



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0074580
(43) 공개일자 2017년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) C07K 14/505 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/81 (2013.01)
C07K 14/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0184021
(22) 출원일자 2015년12월22일
심사청구일자 2015년12월22일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
차현명
서울특별시 중구 다산로36길 109, 6동 203호 (신당동, 현대아파트)
김동일
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 1302호 (송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
임진혁
서울특별시 구로구 중앙로6길 26, 112동 602호 (고척동, 조양휴캐슬)
(74) 대리인
김순용

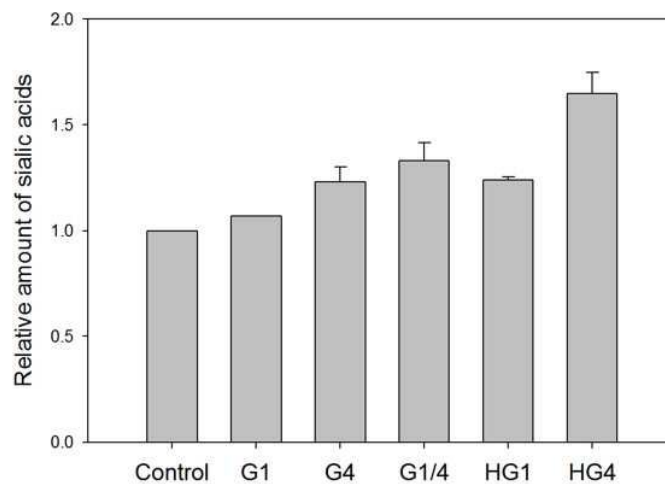
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **Mgat 1, Mgat4 유전자를 이용한 에리트로포이에틴의 시알산 함량을 증가시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 에리트로포이에틴의 시알산 함량을 증가시키기 위한 방법 및 이를 이용하여 제조되는 시알산 함량이 증가된 에리트로포이에틴에 관한 것이다. 본 발명의 Mgat1 및 Mgat4 유전자 과발현 방법에 따르면, 시알산이 증가된 에리트로포이에틴은 효과적으로 생산할 수 있으므로 보다 우수한 체내 지속성을 갖는 에리트로포이에틴을 제공할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 9/1051 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

C12Y 204/01101 (2013.01)

C12Y 204/01145 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A9B6075887

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술사업

연구과제명 글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.20 ~ 2018.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

Mgat1(mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase) 및/또는 Mgat4(Mannosyl (Alpha-1,3-)-Glycoprotein Beta-1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase) 유전자를 포함하는 에리스로포이에틴(EPO) 생산용 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에리스로포이에틴은 2 내지 4개의 안테나 구조(antennary) 인, 에리스로포이에틴(EPO) 생산용 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 에리스로포이에틴은 시알산 함량이 증가된 것인, 에리스로포이에틴(EPO) 생산용 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 벡터가 도입된 형질전환 세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 형질전환 세포는 포유동물 세포, 효모세포 및 곤충 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 형질전환 세포.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 형질전환 세포는 알부민-에리스로포이에틴 생산 숙주 세포인, 형질전환 세포.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 형질전환 세포는 Mgat1 유전자와 Mgat4 유전자가 1:1 내지 1:10 의 비율로 도입된 것을 특징으로 하는, 형질전환 세포.

청구항 8

Mgat1 및 Mgat4 를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 안테나 구조가 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법.

청구항 9

Mgat1 및 Mgat4 를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 에리스로포이에틴 내 시알산 함량을 증가시키는 방법.

청구항 10

Mgat1 및 Mgat4 유전자를 포함하는 발현백터를 알부민-에리스로포이에틴 생산 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 에리스로포이에틴은 2 내지 4개의 안테나 구조(antennary) 에리스로포이에틴인, 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴의 생산방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 에리스로포이에틴의 시알산 함량을 증가시키기 위한 방법 및 이를 이용하여 제조되는 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시알산(sialic acid; Sia, NeuAc, NeuGc)은 뉴라민산(neuraminic acid; Neu)의 아실유도체의 총칭으로 1936년 Blix에 의해 소 타액선(bovine salivary gland)의 뮤신(mucin)으로부터 최초로 분리되었고, 9개의 탄소로 구성되어 있으며 COOH기를 가지고 있는 산성당(acidic sugar)으로 알려져 있다. 치환기의 차이에 의해 23 종류의 시알산이 보고되어 있으며 이들은 생물종이나 조직에 특이적인 분포를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 고등동물에서 시알산은 당단백질, 당지질, 올리고당 당쇄의 Gal, GlcNAc, GalNAc 및 시알산에 각각 특이적인 시알산전효소의 작용에 의해 α -글리코시드 결합으로 연결되어 있다.

