

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 12월 20일 (20.12.2012)



(10) 국제공개번호  
WO 2012/173344 A2

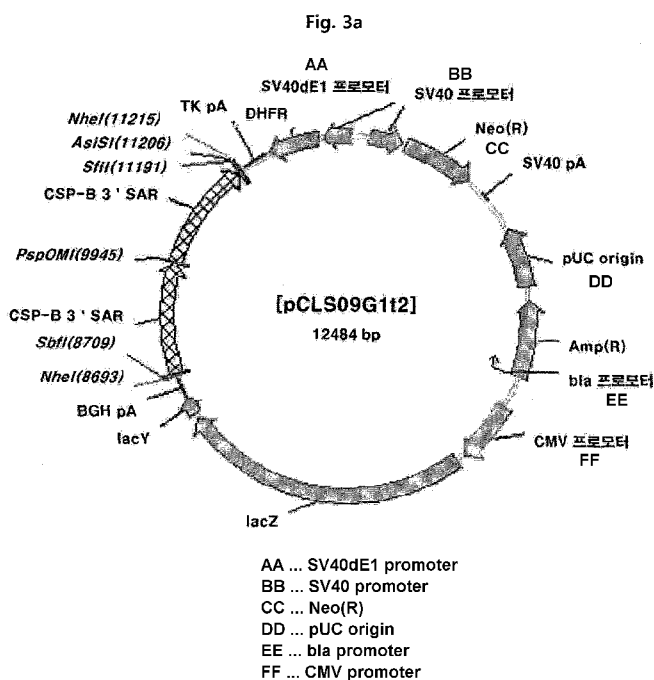
- (51) 국제특허분류:  
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003995
- (22) 국제출원일: 2012년 5월 21일 (21.05.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2011-0056685 2011년 6월 13일 (13.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사종근당 (CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 충정로 3가 368, 120-837 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 고여욱 (KOH, Yeo-Wook) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 464-3, 446-916 Gyeonggi-do (KR). 이상용 (LEE, Sang-Yong) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 464-3, 446-916 Gyeonggi-do (KR). 김수연 (KIM, Su-Yon) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 464-3, 446-916 Gyeonggi-do (KR). 문승기 (MOON, Seung-Kee) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 464-3, 446-916 Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: EXPRESSION VECTOR FOR ANIMAL CELLS INCLUDING CSP-B 5'-SAR FACTOR AND METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS USING SAME

(54) 발명의 명칭 : CSP-B 5'-SAR 인자를 포함하는 동물세포 발현 벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to an expression vector for animal cells, comprising: (a) CSP-B (Cytotoxic Serine Protease-B) 5'-SAR (Scaffold or Matrix Attachment Region); (b) a promoter operable in animal cells; and (c) a polyadenylation sequence, and to a method for producing recombinant proteins using same. The vector of the present invention includes CSP-B 5'-SAR, and thus has the effect of overcoming the inhibition of gene expression according to the position of a foreign gene introduced into an animal cell, and significantly improving the expression rate of a target protein. The vector of the present invention effectively expresses recombinant proteins for drugs or antibodies in animal cells. The vector of the present invention and the method for producing recombinant proteins using same may be very usefully applied to the industrial mass production of drugs.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) CSP-B(Cytotoxic Serine Protease-B)의 5'-SAR(Scaffold or Matrix Attachment Region); (b) 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터; 및 (c) 폴리아데닐화 서열을 포함하는 동물세포용 발현 벡터, 그리고 이를 이용하여 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 벡터는 CSP-B 5'-SAR을 포함하는 벡터로, 동물세포에 도입한 외래 유전자의 위치에 따른 유전자 발현 억제 현상을 극복하는 효과를 가지며, 목적 단백질의 발현율을 크게 향상시킨다. 본 발명의 벡터는 의약품용 재조합 단백질 또는 항체를 동물세포에서 효과적으로 발현시킨다. 본 발명의 벡터 및 이를 이

용한 재조합 단백질의 제조방법은 의약품의 산업적 대량 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.



**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

CSP-B 5'-SAR 인자를 포함하는 동물세포 발현 벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법

5

## 【기술 분야】

본 발명은 CSP-B(Cytotoxic Serine Protease-B, 세포독성 세린 프로테아제-B) 5'-SAR(Scaffold Attachment Region) 인자를 포함하는 동물세포 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 재조합 단백질을 제조하는

10

## 【배경 기술】

CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포와 같은 동물세포에 재조합 단백질을 암호화하는 외래 유전자를 도입하면 임상적 치료를 위한 단백질

15

적혈구증식인자인 NESP(Novel Erythropoiesis Stimulating Protein)는 다베포에틴 알파(Darbepoetin alfa)라고도 불리우며, 천연형 에리스로포이에틴(erythropoietin)에 2 개의 N-연결 당쇄 부위가 생성되도록 유전자 조작이 된 단백질 의약품이다(Egrie and Browne, *Br. J. Cancer*, 84 Suppl. 1:3-10(2001)). NESP 는 조혈모세포를 자극하고 적혈구계로의 분화를 촉진하여 적혈구의 생성을 증가시킨다. NESP '의 혈청 반감기는 기존의 재조합 에리스로포이에틴보다 3 배나 길기 때문에 만성신부전 환자의 빈혈치료에서 적은 투여 빈도로 동등한 치료효과를 기대할 수 있다.

20

항악성종양제인 트라스투주맙(Trastuzumab)은 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조된 인간화 단일클론항체(humanized monoclonal antibody)로서, 세포 표면에 있는 인간 표피증식인자 수용체 2(Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2)에 선택적으로 작용한다. 원발성 유방암의 25-30%에서 HER2 의 과발현이 확인되고 있으며, 트라스투주맙은 HER2 가 과발현된 인간의 종양세포 증식을 억제한다.

25

외래 유전자는 동물세포 염색체의 어느 위치에 삽입되는가에 따라서 그 발현율이 달라질 수 있는데, 주변의 조절 인자들 혹은

30

크로마틴(chromatin)의 구조에 의해서 외래 유전자의 발현이 영향을 받기 때문이다(Zahn-Zabal et al., *J. Biotechnol*, 87, 29-42 (2001)).

주위의 크로마틴이 외래 유전자의 발현에 영향을 주지 않도록 하는 크로마틴 인자를 사용하면 이러한 위치에 따른 유전자 발현 억제  
5 현상(position effect)을 극복할 수 있고, 재조합 단백질을 고발현하는 동물세포 클론을 분리할 수 있는 기회를 높여서 의약품 생산 세포주를 제조하는 시간을 단축할 수 있다. 위치에 따른 유전자 발현 억제 현상을 극복할 수 있는 크로마틴 인자를 사용하여 안정적 세포주(stable cell line)를 만들려는 시도가 이루어지고 있으며, 그러한 인자에는 BE(Boundary  
10 Element), SAR/MAR(Scaffold or Matrix Attachment Region) 및 LCR(Locus Control Region) 등이 있다.

SAR 는 MAR 라고도 불리우는 300-3000 bp 길이의 DNA 이고, 염색체 상의 크로마틴이 세포핵 매트릭스(nuclear matrix)의 단백질과 결합하게 하고 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있으며(Makrides (Ed.), *Gene  
15 Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier. Chapter 10* (2003)), 형질전환 세포주에서 외래 유전자의 발현을 향상시킬 수 있다(Poljak et al., *Nucleic Acids Res*, 22, 4386-4394 (1994); Kalos and Fournier, *Mol. Cell. Biol*, 15, 198-207 (2005)).

Zahn-Zabal 등은 닭 라이소자임(chicken lysozyme) 5'-MAR 를 루시페라제(luciferase) 발현 벡터에 도입하고 이 벡터로 CHO 세포를  
20 형질전환하여 안정적 세포(stable cell)를 만들었다(Zahn-Zabal et al., *J. Biotechnol*, 87, 29-42 (2001)). MAR 를 포함하지 않은 벡터로 형질전환한 안정적 세포와 비교했을 때, 라이소자임 5'-MAR 를 포함한 벡터로 형질전환한 안정적 세포는 더 높은 루시페라제 발현율을 나타내었다.  
25 또한, 라이소자임 5' MAR 를 1 카피 포함한 벡터의 경우보다 MAR 를 2 카피 포함한 벡터의 경우 더 높은 루시페라제 발현율을 나타내었다. 이러한 결과는 동물세포 발현 벡터에 MAR 를 도입하여 목적 단백질의 발현율을 높일 수 있음을 보여준다.

대한민국 특허 출원번호 제 2000-0043996 호에서는 동물세포 발현  
30 벡터에 인간 베타 글로빈(human  $\beta$ -globin) MAR 를 포함시켜서, 동물세포에 외래 유전자를 도입할 때 발생하는 유전자 발현 억제 현상을 극복하였다.

이 특허에는 인간 베타 글로빈 MAR 이외에, GenBank M83137 에 등록되어  
 있는 인간 인터페론 베타(human interferon- $\beta$ ) MAR 와 GenBank M62716 에  
 등록되어 있는 인간 CSP-B 3'-SAR 가 사용되었고, 이 세 가지 SAR/MAR 가  
 목적 단백질인 베타 갈락토시다제( $\beta$ -galactosidase)의 발현율을  
 5 향상시킴을 기술하였다. 또한, 이 특허에는 베타 글로빈 MAR 가 인터페론  
 베타 MAR 또는 CSP-B 3' SAR 보다 효과가 우수하다는 연구 결과가 공지되어  
 있다.

대한민국 특허 출원번호 제 2001-0079227 호에서는 동물세포 발현  
 벡터에 인간 인터페론 베타 MAR 를 도입하여 외래 유전자의 발현을  
 10 증가시키고 효율적으로 재조합 단백질을 발현시켰다. 또한, 대한민국  
 특허 출원번호 제 2007-0108451 호에서는 동물세포 발현 벡터에 인간 베타  
 글로빈 MAR 를 2 카피 포함시켜서 베타 글로빈 MAR 가 1 카피일 경우보다 더  
 우수하게 목적 단백질의 발현율을 향상시킴을 기술하였다. 이 특허에는  
 MAR 인자 1 카피와 2 카피의 비교 연구 결과가 기술되어 있고, MAR 인자 2  
 15 카피와 3 카피의 비교 연구 내용이 기재되어 있지 않다.

Hanson 과 Ley 는 약 70 kb 의 인간 염색체 14q11.2 조혈 세린  
 프로테아제 유전자 군(hematopoietic serine protease gene cluster)에서  
 CSP-B 5'-SAR 와 3'-SAR 를 찾아내어 염기서열을 밝히고, 이들 SAR 가 세포의  
 핵에서 유래하는 스캐폴드(scaffold)와 결합하는 것을 생체의 실험(*in*  
 20 *vitro*)에서 확인하였다(Hanson and Ley, *Blood*, 79, 610-618 (1992)).

CSP-B 5'-SAR 와 3'-SAR 의 염기서열은 각각 GenBank M62717 과  
 M62716 에 등록되어 있고, 그 길이는 각각 2429 bp 와 1233 bp 로써 CSP-B  
 5'-SAR 가 3'-SAR 에 비하여 2 배 정도 더 길다. GenBank AL136018 에는  
 인간 염색체 14 지놈(genome)의 염기서열이 등록되어 있으며, 이 서열  
 25 상에서 CSP-B 단백질을 암호화하는 유전자의 번역 개시 코돈(codon)과 그  
 상위(upstream)에 있는 5'-SAR 사이의 길이는 1195 bp 이고, CSP-B 단백질을  
 암호화하는 유전자의 번역 종결 코돈과 그 하위(downstream)에 있는 3'-SAR  
 사이의 길이는 4543 bp 이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그  
 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서

본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 【발명의 내용】

#### 5 【해결하려는 과제】

본 발명자들은 동물세포에서 재조합 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 벡터를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, CSP-B(Cytotoxic Serine Protease-B)의 5'-SAR(Scaffold or Matrix Attachment Region)를 벡터에 포함시켜(incorporated) 사용하는 경우에 매우 우수한 생산효율로 재조합  
10 단백질을 생산할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명은 동물세포용 발현 벡터를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환된 동물세포를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 재조합 단백질의 제조방법을 제공하는 데  
15 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

#### 20 【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 동물세포용 발현 벡터를 제공한다:

- (a) CSP-B(Cytotoxic Serine Protease-B)의 5'-SAR(Scaffold or Matrix Attachment Region);
- 25 (b) 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터; 및
- (c) 폴리아데닐화 서열.

본 발명자들은 동물세포에서 재조합 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 벡터를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, CSP-B(Cytotoxic Serine  
30 Protease-B)의 5'-SAR(Scaffold or Matrix Attachment Region)를 벡터에 포함시켜(incorporated) 사용하는 경우에 매우 우수한 생산효율로 재조합

단백질을 생산할 수 있음을 규명하였다.

본 발명의 동물세포용 발현 벡터는 CSP-B의 5'-SAR, 동물세포에서 작동하는 프로모터; 및 폴리아데닐화 서열을 포함한다.

본 발명의 가장 큰 특징은 CSP-B의 5'-SAR이 포함된 벡터를 이용하는 것이다. 본 발명에서 이용되는 CSP-B 5'-SAR는 바람직하게는 GenBank M62717에 등록되어 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 서열목록 제1서열에 그 예시적인 뉴클레오타이드 서열이 기재되어 있다.

CSP-B의 5'-SAR은 발현 벡터에서 재조합 단백질의 생산 효율을 크게 증가시킨다.

CSP-B의 5'-SAR은 발현시키고자 하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 업스트림 또는 다운스트림에 위치할 수 있으며, 바람직하게는 다운스트림에 위치한다.

하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, CSP-B 5'-SAR는 종래의 CSP-B 3'-SAR 및 베타 글로빈 MAR 인자보다 동물세포에서 목적 단백질의 발현율을 향상시킨다. 예를 들어, CHO 동물세포에서 목적 단백질인 베타 갈락토시다제를 발현시키는 벡터에 CSP-B 5'-SAR, CSP-B 3'-SAR 및 베타 글로빈 MAR 인자를 1 카피씩 도입한 경우, SAR 인자를 도입하지 않은 경우보다 베타 갈락토시다제 활성이 각각 10.0배, 2.2배 및 8.7배 높게 측정되었다(도 7). 즉, CSP-B 5'-SAR 인자는 다른 인자들보다 상대적으로 우수한 목적 단백질의 발현율을 나타낸다.

또한, 목적 단백질을 NESP로 하여 SAR 인자의 효과를 확인하였을 때 유사한 결과가 도출되었다. CSP-B 5'-SAR와 CSP-B 3'-SAR 인자를 벡터에 도입하고 CHO 세포를 형질전환한 경우, SAR 인자를 도입하지 않은 경우보다 NESP의 발현율이 각각 11.2배 및 3.2배 높게 측정되었다(표 3 및 도 9). 벡터에 CSP-B 5'-SAR 인자를 도입하였을 때, 그 형질전환 세포에서 NESP를 발현하는 양성 클론(positive clone)의 형성 빈도가 증가하였고, 무작위로 선택한 클론들의 NESP 발현율 역시 증가하였다(표 4, 표 5, 도 10 및 도 11).

목적 단백질을 항-HER2 항체로 하여 CSP-B 5'-SAR 인자의 효과를 확인하였다. CSP-B 5'-SAR 인자 2 카피를 벡터에 도입하고 CHO 세포를 형질전환한 경우, SAR 인자를 도입하지 않은 경우보다 항-HER2 항체의

발현율이 상대적으로 높게 측정되었다(표 6 및 도 13). 벡터에 SAR 인자를 도입하였을 때, 무작위로 선택한 클론들의 항-HER2 항체 발현율이 높게 나타났다(도 14 및 도 15).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 5'-SAR는 발현 벡터에서 복수  
5 개의 카피로 존재하며, 이 경우 1 카피로 존재하는 경우보다 재조합 단백질의 생산 효율을 증가시킨다. 보다 바람직하게는, 5'-SAR는 발현 벡터에서 2 카피로 존재한다. 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 5'-SAR는 발현 벡터에서 3 카피로 존재하는 경우보다 2 카피로 존재하는 경우에 재조합 단백질의 생산 효율이 보다 우수하다.

10 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, CSP-B 5'-SAR 인자를 벡터에 1, 2 및 3 카피 도입하여 카피 수에 따른 효과를 확인한 결과, 이 SAR 인자를 연속적으로 2 카피 도입했을 때 베타 갈락토시다제 활성이 가장 높게 측정되었다(도 8). 즉, 벡터 내 SAR 인자의 카피 수가 목적 단백질의 발현율에 영향을 주며 2 카피의 SAR가 가장 바람직하다고 볼 수 있다.

15 5'-SAR가 발현 벡터에서 복수 개의 카피로 존재하는 경우, 상기 복수 개의 카피는 연속적 또는 이격되어 위치할 수 있다. 바람직하게는, 상기 복수 개의 카피는 연속적으로 존재하며, 보다 바람직하게는 발현시키고자 하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 다운스트림에 연속적으로 존재한다.

20 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터는 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40(Simian Virus 40) 프로모터, SV40E1 프로모터, HSV(Herpes simplex virus)의 *tk* 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터,  
25 EF1(elongation factor-1 alpha) 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2(interleukin-2) 유전자의 프로모터, 인간 IFN(interferon) 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 또는 인간 GM-CSF(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 유전자의 프로모터이고, 보다 바람직하게는  
30 CMV 프로모터, SV40 프로모터, SV40E1 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터 또는 베타-액틴 프로모터이고, 가장 바람직하게는

CMV 프로모터이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 발현하고자 하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가적으로 포함하며 바람직하게는 호르몬, 사이토카인, 항체, 펩타이드 앵커, 어드넥틴(AdNectin), 어피바디(affibody, 미국 특허 제5,831,012호), 아비머(Avimer, Silverman, J. et al, *Nature Biotechnology* 23(12):1556(2005)) 또는 쿠니쯔 도메인(Kunitz domain, Arnoux B et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58(Pt 7):12524(2002)), 및 Nixon, AE, *Current opinion in drug discovery & development* 9(2):2618(2006))이다. 보다 바람직하게는 본 발명의 벡터를 이용하여 발현하고자 하는 단백질은 EPO(erythropoietin), EPO 유사체 또는 항-HER2(Human epidermal growth factor receptor 2) 항체이다. 가장 바람직하게는 EPO, EPO 유사체로서 NESP(Novel Erythropoiesis Stimulating Protein, A30N, H32T, P87V, W88N, P90T) 또는 항-HER2 항체이다.

