(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0107804
(43) 공개일자 2014년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/65 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0021817
(22) 출원일자 2013년02월28일
심사청구일자 2014년01월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김민규
대전광역시 중구 수침로 122, 101동 703호(태평동, 푸른뫼아파트)
김근중
전라남도 고흥군 남양면 망주평촌길 29
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

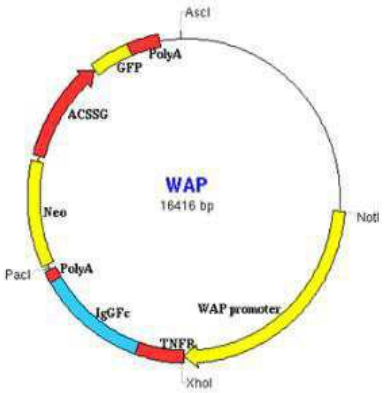
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **바이오 신약 생산용 형질전환 돼지 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 류머티스관절염 치료제를 대량생산하기 위한 방법으로서, 돼지 유선에서 특이적으로 발현되며 조절되는 염기서열을 포함하는 발현벡터, 그 발현벡터를 이용해서 형질전환시킨 동물과 그 동물의 유선에서 유전자를 발현시켜 치료제를 생산하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 TNF-R fusion protein을 대량생산하기 위해 재조합 단백질을 만들고 돼지의 체세포에 transfection 시킨 후 체세포 복제로서 형질전환 동물인 돼지를 생산한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이지혜

대전광역시 유성구 노은동로 187, 605동 1504호(지족동, 열매마을 6단지)

김은영

경기도 의왕시 부곡중앙로 13-13, 가동 301호(삼동, 대신빌라)

김마리아

대전광역시 유성구 어은로 57, 125동 903호(어은동, 한빛아파트)

김종상

대전광역시 중구 동서대로 1388, 103동 802호(목동, 한사랑아파트)

김홍주

충청남도 보령시 진등2길 21(명천동)

임재삼

충청남도 보령시 동현로 46, 203동 704호(동대동, 현대아파트)

백준종

대전광역시 유성구 동서대로 725, 1202동 1102호(원신흥동, 어울림하트A)

이정웅

대전광역시 유성구 문지로 22, 101동 206호(도룡동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012-1038
부처명	산학협력선도대학(LINC) 육성사업단
연구사업명	산학협력선도대학(LINC) 육성사업/차세대바이오그린
연구과제명	산학협력선도대학(LINC) 육성사업/TNF-α receptor antibody 분비 형질전환 돼지의 생산 및 분리정제 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	산학협력선도대학(LINC) 육성사업단/충남대학교 산학협력단
연구기간	2012.04.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

도 1의 WAP(Whey acid Protein)-promoter를 포함하는 벡터(vector).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 벡터(vector)는 유전자발현벡터(vector).

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 벡터는 selective marker를 포함하는 벡터(vector).

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 selective marker는 neomycin 저항성 유전자 또는 GFP(green fluorescent protein) 유전자 중에서 어느 하나 이상을 포함하는 벡터(vector).

청구항 5

WAP-promoter, TNF-a-receptor 유전자 및 human IgG1 Fc 유전자를 포함하는 재조합 DNA.

청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 TNF-a-receptor 유전자 및 상기 human IgG1 Fc 유전자는 융합단백질(recombinant human TNF-a-receptor-Fc fusion protein :TNFR-Fc)에 포함되는 유전자인 재조합 DNA.

청구항 7

WAP-promoter, TNF-a-receptor 유전자 및 human IgG1 Fc 유전자를 포함하는 형질전환된 세포주.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 형질전환된 세포주는 돼지(Sus scrofa domesticus)에서 유래한 세포주.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 형질전환된 세포주는 돼지의 체세포(somatic cell)인 세포주.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 형질전환된 세포주는 랜드레이스(Landrace)에서 유래한 체세포(somatic cell)인 세포주.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 형질전환된 세포주는 돼지의 섬유아세포(fibroblast)인 세포주.