[0003] 복합당질 당쇄의 시알산은 세포막 표면에 존재하는 당쇄 구조에서 가장 말단에 위치하고 있기 때문에 세포와 세포외 환경과의 접촉에 직접적으로 관여하고 있을 것으로 예상되었고, 혈액 중의 혈구세포나 당단백질의 수명이 시알산의 제거에 의해 단축되는 것으로 알려진 바 있다. 이러한 예로서 적혈구 세포막의 시알산이 제거되면(asialylation) 갈락토오스가 세포 표면에 노출되어 쿠퍼(Kupffer) 세포 표면상의 갈락토스와 특이적으로 결합하는 수용체 렉틴(lectin)과 결합함으로써, 수용체 매개된 내포작용(receptor-mediated endocytosis)에 의해 순환계로부터 제거되며, 시알산이 제거된 아사이알로(asialo) 당단백질도 간세포(hepatocyte) 표면의 렉틴에 의해 결합되어 적혈구 세포와 비슷한 경로로 순환계로부터 제거되는 것이 확인되었다. 또한, 시알로 결합을 가지는 당단백질인 알파-안티트립신(alpha-antitrypsin), 콜린에스테라제(cholinesterase), 융모성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin), CTLA4Ig, 인자 VIII(Factor VIII), 감마-글루타미드트랜스퍼라아제(gamma-glutamyltransferase), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony-stimulating Factor, G-CSF) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)은 시알산이 결합된 당단백질의 경우 시알산이 결합되지 않은 것에 비해 당단백질의 반감기가 현저하게 증가하는 것으로 보고되었다.

[0004] 이와 같이 최적의 당사슬이 부가된 형태로 당단백질 의약품을 제조하는 경우 치료 효능과 체내 지속성이 증진되고 면역 부작용이 감소된 성능이 우수한 형태의 의약품을 제조할 수 있어 당단백질 제조에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0005] 시알로 결합을 가진 당단백질 중에서 에리스로포이에틴(erythropoietin, 이하, EPO)은 적혈구 생성을 유도하는 당단백질 호르몬으로서, 제조한 EPO는 빈혈치료제로 이용되고 있다. 야생형의 EPO는 N-결합 당쇄 3개 및 O-결합 당쇄 1개를 가지며, 하나의 N-결합 당쇄에는 최대 4개의 시알산이, 하나의 O-결합 당쇄에는 최대 2개의 시알산이 결합할 수 있어서 잠재적으로 한 분자의 EPO는 총 14개의 시알산이 결합할 수 있다. 시알산이 당쇄에 결합되어 있는 경우, 간에 존재하는 탈시알로 당단백수용체와의 결합을 막아 간에서 EPO가 분해되는 것을 방지한다. 이러한 EPO의 경우 GlcNAc 두 개가 연결된 두 개의 안테나 구조 (bi-antennary)의 당사슬에 비해서 4개의 안테나 구조 (tetra-antennary)에 시알산이 부가된 경우에 체내 활성이 높으며, 체내 지속성도 더 긴 것으로 나타났다. 즉 EPO는 시알산 함량이 높을 수록 체내 지속성이 더 길게 나타나는데, 이는 EPO와 EPO 수용체와의 결합을

약화시키는 덕분에 혈액에서 제거되는 속도가 감소하기 때문인 것으로 알려져 있다. EPO의 체내 지속성을 증가시키기 위하여 알부민(albumin) 또는 항체의 Fc 융합, 페길레이션(PEGylation) 등 다양한 시도가 있었지만, N-결합 당쇄를 2개 추가하여 시알산을 증가시킨 다베포يتين-알파(darbepoetin-alfa)와 비슷한 효능을 보였다.

[0006] 이와 같이 시알산 함량이 EPO의 체내 지속성 측면에 있어서 중요한 역할을 수행하므로, 보다 효과적인 약물의 사용을 위하여 EPO의 시알산 함량을 증가시키려는 목적의 연구가 절실히 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 EPO의 시알산 함량을 증가시키기 위한 연구를 수행하던 중, 알부민-에리스로포이에틴(albumin-EPO, 이하, Alb-EPO) 생산 세포에서 Mgat1 및 Mgat4 유전자를 과발현 시킴으로써 EPO의 시알산 함량을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 발명은 Mgat1 및 Mgat4 유전자의 과발현 비율을 조절하여 시알산 함량이 증가된 EPO를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 Mgat1 및/또는 Mgat4 유전자를 포함하는 에리스로포이에틴(EPO) 생산용 벡터를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.

[0011] 또한 Mgat1 및 Mgat4를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 안테나 구조가 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 Mgat1 및 Mgat4를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 에리스로포이에틴 내 시알산 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 Mgat1 및/또는 Mgat4 유전자를 포함하는 발현벡터를 알부민-에리스로포이에틴 생산 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 Mgat1 및 Mgat4 유전자 과발현 조절 방법에 따르면, 시알산이 증가된 에리스로포이에틴은 효과적으로 생산할 수 있으므로 보다 우수한 체내 지속성을 갖는 에리스로포이에틴을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 pcDNA3.1/Mgat1 벡터 및 pcDNA3.1/Mgat4 벡터의 모식도를 나타낸 도이다.

