



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0101094
(43) 공개일자 2008년11월21일

(51) Int. Cl.

C12N 15/06 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0047343

(22) 출원일자 2007년05월15일

심사청구일자 2007년05월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김익영

서울 광진구 광장동 383번지 신암 밀리안 102동 210호

강수임

경기 성남시 중원구 성남동 3032번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선에

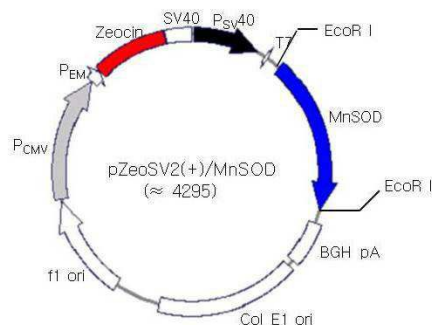
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 제조합 인간 EPO의 생산 증대를 위한 MnSOD가과발현된 부유성 세포주

(57) 요약

본 발명은 제조합 인간 EPO의 생산 증대를 위한 MnSOD가 과발현된 부유성 세포주에 관한 것으로, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 망간 과산화 항돌연변이 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터에 의해 형질전환되어 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포인 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 상기 구성에 의하면, 상기 MnSOD 유전자의 과발현으로 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포의 항산화능을 높여 산화적 스트레스에 저항할 수 있도록 하여 세포주의 수명을 연장시킴으로써 EPO 생산성을 증대시킬 수 있는 이점이 있다. 또한 부작성 세포를 무혈청 배지에서의 배양으로 부유성 세포로 적응시켜, 산업화를 위한 대량생산을 위해 스케일-업(scale-up)의 용이성을 가지는 이점이 있다.

대표도 - 도1



<그림1> pZeoSV2(+)/MnSOD 벡터의 구축

(72) 발명자

권혜미

경기 부천시 원미구 심곡3동 351-8번지

김한천

서울 성북구 안암동5가 40번지 201호

최슬기

서울 종로구 부암동 285 공전빌라 203호

정대원

대구 수성구 만촌2동 태왕리더스 107동 1006호

김익환

서울 광진구 광장동 484번지 현대아파트 301동 1205호

조일택

경기 수원시 권선구 당수동 498번지 6통 1반

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 망간 과산소 항돌연변이 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터에 의해 형질전환되어 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포인 형질전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 동물세포가 CHO *dhfr*⁻ 세포주인 것을 특징으로 하는 형질전환체(기탁번호 KCLRF-BP-00156).

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 CHO *dhfr*⁻ 세포주는 무혈청 배지에서 배양된 부유성 세포주인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 4

제2항의 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 인간 에리트로포이에틴을 제조하는 방법.

청구항 5

제5항에 있어서, 상기 CHO *dhfr*⁻ 세포주를 무혈청 배지에서 배양하여 부유성세포로 적응시키는 단계를 포함하는 인간 에리트로포이에틴을 제조하는 방법.

청구항 6

서열번호 1의 염기서열을 갖는 망간 과산소 항돌연변이 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 동물세포의 발현벡터.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 재조합 인간 에리트로포이에틴(erythropoietin, 이하 'EPO' 라고 약칭함)을 효율적으로 대량 생산하는 세포주에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 EPO 생산 증대를 위한 MnSOD가 과발현된 세포주에 관한 것이다.
- <9> EPO는 적혈구 생산에 관계하는 조혈촉진 호르몬으로, 골수 내에서 생성된 적아구를 적혈구로 분화시키는 당단백질이다. 이러한 EPO는 인체에서 신장의 상피세포에서 생성되므로, 신장이 이상이 있는 경우 EPO의 생성이 감소되어 극심한 빈혈을 초래하게 된다(Jacobson, L.O., Nature, 179;633, 1947). 따라서 EPO는 급, 만성 신부전 환자의 빈혈증 치료제로 사용되며 나아가 항암 및 AIDS 보조치료제로도 쓰이는 등 그 적용범위가 점점 확대되는 추세에 있다.
- <10> EPO를 얻기 위해 초기에는 양의 혈장, 사람의 오줌 등으로부터 추출하는 방법이 시도되었으나, 대량생산이 어렵고 고 순도의 정제가 요구되는 단점이 있었다.
- <11> 그 후, 유전공학적 방법의 발달로 인간 EPO를 분리하고 이를 벡터에 삽입시킨 후 포유동물 세포를 형질전환시킴으로서, 순수한 인간 EPO를 생산하는 방법이 개발되었다(Jacobs et al., Nature, 313, 806, 1985; Lin et al., Proc. Natl. Sci. U.S.A. 82.7580, 1985).
- <12> 즉, 유용단백질 발현에 대표적으로 이용되는 동물세포인 CHO *dhfr*⁻ (dihydrofolate reductase-deficient Chinese Hamster Ovary)를 이용하여 고부가가치의 유용 단백질인 EPO를 생산하는 동물 세포주의 개발을 통해 그 생산량을 증대시키고자 하였다.

