(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 12 월 20 일 (20.12.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/173390 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 15/33 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C07K 14/025* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004667

(22) 국제출원일: 2012 년 6 월 13 일 (13.06.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0057748 2011 년 6 월 15 일 (15.06.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **중앙대학교 산학협력단 (CHUNG-ANG UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 동작구 흑석로 84 중앙대학교, 156-756 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김홍진 (KIM, Hong Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 동작구 흑석로 84 중앙대학교, 156-756 Seoul (KR). **김형진 (KIM, Hyoung Jin)** [KR/KR]; 서울특별시 동작구 흑석로 84 중앙대학교, 156-756 Seoul (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 서울특별시 관악구 인헌동 1659-2 청동빌딩 301 호, 151-832 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

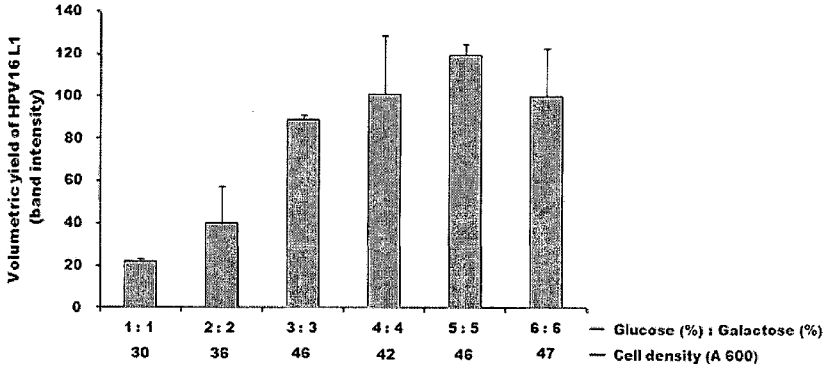
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR ENHANCING THE PRODUCTION YIELD OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS L1 PROTEIN

(54) 발명의 명칭 : 인유두종바이러스 L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법

Fig. 3b



(57) **Abstract**: The present invention relates to a method for enhancing the production yield of human papillomavirus (HPV) L1 protein, comprising a step of culturing cells expressing HPV L1 protein in a medium containing a high concentration of a total carbon source. According to the culturing method using a medium containing a high concentration of a carbon source, the production yield of HPV L1 protein can be remarkably enhanced, and furthermore, the immunogenicity of the produced L1 protein can be greatly increased.

(57) **요약서**: 본 발명은 총 탄소원을 고농도로 함유하는 배지에서 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포를 배양하는 단계를 포함하는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 고농도 탄소원 함유 배지를 이용한 배양 방법에 의하면, 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 놀라울 정도로 현저하게 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 생산된 L1 단백질의 면역원성도 크게 증대되어 있다.

WO 2012/173390 A2

【명세서】

【발명의 명칭】

인유두종바이러스 L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법

【기술 분야】

본 발명은 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 총 탄소원을 고농도로 함유하는 배지에서 HPV L1 단백질 발현 세포를 배양하는 단계를 포함하는 HPV L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

【배경 기술】

자궁경부암은 인유두종바이러스(Human Papillomavirus, HPV)의 감염에 의해 발병된다[1]. 자궁경부암은 매년 500,000 명의 여성에서 발병되며 250,000 명이 사망에 이른다[2]. 다수의 여성이 일생에서 일정의 시기에 무증상의 HPV 에 감염되는 것으로 생각된다[3, 4]. HPV 16 (HPV type 16)은 자궁경부암의 50% 이상의 발병원인이 되고 있으며, 두경부암의 90%의 원인이 되고 있어서, 가장 중요한 타입의 바이러스이다[5]. L1 단백질은 캡시드 구조의 80-90%를 차지하고 있으며, 천연 타입의 HPV 비리온을 닮은 바이러스 유사입자(virus like particle, VLP)로 자기 조립 가능한 특성을 갖는다[6]. 따라서, HPV VLP 으로 면역화시키면 보호성 중화항체를 효과적으로 유도할 수 있다고 여겨지고 있다[7]. 현재 2 종의 VLP-기반 예방 백신이 개발되어 있는 데, 하나는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) 발현시스템을 이용하여 생산되는 가다실(Gardasil™, Merck)이고, 다른 하나는 곤충세포 발현 시스템에서 생산되는 서바릭스(Cervarix™, GlaxoSmithKline)이다[8]. 이들 백신 모두 HPV 16 및 HPV 18 VLP 를 포함하고, 3-용량 프로토콜에 따라 투여되어, 약 70%의 자궁경부암을 예방하는 효과가 있다[9]. 가다실(Gardasil™)의 소비자 가격은 1 회 투여량당 약 120 달러이고, 총 투여량에 대해서는 360 달러이며, 서바릭스(Cervarix™)의 가격도 이와 비슷하다[10]. 이렇게 이들의 가격이 비싸기 때문에 널리 사용되지 못하고 있으며 자궁경부암의 발생 빈도가 높은 개발도상국에서 이들 백신에 대한 접근이 용이하지 않은

이유가 되어 왔다[11]. 따라서, HPV 백신 분야에서, 백신의 생산 수율을 향상시키기 위한 전략이 중요한 요구사항으로 대두되고 있다.

생물 의약의 제조과정에서 경제성을 확보하기 위해서는 업스트림(upstream) 단계인 생물 반응기의 생산성 향상이 최종 산물의 수율을 증가시켜야만 한다[12]. 그러나, 이러한 원칙이 중요하게 부각되지 않고 있으며, 재조합 HPV L1 단백질 생산의 경우 배양 조건을 최적화함으로써 생산 수율을 향상시키고자 하는 연구는 아직 많이 이루어지고 있지 않다. 또한, HPV L1 단백질을 정제하는 프로토콜은 장시간이 소요되고, 노동력을 필요로 하며, 고비용이 요구되어 다양한 배양 조건하에서 L1 단백질의 생산성을 비교하는 연구를 행하기가 어렵다. 최근 본 발명자들은 대량정제에 적합하고 다양한 시료에 대해 적용 가능한 방법으로서, 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*)내에서 생산된 HPV L1 단백질을 정제할 수 있는 1 단계(one step)의 크로마토그래피 방법을 개발하였다[13].

사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*)의 GAL10 프로모터는 재조합 단백질 생산에 가장 강력하고 자주 사용되는 프로모터이다[14, 15]. 글루코오스와 갈락토오스가 존재하는 경우 사카로마이세스 세레비지애는 글루코오스를 선호적으로 사용하고, GAL 유전자는 글루코오스 시스템이 억제되었을 때, 갈락토오스에 의해 유도된다[16]. 따라서, GAL10 프로모터 시스템하에서의 재조합 단백질의 생산에서 가장 중요한 요소는 탄소원의 조성이다[17-19]. 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서의 L1 단백질의 생산은 일반적으로 2-4%의 글루코오스 또는 갈락토오스를 포함하는 배지를 사용하여 48-72 시간 동안 배양하여 행해진다[20-22]. 그러나, 현재까지 배지내의 탄소원의 농도나 조성을 변화시켜 HPV L1 단백질의 발현 수율을 향상시킨 결과는 거의 보고되어 있지 않다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그

전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 발현하는 세포를 배양하는 공정에서 HPV L1 단백질의 생산 수율을 증가시킬 수 있는 방법을 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 총 탄소원의 농도를 통상의 배양 수준 보다 높은 고농도로 첨가한 배지에서 HPV L1 단백질 발현 세포를 배양하면 HPV 의 L1 단백질의 생산 수율이 놀라울 정도로 크게 향상될 뿐만 아니라, 생산된 L1 단백질의 면역원성도 크게 증가한다는 사실을 확인하였다. 이러한 사실은 고농도의 탄소원을 함유하는 배지에서의 세포 배양이 L1 단백질의 발현 및 생산 효율을 증가시킬 뿐만 아니라 L1 단백질의 면역학적 활성을 크게 증대시킬 수 있다는 것을 보여준다.

따라서, 본 발명의 목적은 총 탄소원을 고농도로 포함하는 배지에서 HPV L1 단백질 발현 세포를 배양하는 단계를 포함하는 HPV L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법을 제공하는 것에 있다.

본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 설명된다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 총 탄소원의 농도가 6 - 14%인 배지에서 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포를 배양하는 단계를 포함하는 HPV L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법을 제공한다: (a) 총 탄소원의 농도가 6 - 14%인 배지를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 준비된 배지에 HPV L1 단백질 발현 세포를 접종하여 배양하는 단계.

본 명세서에서 용어 "탄소원(carbon source)" 은 HPV L1 단백질의 발현 세포 배양시 세포에 의해 흡수되어 이 세포의 생체를 구성하는 물질의 탄소원이나 생체 에너지원으로 이용되는 탄소화합물을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 탄소원은 글루코오스, 갈락토오스, 수크로오스, 말토오스, 프럭토오스, 락토오스, 자일로스, 피루브산염, 시트르산염, 석신산염, 시스-아코니테이트, 알파-케토글루타르산염, 푸마르산염, 말산염 및 옥살아세트산염를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 본 발명에서 상기 탄소원은 글루코오스, 갈락토오스, 수크로오스, 말토오스, 프럭토오스, 락토오스, 또는 자일로스이며, 보다 바람직하게는 글루코오스 또는 갈락토오스이다.

본 명세서에서 용어 "총 탄소원(total carbon source)"은 배지에 포함되는 탄소원을 모두 합한 탄소원을 의미한다. 예컨대, 본 발명의 배지에 탄소원으로서 글루코오스와 갈락토오스를 포함되어 있는 경우 글루코오스와 갈락토오스를 합한 탄소원을 의미한다. 본 발명에서는 총 탄소원의 농도가 6 - 14 중량%인 배지를 사용한다. 본 명세서에서 배지 중의 탄소원의 농도를 나타내는 단위 "%" 는 배지 부피에 대한 탄소원 또는 총탄소원의 중량%(W/V)를 의미한다.

본 발명에서 사용되는 총 탄소원의 농도 6 - 14%는 통상적인 재조합 단백질 발현 숙주세포의 배양시 사용되는 총 탄소원의 농도보다 매우 높은 수준이다. 본 발명은 고농도의 총 탄소원을 함유하는 배지에서 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 발현시키면, L1 단백질의 생산 수율이 크게 증가할 뿐만 아니라 생산된 L1 단백질의 면역원성과 같은 생물학적 활성도 크게 향상된다는 것을 발견한 것에 기초한다.

바람직하게는 본 발명에서 배지에 포함된 총 탄소원의 농도는 6% 초과 14 % 이하이며, 보다 바람직하게는 6 - 13%, 또는 6 - 12%이다. 보다 더 바람직하게는 7 - 14%, 7 - 13%, 또는 7 - 12%이며, 보다 더욱 바람직하게는 8 - 14%, 8 - 13%, 또는 8 - 12%이다.

본 발명에서 총 탄소원이 글루코오스와 갈락토오스로 이루어지는 경우, 총 탄소원 중의 글루코오스 및 갈락토오스의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 글루코오스(%):갈락토오스(%) = 5:5 - 9:1 의 범위이고, 보다 바람직하게는 4:4 - 7:1 의 범위이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b) 이후에, 배지에 탄소원을 첨가하여 추가 배양하는 단계 (c)를 더 포함한다.

본 발명에서 상기 단계 (c)에서 더 첨가하는 탄소원은 글루코오스 또는 갈락토오스이며, 바람직하게는 갈락토오스이다.

본 발명에서 "인유두종바이러스(HPV) L1 단백질" 은 인유두종바이러스의 캡시드를 구성하는 주요 단백질 L1 단백질을 의미하며, 숙주 세포에서 재조합 단백질 형태로 발현되는 경우 스스로 바이러스유사입자(virus like particle, VLP)를 형성하는 자기조립 특성을 갖는다. 따라서, 본 명세서에서 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질은 인유두종바이러스(HPV)의 바이러스유사입자(VLP)와 동일한 의미로 사용된다.

본 발명에서 L1 단백질이 유래되는 인유두종바이러스(HPV)의 타입(type)은 특별히 한정되지 않으며, HPV 타입 6a, HPV 타입 6b, HPV 타입 11, HPV 타입 16, HPV 타입 18, HPV 타입 31, HPV 타입 33, HPV 타입 35, HPV 타입 39, HPV 타입 45, HPV 타입 51, HPV 타입 52, HPV 타입 56, HPV 타입 58 및 HPV 타입 68 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

바람직하게는 본 발명의 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질은 HPV 타입 16, HPV 타입 18 또는 HPV 타입 58 의 L1 단백질이다.

인유두종바이러스(HPV) L1 단백질은 바람직하게는 공지된 야생형의 L1 단백질을 발현에 사용된다.

본 발명에서 "인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포"는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 발현하는 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포를 의미한다. 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 발현하는 발현 벡터는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 적합한 발현 벡터안으로 클로닝함으로써 제조할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 제조될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있고, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포내에서의 효율적인 발현을 위해,

전사(transcription) 또는 번역(translation)의 조절서열과 작동적으로 연결될 수 있으며, 이러한 조절서열로서는 예컨대 프로모터(promoter) 또는 종결서열(termination sequence)로서 이들에 작동적으로 연결된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 프로모터 서열로는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) *GAL1* 프로모터를 사용할 수 있으며, 효모의 다른 프로모터 예를 들어 *GAL1*, *GAL10*, *ADH1*, *TDH3* 또는 *PGK* 프로모터 또는 다른 진핵세포 프로모터도 사용할 수 있다. 전사 종결서열로는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) *ADH1* 종결서열을 사용할 수 있으며, 다른 진핵세포 종결서열도 사용할 수 있다.

본 발명에서 숙주세포는 포유동물세포, 곤충세포, 효모세포, 곤충세포, 또는 박테리아가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 동물세포 또는 효모세포이며, 가장 바람직하게는 효모세포를 이용한다. 효모세포는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 발현 효율 및 생물반응기에서의 대용량 생산에도 매우 적합한 숙주 세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 숙주세포인 효모로는 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 시조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*)속, 한세눌라(*Hansenula*) 속, 피키아(*Pichia*) 속, 칸디다(*Candida*) 속, 토루롭시스(Torulopsis) 속, 로도토룰라(Rhodotorula)속, 파피아(*Paffia*)속, 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)속, 탈라로미세스(*Talaromyces*)속, 브레타노미세스(*Brettanomyces spp.*)속, 파키솔렌(*Pachysolen*)속, 데바리오미세스(*Debaryomyces*)속 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

보다 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 클루이베로미세스 프래길리스(*Kluyveromyces fragilis*), 클루이베로미세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 또는 스조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)이며, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisea*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)이다.

본 발명에서 형질전환은 숙주 세포가 효모 세포와 같이 진핵 세포인 경우에, 미세 주입법(Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘

포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입하여 행한다. 한편, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, 형질전환은 $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.

본 발명에서 사용될 수 있는 배지는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포를 배양하는데 적합한 배지로서, 숙주 세포에 따라 적합한 배지를 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명에서 배지는 숙주세포가 효모인 경우 효모 세포가 성장할 수 있는 통상의 배지라면 사용할 수 있으며, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 효모추출물, 펩톤 및 글루코오스/덱스트로스가 포함된 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) 배지 또는 이를 변형한 배지를 사용할 수 있으며, 상기 YPD 배지에 탄소원으로서 글루코오스 이외에 갈락토오스가 추가로 포함된 YPDG 배지를 사용할 수도 있다.

세포의 배양은 통상적으로 진탕배양 또는 회전기에 의한 회전에 의한 것과 같은 호기성 조건하에서 행한다. 배양 온도는 바람직하게는 15 내지 40℃에서 행하고, 배양 시간은 배양 조건 및 필요에 따라 조절할 수 있으며 통상적으로 5 시간 내지 7 일간 행한다. 배지의 pH 는 배양액 중에서 바람직하게는 3.0 - 9.0 의 범위를 유지한다. 배지의 pH 는 무기 또는 유기산, 알칼리 용액, 우레아, 칼슘 카보네이트, 암모니아 등으로 조절할 수 있다. 배양 중에는 필요한 경우 암피실린 및 테트라사이클린과 같은 항생제를 첨가할 수 있다.

본 발명에서 배양된 세포로부터 발현된 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질을 분리하는 방법은 당업계에서 통상적으로 이용되는 단백질의 분리 및 정제 방법을 사용하여 행할 수 있다. 예컨대, 암모늄 설페이트 또는 PEG

등을 이용한 용해도에 따른 분리(solubility fractionation), 분자량에 따른 한외여과 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리, 투석에 의한 분리 등, 다양한 방법이 이용될 수 있고, 통상적으로는 상기한 방법의 조합을 이용하여 분리 및 정제한다. 배양된 세포로부터 발현된 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 분리는 바람직하게는 공지된 문헌, H.J. Kim et al., Protein Expr. Purif. 70 (2010) 68-74 에 기술된 방법에 따라 행할 수 있다.

