

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 6월 14일 (14.06.2018) WIPO | PCT



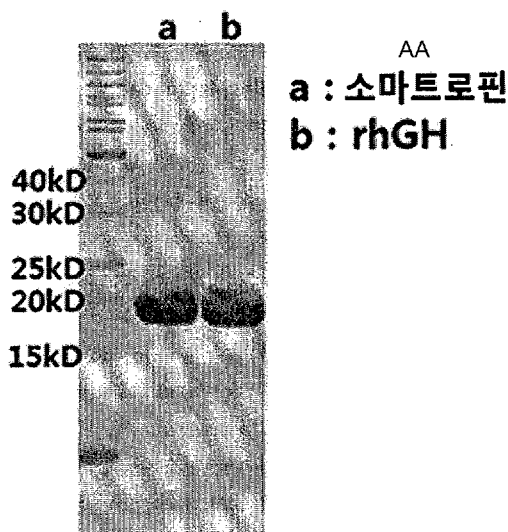
(10) 국제공개번호
WO 2018/105982 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 1/14 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01) *C07K 1/36* (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01) *C07K 14/61* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/014123
- (22) 국제출원일: 2017년 12월 5일 (05.12.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0164620 2016년 12월 5일 (05.12.2016) KR
10-2017-0126421 2017년 9월 28일 (28.09.2017) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 18536 경기도 화성시 팔탄면 무하로 214, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김민영 (KIM, Min Young); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 박형준 (PARK, Hyong Jhun); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 김대진 (KIM, Dae Jin); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR). 정성엽 (JUNG, Sung Youb); 18469 경기도 화성시 동탄기흥로 550, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: IMPROVED PURIFICATION METHOD OF RECOMBINANT PROTEIN

(54) 발명의 명칭: 재조합 단백질의 개선된 정제 방법

[도1]



AA ... Somatotropin

(57) Abstract: The present invention relates to a method for purifying a recombinant protein from recombinant E. coli at high yield and purity without using an additional activation process and including variants and to a method for purifying a recombinant protein at high yield and purify from recombinant E. coli which expresses the recombinant protein in the periplasm thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 재조합 대장균으로부터 재조합 단백질을 별도의 활성화 공정 없이 변형체를 포함하지 않으면서 고수율 및 고순도로 정제하는 방법에 관한 것으로, 재조합 단백질을 페리플라زم 내에서 발현하는 재조합 대장균으로부터 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 정제하는 방법에 관한 것이다.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 재조합 단백질의 개선된 정제 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 재조합 단백질을 페리플라즈마 내에서 발현하는 재조합 대장균으로부터 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 정제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 다양한 치료제로 사용될 수 있는 다양한 단백질 치료 의약품 들은 재조합 단백질로 제조하는 연구뿐만 아니라 이의 임상에서의 적용 및 상용화가 계속되고 있다.
- [3] 이 중 재조합 단백질 중 한 예인, 인간 성장 호르몬은 191개의 아미노산 잔기로 구성된 분자량 약 21,500 달톤의 단백질 호르몬이다. 상기 인간 성장 호르몬은 인간 뇌하수체에서 추출 정제된 이후, 많은 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어, 벡트 등은 사람에 대한 인간 성장 호르몬의 대사 효과 등을 처음 연구하였으며, 라벤은 임상시험을 통해 인간 성장 호르몬이 뇌하수체성 왜소증의 치료 효과가 있음을 밝혔으며 현재까지 이러한 왜소증 치료에 사용되어 오고 있다. 최근 인간 성장 호르몬은 터너 증후군(Turner's Syndrome)의 치료에도 사용되고 있으며, 그 적응증이 확대되고 있는 추세이다.
- [4]
- [5] 이러한 유용성에도 불구하고, 종래 인간 성장 호르몬은 사람의 뇌하수체에서 직접 추출 정제하는 방법에 의해 얻을 수 있었으므로 생산량이 매우 제한되었다. 이에 따라, 인간 성장 호르몬을 유전자 재조합 방법으로 대량생산하는 방법이 시도되었다. 고델 등이 처음으로 유전자 재조합 방법으로 인간 성장 호르몬을 생산한 바 있으나, 이 호르몬은 천연형 인간 성장 호르몬과 비교할 때 N-말단에 메티오닌 잔기가 하나 더 붙어있는 192개 아미노산으로 구성되어 있으며, 이로 인해 항체 생성률의 증가 등의 부작용이 우려되고 있다. 따라서 인체 내에서 발현되는 것과 동일한 기능을 가지는 천연형 인간 성장 호르몬의 개발이 요구되고 있다.
- [6]
- [7] 천연형 인간 성장 호르몬을 얻기 위해, 국제특허 공개공보 제 WO86/01229 호에는 N-말단에 메티오닌이 붙은 인간 성장 호르몬에 디펩티딜 아미노펩티데이즈 I을 처리하여 메티오닌을 제거하는 방법이 개시되어 있으나, 이 방법은 메티오닌을 제거하기 위한 공정이 더 추가되는 단점이 있다. 또한 유럽 특허 제55942호, 제20142호 및 제114695호에는 대장균에서 세포외 발현을 이용한 천연형 인간 성장 호르몬의 제조 방법이 개시되어 있는데, 이 방법들은 그 발현량이 적은 단점이 있다. 또한 효모를 이용하여 천연형 인간 성장

호르몬을 생산하는 방법도 보고된 바 있으나, 이 방법에도 원치 않는 당쇄화의 우려가 있다.

- [8] 특히, 균체 내 생산 방법을 이용한 인간 성장 호르몬의 생산은 숙주 세포 또는 배양 물질에 유래하는 불순물에 의해 오염될 수 있어 고순도 의약품을 정제하기 위해서는 까다로운 정제 공정을 거쳐야 한다. 뿐만 아니라, 대장균을 숙주로 사용하는 경우 대부분의 인간 성장 호르몬은 불용성 물질로 세포질 내에 축적되므로 리폴딩 공정을 거쳐 활성화된 형태로 얻어야 하므로 매우 비효율적이다. 특히 이 공정 중에 부분적으로 환원된 상태, 분자간 이황화 결합체 또는 잘못된 이황화 결합체 등이 유발되어 이들을 다시 제거하여야 하는 어려움이 있으며, 역가의 손실이 많고, 미스 폴딩(misfolding) 같은 원치 않는 변이체의 제거가 매우 어렵게 된다. 또한 번역 개시부인 N-말단에 메티오닌이 부가된 형태로 생산되고, 생산 공정에서 이를 제거하는 것은 매우 어려우며 이로 인한 역가 및 수율의 손실이 있다.

[9]

- [10] 한편, 페리플라즘으로의 분비 생산 방법을 이용한 인간 성장 호르몬의 생산은 N-말단에 메티오닌이 없는 천연형 인간 성장 호르몬을 가용화 형태로 얻을 수 있다. 또한, 페리플라즘 내의 단백질 양이 전체 세포질 내의 단백질에 비해 상대적으로 적은 10% 미만이므로 훨씬 더 용이하게 정제할 수 있으며, 세포를 파쇄하는 공정이 불필요하게 되므로 세포질 내에 존재하는 당류 및 핵산류 등의 오염을 최소화하는 장점이 있다.

- [11] 그러나 페리플라즘 내에서의 단백질 생산은 발현량이 상대적으로 낮아 산업화에 어려움이 있다. 특히, 페리플라즘으로의 단백질 고 발현 시 발현 세포 외막의 불안정성에 의해 정제 전 삼투 충격 등의 전처리 시 세포 자체의 파열로 인한 페리플라즘 내 발현된 재조합 단백질의 특정한 정제가 어려울 수 있으므로, 발현된 단백질을 고수율 및 고순도로 정제할 수 있는 효율적인 방법이 여전히 요구되고 있다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명의 목적은 재조합 대장균으로부터 페리플라즘 내로 발현된 목적하는 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 재조합 대장균으로부터 페리플라즘 내로 발현된 목적하는 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 정제하는 방법이다.

- [15] 하나의 구체예에서 상기 정제 방법은 (i) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즘 내로 발현하는 분리된 재조합 대장균 균체에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후, 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 세포 침전물을 수득하고, 상기

세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액을 처리하여, 페리플라즈막 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계; (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 추출액에 염 또는 카오트로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하여 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즈막 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계; (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 재조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및 (iv) 상기 (iii) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 재조합 단백질의 정제 방법일 수 있다.

[16]

[17] 다른 하나의 구체예에서, 상기 정제 방법은 (1) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈막 내로 발현하는 분리된 재조합 대장균 군체에 카오트로픽 제제 (chaotropic agent)가 함유된 완충용액을 가하여, 페리플라즈막 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 추출액을 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즈막 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계; (3) 상기 (2) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 재조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및 (4) 상기 (3) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 재조합 단백질의 정제 방법일 수 있다.

[18]

[19] 하나의 구체예에서, 상기 정제 방법의 (i) 단계는 (a) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈막 내로 발현하는 재조합 대장균을 배양한 후 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 군체를 수득하는 단계; 및 (b) 분리된 재조합 대장균 군체에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후, 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 세포 침전물을 수득하고, 상기 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액을 처리하여, 페리플라즈막 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계에 의해 수행되는 것을 특징으로 한다.

[20] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액은 증류수인 것을 특징으로 한다.

