(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0145459
(43) 공개일자 2021년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 2800/107 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0062379
(22) 출원일자 2020년05월25일
심사청구일자 2020년05월25일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143 송도웰카운티1단지 101동 703호
황수영
경기도 시흥시 한우물로21번길 28, 3동 201호
(74) 대리인
차준용

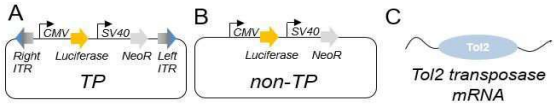
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **CHO 세포에 전이 유전자를 통합하기 위한 방법**

(57) 요 약

본 발명은 CHO 세포에 전이 유전자(transgene)를 통합하기 위한 방법에 관한 것으로, 구체적으로 CHO 세포에 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat), Tol2 좌측 ITR 및 전이 유전자(transgene)를 포함하는 트랜스포존 벡터(TP)를 트랜스포사제 mRNA와 함께 공동-형질 감염시키는 단계를 포함하는, CHO 세포에 전이 유전자(transgene)를 통합하기 위한 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2800/90 (2013.01)
C12N 2840/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318195
과제번호	2018R1D1A1B07040293
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	자가포식작용 매개 대사과정 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

CHO 세포에 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat), Tol2 좌측 ITR 및 전이 유전자(transgene)를 포함하는 트랜스포존 벡터(TP)를 트랜스포사제 mRNA와 함께 공동-형질 감염시키는 단계를 포함하는, CHO 세포에 전이 유전자를 통합하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 경우,

상기 트랜스포존 벡터(TP)와 트랜스포사제 mRNA은 2:1 내지 1:2의 비율로 공동-형질 감염시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 경우,

상기 트랜스포존 벡터(mini-TP) 및 트랜스포사제 mRNA은 1:2 내지 1:4의 비율로 공동-형질 감염시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전이 유전자(transgene)는 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat) 및 Tol2 좌측 ITR의 사이에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질 감염은 전기 천공법(electroporation)에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 상기 전이 유전자가 통합된 CHO 세포를 배양하는 단계를 포함하는 CHO 세포에 상기 전이 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

메틸화 억제제(methylation inhibitor) 또는 히스톤 디아세틸레이즈 억제제(histone deacetylase inhibitor)를

처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 메틸화 억제제는 5-아자시티딘(azacytidine), 데시타빈(decitabine) 및 제블라린(zebularine) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 히스톤 디아세틸레이즈 억제제는 트리코스타틴 A(Trichostatin A) 다이하이드로쿠마린(dihydrocoumarin), 나프토피라논(naphthopyranone) 및 2-하이드록시나프트알데히드(hydroxynaphaldehydes) 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CHO 세포에 전이 유전자(transgene)를 통합하기 위한 방법에 관한 것으로, 구체적으로 CHO 세포에 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat), Tol2 좌측 ITR 및 전이 유전자(transgene)를 포함하는 트랜스포존 벡터(TP)를 트랜스포사제 mRNA와 함께 공동-형질 감염시키는 단계를 포함하는, CHO 세포에 전이 유전자(transgene)를 통합하기 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 진핵 생물 게놈은 풍부한 반복 DNA를 포함하고 일부 반복 서열은 이동성을 갖는다. 게놈에서 전이 인자(transposable element, TE)는 한 위치에서 다른 위치로 이동할 수 있는 DNA 서열이다. 척추동물 게놈은 hAT 패밀리 트랜스포존과 같은 DNA 트랜스포존과 관련된 여러 서열을 포함하지만, 이들 중 어느 것도 자연적으로 활성인 것으로 보이지 않으며, 모두 비-자율적 인자인 것으로 간주한다. 단, Tol2 인자는 자율적으로 활성화된다. 이 인자는 Medaka fish(Oryzias latipes)에서 티로시나아제(tyrosinase) 유전자를 돌연변이시켜 알비노 돌연변이 물고기를 생성하는 것으로 확인되었다. Tol2는 길이가 4.7kb이고 가변 길이(variable length)의 2개의 ITR 및 상기 ITR 사이에 4개의 엑손으로 이루어진 트랜스포사제(transposase) 유전자를 포함한다. Tol2는 10kb 보다 큰 유전자를 트랜스포존 시킬 수 있고, 통합 영역(integration region)은 명확하지 않지만, 일반적으로 다른 hAT 인자와 유사하기 때문에 5' 영역의 유전자는 선호할 수 있다고 가정되었다. Tol2는 잘라 내기 및 붙여 넣기 메커니즘을 통해 단일 카피에 통합되며 8개의 기본 쌍(bp) 복제본을 작성하는 것을 제외하고 대상 위치에서 재배치 또는 변형(modification)을 유발하지 않는다.

[0003] 2012년에 미국에서 생물 제제 총 판매량은 2011년보다 18.2% 증가한 633억 달러에 달했다. 지난 15년 동안(1999-2013), FDA는 1형 의약품 중 113개를 승인했으며 그 중 30%는 생물 제제이다. 재조합 항체를 생산할 때, CHO 세포가 가장 일반적으로 사용되는 숙주이다. 배양된 포유동물 세포는 인간-유사 번역 후 변형에 대한 능력으로 인해 치료용 항체 생산의 주요 숙주로 남아 있기 때문이다. 생물 약제 산업에서 치료용 항체가 유행함에 따라, 최근의 문제는 치료용 항체 생산 효율을 증가시키는 것이다. 이를 위해, 효율이 높은 발현 벡터를 생성하려는 노력이 이루어지고 있다. 원하는 유전자의 용량을 증가시키기 위해 발현 벡터의 크기를 줄이는 것이 또한 중요하다. 현재까지, Tol2 트랜스포존 시스템은 많은 실험에서 사용되었지만, 단백질 발현을 증가시키기 위해 Tol2 트랜스포존 시스템을 포유동물 세포에 도입할 때 거의 적용되지 않았다. 트랜스포존 시스템을 사용한 이전 실험에서, 트랜스포사제는 플라스미드 형태로 공동 형질 감염되었다.

[0004] 그러나 이것은 형질주입(transfection) 이후 트랜스포사제가 오랫동안 존재하게 되어, 트랜스포사제의 일시적 발현 및 통합 트랜스포존의 재전이를 초래하고 잠재적으로 유전 독성을 유발할 수 있다.

[0005] 트랜스포존 시스템은 보다 높은 단백질 생성을 나타내는 재조합 세포를 생성하기 위한 신뢰할 수 있는 도구인

것으로 밝혀졌다. 슬리핑 뷰티(sleeping beauty, SB), Tol2 및 피기백(piggyback, PB)을 포함한 여러 트랜스포존 시스템이 포유류 세포에서 효율적인 단백질 생산을 위해 연구되었다. 이들 트랜스포존 시스템의 각 세트는 유사한 부피 생산성 분포 및 평균 생산성을 나타냈다. 그러나 이들 시스템은 전이 유전자(transgene)의 운반 능력에서 크기 제한이 상이하다. SB 트랜스포존이 보유할 수 있는 유전자의 크기가 6kb인 경우, SB의 전위 효율은 50%의 활성 감소로 나타난다. Tol2 트랜스포존은 전위 활성을 현저하게 감소시키지 않으면서 최대 10kb의 전이 유전자를 숙주 게놈에 통합할 수 있다. 치료용 항체의 삽입 크기는 일반적으로 6kb 이상이므로, 큰 전이 유전자를 운반할 수 있는 트랜스포존 시스템이 바람직하다. 현재의 연구에서 본 발명자는 단백질 생산성에 대한 Tol2 트랜스포존 시스템의 효과를 확인하는 것을 목표로 했다. Tol2 트랜스포사제 벡터에 의한 가능한 유전자 독성을 추가로 방지하기 위해, Tol2 트랜스포사제 mRNA를 사용하고 Tol2 트랜스포존 벡터와 Tol2 트랜스포사제 mRNA 사이의 최적 비율을 확인하였다. 또한,

