 COC 결과의 비교를 도 1에 나타내었다. 추가로 불일치를 조사하기 위해, 7개의 FBS 샘플을 농축시켜 색상의 강도를 증가시켰다. 농축시킨 샘플을 적절한 색상 지점의 확인을 위한 미국 약전 2012 (USP 모노그래프 631, 유색 및 무색) 또는 유럽 약전 5.0 (EP 방법 2.2.2, 액체의 착색 정도)에 나열된 모든 표준 색상 용액에 대해 비교하였다. 샘플을 참조 샘플의 제조 후 5분째에 산란 주광에서, 흑색 배경에 대해 수직으로 보면서 비교하였다. 광의 산란은 참조 샘플 I이 물과 용이하게 구별될 수 있고 참조 현탁액 II가 참조 현탁액 I과 용이하게 구별될 수 있을 정도여야 한다. 액체는, 상기에 기재된 조건 하에 검사한 경우에 그의 투명성이 물 R 또는 사용된 용매의 것과 동일하거나 또는 그의 유백광이 참조 샘플 I의 것보다 뚜렷하지 않은 경우에 투명한 것으로 간주되었다.

[0098] 실행 2 및 3에 대한 착색의 원인을 알지 못하였으므로, 다중 조사 연구를 완결하여 비정형 갈색의 공급원 및 원인을 결정하였다. 실행 1-3으로부터의 샘플을 금속, 미량 원소 (금속 이외의 것) 및 발색단에 대해 분석하였다. 이들 연구는 실행 2 및 3에서 관찰된 착색이 금속 또는 다른 미량 원소에 기인한 것이 아니었음을 시사하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0099] 발색단이 FBS에서 관찰된 예상치 못한 색상과 연관되어 있었는지의 여부를 결정하기 위해, 실행 1-3을 1 cm 경로 길이 큐벳을 이용한 자외선 및 가시광선 (UV/vis) 분광분석법을 사용하여 분석하였다. UV 스펙트럼 (200 - 600 nm)은 분석한 샘플에 대한 관찰 프로파일에서 어떠한 유의차도 나타내지 않았다.

[0100] UV 분광광도계의 감도를 증가시키기 위해, 실험을 10 cm 경로 길이 큐벳을 사용하여 반복하였다. 10 cm 큐벳은

샘플의 흡광도가 분광광도계 미터 광 빔에서의 흡수 분자의 수에 비례함에 기인하여 1 cm 큐벳에 비해 증가된 감도를 제공한다. 샘플을 200-700 nm에서 스캐닝하여 실행 1-3의 흡수 스펙트럼을 결정하였다. 실행 2 및 3에 대한 스펙트럼의 형상은 실행 1과 상이하였는데: 새로운 흡광도 피크가 대략 320 nm 및 460 nm에서 관찰되었고, 이는 실행 1에 대해서는 명백하지 않았다 (도 2a). 상기 차이는 실행 3의 스펙트럼에서 실행 1의 스펙트럼을 차감한 경우에 보다 분명하게 관찰될 수 있다 (도 2b). 실행 2 및 3에 대해 460 nm에서 관찰된 피크는 플라빈 (예를 들어, 비타민) 핑거프린트(fingerprint)와 일치하였다.

[0101] 10 cm UV/vis 결과에 기반하여, MS 검출에 대한 옵션을 갖는 RP-HPLC 및 IEC에 대한 전체 스펙트럼 분석을 실행 1-3으로부터의 FBS 상에서 수행하였다.

[0102] RP-HPLC에 대한 전체 스펙트럼 검출을 사용한 경우에, 실행 1-3에 대해 크로마토그래피 차이는 관찰되지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 그러나, 310 nm에서의 IEC에 대해서는, 부수적인 차이가 관찰되었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 주요 피크 뒤의 약한 피크가 실행 2 및 3에 대해 관찰된 반면, 실행 1에 대한 프로파일은 참조 물질과 비슷하였다.

[0103] 무손상 샘플을 2D LC-MS에 대해 적용하고, 280 및 310 nm 둘 다에서 모니터링하였다. 2D LC-MS 분석은 2가지 부분 - 제1 차원은 RP-HPLC에 의해 질량 분광측정법 분석에 대한 분획화된 피크로서의 제2 차원에 의한 분리임 - 으로 이루어진다. 상기 실험으로부터, 실행 1에 대해서는 예상 질량이 관찰된 반면, 실행 2 및 3에 대해서는 예상 질량 및 대략 +157 Da의 추가 질량이 관찰되었다 (도 4).

[0104] 실시예 2: 부가물의 설명:

[0105] 부가물을 보다 잘 설명하기 위해, 실행 3을 분획화를 위해 선택하고 (IEC 검정 (도 3)으로부터 부수적 피크가 수집됨), 추가로 MS 검출을 포함하는 트립신 펩티드 지도에 의한 2D-LC MS 및 질량 확인에 의해 분석하였다.

