

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶

C07K 3/00

A61K 37/00

(45) 공고일자 1994년04월22일

(11) 공고번호 94-003475

(21) 출원번호	특1985-0008860	(65) 공개번호	특1986-0005015
(22) 출원일자	1985년11월27일	(43) 공개일자	1986년07월16일
(30) 우선권주장	679,121 1984년12월06일 미국(US)		
(71) 출원인	세투스 온콜로지 코포레이션 필립 엘. 맥가리글 2세 미합중국 캘리포니아 94608 에머리빌 53번 스트리트 1400		

(72) 발명자

키스톤 에드워드 코즈

미합중국 캘리포니아 94702 버클레이 허스트 애비뉴 1번 1246

로버트 포간 헬렌백

미합중국 캘리포니아 94901 산 라파엘 스프링 그로브 애비뉴 136

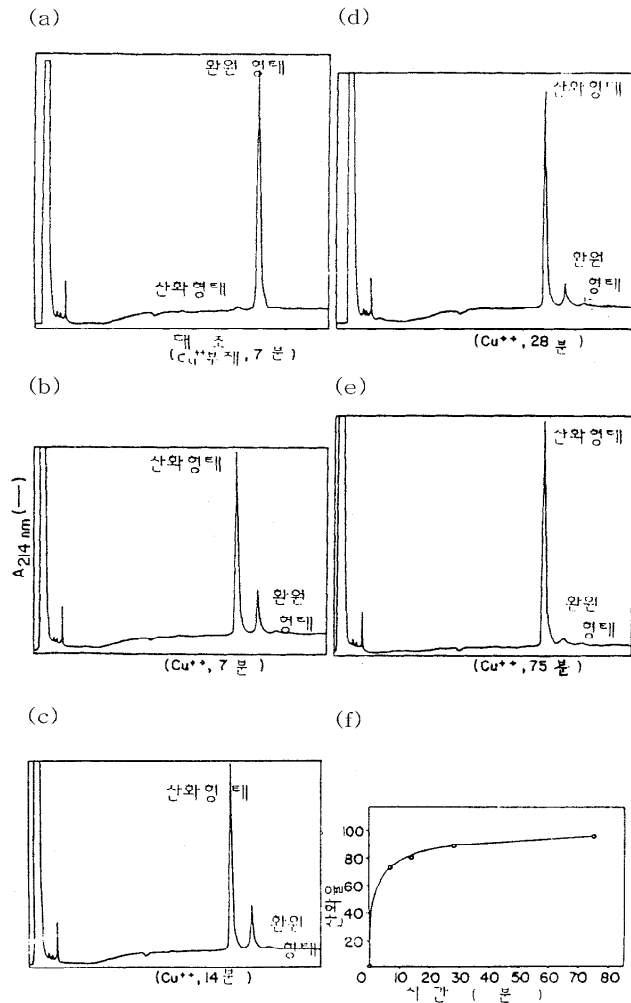
(74) 대리인

이병호, 최달용

심사관 : 정상섭 (특자공보 제3607호)(54) 재조합 단백질에서 디설파이드 결합형성을 촉진시키는 방법요약

내용 없음.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

재조합 단백질에서 디설파이드 결합형성을 촉진시키는 방법

[도면의 간단한 설명]

제1a도는 CuCl_2 없이 7분 동안 완충액에 환원된 IFN- β_{ser17} 을 넣은 대조반응의 역상 고압액체 크로마토그래피(reverse-phase high pressure liquid chromatography : RP-HPLC)이고,

제1b도는 CuCl_2 를 사용하여 7분 동안 환원된 IFN- β_{ser17} 을 산화시킨 후의 반응혼합물의 RP-HPLC이며,

제1c도는 14분 동안 산화시킨 후의 RP-HPLC이고,

제1d도는 28분 동안 산화시킨 후의 RP-HPLC이며,

제1e도는 75분 동안 산화시킨 후의 RP-HPLC이고,

제1f도는 산화시간(분)에 대해 산화된 IFN- β_{ser17} 의 퍼센트를 플롯한 것이다.

제2도의 (a)는 75분 동안 재조합 IFN- β_{ser17} 을 산화시킨 후의 반응혼합물의 RP-HPLC이고,

제2도의 (b)는 75분 동안 산화시킨 물질을 디티오프레이톨로 환원시킨 후의 반응혼합물의 RP-HPLC이며,

제3도의 (a)는 CuCl_2 를 사용하여 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 를 2분 동안 산화시킨 후의 반응혼합물의 RP-HPLC이고,

제3도의 (b)는 10분 동안 산화시킨 후의 반응 혼합물의 RP-HPLC이며,

제3도의 (c)는 50분 동안 산화시킨 후의 반응 혼합물의 RP-HPLC이고,

제3도의 (d)는 50분 동안 산화시킨 생성물을 디티오프레이톨로 재환원시킨 후의 반응혼합물의 RP-

HPLC이며,

제4도는 CuCl_2 를 사용하여 40분 동안 산화시킨 후 des-ala IL-2_{ser 125} 단백질의 은-착색, 비환원 SDS-PAGE 분석을 나타낸 것이고,

제5도는 3가지의 상이한 CuCl_2 농도에 대해 시간(분)에 대한 des-ala-IL-2_{ser 125}의 산화퍼센트를 플롯한 것이며,

제6도는 $8\mu\text{M}$ CuCl_2 를 사용하여 산화반응 시키는 반응물의 pH에 대한 des-ala-IL-2_{ser 125}의 산화퍼센트를 플롯한 것이고,

제7도의 (a)는 CuCl_2 를 사용하여 des-ala IL-2_{ser 125}를 산화시킨 후의 반응 혼합물의 RP-HPLC이고,

제7도의 (b)는 o-페난트롤린/ Cu^{+2} 착화합물을 사용하여 des-ala IL-2_{ser 125}를 산화시킨 후의 반응 혼합물의 RP-HPLC이고,

제8도는 시간(분)에 대해 산화된 des-ala IL-2_{ser 125}의 퍼센트를 플롯한 것이며,

제9도는 CuCl_2 를 사용하여 산화시킨 HPLC-정제된 IL-2의 환원 및 비환원 겔 둘 모두에 대해 SDS-PAGE 분석한 것을 나타낸 것이고,

제10도는 $5\mu\text{M}$ CuCl_2 에 의해 촉진된 des-알라닐 IL-2의 산화생성물에 대한 RP-HPLC 흡수도를 나타낸 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인터페론-베타, 인터루킨-2 및 그의 유테인(mutens)으로 이루어진 그룹중에서 선택된 충분히 환원된 재조합 단백질을 산화시킴으로써 시스테인을 우선적으로 산화시켜 천연 단백질에 존재하는 디설파이드 결합에 상응하는 디설파이드 결합을 형성시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 미생물에서 생성된 충분히 환원되고 글로 운화된 유전자 생성물에서 디설파이드 결합 형성을 촉매하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 그러한 산화법에 관한 것으로, 여기에서 자연적으로 존재하는 단백질에 존재하는 것과 상응하는 디 설파이드 결합 형성을 시험관내에서 촉진시키기 위해 반응을 조절한다.

천연 상태에서 하나 이상의 디설파이드 결합을 갖는 천연 단백질이 미생물내에서 재조합 단백질로서 생성되는 경우, 생성된 단백질은 가끔 디설파이드 결합이 부족한 환원 형태로 존재한다. 몇몇 경우에는 단백질 생성물이, 정제시킨 후에는 올리고머(oligmer)를 함유한다. 그러한 올리고머는 조절되지 않는 산화 또는 티올-디설파이드 교환 반응의 결과로 생성될 수 있다. 천연 단백질이 디설파이드 결합을 함유하는 경우, 올리고머 또는 기타 변형된 단백질 부산물의 생성을 최소화시키면서 재조합 단백질 생성물에서 상응하는 디설파이드 결합의 형성을 화학적으로 촉진시키는 것이 때때로 바람직 할 것이다. 조절되지 않는 방법으로 단백질을 산화시키면 또한 원치않는 이성체가 결과적으로 생성 될 수 있다(적당하지 않는 분자내 결합). 그러한 원치않는 반응은 배양액으로부터 단백질의 정제를 복잡하게 하거나, 원하는 구조를 가진 단백질의 수율을 감소시키거나, 충분한 생체활성보다 적은 활성을 갖는 단백질을 생성시킬 수 있다. 치료적 사용을 위해 의도된 특정 단백질의 경우에는, 정제 또는 제형화 과정 동안 조절되지 않는 디설파이드 결합형성으로 이성체 및/또는 불활성일 수 있고/있거나 증가된 면역원성을 갖는 올리고머로 오염된 불균일한 물질이 생성될 수 있다. 1985년 7월 23 일에 공인된 미합중국 특허 제4,530,787호에는 미생물적으로 생성된 단백질을 선택적이고 조절된 방법으로 비촉매적 산화제, 바람직하게는 o-요도소벤조산을 사용하여 산화시키는 공정이 기술되어 있는데, 거기에서는 시스테인을 우선으로 산화시켜 바람직한 디설파이드 결합을 높은 수율로 생성시킨다. 상기 공정에서는 산화를 확실하게 완결시키기 위해서 단백질에 대해 화학량론적 양 이상의 산화제가 필요하다.

유사하게, 우레아중의 산화 및 환원 글루타치온 혼합물을 사용하여 미생물적으로 생성된 렌넬트 (rennet)에서의 디설파이드 결합형성을 촉매하는 공정이 기술되어 있다[하이엔가 등(Hayenga et al.)]의 유럽 공개 공보 제114,507호(1984년 8월 1일)로 공개된 유럽 특허원 제83307841.3호].

페리시아나이드 또는 구리 +2가 이온이 나트륨 도데실 설페이트의 존재하에 β -갈락토글로블린에서의 디설파이드 결합 형성을 촉매할 수 있다는 것이 알려져 있다[참조 : Leslie, J. et al., Can. Jour. Biochem., 46, 625(1968)]. 다른 문헌에는 특이한 경우에 시스테인 또는 설프하이드릴 그룹에 대한 산화제로서 특이한 2가 금속염을 사용한 예가 기술되어 있다 : (a) 구리이온 : (유리 시스테인에 대해), [참조 : Hanaki, A. et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 2065(1983)] ; (리조짐에서의 설프하이드릴에 대해, [참조 : Yutani, K. et al., J. Biochem., 64, 449(1968)] : (글루타치온, 시스테인, 2-머캅토에탄올, 티오글리콜산 및 환원 리포산과 같은 설프하이드릴 화합물에 대해), [참조 : Kobashi, K., Biochim. Biophys. Acta, 158, 239(1968)] ; (b) 전이 금속 : (시스테인과 기타의 머캅탄 및 유리 설프하이드릴 그룹을 가진 단백질에 대해), [참조 : Friedman, Mendel, The chemistry and Biochemistry of the sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins (New York : Pergamon Press), Chapter 2, pp. 25-50(1973)] ; 및 (c) 혹은 칼슘이온 : (데옥시리보뉴클리아제에서의 설프하이드릴에 대해), [참조 : Price, P. et al., J. Biol. chem., 244, 929(1969)].

