(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12P 21/04
C12P 21/02

(11) 공개번호 10-2005-0095605
(43) 공개일자 2005년09월29일

(21) 출원번호 10-2005-7012831
(22) 출원일자 2005년07월08일
번역문 제출일자 2005년07월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/000499
국제출원일자 2004년01월08일
(87) 국제공개번호 WO 2004/092393
국제공개일자 2004년10월28일

(30) 우선권주장 60/439,418 2003년01월09일 미국(US)

(71) 출원인 제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 레스터, 필립, 엠.
미국 94580 캘리포니아주 산 로렌조 비아 콜루사 15766
퍼슨, 조세핀
스웨덴 에스-169 52 솔나 외터배겐 16아

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 폴리펩티드의 정제

요약

원하는 이종 폴리펩티드가 생산되고 가용화되어 있는 미생물 발효 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 이종 폴리펩티드를 정제하는 방법이 기재되어 있다. 본 방법은 대다수의 폴리펩티드가 가용성인 채로 유지되는 조건하에서 유효량의 6,9-디아미노-2-에톡시아크리딘 락테이트(에타크리딘 락테이트) 용액을 브로쓰 또는 균질화액에 첨가하여 숙주 세포 불순물을 침전시키는 단계, 및 상기 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 폴리펩티드를 분리하는 단계를 포함한다. 에타크리딘 락테이트 및 폴리펩티드를 함유하는 브로쓰 또는 균질화액도 개시되어 있다.

대표도

도 12

색인어

이종 폴리펩티드, 발효 브로쓰, 균질화액, 정제, 가용성, 6,9-디아미노-2-에톡시아크리딘 락테이트, 에타크리딘 락테이트

명세서

기술분야

본 발명은 미생물 발효 브로쓰(broth) 또는 균질화액(homogenate)으로부터 관심 폴리펩티드를 정제하는 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 상기 브로쓰 또는 균질화액에 침전제를 도입하여, 예를 들어 단백질, DNA 및 세포 잔해(debris)를 제거한다.

배경기술

재조합 기술의 개발로 인해, 적당하게 형질전환된 숙주 세포 내에서 단백질을 높은 수준으로 생산할 수 있게 되었다. 그 결과, 재조합적으로 생산된 단백질을 회수하는 신속하고 강력하며 효율적인 정제 방법에 대한 요구가 증가되었다. 일반적으로, 단백질은 관심 단백질의 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드를 삽입하여 상기 단백질을 생산하도록 유전자 조작된 세포, 예를 들어 포유동물, 곤충, 진균 및 세균 세포주를 배양하여 생산된다. 사용되는 세포주는 살아있는 유기체이기 때문에, 이들 세포주에게는 통상적으로 동물 혈청 제제로부터 공급되는 당, 아미노산 및 성장 인자를 함유하는 복합 성장 배지가 공급되어야 한다. 세포에게 공급한 화합물의 혼합물 및 세포 자체의 부산물로부터 원하는 단백질을 인간 치료제로 사용할 만큼 충분한 순도로 분리하는 것은 상당히 어려운 일이다.

세포 잔해로부터의 단백질 정제 절차는, 처음에는 단백질의 발현 부위에 따라 달라진다. 일부 단백질은 세포로부터 주변 성장 배지로 직접 분비될 수 있고, 다른 것들은 세포 내에서 생성된다. 포유동물 세포에서 생산된 폴리펩티드에 대한 정제 계획은 다른 유형의 숙주 세포에서 생산된 폴리펩티드의 경우보다 상당히 더 수월하다. 포유동물 세포는 폴리펩티드를 외부로 배출(export)하기 때문에, 이들 폴리펩티드가 비교적 순수한 형태로 존재하는 성장 배지로부터 이들을 수집할 수 있다. 그러나, 폴리펩티드가 비-포유동물 세포, 예를 들어 진균 또는 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 미생물에서 생산되는 경우에는 폴리펩티드를 세포 내부 또는 주변세포질 공간(periplasmic space)에서 회수한다(Kipriyanov 및 Little, Molecular Biotechnology, 12: 173-201(1999); Skerra 및 Pluckthun, Science, 240: 1038-1040(1988)). 따라서, 세포 용균과 같은 추출을 통해 단백질을 세포로부터 세포외 배지로 방출시킬 필요가 있다. 그러한 파쇄는 세포의 전체 내용물을 균질화액으로 방출시킬 뿐만이 아니라 크기가 작아서 제거하기 어려운 세포하(subcellular) 단편까지 생성된다. 이들은 일반적으로 차등적 원심분리 또는 여과로 제거된다.

세포 용균은 전형적으로 균질화 또는 헤드 밀링(head milling)과 같은 기계적 파쇄 기술로 수행한다. 일반적으로는 관심 단백질이 효과적으로 방출되지만, 그러한 기술에는 몇가지 단점이 있다 (Engler, Protein Purification Process Engineering, Harrison eds., 37-55(1994)). 가공 중 종종 발생하는 온도 상승이 단백질의 불활성화를 초래할 수 있다. 더욱이, 생성된 현탁액은 넓은 스펙트럼의 오염 단백질, 핵산 및 다당류를 함유한다. 핵산과 다당류는 용액 점도를 증가시켜, 잠재적으로 원심분리, 횡류(cross-flow) 여과 또는 크로마토그래피에 의한 추후 가공을 복잡하게 한다. 이들 오염물과 관심 단백질과의 복잡한 결합은 정제 과정을 복잡하게 하고 허용할 수 없도록 낮은 수율을 초래할 수 있다.

이처럼, 세포내 단백질을 방출시키는 보다 선택적인 수단은 추가의 이후 가공을 용이하게 한다. 세포를 투과화시키고(시키거나) 세포내 단백질을 추출하는 몇가지 기술이 보고되어 있다. 이들 방법은 세포 투과성을 증진시키고(시키거나) 추출을 촉진시키기 위한 용매, 세정제, 카오트로프제(chaotropic agent), 항생제, 효소 및 킬레이팅제의 사용을 포함한다. 또한, 배양물 성장 동안에 발효 배지에 글리신과 같은 특정 화합물을 첨가하면 특정 세포내 효소의 방출이 촉진된다고 보고되어 있다. 마지막으로, 또한 동결-해동 처리 또는 삼투 쇼크와 같은 기술이 세포내 단백질의 서브셋을 방출시키는 것으로 밝혀졌다.

그러나, 이들 기술은 모든 세포내 미생물 단백질에 반드시 적용가능한 것은 아니며, 모두가 대규모 가공에의 적용에 제한적이고(이거나) 다른 단점이 있다. 예를 들어 톨루엔 및 클로로포름과 같은 용매는 세포내 단백질의 방출을 촉진시키지만, 이들 물질은 독성 및(또는) 발암성인 것으로 알려져 있다(Windholtz 등, The Merck Index 10판: 300 및 1364(1983)). SDS와 같은 이온성 세정제는 단리된 단백질을 종종 비가역적으로 변성시킨다. 비이온성 세정제는 통상적으로는 변성 작용이 없지만, 회수된 단백질은 종종 세정제 미셀과 회합되어 세정제가 없는 단백질을 수득하기 위한 부가적인 가공이 요구될 수 있다. 요소 및 염산구아니딘과 같은 카오트로프제는 완벽한 방출에 요구되는 농도에서 변성 작용을 가질 수 있고, 이들 작용제의 효과는 배양물의 성장 단계에 따라 달라질 수 있다. 비교적 온화하게 단백질을 방출시키는 수단을 제공하는 리소짐을 사용하는 것은, 리소짐이 비교적 고가이고 이후에 상기 효소 시약으로부터 관심 단백질을 정제하여야 하는 필요가 있어서 제한적이다. 부가적으로, 리소짐 또는 톨루엔 추출과 같은 다른 투과화/방출 기술의 효과 증진에 흔히 사용되는 킬레이팅제는 숙주 단백질이 비특이적 방출되는 단점이 있다.

다른 단백질 방출 방법에도 단점이 있다. 예를 들어 세포를 고 삼투압 배지에 현탁하여 회수한 후에 저 삼투압 완충액에 넣는 삼투 쇼크에는 다른 추출 대체법에 비해 추가의 가공 단계가 요구되거나 (Moir 등, Separation Processes in Biotechnology, Asenjo eds: 67-94(1990)) 저온에서 대용량의 액체 취급이 요구된다. 이로 인해 상기 방법은 대규모 가공에 매력적이지 않다.

동결-해동 처리 또한 세포내 단백질을 방출시키지만, 수율이 비교적 낮아서 종종 여러회의 사이클 또는 추가 가공이 요구된다. 또한, 세포 페이스트를 동결한다는 것은, 다른 추출 대체법과 비교할 때 추가되는 무시할 수 없는 가공 요건이다.

마지막으로, 발효 동안에 글리신과 같은 시약을 첨가하여 세포외 배지로의 단백질 방출을 촉진시켜 왔다 (Aristidou 등, Biotechnology Letters, 15: 331-336(1993)). 몇몇 세포내 단백질의 부분적 방출이 보고되어 있지만, 이러한 접근법에는 발효와 방출 전략의 직접적 커플링 및 잠재적으로는 복합 세포외 브로쓰로부터의 관심 단백질의 추후 분리가 요구된다.

관심 폴리펩티드가 일단 숙주 세포로부터 방출되면, 다른 세포 성분으로부터 상기 폴리펩티드를 정제할 것이 요구된다. 불행히도, 세포 용균과 같은 대부분의 추출 접근법은 단백질을 숙주 세포 프로테아제에 의한 잠재적인 분해에 노출시킬 뿐 아니라, 생성되는 현탁액의 다른 요소로부터 단백질을 단리하기가 더욱 어렵다. 예를 들어 DNA, RNA, 인지질 및 리포폴리사카라이드(LPS)와 같은 음으로 하전된 분자가 존재하여, 음이온-교환 크로마토그래피의 사용(Sassenfeld, TIBTECH, 8: 88-93(1990); Spears, Biotechnology, 3권 - Bioprocessing, Rehm eds: 40-51(1993)) 및(또는) 황산프로타민(Kelley 등, Bioseparation, 1: 333-349(1991); Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2판, Cantor eds., 21-71면(1987)), 황산스트렙토마이신(Wang 등, eds, Fermentation and Enzyme Technology: 253-256(1979)), 폴리에틸렌이민(PEI)(상기 Kelley 등; 상기 Sassenfeld; Cumming 등, Bioseparation, 6: 17-23(1996); Jendrisak, The use of polyethyleneimine in protein purification. Protein purification: micro to macro, ed. Alan R., Liss, Inc, 75-97(1987); Salt 등, Enzyme and Microbial Technology, 17: 107-113(1995))과 같은 폴리양이온을 사용한 침전 및(또는) 폴리에틸렌글리콜(PEG)/인산염 또는 PEG/덱스트란(상기 Kelly 등, Strandberg 등, Process Biochemistry, 26: 225-234(1991))과 같은 비혼화성 폴리머 시스템을 사용한 수성 2상 추출이 종종 요구된다.

다르게는, 황산암모늄 또는 염화칼륨과 같은 중성 염(Wheelwright, Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing: 87-98(1991); Englard 등, Methods in Enzymology 182권, Deutschler eds.: 285-300(1990)) 및(또는) PEG 또는 황산덱스트란과 같은 폴리머(상기 Wang 등; 상기 Wheelwright)를 첨가하여 관심 단백질을 비-단백질성 폴리음이온성 오염물로부터 침전시킬 수 있다. 관심 단백질이 양으로 하전된 경우에는 상기 단백질이 그와 함께 존재하는 임의의 음으로 하전된 분자와 결합하여, 단백질 정제를 사실상 불가능하게 만드는 경향이 있다.

전형적으로, 연구자들은 관심 단백질로부터 해로운 폴리음이온을 분리하기 위하여 상기한 바와 같은 초기 분획화 단계를 이용하였다. 불행히도, 이들 초기 분리 방법 각각은 특히 약제학적 시약의 제조에 사용될 때 심각한 단점이 있었다. 예를 들어 세균 용균물에서 발견되는 대량의 비-단백질성 폴리음이온 오염물은 음이온-교환 크로마토그래피 수지의 결합 능력을 감소시키는 경향이 있다. 또한, 재생 프로토콜은 수지에 폴리음이온이 강하게 결합하기 때문에 종종 비효과적이다(상기 Spears). 마지막으로, 단백질 결합을 유리하게 하는 낮은 이온 강도 조건은 폴리음이온-단백질 상호작용을 파괴하는데 비효과적이고 결국에는 분리하지 못한다 (Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 3판, Cantor eds., 171면(1994)). 황산프로타민 제제는 프로테아제와 바이러스 오염물에 대한 염려로 인해 실용적이지 못하다. 더욱이, 상기 시약의 사용으로 인해 원치않는 단백질 침전이 발생할 수 있다(Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2판, Cantor eds., 21-71(1987)).

약제학적 단백질의 가공에 있어서, 항생제 사용에 대한 일반적인 우려로 인해 황산스트렙토마이신은 일반적으로 가공 시약으로 사용되지 않는다(Scawen 등, Handbook of Enzyme Biotechnology 2판, Wiseman eds.: 15-53(1985)). PEI 제제는 종종 여러가지 양의 에틸렌이민 모노머로 오염되는데, 이것은 발암제로 의심된다(상기 Scawen 등). PEI는 또한 많은 크로마토그래피 수지에 비가역적으로 결합하여, 이들의 효과 및 PEI-이후의 정화에 이용가능한 잠재적인 크로마토그래피 수지의 수를 제한하는 경향이 있다. 일반적으로, 수성 2상 추출 시스템은 예측하기 어렵고 종종 적절한 수성 상으로 관심 단백질을 이동시키는 조건을 결정하기 위한 실험적 접근을 요구한다(상기 Kelly 등).

관심 단백질을 특이적으로 침전시키는 기술은 종종 침전물에 비-단백질성 오염물을 함유시켜, 분리가 비효과적으로 되도록 한다(상기 Scopes; 상기 Wheelwright).

단백질 회수 및 정제에 관해 기재한 특허의 예는 다음과 같다:

미국 특허 제5,665,866호는 가용성이고 정확하게 폴딩되어 조립된 형태의 항체를 수득하는 방법을 개시하고 있다. 상기 방법은 실질적으로 다른 항체-관련 물질이 없고 가용성이며 정확하게 폴딩되어 조립된 항체의 추후 단리가 용이하도록 선택한 공정으로 운전 온도를 34에서 60℃로 한번에 상승시키는 단계를 포함한다.

미국 특허 제5,760,189호는 용액에 킬레이터를 첨가함으로써 음으로 하전된 비-단백질성 물질을 포함하는 티오레독신-유사 융합 단백질을 이. 콜라이로부터 용액으로 방출시키고, 용액에 2가 양이온/알콜 용액을 첨가하여 음으로 하전된 비-단백질성 물질을 용액으로부터 침전시켜 단백질을 함유하는 제1 가용성 분획물 및 원치않는 오염물을 함유하는 제1 불용성 분획물을 형성하는 방법을 개시하고 있다. 임의로, 킬레이터 첨가 전의 온도는 킬레이터 첨가 후의 온도보다 실질적으로 더 낮을 수 있다. 2가 양이온은 예를 들어 마그네슘, 망간 및 칼슘을 단독으로 또는 이들의 배합물로 포함한다.

미국 특허 제5,714,583호는 인자 IX를 함유하는 용액을 음이온-교환 수지에 적용하고, 음이온-교환 수지를 수지로부터의 인자 IX 용출에 요구되는 것보다 낮은 전도율을 갖는 용액으로 세척하고, 음이온-교환 수지를 제1 용출제로 용출시켜 제1 용출물을 형성하고, 용출물을 헤파린 또는 헤파린-유사(예를 들어 음으로 하전된 매트릭스) 수지에 적용하고, 헤파린 또는 헤파린-유사 수지를 제2 용출제로 용출시켜 제2 용출물을 형성하고, 제2 용출물을 히드록시아파타이트 수지에 적용한 후에 히드록시아파타이트 수지를 제3 용출제로 용출시켜 정제된 인자 IX를 함유하는 제3 용출물을 형성하는 단계를 포함하는, 용액에서 인자 IX의 정제 방법을 개시하고 있다.

미국 특허 제6,322,997호는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 고상에 고정되어 폴리펩티드에 결합하거나 그를 변형시키는 시약에 노출시킨 후에 조성물 중 시약의 전하와는 반대인 전하를 갖는 필터에 상기 조성물을 통과시켜 조성물로부터 여과된 시약을 제거하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 회수 방법을 개시하고 있다.

미국 특허 제6,214,984호는 항체 정제를 위한 저-pH 소수성 크로마토그래피(LPHIC)를 개시하고 있다. 특히, 상기 특허는 항체 및 오염물을 함유하는 혼합물을 소수성 상호작용 컬럼에 로딩하고 pH 약 2.5 내지 4.5의 완충액을 사용하여 컬럼으로부터 항체를 용출하는 단계를 포함하는, 오염물로부터 항체를 정제하는 방법을 제공한다. 통상적으로, 컬럼에 로딩된 혼합물의 pH는 용출 완충액과 대략 동일하다.

미국 특허 제6,121,428호는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 고상에 고정되어 폴리펩티드에 결합하거나 그를 변형시키는 시약에 노출시킨 후에 조성물 중 시약의 전하와는 반대인 전하를 갖는 필터에 상기 조성물을 통과시켜 조성물로부터 여과된 시약을 제거하는 단계를 포함하는 폴리펩티드 회수 방법을 제공한다.

미국 특허 제5,641,870호는 항체 및 오염물을 함유하는 혼합물을 임의로 낮은 염 농도의 LPHIC에 가하는 항체 정제 방법을 제공한다. 항체는 컬럼으로부터 그에 결합하지 않는 분획물에 용출된다. 추출 단계에서, 동결된 세포 펠렛은 실온에서 5 mM EDTA와 에탄올에 미리 용해시켜 둔 20 mM 4,4'-DTP를 함유하는 20 mM MES 완충액 (pH 6.0)에 재현탁된다 (완충액 3 리터/세포 펠렛 kg). 현탁된 세포는 5500 내지 6500 PSI의 만틴 가울린(Mantin Gaulin) 균질화기에 2번 통과시켜 파쇄된다. 균질화액은 폴리에틸렌이민(PEI)으로 0.25%(v/v)로 조정되고 동일한 부피의 2 내지 8℃ 정제수로 희석된다. 이어서, 희석된 균질화액은 원심분리된다. 항체는 상등액에 존재한다.

역사적으로, 면역글로불린 G(IgG)는 인간 혈청과 혈장으로부터 정제되었다(Putnam, ed., The Plasma Proteins, 1권 (Academic Press, 1975)). 정제 방법은 종종 하나 이상의 침전 단계를 포함하였다. IgG를 회수하기 위해 가장 통상적으로 사용되는 침전 계획은 콘(Cohn) 분획화이다(Cohn 등, J. Amer. Chem. Soc., 72: 465(1950)). 그러나, 다른 침전 기술이 보고되어 있다(Niederauer 및 Glatz, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 47권(Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992); Steinberg 및 Hershberger, Biochim. et Biophys. Acta, 342: 195-206(1974)). 고도의 방향성 양이온 염료인 6,9-디아미노-2-에톡시아크리딘 락테이트(USAN 명칭 및 본원에서 에타크리딘 락테이트로 불리고 또한 명칭 에토딘(ETHODIN)™ 또는 리바놀(RIVANOL)™로도 알려져 있음)를 이용하여 혈장으로부터 IgG를 정제하는 혁신적인 업적이 Horsjsi 및 Smetana, Acta Med. Scand., 155: 65(1956)에 의해 보고되어 있다. 이후 10년 동안에는 생물학적 물질, 예를 들어 혈장과 성장 배지로부터 IgG와 다른 단백질을 정제하는 6,9-디아미노-2-에톡시아크리딘 락테이트의 능력을 보여주는 수많은 문헌들이 간행되었다(Miller, Nature, 184: 450(1959); Steinbuch 및 Niewiarowski, Nature, 186: 87(1960); Neurath 및 Brunner, Experientia, 25: 668(1969)). 다른 공급원으로부터의 항체 및 다른 단백질을 회수하기 위한 에타크리딘 락테이트의 사용이 보고되어 있다. Tchernov 등, J. Biotechnol., 69: 69-73(1999); 1982. 7. 28에 공개된 SU 944580; Franek 및 Dolnikova, Biotech-Forum-Eur, 7: 468-470(1990); 1987. 12. 23에 공개된 EP 250288; 1987. 8. 20에 공개된 DE 3604947; Rothwell 등, Anal. Biochem., 149: 197-201(1985); Lutsik 및 Antonyuk, Biokhimiya, 47: 1710-1715(1982); 및 Aizenman 등, Mikrobiol-Zh., 44: 69-72(1982)를 참조한다.

미생물로부터 폴리펩티드를 회수하는 1차 단계는 가장 흔히는 고체 물질, 예를 들어 세포 및 세포 잔해를 제거하는 것이다. 원하는 생성물을 조건화 배지에 존재하여 상기 생성물과 특이적으로 상호작용하는 성분으로부터 분리할 필요성을 인식하는 것이 중요하다. 관심 단백질이 양으로 하전된 경우에는 상기 단백질이 그와 함께 존재하는 임의의 음으로 하전된 분자와 결합하기 때문에 통상적 방법에 의한 단백질 정제를 매우 어렵게 만드는 경향이 있다. 이 단계 중 조 미생물 추출물, 예를 들어 이. 콜라이 균질화액으로부터 가용성 오염 단백질의 부가적인 제거는 이후의 크로마토그래피 단계를 간소화할 것이다. 그러한 부가적인 제거는 크로마토그래피 컬럼의 크기와 생산 시간을 감소시켜, 산업적 규모의 생산에 특히 가치있을 것이다.

발명의 요약

정제를 포함하는 본 발명은 청구된 바와 같다.

구체적으로, 본 발명은 한 측면에서

원하는 이종 폴리펩티드가 생산되고 가용화되어 있는 미생물 발효 브로쓰(broth) 또는 균질화액에 대다수의 폴리펩티드가 가용성인 채로 유지되는 조건하에서 유효량의 6,9-디아미노-2-에톡시아크리딘 락테이트(에타크리딘 락테이트) 용액을 첨가하여 숙주 세포 불순물을 침전시키는 단계, 및

상기 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 폴리펩티드를 분리하는 단계

를 포함하는, 원하는 이종 폴리펩티드가 생산되고 가용화되어 있는 미생물 발효 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 이종 폴리펩티드를 정제하는 방법을 제공한다.

다른 측면에서, 본 발명은 에타크리딘 락테이트 및 발효 미생물 세포에 대해 이종인 폴리펩티드를 포함하는 미생물 세포 발효 브로쓰 또는 균질화액을 제공한다.

침전제로서의 에타크리딘 락테이트의 첨가는 숙주 단백질을 포함하는 숙주 잔해를 크게 감소시키며, 이것은 예측못했던 일이다. 상기 방법에서, 대다수의 숙주 단백질은 세포 잔해와 함께 침전물에서 회수되고 폴리펩티드는 정화된(clarified) 상등액에서 회수된다. 에타크리딘 락테이트를 사용함으로써 정화된 추출물의 순도가 향상된다는 것은 컬럼에 요구되는 크로마토그래피 매질 또는 수지의 부피를 감소시켜서 이후의 정제에 필요한 규모를 감소시킨다. 이것은 또한 일부 크로마토그래피 단계(들)를 제거하여 가공 시간과 비용을 개선시킨다. 또한, 본 발명의 방법은 안정한 공급물을 생성하고 중성 pH에서 수행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 항 CD18 F(ab')$_2$(-류신 지퍼(leucine zipper)) 플라스미드 pS1130(단일 프로모터)와 pxCD18-7T3(이중-프로모터)의 제작을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 이중-프로모터 제작물 pxCD18-7T3의 삽입된 핵산 서열(항-CD18-7T3.DNA로 명명됨; 서열번호 1)을 도시한 것이다.

