(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029357
(43) 공개일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C07K 14/73* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C07K 14/70514 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0110153
(22) 출원일자 2023년08월22일
심사청구일자 2023년08월22일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
(72) 발명자
이하늘
인천광역시 연수구 원인재로 212, 107동 1302호
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호
변영주
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 408호
(74) 대리인
차준용

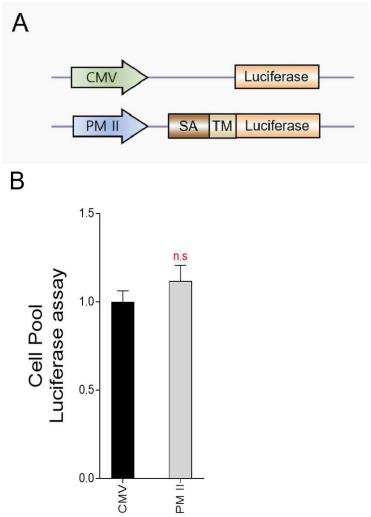
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 프로모터**

(57) 요 약

본 발명의 일실시예는 신규한 프로모터를 제공한다. 상기 프로모터는 재조합 벡터에 포함되어서 목적 단백질의 발현량을 상당히 증가시킬 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따른 프로모터를 포함하는 재조합 벡터는 종래의 벡터보다 증대된 단백질 발현량 및 안정성을 보여주었고 이는 더욱 효율적이고 효과적인 단백질 의약품 생산용 발현벡터의 구현을 용이하게 할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2015/8518 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711185822
과제번호 2021R1A2C1004298
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 미토콘드리아 대사 기반 통합적 노화 제어
기 여 율 0.4/1
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29
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 0.08/1
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2020.05.01 ~ 2023.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345358417
과제번호 2021R1A6C101A432
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 핵심연구지원센터조성지원과제(Cell to In-vivo 이미징 핵심연구지원센터)
기 여 율 0.02/1
과제수행기관명 가천대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2027.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1485019352
과제번호 ARQ202201522002
부처명 환경부
과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원
연구사업명 수생태계 건강성 확보 기술개발사업
연구과제명 국내고유종 기반 하천호소수 생물영향평가 기술개발
기 여 율 0.1/1
과제수행기관명 겐트대학교코리아 산학협력단
연구기간 2022.08.01 ~ 2026.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465040900
과제번호 HP23C0024
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 혁신성장 피부건강 기반기술 개발사업
연구과제명 활성 산소 억제를 통한 피부 역노화 기술 개발
기 여 율 0.4/1
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2023.07.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 목적 단백질을 세포 배양액으로 분비시키는 기능을 가지고 있는 것을 특징으로 하는, 프로모터.

청구항 3

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor), 막관통 단백질(transmembrane protein)을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 순차적으로 프로모터, 스플라이싱 수용 부위, 막관통 단백질을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 막관통 단백질은 인간 CD4 단백질인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 7

서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 세포에 형질주입시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포는 CHO세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 프로모터에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 목적 단백질의 발현량을 높여주는 프로모터에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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. 이 때 사용되는 프로모터는 대부분 강력한 바이러스 기반 프로모터를 사용한다. 숙주 세포 내에서 원하는 유전자를 발현시키기 위해서는 세포 내로 구조 유전자를 수송하여 이를 발현시키는 발현벡터 및 유전자 전달기술이 필요하다. 이때, 발현벡터는 벡터에 삽입된 DNA 단편을 발현시킬 수 있는 벡터로서, 일반적으로 숙주 내에서 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터 서열이나 분비단백질 서열 등의 발현조절서열을 포함한다.

[0004] 기존의 바이러스 기반 프로모터인 CMV나 SV40와 같은 프로모터는 포유류에서 높은 활성을 보이며 CHO 세포에서 강한 전사를 유도한다. 그럼에도 불구하고 바이러스 기반 프로모터는 배양 시간이 지남에 따라 생산성을 잃을 수 있으며 특히 CMV프로모터의 메틸화는 단백질 발현의 손실을 초래할 수 있다. 또한 바이러스 기반 프로모터는 후생적 침묵으로 인해 리포터 유전자 발현에 제한을 가질 수 있다. 숙주 세포의 종류, 발현 시기, 발현양 등은 발현벡터를 선택함에 있어서 주요한 근거가 되며, 목적에 따라 이러한 점들을 충족시키기 위해 다양한 발현벡터가 개발되어 왔고, 특히, 보다 효율적인 발현벡터 내의 프로모터의 개발이 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 관심 유전자의 발현량을 증가시킬수 있는 프로모터를 제공하는 것이다.

[0007] 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

[0009] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터를 제공한다.

[0010] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 프로모터는 목적 단백질을 세포 배양액으로 분비시키는 기능을 가질 수 있다.

[0011] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor), 막관통 단백질(transmembrane protein)을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 순차적으로 프로모터, 스플라이싱 수용 부위, 막관통 단백질을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 막관통 단백질은 인간 CD4 단백질일 수 있다.

[0015] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 세포에 형질주입시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 세포는 CHO세포일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 실시예에 따른, 프로모터는 목적 유전자의 발현량을 종래기술보다 더 많이 그리고 효율적으로 증대시킬 수 있다.

[0019] 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

[0021] 도 1은 신호 펩타이드에 의해 활성화된 루시퍼라제 활성을 보여주는 그림이다. 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터를 포함하는 유전자는 루시퍼라제에 의해 ER 막의 외부로 분비된다. SS를 포함하지 않은 비분비 유전자에서는 루시퍼라제가 분비되지 않는다.