[21] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법의 (ii) 단계의 염 또는 카오트로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하는 단계는, 원심분리 또는 마이크로필터 수행시 세포 응집력을 증가시키는 단계인 것을 특징으로 한다. 상기 세포 응집력을 증가시키는 단계는 세포 침전물의 응집력이 증가하여 원심분리나 마이크로 필터를 수행 시 상등액의 탁도를 감소시키는 것일 수 있다.

[22] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제방법의 (1) 단계의 카오트로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하는 단계는, 페리플라즈막내 단백질을 추출하는 단계로 카오트로픽 제제에 의해 세포 외벽의 파쇄 혹은 변형을 일으켜

페리플라즘 단백질을 추출하는 단계이며, 상기 (i) 단계와 유사한 수득율을 보일 수 있다.

[23]

[24] 이와 같은 세포 응집력 증가는 세포 유래 불순물을 보다 용이하게 펠렛으로 제거할 수 있는 장점과 페리플라즘 내로 발현된 단백질의 특정한 추출을 향상시키는 것일 수 있다.

[25] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 50 mS/cm ~ 300 mS/cm 전도도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[26] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 염화나트륨, 황산나트륨, 황산암모늄, 황산바륨, 황산칼슘, 황산마그네슘, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 염화암모늄, 플루오르화나트륨, 아질산나트륨, 인산칼슘, 황화나트륨, 염화바륨, 염화칼슘, 브로민화마그네슘, 탄산칼슘, 황산칼륨, 아세트산 나트륨, 시트르산나트륨, 브로민화나트륨, 티오시안산 나트륨, 인산나트륨, 소듐 디옥시콜레이트, 아세트산 암모늄, 탄산수소암모늄, 염화 암모늄, Tris-HCl, 트리스 인산염, NP-40(Nonidet P-40), 루브롤 PX(Lubrol PX), 옥틸 글루코시드, 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 아세톤, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산 (Gu-HCl), 우레아, 염화칼륨, 암모늄 설페이트, 부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬(Lithium perchlorate), 아세트산 리튬(Lithium acetate), 염화마그네슘, 염화알루미늄 (AlCl₃), 페놀, 프로판올, SDS (Sodium dodecyl sulfate), 또는 티오요소 (Thiourea)인 것을 특징으로 한다.

[27] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 염은 염화나트륨이며, 상기 카오토로픽 제제는 구아니딘-염산 (Gu-HCl)인 것을 특징으로 한다.

[28] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법의 (ii) 단계의 염 또는 카오토로픽 제제는 전도도가 50 mS/cm ~ 300 mS/cm을 갖도록 투입하는 것을 특징으로 한다.

[29] 다른 하나의 구체에에서, 상기 정제 방법의 (1) 단계는 (a) 목적하는 제조합 단백질을 페리플라즘 내로 발현하는 제조합 대장균을 배양한 후 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 균체를 수득하는 단계; 및 (b) 분리된 제조합 대장균 균체에 카오토로픽 제제 (chaotropic agent)가 함유된 완충용액을 가하여, 페리플라즘 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계에 의해 수행되는 것을 특징으로 한다.

[30]

[31] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법 (1)의 카오토로픽 제제는 50 mS/cm ~ 300 mS/cm 전도도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[32] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법 (1)의 카오토로픽 제제는 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산 (Gu-HCl), 우레아, 암모늄 설페이트, SDS (Sodium dodecyl

sulfate), 또는 티오요소 (Thiourea)인 것을 특징으로 한다.

- [33] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법 (1)의 카오토로픽 제제는 구아니딘-염산 (Gu-HCl)인 것을 특징으로 한다.

[34]

- [35] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 제조합 단백질은 호르몬, 사이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원 또는 수용체 길항물질인 것을 특징으로 한다.

- [36] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 제조합 단백질은 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 옥신토모듈린, 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin) 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), PYY(peptide YY) 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(incretins); 렙틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디포린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)과 같이 지방질(adipose)에서 분비되는 아디포카인류(adipokines); 키스펙틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류(neuropeptides); 이리신(Irisin), 마이오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 머슬린(musclin)과 같이 근육(muscle)에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작용성장펩타이드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩타이드류(natriuretic peptides), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프스타틴, 안지오텐신, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드,

코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[37] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 재조합 단백질은 인간 성장 호르몬, 인터페론-알파, 과립구 콜로니자극인자, 적혈구 생성인자, 혈액인자, 인슐린, 옥신토모듈린, 글루카곤-유사 펩타이드류, 엑센딘류 및 각각의 유도체인 것을 특징으로 한다.

[38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 재조합 단백질은 인간 성장 호르몬인 것을 특징으로 한다.

[39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법의 (iii) 단계 또는 (3) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 1회 혹은 2회 수행되는 것을 특징으로 한다. 그 예로, 2회 일 수 있으나, 정제 수율을 높일 수 있는 한 제한되지 않는다.

[40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 2회 이상 수행시 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 각각 서로 다르거나, 동일한 작용기의 수지를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피 수지의 작용기가 페닐(phenyl), 옥틸(octyl), (이소)프로필((iso)propyl), 부틸(butyl) 및 에틸(ethyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인 것을 특징으로 한다.

[42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법의 (iv) 단계 또는 (4) 단계의 이온 교환 크로마토그래피 수지의 작용기가 메틸설포네이트 (S), 설포프로필 (SP), 카르복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE) 및 폴리아스파르트산 (Poly aspartic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인 것을 특징으로 한다.

[43] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 정제방법으로서, 상기 정제 방법의 (iv) 단계 또는 (4) 단계의 이온 교환 크로마토그래피 수지의 작용기가 쿼터너리암모늄 (Q), 쿼터너리아미노에틸 (QAE), 디에틸아미노에틸 (DEAE), 폴리에틸렌이민 (PEI), 디메틸아미노메틸(DMAE), 및 트리메틸아미노에틸 (TMAE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[44] 본 발명의 방법에 따르면 별도의 활성화 공정 없이 간단하면서도 고수율 및 고순도로 인체 내에서 발현되는 것과 동일한 기능을 가지는 재조합 단백질, 그 예로 천연형 인간 성장 호르몬 등을 얻을 수 있다. 특히 본 발명의 방법에 따르면, 대장균 내에서 발현되는 재조합 단백질의 변형체들, 그 예로 인간 성장 호르몬의 변형체들이 효율적으로 제거된다.

도면의 간단한 설명

[45] 도 1은 정제된 인간 성장 호르몬 단백질의 SDS-PAGE 결과를 보여주는

사진이다 (a: 대조군인 소마트로핀(Somatropin), b: 정제된 성장 호르몬 시료 (rhGH).

[46] 도 2는 정제된 인간 성장 호르몬의 역상 고압 크로마토그래피를 수행한 결과를 보여주는 그래프이다.

[47] 도 3은 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피인, 프로필(Poly HI-Propyl, Avantor사) 컬럼 크로마토그래피를 보여주는 그래프이다.

[48] 도 4는 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피인, 음이온(SourceQ, GE사) 컬럼 크로마토그래피를 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[49] 본 발명을 실시하기 위한 보다 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[50]

[51] 본 발명을 구현하기 위한 하나의 양태로서, 재조합 대장균으로부터 페리플라즈마 내로 발현된 목적하는 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 정제하는 방법을 제공한다.

[52] 하나의 구체예에서, 상기 정제 방법은 (i) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈마 내로 발현하는 분리된 재조합 대장균 군체에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후, 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 세포 침전물을 수득하고, 상기 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액을 처리하여, 페리플라즈마 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계; (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 추출액에 염 또는 카오트로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하여 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즈마 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계; (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 재조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및 (iv) 상기 (iii) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 재조합 단백질의 정제 방법일 수 있다.

[53] 상기 (ii) 단계에서 염 또는 카오트로픽 제제를 첨가하는 단계는 추출액 내의 세포 응집력을 증가시킬 뿐 아니라, 상등액의 탁도를 낮추어, 단백질의 정제 수율을 높일 수 있다.

[54] 이와 같은 정제 방법은 (i) 재조합 단백질을 페리플라즈마 내로 발현하는 재조합 대장균을 배양한 후 원심분리하여 세포 침전물을 얻고, 상기 세포 침전물에 수크로스 등의 당류가 함유된 완충용액을 가한 후 원심분리하여 세포 침전물을

얻고 이 세포 침전물에 증류수를 가하여 페리플라즘 단백질을 얻고, (ii) 염화나트륨 등의 염 혹은 카오트로픽 시료를 투입하고 원심분리하여 페리플라즘 단백질을 포함하는 상등액을 얻고, (iii) 상기 (ii)에서 얻은 상등액을 소수성 상호작용 및 (iv) 이온 교환 크로마토그래피를 차례로 수행하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조합 단백질의 정제 방법에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다(제 1 정제방법).

[55]

[56] 다른 하나의 구체예에서 상기 다른 정제 방법은 (1) 목적하는 제조합 단백질을 페리플라즘 내로 발현하는 분리된 제조합 대장균 균체에 카오트로픽 제제가 함유된 완충용액을 가하여, 페리플라즘 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 추출액을 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즘 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계; (3) 상기 (2) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 제조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및 (4) 상기 (3) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 제조합 단백질의 정제 방법일 수 있다(제2 정제방법).

