



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0120418
(43) 공개일자 2010년11월16일

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0039216

(22) 출원일자 2009년05월06일

심사청구일자 2009년05월06일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호

전수환

인천광역시 부평구 십정2동 동암신동아아파트 10
7동 2207호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 16 항

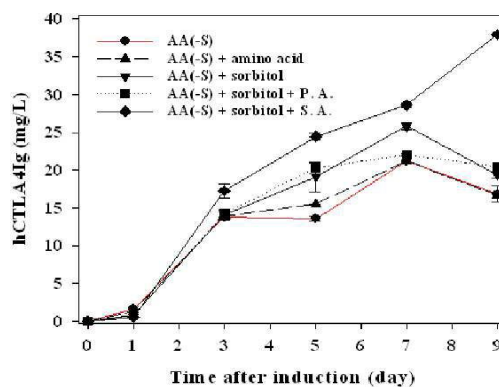
(54) TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 재조합 단백질 대량생산 방법

(57) 요약

본 발명은 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 이를 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포에서 당 고갈에 따른 세포 생존도를 증가시킬 수 있는 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 배지 조성물 및 이를 사용하여 형질전환 식물세포 배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배양배지에 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 첨가함으로써, 당 고갈에 따른 세포사멸의 억제 및 배지 내 당 교환에 의한 삼투압 스트레스를 완화를 통하여 세포의 생존도를 증가시켜 재조합 단백질의 대량 수득이 가능하기 때문에 간편하고 신속하게 목적 단백질을 높은 수율로 회수하여 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도4b



(72) 발명자

최성훈

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

한지연

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

특허청구의 범위

청구항 1

당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체의 재조합 단백질 생산용 배지 조성물에 있어서, 숙신산, 푸마르산 또는 말산으로부터 선택된 TCA 회로 중간생성물 및 소비톨 또는 만니톨로부터 선택된 당알코올을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TCA 회로 중간생성물은 숙신산인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당알코올은 소비톨인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 소비톨은 배양 배지 중에 20~80mM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 TCA 회로 중간생성물은 숙신산이고, 상기 당알코올은 소비톨인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 숙신산 및 소비톨은 전체 배양 배지 중에 10~50mM로 포함되는 것을 특징으로 배지 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 숙신산 및 소비톨은 전체 배양 배지 중에 40mM로 포함되는 것을 특징으로 배지 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지 조성물은 식물세포의 세포 생존력을 증가시키는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 사람 CTLA4Ig인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물세포는 벼 세포인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당 고갈시 작동하는 프로모터는 α -아밀라아제의 RAmy3D 프로모터인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 12

당 고갈시 작동하는 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물체의 재조합 단백질 생산하는 방법에 있어서, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 배지 조성물을 포함하는 배양 배지에서 식물세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 배지 조성물은 식물세포의 세포 생존력을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 재조합 단백질은 사람 CTLA4Ig인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 식물세포는 벼 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 당 고갈시 작동하는 프로모터는 α -아밀라아제의 RAmy3D 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포에서 당 고갈에 따른 세포 생존도를 증가시킬 수 있는 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 배지 조성물 및 이를 사용하여 형질전환 식물세포 배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일상생활에서 필요로 하는 단백질을 대량으로 수득하기 위하여 목적세포를 발현벡터로 형질전환하여 원하는 재조합 단백질을 대량생산하는 시스템이 존재한다. 일반적으로 동물세포와 미생물에의 형질전환을 통한 재조합 단백질 수득 시스템이 구축되어 왔으나, 최근 대량생산에서의 비용 문제 및 FDA 허가 시 동물유래 바이러스나 독소(toxin) 등의 감염 문제가 발생할 수 있다. 식물세포에서 재조합 단백질을 생산하는 것은 식물세포에서 발현할 수 있는 프로모터 및 목적유전자를 포함하는 발현벡터로 식물세포를 형질전환 하는 것으로서, 식물세포배양에 사용할 수 있는 기본배지로는 AA, MS, N6, WHITE 및 SH 배지 등이 있으며, (Ge, X. *et al.*, *Plant cell Rep.*, 25: 392-402, 2006; Terashime *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 4: 31-36, 1999). 식물세포배양은 동물세포배양에 비해 동물유래의 바이러스와 독소 등을 포함하지 않는다는 점, 동물세포배양에 비해 그 정제과정이 간단하고 경제적이란 점(Doran, P. M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204, 2000)에서 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0003] 최근 형질전환 식물세포배양을 이용한 외래단백질 생산에 벼, 담배, 애기 장대 등이 주로 이용되고 있으며, 또한 현재 상기 외래단백질의 생산을 극대화하기 위하여, 고효율 발현벡터의 이용, 대체탄소원 사용, 삼투압 조절제 첨가, 단백질 안정제 사용, 고농도 배양, 배지 교환식 배양 등 다양한 방법들이 연구되고 있다.

[0004] hCTLA4Ig(Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)는 인간 CTLA-4 수용체(human CTLA-4 receptor)의 세포외 도메인(extracellular domain) 부분과 hIgG(human immunoglobulinG)의 Fc 부분이 합쳐진 융합단백질이다(Abrams JR. *et al.*, *J Clin Invest* 103:1243-1252, 1999). hCTLA4Ig의 기능은 CD28/B7의 대사경로(pathway)의 경쟁적인 저해제로 외부 항원(antigen)에 대한 일차적 또는 이차적인 T 세포 의존적인 항체(antibody) 반응을 억제하는 것으로, 이런 hCTLA4Ig의 면역 억제제 효과는 자가 면역질환의 치료제로서의 가능성을 보여준다. Orencia(abatacept), 즉 동물세포로부터 생산된 재조합 hCTAL4Ig은 2005년 12월에 FDA에서 류마티스 관절염 치료제로서 허가받는 등(Bluestone JA. *et al.*, *Immunity* 24:233-238, 2006), 면역질환을 비롯한 다양한 질병치료제로서 hCTAL4Ig의 수요가 증가하고 있으나, 동물세포 배양에서의 동물 바이러스나 독소의 감염, 고비용 저효율 생산 등의 문제점으로 인하여 재조합 hCTAL4Ig의 새로운 대량생산방법의 개발이 필요한 실정이며, 현재 당 고갈에 의해 재조합 hCTAL4Ig등의 외래단백질 생산을 유도하는 식물세포배양 시스템에서도 당 고갈에 따른 세포 사멸 등의 문제점이 존재하여 그 세포 생존력이 약하기 때문에 대량의 재조합 단백질을 고효율로 수득하는 방법의 개발이 필요하다.

