



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030195
(43) 공개일자 2020년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/67 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/67 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0108713

(22) 출원일자 2018년09월12일

심사청구일자 2018년09월12일

(71) 출원인

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

한양대학교 산학협력단

서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

김천생

대전광역시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지 705동 502호

김성준

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 205동 807호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인주원

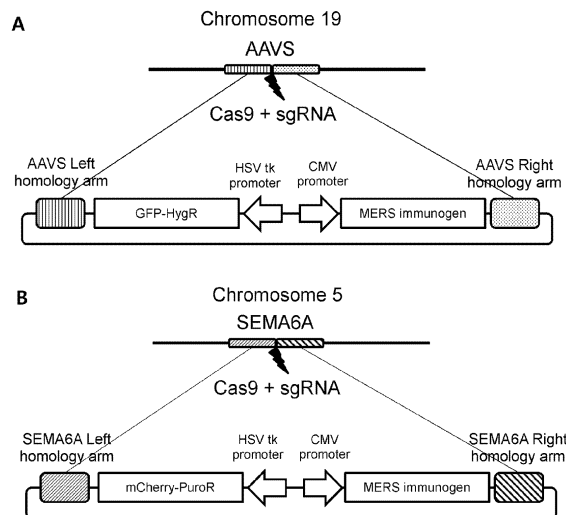
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 CRISPR 편집 기술을 이용한 재조합 항원을 발현시키는 벡터 및 이를 동시에 다중 삽입시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 CRISPR 기술인 Homology directed recombination 방법을 통하여 진핵 세포 크로모솜의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공한다. 동시에 두 곳에 삽입시켜서, 면역원을 안정적이고 과발현 할 수 있는 인간 세포주를 선별 한 후, 이러한 세포를 이용하여 면역원으로 사용 가능한 재조합 단백질을 발현하는 방법에 관한 것으로써, 사회적으로 문제가 되는 다양한 바이러스에 대한 재조합 면역원, 백신 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2770/20051 (2013.01)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국식품연구원

전라북도 완주군 이서면 농생명로 245

(72) 발명자

안대균

경기도 고양시 일산서구 강선로 169 후곡마을15단지아파트 1509동 1203호

김균도

경기도 용인시 수지구 신봉3로 25, 310동 510호

구근본

대전광역시 유성구 신성로84번길 43-6

김해수

대전광역시 유성구 엑스포로 488 엑스포아파트 212동 204호

신혜진

경기도 화성시 노작로4길 22-5 301호

황인수

대전광역시 유성구 신성남로95번길 16 102호

윤건영

대전광역시 서구 만년로68번길 62 101동 506호

장현주

서울특별시 송파구 송파대로36가길 16

유인

경기도 수원시 영통구 덕영대로1673번길 8-11 B02호

김미화

전라북도 전주시 덕진구 전주천동로 453 309호

김범태

대전광역시 유성구 계룡로 92 CJ나인파크 102동 1502호

배상수

서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 자연과학관 36동 316호

우재성

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 하나과학관 316호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 CRC-16-01-KRICT

부처명 국가과학기술연구회

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 융합연구사업

연구과제명 (CEVI)(3A)(화학)해외 유입 고위험 신종바이러스 예방에 효과적인 백신 후보물질 발굴 및
 효능평가시스템

기 여 율 92/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2017.08.01 ~ 2018.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK1803-S01

부처명 한국화학연구원

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 (대과제 관리) 의약바이오본부 운영 사업 (CEVI 융합연구단)

기 여 율 8/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

진핵 세포에서 항원의 안정적인 과 발현 효율 증대를 위해 CRISPR 유전자 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모솜의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원은 메르스 바이러스의 항원인 방법

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag를 C-terminal에 fusion시킨 것인 방법