도 2는 신호 펩타이드 트랩핑을 위한 시스템 설계를 보여준다. (A)는 신호 펩타이드 트래핑을 위한 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터 설계를 보여준다. 막통과 단백질(TM)과 스플라이싱 수용부위(SA)는 루시퍼라제 앞에 배치되도록 설계되었다. (B)는 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터가 삽입된 안정된 세포주가 구축되었다 것을 보여준다. 루시퍼라제 발현 수준은 각 360 세포 배지에서 측정되었다. 각 그래프는 단일 클론 세포 배양끼리 비교되었습니다.

도 3은 전장유전체 분석에 의한 신호 펩타이드의 유효성을 보여준다. 전장유전체분석을 통해 얻은 삽입 위치는 IGV 프로그램을 사용하여 시각화되었다. 삽입 위치에는 길이가 1 kb인 트래핑 유전자를 포함하여 이러한 모든 위치를 포함한 세 가지 후보가 있다.

도 4는 트랩된 프로모터의 루시퍼라제 활성 평가를 보여준다. (A)는 대조군으로 사용된 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터이다. 세 개의 위치를 포함한 1 kb의 유전자를 정방향 및 역방향으로 삽입했다. 효소 위치로 EcoRI를 사용했다. (B)는 대조군, PM I, PM II로 형질주입된 일시적 수준(transient level) 세포에서의 루시퍼라제 발현 수준의 비교 결과를 보여준다. **P < 0.01, Student's t-테스트. 평균 ± 표준 편차, N = 3. (C)는 대조군, PM I 및 PM II로 형질주입된, 일시적 수준(transient level)의 세포 배지에서 루시퍼라제 발현 수준의 비교 결과를 보여준다. **P < 0.01, Student's t-테스트. 평균 ± 표준 편차, N = 3. (D)는 대조군, PM I 및 PM II의 안정된 세포 배지에서 루시퍼라제 발현 수준의 비교 결과를 보여준다. 각 세포마다 무작위로 30개를 선택했다. (E) 대조군, PM I 및 PM II로 안정된 수준 세포 배지에서 루시페라제 Qp의 측정 결과를 보여준다.

도 5는 CMV 프로모터와 PM II의 루시퍼라제 활성 비교를 나타낸다. (A)는 루시페라제 활성 평가를 위한 CMV 프로모터와 PM II 벡터의 설계를 보여준다. (B) CMV 프로모터의 발현 수준과 PM II의 일시적 수준(transient level)의 루시퍼라제 발현 수준을 보여준다. n.s.: 유의하지 않음. Student's t-테스트. 평균 ± 표준 편차, N = 3.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 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.

[0023] 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.

[0024] 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.

[0026] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터를 제공할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 프로모터는 재조합 벡터 내에 위치하고, 재조합 벡터에 위치한 목적 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현을 증대시킬 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 프로모터는 목적 단백질을 세포 배양액으로 분비시키는 기능을 가질 수 있다. 즉, 상기 프로모터는 발현시키려는 목적 단백질과 작동가능하게 연결되어서, 상기 목적 단백질이 발현이 된 후에 세포 배양액으로 분비될 수 있게 할 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 추가적으로 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor), 막통과 단백질(transmembrane protein)을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 스플라이싱 수용부위는 RNA 스플라이싱 일어나기 위해 필요한 부위로서 일종의 표지같은 역할을 할 수 있다. 구체적으로, 인트론의 5'시작 부위에 제공(donor) 부위(GU-)가 있고 3'마지막 부분에는 수용(acceptor) 부위(-AG)가 위치할 수 있다. 상기 막통과 단백질은 세포막에 내장되어 지질 이중층막에 걸쳐 위치할 수 있다. 그리고, 막통과 단백질은 일반적으로 세포질 도메인(세포 내부로 신호 전달용), 막통과 도메인 및 수용체 역할을 하는 세포 외부에 매달려 있는 외포질 도메인의 세 가지 다른 도메인을 가지고 있을 수 있다. 막통과 단백질은 접합 단백질에서 인식, 수송, 고정 및 형질 도입에 이르기까지 세포에서 다양한 생리 기능을 수행할 수 있다. 그리고, 막통과 도메인은 일반적으로 알파 나선 또는 다중 베타 가닥으로 구성된 베타 시트의 구성을 채택하는 소수성 잔기로 구성될 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에서, 상기 재조합 벡터는 순차적으로 프로모터, 스플라이싱 수용 부위, 막통과 단백질을 인코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 막통과 단백질은 인간 CD4 단백질일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 구조(Rescue) 벡터일 수 있다. 구조(Rescue) 벡터는 분비성(secretory) 유전자를 트랩핑(trapping)하기 위한 벡터로서, 세포 배양액으로 분비되는 유전자를 찾기 위해 제작되는 벡터이며, 구체적으로 상기 재조합 벡터는 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터일 수 있다. 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS)는 신호서열과 프로모터를 포함한 영역을 찾기 위한 벡터로 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor), 막통과(transmembrane), 리포터 유전자(reporter gene)를 포함하는 재조합 벡터이다. 신호서열을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는 숙주세포에서 목적으로 하는 외래 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 벡터를 의미한다. 적합한 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서와 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "작동 가능하게 연결된"은 발현이 필요한 유전자와 이의 조절 서열이 서로 결합되어 유전자 발현을 가능케 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다.