[0006] 본 발명자는 Tol2 트랜스포존 크기를 줄인 mini Tol2 트랜스포존 시스템을 최적화하고 Tol2 트랜스포존-매개 발현에서 DNA 메틸화(methylation)의 역할을 발견하였다. 본 발명자의 연구는 개선된 단백질 생산성이 새로운 Tol2 트랜스포존 플랫폼에 의해 매개되는 새로운 메커니즘을 보여준다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개 특허 제10-2018-0054718호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 기존의 Tol2 시스템은 트랜스포사제를 벡터 형태로 세포에 넣어주었다. 그렇게 되면 벡터가 세포 내에 계속 존재하여 유전독성을 일으킬 수 있다. 이를 해결하기 위해 본 발명에서는 트랜스포사제를 mRNA의 형태로 넣어주었다. 또한 기존의 Tol2 시스템은 두 개의 ITRs는 모두 합하여 1kb가 넘는 길이를 갖는다. 발현 벡터는 크기가 작을수록 원하는 유전자를 실을 수 있는 수용력이 커지기 때문에 본 발명은 ITRs의 core부분을 찾아서 ITRs를 짧게 만들어 벡터의 크기를 작게 제작하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, CHO 세포에 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat), Tol2 좌측 ITR 및 전이 유전자(transgene)를 포함하는 트랜스포존 벡터(TP)를 트랜스포사제 mRNA와 함께 공동-형질 감염시키는 단계를 포함하는, CHO 세포에 전이 유전자를 통합하기 위한 방법을 제공한다.

[0010] 상기 Tol2 우측 ITR은 서열번호 1 및 서열번호 3의 염기서열을 포함할 수 있으며, 상기 Tol2 좌측 ITR은 서열번호 2 및 서열번호 4의 염기서열을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 경우, 상기 트랜스포존 벡터(TP)와 트랜스포사제 mRNA은 2:1 내지 1:2의 중량 비율로 공동-형질 감염시키는 것이 바람직하다. 즉 상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 경우, 트랜스포사제 mRNA는 트랜스포존 벡터(TP)에 대하여 0.5 ~ 2배의 중량 비율로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0012] 상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 경우, 상기 트랜스포존 벡터(mini-TP)와 트랜스포사제 mRNA은 1:2 내지 1:4의 중량 비율로 공동-형질 감염시키는 것이 바람직하다. 즉 상기 Tol2 우측 ITR 및 Tol2 좌측 ITR가 각각 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 경우, 트랜스포사제 mRNA는 트랜스포존 벡터(mini-TP)에 대하여 2 ~ 4배의 중량 비율로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0013] 상기 전이 유전자(transgene)는 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat) 및 Tol2 좌측 ITR의 사이에 존재하며, 상기 형질 감염은 전기 천공법(electroporation)에 의하여 수행되는 것이 바람직하다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시 예에서, 상기 방법에 의하여 상기 전이 유전자가 통합된 CHO 세포를 배양하는 단계를

포함하는 CHO 세포에 상기 전이 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 방법을 제공한다

[0015] 상기 단백질 생산 방법은 메틸화 억제제(methylation inhibitor) 또는 히스톤 디아세틸레이즈 억제제(histone deacetylase inhibitor)를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0016] 상기 메틸화 억제제는 5-아자시티딘(azacytidine), 데시타빈(decitabine) 및 제블라린(zebularine) 중 어느 하나이고 히스톤 디아세틸레이즈 억제제는 트리코스타틴 A(Trichostatin A) 다이하이드로쿠마린(dihydrocoumarin), 나프토피라논 (naphthopyranone) 및 2-하이드록시나프트알데히드(hydroxynaphaldehydes) 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

[0017] 시스템은 통합 효율이 낮고 시간이 지남에 따라 단백질 발현이 불안정하다. 이를 개선하기 위해, 본 발명자는 Tol2 벡터 시스템을 도입했으며, 특히 단백질 발현에서 그 효과를 검증하기 위해 최소한의 ITR을 가진 미니-Tol2를 사용했다. 결과적으로, 본 발명자들은 미니-Tol2가 단백질 발현에 효과적이며, 이는 생물 약제 산업에서 재조합 항체를 생성하는데 적용될 수 있음을 발견하였다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 사용된 벡터 시스템의 개략도를 나타낸 도면이다; (A) 대조군 벡터: 루시퍼라제 발현은 CMV 프로모터에 의해 구동되었고, 이 벡터로 형질 감염된 세포는 네오마이신(Neo) 유전자에 의하여 G418로 선택되었다. (B) Tol2 벡터: 대조군 벡터로 명명된 루시퍼라제의 발현 벡터는 Tol2 좌측 암 및 우측 암으로 명명된 2개의 ITR에 의해 경계가 설정되었다. (C) Tol2 벡터를 Tol2 트랜스포사제 mRNA로 공동-형질 감염시켰다.

도 2는 단백질 생산을 위한 Tol2 트랜스포존 시스템의 효과를 나타내는 도면으로, (A) 벌크 풀(bulk pool)로서 Tol2 시스템의 부피 생산성에 대한 트랜스포사제 mRNA 양의 효과; (B) 비-TP와 TP 사이의 게놈 DNA에 통합된 루시퍼라제 카피 수의 비교; (C) 비-TP와 TP 사이의 루시퍼라제 mRNA 발현 수준의 비교; (D) 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 루시퍼라제의 발현에 대한 Tol2 트랜스포존 시스템의 효과; (E) TP 및 비-TP로 생성된 클론 세포주의 분석 결과, 각 플롯의 점은 하나의 세포주의 루시퍼라제 생산성을 나타낸다. 가로 막대는 각 조건에 대한 루시퍼라제 생산의 평균을 나타낸다. (F) 시간에 따른 재조합 세포주의 부피 단백질 생산 분석 결과, 각 그룹에서 높은 루시퍼라제 발현 클론 세포주는 도 2E에서 선택되었다. 세포주는 3일마다 계대하면서 1개월 동안 성장시켰다. 표시된 시간에 3일 배치 배양 종료시 루시페라제 분석에 의해 각 세포주의 부피 생산성을 측정하였다.

도 3은 기존의 Tol2 벡터와 미니 Tol2 벡터 시스템 간의 단백질 발현 효율 비교한 결과로, (A) 미니-TP 구조물은 좌측 및 우측 서열에 통상적인 TP의 일부를 포함하고, 길이는 좌측 암이 200bp, 우측 암이 150bp이다. (B) 미니-TP의 Tol2 트랜스포사제 mRNA 최적화를 나타내고, 루시퍼라제를 발현하는 세포 풀은 상이한 양의 Tol2 트랜스포사제 mRNA로 세포를 형질 감염시킴으로써 생성되었다. 또한, 미니 Tol2 시스템 및 Tol2 시스템의 루시퍼라제 발현 수준을 비교하였다. (C) TP와 미니-TP 사이의 게놈 DNA에 통합된 루시퍼라제 카피 수의 비교 (D) TP와 미니-TP 사이의 루시퍼라제 mRNA 발현 수준의 비교 (E) 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 루시퍼라제의 발현에 대한 TP 및 미니-TP의 비교 (F) 미니 Tol2 시스템의 클론 세포주 및 Tol2 시스템 사이의 루시퍼라제 발현 수준의 비교. 플롯의 각 점은 하나의 세포주의 루시퍼라제 생산성을 나타낸다. 가로 막대는 각 조건에 대한 루시퍼라제 생산의 평균을 나타낸다. (G) 시간에 따른 재조합 세포 풀의 부피 단백질(volumetric protein) 생산 분석. 본 발명자는 도 3E의 각 그룹에서 높은 루시페라제 발현을 갖는 세포주를 선택하고, 그 세포주로 1개월 동안 단백질 생산 안정성을 평가하였다.