- <13> 상기 형질전환된 CHO 세포는 메토타렉세이트(MTX)를 첨가한 배지에서 단계적으로 세포를 적응시켜 EPO 유전자를 증폭시킴으로서 EPO의 생산량을 증가시키고자 하였으나(Malik et al., DNA and Cell Biol., 11, 453, 1992), 이러한 방법은 오랜 배양기간이 필요하고, 생산비용이 높아지는 문제점이 있었다.
- <14> 나아가 동물세포주의 장기배양 시에 나타나는 여러 가지 문제점들은 EPO의 지속적인 생산을 어렵게 한다. 이런 문제점들은 세포 간 접촉 저해(cell-to-cell contact inhibition), pH의 저하, 산화적 스트레스, 독성이 있는 부산물 (암모니아, 락테이트), 저산소증(hypoxia)과 같은 것들에 의해서 야기된다.
- <15> 이런 문제점들을 해결하기 위해서, 종래에는 새로운 배양액으로 교체하여 주거나 교반(agitation) 혹은 산소의 인위적인 공급으로 이를 극복하려는 시도가 이루어졌었다. 또한 에너지로 이용되는 주된 대사산물을 달리함으로써 세포의 장기배양 시에 야기될 수 있는 문제점을 일부 극복하려는 시도가 진행되었었다.
- <16> 그러나 이와 같은 방법으로 문제점들을 해결하는 것은 유용단백질인 EPO를 생산하는 데 한계가 있고 이런 문제점들을 근본적으로 해결할 수 없었다. 본 발명자들은 상기 문제점들을 근본적으로 해결하기 위해 세포사멸 저항성 세포의 개발을 시도하게 되었다. 즉, 모든 호기성 생물은 정상적인 대사과정을 거치면서 과산화음이온(superoxide radical anion), 수산화기(hydroxyl radical), 과산화수소(hydrogen peroxide) 등을 포함하는 활성 산소종 (ROS)을 부산물로 발생시키게 된다. 이러한 활성산소종이 세포내에서 빨리 그리고 효과적으로 제거되지 않으면 산화적 스트레스로 인해 세포사멸을 가져오게 된다. 본 발명자들은 생산 세포주의 산업화시 발생할 수 있는 여러 문제점들인 활성 산소종 (Reactive Oxygen Species)에 의한 손상이나 생산 세포주의 사멸을 억제하여 궁극적으로 생산 세포주의 수명을 연장시킴으로서 유용 단백질인 EPO 생산성 증대를 도모하고자 하였으며 산업적으로 이용 가능한 우수한 생산 세포주 개발을 시도하게 되었다.
- <17> 한편, 동물세포들은 배지내에서 부유시키거나 담체에 부착시켜 배양할 수 있다. 부유성 세포는 세포가 단독으로 배지 중에 부유한 상태에서 증식할 수 있으나, 부착성 세포인 경우 고체 표면에 부착해야만 증식이 가능하다. 따라서 스케일-업(scale-up)할 때 단위 부피당 최고의 세포밀도를 유지하기 위해 보통 부유성 세포를 주로 이용한다. 일반적으로 생물의약품의 생산에 많이 사용되는 CHO 세포는 원래 부착성 세포이지만 부유성 세포로 적응시킬 수 있다. 부착성 세포를 부유성 세포로 적응시켰을 경우 스케일-업(scale-up)의 용이성과 고밀도의 세포농도를 유지할 수 있는 장점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <18> 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 동물세포주의 대량 배양 시 세포 내에서 자발적으로 생성될 수 있는 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화 효소의 유전자를 포함하여 항산화 능력이 높아 산화적 스트레스에 저항할 수 있어 세포주의 수명을 연장시킴으로써 EPO 생산성이 증대된 세포주를 제공하는 것이다.
- <19> 또한, 본 발명은 부착성 세포인 CHO 세포를 무혈청 배지에서의 배양으로 부유성 세포로 적응시켜, 산업화를 위한 대량생산을 위해 스케일-업(scale-up)의 용이성을 가지는 부유성 CHO 세포를 개발, 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

