

발명의 설명

발명의 명칭: 보툴리눔 독소의 제조를 위한 배지 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 보툴리눔 독소의 제조를 위한 배지 조성물에 관한 것으로, 보툴리눔 독소를 생산할 수 있는 클로스트리디움 속 균주들의 배양용 배지 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 배지 조성물은 밀(wheat) 펩톤 및 완두(pea) 펩톤을 포함하는 식물성 펩톤, D-(+)-글루코오스 및 효모 추출물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[2]

배경기술

- [3] 신경독성을 지닌 독소를 분비하는 다양한 클로스트리디움 속 균주들이 1890 년대부터 지금까지 발견되었으며, 지난 70년간 이들 균주들이 분비하는 독소에 대한 특성 규명이 이루어져 왔다(Schant, E. J. *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 56:80, 1992).
- [4] 상기 클로스트리디움 속 균주들에서 유래한 신경독성을 지닌 독소, 즉 보툴리눔 독소(botulinum toxin)는 그 혈청학적 특징에 따라 A 내지 G형의 7가지 형으로 구분된다. 각 독소는 약 150kDa 정도의 독소 단백질을 가지고 있는데, 자연적으로는 여러 비독성 단백질들과 결합되어 있는 복합체로 이루어져 있다. 중간(Medium) 복합체(300kDa)는 독소 단백질과 비독성-비헤마글루티닌 단백질로 이루어져 있고, 큰(Large; 450kDa) 복합체 및 거대(Large-Large; 900kDa) 복합체는 중간 복합체가 헤마글루티닌과 결합되어 있는 형태를 띠고 있다(Sugiyama, H., *Microbiol. Rev.*, 44:419, 1980). 이러한 비독성 비헤마글루티닌 단백질들은 장내에서 낮은 pH와 각종 단백질 가수분해 효소로부터 독소를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 상기 독소는 세포 내에서 분자량이 약 150kDa인 하나의 폴리펩티드로 합성된 후, 세포내 단백질 분해 효소의 작용이나 트립신과 같은 인위적인 효소처리에 의하여 N말단으로부터 1/3 되는 위치에서 절단되어 2개의 단위체인 경쇄(L: light chain)(분자량: 50 kDa) 및 중쇄(H: heavy chain)(분자량: 100kDa)로 나누어진다. 이렇게 나누어진 독소는 단일 폴리펩티드일 때에 비해 그 독성이 크게 증가한다. 두 단위체는 이황화결합으로 서로 연결되어 있으며, 각각은 서로 다른 기능을 갖는다. 중쇄는 표적(target)이 되는 세포의 수용체(receptor)와 결합하고(Park, M.K. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:243, 1990), 낮은 pH(pH4)에서 생체막과 반응하여 채널(channel)을 형성하는 기능을 가지며(Mantecuccio, C. *et al.*, *TIBS.*, 18:324, 1993), 경쇄는 약리활성을 가지고 있어 세제(detergent)를 사용하여 세포에 투과성을 부여하거나, 전기천공(electroporation) 등으로 세포 내 투입되었을 때 신경전달물질의 분비를 방해한다(Poulain, B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:4090, 1988).

- [6] 상기 독소는 신경근육종말(neuromuscular junction)의 콜린성 전시냅스(cholinergic presynapse)에서 아세틸콜린의 엑소시토시스(exocytosis)를 저해하여 전신 무력증을 일으킨다. 극미량의 독소를 처리해도 독성이 나타나는 것으로 보아 이 독소는 어떤 효소 활성을 가질 것으로 생각되어져 왔다(Simpson, L. L. *et al.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26:427, 1986).
- [7] 최근에 밝혀진 바에 의하면, 독소는 메탈로펩티다제 활성(metallopeptidase activity)을 갖고 있으며 그 기질은 엑소시토시스 장치 복합체(exocytosis machinery complex)를 이루는 단위 단백질들인 시냅토프레빈(Synaptobrevin), 선택신(Syntaxin), 25kDa의 시냅소좀 연계 단백질(Synaptosomal associated protein of 25kDa)(SNAP25) 등이다. 각 형의 독소는 이 세 가지 단백질들 중 하나를 기질로 삼고 있는데, B, D, F 및 G형은 시냅토프레빈을, A와 E형은 SNAP25를, C형은 선택신을 특정 부위에서 절단하는 것으로 알려져 있다(Binz, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:9153, 1994).
- [8] 특히, 보툴리눔 독소 A형은 pH 4.0~6.8의 묽은 수용액에 용해성인 것으로 알려져 있다. 약 7 이상의 pH에서 안정화 비-독소 단백질이 신경독소로부터 분리되어, 그 결과 독성이 점진적으로 손실되는데, 특히 pH 및 온도가 상승함에 따라 독성이 감소하는 것으로 알려져 있다.
- [9] 상기 보툴리눔 독소는 소량으로 인체에 치명적이고 대량생산이 용이하므로 탄저균(*Bacillus anthracis*), 페스트(*Yersinia pestis*), 천연두(smallpox virus)와 더불어 4대 생물테러 무기로 사용될 수 있는 독소이다. 그러나, 상기 보툴리눔 독소 중 A형 독소의 경우에는 전신적으로는 인체에 영향을 미치지 않는 용량 이하로 주사하면 상기 주사 부위의 국소 근육을 마비시킬 수 있는 것으로 밝혀졌는데, 이러한 특성을 이용하여 주름살 제거제, 경직성 편마비 및 뇌성마비의 치료제 등으로 광범위하게 사용할 수 있으므로, 수요가 급증하고 있으며 수요에 맞추어 보툴리눔 독소의 생산방법에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [10] 현재 대표적으로 상용화되어 있는 제품은 미국 알러간(Allergan)사의 BOTOX®(보툴리눔 독소 A형 정제된 신경독소 복합체)로, 각각의 BOTOX®의 100 유닛 바이알은 약 5ng의 정제된 보툴리눔 독소 A형 복합체, 0.5mg 인간 혈청 알부민, 및 0.9mg 염화 나트륨으로 구성되고 진공-건조 형태로 제공되며, 보존제 없이(0.9% 염화 나트륨 주입) 멸균 생리식염수를 이용하여 복원시킨다. 다른 상용화된 제품은 영국 Ipsen사의 Dysport®(보툴리눔 독소 약제학적 조성물 중에 락토오스 및 인간 혈청 알부민을 가지는 클로스트리디움 보툴리눔 A형 독소 헤마글루티닌 복합체, 사용 전에 0.9% 염화 나트륨을 이용하여 복원됨) 및 Solstice Neurosciences사의 MyoBloc®(보툴리눔 독소 B형, 인간 혈청 알부민, 숙신산 나트륨, 및 염화 나트륨을 포함하는 약 pH 5.6 주사 용액) 등이 있다.
- [11] 대한민국 등록특허 제10-1339349호에 개시되어 있는 보툴리눔 독소의 제조방법과 일반적으로 사용되는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지는 동물

성 성분들이 함유되어 있다. 따라서, 전염성해면상뇌증 유발인자로 알려진 동물 유래의 변형프리온(abnormal prion)이 오염으로 인해 상기 동물성 성분들에 포함되어 있으면 보툴리눔 독소 제조과정에 문제가 된다.

