



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월19일
 (11) 등록번호 10-1443064
 (24) 등록일자 2014년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 5/02 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *A61K 9/113* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-7007019
 (22) 출원일자(국제) 2009년08월28일
 심사청구일자 2012년08월24일
 (85) 번역문제출일자 2011년03월25일
 (65) 공개번호 10-2011-0049887
 (43) 공개일자 2011년05월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2009/006825
 (87) 국제공개번호 WO 2010/023551
 국제공개일자 2010년03월04일
 (30) 우선권주장
 61/190,486 2008년08월28일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 US05460949 A*
 World Journal of Microbiology &
 Biotechnology. 2003, Vol.19, pp.605-608*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 노파르티스 아게
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
 (72) 발명자
 브로에커, 미하엘
 독일, 마르부르크 35041, 파펠베그 30
 (74) 대리인
 송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **과-생산 효모 유래 스쿠알렌의 제조**

(57) 요약

정제된 효모를 제조하는 방법이 개시되는데, 여기에서 스쿠알렌 소스는 스쿠알렌을 과-생산하는 효모이다. 스쿠알렌은 약학적 목적으로 유용하다. 예를 들면, 그것은 수중유 에멀전을 제조하는데 이용될 수 있고, 에멀전은 특히 면역학적 아주번트로 사용하는데 적당하다.

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하고, 동물-유래 생산물이 없는 통제된 배지에서 성장하는 효모로부터 스쿠알렌을 정제하는 단계; 및 (b) (a)단계의 정제된 스쿠알렌과 수성 성분을 결합하여 수중유 에멀전 아유번트를 형성하는 단계를 포함하는, 수중유 에멀전 아유번트를 제조하는 방법.

청구항 2

(a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하고, 동물-유래 생산물이 없는 통제된 배지에서 성장하는 효모로부터 정제된 스쿠알렌을 얻는 단계; 및 (b) (a)단계에서 정제된 스쿠알렌과 수성 성분을 결합하여 수중유 에멀전 아유번트를 형성하는 단계를 포함하는, 수중유 에멀전 아유번트를 제조하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 5% 이상의 세포 건조 중량에서 스쿠알렌을 생산하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 *에스. 세레비시아(S.cerevisiae)*와 같은 *사카로미세스(Saccharomyces)*인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 시토졸 위치를 가지는 절단형(truncated) HMGR 효소를 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 변형되지 않은 모균주에 대해 HMGR을 과-발현하는 변형된 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 변형되지 않은 모균주에 대해 지모스테롤-24-메틸트랜스퍼라제 및 에르고스타-5,7,24(28)-트리엔놀-22-디하이드로겐아제 중 하나 이상을 저-발현하는 변형된 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 돌연변이 옥시도스쿠알렌 시클라제를 발현하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 분해된 스쿠알렌 에폭시디아제를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 배양하는 동안 스쿠알렌 수율을 증가시키는 인자의 존재 하에 성장시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 인자는 알릴아민, 보리코나졸, 6-아미노-2-n-펜틸티오벤조티아졸, 티아민, 또는 티오키바메이트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효모는 스쿠알렌 정제 전에, 부분 또는 전체 혐기성 조건 하에 성장시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 스쿠알렌은 순도가 97 중량% 보다 큰 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 수중유 에멀전은 마이크론 이하 직경의 유적을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전은 미세 유체화된(microfluidised) 에멀전인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 수중유 에멀전은 스쿠알렌 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항의 방법으로 수중유 에멀전 아주번트를 제조하고, 에멀전 아주번트와 면역원을 혼합하는 단계를 포함하는, 인간에게 비경구적으로 사용하기 위한 백신을 제조하는 방법.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항의 방법으로 수중유 에멀전을 제조하고, 첫 번째 용기에 상기 에멀전을 포장하고, 첫 번째 용기를 면역원을 함유하는 두 번째 용기와 함께 키트 형태로 결합하는 것을 포함하는, 면역원성 조성물 제조용 키트를 제조하는 방법.

청구항 19

제 17 항의 방법을 사용하여 제조된 백신을 인간을 제외한 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 포유동물에서 면역반응을 유발하는 방법.

청구항 20

제 18 항의 키트를 사용하여 제조된 백신을 인간을 제외한 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 포유동물에서 면역반응을 유발하는 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

명세서

기술분야

(관련출원)

[0001]

본 출원은 미합중국 가출원 제61/190,468호의 우선권의 이익을 주장하고, 상기 출원의 모든 내용은 본원에 참조로서 통합된다.

[0002]

(기술분야)

[0003]

[0004] 본 발명은 예를 들면 수중유 에멀전에서 이용하기 위한 스쿠알렌 제조의 기술분야이다.

