

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12P 21/02

(45) 공고일자 1999년06월01일

(11) 등록번호 10-0190777

(24) 등록일자 1999년01월21일

(21) 출원번호	10-1990-0011693	(65) 공개번호	특1991-0004811
(22) 출원일자	1990년07월31일	(43) 공개일자	1991년03월29일
(30) 우선권주장	39255506 1989년08월02일 독일(DE)		
(73) 특허권자	베링베르케 악티엔 게젤샤프트	필립 슈타인, 헤리베르트 부그	
	독일연방공화국 데-3550 마브르크 1 포스토파치 1140		
(72) 발명자	마티아스그로테		
	독일연방공화국데3550마르부르크글라덴버허베크65		
(74) 대리인	이병호, 최달용		

심사관 : 이처영

(54) 리포코르틴을 에스케리키아 콜라이내에서 제조하기 위한 최적의 발효방법

요약

90년 9월 1일자 이전 출원 건

명세서

[발명의 명칭]

리포코르틴을 에스케리키아 콜라이내에서 제조하기 위한 최적의 발효방법

[도면의 간단한 설명]

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 lac 프로모터 또는 tac, trc와 같은 개선된 lac 프로모터를 사용하여 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)내에서 이종 단백질을 제조하기 위한 최적 발효방법에 관한 것이다. 초기 성장기에는 글루코스를 탄소원으로 사용하여 성장시킨 후에 (1) 글루코스를 제한하면서 이소프로필 티오갈락토시드(IPTG)에 의하여 또는 (2) 락토스에 의하여 또는 (3) 락토스를 제한하면서 IPTG와 락토스에 의하여 생성물의 형성을 유도시킨다. 글루코스 또는 락토스는 산소 분압이 10% 이상이 되도록 제한한다.

이.콜라이내에서 다수의 상이한 재조합 단백질을 시판량으로 제조하는 방법은 대체로 잘 알려져있다. 암호화 cDNA를 적절한 서열을 지닌 다중카피 플라스미드에 클로닝시킴으로써 이러한 단백질을 발현시키는 것이 가능하게 되었다.

이에 대한 발현 실험은 일반적으로 진탕 플라스크에서 수행된다. 이와 같은 경우에 있어서 재조합 단백질의 수율은 100ml 미만의 용적으로 진탕 플라스크에서 배양하는 경우 보통 50 내지 100mg/l이다.

비록 이러한 기술을 이용하여 재조합 단백질을 성공적으로 제조할 수 있기는 하지만, 단백질 농도 및 제조량을 현저히 증가시키는 기술이 요구된다. 이러한 요건을 만족시키는 하나의 방안은 발효 방법을 개발하는 것이다. 결론적으로 본 발명의 목적은 이종 단백질을 이.콜라이내에서 발현시키기 위한 발효 방법을 최적화하는 것이다.

적어도 부분적으로는 전술한 요건을 만족시키는 몇몇 방법이 문헌에 기술되어 있다. 그러한 경우에서 lac 프로모터의 사용은 통상적으로 N-말단에 β-갈락토시다제 부분(β-Gal)이 달린 융합 단백질이 제조됨을 의미한다. 발효시의 수율은 보통 당 0.1 내지 2.0g의 융합 단백질이다. 융합된 β-Gal 부분을 감안하면 실질적인 단백질 농도는 종종 전술한 값의 30%까지 감소한다. 더욱이, 생성물로부터 β-Gal 부분을 제거하기 위해서는 정교한 정제 방법이 요구된다.

본 발명은 특히 성숙한 생성물을 발현시키는 방법, 즉, 계속해서 다시 제거하여야 될 융합 부분이 없는 생성물을 발현시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에 의하여 생성물은 비교적 간단하게 정제된다. 그러나, 발효시 생성물의 특이적 수율 및 용적 수율 모두는 일반적으로 현저히 떨어진다. 제조 과정에서 생성물이 가용성이고 생물학적으로 완전히 활성인 형태로 제조되는 경우에 특히 이러한 현상이 뚜렷하게 나타난다. 불활성이고 봉입체로서 축적되는 단백질의 형성과는 달리, 가용성이고 생물학적으로 활성인 생성물은 세포의 대사에 개입될 수 있고 유기체(이.콜라이)를 현저히 교란시킬 수 있으며 이.콜라이 프로테아제에 의하여 훨씬 더 용이하게 분해될 수 있다. 이러한 문제점에도 불구하고, 글루코스를 탄소원으로 사용하고 이소프로필 티오갈락토시드(IPTG)를 유도용으로 사용해온 현재까지의 방법으로도 생물학적으로 완전히 활성인 생성물을 200mg/l의 수율로 수득할 수 있었다.

