



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0065780
(43) 공개일자 2014년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) C07K 1/18 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0132549
(22) 출원일자 2012년11월21일
심사청구일자 2012년11월21일

(71) 출원인
씨제이헬스케어 주식회사
서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동, 씨제이제일제당빌딩)
(주)알테오젠
대전광역시 유성구 유성대로 1662, 305호 (전민동, 대전바이오벤처타운)
(72) 발명자
안지원
서울특별시 서초구 방배2동 440-454 SK 리더스뷰 B동 902호
강길부
부산광역시 부산진구 가야동 389-49번지 19통 4반 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

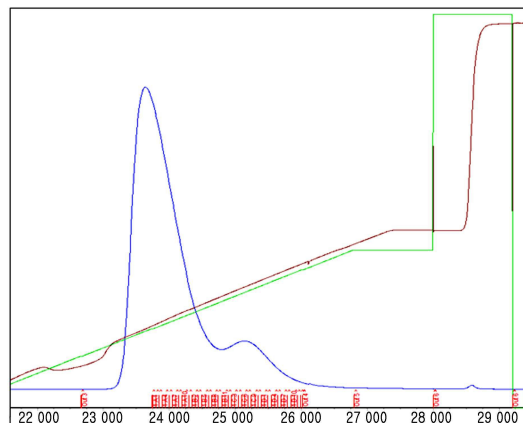
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 지속형 인간 성장호르몬 단량체를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 이용하여 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 고순도로 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 NexP-hGH 단백질의 단량체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전창봉

경기 고양시 일산동구 정발산로82번길 33, (마두동)

이동익

서울 송파구 문정로 83, 129동 1903호 (문정동, 문정래미안아파트)

유정민

서울 도봉구 노해로70길 54, 1906동 306호 (창동, 주공19단지아파트)

최은영

서울 성동구 행당로 79, 123동 404호 (행당동, 대림아파트)

김경화

부산 해운대구 좌동순환로468번다길 40-6, (중동, 영림빌라)

김은영

경기도 이천시 마장면 덕평리 CJ 제일제당 기숙사

조성유

경기 성남시 분당구 중앙공원로 54, 220동 606호 (서현동, 우성아파트)

박영준

서울 서초구 신반포로 45, 60동 502호 (반포동, 주공아파트)

김기완

서울 은평구 진관4로 100, 606동 310호 (진관동, 은평뉴타운상림마을)

이윤정

경기 용인시 수지구 포은대로 298, 103동 1003호 (상현동, 만현마을동보2차아파트)

박순재

대전 유성구 노은로426번길 15, 604동 1002호 (하기동, 송림마을6단지아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용하여 인간 성장호르몬(hGH) 및 알파-1 안티트립신 변이체(NexP)가 융합된 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은

- a) 전-평형화(pre-equilibration)된 음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography) 컬럼에 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료를 주입하는 단계; 및
- b) pH 6.0 내지 9.0인 용출 완충용액을 이용하여 0M 내지 0.4M의 염 농도 구배에서 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 용출시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 a) 단계의 지속형 인간 성장 호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료는 컬럼 주입 전에 여과 단계 없이, pH 6.0 내지 9.0인 완충용액으로 희석한 최종 염 농도가 0 내지 50mM 염화나트륨(NaCl) 또는 0 내지 50mM 염화마그네슘(MgCl₂)인 시료인 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 a) 단계의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료는 주입 전에 음이온 교환 수지 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피 및 안티 알파-1 안티트립신 항체 단편이 부착된 수지로 충전된 친화성 크로마토그래피를 순차적으로 수행하여 부분정제(partially purified)한 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 사용되는 완충 용액은 인산나트륨(sodium phosphate) 완충용액, 인산칼륨(potassium phosphate) 완충용액 또는 트리스(Tris) 완충용액인 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질은 동물세포에서 생산된 단백질인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 b) 단계의 염 농도구배는 연속적 염 농도구배(continuous salt gradient)인 것인 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 b) 단계의 염은 염화나트륨(NaCl)인 것인 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 b) 단계의 염 농도 구배는 염화나트륨(NaCl) 100mM 내지 250mM의 염 농도 구배인 것인 방법.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 음이온 교환 수지의 작용기가 Q(Quaternary amine), DEAE(DiEthylAminoEthyl) 및 QAE(Quaternary Amino Ethyl)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 방법으로 용출된 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질은 단량체가 95% 내지 100%의 순도로 존재하는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 이용하여 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 고순도로 제조하는 방법 및 상기 방법으로 제조된 NexP-hGH 단백질의 단량체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 성장호르몬(human growth hormone, hGH)은 191개의 아미노산으로 구성된 분자량 약 21,500 Da의 단백질 호르몬으로 체내에서 연골 성장판의 세포 분화를 자극하여 성장을 촉진시키는 기능을 담당한다. 이러한 인간 성장호르몬의 체내 합성 및 분비 결핍이 있을 경우, 저 신장증, 심혈관 질환의 위험도 증가, 근육 및 골밀도 감소 등을 유발할 수 있다.