- <20> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 항산화 효소인 망간 과산화 항돌연변이 효소(Manganese Superoxide dismutase, 이하 'MnSOD' 라고 함) 유전자를 CHO *dhfr*⁻ 세포주에 도입함을 통하여 항산화능을 높여 산화적 스트레스에 저항할 수 있어 세포주의 수명이 연장됨으로써 EPO 생산성이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- <21> 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 망간 과산화 항돌연변이 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터 및 이에 의해 형질전환되어 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포인 형질전환체를 제공한다.
- <22> 바람직하게는 상기 동물세포가 CHO *dhfr*⁻ 세포주이며, 무혈청 배지에서 배양된 부유성 세포주이다.
- <23> 또한 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 인간 에리트로포이에틴을 제조하는 방법을 제공한다.
- <24> 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

- <25> 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 망간 과산화 환원효소가 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터에 의해 형질전환되어 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포인 형질전환체를 제공한다.
- <26> 상기 망간 과산화 환원효소가 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터는 EcoRI로 자른 1.0kb 이하의 인간 MnSOD 유전자(ATCC #59946)를 EcoRI로 자른 pZeoSV2(+) (Invitrogen)벡터에 클로닝하여 얻을 수 있고 이렇게 얻어진 서열번호 1의 염기서열을 갖는 플라스미드는 도 1에 나타나 있다(pZeoSV2(+)/MnSOD).
- <27> 본 발명의 벡터로 형질전환되어 인간 에리트로포이에틴을 생성하는 능력을 갖는 동물세포로는 BHK, COS-7, CHO 등을 예로 들 수 있고, CHO가 바람직하다.
- <28> 본 발명에서는 부착성 세포인 CHO 세포를 무혈청 배지에서의 배양으로 부유성 세포로 적응시켜, 산업화를 위한 대량생산을 위해 스케일-업(scale-up)의 용이성을 가지는 부유성 CHO 세포를 제공한다.
- <29> 특히 CHO *dhfr*⁻ (dihydrofolate reductase-deficient Chinese Hamster Ovary) 세포는 유용단백질을 발현하는 대표적인 동물세포로서, MnSOD 유전자가 과발현된 CHO *dhfr*⁻의 개발을 통해 고부가가치의 유용 단백질인 EPO의 생산량을 증대시킬 수 있다.
- <30> 인간 EPO 유전자를 클로닝하기 위해서 pCIneo (Promega) 벡터의 XhoI 와 XbaI 제한 효소로 자른 부위를 EPO cDNA의 XhoI 와 XbaI 부위의 끝과 연결시키고 이로 인해 얻어진 플라스미드 pCIneo/EPO를 CHO *dhfr*⁻ 세포주에 도입시켜 CHO/*dhfr*⁻/EPO 세포주를 얻을 수 있다.
