



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0049047
(43) 공개일자 2011년05월12일

(51) Int. Cl.

C12N 5/04 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0105869

(22) 출원일자 2009년11월04일

심사청구일자 2009년11월04일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김동일

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남119호

구윤모

서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 16동 1203호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

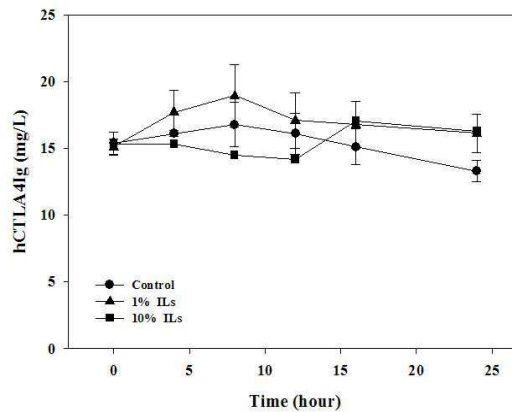
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 식물세포 유래 재조합 단백질의 안정화 방법

(57) 요약

본 발명은 식물세포 배양 중 유도된 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 식물세포 배양 중 이온성 액체를 첨가하여 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 형질전환 식물세포배양에 있어 이온성 액체를 이용함으로써, 기존 재조합 단백질 생산에 비해 단백질의 분해 및 변성 등을 방지할 수 있는 안정성을 제공할 수 있으며, 이로써 재조합 단백질의 안정적이고 높은 생산성을 확보할 수 있다. 또한, 사용되는 이온성 액체는 세포 독성을 나타내지 않으므로, 형질전환 식물세포배양에서 본 발명을 통해 재조합 단백질을 대량생산할 경우, 저비용, 고효율로 생산공정을 실현할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전수환

인천광역시 부평구 십정2동 동암신동아아파트 107
동 2207호

하성호

서울특별시 마포구 성산2동 성산시영아파트 23동
201호

권준영

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

배상우

경기도 광명시 광명2동 98-9 금반석씨티아파트 40
2호

한지연

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

최지원

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

양용석

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 2남135호 세
포배양공학연구실

전혜경

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 하이테크센터
1201호 HCI 연구실

특허청구의 범위

청구항 1

식물세포 배양 중 이온성 액체를 첨가하여 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 식물세포는 형질전환 식물세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 형질전환 식물세포는 형질전환 벼 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 형질전환 식물세포는 RAmv3D 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 이온성 액체는 그 양이온 부분이 치환되는 알킬기의 탄소수가 1 내지 4인 이미다졸륨(imidazolium)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 이온성 액체는 음이온 부분이 메틸설페이트($[\text{CH}_3\text{SO}_4^-]$), 에틸설페이트($[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_4^-]$), 트리플루오로메탄설페이트($[\text{CF}_3\text{SO}_3^-]$), 티오시아네이트($[\text{SCN}^-]$) 및 비스(트리플루오로메틸설페닐)이미드($[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]$)로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 이온성 액체는 1-부틸-2-메틸이미다졸륨 메틸설페이트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 이온성 액체는 0.0001 내지 10 %(v/v) 함량으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 이온성 액체는 계면활성제와 함께 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 계면활성제는 PF-68 또는 PVP-10 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 계면활성제는 0.001 내지 10.0 %(w/v)로 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 재조합 단백질은 이황화 결합을 포함하는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 이황화 결합을 포함하는 단백질은 재조합 hCTLA4Ig 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물세포 배양 중 유도된 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 식물세포 배양 중 이온성 액체를 첨가하여 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 의약품은 생물체 혹은 그 생물체로부터 유래된 조직이나 세포를 통해 생산되는 의약품을 일컫는다. 크게 항체와 치료용 단백질, 세포치료제, 유전자 치료제, 백신으로 분류할 수 있다. 최근 생물의약품 시장은 치료용 항체를 중심으로 빠르게 증가하고 있으며, 많은 치료용 단백질들이 FDA(Food and Drug Administration)와 EMEA(European Medicines Agency)로부터 승인을 받고 있다. 1982년 Eli Lilly 사의 Humulin(유전자 재조합 human insulin, rHI)이 최초로 승인된 이래로 최근까지 500가지 이상의 생물의약품이 승인되었다.

[0003] 최근의 동향을 보면 생명공학 선진국에서의 성공에 힘입어 단백질 제품 중 치료용 고부가가치성 단백질 생산에 대해 식물세포나 식물체를 이용하려는 노력이 시작되었다. 단순화된 실험계로서 세포융합, 유전자 조작에 의한 육종으로의 이용이 가능하므로 여러 가지 생물공학기술의 도입이 가능하고 또한 동물과 달리 전체 형성능(totipotency)을 가지고 있기 때문에 형질전환된 세포로부터도 완전한 식물체를 얻을 수 있으며, 기내 세포 배양 뿐만 아니라 형질전환된 식물체의 세포를 배양함으로써 외래 단백질의 생산이 가능하게 되었다. 특히, 형질전환된 식물 발현 시스템의 개발로 식물세포의 현탁 배양이 가능하게 되고, 이를 통해 경제적 효용성이 높은 치료용 단백질 생산에 도달하게 되었다. 외래 단백질의 생산은 형질전환된 식물세포배양뿐만 아니라 동물세포, 미생물을 이용한 배양을 통해서도 달성될 수 있다. 하지만 식물세포배양은 이들과 대별되는 뚜렷한 장점을 지니고 있다.

