

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12N 15/00(45) 공고일자 1992년09월14일
(11) 공고번호 92-007680

(21) 출원번호	특1985-0001787	(65) 공개번호	특1985-0006549
(22) 출원일자	1985년03월19일	(43) 공개일자	1985년10월14일

(30) 우선권주장	53069 1984년03월19일 일본(JP)
(71) 출원인	자이단호오진까가꾸 오요비켓세이료오호겐꾸쇼 노나까 사네오 일본국 구마모또肯 구마모또시 시미즈마찌 오꾸보 668반찌

(72) 발명자	무라오까 도요하루 일본국 구마모또肯 구마모또시 하나조노 3쵸메 7-13 구또 가즈스케 일본국 구마모또肯 기구찌꾼 니시고시마찌스야 2695-21 시오사끼 고우이찌 일본국 구마모또Ken 구마모또시 시미즈마찌 오꾸보 668 자이단호오진까가 꾸 오요비켓세이료오호겐꾸쇼 나이 미조까미 히로시 일본국 구마모또Ken 기꾸찌꾼 고시마찌 오아자 기꾸도미 1647-151
(74) 대리인	이준구, 백락신

심사관 : 김성완 (책자공보 제2939호)**(54) 형질전환된 효모의 배양방법****요약**

내용 없음.

영세서

[발명의 명칭]

형질전환된 효모의 배양방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 형질전환된 효모의 배양방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 B형 간염비루스 유전자에 의해 재조합된 재조합 플라스미드를 이용하여 형질전환시킨 효모를 배양하는 방법 및 형질전환된 효모를 배양하여 B형 간염 비루스 표면 항원(이하에서는, “HBs항원” 또는 “HBsAg” 라 표기한다)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

B형 간염은 B형 간염 비루스(이하에서는, “HBV” 라 표기한다)에 의해 유발되는 질병으로서 면역학적 및 임상학적으로 매우 심각한 문제점들을 포함하고 있지만, 아직 효과적인 치료방법이 발견되지 않고 있다. 이질병은 전세계적으로 발견되었으며, 특히 아시아 및 아프리카 지역에서 빈번하다.

이 질병에 대항하여, 주로 예방법이 연구되어 왔다. 적절한 예방법이란 HBV에 의해 감염될 우려가 있는 사람에게 HBs 항원의 유효성분을 포함하는 백신을 공급하는 것이다. 백신은 이미 실용화 단계에 있는데, 통상 단순히 “보균자”라고 불리는 잠복지속 감염자의 혈장에서 수득한 HBs 항원을 고도로 정제하고 그 정제된 HBs 항원을 불활성화해서 사용한다.

그러나, 혈액유래 백신은 HBs 항원-양성인 사람의 혈장에서 수득하는 것이기 때문에, 제제중에 남아 있을 수 있는 B형 간염 비루스 또는 다른 혈장 유래 비루스등의 감염인자의 잔재를 부정하기 위해 침팬지에게 안전성 확인시험을 실시해야하는 등의 제조상 많은 문제점을 안고 있다.

인체혈장을 출발물질로 이용하는 대신 DNA 재조합 기술을 이용하여 제조한 형질전환된 에스캐리키아 콜리로부터 HBs 항원을 생산하는 것이 제안되었다(참고, 일본국 특허공개 제 10487/1980호).

그러나, 이 콜리를 이용하는 이 방법에 따르면, 생성된 HBs 항원이 이 콜리 세포내에서 쉽게 분해되고 더구나 이 콜리가 그 생성된 HBs 항원 때문에 자라기 힘들다. 이러한 단점 때문에 이방법은 낮은 HBs 항원 생산성을 나타내며 따라서 대량으로 HBs 항원을 생산하는 데에는 적절하지 못하다.

최근 효모를 이용하여 HBs 항원 입자를 생성하는 것에 성공한 것이 보고 되었다[참고, Nature, 298, 347(1982)]. 이논문에 발표된 방법에 따르면, 효모에 의한 인터페론 생산에도 이용되는 알코올 탈수소 효소(ADH1) 프로모터를 이용하여 HBs 단백질을 코딩하는 유전자를 이 콜리-효모 셔틀벡터내

의 상기한 ADH1 프로모터의 하류에 재조합 시킨다.

한편, 미야노하라등은 억제성 산성 포스파타제 프로모터를 이용하여, 이.콜리-효모 셔틀벡터의 억제성 산성 포스파타제 프로모터의 하류에 HBs 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합시키는 방법을 보고하였다 (참고. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 1 (1983) 및 일본국 특허공개 제 31799/1984호).

본 발명자는 효모를 이용하여 HBs 항원을 대량생산 할 수 있는 개선된 방법에 대해 중점적으로 연구하였고 특정 조건하에서 HBs 항원 생산이 가능한 형질전환된 효모를 배양함으로써 HBs 항원을 효과적으로 수득할 수 있음을 발견하였다.

본 발명의 목적은 B형 간염 바이러스 유전자에 의해 재조합된 플라스미드를 이용하여 형질전환시킨 효모를 배양하여 HBs 항원을 생산하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 상기한 형질전환된 효모를 배양하여 HBs 항원을 생산하는 방법을 제공하는 것이다. 특히, 본 발명은 특정 조건하에서 형질전환된 표모를 배양하는 방법을 제공하는 것으로서, 상기한 형질전환된 효모는 이.콜리 및 효모 모두에서 증식할 수 있는 셔틀벡터내의 억제성 산성 포스파타제 프로모터의 하류에 HBs 항원 유전자를 재조합 시키고, 이 재조합 플라스미드를 이용하여 효모를 형질전환시킴으로써 제조한다.