[57] 본 발명의 정제방법은 수크로즈가 함유된 완충용액을, 제조합 단백질을 페리플라즘 내로 발현하는 분리된 대장균 균체에 가하고 원심분리 후, 증류수를 가하여 페리플라즘 단백질을 포함하는 추출액을 수득 후, 염 또는 카오트로픽 제제를 첨가하여 원심분리하는 단계를 포함하는 방법 (제1 정제방법) 또는 제조합 단백질을 페리플라즘 내로 발현하는 분리된 대장균 균체에 카로트로픽 제제가 함유된 완충용액을 가하여 페리플라즘 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계를 포함하는 방법 (제2 정제 방법)에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[58]

[59] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[60] 본 발명에 사용되는 제조합 대장균은 본 발명의 목적상 목적하는 제조합 단백질을 페리플라즘내로 발현하는 것으로, 분비 서열과 목적하는 단백질이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환된 제조합 대장균이다. 그 예로, 인간 성장 호르몬이 융합된 융합 단백질을 코딩하는 융합 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 제조합 대장균일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[61] 상기 제조합 대장균은 대장균의 열안정성 엔테로톡신 II의 변형된 분비 서열과 인간 성장 호르몬이 융합된 발현 벡터로 형질전환된 대장균에서 발현될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 다양한 목적하는 제조합 단백질과 열안정성 엔테로톡신 II의 변형된 분비 서열과 같은, 융합된 목적하는 제조합 단백질을 페리플라즘으로 이동시킬 수 있는 다양한 분비 서열과

목적하는 재조합 단백질이 융합된 것일 수 있다. 그 예로 서열번호: 1의 분비 서열일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [62] 상기 재조합 단백질은 호르몬, 사이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원 또는 수용체 길항 물질 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 재조합 단백질은 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 옥신토모둘린, 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin) 아밀린(amylin), 가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), PYY(peptide YY) 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(incrētins); 렵틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디폴린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)과 같이 지방질(adipose)에서 분비되는 아디포카인류(adipokines); 키스펙틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류(neuropeptides); 이리신(Irisin), 마이오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 머슬린(musclin)과 같이 근육(muscle)에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작용성장펩타이드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩타이드류(natriuretic peptides), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모둘린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노겐 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프에이틴, 안지오프에이틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오프에이틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토프에이틴, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

- [63] 보다 구체적으로, 상기 재조합 단백질은 인간 성장 호르몬, 인터페론-알파,

과립구 콜로니자극인자, 적혈구 생성인자, 혈액인자, 인슐린, 옥신토모듈린, 글루카곤-유사 펩타이드류, 엑센딘류 및 각각의 유도체일 수 있으며, 그 예로, 인간 성장 호르몬일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[64]

[65] 상기 재조합 대장균의 페리플라즈마 내로 목적하는 재조합 단백질, 그 예로 인간 성장 호르몬과 같은 재조합 단백질을 발현시키기 위하여, 상기 재조합 대장균을 박토-트립톤, 효모추출물, NaCl, phosphate buffer, trace metal, 글루코스, $MgCl_2$ 등이 첨가된 발효조에서 발효할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 박토-효모추출물과 글루코스를 투입하여 유가식 배양(fed-batch) 할 수 있다. 이러한 배지 조성은 재조합 대장균의 고농도 배양과 대장균에서 재조합 단백질의 페리플라즈마로의 고발현에 적합하며 이외에도 일반적인 재조합 대장균에서 재조합 단백질을 발현할 수 있는 배양 방법은 제한없이 포함된다.

[66]

[67] 본원에서 용어, "배양"은 상기 미생물을 적당히 조절된 환경 조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본원의 배양 과정은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 선택되는 균주에 따라 당업자가 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 상기 방법에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 공지된 회분식 배양방법, 연속식 배양방법, 유가식 배양방법 등에 의해 수행될 수 있다. 본원의 미생물의 배양에 사용되는 배지 및 기타 배양 조건은 통상의 에스케리키아속 미생물의 배양에 사용되는 배지라면 특별한 제한 없이 어느 것이나 사용할 수 있으나, 구체적으로는 본원의 미생물을 적당한 탄소원, 질소원, 인원, 무기화합물, 아미노산 및/또는 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 배양할 수 있다.

[68]

본원에서 상기 탄소원으로는 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만니톨, 소르비톨 등과 같은 탄수화물; 당 알코올, 글리세롤, 피루브산, 락트산, 시트르산 등과 같은 알코올; 유기산, 글루탐산, 메티오닌, 리신 등과 같은 아미노산 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전분 가수분해물, 당밀, 블랙스트랩 당밀, 쌀겨울, 카사버, 사탕수수 찌꺼기 및 옥수수 침지액 같은 천연의 유기 영양원을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 글루코오스 및 살균된 전처리 당밀(즉, 환원당으로 전환된 당밀) 등과 같은 탄수화물이 사용될 수 있으며, 그 외의 적정량의 탄소원을 제한 없이 다양하게 이용할 수 있다. 이들 탄소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있다.

[69]

상기 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 질산암모늄 등과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민 등과 같은 아미노산, 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해 생성물 등과 같은 유기 질소원이

사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독으로 사용되거나 2 종 이상이 조합되어 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [70] 상기 인원으로는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨, 또는 이에 대응되는 소듐-함유 염 등이 포함될 수 있다. 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간, 탄산칼슘 등이 사용될 수 있으며, 그 외에 아미노산, 비타민 및/또는 적절한 전구체 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 배지 또는 전구체는 배양물에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [71] 본원에서, 미생물의 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산, 황산 등과 같은 화합물을 배양물에 적절한 방식으로 첨가하여, 배양물의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 또한, 배양물의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양물 내로 산소 또는 산소 함유 기체를 주입하거나 혐기 및 미호기 상태를 유지하기 위해 기체의 주입 없이 혹은 질소, 수소 또는 이산화탄소 가스를 주입할 수 있다.
- [72] 배양물의 온도는 30°C 내지 40°C일 수 있으며, 보다 구체적으로는 35°C 내지 37°C일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 배양 기간은 원하는 유용 물질의 생성량이 수득될 때까지 계속될 수 있으며, 구체적으로는 35 시간 내지 45 시간일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [73] 상기 재조합 대장균은 아미노 말단에 추가의 메티오닌이 첨가되지 않은 천연형 인간 성장 호르몬과 같은 다양한 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즘으로 분비한다. 이렇게 얻어진 재조합 대장균 배양액을 원심분리하여 세포 침전물을 얻는다.
- [74] 이 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후 원심분리하여 세포 침전물을 얻고 이 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액, 그 예로 증류수를 가한 후 원심분리 또는 마이크로 필터를 수행하여 페리플라즘 단백질을 포함하는 상등액을 얻는다. 상기 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액은 그 예로, 증류수일 수 있으나, 삼투압에 의해 페리플라즘 단백질을 추출할 수 있는 용액은 제한 없이 포함된다. 이 과정에서 인간 성장 호르몬 등 목적하는 재조합 단백질을 포함한 페리플라즘 단백질들이 삼투압에 의해 추출된다.
- [75] 구체적으로 세포는 수크로스가 함유된 완충용액, 예를 들어 10% 내지 30% 수크로스가 함유된 완충용액의 처리로 인해 수축되었다가 증류수 처리로 인해 팽창하며 이로 인해 세포막을 통해 추출된다. 상기 삼투압 추출에는 수크로스 이외에 아세톤, 부탄올과 같은 유기용매를 사용할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [76]
- [77] 추출액에 염화나트륨 등의 염이나 카오토로픽 제제를 투입하고 원심분리 혹은

마이크로 필터를 수행하여 페리플라즈마 단백질이 포함된 상등액을 얻을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [78] 하나의 구체예에서, 본 발명의 정제 방법의 (ii) 단계의 염 또는 카오토로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하는 단계는, 원심분리 또는 마이크로필터 수행시 세포 응집력을 증가시키는 단계인 것을 특징으로 한다. 상기 세포 응집력을 증가시키는 단계는 세포 침전물의 응집력이 증가하여 원심분리나 마이크로 필터를 수행 시 상등액의 탁도를 감소시키는 것일 수 있다.
- [79] 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 50 mS/cm ~ 300 mS/cm 전도도, 구체적으로 100 mS/cm ~ 200 mS/cm 전도도, 보다 구체적으로 150 mS/cm ~ 250 mS/cm를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 상기 정제 방법의 (ii) 단계의 염 또는 카오토로픽 제제는 전도도가 50 mS/cm ~ 300 mS/cm, 구체적으로 100 mS/cm ~ 200 mS/cm, 보다 구체적으로 150 mS/cm ~ 250 mS/cm를 갖도록 투입하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 염화나트륨은 1 M 내지 3 M일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이에 의해 세포 침전물의 응집성이 증가하여 원심분리나 마이크로 필터 후 상등액의 탁도가 감소한다. 이는 세포 유래 불순물을 보다 용이하게 펠렛으로 제거할 수 있는 장점과 페리플라즈마에 발현된 단백질의 특정한 추출을 향상시키는 효과가 있다. 또한, 세포 침전물의 응집성 향상은 재조합 단백질을 페리플라즈마로 발현한 세포의 외막 (outer membrane) 의 안정성, 발현 상태와 상관없이 일정하게 정제를 위한 삼투 충격 (Osmotic shock) 등의 전처리가 가능하며 그에 따른 수율 향상을 기대할 수 있다.
- [82] 세포 침전물의 응집성 향상을 위한, 염 또는 카오토로픽 제제는 구체적으로는 염화나트륨 이외에 구아니딘 염산(Gu-HCl), 우레아 (urea), 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, 부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬(Lithium perchlorate), 아세트산 리튬(Lithium acetate), 염화마그네슘, 페놀, 프로판올, SDS (Sodium dodeceyl sulfate), 및 티오요소 (Thiourea) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [83] 구체적으로, 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 추출물 내의 세포 응집성을 향상시킬 수 있는 물질은 제한없이 포함되며, 그 예로, 염화나트륨, 황산나트륨, 황산암모늄, 황산바륨, 황산칼슘, 황산마그네슘, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 염화암모늄, 플루오르화나트륨, 아질산나트륨, 인산칼슘, 황화나트륨, 염화칼슘, 브로민화마그네슘, 탄산칼슘, 황산칼륨, 아세트산 나트륨, 시트르산나트륨, 브로민화나트륨, 티오시안산 나트륨, 인산나트륨, 소듐 디옥시콜레이트, 아세트산 암모늄, 탄산수소암모늄, 염화 암모늄, Tris-HCl, 트리스 인산염, NP-40(Nonidet P-40), 루브롤 PX(Lubrol PX), 옥틸 글루코시드, 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 아세톤, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산 (Gu-HCl), 우레아, 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, 부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬(Lithium perchlorate), 아세트산 리튬(Lithium acetate), 염화마그네슘, 염화알루미늄 (AlCl₃), 페놀, 프로판올, SDS (Sodium dodeceyl

sulfate), 또는 티오요소 (Thiourea)일 수 있다.

