



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0142639
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 2800/204 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0036503

(22) 출원일자 2023년03월21일

심사청구일자 2023년03월21일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

박준태

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호

국명옥

인천광역시 계양구 임학서로42번길 3, 401호

권형욱

서울특별시 서초구 효령로4길 56-16, 201호

(74) 대리인

차준용

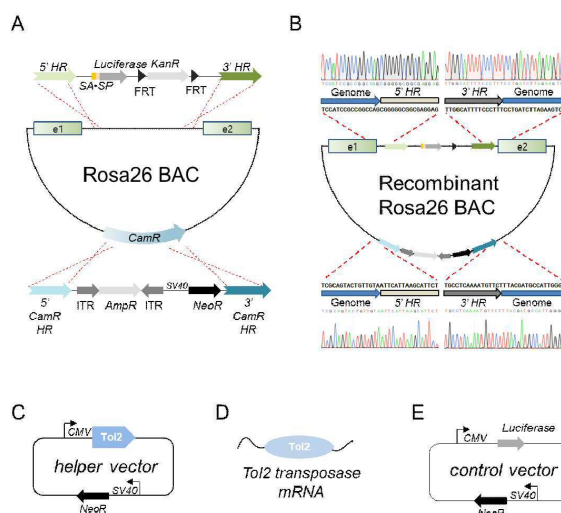
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 ROSA26 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1과 엑손2사이의 지역이 프로모터 역할을 하는, ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터를 제공한다. 본 발명의 따른 프로모터는 종래의 외인성 프로모터, 예를 들어 CMV, SV40, 또는 CAGGS를 이용하는 ROSA26 BAC 시스템보다 재조합 단백질의 발현량을 상당히 증가시킬 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따른 프로모터는 종래의 벡터 시스템보다 증대된 단백질 발현량 및 안정성을 보여주었고 이는 더욱 효율적이고 효과적인 단백질 발현용 BAC시스템 구현을 용이하게 할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345366487
과제번호	2020R1A6A1A03041954
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	융복합기반기술을 이용한 감염병 매개곤충 제어 플랫폼 구축
기 여 율	0.1/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2020.05.01 ~ 2023.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711185822
과제번호	2021R1A2C1004298
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구지원사업
연구과제명	미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어
기 여 율	0.9/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

ROSA26 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1과 엑손2사이의 지역이 프로모터 역할을 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체는 박테리아 인공염색체 타겟 벡터와 재조합하는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1은 서열번호 3로 표시되고 엑손2는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 엑손2사이 위치에서 재조합되는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)을 포함하는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 5' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 5로 표시되고 3' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 6로 표시되는 것을 특징으로 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)의 순서대로 위치하는 하는 것을 특징으로 하는, ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 프로모터는 ROSA26 박테리아 인공염색체의 엑손1과 5' 상동성 영역 사이의 지역인 것을 특징으로 하는, ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 프로모터는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는, ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터.

청구항 11

제1항에 따른 프로모터를 포함하는 ROSA26 박테리아 인공염색체를 이용하여 관심 유전자(GOI)를 발현시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 내인성 프로모터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 ROSA26 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 약제학적 단백질의 생산은 CHO세포 같은 포유류 세포주를 발현벡터로 이용하고 있다. 현재 포유 세포주 시스템에서 100개가 넘는 치료용 단백질이 생산되고 있으며 지난 수십 년 동안 포유류 세포주에서 단백질 생산을 개선하기 위한 상당한 노력이 이루어졌다.

[0004] 종래의 벡터 시스템인 플라스미드 기반 벡터를 이용한 유전자 발현은 단백질 생산에 가장 널리 사용되는 방법이다. 플라스미드-기반벡터는 관심 유전자(GOI, gene-of-interest)의 발현을 유도하는 프로모터를 포함한다. 그러나 이러한 벡터로부터의 발현은 통합 부위에서 주변 염색질에 의해 크게 영향을 받는다. 따라서, 벡터가 일단 "침묵 염색질(silent chromatin)" 영역에 통합되면, 발현은 시간이 지남에 따라 침묵하는 경향이 있다(positional chromatin effect). 따라서, 염색질의 국소 효과를 피하고 플라스미드 기반 벡터의 효능을 향상시키기 위한 몇 가지 전략이 개발되었다. 가장 널리 사용되는 방법 중 하나는 전체 포유동물 유전자좌를 수용할 수 있는 박테리아 인공 염색체(Bacterial Artificial Chromosomes, BAC)를 사용하는 것이다. BAC는 F-인자(F-factor)로부터 유래되며, 모든 시스-작용 조절 요소(cis-acting regulatory element)를 고유 구성으로 함유하는 완전한 유전자를 수용할 수 있다. BAC은 통합 부위에서 주변 염색질에 의해 최소한의 영향을 받으므로, 이들 벡터는 예상된 발현 패턴을 정확하게 전달할 수 있다.