이러한 반응에서의 산화기전은 불명확하지만 퍼옥사이드 또는 유리 라디칼을 포함하는 반응에 근거한다고 사료된다. 그러나, 주어진 이가염이 부반응없이 특이한 단백질의 정확한 산화를 성공적으로 촉진시킬 것이라는 예견은 현재까지 가능하지 않는 것 같다. 본 발명은 여러가지 형태의 재조합 인터루킨-2 및 β -인터페론에서의 디설파이드 형성을 매우 선택적으로 유용하게 촉진시키는 특정 금속

-함유 화합물에 관한 것이다.

본 발명은 시스테인을 우선적으로 산화시켜 천연 단백질에서 존재하는 것에 상응하는 디설파이드 결합을 형성시키는, 인터페론-베타, 인터루킨-2 및 그의 유테인으로 이루어진 그룹중에서 선택된 충분히 환원된 재조합 단백질의 산화 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 용해된 형태의 재조합 단백질을 공기의 존재하, pH 5.5 내지 9에서 Cu^{+2} 양이온을 함유하는 유효량 이상의 산화 촉진제와 반응시키는 것이다.

본 발명의 방법은 산화적 부반응, 완전한 생체활성의 회복불능 및 원하지 않는 올리고머 또는 이성체의 생성을 포함하여 특이한 단백질을 산화시키는 동안 일어나는 난점을 최소화한 것이다. 또한, 촉진제로서 염화제 1구리를 사용하는 본 발명의 방법은 용이하게 분석할 수 있고 최종 생성물로부터 용이하게 제거시킬 수 있는 시약을 포함하여 매우 신속하다는 장점을 지니고 있다. 반응은 촉매적 농도에서 뿐만 아니라 화학량론적 농도(유리 설프하이드릴에 대해)에서도 활성적이다. 따라서, 단백질에 대한 산화 촉진제의 몰 비율(100% 디설파이드 생성에 달하기 위해)을 모니터링 필요성은 기타의 산화제를 사용할때만큼 크지 않다. mg/mL 농도의 재조합 인터루킨-2(rIL-2) 또는 β -인터페론(rIFN- β)에서의 디설파이드 결합 형성은 100 μM 미만 농도의 CuCl_2 에서 한시간 이내에 완결될 수 있다.

제1도는 17위치에서 시스테인 잔기가 세린잔기로 치환된(IFN- β_{ser17} 로 표시) 재조합 유테인 IFN- β 를 산화촉진제로서 8 μM CuCl_2 를 사용하여 산화시키는 반응혼합물의 역상고압 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 흡수도 5가지를 나타낸 것이다. 제1a도는 CuCl_2 없이 7분 동안 완충액에 환원된 IFN- β_{ser17} 을 넣은 대조반응을 나타낸 것이다. 제1b도는 CuCl_2 를 사용하여 7분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제1c도는 14분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제1d도는 28분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제1e도는 75분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제1f도는 RP-HPLC분석에 의거하여 산화시간(분)에 대해 산화된 IFN- β_{ser17} 의 퍼센트를 플롯한 것이다.

제2도는 8 μM CuCl_2 를 사용하여 75분 동안 산화시킨 후에(제2도의 (a)) 50°C에서 10mM 디티오프레이톨에서 15분 동안 환원시킨(제2도의 (b)) 재조합 IFN- β_{ser17} 을 비교한 것이다.

제3도는 125위치에서 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환되고 N-말단 알라닌이 제거된 재조합 유테인 IL-2(des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 로 표시)를 산화촉진제로서 50 μM CuCl_2 를 사용하여 산화시키는 반응혼합물의 RP-HPLC 흡수도 4가지를 나타낸 것이다. 제3도의 (a)는 2분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제3도의 (b)는 10분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제3도의 (c)는 50분 동안의 산화를 나타낸 것이다. 제3도의 (d)는 50분 동안 산화시킨 생성물을 10mM 디티오프레이톨을 사용하여 60°C에서 15분 동안 재환원시킨 후의 반응 혼합물의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

제4도는 분자간 설프하이드릴 그룹(올리고머)의 형성 정도를 측정하기 위해 산화 촉진제로서 50 μM CuCl_2 를 사용하여 40분 동안 산화시킨 후의 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 단백질의 은-착색, 비환원 SDS-PAGE분석을 나타낸 것이다.

제5도는 3가지의 상이한 CuCl_2 농도에 대해 25°C에서 시간(분)에 대한 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 의 산화 퍼센트(백그라운드를 감한 HPLC 피크 높이로서 측정)를 플롯한 것이다. 10mM 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA)을 함유한 대조반응도 또한 실시했다.

제6도는 8 μM CuCl_2 를 사용하여 산화 반응시키는 pH에 대해 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 의 산화율(HPLC 피크 높이로 측정)를 플롯한 것이다. 플롯은 IL-2가 약 70' 산화되었을 때 측정된 반응속도에 여러가지의 pH가 미치는 효과를 나타낸 것이다.

제7도는 o-페난트롤린/ Cu^{+2} 착화합물(제7도의 (b))을 사용하여 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ 를 산화시키는 것과 CuCl_2 를 사용하여(제7도의 (a)) 산화시키는 것을 비교한 것이다.

제8도는 25°C에서 50 μM CuCl_2 , 부분적으로 정제된 IL-2 0.25mg/mL, 50mM 인산나트륨, 0.1% SDS를 사용하여 pH 7.0에서 시간(분)에 대해 산화된 des-ala IL-2 $_{\text{ser125}}$ (DTNB와 반응시켜 측정된 것으로서 유리 설프하이드릴 그룹이 소실됨)의 퍼센트를 그래프로 나타낸 것이다.

제9도는 50 μM CuCl_2 를 사용하여 산화된 HPLC-정제된 IL-2의 환원 및 비환원 겔 둘 모두에 대해 SDS-PAGE 분석한 것을 나타낸 것이다.

제10도는 50 μM CuCl_2 에 대해 촉진된 des-알라닐 IL-2(본래의 IL-2에서 존재하는 3개의 시스테인을 함유)의 산화 생성물에 대한 RP-HPLC 흡수도를 나타낸 것이다.

본 발명의 방법으로 산화된 재조합 단백질은 그들을 생성하는데 사용된 숙주(host)에는 원래 존재하지 않는다. IL-2 및 β -IFN들 모두가 유용한 단백질과 실질적으로도 동일하며, 유용한 단백질에서 분자내 결합으로 단일 시스테인 잔기(디설파이드 결합)를 형성하는 시스테인 잔기를 함유하는 아미노산 배열을 갖고 있다. 여기에서 “실질적으로 동일한”이란 용어는 재조합 단백질과 유용한 단백질의 아미노산 배열이 동일하거나 재조합 단백질과 그의 본래의 짝사이에 역 기능적 차이를 일으키지 않는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들면, 제거, 부가 또는 치환)으로 상이한 것을 말한다. 본 발명의 공정으로 산화된 재조합 단백질은 완전히 환원되는데, 즉 그들은 디설파이드 결합이 없다. 산화에 균질한 기질인 인터루킨-2와 같은 단백질에 있어서 통상 산화시키는 공정에 앞서 환원시킨다. 승온에서 단시간동안 디티오프레이톨 또는 2-머캅토에탄올과 같은 환원제로 단백질을 처리하여 환원시킨다. 환원제는 산화반응시키기 전에 즉시 제거한다.

본 발명의 공정으로 산화된 재조합 단백질은 확실한 유전공학 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다. 상기 기술에는 천연 단백질을 암호화한 구조 유전자를 동정 및 특징화시키고, 천연 단백질과 기능적으로 동등한 유게인을 암호화한 돌연변이체 또는 유전자를 분리 또는 합성하고, 유전자를 발현시키는 위치에서 유전자를 적당한 발현 벡터에 삽입시키고, 벡터를 가진 적당한 이중 숙주, 바람직하게는 미생물을 변형시키고, 정확한 변형체를 동정하여 적당한 성장 배지에서 변형체를 배양하는 것이 포함되어 있다. 전형적으로 세포를 분쇄하고 세포파편을 가용화제(단백질의 용해도에 따라)와 하나 이상의 추출제로 처리하여 조 단백질을 분리하고 여러가지의 예비적 크로마토그래피 공정으로 조 단백질을 정제시켜 배양액으로부터 단백질을 회수한다. 단백질이 발효 또는 회수 공정동안 올리고머를 형성하기 쉬우면 회수공정중 적당한 단계에서 환원제로 단백질을 처리한다.

재조합 단백질은 조 단백질을 실질적으로 순수하거나 순수한 형태로 숙주로부터 회수한 후, 환원시킨 다음 본 발명의 공정을 사용하여 조절된 동역학으로 산화시킨다. 본 발명의 공정에 따른 조절된 산화는 재조합 단백질에서 과산화를 최소한으로 하거나 과산화없이, 그리고 부정확한 디설파이드나 원치않는 올리고머 형성을 최소한으로 하거나 형성없이 그것의 원래의 짝에 적합한 디설파이드 결합을 형성하게 한다. 그러한 산화는 본래의 짝의 배열과 가장 유사한 배열로 재조합 단백질을 높은 수율로 생성시켜 재조합 단백질이 작용적으로 천연 단백질과 동등하게 할 수 있게 해준다.

본 명세서에 사용된 것으로서 “재조합 단백질”이란 용어는 또한 IL-2와 β -IFN의 유테인을 말한다. 그러한 유테인 예는, 예를 들면, 디설파이드 결합에 포함되지 않는 하나 이상의 시스테인이 다른 아미노산으로 치환되어 분자간 결합이나 부정확한 분자내 디설파이드 결합 형성을 위한 자리가 없어진 단백질이 포함된다. 시스테인 외에도 아미노산이 치환된 다른 IL-2 유테인도 또한 구성될 수 있으며 완전히 활성적이다.

바람직하지 않고 중요하지 않는 시스테인을 함유한 유전자는 유전자 부위에 보충적이지만 시스테인 코돈에 단일 또는 여러개의 염기 변화를 함유한 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 선택적으로 변형시켜 그 위치에 상이한 아미노산을 함유한 돌연변이 단백질(유테인)이 생성된다. 제거하는 것이 바람직하면 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 시스테인에 대한 코돈을 없앤다. 시스테인을 중성 아미노산, 예를 들면, 글리신, 발린, 알라닌, 로이신, 이소로이신, 티로신, 페닐알라닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메치오닌으로 전환시키는 것이 바람직하다. 세린, 트레오닌 또는 알라닌이 시스테인과 화학적으로 유사하기 때문에 바람직한 치환체이다. 시스테인이 제거되면 완성된 유테인은 천연의 모단백질보다 아미노산 하나가 적은 단백질이 된다.

