

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷ (11) 공개번호 10-2005-0061612
C07K 1/18 (43) 공개일자 2005년06월22일

(21) 출원번호 10-2005-7009776(분할)
(22) 출원일자 2005년05월30일
(62) 원출원 특허10-2001-7009551
원출원일자 : 2001년07월28일 심사청구일자 2001년08월06일
번역문 제출일자 2005년05월30일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2000/000257 (87) 국제공개번호 WO 2000/44772
국제출원일자 2000년01월31일 국제공개일자 2000년08월03일

(30) 우선권주장 9902000.0 1999년01월30일 영국(GB)

(71) 출원인 델타 바이오테크놀로지 리미티드
영국, 엔지7 1에프디 노팅햄, 캐슬 블러바드 59, 캐슬코어트

(72) 발명자 반 우르크, 헨드릭
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
미드, 데이비드, 존
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
모턴, 필립, 하비
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
카트라이트, 앤드류, 존
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
카메론, 재슨
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
발란스, 데이비드, 제임스
미국 펜실베니아 19406-0901, 킹 오브 프러시아, 피.오. 박스 61501,
퍼스트 애버뉴 1020, 아벤티스 베링
그랜드조지, 미셸, 가스통, 조셉
독일 데-35002 마르부르크, 피.오. 박스 1230, 아벤티스 베링 게엠베하
베레젠코, 스티븐
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
우드로우, 존, 로드니
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
슬립, 데럴
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드
베롱, 장-뤽, 베르나르드
영국 노팅햄 엔지7 1에프디, 캐슬 블러바드 59, 캐슬 코트, 델타 바이오
테크놀로지 리미티드

(74) 대리인 신영무

심사청구 : 있음

(54) 알부민 용액의 정제방법

요약

알부민(바람직하게 형질전환 효모에 의해 발현되고 분비된 알부민)을 일련의 크로마토그래피 단계에 투입함을 포함하는 고순도 알부민 용액의 제조방법이 제공된다. 바람직하게는 공정은 포지티브 방식 양이온 교환 크로마토그래피, 포지티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피, 포지티브 방식 친화성 크로마토그래피, 네가티브 방식 친화성 크로마토그래피(바람직하게는 고정화된 아미노페닐붕산을 사용함), 네가티브 방식 양이온 교환 크로마토그래피 및 네가티브 또는 포지티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피의 단계를 포함한다. 2개 이상의 인-프레임 번역 정지 암호를 포함하는 재조합 알부민 암호화 서열로서 알부민 용액내 니켈의 수준을 감소시키기 위한 방법이 기재되어 있다. 또한 재조합-발현 알부민의 만노실화 능력이 감소된, 재조합 알부민 암호화 서열을 발현하는 진균 세포를 배양함을 포함하는 재조합 알부민 생성 방법이 기재되어 있다.

대표도

도 1

색인어

고순도 알부민, 크로마토그래피, 형질전환

명세서

도면의 간단한 설명

본 발명은 다음과 같이 첨부되는 도면으로 더욱 상세히 설명된다.

도 1 내지 7은 각각 플라스미드 pAYE309, pAYE440, pAYE438, pDB2241, pDB2242, pDB2243 및 pDB2244의 구성을 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명에 따라 제조된 rHA로부터 전기분무 질량 분석기의 conA-결합 rHA 분획을 나타낸 도면이다.

도 9는 켈렉스™에 의해 rHA로부터 제거될 니켈에 대한 pH와 시간의 효과를 나타낸 도면이다.

도 10 및 11은 영역 사카로마이세스 세레비지에 *PMT1*을 암호화하는 단백질에 상동성을 갖는 두개의 DNA 서열을 나타낸다.

도 12 및 15는 영역 사카로마이세스 세레비지에 *PMT7*을 암호화하는 단백질에 상동성을 갖는 네개의 DNA 서열을 나타낸다.

도 16 및 17은 영역 사카로마이세스 세레비지에 *PMT5*를 암호화하는 단백질에 상동성을 갖는 두개의 DNA 서열을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혈청 또는 원형질에서 추출된 단백질 사람 혈청 알부민(HSA) 또는 사람 혈청 알부민의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 암호화 서열을 갖는 생물체를 형질전환 또는 형질감염함으로써 생성된 재조합 사람 알부민(rHA)(유전자식 동물 또는 식물을 사용하여 제조된 rHA도 포함)을 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에서, "알부민"이라는 용어는 일반적으로 HSA 및/또는 rHA를 의미한다.

알부민은 중화상, 쇼크 또는 혈액 손실 환자를 치료하기 위해 사용되어진다. 또한, 고등 진핵 세포를 성장시키기 위한 공급 배지 및 약리학적 활성 화합물에 대한 부형제로서 사용되어지고, 이들 대부분은 안정화되어질 필요가 있다. 현재, 생성물에 대한 수요는 사람 혈액으로부터 추출된 알부민에 의해 충족되어진다. 추출 및 분리 기술의 실례로는 양이온 교환기의 사용에 관한 JP 03/258 728; 음이온 교환기의 사용에 관한 EP 428 758; 및 가열, 염 첨가 및 다이아여과의 사용에 관한 EP 452 753에 공개된 것을 포함한다.

미생물에서 rHA의 생성은 EP 330 451과 EP 361 991에 기재되어 있다. rHA에 대한 정제 기술은 매트릭스-유도된 염료의 제거에 관한 WO 92/04367, 효모-유도된 착색제 제거에 관한 EP 464 590, 알칼리 침전과 이어지는 rHA의 지용성 상에의 적용에 관한 EP 319 067, 및 여러가지 완성된 정제 공정을 포함한 WO 96/37515에 기재되어 있다.

본 발명은 본 명세서에 참조로서 포함하는 WO 96/37515 및 US 5 728 553에 설명된 방법을 보다 강도높게 향상시킨 결과를 나타낸다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 첫번째 양태는 알부민 용액을 정제하는 방법을 제공하는 것이고, 상기 방법은 pH 8.0 내지 9.5이며 전도도가 1 내지 75 mS.cm⁻¹인 미정제 알부민 용액을 알부민에 대해서 네가티브 방식(negative mode)으로 처리되고 고정화된 디히드록시보릴기를 포함하는 친화성 매트릭스를 이용하는 친화성 크로마토그래피 단계로 처리하여 이로 인해 정제된 알부민 용액을 얻는 단계를 포함한다.

바람직하게, 미정제 알부민 용액의 pH는 pH 8.0 내지 9.0이고, 보다 바람직하게는 pH 8.3 내지 8.6이다. 미정제 알부민 용액은 위에서 언급된 pH 범위내의 pH를 갖는 완충제로 완충되어지는 것이 바람직하다.

바람직하게, 완충제는 10 내지 500 mM, 바람직하게 25 내지 200 mM, 및 보다 바람직하게 50 내지 150 mM의 농도로 아미노산을 포함한다. 바람직하게, 아미노산은 글리신이다.

바람직하게, 완충제는 0 내지 500 mM, 바람직하게 25 내지 200 mM, 및 보다 바람직하게 50 내지 150 mM의 농도로 일가 양이온을 포함한다. 바람직하게 일가 양이온은 나트륨이고, NaCl의 형태가 바람직하다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 완충제는 0 내지 500 mM, 바람직하게 25 내지 200 mM, 및 보다 바람직하게 50 내지 150 mM의 농도로 NaCl를 포함한다.

바람직하게, 완충제는 5 내지 250 mM, 바람직하게 10 내지 100 mM의 농도로 이가 양이온을 포함한다. 바람직하게, 이가 양이온은 칼슘이고, CaCl₂ 형태가 바람직하다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 완충제는 5 내지 250 mM, 바람직하게 10 내지 100 mM의 농도로 CaCl₂를 포함한다.

특히 바람직한 구현예에서, 미정제 알부민 용액 및/또는 완충제는 약 100mM 글리신, 약 100mM NaCl 및 약 50mM CaCl₂을 포함한다.

미정제 알부민 용액 및/또는 완충제의 전도도는 10 내지 50 mS.cm⁻¹인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 18 내지 22 mS.cm⁻¹이다.

미정제 알부민 용액 중에서 알부민의 농도는 20 내지 120 g.L⁻¹의 범위인 것이 유리하고, 바람직하게 70 내지 120 g.L⁻¹이고, 보다 바람직하게 100±10g.L⁻¹이다. 바람직하게, 알부민은 0.5 컬럼 부피 이하로 로딩되고, 보다 바람직하게는 0.35 컬럼 부피 이하로 로딩된다.

적합하게, 매트릭스는 붕산을 포함한다. 본 명세서에서 "산"이라는 용어는 그의 염을 포함한다. 이롭게, 붕산은 트리아진 또는 치환된 트리아진을 통해, 예를 들면 모노보로트리아진 또는 디보로트리아진을 형성하기 위해, 아가로스과 같은 지지체에 연결된다. 바람직하게, 붕산은 아미노페닐보레이트이다.

지방족 리간드 및 치환된 방향족 리간드와 같은 페닐보레이트에 대한 대체물을 제시한 공개문헌으로는 Adamek, V. *et al*(1992) *J. Chrom.***625**, 91-99, Singhal, R.P. *et al*(1991) *J. Chrom.***543**, 17-38 및 Liu, X. *et al*(1994)**687**, 61-69이 있다.

적합하게, 친화성 크로마토그래피 단계에 이어서 정제 알부민 용액에 대해서 추가의 정제, 바람직하게는 또 다른 크로마토그래피 정제가 행해진다. 바람직하게, 알부민은 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제된다. 양이온과 음이온 교환 단계의 순서는 그들의 정제 목적이 수행되어지는 동안 상호 교환될 수 있다. 작동 측면에서, 보다 나은 통합된 방법은 양이온 교환 크로마토그래피에 이어서 음이온 교환 크로마토그래피를 진행하는 것이다.

적합하게, 본 발명의 첫번째 양태의 방법에 따라 제조된 정제 알부민 용액은 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정(바람직하게 pH 2.0 또는 pH 4.0 이상의 pH로, 및 바람직하게 pH 10.0 이하의 pH로); 환원제로 처리; 탈색화 처리(예를 들면, 목탄으로); 가열화(살균화 포함); 냉각화 또는 조건화; 사람에게 비경구적 투여를 위한 제형화; 또는 최종 용기로의 배치 공정 중에서 하나 이상의 방법으로 처리된다.

비경구적 투여로는 정맥내 투여, 피하 투여 및 근육내 투여를 포함한다. 알부민은 약리학적 활성 단백질을 위한 부형제로서 작용하고, 이것은 비경구적으로 투여된다.

"최종 용기"는 제조기를 떠난 것이고, 병원 및 약국과 같은 구매자에게 분배되는 것이다.

본 발명의 두번째 양태는 알부민 용액을 정제하는 방법을 제공하는 것이고, 상기 방법은 양이온 교환 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하고, 여기서, 정제된 알부민 용액은 선택적으로 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정(바람직하게 pH 2.0 또는 pH 4.0 이상의 pH로, 및 바람직하게 pH 10.0 이하의 pH로); 환원제로 처리(예를 들면, EP 570 916에 기재); 탈색화 처리(예를 들면, 목탄으로); 가열화(살균화 포함); 냉각화 또는 조건화 공정 중 하나 이상의 방법으로 처리되고, 최종 용기로 옮기 전에 또 다른 정제, 특히 추가의 크로마토그래피 정제는 없다.

양이온 교환 크로마토그래피 단계는 음이온 교환 크로마토그래피 단계에 뒤이어 행해지거나 또는 그 반대이다. 바람직하게는 양이온 교환 크로마토그래피 단계에 이어서 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 진행된다.

바람직하게, 비록 알부민에 상기 언급된 바와 같이 완충제 교환 등과 같은 것을 행하더라도 음이온과 양이온 교환 단계 사이에 추가의 정제 단계는 없다.

조건화는 공정의 다음 단계 또는 최종적인 사용을 위해 알부민의 환경 또는 조건을 개선시키는 임의의 비-정제 처리 단계를 의미한다. 조건화는 옥탄산염 및/또는 다른 지방산, 예를 들면 C₆ 또는 C₁₀ 지방산 또는 소듐 아세틸 트립토판네이트 또는 만델레이트와 같은 알부민 안정화제의 첨가를 포함할 수 있다. 조건화는 또한 염 등의 첨가를 포함하고, 알부민 용액의 전도도를 조절하는 것을 포함할 수도 있다.

본 발명의 첫번째 및 두번째 양태의 양이온 교환 단계는 알부민에 대해 네가티브 또는 포지티브 방식으로 진행될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 양이온 교환 단계는 알부민에 대해서 네가티브 방식으로 진행되는 것이다. 그래서 조건화는 글리코실화 알부민이 비-글리코실화 알부민보다 양이온 물질에 더 강하게 결합하도록 선택되어지는 것이 바람직하다.

본 발명의 첫번째 및 두번째 양태의 양이온 교환 크로마토그래피 단계는 SP-세파로스 FF(SP-Sepharose FF), SP-스페로실(SP-Spherosil), CM-세파로스 FF(CM-Sepharose FF), CM-셀룰로스(CM-Cellulose), SE-셀룰로스(SE-Cellulose) 또는 S-스페라덱스(S-Spheradex)와 같은 시판되는 양이온 교환 매트릭스를 이용할 수 있다. 바람직하게, 양이온 교환 단계는 양이온 교환기로서 고정화된 셀포프로필 치환체를 포함한 매트릭스를 이용한다.

바람직하게, 양이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 4.5 내지 6.0의 pH를 가지며, 보다 바람직하게는 5.0 내지 5.6의 pH, 특히 바람직하게는 5.2 내지 5.4의 pH를 갖는다.

바람직하게, 양이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 알부민 농도가 10 내지 250 g.L⁻¹이며, 바람직하게는 20 내지 70 g.L⁻¹이고, 특히 바람직하게는 50±10g.L⁻¹이다.

바람직하게, 양이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 옥탄산염 이온 농도가 2 내지 15 mM이고, 바람직하게는 5 내지 10 mM이며, 특히 바람직하게는 6 내지 9 mM이다.

편리하게, 양이온 교환 단계 전에, 알부민 용액은 다음과 같은 공정 중 하나를 거친다: (i) pH 조절(바람직하게 pH 2.0 또는 pH 4.0 이상이 pH로, 및 바람직하게 pH 10.0 이하의 pH로); (ii) 농축화; (iii) 다이아여과; 또는 (iv) 옥탄산염 및/또는 다른 지방산, 예를 들면 C₆ 또는 C₁₀ 지방산과 또는 소듐 아세틸 트립토판네이트 또는 만델레이트와 같은 안정화제의 첨가에 의한 조건화. 선택적으로, 또는 부가적으로, 알부민 용액은 다음과 같은 공정 중 하나를 거친다: 완충제 교환; 희석화; 투석; 다이아여과; 환원제로의 처리; 탈색화 처리(예를 들면, 목탄으로); 가열화; 냉각화; 또는 조건화.

일반적으로, 임의의 변형은 제거를 통해서가 아니라 첨가를 통해서 이루어진다. 바람직하게, 알부민 용액의 pH는 아세트산의 첨가에 의해 조절된다. 바람직하게, 알부민 용액은 한외여과에 의해 농축된다.

본 발명의 첫번째 및 두번째 양태에 있어서 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 시판되는 음이온 교환 매트릭스를 이용할 수 있고, 예를 들면, Q 세파로스-FF, QMA-스페로실, DEAE-스페라덱스, Q-하이퍼 D(Q-Hyper D), DEAE-셀룰로스 또는 TMAE, DMAE, 또는 DEAE 프락토겔(DEAE Fractogel)이 있다. 바람직하게, 음이온 교환 단계는 음이온 교환기로서 고정화된 디알킬아미노알킬(예를 들면, 디에틸아미노에틸) 치환체를 포함하는 매트릭스를 이용한다.

바람직한 구현예에서, 본 발명의 첫번째 및 두번째 양태에 있어서 음이온 교환 크로마토그래피 단계는 알부민에 대해서 네가티브 방식으로 진행된다.

바람직하게, 네가티브 방식의 음이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 4.0 내지 5.2의 pH를 가지며, 보다 바람직하게는 4.2 내지 4.9의 pH이고, 특히 바람직하게는 4.5 내지 4.7의 pH를 갖는다.

바람직하게, 음이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 4.0mS.cm⁻¹이하의 전도도를 가지며, 보다 바람직하게는 1.0±0.5mS.cm⁻¹의 전도도를 갖고, 특히 바람직하게는 1.05±0.1mS.cm⁻¹을 갖는다.

편리하게, 음이온 교환 단계 전에, 알부민 용액은 pH 조절 및/또는 물을 사용한 희석화를 거친다. 바람직하게, 알부민 용액의 pH는 아세트산으로 조절된다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 첫번째 및 두번째 양태에 있어서 음이온 교환 크로마토그래피는 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행된다.

적합하게, 포지티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 6.0 내지 8.0의 pH를 가지며, 바람직하게 6.5 내지 7.5의 pH를 가지며, 보다 바람직하게는 6.8 내지 7.2의 pH를 갖는다. 바람직하게, 알부민 용액은 오르토인산염 이온을 사용하여 pH 조절된다.

바람직한 구현예에서, 알부민 농도는 10 내지 100 g.L⁻¹이고, 보다 바람직하게는 25 내지 80 g.L⁻¹이고, 특히 바람직하게는 30 내지 60 g.L⁻¹이다. 바람직하게, 알부민 용액의 전도도는 1.0 내지 2.0 mS.cm⁻¹이고, 바람직하게는 1.2 내지 1.6 mS.cm⁻¹이다.

적합하게, 알부민은 20 내지 90 mM, 바람직하게 30 내지 70 mM, 특히 바람직하게 35 내지 65 mM의 인산염, 예를 들면 인산나트륨을 포함한 완충제를 가지고 음이온 교환기로부터 용출된다. 바람직하게, 알부민은 pH 6.0 내지 8.0, 바람직하게 6.5 내지 7.5의 완충제를 가지고 음이온 교환기로부터 용출된다.

본 발명의 첫번째 및 두번째의 양태의 방법은 다음과 같은 단계 중 하나 이상에 의해 진행되는 것이 특히 바람직하다: 발효; 일차 분리; 센트레이트(centrate) 조건화; 바람직하게 양이온 교환기로서 설포프로필 치환체를 사용한 양이온 교환 크로마토그래피; 바람직하게 음이온 교환기로서 디에틸아미노알킬 치환체를 사용한 음이온 교환 크로마토그래피; 또는 고정화된 알부민-특이 염료, 바람직하게 시바크론 블루(Cibacron Blue)형의 염료를 포함한 친화성 매트릭스를 사용한 친화성 크로마토그래피.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 알부민의 정제 방법은

- (a) 알부민 용액을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 양이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (b) 알부민-함유 양이온 교환 용출물을 수집하는 단계;
- (c) 양이온 교환 용출물을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (d) 알부민-함유 음이온 교환 용출물을 수집하는 단계;
- (e) 음이온 교환 용출물을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 친화성 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (f) 알부민-함유 친화성 크로마토그래피 용출물을 수집하는 단계;
- (g) 친화성 크로마토그래피 용출물을 알부민에 대해서 네가티브 방식으로 진행되고 당접합체(glycoconjugates)(글리코실화 알부민 및/또는 당단백질)에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 친화성 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (h) 알부민-함유 친화성 크로마토그래피 관통유동물(flow through)을 수집하는 단계;
- (i) 친화성 크로마토그래피 관통유동물을 알부민에 대해서 네가티브 방식으로 진행되는 양이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (j) 알부민-함유 양이온 교환 관통유동물을 수집하는 단계;
- (k) 양이온 교환 관통유동물을 네가티브 방식 또는 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (l) 음이온 교환 단계가 네가티브 방식으로 진행되는 알부민-함유 음이온 교환 관통유동물을 수집하는 단계; 또는 음이온 교환 단계가 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 매트릭스로부터 음이온 교환 용출물을 용출시키는 단계를 포함하고,

여기서, 모든 각각의 정제 단계들은 선택적으로 진행되거나 또는 이어서 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정(바람직하게 pH 2.0 또는 pH 4.0 이상의 pH로, 및 바람직하게 pH 10.0 이하의 pH로); 환원제로의 처리; 탈색화 처리(예를 들면, 목탄으로); 가열화(살균화 포함); 냉각화; 또는 조건화 중에서 선택되는 하나 이상의 공정이 진행된다.

따라서, 정제 단계는 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정; 환원제로의 처리; 탈색화 처리; 가열화; 냉각화; 또는 조건화 중에서 선택되는 하나 이상의 공정에 의해 분리되거나 분리되지 않을 수 있다.

임의의 단계가 알부민에 대해 네가티브 방식으로 진행되는 경우, 세척물은 관통유동될 뿐만 아니라 수집될 수 있다.

