


| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2016-0080449 (43) 공개일자 2016년07월08일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/67 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0192270 (22) 출원일자 2014년12월29일 심사청구일자 없음 | (71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교) (72) 발명자 이진우 인천광역시 연수구 송도과학로 85, 연세대학교 진리관D 307호 (송도동) 윤세미 인천광역시 남구 경원대로833번길 39-2 (주안동) 최은주 인천광역시 동구 육송로16번길 15 (송림동) (74) 대리인 특허법인이룸리온, 특허법인이룸 | |

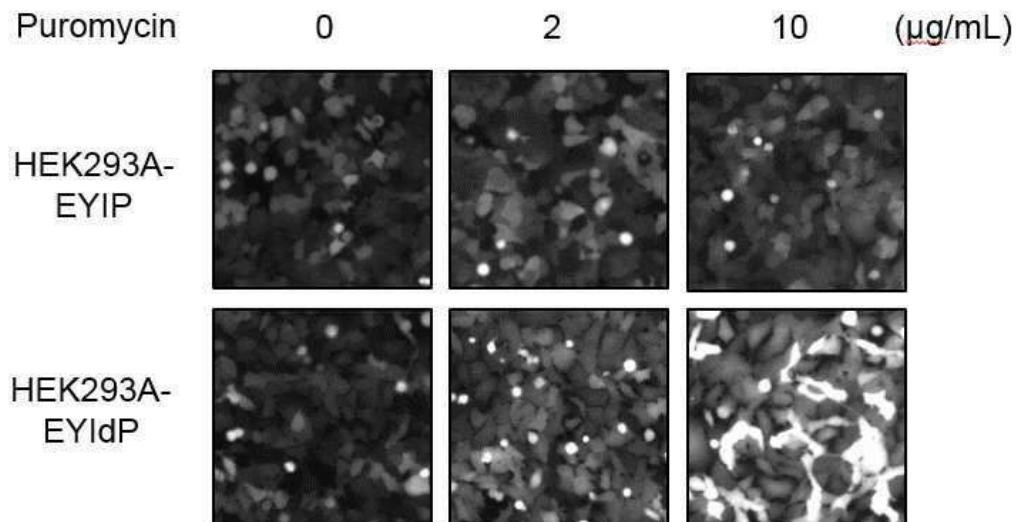
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **고발현 세포주 확립방법**

(57) 요약

본 발명은, IRES 및 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트를 포함하는 고발현 세포주 확립용 발현벡터, 이를 이용한 형질전환세포, 고발현 세포주 확립방법, 및 목적 단백질의 고생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 위양성 세포의 발생을 차단하면서 고발현 세포주만을 신속 용이하게 선별할 수 있으므로, 효율적인 재조합 단백질의 생산이 가능하다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345220439

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(이공분야 기초연구)-일반연구자지원사업(기본)

연구과제명 지방 세포에서 발현되는 tubby 단백질의 조절 및 기능 연구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.30

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, 고발현 세포주 확립용 발현벡터.

- (i) 목적 단백질(POI)을 암호화하는 유전자 발현 카세트;
- (ii) 내부리보솜유입점(Internal Ribosomal Entry Site, IRES)을 암호화하는 유전자; 및
- (iii) 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단백질 불안정화 서열은 유비퀴틴(ubiquitin) G76V 변이체 서열인 것을 특징으로 하는, 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 항생제 선택 마커는 퓨로마이신 아세틸트랜스퍼라제, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 및 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, 발현벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 목적 단백질(POI)은 항체, 호르몬, 백신 및 형광단백질로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, 발현벡터.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 IRES는 상기 (i) 및 (iii)의 발현 카세트 사이에 위치하는 것을 특징으로 하는, 발현벡터.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 얻어진 형질전환세포.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포인 것을 특징으로 하는, 형질전환세포.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 동물세포는 HEK293(Human Embryonic Kidney Cell), CHO(Chinese Hamster Ovary Cell) 및 Vero(Monkey Kidney Cell)로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, 형질전환세포.

청구항 9

제 6 항의 형질전환세포를 항생제로 선택하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 고발현 세포주 확립방법.