사람의 IL-2와 IFN- β 둘 모두는 완성된 단백질에서 3개의 시스테인 잔기를 함유하고 있다. 3개의 시스테인의 존재는 재산화시 이러한 단백질의 가능한 분자내 디설파이드 결합 3가지 중의 하나를 형성하는데 그중의 하나만 천연분자에서 발견되는 정확한 결합에 해당된다. 중요하지 않는 시스테인을 세린으로 변화시킨 IFN- β 와 IL-2의 유테인이 각각 문헌[참조 : Mark et al., (1984), PNAS (USA), 81, 5662-5666 and Wang et al., (1984), Science, 224, 1431-1433]에 상세히 기술되어 있다.

본 공정에서 사용된 산화 촉진제는 시스테인 잔기의 산화를 우선적으로 촉진하며, 2가의 구리 양이온을 함유한 시약이다. 기타의 2가 양이온, 예를 들면, Fe^{+2} 는 산화 촉진제로서 훨씬 덜 효과적이다. Cu^{+2} 양이온은 부산물이 최소이면서 순수한 산화 단백질을 생성시킨다. “우선적으로”란 용어는 산화촉진제가 (1) 보다 높은 수준으로 산화시키지 않거나 우의적이지 않게 산화시키면서 우선적으로 시스테인을 산화시켜 디설파이드 결합을 형성시키고, (2) 우선적으로 시스테인을 산화시켜 천연 단백질에서 존재하는 것에 상응하는 디설파이드 결합을 형성시키고 (3) 다른 잔기에 비해 시스테인 잔기를 우선적으로 산화시키는 것을 말한다. 본 발명에서는 산화 촉진제로, 2개의 시스테인 잔기를 함유한 IL-2 유테인의 산화를 촉진시켜 천연 단백질에서 존재하는 것에 상응하는 디설파이드 결합을 형성시키는 산화된 시스테인을 갖는 목적인 생성물을 95% 이상의 수율로 얻도록 해준다. 또한, 3개의 시스테인 잔기를 함유한 IL-2 유테인의 산화를 촉진시켜 목적인 생성물을 80 내지 85% 이상의 수율로 얻도록 해준다. 본 발명에 적합한 산화촉진제의 예로는 CuCl_2 와 (o-페난트롤린) $_2 \text{Cu}^{+2}$ 착화합물이 있다. 바람직하게는 산화 촉진제는 CuCl_2 이다.

사용된 산화촉진제의 양은 적어도 산화에 유효한 양으로, 즉 편리한 시간 이내에 효과적으로 산화반응을 실시하는데 필요한 최소량이다. 상기량과 각 반응에 최적인 양은, 예를들면, 단백질의 형태, 산화촉진제의 형태, 반응온도, 반응의 pH 및 가용화제의 농도 및 형태와 같은 인자에 따라 다를 수 있다. 산화촉진제의 농도와 산화시간을 변형시키는 것도 또한 생성되는 부산물의 양과 형태에 영향을 미치리라고 기대된다. 약제학적 목적으로 통상 부산물 모두 뿐만 아니라 티올-디설파이드 교환반응을 통해 원치않는 올리고머를 이론적으로 생성할 수 있는 산화되지 않는 출발물질도 제거하는 것이 필요하다. 하기 실시예에서는 유효량은 목적인 디설파이드 결합을 형성시키려는 단백질상에 있는 유리 설프하이드릴 그룹의 농도와 거의 같은 당량이다. 물론 이 양은 제한되는 것은 아니지만 편리한 반응시간, 부산물의 양 및 형태, pH 등을 포함하는 기준에 따라 각 단백질에 대해 최적량이 되어야 한다. 독립된 변수들이 모든 단백질에 대해 유일한 최적의 조건이 없는 방법으로 상호 작용하는 것 같다.

IL-2 산화속도에 대한 CuCl_2 농도의 효과를 설명해주는 제5도는 CuCl_2 의 농도가 0.5에서 50 μM 로 증가함에 따라 관측된 산화속도가 증가하는 것을 보여준다. 반응속도는 또한 실온에서 보다는 오히려 37°C에서 반응을 실시할때 2배가 증가하는 것으로 나타났다(실시예 3참조). 따라서, 단순히 산화촉진제 농도, 반응시간 또는 반응온도를 조절함으로써 과산화에 대한 가능성이 최소화되도록 반응을 조절할 수 있다. 바람직하게는, CuCl_2 의 양은 단백질 농도에 따라 약 1 내지 400 μM 이며, 단백질이 IL-2인 경우 바람직하게는 5 내지 50 μM 이다.

반응 혼합물중의 단백질의 농도는 통상 비교적 작게 유지시켜 올리고머가 형성될 가능성을 적게한다. 산화된 단백질의 분자량과 설프하이드릴 양에 따라 단백질 농도는 통상 약 5mg/ml만이

고, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 2mg/ml, 더욱 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1mg/ml이다.

반응 매질의 pH는 통상 약 5.5 내지 9로 유지시킨다. 여기에서 명시한 pH 범위에서 유의적으로 높은 pH를 사용하면 산화촉진제로서 CuCl_2 를 사용할때 산화속도가 매우 감소된다. IL-2 산화속도에 대한 pH의 효과를 설명한 제6도에서 나타낸 바와 같이 pH는 바람직하게는 약 6 내지 8이고, 더욱 바람직하게는 약 7이다.

단백질의 산화된 형태보다 용해도가 적은 환원된 클로윈된 단백질은 통상, 효과적인 산화를 일으키도록 용액상태, 즉 용해된 형태로 유지시켜야 한다. 따라서, 반응 혼합물은 용액으로부터 단백질이 침전되지 않도록 방지하기 위해 유효량 이상의 가용화제를 함유하는 것이 바람직하다. 본 명세서에 사용된 것으로서 “가용화제”란 용어는 이온성 또는 비이온성 단백질-가용화 용질, 예를 들면, 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 또는 우레아를 말한다. 본 발명의 목적으로 사용될 수 있는 가용화제의 양은 주로 사용된 산화촉진제의 형태와 단백질에 따라 통상 부피당 약 0.1 내지 1중량%(세제에 대해) 또는 약 5 내지 9M(우레아에 대해)이다.

산화 반응시간은, 예를 들면, 반응 혼합물에서의 시약의 농도, 반응 온도 및 시약의 형태에 따라 다르다. 반응온도는 통상 가용화제/용액에서의 단백질 혼합물을 유지하도록 약 20 내지 40°C, 편리하게는 실온이다. 반응온도가 증가하면 반응 속도도 증가한다. 산화를 완결시키기 위해서는 반응시간 또는 온도는 특별한 공정에 적합하도록 변화시킬 수 있다. 산화 반응은, 예를 들면, 용액을 동결시키거나 EDTA와 같은 킬레이터를 반응 혼합물에 가하거나 반응이 중지되는 수준으로 pH를 낮추므로서 효과적으로 종결시킬 수 있다. 가용화제의 농도와 같은 기타의 요인도 또한 반응속도에 영향을 미칠 수 있다. 반응시킨 후에 잔존하는 산화 촉진제와 바람직하지 않는 이성체 또는 올리고머는 선택적 한외여과 또는 크로마토그래픽 기술로 제거할 수 있다. 필요시 산화된 단백질은 역상 고압액체 크로마토그래피와 같은 단백질 정제 공정을 사용하여 부산물과 잔류하는 모든 환원된 단백질로 부터라도 더 정제시킬 수 있다. 반응시키는 동안 산화되는 정도는 또한 RP-HPLC 분석으로 용이하게 정량할 수 있다.

재조합 des-ala IL-2cys₁₂₅은 3개의 시스테인을 함유하며 이론적으로는 부정확한 디설파이드 결합을 형성하기 쉽다. 상기 단백질을 여기에서 기술한 방법으로 산화시킬때 생성되는 생성물은 대부분 그것의 본래쪽의 디설파이드 결합을 가진 단백질로 이루어져 있다(시스테인 잔기 58과 105사이에서) [참조 : Wang et al.(1984), Science, 224 : 1431-1433 ; Robb, et al. 1984, PNAS, 81 : 6486-6490]. 산화된 단백질은 실질적으로 올리고머가 없으며(1 내지 2중량% 미만), 본래 쪽의 결합과는 상이한 디설파이드 결합을 가진 생물학적으로 불활성인 이성체를 약 15중량% 미만 함유한다. 이와는 대조적으로 조절되지 않는 산화를 통해 제조된 제제로 상당량의 올리고머(5 내지 10%)와 심지어 더 많은 양의 바람직하지 않는 이성체를 함유한다. 비축매된 공기 산화는 여러날에 걸쳐 서서히 진행되며 매우 서서히 완결된다.

이성체가 형성될 가능성을 배제하도록 고안된 단백질(예를들면, 125위치에 있는 시스테인을 세린으로 치환한 IL-2, 또는 17위치에 있는 시스테인을 세린으로 치환한 IFN-β)은 물론 이성체를 함유하지 않는다. 적어도 IL-2인 경우에 산화된 단백질은 환원된 것보다 훨씬 더 수용성이며, 또한 생물학적 검정에서 더 높은 고유 활성도(specific activity)를 가진다. 따라서, 제제에서의 가용화제(예를 들면, SDS)의 양은 감소되고, 통상적인 수성의 비경구 부형제를 사용하여 사람 또는 동물용으로 적합한 형태로 제제화시키는데에 충분히 수용성인 정제된 생성물을 생성시킨다. 또한, 이러한 산화된 재조합 IL-2 유테인은 천연 자원으로 부터 분리한 IL-2에 존재하는 디설파이드 결합만 가지고 있다. 디설파이드 결합을 형성시키는데 사용한 상기와 동일한 공정을 IL-2의 다른 유테인에 적용시켜 균질하고 생물학적으로 활성인 물질을 생성시킬 수 있다.

조절된 산화로 제조된 단백질 제제가 조절되지 않는 산화를 통해 제조된 제제보다 바람직한 생성물을 더 많이 함유하고 부산물을 더 적게 함유하기 때문에 항원성이 더 적고 치료적으로 더 활성적인 것으로 기대된다.

치료적 단백질 제제는 약제학적으로 허용될 수 있는 담체와 함께 치료학적 유효량의 단백질을 함유한다. 제제는 통상, 예를 들면, 증류수, 사람 혈청 알부민, 및/또는 덱스트로즈 수용액, 또는 생리학 적 염수와 같은 부형제로 비경구 투여용으로 제제화한다.

하기 실시예는 본 발명을 더 상세히 설명해 주며 본 발명을 제한하지 않는다. 실시예에서 모든 온도는 섭씨이다.

[실시예 1]

[재조합 IFN-β_{ser17}의 조절된 산화]

[IFN-β_{ser17}의 제조]

IFN-β_{ser17}은 미생물에 의해 생성된 IFN-β의 유테인으로 아미노산 위치 17에 있는 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된 것이다. IFN-β_{ser17}은 나머지 2개의 시스테인 잔기를 갖고 있다 ; 하나는 31위치에 있고 다른 하나는 141위치에 있다. 본래의 IFN-β에서 31위치와 141위치에 있는 시스테인이 상호 작용하여 디설파이드 결합을 형성한다. IFN-β_{ser17}을 생성하기 위해 본 실시예에서 사용한 유전학적으로 처리한 이.콜라이(E.coli) 균주는 1983년 11월 18일에 기탁번호 제39,517호로 아메리칸 타이프 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, 미합중국 메릴랜드 20852 록크빌 파크로운 드라이브 12301)에 기탁되어 있다.