상기 EPO 유사체는 인간 EPO의 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상이 변이된 것을 포함한다. EPO 유사체는 아미노산 잔기의 추가(addition), 삭제(deletion) 또는 치환(substitution)을 통해 변이를 생성(mutagenesis)함으로써 제작할 수 있으며, 이를 통해 당쇄화(glycosylation) 위치(site)를 증가시키거나 그 위치를 바꿀 수 있다. EPO 유사체는 인간 EPO 보다 많은 수의 탄수화물 사슬(carbohydrate chain)을 가지며, 적어도 하나 이상의 추가된 당쇄화 위치를 포함한다. 또한, EPO 유사체는 추가된 당쇄화 위치에 의해 자연(natural occurring) 인간 EPO 보다 높은 시알산(sialic acid) 레벨을 나타내지만, 그로 인해 생물학적 활성에 중요한 단백질 2차 또는 3차 구조가 변하지는 않는다. EPO 유사체는 N-당쇄화(N-glycosylation) 또는 O-당쇄화(O-glycosylation)에 대한 추가적인 위치를 1, 2 또는 3군데 가질 수 있다. 예를 들면, 69번째 루신(leucine)이 아스파라긴(asparagine)으로 치환되면 이것이 N-당쇄화의 4번째 위치로서의 역할을 하게 된다.

본 발명의 벡터에서 발현하고자 하는 EPO 유사체의 예는, EPO 서열(예컨대, GenBank M11319의 서열)에서 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 및 138번 위치에서 선택되는 최소 하나의 위치에 추가적인 당쇄화 위치가

도입된 것이다. 가장 바람직하게는, EPO 유사체는 A30N, H32T, P87V, W88N 및 P90T 변이를 포함하는 NESP이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 폴리아데닐화 서열은 소성장 호르몬 터미네이터, HSV(Herpes simplex virus) 유래 TK(Thymidine kinase) 또는 SV40(Simian virus 40) 유래 폴리아데닐화 서열을 포함한다.

본 발명의 벡터에서 바람직한 컨스트럭트는 5'에서 3'의 순서로, 동물세포에서 작동하는 프로모터-발현 단백질 유전자-폴리아데닐화 서열-CSP-B 5'-SAR이며, 보다 바람직한 컨스트럭트는 동물세포에서 작동하는 프로모터-발현 단백질 유전자-폴리아데닐화 서열-CSP-B 5'-SAR-CSP-B 5'-SAR이다.

본 발명의 벡터는 선택마커를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 선택마커의 예는 진핵세포에 작용하는 항생제에 대한 내성 유전자를 포함하고, 바람직하게는 네오마이신, 제네티신(G418) 및 카나마이신에 대한 내성 유전자이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 동물세포에서 목적 단백질을 발현하는 데 이용된다. 상기 동물세포는 포유류, 설치류, 조류 또는 곤충세포이며, 보다 바람직하게는 CHO(Chinese hamster ovary), VERO, HeLa 세포, WI38, BHK(Baby hamster kidney), COS 세포 또는 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포를 포함하고, 보다 더 바람직하게는 CHO, VERO, HeLa 또는 MDCK이고, 가장 바람직하게는 CHO 세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 디히드로폴레이트 환원효소 (dihydrofolate reductase: DHFR) 코딩 서열을 포함한다. 상기 서열은 벡터의 증폭에 유용하다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 발현 벡터에 의해 형질전환된 동물세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 형질전환된 동물세포를 배양하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 단백질의

제조방법은 (i) 본 발명의 형질전환된 동물세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 상기 배양과정에서 생산된 재조합 단백질을 수득하는 단계를 포함한다.

본 발명에서 사용한 CSP-B 5'-SAR 인자는, 종래 기술에서 동물세포 발현 벡터에 도입하여 의약품용 재조합 단백질의 생산성을 향상시키려는  
5 시도에 사용되지 않았던 인자이다. 하기의 실시예로부터, CSP-B 5'-SAR를 벡터에 도입하면 동물세포에서 목적 단백질의 발현율을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다. 재조합 단백질의 생산을 위해서 기존에 사용하지 않았던 새로운 CSP-B 5'-SAR를 벡터에 도입하여 목적 단백질의 발현 효율을 보다 높일 수 있는 방법을 개발한다면 단백질 의약품의 산업적 생산성을  
10 증대시킬 수 있다.

종래 기술에서 CSP-B 5'-SAR를 동물세포 발현 벡터에 도입하여 의약품용 재조합 단백질의 생산성을 향상시키려는 시도는 보고되지 않았다. 또한 SAR를 벡터에 1 카피, 2 카피, 혹은 3 카피 도입하여 이 벡터로 동물세포를 형질전환하였을 때, 몇 카피의 SAR를 포함하는 벡터를 사용하는  
15 것이 재조합 단백질의 생산성을 가장 높일 수 있는가에 대해서도 연구되지 않았다. 또한 SAR 인자의 위치에 따른 목적 유전자의 발현율 증대 효과에 대한 상세한 선행연구 결과가 공개되어 있지 않다.

본 발명의 발현 벡터를 세포에 도입하여 형질전환된 동물세포를 제조하는 경우, 다양한 방법으로 벡터를 세포에 도입시킬 수 있다. 예를  
20 들어, 미세 주입법(Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al.,  
25 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 동물 세포 내로 주입할 수 있다.

형질전환된 동물세포의 배양은 당업계에 공지된 다양한 방법을 프로토콜을 이용하여 실시할 수 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며,  
30 예를 들어, Eagles's MEM(Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:432(1959)),  $\alpha$ -MEM(Stanner, C.P. et al., *Nat. New Biol.*

230:52(1971)), Iscove's MEM(Iscove, N. et al., *J. Exp. Med.* 147:923(1978)), 199 배지(Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640(Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)), F12(Ham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288(1965)), F10  
 5 (Ham, R.G. *Exp. Cell Res.* 29:515(1963)), DMEM(Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., *Virology* 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1(Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)), McCoy's 5A(McCoy, T.A., et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*  
 10 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈(Ham, R.G. et al., *In Vitro* 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다. 동물세포 배양 및 배지에 대한 설명은, R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York에 상세하게 기재되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

15

### 【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명의 벡터는 CSP-B 5'-SAR 을 포함하는 벡터로, 동물세포에 도입한 외래 유전자의 위치에 따른 유전자 발현 억제 현상을 극복하는  
 20 효과를 가지며, 목적 단백질의 발현율을 크게 향상시킨다.

(b) 본 발명의 벡터는 의약품용 재조합 단백질(예컨대, EPO) 또는 항체(예컨대, 항-HER2 항체)를 동물세포에서 효과적으로 발현시킨다.

(c) 본 발명의 벡터 및 이를 이용한 재조합 단백질의 제조방법은 의약품의 산업적 대량 생산에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

25

### 【도면의 간단한 설명】

도 1 은 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다. lacZ 는 베타 갈락토시다제 유전자, BGH pA 는 소 성장호르몬 유전자의 폴리아데닐화 서열 및 TK pA 는 싸이미딘 카이나아제 유전자의 폴리아데닐화  
 30 서열이다.

도 2 는 SAR/MAR 인자를 1 카피 포함하는 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

도 3 은 SAR 인자를 2 카피 포함하는 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

5        도 4 는 CSP-B 5'-SAR 인자를 3 카피 포함하는 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

도 5 는 NESP 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

도 6 은 SAR/MAR 인자를 포함하는 NESP 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

10        도 7 은 SAR/MAR 인자를 1 카피 도입한 벡터로 형질전환한 세포의 상대적 베타 갈락토시다제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 8 은 SAR 인자를 1, 2 및 3 카피 도입한 벡터로 형질전환한 세포의 상대적 베타 갈락토시다제 활성을 나타낸 그래프이다.

15        도 9 는 SAR 인자를 도입한 벡터로 형질전환한 세포의 상대적 NESP(적혈구 자극인자) 발현율을 나타낸 그래프이다.

도 10 은 SAR 인자를 도입하지 않은 pCLS07A1 벡터로 형질전환한 세포에서 무작위 선택한 24 개 클론의 NESP 발현율을 나타낸 그래프이다.

도 11 은 CSP-B 5'-SAR 인자를 도입한 pCLS10A1f1 벡터로 형질전환한 세포에서 무작위 선택한 24 개 클론의 NESP 발현율을 나타낸 그래프이다.

20        도 12 는 항-HER2 항체 발현 벡터의 구조에 대한 개략도이다.

도 13 은 SAR 인자를 2 카피 도입한 벡터로 형질전환한 세포의 상대적 항-HER2 항체 발현율을 나타낸 그래프이다.

25        도 14 는 SAR 인자를 도입하지 않은 pCLS05H2 벡터로 형질전환한 세포에서 무작위 선택한 19 개 클론의 항-HER2 항체 발현율을 나타낸 그래프이다.

도 15 는 CSP-B 5'-SAR 인자를 2 카피 도입한 pCLS05H2f2 벡터로 형질전환한 세포에서 무작위 선택한 19 개 클론의 항-HER2 항체 발현율을 나타낸 그래프이다.

30        【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

5

## 실시예

### 실시예 1: SAR/MAR 인자의 준비

#### 인간 CSP-B 5'-SAR 및 3'-SAR 인자의 준비

GenBank M62717 및 AL136018 에 등록된 인간 CSP-B 5'-SAR DNA 를  
10 PCR(Polymerase Chain Reaction)로 증폭하기 위하여, 인간 자연 살상 세포(natural killer 세포, NK 세포 및 ATCC CRL-2407)의 지노믹(genomic) DNA 를 준비하였다. DNA 분리 키트(Dneasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Cat. No. 69504)를 사용하여 NK 세포로부터 지노믹 DNA 를 준비하였고, 이것을 5' SAR DNA PCR 의 주형으로 사용하였다.

15 NK 세포의 지노믹 DNA 를 주형으로 Cs5S300F 프라이머(attct tcagc acctc cttaa ttttt ctccc; 서열목록 제 5 서열) 및 Cs5S300R 프라이머(ccagg cagcc aaaga tcagt agttg tgttg; 서열목록 제 6 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 35 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.

20 다음으로, 이 PCR 산물을 pGEM-T 벡터(Promega, Cat. No. A3600)에 클로닝하여 pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 제조하였다.

GenBank M62716 및 AL136018 에 등록된 인간 CSP-B 3'-SAR DNA 를 준비하기 위하여, NK 세포의 지노믹 DNA 를 주형으로 2kCspSF 프라이머(tggtt ccttc attgg aaaag gaaaa cac; 서열목록 제 7 서열) 및  
25 2kCspSR 프라이머(tccgc tgagg ctgtg cccac agcca cc; 서열목록 제 8 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 1 차 PCR 산물을 주형으로 CspSF 프라이머(ggatc ccatt ctcct tgatg tacta at; 서열목록 제 9 서열) 및 CspSR 프라이머(gaatt caaac aactc aatag caaga aac; 서열목록 제 10 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서  
30 30 초, 그리고 72℃에서 5 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.

2 차 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 pGEMT-CS3S.1.2k 벡터를 제조하였다.

#### 인간 베타 글로빈 MAR 인자의 준비

5 GenBank L22754 와 NW\_001838021 에 등록된 인간 베타 글로빈 MAR DNA 를 PCR 로 증폭하기 위하여, 인간 G-2 세포의 지노믹 DNA 를 준비하였다. DNA 분리 키트를 사용하여 G-2 세포로부터 지노믹 DNA 를 준비하였고, 이것을 5' MAR DNA PCR 의 주형으로 사용하였다. G-2 세포의 지노믹 DNA 를 주형으로 Bg5MF-100F-NheI 프라이머(aattg ctagc ttgta ttctg ttctg

10 tgagg caagg ttt; 서열목록 제 11 서열) 및 Bg5MR-100R-XhoI 프라이머(aattc tcgag ttcct ctcta tggtg gctca aatgt cct; 서열목록 제 12 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 3 분 20 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pcDNA3.3-TOPO 벡터(Invitrogen, Cat. No. K8300-

15 01)에 클로닝하여 pcDNA3.3-Bg5M 벡터를 제조하였다.

#### 실시예 2: 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 제조

##### pC06 벡터의 제조

사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus, CMV) 프로모터, 다수

20 제한효소 클로닝 부위(Multiple Cloning Sites, MCS) 및 소 성장 호르몬(Bovine Growth Hormone, BGH) 폴리아데닐레이션 서열(polyadenylation sequence, pA)을 순서대로 포함하는 pC06 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, pcDNA3.1(-) 벡터(Invitrogen, Cat. No. V795-20)를 주형으로 V6\_F 프라이머(aagct

25 tggat ccgaa ttcatt cgatg gccgg ccggt accct cgagc tgtgc ctctt agttg ccagc; 서열목록 제 13 서열) 및 V6\_R 프라이머(gctag ctaga gcccc agctg gttct ttccg; 서열목록 제 14 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pcDNA3.3-TOPO

30 벡터(Invitrogen)에 클로닝하여 pC06 벡터를 제조하였다.

*pC04' 벡터의 제조*

SV40(Simian Virus 40) 프로모터, 코작 서열(Kozak sequence, gccatc), *dhfr*(dihydrofolate reductase) 유전자 및 TK(herpes simplex virus thymidine kinase) pA 를 순서대로 포함하는 pC04' 벡터를 제조하기  
 5 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pcDNA3.3 벡터를 주형으로 PsvApaDraF 프라이머(aaaat tgggc cccac tacgt gctgt ggaat gtgtg tcagt taggg t; 서열목록 제 15 서열) 및 PsvKzDHR 프라이머(tggtc gaacc atgat ggccg gaaac gatcc tcatc ctgtc tct; 서열목록 제 16 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였고, pOptiVEC-TOPO 벡터(Invitrogen, Cat. No. 12744-017)를  
 10 주형으로 DHKzPsvF 프라이머(ggatc gtttc gcgcc atcat ggttc gacca ttgaa ctgca tcg; 서열목록 제 17 서열) 및 TKNheNdeR 프라이머(tgtgt gcata tggct agcga taaca atttc acaca ggaaa cag; 서열목록 제 18 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 두가지  
 15 PCR 산물을 중복(overlapping) PCR 을 통해 연결하고, pGEM-T 벡터의 ApaI 및 NdeI 제한효소 부위에 클로닝하여 pC04' 벡터를 제조하였다.

*pC04 벡터의 제조*

pC04' 벡터가 포함하는 SV40 프로모터에서 72 bp(ggtgt ggaaa gtccc  
 20 caggc tcccc agcag gcaga agtat gcaaa gcatg catct caatt agtca gcaac ca; 서열목록 제 19 서열)의 인핸서(enhancer) 1 개를 제거(SV40dE1 프로모터)한 pC04 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pC04' 벡터를 SphI 제한효소로 절단하고, 다음으로 큰 DNA 절편을 자가 라이게이션(self-ligation)시켜 pC04 벡터를 제조하였다.

25

*pCLS07 벡터의 제조*

pC06 벡터의 BGH pA 와 SV40 프로모터 사이에 SV40dE1 프로모터, 코작 서열, *dhfr* 유전자 및 TK pA 가 삽입된 pCLS07 벡터를 제조하기 위하여  
 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pC04 벡터를 주형으로 PsvApaDraF  
 30 프라이머 및 TKNheNdeR 프라이머를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분 20 초의 조건으로 30 회

반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물과 pC06 벡터를 DraIII 및 NheI 제한효소로 각각 절단하고, 여기에서 얻은 두 개의 큰 DNA 절편을 라이게이션 시켜서 pCLS07 벡터를 제조하였다.

#### 5 *pCLS08 벡터의 제조*

pCLS07 벡터의 NheI 제한효소 부위에 MCS 를 삽입하여 pCLS08 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEM-T 벡터에 클로닝되어 있는 에리스로포이에틴 유전자를 주형으로 NhAsE1F 프라이머(aattg ctatg atata gcgat cgcgc aggac agctt ccgac agcag ggcca gg; 서열목록 제 20 서열) 및 BbPsSbNhe1R 프라이머(aattg ctatg atata cctgc aggtat tatgg gcccata tatag ctgag gttga atgag aatat cactg tccca gacac; 서열목록 제 21 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 MCS 를 제조하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 15 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS07 벡터의 NheI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS08 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS08G1 벡터의 제조*

pCLS08 벡터의 HindIII 와 XhoI 제한효소 부위 사이에 lacZ 및 lacY 유전자를 삽입하여 pCLS08G1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pSV-β-Galactosidase 벡터(Promega, Cat. No. TB094)를 주형으로 galHinF 프라이머(aatta agctt ctcgc gcaac ctatt ttccc ctcga ac; 서열목록 제 22 서열) 및 galXhoR 프라이머(aattc tcgag ccgag tttgt cagaa agcag accaa ac; 서열목록 제 23 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 lacZ 및 lacY 유전자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 3 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS08 벡터의 HindIII 및 XhoI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS08G1 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS09G1 벡터의 제조*

pCLS08G1 벡터의 두 NheI 제한효소 부위 사이에 있는 MCS 를 다른 MCS 로 바꾸어서 pCLS09G1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을

5 진행하였다. 먼저, pGEM-T 벡터에 클로닝되어 있는 에리스로포이에틴 유전자를 주형으로 NhSbE1F 프라이머(aattg ctage atata cctgc aggtt gaatg agaat atcac tgtcc cagac a; 서열목록 제 24 서열)와 NhAsSfPsE1R 프라이머(aattg ctage atata gcgat cgcta tatgg ccatg atggc catat agggc ccagg acagc ttccg acagc agggc caggc; 서열목록 제 25 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 새로운 MCS 를 제조하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 15 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, pCLS08G1 벡터의 두 NheI 제한효소 부위 사이에 있는 기존의 MCS 를 제거하고 여기에 PCR 로 새롭게 만든 MCS 를 클로닝하여 pCLS09G1
 10 벡터를 제조하였다. pCLS09G1 벡터의 맵(map)은 도 1 에 나타내었다.

### 실시에 3: SAR/MAR 를 포함하는 베타 갈락토시다제 발현 벡터의 제조

#### *pCLS09G1t1* 벡터의 제조

15 pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 3'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1t1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS3S.1.2k 벡터를 주형으로 cs3sSbf1F 프라이머(aattc ctgca gggga tcca ttctc cttga tgtac taat; 서열목록 제 26 서열) 및 cs3sPsp1R 프라이머(aattg ggccc gaatt caaac aactc aatag caaga aac; 서열목록 제 27 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 3'-SAR
 20 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1t1 벡터를 제조하였다.

#### 25 *pCLS09G1f1* 벡터의 제조

pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1f1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로 cs5sSbf1F 프라이머(aattc ctgca gggaa ttcct aaaca gagca attag gtaag; 서열목록
 30 제 28 서열) 및 cs5sPsp1R 프라이머(aattg ggccc gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; 서열목록 제 29 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5'-SAR

인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1f1 벡터를 제조하였다.