[0031] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프로모터 및 목적 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 세포에 형질주입시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 추가적으로 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor) 및 막통과 단백질(transmembrane protein)을 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 세포는 동물세포일 수 있으며, 바람직하게는 CHO세포일 수 있다.

[0033] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0035] **실시예1. 세포 배양**

[0036] Chinese hamster ovary (CHO) DG44 세포(A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 사용되었다. 세포들은 종래기술에 따라 배양되었다.

[0038] **실시예2. 플라스미드 설계 및 제조**

[0039] 모든 플라스미드는 별도로 언급된 방법을 제외하고 표준 클로닝 기법을 사용하여 제조되었다. 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터는 종래의 Landing Pad 벡터(Kim, J., Lee, Y. H., Kuk, M. U., Hwang, S. Y., Kwon, H. W., & Park, J. T. (2021). Cre/Lox-based RMCE for Site-specific Integration in CHO Cells. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *26*, 795-803)를 사용하여 설계되었다. 막통과 인간 CD4 단백질과 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor, SA)는 Landing Pad 벡터의 리포터 유전자인 루시페라제 앞에 배치되었다. 스플라이싱 수용부위는 Addgene 플라스미드 라이브러리(www.addgene.org)의 ROSAFARY 벡터에 사용된 플라스미드 pROSAFARY에서 얻었다. 인간 CD4 (아미노산 91-178) 막통과 유전자는 유전자 합성 회사인 바이오니어(www.bioneer.co.kr)에서 합성되었다.

[0041] **실시예3. 게놈 DNA 합성 및 프로모터 트랩핑을 위한 전장유전체해독(whole genome sequencing, WGS)분석**

[0042] 유전체 DNA는 제조업체의 지침에 따라 유전체 DNA 프렙 킷 (SGD41-C100; Solgent, 대전, 한국)을 사용하여 추출되었다. 전장유전체해독(WGS) 분석을 위해 유전체 DNA는 next generation sequencing(NGS) 방법을 사용하여 시퀀싱 회사 (www.bioneer.co.kr)로부터 FASTQ 파일로 얻었다. 삽입 위치는 두 가지 방법으로 분석되었다. 분석은 시퀀싱 회사 (www.bioneer.co.kr)와 Linux 서버의 삽입 위치 분석 방법을 사용하여 수행되었다. Linux 서버를 통해 분석된 삽입 위치는 illumina paired-end read 형식의 유전자 매핑 방법을 통해 분석되었다. 시퀀싱 회사로부터 얻은 FASTQ 파일을 Bowtie2 소프트웨어를 사용하여 인덱싱한 후, 참조 파일을 기반으로 alignment를 수행하고 유전자 매핑을 수행했다. 그 후, 얻은 유전자 매핑 파일에 삽입된 벡터서열을 블래스팅(blast)하여 삽입 위치를 얻었다. 얻은 삽입 위치는 IntegrativeGenomicsViewer(IGV)프로그램(https://software.broadinstitute.org/software/igv/)을 통해 시각화되었다.

[0044] **실시예4. 선정된 프로모터(trapped promoter)의 벡터 제조**

[0045] 전장유전체해독 분석을 통해 유전체 DNA의 1 kb 영역 (NW_003613833.1:1781431-1782488)을 얻었다. 이 영역은 정방향(forward) 및 역방향(reverse)으로 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터의 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor, SA) 앞 EcoRV 부위에 삽입되었다. 정방향은 프로모터 I (PM I)(서열번호 2)로, 역방향은 프로모터 II (PM II)(서열번호 1)로 지정되었으며, 각각의 활성은 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터를 대조군으로 사용하여 확인되었다.

[0047] **실시예5. 형질주입(transfection) 및 세포주 성장**

[0048] CHO DG44 세포는 제조업체의 지침에 따라 Lipofector-EZ 시약(AB-LF0EZ150; APTABIO, 수원, 한국)을 사용하여 형질주입되었다. 대조군으로는 2 μg의 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터를 사용하여 세포가 형질주입되었다. 프로모터 활성을 확인하기 위해 2 μg의 PM I(서열번호 2) 및 PM II(서열번호 1) 벡터가 형질주입되었다. 형질주입된 세포는 500 μg/mL G418 (ant-gn-1; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용해서 2 주 동안 선택되었다. 선택 과정에서 배지는 2 일마다 교체되었다. 선택 후, 단일 세포가 96-웰 플레이트 (353072; Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)의 각 웰에 150 μL 배지에 seeding되고 20 일 동안 인큐베이션되었다.

[0050] **실시예6. 루시퍼라제(luciferase) 활성 측정**

[0051] 루시페라제 활성은 Luciferase Assay System (E1500; Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 사용하여 분석되었다. 루시페라제는 두 곳에서 측정되었다: 세포 배양액과 세포질. 세포 배양액에서의 측정한 경우, 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터의 안정된 세포주에서 얻은 모든 세포의 세포 배양액 50 μL이 흰색 96-웰

플레이트 (30396; SPL, 경기도 포천시)의 어느 하나의 웰로 이동되었고, 각 웰에 루시페라제 검사용 시약 II 50 μL이 첨가되었다. 세포질에서의 측정의 경우, 프로모터 후보 PM I(서열번호 2) 및 PM II(서열번호 1)의 일시적인 수준(transient level)에서 루시페라제 활성이 확인되었다. 1×10^6 세포들이 200 × g에서 2분 동안 원심분리되었다. PBS (10010023; Thermo Fisher Scientific)로 두 번 세척한 후, 세포는 1× 세포 배양 용해 용액 200 μL에서 현탁(vortexing)되었다. 용해된 샘플은 60 μL씩 3개의 portion으로 흰색 96-웰 플레이트 (30396; SPL)의 웰로 이동되었다. 각 웰에 PBS 60 μL과 루시페라제 검사용 시약 II 60 μL이 첨가되었다. 루시페라제 활성은 VICTOR 멀티 라벨 플레이트 리더 (2030-0050; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 발광 강도를 측정하여 평가되었다.