- [12] 전염성해면상뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE)은 치명적인 신경의 퇴행성 질환을 일으키는 일종의 퇴행성 신경 질환으로, BSE(Bovine Spongiform Encephalopathy, 소해면상뇌증(광우병)), 스크래피(Scrapie), 크로이츠펔트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob Disease, CJD), 게르스트만-스트라우슬러-샤인커 신드롬(Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome), 쿠루(Kuru), 전염성 밍크뇌증(Transmissible Mink Encephalopathy), 사슴의 만성소모성질병(Chronic Wasting Disease), 고양이 해면상뇌증(Feline Spongiform Encephalopathy) 등 사람 및 동물에서 발병되며, 소해면상뇌증의 경우 종간 장벽(species barrier)을 넘어 사람에게도 발병되는 것으로 보고되고 있다.
- [13] 전염성해면상뇌증의 원인체는 면역원성이 없고, 긴 잠복기를 갖는 특징이 있다. 소해면상뇌증, 즉 광우병에 감염된 소의 뇌의 사후 분석으로부터 신경세포의 파괴와 비정상 단백질 섬유화 침적의 침적으로 인하여 뇌에 스펀지(해면상) 형태의 특이한 패턴의 공포(空胞)가 형성되었음을 확인할 수 있다.
- [14] 전염성해면상뇌증의 원인으로 여겨지는 병원체는 변형프리온(abnormal prion)이라 불리는 감염 단백질이다. 핵산을 필요로 하는 일반 바이러스의 경우와 달리, 변형프리온은 핵산을 포함하지 않고 단백질로만 이루어진 감염 입자이다. 전염성해면상뇌증은 정상프리온(PrP^c)에 감염성 인자인 변형프리온(PrP^{Sc})이 결합하게 되면 병원성프리온으로 전환되어 이러한 병원성프리온이 뇌에 축적되는 것으로 알려져 있다(Prusiner SB, *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 3:52-78, 1989).
- [15] 크로이츠펔트-야콥병은 사람 전염성해면상뇌증(전염성해면양뇌증, Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE)의 드문 신경퇴행성 질환으로, 전염성 물질은 프리온 단백질의 비정상적인 이형체임이 분명하다. 크로이츠펔트-야콥병이 있는 개체는 명백히 완전한 건강 상태로부터 6개월 이내에 무동성무언증(akinetic mutism)으로 악화될 수 있다. 그러므로 동물 유래 산물을 사용하여 얻어지는 보툴리눔 독소와 같은 생물제제를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 경우, 크로이츠펔트-야콥병과 같은, 프리온 매개 질환을 얻게 될 위험성이 존재한다. 따라서, 동물 유래 성분을 사용하여 생산한 원액을 이용하여 의약품을 제조할 경우, 환자가 다양한 병원체 또는 감염성 물질을 받아들리게 되는 위험성이 존재한다.
- [16] 따라서, TSE 감염을 방지하기 위해 카세인 가수분해물(예: TSE-Certificated casein hydrolysate)을 APF(Animal Protein Free medium)을 배지에 첨가하여 균주의 성장을 및 보툴리눔 독소의 생산이 개선된다는 결과가 보고된 바 있다(대한민국 등록특허 제17-1729251호 등). 그러나, 카세인 가수분해물을 첨가한 APF 배지는 여전히 동물 유래 성분인 카세인을 포함하고 있는 점에서, 동물 유래 성분을

포함하지 않는 APF 배지에서 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 높은 성장률 및 높은 독소 생산량을 위한 연구가 요구되고 있다.

- [17] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 프리온 매개 질환을 얻게 될 위험을 예방하기 위하여 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양 시 TSE 감염 우려가 없는 식물 유래 펩톤을 포함하고, 동물 유래 성분은 포함하지 않는 배지를 개발하고자 예의 노력한 결과, 기존 배지보다 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장률을 향상시킬 수 있고 독소 생산량을 개선시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[18]

발명의 내용

기술적 과제

- [19] 본 발명의 목적은 동물 유래 성분을 포함하지 않는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물에서 클로스트리디움 보툴리눔을 배양하여 보툴리눔 독소의 생산량을 개선시키는 제조방법을 제공하는 데 있다.

[21]

과제 해결 수단

- [22] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 밀(wheat) 펩톤 및 완두(pea) 펩톤을 포함하는 식물성 펩톤, D-(+)-글루코오스 및 효모 추출물을 포함하고, 동물 유래 성분을 포함하지 않는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명은 또한, (a) 상기 배지 조성물을 이용하여 클로스트리디움 보툴리눔을 배양하여 보툴리눔 독소를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 보툴리눔 독소를 회수하는 단계를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법을 제공한다.

[24]

발명의 효과

- [25] 본 발명에 따른 식물성 펩톤, 글루코오스 및 효모 추출물을 포함하고 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지를 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양에 이용할 경우, 기존 배지보다 균주 성장률이 증가하고, 동물 유래 성분을 포함하지 않아 안전하게 균주를 배양하여 보툴리눔 독소의 생산성을 증가시킬 수 있다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 peptone from pea, wheat peptone, peptone from potatoes No.2의 3가지 식물성 펩톤을 Factor로 하고, Responses를 OD_{540nm} 값 3 이상으로 하는, 식물성 펩톤의 적절한 비율을 확인하기 위한 JMP의 Custom Design을 나타낸 것이다.
- [28] 도 2는 Custom Design의 Power Analysis 및 Fraction of Design Space Plot을 확인한 Design Evaluation을 나타낸 것이다.
- [29] 도 3은 APF 배지 성분을 포함한 배지를 나타낸 것이다.