형질전환된 효모를 이용하여 효과적이고 안정하게 HBs 항원을 생산해내는 데에는 많은 문제점들이 있다. HBs 항원의 생산성은 배지의 종류 및 배양조건에 의해 크게 영향을 받는다. 예를들면, 효모의 증식을 위한 최적 온도 및 pH 등; 용해된 산소의 양; HBs 항원의 생산을 위한 최적 온도 및 pH 등, 또는 기타의 사항들을 배양 조건으로서 고려해야 한다. 본 발명은 상기한 여러 문제점들을 극복하고 재조합 효모를 이용하여 효율적이고 안정하게 공업적으로 HBs 항원을 생산할 수 있는 개량된 방법을 제공한다.

본 발명에서의 재조합 효모를 이용한 HBs 항원 생산방법은 플라스미드의 억제성 산성 포스파타제 프로모터의 하류에 HBV 유전자를 재조합시킨 플라스미드를 이용하여 형질전환시킨 효모를 배양하고 그로부터 HBs 항원을 생산하는 것인데, 이것은 효모 추출물, 무기 암모늄염, 무기 마그네슘염, 및 글루코오스 및 사카로오스의 단독 또는 혼합물을 포함하는 반합성배지를 형질전환된 효모의 배양배지로 함을 특징으로 한다.

플라스미드의 억제성 산성 포스파타제 프로모터 하류에 HBV 유전자를 재조합시킨 플라스미드를 이용하여 효모를 형질전환시키고 그로부터 HBs 항원을 생산하는 방법은 미야노하라등에 의해 발표되었는데(참고, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 1(1983) 및 일본국 특허 공개 제 31799/1984호), 2μ 플라스미드의 증식기점, pBR 322 플라스미드의 증식기점, 효소 염색체의 증식기점, 효모의 류우신-생성 유전자, 이.콜리의 암피실린 내성 유전자 및 효모의 억제성 산성 포스파타제 프로모터를 포함하는 셔틀 벡터내의 억제성 산성 포스파타제 프로모터 부위의 하류에 HBV 유전자를 결합시켜 셔틀 벡터를 제조하고, 그 셔틀 벡터를 효모 AH 22(a, leu 2, his 4, Can1, Cir⁺)] 또는 [AH 22 pho 80(a, leu 2, his 4, Can1, (Cir⁺)]에 도입시켜 형질전환된 효모를 제조하는 과정을 포함한다.

본 발명에 따르면, 반합성 배지에서의 형질전환된 효모의 배양은 히스티딘($20\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 합성배지(즉, 버크홀더 최소배지)에서 형질전환된 효모를 1차적으로 종 배양시키고 난 후 효모가 목적하는 HBs 항원을 생성해내는 본 배양을 시킴으로써 실시할 수 있다. 본 배양을 합성배지에서 수행하는 경우 하기의 단점들이 수반된다.

(1) 합성배지 내에서 효모가 매우 느리게 증식하며(정지기에 이르기까지 약 72시간이 소모됨) 성숙세포의 수가 매우 적다(예, 정지기에서의 세포수 : $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7 / 1\text{ml}$ 의 배양배지). 따라서 HBs 항원의 생산이 매우 적다(예, $0.2\sim 0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 배양배지).

(2) 미생물의 성장속도 및 증식량을 증가시키기 위해서는 배지의 인산량을 증가시키는 것이 효과적이다. 그러나 상기한 형질전환된 효모 AH 22의 경우에는 억제성 산성 포스파타제가 인산 존재하에서 작용하지 않으므로, 목적하는 HBs 항원을 수득할 수 없다. 따라서, 배지를 배양의 종간기에 인산을 포함하지 않는 합성배지로 교환하는 것이 필요하다. 그리고 형질전환된 효모 AH 22 pho 80의 경우에는, 포로모터가 인산존재하에서 작용할 수 있지만 HBs 항원의 생산성은 매우 낮다[참고, 미야노하라 et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 1(1983)].

본 발명에서 사용한 반합성 배지는 효모 추출물, 무기 암모늄염, 무기 마그네슘염, 및 글루코오스 및 사카로오스의 단독 또는 혼합물, 그리고 적절하게는 프롤린 및 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 에테르 같은 비이온성 계면활성제 등의 첨가물질을 함유한다. 적절한 무기 암모늄염의 예로는 황산암모늄, 염화암모늄 등을 들 수 있다. 적절한 무기 마그네슘염의 예는 황산 마그네슘, 염화 마그네슘 등이다. 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 에테르 계면활성제는 프루로닉(일본국, 아사히덴가제품)같이 현재 시판되고 있는 계면활성제를 포함한다.

반합성 재지의 조성 성분은 하기의 농도를 갖는 것이 바람직하다 : 효모 추출물, $0.3\sim 1.0\text{w/v\%}$; 암모늄염: $0.5\sim 1.0\text{w/v\%}$; 마그네슘염: $0.01\sim 0.1\text{w/v\%}$; 사카로오스 및/또는 글루코오스 : $2\sim 4\text{w/v\%}$; 프롤린 : $0.01\sim 0.1\text{mg}/\text{ml}$; 및 계면활성제 : $5\sim 50\text{ppm}$ 의 중량.