청구항 10

제 9 항의 방법으로 확립된 고발현 세포주를 배양한 후 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 목적 단백질 고생산방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은, IRES 및 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트를 포함하는, 고발현

세포주 확립용 발현벡터에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 발현벡터, 이를 이용한 형질전환세포, 고발현 세포주 확립방법, 및 목적 단백질의 고생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 현재 FDA의 승인을 얻어 시판되는 제조합 의약품들의 대부분이 동물세포 배양 방법을 사용하여 생산되고 있으며, 특히 고부가 가치의 당 단백질 대부분이 동물세포배양 방법으로 생산되기 때문에 고생산성의 제조합 세포주의 연구 개발은 산업계의 집중적인 투자를 받으며 빠르게 성장하고 있는 산업 기술 분야이다. 따라서, 포유류 세포에서 원하는 목적 단백질(Protein of Interest, POI)을 높은 수준으로 발현하는 안정한 발현 세포주를 확립하는 일은, 최근 각광받는 항체 약물 등 생물제제(biologics)의 생산성과 직결되는 일이기 때문에 생물공학 적, 산업적으로 매우 중요하다.
- [0003] 종래 이러한 고발현 유도방법으로는, promoter, enhancer, insulator 등을 개량하여 전사효율을 높힘으로써 mRNA를 대량 생성시키는 방법과, 생성된 mRNA의 안정성을 높이는 방법에 초점이 맞춰져 있다. 그러나, 이러한 방법을 이용하더라도, 결국 높은 수준의 발현을 유지하는 클론을 선별하는 일은 고발현 유도와는 또 다른 문제 이다.
- [0004] 한편, 안정한 발현 세포주를 확립하기 위하여는, 목적 단백질을 발현하는 플라스미드의 transfection 및 항생제 등을 이용한 선택(antibiotic selection) 과정을 요하므로, 형질전환된 세포들 중에서 높은 수준의 발현을 유지 하는 clone을 찾아내는 지리하고도 소모적인 작업을 필요로 한다. 이때, 일반적으로 많이 사용하는 플라스미드 는, POI를 발현하는 발현카세트(expression cassette)와, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제나 퓨로마이신 아세틸 트랜스퍼라제와 같이, 항생제 처리시 생존하게 하는 선택 마커(selection marker) 단백질의 발현카세트를 별도로 가진다.
- [0005] 이러한 플라스미드를 진핵세포에 트랜스펙션하여 항생제 선택과정을 거치면 안정한 발현 세포주를 얻을 수 있는 데, 이를 위해서는 원형 상태의 플라스미드의 임의의 부위에서 절단이 일어나 선형 상태가 되고, 이것이 숙주세 포의 염색체에 삽입(integration)되는 과정이 필요하다. 그러나, 만약 상기 절단부위가 POI 발현카세트 내부일 경우에는, 목적 단백질의 발현 없이 선택마커 단백질의 발현에 의해 항생제 선택에서 살아남게 되는 문제가 있 다. 즉, 항생제 선택에 의해 살아남았으나 POI를 발현하지 않는 위양성 세포가 발생하는 문제가 있는데, 이러한 문제는 POI를 코딩하는 유전자가 길수록 가능성이 높은 바, POI 발현 카세트 내부가 절단될 확률이 높아지기 때 문이다. 또한, POI 발현 카세트에 가장 널리 사용하는 프로모터인 CMV promoter는 시간이 지나면서 진핵세포에 서 그 활성이 감소하게 되는데, 이 또한 항생제 선택을 오래 할수록 위양성 세포의 발생이 증가하는 원인이요소가 된다.
- [0006] 종래, 이러한 문제들을 해결하기 위해, 내부리보솜유입점(Internal Ribosomal Entry Site, IRES)을 사용하여 하나의 mRNA에서 POI와 선택마커 단백질을 모두 발현하게 하는 기술이 개발되었다. 진핵세포에서 mRNA의 번역은 일반적으로 캡(cap)구조 의존적이지만, 캡구조 비의존성 번역을 하는 경우 리보솜이 mRNA 사슬 내부에 존재하고 있는 특정 영역(구조)에 직접 결합하여 번역을 시작하는 경우가 있어 이것을 내부인식(개시)기구라 하고, 내부 개시기구에서 리보솜이 직접 결합하는 mRNA상의 부위에 해당하는 IRES는 mRNA에서 CAP-비의존성 번역을 시작할 수 있도록 하는 RNA의 2차구조를 의미한다. 즉, mRNA의 특정 서열이 2차구조를 형성하여 IRES를 만들면 진핵세 포의 리보솜이 IRES에 결합하여 CAP 단백질이 없어도 번역을 시작할 수 있다.
- [0007] 따라서, IRES를 이용하면 하나의 mRNA에서 두개의 ORF의 발현이 가능하다. 즉, 진핵세포의 유전자는 monocistronic하여 하나의 mRNA에서 한개의 단백질이 만들어지는 반면 바이러스나 박테리아는 polycistronic한 데, 진핵세포에서 bicistronic하게 발현이 유도될 수 있도록 첫번째 ORF와 두번째 ORF 사이에 IRES 서열을 삽입 하여 bicistronic expression vector 형태로 이용할 수 있다. 특히, 이러한 방법은, POI와 선택마커 단백질을 동시에 발현시켜야 하는 경우 유용한데, 두번째 위치하는 선택마커 단백질이 발현되려면 첫번째 위치하는 POI가 먼저 전사되어야 하므로, 목적 단백질과 선택마커 단백질의 발현을 동질화할 수 있기 때문이다. 상기 bicistronic expression vector에서 첫번째 POI ORF는 cap-의존성 번역을 하게되고, 두번째 선택마커 ORF는 IRES-의존성 번역을 하게 된다.
- [0008] 따라서, IRES를 사용하면 위양성 세포의 생성이 근원적으로 차단되는 장점이 있지만, 이러한 장점에도 불구하고 실제 단백질 발현수율이 높은 세포주를 만들기 위해 IRES 기술이 잘 사용되지 않는데, 목적 단백질의 발현수 율이 보장되지 않기 때문이다. 그 원인으로는, 도 1의 모식도에서 알 수 있듯이, 상대적으로 적은 수의 mRNA로 부터 발현된 선택마커 단백질의 발현양이 항생제 선택에서 살아남기에 충분하기 때문이다. 즉, 높은 발현율을

