



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0052939
(43) 공개일자 2012년05월24일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 1/113</i> (2006.01) <i>C07K 16/00</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12N 15/79</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7001716
 (22) 출원일자(국제) 2010년06월21일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년01월20일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/039390
 (87) 국제공개번호 WO 2011/005488
 국제공개일자 2011년01월13일
 (30) 우선권주장
 61/219,257 2009년06월22일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 암젠 인크
 미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
 암젠 센터 드라이브
 (72) 발명자
 슐츠, 조세프, 에드워드
 미국 93012 캘리포니아 산타 로사 벨리 바란카
 로드 16675
 하트, 로저
 미국 80537 콜로라도 러브랜드 클레이포드 애비
 뉴 1279
 케너 III, 로날드, 닉슨
 미국 91320 캘리포니아 뉴베리 파크 브러쉬 오크
 코트 1893
 (74) 대리인
 김영, 양영준</p> |
|---|---|

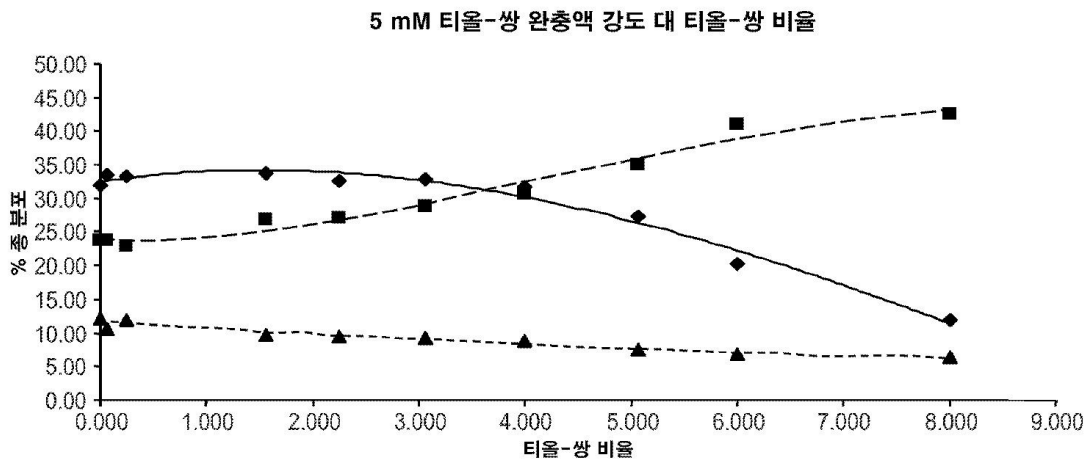
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 조절된 산화환원 상태를 사용한 단백질의 재폴딩**

(57) 요약

본 발명은 2.0g/l 이상의 농도로 존재하는, 비-포유동물 세포에서 발현되는 단백질을 재폴딩시키는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 티올 쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도를 동정하여, 2.0g/l 이상의 농도에서 효율적인 폴딩이 성취되고 상업적 규모를 비롯한 용적 범위에서 사용될 수 있는 조건을 설정하는 것을 포함한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/ℓ 이상의 농도로 용적중에 존재하는 단백질을, 최종 티올-쌍 비율이 0.001 내지 100의 범위이고 산화환원 완충액 강도가 2mM 이상인 산화환원 성분, 및

(i) 변성제;

(ii) 응집 억제제 및

(iii) 단백질 안정화제

중에서 한 가지 이상을 포함하는 재폴딩 완충액과 접촉시켜 재폴딩 혼합물을 형성하는 단계;

(b) 재폴딩 혼합물을 항온처리하는 단계; 및

(c) 재폴딩 혼합물로부터 단백질을 분리하는 단계를 포함하는,

비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/ℓ 이상의 농도로 용적중에 존재하는 단백질을 재폴딩시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 최종 티올-쌍 비율이 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 티올-쌍 완충액 강도가 2.25 mM, 2.5 mM, 2.75 mM, 3 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM 또는 15 mM 이상으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단백질이 비-자연 제한된 가용성 형태로 용적중에 존재하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 비-자연 제한된 가용성 형태가 봉입체(inclusion body)인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 단백질이 가용성 형태로 용적중에 존재하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단백질이 재조합체인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단백질이 내인성 단백질인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단백질이 복합 단백질인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 단백질이 다량체 단백질인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단백질이 Fc 단백질 접합체인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 비-포유동물 발현 시스템이 세균 발현 시스템 및 효모 발현 시스템 중에서 한 가지인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 변성제가 우레아, 구아니디늄 염, 디메틸 우레아, 메틸우레아 및 에틸우레아로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 단백질 안정화제가 아르기닌, 프롤린, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 다가 알콜, 글리세롤, 슈크로스, 소르비톨, 글루코스, 트리스, 황산나트륨, 황산칼륨 및 삼투용해물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 응집 억제제가 아르기닌, 프롤린, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 다가 알콜, 글리세롤, 슈크로스, 소르비톨, 글루코스, 트리스, 황산나트륨, 황산칼륨 및 삼투용해물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 티올-쌍이 환원된 글루타티온, 산화된 글루타티온, 시스테인, 시스틴, 시스테아민, 시스타민 및 베타-머캅토에탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 한 가지 이상의 성분을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 항온처리가 비-호기성 조건하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 분리가 혼합물을 친화성 분리 매트릭스와 접촉시킴을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 친화성 분리 매트릭스가 단백질 A 수지인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 친화성 수지가 혼합 방식 분리 매트릭스인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 분리가 혼합물을 이온 교환 분리 매트릭스와 접촉시킴을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 분리가 여과 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 여과 단계가 침출 여과를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 출원은 본원에 참조로서 인용되는, 2009년 6월 22일자로 출원된 미국 가출원 번호 제61/219,257호의 우선권을 주장한다.
- [0002] 본 발명은 일반적으로 고농도에서의 단백질 재폴딩에 관한 것이고, 더욱 구체적으로 2.0g/ℓ 이상 농도의 용액 중에서 단백질의 재폴딩에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 재조합 단백질은, 세균 및 효모와 같은 비-포유동물 세포를 비롯한 다양한 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 세균과 같은 원핵 세포에서 재조합 단백질의 발현과 관련된 단점은 통상적으로 봉입체(inclusion body)로 언급되는 제한된 가용성의 세포내 침전물로 발현된 단백질이 침전한다는 것이다. 봉입체는 세균 숙주 세포가 고수준의 발현에서 재조합 단백질을 적절히 폴딩시키지 못하여 단백질이 불용성이 되는 결과로서 형성된다. 이것은 특히 진핵 세포 기원의 대형 복합체 또는 단백질 서열의 원핵 세포 발현에서 실제로 나타난다. 부정확하게 폴딩된 재조합 단백질의 형성은 고수준의 효율로 재조합 대형 복합 단백질을 제조하기 위한 세균 발효의 상업적 유용성을 상당히 제한하였다.
- [0004] 세균과 같은 비-포유동물 발현 시스템에서 상업적으로 실행가능한 수준에서 단백질의 재조합 발현이 도래한 이후, 세균성 봉입체로부터 정확하게 폴딩된 단백질을 수득하기 위한 다양한 방법이 개발되어 왔다. 이들 방법은 일반적으로, 전형적으로 봉입체로 침전하는 단백질을 발현시키고, 상기 세포를 용해시키고, 봉입체를 수거함에 이어서, 변성제 또는 계면활성제 및 임의로 환원제(이것은 단백질을 언폴딩(unfold)시키고 봉입체를 거의 구조를 갖지 않는 개별 단백질 쇄로 분해시킨다)를 포함하는 가용화 완충액 내에서 상기 봉입체를 가용화시키는 과정에 따른다. 후속적으로, 상기 단백질 쇄를 재폴딩 완충액(이것은 생물학적 활성 형태로의 복원(renaturation)을 지원한다)으로 희석시키거나 세척한다. 시스템인 잔기가 단백질의 1차 아미노산 서열에 존재하는 경우, 이것은 흔히, 디설파이드 결합이 정확하게 형성되도록 하는 환경(예를 들어, 산화환원 시스템)에서 재폴딩시킬 필요가 있다.
- [0005] 2개 이상의 디설파이드를 포함하는 분자와 같은 복합 분자에 대한 전형적인 재폴딩 농도는 2.0 g/ℓ 미만 및 더욱 전형적으로는 0.01 내지 0.5 g/ℓ 이다 (문헌참조: Rudolph & Lilie, (1996) FASEB J. 10:49-56). 따라서, 항체, 펩티바디 또는 다른 Fc 융합 단백질과 같은 대형 질량의 복합 단백질을 산업적 생산 규모에서 재폴딩시키는 것은 이들 전형적인 생성물 농도에서 단백질을 재폴딩시키는데 큰 용적이 요구되기 때문에, 상당한 한계를 부과하고 상기 산업에서 직면한 통상적인 문제점이다. 이들 유형의 단백질의 재폴딩 농도를 제한하는 한 가지 인자는 부정확하게 쌍을 이룬 디설파이드 결합이 형성되고, 이어서 이것이 상기 단백질 형태가 응집되게 하는 경향을 증가시킬 수 있다는 것이다. 산업적 규모로 단백질을 제조하는 경우 포함되는 대형 용적의 물질 및 대형 풀(pool) 크기로 인해, 상기 공정에서 하나 이상의 단계를 제거하거나 단순화시킴에 의해 상당한 시간 및 자원이 절약될 수 있다.
- [0006] 단백질 재폴딩은 이전에 더욱 고농도에서 입증되었지만, 재폴딩된 상기 단백질은 분자량이 상당히 작거나 단지 1개 또는 2개의 디설파이드 결합을 함유하는 덜 복잡한 분자이다(문헌참조: 예를 들어, Creighton, (1974) J. Mol. Biol. 87:563-577). 추가로, 상기 단백질에 대한 재폴딩 과정에서는 세제 기반 재폴딩 화학물질을 사용하거나(문헌참조: 예를 들어, Stoeckel et al., (1997) Eur J Biochem 248:684-691) 고압 폴딩 전략(문헌참조: St John et al., (2001) J. Biol. Chem. 276(50):46856-63)을 사용하였다. 항체, 펩티바디 및 기타 대형 단백질과 같은 더욱 복잡한 분자는 일반적으로 세제 재폴딩 조건에 순응하지 않고 전형적으로 카오토로픽 재폴딩 용액에서 재폴딩된다. 이들 더욱 복잡한 분자는 흔히 2개 초과 디설파이드 결합을 갖고, 흔히 8개 내지 24개의 디설파이드 결합을 가지며 동중- 또는 이중-이량체를 형성하는 다중쇄 단백질일 수 있다.
- [0007] 본원에서의 보고 때까지, 이들 유형의 복합 분자는 고농도, 즉 2.0 g/ℓ 이상의 농도에서는 재폴딩될 수 없어 소규모상에서 의미있는 정도의 효율을 가졌고 산업적 규모에서는 명백히 아니었다.
- [0008] 대조적으로 본원에 기재된 방법은 적당히 재폴딩된 복합 단백질을 제공하기 위해 소규모 또는 대규모(예를 들어 산업적 규모)에서 고농도로 수행될 수 있다. 고농도 및 대규모에서 단백질을 재폴딩시키는 능력은 재폴딩 작업 자체의 효율이 증진되는 것으로 간주될 수 있고 또한 추가의 장비 및 인력에 대한 필요성을 제거함에 의한 시간 절약 및 비용 절감을 나타낸다. 따라서, 고농도로 존재하는 단백질을 재폴딩시키는 방법은 단백질 제조 과정에 대해 더욱 높은 효율 및 비용 절감으로 간주될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 생성물-중 분포에 대한 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도의 효과를 도시하는 일련의 플롯(plot)이고; 도 1a는 5mM 완충액 강도의 효과를 도시하고; 도 1b는 7.5mM 완충액 강도의 효과를 도시하고, 도 1c는 10mM 완충액 강도의 효과를 도시하고; 도 1d는 12.5mM 완충액 강도의 효과를 도시하고; 도 1e는 15mM 완충액 강도의 효과를 도시하고; 도 1f는 20mM 완충액 강도의 효과를 도시한다.
- 도 2는 고정된 티올-쌍 비율 및 티올-쌍 완충액 강도하에 중 분포에 대한 통기 정도(degree of aeration)의 효과를 도시하는 일련의 플롯이다.
- 도 3은 6g/ℓ에서 수행되고 1ℓ 및 2000ℓ에서 수행된 기재된 방법의 양태를 사용하여 최적화된, 화학적으로 조절된, 비-호기성 재폴딩의 분석학적 오버레이(overlay)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] <발명의 요약>
- [0011] 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/ℓ 이상 농도의 용적중에 존재하는 단백질을 재폴딩시키는 방법은 (a) 최종 티올-쌍 비율이 0.001 내지 100의 범위이고 산화환원 완충액 강도가 2mM 이상인 산화환원 성분, 및 (i) 변성제; (ii) 응집 억제제 및 (iii) 단백질 안정화제 중에서 한 가지 이상을 포함하는 재폴딩 완충액과 상기 단백질을 접촉시켜 재폴딩 혼합물을 형성하는 단계; (b) 재폴딩 혼합물을 항온처리하는 단계; (c) 재폴딩 혼합물로부터 상기 단백질을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0012] 다양한 양태에서, 상기 산화환원 성분은 최종 티올-쌍 비율이 0.001 이상이지만 100 이하이고, 예를 들어, 범위가 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50이고 티올-쌍 완충액 강도는 2mM 이상이고, 예를 들어 2.25 mM 이상, 2.5 mM 이상, 2.75 mM 이상, 3 mM 이상, 5 mM 이상, 7.5 mM 이상, 10 mM 이상, 또는 15 mM 이상이고, 이때, 티올-쌍 완충액 강도는 효과적으로 최대 100mM로 고정된다. 다시 말해서, 범위와 관련하여, 혼합물을 형성하기 위한 상기 티올 완충액 강도는 2 내지 20 mM, 예를 들어, 2.25 mM 내지 20 mM, 2.5 mM 내지 20 mM, 2.75 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 20 mM, 5 mM 내지 20 mM, 7.5 mM 내지 20 mM, 10 mM 내지 20 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM일 수 있다.
- [0013] 재폴딩 완충액의 하나의 양태에서, 상기 재폴딩 완충액은 트리스(Tris) 완충액 내에 우레아, 아르기닌-HCl, 시스테인 및 시스타민을 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 성분들은 실시예 3에 기재된 비율로 재폴딩 완충액 내에 존재한다.
- [0014] 재폴딩 완충액의 또 다른 양태에서, 상기 재폴딩 완충액은 트리스 완충액 내에 우레아, 아르기닌 HCl, 글리세롤, 시스테인 및 시스타민을 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 성분은 실시예 4에 기재된 비율로 재폴딩 완충액 내에 존재한다.
- [0015] 몇몇 양태에서, 상기 단백질은 초기에 봉입체와 같은 비-자연의 제한된 가용성 형태로 용적중에 존재한다. 또한, 상기 단백질은 가용성 형태로 용적중에 존재한다. 상기 단백질은 재조합 단백질일 수 있거나, 또는 이것은 내인성 단백질일 수 있다. 상기 단백질은 항체 또는 다량체성 단백질과 같은 복합 단백질일 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 단백질은 Fc 도메인에 융합되거나 결합된 단백질과 같은 Fc-단백질 접합체(conjugate)이다.
- [0016] 비-포유동물 발현 시스템은 세균 발현 시스템 또는 효모 발현 시스템일 수 있다.
- [0017] 재폴딩 완충액 내에 변성제는 우레아, 구아니디늄 염, 디메틸 우레아, 메틸우레아 및 에틸우레아로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 재폴딩 완충액 내에 단백질 안정화제는 아르기닌, 프롤린, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 다가 알콜, 글리세롤, 슈크로스, 소르비톨, 글루코스, 트리스, 황산나트륨, 황산칼륨 및 삼투용해물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 응집 억제제는 아르기닌, 프롤린, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 다가 알콜, 글리세롤, 슈크로스, 소르비톨, 글루코스, 트리스, 황산나트륨, 황산칼륨 및 삼투용해물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 티올-쌍은 환원된 글루타티온, 산화된 글루타티온, 시스테인, 시스틴, 시스테아민, 시스타민 및 베타-머캅토에탄올로 구성된 군으로부터 선택된 한 가지 이상의 성분을 포함할 수 있다.