반합성 배지가 적당량의 효모 추출물을 포함하고 있기 때문에, 영양물, 인산의 존재하에서 효모가 높은 성장속도로 성장할 수 있고, 약 24시간안에 정지기에 도달하며, 그 시간에 세포의 성장량은 합성배지를 사용한 경우보다 훨씬 큰 약 1×10^8 에 다다른다. 한편 효모 추출액을 적당량으로 조절하기 때문에, 인산은 효모의 로그적 성장기에서 소모되고, 이것은 결과적으로 배지가 대체로 인산을 포함하지 않는 것과 같게 된다. 결과적으로, 형질전환된 효모 AH 22 및 AH pho 80 각각의 경우에, 억제성 산성 포스파타제 프로모터가 작용하게 되어 목적하는 HBs 항원을 다량 효과적으로 생산하게 된다. 다른 조성성분인 암모늄염, 마그네슘염 및 당류(예, 글루코오스 및/또는 사카로오스)는 형질전환된 효모의 성장 및 HBs 항원의 형질발현에 필수적으로서, 이들중 하나만 결핍되어도 미생물의

증식 및 HBs 항원의 형질발현은 현저하게 억제되고, 한편 이들 조성성분을 적당량 첨가했을 때에는 HBs 항원의 생산이 높에 띄게 촉진된다. 한편, 프롤린 및 계면활성제는 필수성분은 아니지만, 이런 성분을 첨가하면 HBs 항원의 생산성이 더 향상된다.

반합성 배니재의 효모 추출액량이 너무 많고, 인산이 지나치게 과량으로 포함되어 있으면, HBs 항원의 생산성이 감소되고, 나아가 효모 추출액속의 류우신 때문에 류우신-생성 표지물을 함유하는 재조합 플라스미드가 효모로부터 제거된다. 따라서 효모 추출액을 지나치게 과량 첨가해서는 안된다.

본 발명에서 이용한 반합성 배지에도 합성배지에 통상적으로 첨가하는 공지의 다른 영양분을 임의로 첨가 할 수 있지만, 이러한 첨가가 HBs 항원의 생산을 꼭 증가시키는 것은 아니며 오히려 때때로 효모 유전자의 다른 특성의 형질발현을 촉진시키는 계기가 되어 HBs 항원의 생산성을 감소시키게 된다.

HBs 항원을 생산해낼 수 있는 형질전환된 효모를 이용한 본 발명의 HBs 항원 생산방법은 배양조건에서도 독특한데 세포의 로그적 성장기 첫째 단계에서의 조건은 다음과 같다: 배양온도 25~30°C ; 배지의 pH 4~5.5; 용해된 산소 2~5ppm 부피 유지; 세포의 로그적 성장기의 중간 및 그 다음 단계의 조건 : 배양 온도 20~24°C; 배지의 pH 6.0~7.0; 용해된 산소량 2~5ppm 부피 유지.

상기의 최적 조건은 반복된 실험으로 확인한 것이다. 예를들면, 가장 높은 세포성장을 보이는 가장 적절한 배양온도는 27~28°C이지만, 최다량의 HBs 항원을 생성하기 위한 온도는 22~24°C 범위이다. 따라서 적절한 온도 범위는 세포의 성장 및 HBs 항원의 형질발현을 위한 온도의 중간이다. 한편, 최고의 세포 성장을 보이는 pH는 4.5~5.5이지만, 최다량의 HBs 항원 생산은 6.0~6.5 사이에서 이루어진다. 따라서 적절한 pH 범위는 세포의 성장 및 HBs 항원 특성의 형질발현을 위한 pH 사이이다.

따라서, 세포의 로그적 성장기의 첫째 단계 및 중간 및 그다음 단계의 온도와 pH를 변화시키는 것은 세포의 성장 및 HBs 항원 생산에 효과적이며 이것은 실험적으로 확인되었다. 또한 세포의 성장 및 HBs 항원 생산에 대한 용해된 산소의 최적량은 2~5ppm 부피로써 이것도 실험적으로 확인 하였다.

상기에서 설명한대로, 본 발명은 효모의 억제성 산성 포스파타제 프로모터를 함유하는 플라스미드에 HBV 유전자를 삽입시키고 그 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 효모를 효모추출물, 무기 암모늄 염, 무기 마그네슘염 및 당류(예, 글로코오스 및/또는 사카로오스)를 함유하는 반합성 배지를 이용하여 상기의 프로모터를 조절하면서 배양시킴으로써 목적하는 HBs 항원을 효과적으로 수득할 수 있게 하였다. 상기한 반합성 배지는 저렴한 가격으로 준비할 수 있고 열멸균처리에서도 안정하다. 본 발명은 이런 측면에서도 유리한다. 나아가, 형질전환된 효모의 성장 및 HBs 항원 형질발현을 위한 최적 배양조건과 반합성 배지 사용을 동시에 적용시킴으로써 목적하는 HBs 항원을 1ml의 배양배지당 0.5~0.7 μg(AUSRIA-II)를 사용한 방사면적 분석시험으로 측정)이라는 높은 생산성으로 수득할 수 있게 되었다. 따라서 본 발명의 방법은 효모의 HBs 항원 및 HBs 항원에 의한 B형 간염 백신을 공업적으로 생산하는데 매우 유용하다. 본 발명은 하기의 참고예 및 실시예로 설명되며 본 발명이 하기의 설명에 국한되는 것은 아니다.