- [0005] 배아 줄기 세포는 gene-trap 돌연변이 스크리닝 기술이 적용되었고, 이로 인해 마우스 염색체 6에 위치한 *ROSA26* 유전자의 발견이 이루어졌다. *ROSA26*은 지속적인 유전자 발현을 유지하며 유전자 침묵 효과에 강한 것으로 알려져 있어, 전사체 삽입 및 기타 리포터 구성 요소에 이용되는 유전자좌이다. *In vivo*에서 구성적 전이유전자 발현을 가진 560개 이상의 *ROSA26* knock-in 유전자 라인들이 생산되었다. 최근에는 *ROSA26* 지역(*ROSA26* BAC)을 포함하는 BAC이 생물학적 과정 분석을 위한 동물 모델 개발에 유용한 자원으로 부상하고 있다. *ROSA26* BAC에 삽입된 전이유전자는 인접 염색체 영역의 방해를 최소한도로 받고 원래의 *ROSA26* 장소의 발현 양상을 신뢰성 있게 복제한다. *ROSA26* BAC 기반의 발현 방법은 포유류 세포에서 재조합 단백질 생성에 활용되었다. 발현 벡터로서 *ROSA26* BAC의 중요성은, 10배 이상의 생산성 증대를 가져온다는 점에서, 본질적으로 전이유전자 발현이 복사본의 수에 의존한다는 사실로 더욱 부각된다.
- [0006] piggyBac (PB), Sleeping Beauty (SB), Tol2 등의 트랜스포존 시스템은 유전자의 유전체 통합을 가능하게 하여 단백질 생산이 가능하도록 하는 능력으로 연구되어 왔다. 트랜스포존 시스템은 전이유전자를 유전체 위치에 이동 및 통합시키는 유전적 요소로 구성되어 있다. 전이유전자 운반 능력과 관련하여, 크기 제한이 다르다. BAC은 150-350 kb 유전체 영역으로 포함하기 때문에 대용량 전이유전자를 운반할 수 있는 트랜스포존 메커니즘이 바람직하다. PB 트랜스포존은 최대 14 kb까지 전송할 수 있지만, 전이 효율이 크게 감소한다. SB 트랜스포존에 6 kb 전이유전자를 실은 경우, 전송 효율이 50% 낮아졌다는 것이 알려져 있다. 그러나 Tol2 트랜스포존은 10 kb의 삽입체를 포함해도 이동 효율에 큰 영향을 미치지 않았다.
- [0007] *ROSA26* BAC 기반의 단백질 발현 시스템에서 종래 기술이 사용하던 외인성 프로모터가 단백질 발현 능력에 있어서 비효율적이었기 때문에, 이를 개선하기 위한 새로운 프로모터 개발이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 관심 유전자의 발현량을 증가시킬수 있는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1과 엑손2 사이의 지역이 프로모터 역할을 하는, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 1로 표시될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체는 박테리아 인공염색체 타겟 벡터와 재조합할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1은 서열번호 3로 표시되고 엑손2는 서열번호 4로 표시될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 엑손2사이 위치에서 재조합될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 5' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 5로 표시되고 3' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 6로 표시될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유

전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)의 순서대로 위치할 수 있다.

[0020] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 프로모터는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 5' 상동성 영역 사이의 지역일 수 있다.

[0021] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 2로 표시될 수 있다.

[0022] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 본 발명에 따른 프로모터를 포함하는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체를 이용하여 관심 유전자(GOI)를 발현시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 실시예에 따른, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터는 재조합 관심 유전자의 발현량을 종래 기술보다 더 많이 그리고 효율적으로 증대시킬 수 있다.

[0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 *ROSA26* BAC과 Tol2 트랜스포존 시스템, 그리고 전통적인 발현 벡터 시스템의 발현 시스템 비교를 보여주는 그림이다. *ROSA26* 유전자의 엑손1과 엑손2 사이 지역이 표적화되었다. (A)는 발현 카세트와 Tol2 트랜스포존 시스템을 통합하기 위한 BAC 재조합 과정의 도식이다. (B)는 재조합 BAC의 염기서열이 참조 염기서열과 일치함을 보여주는 크로마토그램 분석 결과이다. (C)는 CMV 프로모터-구동 Tol2 트랜스포사제 유전자가 포함된 헬퍼 벡터를 보여준다. (D)는 선형화된 헬퍼 벡터를 이용하여 합성된 Tol2 트랜스포사제 mRNA이다. (F)는 루시페라제 유전자가 CMV 프로모터에 의해 구동되는 대조군 벡터이다.

도 2는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터가 재조합 단백질 발현에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. (A)는 대조군 벡터로 형질주입된 세포들 및 헬퍼 벡터를 사용한 *ROSA26* BAC을 이용해 형질주입된 세포들간의 상대적인 루시페라제 활성도이다. * $P < 0.05$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$. (B)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC로 형질주입된 확립 세포 풀에서 단백질 생산에 대한 Western blot 검사를 보여준다. (C)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 포함하는 *ROSA26* BAC에 대해 gDNA의해 유전자 복제수가 평가된 것을 보여준다. * $P < 0.05$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$. (D)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC에 대해 cDNA에 의한 발현 수준이 평가되었다. ** $P < 0.01$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$.

도 3은 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터가 단일 세포 유래 안정 클론에서 재조합 단백질 발현에 미치는 영향을 보여준다. (A)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC을 이용해서 단일 세포 유래 안정 클론에서 세포의 루시페라제(Qp)가 수립되었다 각 점 단일 세포 클론의 Qp를 나타낸다. 수평 막대는 각 조건에 대한 루시페라제 활성도의 평균을 상징한다. 원으로 표시된 단일 세포 클론은 Western blot, 유전자 복제수, 발현 수준 및 batch 배양 실험에 사용되었다. ** $P < 0.01$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 30$, $N = 30$, 각각. (B)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC에 대해 gDNA에 의한 유전자 복제 수가 측정되었다. * $P < 0.05$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$. (C)는 대조군 벡터와 헬퍼mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC에 대해 cDNA에 의한 발현 수준이 측정되었다. ** $P < 0.01$, Student's t-test. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$. (D)는 대조군 벡터와 헬퍼 mRNA를 사용한 *ROSA26* BAC로 형질주입된 확립 세포 풀에서 단백질 생산에 대한 Western blot 검사를 보여준다. (E)는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터가 장기간 단백질 생산성에 미치는 영향을 보여준다. batch 배양을 기반으로 한 안정성 실험을 통해 24일 동안 루시페라제 활성도를 측정하여 결정되었다. ** $P < 0.01$, Bonferroni's post test를 수행한 이후 two-way ANOVA 분석. 평균 $\pm$ 표준편차, $N = 3$.