- [0018] 다양한 양태에서, 정제는 상기 혼합물을, 단백질 A 또는 단백질 G 수지와 같은 친화성 분리 매트릭스와 접촉 시킴을 포함할 수 있다. 또한, 친화성 수지는 혼합형 분리 매트릭스 또는 이온 교환 분리 매트릭스일 수 있다. 다양한 측면에서, 상기 항온처리는 호기성 조건 또는 비-호기성 조건하에서 수행될 수 있다.
- [0019] <발명의 상세한 설명>
- [0020] 관련 문헌은 다양한 단백질 재폴딩 작업을 최적화하는 경우 재폴딩 완충액 티올-쌍 비율이 의도적으로 다양하고, 그 결과로서 티올 완충액 강도가 광범위한 강도에 걸쳐 의도하지 않게 다양함을 시사한다(문헌참조: 예를 들어, Lilie, Schwarz & Rudolph, (1998) Current Opinion in Biotechnology 9(5):497-501, and Tran-Moseman, Schauer & Clark (1999) Protein Expression & Purification 16(1):181-189). 한 연구에서, 티올 쌍 비율과 완충액 강도간의 관계가 용해된 구형체(molten globule)를 형성하는 단순한 단일쇄 단백질인 라이소자임에 대해 조사되었다(문헌참조: De Bernardez et al, (1998) Biotechnol. Prog. 14:47-54). 드 베르나르데즈(De Bernardez) 연구에서는 일방향 반응 모델의 동력학을 고려한 모델 측면에서 티올 농도가 보고되었다. 그러나, 대부분의 복합 단백질은 초기에 보고되지 않은 가역적 열역학 평형에 의해 지배된다(문헌참조: 예를 들어, Darby et al., (1995) J. Mol. Biol. 249:463-477). 더욱 복잡한 거동은 항체, 펩티바디 및 다른 Fc 융합 단백질과 같은 많은 디설파이드 결합을 포함하는 대형 다중쇄 단백질의 경우에 예상된다. 본원에서 보고될 때까지, 단백질 생산 효율과 관련된 복합 단백질에 대한 티올 완충액 강도, 티올-쌍 비율 화학반응 및 단백질 농도의 특정 관계가 보고된 바 없다. 결과적으로, 고도로 농축된 용액에서 단백질을 재폴딩시키는 능력은 대부분 비효율적이거나 이를 수 없는 목표였고 단백질 생산, 특히 산업적 규모에서 단백질 생산에서 병목 현상을 유발하였다.
- [0021] 본원에서 기재되기 전에, 티올-쌍 비율과 티올-쌍 완충액 강도의 별개의 효과에 대한 특정 통제된 조사는 복합 단백질에 대해 보고된 바 없다. 본원에 기재된 바와 같이, 티올-쌍 비율과 단백질 농도와 연계하여 티올-쌍 완충액 강도를 조절함에 의해 단백질 폴딩 작업 효율은 최적화되고 증진될 수 있고 예를 들어, 2g/ℓ 이상의 고농도에서 단백질의 재폴딩이 성취될 수 있다.
- [0022] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 2.0g/ℓ 초과와 같은 고 단백질 농도에서 단백질 재폴딩을 촉진시키는 산화환원 티올-쌍 비율 화학반응의 동정 및 조절에 관한 것이다. 상기 방법은, 항체, 펩티바디 및 다른 Fc 융합 단백질과 같은 Fc 도메인을 포함하는 단백질을 포함하여, 단순 단백질 및 복합 단백질(예를 들어, 2 내지 23개의 디설파이드 결합을 포함하거나 아미노산 잔기가 250개 초과이거나 MW가 20,000 돌턴 초과인 단백질)을 포함하는 임의의 유형의 단백질에 적용될 수 있고 실험실 규모(전형적으로 밀리리터 또는 리터 규모), 파일럿 공장 규모(전형적으로 수백 리터) 또는 산업적 규모(전형적으로 수천 리터)상에서 수행될 수 있다. 펩티바디 및 다른 Fc 융합체로서 공지된 복합 분자의 예는 미국 특허 제6,660,843호, 미국 특허 제7,138,370호 및 미국 특허 제7,511,012호에 기재되어 있다.
- [0023] 본원에 기재된 바와 같이, 티올 완충액 강도와 산화환원 티올-쌍 비율간의 관계가 조사되고 최적화되어 다양한 규모상에서 2.0g/ℓ 이상의 농도에서 단백질을 재폴딩하는 재현가능한 방법이 제공되었다. 수확식은 완충액 티올-쌍 비율 및 완충액 티올 강도의 매트릭스를 성취하기 위한 개별 산화환원 커플 성분의 비율 및 강도를 정확히 계산하기 위해 추론되었다. 일단 상기 관계가 설정되었고 티올 완충액 강도와 티올-쌍 비율이 상호 작용하여 재폴딩 반응에서 수득한 생성물 관련 종의 분포를 한정함을 시스템적으로 입증할 수 있었다.
- [0024] 그러나, 상기 완충액 티올-쌍 비율은 전체 반응에서 전체 시스템 티올-쌍 비율을 결정하는데 있어서 하나의 요소에 불과하다. 언폴딩된 단백질에서 시스테인 잔기는 또한 반응물이기 때문에, 완충액 티올 강도는 최적의 시스템 티올-쌍 비율을 성취하기 위해서는 단백질 농도의 증가에 비례하여 변할 필요가 있다. 따라서, 완충액 티올 강도가 티올-쌍 비율과 상호작용함이 입증된 것 외에도 또한 완충액 티올 강도가 전체 반응에서 단백질 농도와 관련이 있는 것으로 나타났다. 완충액 티올 강도와 시스템 티올 쌍 비율의 최적화는 복합 단백질과 같은 특정 단백질에 맞게 조정되어 시스테인의 잘못된 쌍 형성을 최소화하고 고농도에서 재폴딩을 촉진시킬 수 있다.
- [0025] I. 정의
- [0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 부정관사 "a" 및 "an"은 달리 언급되지 않는 경우 하나 이상을 의미한다.