[참고예]

미야노하라등의 방법(참고. 일본국 특허 공개 제 31799/1984호)에 따라, HBs 항원 생산이 가능한 형질전환된 효모를 제조한다.

(1) HBV DNA의 제조

(i) 바이러스 DNA의 제조

HBsAg 양성인 열사람(혈청형 adr)에게서 푸울 혈장(700ml)을 수득하고 HBeAg를 5,000rpm에서 20분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한다. 생성된 용액을 4°C, 18,000rpm에서 8시간 동안 원심분리하고, 생성된 침전물을 10mM 트리스-HCl, 0.1M NaCl 및 1mM EDTA의 완충용액(pH 7.5) 10ml에 재용해시킨다. 용액을 30% 슈크로오스를 함유하는 원심분리관의 정상부에 가하고, 4°C 39,000rpm에서 4시간 동안 원심분리한다. 생성된 침전물을 상기한 동일 완충용액에 재용해시킨다. 67mM 트리스-HCl(pH 7.5), 80mM NH₄Cl, 25mM MgCl₂, 0.5%(w/v, 이하 동일) NP 40(테르기톨, 시그마회사 제품), 0.1% 2-메르캅토 에탄올, 330 μM dCTP(데옥시시티딘 트리포스페이트), dGTP(데옥시구아노신 트리포스페이트) 및 dATP(데옥시아데노신 트리포스페이트), 0.5 μM α-[³²P]dTTP(데옥시티미딘 트리포스페이트)의 혼합물(500 μl)내에서 완충 용액을 HBV DNA 폴리머라제로 처리함으로써 반응을 시킨다. 반응 혼합물에 최종 농도가 330 μM 이 되도록 dTTP를 가하고, 혼합물을 37°C에서 3시간 동안 더 반응시키고, 반응 혼합물에 동 부피의 100mM EDTA 용액을 가한다. 상기한 DNA 폴리머라제 반응에 의해, HBV DNA의 단일가닥 부위가 전체적으로 이중가닥으로 수복되어 [³²P]표지된 물질을 얻게 된다. 이 물질을 30%, 20% 및 10%의 순서대로 슈크로오스 수용액층을 이룬 원심분리관 정상부에 가하고 4°C, 39,000rpm에서 4.5시간동안 원심분리한다.

DNA에 강하게 결합한 단백질을 분해하기 위해서, 상기에서 수득한 침전물에 대해 37°C에서 2시간 동안 1mg/ml의 프로나제 E(가��가가꾸 가부시끼가이사 제품) 및 0.2% 소듐 라우릴 살레이트 수용액의 혼합물에 의한 처리를 실시한다. 생성된 혼합물을 두 번 페놀(200 μl)로 추출하고, 생성된 DNA 함유 추출물을 에테르로 세척하고 페놀용매를 제거하여 HBV DNA 용액을 수득한다. 이렇게 수득한 DNA는 $2.5 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ 의 비방사활성을 가지며 제한 효소에 의한 분해에 사용될 수 있다.

(ii) HBV DNA의 클로닝 (Cloning)

하기와 같이 백타로써 λ-파아지 샤론 16A DNA를 이용하여 상기에서 수득한 환상 이중가닥 HBV DNA를 클로닝하고 또 한번 플라스미드 pACYC177을 이용하여 클로닝한다.

(A) λ-파아지 샤론 16A 숙주-백타계에서의 클로닝: 10mM 트리스-HCl(pH 7.4), 7mM MgCl₂, 100mM

NaCl 및 7mM 2-메르캅토 에탄올의 혼합물(20μl)내에서 HBV DNA(20ng)을 37°C에서 2시간 동안 엔도뉴클레아제 Xho I으로 처리한다. 생성된 혼합물을 폐놀(20μl)로 추출하고 나아가 에테르로 추출하고, 수성층에 2배량의 냉각 에탄올을 가하여 DNA를 침전시킨다. 혼합물을 -70°C에서 1시간 동안 보존하고 10,000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 침전된 DNA를 회수한다. 이렇게 분리한 침전물을 10mM 트리스-HCl(pH 7.4) 및 1mM EDTA의 혼합물(5μl)에 용해시킨다. HBV DNA 및 상기한 바와 동일한 방법대로 엔도뉴클레아제 Xho I에 의한 절단을 실시하여 수득한 등물량의 λ-파아지 샤론 16A DNA(하나의 Xho I인지 부위를 가짐)를 4°C에서 18시간 동안 T₄ DNA 리가아제[50mM 트리스-HCl(pH 7.4), 10mM MgCl₂, 10mM 디티오트레이톨, 100μg/ml 송아지 혈청 알부민, 0.5mM ATP 및 0.5μl 효소제제(다까라생체의학 제품인 T4 리가아제, 1~5×10¹³ 단위/ml)]에 의한 반응을 시킨다. 반응 혼합물을 폐놀 및 에테르로 추출하고 상기와 동일한 방법대로 에탄올에 의한 침전을 실시한다. 이렇게 수득한 침전물을 10mM 트리스-HCl(pH 7.4) 및 1mM EDTA의 혼합물(10μl)에 용해시킨다.