- <31> 상기 CHO/*dhfr*⁻/EPO 세포주에 MnSOD 유전자를 포함하는 벡터를 도입하여 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주(기탁번호 KCLRF-BP-00156)를 구축할 수 있다.
- <32> 이렇게 구축된 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주는 MnSOD 발현양 및 SOD 활성이 높은 것으로 나타났다(도 3 및 도 4 참조).
- <33> 나아가, 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주는 세포 내에서의 EPO 발현양 및 세포 밖으로 분비되는 EPO 발현양이 증대되는 것으로 나타났다(도 5 및 도 6 참조).
- <34> 또한, 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주에 있어서 EPO의 생물학적 활성도 우수한 것으로 나타났다(도 7 참조).
- <35> 따라서 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주를 이용하면 인간 EPO 제조방법에 있어서 EPO를 효율적으로 대량 생산할 수 있다.
- <36> 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 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <37> 실시예 1. MnSOD 발현 벡터 구축(Construction of the expression vector for MnSOD)
- <38> 인간 EPO 유전자(고려대학교 김익환 세포배양공학연구실)를 서브클로닝하기 위해서 pCIneo (Promega) 벡터의 XhoI 와 XbaI 제한 효소로 자른 부위를 EPO cDNA의 XhoI 와 XbaI 부위의 끝과 연결시켰다. 이로 인해 얻어진 플라스미드 pCIneo/EPO를 CHO *dhfr*⁻ 세포주(ATCC #CRL-9096)에 도입시켰고 이를 CHO/*dhfr*⁻/EPO라 명칭하였다.
- <39> 또한 인간 MnSOD 유전자가 도입된 세포주를 구축하기 위하여 phMnSOD4 벡터(ATCC #59946)로부터 EcoRI로 자른 1.0kb 이하의 인간 MnSOD 유전자를 EcoRI로 자른 pZeoSV2(+) (Invitrogen)벡터에 클로닝하였다. 이로 인해 얻어진 플라스미드는 pZeoSV2(+)/MnSOD (도 1)라고 명칭하였다. 상기 플라스미드에 포함된 MnSOD 유전자는 Genbank의 Y00985 염기서열 중 cDNA 부분으로 서열번호 1로 나타내었다.
- <40> 앞서 구축된 CHO/*dhfr*⁻/EPO 세포주에 lipofectamine system (LipofectAmineTM 2000 reagent)(Gibco-BRL)을 이용하여 pZeoSV2(+)/MnSOD를 도입하여 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주를 구축하였고 제오신(Zeocin)으로 선별(selection)하였다. 도입된 MnSOD cDNA의 여부는 발현 벡터를 제한효소 EcoRI과 BamHI으로 절단하여 DNA 겔(DNA gel)에서 확인하였다(도 2). 상기 제작된 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주는 한국세포주연구재단(KCLRF:

Korean Cell Line Research Foundation)에 2007년 4월 12일자로 기탁되어 기탁번호 KCLRF-BP-00156을 부여받았다.

- <41> 실시예 2. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석법과 SOD 활성분석(SOD activity assay)을 통한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주의 분석
- <42> 부착성 세포를 무혈청 배지인 CHO S-SFM II(Gibco-BRL)에서의 배양으로 부유성 세포로 적응시켰고, 각 세포주는 얼음처럼 차가운(ice-cold) PBS로 두 번 세척(washing)한 후 용해버퍼(lysis buffer)로 30초의 진탕(vortexing)과 5분의 상온 유지를 5번 반복 후 얼음에서 30분간 유지시켜 용해물(lysate)을 모았다.
- <43> 다음 13000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리한 후에 얻어진 상층액을 각 세포주의 세포추출액으로 모았다. 용해버퍼(lysis buffer)는 10mM HEPES-NaOH(pH 7.9), 10mM KCL, 0.1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 0.5mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 2μg/μl 아프로티닌(aprotinin), 2μg/μl 류펩틴(leupeptin), 0.3% 노니데트(Nonidet) P-40로 조성되었다.
- <44> 상기 세포추출액을 단백질 10μg으로 정량 후 10% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 90V에서 20분, 120V에서 1시간 20분 동안 전기영동하였다. 그리고 웨스턴 블롯(western blot) 분석법을 이용하였고 MnSOD에 특이성을 가지는 토끼 다클론 항-MnSOD 항체(rabbit polyclonal anti-MnSOD antibody, Research diagnostics, INC)를 통해 MnSOD 과발현 정도를 분석하였고, 그 결과는 도 3에 나타나 있다.
- <45> 도 3에서 대조구(Control)는 CHO/*dhfr*⁻/EPO, 막(mock)은 CHO/*dhfr*⁻/pZeoSV2, MnSOD는 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD를 나타낸다. 각 세포주의 단백질 정량이 동일함은 각 세포주의 세포추출액에 존재하는 β-액틴(β-actin)의 양을 통해서 확인하였고 각 세포주의 세포추출액에 존재하는 MnSOD의 양은 도 3에서와 같이 CHO/*dhfr*⁻/EPO와 CHO/*dhfr*⁻/pZeoSV2에 비해서 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD에서 많이 발현됨을 확인할 수 있었다. 본 발명에 의해 CHO/*dhfr*⁻/EPO에 MnSOD 유전자가 과발현되었음을 확인할 수 있었다.
- <46> 또한 각 세포주 내에 존재하는 SOD의 활성(activity)을 분석하기 위하여 네이티브 겔 분석(native gel assay) 방법을 이용하였다. 세포추출액을 PBS로 분쇄한 후 100μg의 세포추출액을 10% 런닝(running, pH 8.8)을 포함하는 비-변성 겔(non-denaturing gel)을 통해 4℃에서 90V에서 20분, 100V에서 2시간동안 전기영동하였다. 그리고 SOD 활성(activity)을 확인하기 위하여 겔(gel)을 2.45 mM 니트로블루 테트라졸륨(nitro blue tetrazolium, NBT)의 증류수에서 15분간 반응시키고, 어두운 곳에서 0.028 mM 리보플라빈(riboflavin)과 280 mM TEMED를 넣은 50 mM 포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.8)에서 15분간 반응시켰다.
- <47> 도 4에서와 같이 SOD 활성 겔 분석(activity gel assay)을 통해 각 세포주에서의 SOD 활성(activity)을 분석한 결과 세포내에 존재하는 CuZnSOD의 활성(activity)은 큰 차이를 보이지 않았지만 다른 세포주에 비하여 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD에 존재하는 MnSOD의 활성(activity)이 증가되었음을 확인할 수 있었다.
- <48> 실시예 3. MnSOD의 과발현으로 인한 EPO 발현에 대한 효과
- <49> EPO는 37kda의 당단백질로서 세포내에서 만들어지고 세포 밖으로 분비된다. 실시예 1에서 구축된 CHO/*dhfr*⁻/EPO, CHO/*dhfr*⁻/pZeoSV2, CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주를 통해 3일간 배양된 세포내에 존재하는 EPO의 양과 세포 밖으로 분비되는 EPO의 양을 10% SDS-PAGE 겔의 전기영동을 하였고 웨스턴 블롯을 통해 분석하였고 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다. 각 세포주 별로 세포안과 밖으로 분비되는 EPO의 발현량을 확인하기 위하여 EPO에 특이성을 가지는 토끼 다항체 항-EPO 항체(rabbit polyclonal anti-EPO antibody, Santa Cruz)를 이용하였다.
- <50> 도 5의 C열은 CHO/*dhfr*⁻/EPO를 P열은 CHO/*dhfr*⁻/pZeoSV2를 M열은 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD를 나타내며 3일간 배양된 각 세포주 내에 존재하는 EPO의 양을 확인한 결과 다른 세포주에 비하여 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD에서 많은 양의 EPO가 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이로 인해 MnSOD가 EPO의 발현의 증가에 영향을 미침을 알 수 있었다. 또한 세포 밖으로 분비되는 EPO의 양을 웨스턴 블롯을 통하여 확인해 본 결과, 도 6과 같이 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주에서 많은 양의 EPO가 발현됨을 통해서 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주의 MnSOD가 세포내에서 만들어져서 세포 밖으로 분비되는 EPO의 양의 증가에도 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