[0003] 이를 치료하기 위한 하나의 방편으로, 인간은 1950년대 후반부터 인간의 뇌하수체에서 유래한 성장호르몬의 형태로 성장호르몬 치료(growth hormone therapy)를 받게 되었다. 유전공학기술의 발달로 1985년부터 성장호르몬은 대장균이나 효모에서 대량 생산이 가능해져 이를 의약품으로 개발하여 왔으며, 1990년대 후반부터 제약사들은 환자의 투여 편의성을 개선 및 증대시키기 위하여 투여횟수를 크게 줄일 수 있는 지속형 인간 성장호르몬 개발 및 출시하고 있다. 구체적으로, 1999년 제넨텍 사는 봉합체(encapsulation)로 만든 서방형 제품인 뉴트로핀 디팟 (nutropin depot)을 최초로 출시하였으며, 국내에서는 LG 생명과학에서 히알루론산을 매트릭스로 한 서방형 제품인 디클라제를 2007년 국내에 출시하였다.

[0004] 본 발명자들 역시 체내 지속성을 유지함으로 체내 반감기가 증가된 지속형 인간 성장호르몬을 개발하기 위해 노력하였고, 그 결과 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH를 개발하였다. 이의 제작방법 및 단백질 서열 등은 대한민국 등록특허 제10-1183262호에 개시되었다. 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH는 체내 단백질인 알파-1 안티 트립신(A1AT)의 고유한 체내 활성을 잃어고 반감기를 증가시키기 위하여 특정 아미노산을 변형한 NexP를 인간 성장호르몬의 N-말단 또는 C-말단에 유전자 재조합 방식으로 융합한 단백질이다. NexP-hGH는 1세대 인간 성장호르몬에 비해 체내 반감기가 개선된 장점을 지니며, 동물세포인 CHO 세포에서 발현되는 경우 당화가 되도록 만들어져 있어 대장균에서 제조되는 대다수의 1세대 인간 성장호르몬 의약품과 차별점을 가진다.

[0005] 또한, NexP와 융합된 hGH는 hGH 자체의 구조 및 화학적 특성을 여전히 보유하고 있다. hGH는 중합체를 잘 이루는 단백질로 알려져 있는데, 중합체 형태의 hGH는 체내에서 항원성을 유발할 수 있을 뿐만 아니라, hGH와 이의 수용체 간의 결합을 방해하여 hGH 신호전달을 감소시키는 것으로 알려져 있다.

[0006] 이러한 중합체는 숙주로부터 목적 단백질을 발현시킬 때, 적절한 3차 구조가 형성되지 못한 단백질로부터 발생하거나, 공정 중 목적 단백질의 안정성 저하로 생성될 수 있다. 상업적 생산에서 상기와 같은 중합체는 제품 유래 불순물인 이상 펩타이드로 분류되어 순도시험에서 그 양이 규제되고 있다. 따라서, 생산 공정 중 중합체를 제거하기 위하여 많은 시도가 있었으며, 일반적으로 중합체와 단량체를 분자량으로 분리하는 크기배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography, SEC)가 일반적으로 이용되고 있다. 그러나 크기배제 크로마토그래피의 경우, 컬럼에 로딩하는 부피가 한정적(일반적으로 bed volume의 10% 이내)이기 때문에 목적 단백질을 고농도로 농축해야 하므로, 고농도 농축이 어려운 단백질에 적용할 경우 수율이 저하되는 등의 문제점이 있다.

[0007] 이러한 문제를 극복하기 위하여 근래에는 크기배제 크로마토그래피 외에 컬럼을 이용한 중합체 분리가 시도되고 있다. 양이온 교환수지를 이용하여 면역 글로불린 중합체와 단량체를 서로 분리하는 방법(일본 공개특허 H7-285885) 및 음이온 교환수지를 이용하여 항체 및 우혈청 알부민 중합체를 단량체와 분리하는 방법(유럽 공개특허 EP 1084136)이 개시된 바 있다. 그러나, 목적 단백질의 단량체를 분리하는 방법은 목적 단백질의 종류 등에 따라 조건이 달라질 수 있으며, 기존에 알려진 방법을 다른 단백질의 분리 및 제조에 적용하는 경우 큰 효과를 나타내지 않는 경우가 빈번하게 존재한다. 따라서, 원하는 목적 단백질에 따라 이의 단량체를 고순도 및 고농도로 분리할 수 있는 적절한 조건을 규명해야 할 필요가 있으며, 이러한 조건을 규명하는 것은 단백질 의약품과 같은 단백질 제조 시장에 있어 매우 중요한 문제이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 정제 공정 과정에서 중합체가 형성됨을 확인하여, 기존의 방법으로 정제가 어려웠던 신규한 지속형 인간 성장호르몬의 중합체와 단량체를 서로 분리함으로써, 고순도의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 단량체를 제조하는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 음이온 교환 수지를 이용함으로써 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 중합체와 단량체를 서로 분리하여 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 단량체를 제조할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용하여 인간 성장호르몬 및 알파-1 안티트립신 변이체가 융합된 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 인간 성장호르몬 및 알파-1 안티트립신 변이체가 융합된 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용하여 인간 성장호르몬(hGH) 및 알파-1 안티트립신 변이체(NexP)가 융합된 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0012] 상기 방법은 바람직하게는 a) 전-평형화(pre-equilibration)된 음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography) 컬럼에 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료를 주입하는 단계; 및 b) pH 6.0 내지 9.0인 용출 완충용액을 이용하여 0M 내지 0.4M의 염 농도 구배에서 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 용출시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0013] 상기 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질을 숙주세포로부터 생산하는 경우, 인간 성장호르몬 수용체에 결합하여 생물학적 활성을 나타내는 단량체 형태의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질 외에도, 적절한 3차 구조를 형성하지 못한 NexP-hGH 단백질 또는 NexP-hGH 단백질의 안정성 저하로 인하여 형성된 중합체 형태의 NexP-hGH 단백질이 생산되는 문제점이 있다. 따라서, NexP-hGH 단백질을 숙주 세포로부터 생산하는 경우, NexP-