도 2는 Mgat1 및 Mgat4의 도입을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 형질전환 CHO(Chinese hamster ovary) 세포에서 Mgat1, Mgat4의 도입에 따른 세포 생존율 및 세포 밀도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 Mgat1 및 Mgat4이 도입된 세포주에서의 Alb-EPO 생산량 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 형질전환 CHO 세포에서 Mgat1, Mgat4의 발현량 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 Mgat1 및 Mgat4 유전자 도입에 따른 시알산 함량 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 HG4 세포주에서의 4개 안테나 구조가 증가된 에리스로포이에틴의 생산 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 HG4 세포에서의 2-, 3-, 4개 안테나 구조 에리스로포이에틴 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 Mgat1, Mgat4 유전자를 포함하는 에리스로포이에틴(EPO) 생산용 벡터를 제공한다.
- [0017] 상기 Mgat1 및 Mgat4 유전자를 포함하는 에리스로포이에틴 생산용 벡터는 형질전환 세포 내에서 Mgat1 및 Mgat4의 유전자 발현을 상향 조절하여 2 내지 4 안테나 구조의 에리스로포이에틴의 생산량을 증가시킬 수 있으므로, 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴을 효과적으로 생산할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어 “에리스로포이에틴(erythropoietin; EPO)”은 동물체 내의 조혈조직에 작용하여 적혈구 생성을 촉진하는 체액성 인자이다. 이 물질은 분자량 3만 내지 4만의 산성 당단백질로, 골수의 간세포에 작용하여 간세포를 전적아구로 분화시키는 일에 관여한다. 보통은 혈액 속에 조금밖에 존재하지 않지만, 빈혈이나 저산소상태(예를 들면, 높은 산에 오르는 경우 등)가 되면 혈액 속에서 증가하고 뇨에서도 검출될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 생산되는 에리스로포이에틴은 알부민이 결합된 A1b-EPO인 것이 바람직하며 A1b-EPO는 기존의 에리스로포이에틴보다 성능이 개선된 다베포이에틴-알파(Darbepoetin- α)보다도 우수한 효능을 갖는 에리스로포이에틴의 생산을 가능하게 하는 장점이 있다.
- [0020] 본 발명에 있어 “시알산”은 아미노기나 카르복시기가 결합한 특수한 9탄당인 뉴라민산에 대해 아미노기나 히드록시기가 치환된 화합물의 총칭을 의미한다. 특히 천연에 가장 많이 존재하는 N-아세틸뉴라민산(Neu5AC) 또는 N-글리콜릴뉴라민산(Neu5G)인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게 인간의 당 단백질로 제조하는 경우에는 N-아세틸뉴라민산일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 벡터는 Mgat1 또는 Mgat4 유전자를 각각 포함하는 벡터일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Mgat1 또는 Mgat4 유전자를 각각 포함하는 벡터의 쌍을 포함하여 지칭할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 벡터는 SV40 폴리 A 신호서열을 가질 수 있으며, Mgat1 또는 Mgat4 유전자 발현량을 더욱 증진시키기 위하여 보다 강력한 프로모터를 포함할 수 있다. 또한 선별을 위한 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있고, 상기 항생제는 네오마이신, 암피실린, 또는 지오신 내성 유전자 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 도 1에 도시된 pcDNA3.1/Mgat1 벡터 및 pcDNA3.1/Mgat4 벡터를 개시한다.
- [0023] 본 발명의 Mgat1(mannosyl (α -1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase) 및 Mgat4(Mannosyl (α -1,3-)-Glycoprotein Beta-1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase) 유전자는 당화 효소 관련 유전자로 각각 N-acetylglucosaminyltransferase-I(GnT-I, EC 2.4.1.101)과 N-acetylglucosaminyltransferase-IV(GnT-IV, EC 2.4.1.145)를 발현하는 유전자를 말한다.
- [0024] 본 발명의 Mgat1 및 Mgat4 유전자를 포함하는 에리스로포이에틴 생산용 벡터에 의해 생산되는 에리스로포이에틴은 형질전환을 통해 숙주세포에서 제조되는 모든 에리스로포이에틴 형태를 포함하며, 특히 2 내지 4개의 안테나 구조를 갖는 에리스로포이에틴인 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, Mgat1 및 Mgat4 유전자의 과발현 조절을 통해 숙주세포에서 에리스로포이에틴을 생산하는 경우 대조군과 비교하여 2 내지 4개의 안테나 구조를 갖는 에리스로포이에틴을 대량 생산할 수 있다.
- [0025] 따라서 본 발명은 Mgat1 및/또는 Mgat4 유전자를 포함하는 2 내지 4개의 안테나구조를 갖는 에리스로포이에틴 생산용 벡터를 제공한다.
- [0026] 상기 안테나 구조는 GlcNAc의 연결에 의해서 제조되는 구조를 특정하며, GlcNAc이 2개, 3개, 4개 연결된 경우 각각 2개(bi), 3개(tri-), 4개(tetra-)의 안테나 구조(antennary)를 갖는 에리스로포이에틴으로 지칭할 수 있다.
- [0027] 이와 같이 2 내지 4개의 안테나 구조를 갖는 에리스로포이에틴의 경우 말단에 시알산이 결합할 수 있는 자리를 추가로 제공함으로써 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 상기 에리스로포이에틴 생산용 벡터는 Mgat1 또는 Mgat4 유전자를 각각 포함하는 벡터의 쌍, Mgat1 및 Mgat4를 한번에 포함하는 단일 벡터를 모두 포함하는 에리스로포이에틴 생산용 벡터일 수 있다.
- [0029] 따라서 본 발명은 Mgat1 및/또는 Mgat4의 유전자를 포함하는 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴 생산용 벡터를 제공한다.