도 3A와 3B는 각각 STⅡ + 항-CD18 경쇄(도 3A)와 STⅡ + 항-CD18 중쇄(도 3B)로 명명된, 제작물 pxCD18-7T3(서열번호 2 및 3) 내의 2개 번역 단위에 의해 코딩되는 아미노산 서열(함께 항-CD18-7T3.단백질로 명명됨)을 도시한 것이다. N-말단 STⅡ 분비 신호 서열에는 밑줄을 그었다.

도 4는 항-조직 인자 IgG1 플라스미드 paTF130(phoA/phoA 프로모터)와 pxTF-7T3FL(phoA/tacⅡ-프로모터)의 도식도이다.

도 5는 phoA/tacⅡ-프로모터 제작물 pxTF-7T3FL의 삽입된 핵산 서열(항-TF-7T3FL.DNA로 명명됨; 서열번호 4)을 도시한 것이다.

도 6A와 6B는 각각 STⅡ + 항-TF 경쇄(도 6A)와 STⅡ + 항-TF 중쇄(도 6B)로 명명된 제작물 pxTF-7T3FL(서열번호 5 및 6) 내의 두 번역 단위에 의해 코딩되는 아미노산 서열(함께 항-TF-7T3FL.단백질로 명명됨)을 도시한 것이다. N-말단 STⅡ 분비 신호 서열에는 밑줄을 그었다.

도 7은 에타크리딘 락테이트의 화학적 구조를 도시한 것이다.

도 8A 내지 8C는 에타크리딘 락테이트를 사용하여 침전시킨 후에 3가지 상등액의 비환원 SDS-PAGE 쿠마시-블루-염색된 겔 분석을 보여준다. 각 레인에 표시된 바와 같이, 침전은 상이한 pH 값에서 수행하였다. X로 표시된 레인은 각각의 이. 콜라이 균질화액의 정화된 상등액, 즉, 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장(full-length) 항-TF(각각 도 8A, 8B 및 8C)이다. 균질화액을 각 실험에서 0.8% 에타크리딘 락테이트 용액으로 4배 희석하여 최종 농도가 0.6% 에타크리딘 락테이트가 되도록 하였다. 모든 샘플은 겔에 로딩하기 전에 부피를 맞추었다. 따라서, 100% 회수가 얻어지면, 밴드 강도를 추출물(X)과 비교할 수 있다. 화살표는 생성물 밴드를 표시한다.

도 9A 내지 9C는 에타크리딘 락테이트를 사용하여 침전시킨 후에 상등액의 비환원 SDS-PAGE 쿠마시-블루-염색된 겔 분석을 보여준다. 각 레인에 표시된 바와 같이, 침전은 상이한 에타크리딘 락테이트 농도로 수행하였다. X로 표시된 레인은 각각의 이. 콜라이 균질화액의 정화된 상등액, 즉, 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항-TF(각각 도 9A, 9B 및 9C)이다. 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항-TF의 pH는 각각 8.5, 7.5 및 6.0이었다. 샘플의 전도율은 3.2±0.2 mS/㎝였다. 모든 샘플은 겔에 로딩하기 전에 부피를 맞추었다. 따라서, 100% 회수가 얻어지면, 밴드 강도를 추출물(X)과 비교할 수 있다. 화살표는 생성물 밴드를 표시한다.

도 10A와 10B는 각각 물 또는 에타크리딘 락테이트로 희석한 후에 2가지 상등액의 비환원 SDS-PAGE 쿠마시-블루-염색된 겔 분석을 보여준다. 침전은 다른 전도율 수준으로 수행하였다. 이 연구에는 항-CD18 $F(ab')_2$를 함유하는 이. 콜라이 균질화액을 사용하였다. 각 실험에서 균질화액을 물(도 10A) 또는 0.8% 에타크리딘 락테이트 용액으로 4배 희석하여 최종 농도가 0.6% 에타크리딘 락테이트가 되도록 하고, pH를 8.3으로 조정하였다. 전도율을 변경시키기 위하여, NaCl을 0 내지 400 mM의 상이한 농도로(도면에 표시된 바와 같이) 샘플에 가하였다. 화살표는 생성물 밴드를 표시한다.

도 11은 증가하는 염화나트륨 농도에서의 에타크리딘 락테이트의 용해도 그래프를 보여준다. 가용성 에타크리딘 락테이트의 농도를 결정하기 전에 샘플을 실온에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 백색 사각형은 1.2% 에타크리딘 락테이트 용액을 나타내고, 흑색 사각형은 0.6% 용액을 나타낸다. 실선은 pH 6.0의 0.6% 에타크리딘 락테이트 용액을 나타내고, 파선은 pH 6의 1.2% 에타크리딘 락테이트 용액을 나타내고, 점선은 pH 9의 0.6% 에타크리딘 락테이트 용액을 나타내며, 점이 있는 파선은 pH 9의 1.2% 에타크리딘 락테이트 용액을 나타낸다.

도 12A 내지 12C는 에타크리딘 락테이트를 사용하여 침전시킨 후에 3가지 상등액의 비환원 SDS-PAGE 쿠마시-블루-염색된 겔 분석을 보여준다. 침전은 승온에서 수행하였다. X로 표시된 레인은 각각의 이. 콜라이 균질화액의 정화된 상등액, 즉, 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항-TF(각각 도 12A, 12B 및 12C)이다. 균질화액을 4배 희석하여 최종 농도가 0.6% 에타크리딘 락테이트가 되도록 하고, pH를 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항-TF에 대해 각각 8.5, 7.5 및 6.0으로 조정하였다. 인큐베이션 온도와 시간은 도면에 표시되어 있다. 화살표는 생성물 밴드를 표시한다.

도 13은 3가지 상이한 상등액에 대한 탁도 그래프를 시간 함수로서 보여준다. 0.6% 에타크리딘 락테이트로 처리된 항-CD18 균질화액으로부터의 상등액은 흑색 원(4℃) 또는 백색 원(21℃)으로 표시되어 있고, 0.2% PEI-처리된 샘플은 흑색 사각형(4℃) 또는 백색 사각형(21℃)으로 나타나 있다. 농축 전에 물로 희석된 정화된 항-CD18 균질화액으로부터 회수된 상등액은 흑색 삼각형(4℃)과 백색 삼각형(21℃)으로 나타내었다. 모든 경우에서, 항-CD18 균질화액은 4배 희석되었고 pH는 7.2였다.

발명의 상세한 설명

정의

"미생물 발효 브로쓰 또는 균질화액"이라는 표현은 사용된 배양 용기, 예를 들어 진탕 플라스크 또는 발효조를 사용하였든지 간에, 배양되고 영양분을 소모하는, 효모, 진균 및 세균과 같은 원핵생물을 포함하는 미생물로부터 수득된, 바람직하게는 재현탁된 브로쓰, 페이스트 또는 추출물을 말한다. 바람직하게, 브로쓰 또는 균질화액은 효모 또는 원핵생물로부터

유래된 것이다. 보다 바람직하게, 브로쓰 또는 균질화액은 세균으로부터 유래된 것이다. 본원에서는 균질화액이 바람직하다. 일부 경우 용액이 매우 높은 전도율을 가지면 세포를 수획하고 그들을 재현탁하는 것이 바람직할 수 있지만, 아니면, 균질화액을 발효조로부터 직접 그대로 사용하는 것이 바람직하다. 브로쓰 또는 균질화액의 성분은 세포 잔해, 숙주 세포 단백질, DNA, RNA 등을 포함한다. 따라서, 본원에서 락테이트의 첨가는 숙주 세포 단백질 등의 선별적 침전을 일으켜, 락테이트를 사용하지 않는 것에 비해 더 우수한 정제력을 제공한다.

"대다수의 폴리펩티드가 가용성인 채로 유지되는 조건하에서"라는 표현은 대다수의 표적 폴리펩티드가 브로쓰 또는 균질화액으로부터 침전하는 것을 방지하는 양과 온도와 전도율 수준으로 브로쓰 또는 균질화액에 에타크리딘 락테이트를 첨가하는 것을 말한다. 바람직하게는, 그러한 조건은 약 60% 초과, 더 바람직하게는 약 70% 초과, 더욱 더 바람직하게는 약 75% 초과, 더욱 더 바람직하게는 약 80% 초과, 더더욱 더 바람직하게는 약 85% 초과, 및 더욱 더 바람직하게는 약 85%, 더더욱 더 바람직하게는 약 90% 초과, 가장 바람직하게는 약 95% 초과의 폴리펩티드가 침전하는 것을 방지한다. 이 정도의 용해도는 예를 들어 RP-HPLC, 친화성 크로마토그래피, ELISA들, RIA들과 SDS-PAGE와 고성능 친화성 크로마토그래피(HPAC)의 결합과 같은 적절한 검정법으로 측정된다. 검정법의 선택은 사용되는 숙주 세포의 유형과 생산되는 폴리펩티드와 같은 인자에 따라 달라진다.

본원에서의 목적을 위한 "세균"은 진정세균(*eubacteria*)과 시원세균(*archaebacteria*)을 포함한다. 이들 중 바람직한 것은 그램-양성(gram-positive) 및 그램-음성(gram-negative) 세균을 포함하는 진정세균이다. 더욱 바람직한 것은 그램-음성 세균이다. 하나의 바람직한 유형의 세균은 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*)이다. 엔테로박테리아세아에에 속하는 세균의 예는 에스케리키아(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 크렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*) 및 시겔라(*Shigella*)를 포함한다. 다른 유형의 적당한 세균은 아조토박터(*Azotobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*) 및 파라코커스(*Paracoccus*)를 포함한다. 본원에서는 이. 콜라이가 바람직하다. 적당한 이. 콜라이 숙주는 이. 콜라이 W3110(ATCC 27,325), 이. 콜라이 294(ATCC 31,446), 이. 콜라이 B와 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537)을 포함한다. 이들 예는 제한적이기 보다 설명적이며, W3110이 바람직하다. 상기한 세균 중 임의의 세균의 돌연변이 세포도 사용할 수 있다. 물론, 세균의 세포에서 레플리콘(replicon)의 복제가능성을 고려하여 적절한 세균을 선택하는 것이 필요하다. 예를 들어 pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 잘 알려진 플라스미드가 레플리콘을 제공하는데 사용될 때, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적당하게 사용될 수 있다. 적당한 세균 숙주 세포의 예에 관하여 아래를 추가로 참조한다.

본원에서 사용된 바와 같이, "세포", "세포주", "균주"와 "세포 배양물"이라는 표현은 서로 구별없이 사용되며 모든 그러한 명명은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체"와 "형질전환된 세포"는 도입 수에 상관없이 일차 대상 세포와 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한 모든 자손이 계획되거나 우발적인 돌연변이로 인해, DNA 내용물에서 정확하게 동일하지 않을 수 있음이 이해된다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크린된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 포함된다. 별도의 명명이 의도될 때, 그것은 문맥으로부터 명확할 것이다.

본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩티드"는 일반적으로 악 10개 초과의 아미노산을 갖는 임의의 세포 공급원으로부터의 펩티드와 단백질을 말한다. "이종" 폴리펩티드는 이. 콜라이에 의해 생산되는 인간 단백질과 같은, 사용되는 숙주 세포에 대해 외래인 그들 폴리펩티드이다. 이종 폴리펩티드는 원핵세포 또는 진핵세포에서 유래한 것일 수 있지만, 바람직하게는 진핵세포, 보다 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 이종 폴리펩티드는 재조합적으로 생산되거나 재조합 폴리펩티드인 것이 바람직하다.

폴리펩티드는 발효 브로쓰 또는 균질화액에서 생산되고 가용화되며, 이는 그것이 그러한 브로쓰 또는 균질화액에서 제조되고 이미 생산으로부터 기인하는 가용성 분획물에 있거나 환원제(디티오트레이톨 또는 베타-머캅토에탄올과 같은)와 함께 또는 없이, 카오트로프제(예를 들어 요소 또는 구아니딘) 또는 세정제(나트륨 도데실 설페이트(SDS)와 같은)와 같은 가용화제로 처리 또는 접촉되어 가용화되는 불용성 분획물 또는 형태 또는 상에 있는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 의미로 "가용성", "가용화된", "가용화", "용해된" 또는 "용해"는 폴리펩티드가 원심분리 후 고체 분획물보다 상등액에 있음을 의미한다. 침전 또는 용해도의 정도는 예를 들어 상기 기재한 바와 같은 적절한 검정법에 의해 결정될 수 있다.

포유동물 폴리펩티드의 예는 예를 들어 레닌, 인간 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백; 1-안티트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 트롬보포이에틴; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 인자 Ⅷ C, 인자 Ⅸ, 조직 인자 및 폰 필레브란트(von Willebrands) 인자와 같은 응고 인자; 단백질 C와 같은 항-응고 인자; 심방 나트륨이뇨성 인자(Atrial naturietic factor); 폐 계면활성제; 유로키나제 또는 인간 뇨 또는 조직-형 플라스미노겐 활성화제(t-PA)와 같은, 플라미스노겐 활성화제 및 레테바제(RETEVASE)™와 TNKASE™와 같은 그의 변이체; 봄베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -

베타; 엔케팔리나제, ErbB2의 세포외 영역에 있는 부위(예를 들어 ErbB2의 약 22 잔기 내지 약 584 잔기를 포함하는 부위의 임의의 하나 이상의 잔기)에 결합하는, 2C4와 같은 ErbB2 영역(들)에 대한 항체(WO 01/00245; 하이브리도마 ATCC HB-12697); 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민; 뮬러리안-저해 물질; 릴렉신 A-쇄; 릴렉신 B-쇄; 프로릴렉신; 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드; 베타-락타마제와 같은 미생물 단백질; DNase; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스양 인자; 뇌-유래된 신경영양성 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6)와 같은 신경영양성 인자 또는 NGF와 같은 신경 성장 인자; 카디오트로핀-1(CT-1)과 같은 카디오트로핀(심장 비대 인자); 혈소판-유래된 성장 인자(PDGF); aFGF와 bFGF와 같은 섬유아세포 성장 인자; 상피 성장 인자(EGF); TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 또는 TGF-5를 포함하는, TGF-알파와 TGF-베타와 같은 형질전환 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-Ⅰ 및 -Ⅱ(IGF-Ⅰ 및 IGF-Ⅱ); 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 데스(1-3)-IGF-Ⅰ(뇌 IGF-Ⅰ); CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19와 같은 CD 단백질; 에리트로포이에틴; 골유도성 인자; 면역독소; 골형성 단백질(BMP); 인터페론-알파, -베타 및 -감마와 같은 인터페론; 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 소 혈청 알부민(BSA)과 같은 혈청 알부민; 콜로니 자극 인자(CSF들), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨(IL들), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 항-HER-2 항체; Apo2 리간드; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 예를 들어 AIDS 외피의 일부와 같은, 바이러스 항원; 수송 단백질; 호밍 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 항체; 및 위에 리스트된 폴리펩티드 중 임의의 것의 단편과 같은 분자를 포함한다.

본 발명에 바람직한 폴리펩티드는 인간 혈청 알부민(HSA), 2C4, 조직인자, 항-조직 인자, 항-CD20, 항-HER-2, 헤레귤린, 항-IgE, 항-CD11a, 항-CD18, VEGF 및 수용체 및 rhuFab V2 및 아바스틴(AVASTIN)™과 같은 그에 대한 항체, hGH와 같은 성장 호르몬 및 그의 변이체, 성장 호르몬 수용체, 성장 호르몬 방출 단백질(GHRP), LIV-1(EP 1,263,780), TRAIL, 종양 괴사 인자(TNF)와 그에 대한 항체, TNF 수용체와 관련된 항체, TNF-수용체-IgG, TNF 수용체 관련 인자(TRAF들)와 그의 저해제, 인자 Ⅷ, 인자 ⅧB 영역, 인터페론-감마와 같은 인터페론, TGF-베타와 같은 형질전환 성장 인자(TGF들), 항-TGF-베타와 같은 항-TGF, 액티빈, 인히빈, 항-액티빈, 항-인히빈, t-PA, 레테플라제(RETEPLASE)™ 및 TNKase와 같은 조직-플라미스노겐 활성화제와 그들의 변이체, 항-Fas 항체, Apo-2 리간드; Apo-2 리간드 저해제; Apo-2 수용체, Apo-3, 고사 인자, Ced-4, DcR3, 죽음 수용체와 작용제 항체(DR4, DR5), 림프독소(LT), 프로락틴, 프로락틴 수용체, SOB 단백질, WISP(wnt-유도된 분비 단백질), 신경독소-3(NT-3), 신경 성장 인자(NGF)와 항-NGF, DNase, 간염 항원, 허피스 심플렉스 항원, 렙틴, IGF-1 및 IGF-2와 같은 인슐린-유사 성장 인자와 IGFBP-1-IGFBP-6와 같은 그들의 결합 단백질과 수용체, 인슐린, FGF-17과 같은 섬유아세포 성장 인자(FGF들), 톨 단백질, TIE 리간드, CD40과 항-CD40, 면역어드헤신, 서브틸리신, 간세포 성장 인자(HGF), 트롬보포이에틴(TPO), IL-2, IL-12, IL-17, IL-22, IL-8, IL-9과 같은 인터류킨과 그에 대한 항체와, 전립선-특이적 암 항원(PSCA)을 포함한다.

HER2에 결합하는 항체의 예는 미국 특허 제5,821,337호의 표 3에 기재된 바와 같은 4D5, 7C2, 7F3와 2C4, 및 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7과 huMAb4D5-8을 포함하는 그들의 인간화된 유도체; 및 W0 01/00245에 기재된 바와 같은 인간화된 2C4 돌연변이 번호 560, 561, 562, 568, 569, 570, 571, 574 또는 56869를 포함한다. 7C2 및 7F3와 그들의 인간화된 변이체는 W0 98/17797에 기재되어 있다.

CD20 항원에 결합하는 항체의 예는 이제 "리툭시마브(Rituximab)"("리툭산(RITUXAN)®")로 불리는 "C2B8"(미국 특허 제5,736,137호); "Y2B8"로 명명된 이트륨-[90]-표지된 2B8 쥐 항체(미국 특허 제5,736,137호); "^{131}I-B1 항체(벡사르(BEXXAR)™)를 생성하는 임의로 ^{131}I로 표지된 쥐 IgG2a "B1"(미국 특허 제5,595,721호); 쥐 모노클로날 항체 "1F5"(Press 등, Blood 69(2): 584-591(1987)); "키메라 2H7" 항체(미국 특허 제5,677,180호); 및 인터내셔널 류코사이트 타이핑 워크샵으로부터 입수가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2(Valentine 등, *Leukocyte Typing* Ⅲ(McMichael, Ed., 440면, Oxford University Press(1987))를 포함한다.

더 바람직한 폴리펩티드는 2C4, 항-조직 인자, 항-CD20, 항-HER-2, 헤레귤린, 항-IgE, 항-CD11a, 항-CD18, rhuFab V2와 같은 항-VEGF, hGH, GHRP, LIV-1, TRAIL, TNF에 대한 항체와 TNF 수용체와 관련 항체, TRAF의 저해제, TNF-수용체-IgG, 인자 Ⅷ, 인자 ⅧB 영역, 인터페론-감마, TGF-베타와 항-TGF-베타, 액티빈, 인히빈, 항-액티빈, 항-인히빈, t-PA, TNKase, 항-Fas 항체, Apo-2 리간드; Apo-2 리간드 저해제; Apo-2 수용체, Apo-3, DcR3, 죽음 수용체와 작용제 항체(DR4, DR5), 림프독소(LT), 프로락틴, 프로락틴 수용체, WISP, 항-NGF, NGF, NT-3, 항-IL-8, 항-IL-9, IL-17, IL-22, DNase, GHRP, 간염 항원, 허피스 심플렉스 항원, 렙틴, IGF-1 및 IGFBP1-6, 인슐린, FGF-17, 톨 단백질, TIE 리간드, CD40, 면역어드헤신, 서브틸리신, HGF와 TPO이다.

더욱 더 바람직한 폴리펩티드는 2C4, 항-조직 인자, 항-CD20, 항-HER-2, 항-IgE, 항-CD11a, 항-CD18, rhuFab V2와 같은 항-VEGF, hGH, LIV-1, TRAIL, TNF에 대한 항체 및 TNF 수용체 및 관련 항체, TNF-수용체-IgG, 인자 Ⅷ, 인

자 Ⅷ B 영역, 인터페론-감마, TGF-베타, 액티빈, 인히빈, 항-액티빈, 항-인히빈, t-PA, TNKase, Apo-2 리간드; Apo-2 리간드 저해제; Apo-2 수용체, Apo-3, DcR3, 죽음 수용체 및 작용제 항체(DR4, DR5), WISP, TRAF의 저해제, 항-NGF, NGF, NT-3, 항-IL-8, 항-IL-9, IL-17, IL-22, 항-TGF들, DNase, GHRP, 간염 항원, 허피스 심플렉스 항원, 렙틴, IGF-1 및 IGFBP1-6, 인슐린, FGF-17, 톨 단백질, TIE 리간드, 항-CD40, HGF 및 TPO이다.

특히 바람직한 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 더 바람직하게는 모노클로날 항체와 인간화 항체를 포함하는 항체이다. 그러한 항체는 전장 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 더 바람직하게는, 이들 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 이들은 예를 들어 특히 바람직한 폴리펩티드 2C4, 항-조직 인자 Fab'2 및 전장, 항-CD20, 항-HER-2, 항-IgE, 항-CD11a, 항-CD18 Fab'2 및 전장, 항-VEGF 전장 및 rhuFab V2, LIV-1, DR4, DR5 및 TRAIL을 포함한다.

더욱 더 바람직하게는, 항체는 항-IgE, 항-CD18, 항-VEGF, 항-조직 인자, 2C4, 항-Her-2, 항-CD20, 항-CD40 또는 항-CD11a 항체이다. 폴리펩티드의 정의 내에 포함되는 항체 단편은 바람직하게는 경쇄, 더 바람직하게는 카파 경쇄를 포함한다. 그러한 바람직한 단편은 예를 들어 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 또는 $F(ab')_2$-류신 지퍼(LZ) 융합체를 포함하고, 가장 바람직하게는 $F(ab')_2$이다. 가장 바람직한 항체는 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-조직 인자 $F(ab')_2$, 전장 항-조직 인자 항체와 항-VEGF 항체이다.

본원에서 용어 "항체"는 최광의로 사용되고 구체적으로 무손상(intact) 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체(예를 들어 이중특이적 항체) 및 항체 단편을, 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 포함한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻어진 항체, 즉 집단을 구성하는 개개 항체가 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일한 것을 의미한다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일의 항원 위치에 대한 것이다. 더욱 더, 상이한 결정기(에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대한 것이다. 그들의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 그들이 다른 항체에 의해 오염되지 않은 채 합성될 수 있다는 점에서 장점을 갖는다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 가리키고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 Koehler 등, Nature, 256: 495(1975)에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어 미국 특허 제4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 Clackson 등, Nature, 352: 624-628(1991)와 Marks 등, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.

본 발명에서 모노클로날 항체는 구체적으로 쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동적인 반면, 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동적인 "키메라" 항체, 및 그러한 항체의 단편을 그들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 포함한다(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-685(1984)). 본 발명에서 관심 키메라 항체는 비인간 영장류(예를 들어 구세계 원숭이, 원숭이 등)로부터 유래된 가변-영역 항원-결합 서열과 인간 불변-영역 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다.

"항체 단편"은 바람직하게는 그의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함하는, 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

"무손상" 항체는 경쇄 불변 영역(C_L)과 중쇄 불변 영역, C_H1, C_H2 및 C_H3 뿐만 아니라 항원-결합 가변 영역을 포함하는 것이다. 불변 영역은 원래 서열 불변 영역(예를 들어 인간 원래-서열 불변 영역) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터(effector) 기능을 갖는다.

항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 부위(원래-서열 Fc 또는 아미노산 서열 변이를 갖는 Fc 부위)에 기인하는 그들 생물학적 활성을 말한다. 항체 이펙터 기능의 예는 Clq 결합, 보체 의존적 세포독성, Fc 수용체 결합, 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC), 식균작용, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다.

