



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0105111
(43) 공개일자 2016년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/33 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) G01N 15/06 (2006.01)
G01N 21/59 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/33 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0028375

(22) 출원일자 2015년02월27일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김익환

서울특별시 중구 청구로 64, 109-403

(74) 대리인

한양특허법인

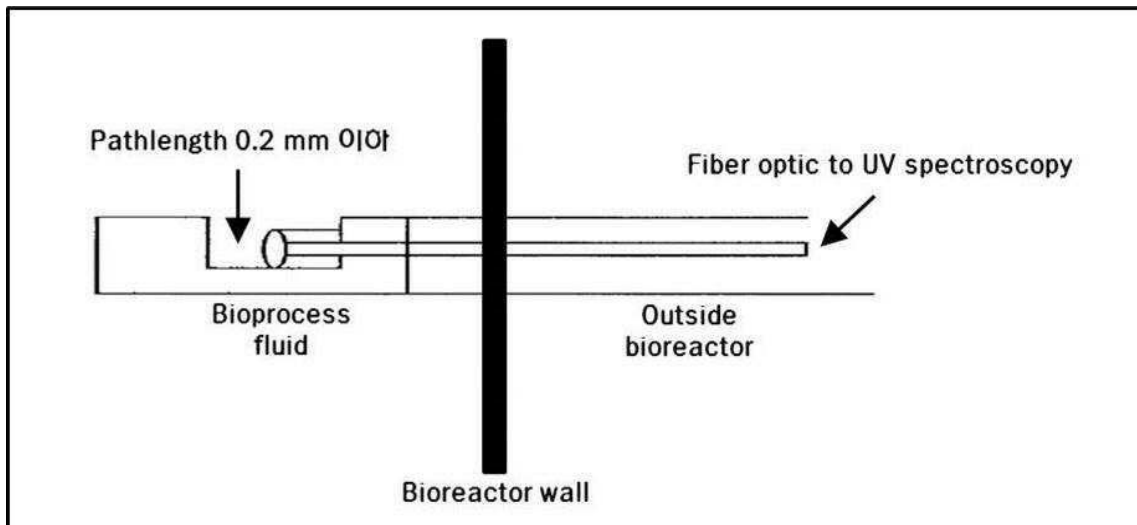
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 자외선 흡광도를 이용한 단백질의 온라인 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 동물세포를 배양하는 과정에서 분리된 재조합 단백질 및 항체 생산량을 온라인으로 정량하기 위한 기술에 관한 것이다. 재조합 세포에 의해서 생산되는 단백질 또는 항체는 본 발명에서 기술된 파장 190~240 nm 영역의 자외선 path 를 0.2 mm 이하로 할 경우 자외선의 흡광도를 이용하여 온라인으로 정량할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 21/00 (2013.01)

G01N 15/06 (2013.01)

G01N 21/5907 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

190~ 200 nm 영역의 자외선 흡광도를 이용한 재조합 단백질의 온라인 측정 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 자외선의 path length 0.2 mm 이하로 설정한 재조합 단백질 온라인 측정 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 온라인 센서를 이용한 단백질 생산공정의 온라인 정량.

청구항 4

제 3항에 있어서, 단백질의 온라인 센서를 이용한 생산 공정 최적화 및 품질관리.

청구항 5

제 2항에 있어서, 단백질의 온라인 측정 방법을 이용한 우수세포주 선별 또는 유용 의약품 개발.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 단백질 및 항체 생산량을 온라인으로 정량하기 위한 기술이다.