도 4는 단백질 발현에서 Tol2 시스템에 대한 메틸화 억제의 효과에 대한 실험 결과로, (A) 메틸 트랜스퍼라제 억제제인 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AzaC, 5-Aza-2'-deoxycytidine) 및 히스톤 데아세틸라제 억제제인 트리코스타틴 A(TSA, Trichostatin A)를 처리하여 메틸화 억제가 Tol2 시스템에서 단백질 발현에 어떻게 영향을 미치는지 결정하였다. (B) TP 및 미니-TP가 DNA 메틸화 억제제 Aza 및 TSA로 처리될 때 단백질 발현 수준의 비교를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0021] **실험예**

[0022] **1. 세포 배양**

[0023] CHO-DG44 세포(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 본 연구에 사용하였다. 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신 및 10 mM 하이포크산틴 나트륨(sodium hypoxanthine) 및 1.6 mM 티미딘과 함께 10% 소태아 혈청이 첨가된 25 mM 글루코스를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 세포를 배양하였다. 세포를 37% 인큐베이터 진탕기에서 5% CO_2 및 150 rpm으로 오비탈 진탕함으로써 Erlenmeyer Flask 250 ml 중 40-80ml의 배지에 유지시켰다. 세포는 2일마다 계대되었다. Cedex HiRes Analyzer(Roche, Switzerland, Base 1)에 의해 세포 밀도 및 생존능(viability)을 평가하였다.

[0025] **2. 플라스미드 및 mRNA**

[0026] Tol2 트랜스포존 시스템에 대한 공여체 플라스미드를 TIR(Terminal Inverted Repeats) 서열로 구축하였다.

표 1

[0027]

Gene (Insert)	Forward primer	Reverse primer
Tol2 left arm & right arm	TTTTGCGCTGCTTCGCGATCTGCGAAGATACGGCCACG(서열번호 5)	CTGGCCCGTACATCGCGAGGCCCATCTGGCCTGTGTTTC (서열번호 6)
mini Tol2 left arm	AAGTGATCTCCAAAA (서열번호 7)	CAGAGGTGTAAAGTA (서열번호 8)
mini Tol2 right arm	GCGGCCGTTACTAGTGGATCC CAGAGGTGTAAAAAG (서열번호 9)	GACCATGATTACGCCAAGCTTAATACTCAAGTACAA (서열번호 10)
mini Tol2 left arm & right arm	TTTTGCGCTGCTTCGCGAAAGTGATCTCCAAAA (서열번호 11)	CTGGCCCGTACATCGCGAAATACTCAAGTACAA (서열번호 12)

[0028] [표 1]에 나타낸 특정 올리고 뉴클레오티드 프라이머(서열번호 5 및 서열번호 6)를 사용하여 Tol2 트랜스포존 시스템에 대한 TIR을 T2U-CAF로부터 증폭시켰다. DNA 주형에서, Tol2 오른쪽 암(서열번호 1)과 왼쪽 암(서열번호 2)은 인접하여 동시에 증폭될 수 있었다. 이어서 PCR 생성물을 pcDNA3_SP_Luciferase의 변형된 버전인 루시퍼라제 제어 벡터로 서브 클로닝하여 Tol2-루시퍼라제 벡터를 생성하였다. 유사하게,

[0029] [표 1]에 나타낸 특정 올리고 뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 미니 Tol2 트랜스포존 시스템에 대한 TIR을 T2U-CAF로부터 증폭시켰다. 위와 달리 미니 Tol2 오른쪽(서열번호 3) 및 왼쪽 암(서열번호 4)은 인접하지 않았으므로 클로닝 단계가 추가되었다. 서열번호 7 및 서열번호 8에 의하여 증폭된 미니 Tol2 왼쪽 암(서열번호 3) 및 서열번호 9 및 서열번호 10에 의하여 증폭된 미니 Tol2 오른쪽 암(서열번호 4)을 T-Blunt™ PCR Cloning kit(solgent, Daejeon, Korea)에 의해 T-벡터에서 우측 배향으로 나란히 클로닝하였다. 클로닝된 T-벡터에서, 서로 인접한 미니 Tol2 왼쪽 암 및 오른쪽 암은 [표 1]에 나타낸 특정 올리고뉴클레오티드 프라이머(서열번호 11 및 12)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되었다. Tol2 및 미니 Tol2를 클로닝할 때, 루시퍼라제 제어 벡터의 NruI 부위에 PCR 산물을 삽입하고 EZ-Fusion™ HT Cloning Kit (EZ015TS; Enzynomics, Daejeon, Korea)을 사용하여 클로닝을 수행하였다. 전위(transposition)를 위해, Tol2 트랜스포사제 mRNA를 Tol2 또는 미니 Tol2 벡터와 함께 공동-형질 감염시켰다. Tol2 트랜스포사제 mRNA를 MEGAscript™ T7 Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 pcDNA6_Tol2 트랜스포사제로부터 증폭시켰다. 주형 플라스미드를 Tol2 트랜스포사제의 다운스트림의 SalI 부위로 선형화하여 전사시켰다. 그렇지 않으면, 원형 플라스미드 주형은 RNA 폴리머라제가 매우 가공적이기 때문에 매우 길고 이질적인 RNA 전사체를 생성한다.

[0031] **3. 형질 감염**

[0032] CHO-DG44 세포를 SG 세포주 4D-Nucleofector™ X Kit L(V4XC-3024; Lonza, Basel, Switzerland)을 사용하여 형질 감염시켰다. 상기 세포를 Cedex HiRes Analyzer로 계수하고 2X10^6 세포를 2,000 rpm에서 2분 동안 원심 분리하였다. 세포를 인산 완충 식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 그런 다음, 이들 세포의 펠렛을 피펫팅에 의해 100 μl의 4D-Nucleofector SolutionTM (Nucleofector™ Solution 82 μl + Supplement 18 μl)에 재현탁시켰다. 2 ㎍의 공여체 플라스미드를 이들 세포에 첨가하였다. 모든 샘플을 nucleocuvette™ 용기로 옮겼다. 큐벳을 4D-Nucleofector™ Core Unit (AAF-1002B; Lonza)이라는 전기 천공 장치에 넣고 이 장치를 작동했다. 그 후, 형질 감염된 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하였다.

[0034] **4. 세포주 개발**

[0035] 공여체 플라스미드 2μg 및 트랜스포사제 mRNA 1 μg 내지 8 μg를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 세포를 공동-형질 감염시켰다. 대조군 형질 감염은 ITR이 없는 루시퍼라제 대조군 벡터에 의해 수행되었다. 형질 감염 후 1일에, 배지를 교체하였다. 세포가 6-웰에 가득 찰(confluent) 때, 이들 세포를 T75 플라스크 또는 T25 플라스크로 옮겼다. 네오마이신에서 선별 항생제인 500 μg/ml G418 (ant-gn-1; Invivogen, San Diego, USA)을 사용하여 배지에서 10일 동안 2일마다 배지를 교체하였다. 선별 압력(selective pressure)을 제거한 후, 생성된 세포 풀을 제한 희석(limiting dilution)에 의해 클론 세포주로 배양하였다. 간략하게, 세포를 150 ㎕ 배지 당 0.8 세포의 밀도로 재현탁시켰다. 이들 희석된 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰로 옮기고 웰당 평균 0.8 세포를 제공하였다. 배양 후 15-20일 후, 세포를 형광 현미경(Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하고 하나의 웰에 단 하나의 콜로니를 갖도록 선택하였다. 세포의 개별 콜로니를 6-웰 플레이트로 옮겼다. 6-웰 플레이트에서 하나의 세포 계대(passage) 후, 세포를 T75 또는 T25 플라스크에 시딩하였다. 이어서, 이들 클론 세포주의 루시퍼라제 수준을 루시퍼라제 분석 시스템(E1500; Promega, Madison, Wisconsin, USA)으로 측정하였다.

