



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051732
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43586 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0152334
(22) 출원일자 2015년10월30일
심사청구일자 2015년10월30일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이원중
인천광역시 연수구 해송로 143 118동 601호 (송도동, 송도웰카운티1단지아파트)
(74) 대리인
차준용

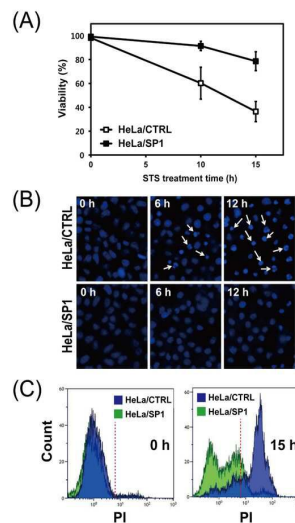
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 인간세포의 세포사멸 억제 용도로 사용되는 누에의 저장 단백질 1

(57) 요약

본 발명은 인간세포의 세포사멸 억제 용도로 사용되는 누에의 저장 단백질 1에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 누에(Silkworm)의 유전자로부터 제작 및 생산된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 생물학적 기능, 즉 인간세포에서 발생하는 세포사멸(Apoptosis) 억제 기능 및 항산화 기능을 새롭게 규명하고, 이를 바이오 의약 분야의 치료용 단백질 생산을 위한 세포주 제작, 세포 배양 배지 소재 및 기능성 화장품 소재 등으로 활용함으로써, 세포사멸을 최소화하면서 치료용 단백질 등의 생산성을 극대화할 수 있는 누에 저장 단백질 1(SP1)의 신규한 용도, 및 이를 이용한 SP1 발현 안정 세포주(Stable cell line)의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

누에 체액(Silkworm hemolymph)으로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)로서,
인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(Apoptosis)을 억제하기 위한 용도로 사용되는,
누에의 저장 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 인간세포는 헬라세포(HeLa cell)인 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 내재성 아포토시스는 스타우로스포린(Staurosporine)에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서,
단백질 바이오 의약품 생산용 세포 배양 배지 소재, 또는 단백질 바이오 의약품 생산을 위한 세포주 제작에 사용되는 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 단백질 바이오 의약품은 치료용 단백질로서 모노클론 항체인 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 저장 단백질 1(SP1)은 항산화 효과 및 활성산소 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서,

기능성 화장품 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는 누에의 저장 단백질.

청구항 8

누에(Silkworm)로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1) 유전자를 이용하여,

인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(Apoptosis)을 억제하기 위한, 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1) 발현 안정 세포주(Stable cell line)를 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 저장 단백질 1(SP1) 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number) NM_001113276인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 내재성 아포토시스는 스타우로스포린(Staurosporine)에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

SP1 발현 안정 세포주의 세포 생존률은 스타우로스포린 처리 10시간 후 91% 이상, 스타우로스포린 처리 15시간 후 78% 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 저장 단백질 1(SP1) 발현 안정 세포주는 SP1의 유전자가 형질주입된 헬라 세포주(HeLa cell line)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

pEGFP-N1을 벡터로 사용하여 형질주입하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인간세포의 세포사멸 억제 용도로 사용되는 누에의 저장 단백질 1에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 누에(Silkworm)의 유전자로부터 제작 및 생산된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 생물학적 기능, 즉 인간세포에서 발생하는 세포사멸(Apoptosis) 억제 기능 및 항산화 기능을 새롭게 규명하고, 이를 바이오 의약

[0001]