- [0027] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-포유동물 발현 시스템"은 포유동물 이외의 유기체로부터 유래된 세포(대장균(*E. coli*)과 같은 세균 및 효모를 비롯한 원핵 세포가 포함되지만 이에 제한되지 않는다)에서 단백질을 발현시키기 위한 시스템을 의미한다. 흔히 비-포유동물 발현 시스템은 목적하는 재조합 단백질을 발현시키는 데 사용되고 다른 경우에, 목적 단백질은 비-포유동물 세포에 의해 발현되는 내인성 단백질이다. 본원의 목적을 위해, 목적 단백질이 내인성이거나 재조합인지에 상관없이, 단백질이 비-포유동물 세포에서 발현되는 경우 상기 세포는 "비-포유동물 발현 시스템"이다. 유사하게, "비-포유동물 세포"는 포유동물 이외의 다른 유기체로부터 유래된 세포이고 이의 예는 세균 또는 효모를 포함한다.
- [0028] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변성제"는 단백질과 접촉하게 되는 경우 단백질의 2차 및 3차 구조의 일부 또는 전부를 제거하는 능력을 갖는 임의의 화합물을 의미한다. 상기 용어 변성제는 변성에 영향을 미치는 특정 화학적 화합물 및 변성에 영향을 미치는 특정 화합물을 포함하는 용액을 언급한다. 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있는 변성제의 예는 우레아, 구아니디늄 염, 디메틸 우레아, 메틸우레아, 에틸우레아 및 이들의 배합물을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0029] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "응집 억제제"는 2개 이상의 단백질 간에 상호작용을 붕괴시키고 감소시키거나 제거하는 능력을 갖는 임의의 화합물을 의미한다. 응집 억제제의 예는 아르기닌, 프롤린 및 글리신과 같은 아미노산; 글리세롤, 소르비톨, 슈크로스 및 트레할로스와 같은 폴리올 및 당; 폴리소르베이트 20, CHAPS, 트리톤 X-100 및 도데실 말토사이드와 같은 계면활성제; 및 이들의 배합물을 포함할 수 있지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같이, "단백질 안정화제"는, 단백질의 본래의 상태가 개선되거나 호전되도록 단백질의 반응 평형 상태를 변화시키는 능력을 갖는 임의의 화합물을 의미한다. 단백질 안정화제의 예는 당 및 다가 알콜, 예를 들어, 글리세롤 또는 소르비톨; 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 α -사이클로덱스트린과 같은 중합체; 아르기닌, 프롤린 및 글라이신과 같은 아미노산 염; 트리스, 황산나트륨 및 황산칼륨과 같은 삼투용해물 및 특정 호프메이스터(Hoffmeister) 염; 및 이의 배합물을 포함할 수 있지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc" 및 "Fc 영역"은 상호교환적으로 사용되고 사람 또는 비-사람(예를 들어, 쥐) C_{H2} 및 C_{H3} 면역글로불린 도메인을 포함하거나 사람 또는 비-사람 C_{H2} 및 C_{H3} 면역글로불린 도메인과 90% 이상 동일한 2개의 연속 영역을 포함하는 항체 단편을 의미한다. Fc는 Fc 수용체와 상호작용할 능력을 가질 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다[문헌참조: 예를 들어, Hasemann & Capra, "Immunoglobulins: Structure and Function," in William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989)(이의 전반적인 내용이 본원에 참조로서 인용됨)].
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 상호교환적으로 사용되고 펩타이드 결합에 의해 결합된 5개 이상의 자연 또는 비자연 발생 아미노산의 임의의 쇄를 의미한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분리된" 및 "정제한다"는 상호교환적으로 사용되고 이종 요소, 예를 들어, 생물학적 거대 분자, 예를 들어, 목적 단백질을 포함하는 샘플중에 존재할 수 있는 단백질 또는 DNA의 양이 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상 감소된 것을 의미한다. 이종성 단백질의 존재는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 겔 전기영동 및 염색 및/또는 ELISA 분석을 비롯한 임의의 적당한 방법에 의해 분석될 수 있다. DNA 및 다른 핵산의 존재는 겔 전기영동 및 염색 및/또는 폴리머라제 연쇄 반응을 사용한 분석을 비롯한 임의의 적당한 방법에 의해 분석될 수 있다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "복합 분자"는 (a) 20,000 MW 초과이거나 250개 초과인 아미노산 잔기를 포함하고 (b) 이의 자연 형태에서 2개 이상의 디설파이드 결합을 포함하는 임의의 단백질을 의미한다. 복합 분자는 다량체를 형성할 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다. 복합 분자의 예는 항체, 펩티바디, 그리고 Fc 도메인 및 기타 대형 단백질을 포함하는 다른 키메라 분자를 포함하지만 이들에 제한되지 않는다. 펩티바디 및 기타 Fc 융합체로서 공지된 복합 분자의 예는 미국 특허 제6,660,843호, 미국 특허 제7,138,370호 및 미국 특허 제7,511,012호에 기재되어 있다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "펩티바디"는 임의로 링커를 통해 Fc 도메인과 함께 결합된 하나 이상의 생물학적 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 언급한다. 펩티바디의 예시에 대해 미국 특허 제6,660,843호, 미국 특허 제7,138,370호 및 미국 특허 제7,511,012호를 참조한다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재폴딩"은 시험관내 또는 생체내에서 예를 들어, 발현 조건 또는 의도적 변

성 및/또는 환원의 결과로서 이의 자연 2차 구조 또는 3차 구조의 일부 또는 전부가 제거된 단백질에 2차 구조 및 3차 구조를 재도입하는 과정을 의미한다. 따라서, 재폴딩된 단백질은 이의 자연 2차 구조 또는 3차 구조의 일부 또는 전부가 재도입된 단백질이다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "완충액 티올-쌍 비율"은 수학식 1에 정의된 바와 같이 재폴딩 완충액에 사용되는 환원되고 산화된 산화환원 종의 관계에 의해 정의된다:

수학식 1

완충액 티올-쌍 비율(TPR)의 정의

$$\text{완충액 TPR} = \frac{\left[\frac{\text{환원제}}{\text{산화제}} \right]^2}{\left[\frac{\text{시스테인}}{\text{시스타민}} \right]^2}$$

[0038]

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "완충액 티올 강도", "티올-쌍 완충액 강도", 및 "티올-쌍 강도"는 상호교환적으로 사용되고 즉, 전체 1당량 티올 농도로서 수학식 2에서 정의되고, 이때 전체 농도는 환원된 종의 합이고 산화된 종 농도의 2배이다.

수학식 2

완충액 티올-쌍 완충액 강도/티올 완충액 강도(BS)의 정의

$$\text{티올-쌍 완충액 강도} = 2[\text{산화제}] + [\text{환원제}] = 2[\text{시스타민}] + [\text{시스테인}]$$

[0040]

[0041] 티올-쌍 비율과 티올-쌍 완충액 강도 간의 관계는 수학식 3 및 4에서 기재된다.

수학식 3

정의된 산화환원 완충액 강도(BS) 및 완충액 산화환원 전위에 대한 환원된 산화환원 종의 계산

$$\text{환원된 산화환원 성분의 농도} = \frac{\left(\sqrt{\text{완충액TPR}^2 + 8 * \text{완충액TPR} * \text{BS}} \right) - \text{완충액TPR}}{4}$$

[0042]

수학식 4

정의된 산화환원 완충액 강도(BS) 및 완충액 산화환원 전위에 대한 산화된 산화환원 종의 계산

$$\text{산화된 산화환원 성분의 농도} = \frac{\left(\frac{\text{환원된 산화환원 성분의 농도}}{\text{TPR}} \right)^2}{\text{TPR}}$$

[0043]

- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "산화환원 성분"은 임의의 티올 반응성 화학물질 또는 단백질의 또 다른 티올 또는 시스테인 잔기와 가역적 티올 교환을 촉진시키는 화학물질을 포함하는 용액을 의미한다. 상기 화합물의 예는 환원된 글루타티온, 산화된 글루타티온, 시스테인, 시스틴, 시스테아민, 시스타민, 베타-머캅토에탄올 및 이들의 배합물을 포함하지만 이들에 제한되지 않는다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "가용화"는 염, 이온, 변성제, 세제, 환원제 및/또는 또 다른 유기 분자가 목적 단백질을 포함하는 용액에 첨가되어 단백질의 2차 및/또는 3차 구조의 일부 또는 전부를 제거하고 단백질을 용매에 용해시키는 공정을 의미한다. 상기 공정은 승온, 전형적으로 10 내지 50℃, 더욱 통상적으로는 15 내지 25℃의 사용 및/또는 알칼리성 pH, 예를 들어, pH 7-12의 사용을 포함할 수 있다. 가용화는 또한 산, 예를 들어, 70% 포름산을 첨가하여 성취될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Cowley & Mackin (1997) FEBS Lett 402:124-130).
- [0046] "가용화된 단백질"은 단백질의 2차 및/또는 3차 구조의 일부 또는 전부가 제거된 단백질이다.
- [0047] "가용화 풀"은 염, 이온, 변성제, 세제, 환원제 및/또는 단백질을 가용화하기 위해 선택된 다른 유기 분자 뿐만 아니라 목적하는 가용화된 단백질을 포함하는 특정 용적의 용액이다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비-호기성 조건"은 기계적 또는 화학적 수단에 의한 혼합물의 의도적 통기 없이 수행되는 임의의 반응 또는 항온처리 조건을 의미한다. 비-호기성 조건하에서 자연적으로 존재하는 한 산소가 존재할 수 있고 산소를 시스템으로 첨가할 의도로 시스템에 도입되지 않는다. 비-호기성 조건은 예를 들어, 밀봉 상부 공간(headspace) 압력 제한, 보유 용기내 함유된 공기 또는 산소의 부재 또는 제한된 노출, 공기 또는 산소 오버레이, 공정 스케일링 동안 물질 이동에 관여하는 특정 수용 공간의 부재, 또는 반응 시스템 내 산소의 존재를 고무시키는 가스 살포 또는 혼합의 부재에 의해, 반응 용액으로의 산소 전달을 제한시킴에 의해 달성될 수 있다. 비-호기성 조건은 또한 화학적 처리, 밀봉 상부 공간 오버레이 또는 불활성 가스 또는 진공으로의 가압에 의해 산소를 의도적으로 제한, 또는 시스템으로부터 제거하거나, 또는 아르곤 또는 질소와 같은 가스를 살포하여 반응 혼합물 내에 산소 농도를 감소시킴에 의해 성취될 수 있다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비-자연" 및 "비-자연 형태"는 상호교환적으로 사용되고, Fc 도메인을 포함하는 단백질과 같은 목적 단백질과 관련하여 사용되는 경우, 단백질의 생물학적 활성을 평가하기 위해 디자인된 적당한 생체내 또는 시험관내 분석에서 생물학적으로 활성인 단백질 형태로 발견되는 한 가지 이상의 형성된 구조적 특성이 단백질에 부재함을 의미한다. 비-자연 형태의 단백질에 부재할 수 있는 구조적 특징의 예는 디설파이드 결합, 4차 구조, 붕괴된 2차 또는 3차 구조 또는 적절한 분석에서 단백질이 생물학적으로 불활성이 되도록 하는 상태를 포함할 수 있지만 이들에 제한되지 않는다. 비-자연 형태의 단백질은 응집할 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비-자연 제한된 가용성 형태"는 Fc 도메인을 포함하는 단백질과 같은 목적 단백질과 관련하여 사용되는 경우, (a) 단백질의 생물학적 활성을 평가하기 위해 디자인된 생체내 또는 시험관내 분석에서 적절히 생물학적 활성이고/거나 (b) 가용성이 되도록 하기 위해 화학적 처리와 같은 처리를 필요로 하는 응집체를 형성하는 단백질 형태에서 발견되는 한 가지 이상의 형성된 구조적 특징이 단백질에 부재하는 임의의 형태 또는 상태를 의미한다. 상기 용어는 구체적으로 재조합 단백질이 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되는 경우 때때로 발견되는 것들과 같은, 봉입체로 존재하는 단백질을 포함한다.
- [0051] II. 이론
- [0052] 2.0 g/ℓ 이상의 농도로 풀 내에 존재하는 미생물 유래 분자의 재폴딩은 다양한 이유 때문에 유리한데, 주로 관련된 반응 용적을 감소시키고 공정 처리량을 증가시키기 때문이다. 공정 스케일링 견지에서, 호기성 조건을 요구하지 않는 조건하에서 재폴딩하는 것이 유리하고 상기 조건은 예를 들어, 연속 또는 간헐적 살포, 공기 또는 산소 밀봉 상부 공간 오버레이의 수행에 의하거나, 밀봉 상부 공간을 가압시키거나, 또는 고효율 혼합을 사용함에 의해 성취될 수 있다. 시스템내 산소 농도는 물질 이동과 관련되기 때문에, 재폴딩 반응의 스케일링은 탱크 구조, 용적 및 혼합 변화와 같은 인자때문에 상당히 더욱 어려워진다. 추가로, 산소는 단백질내 디설파이드 결합 형성에서 직접적인 반응물이 아닐 수 있고 물질 이동 인자와 직접 관련될 가능성이 없다. 이것은 추가로 반응의 스케일링을 복잡하게 한다. 따라서, 비-호기성의 화학적으로 조절된 산화환원 시스템이 단백질의 재폴딩을 위해 바람직하다. 상기 조건의 예는 본원에 제공된다.