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 Fc 부분을 fusion시킨 것인 방법

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것인 방법

청구항 7

제1항에 있어서, 벡터는 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 방법

청구항 8

제1항에 있어서, 벡터는 Cas 단백질 발현 서열을 포함하는 방법

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인 방법

청구항 10

제1항에 있어서, Hygromycin resistant gene 부위를 더 포함하는 방법

청구항 11

제1항에 있어서, Puromycin resistant gene 부위를 더 포함하는 방법

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 진핵 세포는 293 세포인 방법

청구항 13

메르스 바이러스 항원을 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 발현할 수 있는 벡터

청구항 14

제13항에 있어서, AAVS 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

청구항 15

제13항에 있어서, SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

청구항 16

제13항에 있어서, AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 Cas는 Cas9인 벡터

청구항 18

제13항에 있어서, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 벡터

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항원의 안정적인 과 발현을 유도하기 위하여 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 기술인 homology directed recombination 방법을 통하여 인간 크로모솜(chromosome) 특정 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터 및 이를 삽입시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 단백질 연구를 진행할 때 발현은 E.coli와 같은 원핵세포를 이용하여 진행된다. 하지만 바이러스의 표면에 존재하는 단백질을 재조합 면역원으로 사용할 때는 glycosylation 과 같은 단백질 수식이 면역원성에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 원핵세포에서 발현을 수행하는 경우 인간세포와 같은 진핵세포에서 단백질을 발현하는 경우와 다른 glycosylation 이 유도되어 과도한 glycosylation 이 필요한 단백질을 생산하는데는 한계가 있다 (비특허문헌 1). 때문에 재조합 면역원을 발현하는 경우 293 세포와 같은 인간세포를 많이 이용해오고 있다. 현재까지 주로 사용되는 방법은 재조합 면역원 발현 플라스미드를 진핵세포에 transfection 한 후 transient 하게 발현되는 단백질을 정제하는 방법이다 (비특허문헌 2). 이러한 transient 한 방법으로 면역원성을 시험하기에는 충분하지만 대량의 재조합 면역원을 생산하기에는 한계가 존재한다. 이를 극복하기 위해서 인간세포에서 안정적으로 재조합 면역원을 발현할 수 있는 세포주를 선별하여 계속 생산되는 재조합 면역원을 얻어서 정제하는 방법이 사용 가능하다. 면역원을 안정적으로 발현하는 세포주를 제작하기 위해서 CRISPR gene editing 기술의 Homology-directed Repair 방법이 사용되고 있다. 비특허문헌 3에서는 단백질 발현 벡터를 293세포에서 비교적 transcription 이 잘 일어나는 AAVS site에 삽입시키는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 세포안에서 단백질 발현을 유도하는 방법이다. Signal Peptide는 단백질들의 N-말단에 위치하여 세포밖으로 배출(secretion) 될 수 있도록 작용하는 펩타이드이다. 이들을 원하는 단백질에 융합시켜서 발현하면 세포 밖으로 배출 시킬 수 있는

특징이 있다. 메르스 바이러스의 경우도 스파이크 단백질 (S protein)의 경우 자신의 signal peptide를 N-말단에 포함하고 있다. 재조합 면역원 역시 signal peptide를 융합시켜서 발현시키면 세포 밖으로 배출이 가능해서 세포를 lysis 시키지 않고도 원하는 단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다. AAVS site 이외에도 비특허문헌 4에 따르면, gene 의 transcription이 활발히 일어나는 hot spot이 보고되어 있다. 이러한 site 중에서 SEMA6A site를 사용하여 AAVS 에 integration 시키는 방법처럼 추가로 원하는 발현 벡터를 integration 시킬 수 있다. 한 세포에 발현이 활발히 일어나는 두 site에 동시에 동일한 발현 벡터를 integration 시켜서 재조합 면역원 발현을 두 배 이상 향상시킬 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