본 발명의 방법은 다양한 재조합 단백질 생산용 세포 배양 방식에 적용될 수 있으며, 예를 들어 회분식 배양(batch culture), 연속배양(continuous culture), 유가식배양 (fed-batch culture) 방법에 적용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

【유리한 효과】

본 발명은 총 탄소원을 고농도로 함유하는 배지에서 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포를 배양하는 단계를 포함하는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 고농도 탄소원 함유 배지를 이용한 배양 방법에 의하면, 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율이 놀라울 정도로 현저하게 향상시킬 수 있을 뿐 아니라 최종적으로 회수되는 L1 단백질 VLP 의 면역원성을 향상시킬 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 는 HPV 16 L1 단백질의 정제 과정을 보여준다.

도 1b 는 실험에 사용된 탄소원 조성을 나타낸다. 탄소원의 농도에 따른 HPV 16 L1 단백질의 발현양과 정제하여 최종 회수된 L1 단백질의 양을 비교하였다. 검은색 박스의 탄소원 조성이 L1 단백질을 정제하여 최종 회수된 양을 확인한 조성이다.

도 2a 는 탄소원의 조성에 따른 HPV 16 L1 단백질 발현 세포의 성장을 측정한 결과이다.

도 2b 는 탄소원의 조성에 따른 세포당 HPV 16 L1 단백질의 발현량을 측정한 결과이다. 세포당 L1 단백질의 양을 웨스턴 블로팅으로 나타내었다. 튜불린(tubulin)을 내부 대조군으로 사용하였으며, 웨스턴 블로팅 분석은 실시예 실험방법에 기술된 바와 같이 행하였다.

도 3a 은 탄소원의 조성에 따른 HPV 16 L1 단백질의 용적 수율(volumetric yield)을 측정한 결과이다. L1 단백질의 용적 수율을 측정하기 위해 L1 단백질 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 50 ㎖ YPDG 배지에서 배양하였다. 각 탄소원 조성의 배양액에서 세포를 배양하면서 48, 96, 144 시간에 각각 1 ㎖씩 배양액을 취한 후, 0.2 ㎖ 세포 용해 버퍼(break buffer)[20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1.7 mM EDTA pH 7.2 + 0.01 % Tween 80]를 사용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄액은 DW 에 1:50 로 희석한 후 10㎕ 씩 젤에 로딩하여 전기영동을 행한 후 L1 단백질 밴드를 웨스턴 블로팅 분석법으로 검출하였다.

도 3b 는 총 탄소원의 각 조건에서 144 시간 배양한 정지기(stationary phase) 세포의 HPV 16 L1 단백질의 용적 수율을 나타낸 그래프이다. L1 단백질의 용적 수율은 총 탄소원이 글루코오스(%):갈락토오스(%) = 6:6 인 조건에서의 HPV 16 L1 단백질 밴드의 강도를 100%로 하여 이에 대한 상대값으로 표현하였다. 이 실험 결과는 독립된 2 회의 실험을 통해 얻었으며 용적 수율은 평균±SD 로 나타내었다.

도 4a 는 각각 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%의 총 탄소원으로 조성된 배지 조건에서 HPV 16 L1 단백질의 용적 수율을 측정한 결과이다. 4%와 6% 사이의 총 탄소원 조성에 따른 L1 단백질의 발현량을 조사하기 위해 배지에 첨가되는 총 탄소원의 농도를 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%로 준비하였다. 각 총 탄소원 조성 내 글루코오스와 갈락토오스의 비율은 1:1 조건으로 설정하였다. 따라서 각 배지는 글루코오스(%):갈락토오스(%) = 2:2, 2.25:2.25, 2.5:2.5, 2.75:2.75, 3:3 의 조성으로 포함하고 있다. 각 조성의 배지에서 세포를 세포 밀도(cell density)가 600 nm 에서 측정한 OD 가 30 정도에 이를 때까지 배양한 후 회수하여, 0.2 ㎖의 세포 용해 버퍼(break buffer)[20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1.7 mM EDTA pH

7.2 + 0.01% Tween 80]를 사용하여 파쇄하였다. 파쇄액은 DW 에 1:50 으로 희석한 후 10 μL 씩 젤에 로딩하여 전기영동을 행한 후 L1 단백질 밴드는 웨스턴 블로팅 분석법으로 측정하였다.

도 4b 는 도 4a 의 웨스턴 블로팅의 HPV 16 L1 단백질의 강도를 그래프로 나타낸 결과이다. L1 단백질의 밴드 강도는 총 탄소원 6% 조건에서 배양한 L1 단백질 밴드 강도를 100%로 하여 이에 대한 상대값으로 표현하였다.

도 5a 는 탄소원 조성에 따른 HPV 16 L1 단백질의 순도를 측정한 결과이다. 정지기(A600 측정시 OD = 30 - 47)에 있는 세포를 회수하여 정제한 결이다. 정제한 L1 단백질을 SDS-PAGE 와 웨스턴 블로팅으로 확인하였다.

도 5b 는 150 ㎖ YPDG 배지에서 정지기(600 nm 에서 OD 값 30 - 47)까지 배양한 세포를 회수하여 정제한 HPV 16 L1 단백질의 양을 나타낸다. 이 결과는 독립된 2 회의 실험을 통해 얻었으며 L1 단백질의 양은 평균±SD 로 나타내었다.

도 6a 는 유가식 배양(fed batch culture)에서 갈락토오스 첨가(feeding)에 의한 HPV 16 L1 단백질의 발현량 증가를 측정한 결과이다. HPV 16 L1 단백질 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)는 7% 글루코오스와 1% 갈락토오스 함유의 배지 조건으로 144 시간 배양한 후, 144, 168, 192 시간에 각각 1.4% 함유량 조건으로 갈락토오스를 배지에 첨가하고, 216 시간 까지 추가 배양하였다. 배양 후 HPV 16 L1 단백질을 웨스턴 블로팅으로 검출하였다.

도 6b 는 도 6a 의 웨스턴 블로팅 결과의 HPV 16 L1 단백질의 밴드 검출 강도(intensity)를 도시한 그래프이다. HPV 16 L1 단백질의 밴드 강도는 216 시간 배양한 세포 내 L1 단백질의 밴드 강도를 100%로 하여 상대적인 밴드 강도로 수치화하여 나타내었다.

도 7 은 배지 내 총 탄소원을 글루코오스와 갈락토오스의 비율을 1:1 로 하여 조성하면서 총 탄소원 중량이 2%, 4%, 6%, 8%가 되도록 하여 배양한 후 정지기 (A600 측정시 OD = 18 - 38)의 세포를 회수하여 HPV 16 L1 단백질을 정제한 결과이다. 총 탄소원이 6% 이상으로 포함된 배지

조건에서 세포 배양시 회수되는 L1 단백질의 양이 크게 증가됨을 확인하였다.

도 8a 는 생쥐 면역화를 위해 주입되는 HPV 16 L1 단백질이 동일한 양임을 보증하기 위해, 총 탄소원 중량이 2%, 4%, 6%, 8%인 각 조건에서 배양하여 정제한 HPV 16 L1 단백질의 순도 및 농도를 측정한 결과를 보여준다. Bradford 단백질 정량법으로 정량한 각 L1 단백질을 12% 폴리아크릴아마이드젤의 각 웰(well)에 300, 150, 75 ng 의 양으로 로딩하여 전개하였으며, 은염색법(silver staining)으로 단백질을 시각화하였다. 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 포함 배양 조건으로부터 정제한 각 L1 단백질의 순도가 동일하였으며 정량된 단백질 농도도 정확하였다. 이로서, 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 포함 배양 조건으로부터 정제한 각 L1 단백질의 동일한 양이 생쥐 면역화에 사용되었음을 확인하였다.

도 8b 는 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 포함 배양 조건으로부터 정제한 각 HPV 16 L1 단백질을 생쥐에 10 ng 씩 3 회 면역시킨 후 측정한 항-HPV 16 L1 IgG 항체 역가와 항-HPV 16 중화항체 역가를 보여준다. 2%, 4% 총 탄소원 함유 배양 조건에서 얻어진 HPV 16 L1 단백질의 경우 항-HPV 16 L1 IgG 항체가에 있어 3200 이하의 수치를 나타낸 반면, 6%, 8% 총 탄소원 함유 배양 조건에서 얻어진 HPV 16 L1 단백질은 51200 과 512000 의 수치를 보여 4% 이하의 탄소원 조건 보다 16 배와 160 배 높은 항체 역가 수치를 타나내었다. 이러한 차이는 중화항체 역가에서도 비슷하게 나타났다. 이로서 6% 이상의 총 탄소원을 포함하는 배양 조건을 사용하는 경우 HPV 16 L1 단백질의 면역원성이 놀라울 정도로 크게 향상됨을 실험적으로 확인하였다.

도 9 는 총 탄소원 함량에 따른 HPV 18 L1 단백질의 발현양상을 비교 측정한 결과이다. 글루코오스와 갈락토오스의 비율을 1:1 로 하면서 배지 내 총 탄소원 중량이 각각 2%, 4%, 6%, 8% 및 10%가 되게 하여 세포를 정지기 때까지 배양하였다(A600 측정시 OD = 22 - 40). 배양된 세포 내에서 HPV 18 L1 단백질의 발현양은 웨스턴 블로팅을 통해 확인하였다. 2%, 4% 탄소원이 포함된 조건 보다 탄소원이 6% 이상 포함된 조건에서 HPV 18 L1 단백질의 발현이 크게 증가됨을 확인하였다.

도 10a 는 6% 이상의 탄소원 포함 조건이 L1 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블로팅을 통해 확인한 결과이다. 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6% 총 탄소원이 포함된 배양 조건에서 얻은 HPV 18 L1 단백질의 용적 수율을 측정하였다. 각 탄소원 조성에서 글루코오스와 갈락토오스의 비율을 1:1 조건으로 설정하였다. 각 조건의 세포들은 정지기까지 배양한 후 세포를 회수하고, 0.2 mℓ의 세포 용해 버퍼[20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 1.7 mM EDTA pH 7.2 + 0.01% Tween 80]를 사용하여 파쇄하였다. 파쇄액은 DW 에 1:50 으로 희석한 후 10μL 씩 젤에 로딩하여 전기영동을 행한 후 L1 단백질 밴드는 웨스턴 블로팅으로 분석하였다.

도 10b 는 도 10a 의 웨스턴 블로팅상의 L1 단백질 밴드의 상대 강도를 그래프로 나타낸 것이다. 6% 총 탄소원 포함 배양 조건의 L1 단백질 밴드의 강도를 100%로 하여 상대값으로 표현하였다. 배지 내 총 탄소원 함량이 4% 에서 6%로 증가함에 따라 L1 발현이 증가함을 확인하였다.

도 11a 는 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원이 포함된 배지 조건에서 HPV 18 L1 을 발현시켜 최종적으로 정제된 HPV 18 L1 단백질의 양을 비교한 결과이다. L1 단백질을 정제한 후 각 탄소원 배양 조건의 최종 산물은 Bradford 법으로 단백질양을 정량한 후 젤의 각 웰(well)에 500 ng 과 250 ng 의 양으로 로딩하여 확인하였다. 6%와 8%의 총 탄소원 조건으로 생산한 HPV 18 L1 단백질의 경우 55 kDa 위치에 L1 단백질 밴드가 선명하게 확인된 반면, 2%와 4% 탄소원 포함 조건에서는 HPV 18 L1 단백질 밴드가 거의 확인되지 않았다.

도 11b 는 도 11a 의 웨스턴 블로팅에서 500ng 으로 로딩한 L1 단백질 밴드의 상대 강도를 보여주는 그래프이다. 8% 총 탄소원 배양 조건의 L1 단백질 밴드의 강도를 100%로 하여 상대 값으로 표현하였다. HPV 18 L1 단백질을 높은 수율로 정제하기 위해서는 총 탄소원이 6% 이상 고농도로 포함되어야 함을 확인하였다.

도 11c 는 4%와 8% 총 탄소원을 포함한 배지에서 HPV 18 L1 단백질을 발현하여 정제한 결과를 보여준다. 4%와 8% 총 탄소원 조성을 위해 글루코오스(%):갈락토오스(%) = 2:2 와 7:1 로 하였다. 각 조건의 세포는 144 시간 동안 배양한 후 144 시간의 시점에 갈락토오스를

배지내에서 1.4%의 농도가 되도록 첨가하고, 168 시간의 시점까지 추가 배양하였다.

도 12a 는 배지 내 총 탄소원 함유량 증가에 따른 HPV 58 L1 단백질의 용적수율을 나타낸다. 세포는 정지기(A600 측정시 OD = 27 - 38)까지 배양하였다.

도 12b 는 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 포함 조건에서 배양 시 L1 단백질의 발현양을 L1 밴드 강도로 표현한 그래프이다. 각 배양 조건별 L1 밴드 강도는 8% 총 탄소원 조건의 L1 단백질 밴드 강도를 100%로 하여 상대값으로 표현하였다. 이 결과에 나타난 바와 같이 HPV 58 L1 단백질의 발현양은 배지 내 탄소원 함량이 6% 이상일 때 크게 증가됨을 확인하였다.

도 13a 는 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6% 탄소원으로 조성한 배지 조건에서 HPV 58 L1 단백질의 용적 수율을 측정한 결과이다. 각 탄소원 조건에서 글루코오스와 갈락토오스의 비율은 1:1로 하였다.

도 13b 는 도 13a 의 웨스턴 블로팅상의 HPV 58 L1 단백질 밴드의 상대 강도를 그래프로 나타낸 것이다. 각 배양 조건에서의 L1 단백질 밴드의 강도는 6% 탄소원 조건의 L1 단백질 밴드 강도를 100%로 하여 나타내었다.

도 14a 는 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 포함 배양 조건에서 정제하여 회수한 L1 단백질의 순도를 비교한 결과이다. HPV 58 L1 단백질 정제를 위해 세포를 정지기(A600 측정시 OD = 29 - 34)까지 배양하였다. 각 배양 조건에서 L1 단백질을 정제한 후 Bradford 단백질 정량법으로 정량하였으며, 젤상의 웰에 300ng 과 150ng 으로 로딩하여 SDS-PAGE 를 전개한 후 은 염색으로 확인하였다.

도 14b 는 총 탄소원 함량에 따른 HPV 58 L1 의 정제 수율을 나타낸다. 이 결과에서 볼 수 있듯이 HPV 58 L1 단백질은 6% 이상의 탄소원을 함유한 조건으로 배양 시 최종 정제 수율이 크게 향상됨을 확인하였다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로,

본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: HPV 16 L1 단백질의 생산

실험방법

1. 세포주 제작 및 세포 배양

HPV 16 L1 인코딩 폴리뉴클레오타이드 서열은 야생형 아미노산 서열을 유지하면서 mRNA 가 가급적 2 차 구조를 형성하지 않도록 디자인하였다[23]. 폴리뉴클레오타이드는 Blue Heron Biotechnology(Blue Heron Biotechnology, Inc., WA, USA)에 의뢰하여 합성하고, 플라스미드 YEGα-MCS 으로 라이게이션하였다. 이렇게 제조한 재조합 플라스미드 YEGα-MCS-HPV16L1 을 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae) Y2805 에 형질전환하였다. 형질전환체들을 우라실(uracil)이 없는 합성 완전 배지(complete medium)인 "SD-ura"에 도말하고 4 일 또는 5 일간 배양하였다. 단일 콜로니를 SD-ura 액체배지에 접종하여 2 일간 배양하였다. GAL10 프로모터로부터 HPV 16 L1 단백질을 발현시키기 위해, 배양한 형질전환 세포를 1% 효모 추출물(Duchefa, Netherlands), 2% 펩톤(Duchefa) 및 다양한 농도 및 비율의 글루코오스(Duchefa) 및 갈락토오스(Duchefa)를 포함하는 YPDG 배지에서 배양하였다. SD-ura 액체배지에서 배양한 세포는 600 nm 에서 측정한 광학밀도(optical density, OD)는 0.6 까지 도달하였다. 액체 배양물을 10 배씩 희석하여 50 또는 150 ml 의 YPDG 배지를 포함하는 플라스크에 접종하고 30℃, 230 rpm 의 진탕조건하에서 지정된 시간 동안 배양하였다. 세포의 밀도는 OD 600 nm 에서 측정하였다.

