



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월14일
(11) 등록번호 10-0845877
(24) 등록일자 2008년07월07일

(51) Int. Cl.

A01N 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0033854

(22) 출원일자 2007년04월05일

심사청구일자 2007년04월05일

(56) 선행기술조사문헌

US6143563 A

KR10200300195229 A

KR1019990022412 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 연수구 동춘동 금호아파트 109-403

조지숙

경기도 부천시 원미구 심곡2동 152-6

유지선

인천 중구 율목동 60-8 진성아트빌 2-201

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 27 항

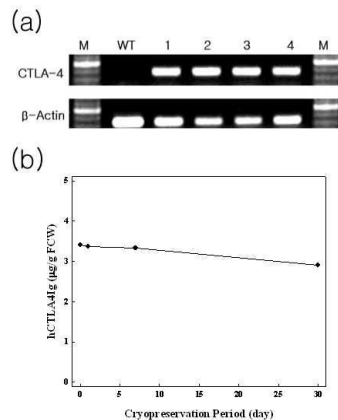
심사관 : 김정민

(54) 형질전환 벼세포의 동결보존 방법

(57) 요약

본 발명은 형질전환 벼세포의 동결보존 방법 및 상기 동결보존된 벼세포의 회수방법에 관한 것으로, 종래의 동결보존 방법보다 최적화된 동결보존 및 회수 조건을 제시한다. 더욱 상세하게는 0.5 M 수크로오스를 포함한 예비배양배지에서 형질전환된 벼세포를 5일간 예비배양한 후 최적의 농도 비율로 혼합된 동결보호제를 첨가하여 동결하고, 액체질소에서 동결보존한 단시간 또는 장시간 경과후 해동하여 동결보존후 형질전환 벼세포에서의 재조합 단백질 발현양이 동결보존전과 큰 차이가 없으며, 성체 벼로 성장하는데 이상이 없음을 확인함으로써 형질전환 벼세포의 효과적으로 재현성높은 동결보존방법 및 회수방법을 제공한다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 삼투압 증진제로 0.4 ~ 0.6 M의 수크로오스가 첨가된 예비배양배지에 형질전환된 벼세포를 예비배양하는 단계;
- 2) 단계 1)의 예비배양된 벼세포에 DMSO(Dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 글라이세롤(glycerol)을 유효성분으로 포함하는 동결보호제 혼합액을 첨가하는 단계;
- 3) 단계 2)의 동결보호제 혼합액이 첨가된 벼세포를 동결시키는 단계;
- 4) 단계 3)의 동결된 벼세포를 동결보존하는 단계를 포함하는 형질전환된 벼세포의 동결보존방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 1)의 수크로오스의 농도는 0.5 M인 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 1)의 예비배양기간은 3 ~ 7일인 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 단계 1)의 예비배양기간은 4 ~ 6일인 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 단계 1)의 예비배양기간은 5일인 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 있어서, 단계 2)의 DMSO, 수크로오스 및 글라이세롤은 각각 0.5 ~ 1.5 M의 농도로 혼합되는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 단계 2)의 DMSO, 수크로오스 및 글라이세롤은 각각 1 M의 농도로 혼합되는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 단계 2)는 0.1 g 세포당 0.1 ~ 0.9 mL의 동결보호제 혼합액을 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 단계 2)는 0.1 g 세포당 0.3 mL의 동결보호제 혼합액을 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 단계 3)은 냉동고에서 $-0.32^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 동결속도로 -43°C 까지 감온하여 50 ~ 200분간 1차 동결하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 단계 3)은 냉동고에서 $-0.32^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 동결속도로 감온하여 -43°C 까지 120분간 1차 동결하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 단계 4)는 액체질소에 동결보존하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서, 단계 5)의 동결된 벼세포는 1일 내지 5개월 동안 보존하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서, 단계 5)의 동결된 벼세포는 1일 내지 3개월 동안 보존하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 19

제 1항에 있어서, 단계 5)의 동결된 벼세포는 1일 내지 1개월 동안 보존하는 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제 1항에 있어서, 단계 1)의 벼세포는 hCTLA4Ig(human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)가 도입되어 형질전환된 것을 특징으로 하는 동결보존 방법.

청구항 23

제 1항의 방법에 의해 동결보존된 형질전환 벼세포.

청구항 24

제 23항에 있어서, hCTLA4Ig가 도입되어 형질전환된 것을 특징으로 하는 형질전환 벼세포.

청구항 25

- 1) 제 1항의 방법으로 동결보존된 벼세포를 동결 온도 이상의 온도에서 해동시키는 단계;
- 2) 단계 1)의 해동된 벼세포에서 동결보호제를 제거하는 단계;
- 3) 단계 2)의 동결보호제가 제거된 벼세포에서 세포의 생존도를 측정하는 단계;
- 4) 단계 3)의 세포 생존도가 뛰어난 벼세포를 선별하는 단계; 및

5) 단계 4)의 선별된 벼세포를 고체배지에서 배양하는 단계를 포함하는 동결보존된 형질전환 벼세포 회수 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 단계 1)의 해동 온도는 0 ~ 70℃이며, 해동시간은 1 ~ 10분인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 단계 1)의 해동 온도는 43℃이며, 해동시간은 3분인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 28

제 25항에 있어서, 단계 2)의 동결보호제는 진공조건에서 필터페이퍼를 이용하여 진공압 하에 제거하는 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 진공압은 100 ~ 300 mmHg인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 30

제 28항에 있어서, 상기 진공압은 200 mmHg인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 31

제 25항에 있어서, 단계 3)의 세포 생존도 측정은 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원 방법인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 32

제 25항에 있어서, 단계 4)의 선별은 벼세포의 동결보존 전의 상태와 비교하여 선별하는 것을 특징으로 하는 회수 방법.

청구항 33

제 25항에 있어서, 단계 5)의 배양기간은 3주인 것을 특징으로 하는 회수 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<12> 본 발명은 형질전환 벼세포의 동결보존 방법에 관한 것으로, 종래의 동결보존 방법보다 최적화된 동결보존 조건에 관한 것이다.

<13> 식물세포는 일반적으로 형질전환 동물세포 및 미생물을 통하여 합성되는 치료용 단백질을 생산하기 위한 대체 시스템으로 사용되어왔다. 이러한 단백질들을 최근 식물유래 의약품라 명명되었다. 최근 몇 년간 미국 FDA 승인된 의약품 및 허가 중인 물질은 개량 생산물(generic products)에 집중되어 있으며 계속적으로 생물공학 산업의 중추이 되고 있다. 현재 많은 재조합 단백질을 생산하기 위한 동물세포와 미생물 시스템이 구축되어 있으나 이들은 각각 대량생산에서의 비용 문제 및 전사후 변형 과정의 부재 등의 단점을 가지고 있다. 최근 담배세포에서 B형 간염 표면 항원(hepatitis B surface antigen)(Smith ML. *et al.*, *Biotechnol Prog* 18:538-550, 2002; Kumar GBS. *et al.*, *Biotechnol Lett* 27:927-932, 2005), 인간 락토페린(human lactoferrin)(Choi SM. *et al.*, *Biotechnol Lett* 25:213-218, 2003), 인간 GM-CSF(human granulocyte macrophage-colony-stimulating factor)(Shin YJ. *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 82:778-783, 2003; Lee SY. *et al.*, *Enzyme Microb Technol* 35:663-671, 2005) 및 hIL(human interleukin)-18(Sharma N. *et al.*, *Biotechnol Bioprocess Eng* 11:154-159, 2006)등의 생산이 보고되었다. 비록 식물유래 발현 시스템이 재조합 단백질을 생산하기 위하여 저렴한 비용,

간단한 배지조성, 인간과 비슷한 전사후 변형 등의 많은 이점을 가지고 있다 하더라도 재조합 단백질의 생산에 있어서의 낮은 수율은 산업화를 위한 제약으로 작용해 왔다.

