



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월09일
(11) 등록번호 10-2188781
(24) 등록일자 2020년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/14 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/14 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7024292(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년09월24일
심사청구일자 2020년08월24일
(85) 번역문제출일자 2020년08월24일
(65) 공개번호 10-2020-0103127
(43) 공개일자 2020년09월01일
(62) 원출원 특허 10-2016-7010746
원출원일자(국제) 2014년09월24일
심사청구일자 2016년09월08일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2014/000932
(87) 국제공개번호 WO 2015/042639
국제공개일자 2015년04월02일
(30) 우선권주장
2013903669 2013년09월24일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006101441 A2
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 16 항

(73) 특허권자
엘리간 파마슈티컬스 인터내셔널 리미티드
아일랜드 더블린 17 쿠락 클론샤프 비즈니스 앤드
테크놀로지 파크
(72) 발명자
엘리엇, 필립
호주, 사우스 오스트레일리아 5031, 서바턴, 달글
레이쉬 스트리트 8, 호스피라 애들레이드 피티와
이 엘티디 씨/-
(74) 대리인
이원희

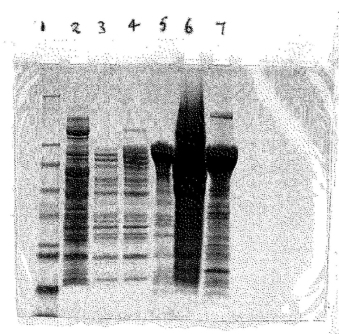
(54) 발명의 명칭 단백질 추출 방법

심사관 : 김승범

(57) 요약

본 발명은 단백질의 추출 방법의 발전을 기반으로 하는 기술이다. 본 발명에서, 단백질은 핵산, 지질 및 기타 단백질이 혼합되어 있는 상태에서 가용성 단백질을 추출하는 방법을 제시한다. 상기 방법은 기존에 제시된 방법에 비하여 순도는 높고, 양은 비슷한 (similar level) 가용성 단백질을 추출할 수 있다. 또한 상기 방법은 수율이 높고, 오염이 적은 정제를 가능하게 한다. 본 발명의 실시예에서 Escherichia coli. 등의 박테리아에서 가용성 단백질을 추출을 위해 카르복실산을 사용하였는데, 이는 일반적으로 미생물 모델에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/7007 (2013.01)
A61L 27/22 (2013.01)
C07K 17/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02008037028 A1
US20120202748 A1
US20090169593 A1
US4675387 A
US20100233783 A1
FEBS Letters (1974) 44(1):59-62
Methods (2008) 45:32-41
W02004022581 A1
Archives of Biochemistry and Biophysics (1990)
280:80-86

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 미생물 군으로부터 가용성 단백질(soluble protein)을 추출하는 방법:

가용성 단백질을 발현하는 미생물 군(population of microorganisms)과 상기 미생물 군으로부터 가용성 단백질을 추출하는데 효과적인 25%(V/V) 내지 37.5% (V/V)의, 아세트산(acetic acid)을 포함하는 용액을 접촉(contacting)하는 단계,

여기서, 아세트산 용액의 pH는 2 내지 6이고,

상기 가용성 단백질은 트로포엘라스틴(tropoelastin) 또는 이의 단편 또는 이의 유도체이고,

상기 접촉은 20 내지 28시간 동안 4℃ 내지 30℃ 사이의 온도에서 수행되고,

상기 접촉은 미생물로부터 가용성 단백질을 추출하게 되며,

상기 가용성 단백질은 용액에서 가용성임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아세트산은 용해비율(dissolution ratio) 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 20:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))로 추가되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아세트산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 10:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))로 추가되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아세트산의 pKa는 3 이상인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미생물군과 계면활성제(detergent)가 추가적으로 접촉하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 미생물군은 박테리아, 효모(yeast) 및 사상균류(filamentous fungi)인 방법.

청구항 7

제1항의 방법에 의해 생산된 트로포엘라스틴을 수득(obtaining)하는 단계 및 상기 트로포엘라스틴을 조성물로 제제화(formulating)하는 단계를 포함하는, 조성물의 생산(producing) 방법.

청구항 8

제1항의 방법에 의해 생산된 트로포엘라스틴 단백질을 수득하는 단계 및 상기 단백질을 고체 지지체(solid support) 또는 반고체 지지체(semi-solid support) 상(onto or into)에 고정화(immobilizing)하는 단계를 포함하는, 고체 또는 반고체 지지체의 제조(producing) 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 추출된 단백질은 70% 이상의 순도를 갖는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 추출된 단백질은 80% 이상의 순도를 갖는 방법.

청구항 11

하기를 포함하는 미생물 균으로부터 가용성 단백질을 추출하는 방법:

가용성 단백질을 발현하는 미생물 균과 상기 미생물 균으로부터 가용성 단백질을 추출하는데 효과적인 25%(V/V) 내지 37.5% (V/V)의, 아세트산(acetic acid) 을 포함하는 용액을 접촉(contacting)하는 단계,

여기서, 아세트산 용액의 pH는 2 내지 6이고,

상기 아세트산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 20:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))로 추가되며,

상기 가용성 단백질은 트로포엘라스틴 또는 이의 단편 또는 이의 유도체이고,

상기 접촉은 20 내지 28 시간 동안 4℃ 내지 30℃ 사이의 온도에서 수행되고,

상기 접촉은 미생물로부터 가용성 단백질을 추출하게 되며,

상기 가용성 단백질은 용액에서 가용성임.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 아세트산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 10:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))로 추가되는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 추출된 단백질은 70% 이상의 순도를 갖는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 추출된 단백질은 80% 이상의 순도를 갖는 방법.

청구항 15

하기를 포함하는 미생물 균으로부터 가용성 단백질을 추출하는 방법:

가용성 단백질을 발현하는 미생물 균과 상기 미생물 균으로부터 가용성 단백질을 추출하는데 효과적인 25%(V/V)

내지 37.5% (V/V)의, 아세트산을 포함하는 용액을 접촉하는 단계,
 여기서, 상기 아세트산 용액의 pH는 2 내지 6이고,
 상기 아세트산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 20:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))로 추가되
 며,
 상기 가용성 단백질은 트로포엘라스틴 또는 이의 단편 또는 이의 유도체이고,
 상기 추출된 단백질은 적어도 70%의 순도를 가지며,
 상기 접촉은 20 내지 28시간 동안 4℃ 내지 30℃ 사이의 온도에서 수행되고,
 상기 접촉은 미생물로부터 가용성 단백질을 추출하게 되며,
 상기 가용성 단백질은 용액에서 가용성임.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 아세트산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 10:1 (산(ml):미생물(g;습
 윤중량))로 추가되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물로부터 단백질을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미생물은 비교적 짧은 시간내에 고품질의 재조합단백질을 생산할수 있다. 더욱이, 많은 미생물들은 관심있는 단백질이 많이 발현되도록 유전적으로 조작하는 것이 쉬운 편이다. 따라서, 미생물은 치료, 진단, 화장품 산업 분야에서 단백질 생산에 적용하기 위해 선택되는 세포종이다. 상기과 같은 많은 적용분야에서, 미생물에서 발현되는 단백질은 일정규모 이상 추출 및 정제되어야만 한다. 이러한 단백질을 정제하기 위해서 종종 균질화(homogenization) 또는 화학적 용해를 이용한 세포의 용해가 필요하다. 그러나 상기 방법에 의한 단백질 유리는, 미생물로부터 단백질에 더불어 핵산, 지질, 내독소(endotoxin) 및 기타 세포구성물 등의 다량의 부가물이 함께 유리된다. 오염물의 대부분은 또한 미생물 내에서 용해되기 때문에, 상기 현상은 응집체(agggregates) 또는 봉입체(inclusion body)에 포함되는 단백질과 달리, 미생물 내에 용해된 단백질을 정제 할 때 특히 두드러진다. 상기 오염된 단백질 및 다른 물질들은 종종 유리하고자 하는 단백질과 함께 추출되기 때문에 이들 오염물질을 제거하기 위하여 단백질을 정제해야만 한다. 오염물질이 많을수록 더 많은 정제 단계와, 정제시약이 필요하며, 이는 단백질 정제과정의 비용 상승 요인이 된다.

[0004] 전통적인 단백질 추출방법에서는 유기용매를 사용하지만, 유기용매의 가격이 비쌀뿐만 아니라, 고인화성이므로 저장, 방연가공, 폭발 방지 및 폐기물 처리를 위한 특별한 장비가 필요하다. 따라서, 대량의 단백질 정제를 위해 유기용매를 사용하는 것은 바람직하지 않다.

[0005] 또한, 강유기용매의 사용시에는 추출과정에서 기능이 저하되거나 부식되지 않는 특별한 장비가 필요하다. 혹은, 추출과정에서 기능저하 또는 부식된 장비의 정기적인 교체가 이루어져야 한다.

[0006] 미생물에서 단백질을 추출하는 또다른 방법은 리소자임과(lysozyme)과 같은 효소를 이용하는 것이다. 그러나 상기 방법은 리소자임가 처리는 비효율적이고, 리소자임이 미생물의 대형 펠릿(pellet)을 침투하여 분산 시키기 어렵기 때문에, 대용량의 미생물로부터 단백질을 추출하는 방법에는 사용하기 어렵다.

[0007] 이같은 사실에 비추어 볼때, 핵산, 내독소 및 기타 단백질의 오염은 줄이면서 미생물로부터 단백질을 추출하는 방법의 개발이 시급하다. 따라서, 본 발명의 단백질 추출법은 단백질을 soluble 형태로 추출하고 오염물질을 침전 시키는 방법을 제공한다.

발명의 내용

- [0009] 한 예로, 본 발명자는 저농도의 카르복실산(카르복실산 50%이하)를 이용하여 표준 추출법으로 고순도의 가용성 단백질을 추출하였다. 또 다른 예에서, 접선유동여과(tangential flow filtration) 또는 침층여과(depth filtration)에서 일반적으로 사용하는 필터를 이용하여, 필터의 손상을 막기위한 추가적인 버퍼의 사용 없이, 단백질 추출액을 직접 필터에 적용시킴으로써 고순도의 가용성 단백질을 추출하였다. 또한, 본 발명에서 카르복실산(예:아세트산)의 농도를 37%, 50%, 62% 로 높이는것이 순도를 낮추는 것을 발견하였고, 25% 아세트산에서 순도가 가장 높은것을 발견하였다. 발명자는 또한 약 37% 또는 50% 또는 62% 이상으로 카르복실산(예, 아세트산) 농도를 증가시키는 것은 단백질의 순도를 감소시키는, 즉 25% 산으로 추출한 단백질 보다 낮은 순도로 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 관점에서, 25%의 카복살산을 포함하는 용액이 순도가 높은 결과를 가져온다. 100% 카르복실산을 포함하는 용액을 사용한 추출은, 후에 정제하기에 충분히 순수한 단백질을 얻지만, 이는 25%의 카르복실산을 포함하는 용액으로 추출 된 단백질만큼 순수하지 않았다.
- [0010] 또 다른 예에서, 본 발명자는 25% 내지 100%의 카복살산을 이용한 추출은, 예를 들어 20 분 또는 30 분 추출한 단백질의 양에 거의 영향을 남기지 않는 것을 발견했다. 따라서, 본 발명자는 원하는 경우 비교적 짧은 시간에 추출이 수행 될 수 있다고 판단했다.
- [0011] 상기에 명시한 바와 같이, 본 발명자는 가용성 단백질이 저렴하며, 또한, 가공, 저장 및/또는 처리용 특수 장비를 필요로 하지 않는 카르복실산으로 추출 할 수있다는 것을 보였다. 본 발명자에 의해 사용되는 예시적인 카르복실산은 아세트산이다.
- [0012] 본 발명자는 이 방법이 넓은 범위의 카르복실산 농도에서 효과적임을 보여 주었다. 발명자는 또한 추출된 단백질의 양 및/또는 순도는 미생물의 중량에 대한 산의 비율을 증가시킴으로써 향상시킬 수있다.
- [0013] 본 발명자에 의한 제조 방법은 가용성 단백질을 추출하기 위하여 특수한 장비, 예를 들어 균질기(homogenizer), 소니케이터(sonicator), 가혹한 유기 용매 또는 리소자임과 같은 효소를 필요로하지 않는다.
- [0014] 본 발명자에 의한 발견은 인간 또는 비인간 동물에 사용하기위한 정제된 단백질 뿐만 아니라, 미생물로 부터 가용성 단백질을 추출하는 방법에 대한 기초를 제공한다.
- [0015] 진술한 논의에 기초하여, 본 발명은, 미생물군으로 부터 가용성 단백질을 추출하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 가용성 단백질을 발현하는 미생물군과 미생미생물군으로 부터 가용성 단백질을 효과적으로 추출하는 양의 카르복실산으로 구성된 용액이 접촉하는 방법으로 구성된 방법을 제공한다.
- [0016] 한 예에서, 카르 복실 산은 아세트산이다.
- [0017] 한 예에서, 미생물군은 가용성 단백질을 추출하기에 충분한 시간 동안 용액과 접촉된다. 예를 들어, 미생물군은 20 시간, 24 시간, 또는 48 시간 또는 그이하 시간 동안 접촉하는데, 예를 들어 약 6 시간, 8 시간, 12 또는 그 이하 등 이다. 예를 들어, 미생물군은 1 시간, 2시간 또는 그 이하, 예를 들어 20분 내지 1시간 동안 접촉한다.
- [0018] 본 발명은 가용성 단백질을 발현하는 미생물군이 미생물군으로 부터 가용성 단백질을 효과적으로 추출하기에 충분한 양의 1% (V/V) 내지 100% (V/V)카르복실산으로 구성된 용액과 접촉하는 방법을 포함하는 미생물군으로 부터 가용성 단백질을 추출하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 용액은 약 1% 내지 약 90%, 80%, 70%, 60%, 또는 50%의 카르복실산을 포함한다. 예를 들어, 상기용액은 10% 내지 90%, 80%, 70%, 60%, 또는 50%의 카르복실산을 포함한다. 예를 들어, 상기 용액은 20% 내지 90%, 80%, 70%, 60%, 또는 50%의 카르복실산을 포함한다. 몇몇 실시예에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같이 지정된 기간(예를 들어 1 시간 이하)동안 상기 미생물군과 상기 용액이 접촉하는 방법을 포함한다.
- [0019] 본 발명은 미생물 군이 가용성단백질을 발현하는 미생물군으로 부터 효과적으로 가용성 단백질을 추출하기에 충분한 양의 1%(V/V) 내지 50%(V/V)의 카르복실산과 접촉하는 방법을 포함하는, 미생물군으로 부터 가용성 단백질을 추출하는 방법을 제공한다.
- [0020] 한 예에서, 상기 용액은 1% (V/V) 내지 40% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0021] 한 예에서, 상기 용액은 1% (V/V) 내지 37.5% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0022] 한 예에서, 상기 용액은 1% (V/V) 내지 30% 카르복실산을 포함하는 용액이다.