hGH 단백질의 중합체 및 단량체가 모두 포함되어 있는 혼합물로부터 단백질 의약품으로 사용할 수 있는 단량체 형태의 NexP-hGH 단백질을 고순도로 분리해낼 필요성이 존재하였다. 본 발명의 방법은 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용하여 NexP-hGH 단백질의 혼합액으로부터 NexP-hGH 단백질의 단량체를 고순도로 분리하여 제조할 수 있는 방법으로, 단량체 형태의 NexP-hGH 단백질의 분리 및 정제에 유용하게 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 용어, "인간 성장호르몬(human growth hormone, hGH)"은 펩타이드 호르몬으로서, 인간의 성장, 세포 생산(cell reproduction) 또는 재생(regeneration)을 가져올 수 있는 호르몬을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 인간 성장호르몬은 체내에서 연골 성장판의 세포 분화를 자극하여 성장을 촉진시킬 수 있는 단백질이라면 제한 없이 포함한다. 상기 인간 성장호르몬은 자연적으로 생산된 성장호르몬 및 유전공학기술을 이용하여 생산된 성장호르몬을 모두 포함하며, 바람직하게는 유전공학기술을 이용하여 생산된 성장호르몬이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 인간 성장호르몬에 대한 정보는 미국 국립보건원(NCBI) GenBank와 같은 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession Number가 AAA98618인 인간 성장호르몬 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 상기 인간 성장호르몬은 체내에서 연골 성장판의 세포 분화를 자극함으로써 성장을 촉진시킬 수 있으므로, 체내 합성 또는 분비에 있어 문제가 있는 개체에 있어 치료용 단백질로서 유용하게 사용될 수 있다. 다만, 환자의 투여 편의성 및 치료 효율을 위하여 반감기를 증대시킬 필요성이 있다. 이를 위하여 체내 지속성을 유지함으로써 체내 반감기가 증대된 알파-1 안티트립신 변이체(NexP)를 인간 성장호르몬에 융합시킴으로써, 반감기를 증대시킨 융합 단백질의 형태(NexP-hGH)로서 이용할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어, "NexP-hGH"은 인간 성장호르몬(hGH) 및 알파-1 안티트립신 변이체(NexP)가 융합된 형태의 단백질로서, 본 발명에서 "지속형 인간 성장호르몬"과 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 NexP는 본 발명자들에 의해 개발된 체내 지속성을 유지함으로 체내 반감기가 증가된 체내 단백질인 알파-1 안티 트립신(alpha 1-Antitrypsin, A1AT)의 변이체로, 본 발명자들에 의해 명명된 용어이다. 단백질 분해 효소 억제제의 활성을 없앤 알파-1 안티 트립신의 단백질 서열, 제작 방법 등은 대한민국 등록특허 제10-1183262호에 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허 제10-1183262호 명세서 전체는 본 발명의 참고자료로 포함된다. 다만, 본 발명의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH에 적용될 수 있는 알파-1 안티트립신 변이체는 상기 대한민국 등록특허 제10-1183262호에 개시된 변이체에 한정되지 않고, 알파-1 안티 트립신이 지닌 단백질 분해 효소 억제제로서의 고유한 체내 활성을 없애고 반감기를 증가시킬 목적으로 일정 아미노산을 돌연변이시킨 것을 모두 포함한다. 상기 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH은 이러한 알파-1 안티 트립신(A1AT)의 변이체를 인간 성장호르몬의 N-말단 또는 C-말단에 유전자 재조합 방식으로 융합한 단백질이며, 1세대 인간 성장호르몬에 비해 체내 반감기가 개선된 물질이다. 대다수의 1세대 인간 성장호르몬 의약품은 대장균에서 제조되는 반면, 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH는 CHO 세포 등 동물 세포에서 발현되어 당화가 되도록 만들어졌다. 이와 같은 당화는 천연형과 유사한 인간 성장호르몬을 생산하여 인체 내에서 항원성을 유발시킬 위험을 줄일 수 있는 장점이 있다.