5

#### *pCLS09G1g1 벡터의 제조*

pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위 사이에 베타 글로빈 MAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1g1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pcDNA3.3-Bg5M 벡터를 주형으로 glmSbf1F  
10 프라이머(aattc ctgca ggttg tattc tgttt cgtga ggcaa ggttt; 서열목록 제 30 서열) 및 glmPsp1R 프라이머(aattg ggccc ttcct ctcta tgttg gctca aatgt cct; 서열목록 제 31 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 베타 글로빈 MAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 3 분 20 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.  
15 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1 벡터의 SbfI 및 PspOMI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1g1 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS09G1t2 벡터의 제조*

pCLS09G1t1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 3'-  
20 SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1t2 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS3S.1.2k 벡터를 주형으로 cs3sPsp2F 프라이머(aattg ggccc ggatc ccatt ctctt tgatg tacta at; 서열목록 제 32 서열) 및 cs3sSfi2R 프라이머(aattg gccat gatgg ccgaa ttcaa acaac tcaat agcaa gaaac; 서열목록 제 33 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B  
25 3'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1t1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1t2 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS09G1f2 벡터의 제조*

30

pCLS09G1f1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1f2 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로 cs5sPsp2F 프라이머(aattg ggccc gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; 서열목록 제 34  
 5 서열) 및 cs5sSfi2R 프라이머(aattg gccat gatgg ccgaa ttcca gtgta aacgt cttcc ttgt; 서열목록 제 35 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1f1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위에 클로닝하여  
 10 pCLS09G1f2 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS09G1tf 벡터의 제조*

pCLS09G1t1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1tf 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로 cs5sPsp2F  
 15 프라이머(aattg ggccc gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; 서열목록 제 34 서열) 및 cs5sSfi2R 프라이머(aattg gccat gatgg ccgaa ttcca gtgta aacgt cttcc ttgt; 서열목록 제 35 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고  
 20 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1t1 벡터의 PspOMI 및 SfiI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1tf 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS09G1f3 벡터의 제조*

pCLS09G1f2 벡터의 CMV 프로모터 및 bla 프로모터 사이에 있는 BglIII 제한효소 부위에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS09G1f3 벡터를  
 25 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로 cs5sBgl3F 프라이머(aatta gatct gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; 서열목록 제 36 서열) 및 cs5sBgl3R 프라이머(aatta gatct gaatt  
 30 ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; 서열목록 제 37 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10, 60℃에서 30 초,

그리고 72°C에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1f2 벡터의 BglIII 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1f3 벡터를 제조하였다.

#### 5 *pCLS09G1f4* 벡터의 제조

pCLS09G1f1 벡터의 CMV 프로모터 및 bla 프로모터 사이에 있는 BglIII 제한효소 부위에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 SAR 가 목적 유전자인 lacZ 및 lacY 유전자의 양쪽에 위치하는 pCLS09G1f4 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로  
10 cs5sBgl3F 프라이머(aatta gatct gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; 서열목록 제 36 서열) 및 cs5sBgl3R 프라이머(aatta gatct gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; 서열목록 제 37 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5' SAR 인자를 증폭하였다. 98°C에서 10 초, 60°C에서 30 초, 그리고 72°C에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.  
15 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS09G1f1 벡터의 BglIII 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS09G1f4 벡터를 제조하였다.

#### 실시에 4: SAR/MAR 도입 벡터를 사용한 베타 갈락토시다제 발현

*pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* 또는 *pCLS09G1g1* 벡터를 사용한  
20 형질전환

CSP-B 5'-SAR, CSP-B 3'-SAR, 및 베타 글로빈 MAR 인자를 벡터에 1 카피씩 도입하여 다음과 같이 그 효과를 알아보기 위하여, 다음과 같은 방법으로 CHO DG44 세포(Invitrogen, Cat. No. 12609)를 형질전환하였다.

부착배양 형태의 DG44 세포를 6-웰 플레이트에 웰당  $4 \times 10^5$  세포로  
25 분주하였다. 24 시간 후 세포가 플레이트 바닥에 완전히 부착된 것을 확인하였다. Opti-MEM 배지(Gibco, Cat. No. 31985-070)를 멸균된 tube 3 개에 각각 500  $\mu$ l 씩 분주한 후 미리 준비한 pCLS09G1, pCLS09G1f1, pCLS09G1t1 및 pCLS09G1g1 벡터를 2  $\mu$ g 씩 혼합하고 약하게 피펫팅 하였다. Opti-MEM 배지를 멸균된 tube 3 개에 각각 500  $\mu$ l 씩 분주하였다. 여기에  
30 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Cat. No. 11668-027)을 10  $\mu$ l 씩 취하여 혼합하고 약하게 피펫팅 한 다음 상온에서 5 분간 방치하였다. DNA 와

시약 용액을 혼합하여 상온에서 20 분간 방치하고, 이 혼합액을 각 DNA 당 준비한 6-웰 플레이트의 웰에 넣고 잘 혼합하였다.

*pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* 또는 *pCLS09G1g1* 벡터로 형질전환한 세포 풀(pool)의 베타 갈락토시다제 활성 확인

*pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* 또는 *pCLS09G1g1* 벡터로 DG44 세포를 형질전환하고 24 시간 후 10% FBS 와 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  제네티신(Geneticin)이 포함된 배지로 교환하였다. 3-4 일에 한 번씩 배지를 교환하며 3 주 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하여 안정적 세포의 풀을 제조하였다.

베타 갈락토시다제 분석 키트(Stratagen, Cat. No. 200383)를 사용하여 형질전환한 안정적 세포에 대한 베타 갈락토시다제 활성을 확인하고, 벡터에 따른 베타 갈락토시다제 활성과 *pCLS09G1* 벡터를 기준으로 한 상대적(relative) 베타 갈락토시다제 활성을 구하였다. 표 1 및 도 7 에 나타낸 바와 같이, SAR/MAR 인자가 도입되지 않은 *pCLS09G1* 벡터에 비해 SAR/MAR 인자를 도입한 벡터는 모두 베타 갈락토시다제 활성이 증가하였다. 또한, 베타 글로빈 MAR 인자를 도입한 *pCLS09G1g1* 벡터에 비하여 CSP-B 5'-SAR 인자를 도입한 *pCLS09G1f1* 벡터의 경우 더 높은 베타 갈락토시다제 활성 증가를 보였다. 따라서, 목적 단백질의 발현을 증가를 위하여 벡터에 CSP-B 5'-SAR 를 도입하는 것이 바람직하다.

【표 1】

| 형질전환에<br>사용한 벡터   | 도입된 SAR/MAR  | 베타 갈락토시다제<br>활성<br>(units/mg) | 베타 갈락토시다제<br>상대적 활성 |
|-------------------|--------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>pCLS09G1</i>   | 없음           | 3.4                           | 1.0                 |
| <i>pCLS09G1f1</i> | CSP-B 5'-SAR | 34.3                          | 10.0                |
| <i>pCLS09G1t1</i> | CSP-B 3'-SAR | 7.4                           | 2.2                 |
| <i>pCLS09G1g1</i> | 베타 글로빈 MAR   | 29.8                          | 8.7                 |

*pCLS09G1f1*, *pCLS09G1f2*, *pCLS09G1f3* 또는 *pCLS09G1f4* 벡터로

### 형질전환한 세포 풀의 베타 갈락토시다제 활성 확인

CSP-B 5'-SAR 인자가 목적 단백질의 발현율을 증가시킨다는 것을 확인하고, 벡터에 도입하는 SAR 인자의 카피 수에 따라서 목적 단백질의 발현율 증가가 어떻게 달라지는지 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 5 수행하였다. pCLS09G1f1, pCLS09G1f2, pCLS09G1f3 또는 pCLS09G1f4 벡터로 DG44 세포를 형질전환하고 제네티신 배지로 선별하여 세포 풀을 얻었다. 형질전환한 안정적 세포에 대한 베타 갈락토시다제 활성을 확인하고, 벡터에 따른 베타 갈락토시다제 활성을 구하였다. 표 2과 도 8에 나타난 바와 같이, SAR 인자를 1 카피 또는 3 카피 도입한 벡터에 10 비하여 SAR 인자를 2 카피 도입한 벡터가 더 높은 베타 갈락토시다제 활성을 보였다. 즉, SAR 인자에 의한 목적 단백질의 발현율 증가는 SAR 인자의 카피 수에 따라 달라지고, SAR 인자를 벡터에 2 카피 도입함으로써 목적 단백질의 발현율을 최대로 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

【표 2】

| 형질전환에<br>사용한 벡터 | 도입된<br>SAR                    | 베타 갈락토시다제<br>활성 (units/mg) |      |      |     | 베타 갈락토시다제<br>상대적 활성 |      |      |     |
|-----------------|-------------------------------|----------------------------|------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
|                 |                               | set1                       | set2 | set3 | 평균  | set1                | set2 | set3 | 평균  |
| pCLS09G1f1      | CSP-B<br>5'-SAR<br>1 카피       | 116                        | 30   | 50   | 65  | 1.0                 | 1.0  | 1.0  | 1.0 |
| pCLS09G1f2      | CSP-B<br>5'-SAR<br>연속 2<br>카피 | 147                        | 103  | 107  | 119 | 1.3                 | 3.4  | 2.1  | 2.3 |
| pCLS09G1f3      | CSP-B<br>5'-SAR<br>3 카피       | 12                         | 36   | 19   | 22  | 0.1                 | 1.2  | 0.4  | 0.6 |
| pCLS09G1f4      | CSP-B<br>5'-SAR<br>비연속 2      | 112                        | 112  | 66   | 97  | 1.0                 | 3.7  | 1.3  | 2.0 |

|  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|----|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  | 카피 |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|----|--|--|--|--|--|--|--|--|

### 실시예 5: NESP 발현 벡터의 제조

#### 에리스로포이에틴 유전자의 준비

GenBank M11319(human fetal liver genomic erythropoietin gene) 및  
 5 GenBank NM000799(human erythropoietin mRNA)에 등록되어 있는 582 bp 의  
 에리스로포이에틴 유전자를 클로닝하기 위하여 다음과 같은 실험을  
 진행하였다. 먼저, Human liver Marathon-Ready cDNA library(BD, Cat.  
 No. 7407-1)를 주형으로 IE1ATGF 프라이머(atggg ggtgc acgaa tgtcc tgcct;  
 서열목록 제 38 서열) 및 IE1TGAR 프라이머(tcata tgtcc cctgt cctgc aggcc  
 10 t; 서열목록 제 39 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초,  
 58℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 40 회 반복하여 PCR 을  
 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하였다.

#### NESP 유전자의 제조

15 대한민국 특허 출원번호 제 1995-0701453 호의 청구항 3 에 명시된  
 에리스로포이에틴 유사체 NESP(A30N, H32T, P87V, W88N, P90T)의 유전자를  
 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, A30N 및 H32T  
 유사체의 유전자를 제조하기 위하여, pGEM-T 벡터에 클로닝되어 있는  
 에리스로포이에틴 유전자를 주형으로 M13R 프라이머(gaaac agcta tgacc  
 20 atg; 서열목록 제 40 서열) 및 IA1g1R 프라이머(ctcat tcaag ctgca tgttt  
 catta cagcc cgtcg tgat; 서열목록 제 41 서열)를 사용하여 PCR 을  
 수행하였고, M13F 프라이머(caggg ttttc ccagt cacga; 서열목록 제 42 서열)  
 및 IA1g1F 프라이머(atcac gacgg gctgt aatga aacat gcagc ttgaa tgag;  
 서열목록 제 43 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초,  
 25 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 40 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을  
 수행하였다. 다음으로, 이 두가지 PCR 산물을 중복 PCR 을 통해 연결하고,  
 pGEM-T 벡터의 NdeI 및 SphI 제한효소 부위에 클로닝하였다.

A30N, H32T 유사체의 유전자를 A30N, H32T, P87V, W88N 및 P90T  
 유사체의 유전자로 돌연변이화 시키고 번역 개시 코돈(codon) 앞에 코작  
 30 서열(gccacc)을 붙이기 위하여, pGEM-T 벡터에 클로닝되어 있는 A30N, H32T

유사체의 유전자를 주형으로 M13R 프라이머 및 IA1G2R 프라이머(cacat gcagc tgcag tgtct cattc acctg ggaag agttg ac; 서열목록 제 44 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였고, M13F 프라이머 및 IA1G2F 프라이머(gtcaa ctctt cccag gtgaa tgaga cactg cagct gcatg tg; 서열목록 제 45 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 40 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 두가지 PCR 산물을 주형으로 IE1KzATGHinF 프라이머(aatta agctt gccac catgg gggtg cacga atgtc ctgcc t; 서열목록 제 46 서열)와 IE1TGAXhoR 프라이머(aattc tcgag tcatc tgtcc cctgt cctgc aggcc t; 서열목록 제 47 서열)를 사용하여 중복 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 50 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.

#### *pCLS07A1* 벡터의 제조

상기 NESP 유전자의 PCR 산물을 pCLS07 벡터의 MCS 중 HindIII 및 XhoI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS07A1 벡터를 제조하였다.

#### 실시예 6: SAR 를 포함하는 NESP 발현 벡터의 제조

##### *pCLS10A1* 벡터의 제조

NESP 를 동물세포에서 발현할 수 있는 pCLS07A1 벡터의 NheI 제한효소 부위에 SAR 또는 MAR 인자를 도입하기 위한 MCS 를 삽입하여 pCLS10A1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pcDNA3.1(-) 벡터를 주형으로 NhAsf1F 프라이머(aattg ctagc atata ggcgcc gccaa cttaga ttagg gtgat ggttc acgta g; 서열목록 제 48 서열) 및 NhC1PaPsf1R 프라이머(aattg ctagc atata atcga ttata tttaa ttaaa tatag ggccc ttgag tgttg ttcca gtttg gaaca aga; 서열목록 제 49 서열)를 사용하여 PCR 을 수행한 후 MCS 를 얻었다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 15 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 이 PCR 산물을 pCLS07A1 벡터의 NheI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS10A1 벡터를 제조하였다.

##### *pCLS10A1t1* 벡터의 제조

pCLS10A1 벡터의 AscI 및 PspOMI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 3'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS10A1t1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS3S.1.2k 벡터를 주형으로 cs3sAsc1F 프라이머(aattg ggcgcg ccgga tccca ttctc cttga tgtac taat; 서열목록 제 50  
 5 서열) 및 cs3sPsp1R 프라이머(aattg ggccc gaatt caaac aactc aatag caaga aac; 서열목록 제 51 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 3'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS10A1 벡터의 AscI 및 PspOMI 제한효소 부위에 클로닝하여  
 10 pCLS10A1t1 벡터를 제조하였다.

#### *pCLS10A1f1 벡터의 제조*

pCLS10A1 벡터의 AscI 및 PspOMI 제한효소 부위 사이에 CSP-B 5'-SAR 인자를 삽입하여 pCLS10A1f1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을  
 15 진행하였다. 먼저, pGEMT-CS5S.3.0k 벡터를 주형으로 cs5sAsc1F 프라이머(aattg ggcgcg ccgaa ttcct aaaca gagca attag gtaag; 서열목록 제 52 서열) 및 cs5sPsp1R 프라이머(aattg ggccc gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; 서열목록 제 53 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 CSP-B 5'-SAR 인자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서  
 20 2 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pCLS10A1 벡터의 AscI 및 PspOMI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS10A1f1 벡터를 제조하였다.

#### 실시에 7: SAR 도입 벡터를 사용한 NESP 발현

25 *pCLS07A1*, *pCLS10A1f1* 또는 *pCLS10A1t1* 벡터로 형질전환한 DG44 세포 풀의 NESP 발현을 확인

베타 갈락토시다제 활성 실험을 통해 확인한 SAR 인자의 효과가 다른 재조합 단백질의 발현에도 적용되는가를 알아보기 위하여, 목적 단백질인 NESP 와 SAR 인자를 포함하는 pCLS07A1, pCLS10A1f1 또는 pCLS10A1t1 벡터를  
 30 DG44 세포에 형질전환하고 제네티신 포함 배지로 선별한 후 세포풀을 얻어서 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법으로 NESP 의

발현율을 확인하였다. 표 3 및 도 9 에 나타난 바와 같이, SAR 인자가 도입된 경우 발현량이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 CSP-B 5'-SAR 인자를 NESP 유전자의 하위(downstream)에 도입한 경우 도입하지 않은 경우보다 NESP 의 발현율이 11.2 배 증가하는 것을 확인하였다.

5 【표 3】

| 형질전환에<br>사용한 벡터 | 도입된 SAR/MAR  | NESP<br>발현율 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | NESP<br>상대적 발현율 |
|-----------------|--------------|-----------------------------------------|-----------------|
| pCLS07A1        | 없음           | 0.7                                     | 1.0             |
| pCLS10A1f1      | CSP-B 5'-SAR | 7.9                                     | 11.2            |
| pCLS10A1t1      | CSP-B 3'-SAR | 2.3                                     | 3.2             |

NESP 를 발현하는 양성 클론의 형성 빈도 확인

10 외래 유전자의 위치에 따른 유전자 발현 억제 현상을 극복할 수 있는 SAR 인자의 효과를 확인하기 위하여, pCLS07A1, pCLS10A1t1 또는 pCLS10A1f1 벡터를 DG44 세포에 형질전환한 후 96-웰 플레이트를 사용해서 단일 콜로니(single colony)를 만들었다. 현미경 관찰을 통해 각 벡터의 콜로니 형성 빈도를 확인하고, 배양액을 채취하여 발현율을 측정하여 각 벡터마다 NESP 를 발현하는 양성 클론 형성 빈도를 구하였다. 표 4 및 표 5 에 나타난 바와 같이, SAR 인자 미도입시 82%의 콜로니 형성 빈도가 나타났고, CSP-B 5'-SAR 인자 도입시 90%, 3'-SAR 인자 도입시 50%의 웰에서 콜로니가 형성되었다. 또한, 양성 클론의 빈도는 SAR 인자 미도입시 및 3'-SAR 인자 도입시 약 40% 정도로 나타났으며, 5'-SAR 인자 도입시 59%로 증가하였다. 즉, 5'-SAR 인자 도입시 외래 유전자의 위치에 따른 유전자 발현 억제 현상이 극복되어 목적 유전자인 NESP 를 발현하는 클론이 더 많이 형성됨을 확인할 수 있었다.