- [30] 도 4a는 탄소원이 Dextrin인 APF 배지의 시간대별 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장률을 측정한 그래프, 도 4b는 탄소원이 Glucose인 APF 배지의 시간대별 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장률을 측정한 그래프이다.
- [31] 도 5는 16가지 종류의 APF 배지의 시간대별 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장률을 측정한 그래프이다.
- [32] 도 6은 D-optimal Design Experiments의 분포 분석을 나타낸 것으로, 실험 결과들이 대체로 고르게 분포해 있음을 확인할 수 있다.
- [33] 도 7은 D-optimal Design Results의 산점도 행렬 분석을 나타낸 것으로, 밀 웹톤 및 완두 웹톤은 OD_{540nm} 및 독소 농도와 약한 양의 상관관계를 보이는 것을 확인할 수 있다.
- [34] 도 8은 잔차 분석을 나타낸 것으로, 실험 결과에 이상치가 없음을 확인할 수 있다.
- [35] 도 9는 OD_{540nm}의 모델 설립을 위한 과정을 나타낸 것으로, VIF 값이 10을 넘지 않고 1 수준으로 존재하므로 모델에 문제가 없으며, Studentized Residuals 결과 모두 95% 신뢰 구간에 포함되는 것을 확인할 수 있다.
- [36] 도 10은 OD_{540nm}에 대한 예측 공식(Prediction Formula)을 나타낸 것이다.
- [37] 도 11은 OD_{540nm}의 상호작용 프로파일(Interaction Profiles)을 나타낸 것이다.
- [38] 도 12는 OD_{540nm}의 모델 설립을 위한 과정을 나타낸 것으로, VIF 값이 10을 넘지 않고 1 수준으로 존재하므로 모델에 문제가 없으며, Studentized Residuals 결과 모두 95% 신뢰 구간에 포함되는 것을 확인할 수 있다.
- [39] 도 13은 독소 농도에 대한 예측 공식을 나타낸 것이다.
- [40] 도 14는 상호작용 프로파일을 나타낸 것이다.
- [41] 도 15는 각 반응치에 대한 예측 공식을 기반으로 OD_{540nm} 및 독소 농도를 위한 배지 조건을 Prediction Profiler를 통해 찾는 과정을 나타낸 것이다.
- [42] 도 16a 및 도 16b는 Simulator 기능을 이용하여 factors와 model noise에 대하여 random variation을 주는 simulation을 5000회 실시한 후, Y in Spec의 분포(도 16a) 및 Edge of failure 분석을 나타낸 것이다(도 16b).
- [43] 도 17은 3 σ 에 해당하는 범위를 NORs로, 4.5 σ 에 해당하는 범위를 PARs로 설정한 완두의 역량 분석을 나타낸 것이다.
- [44] 도 18은 3 σ 에 해당하는 범위를 NORs로, 4.5 σ 에 해당하는 범위를 PARs로 설정한 밀의 역량 분석을 나타낸 것이다.
- [45] 도 19는 APF 배지의 Contour Profiler 결과를 나타낸 것으로, NORs(3 σ , 빨간 선)와 PARs(4.5 σ , 파란 선)를 contour plot에 표시하였을 때, 모델을 만족하는 범위인 흰색 범위를 벗어나지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [46] 도 20은 APF 배지별 보툴리눔 균주의 성장곡선을 나타낸 것이다.
- [47] 도 21은 APF 배지별 독소 발현량을 나타낸 것이다.
- [48]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [49] APF 배지(Animal Protein Free medium) 조성으로도 기존 배지 대비 향상된 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장률(생장률)을 보였으나, 균주의 성장률을 더욱 향상시키면서 여전히 TSE 등의 감염 우려가 없는 배지 성분의 첨가가 요구되고 있는 실정이다. 최근, TSE 감염 사례가 보고된 바 없는 카세인 가수분해물(예: TSE-Certificated casein hydrolysate)을 APF 배지에 첨가하여 균주를 성장시키고 독소를 생산하고 있다.
- [50] 그러나, 카세인 가수분해물은 우유에서 추출되는 성분으로, 카세인은 우유에 함유된 전 단백질의 약 80%를 차지한다. 카세인 가수분해물이 첨가된 APF 배지는 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 같은 동물성 성분을 함유하지는 않으나, 카세인 가수분해물 자체가 동물 유래 성분인 점에서, 카세인 가수분해물과 같은 동물 유래 성분이 첨가되지 않고 식물성 펩톤을 포함하는 안전성이 우수한 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지가 요구되고 있는 실정이다.
- [51] 이에, 본 발명은 일 관점에서, 밀 펩톤 및 완두 펩톤을 포함하는 식물성 펩톤, D-(+)-글루코오스 및 효모 추출물을 포함하고, 동물 유래 성분을 포함하지 않는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물에 관한 것이다. 여기서, 식물성 펩톤은 밀(Wheat) 또는 완두(Pea)에서 추출된 펩톤을 의미하며, 바람직하게는 상업적으로 구매가능한 Millipore™ 96174, Millipore™ 93492-500G-F일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 본 발명에서 기존 배지란 동물 유래 성분인 카세인 가수분해물(Casein hydrolysate), 효모 추출물(Yeast extract) 및 티오글리콜산염 배지(Thioglycollate medium) 등이 포함된 배지를 의미한다. 또한, APF 배지(Animal Protein Free medium)란 동물 유래 단백질을 포함하지 않는 배지를 의미한다.
- [53] 본 발명의 일 실시예에서, TSE-프리(TSE(Transmissible Spongiform Encephalopathy)-free)한 조건에서 동물 유래 성분 없이, Peptone from pea, Wheat peptone, Peptone from potatoes No. 2, Corn steep solid, Gluten from wheat, Potat peptone E210, Banana powder, Tomato juice, Malt extract를 포함한 다양한 식물성 배지 원료가 포함된 APF 배지를 제조하고, 균주의 성장률 및 독소 발현량을 비교하였다. 그 결과, 클로스트리디움 보툴리눔 균주를 효율적으로 배양하기 위한 식물성 배지 원료는 완두 펩톤(peptone from pea), 밀 펩톤(wheat peptone) 및 포테이토 펩톤(peptone from potatoes No. 2)을 포함한 식물성 펩톤을 포함시키는 경우이며, 이 경우 균주 성장 및 독소 발현량이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 결국, 표 4, 표 5 및 도 4에 나타난 바와 같이, 최종 선별된 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물에 포함된 식물성 펩톤은 완두 펩톤, 밀 펩톤 및 포테이토 펩톤인 것으로 확정하였다.
- [54] 본 발명의 다른 실시예에서, TSE-프리(TSE(Transmissible Spongiform Encephalopathy)-free)한 조건에서 동물 유래 성분 없이, 식물성 펩톤인 완두 펩톤,

밀 펙톤 및 포테이토 펙톤이 다양한 조성비로 포함된 APF 배지를 제조하고, 균주의 성장을 및 독소 발현량을 비교하였다. 그 결과, 클로스트리디움 보툴리눔 균주를 효율적으로 배양하기 위한 배지 조성은 밀 펙톤 및 완두 펙톤으로 구성된 균에서 선택된 하나 이상의 식물성 펙톤을 포함시키고, 여기에 탄소원(예: 포도당) 및 질소원(예: 효모 추출물)을 첨가한 경우이며, 이 경우 균주 성장 및 독소 발현량이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 결국, 표 8 내지 표 12 및 도 5 내지 19에 나타난 바와 같이, 최종 선별된 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물에 포함된 식물성 펙톤의 함량은 완두 펙톤 18g/L, 밀 펙톤 7g/L인 것으로 확정하였다.

- [55] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 최종 선별된 식물성 펙톤이 포함된 APF 배지에서 자란 경우와, 본 발명보다 앞서 공개된 한국공개특허 10-2022-0140696에 기재된 배지(비교예 7)에서 자란 경우 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장 패턴(growth pattern) 및 독소(toxin) 농도를 비교하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 표 13 내지 15, 도 20 및 도 21에 나타난 바와 같이, 본 발명의 배지의 경우 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양 28시간이 경과된 시점에서 OD_{540nm} 가 7.1021을 나타내었고, 그 후 OD값이 점점 감소하여 48시간이 경과된 시점에서는 OD_{540nm} 가 5.5636을 나타내었으며, 클로스트리디움 보툴리눔 독소의 상등액 내 독소 농도는 배양 48시간이 경과된 시점에서 $588.8\mu g$ (배양액 10mL) 값을 나타내었다. 한편, 비교예 7의 배지의 경우 표 13 내지 15, 도 20 및 도 21에 나타난 바와 같이, 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양 28시간이 경과된 시점에서 OD_{540nm} 가 6.7739을 나타내었고, 클로스트리디움 보툴리눔 독소의 상등액 내 독소 농도는 배양 48시간이 경과된 시점에서 $263.7\mu g$ (배양액 10mL) 값을 나타내어, 본 발명의 배지의 경우보다 독소 발현량이 55.2% 감소되는 것을 확인할 수 있다.
- [56] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 배지에 한국공개특허 10-2022-0140696에 기재된 배지의 조성 성분 L-시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 및/또는 의료용 소포제 c 에멀전(Dow Corning®)을 추가로 포함시킨 경우(비교예 1 내지 3), 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장 패턴(growth pattern) 및 독소(toxin) 농도를 비교하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 표 13 내지 15, 도 20 및 도 21에 나타난 바와 같이, 비교예 1 내지 3은 OD_{540nm} 값이 본 발명보다 낮고 배양 48시간 후 독소 발현량이 본 발명보다 14.9 내지 76.6% 감소되는 것을 확인할 수 있다.
- [57] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명의 배지에서 완두 펙톤 및/또는 밀 펙톤을 대신하여 대두(Soy) 펙톤을 첨가하고, 추가적으로 L-시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 및 의료용 소포제 c 에멀전(Dow Corning®)을 추가로 포함시킨 경우(비교예 4 내지 6), 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 성장 패턴(growth pattern) 및 독소(toxin) 농도를 비교하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 표 13 내지 15, 도 20 및 도 21에 나타난 바와 같이, 비교예 4 내지 6은 OD_{540nm} 값이 본 발명보

다 현저히 낮고 배양 48시간 후 독소 발현량이 본 발명보다 87.0 내지 94.9% 감소되는 것을 확인할 수 있다.