[0004] 한편, 다양한 재조합 항원을 안정적으로 확보하는 것은 재조합 단백질을 이용한 다양한 연구 진행에 있어서 매우 중요한 과정이다. 그러나, 현재까지의 기술로 재조합 항원의 안정적인 과 발현을 유도하는 기술은 매우 어렵고, 이러한 문제를 극복하는 기술이 공지된 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) 1. Nat Chem Biol (2012) 8(5): 434-436
(비특허문헌 0002) 2. Vaccine 32 (2014) 6170-6176
(비특허문헌 0003) 3. Nature Biotechnology 33 (2015) 543-550
(비특허문헌 0004) 4. Biotechnol. J 11 (2016) 1100-1109

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 항원을 과 발현시키는 벡터를 크로모솜 특정 위치에 삽입시켜서 안정적으로 항원을 발현하는 안정 세포주를 제공하는데 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 항원의 안정적인 과 발현을 증대를 위하여 크로모솜의 다중 위치 (multiple sites)에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 해결하기 위하여,

[0011] 본 발명은 진핵 세포에서 재조합 항원의 안정적인 과발현 유도를 위해 CRISPR 유전자 편집기술인 homology-directed repair 방법으로 인간 크로모솜 특정 위치에 항원을 발현시키는 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 진핵 세포에서 항원의 안정적인 과 발현 효율 증대를 위해 CRISPR 유전자 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모솜의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 보다 구체적으로 항원은 메르스 바이러스의 항원이고, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 것이 바람직하다. 이 RBD 항원은 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag를 C-terminal에 fusion시킨 것, Fc 부분을 fusion시킨 것 또는 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것이 바람직하다.

[0014] 또한 본 발명의 상기 벡터는 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하며, Cas 단백질 발현 서열을 포함하고 Cas 단백질은 Cas9 단백질인 것이 바람직하다.

[0015] 본 발명의 방법은 Hygromycin resistant gene 부위 또는 Puromycin resistant gene 부위를 더 포함할 수 있다. 또한 상기 진핵 세포는 293 세포를 포함한다.

- [0016] 또한 본 발명은 메르스 바이러스 항원을 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 발현할 수 있는 벡터를 제공한다.
- [0017] 상기 벡터는 AAVS 및/또는 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하고, 상기 Cas는 Cas9인 것이 바람직하다. 또한 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)이고, 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag을 C-terminal에 fusion시키거나 RBD 단백질 뒤에 Fc 부분을 fusion시킨 것 또는 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것일 수 있고, Hygromycin resistant gene 부위 또는 Puromycin resistant gene 부위를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 진핵 세포에서 재조합 항원을 안정적이며 고효율로 생산할 수 있는 효과가 있다.
- [0020] 또한 본 발명은 다양한 재조합 항원을 대량으로 확보할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 CRISPR-cas9 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모솜 특정 위치(chromosome 5 및 9)에 항원 발현 벡터를 삽입(integration) 시켜서 항원을 안정적으로 발현하는 안정 세포주(stable cell line)을 제작하는 모식도이다.
- 도 2는 실시예 1의 과정을 통해 과 발현되는 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 구조를 보여주는 모식도이다.
- 도 3은 실시예 2의 재조합 항원을 발현하는 벡터를 chromosome 특정 위치(chromosome 5 및 9) 2곳 동시에 삽입(integration) 시킨 후, 항원 발현양이 세포 안(Cell pellet)과 밖(Supernatant)에서 2배 이상 증가함을 보여주는 웨스턴 블로팅 결과이다.
- 도 4은 실시예 3에서 발현되어 세포 밖(Supernatant)으로 배출된 항원이 glycosylation이 됨을 입증하는 웨스턴 블로팅 결과이다.
- 도 5는 실시예 4의 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)을 대량으로 정제한 후, 은 염색법(silver staining)을 통하여 항원의 고순도 정제를 보여주는 결과이다. 아래 표는 정제된 항원의 고효율을 보여준다.
- 도 6은 실시예 5의 정제된 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)의 고순도를 RP_HPLC를 통해 분석한 결과이다.
- 도 7은 실시예 5의 정제된 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)의 고순도를 gel filtration을 통해 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0025] <실시예 1> 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위) 발현 안정 세포주 선별
- [0026] 본 발명에 따른 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위) 안정 세포주를 제작하기 위해서 다음과 같이 실험하였다.
- [0027] 현재까지, 진핵 세포에서의 단백질 발현은 일시적인 발현을 통하여 이루어져 왔다. 본 발명에서는 CRISPR-Cas9 기술을 이용하여 면역원을 안정하게 발현하는 세포주를 만들고, 이를 이용하여 계속해서 동일한 재조합 항원을 발현 정제할 수 있는 방법을 이용하였다. 단백질 발현이 활발히 이루어지는 크로모솜 위치로 보고된 크로모솜 19번 AAVS 위치에 homology directed repair (HDR) 방법을 이용하여 재조합 항원 발현 벡터를 삽입(integration) 시키는 방법을 이용하였다(도 1 참조). 재조합 항원 발현율을 증가시키기 위하여 AAVS 위치와

