



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월10일

(11) 등록번호 10-1492011

(24) 등록일자 2015년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/38 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7012020(분할)

(22) 출원일자(국제) 2009년02월05일

심사청구일자 2012년05월09일

(85) 번역문제출일자 2012년05월09일

(65) 공개번호 10-2012-0066068

(43) 공개일자 2012년06월21일

(62) 원출원 특허 10-2010-7019501

원출원일자(국제) 2009년02월05일

심사청구일자 2010년09월02일

(86) 국제출원번호 PCT/IN2009/000078

(87) 국제공개번호 WO 2009/113099

국제공개일자 2009년09월17일

(30) 우선권주장

00086/CHE/2009 2009년01월12일 인도(IN)

00310/CHE/2008 2008년02월06일 인도(IN)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004039996 A1

Journal of Bioscience and Bioengineering,
vol. 89, no. 3, pp. 236-240, 2000.

Journal of Industrial Microbiology and
Biotechnology, vol. 18, no. 6, pp. 360-363,
1997.

EP1323831 A

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김정태

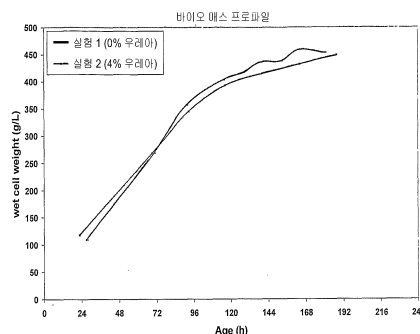
(54) 발명의 명칭 발효 배지 및 이의 방법

(57) 요약

본 발명은, 미생물을 사용하여 발효(fermentation)를 통하여 포스페이트 업테이크(phosphate uptake)를 증가시킴으로써 재조합 단백질, 이들의 유도체(derivatives) 또는 이들의 아날로그(analogs) 및 제2 대사체(secondary metabolites)를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로서, 상기 배지는 우레아의 잔류 농도(residual

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



concentration)가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함하며, 본 발명은 또한, 미생물을 사용한 발효를 통하여 포스페이트 업테이크를 증가시킴으로써 제조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그 및 제2 대사체의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 배지는, 이.콜라이(E.coli), 스트렙토마이세스 스피시스(Streptomyces sp), 아스퍼길러스 스피시스(Aspergillus sp), 리조푸스 스피시스(Rhizopus sp), 페닐리움 스피시스(Penillium sp) 및 리조뮤코르 스피시스(Rhizomucor sp)와 같은 미생물을 사용하여, 증진된 바이오컨버전 비율(enhanced bioconversion rates) 및 G-CSF, 스트렙토키나아제(streptokinase) 및 프라바스타틴(pravastatin)과 같은 펩티드, 및 리파아제와 같은 효소를 획득하기 위해 우레아의 잔류 농도가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함한다.

(72) 발명자

가르그, 사우랍

인도 우타란찰 248 001 데라던, 차크라타 로드 스트리트 10 아시르바드 엔클레이브 15

가르그, 메이안크, 쿠마르

인도 프라데시 250 401 미루트 어터 마와나 디스트 모. 티아이 1093

조시, 술렉카

인도 카나타카 560 010 방갈로레 라자지나가르 디블록 세컨드 스테이지 퍼스트 메인 653/20

쿠마르, 치트날리, 라메고우다, 나빈

인도 방갈로레 560 054마티케르 에이치엠티 레이아웃 세컨드 크로스 108

쿠마르, 비말

인도 파르나 805 015 풀와리오 샤리프 프르넨두 나그 에이3/15 미스터 나젠트라 프라사드 신

고엘, 아누주

인도 카르나타카 560 078 방갈로레 제이피 나가르 퍼스트 페이스 29th 메인 10th 크로스 72

이페르, 하리시

인도 카르나타카 560 043 방갈로레 서드 블록 에이 치알비알 서드 메인 로드 5씨-221

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

G-CSF, 스트렙토키나아제 및 리파제, 또는 제2 대사체 프라바스타틴을 포함하는 균으로부터 선택된 재조합 단백질의 제조 방법으로서,

상기 방법은 배지에서 미생물(microorganisms)을 사용하여 발효를 통하여 포스페이트 업테이크(phosphate uptake)를 증가시키는 단계를 포함하고,

상기 배지는 우레아의 연속적인 공급에 의해 우레아의 잔류 농도가 0.5 g/L 내지 3 g/L 의 범위로 유지되는 것을 포함하는, 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 재조합 단백질의 최대 프로덕트 역가(maximum product titre)가 0.5 g/L 초과로 얻어지는, 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 방법은 컴팩틴(compactin)의 프라바스타틴(pravastatin)으로의 바이오컨버전(bioconversion)이 스트렙토마이세스 배양을 사용하여 적어도 35 % 로 발효되는, 제조 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 우레아는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpyrideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합을 포함하는 균으로부터 선택된 것이고, 액체, 스프레이(spray), 분말(powder) 또는 펠렛 형태(pellet form)로 첨가되는, 제조 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제6항에 있어서,

상기 미생물은 이.콜라이(*E.coli*), 피키아 스피시스(*Pichia* sp.), 스트렙토마이세스 스피시스(*Streptomyces* sp), 아스퍼길러스 스피시스(*Aspergillus* sp), 리조퍼스 스피시스(*Rhizopus* sp), 페닐리엄 스피시스(*Penillium* sp) 및 리조뮤코르 스피시스(*Rhizomucor* sp)를 포함하는 군으로부터 선택되는, 제조 방법.

청구항 15

미생물(microorganisms)을 사용하여 발효를 통하여 포스페이트 업테이크(phosphate uptake)를 증가시킴으로써, 제6항의 방법에 의해 수득된 G-CSF, 스트렙토키나아제(streptokinase) 및 리파제 또는 제2 대사체 프라바스타틴(secondary metabolite pravastatin)을 포함하는 군으로부터 선택된 재조합 단백질을 제조하기 위한 발효 배지로서,

상기 배지는 우레아의 잔류 농도가 0.5 g/L 내지 3 g/L 의 범위로 유지되는 것을 포함하는, 발효 배지.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 재조합 단백질의 최대 프로덕트 역가(maximum product titre)가 0.5 g/L 초과로 얻어지는, 발효 배지.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 우레아는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아 (isopropylpyrideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합(combination)을 포함하는 군으로부터 선택된 것이고, 액체, 스프레이(spray), 분말(powder) 또는 펠렛 형태(pellet form)로 첨가되는, 발효 배지.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 미생물은 이.콜라이(*E.coli*), 피키아 스피시스(*Pichia* sp.), 스트렙토마이세스 스피시스(*Streptomyces* sp), 아스퍼길러스 스피시스(*Aspergillus* sp), 리조퍼스 스피시스(*Rhizopus* sp), 페닐리엄 스피시스(*Penillium* sp) 및 리조뮤코르 스피시스(*Rhizomucor* sp)를 포함하는 군으로부터 선택되는, 발효 배지.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 우레아 또는 이들의 유도체, 카바메이트(carbamates), 카르보디이미드(carbodiimides) 및 티오카바마이드(thiocarbamides)와 같은 탄산 아마이드(carbonic acid amides)의, 향상된 바이오컨버전 속도(enhanced bioconversion rates)를 달성하는 재조합 단백질의 제조용 발효 배지에 있어서의 질소 보충원으로서의 용도에 관한 것이며, 피키아(Pichia)와 같은 메탄올 유도성 진균 발현 시스템(methanol inducible fungal expression systems)을 사용하는 인슐린(insulin) 및 인슐린 아날로그(insulin analogues), 엑센딘(exendin) 및 리파제와 같은 효소(enzymes such as lipase)와 같은 펩타이드에 관한 것이다. 본 발명의 특이한 관점은, 즉각적인 발효 방법(improvised fermentation process)에 관한 것으로, 이는 짧은 제조 기간 동안 높은 프로덕트 수율을 나타내는 최적화된 영양학적 배지 파라미터를 갖는다. 본 발명의 원칙은, 적합한 발현 미생물을 통하여 단백질 및 제2 대사체를 폭넓은 범위로 제조하기 위하여 적용될 수 있다.

배경 기술

[0002]

피키아 파스토리스(Pichia pastoris)와 같은 이스트 기반의 발현 시스템(Yeast based expression systems)이 재조합 단백질을 발현하는데 일반적으로 사용된다[Cregg, J. M. et al., in Dev. Ind. Microbiol. 29:33-41; 1988]. 상기 피키아 파스토리스 발현 시스템(Pichia pastoris expression system)은 메탄올-유도 알콜 옥시다제 프로모터(methanol-induced alcohol oxidase (AOX1) promoter)를 사용하는데, 이는 알콜 옥시다제를 발현하기 위하여 코드화된 유전자를 제어하고, 상기 효소는 메탄올의 대사에 있어서 제1 단계를 촉매화한다[Cregg J M. et al. in Bio/Technology 11: 905-910; 1993]. 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)는 고 발현 레벨(high expression levels)의 포텐셜(potential)이 있고, 세포외 단백질의 효율적인 분비(efficient secretion of extracellular protein)를 가능하게 하며, 글리코실레이션(glycosylation)과 같은 번역 후 변형(post-translational modifications)이 가능하고, 바이오리액터 배양(bioreactor cultures)에 있어서 최소한의 배지에 높은 세포 밀도로의 성장을 가능하게 한다.

[0003]

피키아 파스토리스(Pichia pastoris)를 사용하는 페드 배치 발효 방법(Fed batch fermentation process)은 인비트로젠 사(Invitrogen Co. (San Diego, CA))의 "Pichia fermentation Process Guidelines"에 기재되어 있으며, 본 명세서에서는 대조(control)로 언급된다. 재조합 단백질의 제조에 있어서, 형질전환된 피키아 파스토리스(transformed Pichia pastoris)는, 탄소원으로 글리세롤 상에서, 바람직한 높은 세포 밀도의 바이오매스(desired high cell density biomass)로 성장한다. 제조 페이스(Production phase)는 메탄올을 공급함으로써 시작되는데, 상기 메탄올은 인두서(inducer)로서 작용하고, 배양에 있어서 유일한 탄소원이 된다. 바이오매스 생성(biomass generation) 및 제조 페이스(production phase)가 이루어지는 동안, 암모니아는 질소원으로서 작용하면서 pH를 조절하는데 사용된다.

[0004]

비록 효소 발현 시스템(Yeast Expression Systems)에 의한 다양한 장점이 있더라도, 바이오리액터 중에서 효율적이면서 최대의 재조합 단백질 제조를 위한 영양학적으로 영향을 주는 물리-화학적 환경을 최적화할 필요가 여전히 있다. 높은 특이적 생산성을 달성하는 것이 매우 바람직하다. 최초의 배지 조성(initial media composition), 메탄올 공급 전략(methanol feeding strategy) 및 공정 물리화학적 파라미터(process physicochemical parameters)의 최적화를 통하여 획득하는 것이 가능하다. 암모늄 설페이트(ammonium sulfate), 암모늄 포스페이트(ammonium phosphate), 디 암모늄 포스페이트(di ammonium phosphate), 포타슘 나이트레이트(potassium nitrate), 우레아(urea), 콘 스틱 리커(corn steep liquor), 소야 빈 밀(soya bean meal), 코튼 시드 밀(cotton seed meal), 케인(cane) 및 비트 몰라세즈(beet molasses), 펩톤(peptones), 밀 하이드롤라이세이트(meal hydrolysates) 등이 박테리아, 효모 및 진균 성장에 있어서 질소원으로 사용될 수 있는 것이 보고되고 있다. 미생물의 '성장'을 위한 상이한 탄소원 및 질소원의 사용은 공지 기술이다.

- [0005] 그러나, 재조합 단백질, 펩타이드 및 효소의 효율적인 제조를 위한, 특별히정의된 탄소 및 질소원의 최적의 조합은 공지 기술에 개시된 바 없다. 예컨대 WO/2007/005646 에는 에탄올 제조가 개시되어 있는데, 이는 복합 카보하이드레이트(complex carbohydrates) 뿐만 아니라 콘 스틱 리커(corn steep liquor), 콘 추출물(corn extract), 이스트 오토라이세이트(yeast autolysate) 및 우레아(urea)를 포함하는 복합 성장 배지(complex growth medium) 상에 재조합 효모를 배양(cultivating)하는 방법이다. 또한, 상기 방법은 재조합 단백질의 제조에 있어서 본 발명과는 달리, 성장 또는 제조를 위하여 메탄올 유도성 시스템(methanol inducible machinery)을 사용하지 않는다. 유사하게, 미국 특허 제 4,288,554 호에는, 다른 질소원과 베이스 염 배지의 조합으로 우레아를 사용하는 비 GMO 칸디다 종(non GMO Candida species)의 단순한 성장을 위한 연속 발효 공정(continuous fermentation process)이 개시되어 있다. 상기 문헌에는, 사람 인슐린 및 이들의 아날로그 또는 리파제 등의 효소와 같은 재조합 단백질 및 펩타이드의 효율적인 제조를 위하여 메탄올 유도성 GMO 피키아 파스토리스(methanol inducible GMO Pichia pastoris)를 사용하면서, 발효 공정(배치, 공급 배치, 연속(batch, fed batch, continuous)) 동안 우레아를 사용할 수 있는 것에 대해서는 전혀 개시된 바 없다.
- [0006] 특정 발효 배지(defined fermentation medium)의 사용은 높은 제품(higher product), 생산성(productivity) 및 제조 시간의 절약(lesser production time)을 가능하게 하는데, 상기 특정 발효 배지는 우레아 가수분해(urea hydrolysis)로부터 생성된 우레아의 잔류 농도뿐만 아니라 암모니아의 잔류 농도의 관점에서, 풍부하고(rich) 가용성인(readily soluble) 우레아와 같은 질소원의 첨가를 최적화된 농도로 제어한 배지이다.
- [0007] E. coli를 사용한 재조합 단백질의 제조는 수 년 전부터 알려져 있었으며, 발현 시스템은 명확하게 규명된 상태이다. E. coli 기본 발현 시스템(Ecoli based expression system)은 GCSF, HGH, 스트렙토키나아제(Streptokinase) 및 다른 유사한 생물학적 프리덕트(many other similar biological products)와 같은 분자들의 제조에 있어서 폭 넓게 사용되어 왔다. 재조합 단백질의 제조에 있어서, 형질전환된 E. coli(transformed E.coli)는 탄소원으로 덱스트로스(dextrose) 상에서 목적하는 높은 세포 밀도의 바이오매스(desired high cell density biomass)로 성장한다. 제조 페이스(Production phase)는 필요한 인두서(required inducer)를 사용하여 유도됨으로써 초회화되고, 배지는 발효가 끝날 때까지 영양분을 최소한으로 공급함으로써 유지된다.
- [0008] 진균 배지(Fungal cultures)는 효소 및 다른 유용한 분자들(other commodity molecules)과 같은 가치 있는 바이오-엔터티의 제조를 위하여 사용되어 왔다. 리조퍼스(Rhizopus), 아스페르길러스(Aspergillus), 페니실린(Penicillium) 등과 같은 진균 배지는 리파제(lipases), 아밀라제(amylases), 덱스트라나제(dextranases) 등과 같은 넓은 범위의 다양한 효소들의 제조를 위한 전통적인 발효에 사용되어 왔으며, 이들은 식품, 섬유, 가죽 및 다른 산업에 사용되어 왔다. 항생 프리덕트(antibiotics production)에 워크-호스(work-horses)로 알려져 있는 악티노마이세트(Actinomycetes)는 인류에 유용한 제2 대사체의 제조에 광범위하게 사용되어 왔다. 진균(fungi) 및 악티노마이세트(actinomycetes)의 핵심 성질 중 하나는, 수산화(hydroxylation), 에스테르화(esterification)와 같은 "바이오컨버전(bioconversion)"에 있어서의 이들의 성질이다. 주요한 장점은 바이오컨버전은 특정한 타겟을 갖고 비교적 높은 순도의 프리덕트를 수득할 수 있다는 것이다. 전형적인 예는 킴팩틴의 프라바스타틴으로의 전환이다.
- [0009] 당업계에서 알려진 방법적 개선은, 스티어링(stirring) 또는 산소 공급(supplying with oxygen)과 같은 발효 기술과 관련된 방법을 포함하거나, 또는 발효, 다운-스트림 프로세싱 변화(down-stream processing changes) 또는 미생물 그 자체의 고유의 성질과 관련된 변화(changes related to the intrinsic properties of the microorganism itself) 등이 일어나는 동안 당 농도의 변화와 같은 영양 배지의 조성과의 관련된 수정(modification)과 관련된 방법을 포함한다.
- [0010] 우레아와 같이 특정한 풍부하고 가용성인 질소원의 첨가를 제어하는 것으로 특징지워지는 발효 배지의 사용은, 높은 생산성 및/또는 바이오컨버전의 높은 속도 및 제조 시간의 절감을 가능하게 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 주 목적은 메탄올 유도성 진균 종(methanol inducible fungal species)을 사용하여 발효함으로써 재조합 단백질을, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그를 제조할 수 있는 발효 배지를 수득하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물(microorganisms)을 사용하여 발효함으로써 재조합 단백질을, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그를 제조할 수 있는 발효 배지를 수득하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물을 사용하여 발효함으로써 제2 대사체를 제조할 수 있는 발효 배지를 수득하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 재조합 또는 비 재조합 단백질 프리덕트, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 제2 대사체의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은, 키프렉틴의 프라바스타틴으로의 바이오컨버전 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은, 재조합 단백질 프리덕트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 따라서, 본 발명은, 미생물(microorganisms)을 사용하여 발효를 통하여 포스페이트 업테이크(phosphate uptake)를 증가시킴으로써 재조합 단백질을, 이들의 유도체(derivatives) 또는 이들의 아날로그(analogues) 및 제2 대사체(secondary metabolites)를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로서, 상기 배지는 우레아의 잔류 농도(residual concentration)가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함하며, 본 발명은 또한 미생물을 사용하여 발효를 통하여 포스페이트 업테이크를 증가시킴으로써 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그 및 제2 대사체의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 배지는 우레아의 잔류 농도가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 우레아 첨가된/첨가되지 않은 IN-105 전구체의 바이오매스 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 2는 우레아 첨가된/첨가되지 않은 IN-105 전구체의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 3은 우레아 첨가된/첨가되지 않은 인슐린 전구체의 바이오매스 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 4는 우레아 첨가된/첨가되지 않은 인슐린 전구체의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 5는 우레아 첨가된/첨가되지 않은 글라진(Glargine)의 바이오매스 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 6은 우레아 첨가된/첨가되지 않은 글라진(Glargine)의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 7은 우레아 첨가된/첨가되지 않은 엑센딘(Exendin) 전구체의 바이오매스 프로파일의 비교 그래프이다.
- 도 8은 우레아 첨가된/첨가되지 않은 엑센딘(Exendin) 전구체의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.

