(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
A61K 39/29

(45) 공고일자 1993년03월27일
(11) 공고번호 특1993-0002263

(21) 출원번호	특1985-0001616	(65) 공개번호	특1985-0006450
(22) 출원일자	1985년03월13일	(43) 공개일자	1985년10월05일

(30) 우선권주장 048669 1984년03월13일 일본(JP)

(71) 출원인 자이단호오진가가꾸오요비겟세이료오호겐꾸쇼 노나까 세네오
일본국 구마모또껭 구마모또시 시미즈마찌 오꾸보 668반찌

(72) 발명자 오오또모 노부야
일본국 구마모또껭 구마모또시 시마사끼 6-22-29
미즈노 고스께
일본국 구마모또껭 구마모또시 다쓰따마찌 가미다쓰따 1725-1
하마다 후꾸사부로
일본국 구마모또껭 기꾸찌꾼 니시고시마찌스야 2679-2
미조까미 히로시
일본국 구마모또껭 기꾸찌꾼 고시마찌 오오아자 기꾸도미 1647반찌 151

(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 정진수 (책자공보 제3189호)

(54) 동결건조된 B형간염 백신의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

동결건조된 B형간염 백신의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 동결건조된 B형간염 백신제제의 제조방법에 관한 것이다.

특히 본 발명은 알루미늄 겔 안정화제의 존재하에서 HBs 항원으로부터 수득된 정제된 생성물을 동결건조시킴으로써 제조된 B형간염 백신의 동결건조제제의 제조방법에 관한 것이며, 상기의 HBs 항원은 공지의DNA 제조합 기술로 제조한 HBs 항원을 생산해 낼 수 있는 형질전환 생물체로부터 형질발현된 것이다.

B형간염은 B형간염 비루스(이후엔 "HBV"로 표기한다)에 의해 유발되며 면역 학적 및 임상학적으로 매우 심각한 문제를 포함하고 있으나 아직 효과적인 치료방법이 발견되지 않았기 때문에, 주로 예방법이 연구되어 왔다. 적절한 예방법이란 HBV에 의해 감염될 우려가 있는 사람에게 HBs 항원의 유효성분을 함유하는 백신을 공급하는 방법이다. 백신은 이미 실용화 단계에 있는데, B형간염 백신은 보통 단순히 "보균자"라고만 불리는 잠복 지속감염자의 혈장으로부터 얻은 HBs 항원을 고도로 정제하고, 이 정제된 HBs 항원을 불활성화 함으로써 제조한다.

그러나, 혈액유래 백신은 HBs 항원-양성인 사람의 혈장에서 얻어지기 때문에, 충분한 양의 원료의 확보상 문제점; 제제중에 있을지도 모를 B형간염 비루스 또는 다른 혈액유래 비루스등의 감염성 인자의 잔재를 확인하기 위한 침팬지에서의 안정성 확인시험의 필요성; 시험용 침팬지의 충분한 양 확보상의 문제등 제조상 많은 제약을 갖고 있다.

이러한 문제점들을 제거하기 위하여, 많은 연구가들은 DNA 재조합 기술을 이용하여 HBs 항원 단백질을 코딩하고 있는 HBV DNA를 에스케리키아콜리 또는 효모에 도입하고 그렇게 해서 수득한 형질전환 미생물로부터 HBs 항원을 형질발현시켜 다량의 원료 HBs 항원을 수득하는 기술을 추진하고 있다. 최근, 이러한 재조합 미생물을 이용한 HBs 항원의 형질발현이 성공되었다. 특히, 재조합 효모를 이용한 HBs 항원의 생산은 공업적 응용이 가능한 단계에 이르고 있으며, 따라서 이렇게 해서 수득한 HBs 항원을 정제하고 그로부터 B형간염 백신 제제를 제조하고자 하는 노력이 진행되고 있다.

B형간염 백신은 비루스가 혈액을 통해 감염되는 B형간염 환자의 가족 및 보균자 및 신생아 뿐만 아니라 B형간염 환자 및 보균자와 접촉할 기회가 있는 의료종사자, 연구가의 비루스 감염 예방에 효과적이다. 보균자의 수는 일본에서의 총인구의 2~3% 및 동남아시아 및 아프리카에서는 10~15%의 비율로 나타난 것으로 알려져 있다. 따라서, B형간염 백신을 전세계적으로 이용하는 것이 필요하다.

이런 관점에서 볼때, 일본을 포함한 전세계에서 B형간염 백신을 널리 사용하고, 장기간 안정하게 보관할 수 있는 제제를 제공하는것이 필수적이다.

현재 시판되고 있는 B형간염 백신은 혈액유래 HBs 항원 생성물에서 수득한 액체 제제로서, 보존기간중에 서서히 그 항원의 역가가 저하된다.

이런 형편에서, 본 발명자는 장기 보존성이 우세한 B형간염 백신을 공업적으로 생산할 수 있는 방법을 연구하였고, 혈액유래 HBs 항원 대신 재조합 유래 HBs 항원을 이용하고 특정 조건하에서 HBs 항원을 동결건조시켜 목적하는 백신을 수득할 수 있음을 발견하였다.

일반적으로 백신 투여 후 생체내에서의 항체의 생산성을 높이기 위해서 알루미늄 겔과 같은 보조제와 섞어 불활성화 백신을 제조한다. B형간염 백신 제제에도 또한 통상 알루미늄 겔을 첨가한다. 동결건조된 B형간염 백신 제제의 경우에, 만약 B형간염 백신이 HBs 항원 자체만을 동결건조시켜 만들어졌다면, 사용하기전에 HBs 항원(이후엔, 때때로 "HBsAg"라 표기한다)을 주사용 생리식염수 또는 주사용 증류수에 녹이고사용전에 이 용액을 알루미늄 겔과 혼합하여 제조해야만 한다. 이런 방법의 경우, 최소 사용단위 용기내에서의 HBsAg의 알루미늄 겔에 대한 흡착정도는 조제과정의 순서, 온도조건, 진탕-혼합조건 등에 의하므로 따라서 항체 생산성은 각 백신마다 다를 수 있다. 한편, 재조합 유래 HBs 항원이 종래의 액체제제에서 이용된 것과 같은 조건하에서 동결건조되면 동결건조중에 백신의 항원역가가 저하된다.

본 발명자는 알루미늄 겔에 흡착된 재조합 유래 HBsAg의 동결건조 조건, 즉 항원역가의 저하나 성상의 악화같은 문제점을 보이지 않고 오히려 종래의 액상제제보다 우세한 보존안정성을 갖는 이상적인 동결건조된 제제를 생산할 수 있는 조건에 대해 중점적으로 연구하였으며, 나아가 적절한 안정성을 갖는 제제의 배합조성에 대해 연구하였다. 그 결과로, 현탁액상태에서 정제된 재조합 유래 HBsAg을 알루미늄 겔에 흡착시키고, 현탁액에 안정화제 및 임의의 보존제를 용해시키고 그 혼합물을 동결건조시킴으로써 목적하는 동결건조된 제제를 제조할 수 있음을 발견하였다.

본 발명의 목적 HBs 항원을 생산해낼 수 있는 재조합 생물체를 이용하여 개량된 동결건조된 B형간염 백신 제제를 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 우수한 보존 안정성을 갖는 동결건조된 B형간염 백신을 생산하는 재조합 유래 HBs 항원의 동결건조법을 제공하는 것이다. 본 발명의 목적들과 장점은 숙련된 사람에게는 하기의 설명으로써 명백해질 것이다.