유사하게 단백질을 과 발현시킬 수 있는 크로모솜 5번 SEMA6A 위치를 이용하여 동시에 두 위치에 같은 재조합 항원 발현 벡터를 삽입할 수 있는 시스템을 개발하였다 (도 1 참조).

[0028] Cas9 단백질 발현 플라스미드와 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 발현하는 플라스미드를 293 세포에 트랜스펙션 해주면 원하는 위치의 DNA를 모두 자를 수 있고, 같이 트랜스펙션한 재조합 항원 발현 플라스미드에 있는 왼쪽과 오른쪽 homology arm을 이용하여 HDR이 일어나서 원하는 유전자를 정확한 위치로 삽입할 수 있는 시스템을 개발하였다. 도 1의 재조합 항원 발현 플라스미드에 왼쪽과 오른쪽 homology arm을 표시하였다.

[0029] 재조합 항원을 생산하기 위해서 타겟 단백질은 메르스바이러스의 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체결합부위 (receptor binding domain, RBD)을 사용하였다. 여기에 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag를 C-terminal 에 fusion 시켰다 (도 2. 면역원 발현 벡터 1). 인간 항체의 Fc 부분은 재조합 항원을 체내에서 안정화 시키는 기능을 가지고 있어서 RBD 단백질 뒤에 fusion 시켜서 면역원 발현 벡터 2로 제작하였다 (도 2. 면역원 발현 벡터 2). 인간 항체의 Fc 부분은 프로테인 G 컬럼을 통하여 순수 분리 정제가 가능하고 이를 본 발명에 사용하였다. 자연상태의 메르스바이러스 스파이크 단백질은 글리코실화 (glycosylation)가 된다고 알려져 있다. 따라서, 재조합 메르스바이러스 RBD 항원도 같은 배출 과정을 거치면서 글리코실화가 일어나도록 두 개의 재조합 항원 N-말단에는 글리코실화를 유도하는 signal peptide를 융합시켰다. 세포 밖으로 배출된 재조합 항원을 정제하면, 세포 안에서 발현되는 단백질을 정제하면서 겪을 수 있는 다른 오염 단백질들의 양을 줄일 수 있어 효율적이고 순수하게 단백질을 정제할 수 있는 장점이 있다.

[0030] 실제로 재조합 항원 발현 안정 세포주를 만들기 위하여 먼저 293 세포의 AAVS 위치에 항원 발현 플라스미드를 삽입시켰다. Hygromycin resistant gene이 같이 삽입되어 원하는 세포만 세포 배양 배지에 hygromycin을 첨가하여 선별하였다. 이렇게 생성된 hygromycin resistant 콜로니 중에서 면역원을 효율적으로 발현하는 세포를 웨스턴 방법으로 골라내고 이를 확장하여 면역원 발현 세포로 사용하였다. 또한, 두 위치에 동시에 삽입된 세포를 만들기 위해서 AAVS 에서 얻어진 세포에 동일한 면역원을 발현하는 SEMA6A 위치용 벡터를 이용하여 유사한 방법으로 세포를 선별하였다. SEMA6A 벡터는 puromycin resistant gene이 같이 삽입되어서 세포 배양 배지에 hygromycin 과 puromycin을 같이 첨가하여 세포를 선별하였다. 살아남은 세포들 중에서 면역원 단백질 발현이 높은 세포를 골라서 면역원을 대량 발현하는데 사용하였다.