청구항 12

WAP-promoter, TNF-a-receptor 유전자 및 human IgG1 Fc 유전자가 도입된 형질전환동물(transgenic animal).

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 형질전환동물은 류마티스관절염 치료제를 생산하는 형질전환 동물.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 형질전환동물은 TNF-a-receptor 와 human IgG1 Fc가 융합된 단백질(recombinant human TNF-a-receptor-Fc fusion protein :TNFR-Fc)을 생산하는 형질전환 동물.

청구항 15

제 12항에 있어서,

상기 형질전환동물은 돼지(Sus scrofa domesticus)인 형질전환 동물.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항에 있어서,

상기 벡터, 세포주 및 형질전환 동물을 이용하여 외래 단백질을 생산하는 방법.

청구항 17

제 16항 있어서,

상기 외래 단백질은 류마티스관절염 치료제인 생산방법.

청구항 18

제 17항 있어서,

상기 류마티스관절염 치료제는 TNFR-Fc 융합단백질인 생산방법.

청구항 19

제 16항에 있어서,

상기 외래단백질을 생산하는 방법은 상기 벡터, 세포주 및 형질전환 동물의 유선에서 외래 단백질을 생산하는 발현벡터를 이용한 형질전환동물의 유선에서 유전자 발현을 조절하는 방법.

청구항 20

제 16항에 있어서,

상기 TNFR-Fc 융합단백질을 형질전환된 돼지의 유선에서 발현시켜 류마티스관절염 치료제를 생산하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벡터(vector)를 이용하여 돼지의 형질을 전환하는 방법 및 형질전환 돼지에 관한 발명으로서, 류마티스 관절염의 치료제를 대량 생산하는 방법 및 유전자가 재조합된 형질전환 동물을 제공한다.

[0002] 보다 구체적으로는 인간 재조합 TNF-R fusion protein을 유선 특이적인 프로모터를 이용하여 유선에서 치료제를 생산하는 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 포유동물 개체를 숙주로 이용하는 방법 즉, 형질전환동물(transgenic animal) 생산기법을 이용한 인체생리활성물질을 생산하는 것이 가장 유력한 방법으로 여겨지고 있다. 이러한 생산방법을 동물생체반응기 (Animal Bioreactor)라고 부르며, 최근 미국, 영국 및 네덜란드의 세계적인 기업발명소에서 상당한 수준까지 발명이 진행되어 산업화를 위한 발명으로 발전되고 있는 실정이다.

[0004] 형질전환동물이란 전통적인 교배가 아니라 재조합 DNA 기술과 생식세포공학적 방법에 의하여 새로운 유전형질을 얻게 된 동물을 말하는 것으로서, 이러한 형질전환 (transgenesis)에는 크게 두가지 종류가 있는데 하나는 체세포 형질전환과 생식세포 형질전환이 있다. 체세포 형질전환은 새로이 얻은 유전형질이 그 동물에서는 나타나지만 다음세대로는 전달되지 않는 경우를 말한다. 이러한 경우의 대표적인 예로는 인간에서 유전자 치료를 들 수 있다. 어떠한 질병이 특정 유전자의 이상이나 결핍에 의해서 온다면 정상 유전자를 환자의 세포에 주입하여 정상적인 기능을 할 수 있도록 하여 치유하게 되는데 이 경우 새로이 들어간 유전자는 환자 당대에서만 기능할 뿐 후세에는 전달되지 않는다.

[0005] 이와 반면 생식세포 형질전환은 새로운 유전자를 생식세포로 직접이나 아니면 형질전환된 세포가 생식세포로 전이되도록 하여 새로운 유전형질이 당대뿐 아니라 후세에 까지 전달되는 경우를 말한다. 일반적으로 진정한 의미의 형질전환동물의 생산은 생식세포 형질전환을 통하여 이루어진다.