<14> 최근 식물세포에서 α -아밀라아제 프로모터 시스템(α -amylase promotor system)과 신호 펩티드(signal peptide)를 당이 제거된 배지에서 사용함으로써 재조합 단백질의 생산량을 증대시킨 것이 보고된바 있다(Terashima M. *et al.*, *Biochem Eng J* 4:31-36, 1999; Trexler MM. *et al.*, *Biotechnol Prog* 21:321-328, 2005). 염들로 구성된 배양 배지는 세포 외로 배출된 재조합 단백질의 회수 및 정제과정을 간단하게 만들기 때문에 다른 숙주세포들에 비하여 이들의 높은 생산수율은 바이오 의약품의 생산을 위한 대량생산에 있어서 긍정적이라 할 수 있다. 인간 $\alpha 1$ -안티트립신(Human $\alpha 1$ -antitrypsin)(McDonald KA. *et al.*, *Biotechnol Prog* 21:728-734, 2005), 라이소자임(lysozyme)(Huang J. *et al.*, *Transgenic Res* 11:229-239, 2002), 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin)(Huang LF. *et al.*, *Transgenic Res* 14:569-581, 2005)과 같은 식물세포 유래 재조합 단백질이 최근 형질전환 벼세포를 통해서 합성된 것이 보고되었다.

<15> hCTLA4Ig(Human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)는 인간 CTLA-4 수용체(human CTLA-4 receptor)의 세포외 도메인(extracellular domain) 부분과 hIgG(human immunoglobulinG)의 Fc 부분이 합쳐진 융합단백질이다(Abrams JR. *et al.*, *J Clin Invest* 103:1243-1252, 1999). hCTLA4Ig의 기능은 CD28/B7의 대사경로(pathway)의 경쟁적인 저해제로 외부 항원(antigen)에 대한 일차적 또는 이차적인 T 세포 의존적인 항체(antibody) 반응을 억제하는 것이다. hCTLA4Ig의 면역 억제제 효과는 자가 면역질환의 치료제로서의 가능성을 보여준다. Orencia(abatacept), 즉 동물세포로부터 생산된 재조합 hCTAL4Ig은 2005년 12월에 FDA에서 류마티스 관절염 치료제로서 허가받았다(Bluestone JA. *et al.*, *Immunity* 24:233-238, 2006).

<16> 최근 본 발명자들은 형질전환된 벼세포 배양을 통하여 생물학적 특성을 나타내는 많은 양의 hCTLA4Ig의 생산을 구축하였다. 이러한 형질전환 벼세포 배양을 상업화하기 위해서는 세포주의 안정적인 유지가 필수적이다. 식물세포는 일반적으로 계속적인 계대배양을 통하여 유지된다. 그러나 이러한 방법은 고생산 세포주의 유지방법으로는 문제가 많다. 특히 상기 방법은 시간 및 비용의 낭비가 초래되며, 오염, 생산량의 감소 및 손실이 초래될 수 있다(Kartha KK. Vasil IK(ed) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol.4. Academic, Orlando pp.217-227, 1987). 그에 더하여 형질전환된 식물세포의 경우 생산물에 대한 유전적 정보의 소실이 우려될 수 있다. 그러므로 산업적 생산을 통한 상업화를 위해 형질전환된 식물세포에서 고생산 세포주의 장기보존이 고려되고 있다. 식물 현탁세포에서 동결보존을 위한 일반적인 방법은 보존방법의 과정 즉 각각의 세포주에서 삼투압 하에서의 예비배양, 동결보호제, 동결 및 재생장의 방법이 최적화되어야 하므로 아직까지 확립된바 없다. 단지 식물 현탁세포를 이용한 이차대사산물 및 재조합 단백질의 생산을 위하여 식물세포 시스템에서의 동결보존에 대한 연구가 몇편이 보고되었을 뿐이다(Chen THH. *et al.*, *Plant Physiol.* 75:726-731, 1984; Menges M and Murray JAH. *Plant J* 37:635-644, 2004).

<17> 본 발명자들은 hCTLA4Ig를 생산하는 형질전환 벼세포의 효과적이고 재현성있는 동결보존 방법을 확립하였으며, 본 방법에 따르면 형질전환 벼세포가 액체질소에서 장기보존 후 높은 세포 생존도를 유지할 뿐 아니라, 해동 후 캘러스로의 성공적으로 재생장이 유도됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 목적은 형질전환된 벼세포의 동결보존 방법, 상기 동결보존 방법에 의해 동결보존된 형질전환 벼세포 및 동결보존된 형질전환 벼세포 회수 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 형질전환된 벼세포의 동결보존 방법을 제공한다: 1) 삼투압 증진제가 첨가된 예비배양배지의 형질전환된 벼세포를 예비배양하는 단계; 2) 단계 1)의 예비배양된 벼세포에 동결보호제 혼합액을 첨가하는 단계; 3) 단계 2)의 동결보호제 혼합액이 첨가된 벼세포를 동결시키는 단계; 및 4) 단계 3)의 동결된 벼세포를 동결보존하는 단계.

<20> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 동결보존된 형질전환 벼세포를 제공한다.

<21> 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 동결보존된 형질전환 벼세포 회수 방법을 제공한다: 1) 상기 형질전환된 벼세포를 동결보존하는 방법으로 동결보존된 벼세포를 동결 온도 이상의 온도에서 해동시키는 단계; 2) 단계 1)의 해동된 벼세포에서 동결보호제를 제거하는 단계; 3) 단계 2)의 동결보존체가 제거된 벼세포에서 세포의 생존도를 측정하는 단계; 4) 단계 3)의 세포 생존도가 뛰어난 벼세포를 선별하는 단계; 및 5) 단계 4)의 선별된

벼세포를 고체배지에서 배양하는 단계.