상기 유전학적으로 처리한 이.콜라이는 하기의 배지에서 성장시켰다.

성 분

대략의 초기농도

Na ₃ 시트레이트 · 2H ₂ O	3mM
H ₂ PO ₄	30mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	74mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3mM
MnSO ₄ · H ₂ O	46 μM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	46 μM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 내지 2 μM
L-트립토판	350 μM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	74 μM
티아민 · HCl	0.002%(W/V)
포도당	0.5%(W/V)

필요시 다우 코닝 안티포움(Dow Corning Antifoam) B 25% 용액, 포도당 50% 용액 및 5N KOH를 가한다.

온도는 37±1℃로 유지시키고 pH는 NaOH를 사용하여 6.5±0.1로 유지시키며 용존산소 30% W/W 공기 포화도를 유지시킨다. 남아있는 포도당의 광도(OPTICAL DENSITY) 측정은 14시간째에 실시했고 그후 부터는 약 한시간 간격으로 실시했다. 포도당 소모가 40±6g/ℓ (680nm에서 OD=10 내지 11)에 도달했을 때에 수득한다.

수득한 물질은 압력하에 미세공 크로스-플로우 필터(cross-flow filter)를 통해 순환시키면서 약 3배로 농축시킨다. 수득한 물질이 4 내지 5배로 농축될때까지 탈이온수에 대해 농축된 세포를 디아필터(diafilter)한다. 세포는 4.1 내지 5.5×10⁴ kpa(0.6 내지 0.8psi)에서 만톤-가울린(Manton-Gaulin) 분쇄기에 통과시켜 분쇄한다. 처음 통과한 나트륨 도데실 설페이트(SDS)-인산나트륨 완충액을 가해 최종농도가 2% W/V SDS, 0.08M 인산나트륨이 되게 한 후에 계속하여 1시간 동안 용해시킨다. 고체 디티오프레이톨(DTT)을 가해 최종농도가 50mM이 되게 한 다음 균질물들을 90±5℃로 10분 동안 가열한다. 생성된 세포 현탁액은 정 혼합기(static mixer)내에서 2-부탄올 : 현탁액이 1 : 1 용적 비율로 되게 하여 2-부탄올로 추출한다. 혼합물을 원심분리한 다음 2-부탄올이 많은 층을 모은다.

2-부탄올이 많은 층을 인산염 완충액 염수(PBS)중의 0.1% W/V SDS 2.5용적과 혼합한다. 고체 DTT를 가해 최종 농도가 1mM이 되게 한다. 빙초산을 사용하여 혼합물의 pH를 6.2±0.1로 조정하고 이 혼합물을 원심분리한다. 생성된 페이스트(paste)를 모으고 1N NaOH를 사용하여 pH를 8.5±0.1로 조정하면서 PBS와 10% W/V SDS 혼합물에 재현탁시킨다. 고체 DTT를 가해 최종 농도가 100mM이 되게 하고 현탁액을 90±5℃로 10분간 가열한다. 현탁액을 약 25℃로 냉각시키고, 빙초산을 사용하여 pH를 5.5±0.1로 조정한 다음 용액을 여과한다.

pH 5.5의 1% SDS, 50mM 나트륨 아세테이트 및 1mM EDTA로 이루어진 완충액을 사용하여 상기 용액을 세파크릴(Sephacryl) S-200에비칼럼에 적용시킨다. 가장 높은 인터페론 활성을 함유한 획분을 모으고, 10킬로달톤 분자량을 차단하면서 한 회 여과하여 농축시킨다.

문헌(참조 : Shaked, et al. supra)의 방법을 사용하여 단백질을 사용하여 설피하이드릴 결합을 생성한다. 물층의 산을 혼합하여 1Mm o-요도소벤조산 용액을 제조하고, 혼합물을 약 5분동안 소니케이팅(sonicate)하고 교반한 다음 2% NaOH를 서서히 가해 최종 pH가 8.2±0.2가 되게 한다(염기를 가하는 대신에 소니케이션을 추가로 사용할 수 있다).

반응 완충액 매질은 물에 Na₄P₂O₇ · 10H₂O를 용해시켜 농도가 2mM이 되게 하여 제조한다. 상기 용액의 pH는 10% 아세트산을 가해 9.0으로 조정하고 0.1%의 SDS, 1mM의 에틸렌 디아민테트라아세트산(EDTA) 및 15 μM의 o-요도소벤조산 용액을 상기 용액에 가한다.

완충액 매질은 자석교반기가 장착된 반응용기에 넣고 pH 전극은 9.0에 고정시킨다. 동물 비율의 IFN과 산화제를 도입시키도록 보정된 연동 펌프를 사용하여 지지용기로부터 반응 혼합물에 IFN-β_{ser17}과 o-요도소벤조산 용액을 가한다. 반응 혼합물의 pH는 필요시 5ml/시간의 속도로 연동펌프를 통해 0.25m NaOH를 가해 9.0으로 조절한다. IFN-β 용액(50mM 아세테이트 완충액중 5mg/ml, pH 5.5)을 5시간 동안 2ml/시간(7.0 μM/시간)의 유속으로 가한다 ; 같은 시간동안 o-요도소벤조산 용액은 7ml/시간(7 μM/시간)으로 가한다. 그 후에 계속하여 산용액을 가해 최종적으로 10 내지 15 μM 과량이 되게 한다. 반응시킨후에 역상 HPLC를 실시하고 엘만(Elman) 검정법으로 남은 IFN-β_{ser17}의 티올 함량을 검정한다. 6.5시간후에 10% 아세트산을 반응혼합물에 가해 pH 5.5가 되게 하여 반응을 종결시킨다.

pH 5.5의 0.1% SDS, 1mM EDTA 및 50mM 나트륨 아세테이트로 이루어진 완충액을 사용하여 생성물을 세파크릴-200 칼럼에 넣는다. 상기 칼럼으로 부터 용출된 단량체 피크를 모으고 pH 5.5의 0.1% SDS, 1mM EDTA 및 50mM 나트륨 아세테이트로 이루어진 완충액을 사용하여 세파덱스(Sephadex) G-75칼럼에 넣는다.

[완전히 환원된 IFN-β_{ser17}의 산화]

상기 요도소벤조산 산화법을 사용하여 산화시킨, 세파덱스 G-75로부터 모은 물질은 용이하게 이용할 수 있는 유일한 인터페론 생성물이기 때문에 하기의 구리 산화연구에 사용한다. 디설파이드 결합을 함유한 분자가 하나도 없도록 하기 위해 10mM의 디티오프레이톨을 가한 다음 50℃에서 15분 동안 정제된 IFN- $\beta_{\text{ser 17}}$ 을 환원시킨다. 이것은 0.1% V/V 트리플루오로아세트산 중의 30 내지 60% 아세토니트릴 구배(5분 동안 30 내지 40%, 27분 동안 40 내지 60%)농도를 사용하여 인터페론의 환원 형태로부터 산화형태를 분리해 주는(각각 지체시간은 26분과 28분임) RP-HPLC(Vydac C₄ 칼럼을 사용)로 확인하였다. 환원된 β -인터페론을 RP-HPLC 피크 확분으로 부터 동결건조시켜 농축시키고 5 μ M의 EDTA를 함유한 pH 7.0의 0.1% W/V SDS와 50mM 인산염 완충액에 재현탁시킨다. 반응 혼합물은 0.13mg/ml의 인터페론을 함유한다. 25℃에서 공기-포화된 용액을 사용하여 CuCl_2 를 가해 최종 농도가 8 μ M이 되게 하여 산화시키기 시작한다.

디설파이드 형성의 동역학은 여러가지 HPLC 칼럼으로 부터 용출위치의 변화를 모니터함으로써 측정할 수 있다는 것은 다른 사람들에 의해 밝혀져 있다(참조 : Wu, et al., Anal.Biochem., 129, 345-348(1983) 및 상기 문헌중의 참고 문헌 8). 본 발명의 실시예에서 사용한 산화에 검정은 산화시킨 후에 RP-HPLC 상의 용출 위치의 변화에 의존한다.

제1a도는 CuCl_2 없이 재현탁 매질에서 7분후에 환원된 β -인터페론을 함유한 대조반응의 RP-HPLC를 나타낸 것이다. 제1b도는 7분 동안 산화시킨 후에, 제1c도는 14분 동안 산화시킨 후에, 제1d도는 28분 동안 산화시킨 후에, 제1e도는 75분 동안 산화시킨 후에 CuCl_2 를 함유한 반응 혼합물의 RP-HPLC를 나타낸 것이다. 제1f도는 RP-HPLC 분석에 근거하여 산화시간(분)에 대해 산화 퍼센트를 플로트한 것을 나타낸 것이다. 결과는 75분으로 인터페론의 95%이상 산화된 것을 나타낸다. 이산화된 생성물은 문헌(참조 ; Steward, W. E. II, The Interferon System, (New York : Springer-Verlag, 1981), 9.17)에 기술된 세포병리학효과 검정법을 사용하여 항바이러스 활성에 대해 검정했으며, 천연의 β -IFN, 1×10^8 단위/mg과 동일한 고유 생활성도를 가진 것으로 나타났다.

75분 동안 산화시킨 시료는 50℃에서 15분 동안 10mM DTT중에서 환원시킨다. 제2도의 (a)는 산화된 물질의 RP-HPLC를 나타낸 것이며 제2도의 (b)는 환원된 물질의 RP-HPLC를 나타낸 것이다. 크로마토그램을 비교시 RP-HPLC 지체시간의 변화는 DTT 환원에 의해 가역적인 산화에 기인한다는 것을 나타낸다.

[실시예 2]

[Des-Ala IL-2_{ser 125}의 조절된 산화]

[완전히 환원된 Des-Ala IL-2_{ser 125}의 제조]

Des-Ala IL-2_{ser 125}는 본래의 사람 IL-2와는 아미노산 배열이 (1) 최초의 N-말단 알라닌 잔기가 없고 (2) 125위치에서의 시스테인이 세린으로 치환된 것이 상이한 IL-2이다. 본 실시예에서 사용된 des-ala IL-2_{ser 125}를 생성하는 이.콜라이 균주는 1984년 3월 6일에 기탁번호 제39,626호로 ATCC에 기탁되어 있다.

상기한 유전학적으로 처리한 이.콜라이는 하기의 성장 배지를 사용하여 발효기내에서 성장시켰다.

초기성분	대략의 초기농도
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	72mM
KH_2PO_4	21.6mM
$\text{Na}_3\text{시트레이트}$	1.5mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60 μ M
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60 μ M
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2 μ M
2.5N NaOH를 사용하여 pH 6.50을 조성, 고압증기 멸균 살균한 부가물(후 고압증기멸균)	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3mM
FeSO_4	100 μ
L-트립토판	70mg/ ℓ
티아민-HCl	20mg/ ℓ
포도당	5g/ ℓ
테트라사이클린	5mg/ ℓ
에탄올(임의)	2%(W/V)
카스아미노산	2%(W/V)
필요시 다우 코닝 안티포움 B 20%용액, 포도당 50%용액 및 5N KOH를 가한다.	