[0006] 동물의 복제기술은 발생생물학을 비롯한 여러 분야 발명에 이용될 수 있으며 유용 단백질의 생산, 질환 모델의 개발 및 장기 이식 분야 등 다양한 의학 및 의약 분야에 크게 기여할 것으로 예상되어 그 산업적 유용성이 매우 크다고 할 수 있다. 즉, 상기와 같은 기술을 이용한 생산시스템은 경제성이 매우 높아, 현재 고가로 판매되는 생리활성 물질을 저렴하게 공급할 수 있을 뿐만 아니라, 인체와 생리학적으로 가장 가까운 동물 자체를 생리활성물질 생산 시스템으로 활용하기 때문에 고품질의 생리활성물질을 생산할 수 있고, 동물의 생체 내 단백질 생산 시스템을 활용하기 때문에 대량 생산이 가능하며, 특히 섭취 백신과 같은 의약품 개발은 별도의 정제과정이 필요하지 않는 등의 장점이 있다.

[0007] 많은 종류의 동물들이 재조합 단백질을 생산하기 위하여 형질전환 발명에 사용되고 있으며, 외래 유전자의 발현을 위하여 사용되는 동물의 선택은 필요한 단백질의 양뿐만 아니라 번식적 효율 등의 특징들에 의하여 결정된다. 생쥐의 경우 형질전환군(founder)을 형성하기 전 재조합 벡터의 효율적인 발현을 위한 최적화가 가능하나, 매우 한정된 생쥐의 우유 생산량은 ㎎ 수준의 재조합 단백질의 생산에 부적합하다. 젖소가 우유생산량에서는 최고이지만 성 성숙일령, 임신기간, 산자 수, 형질 전환율 및 사양관리 측면을 고려하면 Animal Bioreactor로서 적합하지만은 않다. 최근 많은 발명에서 Bioreactor로 이용되고 있는 돼지는 현재까지 많은 기초발명이 이루어져 있으며, 생리해부학적 특징이 인간과 매우 유사하며, 번식 및 사육 효율이 좋아, 최적의 중대형 생물자원으로 관심이 고조되고 있다.

[0008] 뿐만 아니라 돼지는 인간 식량자원의 중요한 부분으로 이미 활용되고 있기에 다른 대형 동물에 비해 윤리적 문제의 제기 측면에서도 이해도가 높다고 생각된다. 그러나 현재까지의 발명개발로 얻어진 형질전환동물 유래의 재조합단백질의 생산은 소량에 그쳐 많은 개체를 요구하는 문제를 안고 있으며 이러한 문제점을 극복하기 위하여 많은 재조합단백질을 유선 특이적 프로모터를 이용하여 유즙에서 생산할 수 있도록 하는 발명들이 진행되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2005-0115179호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2007-0081531호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명은 유용단백질을 돼지 등의 포유동물의 유선에서 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 동물을 생산

하기 위해 유선 특이 프로모터를 이용하여 유즙 특이 형질전환 발현벡터를 제작할 수 있도록 하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도 1의 WAP-promoter를 포함하는 유전자 발현벡터(vector)와 WAP-promoter, TNF-a-receptor 유전자 및 human IgG1 Fc 유전자를 포함하는 재조합 DNA를 만들어서 TNFR-Fc 융합단백질을 발현시킬 수 있도록 하였다.

[0012] 또한 상기 재조합 DNA를 도입시킨 형질전환돼지를 만들어서 TNFR-Fc 융합단백질을 대량 생산할 수 있는 형질전환동물 및 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 유선 특이적 발현 벡터를 이용하여 TNFR-Fc 융합단백질을 포함하는 재조합 DNA를 돼지에 형질전환하여 유즙에서 류마티스관절염 치료제를 대량생산할 수 있으므로 경제성이 매우 높다.

[0014] 미생물 생산시스템과 달리 진품성이 보장되는 동물을 이용하며, 인체와 생리학적으로 가장 가까운 돼지 자체를 생산시스템으로 이용하므로 고품질의 치료제를 생산할 수 있다.

[0015] 또한 돼지는 번식 및 사육효율이 좋아 발명의 실시가 매우 용이하며, 유즙의 생산량이 높아 대량생산 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 eGFP-TNFR-Fc vector을 모식한 것이다.

도 2는 형질전환된 세포주에서 GFP의 발현여부를 확인한 것이다.