도 9는 우레아 첨가된/첨가되지 않은 리파제 효소의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.

도 10은 IN-105 전구체 발효가 일어나는 동안 우레아의 농도 변화에 따른 바이오매스 프로파일 결과 그래프이다.

도 11은 IN-105 전구체 발효가 일어나는 동안 우레아의 농도 변화에 따른 프리덕트 농도 프로파일 결과 그래프이다.

도 12는 인슐린 전구체 발효가 일어나는 동안 우레아의 농도 변화에 따른 바이오매스 프로파일 결과 그래프이다.

도 13은 인슐린 전구체 발효가 일어나는 동안 우레아의 농도 변화에 따른 프리덕트 농도 프로파일 결과 그래프이다.

도 14는 IN-105 제조에 있어서 잔류 우레아 농도 및 최대 프리덕트 농도를 나타낸 그래프이다.

도 15는 인슐린 전구체 제조에 있어서 잔류 우레아 농도 및 최대 프리덕트 농도를 나타낸 그래프이다.

도 16은 메탄올 공급 속도가 20g/L/h 이하인 IN-105 전구체의 바이오매스 프로파일의 비교 그래프이다.

도 17은 메탄올 공급 속도가 20g/L/h 이하인 IN-105 전구체의 프리덕트 농도 프로파일의 비교 그래프이다.

도 18은 우레아 외의 화합물에 대한 연구, 피키아 발효의 생산성에 대한 이들의 임팩트에 있어서의 다른 유사 화합물의 시험 그래프이다.

도 19는 브로스(broth)에서 포스페이트 이온의 잔류 농도에 대한 우레아의 효과, 스트레인에 의한 포스페이트 대사에 대한 우레아의 효과 그래프이다.

도 20은 프라바스타틴 제조를 위한 배양 성장 프로파일이다.

도 21은 우레아 첨가에 의한 프라바스타틴 역가 그래프이다.

도 22는 우레아 첨가된 프라바스타틴의 컴팩틴 전환율 그래프이다.

도 23은 E. coli에서의 G-CSF 제조의 WCW 비교 그래프이다.

도 24는 GCSF의 특이적 생산성에 대한 우레아의 효과 그래프이다.

도 25는 E. coli에서의 스트렙토키나아제 제조에 대한 WCW 비교 그래프이다.

도 26은 스트렙토키나아제에 있어서 특이적 생산성에 대한 우레아의 효과 그래프이다.

도 27은 리조뮤코르 종을 사용한 리파아제 제조에 있어서의 우레아의 효과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

본 발명은 미생물을 사용하여 발효를 통하여 포스페이트 업테이크를 증가시킴으로써 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그 및 제2 대사체를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로서, 상기 배지는 우레아의 잔류 농도가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함한다.

[0021]

본 발명의 내용 중 하나의 실시형태에서, 상기 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그의 최대 프리덕트 역가(maximum product titre)가 0.5 g/L 초과로 얻어진다.

[0022]

본 발명의 내용 중 또 다른 하나의 실시형태에서, 상기 제2 대사체는 컴팩틴의 프라바스타틴으로의 바이오컨버전이 적어도 35 %로 발효된다(the secondary metabolites effectuates bioconversion of compactin to pravastatin by at least 35 %).

[0023]

본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 우레아는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필피리덴우레아(isopropylpyridineurea),

페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합(combination)과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군(group)으로부터 선택된 것이고, 액체, 스프레이(spray), 분말(powder) 또는 펠렛 형태(pellet form)로 첨가된다.

- [0024] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 미생물(micro-organisms)은 이.콜라이(E.coli), 스트렙토마이세스 스피시스(Streptomyces sp), 아스퍼길러스 스피시스(Aspergillus sp), 리조퍼스 스피시스(Rhizopus sp), 페닐리움 스피시스(Penillium sp) 및 리조뮤코르 스피시스(Rhizomucor sp)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0025] 본 발명은 또한, 미생물을 사용한 발효를 통하여 포스페이트 업테이크를 증가시킴으로써 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그 및 제2 대사체의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 배지는 우레아의 잔류 농도가 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 의 범위인 것을 포함한다.
- [0026] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그의 최대 프로덕트 역가(maximum product titre)가 0.5 g/L 초과로 얻어진다.
- [0027] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 제2 대사체는 콤팩틴(compactin)의 프라바스타틴(pravastatin)으로의 바이오컨버전(bioconversion)이 적어도 35 % 로 발효된다(effectuates).
- [0028] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 우레아는, 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpylideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된 것이고, 액체, 스프레이(spray), 분말(powder) 또는 펠렛 형태(pellet form)로 첨가된다.
- [0029] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 제조된 재조합 단백질 프로덕트(recombinant protein product)는 G-CSF 및 스트렙토키나아제(streptokinase)를 포함하는 군으로부터 선택된 것이다.
- [0030] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 단백질 프로덕트는 리파제(lipase)이다.
- [0031] 본 발명의 내용 중 또 다른 실시형태에서, 상기 제조된 제2 대사체는 프라바스타틴(pravastatin)이다.
- [0032] 본 발명은 메탄올 유도성 진균 종을 사용하여 발효에 의해 재조합 단백질, 이의 유도체 또는 이의 아날로그를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징한다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpylideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 우레아이다.

- [0035] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 액체, 스프레이, 분말 또는 펠렛 형태로 첨가된다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드를 잔류 농도 1M 이하로 포함한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 기본 염(basal salts) 및 미량 원소(trace elements)의 농도가 대조 배지(control medium)의 0.1배 내지 5배로 변화되고, 상기 탄산 아마이드의 잔류 농도가 1M 이하로 유지된다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 포스페이트(phosphate)의 업테이크(uptake)가 향상된다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 재조합 인슐린 프리덕트(recombinant insulin product)를 발현하는 상기 메탄올 유도성 진균 종이 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아 스페시스(*Pichia sp.*), 사카로마이세스 스페시스(*Saccharomyces sp.*), 사카로마이세스 세리비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로마이세스 스페시스(*Kluyveromyces sp.*), 또는 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0040] 본 발명은 미생물(microorganisms)을 사용한 발효에 의해 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 본 발명은 미생물(microorganisms)을 사용한 발효에 의해 제2 대사체(secondary metabolites)를 제조하기 위한 발효 배지에 관한 것으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpylideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 우레아이다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 액체, 스프레이, 분말 또는 펠렛 형태로 첨가된다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 탄산 아마이드를 잔류 농도는 10 g/L 이하이다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 미생물은 이.콜라이(*E.coli*), 스트렙토마이세스 스페시스(*Streptomyces sp.*), 아스퍼길러스 스페시스(*Aspergillus sp.*), 리조푸스 스페시스(*Rhizopus sp.*), 페닐리엄 스페시스(*Penillium sp.*) 및 리조뮤코르 스페시스(*Rhizomucor sp.*)로부터 선택된다.
- [0047] 본 발명은 발효 배지에 메탄올 유도성 진균 종(methanol inducible fungal species)을 번식시키는(propagating) 것을 포함하는, 재조합 단백질, 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그의 제조 방법으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 탄산 아마이드는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpyrideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 우레아이다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 인슐린 프로덕트는 IN-105이다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 인슐린 프로덕트는 인슐린 전구체(insulin precursor), 인슐린(insulin) 또는 이들의 아날로그(their analogues) 또는 이들의 유도체(derivatives thereof)이다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 재조합 인슐린 프로덕트는 인슐린 글라진(insulin glargine)이다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 단백질은 시클릭(cyclic) 또는 넌-시클릭(non-cyclic) 펩타이드(peptide)이다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 재조합 펩타이드는 엑센딘(exendin)이다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 단백질은 효소이다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 효소 프로덕트는 리파제(lipase)이다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 단백질은 인슐린 전구체(insulin precursor), 인슐린(insulin) 또는 이들의 아날로그(their analogues) 또는 이들의 유도체(derivatives thereof), 글라진(glargine), 엑센딘(exendin), 카르복시펩티다제(carboxypeptidase) 및 리파제(lipase)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 재조합 인슐린 프리덕트(recombinant insulin product)를 발현하는 상기 메탄올 유도성 진균 종이 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 피키아 스페시즈(Pichia sp.), 사카로마이세스 스페시즈(Saccharomyces sp.), 사카로마이세스 세리비시아에(Saccharomyces cerevisiae), 클루이베로마이세스 스페시즈(Kluyveromyces sp.), 또는 한세놀라 폴리모르파(Hansenula polymorpha)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 메탄올 유도성 진균 종은 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)이다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 메탄올 공급 속도(methanol feeding rate)는 시간당 브로스(broth per h)로 20 g /L 이하이다.

- [0061] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 수득된 최대 프로덕트 역가(maximum product titre obtained)가 0.1 g/L 초과이다.
- [0062] 본 발명은 발효 배지에 메탄올 유도성 또는 비-유도성 단백질 발현 미생물(inducible or non-inducible protein expressing microorganism)을 번식시키는(propagating) 것을 포함하는, 재조합 또는 비-재조합 단백질 프로덕트(recombinant or non-recombinant protein products), 이들의 유도체 또는 이들의 아날로그의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpyrideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 우레아이다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 단백질 프로덕트는 G-CSF이다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 재조합 프로덕트는 스트렙토키나아제(streptokinase)이다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 단백질 프로덕트는 리파제이다.
- [0068] 본 발명은 발효 배지에 미생물(microorganism)을 번식시키는(propagating) 것을 포함하는, 제2 대사체(secondary metabolites)의 제조 방법으로, 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 제조된 제2 대사체는 프라바스타틴(pravastatin)이다.
- [0070] 본 발명은 컴팩틴(compactin)의 프라바스타틴(pravastatin)으로의 바이오컨버전(bioconversion) 방법에 관한 것으로, 상기 컨버전은 배지에서 발효되고(effectuate), 상기 배지는 탄산 아마이드(carbonic acid amide)의 유효 농도를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 탄산 아마이드는 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필필리덴우레아(isopropylpyrideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 컴팩틴의 프라바스타틴으로의 바이오컨버전이 적어도 35%이다.

- [0073] 본 발명은 상기에 의해 수득된 재조합 단백질 프로덕트에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 상기 수득된 재조합 단백질 프로덕트는 인슐린 전구체(insulin precursor), 인슐린(insulin) 또는 이들의 아날로그(their analogues) 또는 이들의 유도체(derivatives thereof), 글라진(glargine), 엑센딘(exendin), 카르복시펩티다제(carboxypeptidase) 및 리파제(lipase)를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0075] 본 발명은 발효 배지의 제형화에 있어서 사용되는 영양 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 우레아와 같은 탄산 아마이드 및 관련 형태 또는 이들의 유도체와 같은 질소 컴포넌트를 포함하고, 하나 이상의 다른 발효 배지 컴포넌트를 포함하는데, 이는 짧은 제조 기간 동안 높은 인슐린 또는 유도체 프리덕트 생성물의 관련 아날로그를 수득할 수 있도록 특별히 최적화되어 있다.
- [0076] 우레아와 같은 탄산 아마이드 및 관련 형태 또는 유도체들과 같은 특정 질소원(certain nitrogenated sources)이 공급된 특정 발효 배지를 사용하는 것은 효모 세포의 성장에 영향을 미치지 않고, 오히려 생산성을 향상시키는 데 도움이 된다.
- [0077] 우레아와 같이 첨가되는 질소 컴포넌트는 액체, 스프레이, 분말 또는 펠렛 형태로 첨가될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 핵심은 피키아 종(Pichia sp.)에 의한 인슐린 또는 인슐린 아날로그 발효 공정의 생산성이 배양 배지의 우레아 함량에 크게 영향을 받는다는 데 있다. 따라서, 프로덕트의 수율은 배양 배지 중에 우레아와 같은 질소성 컴포넌트를 가함으로써 발효 기간의 감소가 상당히 증가한다.
- [0079] 본 발명의 가장 바람직한 실시예에 의하면, 발효 배지에 우레아를 첨가함으로써 차례로 생산성을 증가시키는 핵심 성분 '포스페이트(phosphate)'의 소비 속도가 증가된다. 인산염의 소비 속도가 빨라질수록, 발효 회전 속도가 감소하고, 생산성이 증가된다. 따라서, 포스페이트와 함께 우레아의 대사(metabolism)는 성장 프로파일(growth profile)에 영향을 미치지 않고 단백질 또는 펩타이드 발현 속도를 증가시키고, 발효 시간을 감소시키는 것으로 새롭게 확인되었다.
- [0080] 본 발명의 또 다른 관점에 의하면, 우레아를 첨가함으로써 어느 pH에서도 발효의 완료시에 프로덕트 회수가 증가될 수 있다.
- [0081] 본 발명으로 단백질 프로덕트의 수율 증가, 제조 사이클 시간(production cycle times)의 감소, 공정에의 영양 공급(nutrients fed)의 활용도 증가가 가능해지고, 일반적으로 자본 및 제조 비용을 감소시킬 수 있게 된다.
- [0082] 화학적으로 정의된 배지(chemically defined medium)를 사용한 산업적 발효 공정(industrial fermentation process)을 위한 적합한 미생물 스트레인(suitable microbial strain)은 관심이 있는 다양한 화합물을 생성하는 와일드 타입 스트레인(wild type strain)일 수 있으며, 상기 와일드 타입 스트레인은 성장 퍼포먼스가 우수하다.
- [0083] 제조 유기체(production organism)로서 사용될 수 있는 바람직한 효모(yeasts)로는, 예컨대 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 피키아 스피시스(Pichia sp.), 사카로마이세스 스피시스(Saccharomyces sp.), 사카로마이세스 세리비시아에(Saccharomyces cerevisiae), 클루이베로마이세스 스피시스(Kluyveromyces sp.), 또는 한세

눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)를 포함한다.

- [0084] 또한, 화학적으로 정의된 배지를 사용한 산업적 발효 공정을 위한 적합한 미생물 스트레인은 목적하는 페어런스 스트레인(parent strain)을 전통적인 변이 발생 처리(classical mutagenic treatment) 또는 재조합 DNA 형질전환(recombinant DNA transformation)에 주입함으로써 수득 및/또는 향상시킬 수 있고, 생성된 변이체(resulting mutant) 또는 형질전환된 미생물 스트레인(transformed microbial strain)은 화학적으로 정의된 배지에 우수한 성장 퍼포먼스를 갖는다. 생성된 변이체 또는 형질전환된 스트레인이 향상되거나 또는 페어런스 스트레인과 비교하였을 때 화학적으로 정의된 배지 상에서 유사한 성장 퍼포먼스를 나타내는지는, 화학적으로 정의된 배지 상에 페어런스 스트레인의 성장 퍼포먼스에 의존될 것이다.
- [0085] 당업자로서는, 최종 결과가 모든 경우에 있어서 적은 시간 동안 높은 역가를 나타낼지라도, 탄산 아마이드 공급의 최적 농도는 클론마다 다양할 수 있다.
- [0086] "발효 배지들(Fermentation media)" 또는 "발효 배지(Fermentation medium)"는 발효가 이루어지는 환경을 의미하는 것으로, 이는 특정 치료 프로덕트(specific therapeutic product)를 제조하는 발효 미생물에 의해 유용화되는 발효 기질(fermentation substrates) 및 다른 원료 물질(other raw materials)을 포함한다.
- [0087] "질소 컴포넌트(Nitrogenous components)"는 발효 배지에 있어서 동화될 수 있는 질소원(source of assimilable nitrogen)인 기질(substrates), 원료 물질(raw materials) 또는 컴포넌트이다.
- [0088] 본 발명의 현저한 관점에 의하면, 발효 배지에 있어서 바람직한 질소 컴포넌트는 우레아와 같은 탄산 아마이드이다. 이는 N-CO-N 또는 관련기를 포함하는 화합물일 수 있다. 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸-N-페닐우레아(N-acetyl-N-phenylurea), 이소프로필리덴우레아(Isopropylideneurea), N-페닐 우레아(N-phenyl urea) 등과 같은 우레아의 유도체 또는 이들의 조합의 용도는 본 발명에서 고려되었다.
- [0089] 본 명세서에서 사용된 "유효량(effective amount)"은 우레아 또는 이들의 유도체들의 양으로, 본 발명에 따르면 발효 배지에 도입되었을 때 효모 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 적은 기간 동안의 단백질의 상당량/수율(appreciable quantity/yield)이다.
- [0090] "발효 유기체(Fermenting Organism)"라 함은, 목적하는 발효 공정에서 사용되기에 적합한 미생물을 의미한다. 발효 유기체의 예로는, 효모와 같은 진균 유기체(fungal organisms)를 포함한다. 본 발명에서 발효 유기체의 예로는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아 스피시스(*Pichia sp.*), 사카로마이세스 스피시스(*Saccharomyces sp.*), 사카로마이세스 세리비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로마이세스 스피시스(*Kluyveromyces sp.*), 또는 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)이다.
- [0091] 본 발명은 메탄올 유도성 진균 종을 사용한 재조합 펩타이드 발현에 적합할 수 있으나, 재조합 발현된 펩타이드(recombinantly expressed peptides), 단백질(proteins), 인슐린(insulin), 인슐린 전구체(insulin precursors), 인슐린 유도체(insulin derivatives) 또는 인슐린 아날로그(insulin analogues)에 한정되지 않는다.
- [0092] 본 명세서에서 단백질 또는 폴리펩티드를 설명하기 위하여 사용된 "재조합(recombinant)"이라는 용어는 재조합 폴리뉴클레오타이드(recombinant polynucleotide)의 발현에 의해 제조된 폴리펩타이드를 의미한다. 본 명세서에서 세포에 사용된 "재조합(recombinant)"이라는 용어는 재조합 벡터(recombinant vectors) 또는 다른 트랜스

퍼 DNA에 대한 수용체(recipients)로 사용될 수 있거나 사용되어 온 세포를 의미하며, 감염된(transfected) 오리지널 세포(original cell)의 자손(progeny)을 포함한다. 단일 페어런트 세포(single parental cell)의 자손은 형태학적(morphology) 또는 게놈(genomic) 또는 총 DNA 보체(complement)에 있어서 오리지널 페어런트와 완벽하게 동일할 수는 없으며, 이는 우발적(accidental) 또는 의도적인(deliberate) 변이 때문이다.