[0106] 2D LC-MS 분석 (도 5)으로부터, 예상 질량 이외에, 대략 +156 Da 질량 증가가 분획화된 솔더 피크에 대해 다시 관찰되었다. 샘플의 (DTT로의) 온-라인 감소 시, 예상된 질량 감소가 관찰되었다. 감소시킨 분석과 천연 분석 사이에서 관찰된 추가의 4 달톤은 디설피드 결합의 파괴 및 4개의 수소 부가에 기인한 것이다. 추가의 질량이 다시 관찰되었고, 이는 변형이 비-가역적이거나 또는 공유적임을 시사한다.

[0107] 트립신 펩티드 지도로부터, 샘플을 214 nm 및 310 nm 둘 다에서 수집하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 신규 피크는 45-55분 영역에서 증진되었다. 310 nm에서 48.8분에 관찰된 신규 피크의 LC-MS-MS 분석은 +154.006 Da의 변형된 시스테인 잔기를 갖는 T20 펩티드인 것으로 결정되었다. 변형된 (시스테인에서, +154.006 Da) 및 무함유 T6 및 T16 펩티드가 또한 질량 추출에 의해 검출되었다. 감소된 T21 또는 변형된 T21은 검출되지 않았지만, 이것은 낮은 수준의 존재에 기인한 것일 수 있다. 310 nm에서 50 내지 56분에서 용리되는 것으로 관찰된 다른 2개의 피크는 참조물질과 비교하였을 때 어떠한 특유의 중도 함유하지 않았다.

[0108] 1D 및 2D 1H NMR 분석을 수집하여 부가물 구조를 결정하였다. 추가의 데이터는 TOSCY (전체 상관관계 분광분석법), HSQC (이핵성 단일 양자 결집), HMBC (이핵성 다중 결합 상관관계) 및 ROESY (회전-프레임 오버하우저 효과 분광분석법 (nOe))를 사용하여 획득하였다.

[0109] TOSCY는 서로 커플링된 모든 양성자 뿐만 아니라 주어진 스핀 시스템 내의 모든 다른 양성자 사이의 상관관계를 생성한다. HSQC 실험은 직접적으로 결합된 핵 (즉, 2가지 유형의 화학적 핵)의 화학적 이동을 상호관련시키는 반면, HMBC 실험은 2개 이상의 화학 결합에 의해 서로 분리된 2가지 유형의 핵의 화학적 이동을 상호관련시킨다. ROESY는 정확한 분자 입체형태 (즉, 분자의 3차원 구조)를 확인하기 위해 화학 결합을 통하지 않고, 공간을 사용하는 nOe를 이용한다. 수집된 펩티드에서는 방향족 (퀴논) 양성자와 182 ppm에서의 C=O 사이의 장거리 1H-13C 커플링이 관찰되었다. 방향족 영역에서 수집된 펩티드에 대한 1H-13C HSQC 화학적 이동은 나프탈렌-1,4-디온에 결합된 합성 모델 화합물에 대해 관찰된 것과 밀접하게 일치한다. TOSCY 데이터는 산물에 Q, V 및 R 공명을 할당한다. 합성 펩티드 (NH₂-IVQCR-COOH)에 대한 산물의 1H-15N HSQC 데이터 비교는 도 7에 나타난 바와 같은 산물 샘플에서의 Cys NH 상관관계 상실을 나타내었다. 제안된 구조는 Cys의 CH와 Arg의 NH 사이에서 관찰된 강한 nOe에 의해 확인되었다 (도 8). 수집된 NMR 데이터에 기반하여, 제안된 구조를 도 9에 나타내었다.

[0110] 재조합 단백질-갈색 부가물을 형성한 1,4-디히드록시-2-나프토에이트 (DHNA)로서의 유색 종의 확인은 MS, NMR 및 유전자 데이터에 기반하였다. NMR 데이터로 DHNA가 시스테인 잔기를 통해 재조합 단백질에 부착되었음을 확인하였다. DHNA는 이. 콜라이 세포의 메나퀸은 생합성 경로 (도 10)로부터 유래된 산물이다. 메나퀸은 이.

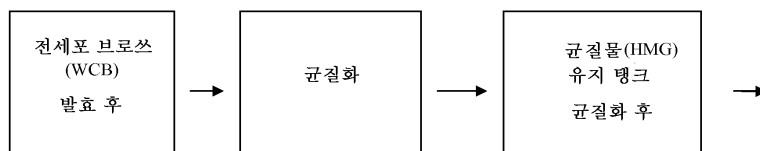
콜라이에 존재하지만, 그의 생산은 배양이 혐기성 및/또는 미세호기성 조건일 때 증가된다. 메나퀴논은 제한된 산소 환경에서 전자 수송에 사용되고, 혐기성 (미세호기성) 조건에서 단백질 DsbB를 형성하는 디설피드 결합을 활성 산화 상태로 되돌리는데 사용된다.