- [0053] 소정의 단백질에 대한 최적의 재폴딩 화학반응은 세심하게 균형을 이루어 폴딩된/산화된 상태를 최대화하면서 목적하지 않은 생성물 중, 예를 들어, 응집물, 형성되지 않은 디설파이드 브릿지(예를 들어, 환원된 시스테인 쌍), 부정확한 디설파이드 쌍 형성(이는 잘못된 폴딩을 유발할 수 있다), 산화된 아미노산 잔기, 탈아미드화된 아미노산 잔기, 부정확한 2차 구조 및 생성물 관련 부가물(예를 들어, 시스테인 또는 시스테아민 부가물)을 최소화한다. 상기 균형을 성취하는데 있어서 중요한 한가지 인자는 재폴딩 시스템의 산화환원 상태이다. 산화환원 상태는 단백질내 포함된 시스테인 잔기 수, 재폴딩 용액내 산화환원 커플 화학물질(예를 들어, 시스테인, 시스틴, 시스타민, 시스테아민, 환원된 글루타티온 및 산화된 글루타티온)의 비율 및 농도, 가용화 완충액으로부터 전달되는 환원제(예를 들어, DTT, 글루타티온 및 베타-머캅토에탄올)의 농도, 혼합물내 중금속의 수준 및 용액내 산소의 농도를 포함하지만 이들에 제한되지 않는 많은 인자에 의해 영향을 받는다.
- [0054] 티올-쌍 비율 및 티올-쌍 완충액 강도는 시스테인 및 시스타민을 각각 환원제 및 산화제 예로서 사용하여 상기 수학적 1 및 2에서 정의된다. 단백질 농도 및 가용화로부터 환원제 전달(carry-over)과 커플링된 이들은 티올-쌍 비율과 티올-쌍 완충액 강도간의 균형을 성취하는데 있어서 요소들일 수 있다.
- [0055] 도 1로 돌아가서, 상기 도면은 생성물-관련 종의 분포에 대한 티올-쌍 비율 및 티올 완충액 강도의 효과를 도시하고 이는 복합 이량체성 단백질에 대해 역상 HPLC 분석에 의해 가시화된다. 도 1a-1f에서, 점선은 산화된 아미노산 잔기, 단일쇄 중 및 안정하게 혼합된 디설파이드 중간체를 갖는 단백질 종을 나타내고 대쉬 라인(dashed line)은 잘못된 쌍 형성 또는 부정확하게 형성된 디설파이드 단백질 종 및 부분적으로 형성되지 않은 디설파이드 연결을 갖는 단백질 종을 나타낸다. 실선은 적절히 폴딩된 단백질 종을 나타낸다. 도 1a-1f는 일정한 6g/l의 단백질 농도에서, 티올-쌍 완충액 강도가 증가됨에 따라 필적하는 종 분포를 성취하기 위해 요구되는 티올-쌍 비율 역시 증가해야만 함을 입증한다. 예를 들어, 도 1에 나타난 바와 같이, 완충액 강도가 5mM로부터 10mM로 증가되는 경우, 균형을 이룬 티올-쌍 비율은 필적할만한 종 분포를 성취하기 위해서는 약 2배 높아야 할 것이다. 이것은 주로 전체 시스템 티올-쌍 비율에 대하여, 가용화로부터 전달된 환원제의 증가된 완충작용 때문이다. 더욱 낮은 산화 환원 완충액 강도에서, 전체 시스템은 조절하기가 더욱 어려워진다. 단백질 농도 및 단백질 서열내에 포함된 시스테인의 수는 또한 시스템을 조절하기 위해 요구되는 최저 요구치의 티올-쌍 완충액 강도와 관련된다. 단백질마다 다양한 특정 포인트 미만에서, 단백질 티올 농도는 산화환원 커플 화학물질을 압도할 수 있어 재현불가능한 결과를 유도한다.
- [0056] 도 1에 도시된 결과에서, 재폴딩 용액의 티올-쌍 비율이 의도적으로 더욱 환원성이도록 설정된 경우, 수득한 생성물 분포는 환원된 생성물 종을 더욱 많이 생성하는 쪽으로 이동한다(대쉬 라인). 재폴딩 용액의 티올-쌍 비율이 의도적으로 더욱 낮아지거나 더욱 산화성이도록 설정된 경우, 수득한 생성물 분포는 산화된 잔기, 단일쇄 형태 및 안정하게 혼합된 디설파이드 중간체 종(점선)을 더욱 많이 생성하는 쪽으로 이동한다. 최적의 티올-쌍 비율 및 티올-쌍 완충액 강도를 선택하는 능력이 목적하는 폴딩된 단백질 형태의 생성을 위한 최적화를 가능하게 한다. 상기 최적화된 생성은 재폴딩 풀에서 목적하는 폴딩된 단백질 종의 양 또는 수율을 최대화하거나, 또는 수득한 목적하지 않은 생성물 관련 종을, 후속 정제 단계에서 가장 용이하게 제거됨에 따라 공정 수율 또는 순도에 전체 이득을 유도하는 형태로 의도적으로 전이시킴에 의해 성취될 수 있다.
- [0057] 산화환원 성분 티올-쌍 비율 및 티올-쌍 완충액 강도의 최적화는 각각의 단백질에 대해 수행될 수 있다. 매트릭스 또는 일련의 다인성 매트릭스는 목적하는 종의 수율 및 분포를 최적화하는 조건을 위해 재폴딩 반응을 최적화하기 위해 평가될 수 있다. 최적화 스크린은 완전한 또는 부분적인 요인 매트릭 내에서 산화환원 화학 반응, 티올-쌍 비율, 티올-쌍 완충액 강도, 항온처리 시간, 단백질 농도 및 pH를 시스템적으로 평가하기 위해 설정될 수 있고, 이때 각각의 성분은 3개 이상의 농도 또는 pH 수준 범위에서 다양하고 모든 다른 파라미터는 일정하게 유지된다. 완료된 반응은 표준 다변수 통계학적 도구를 사용하여, 수율 및 생성물 품질에 대한 RP-HPLC 및 SE-HPLC 분석에 의해 평가될 수 있다.
- [0058] III. 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/l 이상의 농도로 용적중에 존재하는 단백질을 재폴딩시키는 방법
- [0059] 본원에 기재된 재폴딩 방법은 특히 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되는 단백질을 재폴딩시키는 데 유용하다. 본원에서 주지된 바와 같이, 비-포유동물 세포는 가용성 또는 완전히 불용성 또는 비-자연 제한된 가용성 형태로 세포내에서 발현되는 재조합 단백질을 생성하도록 조작될 수 있다. 흔히, 상기 세포는 재조합 단백질을 소위 봉입체로 불리우는 큰 불용성 또는 제한된 가용성 응집체로 침적시킨다. 그러나, 특정 세포 성장 조건(예를 들어, 온도 또는 pH)은 세포가 세포내 가용성 단량체 형태로 재조합 단백질을 생성하도록 변형

될 수 있다. 불용성 봉입체로 단백질을 제조하기 위한 대안으로서, 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 세포 용해물로부터 직접 포획될 수 있는, Fc 영역을 포함하는 단백질을 포함하는 가용성 단백질로서 발현될 수 있다. 용해물로부터의 직접적인 포획은 비교적 순수한 단백질의 재폴딩을 가능하게 하여 봉입체 공정에서 요구되는 매우 노동집약적인 수거 및 분리 공정을 피한다. 그러나 상기 재폴딩 방법은 친화성 정제된 샘플에 제한되지 않고 세포 용해물 용액에서 발견된 단백질(즉, 어느 방식으로든 정제되지 않은 단백질)과 같은, 비-포유동물 발현 시스템에서 발현된 단백질을 포함하는 임의의 샘플에 적용될 수 있다.

[0060] 하나의 측면에서, 본 발명은 가용성 형태로 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/ℓ 이상의 농도로 용액중에 존재하는 단백질, 예를 들면, 단백질이 발현되는 비-포유동물 세포의 세포 용해물로부터 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 단백질을 재폴딩시키는 방법에 관한 것이다. 상기 용액은 단백질 정제 공정의 임의의 단계로부터 유래될 수 있지만, 하나의 예에서 상기 용액은 친화성 크로마토그래피 용출 풀(예를 들어, 단백질 A 용출 풀)이다. 또 다른 예에서, 상기 용액은 공정 스트림 내에 위치한다. 그러나, 상기 방법은 Fc-함유 단백질에 국한되지 않고, 그리고 가용성 형태로 발현되고 비-포유동물 유래 세포 용해물로부터 포획된 임의의 종류의 펩타이드 또는 단백질에 적용될 수 있다. 상기 분리된 가용성 단백질은 흔히 환원된 형태로 비-포유동물 세포로부터 방출되고, 따라서 카오트로피제와 같은 변성제를 첨가함에 의한 재폴딩을 위해 준비될 수 있다. 추가로 최적화된 티올-쌍 비율 및 티올-쌍 완충액 강도에서 단백질 안정화제, 응집 억제제 및 산화환원 성분과의 배합은 1 내지 40g/ℓ의 농도에서, 예를 들어, 10 내지 20g/ℓ의 농도에서 재폴딩을 가능하게 한다.

[0061] 상기 방법중 하나의 특정 양태에서, 단백질은 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 고압 용해에 의해 발현 세포로부터 방출된다. 이어서 상기 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 용해물로부터 포획되고 10g/ℓ 이상의 농도로 용액중에 존재한다. 이어서 상기 단백질은 변성제, 응집 억제제, 단백질 안정화제 및 산화환원 성분을 포함하는 재폴딩 완충액과 접촉되고, 이때 산화환원 성분은 0.001 내지 100의 범위, 예를 들어, 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50의 범위를 갖는 최종 티올-쌍 비율(본원에서 정의된 바와 같음) 및 2 mM 이상, 예를 들어, 2.25 mM 이상, 2.5mM 이상, 2.75 mM 이상, 3 mM 이상, 5 mM 이상, 7.5 mM 이상, 10 mM 이상, 또는 15 mM 이상의 티올-쌍 완충액 강도(본원에서 정의된 바와 같음)를 갖고, 여기서 티올-쌍 완충액 강도는 효과적으로 최대 100 mM로 고정된다. 다시 말해서, 범위와 관련하여, 티올 완충액 강도는 2 내지 20 mM, 예를 들어, 2.25 mM 내지 20 mM, 2.5 mM 내지 20 mM, 2.75 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 20 mM, 5 mM 내지 20 mM, 7.5 mM 내지 20 mM, 10 mM 내지 20 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM이다.

[0062] 또 다른 측면에서, 본 발명은 봉입체 형태와 같은 불용성 또는 제한된 가용성 형태로 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되는 단백질을 재폴딩시키는 방법에 관한 것이다. 상기 단백질이 봉입체로 배치되는 경우, 봉입체는 용해된 세포로부터 수거되고 세척되고 농축되고 재폴딩된다.

[0063] 재폴딩 완충액의 최적화는 본원에 제공된 신규 방법을 사용하여 각각의 단백질 및 각각의 최종 단백질 농도 수준에 대해 수행될 수 있다. 실시예에서 나타난 바와 같이, 재폴딩 완충액이 변성제(예를 들어, 우레아 또는 기타 카오트로피제, 유기 용매 또는 강한 세제), 응집 억제제(예를 들어, 약한 세제, 아르기닌 또는 저농도의 PEG), 단백질 안정화제(예를 들어, 글리세롤, 슈크로스 또는 기타 삼투용해물, 염) 및 산화환원 성분(예를 들어, 시스테인, 시스타민, 글루타티온)을 함유하는 경우에, Fc 영역을 포함하는 단백질을 재폴딩시킬 때 양호한 결과를 얻을 수 있다. 최적의 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도는 티올-쌍 비율(이는 0.001 내지 100의 범위를 가질 수 있고, 예를 들어, 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50 범위내일 수 있다) 대 티올-쌍 완충액 강도(이는 2 mM 초과일 수 있고, 예를 들어, 2.25 mM 이상, 2.5 mM 이상, 2.75 mM 이상, 3 mM 이상, 5 mM 이상, 7.5 mM 이상, 10 mM 이상, 또는 15 mM 이상일 수 있고, 여기서, 티올-쌍 완충액 강도는 최대 100 mM로 효과적으로 고정된다. 다시 말해서, 범위와 관련하여, 상기 티올 완충액 강도는 단백질 농도 및 봉입체를 가용화시키기 위해 사용되는 환원제의 농도에 따라 2 내지 20 mM, 예를 들어, 2.25 mM 내지 20 mM, 2.5 mM 내지 20 mM, 2.75 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 20 mM, 5 mM 내지 20 mM, 7.5 mM 내지 20 mM, 10 mM 내지 20 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM이다)의 실험적 매트릭스를 사용하여 결정할 수 있다. 조건은 실시예 2에 기재된 신규 방법을 사용하여 최적화시킬 수 있다.