[0093] "폴리펩타이드(polypeptide)", "단백질(Protein)", "펩타이드(peptide)"의 용어는 아미노산을 의미하며, 프로덕트의 특정 길이를 의미하지 않는다; 즉, 펩타이드(peptides), 올리고펩타이드(oligopeptides) 및 단백질은 폴리펩타이드의 정의의 범주에 포함된다. 상기 폴리펩타이드들의 화학적 또는 발현 후 변형(post-expression modifications)이 특정 구체예로 포함되거나 배제될지라도 상기 용어는 폴리펩타이드의 발현 후 변형을 언급 또는 배제하지 않는다. 일 실시예에서, 분자는 폴리펩타이드 또는 이들의 관련 아날로그 또는 이들의 유도체이다. 바람직하게는, 폴리펩타이드는 시클릭 펩타이드(cyclic peptide)이다. 또 다른 실시예에 의하면, 폴리펩타이드는 비-시클릭 펩타이드(non-cyclic peptide)이다. 또 다른 실시예에 의하면, 폴리펩타이드는 엑센딘(exendin), 엠티피바타이드(eptifibatide), 아토시반(atosiban), 리파제, 카르복시펩티다제와 같은 효소(enzymes such as lipase, carboxypeptidase) 등을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0094] 인슐린은 두 개의 아미노산 사슬 사이에 분포된 51 개 아미노산의 폴리펩타이드이다: A 사슬은 21개의 아미노산이고, B 사슬은 30개의 아미노산이다. 상기 사슬들은 두 개의 다이설파이드 브릿지(disulfide bridges)로 서로 연결된다. 이는 자연적으로 발생된 인슐린 뿐만 아니라 인슐린 유도체 및 아날로그의 용도를 포함한다. 인슐린 화합물은, 예컨대 사람 인슐린과 같이 포유류 인슐린 화합물, 또는 인슐린 화합물 유도체 또는 아날로그일 수 있다.

[0095] 인슐린 유도체는 자연적으로 발생된 인슐린, 즉 사람 인슐린 또는 동물 인슐린의 유도체이며, 적어도 하나의 자연적으로 발생된 아미노산 잔기의 치환(substitution) 및/또는 적어도 하나의 아미노산 잔기 및/또는 유기 잔기의 추가(addition)에 의해, 상응하는, 또는 동일한 자연 발생된 인슐린과는 구별된다. 인슐린이라는 용어는 B- 및 A- 사슬로 구성되는 폴리펩타이드로 정의된다. 인슐린 유도체는 자연 발생된 인슐린과 적어도 60% 동일(homologous)할 수 있다. 인슐린 유도체는 더욱 동일할 수 있으며, 예컨대 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 90%, 자연 발생된 인슐린과 동일할 수 있다. 일반적으로, 인슐린 유도체는 사람 인슐린과 비교하여 다소 수정된 활동을 한다.

[0096] 유전적 조작(genetic engineering)에 의해 인슐린 및 인슐린 유도체를 제조할 때, 인슐린 전구체, B, C 및 A 사슬을 포함하는 "프로인슐린(proinsulin)"이 자주 발현된다. 상기 프로인슐린은 적절하고 옳은 폴딩(appropriate and correct folding) 및 다이설파이드 브릿지의 형성 후에 C 사슬의 효소적 또는 화학적 제거에 의해 인슐린 또는 인슐린 유도체로 전환될 수 있다. 프로인슐린 유도체는 자연적으로 발생된 프로인슐린의 B- 및 A- 사슬과 적어도 60% 동일할 수 있다. 그러나, C-펩타이드의 연결은 공지된 자연적으로 발생된 C-펩타이드와 완전히 상이할 수 있도록 선택될 수 있다. 프로인슐린 유도체는 자연적으로 발생된 프로인슐린과 적어도 약 75%, 적어도 약 90% 동일할 수 있다.

[0097] 본 발명의 특정 구체예에 따르면, 재조합 인슐린 프로덕트는 IN-105이다. 생성된 치료적 프로덕트는 분자 IN-105와 특히 관련이 있다. IN-105는 인슐린 B-사슬의 B29 위치에서 엡실론 아미노산 리신(epsilon amino acid Lysine)에 구조식 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_9\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 의 지방족 올리고머와 컨쥬게이트된 인슐린 분자이다. 상기 분자는 A1, B1 및 B29 에서 모노컨쥬게이트될 수 있고, A1, B1 및 B29의 다양한 조합에서 디-컨쥬게이트될 수 있거나, 또는 A1, B1 및 B29의 다양한 조합에서 트리컨쥬게이트될 수 있다.

[0098] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 본 발명의 발효 배지를 활용하여 발효되어 제조된 재조합 단백질은 시클릭 또는 비-시클릭 펩타이드이다.

[0099] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 본 발명의 발효 배지를 활용하여 발효되어 제조된 재조합 단백질은 효소이다.

[0100] 본 발명의 일 관점에 따르면, 발효 프로토콜(fermentation protocol)은 세 가지 페이스를 포함할 수 있는데: 배치(Batch), 페드-배치(선택적)(fed-batch (optional)) 및 메탄올 유도 페이스(methanol induction phase)이다.

[0101] 본 발명의 가장 현저한 관점에 따르면, 본 발명에서 사용된 발효는 하기 컴포넌트를 포함한다. 또한 배지의 제조 방법도 포함된다.

표 1

[0102] 배지 조성(MEDIUM COMPOSITION)

조성(Components)	양(Quantity) (g/L)
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.93
MgSO ₄ ·7H ₂ O	29.8
K ₂ SO ₄	36.4
KOH	4.13
글리세롤(Glycerol)	40
H ₃ PO ₄ (Density-1.7)	22.95
우레아(Urea)	6.0

[0103] 개개의 컴포넌트는 상기 언급된 시퀀스에서 물의 최소 부피에 용해되었으며, 121℃에서 1시간 동안 멸균되었다. 미량 염 용액(trace salt solution) 및 D-비오틴(D-biotin)(여과에 의해 미리 살균)(pre-sterilised by filtration))을 배지에 무균으로(aseptically) 가하고, 각각을 4.35 ml/L의 속도로 배지에 가하였다(미량 염 용액의 밀도는 1.05 이었고, D-비오틴의 경우는 1.0이었다).

표 2

[0104] 미량 염 용액의 조성(COMPOSITION OF TRACE SALT SOLUTION)

조성 (염) Components (Salts)	Quantity (g/L)
구리 설페이트(Copper sulphate), CuSO ₄ ·5H ₂ O	6.0
소듐 아이오다이드(Sodium iodide), NaI	0.08
망간 설페이트(Manganese sulphate), MnSO ₄ ·H ₂ O	3.0
소듐 몰리브데이트(Sodium molybdate), Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.20
붕산(Boric acid), H ₃ BO ₃	0.02
코발트 클로라이드(Cobalt chloride), CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.50
아연 클로라이드(Zinc chloride), ZnCl ₂	20.0
철 설페이트(Ferrous sulphate), FeSO ₄ ·7H ₂ O	65.0
황산(Sulphuric acid), H ₂ SO ₄	5.0mL

[0105] 모든 염은 포터블 워터(potable water)에 하나씩 용해되었으며, 멸균 그레이트 여과 장치(sterilizing grade filtration apparatus)를 통하여 여과에 의해 멸균되었다.

[0106] 비오틴 용액 조제(Biotin solution preparation):

[0107] D-비오틴(D-Biotin) 0.2 g/L

[0108] 비오틴을 포터블 워터(potable water)에 용해하였으며, 멸균 그레이트 여과 장치(sterilizing grade filtration apparatus)를 통하여 여과에 의해 멸균되었다.

[0109] 효모 추출물 및 소이 펩톤 공급(Yeast Extract and Soy peptone feed):

[0110] 부가적으로, 발효가 이루어지는 동안 효모 추출물 및 소이 펩톤(Yeast Extract and Soy Peptone (YEP)) 공급하였다. 이는 하기와 같이 준비되었다:

표 3

[0111]

조성(Components)	Conc. (g/L)
소이 펩톤(Soy Peptone)	100
효모 추출물(Yeast extract)	50

[0112] 상기 컴포넌트를 용해시키고, 포터블 워터(potable water)로 부피를 맞추었다. 용액을 121 내지 123℃에서 90 분 동안 멸균하였다. YEP공급의 밀도는 약 1.05이었다.

[0113] 메탄올 공급:

[0114] 12.0 ml 의 미량 염 용액(trace salt solution), 12mL 의 D-비오틴 용액(D-biotin solutions) 및 40 g의 우레아를 공급 전에 메탄올 리터당 가하였다.

[0115] 발효 공정(FERMENTATION PROCESS):

[0116] 발효 공정은 배치 세포 성장 페이스(batch cell growth phase), 선택적 글리세롤 공급 배치 페이스(an optional glycerol fed batch phase) 및 메탄올 유도 페이스(methanol induction phase)를 포함한다.

[0117] 배치 세포 성장 페이스(BATCH CELL GROWTH PHASE)

[0118] 배치 모니터링 및 대조(Batch monitoring and control)

[0119] 제조 발효 파라미터(Production fermenter parameters)를 초회 세팅하고 하기와 같이 조절하였다:

[0120] 온도 : 30 °C ± 2°C

[0121] pH: 5 ± 0.2

[0122] DO: >10%

[0123] 런타임(Run Time): 22-24hr

[0124] 메탄올 유도 페이스(METHANOL INDUCTION PHASE (MIP))

- [0125] 메탄올 공급은 배지 페이스의 종료 직후에 시작되었다. 메탄올을 상업적으로 사용가능한 멸균 그레이트 필터를 사용하여 여과함으로써 멸균하였다(온라인).
- [0126] MIP의 초기에는, 배지에 투입되는 단백질 발현에 따라(프로덕트마다, 뿐만 아니라 클론마다 변화시키면서) pH를 4.0 ± 0.1 또는 6.0 ± 0.1 또는 6.3 ± 0.1 으로 맞추었고, 온도를 18 내지 24 °C로 (프로덕트마다, 뿐만 아니라 클론마다 변화시키면서) 맞추었다.
- [0127] 동시에, 다른 공급, 효모 추출물 및 소이 펩톤 피드(yeast extract and Soy peptone feed (YEP))를 발효기에서 초기 부피 0.4g/L/h의 속도로 시작하였다.
- [0128] MIP 모니터링 및 대조(MIP monitoring and control)
- [0129] 온도: 18 °C 내지 30 °C (프로덕트마다, 뿐만 아니라 클론마다 변화시키면서)
- [0130] pH: 3.0 내지 7.0
- [0131] DO: >1% (브로스에서 대조 메탄올 농도로 사용(used to control methanol concentration in broth))
- [0132] 런 타임(Run Time): 5 - 8 일 (클론 마다 변화시키면서)
- [0133] 어세이(Assay) pH : 1 내지 9.5 (단백질 유형에 따라(depending upon protein type))
- [0134] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 동결건조한 글리세롤 스톡 배양(lyophilized glycerol stock culture)을 최소 글리세롤(minimal glycerol (MGY)) 배지에 배양함으로써 접종원을 준비한다. 기본이 되는 발효배양기 배지(basal fermentor media)는 "대조 피키아 프로세스 가이드라인(Control Pichia process guidelines)"으로부터 유래하였고, 오르토-인산(ortho-phosphoric acid), 칼슘 설페이트 디하이드레이트(calcium sulfate dehydrated), 포타슘 설페이트(potassium sulfate), 마그네슘 설페이트 헵타 하이드레이트(magnesium sulfate hepta hydrated), 포타슘 하이드록사이드(potassium hydroxide), 글리세롤(glycerol), 미량 염(trace salts) 및 D-비오틴(D-biotin)을 포함한다. 영양 배양 배지는 공지된 화합물을 소량 또는 미량으로 포함하여야 하며, 이들은 통상 Ca, Mg, Mn, Fe, K, Co, Cu, Zn, B, Mo, Br 및 I의 수용성 화합물과 같은 발효 배양 배지에 포함된다. 다른 미량 염들은 또한 존재할 수 있다. 본 발명의 미량 염 용액은 특히 구리 설페이트 펜타 하이드레이트(cupric sulfate penta hydrated), 소듐 요오다이드(sodium iodide), 망간 설페이트 모노 하이드레이트(manganese sulfate mono hydrated)를 포함한다. 소듐 몰리브데이트 디 하이드레이트(Sodium molybdate di hydrated), 붕산(boric acid), 코발트 클로라이드 헥사 하이드레이트(cobalt chloride hexa hydrated), 아연 클로라이드(zinc chloride), 철 설페이트 헵타 하이드레이트(ferrous sulfate hepta hydrated). 각 배지 성분의 농도가 각각의 프로덕트에 특히 최적화될 지라도, 대조 배지는 하기와 같다:
- [0135] **대조 배지(CONTROL MEDIA)**
- [0136] 발효 베이스 염 배지(Fermentation Basal Salts Medium) :
- [0137] 1 리터에 있어서, 하기 성분들을 함께 혼합한다:
- [0138] 인산(Phosphoric acid): 85% (26.7 ml)
- [0139] 칼슘 설페이트(Calcium sulfate): 0.93 g
- [0140] 포타슘 설페이트(Potassium sulfate): 18.2 g
- [0141] 마그네슘 설페이트--7H₂O(Magnesium sulfate-7H₂O): 14.9 g
- [0142] 포타슘 하이드록사이드(Potassium hydroxide): 4.13 g

- [0143] 글리세롤(Glycerol): 40.0 g
- [0144] 물을 가하여 1리터로 함
- [0145] 발효조에 물을 가하여 적당한 부피로 하고 멸균한다.
- [0146] PTM1 미량 염(Trace Salts)
- [0147] 하기 성분들을 함께 혼합한다:
- [0148] 구리 설페이트-5H₂O(Cupric sulfate 5H₂O): 6.0 g
- [0149] 소듐 요오다이드(Sodium iodide): 0.08 g
- [0150] 마그네슘 설페이트-H₂O(Manganese sulfate-H₂O): 3.0 g
- [0151] 소듐 폴리브데이트-2H₂O(Sodium molybdate-2H₂O): 0.2 g
- [0152] 붕산(Boric Acid): 0.02 g
- [0153] 코발트 클로라이드(Cobalt chloride): 0.5 g
- [0154] 아연 클로라이드(Zinc chloride): 20.0 g
- [0155] 철 설페이트-7H₂O(Ferrous sulfate-7H₂O): 65.0 g
- [0156] 비오틴(Biotin): 0.2 g
- [0157] 황산(Sulfuric Acid): 5.0 ml
- [0158] 물을 가하여 최종 부피를 1리터로 하였음.
- [0159] 여과, 멸균 및 실온 보관함.
- [0160] 상기 혼합물들로부터 흐린 침전물이 생성될 수 있다. 상기 배지를 여과하고 멸균한 후 사용한다.
- [0161] 상기 대조 배지에 더하여, 우레아를 상이한 농도로 포함시킨다.
- [0162] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 배치 페이스(batch phase) 동안의 바이오매스 생성(biomass generation)은 글리세롤이 초기 배지(initial medium)에 존재할 때 까지 이다. 더욱이, 바이오매스 생성은 크리티컬하지 않고, 몇몇의 경우에만 일어난다.
- [0163] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 목적하는 바이오매스가 달성된 뒤에, 배양은 메탄올 및 우레아의 연속적인 공급으로 유도된다. 메탄올 공급이 일어나는 동안, 효모 추출물 및 펩톤 용액을 또한 공급한다.
- [0164] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 메탄올 공급 속도는 20 g/L/h이하이다. 당업자로서는, 제조 레벨을 더욱 향상시키는 공급 속도의 최적화가 본 발명을 통하여 고려될 것이다.
- [0165] 본 발명이 하기 실시예에서 특정한 바람직한 구체예와 연결되어 설명되며, 이러한 관점에서 더욱 완전히 이해될 것이다. 본 발명은 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 반대로, 다른 가능한 변형예, 수정 및 등가물까지 포함될 것이며, 첨부된 청구항에 정의된 발명의 범주를 포함할 것이다. 따라서, 바람직한 구체예를 포함하는

하기 실시예는 본 발명의 실재를 예시하기 위하여 제공된 것이며, 특정 예들은 본 발명을 바람직하게 구체화하는 예시로서 제공된 것이고, 본 발명의 원칙 및 개념적인 측면에서 발효 공정을 개시한 것으로 이해되어야 할 것이다.