발효를 최적화하기 위하여, 본 발명은 성장 양상과 생성물 형성을 개선시켰다. 생성물이 세포내에서 형성되므로, 특정 생성물의 농도(세포당 생성물의 양)와 세포수가 중요하다. 두 요소의 산물이 제조 방법

의 용적 생산율(g/l)이다.

고 밀도 세포 발효가 제조할 이.콜라이 균주에 대하여 문헌에 자주 기술되어 왔다. 이와 관련하여 건조량(DM) 30g/l 이하의 세포 밀도가 보통 언급된다. 대체로 알려져 있는 몇몇 방법을 조합함으로써, 재조합 이.콜라이 K12 균주를 A₆₅₀이 150에 해당하는 DM 50g/l의 세포 밀도로 발효시키는 방법을 개발할 수 있게 되었다. 본원에서의 필수적인 관점은 주입 공기의 산소-공부성이 후술되는 방법의 조건이 아니라는 점에 있다. 이러한 점은, 기질로서 순수한 산소를 사용시 비용이 많이 들고 부수적으로는 폭발-방지 수단없이도 사용할 수 있으므로, 방법의 경제적 측면에서 볼때 유리한 효과가 있다.

고 용적 생성물을 수득하는 방법에 있어 중요한 인자는 프로모터의 최적 유도이다. 전술한 바와 같이 저 밀도 세포로 수행하는 IPTG를 사용한 유도는 다수의 문헌에 기술되어 있다.

IPTG(1mM 내지 10mM, 바람직하게는 5mM)로 유도하고 산소 분압이 10% 이상되도록 기질로서 글루코스를 제한한 후 용적 수율이 5배까지, 즉 0.2g/l 내지 1.0g/l으로 향상되었음이 밝혀졌다.

본 발명의 두번째 양태에서는 탄소원인 동시에 천연 유도제로서 락토스를 사용하여 성장시키는 경우에서의 생성물 형성의 유도를 포함한다. 마찬가지로 산소 분압은 락토스의 첨가를 조절함으로써 전술한 바와 같이 10% 이상으로 유지된다. 락토스에 의한 유도는 이러한 공정이 IPTG 유도보다 덜 효율적인 것으로 주장되어 왔기 때문에 문헌상에서는 최적으로 도달하지 못하는 것으로 간주된다. 본 발명 이전까지는, 락토스를 유도제로 사용하는 어떠한 효율적인 발효방법도 기술되어 있지 않았다. 본 발명에 따른 실험적인 연구는 비교적 느린 생성물 형성이 이.콜라이의 본래의 대사에 다소 적은 교란 효과를 나타내기 때문에, 비교적 약한 유도 및 따라서, 비교적 느린 생성물 형성에 의하여 생성물이 보다 높은 최종 농도에 도달할 수 있다는 고찰에 기초한다. 이러한 시도는 전술한 농도에 대해 상대적으로 2배에 상응하는, 2g/l(+/- 10%) 생성물 농도가 달성되는 적절한 실험에서 확인되었다. 이러한 방법은 대수 성장기에서 글루코스를 락토스로 대체한다는 점에서 IPTG로 유도된 전술한 방법과는 상이하다. 발효 말기의 높은 대사 활성 범위에서, 산소의 분압을 10% 이상으로 유지시키기 위해 락토스의 첨가를 또한 제한하는 경우, 세번째 변형 방법으로서 IPTG 첨가에 의하여 락토스에 의한 유도를 추가로 보조할 수 있다. 이와 같은 추가의 IPTG 유도는 특정의 선택된 발효 장치의 동력 입력이 배지에 산소를 공급하기에 부적당할 경우에만 필요하다. 기술한 두번째 방법에서 플라스미드 손실 증가가 관측되기 때문에, 규모 확대시, 발효 용적의 증가에 따른 교차점이 존재하고, 교차점 이후에는 락토스로 유도하는 경우에 플라스미드 손실의 경미한 증가가 관찰되기 때문에 처음에는 두번째 공정이 경제적이거나 그 다음부터는 첫번째 공정이 더 경제적이다.