분야의 치료용 단백질 생산을 위한 세포주 제작, 세포 배양 배지 소재 및 기능성 화장품 소재 등으로 활용함으로써, 세포사멸을 최소화하면서 치료용 단백질 등의 생산성을 극대화할 수 있는 누에 저장 단백질 1(SP1)의 신규한 용도, 및 이를 이용한 SP1 발현 안정 세포주(Stable cell line)의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 아포토시스(Apoptosis)는 프로그램된 세포사멸의 한 유형으로서 생물의 일생 동안 항상성을 유지시켜주는 수단이 된다. 인간을 비롯한 다세포 동물들은 복잡한 아포토시스 프로세스를 이용하여 손상된 세포, 과잉 세포 또는 잠재적으로 위험한 세포를 몸으로부터 제거한다. 따라서 아포토시스의 조절 장애는 암과 같은 위험한 질병, 신경 질환, 심혈관 질환 및 자가면역증의 잠재적 원인이 될 수 있다.
- [0003] 2가지 대표적인 아포토시스 신호 전달 메커니즘은 외인성 또는 내재성 경로를 통한 세포사멸과 관련된다. 이 중 외인성(Extrinsic) 경로는 세포 밖의 사멸 리간드가 세포막 상의 수용체에 결합될 것을 요구한다. 다른 외인성 경로는 소포체(ER)-매개 아포토시스와 관계가 있는데, 이는 카스파아제-12를 활성화시키고, 카스파아제-12는 차례로 카스파아제-9 및 카스파아제-3를 활성화시킨다.
- [0004] 반면, 내재성(Intrinsic) 아포토시스 신호 전달 경로에서는 미토콘드리아가 세포사멸 프로세스를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 여기서 아포토시스 신호는 Bax(Bcl-2-associated X protein)가 미토콘드리아 막 내로 삽입되도록 유도한다(Bax 전좌). Bax가 미토콘드리아 막으로 전좌됨에 따라 미토콘드리아 내의 사이토크롬 c가 사이토솔 내로 방출되고, 이로 인해 카스파아제-9 및 카스파아제-3가 연이어 활성화된다.
- [0005] 동물세포를 배양하여 모노클론 항체와 같은 치료용 단백질을 생산하는 산업적 바이오프로세스에 있어, 바이오리액터에서 아포토시스에 의한 지나친 세포사멸은 큰 문제가 아닐 수 없다. 대규모 바이오리액터에서의 세포 배양 도중, 세포들은 저산소증, 영양소 부족 및 전단응력 등 다양한 스트레스를 받으며, 이는 아포토시스를 활성화시킬 수 있다. 아포토시스에 기인한 세포 생존률(Cell viability) 감소는 재조합 단백질 생산을 직접적으로 제한하게 된다. 또한 세포 배양에서 아포토시스는 원치 않는 부산물의 발생 위험성을 증가시키고, 이러한 부산물은 다운스트림 정제 프로세스에 의해 제거되어야 한다. 따라서 생산성 감소 및 생산비용 증가를 방지할 수 있는 항-아포토시스(Anti-apoptotic) 방법을 확보하는 것이 필수적이다.
- [0006] 이러한 측면에서, 세포 배양 도중 아포토시스를 극복하기 위한 다양한 노력들, 예컨대 영양소 보충, 아포토시스 억제제의 첨가, 아포토시스-관련 유전자 발현을 막기 위한 RNA 간섭(RNAi) 기술의 적용, 및 항-아포토시스 유전자 삽입에 의한 아포토시스 저항성 세포주의 제조 등이 시도되어 왔다. 일 예로, CHO 세포에서 30Kc6 유전자의 안정 발현(Stable expression)은 생존률을 크게 향상시켜 모노클론 항체의 생산성을 증가시킨바 있다. 또한 아포토시스 링크 유전자 2(Apoptosis linked gene 2; Alg-2) 및 소간섭 RNA(siRNA)에 의한 징크 핑거 단백질 전사 요소(Zinc finger protein transcriptional factor) Requiem의 노크-다운은 CHO 세포에서 세포 생존률을 효율적으로 향상시켜 유가배양(Fed-batch culture)시 인터페론- γ 의 생산성을 증대시켰다.
- [0007] 누에(Silkworm)는 실크 섬유를 생산하여 인간에게 큰 혜택을 제공하고 있는 곤충이다. 한편, 최근 다수의 보고들을 통해 누에 체액(Silkworm hemolymph)이 몇몇 항-아포토시스 단백질을 함유하고 있음이 입증되었고, 본 발명자는 선행 연구를 통해 누에의 30K 단백질 및 저장 단백질(SP)이 주요 항-아포토시스 단백질임을 밝힌바 있다. 30K 유전자로 형질주입(감염)된 세포에서 30K 단백질의 과발현, 및 *E. coli* 또는 곤충세포로부터 생산된 재조합 30K 단백질의 보충은 아포토시스를 성공적으로 억제하였다. 또한 재조합 30K 단백질의 발현은 아포토시스를 억제함에 따라 CHO 세포에서 재조합 단백질의 생산성을 증대시켰다.
- [0008] 그러나, 포유동물 세포 시스템에서의 SP의 역할에 대해서는 상대적으로 거의 알려진 바가 없다.
- [0009] 누에는 *Bombyx mori* SP1 및 SP2라는 이름의 2가지 유형의 SP를 지니고 있다. 본 발명자는 선행 연구를 통해 누에 체액으로부터 정제된 SP2를 배양 배지에 보충한 결과 아포토시스가 억제됨을 확인하였다.
- [0010] 한편, SP1은 곤충 해모시아닌 단백질의 일종으로서 누에 암컷-특이적인 단백질이며, 10%가 넘는 메티오닌으로 구성되어 있다. 이러한 SP1과 관련하여, 누에 체액으로부터 정제된 SP1이 배콜로바이러스-유발 곤충 세포 아포토시스에 대해 항-아포토시스 효과를 지닌다는 점이 일부 확인된 바 있다.
- [0011] 그러나, SP1의 포유동물 세포 아포토시스에 대한 항-아포토시스 효과는 현재까지 전혀 입증된 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001) Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of Bombyx mori. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285: 224-228.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 상기와 같은 종래기술에서 보듯이, 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 그 생물학적 기능이 거의 알려져 있지 않다. 이에 본 발명자는 예의 연구를 거듭한 결과, SP1의 다양한 생물학적 기능을 규명하고 본 발명에 이르게 되었다.
- [0014] 구체적으로, 본 발명자는 SP1 단백질이 인간세포에서 발생하는 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의한 세포사멸(Apoptosis) 억제에 특이적인 효과가 있으며, 또한 산화 스트레스 내지 세포 내에서 발생하는 활성산소를 억제하는 기능을 보여 항산화 효과가 있음을 규명하였다.
- [0015] 이를 통해, 본 발명자는 바이오 의약 분야의 치료용 단백질 생산, 세포 배양 배지 소재 및 기능성 화장품 소재 등으로 활용시 세포사멸을 최소화하면서 생산성을 극대화할 수 있는 누에의 저장 단백질 1(SP1)의 신규한 용도, 및 이를 이용한 SP1 발현 안정 세포주의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 누에 체액(Silkworm hemolymph)으로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)로서, 인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(아포토시스 또는 에이파토시스, Apoptosis)을 억제하기 위한 용도로 사용되는, 누에의 저장 단백질을 제공한다.
- [0017] 상기 저장 단백질 1(SP1)은 곤충 헤모시아닌 단백질 타입으로서, 누에의 암컷-특이적 단백질이며, 메티오닌이 많은 부분 함유되어 있다.
- [0018] 구체적으로, 상기 저장 단백질 1(SP1)은 하기 서열목록에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0019] [SP1 아미노산 서열] 이 중 본 발명에서 사용된 SP1은 16번인 Thr부터 해당됨.

```

<210> 2
<211> 747
<212> PRT
<213> Bombyx mori sex-specific storage-protein SP1
<400> 2
Met Arg Val Leu Val Leu Leu Ala Cys Leu Ala Ala Ala Ser Ala Thr
  1           5           10          15
Ala Ile Ser Gly Gly Tyr Gly Thr Met Val Phe Thr Lys Glu Pro Met
          20           25           30

Val Asn Leu Asp Met Lys Met Lys Glu Leu Cys Ile Met Lys Leu Leu
      35           40           45
Asp His Ile Leu Gln Pro Thr Met Phe Glu Asp Ile Lys Glu Ile Ala
      50           55           60
Lys Glu Tyr Asn Ile Glu Lys Ser Cys Asp Lys Tyr Met Asn Val Asp

      65           70           75           80
Val Val Lys Gln Phe Met Glu Met Tyr Lys Met Gly Met Leu Pro Arg
          85           90           95
Gly Glu Thr Phe Val His Thr Asn Glu Leu Gln Met Glu Glu Ala Val

          100          105          110
Lys Val Phe Arg Val Leu Tyr Tyr Ala Lys Asp Phe Asp Val Phe Met
          115          120          125
Arg Thr Ala Cys Trp Met Arg Glu Arg Ile Asn Gly Gly Met Phe Val
          130          135          140
Tyr Ala Phe Thr Ala Ala Cys Phe His Arg Thr Asp Cys Lys Gly Leu
          145          150          155          160
Tyr Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Ile Tyr Pro Tyr Phe Phe Val Asp Ser
          165          170          175

His Val Ile Ser Lys Ala Phe Met Met Lys Met Thr Lys Ala Ala Lys
          180          185          190
Asp Pro Val Leu Trp Lys Tyr Tyr Gly Ile Thr Val Thr Asp Asp Asn
          195          200          205
Leu Val Val Ile Asp Trp Arg Lys Gly Val Arg Arg Ser Leu Ser Gln
          210          215          220
Asn Asp Val Met Ser Tyr Phe Met Glu Asp Val Asp Leu Asn Thr Tyr
          225          230          235          240
Met Tyr Tyr Leu His Met Asn Tyr Pro Phe Trp Met Thr Asp Asp Ala

          245          250          255
Tyr Gly Ile Asn Lys Glu Arg Arg Gly Glu Ile Met Met Tyr Ala Asn
          260          265          270
Gln Gln Leu Leu Ala Arg Met Arg Leu Glu Arg Leu Ser His Lys Met
          275          280          285
Cys Asp Val Lys Pro Met Met Trp Asn Glu Pro Leu Glu Thr Gly Tyr
          290          295          300
Trp Pro Lys Ile Arg Leu Pro Ser Gly Asp Glu Met Pro Val Arg Gln
          305          310          315          320