보이는 세포와 낮은 발현율을 보이는 세포 모두 항생제 선택시 살아남게 되므로, 이들 세포중 고발현 수율을 보이는 세포주를 선별하기란 쉽지 않다는 문제가 있다. 더욱이, 세포배양을 지속적으로 하게 되면, 프로모터의 활성이 감소하게 되어도 계속 살아남을 수 있으므로 오랜 배양 후에는 대부분의 세포가 낮은 발현을 보이게 된다.

[0009] 따라서, IRES를 활용하여 위양성 세포의 발생을 차단하면서 높은 발현을 보이는 세포만 살아남게 하기 위해서는 선택마커 단백질의 발현을 감소시키는 기술이 필요하다. 이를 통해, 상대적으로 더 많은 양의 mRNA가 있어야 비로서 항생제 선택에서 살아남을 수 있는 양의 선택마커 단백질 발현이 가능하게 되므로, 높은 단백질 발현을 보이는 세포만 살아남게 되어 고발현 세포주의 선별이 가능할 것이다(도 2 참조). 또한, 장기간 배양에 의해 프로모터의 활성이 감소된 세포는, 선택마커 단백질의 양이 충분치 못해 살아남지 못하고, 높은 발현을 보이는 세포만 지속적으로 살아남게 될 것이다.

[0010] 이와 같이, 선택마커 단백질의 발현을 감소시키기 위해서는, mRNA 수준에서 불안정화시키는 방법과 단백질 수준에서 불안정화시키는 방법이 있다. 그러나, mRNA를 불안정화시키는 방법을 이용할 경우, 선택마커 단백질의 발현을 감소시키기 위해서는 POI의 발현도 같이 감소하게 되는 문제가 있기 때문에, 단백질 수준에서 불안정화시키는 방법이 더욱 유용할 것이다. 단백질 수준의 불안정화 방법에는, 카복시말단에 mouse ODC 단백질의 PEST 도메인 등을 붙이는 방법이 주로 사용되나 이 정도로는 충분치 않아, 더 강력한 불안정화 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명은, 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트와 IRES 유전자를 포함하는, 고발현 세포주 확립용 발현백터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 발현백터를 이용한 형질전환세포, 고발현 세포주 확립방법, 단백질 생산방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 목적 단백질(POI)을 암호화하는 유전자 발현 카세트; 내부리보솜유입점(Internal Ribosomal Entry Site, IRES)을 암호화하는 유전자; 및 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트를 포함하는, 고발현 세포주 확립용 발현백터를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은, 상기 발현백터로 숙주세포를 형질전환하여 얻어진 형질전환세포를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은, 상기 형질전환세포를 항생제로 선택하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 고발현 세포주 확립방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은, 상기 방법으로 확립된 고발현 세포주를 배양한 후 단백질을 정제하는 단계를 포함하는, 목적 단백질 고생산방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로, 상기 단백질 불안정화 서열은 유비퀴틴(ubiquitin) G76V 변이체 서열일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 항생제 선택 마커는 퓨로마이신 아세틸트랜스퍼라제, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 및 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 목적 단백질(POI)은 항체, 호르몬, 백신 및 형광단백질로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 IRES는 상기 POI 발현 카세트와 항생제 선택 마커 발현 카세트 사이에 위치할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 숙주세포는 동물세포일 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 동물세포는 HEK293(Human Embryonic Kidney Cell), CHO(Chinese Hamster Ovary Cell) 및 Vero(Monkey Kidney Cell)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 위양성 세포의 발생을 차단하면서 고발현 세포주만을 신속 용이하게 선별할 수 있으므로, 효율적인 재조합 단백질의 생산이 가능하다. 따라서, 세포배양기술을 통해 생산되는 치료용 항체 단백질, 호르몬, 백신, 바이오시밀러 등의 약물을 대량 생산하는데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은, IRES 유전자와 항생제 선택마커 유전자를 포함하는 일반적인 발현벡터에 대하여 항생제 선택을 실시한 결과를 나타내는 모식도이다.

