(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0034524
(43) 공개일자 2009년04월08일

(51) Int. Cl.
C12N 15/867 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0099789
(22) 출원일자 2007년10월04일
심사청구일자 2007년10월04일

(71) 출원인
학교법인 선목학원
대구 중구 남산3동 225-1
(72) 발명자
김태완
대구 수성구 수성동4가 우방사랑마을아파트 101-202
이훈택
서울 송파구 문정동 대우푸르지오아파트 202-401
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 7 항

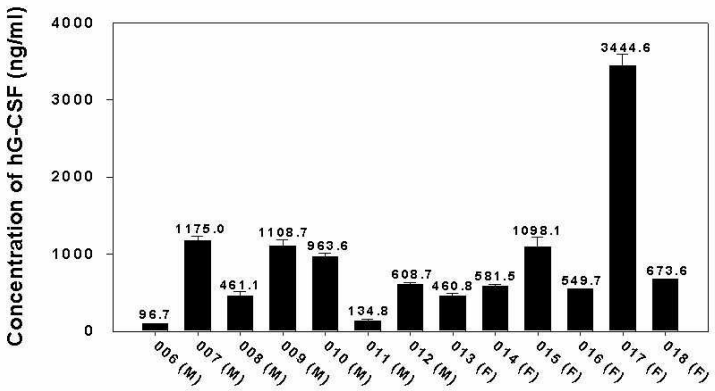
(54) 사람 혈액의 과립구집락자극인자(hG-CSF) 유전자를내장하는 레트로바이러스 발현벡터 및 이에 의해형질전환된 가금

(57) 요 약

본 발명은 사람 혈액의 과립구집락자극인자(human Granulocyte-colony Stimulating Factor)를 코딩하는 유전자의 전이와 발현을 위한 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 이에 의해 형질전환된 가금 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 레트로바이러스 벡터에 의하면 사람의 hG-CSF 유전자를 효율적으로 전이시켜 여러 동물의 세포와 가금류를 hG-CSF 유전자를 발현할 수 있도록 효율적으로 형질전환 할 수 있으며, 형질전환 된 동물 세포나 닭을 생체반응기로 사용하여 hG-CSF를 경제적으로 대량으로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

구본철

대구 수성구 만촌1동 메트로팔레스아파트 506-1706

권모선

대구 수성구 만촌1동 메트로팔레스아파트 506-1706

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20050501034844
부처명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린21사업
연구과제명	바이러스 벡터를 이용한 G-C S F 생산 형질전환 닭 개발
주관기관	대구 가톨릭대학교
연구기간	2005. 05. 27~2007. 12. 31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 재조합 hG-CSF 유전자를 내장하는 발현용 레트로바이러스(retrovirus) 벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 레트로바이러스는 쥐 백혈병 바이러스 유래의 복제-결핍 레트로바이러스인 것을 특징으로 하는 발현용 레트로바이러스 벡터.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 벡터는 plasmid 형태가 pLNC-GCSF (KCTC 11200BP)인 것을 특징으로 하는 발현용 레트로바이러스 벡터.

청구항 4

제 1 항에 의한 레트로바이러스 벡터에 의해 형질전환된 동물세포.

청구항 5

제 4 항의 동물세포는 소의 태아섬유아세포, 닭의 배아섬유아세포, HeLa 세포, 쥐의 NIH3T3세포 또는 닭의 배아섬유아세포인 형질전환된 동물세포.

청구항 6

제 1 항에 의한 레트로바이러스 벡터에 의해 형질전환되어 hG-CSF 유전자를 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 형질전환 가금.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 가금은 닭, 오리, 칠면조, 기러기, 메추라기 또는 비둘기인 형질전환 가금.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 사람 혈액의 과립구집락자극인자(human Granulocyte-colony Stimulating Factor)를 코딩하는 유전자의 전이와 발현을 위한 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 이에 의해 형질전환된 가금 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 사람의 과립구집락자극인자(hG-CSF)는 크기가 19.6 kd인 당단백질로서 조혈 전구세포들의 증식과 분화를 조절하고(Bober et al., 1995, Immunopharmacology 29: 111-119), 고형암 및 혈액종양 환자의 항암요법 치료시, 재생불량성 빈혈이나 골수 이형성 증후군 발병시, 그리고 조혈모세포 이식시에 나타나는 호중구 감소증을 치료하기 위하여 사용된다(Kaushansky, 2006, N. Engl J. Med. 354: 2034-2045). 현재 사용되고 있는 대부분의 hG-CSF는 주로 대장균에서 재조합 단백질 형태로 생산되고 있다. 그러나 대장균에서 생성되는 단백질은 당쇄화(glycosylation)와 같은 유전자 암호번역 이후의 단백질 변형(posttranslational modifucation) 과정에 많은 문제가 있기 때문에 여러 가지 면에서 사용이 제한적이다. 이러한 점을 해결하기 위한 가장 이상적인 방법은 먼저 hG-CSF 유전자가 도입되어 그 유전자를 발현하는 동물, 즉 형질전환가축으로부터 직접 당단백질(glycoprotein)을 수확하는 것이다.