[0064] 상기 방법의 하나의 특정 양태에서, 단백질은 비-포유동물 발현 시스템에서 발현되고 2.0g/ℓ 이상의 농도로 용액중에 존재한다. 상기 단백질은 변성제, 응집 억제제, 단백질 안정화제 및 산화환원 성분을 포함하는 재폴

딩 완충액과 접촉되고, 이때 산화환원 성분은 0.001 내지 100의 범위, 예를 들어, 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50의 범위내를 갖는 최종 티올-쌍 비율(본원에서 정의된 바와 같음) 및 2 mM 이상, 예를 들어, 2.25 mM 이상, 2.5 mM 이상, 2.75 mM 이상, 3 mM 이상, 5 mM 이상, 7.5 mM 이상, 10 mM 이상, 또는 15 mM 이상의 티올-쌍 완충액 강도(본원에서 정의된 바와 같음)를 갖고, 여기서, 티올-쌍 완충액 강도는 최대 100 mM로 효과적으로 고정된다. 다시 말해서 범위와 관련하여, 티올 완충액 강도는 혼합물을 형성하기 위해 2 내지 20 mM, 예를 들어, 2.25 mM 내지 20 mM, 2.5 mM 내지 20 mM, 2.75 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 20 mM, 5 mM 내지 20 mM, 7.5 mM 내지 20 mM, 10 mM 내지 20 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM이다. 광범위한 변성제 유형이 재폴딩 완충액 내에 사용될 수 있다. 재폴딩 완충액 내에 사용될 수 있는 몇몇 공통된 변성제의 예는 우레아, 구아니디늄, 디메틸 우레아, 메틸우레아 또는 에틸우레아를 포함한다. 변성제의 특정 농도는 본원에 기재된 바와 같은 통상의 최적화에 의해 결정될 수 있다.

[0065] 광범위한 단백질 안정화제 또는 응집 억제제가 재폴딩 완충액 내에 사용될 수 있다. 재폴딩 완충액 내에 유용할 수 있는 몇몇 공통된 응집 억제제의 예는 아르기닌, 프롤린, 폴리에틸렌 글리콜, 비-이온성 계면활성제, 이온성 계면활성제, 다가 알콜, 글리세롤, 슈크로스, 소르비톨, 글루코스, 트리스, 황산나트륨, 황산칼륨, 기타 삼투용해물 또는 유사 화합물을 포함한다. 응집 억제제의 특정 농도는 본원에 기재된 바와 같이 통상의 최적화에 의해 결정될 수 있다.

[0066] 재폴딩 완충액의 산화환원 성분은, 산화환원 성분이 0.001 내지 100의 범위, 예를 들어, 0.05 내지 50, 0.1 내지 50, 0.25 내지 50, 0.5 내지 50, 0.75 내지 40, 1.0 내지 50 또는 1.5 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 10 내지 50, 15 내지 50, 20 내지 50, 30 내지 50 또는 40 내지 50의 범위내의 최종 티올-쌍 비율 및 2 mM 이상, 예를 들어, 2.25 mM 이상, 2.5 mM 이상, 2.75 mM 이상, 3 mM 이상, 5 mM 이상, 7.5 mM 이상, 10 mM 이상, 또는 15 mM 이상의 티올-쌍 완충액 강도(여기서, 티올-쌍 완충액 강도는 효과적으로 최대 100mM로 고정된다)를 갖도록 권고된 임의의 조성물일 수 있다. 다시 말해서, 범위와 관련하여 티올 완충액 강도는 2 내지 20 mM, 예를 들어, 2.25 mM 내지 20 mM, 2.5 mM 내지 20 mM, 2.75 mM 내지 20 mM, 3 mM 내지 20 mM, 5 mM 내지 20 mM, 7.5 mM 내지 20 mM, 10 mM 내지 20 mM, 또는 15 mM 내지 20 mM이다. 적합한 산화환원 성분을 동정하는 방법, 즉, 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도를 결정하는 방법은 공지되어 있고/거나 본원에 제공된다. 산화환원 성분을 형성할 수 있는 특정 티올 쌍의 예는 환원된 글루타티온, 산화된 글루타티온, 시스테인, 시스틴, 시스테인아민, 시스타민 및 베타-머캅토에탄올 중에서 한 가지 이상을 포함할 수 있다. 따라서, 티올-쌍은 예를 들어, 환원된 글루타티온 및 산화된 글루타티온을 포함할 수 있다. 티올 쌍의 또 다른 예는 시스테인 및 시스타민이다. 산화환원 성분은 본원에서 제공된 바와 같이 최적화될 수 있다.

[0067] 상기 단백질은 상기 언급된 티올 쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도를 갖는 산화환원 성분과 접촉시켜 재폴딩 혼합물을 형성한 후, 이어서 상기 재폴딩 혼합물은 목적하는 시간 동안 항온처리한다. 항온처리는 본원에 정의된 바와 같이 비-호기성 조건하에서 수행할 수 있다. 비-호기성 조건은 산소가 완전히 부재일 필요는 없고 단지 초기 시스템에 존재하는 것 이외의 추가의 산소가 의도적으로 도입되지는 않는다. 상기 항온처리 시간은 다양하고, 그리고 원하는 분석학적 성질을 갖는 안정한 재폴딩 혼합물이 성취될 수 있도록 선택된다. 항온처리 시간은 예를 들어, 1시간, 4시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 또는 그 이상일 수 있다.

[0068] 시스템 내에 존재하는 산소 수준에 대한 고농도 재폴딩 민감성 및 소규모에서 더욱 큰 산소 물질 이동의 성향 때문에, 항온처리 단계 동안 산소 수준을 조절하고 비-호기성 조건을 유지하기 위한 방법 및/또는 장치가 개발될 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 과정은 질소 또는 아르곤과 같은 불활성 가스하에 모든 재폴딩 성분들의 제조, 분배 및 혼합을 포함하여 산소가 반응으로 진입하는 것을 회피할 수 있다. 상기 방법은 특히 허용가능한 티올-쌍 비율을 동정하는데 도움이 된다. 15리터 이하의 규모에서 유용한 또 다른 양태에서, 단백질 및 재폴딩 완충액을 함유하는 재폴딩 반응기의 밀봉 상부 공간은 불활성 가스 또는 불활성 가스와 공기 또는 산소의 혼합물로 정화할 수 있고, 그리고 반응 용기는 밀봉하고 항온처리 시간 동안 낮은 회전 속도에서 혼합한다.

[0069] 항온처리 후, 상기 단백질은 재폴딩 혼합물로부터 분리한다. 상기 분리는 임의의 공지된 단백질 정제 방법을 사용하여 성취할 수 있다. 예를 들어, 단백질이 Fc 도메인을 포함하는 경우, 단백질 A 칼럼은 재폴딩 부형체로부터 단백질을 분리하는 적당한 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 다양한 칼럼 크로마토그래피 전략이 사용될 수 있고, 이는 분리되는 단백질의 성질에 의존한다. 실례는 HIC, AEX, CEX 및 SEC 크로마토그래피를 포함한다. 비-크로마토그래피 분리, 예를 들어, 염, 산, 또는 중합체(예를 들어, PEG)를 사용한 침전 역시 고려될 수 있다(문헌참조: 미국 특허출원 제20080214795호). 재폴딩 성분으로부터 단백질을 분리하기 위한 또 다른

대안적인 방법은 접선 유동 여과 시스템을 사용한 투석 또는 투석여과를 포함할 수 있다.

[0070] 또 다른 예시적인 재폴딩 작업에서, 비-포유동물 발현 시스템으로부터 수득된 봉입체는 대략 10 내지 300분 동안 리터당 단백질 10 내지 100g의 범위 및 더욱 전형적으로는 20 내지 40g/ℓ의 범위로 가용화된다. 이어서 상기 가용화된 봉입체는 회석하여 용액 내에 변성제 및 환원제가 단백질이 재폴딩되도록 하는 수준으로 감소되도록 한다. 상기 회석은 우레아, 글리세롤 또는 슈크로스, 아르기닌 및 산화환원 쌍(예를 들어, 시스테인 및 시스타민)을 함유하는 재폴딩 완충액 내에서 1 내지 15g/ℓ 범위의 단백질 농도를 유도한다. 하나의 양태에서, 최종 조성은 1-4 M 우레아, 5-40% 글리세롤 또는 슈크로스, 25-500 mM 아르기닌, 0.1-10 mM 시스테인 및 0.1-10 mM 시스타민이다. 이어서 상기 용액은 1시간 내지 4일 간의 시간에 걸쳐 있을 수 있는 항온처리 동안 혼합한다.

[0071] 본원에 주지된 바와 같이, 상기된 방법은 특히 세균 발현 시스템 및 더욱 구체적으로 단백질이 세균 세포내에서 봉입체 형태로 발현되는 세균 시스템에서 발현되는 단백질에 대해 유용하다. 상기 단백질은 복합 단백질, 즉, (a) 20,000 MW 초과 단백질 또는 250개 초과 아미노산 잔기를 포함하는 단백질 및 (b) 이의 자연 상태에서 2개 이상의 디설파이드 결합을 포함하는 단백질일 수 있다. 단백질이 봉입체로 발현되는 경우, 단백질의 자연 상태에서 발견되는 임의의 디설파이드 결합이 잘못 형성되거나 전혀 형성되지 않을 가능성이 높다. 상기된 방법은 이들 및 다른 형태의 목적 단백질에 적용될 수 있다. 상기된 방법을 사용한 재폴딩을 위해 고려될 수 있는 단백질의 특정 예는 항체를 포함하고, 이들 항체는 통상적으로 그들의 비교적 큰 크기와 다수의 디설파이드 결합 때문에 전형적인 재폴딩 방법을 사용하여 고농도에서 재폴딩되기가 매우 어렵다. 상기 방법은 또한 펩티다제와 같은 다른 Fc 함유 분자를 재폴딩하고, 더욱 일반적으로는 다른 단백질과 융합된 Fc 도메인을 포함하는 임의의 융합 단백질을 재폴딩하는데 사용할 수 있다.

[0072] 상기된 방법의 또 다른 측면은 벤치 규모에서 산업 또는 상업용 규모에 이르기까지 임의의 규모상에서 방법이 수행될 수 있게 하는 그의 스케일링 능력(scalability)이다. 실제로, 상기된 방법은 상업적 규모상에서 특정하게 적용될 수 있고 이 경우에 상기 방법은 대량의 단백질을 효율적으로 재폴딩하기 위해 사용될 수 있다.

[0073] 지금부터 본 발명은 특정 양태를 예시하는 하기의 실시예를 참조로 설명될 것이다. 그러나 이들 양태는 설명을 위한 것이지 어떠한 방식으로든 발명을 제한하는 것으로서 해석되지 말아야 함을 주지해야 한다.

[0074] 실시예

[0075] 본원에 제공된 실시예는 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도가 환경적 영향 및 통기에 불감성인 효율적 재폴딩 반응을 성취하는데 중요함을 입증한다. 이러한 불감성은 공장에서 공장으로의 공정 이동, 산업적 또는 상업적 규모상에서 스케일링의 용이성 때문에 고려된다.

[0076] 본 실시예는 또한 전형적인 재폴딩 반응 농도(0.01-2.0 g/ℓ)에서, 외부 통기에 대한 민감성이 비교적 약함을 입증한다. 그러나, 약 2g/ℓ 이상의 농도에서, 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 농도에 대한 재폴딩 반응의 민감성은 증가되고 거의 모든 화학적 성분들, 특히 산화환원 성분들은 반응에서 단백질 농도의 변화를 수용하도록 조정할 필요가 있을 수 있다.