배경 기술

[0005] 상어 간 오일은 스쿠알렌이라는 분지된, 불포화 테르페노이드, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔을 함유한다. 스쿠알렌은 인간 백신에서 수중유 에멀전에서 이용하는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면 MF59 에멀전은 인플루엔자 백신 아쥬번트로 사용된다. 스쿠알렌은 또한 다른 약학적인 제품 (예: 연고, 좌약) 및 화장품에 이용된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 스쿠알렌의 통상적인 소스는 주로 생선 오일, 및 특히 상어 간 오일이다. 특히 엄격한 제조 기준(노바티스에서 MF59 제조 중에 사용되는 것과 같은)을 준수하지 않았다면 상어 간 오일로부터 추출된 스쿠알렌의 사용과 관련하여 문제가 될 수 있다. 예를 들면, 상어는 인간에게도 감염성이 있는 병원체에 감염될 수 있고, TSE 또는 TSE-유사 상어 매개체가 존재할 수 있다(예: 참고문헌 1-3). 더욱이 상어는 카르카톡신과 같은 인간 독소를 함유할 수 있다. 그래서 싸고 낮은 등급의 스쿠알렌 소스는 인간을 위한 약학적인 사용에는 적당하지 않다. 스쿠알렌이 면역학적 아쥬번트의 일부인 상황에서 인간 수용체에게 피해 위험이 높아지게 될 수 있는데, 왜냐하면, 정의상, 아쥬번트는 불순물에 대하여 원하지 않는 강한 면역반응을 유발할 수 있기 때문이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상어에서 유래한 값싼 저등급 스쿠알렌 소스를 사용하기보다는, 따라서, 스쿠알렌의 약학적 사용(e.g. MF59의 제조에 사용되는 것처럼)은 상등급 재료를 사용하는데, 하지만 이러한 상등급 스쿠알렌은 비싸고 이용성이 제한된다. 이러한 비싼 소스는, 예를 들면 개발도상국에서는, 유용하지 않다.

발명의 효과

[0008] 가격이 그렇게 비싸지 않으면서 이들 높은 약학적인 기준을 충족시키는 스쿠알렌 소스를 찾는 것은 유용할 것이다. 특히 스쿠알렌이 인간에게 비 경구적 사용 및/또는 면역학적 아쥬번트로 사용될 목적일 때, 스쿠알렌의 가능한 대안 소스가 따라서 요망된다. 약학적 등급의 스쿠알렌의 값싼 소스는 특히 상어에 접근을 시도할 수 없고 예를 들면 노바티스가 현재 사용하는 비싼 약학적 등급의 재료를 쉽게 제공할 수 없는 개발도상국에서 특히 유용할 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 스쿠알렌을 과-생산하는 효모로부터 스쿠알렌을 제조하는 방법과 관련이 있다. 효모는 GRAS(일반적으로 안전한) 생물체여서, 약학적으로 이용하기 위한 유용한 스쿠알렌 소스이다. 게다가, 스쿠알렌은 병원체, 프리온 및 환경 독소에 의한 오염없이 제조될 수 있는데, 예를 들면, 효모는 선천적으로 수은이 없다. 백신 분야에서 효모는 이미 이용되고 있으며(예: B형 간염 바이러스 표면 항원의 재조합 발현을 위해 이용), 어떤 특정한 조절 염려가 없으므로, 즉 효모 유래 스쿠알렌은 특히 면역학적 아쥬번트 제조에 사용되기에 적당하다. 최종적으로 효모 배양 기술은 널리 퍼져 있고 기술이전이 용이하다.

[0010] 그래서 본 발명은 (a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모를 성장시키는 단계; 및 (b) (a) 단계에서 성장한 효모로부터 스쿠알렌을 정제하는 단계를 포함하는 순수 스쿠알렌을 제조하는 방법을 제공한다. 정제된 스쿠알렌은 약품, 식품, 식품첨가물, 화장품 등의 제조에서 성분으로 이용될 수 있다.

[0011] 본 발명은 또한 (a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모로부터 정제된 스쿠알렌을 얻는 단계; 및 (b) (a)단계의 스쿠알렌과 비-스쿠알렌 성분을 결합하여 스쿠알렌-함유 제품을 형성하는 단계를 포함하는 스쿠알렌-함유 제품을 제조하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 정제된 스쿠알렌의 생산을 위하여 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모의 이용을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 (a) 효모가 고수율의 스쿠알렌을 생산하도록 하는 조건하에 효모 배양물을 성장시키는 단계; (b) 스쿠알렌이 중량으로 순도 97%이상 이도록 배양된 효모로부터 스쿠알렌을 정제하는 단계를 포함하는 정제된 스

쿠알렌을 제조하는 방법을 제공한다.