20 【표 4】

| 형질전환에<br>사용한 벡터 | 도입된 SAR/MAR  | 전체<br>웰 갯수 | 콜로니 형성<br>웰 갯수 | 콜로니 형성<br>빈도 (%) |
|-----------------|--------------|------------|----------------|------------------|
| pCLS07A1        | 없음           | 240        | 197            | 82               |
| pCLS10A1f1      | CSP-B 5'-SAR | 240        | 217            | 90               |

|            |              |     |     |    |
|------------|--------------|-----|-----|----|
| pCLS10A1t1 | CSP-B 3'-SAR | 240 | 119 | 50 |
|------------|--------------|-----|-----|----|

【표 5】

| 형질전환에<br>사용한 벡터 | 도입된 SAR/MAR  | 전체<br>콜로니<br>갯수 | 양성 클론<br>갯수 | 양성 클론<br>빈도 (%) |
|-----------------|--------------|-----------------|-------------|-----------------|
| pCLS07A1        | 없음           | 197             | 89          | 45              |
| pCLS10A1f1      | CSP-B 5'-SAR | 217             | 127         | 59              |
| pCLS10A1t1      | CSP-B 3'-SAR | 119             | 51          | 43              |

#### 단일 클론의 NESP 발현을 확인

- 5 NESP 의 발현이 확인된 96-웰 플레이트 상의 양성 클론 중 임의로 벡터당 24 개를 골라 24-웰 플레이트로 계대한 후 배양액을 채취하여 발현율을 측정하였다. 도 10 과 도 11 에 나타낸 바와 같이, CSP-B 5' SAR 인자를 도입한 벡터의 경우 임의로 선택한 24 개의 양성 클론 중 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 발현율을 나타내는 고발현 클론이 13 개 나타났고, SAR 인자 미도입
- 10 벡터의 경우 5 개 나타났다. 즉, 벡터에 5' SAR 인자를 도입시 고발현 클론의 출현 빈도수가 증가하는 것을 확인하였다.

#### 실시예 8: 항-HER2 항체 발현 벡터의 제조

##### pC01 벡터의 제조

- 15 네오마이신 저항 유전자, 암피실린 저항 유전자, CMV 프로모터, MCS, 및 BGH pA 를 순서대로 포함하는 pC01 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pcDNA3.1(-) 벡터를 주형으로 V1\_F 프라이머(aagct tcctc agcat cgatg gccgg ccgga tccct gtgcc ttcta gttgc cagcc atctg t; 서열목록 제 54 서열) 및 V1\_R 프라이머(tagag cccca gctgg
- 20 ttctt tccgc ctcag; 서열목록 제 55 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pcDNA3.3-TOPO 벡터에 클로닝하여 pC01 벡터를 제조하였다.

*pC02 벡터의 제조*

CMV 프로모터, pC01 벡터의 MCS 와 다른 MCS 및 BGH pA 를 순서대로 포함하는 pC02 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pcDNA3.1(-) 벡터를 주형으로 V2\_F 프라이머(gaatt ctgta caggt  
 5 acccc tgcag gctcg agctg tgcct tctag ttgcc agcca tctgt; 서열목록 제 56 서열) 및 V2\_R 프라이머(tagag ccca gctgg ttctt tccgc ctcag; 서열목록 제 57 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pcDNA3.3-TOPO 벡터에 클로닝하여 pC02 벡터를  
 10 제조하였다.

*pC03 벡터의 제조*

pC01 벡터에 포함된 네오마이신 저항 유전자, 암피실린 저항 유전자, CMV 프로모터, 첫번째 MCS, BGH pA, pC02 벡터에 포함된 CMV 프로모터,  
 15 두번째 MCS 및 BGH pA 를 순서대로 포함하는 pC03 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, pC01 벡터를 DraIII 및 AgeI 제한효소로 절단하고 큰 DNA 절편을 얻었다. 다음으로 pC02 벡터를 주형으로 PcmvAgeF 프라이머(aatct gaccg gtgtt aggcg ttttg cgctg ctctg cg; 서열목록 제 58 서열) 및 BGHNheDraR 프라이머(ttact acact acgtg gatcg  
 20 agcta gctag agccc cagct ggttc tttcc g; 서열목록 제 59 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하고 이 PCR 산물을 DraIII 및 AgeI 제한효소로 절단하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 마지막으로, pC01 벡터를 DraIII 및 AgeI 제한효소로 절단한 DNA 절편과 이 PCR 산물을 라이게이션 시켜서 pC03  
 25 벡터를 제조하였다.

*pCLS05 벡터의 제조*

140pC03 벡터의 BGH pA 와 SV40 프로모터 사이에 SV40de1 프로모터, 코작 서열, dhfr 유전자 및 TK pA 가 삽입된 pCLS05 벡터를 제조하기 위하여  
 30 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, pC04 벡터를 주형으로 PsvApaDraF 프라이머 및 TKNheNdeR 프라이머를 사용하여 PCR 을 수행하였다. 98℃에서

10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물과 pC03 벡터를 DraIII 및 NheI 제한효소로 각각 절단하고, 여기에서 얻은 두 개의 큰 DNA 절편을 라이게이션 시켜서 pCLS05 벡터를 제조하였다.

5

#### *pCLS05H1 벡터의 제조*

pCLS05 벡터의 EcoRI 및 XhoI 제한효소 부위 사이에 항-HER2 항체 중쇄(heavy chain) 유전자를 삽입하여 pCLS05H1 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 먼저, 합성한 항-HER2 항체 유전자를 주형으로 H1ssF 프라이머(ctctt cttgg tagca acagc tacag gtgtc cactc cgagg tccaa ctggt cgaaa gcggt gga; 서열목록 제 60 서열)와 HITGAXhoR 프라이머(aattc tcgag tcatt taccc ggaga caggg agagg ctctt; 서열목록 제 61 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 시그널 서열(signal sequence)의 일부가 있는 중쇄 유전자를 증폭하고, 이 PCR 산물을 주형으로 H1ssEcoF 프라이머(aattg aattc gccac catgg gatgg agctg tatca tcctc ttctt ggtag caaca gctac agg; 서열목록 제 62 서열)와 HITGAXhoR 프라이머(서열목록 제 61 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 코작 서열과 시그널 서열이 있는 중쇄 유전자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고 72℃에서 1 분 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로, 이 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하고, EcoRI 및 XhoI 제한효소로 절단하여 코작 서열과 시그널 서열이 있는 중쇄 유전자를 얻은 후, pCLS05 벡터의 EcoRI 및 XhoI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS05H1 벡터를 제조하였다.

#### 25 *pCLS05H2 벡터의 제조*

pCLS05H1 벡터의 HindIII 및 BamHI 제한효소 부위 사이에 항-HER2 항체 경쇄(light chain) 유전자를 삽입하여 pCLS05H2 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 합성한 항-HER2 항체 유전자를 주형으로 H2ssF 프라이머(ctctt cttgg tagca acagc tacag gtgtc cactc cgata tccag atgac ccaga gtccc tct; 서열목록 제 63 서열)와 H2TGABamR 프라이머(aattg gatcc tcaac actct cccct gttga agctc tttgt;

서열목록 제 64 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 시그날 서열의 일부가  
 있는 경쇄 유전자를 증폭하고, 이 PCR 산물을 주형으로 H2ssHinf  
 프라이머(aatta agctt gccac catgg gatgg agctg tatca tcctc ttctt ggtag  
 caaca gctac agg; 서열목록 제 65 서열)와 H2TGABamR 프라이머(서열목록  
 5 제 64 서열)를 사용하여 PCR 을 수행하여 코작 서열과 시그날 서열이 있는  
 경쇄 유전자를 증폭하였다. 98℃에서 10 초, 60℃에서 30 초, 그리고  
 72℃에서 1 분의 조건으로 30 회 반복하여 PCR 을 수행하였다. 다음으로,  
 이 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하고, HindIII 및 BamHI 제한효소로  
 절단하여 코작 서열과 시그날 서열이 있는 경쇄 유전자를 얻은 후,  
 10 pCLS05H1 벡터의 HindIII 및 BamHI 제한효소 부위에 클로닝하여 pCLS05H2  
 벡터를 제조하였다. pCLS05H2 벡터의 맵은 도 12a 에 나타내었다.

#### 실시에 9 : SAR 를 포함하는 항-HER2 항체 발현 벡터의 제조

##### *pCLS05H2f2 벡터의 제조*

15 항-HER2 항체를 동물세포에서 발현할 수 있는 pCLS05H2 벡터의 중쇄  
 유전자와 *dhfr* 유전자 사이에 CSP-B 5'-SAR 인자를 2 카피 도입하여  
 pCLS05H2f2 벡터를 제조하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다.  
 pCLS05H2 벡터 및 pCLS09G1f2 벡터를 XhoI 및 BssHII 제한효소로 각각  
 절단하고 여기에서 얻은 두 개의 큰 DNA 절편을 라이게이션 시켜서  
 20 pCLS05H2f2 벡터를 제조하였다. pCLS05H2f2 벡터의 맵은 도 12b 에  
 나타내었다.

#### 실시에 10 : SAR 도입 벡터를 사용한 항-HER2 항체 발현

##### *pCLS05H2 또는 pCLS05H2f2 벡터로 형질전환한 DG44 세포 풀의 항-HER2 항체 발현을 확인*

25 목적 단백질인 항-HER2 항체의 유전자를 포함하는 pCLS05H2 벡터와  
 항체 유전자 및 SAR 인자를 포함하는 pCLS05H2f2 벡터를 각각 DG44 세포에  
 형질전환하고 제네티신 포함 배지로 선별한 후 세포 풀을 얻어서 ELISA  
 방법으로 항-HER2 항체의 발현율을 확인하였다. 표 6 및 도 13 에 나타낸  
 30 바와 같이, SAR 인자를 2 카피 도입한 경우 도입하지 않은 경우보다 항-  
 HER2 항체의 발현율이 30 배 높은 것을 확인하였다. SAR 인자를 포함하는

pCLS05H2f2 벡터를 사용했을 때 제네티신에 저항성을 나타내며 살아남은 세포의 개수가 상대적으로 많았다.

【표 6】

| 형질전환에<br>사용한 벡터 | 도입된 SAR                        | 항-HER2 항체<br>발현율 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |      |      |      | 항-HER2 항체<br>상대적 발현율 |      |      |      |
|-----------------|--------------------------------|----------------------------------------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|
|                 |                                | set1                                         | set2 | set3 | 평균   | set1                 | set2 | set3 | 평균   |
| pCLS05H2        | 없음                             | 0.29                                         | 0.50 | 0.26 | 0.35 | 1.0                  | 1.0  | 1.0  | 1.0  |
| pCLS05H2f2      | CSP-B 5'-<br>SAR<br>연속 2<br>카피 | 6.74                                         | 8.22 | 13.6 | 9.54 | 22.7                 | 16.2 | 52.6 | 30.5 |

#### 5 단일 클론의 항-HER2 항체 발현을 확인

항-HER2 항체의 발현이 확인된 96-웰 플레이트 상의 양성 클론을 임의로 골라 24-웰 플레이트로 계대한 후 배양액을 채취하여 발현율을 측정하였다. 도 14 와 도 15 에 나타난 바와 같이, CSP-B 5'-SAR 인자를 2 카피 도입한 벡터의 경우 임의로 선택한 19 개의 양성 클론 중 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 발현율을 나타내는 고발현 클론이 10 개 나타났고, SAR 인자 미도입 벡터의 경우 6 개 나타났다. 즉, 벡터에 5'-SAR 인자를 도입시 상대적으로 재조합 단백질을 고발현하는 클론의 출현 빈도수가 증가하는 것을 확인하였다.

15 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

20

## 【특허청구범위】

## 【청구항 1】

다음을 포함하는 동물세포용 발현 벡터:

- (a) CSP-B(Cytotoxic Serine Protease-B)의 5'-SAR(Scaffold or Matrix Attachment Region);
- (b) 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터; 및
- (c) 폴리아데닐화 서열.

## 【청구항 2】

- 제 1 항에 있어서, 상기 벡터는 발현하고자 하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 3】

- 제 1 항에 있어서, 상기 5'-SAR 는 2 카피(copies)로 존재하는 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 4】

- 제 1 항에 있어서, 상기 동물세포에서 작동하는(operable) 프로모터는 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40(Simian Virus 40) 프로모터, SV40E1 프로모터, HSV(Herpes simplex virus)의 tk 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF1(elongation factor-1 alpha) 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2(interleukin-2) 유전자의 프로모터, 인간 IFN(interferon) 유전자의 프로모터, 인간 IL-4(interleukin-4) 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 또는 인간 GM-CSF(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 유전자의 프로모터인 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 폴리아데닐화 서열은 소성장 호르몬(Bovine Growth Hormone), HSV(Herpes simplex virus) 유래 TK(Thymidine Kinase) 또는 SV40(Simian virus 40) 유래 폴리 아데닐화 서열인 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 동물세포는 CHO(Chinese hamster ovary), VERO, HeLa 세포, WI38, BHK(Baby hamster kidney), COS 세포 또는 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포인 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 7】

제 2 항에 있어서, 상기 단백질은 호르몬, 사이토카인, 항체, 펩타이드 앵타머, 어드넥틴(AdNectin), 어피바디(affibody), 아비머(Avimer) 또는 쿠니쯔 도메인(Kunitz domain)인 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 단백질은 EPO(erythropoietin), EPO 유사체 또는 항-HER2(Human epidermal growth factor receptor 2) 항체인 것을 특징으로 하는 동물세포용 발현 벡터.

## 【청구항 9】

상기 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 발현 벡터에 의해 형질전환된 동물세포.

## 【청구항 10】

상기 제 9 항의 형질전환된 동물세포를 배양하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법.