[0037] **5. 단백질 정량**

[0038] 세포 수는 Cedex HiRes Analyzer를 사용하여 측정하였고, 루시퍼라제 단백질 농도는 루시퍼라제 분석 시스템에 의해 분석되었다; 2X10^6 세포를 2분 동안 2,000 rpm에서 원심 분리하였다. 이들 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 그런 다음, 이들 세포의 펠릿을 100 μl의 1x 세포 배양 용해 시약 및 100 μl의 PBS에서 볼텍싱 하였다. 이들 용해된 샘플을 100 ㎕의 백색 96-웰의 각 웰에 옮기고, 100 ㎕의 루시퍼라제 분석 시약(LARII)을 각 웰에 첨가하였다(용해 샘플:LARII=1:1). 그 후, 플레이트를 발광성을 갖는 VICTOR Multilabel Plate Reader (2030-0050; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다.

[0040] **6. gDNA 및 cDNA의 준비**

[0041] 게놈 DNA(gDNA)는 안정한 재조합 CHO 세포주로부터 제조되었다; 2X10^6 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 제조업자의 지시에 따라 Solg™ Genomic DNA Prep Kit (SGD41-C100; SPL)를 사용하여 gDNA를 분리하고 정제하였다. 매뉴얼에 따라 Rnasy Mini Kit (74104; QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 2X10^6 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 정제된 RNA를 RNAse-free water에 -80℃에서 저장하였다. 제조업자의 지시에 따라 Phusion RT-PCR Kit (F-546S; Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 총 RNA를 역전사시켰다. gDNA 및 cDNA의 순도 및 농도는 DS-11 Spectrophotometer (DeNovix)로 측정하였다.

[0043] **7. 실시간 PCR**

[0044] 실시간 qPCR은 SYBR 방법을 사용하여 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)으로 수행되었다. 프라이머는 루시퍼라제 영역에서 200bp 단편, 하우스키핑 유전자 GAPDH에서 200bp 단편을 증폭시키고 내부 대조군으로서 작용하고 데이터를 정규화하도록 설계되었다. 실시간 qPCR은 비템플릿 대조군 및 변성에

의한 음성 대조군을 포함하는 20ng의 gDNA 또는 cDNA로 수행되었다(95℃에서 5분 동안, 이어서 94℃에서 30초 동안, 57℃에서 30초 및 70℃에서 10초, 40회 사이클).

[0046] **8. 메틸화 억제제 처리**

[0047] 메틸트랜스퍼라제 억제제, 5-아자-2'-데옥시시티딘(5-AzaC) 및 히스톤 데아세틸라제 억제제, 트리코스타틴 A(TSA)을 CHO 세포에 처리하였다. 탈메틸화(demethylation)의 영향을 분석하기 위해, CHO 세포를 5μM의 5-AzaC 및 100ng/ml의 TSA로 처리하였다. 루시퍼라제 측정 4일 전에, 5-AzaC를 세포에 매일 적용하고 측정 24시간 전에 TSA를 첨가하였다. 대조군 세포는 비히클 디메틸 설폭사이드(DMSO)로 처리되었다.

[0049] **9. 통계 분석**

[0050] 표준 통계 소프트웨어 패키지(SigmaPlot 12.5; Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. student's t-test 또는 two-way ANOVA test를 사용하여 차이가 유의한지 여부를 확인했다.

[0052] **실시예**

[0053] **1. 높은 단백질 생산성을 위해 Tol2 트랜스포존 시스템을 도입한 벡터의 효과**

[0054] Tol2 트랜스포존 시스템-매개 유전자 발현을 평가하기 위해, 본 발명자들은 Tol2 우측 ITR(inverted terminal repeat, 서열번호 1) 및 좌측 ITR(서열번호 2) 사이에 위치하는 CMV 프로모터-구동 루시페라제 유전자 SV40 프로모터-구동 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 트랜스포존 벡터(TP)를 설계하였다(도 1A). 비교를 위해, 본 발명자는 CMV 프로모터-구동 루시퍼라제 유전자 및 SV40 프로모터-구동 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 비-트랜스포존 벡터(비-TP)를 설계하였다(도 1B). Tol2 트랜스포존 시스템은 게놈에 TP를 삽입하기 위해 필요한 Tol2 트랜스포사제를 필요로 한다. Tol2 트랜스포사제는 Tol2 트랜스포사제를 코딩하는 헬퍼 플라스미드(helper plasmid)로서 형질 감염될 수 있다. 그러나 포유동물 세포에서 트랜스포존 시스템의 사용은 DNA 벡터로부터의 트랜스포사제의 제어되지 않은 활성에 의해 방해되어 게놈 불안정의 위험이 있다. 따라서, Tol2 트랜스포사제 mRNA를 Tol2 트랜스포존 시스템의 헬퍼 플라스미드로 사용하였다(도 1C).

[0055] TP와 Tol2 트랜스포사제 mRNA 사이의 최적 비율을 확인하기 위해, 다른 양의 Tol2 트랜스포사제 mRNA(0, 1, 2, 4 및 8μg)로 TP(2μg)를 공동 형질 감염했다(도 2A). 2μg 비-TP로 형질 감염된 세포 풀을 대조군으로 사용하였다(도 2A). 형질 감염 후, 세포 풀을 500 ㎍/ml G418을 함유하는 배지에서 10일 동안 선택하였다. 그런 다음 루시퍼라제 활성을 측정하여 전이 유전자 발현을 조사했다. 비-TP와 TP 사이에 루시퍼라제 활성에는 차이가 없었으며, 이는 ITR의 존재가 전이 유전자(transgene) 발현을 증가시키지 않음을 나타낸다(도 2A). 그러나 TP 및 상이한 양의 Tol2 트랜스포사제 mRNA(1, 2 및 4 μg)를 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀은 루시퍼라제 활성을 유의하게 증가시켰다(도 2A). 그 중에서도 TP가 포함된 1μg의 Tol2 트랜스포사제 mRNA가 가장 높은 활성을 나타냈다(도 2A). 이들 결과는 Tol2 트랜스포존 시스템이 전이 유전자 발현을 촉진시켰으며 TP와 Tol2 트랜스포존 mRNA 사이의 2:1 및 1:2의 비율이 Tol2 트랜스포존-매개 발현에서 결정적인 인자라는 것을 나타내었다. 도 2A를 참조하면 TP와 Tol2 트랜스포존 mRNA가 1:1의 비율로 형질 감염시킨 경우에도 트랜스포존 mRNA를 첨가하지 않은 경우에 비하여 루시퍼라제 활성이 증가하는 것으로 보아 TP와 Tol2 트랜스포존 mRNA 는 2:1 내지 1:2의 비율로 첨가되는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

[0056] 트랜스포존 시스템은 정의된 DNA 세그먼트가 게놈의 다른 부분으로 이동하여 숙주 게놈으로의 전이 유전자 통합 효율을 증가시키는 정확한 과정이다. 따라서, Tol2 트랜스포존 시스템이 전이 유전자 통합을 촉진한다는 것을 확인하기 위해, 게놈 DNA를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다(도 2B). TP 및 1μg Tol2 트랜스포사제 mRNA로 공동-형질 감염된 세포는 비-TP와 비교하여 상당히 증가된 도입 유전자 통합을 나타내는 것으로 관찰되었다(도 2B). 그런 다음 증가된 전이 유전자 통합이 전이 유전자 발현을 촉진하는지 여부를 조사하였다. 루시퍼라제 유전자의 발현 수준을 조사하기 위해 cDNA를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다(도 2C). TP 및 1μg Tol2 트랜스포사제 mRNA로 공동-형질 감염된 세포는 비-TP와 비교하여 루시퍼라제 유전자의 발현에서 유의미한 증가를 나타냈다(도 2C). Tol2 트랜스포존 시스템이 비-TP보다 더 높은 단백질 발현을 갖는 것을 다시 한번 확인하기 위해, 발현된 단백질의 양을 웨스턴 블롯을 사용하여 비교하였다. 결과적으로, TP 및 1μl의 Tol2 트랜스포사제 mRNA로 공동-형질 감염된 세포의 밴드는 비-TP보다 약 2배 더 두껍다(도 2D). 이러한 결과는 Tol2 트랜스포존 시스

템이 도입될 때 단백질 발현이 그렇지 않은 경우보다 약 2배 더 높다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 Tol2 트랜스포존 시스템이 증가된 전이 유전자 통합 효율을 통해 유전자 발현을 증가시켰음을 나타냈다. 이종 풀(heterogeneous pool)로부터 단일 세포 클론을 수득하기 위해, 제한 희석(limiting dilution)이 수행되었다. 각각의 세포 풀로부터 14개의 클론 세포주가 생성되었다(도 2E). Tol2 트랜스포존 시스템으로 공동-형질 감염된 단일 세포 클론은 비-TP보다 높은 루시페라제 활성의 평균을 나타내어, 세포 풀로부터의 일시적 데이터 결과를 다시 확인할 수 있다(도 2E).