- [0014] 본 발명은 또한 (a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모로부터 스쿠알렌을 정제하는 단계; 및 (b) (a)단계에서 정제된 스쿠알렌과 수성 성분을 결합하여 수중유 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는 수중유 에멀전을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0015] 그래서 본 발명은 (a) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모로부터 정제된 스쿠알렌을 얻는 단계; 및 (b) (a)단계에서 정제된 스쿠알렌과 수성 성분을 결합하여 수중유 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는 수중유 에멀전을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 기술된 것과 같은 수중유 에멀전을 제조하고, 에멀전과 면역원을 혼합하는 것을 포함하는 면역원성 조성물(예: 백신)을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 기술된 것과 같은 수중유 에멀전을 제조하고, 첫 번째 용기에 에멀전을 포장하고, 첫 번째 용기를 면역원을 함유하는 두 번째 용기와 함께 키트 형태로 결합하는 것을 포함하는, 이러한 방식으로 면역원성 조성물 제조를 위한 키트를 제조하는 방법을 제공한다. 면역원은 건성 또는 수성 형태일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 또한 이러한 방법으로 제조된 면역원성 조성물을 동물에 투여하는 것을 포함하는 동물(예: 포유동물)에서 면역 반응을 유발하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 포유동물에서 면역 반응을 일으키는 약제의 제조에 사용하기 위한 스쿠알렌을 제공하는데, 여기에서 스쿠알렌은 (i) 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모로부터 정제되고 (ii) 수성 성분과 결합하여 수중유 에멀전을 형성하여 약제에 포함시킨다.
- [0020] 본 발명은 (a) 효모가 고수율의 스쿠알렌을 생산하도록 하는 조건 하에 효모 배양물을 성장시키는 단계; (b) 배양된 효모로부터 스쿠알렌을 정제하는 단계; 및 (c) (b)단계에서 정제된 스쿠알렌을 수성 성분을 결합하여 수중유 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는 수중유 에멀전을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 스쿠알렌을 이용하는 방법에서, 배양하는 동안 고수율의 스쿠알렌을 생산하는 효모로부터 정제된 스쿠알렌을 사용하는 것으로 구성된 개선책을 제공한다.
- [0022] **효모에서 스쿠알렌 생산**
- [0023] 본 발명은 효모로부터 정제된 스쿠알렌을 이용한다. 효모는 자연발생 또는 돌연변이 균주일 수 있는데 이것들은 높은 스쿠알렌 수율에 대해 선택되며, 그것들은 일반적으로 고수율로 스쿠알렌을 생산하기 위하여 조정된 유전적으로 조작된 균주일 것이다. 다른 가능성은 증가된 스쿠알렌 수율을 가져오는 인자의 존재하에 자연적, 돌연변이 또는 조작된 효모 균주를 배양하는 것이다.
- [0024] 스쿠알렌의 수율은 특정 효모에서 % 세포 건조 중량(cdw)으로 표시될 수 있다. 보통 효모 야생형 *야로우리아 리폴리티카*(*Yarrowia lipolytica*) 균주는 전형적으로 약 0.5 % cdw 로 스쿠알렌을 생산하고, 반면에 보통 *사카로미세스 우바룸*(*Saccharomyces uvarum*) 양조 효모는 약 1.4 % cdw 로 스쿠알렌을 생산할 수 있다[4]. "고수율"의 스쿠알렌을 생산하는 효모는 적어도 2 % cdw 이상인 것 중에 하나이다. 예를 들면 ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 , ≥ 7 , ≥ 8 , ≥ 9 , ≥ 10 , ≥ 11 , ≥ 12 , ≥ 13 , ≥ 14 , ≥ 15 또는 그 이상의 % cdw 가 스쿠알렌인 것이다.
- [0025] 스쿠알렌 수율은 또한 특정 효모에서 전체 지질의 %로써 표현될 수 있다. 보통 *에스.우바룸*(*S. uvarum*) 양조 효모는 전체 지질의 33%로 스쿠알렌을 생산한다[4]. "고수율"의 스쿠알렌을 생산하는 효모는 전체 지질의 $\geq 40\%$ 예를 들면 $\geq 50\%$, $\geq 60\%$ 등으로 스쿠알렌을 생산할 수 있다.
- [0026] 스쿠알렌은 그것의 트랜스-구조(자연적 이소형)로 적어도 95% 예를 들면 $>96\%$, $>97\%$, $>98\%$, $>99\%$, 또는 100%가 유리하다.
- [0027] 고수율의 스쿠알렌을 가지는 자연 발생 돌연변이 효모 균주는 기술분야에서 알려져 있는데, 예를들면 참고문헌 5에 기술된 *토루라소프라 델브루키*(*Torulaspora delbrueckii*) 균주이다. 돌연변이체는, 예를 들면 참고문헌 6 및 7 에 기술된 것과 같은 돌연변이(무작위 또는 작위 돌연변이 모두)를 유발하고, 뒤이어 적당하게 높은 스쿠알렌 수율을 갖는 것들에 대해 돌연변이된 세포를 스크리닝하는 잘 알려진 방법에 의해 얻을 수 있다. 참고문헌 8은 적절한 온도에서 성장할 때 스쿠알렌 축적을 야기하는 4- α -카복시스테롤-C3-디하이드로젠아제 (ERG26)의 온도 민감성 돌연변이를 가진 돌연변이체 효모 균주를 기술한다.
- [0028] 보통, 본 발명은 유전적으로 조작된 효모를 사용할 것이다. 시작 균주의 스쿠알렌 수율을 증가시키는데 다양한

방법이 이용될 수 있다. 스테롤 대사를 조정하여, 예를 들면, 스쿠알렌 동화작용을 증가시키므로써, 및/또는 스쿠알렌 이화작용 감소시키므로써(그것의 분해 및/또는 그것의 에르고스테롤로의 자연적인 변환을 포함함) 스쿠알렌 수율을 증가시킬 수 있다. 스쿠알렌 생합성에 관여하는 유전자는 메발로네이트 키나아제, 포스포메발로네이트 키나아제, 피로포스포메발로네이트 디카르복실아제, 이소펜테닐 피로포스페이트 아이소머라아제, HMGR(3-히드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리덕타아제), 및 스쿠알렌 신타아제를 포함한다. 스쿠알렌을 에르고스테롤로 변환하는데 관여하는 유전자는 스쿠알렌 에폭시다아제(ERG1), 라노스테롤 신타아제, C14-디메틸아제, d14-리덕타아제, C4-메틸옥시다아제, C4-디카르복실아제(EGR26), 3-케토리덕타아제, C24-메틸트랜스퍼라제, C8-아이소머라아제, C5-디세쉴라아제, d22-디세쉴라아제 및 d24-리덕타아제를 포함한다. 다른 이화작용 효소는 LEU2(β -이소프로필말레이트 디하이드로겐아제), 옥시도스쿠알렌 시클라제, 지모스테롤-24-메틸트랜스퍼라제 및 에르고스타-5,7,24(28)-트리에놀-22-디하이드로겐아제를 포함한다. 이러한 조작은 예를 들어서 참고문헌 9에 개시되어 있다