[0004] 동물세포배양을 통한 치료용 단백질의 생산은 완전한 post-translation modification으로 인해 높은 생리활성물질의 생산이 가능하지만 세포자체의 느린 성장속도, shear stress에 약한 세포 특성상 대량 배양의 어려움, 혈청 사용으로 인한 높은 배지 가격, 인체에 유해한 바이러스 등의 높은 감염 가능성, 분리, 정제의 어려움 등의 문제점을 가지고 있다. 또한 미생물 배양을 이용한 치료용 단백질의 생산은 빠른 성장속도와 높은 세포농도, 조작의 편리성과 간단한 배지조성, 많은 연구로 인한 배경 지식의 확립 등의 장점에도 불구하고 원핵세포 특성상 진핵세포가 가지고 있는 다양한 post-translational modification을 하지 못함으로써 충분한 생리활성을 가진 단백질을 생산하기 힘들다는 커다란 단점을 가지며, 다량 발현 시 inclusion body의 형성으로 인한 용해성 문제 등의 난점을 가지고 있다.

- [0005] 이러한 동물세포와 미생물 배양을 통한 유용 단백질 생산의 문제점을 극복하기 위한 수단으로써 식물을 이용한 연구가 대두되었다. 식물세포배양을 통한 치료용 단백질의 생산은 기존의 동물세포나 미생물 배양이 가지고 있던 문제점들을 해결하기 위한 대체 수단으로써 그 중요성이 점차 부각되고 있다. 식물세포배양을 통한 치료용 단백질 생산은 post-translational modification이 가능하다는 장점과 더불어 분리, 정제가 쉬우며 인체에 유해한 바이러스의 감염 가능성이 적고, 생산 비용이 적게 들며 대규모 생산이 용이하다.
- [0006]
- [0007] 본 발명에서는 형질전환 벼 현탁세포를 이용한 재조합 hCTLA4Ig 단백질 생산 시, 배지에서 당이 고갈되는 시점에서 작동되는 α -아밀라아제 프로모터 시스템(α -amylase promotor system)을 사용함으로써 재조합 단백질을 생산한다(Terashima M. et al., Biochem Eng J 4:31-36, 1999; Trexler MM. et al., Biotechnol Prog 21:321-328, 2005). 이는 재조합 단백질의 생산에 있어서 당이 고갈되는 시점에서 작동되는 α -아밀라아제 프로모터 시스템 사용에 따라, 세포의 성장단계와 단백질 생산단계가 분리된다. 종래 기술로는 본 시스템에 따라 2단계 배양을 수행하여 당이 존재하는 성장단계에서의 세포의 성장단계 이후, 당이 제거된 배지로 교환해주어 생산단계 이르게 하여 재조합 단백질을 생산한다.
- [0008] hCTLA4Ig는 T 세포에 의한 면역반응에 관여하는 CTLA-4(CD152)와 human IgG의 Fc부분을 융합한 단백질이다. 그 결과, dimeric hCTLA4Ig를 형성하여 생체내의 half-life가 연장되었으며 또한 affinity chromatography에 의한 효과적인 정제가 가능하게 되었다. 면역반응 유발에 있어서 중요한 T 세포의 co-stimulatory signal은 T 세포 표면의 CD28이나 CTLA-4와 antigen presenting cells(APCs) 표면의 B7 수용체(CD80 및 CD86)간의 결합이다. 이 때, CTLA-4는 CD28과 반대로 T 세포의 활성을 억제하거나 감소시키는 신호를 전달하는 역할을 하며, B7 수용체와 약 20~50배 높은 친화력을 보인다. 따라서 hCTLA4Ig는 T 세포 특이적 면역 억제 반응을 유도하여 면역억제제 역할을 한다.
- [0009] 2005년 12월 Bristol-Myers Squibb(BMS)사의 hCTLA4Ig는 자가 면역질환의 일종인 류마티스 관절염 치료제로서 미국 FDA(USA Food and Drug Administration)에서 승인을 받아 Orencia(abatacept)라는 상품명으로 판매되고 있으며, 2008년에는 매출액이 4천 4백억 달러에 이르고 있다. 현재 류마티스 관절염 시장에서는 가격이 높은 TNF- α 저해제인 Amgen/Wyeth/Takeda의 Enbrel과 Abbott/Eisai의 Humira가 매출을 늘려서 시장의 구동력이 되고 있다. 또한 BMS의 Orencia, Biogen Idec/Genentech/Chugai/Zenyaku 공업의 Rituxan과 Roche의 MabThera와 같이 새로운 기작을 갖는 신규 의약품의 판매도 이루어지고 있다. 앞으로 류마티스 관절염 치료에 대한 수요가 계속 증가함에 따라 이 치료제들의 시장도 점차 확대될 것으로 전망하고 있다.
- [0010] 세포 밖으로 분비된 목적 단백질은 여러 가지 기작에 의해 그 안정성을 잃어 버려 생산성에 커다란 영향을 끼친다. 이런 단백질의 안정성에 영향을 미치는 요인으로서는 발현되어 배지로 분비된 단백질 자체의 구조적 특징에 의한 불안정성이나 aggregation에 의한 불안정성이 있으며, 구체적으로는 pH, 온도, 전단응력 등의 물리화학적 요인이나 배지 내의 프로테아제(proteases)에 의한 목적 단백질의 분해요인이 생산성에 가장 큰 영향을 미치고 있다.
- [0011] α -아밀라아제 프로모터와 *RAmy1A* signal peptide를 이용한 형질전환 벼 세포의 경우, 당 고갈시에 목적 단백질의 발현이 강하게 이루어지며 세포 밖의 배지로 분비된다. 하지만, 이 시스템의 단점은 당 고갈에 의해 생산이 유도되기 때문에 적절한 탄소원이 없는 상태에서 목적 단백질을 합성하게 된다는 점이다. 이러한 생산조건은 세포의 viability 감소 및 사멸, 이로 인한 배지내로의 단백질 분해제인 프로테아제(proteases) 분비 증가를 유발하여 단백질 분해(degradation)가 발생하며, 물리적 화학적 스트레스로 인한 단백질 변성(denaturation)이 목적 단백질의 안정성 저해와 궁극적으로는 생산성 저해를 일으킨다. 따라서, 목적 단백질 안정성의 증진을 통하여 활성이 높은 완전한 생산을 유도하는 것이 필요하다.
- [0012] 한편, 소금과 같이 금속 양이온과 비금속 음이온으로 이루어진 이온성 염 또는 염화합물이 통상 800℃ 이상의 고온에서 녹는 것과는 달리 100℃ 이하의 온도에서 용점이 형성되어 있는 염이나 염화합물을 이온성 액체라 한