- <51> 실시예 4. MnSOD의 과발현으로 인한 EPO 생물학적 활성에 대한 효과
- <52> MnSOD의 과발현으로 인한 EPO의 생물학적 활성은 EPO 존재 하에서만 자랄 수 있는 EPO-의존적 인간 세포주(EPO-dependent human cell line)인 F-36E 세포(Riken Cell Bank RCB0776, Japan)로 측정할 수 있었다.
- <53> 96-웰 플레이트(96-well plate) 각 웰(well)에 1×10^5 cell/mL F-36E 세포를 넣고 표준(standard) EPO와 각 세포주를 일주일간 배양하면서 매일 거둔 상층액을 F-36E 세포 배양액(cell broth)으로 연속 희석(serial dilution) 시켰다. EPO의 생물학적 활성 측정하기 위해 F36E 셀(cell)의 생존세포 농도(viable cell density)를 MTT방법(Hansen et al., J Immunol Methods, 119, 2, 1989)으로 측정했다.
- <54> 상기 MTT 방법은 96 웰 플레이트(well plate)에서 배양 샘플(cultured sample) $100\mu\text{l}$ 에 5 mg/mL 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) $10\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 37°C , 3시간 동안 더 배양했다. 0.04M HCl 이소-프로필 알콜(iso-propyl alcohol) $100\mu\text{l}$ 를 각 웰에 첨가한 후 불용성 블루 포르마잔 크리스탈(insoluble blue formazan crystal)을 녹여주기 위해 혼합물을 피펫팅(pipetting) 하였다. 블루 포르마잔(Blue formazan)이 있는 플레이트를 620nm를 테스트(test) 파장으로 하여 570nm에서의 O.D.를 측정하였다. 그리고 측정값을 이용하여 도 7과 같은 그래프를 그렸다. 도 7에 나타난 바와 같이, F36E 세포를 통한 EPO의 생물학적 활성 역시 본 발명에 의한 MnSOD가 과발현된 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주가 CHO/*dhfr*⁻/EPO, CHO/*dhfr*⁻/pZeoSV2 세포주보다 우수한 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

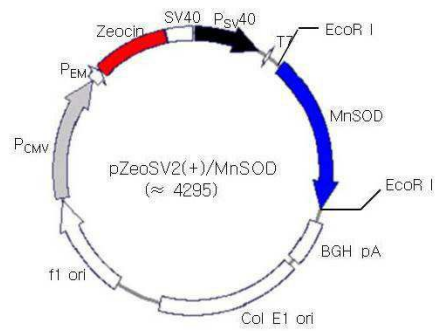
- <55> 상술한 바와 같이, 본 발명은 망간 과산소 항돌연변이 효소 MnSOD 유전자를 포함하는 CHO *dhfr*⁻ 세포주를 제공하여 동물세포주의 대량 배양시 세포 내에서 자발적으로 생성될 수 있는 활성산소종을 제거할 수 있어 항산화능이 높아지고 세포주의 수명이 연장됨으로써 EPO 생산성이 증대되는 효과를 도모할 수 있다. 본 발명은 EPO 단백질 제제에 대한 생산 기술을 개발함과 동시에 유용 단백질 제제의 국내 산업화에 커다란 기여를 할 수 있는 유용한 발명이라고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 본 발명에 의해 구축된 pZeoSV2(+)/MnSOD 벡터를 나타낸 도면.
- <2> 도 2는 본 발명에 의한 MnSOD 유전자가 도입된 pZeoSV2 벡터를 제한효소를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 도면.
- <3> 도 3은 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주의 MnSOD 발현양을 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도면.
- <4> 도 4는 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주의 SOD 활성을 SOD 활성분석(SOD activity assay)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도면.
- <5> 도 5는 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주 내에서의 EPO 발현양을 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도면.
- <6> 도 6은 본 발명에 의한 CHO/*dhfr*⁻/EPO/MnSOD 세포주의 세포밖으로 분비되는 EPO 발현양을 웨스턴 블롯팅(Western blotting)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도면.
- <7> 도 7은 본 발명에 의한 재조합 인간 EPO(recombinant human EPO)의 생물학적 활성을 분석한 결과를 나타낸 도면.