- [84] 본 발명의 용어 "염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 형태의 물질인 염 중에서도 상기 세포 응집성을 향상시킬 수 있는 형태의 염을 의미한다. 통상적으로 금속염, 유기염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [85] 그 예로, 상기 염은 염화나트륨이며, 상기 카오토로픽 제제는 구아니딘-염산 (Gu-HCl)일 수 있다.

[86]

- [87] 페리플라즈م 단백질을 추출하는 또 하나의 구체예에서 세포 침전물에 카오토로픽 제제가 함유된 완충용액을 가하여 페리플라즈م 단백질을 추출하고, 원심분리 또는 마이크로 필터를 수행하여 페리플라즈م 단백질을 포함하는 상등액을 얻을 수 있다.

- [88] 상기 정제 방법의 (2) 단계의 카오토로픽 제제는 전도도가 50 mS/cm ~ 300 mS/cm, 구체적으로 100 mS/cm ~ 200 mS/cm, 보다 구체적으로 150 mS/cm ~ 250 mS/cm을 갖도록 투입하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89]

- [90] 다른 또 하나의 구체예에서 상기 정제 방법의 (2) 단계에서 페리플라즈م 단백질을 추출하기 위한 카오토로픽 제제는 구아니딘 염산(Gu-HCl) 이외에 우레아 (urea), 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, SDS (Sodium dodecyl sulfate), 및 티오요소 (Thiourea) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[91]

- [92] 구체적으로, 페리플라즈마내의 단백질을 추출시킬 수 있는 카오토로픽 제제는 제한없이 포함되며, 그 예로, 염화나트륨, 황산나트륨, 황산암모늄, 황산바륨, 황산칼슘, 황산마그네슘, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 염화암모늄, 플루오르화나트륨, 아질산나트륨, 인산칼슘, 황화나트륨, 염화바륨, 염화칼슘, 브로민화마그네슘, 탄산칼슘, 황산칼륨, 아세트산 나트륨, 시트르산나트륨, 브로민화나트륨, 티오시안산 나트륨, 인산나트륨, 소듐 디옥시콜레이트,

아세트산 암모늄, 탄산수소암모늄, 염화 암모늄, Tris-HCl, 트리스 인산염, NP-40(Nonidet P-40), 루브롤 PX(Lubrol PX), 옥틸 글루코시드, 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 아세톤, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산(Gu-HCl), 우레아, 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, 부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬(Lithium perchlorate), 아세트산 리튬(Lithium acetate), 염화마그네슘, 염화알루미늄(AlCl_3), 페놀, 프로판올, SDS (Sodium dodeceyl sulfate), 또는 티오요소(Thiourea)일 수 있다.

[93]

[94] 구체적으로 세포는 구아니딘-염산(Gu-HCl)이 함유된 완충용액, 예를 들어 0.5M 내지 3 M 구아니딘-염산(Gu-HCl)이 함유된 완충용액의 처리로 인해 페리플라즈마의 단백질이 추출된다. 상기 카오토로픽 제제에 의한 추출에는 구아니딘-염산(Gu-HCl) 이외에 우레아, 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, SDS (Sodium dodeceyl sulfate), 또는 티오요소(Thiourea) 같은 제제를 포함한 완충용액을 사용할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[95] 앞선 구체에 중 어느 하나의 정제방법에서, 상기 정제 방법의 (iii) 단계 또는(3) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 1회 혹은 2회 수행되는 것을 특징으로 한다. 그 예로, 2회 일 수 있으나, 정제 수율을 높일 수 있는 한 제한되지 않는다.

[96] 상기 수행되는 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 각각 서로 다르거나, 2회 이상 수행시 동일한 작용기의 수지를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[97]

[98] 구체적으로, 상기 페리플라즈마 단백질을 포함하는 상등액을 수득한 이후, 이어서 소수성 상호작용 컬럼 제1 크로마토그래피, 소수성 상호작용 컬럼 제2 크로마토그래피 및 이온 교환 컬럼 크로마토그래피를 차례로 수행하여 고순도의 재조합 재조합 단백질을 정제 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[99] 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피 수지의 작용기가 페닐(phenyl), 옥틸(octyl), (이소)프로필((iso)propyl), 부틸(butyl) 및 에틸(ethyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[100] 구체적으로, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에는 페닐 작용기를 갖는 컬럼을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 크로마토그래피 조건으로는 pH를 6.0 내지 9.0의 범위, 구체적으로는 6.5 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0 내지 8.5, 더 구체적으로 pH 7.5 내지 8.5의 범위로 유지하면서, 염의 농도가 500 mM 이하인 완충용액으로 용출할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[101] 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에는 프로필 작용기를 갖는 컬럼을 사용할 수 있으며, 크로마토그래피 조건으로는 pH를 6.0 내지 9.0의 범위, 구체적으로는 6.5 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0

내지 8.5, 더 구체적으로는 pH 7.5 내지 8.5의 범위로 유지하면서, 염의 농도가 2 M 이하인 완충용액으로 용출할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[102]

[103] 앞선 구체예 중 어느 하나의 정제방법에서, 상기 정제 방법의 (iv) 단계 또는(4) 단계의 이온 교환 크로마토그래피 수지의 작용기가 메틸설포네이트 (S), 설포프로필 (SP), 카르복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE) 및 폴리아스파르트산 (Poly aspartic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 쿼터너리암모늄(Q), 쿼터너리아미노에틸 (QAE), 디에틸아미노에틸 (DEAE), 폴리에틸렌이민 (PEI), 디메틸아미노메틸(DMAE), 및 트리메틸아미노에틸 (TMAE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나일 수 있다.

[104] 구체적으로, 상기 이온 교환 컬럼 크로마토그래피에는 Q 작용기를 갖는 컬럼을 사용할 수 있으며, 크로마토그래피 조건으로는 pH를 6.0 내지 9.0의 범위, 구체적으로는 6.5 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0 내지 9.0, 더 구체적으로는 7.0 내지 8.5, 더 구체적으로는 pH 7.0 내지 8.0의 범위로 유지하면서, 염의 농도가 200 mM 이하인 완충용액으로 용출할 수 있으나, 이제 제한되지 않는다.

[105]

[106] 본 발명의 방법에 따르면, 디아미네이션(deamination) 등이 일어난 변이체들이 효율적으로 제거된 목적하는 재조합 단백질을 고수율 및 고순도로 얻을 수 있다. 구체적으로, 상기 재조합 단백질은 인간 성장 호르몬일 수 있으며, 기존의 대한민국 등록 특허인 제10-0443890호에서 개시된 방법보다 정제 수율이 1.5배 내지 3배 이상 증가하는 효과의 우수성을 확인하였다.

[107]

[108] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 보다 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범주가 제한되는 것은 아니다.

[109] 실시예1: 수크로스가 함유된 완충용액을 이용한 인간 성장 호르몬 단백질 정제방법 1

[110]

[111] 실시예 1-1: 재조합 대장균에서의 발현을 통한 인간 성장 호르몬 단백질의 제조

[112] 대장균의 열안정성 엔테로톡신 II의 변형된 분비 서열 (MKKTIAFLLA SMFVFSIATN AYA, 서열번호 1)과 대표적인 재조합 단백질의 일종인 인간 성장 호르몬이 융합된 발현 벡터로 형질전환된 대장균 BL21(DE3) 균주를 멸균 LB배지(박토-트립톤 10 g/l, 박토-효모 추출물 5 g/l, NaCl 10 g/l) 1리터가 들어있는 2리터 플라스크에 접종하여 종균 배양하였다. 이 배양액을 박토-트립톤, 효모추출물, NaCl, 인산 완충용액 (phosphate buffer), 미량의 금속(trace metal), 글루코스, MgCl₂ 등이 첨가된 50리터 발효기에서 배양하였다. pH 6.7에서 배양 시작 후 pH가 6.8이 되면 유가 배양(fed-batch)을 시작하였다.

박토-효모추출물 100 g/l와 글루코스 385 g/l를 투입하였고, OD가 70~80에 도달하면 박토-효모추출물 140 g/l와 글루코스 264 g/l를 투입하여 최종 42~45시간 발효하였다. 발효가 종료된 후, 발효액을 12,300g로 원심 분리하여 균체를 얻고 -70 °C에 보관하였다.