Fig. 1

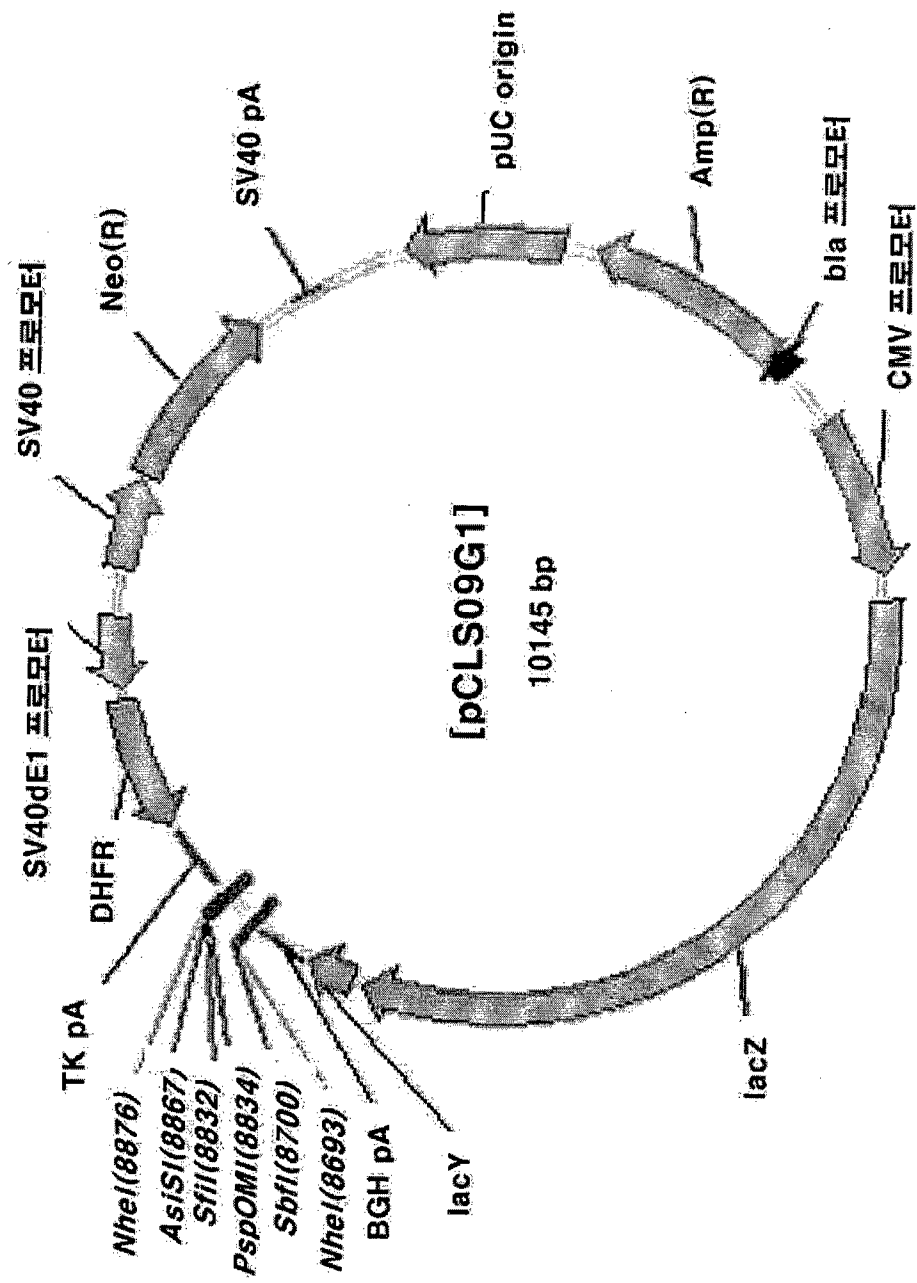


Fig. 2a

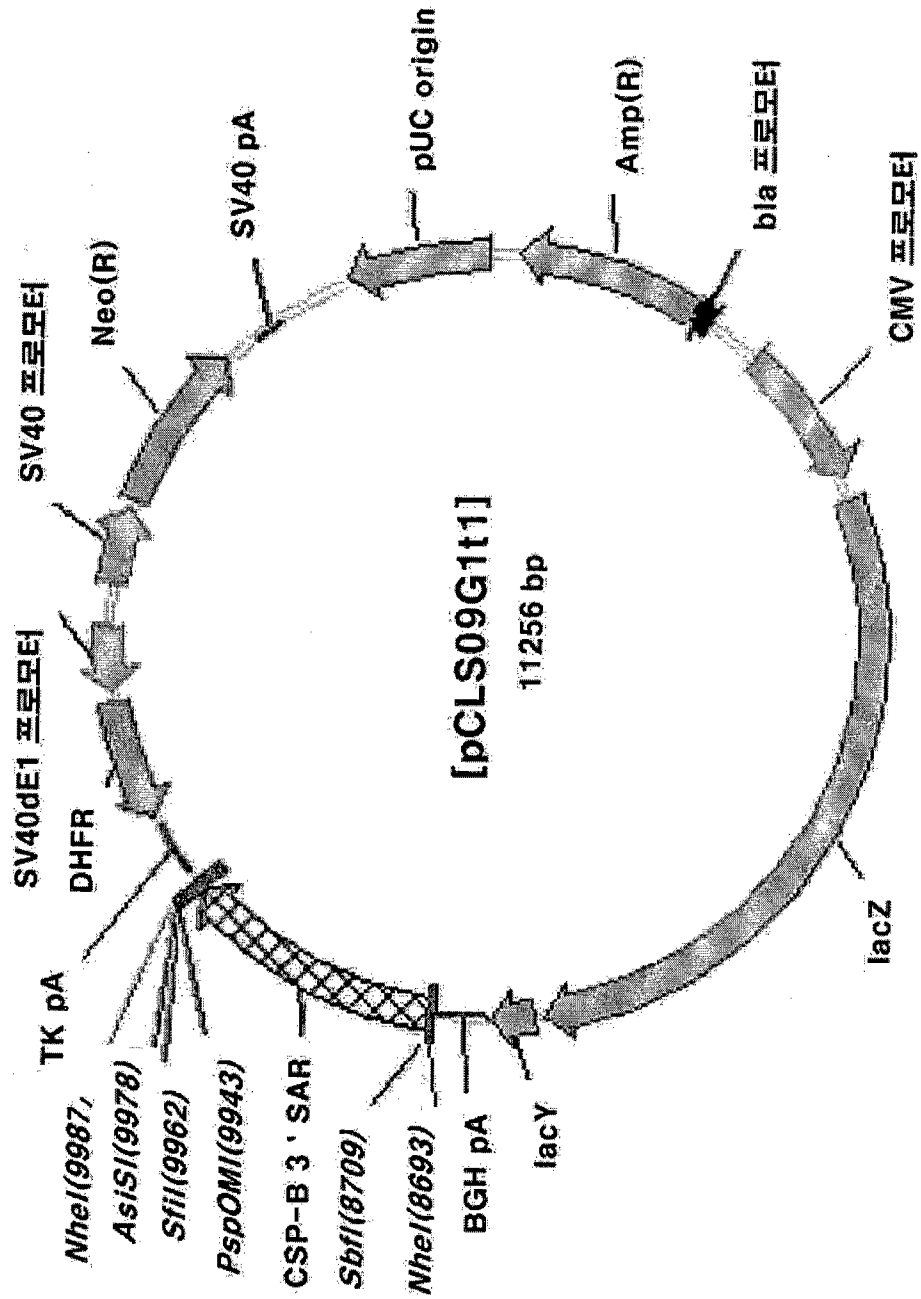


Fig. 2b

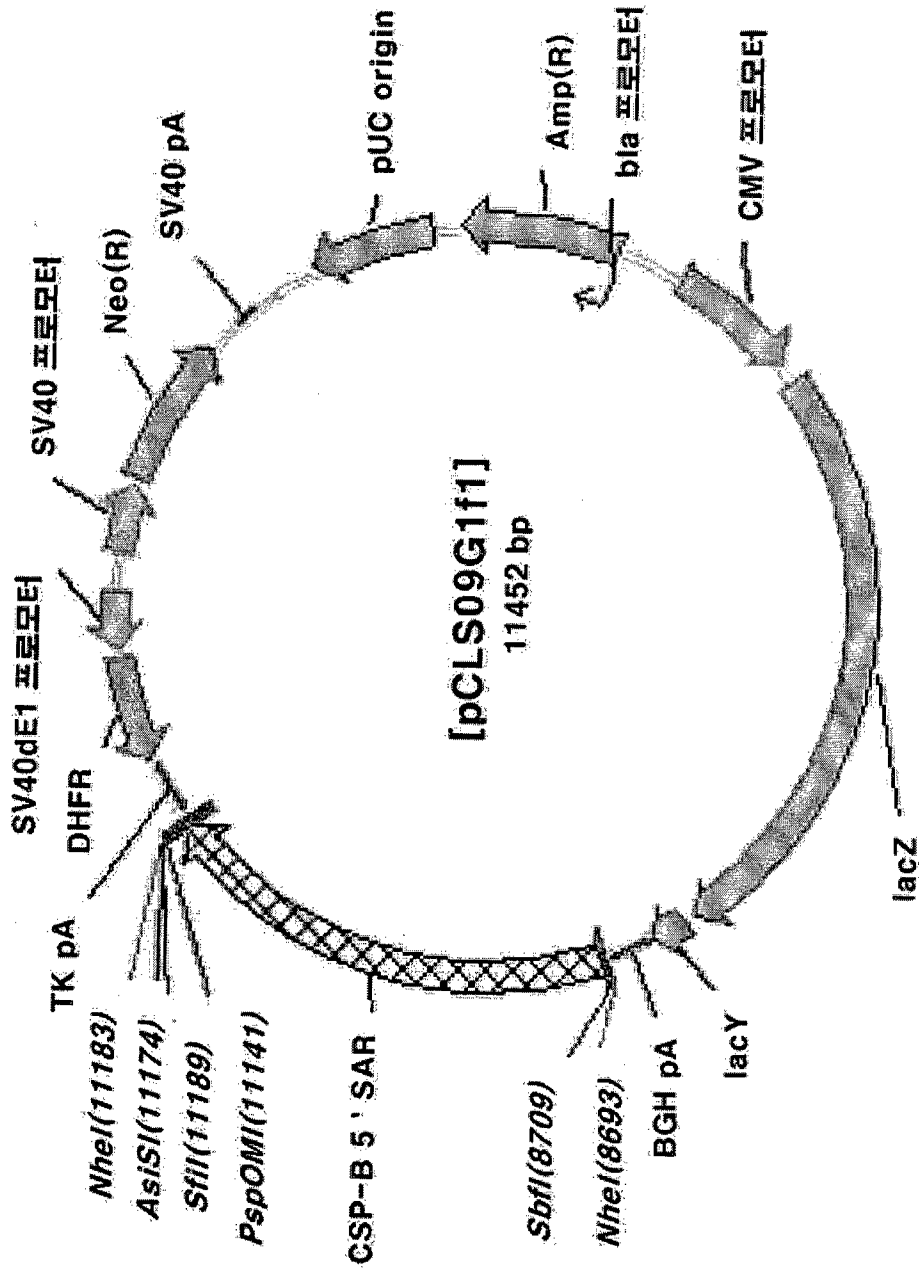
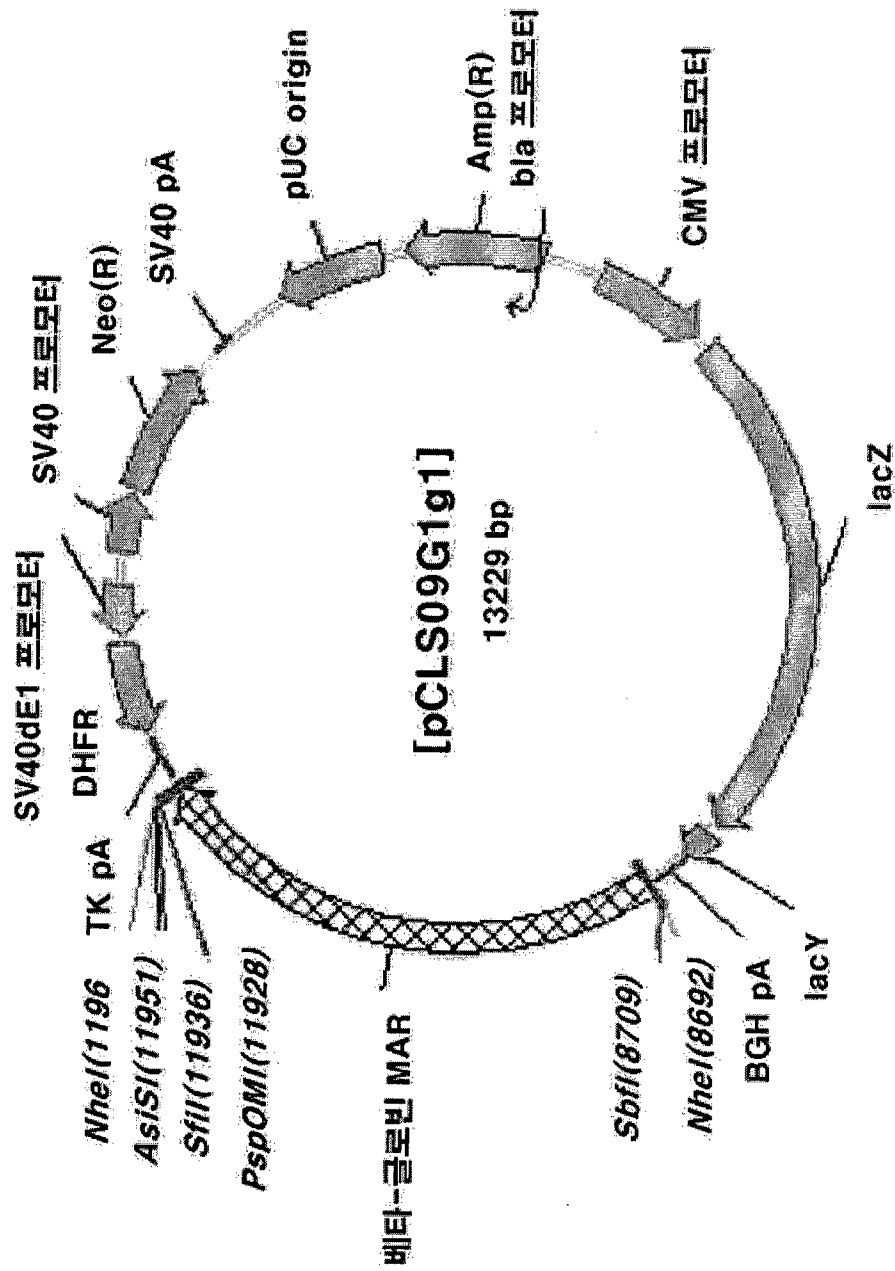
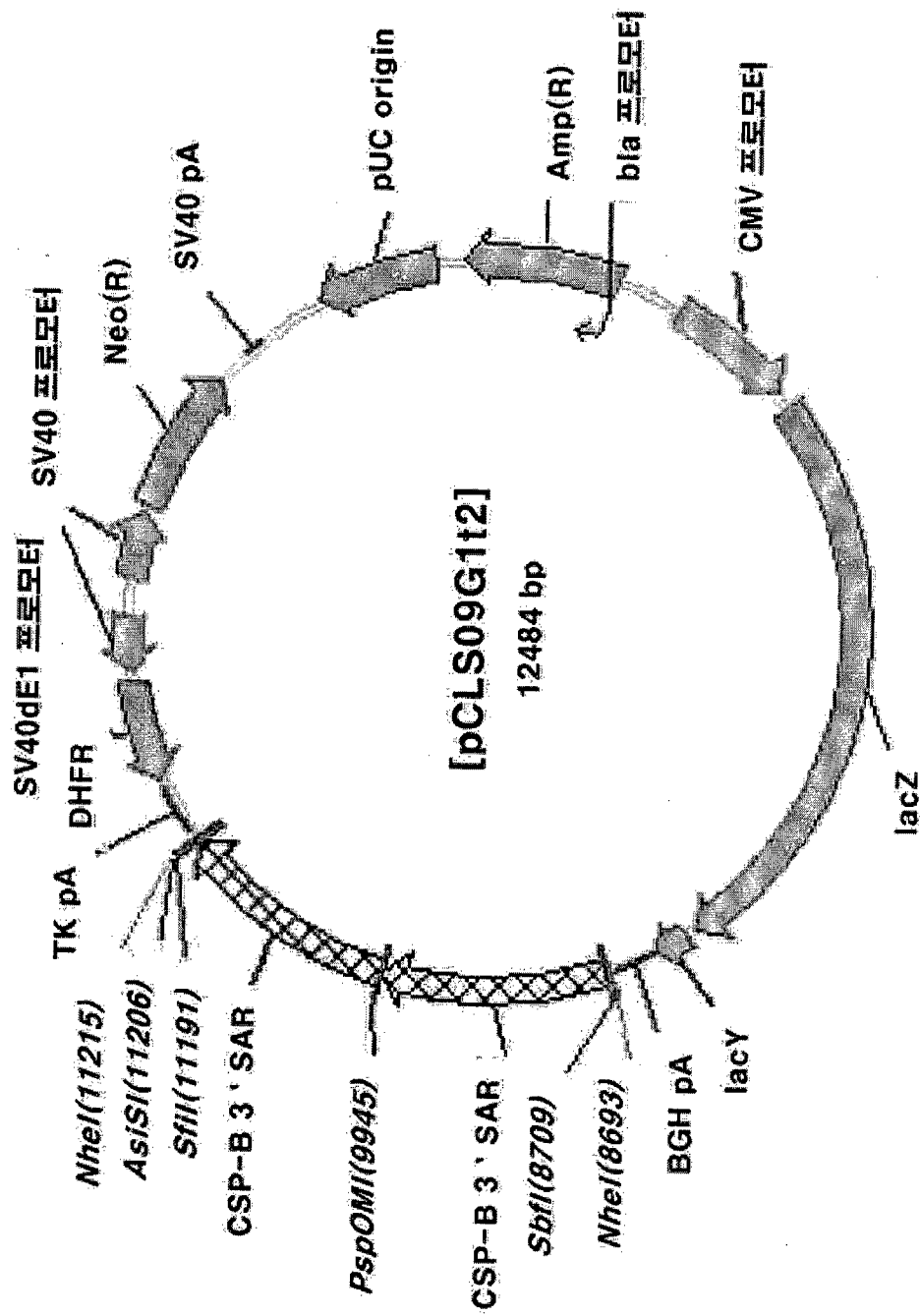