어닐링된 DNA를 “효소학의 방법”, 68, 299-309에 기재된 방법대로 시험관내 포장작업 처리하여 λ-파아지를 형성시키고, 지시균으로써, 이.콜리 DP50 SupF(참고. Blattner, F.R. et al, 사이언스 196, 161, 1977)를 이용하여 L-한천평판(23cm×23cm) 위에 더 많은 플라크(10⁴)를 형성시킨다. 이 플라크에 대해 상기에서 제조한 ³²P-표지된 HBV DNA를 이용하여 플라크 혼성 처리하고, 이로써 HBV DNA를 함유하는 파아지로부터 형성된 플라크를 선택하고, 그로부터 복수의 목적하는 파아지를 분리한다.

(B) 플라스미드 pACYC177을 벡터로 이용한 재클로닝 : 상기 (A)에서 수득한 HBV DNA 함유 파아지로부터, “표소학의 방법”, 68, 245-378, 1979에 기술되어 있는 방법대로, 이.콜리 DP50-SupF를 감염균으로 이용하여 파아지 DNA를 제조한다. 이렇게하여 수득한 DNA를 상기한 바와 동일한 조건하에서 Xho I으로 2시간 동안 분해 시키고, 생성된 반응 혼합물을 0.75% 아가로오스겔 전기영동시켜 HBV DNA(3.2kb)를 분리한다. HBV DNA를 DEAE(디에틸아미노에틸 셀루로오스)페이퍼(일본국, 토요로시 제품)에 흡착시켜 벡터 DNA로부터 분리해내고 1M NaCl 수용액으로 용출시켜 양말단에 Xho I 말단을 갖는 HBV DNA를 수득한다.

한편, 카나마이신 내성 유전자내에 Xho I 인지부위 하나를 함유하는 플라스미드 pACYC177(참고. Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.: J. Bacteriol., 134, 1141-1156, 1978)을 Xho I을 이용하여 분해시키고, 생성물을 상기에서와 동일한 방법으로 폐놀, 추출, 에테를 처리 및 에탄올 침전을 실시하여 정제한다.

Xho I으로 분해시켜 수득한 pACYC 177을 상기에서 수득한 Xho I-말단 HBV DNA와 1 : 5의 몰비율로 혼합하고, 상기한대로 18시간 동안 T4 DNA 리가아제 촉매 반응을 시켜 공유결합적으로 연결시킨다.

반응 혼합물(10μl)을 M.v. 노르가드, 유전자, 3, 279(1978)에 기재된 방법에 따라 제조한 이.콜리 X1776[참고. R. III. Curtiss, et al., “재조합 DNA의 분자 콜로닝” 증보판. W.A.Scott 및 R. Werner, 제99면, 아카데미 출판사(1977)] 0.1ml에 가하고, 혼합물을 잘 섞고 0°C에서 25분간 방치한다. 혼합물을 암피실린(20μg/ml), α-비오틴(1μg/ml), 디아미노피렐산(100μg/ml) 및 디민(20μg/ml)을 함유하는 L-한천평판에 도포하고, 37°C에서 밤새 배양한다. 생성된 군락을 카나마이신(20μg/ml)을 함유하는 한천평판 및 암피실린(20μg/ml)을 함유하는 한천평판 모두에 도포하고, 암피실린을 함유한 한천평판에서만 증식하는 군락을 선택한다. 이렇게 선택한 군락으로부터, K. 마츠바라(J. Virol., 16, 479, 1975)에 의해 설명된 방법에 따라 플라스미드를 제조한다. 이렇게 하여 수득한 플라스미드 즉, pACYC177 HBV DNA의 재조합 DNA(“pHBV”라 명명된)를 상기한 동일한 조건하에서 Xho I으로 처리하여 총 HBV DNA 단편(3.2kb)을 수득한다. 한편, 재조합 DNA를 Xho I 및 Bam HI으로 처리하면 HBsAg 유전자를 함유하는 단편(약 1.3kb)을 수득할 수 있다.

(2) 셔틀 벡터 pAM 81, pAM 82, pAM 83 및 pAM 84의 제조.

억제성 산성 포스파타제(RAP)를 구성하는 60,000달톤의 폴리펩티드(P60) 유전자를 함유하고 있는 약 8,000 뉴클레오티드쌍(8kb)의 EcoRI 단편(효모 S288C 유전자은행으로부터 이용 가능; 참고. Clarke, L 및 Carbon, J., 세포, 9, 91-99, 1976)을 이.콜리 플라스미드 pBR 322의 EcoRI 부위에 삽입시켜 출발물질로써 이용될 플라스미드를 제조한다.

RAP의 코딩서열을 제거하기 위해, 출발 플라스미드를 제한 효소 Sal I으로 분해시키고, T4 DNA 리가아제를 이용하여 다시 공유결합적으로 연결시킨다. 생성된 플라스미드 pAT 25는 Sal I부위부터 산성 포스파타제 유전자까지의 단편 5.2kb가 결핍되어 있다[상기의 플라스미드 pAT 25는 암피실린 내성 유전자를 함유하는 pBR 322의 EcoRI 부위로부터 Sal I 부위까지의 단편(약 3.7kb) 및 효모 산성 포스파타제 유전자의 EcoRI 부위로부터 Sal I 부위까지를 함유하는 단위(약 2.8kb)를 함유하고 있는데, 각 단편들은 각각의 대응하는 말단에서 연결되어 있다.]

상기한 pAT 25의 EcoRI 부위에, 플라스미드 YRP 7(참고. Struhl, K et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 76, 1035-1039, 1979)을 EcoRI로 처리하여 제조한 ars 1 및 Trp 1 유전자를 함유하는 EcoRI 단편(1.4kb)을 삽입하여 플라스미드 pAT 26을 수득한다. 상기한 ars 1-Trp 1 단편은 Trp 1 유전자내에 제한효소 Hind III의 인지부위 하나를 포함한다.