- [113] 본 실시예 1-1에서 발현 및 생산된 인간 성장호르몬은 발현 벡터 내에 연결된 분비 서열에 의해서 재조합 대장균의 페리플라즘에 존재하게 된다. 이하, 페리플라즘 내에 존재하는 인간 성장호르몬은 페리플라즘 단백질이라 지칭한다.

[114]

[115] **실시예 1-2: 페리플라즘 단백질 추출 (단계 1)**

- [116] 상기 실시예 1-1에서 얻은 대장균 균체 10 g을 상온의 완충용액(20% 수크로즈, 1 mM EDTA, 30 mM 트리스, pH 7.5) 150 ml에 가하고 90분 동안 교반한 후, 12,300 g으로 연속 원심분리하여 펠렛을 수거하였다. 이 펠렛에 다시 4~8 °C의 증류수 150 ml을 가한 후, 4~8 °C에서 1 시간 동안 교반하였다. 이후 염화나트륨을 투입하여 약 2 M (전도도 약 100~200 mS/cm) 농도가 되게 한 후, 12,300 g으로 연속 원심분리하여 펠렛 (pellet)을 제거하고, 페리플라즘 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다. 상등액을 0.2 μ m 필터를 이용하여 필터링 (filtering)을 수행하였다. 상기 염화나트륨 대신 카오트로픽 제제 (구아니딘-염산 등)을 투입할 수 있으며, 농도는 약 2 M (전도도 약 150~250 mS/cm) 이 되게 하였다. 이후 원심분리하여 상등액을 수거하는데 염화나트륨보다 세포의 응집력이 높아져 상등액의 탁도가 낮은 결과를 얻었다. 이는 세포 유래 불순물을 보다 용이하게 펠렛으로 제거할 수 있는 장점과 페리플라즘에 발현된 단백질의 추출을 향상시키는 효과가 있다. 구아니딘-염산을 사용했을 경우, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피를 수행하기 위해 염을 제거하는 단계를 추가적으로 수행하였다.

[117]

[118] **실시예 1-3: 소수성 상호작용 컬럼 제1 크로마토그래피 (단계 2)**

- [119] 상기 실시예 1-2에서 얻은 상등액으로 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피인, 부틸-세파로스 패스트 플로우(Butyl-Sepharose fast flow, GE사, 미국) 컬럼 크로마토그래피를 다음과 같이 수행하였다.
- [120] 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 1 (2.2 M 염화나트륨, 50 mM 트리스, pH 8.0)로 미리 평형화된 부틸-세파로스 컬럼(10x24 mm, Pall사, 미국)에 흡착시킨 후 흡착되지 않은 단백질을 동일 완충용액으로 충분히 세척하여 제거하고, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 용출용액 (10 mM 트리스, pH 8.0)를 단계적으로 가하여 용출시켰다.

[121]

[122] **실시예 1-4: 소수성 상호작용 컬럼 제2 크로마토그래피 (단계 3)**

- [123] 상기 실시예 1-3에서 얻은 분획으로, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피인,

프로필(Poly HI-Propyl, Avantor사, 미국) 컬럼 크로마토그래피를 다음과 같이 수행하였다.

- [124] 실시예 1-3에서 얻은 분획에 5 M 염화나트륨 용액을 투입하여 분획의 염화나트륨 농도가 2 M이 되게 하였다. 이후 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 2 (2 M 염화나트륨, 50 mM 트리스, pH 8.0)으로 미리 평형화된 프로필 컬럼(10×28 mm, Pall사, 미국)에 흡착시킨 후 흡착되지 않은 단백질을 동일 완충용액으로 충분히 세척하여 제거하고 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 용출용액 (10 mM 트리스, pH 8.0)을 단계적으로 가하여 용출시켰다. 용출된 분획들을 전기영동 분석하여 인간 성장 호르몬의 순도가 95% 이상인 분획을 수집하였다.

[125]

[126] 실시예 1-5: 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피 (단계 4)

- [127] 상기 실시예 1-4에서 얻은 분획으로, 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피인, 음이온(Source Q, GE사, 미국) 컬럼 크로마토그래피를 다음과 같이 수행하였다.

- [128] 실시예 1-4에서 얻은 분획을 Sephadex G25 컬럼(GE사, 미국)을 이용하여 10 mM 트리스 (pH 7.5) 버퍼로 교환하였다. 버퍼 교환된 시료를 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 1(10 mM 트리스, pH 7.5)으로 미리 평형화된 음이온 컬럼(15×13 mm, Pall사, 미국)에 투입하여 흡착시킨 후 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 2(10 mM 트리스, 0.25 M 염화나트륨, pH 7.5)로 단계적으로 가하여 용출시켰다.

[129]

[130] 실시예 1-6: 인간 성장 호르몬의 순도 확인 (단계 5)

- [131] 상기 실시예 1-5에서 최종 용출된 분획을 SDS-PAGE (12% NuPAGE, Novex사, 미국)로 전기영동 분석하여 인간 성장 호르몬의 순도를 분석하였으며, 그 결과로도 1에 나타내었다.

- [132] 도 1의 결과인 SDS-PAGE 상에서 a는 대조군인 소마트로핀 (Somatropin, Pfizer사, 미국)이며, b는 정제된 인간 성장 호르몬 이다. 정제된 인간 성장 호르몬은 SDS-PAGE 상에서 대조군인 소마트로핀과 동등 이상의 순도를 나타내었다.

- [133] 또한 역상 고압 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 컬럼 (Vydac 214TP54)을 이용하여 순도를 분석하였다. 역상 고압 컬럼 크로마토그래피는 유럽 약전(European Pharmacopia)의 방법에 따라 수행하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 알 수 있듯이, 순도는 97.8%를 나타내었다.

- [134] 실시예 2: 카오토로픽 제제가 함유된 완충용액을 이용한 인간 성장 호르몬 단백질의 정제방법 2

[135]

- [136] 실시예 2-1: 재조합 대장균에서의 발현을 통한 인간 성장 호르몬 단백질의 제조

- [137] 실시예 1-1과 같이 인간 성장호르몬을 발현 및 생산하였으며 이는 발현 벡터

내에 연결된 분비 서열에 의해서 재조합 대장균의 페리플라즘에 존재하게 된다. 이하, 페리플라즘 내에 존재하는 인간 성장호르몬은 페리플라즘 단백질이라 지칭한다.

[138]

[139] 실시예 2-2: 페리플라즘 단백질 추출 (단계 1)

[140] 상기 실시예 2-1에서 얻은 대장균 균체 2 g을 상온의 완충용액(2 M 구아니딘-염산, 30 mM 트리스, pH 7.0, 전도도 131 mS/cm) 15 ml에 가하고 4~8 °C에서 4 시간 동안 교반한 후, 12,300 g으로 연속 원심분리하여 펠렛 (pellet)을 제거하고, 페리플라즘 단백질이 포함된 상등액을 수거하였다. 상등액을 0.2 µm 필터를 이용하여 필터링 (filtering)을 수행하였다. 필터링을 수행한 상등액을 Sephadex G25 컬럼(GE사, 미국)을 이용하여 10 mM 트리스 (pH 7.5) 버퍼로 교환하였다.

[141]

[142] 실시예 2-3: 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피 (단계 2)

[143] 상기 실시예 2-2에서 얻은 상등액으로, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피인, 프로필(Poly HI-Propyl, Avantor사, 미국) 컬럼 크로마토그래피를 다음과 같이 수행하였다.

[144] 실시예 2-2에서 얻은 상등액을 5 M 염화나트륨 용액을 투입하여 상등액의 염화나트륨 농도가 2.2 M이 되게 하였다. 이후 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 1(2.2 M 염화나트륨, 50 mM 트리스, pH 8.0)으로 미리 평형화된 프로필 컬럼(10×28 mm, Pall사, 미국)에 흡착시킨 후 흡착되지 않은 단백질을 동일 완충용액으로 충분히 세척하여 제거하고 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피용 용출용액 (10 mM 트리스, pH 8.0)를 단계적으로 가하여 용출시켰다. 프로필 컬럼 크로마토그래피는 도 3에 나타내었다.

[145]

[146] 실시예 2-4: 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피 (단계 3)

[147] 상기 실시예 2-3에서 얻은 분획으로, 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피인, 음이온(Source Q, GE사, 미국) 컬럼 크로마토그래피를 다음과 같이 수행하였다.

[148] 실시예 2-3에서 얻은 분획을 Sephadex G25 컬럼(GE사, 미국)을 이용하여 10 mM 트리스 (pH 7.5) 버퍼로 교환하였다. 버퍼 교환된 시료를 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 1(10 mM 트리스, pH 7.5)으로 미리 평형화된 음이온 컬럼(15×13 mm, Pall사)에 투입하여 흡착시킨 후 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피용 완충용액 2(10 mM 트리스, 0.25 M 염화나트륨, pH 7.5)로 단계적으로 가하여 용출시켰다. 실시예 2-4에서 수행한 음이온 컬럼 크로마토그래피는 도 4에 나타내었다.

[149]

[150] 실시예 2-5 인간 성장 호르몬의 순도 확인 (단계 4)

[151] 상기 실시예 2-4에서 최종 용출된 분획을 역상 고압 액체

크로마토그래피(RP-HPLC) 컬럼 (Vydac 214TP54)을 이용하여 순도를 분석하였으며, 순도는 96.0%이었다.