발효기의 pH는 5N KOH를 사용하여 6.8로 유지시킨다. 남은 포도당은 5 내지 10g/ℓ 사이에 유지시키고, 용존 산소는 40% W/W를 유지시키며 온도는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지시킨다. OD 680이 약 10 내지 15가 되면 카스아미노산(20% W/V원용액)을 가한다. 카스아미노 농축용액을 가한지 3시간 후에 에탄올(95% W/W)을 가해 최종농도가 2% W/W가 되게 한다. 에탄올을 가한지 2시간 후에 수거한다.

유도된, 클로닝된 IL-2를 함유한 이.콜라이 MM 294-1 세포 약 20 내지 40g(습량)을 200ml의 50mM 트리스, 1mM EDTA(pH 8.1 내지 8.5)에 재현탁시킨다. 높은 pH는 다음 단계에서 이.콜라이 단백질을 선택적으로 추출하는 것을 촉진한다. 세포는 3000 내지 4000×g에서 10분 동안 원심분리하고 4℃에서 200ml의 트리스/EDTA 완충액을 재현탁시킨다.

히트 시스템 모델 w-375소니케이터를 “9”에 고정시켜 조작시 50% 총 효율을 가진 큰 탐침 펄싱을 사용하여 4℃에서 45분 동안(또는 600에서 광도가 약 85% 떨어질때까지) 세포를 소니케이트한다. 이와는 달리 만콘-가울린 균질화기에 3회 통과시켜 세포를 분쇄한다. 분쇄물을 4℃에서 벡크만(Beckman) JA 20 로우터(rotor)를 사용하여 4500×g에서 10분 동안(6000rpm) 원심분리한다. 파편을 실온에서 50ml의 트리스/EDTA 혼합물에 재현탁시킨다. 5분간에 걸쳐 같은 부피의 트리스/EDTA 완충액중의 8M 우레아(Schwartz/Mann 고순도)를 신속히 교반하면서 현탁액에 가해 우레아의 최종 농도가 4M이 되게 한다. 생성된 혼합물을 실온에서 15 내지 30분 동안 서서히 교반한다.

교반한 후에 혼합물을 12,000×g에서 15분 동안(실온에서 벡크만 JA 20로우터에서 12,000rpm) 원심분리하고 펠렛을 분리한다. 펠렛을 20℃에서 9ml의 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 1mM EDTA, 10mM DTT에 재현탁시킨다. 1ml의 20% W/V SDS를 가해 펠렛을 용해시키고 격렬히 와동시킨다. 재현탁액을 실온에서 10분 동안 12,000×g에서 원심분리하고 불용성 물질은 제거한다.

남아 있는 용액은 40℃에서 15분 동안 가열하여 모든 IL-2가 완전히 환원되도록 한다. 상층액(40% 순수한 IL-2를 함유)을 2.6×100cm 세파퀼-200(S-200) 칼럼에 넣고 50mM 인산나트륨(pH 6.8), 1mM EDTA, 1mM DTT, 1% W/V SDS로 용출시킨다. 각 획분 3ml를 15% W/V SDS/PAGE 작은겔에 적용시키고 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색한다. 가장 적게 오염물질을 함유한 획분을 모으고(약 35k, 18k 및 12k 달톤에서 오염물질을 최소로 함유함(Amicon) YM 5 한외여과기를 사용하여 5 내지 10ml로 농축한다. 제조된 것은 약 80 내지 90% 순수한 IL-2이다.

S-200 풀(pool)을 2.6cm×100cm 세파덱스 G 100칼럼에 넣고 0.1% W/V SDS를 사용하여 상기한 바와 같이 용출한다. SDS/PAGE로 획분을 분석하고 가장 순수한 획분을 모은다. 가장 순수한 획분은 100,000 단위당 0.2 내지 0.5ng의 내독소를 가진 95 내지 98% 순수한 IL-2를 함유한다. 조 용해질에 존재하는 IL-2 30% 이상을 순수한 IL-2로서 회수한다.

질소하에 상기 G-100 획분을 4℃에서 저장하면 부가물없이 적어도 6주 동안 안정한 것으로 나타났다. 4℃에서 형성한 SDS-함유 침전물을 사용하기 전에 25℃에서 재용해시키거나 IL-2의 유의적인 손실없이 제거할 수 있다.

[CuCl₂를 사용한 Des-Ala IL-2_{ser125}의 조절된 산화]

상기와 같이 수득한 정제된, 완전히 환원된 생성물을 pH 8.0의 50mM 트리스-HCl 완충액에 대해 디아필트레이션/한외여과로 0.5mg/ml IL-2로 조정한다. 트리스 완충액에 대한 디아필트레이션은 pH를 조절할 뿐만 아니라 산화반응을 방해할 수 있는 어떤 잔존하는 EDTA나 DTT라도 제거해준다. 디아필트레이션/한외여과 단계후의 SDS 농도로 1.6% W/V(문헌(참조 : Anal. Biochem., Vol.118, p.138-141(1981))에 기술된 SDS에 대한 아크리딘 오렌지 검정법으로 측정)이며 pH는 약 8.00이다. 농축물은 용액을 통해 공기를 버블링하여 산소처리하고, 새로이 제조한 용액을 사용하여 0.5 μM, 5 μM 또는 50 μM의 CuCl₂를 가해 산화시키기 시작한다. 반응은 25℃에서 실시한다. 산화의 동역학을 측정하기 위해 여러가지의 시간간격으로 반응 혼합물을 취하고, 10mM 농도까지 EDTA를 가해 급냉시키고 -70℃에서 신속히 동결시킨다. RP-HPLC가 IL-2의 환원된 형태로부터 산화된 형태를 분리시키기 때문에(각각 지체 시간이 41분과 45분) 반응의 정도를 측정하기 위해 0.1% 트리플루오로아세트산중의 아세토니트릴 구배용출(gradient elution)(30 내지 60%, 45%)을 사용하여 각각을 RP-HPLC를 분석한다.

제3도는 50 μM CuCl₂를 사용하여 산화반응시킨 것에 대한 RP-HPLC 분석을 나타낸 것이다(재환원시키기 전과 후). 제3도의 (a)는 2분 동안 산화시킨 후 시료가 약 2/3 산화된 것을 나타낸다. 제3도의 (b)는 10분 동안 산화시킨 후 시료가 거의 완전히 산화되고 미량의 기타 피크(부반응을 시사)만 관찰된 것을 나타낸다. 제3도의 (c)는 50분 동안의 산화로 생성된 소수생성물의 양이 증가되지 않는 것을 나타내며, 따라서 장시간 산화시키는 동안 부반응은 일어나지 않는다. 제3도의 (d)는 50분 동안 산화시킨 후 산화 생성물이 60℃에서 15분 동안 10mM 디티오프로이톨을 사용하여 완전히 환원된 IL-2로 재환원시킬 수 있음을 나타낸다. 이것은 제3도의 (a), (b), (c)에서의 피크가 환원가능한 산화된 물질을 나타낸 것임을 알 수 있다.

제4도는 50 μM CuCl₂를 사용하여 40분 동안 산화시킨 생성물의 은-착색, 비환원 SDS-PAGE 분석을 나타낸 것이다. 민감한 착색 기술을 사용했음에도 불구하고 소량의 산화 생성물만 분자내 설프하이드릴 그룹을 형성하여 이량체를 생성시킨 것으로 나타났다.

여러가지의 CuCl₂ 농도에서 실시한 산화에 대한 연구가 제5도에 요약되어 있다. 이 도면은 백그라운드를 감한 HPLC 피크의 높이로 측정한 것으로서 관측된 산화속도가 CuCl₂ 농도에 의존한다는 것을 나타낸 것이며, 따라서 반응은 이 매개 변수를 조정함으로써 조절할 수 있다. 5 μM CuCl₂를 사용하여 6배 물과량의 IL-2를 함유한 반응은 60분 이내에 완전히 산화되며 이것은 CuCl₂가 촉매적으로 역할한다는 것을 나타낸다. 10mM EDTA를 함유한 대조반응은 전혀 산화되지 않았다.

유사하게 30mM 트리스와 pH6, 6.5, 7.5, 8.0, 8.5 또는 9.5로 조정한 30mM 인산나트륨 완충액의 혼합물에서 8 μM CuCl₂를 사용하여 0.1% w/v SDS를 함유한 0.2mg/ml IL-2 용액에 대해 일련의 산화반

응을 실시했다. 모든 반응에서 pH는 반응 말기에서 확인했다. 이러한 pH에 대해 7분 동안 실시한 산화에 대한 연구가 제6도에 요약되어 있다. 이 도면은 IL-2의 산화에 최적인 pH 범위가 약 6 내지 8임을 나타내며, 그 이상에서는 산화 속도가 급격히 떨어진다.

[$(\text{O-페난트롤린})_2 \text{Cu}^{+2}$ 착화합물을 사용한 Des-Ala IL-2_{ser125}의 조절된 산화]

CuCl_2 대신에 새로이 제조한 $8 \mu\text{M}(\text{O-페난트롤린})_2 \text{Cu}^{+2}$ 착화합물을 사용하여 상기 산화공정을 반복한다. 상기한 트리스/인산염 완충액은 pH7.0이며 0.1% SDS(w/v)를 함유한다. 제7도는 $8 \mu\text{M} \text{CuCl}_2$ 를 사용하여 7분 동안 산화시킨후에 IL-2의 RP-HPLC(제7도의 (a))와 $8 \mu\text{M}(\text{O-페난트롤린})_2 \text{Cu}^{+2}$ 를 사용하여 7분 동안 산화시킨 후에 IL-2의 RP-HPLC를 비교한 것을 나타낸다. 결과는 CuCl_2 단독보다는 pH7에서 $(\text{O-페난트롤린})_2 \text{Cu}^{+2}$ 착화합물에 의해 더 빨리 IL-2가 산화되는 것을 알 수 있다.

[산화된 Des-Ala IL-2_{ser125}의 정제]

실시에 2의 우레아 추출물로부터 회수한 불용성물질을 pH7.0의 50mM 인산나트륨 완충액, 1mM EDTA에 재현탁시킨다. 현탁액은 고체 SDS를 가해 용해시켜 최종 농도가 5% w/v가 되게 한다.

5% SDS 용액은 pH 8.0의 0.1M $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_{10}$ 로 희석하여 2% SDS가 되게 한다. 단백질 농도를 측정하고, pH를 8.5로 조정하고 50mM DTT와 2mM의 EDTA를 가한다. 질소 기류하에 혼합물을 40℃로 가열하여 IL-2를 환원시킨다. 혼합물을 냉각시키고 pH를 5.0으로 조정한다.