상기한 pAT 26의 Hind III부위에, 플라스미드 pSLE 1 (참고. Tohe, A. et al. J. Bacteriol., 141, 413-416 1980)을 Hind III로 처리하여 제조한 Leu 2 및 2μ ori를 함유하는 Hind III 단편을 삽입하여 셔틀벡터 pAT 77을 제조한다. 사카로미세스 세레비시아에에 운반된 pAT 77(즉 사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAT 77)는 부다페스트 조약하에 일본국 통상 산업성 공업기술원 미생물 공업기술 연구소에 “FERM BP-324”로서 기탁되어 있다.

이렇게 수득한 pAT 77(1μg)을 Sal I으로 전달시킨 후, 20mM 트리스-HCl(pH 8.2), 12mM CaCl₂, 12mM MgCl₂, 0.2M NaCl 및 1mM EDTA의 용액(50μl)내에서 엑소뉴클레아제 BAL 31(0.1U)으로 30초-1분간 처리한다. 상기와 동일한 방법으로 반응 혼합물에 대해 폐놀 추출 및 에탄올 침전을 실시한다.

생성된 침전물을 *Xho* I 링커(1pmol)와 혼합하고 상기에서와 동일한 조건하에 12시간 동안 T4 DNA 리가아제를 이용하여 연결시킨다.

이. 콜리 *X1776*을 암피실린 내성 형질전환체로 형질전환시키기 위해 R.III. 쿠르티스 등, “재조합 DNA의 분자를로닝” 증보관. W.A. 스코트 및 R. 위너, 제99면, 아카데미 출판사(1977)에 설명되어 있는 방법대로 이. 콜리 *X1776*을 상기의 반응 혼합물로 처리한다. 생성된 형질전환체로부터, K. 마츠바라(*J. Virol.*, 16, 479, 1975)에 의해 설명된 방법에 따라 플라스미드 DNAs를 제조한다. 막삼-길버트 법(참고. Maxam, A. Gilbert, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 560-564)에 따라 생성된 DNAs의 뉴클레오티드 서열을 결정하고, BAL 31에 의해 제거된 산성 포스파타제 유전자의 영역을 결정한다. 이들 DNAs 중에서, 포스파타제의 모든 구조적 유전자가 결핍되어 있는 목적하는 플라스미드 pAM 81, pAM 82, pAM 83 및 pAM 84를 선택하고 분리한다.

포스파타제 구조식 유전자의 생성을 P60의 첫째 아미노산(메티오닌)을 코딩하는 코돈 ATG의 “A”를 “+1”로 표기하고, 이들 셔틀 벡터의 하기 영역을 제거한다. pAM 81: +2까지, pAM 82: -33까지, pAM 83: -50까지, 및 pAM 84: -51까지. 사카로미세스 세레비시아에 운반된 pAM 81, pAM 82, pAM 83 및 pAM 84(즉, 각각 사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAM 84는 부다페스트 조약과 일본국, 통상 산업성 공업 기술원 미생물 공업기술 연구소에 각각 “FERM BP-325”, “FERM BP-313”, “FERM BP-327” 및 “FERM BP-326”으로 기록되어 있다.

(3) HBsAg 유전자 형질발현 플라스미드의 제조

(i) 전체 HBV DNA를 삽입한 플라스미드의 제조

플라스미드 pHBV(pACYC 177-HBV DNA)를 *Xho* I으로 처리하여 수득한 HBV DNA를 *Xho* I 절단된 셔틀 벡터 pAM 81, pAM 82, pAM 83 및, pAM 84와 몰비율 5 : 1로 혼합하고 상기에서와 동일한 조건하에 T4 DNA 리가아제를 이용하여 재조합시킨다.

이. 콜리 *X1776*을 반응 혼합물에 의한 형질전환 시키고 생성된 암피실린 내성 형질전환체로부터 상기에서 설명한 방법에 따라 플라스미드 DNA를 제조한다. 이렇게 하여 수득한 DNAs를 *Xho* I, *Xba* I 및 *Hind* III등의 여러 제한효소로 분석하고, 그로부터 벡터에의 HBV DNA의 삽입 및 그 방향을 결정한다.

이렇게 하여 수득한 HBsAg 유전자 형질발현 플라스미드는 포스파타제 프로모터 하류에 HBs 유전자 및 HBC 유전자를 순서대로 포함하고 있고, 셔틀 벡터 pAM 81, pAM 82, pAM 83 및 pAM 84에 의해 재조합된 플라스미드는 각각 pAH 201, pAH 203, pAH 205 및 pAH 207로 명명하였다.