배경 기술

[0002] 산업 바이오 공정과정 중 재조합 단백질은 복잡한 환경 속에 있기 때문에 전통적으로 단백질의 측정은 노동 집약적이고 시간이 많이 소요되는 면역분석법(Immunoassay)에 의존하고 있다. 그러나 최근 몇 년간, 분석 기술의 발전은 바이오 공정 시 단백질 정량을 위한 방법을 향상시키는 결과를 가져왔다. 특정 생물공정을 위한 정량 기술에서 가장 일반적으로 사용되는 기술은 전자화학 발광, 광 바이오센서, 혼탁 측정법 그리고 크로마토그래피 등이다. 크고 작은 재조합 치료용 단백질을 측정하기 위한 각 기술의 장점은 종래의 효소 결합 면역 분석법(ELISA)과 비교된다. 효소 결합 면역 분석법은 사용하기 쉽고, 상대적으로 민감하고 유지 보수가 필요하지 않는다. 또한, 처리관련 오류를 줄일 수 있는 빠른 반자동 세척 및 측정시스템을 사용할 수 있다. 그리고 플레이트 당 96 샘플을 동시에 정량할 수 있기 때문에 샘플 당 분석 시간은 매우 경제적이다. 그러나 이것은 현재 단일 샘플 분석을 위해서는 이상적인 분석방법이 아니다. ELISA기법과 관련된 잠재적인 문제는 작은 분자, 낮은 동적 선형 범위일 때 분석 개발시간이 길다는 것이다. 또한, 광범위한 샘플 희석, 특히 유체처리 파생오류와 관련된 위험성은 대부분의 ELISA 기반을 한 분석에서는 바람직하지 않다.

[0003] 다른 한편으로, 광 바이오 센서 분석의 장점은 희석 단백질과 주요 오염 물질의 급속한(<10 분) 정량에 있다. 분석 시 수동 및 완전 자동화 시스템을 이용할 수 있고, 센서 칩을 이용한 다양한 화학물질을 분석할 수 있다. 이러한 센서 칩 자체와 같은 소모품은 비싸지만 재사용이 가능하고 사용기간이 길다. 또한, 기기는 운동 분석, 에피토프 매핑, 결합 부위의 특성화와 다양한 복합체 형성의 기능 분석 등 다른 분석에도 사용될 수 있다. 하지만 광범위하게 사용될 경우 단가가 매우 비싸고, 소프트웨어를 사용하기 전에 특별한 교육이 필요하다는 단점이 있다. 산업적 이용을 위한 대용량 세포 배양 공정을 통한 단백질 생산 시장의 성장과 더불어 온라인 정량을 이용한 정량적 방법의 개발이 세포 배양 기술을 통해 생산성 향상의 중요성이 높아지고 있다. 기존의 오프라인(off-line classical methodologies) 분석 방법은 소요시간이 길고 노동력을 요하여 실시간 단백질 정량(at-line quantification)을 충족시키지 못하고 있다.

[0004] 실험실 수준에서 배양 중에 세포 농도, pH, ATP, lactate, ammonia, glutamine 등의 농도를 연속 측정하면서, 재조합 단백질의 생산성을 높이려는 노력을 꾸준히 해오고 있다. 국내의 광학장치를 이용한 동물세포배양 정량

기술은 아직 기초연구단계이며, 실제 생산라인에의 적용은 아직 이루어지지 않고 있다. 국내 IT업계나 제조업의 기술 수준으로 볼 때 광학장치를 이용한 동물세포배양 정량 장치 및 분석 소프트웨어 개발 가능성은 높은 편이기는 하나 아직까지 구체적으로 진행되지는 않고 있다. 산업용 파일럿 플랜트에서 포유동물세포의 배양공정에 온라인 in-situ 근적외선 분광 분석을 적용한 정량 사례들이 소개되어 왔다. 근적외선 분광법의 특정 변수에 대한 정량 기술은 입증되었지만, 이와 관련된 자외선 분광법에 대해서는 연구된 바 없다. 세포배양공정을 정량하는 데 있어 자외선 분광법은 몇 가지 이점이 있다. 비파괴적이고, 재현성이 높으며, 전처리가 필요하지 않다. 또한 결과도 빠르게 얻을 수 있어 in-situ로 적용할 수 있는 가능성을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 앵타머 칩을 이용한 표적 단백질 또는 표적 세포의 검출 및 정량 방법, W02013111953 A2 (2013)
- (특허문헌 0002) Applying potential difference to sample, shining UV light onto sample, measuring absorption, US6613210 B1 (2003)