도 3은 대리모로부터 태어난 산자들이다.

도 4는 태어난 산자들에서 PCR을 통한 TNFR-Fc 유전자의 확인한 것이다.

도 5는 태어난 산자의 몸과 장기에서 GFP의 발현을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 단백질의 일종인 생리활성물질은 인체 내 질병을 치료하거나 예방을 위해 꼭 필요한 물질이지만 생산가격이 비싸고 대량생산이 어렵다는 난제를 안고 있다. 생리활성물질을 추출하기 위한 대부분의 발명들은 동식물, 미생물을 이용한 생산과 최근 세포주를 이용한 생리활성물질 생산에 주력하고 있는 실정이다. 미생물을 이용한 인체생리활성물질의 대량생산은 숙주로 이용되는 미생물의 단백질 발현 및 3차구조형성기작 (폴딩) 과정이 고등동물과 달라 인체 고유의 생리활성물질과 생물 활성이 동일한 것을 생산할 수 없으며, 또한 순수 정제가 어려워 의약품으로써의 요건인 품질의 안정성, 동질성이 결여되는 문제가 있다. 이러한 이유로 동물세포를 숙주로 이용하는 방법은 의약품의 생물활성 측면에서 미생물을 숙주로 이용할 때의 결점을 보강해줄 수 있어 바람직한 생산 방법으로 기대되고 있으나, 생산 규모를 늘리는 등의 기업화가 곤란하고 배지 비용이 비싸 원가 절감이 어려운 실정이므로 새로운 생산시스템의 개발이 절실히 요청되고 있다. 최근에 각광 받고 있는 항체 의약품은 항체 절편 및 융합 항체를 포함한 다양한 구조의 항체가 활용되고 있으며, 특히, 항체의 Fc 부분을 생체 활성 물질과 결합하여, 생산하는 전략은 생체 활성 물질의 안정성(stability), 분비(secretion) 및 순수 분리 과정에서 상당한 이점을 주고 있다.

[0018] 류마티스 관절염은 다발성으로 말초 활막 관절에 발생하는 만성적인 자가면역성 염증질환이다. 전통적인 류마티스 관절염 치료제로는 methotrexate (MTX), hydroxychloroquine (HCQ), sulfasalazine (SSZ), leflunomide 등의 단독 또는 복합으로 이용된다. 그러나 이 약물들은 완치보다 경과를 지연시키는 효과를 보이며 많은 부작용과 증상이 더 심해지는 경우도 있어 치료에 어려움이 있다. 류마티스 관절염 치료제로 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-a) 억제제는 류마티스 관절염의 비정상적인 염증 반응에 중점적으로 작용하는 cytocine인 TNF-a를 차단하여 염증을 억제하는 작용을 한다. 재조합 단백질을 이용한 관절염 치료제 시장은 현재 recombinant human TNF-a-receptor-Fc fusion protein (TNFR-Fc)로서 치료용 단백질로 분류된 항체 의약품으로 제조되고 있으며 그 사용이 날로 증가하고 있다. 현재 세계적인 대형 제약회사인 Abbott Lab. (아보트 랩)에서 생산한 Humira (휴미라) 라는 제품으로 우리나라에서도 수입 판매되고 있다. 관절염과 같은 자가 면역 질환 바이오 의약품의

경우, 항암제 와 인슐린 제제와 함께 이 분야를 리드하고 있다.

[0019] 따라서 본 발명에서는 human IgG1 Fc와 융합된 TNF-alpha Receptor를 유선 특이 promotor Whey Acid Protein(WAP)가 장착된 DNA 벡터에 클로닝하여 형질전환 체세포주를 확립하고, 확립된 체세포를 이용한 형질전환 복제돼지를 생산하여 유즙을 통해 TNFR-Rc Receptor의 생산 가능성을 제시하고자 한다.