무손상 항체는 그들의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 상이한 "클래스"로 지정될 수 있다. 이들은 5 클래스의 면역글로불린이다: 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 명명된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. γ와 α 클래스는 C_H 서열과 기능의 비교적 작은 차이에 기초하여 서브클래스로 추가로 나뉘며, 예를 들어 인간은 아래 서브클래스를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조와 삼차원 배열은 잘 알려져 있다.

"항체-의존적 세포-매개된 세포독성"과 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR들)(예를 들어 천연 킬러(NK) 세포, 호중구 및 대식세포)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용균을 유발하는 세포-매개된 반응을 말한다. 단핵구가 FcRⅠ, FcRⅡ 및 FcRⅢ를 발현하는 반면, ADCC를 매개하기 위한 일차적 세포, NK 세포는 FcRⅢ만을 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 Ravetch 및 Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492(1991)의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 측정하기 위하여, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 것과 같은, 시험관 내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 그러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈액 단핵 세포(PBMC)와 천연 킬러(NK) 세포를 포함한다. 다르게 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 Clynes 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 652-656(1998)에 기재된 것과 같은 동물 모델에서 측정될 수 있다.

"인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR들을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 FcRⅢ를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈액 단핵 세포(PBMC), 천연 킬러(NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포와 호중구를 포함하며, PBMC들과 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 혈액 또는PBMC들로부터 분리될 수 있다.

"원래 항체"는 보통 두 동일한 경(L)쇄와 두 동일한 중(H)쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 헤테로테트라머 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유적 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되며, 디설파이드 결합의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄 간에 변화한다. 각 중쇄와 경쇄는 또한 규칙적으로 공간을 갖는 쇄내 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각 중쇄는 일 말단에 많은 불변 영역 다음에 가변 영역(V_H)을 갖는다. 각 경쇄는 일 말단에 가변 영역(V_L)과 다른 말단에 불변 영역을 갖는다. 경쇄의 불변 영역은 중쇄의 제1 불변 영역과 정렬되고, 경쇄 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄 가변 영역 사이에 경계면을 형성하는 것으로 믿어진다.

용어 "가변"은 가변 영역의 특정 부분이 서열에서 항체 사이에 크게 다르고 각각의 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 결합과 특이성에 사용되는 사실을 말한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 영역에 걸쳐 균일하게 분포되어 있지 않다. 그것은 경쇄와 중쇄 가변 영역 둘 다에서 초가변(hypervariable) 부위라 불리는 세 조각에 집중되어 있다. 가변 영역의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크 부위(FR들)라 불린다. 원래 중쇄와 경쇄의 가변 영역은 각각 대개 베타-쉬트 배열을 채택하고, 루프 연결을 형성하고, 일부 경우 베타-쉬트 구조의 일부를 형성하는, 세 초가변 부위에 의해 연결되는, 네 FR들을 포함한다. 각 쇄의 초가변 부위는 FR들에 의해 밀접하게 가까이 함께 유지되며, 다른 쇄의 초가변 부위와 함께, 항체의 항원-결합 위치의 형성에 기여한다(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)). 불변 영역은 항체의 항원에 대한 결합에 직접 관여하지 않지만, 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC)에서 항체의 참여와 같은, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

본 발명에서 사용될 때 용어 "초가변 부위"는 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 말한다. 초가변 부위는 일반적으로 "상보성-결정 부위" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어 경쇄 가변 영역의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 영역의 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)) 및(또는) "초가변 루프"로부터의 잔기(예를 들어 경쇄 가변 영역의 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 영역의 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia 및 Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917(1987))로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크 부위" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 부위 이외의 다른 그들 가변 영역 잔기이다.

항체의 파파인 분해는 각각 단일의 항원-결합 위치를 갖는 "Fab" 단편이라 불리는 두 동일한 항원-결합 단편과, 그 이름이 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영하는 잔여 "Fc" 단편을 생산한다. 펩신 처리는 두 항원-결합 위치를 갖고 항원과 여전히 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다.

"Fv"는 완전한 항원-인식과 항원-결합 위치를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 부위는 단단한, 비공유 결합된 하나의 중쇄와 하나의 경쇄 가변 영역의 다이머로 구성된다. 그것은 각 가변 영역의 세 초가변 부위가 상호작용하여 V_H-V_L 다이머의 표면 상의 항원-결합 위치를 결정하는 이 배열로 있다. 총괄적으로, 6개의 초가변 부위가 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일의 가변 영역(또는 항원에 특이적인 3개의 가변 영역만을 포함하는 Fv의 절반)조차도 전체 결합 위치 보다 낮은 친화도일지라도, 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 영역과 중쇄의 제1 불변 영역(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터의 하나 이상 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 영역의 카르복시 말단에서 소수 잔기가 부가되어 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 영역의 시스테인 잔기(들)이 적어도 하나의 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 명명이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 제조되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 알려져 있다.

임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 "경쇄"는 그들의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ)와 람다(λ)로 불리는, 2개의 명확하게 구별되는 유형으로 지정될 수 있다.

"단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 이들 영역이 단일의 폴리펩티드 쇄에 존재하는, 항체의 V_H 및 V_L 영역을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 추가로 scFv가 항원 결합을 위해 목적 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H와 V_L 영역 사이에 폴리펩티드 링커를 포함한다. scFv의 검토를 위해, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113권, Rosenburg 및 Moore eds.(Springer-Verlag, New York 1994), 269-315면을 참조한다. 항-ErbB2 항체 scFv 단편이 WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호에 기재되어 있다.

용어 "디아바디"는 가변 경 영역(V_L)에 연결된 가변 중 영역(V_H)을 동일한 폴리펩티드 쇄(V_H-V_L)에 포함하는, 두 항원-결합 위치를 갖는 작은 항체 단편을 말한다. 너무 짧아 동일한 쇄 상의 두 영역 사이의 쌍형성을 허용하지 못하는 링커를 사용하여, 영역은 다른 쇄의 상보적 영역과 쌍을 이루게 되고 두 항원-결합 위치를 창출한다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448(1993)에 더 충분히 기재되어 있다.

"인간화된" 형태의 비인간(예를 들어 설치류) 항체는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분에 대해, 인간화 항체는 수혜자의 초가변 부위가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은, 비인간 종(공여자 항체)의 초가변 부위로부터의 잔기에 의해 대체되는 인간 면역글로불린(수혜자 항체)이다. 일부 경우, 인간 면역글로불린의 프레임워크 부위(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화 항체는 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정련하기 위해 가해진다. 일반적으로, 인간화 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프가 비인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR들이 인간 면역글로불린 서열의 것들인, 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 영역의 실질적으로 모두를 포함할 것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 더 상세한 것에 대해서는, Jones 등, Nature., 321: 522-525(1986); Riechmann 등, Nature, 332: 323-329(1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992)을 참조한다.

"단리된" 항체는 그의 천연 환경으로부터 동정되고 분리되고(되거나) 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 라우리법에 의해 결정된 바 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과의 항체로, (2) 스피닝 컵 시퀴네이터(spinning cup sequenator)를 사용하여 적어도 15개 잔기의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는, 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성으로 정제될 수 있다. 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이므로, 분리된 항체는 재조합 세포 내의 계내(in situ) 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로는 분리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

"류신 지퍼"는 매 일곱번째 아미노산이 류신 잔기인, 몇몇 반복 아미노산을 갖는 펩티드 (흔히는 아미노산 잔기 약 20 내지 40개 길이)이다. 그러한 류신 지퍼 서열은 류신 잔기가 다이머 형성을 위한 소수성 측에 정렬되는, 양극성 알파-나선을 형성한다. 본원에서 류신 지퍼의 예는 헤테로다이머(예를 들어 이중특이적 항체)를 형성하는데 사용될 수 있는, Fos-Jun

류신 지퍼(O'Shea 등, Science, 245: 646(1989)); 호모다이머(예를 들어 단일특이적 항체)를 형성하는데 사용될 수 있는 효모로부터의 GCN4 류신 지퍼(Landschulz 등, Science, 240: 1759-1764(1988)); 및 C/EBP와 c-myc과 같은, 다른 DNA-결합 단백질에서 발견되는 류신 지퍼, 및 이들 중 임의의 것의 변이체를 포함한다.

"제어 서열"이라는 표현은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현을 위해 필요한 DNA 서열을 말한다. 세균에 적당한 제어 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열과 리보솜-결합 위치를 포함한다.

핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 위치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어 전서열 또는분비 리더의 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되면 폴리펩티드의 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터는 서열의 전사에 영향을 미치면 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 위치는 번역을 용이하게 하도록 위치되면 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결되는"은 연결되는 DNA 서열이 연속적이고, 분비 리더의 경우, 연속적이고 판독 상(reading phase)에 있음을 의미한다. 연결은 예를 들어 편리한 제한 위치에서의 라이게이션으로 수행할 수 있다. 그러한 위치가 존재하지 않는 경우에는 통상적인 관행에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

용어 폴리펩티드의 "회수"는 일반적으로 그것이 생산된 세포가 없는 폴리펩티드를 수득하는 것을 의미한다.

"숙주 세포 불순물"은 발효 브로쓰 또는 균질화액 중의 오염 숙주 단백질 및 DNA와 세포 잔해와 같은 다른 생분자 불순물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 태양

본 발명은 일 측면에서 목적 이종 폴리펩티드를 그것이 생산되거나 가용화된 미생물 발효 브로쓰 또는 균질화액으로부터 정제하는 방법을 제공한다. 폴리펩티드는 이미 가용성 분획물에서 생산될 수 있거나, 불용성일 수 있으며(예를 들어 불용성 분획물, 상 또는 형태로 생산) 따라서 폴리펩티드를 용해시키도록 접촉 또는 처리될 수 있다. 폴리펩티드가 불용성 상태로 생산되면, 그것은 에타크리딘 락테이트를 가하기 전에 가용화제에 노출시키거나 그와 접촉시켜, 예를 들어 그러한 시약을 불용성 폴리펩티드를 함유하는 분획물에 가하여, 가용화된다. 폴리펩티드가 이미 가용성 분획물에 있는 것이 바람직하다. 본원에서의 방법은 브로쓰 또는 균질화액에 유효량의 에타크리딘 락테이트 용액을 가하여 브로쓰 또는 균질화액에 함유된 숙주 세포를 침전시키는 것을 포함한다. 그러한 첨가는 대다수의 폴리펩티드가 가용성인 채로 유지되는 조건하에서 일어난다. 다음 단계에서 목적 폴리펩티드는 세포 잔해, 숙주 세포 단백질, DNA, RNA 등을 포함하는 브로쓰 또는 균질화액으로부터 분리된다.

표적 폴리펩티드가 양성 표면 전하를 갖는 반면에 에타크리딘 락테이트에 의해 침전된 대부분의 숙주 단백질은 음전하를 가지므로, 표적 폴리펩티드가 침전된 숙주 단백질로부터 상등액에서 회수될 수 있도록 하기 위해서는 숙주 세포 불순물에 함유된 숙주 단백질의 평균 pI보다 높은 pI를 갖는 것이 바람직하다. 그러한 평균 pI는 예를 들어 pI 밴드가 약 7.5 내지 5.0 범위이고, 평균이 6.25인, 숙주 단백질의 2-D 겔에 의해 결정될 수 있다. 별법으로, 이러한 결정을 위해서 등전점 전기영동(2-D 겔의 제1 차원)만을 이용할 수도 있고, 크로마토포커싱 및 아미노산 조성에 의한 계산을 이용할 수도 있다. 더 바람직한 폴리펩티드는 pI가 약 7 이상, 바람직하게는 약 7 내지 10이다.

사용되는 바람직한 폴리펩티드는 상기한 바와 같다.

사용되는 에타크리딘 락테이트의 농도는 예를 들어 용액에 존재하는 대부분의 숙주 세포 불순물의 표면 상에 있는, 용액 중 음전하의 양에 따라 달라진다. 따라서, 에타크리딘 락테이트 농도는 적어도 용액 중 DNA와 숙주 단백질 농도와 같은 숙주 세포 불순물의 양에 따라 달라진다. 균질화액 중 숙주 단백질과 DNA의 농도가 높을수록, 요구되는 에타크리딘 락테이트의 양은 높아진다. 따라서, 에타크리딘 락테이트가 결합하고 따라서 침전하는데 이용가능한 음으로 하전된 성분이 많을수록, 침전을 최대화하기 위해 더 많은 양의 에타크리딘 락테이트가 필요하다. 에타크리딘 락테이트의 바람직한 농도는 일반적으로 약 0.1%(중량/부피) 초과이다. 약 0.1 내지 5%의 에타크리딘 락테이트 농도가 더 바람직하고, 약 0.4 내지 5%가 더욱 더 바람직하며, 약 0.6 내지 5%(중량/부피)가 가장 바람직하다.

일반적으로, 침전을 수행할 때 용액의 전도율이 낮을수록, 세포 잔해와 DNA로부터 폴리펩티드의 정제가 더 효율적이다. 전도율은 예를 들어 균질화액 또는브로쓰의 염의 양에 의하여 또는 균질화액 또는 브로쓰를 물 또는 다른 적당한 용매로 희석함으로써 제어할 수 있다. 에타크리딘 락테이트 첨가 후 브로쓰 또는 균질화액의 전도율은 약 16 밀리지멘스(mS) 미만, 더 바람직하게는 약 1 내지 15 mS, 더욱 더 바람직하게는 약 1 내지 10 mS, 가장 바람직하게는 약 1 내지 5 mS이다.

침전 중 용액의 전도율은 적어도 부분적으로 거기에 존재하는 염의 유형에 따라 달라질 것이다. 할라이드(예를 들어 클로라이드 또는 브로마이드)는 염을 위해 바람직하지 않은 음이온이지만, 그들이 존재하면, 그들은 바람직하게는 에타크리딘 락테이트 첨가 전 용액 중 약 100 mM 미만, 및 일단 에타크리딘 락테이트가 첨가되면 약 50 mM 미만의 농도이다. 본원에서 사용하는 일부 예시적 염은 완충 염, TRIS, MES, MOPS, 아세테이트 및 시트레이트를 포함한다. 존재하는 염의 농도는 에타크리딘 락테이트를 침전시키는 양을 초과해서는 안된다. 정확한 양은 주로 염의 유형과 염과 에타크리딘 락테이트 사이의 화학양론에 따라 달라지며, 한계는 화학양론의 낮은 끝에 있고, 즉 낮은 끝은 에타크리딘 락테이트에 비교적 더 많은 염을 의미한다.

에타크리딘 락테이트 첨가 후 브로쓰 또는 균질화액의 pH는 예를 들어 폴리펩티드의 pI, 폴리펩티드 상의 음성 표면 전하의 양, 용액 중 숙주 세포 불순물의 양, 및 에타크리딘 락테이트의 농도에 따라 달라진다. pH는 바람직하게는 폴리펩티드의 pI보다 높지 않다. 일반적으로, pH 범위는 약 4 내지 10이지만, 효율적인 숙주 세포 불순물 침전을 위해서는, 에타크리딘 락테이트가 이 pH에서는 덜 전하를 띄게 되므로, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 pH는 바람직하게는 약 9 이하이며, 약 4 내지 9가 바람직한 범위이다. 더 바람직하게, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 pH는 약 5 내지 9이고, 더욱 더 바람직하게는 약 6 내지 9이다. 폴리펩티드 상의 음성 표면 전하가 많을수록 이 범위 내의 pH는 더 낮아지며, 그러한 폴리펩티드에 대해 바람직한 범위는 약 pH 6 내지 7이다.

에타크리딘 락테이트 첨가 후 브로쓰 또는 균질화액은 임의로 임의의 기간 동안 승온에서 인큐베이션된다. 온도를 상승시킬지 여부와 얼마나 오랫동안인지는 관심 폴리펩티드의 유형, 존재하는 경우, 방법에서 이 기간 동안 승온에 노출되면 관심 폴리펩티드에 무슨 변형이 일어나는지 등을 포함하는, 많은 인자에 따라 달라진다. 예를 들어 전장 항체의 경우에는 가열하지 않거나 약 25℃ 이하의 온도를 갖는 것이 바람직한 반면, 항-조직 인자 $F(ab')_2$를 정제하는 경우에는 승온이 바람직하다. 이들 인자를 염두에 둘 때, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 온도는 일반적으로 약 1 내지 60 분 동안 약 실온 내지 약 70℃, 더 바람직하게는 약 실온 내지 약 65℃ 범위에서 유지시킨다. 온도가 상승되는 경우의 바람직한 범위 중 하나는 약 1 내지 60 분 동안 약 50 내지 65℃에서 유지시키는 것이다.

다른 측면에서, 본 발명은 에타크리딘 락테이트와 이종 폴리펩티드를 포함하는 미생물 세포로부터의 발효 브로쓰 또는 균질화액인 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 그러한 브로쓰 또는 균질화액에 용해된다. 브로쓰 또는 균질화액의 세포, 폴리펩티드, 농도 및 조건은 상기한 바와 같다. 폴리펩티드의 용해 정도는 상기한 검정법 등과 같은 적절한 검정을 통해 결정될 수 있다. 배양 지수가 사용되고 폴리펩티드 생산이 하기하는 과정과 같은, 통상적인 방식으로 수행된다.

A. 핵산의 선택 및 그의 변형

항체와 같은 본원에서의 폴리펩티드가 어떠한 공급원(예를 들어 무손상 항체의 펩신 절단)로부터도 제조될 수 있는 반면, 바람직하게 그것은 재조합적으로 제조된다. 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 적당하게는 그것이 관심 폴리펩티드(들)를 코딩하는 한, 임의의 공급원으로부터의 RNA, cDNA, 또는 게놈 DNA이다. 미생물 숙주에서 이종 폴리펩티드(그의 변이체를 포함하는)의 발현을 위해 적절한 핵산을 선택하는 방법이 잘 알려져 있다. 미생물 세포 배양물에서 비-항체 폴리펩티드를 제조하기 위한 적절한 핵산의 선택은 당업계에 잘 알려져 있다.

모노클로날 항체가 생산되고 있다면, 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 쉽게 분리되며 통상적인 과정(예를 들어 쥐 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여)을 이용하여 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터로 위치되어, 그 후 본원에서의 미생물 숙주 세포로 형질전환되어 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 얻을 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA의 세균에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문은 Skerra 등, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262(1993) 및 Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188(1992)을 포함한다.

비인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 기재되어 있다. 바람직하게는, 인간화 항체는 비인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 전형적으로 "수입(import)" 가변 영역으로부터 채택된, "수입" 잔기로 언급된다. 인간화는 필수적으로 Winter와 공동연구자(Jones 등, Nature, 321: 522-525(1986); Riechmann 등, Nature, 332: 323-327(1988); Verhoeyen 등, Science, 239: 1534-1536(1988))에 따라, 초가변 부위 서열을 인간 항체의 상응하는 서열 대신 치환하여, 수행될 수 있다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 영역

보다 실질적으로 적은 것이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된, 키메라 항체이다(미국 특허 제4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 부위 잔기와 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 위치로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

인간화 항체를 제조하는데 사용되는, 인간 가변 영역, 경 및 중 영역 둘 다의 선택은 항원성을 감소시키기 위해 매우 중요하다. 소위 "최적(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 영역 서열이 공지의 인간 가변-영역 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 그런 다음 설치류의 것과 가장 가까운 인간 서열이 인간화 항체를 위한 인간 프레임워크 부위(FR)로 수용된다(Sims 등, J. Immunol., 151: 2296(1993); Chothia 등, J. Mol. Biol., 196: 901(1987)). 다른 방법은 특정 서브그룹의 경쇄 또는 중쇄의 모든 인간 항체의 보존된 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 부위를 이용한다. 동일한 프레임워크를 몇몇 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다(Carter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285(1992); Presta 등, J. Immunol., 151: 2623(1993)).

항체가 항원에 대한 높은 친화도와 다른 바람직한 생물학적 성질을 보유하면서 인간화되는 것이 추가로 중요하다. 이 목적을 달성하기 위하여, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체는 친 서열과 인간화 서열의 삼차원 모델을 이용하여 친 서열과 다양한 구상된 인간화 산물의 분석방법에 의해 제조된다. 삼차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 삼차원 형태 구조를 보여주고 배치하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 배치의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 그럴듯한 역할의 분석, 즉, 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이 방식으로, FR 잔기는 수혜자 및 수입 서열로부터 선택 및 결합되어 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은, 원하는 항체 특성이 달성된다. 일반적으로, 초가변 부위 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

다양한 형태의 인간화 항체 또는 친화도-성숙된 항체가 고안된다. 예를 들어 인간화 항체 또는 친화도-성숙된 항체는 면역포접체를 생성하기 위하여 하나 이상의 표적화제(들)와 임의로 포접되는, Fab와 같은, 항체 단편일 수 있다. 다르게는, 인간화 항체 또는 친화도-성숙된 항체는 무손상 IgG1 항체와 같은 무손상 항체이다.

Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다(Carter 등, Bio/Technology, 10: 163-167(1992)). 다른 접근법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편의 제조를 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일-쇄 Fv 단편(scFv)이다(WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호). 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 제5,641, 870호에 기재된 바와 같은, "선형 항체"일 수 있다. 그러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

이중특이적 항체는 적어도 두 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적 이중특이적 항체는 Dkk-1 단백질의 두 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들어 $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

상이한 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 영역(항체-항원 결합 위치)이 면역글로불린 불변-영역 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 적어도 일부의 힌지, CH2 및 CH3 부위를 포함하는, 면역글로불린 중쇄 불변 영역과 함께이다. 경쇄 결합을 위해 필요한 위치를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)이 적어도 하나의 융합체에 존재하도록 하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체를 코딩하는 DNA 및 원하는 경우에는 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터에 삽입되고, 적당한 세균 숙주 유기체로 공동-형질감염된다. 이것은 제작에 사용된 동일하지 않은 비율의 세 폴리펩티드 쇄가 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 세 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 두 폴리펩티드 쇄의 발현이 높은 수율을 초래하거나 비율이 특별한 의미가 없을 때 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄의 코딩 서열을 하나의 발현 벡터에 삽입하는 것이 가능하다.

이 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 암(arm)에 있는 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄와, 나머지 암에 있는 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제2 결합 특이성을 제공하는)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 단지 절반에서의 면역글로불린 경쇄의 존재는 편리한 분리 방법을 제공하므로, 이 비대칭 구조는 원치않는 면역글로불린 쇄 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 확인되었다. 이 접근법은 WO 94/04690에 기재되어 있다. 이중특이적 항체 생성의 추가 상세사항에 대해, 예를 들어 Suresh 등, Methods in Enzymology, 121: 210(1986)을 참조한다.

미국 특허 제5,731,168호에 기재된 다른 접근법에 따르면, 항체 분자 쌍 사이의 경계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 헤테로다이머의 퍼센티지를 최대화하도록 조작될 수 있다. 바람직한 경계면은 적어도 일부의 항체 불변 영역의 C_H3 영역을 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄(예를 들어 타이로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "강(cavities)"이 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것들(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)로 대체하여 제2 항체 분자의 경계면에서 창출된다. 이것은 호모다이머와 같은 다른 원치않는 최종산물에 비해 헤테로다이머의 수율을 증가시키는 기작을 제공한다.

이중특이적 항체는 가교결합 또는 "헤테로포접" 항체를 포함한다. 예를 들어 헤테로포접체의 항체의 하나는 아비딘에 커플링되고, 나머지는 바이오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어 면역 체계 세포를 원치않는 세포로 표적화시키고(미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염 치료를 위해 제안된다(WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로포접체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적당한 가교결합제는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 미국 특허 제4,676,980호에, 수많은 가교결합 기술과 함께, 개시되어 있다.

항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어 이중특이적 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. Brennan 등, Science, 229: 81(1985)은 무손상 항체를 단백분해에 의해 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 과정을 기재하고 있다. 이들 단편은 디티올 복합화제 나트륨 아르세나이트 존재 하에 환원되어 인접한 디티올을 안정화하고 분자간 디설파이드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환되고 동몰량의 나머지 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선별적 고정화제로서 사용될 수 있다.