본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에서, 알부민 정제 방법은

- (a) 알부민 용액을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 양이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (b) 알부민-함유 양이온 교환 용출물을 수집하는 단계;
- (c) 양이온 교환 용출물을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (d) 알부민-함유 음이온 교환 용출물을 수집하는 단계;
- (e) 음이온 교환 용출물을 알부민에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 친화성 크로마토그래피로 처리하는 단계;
- (f) 알부민-함유 친화성 크로마토그래피 용출물을 수집하는 단계;

(g) 친화성 크로마토그래피 용출물을 알부민에 대해서 네가티브 방식이며 당접합체에 대해서 포지티브 방식으로 진행되는 친화성 크로마토그래피로 처리하는 단계;

(h) 알부민-함유 친화성 크로마토그래피 관통유동물을 수집하는 단계;

(i) 친화성 매트릭스 관통유동물을 알부민에 대해서 네가티브 또는 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;

(j) 음이온 교환 단계가 네가티브 방식으로 진행되는 알부민-함유 음이온 교환 관통유동물을 수집하는 단계; 또는 음이온 교환 단계가 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 용출물을 음이온 교환 매트릭스로부터 용출하는 단계;

(k) 음이온 교환 크로마토그래피 단계에 의해 정제된 알부민 용액을 알부민에 대해서 네가티브 방식으로 진행되는 양이온 교환 크로마토그래피로 처리하는 단계;

(l) 알부민-함유 양이온 교환 관통유동물을 수집하는 단계를 포함하고

여기서, 모든 각각의 정제 단계들은 선택적으로 진행되거나 또는 이어서 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정(바람직하게 pH 2.0 또는 pH 4.0 이상의 pH로, 및 바람직하게 pH 10.0 이하의 pH로); 환원제로의 처리; 탈색화 처리(예를 들면, 목탄으로); 가열화(살균화 포함); 냉각화; 또는 조건화 중에서 선택되는 하나 이상의 공정이 진행된다.

따라서, 정제 단계는 완충제 교환; 농축화; 희석화; 투석; 다이아여과; pH-조정; 환원제로의 처리; 탈색화 처리; 가열화; 냉각화; 또는 조건화 중에서 선택되는 하나 이상의 공정에 의해 분리되거나 분리되지 않을 수 있다.

바람직하게, 본 발명의 포지티브 방식 양이온 교환 단계 이전에, 상기 알부민 용액은 상기에서와 같이 조건화된다. 바람직하게, 옥탄산염은 최종 농도를 약 1 내지 10 mM으로 하기 위해 첨가되고, pH는 약 4.0 내지 5.0으로 조절된다.

이롭게, 포지티브 양이온 교환 단계에 보유된 알부민은 용출되기 전에 높은 농도의 염 용액(예를 들면, pH 3.5 내지 4.5에서, 바람직하게는 약 pH 4.0에서, 10 내지 100 mM, 바람직하게는 20 내지 40 mM, 예를 들면 25 내지 30 mM의 아세트산나트륨을 가지고 완충된 0.5 내지 3.0 M NaCl)으로 세척된다.

바람직하게, 알부민은 알부민에 대해 특이 친화성을 갖는 화합물, 특히 예를 들면 옥탄산염과 같은 산 또는 C₆ 또는 C₁₀과 같은 다른 지방산을 함유한 완충제를 사용하여 양이온 교환 단계에서 용출된다.

적합하게, 알부민은 제 1 음이온 교환 단계의 음이온 교환기로부터 높은 농도(예를 들면, 적어도 50mM, 바람직하게는 50 내지 200 mM, 예를 들면, 80 내지 150 mM)의 붕산염, 예를 들면 테트라붕산나트륨 또는 테트라붕산칼륨을 함유한 완충제를 가지고 용출된다.

바람직하게, 포지티브 방식 친화성 크로마토그래피 단계는 고정화된 알부민-특이 염료, 예를 들면 바람직하게 1,4-디아미노부탄과 같은 스페이서 또는 C₁₋₈, 바람직하게 C₁₋₆, 예를 들면 C₁₋₅ 및 가장 바람직하게는 C₄ 길이를 갖는 또 다른 스페이서를 통해 수지상에 고정되고, 바람직하게 α,ω-디아미노 치환체를 갖는 시바크론 블루 타입의 염료를 포함하는 수지를 사용한다. 바람직하게, 상기 매트릭스는 WO 96/37515에 설명된 바와 같이 제조된 "델타 블루 매트릭스"(DBA)이다.

본 발명의 세번째 양태는 알부민 용액 중에 니켈 이온의 농도를 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 알부민 용액을 pH 2.5 내지 7.5, 바람직하게 2.5 내지 6.0으로 하는 단계 및 니켈 이온을 제거하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 상기 알부민 용액은 pH 4.0 내지 7.5로, 바람직하게 pH 4.0 내지 6.0으로, 보다 바람직하게 pH 4.0 내지 5.5로, 특히 바람직하게는 pH 4.0 내지 5.0으로, 가장 바람직하게는 pH 4.0 내지 4.5로 한다.

바람직하게, 본 발명의 세번째 양태의 방법은 pH 2.5 내지 6.0의 완충제 또는 상기 언급된 pH 범위 내의 pH를 갖는 완충제에 대해서 다이아여과하는 단계를 포함한다. 선택적으로 니켈 제거는 상기 pH 범위 내의 pH를 갖는 완충제로 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 이를 수 있다. 겔 투과 크로마토그래피는 세파크릴 S200 HR을 사용하여 수행될 수 있다. 바람직하게, 완충제는 아세트산염 및/또는 말산염 이온을 포함한다. 선택적으로, pH를 조절하고 물을 이용한 다이아여과/겔 투과 크로마토그래피를 행하도록 알부민에 충분한 완충 수용능력이 있다.

상기 니켈 이온은 선택적으로 킬레이트화될 수 있고 알부민으로부터 제거될 수 있다. 이것은 낮은 pH에서, 바람직하게 pH 4.0 내지 6.0, 보다 바람직하게 pH 4.0 내지 4.5에서 세파로스(파마시아사의 킬레이팅 세파로스) 또는 또 다른 중합체(예를 들면, 바이오 래드 레버러터리즈의 켈렉스(Chelex))에 고정된 이미노디아세트산과 같은 킬레이팅제를 사용하여 이를 수 있다.

바람직하게, 본 발명의 세번째 양태의 방법으로부터 나온 산물이 네가티브의 양이온 교환 크로마토그래피로 즉시 처리되는 경우, 본 발명의 세번째 양태는 알부민 용액을 pH 5.0 내지 5.6으로 하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다. 반대로, 본 발명의 세번째 양태의 방법으로부터 나온 산물이 즉각적으로 네가티브의 음이온 교환 크로마토그래피로 처리되지 않는 경우, 본 발명의 세번째 양태는 알부민 용액을 pH 4.3 내지 4.9로 하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 첫번째, 두번째 및 세번째 양태의 바람직한 구현예에서, 초기 알부민 용액은 발효 배지에서 알부민을 암호화하는 뉴클레오티드 서열로 형질전환된 진균을 배양하는 것으로 얻어진 진균 배양 배지로부터 유도되고, 여기서 상기 진균은 알부민을 발현하고, 이것을 배지로 분비한다. 상기 진균은 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종의 사상균이 될 수 있다. 바람직

하게, 진균은 효모이다. 보다 바람직하게, 진균은 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*)속(예를 들면, 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*)) 또는 피치아(*Pichia*)속(예를 들면, 피치아 파스토리스(*Pichiapastoris*))이다.

바람직하게, 본 발명의 첫번째, 두번째 또는 세번째 양태에 따라 정제된 적어도 일부의 알부민은 본 발명의 다섯번째 양태에 따른 세포 또는 본 발명의 여섯번째 양태에 따른 방법에 의해 제조된다.

본 발명의 네번째 양태는 본 발명의 상기 양태들 중 어느 하나의 양태에 따른 방법에 의해 얻어질 수 있는 알부민 용액을 제공한다. 바람직하게, 알부민 용액은 다음과 같은 특성 중 하나 이상을 나타내는 재조합 알부민을 포함한다.

(1) 콘카나발린 A(Concanavalin A)에 결합정도 0.5%(w/w) 이하, 바람직하게는 1.2% 또는 0.15% 이하;

(2) 단백질 몰당 헥소스 0.6몰 이하, 및 바람직하게, 단백질 몰당 헥소스 0.10, 0.075 또는 0.05몰 이하의 글리케이션(glycation) 농도.

본 발명의 방법에 의해 제조된 정제 알부민 용액은 그의 의도된 용도에 따라 추가로 처리될 수 있다. 예를 들면, 한외여과 투석잔류물이 물의 적어도 5 투석잔류물 당량에 대해서 다이아여과되면서, 리터당 알부민이 적어도 약 10g, 바람직하게 적어도 40g 또는 보다 바람직하게 약 80g인 알부민 농도를 갖는 한외여과 투석잔류물을 얻기 위해 한외여과 막을 통해 한외여과될 수 있다.

본 발명의 다섯번째 양태는 재조합 알부민 암호화 서열을 포함하고, 여기서 재조합 알부민 암호화 서열의 3' 말단은 두개 이상의 인-프레임 번역 정지 암호(in-frame translation stop codon)를 포함하고, 바람직하게 세계의 인-프레임 번역 정지 암호를 포함하는 DNA 서열, 플라스미드 또는 세포를 제공한다.

본 발명의 다섯번째 양태의 재조합 세포는 진핵세포 또는 원핵세포일 수 있다. 재조합 세포는 세균(예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 효모(예를 들면, 사카로마이세스속(구체적으로, 사카로마이세스 세레비지에), 클루이베로마이세스속(구체적으로, 클루이베로마이세스 락티스) 또는 피치아속(구체적으로 피치아 파스토리스)), 사상균(예를 들면, 아스페르길루스), 식물 또는 식물 세포, 동물 또는 동물 세포(이것은 형질전환된 것일 수 있음) 또는 곤충 세포일 수 있다.

본 발명의 여섯번째 양태는 재조합 알부민을 제조하는 방법을 제공하는 것이고, 상기 방법은 재조합 알부민 암호화 서열을 발현하는 진균 세포를 배양하는 단계 및 상기 알부민을 얻은 단계를 포함하며, 여기서 세포는 적어도 재조합적으로 발현된 알부민의 만노실화의 감소된 수용능력을 갖게 하는 유전적 변형을 가지며, 배양 배지는 적어도 1,000L이고, pH 6.0 내지 6.8이다.

본 발명에서, 유전적 변형이라는 것은 바람직하게 진균 세포 DNA 서열의 하나 이상의 염기 또는 단편의 임의의 억제, 치환, 결실 또는 추가하는 것을 의미한다. 이와 같은 유전적 변형은 시험관내 실험(직접적으로 단리된 DNA 상에서)에서 또는 그 자리에서, 예를 들면 유전 공학 기술에 의해 또는 진균 세포를 돌연변이 유발제에 노출시키는 것에 의해 얻을 수 있다. 돌연변이 유발제로는 예를 들면 에너지 선(X-선, γ -선, UV 등)과 같은 물리적 제제 또는 알킬화제(EMS, NQO 등), 비스알킬화제, 개재화 제제 등과 같은 DNA의 다른 관능기와 반응할 수 있는 화학 제제를 포함한다. 유전적 변형은 또한 유전적 분열, 예를 들면 문헌[참조: Rothstein *et al*] *Meth. Enzymol.* **194**(1991), 281-301]에 공개된 방법에 따라 얻을 수 있다. 이 방법에 따라서, 유전자의 일부 또는 모두가 상동 재조합을 통해 시험관내 실험의 변형된 버전에 의해 교체된다. 유전적 변형은 또한 트랜스포존, 파지 등과 같은 DNA 서열 상에서 임의의 돌연변이 삽입에 의해 얻을 수 있다.

점돌연변이와 같은 특정 변형은 세포의 메카니즘에 의해 반전되거나 약화될 수 있다고 알려져 있다. 이와 같은 변형은 본 발명의 변형된 진균 세포의 가장 유용한 형태를 제공하지 못하는데, 이는 이들 표현형의 특성이 매우 불안정하기 때문이다. 따라서, 유전적 변형은 안정하게 물려받고/받거나 비-귀속적이고/이거나 비-누출적인 것이 바람직하다. 이와 같은 변형은 결실 또는 유전자 분열에 의해 유전적으로 얻을 수 있다.

"누출 돌연변이" 및 그의 그램메틱컬(grammatical) 변형체에는 야생형 기능의 완전한 불활성 보다는 부분적인 불활성으로부터 얻어진 돌연변이체를 포함한다.

본 발명의 진균 세포에 의해 행해진 유전적 변형은 세포의 DNA 서열의 암호화 영역에 및/또는 유전자의 발현에 영향을 미치는 영역에 위치할 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 변형은 일반적으로 암호화 영역 또는 하나 이상의 유전자 발현을 책임지는 또는 이에 수반되는 영역에 영향을 미치고, 상기 유전자의 발현 생성물은 만노실화에 수반되는 효소이다.

단백질을 만노실화하는 본 발명의 진균 세포의 감소된 수용 능력은 따라서, 구조적 및/또는 형태적 변화에 기인한 불활성 효소의 생성을 초래하거나, 변경된 생물학적 특성을 갖는 효소의 생성을 초래하거나, 상기 효소의 생성을 초래하지 않거나 또는 상기 효소를 낮은 수준으로 생산하게 한다.

진균 세포 만노실화 경로는 단백질 또는 펩티드의 세틸 및/또는 트레오닐 아미노산의 히드록실기에 제 1 만노실 잔기를 부착하는 것을 포함하고, 이어서 이어지는 만노실 잔기의 첨가에 의해 O-결합된 이당류 및 올리고당류로 연장되는 것을 포함한다. 제 1 만노실 잔기는 돌리콜 모노포스페이트 만노스(Dol-P-Man)로부터 소포체 중의 단백질로 전달되고, 추가적인 만노실 잔기는 골지체 중의 GPD-Man으로부터 전달된다.

본 발명의 바람직한 구현예에서, 변형된 진균 세포는 적어도 하나의 유전자 중에 유전적 변형을 담고 있고, 그의 발현 생성물은 세틸 또는 트레오닐 아미노산의 히드록실기에 만노실 잔기의 부착과 관련된다.

또 다른 본 발명의 바람직한 구현예에서, 변형된 진균 세포는 적어도 하나의 유전자 중에 유전적 변형을 담고 있고, 그의 발현 생성물은 Dop-P-Man 전구체로부터 세틸 또는 트레오닐 아미노산의 히드록실기로 만노실 잔기의 전달과 관련된다. 보다 바람직하게, 이들 유전자 중 하나는 PMT 유전자(예를 들면, *PMT1*, *PMT2*, *PMT3*, *PMT4*, *PMT5*, *PMT6* 또는 *PMT7*)이다, 바람직하게, PMT 유전자는 *PMT1*, *PMT5* 또는 *PMT7*이다.

본 명세서에 참조로서 포함되는 WO 94/04687에는 O-만노실화 활성화에 불완전한 사카로마이세스 세레비지에의 제조를 설명하고 있다. O-만노실화 활성화에 불완전한 *S. cerevisiae* 세포는 유전자 분열에 의해, *URA3* 유전자의 *PMT1* ORF의 *HindIII* 억제 사이트로의 삽입에 의해 제조된다. 얻어지는 돌연변이체는 YEPD(약 pH 6.95)상에 또는 최소 배지 + Ade + Leu(약 pH 4.75, 효모 성장으로 사멸) 상에서 성장된다. 놀랍게도, 본 발명자들은 WO 94/04687에 사용된 성장 배지의 pH가 분비된 알부민을 생성하는 PMT 돌연변이체의 대량 배양을 위해 최적이지 아니라는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 pH 6.0 내지 6.8의 성장 배지는 대량 발효동안 숙주 세포 통합(integrity)이라는 측면에서 이롭다는 것을 발견하였다.

세틸 또는 트레오닐 아미노산의 히드록실기에 만노실 잔기의 부착에 관련된 유전자의 변형에 덧붙여, 본 발명의 진균 세포는 이당류 또는 올리고당류를 발생시키는 만노실 잔기의 후속 첨가와 관련된 또는 만노실 잔기 공여기(Dol-P-Man)의 합성과 관련된 유전자에서의 변형을 또한 내포한다.

바람직하게, 진균 세포는 PMT 유전자 또는 PMT 유전자의 발현 또는 산물에 영향을 미치는 유전자 내의 유전적 변형을 갖는다. PMT 유전자의 발현에 영향을 미치는 유전자는 예를 들면 mRNA 전사 수준 또는 PMT 산물 수준에 영향을 미친다.

본 발명의 여섯번째 양태의 진균 세포는 사상균 및 효모로부터 선택될 수 있다. 바람직하게, 상기 세포는 효모이고, 예를 들면 사카로마이세스 속(구체적으로 사카로마이세스 세레비지에), 클루이베로마이세스 속(구체적으로, 클루이베로마이세스 락티스) 또는 피치아 속(구체적으로 피치아 파스토리스)의 효모이다.

바람직하게, 재조합 알부민 암호화 서열을 발현하는 진균 세포는 적어도 5,000L, 보다 바람직하게 적어도 7,500L의 배양 배지에서 배양된다.

바람직하게, 재조합 알부민 암호화 서열을 발현하는 진균 세포는 pH 6.2 내지 6.7의 범위 내에서, 보다 바람직하게는 pH 6.3 내지 6.5의 범위 내에서 유지되는 배양 배지 중에 배양된다. 바람직하게, 배양 배지의 pH는 pH 6.3 내지 pH 6.5, 바람직하게는 pH 6.35 내지 6.45, 보다 바람직하게는 pH 6.4로 설정된 pH 조절기를 사용하여 유지된다. 바람직하게, 상기 pH 조절기는 상기 언급된 pH 범위 중 하나 내의 임의의 pH 값의 0.20 또는 0.10 pH 유닛 내에서 또는 pH 6.4의 0.20 또는 0.10 pH 유닛 내에서 조절된다.

선택적인 구현예에서, 진균 세포는 pH 5.30 내지 5.90, pH 5.50 내지 5.90, pH 5.40 내지 5.90, 또는 pH 5.40 내지 5.60의 범위내에서 유지되는 배양 배지 중에서 배양된다. 바람직하게, 낮은 조절 설정점은 pH 5.40 내지 5.60이고, 바람직하게 pH 5.45 내지 5.55이고, 보다 바람직하게 낮은 조절 설정점은 pH 5.50이다.

본 발명은 고 정제 알부민의 제조방법을 제공한다. 상기 알부민은 극단적으로 낮은 수준의 착색제에 의해 특징지어진다. 본 명세서에서 사용된 "착색제"라는 용어는 알부민을 착색하는 임의의 화합물을 의미한다. 예를 들면, 안료는 효모와 같은 유기체로부터 나온 착색제이고 이것은 재조합 알부민을 제조하기 위해 사용되며, 반면에 염료는 알부민을 정제하기 위한 크로마토그래피 단계에서 나온 착색제이다.

알부민은 또한 알루미늄, 락트산염, 시트르산염, 금속, 예를 들면 이뮤노글로블린, 프리-칼리크레인 활성화제, 트랜스페린, α_1 -산 당단백질, 헤모글로빈 및 혈액 응고 인자와 같은 비-알부민 사람 단백질, 원핵성 단백질, 알부민의 단편, 알부민 응집체 또는 중합체, 또는 엔도톡신, 빌리루빈, 헴, 효모 단백질, 동물 단백질 및 바이러스가 매우 낮은 수준으로 또는 실질적으로 없는 것을 특징으로 한다. 실질적으로 없다는 것은 검출될 수 있는 수준 이하라는 것을 의미한다.

본 발명의 알부민은 적어도 99.5% 단위체 및 이합체, 바람직하게는 필수적으로 100% 단위체 및 이합체일 수 있다. 최대 0.5%, 바람직하게 0.2% 삼합체가 큰 형태의 알부민이 일반적으로 존재하지 않는다면 허용될 수 있다. 추가로 다음과 같은 특징 중 하나 이상에 의해 특징지어진다. 알부민 1g에 기초해서 100ng 이하의 니켈 이온 농도; 아마도리 산물 분석법(Amadori product assay)에서 측정된 바와 같이 단백질 몰당 헥소스 0.6몰 이하, 바람직하게 0.10, 0.075 또는 0.05 몰 이하의 글리케이션 농도; 완전한, 예를 들면 균질의 C-말단; 0.5%(w/w) 이하, 바람직하게 0.2% 또는 0.15% 이하의 conA-결합 알부민의 함량; 단백질 몰당 적어도 0.85몰의 SH의 유리 티올 함량; 및 실질적으로 C18 또는 C20 지방산 없음. 본 발명의 방법에 의해 정제된 알부민 제조물 중 단백질의 적어도 99중량%, 바람직하게 적어도 99.9중량%는 알부민이다. 이와 같은 고 순도 알부민은 불리한 부작용을 거의 일으키지 않는다.

본 발명에 따라 정제된 rHA는 일반적으로 혈청-유도된 오염물이 없을 것이며, 이는 출발물질에 존재하지 않기 때문이다.

본 발명에 따라서, 고 순도 알부민은 불순한 알부민 용액으로부터 얻는다. 상기 방법은 다음과 같은 단계 중 하나 이상을 포함한다: 사람 알부민의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열로 형질전환된 미생물을 발효 배지 중에 배양하는 단계; 바람직하게 미생물을 배양 배지로부터 분리하는 단계; 필요한 경우 추가의 정제공정을 위해 배지를 조건화하는 단계; 세개의 연속적인 크로마토그래피 단계를 통해 조건화된 배지를 통과시키는 단계; 산물을 한외여과/다이아여과하는 단계; 한외여과된 산물을 추가의 크로마토그래피 단계를 거쳐 통과시키는 단계; 정제 전에 다시 두개의 추가 크로마토그래피 단계를 통해 한외여과/다이아여과하는 단계; 및 최종적인 한외여과/다이아여과하는 단계.

선택적으로, 발효 배지 대신, 불순한 알부민 용액은 지난 50년동안 개발된 수많은 추출 및 정제 기술 중 임의의 것에 의해 혈청으로부터 얻은 용액이 될 수 있다. 예를 들면, 이들은 문헌[참조: Stoltz et al(1991) *Pharmaceut. Tech. Int.* June 1991, 60-65 및 More & Harvey (1991) in "Blood separation and Plasma Fractionation" Ed. Harris, Wiley-Liss, 261-306.]에 기재되어 있다.