<22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<23> 본 발명자들은 동결보존 동안 얼음 결정화(ice crystallization)를 최소화하기 위하여 형질전환 벼 세포의 세포 크기 및 수분함량을 줄이기 위하여 삼투압 하에서 예비배양을 수행하였으며, 세포를 -70℃ 냉동고에서 동결하였다. 그 결과, 120분간의 동결이 가장 효과적이었음을 알 수 있었다(도 1a 참조). 또한, 예비배양 배지내의 0.09 M 수크로오스(sucrose)에 비하여 0.3, 0.5, 0.7 M의 수크로오스가 전체 예비배양 기간에서 더 높은 생존도를 나타냄을 확인하였다(도 1a 참조). 특히 0.5 < 수크로오스가 가장 높은 생존도를 나타냈다. 이때 동결 속도는 120 분까지 -0.32℃/분을 나타내었으며, 이때의 온도는 -43℃였으며, 이후 액체질소에 동결보존하였다 (도 1b 참조).

<24> 또한 예비배양 기간을 1일부터 13일까지 나누어 배양 후에 동결보존을 수행한 결과 해동 후의 세포 생존도는 3~7일이 우수하였고, 특히 5일간 예비배양을 수행한 것이 가장 효과적이었음을 알 수 있었다(도 2 참조). 0.5 M 수크로오스를 함유한 예비배양배지에서의 시간에 따른 세포생장을 측정한 결과 배양 5일째에 가장 높은 세포생장을 나타내었으며 또한 이 기간에 세포의 크기가 가장 낮으므로 세포의 수분함량이 가장 적은 시기임을 알 수 있었다(도 3 참조).

<25> 이후 표 1과 같이 다양한 삼투압 증진제를 같은 삼투압 조건하에서 예비배양배지에 첨가하였다. 그 결과 삼투압 증진제에 따라 세포 생존도에 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 상기 조건 사이에서 0.5 M 수크로오스를 첨가한 예비배양 배지가 동결보존 후에 가장 높은 세포생존도를 나타냄을 알 수 있었다. 이때 0.2 M 수크로오스와 0.15 M 소듐 클로라이드는 0.5 M 수크로오스와 같은 삼투압을 나타내는 음성 대조군으로 사용되었으며 이때의 세포 생존도가 가장 낮음을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

<26> 본 발명자들은 표 2와 같이 DMSO, 글라이세롤 및 수크로오스를 다양한 농도로 혼합한 동결보호제를 제조하여 형질전환 벼세포에 가장 효과적인 동결보호제를 선별하기 위하여 세포에 시험하였다. 종래 보고에서 벼세포의 동결보존에 사용된 최적의 동결보호제는 0.5 M DMSO, 0.5 M 글라이세롤 및 1.0 M 수크로오스의 혼합액이라고 보고된 바 있었다. 그러나 본 발명자의 실험 결과 DMSO, 글라이세롤 및 수크로오스 각각의 1.0 M을 혼합한 동결보호제가 기존 연구에서 사용된 동결보호제보다 동결보존후에 1.2배 높은 세포 생존도를 나타내었다(도 5 참조). 이를 통해 각각의 동결보호제는 단독으로 사용하는 것 보다 혼합액의 형태로 높은 농도로 첨가할 수록 효과적임을 알 수 있다.

<27> 또한 형질전환된 벼세포를 이 실험에서 확립한 최적의 조건하에서 동결보존을 수행하였으며, 동결보존후 세포생존도를 1달간(30일) 측정한 결과 처음 1일 동결보존 후의 세포생존도는 88% 인 것으로 나타났으며, 한달간의 동결보존 후에도 72%의 높은 세포생존도를 나타냄을 알 수 있었다(도 6 참조).

<28> 본 발명자들은 동결보존후의 세포를 회수하여 세포를 고체배지에서 재생장을 성공적으로 유도하였다. 본 발명자들은 3주간의 회복기간을 통하여 재생장된 세포로부터 삽입된 hCTLA4Ig 유전자의 발현 및 단백질의 합성량을 측정하였다. 제조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 당이 제거된 고체 배지에서 세포를 4일간 배양하여 mRNA 및 단백질 발현을 분석하였다. 그 결과, 재생장된 캘러스에서 mRNA의 발현은 동결보존 하기 전과 변함없이 발현됨을 확인하였으며(도 7a 참조), 제조합 hCTLA4Ig의 발현량 또한 1달간의 동결보존에 영향없이 생산됨을 확인하였다(도 7b 참조). 이를 통해 본 발명자는 최적의 동결보존 조건을 수립하였는데, 삼투압 증진제로는 0.5 M 수크로오스가 포함된 예비배양배지를 이용하여 형질전환된 벼세포를 5일간 후 -0.32℃/분으로 -43℃까지 120분간 동결한 후 액체질소에 동결보존하는 것이 그것이다.

<29> 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 형질전환된 벼세포의 동결보존 방법을 제공한다: 1) 삼투압 증진제가 첨가된 예비배양배지의 형질전환된 벼세포를 예비배양하는 단계; 2) 단계 1)의 예비배양된 벼세포에 동결보호제 혼합액을 첨가하는 단계; 3) 단계 2)의 동결보호제 혼합액이 첨가된 벼세포를 동결시키는 단계; 및 4) 단계 3)의 동결된 벼세포를 동결보존하는 단계.

<30> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 삼투압 증진제는 수크로오스인 것이 바람직하다. 상기 수크로오스의 농도로는 0.3 ~ 0.7 M인 것이 바람직하며, 0.4 ~ 0.6 M인 것이 더욱 바람직하며, 0.5 M인 것이 가장 바람직하다. 또한 단계 1)의 예비배양기간은 3 ~ 7일인 것이 바람직하며, 4 ~ 6일인 것이 더욱 바람직하며, 5일인 것이 가장 바람직하다.

<31> 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 동결보호제 혼합액은 DMSO(dimethyl sulfoxide), 수크로오스 및 글라이세롤(glycerol)로 구성되는 것이 가장 바람직하다. 상기 DMSO, 수크로오스 및 글라이세롤은 각각 0.5 ~ 1.5 M의 농

도로 혼합되는 것이 바람직하며, 각각 1 M의 농도로 혼합되는 것이 가장 바람직하다. 또한 0.1 g 벼세포당 0.1 ~ 0.9 mL의 동결보호제 혼합액을 첨가하는 것이 바람직하며, 0.3 mL의 동결보호제 혼합액을 첨가하는 것이 가장 바람직하다.