도 4는 종래 발현 벡터와 *ROSA26* BAC with Tol2 트랜스포존 시스템 간의 발현 시스템을 비교한 것이다. *ROSA26* 유전자의 엑손1 지역이 표적화되었다. (A)는 발현 카세트와 Tol2 트랜스포존 시스템을 통합하기 위한 BAC 재조합 절차의 도식을 나타낸다. (B)는 재조합 BAC의 서열이 참조 서열과 비교하여 보존됨을 나타내는 크로마토그램 결과이다. (C)는 대조군 벡터 및 헬퍼 mRNA를 사용하는 *ROSA26* BAC 으로 형질주입된 세포 간 상대적인 루시페라제 활성을 보여준다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t-test. 평균 $\pm$ S.D., $N = 3$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0029] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명은 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1과 엑손2사이의 지역이 프로모터 역할을 하는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터를 제공할 수 있다.
- [0033] 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1과 엑손2사이의 지역은 *ROSA26* BAC의 엑손1과 엑손2사이의 염기서열을 의미할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 *ROSA26* BAC의 엑손1과 엑손2사이의 염기서열은 서열번호 1로 표시될 수 있으며, 상기 엑손1과 엑손2사이의 염기서열 전체가 단백질 발현을 위한 프로모터로서 역할을 수행할 수 있다. 그리고, 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체(BAC)의 엑손1은 서열번호 3로 표시될 수 있고, 엑손2는 서열번호 4로 표시될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체는 박테리아 인공염색체 타겟 벡터와 재조합할 수 있고, 그 위치는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 엑손2사이일 수 있다. 상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)을 포함할 수 있고, 상기 5' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 5로 표시될 수 있으며, 3' 상동성 영역(homology region)은 서열번호 6로 표시될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 제1항생제 내성 유전자는 카나마이신 내성 유전자일 수 있다. 또한, 상기 박테리아 인공염색체 타겟 벡터는 5' 상동성 영역(homology region), 관심 유전자(GOI), 제1항생제 내성 유전자 및 3' 상동성 영역(homology region)의 순서대로 위치할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체가 박테리아 인공염색체 타겟 벡터와 재조합할 경우, *ROSA26* 박테리아 인공염색체 내인성 프로모터는 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 박테리아 인공염색체 타겟 벡터의 5' 상동성 영역 사이의 지역일 수 있다. 즉, *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 박테리아 인공염색체 타겟 벡터의 5' 상동성 영역 사이의 염기서열이 관심유전자의 발현을 위한 프로모터 역할을 할 수 있다. 상기 *ROSA26* 박테리아 인공염색체의 엑손1과 박테리아 인공염색체 타겟 벡터의 5' 상동성 영역 사이의 염기서열은 서열번호 2로 표시될 수 있다.
- [0037] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0039] 실시예1. 플라스미드 설계 및 제조

- [0040] 표준적인 클로닝 기술로 재조합 플라스미드를 만들었다. BAC 타겟팅 벡터는 루시페라제(luciferase) 유전자와 카나마이신(*KanR*) 내성 유전자 양옆에 5' 상동성 지역(HR)과 3' 상동성 지역(HR)이 배치되도록 만들어졌다. 클로람페니콜(*Chloramphenicol*) 내성 (*CamR*) 타겟팅 벡터는 역전된 왼쪽 및 오른쪽 *Tol2* 트랜스포존, *AmpR*, 네오마이신 내성 유전자(*NeoR*) 양옆에 5' HR과 3' HR이 배치되도록 제작되었다. 헬퍼 벡터(helper vector)는 *Tol2* 트랜스포사제를 코딩하는 cDNA를 pcDNA 6 벡터 (V22020; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 삽입함으로써 제작

되었다. 대조군 벡터는 CMV 프로모터-구동 루시페라제 유전자를 포함하도록 제조되었다.

[0042] 실시예2. Helper mRNA(Tol2 transposase mRNA) 합성

[0043] 제조업체 프로토콜에 따라 MEGAscriptTMT7 전사 키트 (AM1333; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 mRNA를 합성했다.

[0045] 실시예3. 박테리아 균주(strain), BAC 클론 및 BAC 재조합

[0046] SW105 박테리아 유전자형: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ lacZ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ ara, leu) 7649 galU galK rspl nupG [λ ci857 (cro-bioA) $\times$ tet] [(cro-bioA) $\times$ araC-PBADflpe]. SW105 박테리아는 국립암연구소 Copeland 연구실에서 지원받았다. ROSA26 BAC 클론 (RP24-85L15)은 BACPAC 자원 센터 (CHORI, Oakland, CA, USA)에서 구입했다. BAC 재조합(recombineering)은 λ red 재조합 절차에 따라 수행되었다.