[0053] **실시예7. 성장률 및 비생산속도(specific production rate, Qp) 측정**

[0054] 안정된 수준에서 배지에 배출된 루시페라제 단백질은 성장률과 세포 특이 생산성 (Qp)을 위해 측정되었다. Qp는 다음 식을 통해 계산되었다.

[0056]
$$\mathrm{Qp}(pg/cell/day)\ \text{in media} = \frac{\text{luciferase activity2} - \text{luciferase activity1}}{\text{density2} - \text{density1}} \times \text{Growth rate } (\mu)$$

[0057]
$$\text{Growth rate } (\mu) = \frac{\ln(\text{density2}) - \ln(\text{density1})}{\text{time2} - \text{time1}}$$

[0058] 각 세포의 안정된 세포주에서 프로모터 후보인 PMI와 PMII의 활성을 확인하기 위해 30개의 세포가 무작위로 선택되었다. 각 세포 배양액 50 μL씩이 흰색 96-웰 플레이트 (30396; SPL)의 웰로 이동되었고, 각 웰에 루시퍼라제Assay Reagent II 50 μL이 첨가되었습니다. 성장률과 비생산속도(Qp)를 측정하기 위해 30개의 세포가 선택되어 5×10^4 세포로 다시 seeding되었고 4일 동안 배양되었다. 그 후, 세포 배양액 50 μL에 루시퍼라제Assay Reagent II 50 μL이 첨가되어 루시페라제 검사가 수행되었다.

[0060] **실시예8. 통계 분석**

[0061] 통계 분석은 표준 통계 소프트웨어 패키지(SigmaPlot 12.5; Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 학생 t-검정(Student's t-test)과 본페로니의 다중 비교 검정(Bonferroni's multiple comparison test)을 포함한 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)이 차이가 유의한지 여부를 확인하기 위해 사용되었다.

[0063] **결과 분석**

[0064] 프로모터가 없는 프로모터 트랩(trap) 벡터의 CHO 세포 라이브러리의 제조

[0065] 프로모터 트랩핑(trapping)을 위해서, 프로모터가 없는 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터들이 Chinese hamster ovary (CHO) 세포들에 형질주입(transfection)되었다(도 1). 이 시점에서, 막통과 도메인은 G418 저항성을 부여하는 세포질의 C말단에 위치하고 있고, 루시퍼라제는 N말단에 위치하고 있으며 세포 배양배지에서 측정을 위해 세포들 밖으로 보내진다. 추가적인 스플라이싱 수용부위(splicing acceptor) 서열은 막통과 도메인 앞에 삽입되었다. 유전자의 인트론에 삽입되었을 때, 효과적으로 스플라이싱이 유도될 수 있다. 게다가, 세포질에서 루시퍼라제 단백질 활성은 세포 배지에서 분비된 루시퍼라제 단백질 활성과 상관관계가 있다(도 2A). 따라서, 루시퍼라제 활성은 리포터 유전자 활성을 측정하기 위해 세포 배양 배지에서 측정되었다. 첫째로, 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터의 G418 저항성 CHO세포들이 획득되었다. 단일 세포 클론을 획득하기 위해서, 96웰 플레이트에 21일동안 고정적으로 배양되었고, 그런 다음 6웰 플레이트로 옮겨졌다. 그리고 나서, 단일 세포 클론의 배지로 분비된 루시퍼라제의 양을 측정함으로써 360개의 무작위 통합된 프로모터 부위 후보들이 분리되었다. 그 후보들 중에서, 126 및 72의 루시퍼라제 발현 수준이 #88 및 #272 세포 배지에서 각각 발견되었다(도 2B). 가장 높은 루시퍼라제 발현수준을 가진 세포 #88이 선택되었고 삽입부위가 분석되었다.

[0067] 무작위 통합된(integrated) 프로모터 삽입 부위에 대한 바이오인포매틱스 분석

[0068] 가장 많은 루시퍼라제를 분비한 #88 세포의 삽입 부위를 확인하기 위해, 유전체 DNA의 전장유전체서열(whole genome sequence)이 획득되었다. 이는 NGS방법을 사용해서 FASTQ 파일로서 획득되었다. CHO DG44 참조 파일 및 FASTQ 파일은 인덱싱되었고 정렬(aligned)되었으며 유전자 맵핑이 Bowtie2 소프트웨어를 통해 수행되었다. 그런 다음, 삽입 부위의 위치가 BLASTN 분석 쿼리로 확인되었고 IGV 프로그램으로 시각화되었다(도 3). 시각화된 지역은 CHO세포 유전자 NW_003613833.1의 1781431-1782488 bp 부분이었다. CHO DG44 참조 파일은 #88 세포들의 유전체 DNA파일과 매칭되었다. 보라색(purple) 부분들은 CHO DG44 참조 파일과 매칭되지 않았던 지역들을 가리킨다. 이러한 파트를 삽입부위로서 인식하면서, 3군데의 삽입 부위를 포함하는 1 kb가 프로모터 후보로서 선정되었다.