본 발명의 동결건조된 B형간염 백신은, 재조합 유래 HBs 항원의 중성-완충용액의 수용액에 알루미늄 겔을 가하여 HBs 항원을 일루미늄 겔에 흡착시키고, 거기에 아미노산 및/또는 당류에서 선택한 안정화제 및 임의의 콜로이드성 물질 및 나아가 임의의 공지의 보존제, 등장액제 등을 가하여 백신용액을 제조하고, 그것을 최소 사용단위 용기내에 나누어 쏟아 붓고 동결건조시켜 제조한다. 이렇게 해서 수득한 동결건조된 B형간염 백신 제제는 장기간 높은 항원역가를 유지하며, 각 최소 사용단위 용기는 각 제제량이 똑같은 항원 유지를 나타내므로, 따라서 사용이 매우 편리하다.

B형간염 비루스 DNA로부터 분리한 HBs 항원을 코딩하는 유전자를 이콜리, 효모, 동물 배양 세포 등의 생물체에 도입하여, 그 유전자로 생물체를 형질전환시키고, HBs 항원 유전자의 작용에 의해 HBs 항원을 형질발현시킴으로써 원료로 쓰이는 정제된 재조합 유래 HBs 항원을 제조할 수 있다. 재조합 유래 HBs항원의 제조법은 이미 알려져 있다. 예를들면 재조합 효모유래 HBs 힝원의 제조법은 발렌주엘라에 의해 보고되었는데(참고. Valenzuela,Natrue,298,34가(1982) 및 일본국 특허 공개 제77823/1983호), pBR322 플라스미드의 복제 개시 부위, 2μ플라스미드의 복제 개시 부위, Trp1 및 효모 알코올 탈수소 효소 프로모터 부위를 포함하는 셔틀 벡타(pMA56)내의 효모 알콜 탈수소효소 프로모터에 HBs 유전자를 결합시킨 셔틀 벡타(pHBs16)를 제조하고, 이 셔틀 벡타를 효모에 도입시켜 형질전환된 효모를 제조하고, 이 형질전환된 효모를 배양하여 목적하는 HBs 항원을 생산한다.

효모유래 HBs 항원의 또 다른 제조법은 미야노하라 등에 의해 보고되었는데(참고. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80,1(1983) 및 일본국 특허 공개 제31799/1984호), 2μ 플라스미드의 복제 개시 부위, P^{BR}322 플라스미드의 복제 개시 부위, 효모 염색체의 복제 개시 부위, 류우신 합성에 참여하는 효모의 1eu2 유전자, 이.콜리의 암피실린-내성 유전자, 효모의 억제성 산성 포스파타제 프로모터 부위를 포함하는 셔틀 벡타(pAM82)내의 억제성 산성 포스파타제 프로모터에 HBs 유전자를 결합시킨 셔틀 벡타(pAH203)를 제조하고, 이 셔틀 벡타를 효모에 도입시켜 [AH22[a,leu2,his4,Canl,cir+)] 형질전환된 효모를 제조하고, 이 형질전환된 효모를 배양하여 목적하는 HBs 항원을 생산한다.

또한 HBs 유전자가 효모 3-포스포글리세린산 키나아제(PGK) 프로모터에 결합된 셔를 벡타를 제조하고, 이를 HBs 항원을 생산하는 형질전환된 효모를 제조하는데 이용하는 방법이 히트제만에 의해 보고되었다[참고.Hitzeman, 핵산연구,11(9),2745(1983) 및 일본 특허 공개 제109427/1983호].

나아가 Coll EI, pMB1 또는 p15A로부터 유래된 이.콜리 플라스미드에 삽입된 SV40 DAN의 복제 개시 부위를 가지며 포유동물 세포내에서는 복제 억제 부위가 결핍된 벡타와 HBs 유전자를 재조합하여 재조합DNA를 제조하고, 생쥐의 LTK-세포 등의 포유동물 세포를 재조합 DNA에 의해 형질전환시키고 난 후,이 형질전환된 세포를 배양하여 목적하는 HBs 항원을 수득하는 방법이 노자키 등에 의해 보고되었다[참고. 제30회 일본 비루스학회총회, 연설초록, P-1069(1982) 및 일본국 특허 공개 제36698/1984호]. DNA재조합 기술을 이용한 동물세포에 의한 HBs 항원의 생성방법에 대한 기타의 여러 보고가 있는데, 예를들면 일본국 특허 공개 제56685/1983,995/1983 및 39784/1982이다.

이렇게 해서 수득한 HBs 항원을 생물학적 활성물질을 분리하고 정제하는데 이용되는 세포파쇄, 파쇄된 세포의 추출, 황산암모늄에 의한 염석, 겔여과, 이온교환 크로마토그래피, 폴리에틸렌글리콜에 의한 분획, 친화성 크로마토그래피, 슈크로오스 및 염화세슘에 의한 초원심분리 등의 공지의 정제방법에 고도로 정제하고, 고도로 정제된 HBs 항원은 본 발명의 동결건조된 B형간염 백신의 제조에 이용된다.

상기와 같이 재조합 생물로부터 수득한 정제된 HBs 항원은 하기의 방법대로 동결건조시킨다. 0.01M 인산 완충용액, 0.01M 시트레이트 완충용액, 또는 0.005M 맥일바인 완충용액 등과 같이 적절한 농도의 중성완충용액 또는 물에 HBs 항원을 용해시켜 HBs 항원 및 다른 첨가물이 다음의 농도를 갖도록 한다.

즉, HBs 항원은 0.1W/V%, 바람직하게는 0,02W/V% 이하의 단백질 농도이어야 한다. 보조제로써 가해지는 알루미늄 겔은 HBs 항원(단백질의 농도로서) 중량의 3～10배 중량의 양과 같아야 한다.

HBsAg의 알루미늄 겔에 대한 흡착은 HBs 항원을 포함하는 용액을 알루미늄 겔과 혼합하거나, 염화알루미늄을 포함하는 용액 정당량을 HBs 항원을 포함하는 용액에 가하고 거기에 적절한 농도의 수산화나트륨 수용액을 가하거나, 수산화알루미늄 겔을 만들어 HBs 항원을 동시에 흡착시키거나 하여 수행할 수 있다. 수산화나트륨 수용액 대신에 트리소듐 포스페이트 수용액을 사용할때, 알루미늄 포스페이트 겔을 제조하고 거기에 HBs 항원을 흡착시킨다. 따라서, 본 발명에서 알루미늄 겔은 수산화알루미늄 겔 및 인산알루미늄 겔을 포함한다.

이렇게 해서 수득한 HBs 항원-흡착된 알루미늄 겔 현탁액을 안정화제, 임의의 보존제 및 등장액제와 혼합한 후, 혼합물을 동결건조시킨다.

안정화제는 아미노산 및 다당류를 포함한다. 아미노산 및 다당류는 단독적으로 쓰일 수 있으나, 병행하여 사용하는 것이 바람직하다. 콜로이드성 물질 또는 안정화제로서 임의로 가해질 수 있다.

적절한 아미노산의 예로는 글리신, 알라닌, 글루탐산, 아르기닌, 리신 등 또는 그 염(예, 글루탐산 모노소듐)을 들 수 있다. 이들은 단독 또는 둘 이상을 병행하여 사용할 수 있는데, 통상 사용양은 0.1～2.0W/V%이다. 적절한 당류의 예로는 글루코오스, 크실로오스, 갈락토오스, 프럭토오스 등의 단량류, 락토오스, 말토오스, 사카로오스 등의 이당류, 및 만니톨, 소르비톨, 크실리톨 등의 당알코올이 있는데, 이들은 단독 또는 둘 이상을 병행하여 사용할 수 있다. 당류는 통상 0.1～15W/V%의 양이 사용된다. 적절한 콜로이드성 물질의 예는 젤라틴, 인체 알부민, 덱스트란 등이다. 이들은 통상 0.01～0.1W/V%의 양으로 사용된다. 티메로살 같은 임의의 보존제는 약 0.05～0.1W/V%의 양으로 사용한다.