[0048] 실시예4. 세포 배양

[0049] CHO DG44 세포 (A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)는 25 mM 글루코스를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% 소태아혈청 (SH30919.03; Hyclone, Waltham, MA, USA), 10 mM 소듐 하이포산틴(sodium hypoxanthine) 및 1.6 mM 티미딘(thymidine) (2068642; Gibco, Waltham, MA, USA)과 함께 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 (SV30079.01; Hyclone)으로 보충하여 배양되었다. 세포는 5% CO₂가 보충된 주변 공기(20% O₂)에서 배양되었다. 가득찬(confluent) 세포는 1:4로 분할되었고, 배양액은 2일마다 교체되었다. 세포 밀도와 생존율은 Cedex HiRes Analyzer (05650216001; Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 평가되었다.

[0051] 실시예5. 형질주입(transfection) 및 세포주 성장

[0052] CHO DG44 세포는 제조업체 프로토콜에 따라 LipofectamineTM2000 (11668030; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 형질주입되었다. 5×10^5 개의 세포들은 0.193 μ g의 대조군 벡터(7,123 bps) 또는 6 μ g의 재조합된 ROSA26 BAC(222,649 bps)와 함께 형질주입되었다. 대조군 벡터와 재조합된 ROSA26 BAC의 형질주입 복사본 수는 2:1로 설정되었다. Tol2 트랜스포존 매개 전좌(translocation)을 위해, 5×10^5 개의 세포들은 6 μ g의 재조합 ROSA26 BAC와 0.667 μ g의 헬퍼 벡터와 함께 공동 형질주입되었다. 형질주입된 세포들은 500 μ g/mL G418 (ant-gn-1; Invitrogen)를 사용하여 2 주 동안 선택되었다. 선택 과정 중에 배지는 2 일마다 교체되었다. 선택 후, 단일 세포가 96-well 플레이트 (353072; Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)의 150 μ L 배지에 웰당seeding되었고, 15 일 동안 인큐베이션 되었다.

[0054] 실시예6. 루시페라제(luciferase) 활성 측정

[0055] 세포 수는 Cedex HiRes Analyzer를 사용하여 결정되었고, 루시페라제(luciferase) 단백질 농도는 luciferase assay system(E1500; Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 사용하여 분석되었다. 2×10^6 개의 세포들은 200 $\times$ g로 2 분간 원심 분리되었고 PBS로 두 번 세척되었다. 세포들은 1 $\times$ cell culture lysis reagent 100 μ L과 PBS 100 μ L로 vortexing되었다. 100 μ L의 용해된 샘플들은 흰색 96-well plate의 각 웰로 옮겨졌고, 각 웰에 luciferase assay reagent II 100 μ L이 첨가되었다. luciferase 활성은 VICTOR multi-label plate reader(2030-0050; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)에서 발광 강도를 측정하여 평가되었다.

[0057] 실시예7. 배지 샘플에서 상대적인 세포 특이적 생산성(relative cell-specific productivity, Qp)의 결정

[0058] 배지에서 분비된 루시페라제(luciferase) 단백질의 상대적인 활성은 배지에서 상대적인 세포 특이적 생산성

(pg/cell/day)(Qp)을 측정하여 결정되었다. 배지에서 루시페라제(luciferase) 활성을 측정하기 위해, 100 μ L의 배지 샘플이 수집되었고 흰색 96-well plate의 각 웰로 옮겨졌다(30396; SPL). 각 웰에 Luciferase assay reagent II 100 μ L이 첨가된 후, 루시페라제(luciferase) 활성은 VICTOR multi-label plate reader(2030-0050; PerkinElmer)를 사용하여 발광 강도를 측정하여 평가되었다. 세포 밀도와 생존율은 Cedex HiRes Analyzer(05650216001; Roche)를 사용하여 평가되었다. 배지에서 Qp는 다음과 같은 공식을 사용하여 계산되었다.

$$Qp \left(\frac{\text{pg}}{\text{cell}} \right) \text{ in media} = \frac{\text{luciferase activity2} - \text{luciferase activity1}}{\text{density2} - \text{density1}} \times \text{Growth rate } (\mu)$$

$$\text{Growth rate } (\mu) = \frac{\ln(\text{density2}) - \ln(\text{density1})}{\text{time2} - \text{time1}}$$

실시예8. 웨스턴 블랏 분석

공지기술로 Western blotting이 수행되었다. 단백질은 SuperSignal™West Pico chemiluminescence 용액 (34577; Thermo Fisher Scientific)으로 Chemidoc XRS+ 시스템 (1708265; BIO-RAD; Hercules, CA, USA)을 이용하여 검출되었다. 본 발명에서 사용된 1차 항체는 HRP-conjugated anti-luciferase antibody (sc74548; 1:1000 희석; Santa Cruz Biotechnology) 및 HRP-conjugated β (sc47778; 1:1000 희석; Santa Cruz Biotechnology)이었다. 루시페라제(luciferase) 및 β 의 밴드 밀도는 ImageJ 프로그램(<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)을 사용하여 정량화되었다.

실시예9. 상보적 DNA(cDNA) 제조 및 qPCR(Quantitative PCR)

mRNA는 2×10^6 세포들에서 Rnasy Mini Kit (74104; QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리되었다. mRNA는 phusion RT-PCR Kit (F-546S; Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 역전사되었다. gDNA 및 cDNA의 순도와 농도는 DS-11 Spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정되었다. qPCR은 Solg™2 $\times$ real-time PCR smart mix (SRH83-M40h; Solgent)를 사용하여 CFX Connect™Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 수행되었다. qPCR은 20 ng의 cDNA로 수행되었으며, 95° C에서 5 분 동안 denaturation을 진행한 후, 94° C에서 30 초, 57° C에서 30 초, 70° C에서 10 초의 40 사이클을 돌렸다. qRT-PCR은 다음 프라이머를 사용하여 수행되었다: 5'-GCACCACCAACTGCTTAGC-3' (*GAPDH*-forward)(서열번호 7), 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGA-3' (*GAPDH*-reverse) (서열번호 8), 5'-AAGAGATACGCCCTGG-3' (*luciferase*-forward) (서열번호 9), 5'-AATAACGCGCCCAACA-3' (*luciferase*-reverse) (서열번호 10).