[0070] 트랩된 프로모터의 활성 평가

[0071] 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터의 스플라이싱 수용부위(splicing acccepor) 상에 정방향(forward) 및 역방향(reverse)의 삽입부위를 통해서, IGV에 의해 탐지된 3군데의 삽입부위를 포함하는 1 kb 유전자 지역이 분석되었다(도 4A). 실제 트랩된 부위가 유전자 전사를 일으키는 검증하기 위해서, CHO 세포들은 형질도입되었고 세포 및 배지로부터 분비된 실제 루시퍼라제 단백질의 양이 측정되었다. 일시적인 수준(transient level)에서 세로포부터 분비되 루시퍼라제 양은 PM I(서열번호 2) 및 PM II(서열번호 1) 각각에서 대조군인 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터와 비교해서, 3.6배, 28.5배의 활성을 보여줬다(도 4B). 세포 배지에서 분비된 루시퍼라제 양은 PM I(서열번호 2) 및 PM II(서열번호 1) 각각에서 대조군인 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터와 비교해서, 2.8배, 56배의 활성을 보여줬다(도 4C). 그리고 나서, 각 세포의 단일클론 세포들의 루시퍼라제 분비 활성이 평가되었다. 30개의 단일 세포 클론들이 무작위로 선택되었고 세포 배지에서 분비된 루시퍼라제의 양이 측정되었다(도 4D). 각 그래프에서 점들은 루시퍼라제 활성을 나타낸다. 세포 배지에서 분비된 루시퍼라제의 평균값은 대조군인 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터와 비교해서, 8.56배, 58.25배 높였다. 각 그룹의 Qp를 측정함으로써, 측정된 Qp 가 대조군인 신호서열구조(Signal sequence rescue, SS) 벡터와 비교해서 상당히 높이(height)측면에서 상당히 증가했다는 것이 확인되었다(도 4E). 루시퍼라제 활성에 있어서 주요한 차이는 트랩된 후보가 신호 펩타이드(signal peptide)를 포함하는 프로모터 역할을 보여주었다는 것을 말하고 있다.

[0073] 본 발명의 프로모터와 종래 프로모터와의 비교

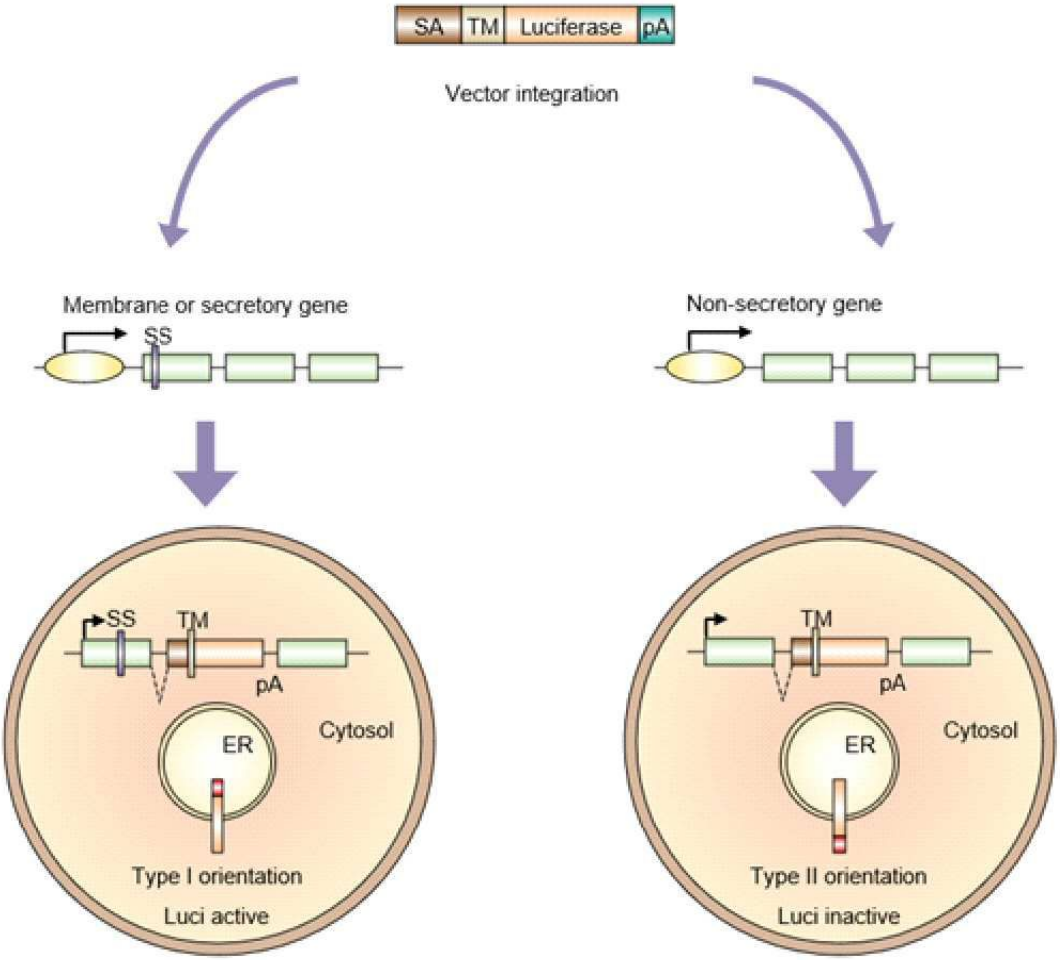
[0074] 실제 신호 펩타이드를 포함하고 있는 프로모터 지역이로 간주되는 1 kb 유전자 지역의 상업적 효과를 검증하기 위해서, 매우 높은 활성을 보인 역방향 PM II(서열번호 1)를 CMV 프로모터와 비교하였다(도 5A). CHO 세포들은 형질주입되었고 세포에서의 루시퍼라제 단백질의 양이 측정되었다. 일시적 수준(transient level)에서 세포에서 측정된 루시퍼라제의 양은 CMV 프로모터와 비교해서 대략 1.1배 더 높은 활성을 보여주었다(도 5B).