[0017] 상기 알파-1 안티트립신은 분자량이 약 50,000Da의 포유류의 혈액 내에 존재하는 단백질 중의 하나로서, 혈액 내 농도는 약 2mg/ml에 달하는 주 혈액 단백질 중의 하나이며, 알파-1 프로테아제 억제제(alpha-1 protease inhibitor)라고도 불리운다. 혈액 내에서 추출한 알파-1 안티트립신은 FDA의 허가를 거쳐서 프로라스틴(Prolastin)이라는 상품명으로 폐기종(emphysema) 치료제로 판매되고 있다. 프로라스틴은 통상적으로 60mg/kg의 용량으로 1주 간격으로 정맥 주사로 인체에 투여되며, 인체에서의 안전성 및 유효성이 입증된 단백질이다. 또한, 알파-1 안티 트립신의 프로테아제 억제제로서의 역할 및 구조 등은 이미 잘 알려져 있다(Elliott, P. et al., JMB 275, 419-425, 1998). 상기 알파-1 안티트립신은 자연계에 100여 종 이상의 대립유전자(allele)가 존재하고, 표현형(phenotype)은 IEF(isoelectric focusing) 유형에 따라 A에서 Z로 구분한다(Stoller et al., The Lancet, 365, 2225-2236, 2005). 이중 가장 많은 M 대립 유전자는 정상형으로 아미노산 서열 변이에 의해 다시 M1(Val²¹³), M2, M3과 같이 여러 가지 아형(subtype)으로 구분된다. 따라서, 본 발명에 사용된 알파-1 안티트립신은 자연계에 존재하는 특정 아형이며, 다른 아형에 대하여도 동일한 효과를 얻을 수 있다. 상기 알파-1 안티트립신 단백질에 대한 정보는 미국 국립보건원(NCBI) GenBank와 같은 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 Accession Number가 CAJ15161인 알파-1 안티트립신 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0018] 이러한 알파-1 안티트립신은 특정부위 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis) 방법을 이용하여 하나 이상의 아미노산 잔기를 변형시켜 고유한 체내 활성을 없애고 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 알파-1 안티트립신 변이체에서 하나 이상의 아미노산의 변이는 P2 위치인 357번째 아미노산인 프롤린(Proline, P)이 변이된 것을 특징으로 하며, 보다 구체적으로 아스파라진(Asparagine, N)으로 변이시킨 것을 특징으로 한다. 또한, 알파-1 안티트립신 변이체에서 하나 이상의 아미노산의 변이는 P2 위치인 357번째 아미노산인 프롤린이 아스파라진으로 변이된 것을 포함하고 다른 위치에 있는 하나 이상의 아미노산을 변이시킨 것도 포함한다. 아울러, 상기 다른 위치에 있는 하나 이상의 아미노산의 변이는 9번째 아미노산인 글루타민(Glutamine, Q)이 아스파라진으로의 변이, 232번째 아미노산인 시스테인(Cysteine, C)이 세린(Serine, S)으로의 변이 또는 359번째 세린(Serine, S)이 트레오닌(Threonine, T)으로 변이된 것을 모두 포함한다. 이러한 알파-1 안티트립신 변이체는 ³⁵⁷Asn-³⁵⁸X-³⁵⁹Ser 또는 ³⁵⁷Asn-³⁵⁸X-³⁵⁹Thr의 새로운 N-당화 부위가 생성되어 알파-1 안티트립신의 프로테아제 억제제의 활성을 중화시키는 동시에 체내 주입시에 아미노산 치환에 의한 면역원성 가능성을 최소화할 수 있으며, 유리 시스테인기에 의한 이중체 형성 등을 제거할 수 있는 장점을 지닌다.
- [0019] 상기 알파-1 안티트립신 변이체를 융합하여 반감기가 증대된 인간 성장호르몬인 본 발명의 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH은 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 동물세포에 도입하여 발현함으로써 수득할 수 있다. 상기 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질을 포함하는 수득물은 발현시 적절한 3차 구조를 형성하지 못하거나 정제 과정을 거치는 동안 안정성 저하 등으로 단량체 외에도 중합체를 형성할 수 있다. 이러한 중합체 형태의 지속형 인간 성장호르몬은 생체 내에서 적절한 신호전달을 가져오지 못하거나 항원으로 인식될 수 있어 중합체 및 단량체가 모두 포함되어 있는 시료로부터 단량체를 고순도로 분리해낼 필요가 있다. 본 발명의 제조 방법을 이용하는 경우에는 단량체가 고순도로 포함되어 있는 분획을 분리해낼 수 있다.
- [0020] 상기 제조 방법의 각 단계를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0021] 상기 a) 단계는 전-평형화(pre-equilibration)된 음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography) 컬럼에 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료를 주입하는 단계이다. 이와 같은 음이온 교환 수지를 이용하는 경우, 시료 내에 지속형 인간 성장호르몬 외의 다른 성분 등을 제거하는 것이 가능하고, 지속형 인간 성장 호르몬 단량체를 농축할 수 있을 뿐만 아니라, 지속형 인간 성장호르몬의 중합체를 제거할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "음이온 교환 수지 크로마토그래피(anion exchange chromatography)"는 양으로 하전된 지지체에 음으로 하전된(또는 산성) 분자를 결합시키는 것에 의해 분자들을 이들의 전하에 따라 분리할 수 있는 것으로서, 분자들의 동족체(산성, 염기성 및 중성)는 이 기법에 의해 쉽게 분리할 수 있다. 본 발명의 음이온교환 크로마토그래피에 사용될 수 있는 수지로는 강음이온 교환 수지와 약음이온 교환 수지를 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 세파텍스, 세파로즈, 소스, 모노, 미니(상품명, GE healthcare) 등일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 상기 수지의 작용기가 Q(Quaternary amine), DEAE(DiEthylAminoEthyl) 또는 QAE(Quaternary Amino Ethyl) 등인 수지를 사용할 수 있다. 바람직하게는 상기 수지의 작용기가 Q 또는 DEAE 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 강음이온 교환 수지인 Q-세파로즈를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 수지의 작용기가 Q인 Q-세파로즈 수지가 충전된 BPG 컬럼을 사용하였다(실시예 3).
- [0023] 본 발명의 음이온 교환 수지 크로마토그래피에 사용되는 음이온 교환 수지는 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료를 주입시키기 전에 수성 완충용액으로 전-평형화(pre-equilibration)시킬 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 혼합액을 포함하는 시료"는 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질을 생산하는 세포의 배양 상등액(cell culture supernatant) 또는 상기 세포의 파쇄물(cell