도 2는, IRES 유전자와 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택마커 유전자를 포함하는 본 발명의 발현벡터에 대하여 항생제 선택을 실시한 결과를 나타내는 모식도이다.

도 3은, 일반적인 발현벡터(pLVX-EYIP)와 본 발명의 발현벡터(pLVX-EYIdP)의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 4는, 일반적인 발현벡터(pLVX-EYIP) 또는 본 발명의 발현벡터(pLVX-EYIdP)를 함유하는 렌티바이러스로 숙주 세포를 형질도입하여, 상기 각 발현벡터가 숙주세포 게놈 내에 안정하게 integration되었음을 보여주는 그래프이다.

도 5는, 일반적인 발현벡터(pLVX-EYIP)와 본 발명의 발현벡터(pLVX-EYIdP) 각각을 숙주세포(HEK293A)에 형질전환시키고 다른 농도(2ug/ml, 10ug/ml)의 항생제(puromycin)로 선택한 후, 본 발명의 발현벡터에 의해 형광단백질(YFP)이 고발현되었는지 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.

도 6은, 일반적인 발현벡터(pLVX-EYIP)와 본 발명의 발현벡터(pLVX-EYIdP) 각각을 숙주세포(HEK293A)에 형질전환시키고 다른 농도(2ug/ml, 10ug/ml)의 항생제(puromycin)로 선택한 후, 본 발명의 발현벡터에 의해 형광단백질(YFP)이 고발현되는 안정한 세포주가 확립되었는지 형광현미경으로 형광세기를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은, 목적 단백질(POI)을 암호화하는 유전자 발현 카세트; 내부리보솜유입점(Internal Ribosomal Entry Site, IRES)을 암호화하는 유전자; 및 단백질 불안정화 서열이 연결된 항생제 선택 마커 유전자 발현 카세트를 포함하는, 고발현 세포주 확립용 발현벡터를 제공한다.

[0027] 본 발명에서는, 항생제(Puromycin) 저항성을 부여하는 단백질(예를 들면, puromycin acetyl transferase, PA C)의 아미노 말단에 ubiquitin-fusion degradation(UFD)을 일으키게 하는 Ubiquitin G76V(Ub^{G76V})를 도입함으로써, 상기 단백질을 불안정화시킬 수 있는 발현벡터(예; pLVX-EYIdP)를 고안하였다. 이때, Ubiquitin G76V은, 야생형 유비퀴틴의 76번째 아미노산인 glycine을 valine으로 치환시킨 변이체로서, ubiquitin hydrolase 분해에 저항성을 갖는 형태이다.

[0028] 또한, 본 발명에서는, 상기 발현벡터를 함유하는 렌티바이러스를 제작하여 숙주세포(HEK293)에 도입한 후 항생제 선택을 진행하고, 단백질 발현 및 형광세기를 확인한 결과, 대조군(pLVX-EYIP)에 비하여 목적 단백질(POI)의 발현량 및 형광세기가 3배 이상 증가함을 알 수 있었다.