[0057] 그런 다음 1개월 동안 트랜스진 발현의 장기 안정성에 대한 트랜스포존의 효과를 평가했다. 각 세포주의 특이적 성장 속도(μ)는 3일 배치 배양(batch cultures)으로부터 주기적으로 결정되었다. 비교를 위해, 루시페라제 발현 수준이 높은 단일 세포주는 비-TP 및 TP에서 하나씩 선택되었고, 이는 파란색 원으로 표시되어 있다(도 2E, F). Tol2 트랜스포존 세포주 및 비-TP 세포주를 비교할 때, 두 세포주의 μ 값은 거의 차이가 없고 30일 동안 일정하다는 것이 확인되었다(도 2F). 이러한 결과는 Tol2 트랜스포존의 세포 성장 속도는 비-TP와 같이 일정하고 루시퍼라제 발현 수준은 비-TP의 것보다 높기 때문에 Tol2 트랜스포존이 단백질 발현을 위한 효과적인 벡터 시스템임을 나타낸다.

[0059] **2. 기존의 TP와 mini-TP의 단백질 발현 효율 비교**

[0060] 벡터 크기는 형질 감염 효율에 영향을 미친다. 크기가 클수록 형질 감염의 효과가 떨어진다. Tol2 ITR은 전위(transposition)에 필수적인 cis-시퀀스를 가지고 있다. 우측 및 좌측 ITR은 각각 536bps 및 517bps이다. Tol2 ITR2의 최소 cis-시퀀스(mini-Tol2)는 좌측 ITR에서 200bp, 우측 ITR에서 150bp로 구성되었다. 이 mini-Tol2는 효율이 감소되지 않고 전위할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 mini-Tol2는 종래의 Tol2와 비교하여 전이 유전자 통합 및 후속 발현(subsequent expression)을 얼마나 효율적으로 유도하는지 테스트되지 않았다. 따라서 트랜스포존으로서의 그의 능력을 시험하기 위해, 본 발명자들은 최소 ITR에 의해 측면에 위치한 CMV 프로모터-구동 루시퍼라제 유전자 및 SV40 프로모터-구동 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 미니 Tol2 트랜스포존 벡터(mini-TP)를 설계 하였다(도 3A). 본 발명자들에 의하여 설계된 미니 Tol2 트랜스포존 벡터(mini-TP)는 Tol2 우측 ITR(서열번호 3) 및 좌측 ITR(서열번호 4)를 포함한다.

[0061] 미니-TP와 Tol2 트랜스포사제 mRNA 사이의 최적 비율을 확인하기 위해, 상이한 양의 Tol2 트랜스포사제 mRNA(1, 2, 4 및 8μg)로 미니-TP(2μg)를 공동-형질 감염시켰다(도 3B). 2μg 비-TP로 형질 감염된 세포 풀을 대조군으로 사용하였다(도 3B). 또한, TP 및 1μg Tol2 트랜스포사제 mRNA를 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀을 TP와 미니-TP 사이의 활성을 비교하기 위한 또 다른 대조군으로 사용하였다(도 3B). TP 및 1μg Tol2 트랜스포존 mRNA를 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀은 Tol2 트랜스포존-매개 발현에 의해 증가된 전이 유전자 발현을 확인한 결과 비-TP와 비교하여 루시퍼라제 활성을 유의하게 증가시켰다. 미니-TP 및 4μg Tol2 트랜스포사제를 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀은 비-TP와 비교하여 유의한 루시퍼라제 활성을 나타냈다(도 3B).

[0062] 이들 결과는 미니-TP가 유의하게 전이 유전자 발현을 촉진하였고, 미니-TP와 Tol2 트랜스포존 mRNA 사이의 1:2 및 1:4의 비율은 미니-Tol2 트랜스포존-매개 발현에서 결정적인 인자라는 것을 나타낸다. 또한, 미니-TP 시스템은 TP 및 1μg Tol2 트랜스포사제 mRNA로 공동-형질 감염된 세포 풀과 비교하여 유사한 루시페라제 활성을 나타냈다(도 3B). 이 결과는 mini-TP의 ITR이 TP의 ITR보다 작더라도 mini-TP는 원래 TP와 동일한 활동을 나타낸다는 것을 보여준다.

[0063] TP와 미니-TP 사이의 전이 유전자의 통합된 카피를 비교하기 위해, 게놈 DNA를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 미니-TP 시스템을 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀은 원래의 TP 시스템을 사용한 것에 비해 상당히 증가된 전이 유전자 통합을 나타냈다(도 3C). cDNA를 사용하여 정량적 PCR을 수행하여 발현에 대한 증가된 전이 유전자 통합의 효과를 조사하였다(도 3D). 미니-TP 시스템을 갖는 공동-형질 감염된 세포 풀은 원래의 TP 시스템을 갖는 것들과 비교하여 유사한 전이 유전자 발현을 나타냈다(도 3D). 이러한 결과는 mini-TP가 원래의 TP보다 전이 유전자 통합에서 더 효과적이지만, mini-TP는 TP와 비슷한 발현 결과를 나타낸다는 것을 보여준다.

[0064] TP 및 미니-TP의 단백질 발현 수준이 동일한 것을 확인하기 위해, 웨스턴 블롯을 사용하여 발현된 단백질의 양을 비교하였다. 그 결과, 미니-TP와 4μg의 트랜스포사제로 공동 형질 감염된 세포는 TP와 1μg의 트랜스포사제로 동시 형질 감염된 세포보다 약 1.5배 더 두꺼운 밴드를 가짐을 확인하였다(도 3E). 이러한 결과는 미니-TP가 TP보다 단백질 발현에 더 효과적 일 수 있음을 나타낸다.

[0065] 단일 세포 클론을 얻고 전이 유전자 활성의 분포를 평가하기 위해, 이종성 풀(heterologous pool)로부터 제한

희석을 수행하였다. 각각의 세포로부터 20개의 클론 세포주가 생성되었다(도 3F). 미니-TP 시스템으로부터의 단일 세포 클론은 TP 시스템과 유사한 루시퍼라제 활성을 나타내었고, 이는 미니-TP 시스템이 TP 시스템과 유사한 능력을 가짐을 나타낸다. 그러나 미니-TP 시스템으로부터의 세포는 TP 시스템보다 높은 루시퍼라제 활성의 평균을 보여주었으며, 이는 긴 ITR보다는 짧은 ITR을 사용하는 것이 동일한 단백질 수율 또는 더 나은 수율을 나타낼 수 있음을 시사한다(도 3F). 단일 세포 클론 결과로부터의 데이터는 TP와 미니-TP 사이의 유사한 루시페라제 활성의 관점에서 일시적 데이터를 다시 한번 확인한것이다.