- [0030] 또한 본 발명은 상기 에리스로포이에틴 생산용 벡터가 도입된 형질전환 세포를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 형질전환 세포는 포유동물 세포, 효모세포 및 곤충 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 특히 이는 에리스로포이에틴 생산 숙주 세포, 더욱 바람직하게는 알부민-에리스로포이에틴 생산 숙주 세포일 수 있다.
- [0032] 형질전환 세포로 사용될 수 있는 세포는 에리스로포이에틴의 생산에 사용될 수 있는 당 분야에 널리 사용할 수 있는 다양한 숙주세포를 제한없이 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나 예컨대 BHK(baby hamster kidney) 세포나 CHO 세포와 같은 햄스터 세포일 수 있으며, 상기 세포들은 자체의 당화체계에 α -2,6-시알산 전이효소가 없기 때문에 α -2,3-결합 형태의 말단 시알산만이 나타나게 되며, 인간 EPO와 같은 복합형(complex type) 당단백 호르몬의 생성능이 우수하고, 또한 생성된 복합형 당말단에 형성되는 시알산 중에서도 N-글리코틸 뉴라미닉산의 생성률이 낮거나 거의 생성되지 않는 장점을 갖는다.
- [0033] 특히 알부민-에리스로포이에틴(Alb-EPO) 생산 숙주 세포를 사용하는 경우, 기존의 당쇄를 증가시킨 다베포이에틴-알파와 비교하여 안테나 증가를 통해 보다 체내 지속성이 증가된 에리스로포이에틴을 생산할 수 있다. 상기 Alb-EPO 생산 숙주세포는 이를 생산할 수 있는 당 분야에 공지된 숙주세포를 제한 없이 포함할 수 있고, 제조하여 또는 구입하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 한국특허출원번호 10-2007-0114360 특허에 기재된 세포주를 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 Mgat1과 Mgat4는 당단백질의 안테나를 형성시키는데 중요한 역할을 한다. Mgat1 유전자는 발현 정도에 따라 Mgat4의 발현에 영향을 주기 때문에 두 유전자의 발현 변화가 안테나 구조를 증가시키는데 효과적일 수 있고, 이들의 과발현 비율을 조절하는 것이 안테나 구조의 증가에 매우 중요하고 필수적인 요소가 된다. 보다 구체적으로 Mgat1을 Mgat4 보다 높은 비율로 도입하는 경우 시알산 함량 증가 목적을 달성하는데 효과적이지 않을 수 있다. 따라서 본 발명은 두 유전자의 과발현 비율을 조절하는 방법을 통해 시알산을 극대화 시키는 방법을 개시하며, 보다 구체적으로 형질전환 세포는 Mgat1 보다 Mgat4 유전자가 높은 비율로 도입되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 Mgat1 유전자와 Mgat4 유전자가 1:1 내지 1:30, 바람직하게는 1:1 내지 1:15, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:10의 비율, 가장 바람직하게는 1: 4의 비율로 도입된 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명에서는 이와 같이 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴을 생산할 수 있는 세포를 2015년 11월 17일자로 한국생명공학연구원 유전자은행(대한민국 대전광역시 유성구 어은동 52번지)에 기탁하였으며, 이의 기탁번호는 KCTC18426P이다.
- [0036] 또한 본 발명의 또다른 측면에 있어서, 본 발명은 Mgat1 및 Mgat4 를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 안테나 구조가 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법을 제공한다.
- [0037] 또한 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 Mgat1 및 Mgat4 를 과발현시키는 단계; 를 포함하는 에리스로포이에틴 내 시알산 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0038] 상기와 같은 방법은 Mgat1 및 Mgat4의 과발현을 통해, 4 개의 안테나 구조를 갖는 에리스로포이에틴의 생산을 증가시키고, 이를 통해 에리스로포이에틴 내 시알산 함량을 증가시킬 수 있어 반감기 및 체내 지속성이 개선된 에리스로포이에틴을 대량 생산할 수 있도록 한다.
- [0039] 따라서 본 발명은 Mgat1 및/또는 Mgat4 유전자를 포함하는 발현벡터를 알부민-에리스로포이에틴 생산 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법을 제공한다.
- [0040] 또한 본 발명은 상기 에리스로포이에틴이 2 내지 4개의 안테나 구조 에리스로포이에틴인 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴 생산 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 시알산 함량이 증가된 에리스로포이에틴의 생산 방법은, 시알산 함량을 높이기 위한 공지된 다양한 방법과 함께 병행하여 사용할 수 있으며, 예컨대 시알산의 전구체를 세포 내에서 높은 수준으로 유지함으로써 에리스로포이에틴 내 더욱 높은 시알산 함량을 달성할 수 있다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의