[0032] <실시예 2> 두 위치에 동시에 삽입한 재조합 항원 발현 세포에서 단백질 발현을 증가 확인

[0033] 상기 실시예 1에서 제작된 AAVS와 SEMA6A 두 위치에 동시에 삽입된 재조합 항원 발현 세포 (AACY + SEMA6A) 가 AAVS 위치 1곳에만 발현하는 세포 (AACY)보다 재조합 항원의 발현율이 증가하는지 알아보기 위하여 확인 실험을 진행하였다. 세포 안에서 만들어진 면역원 단백질이 세포 밖으로 배출되도록 제작한 시스템이어서 세포 안의 단백질의 양과 세포 밖 배지에 존재하는 단백질의 양을 비교하였다. 도 2의 면역원 발현 벡터 2번을 이용하여 실험한 결과를 보여주고 있다. 이 항원 (MERS-RBD-Fc)의 경우 인간 항체의 Fc 부분이 fusion 되어 있어서, 웨스턴 블로팅 방법으로 인간 항체에 대한 2차 항체를 이용하면 단백질 발현을 확인 할 수 있다.

[0034] 도 3의 결과에서 나타난 바와 같이 AACY 의 경우보다 AACY + SEMA6A 의 경우가 세포 내에서의 발현 (Cell pellet) 과 세포 밖으로 secretion 된 (supernatant) 항원 모두 발현이 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 단백질 발현 증가는 항원 생산율의 증가로 이어져 실제 항원 생산에 있어서 경제성을 상승시킨다.

[0036] <실시예 3> 재조합 항원 (메르스바이러스 수용체결합부위) 글리코실화 (glycosylation) 확인

[0037] 메르스 바이러스의 signal peptide에 의해서 세포밖으로 secretion 된 재조합 항원이 glycosylation 이 잘 일어났는지 확인하기 위하여 N-linked glycan을 제거할 수 있는 PNGase F를 이용하여 실험하였다.

[0038] PNGase F를 이용하여 glycosylation 된 부분을 제거하면 단백질의 전체 무게가 감소하고, 이러한 glycosylation 이 제거된 단백질이 SDS-PAGE gel 상에서 더 빨리 이동하게 되어 이러한 크기 차이를 비교하여 glycosylation 이 되었는지 확인 할 수 있는 실험이다. 실험에 사용한 재조합 항원은 도 2의 면역원 발현 벡터 1에 의해서 만들어진 메르스바이러스 수용체결합부위 단백질이다 (MERS-RBD).

[0039] 메르스바이러스 수용체결합부위 단백질에 PNGase F를 처리하고, 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 면역원을 인지할 수 있는 anti-His tag 항체를 이용하여 단백질을 확인하였다. 도 3에서 확인한 바와 같이 PNGase F를 처리한 면역원 단백질 (MERS-RBD deglycosylated) 이 처리하지 않은 면역원 단백질 (MERS-RBD glycosylated) 보다 작은

크기로 검출되는 것으로 보아 glycosylation 이 잘 유도됨을 확인하였다. 바이러스의 표면 단백질과 유사하게 glycosylation 을 유도하여 특이적으로 바이러스를 중화시킬 수 있는 항체를 형성하는데 도움이 될 수 있는 면역원으로서 사용 가능할 것이다.