부가적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있다(Shalaby 등, J. Exp. Med., 175: 217-225(1992)).

재조합 세포 배양물로부터 직접 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어 이중특이적 항체가 류신 지퍼를 이용하여 제조되었다(Kostelny 등, J. Immunol., 148: 1547-1553(1992)). Fos와 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 유전자 융합에 의해 두 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결된다. 항체 호모다이머가 힌지 영역에서 환원되어 모노머를 형성한 후 재산화되어 항체 헤테로다이머를 형성한다. 이 방법은 또한 항체 호모다이머의 제조를 위해 사용될 수 있다. Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448(1993)에 의해 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하는 대체 기작을 제공하였다. 단편은 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 두 영역 사이의 쌍 형성을 허용하지 못하는 링커에 의해 경쇄 가변 영역(V_L)에 연결된 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 V_H 및 V_L 영역은 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 영역과 쌍을 이루도록 강제되어, 두 항원-결합 위치를 형성한다. 단일쇄 Fv(scFv) 다이머를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하는 다른 전략이 또한 보고되어 있다(Gruber 등, J. Immunol., 152: 5368(1994)).

2 초과의 결합가를 갖는 항체가 고안된다. 예를 들어 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다(Tutt 등, J. Immunol., 147: 60(1991)).

폴리펩티드 변이체를 코딩하는 핵산 분자가 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은 천연 공급원으로부터의 분리(천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오티드-매개된(또는 부위-특이적) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 또는 폴리펩티드의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 카세트 돌연변이유발을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

예를 들어 Fc 수용체 결합을 증진시키기 위하여, 이펙터 기능에 관하여 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 부위에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입하여 달성될 수 있다. 다르게 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)가 Fc 부위에 도입되어, 이 부위에 쇄간 디설파이드 결합 형성을 허용할 수 있다.

항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 항체(특히 항체 단편)로 샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 도입할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체 내 혈청 반감기를 증가시키는 것을 담당하는 IgG 분자(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 부위의 에피토프를 말한다.

본 발명에서는 항체의 다른 변형이 고안된다. 예를 들어 항체는 다양한 비단백질성 폴리머, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다.

B. 복제가능한 벡터로의 핵산의 삽입

이종 핵산(예를 들어 cDNA 또는 게놈 DNA)은 적당한 프로모터의 제어 하에 미생물에서의 발현을 위해 복제가능한 벡터로 적당하게 삽입된다. 많은 벡터가 이 목적을 위해 이용가능하며, 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터로 삽입되는 핵산의 크기와 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 달라진다. 각각의 벡터는 그것이 양립가능한 특정 숙주 세포에 따라 다양한 성분을 함유한다. 특정 유형의 숙주에 따라, 벡터 성분은 일반적으로 하기 중 하나 이상을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 프로모터 및 전사 종결 서열.

일반적으로, 숙주 세포와 양립가능한 종으로부터 유래된 레플리콘과 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 미생물 숙주와 연결되어 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 위치, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마커 서열을 운반한다. 예를 들어 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드, pBR322(예를 들어 Bolivar 등, Gene, 2: 95(1977))를 이용하여 형질전환된다. pBR322는 앰피실린과 테트라사이클린 내성 유전자를 함유하고 따라서 형질전환된 세포를 동정하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322 플라스미드, 또는 다른 세균 플라스미드 또는 파지는 또한 일반적으로 선별 마커 유전자의 발현을 위해 숙주에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나, 함유하도록 변형된다.

(i) 신호 서열 성분

본 발명의 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 직접적으로 뿐만 아니라 다른 폴리펩티드, 바람직하게는 성숙 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 위치를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드와의 융합체로 발현될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 그것은 벡터로 삽입되는 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 가공(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이어야 한다.

원래 또는 진핵세포 폴리펩티드 신호 서열을 인식하고 가공하지 못하는 원핵 숙주 세포를 위해, 신호 서열은 예를 들어 lamB, ompF, 알칼라인 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정 엔테로독소 II 리더로 구성된 그룹으로부터 선택되는 원핵세포 신호 서열로 치환될 수 있다. 효모 분비를 위해 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 알파 인자 리더(사카로마이세스(*Saccharomyces*)와 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*)-인자 리더를 포함, 후자는 미국 특허 제5,010,182호에 기재됨) 또는 산 포스파타제 리더, C. 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더(1990. 4. 4에 공개된 EP 362,179) 또는 1990. 11. 15에 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호일 수 있다.

(ii) 복제 기원 성분

발현 벡터는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제할 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 그러한 서열은 다양한 미생물에 대해 잘 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기원이 이. 콜라이와 같은 대부분의 그램-음성 세균에 적당하다.

(iii) 선별 유전자 성분

발현 벡터는 일반적으로 선별 마커로도 명명되는, 선별 유전자를 함유한다. 이 유전자는 선별 배양 배지에서 성장한 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 선별 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 못할 것이다. 이 선별 마커는 본 발명에 의해 사용되고 정의된 유전적 마커와 별개이다. 전형적인 선별 유전자는 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 앰피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 유전적 마커(들)의 존재에 의해 유발되는 것들 이외의 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 입수가능하지 않은 결정적 영영분을 공급하는 단백질을 코딩하며, 예를 들어 바실러스(*Bacilli*)를 위해 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

선별 계획의 일례는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이 경우, 관심 핵산으로 성공적으로 형질전환된 그들 세포는 약물 내성을 부여하는 폴리펩티드를 생산하고 따라서 선별 섭생에서 살아남는다. 그러한 우성 선별의 예는 약물 네오마이신(Southern 등, J. Molec. APPl. Genet., 1: 327(1982)), 마이코페놀산(Mulligan 등, Science, 209:

1422(1980)) 또는 하이그로마이신(Sugden 등, Mol. Cell. Biol., 5: 410-413(1985))을 이용한다. 위에 주어진 세 예는 진핵세포 제어 하에 각각 적절한 약물 G418 또는 네오마이신(제네티신), xgpt(마이코페놀산) 또는 하이그로마이신에 대한 내성을 운반하는 세균 유전자를 사용한다.

(iv) 프로모터 성분

관심 폴리펩티드를 제조하기 위한 발현 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되는 적당한 프로모터를 함유하고 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된다. 원핵세포 숙주와 사용하기에 적당한 프로모터는 베타-락타마제와 락토스 프로모터 시스템(Chang 등, Nature, 275: 615(1978); Goeddel 등, Nature, 281: 544(1979)), 아라비노스 프로모터 시스템(Guzman 등, J. Bacteriol., 174: 7716-7728(1992)), 알칼라인 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템(Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057(1980) 및 EP 36,776) 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터(deBoer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25(1983))를 포함한다. 그러나, 다른 알려진 세균 프로모터가 적당하다. 그들의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있어, 당업자가 임의의 요구되는 제한 위치를 공급하는 링커 또는 어댑터를 이용하여 그들을 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 라이게이션시킬 수 있도록 한다(Siebenlist 등, Cell, 20: 269(1980)).

세균 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 일반적으로 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno)(S. D.) 서열을 함유한다. 프로모터는 제한 효소 분해에 의해 세균 공급원 DNA로부터 제거되고 원하는 DNA를 함유하는 벡터에 삽입될 수 있다.

효모에서 사용하기에 적당한 프로모터는 당업계에 잘 알려져 있다. 효모와 사용하기 위한 적당한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제(Hitzeman 등, J. Biol. Chem., 255: 2073(1980)) 또는 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글로코키나제와 같은, 다른 해당 효소(Hess 등, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149(1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900(1978))의 프로모터를 포함한다.

성장 조건에 의해 제어되는 전사의 부가적인 장점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데하이드로게나제 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 및 말토스와 갈락토스 이용을 담당하는 효소의 프로모터 부위이다. 효모 발현에서 사용하기 위한 적당한 벡터와 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다.

(v) 벡터의 제작 및 분석

상기 성분의 하나 이상을 함유하는 적당한 벡터의 제작은 표준 라이게이션 기술을 사용한다. 분리된 플라스미드 또는 DNA 단편은 절단되고, 재단되고, 요구되는 플라스미드를 생성하기 위해 원해지는 형태로 재라이게이션된다.

제작된 플라스미드에서 정확한 서열을 확인하는 분석을 위해, 라이게이션 혼합물을 이. 콜라이 K12 균주 294(ATCC 31,446) 또는 다른 균주를 형질전환하는데 사용하고 성공적인 형질전환체는 적절한 경우 앰피실린 또는 테트라사이클린 내성에 의해 선별된다. 형질전환체로부터의 플라스미드가 제조되고, 제한 엔도뉴클라제 분해에 의해 분석되고(되거나), Sanger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 5463-5467(1977) 또는 Messing 등, Nucleic Acids Res., 9: 309(1981)의 방법, 또는 Maxam 등, Methods in Enzymology, 65: 499(1980)의 방법에 의해 서열분석된다.

C. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

본 발명에서 벡터의 DNA를 클로닝하거나 발현하는데 적당한 숙주 세포는 원핵세포와 효모를 포함하는 진균 세포를 포함하는, 임의의 미생물 세포이다. 이 목적에 적당한 원핵생물은 위 정의된 바와 같은 세균, 바람직하게는 그램-음성 또는 그램-양성 유기체와 같은, 진정세균을 포함한다. 예는 에스케리키아, 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터, 어르위니아, 크렙시엘라, 살모넬라, 예를 들어 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아, 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라, 및 B. 서브틸리스(*B. subtilis*)와 B. 리케니포르미스(*B. licheniformis*)(예를 들어 1989. 4. 12에 공개된 DD 266,710에 개시된 B. 리케니포르미스 41P)와 같은 바실러스, P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)와 같은 슈도모나스와 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776(ATCC 31,537)와 이. 콜라이 W3110(ATCC 27,325)과 같은 다른 균주가 적당하지만, 하나의 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294(ATCC 31,446)이다. 이들 예는 제한적이기 보다 설명적이다. 상기한 균주 중 임의의 것의 돌연변이 세포 또한 나중에 본 발명에서 요구되는 적어도 최소의 유전형을 함유하기 위해 추가로 돌연변이되는 출발 숙주로서 사용될 수 있다.

이. 콜라이 균주 W3110이 재조합 DNA 산물 발효를 위한 통상적인 숙주 균주이므로 바람직한 친 이. 콜라이 숙주이다. 친 숙주로 사용되는 출발 이. 콜라이 숙주의 예는, 그들의 유전형과 함께, 아래 표에 포함되어 있다:

균주	유전형
W3110	K-12 F⁻ lambda⁻ *IN(rrnD-rrnE)1*
1A2	W3110 *ΔfhuA*
9E4	W3110 *ΔfhuA ptr3*
27A7	W3110 *ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169*
27C6	W3110 *ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ΔompT*
27C7	W3110 *ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ΔompT degP41*::kan^R
33D3	W3110 *ΔfhuA ptr3 lacIq lacL8 ΔompT degP41*:: kan^R
36F8	W3110 *ΔfhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ptr3 degP41*:: kan^R *ilvG2096*
41H1	W3110 *ΔfhuA phoS* (T104) Δ(argF-lac)169 degP41*:: kan^R *ptr3 ilvG2096(Val^r)*
43D3	W3110 *ΔfhuA ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ΔompT degP41* kan^R *ilvG2096*
43H1	W3110 *ΔfhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac) 169 degP41ilvG2096(Val^r) ptr3 ΔompT prc::kan^R sprW148R*
43E7	W3110 *ΔfhuA Δ(argF-lac)169 ΔompT ptr3 phoAΔE15 degP41ilvG2096*
44D6	W3110 *ΔfhuA ptr3 Δ(argF-lac)169 degP41*:: kan^R *ΔompT ilvG2096*
45F8	W3110 *ΔfhuA ptr3 Δ(argF-lac)169 degP41 ΔompT phoS* (T10Y) ilvG2096*
45F9	W3110 *ΔfhuA ptr3 Δ(argF-lac)169 degP41 ΔompT ilvG2096 phoS* (T10Y) Δcyo::kan^R*
49A5	W3110 *ΔfhuA phoA ΔE15Δ(argF-lac)169 deoC2 degP41 ilvG2096 (Val^r) ΔfucP ΔmalE*
58B3	W3110 *ΔfhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC degP41 ilvG2096(Val^r) Δprc*
58H2	W3110 *ΔfhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41ilvG2096(Val^r) ptr3 ΔompT sprW148R*
58H7	W3110 *ΔfhuA (ΔtonA) Δ ptr3 ΔompT ΔdegP lac Iq ΔlacY*
59A7	W3110 *ΔfhuA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC degP41 ilvG2096(Val^r) Δprc sprW148R*
60H4	W3110 *ΔfhuAΔmanA phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC2 degP41 ilvG2096(Val^r) Δprc prc-suppressor*
61D6	W3110 *ΔfhuA ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41*
62A7	W3110 *ΔfhuA ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 ilvG2096*

균주 36F8을 제조하는데 중간체, 즉 27B4(미국 특허 제5,304,472호) 및 35E7(27B4 보다 더 잘 자라는 자발적 온도-내성 콜로니 분리물)이 또한 적당하다. 부가적인 적당한 균주는 1990. 8. 7에 등록된 미국 특허 제4,946,783호에 개시된 돌연변이 주변세포질 프로테아제(들)를 갖는 이. 콜라이 균주이다.

위 균주는 친 균주의 염색체 통합 또는 아래 실시예에 기재된 것들을 포함하는, 다른 기술에 의해 제조될 수 있다.

전장 항체가 2002. 8. 8에 공개된 WO 02/061090의 교시에 따라 이. 콜라이에서 제조될 수 있다.

원핵생물에 더하여, 필라멘트상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 폴리펩티드-코딩 벡터를 위한 적당한 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)가 통상적으로 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 것은 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach 및 Nurse, Nature, 290: 140(1981); 1985. 5. 2에 공개된 EP 139,383); 예를 들어 K. 락티스(*K. lactis*)(MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt 등, J. Bacteriol., 737(1983)), K. 프래질리스(*K. flagilis*)(ATCC 12,424), K. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), K. 위커라미(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178), K. 왈티(*K. waltii*)(ATCC 56,500), K. 드로소필라럼(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906; Van den Berg 등, Bio/Technology, 8: 135(1990)), K. 써모톨러란스(*K. thermotolerans*) 및 K. 마릭시아누스(*K. marxianus*)와 같은 클루이베로마이세스 숙주(미국 특허 제4,943,529호; Fleer 등, Bio/Technology, 9: 968-975(1991)); 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070; Sreekrishna 등, J. Basic Microbiol., 28: 265-278(1988)); 칸디다; 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)(Case 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263(1979)); 스완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*)와 같은 스완니오마이세스(1990. 10. 31에 공개된 EP 394,538); 및 예를 들어 뉴로스포라, 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*)(1991. 1. 10에 공개된 WO 91/00357)과 같은 필라멘트상 진균, 및 A. 니듈란스(*A. nidulans*)(Ballance 등, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289(1983); Tilburn 등, Gene, 26: 205-221(1983); Yelton 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474(1984)) 및 A. 나이거

(*A. niger*)(Kelly 및 Hynes, EMBO J., 4: 475-479(1985))와 같은 아스퍼질러스 숙주를 포함한다. 본 발명에는 메탄올 자화 효모가 적당하고 한세눌라(*Hansenula*), 칸디다, 클로에케라(*Kloeckera*), 피치아, 사카로마이세스, 토루롭시스(*Torulopsis*) 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)로 구성된 속으로부터 선택되는 메탄올 상에서 성장할 수 있는 효모를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이 클래스의 효모의 예시인 구체적 종의 목록은 C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269(1982)에서 발견될 수 있다.

폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 숙주 세포로 삽입된다. 바람직하게는, 이것은 숙주 세포를 상기한 발현 벡터로 형질전환하고 다양한 프로모터 유도에 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양하여 수행된다.

사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그러한 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 행해진다. Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)의 섹션 1.82에 기재되어 있는 바와 같이, 염화칼슘을 이용하는 칼슘 처리가 일반적으로 원핵 세포 또는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 다른 세포에 사용된다. 다른 형질전환 방법은 Chung 및 Miller, Nucleic Acids Res., 16: 3580(1988)에 기재되어 있는 바와 같이, 폴리에틸렌글리콜/DMSO를 사용한다. 효모로의 형질전환은 전형적으로 Van Solingen 등, J. Bact., 130: 946(1977) 및 Hsiao 등, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 76: 3829(1979)의 방법에 따라 수행된다. 그러나, DNA를 세포로 도입하는 다른 방법, 예를 들어 핵 미세주입, 전기천공, 무손상 세포와 세균 원형질 융합, 폴리양이온, 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴에 의한 것과 같은 방법이 또한 사용될 수 있다.

D. 숙주 세포 배양

본 발명의 폴리펩티드를 제조하는데 사용되는 원핵 세포는 상기 Sambrook 등에 의해 일반적으로 기재된 배지를 포함하는, 당업계에 알려지고 선택된 숙주 세포의 배양에 적당한 배지에서 성장된다. 세균에 적당한 배지는 AP5 배지, 영양 브로쓰, 루리아-베르타니(LB) 브로쓰, 나이다르츠(Neidhardt's) 최소 배지, 및 C.R.A.P. 최소 또는 완전 배지와, 필요한 영양분 보충물을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선별적으로 허용하는, 발현 벡터의 제작에 기초하여 선택되는, 선별제를 함유한다. 예를 들어 앰피실린이 앰피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위한 배지에 첨가된다. 탄소, 질소 및 무기 인산염 원 이외의 임의의 필요한 보충성분이 또한 단독으로 또는 복합 질소원과 같은 다른 보충성분 또는 배지와의 혼합물로 도입되는 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오트레이톨로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

적당한 배지의 예는 미국 특허 제5,304,472호 및 제5,342,763호에 주어져 있다. C.R.A.P. 인산염-제한 배지는 872 ㎖까지의 적량의 SQ H_20를 갖고 오토클레이브되고; 55℃로 냉각되고 110 ㎖ 1 M MOPS pH 7.3, 11 ㎖ 50% 글루코스, 7 ㎖ 1 M $MgS0_4$로 보충되는, KOH로 pH가 7.3으로 조정된, 3.57 g $(NH_4)_2(SO_4)$, 0.71 g Na시트레이트-$2H_20$, 1.07 g KCl, 5.36 g 효모 추출물(인증된), 5.36 g 하이케이스SF™-쉐필드(HycaseSF™-Sheffield)로 구성된다. 그 후 카르베니실린이 유도 배양물에 50 ㎍/㎖의 농도로 첨가될 수 있다.

원핵 숙주 세포는 적당한 온도에서 배양된다. 이. 콜라이 성장을 위해, 예를 들어 바람직한 온도는 약 20℃ 내지 약 39℃, 더 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃ 범위이고, 더욱 더 바람직하게는 약 30℃이다.

알칼라인 포스파타제 프로모터가 사용되는 경우, 본 발명의 관심 폴리펩티드를 생산하는데 사용되는 이. 콜라이 세포는 알칼라인 포스파타제 프로모터가 예를 들어 상기 Sambrook 등에 일반적으로 기재된 바와 같이 부분적으로 또는 완전하게 유도될 수 있는 적당한 배지에서 배양된다. 배양 필요성은 무기 인산염의 부재 또는 인산염 기아 수준에서 결코 일어나지 않는다. 처음에, 배지는 단백질 합성의 유도 수준 초과 및 세균 성장에 충분한 양으로 무기 인산염을 함유한다. 세포가 성장하고 인산염을 이용함에 따라, 그들은 배지 중의 인산염 수준을 감소시켜, 폴리펩티드의 합성 유도를 유발한다.

프로모터가 유도성 프로모터이면, 유도가 일어나기 위해, 전형적으로 세포는 관심 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하기 위하여, 유도가 시작되는(예를 들어 유도제의 첨가에 의해, 배지 성분의 결핍에 의해 등) 시점에서, 임의의 광학밀도, 예를 들어 고 세포 밀도 방법을 이용하여 약 200의 A_{550}이 달성될 때까지 배양된다.

임의의 필요한 보충성분이 또한 당업자에게 알려진 적절한 농도로 포함되고, 단독으로 또는 복합 질소원과 같은 다른 보충성분 또는 배지와의 혼합물로서 도입될 수 있다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 9의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우에는 pH가 약 6.8 내지 약 7.4인 것이 바람직하고, 약 7.0인 것이 더욱 바람직하다.

효모를 배양하기 위해 사용될 수 있는 하나의 선별 배지는 Kaiser 등, Methods in Yeast Genetics(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994), 208-210면에 기재된 바와 같이 제조되는 우라실 결여 합성 완전 덱스트로스 아가(SCD-Ura)이다.

E. 발현 검출

유전자 발현은 직접 샘플에서, 폴리펩티드의 서열에 기초하여, 적절하게 표지된 프로브를 이용하여, 예를 들어 통상적인 서던 블럿팅, mRNA의 전사를 정량화하는 노던 블럿팅(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205(1980)), 도트 블럿팅(DNA 분석) 또는 계내 혼성화에 의해 측정될 수 있다. 다양한 표지, 가장 통상적으로 방사성동위원소, 특히 ^{32}P가 사용될 수 있다. 그러나, 폴리펩티드로의 도입을 위해 바이오틴-수식된 뉴클레오티드를 사용하는 것과 같은, 다른 기술도 사용될 수 있다. 그 후 바이오틴은 아비딘 또는 방사성핵종, 형광, 효소 등과 같은, 광범위하게 다양한 표지로 표지될 수 있는, 항체에 대한 결합 위치 역할을 한다. 다르게는, 검정법 또는 겔이 단백질 검출을 위해 사용될 수 있다.

F. 폴리펩티드의 정제

재조합 기술을 이용할 때, 본 발명의 폴리펩티드는 세포내 또는 주변세포질 공간에서 생산된다. 폴리펩티드가 세포내에서 생산되면, 제1 단계로서 입자화된 잔해, 숙주 세포 또는 용균 세포(예를 들어 균질화로부터 기인하는)를 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거하여 세포 브로쓰 또는 균질화액을 제조한다.

그 후, 본 발명에 따라, 위에서 정의된 바와 같은 세포성 불순물이 상기한 바와 같은 조건하에서 에타크리딘 락테이트를 사용하는 침전에 의해 균질화액 또는 브로쓰로부터 제거되고, 생성된 혼합물은 가용성 형태의 관심 폴리펩티드가 회수되도록 처리된다.

브로쓰 또는 균질화액으로부터 표적 폴리펩티드의 분리는, 원심분리 및 여과와 같이 당업계에 공지된 수단 등을 비롯한 임의의 적당한 수단으로 달성될 수 있다. 분리는 원심분리 또는 예를 들어 1 미크론까지 약 300 킬로달톤의 필터를 이용하는 접선 흐름 여과(tangential flow filtration)를 사용하여 수행하는 것이 바람직하다.

브로쓰 또는 균질화액으로부터 폴리펩티드를 분리한 후에는 크로마토그래피 또는 한외여과/투석여과 또는 접선 흐름 여과와 같은 여과 등을 비롯한 임의의 공지된 수단으로 정제할 수 있다. 특히, 하기하는 절차가 적당한 정제 과정의 예이며 이들을 개별적으로 또는 조합하여 이용할 수 있고, 사용되는 구체적 방법(들)은 폴리펩티드의 유형에 따라 달라진다: 고정화된 금속 친화도 크로마토그래피(IMAC), 수성 2-상 분리(ATPS), 면역친화성 또는 이온-교환 컬럼 상의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 소수성-상호작용 크로마토그래피(HIC); 실리카 상의 크로마토그래피; S-세파로스(SEPHAROSE)™와 DEAE와 같은 이온-교환 수지 상에서의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 한외여과/투석여과, 접선 흐름 여과, 예를 들어 세파덱스(SEPHADEX)™ G-75를 이용하는 겔 여과에 따라 달라진다.