[0166] 본 발명은 발효 배지를 제형화하는데 사용되는 영양 조성물(nutrient composition)을 제공하는데, 상기 조성물은 우레아와 같은 카바마이드(carbamides) 및 카바메이트(carbamates), 카보디이미드(carbodiimides), 티오카바마이드(thiocarbamides)와 같은 관련 형태 또는 유도체들과 같은 질소 컴포넌트를 포함하며, 짧은 제조 기간 동안 높은 프로덕트 수율을 획득하게 하는 특히 최적화된 다른 발효 배지 컴포넌트를 포함한다.

[0167] 본 발명은 메탄올 유도성 GMO 피키아 파스토리스(methanol inducible GMO *Pichia pastoris*)를 사용하여, 발효 공정이 일어나는 동안(배치, 공급 배치, 연속) 인슐린(insulin), 글라진(glargine) IN105, 엑센딘(exendin), 리파제(lipase) 및 카르복시펩티다제(carboxypeptidase)와 같은 재조합 단백질 프로덕트를 더 우수한 수율로 수득할 수 있게 하는데, 이는 효모 세포의 성장에 영향을 미치지 않으면서 우레아의 첨가를 통하여 가능하게 된 것이다.

[0168] 본 발명의 일 관점에 따르면, 제조 수율 및 시간에 특별히 영향을 주는 질소 컴포넌트는 우레아와 같은 탄산 아마이드 또는 이들의 유도체 및 상기 언급된 관련 화합물들이다.

[0169] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 제조 미생물로서 사용되는 바람직한 효모에는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피키아 스피시즈(*Pichia sp.*), 사카로마이세스 스피시즈(*Saccharomyces sp.*), 사카로마이세스 세리비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 클루이베로마이세스 스피시즈(*Kluyveromyces sp.*), 또는 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)를 포함한다.

[0170] 본 발명은 이 콜라이, 악티노마이세트 및 진균 배지를 사용하여 향상된 바이오컨버전 속도를 달성하는 단백질의 제조용 발효 배지에, 질소 공급원으로서 우레아 또는 이들의 유도체, 카바메이트, 카보디이미드 및 티오카바미드와 같은 탄산 아마이드의 용도를 예시한다. 본 발명의 현저한 관점은 높은 생산성을 갖는 최적화된 영양 배지 파라미터를 갖는 즉각적인 발효 공정(improvised fermentation process)에 관한 것이다. 본 발명의 원칙은 적합한 발현 미생물의 발효를 통하여 단백질 및 제2 대사체의 넓은 범위의 제조에 적용될 수 있다.

[0171] 본 발명은 발효 배지를 제형화하는데 사용되는 영양 조성물(nutrient composition)을 제공하는데, 상기 조성물은 우레아와 같은 카바마이드(carbamides) 및 카바메이트(carbamates), 카보디이미드(carbodiimides), 티오카바마이드(thiocarbamides)와 같은 관련 형태 또는 유도체들과 같은 질소 컴포넌트를 포함하며, 짧은 제조 기간 동안 높은 프로덕트 수율을 획득하게 하는 특히 최적화된 하나 이상의 다른 발효 배지 컴포넌트를 포함한다.

[0172] 따라서, 본 발명은 이 콜라이를 사용하여 발효 공정이 일어나는 동안(배치, 공급 배치, 연속) GCSF, 스트렙토키나제(Sterptokinase), HGH 와 같은 단백질 프로덕트를 더 나은 수율로 수득할 수 있도록 하며, 이는 효모 세포의 성장에 영향을 미치지 않으면서 우레아의 첨가를 통하여 가능하게 된 것이다.

[0173] 본 발명은 또한, 악티노마이세트(actinomycetes) 및/또는 진균 배지(fungal cultures)를 사용하여 발효 공정이 일어나는 동안(배치, 공급 배치, 연속) 프라바스타틴(Pravastatin)과 같은 프로덕트를 더 나은 수율로 수득할 수 있는 바이오컨버전 속도의 향상을 가능하게 한다.

[0174] 본 발명은 또한, 진균 배지를 사용하여 배치 또는 공급 배치 과정에 있어서 리파제, 아밀라제, 셀룰라제와 같은

효소의 제조 속도를 향상시킨다.

- [0175] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 제조 수율 및 시간에 특별히 영향을 주는 질소 컴포넌트는 우레아와 같은 탄산 아마이드 또는 이들의 유도체 및 상기 언급된 관련 화합물들이다.
- [0176] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 바람직한 미생물은 엔테로박테리아에 패밀리의 스트레인이며, 바람직하게는 이. 콜라이에 한정되지 않으나 이를 포함하는 것으로 제조 미생물로 바람직하게 사용된다.
- [0177] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 바람직한 미생물은 악티노마이세트 및/또는 진균 패밀리(스트렙토마이세스 중, 악티노플레인 중, 아스퍼길러스 중, 리조퍼스 중 및 페니실리움 중을 포함하나, 이에 한정되지 않음)이다.
- [0178] 본 발명의 다른 목적, 형태, 장점 및 관점들이 하기 기재로부터 당업자에게 명백할 것이다. 그러나, 하기 기재 및 특정 실시예들은 본 발명의 바람직한 실시예를 예시하는 것이며, 오직 예시일 뿐임을 이해하여야 할 것이다. 개시된 발명의 범주 내에서 다양한 변화 및 변형이 당업자에게 가능할 것이다.
- [0179] 본 발명은 발효 배지를 제형화하는데 사용되는 영양 조성물(nutrient composition)을 제공하는데, 상기 조성물은 우레아와 같은 카바마이드(carbamides) 및 카바메이트(carbamates), 카보디이미드(carbodiimides), 티오카바마이드(thiocarbamides)와 같은 관련 형태 또는 유도체들과 같은 질소 컴포넌트를 포함하며, 짧은 제조 기간 동안 목적하는 단백질 프로덕트 또는 제2 대사체의 높은 수율을 획득하게 하는 특히 최적화된 하나 이상의 다른 발효 배지 컴포넌트를 포함한다.
- [0180] 본 발명은 우레아와 같은 탄산 아마이드 및 관련 형태 또는 유도체들과 같은 특정 질소원이 공급된 특정 발효 배지의 용도를 개시하는데, 이는 발효 유기체(fermenting organism)의 성장에 영향을 미치지 않으면서 생산성을 향상시키는데 도움이 되는 특정 농도이다.
- [0181] 우레아와 같이 첨가되는 질소 컴포넌트는 액체, 스프레이, 분말 또는 펠렛 형태로 첨가될 수 있다.
- [0182] 산업적 발효 공정을 위하여 적합한 미생물 스트레인은, 목적하는 다양한 화합물을 제조하는 와일드 타입 스트레인이면 어느 것이나 가능하되, 상기 와일드 타입 스트레인은 우수한 성장 퍼포먼스를 갖는 것이다.
- [0183] 또한, 산업적 발효 공정을 위하여 적합한 미생물 스트레인은, 목적하는 페어런스 스트레인(parent strain)을 전통적인 변이 발생 처리(classical mutagenic treatment) 또는 재조합 DNA 형질전환(recombinant DNA transformation)에 주입함으로써 수득 및/또는 향상시킬 수 있고, 생성된 변이체(resulting mutant) 또는 형질전환된 미생물 스트레인(transformed microbial strain)은 우수한 성장 퍼포먼스를 갖는다. 생성된 변이체 또는 형질전환된 스트레인이 향상되거나 또는 페어런트 스트레인과 비교하였을 때 화학적으로 정의된 배지 상에서 유사한 성장 퍼포먼스를 나타내지는, 화학적으로 정의된 배지 상에 페어런트 스트레인의 성장 퍼포먼스에 의존될 것이다.
- [0184] 즉각적인 발효 배지(instant fermentation medium)를 사용한 발효 프로세스는, 프로덕트 농도(product concentration, 부피 당 프로덕트(product per volume), 프리덕트 수율(product yield, 소비된 탄소원 당 형성된 프로덕트(product formed per carbon source consumed), 및 프로덕트 제형(product formation, 부피 및 시간 당 형성된 프로덕트(product formed per volume and time), 또는 다른 공정 파라미터 및 이들의 조합으로

구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 파라미터의 관점에서 향상된다.

- [0185] 당업자로서는, 탄산 아마이드 공급물(carbonic acid amide supplements)의 최적 농도는, 최종 결과가 모든 경우에 있어서 더 적은 시간에 높은 역가를 얻을 수 있음에도 불구하고, 클론마다 달라질 수 있다.
- [0186] "발효 배지들(Fermentation media)" 또는 "발효 배지(Fermentation medium)"라 함은, 발효가 수행되는 환경을 의미하는 것으로, 특정 치료적 프로덕트를 생성하는 미생물을 발효시킴으로써 유용화되는 발효 물질 및 다른 원료 물질을포함한다.
- [0187] 본 발명에 있어서의 발효 배지는 적합한 탄소 기질(suitable carbon substrates)을 포함하여야 한다. 적합한 기질은 글루코스 및 프럭토스와 같은 모노사카라이드, 락토스 또는 수크로스와 같은 올리고사카라이드, 전분 또는 셀룰로스와 같은 폴리사카라이드 또는 이들의 혼합물 및 다른 성분 콘스텝 리커(cornsteep liquor), 슈거 비트 몰라세스(sugar beet molasses), 글리세롤(glycerol) 및 발리 몰트(barley malt)를 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 부가적으로 탄소 기질은, 핵심 바이오케미컬 중간체로의 대사적 전환이 예시될 수 있는, 이산화탄소, 메탄올과 같은 일-탄소 기질(one-carbon substrates)일 수 있다. 따라서, 본 발명에서 활용될 수 있는 탄소원으로 기질을 포함하는 탄소의 폭넓은 범위를 포함할 수 있으며, 유기체의 선택에 한정될 것이다. 적합한 탄소원에 더하여, 발효 배지는, 배양의 성장에 적합하고, 목적하는 단백질 또는 최종 생성물의 발현을 증대시키기에 적합한, 미네랄, 염, 버퍼, 및 당업자에게 공지된 다른 성분들을 포함하여야 한다.
- [0188] "질소원(Nitrogenous components)"은 기질, 원료 물질 또는 컴포넌트를 의미하며, 이들은 발효 배지에 있어서 질소원이 된다.
- [0189] 적합한 질소원은 소야 플로어(oya flour) 코튼 시드 플로어(tton seed flour), 펩톤(peptones), 효모 추출물(yeast extract), 카제인(casein), 카제인 하이드롤리세이트(casein hydrolysates), 콘 스텝 리커(corn steep liquor) 및 암모늄 이온의 무기염(inorganic salts of ammonium ion), 나이트레이트(nitrates) 및 나이트라이트(nitrites)를 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0190] 본 발명의 현저한 관점에 따르면, 발효 배지에서 바람직한 공급물(supplement)은 우레아와 같은 탄산 아마이드이다. 이는 N-CO-N 또는 관련 기를 포함하는 화합물을 포함할 수 있다. 디메틸우레아(dimethylurea), 디에틸우레아(diethylurea), N-아세틸페닐 우레아(N-acetylphenyl urea), 이소프로필릴리덴우레아(isopropylpylideneurea), 페닐우레아(phenylurea) 또는 이들의 조합과 같은 우레아 또는 이들의 유도체를 사용함을 본 발명에서 고려할 수 있다.
- [0191] 본 명세서에서 사용된 "유효량(effective amount)"이라 함은, 본 발명에 따른 우레아 또는 이들의 유도체의 양으로, 발효 배지에 도입되었을 때, 발효 유기체의 성장에 영향을 미치지 않으면서 짧은 시간 동안 프로덕트의 상당량/수율(appreciable quantity/yield)이 제조된다.
- [0192] "발효 유기체(Fermenting Organism)"이라 함은, 목적하는 발효 공정에 사용되기에 적합한 미생물을 의미한다. 본 발명의 다른 관점에 의하면, 바람직한 미생물은 스트레인 박테리아(strains bacteria), 악티노마이세스(actinomycetes) 및/또는 진균 종(fungal species)이며, 바람직하게는 제조 미생물로서 이.콜라이(E.coli), 스트렙토마이세스 스피시스(Streptomyces sp), 악티노플레인스 스피시스(actinoplanes sp), 아스페길러스 스피시스(Aspergillus sp), 리조퍼스 스피시스(Rhizopus sp), 페닐리움 스피시스(Penillium sp)등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0193] 본 명세서에서 단백질 또는 폴리펩타이드를 설명함에 있어서 사용된 용어 "재조합(recombinant)"라 함은 재조합 폴리뉴클레오타이드의 발현에 의해 제조된 폴리펩타이드를 의미한다. 본 명세서에서 세포를 설명하는 데 사용된 용어 "재조합"은 재조합 벡터 또는 다른 트랜스퍼 DNA에 있어서 수용체로 사용될 수 있거나 사용되는 세포를 의미하며, 감염된(transfected) 오리지널 세포(original cell)의 자손(progeny)을 포함한다. 단일 페어런트 세포(single parental cell)의 자손은 형태학적(morphology) 또는 게놈(genomic) 또는 총 DNA 보체(complement)에 있어서 오리지널 페어런트와 완벽하게 동일할 수는 없으며, 이는 우발적(accidental) 또는 의도적인(deliberate) 변이 때문이다.
- [0194] 용어 "폴리펩타이드(polypeptide)", "단백질(protein)", "펩타이드(peptide)"라 함은, 아미노산의 폴리머를 의미하며, 프러덕트의 특정 길이를 의미하는 것은 아니다; 즉, 펩타이드, 올리고펩타이드 및 단백질이 폴리펩타이드의 범주에 포함된다. 상기 폴리펩타이드들의 화학적 또는 발현 후 변형(post-expression modifications)이 특정 구체체로 포함되거나 배제될지라도 상기 용어는 폴리펩타이드의 발현 후 변형을 언급 또는 배제하지 않는다. 일 실시예에서, 분자는 폴리펩타이드 또는 이들의 관련 아날로그 또는 이들의 유도체이다. 바람직하게는, 폴리펩타이드는 시클릭 펩타이드(cyclic peptide)이다. 또 다른 실시예에 의하면, 폴리펩타이드는 비-시클릭 펩타이드(non-cyclic peptide)이다. 본 발명의 또 다른 관점에 의하면, 재조합 단백질은 본 발명의 발효 배지를 사용하여 발효됨으로써 제조된다.
- [0195] 본 발명의 일 실시예는 GCSF (Granulocyte Colony stimulating factor)의 제조와 관련된다. GCSF는 증식(proliferation), 분화(differentiation), 및 호중성 과립구(neutrophilic granulocytes)의 작용기 활성화(functional activation)을 조절하는 약제학적 활성 단백질(pharmaceutically active protein)이다[Metcalf, Blood 67:257 (1986); Yan, et al. Blood 84(3): 795-799 (1994); Bensinger, et al. Blood 81(11): 3158-3163 (1993); Roberts, et al., Expt'l Hematology 22: 1156-1163 (1994); Neben, et al. Blood 81(7): 1960-1967 (1993)]. GCSF는 중성 또는 재조합 단백질을 의미하며, 바람직하게는 사람의 단백질이고, 조직(tissues), 단백질 합성(protein synthesis), 중성 또는 재조합 세포(natural or recombinant cells)로의 세포 배양과 같은 통상적인 방법으로 수득된 것을 의미한다. 뮤테인(mutens) 또는 다른 변형된 단백질과 같이 GCSF의 활성을 갖는 단백질을 고려할 수 있다.
- [0196] "제2 대사체(secondary metabolite)"는 제1 대사체로부터 유래된 화합물로, 유기체에 의해 제조된 것으로, 제1 대사체는 아니며 표준 조건에서 미생물의 성장에 요구되지 않는다. 제2 대사체 화합물은 후속적인 화학적 전환 또는 후속적인 바이오트랜스포메이션에 의해 유용한 화합물로 전환될 수 있다. 이와 같이, 상기 중간체 화합물의 향상된 기능성의 제공은 궁극적으로 유용한 화합물의 향상된 제조를 가능하게 하며, 본 명세서에서는 제2 대사체로 명명하였다.
- [0197] 본 발명의 일 관점에서, 발효 프로토콜(fermentation protocol)은 배치(Batch) 및 페드-배치(fed-batch)(선택적), 두 개의 페이스를 포함할 수 있다.
- [0198] 본 발명은 하기 실시예에 의해서 더욱 상세히 설명된다. 하기 실시예들은, 본 발명의 바람직한 구체예를 나타내는 것이며 오로지 예시를 위하여 설명된 것이다. 상기 기재와 실시예로부터, 당업자는 본 발명의 핵심적인 특징을 확인할 수 있을 것이며, 본 발명의 범주를 벗어나지 않고, 본 발명의 다양한 변형 및 수정을 도출해 낼 수 있을 것이다. 하기 실시예들은 본 발명을 한정하는 것으로 간주될 수 없다. 하기에 본 발명의 실시예를 개시하도록 하겠다.
- [0199] **실시예 1**
- [0200] 두 개의 발효조 배치를 IN105 전구체를 발현하기 위한 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)를 사용하여 운영하

었다. 하나의 배치(실험 #1)에는 대조 배지 강도의 절반이 글리세롤을 제외한 초회 배지로 채워진다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 약 8 g/L/h 의 공급 속도로 공급하였다. 발효를 8일 이하로 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 7일 동안 3.0 g/L에 이르렀으며, 멸균하였다. 다른 배치에는(실험 #2), 동일한 배지 조성을 사용하였으며, 0.1M 우레아를 발효기에 추가적으로 가하였다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 4% w/v 우레아와 함께 공급하였다. 발효를 8일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 7일 동안 3.5 에 이르렀다. 세포 성장 프로파일에는 특별히 상이한 점은 관찰되지 않았다. 상기 실험을 통하여 얻어진 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 1 및 2에 각각 나타내었다.