```

[0022]

Asn Asn Met Val Val Ala Thr Lys Asp Asn Leu Lys Met Lys Gln Met
 325 330 335
 Met Asp Asp Val Glu Met Met Ile Arg Glu Gly Ile Leu Thr Gly Lys
 340 345 350
 Ile Glu Arg Arg Asp Gly Thr Val Ile Ser Leu Lys Lys Ser Glu Asp
 355 360 365
 Ile Glu Asn Leu Ala Arg Leu Val Leu Gly Gly Leu Glu Ile Val Gly
 370 375 380
 Asp Asp Ala Lys Val Ile His Leu Thr Asn Leu Met Lys Lys Met Leu

 385 390 395 400
 Ser Tyr Gly Gln Tyr Asn Met Asp Lys Tyr Thr Tyr Val Pro Thr Ser
 405 410 415
 Leu Asp Met Tyr Thr Cys Leu Arg Asp Pro Val Phe Trp Met Ile
 420 425 430
 Met Lys Arg Val Cys Asn Ile Phe Thr Val Phe Lys Asn Met Leu Pro
 435 440 445
 Lys Tyr Thr Arg Glu Gln Phe Ser Phe Pro Gly Val Lys Val Glu Lys
 450 455 460

 Ile Thr Thr Asp Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Glu Tyr Asp Met Asp
 465 470 475 480
 Ile Ser Asn Ala Met Tyr Leu Asp Ala Thr Glu Met Gln Asn Lys Thr
 485 490 495
 Ser Asp Met Thr Phe Met Ala Arg Met Arg Arg Leu Asn His His Pro
 500 505 510
 Phe Gln Val Ser Ile Asp Val Met Ser Asp Lys Thr Val Asp Ala Val
 515 520 525
 Val Arg Ile Phe Leu Gly Pro Lys Tyr Asp Cys Met Gly Arg Leu Met

 530 535 540
 Ser Val Asn Asp Lys Arg Leu Asp Met Phe Glu Leu Asp Ser Phe Met
 545 550 555 560
 Tyr Lys Leu Val Asn Gly Lys Asn Thr Ile Val Arg Ser Ser Met Asp
 565 570 575

[0023]

[0024]

```

Met Gln Gly Phe Ile Pro Glu Tyr Leu Ser Thr Arg Arg Val Met Glu
      580              585              590
Ser Glu Met Met Pro Ser Gly Asp Gly Gln Thr Met Val Lys Asp Trp
      595              600              605

Trp Cys Lys Ser Arg Asn Gly Phe Pro Gln Arg Leu Met Leu Pro Leu
      610              615              620
Gly Thr Ile Gly Gly Leu Glu Met Gln Met Tyr Val Ile Val Ser Pro
      625              630              635              640
Val Arg Thr Gly Met Leu Leu Pro Thr Leu Asp Met Thr Met Met Lys
      645              650              655
Asp Arg Cys Ala Cys Arg Trp Ser Ser Cys Ile Ser Thr Met Pro Leu
      660              665              670
Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Ile Asp Met Ala Ser Phe Phe Thr Ser

      675              680              685
Asn Met Lys Phe Ala Asp Val Met Ile Tyr Arg Lys Asp Leu Gly Met
      690              695              700
Ser Asn Thr Ser Lys Thr Val Asp Thr Ser Glu Met Val Met Met Lys
      705              710              715              720
Asp Asp Leu Thr Tyr Leu Asp Ser Asp Met Leu Val Lys Arg Thr Tyr
      725              730              735
Lys Asp Val Met Met Met Ser Ser Met Met Asn
      740              745

```

[0025]

[0026]

상기 SP1을 누에 체액으로부터 분리, 정제하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 한국등록특허 제10-0530506호, 또는 본 발명자의 선행 연구인 「Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001) Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 224-228.」 및 「Rhee, W. J., E. H. Lee, J. H. Park, J. E. Lee, and T. H. Park (2007) Inhibition of HeLa cell apoptosis by storage-protein 2. *Biotechnol. Prog.* 23: 1441-1446.」를 참조하여 SP1을 수득할 수 있다.

[0027]

본 발명에서는 SP1의 인간세포 아포토시스에 대한 효과를 조사하였으며, 구체적으로 헬라세포(HeLa cell)에 대한 SP1의 항-아포토시스 효과를 실험을 통해 확인하였다.

[0028]

또한, 상기 내재성 아포토시스는 스타우로스포린(Staurosporine, STS)에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0029]

본 발명에 따른 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 단백질 바이오 의약품 생산용 세포 배양 배지 소재, 또는 단백질 바이오 의약품 생산을 위한 세포주 제작에 매우 적합하게 사용될 수 있다.

[0030]

일 구체예로, 상기 단백질 바이오 의약품은 치료용 단백질로서 모노클론 항체일 수 있다.

[0031]

아울러, 본 발명에 따른 상기 저장 단백질 1(SP1)은 세포사멸(Apoptosis) 억제 효과와 더불어, 항산화 효과 및 활성산소 억제 효과를 갖는다.