- [0023] 한 예에서, 상기 용액은 1% (V/V) 내지 25% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0024] 예를 들어, 상기 용액은 10% (V/V) 내지 40% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0025] 예를 들어, 상기 용액은 10% (V/V) 내지 37.5% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0026] 예를 들어, 상기 용액은 10% (V/V) 내지 25% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0027] 예를 들어, 상기 용액은 20% (V/V) 내지 40% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0028] 예를 들어, 상기 용액은 20% (V/V) 내지 37.5% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0029] 예를 들어, 상기 용액은 25% (V/V) 내지 37.5% 카르복실산을 포함하는 용액이다.
- [0030] 아세트산 추가적인 양은 본 명세서에서 기재되었고, 발명의 본 실시예에서 준용하여 적용되었다.
- [0031] 40%, 37.5%, 25% 또는 그 이하의 카르복실산을 포함하는 용액의 사용은 이어지는 정제 단계의 축소 및/또는 비용 절감을 가능하게 한다. 이것은 단백질 추출 처리에 사용되는 여러 개의 필터가, 예를 들면 접선 흐름 여과 (tangential flow filtration)에서, 카르복실산, 예컨대, 25%, 37.5%, 40% 또는 그이상 농도의 아세트산에 의해 있기 때문이다. 이러한 조건에 의해 손상받는 필터의 예시는 셀룰로오스(cellulose) 또는 폴리에테스설폰(polyethersulfone)으로 구성되거나 이를 포함한다.
- [0032] 본 발명은 또한 미생물 집단에서 가용성 단백질을 추출하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 가용성 단백질을 발현하는 미생물군과 미생물 군으로부터 가용성 단백질을 추출하기에 효과적인 카르복실산을 포함하는 용액의 양과 20시간 또는 그이하, 15시간, 10시간, 5시간, 4시간, 3시간, 2시간 또는 1시간 동안 접촉하는 것을 포함하는 방법이다. 한 예에서, 미생물군은 1시간 또는 그이하, 예를 들어 10분 내지 1시간동안 용액과 접촉하였다. 한 예에서, 미생물군은 20 분 내지 1 시간 동안 용액과 접촉하였다.
- [0033] 추가적인 추출시간은 본 명세서에 설명하였고, 본 발명의 실시예에서 준용하여 적용되었다.
- [0034] 한 예에서, 상기 용액은 10% 내지 100%이고, 예를 들어 10% 내지 90%, 80%, 75%, 70% 또는 본 명세서에 기재된 양을 포함하는 용액이다.
- [0035] 본 발명의 한 예에서의 방법에서 카르복실산은 용해비율 1:1 (산(ml):미생물군 g(습윤무게))의 용해비율로 추가된다. 예를 들어, 카르복실산은 용해비율 5:1 (산(ml):미생물군 g(습윤무게)) 내지 20:1 (산(ml):미생물군 g(습윤무게)), 가령 10:1 (산(ml):미생물군 g(습윤무게))의 용해비율로 추가된다. 본 발명의 실험적인 예에서, 카르복실산은 9:1 (산(ml):미생물군 g(습윤무게))의 용해비율로 추가되었다.
- [0036] 한 예에서, 카르복실산은 세포 배양 배지와 같은 용액에 현탁되지 않은 미생물에 추가된다. 예를 들어, 미생물은 원심 분리하여 침전되었다.
- [0037] 한 예에서, 카르복실산은 세포 배양 배지 또는 다른 용액 등의 미생물을 포함하는 용액에 첨가되며, 이는 1%(V/V) 내지 50% (V/V) 미만의 카르복실산 용액이 된다.
- [0038] 카르복실산은 당업자에게 명백 할 것이다. 카르복실산의 예시가 표 1에 나열되어 있다.
- [0039] 한 예에서, 카르복실산은 적어도 약 3의 pKa를 가진다. 본 명세서에 예시한 것과 같이, 적절한 카르복실산은 아세트산 또는 포름산을 포함한다. 본 발명자는 아세트산이 요산, 수산화 나트륨 또는 이소프로판올(isopropanol)보다 높은 회수율 및 또는 순도의 가용성 단백질을 추출하는 데 유용한 것을 보였다.
- [0040] 한 적절한 예에서, 어떠한 예들에 따라 미생물군이 용액과 5시간 이하, 즉, 4시간 이하, 예를 들어 3시간 이하, 2시간 접촉하는 것을 포함하는 방법이 본 명세서에 기재되었다. 한 예에서, 상기 방법은 1 시간 이하동안 용액과 미생물군이 접촉하는 방법을 포함한다.
- [0041] 당업자는 이러한 방법은 상기 미생물군과 산이 실제로 접촉이 필요함을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "이하"은 적어도 1 분, 예를 들어 적어도 5, 10 또는 15 분을 의미한다.
- [0042] 한 예에서 상기 방법은 미생물군이 Tween (polyoxyethylene-sorbitan monooleate, 예를들어 Tween 20 또는 Tween 80) 또는 Triton X(polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenylether)와 같은 계면활성제를 추가적으로 포함한다. 한 예에서, 상기 계면활성제는 카르복실산에 첨가된다. 한 예에서 상기 계면활성제는 카르복실산 후에 첨가된다. 한 예에서, 상기 계면활성제는 카르복실산 전에 첨가된다.

- [0043] 한 예에서, 가용성 단백질은 재조합 미생물군에서 발현된다.
- [0044] 대표적인 미생물은 박테리아, 효모 또는 곰팡이를 포함된다, 즉, *Escherichia coli*와 같은 그람 음성 박테리아이다.
- [0045] 한 예에서, 가용성 단백질은 단백질이 미생물 집단에서 추출 될 때 가용성을 유지하도록 허용하는 pI를 갖는다. 한 예에서, 상기 단백질은 6.5 내지 6.4, 6내지 8의 중성 pI를 갖는다.
- [0046] 또 다른 예에서, 상기 단백질은 알칼리성 pI를 갖는다. 예를 들어, 가용성 단백질은 7.5 이상의 pI를 갖는다. 또 다른 예에서, 가용성 단백질은 10.4의 pI를 갖는다.
- [0047] 또 다른 예에서, 상기 단백질은 산성 pI를 갖는다. 예를 들어, 상기 단백질은 6.5 이하의 pI를 갖는다. 또 다른 예에서, 가용성 단백질은 6 이하 또는 5.5 이하의 pI를 갖는다. 예를 들어 상기 단백질은 5이하의 pI를 갖는다. 예를 들어 상기 단백질은 4.7이하, 즉 4.6 또는 4.6의 pI를 갖는다.
- [0048] 한 예에서, 단백질은 경단백질(scleroprotein), 샤페로닌(chaperonin), heat shock 단백질, 펩티드(예를 들어, 나트륨 이뇨 펩티드(natriuretic peptide)) 및 항체의 가변 도메인을 포함하는 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0049] 한 예에서, 상기 단백질은 융합 단백질이다. 예를 들어, 상기 단백질은 펩티드 또는 폴리펩티드의 여러 복사본(copies; 예를 들어, 두 개 또는 세 개의 사본)을 포함한다. 또 다른 예에서, 상기 단백질은 서로 융합된 융합된 두 폴리펩티드, 예를 들어 정제를 용이하기 위한 태그(예를 들어 hexa-histidine tag)와 융합된 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 항체의 Fc부위를 포함한다.
- [0050] 일 예에서, 상기 방법은 추가적으로 미생물군 불용 성분을 가용성 단백질을 포함하는 용액으로부터 제거하는 것을 포함한다. 예를 들어, 상기 방법은 추가로 용액을 원심분리 및/또는 여과하여 가용성 분획, 즉 원심분리의 상층액을 회수 하는 단계를 포함한다.
- [0051] 본 발명은 또한 미생물 집단에서 가용성 단백질의 정제 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 단백질의 추출 방법과 상기 방법에 의해 추출된 가용성 단백질 정제 방법의 실시를 포함하는 방법을 제공한다
- [0052] 한 예에서 본 명세서에 기재된 방법은 추출 또는 정제된 단백질을 변형하는 방법을 추가적으로 포함한다. 예를 들어 상기 단백질은 다른 단백질과의 접합 또는 그의 절단(태그(tag) 제거 및/또는 융합 단백질 내의 펩티드의 여러 복사본의 절단)에 의해 변형될 수 있다.
- [0053] 본 발명은 단백질의 변형 방법을 추가적으로 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 방법중 어느하나의 방법으로 추출 또는 정제된 단백질을 얻는 방법 및 상기 단백질의 변형을 포함한다. 한 예에서, 단백질의 변형은 다른 화합물을 상기 단백질에 접합하는 것을 포함한다. 또 다른 예에서, 단백질의 변형은 프로테아제의 접촉으로 인한 상기 단백질의 절단을 포함한다.
- [0054] 한 예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 약학적 조성물, 화장품 조성물, 수의학적 조성물을 특징으로 하는 치료용 조성물의 제조를 추가적으로 포함한다.
- [0055] 한 예에서, 본 명세서에 개시된 방법은 상기 단백질을 고체 지지체(solid support) 또는 반고체 지지체(semi-solid support)에 고정화 하는 것을 추가적으로 포함한다. 실험적인 지지체는 패치(patches) 및/또는 임플란트(implant) 및/또는의료용 장비(medical devices)이다. 본 발명은 약학적 조성물, 화장품 조성물, 수의학적 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 방법중 어느 하나의 방법으로 단백질을 추출, 정제 또는 생산하여 연고, 약학적 조성물, 화장품 조성물, 수의학적 조성물을 제조하는 방법을 포함한다.
- [0056] 본 발명은 고체 또는 반고체 지지체를 제조하는 방법을 또한 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 방법중 어느 하나의 방법으로 단백질을 추출, 정제 또는 생산하여 얻는 방법 및 고체지지체 또는 반고체 지지체 위 또는 안에 상기 단백질을 고정화 하는 것을 포함한다.
- [0057] 한 예에서, 상기 조성물, 고체지지체 또는 반고체 지지체는 인간 또는 비인간 동물에게 투여 또는 적용하였다.
- [0058] 한 예에서, 상기 조성물, 고체지지체 또는 반고체 지지체는 의학적 또는 화장품 용도로 사용된다.
- [0059] 한 예에서, 상기 조성물, 고체지지체 또는 반고체 지지체는 약학적 용도, 화장품 용도, 약용화장품 용도, 수의 과용 용도 또는 이식을 위해 사용된다.