내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] 실시예 1. Mgat1 및 Mgat4 과발현을 위한 벡터의 제조

[0044] Mgat 유전자는 에리스로포이에틴 (EPO)의 글리칸 구조에 안테나를 형성시키는 중요 유전자로 말단에 시알산이 결합할 수 있는 자리를 제공할 수 있다. 따라서 알부민(A1b)을 결합시킨 A1b-EPO 의 말단에 시알산 결합을 증가시키기 위하여 Mgat1 및 Mgat4 유전자를 과발현시킬 수 있는 벡터를 제조하였으며, 제조된 각각의 pcDNA3.1/Mgat1 벡터 및 pcDNA3.1/Mgat4 벡터를 도 1에 나타내었다. Mgat1 및 Mgat4 과발현 세포주에 사용할 발현벡터에 Mgat1 및 Mgat4가 정상적으로 도입되었는지 여부를 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0045] 도 2에 나타난 바와 같이, pcDNA3.1/Mgat1 벡터 및 pcDNA3.1/Mgat4 벡터에 Mgat1 및 Mgat4가 각각 성공적으로 도입되었음을 확인하였고, 이를 이후 실험에 사용하였다.

[0046] 실시예 2. Mgat1, Mgat4 도입 형질전환 CHO 세포의 제조 및 이의 특성 확인

[0047] 2.1 Mgat1, Mgat4 도입 형질전환 CHO 세포의 제조

[0048] 실시예 1에서 제조된 벡터를 이용하여 형질전환 CHO 세포를 제조하였다. CHO 세포로는 A1b-EPO를 생산하는 세포를 제작하여 이용하였으며, 이에 Mgat1 및 Mgat4 유전자를 도입하였다. 두 유전자의 과발현은 Freestyle MAX Reagent 37.5 μ L와 OptiPRO-SFM 600 μ L를 섞은 용액을 pcDNA3.1/Mgat1와 pcDNA3.1/Mgat4 벡터의 농도를 총 37.5 μ g로 OptiPRO-SFM 600 μ L에 녹인 용액에 첨가하여 DNA-lipid 복합체를 형성하였다. 형성된 복합체는 20분 동안 반응 시킨 후 1×10^6 cells/mL 농도의 CHO 세포에 도입하여 ProCHO5 배지 30 mL에 4 mM 글루타민을 첨가하고 125 rpm으로 부유 배양하였다. 지오신 항생제 선별을 통해 유전자 도입된 형질전환 CHO 세포를 선별하고, 단일 클론을 얻기 위하여 제한 희석법(limiting dilution)의 수행으로 하나의 세포로부터 증식한 세포들로 이루어진 형질전환 된 세포주를 확립하였다. 도입되는 Mgat1, Mgat4 유전자의 비율을 하기 표 1과 같이 변화시켰다.

[표 1]

Cell line	DNA ratio	
	GnT-I (Mgat1; EC 2.4.1.101)	GnT-IV (Mgat4; EC 2.4.1.145)
Control	0	0
G1	10	0
G4	0	10
G1,4	5	5
HG1	8	2
HG4	2	8