[152]

[153] 상기와 같은 결과들은 페리플라즘 내로 분비 발현시키는 재조합 단백질 발현 시스템인 대장균 발현 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 제조하는 방법에 있어서, 페리플라즘 단백질을 포함하는 상등액 또는 균체에 염 또는 카오토로픽 제제를 첨가하여, 상등액 내에 존재하는 세포의 응집력을 증가시키는 단계를 포함하는 본 발명의 정제 방법이 기존의 재조합 단백질을 정제하는 방법에 비해 고 수율 및 고순도로 재조합 단백질을 정제하는 방법임을 시사하는 것이다.

[154] 더욱이, 본 발명의 방법은 수크로스등을 포함하는 완충용액을 이용하거나, 직접 카오토로픽제제를 이용하는 방법 모두에 있어서 효과적으로 정제할 수 있는 공정을 확립하였음을 시사하는 것이다. 아울러, 별도의 재결합(refolding)과정 없이도, 생체 내에서 활성을 갖는 온전한(intact) 단백질을 수득하는 것이 가능함을 시사하는 것이다.

[155]

[156] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 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 실시예들은 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.

[157]

청구범위

- [청구항 1] (i) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈م 내로 발현하는 분리된 재조합 대장균 균체에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후, 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 세포 침전물을 수득하고, 상기 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액을 처리하여, 페리플라즈م 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계;
- (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 추출액에 염 또는 카오토로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하여 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즈م 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계;
- (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 재조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및
- (iv) 상기 (iii) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 재조합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 2] (1) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈م 내로 발현하는 분리된 재조합 대장균 균체에 카오토로픽 제제가 함유된 완충용액을 가하여 페리플라즈م 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계에서 수득한 추출액을 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 페리플라즈م 단백질을 포함하는 상등액을 수득하는 단계;
- (3) 상기 (2) 단계에서 수득한 상등액을 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에 적용하여, 목적하는 재조합 단백질을 포함하는 분획물을 용출하는 단계; 및
- (4) 상기 (3) 단계의 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피에서 용출된 분획물을 이온 교환 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하는, 목적하는 재조합 단백질의 정제 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (i) 단계는
- (a) 목적하는 재조합 단백질을 페리플라즈م 내로 발현하는 재조합 대장균을 배양한 후 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 균체를 수득하는 단계; 및
- (b) 분리된 재조합 대장균 균체에 수크로스가 함유된 완충용액을 가한 후, 원심분리 또는 마이크로필터를 수행하여 세포 침전물을 수득하고, 상기 세포 침전물에 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액을 처리하여, 페리플라즈م 단백질을 포함하는 추출액을 수득하는 단계에 의해 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 수크로스가 함유된 완충용액에 비해 삼투압이 낮은 용액은 증류수인, 방법.

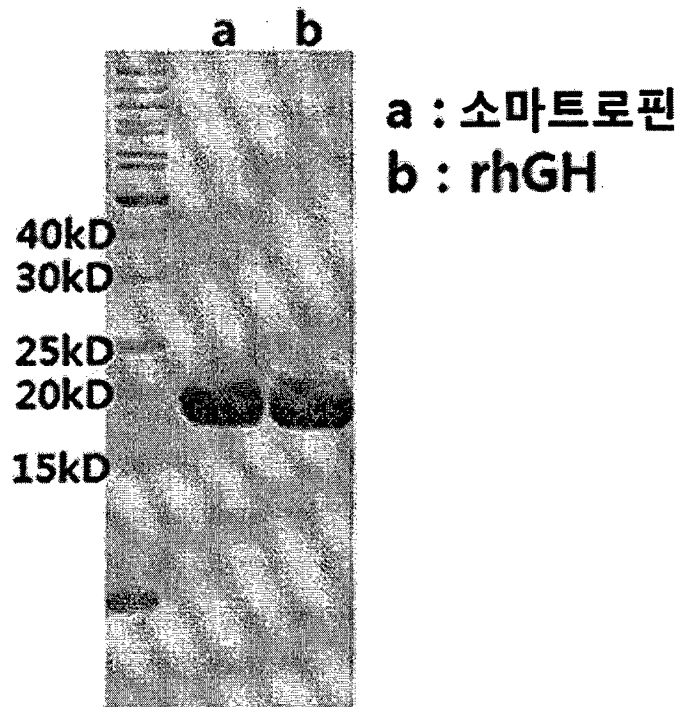
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 카오토로픽 제제가 함유된 완충용액을 가하여 페리플라즈마의 단백질을 추출하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (ii) 단계의 염 또는 카오토로픽 제제 (chaotropic agent)를 첨가하는 단계는, 원심분리 또는 마이크로필터 수행시 세포 응집력을 증가시키는 단계인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 50 mS/cm ~ 300 mS/cm 전도도를 갖는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 카오토로픽 제제는 50 mS/cm ~ 300 mS/cm 전도도를 갖는 것인, 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 염 또는 카오토로픽 제제는 염화나트륨, 황산나트륨, 황산암모늄, 황산바륨, 황산칼슘, 황산마그네슘, 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 염화암모늄, 플루오르화나트륨, 아질산나트륨, 인산칼슘, 황화나트륨, 염화바륨, 염화칼슘, 브로민화마그네슘, 탄산칼슘, 황산칼륨, 아세트산 나트륨, 시트르산나트륨, 브로민화나트륨, 티오시안산 나트륨, 인산나트륨, 소듐 디옥시콜레이트, 아세트산 암모늄, 탄산수소암모늄, 염화 암모늄, Tris-HCl, 트리스 인산염, NP-40(Nonidet P-40), 루브롤 PX(Lubrol PX), 옥틸 글루코시드, 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 아세톤, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산 (Gu-HCl), 우레아, 염화 칼륨, 암모늄 설페이트, 부탄올, 에탄올, 과염소산 리튬(Lithium perchlorate), 아세트산 리튬(Lithium acetate), 염화마그네슘, 염화알루미늄 (AlCl₃), 페놀, 프로판올, SDS (Sodium dodecyl sulfate), 및 티오요소 (Thiourea)로 이루어진 군에서 선택된 것인, 방법.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 카오토로픽 제제는 트윈80, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 트리톤 X-100, 구아니딘-염산 (Gu-HCl), 우레아, 암모늄 설페이트, SDS (Sodium dodecyl sulfate), 및 티오요소 (Thiourea)로 이루어진 군에서 선택된 것인, 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 염은 염화나트륨이며, 상기 카오토로픽 제제는 구아니딘-염산 (Gu-HCl)인 것인, 방법.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 카오토로픽 제제는 구아니딘-염산 (Gu-HCl)인 것인, 방법.
- [청구항 13] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제조합 단백질은 호르몬, 사이토카인, 인터루킨, 인터루킨 결합 단백질, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체, 세포표면항원 또는 수용체 길항물질인, 방법.
- [청구항 14] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제조합 단백질은 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 글루카곤, GIP(Gastric inhibitory polypeptide), 옥신토모듈린, 제닌(Xenin), 인슐린, CCK(Cholecystokinin) 아밀린(amylin),

가스트린(gastrin), 그렐린(ghrelin), PYY(peptide YY) 등과 같이 위나 장에서 혈당과 체중을 조절하는 인크레틴류(cretins); 렙틴(Leptin), 아디포넥틴(adiponectin), 아디폴린(adipolin), 아펠린(apelin), 카르토넥틴(cartonectin)과 같이 지방질(adipose)에서 분비되는 아디포카인류(adipokines); 키스펙틴(Kisspeptin), 네스파틴-1(Nesfatin-1)과 같이 뇌에서 분비되는 뉴로펩타이드류(neuropeptides); 이리신(Irisin), 마이오넥틴(myonectin), 데코린(decorin), 폴리스타틴(follistatin), 머슬린(musclin)과 같이 근육(muscle)에서 분비되는 펩타이드 혹은 단백질류; 혈관작용성장펩타이드(Vasoactive intestinal peptide), 나트륨이뇨펩타이드류(natriuretic peptides), 호중구 증가 인자(G-CSF), 인간 성장 호르몬(hGH), 에리스로포이에틴(EPO), 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 인터페론 수용체, 지프로테인 관련수용체(G protein-coupled receptor), 인터루킨류, 인터루킨 수용체, 효소류, 인터루킨 결합 단백질, 사이토카인 결합 단백질, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T 세포인자, 단백질 A, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림프독소, 종양 괴사인자, 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 고 당쇄화 적혈구 생성인자, 안지오프에이틴류, 헤모글로빈, 트롬빈, 트롬빈 수용체 활성화 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프에이틴, 안지오프에이틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오프에이틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린 유사 성장인자, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬, 오토탁신, 락토프레틴, 미오스타틴, 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