[0111] 실시예 3: DHNA-산물 부가물의 형성을 경감시키기 위한 Hi-dO 공정

[0112] 산물의 유리 티올의 생성 및 DHNA-산물 부가물의 후속적 형성을 방지하기 위한 제어 전략을 개발하였다. 색상 형성의 원인은 수확 작업 동안의 낮은 산화환원 환경의 결과인 것으로 결정되었는데, 이는 실행 2 및 3이 가장 높은 적정 및 세포 밀도를 나타내었으며, 둘 다 그의 희석된 균질물에 대해 보다 긴 유지 시간을 적용하였고, 15°C 미만의 표적 온도를 달성하기 위해 균질물에 대해 보다 긴 지속기간을 견디게 하였고, 차선 균질물 혼합 시간 및 속도를 가졌기 때문이었다 (테이터는 나타내지 않음). 이들 인자는 산물 디설피드 결합의 환원을 촉진하여 DHNA를 단백질 산물의 유리 티올에 부착시키는 기회를 허용하는 저산소 환경을 생성하는데 기여하였다.

[0113] DHNA-단백질 부가물이 환원된 디설피드 결합 (즉, 유리 티올)을 유발하는 수확 작업 동안의 낮은 산화환원 환경 동안에 형성되었으므로, 유리 티올의 생성 및 DHNA-산물 부가물의 형성을 방지하기 위한 접근법을 개발하였다. Hi-dO로 불리는 이 증진된 공정 제어는 수확 작업에서 0 초과 (>0%)의 용존 산소 수준을 유지시켜 환원 환경을 제거한다 (즉, 유리 티올을 생성하지 않음).

[0114] DHNA-산물 부가물의 형성은 발효 및 수확 작업에 걸쳐 다중 사건의 조합을 요구하는 복합 생물학적 반응이다. 발효 공정의 산출 결과는 DHNA의 상당한 수준 및/또는 이용가능성의 생성이다. 하기 개략도는 전형적 수확 작업의 3가지 주요 단계: 발효 후 단계, 균질화 단계, 이어지는 균질화 후 단계를 나타낸다.



[0115] 몇몇 공정 단계를 발효 후/균질화 전에 시험하고 균질화 후에 시험하여, 이러한 작용이 환원 환경 또는 유리 티올 생성을 경감시키는지 결정하였다. 시험된 이러한 공정 증진을 표 1 및 도 12에 나타내었다.

[0117] 표 1. 공정 증진 (Hi-dO)

발효 후/균질화 전	HMG 유지 탱크에서/균질화 후
WCB Hi-dO 공정 제어 개시: 1. $dO_2 > 75\%$를 표적으로 함 2. 교반 속도를 증가시킴 (6.3 와트/L) 3. 오버레이 공기를 적용함 (0.6 vvm) 4. 약 18.85 psi (1.3 bar)까지 배압을 부가함 5. 공정 시간 = 1.5 시간	균질물 전달 전에 균질물을 물로 2 회 희석함 1. 10°C 로 온도 제어함 2. 교반 및/또는 공기 살포를 증가시킴으로써 $dO_2 > 50\%$를 표적으로 함
	즉시 희석시키기 위해 균질물을 물에 전달함
	Hi-dO₂ 균질물 공정 제어 개시: 6. $dO_2 > 50\%$를 표적으로 유지함 7. 교반을 증가시킴 (1 - 6 와트/L) 8. 오버레이 또는 살포되는 공기를 적용함 (필요한 경우) 9. 공정 시간 = 2 시간

[0118] 표 1 및 도 12에 요약된 공정 증진의 결과를 표 2에 나타내었다.

[0119] 표 2

[0121] Hi-d0 증진 공정 제어로 수행된 개발 실행의 제품 품질 분석

발효 실행	IEC 이상 피크 % @ 280 / 310nm	IEC 주요 피크 % @ 280	RP-HPLC 피크 A %	SEC 단량체 %	천연 SEC 단량체 %
소규모 (10L) #1	0.00 / 0.00	99.48	98.82	100.00	99.99
소규모 (10L) #2	0.00 / 0.00	99.69	99.00	100.00	99.97
제조 규모 (1,000L)	0.00 / 0.00	99.58	99.03	100.00	99.99
방출 스펙트럼 FBS CofA	정의되지 않지만, 검출가능하지 않아야 함.	≥ 97% 주요 피크	≥ 97% 피크 A	≥ 98% 단량체	≥ 98% 단량체