- <32> 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 동결은 냉동고에서 -0.32℃/분의 속도로 50 ~ 200분간 동결시키는 것이 바람직하며, 120분간 동결시키는 것이 가장 바람직하다.
- <33> 상기 방법에 있어서, 단계 4)는 액체질소에 동결보존하는 것이 가장 바람직하다. 또한 동결보존 기간은 1일 내지 5개월인 것이 바람직하며, 1일 내지 3개월인 것이 더욱 바람직하며, 1일 내지 1개월인 것이 가장 바람직하다.
- <34> 상기 방법으로 형질전환된 벼세포를 동결보존할 경우, 1일간 동결보존시 80 ~ 88%의 세포생존도를 나타내며, 1달 동안 동결보존시 69~72%의 세포생존도를 나타낸다.
- <35> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 벼세포는 hCTLA4Ig(human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-Immunoglobulin), α1-안티트립신(Human α1-antitrypsin), 라이소자임(lysozyme) 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin) 등이 도입되어 형질전환되는 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에서는 산업적으로 이용가능성이 높은 hCTLA4Ig를 도입하여 형질전환하였다.
- <36> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 동결보존된 형질전환 벼세포를 제공한다.
- <37> 본 발명의 형질전환 벼세포는 hCTLA4Ig가 도입되어 형질전환된 것을 특징으로 한다.
- <38> 아울러, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 동결보존된 형질전환 벼세포 회수 방법을 제공한다: 1) 상기 형질전환된 벼세포를 동결보존하는 방법으로 동결보존된 벼세포를 동결 온도 이상의 온도에서 해동시키는 단계; 2) 단계 1)의 해동된 벼세포에서 동결보호제를 제거하는 단계; 3) 단계 2)의 동결보존제가 제거된 벼세포에서 세포의 생존도를 측정하는 단계; 4) 단계 3)의 세포 생존도가 뛰어난 벼세포를 선별하는 단계; 및 5) 단계 4)의 선별된 벼세포를 고체배지에서 배양하는 단계.
- <39> 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 해동 온도는 0~70℃이며, 해동시간은 1 ~ 10분인 것이 바람직하며, 더욱 상세하게는 해동 온도는 43℃이며, 해동시간은 3분인 것이 가장 바람직하다.
- <40> 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 동결보호제는 진공 조건에서 필터페이퍼를 이용하여 진공압 하에 제거하는 것이 바람직하며, 상기 진공압은 100~300 mmHg인 것이 바람직하며, 더욱 상세하게는 200 mmHg인 것이 가장 바람직하다.
- <41> 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 세포 생존도 측정은 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원 방법인 것이 바람직하다.
- <42> 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 선별 방법은 해동된 동결보존한 형질전환 벼세포와 형질전환된 세포의 동결보존 전의 상태를 비교하여 세포생존도가 높은 벼세포를 선별하는 것이 바람직하다.
- <43> 상기 방법에 있어서, 단계 5)의 배양기간은 3주인 것이 바람직하다.
- <44> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- <45> 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<46> <실시예 1> 동결보존의 다양한 조건에 의한 형질전환 벼 현탁세포의 생존도 조사

<47> <1-1> 식물세포배양

<48> 30 mg/L의 hCTLA4Ig를 생산하는 *Oryza sativa* L. CV. *Dongjin*의 형질전환 현탁세포는 보령제약으로부터 확립되어 제공받았다. 벼 캘러스의 형질전환은 충격-매개 형질전환(bombardment-mediated transformation) 방법을 통하여 수행하였다(Shin YJ. *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 82:778-783, 2003). 형질전환 벼 캘러스로부터 유래된 형질전환 벼 현탁세포는 변형된 2 mg/L 2,4-디클로로페녹시초산(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.2 mg/L 키네티(kinetin), 0.1 mg/L 지베렐린 산(gibberellic acid) 및 3%(w/v) 수크로오스(sucrose)를 첨가한 AA 배지(Thompson JA. *et al.*, *Plant Sci* 47:123-133, 1986)에서 배양되었다. 50 mg/L 하이그로마이신(hygromycin)은 형질전환된 벼세포를 유지하기 위한 선택압(selection pressure)으로 첨가하였다. 계대배양을 10일 간격으로 수행하였으며, 110 rpm으로 28℃의 교반 배양기(shaking incubator)에서 배양하였다. 생산배지

는 배양배지에서 수크로오스를 제외한 배지를 사용하였다.

<49> <1-2> 예비배양 조건에 대한 조사

<50> 본 발명자들은 다양한 예비배양 배지를 준비하여 조건을 다양화하였다. 방법은 하기와 같다. 다양한 예비배양 배지는 액체질소에 넣기 전에 사용되었으며, 0.09, 0.3, 0.5 및 0.7 M 수크로오스를 사용하여 1, 3, 5, 7, 9, 또는 14일간 배양하였다. 분당 1 °C씩 내려가는 Mr. Frosty freezing container(Nalgene, USA)에 동결보호제를 첨가한 세포를 넣은 뒤 -70°C에서 천천히 예비동결을 수행하였다. 이때의 예비동결 속도를 측정하기 위하여 freezing container안의 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)의 온도를 90, 120, 240, 480 및 1440 분에서 측정하였으며, 각각의 간격에서의 예비동결된 세포를 액체질소에 보관하였다. 해동은 43°C의 워터 베스(water bath)에서 3분간 수행하였다.

<51> 세포의 생체 중량(FCW:fresh cell weight) 및 세포의 건조중량(DCW:dry cell weight)을 측정함으로써 세포의 생장을 나타내었다. 플라스크로부터 현탁세포의 샘플은 와트만 No.1 필터 페이퍼(Whatman No. 1 filter paper)에 진공(vacuum)압 200 mmHg 하에서 동량의 증류수로 배지성분을 제거하여 세포의 생체중량을 측정하였으며, 세포의 건조 중량은 이것을 다시 60°C에서 24시간을 건조한 뒤 측정하였다. 세포의 생체중량/세포의 건조 중량 비율, 즉 세포 간접 크기 지수는 식물세포내의 물 함량을 의미하며, 세포의 생체중량을 세포의 건조중량으로 나누어 계산하였다.

<52> 해동된 세포는 회수하자마자 동결보호제를 여러 장의 토요 No.1 필터 페이퍼(Toyo No.1 filter paper)를 이용하여 진공압 200 mmHg를 이용하여 제거하였다. 세포의 생존도는 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원 방법을 이용하였으며, 동결보호하기 전의 세포에 대한 상대적인 값으로 나타내었다. TTC 환원 방법은 다음과 같다. 0.05 M의 포타슘 포스페이트 버퍼(phosphate buffer, pH 9)에 1.5%의 TTC 파우더(Sigma, T-8877, USA)를 용해한 것을 0.1 g의 세포당 1.6 mL를 첨가하여 20°C 워터 베스에서 24 시간동안 반응시킨 뒤 TTC 용액을 제거한 후 1 mL의 알코올을 첨가하여 60°C 워터 베스에서 30분간 추출하였다. 이후 추출한 상등액을 수거하여 485 nm에서 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하였다. 동결보존 후에 회수된 세포는 세포 생존도를 측정 및 세포재생장을 위하여 50 mg/L의 하이그로마이신을 함유한 AA 고체배지에서 배양되었다.

<53> 그 결과, 예비동결 과정은 120분이 가장 적합하며, 예비배양 배지 내 0.09 M 수크로오스를 첨가하는 경우에 비하여 0.3, 0.5 및 0.7 M 수크로오스를 첨가한 경우가 전체 예비배양 기간 중에서 더 우수한 생존도를 나타냄을 확인하였으며, 0.5 M 수크로오스를 첨가하는 것이 가장 우수한 세포생존도를 나타냄을 확인하였다(도 1a). 동결 속도는 120분까지 -0.32°C/분을 나타내었으며, 이때의 온도는 -43°C였다. 이후 액체질소에 동결보존되었다(도 1b).