[0020] 류마티스 관절염은 다발성 관절염을 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로 그 원인이 불분명하나 TNF-a라는 cytokine에 의한 염증 반응이 크게 작용한다. 현제 류마티스 관절염을 완치하는 약물은 아직 없으며, 비스테로이드 항염제와 스테로이드, 항류마티스약제와 주 원인인 TNF-a 차단제를 처방하고 있다. TNF-a 차단제는 기존 항류마티스약물로 반응을 보이지 않는 중증의 환자 및 조기 환자에서 기존 약물에 비해 빠르고 뛰어난 효과를 보였다. 또한 염증성 질환에서 이전의 비선택적인 면역억제제와는 달리 표적화된 치료제로 그 효과와 안전성에 관한 발명이 활발히 진행되고 있다. 이런 TNF-a 차단제는 1990년대 후분 분자생물학적 기술의 발달과 질병에 대한 발명을 통해 개발되었고, 2002년 제약회사인 Abbott Lab에서 전문적으로 생산하고 있다. TNF-a 차단제는 한 회사에서 독점으로 생산, 판매되고 있어 그 가격이 비싸 환자들의 이용에 어려움이 있다. TNF-a 억제제는 soluble TNF-a 수용체를 사람의 IgG1의 Fc portion에 연결시킨 재조합 융합단백질인 Etanercept와 사람단일클론항체인 Adalimumab 그리고 TNF-a에 대한 카이메릭 단일클론항체인 Infliximab, 3종류이다.

[0021] 본 발명에서 동물이란 쥐, 기니피그 등 설치류뿐만 아니라 영장류, 파충류 등을 포함하며, 가축이란 소, 돼지, 개, 염소, 양 등 포유류뿐만 아니라 닭, 오리, 거위 등 가금류를 포함한다.

[0022] 보다 구체적으로는 본 발명에서 형질전환 돼지는 유즙에서 생산되는 융합단백질은 TNF-a 수용체와 사람의 IgG1의 Fc 부분을 연결한 형태이다. PCR 결과 돼지의 몸체와 내부 장기에서 TNFR-Fc 유전자의 발현이 확인되었다.

[0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] **<실시예 1>**

[0025] **TNFR-Fc 융합 유전자 발현 벡터**

[0026] Human blood에서 mRNA를 추출, cDNA 합성 과정을 통해 주형 DNA를 얻는다. TNF-alpha receptor 유전자 중 extracellular domain을 타깃으로 하는 프라이머를 제작하여 중합효소연쇄반응을 실시하여 human TNF-alpha extracellular domain 부분을 합성한다. 이를 Whey acid protein(WAP) promoter를 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 amplification 후 T vector에 클로닝하여 Human IgG1 Fc와 eGFP(enhanced green fluorescent protein)와 융합된 TNF-a receptor를 발현하는 유전자를 확립하였다.

[0027] 도 1은 eGFP-TNFR-Fc vector 모식한 것으로서 WAP-promoter, TNFR 유전자, IgGFc 유전자, Neomycin 저항성 유전자, ACSSG 및 GFP 유전자를 포함하며 그 크기는 16416 bp 이다.

[0028] **<실시예 2>**

[0029] **형질전환된 세포주**

[0030] **<2-1> 공여 세포 분리배양**

[0031] 공여 세포로는 랜드레이스의 45일된 태아로부터 얻은 섬유아세포를 사용하였다. 돼지 태아의 두부와 내장부위, 연골조직을 제거한 조직만 분리하여 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 3회 세척하고 잘게 조각냈다. 분리한 조직은 Trypsin-EDTA 용액과 0.8 % collagenase type II 용액의 혼합액을 첨가하여 39℃, 5 % CO2, 포화습도 배양기내에 30분에서 1시간 정치하였다. 정치 후 원심 분리용 tube에 옮겨 vortexing과 pipetting 후 최종 원심 세정하고 침전 세포와 조직편을 10 % FBS가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)에 부유하여 세포 배양용 petri dish로 옮겨 39℃, 5 % CO2, 포화습도 배양기내에서 배양하였다. 확립된 섬유아세포는 15 % FBS (invitrogen), 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (Invitrogen), antibiotics (Invitrogen)를 포함하는 DMEM (Invitrogen) 배지에 부유시켜 60 mm dish에서 배양하였다. 배양 후 포화상태가

된 세포는 새로운 petri dish로 계대 배양하였다.