[0066] 각 클론의 장기 안정성에 대한 미니-TP의 효과를 확인하기 위하여, 각 그룹으로부터 높은 루시페라제 활성을 나타내는 청색 원으로 표시되는 단일 세포 클론을 1개월 동안 유지시켰다(도 3G). 각 세포주의 세포 성장 속도(μ)는 3일 배치 배양으로부터 주기적으로 결정되었다. TP 세포주와 미니-TP 세포주를 비교할 때, 두 세포주의 μ값은 거의 차이가 없고 30일 동안 일정하다는 것이 확인되었다(도 3G). 이 결과는 원래의 TP와 미니-TP가 단백질 발현에 미치는 영향에 차이가 없으며, TP와 미니-TP는 효과적인 단백질 발현 시스템이라는 것을 나타낸다.

[0068] **3. 트랜스포존 및 DNA 메틸화**

[0069] DNA 메틸화(methylation)는 헤테로크로마틴의 형성을 초래하고 결과적으로 전사 억제를 초래한다. 이것은 진핵생물 게놈을 트랜스포존으로부터 보호하기 위해 진화되었기 때문에 트랜스포존과 밀접한 관련이 있다. 슬리핑 뷰티(sleeping beauty)와 같은 트랜스포존이 인간 세포에서 사용될 때, 유전자 침묵은 게놈으로 통합된 후에 관찰되었다. 그러나 이 유전자 침묵은 DNA 메틸화 억제제를 사용하여 부분적으로 전환되었다. 따라서, 본 발명자들은 Tol2 트랜스포존-매개 발현에 대한 DNA 메틸화 억제제의 효과를 조사하였다. 본 발명자는 DNA 메틸화 억제제로, DNA에 통합되고 DNA 메틸화를 억제하는 5-아자시티딘(5-azacytidine)을 사용했다. 또한 Trichostatin A는 DNA 메틸화가 감소하면서 히스톤 H4 아세틸화를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

[0070] DNA 메틸화 억제의 강화된 효과를 조사하기 위해, 트리코스타틴 A 및 5-아자시티딘을 동시에 처리하였다. 5-아자시티딘 처리 군의 발광은 DMSO 처리 군의 발광에 의해 정규화되었다(도 4A, B). TP 시스템으로부터의 세포에서 DNA 메틸화의 억제는 비-TP로부터의 세포와 비교하여 트랜스진 활성화를 상당히 개선시켰다(도 4A). 메틸화 억제제가 비-TP 그룹에 처리되었을 때, 단백질 발현량이 DMSO 처리와 비교하여 약 2배 증가한 것으로 관찰되었다(도 4A). 그러나 메틸화 억제제가 TP 그룹에서 처리될 때, 단백질 발현은 DMSO 처리와 비교하여 약 3배 증가하였다(도 4A). 이들 결과는 DNA 메틸화의 억제가 Tol2 트랜스포존-매개 시스템에서 발생할 수 있는 유전자 침묵을 방지하여 트랜스진 활성화를 초래할 수 있음을 나타낸다. 또한, 메틸화 억제제를 처리할 때, TP 및 미니-TP의 단백질 발현 수준도 비교하였다. TP 도입 세포에 메틸화 억제제로 처리하면 DMSO 처리 군에 비해 단백질 발현이 약 2배 증가했다(도 4B). 미니-TP가 도입된 세포에서 메틸화 억제제가 처리될 때, 단백질 발현은 DMSO 처리 군과 비교하여 약 4배 증가하였다(도 4B). 이들 결과는 미니-TP가 TP보다 DNA 메틸화의 억제로 인한 유전자 침묵을 방지하는 능력이 더 우수하여, 트랜스진 활성화가 더 높다는 것을 나타낸다.

[0072] **결과 검토**

[0073] 현재, 치료용 재조합 단백질은 바이오 제약 산업에서 주목받고 있다. 따라서, 치료 단백질 생산성의 증가는 이 분야에서 주요 관심사가 되었다. 치료적 재조합 단백질을 생성하는데 사용되는 통상적인 벡터 시스템은 무작위 통합에 의해 용이하게 생성될 수 있지만, 통합 효율이 낮고 불안정하다. 기존의 벡터 시스템에서의 이러한 한계 때문에, 트랜스포존 시스템을 사용하여 GOI를 숙주 게놈에 통합하는 효율을 개선하기 위한 실험이 있었다. Tol2 트랜스포존 시스템을 포함하는 벡터의 효과의 중요성은 Tol2, SB(Sleeping Beauty) 및 PB(PiggyBac) 트랜스포존 시스템의 단백질 발현 수준을 비교하는 실험 결과에 의해 뒷받침된다.

[0074] 그러나 미니 Tol2에 대한 실험은 없으며, 이는 전위(transposition)에 대한 최소 길이의 ITR로 수행된다. 본 발명에서는 재조합 항체 생산에 일반적으로 사용되는 CHO 세포에 Tol2 트랜스포존 시스템을 도입하고 단백질의 발현 수준을 평가했다. 따라서, 우리는 전위에 필수적인 Tol2 전이 인자(transposable element, TE)를 사용하여 발현 벡터를 생성하고 Tol2 트랜스포사제 mRNA와 공동 형질 감염시켰다. Tol2 벡터 및 트랜스포사제 mRNA에 의한 숙주 세포의 공동-형질 감염은 공여체 벡터로부터 세포 게놈으로 재조합 트랜스포존의 전달을 허용한다.

[0075] 현재까지, 트랜스포존 시스템을 사용하여 단백질 발현을 증가시키는 많은 실험이 있지만, 본 발명자의 실험에는 세 가지 새로운 점이 있다. 먼저, 트랜스포존 벡터와 트랜스포사제를 공동 감염시킬 때, 트랜스포사제는 많은

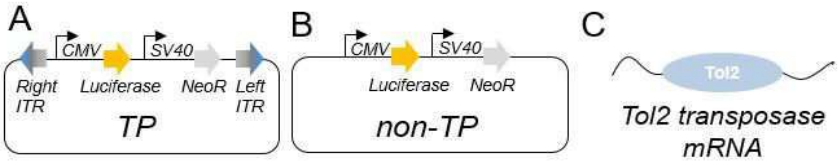
이전 실험에서 플라스미드로 도입되었지만 mRNA로는 거의 도입되지 않았다. 플라스미드는 세포 내에 오랫동안 머무르는 한 유전 독성이 있을 수 있다. 그러나 mRNA는 시간이 지남에 따라 분해되기 때문에 mRNA를 사용하면 이러한 위험이 줄어든다. 따라서, 단백질 생산 효율이 높은 mRNA 트랜스포사제 양을 결정하기 위해 mRNA 최적화를 수행하였다. 둘째, 발현 벡터의 운반 유전자 용량이 클수록 벡터는 더 효율적이다. 따라서 우리는 전위에 필요한 최소 Tol2 서열을 발견하고, 기존 Tol2 벡터와 비교하여 단백질 발현 수준을 평가했다. 셋째, Tol2 트랜스포존 시스템을 메틸화 억제제 Aza 및 TSA로 처리하여 단백질 발현 수준을 추가로 증가시켰다.