- [0060] 한 예에서, 상기 조성물, 고체지지체 또는 반고체 지지체는 경구용, 이식, 피내(intra-dermally), 근육 내(intramuscularly), 피하(subcutaneously), 정맥 내(intravenously), 동맥 내(intra-arterially), 근육 내(intra-muscularly), 에어로졸로써, 또는 안구 내(intra-ocularly)로 투여된다.
- [0061] 한 예에서, (변성 단백질을 포함하는) 단백질, 조성물, 고체 지지체 또는 반고체 지지체는 의약품용도, 화장품용도, 약용화장품 용도, 수의학적 용도 또는 이식을 위한 것이다. 한 예에서 상기 조성물은 약학적 조성물이다. 한 예에서, 상기 조성물은 화장품 조성물이다. 본 명세서에 개시된 방법은 줄기세포, 전구세포, 피부세포등의 세포 고정 또는 성장용 스캐폴드(scaffold)의 생산 용도이며, 식품 또는 섬유 산업의 적용을 위한 예에서 효소의 생산 용도이다.
- [0062] 본 발명은 본 명세서에 개시된 단백질, 조성물, 고체지지체 또는 반고체 지지체를 포함하는 장치를 제공한다. 한 예에서, 상기 장치는 주사기(syringe), 패치(patch) 또는 임플란트(implant)이다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 도 1은 E.coli로 부터 제조한 단백질을 추출하기 위한 다양한 처리의 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamid gel) 전기영동 분석 결과를 나타낸 사진이다. 1열, 사이즈 마커(size marker); 2열, 15 mM NaOH 추출; 3열, 0.57% (V/V) 아세트산 추출(실온); 4열 0.57% (V/V) 아세트산 추출(4℃); 5열, 10% (w/v) 포름산(formic acid) 추출; 6열, 요산 추출; 7열, n-프로판올(n-propanol) 추출.
- 도 2는 E.coli로 부터 제조한 단백질을 추출하기 위한 다양한 처리의 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamid gel) 전기영동 분석 결과를 나타낸 사진이다. 1열, 사이즈 마커(size marker); 2열, 10% (V/V) 아세트산 추출; 3열, 5% (V/V) 아세트산 추출; 4열 2% (V/V) 아세트산 추출; 5열, 요산 추출.
- 도 3은 아세트산 농도(V/V), 희석율과 발효리터 당 회수되는 재조합 단백질의 양(g) 사이의 상관관계를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 아세트산 농도(V/V), 희석율과 추출된 재조합 단백질의 순도 사이의 상관관계를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 재조합 단백질을 발현하는 E.coli의 추출물을 SDS PAGE로 분석한 결과를 나타낸 사진이다. 상기 추출물은 상이한 농도의 아세트산(V/V)을 이용하여 생산되었으며, 이를 도 상단에 표시하였다.
- 도 6은 E.coli에서 추출한 재조합 단백질의 순도와 수율을 RP-HPLC를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 표시된 바와 같이, 상기 추출물은 각기 상이한 농도의 아세트산(V/V)을 이용하여 생되었다.
- 도 7은 두 그래프를 포함하고 있으며, RP-HPLC로 결정된 E.coli에서 추출된 재조합 단백질의 수율(좌)과 순도(우)를 보여준다. 상기 추출물은 표시된 바와 같이 상이한 농도의 아세트산(V/V)과 상이한 시간의 기간으로 생산되었다.
- 도 8은 재조합 단백질을 발현하는 E.coli 추출물의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 사진이다. 상기 추출물은 도 상단에 표시된 바와 같이 상이한 농도의 아세트산(V/V)을 이용하여 20분 동안 생산되었다.
- 도 9는 펩티드의 여러 복사본(multiple copies)를 포함하는 재조합 융합 단백질을 발현하는 E.coli 추출물의 SDS-PAGE 결과를 보여주는 사진이다. 1열, 사이즈마커; 2열 세포 용해물(cell lysate), 3열, 25%(V/V) 아세트산 추출물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0065] **일반적인 사실**
- [0066] 본 명세서 전반에 걸쳐 않는 한 특별히 달리 언급하거나 문맥을 달리 언급하거나 이들 하나의 단계, 물질의 조성물(composition of matter), 다수의 단계(group of steps) 또는 다수의 물질의 조성물(group of compositions of matter)의 참조는 하나 또는 다수의 단계들, 물질의 조성물, 다수의 단계 또는 다수의 물질의 조성물을 망라하여 이끌어내져야 한다.
- [0067] 당업자는 본 발명이 변형 및 상세 설명 이외의 변형 여지가 있음을 이해할 것이다. 그것은 본 발명이 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야한다. 본 발명은 또한 개별적, 집합적 또는 특별히 명기되는 모든 단계, 기능, 구성, 조성물과 이 규격에 표시된 모든, 및 모든 조합 또는 둘 이상을 포함한다.
- [0068] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도 된 본 명세서에 기재된 구체적인 예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다.

기능적으로 동등한 제품, 조성물 및 방법들은 본 발명의 범위 내에 명확하다.

- [0069] 모든 예는 본원에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 다른 실시 예를 주의하여 준용(*mutatis mutandis*)하여야 한다.
- [0070] 특별히 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 일반적으로, 당업자에 의해 이해되는 동일한 의미를 가지고 수행되어 한다(예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역화학염색, 단백질 화학 및 생화학).
- [0071] 달리 명시하지 않는한, 본 발명에 사용되는 재조합 단백질 및 세포 배양 기술은 당업자에게 공지된 표준 절차이다. 이러한 기술은 J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984); J. Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T.A. Brown (편집자), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991); D.M. Glover and B.D. Hames (편집자), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996); 및 F.M. Ausubel et al. (편집자), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지 모든 업데이트 포함)와 같은 서적 전반에 설명 및 기술되어있다.
- [0072] 용어 "및/또는"은, 예를들어 "X 및/또는 Y가"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 두 의미 또는 각 의미는 명확한 지원을 통해 취해져야 한다.
- [0073] 설명 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다" 또는 "포함하는" 또는 "포함하는 것"등의 변형은 언급된 요소(element), 정수(integer) 또는 단계(step)을 포함하는 것을 암시하는 것으로 이해되어야 하지만, 어떠한 다른 요소, 정수, 단계 또는 요소, 정수 또는 단계의 집단(group of element)이 제외되서는 안된다.
- [0074] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "로부터 유도된"이라는 용어는 특정의 정수가 직접적이지 않더라도, 특정 소스로부터 얻어지는 것을 의미한다.
- [0075] **선택된 정의들(selected definitions)**
- [0076] 용어 "추출(extraction)"은 그것이 발현되는 미생물에서 가용성 단백질을 제거하는 것을 의미한다. 몇몇 실시 예에서, 가용성 단백질을 추출하는 단계는 미생물 안에 추출 이전에 존재했던 다른 성분이나 물질을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70%를 제거한다.
- [0077] 본 명세서에서 사용된 용어 "가용성 단백질(soluble protein)"은 미생물 내에서 발현되는 것(예를 들면, 미생물의 세포질 또는 주변세포질 내에 단백질이 가용성 형태 인것)으로 이해 될 것이다. 예를 들어, 상기 단백질은 세포의 세포질이나 주변세포질 내에 불용성 침전이나 예를 들어 봉입체(inclusion body)를 형성하지 않는다.
- [0078] 용어 "미생물"이란 미세 단세포 또는 다세포 유기체를 언급하는 것으로 당업자에게 명백 할 것이다. 대표적인 미생물은 단세포이다. 본 발명의 방법에 유용한 미생물의 예는 효모, 곰팡이 및 박테리아를 포함한다.
- [0079] 용어 "미생물군(population of microorganisms)"은 배양 또는 발효중에 생산된 미생물들을 포함한다. 한 예에서, 미생물은 클론(clone)으로부터 배양에서 발생한다, 즉 무성번식(clonal)이다. 예를 들어 상기 세포는 배양 과정중 발생한 것들은 돌변변이라기 보다는 대부분 유전적으로 동일하다.
- [0080] 본 명세서에서 사용되는 용어 "카르복실산(carboxylic acid)"은 적어도 하나의 카복실기(carboxyl group)를 포함하는 어떤 유기산을 총칭하는데, 상기 카르복실산은 표 1에 기재되어 있다. 한 예에서, 상기 카르복실산은 2 이상, 2.5, 3, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 또는 4.5의 pKa를 갖는다. 예를 들면, 카르복실산은 아세트산(acetic acid), 포름산(formic acid), 시트르산(citric acid), 락트산(lactic acid), 요산(uric acid), 벤조산(benzoic acid), 클로로 아세트산(chloroacetic acid) 또는 프로판산(propanic acid)이다. 한 예에서, 카르복실산은 포름산, 아세트산, 벤조산 또는 프로판 산이다. 한 예에서, 카르복실산은 아세트산, 벤조산 또는 프로판 산이다. 한 예에서, 카르복실산은 아세트산이다.
- [0081] 당업자는 용어 "% (V/V)"("부피(volume) 퍼센트" 또는 "볼륨 퍼센트 체적(volume for volume percent)")가 ((용질의 총 체적 (카르복실산) / 용액의 총 부피) × 100 %)식에 의해 계산된 것으로 이해된다는 것을 이해할 것이다.
- [0082] 용어 "습윤 중량(wet weight)"은 단순하게 건조하지 않고 측정된 미생물 집단의 무게를 의미한다. 예를 들어, 미생물의 중량은 세포 배양물로부터 수확(예를 들면, 원심 분리 및/또는 여과에 의해) 후 세포를 건조하지 않고

결정된다.

[0083] 용어 "용해비율(dissolution ratio)"의 의미는 본 명세서의 설명으로부터 당업자에게 명백 할 것이다. 특히, 이 용어는 미생균의 흡윤증량에 대한 카르복실산을 포함하는 용액의 부피의 비율을 의미한다.

[0084] 카르복실산(Carboxylic acid)

[0085] 상기하였듯이, 본 발명은 어떤 종류의 카르복실산도 세포로 부터 가용성 단백질을 추출 가능함을 고려한다.

[0086] 한 예에서, 충분히 낮은 pKa를 갖는 카르복실산도 본 명세서에 제시한것과 같은 %를 사용할때 추출을 가능하게 한다.

[0087] 한 예에서, 충분히 높은 pKa의 카르복실산을 단백질 추출에 사용하여도 예를 들어, 1 내지 50%, 예를 들어 1 내지 37.5%를 사용시에 반응조 등의 장비 손상을 가져 오지 않는다.

[0088] 카르복실산의 예와 그 pKa를 표 1에 기재하였다.

표 1

[0089]

분자식	명칭	pKa
CH2O2	포름산(Formic acid)	3.75
C2HC13O2	트리아세트산(Trichloroacetic acid)	0.70
C2H2C12O2	디클로로아세트산(Dichloroacetic acid)	1.48
C2H2O4	옥살산(Oxalic acid)	1.23
C2H3BrO2	브로모아세트산(Bromoacetic acid)	2.69
C2H3ClO2	클로로아세트산(Chloroacetic acid)	2.85
C2H3IO2	요오도아세트산(Iodoacetic acid)	3.12
C2H4OS	티오아세트산(Thioacetic acid)	3.33
C2H4O2	아세트산(Acetic acid)	4.76
C2H4O3	글리콜산(Glycolic acid)	3.83
C3H4O2	아크릴산(Acrylic acid)	4.25
C3H6O2	프로판산(Propanoic acid)	4.86
C3H6O3	락트산(Lactic acid)	3.08
C3H6O4	글리세르산(Glyceric acid)	3.52
C4H4O4	말레산(Maleic acid)	1.83
C4H4O5	옥살로아세트산(Oxaloacetic acid)	2.22
C4H6O3	아세토아세트산(Acetoacetic acid)	3.58
C4H6O4	숙신산(Succinic acid)	4.16
C4H6O5	말산(Malic acid)	3.40
C4H7NO4	아스파르트산(Aspartic acid)	1.99
C4H8O2	부탄산(Butanoic acid)	4.83
C4H8O2	2-메틸프로판산(2-Methylpropanoic acid)	4.88
C4H8O3	3-수산화프로판산(3-Hydroxybutanoic acid)	4.70
C4H8O3	4-수산화프로판산(4-Hydroxybutanoic acid)	4.72
C4H9NO2	2-아미노부탄산(2-Aminobutanoic acid)	2.29
C4H9NO2	4-아미노부탄산(4-Aminobutanoic acid)	4.031
C5H4N4O3	요산(Uric acid)	3.89
C5H8O4	글루타르산(Glutaric acid)	4.31
C5H9NO4	L-글루탐산(L-Glutamic acid)	2.13
C5H10O2	펜탄산(Pentanoic acid)	4.84
C5H10O2	트리메틸아세트산(Trimethylacetic acid)	5.03
C6H5NO2	피콜린산(Picolinic acid)	1.07
C6H8O7	시트르산(Citric acid)	3.14
C6H8O7	이소시트르산(Isocitric acid)	3.29
C6H10O4	아디프산(Adipic acid)	4.43
C6H11NO3	아디파르산(Adiparnic acid)	4.63
C6H12O2	헥산(Hexanoic acid)	4.85
C7H5BrO2	2-브로모벤조산(2-Bromobenzoic acid)	2.84
C7H5BrO2	3-브로모벤조산(3-Bromobenzoic acid)	3.86
C7H5ClO2	2-클로로벤조산(2-Chlorobenzoic acid)	2.92
C7H5ClO2	3-클로로벤조산(3-Chlorobenzoic acid)	3.82

C7H5ClO2	4-클로로벤조산(4-Chlorobenzoic acid)	3.98
C7H5IO2	2-요오도벤조산(2-Iodobenzoic acid)	2.85
C7H5IO2	3-요오도벤조산(3-Iodobenzoic acid)	3.80
C7H5NO4	퀴놀린산(Quinolinic acid)	2.43
C7H6O2	벤조산(Benzoic acid)	4.19
C7H14O2	헵탄산(Heptanoic acid)	4.89
C8H16O2	옥탄산(Octanoic acid)	4.89

[0090] 한 예에서, 카르복실산은 2 이상의 pKa를 갖는다. 예를 들어 카르복실산은 펜산탄(pentanoic acid), 트리메틸아세트산(trimethylacetic acid), 시트르산(citric acid), 이소시트르산(isocitric acid), 아디프산(adipic acid), 헥산(hexanoic acid), 2-브로모벤조산(2-bromobenzoic acid), 3-브로모벤조산(3-bromobenzoic acid), 2-클로로벤조산(2-chlorobenzoic acid), 3-클로로벤조산(3-chlorobenzoic acid), 4-클로로벤조산(4-chlorobenzoic acid), 2-요오도벤조산(2-iodobenzoic acid), 3-요오도벤조산(3-iodobenzoic acid), 퀴놀린산(quinolinic acid), 벤조산(benzoic acid), 헵탄산(heptanoic acid), 옥탄산(octanoic acid), 포름산(formic acid), 브로모아세트산 (bromoacetic acid), 클로로아세트산 (chloroacetic acid), 요오도아세트산 (iodoacetic acid), 티오아세트산(thioacetic acid), 아세트산(acetic acid), 글리콜산(glycolic acid), 아크릴산(acrylic acid), 프로판산(propanoic acid), 락트산(lactic acid), 글리세르산(glyceric acid), 옥살로아세트산(oxaloacetic acid), 아세토아세트산(acetoacetic acid), 숙신산(succinic acid), 말산(malic acid), 부탄산(butanoic acid), 2-메틸프로판산(2-methylpropanoic acid), 3-수산화부탄산(3-hydroxybutanoic acid), 4-수산화부탄산(4-hydroxybutanoic acid), 2-아미노부탄산(2-aminobutanoic acid), 4-아미노부탄산(4-aminobutanoic acid), 요산(uric acid), 글루타르산(glutaric acid) 및 L-글루탐산(1-glutamic acid)이다. 한 예에서, 카르복실산은 3 이상의 pKa를 갖는다. 예를 들어 카르복실산은 포름산(formic acid), 요오도아세트산 (iodoacetic acid), 티오아세트산(thioacetic acid), 아세트산(acetic acid), 글리콜산(glycolic acid), 아크릴산(acrylic acid), 프로판산(propanoic acid), 락트산(lactic acid), 글리세르산(glyceric acid), 아세토아세트산(acetoacetic acid), 숙신산(succinic acid), 말산(malic acid), 부탄산(butanoic acid), 2-메틸프로판산(2-methylpropanoic acid), 3-수산화부탄산(3-hydroxybutanoic acid), 4-수산화부탄산(4-hydroxybutanoic acid), 4-아미노부탄산(4-aminobutanoic acid), 요산(uric acid), 글루타르산(glutaric acid), 펜탄산(pentanoic acid), 트레메틸아세트산(trimethylacetic acid), 시트르산(citric acid), 이소시트르산(isocitric acid), 아디프산(adipic acid), 아디프아르산(adiparnic acid), 헥산(hexanoic acid), 3-클로로벤조산(3-chlorobenzoic acid), 4-클로로벤조산(4-chlorobenzoic acid), 3-이소벤조산(3-iodobenzoic acid), 벤조산(benzoic acid), 헵탄산(heptanoic acid) 및 옥탄산(octanoic acid)이 있다.