[0041] <실시예 4> 항원 (메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 발현 세포 대량 배양 및 단백질 정제와 이를 통한 단백질 발현 수율 확인

[0042] 실시예 1에서 선별된 세포주들을 대량으로 증식하여 면역원을 분리하였다. 세포를 키울 때 사용되는 소태아 혈청의 경우 여러 단백질들이 고농도로 포함되어 있어서 항원 단백질의 정제에 방해가 될 수 있어서, 혈청없이 293 세포를 키울 수 있는 serum free media를 이용하여 면역원 발현 세포주들을 대량 배양하였다. 시그마 회사의 Excell 293 serum free media 혹은 ThermoFisher Scientific 회사의 FreeStyle 293 expression media를 사용하였다. Sigma 회사의 CELLINE Classic bioreactor flask의 경우 항체나 세포의 단백질 발현에 많이 사용되는 flask로 중간에 삽입된 membrane을 통해서 세포의 증식에 필요한 배지는 자유롭게 이동하지만 세포나 세포 밖으로 배출된 단백질들은 이동하지 못한다. 많은 수의 세포를 적은 볼륨 안에서 배양이 가능한 장점이 있고 고농도의 단백질을 얻을 수 있어서 정제 과정에서 훨씬 고순도의 단백질 정제에 도움이 된다. 원심분리기를 이용하여 세포와 세포배양액을 분리한 후 세포배양액 속에 있는 재조합 항원을 정제하였다. MERS-RBD 단백질은 Ni-NTA column (QIAGEN)을 이용하여 정제하였고, MERS-RBD-Fc 단백질은 protein G-column (GE healthcare)을 이용하여 정제하였다. 도 5에서 대량 정제된 재조합 항원을 은 염색법 (silver staining)으로 염색하여 확인한 결과를 제시한다. 각 항원 단백질의 수율은 도 5의 테이블에 정리하였다. 두 위치에 삽입한 세포에서는 (AACY + SEMA6A) 수율이 2배 이상 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

[0044] <실험예 5> 정제된 항원 (메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 순도 분석

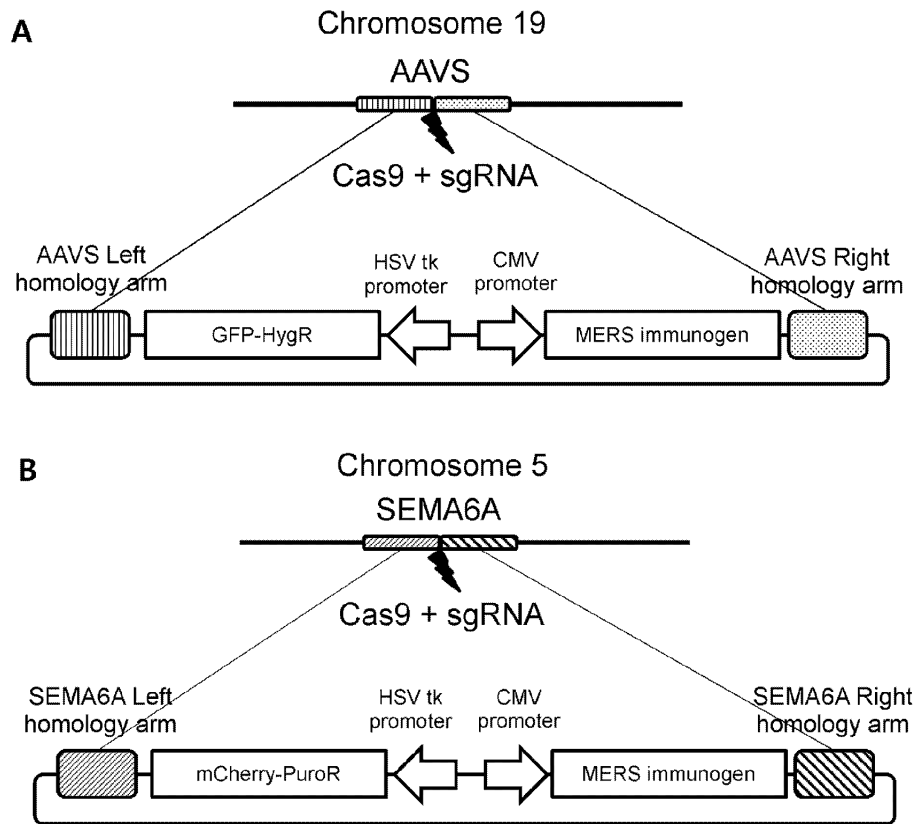
[0045] 정제된 재조합 항원들의 순도를 측정하기 위하여 RP-HPLC, Gel filtration 방법을 통하여 분석하였다. 도 6에서는 MERS-RBD 항원과 MERS-RBD-Fc 항원의 순도를 RP-HPLC 방법으로 분석한 그래프이다. 단 1회의 column 정제만을 이용하여서도 94% 이상의 고순도의 항원들이 정제된 것을 확인할 수 있었다. 정제된 각 항원들의 순도를 그래프 밑의 표로 제시하였다. Gel filtration 방법을 통하여 추가적으로 MERS-RBD-Fc 항원의 순도를 분석하였다 (도 7). MERS-RBD-Fc 면역원의 경우 대부분 single peak 를 나타내는 것으로 확인되어 순도가 높은 항원임을 확인하였다.