[0077] 실시예 1

[0078] 제조합 단백질의 발현

[0079] 하나의 양태에서, Fc 잔기를 포함하는 제조합 단백질은 비-포유동물 발현 시스템, 즉 대장균(*E. coli*)에서 발현시키고 봉입체 형태로 세포질 침적물을 형성하도록 하였다. 각각의 단백질에 대한 재폴딩을 위한 공정은 다음과 같다.

[0080] 발현 단계를 완료한 후, 세포 브로쓰를 원심분리하고 액체 분획물을 제거하여 페이스트로서 세포를 잔류시켰다. 상기 세포를 본래 용적의 약 60%로 물에 재현탁시켰다. 이어서 상기 세포를 고압 파쇄기에 3회 통과시켜 용해시켰다. 상기 세포를 용해시킨 후, 용해물을 디스크-스택 원심분리기로 원심분리하여, 제한된 가용성의 비-자연 형태로, 즉, 봉입체로서 발현된 단백질을 고체 분획으로 수거하였다. 상기 단백질 슬러리는 포획된 고체 슬러리를 본래의 발효 브로쓰 용적의 50% 내지 80%로 물에 반복적으로 재현탁시킴에 의해 수회 세척하고 혼합하고 원심분리하여 고체 분획으로 단백질을 수거하였다. 최종 세척된 봉입체를 포획하고 동결

저장하였다.

[0081] 실시예 2

[0082] 재폴딩 조건/산화환원 성분의 동정

[0083] 다중 복합체인 미생물 유래 단백질을 평가하였다. 각각의 단백질을 적당한 수준의 구아니딘 및/또는 우레아 (전형적으로 4 내지 6M 구아니딘 또는 4 내지 9M 우레아의 등량 수준) 또는 상기 단백질을 완전히 변성시키는 2개 변성제의 배합물중에서 가용화시켰다. 상기 단백질을 pH 8.5에서 5 내지 20mM의 DTT로 환원시키고 대략 1 시간 동안 실온에서 항온처리하였다.

[0084] 재폴딩 완충액의 동정은 각각의 단백질에 대해 수행하였다. 수율을 최적화하고 응집물 형성을 최소화하는 조건에 대한 재폴딩 반응을 동정하기 위해 다인성 매트릭스 또는 일련의 다인성 매트릭스를 평가하였다. 동정 스크린은 완전한 요인 매트릭스 중에서 우레아, 아르기닌, 글리세롤 및 pH를 시스템적으로 평가하도록 설정하였고, 이때 각각의 성분은 3개 이상의 농도 범위 또는 pH 수준 범위에서 다양화시키고 모든 다른 파라미터는 일정하게 유지시켰다. 완료된 반응은 표준 다변수 통계학적 도구를 사용하여 수율 및 생성물 품질에 대해 RP-HPLC 및 SE-HPLC로 평가하였다. 이어서 목적하는 바와 같이 작용하는 조건 서브셋을 후속 스크린에서 추가로 평가하여 다인성 스크린에서 pH의 범위, 티올-쌍 비율의 범위, 티올-쌍 완충액 강도의 범위 및 잠재적으로 추가의 부형제 수준의 범위를 평가하였다. 2차 상호작용 역시 표준 다변수 통계학적 도구를 사용하여 평가하였다.

[0085] 역상 및 크기 배제 HPLC 분석에 의해 측정된 바와 같이 최상의 결과는 변성제(예를 들어, 1 내지 4M 수준의 비-변성 수준에서 우레아, 디메틸 우레아 또는 기타 카오토트로피제), 응집 억제제(예를 들어, 5 내지 500mM 수준의 아르기닌), 단백질 안정화제(예를 들어, 5 내지 40% w/v 수준의 글리세롤 또는 슈크로스) 및 산화환원 성분(예를 들어, 시스테인 또는 시스타민)을 함유하는 재폴딩 완충액을 사용하여 관찰하였다. 티올-쌍 비율 및 산화환원 완충액 강도는 티올-쌍 비율(0.1 내지 100, 더욱 전형적으로는 1 내지 25) 대 완충액 강도(전형적으로 2mM 내지 20mM, 이것은 단백질 농도, 단백질내 시스테인 잔기수 및 봉입체를 가용화시키기 위해 사용되는 환원제의 농도에 의해 좌우됨)의 실험적 매트릭스를 사용하여 측정하였다.

[0086] 개별 반응물들은 다양한 수준의 시스테인 및 시스타민을 사용하여 형성하였고 이는 다양한 티올-쌍 완충액 강도에서 티올-쌍 비율의 매트릭스를 조절 가능하게 한다. 상기 관계를 수학적 3 및 4를 사용하여 계산하였다. 각각의 조건은 호기성 및 비-호기성 조건하에서 본원에 기재된 기술을 사용하여 스크리닝하였다. 수율의 안정적인 균형, 목적하는 폴딩 종의 분포, 환경적 산화제(예를 들어, 공기)에 대한 불감성 및 가용화 단계로부터 전달된 DTT중의 표준 변화에 대한 불감성을 충족하도록 최적의 조건을 선택하였다.

[0087] 실시예 3

[0088] 세포 용해물로부터 포획된 비-자연 가용성 단백질 형태의 고농도 재폴딩

[0089] 하나의 양태에서, Fc 잔기에 연결된 다수의 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 단백질을 세포내 가용성 펩타이드 채로서 대장균에서 발현시키고 수거되고 세척된 세포로부터 용해시키고 친화성 크로마토그래피에 의해 용해물로부터 분리하고 이어서 본원에 기재된 바와 같이 대략 12g/ℓ의 농도에서 재폴딩시켰다.

[0090] 발현 단계를 완료한 후, 전체 발효 브로쓰 분액을 원심분리하고 액체 분획을 제거하고 세포를 페이스트로서 잔류시켰다. 세포를 본래 용적의 대략 60%로 물에 재현탁시켰다. 이어서 상기 세포를 고압 파쇄기에 3회 통과시켜 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후, 상기 용해물 풀을 공기의 존재하에 8 내지 72시간 동안 혼합하여 펩타이드 채의 이량체화가 가능하도록 하였다. 이량체화 공정 후, 목적하는 펩타이드 채는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 용해물 풀로부터 분리하였다. 상기 단백질 A 칼럼 용출 풀은, 단백질 A 용출 물질 8부 대 우레아 (10 M), 아르기닌-HCl (2.5 M), 트리스(pH 8.5)(1050 mM), 및 시스테인(10mM, 5 mM, 또는 4 mM) 및 시스타민(4mM)을 함유하는 재폴딩 완충액 2부의 비율로 혼합하였다. 상기 희석된 혼합물은 pH 8.5로 적정하고 안정한 풀이 성취될 때까지 (약 24시간) 질소하에 약 5℃에서 항온처리하였다. 대략 30 내지 80%의 목적하는 생성물의 수율이 평가된 산화환원 조건에 따라 수득되었다.

[0091] 대규모 단백질 생산 공정에 전형적으로 존재하는 것들과 유사한 비-호기성 조건을 모방하기 위해 수개의 단계를 거쳤다. 반응 용적이 대략 15ℓ 미만인 경우, 재폴딩 용기 밀봉 상부 공간을 질소로 정화하여 시스템에 존

제할 수 있는 유효 산소를 제한하였다. 이어서 상기 용기를 밀봉하고 항온처리를 개시하였다.

[0092] 반응 용적이 대략 15ℓ 초과이지만 500ℓ 미만인 경우, 재폴딩 완충액을 제조하고 대략 5℃에서 평형화하여 용액중에 안정한 산소 수준(전형적으로 공기 포화도에 대해 50% 내지 70% 용존 산소)을 성취하였다. 재폴딩 혼합물이 형성된 후 용기 밀봉 상부 공간을 질소로 정화하여 시스템에서 존재할 수 있는 임의의 추가의 유효 산소를 제한하고 상기 용기를 밀봉시키고 항온처리를 개시하였다.

[0093] 실시예 4

[0094] 봉입체로부터 고농도 재폴딩

[0095] 하나의 양태에서, 링커를 통해 IgG1 분자의 Fc 잔기의 C-말단에 연결된 생물학적 활성 펩타이드를 포함하고 약 57kDa의 분자량을 가지며 8개의 디설파이드 결합을 포함하는 재조합 단백질을 봉입체로서 대장균에서 발현시키고 수거하고 세척하고 농축시키고 가용화시키고 본원에 기재된 바와 같이 6g/ℓ의 농도에서 재폴딩시켰다.

[0096] 동결 농축된 봉입체 분액을 실온으로 해동시키고 적당량의 구아니딘 및/또는 우레아와 혼합하여 완전히 단백질을 변성시키는 4 내지 6M 구아니딘에 상응하는 변성제 수준을 생성하였다. 이어서 상기 단백질을 pH 8.5에서, 5 내지 20mM의 DTT로 환원시키고 대략 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 봉입체를 용해시키고 변성시키고 환원시킨 후, 이들을 우레아 (1-5 M), 아르기닌-HCl (5-500 mM), 글리세롤 (10-30% w/v), 및 실시예 2에 기재된 과정에 의해 측정된 바와 같이 동정된 수준의 시스테인 및 시스타민을 함유하는 재폴딩 완충액내로 희석시켰다. 최종 성분 농도는 4 M 우레아, 150 mM 아르기닌 HCl, 20.9% (w/v) 글리세롤, 2.03 mM 시스테인, 및 2.75 mM 시스타민이다. 희석 수준은 가용화로부터 변성제의 희석과 균형을 이루고 재폴딩 동안에 분자의 열역학적 안정성을 유지하고 재폴딩 혼합물중에서 최고로 가능한 단백질 농도를 유지하도록 선택하였다. 상기 희석된 혼합물은 알칼리성 pH(pH 8 내지 pH 10)으로 적정되었고 관련 분석학적 측정에 의해 결정된 바와 같이 안정한 풀이 성취될 때까지(12시간 내지 72시간) 비-호기성 조건하에 5℃에서 항온처리하였다. 수득 공정은 1ℓ 규모에서 2000ℓ 규모로의 안정한 스케일링 능력을 보여줌을 입증하였다(도 3 참조). 대략 27 내지 35%의 목적하는 생성물 수율이 상기 2개 규모에서 수득되었다. 생성물 관련 불순물의 분포는 또한 정밀한 변량 이내 에 유지되었다(도 3 참조).

[0097] 소규모에서의 산소 물질 이동은 용이하게 성취되고 대규모로 관찰되는 상대적으로 불량한 물질 이동을 모방하기 위해 억제되는데 여기서, 재폴딩 용액의 용적은 대규모 용기 표면에 존재하는 공기 용적 및 표면적에 비해 크다. 따라서, 대규모의 단백질 생산 공정에 전형적으로 존재하는 것들과 유사한 비-호기성 조건을 모방하기 위해 수개의 단계를 거쳤다. 반응 용적이 대략 15ℓ 미만인 경우 재폴딩 완충액에 질소를 살포하여 용액으로부터 산소를 제거하고 질소 블랭킷하에 성분들을 분산시키고 일단 재폴딩 혼합물이 형성되면 용기 밀봉 상부 공간을 질소로 정화하여 시스템에 존재할 수 있는 유효 산소를 제한하였다. 이어서 상기 용기를 밀봉하고 항온처리를 개시하였다.

[0098] 반응 용적이 대략 15ℓ 초과이지만 500ℓ 미만인 경우, 재폴딩 완충액을 제조하고 대략 5℃에서 평형화하여 용액중에 안정한 산소 수준(전형적으로 공기 포화도에 대해 50% 내지 70% 용존 산소)을 성취하였다. 재폴딩 혼합물이 형성된 후 용기 밀봉 상부 공간을 질소로 정화하여 시스템에서 존재할 수 있는 임의의 추가의 유효 산소를 제한하고 상기 용기를 밀봉시키고 항온처리를 개시하였다.