- [58] 본 발명에 있어서, 상기 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물은 완두 펩톤(Peptide from pea), 밀 펩톤(Wheat peptide), 포테이토 펩톤(Peptide from potatoes No. 2), 옥수수 침지액 고형물(Corn steep solid), 밀 글루텐(Gluten from wheat), 포테이토 펩톤(Potato peptide E210), 바나나 분말(Banana powder), 토마토 주스(Tomato juice) 및 맥아 추출물(Malt extract)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 식물 유래 성분을 포함할 수 있고, 바람직하게는 완두 펩톤(Peptide from pea), 밀 펩톤(Wheat peptide) 및 포테이토 펩톤(Peptide from potatoes No. 2), 더욱 바람직하게는 완두 펩톤(Peptide from pea) 및 밀 펩톤(Wheat peptide)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [59] 본 명세서에서 용어 "식물성 펩톤" 또는 "식물성 가수분해물"은 식물로부터 얻은 단백질의 분해 산물을 의미한다. 예를 들어 밀 펩톤(밀 가수분해물)은 밀(Wheat)로부터 수득한 총단백질을 분해하여 얻은 산물을 의미한다. 또한, "카세인 가수분해물"은 카세인 단백질의 분해 산물을 의미한다.
- [60] 상기 식물성 단백질 또는 카세인 단백질의 분해는 바람직하게는 부분적 분해(partial digest)에 의해 행해진다. 상기 단백질의 분해는 바람직하게는 산처리, 염기처리, 효소처리, 고압처리, 열처리 또는 물리적 처리에 의한 분해를 통해 행해지며, 더욱 바람직하게는 식물성 펩톤 또는 카세인 가수분해물은 효소처리된 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 물리적 처리는 예컨대 그라인딩(grinding)이다.
- [61] 본 발명에서의 식물성 펩톤 또는 카세인 가수분해물은 단백질의 부분적 분해 산물로서, 단분자인 아미노산 뿐만 아니라, 수개 내지 수십개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 온전한 단백질 분자가 모두 포함되어 있는 혼합물 형태이다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 식물성 펩톤의 함량은 0.1~10w/v%(1~100g/L)인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 0.2~5w/v%(2~50g/L)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.5~2w/v%(5~20g/L)일 수 있다.
- [63] 본 발명에 있어서, 상기 밀 펩톤의 함량은 0.1 내지 4.0w/v%(1 내지 40g/L), 바람직하게는 0.45 내지 0.95w/v%(4.5 내지 9.5g/L), 바람직하게는 0.48 내지 0.92w/v%(4.8 내지 9.2g/L), 바람직하게는 0.55 내지 0.85w/v%(5.5 내지 8.5g/L), 더욱 바람직하게는 0.7w/v%(7g/L)일 수 있다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 완두 펩톤의 함량은 0.1 내지 3.5w/v%(1 내지 35g/L), 바람직하게는 1.55 내지 2.05w/v%(15.5 내지 20.5g/L), 바람직하게는 1.58 내지 2.03w/v%(15.8 내지 20.3g/L), 바람직하게는 1.65 내지 1.95w/v%(16.5 내지 19.5g/L), 더욱 바람직하게는 1.8w/v%(18g/L)일 수 있다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물은 L-시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 및/또는 소포제를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

- [66] 본 명세서에서, “소포제(antifoaming agent)”는 포말의 형성을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 물질을 의미하고, “발포 방지제”와 상호교환적인 의미로 사용된다. 상기 소포제는 의료용 소포제를 포함할 수 있고, Dow Corning®을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물은 탄소원 및 질소원을 포함할 수 있다.
- [68] 본 발명에 있어서, 상기 탄소원은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린, 전분 등), 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)일 수 있고, 바람직하게는 D-(+)-글루코오스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 탄소원의 함량은 0.1 내지 1.5w/v%(1 내지 15g/L), 바람직하게는 0.25 내지 1.5w/v%(2.5 내지 15g/L), 바람직하게는 1.0w/v%(10g/L)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] 본 명세서에서, “질소원”이란 균주의 생장에 있어서 단백질, 퓨린(purine), 피리미딘(pyrimidine) 및 다당류 키틴(chitin) 등의 합성에 필수적인 질소 원자를 포함하는 유기 또는 무기물을 의미하고, 상기 질소원은 효모 추출물이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 본 발명에 있어서, 상기 질소원은 효모 추출물(Yeast extract), 폴리펩톤(Polypeptone), 트립톤(Tryptone), 맥아 추출물(Malt extract), 옥수수 침지액(Corn steep liquor), 소이톤(Soytone)일 수 있고, 바람직하게는 효모 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 질소원의 함량은 0.5 내지 2.0w/v%(5 내지 20g/L), 바람직하게는 0.5 내지 1.0w/v%(5 내지 10g/L), 바람직하게는 1.0w/v%(10g/L)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 상기 배지 조성물을 이용하여 클로스트리디움 보툴리눔을 배양하여 보툴리눔 독소를 생성시키는 단계; 및 (b) 상기 생성된 보툴리눔 독소를 회수하는 단계를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법에 관한 것이다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 혐기 조건에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 배양은 33 내지 37°C의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 배양은 20 내지 48시간 동안 수행하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 독소는 보툴리눔 독소 A, B, C, D, E, F 및 G로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [75]
- [76] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [77]
- [78] 실시예 1: 식물성 펩톤 선정
- [79] 1-1: 배양에 사용한 CYG 배지의 조성(대조군)
- [80] 클로스트리디움 보툴리눔 배양용 CYG 배지(Casein, Yeast extract and Glucose)는 2% 카세인 가수분해물(casein hydrolysate)[20g/L], 1% 효모 추출물(yeast extract)[10g/L], 1% 글루코오스(glucose)[10g/L]를 증류수 90 mL에 녹인 후 최종 부피를 100 mL로 맞추고, 만들어진 배지를 15 mL culture tube에 10 mL씩 분주하여 제조하였다. 그 후, 배지를 121°C에서 30분간 autoclave한 후 혐기성 배양기에서 혐기성 상태로 유지하였다.
- [81] 1-2: 배양에 사용한 APF 배지의 조성
- [82] 하기 표 1 및 표 2와 같이, 1% 효모 추출물(yeast extract)[10g/L], 1% 텍스트린(Dextrin) 또는 글루코오스(Glucose)[10g/L]에, 2% 식물성 펩톤 후보군 9종(Sigma™ C8160-500G, Millipore™ 96174, Millipore™ 93492-500G-F, Sigma-Aldrich™ G5004-500G, Millipore™ 38143-500G, Organotechnie™ 19425, Sigma-Aldrich™ B4032-500G, Sigma-Aldrich™ 17218-500G, Merck™ 1.05391.0500)[10g/L]를 첨가한 후, 주사용수 90 mL에 녹인 후 최종 부피를 100 mL로 맞추고, 각 배지의 pH를 7.3으로 맞춘 후, 만들어진 배지를 15 mL culture tube에 10 mL씩 분주하여 제조하였다. 그 후, 배지를 121°C에서 30분간 autoclave한 후 혐기성 배양기에서 혐기성 상태로 유지하였다.
- [83] [표1]