용액은 실온에서 1mM DTT를 함유한 2-부탄올을 1 : 1 비율(v/v)로 하여 추출한다. 잔류(residue) 시간은 2 내지 2.5분이다. 유속 200mL/분으로 액체-액체층 분리기에서 추출한다. 유기 추출물을 분리하고 NaOH를 사용하여 pH를 8.0으로 조정한다. 추출물을 pH6의 10mM $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_{10}$, 2mM DTT 중의 0.1% SDS에 서서히 가하고 15 내지 20분 동안 교반한다. 생성된 침전물을 분리하고 생성된 페이스트를 PBS 중의 5% SDS에 재현탁시킨다. 원심분리하여 용액을 맑게하고 상기와 같이 환원시킨다. 환원시킨 후에 용액은 아세트산을 사용하여 pH5.5로 조정한다. 용액은 2.6cm × 100cm S-200칼럼에 넣고, 50mM 인산나트륨(pH6.8), 1mM EDTA, 1mM DTT, 1% w/v SDS를 용출제로하여 겔 여과하여 정제한다.

상기 칼럼으로부터 피크 확분을 모으고, 아미콘 YM-5 한외여과 막을 사용하여 상기물질 760μL로 농축하면 총 단백질 6.6mg이 수득된다. 디티오프레이톨을 2.5mM 농도로하여 가하고 시료를 60℃로 10분간 가열하여 완전히 환원시킨다. 0.1% SDS를 함유한 50mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)으로 평형시킨 탈염 G-25 칼럼(19×0.9cm)을 사용하여 환원제를 제거한다. 단백질 피크를 모으면 5.5mg이 수득되고 이것은 칼럼 완충액으로 0.25mg/mL가 되게 희석한다. 엘만시약[5, 5- 디티오-비스(2-니트로벤조산), (DTNB)] 설프하이드릴 검정법(표준물질로서 시스테인을 사용하여 문헌[참조 : Habeeb, A.F.S.A., Methods of Enzymology, Vol. 25, Part B, pp. 457-464(1972)]에 기술된 바와 같이 검정)을 사용하여 유리 설프하이드릴 그룹의 양을 즉시 검정한다.

시료에 15초 동안 공기를 버블하여 용액에 공기를 통하게 한 다음 50 μM 농도의 CuCl_2 를 가해 25℃에서 산화시키기 시작한다. 실온에서 5분, 10분 및 30분 동안 배양시킨 후에 DTNB 검정법을 사용하여 나머지의 유리 설프하이드릴 그룹을 검정하여 산화된 정도로 측정한다.

S-200 칼럼으로부터 피크 IL-2 확분의 산화 동역학을 그린 제8도는 산화가 30분으로 완결되는 것을 나타낸다. 35분에 10mM 농도의 EDTA를 가한 다음 10분의 1용적의 100% 아세트니트릴/5% 트리플루오로 아세트산을 가한다. 10% 아세트니트릴/0.1% TFA로 평행시킨 10mm × 25cm, 10 μ Vydac C₄ 칼럼상에 예비적 RP-HPLC하여 남아있는 이.콜라이 단백질과 내독소로부터 산화된 IL-2를 분리한다. 2mL/분의 속도로 구배용출하여(5분 동안 10 내지 30% 아세트니트릴, 45분 동안 30 내지 60% 아세트니트릴) 60% 아세트니트릴에서 IL-2를 회수한다. IL-2의 피크를 모으고 회수된 총 단백질은 280nm에서의 흡수도에 의해 3mg인 것으로 측정되었다.

이 시점에서 단백질은 하기와 같이 제제화한다. : 7.7mL의 HPLC 확분에 1.7%의 만니톨을 가하고 0.037%의 SDS를 가한다. 하루밤 시료를 동결건조시키고 WFI(주사용 증류수)중의 50mM 인산나트륨(pH6.8) 2.9mL에 재현탁시킨다. SDS와 만니톨의 최종 농도를 각각 0.1%의 5%이다.

동결건조된, 재현탁된 IL-2 4 μg을 환원 및 비환원상태하에서 SDS-PAGE 작은겔에 적용시켜 분석한다(1% β-머캅토에탄올의 존재 또는 부재하에 2% SDS, pH6.8의 50mM 트리스-HCl에서 5분간 비등시킴). 제9도는 디설파이드 결합을 함유한 분자에 대한 문헌으로부터 예상한 바와 같이 환원된 IL-2보다 비환원된 IL-2가 약간 더 빨리 이동한다는 것을 나타낸다. TCA-고정된 쉬마주(Shimadzu) CS-930 스캐너를 사용한 농도계 스캔과 쿠마시-염색된 겔에 의해 최종 생성물은 95% 이상 순서하며 IL-2의 올리고머에 대해 기대되는 위치로 이동한 단백질을 2% 이하 함유함을 알았다. 필요시 IL-2 산화단계 다음에 분자체 크로마토그래피(S-200 칼럼, 상기와 같이 용출)에 의해 잔존하는 IL-2 올리고머를 효과적으로 제거할 수 있다. RP-HPLC에 의해 잔존하는 이.콜라이 오염물질과 파이로겐 들 모두가 제거된 것을 알았다. S-200으로 모은 출발물질중 적어도 50%가 최종 산화생성물로 회수되었다.

정제된 IL-2의 최종 고유 생활성도는 4 내지 6×10^6 단위/mg(단위는 HT-2 세포종식 검정법[참조 : Watson, J.(1979) JEM, 150 : 1510-1519 and Gillis, S., et al.(1979) J.I. 120 : 2027-2032]을 사용하여 측정된 단위에 의거한 것이다)인 것으로 측정되었으며 단백질 함량에 대해서는 문헌[참조 : Lowry, O. H., et. al.(1951) J. Biol. Chem., 193 : 265-275]의 방법으로 측정했으며, 리무루스 아메보사이트 리세이트(limulus amoebocyte lysate, LAL) 검정법으로 측정한 것으로서 내독소 함량은 0.3ng/IL-2mg 미만이다. 정제된 산화 생성물의 특이한 생물학적 활성은 유도된 말초 혈액 임파구로부터의 천연 IL-2 또는 유도된 주르캣(Jurkat) 세포주로부터 분리한 천연 IL-2의 활성과는 실제 구별할 수 없다. 따라서, 산화된 재조합 IL-2의 생물활성은 산화된 것으로 알려진 두개의 천연쪽의 생

물활성과 공통점이 있다. 환원된 천연 및 환원된 재조합 IL-2 단백질은 둘 모두 유의적으로 더 낮은 고유 생활성도를 갖고 있다. 여기에서 산화된 생성물이 천연의 주르켓 또는 말초 혈액 임파구 IL-2에 대해 측정된 것과 동일한 생물학적 활성을 가진 것으로 나타났기 때문에 본 발명의 공정으로 생성된 IL-2는 바이러스 병소와 암을 퇴치하는 사람의 면역계의 능력을 증강시키는데 유용하다.

최종 생성물은 저장하기 위해 동결건조시키고/시키거나 4°C에서 생물학적 또는 물리적 성질의 유의적인 변화없이 60일까지 또는 그 이상 용액상태로 저장할 수 있다.

완전히 환원된 IL-2를 용액으로 유지하기 위한 SDS나 기타의 가용화제를 사용하지 않고 상기와 같이 des-ala IL-2_{ser125}의 산화 반응을 실시할 경우, 측정할 만큼의 산화반응이 일어나지 않는다. 산화촉진제로서 FeSO₄를 사용하는 것을 제외하고는 상기의 바람직한 조건을 사용하여 des-ala IL-2_{ser125}에 대해 산화반응을 실시할 경우 생성물의 10% 이하가 산화되었으며, 이것은 Fe⁺²가 산화를 촉진하는데 훨씬 덜 효과적인 양이온임을 말해준다.

상기의 조건을 사용하여 3개의 시스테인을 함유한 환원된 분자(즉, 1983년 8월 4일에 기탁번호 제 39,405호로 아메리칸 타이프 컬처 콜렉션에 기탁된 이.콜라이 군주로부터 생성된 des 알라닐 재조합 IL-2)에 대해 산화반응을 실시할 경우, 85% 이상의 생성물이 정확한 디설파이드 결합(시스테인 58과 시스테인 105사이의 결합)을 했으며 천연단백질과 동일한 생물활성을 나타냈다. 약 15%의 물질이 불활성이며, 이것은 부정확한 디설파이드 결합을 함유한 IL-2의 이성체인 것 같다. 제10도는 30 내지 60% 아세로니트릴 구배로 용출시킨 최종생성물의 RP-HPLC 분석을 나타낸 것이다. 지체 시간은 불활성 이성체에 대해서는 29분이고 활성 IL-2에 대해서는 44분이다.

[실시예 3]

[37°C에서 Des-Ala IL-2_{ser125}의 조절된 산화]

본 실시예는 온도 증가가 본 발명의 산화반응에 미치는 효과를 설명한 것이다.

실시예 2의 산화된 Des-Ala IL-2_{ser125}의 정제에서 기술한 S-200 칼럼으로부터의 피크 획분을 모으고 피크물질은 아미콘 YM-5 한외여과막을 사용하여 720μl로 농축시킨다. 0.1% SDS를 함유한 50mM 인산 나트륨 완충액(pH7.0)으로 평형시킨 G-25 탈염 칼럼을 사용하여 디티오프레이톨을 제거한다. 동일한 완충액을 사용하여 단백질 농도를 0.25mg/ml로 조정한다. IL-2는 10ml씩 2부분으로 나누고 순환 수 욕에서 25°C나 37°C로 평형시킨다. 50mM의 CuCl₂를 가해 산화 반응을 실시한다. 산화 반응의 동역학은 1) 엘만시약 검정법을 사용하여 유리 설프하이드릴 그룹의 양을 측정하고 2) RP-HPLC를 실시하여 환원된 IL-2와 산화된 IL-2에 대해 기대되는 지체 시간에서 존재하는 IL-2의 양을 모니터하여 측정한다.

25°C에서 37°C로 산화반응의 온도를 높이면 두가지 검정 모두로 측정된 것으로서 산화속도는 약 2배 증가하는 것으로 나타났다. 따라서, 구리 농도뿐만 아니라 온도도 산화 속도에 영향을 미친다. 25°C와 37°C 두가지 모두에서 산화는 실제로 100% 진행 완결되므로, 유리 설프하이드릴 그룹을 최소화시키고 티오-디설파이드 교환으로 올리고머가 잇따라 생성될 가능성을 매우 감소시킨다. 역상 HPLC 분석은 산화된 IL-2 생성물이 동일한 것임을 나타내고 생물 검정법으로 그들이 동일한 고유 활성도를 갖는 것을 알았다. 비환원 SDS-PAGE 분석으로 어느 온도에서든 1% 이하의 올리고머가 형성된 것을 알았다.