[0029] 이러한 결과는, 본 발명의 발현벡터에 의해 목적 단백질(POI)이 고발현되는 안정한 세포주만을 선별할 수 있음을 의미하는 것이다. 즉, 본 발명에 의해, 세포 선별의 공정 및 시간을 대폭 단축할 수 있고, 고발현을 나타내는 세포의 비율이 상승함으로써 단시간에 효율적으로 목적 단백질 유전자를 고레벨로 발현하는 세포를 확립할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, "발현 벡터"란 유전자 공학에 이용되는 벡터로서, 플라스미드 벡터가 바람직하나 이에 한정되지 않고, 예를 들면 바이러스 벡터, 코스미드 벡터, 세균 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC) 및 다른 비플라스미드 벡터도 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, "선택 마커 유전자(selection marker gene)"란 목적 단백질의 유전자와 연결되어 발현 벡터에 삽입된 마커 유전자로서, 목적 유전자가 정상적으로 발현되는 세포를 선별 확인할 수 있게 한다. 이때, 선택 마커 단백질로는, 퓨로마이신 아세틸트랜스퍼라제, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0032] 본 발명에 있어서, "발현 카세트"란 프로모터에서부터 유전자 코드 서열, 터미네이터 서열까지의 유전자 발현의 단위를 의미하는 것으로, 인트론, 스페이서, 번역 증강 영역 등을 포함하는 경우도 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 선택 마커 유전자 발현 카세트에 있어서의 "프로모터"는 동물 세포, 특히 포유류 세포에서 발현 가능한 프로모터이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 인간이나 마우스의 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 원숭이 바이러스 40(SV40) 프로모터, 인간 헤르페스 단순 바이러스의 티미딘 키나제 유전자(HSV-tk) 프로모터 등의 바이러스에서 유래하는 것이거나; 또는 마우스 포스포글리세레이트-키나제1(phosphoglycerate-kinase1) 유전자(PGK) 프로모터 등의 비바이러스성 세포 유전자에서 유래하는 것이거나; 또는 유래가 상이한 프로모터의 혼성을 들 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, "항생제"란 단백질 합성 저해제 물질로서, 퓨로마이신(Puromycin), 네오마이신(Neomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 블라스티사이드(Blasticidin), 게네티신(Geneticin)(G418), 제오신(Zeocin) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "IRES(Internal Ribosomal Entry Site)"란 리보솜이 직접 결합하는 mRNA상의 부위를 말하며, mRNA에서 CAP-비의존성 번역을 시작할 수 있도록 하는 RNA의 2차구조를 의미한다. 진핵세포에서 bicistronic하게 발현이 유도될 수 있도록, 첫번째 ORF와 두번째 ORF 사이에 IRES 서열을 삽입하여 bicistronic expression vector 형태로 이용할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "목적 단백질(POI)"은 항체, 호르몬, 백신, 형광단백질 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 목적 단백질(POI) 발현 카세트, IRES 및 선택마커 발현 카세트의 배치 순서는, 목적 단백질(POI)의 발현이 가능한 한 특별히 한정되지 않지만, 일반적으로 목적 단백질(POI) 발현 카세트, IRES 및 선택마커 발현 카세트 순서로 상류로부터 하류로 향하여 배치한다. 이들 3개의 요소는 서로 직접 연결되어 있을 필요는 없고, 원하는 바에 따라 인트론, 스페이서, 번역 증강 영역 등을 사이에 가질 수도 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은, 상기 발현백터로 숙주세포를 형질전환하여 얻어진 형질전환세포를 제공할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, "숙주세포"는 재조합 단백질의 생산에 일반적으로 이용되는 사람 세포(HEK293, PER.C6, HKB11, HT1080 F2N 등) 외에도, 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO), 원숭이 신장세포(Vero), 마우스 미엘로마 세포(NSO), 마우스 골수종 세포(SP2/0), 베이비 햄스터 키드니 세포(BHK-21) 등의 포유류 유래의 세포를 들 수 있으나, 이에 한정되지 않고 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 모르모트, 토끼, 개, 소, 말, 양, 원숭이, 돼지 등의 동물 유래의 세포 등을 넓게 도입 대상으로 할 수 있다. 또한, 대장균 등의 세균 세포나 효모, 곤충 세포 등을 이용한 단백질 생산 시스템에도 응용할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 숙주세포의 "형질전환 방법"은 제한이 없으며, 예를 들면 바이러스 감염법(transduction), 리포펙션법, 인산칼슘법, 전기천공법, DEAE 텍스트란법, 마이크로인젝션 등을 이용할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은, 상기 형질전환 세포를 항생제로 선택하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 고발현 세포주 확립방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 항생제 선택에 사용하는 항생제 농도는 일반적으로 사용되는 농도의 범위에서 고발현 세포의 농축이 가능하지만, 조금 높은 농도가 바람직하다. 최적의 농도는 숙주세포나 이용하는 배지의 종류에 따라 다르며, 이들 농도의 설정 방법은 당업자에게는 공지이고, 적절하게 설정할 수 있다. 예를 들면, HEK293 세포를 배양하고 퓨로마이신 내성 유전자 발현 카세트를 이용한 경우의 퓨로마이신의 농도로서는 2 μ g/ml 이상, 보다 바람직하게는 5 μ g/ml 이상, 더욱 바람직하게는 10 μ g/ml 이상이다.
- [0043] 본 발명의 선별방법을 이용하면, 항생제 선택 후에도 생존하는 세포군(폴리클론)의 상태로 목적 단백질 생산량이 유의하게 상승하고 있어, 이들 세포군으로부터 세포를 단리하고 배양함으로써 용이하게 고발현을 나타내는 세포주(모노클론)를 취득할 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 세포의 발현 수준은 리포터 유전자의 발현량에 의해 확인할 수 있으며, 예를 들면 YFP(Yellow Fluorescent Protein; 황색 형광 단백질), GFP(Green Fluorescent Protein; 녹색 형광 단백질), Luciferase 유전자 등의 형광 단백질 유전자를 포함하는 발현 카세트를 본 발명의 발현 백터에 도입하고, 형광 현미경 또는 FACS(fluorescence activated cell sorting; 형광 활성화 세포 분석기) 등의 유세포 분석기를 이용하여 형광 강도를 해석함으로써 확인할 수 있다. 또한, 리포터 유전자에 한하지 않고, ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; 효소 결합 면역흡착 측정법), 효소 면역 측정법(EIA) 등을 이용함으로써 항체 등의 목적

단백질의 발현량을 분석할 수도 있다.