[0047] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시 예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다.

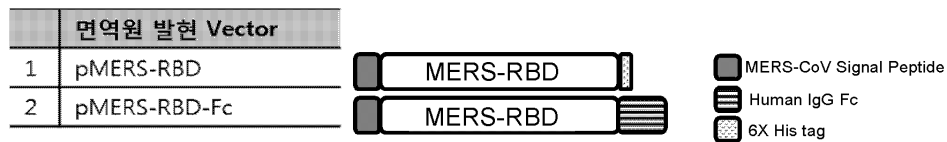
[0048] 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

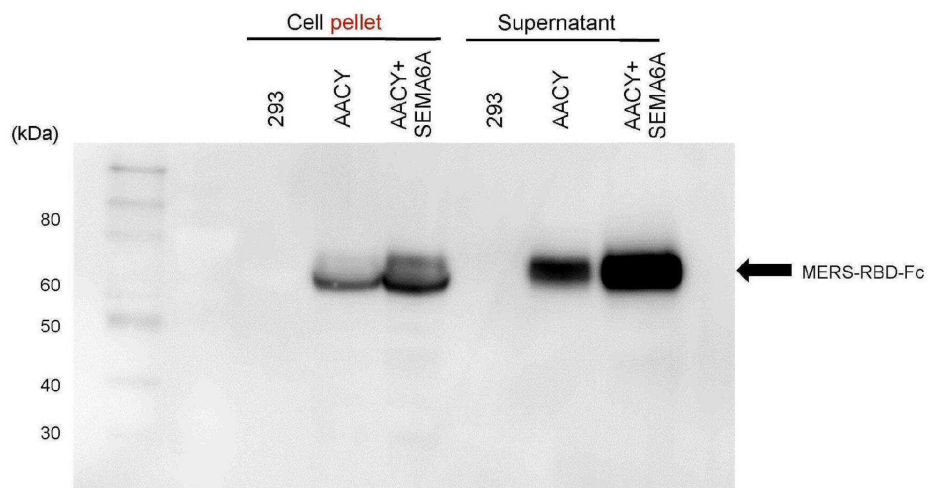
도면1



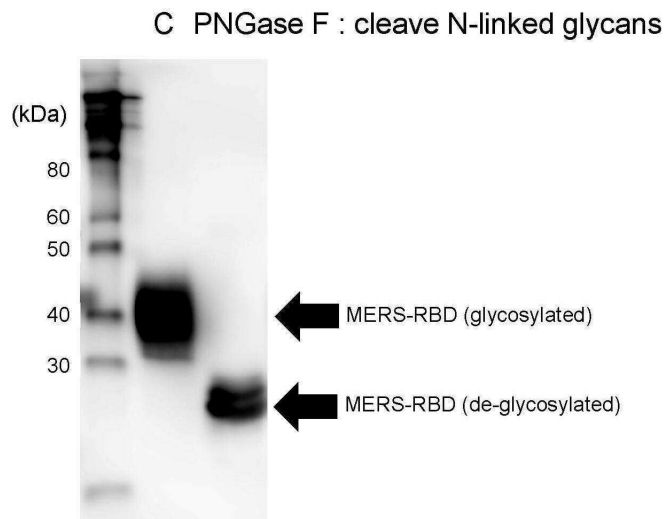
도면2



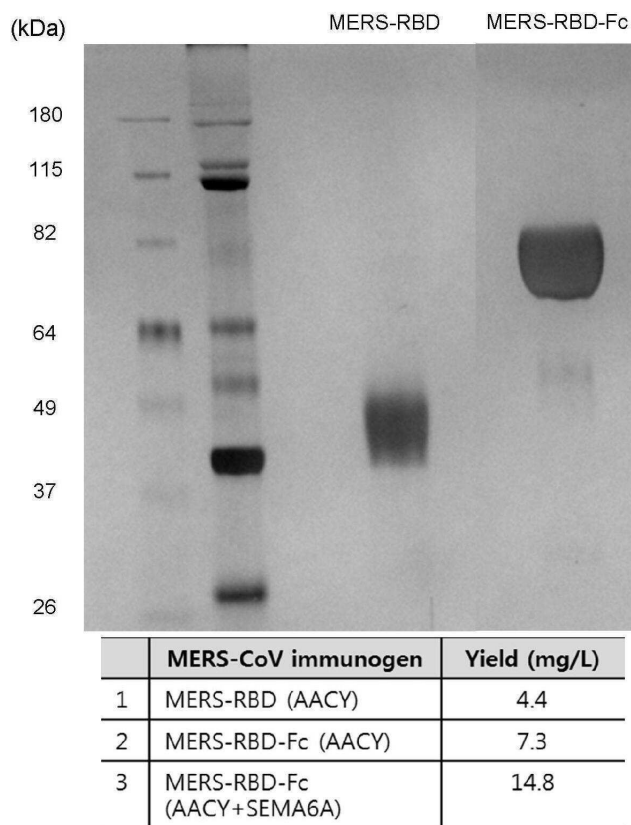