2. HPV 16 L1 단백질의 정제

HPV 16 L1 단백질은 이미 공지된 방법에 따라 정제하였다[13]. 도 1a 에 개시된 바와 같이, 세포들을 글라스 비드(BioSpec Products, OK, USA)로 파쇄한 후 세포 찌꺼기들을 제거하였다. HPV 16 L1 단백질을 40% 포화 암모늄설페이트내에서 침전시키고, 침전된 단백질들을 PBS(phosphate-

buffered saline) + 0.01% Tween 80 에 대해서 투석하였다. 단백질의 농도는 버퍼[10 mM 소디엄포스페이트 pH 7.2, 150 mM NaCl + 0.01% Tween 80]을 사용하여 5 mg/mℓ 으로 맞추고, 현탁액을 상온에서 12 시간 동안 유지하였다. 침전된 단백질 오염물을 제거하여 얻은 샘플을 양이온 교환크로마토그래피용 결합 버퍼[PBS + 0.37 M NaCl + 0.01% Tween 80, final NaCl conc. 0.5 M]에 대해 투석처리하였다. 4 mℓ의 P-11 포스포셀룰로오스 레진(P-11 resin, Whatman, UK)으로 팩킹된 컬럼을 결합 완충액으로 평형화시키고, 투석한 샘플을 컬럼상에 로딩하였다. 컬럼은 컬럼 부피의 6 배 용량의 결합 완충액으로 세척한 후에, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 및 1 M NaCl 을 포함하는 완충액으로 용출시켰다. 용출된 분획을 회수하여 Amicon Ultra-4 (Millipore, USA)을 사용하여 농축시켰다.

3. 단백질 농도 측정

단백질 농도는 우혈청알부민(BSA; Pierce, USA)를 표준물질로 하여 Bio-Rad Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 측정하였다.

4. SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅

SDS-PAGE 는 Laemmli 의 방법[24]에 따라 행하였고, 웨스턴 블로팅은 이미 공지된 방법[25]을 사용하여 행하였다. HPV 16 L1 단백질은 1 차 항체로서 토끼의 항-HPV 16 L1 혈청을 사용하였고, 2 차 항체로서 염소 HRP-컨쥬게이트된 항-토끼 IgG 폴리클로날 항체(Pab, Pierce, USA)를 사용하여 검출하였다[13]. 튜불린은 흰쥐(rat) 항-튜불린 폴리클로날 항체(Abcam, USA), 및 HRP 컨쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG 폴리클로날 항체(Pierce, USA)를 사용하여 검출하였다. 밴드의 강도는 NIH open source software Image J 으로 측정하여, 공지 방법에 따라 산출하였다.

5. 정제된 L1 단백질의 면역화 및 면역원성 평가

HPV 16 L1 의 면역원성 평가를 위해 6 주령 Balb/c 생쥐를 사용하였다(Orientbio. south Korea). 생쥐는 1 주일간 적응기를 거친 후 L1 단백질로 면역화시켰다. 생쥐는 피하주사를 통해 면역화시켰으며 2 주

간격으로 3 회 면역화시켰다. 1 회 면역화에 10 ng 의 L1 단백질 및 200㎍ 의 수산화 알루미늄(aluminium hydroxide)(Sigma, USA)을 투여하였다. 동일양의 정제한 HPV 16 L1 단백질을 생쥐에 면역화시키기 위해 공지된 단백질 정량법 및 SDS-PAGE 방법에 따라 L1 단백질의 순도 및 농도를 확인하였다. 3 차 면역 10 일후 생쥐 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 항-HPV16 L1 IgG 항체 역가와 항-HPV 16 중화활성을 측정하였다. 생쥐 혈액 내 항-HPV16 L1 IgG 항체 역가와 항-HPV16 중화활성은 이미 공지된 방법에 따라 ELISA(Enzyme-linked immnosorbent assay)와 pseudovirus-based neutralization assay 를 통해 측정하였다 [Kim H. J. et al., PLoS One. 2012;7(4):e35893. Epub 2012 April 26; The choice of resin-bound ligand affects the structure and immunogenicity of column-purified human papillomavirus type 16 virus-like particles].

6. 통계 분석

그룹간의 차이의 통계학적 유의성은 two tailed Student's t-test 를 사용하여 결정하였다. $P < 0.05$ 을 유의성있는 차이로 간주하였다.

실험결과

1. 탄소원 농도에 따른 세포의 성장률 및 세포당 HPV 16 L1 단백질의 발현양 비교

HPV 16 L1 단백질 발현 및 생산에 대해 미치는 총 탄소원 농도의 영향을 조사하기 위해, 탄소원의 농도에 따른 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae) 세포의 성장과, 세포당 HPV 16 L1 단백질의 발현양을 비교하였다. 탄소원으로서 글루코오스와 갈락토오스의 함유량을 글루코오스(%) : 갈락토오스(%) = 1:1 - 6:6 까지 변화시켜 배지를 조성한 후, L1 단백질을 발현시켜 정제하였다(도 1b 참조). 실험결과, 도 2a 에서 보여지는 바와 같이, 144 시간 배양시 최종 세포 밀도는 배지내에서 탄소원인 글루코오스 및 갈락토오스의 총합의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 각각의 탄소원 농도 조건에서 배양한 세포들은 0 - 120 시간 배양시 까지 대수기(exponential phase)의 성장을 보였으며,

120 시간 이후 배양시에는 세포의 성장률이 감소하여 정지기(stationary phase)의 양상을 나타냈다(도 2a 참조).

탄소원 농도에 따른 세포당 L1 단백질의 발현양을 조사하기 위해 동일한 양의 세포 용해 단백질을 로딩하여 L1 단백질의 양을 웨스턴 블로팅에 의해 비교하였다. 글루코오스:갈락토오스 비율이 1:1 과 2:2 조건의 경우 배양 96 시간 이후 L1 단백질의 발현양이 급격하게 감소하는 현상을 보인 반면, 3:3, 4:4, 5:5, 6:6 조건의 경우 대수기(144 시간)까지 그 발현양이 유지됨을 확인하였다(도 2b 참조). 이러한 결과는 총 탄소원이 배지내 6% 이상인 경우 세포당 L1 단백질의 발현양이 대수기까지 안정적으로 유지될 수 있다는 것을 의미한다.

2. 탄소원 농도에 따른 HPV 16 L1 단백질의 용적 수율 비교

탄소원 농도에 따른 배양액 내 HPV 16 L1 단백질 양을 비교하기 위해, 용적 수율(volumetric yeild)을 비교하였다. 용적수율은 일정부피의 세포 배양액 내 존재하는 L1 단백질 양을 나타낸다. 도 3a 에서 보여지는 바와 같이 글루코오스(%) : 갈락토오스(%)가 1:1 조건의 경우 L1 단백질의 용적 수율은 세포 밀도가 증가함에 따라 감소하였으며, 2:2 조건의 경우 세포 밀도가 증가함에 따라 L1 단백질의 용적 수율이 제한적으로 증가되었다. 그러나, 글루코오스(%) : 갈락토오스(%)가 3:3 이상인 조건에서는 세포 밀도가 증가함에 따라 HPV 16 L1 단백질의 용적 수율이 비례하여 증가함을 확인할 수 있었다(도 3a 및 도 3b 참조). 이러한 결과는 도 2b 의 결과에서 확인된 바와 같이, 총 탄소원이 6% 이상인 조건에서는 세포당 HPV 16 L1 단백질 발현양이 정지기 까지 안정적으로 유지되기 때문인 것으로 보여진다. 따라서, HPV 16 L1 단백질을 고효율로 발현시키기 위해서 배지 내 총 탄소원이 6% 이상이 요구된다는 것을 확인하였다.

상기 도 3a 및 도 3b 의 결과는 4% 총 탄소원 농도에 비해 6% 이상의 총 탄소원 농도가 HPV 16 L1 단백질 발현양을 현격하게 증대시켜 준다는 것을 보여주었다. 이어서, 4%와 6%의 총 탄소원 농도 사이에서 HPV 16 L1 단백질 발현양이 어떻게 달라지는지를 구체적으로 조사하기 위해, 배지 내 총 탄소원의 농도를 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%로 각각 조성하여

HPV 16 L1 단백질의 발현양을 측정하였다. 도 4a 및 도 4b 의 결과에서 확인되는 바와 같이 총 탄소원 농도가 4%와 6% 사이에서 탄소원의 농도가 증가함에 따라 HPV 16 L1 단백질의 발현양이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 6% 이상 또는 초과의 총 탄소원 농도 조성이 HPV 16 L1 단백질 발현을 급격하게 증가시킨다는 것을 더욱 명확히 보여준다.

3. 탄소원 농도에 따른 HPV 16 L1 단백질의 순도 및 회수량 비교

글루코오스(%) : 갈락토오스(%) = 1:1, 2:2, 4:4 로 각각 조성된 배지에서 정지기 까지 배양한 세포 내 HPV 16 L1 단백질을 정제하여 회수된 L1 단백질의 순도를 비교하였다. 도 5a 의 결과에서 보여지는 바와 같이 각 조건에서의 HPV 16 L1 단백질은 정제가 완료된 후 최소 92% 이상의 순도를 나타내었다. 또한, 150 ㎖ 배양액에서 배양된 세포 내 HPV 16 L1 단백질을 정제하여 그 양을 비교한 결과, 총 탄소원의 농도가 증가함에 따라 HPV 16 L1 단백질의 회수양도 비례하여 증가됨을 확인할 수 있었다(도 5b 참조). 이러한 결과는 배양액 내 총 탄소원의 농도가 HPV 16 L1 단백질의 최종 수율에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여주는 결과이다. 종합적으로 6% 초과의 총 탄소원 농도 조건에서는 L1 단백질의 발현 뿐만 아니라 최종 회수된 HPV 16 L1 단백질의 수율도 증가됨을 확인하였다.

4. 갈락토오스 첨가에 의한 HPV 16 L1 단백질의 발현양 증가

HPV 16 L1 단백질 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 글루코오스(%) : 갈락토오스(%) = 7:1 의 조건으로 144 시간 동안 배양한 후 144, 168, 192 시간에 갈락토오스를 배지에 첨가하였다. 갈락토오스는 배지에서 1.4% 농도가 되도록 첨가하였으며, 세포는 216 시간 까지 추가 배양하였다. 도 6a 및 도 6b 에서 보는 바와 같이 갈락토오스가 첨가된 후 HPV 16 L1 단백질의 발현량이 크게 증가됨을 확인하였다. 이는 6% 이상의 탄소원 조건의 배양 시 배양액에 탄소원을 추가해 줄 경우 L1 단백질의 발현양이 더욱 증가할 수 있음을 보여준다.

5. 갈락토오스 첨가에 의한 HPV 16 L1 단백질의 정제 수율 증가

HPV 16 L1 단백질 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)는 글루코오스(%) : 갈락토오스(%) = 7:1 의 조건으로 96 시간 동안 배양한 후, 갈락토오스를 배지내 1.4% 농도가 되도록 첨가하여 144 시간 까지 추가 배양하였다. 세포 내의 HPV 16 L1 단백질을 정제한 결과, 1.5 mg 의 HPV 16 L1 단백질을 회수하였다(하기 표 1 참조). 이는 글루코오스(%): 갈락토오스(%) = 7:1 조건으로 배양하되, 갈락토오스의 첨가 없이 배양한 조건의 L1 단백질의 양보다 2 배 정도 높은 양이다. 이러한 결과는 총 탄소원 농도 6% 이상의 배양 조건에서 배양한 후, 배지에 갈락토오스를 첨가하면 HPV 16 L1 단백질의 발현량 증가가 최종 정제 수율의 증가로 이어질 수 있음을 보여주는 것이다.

【표 1】

갈락토오스 첨가 시점 (hr)	세포회수 시점 (hr)	총탄소원 함량	세포밀도 (A600)	세포중량 (g)	총세포 용해물 단백질(mg)	정제된 HPV16 L1 단백질(mg)
96 hr	144 hr	8%(7:1)	51	9.5	290	1.5

6. 탄소원 농도에 따른 HPV 16 L1 단백질의 면역원성 비교

HPV 16 L1 단백질을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원이 함유된 배지에서 정지기까지 배양하였다. HPV 16 L1 단백질의 정제를 위해 150 ㎖ 배지의 각 배양 조건에서 세포를 배양하였다. 배양한 세포를 600 nm 에서 측정 시 단위면적당 세포 밀도가 18 - 38 의 수치를 나타내었다(도 7). 도 7 에는 2%, 4%, 6%, 8% 총 탄소원 함유 조건에서 생산된 HPV 16 L1 단백질을 정제하여 최종 회수한 L1 단백질의 양을 나타내었다. 상기 설명된 결과와 유사하게 6% 이상의 탄소원이 함유된 배지에서 배양 시 최종 정제되어 회수된 HPV 16 L1 단백질의 양이 크게 증가됨을 확인하였다. 이 결과는 고효율로 HPV 16 L1 을 정제하기 위해서 6% 이상의 탄소원이 요구된다는 것을 더욱 명확하게 보여준다.

각 배양 조건에서 정제 회수된 HPV 16 L1 단백질의 정량적 평가를 위해 동일 양의 단백질을 로딩하여 SDS-PAGE 상에서 확인하였다. 도 8a 결과에서 알 수 있는 바와 같이 2%, 4%, 6%, 8% 탄소원 함유 조건에서

얻어진 HPV 16 L1 단백질의 순도 및 양이 동일함을 확인하였다. 이로서, 2%, 4%, 6%, 8% 탄소원 포함 조건으로부터 얻은 HPV 16 L1 단백질을 동일한 양으로 생쥐에 주입하여 면역화하였음을 확인하였다.

도 8b 는 HPV 16 L1 단백질을 10 ng 씩 투여하여 3 회 면역화한 후 항-HPV 16 L1 IgG 역가와 항-HPV 16 중화항체 역가를 측정한 결과이다. 도 8b 의 결과에서 보여지는 바와 같이 2% 및 4% 탄소원 함유 조건에서 생산된 L1 단백질의 면역에 의해 항-HPV 16 L1 IgG 역가는 3200 이하를 나타낸 반면, 6% 및 8% 총 탄소원 함유 조건에서 생산된 L1 단백질 면역에 의한 항-HPV 16 L1 IgG 역가는 51200 과 512000 을 나타내었다. 또한, 2% 및 4% 총탄소원 함유 조건으로부터 얻은 L1 단백질로 면역된 생쥐 혈청은 HPV 16 에 대해 중화활성이 약하게 나타난 반면, 6% 및 8% 총탄소원 함유 조건에서 얻은 L1 단백질로 면역화시킨 생쥐 혈청은 60% 이상의 중화활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 6% 이상의 총탄소원 조건에서 얻어진 L1 단백질의 면역원성이 6% 이하의 탄소원 조건에서 얻어진 L1 단백질의 면역원성 보다 확연히 우수함을 확인하였다.

실시예 2 : HPV 18 L1 단백질의 생산

실험방법

사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)의 코돈(codon) 사용에 최적화된 HPV 18 L1 단백질의 DNA (MO) 서열을 Blue Heron Biotechnology (Blue Heron Biotechnology, Inc., USA)에 의뢰하여 합성하였다. HPV18 L1 발현을 위한 세포주 제작 및 발현은 기존 문헌에 공지된 방법에 따라 진행하였다 [H.J. Kim, S.J. Lee, H.-J. Kim, J. Biotechnol. 150 (2010) 31-36]. HPV 18 L1 단백질의 발현을 위한 세포배양과, HPV 18 L1 단백질의 정제, 농도 측정 및 SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅에 의한 단백질 확인은 상기 실시예 1 의 HPV 16 L1 단백질의 생산에서와 동일한 과정으로 행하였다.

실험결과

1. 탄소원의 농도에 따른 HPV 18 L1 단백질의 용적수율 비교

글루코오스:갈락토오스 = 1:1 로 하여 총 탄소원의 농도가 각각 2%, 4%, 6%, 8% 및 10%로 각각 조성한 배지에서 HPV 18 L1 단백질 발현

사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 144 시간 배양하여 정지기 까지 배양한 후, 세포 내에서 발현된 HPV 18 L1 단백질을 정제하여 회수된 L1 단백질의 양을 비교하였다. 도 9 에서 보여지는 바와 같이 HPV 18 L1 단백질의 생산량은 총 탄소원 농도가 6% 이상일 때 크게 증가하였다. 이러한 결과는 6% 이상의 탄소원이 포함된 배지에서 배양하는 경우 HPV 18 L1 단백질을 고효율로 발현시킬 수 있다는 것을 의미한다.

4% 및 6%의 총 탄소원 농도 사이에서 HPV 18 L1 단백질의 발현양이 어떻게 달라지는지를 구체적으로 조사하기 위해 배지 내 총 탄소원의 농도를 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%로 각각 조성하여 HPV 18 L1 단백질의 발현양을 측정하였다. 각 탄소원 조건에서 글루코오스 : 갈락토오스 = 1:1로 하였으며 세포는 정지기 까지 배양하였다.