[0045] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0046] **[실시예]**

[0047] **실시예 1: 불안정화 선택마커 발현벡터 제작**

[0048] 목적 단백질을 높은 수준으로 발현하는 안정한 세포주 확립을 위한 첫 단계로, 불안정화 선택마커(destabilized selective marker)가 발현되는 발현벡터를 제조하였다.

[0049] 우선, EF1a 프로모터, IRES, 및 Puromycin acetyl transferase 유전자(Puro)를 함유하는 벡터 pLVX-EF1a-IRES-Puro(이하, "pLVX-EIP")((주)Clontech)를 구입하여, PAC(Puromycin acetyl transferase)의 아미노 말단에 UFD(ubiquitin-fusion degradation)를 일으키게 하는 ubiquitin G76V(이하 Ub^{76V})를 도입하여 "pLVX-EIdP"를 제작한 후, Transgene의 발현 정도를 형광으로 쉽게 비교하기 위하여 YFP(yellow fluorescent protein)를 pLVX-EIP와 pLVX-EIdP에 각각 도입하여 최종적으로 pLVX-EYIP와 pLVX-EYIdP를 얻었다.

[0050] 구체적인 방법은 하기와 같다.

[0051] **1-1. pLVX-EIdP 제작**

[0052] pLVX-EIP((주)Clontech)를 주형으로 하고, 프라이머쌍으로서 5'-aga cga cct tcc atg cat acc gag tac aag ccc-3' 및 5'-ggg ctt gta ctc ggt atg cat gga agg tcg tct-3'를 사용하여 site-directed mutagenesis를 시행함으로써 pLVX-EIP의 PAC(Puromycin acetyl transferase) 아미노 말단에 NsiI restriction site를 도입하고, 이를 pLVX-EF1a-IRES-NsiI-Puro로 명명하였다.

[0053] 한편, Ub^{G76V}-Puro 플라스미드를 주형으로 하고, 프라이머쌍으로서 5'-tta tgc atg tgc aga ttt tcg tg-3' 및 5'-ttc tgc agc ac caca cct ctg-3'로 PCR 증폭을 시행한 후, NsiI/PstI으로 절단한 단편을 상기 pLVX-EF1a-IRES-NsiI-Puro의 NsiI 위치에 삽입하여 "pLVX-EIdP"를 얻었다.

[0054] **1-2. pLVX-EYIP와 pLVX-EYIdP 제작**

[0055] YFP(yellow fluorescent protein) 유전자를 포함하는 pcDNA3.1-hygro-YFP 벡터를 NheI 및 XbaI으로 절단하여 YFP 유전자 단편만을 분리하여, 상기 실시예 1-1에서 얻어진 pLVX-EIP 및 pLVX-EIdP의 XbaI restriction site에 각각 삽입한 후, 이들 플라스미드를 pLVX-EYIP와 pLVX-EYIdP라고 명명하였다(도 3 참조).

[0056] **실시예 2: Lentivirus 제작**

[0057] 실시예 1에서 제작된 pLVX-EYIP 또는 pLVX-EYIdP를 함유하는 2종류의 렌티바이러스를 제작하기 위하여, 다음의 실험을 수행하였다.

[0058] 우선, 숙주세포로서 HEK293T(Human Embryonic Kidney Cell 293T) 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6웰 플레이트에 7x10⁵ 세포/웰의 농도로 접종한 후 24시간 뒤에 항생제를 포함하지 않는 DMEM 배지로 교체하였다. 이후, pLVX-EYIP 또는 pLVX-EYIdP와, packaging vector인 psPAX2(1.2ug) 및 pMD2G(0.4ug)을 4:3:1의 비율로 총 3ug이 되도록 HEK293T 세포에 밤새 트랜스펙션킨 후, 다음날 10% FBS와 항생제가 포함된 DMEM/F12 배지로 교체하고, 24시간 후 1차 바이러스 수확을 진행하였다. EYIP와 EYIdP 렌티바이러스가 포함된 배지를 1.5ml 튜브에 모아서 pellet down 후 200ul씩 분주하여 -80℃에 냉동 보관하였다. 플레이트의 웰에 새 배지를 교체하여 24시간 후 위와 같은 방법으로 2차 바이러스 수확을 진행하였다.

[0059] **실시예 3: Lentivirus Transduction**

[0060] 실시예 2에서 제조된 2종류(EYIP와 EYIdP)의 YFP 발현 렌티바이러스를 HEK293A(Human Embryonic Kidney Cell 293A) 세포주에 도입하기 위해, 다음의 실험을 수행하였다.