[0005] 벼세포의 경우 현탁배양에서 배지내로 분비되는 총 단백질의 20~40%는 알파 아밀라아제 유전자 집단(α -amylase gene family)인 RAmy3D와 RAmy3E이고, 이 두 가지 유전자는 배지내 당 농도에 따라 발현양의 현저한 차이를 나

타낸다. 특히 RAmv3D는 배지내 당이 고갈되었을 때 발현양이 165배 증가되며, 이와 반대로 배지내 수크로즈, 글루코즈, 프락토즈, 갈락토즈 같은 당이 존재할 시 RAmv3D 유전자의 발현이 억제된다고 알려져 있다.(Hellwig, S. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 22: 1415-1422, 2004). 이러한 유도 프로모터(inducible promoter)를 배양에 이용하면 세포생장 시 당을 첨가하여 세포의 농도를 증진시키고, 당 고갈에 의해 생산성을 향상시킬 수 있는 2단계 배양이 가능하기 때문에, (James, E. A. and J. M. Lee, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 72: 127-156, 2001). 최근, 외래 단백질의 대량발현을 위한 형질전환된 식물세포의 대표적인 예로 연구되고 있으며, 벼세포에서 RAmv3D 프로모터를 이용해 재조합 단백질인 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma, hCTLA4Ig 등을 생산하고 있다.

[0006] 종래에는 형질전환된 벼 현탁세포를 이용한 재조합 CTLA4Ig 단백질 생산 시, 배지에서 당이 고갈되는 시점에서 작동되는 α -아밀라아제 프로모터 시스템(α -amylase promotor system)을 사용함에 따라(Terashima M. *et al.*, *Biochem Eng J* 4:31-36, 1999; Trexler MM. *et al.*, *Biotechnol Prog* 21:321-328, 2005). 세포의 생장단계와 단백질 생산단계가 분리되는 2단계 배양을 수행하여 당이 존재하는 세포의 생장단계 이후 당이 제거된 배지로 교환해주어 재조합 단백질을 생산하였다.

[0007] 그러나, 배양액 내의 당 고갈에 의해 단백질의 발현이 시작되는 동시에 세포의 사멸단계도 시작되며, 세포가 사멸시기에 접어들면, 단백질 생산량이 정지하거나 혹은 세포 밖으로 방출되는 단백질 분해효소나 세포 잔해(debris)에 의해 단백질 분해가 일어나기 때문에 그 실질적인 재조합 단백질 생산량은 낮다. 즉, 재조합 단백질 생산을 위한 배지 내의 당 고갈은 에너지원 공급을 차단하여 세포 생존도를 감소시키고, 삼투압의 변화로 인한 세포사멸 현상을 야기한다. 또한 세포가 더지면서 단백질분해제 등이 배지 내로 많이 분비되어 목적단백질을 분해함으로써 결국 재조합 단백질의 생산성이 감소되는 문제를 유발하게 되는 것이다.

[0008] TCA 회로(tricarboxylic acid cycle)는 고리모양으로 연속되는 대사과정으로 동식물체의 미토콘드리아 내에서 일어나는 에너지 생성을 위한 화학적 순환과정이다. TCA 회로의 각 단계는 각각 특정한 효소에 의한 촉매작용을 받으며, 탄소수 2개의 아세틸조효소 A(acetyl coenzyme A/Acetyl Co A)가 탄소수 4개의 화합물인 옥살로아세트산과 반응하여 3개의 카복시기를 탄소수 6개인 시트르산(citrate)을 생성하는 것으로부터 시작된다. 연속되는 효소의 촉매반응에서 여러 가지 중간생성물이 만들어지는데, 즉 시스-아코니티산, 이소시트르산(isocitrate), 옥살숙신산, α -옥소글루타르산과 이산화탄소, 숙신산, 피루브산, 시트르산, 이산화탄소와 아데노신삼인산(adenosine triphosphate/ATP), 푸마르산(fumarate), 말산(malate)등이 이에 해당한다.

[0009] 당알코올이란, 단당류의 카보닐기를 환원하여 만들어지는 하이드록시기가 두 개 이상인 알코올이나, 그와 같은 계열에 속하는 화합물을 통틀어 일컫는 용어로서, 대표적으로 소비톨, 만니톨 등을 들 수 있다.