Fig. 2c



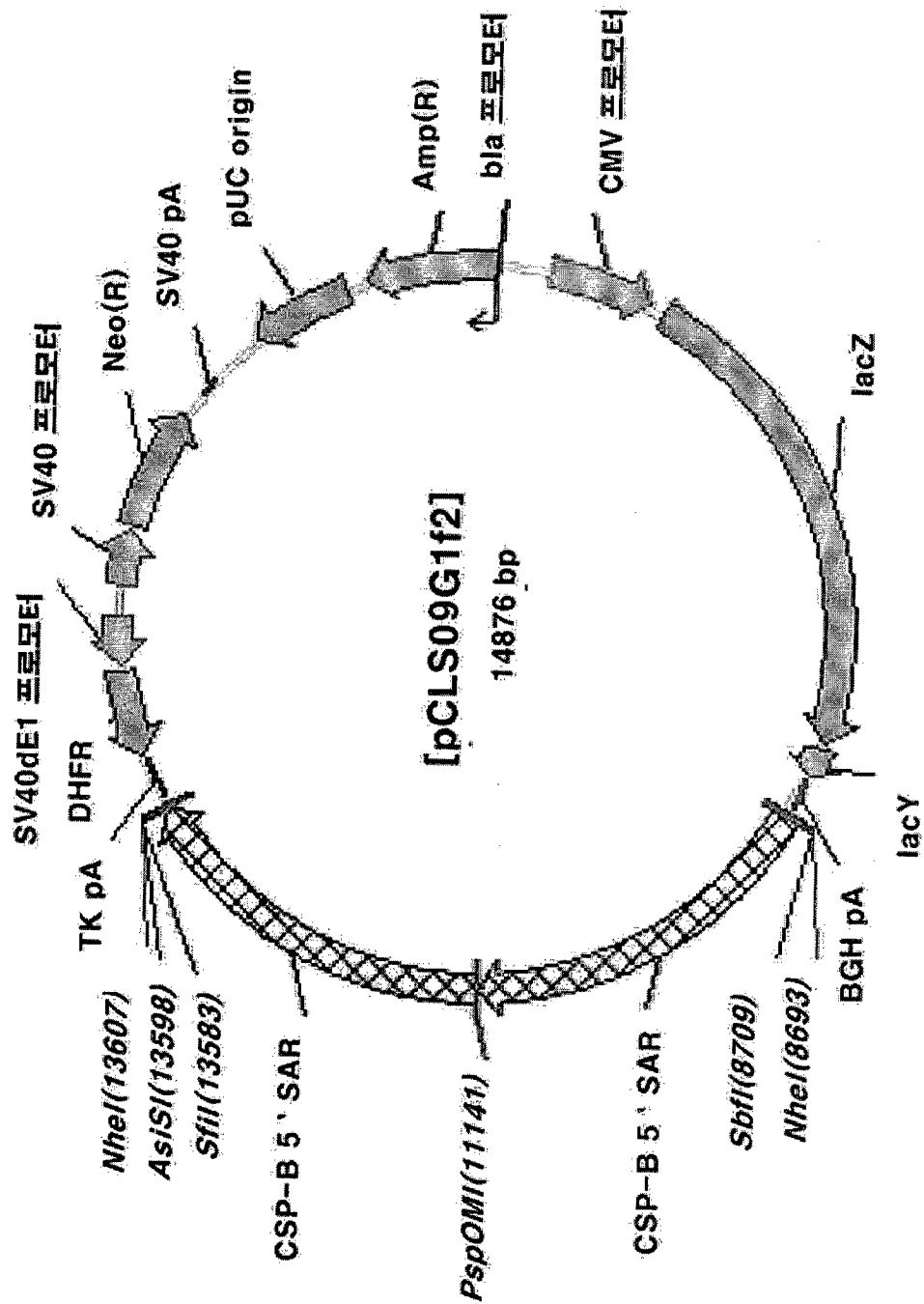
5/23

Fig. 3a



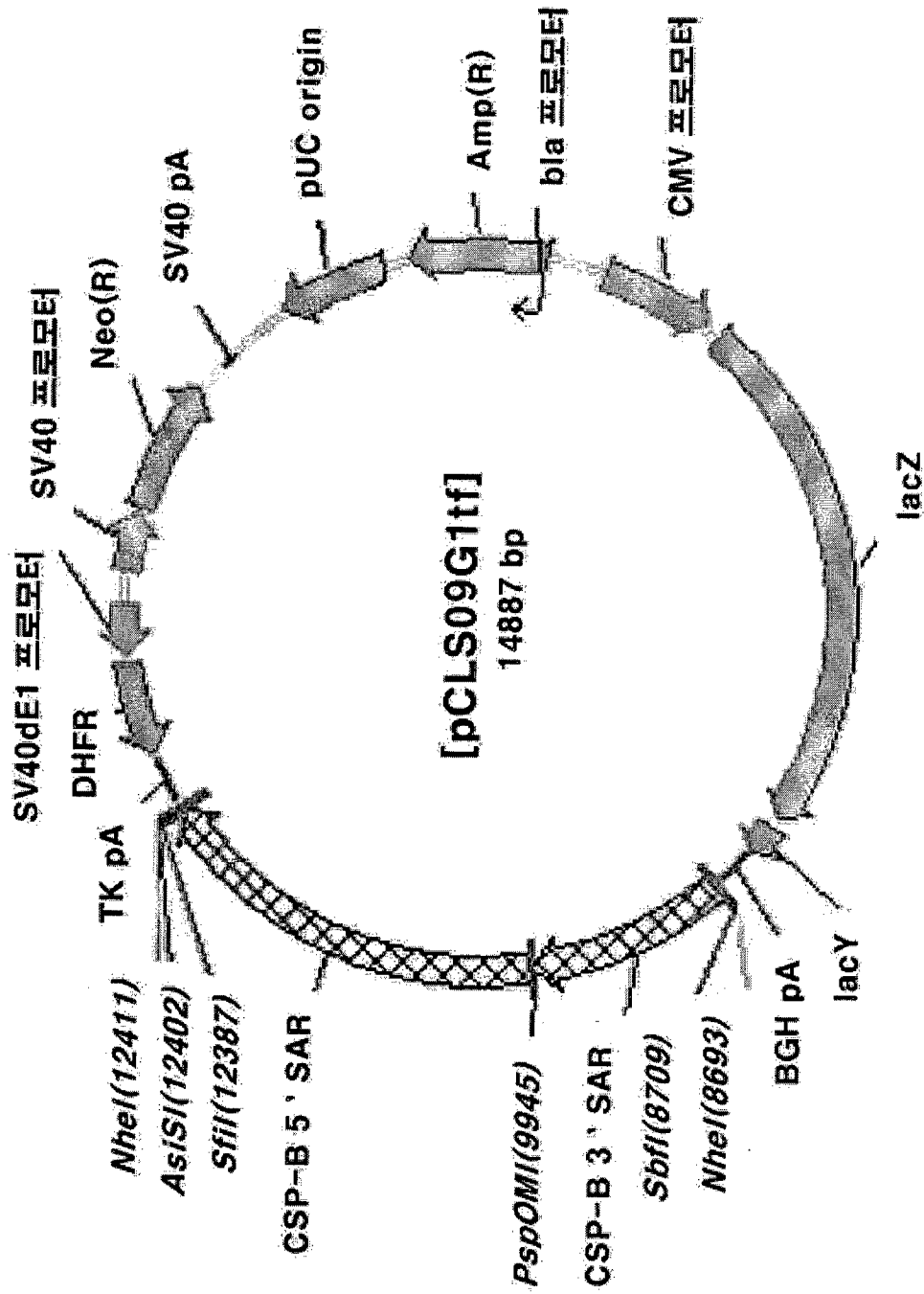
6/23

Fig. 3b



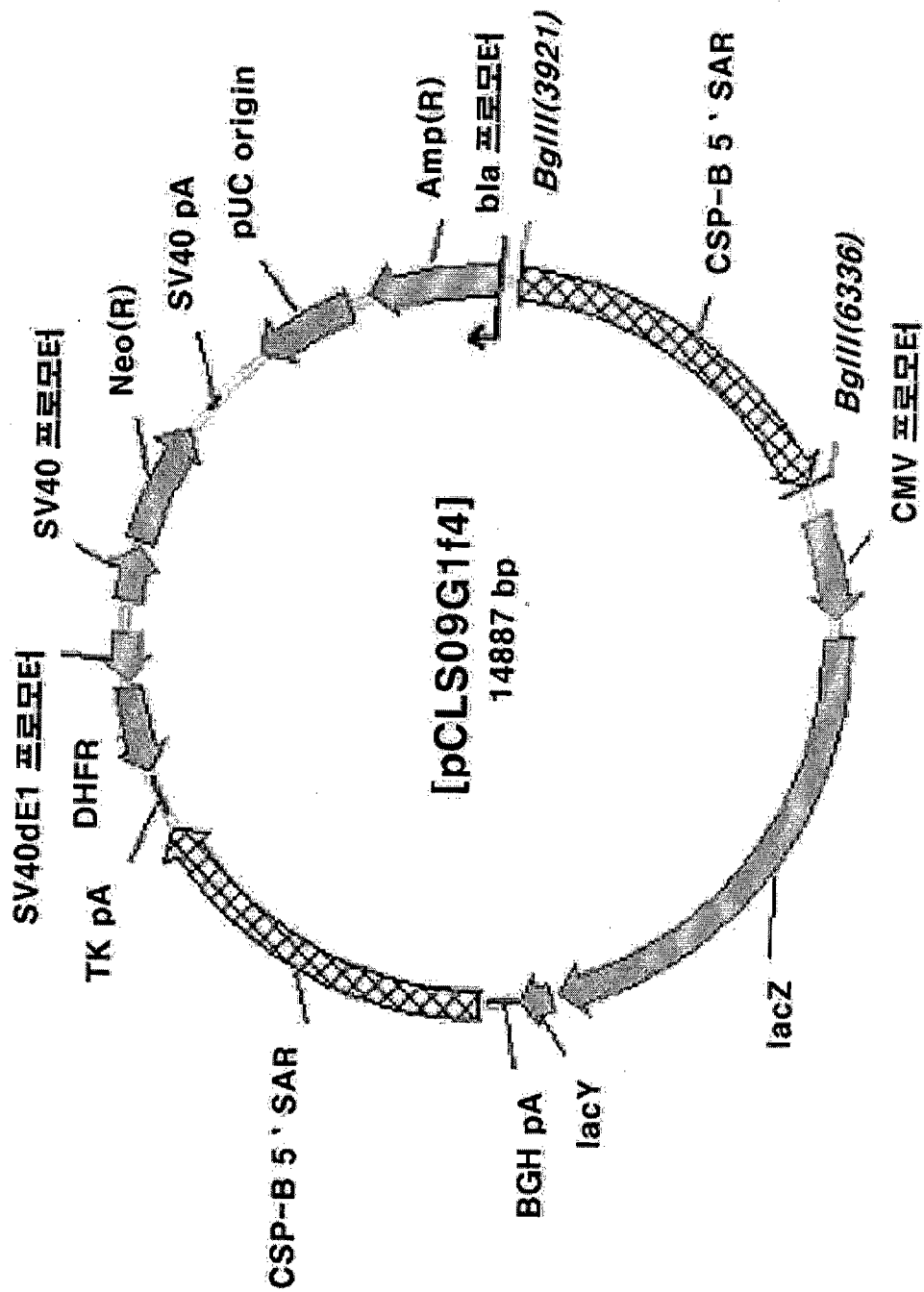
7/23

Fig. 3c



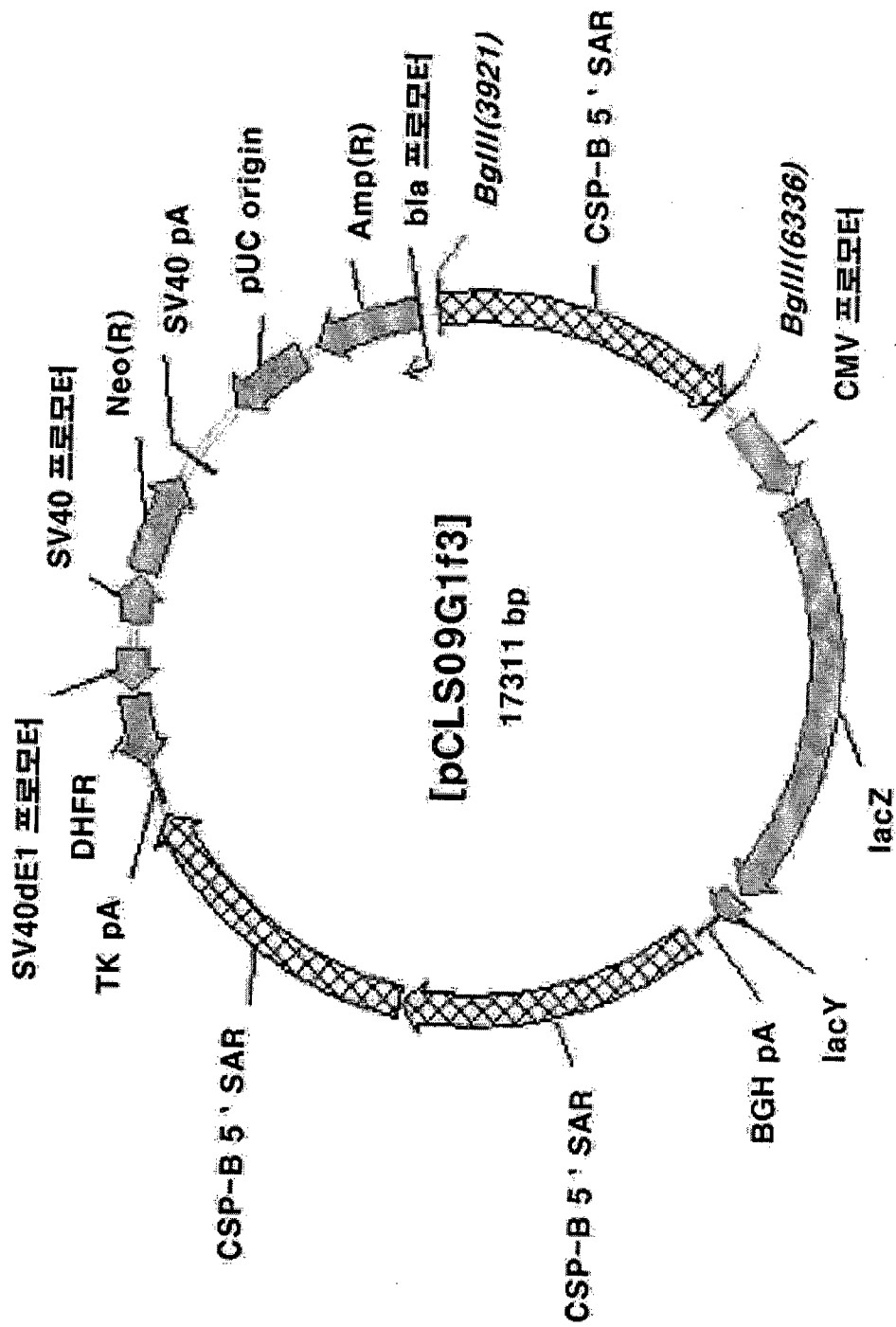
8/23

Fig. 3d



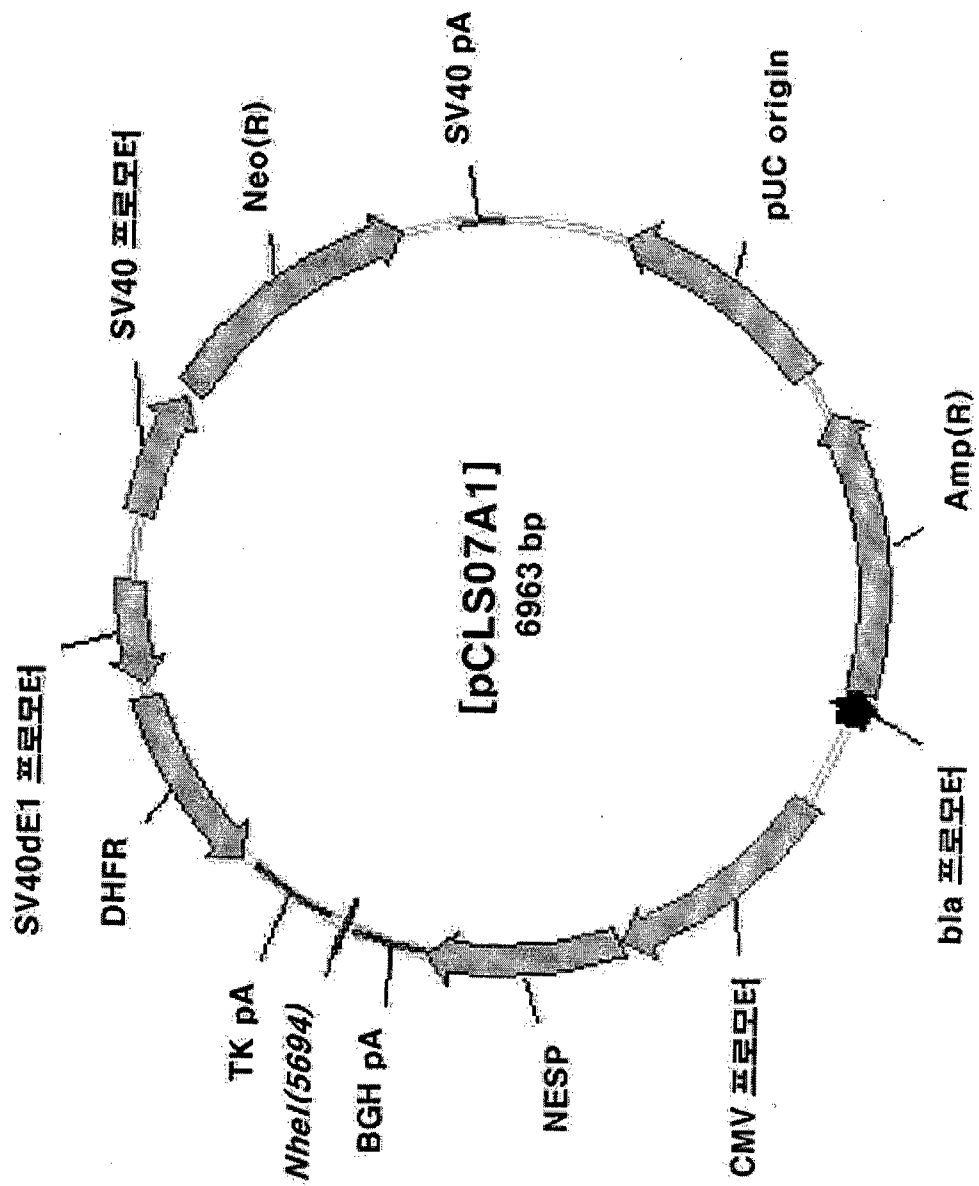
9/23

Fig. 4