다. 특히, 상온에서 액체로 존재하는 이온성 액체를 상온 이온성 액체(room temperature ionic liquid)라고 한다. 이러한 이온성 액체는 유기 양이온과 음이온으로 구성되어 있으며, 양이온으로서는 디알킬이미다졸륨, 알킬 피리디늄, 4급 암모늄, 4급 포스포늄 등이 있고, 음이온으로는 NO_3^- , BF_4^- , AlCl_4^- , Al_2Cl_7^- , AcO^- , PF_6^- , TfO^- (trifluoromethanesulfonate, CF_3SO_3^-), Tf_2N^- (trifluoromethanesulfonylamide, $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$), $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^-$ (L-lactate), SbF_6^- 등이 있다. 이온성 액체의 특성으로는 강유전성, 비가연성에 의한 우수한 열적 안정성, 비휘발성, 무독성, 이온전도도를 가지고 있고 높은 극성을 이용하여 무기 및 유기 금속 화합물들을 쉽게 용해시킬 수 있으며 광범위한 온도 범위에서 액체로 존재할 수 있음을 들 수 있다.

[0013] 현재, 이러한 특성을 갖는 이온성 액체는 촉매, 분리, 전기화학 등의 광범위한 화학분야에서 응용되고 있다. 예를 들면, 이온성 액체를 이용한 분리, 유기금속화합물을 함유한 고효율 촉매로서의 이온성 액체의 합성 및 응용에 대한 연구, 이온성 액체를 첨가한 유기합성 기술인 광화학성 화합물 제조기술 개발에의 적용, 이온성 액체를 고정화 촉매로 이용하여 이차 알코올의 트랜스에스테르화(transesterification) 반응을 통한 화합물의 합성 등의 분야에서 높은 활성과 재사용성 및 친환경성 등으로 주목을 받고 있다. 이러한 이온성 액체는 균일계 촉매반응의 용매, 촉매, 분리매개체, 나노화학, 전해질, 초임계 유체-이온성 액체 등을 연계하는 방법 등에서 그 이용이 고려되고 있으나, 아직까지 생물공학에서 사용되는 예는 극히 제한적이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 이에 본 발명자들은 단백질 안정화의 측면에서 이온성 액체를 세포 배양에 적용하고자 하였다. 구체적으로는, 재조합 단백질을 생산하는 형질전환 식물세포 배양 시스템에 적용함으로써 종래의 단백질 안정성에 관한 문제점을 개선하고자 하였으며, 종래 이온성 액체에 관한 연구를 기반으로 이를 재조합 단백질의 안정성 문제에 적용하여 세포 배양을 통한 재조합 단백질 생산에 있어서 이를 안정화 시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0015] 본 발명은 식물세포 배양 중 유도된 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 식물세포 배양 중 이온성 액체를 첨가하여 재조합 단백질을 안정화 시키는 방법에 관한 것이다.

[0016] 상기 식물세포는 바람직하게는 유전적으로 형질이 전환된 식물세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 RAmv3D 프로모터를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 식물세포일 수 있다. 하기 실시예에서는 형질전환 식물세포 중 형질전환 벡터 세포를 일 예로 사용하였다.

[0017] 상기 이온성 액체는 그 양이온 부분이 치환되는 알킬기의 탄소수가 1 내지 4인 이미다졸륨(imidazolium)이며, 음이온 부분이 메틸설페이트($[\text{CH}_3\text{SO}_4^-]$), 에틸설페이트($[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_4^-]$), 트리플루오로메탄설포네이트($[\text{CF}_3\text{SO}_3^-]$), 티오시아네이트($[\text{SCN}^-]$) 및 비스(트리플루오로메틸설포닐)이미드($[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$)로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 이온성 액체는 1-부틸-2-메틸이미다졸륨 메틸설페이트일 수 있다.

[0018] 상기 이온성 액체는 0.0001 내지 10 %(v/v) 함량으로 첨가하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 그 함량이 0.001 ~ 1 %(v/v)일 수 있다.

[0019] 상기 계면활성제는 상기 식물세포 배양 시 전단응력에 의해 식물세포의 손상을 줄여 주는 역할을 하는 것으로, 본 발명의 이온성 액체와 함께 첨가될 수 있다. 상기 계면활성제의 종류는 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제, 양쪽성 계면활성제 등 특별히 종류가 제한되는 것은 아니나, Pluronic F-68(PF-68) 또는

Polyvinylpyrrolidone-10(PVP-10)를 사용하는 것이 바람직하며, 그 첨가 함량은 0.001 내지 10.0 %(w/v)일 수 있으며, 보다 바람직한 함량은 0.3 %(w/v)일 수 있다.

[0020] 상기 재조합 단백질은 식물세포 배양 중 유도되는 단백질로서 이황화 결합을 포함하는 것이라면 특별히 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 재조합 hCTLA4Ig 단백질일 수 있다.