도 10a 및 도 10b 의 결과에서 확인되는 바와 같이 4% 와 6% 사이의 총탄소원 농도에서 탄소원의 농도가 증가함에 따라 HPV 18 L1 단백질의 발현양이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 6% 이상(또는 초과)의 탄소원 조성이 HPV 18 L1 단백질 발현을 증가시킨다는 것을 더욱 명확히 보여주고 있다.

2. 탄소원 농도에 따른 HPV 18 L1 단백질의 정제수율 비교

도 11a 는 2%, 4%, 6%, 8% 농도로 총 탄소원을 함유한 배지에서 정지기 까지 세포를 배양한 후 HPV 18 L1 단백질을 정제하여 비교한 결과이다. HPV 18 L1 단백질 정제를 위해 세포를 150 ㎖ 배지 용량으로 각 탄소원 농도 조건에서 정지기까지 배양하였다. 최종 정제 산물의 HPV 18 L1 단백질의 확인을 위해 Bradford 단백질 정량법으로 단백질 농도를 정량한 후, 500 ng 과 250 ng 을 SDS-PAGE 젤에 로딩하여 확인하였다. 최종 정제 산물의 각 배양 조건별 정량된 단백질의 총량은 2% 총 탄소원인 경우 0.4 mg, 4% 총 탄소원인 경우 0.4 mg, 6% 총 탄소원인 경우 0.4 mg, 8% 총 탄소원인 경우 0.4 mg 으로 동일한 것으로 확인되었다. 그러나 55 kDa 의 HPV 18 L1 단백질 밴드는 6%와 8% 총 탄소원 조건에서만 선명하게 확인되었다.

총 탄소원 함유량의 각 조건에 따른 HPV 18 L1 의 밴드 강도는 도 11b 에 구체적으로 나타나 있다. 도 11b 는 웰당 500 ng 의 단백질을 로딩한

각 배양 조건별 L1 단백질의 밴드 강도를 나타낸 것으로서, 8% 탄소원 조건의 L1 밴드의 강도를 100%로 하여 상대값으로 나타내었다. 이 결과에 의하면 6% 이상의 총 탄소원을 함유한 배양조건으로부터 정제한 HPV 18 L1 단백질의 양이 2% 또는 4% 총 탄소원 함유 배양 조건으로부 얻은 HPV 18 L1 단백질의 양 보다 월등하게 많다는 것을 확인할 수 있다.

3. 갈락토오스 첨가에 의한 HPV 18 L1 단백질의 정제수율 증가

HPV 18 L1 단백질 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 글루코오스(%): 갈락토오스(%) = 2:2 및 7:1 의 비율로 함유한 배지에서 144 시간까지 배양한 후, 144 시간의 시점에 갈락토오스를 배지내에서 1.4%의 농도가 되도록 첨가하고, 168 시간의 시점까지 추가 배양하였다. 배양된 두 가지 배양조건의 세포에서 HPV 18 L1 단백질을 정제하여 정제된 L1 단백질의 양을 비교하였다. 그 결과 글루코오스(%): 갈락토오스(%) = 7:1 조건에서 생산된 HPV 18 L1 단백질만 정제가 되었으며, 글루코오스(%) : 갈락토오스(%) = 2 : 2 조건에서 생산된 HPV 18 L1 단백질은 정제가 거의 되지 않았다(도 11c 및 표 2 참조). 이러한 결과는 7:1 조건에서 생산된 HPV 18 L1 단백질이 정제하여 회수하기에 좋은 형태임을 의미한다. 결론적으로 총 탄소원이 6% 이상으로 첨가된 배양 조건에서 높은 L1 단백질의 발현양을 보였으며, 총 탄소원이 높은 글루코오스의 비율과 낮은 갈락토오스의 비율로 구성된 배지에서 정지기까지 배양한 세포내에서 L1 단백질의 정제 수율이 가장 높았음을 확인할 수 있었다.

【표 2】

갈락토오스 첨가 시점 (hr)	세포회수 시점 (hr)	총탄소원 함량	세포밀도 (A600)	세포중량 (g)	총세포 용해물 단백질(mg)	정제된 HPV16 L1 단백질(mg)
144 hr	168 hr	4%(2:2)	59	7.7	257	-
144 hr	168 hr	8%(7:2)	46	10.7	276	0.25

상기 표 2 는 갈락토오스 첨가에 의한 HPV 18 L1 단백질의 정제 결과를 보여준다. HPV18 L1 발현 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)는 글루코오스(%):갈락토오스(%) = 2 : 2 와 7 : 1 첨가된

150 ㎖의 배지에서 각각 배양하였다. 상기 두 가지 조건에서 배양한 세포를 144 시간 배양 후 갈락토오스를 1.4%가 되도록 첨가하여 168 시간까지 추가 배양하였다.

실시예 3 : HPV 58 L1 단백질의 생산

실험방법

1. 세포주 제작

사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)의 코돈(codon) 사용에 최적화된 HPV 58 L1 단백질의 DNA (MO) 서열을 Blue Heron Biotechnology (Blue Heron Biotechnology, Inc., USA)에 의뢰하여 합성하였다. HPV 58 L1 MO 유전자의 업스트림(upstream)과 다운스트림(downstream)에 Hind Ⅲ와 Sal I 자리가 각각 포함되도록 제작하였다. 합성된 HPV 58 L1 MO 는 YEGα-MCS 의 Hind Ⅲ와 Sal I 자리 사이에 삽입하였으며, HPV 58 L1 MO 를 삽입한 YEGα-MCS 는 YEGα-HPV58 L1 MO 로 명명하였다. 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae) Y2805 는 기존에 공지된 방법에 따라 리튬 아세테이트(lithium acetate)방법을 사용하여 형질전환하였다[H.J. Kim, S.J. Lee, H.-J. Kim, J. Biotechnol. 150 (2010) 31-36]. HPV 58 L1 단백질의 발현을 위한 세포배양과, HPV 18 L1 단백질의 정제, 농도측정 및 SDS-PAGE 및 웨스턴블로팅에 의한 단백질 확인은 상기 실시예 1 의 HPV 16 L1 단백질의 생산에서와 동일한 과정을 통해 행하였다.

실험결과

1. 탄소원 농도에 따른 HPV 58 L1 단백질의 발현양 비교

도 12a 는 2%, 4%, 6%, 8%의 총 탄소원으로 조성된 배지에서 HPV 58 L1 단백질을 발현하는 사카로마이세스 세레비지애(S. cerevisiae)를 정지기까지 배양한 후 발현된 L1 단백질의 용적 수율을 웨스턴 블로팅으로 비교한 결과이다. HPV 16 L1 과 HPV 18 L1 단백질 발현 양상과 유사하게 6% 이상의 탄소원을 함유한 배양배지 조건에서 현격하게 높은 L1 단백질의 발현을 확인할 수 있었다. 도 12b 는 도 12a 에서 나타난 HPV 58 L1 밴드의 강도를 그래프화한 것이다. HPV 58 L1 단백질 발현양의 상대 비교를 위해

8% 탄소원 조건의 HPV 58 L1 단백질의 밴드 강도를 100%로 하여 상대값을 구하였다.

4% - 6% 사이의 총 탄소원 함유 조건에서 HPV 58 L1 의 발현양 변화를 구체적으로 조사하기 위해 배지 내 탄소원 함량을 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%로 조성하였다. 각 탄소원 조건별 글루코오스와 갈락토오스의 비율은 1:1 로 하였다. 도 13a 는 배지내 탄소원 함량을 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%로 하였을 때 HPV 58 L1 단백질의 용적수율을 웨스턴 블로팅으로 분석한 결과이다. 도 13b 는 도 13a 의 HPV 58 L1 의 밴드 강도를 그래프화 한 것이다. 밴드 강도에 따른 차이 비교를 위해 6% 총 탄소원 함유 조건의 L1 단백질 밴드의 강도를 100%로 하였다(도 13b). 4 - 6% 총 탄소원 조건에서 HPV 58 L1 단백질의 용적 수율을 조사한 결과 탄소원 함량이 증가함에 따라 L1 단백질의 용적수율이 증가한다는 것을 확인하였다. 결론적으로, 6% 이상의 탄소원을 함유한 배지 조건에서 세포를 배양한 경우 HPV 58 L1 단백질의 발현양이 크게 증가됨을 보여준다.

2. 탄소원 농도에 따른 HPV 58 L1 단백질의 정제수율 비교

탄소원 농도에 따른 HPV 58 L1 단백질의 정제수율을 비교하기 위해, 2%, 4%, 6%, 8%의 총 탄소원을 함유한 배지에서 정지기 까지 세포를 배양한 후 HPV 58 L1 단백질을 정제하여 비교하였다. 각 배지 조건에서 글루코오스와 갈락토오스의 비율을 1:1 로 하였다. 세포를 150 ㎖의 배지에서 정지기(A 600 에서 OD 값 29 - 34) 까지 배양하여 HPV 58 L1 단백질을 정제한 후 단백질의 양을 SDS-PAGE 상에서 확인하였다(도 14a). 이를 위해 배양 세포로부터 HPV 58 L1 단백질을 정제한 후 Bradford 법으로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질 농도를 바탕으로 웰당 300 ng 과 150 ng 의 단백질을 로딩하였다. 그 결과 각 배양 조건으로부터 정제된 HPV 58 L1 단백질은 높은 순도를 나타내었으나, 2% 탄소원 조건에서 정제된 HPV 58 L1 단백질의 경우 매우 약한 밴드 강도를 나타내었다.

도 14b 는 최종 정제된 HPV 58 L1 단백질의 양을 그래프화 한 결과이다. 각 조건별 L1 단백질의 양은 단백질 정량 결과와 SDS-PAGE 결과를 통해 산출하였다. 도 14b 에서 나타난 바와 같이 최종 회수된 HPV

58 L1 단백질의 양은 배지 내 총 탄소원의 함량이 6% 이상일 때 크게 증가되었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조문헌

[1] C.B. Woodman, S.I. Collins, L.S. Young, The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 11-22.

[2] National Cancer Institutue, Women's Health Report, Fiscal Years 2005-2006, NCI Women's Health Report FY2005-2006 (2007).

[3] T. Nyari, I. Cseh, M. Woodward, J. Szollosi, M. Bak, J. Deak, Hum. Reprod. 16 (2001) 2235-312 2237.

[4] T.A. Nyari, L. Kalmar, J. Deak, J. Szollosi, I. Farkas, L. Kovacs, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 115 (2004) 99-100.

[5] M.J. Conway, C. Meyers, J. Dent. Res. 88 (2009) 307-317.

[6] B. Bishop, J. Dasgupta, M. Klein, R.L. Garcea, N.D. Christensen, R. Zhao, X.S. 14 Chen, J. Biol. Chem. 282 (2007) 31803-31811.

[7] I.H. Frazer, Gynecol. Oncol. 118 (2010) S8-11.

[8] V. Madrid-Marina, K. Torres-Poveda, G. Lopez-Toledo, A. Garcia-Carranca, Arch. Med. Res. 40 (2009) 471-477.

[9] M. Deschuyteneer, A. Elouahabi, D. Plainchamp, M. Plisnier, D. Soete, Y. Corazza, L. Lockman, S. Giannini, M. Deschamps, Hum. Vaccine 6 (2010) 407-419.

[10] National Cancer Institute, Human Papillomavirus (HPV) Vaccines,

[11] L. Schadlich, T. Senger, C.J. Kirschning, M. Muller, L. Gissmann, Vaccine 27 (2009) 1511-1522.

[12] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2010, Nat Biotechnol 28 (2010) 917-924.

[13] H.J. Kim, S.Y. Kim, S.J. Lim, J.Y. Kim, S.J. Lee, H.-J. Kim, Protein Expr. Purif. 70 (2010) 68-74.

[14] M. Rubio-Texeira, FEMS Yeast Res. 5 (2005) 1115-1128.

[15] M.D. Kim, K.C. Han, H.A. Kang, S.K. Rhee, J.H. Seo, J. Biotechnol. 101 (2003) 81-87.

[16] J. van den Brink, M. Akeroyd, R. van der Hoeven, J.T. Pronk, J.H. de Winde, P. Daran-Lapujade, Microbiology 155 (2009) 1340-1350.

[17] E.S. Choi, J.H. Sohn, S.K. Rhee, Appl. Microbiol. Biot. 42 (1994) 587-594.

[18] J. Whang, J. Ahn, C.S. Chun, Y.J. Son, H. Lee, E.S. Choi, Process Biochem. 44 (2009) 1190-1192.

[19] N. Hadiji-Abbes, I. Borchani-Chabchoub, H. Triki, R. Ellouz, A. Gargouri, R. Mokdad-Gargouri, Protein Expr. Purif. 66 (2009) 131-137.

[20] J.C. Cook, J.G. Joyce, H.A. George, L.D. Schultz, W.M. Hurni, K.U. Jansen, R.W. Hepler, C. Ip, R.S. Lowe, P.M. Keller, E.D. Lehman, Protein Expr. Purif. 17 (1999) 477-484.

[21] S.N. Kim, H.S. Jeong, S.N. Park, H.-J. Kim, J. Virol. Methods 139 (2007) 24-30.

[22] D.T. Buonamassa, C.E. Greer, S. Capo, T.S. Yen, C.L. Galeotti, G. Bensi, Virology 293 (2002) 335-344.

[23] H.J. Kim, S.J. Lee, H.-J. Kim, J. Biotechnol. 150 (2010) 31-36.

[24] U.K. Laemmli, Nature 227 (1970) 680-685.

[25] M.A. Park, H.J. Kim, H.-J. Kim, Protein Expr. Purif. 59 (2008) 175-181.

[26] S.Y. Kim, H.J. Kim, H.-J. Kim, Protein Expr. Purif. 76 (2011) 103-108.

[27] R.Z. Rizk, N.D. Christensen, K.M. Michael, M. Muller, P. Sehr, T. Waterboer, M. Pawlita, J. Gen. Virol. 89 (2008) 117-129.

[28] L. Shi, G. Sanyal, A. Ni, Z. Luo, S. Doshna, B. Wang, T.L. Graham, N. Wang, D.B. Volkin, J. Pharm. Sci. 94 (2005) 1538-1551.

[29] J.J. Carter, G.C. Wipf, S.F. Benki, N.D. Christensen, D.A. Galloway, J. Virol. 77 (2003) 11625-11632.

[30] B. Balasundaram, S. Harrison, D.G. Bracewell, Trends Biotechnol. 27 (2009) 477-485.

[31] C.B. Buck, C.D. Thompson, Y.Y. Pang, D.R. Lowy, J.T. Schiller, J. Virol. 79 (2005) 2839-2846.

[32] M.J. Conway, S. Alam, E.J. Ryndock, L. Cruz, N.D. Christensen, R.B. Roden, C. Meyers, J. Virol. 83 (2009) 10515-10526.

[33] S.Y. Li, R. Srivastava, S.L. Suib, Y. Li, R.S. Parnas, Bioresour. Technol. 102 (2011) 4241-397 4250.

[34] C.A. Cardona, O.J. Sanchez, Bioresour. Technol. 98 (2007) 2415-2457.

[35] C. Meyers, M.G. Frattini, J.B. Hudson, L.A. Laimins, Science 257 (1992) 971-973.

[36] M.A. Ozbun, C. Meyers, J. Virol. 71 (1997) 5161-5172.

[37] H.C. Selinka, T. Giroglou, T. Nowak, N.D. Christensen, M. Sapp, J. Virol. 77 (2003) 12961-12967.

[38] L. de Witte, Y. Zoughlami, B. Aengeneyndt, G. David, Y. van Kooyk, L. Gissmann, T.B. Geijtenbeek, Immunobiology 212 (2007) 679-691.

[39] D. Opalka, K. Matys, P. Bojczuk, T. Green, R. Gesser, A. Saah, R. Haupt, F. Dutko, M.T. Esser, Clin. Vaccine Immunol. 17 (2010) 818-827.

[40] C. Schellenbacher, R. Roden, R. Kirnbauer, J. Virol. 83 (2009) 10085-10095.