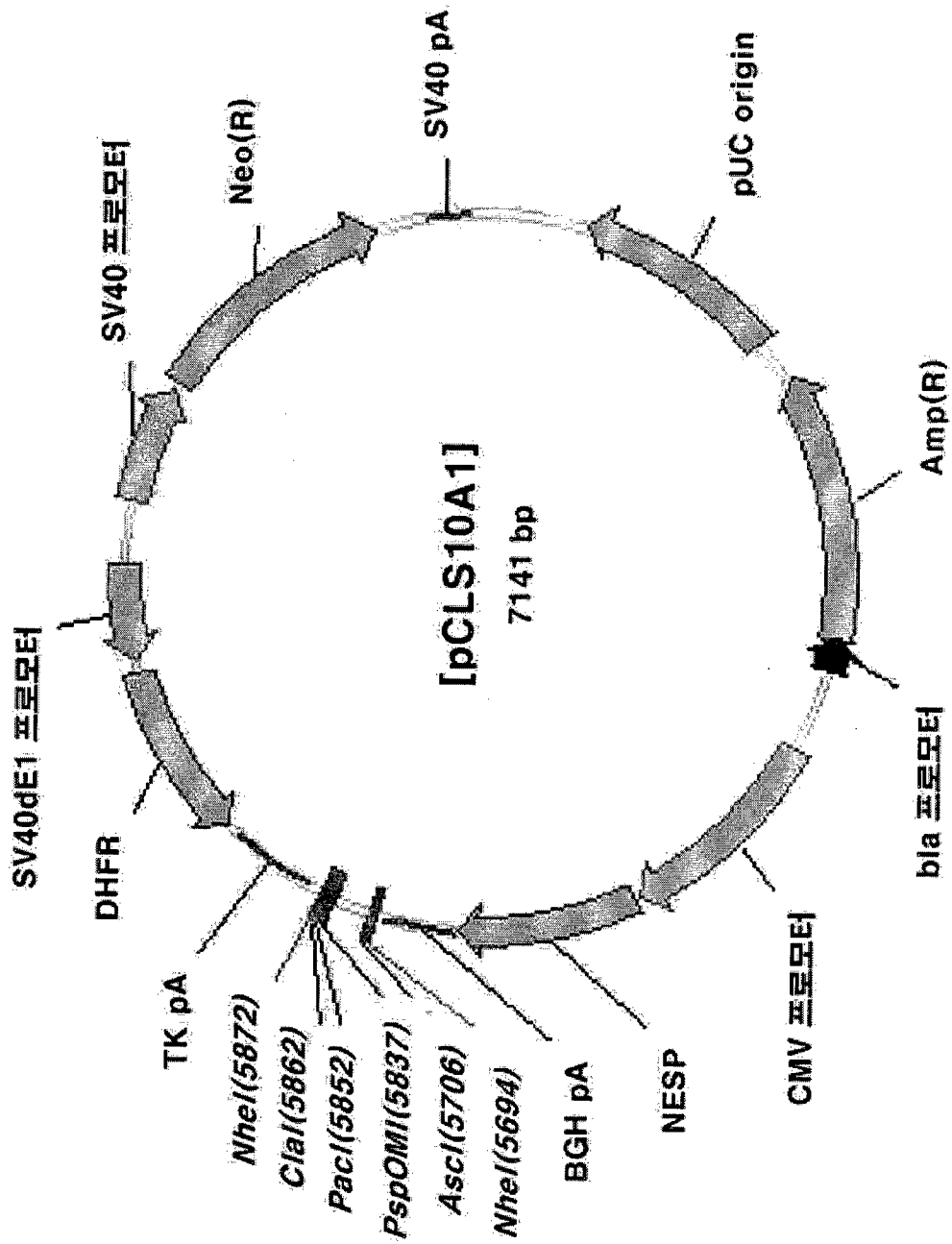
10/23

Fig. 5a



11/23

Fig. 5b



12/23

Fig. 6a

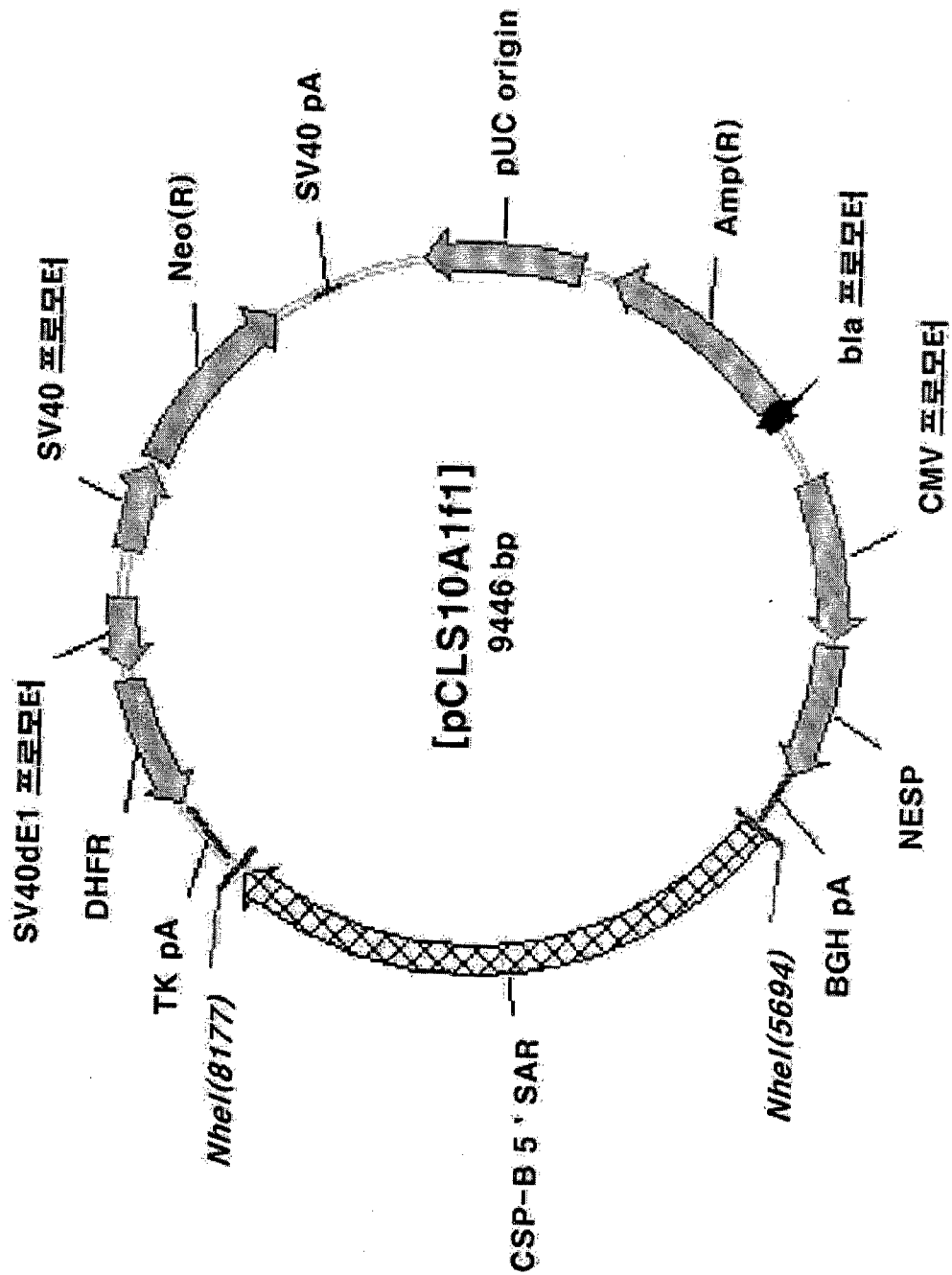


Fig. 6b

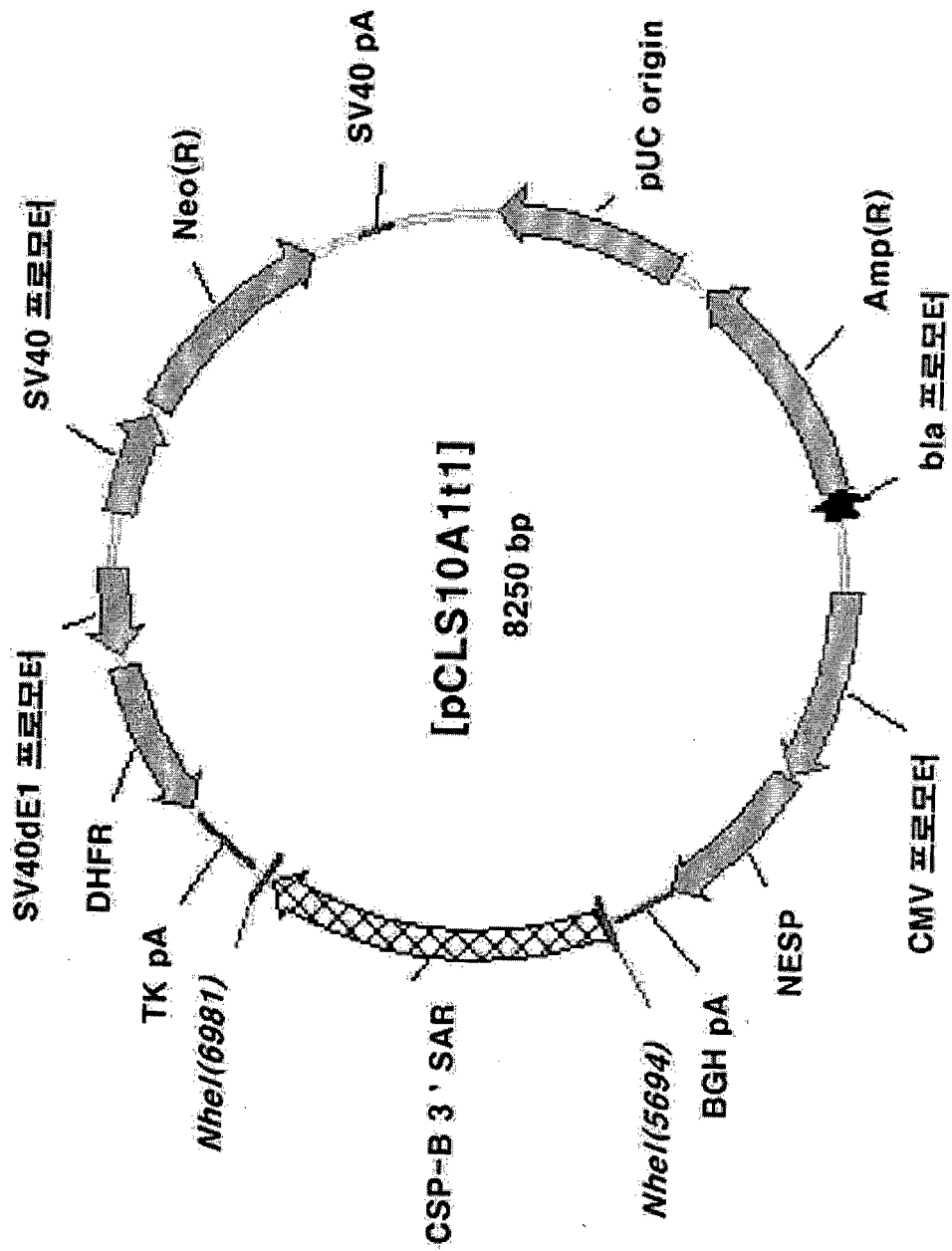


Fig. 7

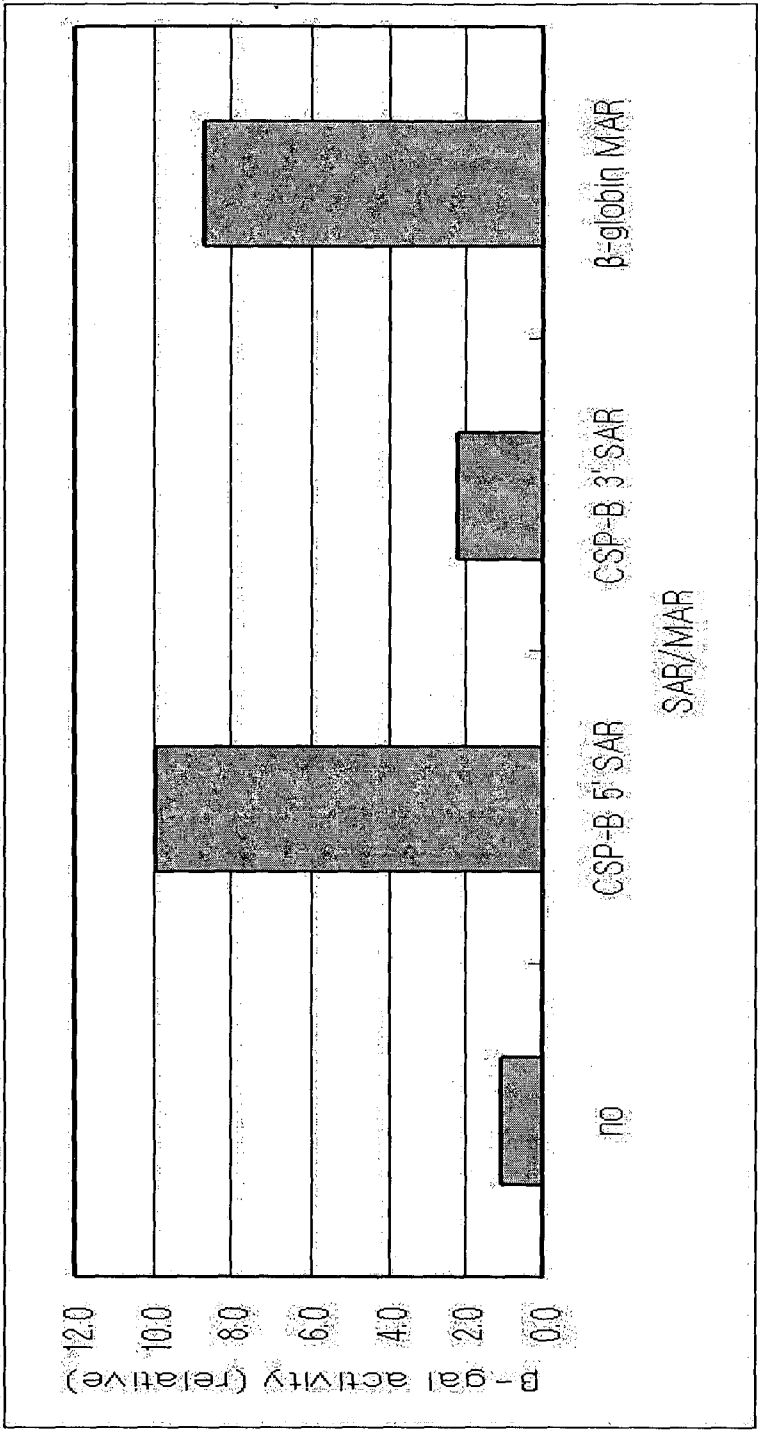


Fig. 8

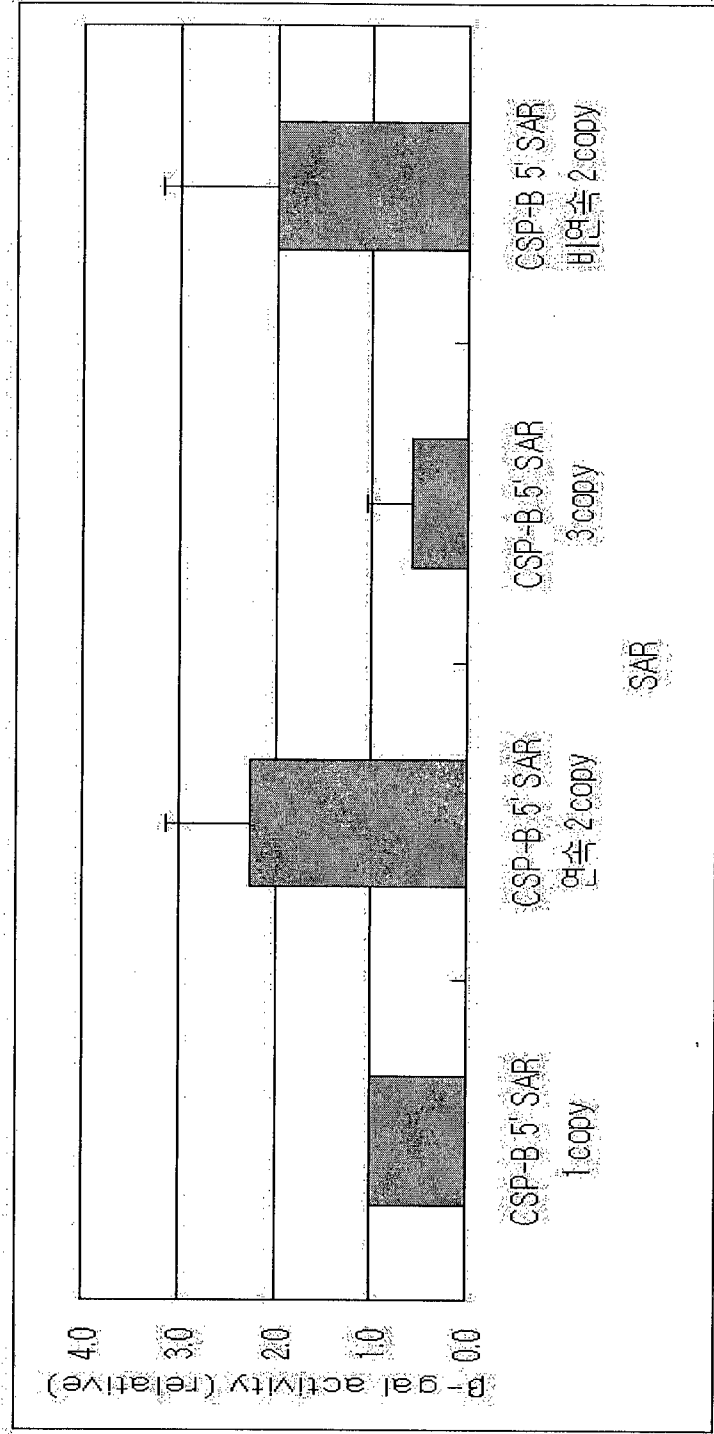
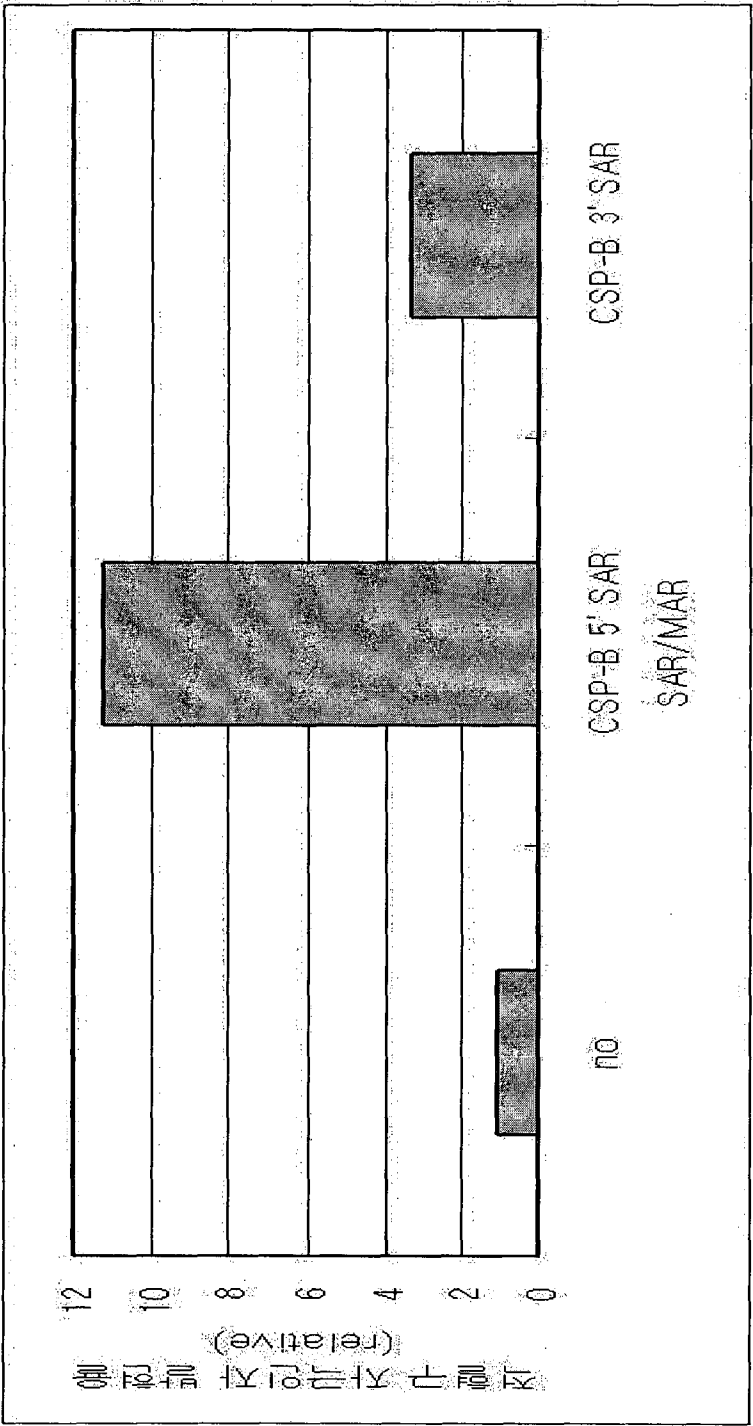