[0091] 한 예에서, 카르복실산은 4 이상의 pKa를 갖는다. 카르복실산은 아세트산(acetic acid), 아크릴산(acrylic acid), 부탄산(butanoic acid), 2-메틸프로판산(2-methylpropanoic acid), 3-수산화부탄산(3-hydroxybutanoic acid), 4-수산화부탄산(4-hydroxybutanoic acid), 2-아미노부탄산(2-aminobutanoic acid), 4-아미노부탄산(4-aminobutanoic acid), 글루타르산(glutaric acid), 펜탄산(pentanoic acid), 아디프산(adipic acid), 헥산(hexanoic acid), 헵산(heptanoic acid), 옥탄산(octanoic acid) 및 벤조산(benzoic acid)이 있다.

[0092] 한 예에서, 카르복실산은 4.5이상의 pKa를 갖는다. 예를 들어 아세트산(acetic acid), 프로판산(propanoic acid), 부탄산(butanoic acid), 2-메틸프로판산(2-methylpropanoic acid), 3-수산화부탄산(3-hydroxybutanoic acid), 4-수산화부탄산(4-hydroxybutanoic acid), 펜탄산(pentanoic acid), 트리메틸아세트산(trimethylacetic acid), 아디프아르산(adiparnic acid), 헥산(hexanoic acid), 헵산(heptanoic acid) 및 옥탄산(octanoic acid)이 있다.

[0093] 한 예에서, 카르복실산은 아세트산 또는 포름산이다.

[0094] 한 예에서 카르복실산은 아세트산이다. 본 발명에서 상기 산의 사용은 또다른 카르복실산에 비하여 수율 및 순도 면에서 우수함을 확인하였다. 상기 카르복실산은 유기용매에 비하여 상대적으로 값이 저렴하고 일반적으로 가공, 저장 및 처리에 특별한 장비가 필요하지 않다.

[0095] 본 발명의 실험예에서, 미생물군은 일정시간동안 카르복실산의 %(V/V) 가 1 내지 100% 이하의 비율로 접촉한다. 예를 들어 카르복실산의 %(V/V) 가 1 내지 95%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 90%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 85%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 80%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 75%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 70%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 65%.

예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 60%. 예를 들어 카르복실산의 % 비율이 1 내지 55%.

[0096] 본 발명의 방법의 한 예에서, 카르복실산은 1 내지 50% 이하의 %(V/V)로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 1 내지 45%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 2 내지 50%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 2 내지 40%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 2 내지 37.5%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 3 내지 37.5%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 3 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 5 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 6 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 7 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 8 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 9 내지 30%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 10 내지 37.5%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 10 내지 25%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 1, 2, 6, 10, 15, 17.5, 25 또는 37.5%의 %(V/V) 비율로 사용된다. 예를 들어 카르복실산은 25%의 %(V/V) 비율로 사용된다.

[0097] 한 실험예에서, 카르복실산은 유효성분이 없거나 또는 검출이 되지 않는 용매에 희석하여 사용할 수 있다.

[0098] 한 실험예에서 카르복실산은 물에 희석된다.

[0099] 한 실험예에서, 카르복실산을 포함하는 용액은 2 내지 6, 예를 들어 2 내지 5, 또는 2 내지 4의 pH를 갖는다. 예를 들어, 카르복실산을 포함하는 상기 용액은 2 내지 3의 pH를 갖는다. 또 한 예에서, 카르복실산을 포함하는 용액은 2 내지 2.5의 pH를 갖는다.

[0100] **추출(Extraction)**

[0101] 한 예에서 카르복실산은 용해비율 약 1:1(산(ml):미생물(g;습윤중량))내지 20:1(산(ml):미생물(g;습윤중량))으로 추가 되었다. 예를 들어 카르복실산은 용해비율 2:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 15:1(산(ml):미생물(g;습윤중량))으로 추가되었다. 예를 들어 카르복실산은 용해비율 3:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 10:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))으로 추가되었다. 예를 들어 카르복실산은 용해비율 5:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)) 내지 10:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량))으로 추가되었다. 예를 들어 카르복실산은 용해비율 5:1 (산(ml):미생물(g;습윤중량)), 6:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)), 7:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)), 8:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)), 7:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)), 또는 9:1(산(ml):미생물(g;습윤중량)) 으로 추가되었다.

[0102] 본 발명의 한 실험예에서 카르복실산은 용해비율 약 9:1(카르복실산(ml):미생물(g; 습윤중량))으로 추가되었다.

[0103] 몇몇 예에서, 미생물을 개량하기에 앞서 미생물을 수득해야하는 것이 바람직하다. 미생물 수득을 위한 방법은, continuous flow centrifugation(예;disk-stack centrifugation(Alfa Laval 또는 GEA Westfalia Separator Group GmbH)), microfiltration 또는 tangential flow filtration인 것이 바람직 하다.

[0104] 미생물 수득 후 미생물의 중량은 쉽게 결정된다. 혹은, 미생물 샘플의 중량을 계량하고, 이를 전체 미생물 총량의 계산 또는 추정 에 이용한다.

[0105] 또 다른 예에서, 배양된 미생물 샘플을 수득하고 계량하였고, 그 중량을 이용하여 전체 미생물 배양의 중량을 추정 또는 계산하였다. 적절한 양의 카르복실산을 함유하는 용액은 배양에 직접 추가될 수 있다.

[0106] 이어지는 예에서, 배양된 미생물의 중량은, 배양에 추가되는 각 구성물(예; 배지 및 먹이)의 알려진 중량을 기초로 추정되며, 중량은 배양에서 미생물의 중량을 계산 또는 추정하는데 이용된다. 적절한 양의 카르복실산을 함유하는 용액은 배양에 직접 추가될 수 있다.

[0107] 한 예에서, 미생물균은 가용성단백질이 추출되기 충분한 시간동안 용매와 접촉한다.

[0108] 상기에 전술한바와 같이, 발명자는 본 명세서에 개시된 임의의 실시예를 따라 미생물균으로부터 가용성 단백질의 빠른 추출을 가능하게 하는 방법을 결정해야 한다. 예를 들어, 발명자는 카르복실산을 함유한 용매가 약 20분 또는 1시간 또는 20시간 접촉하였을때, 미생물균으로부터 비슷한 양의 단백질이 추출되는 것을 확인하였다. 한 예에서, 미생물균과 카르복실산을 함유한 용매가 5시간, 4시간, 3시간 또는 2시간 이하로 접촉하는 방법으로 구성된다. 예를 들어, 미생물균과 카르복실산을 함유한 용매가 20분, 30분, 45분과 등의 1시간 내지 그 이하로 접촉하는 방법으로 구성된다. 본 발명은 더 장시간의 추출도 고려된다. 예를 들어, 미생물균과 카르복실산을 함유한 용매는 약 1시간 내지 20시간, 예를 들어 1시간에서 5시간 또는 1시간에서 3시간 접촉한다. 한 예에서, 미생물균은 카르복실산과 약 1시간 접촉한다.

- [0109] 미생물군은 카복실산과 2℃ 내지 40℃에서, 예를들어 4℃ 내지 30℃, 예를 들어 실온에서 접촉한다. 숙련자는 실온은 추출이 실행되는 환경에 의존한다는 것을 이해할 수 있다. 예를들어 제조시설에서 상기 온도는 16 내지 26℃일수 있고, 예를 들어 18 내지 25℃, 예를들어 19, 20, 21, 22, 23 또는 24℃ 이다.
- [0110] 카복실산으로 구성된 용매와 미생물군은 혼합을 위해 표준기술로 교반될 수 있다. 카복실산에 용해시킨 후, 가용성 단백질을 함유한 용매는 오염물질과 분리해야한다. 예를 들어, 카복실산을 함유한 용매, 미생물군 및 가용성 단백질은 원심분리(centrifuzation) 또는 미세여과(microfiltration) 되어야 한다. 그리고 가용성 단백질이 포함된 수용성층은 회수되어야 한다.
- [0111] 한 예에서, 본 명세서에 기술한 추출방법은 미생물과 무기산을 접촉하는 것으로 구성되어 있지 않다
- [0112] 한 예에서, 본 명세서에 기술한 추출방법은 카복실산 또는 물 외에 다른 유기용매를 미생물군과 접촉하는 것으로 구성되어 있지 않다. 한 예에서, 상기 방법은 미생물군이 알콜, 예를들어 부탄올 또는 프로판올과 접촉하는 것으로 구성되어 있지 않다.
- [0113] 한 예에서, 본 명세서에 기술한 추출방법은 소니케이션(sonication) 또는 균질혼합(hmogenization)을 시행하는 것으로 구성되어 있지 않다.
- [0114] 한 예에서, 본 명세서에 기술한 추출방법은 가용화 촉진자로써, 폴리에틸렌이민, 황화마그네슘(MgSO₄), 염화마그네슘(MgCl₂), 황화칼슘 또는 염화칼슘(CaCl₂)을 추가하지 않는다.
- [0115] **미생물 (microorganisms)**
- [0116] 추출 가용성 단백질을 발현하기에 적합한 미생물은 본 발명에있어서, 당업자에게 명백 할 것이다. 예를 들어, 미생물은 효모, 균류 또는 박테리아이다.
- [0117] 실험적인 효모는 *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichiapijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis* 및 *Candida albicans*를 포함한다.
- [0118] 실험적인 사상균은 *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum* 및 *Neurospora crassa*를 포함한다.
- [0119] 본 발명에서 적합한 박테리아는 archaeobacteria 및 eubacteria가 적합하고 eubacteria가 더욱 적합하다. 예를 들어 본 발명에서 Enterobacteriaceae와 같은 그람-음성 박테리아가 유용하게 사용되었다. 유용한 박테리아로는 *Escherichia*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Shizobia*, *Vitreoscilla* 및 *Paracoccus*를 포함한다.
- [0120] 한 예에서, 미생물은 *Escherichia coli* 이다. 적절한 *E. coli* 슛주는 *E. coli* W3110(ATCC 27325), *E. coli* 294(ATCC 31446 또는 33625), *E. coli* B 및 *E. coli* X1776(ATCC 31537)을 포함한다. 상기 예는 제한적인 것이 아닌 예시이다. 돌연변이체는 상기 제시된 어떠한 미생물을 사용해도 무방하다. 재조합 발현체를 활용하는 경우, 적합한 미생물은 미생물에서 발현백터의 복제성을 고려하여 선택될수 있다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410와 같은 플라스미드를 사용할때, *E. coli*, *Serratia* 또는 *Salmonella* 종이 숙주로 사용될 수 있다.
- [0122] *내인성 단백질을 추출 할 때, 그 단백질을 발현하는 미생물을 선택하는 것이 중요하다.
- [0123] **제조합체 발현(Recombinant Expression)**
- [0124] 한 예에서, 가용성 단백질은 재조합으로 발현된, 즉, 제조합 가공된 단백질이다. 예를 들어, 가용성 단백질을 코딩하는 핵산은 발현 구조 프로모터에 연결되어있다. 발현구조체가 미생물의 게놈에 통합되거나 또는 플라스미드가 예피솜 유사상태로 남아있음으로써 미생물에 도입될수 있다. 몇몇 예에서, 발현구조체는 발현백터이다.
- [0125] 본 발명에서 사용된, "프로모터(promoter)"라는 용어는 광범위한 의미를 가지며, TATA box 또는 개시인자를 포함하는 유전체 유전자의 전사 조절 서열을 포함하는데, 이는 정확한 전사의 개시를 위해 요구되며, 발생 또는 외부 자극에 대한 반응으로, 또는 조직 특이적으로, 부가적인 조절자(상부 활성화인자 서열(upstream activating

sequences), 전사인자 결합 부위(transcription factor binding sites), 증폭자(enhancer), 억제자(silencer))와 함께/또는 없이 핵산의 발현을 변화시킨다.