[0032]

그 결과, 본 발명에 따른 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 항노화 등 기능성 화장품의 소재로 매우 적합하게 활용될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 누에(Silkworm)로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1) 유전자를 이용하여, 인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(Apoptosis)을 억제하기 위한, 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1) 발현 안정 세포주(Stable cell line)를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0034] 아포토시스 억제가 요구되는 바이오 산업 분야에서의 사용을 위해서는 재조합 SP1의 항-아포토시스 효과를 실질적으로 평가할 필요가 있다.
- [0035] 이에, 본 발명에서는 HeLa 세포에서 SP1의 일과성 발현(또는 일시적 발현, Transient expression)이 내재성 미토콘드리아 경로에 의해 유발되는 아포토시스(예컨대, STS 처리에 의해 유발되는 아포토시스)를 억제하여 세포 생존률(Viability)을 다소 증가시킴을 확인하였다. 나아가, 본 발명은 SP1의 항-아포토시스 효과를 보다 적극적으로 검증하기 위해 SP1을 발현하는 안정 세포주를 스크리닝 및 구성하였다. 구체적으로, 세포주의 항-아포토시스 효과를 트라이판 블루 배제 분석, 핵 단편화(Nuclear fragmentation)의 현미경 분석 및 유동세포 계측법을 이용해 평가하였으며, SP1 발현 세포주는 내재성 아포토시스 유발체 처리에 대해 강력한 항-아포토시스 활성을 나타내었다.
- [0036] 본 발명의 SP1 발현 안정 세포주 제조에 사용되는 상기 저장 단백질 1(SP1) 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number) NM_001113276인 것일 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 내재성 아포토시스는 스타우로스포린에 의해 유발되는 것일 수 있다.
- [0038] 이 경우, SP1 발현 안정 세포주는 스타우로스포린 처리 10시간 후 91% 이상(예컨대, 91.4%), 스타우로스포린 처리 15시간 후 78% 이상(예컨대, 78.6%)의 높은 세포 생존률을 나타낸다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 저장 단백질 1(SP1) 발현 안정 세포주는 SP1의 유전자가 형질주입된 헬라 세포주(Hela cell line)인 것일 수 있다.
- [0040] 이때, 형질주입을 위한 벡터로는 pEGFP-N1을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 누에 체액 유래의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)은 항-아포토시스 활성이 뛰어나고, 인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(Apoptosis)을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0042] 따라서, 바이오 의약 산업 분야, 예컨대 단백질 바이오 의약품 생산용 세포 배양 배지 소재, 바이오 의약 소재 자체 및 바이오 의약 생산 세포주 제작 등에 적용시 세포사멸을 최소화하며 그 생산성을 극대화시킬 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명에 따른 누에 체액 유래의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)은 항산화 작용 및 활성산소 억제 기능이 우수하다.
- [0044] 따라서, 일반 화장품은 물론 기능성 항노화 화장품 소재로서의 개발 가능성이 매우 크다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 HeLa 세포 아포토시스에서 SP1의 일과성 발현(Transient expression)의 효과를 나타낸 도면이다. 세포들은 벡터 대조군 또는 SP1 발현 벡터로 형질주입되었고, 2일 동안 배양하였다. 형질주입된 세포는 아포토시스 유발을 위해 1 μ M STS로 처리하였다. (A)는 STS 처리 후 0, 10 및 15시간에서 측정된 세포 생존률(모든 값은 평균 $\pm$ SD, n=3), (B)는 STS 처리 후 0 및 15시간에서 요오드화 프로피디움으로 착색된 세포를 나타낸다(X-축 =

eGFP 발현 수준, Y-축 = 요오드화 프로피디움의 강도, 죽은 세포 = 상부 4분면들에 위치, 숫자 = 상부 4분면들에서 아포토시스 발생 비율(%).

도 2는 SP1 발현 안정 세포주의 수립 및 선별에 관한 도면이다. 세포들은 SP1 발현 벡터로 형질주입되었고, G418 함유 배지에서 선별되었다. (A)는 형광 현미경 하에서 관찰된 eGFP 발현 세포를 최초 선별한 후, 96 웰 플레이트에서 배양하고, WST-1 분석을 이용해 그들의 항-아포토시스 효과를 테스트한 것이다(HeLa 세포를 음성 대조군으로 사용, STS 처리 후 15시간에서 HeLa 세포보다 생존률이 높은 세포 클론을 선별). (B)는 (A)로부터 선별한 5개의 클론(3, 4, 5, 8 및 28)에 대해 트라이판 블루 배제 분석을 통해 아포토시스 억제 활성을 추가적으로 테스트한 것이다(HeLa 세포를 음성 대조군으로 사용, 클론 No. 8이 최고의 아포토시스 억제 활성을 나타냄). (C)는 클론 No. 8(HeLa/SP1)의 SP1 발현을 테스트한 것이다(전체 RNA를 추출하고 cDNA로 변환, SP1에서 위쪽(D1), 중간(D2) 및 아래쪽(D3)의 서로 다른 부분을 증폭하는 3개의 서로 다른 프라이머 세트로 PCR을 수행, 다른 세포주로서 SP1 없이 pEGFP-N1으로 수립된 HeLa/CTRL을 음성 대조군으로 사용, 인간 액틴(hActin)을 RT-PCR을 위한 양성 대조군으로 사용).

도 3은 SP1 발현 HeLa 안정 세포주의 항-아포토시스 효과를 나타낸 도면이다. 세포들은 소정 시간 동안 STS로 처리하고, (A) 트라이판 블루 배제 분석, (B) 핵 단편화 관찰을 위한 호크스트(Hoechst) 염색 및 (C) 유동세포 계측법에 의해 항-아포토시스 효과를 분석하였다. (A)는 STS 처리 후 0, 10 및 15시간에서 측정된 세포 생존률(모든 값은 평균±SD, n=3), (B)는 STS로 0, 6 및 12시간 동안 처리한 후, Hoechst 33342 염색한 다음 형광 현미경 하에서 관찰한 것(화살표 = 단편화된 아포토시스 핵), (C)는 STS 처리 후 0(좌측) 및 15시간(우측)에서 요오드화 프로피디움으로 착색된 세포를 나타낸다(점선보다 높은 형광 강도를 갖는 세포를 죽은 세포로 간주).