동결건조된 백신을 사용할때에는 제제를 생리적 등장상태로 만들기 위해 중성염을 첨가하는 것이 바람직하다. 중성염은 염화나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘을 포함한다. 바람직한 중성염은 상기한 다른 중성염과 혼합하여 사용할 수 있는 염화나트륨이다. 중성염의 통상 농도는 0.1～3W/V% 바람직하게는 0.5～2W/V%이다.

이렇게 제제된 백신 용액을 나누어 각 포장단위에 쏟아 부어, 각 용기와 20㎍～1,000㎍의 HBs 항원을 포함하도록 한다. 각 용기의 분할된 용액을 공지의 급속 동결건조법 또는 완속 동결건조법으로 동결건조시켜 목적하는 동결건조된 제제를 수득한다. 동결건조는 통상 하기의 조건에서 수행된다. 즉, 용액을 수시간동안(예, 3～10시간) 대기압하 낮은 온도(예, -40℃ 또는 그 이하, 바람직하게는 -50℃ 또는 그 이하)에서 예비동결건조시킨 후, 십-수십시간(예, 15시간)동안 감암(예, 0.01～0.05토르)하에 지정된 고온(예, 0°～8℃)에서 1차 동결건조시키고, 이 단계에서, 생성물의 온도를 -35℃이하(예, 약 -38℃)로 내린다. 그리고 수시간～수십시간 동안(예, 6～10시간, 바람직 하게는 7～9시간) 감암(예,0.001～0.005토르) 하에 지정된 상승온도(예, 25°～30℃) 에서 2차 동결건조시킨다.

동결건조된 제제는 최소한 재조합 유래 HBs 항원, 알루미늄 겔, 안정화제 및 중성염을 포함한다.

이렇게 하여 얻어진 동결건조된 B형간염 백신 제제는 항원역가를 저하시키지 않은채 우수한 보존 안전성으로 보관할 수 있으며 나아가 사용시 주사액에 빠르게 용해시킬 수 있다.

본 발명의 동결건조된 제제를 사용할때에는, 제제를 주사용 증류수 또는 주사용 생리식염수에 용해시켜, HBs 항원 단백질의 농도를 5㎍/㎖～5㎍/㎖로 조정하고 염농도를 등장상태에 가깝게 조절하고 그 생리적등장액을 피하 접종 경로로 투여한다. 성인의 1회 백신 투여량은 통상 5㎍～50㎍의 HBs 항원 단백질 농도 범위에서이다.

본 발명의 제제는 생물학적 제제기준(건강 후생성 공고 제287호, 일본국 1981)에 명시된 기니아 피그에서의 일반 시험법을 실시했을때 아무런 이상 독성을 보이지 않는다.

본 발명은 하기의 참고예 및 실시예로 설명되며, 본 발명이 여기에 한정되는 것은 아니다.

[참고예 1]

재조합 효모유래 정제된 HBs 항원의 조제

미야노하라 등의 방법(참고. 일본국 특허 공개 제31799/1984호)에 따라, 하기와 같은 방법으로 재조합 효모를 제조하고 배양하여 HBs 항원을 생산하고, 그 HBs 항원을 분리하고 정제한다.

(1) HVB DNA의 제조

(i) 비루스DNA의 제조

HBsAg 양성인 열 사람(서브타입 adr)에게서 푸울 혈장(700㎖)을 수득하고, HBsAg을 5,000rpm에서 20분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한다. 생성된 용액을 4℃에서 18,000rpm으로 8시간동안 원심분리하고, 생성된 침전물을 10mM 트리스-HCl, 0.1M NaCl 및 1mM EDTA의 완충용액(pH7.5) 10㎖에 재용해시킨다. 용액을 30% 슈크로오스를 포함하는 원심분리관의 정상부에 가하고 4℃, 39,000rpm에서 4시간동안 원심분리한다. 생성된 침전물을 상기한 동일 완충용액에 재용해시킨다.

완충용액을 67mM 트리스-HCL(pH7.5), 80mM NH_4Cl, 25mM $MgCl_2$, 0.5%(W/V%, 이하에서도 동일) NP40(데트기톨, 시그마 회사제품), 0.1% 2-메르캅토 에탄올, 330μM dCTP(데옥시시티딘 트리포스페이트), dGTP(데옥시구아노신 트리포스페이트), 및 dATP(데옥시아데노신 트리포스페이트), 0.5μM

-α[^{32}P]dTTP[데옥시티미딘 트리포스페이트]의 혼합물 (500㎕)에서 처리함으로써 37℃에서 30분간 HBV DNA 폴리머라제와 반응시킨다. 이 반응 혼합물에 최종 농도가 330μM이 되도록 dTTP를 가하고, 혼합물을 37℃에서 3시간동안 더 반응시킨 후, 반응 혼합물에 동량의 100mM EDTA 용액을 첨가한다.

상기한DNA 폴리머라제 반응에 의해, DNA의 만일 가닥 부분이 전체적 이중나선으로 수복되어 [^{32}P]표지된 물질을 수득한다. 30%, 20% 및 10%의 슈크로오스 수용액이 순서대로 층을 이룬 원심분리관의 정상부에 이 물질을 첨가하고, 4℃, 39,000rpm으로 4.5시간동안 원심분리한다.

DNA에 강하게 결합되어 있는 단백질을 분해시키기 위해, 상기에서 수득한 침전물을 1㎎/㎖의 프로나제 E(가껭가가꾸가부시끼가이샤 제품) 및 0.2% 소듐라우릴 설페이트 수용액의 혼합물(200㎕)에서 2시간동안 37℃에서 처리한다. 생성된 혼합물을 페놀(20㎕)로 두번 추출하고, 생성된 DNA-포함 추출물을 에테르로 세척하여 페놀 용매를 제거하고 HBV DNA 용액을 수득한다. 이렇게 수득한 DNA는 2.5×106cpm/㎍의 비방사활성을 가지며, 제한 효소에 의한 분해에 이용될 수 있다.

(ii) HBV DNA의 클로닝(cloning)

상기에서 수득한 환형 이중 가닥 HBV DNA는 λ-파지샤론 16A DNA를 벡타로 이용하여 클로닝할 수있고 또다시 공지의 플라스미드 pACYC177을 벡타로 하여 하기와 같이 클로닝할 수 있다.

(A) λ-파지샤론 16A 숙주-벡타계에서의 클로닝;

10mM 트리스-HC1(pH7.4),7mM $MgCl_2$, 100mM NaCl 및 7mM 2-메르캅토에탄올의 혼합물(20㎕)에서 HBV DNA(20ng)을 37℃에서 2시간동안 엔도뉴클레아제 Xho I으로 처리한다. 생성된 혼합물을 페놀(20㎕) 및 에테르로 각각 추출하고, 수성층에 2배량의 냉각 에탄올을 가해 DNA를 침전시킨다. 혼합물을 -70℃에서 1시간동안 방치하고 10,000rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후, 침전된 DNA를 회수한다. 이렇게 분리된 침전물을 10mM 트리스-HCl(pH7.4) 및 1mM EDTA의 혼합물(5㎕)에 용해시킨다. HBV DNA 및 상기와 같은 방법으로 엔도뉴클아제 Xho I으로 계열시켜 얻은 등몰량의 μ-파지샤론 16ADNA(Xho I 인지부위를 하나 갖고 있는)를 4℃에서 18시간동안 T4 DNA 리가아제[50mM 트리스-HCl(pH7.4),10mM $MgCl_2$,10mM 디티오트레이톨,100㎍/㎖ 송아지 혈청 알부민, 0.5mM ATP 및 0.5㎕효소 제제(다카라 생체의학제품인 T4 리가아제 1~5×10^3 단위/㎖)의 화합물(10㎕)]과 반응시킨다. 반응 혼합물을 페놀 및 에테르로 추출하고, 상술한 바와 같은 방법으로 에탄올로 침전시킨다. 이렇게 얻어진 침전물을 10mM 트리스-HC1(pH7.4) 및 1mM EDTA 혼합물(10㎕)에 용해시킨다.