[0122]

[0123] 갈색 착색의 기원을 이해하기 위해 근본 원인 분석을 수행하였다. 상기 분석은 유색 종 (DHNA)의 확인, 재조합 단백질 산물에 대한 그의 부착, 부가물 (DHNA-단백질) 구조, 그의 기원 및 DHNA가 언제 어떻게 생산 공정 동안 산물에 부착되었는지에 대해 제안된 메카니즘의 결과를 생성하였다. 표 1에 요약된 바와 같이, 수확 작업 전반에 걸쳐 0 초과 (> 0%)의 용존 산소 수준을 유지시켜 환원 환경을 제거하고 산물 유리 티올의 형성을 방지함으로써, 갈색 부가물의 형성을 방지하는 경감 전략을 시행하였다. 그 결과, 이상 피크 %가 0%를 나타낸 IEC 분석에 의해 나타난 바와 같이, 갈색 부가물 형성이 FBS에서 검출되지 않았다 (표 2).

[0124] 실시예 4: menE 유전자-결실 이. 콜라이 숙주 세포 생성

[0125] 본 발명의 Hi-d0 수확 공정 이외에, 갈색 부가물 형성을 경감시키기 위해 또 다른 접근법을 수행하였다. 이것은 menE 유전자가 게놈으로부터 결실되도록 원핵 숙주 세포를 유전자 조작함으로써, 재조합 산물에 부착될 수 있는 메나퀴논은 생합성 경로로부터의 임의의 DHNA 중간체 생산을 방지하는 것을 포함하였다.

[0126] menE 유전자 결실 숙주 세포를 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Baba et al., Construction of E. coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Molecular Systems Biology, vol. 21, p.1-10 (2006)]에 기재된 방법에 따라 인-프레임 단일-유전자 녹아웃 돌연변이체로서 생성하였다. menE 유전자를 FLP 인식 표적 부위에 의해 플랭킹된 내성 카세트 (예컨대, 카나마이신) 및 인접한 염색체 서열에 대한 50개 염기 쌍 상동성을 함유하는 PCR 생성물로의 돌연변이유발에 대해 표적화하였다.

[0127] 돌연변이유발은, 숙주 세포를 30 µg/mL 카나마이신을 함유하는 루리아-베르타니 브로쓰 (LB) 한천 상 37°C에서 호기적으로 인큐베이션하였을 때, 대략 10-1000개의 카나마이신 내성 콜로니를 생성하였다.

[0128] 실시예 5: menE 유전자-결실 이. 콜라이 숙주 세포를 사용한 재조합 단백질의 생산

[0129] DHNA-연관 단백질 부가물을 나타내지 않았던 재조합 단백질을 생산하는 menE 유전자-결실 이. 콜라이 숙주 세포의 능력을 시험하였다. 간략하게, menE 유전자-결실 이. 콜라이 세포를 2가지 재조합 단백질 PROT 1 및 PROT 2, 및 2가지 재조합 항체 AB 1 및 AB2를 코딩하는 플라스미드 구축물로 당업자에게 익히 공지된 표준 기술 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., Expression of full-length immunoglobulins in E. coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies, J of Immunol Methods 263 p. 133-147 (2002)] 참조)에 따라 형질전환시켰다. 4가지 재조합 단백질/항체의 발효는 본원에 기재된 바와 같이 진행시켰다 (또한 US 6,979,556을 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함됨).

[0130] 4가지 재조합 단백질/항체 모두에 대한 여과된 벌크 재조합 산물을 310 nm에서 IEC 검정에 의해 DHNA-단백질 부가물 형성에 대해 시험하였고, 검출가능한 DHNA-단백질 부가물 형성은 나타나지 않았다 (PROT 1에 대한 예시적인 결과에 대해서는 도 11 참조).

[0131] 놀랍게도, menE 결실 이. 콜라이 세포를 사용한 결과로서의 재조합 산물의 수율은 무손상 야생형 menE 유전자를 갖는 이. 콜라이 숙주 세포를 사용한 수율과 비교하여 인지가능하게 약 20% 내지 50% 증가한 것으로 밝혀졌다. 표 3은 이들 결과를 나타낸다.