효 과

[0021] 본 발명에 의하면, 형질전환 식물세포배양에 있어 이온성 액체를 이용함으로써, 기존 재조합 단백질 생산에 비해 단백질의 분해 등을 방지할 수 있는 안정성을 제공할 수 있으며, 이로써 재조합 단백질의 안정적이고 높은 생산성을 확보할 수 있다. 또한, 사용되는 이온성 액체는 세포 독성을 나타내지 않으므로, 형질전환 식물세포배양에서 본 발명을 통해 재조합 단백질을 대량생산할 경우, 저비용, 고효율로 생산공정을 실현할 수 있다.

[0022]

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지나지 않으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0024] <실시예>

[0025] 1. 형질전환 벼의 제작

[0026] 세포주는 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산하도록 형질 전환된 발현 벡터(도 7 참조, 전북대학교, 보령제약, 대한민국)를 *Oryza sativa* L. cv. Dongjin의 현탁세포(전북대학교, 보령제약, 대한민국)에 사용하였다. 상기 형질 전환된 발현 벡터는 벼의 아밀라제 유전자군인 RAmy3D 유도 프로모터를 입자주입(particle-bombardment) 방법(Lee, S. J. et al., Protein Express. Purif. 51: 293-302, 2007)을 이용하여 벡터에 삽입시켜 형질 전환시켰고, 상기 RAmy3D 유도 프로모터는 수크로스(sucrose)가 고갈된 상태에서 작동하도록 되어있다.

[0027] 2. 형질전환 벼 세포 배양

[0028] 형질전환 벼 세포 배양은 상기 1.에서 제작한 형질전환 벼 세포주 3g/L를 30g/L 수크로스가 첨가된 AA 배지에서 배양하였다. 배지의 pH는 5.8로 맞춘 뒤 500 mL 엘렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)에 분주하여 가압증기 멸균하였다. 현탁 배양은 120 rpm, 28℃, 암 조건으로 유지하였으며 9일 간격으로 계대 배양을 수행하였다.

[0029] 3. 형질전환 벼 세포배양을 통한 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 생산

[0030] 형질전환 벼 세포에서 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 생산은 당 고갈 시에 발현되는 α-아밀라아제 프로모터에 의해 이루어지므로, 수크로스(sucrose)를 포함한 기본 AA 생장배지에서 수크로스를 제거한 생산배지로 전환하여 재조합 hCTLA4Ig 단백질 생산을 유도하였다. 단백질 유도 상태의 형질전환 벼 세포배양 역시 상기 2.의 세포 배양조건과 동일하게 유지하였다.

[0031] 4. 이온성 액체의 배양액 상 적용

[0032] 기존의 AA 배지를 사용하여 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산할 경우에는 α-아밀라아제 프로모터의 발현이 당 고갈에 의해 작동되기 때문에, AA 기본배지에서 당을 제거하여 이를 유도배지, 즉 생산배지로 이용하였다. 형질전환 벼 세포는 재조합 hCTLA4Ig 단백질 생산 시 배지 내로 단백질을 분비(secretion)하게 되는 시스템으로, 생산배지에서 배양한 후 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 생산 시점에서 배양액을 회수하여, 이에 이온성 액체를 처리한 후 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 안정화 정도를 측정하였다.

[0033] 사용한 이온성 액체는 1-부틸-2-메틸이미다졸륨 메틸설페이트 ([Bmin][MS])이며, 이를 사용하기 위하여 100 mM Tris-HCl(pH 8.1), 1 mM EDTA, 3 mM 환원된 글루타치온(GSH) 및 0.3 mM 산화된 글루타치온(GSSG)를 버퍼(buffer)에 녹여 사용하였다. 단순희석법에 의해 제조한 이온성 액체를 농도별로 10배, 100배 희석하여 상기 배양 후 회수한 배양액에 1 %(v/v) 처리하였으며, 상온에서 4시간 간격으로 샘플링(sampling)을 진행한 후 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 정량함으로 이온성 액체를 통한 배양액 상에서의 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 안정성 확인을 실시하였고, 결과를 도 1에 나타내었다.

[0034] 도 1에 의하면, 기존의 AA 배지에서 배양 후 회수한 배양액 상에서의 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 양은 시간이 경과함에 따라 배양액 내의 단백질 분해효소(protease)의 영향이나 기타 온도 등과 같은 물리적 요인으로 인한 분해가 확인된 반면, 이온성 액체를 농도별로 첨가한 경우 모두 기존 방법보다 재조합 hCTLA4Ig 단백질 양이 유지됨을 확인할 수 있다.

[0035] 5. 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 정량방법

[0036] 배지로 분비된 재조합 hCTLA4Ig 단백질 및 이온성 액체를 처리한 후의 재조합 hCTLA4Ig 단백질의 정량은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석법을 이용하여 측정하였다. Sandwich ELISA를 수행하기 위하여 제 1 항체(first antibody)로는 goat anti-human IgG(Fc) (KPL)를 사용하였고, 제 2 항체(secondary antibody)로는 peroxidase-labeled goat anti-human IgG(g)(KPL)를 사용하였다. 기질은 ABTS peroxidase substrate(KPL)로 사용하였고, 발색정도를 405 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 표준물질로는 ImmunoPure human IgG(Pierce)를 사용하였다. 분석에 사용된 완충액(buffer)의 조성과 자세한 분석방법은 하기 [표 1] 및 [표 2]에 나타난 바와 같다.