[41] J.Y. Park, H.M. Pyo, S.W. Yoon, S.Y. Baek, S.N. Parz, C.J. Kim, H. Poo, J. Microbiol. 40 (2002) 313-318.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질의 생산 수율을 향상시키는 방법:

(a) 총 탄소원의 농도가 6 - 14%인 배지를 준비하는 단계; 및

(b) 상기 준비된 배지에 인유두종바이러스(HPV) L1 단백질 발현 세포를 접종하여 배양하는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 HPV L1 단백질은 HPV 타입 16, HPV 타입 18 또는 HPV 타입 58 의 L1 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 배지의 총 탄소원의 농도가 7 - 14%인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 배지의 총 탄소원의 농도가 8 - 14%인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 배지의 총 탄소원은 글루코오스 및 갈락토오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 HPV L1 단백질 발현 세포는 HPV L1 단백질을 발현하는 벡터로 형질전환된 효모 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 효모 세포는 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b) 이후에, 배지에 탄소원을 더 첨가하여 추가 배양하는 단계 (c)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 배지에 더 첨가하는 탄소원은 갈락토오스인 것을 특징으로 하는 방법.

Fig. 1a

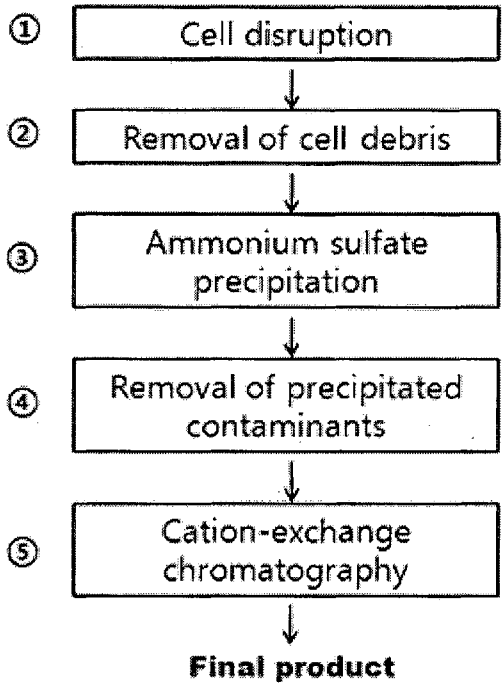

①
Cell disruption
②
Removal of cell debris
③
Ammonium sulfate precipitation
④
Removal of precipitated contaminants
⑤
Cation-exchange chromatography
Final product

Fig. 1b

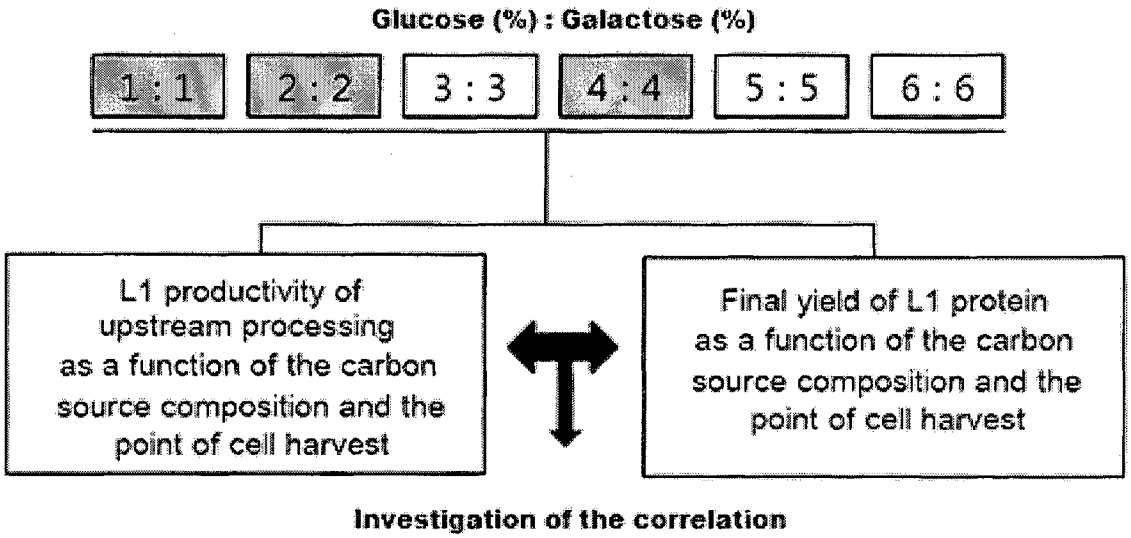

Glucose (%) : Galactose (%)
1 : 1
2 : 2
3 : 3
4 : 4
5 : 5
6 : 6
L1 productivity of upstream processing as a function of the carbon source composition and the point of cell harvest
Final yield of L1 protein as a function of the carbon source composition and the point of cell harvest
Investigation of the correlation

Fig. 2a

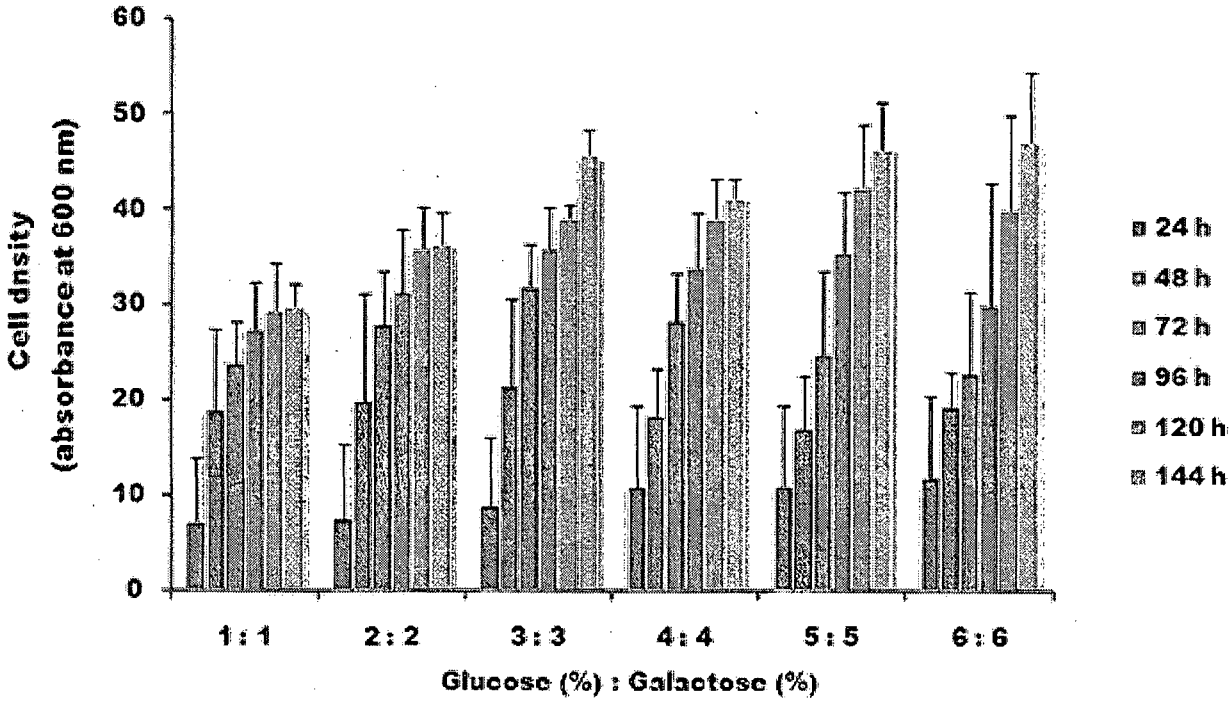

60
50
40
30
20
10
0
Cell dnsity
(absorbance at 600 nm)
1 : 1
2 : 2
3 : 3
4 : 4
5 : 5
6 : 6
Glucose (%) : Galactose (%)
24 h
48 h
72 h
96 h
120 h
144 h

Fig. 2b

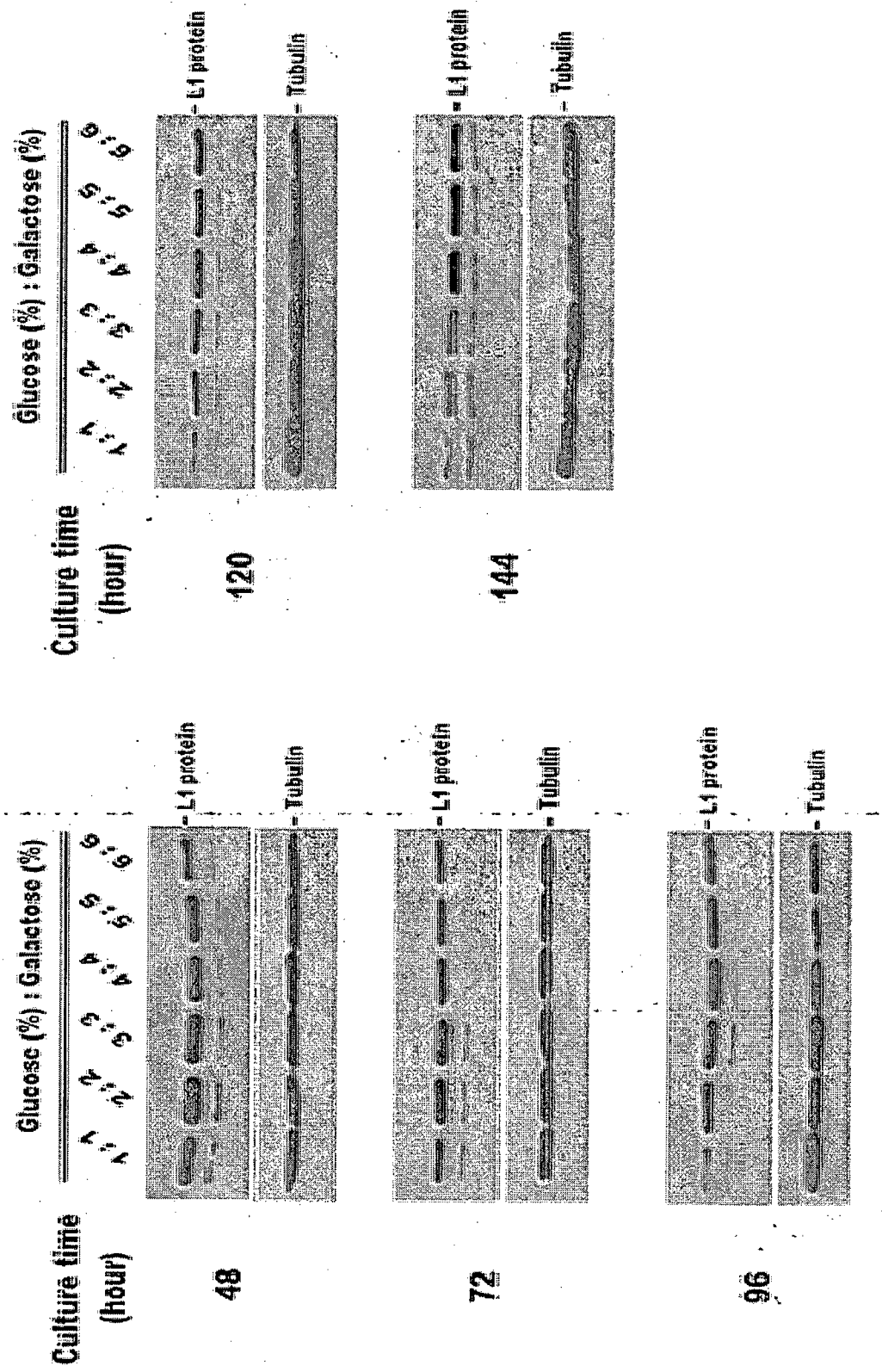

Glucose (%) : Galactose (%)
Culture time (hour)
L1 protein
Tubulin
48
72
96
120
144

Fig. 3a

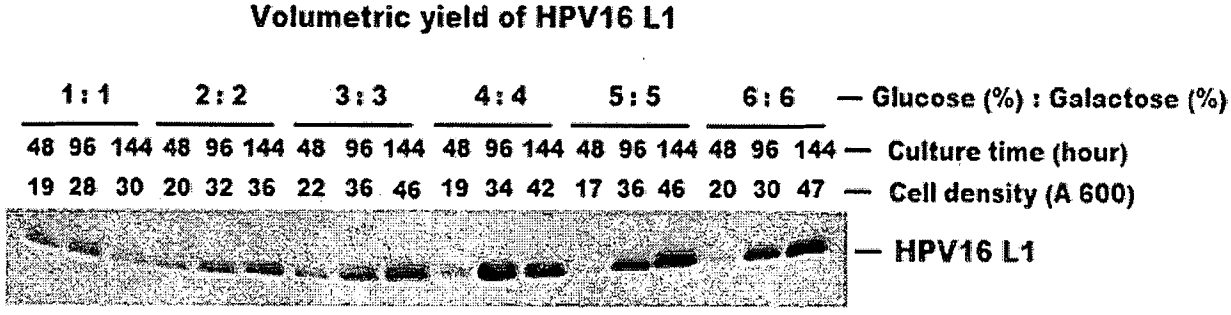

Volumetric yield of HPV16 L1
1 : 1
2 : 2
3 : 3
4 : 4
5 : 5
6 : 6
— Glucose (%) : Galactose (%)
48 96 144 48 96 144 48 96 144 48 96 144 48 96 144 48 96 144
— Culture time (hour)
19 28 30 20 32 36 22 36 46 19 34 42 17 36 46 20 30 47
— Cell density (A 600)
— HPV16 L1

Fig. 3b

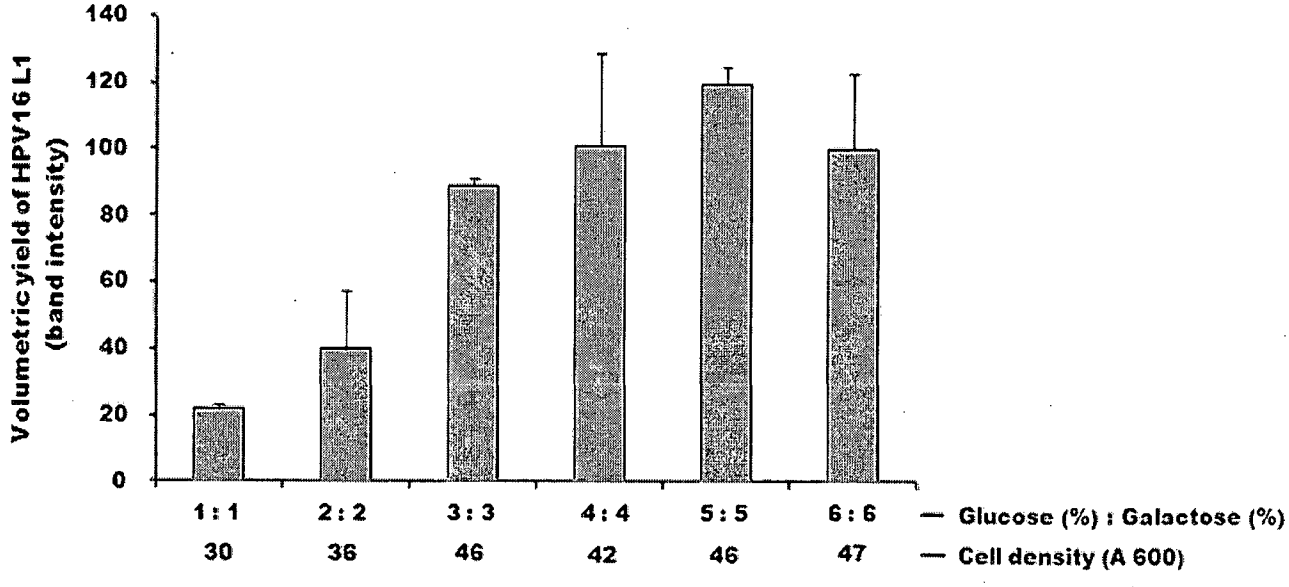

Volumetric yield of HPV16 L1
(band intensity)
140
120
100
80
60
40
20
0
1 : 1
2 : 2
3 : 3
4 : 4
5 : 5
6 : 6
— Glucose (%) : Galactose (%)
30
36
46
42
46
47
— Cell density (A 600)