예를 들어 단백질의 전체 회수 과정의 일부로서, 폴리펩티드는 폴리펩티드에 결합하거나 변형하는 고정화된 시약에 노출될 수 있다. 따라서, 폴리펩티드는 항체와 같은, 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 고정화된 시약이 항체를 포획하고 불순물은 친화성 크로마토그래피 컬럼을 통과하는, 친화성 크로마토그래피에 가해질 수 있다. 폴리펩티드는 이어서 폴리펩티드가 더 이상 고정화된 시약에 결합하지 않도록 조건을 변화시켜 컬럼으로부터 용출될 수 있다. 고정화된 시약은 또한 폴리펩티드를 변형하는 프로테아제와 같은 효소일 수 있다(Sahni 등, Anal. Biochem., 193: 178-185(1991) 및 Voyksner 등, Anal. Biochem., 188: 72-81(1990)).

다른 유형의 정제 방법은 여과이다. 유체로부터 정교한 입자 크기의 오염물의 여과는 필터가 오염물을 보유하도록 오염된 조성물이 통과되는 다양한 다공성 필터를 사용하여 수행되어왔다. 오염물의 보유는 기계적 여과(straining) 또는 전기역학적 입자 포획 또는 흡착에 의해 발생할 수 있다. 기계적 여과에서, 입자는 그것이 그 자신 보다 더 작은 공극을 통과하는 것을 시도할 때 물리적 봉입에 의해 보유된다. 전기역학적 포획 기작의 경우, 입자는 다공성 필터 내의 표면과 충돌하고 단-범위 인력에 의해 표면 상에 보유된다. 전기역학적 포획을 달성하기 위해, 전하-변형 시스템이 필터의 표면 전하 특성을 변화시키는데 사용될 수 있다(예를 들어 WO 90/11814 참조). 예를 들어 제거되는 오염물이 음이온인 경우에는 양이온 전하 변형제를 사용하여 필터의 전하 특성을 변화시켜, 오염물이 필터에 의해 보유되도록 할 수 있다.

모노클로날 항체는 예를 들어 겔 여과 또는 전기영동, 투석, HIC, 친화성 크로마토그래피, 예를 들어 단백질-A 세파로스™, 단백질-G, 항원-친화성 또는 항-IgG 친화성 크로마토그래피, 균질화, 원심분리의 여과에 의한 정화, 예를 들어 황산암

모늄, 폴리에틸렌글리콜 또는 카프릴산 처리에 의한, 침전, 예를 들어 히드록시아파타이트와 같은 수지, 예를 들어 세라믹-히드록시아파타이트와 바이오겔(BIOGEL) HT™와 같은 인산칼슘 함유 수지, 디에틸아미노에탄(DEAE), 폴리에틸렌이민(PEI), 및 4급 아미노에탄(QAE)과 같은, 양으로 하전된 부위(중성 pH에서)를 갖는 것들을 포함하는 음이온-교환 수지, 예를 들어 Q-세파로스 패스트 플로우(Q-SEPHAROSE FAST FLOW)™ 수지(파마시아), DEAE-세파로스 패스트 플로우™ 수지, DEAE-토요펄(DEAE-TOYOPEARL)™ 수지, QAE-토요펄™ 수지, 포로스-Q(POROS-Q)™ 수지, 프랙토겔-DMAE(FRACTOGEL-DMAE)™ 수지, 프랙토겔 EMD-TMAE™ 수지, 매트렉스 셀루파인 DEAE(METREX CELLUFINE DEAE)™ 등을 이용하는, 이온-교환 크로마토그래피와 같은 통상적인 항체 정제 과정에 의해 침전물로부터 적당하게 분리될 수 있다. 항체를 분리하고 정제하는 방법은 Antibodies: A Laboratory Manual; Harlow 및 Lane, eds.(Cold Spring Harbor Laboratories, New York: 1988)에 추가로 기재되어 있다.

하나의 구체적인 실시양태에서, 회수 단계는 가용화된 폴리펩티드를 폴리펩티드와 결합하거나 그를 변형시키는 시약이 고정된 고상에 노출시키는 것을 포함한다. 일 실시양태에서, 고상은 컬럼에 채워지고 고정화된 시약은 폴리펩티드를 포획한다. 다른 실시양태에서, 시약은 폴리펩티드를 화학적 및(또는) 물리적으로 변형시키고 예를 들어 컬럼에 채워지는 고상에 고정화되고 조성물은 컬럼을 통과한다. 예를 들어 폴리펩티드는 회수 과정의 일부로서 고정화된 시약이 제거하는 전구체 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어 전구체 폴리펩티드는 회수 과정에서 고정화된 펩신에 의해 제거되는, 류신 지퍼 다이머화 영역을 갖는 항체이다.

이 실시양태에서, 폴리펩티드와 여과된 시약(및 임의로 하나 이상의 추가 오염물)을 포함하는 조성물은 그 후 조성물로부터 여과된 시약을 제거하도록, 조성물의 pH에서 시약의 전하와 반대되는 전하를 갖는 필터를 통해 통과된다. 필터는 산성 프로테아제, 단백질 A, 단백질 G 또는 친화성 컬럼으로부터 여과될 수 있는 다른 시약과 같은, 조성물의 pH에서 음으로 하전된 오염물을 제거하기 위해 양으로 하전될 수 있다. 다르게는, 필터는 염기성 프로테아제와 같은, 조성물의 pH에서 양으로 하전된 오염물을 제거하기 위하여 음으로 하전될 수 있다. 바람직하게는, 필터를 통해 통과된 조성물 중 관심 있는 폴리펩티드의 전하 특성은 폴리펩티드가 필터에 의해 유의하게 보유되지 않고 그를 통해 통과하도록 하는 것이다. 필터는 이전 단계에서와 같이 처리된 용출제와 "인 라인"으로 위치될 수 있다(즉, 용출제는 필터를 통해 직접 흐름). 이것은 용출제가 풀 탱크에 모아지기 전에, 필터를 직접 컬럼 용출제 포트에 연결하여 달성될 수 있다. 필터는 사용된 필터의 유형에 적용가능한 기술을 이용하여 재생될 수 있다.

HIC는 또한 항체 단편 정제에 사용되어 왔다. 예를 들어 Inouye 등, Protein Engineering, 6, 8 및 1018-1019면(1993); Inouye 등, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, 5: 609-61(1993); Inouye 등, Journal of Biochemical 및 Biophysical Methods, 26: 27-39(1993); Morimoto 등, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117(1992); 및 Rea 등, Journal of Cell. Biochem., Suppl. 0, 초록 번호 X1-206(17 파트 A), 50면(1993)을 참조한다. HIC 컬럼은 정상적으로 소수성 리간드(예를 들어 알킬 또는 아릴 그룹)가 커플링된 기제 매트릭스(예를 들어 가교결합된 아가로스 또는 합성 공중합체 물질)를 포함한다. 많은 HIC 컬럼이 상업적으로 입수가능하다. 예는 저 또는 고 치환도의 페닐 세파로스 6 패스트 플로우™ 컬럼(파마시아 LKB 바이오테크놀로지, AB, 스웨덴); 페닐 세파로스™ 고성능 컬럼(파마시아 LKB 바이오테크놀로지, AB, 스웨덴); 옥틸 세파로스™ 고성능 컬럼(파마시아 LKB 바이오테크놀로지, AB, 스웨덴); 프랙토겔™ EMD 프로필 또는 프랙토겔™ EMD 페닐 컬럼(E. 머크, 독일); 매크로-프렙(MACRO-PREP)™ 메틸 또는 매크로-프렙 t-부틸 지지체(바이오-래드, 캘리포니아); WP HI-프로필(C3)™ 컬럼(J. T. 베이커, 뉴저지); 및 토요펄™ 에테르, 페닐 또는 부틸 컬럼(토소하스, PA)을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

배치 소수성 크로마토그래피 매트릭스의 예는 당업계에 잘 알려져 있고 세파로스™, 아가로스 또는 실리카, 예를 들어 부틸, 페닐 또는 옥틸 세파로스™, 또는 셀룰로스 또는 폴리스티렌과 같은 폴리머와 같은 지지 매트릭스에 결합된 C_{18} 알킬쇄를 포함한다. 미국 특허 제6,214,984호는 항체와 항체 단편 정제를 위해 저-pH 소수성 상호작용 크로마토그래피(LPHIC)의 사용을 기재하고 있다. 이 방법은 항체 단편, 특히 정확하게 폴딩되지 않고(않거나) 디설파이드 결합되지 않은 오염 항체 단편으로부터 정확하게 폴딩되어 디설파이드 결합된 항체 단편(예를 들어 Fab 단편)을 정제하기 위해 특히 유용하다. LPHIC 전에, 세포로부터 제조된 항체 조성물은 바람직하게는 예가 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 포함하는 적어도 하나의 정제 단계에 가해진다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 종과 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 영역의 이소타입에 따라 달라진다. 단백질 A는 임의의 인간 중쇄에 기초한 항체를 정제하는데 사용될 수 있다(Lindmark 등, J. Immunol. Meth., 62: 1-13(1983)). 단백질 G가 모든 마우스 이소타입과 하나의 인간 이소타입을 위해 권장된다(Guss 등, EMBO J., 5: 1567-1575(1986)). 친화성 리간드가 부착된 매트릭스는 가장 흔히는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스가 아가로스로 얻어지는 것 보다 더 빠른 유속과 더 짧은 가공시간을 허용한다. 항체가 CH3 영역을 포함할 때, 베이커본드(BAKERBOND) ABX™ 수지(J. T. 베이커, 필립스버그, N. J.)가 정제에 유용하다.

이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상의 크로마토그래피, 음이온- 또는 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피(폴리아스파르트산 컬럼과 같은), 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전과 같은 단백질 정제를 위한 다른 기술 또한 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다.

G. 폴리펩티드의 용도

그렇게 회수된 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 담체에서 제제화될 수 있고 다양한 진단, 치료 또는 그러한 분자에 대해 알려진 다른 용도에 사용된다. 예를 들어 본원에 기재된 항체는 효소 면역검정법과 같은 면역검정법에 사용될 수 있다.

본원에 기재된 방법을 이용하여 정제된 폴리펩티드의 치료 용도 또한 고안된다. 예를 들어 성장 인자 또는 호르몬은 원하는 바와 같이 성장을 증진시키는데 사용될 수 있고, 항체는 혈괴에 혈전용해제를 전달하거나, 종양 세포에 면역독소를 전달하거나, 효소 활성화되는 프로드럭을 표적 위치(예를 들어 종양)에서 전환시키거나, 감염성 질환을 치료하거나, 세포 표면 수용체에 면역 복합체를 표적화하기 위해, 백신 애쥬번트로서, 재지향된 세포독성(예를 들어 종양 세포를 죽이기 위해)을 위해 사용될 수 있다.

폴리펩티드의 치료 제제는 동결건조된 케익 또는 수용액 형태로, 원하는 정도의 순도를 갖는 폴리펩티드를 임의의 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16판, Osol, A., Ed.(1980))와 혼합하여 저장을 위해 제조된다.

허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 용량과 농도에서 수혜자에게 비독성이며, 인산염, 시트르산염 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 포함하는 항산화제; 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은, 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 만니톨 또는 솔비톨과 같은 당 알콜; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 및(또는) 트윈(TWEEN)™, 플루로닉(PLURONIC)™ 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

폴리펩티드는 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼 중에서, 예를 들어 코아세르베이트화 기술 또는 경계면 중합(예를 들어 각각, 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트)마이크로캡슐)에 의해, 제조된 마이크로캡슐에 봉입될 수 있다. 그러한 기술은 상기 Remington's Pharmaceutical Sciences에 개시되어 있다.

생체 내 투여를 위해 사용되는 폴리펩티드는 멸균되어야만 한다. 이것은 동결건조와 재구성 전 또는 후에 멸균 여과 막을 통해 여과하여 쉽게 달성된다. 항체는 통상적으로 동결건조 형태 또는 용액으로 저장될 것이다.

치료 폴리펩티드 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 구멍을 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 위치된다.

폴리펩티드 투여의 경로는 공지의 방법, 예를 들어 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내 또는 병변내 경로에 의하거나, 아래 기재되는 바와 같은 서방성 시스템에 의해, 주사 또는 주입에 따른다. 폴리펩티드는 주입 또는 볼루스 주사에 의해 연속적으로 투여된다.

서방성 제제의 적당한 예는 매트릭스가 성형된 물품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태인, 폴리펩티드를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어 Langer 등, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277(1981) 및 Langer, Chem. Tech., 12: 98-105(1982)에 의해 기재된 바와 같은 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락타이드(미국 특허 제3,773,919호, EP 58,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman 등, Biopolymers, 22: 547-556(1983)), 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트(상기 Langer 등), 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™(락트산-글리콜산 공중합체와 루프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로스피어)와 같은 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산(EP 133,988)을 포함한다.

에틸렌-비닐 아세테이트와 락트산-글리콜산과 같은 폴리머가 100 일 이상 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 임의의 히드로겔은 더 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 예를 들어 캡슐화된 항체가 체내에 장시간 남아있을 때, 그들은 37℃에서 수분에 노출된 결과 변성하거나 응집하여, 생물학적 활성의 상실과 가능한 면역원성 변화를 일으킬 수 있다. 합리적인

전략이 관여하는 기작에 따라 항체 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예를 들어 응집 기작이 티오-디설파이드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는 설프하이드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결건조하고, 수분 함량을 제어하고, 적절한 첨가제를 사용하고, 특정 폴리머 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성될 수 있다.

서방성 폴리펩티드 조성물은 또한 리포좀에 봉입된 폴리펩티드를 포함한다. 항체를 함유하는 리포좀은 그 자체로 알려진 방법에 의해 제조된다: DE 3,218,121; Epstein 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692(1985); Hwang 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 일본특허출원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제544,545호; 및 EP 102,324. 통상적으로 리포좀은 지질 함량이 약 30몰% 콜레스테롤 보다 큰, 작은(약 200-800 옹스트롬) 유니라멜라 타입이며, 선택되는 비율은 폴리펩티드로의 가장 효과적인 치료를 위해 조정된다.

치료적으로 사용되는 폴리펩티드의 유효량은 예를 들어 치료 목적, 투여경로 및 환자의 상태에 따라 달라질 것이다. 따라서, 가장 유익한 치료 효과를 얻기 위하여 요구되는대로 치료사가 용량을 적정하고 투여 경로를 변형하는 것이 필요할 것이다. 전형적인 1일 용량은 상기한 인자에 따라 달라지며, 약 1 ㎍/kg 내지 10 ㎎/kg 이하 또는 그 이상 범위일 수 있다. 전형적으로, 임상의는 원하는 효과를 달성하는 용량에 도달할 때까지 폴리펩티드를 투여할 것이다. 이 치료법의 진행은 통상적인 검정법으로 쉽게 모니터링된다.

본 발명은 아래 실시예를 참조로 하여 보다 완전히 이해될 것이다. 그러나, 그들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에서의 모든 문헌과 특허 인용물은 참조에 의해 도입된다.

실시예

실시예 1

재료 및 방법

A. 플라스미드, 형질전환, 발효

1. rhuFab'2(xCD18)의 생산

a. 플라스미드 제작

대조 플라스미드, pS1130을 항-CD18 $F(ab')_2$의 이시스트론(dicistronic) 발현을 위해 설계하였고 그것은 Carter 등, Bio/Technology, 10: 163-167(1992)에 의해 기재된 벡터에 기초하였다. 이 설계는 C-말단 류신 지퍼를 갖는 경쇄와 중쇄 단편 둘 다의 유전자의 전사를 단일 phoA 프로모터의 제어 하에 위치시킨다. 중쇄-류신 지퍼의 코딩 서열 하류에 위치한 λ_{t0} 전사 종결자로 전사를 끝낸다(Scholtissek 및 Grosse, Nucleic Acids Res., 15(7): 3185(1987)). 열 안정성 엔테로독소 Ⅱ 신호 서열(STⅡ)이 각 쇄의 코딩 서열 앞에 위치하며 주변세포질로 폴리펩티드의 분비를 지시한다(Lee 등, Infect. Immun., 42: 264-268(1983); Picken 등, Infect. Immun., 42: 269-275(1983)). 류신 지퍼는 중쇄 단편의 C-말단 끝에 부착되어 두 Fab' 암의 다이머화를 촉진하였다.

두 분리된 번역 단위, pxCD18-7T3를 함유하는 이중-프로모터 플라스미드는 일시적으로 중쇄의 전사로부터 경쇄의 전사를 분리시킨다. pS1130에서와 같이, 경쇄는 phoA 프로모터의 제어 하에 남아있다. 그러나, pxCD18-7T3에서, λ_{t0} 전사 종결자가 경쇄 코딩 서열 다음에 온다. 이 종결자의 하류에, tacⅡ 프로모터가 첨가되어 중쇄 단편/C-말단 류신 지퍼의 전사를 제어하였다(DeBoer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25(1983)). 제2 λ_{t0} 전사 종결자가 이 코딩 서열 다음에 온다. STⅡ 신호 서열의 침묵 코돈 변이체를 두 쇄의 분비를 지시하기 위해 사용하였다(Simmons 및 Yansura, Nature Biotechnology, 14: 629-634(1996)).

단일 프로모터 제어 플라스미드 대 이중-프로모터 플라스미드의 도식적 비교가 도 1에 도시되어 있다. pxCD18-7T3의 발현 카세트 서열이 도 2에 제공되어 있고(서열번호 1), 두 번역 단위로부터의 아미노산 서열(서열번호 2 및 3)이 도 3A(경쇄)와 3B(중쇄)에 각각 나타내어져 있다.

b. 발효

발효에 사용된 숙주 균주는 59A7로 명명된, 이. 콜라이 W3110의 유도체였다. 완전한 유전형은 W3110 *ΔfhuA phoA ΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC degP41 ilvG2096 (Val^r) Δprc spr*W148R이다. 59A7 숙주 세포를 pxCD18-7T3 플라스미드로 형질전환시키고 성공적인 형질전환체를 선별하고 배양물에서 성장시켰다. 부가적인 플라스미드, pMS421을 pxCD18-7T3와 함께 공동-형질전환시켰다. 이 부가적인 플라스미드, pMS421은 tacⅡ 프로모터의 제어를 향상시키고, 또한 스펙티노마이신 및 스트렙토마이신 내성을 부여하는 lacIq를 제공하는 pSC101-기초 플라스미드이다.

각각 10-리터 발효를 위해, 10-15% DMSO에 1.5 ㎖의 배양물을 함유하는 단일 바이알을 0.5 ㎖의 테트라사이클린 용액(5 ㎎/㎖)과 2.5 ㎖의 1 M 인산나트륨 용액으로 보충된 500 ㎖의 LB 배지를 함유하는 1-ℓ 진탕 플라스크로 해동시켰다. 이 종자 배양물을 약 16 시간 동안 30℃에서 성장시킨 후 10-ℓ 발효조를 접종하는데 사용하였다.

발효조를 처음에 약 4.4 g의 글루코스, 100 ㎖의 1 M 황산마그네슘, 10 ㎖의 미량원소 용액(1 ℓ의 최종 부피 중에 100 ㎖ 염산, 27 g 염화제2철 6수화물, 8 g 황산아연 7수화물, 7 g 염화코발트 6수화물, 7 g 몰리브덴산나트륨 2수화물, 8 g 황산구리 5수화물, 2 g 붕산, 5 g 황산망간 1수화물), 20 ㎖의 테트라사이클린 용액(에탄올 중 5 ㎎/㎖), 10 ㎖의 퍼맥스(FERMAX) 애쥬번트 27™(또는 임의의 균등한 소포제), 1 백의 HCD 염(37.5 g 황산암모늄, 19.5 g의 제2인산칼륨, 9.75 g의 제1인산나트륨 2수화물, 7.5 g의 시트르산나트륨 2수화물, 11.3 g의 제1인산칼륨), 및 200 g의 NZ 아민 A(단백질 가수분해물)를 함유하는, 약 6.5 리터의 배지로 시작하였다. 발효를 30℃에서 10 slpm의 기류에서 수행하고 pH 7.0±0.2에서 제어되었다(비록 이 범위를 벗어나는 때때로의 탈선이 일부 경우 발생하였지만). 발효조의 배압과 교반속도를 변화시켜 발효조에서 산소 전달 속도를 조작하였고, 결과적으로, 세포 호흡 속도를 제어하였다.

진탕 플라스크로부터의 세포-함유 배지로 발효조를 접종한 후, 발효조로 농축 글루코스 용액을 공급하는 컴퓨터-기초된 알고리즘을 이용하여 배양물을 발효조에서 높은 세포 밀도로 성장시켰다. 수산화알루미늄(58% 용액)과 황산(24% 용액)을 또한 pH를 제어하기 위하여 필요한대로 발효조로 공급하였다. 소포제의 추가 첨가가 또한 거품발생을 제어하기 위하여 일부 경우 사용되었다. 배양물이 약 40 OD_{550}의 세포 밀도에 도달하였을 때, 부가적인 100 ㎖의 1 M 황산마그네슘을 발효조에 가하였다. 부가적으로, 발효조로의 농축 염 공급(1 ℓ의 물에 약 10 g의 황산암모늄, 26 g의 제2인산칼륨, 13 g 제1인산칼륨 2수화물, 2 g의 시트르산나트륨 2수화물 및 15 g의 제1인산칼륨으로 구성된)을 배양물이 약 20 OD_{550}에 도달하였을 때 2.5 ㎖/분의 속도로 시작하고 약 1250 ㎖가 발효에 첨가될 때까지 계속하였다. 발효를 전형적으로 72-80 시간 동안 계속하였다.

발효 중, 일단 발효를 위한 용존 산소 셋포인트에 도달하면, 셋포인트에서 용존 산소 농도를 제어하기 위하여 농축된 글루코스 용액을 용존 산소 프로브 신호에 기초하여 공급하였다. 결과적으로, 이 제어 계획에서, 발효에서 산소 전달 용량에 영향을 미치는, 교반 속도 또는 배압과 같은 발효조 운전 지수의 조작이 세포의 산소 섭취 속도 또는 대사 속도를 상응하게 조작하였다.

질량 분광계가 발효로부터의 오프-가스의 조성을 모니터링하는데 사용되었고 발효에서 산소 섭취와 이산화탄소 생성 속도의 계산을 가능하게 하였다.

배양물이 약 220 OD_{550}의 세포 밀도에 도달하였을 때, 교반을 약 12 시간에 걸쳐 최초 속도 1000 rpm에서 약 725 rpm으로 감소시켰다. 배양물이 220 OD_{550}의 세포 밀도에 도달한 후 약 12 시간에 중쇄 합성을 유도하기 위해 15 ㎖의 200 mM 이소프로필 β-D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 첨가하였다.

2. 항-조직 인자 $F(ab')_2$의 제조

a. 플라스미드 제작

상기한 이중 프로모터 플라스미드 pXCD18-7T3과 유사한 이중 프로모터 플라스미드, pxTF7T3를 창제하고, 항-조직 인자 경쇄 및 중쇄 발현의 일시적 분리를 가능하게 하는데 사용하였다. 플라스미드 pMS421로부터의 lacI 서열을 또한 pxTF7T3 상에 도입하여 새로운 이중-프로모터 플라스미드 pJVG3IL을 창제하였다.

b. 발효

이들 발효에 사용된 숙주 균주는 60H4로 명명된, 이. 콜라이 W3110의 유도체였다. 60H4의 완전한 유전형은 W3110 *ΔfhuA ΔmanA phoA ΔE15 Δ(argF-lac)169 deoC2 degP41 ilvG2096(Val^r) Δprc prc-억제자*이다. 60H4 숙주 세포를 pJVG3IL로 형질전환시키고 성공적인 형질전환체를 선별하고 배양물에서 성장시켰다.

주요하게 운전 길이를 약 72 내지 114 시간으로 변화시킨 것을 제외하고는, 상기한 바와 같은 항-CD18 $F(ab')_2$에 대한 것들과 유사한 조건하에서 발효를 수행하고, 220의 배양물 OD_{550}을 달성한 후 약 4 내지 12 시간에 IPTG를 이용하여 중쇄를 유도하였다.