또 다른 방법에서, 알부민은 형질전환된 동물, 예를 들면, 염소, 양 또는 소로부터, 구체적으로 동물의 우유 또는 혈액으로부터 또는 형질전환 닭의 경우, 계란 흰자로부터 얻을 수 있다.

여전히 또 다른 방법에서, 알부민은 형질전환 식물, 예를 들면 담배, 감자 또는 곡물(옥수수)로부터 얻을 수 있다.

알부민이 비-원형질원으로부터 정제되는 경우에서, 종래 기술의 정제 방법은 비교적 높은 농도의 니켈 이온을 야기한다. 알부민은 분자의 N-말단에서 구리, 니켈 및 아연 이온에 대해 높은 친화성 결합 사이트를 가지고 있는 것은 알려져 있다. 결과적으로, 알부민 분자는 배양 및/또는 정제를 위해 사용된 배지로부터 니켈 이온을 효과적으로 농축한다. 본 발명에 따라 정제된 알부민은 현저하게 낮은 농도의 니켈 이온을 갖는다.

본 발명의 임의의 공정 전에 또는 이어서, 알부민 용액은 완충제 교환, 농축화, 희석화, 가열화(살균화 포함), 냉각화가 진행될 수 있고, 또는 용액을 조건화하거나 또는 pH를 조절하기 위해 알부민 용액에 염 등이 첨가될 수 있다. 선택적으로, 알부민은 환원제로 처리될 수 있으며, 또는 탈색화 단계가 진행될 수도 있다.

최종적인 산물은 부가된 안정성이 제공되도록 제형화될 수 있고, 그의 의도된 용도에 따라 제형화될 수 있고, 예를 들면 이것은 비경국적 투여를 위해, 바람직하게는 인간에게 비경국적 투여를 위해 제형화될 수 있다. 적합하게, 알부민에는 살균처리될 수 있다.

바람직하게, 본 발명의 고 순도 알부민 산물은 적어도 100g, 보다 바람직하게 1kg 또는 10kg의 알부민을 포함하고, 이것은 다수의 약병들로 분리되어 질 수 있다.

본 발명의 알부민은 화상, 쇼크 또는 혈액 손실의 치료에서의 치료적 용도 이외에 다양한 역할을 수행할 수 있다. 예를 들면, 이것은 최종 생성물의 부형제(예를 들면, 액상 제형, 동결건조된 제형, 또는 흡입을 위한 제형)로서, 전체 세포 배양, 바이러스 생성, 유전자 치료, 시험관내 실험의 발효 배지 동안 다른 단백질의 안정화를 위해 및 캐눌라(cannulae), 카테테르 및 혈관 보철물(vascular prostheses)과 같은 의약품 장치를 코팅하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 각각의 양태는 본 발명의 하나 이상의 다른 양태와 조합될 수 있다고 이해되어야 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 방법이 혈청과 같은 다수의 원료로부터 얻은 불순한 알부민 용액으로부터 고 정제 알부민을 얻기 위해 사용될 수 있기 때문에, 재조합 사람 알부민(rHA)을 정제하는데 특히 적용될 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 알부민은 임의의 포유류 알부민, 예를 들면 래트, 소 또는 쥐의 알부민일 수 있지만, 바람직하게 사람 알부민이다.

알부민 암호화하는 DNA는 알부민을 생성하기 위해 적합한 숙주에서 발현될 수 있다. 따라서, DNA는 발현 벡터를 구성하기 위해 본 명세서에 포함된 기술의 측면에서 적절하게 변형된 공지된 기술에 따라서 사용될 수 있고, 이것은 이어서 알부민의 발현과 생성을 위한 적절한 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용된다.

알부민을 암호화하는 DNA는 적절한 숙주로의 도입을 위해 폭넓게 다양한 다른 DNA 서열과 합쳐질 수 있다. 반생종 DNA(companion DNA)는 숙주의 성질, DNA를 숙주로 도입하는 방법 및 에피솜의 유지 또는 통합이 요구되는지의 여부에 의존할 것이다.

일반적으로, 상기 DNA는 발현 벡터, 예를 들면 플라스미드로 적절한 방향으로 삽입되고, 발현을 위한 해독 프레임이 수정된다. 필요하다면, 상기 DNA는 비록 제어가 일반적으로 발현 벡터에서 유용할지라도 요구된 숙주에 의해 인식된 적절한 전사적 및 번역적 조절 제어 뉴클레오티드 서열에 연결될 것이다. 전체적인 번역 해독을 최소화하고, 이어서 연장되고 비-천연적인 융합 단백질의 생성을 회피하기 위해 번역 정지 암호, 예를 들면 UAA, UAG 또는 UGA를 암호화하는 DNA 서열 하나 이상을 병합하는 것이 바람직하다. 번역 정지 암호 UAA를 암호화하는 DNA 서열이 바람직하다. 그리고, 상기 벡터는 표준-기술을 통해 숙주로 도입되고, 이어서 형질전환된 숙주 세포를 위해 선택된다. 형질전환된 숙주 세포는 이어서 충분한 시간과 당업자에게 잘 알려지고 본 명세서에서 개시된 기술 측면에서 알부민의 발현을 허용하는 적절한 조건 하에서 배양되고, 이어서 이들은 회수될 수 있다.

세균(예를 들면 이.콜라이 및 바실러스 서브틸리스), 효모(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지에, 피치아 파스토리스 및 클루이베로마이세스 락티스), 사상균(예를 들면, 아스페르길루스), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함한 많은 발현 시스템은 알려져 있다. 바람직한 미생물은 효모 사카로마이세스 세레비지에, 클루이베로마이세스 락티스 및 피치아 파스토리스이다. 예를 들어 유전자 암호화 서열의 분열에 의한 단백질의 O-글리코실화에 포함된 하나 이상의 단백질 만노실트랜스퍼라제 중에 부족한 효모를 사용하는 것이 특히 바람직하다.

알부민 단백질 서열은 N-결합된 글리코실화를 위한 임의의 사이트를 포함하지 않고, O-결합된 글리코실화에 의해 천연적으로 변형된다는 기록도 없다. 그러나, 본 발명자들은 다수의 효모 중에서 생성된 rHA가 일반적으로 만노스를 포함하는 O-결합된 글리코실화에 의해 변형될 수 있다는 것을 발견하였다. 상기 만노실화된 알부민은 렉틴 콘카나발린 A에 결합될 수 있다. 효모에 의해 생성된 만노실화된 알부민의 양은 PMT 유전자(WO 94/04687)의 하나 이상이 결손된 효모 균주를 사용하여 감소될 수 있다.

이것을 이루는 가장 편리한 방법은 Pmt 단백질 중 감소된 수준의 하나가 제조되도록 그의 게놈 중에 부족한 효모를 창출하는 것이다. 예를 들면, Pmt 단백질이 거의 또는 전혀 제조되지 않도록 암호화 서열 또는 조절 영역(또는 PMT 유전자 중 하나의 발현을 조절하는 또 다른 유전자) 중에서 결실, 삽입 또는 전위될 수 있다. 선택적으로, 상기 효모는 항-Pmt 제제, 예를 들면 항-Pmt 항체와 같은 것을 제조하기 위해 형질전환될 수 있다.

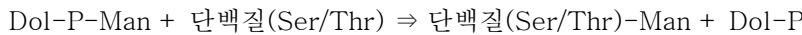
본 명세서에 참조로서 포함되는 문헌[Botstein and Shortle, "Strategies and Applications of *In Vitro* Mutagenesis", Science, 229: 193-210(1985)]에 기재된 바와 같이, 감소된 수준의 Pmt 단백질이 제조되도록 PMT 유전자 중 하나를 변형하기 위해서, 위치 지정 돌연변이 또는 다른 공지된 기술이 치환, 삽입, 결실 및 전위와 같은 단일 또는 다중 돌연변이를 창출하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 돌연변이는 사슬 종결 돌연변이(명확하게 3' 말단 근처에 도입된 정지 암호는 유익한 유전자 산물에 불충분한 효과를 갖는다; 당업자는 용이하게 암호화 서열의 5' 쓰리 쿼터(3/4)에서 돌연변이를 만들 수 있음), 해독 프레임을 변경하는 점 돌연변이, 암호화 서열의 소량 내지 대량 결실, 유전자 발현에 영향을 미치는 프로모터 또는 종결자 중의 돌연변이 및 mRNA를 불안정화하는 돌연변이를 포함한다. 특히 돌연변이는 유전자 전위[참조문헌: Winston, F. et al(1983) *Methods Enzymol.* 101, 211-228]와 같은 공지된 유전자 분열 기술의 확장에 의해 도입될 수 있다.

일반적으로, 하나는 유전자 서열을 분열하기 위해 선택할 수 있는 마커를 사용하지만, 특히 표현형으로 분열이 검출될 수 있다면, 이것이 그 경우가 될 필요는 없다. 많은 경우에서, 간접 서열의 삽입은 정지 암호가 Pmt 서열을 갖는 프레임에 존재하도록 될 것이고, 삽입된 암호화 서열은 번역되지 않는다. 선택적으로 삽입된 서열은 Pmt에 대한 다른 해독 프레임 중에 있을 수 있다.

PMT 로커스의 하나로부터 단백질의 감소된 생성을 초래하기 위해 및/또는 감소된 수준의 활성을 갖는 PMT 로커스의 하나로부터 단백질의 생성을 초래하기 위해 유전자는 결실된 또는 전환된 하나 이상의 부위(선택적으로 조절 영역 포함, 최대 전체 유전자)를 갖거나, 또는 이것은 삽입된 부위를 가질 수 있다.

사카로마이세스 세레비지에의 PMT 유전자는 특이성이 다양한 일곱개(PMT1-PMT7) 단백질 O-만노실트랜스퍼라제의 균을 암호화한다. 이들 단백질은 또한 돌리칠 포스페이트-D-만노스 : 단백질 트랜스퍼라제, 돌리칠-포스페이트-D-만노스 : 단백질 O-D-만노실트랜스퍼라제 또는 포스포만노스 트랜스퍼라제[참조문헌: Gentzsch and Tanner, EMBO 15, 5752-5757, 1996, 본원에 참조로 인용됨]로서 알려져 있다. 통합 막 효소의 균은 하기 반응식에 의해 설명되는 바와 같이 폴리펩티드 사슬 내의 세린 또는 트레오닌의 히드록실기 상에 돌리칠 포스페이트 만노스의 형태로 만노스의 전달을 촉진한다.

반응식 1
Mg²⁺



유용한 증거로는 돌리칠 포스페이트 만노스의 합성과 이어지는 만노스의 단백질로의 전달이 소포체에서 일어난다는 것이다.

이들 균의 효소는 다른 기질(단백질) 특이성[참조문헌: Gentzsch and Tanner(1997) *Glycobiology* 7, 481-486]을 갖는다는 것이 명확하다. 일곱개의 테스트 단백질 중 다섯개는 pmt1 또는 pmt2 돌연변이 사카로마이세스 세레비지에 균주에서 글리코실화가 진행됨(under-glycosylation)에 의해 나타난 바와 같이, Pmt1p와 Pmt2p에 대한 기질이고, PMT1 및 PMT2 유전자 각각의 산물이다. 또 다른 두개의 테스트 단백질은 PMT1 또는 PMT2 돌연변이에 의해 명백히 영향을 미치지 않지만, pmt4 돌연변이 균주에서 글리코실화가 진행된다.

92kD Pmt1p 단백질 O-만노실트랜스퍼라제 효소는 용해된 사카로마이세스 세레비지에 막으로부터 균질하게 정제된다 [참조문헌: Strahl-Bolsinger and Tanner (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**, 185-190]. Pmt1p(PMT1)에 대해 암호화하는 유전자는 클론화되거나 서열화된다. 상기 유전자는 크로모솜 IV에 위치되고 817 아미노산의 일차 서열을 갖는 단일 폴리펩티드를 암호화한다 [참조문헌: Strahl-Bolsinger et al(1993) *P.N.A.S. USA* 90, 8164-8168]. PMT1(및 다른 PMT 유전자)의 서열 정보는 사카로마이세스 세레비지에에서 관련된 만노실트랜스퍼라제 암호화 유전자의 동정을 위해 사용될 수 있다.

도 10 및 11에 나타난 서열은 영역 사카로마이세스 세레비지에 PMT1을 암호화하는 단백질과 상동이고, 도 12 내지 15에 나타난 서열은 영역 사카로마이세스 세레비지에 PMT7을 암호화하는 단백질과 상동이고, 도 16 내지 17에 나타난 서열은 사카로마이세스 세레비지에 PMT5을 암호화하는 단백질과 상동이다. 당업자에게 이들 서열의 임의의 하나가 사카로마이세스 세레비지에 만노실트랜스퍼라제 유전자를 동정(또는 분열)하는데 사용될 수 있다는 것은 명확할 것이다. 도 10 내지 17에 나타난 서열의 단편이 도 10 내지 17에 나타난 서열과 그의 단편과 상동인 서열과 같이 유사하게 사용될 수 있다고 이해되어질 수 있다. 상동의 서열을 발생하기 위한 기술은 이 분야에 잘 알려져 있다.

상동의 서열의 의해 도 10 내지 17 중 어느 하나에 나타난 서열과 또는 도 10 내지 17 중 어느 하나에 나타난 서열의 단편과 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 상동성을 갖는 서열을 포함한다는 것이 명확해질 것이다.

퍼센트 상동성은 예를 들면 문헌[참조: Devereux et al. (*Nucl. Acids res.* 12 : 387, 1984)]에 설명되고, 더 유니버시티 오브 위스콘신 제네틱스 컴퓨터 그룹(the University of Wisconsin Genetics Computer Group; UWGCG)으로부터 구매할 수 있는 버전 6.0의 GAP 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 정보를 비교하여 결정될 수 있다. 상기 GAP 프로그램은 스

미스 및 워터맨[참조문헌: Adv. Appl. Math 2. 482. 1981]에 의해 교정된 니들맨 및 운쉬[참조문헌: J. Mol. Biol. 48:443, 1970]의 정렬 방법을 사용한다. GAP 프로그램에 대한 바람직한 불이행 변수는 (1) 뉴클레오티드에 대한 단항 비교 매트릭스(아이덴티티에 대한 1의 값 및 비-아이덴티티에 대한 0의 값을 포함) 및 문헌[참조: Schwarts and Dayhoff, eds, Atlas of Protein Sequence and sturcture, National Biomedical Research Foundation, pp 353-358, 1979]에 기재된 바와 같이 문헌[참조: Bribskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986]의 정렬된 비교 매트릭스; (2) 각각의 겹에 대한 3.0의 페널티 및 각각의 겹에서 각각의 심볼에 대한 추가적인 0.10 페널티; 및 (3) 말단 겹에 대한 페널티 없음을 포함한다.

사카로마이세스 세레비지에 이외의 효모가 사용되는 경우, 사카로마이세스 세레비지에의 PMT 유전자와 동등한 하나 이상의 유전자의 분열은 또한 예를 들면 피치아 파스토리스 또는 클루이베로마이세스 락티스에서 또한 이롭게 된다. 사카로마이세스 세레비지에로부터 단리된 PMT1(또는 다른 PMT 유전자)의 서열은 다른 진균 중에서 유사한 효소적 활성을 암호화하는 유전자의 동정 또는 분열에 사용될 수 있다. 클루이베로마이세스 락티스의 PMT1 동족체의 클로닝은 WO 94/04687에 기재되어 있다.

사카로마이세스 세레비지에 이외의 효모가 사용되는 경우, 도 10 내지 17에 나타낸 서열은 사카로마이세스 세레비지에 PMT 유전자와 동등한 유전자를 동정(또는 분열)하는데 또한 사용될 수 있다. 당업자들에게 도 10 내지 17에 나타낸 서열의 단편이 도 10 내지 17에 나타낸 서열 및 그의 단편에 나타낸 서열과 상동성인 서열과 마찬가지로 유사하게 사용될 수 있다는 것이 명확할 것이다.

유전자 분열을 수행하기 위한 방법은 문헌에 기재되어 있고, 예를 들면 보엠 등의 문헌[참조: Boehm, T., Pirie-Shepherd, S., Trinh, L., Shiloach, J. and Folkman, J. 1999 Yeast 15 563-572]에 표적 유전자에 특이성인 피치아 파스토리스 DNA에 의해 측면에 위치된 마커로서 사카로마이세스 세레비지에 *SUC2* 유전자의 용도가 기재되어 있다. 피치아 파스토리스 분열의 실예에서, *SUC2* DNA 서열은 도 10 내지 17에 나타낸 임의의 DNA 서열 내의 위치에 삽입될 수 있다.

상기 효모는 WO 95/33833 및 WO 95/23857에 각각 교시되어 있는 바와 같이 HSP150 및/또는 YAP3의 결실을 갖는 것이 바람직할 것이다.

바람직한 구현예에서, 효모는 사카로마이세스 세레비지에 2 μ m 플라스미드에 기초된 발현 플라스미드로 형질전환된다. 효모를 형질전환함과 동시에, 플라스미드는 박테리아 복제 및 절개된 서열 선택을 포함하고, 이어서 EP 286 424에 교시된 바에 따른 내부적인 재조합 결과에 의한 형질전환을 포함한다. 상기 플라스미드는 EP 431 880에 교시된 바와 같은 효모 프로모터(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지에 *PRBI* 프로모터); 예를 들면, 대부분의 천연 HSA 분비 리더에 WO 90/01063에 교시된 일부의 사카로마이세스 세레비지에 α -교배 인자 분비 리더를 합친 것을 포함하는 분비 리더 암호화하는 서열; 사람 유전자에 대응하는 cDNA를 단리하기 위한 공지된 방법에 의해 얻을 수 있고, 예를 들면, EP 73 646 및 EP 286 424에 또한 기재된 HSA 암호화 서열; 및 전사 종결자, 바람직하게 EP 60 057에 교시된 사카로마이세스 *ADHI*로부터 종결자를 포함하는 발현 카세트를 또한 포함한다. 바람직하게 벡터는 적어도 두개의 번역 정지 암호를 병합한다.

상기에서 설명된 플라스미드의 다양한 요소의 선택은 비록 상기 요소가 생성물의 향상된 수율에 기여할 지라도 얻어진 알부민 생성물의 순도에 직접적으로 관련되지 않는다. 발효 및 정제 방법의 바람직한 구현예는 실시예 1에서 설명된다.

실시예 1

알부민-생성 미생물의 구성을 위한 클로닝 전략은 알부민 암호화 서열의 3' 말단과 그의 ADHI 전사 종결 서열과의 접합이 ADH 암호화 서열이 제거되도록 및 두개의 연속적인 인-프레임 번역 정지 암호가 존재하고, 이어서 세번째 정지 암호 다운스트림이 다음과 같이 존재하도록 변경될 수 있다는 것만 제외하고 EP 431 880에 기재된 바와 같다.

.... L G L 정지 정지 A 정지

.... TTA GGC TTA TAA TAA GCT TAA

이것은 EP 431 880에 기재된 플라스미드 pAYE309로부터의 ADHI 종결자를 하기의 서열을 갖는 두개의 일본쇄 올리고 뉴클레오티드, JMADH1 및 JMADH2를 사용하는 PCR 돌연변이 유발에 의한 변형에 의해 이룰 수 있다.

JMADH1

HindIII

5' - GCATAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAG - 3'

JMADH2

NotI BamHI

3'-TGGACAACATTAGCAAGAAGGTGTGCCTAGCGCCGCGCCTAGGTACG-5'

상기 PCR 조건은 94°C에서 60초, 37°C에서 120초, 및 72°C에서 180초로 25 사이클이다. 0.48kb PCR 산물을 HindIII 및 BamHI 모두로 분해하였고, WO 97/24445에 설명된 바와 같이 HindIII 및 BamHI로 유사하게 분해되어진 플라스미드 pBST+ 로 연결하여 플라스미드 pAYE440을 생성하였다(도 2). 상기 ADHI 종결자는 두개의 일본쇄 올리고뉴클레오티드, AT19R 및 하기 시퀀스를 갖는 보편적인 -40 프라이머를 사용하여 PCR 돌연변이 유발에 의해 추가로 변형되었다.

AT19R

HindIII

5' - AGTCCAAGCTTAATTCTTATGATTTATGAT - 3'

-40

3' - CAGCACTGACCCTTTTG - 5'

PCR 조건은 94°C에서 30초, 50°C에서 40초 및 72°C에서 50초로 25 사이클, 그런 다음 72°C에서 10분으로 1 사이클이고, 주형으로서 pAYE440(도 2) 중의 ADHI 종결자를 사용한다. 사용된 기계는 퍼킨 엘머사의 GeneAmp PCR system 9600이다. 적당한 크기인 약 0.33kb의 산물을 수득하고 HindIII와 BamHI로 분해한다. EP 431 880에 기재된 플라스미드 pAYE309를 NotI과 HindIII로 분해하고, PRBI 프로모터 단편과 숙성된 HSA의 직접 분비에 사용되는 HSA/MF α -1 리더 서열(WO 90/01063)의 일부를 포함하는 0.84kb DNA 단편을 WO 97/24445에 기재된 바와 같이 NotI과 HindIII로 분해된 pBST+ 로 연결하여 플라스미드 pAYE438(도 3)을 생성한다. 수령 플라스미드 pAYE438을 HindIII와 BamHI로 분해하고 변형된 ADHI 종결자를 이 벡터에 성공적으로 클로닝하여 플라스미드 pDB2241(도 4)을 생성한다. 이 플라스미드는 pBST+ (WO 97/24445) 골격, PRB1 프로모터 및 변형된 ADHI 종결자를 포함한다.