Fig. 4a

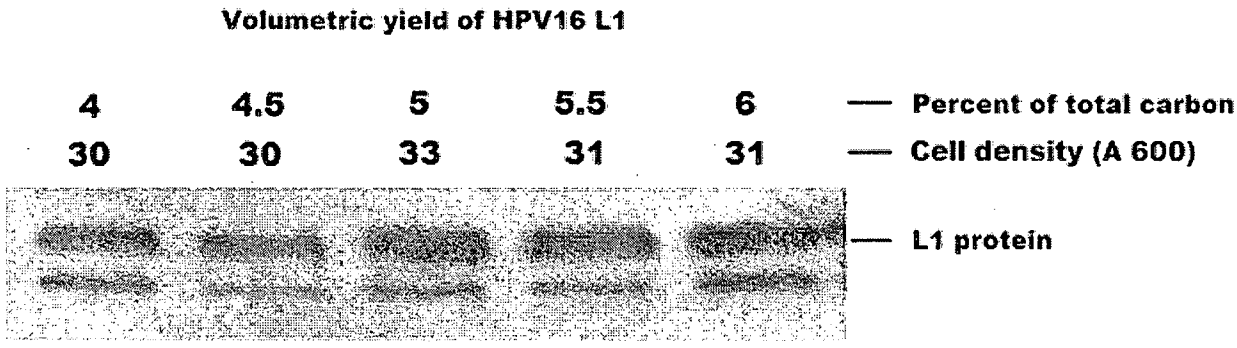

Volumetric yield of HPV16 L1
4
4.5
5
5.5
6
Percent of total carbon
30
30
33
31
31
Cell density (A 600)
L1 protein

Fig. 4b

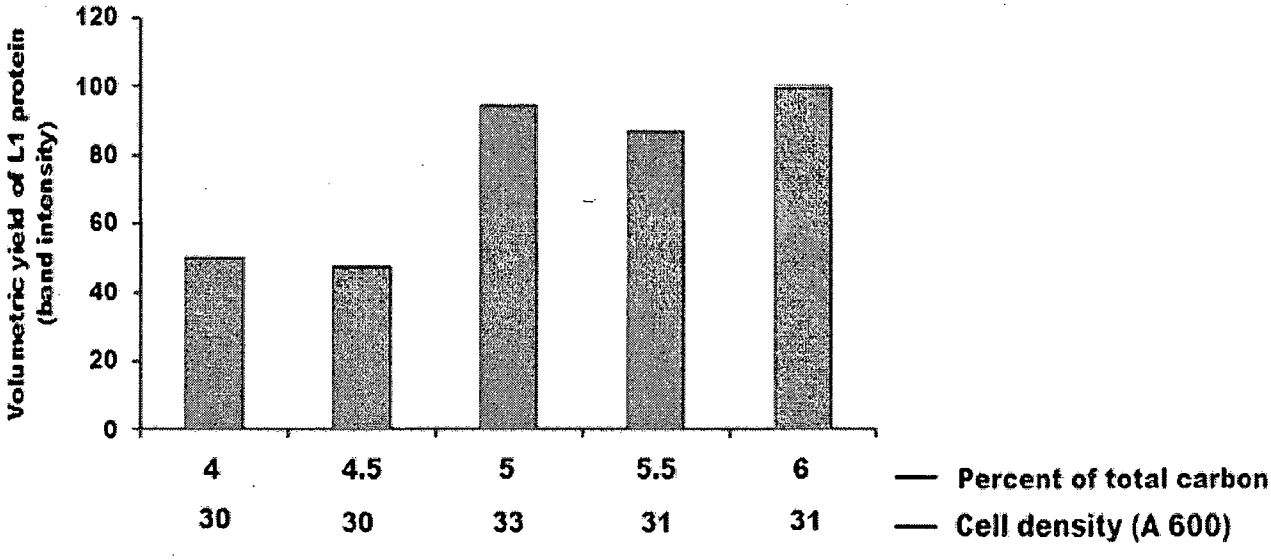

Volumetric yield of L1 protein (band intensity)
120
100
80
60
40
20
0
4
4.5
5
5.5
6
Percent of total carbon
30
30
33
31
31
Cell density (A 600)

Fig. 5a

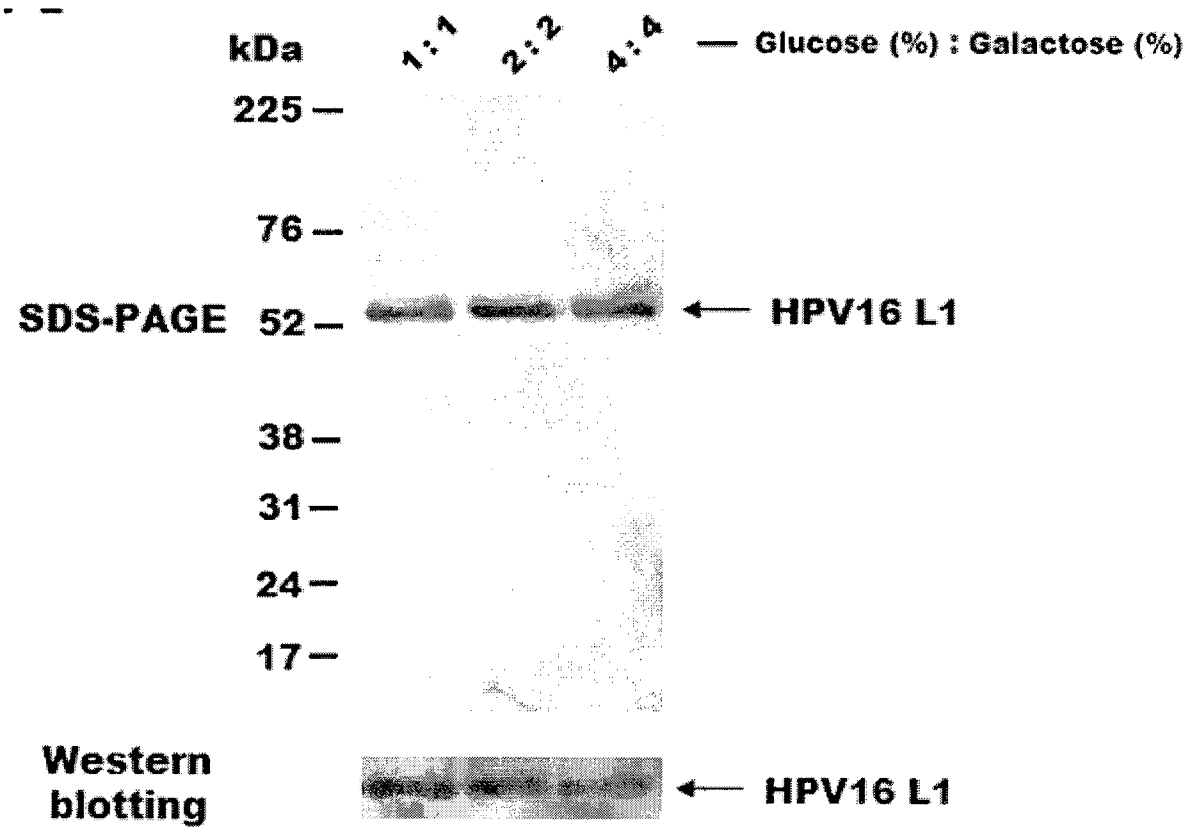

kDa
1:1
2:2
4:4
Glucose (%) : Galactose (%)
225
76
SDS-PAGE
52
HPV16 L1
38
31
24
17
Western blotting
HPV16 L1

Fig. 5b

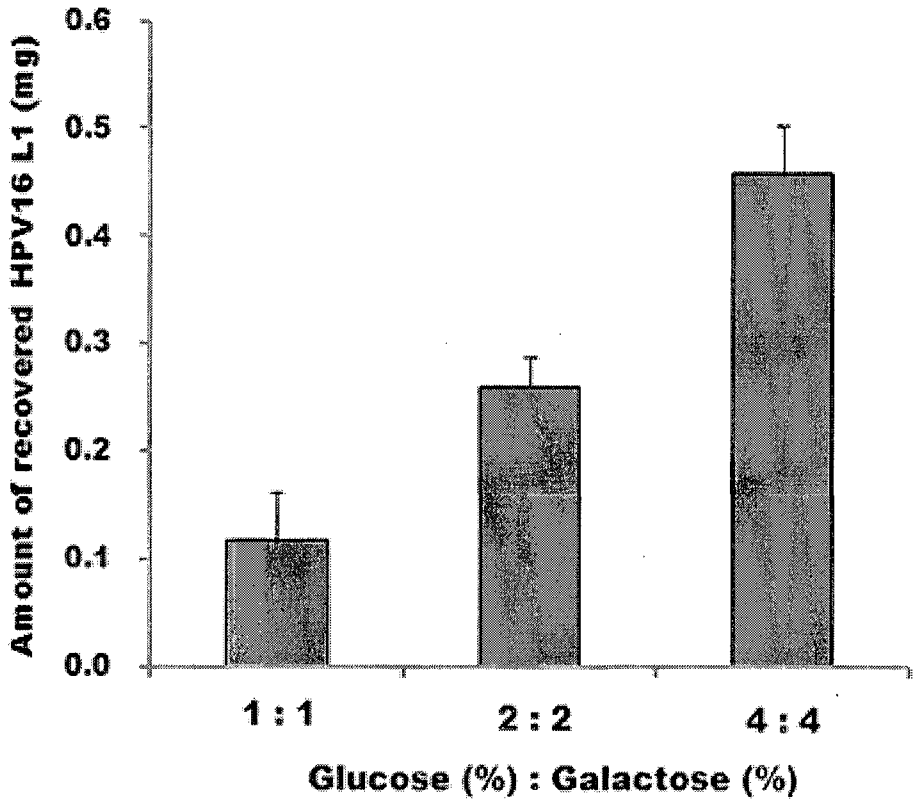

Amount of recovered HPV16 L1 (mg)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1 : 1
2 : 2
4 : 4
Glucose (%) : Galactose (%)

Fig. 6a

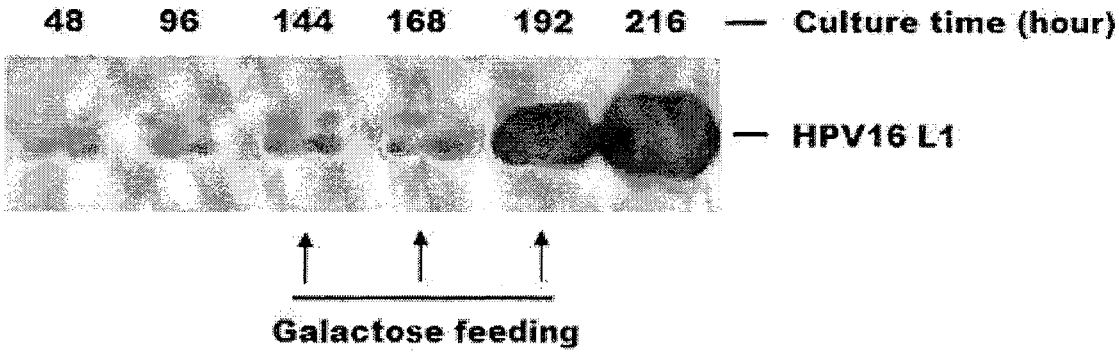

48
96
144
168
192
216
Culture time (hour)
HPV16 L1
Galactose feeding

Fig. 6b

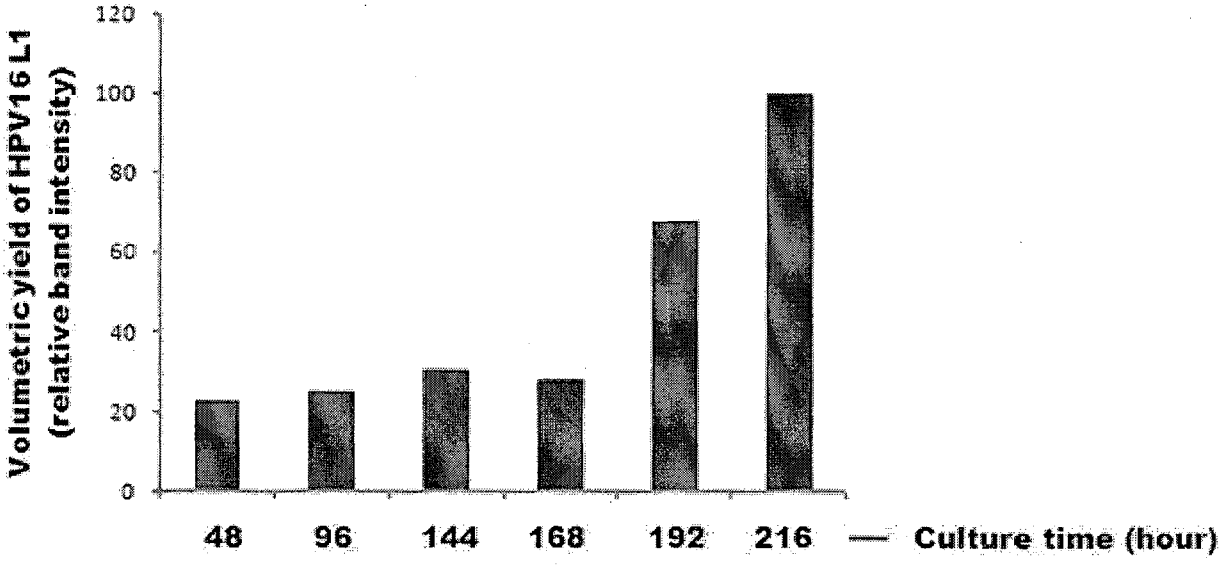

Volumetric yield of HPV16 L1
(relative band intensity)
120
100
80
60
40
20
0
48
96
144
168
192
216
Culture time (hour)

Fig. 7

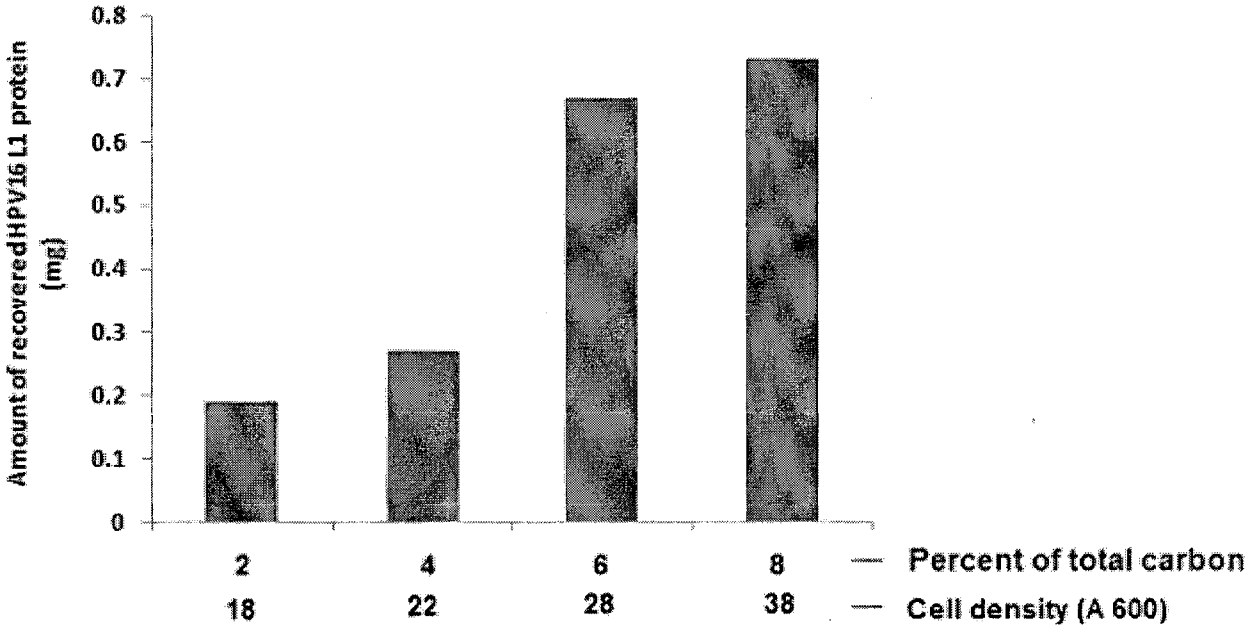

Amount of recovered HPV16 L1 protein (mg)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2
4
6
8
Percent of total carbon
18
22
28
38
Cell density (A 600)