이렇게 어닐링된 DNA는 "효소학의 방법",**68**,299~309에 기재된 것과 같은 방법으로 시험관내 포장작업으로 처리하여 μ-파지를 형성시키고, 지시균으로서 이.콜리 DP50 SupF(참고, Blattner,F.R.et al, 사이언스 **196**,161,1977)이 플라크를 플라크 혼성 처리하고, 이로써 목적하는 복수의 파지를 분리한다.

(B) 플라스미드 pACYC177을 벡타로 사용한 재클로닝;

상기의 (A)에서 수득한 HBV DNA를 포함하는 파지로부터, 이.콜리 DP50-SupF를 감염될 대장균으로 이용하여 "효소학의 방법" **68**, 245~378, 1979에 기술된 것과 동일한 방법으로 파지 DNA를 제조한다. 이렇게 얻은 DNA를 상기한 바와 같은 조건하에서 2시간동안 제한효소 Xho I로 분해시키고, 생성된 반응 혼합물을 0.75% 아가로오스-겔로 전기 영동시켜 HBV DNA(3.2kb)를 분리시킨다. HBV DNA를 DEAE(디에틸아미노에틸 셀루로오스)페이퍼(Toyo Roshi제품, 일본국)에 흡착시켜 벡타 DNA로부터 분리시키고 이어서 1M NaCl 수용액으로 용출시켜 양말단에 Xho I 말단을 갖는 HBV DNA를 수득한다.

한편, 카나마이신 내성 유전자내에 하나의 Xho I 절단 부위를 갖는 플라스미드 pACYC177(참조.Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.; J.Bacteriol.,**134**,1141~1156(1978))를 Xho I으로 분해시키고, 상술한 것과 같은 방법으로 페놀추출, 에테르 처리 및 에탄올 침전을 실시하여 생성물을 정제한다.

위에서 수득한 Xho I 개열 pACYC177을 상기에서 수득한 Xho I-말단 HBV DNA와 1:5의 몰비율로 혼합하고, 상기한 대로 18시간동안 T4 DNA 리가아제 촉매 반응을 시켜 공유결합적 연결을 시킨다.

M.V.노르가드, 유전자,3,279(1978)에 기재된 방법으로 제조한 이.콜리 X1776[참조. R.lll.Curtis,et.al, "재조합 DNA의 분자 클로닝"eds. W.A.Scott & R.Werner, 제99면, Academic pres(1977)]0.1㎖에 위의 반응 용액(10㎕)을 가하고, 혼합물을 잘 섞은 후 0℃에서 24분간 방치한다. 이 혼합물을 암피실린(20㎍/㎖),α-비오틴(1㎍/㎖), 디아미노 피메르산(100㎍/㎖) 및 티민(20㎍/㎖)을 포함한 L-한천 평판에 도포하고 37℃에서 방새 배양한다. 생성된 군락을 카나마이신(20㎍,/㎖)을 포함한 한천 평판 및 암피실린(20㎍/㎖)을 포함한 한천 평판 모두에 도포하고, 암피실린을 포함한 한천 평판에서만 자라는 군락을 선택한다. 이렇게 선택된 군락으로부터, K.마쯔바라(J.Virol.,16,479,1975)에 기재된 방법으로 플라스미드를 제조한다. 이렇게 얻은 플라스미드, 즉 pACYC177-HBV DNA의 재조합 DNA"pHBV"라 표기한다)를 상술한 것과 동일한 조건하에서 Xho I로 처리하여 전체 HBV DNA 단편(3.2kb)을 수득한다.

(2) 셔틀 벡타 pAM82의 제조

억제성 산성 포스파타제(RAP)을 구성하는 60,000달톤의 폴리팹티드(P60) 유전자를 포함하는 약 8,000뉴클레오티드 쌍(8kb)의 EcoR I 단편(효모 S288C 유전자 은행으로부터 이용가능; 참고. Clarke, L. 및Carbon, J., 세포, **9**,91~99,1976)을 공지의 이.콜리 플라스미드 pBR322의 EcoR I 부위에 삽입시켜, 출발재료로 쓰이는 플라스미드를 수득한다.

RAP의 코딩 서열을 제거하기 위해, 출발 플라스미드를 제한 효소 Sal I으로 분해시키고 다시 T4 DNA 리가아제로 공유결합에 의해 연결시킨다. 생성된 플라스미드 pAT25는 Sal I 부위로부터 산성 포스파타제유전자 단편 5.2kb가 결핍되어 있다[상기한 플라스미드 pAT25는 암피실린 내성 유전자를 포함하는pBR322의 EcoR I 부위로 부터 Sal I 부위까지의 단편(약 3.7kb) 및 효모 산성 포스파타제 유전자

의 EcoR I 부위로부터 Sal I 부위까지의 단편(약 2.8kb)을 포함하는 플라스미드로서, 두 단편들은 각각의 대응말단에서 결합된다].

플라스미드 YRP7(참고. Struhl,K.et al, Proc.Natl.Acad.Sci. 미합중국,**76**,1035~1039,1979)을 EcoR I으로 처리하여 제조한 ars1 및 Trp1 유전자를 포함하는 EcoR I 단편(1.4kb)을 상기한 pAT25의 EcoR I 부위에 삽입시켜 플라스미드 pAT26을 수득한다. 상기한 ars1-Trp1 단편은 Trp1 유전자내에 제한효소 HindIII의 인자부위 하나를 갖고 있다.

플라스미드 pSLE1(참고, Tohe,A,et al, J.Bacterio.,**141**,413~416,1980)을 HindIII로 처리하여 제조한 Leu2 및 2μori를 포함하는 HindIII 단편을 상기한 pAT26의 HindIII 부위에 삽입시켜 셔틀 벡타 pAT77을 수득한다. 사카로미세스 세레비시아에 운반되는 pAT77 (즉, 사카로미세스 세레비사이에 AH22/pAT77)은 부다페스트 조약하에 일본국 통상 산업성 공업기술원 미생물 공업기술 연구소에 "FERM BP-324"로:1985.9.12에 한국 종균협회에 "KFCC-10171"로 기탁되어 있다.

이렇게 얻은 pAT77(1㎍)은 Sal I으로 개열되고 다시 20mM 트러스-HC1(pH8.2), 12mM $CaCl_2$ 12mM $MgCl_2$, 0.2M NaCl 및 1mM EDTA의 용액(50㎕)에서 액소뉴클레아제 BAL31(0.1U)으로 30초~1분간 처리한다, 반응 혼합물을 상기에서와 동일한 방법으로 페놀 추출 및 에탄올 침전 처리를 수행한다. 생성된 침전물을 Xho I링커(1pmol)와 혼합하고, 상기에서와 동일한 조건하에 12시간동안 T4 DNA 리가아제를 사용하여 연결시킨다.