[0032] **<2-2> TNFR-Fc 발현 세포주**

[0033] 계대 배양한 pig fibroblast를 trypsin 처리 하여, petri dish에서 떼어내고, DMEM 배지와 PBS로 세척한 후, 세포수 106 개가 되도록 맞춰 Gene Pulser Electroporation Buffer Reagent (Bio-Rad) 400 μl에 부유하고, 10 μg의 TNFR-Fc 유전자 발현 벡터를 섞어 0.4 cm cuvette (bio-rad)에 분주하였다. Electroporation은 Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad) 에서 Square wave 방법을 사용하였다. 각 샘플 마다, pulse는 한번, 25 msec, 250 voltage 로 수행하였다. Eletroporation이 끝난 세포는 15 % FBS, 5 ng/ml bFGF를 포함하는 DMEM 배지를 첨가하여 배양하였다. 3일 후, 세포의 증식 정도에 따라 생존도를 측정하고, 형광현미경을 통해 eGFP를 발현하는 세포를 측정하여, 항생제인 neomycin에 저항성을 가지는 세포를 선택적으로 배양하였다.

[0034] **<2-3> eGFP-TNFR-Fc 세포주 확인**

[0035] 도 2는 형질전환된 세포주에서 GFP의 발현여부를 확인한 것을 도시한 것이다. 결론적으로 WAP promoter를 사용하여 만든 vector로 transfection을 실시하였고 neomycin으로 selection을 실시하였다. selection된 cell에서는 GFP의 발현을 확인할 수 있었다.

[0036] **<실시예 3>**

[0037] **형질전환 동물**

[0038] **<3-1> 돼지의 난자 채취 및 체외성숙**

[0039] 인근 지역 도축장에서 도축된 돼지의 난소를 분리 회수하여 28℃의 생리식염수에 보관하여 실험실로 운반하였다. 회수해온 난소는 18게이지 바늘이 장착된 10 ml 주사기를 이용하여 3~8 mm 직경의 난포로부터 난포액을 채취하였다. 수집된 난포액은 37℃ 항온수조에 정치시켜 침전물을 20 % FBS가 첨가된 Saline에서 난구세포가 치밀하게 부착된 미성숙 난자만을 골랐다. 수집한 미성숙 난자는 체외성숙 배지에서 3회 세척하고 배양하는데, 체외성숙 배지로는 Tissue culture medium(TCM)-199 배양 배지(Sigma)를 기본으로 하여 10 % Porcine follicular fluid(PFF), 0.4 mM L-cysteine, 1 mM Sodium-pyruvate, 2.5 mM Fructose, 0.13 mM Kanamycin, 10 ng/ml Epidermal growth factor(EGF) 그리고 500 IU/ml Gonadotropin hormone(GTH)를 첨가하여 4-well dish에 미성숙 난자를 넣어 38℃, 5 % CO2 배양기에서 22시간 배양하고, 그 후 호르몬을 첨가하지 않은 체외성숙 배지에서 22시간 추가 배양하였다. 총 44시간의 체외성숙 후 0.1 % Hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하여 제 1극체의 유무로 성숙난자를 골라 체세포 복제배아 생산에 이용하였다.

[0040] **<3-2> 체세포 복제배아 생산**

[0041] 체외성숙된 돼지의 난자는 미세조작기(Micromanipulator, Narishige, Japan)가 장착된 현미경(Inverted microscope TE-2000, Nikon, Japan)에서 실시하였다. 성숙 난자의 탈핵은 Hoechst 33342로 염색하여 Ultra Violet(UV)에서 확인하며 실시하였고 TNFR-Fc 유전자가 형질전환된 공여 체세포를 난자의 위란강에 주입하였다. 난자의 세포질과 공여세포간 융합을 위하여 Elecrto Cell Fusion(LF101, Nepa gene, Japan)을 이용하여 1.6 kV/cm, 30, 1 Dc 펄스의 전기자극을 주었다. 융합된 난자는 Porcine zygote medium(PZM-3) 배지에 옮겨 대리모에 이식 전까지 체외배양 하였다.