[0010] 대표적인 당알코올인 소비톨(sorbitol)은 만니톨(mannitol) 등과 함께 자연계 널리 존재하며, 포도당과 같은 육탄당을 환원하여 얻는 당알코올이다. 소비톨의 화학적 특징으로는 분자식 $C_6H_{14}O_6$, 분자량 182.17 g/mol, 밀도 0.68 g/cm³, 녹는점 0.68 g/cm³ 이며, 산업적 용도로는 화장용 로션, 크림, 치약, 식품 첨가제, 비타민 C의 합성 원료, 당뇨병 환자의 감미료 등으로 널리 쓰인다. 식물조직배양에서 있어서의 소비톨은 일본배의 신초생장(shoot proliferation)을 증가시키고, 과수화(hyperdricity)를 감소시킨다고 보고되었으며, 벼에서는 캘러스 생장(callus growth)과 프롤린 축적(proline accumulation)을 야기한다고 알려져 있다. 소비톨은 실새삼(dodder) 캘러스의 식물체 재분화(plant regeneration)에도 영향을 미친다고 알려져 있다. 현재까지 당 고갈 프로모터를 가지는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배양방법의 단점으로 여겨지는 당 고갈에 따른 세포 사멸로 인하여 재조합 단백질의 수득률이 감소하는 것을 개선하는 기술 개발의 필요성이 증대하고, 한국공개특허 10-2003-0072764 호에서는 만니톨 및 NaCl을 포함하는 배지를 활용하여 재조합 hGM-CSF를 생산하는 방법을 개시하고, 한국공개특허 10-2008-0027729 호에서는 복합 아미노산을 첨가하여 배지 교환 없이 재조합 단백질을 수득하는 방법을 개시하고 있는 등 활발한 연구가 진행되고 있으나, 세포 생존도를 증가시키므로써 목적단백질의 생산량을 현저하게 증가시킬 수 있는 저비용 고효율 식물세포 배양 배지 및 배양 방법의 개발은 현재까지 이루어지고 있지 않은 실정이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 당 고갈에 따른 식물세포의 사멸의 억제 등을 통한 식물세포에서의 재조합 단백질의 대량생산 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 세포 배양 시 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 사용할 경우, 세포 생존도를 증가시켜 높은 수율의 재조합 단백질을 수득할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 식물세포 배양 배지를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 식물세포 배양 배지를 사용하여 식물세포에서 높은 수율의 재조합 단백질의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포 배양 배지를 제공한다.
- [0015] 본 발명에 따른, 특정 TCA 회로 중간생성물은 바람직하게는 숙신산, 푸마르산 또는 말산으로부터 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 숙신산 또는 말산이며, 가장 바람직하게는 숙신산이다. 본 발명에 따른 당알코올은 바람직하게는 소비톨 또는 만니톨로부터 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 소비톨이며, 배양 배지 중에 바람직하게는 20 ~ 200 mM 의 농도로, 가장 바람직하게는 40mM의 농도로 포함될 수 있다.
- [0016] 상기 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올은 배양 배지에 각각 0.01~ 500 mM로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 10~ 100 mM 로 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명자는 당이 포함된 배지에서 10일 동안 배양된 세포를 회수하여, 당이 없는 배지인 생산 배지에 세포를 접종하고, TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 접종 초기, 또는 배양 중(fed-batch)에 각각 또는 병행 첨가하여 생산성이 향상됨을 확인하였다. 본 발명에 따른 배양 배지는 당 고갈에 따른 세포 사멸을 방지하여 세포생존력을 증가시킬 수 있고, 결과적으로 재조합 단백질을 생산을 증가시킬 수 있다. (도 2 내지 도 4)
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서 숙신산, 푸마르산 및 말산을 첨가한 경우, 세포 생존도 및 재조합 단백질 생산량이 대조군(미첨가군)에 비하여 유의미하게 증가하였으며, 특히, 숙신산 의 경우가 가장 높은 세포 생존도 및 재조합 단백질 생산량을 나타내고 있음을 확인하였다
- [0019] 본 발명에서, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 재조합 단백질을 발현벡터로 형질전환된 식물세포는 벼, 담배 또는 애기 장대이며, 보다 바람직하게는 벼세포이고, 당 고갈시 작동하는 프로모터는 α -아밀라아제의 RAm3D 또는 RAm3E 프로모터이며, 보다 바람직하게는 RAm3D프로모터이고, 목적 재조합 단백질은 G-CSF, GM-CSF, SA, AAT, INF-gamma 또는 hCTLA4Ig이며, 보다 바람직하게는 사람 CTLA4Ig이다.
- [0020] 본 발명의 배양 배지는 MS, SH, AA, N6, B5, White 배지 등을 기본배지로 사용할 수 있으며, 당업자에게 자명한 형질전환 식물세포의 생장 및 재조합 단백질의 생산을 증가시키는데 직·간접적으로 영향을 주는 물질들을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서는, 사람 CTLA4Ig 를 발현할 수 있는 RAm3D 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 벼세포의 현탁배양 시 재조합 단백질의 수득률을 최대화 할 수 있는 최적 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 선별하였으며, 실험군으로서 피루브산, 시트르산, 숙신산, 푸마르산 또는 말산을 첨가하였다. (도 2), 실험 결과, 세포 건조 중량, 세포 생존도 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량에서 숙신산>말산>푸마르산 순으로 나타남에 따라 숙신산이 TCA 회로 중간생성물 중 가장 우수한 배지 첨가물임을 알 수 있으며, 숙신산을 포함하는 배지의 경우 세포 생존도가 대조군에 비하여 2.8배 증가하였으며, 이는 TCA 회로 중간생성물인 피루브산에 비하여도 2.7배가 증가한 수치이다. 또한 도 2a 의 세포 생존도 및 도 2b의 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프가 유사한 증감패턴을 보임에 따라 식물세포의 세포 생존도 및 재조합 단백질 생산량이 비례적으로 증감함을 확인할 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명의 다른 실시예에서는 당알코올인 소비톨의 농도별 처리에 따른 삼투압과 세포생존력 그래프 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량을 실험하였고(도 3), 소비톨의 처리 시 세포생존도 및 단백질 생산량이 증가함을 확인할 수 있었으며, 소비톨이 20~80mM에서 높은 세포 생존도를 나타내며, 최적의 소비톨 농도는 40mM 임을 알아내었다.
- [0023] 본 발명의 실시예에서 식물세포에서의 재조합 단백질 대량생산을 위한 최적의 배지구성분들의 조합을 통하여 식물세포의 세포 생존도 및 단백질 생산량을 확인한 결과, 기본 AA 배지에, 소비톨 및 숙신산을 40_{mM} 첨가한 경우, 세포 생존도 및 단백질 생산량이 가장 높음을 확인함으로써(도 5), 본 발명의 특정 TCA 회로 중간생성물

및 당알코올, 바람직하게는 숙신산 및 소비톨을 포함하는 배양 배지의 경우 당 고갈에 따른 세포 사멸을 억제하고, 배지 내 당 교환에 의한 삼투압 스트레스를 완화를 통하여 세포의 생존도를 증가시켜 재조합 단백질의 대량 수득이 가능할 수 있음을 알아내었다.