<3> 최근까지 형질전환 가축의 생산에 관한 연구의 대부분은 주로 소, 돼지, 양, 토끼 그리고 염소 등의 포유류를 대상으로 이루어졌다. 이들의 경우 시간과 비용의 방대한 투자에도 불구하고 경제적인 측면에서 성공적인 형질전환 가축의 생산에 관한 보고는 미비한 실정이다. 이러한 현상은 대부분 포유류들의 긴 세대 간격, 복잡한 생리적 형태적 특징 및 연구에 드는 천문학적인 비용에 기인한다.

<4> 한편 가금은 포유류에 비해 성숙 기간과 세대간격이 짧으며 포유류에 비해 번식능력이 대단히 높기 때문에 형질전환된 가금의 계통성립이 용이하고 비교적 적은 노력과 비용으로 많은 개체를 대상으로 하는 실험이 가능하다는 장점을 가지고 있다(Ivarie, 2003, Trends Biotechnol. 21: 14-19).

<5> 그러나, 가금의 경우 포유류와는 달리 수정 시 일어나는 일반적인 다정자침입(polyspermy) 현상(Perry, 1987, J. Anat. 150: 99-109)이나, 수정 후부터 산란 직후까지의 배발생으로 인하여 배발달 X기(stage X, Eyal-Giladi et al., 1976, Dev. Biol. 49: 321-337)에 해당하는 갓 산란한 계란의 배에는 이미 약 60,000여 개의 분화전능(pluoripotent)한 세포들이 존재한다(Petitte and Mozdziak, 2002, in: Transgenic Animal Technology (edited by C.A. Pinkert, Chapter 11, Academic Press, San Diego). 이러한 형태적, 발생적 특징으로 인해 가금에 있어 포유류의 경우와 동일한 방법으로 외래 유전자를 도입하는 것은 매우 어렵다. 또한 가금의 수란관에서 초기 수정란을 채취하기가 기술적으로 지극히 어려울 뿐만 아니라 산란된 난(卵)의 배는 두꺼운 난각으로 둘러싸여 있기 때문에 포유류에 사용되고 있는 유전자 이식 기술의 적용이 불가능하다.

<6> 형질전환 가금의 생산에 있어서 외래유전자의 도입에 이용되는 표적 세포에는 난의 X기의 배반엽 세포(Rosenblum and Chen, 1995, Transgenic Res. 4: 192-198), 원시생식세포(primordial germ cell) (Li et al., 1995, Transgenic Res. 4: 26-29), 갓 수정된 난자(Sherman et al., 1998, Nat. Biotech. 16: 1050-1053), 태아 줄기 세포(embryonic stem cell; Pain et al., 1999, Cells Tissues Organs 165: 212-219) 및 정자(Nakanishi and Iritani, 1993, Mol. Reprod . Dev. 36: 258-261) 등이 있으며, 외래 유전자의 전이를 위해 DNA를 표적세포에 직접 형질감염(transfection)시키는 물리 또는 화학적 방법(Muramatsu et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 230: 376-380)을 이용하거나 바이러스의 감염성을 이용하는 생물학적인 방법(Thoraval et al., 1995, Transgenic Res. 4: 369-377)을 이용한다. 따라서, 형질전환 닭의 생산방법은 외래 유전자를 전이시키고자 하는 표적 세포와 유전자의 전이 방법에 따라 많은 방법이 있을 수 있는데 이 중에서 X기의 배반엽 세포에 레트로바이러스 벡터 시스템을 이용하는 방법이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 이 방법의 가장 큰 장점은 유전자의 전이에 있어서 레트로바이러스 고유의 감염성을 이용하므로 기술적으로 가장 용이하다는 데에 있다. 이 방법을 이용하여 Salter 등(1987, Virology, 157: 236-240)은 닭의 배에 복제-가능 바이러스(replication-competent retrovirus vector)를 직접 주입하여 생식세포에서 외래 유전자의 전이가 확인된 최초의 형질전환 닭을 생산하였고, 그 후 Bosselman 등(1989, Science, 243: 533-535)은 복제-결핍 바이러스(replication-defective retrovirus vector)를 이용하여 형질전환 닭을 생산하였다. 또한, 최근에는 McGrew 등(2004, EMBO reports, 5: 728-733), Lillico 등 (2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104: 1771-1776), Harvey 등(2002, Nat. Biotech., 19: 396-399), Mozdziak 등(2003, Dev. Dyn. 226: 439-445) 및 Rapp 등(2003, Transgenic Res. 12: 569-575)에 의해 성공적인 결과가 보고되었다. 그러나, 이들 연구들은 다음과 같은 단점을 갖는다. 즉, 이들의 연구에서는 EIAV (equine infectious anemia virus) 와 HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1)과 같은 lentivirus vector system 혹은 ALV (avian leukosis virus), REV(reticuloendotheliosis virus) 혹은 SNV (spleen necrosis virus)와 같은 조류 레트로바이러스(avain retrovirus) 시스템을 이용하였는데, HIV로 대표되는 lentivirus vector의 경우는 태생적인 생물학적 안전성 문제가 있으며, 조류 retrovirus vector를 사용하는 경우는 전이된 바이러스 벡터와 닭의 세포에 내재되어 있는 내재성 레트로바이러스(endogenous retrovirus)가 서로 상동성 재조합(homologous recombination)됨으로써 복제가 가능한 바이러스가 생산되는 생물학적위험 문제가 나타날 수 있다.