생성물의 농도가 최대에 도달할 때에 발효를 마친다. 당해 분야의 전문가들에 공지된 방법을 사용하여 생체량을 (예를 들면, 분리기내에서) 농축시키고 (예를 들면, 고압 균질화기내에서) 파괴한다. 세포 분획을 침강시킨 후에 생성물의 대부분은 투명한 상등액중에 존재한다.

따라서, 본 발명은 lac 프로모터 또는 최적화된 lac 프로모터의 조절하에 이.콜라이 내에서 이종 단백질을 발현시키기 위한 최적화된 발효 방법에 관한 것이며, 유도과정은 대수 성장기 말기에

(1) 글루코스 첨가를 제한하여 산소 분압을 10% 이상으로 유지시키면서, 기질-제한된 글루코스 첨가와 동시에 IPTG 에 의해,

(2) 락토스의 첨가를 제한하여 산소 분압을 10% 이상으로 유지시키면서, 탄소원인 동시에 천연의 유도제로서의 락토스에 의해, 또는

(3) 락토스의 첨가를 제한하여 산소의 분압을 10% 이상으로 유지시키면서, 탄소원인 동시에 유도제로서의 락토스 및 추가로 IPTG에 의해 수행된다.

바람직한 변형방법에서, 각각의 경우 산소 분압은 하나 이상의 다음과 같은 수단에 의하여 증가된다.

(a) 초대기압하, 바람직하게는 2bar 이하에서의 발효,

(b) 동력 입력(교반기 속도 증가) 및 통기율(2vvm 이하)의 조절,

(c) 향상된 헨리 계수(Henry coefficient) 및 감소된 대사 활성을 통하여, 산소 전달율을 증가시키고 산소 흡수율을 감소시키기 위한 37℃부터 30℃까지의 온도 강하[배치 크기(=용기)가 증가함에 따라 특이적 동력 입력이 감소하기 때문에 1,000 이상으로 확대하는 것이 필요하다].

모든 변형 방법에서, 탄소원으로 당 기질의 첨가는 5 내지 10g/l의 최대치로 조절하고 pH를 NH₄OH 및 H₃PO₄를 첨가하여 발효 기간 전반에 걸쳐서 pH 6.7 내지 7.3의 범위로 조절하는 것이 일반적이다.

전술한 방법은 바람직하게는 리포코르틴[참조문헌: Grundmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, (1988) 3708-3712]에 속하는 단백질 PP4 및 PP4-x와 이들의 돌연 변이체 및 변형체를 유전공학적으로 제조하기 위하여 사용된다.

본 발명은 실시예 및 특허청구의 범위에 상세히 기술된다.

(실시예)

하기 실시예는 이.콜라이 K12 균주 W3110 lac IQ[참조문헌: Brent and Ptashne (1981) Proc. Acad. Natl. Sci. USA 78, 4204-4208]의 발효 방법을 기술하며, 당해 균주는 플라스미드 pTrc 99A-PP4[참조문헌: Amann et al. (1988) Gene 69, 301-315] 또는 pTrc 99A-PP4-X[참조문헌: Grundmann et al. (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 59-67]로 형질전환되었다.

표1은 매우 적합한 배지를 나타낸다.

표 1

예로든 성장 배지의 조성;

(g 또는 mg/ℓ 로 나타냄)

요구되는 탄소원(당)

효모 추출액	20g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1.2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.5g
KCl	1.0g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g
시트르산	0.25g
NH_4Cl	5.0g
티아민	5.0mg
H_3BO_3	2.0mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.8mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.16mg
KI	0.4mg
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.02mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.6mg

발효 용적 8ℓ 로 10ℓ 들이 Biostat E 발효조(Braun Melsungen 제조)에서 발효시킨다.

발효중에는 플라스미드-함유 세포에 어떠한 선택압도 작용하지 않는다. 즉, 항생물질의 첨가없이 발효시킨다. 발효조에 발세 진탕시킨 플라스크 예비배양액을 접종한다. 초기 성장기에는 글루코스를 탄소원으로 사용하고, 글루코스는 본 단계에서 0.1M 미만의 아세트산을 형성하도록 계측한다. 아세트이트 농도가 증가하면 생성물 수율이 현저히 떨어진다. 초기 성장기에서 10 내지 15시간 경과한 후, OD_{650} 이 약 50인 세포 농도가 달성되며, 생성물 형성의 유도는 3가지의 상이한 대체 방법으로 수행된다:

(1) 1 내지 10mM IPTG(바람직하게는 5mM IPTG) 첨가후 계속적인 글루코스의 계량투입

초기 성장기의 말기에 가서, 탄소원(기질)으로서 글루코스를 계속 계측하면서 1 내지 10mM IPTG(바람직하게는 5mM IPTG)를 가함으로써 생성물 형성을 유도한다. 이와같은 경우에서, 생성물 형성 속도는 시간에 따른 글루코스 농도에 뚜렷하게 좌우되는 것으로 나타났다. 실질적인 기질로서의 글루코스와 외관상의 기질로서의 IPTG는 글루코스가 lac 오페론의 활성화를 부분적으로 또는 완전히 억제하는 다이옥시 법칙(diauxia rule)에 따라, 경쟁기질로서 나타난다. 이러한 경우에서, ℓ 당 1g의 PP4 또는 PP4-X의 수율이 글루코스-제한 시스템 (글루코스 농도 0.1g/l 미만)에서 달성된다.

펌프를 고정하거나 온-라인 HPLC 측정장치를 이용하여 글루코스를 제한한다. 세포의 성장율은, 비-제한 시스템내에서는 유도에 의해 감소되지 않는 반면, 예측되는 바와 같이 제한된 시스템내에서는 글루코스 농도의 함수로서 감소한다. 연관 성장율에 따라 세포 밀도가 OD_{650} 100 내지 150에 도달한다.

(2) 계속적인 락토스의 계량 투입

초기 성장기의 말기에 가서, 탄소원으로서 글루코스를 락토스로 대체하여 생성물 형성을 유도한다. 락토스는 lac 오페론의 생리학적 유도제이지만 IPTG 보다는 덜 완전한 유도를 유발한다. 유도가 도중에, 세포는 계속 성장하여 세포 밀도가 OD_{650} 100이 된다. 생성물 농도는 1.5g/l에 도달한다.

(3) 계속적인 락토스의 계량 투입 및 1 내지 10mM IPTG(바람직하게는 5mM)의 첨가

초기 성장기의 말기에 가서, 탄소원으로서 글루코스를 락토스로 대체하고 IPTG를 추가로 가함으로써 생성물의 형성을 유도한다. 이와같은 경우에서, IPTG에 의하여 강력하게 유도되고 이와 동시에 생리학적 기질인 락토스가 이용된다. 이 경우에는 글루코스 + IPTG에서와는 달리 탄소원의 정확한 계량 투입은 필요하지 않다. 30g/l 까지의 과량의 락토스가 생산성에 역효과를 미치지 않는다. 유도하는 도중에 세포들은 또한 계속 성장하여 세포 밀도가 OD_{650} 100에 달하게 된다. 발효 말기에서 생성물의 농도는 2.0g/l이다.

플라스미드의 안정성은 (1)에서 (3)의 순으로 감소하기 때문에 유도는 특정의 발효 배치 크기의 함수로서 하나의 방법을 선택하여 수행한다.

기술된 실험에서 선택된 발효 변수가 표2에 요약되어 있다.

표 2

발효 변수

pH	7.0(H_3PO_4 및 NH_4OH 를 첨가함으로써 조절)
통기율	0.5 내지 2.0vvm
회전수	1500rpm
온도	37℃(내지 30℃)
제이지 압력	2.0bar 이하
기질 농도	5.0g/ℓ 미만으로 조절된 글루코스; (용존산소 감소시 제한됨). 연속 계량투입하여 조절된 락토스(30g/ℓ 미만) (용존산소 감소시 제한됨)
용존 산소	10% 이상

(57) 청구의 범위

청구항 1

이소프로필 티오갈락토시드(IPTG)로 유도하고 탄소원으로 글루코스를 사용하는 경우 산소 분압이 10% 이상이 되도록 글루코스 농도를 조절함을 포함하여, 락토스에 의해 유도될 수 있는 프로모터를 이용하여 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)내에서 리포코르틴(lipocortin)을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 초대기압하, 바람직하게는 2bar 이하에서의 발효,
- (b) 동력의 입력(교반기 속도 증가) 및 통기율(2vvm 이하)의 조절,
- (c) 37℃에서 30℃까지의 온도 강하,
- (d) 탄소원으로서의 기질의 첨가를 최대 5 내지 10g/l까지 조절 및
- (e) 6.7 내지 7.3으로서 pH 조절의 방법중 하나 이상의 방법이 적용되는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 리포코르틴이 PP4, PP4-x 또는 PP4의 돌연변이체 및 변형체의 그룹중에서 선택되는 방법.