[0076] 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.

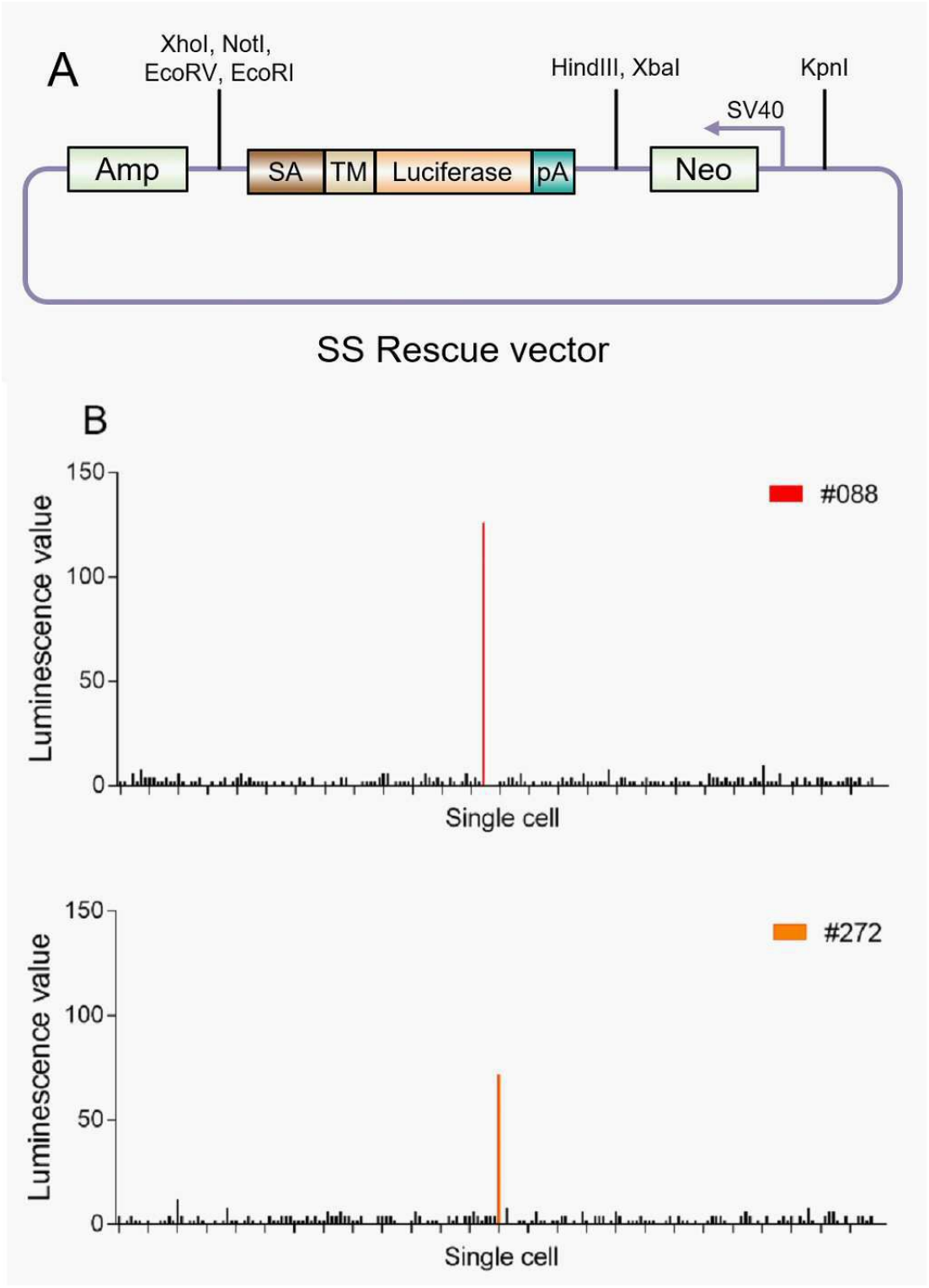
[0077] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