[0099] 500ℓ 초과인 규모로 재폴딩 완충액을 제조하고 대략 5℃에서 평형화하여 용액중에 안정한 산소 수준(전형적으로 공기 포화도에 대해 50% 내지 70% 용존 산소)을 성취하였다. 재폴딩 혼합물이 형성된 후 용기를 밀봉시키고 항온처리를 개시하였다.

[0100] 재폴딩 혼합물의 단백질 농도는 6 g/ℓ 이고, 이것은 상기 실시예에 기재된 방법 이외의 방법을 사용하여 수득된 1.5 g/ℓ의 회수 농도 보다 4배 증진된 것이다. 총 연간 공정 생산성은 한 가지 특정 제조 설비에서 기존의 설비 탱크에서 증진된 용적 효율로 인해 >930%로 증가되는 것으로 계산되었다.

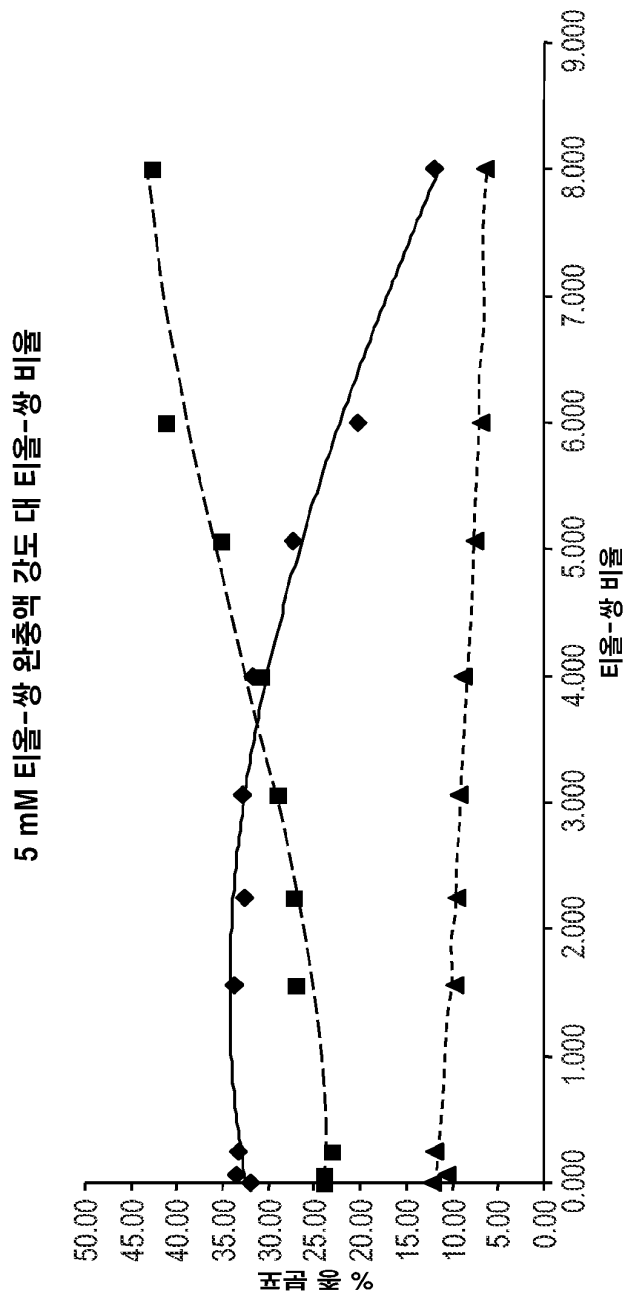
[0101] 실시예 5

[0102] 디설파이드 쌍 형성에 대한 티올-쌍 산화 상태의 효과

- [0103] 도 1a-1f는 티올-쌍 비율이 더욱 산화성 상태(더욱 낮은 티올-쌍 비율)로 강제됨에 따라 더욱 높은 비율의 생성물 종이 산화된 아미노산 잔기 및 혼합된 디설파이드 형태를 가짐을 입증한다. 티올-쌍 비율이 더욱 환원성 상태(더욱 높은 티올-쌍 비율)로 구동됨에 따라 이것은 산화된 아미노산 변종 수준을 저하시키고 부정확한 디설파이드 쌍 형성 또는 형성되지 않은 디설파이드 결합을 갖는 생성물 수준을 증가시켰다. 전체 티올-쌍 완충액 강도가 변형됨에 따라 상응하는 최적 티올-쌍 비율이 변화된다. 이러한 효과는 완충액 강도가 완충 용액 내에서 산 및 염기 부가에 대한 pH 민감성을 조절하는 방식과 유사하다.
- [0104] 최적의 균형을 이론 종들이 수득될 수 있다. 도 1a 내지 1f에 나타난 바와 같이, 티올-쌍 완충액 강도와 티올-쌍 비율간의 관계가 명백하고 이것은 최적의 종 균형을 이루게 하여 낮은 가용성의 단백질의 효율적인 재폴딩을 촉진시키는 것으로 확인될 수 있다. 티올-쌍 비율과 티올-쌍 완충액 강도의 조절을 통한 생성물 변종(예를 들어, 부정확하게 디설파이드 결합된 종 및 잘못 폴딩된 종)을 조절하는 능력은 효율적이고 효과적이며 신뢰할 수 있는 후속 정제 공정을 가능하게 한다.
- [0105] 실시예 6
- [0106] 재폴딩 효율에 대한 비-호기성 조건의 효과
- [0107] 도 2 및 3은 티올-쌍 완충액 강도가 단백질 농도 및 단백질내 시스테인 잔기의 수를 고려하여 적절히 선택되는 경우, 산소와 같은 외부 영향에 대한 민감성이 상당히 감소됨을 입증한다. 이것은 비-호기성 재폴딩 조건을 가능하게 하여 규모와 반응기 구성간에 관계 이전을 매우 용이하게 한다.
- [0108] 도 2는 수개의 환경적 조건하에서 15ℓ 규모의 재폴딩과 20mℓ 규모의 재폴딩간에 RP-HPLC 분석 종 분포를 비교한다. 조건 1에 대해(도 1에서 "1"로 추적 표시됨), 가용화 화학물질 및 용액을 공기중에서 분산시키고 재폴딩 혼합물을 공기중에서 항온처리하였다. 조건 2에서 가용화 화학물질 및 용액을 공기중에서 분산시키고 질소 밀봉 상부 공간하에 항온처리하였다. 조건 3 내지 7에서, 가용화 화학물질 및 용액을 질소 오버레이 조건하에서 분산시키고 조건 3, 5, 6, 및 7에서 가용화 화학물질 및 용액을 질소하에 항온처리하였다. 조건 7에서, 가용화 용액과 배합하기 전에 재폴딩 용액으로부터 질소를 또한 제거하였다. 조건 4에서 가용화 화학물질 및 용액을 주변 대기 조건하에서 항온처리하였다.
- [0109] 도 2에 나타난 결과는, 가용화 화학물질 및 용액이 공기의 존재하에서 분산되거나 항온처리되는 조건(즉, 조건 1, 2 및 4)이 대규모 조절에 필적하는 결과를 성취하지 못함을 입증한다. 조건 1, 2 및 4에서 산화된 종의 증가된 형성(프리-피크(pre-peak))이 관찰된다. 이들 프리-피크는 조건 1, 2 및 4에 대한 패널에서 화살표로 표시된다.
- [0110] 도 3은 1ℓ 규모 및 2000ℓ 규모에서, 실시예 2에 기재된 바와 같이 성취된, 동정된 조건의 RP-HPLC 분석학적 결과를 비교한다. 상기 도면에서, 종의 분포에서 어떠한 실질적 차이도 검출되지 않는다. 종합해 보면, 도 2 및 3은 통기가 주의깊게 통제되는 경우에, 소규모 재폴딩 반응이 재폴딩 반응의 스케일-업(scale-up)시 예측되는 결과들을 더욱 예측가능하게 하여 대규모 단백질 재폴딩 공정의 수행을 촉진시킴을 입증한다.