카테고리	배지 (g/L)		1	2	3	4	5	6	7	8	9
탄소원 (C-source)	덱스트린(Dextrin)		10	10	10	10	10	10	10	10	10
	글루코오스(Glucose)										
식물 유래 성분 (Plant- derived compounds)	옥수수 침지액 (Corn steep)	옥수수 침지액 고형 물 (Corn steep solid)	10								
	완두(Pea)	완두 펩톤 (Peptone from pea)		10							
	밀 글루텐 (Wheat gluten)	밀 펩톤 (Wheat peptone)			10						
		밀 글루텐 (Gluten from wheat)				10					
	포테이토 (Potato)	포테이토 펩톤 (Peptone from potatoes No. 2)					10				
		포테이토 펩톤 (Potato peptone E210)						10			
	바나나 (Banana)	바나나 분말 (Banana powder)							10		
	토마토 (Tomato)	토마토주스 (Tomato juice)								10	
	맥아 (Malt)	맥아 주출물 (Malt extract)									10
질소원 (N-source)	효모 주출물 (Yeast extract)		10	10	10	10	10	10	10	10	10

[84] [표2]

카테고리	배지 (g/L)	10	11	12	13	14	15	16	17	18
탄소원 (C-source)	덱스트린(Dextrin)									
	글루코오스(Glucose)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
식물 유래 성분 (Plant- derived compounds)	옥수수 침지액 (Corn steep)	10								
	옥수수 침지액 고형물 (Corn steep solid)									
	완두(Pea)		10							
	완두 펩톤 (Peptone from pea)									
	밀 글루텐 (Wheat gluten)			10						
	밀 글루텐 (Gluten from wheat)				10					
	포테이토 (Potato)					10				
	포테이토 펩톤 (Peptone from potatoes No. 2)									
	포테이토 펩톤 (Potato peptone E210)						10			
	바나나 (Banana)							10		
질소원 (N-source)	토마토 (Tomato)								10	
	토마토주스 (Tomato juice)									10
	맥아 (Malt)									10
	맥아 추출물 (Malt extract)									10
질소원 (N-source)	효모 추출물 (Yeast extract)	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[85] 1-3: 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양

[86] 표 1 및 표 2의 배지 성분 1 내지 18의 배지가 들어 있는 배양 튜브(culture tube)에 20 μ L의 클로스트리디움 보툴리눔(질병관리본부 관리번호: 4-029-CBB-MF-2020001)을 접종하여 35°C $\pm$ 1°C에서 혐기적 조건으로 20, 24, 28, 48시간 동안 정지 배양을 하면서 sampling 하였다. 그 후, UV spectrophotometer를 이용하여 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm} 값을 측정하여 성장률을 확인하였고, blank는 배양 배지로 하였다. 측정한 OD_{540nm} 값을 토대로 대조군과 비교하여 배지의 식물성 펩톤 후보군을 선정하였다.

[87] 1-4: 균주 성장률

[88] 식물성 펩톤 후보군 중 옥수수 침지액 고형물, 바나나 분말, 밀 글루텐(gluten from wheat)은 배지 멸균 후 침전물이 생겨 향후 filtration 공정 수행이 어렵고 정확한 OD_{540nm} 값 측정이 어려워, 식물성 펩톤 후보군에서 제외한 후, 식물성 펩톤 후보군을 포함한 배지 성분은 하기 표 3과 같다:

[89] [표3]

배지 (g/L)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
덱스트린(Dextrin)		10	10	10	10	10	10						
글루코오스(Glucose)								10	10	10	10	10	10
완두(Pea)	완두 펩톤 (Peptone from pea)	10						10					
밀 글루텐 (Wheat gluten)	밀 펩톤 (Wheat peptone)		10						10				
포테이토 (Potato)	포테이토 펩톤 (Peptone from potatoes No. 2)			10						10			
	포테이토 펩톤 (Potato peptone E210)				10						10		
토마토 (Tomato)	토마토주스 (Tomato juice)					10						10	
맥아 (Malt)	맥아 추출물 (Malt extract)						10						10
효모 추출물 (Yeast extract)		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[90] 표 3의 배지 성분 1 내지 12의 배지 및 2개의 대조군 배지(CYG 배지)의 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm} 값을 측정하였고(표 4), 각 배지의 탄소원(Dextrin 또는 Glucose)의 시간대별 OD_{540nm} 값 그래프를 비교하였다(도 4).

[91] [표4]

배지	시간대별 OD _{540nm} 값			
	20hr	24hr	28hr	48hr
1	1.8730	2.3500	3.2304	3.2722
2	1.8599	2.1685	2.5121	4.0037
3	1.4141	1.5862	2.0204	2.4978
4	1.4811	2.0280	2.3678	2.6301
5	1.0544	1.1912	1.3145	0.8669
6	1.1858	1.6250	1.8331	1.4966
7	2.2260	3.0544	3.7671	4.0443
8	2.3389	3.2501	3.6515	2.6177
9	1.5869	1.9006	1.9675	2.0508
10	1.2805	1.2364	1.1067	1.8789
11	0.9147	1.0896	1.1602	1.3564
12	1.0836	1.4444	1.6244	0.5030
대조군 1	2.0969	2.8093	3.0028	2.3717
대조군 2	1.1039	1.6976	2.0191	2.2898

- [92] 그 결과, 표 4 및 도 4에 나타난 바와 같이, 완두, 밀, 포테이토 유래 성분을 사용한 배지 1, 2, 3, 7, 8 및 9에서 공통적으로 균주가 높은 성장률을 보이는 것으로 확인되었다.
- [93] 또한, 완두, 밀, 포테이토 유래 성분의 동일한 식물성 펩톤을 사용하더라도, 탄소원으로 글루코오스를 사용한 배지 7, 8 및 9가, 텍스트린을 사용한 배지 1, 2 및 3보다, 균주가 높은 성장률을 보이는 것으로 확인되었다. 특히, 밀 유래 성분의 경우 텍스트린을 사용한 배지 2에서 균주 접종 후 48시간이 지나서도 성장하는 추세를 보였고(도 4), 이는 향후 원액 생산 공정 시간을 불필요하게 지연시킬 가능성이 있으므로 배지의 탄소원으로서 글루코오스를 사용하는 것이 적합할 것으로 확인되었다.
- [94] 1-5: 보툴리눔 독소 농도
- [95] 실시예 1-4에서 균주의 높은 성장률을 보인 배지 1, 2, 3, 7, 8 및 9의 독소 단백질량을 측정하였다. 기존 연구에서는 사멸기에 독소를 회수하므로, 배양 후반부인 28, 48 시간대의 보툴리눔 독소 A형 배양액의 정량시험을 위해 ELISA 시험법으로 측정한 결과는 하기 표 5와 같다(ICH guideline, Q2(R1)).
- [96] 항독소를 희석하여 96 well plate의 각 well에 분주하고 16시간 이상 코팅시켰다. Plate의 내용물을 제거하고 각 well에 blocking 용액을 분주하여 blocking 시킨 후,

wash buffer로 plate를 3회 세척하였다. 표준품 및 배양액을 희석하여 triplicate로 각 well에 분주하여 반응시킨 후, wash buffer로 plate를 3회 세척하였다. 1차 항체 희석 용액을 각 well에 분주하여 반응시킨 후, wash buffer로 plate를 3회 세척하였다. 2차 항체 희석 용액을 각 well에 분주하여 반응시킨 후, wash buffer로 plate를 3회 세척하였다. Substrate 용액을 각 well에 분주하고 발색시킨 후, 각 well에 stop solution을 분주하여 반응을 정지시켰다. 450-540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[97] [표5]

배지	식물/동물 유래 성분	탄소원	독소 농도 (ng/mL)	
			28hr	48hr
대조군 1 (CYG)	카세인	글루코오스	17826.0	20007.7
1	완두	덱스트린	11716.8	6676.7
2	밀		4294.4	5703.5
3	포테이토		14732.2	9945.9
7	완두	글루코오스	20775.2	11772.9
8	밀		5135.8	17415.1
9	포테이토		14440.7	16602.9

[98] 그 결과, 표 5에 나타난 바와 같이, 독소 발현량은 완두, 포테이토, 밀 순서로 높았다. 또한, 동일한 식물성 펩톤 사용시 탄소원으로 글루코오스를 사용한 배지의 독소 발현량이 덱스트린을 사용한 배지보다 더 높은 것으로 확인되었고, 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 독소 생산 배지의 탄소원으로는 글루코오스를 사용하는 것이 더 적합한 것으로 확인되었다.