- [0126] 본 문헌에서, "프로모터(promoter)"라는 용어는 또한 재조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 유도체를 묘사할때 쓰이는데, 그것의 작동과 연결되어 핵산의 발현을 활성화 하거나 증진 시킨다. 선호되는 프로모터는 하나 또는 그 이상의 특이적인 조절요소를 증폭 발현하거나, 특이적 발현을 변화시키거나, 핵산을 일시적으로 발현하는 추가적인 카피를 포함할수 있다.
- [0127] 본 문헌에서 사용된 바와 같이, "동작가능하게 연결된(operatively linked to)"라는 용어는 핵산의 발현이 프로모터에 의해 조절되도록 하는 핵산에 대한 상대 위치에 자리하는 것을 의미한다.
- [0128] "발현 구조체(expression construct)"라는 용어는 가장 넓은 맥락을 가지고, 가용성 단백질의 발현을 위해 어떠한 다른 요소를 필요로 하는 가용성 단백질을 코딩하는 핵산과 동작가능하게 연결된 프로모터로 포함하는 핵산을 포함한다.
- [0129] "발현벡터(expression vector)" 라는 용어는 가용성 단백질의 발현을 위해 어떠한 다른 요소를 필요로 하는 가용성 단백질을 코딩하는 핵산과 연결되어, 동작가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 핵산이, 이에 더하여 선택 표지자를 코딩하고 있고, 벡터가 복제되도록 허락된 서열을 가지고 있는 핵산을 나타낸다.
- [0130] 본 발명의 문맥 내에서, 발현 벡터는 플라스미드, 박테리오파지, 파지 미드(phagemid), 코스 미드, 바이러스 서브 - 게놈(virus sub genomic) 또는 게놈 단편(genomic fragment) 또는 이중 DNA의 발현을 유지 또는 복제할수 있는 다른 핵산으로 이해되어야한다.
- [0131] 대부분의 발현 벡터는 다양한 세포에서의 발현을위한 상업적으로 이용 가능하다. 적절한 벡터의 선택은 당업자의 지식 범위 내에 있다.
- [0132] 보통의 프로모터는 박테리아(*E. coli*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.*, and *Pseudomonas sp.*)를 포함하는 균으로부터 선택된 박테리아)의 바이러스 발현을 위해 적합하며, lacZ 프로모터, Ipp의 프로모터, 온도에 민감한 λ_L 또는 λ_R 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, SP6 프로모터 또는 IPTG 유도 tac 프로모터 또는 lacUV5 프로모터와 같은 반 인공 프로모터(semi-artificial promoter)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 박테리아 세포에서 본 발명의 핵산 단편을 발현하는 많은 다른 유전자 구조 시스템은 당 업계에서 잘 알려져 있으며, 예를들어 Ausubel *et al.*, (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987)과 Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition, 2001)이 설명하고 있다.
- [0133] 박테리아 세포에서 재조합 폴리펩티드(polypeptide)의 발현을 위한 다양한 벡터와 효과적인 리보솜 결합 부위는 다음과 같은 예에서 논의되어져 왔고; PKC30 (Shimatake and Rosenberg, *Nature* 292, 128, 1981); pKK1 73-3 (Amann and Brosius, *Gene* 40, 183, 1985), pET-3 (Studier and Moffat, *J Mol. Biol.* 189, 113, 1986); 예를 들어 pCR 벡터 세트(pCR vector suite, Invitrogen), pGEM-T Easy 벡터 (Promega), pL 발현 벡터 세트 (pL expression vector suite, Invitrogen), pBAD/TOPO 또는 pBAD/thio - 아라비노즈 발현 프로모터를 포함하는 TOPO 시리즈 벡터 (TOPO vector series of vectors containing an arabinose-inducible promoter, Invitrogen, Carlsbad, CA), 후자는 발현 된 단백질의 구조적 제약을 위한 융합 단백질을 생산하도록 설계되었다; pFLEX 발현 벡터 시리즈 (Pfizer nc., CT, USA); pQE 발현벡터 시리즈(QIAGEN, CA, USA), 또는 pL 발현 벡터 시리즈 (Invitrogen)등이 있다.
- [0134] *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* 및 *S. pombe*을 포함하는 균으로부터 선택된 효모세포 등에서 발현하기 적합한 전형적인 프로모터는 예를들어 ADH1 프로모터, GAL1 프로모터, GAL4 프로모터, CUP1 프로모터, PH05 프로모터, *nmt* 프로모터, RPR1 프로모터 또는 TEFJ 프로모터를 포함하나 이에 한정하지 않는다.
- [0135] 효모 세포에서의 발현을위한 발현 벡터는 pACT 벡터 (Clontech), pDBleu-X 벡터, pPIC 벡터 세트 (pPIC vector suite, Invitrogen), pGAPZ 벡터 세트 (pGAPZ vector suite, Invitrogen), pHYB 벡터 (Invitrogen), pYD 1 벡터 (Invitrogen), 및 pNMT 1 , pNMT41, pNMT81 TOPO 벡터 (Invitrogen), pPC86-Y 벡터, (Invitrogen), pRH 벡터 시리즈 (Invitrogen), pYESTrp 벡터 시리즈 (Invitrogen)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 많은 다른 발현 구조체와 그들의 사용을 위한 방법들이 당업자에게 알려져 있는데, 예를 들어 Giga-Hama 과 Kumagai (Foreign Gene Expression in Fission Yeast: Schizosaccharomyces pombe, Springer Verlag, ISBN 3540632700, 1997) 및 Guthrie and Fink (Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology Academic Press, ISBN

0121822540, 2002)등이 있다.

- [0136] 발현구조체 또는 발현 벡터는 당업계에 알려진 표준 방법을 이용하여 미생물에 도입된다. 예를 들어, Sambrook et al., 이 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에서 논의 한 것과 같이 다가 양이온을 처리 하는 것은 실질적인 세포 장벽을 가지고 있는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 형질전환을 위한 또 다른 방법은 Chung 과 Miller가 논의 했듯이(Nucleic Acids Res., 16: 3580, 1988) 폴리에틸렌 글리콜(polyethylen glycol)/DMSO를 이용하는 것이다. 다른 방법은 전기천공법(electroporation), 양이온성 지질, 바이러스 전달(viral delivery) 및 교배(mating) 전략을 포함하는 방법을 균류를 위해 사용한다.
- [0137] 제조합 미생물의 제조 후, 상기 미생물은 가용성 단백질을 발현하는 미생물의 개체군을 생성하기에 충분한 조건 하에서 배양 하였다. 따라서, 본 발명의 방법은 제조합 세포의 제조 또는/및 가용성 단백질의 발현을 모두 망라한다.
- [0138] 가용성 단백질의 생산에 사용하는 미생물은 일반적으로 기술된 바와 같이 프로모터가 유도 될 수 있는 적합한 배지에서 배양되는데, 즉, 상기문헌 *Sambook et al.*, 및 상기문헌 *Ausubel et al.*, 이 상업적으로 이용가능하다. 탄소, 질소 및 무기 인산염 공급원 이외의 임의의 다른 필요한 어떠한 보 보충은 복합 질소원과 같은 단독으로 또는 다른 보충 성분은, 단독 또는 질소원 복합체 등의 또 다른 성분 또는 배지와 혼합물로서 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배지의 pH는 5내지 9의 어떠한 pH일 수 있으며, 주로 숙주 유기체에 따라 결정된다. 가용성 단백질의 축적을 위해서, 미생물은 가용성 단백질의 축적에 충분한 조건 하에서 배양된다. 이러한 조건은 즉, 온도, 영양분, 및 세포 밀도 조건이 미생물로 하여금 단백질을 발현하고 축적하도록 하는 조건이다. 또한, 이러한 조건은 당업자에게 공지 된 바와 같이, 미생물이 단백질의 전사, 번역, 및 한 세포 구획에서 다른 구획으로 단백질의 통과와 같은 기본적인 세포 기능을 수행 할 수 있는 조건 하이다.
- [0139] 발현이 유도되는 경우, 즉, 유도성 프로모터를 사용하는 경우, 전형적으로 세포는 확실한 시각적 밀도에 도달할 때까지 배양 되어야 하고, 그때 가용성 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 발현을 유도하기 위하여 유도(induction)가 시작된다(예. 유도인자의(inducer) 첨가, 억제인자(repressor, suppressor)의 제거, 또는 배지 조성의 제거).
- [0140] **단백질(Proteins)**
- [0141] 본 발명은 미생물에 용해 남아있는 어떠한 단백질, 즉, 박테리아 내에 봉입체(inclusion body)를 형성하지 않는 단백질을 추출하는 단계를 포함한다.
- [0142] 한 예에서, 가용성 단백질은 단백질이 미생물군에서 추출 될 때 수용성을 유지하도록 허용하는 단백질 pI를 갖는다.
- [0143] 한 예에서, 상기 가용성 단백질은 7.5 이상, 8.5 이상, 9 이상, 9.5 이상, 10 이상, 10.5 이상, 11 이상, 11.5 이상, 12 이상, 12.5 이상 또는 13의 pI를 갖는다.
- [0144] 한 예에서, 상기 가용성 단백질은 6.5 이하, 6 이하, 5.5 이하, 5 이하, 4.5 이하, 4 이하, 3.5 이하, 3 이하, 2.5 이하, 또는 2의 pI를 갖는다. 예를 들어, 상기 단백질은 3 내지 6, 예를들어 4 내지 5, 예를들어 4.6의 pI를 갖는다.
- [0145] 한 예에서, 상기 가용성 단백질은 7, 예를 들어 6 내지 7의 pI를 갖는다.
- [0146] 단백질의 적절한 pI를 추정하여 결정하는 방법은 당업자에게 명백하다. 예를 들어, 단백질의 이론적인 pI는 [Bjellqvist et al., *Electrophoresis*, 14: 1023-1031, 1993]에 기술된 방법을 사용하여 추정할 수 있다. Bjellqvist et al.에 의해 기술된 알고리즘은 Swiss Institute of Bioinformatics사의 ExPasy Proteomics Server에서 사용 가능한 Compute pI 툴에 의해 시행된다
- [0147] 대안 적으로, 단백질의 pI는 등전점전기영동(isoelectric focusing; IEF)을 사용하여 결정된다. IEF는 양성전해 질 용액을 immobilized pH gradient (IPG) 겔에 추가하는 것에 연관되어 있다. IPG는 pH 구배와 함께 공동중합된 아크릴아미드 겔 매트릭스이다. 전류는 겔을 통과하여 지나서 "양성" 양극과 "음성" 음극 말단을 생성한다. 음으로 충전된 단백질은 중앙의 pH 구배를 통과하여 양성으로 충전된 단백질이 "음성" 말단으로 이동하는 동안 "양성" 말단으로 이동한다. 단백질은 해당 단백질의 pH 등전점에 도달할때 까지 pH 구배를 통과하여 그의 전하와 반대 방향으로 이동한다. 이대, 단백질은 더이상 순전하(net electric charge; 관련된 작용기의 양

성자화 또는 탈양성자화에 기인하는) 가 없고, 겔 내에서 더이상 진행되지 않는다.

- [0148] 한 예에서, 상기 단백질은 인간의 치료 목적으로 사용된다. 예시적인 단백질은 인터루킨-11(Interleukin; pI 11.85), 인터페론(alfacon 1; pI 9), 인터페론베타(interferon beta; pI 8.9), 인터페론 감마, 조직플라스미노겐활성인자(tissue plasminogen activator; tPA), 유로키나아제(urokinase), 옥트레오티드(octreotide; pI 8.29) 또는 케라틴세포성장인자(keratinocyte growth factor; pI 10.42)를 포함한다.
- [0149] 한 예에서, 상기 단백질은 인터페론, 예를 들어 인터페론 베타이다.
- [0150] 한 예에서, 상기 단백질은 인터루킨, 예를 들어 IL-2와 같은 림포카인(lymphokine)이다.
- [0151] 한 예에서, 상기 단백질은 항체의 가변 도메인을 포함한다. 예시적인 가변 도메인을 포함하는 단백질은, 예를 들어, 도메인 항체 (예를 들어, US6248516), Fab 단편(Fab fragment), Fab' 단편(Fab' fragment), F(ab) 단편(F(ab) fragment), scFv(예를 들어, US5260203에 기술된 바와 같이), 2가 항체 절편(diabody), 3가 항체 절편(triabody), 4가 항체 절편(tetrabody) 또는 고차 착물 (예를 들어, W098/044,001 및/또는 W094/007921에 기술된 바와 같이)을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 항체의 Fab 단편이다. 예를 들어, 상기 단백질은 abciximab, ranibizumab 또는 certolizumab(이는 certolizumab pegol을 제조하기 위해 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)에 융합할 수 있다)이다.
- [0152] 한 예에서, 상기 단백질은 경 단백질(scleroprotein)이다. 예를 들어, 상기 단백질은 콜라겐(예를 들어, I형 콜라겐, II형 콜라겐, III형 콜라겐, IV형 콜라겐, V형 콜라겐, VI형 콜라겐, VII형 콜라겐, VIII형 콜라겐, IX형 콜라겐, X형 콜라겐, XI형 콜라겐 또는 XII형 콜라겐), 테나신(tenascin; 예를 들어, 테나신 C 또는 테나신 X), 라미닌(laminin; 예를 들어, 라미닌 알파, 라미닌 베타 또는 라미닌 감마), 피브릴린(fibrillin), ALCAM, 비트로넥틴(vitronectin), 데코린(decorin), 매트릭스 GLA 단백질(matrix gla protein), 엘라스틴(elastin), 트로포엘라스틴(tropoelastin) 또는 테코린(tectorin)이다.
- [0153] 한 예에서 단백질은 꼬인 코일 구조를 갖는 것을 포함한다. 예를 들어, 상기 단백질은 피브리노겐, 비-가교된 케라틴(표피), 미오신, 트로포 미오신(tropomyosin) 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택된다..
- [0154] 또 다른 예에서, 단백질은 샤페로닌(chaperonin) 또는 heat shock 단백질이다. 한 예에서, 상기 단백질은 I형 샤페로닌 또는 II형 샤페로닌이다. 예시적으로, 샤페로닌은 예를 들어 Hill et al., Genome Res. 14:1669-1675, 2004에 보고되었다. 한 예에서, 상기 단백질은 US7618935에 개시된 것과 같이 샤페로닌이다.
- [0155] 또 다른 예에서, 가용성 단백질은 나트륨 이노 펩티드(natriuretic peptide) 또는 이의 활성 단편이다.
- [0156] 이어지는 예에서, 상기 가용성 단백질은 백신으로 사용되는 것과 같은 단백질의 면역성 단편이다.
- [0157] 한 예에서, 상기 단백질은 융합 단백질이다.
- [0158] 예를 들어, 이와같은 융합 단백질은 예를 들어 대량 생산을 촉진하기 위하여, 펩티드 또는 폴리펩티드의 다수의 복사본을 포함 할 수 있다.
- [0159] 또 다른 예에서, 상기 융합 단백질은 태그(tag), 예를 들어, 정제 또는 검출을 촉진하는, 예를 들어 hexa-his 태그를 포함한다.
- [0160] 이어지는 예에서, 상기 융합 단백질은 하나의 서로 융합된 두 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 상기 융합 단백질은 항체, 예를 들어 IgG의 Fc 부위에 융합된 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들어, 상기 융합 단백질은 항체의 Fc부위와 융합된 하나 이상의 (예, 둘) 트롬보포이에틴(thrombopoietin) 수용체 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 상기 융합 단백질은 로미플로스티움(romiplostim)이다.
- [0161] 본 명세서에서 단백질의 돌연변이체를 포함하는 단백질에 대한 참조는, 예를 들어 하나 이상의 보존된 아미노산 단백질에 치환, 하나이상의 결실 및/또는 하나이상의 삽입을 포함한다. 한 예에서, 상기 단백질은 20 미만의 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입을 포함한다.
- [0162] **단백질 변형(Protein Modifications)**
- [0163] 본 발명의 방법에 의해 추출되거나 회수된 단백질은 변형, 예를 들어 다른 화합물에 결합될 수 있다.
- [0164] 예를 들어, 상기 다른 화합물은 방사성 동위 원소, 검출 가능한 표지자(detectable label), 치료 화합물, 콜로이드(colloid), 독소, 핵산, 펩티드, 단백질로 및 그 혼합물 안에서 단백질의 반감기를 증가시키는 화합물로 이

루어진 군으로부터 선택된다.