실시예 2

프로덕트 발현 속도를 확인하기 위하여 피키아 파스토리스 발효를 사용하여 우레아가 있는 인슐린 전구체 발현을 연구하였다. 본 시험에서 시험적인 대조 배지 조성물(trial control media composition)을 사용하였으며, 4% 우레아와 함께 메탄올을 20 g/L/h 초과의 속도로 공급하였다. 본 시험에서 시험적인 최대 프로덕트 농도(trial maximum product concentration)는 137 시간 동안 4.21 g/L 에 달했으며, 우레아를 발효기에 가하지 않은 경우에는 182 시간 동안 4.26 g/L 이었다. 세포 성장 프로파일에는, 성장 프로파일에는 영향을 미치지 않으면서 발효기에 우레아를 첨가함으로써 프로덕트 발현 속도는 증가하고 발효 시간은 감소되는, 눈에 띄는 차이점은 나타나지 않았다. 상기 실험으로 인한 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 3 및 4에 각각 나타내었다.

실시예 3

두 개의 발효기 배치를 글라진 전구체의 발현을 위한 피키아 파스토리스를 사용하여 운영하였다. 하나의 배치에는(실험 # 1) 대조 배지 강도의 절반이 글리세롤을 제외한 초회 배지로 채워진다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 약 8 g/L/h 의 공급 속도로 공급하였다. 발효를 10일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 10일 동안 1.03 g/L에 이르렀으며, 멸균하였다. 다른 배치에는(실험 #2), 동일한 배지 조성을 사용하였으며, 0.1M 우레아를 초기 발효 배지에 추가적으로 가하였다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 4% w/v 우레아와 함께 공급하였다. 발효를 9일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 9일 동안 1.75 에 이르렀다. 세포 성장 프로파일에는 특별히 상이한 점은 관찰되지 않았다. 상기 실험을 통하여 얻어진 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 5 및 6에 각각 나타내었다.

실시예 4

두 개의 발효기 배치를 엑센딘 전구체의 발현을 위한 피키아 파스토리스를 사용하여 운영하였다. 하나의 배치에는(실험 # 1) 대조 배지 강도의 절반을 글리세롤을 제외한 초회 배지로 글리세롤 공급 배치와 함께 채운다. 글리세롤 공급 배치를 운영한 후에, 메탄올을 약 11 g/L/h 의 공급 속도로 공급하였다. 발효를 6일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 6일 동안 0.74 g/L에 이르렀으며, 멸균하였다. 다른 배치에는(실험 #2), 동일한 배지 조성을 사용하였으며, 0.1M 우레아를 발효기에 추가적으로 가하였다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 4% w/v 우레아와 함께 공급하였다. 발효를 5일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 5일 동안 0.78 에 이르렀다. 세포 성장 프로파일에는 특별히 상이한 점은 관찰되지 않았다. 상기 실험을 통하여 얻어진 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 7 및 8에 각각 나타내었다.

실시예 5

두 개의 발효기 배치를 효소, 리파제의 발현을 위한 피키아 파스토리스를 사용하여 운영하였다. 하나의 배치에는(실험 # 1) 대조 배지 강도의 절반을 글리세롤을 제외한 초회 배지로 채운다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 약 6 g/L/h 의 공급 속도로 공급하였다. 발효를 8일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 7일 동안 1650×10^6 g/L에 이르렀으며, 멸균하였다. 다른 배치에는(실험 #2), 동일한 배지 조성을 사용하였으며, 0.1M 우레아를 발효기에 추가적으로 가하였다. 배치를 운영한 후에, 메탄올을 4% w/v 우레아와 함께 공급하였다. 발효를 8일 동안 계속하였다. 최대 프로덕트 농도는 7일 동안 2500×10^6 에 이르렀다. 세포 성장 프로파일에는

특별히 상이한 점은 관찰되지 않았다. 상기 실험을 통하여 얻어진 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 9에 각각 나타내었다.

[0209] 실시예 6

[0210] 메탄올 공급 뱃치 동안 메탄올 중 1, 2, 3 및 5% 우레아를 포함하는 IN105 전구체의 제조에 사용된(taken for) 메탄올 뱃치 중 우레아 농도의 효과를 연구하였다. 다른 파라미터는 실시예 1과 동일하였다. 최대 프로덕트 농도는, 메탄올 중 우레아의 농도가 각각 0, 1, 2, 3, 4 및 5% 인 배치에서 7일 동안 3.0, 3.2, 2.5, 3.3, 3.5 및 2.8 g/L이었다. 메탄올 유도 페이스 동안 메탄올 중 4% 우레아를 사용한 경우에 생산성이 우수함을 관찰할 수 있었다. 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 10 및 11에 각각 나타내었다.

[0211] 실시예 7

[0212] 20 g/L/h의 메탄올 공급 속도를 갖는 또 다른 실험에서, 최대 인슐린 전구체 농도를 가능하게 하는 가장 효과적인 우레아 농도를 확인하기 위해서, 우레아의 농도를 다양하게 하였다. 메탄올이 각각 0, 1, 2, 3, 4 및 5% 우레아 농도에서 공급될 때 뱃치 중에서 182, 166, 140, 164, 137 및 170 시간에서 최대 프로덕트 농도는 4.26, 4.03, 3.39, 4.16, 4.21 및 5.31 g/L 에 이르렀다. 바이오매스 및 프로덕트 농도 프로파일을 도 12 및 13에 각각 나타내었다. 시험은, 우레아의 첨가는 인슐린 전구체 제조 속도를 증가시키고, 메탄올이 5%의 우레아에서 공급될 때 발현 속도가 가장 높았음을 나타내었다.

[0213] 실시예 8

[0214] 메탄올 유도 페이스(methanol induction phase) 동안 시험용 뱃치(Trial batches)를 연구하였고, 잔류 우레아 농도(residual urea concentration)를 세포가 없는 상층액(cell free supernatant) 중에서 각각 상이한 수준으로 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.2 및 1.5M의 농도로 유지하였으며, 생산성에 대한 효과를 연구하였다. 모든 뱃치는 실시예 1과 유사한 파라미터 및 배지 조성을 갖도록 하였다. 잔류 우레아를 우레아 스톡(urea stock)을 각각 공급함으로써 유지하였다. 뱃치를 통하여 발효가 일어나는 동안 세포가 없는 상층액 중에서 우레아가 1M의 범위에서 유지될 때 최대 프로덕트를 수득할 수 있음을 결과로 나타내었다. 잔류 우레아 농도가 약 0.5 M로 유지될 때 최대 프로덕트 농도 4.46 g/L 가 수득되었다.

[0215] 본 실험에서 총 우레아는, 잔류 우레아가 각각 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2 및 1.5 M 농도에서 유지될 때, 시험에서 최종 브로스 부피(final broth volume)의 0, 0.2, 0.5, 0.9, 1.2, 1.8, 2.3 and 2.9 M 당량으로 공급되었다. 결과는 도 14에 나타내었다.

[0216] 실시예 9

[0217] 인슐린 전구체 발효와 함께 시험을 실시하였다. 본 시험에서 메탄올을 20 g/L/h의 속도로 공급하였다. 인슐린 전구체 발효에서, 0.7 M의 잔류 농도가 유지될 때, 프로덕트 농도가 최대였음이 관찰되었다. 본 시험에서, 총 우레아는, 잔류 우레아가 각각 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2 및 1.5M 농도로 유지될 때, 시험에서 최종 브로스 부피(final broth volume)의 0.0, 1.6, 2.7, 3.5, 7.0, 8.8, 11.7 및 13.3M 당량으로 공급되었다. 배양이 우레아를 현저한 양으로 소비할 수 있다는 결과가 도 15에 도시되었다.

[0218] 실시예 10

[0219] IN105 의 또 다른 뱃치가 표준 대조 배지(standard Control media) 및 4% 우레아가 첨가된 20 g/L/h이하의 메탄올에서 운영되었다. 본 시험에서, 113시간 경과 후 3.71 g/L 프로덕트 농도가 도달되었으며, 반면 우레아가 발효기에 공급되지 않을 때는 183 시간 경과 후 3.76 g/L 수득되었다. 결과는 도 16 및 도 17에 도시되었다.

- [0220] **실시예 11**
- [0221] 추가의 실험에서, 발효 생산성에 대한 이들의 효과를 관찰하기 위하여, 우레아 대신 다른 다양한 화합물로 대체하였다. 따라서, 각각의 배치에, 티오우레아(thiourea), 디이미드(diimides), 카보디이미드(carbodiimides), 티오카바마이드(thiocarbamides)를 1% 농도로 시험하였다. 모든 화합물에서 대조에 비하여 생산성이 향상되었음을 도 18을 통하여 확인할 수 있다.
- [0222] **실시예 12**
- [0223] 실험에서, 발효 동안 우레아를 공급하였으며, 우레아 공급이 이루어 지지 않은 배치와 비교할 때 더 빨리 배지 내에서 포스페이트의 결손(depletion)이 일어나 효모에 의해 포스페이트의 업테이크(uptake)가 증가되었다. 따라서, 펩타이드 및 단백질의 제조를 위한 표준 또는 수정된 피키아 발효 프로토콜로서의 우레아의 포함(incorporation)으로 인해, 메타볼릭 시프트(metabolic shift)의 결과 포스페이트의 소비가 빨라졌으며, 생산성(g/L/h)이 높아졌다. 상기의 실시예에서, 잔류 우레아 농도는 약 0.5 g/L(0.5 g/lit) 내지 약 3 g/L로 조절되었다(control).
- [0224] **실시예 13**
- [0225] 물 1000 ml 에 소야 빈 플로어(Soya bean flour) 5.0 그램(grams), 텍스트로스 모노하이드레이트(Dextrose monohydrate) 20.0 그램, 소이 펩톤(Soy peptone) 5.0 그램, CaCO_3 1.0 그램, K_2HPO_4 0.1 그램을 포함하는 성장 배지를 준비하였다. 시드 배지(seed medium)의 pH를 NaOH 용액으로 6.8 ± 0.1 으로 맞추었다. 멸균된 접종원 배지(sterilized inoculum medium)를 배지의 포자 바이알 현탁액(spore vial suspension of culture), 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp (BICC 6826))으로 접종하고, $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 48 시간 동안 호기성 조건(aerobic conditions)에서 배양하였다. 성장 시드(grown seed)를 물 1000 ml 중 소야 빈 플로어(Soya bean flour) 37.5 그램, 텍스트로스 모노하이드레이트(Dextrose monohydrate) 22.5 그램, 코튼 시드 플로어(Cotton Seed Flour) 3.75 그램, 콘 스틱 리커(corn steep liquor) 7.5, NaCl 7.5 및 안티폼(Antifoam) SAG 0.5 그램을 포함하는 발효 배지에(pH는 7.0 ± 0.1 로 맞추어)이동시켰다. 48시간 동안 인큐베이션 한 후에, 멸균 컴팩틴 용액(sterile compactin solution)을 텍스트로스 소량과 함께 가하였다. 24시간이 경과할 때 마다, 몇 개의 유사한 플라스크 중 하나의 플라스크로부터 컴팩틴의 프라바스타틴으로의 바이오컨버전을 확인하였다. 컴팩틴 3.0 g/L 모두가 공급될 때까지 24 시간마다 상기 과정을 반복하였다.
- [0226] 변형된 발효 배지(modified fermentation medium)를 사용하는 실험의 시작(initiation of experiments)에 앞서, 우레아의 각각 상이한 양을 발효 배지에 가하여, 유기체에 대한 우레아의 독성 정도를 확립하였다. 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 및 4.0 g/L 농도를 발효 배지를 포함하는 플라스크에 가하고, 상기와 동일하게 배양하였다. 48 시간 동안 인큐베이션한 후, 플라스크 각각의 성장을 모니터링하였다. 결과 데이터를 도 20에 나타내었다.
- [0227] 3.0 g/L 초과의 우레아 농도로 배양의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다. 반복된 시험 역시 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 3.0 g/L 미만의 농도를 바이오컨버전에 있어서의 우레아의 효과르 확인하였다.
- [0228] 상기 언급한 바와 같이, 추가적인 구성성분(additional constituent)으로 우레아를 함유하는 제조 배지로 유사한 시험을 수행하였다. 제조 배지 중 우레아의 농도를 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 및 3.0 g/L로 유지하였고, 접종(inoculation)시에 첨가하였다.
- [0229] 48 시간의 인큐베이션 후에, 멸균 컴팩틴 용액을 텍스트로스 공급과 함께 공급하였다. 유사한 조건 하에 운영한 다수의 플라스크 중 하나로부터 24 시간 후 바이오컨버전을 산정하였다. 컴팩틴 3 g/l을 누적적으로(cumulatively)공급할 때까지 매 24 시간 마다 상기 과정을 반복하였다. 프라바스타틴의 형성에 있어서 소비되

는 총 컴팩틴의 관점에서 바이오컨버전을 산정하였다. 역가(titer) 및 전환율(percentage conversion)의 관점에서 실험 결과를 도 21 및 도 22에 각각 나타내었다.

[0230] 우레아 농도가 1.5 g/L 인 플라스크는, 59.5% 전환된 대조군 플라스크와 비교하였을 때, 프라바스타틴으로의 컴팩틴의 최대 전환이 85.4 % 이었다.

[0231] 상기의 실시예에서, 잔류 우레아 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 로 조절되었다.

[0232] 실시예 14

[0233] 우레아와 함께, 그라눌로사이트 콜로니 스티물레이팅 팩터(Granulocyte colony stimulating factor (GCSF))의 발현을 이.콜라이 발효를 사용하여 연구하였으며, 이를 통하여 프로덕트 발현 속도를 확인하였다. 시험에 사용된 배지는 프리-시드 배지(pre-seed medium), 시드 배지(seed medium) 및 제조 배지(production medium)로 이루어진다. 상기 프리-시드 배지는 1000 ml 의 물에 소야 펩톤(Soya peptone) 10.0 g, NaCl 10.0 g, 효모 추출물(yeast extract) 10.0 g 을 포함한다. 시드 배지는 1000 ml 의 물에 1.2 g 의 암모늄 설페이트(Ammonium sulphate), 2.4 g의 마그네슘 설페이트(Magnesium sulphate), 10 g 의 효모 추출물(Yeast extract), 11g 의 DMH, 5g 의 K₂HPO₄, 40ml 의 미량 염(Trace salts)을 포함한다. 제조 배지는 1000 ml 의 물에 텍스트로스 모노하이드레이트(dextrose monohydrate) 11g, 암모늄 설페이트(Ammonium sulphate) 2.4g, 마그네슘 설페이트(Magnesium sulphate) 4.8g, 효모 추출물(yeast extract) 20g, K₂HPO₄ 10g, 미량 염(Trace salts) 40ml 을 포함한다. pH를 암모니아로 7.0 으로 맞추었다. 배치 페이스가 완성된 후에, 발효기인 바이오메스가 텍스트로스 및 효모 추출물의 연속적인 공급으로 증가되었다. 이어서 셀 매스(cell mass)가 유도되었으며, 목적하는 프리덕트의 제조를 위하여 추가로 8 시간 동안 운영하였다.

[0234] 3 개의 발효기 배치를 이.콜라이 발효 공정에서 우레아의 효과를 확인하기 위하여 사용하였다. 첫번째 배치(실험 #1)는 우레아를 첨가하지 않은 대조 배치이다. 사용된 배지는 상기와 동일하다. 배치를 ~180g/L WCW에서 유도하였다. 유도 후에 8시간 동안 발효를 계속하였다. 달성된 최대 프로덕트는 6.6g/L 으로, 특정 활성(specific activity)이 0.028 g/wcw이었다. 두번째 배치(실험 #2)에서, 1g/L 의 우레아를 상기 배지에 더하여 발효기에 추가하였다. 상기 배치를 우레아(1g/L)와 유사한 양을 갖는 피드(feed)로 공급하였다. 배치를 ~180g/L WCW 에서 유도하고, 유도 후에 8 시간 동안 발효를 계속하였으며, 수득된 프로덕트는 7.4g/L 이었고, 특정 활성은 0.033 g/WCW이었다. 세번째 배치(실험 #3)는 2 g/L 우레아를 사용하였다는 것을 제외하고는 실험 #2와 유사하다. 수득된 최종 프로덕트는 6.58g/L 로, 특정 활성은 0.032 g/wcw이었다.

[0235] 상기 결과에서 나타나듯이, 세포 성장 프로파일(cell growth profile)에서 발효기에 우레아를 첨가함으로써 성장 프로파일에 영향을 미치지 않으면서 프로덕트 형성을 증가시키는 나타내는 현저한 차이점은 나타나지 않았다. 특이적 생산성에 있어서 전체 약 18% 증가를 얻을 수 있었다. 상기 실험 결과인 WCW 프로파일을 도 23에 나타내었으며, 특이적 생산성 프로파일을 도 24에 나타내었다.

[0236] 상기의 실시예에서, 잔류 우레아 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 로 조절되었다.