[0029] 관련 효소들에 대한 활성 수준은 어떤 적절한 방법, 보통 유전공학에 의해 증가 또는 감소될 수 있다. 효모는 참고문헌 7 및 10에 기재된 것들을 포함하는 기본적인 방법에 의해 유전적으로 조작될 수 있다. 유전자는 플라스미드 안, 또는 염색체 통합에 의한 것 등 다양한 방법으로 효모에 도입될 수 있다. 유전자 녹아웃 기술은 또한 효모에 대해 잘 구축되어있다.

[0030] 효소활성을 증가시키는 방법은, 예를 들어서 보통 플라스미드에 하나 이상의 유전자를 부가하여 균주에 이미 존재하는 효소의 복제수를 증가시키는 것; 예를 들어서 강력한 프로모터를 제공함으로써 이미 존재하는 효소의 발현 수준을 증가(과-발현)시키는 것; 이중 효소 즉 균주에 이미 존재하지 않는 것을 부가하는 것; 저해 또는 억제 인자의 발현을 감소 또는 방지하는 것; 예를 들어서 안정성을 강화하거나, 저해를 시행하는 아미노산 잔기를 제거하거나, 단백질 트래피킹 또는 세포 위치를 변화하도록 균주에 이미 존재하는 효소의 시퀀스를 변형; 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 효소 시퀀스 절단은 막 단백질로부터 시토졸 단백질로 변화시킬 수 있고 이는 스쿠알렌 축적을 야기한다는 것이 잘 알려져 있다.

[0031] 효소활성을 감소시키는 방법은, 균주에 이미 존재하는 효소의 결실; 예를 들어서 약한 프로모터를 제공함으로써 이미 존재하는 효소의 발현 수준을 감소시키는 것; 저해 또는 억제 인자의 발현을 증가시키는 것; 예를 들어서 안정성을 감소시키거나 효소 활성을 중재하는 아미노산 잔기를 변형시키거나, 기능성 도메인을 결실시키거나, 단백질 트래피킹 또는 세포 위치를 변화시키기 위해 균주에 이미 존재하는 효소의 시퀀스를 변형시키는 것; 등을 포함한다.

[0032] 저- 또는 과- 발현의 수준, 및 증가 또는 감소된 활성의 수준은 관련 변형이 결여된 대응하는 야생형 균주에 관하여 표현된다.

[0033] 이미 효모에서 적당한 유전적 조작에 관한 여러 보고가 있다. 예를 들면, 참고문헌 11은 지모스테롤-24-메틸트랜스퍼라제 및/또는 에르고스타-5,7,24(28)-트리에놀-22-디하이드로겐아제의 감소된 발현과 함께 HMGR의 과-발현으로 인하여 스쿠알렌 축적이 증가된 효모가 개시되어있다. 참고문헌 12는 절단형 HMGR(HMG1 이소효소)을 발현하는 효모를 개시하는데, 이는 막-결합 지역이 결여되어 시토졸 효소를 제공하고, 스쿠알렌 축적을 보인다. 스쿠알렌 에폭시다아제의 분해는 스쿠알렌의 축적을 야기한다[13]. 참고문헌 14는 아세틸-CoA 카르복실아제를 저해하고 HMGR을 과-발현하는 *야로위아 리포피티카*(*Yarrowia lipolytica*)의 변형을 개시하는데, 이런 균주는 유장 또는 사탕수수 같이 비싸지 않은 탄소 소스를 사용하여 스쿠알렌 2 % cdw 를 생산했다. 옥시도스쿠알렌 시클라제(EGR7)의 돌연변이는 또한 스쿠알렌 축적을 야기할 수 있다[8]. 콜레스테롤의 첨가 없이는 3-케토스테롤에서 성장할 수 없는 에르고스테롤 옥스트로프가 스쿠알렌을 축적하는 것으로 발견되었다[15]. 헵 합성 장애가 있는 효모 균주는 스쿠알렌을 축적할 수 있다[16].

[0034] 이들 접근의 조합은, 예를 들어서 스쿠알렌 에폭시다아제의 녹아웃과 조합한 시토졸 절단형 HMGR의 발현이 이용될 수 있다.

[0035] 참고문헌 12에 기술된 것과 같은, 절단형 HMGR을 발현하는 *에스.세레비시아*(*S.cerevisiae*) 균주가 바람직하다. 이상적으로 구성 프로모터(예: ADHI 프로모터)의 조절하에, HMG1의 가용성 비-막-결합 형태의 발현은 높은 수준의 스쿠알렌 축적(40x 야생형)을 야기한다. 상기 절단형 단백질은 스페이서 지역 일부 및 HMG1p의 C-말단 촉매 도메인을 포함할 수 있는데, 그러나 N-말단 막-스패닝 지역이 결여되어있다. 균주는 하나 이상의 유전자 복제를 발현할 수 있다.