[0037] [표 1] ELISA 완충액(buffer)의 조성

Buffer	Composition
Coating buffer	1.59 g/L Na ₂ CO ₃ 2.93 g/L NaHCO ₃ pH 9.6
PBS	8.0 g/L NaCl 0.2 g/L KH ₂ PO ₄ 1.15 g/L Na ₂ HPO ₄ 0.2 g/L KCl pH 7.4
Blocking solution	2% FBS in PBS
Washing buffer(PBST)	0.05% tween20 in PBS
Assay buffer	2% FBS in PBST

[0039] [표 2] ELISA 분석방법

Step	Reagent	Dilution	Loading volume (μL/well)	Reaction time
Coating	1st antibody: Goat anti-human IgG(Fc)(KPL)	1:1000 (Ab:coating buffer)	100	Overnight(4℃)or 2 h(37℃)
Blocking	Blocking solution		200	2 h (room temp.)
Washing	3 times with washing buffer(PBST)			
Standard/sample loading	Standard: Human IgG(Pierce)	1/2-fold series dilution	100	1 h(37℃)
Washing	4 times with washing buffer(PBST)			

Detection	2nd antibody: Peroxidase-labled goat anti-human IgG(g)(KPL)	1:5000 (Ab:assay buffer)	100	1 h(37℃)
Washing	5 times with washing buffer(PBST)			
Color development	Substrate: ABTS peroxidase(KPL)		100	Until O.D of the first standard well reach to 1.0
Reading	Read with microplate reader at 405nm			

6. 이온성 액체를 배양 중에 적용한 재조합 단백질 안정화 방법

이온성 액체를 형질전환 식물세포 배양 중에 적용하기 위하여 수크로스(sucrose)를 제거한 생산배지로 옮겨주어 재조합 hCTLA4Ig 단백질을 생산을 유도하였다. 단백질 유도 상태의 세포배양 역시 생장상태의 세포 배양조건과 동일하게 유지하였다. 이온성 액체를 세포 배양 중에 첨가하였을 때, 세포에 미치는 독성을 확인한 연구(Lee, S. M. et al., Korean. J. Chem. Eng., 22:4, 687-690, 2005)를 토대로 식물세포 배양 시 이온성 액체를 첨가하여 세포에 미치는 독성의 확인 및 단백질의 안정성에 미치는 역할을 확인하였다.

생산배지에 첨가한 이온성 액체는 상기 회수한 배양액에 처리한 조성과 동일하며, 배양에 적용하기 위하여 0.22 μ m 필터로 멸균처리를 한 후에 배양 중에 적용하였다. 단순회석법에 의해 제조한 이온성 액체를 농도별로 처리한 후 농도별 효과를 확인하였고, 첨가 시기에 따른 안정성 효과를 확인하였다. 또한, 현탁세포 배양 시 전단응력에 의한 세포의 손상을 줄여 주는 역할을 하는 것으로 알려진 계면활성제와 함께 이온성 액체를 조합하여 처리함으로써 단백질 안정성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

이온성 액체가 hCTLA4Ig의 안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1%의 이온성 액체와 계면활성제인 PF-68를 0.3%의 농도로 배양 초기에 첨가하여 관찰하였다. Time-course 관찰 중 생산성 증진을 위해 단백질 안정제가 최대 요구되는 결과를 보인 12일째 결과를 토대로 대조구(control) 대비 1%의 이온성 액체를 첨가한 것의 생산성이 50% 증진된 것을 확인하였고, 1%의 이온성 액체와 0.3% PF-68를 첨가한 것의 생산성은 80% 이상 증진된 것을 확인하였으며, 그 결과는 도 2에 나타난 바와 같다. 이온성 액체의 효과를 확인한 후, 이온성 액체의 농도별 효과를 확인하기 위하여 0.01, 0.1, 0%의 이온성 액체를 배양 초기에 농도별로 첨가하였다. 8일째에 배양액을 회수하여 hCTLA4Ig를 정량한 결과, 도 3에서처럼 0.01%의 이온성 액체를 첨가한 경우 생산성이 대조구(control) 대비 270% 이상 증가한 결과를 확인할 수 있었다.

이온성 액체의 최적 농도를 확인한 후 계면활성제를 첨가한 조합 실험을 통하여 최대 효과를 확인하고자 하였다. 가장 생산성이 증진된 효과를 보인 0.01%의 이온성 액체 첨가에 계면활성제인 PVP10과 PF-68을 0.3% 첨가한 후 그 효과를 확인하였다. 배양 초기와 배양 시작 후 5일째에 이온성 액체 및 계면활성제를 첨가한 후 8일째에 배양액을 회수하여 hCTLA4Ig를 정량한 결과를 도 4 및 5에 각각 도시하였다. 도 4에 의하면, 배양 초기에 이온성 액체 및 계면활성제를 첨가한 경우, 0.01%의 이온성 액체와 0.3% PF-68를 첨가한 경우 생산성이 대조구(control) 대비 150% 이상 증가함을 알 수 있었다. 도 5에 의하면, 배양 시작 후 5일째에 0.01%의 이온성 액체와 0.3% PF-68를 첨가한 경우 생산성이 대조구(control) 대비 400% 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 형질전환 배 세포배양을 통한 치료용 단백질 hCTLA4Ig를 생산하는 데 이온성 액체 첨가를 통한 단백질 안정화를 통하여 생산성이 증진되는 효과를 확인 하였으며, 특히 0.01%의 이온성 액체와 0.3%의 PF-68를 배양 시작 후 5일째에 첨가할 경우 가장 생산성이 증진되는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