extract)로부터 부분 정제된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에서 용어, "부분 정제(partially purified)"는 크로마토그래피와 같은 분류 과정(fractionation procedure)을 하나 이상 수행하였으나 목적하는 NexP-hGH 단백질의 단량체 외에도 중합체 등이 존재하는 상태를 의미한다. 상기 부분 정제 과정은 특별히 그 종류가 제한되지 않으며, 그 예로 소수성 크로마토그래피, 음이온 교환 수지 크로마토그래피, 항체 단편이 부착된 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피 또는/및 정용여과(diafiltration)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 부분 정제는 바람직하게는 소수성 크로마토그래피, 음이온 교환 수지 크로마토그래피 및 항체 단편이 부착된 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법을 이용하여 정제하는 것이며, 더욱 바람직하게는 a) NexP-hGH를 포함하는 시료를 음이온 교환 수지 크로마토그래피에 적용하는 단계, b) 단계 a)에서 생성된 용출액을 소수성 수지 크로마토그래피에 적용하는 단계; 및 c) 단계 b)에서 생성된 용출액을 안티 알파-1 안티트립신 항체 단편이 부착된 수지로 충전된 친화성 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는 부분 정제 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 친화성 크로마토그래피로 정제한 용액은 정용 여과 없이 본 발명의 단량체를 분리하기 위한 음이온 교환 수지 크로마토그래피에 적용될 수 있으나, 이에 국한되지 않으며 정용여과를 거친 다음 본 발명의 제조 방법에 적용하는 것 또한 가능하다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는 형질전환된 CHO 세포로부터 수득한 배양액을 정용여과하고 이를 Q-세파로즈 수지를 이용한 음이온 교환 수지 크로마토그래피, 페닐 세파로즈를 이용한 소수성 크로마토그래피를 이용하여 순차적으로 정제한 다음, 다시 정용여과를 수행하고, 안티-알파1 안티트립신 항체 단편이 부착된 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피 공정으로 부분 정제하였다(실시예 1 및 2).

[0027] 또한, 부분 정제된 용출액은 정용여과 단계 없이 pH 6.0 내지 9.0인 0 내지 20mM 트리스(Tris) 완충용액으로 희석한 최종 염 농도가 0 내지 50mM NaCl 또는 0 내지 50mM 염화마그네슘(MgCl₂)인 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 시료를 여과단계 없이 최종 염 농도가 50mM 이하의 NaCl 또는 50mM 이하 염화마그네슘(MgCl₂)으로 희석시켜 사용하는 경우, 정용여과로 인한 중합체의 증가 및 단백질의 손실을 줄일 수 있는 이점을 지닌다.

[0028] 상기 b) 단계는 pH 6.0 내지 9.0인 용출 완충용액을 이용하여 0M 내지 0.4M의 염 농도 구배에서 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 용출시키는 단계이다.

[0029] 구체적으로, b) 단계에서는 시료를 주입한 컬럼을 세척 완충액으로 세척하고, pH 6.0 내지 9.0인 용출 완충용액을 이용하여 염 구배(salt gradient)로 용출시킨다. 상기 염 구배는 연속식 염 구배(continuous salt gradient) 또는 단계식 염 구배(stepwise salt gradient)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 연속식 염 구배 또는 단계식 염 구배는 지속형 인간 성장호르몬의 단량체를 고순도로 분리할 수만 있다면 어느것이든 무방하다. 본 발명의 일 실시예에서는 연속식 염 구배로 지속형 인간 성장호르몬의 단량체를 고순도로 용출하였다(실시예 3).