Fig. 8a

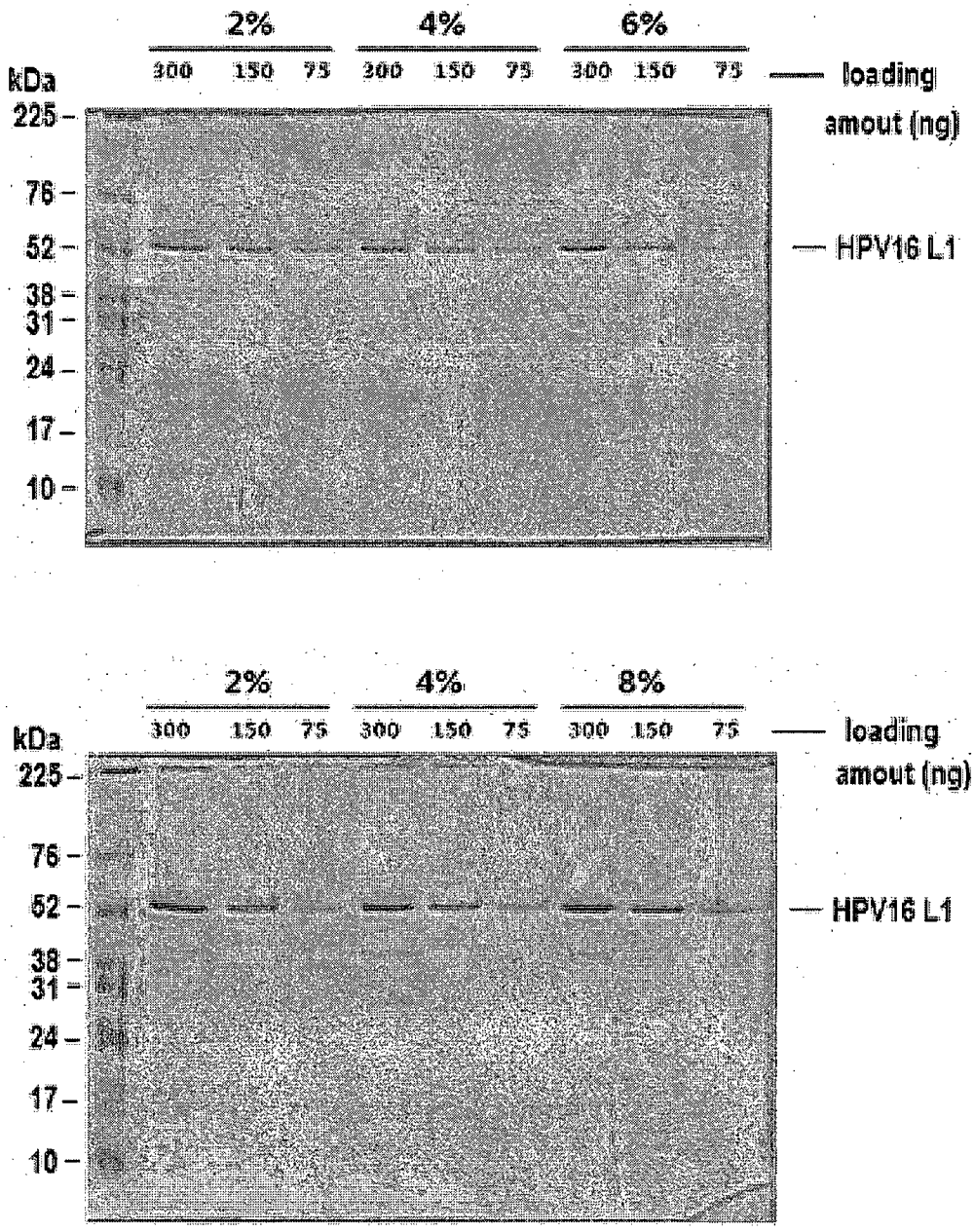

2%
4%
6%
300 150 75 300 150 75 300 150 75
loading amout (ng)
kDa
225
76
52
38
31
24
17
10
HPV16 L1
2%
4%
8%
300 150 75 300 150 75 300 150 75
loading amout (ng)
kDa
225
76
52
38
31
24
17
10
HPV16 L1

Fig. 8b

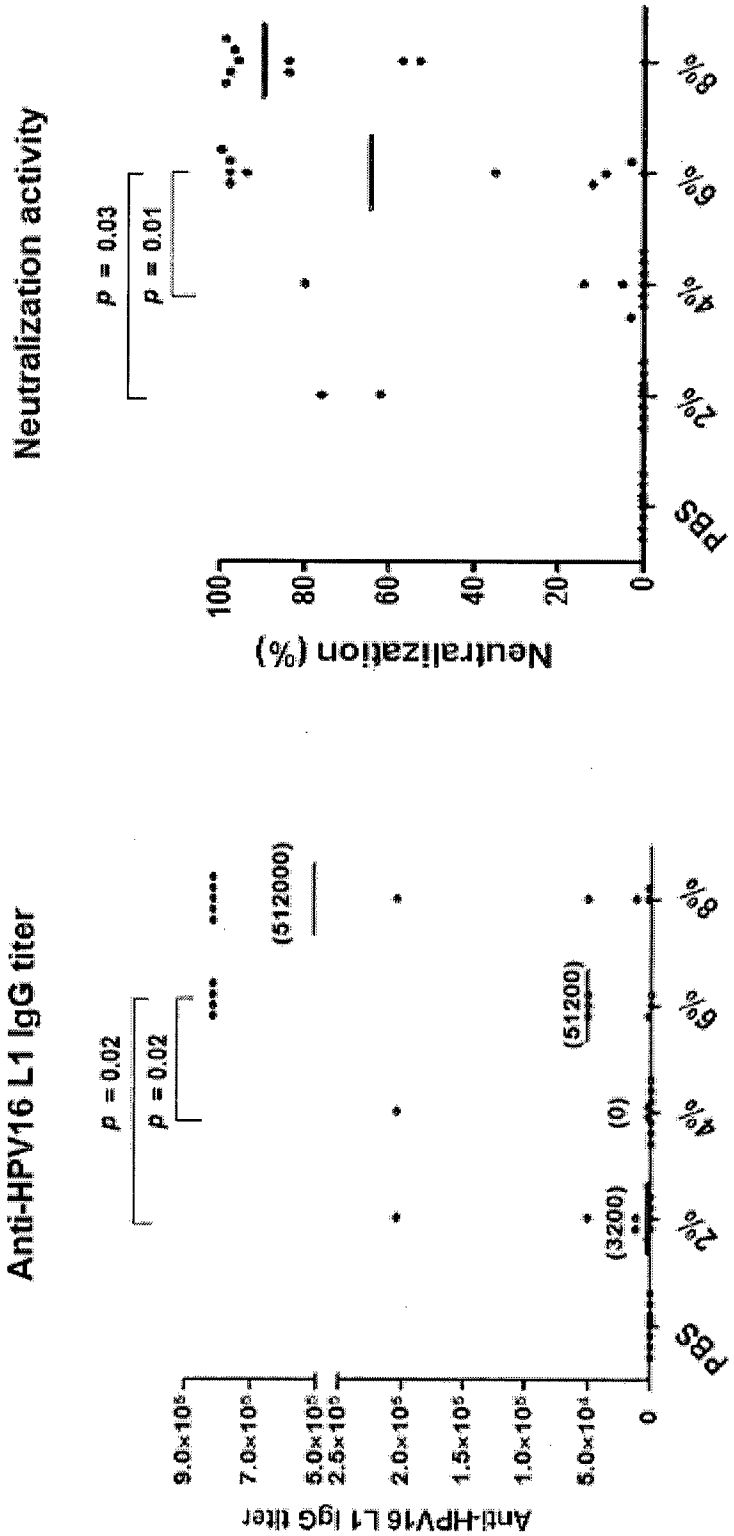

Neutralization activity
p = 0.03
p = 0.01
Neutralization (%)
100
80
60
40
20
0
PBS
2%
4%
6%
8%
Anti-HPV16 L1 IgG titer
p = 0.02
p = 0.02
(512000)
(51200)
(3200)
(0)
9.0×10⁵
7.0×10⁵
5.0×10⁵
2.5×10⁵
2.0×10⁵
1.5×10⁵
1.0×10⁵
5.0×10⁴
0
PBS
2%
4%
6%
8%

Fig. 9

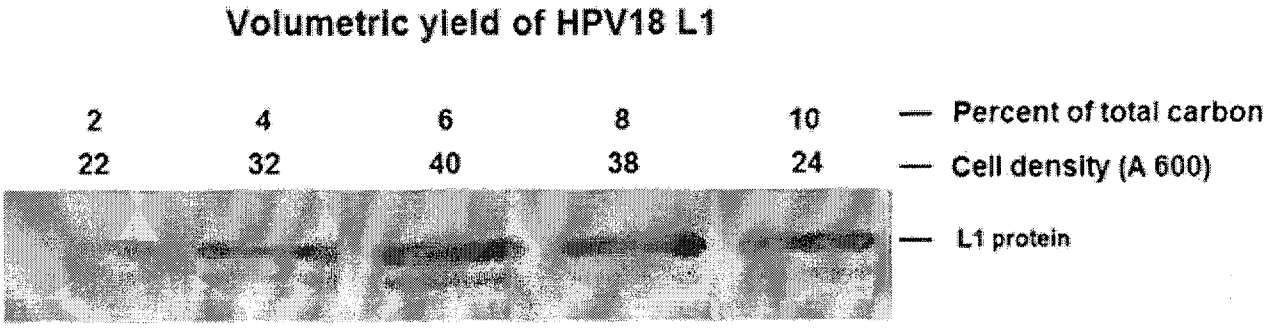

Volumetric yield of HPV18 L1
2 4 6 8 10
— Percent of total carbon
22 32 40 38 24
— Cell density (A 600)
— L1 protein

Fig. 10a

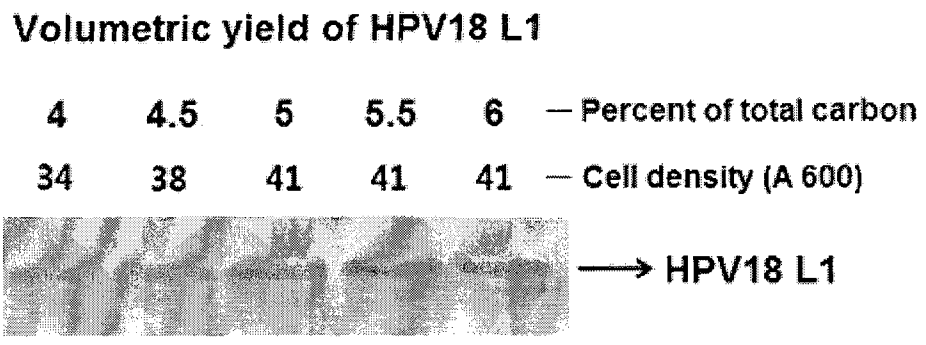

Volumetric yield of HPV18 L1
4 4.5 5 5.5 6
— Percent of total carbon
34 38 41 41 41
— Cell density (A 600)
⟶ HPV18 L1

Fig. 10b

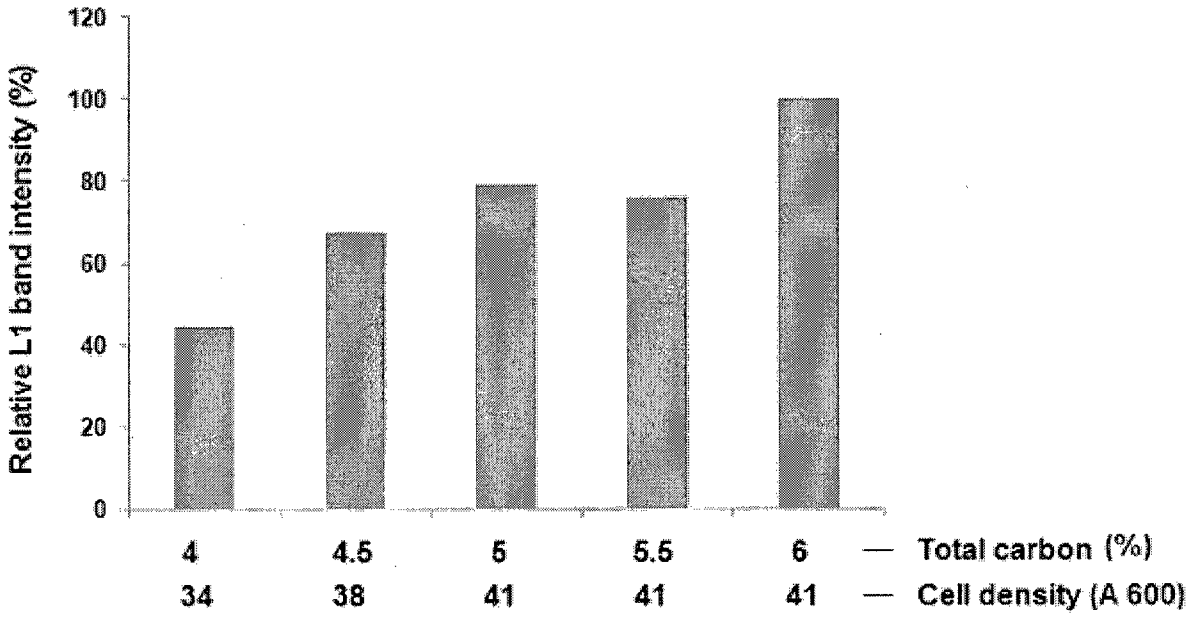

Relative L1 band intensity (%)
120
100
80
60
40
20
0
4
4.5
5
5.5
6
— Total carbon (%)
34
38
41
41
41
— Cell density (A 600)

Fig. 11a

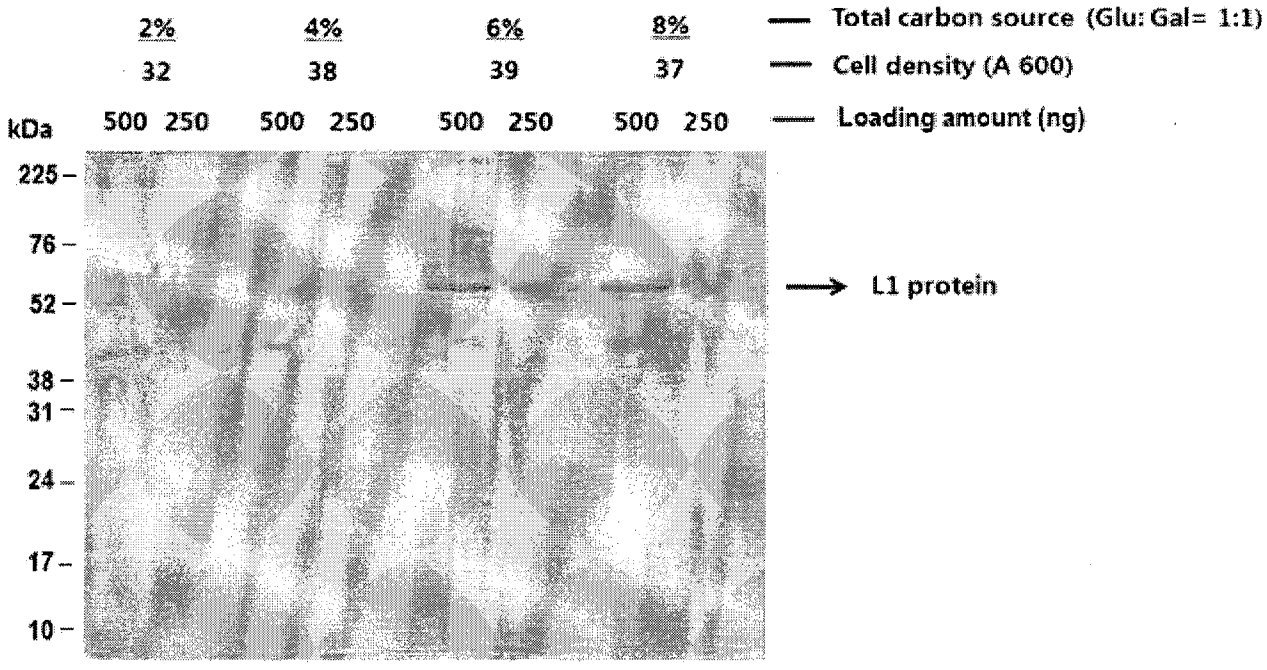

2%
4%
6%
8%
Total carbon source (Glu: Gal= 1:1)
32
38
39
37
Cell density (A 600)
kDa
500 250 500 250 500 250 500 250
Loading amount (ng)
225
76
52
38
31
24
17
10
L1 protein