HSA 암호화 영역의 말단에서 2개의 번역 정지 암호의 도입을 촉진하고 필요한 HindIII 부위를 생성하기 위해서 HSA 암호화 영역의 3' 말단을 변형시킨다.

이본쇄 올리고뉴클레오티드 연결자인 AT21/AT22를 AflIII/HindIII로 절단된 pDB2241에 연결하여 5' 말단의 AflIII과 충전자 영역에 이어 Bsu361 및 HSA 암호화 DNA의 HindIII 서열을 포함하지만 역분의 TAA 번역 정지 암호를 첨가하지는 않는다. 삽입된 연결자를 갖는 클론을 DNA 서열화에 의해 검토하여 적당한 플라스미드인 pDB2242(도 5)가 고안된다.

연결자 AT21/22

AT21

AflIII

Bsu361

HindIII

TTA AGA GTC CAA GCC TTA GGC TTA TAA TA
CT CAG GTT CGG AAT CCG AAT ATT ATTCGA

A L G L 정지 정지

최종 rHA 발현 카세트를 생성하기 위해서 pAYE309(도 1)의 AflIII/Bsu361 단편을 AflIII/Bsu361로 분해된 pDB2242에 연결하여 플라스미드 pDB2243(도 6)을 제조한다. 마지막으로 rHA 발현 비통합 벡터를 pDB2243으로부터의 NotI 발현 카세트를 NotI으로 절단된 pSAC35에 연결함으로써 제조하여[참고문헌: Sleep et al., 1991, Bio/Technology 9, 183-187 및 EP 431 880] rHA 전사의 방향이 LEU2 유전자와 동일한 배향인 플라스미드 pDB2244(도 7)를 생성한다.

따라서, 플라스미드 pDB2244가 비통합 벡터 pSAC3으로부터 유도되고[참고문헌: Chinery and Hinchcliffe (1989) Current Genetics 16, 21-25], 2 μ m 플라스미드 전부, 숙주 leu2 돌연변이에 상보적인 LEU2 유전자, PRB1 프로모터가 HSA 서열의 발현을 유도하는 발현 카세트 및 세균 플라스미드 pUC9를 포함한다. PLC9는 어떠한 세균 DNA도 rHA 생성에 사용되는 유기체에 존재하지 않도록 사카로마이스스 세레비지에 2 μ m FLP 재조합효소 시스템에 의해 플라스미드로부터 절제된다[참고문헌: Chinery and Hinchcliffe, 상기 인용문헌].

발현 벡터는 발현을 조절하기 위한 사카로마이세스 세레비지에 PRB1 프로모터 및 ADH1 전사 종결자와 숙성된 HSA의 분비를 조절하기 위한 HSA/MFα-1 리더 서열(WO 90/01063)을 사용한다.

플라스미드 pDB2244를 문헌[참조: Hinnen et al., (1978) P.N.A.S. 75, 1929]에 기재된 방법에 의해서 leu2, yap3, hsp150, pmt1 [cir^o]인 사카로마이세스 세레비지에 균주에 도입한다. pmt1 돌연변이는 WO 94/04687의 방법에 의해 달성될 수 있다. 형질전환체는 류신이 부족한 완충된 최소 배지(아미노산과 황산암모늄이 없는 0.15% (w/v) 효모 질소 기재(디프코사), 0.5% (w/v) 황산암모늄, 0.1M 시트르산/Na₂HPO₄·12H₂O pH6.5, 2% (w/v) 수크로스) 상에서 선택된다. 형질전환체를 복합체(YEP, 1% (w/v) 효모 추출액, 2% (w/v) 박토펙톤 및 2% (w/v) 수크로스) 또는 완충된 최소 배지 액체 배지 10ml를 함유하는 50ml 플라스크 중에서 30°C에서 200rpm으로 72시간 동안 성장시킬 때, rHA가 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및/또는 로켓 겔 면역 전기영동에 의해서 세포 유리 배양물 상등액에서 검출될 수 있다.

완충된 최소 배지 내의 주요한 원 세포 배양물을 사용하여 20% (w/v) 트레할로스의 존재하에 분취량의 배양물을 동결시킴으로써 진탕 플라스크 배양물의 제조에 적합한 공정 효모의 러닝 원료(작동 세포 뱅크)를 제조한다.

발효는 하기의 차이점을 제외하고는 본원에 참조로 인용되는 WO 96/37515 및 US 5 728 553에 기재된 바와 본질적으로 동일하다:

시이드(seed) 발효

rHA 생성을 위한 배지를 시이드 발효기 용기에 첨가한 후, 작동 온도를 30°C 로 설정하고, 최소 교반기 속도를 균질이 이루어지도록 설정하여 산소 또는 탄소와 같은 영양물의 농도구배를 피한다. pH 6.40으로 설정되고 6.40±0.10으로 조절되는 pH 조절기를 사용하여 초기 pH를 암모니아 용액(비중 0.901)으로 조절한다.

또한, 하한 조절 설정점을 pH 5.50으로 하여 pH를 5.50 내지 5.90의 범위에서 유지한다. 초기 pH를 암모니아(예를 들어 수성 암모니아 비중 0.880)로 조절할 수 있다. 이러한 하한 발효 pH는 rHA의 증진된 질량 분석 프로필을 발생시킨다.

pH의 하강이 온라인 기구에 의해 검출가능한 생장의 최초 징후이기 때문에 상기 범위의 상한에 가까운 초기 pH가 초기 대사의 관찰을 촉진시키기에 바람직하다.

특히 하나 이상의 PMT 유전자에 결손이 있는 균주에 있어서, 발효가 보통 요구되는 것보다 더 높은 pH에서 수행되는 것이 유리하다고 알려졌다. 따라서, pH를 약 5.5에서 조절하는 것보다 설정점을 pH 6.20 내지 pH 6.70, 바람직하게는 pH 6.3 내지 6.5로 조절하는 것이 유리하다. 이러한 더 높은 pH에서, 센트레이트의 질은 감소된 세포 용혈로 인하여 현저히 개선된다. 세포 용혈은 상등액으로부터 전체 세포 모두를 제거하기에만 충분한 발효물의 원심분리 단계에 이어 현탁시에 잔존하는 세포 파편을 유발시킨다. 이것이 표 1에 명시되어 있고, pH 5.5에 비하여 pH 6.3 내지 6.5의 범위에서 효모 배양시 배양물 상등액의 습윤 중량 함량에서의 현저한 감소가 예시된다.

표 1.

발효 pH	상등액의 습윤 중량 함량 (g.L ⁻¹)
5.5	9.9 (2.4, 6)
6.3-6.5	3.4 (1.0, 13)

센트레이트 질과 시이드 발효기 용기내의 발효 pH 간의 관계를 나타냄.
괄호안의 수치는 표준편차와 샘플의 수임.

2M H₂SO₄가 또한 pH 교정제로서 사용된다. 수크로스 20 g.L⁻¹, MW10 배치 비타민 및 Breox FMT30 소포제 0.04g.L⁻¹를 용기에 첨가한다.

평균 여과된 공기를 0.5 v/v/m(즉, 분당 매질리터당 비압축 공기 0.5 리터)으로 용기에 도입하고, 배지를 무균 진탕 플라스크 배양물로부터 리터당 10mg 이상의 세포 건조 중량을 접종한 다음, 감독 컴퓨터 조절 시스템을 개시한다. 예상된 배치 시기는 12 mg.L⁻¹의 접종 농도로부터 62 ±10 시간이다. MW10 공급물은 배치 시기가 끝나기 전에 연결되어야 한다(용적은 배치 용적과 같음).

발효 조절 알고리즘의 특성은 하기의 내용을 포함한다: 배치 시기의 종료는 30분에 15%를 초과하는 용존 산소 신장력(DOT) 증가에 의해서 시그널링된다; 공급물은 배치 매질 리터당 0.05 ml로 개시된다; 기질 공급율은 공식 SF = SF₀e^{μk}(SF는 기질 공급율(mL.분⁻¹)이고, SF₀은 초기 기질 공급율(mL.분⁻¹)이며, μ는 비생장율(예를 들어 0.06 시간⁻¹)이며, k는 모든 조건이 충족되는 경우 0에서 시작하여 매 1분에 한번 0.0167씩 증가하는 상대 변수임)에 따라 결정된다; 기질 공급율(k의 조작에 의해서)은 DOT<15% 및/또는 호흡상(RQ)≥1.2에 대하여 감소된다.

공급은 pH 6.2 이하인 경우 또는 온도가 29.0°C 이하이거나 31.0°C 이상인 경우에 중단된다. 공급은 또한 조절 알고리즘을 통하여 자동적으로 수행될 수 있다. 2시간에 걸쳐 평균 RQ가 1.13 이상인 경우 또는 에탄올이나 아세테이트 축적의 증거가 있는 경우 SF는 감소된다.

DOT가 20% 이상인 공기 포화를 유지하기 위해서 교반이 증가된다. 일단 공급이 시작되면, Breox FMT30의 농도는 0.3g.L⁻¹(최종 용적에서 계산)로 증가된다. 예상되는 공급 단계 기간은 용기의 전달 한계에 따라 65±17 시간이다.

산소 유입율(OUR) 및 이산화탄소 전개율(CER) 값을 정확한 기체 분석을 제공하기에 충분한 수준으로 유지하기 위해서 대기 유동은 발효를 통하여 증가된다. 발효의 대기 유동율은 보통 1 v/v/m이다. 배양물의 온도 및 CDW를 측정하기 위해서 매일 검사가 수행된다. 적합한 샘플이 보유된다. 공급 종료시, 배양물이 생성물 용기에 전달된다.

생성물 발효

생성물 발효기가 0.25 내지 1.00 g.cdw.L⁻¹으로 집중된다. pH 6.40으로 설정되고 6.40±0.10으로 조절되는 pH 조절기를 사용하여 초기 pH를 암모니아 용액(비중 0.901)으로 조절한다.

또한, 하한 조절 설정점을 pH 5.50으로 하여 pH를 5.50 내지 5.90의 범위에서 유지한다. 초기 pH를 암모니아(예를 들어 수성 암모니아 비중 0.880)로 조절할 수 있다. 이러한 하한 발효 pH는 rHA의 증진된 질량 분석 프로필을 발생시킨다.

pH의 하강이 온라인 기구에 의해 검출가능한 생장의 최초의 징후이기 때문에 상기 범위의 상한에 가까운 초기 pH가 초기 대사의 관찰을 촉진시키기에 바람직하다.

특히 하나 이상의 PMT 유전자에 결손이 있는 균주에 있어서, 발효가 보통 요구되는 것보다 더 높은 pH에서 수행되는 것이 유리하다고 알려졌다. 따라서, pH를 약 5.5로 조절하는 것보다 설정점을 pH 6.20 내지 pH 6.70, 바람직하게는 pH 6.3 내지 6.5로 조절하는 것이 유리하다. 이러한 더 높은 pH에서, 센트레이트의 질은 감소된 세포 용혈로 인하여 현저히 개선된다. 세포 용혈은 상등액으로부터 전체 세포 모두를 제거하기에만 충분한 발효물의 원심분리 단계에 이어 현탁시에 잔존하는 세포 파편을 유발시킨다. 이것이 표 2에 명시되어 있고, pH 5.5에 비하여 pH 6.5에서 효모 배양시 배양물 상등액의 습윤 중량 함량에서의 현저한 감소가 예시된다.

표 2.

발효 pH	상등액의 습윤 중량 함량 (g.L ⁻¹)
5.5	36.3
6.5	4.7

센트레이트 질과 생성물 용기내의 발효 pH 간의 관계를 나타냄.

2M H₂SO₄가 또한 pH 교정제로서 사용된다. 수크로스 20 g.L⁻¹, MW10 배치 비타민 및 Breox FMT30 소포제 0.04g.L⁻¹를 용기에 첨가한다.

초기 기질 공급율은 하기 공식에 따라 결정된다.

$$1000 \times \mu \times [\text{CDW}] \times V_{\text{배치}}$$

$$SF_0 = \text{-----}$$

$$60 \times Y_{x/s} \times [\text{수크로스}]$$

상기식에서,

SF₀는 초기 기질 공급율이고, μ는 비성장율(예를 들어 0.06 시간⁻¹)이며, V_{배치}는 배치 용적(L)이며, Y_{x/s}는 세포 수율(g.L⁻¹)이며, [수크로스]는 수크로스 농도(g.L⁻¹)이며 [CDW]는 세포 건조 중량(g.L⁻¹)이다. 기질 공급율은 공식 SF = SF₀e^{μk}(SF는 기질 공급율(mL.분⁻¹)이고, SF₀은 초기 기질 공급율(mL.분⁻¹)이며, μ는 비성장율(시간⁻¹)(예를 들어 0.06 시간⁻¹)이며, k는 모든 조건이 충족되는 경우 0에서 시작하여 매 1분에 한번 0.0167씩 증가하는 상대 변수임)에 따라 결정된다. 다수의 조건이 발효 동안 일정하게 검토되고, SF를 k의 조작에 의해서 조절하기 위해서 사용되며; SF는 DOT<15% 및/또는 호흡상(RQ)≥1.2에 대하여 감소된다. 공급은 pH<6.2인 경우 또는 온도<29.0°C 또는 온도>31.0°C인 경우에 중단된다. 공급은 또한 조절 알고리즘을 통하여 자동적으로 수행된다. 2시간에 걸쳐 평균 RQ>1.13인3 경우 또는 에탄올이나 아세테이트 축적의 증거가 있는 경우 SF는 감소된다.

교반이 20% 이상의 DOT의 공기 포화를 유지하기 위해서 증가되고, 혼합을 촉진하기 위해서 한번 수득된 최대값으로 유지된다. 일단 공급이 시작되고 배양물이 탄소 제한하에 있으면, Breox FMT30의 농도는 0.2 내지 0.32 g.L⁻¹(최종 용적에서 계산)로 증가된다. 예상되는 공급 단계 기간은 용기의 전달 한계에 좌우되고, 전형적으로 8,000L 규모에서 90 내지 120 시간이다.

산소 유입율(OUR) 및 이산화탄소 전개율(CER) 값을 정확한 기체 분석을 제공하기에 충분한 수준으로 유지하기 위해서 대기 유동은 발효를 통하여 증분으로 증가된다. 용기는 OTR을 증진시키기 위해 필요한 만큼 과잉 압박된다. 발효의 대기 유동율은 보통 1 v/v/m이다. 배양물의 순도 및 CDW를 측정하기 위해서 검사가 매일 수행될 수 있고 적합한 샘플이 보유된다.

배양물은 공급 종료시 하류 프로세싱을 위해 유지된다.

생성 배양물의 유지

생성 배양물은 배양물의 배치 프로세싱을 가능하게 하는 적합한 조건 하에서 유지될 수 있다. 유지 시간은 최소한으로 유지되어야 하지만 필요한 경우 48시간까지 및 그 이상으로(예를 들어 5일) 연장될 수 있다. 배치 프로세싱의 조건 하에서 본원에 표현된 바와 같은 유지 시간의 제약은 배양물의 최종부가 가공되도록 적용하는 것으로 이해될 것이다.

발효로부터의 센트레이트 또는 기타 공급원(예를 들어 원형질)로부터의 불순한 알부민 용액이 중합 및 단백질 분해효소 활성으로부터 rHA를 보호하면서 양이온 교환 매트릭스에서의 크로마토그래피를 위해 제조되거나 조건화된다. 바람직하게는, 옥탄산나트륨(크로마토그래피 용액 14(CS14)-표 3)은 최종 농도 1 내지 10 mM, 예를 들어 5mM로 첨가된다. pH는 아세트산으로 pH4.3 내지 4.8, 바람직하게는 4.50±0.1(가장 바람직하게는 ±0.05)로 조절되고 전도도는 5.5mScm⁻¹ 이하로 검토된다.

크로마토그래피

모든 작업은 주위 온도(20±5°C)에서 수행될 수 있다. 크로마토그래피 컬럼을 위한 알부민 로드(g/L)가 SDS-PAGE(제 1 단계에서) 또는 GP-HPLC(모든 다른 컬럼을 위해)에 의해 알부민(g/L) 적정으로부터 측정된다. 이러한 단계의 진행은 예를 들어 254 또는 280 nm에서 UV 흡광도를 온라인으로 측정함으로써 모니터링된다.

본 발명의 특히 바람직한 구현예에서 정제방법은 양이온 교환 크로마토그래피(SP-FF); 음이온 교환 크로마토그래피(DE-FF); 친화성 크로마토그래피(DBA); 한외여과 및 다이아여과; 제 2 친화성 크로마토그래피 단계(PBA); 한외여과 및 다이아여과; 제 2 양이온 교환 크로마토그래피 단계(SP-FF2); 및 제 2 음이온 교환 크로마토그래피 단계(DE-FF2)를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 정제방법은 최종 한외여과/다이아여과에 이어 제형화 단계 및/또는 용액의 최종 용기로의 배치로 이어진다.

본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 단계의 순서는 다수 측면에서 신규하고 발명성이 있다. 본원에 기재된 바와 같이 개선된 완충제와 함께 아미노페닐보로네이트(PBA) 매트릭스의 사용, 및 적은 로드 용적의 사용은 ELISA에 의해 측정된 증가된 효모 항원 제거(약 4 내지 20 배)를 제공하기 위해서 예시되었다. 아미노페닐보로네이트 매트릭스와 함께 사용된 완충제는 예상치 않게도 특히 유리한 것으로 밝혀졌고 광범위한 성분 및 성질의 과다한 완충제의 집약적인 시도의 결과를 나타낸다. 완충제는 WO 96/37515의 PBA 크로마토그래피 단계에 사용된 완충제에 비하여 현저히 증가된 효모 항원 제거를 제공한다.

아미노페닐보로네이트 매트릭스를 매우 농축된, 예를 들면 100±10g.L⁻¹의 알부민 용액으로 로딩시키는 것은 rHA 및 효모 항원의 개선된 분해능이 더 적은 로드 용적으로 인하여 달성될 수 있음을 의미한다.

WO 96/37515는 제 1 친화성 크로마토그래피 단계 이후에 S200 겔 투과 단계를 포함한다. 겔 여과 단계는 효모 항원, 안료 및 이합 알부민에 대하여 알부민을 정제한다. 본 발명자들은 이 단계가 본 발명자들이 아미노페닐보로네이트 친화성 단계 및 추가의 양이온 및 음이온 교환 단계의 도입으로 이루어낸 개선으로 인하여 더 이상 필요하지 않음을 발견하였다.

아미노페닐보로네이트 친화성 단계 이후에 네가티브 방식 양이온 교환 단계를 위해서 알부민이 농축되고 다이아여과되는 것이 바람직하다. 본 발명자는 이러한 다이아여과 단계 및 양이온 교환 단계의 결합이 니켈 이온의 상대 농도를 실질적으로 감소시킨다는 것을 발견하였다. 특히, rHA의 낮은 pH로의 노출이 니켈 이온 수준을 감소시키는데 효과적이다. 따라서, 본 발명에 따라 정제된 알부민은 놀랍게도 낮은 니켈 이온 함량(알부민 g당 100ng 이하)을 지닌다.

본원에 기재된 바와 같은 네가티브 방식 양이온 교환 단계는 글리코실화된 것이라고 생각되는, 소량의 변형된 rHA인 콘카나발린 A 결합 물질(cbm)을 제거하기 위해서 사용된다. 네가티브 방식 양이온 교환 단계는 재조합 pmt1-돌연변이 사카로마이세스 세레비지에 의해 생성된 cbm 함량을 약 1.3배 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 더욱 대단한 효과가 비-pmt1 돌연변이로부터 유도된 rHA로 달성된다(2 내지 3 배 제거).

다른 상용 효모에 비하여, 사카로마이세스 세레비지에는 상대적으로 낮은 수준의 변형 rHA를 생성한다. 따라서, 네가티브 방식 양이온 교환 단계 및 하나 이상의 PMT 유전자에 결손이 있는 세포의 사용은 rHA가 사카로마이세스 세레비지가 아닌 재조합 숙주에 의해 생성되는 경우 훨씬 더 중요할 수 있다.

알부민 정제 동안 사용되는 크로마토그래피 용액이 표 3에 상세히 기재되어 있다. 매우 대규모의 알부민 제조 및 제품의 상대적으로 낮은 가격으로 인하여, 이러한 완충제 염이 산업적 규모에서 고순도 형태로 이용가능하고 Tris, HEPES 또는 MOPS와 같은 기타 보편적으로 사용되는 완충제에 비하여 낮은 가격이므로 공정에 가장 적합하다. 또다른 완충제, 예를 들면 유사 pK_a의 완충제가 표 3에서 사용된 것에 대체하여 사용될 수 있지만(예를 들어 아세트이트 대신에 말레이트), 대부분의 경우에 비용 및 대규모에서의 이용가능성이 이들의 사용을 지배한다. 또다른 염의 형태가 사용될 수 있는데, 단, 용해성이고 산업 규모에서 이용가능하며 비용이 적게 든다.

완충제 용액이 하기 농도로 제조될 수 있거나 농축된 원료 용액이 즉각적인 사용을 위해 온라인에서 혼합되거나 희석될 수 있다.