요약하면, 본 발명은 천연 단백질에서 발견되는 것과 일치하는 디설파이드 결합의 형성을 시험관에서 촉매하는 Cu⁺²를 함유한 산화 촉진제를 사용하여 완전히 환원된 시스테인-함유 재조합 IL-2와 IFN-β를 산화시키는 조절된 산화방법을 제공하는 것이다. 본 공정은 산화시키는 동안 부반응을 없애거나 최소화시키고 산화된 생성물의 능력을 초대화하여 완전한 생물활성을 회복하도록 해준다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

용해된 형태의 재조합 단백질을 함유한 수용액을 pH 약 5.5 내지 9에서 공기의 존재하에 Cu⁺² 양이온을 함유한 유효량 이상의 산화 촉진제와 반응시킴을 특징으로 하여, 인터페론-베타, 인터루킨-2 및 그의 유데인으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 충분히 환원된 재조합 단백질을 산화시킴으로써 시스테인을 우선적으로 산화시켜 천연 단백질에 존재하는 디설파이드 결합에 상응하는 디설파이드 결합을 형성시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 디설파이드 결합을 형성하도록 유리되어 있고, 결실되거나 다른 아미노산으로 치환된 단백질의 생물학적 활성에 필수적이 아닌 하나 이상의 시스테인 잔기를 가진 단백질의 유데인이 재조합 단백질을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 유데인이 des-ala IL-2_{ser125} 또는 IFN-β_{ser17}임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, pH가 약 6 내지 약 8임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, 산화 촉진제가 CuCl_2 또는 $(\text{O-페난트롤린})_2 \text{Cu}^{+2}$ 임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, 단백질의 농도가 약 0.05 내지 약 $2\text{mg}/\text{mL}$ 임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, 산화 촉진제의 농도가, 산화시켜 시스틴을 형성시키려는, 단백질 상에 있는 유리 설프하이드릴 그룹의 농도와 거의 동일함을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

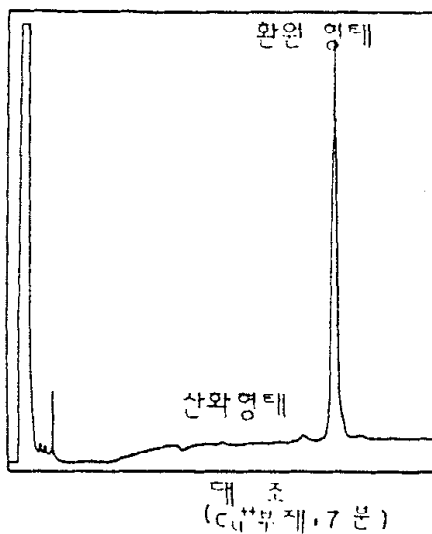
제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, 산화 촉진제가 CuCl_2 이고 이의 농도가 약 1 내지 $400\mu\text{M}$ 임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

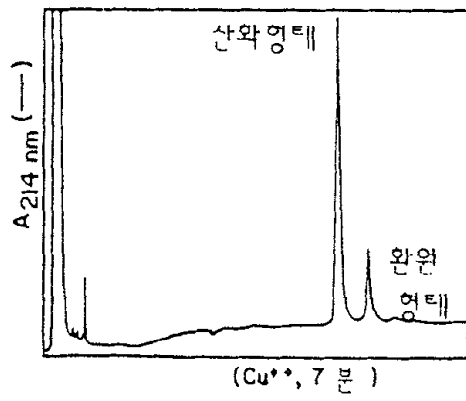
제1항 내지 제3항중 어느 한항에 있어서, 나트륨 도데실 설페이트 또는 우레아를 사용하여 단백질을 용해시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

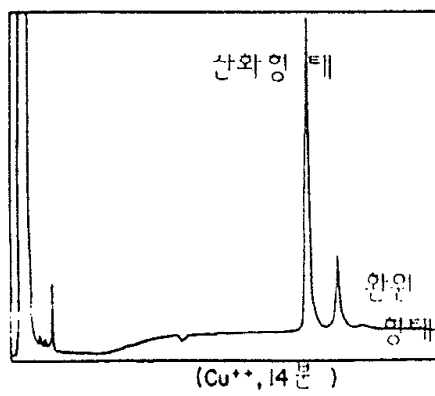
제1항에 있어서, 단백질이 IL-2 또는 IFN- β 유테인이고, 산화 촉진제가 약 5 내지 $50\mu\text{M}$ 의 CuCl_2 이며, 반응의 pH가 약 7이고, 반응 혼합물중의 IL-2 또는 IFN- β 유테인의 농도가 약 0.1 내지 약 $1\text{mg}/\text{mL}$ 이며, 가용화제로서 나트륨 도데실 설페이트가 용적당 약 0.1 내지 1중량%의 농도로 존재함을 특징으로 하는 방법.