[0036] 효모(자연형, 돌연변이 또는 조작된)는 스쿠알렌의 수율을 증가시키는 인자의 존재하에 성장할 수 있다. 예를 들면, 알릴아민 안티미코티스(예: 테르비나핀, 나프티핀)은 스쿠알렌 에폭시다아제를 저해할 수 있고 에르고스

테를 결핍 및 세포내 스쿠알렌 축적을 야기한다[17]. 만약 스쿠알렌 에폭시디아제 저해제가 치사량 이하로 포함되거나, 또는 내성 균주 등과 함께 이용된다면, 배양의 스쿠알렌 수율은 증가될 수 있다. 테르비나핀 존재 하에 스쿠알렌 수율이 ~100배 증가함이 참고문헌 18에 개시되어있다. 다른 칸디다(*Candida*) 종의 스쿠알렌 에폭시디아제는 약 10의 인자에 의해 테르비나핀에 대한 민감성이 다르고, 인자의 농도는 관심있는 어떤 효모에 대해 최적이어야 할 수도 있다. 스쿠알렌 축적을 야기할 수 있는 다른 안티미코티스는 보리코나졸[19], 6-아미노-2-n-펜틸티오벤조티아졸[20], 및 티오카바메이트 안티미코티스(예: 톨나프테이트 및 톨시클레이트)[21]를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 티아민 존재 하의 성장은 또한 스쿠알렌 수율을 증가시킬 수 있다[22].

[0037] 적당한 효모는 스쿠알렌을 생산하거나 또는 스쿠알렌을 생산하도록 조작될 수 있는 어떤 효모도 포함한다. 적당한 효모의 예로는 *아르스로아커스(Arthroascus)*, *아르시오지마(Arxiozyma)*, *아르술라(Arxula)*, *부레라(Bullera)*, *칸디다(Candida)*, *디바리오미세스(Debaryomyces)*, *데케라(Dekkera)*, *디포다스코프시스(Dipodascopsis)*, *엔도미세스(Endomyces)*, *에레모테시움(Eremothecium)*, *지오텐리쿰(Geotrichum)*, *한세니아스포라(Hanseniaspora)*, *한세놀라(Hansenula)*, *호르모아스커스(Hormoascus)*, *이삭켄키아(Issatchenkia)*, *크로엠키펜(Kloeckera)*, *클루이베로미세스(Kluyveromyces)*, *리포미세스(Lipomyces)*, *로더로미세스(Lodderomyces)*, *메츠키니코위아(Metschnikowia)*, *파키소렌(Pachysolen)*, *파키티초스포라(Pachytrichospora)*, *피키아(Pichia)*, *로도스코리디움(Rhodospiridium)*, *로도토룰라(Rhodotorula)*, *사카로미세스(Saccharomyces)*, *사카로미코데스(Saccharomycodes)*, *스키조블라스토스포리온(Schizoblastosporion)*, *스키조사카로미세스(Schizosaccharomyces)*, *스콰니오미세스(Schwaniomyces)*, *스포로보로미세스(Sporobolomyces)*, *스테리그마토미세스(Sterigmatomyces)*, *심포디오미세스(Sympodiomyces)*, *타프리나(Taphrina)*, *토룰라(Torula)*, *토룰라스포라(Torulaspora)*, *토룰로프시스(Torulopsis)*, *트리초스포론(Trichosporon)*, *야로위아(Yarrowia)*, *지고한세놀라(Zygothansenula)*, 및 *지고사카로미세스(Zygosaccharomyces)* 속의 종을 포함한다. 본 발명을 위한 유용한 속은 *사카로미세스(Saccharomyces)*, 및 *토룰라스포라(Torulaspora)*이다. 본 발명에서 이용되기 위한 바람직한 종은 *토룰라스포라 델브루키(Torulaspora delbrueckii)*이고, 가장 바람직한 것은 *사카로미세스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae)*이다.

[0038] 스쿠알렌을 생산하는 효모 발효는 대규모로 이행할 수 있어서, 스쿠알렌을 거의 무제한적으로 제공하고, 생산된 스쿠알렌의 단가를 감소시킬 수 있다. 효모는 어떤 알려진 배양물 또는 발효 시스템을 이용하여 성장시킬 수 있다. 본 발명에서 이용하기 위한 적당한 효모 발효 시스템은 배치식 및 연속식 발효 시스템을 포함한다. 2 단계 배양 시스템이 이용될 수 있다. 효모는 스쿠알렌 생산을 증가시키는 혐기성 단계(적어도 부분적으로)로 바뀌기 전에 생물질을 증가시키는 호기적 단계 하에서 성장시킬 수 있다. 2 단계 배양 시스템은 성장 단계로부터 스쿠알렌 축적을 분리하는 것을 허용한다. 혐기성 조건 하에서 효모의 배양은 스쿠알렌 생산을 증가시키는데 이용될 수 있고[23-25], 탄소 소스 또한 영향을 미칠 수 있다.