도 4는 TNF α 처리 후 HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 세포주의 생존률을 나타낸 도면이다. 세포들은 10 μg/mL 사이클로헥시미드의 100 ng/mL TNF α로 처리하였다. 트라이판 블루 배제 분석을 통해 처리 후 0, 12, 18 및 24시간에서의 세포 생존률을 측정하였다(모든 값은 평균±SD, n=4).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예

[0048] (1) 세포 배양 및 아포토시스 유발

[0049] HeLa 세포를 10% FBS(소태아혈청, Biowest, France) 및 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, USA)을 함유하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Biowest, France)에서 배양하였다.

[0050] 세포들을 T-25 플라스크에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건으로 유지하였다.

[0051] 스타우로스포린(STS, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA)을 다이메틸설폭사이드(DMSO, Sigma, USA)에 녹여 1 mM 농도의 원액을 마련하고, 증식배지에서 1 μM의 최종 농도 조건으로 아포토시스를 유발하는데 사용하였다.

[0052] 100 ng/mL의 TNF α(Cell Signaling Technologies)를 10 μg/mL 사이클로헥시미드(Sigma)로 처리하였다.

[0053] (2) 플라스미드, 형질주입(Transfection) 및 SP1-함유 세포의 선별

[0054] SP1 유전자(GenBank accession number, NM_001113276)를 PCR로 증폭하고, Xho I 및 Sac II의 제한 부위에서 pEGFP-N1 플라스미드(Clontech Laboratories, Inc.) 내로 삽입하였다.

[0055] pEGFP-N1 단독(대조군) 또는 pEGFP-N1/SP1을 Lipofectamine 2000™(Invitrogen, USA)을 이용하여 제품 설명서에 따라 HeLa 세포에 형질주입하였다.

[0056] 일시적 형질주입(Transient transfection)의 경우, SP1 단백질 발현 구조 또는 벡터만으로 형질주입된 세포들을 유전자 발현이 적절히 되도록 하기 위해 아포토시스 유발 전 48시간 동안 인큐베이트하였다.

[0057] SP1 단백질을 발현하는 안정 세포주 또는 대조군 세포주를 수립하기 위해, 세포들을 상기 플라스미드로 형질주입하고, 48시간 후에 500 μg/mL G418(Gibco)을 함유하는 선택배지로 옮겼다. 선택배지는 매 2~3일 마다 교체하

였다. 선택배지에서 2~4주 동안 인큐베이션한 후, 세포들을 희석하고 96 웰 플레이트에 각 웰 마다 단일 세포로서 접종하였다.

[0058] 각 세포주의 항-아포토시스 효과를 STS 처리 후 EZ-Cytox(DOGEN, Republic of Korea)를 이용해 WST-1(수용성 테트라졸리움 염 1) 분석으로 테스트하였다.

[0059] 비-형질주입 대조군 HeLa 세포보다 높은 생존율을 갖는 세포주를 트라이판 블루 배제 분석을 이용하여 추가적으로 선별하였다.

[0060] (3) 역전사 PCR(RT-PCR) 분석

[0061] Isol-RNA 용해 시약(5-prime)으로 제품 설명서에 따라 전체 세포 RNA를 추출하였다.

[0062] RNA 농도를 측정하고, ReverTra Ace qPCR RT 마스터 믹스(TOYOBO, Japan)를 이용해 1 μ g의 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다.

[0063] PCR은 각 사이클에 대해 하기 프로그램을 이용하여 35 사이클 수행하였다:

[0064] 95°C에서 30초 동안 변성, 58°C에서 30초 동안 어닐링, 및 인간 액틴 프라이머(Forward: 5'-ATG AAG TGT GAV GTT AC ATC CG-3', Reverse: 5'-GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT G-3'), SP1 프라이머 I(Forward: 5'-ACA TGA AGA TGA AGG AGC TTT GC-3', Reverse: 5'-TAG AGA CCC TTG CAG TCG GTT-3'), SP1 프라이머 II(Forward: 5'-AGT CTT CCG AGT CCT CTA C-3', Reverse: 5'-CTC AGA CGT TCC AGT CTC ATT C-3'), 및 SP1 프라이머 III(Forward: 5'-GAT CCG AGA GGG TAT CCT TAC T-3', Reverse: 5'-CTA CGG ACG ATG GTG TTC TTT-3')로 72°C에서 1분 동안 익스텐션.

[0065] PCR 산물을 전기영동에 의해 2% 아가로스 겔 상에서 분석하였다.

[0066] (4) WST-1 분석 및 세포 계수

[0067] 세포들을 10% FBS 및 500 μ g/mL G418을 함유하는 DMEM에서 96 웰 플레이트(WST-1 분석용) 및 24 웰 플레이트(세포 계수용)에 접종하였다. 접종 밀도는 5×10^4 세포/cm²였다.

[0068] 1일 배양 후, 아포토시스 유발을 위해 세포들을 1 μ M STS로 처리하고, 분석에 앞서 10 및 15시간 동안 추가적으로 인큐베이트하였다.

[0069] 세포 생존율을 평가하기 위해, EZ-Cytox을 이용한 WST-1 분석을 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0070] 혈구계산기(Hemocytometer)로 트라이판 블루 염색 배제법을 이용하여 세포 계수(Cell counting)를 수행하였다.

[0071] (5) 형광 현미경을 이용한 세포 모폴로지 관찰

[0072] 세포들을 챔버 슬라이드에 5×10^4 세포/cm²로 접종하고, STS로 처리하였다.

[0073] Opti-MEM에서 1시간 동안 2 μ g/mL Hoechst 33342 형광 염료를 이용하여 형광 현미경을 통해 핵 응축 및 단편화(다운스트림 아포토시스 발생)를 눈으로 확인할 수 있도록 하였다.

[0074] 이어서, 관찰 전에 세포들을 PBS로 2회 세척하였다.

[0075] 더 밝고 작은 핵 반점을 죽은 세포로 간주하였다.

[0076] (6) 유동세포 계측법(Flow cytometry)에 의한 아포토시스의 정량화

[0077] 아포토시스 유발 후 세포들(1×10^5 세포)을 수집하고, PBS에서 10 μ g/mL 요오드화 프로피디움(PI, Sigma, USA) 400 μ L에 재현탁시켰다.

[0078] 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 유세포 분석기(Beckman Coulter, Inc. USA)를 이용하여 즉시 세포들을 분

석하였다.

[0079] **실험예**

[0080] **(1) SP1의 일과성 발현에 의한 아포토시스 억제**

[0081] SP1의 아포토시스에 대한 효과를 조사하기 위해, SP1 유전자를 클로닝하고 SP1 발현 벡터를 구성하였다.