[0024] 본 발명은 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포에서 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 배지 조성물을 사용하여 형질전환 식물세포 배양시 재조합 단백질을 대량생산할 수 있는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명자는 당이 포함된 배지에서 10일 동안 배양된 세포를 회수하여, 당이 없는 배지인 생산 배지에 세포를 접종하고, TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 접종 초기, 또는 배양 중(fed-batch)에 각각 또는 병행 첨가하여 생산성이 향상됨을 확인하였다. 본 발명의 배양 배지를 사용하여 식물세포를 배양 할 경우, 세포생존력이 증가하여 현저하게 향상된 수율의 재조합 단백질을 수득할 수 있음은 상기에서 살펴본 바와 같으며, 숙신산 및 소비톨을 포함하는 배양 배지를 사용하여 식물세포를 배양할 경우 재조합 단백질을 대조군에 비하여 2,4배 이상 성공적으로 수득할 수 있게 됨을 확인하였다.(도 2 내지 도 4)

[0026] 본 발명의 배지 성분 외에도 형질전환 식물세포의 성장을 증진시킬 수 있는 배지 구성 및 배양방법이 본 발명의 범주에 포함됨은 당업자에게 자명한 사실이며, 일례로 고농도 세포 배양 및 재조합 단백질의 고효율 수득이 가능하도록, 배지 내 완충용액, 복합질소원, 계면활성제등을 첨가할 수 있고, 본 발명의 기술분야에 종사하는 자들에게 널리 공지된 세포 배양 성분들이 적절하게 사용될 수 있으며, 공지성분의 첨가는 본 발명의 기술적 사상의 범주에 포함된다.

효 과

[0027] 본 발명에 따르면, 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배양배지에 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 첨가함으로써, 당-고갈에 따른 세포사멸의 억제 및 배지 내 당 교환에 의한 삼투압 스트레스를 완화를 통하여 세포의 생존도를 증가시켜 재조합 단백질의 대량 수득이 가능하기 때문에 간편하고 신속하게 목적 단백질을 높은 수율로 회수하여 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 기존 재조합 단백질 생산에 비해 저렴한 생산 비용, 간소화된 대량생산공정 개발, 세포 배양 시의 오염방지를 통하여 형질전환 식물세포배양에서 재조합 단백질의 대량생산 시, 저비용, 고효율로 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 특정 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올을 포함하는 식물세포 배양 배지 및 이를 이용한 재조합 단백질 대량생산 방법을 제공한다.

[0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0030] <실시예 1> 형질전환 식물체 제작 및 배양 실험방법

[0031] 1-1. 세포 배양 및 배지

[0032] 본 실시예에 사용된 세포주는 도 5의 발현벡터(전북대학교, 보령제약, 대한민국)로 형질전환된 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산하는 형질전환 벼(Oryza sativa L. Dongjin) 세포주이다. 여기에는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAmY3D 유도 프로모터를 particle-bombardment 방법(Lee, S. J. *et al.*, *Protein Expres. Purif.* 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질전환하였고, 상기 프로모터는 수크로스가 고갈된 상태에서 작동된다. 생장배지로는 amino acid(AA) 기본배지(Terashima 등, 1999)를 사용하였으며, 탄소원으로는 30 g/L sucrose를 사용하였고, 생장조절제로는 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellin(GA3)을 사용하였다. pH를 5.8로 맞춘 뒤, 500 mL의 Erlenmeyer flask에 분주한 다음, 121℃ 1기압에서 가압증기 멸균하였으며, 아미노산 혼합용액(1.0 mM glycine, 6.0 mM glutamine, 2.0 mM aspartic acid, 1.3 mM arginine)을 농축한 다음 0.1 mg/L gibberellin (GA), 50 mg/L hygromycin을 첨가하여 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균하였다. Shaking 배양기에서 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 7일 간격으로 계대 배양을 수행하였다. 멸균된 100 mL Erlenmeyer flask에 0.22 μ m membrane filter로 여과된 배지혼합용액

을 30 mL씩 분주하여 실험을 수행하였으며, 생장시와 같은 조성의 배지를 이용하였다. 목적단백질을 생산하기 위해서 유도(induction) 배지로는 생장배지에서 sucrose만을 제거한 배지를 사용하였으며, 28℃, 120 rpm, 암 조건에서 2일 간격으로 시료를 취하였다.

1-2. 세포중량 측정

세포의 생장을 측정하기 위해서 세포생체량(FCW, fresh cell weight)과 세포건체량(DCW, dry cell weight)을 각각 측정하였다. 100 mL Erlenmeyer flask 배양한 현탁세포는 Buchner funnel(OMG사, 대한민국)을 이용해 Whatman No. 1 여과지상에서 세포와 배양액을 분리하였다. 배지는 추가적인 분석을 위해 따로 저장한 뒤, 여과지 상의 세포는 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고, 미리 무게를 측정한 weighing dish(OMG사, 대한민국)에 세포를 담고 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 2일 동안 60℃의 drying oven에서 건조시킨 뒤 세포건체량을 측정하였다.

1-3. 세포 생존도 측정

세포생체량(FCW) 0.1 g에 1.5% TTC(triphenyl tetrazolium chloride, pH 9) 용액 1.6 mL을 첨가한 뒤, 20° C에서 24시간 동안 반응시켰다. 15° C, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음, 상등액은 버리고 95% 에탄올을 1 mL 첨가하였다. 완전히 vortexing 한 뒤, 60° C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 세포 내에 생성된 red formazan을 추출하였다. 4° C, 15,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액 0.6 mL을 취하고, spectrophotometer를 이용하여 485 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Blank로는 95% 에탄올을 이용하였다.