R.III.쿠르티스, "재조합 DNA의 분자 클로닝" 중보판, W.A. 스콧트 및 R. 워너, 제99면, 아카데미 출판산(1977)에 기술된 방법으로 이.콜리 X1776을 상기의 반응용액으로 형질전환시키고, 생성된 형질전환체로부터 플라스미드 DNAs를 K.마츠바라(J.Virol.,16,479,1975)가 기술한 방법대로 조제할 수 있다. 막삼-길버트 법(참고. Maxam, A.& Gilbert, W.; Pro.Natl,Acad.Scio,74,560~564)에 따라 생성된 DNAs의 뉴클레오티드 서열을 결정하고, 나아가 BAL31으로 제거된 산성 포스파타제의 부위도 결정한다. 이 DNAs중에서 목적하는 플라스미드 pAM82를 선택하고 분리한다.

포스파타제 구조 유전자의 생성물 P60의 최초의 아미노산(메티오닌)을 코딩하는 코돈 ATG의 A를 "+1"이라 표시하고, 셔틀 벡타 pAM82내의 -33까지의 부위를 제거한다. 사카로미세스 세레비시아에에 운반되는 pAM82(즉 사카로미세스 세레비시아에 AH22/pAM82)는 부다페스트 조약하에 일본국 통상 산업상 공업기술원 미생물 공업기술 연구소에 FERM BP-313"로; 1985.9.12에 한국 종균협회에 "KFCC-10172"로기탁되어 있다.

(3) HBsAg 유전자-형질발현 플라스미드의 제조

플라스미드 pHBV를 Xho I로 처리하여 수득한 HBV DNA를 Xho I으로 개열시킨 셔틀 벡타 pAM82와 몰비율 5:I로 상기에서와 동일한 조건하에 T4 DNA 리가아제를 사용하여 제조합시킨다.

이.쿨리 X1776을 반응용액으로 형질전환시키고 생성된 암피실린 내성 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 제조한다. 제조한 DNA를 Xho I, Xba I 및 HindIII등과 같은 각종의 제한효소로 분석하여, 벡타에의 HBV DNA의 삽입 및 방향을 절정할 수 있다.

이렇게 얻어진 HBs 유전자-형질발현 플라스미드(pAH203이라 명명)는 포스파타제 프로모터 하류에 HBs 유전자 및 HBc 유전자를 순서대로 갖고 있는 HBsAg-형질발현 플라스미드이다.

(4) 형질전환된 효모의 조제

출발효모는 사카로미세스 세레비시아에AH 22[a, leu 2, his4, canl(Cir^+)]로서, 부다페스트조약하에 일본국 통상 산업성 공업기술원 미생물 공업기술 연구소에 "FERM BP-312"로; 1985. 9. 12에 한국 중균협회에 "KFCC-10170"로 기탁되어 있다. 출발효모를 2% 폴리펩톤, 1% 효모추출물 및 2% 글루코오스를 포함하는 YPD 배지(100㎖)에 접종하고, 혼합물은 30℃에서 밤새 배양한 후, 원심분리하여 세포를 회수한다. 이렇게 회수한 세포를 증류수(20㎖)로 세척하고, 1.2M 소르비톨 및 100㎍/㎖ 지몰리아제-60,000(세이가꾸고오교 가부시끼가이샤 제품, 일본국)의 용액(5㎖)에 현탁시키고, 이 현탁액을 30℃에서 30분간 방치하여 스페로플라스트를 수득한다. 이렇게 조제한 스페로플라스트를 1.2M 소르비톨 용액으로 세변세척하고, 2M 소르비톨, 10mM $CaCl_2$ 및 10mM 트리스-HCl(pH7.5)의 용액(0.6㎖)에 현탁시킨다. 이렇게 제조한 현탁액을 6㎕량으로 작은 시험관에 나누어 넣는다. 현탁액에 상기(3)에서 제조한 제조합 플라스미드 pAH203(30㎕)의 용액을 가한다. 잘 섞은 후, 0.1M $CaCl_2$(3㎕)를 최종농도가 10mM $CaCl_2$가 되도록 가하고 혼합물을 실온에서 5~10분간 방치한다. 생성된 혼합물에 20%폴리에틸렌 글리콜 4,000,10mM $CaCl_2$ 및 10mM 트러스-HCl(PH7.5)를 각 1㎖씩 가한 후, 혼합물을 실온에서 20분간 방치한다. 생성된 혼합물(각 0.2mL)을 45℃항온에 보관된 22%소르비톨, 2% 글루코오스, 0.7% 효모 질소 베이스 아미노산, 2% YPD, 20㎍/㎖ 히스티딘 및 3% 한천을 함유하는 배지(10㎖)에 가한다.

서서히 혼합한 후에, 미리 준비 1.2M 소르비톨 및 0.7%효모 질소 베이스 아미노산, 2% 글루코오스, 20㎍/㎖ 히스티딘 및 2% 한천을 포함하는 최소 배지 평판 위에 층이 되게 첨가한 후 고화시킨다. 이 평판을 30℃에서 배양하여 루이신 비요구성 효모의 군락을 얻는다. 이 군락을 히스티딘(20㎍/㎖)을 보충한 버크홀더 최소배지[참고, Tohe, A, et al; J. Bacterol.,113,727~738,1973]에서 배양하여 목적하는 형질전환된 효모 사카로미세스 세레비시아에 AH22/pAH203(1985. 9. 12자로 한국 종균협회에 KFCC-10173로 기탁됨)을 수득한다.

(5) 형질전환된 효모에 의한 HBsAg의 생산

상기(4)에서 수득한 형질전환된 효모를 히스티딘(20㎍/㎖)을 보충한 버크홀더 최소배지(10㎖)에 접종시키고 30℃에서 배양한다. 생성된 배양물을 히스티딘(20㎍/㎖)을 보충한 버크홀더 최소배지(10ℓ)에 다시 접종시키고 30℃에서 48시간 동안 진탕하면서 배양한다. 로그적 발육기에 있

는 세포를 원심분리로 수집하고, 인산을 포함하지 않는 최소배지(버크홀더 최소배지의 KH_2PO_4를 KCL로 바꾸고, 20㎍/㎖의 히스티딘을 보충하여 조제한) 10ℓ에 세포농도가 약 4×10^6 세포/㎖되도록 현탁시킨다. 30℃에서 24시간도안 배양한 후, 배양배지를 4,000rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 수득한다(약 120g).

(6) HBs 항원 정제 생산물의 제조

상기(5)의 과정을 반복하여 수득한 세포 (약 1kg)에 0.1M인산완충용액(pH7.2,5ℓ)을 가하고, 혼합물을 600~700Kg/㎠의 압력하에 만톤-가울린 파쇄기로 처리하여 세포를 파쇄한다. 파쇄된 세포를 원심분리하여 조 HBs 항원 추출물을 수득한다. 조 추출물에 10%아세트산 수용액을 적가하여 pH 5.2로 조절한다. 혼합물을 4℃에서 30분간 교반한 후, 생성된 침전물을 원심분리하여 제거한다.

수득한 상층액에 수성 암모니아를 가하여 혼합물의 pH가 6.5가 되도록 조절하고, 거기에 상기 pH를 유지하면서 황산암모늄을 서서히 가하여 최종농도가 2.5M이 되도록 한다. 30분간 방치한 후, 혼합물을 원심분리하여 HBs 항원을 포함하는 침전물을 수득한다. 수득한 침전물을 0.1M인산 완충용액(pH 7.2, 약 300㎖)에 현탁시키고, 상기와 동일한 완충용액으로 혼합물을 투석한다.