[0165] 예시적인 화합물을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

그룹	상세설명
방사성동위원소(직접 또는 간접적)	^{123}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{133}I , ^{135}I , ^{47}Sc , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{97}Ru , ^{100}Pd , $^{101\text{m}}\text{Rh}$, $^{101\text{m}}\text{Rh}$, ^{199}Sb , ^{128}Ba , ^{197}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{153}Sm , ^{169}Eu , $^{212\text{Pb}}$, ^{109}Pd , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{64}Cu , ^{105}Rh , ^{198}Au , ^{199}Au 또는 ^{17}Lu
반감기 증가자(Half life extenders)	<ul style="list-style-type: none"> 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol) 글리세롤(Glycerol) 포도당(Glucose) 알부민(Albumin)
형광 프로브(Fluorescent probes)	<ul style="list-style-type: none"> 피코에리트린(Phycoerythrin; PE) 알로피코시아닌(Allophycocyanin; APC) 알렉사 플로어 488(Alexa Fluor 488) 싸이 5.5(Cy5.5)
생물학적 치료제(Biologics)	<ul style="list-style-type: none"> 레닐라 루시페라아제(Renilla luciferase)와 같은 형광 단백질, GFP 면역 조절제(Immune modulators) 독소(Toxins) 이뮤노글로불린(Immunoglobulin)
화학적 치료제(Chemotherapeutics)	<ul style="list-style-type: none"> 탁솔(Taxol) 5-FU 독소루비신(Doxorubicin) 이다루비신(Idarubicin)

[0167] 단백질 정제(Proten purification) 몇몇 예에서, 본 발명의 방법은 추가로 단백질을 정제하는 단계를 포함한다. 단백질을 정제하는 다양한 방법이 알려져있다.

[0168] 미생물로부터 제조된 단백질은 예를 들어 이온 교환 크로마토 그래피(ion exchange chromatography), 히드록시 아파타이트 크로마토 그래피(hydroxyapatite chromatography), 인회석 크로마토 그래피(fluoroapatite chromatography), 변위 크로마토 그래피(displacement chromatography), 겔 전기 영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피(ultrafiltration or affinity chromatography)를 사용하여 정제 할 수있다. 이러한 기술은 당 업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 Scopes(Protein purification: principles and practice, 3판, Springer Verlag, 1994)에 기술되어 있다. 에탄올 침전(ethanol precipitation), 역상 HPLC(Reverse Phase HPLC), 실리카(silica)상의 크로마토그래피, 헤파린(heparin)상의 크로마토 그래피, 크로마토 포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE 및 황산 암모늄 침전(sulfate precipitation)과 같은 단백질 정제를위한 다른 기술 또한 회수되는 단백질에 따라 가능하다.

[0169] 당업자는 또한 가용성 단백질이 정제 또는 검출이 용이를 위해서 예를 들어 폴리히스티딘태그(poly-histidine tag), 예를 들어 헥사히스티딘 태그(hexahistidine tag), 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(influenza virus hemagglutinin tag), 시미안 바이러스 5 태그(Simian Virus 5 tag), 플래그 태그(FLAG tag) 또는 글루타치온 S-전이효소(glutathion S-transferase; GST) 태그를 포함하도록 변형될 수 있음을 인식할것이다. 생성된 단백질은 이러한 친화 정제(affinity purification)와 같은 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 정제한다. 예를 들어, 헥사-히스 태그를 포함하는 단백질은 니켈-니트릴로크리아세트산(Ni-NTA)을 포함하는 샘플과 접촉하여 헥사-히스 태그가 고체 또는 반고체 지지체에 고정되어 특별히 결합하는 단계, 결합하지 않은 단백질을 세척하는 단계 및 결합된 단백질을 순차적으로 분리하는 단계를 거쳐 정제된다.

[0170] 제형(Formulation)

[0171] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 추출 및/또는 정제된 단백질은 조성물로 제제화 될 수있다. 예를 들어, 조성물은 예방, 치료 또는 의용화장품 용도로 비경구적 투여, 국소 투여(topical administration), 경구 투여, 근육내 투여, 안내 투여(intraocular administration), 피하 투여, 국소 투여(local administration), 에어로졸

투여, 피내 투여 또는 경피 투여(transdermal administration)용 할 수 있다.

- [0172] 통상적으로, 치료적으로 유효한 양의 단백질이 환자에게 투여 용 조성물로 제제화 될 것이다. 어구 "치료적 유효량"은 치료 또는 다른 치료적 효과를 촉진, 유도, 및/또는 증진하기에 충분한 양을 의미한다. 알 수 있는 바와 같이, 이러한 조성물에서 단백질의 농도는 광범위하게 변할 수 있고, 유체 부피, 점도, 체중 및 선택된 특정 투여 방식과 환자의 요구에 따른 추천에 기초하여 주로 선택된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 치료적 유효량은 예를 들어 1회 이상의 개별 투여 또는 연속적인 주입(continuous infusion)일때 1 µg/kg 내지 150 mg/kg의 단백질이며, 예를 들어, 하나 이상의 개별 투여에 의해 또는 연속 주입에 의한 단백질이다. 전형적인 일일 투여량은 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위이다. 환자에게 투여되는 예시적인 단백질 투여량은 환자 무게의 0.1 내지 10mg/kg의 범위이다.
- [0173] 투여를위한 조성물은 약학 적으로 허용 가능한 담체(carrier), 바람직하게는 수성 담체(aqueous carrier) 중 용해 된 단백질의 용액을 일반적으로 포함 할 것이다. 수성 담체의 종류는, 예를 들면, 완충 식염수 등을 사용할 수 있다. 다른 예시적인 담체로는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 5 % 인간 혈청 알부민을 포함한다. 이러한 혼합 된 오일 및 에틸 올 레이트와 같은 비 수성 운송체(vehicle)에도 사용할 수 있다. 리포솜 또한 담체로서 이용 될 수 있다. 담체는 등장성 및 화학적 안정성을 향상시키는, 예를 들면, 완충액 및 보존제를 첨가제를 소량 포함 할 수 있다. 상기 조성물은 생리학적 조건의 근접이 요구되는 것 처럼 pH 조정 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은, 예를 들면, 아세트산 나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젯산 나트륨 등의 약학 적으로 허용 가능한 보조 물질을 포함 할 수 있다.
- [0174] 약학적 조성물을 제조하기위한 기술은 Remington 's Pharmaceutical Sciences(16th Ed. Mack Publishing Company, 1980)에 예시된 바와 같이, 당해 분야에 일반적으로 알려져 있다.
- [0175] 본 명세서에 기술된 어떠한 실험예중 하나의 방법에 의해 추출, 분리 또는 생산된 단백질은 또한 고체지지체 또는 반고체지지체에 부착 될 수 있다. 예시적인 반 고체 지지체는 일반적으로 효소 또는 산 염기 가수 분해 또는 용해에 의해 분해되는 폴리머(polymer)를 재료로 만들어진 매트릭스(matrices)이다.
- [0176] 인체에 삽입되면, 매트릭스는 효소와 체액에 의해 동작된다. 바람직한 서방성 매트릭스는 리포솜, 폴리락티드(락트산), 폴리글리콜라이드(글리콜 산의 중합체), 폴리락티드 글리콜라이드 중합체(락트산과 글리콜산의 공중합체) 폴리안하이드라이드, 폴리(오르토)에스테르, 다단백질(polyproteins), 히알루론산, 콜라겐, 콘드로이틴 황산, 카르복실산, 지방산, 인지질, 다당류, 핵산, 폴리아미노산(polyamino acid), 페닐알라닌, 티로신, 이소류신과 같은 아미노산, 폴리뉴클레오티드, 폴리비닐 프로피렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘이다.
- [0177] 예시적인 고체 지지체는 플라스틱, 밴드(bandage), 봉합사, 스텐트, 페이스 메이커, 인공 와우 또는 뼈 및/또는 척추 임플란트를 포함한다.
- [0178] 본원에 기재된 조성물, 반고체 지지체 및 고체 지지체는 추가 구성 요소를 포함 할 수 있다. 예를 들어, 추가 구성 요소는 치료 또는 미용 효과를 제공하거나, 추출 된 단백질의 치료 또는 미용 효과를 강화하거나, 예를 들면 복합체를 형성하는 등 추출된 단백질의 결합과 상호 작용하는 화합물(예, 단백질)이다.
- [0179] 본명세서에 기재된 조성물, 반 고체 지지체 및 고체 지지체는 약학적 용도, 수의학적 용도, 화장품용도, 의용화장품용도, 이식용도 또는 대상에 적용을 포함하는 다양한 용도에 적합하다. 반고체 및 고체 지지체는 조직의 팽창, 조직 결합의 보정 및 상처의 밀봉에 유용하다. 이와 유사하게, 조직 매트릭스 구성물은 조직의 팽창, 조직 결합의 보정 및 상처의 밀봉에 유용하다.
- [0180] 본 명세서에 기재된 조성물, 고체 지지체 또는 반 고체 지지체는 주입(injection), 이식(implantation), 살포(spraying), 닦기(wiping), 붓기(pouring), 붙이기(pasting), 접촉(contacting)에 의해 적용될 수 있다.
- [0181] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 방법으로 분리, 추출 또는 생산된 의료기기 포함한다. 상기 용어 "의료장치"는 의료기기로써의 조절요소인 어떠한 물질의 조성물을 아우른다. 따라서, 이 용어는 밴드 와 드레싱, 봉합사, 임플란트, 주사기, 스텐트, 바늘없는 주입기, 및 맥박 조정기등을 포함 할 수 있다.
- [0182] **키트(Kits)**
- [0183] 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에 사용하기위한 지시 사항과 함께 카르복실산 패키지를 포함하는 키트를 제공한다
- [0184] 한 예에서, 상기 키트는 가용성 단백질을 발현하는 미생물 집단의 생산에 이용되는 미생물을 추가로 포함한다.

[0185] 다른 예에서, 키트는 본원에 기재된 방법을 수행하여 단백질을 추출하기 위한 지시사항과, 추출될 가용성 단백질을 발현하는 미생물군을 생산하기 위한 미생물을 포함한다.

[0186] 다른 예에서, 키트들은 본 발명의 방법을 수행하여 추출된 단백질을 포함한다.

[0187] 다른 예에서, 키트는 본 발명에 제시된 고체 지지체 또는 반고체지지체, 또는 의료장치를 포함한다.

[0188] **실험예**

[0189] 하기의 예들은 다양한 카르복실산이 미생물군(*E. coli*)으로부터 가용성 단백질 (재조합 가용성 단백질)을 출하는데 유용하다는 것을 보여준다.

[0190] **<실험예 1> 서로 다른 재조합 단백질 추출 방법의 비교**

[0191] 카르복실 산, n- 프로판올(n-propanol) 또는 요소(urea)를 이용하여 pI 7.5, 분자량 약 72kDa의 재조합 단백질을 추출하는 능력을 시험하였다.

[0192] 시험에 사용한 추출용액:

[0193] 1. 100 mM(0.57%(V/V)) 아세트산(aceitic acid)(실온)

[0194] 2. 100 mM(0.57%(V/V)) 아세트산 (4℃)

[0195] 3. 2.2 M (10%(w/v)) 포름산(formic acid)

[0196] 4. 60% n-프로판올

[0197] 5. 15 mM NaOH; 및

[0198] 6. 요소 추출 용액

[0199] 표3에 각 용액을 처리한 세포의 중량을 나타내었다.

표 3

처리군(treatment)	세포중량
100 mM(0.57%(V/V)) 아세트산(실온)	1.14g
100 mM(0.57%(V/V)) 아세트산 (4℃)	1.22g
2.2 M (10%(w/v)) 포름산	1.32g
60% n-프로판올	1.23g
15 mM NaOH	1.26g
요소 추출 용액	1.32g

[0200] 세포 1g(습윤중량) 당 5 ml의 용액을 첨가하고, 1시간 동안 혼합하였다. 상기 용액은 원심분리를 하여 침전물을 제거하고 상층액을 회수하였다. 상기 세포에 15 mM의 NaOH가 처리되고 15분동안 배양한 후 pH를 8.0으로 적정하기 위해 100 μl의 1M borate(pH8.0)가 추가되어, 약 20mM의 붕산염(borate) 용액이 되었다.