양이온 교환 크로마토그래피

알부민이 적어도 효모 단백질(알부민이 효모 발효로부터의 rHA인 경우) 및 기타 항원, 저분자량 오염물질 및 착색된 화합물에 대하여 양이온 교환 크로마토그래피에 의해서 농축되고 정제된다. 이 방법은 SP-세파로스 FF, SP-스페로실, CM-세파로스 FF, CM-셀룰로스, SE-셀룰로스 또는 S-스페로텍스와 같은 시판되는 양이온 교환 매트릭스를 사용한다. 바람직하게는, 매트릭스는 추상 유동 컬럼에서 사용되는 경우 베드 높이가 5 내지 25 cm, 바람직하게는 10 내지 15 cm, 예를 들면 12.5 cm일 수 있는 SP-세파로스 FF(파마시아사)이다. 방사상 유동형 컬럼이 사용되는 경우, 적합한 베드 유동 경로 길이는 11.0±1.0 cm이다. 매트릭스 L당 10 내지 50 g 알부민, 바람직하게는 40±10g 알부민의 컬럼 로딩이 적합하다. 매트릭스는 알칼리 저장 용액을 제거하기 위해서 완충제로 평형화되고; 바람직하게는 완충제는 pH를 pH6.0으로 감소 시키기에 충분히 강해야 한다. CS01과 같은 완충제가 컬럼으로부터 저장 용액 CS07을 제거하기 위해서 사용되지만; pH 6.0 이하의 일부 완충제가 사용될 수 있다. 평형화는 컬럼 유출물의 pH가 약 pH6.0일 경우 완전한 것으로 판단된다.

표 3a.

용액		성분	농도 (g.L ⁻¹)	pH	전도율 (mS.cm ⁻¹)
번호	명칭				
CS01	SP-FF 평형제 /세척제 3 /DE-FF 평형제	CH ₃ COOH	1.85	5.45 - 5.65	1.9 - 2.2
		NaOH (27% (w/w))	4.00		
CS02	SP-FF 세척제 1	CH ₃ COOH	3.00	3.9 - 4.1	0.6 - 0.8
		NaOH (27% (w/w))	1.19		
CS03	SP-FF 세척제 2	CH ₃ COOH	1.62	3.9 - 4.1	125 - 165
		NaOH (27% (w/w))	1.19		
		NaCl	117		
CS04	SP-FF 용출물/ DE-FF 예비- 평형제	CH ₃ COOH	5.13	5.4 - 5.6	5.0 - 6.0
		NaOH (27% (w/w))	11.5		
		옥탄산	0.721		
CS05	염 세정제	NaCl	58.4	5 - 9	75 - 95
		폴리솔베이트 80	5.00		
CS06	0.5M NaOH	NaOH (27% (w/w))	74.1	> 12	80 - 120
CS07	20mM NaOH	NaOH (27% (w/w))	2.96	> 12	3.5 - 5.5
CS08	DE-FF 세척제	K ₂ B ₄ O ₇ .4H ₂ O	4.80	9.0 - 9.4	2.5 - 3.5
CS09	DE-FF 용출물	K ₂ B ₄ O ₇ .4H ₂ O	33.6	9.2-9.5	15.0-18.0
CS10	DBA 평형제 /세척제	CH ₃ COONH ₄	19.3	8.7 - 9.1	18 - 22
		NaOH (27% (w/w))	5.93		

표 3b.

용액		성분	농도 (g·L ⁻¹)	pH	전도율 (mS·cm ⁻¹)
번호	명칭				
CS11	DBA 용출물	NaCl	117	6.7 - 7.1	125 - 165
		NaOH (27% (w/w))	14.1		
		H ₃ PO ₄ (85% (w/w))	5.79		
CS14	2M 옥탄산나트륨	NaOH (27% (w/w))	281	7.8 - 8.4	-
		옥탄산	288		
CS15	아세트산	CH ₃ COOH	1045	-	-
CS17	DE-FF2 평형제 /세척제	CH ₃ COOH	1.50	4.5-4.7	0.85-1.05
		NaOH (27%w/w)	1.66		
CS18	양성-양식 DE-FF2 용출물	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	8.58	6.8-7.0	5.5-6.5
		NaOH (27%w/w)	4.07		
CS19	SP-FF2 평형제 /세척제	CH ₃ COOH	1.80	5.2-5.4	1.8-2.1
		NaOH (27%w/w)	3.52		
CS20	PBA 평형제/세척제	글리신	7.51	8.3-8.6	18-22
		NaCl	5.84		
		NaOH (27%w/w)	0.95		
		CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.35		
CS21	20%(w/w) 아세트산	CH ₃ COOH	205	1.9-2.2	1.8-2.0
		H ₂ O	820		
CS22	최종 pH 조절제	Na ₂ HPO ₄	71.0	11.2-11.4	43-49
		NaOH (27%w/w)	37.0		
EXO4	최종 pH 조절 알칼리	NaOH (47%w/w)	42.6	≥12	80-120
		H ₂ O	970		
EXO5	최종 pH 조절 산	HCl (37%w/w)	19.7	≤1.5	60-90
		H ₂ O	982		

이 특정 실시예에 대하여 모든 정량은 ±2%이다.

발효로부터의 센트레이트가 중합 및 단백질분해효소 활성으로부터 rHA를 보호하면서 양이온 교환 매트릭스에서의 크로마토그래피를 위해 제조되거나 조건화된다. 그러나, 효모 균주가 rHA를 정제하기 위해서 요구되는 pH에서 rHA를 분해하는 단백질분해효소에서 결손되지 않은 경우, 배양물 상등액은 예를 들면, WO 94/03636에 상세화된 바와 같이 50 내지 70 °C에서 30분 동안의 열처리에 의해서 저온살균되어야 한다. 전형적으로 1 내지 10 mM의 옥탄산염나트륨이 rHA를 열변성으로부터 보호하기에 충분하고 60 내지 80 °C의 온도에서 30초 이상 10분 이하로의 처리가 뱃치 또는 관통유동 절차에서 단백질분해효소를 불활성시키기에 알맞다. HSA가 사용되는 경우 저온살균이 또한 바람직할 것이다.

이어서 조건화된 센트레이트를 예를 들면, 0.07 내지 0.75 베드 용적/분, 바람직하게는 0.3 내지 0.6 베드 용적/분, 본 실시예에서 0.5 베드/분의 유동율로 컬럼에 로딩한 다음, 컬럼을 잔여 오염물질을 제거하기 위해서 하나 이상의 용액으로 세척한다. 컬럼을 먼저 예를 들어 8 용적의 10 내지 100 mM, 바람직하게는 30 내지 70 mM, 예를 들면 50 mM 아세테이트, pH3.9-4.1, 0.6-0.8 mS·cm⁻¹의 용액(CS02)으로 세척한다. 그런 다음, 컬럼을 4 용적의, 아세트산나트륨 완충제 중에 1 내지 3 M NaCl, 바람직하게는 2M NaCl을 함유하는 높은 농도의 염 완충제(예를 들면, 10 내지 50 mM, 바람직하게는 27mM의 아세트산나트륨, pH3.5-4.5, 바람직하게는 pH4.0(CS03))에 이어 10 용적의 CS01로 세척한다. 알부민을 아세트산염/옥탄산염 완충제(예를 들면, 40 내지 120, 바람직하게는 60 내지 100, 예를 들어 85 mM 아세테이트, 및 2 내지 50 mM, 바람직하게는 2 내지 20 mM, 예를 들어 5 mM 옥탄산염(CS04))로 용출하여 수집한다. 알부민의 수집은 UV 시그널이 0.6 A₂₅₄/cm 이상으로 발생할 때 시작하여 UV 시그널이 0.36 A₂₅₄/cm 이하로 떨어질 때까지 계속된다. 이어서, 컬럼을 0.25 내지 3.0 M NaCl과 0.05 내지 2 % 세정제 (CS05)를 사용하고, 그런 다음 0.1 내지 1.0 M NaOH(CS06)를 사용

하여 세정한다. 다음, 희석된(10 내지 50 mM) NaOH(CS07)에서 저장한다. 본 실시예에서, 평형화, 로딩 및 세척 단계를 위한 유동율은 분당 0.5 베드 용적이다. 알부민의 용출을 위해서, 0.04 내지 0.6 베드 용적/분, 바람직하게는 0.15 내지 0.35 베드 용적/분, 본 실시예에서 0.25 베드 용적/분의 유동율이 사용된다.

음이온 교환 크로마토그래피

음이온 교환기로부터의 용출물을 $10\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 바람직하게는 $5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 특히 $2.5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이하로 희석하고 QMA-스페로실, DEAE-스페로텍스, Q-Hyper D, DEAE-셀룰로스, QAE-셀룰로스, 또는 TMAE, DMAE 또는 DEAE 프락토겔과 같은 음이온 교환 수지에 로딩한다. 바람직하게는, 매트릭스는 시판되는 음이온 교환 매트릭스 DEAE 세파로스-FF(파마시아사)(베드 유동 경로 길이 $11.0\pm 1.0\text{cm}$)이고, 양이온 용출 완충제(CS04)로 예비-평형화시킨 다음, 3 컬럼 용적의 CS01로 평형화시킨다. 알부민을 매트릭스 리터당 $30\pm 10\text{g}$ 단위체 알부민으로 매트릭스에 로딩하고, 매트릭스를 pH를 약 9.2로 높이는 효과가 있는 희석 4중붕산염, 예를 들면 15 내지 25 mM의 4중붕산칼륨 또는 4중붕산나트륨(CS08)으로 세척한다. 다음, 알부민을 더욱 농축된 4중붕산염 완충제(예를 들어 80 내지 150 mM, 바람직하게는 110mM의 4중붕산칼륨(CS09))로 용출한다. 매트릭스를 염/세정제(CS05)에 이어 NaOH(CS06)으로 세정하고 희석 NaOH(CS07)에서 저장한다. 그런 다음, 음이온 교환 매트릭스로부터의 용출물을 친화성 매트릭스에 로딩한다.

친화성 크로마토그래피

이 단계는 rHA를 45kDa N-말단 알부민 단편, 효모 항원 및 안료에 대하여 더 정제한다. 친화성 매트릭스는 알부민을 결합시키는 시바크론 블루형 염료, 예를 들면 리액티브 블루 2(Reactive Blue 2), 프로시온 블루 HB(Procion Blue HB), 블루 세파로스(Blue Sepharos), 블루 트리사크릴(Blue Trisacryl) 및 기타 안트라퀴논형 화합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 매트릭스는 WO96/37515에 기재된 바와 같이 제조된 "델타 블루(Delta Blue)" 매트릭스(DBA)이다.

본 방법은 베드 유동 경로 길이가 $11.0\pm 1.0\text{cm}$ 인 DBA를 사용한다. DBA는 아세트산암모늄 완충제(CS10에서와 같이, 100 내지 300 mM, 바람직하게는 200 내지 275 mM, 예를 들어 250mM) 및 7.0 내지 14.0 g/L, 바람직하게는 8.0 내지 12.0 g/L, 본 실시예에서 $10.0\pm 1.0\text{ g/L}$ 로 적용된 알부민으로 평형화시킨다. 평형화, 로딩 및/또는 세척 단계는 0.05 내지 0.30 베드 용적/분, 바람직하게는 0.15 내지 0.27 베드 용적/분, 본 실시예에서 0.25 베드 용적/분의 유동율로 수행된다. 모든 다른 단계는 0.20 베드 용적/분으로 수행된다. 로딩이 완료되었을 때, 오염물질을 제거하기 위해서 컬럼을 예를 들어 CS10의 아세트산암모늄 완충제(10 내지 30 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 바람직하게는 15 내지 25 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) 1 내지 5 용적, 바람직하게는 5 컬럼 용적으로 세척한다. 알부민을 강한 염 및 인산염 용액(CS11에서와 같이, 1.0 내지 3.0 NaCl, 예를 들어, 1.5 내지 2.5 M NaCl 또는 2.0M NaCl, 및 5 내지 100 mM, 예를 들어 50mM 인산염)으로 용출한다. 그런 다음, 컬럼을 CS06을 사용하여 세정하고 CS07에서 저장한다.

이어서 페닐 보로네이트 아가로스(PBA) 크로마토그래피를 사용하는 정제를 위한 준비로 DBA 컬럼으로부터의 용출물을 농축하고 다이아여과시킨다. DBA 한외여과가 30,000 이하의 공식 분자량 차단으로 단백질을 농축에 사용되는 여타의 한외여과 막, 바람직하게는 예를 들어 10,000 공칭 분자량 차단의 폴리에테르설폰형 막(예를 들어, 필트론 오메가 시리즈)으로 수행될 수 있다. DBA 용출물을 농축한 다음, 적어도 5 용적의 물에 이어 적어도 5 용적의 CS20에 대하여 약 $100\text{g rHA}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 다이아여과시킨다. 다이아여과 종료시, 투석잔류물을 필요한 경우 추가로 농축하고, 단계 회수를 증가시키기 위해서 장치들을 CS20으로 세척한다. 최종 투석잔류물의 농도는 20 내지 120 $\text{g rHA}\cdot\text{L}^{-1}$, 바람직하게는 70 내지 120 $\text{g rHA}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 범위, 또는 본 실시예에서와 같이 $100\pm 10\text{g rHA}\cdot\text{L}^{-1}$ 이어야 한다. 사용후, 잔여 단백질을 물로 흘려보냄으로써 막을 처리하고 CS06으로 세정한 다음 CS07에서 저장한다.

PBA는 당단백질, 당지질, 다당류, 올리고당류 및 단당류와 같은 당접합체를 제거하기 위한 친화성 단계이고 리간드로서 고정화된 아미노페닐붕산을 사용한다. 아미노페닐붕산은 스페이서에 의해서 폴리아크릴아미드, 아가로스, 셀룰로스 또는 유기 중합체와 같은 불용성 매트릭스에 공유결합된다. 미국 특허 제4,562,251호(본원에 참조로 인용됨)에는 (1) 트리아진을 먼저 아가로스에 O-연결시킨 다음, 제 2 반응에서 3-아미노페닐붕산(APBA)으로 연결하고, (2) 트리아진을 먼저 APBA와 반응시켜 모노 또는 디-보르트리아진을 생성하며, 이들을 트리아진 상의 유리 염소에 의해서 -ONa 활성화 아가로스에서 O-연결시켜 모노 또는 디-치환 아가르스를 생성함으로써 디보르트리아진 또는 모노보르트리아진 아가르스의 적합한 제조방법이 기재되어 있다.

선행 특허인 미국 특허 제4,269,605호에서는 본원에 우선하여 아가르스의 에피클로로히드린의 활성화를 포함하는 다양한 활성화 방법을 시도하였다. 시판되는 매트릭스에는 아미콘의 PBA30과 시그마의 아크릴성의 비딩된 아미노페닐보로네이트가 포함된다.

글리신(10 내지 500 mM, 예를 들어 25 내지 200 mM, 바람직하게는 50 내지 150 mM, 본 실시예에서 100mM), NaCl(0 내지 500 mM, 예를 들어 25 내지 200 mM, 바람직하게는 50 내지 150 mM, 본 실시예에서 100mM) 및 CaCl_2 (5 내지 250 mM, 바람직하게는 10 내지 100 mM, 본 실시예에서 50 mM)를 함유하는 완충제(pH 8.0 내지 9.5, 바람직하게는 pH 8.0 내지 9.0, 본 실시예에서 pH8.5 (CS20))를 사용하는 것이 특히 유익하다고 밝혀졌다.

PBA 컬럼은 $11.0\pm 1.0\text{cm}$ 의 유동 경로 길이를 사용하고 상기의 완충제, 예를 들어 CS20으로 예비-평형화시킨다. 컬럼은 1 이하의 컬럼 용적, 바람직하게는 0.5 이하의 컬럼 용적, 본 실시예에서 0.35 이하의 컬럼 용적으로 로딩한다. PBA를 네가티브 단계로서 수행하고, 따라서 알부민을 컬럼으로부터의 관통유동물 및 세척물에 수집한다. 모든 크로마토그래피 단계는 0.005 내지 0.3 베드 용적/분의 유동율로 수행될 수 있다. 바람직하게는 컬럼의 평형화 및 세척은 0.01 내지 0.05, 바람직하게는 0.025 베드 용적/분의 유동율에서 수행되는 알부민 용액의 로딩 및 수집 보다 더 높은 유동율, 예를 들어 0.19 베드 용적/분에서 수행된다. 그런 다음, 컬럼을 염(CS03), 붕산염 완충제(CS09), NaOH(CS06)로 세정하고 희석된 NaOH(CS07)에서 저장한다.

PBA 크로마토그래피 이후 네가티브 방식 양이온 교환 단계를 준비하기 위해서 알부민 용액을 농축하고 다이아여과시킨다. 이러한 다이아여과 단계와 네가티브 방식 양이온 교환 크로마토그래피의 결합은 실질적으로 니켈 이온의 상대 농도를 감소시킨다.

PBA 한외여과는 30,000 이하의 공식 분자량 차단으로 단백질 농축에서 사용되는 여타의 한외여과 막, 바람직하게는 10,000의 공식 분자량 차단의 폴리에테르설폰형 막(예를 들어 펠트론 오메가 시리즈)으로 수행될 수 있다. 수집된 PBA 관통유동물을 CS21로 pH5.3±0.5로 조절하고 수집한 다음, 적어도 7 용적의 CS19에 대하여 약 100g rHA.L⁻¹로 다이아여과시킨다. 다이아여과 종료시, 장치를 CS19로 세척하고, 투석잔류물 농도를 50±10g rHA.L⁻¹으로 하기 위해서 요구되는 만큼 추가로 C19를 첨가한다. 마지막으로, 최종 농도를 약 2 내지 15, 바람직하게는 5 내지 10, 더욱 바람직하게는 6 내지 9 mM, 및 본 실시예에서 6mM로 하기 위해서 옥탄산나트륨, 예를 들어 CS14를 3mL.L⁻¹로 첨가한다. 사용후, 잔여 단백질을 물로 흘려보냄으로써 막을 처리하고 CS06으로 세정한 다음 CS07에서 저장한다.

이어서 예를 들어 SP-FF 세파로스(파마시아사)를 사용하여 알부민 용액을 제 2 양이온 교환 단계에 투입하는데, 이 단계는 네가티브 방식이기 때문에 이 시기에 알부민은 보유되기 보다 매트릭스를 통과한다. 조건은 만노실화된 알부민이 매트릭스에 결합되도록 하는 조건이다. 완충제는 바람직하게는 아세트산나트륨 완충제(5 내지 110 mM 아세테이트, 바람직하게는 10 내지 50 mM, 본 실시예에서 30mM, pH 5.2-5.4, CS19)이다. 시트레이트 포스페이트 완충제와 같이, 적합한 범위로 완충할 수 있는 기타 완충제가 사용될 수 있다. 적합하게, 완충제는 약 2mS.cm⁻¹의 전도도를 갖는다. 컬럼은 11.0±1.0cm의 유동 경로 길이를 갖고, 알부민은 10 내지 250 g.L⁻¹, 바람직하게는 20 내지 70 g.L⁻¹, 본 실시예에서 50±15 또는 50±10 g.L⁻¹ 매트릭스로 로딩된다. 이것이 네가티브 단계이므로, 알부민은 관통유동물 및 세척물에 수집된다.

이러한 양이온 교환 단계 후, 알부민을 네가티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피에 투입한다. 이 단계는 ELISA 및 웨스턴 블롯에 의해 측정된 효모 항원을 제거한다. 제 2 양이온 교환 단계로부터 수집된 관통유동물 및 세척물을 물로 1.05±0.1mS.cm⁻¹로 희석된 CS21을 사용하여 pH4.60±0.10으로 조절하고 rHA를 하기 조건을 사용하여 정제한다. 이 단계는 유동 경로 길이 11.0±1.0cm의 DE-FF 세파로스(파마시아사)와 같은 음이온 교환 매트릭스를 사용하고 알부민을 50 내지 250 g.L⁻¹, 바람직하게는 150±50g.L⁻¹ 매트릭스로 로딩한다. 이것이 네가티브 단계이므로 알부민이 관통유동물 및 세척물에 수집된다. 관통유동물 및 세척물의 pH를 CS22를 사용하여 7.0±0.1로 조절한다.

또한 실시예 9에 기재된 바와 같이, pH-조절이 DEAE 관통유동물 및 세척물에서 수행되는 대신에 최종 UF 공급물 용기에서 일어날 수 있다.

실시예 1이 pmt1 돌연변이에 관하여 설명되지만, 본 발명의 정제방법은 이 로커스에서 돌연변이가 없거나 사실상 일부 다른 pmt 로커스에서 돌연변이가 없는 숙주 세포에 똑같이 적용가능하다.

실시예 2

센트레이트의 질을 조사하기 위해서 두 분석이 사용된다. 센트레이트의 질이 열악할수록 효모 세포의 "건고성"이 나쁘다.

두 분석은 하기와 같다:

- 1. 600nm에서의 센트레이트의 흡광도(A₆₀₀) 측정.
- 2. 센트레이트내 입자의 습윤 중량(WW) 측정.

두 분석 모두에서, 수치가 높을수록 센트레이트의 질은 열악하다.

일괄 먹이(fed-batch) 발효로 성장된, 2가지 상이한 pH 하에서의 3가지 상이한 효모 균주의 센트레이트 질을 비교한다.

표 4.

특정 유전자 결실	A ₆₀₀	WW(g.L ⁻¹ 센트레이트)
pH 5.5에서 성장		
pmt1-/hsp150-/yap3-	1.39(0.52, 24)	12.4(4.9, 23)
hsp150-/yap3-	1.11(0.62, 9)	9.1(2.9, 7)
yap3-	0.58(0.34, 10)	3.9(2.0, 10)
pH 6.4 또는 6.5에서 성장		
pmt1-/hsp150-/yap3-	0.41(0.17, 6)	2.6(0.8, 6)
hsp150-/yap3-	0.47(0.19, 8)	4.6(1.4, 7)
yap3-	0.41(0.08, 6)	2.1(0.8, 6)

2가지 상이한 pH에서 성장된 일괄 먹이 발효로의 3가지 상이한 rHA 생성 균주에 대한 A600 및 WW 값. 첫번째 컬럼에 특정 유전자의 결실이 표시되어 있다. 괄호 안의 값은 표준편차와 샘플의 수이다.