<54> 또한, 예비배양 기간을 1일부터 13일까지 나누어 배양 후에 동결보존을 수행한 결과, 해동후의 세포 생존도는 5일간 예비배양을 수행한 것이 가장 효과적임이 확인되었다(도 2). 0.5 M 수크로오스를 함유한 예비배양배지에서 시간에 따른 세포생장을 측정한 결과 배양 5일째에 가장 높은 세포생장을 나타냈으며, 또한 이 기간에 세포의 크기가 가장 낮은 것을 알 수 있었다(도 3). 이를 통해 배양 5일째가 세포의 수분함량이 가장 적은 시기임을 알 수 있다.

<55> <1-3> 삼투압 증진제 조건에 대한 조사

<56> 만노스(Mannitol), 소르비톨(sorbitol), 트리할로스(trehalose) 및 소듐 클로라이드(sodium chloride)를 삼투압 조절제로써 동일한 삼투압 조건으로 예비배양 배지에 표 1과 같은 조건으로 첨가하였다. 각각의 배지 내의 삼투압은 Osmette A osmometer(Fisher, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포의 생존도는 실시예 1-2의 방법과 같이 수행하였다.

표 1

<57> 삼투압 증진제 조건

	예비 배양 배지에 첨가한 삼투압 증진제 조건
실험군 a	0.5 M 수크로오스
실험군 b	0.2 M 수크로오스 + 0.3 M 만니톨
실험군 c	0.2 M 수크로오스 + 0.3 M 소르비톨
실험군 d	0.2 M 수크로오스 + 0.3 M 트리할로스
실험군 e	0.2 M 수크로오스 + 0.15 M 소듐 클로라이드

<58> 그 결과, 삼투압 증진제에 따라 세포 생존도에 많은 차이가 남을 알 수 있었다. 이때, 0.2 M 수크로오스와 0.15 M 소듐 클로라이드는 음성 대조군이며, 세포 생존도가 가장 낮음을 확인하였다(도 4).

<59> <1-4> 동결보호제 조건에 대한 조사

<60> 동결보호제는 표 2와 같은 여러 가지 농도의 DMSO, 글라이세롤(glycerol) 및 수크로오스를 혼합하여 제조한 후 동결튜브에 0.4 g의 예비 배양 후의 세포와 1.2 mL의 동결보호제를 첨가하여 실험을 수행하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행되었다.

표 2

<61> 동결보호제의 조성

DMSO	글라이세롤	수크로오스
1.0 M	1.0 M	1.0 M
1.0 M	0.5 M	1.0 M
0.5 M	0.5 M	1.0 M
0.5 M	1.0 M	1.0 M
0.5 M	0.5 M	0.3 M
0.5 M	1.0 M	0.5 M
0.5 M	0.3 M	0.5 M
1.0 M	0.5 M	0.5 M
0.5 M	0.5 M	0.5 M
0.3 M	0.5 M	0.5 M
0	0.5 M	0.5 M
0.5 M	0	0.5 M
0.5 M	0.5 M	0

<62> 기존의 보고에 의하면 DMSO, 글라이세롤 및 수크로오스 각각을 0.5 M씩 혼합하는 것이 최적의 동결보호제의 조건이었다. 표 2과 같이 다양한 농도로 혼합한 동결보호제를 제조하여 형질전환 벼세포의 동결보존에 이용한 결과, DMSO, 글라이세롤 및 수크로오스 각각이 1.0 M로 혼합한 동결보호제가 기존의 최적의 동결보호제의 조건보다 동결보존 후 1.2배 높은 세포 생존도를 나타내었다(도 5). 또한 각각의 동결보호제는 각각으로 사용하는 것보다 혼합액의 형태를 높은 농도로 첨가할수록 효과적임을 알 수 있었다.

<63> <1-5> 동결보존 기간별 세포생존율 조사

<64> 상기에서 밝혀진 최적의 동결보존 조건(0.5 M 수크로오스를 첨가한 AA 예비배양배지를 이용하여 5일간 예비배양, 1 M 수크로오스, 1 M 글라이세롤 및 1 M DMSO로 혼합된 동결보호제를 이용한 동결)을 통하여 세포를 동결보존한 후, 1일간 및 한달간 보존한 벼세포를 다시 해동하여 세포생존율을 측정하였다. 실시예 1-2와 같은 방법으로 벼세포를 해동한 후 세포생존율을 측정하였다.

<65> 그 결과, 1일간 보존한 벼세포는 평균 88%의 생존율이 관찰되었으며, 한달간 보존한 벼세포는 평균 72%의 생존율이 관찰되었다(도 6).

<66> <1-6> RT-PCT(Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction analysis)

<67> 실시예 1-2에서 동결보존 후의 세포를 회수하여 세포를 고체배지에서의 재생장을 성공적으로 유도한 본 발명자들은 3주 간의 회복기관을 통하여 재생장된 세포로부터 삽입된 hCTLA4Ig 유전자의 발현을 측정하였다. 유전자의 발현을 확인하기 위하여 당이 제거된 고체 배지에서 세포를 4일간 배양하였다. 캘러스 내의 전체 RNA는 RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, USA)를 사용하여 분리하였다. RT-PCR은 two-step RT-PCR-&GO kit(QBIOgene, USA)를 이용하여 수행하였다. PCR 증폭을 위하여 사용한 프라미어들은 하기와 같다: hCTLA-4-F1(5'-CTG CAG GCA ATG CAC GTG GCC CAG-3':서열번호 1) 및 hCTLA-4-R1(3'-TCT AGA CAG AAT CTG GGC ACG GTT C-5': 서열번호 2). hCTLA4Ig 융합 단백질의 mRNA 크기가 분석을 하기에는 너무 크기 때문에 hCTLA-4의 mRNA의 프로필을 사용하였다. 대조군으로는 벼 β -액틴 형질전환체(β -actin transcripts)를 증폭하여 사용하였다.

<68> 그 결과, 재생장된 캘러스에서 mRNA의 발현은 동결보존하기 전과 변함없이 발현됨을 확인하였다(도 7a).