[0039] 효모는 통제된 배지에서 성장할 수 있기 때문에, 배양물은 분명히 질병유발 매개체, 환경 독소 및 다른 오염원을 확실히 배제할 수 있다. 효모 성장에 적당한 배지는 효모 종 및 발효 시스템에 의존할 것이다. 적당한 배지는 보충제가 있거나 없는 대량 또는 미소 배지를 포함한다. 예를 들면, 효모는 MM, EMM, YPD, YPDS, YPG, YPGS, YT, YAPD, YEPD, YPL, YEP, YNBD 및 SD 에서 성장시킬 수 있다. 어떤 동물 유래 생산물(예: 유청)이 없는 배지가 이상적이다. 만약 동물(및 특히 소) 재료가 세포의 배양 중에 사용된다면, 전염성 해면양뇌증(TSEs) 특히 소 해면양뇌증(BSE)이 없는 소스로부터 얻어져야 한다.

[0040] 배양 조건의 조절로 인해, 본 발명에 따른 효모로부터 정제된 스쿠알렌은 병원체, 병원체의 대사 산물, 독소 및 다른 유해 물질에 의한 오염이 배제되고, TSE-유발 매개체(이러한 매개체는 효모에서 발견되지 않는다)가 없는 것으로 추정된다. 효모로부터 스쿠알렌을 분리하는 방법은 당해 기술분야에 알려져 있고, 크로마토그래피, 액체-액체 용제 추출, 서브크리티칼 가스 추출[26], 및 예를 들면, CO₂를 사용하는 슈퍼크리티칼 플루이드 추출(선택적으로 동결 건조가 선행된), 클로로포름-메탄올 용제 추출[5,23,27]과 같은 방법을 포함한다. 이상적으로, 정제된 스쿠알렌은 순도 97%(중량으로)보다 크고, 좀 더 바람직하게는, 순도98%, 99%, 99.5%, 99.9%, 99.99%보다 크고, 심지어 순도 100%이다. 이상적으로, 정제된 스쿠알렌은 독성 등가량(TEQ)로써 측정된, 스쿠알렌의 그램당 6153pg 미만의 PCB/다이옥신을 포함한다. TEQ는 PCB/다이옥신 혼합물의 독성을 단일 숫자로서 표현되게 한다. 각 PCB(폴리클로리네이티드 비페닐)의 독성은 2,3,7,8-TCDD 다이옥신(기준값 1을 가진다) 독성의 분율(독성 등가 인자, TEF;WHO 2005)로서 표현된다. 혼합물의 전체 TEQ를 계산하기 위하여, 각 PCB의 질량은 그것의 TEF로 곱하고, 그때 TEQ는 이들 값의 합이다. 예를 들면, 스쿠알렌은 5000 pg/g, 4000 pg/g, 3000 pg/g, 2000 pg/g, 1000 pg/g, 500 pg/g, 100 pg/g, 50 pg/g (TEQ) 보다 적은 다이옥신/PCB 수준을 가질 수 있다.