<7> 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 발명자들은 등록특허 제696571호에서 쥐 백혈병 바이러스(MLV: murine leukemia virus) 유래의 복제-결핍 레트로 바이러스 발현벡터를 이용한 가금류의 형질 전환 방법에 대해 개시한 바 있다. MLV는 조류 유래의 레트로 바이러스가 아니므로 상기와 같은 생물학적 위험 요인이 적을 뿐 아니라, 고농도의 레트로바이러스 벡터 스톡을 얻는 것이 용이하여 효율적인 유전자 전이가 가능하다.

<8> 아직까지 다른 포유동물에 비해 가금류의 형질전환은 많은 제한을 갖고 있으며, 그로 인하여 가금류의 형질전환에 의한 유효물질의 생산 또한 아직 많은 연구가 이루어지고 있지는 않다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명은 전술한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 사람의 hG-CSF 유전자의 전이 및 발현이 용이하고 생물학적 위험성이 낮은 레트로바이러스 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<10> 또한 본 발명은 상기 레트로바이러스 벡터를 사용하여 포유류에 비해 번식능력이 높고, 성숙 기간과 세대간격이 짧은 가금류를 형질전환하는 방법 및 그에 의해 형질전환 된 가금류를 제공하고자 하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제 해결수단

<11> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 1의 재조합 hG-GSF 유전자를 내장하는 발현용 레트로바이러스(retrovirus) 벡터인 것을 특징으로 한다.

<12> 본 발명에 사용된 retrovirus vector system의 장점은 다른 외래유전자 도입방식에 비해 유전적으로 안정성을 나타내며(Temin, Genome 31:17-22, 1989), 외래유전자가 표적세포의 genome에 삽입될 때 반복되지 않는 단일 유전자만이 진정염색질 부위 내로 선택적으로 도입될 수 있고, 다양한 종류의 세포에 다양한 종류의 외래유전자를 높은 효율로 감염시킬 수 있다는 점을 들 수 있다(Rohdewohld 등, J. Virol. 61: 336-343, 1987).

<13> 본 발명에서 발현시키고자 하는 서열번호 1의 hG-CSF 유전자는 레트로바이러스 벡터 내에 도입한 CMV(cytomegalo virus) promoter의 3'에 위치하게 하여 hG-CSF 유전자의 발현이 CMV promoter 통제하에 일어나게 하였으며, 또한 hG-CSF 유전자의 발현을 최대화하기 위해 우드척 간염 바이러스의 포스트-전사 조절 요소(WPRE: woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) DNA 조각을 hG-CSF cDNA의 3' 위치에 도입하였다(도 1).

<14> 상기 레트로바이러스 벡터로는 ALV(avian leukosis virus), REV(reticuloendotheliosis virus), SNV(spleen necrosis virus) 또는 쥐 백혈병 바이러스(MLV: murine leukemia virus) 시스템 등을 사용할 수 있으며, 감염된 세포 내에서 자유롭게 복제·재생산되어 다른 세포를 감염시키는 문제를 방지하기 위하여 입자 형성과 복제에 관여하는 gag, pol 및 env 유전자가 제거된 복제-결핍 레트로바이러스 시스템을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 가금류의 형질전환에는 동일 조류 레트로바이러스 시스템을 이용하는 경우 스스로 복제가 되지 않는 복제-결핍 바이러스 벡터를 사용한다고 할 지라도 전이된 바이러스 벡터와 가금류의 세포에 내재되어 있는 내재성 레트로바이러스(endogenous retrovirus)가 서로 상동성 재조합되어 복제가 가능한 바이러스가 생산되는 생물학적 문제가 나타날 수 있으므로 MVL 유래의 복제-결핍 레트로바이러스인 것이 보다 바람직하다.