[0132] 표 3 - menE 유전자-결실 숙주 세포를 사용한 재조합 단백질 수율

재조합 단백질	야생형 이. 콜라이 숙주를 사용한 수율	menE 유전자-결실 이. 콜라이 숙주를 사용한 수율	변화 %
PROT 1	1.9 g/L	2.5 g/L	30%
PROT 2	5.5 g/L	6.5 g/L	20%
AB1	0.7 g/L	1.0 g/L	40%
AB2	0.46 g/L	0.72 g/L	50%

[0133]

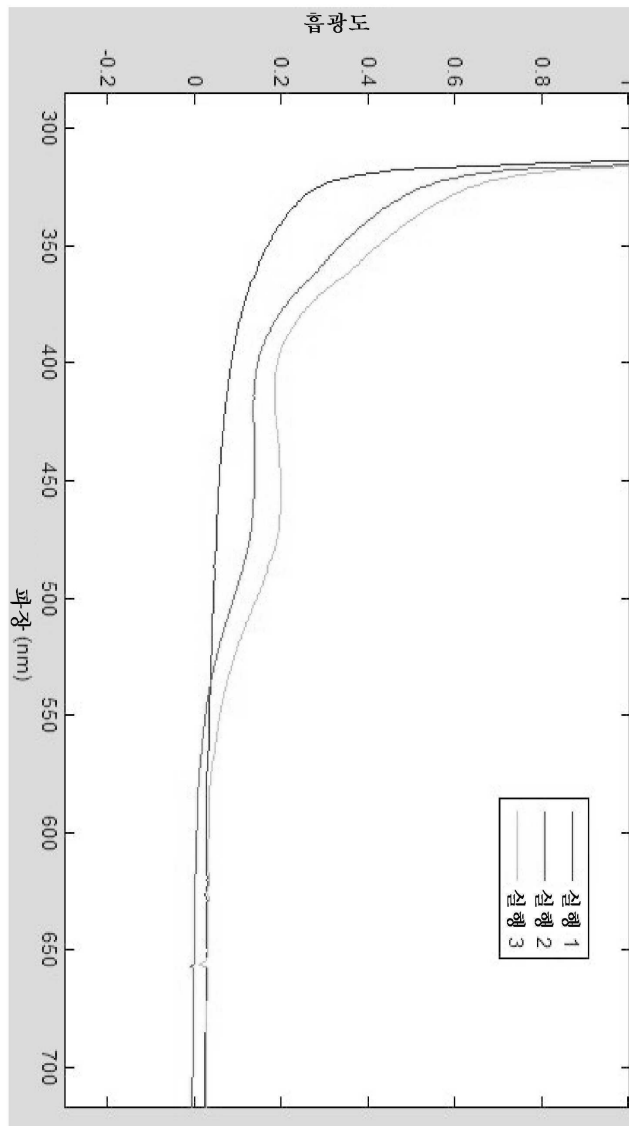
도면

도면1

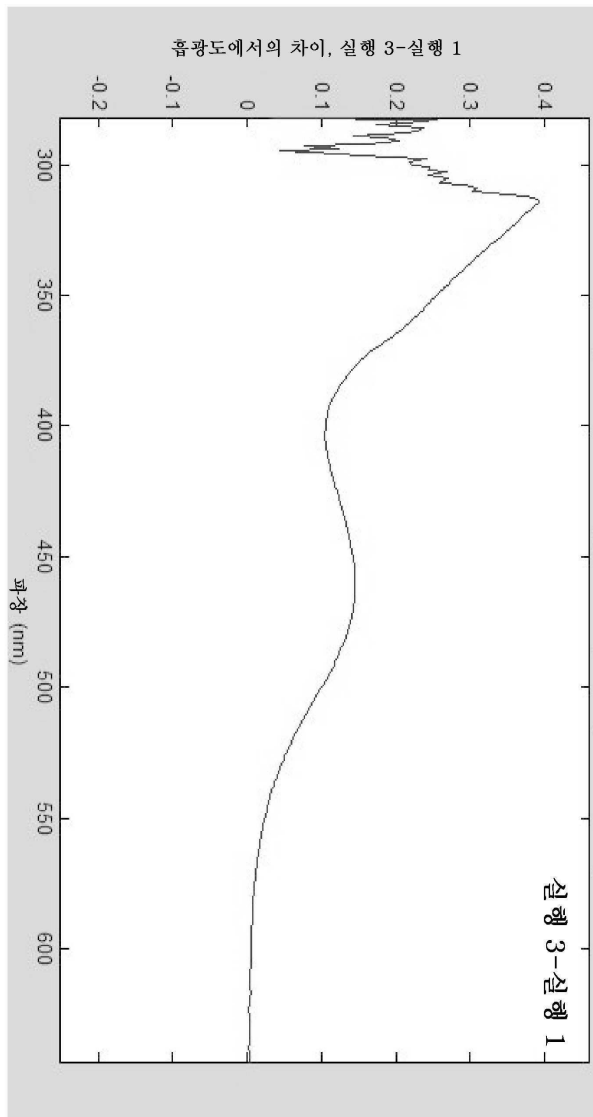


PW = 정제수
 C = 개발 대조군 실험
 1 = 실험 1
 2 = 실험 2
 3 = 실험 3

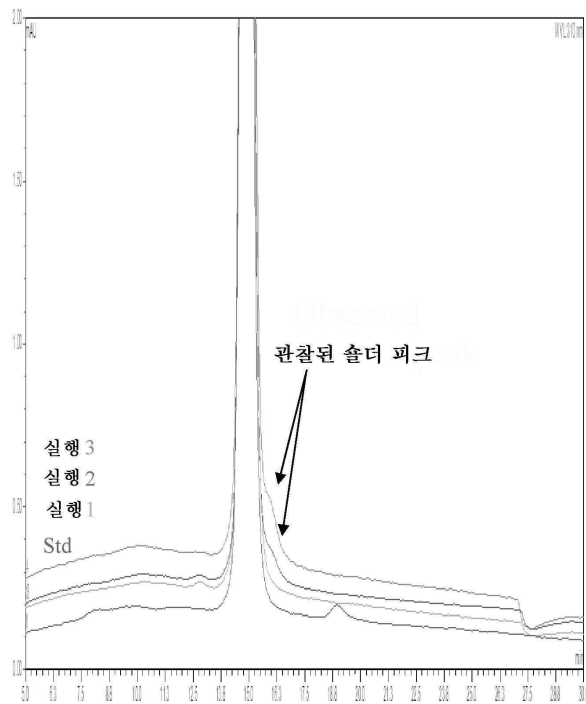