[0042] **<3-3> 대리모의 발정동기화 및 이식**

[0043] 형질전환 체세포 복제 배아의 이식을 위해 대리모의 발정동기화는 호르몬 주사로 조절하였다. 이식 6일전 1000 IU의 Pregnant mare serum gonadotrophin(PMSG)를 근육주사하고 주사 3일후 10000 IU의 human chorionic gonadotropin(hCG)를 근육주사 하여 대리모의 발정을 동기화하였다. 발정동기화된 대리모에 이식은 호흡마취를

유지하여 수술적 방법으로 난관에 이식하였다.

[0044] **<3-4> 형질전환 돼지의 TNFR-Fc 유전자 발현 확인**

[0045] 태어난 돼지에서 TNFR-Fc 유전자 발현을 확인하기 위해 태어난 산자의 귀 조직을 채취하였다.

[0046] **<3-5> 결론**

[0047] eGFP-TNFR-Fc 유전자가 들어가 GFP를 발현하는 세포만 선택하여 만든 형질전환 체세포복제배아를 대리모에 이식한 결과, 총 15마리의 대리모 중 7마리가 임신을 하였고 그 중 2마리가 산자를 생산하고 1마리는 분만 예정이다. 각 대리모당 200여개의 복제배아가 이식되었고 평균 Fusion rate는 약 80 % 정도이다. 태어난 형질전환 돼지는 각 7마리와 4마리로 총 11마리의 돼지가 태어났으나 현재 3마리의 돼지가 사육중이다. 태어난 산자는 몸체와 내부장기에서 GFP를 발현하였고 PCR을 통한 검증결과에서도 모든 산자들이 TNFR-Fc유전자를 발현하였다.

[0048] 하기 표 1.에 따르면 eGFP-TNFR-Fc 유전자가 들어간 형질전환 체세포복제배아를 대리모에 이식한 결과로서 2마리의 산자를 생산하였다.

표 1

표 1. eGFP-TNFR-Fc를 갖는 형질전환 돼지의 생산

[0049]

Porcine ID	Delivery (ovulation)	No. of Embryo	Estrus Syn.	Delivered piglets (%, Efficiency delivered/transferred)
1	Gilt (Pre-)	213	Hormone	7 Cesarean secrion (3.3 %)
2	Gilt (Post-)	253	Hormone	4 Cesarean secrion (1.6 %)

[0050] 도 3은 대리모로부터 태어난 산자들을 도시한 것이다.

[0051] 도 4은 태어난 산자들에서 PCR을 통한 TNFR-Fc 유전자의 확인한 것으로서 1번 산자(Embryo 213) 및 2번 산자(Embryo 253) 모두 각 샘플에서 TNFR-Fc 유전자를 갖고 있음이 확인되었다.

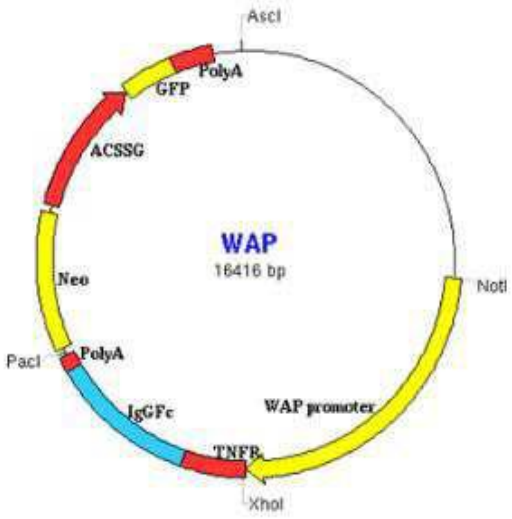
[0052] 도 5는 태어난 산자의 몸과 장기에서 GFP의 발현여부를 확인하기 위해 촬영한 것으로서 GFP 유전자가 발현된 산자는 심장, 폐, 간, 신장, 비장 및 창자 등의 장기에서 형광 반응이 나타나는 것으로부터 형질전환이 이루어졌음을 알 수 있다.