[0201] 이어서, 10 μl의 n-프로판올 추출액은 hetovac을 사용하여 건조하고, 도데실 황산 리튬(litium dodecyl sulfate; LDS) 샘플 버퍼(sample buffer) 13 μl에서 재혼합한뒤, 4-12%의 SDS-polyacrylamide 겔 전기영동 겔에 충전(loading)한다. 다른 샘플들은, 10ul의 상층액을 3ul의 LDS 샘플 버퍼와 섞어 겔에 충전한다. 이 결과들도 1에 나타내었다.

[0202] 상기 결과는 NaOH 또는 0.57%(V/V) 아세트산은 유의적 수준으로 재조합 단백질을 용해 시키지 못한 것을 보여준다. Formic acid 추출은 단백질을 n-프로판올 만큼 잘 용해한다. 요산 용해는 다량의 세포질 단백질을 추출하여 과하게 끌리는 결과를 도 1에서 볼수 있다. 상기 요산의 결과는 대량의 핵산이 용해된 결과로 나타난 작용일 수 있다.

[0203] **<실험예 2> 재조합단백질의 아세트산 추출**

[0204] <실험예 1>에서 보였듯이, 포름산은 *E. coli*에서 재조합 단백질 추출에 이용될 수 있다. 아세트산은 포름산과 유사하게 비교적 약한 카르복실산이다. 또한, 아세트산은 저렴하고, 보관, 공정, 처리가 용이하다. 따라서, <실험예 1>에서 아세트산을 *E. coli*에서 재조합단백질 추출에 시험하였다.

- [0206] 2%(V/V); ph 2.71, 5%(V/V); ph 2.47 및 10%(V/V); ph 2.22의 아세트산을 시험하였다.
- [0207] 세포들은 하기와 같이 용해되었다.
- [0208] 2% 아세트산: 1.12g(습윤중량)의 세포 페이스트(paste) + 5 ml의 2%(V/V) 아세트산
- [0209] 5% 아세트산: 1.01g(습윤중량)의 세포 페이스트(paste) + 5 ml의 5%(V/V) 아세트산
- [0210] 10% 아세트산: 1g(습윤중량)의 세포 페이스트(paste) + 5 ml의 10%(V/V) 아세트산
- [0211] 요산: 1.08g(습윤중량)의 세포 페이스트(paste) + 5 ml의 요산 버퍼.
- [0212] 샘플들은 혼합을 위해 볼텍스(vortex) 되고 세포 페이스트는 주격으로 교란 되었다. 그 뒤 샘플은 회전교반기에서 약1.5시간 동안 혼합되었다. 각 샘플로 부피 1 ml의 샘플을 취해서 14,000rpm에서 원심분리(Eppendorf™ bench top centrifuge) 하여 침전을 만들었다. 10ul의 상층액을 회수하여 SDS-PAGE 분석하였다. 이 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0213] SDS-PAGE결과는 아세트산용해가 대량의 다른 단백질이 세포에서 추출되지 않아, 단백질 추출에 상당히 좋은 방법임을 나타낸다. 이것은 요산 추출과 대비되는 결과이다.
- [0214] 아세트산 추출의 원심분리에 이어, 침전은 쉽게 분리되고, 상층액은 약한 노란색인데 반해, 요산추출은 원심분리 후, 상층액은 진한 노란색이며, 무르고 `끈적한` 침전을 보였다.
- [0215] HPLC 분석은 2% (V/V), 5% (V/V) 또는 10% (V/V)를 이용한 추출은 크로마토그램상 대조군단백질(다른 방법으로 생산된)과 같은 지점의 재조합 단백질을 녹이는 것을 나타낸다. 상기 결과는 재조합 단백질이 정확하게 형성되고, 산성추출에 의해 손상 받아 분해되지 않음을 나타낸다.
- [0216] 상기 두 HPLC와 SDS-PAGE 결과는 10% 아세트산 추출이 5% 추출보다 더 많은 단백질을 추출하고, 5% 추출은 2% 추출보다 더 많은 단백질을 추출하는 것을 보여준다. 더욱이, 아세트산 추출 단백질은 요산 추출에 비해 상당히 더 순수하다(HPLC 분석 결과, 10% 아세트산 추출 70.6% 순도 vs. 요산추출 48.6% 순도)
- [0217] **<실험예 3> 아세트산 추출 조건의 특징**
- [0218] 아세트산 농도, 배양시간 및 회석율(산 ml : g 습윤세포)의 효과를 결정하기 위해, 박스 벤켄 디자인(Box-Behnken design)이 계획 되었다. 고려되는 요소는:
- [0219] 아세트산 농도(% V/V): 최소 = 10%, 최대 = 25%
- [0220] 배양시간(h): 최소 = 1, 최대 = 5
- [0222] *회석율(산 ml/g 습윤세포): 최소 = 1, 최대 = 9
- [0223] 시험된 변수들을 표 4에 나타내었다.

표 4

실험디자인

[0224]

시행횟수	아세트산 농도 (% V/V)	시간(hr)	회석배율(x ml 산 : 1 g 세포)	실제 세포 중량 (g)	시제 산의 부피 (ml)
1	10	1	5	1.15	5.7
2	10	3	9	1.05	9.5
3	17.5	5	1	1.09	1.1
4	10	3	1	1.06	1.1
5	10	5	5	1.05	5.3
6	17.5	1	1	1.08	1.1
7	25	5	5	1.04	5.2
8	17.5	3	5	1	5
9	17.5	3	5	1.11	5.6
10	25	3	9	1.06	9.5
11	17.5	1	9	1.06	9.5
12	25	3	1	1.11	1.1
13	17.5	3	5	1.02	5.1

14	17.5	5	9	1.04	5.2
15	25	1	5	1.07	5.4

[0225] 모든 반응은 회전교반기 위에 위치하기 전에 볼텍스 하고, 유리파스퇴르 피펫으로 반응튜브에 부착한 모든 세포 무리를 혼합시켰다. 반응 1은 샘플 수집한 뒤 회전교반기에 되돌려서 이후 19시간 동안 혼합하였다.

[0226] 반응들은, 샘플링 용액이 완전히 확실하게 혼합되기 위해서 볼텍스 되었다. 각각의 시점(time point)에서 1ml의 용액을 회수하여 4℃, 14000rpm에서 원심분리하고(Eppendorf™), 약 500 ul의 상층액을 취하여 HPLC 분석을 위해 저장하였다. 이 결과를 표 5에 나타내었다.

표 5

[0227]

샘플	단백질 (µg)	순도 (%)	부피	농도 (mg/ml)	총부피 (ml)	총단백질 (mg)	세포양 (g)	단백질(mg)/세포양(g)	효소(g/L) (@130g cell/L)
Control	10	93.7	10						
1	1.9	41.3	10	0.2	6.9	1.3	1.15	1.1	0.15
2	1	40.4	10	0.1	10.6	1.1	1.05	1.1	0.14
3	5.7	37	10	0.6	2.2	1.2	1.09	1.1	0.15
4	4.8	25.8	10	0.5	2.2	1.1	1.06	1	0.13
5	1.6	36.3	10	0.2	6.4	1.1	1.05	1	0.13
6	5.4	36.6	10	0.5	2.2	1.2	1.08	1.1	0.14
7	8.8	75.5	10	0.9	6.2	5.5	1.04	5.2	0.68
8	3.9	57.5	10	0.4	6	2.3	1	2.3	0.3
9	3	49.2	10	0.3	6.7	2.0	1.11	1.8	0.23
10	8.2	77.8	10	0.8	10.6	8.7	1.06	8.2	1.07
11	2.5	66.4	10	0.2	10.6	2.6	1.06	2.5	0.32
12	4.2	28	10	0.4	2.2	0.9	1.11	0.8	0.11
13	2.9	45.6	10	0.3	6.1	1.7	1.02	1.7	0.22
14	3.5	52	10	0.3	6.2	2.1	1.04	2.1	0.27
15	5.8	58.9	10	0.6	6.5	3.8	1.07	3.5	0.46
1내지 20시간	2.2	43.2	10	0.2	6.9	1.6	1.15	1.3	0.18

[0228] 이 결과는 또한 <도 3>과 <도 4>에 묘사하였다. 이 결과는 아세트산은 다양한 시간에서 재조합 단백질을 추출할 수 있으며, 배양 시간이 순도나 회수율에 영향을 주지 않는다는 것을 보여준다. 또한 상기 결과는 시험된 조건에서 세포의 용해나 단백질의 추출이 쉽게 될 수 있음을, 세포의 용해 및 단백질의 추출이 1시간, 3시간, 5시간 또는 20시간 시험 결과가 유사하다는 것을 확인함으로써 알려준다. 이는 더 긴 배양 시간이 더 높은 세포 용해 수준을 초래할 것이라는 점을 예상했다면 반 직관적인 결과이다. 또한, 상기 결과는 아세트산 농도와 회석 비율이 수득율(농도:추정된 회귀계수 0.22; p<0.005; 비율: 추정된 회귀계수 0.16, p<0.05)과 순도(농도:추정된 회귀계수 12.05; p<0.005; 비율: 추정된 회귀계수 13.65, p<0.005)에 매우 강한 영향을 준다는 것을 나타낸다. 상기 두 순도와 수득율은 농도 및 용해비율의 증가와 함께 증가한다.

[0229] <실험예 4> 아세트산의 양의 단백질 회수와 순도에 대한 영향

[0230] 아세트산의 다양한 농도와 추출 시간이 E.coli로부터 추출된 재조합 단백질의 양과 순도에 미치는 영향을 결정하기 위해 분석이 시행되었다. 세포는 <실험예 1>의 분석과 동일한 단백질을 발현한다.

[0231] 각기 다른 농도의 아세트산(25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5, 100 %)을 이용한 추출은 20±4시간 overnight동안 추출 하여 완성되었다. 이후 상층액은 RP-HPLC 분석하였고, 표준자료와 peak area와 순도를 비교하여 추출된 재조합 단백질의 양과 순도를 결정하였다.

[0232] 도 5에 나타난 바와 같이, SDS-PAGE 분석은 아세트산 농도 증가에 따라 추출된 단백질의 수준도 증가하며, 또한 오염된 단백질의 수준 또한 증가하는 것을 의미한다.

[0233] 표 6에 RP-HPLC결과를 나타내었다. 이러한 결과는 아세트산 농도가 약 62.5% 보다 클때 순도가 감소하는 것

을 보여준다.

표 6

아세트산 (%)	순도 (%)	수득율 (g/L)
25% Control	93.54	1.54
25%	94.45	1.24
37.5%	90.56	1.47
50%	88.28	1.67
62.5%	88.57	1.93
75%	78.11	2.11
87.5%	77.67	2.19
100%	79.40	2.28

[0234]

[0235]

표 6에 나타난 결과는 또한 도 6에 그래프로 나타내었고, 이는 아세트산 농도와 재조합 단백질 수득율 사이의 상관관계와 아세트산 농도와 순도간에 한번 역치에 도달후 역상관계가 있음을 나타낸다.

[0236]

상기에 시험한바와 같이 다양한 아세트산 농도 조건에서, 다양한 시간동안 (5, 10, 20, 40 및 60분) 반응시킨 뒤, 100 ul의 샘플을 취하여 즉시 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 상기 상층액은 RP-HPLC 분석하여 표준자료와 비교하여 순도와 질을 결정하였다. 이 분석 결과는 표 7 및 8과 도7에 나타내었다. SDS-PAGE 분석은 직교 방법의 단백질 순도 비교를 제공하고자 수행되었고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

표 7

5, 10, 20, 40 및 60분간 배양하여 추출한 *E.coli* 재조합 단백질에 미치는 아세트산 농도의 영향

분	아세트산 농도						
	25%	37.50%	50%	62.50%	75%	87.50%	100%
	추출 단백질(g/L)						
5	0.68	0.82	1.52	1.80	2.27	2.11	2.25
10	0.75	1.11	1.79	1.95	2.28	2.48	2.47
20	0.86	1.14	1.51	1.94	1.97	2.05	2.22
40	0.85	1.21	1.63	1.84	1.84	2.13	2.19
60	0.86	1.18	1.74	1.86	2.12	2.29	2.39

[0237]

표 8

5, 10, 20, 40 및 60분간 배양하여 추출한 E.coli 재조합 단백질의 순도에 미치는 아세트산 농도의 영향

분	아세트산 농도						
	25%	37.50%	50%	62.50%	75%	87.50%	100%
	단백질 순도(%)						
5	84.6	85.0	87.0	86.8	79.2	76.6	78.5
10	83.8	85.3	86.5	85.7	76.1	75.3	77.3
20	84.9	87.3	88.1	85.9	77.8	76.7	78.0
40	86.1	87.0	88.3	86.1	77.0	75.9	78.6
60	84.8	86.7	88.2	87.2	76.4	75.6	76.2