7. 세포(cell)에 이온성 액체가 미치는 영향

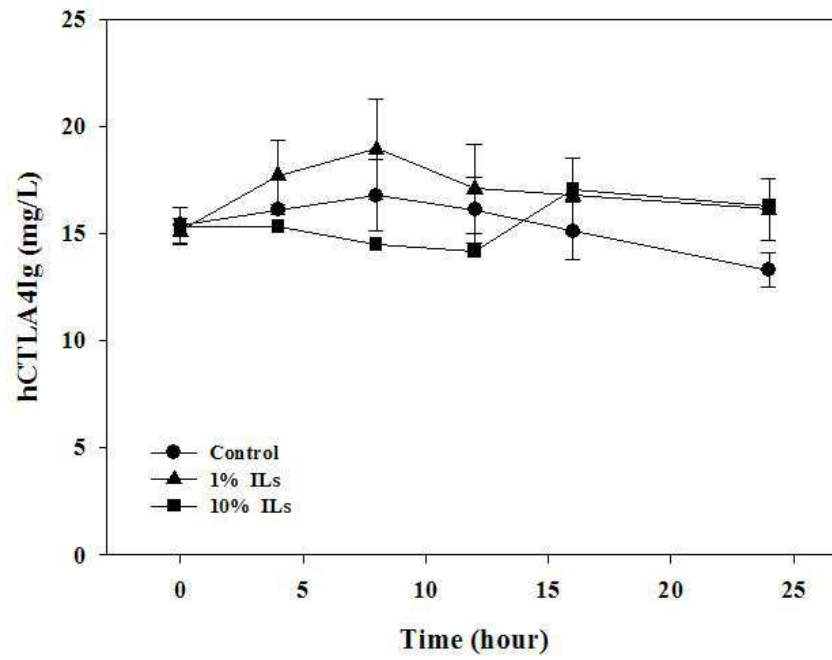
이온성 액체와 계면활성제를 조합하여 첨가한 배양에서의 세포 생존도(cell viability), 세포건체량(dry cell weight) 및 pH를 time-course로 관측함으로써 세포에 이온성 액체가 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

- [0048] 세포의 생존도는 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법으로 상대적인 생존도(relative cell viability)를 측정하였다. 1.5%의 TTC 용액(0.05 M 인산칼륨 용액(potassium phosphate solution), pH 9.0) 1.6 ml를 0.1 gFCW의 세포에 첨가하고 20℃에서 24시간 반응하였다. 그 후, TTC 용액을 제거하고 95% 에탄올(ethanol) 1 mL를 첨가하여 60℃에서 30분간 반응 후 붉은 포르마잔(red formazan)을 추출하였다. 15,000 rpm으로 원심분리한 후, 상등액을 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. 블랭크(Blank)로는 95% 에탄올(ethanol)을 사용하였다.
- [0049] 세포의 성장을 측정하기 위해서 세포생체량(fresh cell weight, FCW)과 세포건체량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지상에서 시료의 배양액과 분리하였다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 weighting dish에 세포를 옮겨 담아 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 60℃의 dry oven에서 48시간 동안 항량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.
- [0050] 또한, 배양액의 pH를 측정하기 위해서 pH meter(Thermo, Electron Co.)를 이용하여 측정하였다. pH meter 기기의 전원을 켜 후 pH probe를 증류수로 깨끗이 씻어낸 후 부드러운 휴지로 물기를 살짝 닦아주었다. Calibration을 실시한 후 pH probe를 측정하고자 하는 용액에 넣은 후 수치가 안정될 때까지 기다린 다음 pH의 수치를 기입하였다. 그런 다음, 증류수로 깨끗이 씻어낸 후 보관용액에 담가 probe가 마르지 않도록 보관하였다.
- [0051] 상기 세포 생존도(cell viability), 세포건체량(dry cell weight) 및 pH를 time-course로 관측한 결과는 도 6(relative cell viability), 도 7(dry cell weight) 및 도 8(pH)에 각각 나타난 바와 같다. 도 6 내지 도 8에 의하면, 대조구(control)와 유사한 양상으로 세포생존도(cell viability)가 감소하는 것으로 확인할 수 있으며, 이로써 이온성 액체의 첨가가 세포에 무해함을 확인할 수 있었다.
- [0052] 이상에 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0053] 도 1은 제조합 hCTLA4Ig 단백질 생산 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체를 농도별로 첨가하였을 때, 시간에 따른 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 양의 변화를 나타낸 것이다.
- [0054] 도 2는 본 발명에 따른 이온성 액체 및 계면활성제 PF-68를 함께 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중에 첨가하였을 때, 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 양을 나타낸 것이다.
- [0055] 도 3은 제조합 hCTLA4Ig 단백질 생산 배양 중 첨가한 본 발명에 따른 이온성 액체의 농도에 따른 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 양을 나타낸 것이다.
- [0056] 도 4는 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체와 계면활성제인 PVP10 및 PF-68를 배양 초기 단계에서 첨가한 경우, 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 양을 나타낸 것이다.
- [0057] 도 5는 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체와 계면활성제인 PVP10 및 PF-68를 배양 시작 후 5일째에 첨가한 경우, 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 양을 나타낸 것이다.
- [0058] 도 6은 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체 및 계면활성제(PF-68)를 배양 시작 단계에서 첨가한 후 time-course로 상대 세포 생존도(relative cell viability)를 나타낸 것이다.
- [0059] 도 7은 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체 및 계면활성제(PF-68)를 배양 시작 단계에서 첨가한 후 time-course로 세포건체량(dry cell weight)의 변화를 나타낸 것이다.
- [0060] 도 8은 제조합 hCTLA4Ig 단백질의 배양 중 본 발명에 따른 이온성 액체 및 계면활성제(PF-68)를 배양 시작 단계