실시예10. 통계 분석

통계 분석은 표준 통계 소프트웨어 패키지(SigmaPlot 12.5; Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 차이가 유의한지 여부를 결정하기 위해 Student's t-검정이 사용되었다.

결과 분석

1. BAC 내인성 프로모터 시스템의 수립

제조합 단백질 합성을 위한 BAC 내재성 프로모터 시스템은 두 가지 서로 다른 방법론을 사용하여 설계되었다. 첫 번째 방법은 구성적이고 보편적인 발현을 가능하게 한다고 인식된 핫스팟인 *ROSA26* 유전자 포함하는 *ROSA26* BAC를 이용했다. BAC 재조합(recombineering)을 위해, BAC 타겟팅 벡터 내에서 5' 상동성 영역(HR)과 3' HR은 루시페라제 유전자를 양옆에 위치했다(도 1A). *ROSA26* 유전자의 엑손 1과 엑손 2를 표적화하여 BAC 재조합을 수행했다(도 1A). 종래기술에서 *ROSA26* BAC 기반 발현은 CAG 하이브리드 프로모터로 제어되었다. 그러나 본 발명

에서는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터를 이용하여 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터의 성능을 검증하기 위해 사용되었다. 둘째, 생식세포에서 통합량을 높이기 위해 Tol2 트랜스포존 시스템을 사용하였으며, 이는 유전체 통합 비율을 크게 높여준다. 이를 *ROSA26* BAC와 함께 수행하였다. 염색체 후반부 벡터에 있는 클로람페니콜 내성 유전자(CamR)가 BAC 기본구조(backbone)에 위치하기 때문에 클로람페니콜 내성 유전자(CamR)를 Tol2 트랜스포존 시스템을 도입하는 데 사용하였다. 포유류 선택 마커인 네오마이신 내성 유전자(NeoR), 수득과 손실 스크리닝용 앰피실린 내성 유전자(AmpR) 및 BAC 재조합용 역반복요소(inverted terminal repeats, ITRs) 2 개가 포함된 CamR 타겟팅 벡터에 5' 및 3' CamR HR이 삽입되었다(도 1A). *ROSA26* 유전자의 엑손 1과 엑손 2 사이의 표적화는 BAC 재조합을 가능하게 했다(도 1A). BAC 재조합 후 재조합 영역은 DNA 시퀀싱을 통해 확인되었다. *ROSA26* BAC DNA 시퀀싱은 재조합된 서열을 보여줬고, 이는 상동성 재조합이 성공적으로 완료되었음을 보여주었다(도 1B). Tol2 트랜스포사제는 ITRs에 부착되어 트랜스포존 매개 전이유전자 통합을 보조하도록 설계된 헬퍼 벡터에 의해 인코딩되었다(도 1C). Tol2 트랜스포사제 mRNA는 기질로서 상기 헬퍼 벡터를 사용하여 합성되었다(도 1C, 1D). 대조군 벡터는 단순히 CMV 구동 루시페라제 유전자를 포함했고, 이는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터와 비교되었다(도 1E).

[0074] 벡터는 일시적으로 세포에 형질주입되었고, 루시페라제 활성을 모니터링했다. 재조합된 *ROSA26* BAC는 대조군 벡터와 비교하여 2배 이상 높은 루시페라제 활성을 보였고, 이는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터가 종래의 벡터 시스템과 비교했을 때 단백질 생산을 상당히 높여준다는 것을 확인시켜주었다(도 2A). *ROSA26* 지역의 엑손1을 표적화하는 내인성 프로모터 시스템은 루시페라제 활성이 대조군 벡터보다 현저히 감소함을 보였다(도 4). 단백질 합성 수준은 Western blotting을 통해 평가되었다. 재조합된 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템은 대조군 벡터 대비 루시페라제 단백질 합성을 현저히 증가시켰다(도 2B). 그런 다음, 루시페라제 활성 유도 효과가 본 발명의 프로모터 시스템의 결과가 아니라는 가능성을 배제하기 위해서 전이유전자 통합 효율성을 평가했다. 재조합된 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 전이유전자 통합 효율성은 대조군 벡터 대비 1.5배 이상 증가하였으며, 루시페라제 유전자의 발현 수준은 대조군 벡터 대비 9.3배 더 높았다(도 2C 및 2D).