Fig. 11b

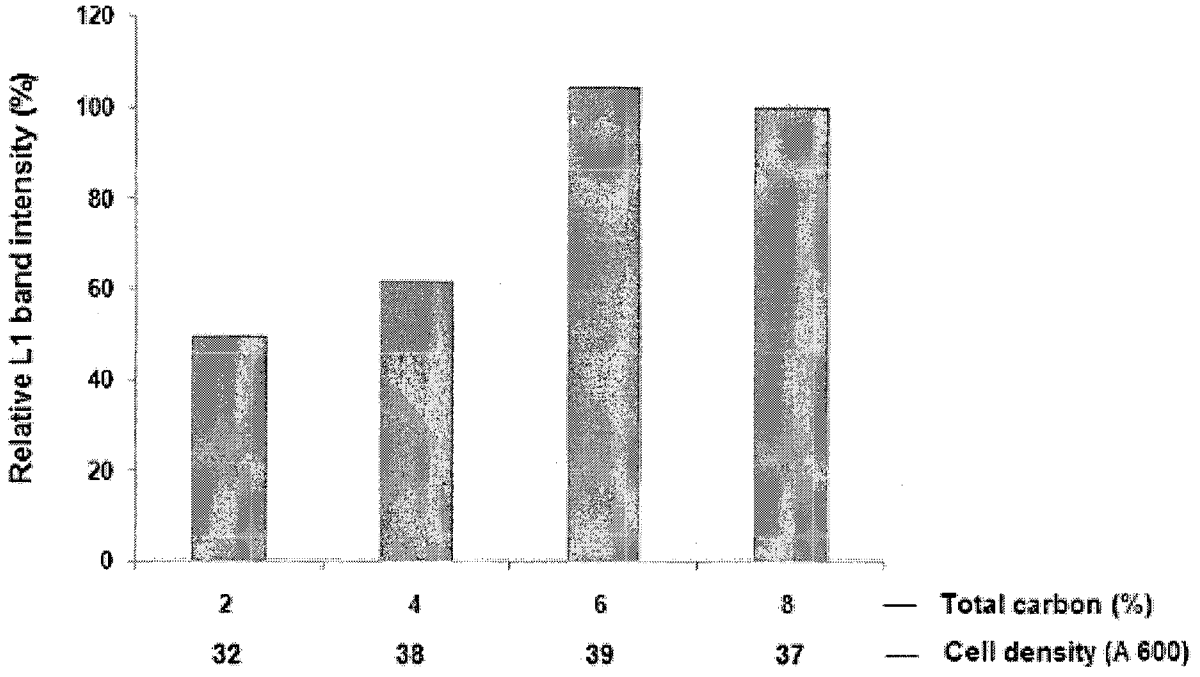

Relative L1 band intensity (%)
120
100
80
60
40
20
0
2
4
6
8
Total carbon (%)
32
38
39
37
Cell density (A 600)

Fig. 11c

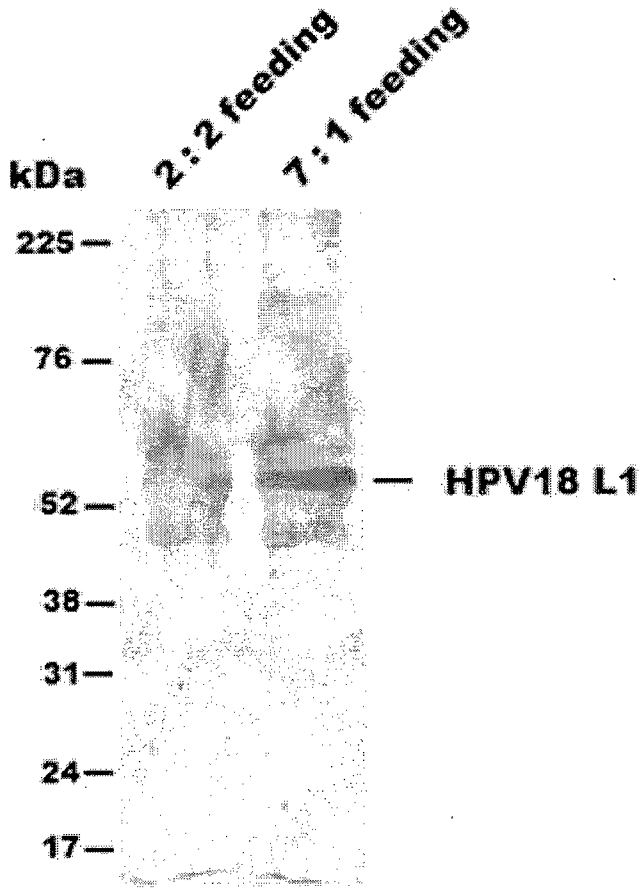


Fig. 12a

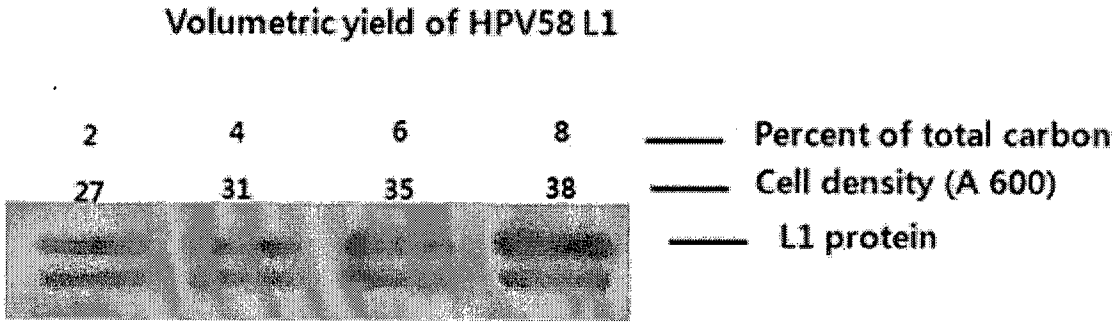


Fig. 12b

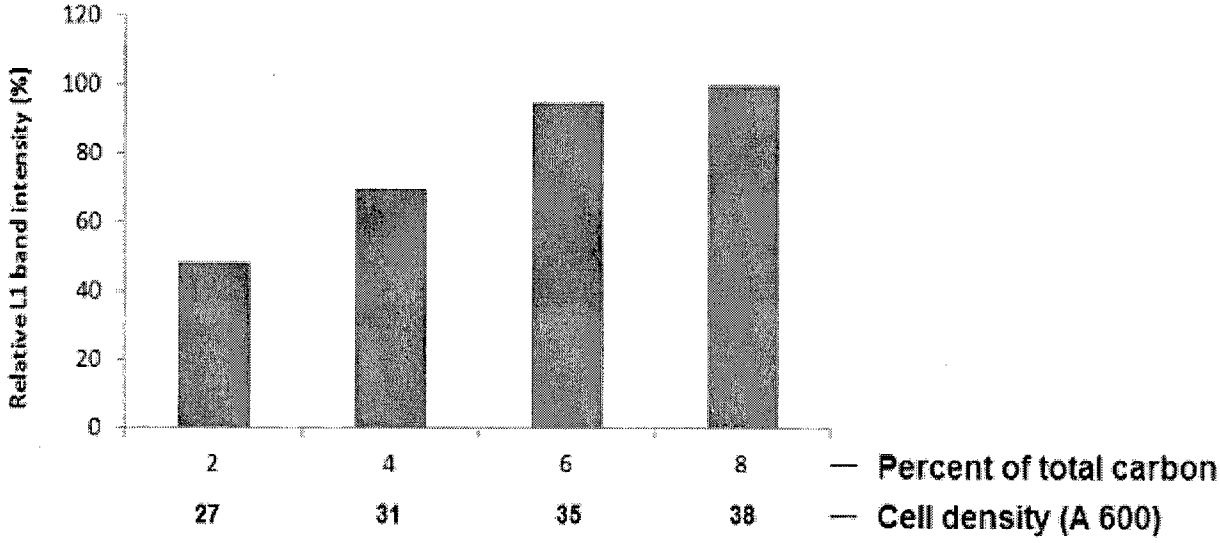


Fig. 13a

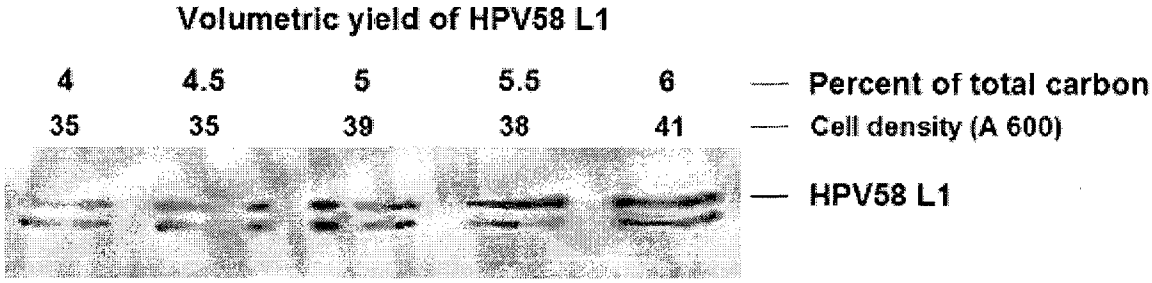


Fig. 13b

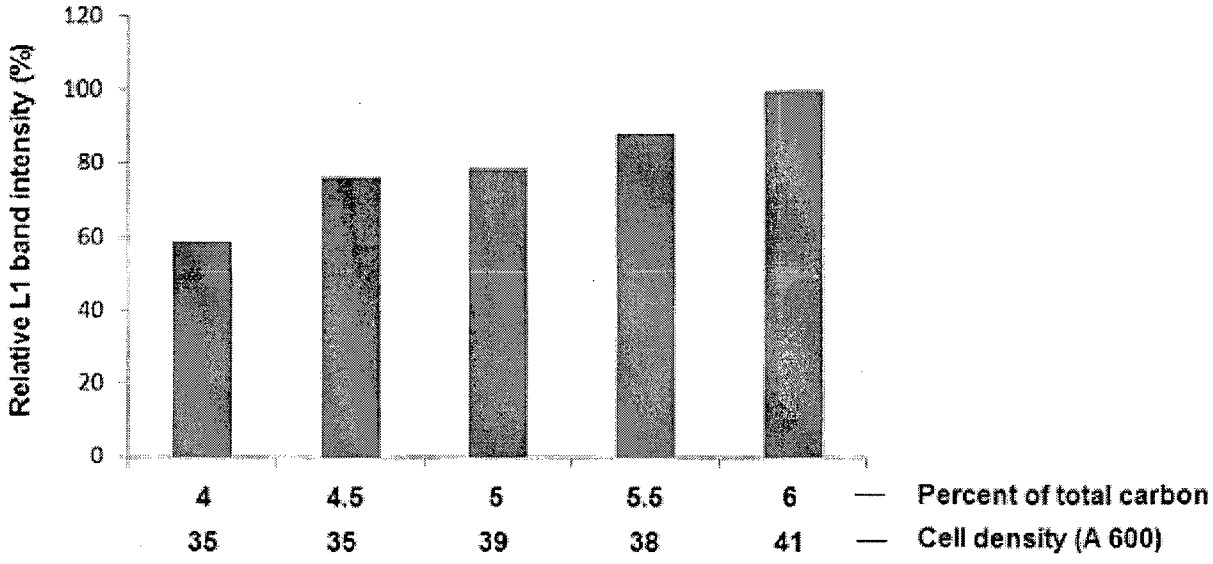


Fig. 14a

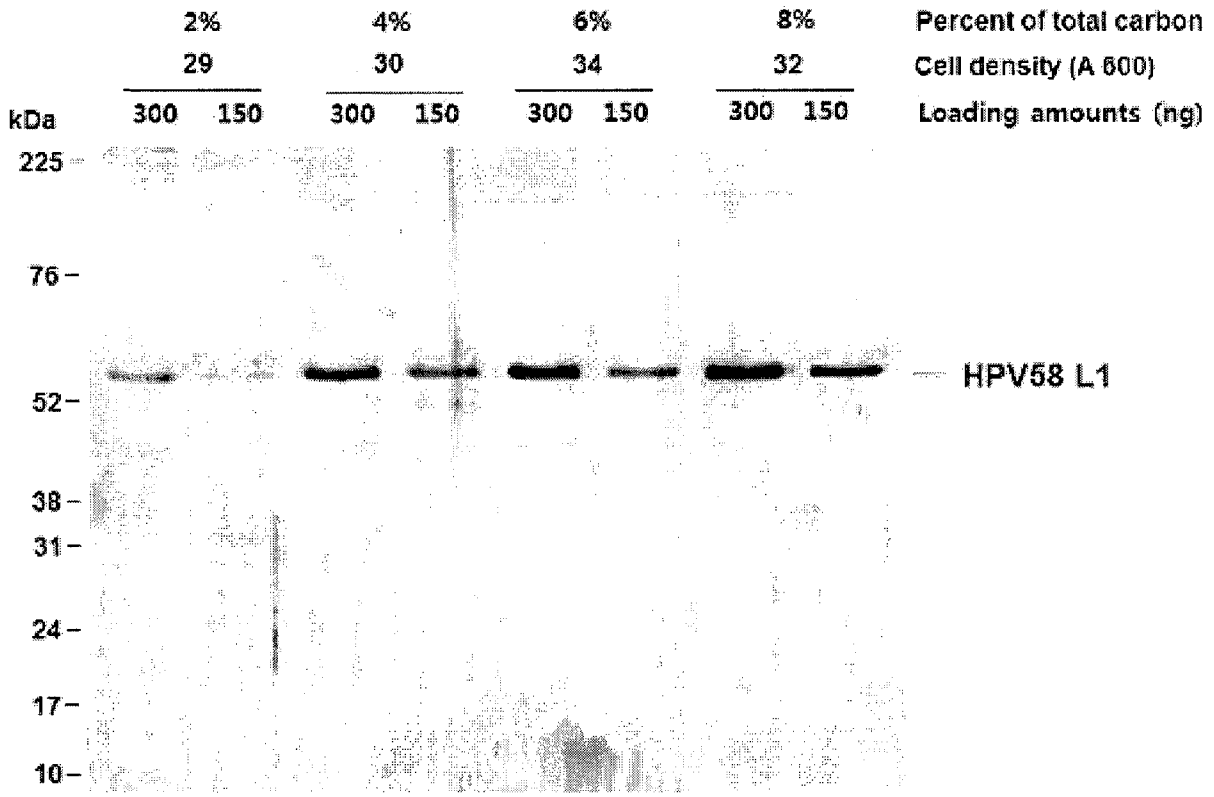
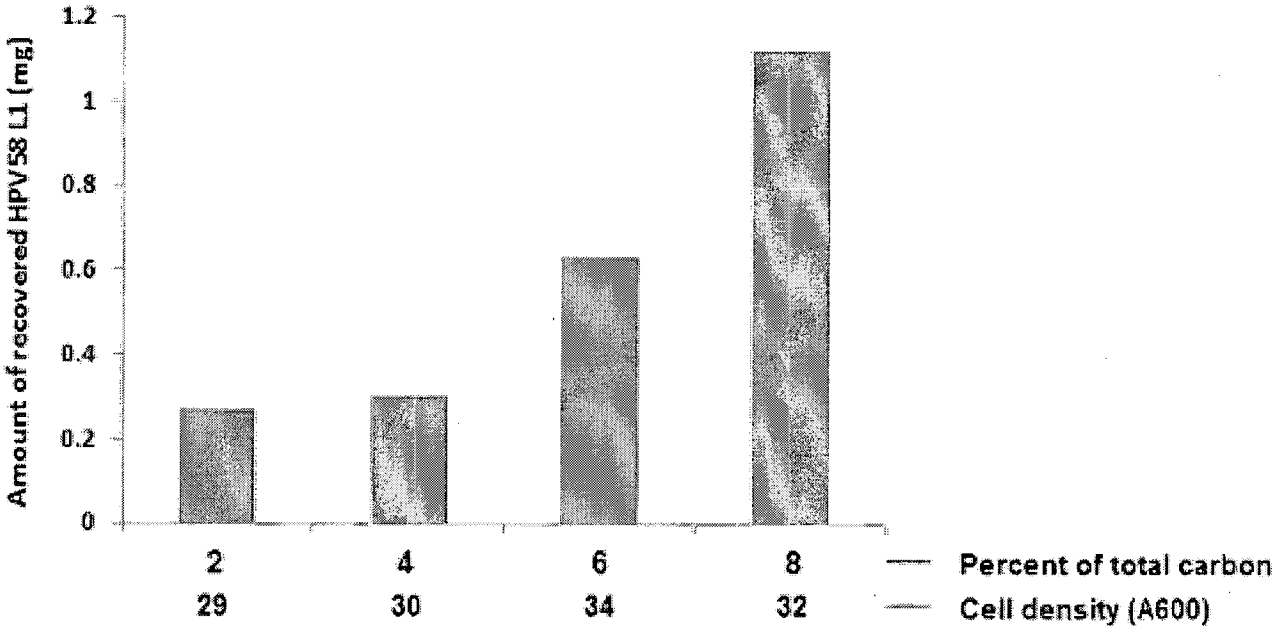

2%
4%
6%
8%
Percent of total carbon
29
30
34
32
Cell density (A 600)
kDa
300 150
300 150
300 150
300 150
Loading amounts (ng)
225
76
52
38
31
24
17
10
HPV58 L1

Fig. 14b


Amount of recovered HPV58 L1 (mg)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2
4
6
8
29
30
34
32
Percent of total carbon
Cell density (A600)