1-4. 단백질 분해(protease activity) 활성 측정

hCTLA4Ig가 배지내로 분비될 때, protease도 같이 분비되기 때문에 수정된 Anson's method을 이용하여 protease 활성을 측정하였다. 0.5 mL 1% Na-caseinate(67 mM phosphate buffer, pH 7.0) 용액에 배지 sample 0.5 mL을 첨가하고 50℃에서 20분간 반응시켰다. 그 다음 30% TCA(stop solution) 용액 0.3 mL을 첨가한 뒤 50℃에서 30분간 반응시켜, protease가 casein에 존재하는 아미노산을 분해하는 것을 정지시켰다. 14,500 rpm에서 10분간 원심분리를 하고, 상등액 0.8 mL을 취한 뒤, 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve는 tyrosine 용액농도를 0.05 ~ 0.4 mg/mL로 하여 얻었으며, blank는 3차 증류수로 하였다.

1-5. 삼투압 측정

삼투압 측정을 위해서는 Osmette Model 5002(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하였으며, 측정 원리는 빙점 강하를 이용하는 것으로 시료의 어는점보다 1~2℃ 낮은 온도로 supercooling시킨 후 vibration으로 ice crystal을 생성하여 ice와 liquid간의 평형상태를 만들어 빙점을 측정하는 방법이다. 삼투압 측정을 위해 각 시료를 2 mL씩 취한 후, 분석용 test tube를 사용하여 각각의 삼투압을 측정하였다. 시료 측정 전, 100 mOsmkg⁻¹ H₂O과 500 mOsmkg⁻¹ H₂O의 표준시료를 이용해 측정기를 보정하였다. 단위는 mOsmkg⁻¹ H₂O를 사용하였다.

1-6. hCTLA4Ig 정량

배지로 분비된 hCTLA4Ig의 양은 ELISA 분석법을 이용하여 정량하였다. Capture 항체로 Goat anti-human IgG (KPL, USA)를 사용하였으며, capture 항체와 coating 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)를 1 : 1000으로 희석하여 well당 100 mL씩 분주하여 4℃ overnight한 후, blocking 버퍼 (8 g/L NaCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 1.15 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KCl, 2% FBS, pH 7.4)를 well당 200 mL씩 분주하여 1~2시간 상온에서 incubation 시켰다. Standard는 human IgG (Pierce, USA)를 사용하여 assay diluent를 well당 100 mL씩 분주하고 시료 및 standard 200 mL씩 넣고 1/2씩 희석하여 상온에서 2시간 incubation 시켰다. Detection 항체인 peroxidase labeled goat anti-human IgG (KPL, USA)와 assay diluent를 1 : 5000으로 혼합하여 well당 100 mL씩 분주하고 상온에서 1시간 incubation한 후, ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 well당 100 mL씩 분주하여 상온에서 20분 동안

incubation 시켰다. 그 후, stop 버퍼를 well당 100 mL씩 분주하여 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

[0043] <실시예 2> 세포 배양 시 TCA 회로 중간생성물의 영향

[0044] 상기 실시예 1-1의 생장배지에서 9일 동안 배양한 형질전환 세포를 여과한 후, TCA 회로 중간생성물이 첨가된 AA 배지에 재조합단백질 생산을 유도하였다. TCA 회로 중간생성물의 첨가는 기존 AA배지(대조군)에, 피루브산(SIGMA사), 시트르산(SIGMA사), 숙신산(SIGMA사), 푸마르산(SIGMA사) 및 말산(SIGMA사)을 각각 40 mM 첨가하여 0.22 μ m membrane filter로 여과 멸균하였다. 이후, TCA 회로 중간생성물 첨가 배양시의 건조된 세포중량을 기존의 AA 기본배지와 비교하였다.

[0045] 도 1a 에 나타난 바와 같이, RAmY3D 프로모터는 배지내 당 존재 시 발현이 억제되므로, AA배지에 당을 제거하여 hCTLA4Ig의 발현을 유도하였으며, 당이 제거된 유도시기(induction period)동안 세포 중량(cell mass)과 세포 생존도(cell viability)는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 세포 중량의 경우, 0일째의 세포건조중량(DCW, dry cell weight)이 7.4 g/L, 10일째의 세포건조중량이 3.3 g/L였다. 세포 생존도는 초기접종시의 세포 생존도를 100%하여 4일째 23%로 급격히 감소하는 결과를 보였다. 이는 발현을 유도하기위해 배지내 당을 제거하였기 때문에, 세포에 에너지공급을 할 수 없어 세포사멸이 일어났음을 알 수 있다.

[0046] 그러나, 도 2a에 나타난 바와 같이, TCA 회로 중간생성물을 첨가한 경우, 세포중량에 있어서, 숙신산, 말산은 대조군에 비해 각각 37%, 23% 증진된 결과를 확인하였고, 세포 생존도인 경우, 숙신산, 말산은 대조군에 비해 각각 47%, 33% 증진된 결과를 확인하였다.

[0047] 재조합 단백질 생산량의 실험은 종래 AA 배지의 사용으로 재조합 단백질을 생산할 경우에는 RAmY3D 프로모터의 발현이 당 고갈에 의해 작동되기 때문에, AA기본배지에서 당을 제거하여 이를 유도배지, 즉 생산배지로 이용하였다. 유도시기동안, hCTLA4Ig 생산량은 당 제거에 의해 RAmY3D 프로모터가 작동하여, hCTLA4Ig의 발현이 유도되어 점차 생산이 증가되는 경향을 확인하였다(도 1b). hCTLA4Ig 생산은 2일째 7.2 mg/L, 6일째 최대 생산량인 19 mg/L를 확인하였다. 또한, 목적 단백질을 분해할 수 있는 단백질 분해제 활성(protease activity)을 측정한 결과, 10일째까지 98 U/mL로 증가하는 경향을 나타내었다.

[0048] 그러나, 기존 AA배지에 TCA 회로 중간생성물을 첨가한 후 목적단백질의 생산량을 확인한 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, hCTLA4Ig 생산량에 있어서, 숙신산의 첨가가 대조군(미첨가군)에 비해 생산성을 37% 향상시켰다.

[0049] 상기 결과를 표로 정리하면 다음과 같다.