[0076] BAC 내인성 프로모터 시스템의 성능

[0077] 규제 기준을 준수하기 위해, 단일 클론들은 단일성을 보장하고 일관된 결과를 제공해야하기 때문에 단일 클론들은 세포 풀에서 생산되어야 한다. 세포 풀의 세포 특성이 유지되도록 보장하기 위해 한정 희석법을 사용하여, 단일 클론을 위한 단일 세포 분리를 수행했다. 그리고 각 그룹마다 30개의 단일 클론이 생성되었다(도 3A). *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템을 사용하여 생성된 단일 세포 클론의 세포외 루시페라제(Qp)는 대조군 벡터에 비해 유의하게 높았다(도 3A). 이 결과는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템에 의해 매개되는 생산성 촉진 효과가 단일 세포 클론에서도 유지되며, 이로 인해 세포주 생성에 있어서 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 사용이 유효함을 보여준다. 루시페라제 활성 유도 효과가 본 발명의 프로모터 시스템의 결과가 아니라는 가능성을 배제하기 위해서 단일 클론 수준에서 전이유전자 통합 효율성이 평가되었다. 재조합 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 전이유전자 통합 효율성은 대조군 벡터에 비해 10% 낮았으며, 루시페라제 유전자의 발현 수준은 유의하게 1.5배 높았다(도 3B 및 3C). 단백질 생산 수준은 웨스턴 블로팅을 통해 조사되었다. *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템은 대조군 벡터에 비해 루시페라제 단백질 생산량이 유의하게 증가하였다(도 3D). 재조합 단백질 대규모 합성 분야에서 가장 긴급한 연구 목표는 지속적인 전이유전자 발현을 가능하게 하는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 구축이다. 따라서 본 발명자들은 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템이 지속적인 단백질 생산을 할 수 있는지를 검사했다. 장기간 생산에 있어서 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 영향을 결정하기 위해, batch 배양 기반 안정성 연구가 24일 넘게 수행되었다. 배양기간 24일동안, *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템의 루시페라제 활성은 대조군 벡터보다 유의적으로 높게 유지되었고, 이는 *ROSA26* BAC 내인성 프로모터 시스템이 장기간의 배양이 요구되는 생물 약제학적 생산에 사용될 수 있다는 점을 보여주었다(도 3F).

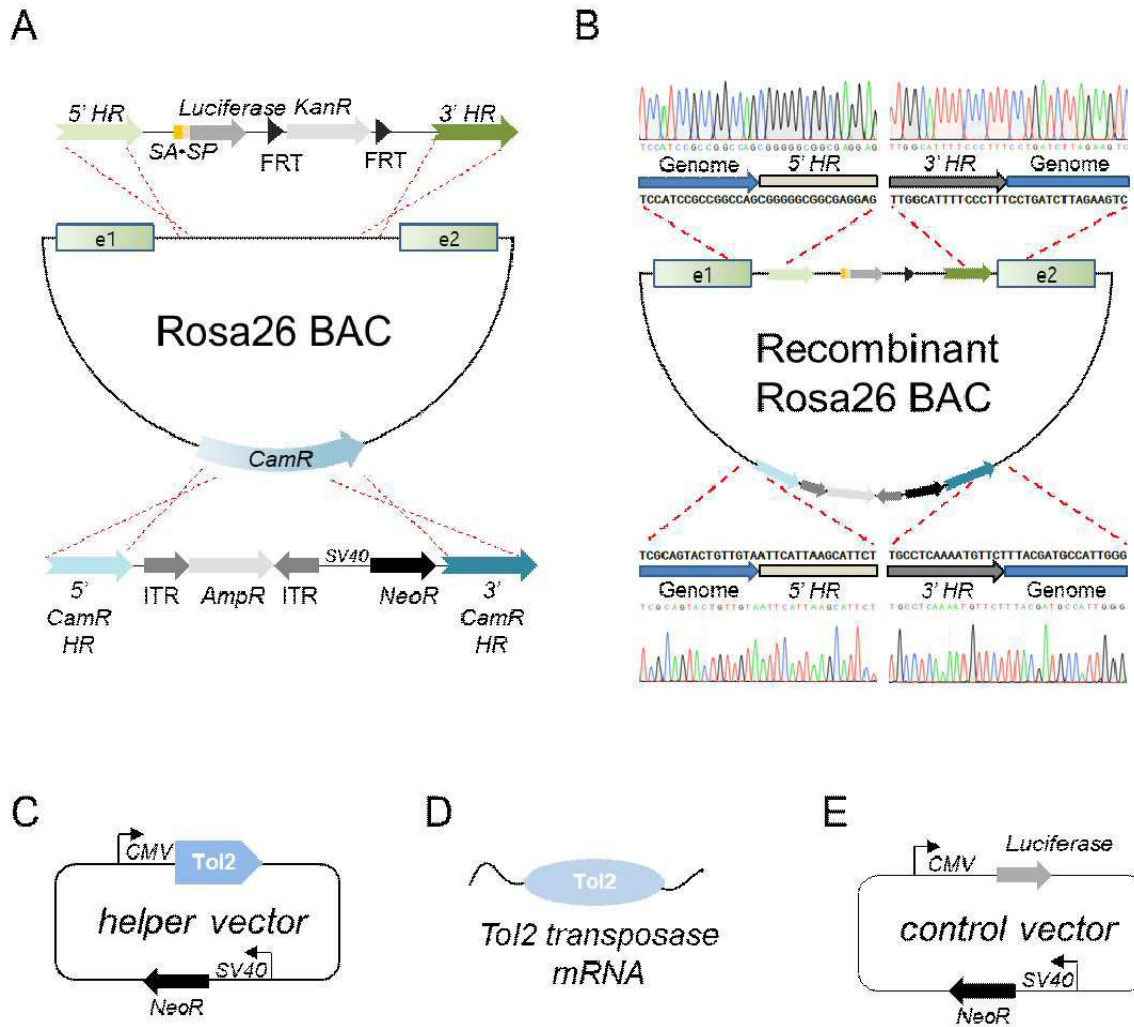
[0079] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0080] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등