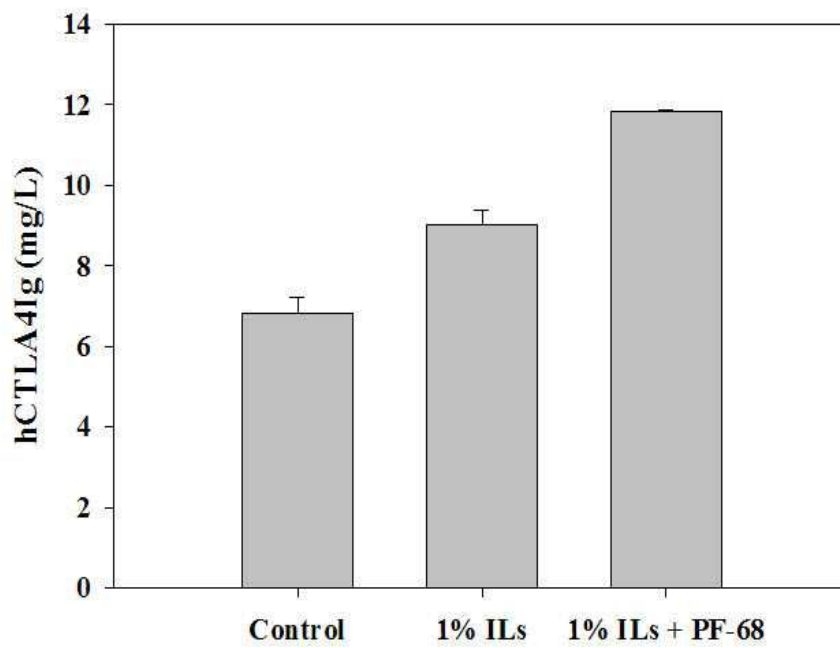
에서 첨가한 후 time-course로 pH의 변화를 나타낸 것이다.