상기 표로부터, pH5.5에서 다중-유전자 결실 균주는 열등한 센트레이트를 수득하고, 반면에 pH6.4 또는 6.5에서는 이러한 추가 유전자 결실의 결실 효과가 회피된다.

실시예 3

본 실시예는 pmt1 돌연변이가 없는 균주를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 바와 동일한 방법으로 수행한다. 이 균주는 또한 2가지 상이한 pH 조절값에서 성장되고, 센트레이트의 습윤 중량 함량은 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정된다. 이러한 효모 균주에 대해서 상승된 pH 조절점에서의 생장의 이익이 관찰되고; 표 5에서 예시되는데, 효모가 pH5.5에 비하여 pH6.3 내지 6.5의 범위에서 배양될 경우, 배양물 상등액의 습윤 중량 함량에서의 현저한 감소가 예시된다.

표 5.

발효 pH	상등액의 습윤 중량 함량(g.L ⁻¹)
5.5	10.0 (2.3, 4)
6.3-6.5	4.6 (1.4, 7)

비-pmt1 균주에 대한 센트레이트 질과 발효 pH의 관계. 괄호 안의 값은 표준 편차와 샘플의 수이다.

따라서, 약 5.5에서의 pH 조절보다, 조절 설정점을 pH6.30 내지 pH6.70, 바람직하게는 pH6.3 내지 pH6.5로 하는 것이 유리하다. 이러한 더 높은 pH에서, 센트레이트의 질은 감소된 세포 용혈로 인하여 현저하게 개선된다.

실시예 4

본 실시예는 하기의 차이를 제외하고는 실시예 1에 기재된 바와 유사한 방법으로 수행된다. 5.90으로 설정되고 5.90+0.20으로 조절되는 pH 조절기를 사용하고 탄소원으로서 글루코스를 사용하여 비생장률이 0.10h⁻¹인 것을 제외하고는 상기와 동일한 조건 및 배지를 사용하여 효모 피치아 파스토리스인 균주 GS115(인비트로젠사)를 배양한다. 배치 단계 기간은 28시간이고 공급 단계 기간은 42시간이다. 일단 공급 단계가 개시되면 재조합 인간 알부민이 첨가되고 발효 종료시 3.8 g rHA.L⁻¹ 배양물의 최종 농도를 제공한다. 피치아 배양물을 스파이킹 하기 위해서 사용된 rHA를 정제하지만 본 발명의 정제방법을 따르지 않는다.

그런 다음, 피치아 일괄 먹이 배양 배지로부터의 rHA를 실시예 1에 기재된 정제방법에 따라서 정제한다.

실시예 5

본 실시예는 실시예 4에 기재된 바와 같이 피치아 배양 배지로부터 정제된 rHA의 분석에 대해 기재한다.

면역분석 데이터

(i) 피치아 배양 배지로부터 정제된 rHA; (ii) 배양 배지를 스파이킹하기 위해서 사용된 rHA 및 (iii) 본 발명에 따라 정제된 사카로마이세스 세레비지에 의해 생성된 알부민에서 면역분석을 수행한다.

웨스턴 블롯 요약

항체 배치 수 Ig9601

겔형 4-12 % SDSNR NOVEX GELS

우유형 UHT

노출시간 20초

Ig9601은 비-알부민 생성 사카로마이세스 세레비지에 균주에 대하여 상승되고 이에 따라 효모 항원을 검출하기 위해서 사용될 수 있다.

웨스턴 블롯은 피치아 배양 배지로부터 유도된 알부민의 효모 항원 프로필이 피치아 발효를 스파이킹하기 위해서 사용되는 물질 보다 더 소수의 덜 강렬한 밴드를 함유함을 나타낸다. 피치아-유도 알부민 효모 항원 프로필은 사카로마이세스-유도 프로필과 매우 유사하다.

ELISA 블롯 요약

피치아 배양 배지로부터 정제된 알부민 및 피치아 배지를 스파이킹하기 위해서 사용된 알부민 내 효모 항원 불순물을 Ig9601을 사용하여 ELISA에 의해 정량한다.

피치아 배양 배지로부터 정제된 알부민의 효모 항원 함량은 분석의 검출 한계 이하(약 $0.004\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)이고, 피치아 배지를 스파이킹하기 위해서 사용된 알부민에 대한 항원 함량은 $0.62\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 이다.

Con A 결합 물질

실시예 9에 기재된 Con A 분석을 피치아 배양 배지로부터 정제된 알부민 및 피치아 배지를 스파이킹하기 위해서 사용된 알부민에 대해서 수행한다. 피치아 배양 배지로부터 정제된 알부민에 대한 Con A 결합 물질의 함량은 0.22%(w/w)이고 피치아 배지를 스파이킹하기 위해서 사용된 알부민에 대한 Con A 결합 물질의 함량은 0.57%(w/w)이다.

피치아 배양 배지로부터 정제된 알부민 중의 Con A 결합 물질의 수준은 본 발명의 방법에 따라 사카로마이세스 세레비지애로부터 정제된 알부민이 pmt1 돌연변이로부터 생성되지 않을 경우 그의 수준과 유사하다 (표 6 참조).

순도 분석은 본 발명의 방법이 사카로마이세스 세레비지애가 아닌 효모(예를 들어 피치아)로부터의 알부민 및 사카로마이세스 세레비지애로부터 정제된 알부민과 유사한 순도의 알부민을 정제하는 데에 성공적으로 사용될 수 있음을 확인한다.

실시예 6

실시예 1에서 네가티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계(DE-FF2)가 제 2 양이온 교환 크로마토그래피 단계(SP-FF2)에 이어진다. 이와 다른 정제방법에서 제 2 양이온 교환 크로마토그래피 단계에 이어 포지티브 방식 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 수행될 수 있다.

pH 약 5.3에서의 SP-FF2 용출물로부터 pH는 pH7로 증가될 필요가 있다. pH 조절 및 다이아여과와 같은 두가지 방법이 있다. 다이아여과가 더 나은 품질의 산물을 생성하는 것으로 보인다.

DE-FF2(A)

SP-FF2 관통유동물 및 세척물은 0.5M 오르토인산수소이나트륨을 사용하여 pH7.0으로 pH 조절된다. 이 물질을 DEAE 상으로 표준 포지티브 조건 하에서 로딩하여 $40\text{g rHA}\cdot\text{L}^{-1}$ 매트릭스의 매트릭스 로딩을 부여하고 로드의 pH 및 전도도는 각각 7.0 및 $1.29\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이다.

DE-FF2(B)

SP-FF2 관통유동물 및 세척물은 10 용적의 10mM 인산나트륨(pH 7.0)으로 다이아여과되고 농축되며 완충제를 사용하여 $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 희석된 다음, 표준 포지티브 조건하에서 DEAE로 로딩된다. 로드의 pH 및 전도도는 각각 7.0 및 $1.43\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이다.

DE-FF2A/DE-FF2B로부터의 알부민은 적합하게는 45 내지 55 mM 인산나트륨 완충제(pH 7.0)에 의해서 용출된다.

실시예 7

rHA로부터 낮은 pH로의 처리에 의한 니켈 제거의 동력학이 조사되었다 (도 9 참조). 결과는 pH 4 내지 pH 4.5에서 니켈 제거의 속도 및 정도가 모두 pH에 독립적임을 나타내지만, pH5에서 제거율은 약하게 나타난다. 니켈 제거의 속도 및 정도는 pH가 5 내지 6.5로 증가함에 따라 감소하고, pH 6.5 이상에서 거의 또는 전혀 제거되지 않는다.

실시예 8

냉동이 잘 되지 않은 원형질 페이스트(센테온 과마 게엠베하)의 샘플로부터 인간 혈청 알부민의 정제가 실시예 1에서 상세화된 정제방법을 사용하여 달성된다.

각 크로마토그래피 단계에서의 HSA의 회수는 PBA 컬럼을 제외하고 주로 동일한 단계에서 참여된 rHA 회수에 필적할만하다. 여기에서, 회수는 클리케이션된 알부민의 제거로 인한 것일 수 있는 예상된 것 보다 훨씬 더 낮다.

실시예 9

본 실시예는 매우 정제된 rHA의 농축, 다이아여과 및 적합한 산물, 예를 들어 20%(w/v) 알부민으로의 제형화를 설명한다. 이 절차는 두 단계, 즉, 최종 한외여과(UF) 및 제형화에서 수행된다.

최종 UF는 낮은 pH에서의 다이아여과에 의해서 니켈 농도를 감소시키고 적합한 등급의 물을 사용하여 제한된 수성 환경에서의 rHA를 나타낸다.

최종 UF는 DEAE 관통유동물 및 세척물의 최종 UF 공급 용기로의 전달과 함께 시작된다. 하기에 기재된 바와 같이, 알부민을 농축하고, pH7.0으로 조절된 pH에서 다이아여과시킨 다음, 더 농축한다.

DE-FF2가 포지티브 방식으로 수행되는 경우, DE-FF2 용출물은 DEAE 관통유동물 및 세척물 대신에 또는 이에 첨가하여 사용될 수 있다.

DE-FF2 관통유동물 및 세척물(또는 DE-FF2가 포지티브 방식으로 수행되는 경우에는 용출물)의 전달 후, rHA-함유 공정 스트림은 후속적으로 10,000의 공식 분자량 차단 셀룰로스 막이 구비된 한외여과 시스템 내의 제 1 농축, 다이아여과 및 제 2 농축 단계로 투입된다. 초기 농축 단계는 rHA 농도를 약 100g.L⁻¹로 증가시키고, 암모니아를 제거하기 위해서 rHA가 적어도 5, 바람직하게는 적어도 7 투석잔류물 용적 당량의 주입용 물, 바람직하게는 50mM 염용액에 대하여 다이아여과되는 연속 다이아여과 단계로 즉시 이어진다. 다이아여과 후 pH를 7.0으로 조절하고 제 2 농도 단계는 rHA 농도를 275 내지 325 g.L⁻¹로 더 증가시킨다. UF 종료시 투석잔류물은 대용량 산물 제형화 용기로 전달된다.

pH-조절이 DEAE 관통유동물 및 세척물 상에서 수행되는 대신에, pH 조절은 최종 UF 공급물 용기, 바람직하게는 여과 공정과 제 2 농축 단계 사이에서 일어날 수 있다. 바람직하게는, 다이아여과 투석잔류물은 EX04를 사용하여 pH 7±0.1로 조절된다. pH가 7.1을 초과하지만 pH 8.5 이하로 유지되는 경우, 그런 다음에 pH는 EX05를 사용하여 감소될 수 있다.

제형화 단계는 대용량 산물 평균 여과 및 충전에 적합한 화학적 환경 및 적합한 농도에서 rHA를 생성한다. 전달된 최종 UF 투석잔류물이 알부민, 나트륨 및 옥탄산염의 농도를 측정하기 위해서 분석된다. 이들의 양이 고려되고 필요한 추가량의 원료 염화나트륨 및 옥탄산나트륨 부형제 용액 및 적합한 등급의 물이 첨가되어 대용량 제형 특이화가 달성된다. 최종 알부민 농도는 150 내지 250 g.L⁻¹ 또는 235 내지 265 g.L⁻¹일 수 있고 나트륨 농도는 130 내지 160 mM일 수 있다. 그러나, 일부 다른 가능한 알부민 농도는 예를 들어 적어도 4%(w/v)의 최소 농도, 바람직하게는 4 내지 25 %(w/v)로 제조될 수 있다. 제형화는 폴리솔베이트 80 또는 인간 알부민에 대해 미국 약전에서 특화된 것들과 같은 적합한 통상적인 약학적으로 허용되는 부형제와 희석수의 첨가 후에 완료된다.

알부민 g당 0.08 mmol 옥탄산나트륨의 최종 농도가 바람직하다. 산물은 멸균되고 발열성이다. 1% 이하의 이합체 알부민일 수 있고 더 큰 중합체나 응집물이 검출되지 않는다.

실시예 10

본 실시예는 본 발명에 따라서 정제된 알부민의 순도를 측정하기 위해서 수행되는 분석을 설명한다. 달리 언급되지 않을 경우, 모든 분석은 실시예 1에 따라 정제되고 실시예 9에 따라 제형화된 알부민에서 수행된다.

rHA의 글리케이션

글리케이션된 단백질의 미세분석은 본 발명에 따라 정제된 rHA가 비-효소 글리코실화(글리케이션)에 의해 실질적으로 변형되지 않음을 나타낸다. 미세분석은 과요오드산염을 사용하여 아마도리 산물(AP)의 C-1 하이드록실 그룹의 산화에 의해서, 글리케이션된 단백질의 안정한 AP 형태를 측정한다. 과요오드산염 산화에 의해 방출된 포름알데히드를 암모니아에서 아세틸아세톤과의 반응에 의한 크로모포어인 디아세틸디하이드로루티딘(DDL)으로의 전환에 의해 정량한다. 그런 다음, DDL을 비색계로 측정한다. 파마시아사의 PD-10(G25 세파텍스) 컬럼을 사용하여 탈염화시킨 후 샘플을 분석한 다음, 샘플내 알부민을 브래드포드(Bradford)법에 의해 재정량하여 10mg의 알부민을 분석한다. 프룩토스 양성 대조군이 포함되고 412nm에서의 흡광도가 쉬마즈사 UV 2101 분광광도계에서 판독된다. 매 물의 헥소스에 대하여 1몰의 아마도리 산물이 형성된다.

샘플	아마도리 산물(몰)/알부민(몰)
A	0.79
B	0.76
C	0.41
D	0.48
E	0.46
F	0.22
G	0.41
H	0.37
I	0.54
J	0.76
K	0.84
L	0.50
M	0.43
N	0.59
O	0.41
P	0.18
Q	0.24
R	0.04

샘플 A부터 Q는 미국, 유럽 및 일본으로부터 시판되는 HSA 제품이다 (평균=0.49±0.20). 샘플 R은 본 발명에 따라 정제된 rHA이다.

C-말단의 분석

제조합 단백질의 품질 조절의 중요한 국면은 예측된 1차 구조의 배좌 및 안정성이다. 시판되는 HSA 및 N-말단 서열화 및 FAB 질량 분석에 의해 본 발명에 따라 정제된 rHA에서 C-말단 트립신 펩티드의 분석은 HSA에서 C-말단 류신이 부족한 끝이 잘린 펩티드의 존재를 나타낸다. Des-Leu C-말단 트립신 펩티드는 시판 HSA에서 약 5 내지 10 % (정량적이지 않음) 검출되지만, 본 발명의 rHA에서는 심지어 30°C에서 6개월 후에도 검출되지 않는다. Des-Leu 펩티드는 HSA에서 30°C에서 12주 후에도 검출되지 않고, 전체 길이 C-말단 펩티드에 대한 피크는 다른 샘플에 비하여 매우 감소되고 이것은 아마도 추가의 C-말단 분해가 수행되었음을 나타낸다.

이러한 결과는 본 발명에 따라 정제된 rHA가 안정한 전체 길이 카복시-말단을 지님을 나타내고, 반면에 시판원으로부터 전부터 이용가능한 HSA는 비교적 이질적인 것으로 보인다.

본 발명에 따라 제조된 rHA의 니켈 이온 함량

측정 기구:

SIMAA 6000, 퍼킨 엘머 로(爐): 2470°C, 232nm에서의 검출을 사용하는 CTT(항온 튜브).

보정:

방법은 3점 보정을 기초로 한다 (퍼킨 엘머사로부터의 18/30/60 µg/L 표준 용액). 보정 후, 정제수의 블랭크를 측정한다. 조절 대조군은 블랭크 후와 각 시험 시리즈의 종료시 측정한다 (Ni-표준 20µg/L, 퍼킨 엘머사로부터 증명된 표준).

샘플 제조:

각 분석은 또한 보정과 대조군 표준에 대해 유효한 중복 측정의 결과이다. 예상된 Ni 농도에 따라, 샘플을 보정 범위 내인 Ni-농도로 작업하기 위해서 적합한 비로 희석한다. 10% 이상의 단백질 농도를 갖는 샘플은 어떠한 경우에도 적어도 1:5 로 희석해야 한다. 희석은 정제수로 수행한다.

샘플 모세관을 위한 세정 용액: 0.5 ml 트리톤 X 100으로 혼합된 2L 정제수. 각각의 시험 시리즈는 시스템 적합성 시험을 포함한다.

요구사항:

1. 적어도 0.99000의 보정의 상관 계수. 그렇지 않다면, 보정은 한번 반복되어야 한다. 보정이 두번째에도 요구사항을 따르지 않을 경우, 여러 분석이 수행되어야 한다.

2. 30µg/L-표준으로 측정된 특징적인 질량은 이론치 20pg/0.0044A-s에 20% 이상 초과하지 않는다.

특징적인 질량 m_0 :

1 퍼센트의 흡수에 기여하는 분석물의 피코그램(pg)으로의 양. 1 퍼센트의 흡수는 0.0044A-s(암페어 초)에 해당한다.

용적 표준(mL) * 농도(mg/L) * 0.0044A-s

$$m_0 = \frac{\text{용적 표준(mL) * 농도(mg/L) * 0.0044A-s}}{\text{샘플 흡광도 * 블랭크 흡광도}}$$

3. 대조군 표준의 측정된 농도는 신뢰 범위(2s/3s 기준) 내 이어야 한다.

계산:

측정 기구는 하기 용어에 따라서 결과를 계산한다.

$$\text{결과}(\mu\text{g Ni/L}) = [A1/\text{경사} \pm A2/\text{경사}] : 2 * V$$

A: 흡광도

경사: 보정 곡선의 경사(선형 회귀)

V: 희석

변경자는 사용되지 않는다.

샘플	[니켈]/[rHA] (µg/g)	
	배치 1	배치 2
PBA 로드	0.73	0.74
PBA 관통유동물 및 세척물	0.41	0.43
SP-FF2 로드	0.06	0.06
SP-FF2 관통유동물 및 세척물	<0.03	<0.03
DE-FF2 관통유동물 및 세척물	0.14	0.28

배지 및 장쇄 지방산의 분석

본 발명에 따른 알부민 및 시판 HSA의 지방산 프로필이 C17:0 내부 표준을 사용하여 지방산의 산성 용매 추출 및 기체 크로마토그래피에 의해 분석된다. rHA 및 HSA에 대한 프로필은 현저한 차이를 나타내지만 어떠한 비정상 지방산도 본 방법에 의한 본 발명의 알부민에서는 검출되지 않는다. 예상된 바와 같이, 둘다 대량의 첨가된 안정화제인 옥탄산염 (C8:0)을 나타낸다. 이와는 달리, 시판되는 HSA는 압도적으로 C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 및 C18:2에 의해 특성화되고, 본 발명의 알부민은 주로 C10:0 및 C12:0, 종종 C14:0을 함유한다. 추가의 실험은 rHA 최종 산물 내의 C10:0 및 C12:0의 수준이 정제 공정 최종 단계에 사용되는 옥탄산염 중의 오염물질의 수준과 관계가 있음을 나타낸다.

바람직하게는, 총 C18 지방산의 수준은 1.0%(몰/몰)의 옥탄산염 수준을 초과하지 않고, 바람직하게는 0.5%의 수준을 초과하지 않는다. 또한, 본 발명의 알부민에서, C18:2, C18:3 및 C20 지방산의 수준은 일반적으로 검출불가능하다. 시판되는 HSA에서, 전형적으로 알부민 몰당 약 0.4몰의 C18 지방산일 수 있다. 본 발명의 산물에서, 전형적으로 알부민 몰당 C20 지방산은 검출되지 않고 약 0.02몰의 C18 지방산이 검출된다.

SDS 환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

이 분석은 WO 96/37515에 기재된 바와 같이 수행된다. 분석은 본 발명의 rHA가 환원제(β-머캅토에탄올)로 처리시 SDS 환원 폴리아크릴아미드 전기영동(PAGE)에서 단일 밴드로서 이동하여 단일 폴리펩티드 채로 이루어짐을 나타내고, 이는 단위체로서 존재하는 알부민의 비율이 적어도 99.9%임을 나타낸다.

겔 투과 고압 액체 크로마토그래피

25% w/v로 제형화된 본 발명에 따라 정제된 알부민 10mg/ml 용액 25µl를 쉬마즈사 LC6A HPLC 상의 TSK3000SWXL 컬럼에 주입하고 0.1% 이하의 중합체 알부민을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과는 상기의 제형이 정제된 알부민의 중합체/응집물 함량에 어떠한 영향도 미치지 않음을 나타내었다.

2차원 겔 전기영동

본 발명의 방법에 의해 제조된 알부민의 rHA 2µg을 밀리포어 인베스티게이터 시스템(Millipore Investigator system)을 사용하여 2-차원 전기영동에 투입한다. 1차원에서의 분리는 pH 3 내지 10 등전점 겔, 이어서 2차원에서 10% 폴리아크릴아미드/SDS 겔에서 수행된다. 쿠마시 블루로의 겔 착색시, 단지 하나의 얼룩이 보이고, 이는 단지 한 종류 단백질의 존재를 나타낸다.

만노실화 알부민 / Con A 분석

콘카나발린 A(Con A)는 α-D-만노피라노실, α-D-글루코피라노실 및 입체적으로 연관된 잔기를 함유하는 분자를 결합시킨다. Con A 분석시, 만노실화 알부민의 함량을 측정하기 위해서 재조합 인간 알부민(rHA) 및/또는 인간 혈청 알부민(HSA)의 Con A 세파로스(파마시아사, Cat. No. 17-0440-01) 친화성 크로마토그래피가 사용된다.