표 1

[0050] TCA 회로 중간생성물의 종류에 따른 세포 생존력 및 재조합 단백질 생산량

구분	세포생존도(g/L)	재조합단백질 생산량(mg/L)
Control	2.2	14
P. A.	2.3	13
C. A.	1.8	4.8
S. A.	6.2	25
F. A.	2.5	17
M. A.	4.1	21

[0051] *P. A.:피루브산, C. A.:시트르산, S. A.:숙신산, F. A.:푸마르산, M. A.:말산임.

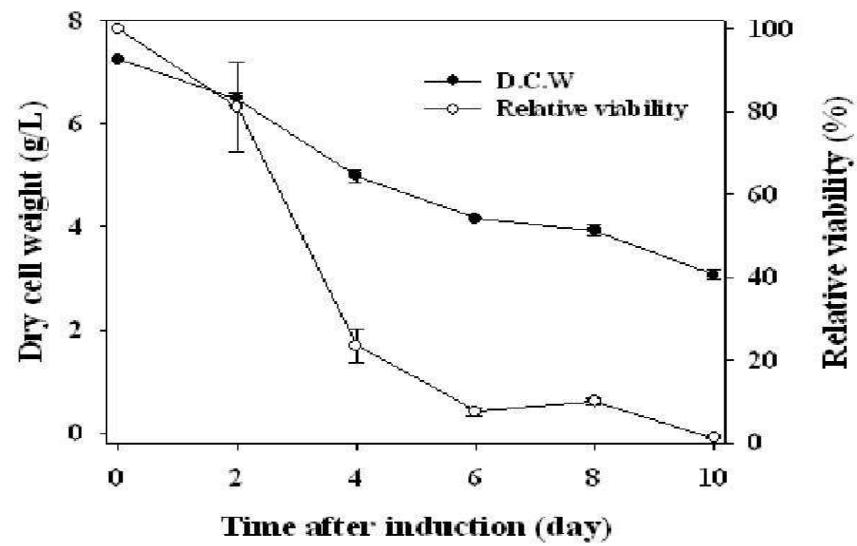
[0052] <실시예 3> 세포 배양 시 당알코올의 영향

[0053] 배지 내 당 제거에 의한 삼투압 스트레스를 최소화하기 위해, sorbitol을 삼투압조절제로 사용하였다. Polyol은 식물이 외부환경스트레스(stress)에 의해 야기될 수 있는 팽창(turgor)에 견딜 수 있게 할 수 있을 뿐만 아니라, 단백질 등의 거대분자(macromolecules)들을 안정화 시킬 수 있다. 당알코올인 sorbitol를 10 ~ 160 mM 농도로 하여, 삼투압, 세포생존도와 hCTLA4Ig 생산량을 측정하였다(도 3).

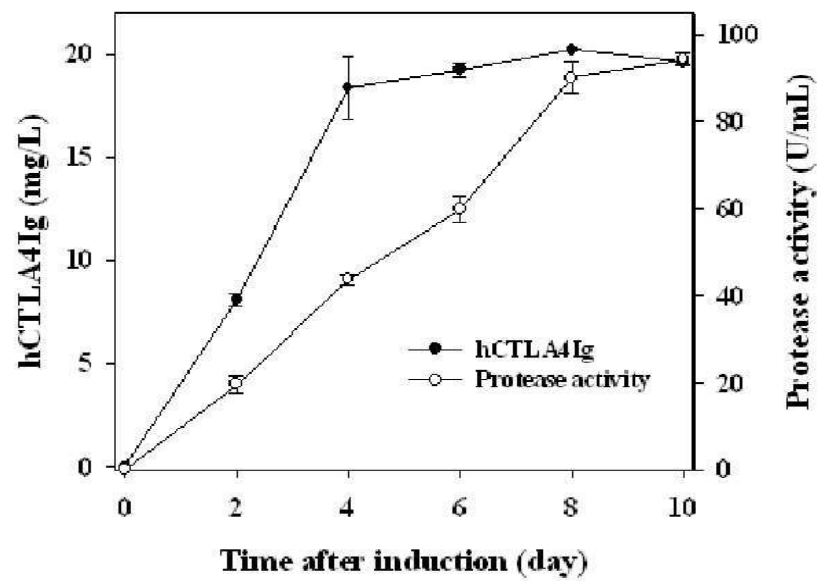
- [0054] 상기 실시예 1-1의생장배지에서 9일 동안 배양한 형질전환 세포를 여과한 후, 소비톨을 10, 20, 40, 80 및 160mM의 농도로 첨가된 AA배지에 재조합단백질 생산을 유도하였다. 소비톨(SIGMA사)은 0.22 μ m membrane filter 로 여과 멸균하였다. 이후, 소비톨 첨가 배양시의 건조된 세포중량 및 삼투압을 기존의 AA 기본배지와 비교하였다.
- [0055] 배지 내 30 g/L sucrose가 존재할 경우, 초기 0일째, 삼투압이 187 mOsm/kgH₂O 였으며, 배양 후반 7일째에는 138 mOsm/kgH₂O 였다. 배지 내, 30 g/L sucrose가 없을 경우, 삼투압이 92 mOsm/kgH₂O 였으며, 여기에 sorbitol 을 농도별로 첨가하였을 경우, 20 mM sorbitol은 121 mOsm/kgH₂O, 40 mM sorbitol은 143 mOsm/kgH₂O, 80 mM sorbitol은 178 mOsm/kgH₂O, 160 mM sorbitol은 252 mOsm/kgH₂O로 점차 증가하는 경향을 확인하였다. 생산을 위한 배지교환 시, 삼투압의 스트레스를 최소화시킬 수 있는 sorbitol의 농도는 40 mM이었다. 당이 제거된 배지에서 세포는 삼투압의 변화로 인해 세포가 터져(rupture), 세포사멸(cell death)이 발생하였다. Sorbitol을 40 mM로 첨가한 경우, 대조군에 비해 세포 생존도를 60% 향상시킴으로써, 삼투압의 스트레스를 줄일 수 있음을 확인하였다.
- [0056] 또한, 기존 AA배지에 소비톨을 농도별로 첨가한 후 목적단백질의 생산을 확인하였다. 유도시기 후 4일째, hCTLA4Ig 생산성은 40 mM의 sorbitol을 사용한 경우 대조군에 비해 45% 증가되었다.(도 3b) 세포 생존도와 hCTLA4Ig 생산에 가장 효과적인 sorbitol의 농도는 40 mM이었다. 따라서, 이후, 40 mM의 sorbitol을 세포생존도와 hCTLA4Ig 생산성을 향상시키기 위해 사용하였다.
- [0057] <실시예 4> 세포 배양 시 TCA 회로 중간생성물 및 당알코올의 영향
- [0058] 상기 실시예 1-2의생장배지에서 9일 동안 배양한 형질전환 세포를 여과한 후, TCA 회로 중간생성물 및 당알코올이 첨가된 AA배지에 재조합단백질 생산을 유도하였다. 기존 AA배지에 실험군으로 40 mM 피루브산, 40 mM 숙신산, 40 mM 소비톨 또는 10배 농축된 아미노산을 조합하여 첨가하여 세포중량 및 생산성을 비교하였다.
- [0059] 세포건조중량 측정결과 도 4a 에 나타난 바와 같이, 7일째, 숙신산과 소비톨을 함께 사용한 경우, 대조군에 비해 세포건조중량이 46% 증가되었다.
- [0060] 또한, 재조합 단백질 생산량의 실험 결과, 유도시기 후 9일째, 숙신산과 소비톨을 사용한 경우, 대조군에 비해 생산량이 2.3배 증가된 결과를 확인하였다. (도 4b)
- 도면의 간단한 설명**
- [0061] 도 1 (a) 및 (b)는 각각 당 고갈시 작동하는 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포의 배양 시간에 따른 세포건조중량과 세포생존력(viability) 그래프 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이며,
- [0062] 도 2 (a) 및 (b)는 각각 특정 TCA 회로 중간생성물의 종류에 따른 세포건조중량과 세포생존력(viability) 그래프 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이며,
- [0063] 도 3 (a) 및 (b)는 각각 소비톨의 농도별 처리에 따른 삼투압과 세포생존력(viability) 그래프 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이며,
- [0064] 도 4 (a) 및 (b)는 아미노산, 소비톨, 피루브산, 숙신산을 포함한 배지에서의 형질전환된 식물세포의 배양 시간에 따른 세포건조중량 그래프 및 사람 CTLA4Ig 단백질 생산량 그래프이고,
- [0065] 도 5는 본 발명에 사용된 재조합 CTLA4Ig 단백질을 생산하도록 벼세포에 형질전환된 발현벡터를 도시한다.