[0082] HeLa 세포는 pEGFP-N1 대조군 벡터 단독 또는 SP1 유전자를 포함한 pEGFP-N1으로 각각 일시적으로 형질주입되었다.

[0083] 형질주입 2일 후, 아포토시스 유발을 위해 형질주입된 세포를 STS로 처리하였다.

[0084] STS 처리 후 10 및 15시간에서 세포 생존율을 평가하였다(도 1A).

[0085] SP1이 없는 대조군 벡터로 형질주입된 세포의 경우, 생존율이 STS 처리 후 10 및 15시간에서 각각 86.0 및 63.7%로 떨어졌다.

[0086] 반면, SP1을 포함한 pEGFP-N1 벡터로 형질주입된 세포의 경우, 세포 생존율 감소가 지연되어 생존율이 STS 처리 후 10 및 15시간에서 각각 94.9 및 72.0%를 나타내었다. 이는 HeLa 세포에서 SP1의 발현이 아포토시스를 억제하였음을 의미한다.

[0087] 또한, 유동세포 계측법을 이용하여 일시적으로 형질주입된 세포의 생존율을 추가적으로 분석하였다.

[0088] 형질주입 2일 후, 세포를 STS로 15시간 동안 처리한 후, 분석 전에 요오드화 프로피디움으로 착색하였다.

[0089] 녹색 형광 신호(X-축)의 증가는 세포의 부분이 성공적으로 형질주입되었고, 이로 인해 SP1이 발현되었음을 의미하는바, 이는 eGFP가 SP1와 함께 융합단백질로서 발현되었기 때문이다.

[0090] 아포토시스 세포를 나타내는 상단 사분면은 세포가 SP1을 발현하지 않았을 때 37%를 차지한 반면, SP1 유전자를 발현한 세포는 28%를 차지하였다(도 1B). 이를 통해, SP1이 HeLa 세포에서 아포토시스를 억제할 수 있음을 추론할 수 있다.

[0091] **(2) SP1 발현 안정 세포주의 제조**

[0092] SP1의 항-아포토시스 효과를 명확히 증명하기 위해, SP1을 안정적(영구적)으로 발현하는 세포주를 제조하였다.

[0093] HeLa 세포를 SP1 유전자가 없는 pEGFP-N1(대조군 벡터) 또는 SP1 유전자를 지닌 pEGFP-N1로 형질주입하고, 안정 형질전환물(Stable transfectants)을 선택함으로써 G418를 함유하는 배지를 이용하여 스크리닝하였다.

[0094] 세포들을 96 웰 플레이트에 단일 세포로서 접종하였다.

[0095] 접종 2주 후, 세포들을 형광 현미경으로 관찰하고, GFP 발현 세포만을 선별하여 계속 유지 및 테스트를 실시하였다.

[0096] 상기 세포주를 STS로 15시간 동안 처리하고 WST-1 분석을 통해 항-아포토시스 효과를 평가하였다(도 2A).

[0097] 28개 클론 중 5개(클론 No. 3, 4, 5, 8 및 28)가 STS 처리 후 비-형질주입된 HeLa 세포(도 2A의 점선)보다 높은 생존율을 나타내었다. 이들 클론에 대해 트라이판 블루 배제법을 이용한 생존 세포 계수를 통해 항-아포토시스 활성을 추가적으로 테스트하였다.

[0098] 도 2B에서 보듯이, 5개 클론 중 클론 No. 8이 STS 처리 후 가장 현저한 항-아포토시스 활성을 나타내었는바, 이를 최종 세포주, HeLa/SP1로 간주하였다.

[0099] 상기 HeLa/SP1 세포주가 SP1을 발현함을 확인하기 위해, HeLa/SP1로부터 전체 RNA를 정제한 후 cDNA로 변환시켰다.

[0100] SP1의 3개 서로 다른 영역(D1, D2 및 D3)을 증폭시키는 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하고, DNA 전기영동을 이용하여 결과를 분석하였다(도 2C).

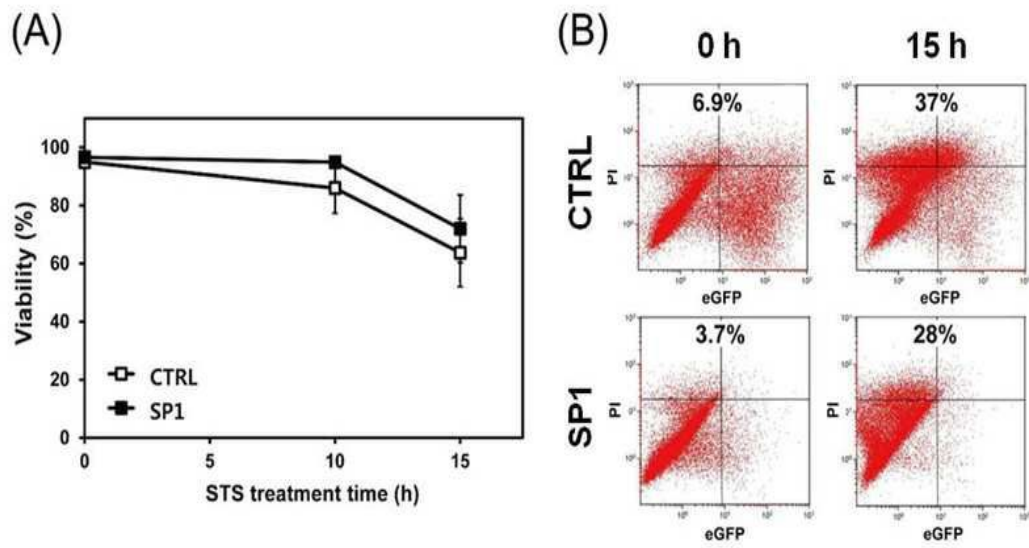
[0101] 인간 액틴(hActin) 프라이머를 인터널 콘트롤(Internal control)로 사용하였다.