[0051] 2.2 Mgat1, Mgat4 도입 형질전환 CHO 세포의 증식 및 A1b-EPO 생산량 확인

[0052] 각각의 형질전환체를 3×10^5 cells/mL의 농도로 125-mL Erlenmeyer flask 접종하여 ProCHO5 배지 20 mL에 4 mM 글루타민을 첨가하고 100 rpm으로 부유 배양하였다. 제조된 형질전환 CHO 세포에서 Mgat1, Mgat4의 도입이 독성을 나타내는지 여부를 세포 밀도 및 생존율을 분석을 통해 확인하였으며, G1, G4, G1,4, HG1, HG4 세포주에 서의 A1b-EPO 생산량의 변화를 8일 동안 관찰하였다. 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0053] 도 3에 나타난 바와 같이, Mgat1 및 Mgat4가 도입된 세포주들은 모두 상기 유전자들이 도입되지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존율 및 세포 밀도에서 큰 차이가 없었으며, 즉 세포에 독성을 나타내지 않았다. 또한 도 4에 나타난 바와 같이, Mgat1 및 Mgat4이 도입된 세포주들에서 A1b-EPO의 생산량이 대조군과 유사한 수준으로 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과에 따라 Mgat1 및 Mgat4의 도입이 CHO 세포에 독성을 유발하지 않으며, A1b-EPO의 생산량에도 부정적인 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[0054] **2.3. Mgat1, Mgat4 형질전환 비율에 따른 유전자 발현 및 시알산 함량 확인**

[0055] Mgat1, Mgat4 유전자가 도입된 각각의 형질전환 CHO 세포에서 Mgat1 및 Mgat4의 유전자 발현량을 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0056] 도 5에 나타난 바와 같이, 유전자가 도입된 각 세포들은 대조군과 비교하여 Mgat1 및 Mgat4 유전자의 발현량이 증가하였다. 보다 구체적으로, Mgat1 이 도입된 G1, G1,4, HG1, HG4 에서는 모두 대조군에 비해 현저한 Mgat1 발현 증가가 확인되었으며 Mgat4 가 도입된 G4, G1,4, HG1, HG4에서 Mgat4 유전자 발현이 현저히 증가하였고, Mgat1만을 도입한 G1 군에서도 Mgat4 발현 증가가 유도되었으며, HG4 군에서 Mgat4 유전자 발현량이 가장 높았다.

[0057] 또한 각각의 형질전환 세포주에서 발현된 단백질의 시알산 함량을 측정하였다. 시알산의 함량을 측정하기 위하여 HiTrap Blue HP column으로 정제를 수행하였다. 정제된 샘플에 10 mM sodium periodate 20 µL를 첨가한 후 4℃에서 반응시키고 50 mM sodium thiosulfate solution 100 µL로 반응을 종결하였다. 그 후, 4 mM ammonium acetate 500 µL와 100 mM acetoacetanilide 400 µL를 첨가하여 10분 반응 후 338 nm의 여기 파장과 471 nm 방출 파장에서 시알산 함량을 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0058] 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 모든 형질전환 세포주에서 시알산 함량이 증가하였으며, Mgat1 및 Mgat4의 도입 비율에 따라 다른 시알산 함량 증가가 확인되었다. 이와 같은 결과는 Mgat1 및 Mgat4의 도입에 있어서 이의 도입 비율이 중요한 인자가 될 수 있음을 보여주었다. 실험 결과, Mgat1 를 Mgat4 보다 낮은 비율로 도입하는 경우 시알산 함량이 더욱 증가하는 것으로 나타났으며, Mgat1 및 Mgat4가 1:4 의 비율로 도입된 HG4 세포주가 가장 높은 시알산 함량을 나타내었으므로 이후 HG4 세포주를 이용하여 글리칸 분석을 수행하였다.

[0059] **실시예 3. 글리칸 구조 분석을 통한 테트라 안테나 구조 증가 확인**

[0060] Mgat1 및 Mgat4 유전자 도입을 통해서 시알산 함량이 증가되었으므로, 이것이 Mgat1 및 Mgat4 유전자 도입을 통해 글리칸 구조에 안테나 형성이 증가하여 달성되는지 확인하기 위하여 글리칸 구조 분석을 수행하였다. 보다 구체적으로 시알산 함량이 가장 높은 HG4 세포주에서 발현된 단백질의 글리칸 구조 분석은 HILIC(hydrophilic interaction chromatography) 방법으로 진행하였다. 정제된 샘플에 PNGase F 효소를 처리하여 N-글리칸을 분리하고 2-aminobenzamide(2-AB) 형광 dye를 표지한 후 GlycoClean S cartridge로 정제하였다. 형광 표지된 글리칸은 HPLC와 형광 검출기를 이용하여 330 nm의 여기 파장과 420 nm 방출 파장에서 분석하였다. HPLC 분석에는 TSK gel-Amide 80 column(5 µm, 4.6 × 250 mm)을 사용하였으며 peak의 retention time은 dextran calibration ladder와 비교하여 글루코스(glucose unit, GU)으로 환산하였다.

[0061] 또한 HG4 세포에서 2-, 3-, 4개 안테나 구조 에리스로포이에틴의 생산량이 증가되어 있는지 안테나 분석을 수행하였다. HG4 세포에서 발현된 샘플의 N-글리칸 안테나 비율은 weak anion exchange(WAX) chromatography 방법을 사용하였다. 2-AB 표지된 Alb-EPO는 TSK gel-DEAE 5PW column(10 µm, 7.5 × 75 mm)을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 이와 같은 실험 결과를 도 7 및 도 8 에 나타내었다.