(ii) HBsAg 유전자 단편이 삽입된 플라스미드의 제조

플라스미드 pHBV를 *Bam* HI에 의해 절단하여 제조한 HBsAg 유전자 단편(3μg)을 200μM αATP, αCTP, αTTP 및 αGTP를 함유하는 67mM 트리스-HCl(pH 8.6), 6.7mM MgCl₂, 10mM 2-메르캅토에탄올, 6.7μM EDTA 및 16.7mM(NH₄)₂SO₄의 용액(100μl)내에서 30분간 T4 DNA 폴리머라제(0.2U) 처리를 실시하여 *Bam* HI 절단 말단을 메꾼다. 반응 혼합물에 대해 상기한 대로 추출 및 에탄올 침전을 실시한다. 생성된 침전물을 *Xho* I 링커와 1 : 10의 몰비율로 섞고 이전에 설명한 것과 동일한 조건하에 T4 DNA 리가아제를 이용하여 연결 반응을 시킨다. 페놀 추출 및 에탄올 침전후, 생성된 플라스미드에 대해 *Xho* I 처리를 실시하여 양말단에 *Xho* I 절단 말단을 갖는 HBsAg 유전자 단편(약 1.3kb)을 수득한다. 이렇게 하여 수득한 단편을 *Xho* I에 의해 절단된 셔틀 벡터 pAM 82와 5 : 1의 몰비율로 섞고 T4 DNA 리가아제를 이용하여 어닐링시키고, 이 반응 혼합물을 이용하여 상기 (1)에 기술한 동일한 방법으로 이. 콜리 *X1776*을 형질전환시켜 플라스미드 DNA를 수득한다.

이렇게 하여 수득한 플라스미드내 벡터 pAM 82의 포스파타제 프로모터의 하류에 올바른 방향으로 HBsAg를 삽입시키고, 이 플라스미드를 pAS 101이라 명명한다.

(4) 형질전환된 효모의 제조

부다페스트 조약하에 일본국 통상 산업성 공업기술 연구소에 “FERM BP-312”로서 기록되어 있는 사카로미세스 세레비시아에 AH 22[a, leu2, his4, can1, (Cirp⁺)]를 출발 효모로 사용한다. 출발 효모를 2% 폴리펩톤, 1% 효모 추출물 및 2% 글루코오스를 함유하는 YPD 배지(100ml)에 접종하고, 그 혼합물을 30°C에서 밤새 배양한 후, 원심분리하여 세포를 수집한다. 수집한 세포를 멸균수(200ml)로 세척하고, 1.2M 소르비톨 및 100μg/ml 지모리아제-60,000(일본국, 생화학 공업 제품)의 용액(5ml)에 혼탁시키고, 혼탁액을 30°C에서 30분간 방치하여 스페로플라스틱을 수득한다. 제조한 스페로플라스틱을 1.2M 소르비톨 용액을 사용하여 세 번 세척하고, 2M 소르비톨, 10mM CaCl₂ 및 10mM 트리스-HCl(pH 7.5)의 용액 (0.6ml)에 혼탁시킨다. 이렇게 제조한 혼탁액을 분할하여 작은 시험관에 60μl를 뜯는다. 혼탁액에 상기(3)에서 제조한 재조합 플라스미드 pAH203용액(30μl)을 가한다. 잘 섞은 후, 0.1M CaCl₂ (3μl)를 최종 농도 10mM CaCl₂가 되도록 가하고, 그 혼합물을 실온에서 5~10분간 방치한다. 생성된 혼합물에 20% 폴리에틸렌글리콜 4,000, 10mM CaCl₂ 및 10mM 트리스-HCl(pH 7.5)의 용액 1ml씩을 가하고, 실온에서 약 20분간 방치한다. 생성된 혼합물(각 0.2ml)을 22% 소르비톨, 2% 글루코오스, 0.7% 효모 절소 베이스 아미노산, 2% YPD, 20μg/ml 히스티딘 및 3% 한천을 함유하는 배지(10ml)에 가하고, 항온 45°C에서 보존한다. 천천히 섞은 후, 혼합물을 미리 준비한 1.2M 소르비톨 및 0.7% 효모 절소 베이스 아미노산, 2% 글루코오스, 20μg/ml 히스티딘 및 2% 한천을 함유하는 최소 배지의 평판위에 한층을 이루도록 도포하고 고화시킨다. 평판을 30°C에서 배양하여 류우신-비요구성 효모의 군락을 수득한다. 군락을 히스티딘(20μg/ml)을 보충한 버크홀더 최소 배지[참고. Tohe, A. et al; *J. Bacteriol.*, 113, 727-738, 1973]에서 배양시켜 목적하는 형질전환된 효모: 사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAH 203을 수득한다.

재조합 플라스미드, PAS101, pAh201 및 pAH205를 재조합 pAH203 대신 이용하는 것만 제외하고 상기에 기술한 것과 동일한 방법으로 하기의 형질전환된 효모를 제조한다.

사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAs 101

사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAH 201

사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAH 205

사카로미세스 세레비시아에 AH 22 대신 사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 88[a leu2 his4

Can1(Cir⁺)] (부다페스트 조약하에 일본국, 통상 산업성 공업기술원 미생물 공업기술연구소에 “FERM BP-509”로서 기탁되어 있다)를 이용하는 것만을 제외하고 상기한 방법을 그대로 반복하여 하기의 형질전환된 효모를 수득한다.