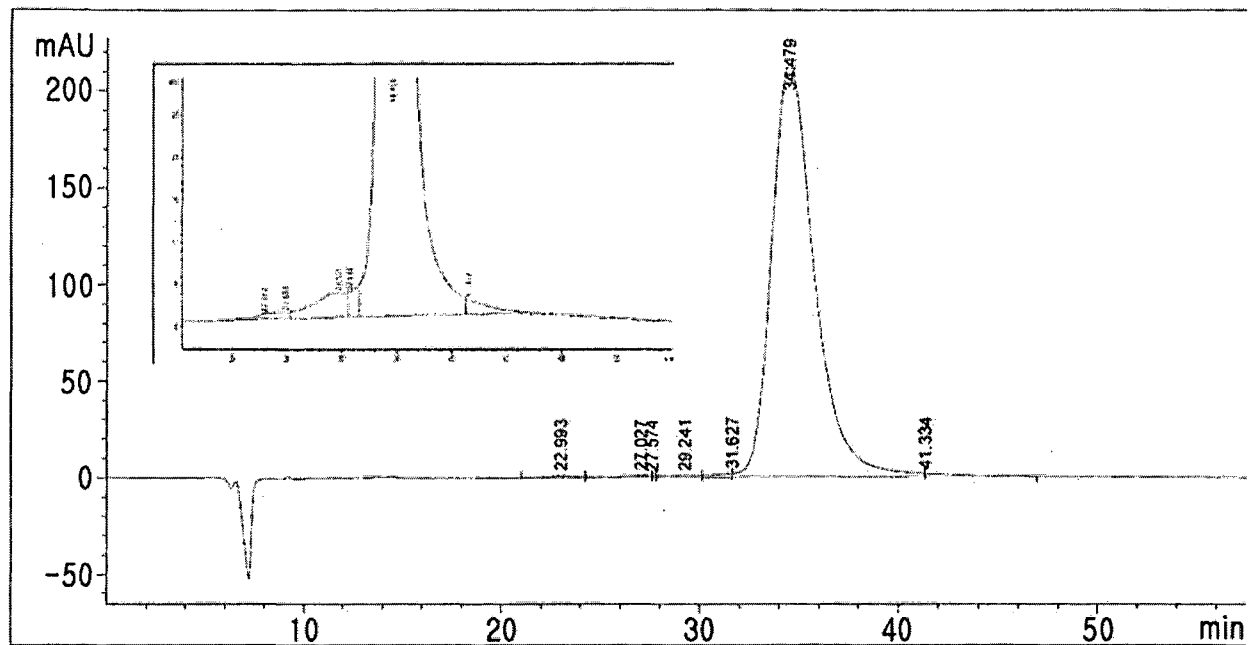
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 제조합 단백질은 인간 성장 호르몬, 인터페론-알파, 과립구 콜로니자극인자, 적혈구 생성인자, 혈액인자, 인슐린, 옥신토모듈린, 글루카곤-유사 펩타이드류, 엑센딘류 및 각각의 유도체인, 방법.
- [청구항 16] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제조합 단백질은 인간 성장 호르몬인,

- 방법.
- [청구항 17] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 1회 또는 2회 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 2회 수행되는 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피는 각각 서로 다른 작용기의 수지를 이용하는 것인, 방법.
- [청구항 19] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피 수지의 작용기가 페닐(phenyl), 옥틸(octyl), (이소)프로필((iso)propyl), 부틸(butyl) 및 에틸(ethyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인, 방법.
- [청구항 20] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피 수지의 작용기가 메틸설포네이트 (S), 설포프로필 (SP), 카르복시메틸 (CM), 설포에틸 (SE) 및 폴리아스파르트산 (Poly aspartic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인, 방법.
- [청구항 21] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 이온 교환 크로마토그래피 수지의 작용기가 쿼터너리암모늄(Q), 쿼터너리아미노에틸 (QAE), 디에틸아미노에틸 (DEAE), 폴리에틸렌이민 (PEI), 디메틸아미노메틸(DMAE), 및 트리메틸아미노에틸 (TMAE)))으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것 중 하나인, 방법.

[도 1]



[도2]