[0062] 도 7에 나타난 바와 같이, HG4 세포주에서는 대조군과 비교하여 4개 안테나 구조(tetra-antennary)를 갖는 에리스로포이에틴을 지칭하는 형광 신호의 증가가 확인되었으며, 이에 따라 Mgat1 및 Mgat4의 도입을 통해 4개 안테나 구조(테트라 안테나 구조)가 증가하고 이에 따라 말단의 시알산 함량이 증대됨을 확인하였다.

[0063] 도 8에 나타난 바와 같이, 2개 안테나 구조의 경우 약 5배, 3개 안테나 구조의 경우 약 7배, 4개 안테나 구조의 경우 약 7배의 생산량 증가가 이루어짐을 확인하였다.

[0064] 이와 같은 결과는 Mgat1 및 Mgat4를 도입함으로써 2 내지 4개의 안테나 구조를 갖는 에리스로포이에틴이 효과적으로 형성될 수 있으며, 이를 통해 글리칸 말단이 증가하여 시알산 함량이 증대된 EPO를 효과적으로 생산할 수 있음을 나타낸다.

수탁번호

[0065]

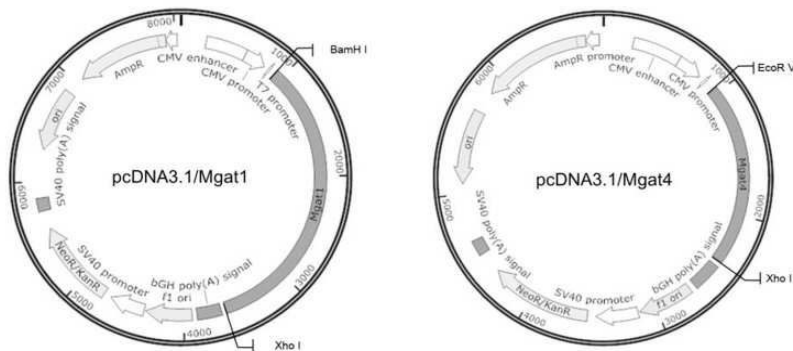
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18426P