- [0041] 상기 효모로부터 스쿠알렌이 정제되면, 예를 들면 약제, 수중유 에멀전 아쥬번트 등의 후속 제품의 제조에 이용될 수 있다.
- [0042] **수중유 에멀전**
- [0043] 수중유 에멀전은 특히 백신 아쥬번팅에 사용하는데 적당한 것으로 발견되었다. 본 발명에 따라 제조된 에멀전은 수성 성분에 더하여 스쿠알렌 및 적어도 하나의 계면활성제를 포함한다. 에멀전은 추가적인 오일을 포함할 수 있다. 이상적으로, 상기 오일 및 계면활성제는 생분해성(대사작용성) 및 생체적합성이다.
- [0044] 스쿠알렌 및 토크페롤의 오일 조합이 이용될 수 있다. 조성물은 토크페롤을 포함하는데, α , β , γ , δ , ϵ 또는 ζ 토크페롤 중 어느 하나가 이용될 수 있고, α -토크페롤이 바람직하다. 토크페롤은 여러가지 형태, 예를 들면 다른 염 및/또는 이성질체를 취할 수 있다. 염은 숙시네이트, 아세테이트, 니코티네이트 등과 같은 유기 염을 포함한다. D- α -토크페롤 및 DL- α -토크페롤은 둘 다 이용될 수 있다. 바람직한 α -토크페롤은 DL- α -토크페롤이다.
- [0045] 2-20%(부피로) 범위의 오일 함량이 전형적이다.
- [0046] 상기 에멀전에서 유적은 일반적으로 직경이 5 μ m보다 작고, 마이크론 이하 직경의 유적을 가질 수 있고, 이들 작은 크기는 편리하게 미세 유체화기(microfluidiser)를 통해 달성되어 안정한 에멀전을 제공한다. 200nm보다 작은 크기의 방울이 필터 멸균을 할 수 있기 때문에 바람직하다.
- [0047] 계면활성제는 이들의 'HLB' (hydrophile/lipophile balance)에 의해 분류될 수 있다. 본 발명의 바람직한 계면활성제는 적어도 10, 바람직하게는 적어도 15, 보다 바람직하게는 적어도 16의 HLB를 갖는다. 본 발명은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(일반적으로 Tweens 라고 불림), 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 선형 EO/PO 블록 코폴리머와 같은 상표명 DOWFAX™으로 판매되는 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌 옥사이드(PO), 및/또는 부틸렌 옥사이드(BO)의 코폴리머; 옥토시놀, 이는 에톡시(옥시-1,2-에탄다일)그룹의 수가 다양할 수 있고, 옥토시놀-9 (트리톤 X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올)가 특별한 관심이 있으며; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL CA-630/NP-40); 포스파티딜콜린(레시틴)과 같은 포스포리피드; Tergitol™ NP 시리즈와 같은 노닐페놀 에톡실레이트; 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (Brij 30)과 같은 라우릴, 세틸 및 오레일 알코올(Brij 계면활성제로 알려진)로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 패티 에테르; 및 소르비탄 트리올레이트 (Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트와 같은 소르비탄 에스테르 (일반적으로 SPANs로 알려짐) 를 포함하는 계면활성제가 이용될 수 있다. 비-이온 계면활성제가 바람직하다. 상기 에멀전에 포함시키기 위해 가장 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 80 (폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트; Tween 80)이다.
- [0048] 계면활성제의 혼합물, 예를 들면 Tween 80/Span 85 혼합물이 이용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및 옥토시놀의 조합은 또한 적당하다. 다른 유용한 조합은 라우레스 9, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥토시놀을 포함한다.
- [0049] 계면활성제의 바람직한 양(중량%)은: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(Tween 80과 같은) 0.01 내지 2%; 옥틸-또는 노닐페녹시 폴리에톡시에탄올(Triton X-100, 또는 다른 Triton 시리즈 세척제와 같은) 0.001 내지 0.1 %; 폴리옥시에틸렌 에테르(라우레스 9와 같은) 0.01 내지 20 % 이다.
- [0050] 폴리소르베이트 80 계면활성제를 함유하는 스쿠알렌-함유 수중유 에멀전이 바람직하다. 특정 수중유 에멀전 아쥬번트는 본 발명에서 포함하는 다음에 따라 정제된 스쿠알렌을 이용하여 만들 수 있으나 이에 제한되지는 않는다:
- [0051] ● 스쿠알렌, 폴리소르베이트 80, 및 소르비탄 트리올레이트의 서브마이크론 에멀전. 상기 에멀전의 조성물은 부피로 약 5% 스쿠알렌, 약 0.5% 폴리소르베이트 80 및 약 0.5% Span 85가 될 수 있다. 중량으로, 이들 비율은 4.3% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80 및 0.48% Span 85가 된다. 이 아쥬번트는 'MF59' 로 알려져 있고[28-30], 참고문헌 31의 챕터10 및 참고문헌 32의 챕터 12에 보다 자세히 기술되어있다. 상기 MF59 에멀전은 유리하게 시트레이트 이온, 예를 들면 10mM 소듐 시트레이트 버퍼를 포함한다.
- [0052] ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 폴리소르베이트 80의 서브마이크론 에멀전. 이들 에멀전은 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 토크페롤 및 0.3 내지 3% 폴리소르베이트 80을 가질 수 있고, 스쿠알렌의 중량비로: 토크페롤은 바람직하게는 ≤ 1 (예: 0.90) 이고 이는 더 안정한 에멀전을 제공할 수 있다. 스쿠알렌 및 폴리소르베이트 80은 부피비로 약 5:2 또는 중량비로 약 11:5로 존재할 수 있다. 이러한 에멀전 중 하나는 2% 용액을 만들기 위해 PBS에서 Tween 80을 분해하고, 혼합물을 미세 유체화함으로써 만들어질 수 있다. 상기 결과 에멀전은 예를 들면 평

균 직경 100 내지 250nm 사이, 바람직하게는 약 180nm의 유적을 가진다. 상기 에멀전은 또한 3-디-0-아실레이티드 모노포스포릴 리피드 A (3d-MPL)을 포함할 수 있다. 이 타입의 다른 유용한 에멀전은, 사람 당 투여량, 0.5-10 mg 스쿠알렌, 0.5-11 mg 토크페롤, 및 0.1-4 mg 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다[33].

[0053] ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 Triton 세척제 (예: Triton X-100)의 에멀전이다. 상기 에멀전은 또한 3d-MPL(아래 참조)을 포함할 수 있다. 상기 에멀전은 포스메이트 버퍼를 포함할 수 있다.

[0054] ● 에멀전은 스쿠알렌, 수성 용제, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 하이드로필릭 비이온 계면활성제(예: 폴리옥시 에틸렌 (12) 세토스테아릴 에테르) 및 하이드로포빅 비이온 계면활성제 (예: 소르비탄 모노올레이트 또는 'Span80' 과 같은 소르비탄 에스테르 또는 만니드 에스테르)를 포함하는 에멀전. 상기 에멀전은 바람직하게는 열가역성이고 및/또는 200 nm보다 작은 크기의 유적으로 적어도 90% (부피로)를 가진다[34]. 상기 에멀전은 또한 알디톨; 항냉동제 (예: 도데실말토사이드 및/또는 수크로오스와 같은 설탕); 및/또는 알킬폴리글리코시드 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 에멀전은 TLR4 작용제를 포함할 수 있다[35]. 이러한 에멀전은 동결건조 될 수 있다.

[0055] ● 스쿠알렌, 폴록사머 105 및 Abil-Care의 에멀전이다[36]. 아쥬번트 백신에서 이들 성물의 최종농도(중량)는 5% 스쿠알렌, 4% 폴록사머 105(플루로닉 폴리올) 및 2% Abil-Care 85 (비스-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 디메티콘; 카프틸릭/카프릭 트리글리세라이드)이다.