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Analytical Biochemistry 378, 158-165 (2008)
- (비특허문헌 0002) Biotechnology Progress 19, 1000-1005 (2003)
- (비특허문헌 0003) TRENDS in Biotechnology 20, 149-156 (2002)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 재조합 동물세포를 배양하는 과정에서 분비된 재조합 단백질 및 항체 생산량을 온라인으로 정량하기 위한 기술을 개발하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 재조합단백질의 특이적인 자외선의 흡광 정도를 분석함으로써 세포배양액 흡광도에 따른 단백질의 온라인 정량 방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명자들은 단백질 양의 변화에 따라 특정 영역의 자외선 흡광도의 차이가 나타나는 것을 확인하였다. 이때 자외선의 path length를 짧게 하면 낮은 오차를 나타내며 실시간으로 정량할 수 있음을 발견하였다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0011] (a) 본 발명은 190~240 nm 영역의 자외선 흡광도를 이용할 경우 단백질을 온라인으로 정량할 수 있는 방법을 제시한다.
- [0012] (b) 위에서 제시된 자외선의 path length를 0.2 mm이하로 짧게 설정함으로써 빠르고 정확하게 단백질의 양을 실시간 온라인으로 정량할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 본 발명에 따른 자외선분광법 적용을 위한 optical fiber sensor를 나타내는 개략도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 자외선분광법을 이용하여 단백질의 양을 실시간 온라인으로 정량하는 과정을 모식적으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 세포배양액 내의 유용단백질의 양 증가에 따른 흡광곡선의 변화특성, 흡광영역의 설정 및 면역글로불린

G (Immunoglobulin G, IgG) 양과 흡광지표와의 상관관계를 나타낸 것이다.