도면3



도면4



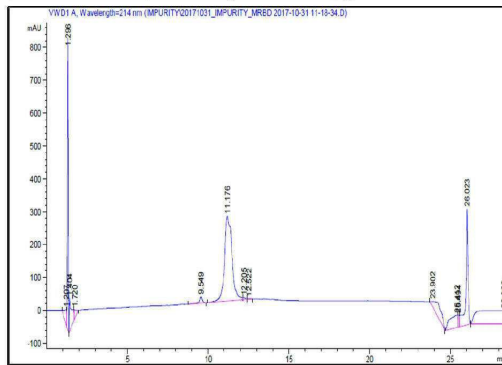
도면5



도면6

A

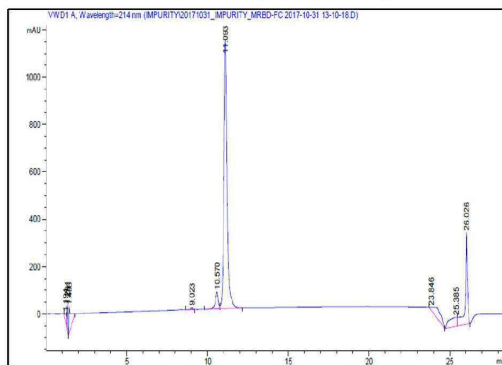
● MERS-RBD (RP-HPLC)



Peak	RT	Area	%Area
Peak 1	9.549	221.374	2.63
Peak 2	11.176	8195.504	97.37

B

● MERS-RBD-Fc (RP_HPLC)



Peak	RT	Area	%Area
Peak 1	10.570	880.29	5.46
Peak 2	11.093	15244.9	94.54

도면7

● MERS-RBD-Fc (gel filtration)