[0030] 본 발명의 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 분리할 수 있는 염 농도는 0M 내지 0.4M의 염 농도일 수 있으며, 바람직하게는 50mM 내지 300mM의 염 농도이며, 더욱 바람직하게는 100mM 내지 250mM의 염 농도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염은 바람직하게는 나트륨 염이며, 더욱 바람직하게는 염화나트륨이나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 상기 세척 및 용출 단계에서 사용되는 완충용액은 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 그 예로 인산나트륨(Sodium phosphate) 완충용액, 인산칼륨(Potassium phosphate) 완충용액 또는 트리스(Tris) 완충용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 단, MgCl₂가 포함된 트리스(Tris) 완충용액에서 NexP-hGH의 보관시간이 길어지면

중합체가 증가하므로 세척 및 용출단계에는 $MgCl_2$ 를 제거하는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질을 포함하는 배양액을 형질전환된 CHO 세포로부터 수득하였고, 이를 정용여과한 다음, 음이온 교환 수지 크로마토그래피 및 소수성 크로마토그래피를 순차적으로 수행하여 정제하였다. 그 다음, 다시 정용여과하고 항-알파1-안티트립신 항체 단편이 부착된 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 이와 같은 과정으로 부분정제한 SE-HPLC 상 순도 약 90%인 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질의 단량체를 포함하는 시료를 Q-세파로즈 수지를 사용한 음이온 크로마토그래피 컬럼(BPG 컬럼, 직경 7cm)에 40ml/min의 유속으로 주입하여 결합시킨 후, 20mM 트리스 완충용액(pH 7.4) 및 20mM 인산나트륨 용출 완충용액(pH 7.4)를 순차적으로 40ml/min의 유속으로 3 컬럼 용량을 흘려 불순물을 세척하였다. 그 다음, 0.4M NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 용출 용매(pH 7.4)를 사용하여 40ml/min의 유속으로 10 컬럼 용량만큼 연속식 염 농도구배로 흘려 지속형 인간 성장호르몬을 용출하였다. 그 결과, 100mM 내지 250mM의 NaCl 농도에서 지속형 인간 성장호르몬을 고순도로 분리해냈으며, 반면, 250mM 내지 350mM의 NaCl 농도에서는 단량체에 비하여 60% 이상의 중합체를 포함하는 지속형 인간 성장호르몬이 분리되었다(도 1 및 2). 또한 이와 같은 방법으로 중합체가 분리된 고순도의 지속형 인간 성장호르몬은 12mg/ml 이상의 고농도로 농축하여도 중합체가 1% 이상 증가되지 않음을 확인하였다.

[0033] 따라서, 본 발명은 분리가 용이하지 않은 중합체 형태의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질을 효율적으로 제거하여 단량체 형태의 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질만을 고순도로 분리할 수 있는 방법으로, 바람직하게는 95 내지 100%의 순도로 NexP-hGH를 분리하여 제조하는데 이용할 수 있다.

[0034] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 인간 성장호르몬(hGH) 및 알파-1 안티트립신 변이체(NexP)가 융합된 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH 단백질의 단량체를 제공한다.

[0035] 상기 인간 성장호르몬, 알파-1 안티트립신 변이체 및 NexP-hGH에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 방법은 음이온 교환 수지를 이용하여 지속형 인간 성장호르몬인 NexP-hGH의 중합체와 단량체를 포함하는 혼합물로부터 단량체만을 99% 이상의 높은 순도로 얻을 수 있는 장점을 지닌다. 본 발명의 방법에서 제공하는 고순도의 정제 방법을 생산 공정에 적용할 경우, 대량으로 고농도 및 고순도의 지속형 인간 성장호르몬을 정제할 수 있으며, 이로 인해 생활성(bioactivity)을 높이고 항원성을 감소시킬 수 있는 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 단백질을 제조할 수 있어, 본 발명은 지속형 인간 성장호르몬의 산업적 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은, 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용하여 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 중합체 및 단량체를 분리한 크로마토그래피를 나타낸 도이다.

도 2는, 음이온 교환 수지 크로마토그래피에서 분획(fraction)별 지속형 인간 성장호르몬 단량체의 순도를 SE-HPLC(Size exclusion-HPLC)로 측정한 결과를 나타내는 도이다. 도 2a는, 음이온 교환 수지 크로마토그래피에서 100mM 내지 250mM의 염 농도에서 수득한 고순도의 지속형 인간 성장호르몬 단량체를 나타내며, 도 2b는, 음이온 교환 수지 크로마토그래피에서 250mM 내지 350mM의 염 농도에서 수득한 인간성장호르몬 단량체의 순도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1: 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 제조

[0040] <1-1> 인간 성장호르몬/알파-1 안티트립신 변이융합체를 발현하는 벡터의 제조[hGH/A1 AT(Q9N,P357N)]