도 4는 세포배양액 내의 최종 유용단백질인 IgG를 빛을 이용하여 정량한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 세포배양액 내의 최종 유용단백질인 IgG를 회석하지 않는 조건에서, 빛을 이용하여 정량한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 자외선분광법을 이용하여 동물세포배양을 통해 생산해내는 최종 유용단백질인 IgG 항체 생산량을 실시간 온라인으로 정량분석한 결과와 흡광지표로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 세포배양하는 과정에서 분비된 재조합 단백질 및 항체 생산량을 실시간 온라인으로 정량하기 위한 기술을 제공하고, 빠르고 정확한 단백질의 양을 측정하기 위한 최적의 path length를 제안한다.
- [0015] 이하, 본 발명을 다음의 실시 예를 통하여 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0016] <실시예>
- [0017] 실시예 1: 최종 산물인 유용단백질의 양을 정량 할 수 있는 기술 개발
- [0018] 세포배양액 내의 유용단백질 양의 변화에 따라 나타나는 흡광곡선의 변화 검출조건 및 검출영역을 분석한 결과, 배양액을 회석하여 유의있는 흡광변화 측정가능 농도를 확인하였고, 194 nm ~ 245 nm의 목표단백질 분석에 적합한 흡광영역을 설정하였다. 또한, 세포배양액 내의 유용단백질의 양에 따른 흡광스펙트럼 분석결과, 최대흡광을 나타내는 빛의 파장이 단백질의 양이 증가함에 따라 점점 길어짐을 확인하였다. 선정된 영역에서의 유용단백질의 양에 따른 흡광지표를 in vitro bioassay 및 일반적인 단백질 정량방법과 비교해 본 결과 유사한 양상을 나타냄을 확인하였다.
- [0019] 도 3은 세포배양액 내의 유용단백질의 양 증가에 따른 흡광 곡선의 변화특성, 흡광 영역의 설정 및 IgG 양과 흡광 지표와의 상관관계를 나타낸 것이다. 세포배양액내의 단백질 양 증가에 따른 흡광도 차이를 확인하고 standard curve를 작성하였다. 200-220 nm의 자외선 파장에서 세포배양액 내의 유용단백질 IgG 항체의 양이 증가함에 따라 최대 흡광을 나타내는 빛의 파장이 점점 길어지며, 최대 흡광도가 증가함을 확인할 수 있다. 이는 기존 연구에서 erythropoietin (EPO)에 대한 standard curve와 유사한 양상을 나타내었다.
- [0020] 실시예 2: 최종 산물인 재조합단백질의 양을 정량 기술의 온라인 적용 가능성 확인
- [0021] 세포배양액 내의 유용단백질 양의 변화에 따라 나타나는 흡광 곡선의 변화 검출조건 및 검출영역을 분석한 결과, 배양액을 회석하여 유의있는 흡광 변화 측정가능 농도를 확인하였고, 200-220 nm의 목표단백질 분석에 적합한 흡광 영역을 설정하였다. 또한, 세포배양액 내의 유용단백질의 양에 따른 흡광 스펙트럼 분석결과, 최대 흡광을 나타내는 빛의 파장이 단백질의 양이 증가함에 따라 점점 길어짐을 확인하였다. 선정된 영역에서의 유용단백질의 양에 따른 흡광 지표를 일반적인 단백질 정량방법과 비교해 본 결과 유사한 양상을 나타냄을 확인하였다. 그리하여 sample preparation 없이 동일한 결과를 얻음으로써 실시간 및 온라인 정량에 적용가능한 기술임을 확인하였다.
- [0022] 도 4는 세포배양액 내의 최종 단백질인 IgG를 빛을 이용하여 정량한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 세포배양액 내의 최종 유용단백질인 IgG의 양을 흡광 지표로 분석한 결과, 세포 배양시간에 비례하여 증가함을 확인할 수 있다.
- [0023] 도 5에서 알 수 있듯이, 세포 배양을 통해 생산해내는 최종 유용단백질을 빛을 이용해 정량하는 기술을 통해 sample preparation 과정 없이 이전과 같은 결과를 얻음으로써 실시간으로 정보를 얻는 것이 실현 가능하다는 것을 확인할 수 있다.
- [0024] 실시예 3: 자외선 분광법을 이용한 재조합단백질의 온라인 probe 개발
- [0025] 재조합단백질 생산성 정량 방법을 바이오리액터 내에서 구현할 수 있도록 자외선 분광법을 이용하는 optical

fiber sensor를 개발하여 유용단백질을 함유한 표준세포배양액 내 유용단백질의 양에 따른 흡광도를 구해 실제 배양중인 세포배양액의 흡광도로부터 유용단백질의 양을 추정할 수 있는 흡광 지표를 구하고, 이를 통해 구한 유용단백질의 양을 bioassay 및 일반적인 단백질 정량 분석법을 통해 정량한 결과와 비교하였다.

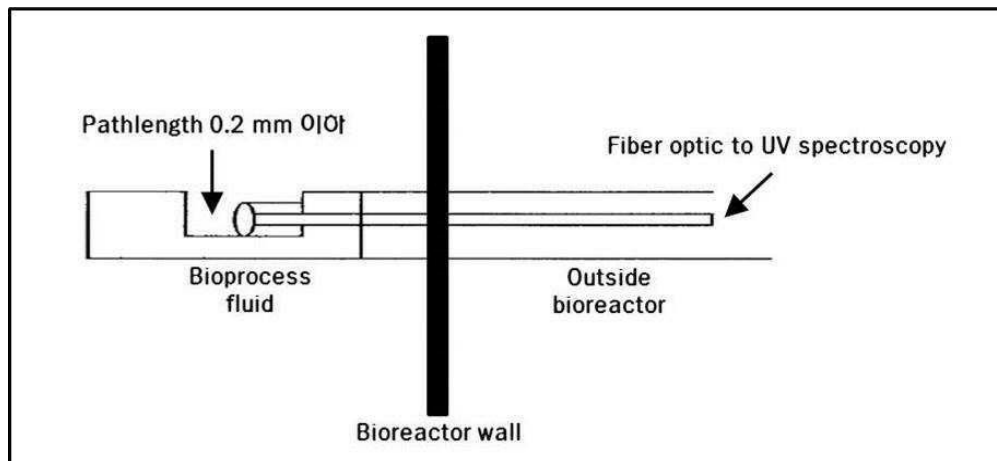
산업상 이용가능성

[0026]