[0061] 우선, HEK293A 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 24웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 접종하였다. 24시간 뒤에 EYIP와 EYIdP lentivirus 200ul에, 바이러스와 숙주세포의 결합력을 높혀 감염도(infectivity)를 증가시키기 위하여 polybrene을 8ug/ml 농도로 넣고 DMEM 배지 200ul와 잘 혼합하여 HEK293A에 감염시켰다. 바이러스 감염 15시간 후, 새로운 배지로 교체하고, 72시간 후 puromycin을 0, 2, 10ug/ml의 농도로 각각 처리하여 selection을 진행하였다.

[0062] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 렌티바이러스에 의해 각 발현백터가 숙주세포 게놈에 안정하게 integration되어, YFP가 안정하게 발현되는 selected HEK293A-LVX-EYIP 세포주(이하, 293A-LVX-EYIP-P0,2,10) 및 HEK293A-LVX-EYIdP 세포주(이하, 293A-LVX-EYIdP-P0,2,10)가 확립되었음을 확인하였다.

[0063] **실시예 4: Western Blot**

[0064] 실시예 3에서 제조된 2종류의 안정적인 세포주에 대하여, YFP 발현량을 확인하기 위하여, 다음의 방법으로 웨스턴 블랏팅을 실시하였다.

[0065] 우선, 실시예 3에서 농도별로(0, 2, 10ug/ml) 항생제 선택된 293A-LVX-EYIP-P0,2,10 세포와 293A-LVX-EYIdP-P0,2,10 세포를, 10% FBS를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6웰 플레이트에 5×10^5 세포/웰의 농도로 접종하였다. 24시간 후 PBS-Triton lysis buffer 200ul를 세포에 처리하여 lysis시킨 후, 세포를 1.5ml 튜브에 모아 13,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리하고, 상층액만 따로 모아 단백질을 실시한 후 단백질 양이 20ug이 되도록 5× Sample buffer를 넣어서 샘플을 만들고 100℃에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시켰다.

[0066] 10% SDS-PAGE gel에 상기 샘플을 loading한 후 125V에서 1시간 이상 전기영동시킨 후, NC membrane을 이용하여 통상의 방법으로 transfer 및 blocking을 진행하였다. 1시간 후, 1차 항체인 항-YFP, 항-PuroR, 항-Actin 항체를 4℃에서 밤새 배양하고, 다음날 1× PBST 버퍼로 membrane을 3번 세척한 후 2차 항체를 결합시켰다. 이때, 2차 항체로서 YFP는 anti-rabbit, PuroR은 anti-rat, Actin은 anti-goat로 1:5000의 비율로 상온에서 1시간 처리하였다. 이후, 1× PBST 버퍼로 membrane을 3번 세척하고 ECL solution을 membrane에 처리한 후 현상하여, YFP, Ub-PuroR, PuroR, Actin의 밴드 양상을 확인하였다.

[0067] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 항생제 저항 단백질을 불안정화시킨 본 발명의 발현백터(EYIdP)로 형질전환된 세포의 경우에는, 실제 Ubiquitin G76V가 Puromycin acetyltransferase의 N-말단에 부가되어 전기영동상의 shift가 관찰되었다. 또한, 본 발명의 경우, 일반적인 발현백터(EYIP)에 비하여 형광단백질(YFP)의 발현량이 3배 이상 증가하였으며, 특히 항생제(puromycin)의 농도가 높을수록 발현량은 더욱 증가하였다.

[0068] **실시예 5: 형광세기 측정**

[0069] 실시예 4를 통하여 본 발명의 발현백터(pLVX-EYIdP)에 의해 형광단백질(YFP)의 발현량이 월등히 증가하였음을 확인하였으므로, 이에 비례하여 형광세기도 증가하였는지 더욱 확인하였다.

[0070] 우선, 실시예 3에서 농도별로(0, 2, 10ug/ml) 항생제 선택된 293A-LVX-EYIP-P0,2,10 세포와 293A-LVX-EYIdP-P0,2,10 세포를, 10% FBS를 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰의 농도로 접종한 후, 24시간 지나 형광 현미경을 이용하여 1000배에서 형광세기를 관찰하였다.

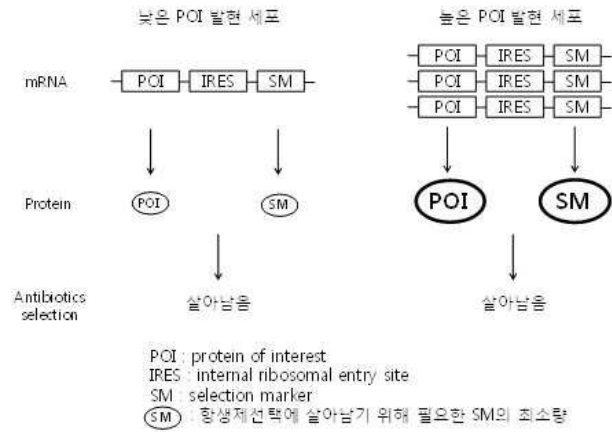
[0071] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현백터(pLVX-EYIdP)로 형질전환된 세포의 경우 형광세기가 일반적인 발현백터(pLVX-EYIP)에 비하여 현저히 증가하였으며, 특히 항생제(puromycin)의 농도가 높을수록 형광세기는 더욱 증가하였다. 이로써, 본 발명의 발현백터에 의해 목적 단백질(POI)이 고발현되는 안정적인 세포주가 확립되었음을 알 수 있다.