재조합 인간 알부민(rHA)을 145mM 염화나트륨으로, 그런 다음 Con A 희석 완충제(200mM 아세트산나트륨, 85mM 염화나트륨, 2mM 염화마그네슘, 2mM 염화망간, 2mM 염화칼슘 pH5.5)를 1:1로 사용하여 5%(w/v) rHA로 희석한다. 이어서, 100mg rHA를 평형화된 2mL Con A 세파로스 컬럼 상에 로딩한 다음, Con A 평형화 완충제(100mM 아세트산나트륨, 100mM 염화나트륨, 1mM 염화마그네슘, 1mM 염화망간, 1mM 염화칼슘 pH5.5)(5 x 4 mL)로 세척한다. 컬럼을 6mL Con A 용출 완충제(100mM 아세트산나트륨, 100mM 염화나트륨, 0.5M 메틸-α-D-만노피라노사이드 pH5.5)로 용출한다.

Con A 로드 중의 단위체 알부민(약 0.1 mg.mL⁻¹으로 희석) 및 용출물(순수물로 분석)을 0 내지 0.2 mg.mL⁻¹ rHA 표준 곡선을 사용하여 GP.HPLC에 의해 정량하고 용출물에서 회수된 Con A 결합 알부민 단위체를 로드의 퍼센티지로 표현한다.

표 6.

ConA-결합 rHA(로드 %)									
배치 1		배치 2		배치 3		배치 4		배치 5	
PBA FT&W	0.14	PBA FT&W	0.16	PBA FT&W	0.15	PBA FT&W	0.13	PBA FT&W	0.55
SP-FF2 FT&W	0.10	SP-FF2 FT&W	0.12	SP-FF2 FT&W	0.14	SP-FF2 FT&W	0.09	SP-FF2 FT&W	0.32
최종 산물	0.10	최종 산물	0.11	최종 산물	0.12	최종 산물	0.07	최종 산물	0.28
공정을 통한 ConA-결합 rHA의 제거. 배치 1 내지 4는 pmt1 돌연변이로부터 유도되는 반면, 배치 5는 비-돌연변이 균주로부터 유도된다. (FT&W = 관통유동물 및 세척물)									

Con A-결합 rHA는 전기분부 질량분석기에 의해서 추가로 분석된다(도 8). 이것은 Con A-결합 rHA 양의 감소 외에도 Con A-결합 rHA 변형 정도가 감소됨을 나타낸다.

색채의 분석

1cm 큐벳 중의 최종 산물의 5%(w/v) 용액의 흡광도가 350nm, 403nm 및 500nm에서 측정되고 알부민 g당 흡광도/파장 cm당 리터(예를 들어 ABS.L.g⁻¹.cm⁻¹)의 견지에서 계산된다. 본 발명의 알부민은 하기의 값을 갖는다:

파장 평균 흡광도 (n=4 배치)

(nm) (L.g⁻¹.cm⁻¹)

350 5.75x10⁻³

403 1.7x10⁻³

500 0.4x10⁻³

일반적으로, 본 발명의 알부민은 각각 상기 세 파장에서 8.0 x 10⁻³, 3.0 x 10⁻³ 및 0.75 x 10⁻³의 흡광도를 초과하지 않는다.

다수의 시판되는 HSA 제조물의 분석은 이들 파장에서 더 높은 흡광도를 나타낸다 (도 7 참조).

표 7.

샘플	A ₃₅₀	A ₄₀₃	A ₅₀₀
1	9.95 x 10 ⁻³	4.10 x 10 ⁻³	0.8 x 10 ⁻³
2	9.95 x 10 ⁻³	5.36 x 10 ⁻³	1.1 x 10 ⁻³
3	7.40 x 10 ⁻³	3.26 x 10 ⁻³	0.6 x 10 ⁻³
4	7.20 x 10 ⁻³	3.60 x 10 ⁻³	0.6 x 10 ⁻³
5	8.68 x 10 ⁻³	4.08 x 10 ⁻³	0.8 x 10 ⁻³
6	11.45 x 10 ⁻³	6.26 x 10 ⁻³	1.2 x 10 ⁻³
7	7.20 x 10 ⁻³	3.70 x 10 ⁻³	0.8 x 10 ⁻³
8	6.82 x 10 ⁻³	4.78 x 10 ⁻³	1.8 x 10 ⁻³
선형 기술 HSA 제조물의 흡광도(L.g ⁻¹ .cm ⁻¹)			

세포내독소

약물 제품의 용액은 자동 세포내독소 검출 시스템(예를 들어 LAL 5000E)을 사용하여 36.5 내지 37.5 °C의 온도에서 340nm에서 동력학적 탁도계 측정에 의해 리물러스(Limulus) 변형세포 용혈물을 사용하여 분석한다. 표준 곡선은 표준 세포내독소 제조물의 기지 농도로부터 제작되고, 음성 대조군 및 기지량의 표준 세포내독소로 스파이킹된 시험 물질 용액이 또한 분석에 포함된다. 반응 혼합물에 있어서의 탁도의 변화는 시간 및 로그-로그 회귀에 대해서 분석된다. 약물 제품내 세포내독소가 표준 곡선에 대해서 정량되고 세포내독소 스파이크의 회수가 확인된다. 어떠한 세포독소도 검출되지 않는다.

유리 티올

엘만의 시약인 5,5-디티오비스-(2-니트로벤조에이트)(DTNB)는 cys-SH(rHA의 경우, Cys-잔기 34)와 같은 유리 설피드릴 그룹을 검출하는 특정한 수단이다. 반응은 412nm에서 최대 흡광도를 갖는 5 티오-2-니트로벤조에이트 이온 TNB²⁻를 방출시킨다. 412nm에서의 흡광도의 증가분을 측정하고 412nm에서의 TNB²⁻의 몰 여기 계수로 나눔으로써, rHA의 유리 설피드릴 함량을 계산할 수 있다.

샘플	몰.몰 ⁻¹
A	0.82
B	0.77
C	0.77
D	0.85
E	0.90

발명의 효과

본 발명은 알부민을 보다 고순도로 효과적으로 정제할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

발효 배지중에서 알부민-암호화 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 사카로마이세스 세레비지애를 배양하는 것으로 얻어진 사카로마이세스 세레비지애 배양 배지로부터 유도된 알부민 용액을 정제하는 방법에 있어서, 상기 사카로마이세스 세레비지애는 배지중에 알부민을 발현하고 이것을 분비하며, 상기 방법은

(a) 센트레이트 조건화의 선택적 개시 단계;

(b) 알부민에 대하여 포지티브 방식으로 진행되는 양이온 교환 크로마토그래피에 이어서 알부민에 대하여 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피의 수행 단계;

(c) 알부민 산물의 선택적 멸균화 단계;

(d) 알부민 산물을 최종 용기로 배치시키는 단계를 포함하고, 여기서 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 얻은 알부민 용액은 최종 용기로 들어가기 전에 추가적인 크로마토그래피 정제를 진행하지 않는 것인 알부민의 정제방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 양이온 교환 단계는 양이온 교환기로서 고정화된 설포프로필 치환체를 포함하는 매트릭스를 이용하는 것인 방법.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 양이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 4.5 내지 5.0의 pH를 갖는 것인 방법.

청구항 4.

제 1항 내지 제 3항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 알부민 용액은 양이온 교환 매트릭스의 리터당 10 내지 50g 알부민으로, 보다 바람직하게는 양이온 교환 매트릭스의 리터당 40±10g 알부민으로 로딩되는 것인 방법.

청구항 5.

제 1항 내지 제 4항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 양이온 교환 단계 이전에 알부민 용액이 (i) pH-조절 공정; 또는 (ii) 옥탄산염 및/또는 기타 지방산의 첨가에 의한 조건화 공정중 하나 이상의 공정으로 진행되는 것인 방법.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 양이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액은 2 내지 10mM의 옥탄산염 이온 농도, 바람직하게는 5 내지 10mM의 옥탄산염 이온 농도를 갖는 것인 방법.

청구항 7.

제 1항 내지 제 6항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 포지티브 방식의 양이온 교환 단계 이전에, 알부민 용액이 옥탄산염의 첨가에 의해 2 내지 10mM의 최종 농도로 조건화되고, pH는 4.0 내지 5.0으로 조절되는 것인 방법.

청구항 8.

제 1항 내지 제 7항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 음이온 교환 단계는 음이온 교환기로서 고정화된 디알킬아미노알킬 치환체를 포함하는 매트릭스를 이용하는 것인 방법.

청구항 9.

제 1항 내지 제 8항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피가 진행되는 알부민 용액이 $4.0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이하의 전도도를 갖는 것인 방법.

청구항 10.

제 1항 내지 제 9항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 알부민 용액은 음이온 교환 매트릭스의 리터당 $30 \pm 10\text{g}$ 단위체 알부민으로 로딩되는 것인 방법.

청구항 11.

제 1항 내지 제 10항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 음이온 교환 단계 이전에, 알부민 용액이 희석되는 것인 방법.

청구항 12.

제 1항 내지 제 11항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 알부민은 50mM 이상, 바람직하게는 50 내지 200mM, 보다 바람직하게는 80 내지 150mM의 붕산염을 함유하는 완충제를 갖는 음이온 교환기로부터 용출되는 것인 방법.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 상기 알부민이 보다 농축된 사중붕산염 완충제로 용출되기 전에, 상기 음이온 교환기는 15 내지 25mM 사중붕산염 완충제를 포함하는 완충제로 세척되고, 음이온 교환기의 pH를 9.2 근방으로 올리는 것인 방법.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 보다 농축된 사중붕산염 완충액은 80 내지 150mM 사중붕산칼륨을 포함하고, 바람직하게는 110mM 사중붕산칼륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 15.

제 1항 내지 제 14항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스, 피치아 또는 클루이베로마이세스 속인 방법.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스 세레비지에인 방법.

청구항 17.

제 1항 내지 제 16항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 효모는 효모가 재조합적으로-발현된 알부민의 만노실화의 적어도 감소된 능력을 갖게 하는 유전적 변형을 갖는 것인 방법.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 상기 변형은 임의의 억제, 치환, 결실, 부가, 분열 및/또는 돌연변이 삽입을 포함하는 것인 방법.

청구항 19.

제 18항에 있어서, 상기 변형은 안정하게 물려받거나, 비-귀속적이거나 및/또는 비-누출적인 방법.

청구항 20.

제 17항 내지 제 19항중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 변형은 유전자의 암호화 영역 또는 유전자의 발현과 관련된 영역에 위치되는 것인 방법.

청구항 21.

제 20항에 있어서, 상기 유전자는 *PMT* 유전자이고, 바람직하게는 *PMT1* 유전자인 방법.

청구항 22.

발효 배지에서 알부민-암호화 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 효모를 배양하는 것으로 얻어진 효모 배양 배지로부터 유도된 알부민 용액을 정제하는 방법에 있어서, 상기 효모는 배지에서 알부민을 발현하고 이것을 분비하며, 상기 방법은

(a) pH가 4.0 내지 5.0이고, 옥탄산염 이온 농도가 2 내지 15mM이고, 바람직하게는 5 내지 10mM인 알부민 용액을 제조하기 위해 알부민 용액의 설프레이트 조건화 개시 단계;

(b) 알부민에 대하여 포지티브 방식으로 진행되며, 양이온 교환기로서 고정화된 셀포프로필 치환체를 포함하는 매트릭스를 이용하는 양이온 교환 크로마토그래피가 수행되는 단계;

(c) $4.0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이하의 전도도를 갖는 알부민 용액을 제공하기 위해 단계 (b)로부터 얻은 알부민 용액을 희석에 의해 조절하는 단계;

(d) 단계 (c)에 의해 제조된 알부민 용액을 알부민에 대하여 포지티브 방식으로 진행되는 음이온 교환 크로마토그래피로 처리하고, 여기서 음이온 교환 단계는 음이온 교환기로서 고정화된 디알킬아미노알킬 치환체를 포함하는 매트릭스를 이용하고, 음이온 교환기는 알부민이 80 내지 150mM의 사중붕산칼륨을 포함하는, 보다 바람직하게는 110mM 사중붕산칼륨을 포함하는 보다 농축화된 사중붕산염 완충제로 용출되기 전에, 12 내지 25mM의 사중붕산염 완충제를 포함하는 완충제로 세척되고, 음이온 교환기의 pH를 9.2 근방으로 올리는 단계;

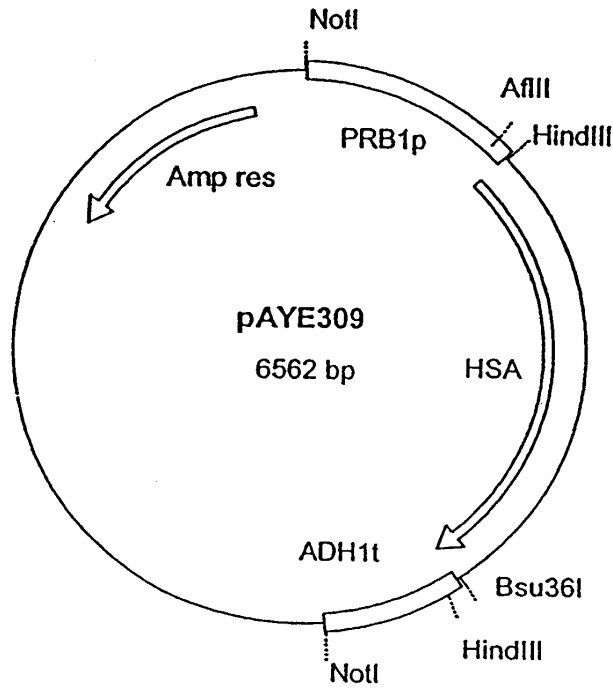
(e) 알부민 산물의 선택적 멸균화 단계; 및

(f) 상기 알부민 산물을 최종 용기로 배치하는 단계를 포함하고,

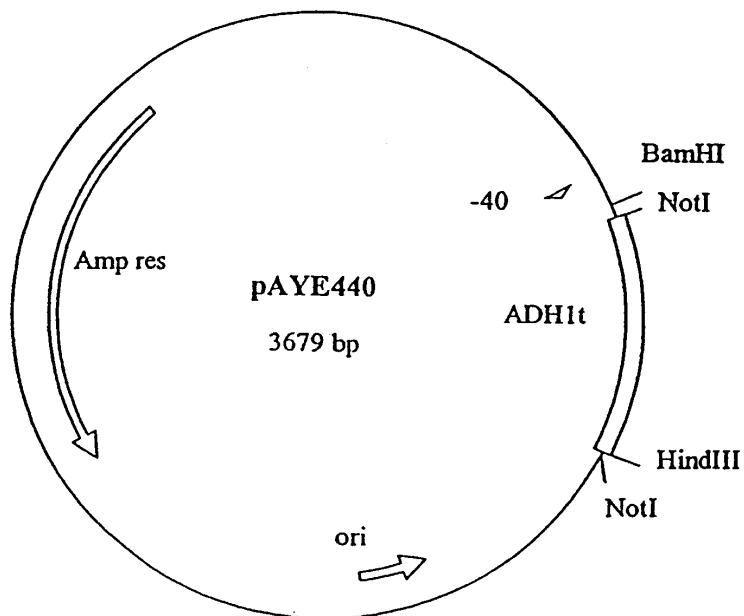
여기서, 사카로마이세스 세레비지애는 사카로마이세스 세레비지애가 재조합적으로-발현된 알부민의 만노실화의 적어도 감소된 능력을 갖도록 *PMT* 유전자, 바람직하게는 *PMT1* 유전자의 암호화 영역 또는 상기 유전자의 발현과 관련된 영역에 위치한 유전적 변형을 갖고, 음이온 교환 크로마토그래피 단계로부터 얻은 용액은 최종 용기로 들어가기 전에 추가의 크로마토그래피 정제가 진행되지 않는 것인 방법.