사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 80/pAS 101

사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 80/pAH 201

사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 80/pAH 203

사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 80/pAH 205

[실시예 1]

상기 참고예에서 수득한 형질전환된 효모 사카로미세스 세레비시아에 AH 22/pAH 203을 히스티딘(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 보충한 버크홀더 최소 배지(10ml)를 함유하고 있는 시험관 몇 개에 접종시키고 30°C에서 48시간동안 배양한다. 세 개의 시험관내의 배양물(각 10ml)을 합하고, 효모 추출액(0.5w/v%), 사카로오스(4w/v%), 황산 암모늄(0.5w/v%), 및 황산 마그네슘(0.05w/v%)를 함유하는 수용액(3l)을 121°C에서 15분간 오토클레이브 하여 제조한 배지에 혼합한다. 혼합물을 하기의 조건하에 5l짜리 단지 발효기내에서 배양한다: 온도, 22°C; pH 6.2~6.5(조정) ; 교반속도, 300rpm; 용해된 산소, 3ppm(용해된 산소용 미터로 측정, 공기 취입을 조절함으로써 조정한다)에서 3시간 동안. 상기 배양에 의해, 효모는 배양 배지 1ml당 5.8×10^7 세포(코울터 키운터[®]로 측정)로 증식한다.

상기에서 수득한 배양배지(10ml)를 원심분리하여 세포를 수집하고 유리구슬 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄해서 HBs 항원을 추출한다. 인체 혈장 유래 BBs 항원의 정제된 표준품을 참고물로 하는 AUSRIA-II(일본국, 다이아보트사 제품)를 이용하여 방사면역분석 시험법에 의한 HBs 항원 내용량을 측정한다. 결과는, 배양배지 1ML당 0.16 μg 의 HBs 항원이 포함된 것으로 나타났다.

[실시예 2]

상기 참고예에서 수득한 형질전환된 효모 사카로미세스 세레비시아에 AH 22 pho 80/pAS 101을 히스티딘(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 보충한 버크홀더 최소 배지(10ml)를 함유하고 있는 시험관 수십개에 접종하고 30°C에서 48시간 배양한다.

세 개의 시험관 내의 배양물(각 10ml)을 합한다. 효모 추출액(0.5w/v%), 사카로오스(4w/v%), 황산 암모늄(0.5w/v%), 및 황산 마그네슘(0.05w/v%)를 함유하는 멸균배지(3l)를 포함하고 있는 단지 발효기 5개에 그 혼합물을 가한다. 이 혼합물을 제1표에 나나tan 것과 같은 다양한 조건하에서 배양한다.

이렇게 하여 수득한 배양물에 대해 실시예 1에서와 동일한 방법으로 성숙 세포의 수 및 생성된 HBs 항원의 양을 측정한다. 결과를 제1표에 나타내었다.

[표 1]

실험 번호	배양 조건 ¹⁾						분석데이터 ³⁾	
	첨가물		배양온도(°C)		배양배지의 pH		세포 수 (세포/ml)	HBs 항원 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	프로토리 (mg/ml)	세정제 ²⁾ (ppm)	배양 시간	배양 시간	0~12시간	12~24시간		
1	0	0	22	22	6.2~6.5	6.2~6.5	5.5×10^7	0.25
2	0	0	27	27	4.7~5.0	4.7~5.0	1.1×10^8	0.28
3	0	0	27	22	4.7~5.0	6.2~6.5	8.7×10^7	0.52
4	0.04	10	22	22	6.2~6.5	6.2~6.5	5.8×10^7	0.43
5	0.04	10	27	22	4.7~5.0	6.2~6.5	8.9×10^7	0.68

1) 통상의 조건: 교반속도, 300rpm : 총 배양시간, 24시간 ; 용해된 산소 : 3ppm.

2) 프루로닉 L 61(아사이엔카 가부시끼가이사 제품)

3) 실시예 1에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

효모의 억제성 산성 포스파타제 프로모터를 운반하는 플라스미드에 B형 간염 비루스 유전자를 삽입하여 제조한 재조합 플라스미드에 의해 형질전환된 효모를 배양하고 그럼으로써 HBs 항원을 제조하는 방법에 있어서, 효모 추출물, 무기암모늄염, 무기 마그네슘염 및 글루코오스와 사카로오스의 하나 또는 둘다를 함유하는 반합성 배지에서 형질전환된 효모를 배양함을 특징으로 하는 개량방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 무기 암모늄염이 황산 암모늄 및 염화 암모늄염에서 선택된 것이고, 무기 마그네슘이 황산 마그네슘 및 염화 마그네슘에서 선택된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 반합성 배지가 프롤린 및 비이온성 세정제를 더 함유하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 비이온성 세정제가 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 에테르인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 반합성 배지가 0.3~1.0w/v%의 효모 추출물, 2~4w/v%의 사카로오스, 0.5~1.0w/v%의 황산 암모늄, 0.01~0.1w/v%의 황산 마그네슘 0.01~0.1mg/ml의 프롤린 및 5~50ppm의 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 에테르를 함유하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 세포의 로그적 성장기에 있어 각 단계가 세포의 로그적 성장기의 첫째단계에는: 배양온도 25~30°C; 배지의 pH 4~5.5; 용해된 산소는 2~5ppm의 부피유지; 및 세포의 로그적 성장기의 중간기 및 그 다음 단계에는: 배양온도 20~24°C; 배지의 pH 6.0~7.0 범위내; 및 용해된 산소는 2~5 ppm 부피범위를 유지하는 조건을 갖는 상태하에서 배양을 수행하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포의 로그적 성장기의 첫째단계의 조건이 배양온도 27~28°C; 배지의 pH 4.5~5.5; 용해된 산소가 2~5ppm 부피를 유지하는 것이고; 세포의 로그적 성장기의 중간기 및 그 다음 단계의 조건이 배양온도 22~24°C; 배지의 pH 6.0~6.5; 및 용해된 산소가 2~5ppm 부피범위를 유지하는 것인 방법.