[0041] 인간 성장호르몬을 알파-1 안티트립신 변이융합체의 N 말단에 융합시킨 단백질을 발현하는 벡터를 제조하기 위하여 우선, 부위 특이적 돌연변이(site directed mutagenesis)를 통하여 357번 프롤린(Proline, P)을 아스파라진(Asparagine, N)으로 치환시킨 알파-1 안티트립신 변이체(A1AT(P357N))를 제조하였다. 그 다음, 이를 Xho1과 BamH1 제한효소 부위를 가지는 pG001 유래 PCR product hGH 및 벡터 pAV1과 클로닝하여 pT107을 제조하였다. pT107은 hGH와 A1AT가 링커 없이 결합되어 있는 P357N 변이체이다. 당화 증가를 위하여 이 클론의 A1AT(P357N)를 9번 글루타민을 아스파라진으로 점 돌연변이(point mutation)시켜서 이중 변이체(A1AT(Q9N, P357N))을 만들고 DHFR 유전자 및 Kozac 서열 등을 추가 삽입하여 벡터를 제조하였다. 상기 벡터에서 발현되는 인간 성장호르몬/알파-1 안티트립신 변이융합체를 107N으로 명명하였다.

[0042] <1-2> 지속형 인간성장호르몬 NexP-hGH인 인간 성장호르몬/알파-1 안티트립신 변이융합체 107N의 발현

[0043] 상기 <1-1>의 벡터로 만들어진 클론을 차이니스 햄스터 난소세포(CHO)에 형질도입시키고 인간 성장호르몬/알파-1 안티트립신 변이융합체(107N)의 발현을 확인하였다. 인간 성장호르몬/알파-1 안티트립신 변이융합체(107N) 발현 세포는 8% CO₂ 및 37℃ 온도 조건에서, CD Opti-CHO 배지에서 배양하였고, 0.5x10⁶ cells/ml 농도로 접종하여 현탁 배양하였다.

[0044] 실시예 2: 음이온 교환 수지, 소수성 수지 크로마토그래피 및 안티 알파1-안티트립신 항체 단편이 부착된 수지를 이용한 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH의 정제

[0045] 상기에서 형질 전환된 CHO 세포로부터 제조한 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH을 발현하여 얻은 배양액 약 2ℓ를 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 이용하여 한외 여과 시스템(분자량 컷 오프 30,000)을 이용하여 정용여과(diafiltration)하였다.

[0046] 약 250ml Q-sepharose(GE Healthcare사) 수지를 XK-50컬럼(GE Healthcare사)에 충전 한 다음, 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다. 준비된 Q-sepharose 컬럼에 상기 정용여과액 약 1ℓ를 20ml/min의 유속으로 흘린 후, 다시 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 약 3CV(column volume)흘려 컬럼을 세척하였다. 그 다음, 100mM NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 20ml/min의 유속으로 약 3CV정도 흘려 불순 단백질을 제거한 후, 180mM NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 20ml/min의 유속으로 약 3CV정도 흘려 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH가 포함된 용액을 회수하였다.

[0047] Q-sepharose 컬럼 용출액에 4M NaCl/20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 첨가하여 약 2.5M NaCl/20mM 소듐 포스페이트(pH 8.0)가 되도록 하여 페닐-세파로즈(Phenyl-sepharose) 로딩액을 준비하였다.

[0048] 약 250ml 페닐-세파로즈(GE Healthcare사) 수지를 XK-50컬럼(GE Healthcare사)에 충전한 다음, 2.5M NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.5)을 충분히 흘려 컬럼을 평형화시켰다. 준비된 페닐-세파로즈 컬럼에 상기 페닐-세파로즈 로딩액 약 1.2ℓ를 20ml/min의 유속으로 흘린 후, 다시 2.5M NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 약 3CV(column volume)흘려 컬럼을 세척하였다.

[0049] 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 8.0)을 20ml/min의 유속으로 약 4CV정도 흘려 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH가 포함된 용액을 회수하였다.

[0050] 그 다음, 상기에서 얻은 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH가 포함된 용액 약 1ℓ를 150mM NaCl이 포함된 트리스(Tris) 완충용액(pH 7.4)을 이용하여 한외 여과 시스템(분자량 컷 오프 30,000)으로 정용여과(diafiltration)하였다.

[0051] 약 250ml 안티 알파1-안티트립신(A1AT) 항체 단편이 부착된 수지(GE Healthcare사, 이하 'A1AT'로 명명)를 XK-50컬럼(GE Healthcare사)에 충전한 다음, 150mM NaCl이 포함된 트리스(Tris) 완충용액(pH 7.4)을 충분히 흘려

컬럼을 평형화시켰다. 준비된 A1AT 컬럼에 상기 정용여과액 약 1ℓ를 20ml/min의 유속으로 흘린 후, 다시 150mM NaCl이 포함된 트리스(Tris) 완충용액(pH 7.4)을 약 3CV(column volume)흘려 컬럼을 세척하였다. 이후 50mM MgCl₂가 포함된 트리스(Tris) 완충용액 (pH 7.4)으로 컬럼을 세척한 후, 180mM MgCl₂가 포함된 트리스(Tris) 완충용액(pH 7.4)을 흘려 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH가 포함된 분획을 용출하였다.