개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

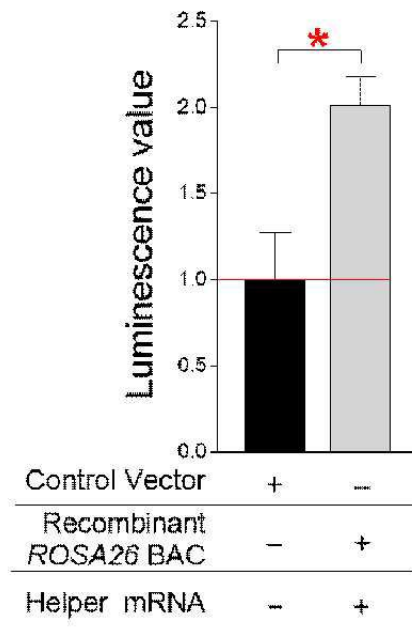
도면

도면1

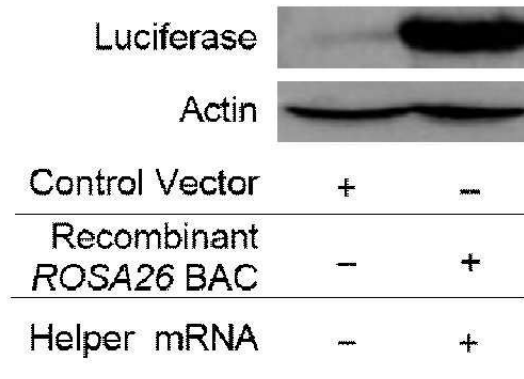


도면2

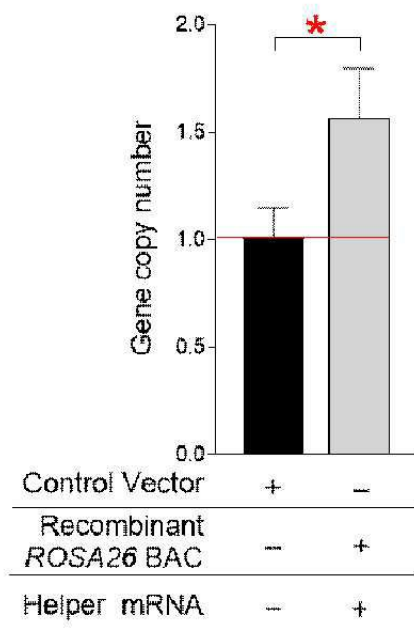