[0072] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라

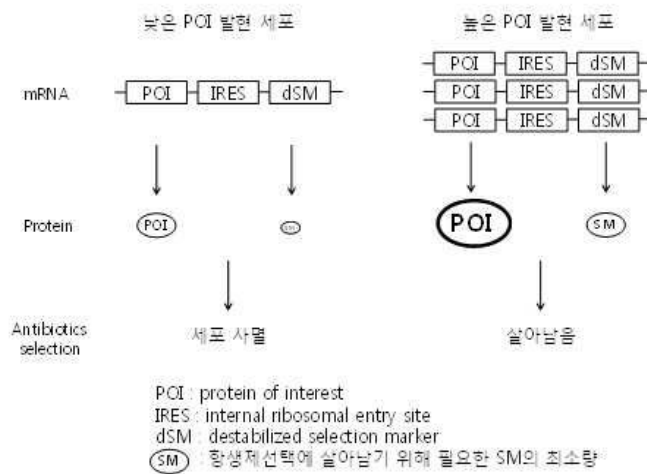
면 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

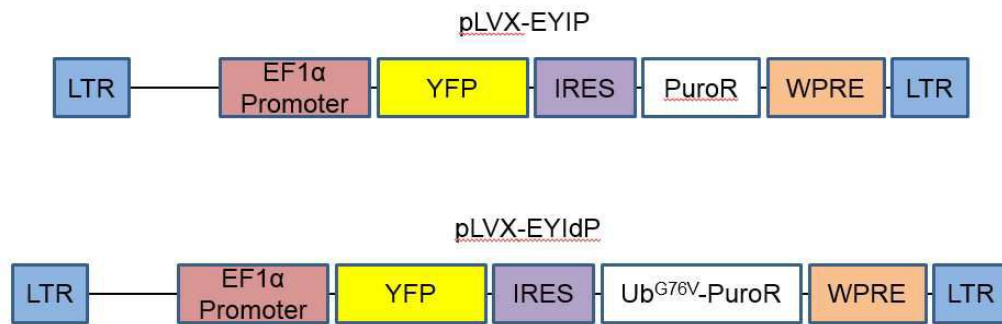
도면1



도면2

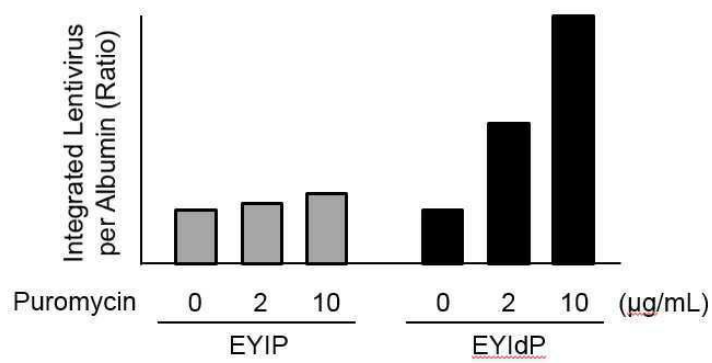


도면3

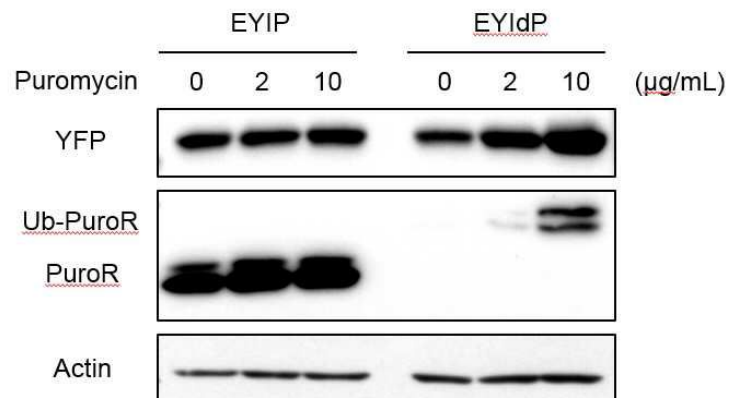


LTR, long term repeat; YFP, yellow fluorescent protein; IRES, internal ribosomal entry site; Ub, ubiquitin; PuroR: puromycin resistance gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element.

도면4



도면5



도면6