[99] 실시예 1의 실험 결과를 종합하여, 최종적인 식물성 펩톤 후보로서, 완두 펩톤(Peptide from pea), 밀 펩톤(Wheat peptide) 및 포테이토 펩톤(Peptide from potatoes No.2)를 3가지 식물성 펩톤을 선별하였다.

[100]

[101] 실시예 2: 식물성 펩톤의 비율 선정

[102] 2-1: 식물성 펩톤의 비율 선정 방법

[103] 실시예 1-4 및 1-5에서 최종적으로 선정된 식물성 펩톤 최종 후보군 3가지의 비율을 선정하기 위하여, JMP의 Custom Design을 이용하여 Response인 OD_{540nm} 값을 3 이상으로 하고, Factor인 식물성 펩톤 3가지의 비율을 2% 이내로 설계하였다. 또한, 실시예 1-1 및 1-2와 동일하게, 탄소원 및 효모 추출물은 1% 비율로 고정하였고, 배지 조건당 duplicate로 진행하였다(도 1; Peptide 1: 완두 펩톤; Peptide 2: 밀 펩톤; Peptide 3: 포테이토 펩톤).

- [104] Design Evaluation을 위하여 Power Analysis 및 Fraction of Design Space Plot을 확인하였다(도 2; Peptone 1: 완두 펩톤; Peptone 2: 밀 펩톤; Peptone 3: 포테이토 펩톤)).
- [105] Custom Design을 통해 얻은 식물성 펩톤 비율에 따른 OD_{540nm} 값의 실험 디자인은 하기 표 6과 같고, 각 조건에 따른 배양 완료 후 독소 농도를 측정하여 분석 항목에 추가하였다(Peptone 1: 완두 펩톤; Peptone 2: 밀 펩톤; Peptone 3: 포테이토 펩톤).
- [106] [표6]

	Peptone 1	Peptone 2	Peptone 3	OD540nm
1	10	20	0	
2	10	0	10	
3	20	10	0	
4	10	0	0	
5	10	10	20	
6	0	10	0	
7	0	0	0	
8	20	20	0	
9	0	20	20	
10	0	20	10	
11	20	20	20	
12	20	0	0	
13	20	0	20	
14	0	20	0	
15	20	10	10	
16	0	0	20	

- [107] 2-2: 배양에 사용한 APF 배지의 조성
- [108] 하기 표 7과 같이, 탄소원으로서 1% 글루코오스(Glucose)[10g/L], 1% 효모 추출물(yeast extract)[10g/L]에, 2% 식물성 펩톤 후보군 3종을 [10g/L]를 첨가한 후, 주사용수 90 mL에 녹인 후 최종 부피를 100 mL로 맞추고, 만들어진 배지를 15 mL culture tube에 10 mL씩 분주하여 제조하였다. 그 후, 배지를 121°C에서 30분 간 autoclave한 후 혐기성 배양기에서 혐기성 상태로 유지하였다.
- [109] [표7]

	배지 성분 (g/L)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
탄소원	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
효모 추출물	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
완두 펩톤	10	10	20	10	10	0	0	20	0	0	20	20	20	0	20	0
밀 펩톤	20	0	10	0	10	10	0	20	20	20	20	0	0	20	10	0
포테이토 펩톤	0	10	0	0	20	0	0	0	20	10	20	0	20	0	10	20

- [110] 2-3: 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양

- [111] 표 7의 배지 성분 1 내지 16의 배지가 들어 있는 배양 튜브에 20 μ L의 클로스트리디움 보툴리눔(질병관리본부 관리번호: 4-029-CBB-MF-2020001)을 접종하여 35°C $\pm$ 1°C에서 혐기적 조건으로 20, 24, 28, 48시간 동안 정치 배양을 하면서 sampling 하였다. 그 후, UV spectrophotometer를 이용하여 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm} 값을 측정하여 성장률을 확인하였고, blank는 배양 배지로 하였다. 측정한 OD_{540nm} 값을 토대로 배지의 식물성 펩톤의 첨가 비율을 선정하였다.
- [112] 2-4: 균주 성장률
- [113] 표 7의 배지 성분 1 내지 16의 배지의 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm}값을 측정하였고(표 8), 각 배지의 시간대별 OD_{540nm} 값 그래프를 비교하였다(도 5).
- [114] [표8]

배지	시간대별 OD _{540nm} 값			
	20hr	24hr	28hr	48hr
1	4.2407	6.0792	6.6703	7.6256
2	2.9021	3.1707	3.7849	4.5212
3	4.3292	5.5489	6.7432	5.1707
4	2.3007	2.6335	3.6120	3.9954
5	3.3414	4.4627	4.8113	4.5013
6	2.2590	2.8932	3.7034	3.1049
7	0.2857	0.1835	1.1849	0.6199
8	4.2728	6.7621	8.1035	4.7047
9	4.2576	4.2045	5.4406	5.8829
10	3.3709	3.7021	5.1411	4.3266
11	5.1641	5.6140	6.6381	2.2498
12	3.7988	4.7715	5.9342	4.2629
13	5.3545	5.1057	6.5547	2.0944
14	2.8511	3.3602	3.7440	4.6341
15	4.8876	3.4032	5.8843	5.2539
16	2.2215	2.8578	2.7791	3.8910

- [115] 2-5: 실험 디자인(Design of Experiment, DoE) 결과 분석
- [116] 표 7의 배지 성분 1 내지 16의 배지에 대해, 기존 클로스트리디움 보툴리눔 연구 결과의 1차 종배양 시간인 24시간대의 OD_{540nm} 값을 분석에 사용하였고, 사멸기

에 독소를 회수하므로, 독소 단백질량은 48시간대의 ELISA 측정 값을 사용하였으며(표 9), 이를 토대로 JMP를 이용하여 통계적으로 결과를 분석하였다.

[117] [표9]

	Pea	Wheat	Potato	OD at 24hr	Toxin at 48hr
1	10	20	0	6.0792	42041.2
2	10	0	10	3.1707	56296.2
3	20	10	0	5.54885	64887.3
4	10	0	0	2.6335	44518.3
5	10	10	20	4.46265	44377.2
6	0	10	0	2.89315	35791.2
7	0	0	0	0.18351	16783
8	20	20	0	6.7621	56713.4
9	0	20	20	4.2045	19848.6
10	0	20	10	3.7021	34152.4
11	20	20	20	5.61395	34592.6
12	20	0	0	4.7715	50099.6
13	20	0	20	5.10565	49023.4
14	0	20	0	3.36015	20371.4
15	20	10	10	3.4032	35153.9
16	0	0	20	2.8578	25383.1

[118] [표 9]의 조건별 결과를 분포 분석을 통해 실험 디자인이 D-optimal인 것이 확인되었고, 실험 결과들이 대체로 고르게 분포해 있는 것이 확인되었다(도 6).