3. 전장 항-TF 항체의 제조

a. 플라스미드 제작

플라스미드 pxTF-7T3FL의 발현 카세트는 5'에서 3'까지: (1) phoA 프로모터(Kikuchi 등, Nucleic Acids Res., 9(21): 5671-5678(1981)); (2) trp 샤인-달가르노(Yanofsky 등, Nucleic Acids Res., 9: 6647-6668(1981)); (3) STⅡ 신호 서열의 침묵 코돈 변이체(TIR 상대 강도 약 7)(Simmons 및 Yansura, Nature Biotechnology, 14: 629-634(1996)); (4) 항-조직 인자 경쇄의 코딩 서열; (5) λ_{t0} 종결자(Scholtissek 및 Grosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185(1987)); (6) tacⅡ 프로모터((DeBoer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25(1983)); (7) 제2 trp 샤인-달가르노; (8) STⅡ 신호 서열의 제2 침묵 코돈 변이체(TIR 상대 강도 약 3); (9) 항-조직 인자 전장 중쇄의 코딩 서열; 및 (10) 제2 λ_{t0} 종결자를 포함한다. 이 발현 카세트를 이. 콜라이 플라스미드 pBR322의 프레임워크로 클로닝하였다(Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43: 77-90(1978)).

따라서, pxTF-7T3FL의 벡터 설계는 두 동일한 프로모터 대신 두 상이한 프로모터를 사용하여 각 쇄의 일시적으로 분리된 발현을 허용한다. 이 플라스미드에서, 경쇄는 phoA 프로모터의 제어 하에 있다. 그러나, tacⅡ 프로모터를 중쇄의 전사를 제어하는데 사용한다. 당업계에 알려진 바와 같이, phoA 및 tacⅡ 프로모터는 실질적으로 상이한 조건하에서 유도된다. 단일-프로모터 플라스미드 paTF130와 pxTF-7T3FL의 도식적 비교가 도 4에 도시되어 있다. pxTF-7T3FL의 발현 카세트의 핵산 서열(서열번호 4)이 도 5에 제공되어 있고, 그것이 코딩하는 폴리펩티드 서열(서열번호 5 및 6)이 도 6A(경쇄)와 6B(중쇄)에 각각 제공되어 있다. 아래 숙주 세포를 pxTF-7T3FL와 pJJ247로 공동-형질전환하였다. pJJ247은 시리즈에서 DsbA가 먼저인, DsbA와 DsbC 둘 다의 발현을 주도하는 tacⅡ 프로모터를 코딩하고 그의 제작은 WO 02/061090에 기재되어 있다.

b. 발효

소규모 발현을 위해 유전형 W3110 *ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lacIq lacL8 ΔompT Δ(nmpc-fepE) degP41*을 갖는, 이. 콜라이 균주 61D6를 숙주 세포로 사용하였다. 형질전환 후, 선별된 형질전환체 피크를 카르베니실린(50 ㎍/㎖)과 카나마이신(50 ㎍/㎖)으로 보충된 5 ㎖의 루리아-베르타니 배지로 접종하고 밤새 배양 휠에서 30℃에서 성장시켰다. 10-리터 발효를 WO 02/061090에 기재된 바와 같은 배지를 이용하여 수행하고 기본 발효 조건은 또한 아래 변형이 발효 과정에 가해진 것을 제외하고는 W0 02/061090에 기재된 바와 같았다: 300 ㎖의 1M $NaP0_4$, pH 7.0을 약 40 시간에 가하여 약 30 mM의 농도를 제공하였다. 100 ㎖의 IPTG의 200-mM 용액을 약 44 시간에 가하여 약 2mM의 농도를 제공하였다. 발효물을 접종 후 80 시간에 수획하였다.

B. 단백질 동정

일차원 SDS-PAGE 겔 전기영동을 노벡스(Novex)로부터의 4-12% 선형 아크릴아미드 구배에서 수행하였다. 구체적으로, 사용된 시스템은 누페이지™ 비스-트리스 프리-캐스트(NUPAGE™ Bis-TRIS Pre-Cast) 겔로 구성된, 노벡스®누페이지 ™ 시스템(저분자량 단백질을 위해)이었다.

C. 화학물질

침전제 에타크리딘 락테이트는 98% 순수하였고 시그마(세인트 루이스, MO, USA)로부터 구입하였다. 에타크리딘 락테이트는 361.4 Da의 분자량을 갖는다. 모든 다른 화학물질은 분석 등급이었다.

D. 침전

항체- 및 $F(ab')_2$-함유 이. 콜라이 물질을 왓츠 플루이대르 인코퍼레이티드(Watts Fluidair Inc.)(모델 B12-04DJC, 키터리, MN, USA)로부터의 마이크로플루이다이저를 사용하여 균질화하였다. 세포를 4-바 압력에서 마이크로플루이다이저를 통해 3회 통과시켰다. 단백질의 열 분해를 방지하기 위해, 물질을 각 마이크로플루이다이저 통과 동안 빙수욕을 통해 통과시켰다. $F(ab')_2$ 균질화액에 있는 총 단백질 농도는 30 ㎎/㎖였다. 재현탁 페이스트로부터 유래된, 전장 항-TF 균질화액은 18 ㎎/㎖의 총 단백질 농도를 가졌다. 항-TF 페이스트를 25 mM 트리스-HCl 완충액, pH 7.5에 재현탁하였다.

에타크리딘 락테이트 침전제를 원하는 최종농도(w/v)로 물에 용해시켰다.

1. pH 연구:

침전 실험을 0.6%(w/v)의 일정한 에타크리딘 락테이트 농도로 수행하였다. 0.8% 에타크리딘 락테이트 용액을 제조하고 이. 콜라이 균질화액과 3:1 비율, 예를 들어 3 ㎖의 에타크리딘 락테이트과 1 ㎖의 이. 콜라이 균질화액을 혼합하였다. pH를 원하는 pH에 따라 HCl 또는 NaOH를 이용하여 조정하였다.

2. 에타크리딘 락테이트 농도 연구:

균질화액을 에타크리딘 락테이트 저장 용액으로 4배 희석하고(pH 연구에서와 같이 1:3) pH를 각각의 표적 단백질에 대한 세트 값에서 유지하였다. 항-CD18에 대해, pH는 8.5이고 항-TF에 대해 pH 7.5였다. 침전 시스템에서 최종 에타크리딘 락테이트 농도는 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75 및 0.9%(w/v)였다. 참조로서 0% 에타크리딘 락테이트로 한 세트의 실험을 수행하였다.

3. 전도율/희석 연구:

단백질 침전에 대한 전도율의 영향을 평가하기 위하여 다양한 농도의 NaCl을 항-CD18 균질화액에 가하였다. 연구된 NaCl 농도는 0, 50, 100, 150, 200 및 400 mM이었다. 에타크리딘 락테이트가 없는 참조 시리즈를 또한 수행하여 임의의 단백질이 높은 염 농도로 인해 침전되었는지 여부를 결정하였다. 이 염 스파이크 연구에서 pH는 8.5였고 항-CD18 균질화액은 4배 희석되었다. 이 샘플에서 에타크리딘 락테이트 농도는 0.6%였고 참조 실험을 위해서는 0%였다.

샘플의 전도율을 변화시키기 위하여 균질화액을 증가하는 양으로 희석시키고, pH를 일정하게, 항-CD18과 항-TF에 대해 각각 pH 8.5와 7.5로 유지하였다. 모든 실험은 0.6%(w/v)의 최종 에타크리딘 락테이트 농도를 가졌다. 균질화액은 2, 3, 4, 5, 6 및 7배 희석되었다.

4. 온도 연구:

일부 실험을 승온에서 수행하였다. 이. 콜라이 균질화액을 4배 희석하고 최종 에타크리딘 락테이트 농도는 0.6%였다. pH는 항-CD18 및 항-TF에 대해 각각 8.5 또는 7.5였다. 샘플을 목적 온도, 즉 50, 60 및 70℃의 항온 수욕에서 인큐베이션하였다. 샘플을 승온에서 20 내지 120 분 동안 인큐베이션하였다. 16 시간의, 장시간 인큐베이션을 50℃에서 수행하였다.

침전제와 이. 콜라이 균질화액을 함께 혼합하고 pH를 조정한 후, 샘플을 30 내지 60 분 동안 교반 조건하에서 인큐베이션하였다. 침전 실험을 4-㎖ 규모로, 유리 관에서 수행하였다. 모든 실험을 두번 수행하고 평균값을 보고하였다.

E. 이. 콜라이 단백질 검정

에타크리딘 락테이트는 가장 통상적으로 사용되는 단백질 측정 검정법, 예를 들어 브래드포드, BCA와 상호작용하고 분광광도계 흡수를 280 ㎚에서 측정하였다. 따라서, 총 단백질 농도를 일반적 이. 콜라이 단백질 ELISA를 이용하여 측정하였다. 샘플을 생선 젤라틴-함유 완충액(0.15 M NaCl, 0.1 M $NaPO_4$, 0. 1% 생선 젤라틴, 0.05% 트윈(TWEEN)20™, 0.05% 프로클린(PROCLIN)™ 300)에서 희석하여 항-이. 콜라이 단백질 항체에 대한 비특이적 결합을 감소시켰다. 코팅

항체는 염소 항-전체 ECP였다. 포접체 항체는 호스래디쉬 퍼옥시다제에 부착된, 항-항체 전체 ECP였다. 405 ㎚에서의 흡광도를 몰레큘라 디바이스 모델 스펙트라 맥스 플러스(SPECTRA MAX PLUS)™(서니베일, CA, USA)로부터의 플레이트 리더를 사용하여 모니터링하였다.

F. 단백질 G 검정

회수된 $F(ab')_2$ 및 항체 농도를 측정하기 위하여, 단백질 G 친화성 크로마토그래피 검정법을 사용하였다. 이뮤노 디텍션(IMMUNO DETECTION)™ 단백질 G 컬럼을 퍼셉티브 바이오시스템즈(PerSeptive Biosystems)(프라밍엄, MA, USA)로부터 구입하였다. 컬럼을 인산-완충 염수(PBS)로 평형화하고 HCl로 pH가 2.2로 조정된 PBS로 용출하였다. 에타크리딘 락테이트로부터의 간섭을 최소화하기 위하여, 검정 전 샘플을 배제 스핀 컬럼(exclusion spin columns)(바이오-스핀®6 트리스(BIO-SPIN®6 Tris) 컬럼(바이오-래드 래보라토리즈, 헤르큘레스, CA, USA))상에서 처리하였다. 스핀 컬럼을 판매자에 의해 권고되는 바와 같이 사용하였다. 샘플 중 잔여 에타크리딘 락테이트의 임의의 간섭을 최소화하기 위해, 테트라메틸암모늄 클로라이드(TMAC) 세척 단계를 크로마토그래피 방법에 도입하였다(Fahrner 등, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 18: 302-327(2001)). 휴렛 팩커드로부터의 HPLC(HP 1090™ 액체 크로마토그래프)를 이용하여 검정하였다. 샘플을 PBS로 희석하였다. 표준 곡선을 정제된 단백질(제넨테크, 인코퍼레이티드로부터)을 이용하여 각각의 단백질에 대해 만들었다.

G. DNA 검정

침전 후의 상등액 중 DNA 농도를 몰레큘라 프로브(유진, OR, USA)로부터의 피코 그린 키트를 이용하여 측정하였다. 그것은 형광 시약(피코 그린)이 이본쇄 DNA에 결합하는 형광 검정법이다. 피코 그린 시약은 502 ㎚에서 여기하고 523 ㎚에서의 발산이 기록된다. 몰레큘라 디바이스(서니베일, CA, USA)로부터의 형광 플레이트 리더, 스펙트라 맥스 제니니 XS(SPECTRA MAX GENINI XS)™를 이용하여 검정하였다. 에타크리딘 락테이트는 피코 그린 검정 시약과 상호작용하기 때문에 분석 전 침전제는 용액으로부터 제거되었다. 에타크리딘 락테이트를 샘플로부터 단백질 G 친화성 크로마토그래피 검정 단락에 기재된, 바이오-스핀® 6 트리스 컬럼을 이용하여 제거하였다.

H. SDS-PAGE

에타크리딘 락테이트 침전 후 얻은 상등액을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 노벡스(샌디에고, CA, USA)로부터의 비환원된 4-12% 누페이지™ 겔을 항-CD18과 항-TF의 정제와 회수를 가시화하는데 사용하였다. 프리-캐스트 겔을 사용하고 운전 완충액은 MOPS(노벡스로부터 구입한 미리 제조된 농축물)였다. 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루 R250™의 여과된 용액으로 염색하였다. 상등액을 각각의 정화된 이. 콜라이 추출물에 대해 부피 보상하였다. 이 방법으로 에타크리딘 락테이트로의 침전 후 상등액에서 100% 수율이 얻어진다면, 이. 콜라이 추출물과 샘플에서 단백질 밴드의 강도는 동일하여야 한다. 따라서, 겔을 침전으로부터 얻어진 정제 정도를 정확히 표시하는데 사용할 수 있다.

I. 에타크리딘 락테이트 용해도

두 에타크리딘 락테이트 용액, 즉, 0.6 및 1.2%를 연구하였다. 각 용액을 두 수적으로 나누고 pH를 각각 6.0과 9.0으로 조정하였다. 시스템에서 약간의 완충 능력을 얻기 위하여, 에타크리딘 락테이트를 10 mM 트리스-HCl 완충액에 용해시켰다. 각 에타크리딘 락테이트 용액을 증가하는 양, 즉 0, 50, 100, 150, 200, 300 및 600 mM의 NaCl에 노출시켰다. 샘플을 3 시간 동안 인큐베이션한 후, 마이크로퓨즈(소발(SORVALL) MC12V™, 듀퐁, 윌밍톤, DE, USA)에서 1200 g에서 20 분 동안 원심분리하였다. 270 ㎚에서의 흡광도를 측정하여 상등액을 에타크리딘 락테이트에 대해 검정하였다. 사용된 분광광도계는 아질런트(AGILENT) 8453 UV-VIS™으로 알려진 휴렛 팩커드(윌밍톤, DE), 이제 알리전트 테크놀로지즈(Aligent Technologies)(팔로 알토, CA)로부터의 HP8453 UV-VIS™였다. 표준 곡선을 기지의 에타크리딘 락테이트 농도를 갖는 용액으로부터 도출하였다.

J. 탁도

시간과 온도의 함수로서 상등액의 안정성을 측정하기 위하여, 탁도를 모니터링하였다. 사용된 탁도 계측기는 HACH(모델 2100N, 에임즈, 아이오와, USA)로부터였다. 샘플을 실온에서 샘플 희석 없이 측정하였다.

항-CD18 균질화액을 0.6% 에타크리딘 락테이트, 0.2% PEI 또는 물만으로 처리하였다. 세 샘플 모두에서, 항-CD18 균질화액을 4배 희석하고 pH는 7.2±0.2였다. 4000 g에서 1 시간 원심분리한 후, 상등액을 회수하고 두 수적으로 나누었다. 한 부분의 각 샘플을 실온(21℃)에서 다른 하나를 4℃에서 인큐베이션하였다.

결과 및 논의

pH의 영향

에타크리딘 락테이트 분자는 대부분의 pH 간격에 걸쳐 양으로 하전된다(상기 Miller; 상기 Neurath 및 Brunner; Franek, Methods in Enzymology, ed. Langone, J. J., Van Vunakis, H., 121: 631-638(1986)). 그러나, pH 변화가 폴리펩티드 상의 전하에 영향을 미치고 폴리펩티드의 pI와 에타크리딘 락테이트에 노출 시 그것이 침전할 때의 pH 사이에 상호관계가 있으므로(상기 Neurath 및 Brunner), 본 발명의 방법에서 정제 정도에 대한 pH의 영향을 조사하였다.

각각 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항-TF를 함유하는 균질화액을 4 내지 10의 pH 범위를 포함하도록 조정된 0.6% 에타크리딘 락테이트 용액에 노출시켰다. 도 8A 내지 8C는 에타크리딘 락테이트 처리 및 각각의 이들 단백질의 원심분리 후 정화된 상을 보여준다.

표 1에서, 항-TF를 전장 항체와 $F(ab')_2$로서 연구하였다. 이. 콜라이 균질화액을 0.8%(w/v) 에타크리딘 락테이트 용액으로 1:3 비율로, 즉, 샘플 중 0.6%의 최종 에타크리딘 락테이트 농도로 처리하였다. pH를 각각 HCl과 NaOH로 조정하여 원하는 pH를 얻었다. 수율과 정제 인자를 정화된 세포 균질화액의 각각에 대해 계산한다. 회수된 상등액에 있는 DNA 농도가 또한 표에 보고되어 있다.

<표 1: 에타크리딘 락테이트로 처리될 때 αCD18과 αTF의 정제와 수율에 대한 pH 영향>

	항-CD18 $F(ab')_2$		항-TF $F(ab')_2$		항-TF 전장 Ab		
pH	정제 인자*	수율(%)	정제 인자*	수율(%)	정제 인자*	수율(%)	DNA 농도(㎍/㎖)
4	3.2	100	1.8	93	2.4	100	0.2
5	5.3	100	5.1	93	4.4	100	0.1
6	5.6	100	5.1	67	6.7	100	≤0.001
7	5.6	100	5.4	70	7.1	86	≤0.001
8	5.6	87	5.0	42	6.2	65	≤0.001
9	5.4	84	4.7	22	5.3	24	≤0.001
10	4.2	85	4.7	18	0.9	7	0.3

* 1의 값은 에타크리딘 락테이트로 처리되지 않은 시스템에서 얻어진 것과 동일한 정제이다.

모든 세 단백질에 대해 pH 범위 4 내지 10에 걸쳐 종모양의 곡선이 정제 정도와 DNA 농도에 대해 얻어진 것을 알 수 있다. 중간 pH 값, 즉 pH 5 내지 9에서, 약 5배의 정제가 얻어졌다. 항-CD18 $F(ab')_2$와 항-TF 항체 전장과 $F(ab')_2$의 수율은 pH가 높아질수록 감소하고, 항-TF 항체 전장과 $F(ab')_2$는 항-CD18 $F(ab')_2$ 보다 더 강한 pH 의존성을 가졌다. pH 범위 4-10에서 항-CD18 $F(ab')_2$의 수율은 100에서 85%로 항-TF $F(ab')_2$의 수율은 93에서 18%로 감소한다. 임의의 하나의 이론에 제한되지 않으면서, 이것은 항-CD18에 비해 항-TF의 더 낮은 pI, 예를 들어 각각 pI 7.5 및 8.9에 부분적으로 기인할 수 있다; 그러나, 이들은 이론적으로 계산된 pI 값이다.

전장 항-TF 단백질은 그 단백질의 $F(ab')_2$ 버전 보다 훨씬 더 강한 pH 의존성을 갖는다. 전장 항-TF의 순도는 pH 7.0에서 가장 높다. 8을 넘는 pH에서, 상당한 수율 손실이 관찰된다(도 8C). 전장 항-TF를 위해 약 7.0의 pH가 바람직하고, 즉 7.1배 정제와 86% 수율이다. 임의의 하나의 이론에 제한되지 않으면서, 항-CD18에 비한 항-TF의 더 높은 손실에 대한 하나의 가능한 설명은 그의 pI 초과에서 인큐베이션될 때 항-TF가 항-CD18 보다 더 많은 음성 표면 전하를 갖는 것이다. 이와 유사하게, 임의의 하나의 이론에 제한되지 않으면서, 더 큰 전장 항-TF가 상응하는 $F(ab')_2$ 보다 더 많은 음성 표면 전하를 가질 수 있고 따라서 pH를 증가시킬 때 상당히 더 높은 수율 손실이 관찰된다.

그러나, 세포 잔해와 숙주 단백질 이외의 성분이 표적 폴리펩티드로부터 제거되어야만 한다. 하나의 그러한 성분은 DNA이다. 표적 폴리펩티드와 함께 높은 DNA 농도를 갖는 것의 주요 단점은 용액의 점도가 증가하는 것이다. 이것은 추가 하류 가공에 부정적인 영향을 미칠 것이다. 또한, 음이온 교환 컬럼을 제1 포획 컬럼으로 이용하면, 음으로 하전된 DNA는 수지에 결합하고 따라서 컬럼의 단백질 용량을 감소시킬 것이다.

따라서, 에타크리딘 락테이트 침전 후 상등액 중의 DNA 농도를 결정하였다. 그 결과는 에타크리딘 락테이트 침전 후 상등액 중의 DNA 농도가 이. 콜라이 균질화액에서 얻어진 최초 DNA 농도에 비해 유의하게 감소됨을 보여준다. 그러나, 상등액 중의 DNA 농도는 그의 pH가 감소함에 따라 증가하며, 즉 pH 5.0 및 4.0에서 각각 0.1 및 0.2 ㎍/㎖였다. 임의의 하나의 이론에 제한됨이 없이, 이것은 DNA 상의 인산염이 낮은 pH에서 덜 음으로 하전되는 사실에 기인할 수 있다. 매우 높은 pH, 예를 들어 pH 10.0에서, DNA 농도는 유의하게 증가하고(0.3 ㎍/㎖) 단백질 순도 역시 감소하였다. 임의의 하나의 이론에 제한되지 않으면서, 이것은 부분적으로 pH가 항체와 $F(ab')_2$의 pI 초과인 사실에 기인한다; 그러나, 그것은 또한 부분적으로 에타크리딘 락테이트가 이 pH에서 덜 하전되는 사실에 기인할 수 있다.

에타크리딘 락테이트 농도의 영향

이. 콜라이 균질화액을 에타크리딘 락테이트 용액과 (1:3) 비율로 혼합하였다. 샘플 중 에타크리딘 락테이트 농도를 0에서 0.9%(w/v)로 0.15% 증가분으로 증가시켰다. 이 연구는 항-CD18, 항-TF $F(ab')_2$ 및 전장 항체에 대해 각각 pH 8.5, 7.5 및 6.0에서 수행되었다.

표 2는 에타크리딘 락테이트 농도의 정제와 수율에 대한 영향을 보여준다. 표 2에서, 항-TF는 전장 항체와 $F(ab')_2$로서 연구되었다. 이. 콜라이 균질화액을 상이한 농도의 에타크리딘 락테이트 용액으로 1:3 비율로 처리하였다; 샘플 중 최종 에타크리딘 락테이트 농도가 보고된다. 항-CD18, 항-TF($F(ab')_2$), 및 전장 항-TF의 pH는 각각 8.5, 7.5 및 6.0이었다. 회수된 상등액 중 DNA 농도 또한 표에 보고되어 있다.

<표 2: 증가하는 에타크리딘 락테이트 농도로 처리될 때 항-CD18과 항-TF의 순도와 수율에 대한 영향>

	항-CD18 $F(ab')_2$		항-TF $F(ab')_2$		항-TF 전장 Ab		
에타크리딘 락테이트 (%w/v)	정제 인자*	수율(%)	정제 인자*	수율(%)	정제 인자*	수율(%)	DNA 농도 (㎍/㎖)
0	1.0	100	1.0	100	1.0	100	77.9
0.15	1.1	100	1.3	97	3.4	100	3.9
0.30	1.7	100	2.2	93	6.7	100	0.4
0.45	4.0	100	5.2	96	6.5	100	0.2
0.60	5.8	100	5.6	98	6.5	100	≤0.001
0.75	5.9	100	5.6	78	6.3	100	≤0.001≤0.001
0.90	5.9	100	5.4	70	6.3	100	

* 1의 값은 에타크리딘 락테이트로 처리되지 않은 시스템에서 얻어진 것과 동일한 정제이다.