도면

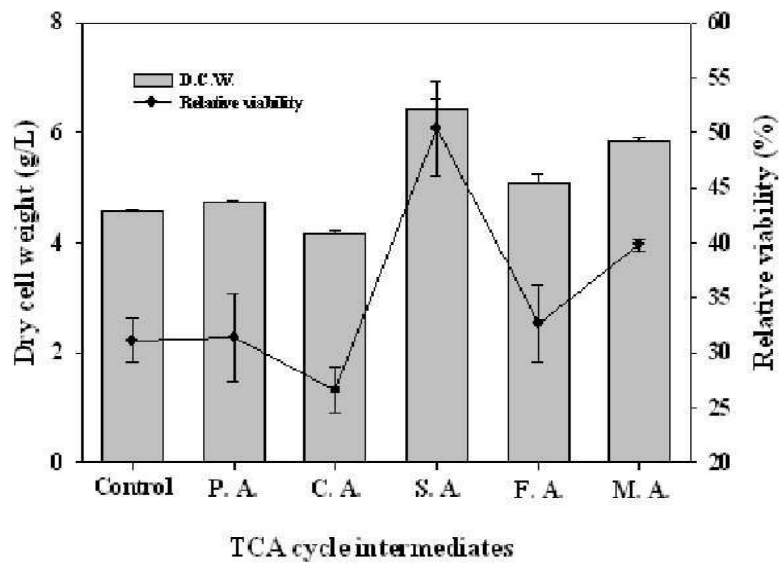
도면1a



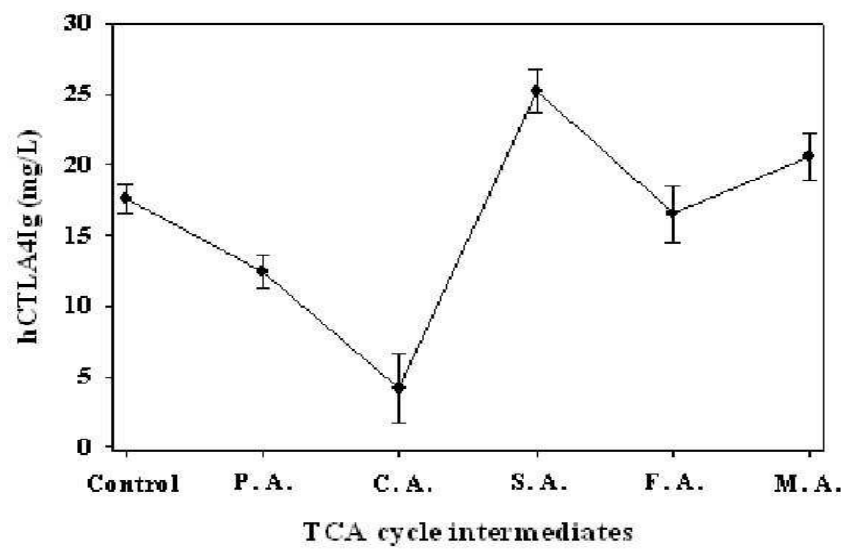
도면1b



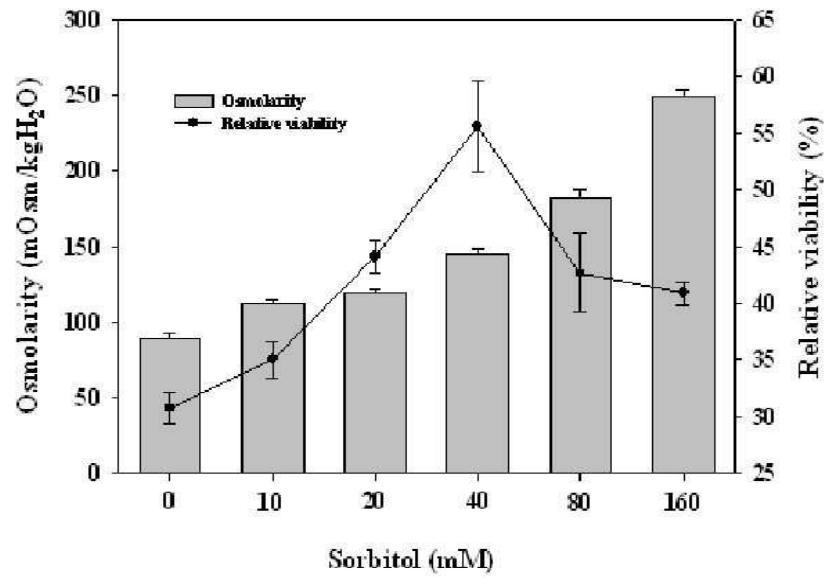
도면2a