도면

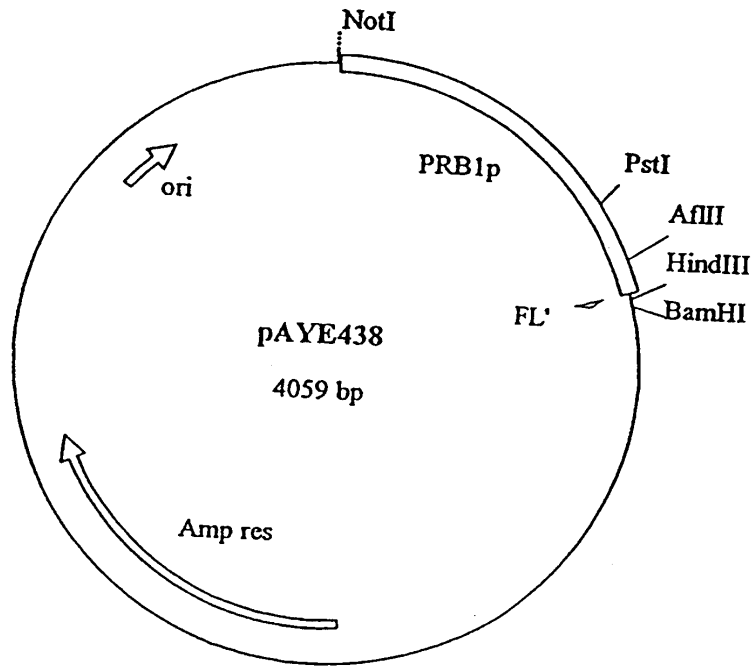
도면1



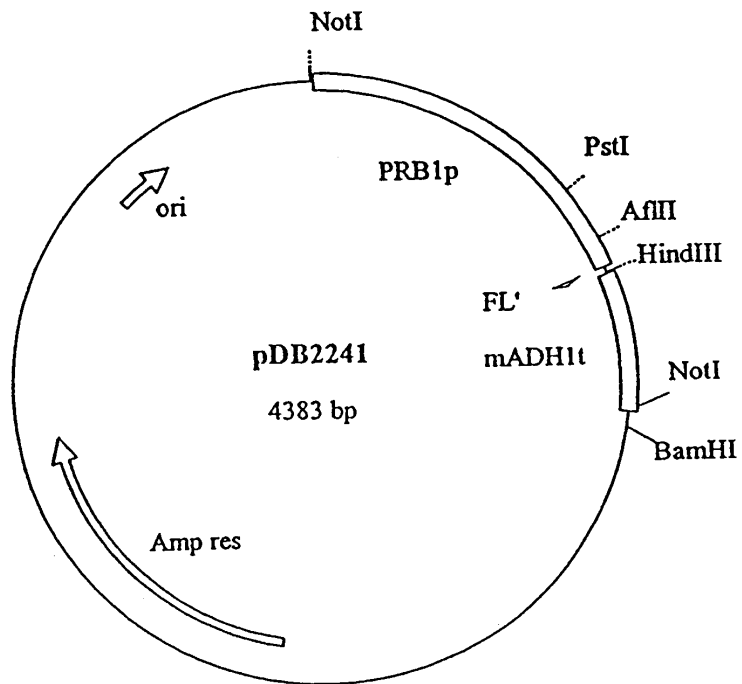
도면2



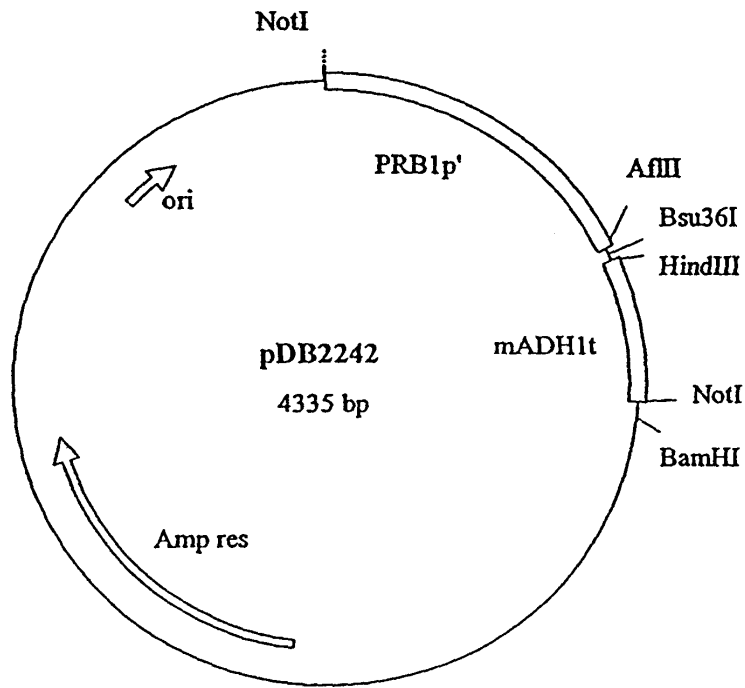
도면3



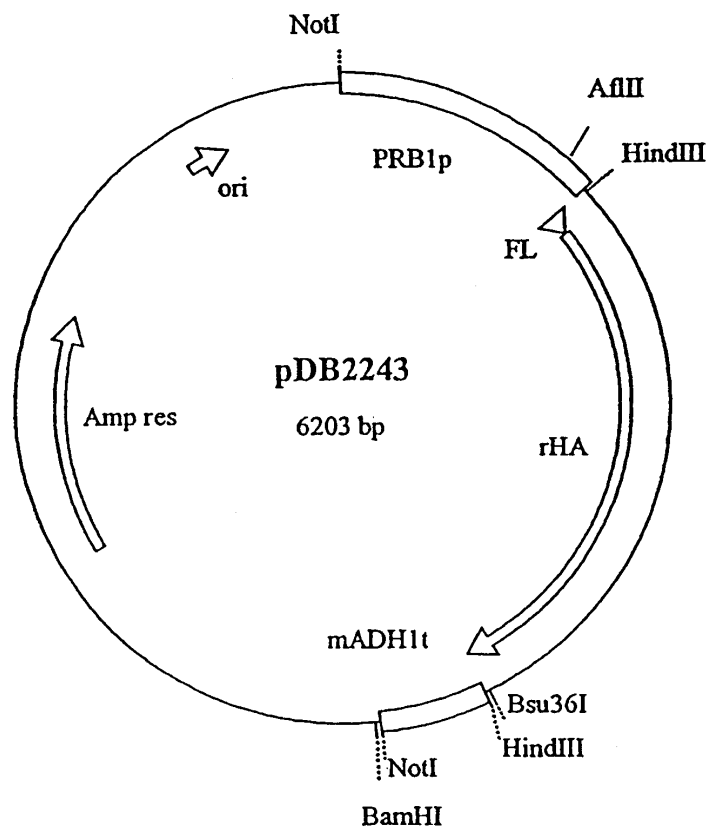
도면4



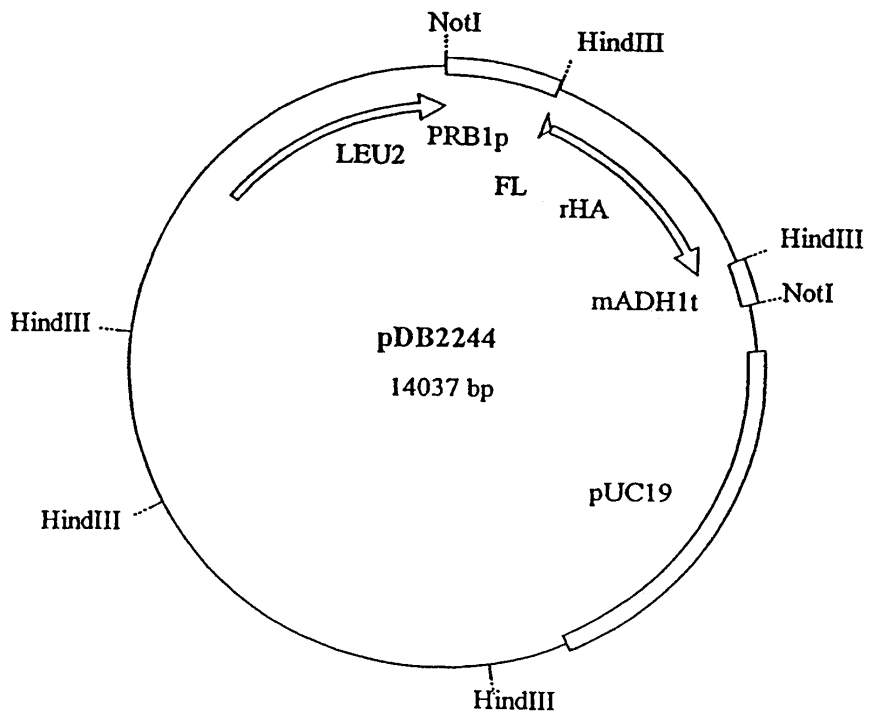
도면5



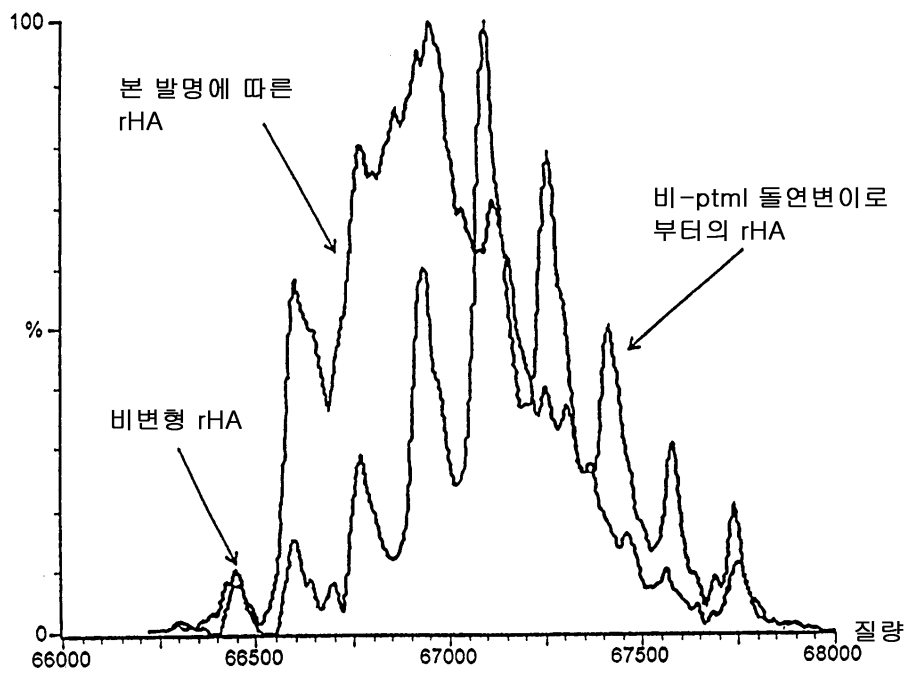
도면6



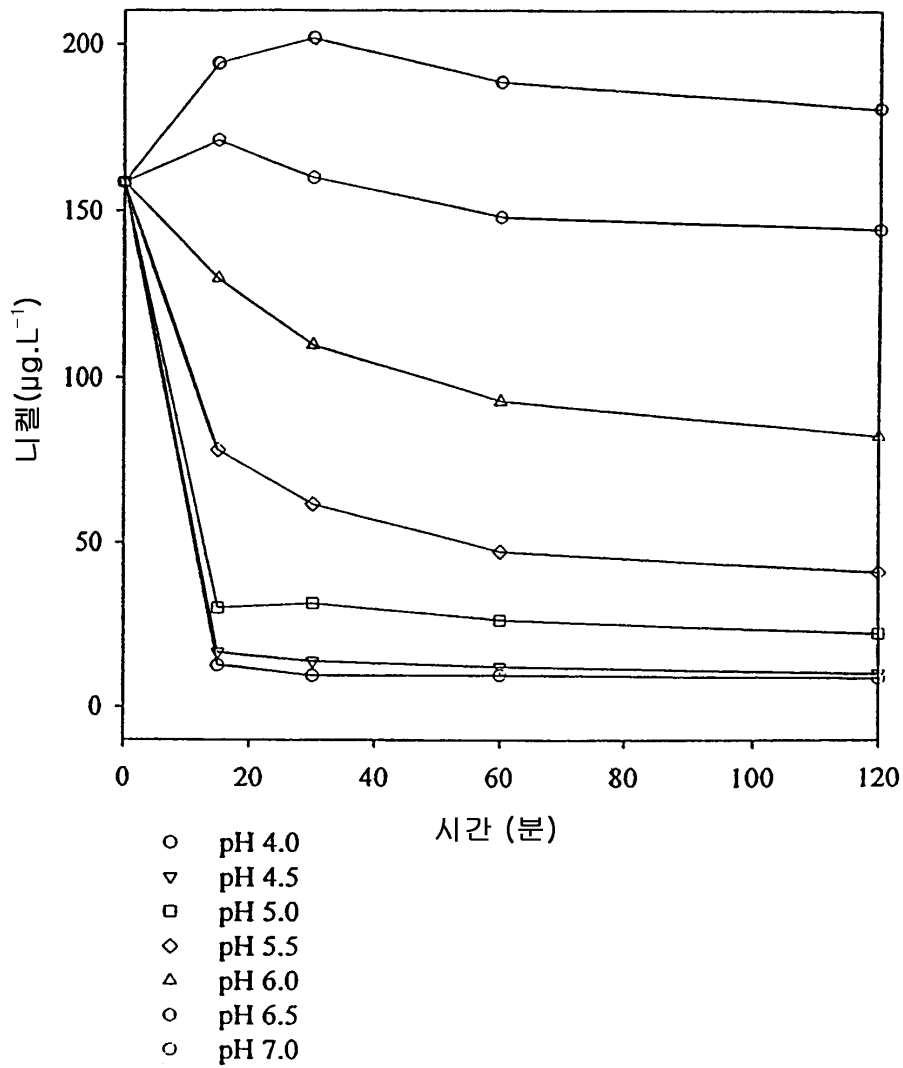
도면7



도면8



도면9



도면10

5'-GATTGGCAGAAGAGGTATCTGCTTATGGACATGAGGGGCTTTGGCGGT
 GATGCCAATGATGACTTTGTTGTGGAGATTGCCAAGGATCTTTCAACTAC
 TGAAGAAGCTAAGGAAAACGTTAGGGCCATTCAAACGTTTTTAGATTGA
 GACATGCGATGACTGGTTGTTACTTGTCTCCCACGAAGTCAAGCTTCCC
 AAGTGGGCATATGAGCAACAAGAGGTTACTTGTGCTACTCAAGGTATCAA
 ACCCTATCTTACTGGTACGTTGAGACCAACGAAAACCCATTCTTGGATAA
 AGAGGTTGATGAAATAGTTAGCTATCCTGTTCCGACTTTCTTTCAAAGGTT
 GCCGACTCACGCCAGAATGTGGAAGATCAACAAGGCTTACTGATCATATG
 CTATGAATCCAGTCCAGATCTTGG-3'

도면11

5'-GTGTTGCAGTTGTAGTCCCACCTGAGTATCTTGGATTCGTTGCATTGGT
 CCTTGGTCCATCGTCCTGCATAGATCAATGGGAGAATATCTTTGGAAGAT
 AGAAAGCGCAACGGCAAAAAAGAGAACGAATATGGAGTAAGACACAACC
 TGTTTGTTTTTGAAGACATAAGAGTGAATAATCTCAAACACATGTCCGAG
 AGCCAATATAACAAAGTACAATGATGGTAGATAGTGGTGCAAAAATAGCT
 GACGGGCCATAAGGGAAAGATGGCAAGTAATGCAGTACCCATCCTAGGA
 TGTAATGAAGCATTGAAACATTGAAGTTGAGCACAGTTGGGTCAACGCTG
 AACCCAAAACCTCTTTGCCTCTCAGAATAGAGAAACCAAAAAGACAGAG
 AACAAAGCATACTTGCGGTGACTGTCACCAAGTGACAGCATTTCCTATGAA
 ATAAATTG-3'

도면12

5'-TACGTTATGGATGTGCATCCACTTCCTGAAGCTTCTCATCGGCAACCTT
 TTGAATCTGCAATTTATTATCTTCATTGAAGGCAAGCTTGAACACTTTGAC
 GGTAGAAAGACGAGCGACAACCAAGAATTGCCCGTCAGAAGTGAGATCA
 CAATGGGTGATGTTGTCCTCATCGCTTAGGACCAGTTTGGCTAATAGTTTT
 CTGCCTTGCTGAGGAAGGACTTTCATACTTTAATGGTTTGGTCTTGCCCA
 TGATCACCAGCTTCTGGGATTTATTGAAAAGGACAGTTTGATCGTTTCAG
 GGAATACTGACAGTCTTTGAATTCGCAGTCTTGAACGATTGAGCTTAG
 AAACGGCTATGTCTGACAATGATGCTTCAGATAGTACAGATCGAGGTCCT
 GGATTGG-3'

도면13

5'-GCGCAGGTGACTTCTTGCTGGAAAATGTGCTACAAGGAGGTAAAGACC
 GTGTCATTGAGGGCCTGGTTTGGTCTACTTATGACGATTACCCTCGTCGTC
 TGTTTTCCATTGGTGGTTCGACTGTGATGACCGAATGGGATATTGCTACCG
 GTTTGCCCTTAAACAACACTACGATTGTAACCTCCGGTATCACCTGGAGTATC
 AGCATCAACACAACACTCAGGATAAGATATGCGTAGGCTGTGACAATGGAA
 CTGTAGTCGTTATTGACATAAGTGGTGGACCGGGATCTCTAGTATAAGAA
 AATTGTATCCGGATGTTCTGATGGCCGATAAGGATATGGAATACGAGGAA
 G-3'

도면14

5'-GTATTGCAGTTGTAGTCCCAGAATGAATTGCTCTTTTAATTGTTCTTTTT
GGCTGGAGAAGTGCTCGTATGTCTTGATCGATGAGATACAGCTGAGATTT
AAGTTGTTCTAGGTTGATAGTTGAATGTTTCAGAGTTGAGGGTTCCATGG
TCAAGTATAGGAGGATCCAGCTCATCTAGGGAGTGGAATTGAGTACTGAC
ACTCATTACTGGAAGAAGTAGAAAGAGTACTGGTTTTGTGGTAAAGTTCCA
TATTTTCAGATGTCTGTAGATGGTCGAGCGAGGTGAACATTTTCATAGGAGA
TTTCAGAGGAGTTGGACTTTGAAAATGGTGACAAAAGGTAGACAGAAGA
AAGGTTAGAGAGTGCAGTGATTCAAGGTGGTTGCAGAAGTCC-3'

도면15

5'-TTGAGACATGCTATGACGGGTCAAGTTTTTAGATAAAAGTTGGACTCTTG
GGCATGAGCGCATCCTCACATCGGCCATAGCAGATAAACGGTAGCAGTTT
TTTTGAACGAGGCTGTAAGATAGGGGAATCTCCGTTTTAGGCTTTTCAGTG
ACTTGTTGCATCGCAATGGGTAGATATGTTCCAGTGGCAAAAGCTCTG
GATGCTATGAAACTGACCAAATGTGGATTAGAACTTGGAGTCTAACTATT
TGACTCTAAGAATTTCCAATTTTTGCCTTCTACTAGCCATTTTCTACTTTC
ATGGGACATCATCACTTATTTGCTCCCAACCTGTCAAATACCCACCAAT
GTTCAAGGTCG-3'

도면16

5'-AGATTGAGACATGCTATGACGGGTTGTTACTTGTCTCCCGGAAGTCA
AGCTTCCAAGTGGGCATATGAGCAACAAGAGGTTACTTGTGCTACTCAA
GGGTATCAAACCACTATCTTACTGGTACGTTGAGACCAACGAAAACCCAT
TCTTGGATAAAGAGGTTGATGAAATAGTTAGCTATCCTGTTCCGACTTTCT
TTCAAAAGGTTGCCGAGCTACACGCCAGAATGTGGAAGATCAACAAGGG
CTTAACTGATCATCATGTCTATGAATCCAGTCCAGATTCTTGGCCCTTCT
GTCAGAGGTATAAGCTACTGGTCAAAAAATCACTCCAAATTATTTTCATAG
GTAATGCTGCACTTGGTGGACAGTCACCGAAGTTTG-3'

도면17

5'-GTGTTGCAGTTGTAGTCCCACCTTGAGTATCTTGGATTCGTTGCATTGGT
 CCTTGGTCCATCGTCCTGCATAGATCAATGGGAGAATATCTTTGGAAGAA
 GAAAGCGCAACGGCAAAAAAGANAACGAATATGGAGTAAGACACAACCT
 GTTTGTTTTTTGAAGACATAAGAGTGAATAATCTCAAACACATGTCCGAGA
 GCCAATATACCAAAGTACAATGATGGTAGATAGTGGGTGCAAAAATAGCT
 GACGGGCCATAAGGAAAGATGGCAAGTAATGCAGTACCCATCCTAGGAT
 GTAATGAAGCATTGTAACATTGAAGTTGAACACAGTTGGGTCAACGCTGA
 ACCCAAACCTCTTTGCCATCTCAGAATAGAGAAAACCAAAGACAGA
 GAACAAAGCA-3'

<110> Delta Biotechnology Limited

<120> Process for Purifying an Albumin Solution

<130> DELBE/P22390KRdiv1

<150> GB9902000.0

<151> 1999-01-30

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 423

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1
 gattggcaga agaggtatct gcttatggac atgaggggct ttggcgggta tgccaatgat 60
 gactttgttg tggagattgc caaggatctt tcaactactg aagaagctaa ggaaaacgtt 120
 agggccattc aaactgtttt tagattgaga catgcatga ctggttgta cttgttctcc 180
 cacgaagtca agcttcccaa gtgggcatat gagcaacaag aggttacttg tgctactcaa 240
 ggtatcaaac cctatcttac tggtagcttg agaccaacga aaaccattc ttggataaag 300
 aggttgatga aatagttagc tatcctgttc cgactttctt tcaaaggttg ccgactcacg 360
 ccagaatgtg gaagatcaac aaggcttact gatcatatgc tatgaatcca gtccagatct 420
 tgg 423

<210> 2

<211> 454

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

gtgttgcaagt ttagtccca cttgagtatc ttggattcgt tgcattggtc cttggtccat 60
 cgtcctgcat agatcaatgg gagaatatct ttggaagata gaaagcgcaa cggcaaaaaa 120
 gagaacgaat atggagtaag acacaacctg tttgtttttg aagacataag agtgaataat 180
 ctcaaacaca tgtccgagag ccaatatacc aaagtacaat gatggtagat agtggtgcaa 240
 aatagctga cgggccataa gggaaagatg gcaagtaatg cagtacccat cctaggatgt 300
 aatgaagcat ttgaacattg aagttgagca cagttggggtc aacgctgaac ccaaacctc 360
 tttgcctctc agaatagaga aacaaaaaag acagagaaca aagcatactt gcggtgactg 420
 tcaccaagtg acagcattcc tatgaaataa attg 454

<210> 3
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 3
 tacgttatgg atgtgcatcc acttctgaa gcttctcadc ggcaaccttt tgaatctgca 60
 atttattatc ttcattgaag gcaagcttga acactttgac ggtagaaaga cgagcgacaa 120
 ccaagaattg cccgtcagaa gtgagatcac aatgggtgat gttgtcctca tcgcttagga 180
 ccagtttggc taatagtttt ctgccttgct gaggaaggac tttccatact ttaatggttt 240
 ggtcttgccc atgatcacca gcttctggga tttattgaaa aggacagttt gatcgtttca 300
 ggaataactg acagtctttg aatttcgcag tcttgaaacg attcagctta gaaacggcta 360
 tgtctgacaa tgatgcttca gatagtacag atcgagggtcc tggattgg 408

<210> 4
 <211> 350
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4
 gcgcaggtga cttcttgctg gaaaatgtgc tacaaggagg taaagaccgt gtcattgagg 60
 gcctggtttg gtctacttat gacgattacc ctogtctct gttttccatt ggtggttcga 120
 ctgtgatgac cgaatgggat attgctaccg gtttgccctt aaacaactac gattgtaact 180
 ccggtatcac ctggagtatc agcatcaaca caactcagga taagatatgc gtaggctgtg 240
 acaatggaac ttagtctggt attgacataa gtggtggacc gggatctcta gtataagaaa 300
 attgtatccg gatgttctga tggccgataa ggatatggaa tacgaggaag 350

<210> 5

<211> 391
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 5
 gtattgcagt tgtagtccca gaatgaattg ctcttttaat tgttcttttt ggctggagaa 60
 gtgctcgtat gtcttgatcg atgagataca gctgagattt aagttgttct aggttgatag 120
 ttgaatgttc agagttgagg ggttccatgg tcaagtatag gaggatccag ctcatctagg 180
 gagtggaaatt gagtactgac actcattact ggaagaagta gaaagagtac tggttttgtg 240
 gtaagttcca tatttcagat gtctgtagat ggtcgagcga ggtgaacatt tcataggaga 300
 tttcagagga gttggacttt gaaaatgggtg acaaaaggta gacagaagaa aggttagaga 360
 gtgcagtgat tcaaggtggt tgcagaagtc c 391

<210> 6
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 6
 ttgagacatg ctatgacggg tcaagttttt agataaagtt ggactcttgg gcatgagcgc 60
 atcctcacat cggccatagc agataaacgg tagcagtttt tttgaacgag gctgtaagat 120
 aggggaatct ccgttttagg ctttcagtga cttgttgcac cgcaatgggt agatatgttc 180
 accagtggca aaagctctgg atgctatgaa actgaccaa tgtggattag aacttgagat 240
 ctaactattt gactctaaga atttccaatt tttgccttct actagccatt ttctactttc 300
 atgggacatc atcaattatt tgctcccaa cctgtcaaat accaccaat gttcaaggtc 360
 g 361

<210> 7
 <211> 386
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7
 agattgagac atgctatgac gggttgttac ttgttctccc gcgaagtcaa gttcccaag 60
 tgggcatatg agcaacaaga ggttacttgt gctactcaag ggtatcaaac cactatctta 120
 ctggtacgtt gagaccaacg aaaaccatt cttggataaa gaggttgatg aaatagttag 180
 ctatcctgtt ccgactttct ttcaaaagggt tgccgagcta cacgccagaa tgtggaagat 240
 caacaagggc ttaactgatc atcatgtcta tgaatccagt ccagattctt ggccttcct 300
 gtcagaggta taagctactg gtcaaaaaat cactccaaat tatttcatag gtaatgctgc 360
 acttgggtga cagtcaccga agtttg 386

<210> 8
 <211> 406
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces castellii*

<400> 8
 gtggttcagc ttagtccca cttgagtatc ttggattcgt tgcattggtc cttggtccat 60
 cgtcctgcat agatcaatgg gagaatatct ttggaagaag aaagcgcaac ggcaaaaaag 120
 anaacgaata tggagtaaga cacaacctgt ttgtttttga agacataaga gtgaataatc 180
 tcaaacacat gtccgagagc caatatacca aagtacaatg atggtagata gtgggtgcaa 240
 aatagctga cgggccataa ggaaagatgg caagtaatgc agtaccatc ctaggatgta 300
 atgaagcatt tgaacattga agttgaacac agttgggtca acgctgaacc caaacctct 360
 ttgcatctc agaatagaga aaaccaaaaa gacagagaac aaagca 406