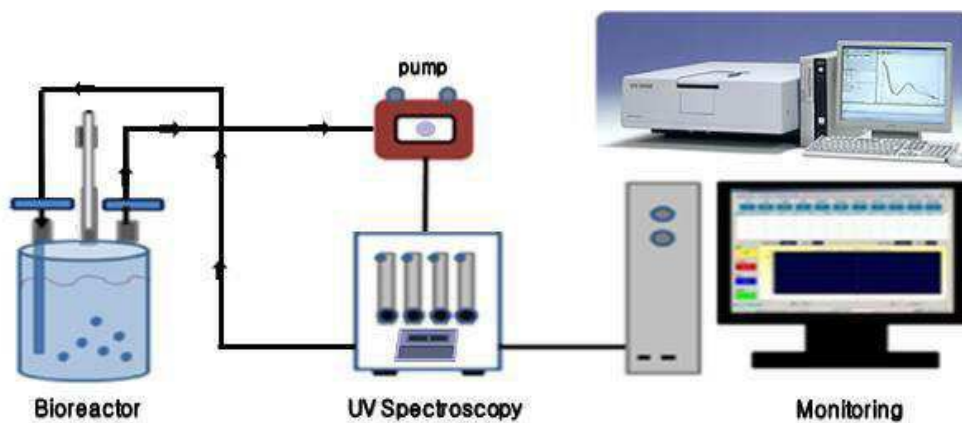
본 발명의 재조합 단백질에 대한 온라인 정량 기술은 세포배양 기반 기술 확보에 활용될 수 있을 것이다. 예를 들면, pH, 세포농도 및 단백질 on-line 측정 기술을 적용한 세포배양기 기반 기술 개발과 온라인 정량 디바이스를 응용한 단백질 생산기술에 적용되어 재조합 단백질 생산성 향상에 활용될 수 있을 것이다.