<69> <1-7> hCTLA4Ig 정량 조사

<70> 본 발명자들은 동결보존 후 재생장된 캘러스에서 hCTLA4Ig 단백질의 양을 정량적으로 측량하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 당이 제거된 고체 배지에서 세포를 4일간 배양하였다. 세포내의 단백질은 0.1 g의 베타 캘러스로부터 액체질소를 이용하여 파쇄한 후 세포용해 버퍼[lysis buffer: 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 29 mM MgCl₂, 4% CHAPS(3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 10 mM EDTA, 100 mM DTE(dithioerythritol), protease inhibitor cocktail)를 200 μ l 첨가하여 상온에서 반응하여 추출하였다. 재조합 hCTLA4Ig의 농도는 염소 항인간 IgG 항체(goat antihuman IgG antibody)를 이용하여 포획(capture)후에 HRP(horseradish peroxidase)-표지된 염소 항인간 InG 항체(labeled goat antihuman IgG antibody)(KPL Inc., USA)를 사용하여 검출하는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다. ELISA 방법은 하기와 같다. 포획 항체[Capture Antibody: Goat anti-human IgG(Fc)(KPL, USA)]를 코팅 버퍼(coating buffer : 1 L당 1.59 g Na₂CO₃, 2. 93 g NaHCO₃, HCl로 pH 9.6으로 적정)와 1:1000으로 희석하고 96-웰당 100 μ l씩 로딩한 후 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 이 후 블로킹 버퍼(blocking buffer: 2 플레이트 기준으로 49 mL PBS, 0.2% FBS 1 mL)를 웰당 200 μ l씩 분주하고 2시간 동안 상온에서 방치한 후 세척 버퍼(washing buffer : 1 L당 3.0 g NaCl, 0.2 g NH₂PO₄, 1.15 g KCl, pH 7.4로 적적항 후 tween 0.05% 500 μ l 첨가)로 3회 세척하였다. 이후 스탠다드(standard)로 인간 IgG(human IgG, Pierce, USA) 및 샘플을 웰당 200 μ l씩 로딩하고 1/2로 3회 희석하였다. 이후 37℃에서 1시간 또는 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후 세척 버퍼로 4회 세척하였다. 이후 검출 항체와 퍼옥시데이즈가 표지된 염소 항-인간 IgG(peroxidase labled goat anti-human IgG, KPL, USA)를 이용하여 검출하였다. 이때 검출 항체와 어세이 버퍼(assay buffer: 1 플레이트 기준으로 49 mL PBST, 0.2% FSB 1 mL)를 1:5000으로 희석하여 웰당 100 μ l씩 로딩하였고, 37℃에서 1시간 동안 방치하고 5회 세척하였다. 기질로는 ABTS 퍼옥시데이즈 기질(peroxidase substrate, KPL, USA)을 이용하였다. 웰당 기질을 100 μ l씩 로딩하였고 15분간 상온에서 반응시켰다. 이후 정지 버퍼(stop buffer: peroxidase stop solution KPL No. 50-85-02를 1/5로 희석하여 1 플레이트당 10 mL)를 웰당 100 μ l씩 분주하고 OD 405 nm에서 측정하였다.

<71> 그 결과, 재조합 hCTLA4Ig의 단백질은 1달간의 동결보존에 영향없이 생산됨을 확인하였다(도 7b).

발명의 효과

<72> 본 발명은 최적화된 동결보존 방법에 관한 것으로, 0.5 M 수크로오스를 포함한 예비배양배지에서 형질전환된 베타 세포를 5일간 예비배양한 후 최적의 농도 비율로 혼합된 동결보호제를 첨가하여 동결하고, 동결보관한 후 해동하여 재생장에 성공함을 확인함으로써 형질전환된 베타 세포를 동결보존 및 동결보존된 베타 세포를 회수하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 동결보존 조건을 조사한 결과이다:

<2> a : 수크로오스 농도 및 동결 시간별 세포 생존율 그래프; 및

<3> b : 동결시 온도 및 시간대를 나타내는 그래프.

<4> 도 2는 예비배양 시간대별 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

<5> 도 3은 예비배양 시간대별 세포의 생체중량(FCW:fresh cell weight) 및 세포의 건조중량(DCW; dry cell weight)을 나타낸 그래프이다.

<6> 도 4는 삼투압 증진제 조건에 따른 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

<7> 도 5는 동결보호제 조건에 따른 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

<8> 도 6은 최적의 동결보존 조건에 따른 동결보존시간별 세포 생존율을 나타내는 그래프이다.

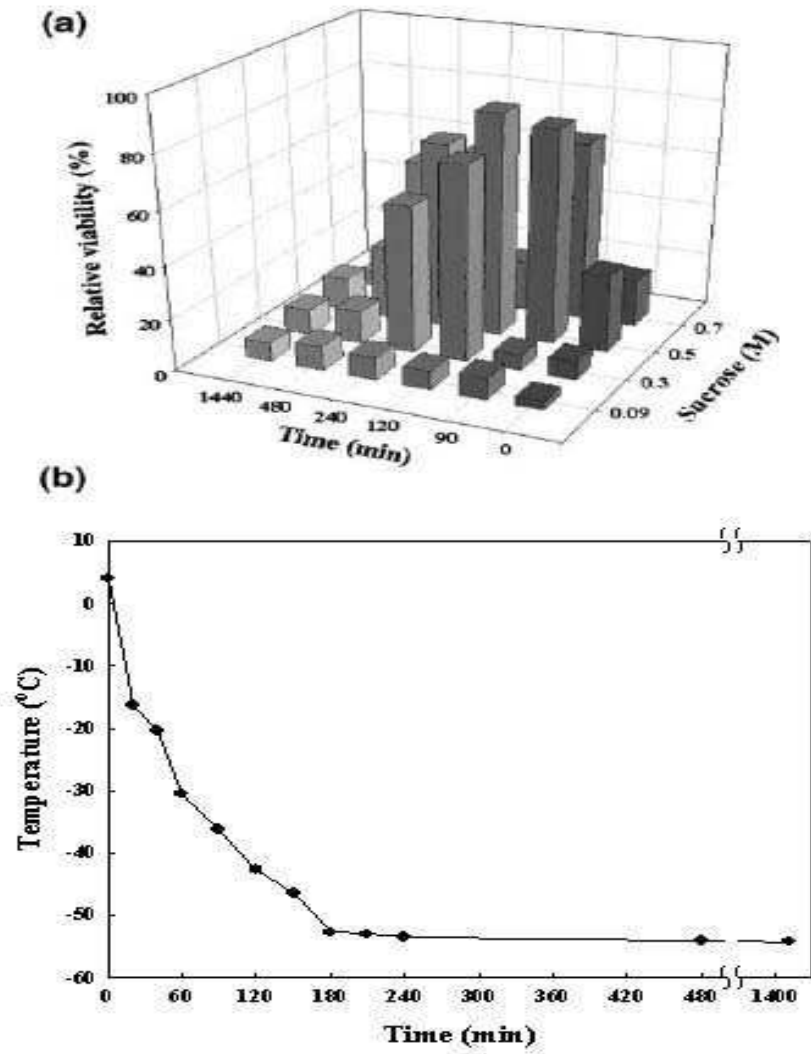
<9> 도 7은 hCTLA4Ig의 단백질 정량 및 유전자 발현 조사한 결과이다:

<10> a : hCTLA4Ig의 유전자 발현을 조사한 RT-PCR 결과; 및

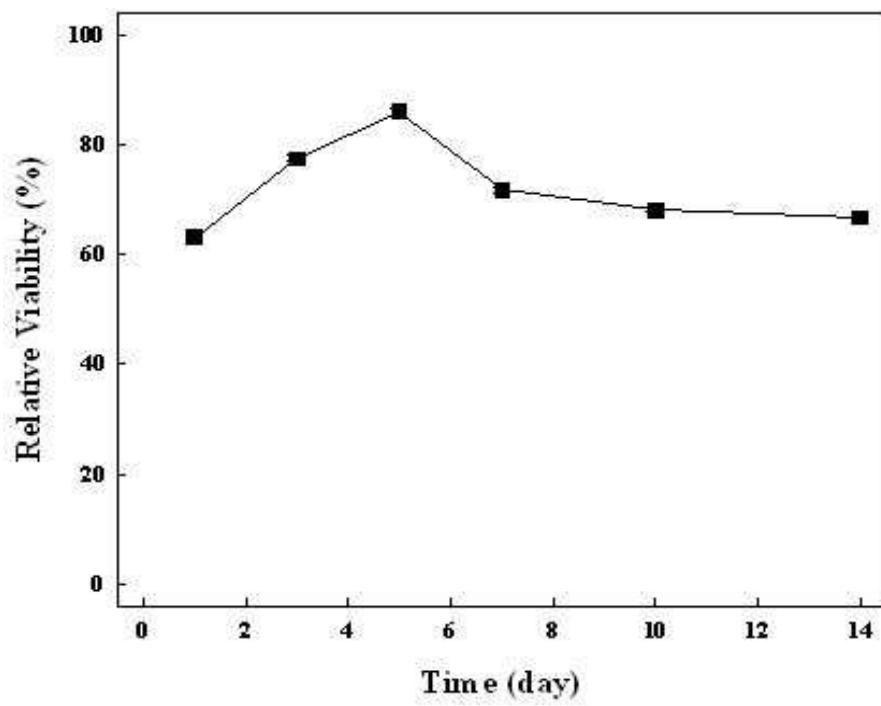
<11> b : hCTLA4Ig의 단백질 정량 결과.