[0237] 실시예 15

[0238] 스트렙토키나제의 제조를 위한 발현 시스템으로 이.콜라이(E.coli)를 사용하여 유사한 시험을 수행하였다. 사용된 배지는 실시예 13과 동일하며, 시험된 우레아 농도 역시 동일하다. 실시예 14에 기재된 바와 같이, 유사한 3개의 배치를 우레아 농도 0g/L, 1 g/L 및 2 g/L 으로 하였다. 우레아를 첨가하지 않은 대조 배치(실험 # 1)은 0.026 g/wcw의 특이적 생산성을 갖는 8 시간 유도 후에 최종 생산성 7.06 g/L 이다. 최대 역가(maximum titre)는 1 g/L 우레아 배치(실험 # 2)에서 달성되며, 이는 생산성 10.5 g/L 이고, 특이적 생산성 0.041

g/wcw이다. 2 g/L 우레아(실험 # 3)의 배치는 6.56 g/L 프로덕트를 나타내며, 특이적 생산성은 0.022 g/wcw이었다. 상기 프로덕트에 있어서, 우레아 농도의 증가는 1 g/L 초과이고, 특이적 생산성 및 역가에 있어서 현저한 감소가 나타났다.

[0239] 실시예 2와 마찬가지로, 상기 3 개의 시험의 WCW 에서는 현저한 변화가 나타나지 않았는데, 이는 생산성의 증가가 프리덕트 형성의 증가의 결과이며, 바이오매스에서의 변화에 연결되는 것은 아니라는 것을 나타낸다. 특정 생산성에 있어서 전체 약 57% 의 증가가 수득된다. 상기 실험 결과로부터 얻은 WCW 프로파일은 도 25에 도시되었다. 역가 프로파일은 도 26에 나타났다.

[0240] 상기의 실시예에서, 잔류 우레아 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 로 조절되었다.

[0241] **실시예 16**

[0242] 리파제 효소를 생성하는 것으로 알려진 리조뮤코르 종(Rhizomucor sp (BICC 362))은 배지 중에서 우레아를 첨가로 생산성 향상을 나타내었다. 상기 배양으로부터 생성된 리파제는 에스테르화(esterification) 및 가수분해(hydrolysis)와 같은 바이오컨버전 반응에 광범위하게 사용될 수 있다. 두 개의 발효 배치(10 L 부피)를 상기 공정에 사용하였으며, 하나는 우레아 첨가를 하지 않은 것이고, 다른 하나는 0.5 g/L 우레아를 첨가하였다. 높은 우레아 농도(1 g/l)인 시험을 하였으며, 이는 낮은 생산성을 나타내었고, pH를 유지하기 위하여 부식성의 소비가 매우 높았다. 리조뮤코르 종(Rhizomucor sp (BICC 362))의 성장 배지는 각각 마이다(Maida) 41.4 g, 수크로스(sucrose) 10 g, 펩톤(peptone) 3.06 g, 암모늄 설페이트(ammonium sulphate) 2g, 효모 추출물(yeast extract) 2g, 포타슘 포스페이트(potassium phosphate) 0.85 g, 칼슘 클로라이드(calcium chloride), 마그네슘 설페이트(magnesium sulphate) 및 소듐 클로라이드(sodium chloride) 1 g 을 포함한다. 전체 배지는 물을 가하여 1L로 하였다. 성장 시드(grown seed (10% v/v))를 물 1000 ml중 덱스크로스(dextrose) 12.5g, 소야 펩톤(soya peptone) 37.5g, 소야 플로어(soya flour) 25, 포타슘 포스페이트(potassium phosphate) 2.5, 마그네슘 설페이트(magnesium sulphate) 0.625, 소야 오일(soya oil) 12.5 g 을 포함하는 제조 배지(production medium)로 이동시켰다. 배지의 pH는 6.0으로 맞추었고, 부식성 첨가(caustic addition)된 배치를 통하여 6.0으로 유지하였다.

[0243] 우레아(0.5 g/l)를 첨가함으로써 대조 배지에 비하여 리파제 생성 속도가 증가함을 확인할 수 있었다. 우레아의 높은 농도는 낮은 생산성을 나타낸다. 데이터를 도 27에 나타내었다.

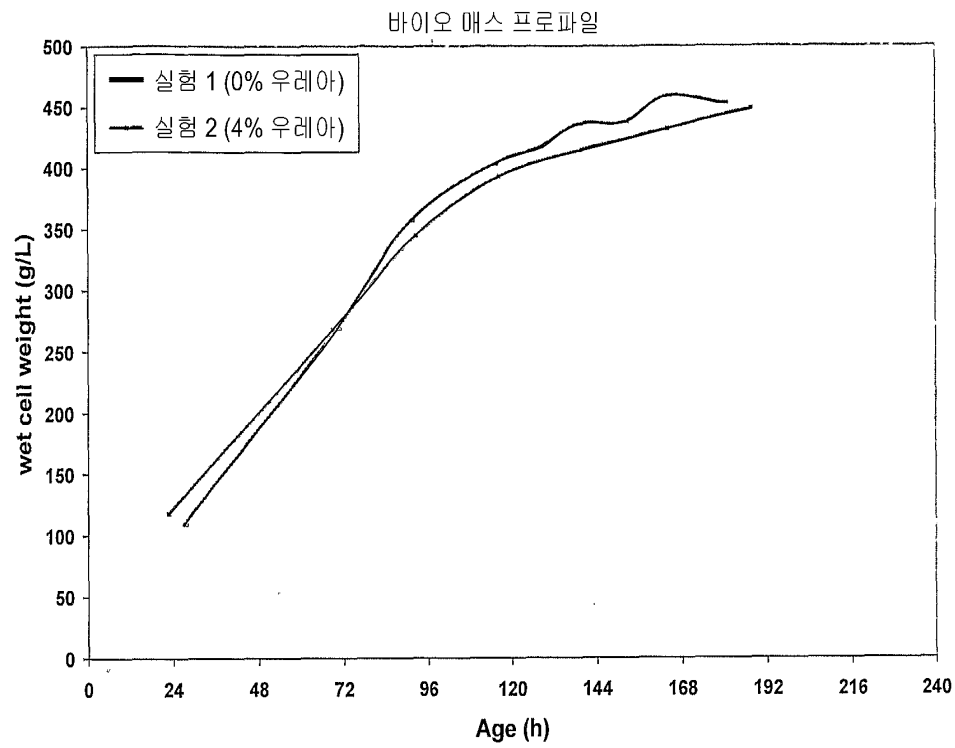
[0244] 본 발명은 특정 방법론, 프로토콜, 셀라인(cell lines), 종 또는 속, 및 배지 조성 등에 한정되지 않는다. 본 명세서에 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용된 것으로, 본 발명을 한정하기 위하여 사용된 것은 아니다. 상기 기재는 당업자에게 본 발명의 실시를 설명하기 위한 것이며, 모든 명백한 변형 및 수정을 설명하는 것은 아니다.

[0245] 상기의 실시예에서, 잔류 우레아 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 3 g/L 로 조절되었다.