[0076] 본 발명자의 지식으로, 본 발명은 미니 Tol2 벡터가 종래의 Tol2 벡터보다 단백질을 발현하는데 더 효과적이라는 첫 번째 증명을 제공한다. 이러한 개선은 트랜스포사제 mRNA의 공동-형질 감염을 동반해야 한다. 이들 결과의 관련성을 확대하여, 미니-Tol2 및 4㎍ 트랜스포사제 mRNA의 공동-형질 감염은 기존 Tol2 벡터 및 1㎍ 트랜스포사제 mRNA의 공동-형질 감염과 유사한 루시퍼라제 발현을 나타냈다. 이는 미니-Tol2 벡터 시스템이 기존의 Tol2 시스템과 동일한 효과를 가지며 단백질 생산 능력을 증가시키기 때문에 효과적인 발현 벡터 시스템임을 나타낸다. 또한, 이들 미니-Tol2 벡터 시스템에서 메틸화 억제제의 처리는 처리되지 않은 것과 비교하여 단백질 발현을 약 4배 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 결과적으로 본 발명은 미니-Tol2 벡터가 재조합 단백질 생성에 많은 이점을 제공할 것임을 시사한다. 또한, 본 발명자는 미니-Tol2 시스템에서 메틸화(methylation) 억제제의 사용이 단백질 발현에 효과적이라고 제안하지만, 이 결과를 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

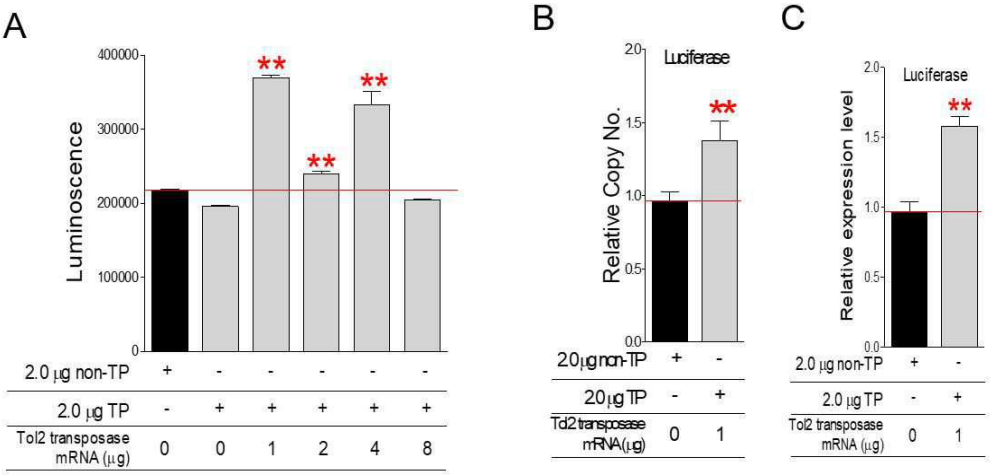
[0077] 요약하면, 종래의 벡터 시스템은 통합 효율이 낮고 시간이 지남에 따라 단백질 발현이 불안정하다. 이를 개선하기 위해, 본 발명자는 Tol2 벡터 시스템을 도입했으며, 특히 단백질 발현에서 그 효과를 검증하기 위해 최소한의 ITR을 가진 미니-Tol2를 사용했다. 결과적으로, 본 발명자들은 미니-Tol2가 단백질 발현에 효과적이며, 이는 생물 약제 산업에서 재조합 항체를 생성하는데 적용될 수 있음을 발견하였다.