[0056] 상기 에멀전은 운반자, 또는 백신 제조시에 임시적으로 분리 항원-함유 성분과 혼합될 수 있다. 여기에서 이들 두 성분은 액체이고 혼합을 위한 두 액체의 부피비는 다양할 수 있지만(예: 3:1 과 1:5 사이) 일반적으로는 약 1:1 이다. 그래서 본 발명의 방법은 에멀전과 면역원을 결합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 방법은 상기 에멀전 또는 상기 에멀전/면역원 혼합물을 포장하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 에멀전은 키트 안의 첫 번째 용기에서 포장될 수 있고, 여기에서 상기 키트는 면역원을 포함하는 두 번째 용기를 포함한다. 상기 두 용기의 내용물은 혼합될 수 있고, 대상물(예: 인간)에게 투여될 수 있고 또는 각각 공동 투여될 수 있다.

[0057] **일반**

[0058] 용어 "포함"은 "구성"의 의미를 포함한다. 예를 들면 X를 "포함"하는 조성물은 X만으로 구성된 것일 수도 있고 또는 X+Y처럼 어떤 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0059] 수치값 x 와 관련한 "약"이란 용어는 예를 들면 x+10% 처럼 임의적 및 수단적이다.

[0060] **본 발명의 실시를 위한 방식**

[0061] 다양한 돌연변이 효모 균주가 유전 공학 기술에 의해 제조될 수 있다. 상기 돌연변이 균주는 과-발현 또는 저-발현 효소 둘 중 하나로 스쿠알렌 대사에 수반된다. 이러한 효모 중 하나는 참고문헌 11에 기재된 ATC1551 균주로, 이는 적당한 성장 조건하에 16 % cdw 이상의 스쿠알렌을 생산할 수 있다. 배양 후에, 배양된 세포는 글라스 비드 밀을 사용하여 모으고 분해한다. 스쿠알렌은 (2:1) 클로로포름-메탄을 용제 추출;또는, 수율 향상을 위한, 참고문헌 5에 기재된 동결건조법 및 그 후 슈퍼크리티칼 카본 다이옥사이드 추출 중 하나에 의한 용해물로부터 정제된다. 결과물 스쿠알렌은 순도가 매우 높다(≥95%).

[0062] 정제된 스쿠알렌은 Tween 80 및 Span 85 계면활성제의 혼합물과 결합되고, 시트레이트 버퍼와 결합하여 (부피로) 5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80 및 0.5% Span 85의 혼합물을 제조한다. 이 혼합물은 미세 유체화되어 평균 방울 크기가 500nm보다 적은 것으로 된 에멀전을 제조한다. 'MF59' 로 알려진 이 에멀전은 백신 아쥬번트로 이용될 수 있다.

[0063] 본 발명은 오직 실시예의 방법에 의해 기술되었고, 본 발명의 범위와 사상 안에서 변형이 만들어질 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0064] **참고문헌**

[0065] [1] Borucinska & Frasca (2002) J Fish Diseases 25:287-98. [2] Bertone et al. (1996) J Fish Diseases 19:429-34.

[0066] [3] Briones et al (1998) J Vet Med B 45:443-5.

[0067] [4] Blagovic et al. (2001) Food technol Biotechnol. 39:175-81.

[0068] [5] Bhattacharjee et al (2003) World Journal of Micorbiology and Biotechnology, 19: 605-608.

- [0069] [6] Boeke et al., (1984) *Mol. Gen. Genet.*, 197:345-346
- [0070] [7] Sherman et al., (1986) *Methods and 효모 Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- [0071] [8] Germann et al. (2005) *J Biol Chem* 280:35904-13.
- [0072] [9] Veen et al. (2003) *FEMS 효모 Research* 4:87-95.
- [0073] [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor
- [0074] [11] US patent 5460949.
- [0075] [12] Polakowski et al. (1998) *Appl Microbiol Biotechnol* 49(1):66-71.
- [0076] [13] Pasrija et al. (2005) *J Antimicrob Chemother.* 55(6):905-13.
- [0077] [14] Performance of the Third 50 Completed ATP Projects (2006) NIST SP 950-4, pages 59-62.
- [0078] [15] Gachotte et al (1999) *PNAS USA* 96:12655-60.
- [0079] [16] Ness et al. (1998) *J Bacteriol.* 180(7):1913-9.
- [0080] [17] Ryder et al. (1985) *Biochem J.* 230:765-770
- [0081] [18] Leber et al. (2001) *European Journal of Biochemistry* 268:914-924.
- [0082] [19] Sanati et al (1997) *Antimicrob Agents Chemother.* 41(11):2492-6.
- [0083] [20] Kuchta et al (1997) *FEMS Microbiol Lett* 150:43-7.
- [0084] [21] Ryder et al. (1986) *Antimicrob Agents Chemother* 20:858-60.
- [0085] [22] Nishikawa et al (1978) *Biochim Biophys Acta* 531(1): 86-95.
- [0086] [23] Bhattacharjee et al, (2001) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 811-816
- [0087] [24] Jahnke & Klein (1983) *J Bacteriol* 155:488-92.
- [0088] [25] Valero et al. (2001) *J Bioscience Bioengin* 92:33-8.
- [0089] [26] W094/26683.
- [0090] [27] Foch et al., (1957) *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- [0091] [28] W090/14837.
- [0092] [29] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [0093] [30] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [0094] [31] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0095] [32] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [0096] [33] W02008/043774.
- [0097] [34] US-2007/0014805.
- [0098] [35] US-2007/0191314.
- [0099] [36] SuLi et al. (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.