투석후, 혼합물을 3배의 0.1M인산 완충용액으로 희석시키고, 상기와 동일한 완충용액으로 평형화한 히드록시아파티트 컬럼(겔 내용량 : 약 1ℓ)을 통과시켜, 그 겔에 HBs 항원이 흡착되도록 한다. 평형화에 사용한 것과 동일한 완충용액으로 컬럼을 잘 세척한 후, 0.2M 인산칼륨 완충용액(pH 7.2 약 3ℓ)을 통과시켜 오염물질을 제거한다. 그후에 0.5M 인산칼륨 완충용액(pH 7.2 약 3ℓ)을 통과시켜 HBs항원을 용출시킨다. 0.1M인산칼륨 완충용액으로 투석한 후, 상기와 동일한 완충용액으로 미리 평형화한 히드록시아파티트 컬럼(겔 내용량:약 500㎖)을 통과시켜 HBs 항원이 겔에 흡착되도록 한다. 인산 칼륨 완충용액(약 2ℓ)을 0.2→0.5M의 농도구배를 형성시키면서 컬럼을 통과시켜 HBs 항원을 포함하는 분획을 수집한다.

이렇게 수득한 HBs 항원-함유 분획(약 1000㎖)을 0.01M 인산 완충용액으로 투석하고, 유공 섬유 한외여과(미니모듈, 아사히 케미칼사 제품, 일본국)로 100㎖가 되도록 농축시킨다.

50%가 슈크로오스 용액, 20% 슈크로오스용액 및 수득한 HBs 항원-함유 분획을 히다찌 RP-42의 초원심분리관에 세층이 되게 넣은 후, 27,000rpm, 4℃에서 16시간 동안 초원심분리하여, HBs 항원이 슈크로오스 용액 경계면 주위에 농축되도록 한다.

이렇게 정제된 HBs 항원-함유 분획을 0.14M 염화나트륨을 첨가한 0.01M 인산 완충용액으로 투석하고, 여기에 1.2g/㎖ 농도의 염화세슘을 가한다. 이 혼합물을 히다찌 RP-42 초원심분리기로 25,000rpm, 10℃에서 60시간 동안 원심분리함으로서 농축시켜 정제된 HBs항원을 수득한다. 이렇게 정제된 HBs 항원-함유 분획을 0.14M 염화나트륨을 첨가한 0.01M인산 완충용액으로 투석하고, 미니모듈(아사이 케미칼제제품)로 농축시킨다. 생성물을 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M 인산완충용액으로 다시 투석시킨 후, 여과로써 멸균시켜 정제된 HBs 항원생성물(HBs 항원 단백질 내용량:106㎍/㎖: 12㎖)을 수득한다.

SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 실시해 보면, 상기에서 수득한 정제된 HBs 항원 생성물은 하나의 소단위 단백질(분자량: 약 25,000)의 밴드를 나타낸다. 한편, 정제된 HBs 항원 생성물을, 항 재조합유래 HBs 항원-기니아 피그 항체 및 항 인체 유래 HBs 항원-기니아 피그 항체를 이용한 면역 확산법에 의거한 인체 유래 HBs 항원 표준 생산물과 비교해 보면 두 HBs 항원 정제 생성물은 동일한 항원성을 나타낸다.

[참고예 2]

재조합 포유동물 세포유래의 정제된 HBs 항원의 제조

노자키 등의 방법(참고. 일본국 특허 공개 제 36698/1984)에 따라 하기와 같이 재조합 포유동물 세포를 제조하고 배양하여 HBs 항원을 생산하고, 그 HBs 항원을 분리하고 정제한다.

(1) HBV DNA BamH I 단편의 제조

상기의 참고예 1, (1)에서 제조한 플라스미스 pHBV를 통상의 방법대로 BamH I으로 처리하고, 반응혼합물을 0.75% 아가로오스 겔로 전기영동시켜 HBV DNA의 BamH I 단편을 수득한다.

(2) 벡타(pXPIIG BamH I 단편)의 제조

셔틀 벡타 pXRIIG(하바드 대학교, 미합중국에서 이용가능)(1㎍)을 10mM 트리스-HCL(pH8.0), 7mM $MgCl_2$ 100mM NaCl 및 2mM 2-메르캅토에탄올의 혼합물(20㎕)에 가하고, 여기에 BamH I 1 단위(1단위:1시간당 1㎍의 λ-DNA을 완전하게 분해시킬 수 있는 효소의 활성)를 가하고, 혼합물을 30℃에서 1시간동안 반응시킨다. 반응 혼합물을 페놀로 추출하고, 수성층을 에테르로 추출한 후 에탄올 침전을 수행한다. 침전물을 물에 용해시킨다. 이 용액은 재조합 DNA의 제조에 이용한다.

(3) HBV DNA pXRIIG의 재조합 DNA의 제조

HBV DNA BamH I 단편(150ng) 및 pXRIIG BamH I 단편(50ng)을 포함하는 용액(50㎕)을 16℃에서 4시간동안 T4 DNA 리가아제와 반응시킨다.

이 콜리 X1776을 상기와 동일한 방법으로 상기에서 수득한 반응 혼합물을 이용하여 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체로부터, 상기의 (1),(B)에 기술된 것과, 동일한 방법으로 L-한천 평판에서 12시간동안 배양한 후 한천 배지에서 발육하는 군락을 선택하고, 선택된 군락을 테트라시클린(Tc)(10㎍/㎖)을 포함하는 한천 배지 및 암피실린 (Ap)(40㎍/㎖)을 포함하는 한천 배지에 도포한다. Tc-함유 한천 배지에서는 발육하지 못하지만 Ap-함유 배지에서는 발육하는 군락을 선택한다. 이 군락을 상술한 바와같이 이 콜리X1776의 배지 액체에 각각 배양시키고, 상기와 동일한

방법으로 플라스키드를 추출한다. 여러 제한 효소 (예, BamH Ⅰ, Xho Ⅰ, HindⅢ, Sal Ⅰ)들로 개열 형태를 분석하여, HBV DNA의 BamH Ⅰ 단편 세개 및 pXRⅡG의 한단편을 포함하는 재조합 DNA(pSHB$_3$라 명명한 상기의 재조합 DNA)을 선택한다.

(4) 생주의 LTK-세포의 형질전환

하기의 액체 A 및 B를 제조한다.

액체 A: 50mM 헤페스(즉, N-2-히드록시에틸피페라진-N-2-에탄술폰산), 280mM NaCl, 및 15mM Na_2HPO : $12H_20$를 포함하는 용액(1.25㎖, pH 7.1)

액체 B:pSHB$_3$ (50㎍), pTK(2.5㎍)(참고. Colbere-Garapin, F., Proc. Nat1. Acad. Scie. 미합중국,76,3755,1979), 연어의 정자 DNA(전달자 DNA, 50㎍) 및 2M $CaCl_2$(0.15㎖)을 함유하는 DNA 용액을 혼합물(1.1㎖)

액체 B를 교반하에 액체 A에 적가하고, 혼합물을 실온에서 30분간 방치한다. 충분히 피펫팅한 후, 혼합물(0.5㎖)을 플라스크내의 생쥐 LTK-세포 단일층(약 10^5 세포/플라스크)에 적가한다. 혼합물을 세포에 흡착되도록 하기 위해 플라스크를 실온에서 30분간 방치하고, 여기에 10%소의 혈청을 함유하는 둘베코의 변형된 이글 배지(이후엔 "DMEM"이라 표기,5㎖)를 가하고(참고, Dulbecco, R,& Freeman, G.:Virology,8,396,1959). 혼합물을 5% CO_2 하에 37℃에서 약 5시간 동안 배양시킨다. 새로운 DMEM으로 교환하고, 혼합물을 약 24시간 동안 더 배양시킨 후, 배지를 히포크산틴(15㎍/㎖), 아미노프테린(1㎍/㎖)및 티미딘(5㎍/㎖)을 함유하는 배지(이후엔 "HAT 배지"라 표기)[참고. Littlefie]d; J. Proc. Natl.Acad. Sci. 미합중국,72,3961~3965,(1963)]로 교환시킨다. 배지를 매 2~3일마다 새로운 HAT 배지로 교환하면서 계속하여 배양시킨다. 4주후에 TK^+ 세포의 군락을 수집하여 목적하는 형질 전환된 세포를 수득한다.