도면

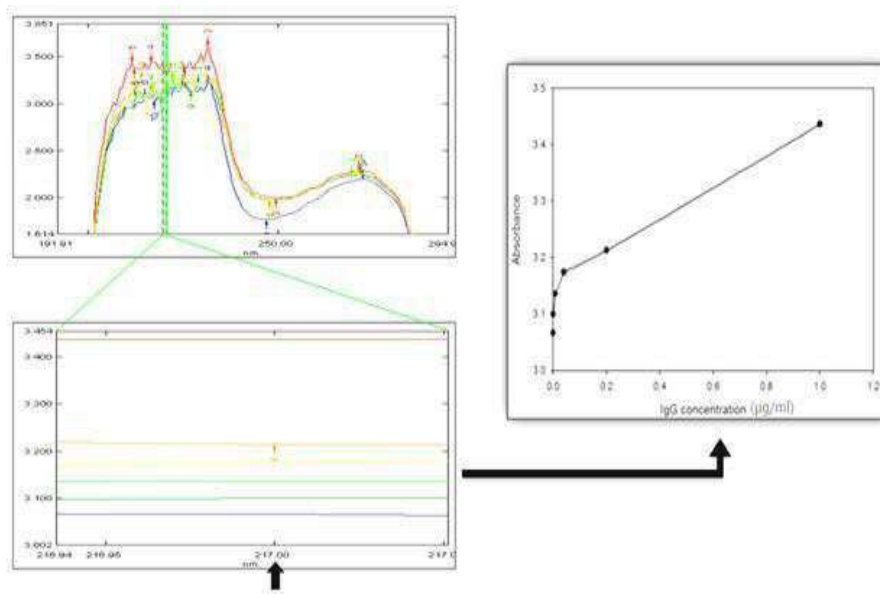
도면1



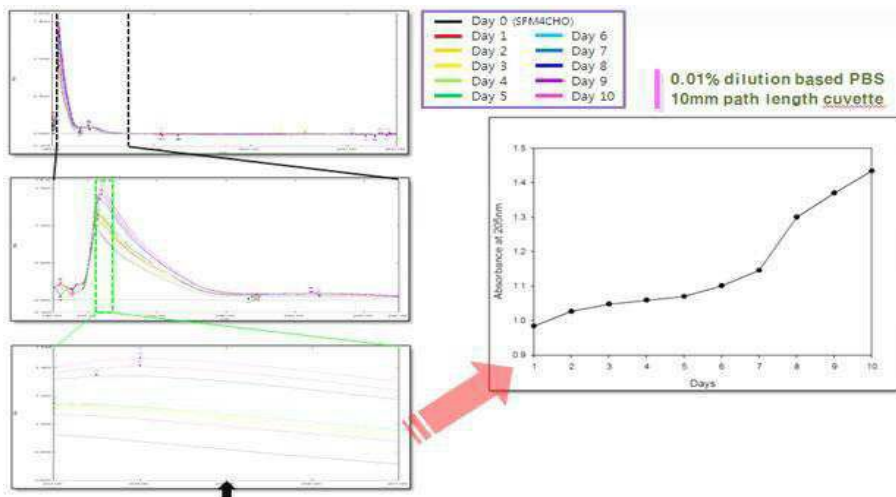
도면2



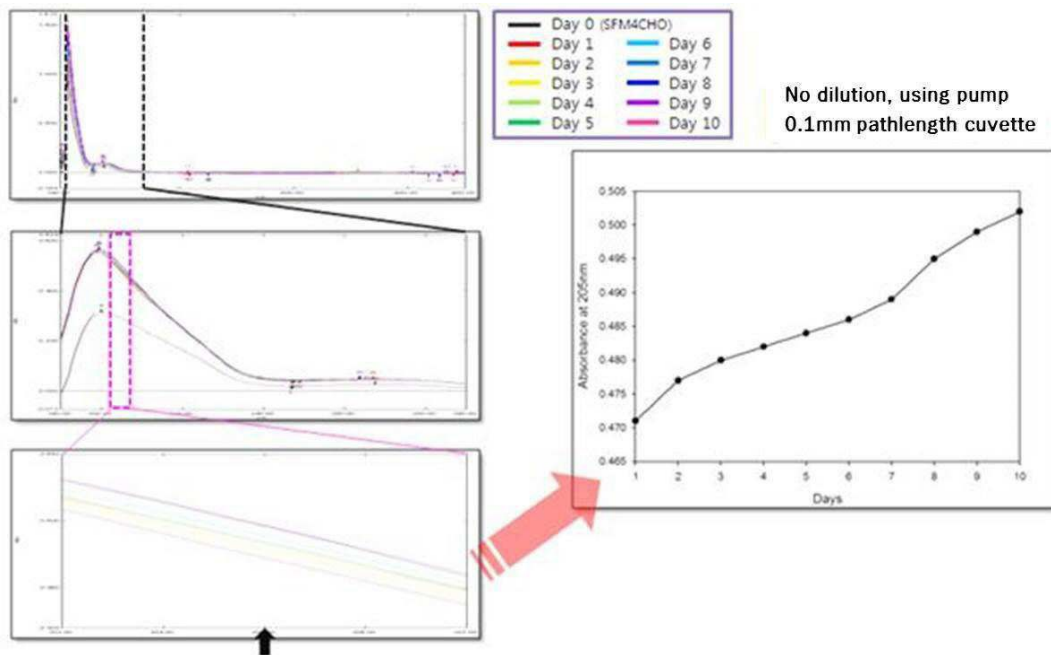
도면3



도면4



도면5



도면6