도면

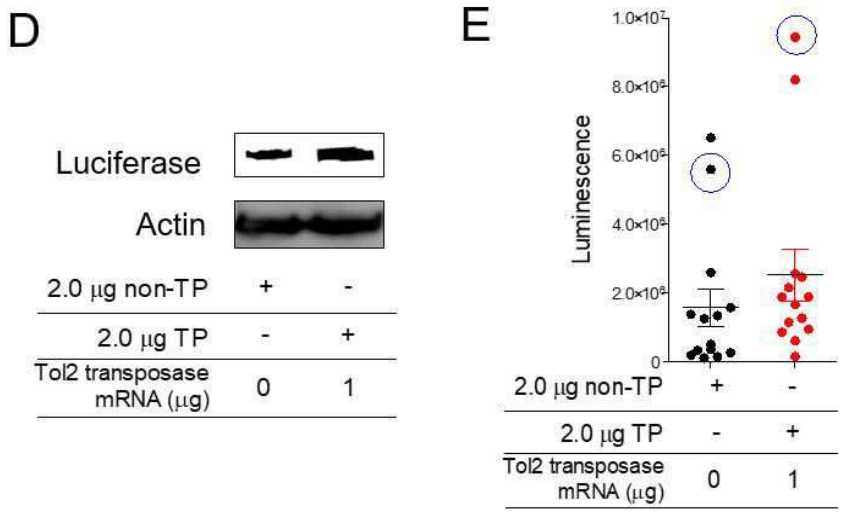
도면1



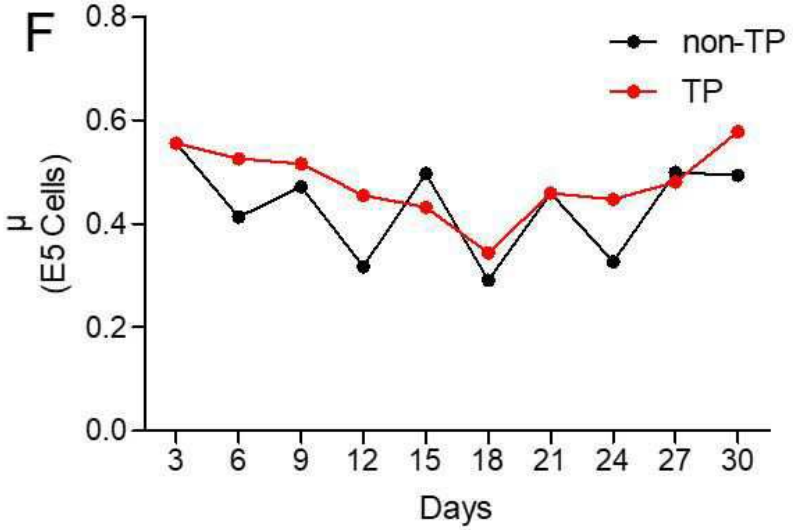
도면2abc



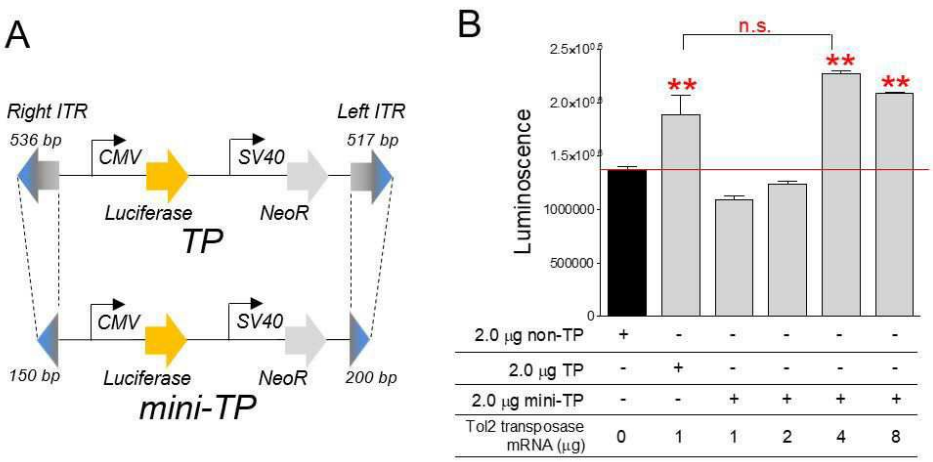
도면2de



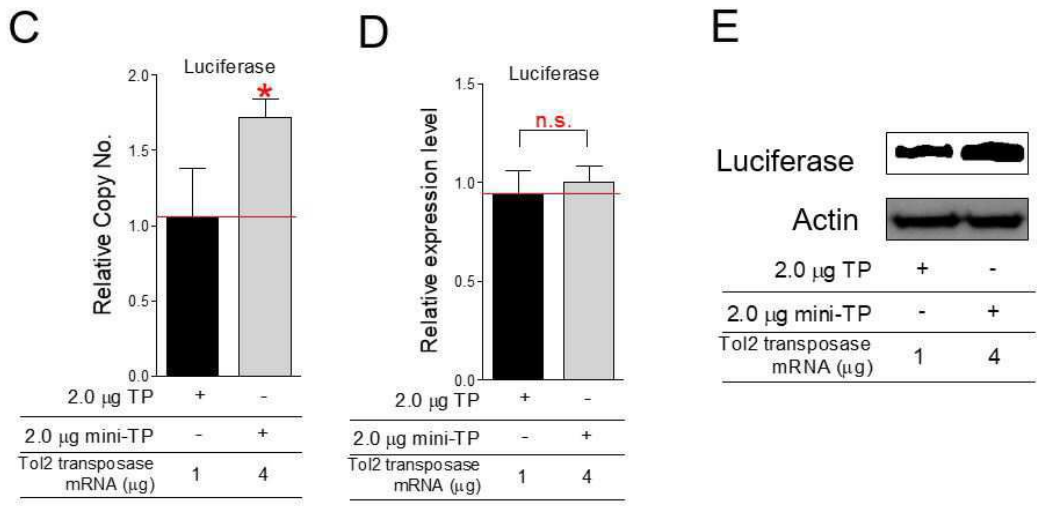
도면2f



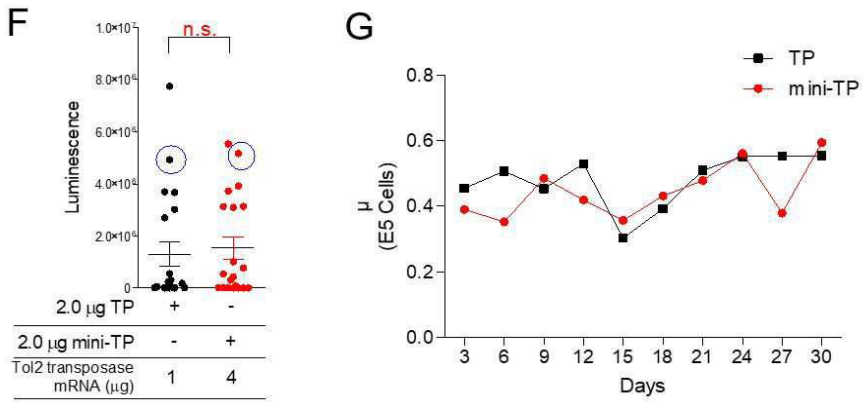
도면3ab



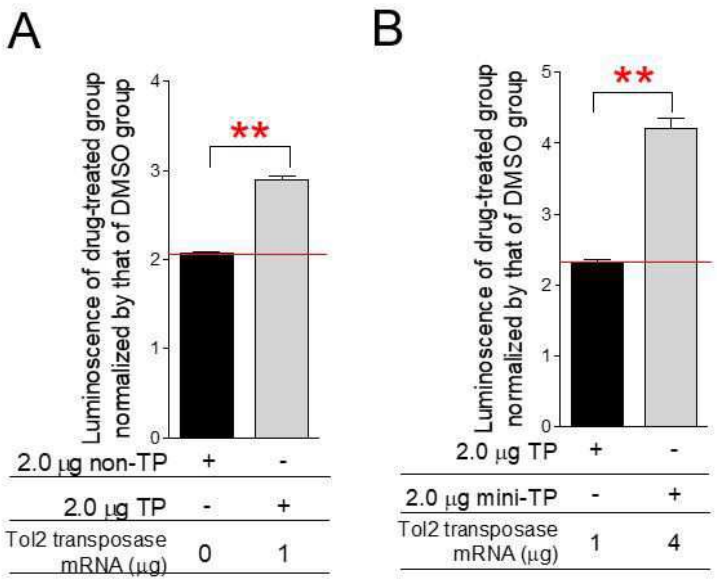
도면3cde



도면3fg



도면4



서 열 목 록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> METHOD FOR INTEGRATION OF TRANSGENE IN CHO CELLS

<130> P20-0000

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 864

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tol2 right ITR

<400> 1

catatttgtt tcttacatca tttctagcat ctttgagcgc tggctaagaa ctcatcagcc 60

tccccggtcc atctactcac gtaccaatgc accaattggc cacaatgacg gctactacat 120

ggtgccattc cttcctcttt ataggaatgg agactacctc ctgtccaaca atgctcttgg 180

atacgagtac gcctacctgt tggacccagg tcattgcaca acaccagaaa tgccctctga 240

tctgcaaaag acgtgaatat ctgttcagac acccatatcc actctgttcc acacaggtca 300

gaggtttgtc caggagttct tgacagaggt gtaaaaagta ctcaaaaatt ttactcaagt 360

gaaagtacaa gtacttaggg aaaattttac tcaattaaaa gtaaaagtat ctggctagaa 420

tcttacttga gtaaaagtaa aaaagtactc cattaaaatt gtacttgagt attaaggaag 480

taaaagtaaa agcaagaaag aaaactagag attcttgttt aagcttttaa tctcaaaaaa 540

cattaaatga aatgcataca aggttttatc ctgctttaga actgtttgta tttaattatc 600

aaactataag acagacaatc taatgccagt acacgctact caaagttgta aaacctcaga 660

tttaacttca gtagaagctg attctcaaaa ttgttagtgt caagcctagc tcttttgggg 720

ctgaaaagca atcctgcagt gctgaaaagc ctctcacagg cagccgatgc gggaagaggt 780

gtattagtct tgatagagag gctgcaaata gcaggaaacg tgagcagaga ctccctggtg 840

tctgaaacac aggccagatg ggcc 864

<210> 2

<211> 558

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tol2 left ITR

<400> 2

tctgcgaaga tacggccacg ggtgctcttg atcctgtggc tgattttgga ctgtgctgct 60

cgcagctgct gatgaatcac atacttcctc cattttcttc cactgattga ctgttataat 120

ttccctaatt tccaggtcaa ggtgctgtgc attgtggtaa tagatgtgac atgacgtcac 180

ttccaaagga ccaatgaaca tgtctgacca atttcatata atgtgaaaac gattttcata 240

ggcagaataa ataacattta aattaaactg ggcatcagcg caattcaatt ggtttggtaa 300

tagcaaggga aaatagaatg aagtgatctc caaaaaataa gtacttttg actgtaaata 360

aaattgtaag gagtaaaaag tacttttttt tctaaaaaaa tgtaattaag taaaagtaaa 420

agtattgatt tttaattgta ctcaagtaaa gtaaaaatcc ccaaaaataa tacttaagta 480

cagtaatcaa gtaaaattac tcaagtactt tacacctctg gttcttgacc ccctaccttc 540

agcaagccca gcagatcc 558

<210> 3

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-Tol2 right ITR

<400> 3

cagaggtgta aaaagtactc aaaaatttta ctcaagtgaa agtacaagta cttagggaaa 60

attttactca attaaaagta aaagtatctg gctagaatct tacttgagta aaagtaaaaa 120

agtactccat taaaattgta cttgagtatt 150

<210> 4

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mini-Tol2 left ITR

<400> 4

aagtgatctc caaaaaataa gtacttttg actgtaaata aaattgtaag gagtaaaaag 60

tacttttttt tctaaaaaaa tgtaattaag taaaagtaaa agtattgatt tttaattgta 120

ctcaagtaaa gtaaaaatcc ccaaaaataa tacttaagta cagtaatcaa gtaaaattac 180

tcaagtactt tacacctctg 200

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Tol2 left arm & right arm Forward primer

<400> 5

ttttgcgctg cttcgcgatc tgcgaagata cggccacg 38

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tol2 left arm & right arm Reverse primer

<400> 6

ctggcccgta catcgcgagg cccatctggc ctgtgtttc 39

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini Tol2 left arm Reverse primer

<400> 7

aagtgatctc caaaa 15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini Tol2 left arm Reverse primer

<400> 8

cagaggtgta aagta 15

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini Tol2 right arm Forward primer

<400> 9

gcggccgtta ctagtggatc ccagaggtgt aaaaag 36

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> mini Tol2 right arm Reverse primer

<400> 10

gaccatgatt acgccaagct taatactcaa gtacaa 36

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini Tol2 left arm & right arm Forward primer

<400> 11

ttttgcgctg cttcgcgaaa gtgatctcca aaa 33

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mini Tol2 left arm & right arm Reverse primer

<400> 12

ctggcccgta catcgcgaaa tactcaagta caa 33