Fig. 9



17/23

Fig. 10

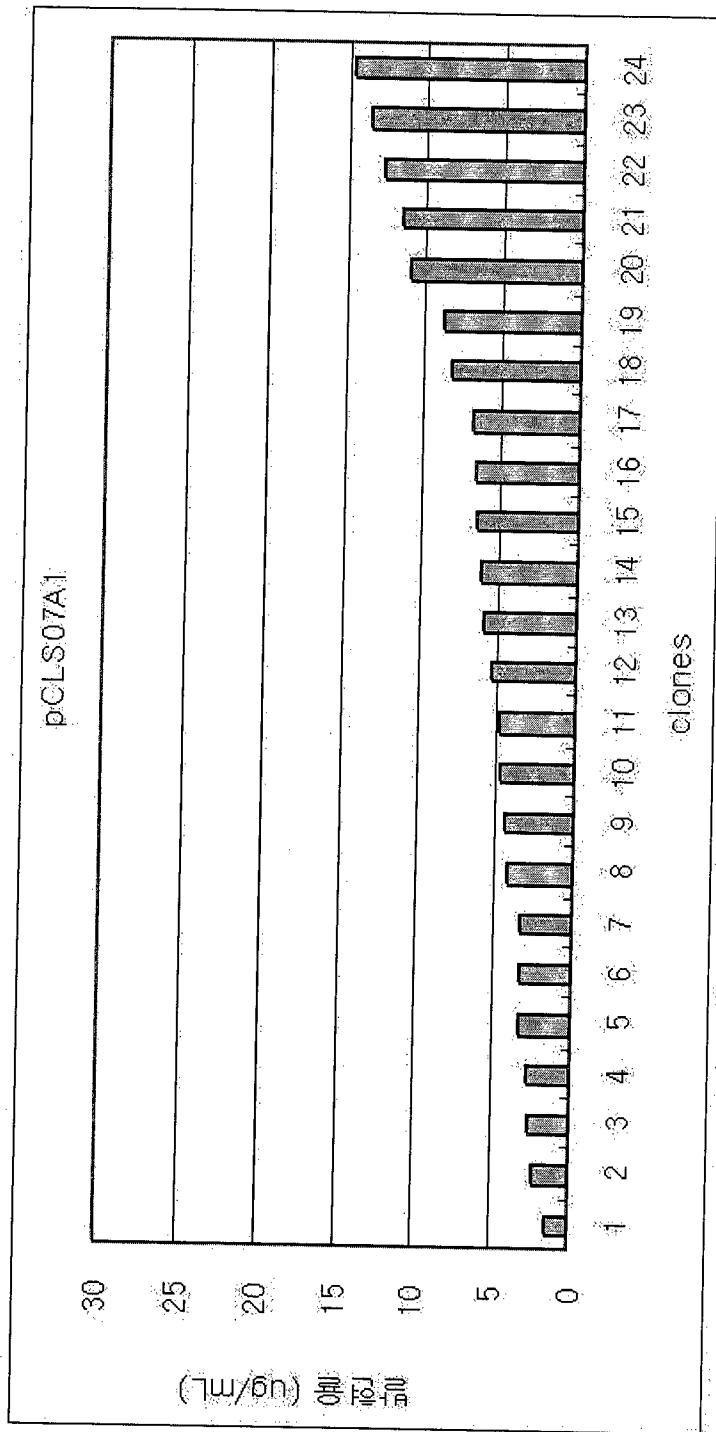


Fig. 11

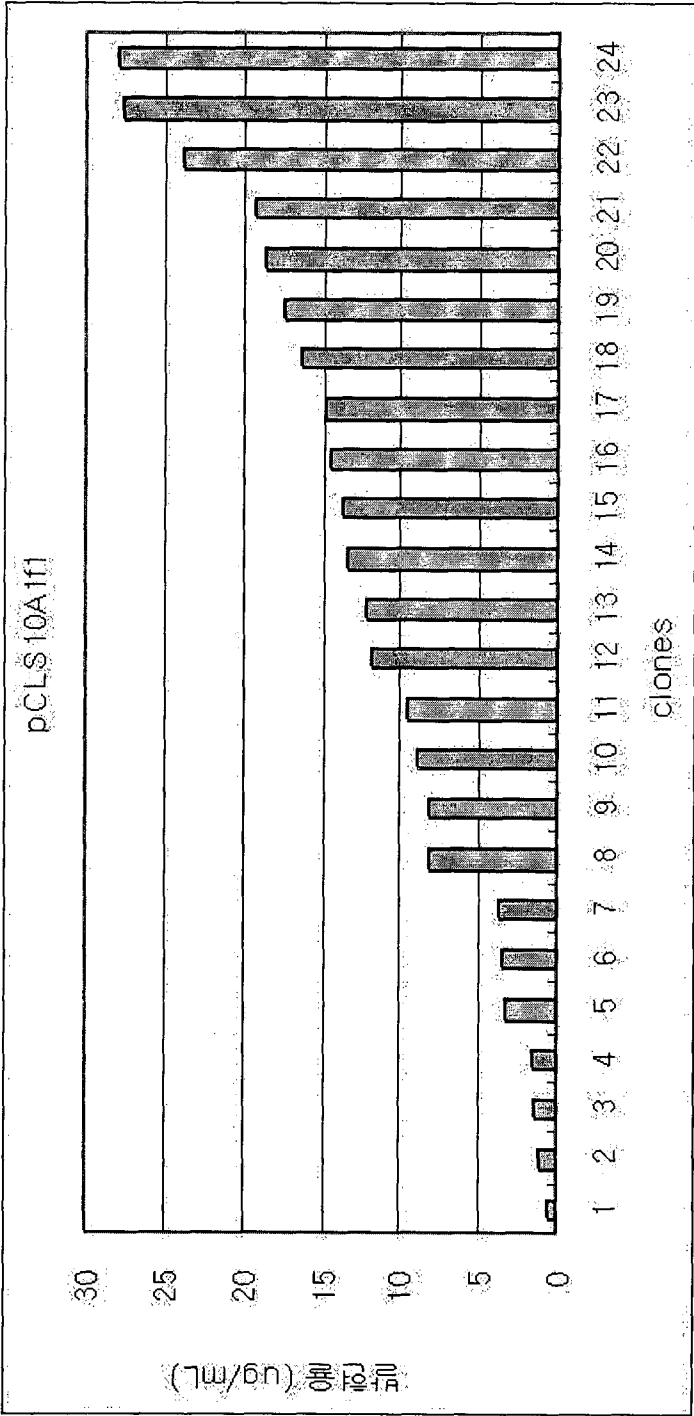
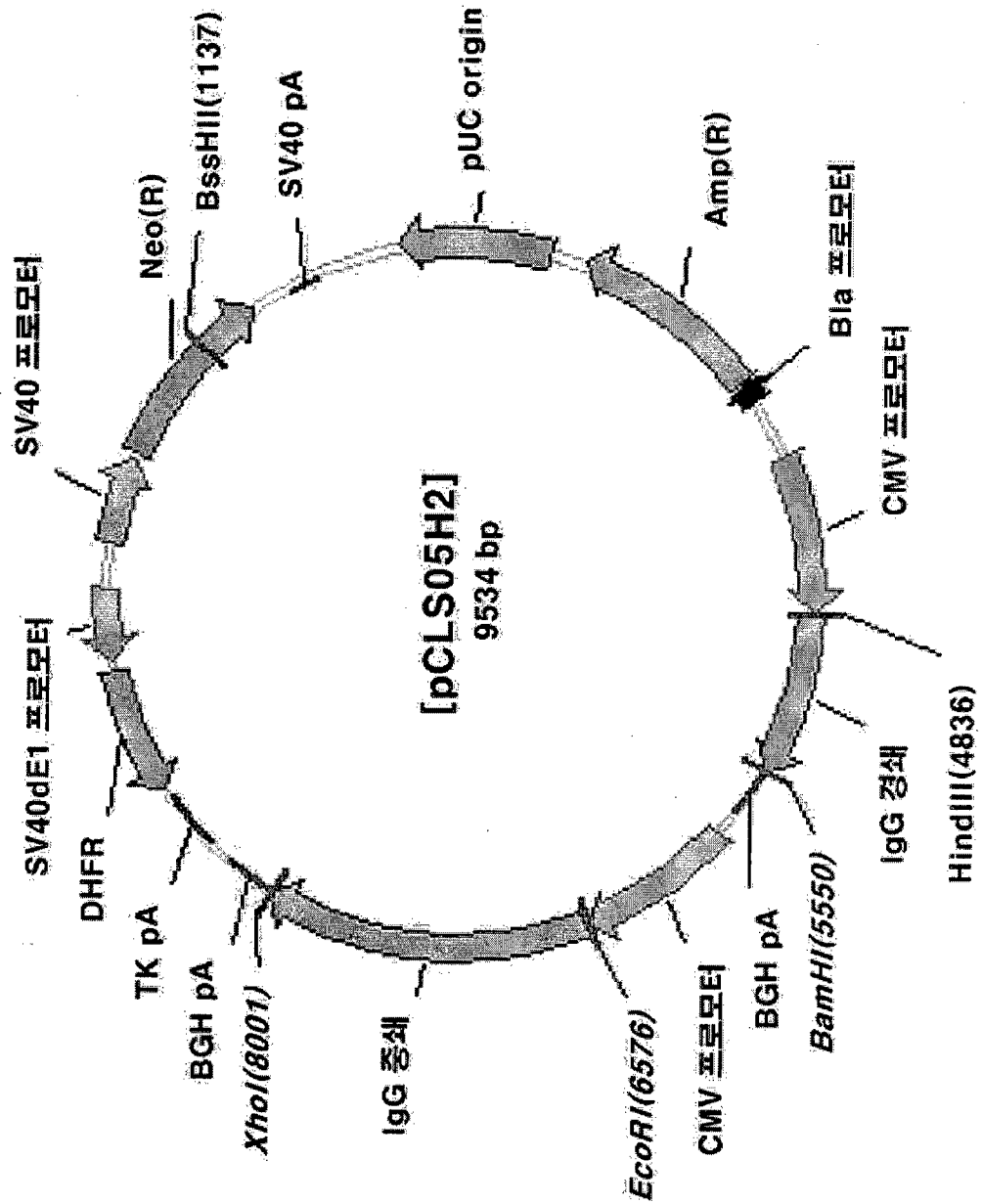


Fig. 12a



20/23

Fig. 12b

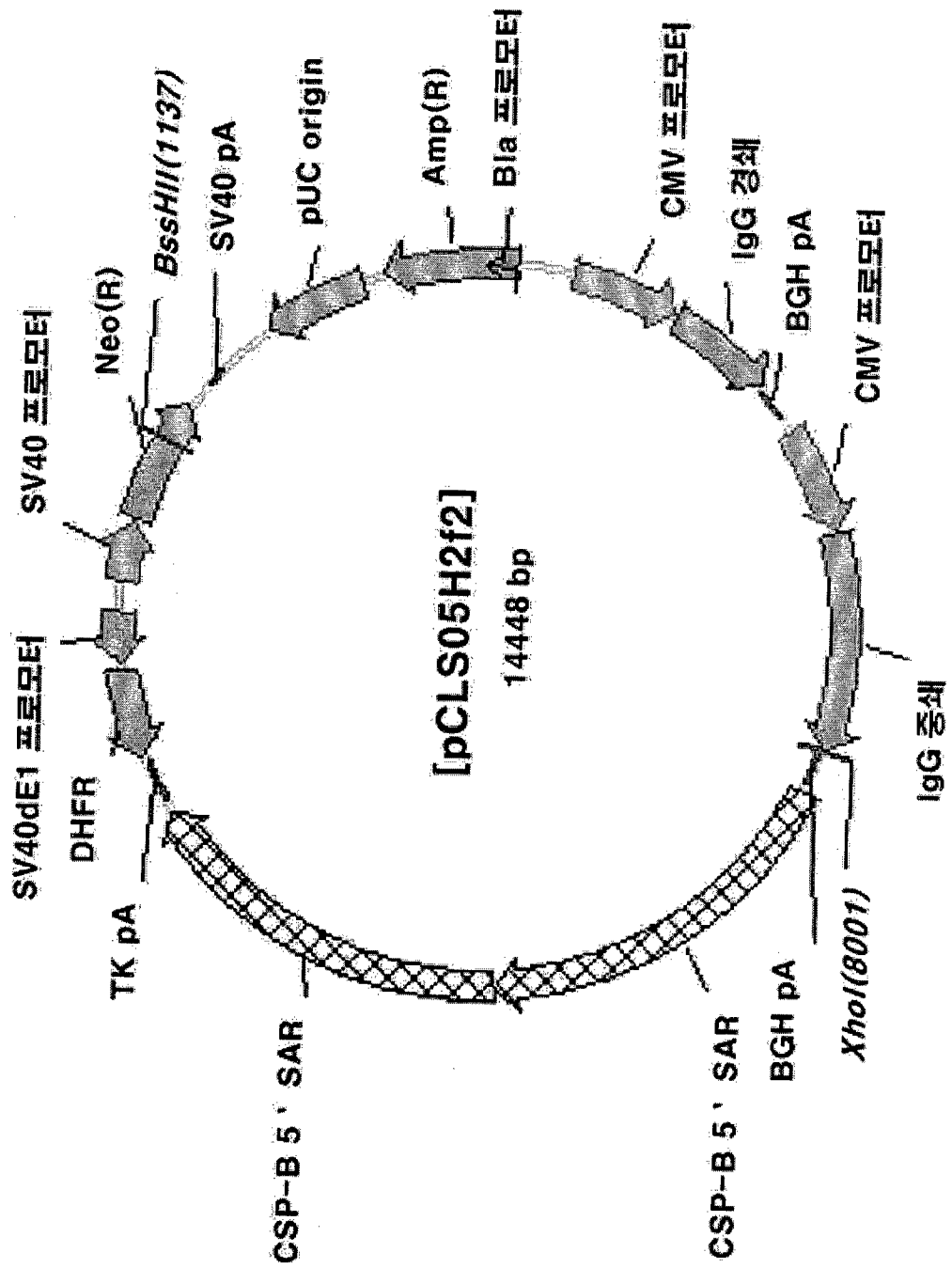


Fig. 13

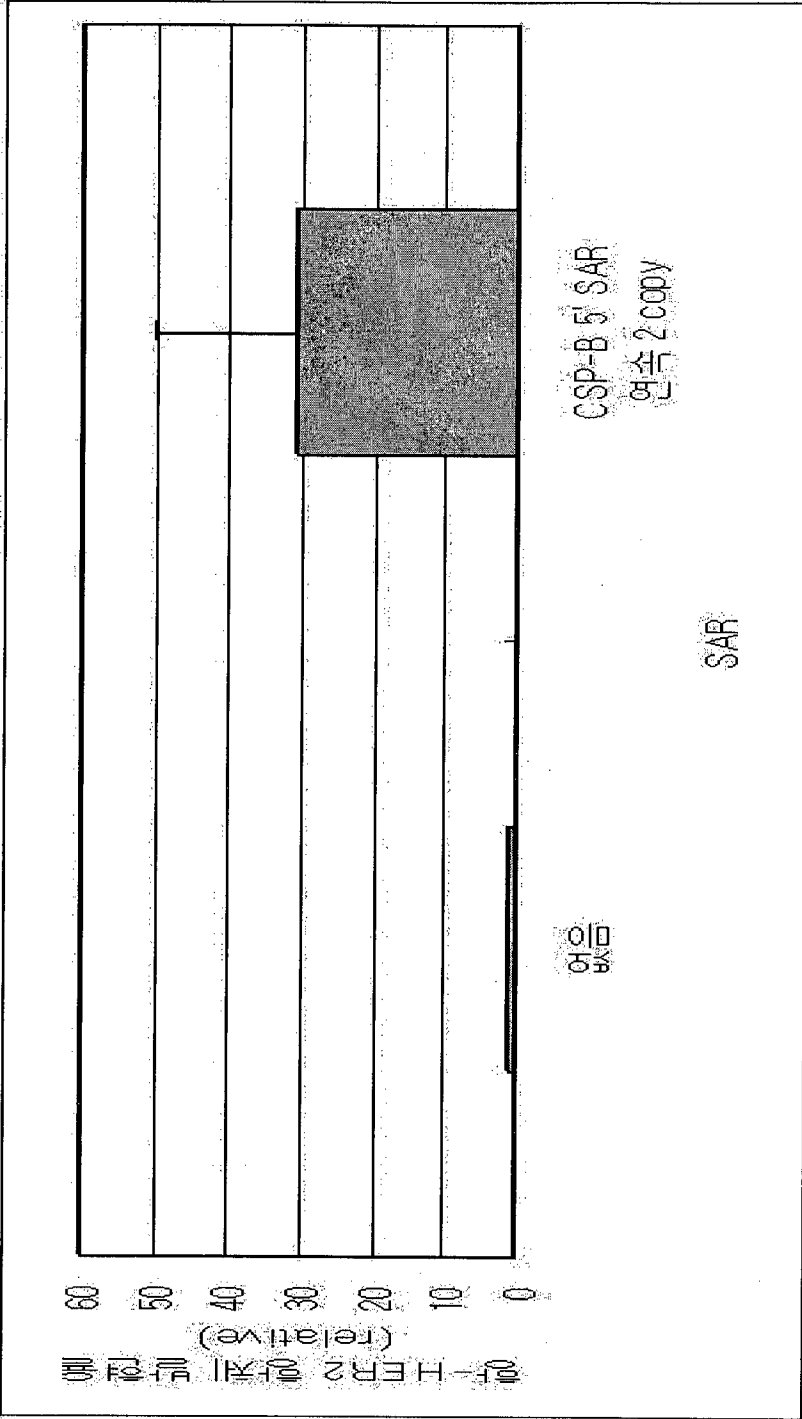


Fig. 14

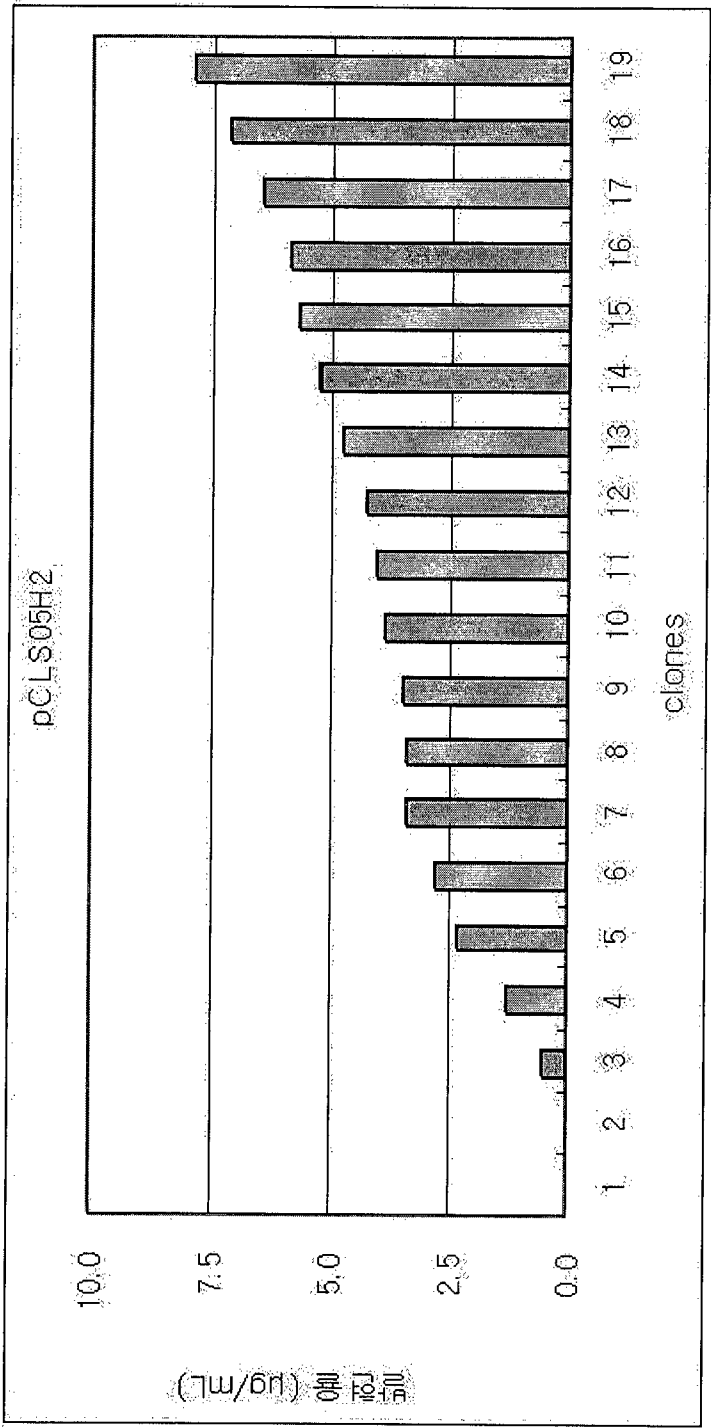


Fig. 15