도면

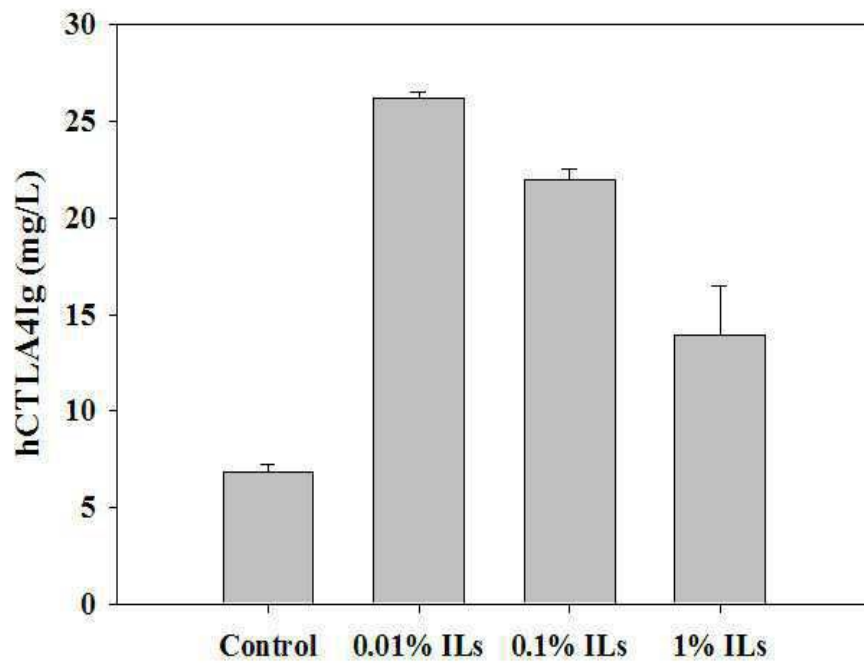
도면1



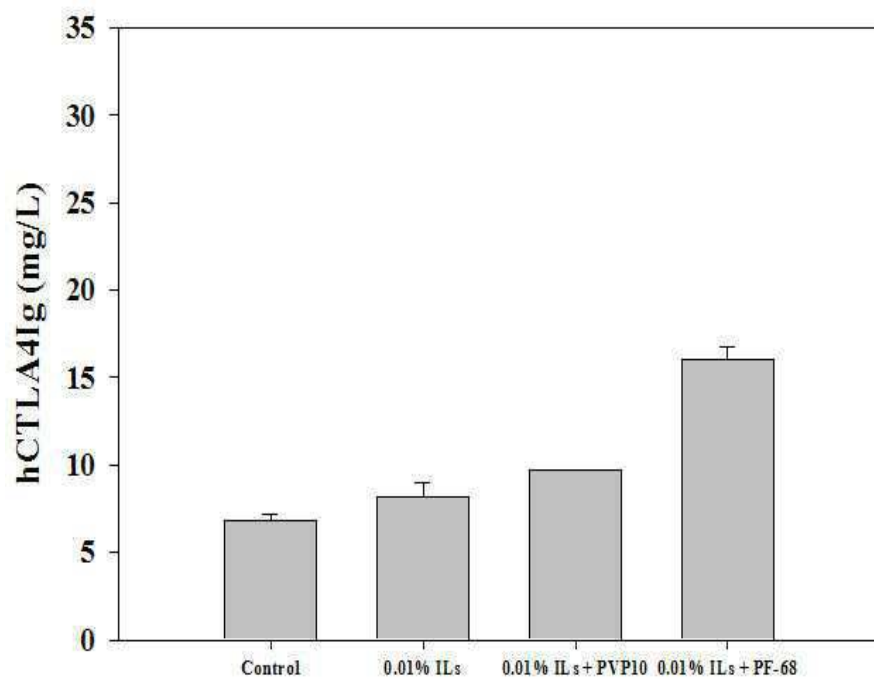
도면2



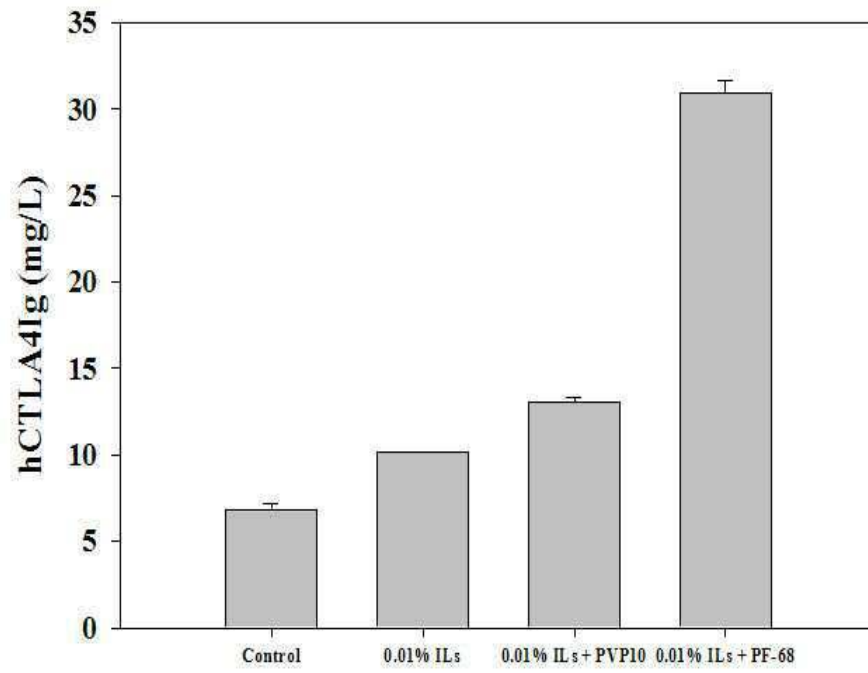
도면3



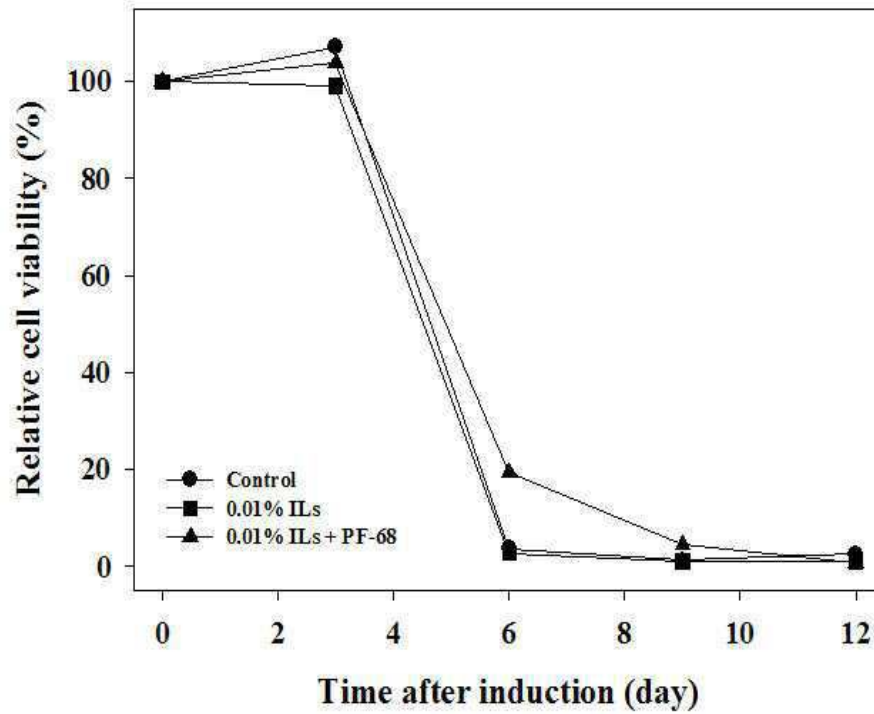
도면4



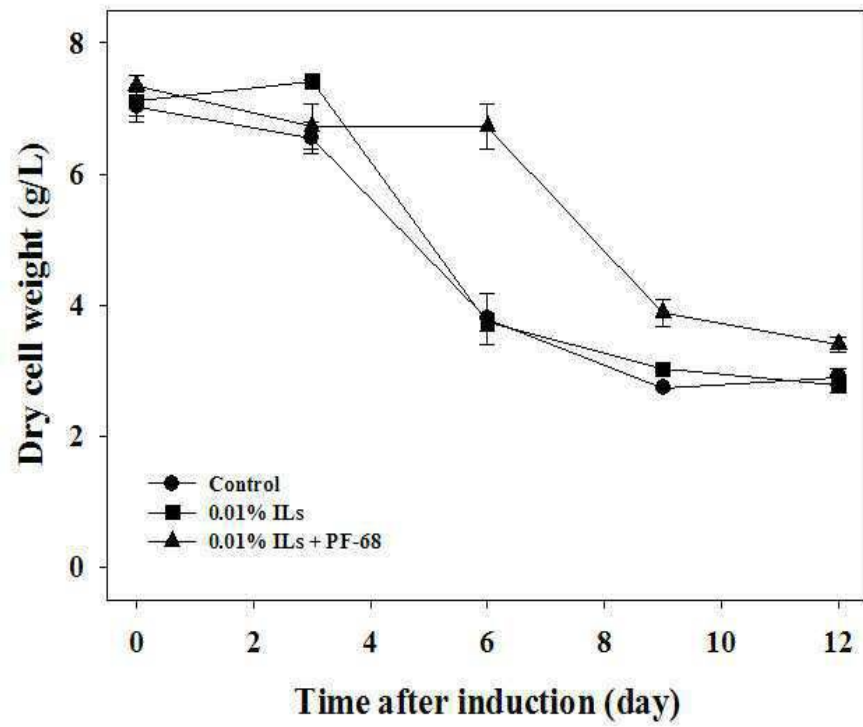
도면5



도면6



도면7



도면8