도면

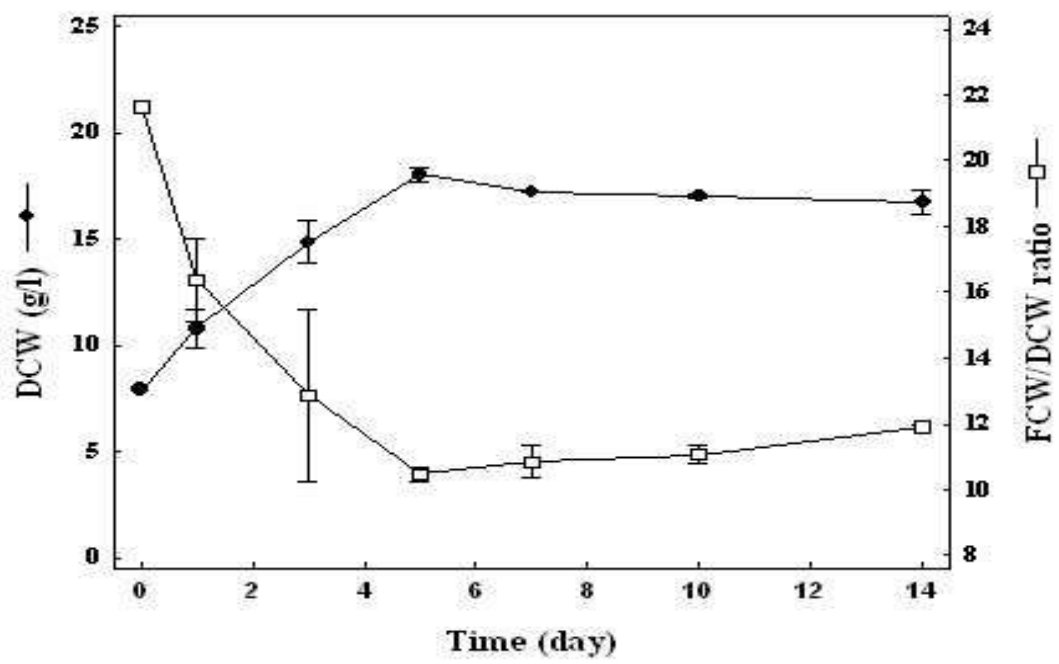
도면1



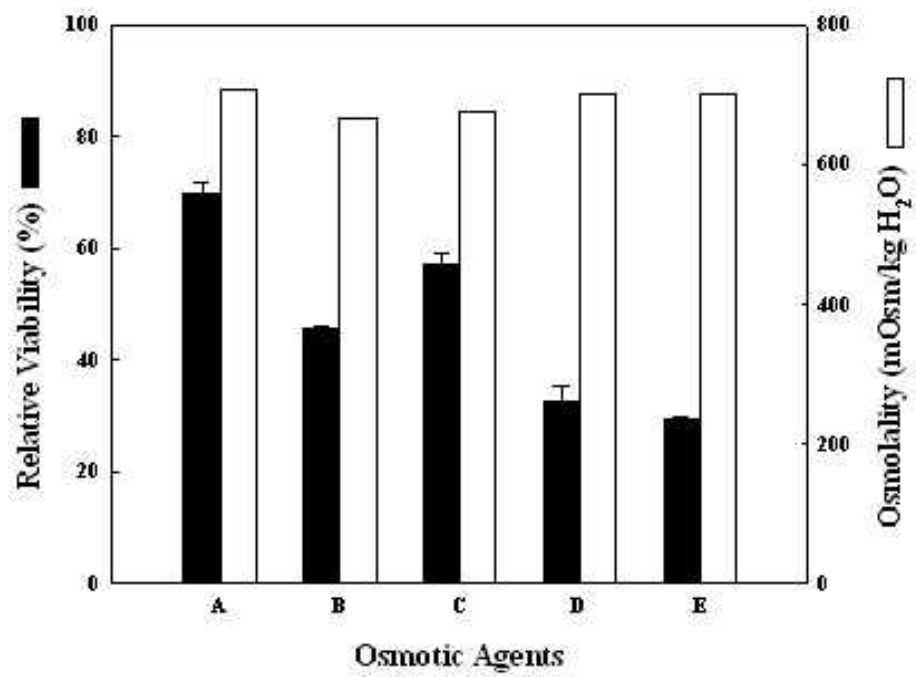
도면2



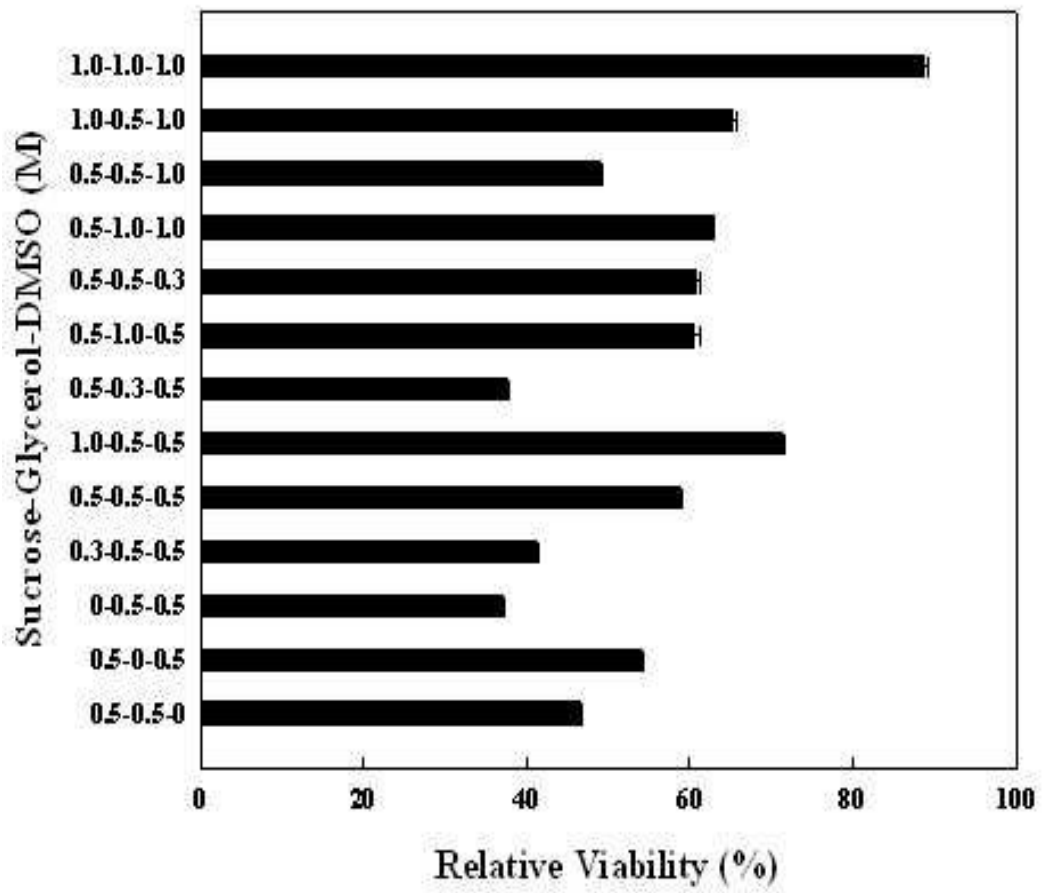
도면3



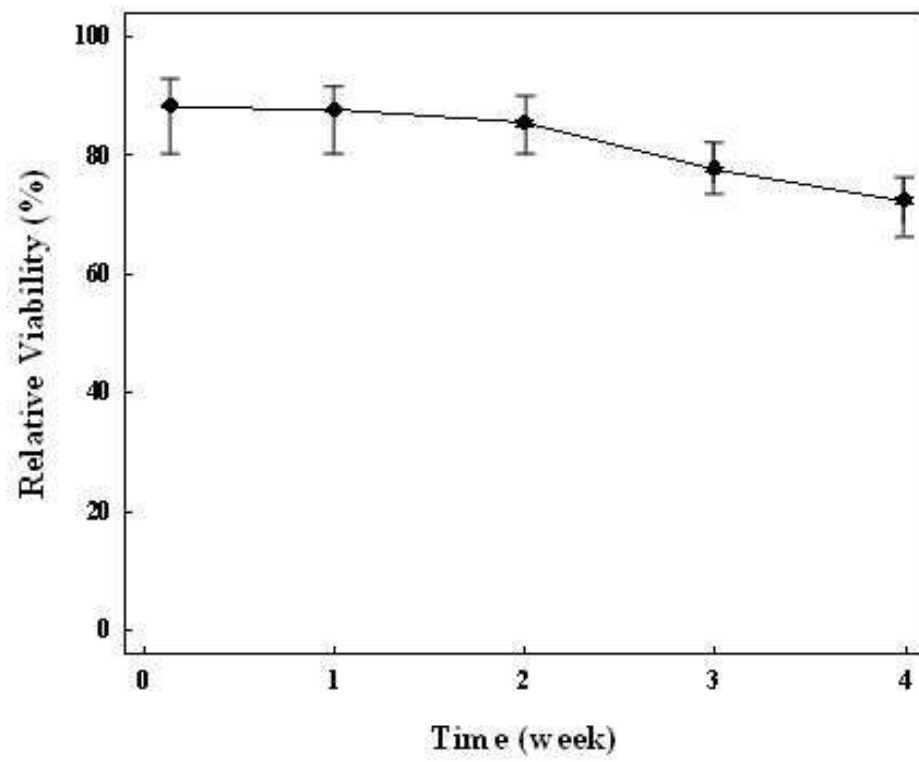
도면4



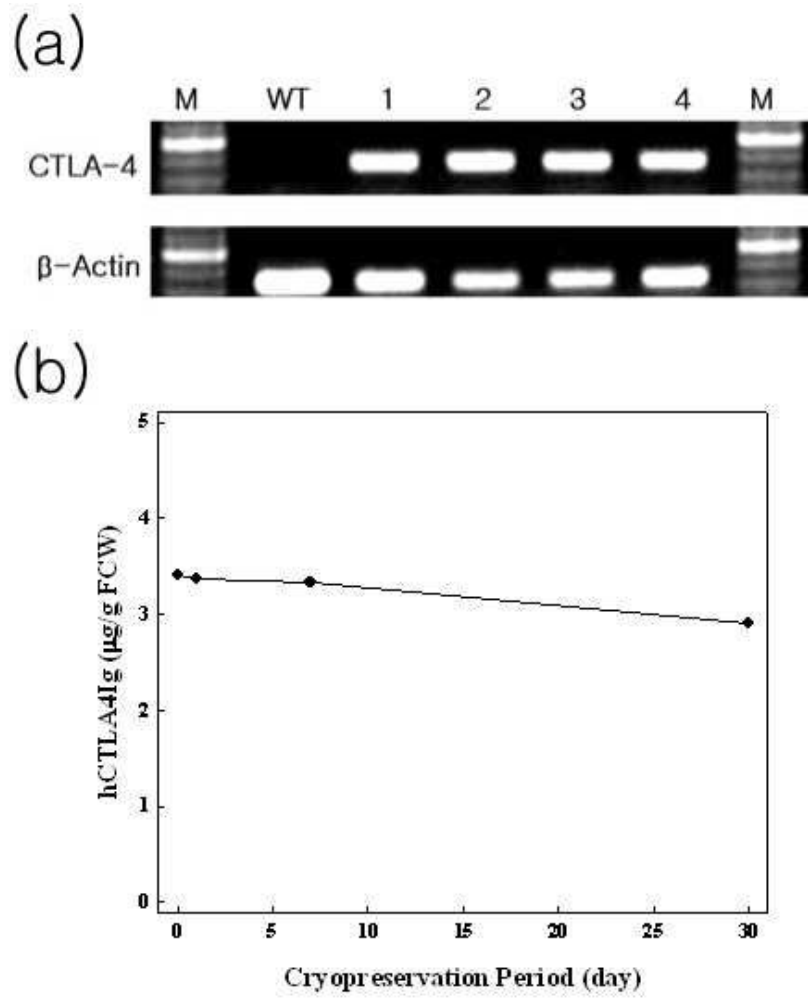
도면5



도면6



도면7



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)