[119] 산점도 행렬 분석(Scatterplot matrix analysis)에 따르면, correlation 값이 모두 0.75 이하로 약한 상관관계를 나타냈으며, X변수(완두, 밀, 포테이토)간 R값은 0에 가까운 매우 약한 상관관계이므로 interaction은 없었고, Y변수(OD_{540nm}, Toxin concentration)간, 완두와 Y변수, 밀과 OD_{540nm} 값은 모두 약한 양의 상관관계를 보이는 것이 확인되었고(도 7), 잔차 분석(Outlier analysis)을 통해 실험 결과에 이상치가 없는 것이 확인되었다(도 8).

[120] 2-6: 식물성 펩톤 종류에 따른 OD_{540nm} 값 분석

[121] 식물성 펩톤 종류에 따른 OD_{540nm} 값 분석 결과를 바탕으로 fit model을 수립하였다. 모델은 least square를 이용하여 effect leverage 방식으로 수립하였으며, response surface 방법으로 X변수를 분석하였다. 최적의 모델을 선택하기 위해 R square 값과 RMSE 값을 함께 고려하고, effect summary와 effect test의 p-value 값을 확인 후 유의하지 않은 항을 삭제하였다.

[122] 최적으로 확립한 모델의 VIF 값을 확인한 결과, 그 값이 10을 넘지 않고 1 수준으로 존재하므로 model에 문제가 없는 것이 확인되었고, 잔차 분석에서 각 점들이 위아래로 고루 분포하며 studentized residuals 결과에서 모두 95% 신뢰 구간 안에 포함되는 것이 확인되었다(도 9).

[123] Effect test 결과를 통해 model에 큰 영향을 주는 인자들을 확인한 결과, 완두 및 밀이 model에 영향을 미치는 것으로 판명되었고(표 10), 본 model을 통하여 OD_{540nm}에 대한 예측 공식(prediction formula)을 구하였으며(도 10), Main effects와

Interaction profiles을 살펴본 결과, 완두와 포테이토, 밀과 포테이토 간 상호작용이 있으나 나머지 인자간에는 상호작용이 없는 것이 확인되었다(도 11).

[124] [표10]

Effect Tests					
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Pea	1	1	19.476398	42.6410	0.0006*
Wheat	1	1	12.520622	27.4122	0.0019*
Potato	1	1	0.147585	0.3231	0.5904
Pea*Pea	1	1	0.695719	1.5232	0.2633
Pea*Wheat	1	1	0.789833	1.7292	0.2365
Wheat*Wheat	1	1	0.170263	0.3728	0.5639
Pea*Potato	1	1	2.003438	4.3863	0.0811
Wheat*Potato	1	1	2.272906	4.9762	0.0672
Potato*Potato	1	1	2.029966	4.4443	0.0796

[125] 2-7: 식물성 펩톤 종류에 따른 독소 발현량 분석

[126] ELISA 분석 결과를 바탕으로 fit model을 수립하였다. 모델은 least square를 이용하여 effect leverage 방식으로 수립하였으며, response surface 방법으로 X변수를 분석하였다. 최적의 model을 선택하기 위해 R square 값과 RMSE 값을 함께 고려하며, effect summary와 effect test의 p-value값을 확인 후 유의하지 않은 항을 삭제하였다.

[127] 최적으로 확립한 모델의 VIF 값을 확인한 결과, 그 값이 10을 넘지 않고 1 수준으로 존재하므로 model에 문제가 없는 것이 확인되었고, 잔차 분석에서 각 점들이 위아래로 고루 분포하며 studentized residuals 결과에서 모두 95% 신뢰 구간 안에 포함되는 것이 확인되었다(도 12).

[128] Effect test 결과를 통해 model에 큰 영향을 주는 인자들을 확인한 결과, 완두가 모델에 유의한 영향을 미치는 것으로 판명되었고(표 11), 본 model을 통하여 OD_{540nm}에 대한 예측 공식(prediction formula)을 구하였으며(도 13), Main effects와 Interaction profiles을 살펴본 결과, 완두와 포테이토, 밀과 포테이토 간 상호작용이 있으나 나머지 인자간에는 상호작용이 없는 것이 확인되었다(도 14).

[129] [표11]

Effect Tests					
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Pea	1	1	1432636114	15.5150	0.0043*
Wheat	1	1	16083929.8	0.1742	0.6874
Potato	1	1	107423198	1.1634	0.3122
Pea*Pea	1	1	239492040	2.5936	0.1460
Wheat*Wheat	1	1	43348778.2	0.4695	0.5126
Pea*Potato	1	1	151433498	1.6400	0.2362
Wheat*Potato	1	1	94093681.4	1.0190	0.3423

[130] 2-8: Robust Optimization

- [131] 각 반응치에 대하여 수립한 예측 공식(prediction formula)을 바탕으로 적절한 OD_{540nm} 와 최대의 독소 농도를 얻을 수 있는 배지 조건을 확인하기 위해, Profiler를 이용하여 Robust optimization 조건을 확인하였다. 실제 배양 공정에서 OD_{540nm} 값의 경우, exponential phase를 유지하면서 계대 후에 지속적으로 성장할 수 있는 세포 상태를 선정한다. 따라서, exponential phase 내에서 계대를 위한 최소 세포 농도가 OD_{540nm} 값 3 이상 7 이하인 점에서, 수립한 모델식을 바탕으로 OD_{540nm} 값을 Match target: 5로 설정하여 적절한 조건을 탐색하였다. 독소 농도의 경우, 가장 높은 농도의 독소를 생산하는 조성을 찾기 위해 ELISA 값이 Maximize인 것으로 설정하였다. 두 반응치에 대하여 desirability를 최대화한 분석을 수행한 결과, 완두와 밀만을 사용하는 것이 확인되었고, 이후 분석에서는 포테이토를 제외하였다(도 15).
- [132] Simulator 기능을 이용하여 factors와 model noise에 대하여 random variation을 주는 simulation을 5000회 실시한 후(도 16a), simulation 결과를 Edge of failure analysis를 통해 나타내었다. 5000회 중 1건을 제외하고는 반응치가 모두 spec limit안에 들어오는 것이 확인되었다(도 16b).
- [133] 적절한 조건의 결과를 얻기 위해 각 성분들의 허용범위(acceptable ranges)를 구하였고, 3σ 에 해당하는 범위를 NORs로(실제 결과 분포의 99.7%를 대변하는 범위), 4.5σ 에 해당하는 범위를 PARs로 설정하였다(도 17 및 도 18). 이를 바탕으로 구한 각 성분 별 허용범위는 표 12와 같다.
- [134] [표12]

성분 (g/L)	Set point	NORs (3σ)	PARs (4.5σ)
완두 펩톤	18 g/L	16.5 ~ 19.5	15.8 ~ 20.3
밀 펩톤	7 g/L	5.5 ~ 8.5	4.8 ~ 9.2

- [135] 실제 공정에 적용 시 작업자의 편의를 위해 set point를 완두 펩톤 18g/L, 밀 펩톤 7g/L로 설정하였고, 모델을 만족하는 범위를 확인하기 위하여, NORs(3σ , 빨간 선) 및 PARs(4.5σ , 파란 선)를 contour plot에 표시한 결과, 공정 조건을 만족하는 흰색 범위를 벗어나지 않았고, 이를 통해 본 시험과 통계분석으로 설정한 NORs와 PARs가 적합하다는 것이 확인되었다(도 19).
- [136]
- [137] 실시예 3: APF 배지별 흡광도 및 독소 발현량 비교 측정
- [138] 3-1: 배양에 사용한 배지의 조성
- [139] 클로스트리디움 보툴리눔 배양용 APF 배지에, 완두 펩톤 및 밀 펩톤을 실시예 2-8에서 선정된 함량으로 첨가하고, 탄소원으로 D-(+)-글루코오스 및 질소원으로 효모 추출물을 각각 실시예 1-2에서와 동일한 함량으로 첨가하였다.
- [140] 한편, L-시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 또는 소포제 에멀전이 APF 배지에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 APF 배지에 추가로 0.2g/L L-시스테인

인 하이드로클로라이드 일수화물 및/또는 0.24g/L 의료용 소포제 c 에멀전(Dow Corning®)을 첨가하였다. 또한, 대두(Soy) 펩톤이 APF 배지에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 APF의 완두 펩톤 및/또는 밀 펩톤 대신 18g/L 대두 펩톤을 첨가하였고, 추가로 0.2g/L L-시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 및 0.24g/L 의료용 소포제 c 에멀전(Dow Corning®)을 첨가하였다.