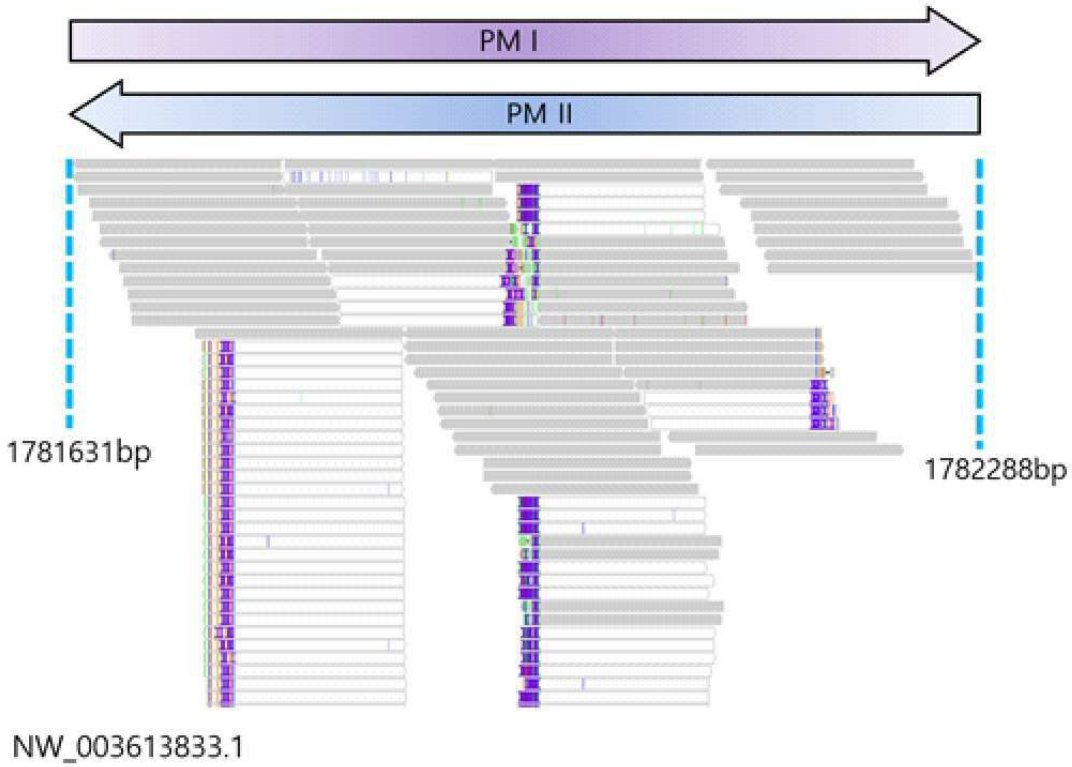
도면1


SA
TM
Luciferase
pA
Vector integration
Membrane or secretory gene
SS
Non-secretory gene
SS
TM
pA
ER
Cytosol
Type I orientation
Luci active
TM
pA
ER
Cytosol
Type II orientation
Luci inactive