A



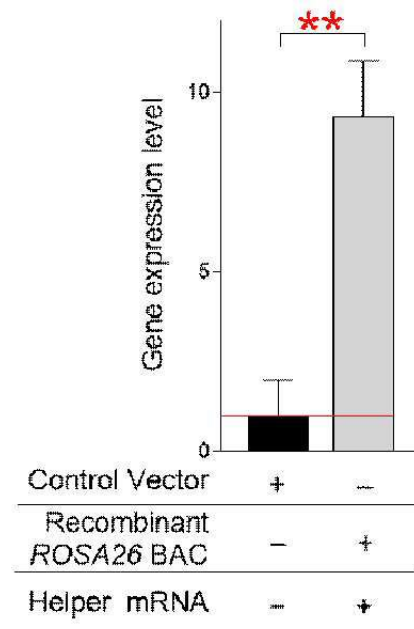
B



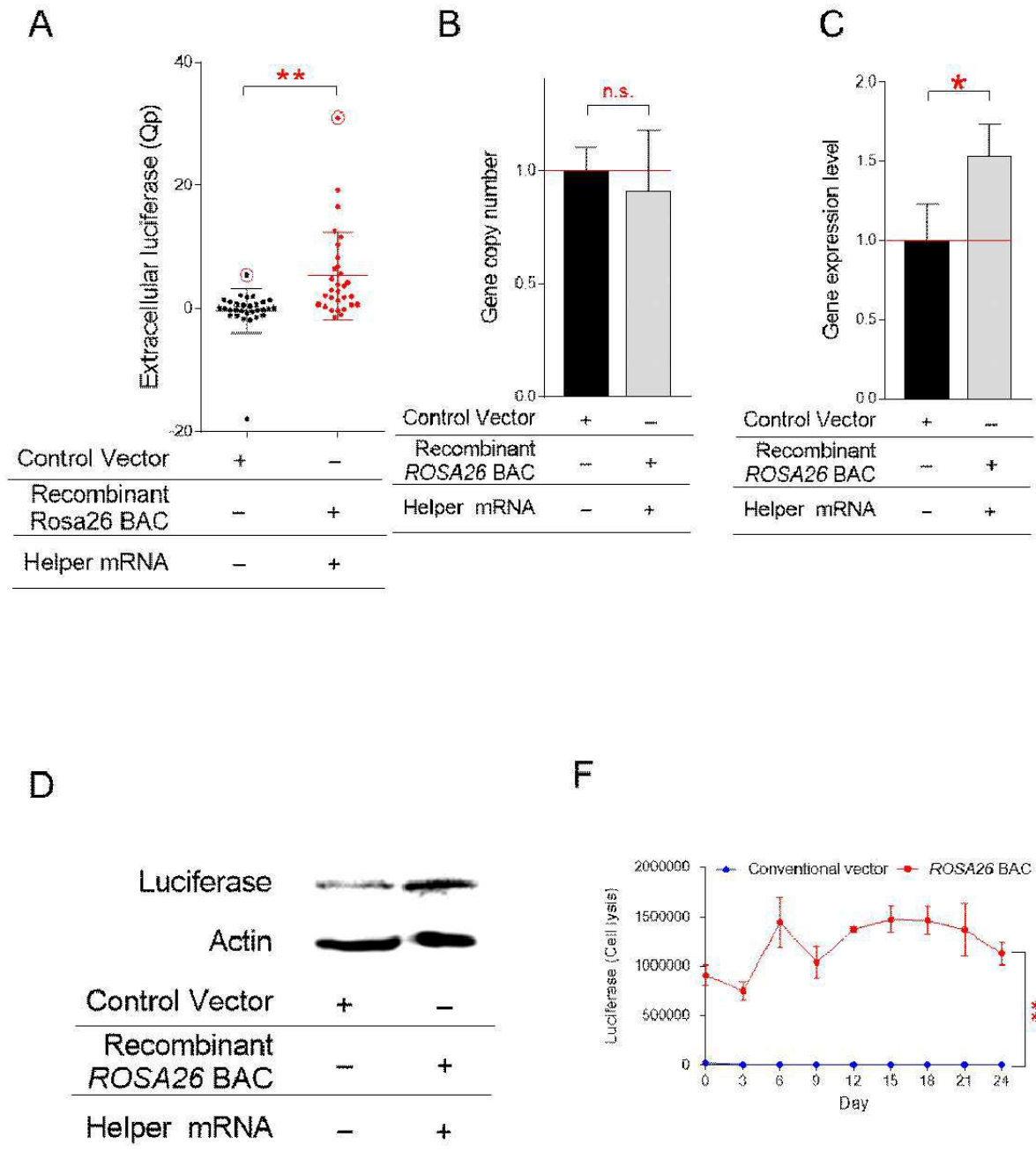
C



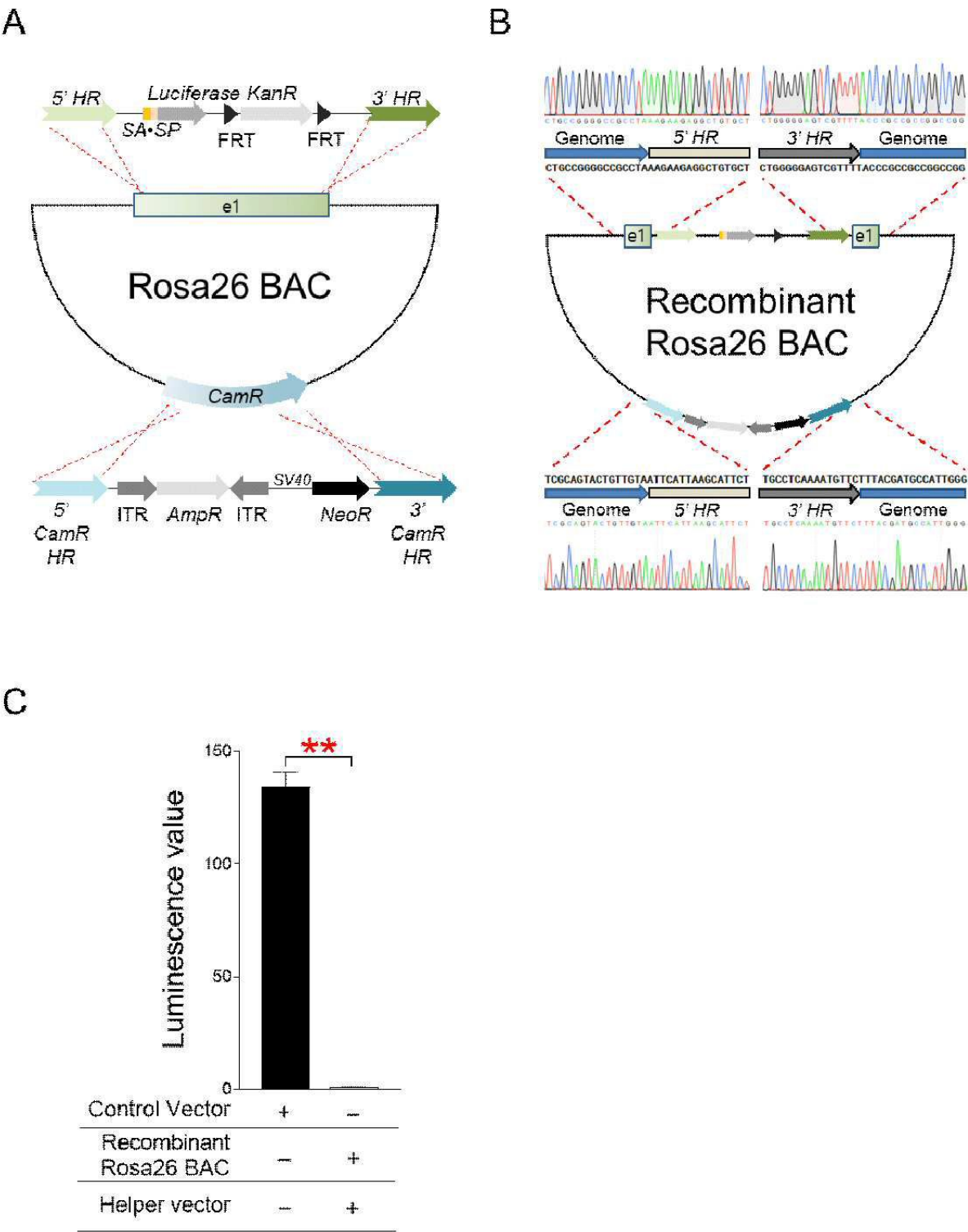
D



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.