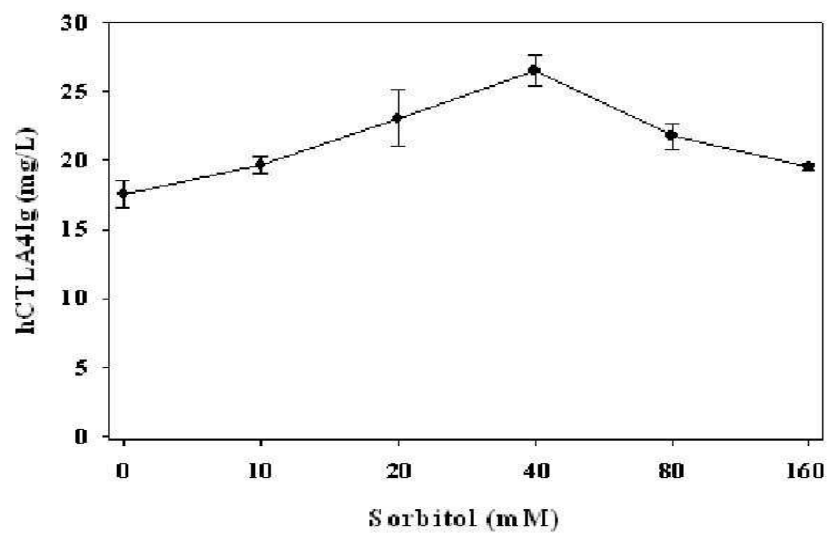
도면2b



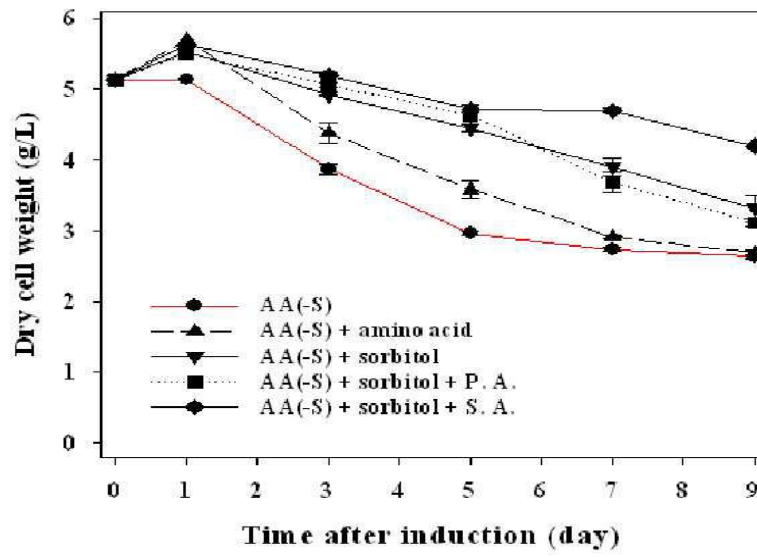
도면3a



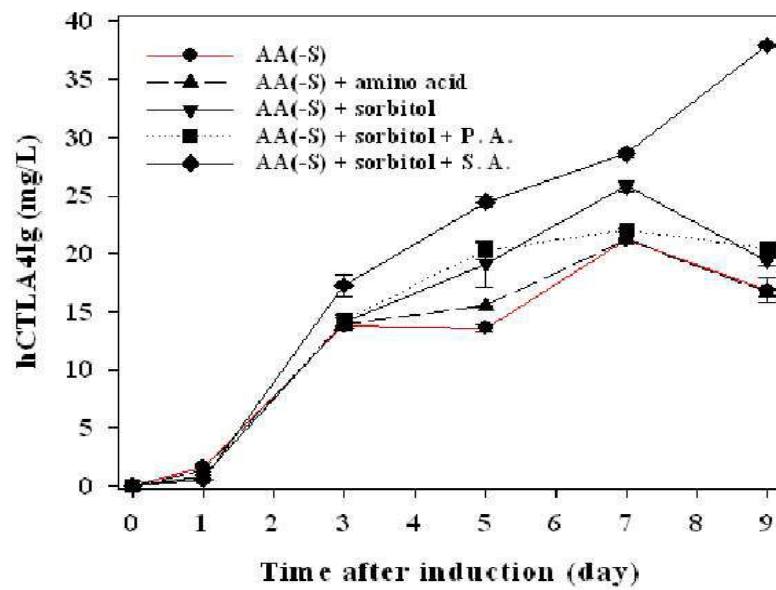
도면3b



도면4a



도면4b



도면5