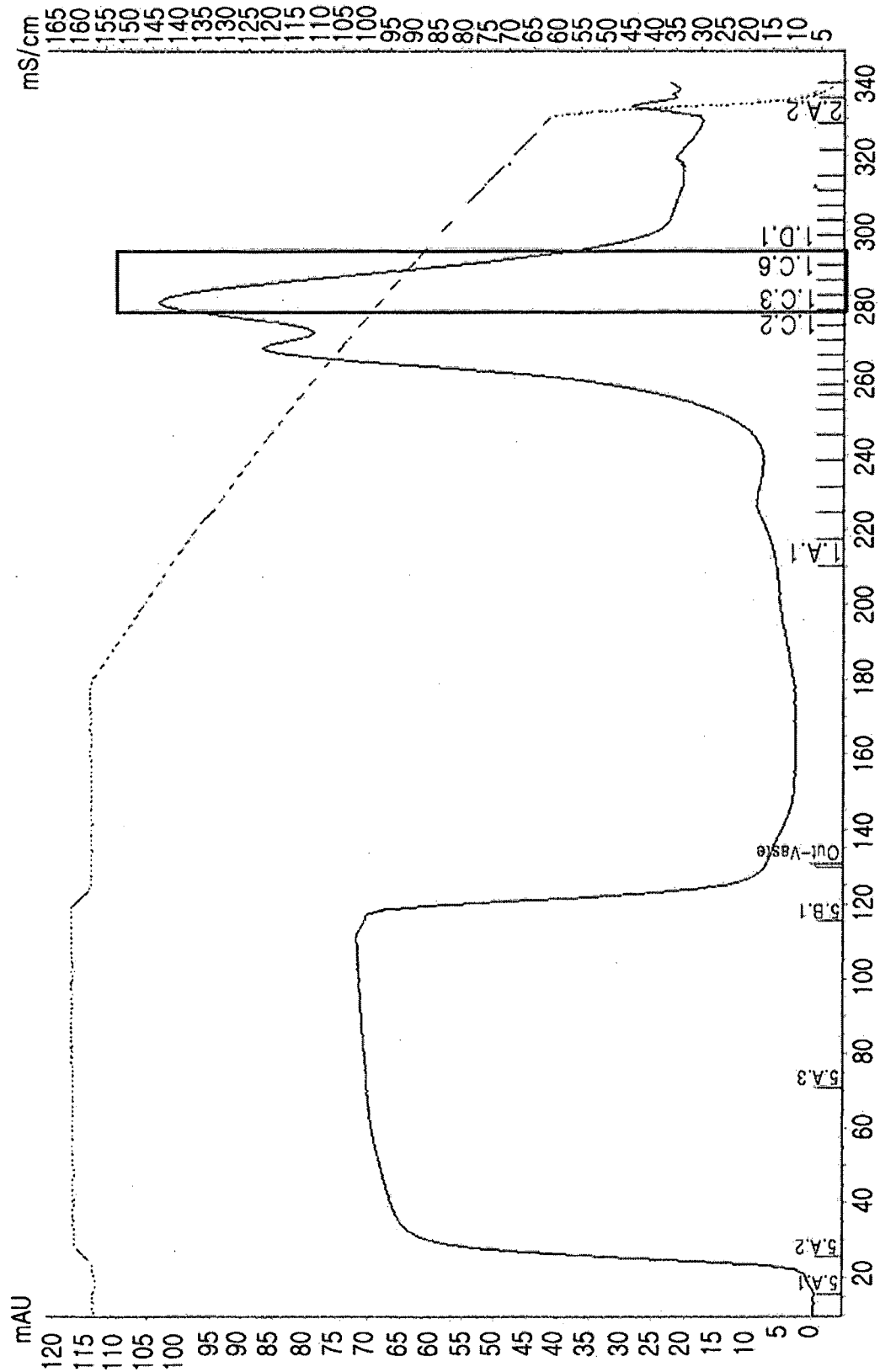
=====
 Area Percent Report
 =====

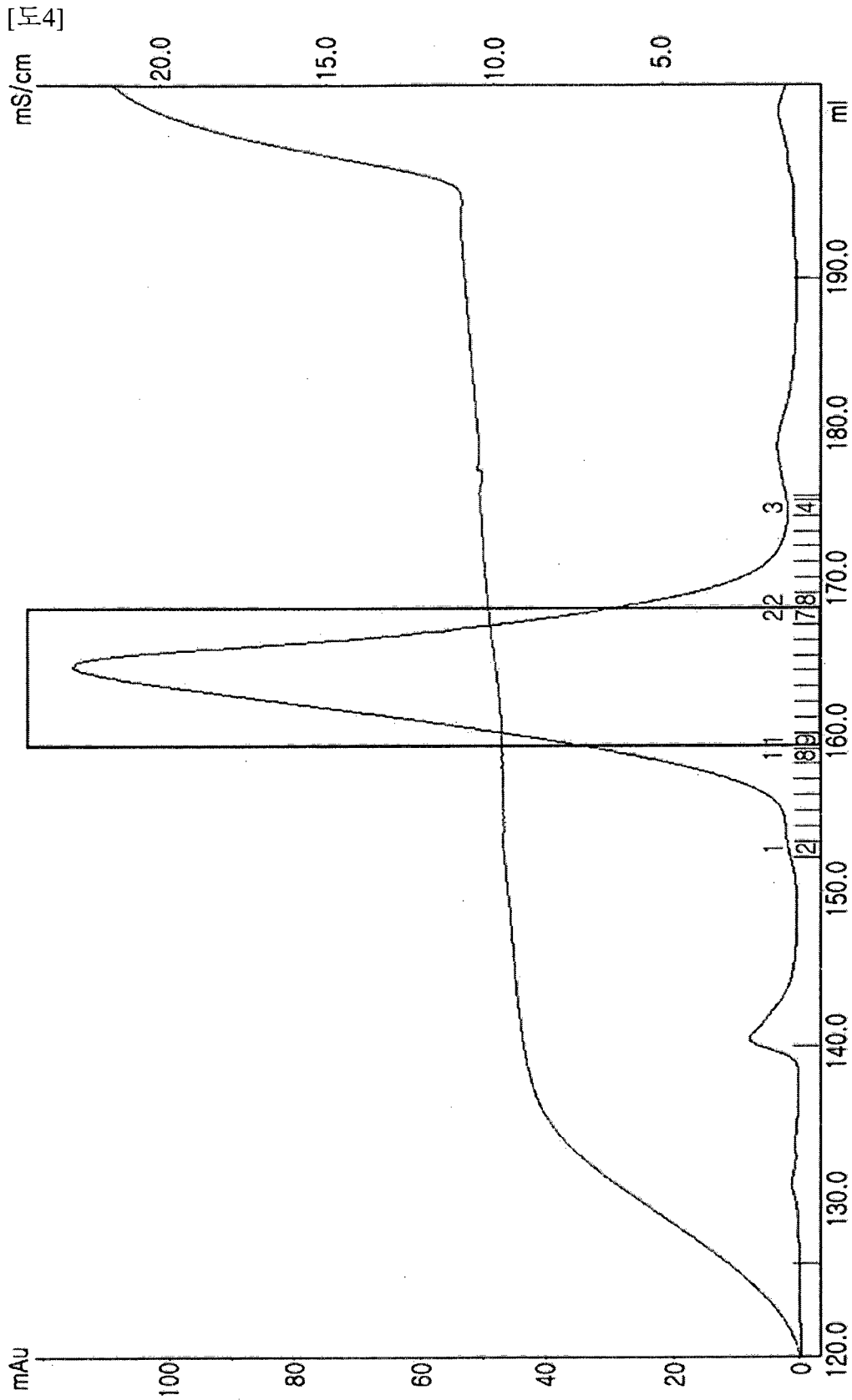
Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: MWD1 G, Sig=220,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	22.993	BV	1.3255	96.86900	1.02604	0.2957
2	27.027	VV	2.1404	136.98105	8.48054e-10	0.4181
3	27.574	VV	0.2157	10.14248	7.83547e-10	0.0310
4	29.241	VV B	1.6493	131.02501	1.00480	0.4000
5	31.627	VV	1.0468	115.18851	1.83399	0.3516
6	34.479	VF	2.2966	3.20504e4	213.35605	97.8363
7	41.334	VB	2.3097	218.59311	1.57735	0.6673

[도3]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/014123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/14(2006.01)i, C07K 1/18(2006.01)i, C07K 1/20(2006.01)i, C07K 1/34(2006.01)i, C07K 1/36(2006.01)i, C07K 14/61(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 1/14; C07K 1/16; C07K 14/475; C12N 9/26; C07K 14/53; C12N 9/00; C07K 1/18; C07K 1/20; C07K 1/34; C07K 1/36; C07K 14/61

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: recombinant protein, refinement, periplasm, buffer solution, centrifugation, microfilter, precipitate, extract, salt, chaotropic agent, supernatant, hydrophobic interaction column chromatography, fraction, elution, ion exchange chromatography

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0443890 B1 (HANMI PHARM. CO., LTD.) 09 August 2004 See claims 1-7.	1-21
A	BECKER, G. W. et al., "Expression, Secretion and Folding of Human Growth Hormone in Escherichia Coli: Purification and Characterization", FEBS Letters, August 1986, vol. 204, no. 1, pages 145-150 See abstract; "3.2. Purification of secreted hGH" section.	1-21
A	KR 10-1989-0016166 A (PHILLIPS PETROLEUM CO.) 28 November 1989 See claim 1.	1-21
A	KR 10-2012-0045451 A (HANMI SCIENCE CO., LTD.) 09 May 2012 See abstract; claims 1 and 2.	1-21
A	US 2016-0168554 A1 (FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.) 16 June 2016 See claim 13.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 MARCH 2018 (20.03.2018)

Date of mailing of the international search report

20 MARCH 2018 (20.03.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/014123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0443890 B1	09/08/2004	KR 10-2002-0080108 A	23/10/2002
KR 10-1989-0016166 A	28/11/1989	EP 0337492 A1	18/10/1989
		EP 0337492 B1	21/06/1995
		JP 01-311028 A	15/12/1989
		JP 2721699 B2	04/03/1998
		KR 10-1996-0004707 B1	12/04/1996
		US 5004688 A	02/04/1991
KR 10-2012-0045451 A	09/05/2012	AU 2011-321169 A1	06/06/2013
		AU 2011-321169 B2	25/02/2016
		BR 112013010522 A2	02/08/2016
		CA 2816050 A1	03/05/2012
		CN 103228672 A	31/07/2013
		CN 103228672 B	16/09/2015
		DK 2632944 T3	02/10/2017
		EP 2632944 A2	04/09/2013
		EP 2632944 B1	21/06/2017
		ES 2640321 T3	02/11/2017
		IL 226043 A	27/06/2013
		JP 2013-540809 A	07/11/2013
		JP 2017-060488 A	30/03/2017
		JP 6138690 B2	31/05/2017
		MX 2013004830 A	03/06/2013
		MX 344815 B	06/01/2017
		NZ 610314 A	28/03/2014
		RU 2013124809 A	10/12/2014
		RU 2596408 C2	10/09/2016
		SG 189509 A1	31/05/2013
		US 2013-0211054 A1	15/08/2013
		US 9193761 B2	24/11/2015
		WO 2012-057529 A2	03/05/2012
		WO 2012-057529 A3	28/06/2012
		ZA 201303834 B	30/04/2014
US 2016-0168554 A1	16/06/2016	CA 2915253 A1	24/12/2014
		CN 105473607 A	06/04/2016
		EA 201600026 A1	31/08/2016
		EP 3010932 A1	27/04/2016
		EP 3010932 B1	19/07/2017
		ES 2643485 T3	23/11/2017
		IT MI20130992 A1	18/12/2014
		US 9822351 B2	21/11/2017
		WO 2014-203133 A1	24/12/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 1/14(2006.01)i, C07K 1/18(2006.01)i, C07K 1/20(2006.01)i, C07K 1/34(2006.01)i, C07K 1/36(2006.01)i, C07K 14/61(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 1/14; C07K 1/16; C07K 14/475; C12N 9/26; C07K 14/53; C12N 9/00; C07K 1/18; C07K 1/20; C07K 1/34; C07K 1/36; C07K 14/61

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 제조합 단백질, 정제, 페리플라즈, 완충용액, 원심분리, 마이크로필터, 침전물, 추출액, 염, 카오토로픽 제제, 상등액, 소수성 상호작용 컬럼 크로마토그래피, 분획물, 용출, 이온 교환 크로마토그래피

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0443890 B1 (한미약품 주식회사) 2004.08.09 청구항 1-7 참조.	1-21
A	BECKER, G. W. 등, 'Expression, secretion and folding of human growth hormone in Escherichia coli: Purification and characterization', FEBS Letters, 1986.08, 204권, 1호, 페이지 145-150 초록; "3.2. Purification of secreted hGH" 섹션 참조.	1-21
A	KR 10-1989-0016166 A (휘립프스 피트로오 리암 캄파니) 1989.11.28 청구항 1 참조.	1-21
A	KR 10-2012-0045451 A (한미사이언스 주식회사) 2012.05.09 요약; 청구항 1 및 2 참조.	1-21
A	US 2016-0168554 A1 (FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.) 2016.06.16 청구항 13 참조.	1-21

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 03월 20일 (20.03.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 03월 20일 (20.03.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

장기정

전화번호 +82-42-481-8364



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0443890 B1	2004/08/09	KR 10-2002-0080108 A	2002/10/23
KR 10-1989-0016166 A	1989/11/28	EP 0337492 A1	1989/10/18
		EP 0337492 B1	1995/06/21
		JP 01-311028 A	1989/12/15
		JP 2721699 B2	1998/03/04
		KR 10-1996-0004707 B1	1996/04/12
		US 5004688 A	1991/04/02
KR 10-2012-0045451 A	2012/05/09	AU 2011-321169 A1	2013/06/06
		AU 2011-321169 B2	2016/02/25
		BR 112013010522 A2	2016/08/02
		CA 2816050 A1	2012/05/03
		CN 103228672 A	2013/07/31
		CN 103228672 B	2015/09/16
		DK 2632944 T3	2017/10/02
		EP 2632944 A2	2013/09/04
		EP 2632944 B1	2017/06/21
		ES 2640321 T3	2017/11/02
		IL 226043 A	2013/06/27
		JP 2013-540809 A	2013/11/07
		JP 2017-060488 A	2017/03/30
		JP 6138690 B2	2017/05/31
		MX 2013004830 A	2013/06/03
		MX 344815 B	2017/01/06
		NZ 610314 A	2014/03/28
		RU 2013124809 A	2014/12/10
		RU 2596408 C2	2016/09/10
		SG 189509 A1	2013/05/31
		US 2013-0211054 A1	2013/08/15
		US 9193761 B2	2015/11/24
		WO 2012-057529 A2	2012/05/03
		WO 2012-057529 A3	2012/06/28
		ZA 201303834 B	2014/04/30
US 2016-0168554 A1	2016/06/16	CA 2915253 A1	2014/12/24
		CN 105473607 A	2016/04/06
		EA 201600026 A1	2016/08/31
		EP 3010932 A1	2016/04/27
		EP 3010932 B1	2017/07/19
		ES 2643485 T3	2017/11/23
		IT MI20130992 A1	2014/12/18
		US 9822351 B2	2017/11/21
		WO 2014-203133 A1	2014/12/24