[141] 상기 배지들을 15 mL culture tube에 10 mL씩 분주하여 제조하였다. 그 후, 배지를 121°C에서 30분간 autoclave한 후 혐기성 배양기에서 혐기성 상태로 유지하였다. 클로스트리디움 보툴리눔 배양용 APF 배지 및 상기 배지의 구체적인 조성은 표 13과 같다.

[142] [표13]

성분 (g/L)	APF 배지	비교예 1	비교예 2	비교예 3	비교예 4	비교예 5	비교예 6	비교예 7
완두 펩톤	18	18	18	18	-	-	-	-
밀 펩톤	7	7	7	7	-	7	7	20
효모 추출물	10	10	10	10	10	10	10	20
D-(+)-글루코오스	10	10	10	10	10	10	10	10
대두 펩톤	-	-	-	-	18	18	18	-
L-시스테인 HCl	-	0.2	-	0.2	-	-	0.2	0.2
소포제 C 에멀전	-	-	0.24	0.24	-	-	0.24	0.24

[143] 3-2: 클로스트리디움 보툴리눔 균주의 배양

[144] 표 13의 배지가 들어 있는 배양 튜브(culture tube)에 20μL의 클로스트리디움 보툴리눔(질병관리본부 관리번호: 4-029-CBB-MF-2020001)을 접종하여 35°C±1°C에서 혐기적 조건으로 20, 24, 28, 48시간 동안 정지 배양을 하면서 sampling 하였다. 그 후, UV spectrophotometer를 이용하여 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm} 값을 측정하여 성장률을 확인하였고, blank는 배양 배지로 하였다.

[145] 3-3: 균주 성장률 및 독소 발현량

[146] 표 13의 배지를 각 시간마다 sampling한 배양액의 OD_{540nm} 값 및 배양 48시간 후 독소 발현량을 측정하였다(표 14, 표 15, 도 20 및 도 21).

[147] [표14]

	APF 배지	비교예 1	비교예 2	비교예 3	비교예 4	비교예 5	비교예 6	비교예 7
OD at 20 hr	4.0474	3.7144	1.7721	3.9557	2.2205	2.8330	1.7535	3.7871
OD at 24 hr	5.9563	5.3636	2.0319	5.6034	2.9668	3.4903	2.7539	5.4549
OD at 28 hr	7.1021	6.2576	1.7567	7.1667	3.5252	4.2801	3.2109	6.7739
OD at 48 hr	4.5636	5.3044	1.5032	4.5062	4.4182	5.3889	3.7297	7.8900
Toxin at 48 hr (μg)	588.8	452.1	137.9	501.1	75.2	76.4	30.1	263.7
Control 대비 독소발현(%)	-	-23.2	-76.6	-14.9	-87.2	-87.0	-94.9	-55.2

[148] [표15]

		측정값 (ng/mL)	평균값	배양액 (mL)	독소량 (μg)
APF 배지	tube1	46894.1	58880.8	10	588.8
	tube2	70867.6			
비교예 1	tube1	51505.6	45208.9	10	452.1
	tube2	38912.1			
비교예 2	tube1	13052.2	13792.6	10	137.9
	tube2	14533.0			
비교예 3	tube1	57599.9	50110.8	10	501.1
	tube2	42621.6			
비교예 4	tube1	6196.3	7522.7	10	75.2
	tube2	8849.1			
비교예 5	tube1	7051.5	7644.9	10	76.4
	tube2	8238.4			
비교예 6	tube1	2696.2	3012.2	10	30.1
	tube2	3328.3			
비교예 7	tube1	29852.4	26366.1	10	263.7

- [149] 그 결과, 표 14, 도 20 및 도 21에 나타난 바와 같이, 본 발명의 APF 배지에 클로스트리디움 보툴리눔을 배양할 경우, APF의 20 ~ 28시간대의 성장이 가장 좋고, 균주 성장 이후 48시간대의 독소 발현량도 가장 높았다.
- [150] 한편, 본 발명의 APF 배지에 추가로 L-시스테인 HCl 일수화물만 첨가한 비교예 1, 본 발명의 APF 배지에 추가로 의료용 소포제 C 에멀전만 첨가한 비교예 2, 본 발명의 APF 배지에 추가로 L-시스테인 HCl 일수화물 및 의료용 소포제 C 에멀전을 첨가한 비교예 3의 경우, 본 발명의 APF 배지보다 균주 성장이 낮고, 독소 발현량이 각각 23.2%, 76.6%, 14.9% 감소하는 것으로 확인되었다. 이에, 본 발명의 APF 배지 구성에 추가로 L-시스테인 HCl 일수화물 및/또는 의료용 소포제 C 에멀전을 첨가하더라도, 본 발명의 APF 배지 구성이 균주 성장 및 독소 발현량이 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [151] 한편, 본 발명의 APF 배지에 완두 펩톤 및 밀 펩톤 대신 대두 펩톤을 첨가한 비교예 4, 본 발명의 APF 배지에 완두 펩톤 대신 대두 펩톤을 첨가한 비교예 5, 본 발명의 APF 배지에 완두 펩톤 대신 대두 펩톤을 첨가하고 추가로 L-시스테인 HCl 일수화물 및 의료용 소포제 C 에멀전을 첨가한 비교예 6, 및 선행문헌 한국 공개특허 10-2022-0140696의 구성과 동일한 비교예 7의 경우, 본 발명의 APF 배지보다 균주 성장이 낮고, 독소 발현량이 각각 87.2%, 87.0%, 94.9%, 55.2% 감소하는 것으로 확인되었다. 이에, 독소를 회수할 수 있는 사멸기까지 소요시간이 72시간 이상 예상되는 점을 고려하면, 본 발명의 APF 배지 구성이 균주 성장 및 독소 발현량이 우수한 것을 확인할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 밀(wheat) 펩톤 및 완두(pea) 펩톤을 포함하는 식물성 펩톤; D-(+)-글루코오스; 및 효모 추출물을 포함하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 동물 유래 성분을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 동물 유래 성분은 카세인 가수분해물인 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 밀 펩톤의 함량은 0.1 내지 4.0w/v%인 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 완두 펩톤의 함량은 0.1 내지 3.5w/v%인 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 D-(+)-글루코오스 및 상기 효모 추출물의 함량은 각각 0.005 내지 2w/v%인 것을 특징으로 하는 클로스트리디움 보툴리눔 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 7] 하기 단계를 포함하는 보툴리눔 독소의 제조방법:
 (a) 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 배지 조성물을 이용하여 클로스트리디움 보툴리눔을 배양하여 보툴리눔 독소를 생성시키는 단계; 및
 (b) 상기 생성된 보툴리눔 독소를 회수하는 단계.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 배양은 혐기 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 배양은 33 내지 37°C의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 배양은 20 내지 48시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 독소는 보툴리눔 독소 A, B, C, D, E, F 및 G로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 보툴리눔 독소의 제조방법.