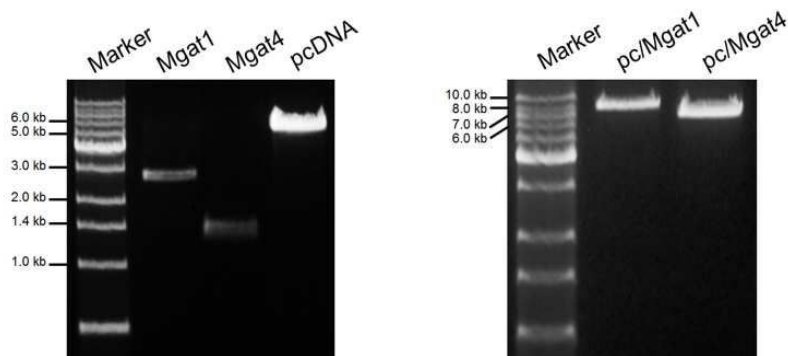
수탁일자 : 20151117

도면

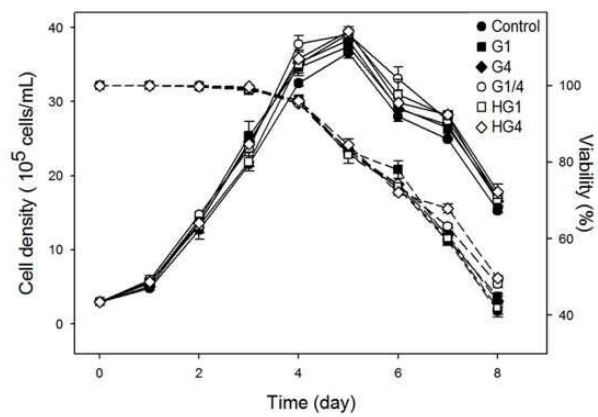
도면1



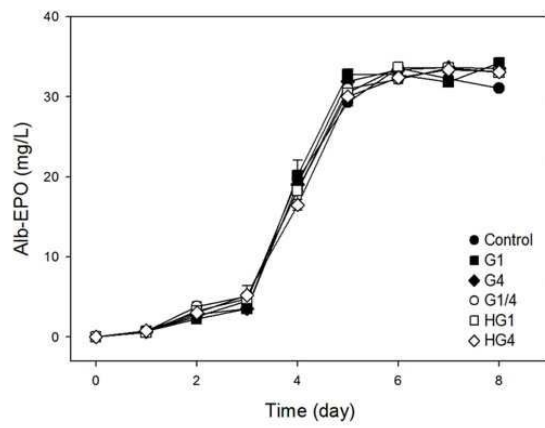
도면2



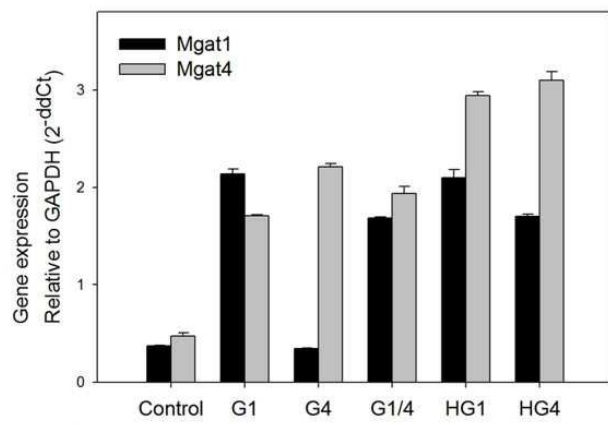
도면3



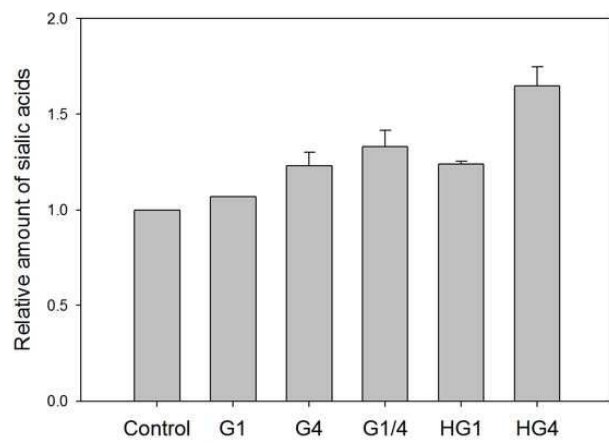
도면4



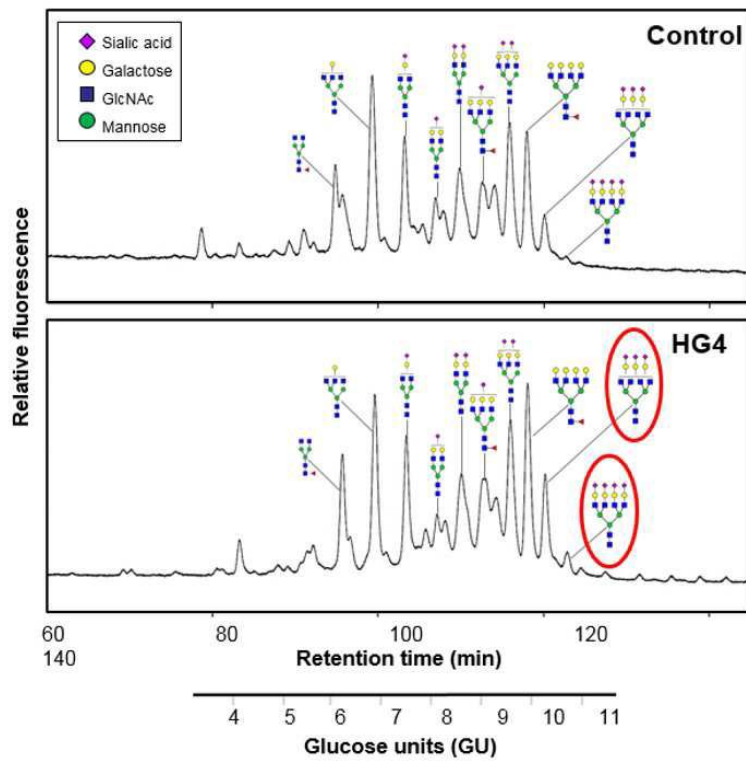
도면5



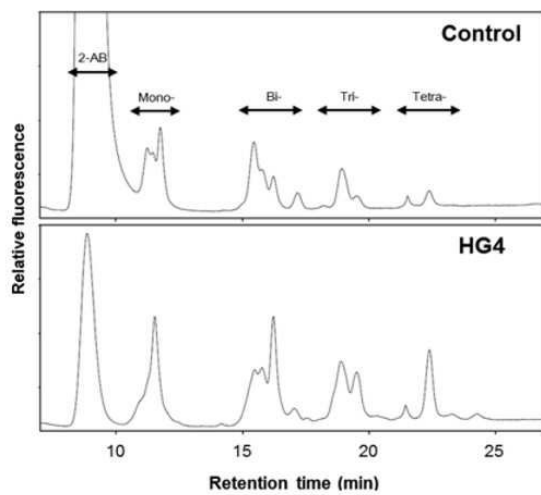
도면6



도면7



도면8



Cell line	Sialylated glycans (%)		
	Bi-antennary	Tri-antennary	Tetra-antennary
Control	23.8	11.9	9.1
HG4	26.4	21.4	16.2