[0053] 본 발명에서는 eGFP-TNFR-Fc 유전자를 넣은 형질전환 복제돼지가 성공적으로 태어났으며, GFP의 발현과 TNFR-Fc 유전자 역시 모든 산자들에서 발현됨을 확인하였다. 이 발명의 결과로 보았을 때, eGFP-TNFR-Fc 형질전환 체세포의 상태가 매우 안정적이며 체세포 복제 배아의 발달면에 있어서도 큰 영향을 주지 않음을 보였다.

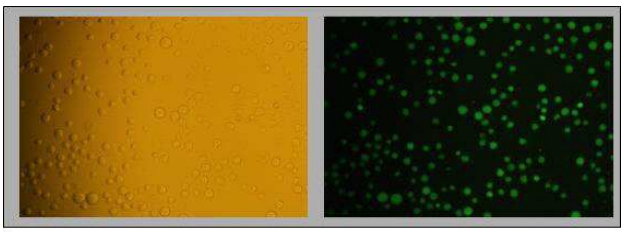
[0054] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

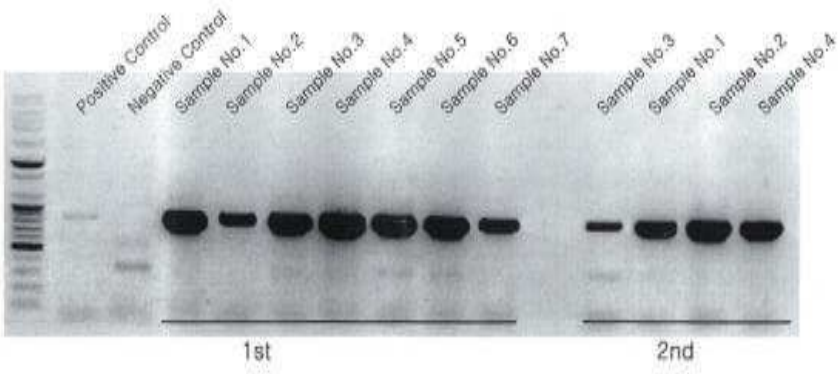


도면2

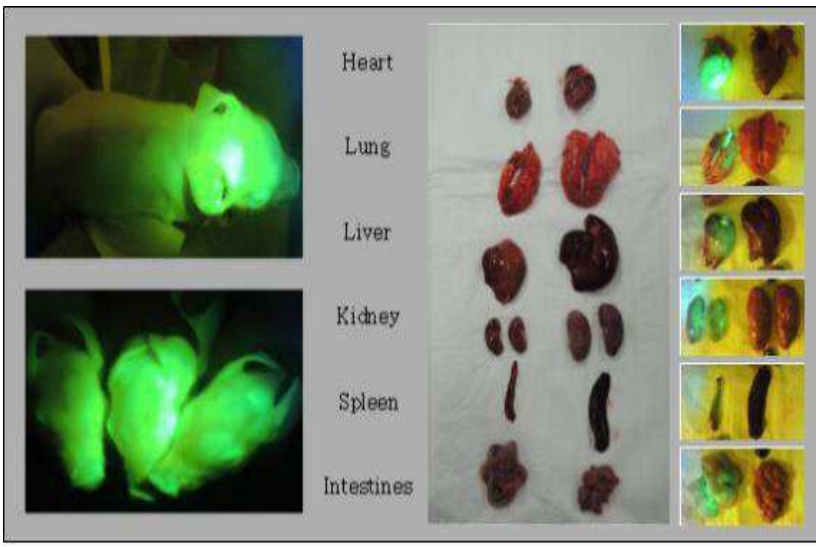


도면3

도면4


Positive Control
Negative Control
Sample No.1
Sample No.2
Sample No.3
Sample No.4
Sample No.5
Sample No.6
Sample No.7
Sample No.3
Sample No.1
Sample No.2
Sample No.4
1st
2nd

도면5


Heart
Lung
Liver
Kidney
Spleen
Intestines