[0052] 상기의 방법으로 정제한 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH은 단량체 대비 중합체의 비율이 10% 이상 존재하였다.

[0053] 실시예 3: 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용한 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH 중합체와 단량체의 분리 및 정제

[0054] 상기 실시예 2의 정제된 지속형 인간 성장호르몬 NexP-hGH는 단량체 대비 중합체의 비율이 10% 이상으로, 단량체 및 중합체가 모두 존재하는 혼합물로부터 단량체만을 특이적으로 분리정제할 필요성이 있다. 이에 본 발명자들은 하기와 같은 방법으로 중합체 및 단량체의 혼합액으로부터 단량체만을 분리정제하였다.

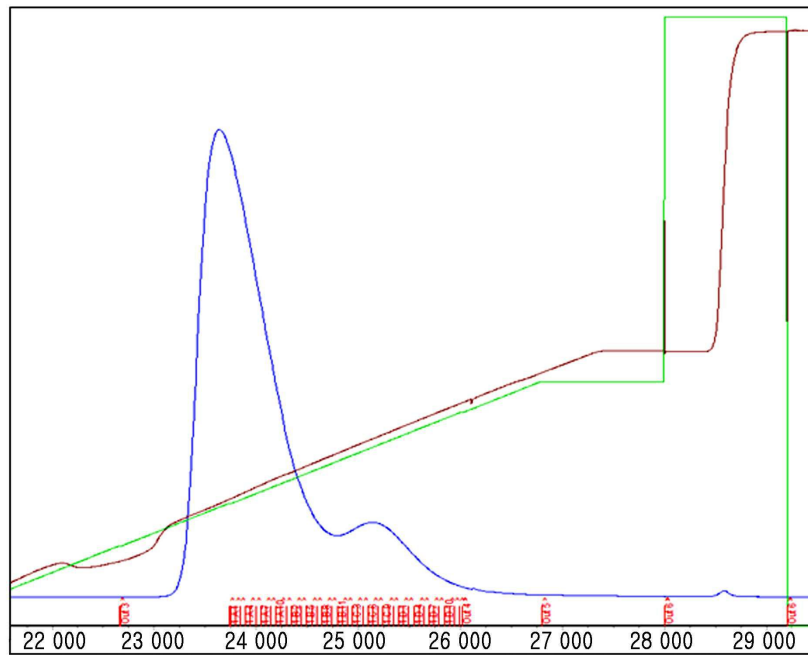
[0055] 상기 실시예 2에서 용출한 NexP-hGH를 Q컬럼 평형 완충용액으로 7배 희석한 다음, Q-세파로즈 수지가 충전된 BPG 컬럼(직경 7cm)에 40ml/min의 유속으로 부하하여 결합시켰다. 그 다음, 20mM 소듐 포스페이트 완충용액(pH 7.4)을 40ml/min의 유속으로 3 컬럼 용량으로 사용하여 컬럼에 붙지 못한 불순물을 세척하였다. 지속형 인간 성장 호르몬 NexP-hGH 단량체를 고순도로 분리정제하기 위하여, 0.4M NaCl이 포함된 20mM 소듐 포스페이트 용출 용매(pH 7.4)를 40ml/min 유속으로 10 컬럼 용량만큼 연속식 염 농도 구배로 흘려 NexP-hGH를 용출시켰다. 그 결과, 약 100mM 내지 250 mM의 염 농도에서 단량체가 약 98% 이상인 지속형 인간 성장호르몬이 분리되며, 250mM 내지 350mM의 염 농도에서 단량체 대비 60% 이상의 중합체를 포함하는 지속형 인간 성장호르몬이 분리되는 것을 확인하였다(도 1 내지 2). 또한, 중합체가 분리된 고순도의 지속형 인간 성장호르몬의 경우, 12mg/mL 이상의 고농도로 농축하여도 중합체가 1% 이상 증가되지 않음을 확인하였다.

[0056] 상기와 같은 결과는 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 이용한 본 발명의 방법이 단량체 형태의 NexP-hGH 단백질을 고순도로 분리하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것으로, 특히 100mM 내지 250mM의 염 농도에서 단량체 형태의 NexP-hGH 단백질을 고순도로 분리할 수 있음을 나타내는 결과이다.

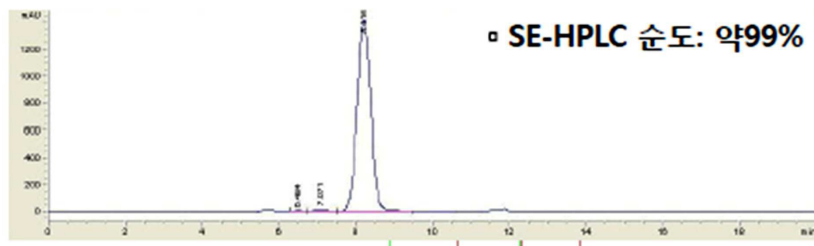
[0057] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2a



도면2b