- [0102] SP1 유전자를 지닌 벡터로 형질주입된 세포주는 3개 영역 모두에서 증폭된 SP1의 PCR 산물을 나타낸 반면, SP1 유전자가 없는 대조군 세포주(HeLa/CTRL)는 증폭된 PCR 산물이 발생하지 않았는바, 이는 HeLa/SP1이 전체 SP1 유전자를 발현함을 의미한다.
- [0103] 이를 통해, 제조된 HeLa/SP1 세포주가 SP1을 발현한다는 점이 명백히 확인되었다.
- [0104] **(3) SP1 안정 발현에 의한 아포토시스 억제**
- [0105] SP1을 포함 및 비-포함하여 수립된 2가지 세포주를 10 및 15시간 동안 STS로 처리하고, 트라이판 블루 염색법을 이용하여 세포 생존률을 분석하였다.
- [0106] 도 3에서 보듯이, HeLa/CTRL의 생존률은 감소하여 STS에 의한 아포토시스 유발 후 10 및 15시간에서 단지 60.2 및 36.5%의 세포만이 생존가능하였다.
- [0107] 반면, SP1을 안정적으로 발현하는 HeLa/SP1 세포주는 아포토시스에 대한 저항성을 나타내어, STS 처리 후 10 및 15시간에서 각각 91.4 및 78.6%의 생존률을 보였다.
- [0108] 아포토시스는 핵 단편화를 동반하며, 핵 염색에 의해 눈으로 확인할 수 있다.
- [0109] HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 각각을 STS로 처리하고, 형광 현미경 하에서 핵 단편화를 관찰하였다(도 3B).
- [0110] HeLa/CTRL은 작은 단편화 된 핵을 지닌 다수의 세포를 포함하였고, 이러한 아포토시스 세포의 수는 STS 처리 시간에 따라 증가하였다.
- [0111] 반면, HeLa/SP1의 경우 STS 처리 12시간 후에도 극소수의 세포만이 단편화된 핵을 나타내었다.
- [0112] 또한, 유동세포 계측법을 이용하여 아포토시스를 평가하였다(도 3C).
- [0113] 각 세포주를 STS로 15시간 동안 처리하고, 아포토시스 분석을 위해 요오드화 프로피디움으로 착색하였다.
- [0114] HeLa/CTRL의 경우 단지 22%의 세포만이 생존한 반면, HeLa/SP1의 경우 79%의 세포들이 여전히 생존하고 있었다.
- [0115] 결국, SP1은 HeLa 세포에 있어 STS에 의해 유발되는 아포토시스를 강하게 억제할 수 있는 단백질임이 다시 한번 확인되었다.
- [0116] STS는 내재성 신호 경로를 통해 아포토시스를 유발하고, 세포 내에서 미토콘드리아에 작용하는 세포 내 신호를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이는 미토콘드리아로부터 사이토졸로의 사이토크롬 c 방출을 유발하고, 그 결과 카스파아제 활성화를 자극한다.
- [0117] SP1의 항-아포토시스 메커니즘에 대해서는 더욱 심오한 연구가 필요하겠지만, 본 발명에 따라 SP1이 내재성 미토콘드리아 아포토시스 경로를 억제한다는 점은 명확히 확인되었다.
- [0118] 한편, 누에 체액은 Bax 전좌와 무관한 세포 표면 수용체-의존성 아포토시스 경로에 기인한 아포토시스는 차단할 수 없었다. 즉 SP1은 외인성 아포토시스 경로는 차단할 수 없을 것으로 추정된다.
- [0119] 이를 입증하기 위해, 각 세포주를 대표적인 외인성 경로 아포토시스 유발제인 TNF α 100 ng/mL로 처리하였다.
- [0120] TNF α 처리 후 HeLa/SP1의 세포 생존률 감소율은 HeLa/CTRL의 경우보다 약간 낮았지만, 통계학적으로 유의적인 차이는 없었다(도 4).
- [0121] 이는 SP1이 세포 표면 수용체-매개 외인성 아포토시스 경로는 차단하지 못함을 알려준다.
- [0122] HeLa 세포 아포토시스에 있어, SP1 및 SP2 간의 체계적인 비교는 아직까지 수행된 바 없었다. 본 발명자는 누에 체액으로부터 정제된 SP2를 이용하여 SP2의 항-아포토시스 효과를 평가한 바 있으며, 본 발명에서는 SP1 발현 세포주를 제조하여 그 항-아포토시스 효과를 구체적으로 입증하였다.
- [0123] SP1 및 SP2가 누에에서 저장 단백질로서의 기능적 역할, 항-아포토시스 활성 및 열에 대한 저항성과 같은 몇몇 공통된 특성을 지니지만, 그 기본 구조에 있어서는 단지 30%의 상동성을 공유한다는 점은 흥미롭다.
- [0124] 따라서, 포유동물 세포에 있어서 이들의 생물학적 역할은 상호 차이점을 보일 것으로 예상된다.