도면**도면 1A**

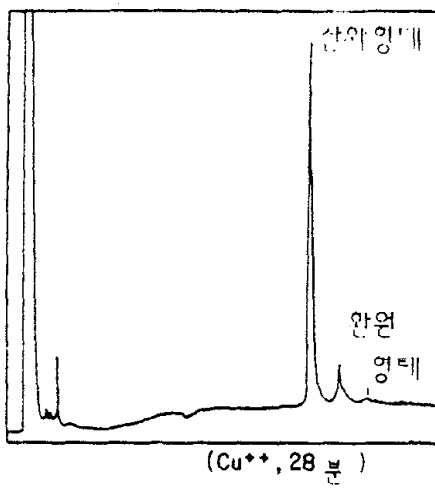
도면 1B



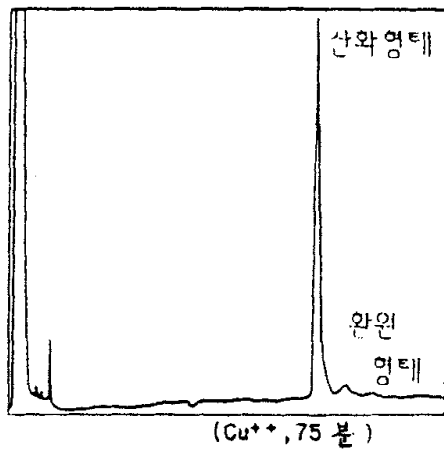
도면 1C



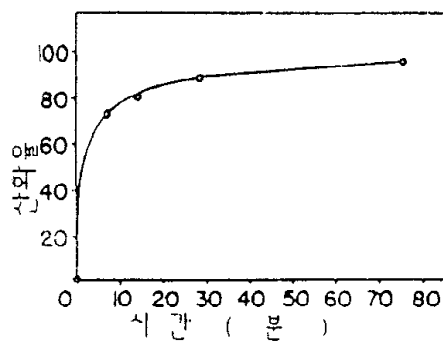
도면 1D



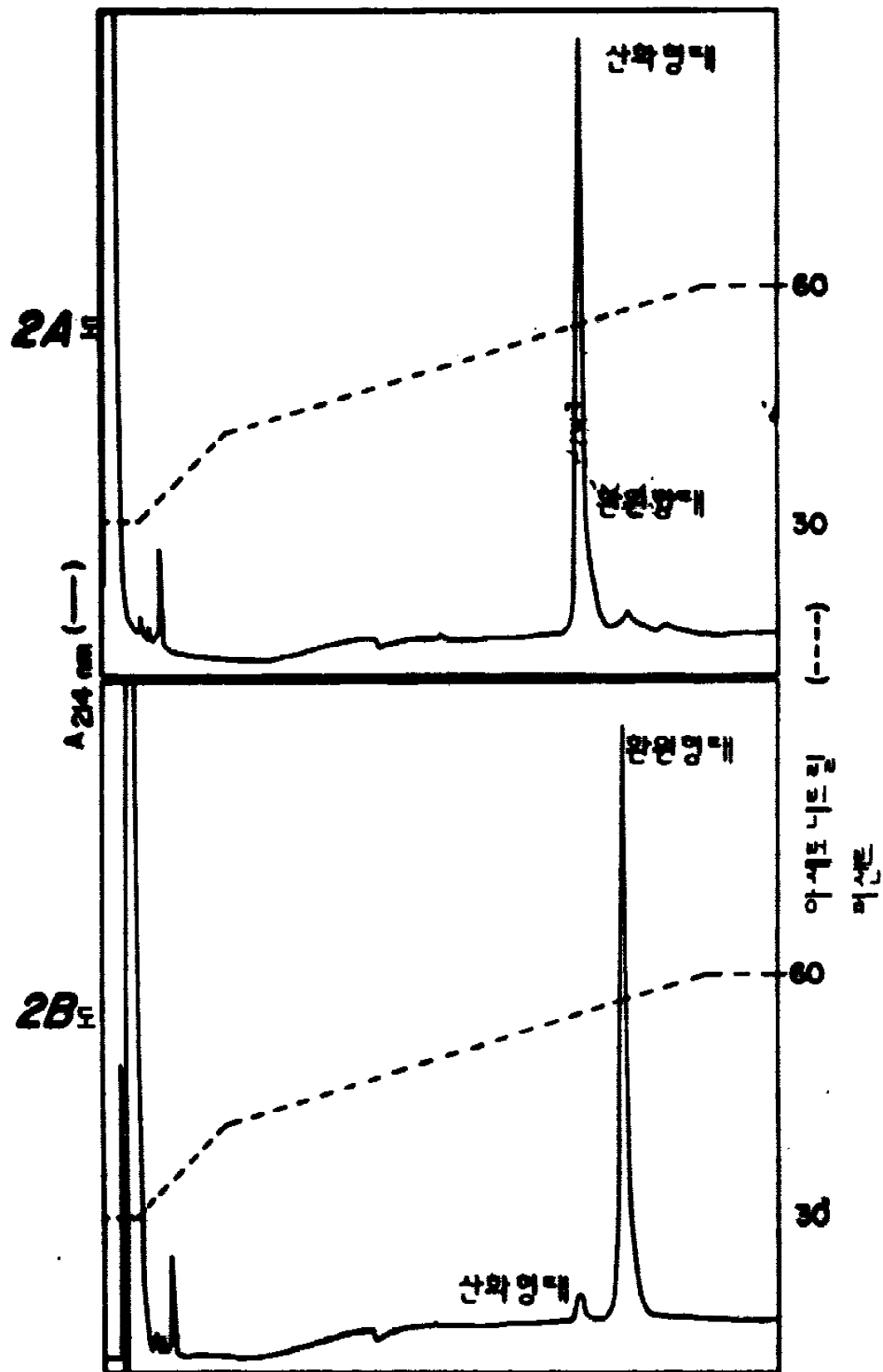
도면 1E



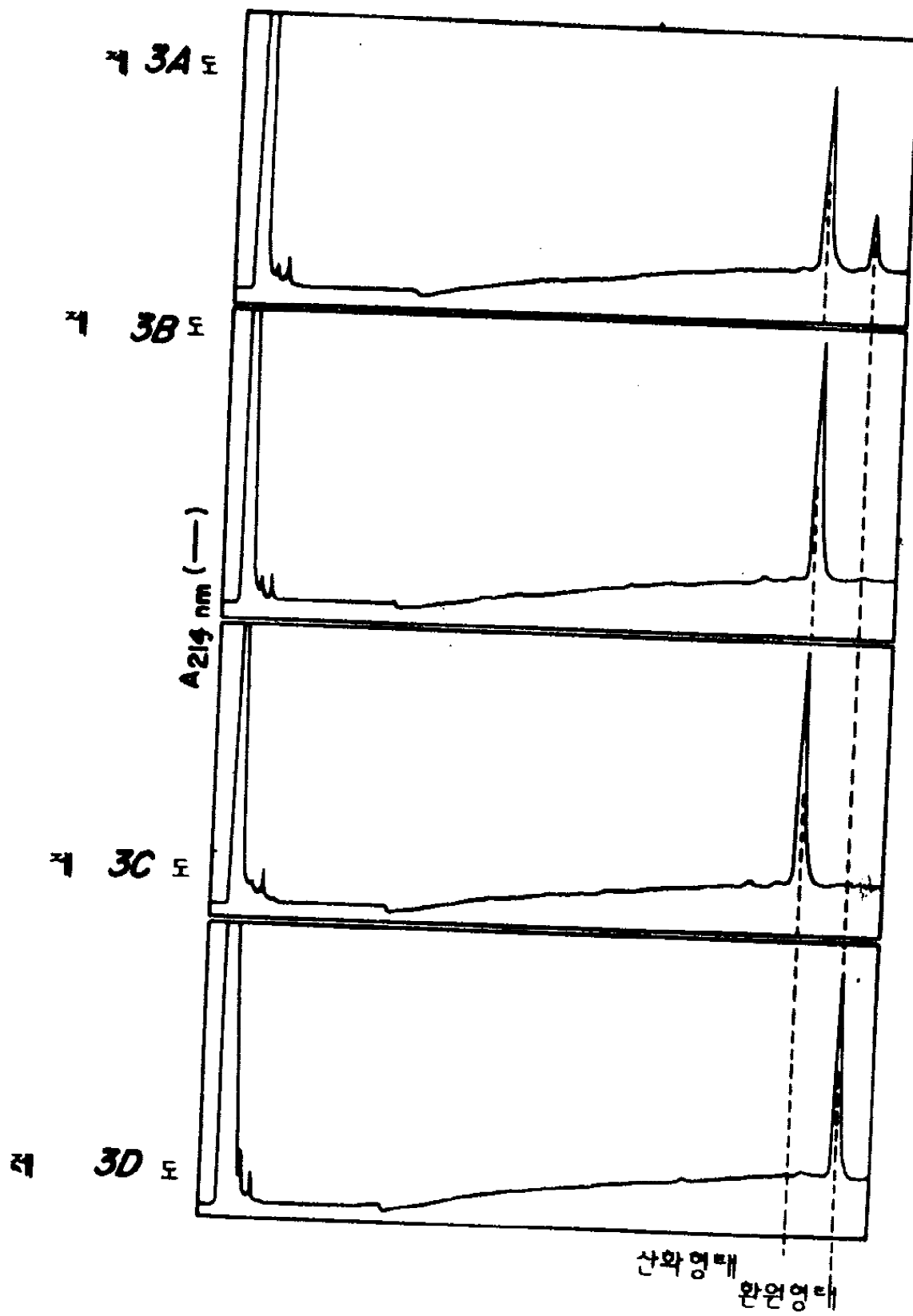
도면 1F



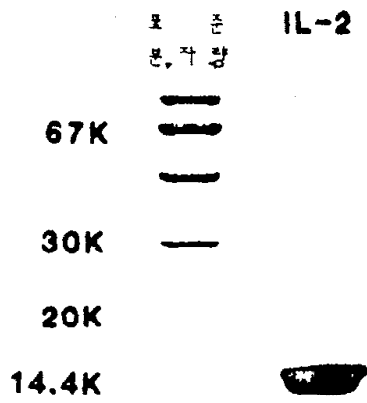
도면2



도면3

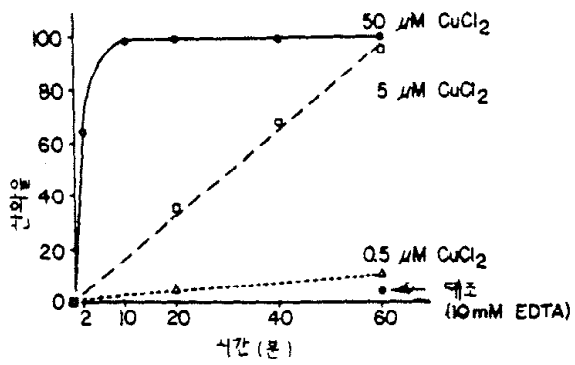


도면4

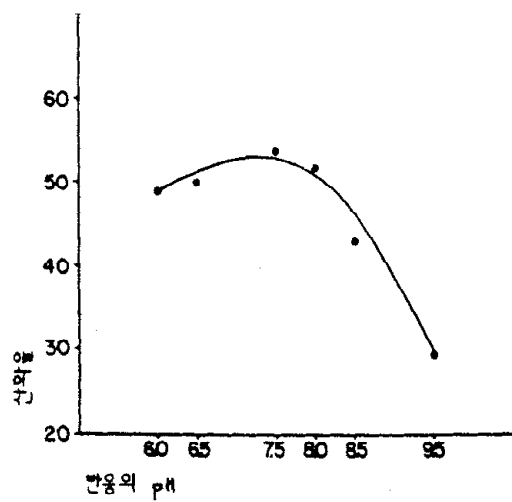


(은 - 착색)

도면5

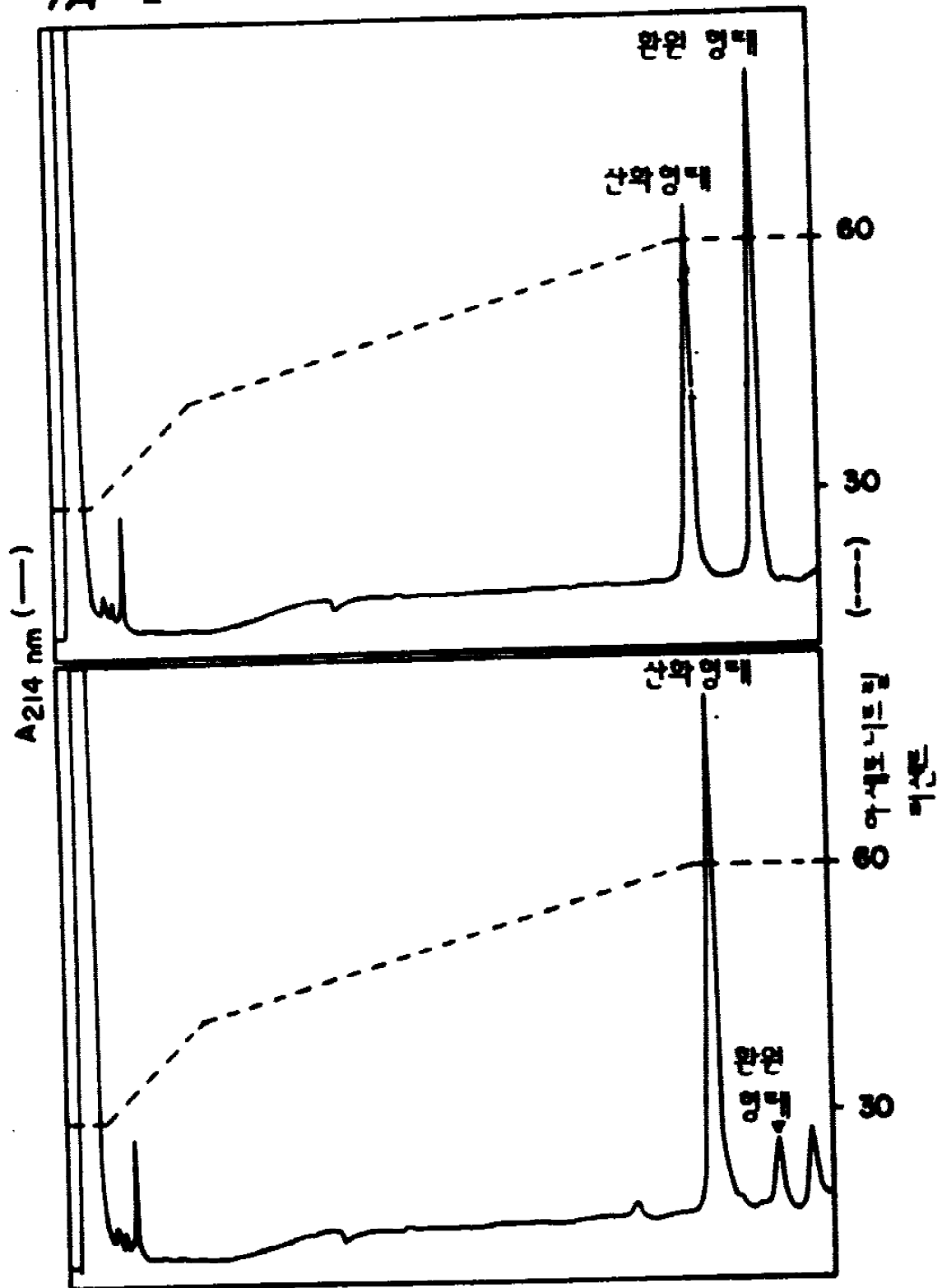


도면6



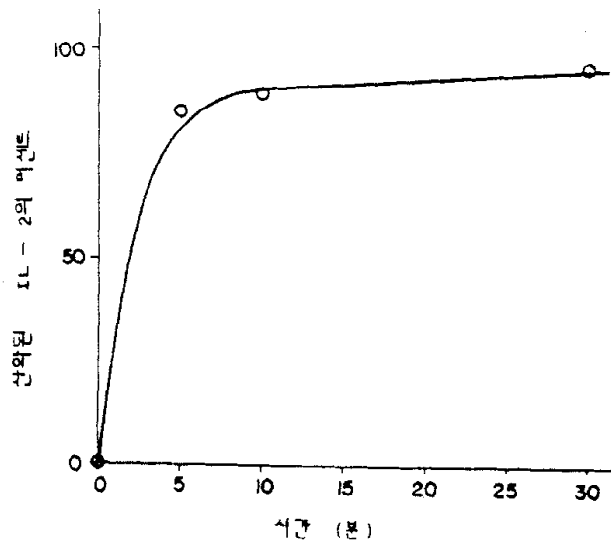
도면7

제 7A 도

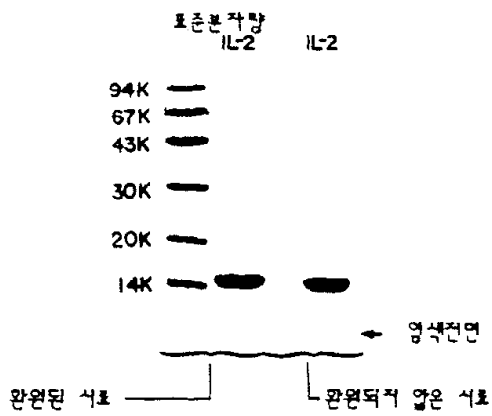


제 7B 도

도면8



도면9



도면10