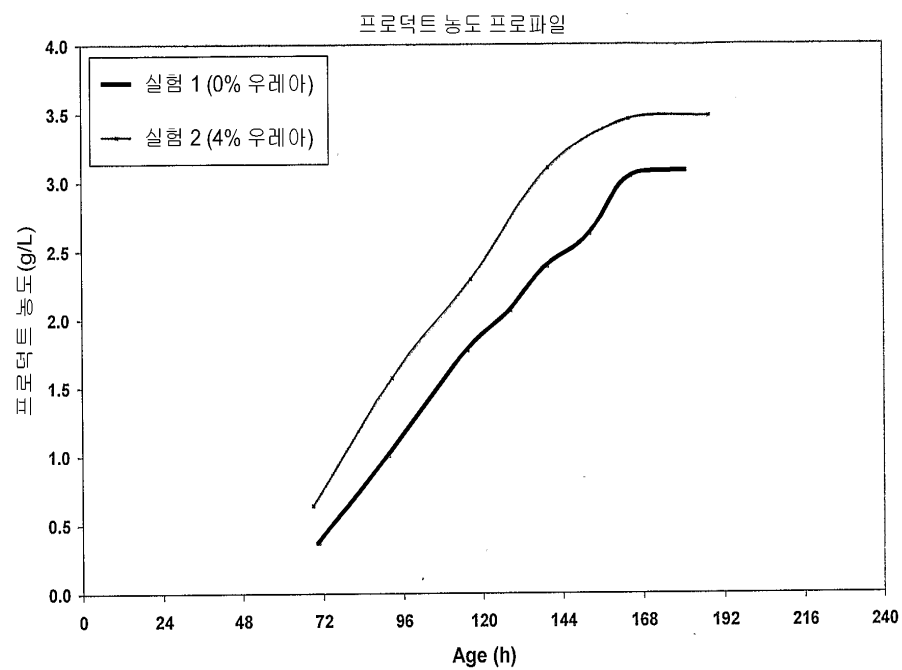
[0246] —

도면

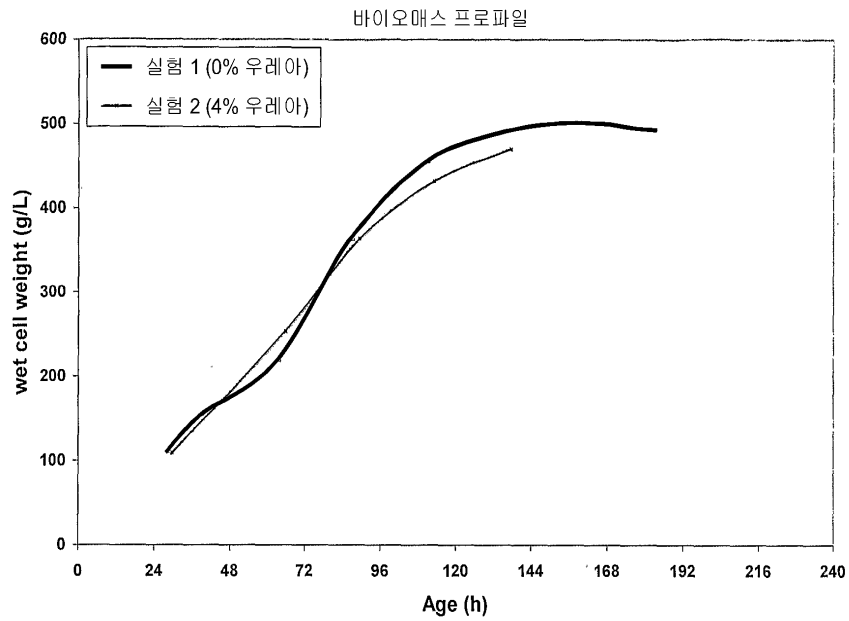
도면1



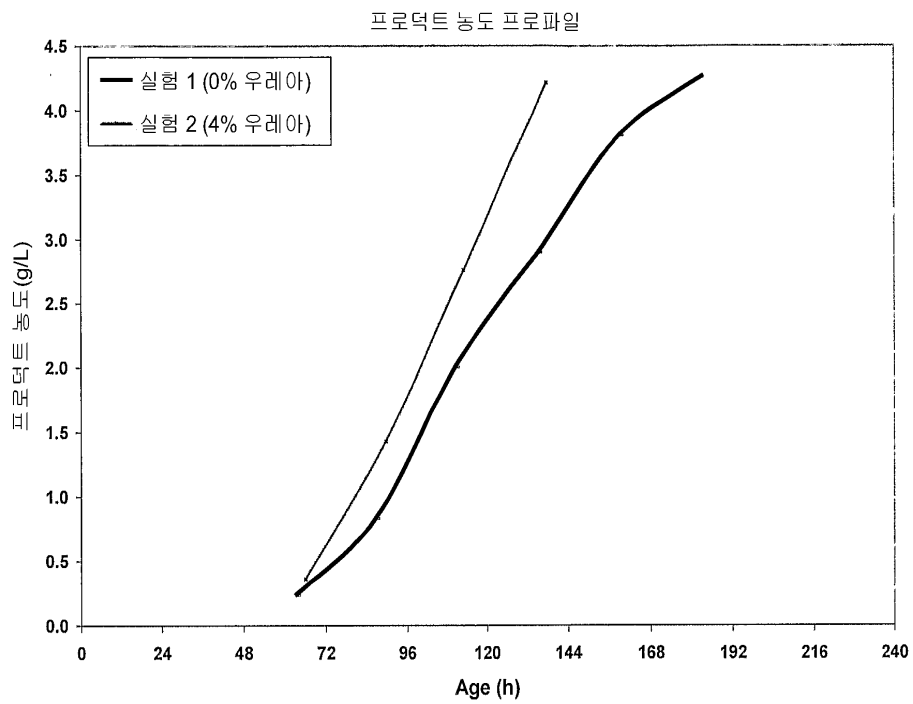
도면2



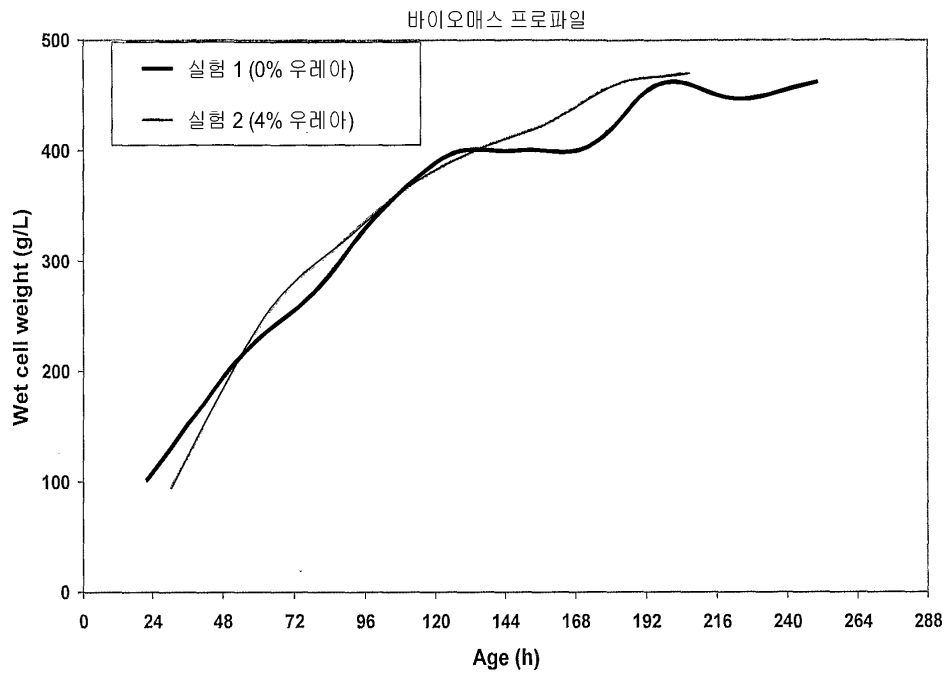
도면3



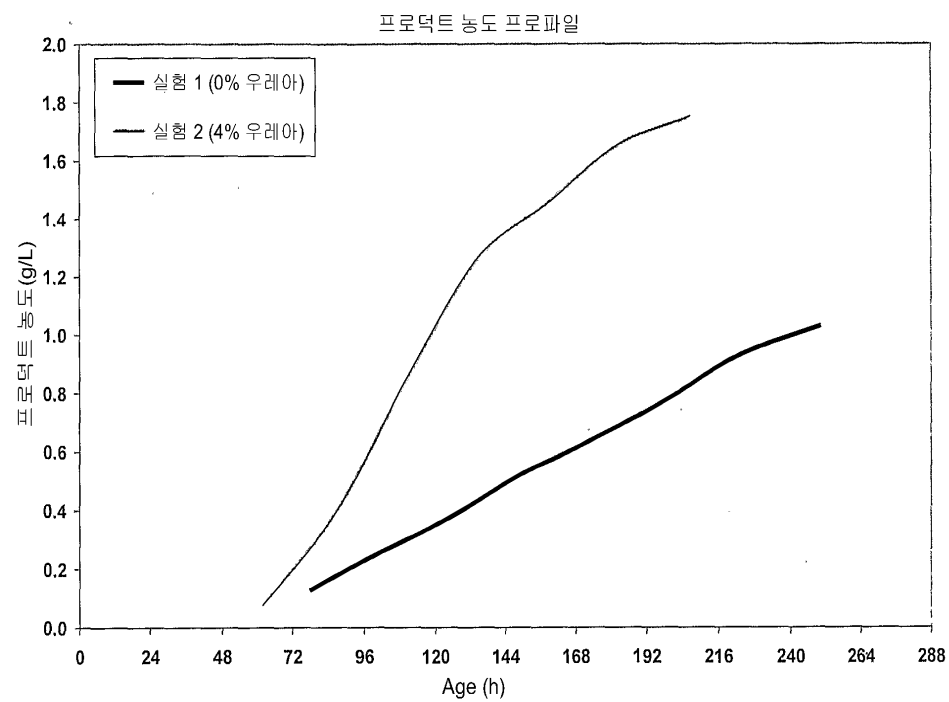
도면4



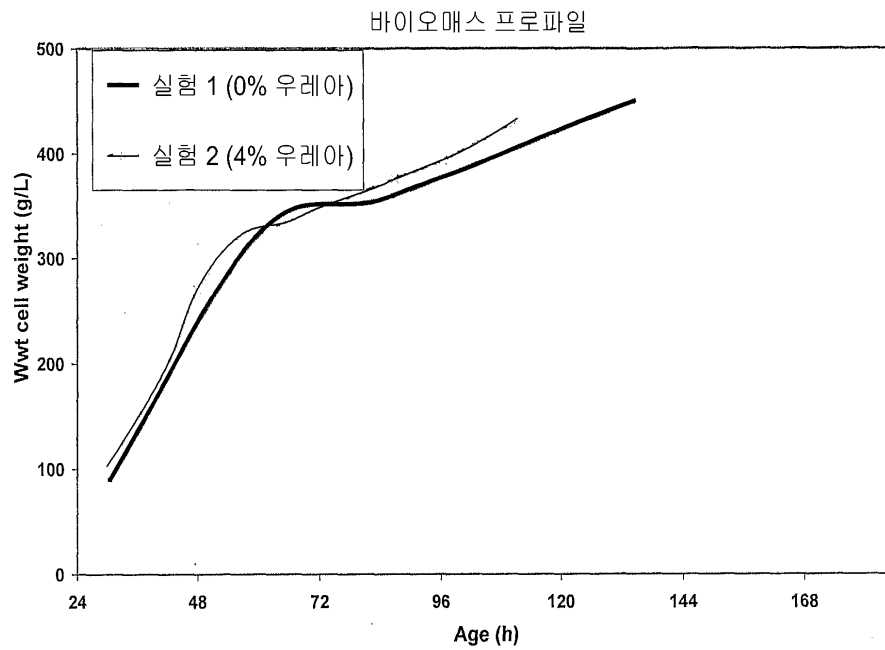
도면5



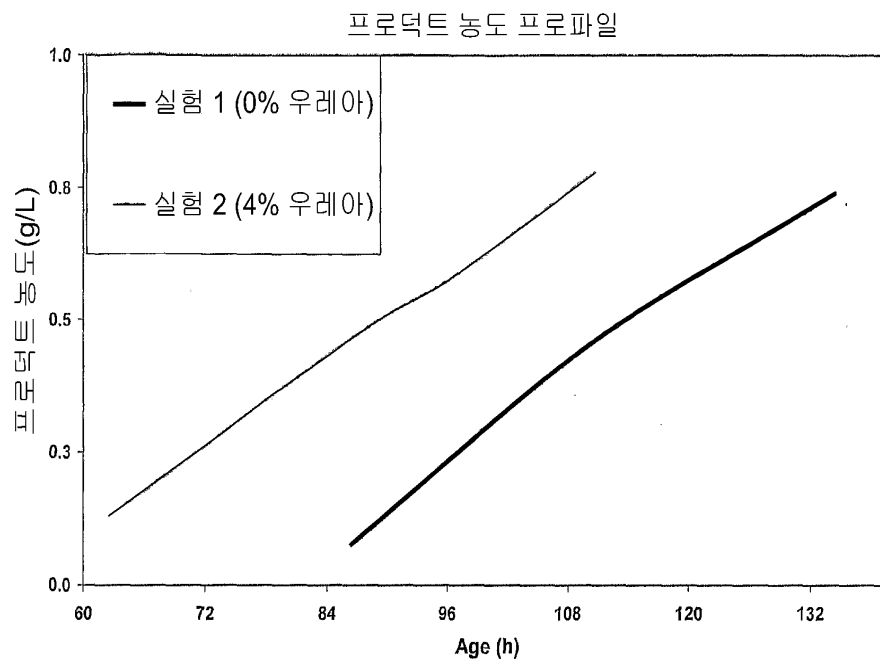
도면6



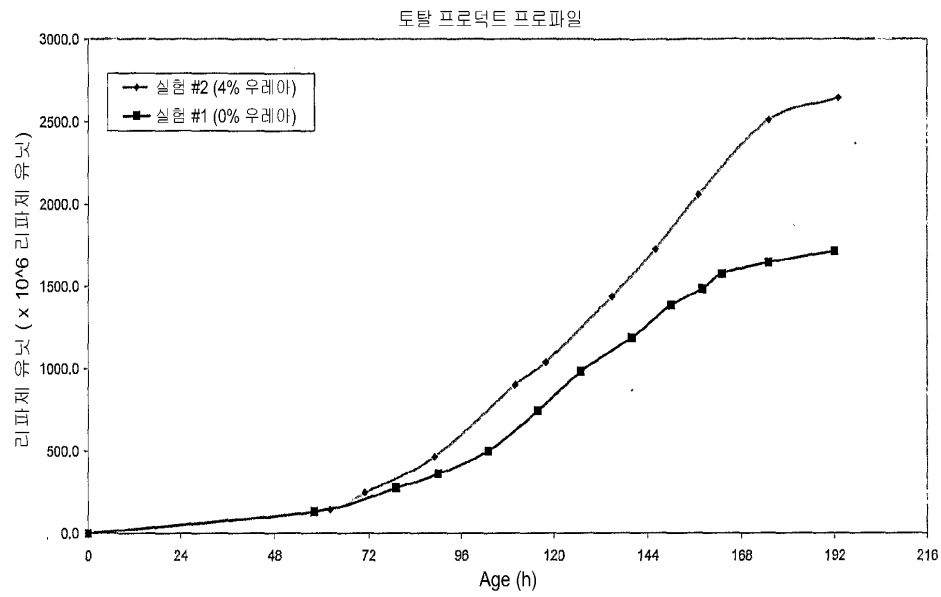
도면7



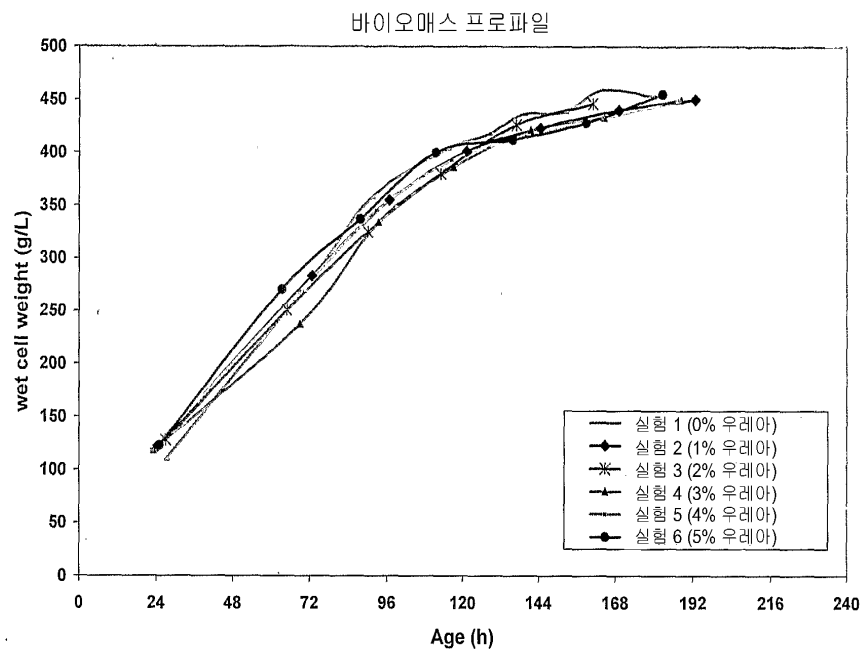
도면8



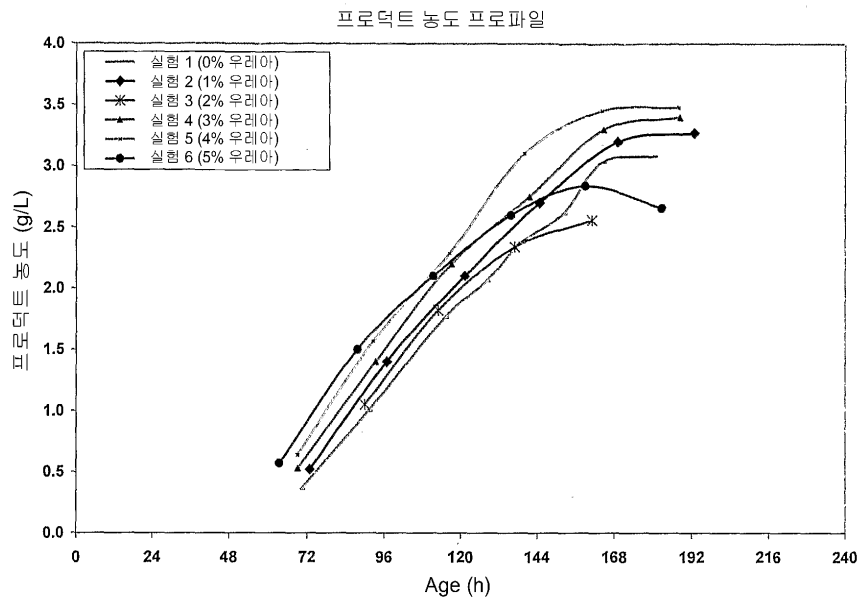
도면9



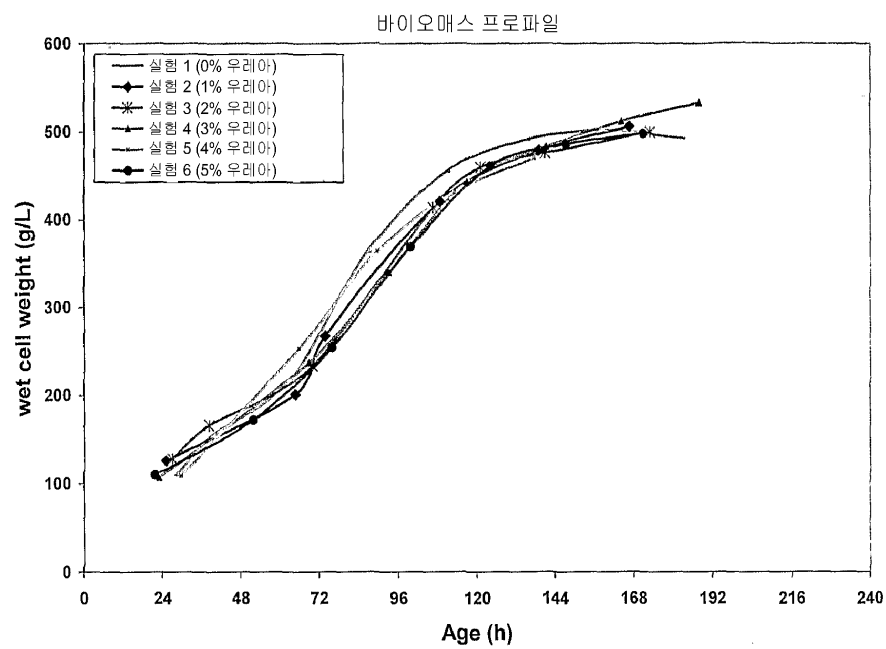
도면10



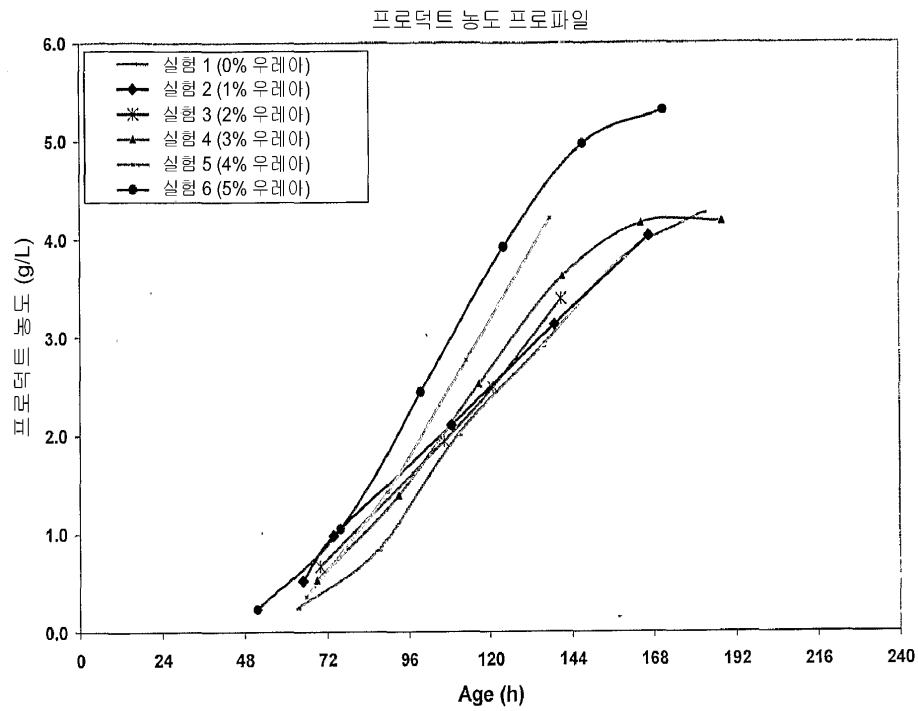
도면11



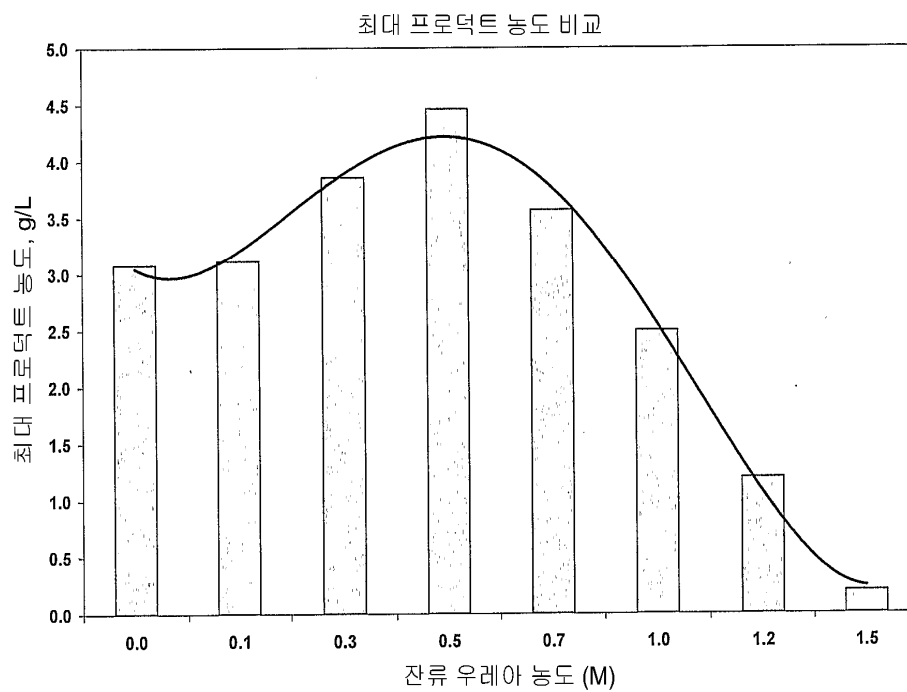