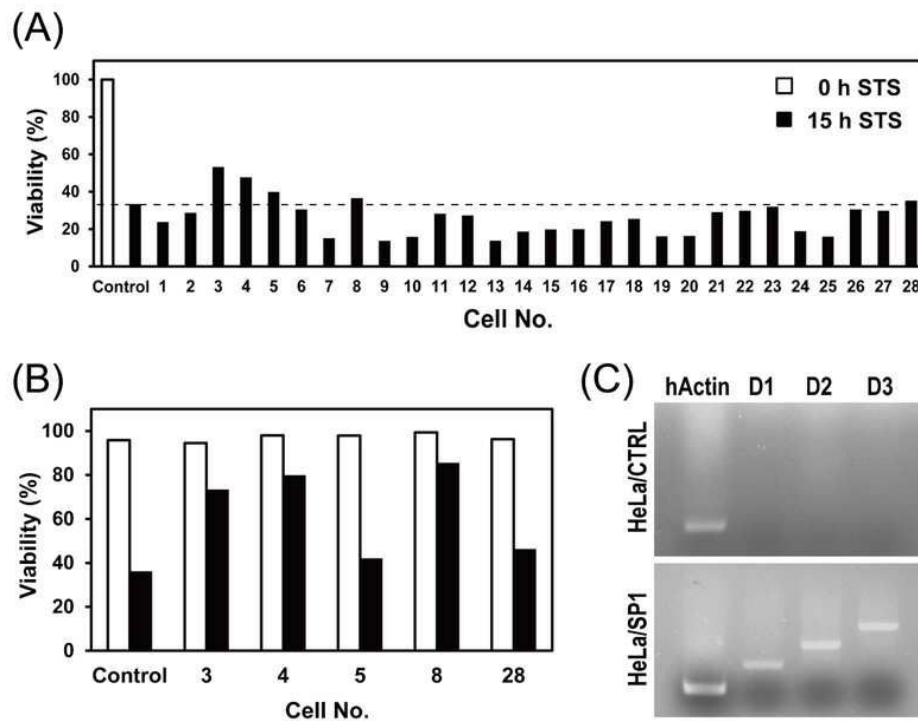
- [0125] 30K 단백질의 생물 물리학적 특성 및 구조적 정보는 잘 설명이 되어 있는 반면, SP1의 생물학적 기능에 대해서는 알려진 바가 거의 없었다.
- [0126] 특히, 30K 단백질은 세포막에 침투하여 미토콘드리아 막으로의 Bax 전좌를 차단하는 것으로 알려져 있다.
- [0127] SP1의 침투에 대해서는 현재 개발된 바가 없지만, SP1에 의한 아포토시스 억제에는 세포 내로의 내재화 (Internalization)를 요구하는 것으로 예상되는바, 그 이유는 다음과 같다: 첫째, 누에 체액으로부터 정제된 SP를 배양 배지에 보충하면 아포토시스가 억제된다는 점이다. 둘째, 전술한 바와 같이 SP1의 세포 내 발현이 아포토시스를 억제하였다는 점이다. 또한, SP1은 세포 표면 수용체-매개 아포토시스의 억제에는 실패하였다는 점이다(도 4).
- [0128] 모노클론 항체를 포함한 치료용 단백질 시장은 급속하게 성장하고 있고, 치료용 단백질의 생산은 바이오 산업의 주요 분야로 자리잡고 있다.
- [0129] 따라서, 세포 배양 도중 세포사멸에 대해 저항성을 지녀 대규모 생산의 요구사항을 충족시킬 수 있는 세포주의 개발이 매우 중요하다.
- [0130] 이러한 측면에서, 본 발명에 따른 SP1 발현 세포주의 수립은 치료용 단백질 생산의 매우 전도유망한 전략이 될 수 있다. 첫째, SP1은 아포토시스를 억제하는바 배양 도중 생산 시간을 연장하고, 이를 통해 생산량 및 품질의 증대가 가능해지기 때문이다. 둘째, SP1은 천연 단백질인바 상업적 치료용 단백질 생산에 사용시 잠재적 리스크가 존재하지 않기 때문이다. 일부 잘 알려진 항-아포토시스 단백질, 예컨대 Bcl-2는 세포에서 Bcl-2 단백질을 과발현하는 대표적인 종양 단백질로서, 정제 프로세스를 통해 숙주세포 단백질로서 깨끗하게 제거되어야 한다. 이런 의미에서, CHO 및 SP2/0 세포와 같은 치료용 단백질 생산 세포주에 있어 SP1의 항-아포토시스 역할, 및 그 메커니즘에 대한 더욱 심오한 조사는 바이오 의약 산업의 발전에 크게 이바지할 수 있을 것이다.
- [0131] **결과 검토**
- [0132] 누에 체액의 항-아포토시스 활성은 2가지 주요 단백질 종류, 즉 30K 단백질 및 SP로부터 발생된다.
- [0133] 30K 단백질의 항-아포토시스 활성, 메커니즘 및 적용예는 잘 증명이 되어 있는 반면, SP의 다양한 특성들에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.
- [0134] 본 발명에서는, 인간세포 아포토시스에서 SP1의 항-아포토시스 효과를 조사하였다.
- [0135] HeLa 세포에서 SP1의 발현은 내재성 아포토시스 경로에 대해 강한 저항성을 보인 반면, 외인성 아포토시스 경로에 대해서는 그렇지 않았다.
- [0136] 또한, SP1은 Bcl-2 종류, 30K 단백질 또는 IAP(Inhibitor of apoptosis protein)와 같은 잘 알려진 아포토시스 억제제와는 어떠한 서열상 일치성(Sequence homology)도 공유하지 않는다.
- [0137] 따라서, SP1에 의한 아포토시스 억제는 세포사멸 최소화 및 생산성 최대화에 초점을 둘 때, 바이오 의약 산업에 매우 유용하게 활용될 수 있는 새로운 항-아포토시스 전략을 제공할 수 있을 것이다.

도면

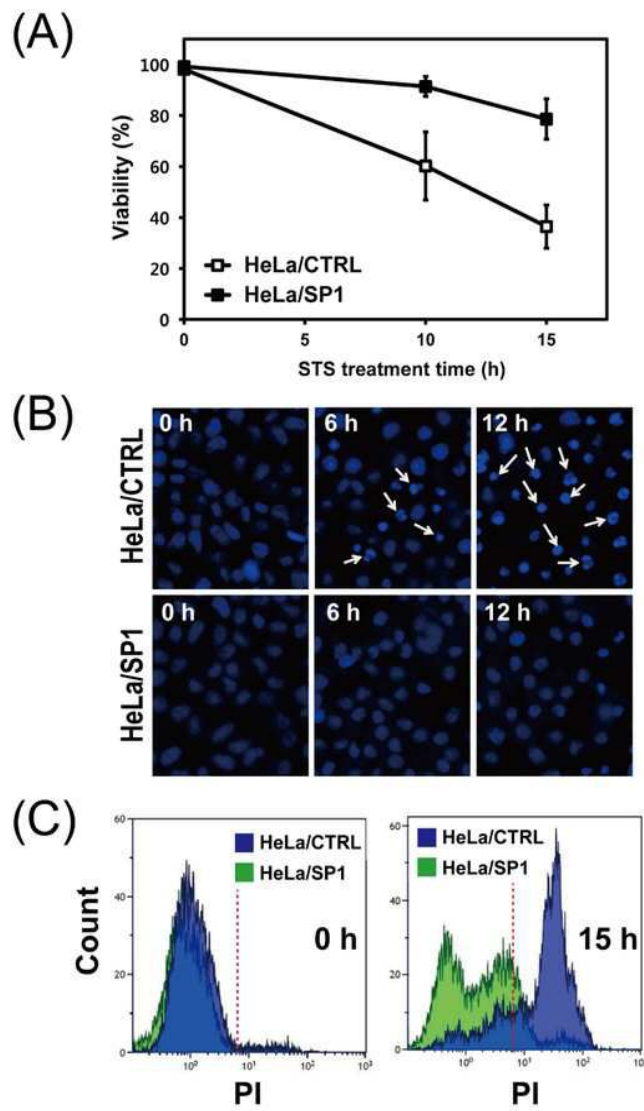
도면1



도면2



도면3



도면4