항체의 순도는 에타크리딘 락테이트의 농도와 강하게 상호관련되어 있는 것으로 나타났다(도 9A 내지 9C 및 표 2). 약 0.6% 초과의 에타크리딘 락테이트 농도에서 증가된 정제에 대한 증가된 에타크리딘 락테이트 농도의 영향은 급격하지 않았다. 그러나, 더 낮은 농도의 에타크리딘 락테이트에서, 즉 에타크리딘 락테이트가 부족할 때, 모든 약간의 침전제 첨가는 실질적으로 부가적인 $F(ab')_2$의 정제를 일으켰다.

항-CD18 $F(ab')_2$의 수율은 상이한 농도의 에타크리딘 락테이트의 첨가에 의해 영향을 받지 않았다. $F(ab')_2$ 둘 다의 회수 단계는 모든 실험에 대해 약 90%였다. 그러나, 항-TF $F(ab')_2$ 보다 $F(ab')_2$ 항-CD18의 정량적 회수를 얻는 것이 더 쉬운 것으로 보인다. 임의의 한 이론에 제한되지 않으면서, 이것은 연구된 pH에서 항-CD18 $F(ab')_2$에 비해 항-TF $F(ab')_2$ 상에 더 많은 음성 표면 전하가 있기 때문일 수 있다. 전장 항-TF는 상응하는 $F(ab')_2$ 보다 더 낮은 에타크리딘 락테이트 농도, 각각 0.3% 및 0.6%에서 최대 정제에 도달하였다. 임의의 한 이론에 제한되지 않으면서, 이것은 아마도 항-TF 전장

균질화액 중의 더 낮은 전체 단백질 농도, 즉 전장 및 $F(ab')_2$ 항-TF에 대해 각각 18 및 30 ㎎/㎖에 기인한다. 전장 항-TF는 또한 재현탁된 페이스트로부터 유래되고 $F(ab')_2$는 발효조로부터 직접 브로쓰로서 채택된다. 따라서, 이. 콜라이 브로쓰에 존재하는 가용성 배양 배지는 재현탁된 전장 항-TF 물질에 존재하지 않을 것이며, 이것은 임의의 한 이론에 제한되지 않으면서, 보여진 차이점을 부분적으로 설명할 수 있다.

상등액 중의 DNA 농도는 단백질 정제에 대해 얻어진 데이타와 강하게 상호관련되어 있다. 0.6% 이상의 에타크리딘 락테이트 첨가에서, 상등액에서 DNA는 검출되지 않았다. 또한 에타크리딘 락테이트 농도가 0에서 0.6%로 증가될 때 상등액 중 감소하는 DNA 농도, 즉 78에서 0 ㎍/㎖의 명확한 경향이 있다.

<u>전도율의 영향</u>

에타크리딘 락테이트가 부분적으로 분자의 하전된 특성으로 인해 단백질을 침전시키므로(상기 Neurath 및 Brunner), 샘플의 전도율은 침전 후 항체와 $F(ab')_2$의 순도에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 샘플이 높은 염 농도, 즉 높은 전도율을 가지면, 염은 단백질을 에타크리딘 락테이트로부터 차폐시키고 따라서 정제 효과를 감소시킬 수 있다.

항-CD18 균질화액을 두 세트의 실험에 가하여 전도율의 영향을 샘플 중 단백질 농도로부터 분리하였다. 두 세트의 실험에 NaCl을 가하였다(0-400 mM). 한 세트의 실험은 0.6% 에타크리딘 락테이트를 함유하였고 나머지 세트에서는 물을 사용하였다. 물-함유 시스템을 대조로 사용하여, NaCl이 임의의 침전을 유발하면 이것은 에타크리딘 락테이트로부터 유래된 침전으로부터 구별될 수 있었다. 에타크리딘 락테이트가 없는 시스템, 즉 물 시스템에서, 단백질 침전이 0-400 mM NaCl 농도 범위에서 관찰되지 않았다(도 10A). 에타크리딘 락테이트-함유 실험은 전도율이 감소할 때 항-CD18의 정제에 강한 증가를 보였다(도 10B).

임의의 한 이론에 제한되지 않으면서, 낮은 전도율에서 항-CD18의 개선된 정제의 한 이유는 낮은 염 농도에서 하전된 에타크리딘 락테이트의 낮은 차폐 능력일 수 있다. 유사한 차폐 효과가 PEI가 증가하는 염 농도에서 단백질 정제를 위해 사용될 때 나타난다(상기 Jendrisak). 그러나, 보다 더 중요한 인자는 높은 염 농도에서 에타크리딘 락테이트의 낮은 용해도이다(상기 Miller; 상기 Neurath 및 Brunner; 상기 Franek). 100 mM NaCl에서 에타크리딘 락테이트의 침전이 추출 시스템에서 관찰되었고, 염 농도가 증가할수록, 더 많은 에타크리딘 락테이트가 침전하였다. 따라서, 시스템에서 더 적은 에타크리딘 락테이트가 가용성으로 되고 단백질과 다른 생분자를 침전시키는데 이용가능하다.

NaCl 농도의 함수로서의 에타크리딘 락테이트의 용해도를 연구하였을 때, pH 의존성이 관찰되었다(도 11). pH 6에서 0.6과 1.2% 에타크리딘 락테이트 용액 사이에 용해도에서 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 두 용액 모두 50 mM NaCl에서 가용성이었지만 100 mM에서는 거의 완전히 침전하였다. 에타크리딘 락테이트가 덜 하전된 pH 9 용액에 대해, 용해도에서 유의한 차이가 두 농도의 에타크리딘 락테이트에서 나타났다. 0.6% 에타크리딘 락테이트 용액이 더 농축된 에타크리딘 락테이트 용액 보다 더 낮은 염 농도에서 침전하였다(도 11). 염화물이 특히 효율적으로 에타크리딘 락테이트를 침전시키는 것으로 나타났다(상기 Franek).

실제로, 침전 실험의 전도율은 희석 인자에 의해 결정될 것이다. 따라서, 이. 콜라이 균질화액의 희석 인자의 영향을 연구하는 한 세트의 실험을 수행하였다. 전체 에타크리딘 락테이트 농도를 일정하게, 즉 0.6%(w/v)로 유지하였으나, 샘플의 전도율은 증가된 희석과 함께 감소하였다. 그 결과를 표 3에 나타내었다. 표 3에서, 항-TF를 전장 항체와 $F(ab')_2$로서 연구하였다. 각 실험에서 에타크리딘 락테이트의 농도는 0.6%(w/v)였다. 항-CD18, 항-TF($F(ab')_2$) 및 전장 항-TF의 pH는 각각 8.5, 7.5 및 6.0이었다. 수율과 정제 인자는 각 정화된 세포 균질화액에 대해 계산된다. 회수된 상등액 중 DNA 농도도 표에 보고된다.

<표 3: 상이한 양의 이. 콜라이 균질화액 희석 시 항-CD18과 항-TF의 순도와 수율에 대한 영향>

		항-CD18 $F(ab')_2$		항-TF $F(ab')_2$		항-TF 전장 Ab		
희석 (배)	전도율 (mS)	정제 인자*	수율 (%)	정제 인자*	수율 (%)	정제 인자*	수율 (%)	DNA 농도 (㎍/㎖)

2	5.0	2.4	72	2.3	77	3.4	70	20.7
3	4.0	4.1	76	4.0	60	6.7	82	0.5
4	3.2	5.5	71	4.9	95	6.7	95	≤0.001
5	2.7	6.1	88	5.2	100	6.5	100	≤0.001
6	2.4	6.1	92	5.0	100	6.0	100	≤0.001
7	2.1	6.3	100	5.1	100	6.0	100	≤0.001

* 1의 값은 에타크리딘 락테이트로 처리되지 않은 시스템에서 얻어진 것과 동일한 정제이다.

결과는 전도율이 희석을 증가시켜 저하되면 $F(ab')_2$의 정제가 증진됨을 보여주었다. 그러나, 3.5 mS 이하의 전도율에서, 전도율의 영향은 사소하였다. 이 실시예에서 사용된 이. 콜라이 균질화액에 대해 4-배 희석이 3.5 mS 미만의 전도율을 얻기 위해 수행되어야만 했다. 전장 항-TF 항체에 대해 균질화액에 대해서 보다 약간 더 낮은 희석이 수행될 수 있다. 임의의 한 이론에 제한되지 않으면서, 이것은 전장 균질화액 중의 단백질 농도가 더 낮은 사실에 기인할 수 있다. 더욱이, 전장 물질이 재현탁 페이스트로부터 유래되므로, 침전에 영향을 미칠 수 있는 일부 배지 성분이 에타크리딘 락테이트 침전 전에 제거되었다.

이들 실험에서 단백질 농도는 증가된 희석(전도율 저하)과 함께 감소하였다. 따라서, 에타크리딘 락테이트 농도 연구에서 과량의 농도인 것으로 밝혀진 0.6% 에타크리딘 락테이트가 첨가되더라도, 숙주 단백질과 DNA의 최대 제거가 덜 희석된 샘플에서는 얻어지지 않았다. 이것은 에타크리딘 락테이트 농도 연구에서 수행된 샘플에 비해 이들 샘플에서, 증가된 균질화액 농도, 즉, 전체 단백질 및 DNA에 기인한다. 따라서, 단백질, DNA 및 다른 성분의 전체 농도는 에타크리딘 락테이트 농도 또는 다르게는 요구되는 희석에 영향을 미친다. 항-CD18 $F(ab')_2$와 전장 및 $F(ab')_2$ 항-TF의 수율은 전도율 감소와 함께 증가하였다.

DNA 제거에 대한 영향 또한 전도율 의존적인 것으로 밝혀졌다. 두배 희석, 즉 5.0 mS에서, 높은 DNA 농도, 20.7 ㎍/㎖가 상등액에서 얻어졌다. 그러나, 3배 희석, 즉 4.0 mS가 수행되면, 농도는 0.5 ㎍/㎖로 감소하고, 더 높은 희석에서 DNA는 검출되지 않았다. 이미 지적한 바와 같이, 이 경우 단백질과 DNA에 대한 에타크리딘 락테이트의 총량은 더 높은 희석, 즉 더 낮은 전도율과 함께 증가한다. 따라서, 이 실시예에서 보여진 영향은 전도율을 낮추고 에타크리딘 락테이트의 양을 증가시키는 것이다.

<u>온도의 영향</u>

온도는 침전 실험을 수행할 때 중요한 것으로 알려진 인자이다. 따라서, 임의의 상승된 온도가 에타크리딘 락테이트와 결합하여 연구되었다. 승온에서 인큐베이션 시간의 영향 또한 조사되었다.

승온, 즉 50 내지 70℃에서의 인큐베이션은 두 $F(ab')_2$ 단백질의 순도에 긍정적인 영향을 미쳤다(도 12A 및 12B). 온도가 높을수록, 정제가 더 효율적이다. 70℃에서의 정제는 $F(ab')_2$ 단백질의 순도를 유의하게 향상시켰다. 더 긴 시간, 즉 70℃에서, 20 분에 비해 40 분 동안 샘플을 인큐베이션하는 것은 $F(ab')_2$의 순도를 향상시키지 않았지만(도 12A 및 12B), 약 10%의 수율 손실이 관찰되었다. 그러나, 샘플을 70℃ 초과에서 인큐베이션한 경우에는 $F(ab')_2$가 회수되지 않았으며, 이는 다른 이. 콜라이 단백질 뿐만 아니라 $F(ab')_2$의 온도 침전에 기인한다.

인큐베이션 시간을 더 밀접하게 조사하기 위하여, 샘플을 50℃에서 16 시간과 30 분 동안 인큐베이션하는 실험을 수행하였다. 그 결과는 이 온도에서 30 분에 비해 16 시간 동안 인큐베이션된 샘플에 대해 유의한 정제 개선이 없음을 보여주었다. 이것은 온도 침전이 신속한 현상임을 가리키며, 이는 적절한 온도로의 신속한 가열이 긴 인큐베이션 시간 보다 더 적당함을 암시한다.

전장 항-TF도 승온에서 연구하였다. 50℃에서 15 분 인큐베이션은 항체의 순도에 약간의 긍정적인 영향을 미쳤고 실온에서 인큐베이션된 샘플에 비해 회수된 물질의 손실이 관찰되지 않았다(도 12C). 그러나, 온도가 60℃로 증가하면, 거의 모든 항-TF가 침전되었다. 데이타는 전장 항-TF가 $F(ab')_2$ 항-TF 단백질 보다 승온에서 낮은 안정성을 가짐을 가리킨다.

온도의 증가는 표적 폴리펩티드의 변형을 유발할 수 있으므로, 실행 전에 승온에서 특정 관심 폴리펩티드의 안정성을 평가할 필요가 있다.

공급류의 안정성

가능한 가장 깨끗한 공급류를 회수하는 것이 중요하다. 그러나, 공급류의 다른 중요한 특성은 시간에 따른 그의 안정성이다. 따라서, 에타크리딘 락테이트 또는 PEI 처리 후의 상등액과 통상의 원심분리 후의 상등액을 안정성에 관해 비교하였다. 각 상등액을 2가지 온도, 즉 실온(21℃)과 4℃에서 인큐베이션하였다. 안정성은 각 샘플의 탁도를 측정하여 모니터링하였다.

도 13에는 시간에 따른 탁도 변화를 3가지 다른 상등액, 즉 에타크리딘 락테이트, PEI 및 무처리 정화된 상등액 각각에 대해 나타내었다. 고분자 전해질, 즉 에타크리딘 락테이트와 PEI가 상등액의 탁도를 유의하게 감소시켰음을 분명히 알 수 있다. 정화 후 직접적으로 PEI-처리된 샘플은 탁도가 겨우 절반, 즉 327 NTU이며 에타크리딘 락테이트 상등액은 탁도가 1 NTU이지만, 무처리 정화된 상등액의 탁도는 약 700 NTU이었다. PEI-처리된 상등액의 탁도를 모니터링할 때에는 시간에 따라 달라지거나 인큐베이션 온도에 따라 달라지는 것으로 나타난 주요 차이는 없었다. 단지 원심분리된 상등액의 경우가 처음 48 시간 동안 실온 샘플에서 탁도가 더 낮은 경향이 있었다. 그러나, 72 시간 실온 샘플은 샘플의 탁도가 높아서 측정할 수 없었다. 에타크리딘 락테이트-처리된 상등액은 4℃에서의 인큐베이션시에 유의하게 증가하지 않는 매우 낮은 탁도를 가졌다. 샘플을 21℃에서 인큐베이션한 경우에는 탁도가 72 시간에 걸쳐 1에서 100 NTU로 유의하게 증가하였다. 그러나, 정화 후 직접적으로 다른 두 상등액에 대해 얻어진 탁도에 비해 100 NTU는 훨씬 낮다. 따라서, pH 7에서 에타크리딘 락테이트 처리 후 회수된 상등액은 안정한 공급류라고 결론내릴 수 있다.

결론

에타크리딘 락테이트는 배양 브로쓰 또는 균질화액으로부터 이종 폴리펩티드의 일차 회수를 위한 침전제로서 성공적으로 사용될 수 있다. 에타크리딘 락테이트를 침전제로 사용할 때, 이상적인 표적 폴리펩티드는 바람직하게는 평균 숙주 단백질 보다 더 높은 pI를 갖는다. 따라서, 표적 단백질은 양으로 하전되고 따라서 상등액에서 회수됨과 동시에 대부분의 단백질은 음으로 하전되고 에타크리딘 락테이트에 의해 침전될 수 있다.

침전을 위한 에타크리딘 락테이트의 바람직한 농도는 브로쓰 또는 균질화액 중 숙주 단백질과 DNA의 농도에 매우 의존적이다. 브로쓰 또는 균질화액 중 단백질과 DNA 농도가 높을수록, 요구되는 에타크리딘 락테이트의 양이 많다. 따라서, 에타크리딘 락테이트가 결합하고, 따라서 침전시키는데 이용가능한 음으로 하전된 성분이 많을수록, 침전을 위한 에타크리딘 락테이트의 바람직한 양은 더 많다. 침전을 수행할 때 용액의 전도율이 더 낮을수록, 폴리펩티드의 정제가 더 효율적이다. 침전 단계는 세포 잔해가 제거되는 동시에 유의한 폴리펩티드 정제와 DNA 감소를 제공할 것이다.

효율적인 숙주 단백질 및 DNA 침전을 위해, 분자가 이 pH 초과에서는 덜 하전되므로, pH는 일반적으로 약 4 내지 10이고, 바람직하게는 약 pH 9 이하이다. 에타크리딘 락테이트는 폴리펩티드를 정제할 때 바람직하게는 약 pH 5 내지 9 범위에서 사용되어야 한다. 정제를 향상시키기 위하여, 승온에서 짧은 인큐베이션이 수행될 수 있다. 그러나, 승온에서의 안정성이 표적 폴리펩티드의 침전을 피하기 위해 특정 관심 폴리펩티드에 대해 결정되어야 한다. 또한, 회수된 표적 폴리펩티드의 품질을 조사하여, 표적 폴리펩티드의 변형이 일어나지 않았는지 확인해야 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

원하는 이종 폴리펩티드가 생산되고 가용화되어 있는 미생물 발효 브로쓰(broth) 또는 균질화액(homogenate)에 대다수의 폴리펩티드가 가용성인 채로 유지되는 조건하에서 유효량의 에타크리딘 락테이트 용액을 첨가하여 숙주 세포 불순물을 침전시키는 단계, 및

상기 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 폴리펩티드를 분리하는 단계

를 포함하는, 원하는 이종 폴리펩티드가 생산되고 가용화되어 있는 미생물 발효 브로쓰 또는 균질화액으로부터 원하는 이종 폴리펩티드를 정제하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 브로쓰 또는 균질화액이 효모 또는 원핵생물로부터 유래된 것인 방법.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 브로쓰 또는 균질화액이 세균으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 브로쓰 또는 균질화액이 진정세균(*eubacteria*)으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 브로쓰 또는 균질화액이 그램-음성(gram-negative) 세균으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 브로쓰 또는 균질화액이 이. 콜라이(*E. coli*)로부터 유래된 것인 방법.

청구항 7.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드를 균질화액으로부터 분리하는 것인 방법.

청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드의 pI가 숙주 세포 불순물에 함유된 숙주 단백질의 평균 pI보다 더 높은 것인 방법.

청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드의 pI가 약 7 이상인 것인 방법.

청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 재조합 폴리펩티드인 방법.

청구항 11.

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.

청구항 12.

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 인간화 항체인 방법.

청구항 13.

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 전장 항체인 방법.

청구항 14.

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체 단편인 방법.

청구항 15.

제14항에 있어서, 폴리펩티드가 경쇄를 포함하는 항체 단편인 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 폴리펩티드가 카파 경쇄를 포함하는 항체 단편인 방법.

청구항 17.

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 또는 $F(ab')_2$-류신 지퍼(leucine zipper) 융합체인 방법.

청구항 18.

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 $F(ab')_2$인 방법.

청구항 19.

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항-IgE, 항-CD18, 항-VEGF, 항-조직 인자, 2C4, 항-Her-2, 항-CD20, 항-CD40 또는 항-CD11a 항체 또는 항체 단편인 방법.

청구항 20.

제1항 내지 제11항 및 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-조직 인자 $F(ab')_2$, 전장 항-조직 인자 항체 또는 항-VEGF 항체인 방법.

청구항 21.

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트의 농도가 약 0.1 내지 5%(중량/부피)인 방법.

청구항 22.

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트의 농도가 약 0.4 내지 5%(중량/부피)인 방법.

청구항 23.

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트의 농도가 약 0.6 내지 5%(중량/부피)인 방법.

청구항 24.

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 전도율이 약 1 내지 15 mS인 방법.

청구항 25.

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 pH가 약 5 내지 9인 방법.

청구항 26.

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 pH가 약 6 내지 9인 방법.

청구항 27.

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 온도가 약 실온 내지 70℃인 방법.

청구항 28.

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 온도를 약 1 내지 60 분 동안 약 실온 내지 약 65℃로 유지시키는 것인 방법.

청구항 29.

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트 첨가 후에 브로쓰 또는 균질화액의 온도를 약 1 내지 60 분 동안 약 50 내지 65℃로 유지시키는 것인 방법.

청구항 30.

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 분리 단계를 원심분리 또는 여과에 의해 수행하는 것인 방법.

청구항 31.

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드를 브로쓰 또는 균질화액으로부터 분리한 후에 크로마토그래피 또는 여과를 통해 추가로 정제하는 것인 방법.

청구항 32.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트를 첨가하기 전에 상기 폴리펩티드가 가용성 분획물 중에 생산되는 것인 방법.

청구항 33.

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트를 첨가하기 전에, 상기 폴리펩티드가 불용성이고 이 폴리펩티드를 가용화제와 접촉시켜 용해시키는 것인 방법.

청구항 34.

에타크리딘 락테이트 및 발효 미생물 세포에 대해 이종인 폴리펩티드를 포함하는 미생물 세포 발효 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 35.

제34항에 있어서, 세균 세포로부터 유래된 것인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 36.

제34항 또는 제35항에 있어서, 이. 콜라이로부터 유래된 것인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 37.

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 재조합 폴리펩티드인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 38.

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체 또는 항체 단편인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 39.

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 $F(ab')_2$인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 40.

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항-IgE, 항-CD18, 항-VEGF, 항-조직 인자, 2C4, 항-Her-2, 항-CD20, 항-CD40 또는 항-CD11a 항체인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 41.

제34항 내지 제38항 및 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항-CD18 $F(ab')_2$, 항-조직 인자 $F(ab')_2$, 전장 항-조직 인자 항체 또는 항-VEGF 항체인 브로쓰 또는 균질화액.

청구항 42.

제34항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 에타크리딘 락테이트의 농도가 약 0.1 내지 5%(중량/부피)인 브로쓰 또는 균질화액.

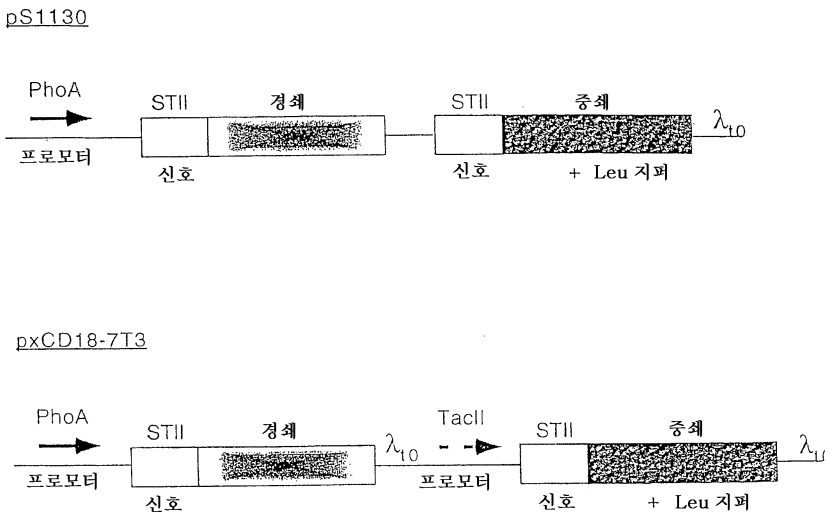
청구항 43.

제34항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 가용성인 브로쓰 또는 균질화액.