도면2a



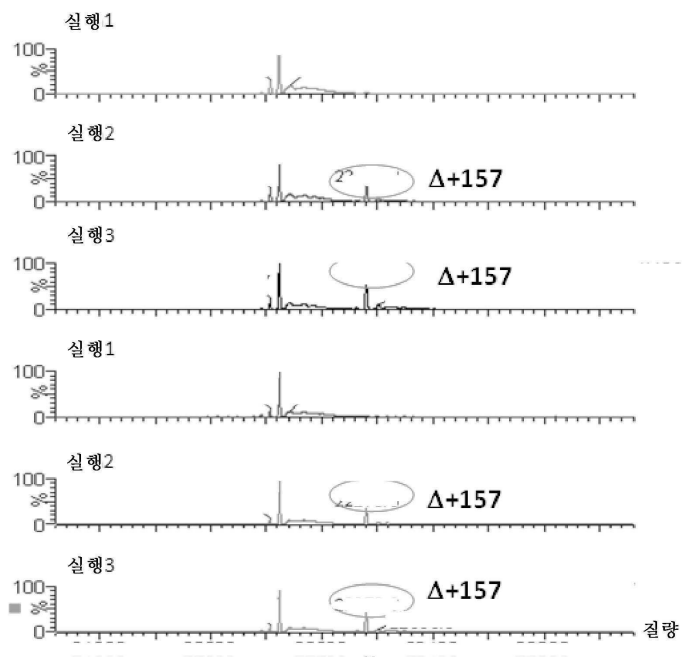
도면2b



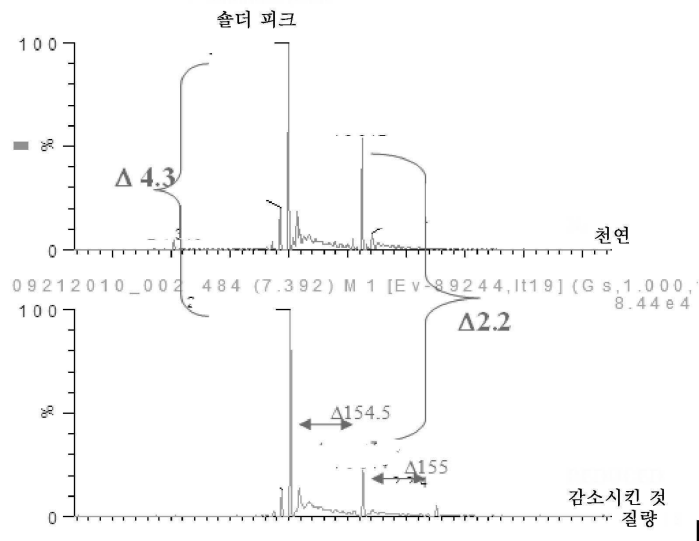
도면3



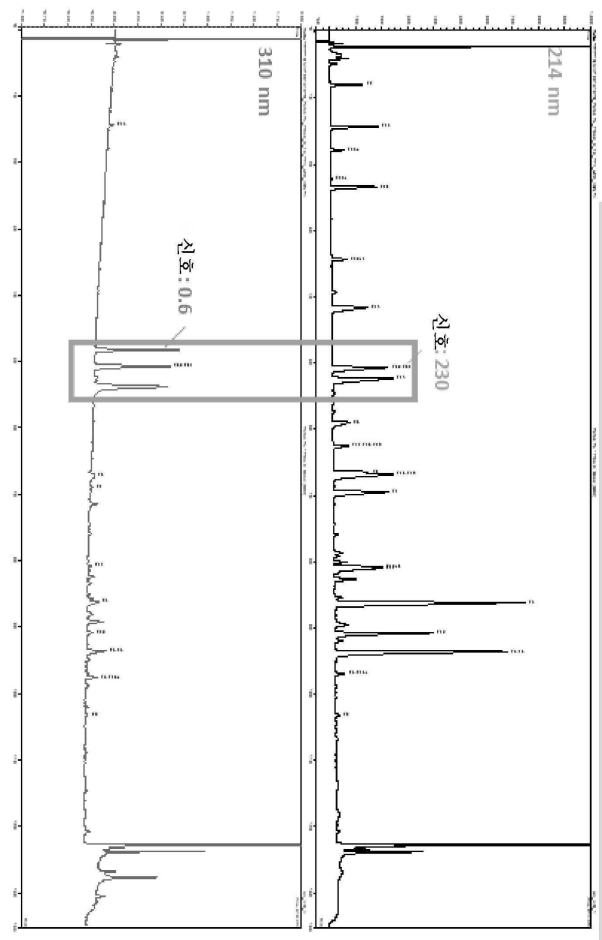
도면4



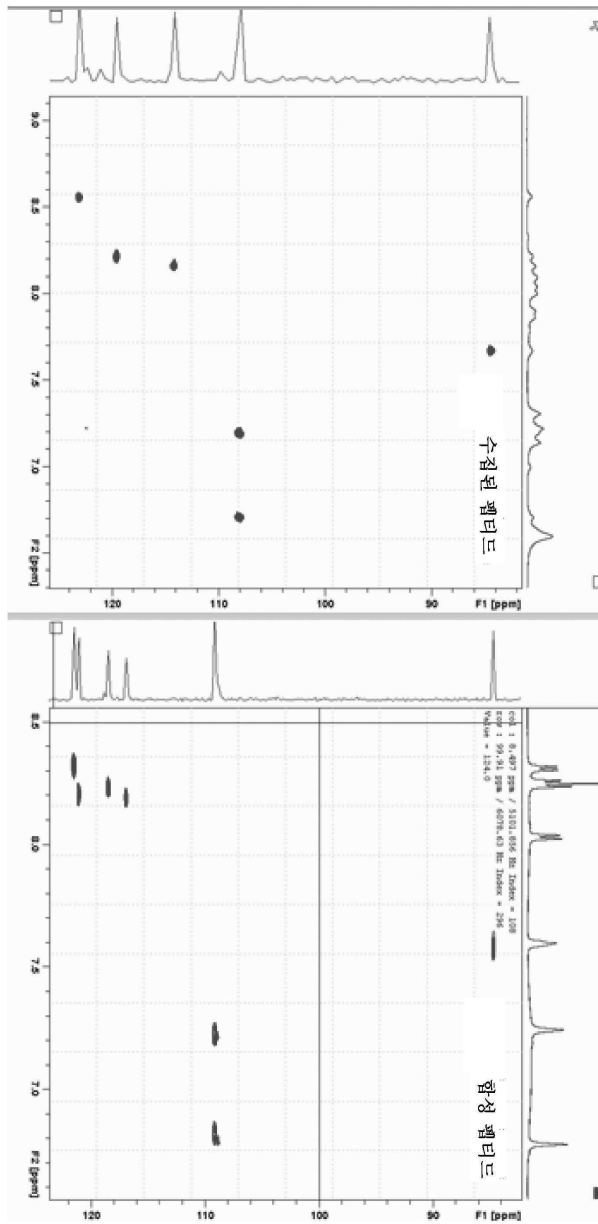
도면5