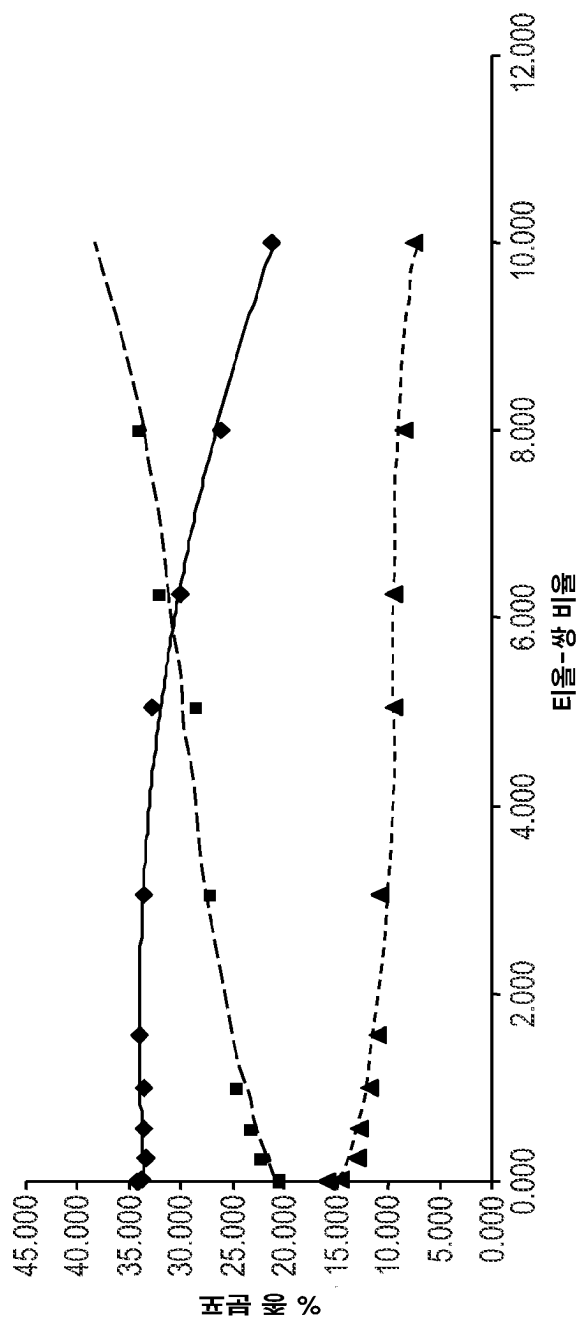
도면

도면1a

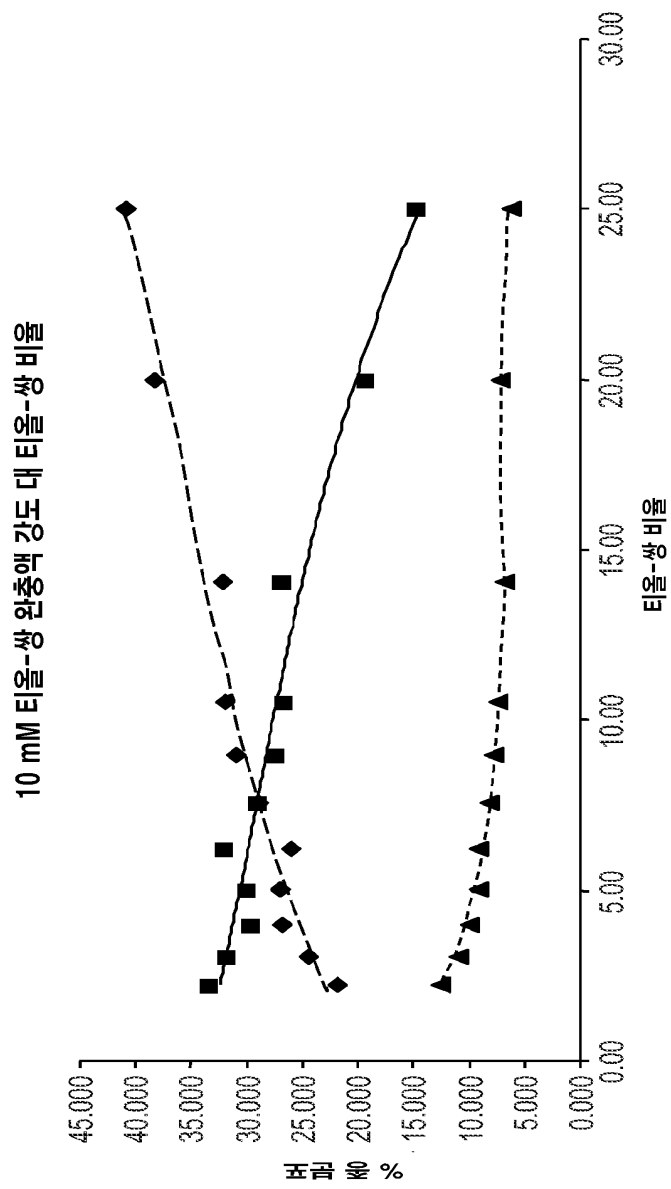


도면1b

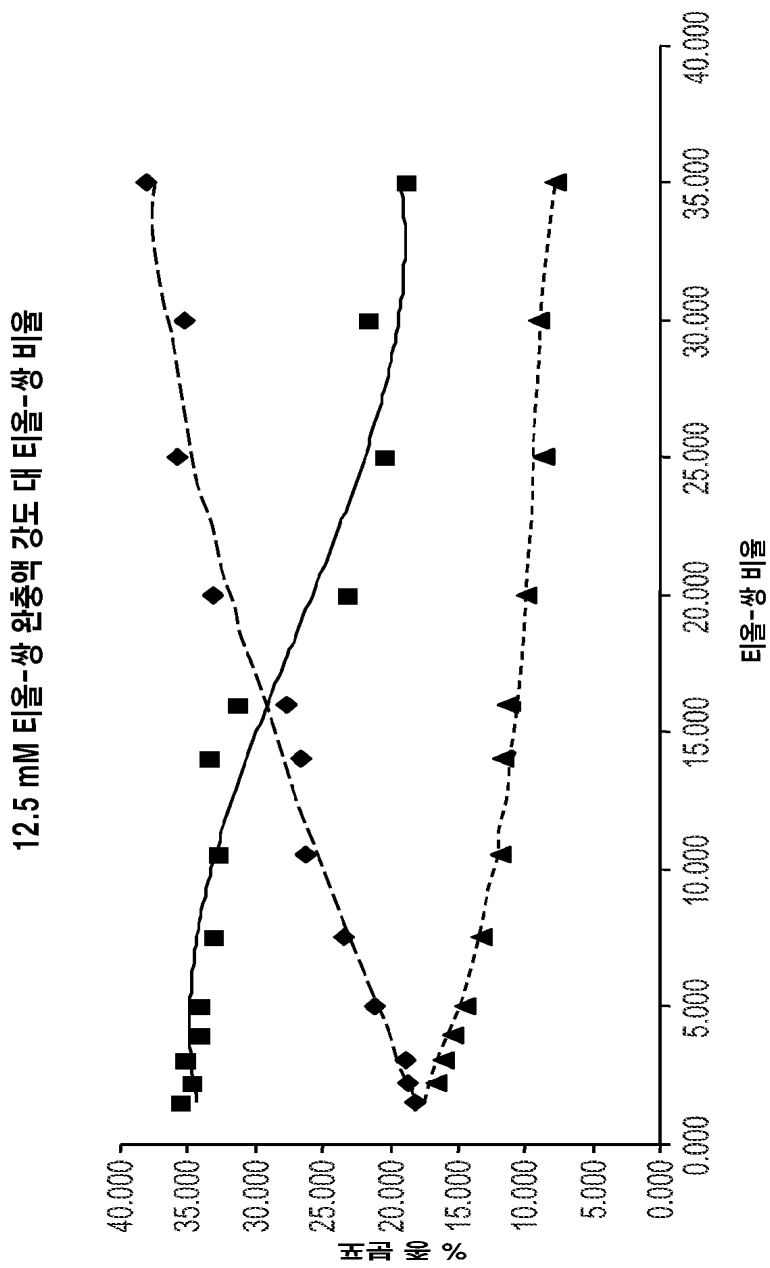
7.5 mM 티올-쌍 완충액 강도 대 티올-쌍 비율



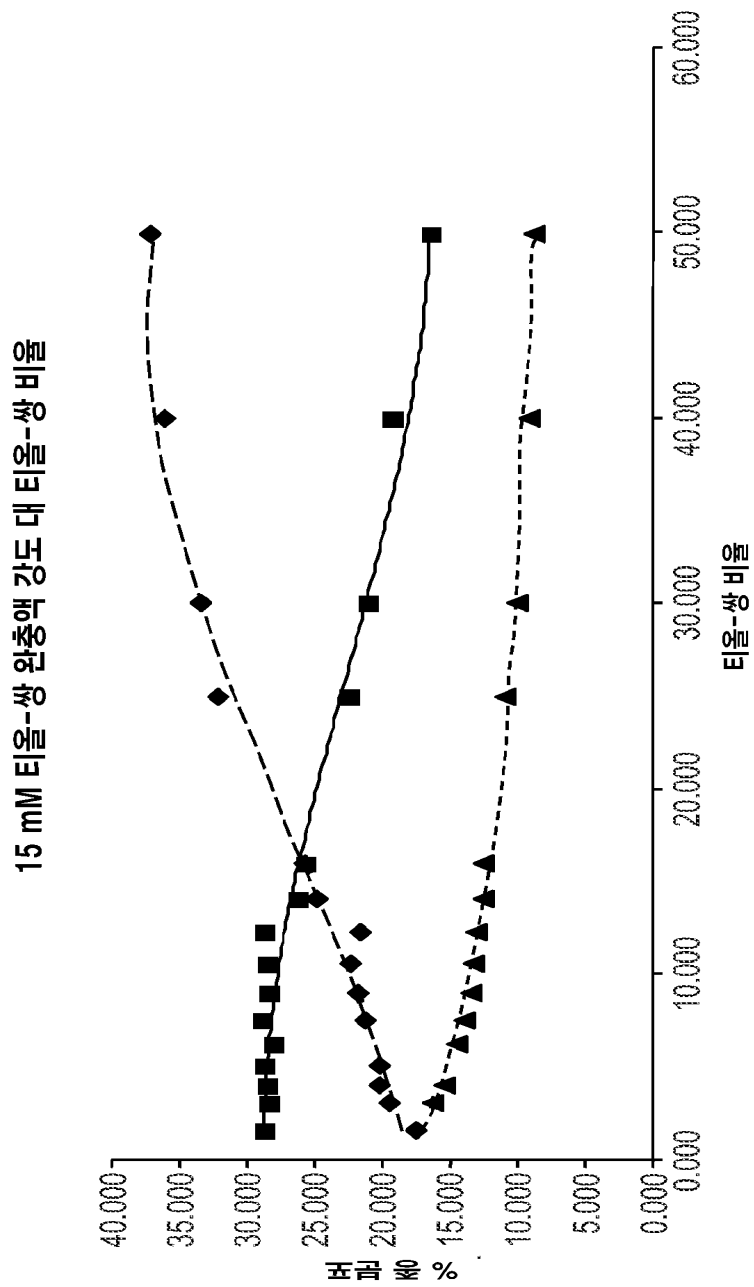
도면1c



도면1d

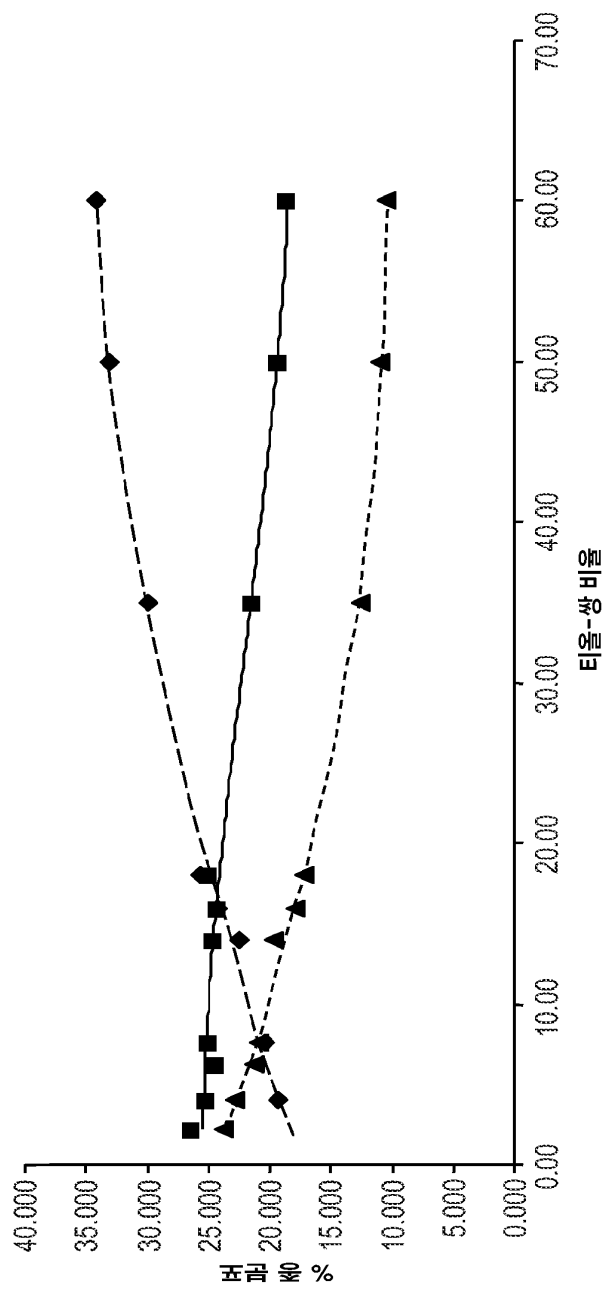


도면1e

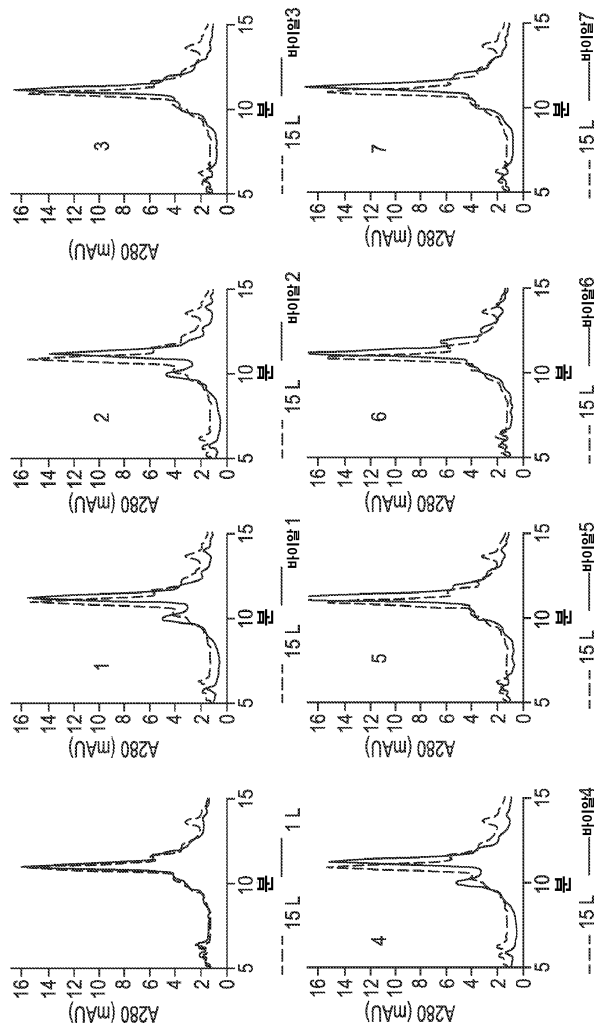


도면1f

20 mM 티올-쌍 완충액 강도 대 티올-쌍 비율



도면2



도면3