도면

도면1

항-CD18 Fab'2(-류신 지퍼) 플라스미드의 도식도



도면2

항-CD18-7T3.DNA

```
GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA
GTTGTTATTTAAGCTTGCCCAAAAAGAAGAAGAGTCGAATGAACTGTGTGCGCAGGTAGA
AGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCG
GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCTGA
CGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTA
AAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCTT
TGTTTTTATTTTTTAATGTATTTGTAACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTA
GAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTTTCTATTGCTA
CAAACGCGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGG
GCGATAGGGTCACCATCACCTGTCGTGCCAGTCAGGACATCAACAATTATCTGAACTGGT
ATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAACTACTGATTTACTATACCTCCACCCTCCACT
CTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGTTCTGGTTCTGGGACGGATTACACTCTGACCATCA
GCAGTCTGCAACCGGAGGACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAGGTAATACTCTGCCGC
CGACGTTCGGACAGGGCACGAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAT
TAAATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTAGGCCTAACG
CTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGTTGCCGACGCGCATCTCGACTGCACGGTGCAC
CAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAAT
CACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCG
ACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACT
AGTTTAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAG
AAGAATATTGCGTTCCTACTTGCCTCTATGTTTGTCTTTTCTATAGCTACAAACGCGTAC
GCTGAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGT
TTGTCCTGTGCAACTTCTGGCTACACCTTTACCGAATACACTATGCACTGGATGCGTCAG
GCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCAGGGATTAATCCTAAAAACGGTGGTACCAGC
CACAACCAGAGGTTCATGGACCGTTTCACTATAAGCGTAGATAAATCCACCAGTACAGCC
TACATGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTAGATGG
CGAGGCCTGAACTACGGCTTTGACGTCCGTTATTTTGACGTCTGGGGTCAAGGAACCCTG
GTCACCGTCTCCTCGGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTCGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCGCCGTGCCCAGCACCA
GAACTGCTGGGCGGCCGCATGAAACAGCTAGAGGACAAGGTCGAAGAGCTACTCTCCAAG
AACTACCACCTAGAGAATGAAGTGGCAAGACTCAAAAAGCTTGTCGGGGAGCGCTAAGCA
TGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGTTAACTC
ATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCT
AACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCG
TCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCCTCTTGCGGG
ATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGT
```

(서열번호 1)

도면3

항-CD18-7T3.단백질

A.

STII + 항-CD18 경쇄

```
MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWY
QQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLP
PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C
```

(서열번호 2)

B.

STII + 항-CD18 중쇄

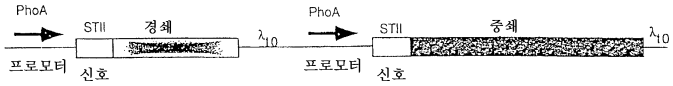
```
MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYTMHW
MRQAPGKGLEWVAGINPKNGGTSHNQRFMDRFTISVDKSTSTAYMQMNSLRAEDTAVYY
CARWRGLNYGFDVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKK
LVGER
```

(서열번호 3)

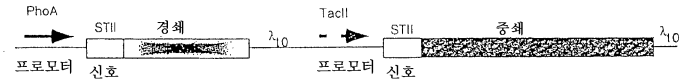
도면4

항-조직 인자 IgG1 플라스미드의 도식도

paTF130



pxTF-7T3FL



도면5

항-TF-7T3FL.DNA

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATTGCTGA
GTTGTTATTTAAGCTTGCCCAAAAAGAAGAAGAGTCGAATGAACTGTGTGCGCAGGTAGA
AGCTTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAGCG
GTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATTCCTGA
CGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTA
AAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCTT
TGTTTTTATTTTTTAATGTATTTGTAACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTA
GAATTATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTCGTTTTTTCTATTGCTA
CAAACGCGTACGCTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGG
GCGATAGGGTCACCATCACCTGCAGAGCCAGTCGCGACATCAAGAGCTATCTGAACTGGT
ATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAAAGTACTGATTTACTATGCTACTAGTCTCGCTG
AAGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGTTCTGGGACGGATTACACTCTGACCATCA
GCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTCGCAACTTATTACTGTCTTCAGCACGGAGAGTCTCCAT
GGACATTTGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGC
TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAT
TAAATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCGAGCTCGGTACCCGGGGATCTAGGCCTAACG
CTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGTTGCCGACGCGCATCTCGACTGCACGGTGCAC
CAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAAT
CACTGCATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCG
ACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACT
AGTTTAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGATCTAGAATTATGAAG
AAGAATATTGCGTTCCTACTTGCCTCTATGTTTGTCTTTTCTATAGCTACAAACGCGTAC
GCTGAGGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGT
TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCAATATTAAGGAGTACTACATGCACTGGGTCCGTCAG
GCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGATTGATTGATCCAGAGCAAGGCAACACGATC
TATGACCCGAAGTTCCAGGACCGTGCCACTATAAGCGCTGACAATTCCAAAAACACAGCA
TACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGAGAC
ACGGCCGCTTACTTCGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAAGCATGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGG
TTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGTTAACTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTT
AATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTA
ACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGA

(서열번호 4)

도면6

항-TF-7T3FL.단백질

A.

STII + 항-TF 경쇄

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWY
QQKPGKAPKVLIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESP
WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

(서열번호 5)

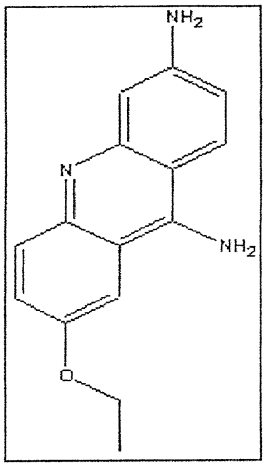
B.

STII + 항-TF 중쇄

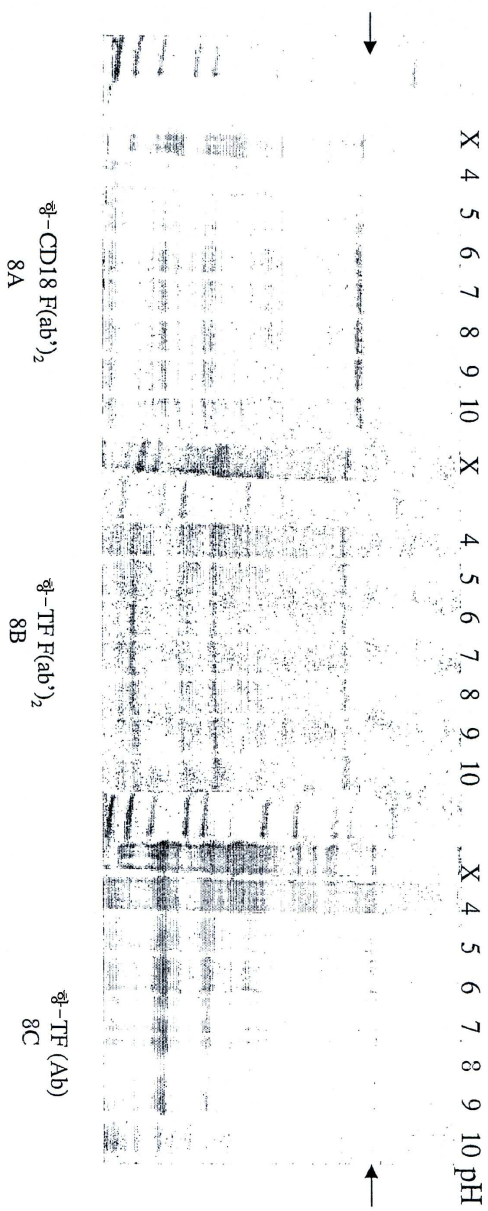
MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYYMHW
VRQAPGKGLEWVGLIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY
CARDTAAYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(서열번호 6)

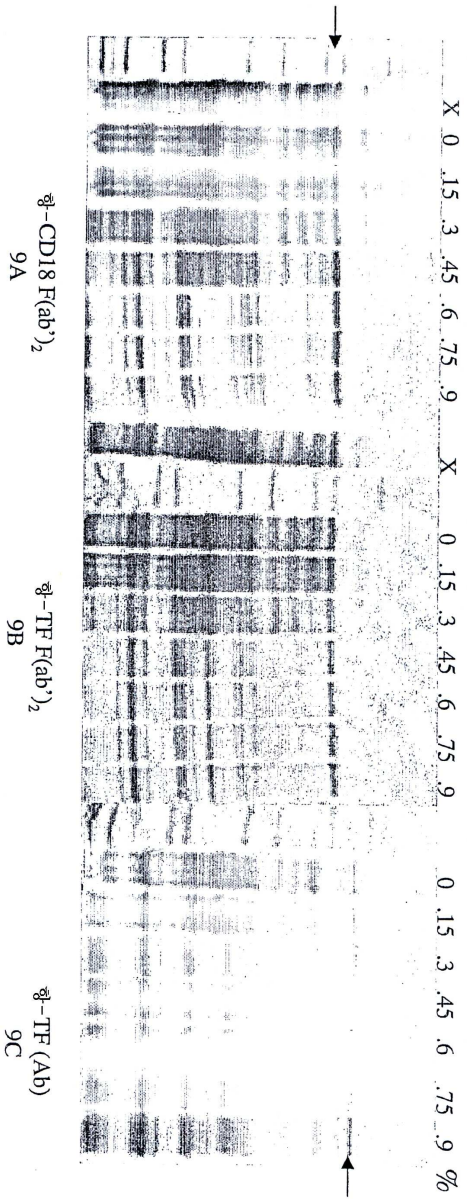
도면7



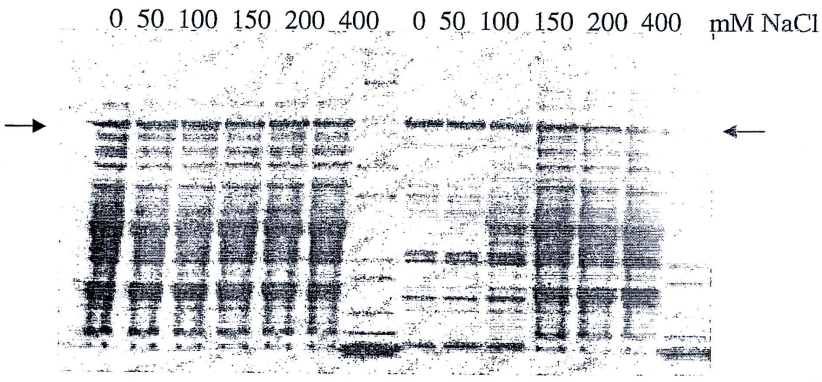
도면8


X 4 5 6 7 8 9 10 X 4 5 6 7 8 9 10 X 4 5 6 7 8 9 10 pH
항-CD18 F(ab')2
8A
항-TF F(ab')2
8B
항-TF (Ab)
8C

도면9

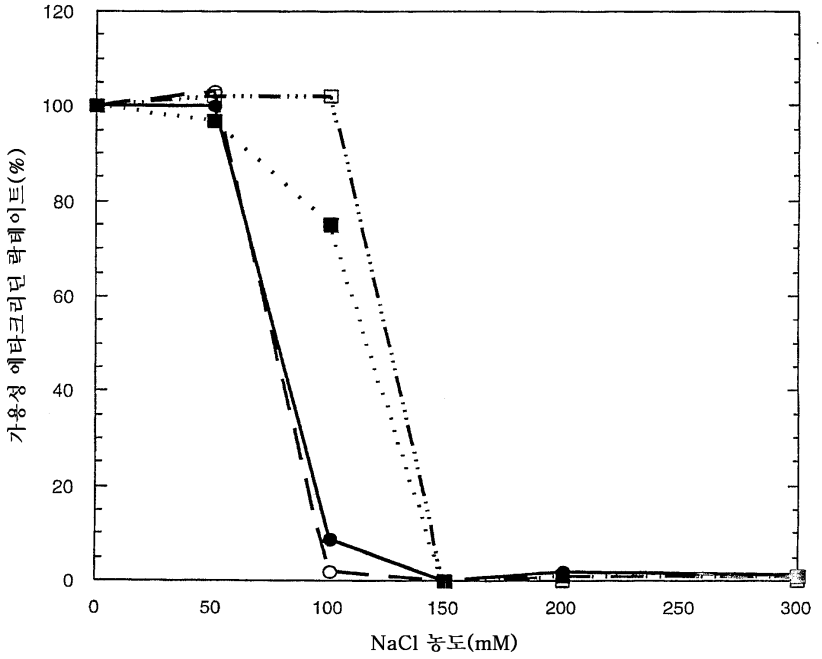

X 0 .15 .3 .45 .6 .75 .9
X 0 .15 .3 .45 .6 .75 .9
0 .15 .3 .45 .6 .75 .9 %
항-CD18 F(ab')2
9A
항-TF F(ab')2
9B
항-TF (Ab)
9C

도면10

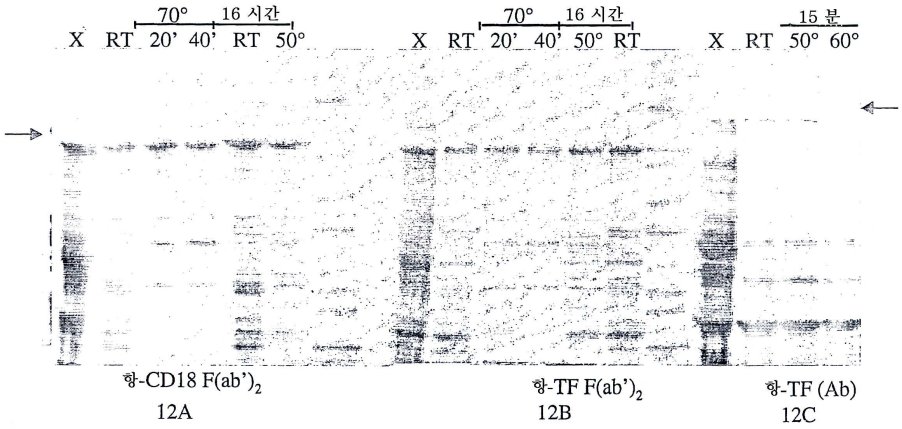


10A 10B

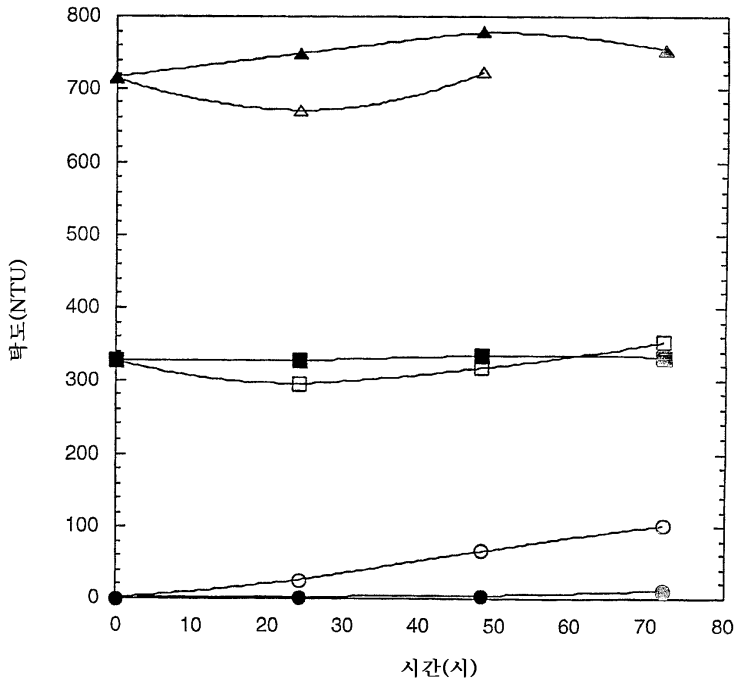
도면11



도면12



도면13



<110> GENENTECH, INC.

<120> PURIFICATION OF POLYPEPTIDES

<130> P1941R1 PCT

<140> PCT/US2004/000499
<141> 2004-01-08

<150> US 60/439,418
<151> 2003-01-09

<160> 6

<210> 1
<211> 2700
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 1
gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50

tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100

gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150

tcgcaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200

gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250

gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctcgtcagta 300

aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350

atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gtacgcaagt 400

tcacgtaaaa agggtatcta gaattatgaa aaagaatatc gcatttcttc 450

ttgcatctat gttcgttttt tctattgcta caaacgcgta cgctgatatc 500

cagatgaccc agtccccgag ctccctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550

caccatcacc tgtcgtgcca gtcaggacat caacaattat ctgaactggt 600

atcaacagaa accaggaaaa gctccgaaac tactgattta ctatacctcc 650

accctccact ctggagtccc ttctcgcttc tctggttctg gttctgggac 700

ggattacact ctgaccatca gcagtctgca accggaggac ttcgcaactt 750

attactgtca gcaaggtaat actctgccgc cgacgttcgg acagggcacg 800

aaggtggaga tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc 850

gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc 900

tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 950

gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000

ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 1050

acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150

acgccggacg catcgtggcg agctcggtac ccggggatct aggcctaacg 1200

ctcggttgcc gccgggcgtt ttttattgtt gccgacgcgc atctcgactg 1250

cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta 1300

tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc tcaaggcgca 1350

ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1400

aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agtttaatgt 1450

gtggaattgt gagcggataa caattaagct taggatctag aattatgaag 1500

aagaatattg cgttcctact tgcctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550

aaacgcgtac gctgaggttc agctggtgga gtctggcggt ggcctggtgc 1600

agccaggggg ctcactccgt ttgtcctgtg caacttctgg ctacaccttt 1650

accgaataca ctatgcactg gatgcgtcag gccccgggta agggcctgga 1700

atgggttgca gggattaatc ctaaaaacgg tggtaccagc cacaaccaga 1750

ggttcatgga ccgtttcact ataagcgtag ataaatccac cagtacagcc 1800

tacatgcaaa tgaacagcct gcgtgctgag gacactgccg tctattattg 1850

tgctagatgg cgaggcctga actacggctt tgacgtccgt tattttgacg 1900

tctggggtca aggaaccctg gtcaccgtct cctcggcctc caccaagggc 1950

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac 2000

agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 2050

tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 2100

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc 2150

ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 2200

ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 2250

actcacacat gcccgccgtg cccagcacca gaactgctgg gcggccgcat 2300

gaaacagcta gaggacaagg tcgaagagct actctccaag aactaccacc 2350

tagagaatga agtggcaaga ctcaaaaagc ttgtcgggga gcgctaagca 2400

tgcgacggcc ctagagtccc taacgctcgg ttgccgccgg gcgtttttta 2450

ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag 2500

tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta 2550

acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg tcaccctgga tgctgtaggc 2600

ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgcggg atatcgtcca 2650

ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt 2700

<210> 2
<211> 237
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 2
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
1 5 10 15

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
35 40 45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser
65 70 75

Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
80 85 90

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
95 100 105

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
110 115 120

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
125 130 135

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
140 145 150

```
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
                 155                 160                 165

 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                 170                 175                 180

 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                 185                 190                 195

 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
                 200                 205                 210

 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                 215                 220                 225

 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                 230                 235

<210> 3
<211> 300
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 3
 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
   1               5                  10                  15

 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                 20                  25                  30

 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                 35                  40                  45

 Ala Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Met
                 50                  55                  60

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Asn
                 65                  70                  75

 Pro Lys Asn Gly Gly Thr Ser His Asn Gln Arg Phe Met Asp Arg
                 80                  85                  90

 Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln
                 95                 100                 105

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                110                 115                 120

 Arg Trp Arg Gly Leu Asn Tyr Gly Phe Asp Val Arg Tyr Phe Asp
```

```
                125                 130                 135

 Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
                140                 145                 150

 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
                155                 160                 165

 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                170                 175                 180

 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                185                 190                 195

 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                200                 205                 210

 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
                215                 220                 225

 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
                230                 235                 240

 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                245                 250                 255

 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Arg Met Lys
                260                 265                 270

 Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His
                275                 280                 285

 Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg
                290                 295                 300

<210> 4
<211> 3100
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 4
 gaattcaact tctccatact ttggataagg aaatacagac atgaaaaatc 50

 tcattgctga gttgttattt aagcttgccc aaaaagaaga agagtcgaat 100

 gaactgtgtg cgcaggtaga agctttggag attatcgtca ctgcaatgct 150

 tcgcaatatg gcgcaaaatg accaacagcg gttgattgat caggtagagg 200
```

gggcgctgta cgaggtaaag cccgatgcca gcattcctga cgacgatacg 250

gagctgctgc gcgattacgt aaagaagtta ttgaagcatc ctcgtcagta 300

aaaagttaat cttttcaaca gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt 350

atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta tttgtaacta gtacgcaagt 400

tcacgtaaaa agggtatcta gaattatgaa aaagaatatc gcatttcttc 450

ttgcatctat gttcgttttt tctattgcta caaacgcgta cgctgatatc 500

cagatgaccc agtccccgag ctccctgtcc gcctctgtgg gcgatagggt 550

caccatcacc tgcagagcca gtcgcgacat caagagctat ctgaactggt 600

atcaacagaa accaggaaaa gctccgaaag tactgattta ctatgctact 650

agtctcgctg aaggagtccc ttctcgcttc tctggatccg gttctgggac 700

ggattacact ctgaccatca gcagtctgca gccagaagac ttcgcaactt 750

attactgtct tcagcacgga gagtctccat ggacatttgg acagggtacc 800

aaggtggaga tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc 850

gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc 900

tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 950

gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1000

ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 1050

acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 1100

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttaat taaatcctct 1150

acgccggacg catcgtggcg agctcggtac ccggggatct aggcctaacg 1200

ctcggttgcc gccgggcgtt ttttattgtt gccgacgcgc atctcgactg 1250

cacggtgcac caatgcttct ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta 1300

tggctgtgca ggtcgtaaat cactgcataa ttcgtgtcgc tcaaggcgca 1350

ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac ggttctggca 1400

aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agtttaatgt 1450

gtggaattgt gagcggataa caattaagct taggatctag aattatgaag 1500

aagaatattg cgttcctact tgcctctatg tttgtctttt ctatagctac 1550

aaacgcgtac gctgaggttc agctggtgga gtctggcggt ggcctggtgc 1600

agccaggggg ctcactccgt ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaatatt 1650

aaggagtact acatgcactg ggtccgtcag gccccgggta agggcctgga 1700

atgggttgga ttgattgatc cagagcaagg caacacgatc tatgacccga 1750

agttccagga ccgtgccact ataagcgctg acaattccaa aaacacagca 1800

tacctgcaga tgaacagcct gcgtgctgag gacactgccg tctattattg 1850

tgctcgagac acggccgctt acttcgacta ctggggtcaa ggaaccctgg 1900

tcaccgtctc ctcggcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca 1950

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt 2000

caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc 2050

tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 2100

tactccctca gcagcgtggt gactgtgccc tctagcagct tgggcaccca 2150

gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca 2200

agaaagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 2250

ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa 2300

acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg 2350

tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 2400

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 2450

caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 2500

ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 2550

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc 2600

acaggtgtac accctgcccc catcccggga agagatgacc aagaaccagg 2650

tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 2700

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 2750

cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg 2800

acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2850

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg 2900

taaataagca tgcgacggcc ctagagtccc taacgctcgg ttgccgccgg 2950

gcgtttttta ttgttaactc atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt 3000

aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca ggcaccgtgt 3050

atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg tcaccctgga 3100

<210> 5
<211> 237
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 5
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
1 5 10 15

Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
20 25 30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
35 40 45

Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
50 55 60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr
65 70 75

Ser Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
80 85 90

Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
95 100 105

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Trp Thr
110 115 120

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
125 130 135

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
140 145 150

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

```
                155                 160                 165

 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                170                 175                 180

 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                185                 190                 195

 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
                200                 205                 210

 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
                215                 220                 225

 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                230                 235

<210> 6
<211> 470
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Sequence is synthesized

<400> 6
 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe
   1               5                  10                  15

 Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                 20                  25                  30

 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                 35                  40                  45

 Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Glu Tyr Tyr Met His Trp Val
                 50                  55                  60

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile Asp
                 65                  70                  75

 Pro Glu Gln Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp Arg
                 80                  85                  90

 Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                 95                 100                 105

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                110                 115                 120

 Arg Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                125                 130                 135
```

```
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
                140                 145                 150

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
                155                 160                 165

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
                170                 175                 180

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                185                 190                 195

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
                200                 205                 210

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
                215                 220                 225

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
                230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                260                 265                 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
                275                 280                 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
                290                 295                 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                305                 310                 315

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                320                 325                 330

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                335                 340                 345

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                350                 355                 360

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                365                 370                 375

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
                380                 385                 390

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
```

```
                395                 400                 405

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
                410                 415                 420

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                425                 430                 435

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                440                 445                 450

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                455                 460                 465

Leu Ser Pro Gly Lys
                470
```