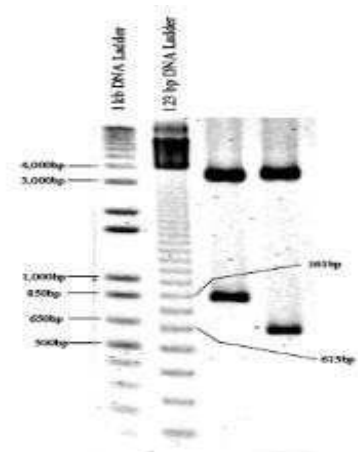
도면

도면1



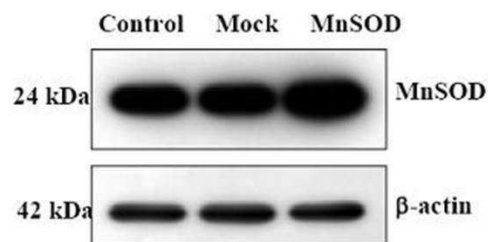
<그림1> pZeoSV2(+)/MnSOD 벡터의 구조

도면2



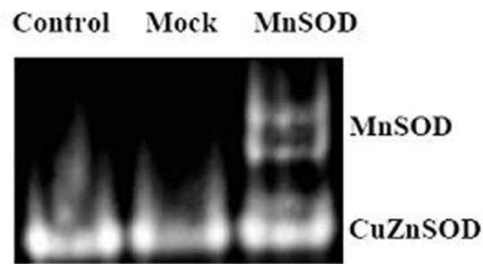
<그림 2> 제한효소를 이용한 MnSOD 유전자가 도입된 pZeoSV2 벡터의 분석

도면3



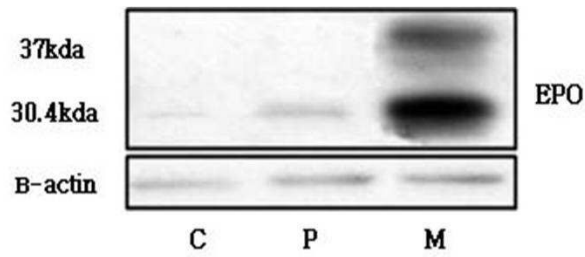
<그림 3> Western blotting을 통한 CHO/EPO/MnSOD 세포주의 MnSOD 발현양 분석

도면4



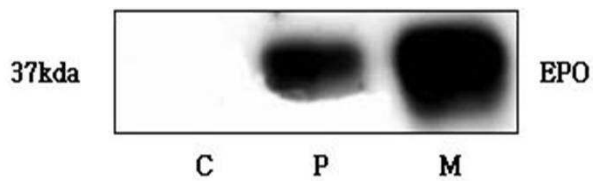
<그림 4> SOD activity assay를 통한 CHO/EPO/MnSOD 세포주의 분석

도면5



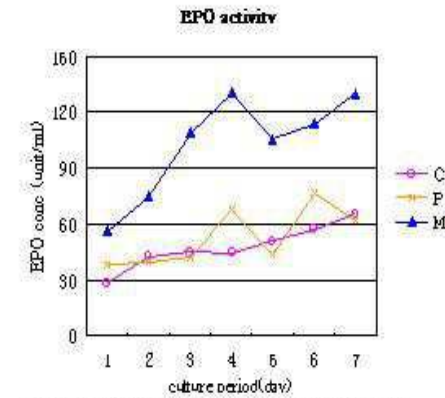
<그림 5> Western blotting을 통한 CHO/*dhfr*/EPO/MnSOD 세포주의 EPO 발현양 분석

도면6



<그림 6> Western blotting을 통한 CHO/*dhfr*/EPO/MnSOD 세포주의 세포밖으로 분비되는 EPO 발현양 분석

도면7



<그림 7> 제조항 인간 EPO의 생물학적 활성

서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Suspension adapted cell for overproducing recombinant Human Erythropoietin using MnSOD overexpression

<130> P11-070509-01

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgttgagcc gggcagtgtg cggcaccagc aggcagctgg ctccggcttt ggggtatctg 60

ggctccaggc agaagcacag cctccccgac ctgccttacg actacggcgc cctggaacct 120

cacatcaacg cgcatcatcat gcagctgcac cacagcaagc accacgcggc ctacgtgaac 180

aacctgaacg tcaccgagga gaagtaccag gaggcgttgg ccaagggaga tgttacagcc 240

cagacagctc ttacgcctgc actgaagttc aatggtggtg gtcatatcaa tcatagcatt 300

ttctggacaa acctcagccc taacggtggt ggagaacca aaggggagtt gctggaagcc	360
atcaaactg actttggttc ctttgacaag ttttaaggaga agctgacggc tgcattctgtt	420
ggtgtccaag gctcaggttg gggttggcctt ggtttcaata aggaacgggg acacttaciaa	480
attgctgctt gtccaaatca ggatccactg caaggaacaa caggccttat tccactgctg	540
gggattgatg tgiggagca cgcttactac cttcagtata aaaatgtcag gcctgattat	600
ctaaaagcta ttgggaatgt aatcaactgg gagaatgtaa ctgaaagata catggcttgc	660
aaaaagtaa	669