(5) 형질 전환된 포유동물 세포에 의한 HBs 항원의 생산

상기 (4)에서 제조한 형질전환된 생쥐 L세포를 10%소혈청, 페니실린(250 단위/㎖) 및 스트렙트마이신(0.2㎍/㎖)을 함유하는 DMEM 배지에 접종시키고, 그 혼합물을 37℃에서 1주일간 배양시킨다. HBs 항원을 함유하는 배양액의 상층액은 약 400ng/㎖의 농도이다.

(6) 형질 전환된 포유동물세포에 의해 생성된 HBs 항원의 정제

상기 (5)에서와 같은 배양을 반복하여 수득한 배양 상층액(10ℓ)을 유공섬유 한외여과(미니모둘, 아사이케미칼 제품, 일본국)시켜 1000㎖가 되도록 농축시킨다. 수성 암모니아를 가하여 pH 6.5를 유지시키면서 최종농도가 2.5M이 될때까지 용액에 황산 암모늄을 서서히 가한다. 30분간 방치한 후, 원심분리를 하여 HBs 항원-함유 침전물을 분리한다. 침전물을 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M인산 완충용액(pH 7.2)에 용해시키고, 혼합물을 상기에서 사용한 것과 동일한 완충용액으로 투석시킨다.

투석후에, 혼합물을 세파로오스 CL6B로 팩킹된 킬럼(파마시아 제품, 스웨덴)(겔 내용량=2ℓ)에 통과시켜 겔 여과 크로마토그래피를 수행한다. HBs 항원을 함유하는 분획(UV 흡수 모니터로 분석했을때 검출되는, 공극 부피에 해당하는 용출의 시초에서 얻어지는 첫째 피이크를 포함하는 분획)을 수집한다. 수집한 분획을 0.1M 인산칼륨 완충용액(pH 7.2)으로 투석하고, 상기와 동일한 완충용액으로 미리 평형화한 히드록시아파티트 컬럼(겔 내용량:약 250㎖)에 통과시켜 HBs 항원이 겔에 흡착되게 한다. 컬럼을 평형화에 사용한 동완충용액으로 세척하며, 오염물질을 제거하고, 0.5M 인산칼륨 완충용액으로 처리하여 HBs 항원을 용출시킨다. HBs 항원을 함유하는 분획(약 250㎖)을 0.01M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 투석하고, 유공섬유 한외여과를 시켜 50㎖가 되도록 농축시킨다.

50% 슈크로오스 용액, 20% 슈크로오스용액 및 상기에서 수득한 HBs 항원-함유 분획을 히다찌 RP-42 초원심 분리관에 세층으로 나누어 넣고, 27,000 rpm, 4℃에서 16시간 동안 초원심분리하여, HBs 항원이 슈크로오스 용액층의 접촉면에 농축되도록 한다.

이렇게 정제된 HBs 항원-함유 분획을 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M인 산완충용액으로 투석하고, 미니모둘(아사이 케미칼 제품)로 농축시킨다. 생성물을 여과로 멸균시켜 정제된 HBs 항원 생성물을 수득한다(HBs 항원 단백질 내용량:98㎍/㎖;14㎖)

[실시예 1]

참고예 1(HBs 항원 단백질 농도:86㎍/㎖)에 기술한 것과 동일한 방법으로, 정제된 재조합 유래 HBs 항원 생성물의 용액에 HBS 항원 단백질 중량의 8배에 해당하는 수산화 알루미늄 겔(수산화알루미늄의 질량으로 계산)을 가한다.

이 혼합물을 원심분리하고 상층액을 제거하여 HBS 항원-흡착 수산화알루미늄 겔을 수득한다.

한편, 수산화 알루미늄 겔 대신 인산 알루미늄 겔을 사용하는 것을 제외하고는 상기 과정을 반복하여 HBs 항원-흡착 인산 알루미늄 겔을 수득한다.

상기에서 수득한 각 HBs 항원-흡착 알루미늄 겔에 표 1에서 제시한 다종의 안정화제를 첨가한 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M인산 완충용액(pH6.0)을 가하여 백신 용액(HBs 항원 단백질 농도:40㎍/㎖)을 수득한다.

이 용액 1㎖ 씩을 2㎖ 바이알에 패킹하고, -50℃ 대기압하에서 6시간 동안 예비 동결건조를 시킨 후, 0.04 토르로 감압하여 5℃에서 15시간 동안 1차 동결건조시키고, 그후에 30℃, 0.04 토르의 압력하에서 8시간 동안 2차 동결건조시켜, 목적하는 동결건조된 제제를 수득한다.

실시번호 1~11의 동결건조 생성물에 생리식염용액(각 2㎖)을 가하고, 시트르산 나트륨을 더 가하여

알루미늄 겔을 완전하게 용해시킨다.

AUSRIA II(다이나보트 방사성동위원소 실험실 제품.일본국)를 이용한 방사 면역 분석시험으로 용액내의 HBS 항원을 측정하고, 데이타를 참고물(동결건조시키기 전의 생성물)과 비교한다. 상대 항원성을 표 2에 나타내었다.

[표 1]

실시번호	조성											
	수산화알루미늄 (㎍/ml)	인산알루미늄 (㎍/ml)	글루코오스 (㎍/ml)	락토오스 (㎍/ml)	만니톨 (㎍/ml)	모노소듐 ℓ-글루타메이트(㎍/ml)	아르기닌 (mg/ml)	리신 (mg/ml)	글라신 (mg/ml)	알라닌 (mg/ml)	젤라틴 (mg/ml)	염화알부민 (mg/ml)
1	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	320	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	320	0	100	0	0	2	2	0	0	0	0	0
4	320	0	100	0	0	2	2	0	0	0	0.4	0
5	320	0	0	100	0	2	2	0	0	0	0.4	0
6	320	0	0	0	100	2	2	0	0	0	0.4	0
7	320	0	0	0	100	2	2	0	0	0	0	1.0
8	320	0	0	0	100	2	0	2	0	0	0.4	0
9	320	0	0	100	0	0	0	0	10	0	0.4	0
10	320	0	0	100	0	0	0	0	0	10	0.4	0
11	0	320	0	100	0	2	2	0	0	0	0.4	0

[표 2]

실시번호	상대 항원성*
1	0.16
2	0.66
3	0.82
4	1.05
5	0.98
6	0.96
7	1.04
8	0.96
9	1.02
10	0.94
11	0.99

*) 동결 건조시키기 전의 생성물의 항원성(이 값을 1로 계산하였다)에 대한 동결 건조된 생성물의 항원성의 상대 수치.