도면12



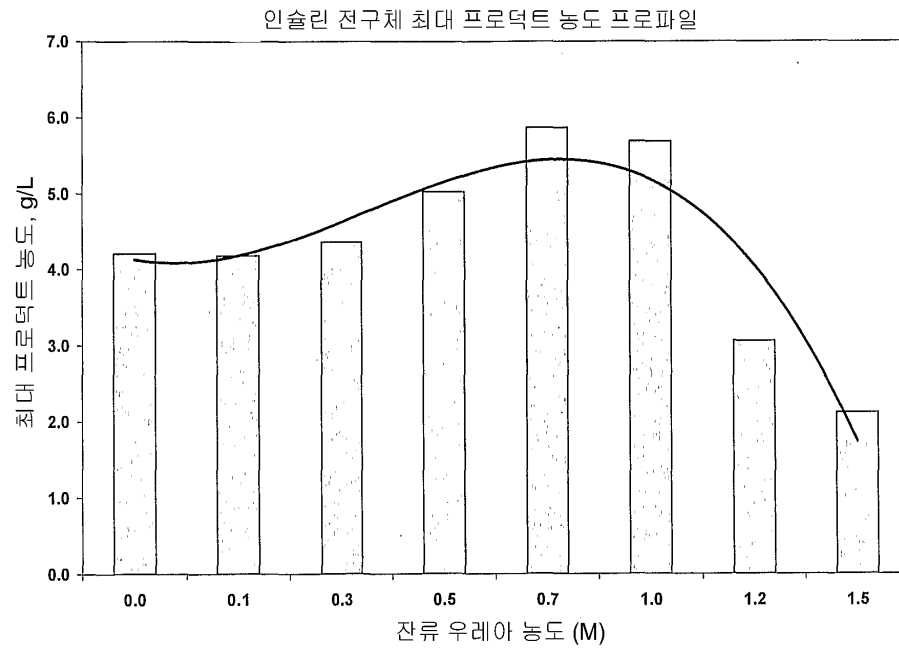
도면13



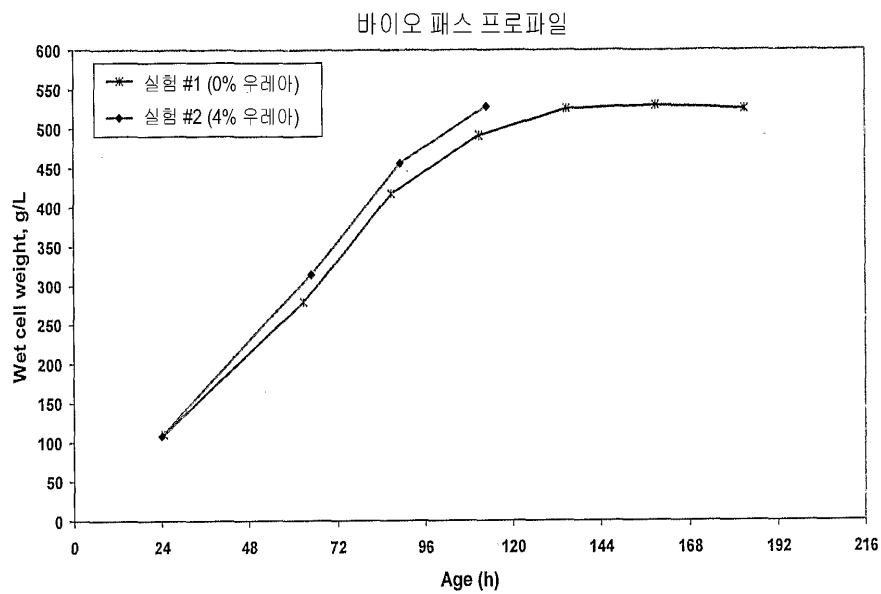
도면14



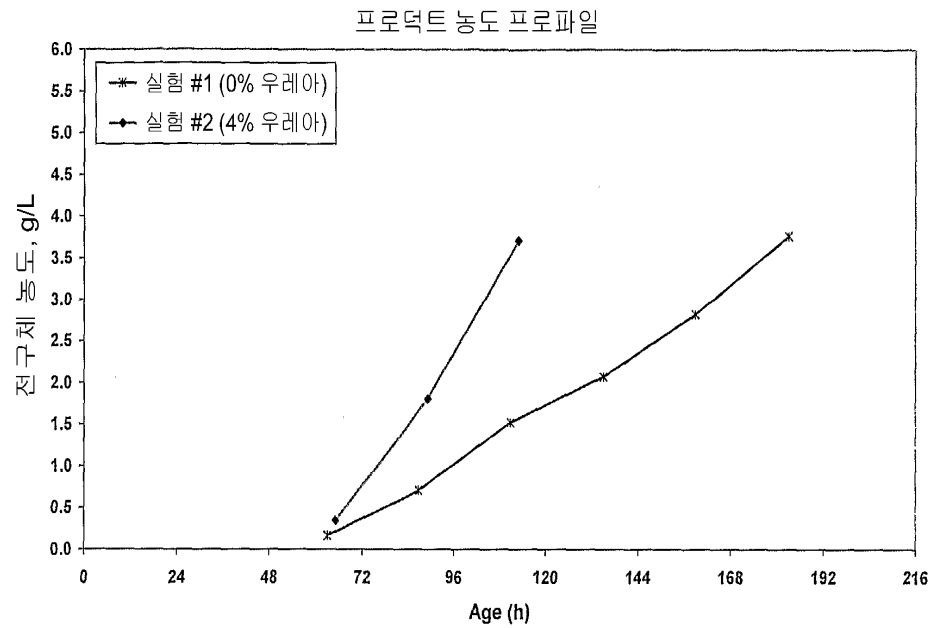
도면15



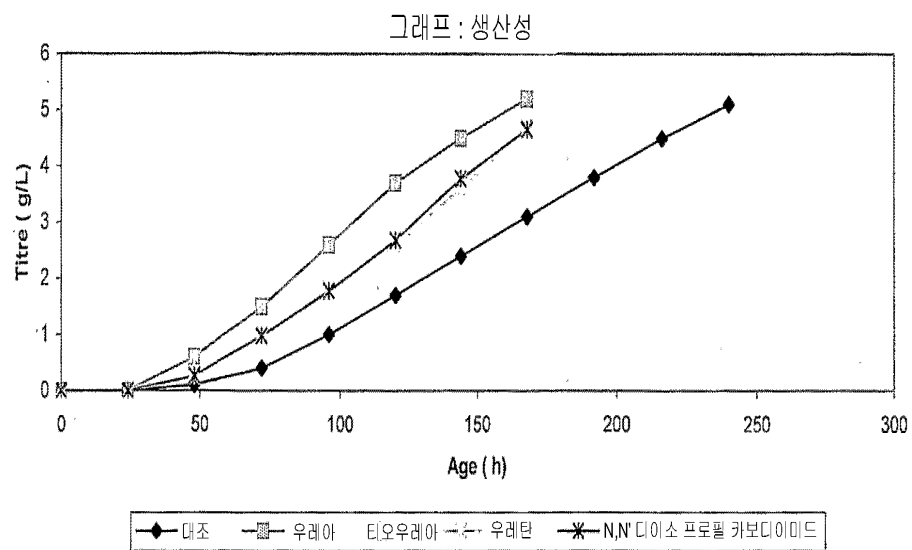
도면16



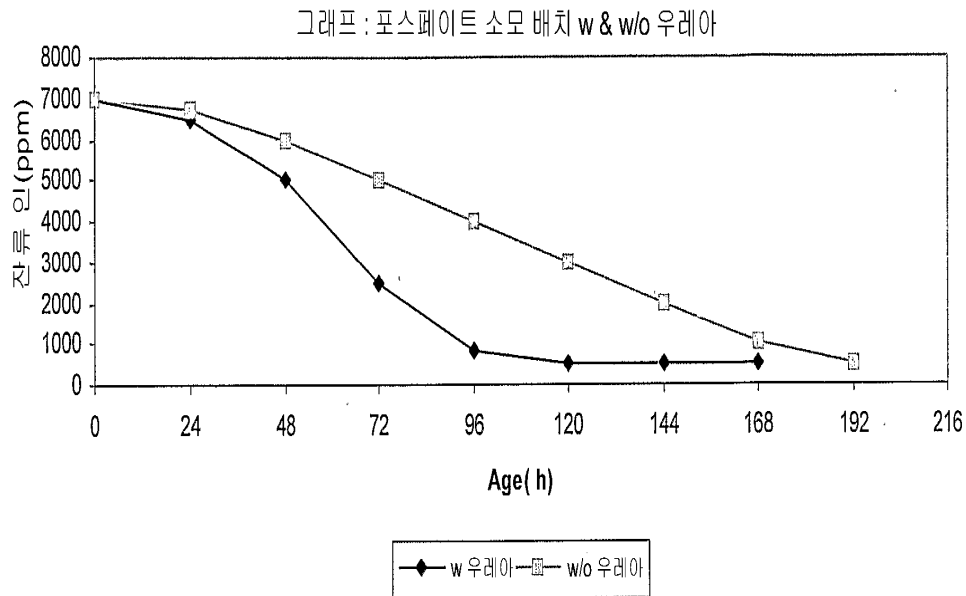
도면17



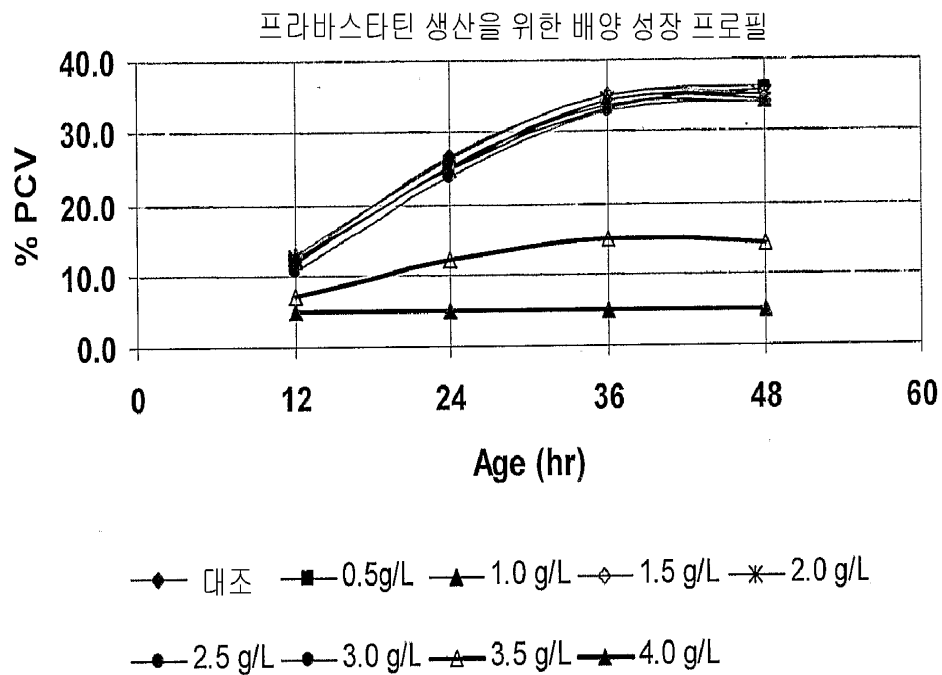
도면18



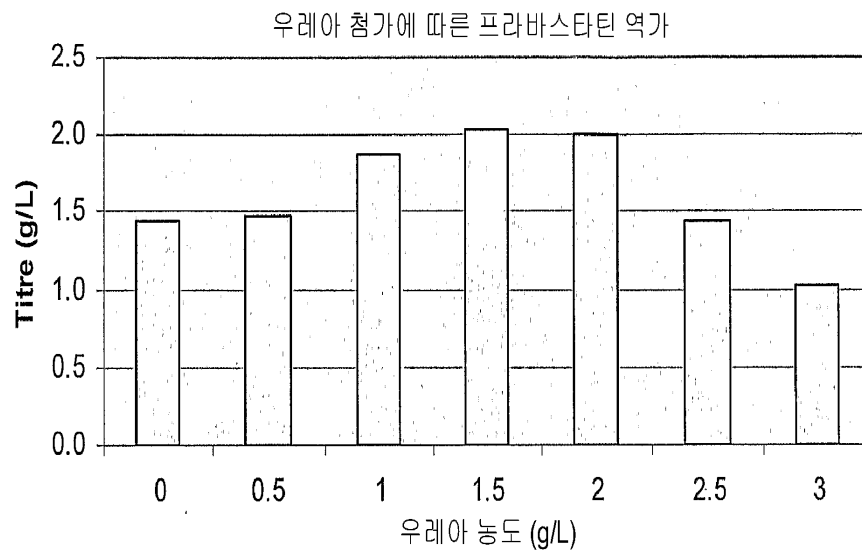
도면19



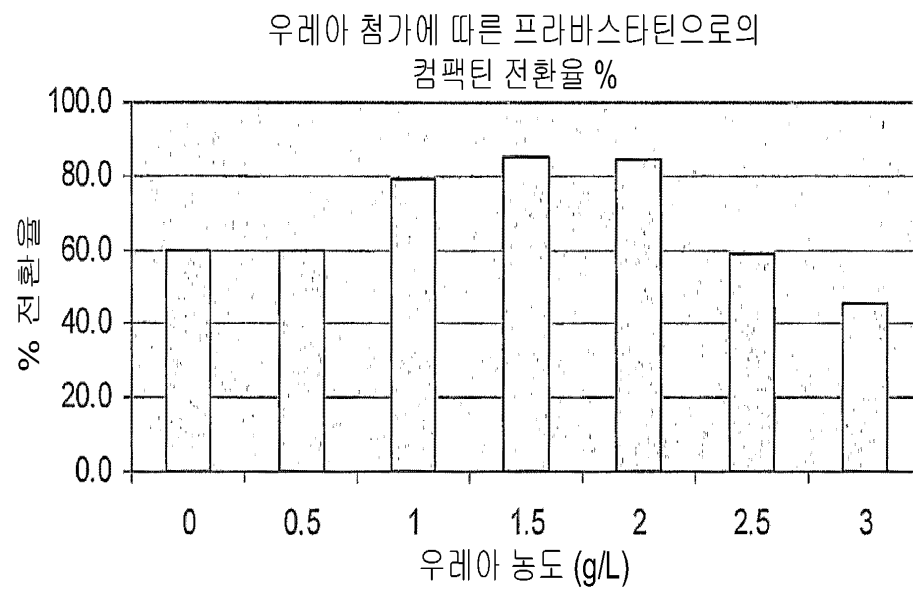
도면20



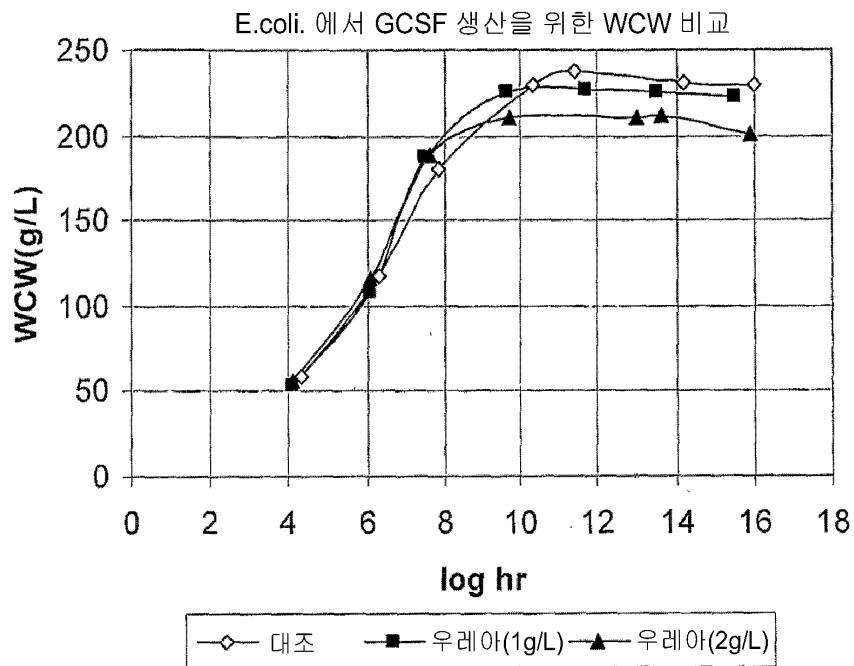
도면21



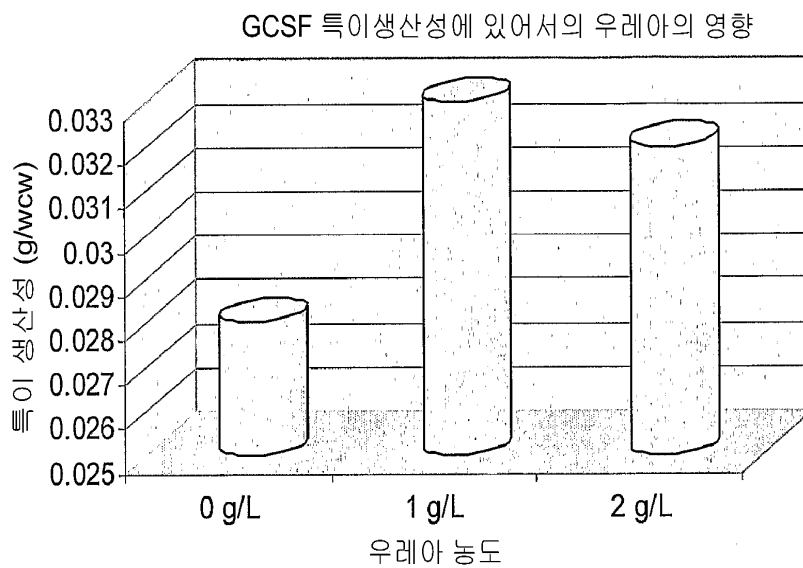
도면22



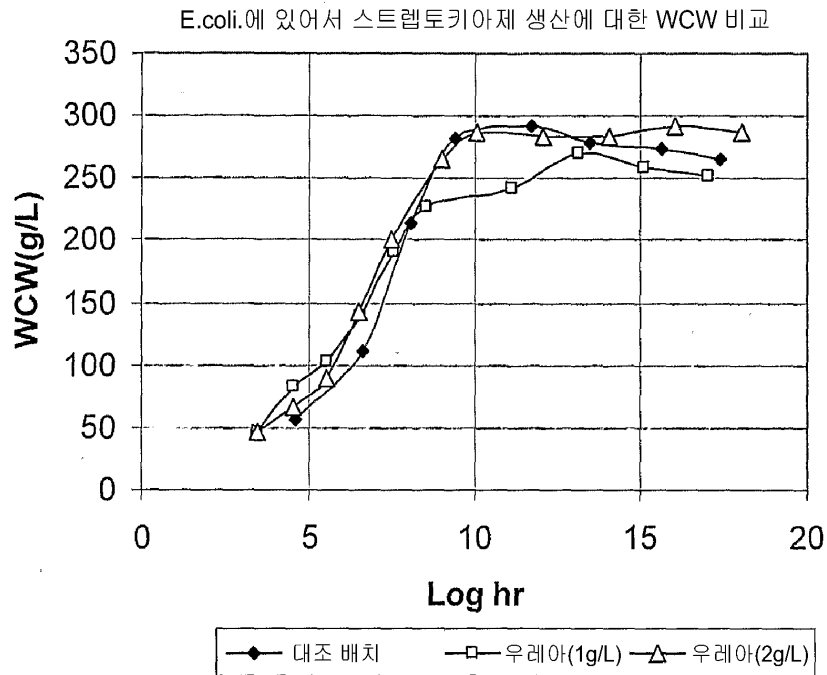
도면23



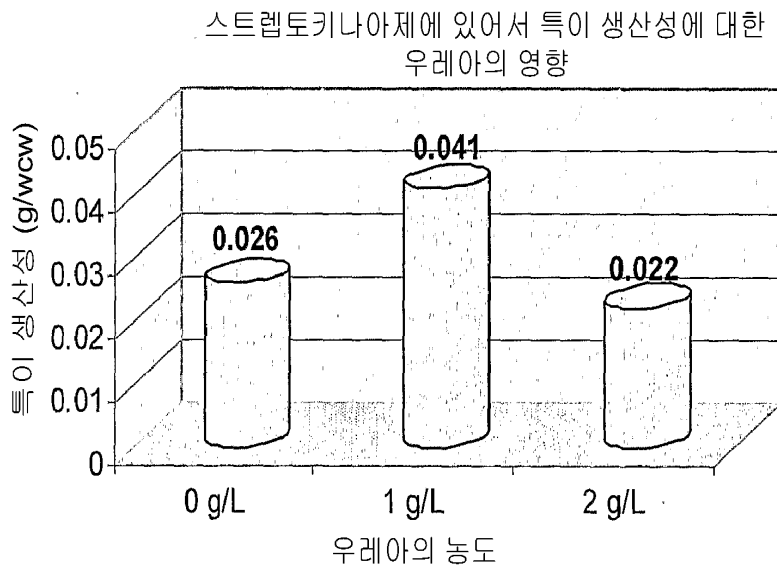
도면24



도면25



도면26



도면27