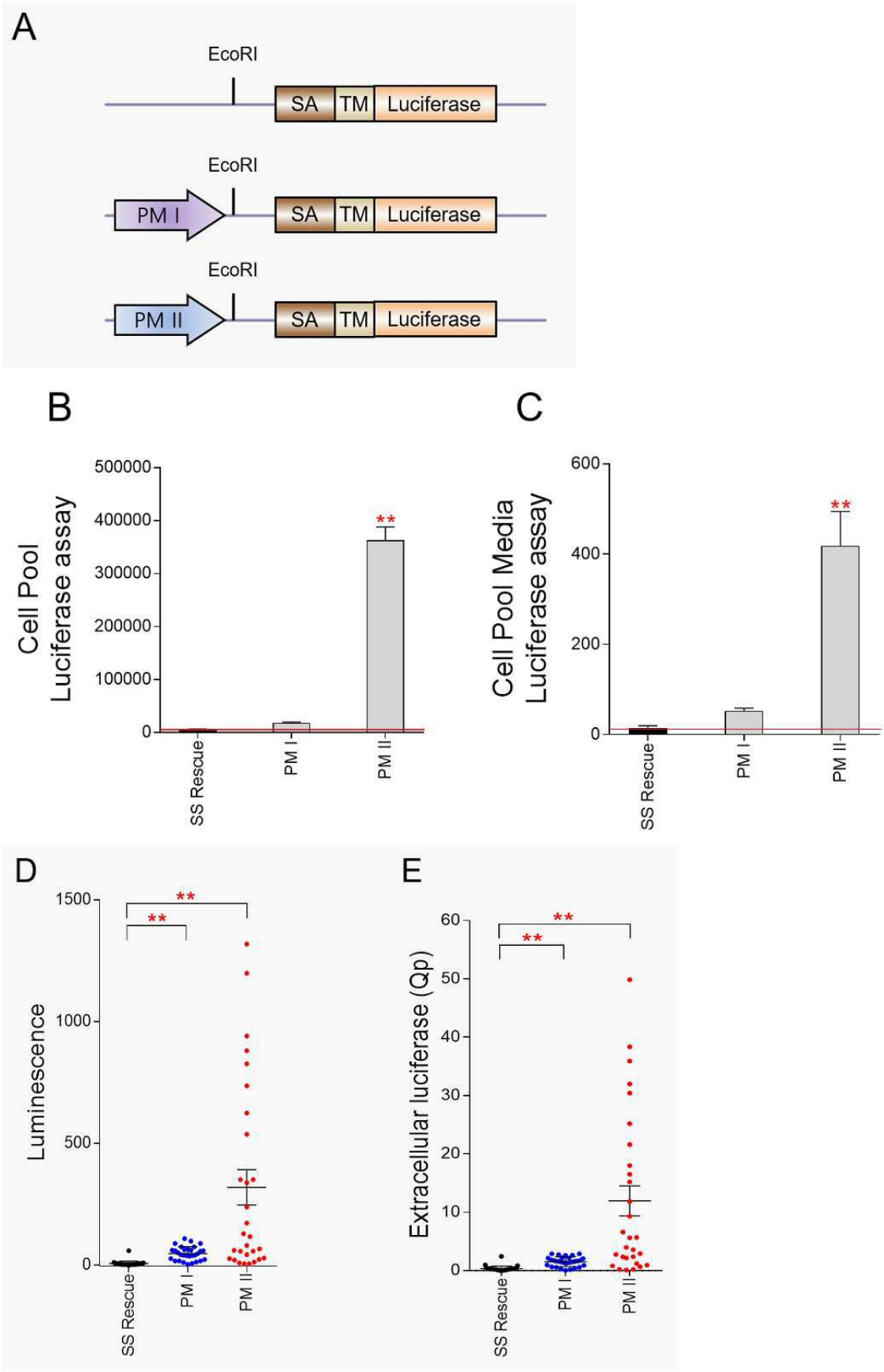
도면2


A
XhoI, NotI,
EcoRV, EcoRI
HindIII, XbaI
KpnI
SV40
Amp
SA
TM
Luciferase
pA
Neo
SS Rescue vector
B
Luminescence value
150
100
50
0
#088
Single cell
Luminescence value
150
100
50
0
#272
Single cell

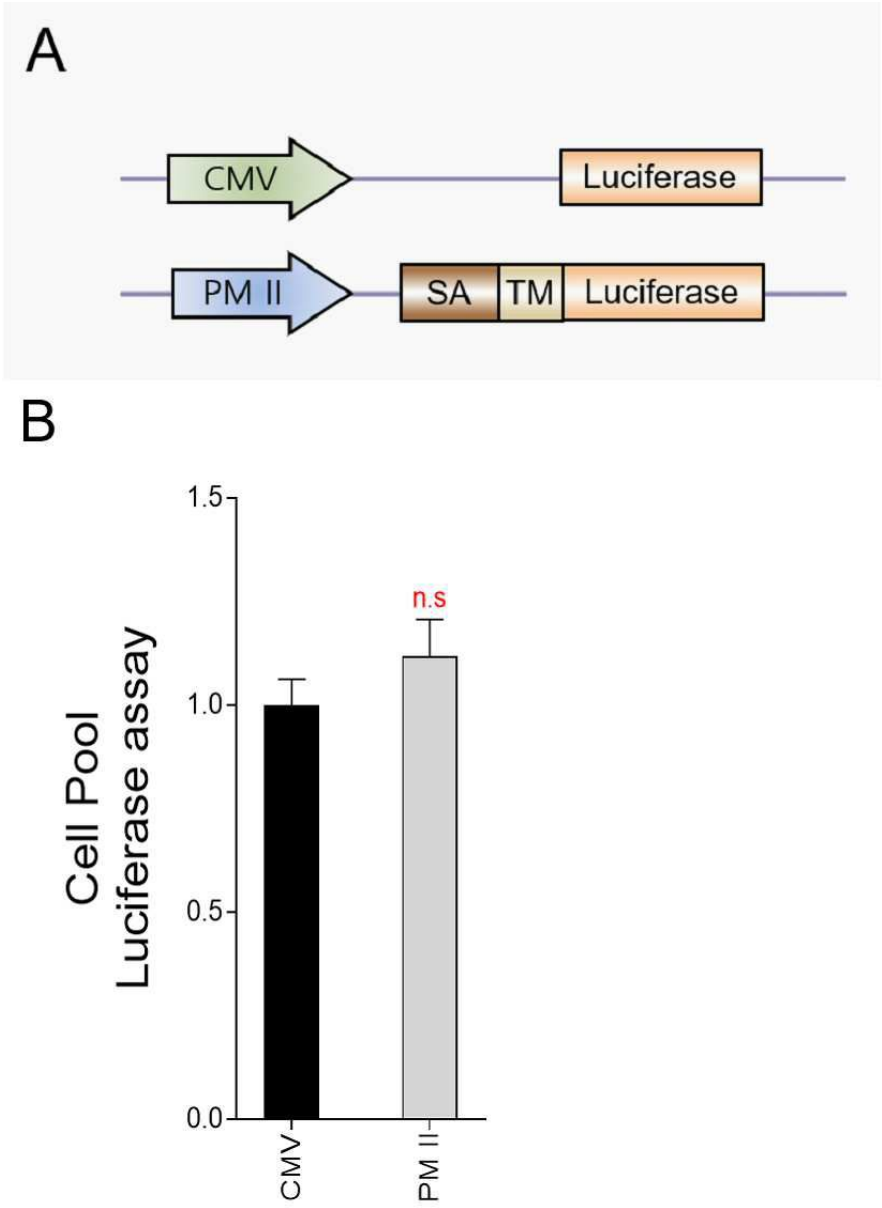
도면3



도면4


A
EcoRI
SA
TM
Luciferase
PM I
PM II
B
Cell Pool
Luciferase assay
500000
400000
300000
200000
100000
0
**
SS Rescue
PM I
PM II
C
Cell Pool Media
Luciferase assay
600
400
200
0
D
Luminescence
1500
1000
500
E
Extracellular luciferase (Qp)
60
50
40
30
20
10

도면5


A
CMV
Luciferase
PM II
SA
TM
Luciferase
B
Cell Pool
Luciferase assay
1.5
1.0
0.5
0.0
n.s
CMV
PM II

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.