[실시예 2]

참고예 1 에 기술한 것과 동일한 방법으로 제조한 정제된 재조합 유래 HBs 항원 생성물(HBs 항원 단백질 농도:96㎍/㎖)의 용액(120㎖)에 염화 알루미늄(60㎎)의 수용액(5㎖)을 가한다. 용액을 1N NaOH로pH 6.10이 되게 조절한다. 이 혼합물을 원심 분리하고, 상층액을 제거하여 HBs 항원-흡착 알루미늄 겔을 수득한다. 이렇게 수득한 알루미늄 겔을 락토오스(10w/v%), 모노소듐 ℓ-글루메타이트(0.4 w/v%), 아르기닌(0.4 w/v%), 젤라틴(0.08 w/v%) 및 티메로살(0.005 w/v%)을 함유하는 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M 인산완충 용액(pH 6.0,72㎖)과 혼합한다.

이렇게 수득한 백신 용액을 분할하고 각 용액(0.5㎖)을 2㎖ 바이알에 붓고, 실시예1에서와 동일한 방법으로 동결 건조 처리한다.

상기 실시예2에서 수득한 동결 건조된 백신 제제를 기니아 피그에서의 면역성원이라는 측면에서 출발 원액과 비교한다. 즉, 동결건조된 백신 제제를 증류수에 용해시키고, 그 용액을 HBsAg 0.5㎍, 1㎍ 및 2㎍의 양으로 기니아 피그의 등에 피하 주사한다. 5주 후에, 동물로 부터 채혈하고, 그것의 항 HBs 항체 량을 방사 면역 분석 시험(다이나모트사 제품: AUSAB 항 HBs 항체 측정기, 일본국)으로 측정한다. 참고물질로서, 출발원액을 접종하는 경우에도 이와같이 항체 역가를 측정한다. 결과는 표 3에 나타내었다.

[표 3]

	상대 역가*	신뢰성 한계(95%)
참고물	1.00	
동결 건조된 백신	3.78	2.15~14.21

*) 출발원액 각 접종량에서의 평균 항체가(이를 1로 계산하였다)에 대한 동결 건조된 백신 각 접종량에서의 평균 항체가의 평균 상대치.

동결 건조된 백신의 보존 안정성에 대한 실험을 하기와 같이 실시한다.

동결 건조된 백신을 항온에서 소정 기간 동안 보존한 후, 백신 시료에 시트르산 나트륨을 가하여 알루미늄 겔을 용해시키고, 그의 항원성을 방사 면역 분석 시험으로 측정한다. HBs 항원 표준 시료와 비교하여 동결 건조된 생성물의 상대치를 계산한다(즉, 인체 알부민을 정제된 인체 유래 HBs 항원 생성물에 가하여 제조한 생성물을 바이알에 소량으로 나누고, -80℃에서 동결 건조시키는 상태로 보존한다: 측정할 때에는 액화한 시료를 참고물로 사용한다)(참고물의 항체가 1로 계산한다. 각 시료의 상대치를 표4에 나타내었다(동결 건조된 시료의 값을 1로 나타내었다)

본 발명의 동결건조 생성물은 37℃에서 25주간 보관한 후에도 안정한데, 이는 액상 백신과는 현저하게 다르다(참고, 이후에 기재된 비교예).

한편, 37℃에서 25주간 보관한 시료로 이상 독성 시험을 수행했을 때, 아무런 이상 독성도 발견되지 않았다.

[표 4]

보존 온도	항원성의 변화				
	1주후	4주후	10주후	15주후	25주후
37℃	1.06	0.92	0.98	1.12	1.06
실온	0.96	0.96	1.04	1.01	1.04
4℃	1.00	0.98	1.10	1.02	0.96

[비교예 1]

실시예 2에서 사용한 것과 동일한 정제된 재조합 유래 HBs 항원 생성물(HBs 항원 단백질 농도:96㎍/㎖) 용액(50㎖)에 수산화 알루미늄 겔(29㎎)을 함유하는 현탁액(2.9㎖)을 가한다. 혼합물을 원심분리하고, 상층액을 제거하여 HBs 항원-흡착 알루미늄 겔을 수득한다. 알루미늄 겔을 티에로살(50㎍/㎖)을 함유하는 0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M 인산 완충용액(pH 6.0,60㎖)과 혼합하여 백신 용액을 제조한다. 백신용액(각 1㎖)을 2㎖ 바이알에 분할하여 액상 백신 제제를 수득한다.

실시예 2와 동일한 방법으로 백신 제제에 대한 보존 안전성 시험을 실시한다. 걸과를 표5에 나타내었다.

한편, 실시예 2에서 제조한 백신 제제를 동결건조시키지 않은 채(즉, 있는 그대로)보존 안전성 시험을 실시한다. 결과를 표6에 나타내었다.

[표 5]

보존 온도	항원성의 변화[1]				
	1주후	5주후	10주후	15주후	25주후
37℃	0.71	0.20	0.18	0.03	0.00
4℃	1.02	1.09	0.98	1.02	1.02

1) 측정방법은 실시예 2에서와 동일하다.

[표 6]

보존 온도	항원성의 변화[1]				
	1주후	5주후	10주후	15주후	25주후
37℃	0.67	0.23	0.19	0.13	0.00

1) 측정방법은 실시예 2에서와 동일하다.

[실시예 3]

참고예 2에서 기술한 바와 동일한 방법으로 제조한 정제된 재조합 유래 HBs 항원(HBS 항원 단백질 농도:105㎍/㎖) 생성물의 용액(80㎖)에 수산화 알루미늄 겔(50㎎)의 수용액(5㎖)을 가한다. 혼합물을 원심 분리하고, 상층액을 제거하여 HBs 항원-흡착 알루미늄 겔을 수득한다. 이렇게 얻어진 알루미늄 겔을 락토오스 (10 w/v%), 글리신(1 w/v%), 젤라틴(0.05 w/v%) 및 티메로살(0.05 w/v%)을 함유하는0.14M 염화나트륨-첨가 0.01M 인산 완충용액(pH 6.0,105㎖)과 혼합한다.

이렇게 수득한 백신용액을 분할하여 각 용액(1㎖)을 2㎖ 바이알에 붓고, 실시예1에 기술한 바와 동일한 방법으로 동결 건조 처리한다.

실시예 2에서와 동일한 방법으로 동결 건조된 생성물에 대해 보존 안전성 시험을 실시한다. 결과를 표7에 나타내었다.

[표 7]

보존 온도	항원성의 변화[1]				
	1주후	5주후	10주후	15주후	25주후
37℃	1.01	0.97	1.06	0.99	0.98
실온	1.04	0.95	1.05	1.00	0.98
4℃	1.04	0.92	1.11	0.97	1.01

1) 측정 방법은 실시예 2에서와 동일하다.

위에서 사용된 37℃에서 25주간 보존한 시료에 대해 이상 독성 시험을 실시했으나, 아무런 이상 독성도 발견되지 않았다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

HBs 항원의 생산이 가능한 재조합 생물체로 부터 생성된 정제된 B형 간염 비루스 표면 항원의 수용액에 알루미늄 겔 및 안정화제를 가하고, 알루미늄 겔에 B형 간염 비루스 표면 항원이 흡착되어 있는 혼합물을 최소 사용단위로 분할하고, 각 사용 단위 혼합물을 동결 건조시킴을 특징으로 하는 동결 건조된 B형 간염 백신 제제의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 동결건조 단계가 대기압하 저온에서 수신간 동안 예비 동결 건조, 감압하 고온에서 10~수십시간 동안 1차 동결 건조, 및 더 높은 온도, 더 낮은 압력하에서 수시간~열시간 동안 2차 동결 건조시키는 세단계를 포함하는 방법.