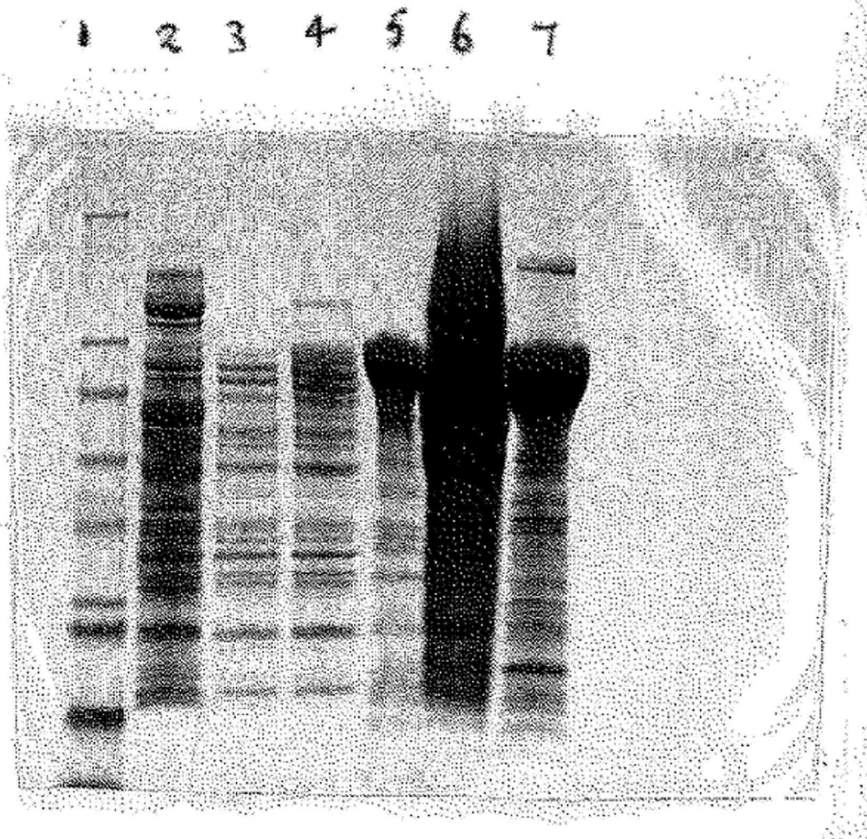
[0238]

[0239] <실험예 5> 아세트산을 이용한 융합 단백질의 추출

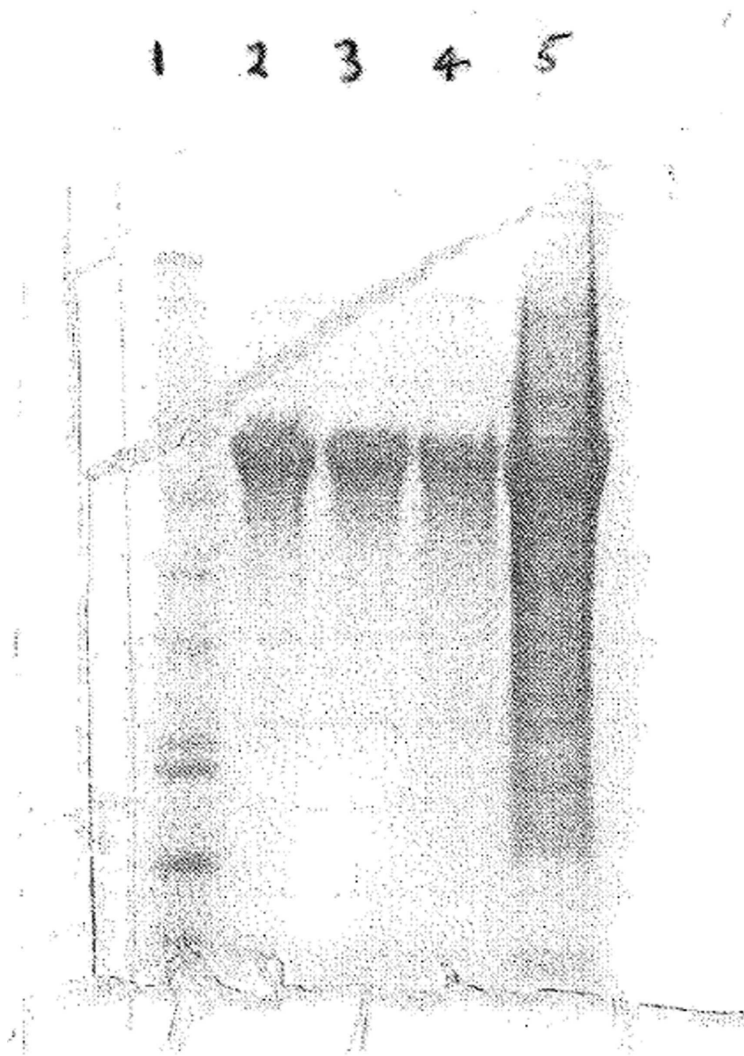
[0240] pI 약 4.6인 세 개의 복사본 펩타이드로 구성된 융합 단백질을 발현하는 박테리아 세포가 자라고, 수확되고, 열려졌다. 이어, 세포는 용해되거나, 25%(V/V)아세트산과의 1시간 동안 접촉에 의해 융합 단백질이 추출되고, 원심분리한 후 상층액을 회수하였다. SDS-PAGE 분석 결과를 도 9에 나타내었다. 이상의 결과는 아세트산을 이용한 추출이 숙주 세포 단백질의 오염을 상당히 감소하는 것을 보여준다. 또한, 상기 결과는 상기에 기술한 추출 방법이 융합 단백질 및 산성 pI를 가진 단백질의 추출에 적합하다는 것을 보여준다.

도면

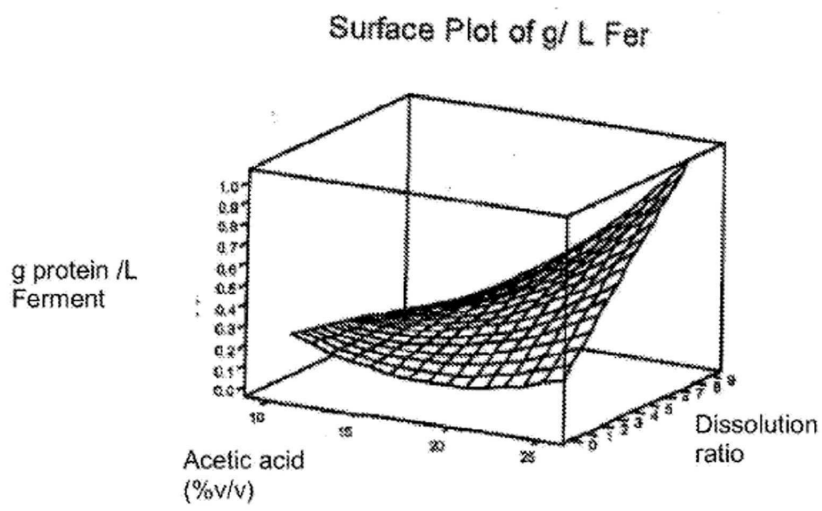
도면1



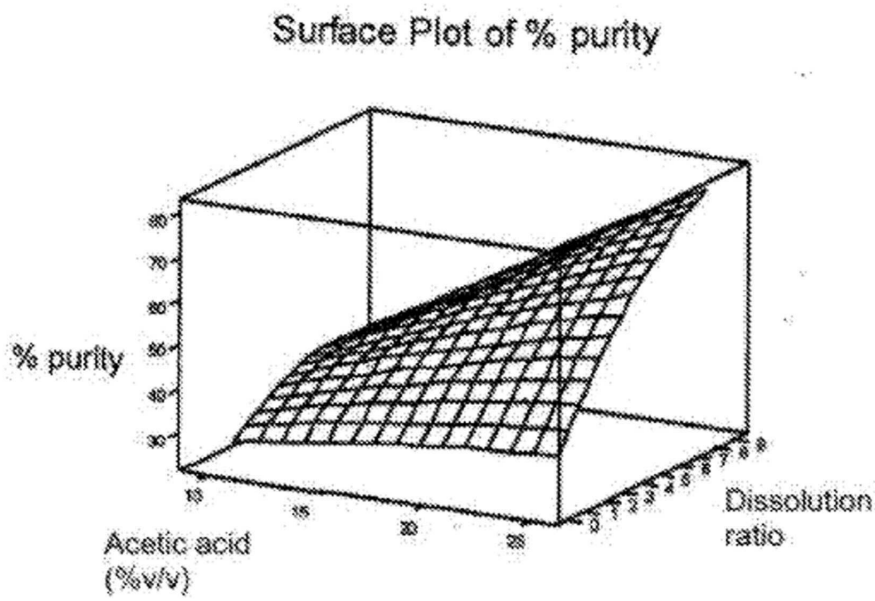
도면2



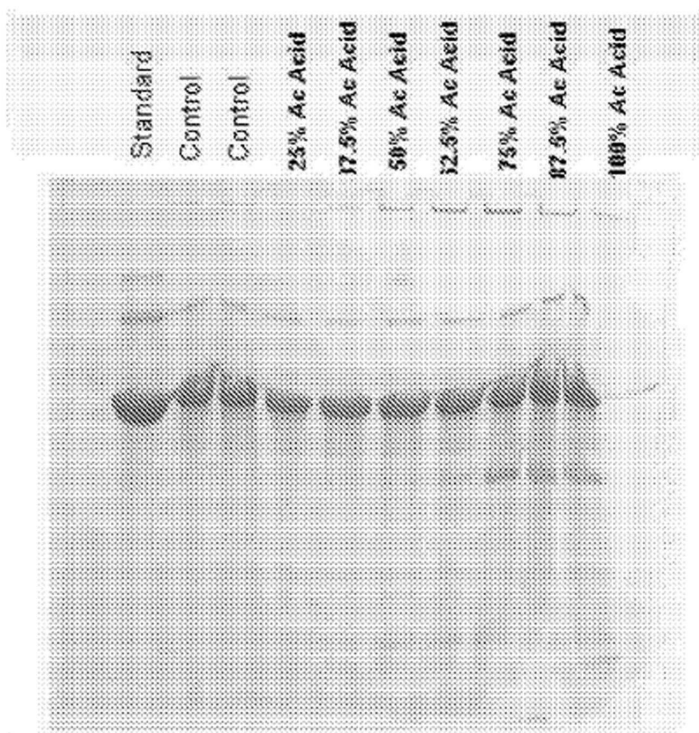
도면3



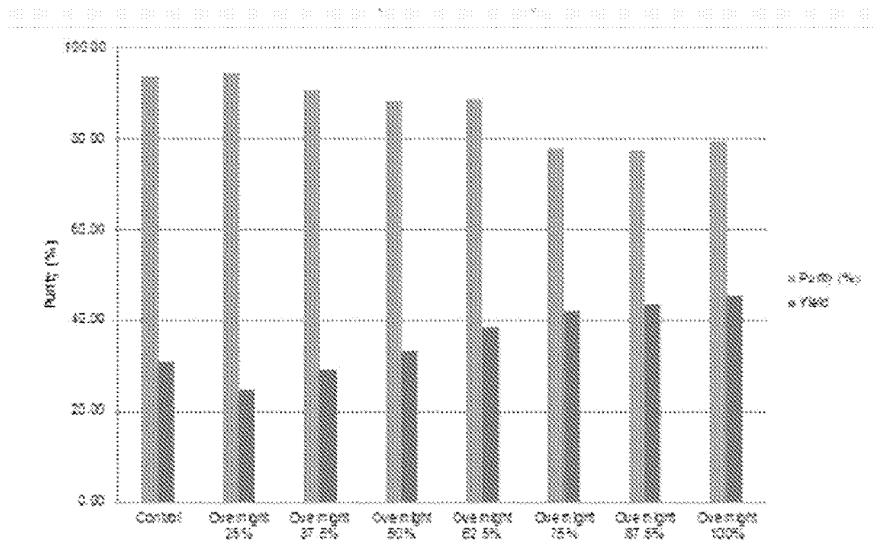
도면4



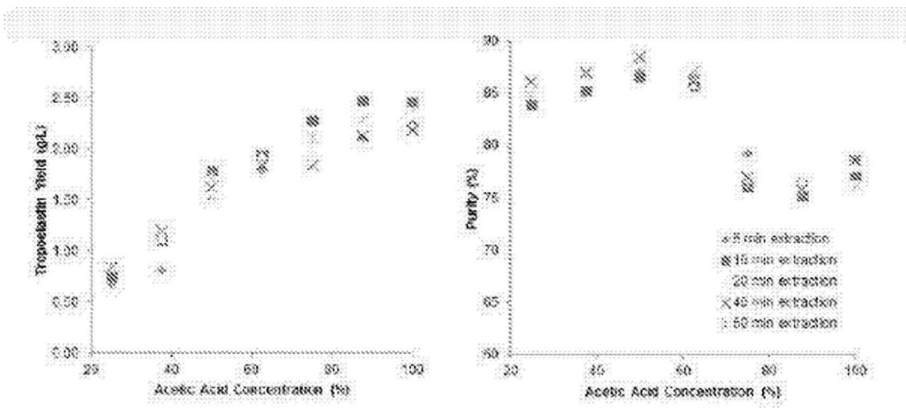
도면5



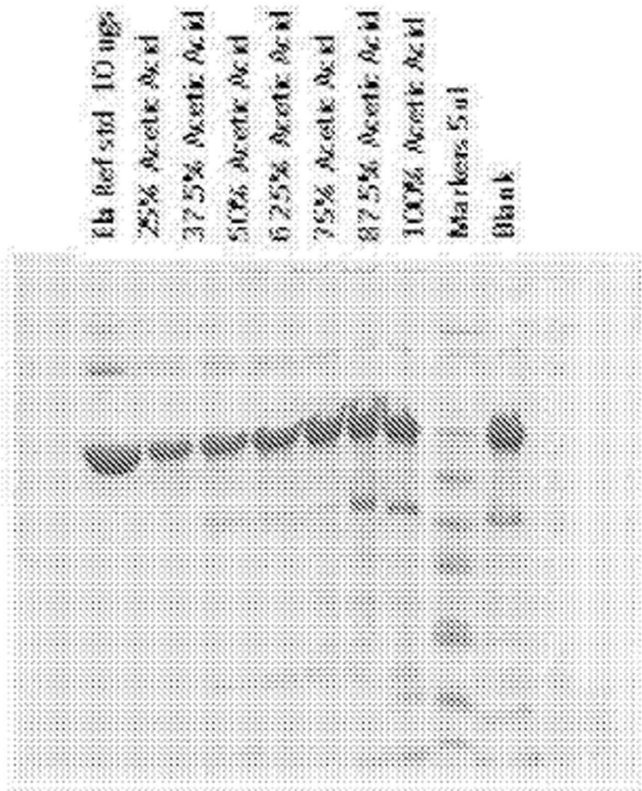
도면6



도면7



도면8



도면9