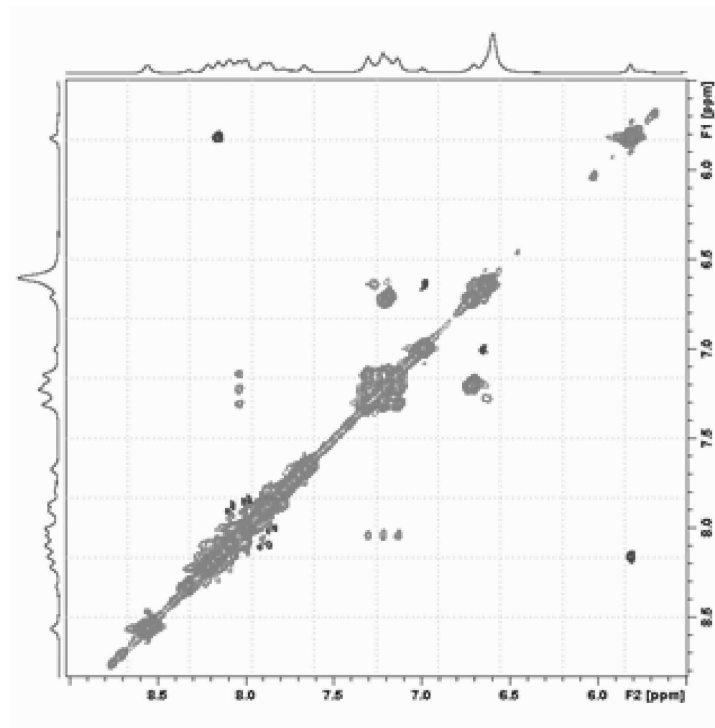
도면6



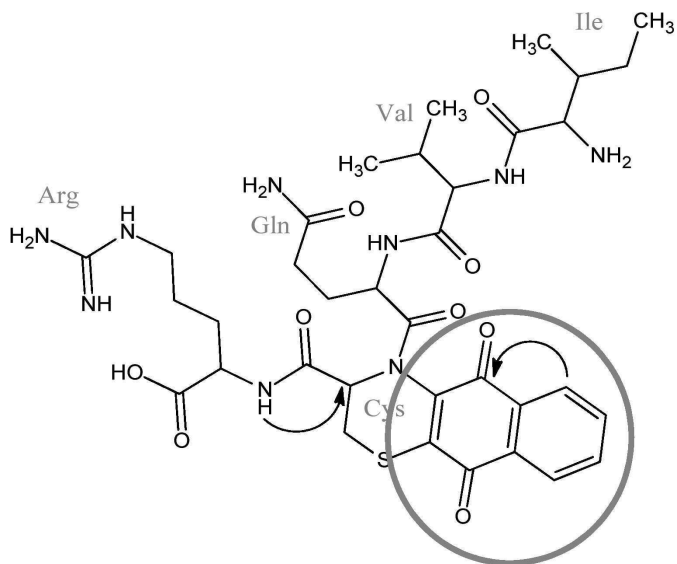
도면7



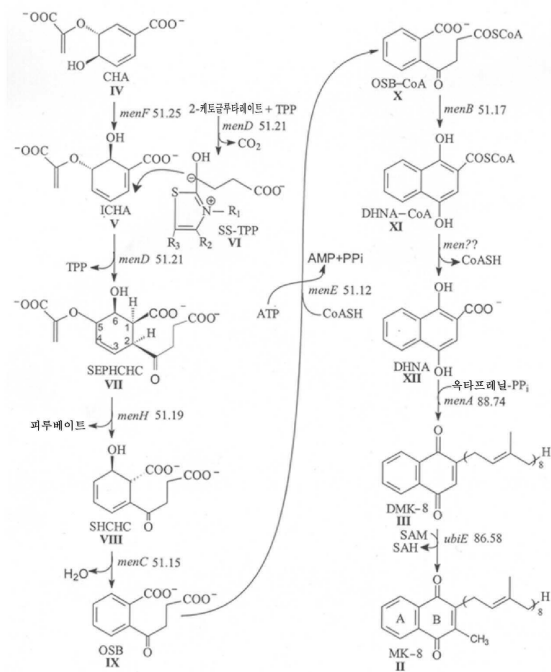
도면8



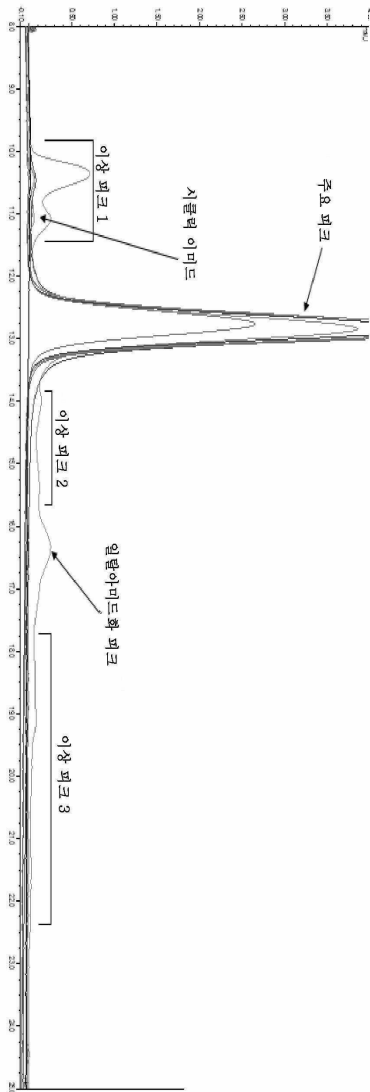
도면9



도면10



도면11



도면12