<15> 본 발명의 실시예에서는 pGEM-Teasy-WPRE로부터 분리한 WPRE를 pUC18-GCSF에 도입하여 pUC18-GCSFW를 cloning하고 Spe I, Mungbean nuclease 및 Hind III enzyme을 차례로 처리하여 hG-CSF cDNA와 WPRE가 연결된 서열번호 2의 DNA 조각을 분리하였다. 상기 과정에서 부위-특이적인 DNA 절단 및 결합은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 조건 하에 전술한 제한 효소를 처리하여 수행하였다. 분리한 hGCSF-WPRE는 Cla I, Mungbean nuclease 및 Hind III를 차례로 처리한 MLV 유래의 복제-결핍 바이러스 벡터인 pLNCX에 ligation하여 최종적으로 pLNC-GCSFW plasmid를 구축하였다. 플라스미드 pLNC-GCSFW의 개열지도는 도 2에 도시된 바와 같다. 이러한 본 발명에 의한 발현용 바이러스 벡터인 LNC-GCSFW를 2007년 9월 13일자로 국제기탁기관인 대전시 유성구 어은동 52번지 소재의 KCTC (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 수탁번호 KCTC 11200BP로 기탁하였다.

<16> 본 발명의 다른 일양태는 상기 레트로바이러스 벡터 LNC-GCSFW에 의해 형질전환된 동물세포에 관한 것이다. 상기 동물세포는 가금류의 동물세포 뿐 아니라, 소, 돼지 또는 쥐와 같은 포유류의 동물세포 또한 포함한다. 보다 구체적으로는 실시예에 기재되어 있는 것과 같은 소의 태아섬유아세포, 닭의 배아섬유아세포, 사람의 세포인 HeLa 세포 또는 쥐의 세포인 NIH3T3 세포인 것이 바람직하다.

<17> 본 발명의 벡터에 의한 동물세포의 형질전환은 MLV-유래의 복제-결핍 레트로바이러스 벡터 LNC-GCSFW를 패키징 세포로 전이 및 발현시켜 수득한 레트로바이러스를 사용하여 수행된다. 보다 구체적으로, 레트로바이러스 벡터인 LNC-GCSFW를 제조하여 PT67 패키징 세포(ClonTech, USA)에 전이 및 발현시키고 G418을 처리하여 형질전환된 세포를 선별한다. 선별된 세포로부터 바이러스 스톡을 회수하여 다시 GP2-293 세포(ClonTech, USA)에 감염시킨다. 상기 감염된 GP2-293 세포에 pVSV-G (ClonTech, USA)를 전이 및 발현시키고 새로운 배지로 갈아준 후 배양하여 얻은 배양액 또는 이를 원심분리하고 여과하여 농축한 고농도의 바이러스 스톡을 사용하여 동물세포를 감염시킨다. 감염된 세포를 G418로 처리하여 형질전환된 세포를 얻는다.

<18> 상기 형질전환된 동물세포의 배양액 중 hG-CSF의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과 모든 동물세포의 배양액에서 hG-CSF가 발현된 것을 알 수 있었다. 특히, 형질전환된 닭세포의 배양액에서는 약 3mg/ml의 농도로 hG-CSF가 존재하여 본 발명에 의해 형질전환된 동물세포가 hG-CSF를 경제적으로 대량생산하는 생체반응기로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

<19> 본 발명의 또 다른 일양태는 상기 레트로바이러스 벡터 LNC-GCSFW에 의해 형질전환되어 hG-CSF 유전자를 발현할 수 있는 것을 특징으로 하는 형질전환 가금에 관한 것이다.

<20> 본 발명에서 "가금(poultry)"이란 조류 중에서 가축을 말하며, 닭, 오리, 칠면조, 기러기, 메추라기 및 비둘기를 포함한다.

<21> 계란에 virus를 주입하고 부화시키는 방법으로는 ex-ovo culture 방법(Petitte and Mozdziak, 2002, Transgenic Animal Technology, second ed., Academic Press, San Diego, 2002, pp. 279-306)을 사용하였다. 닭의 배는 단계 Ⅰ에서 단계 XIV까지를 포함하는데, 난할(clevage) 단계(단계Ⅰ에서 단계Ⅵ), 투명대 형성(formation of the a. pellucida) 단계(단계 Ⅶ에서 단계 X) 및 형태 발생(morphogenetic development) 단계(단계 XI에서 단계XIV)로 이루어져 있다. 본 발명에서 "배"는 발생 초기 단계로 난생 또는 난태생을 하는 동물에서는 2세포기부터 개체발생을 마치고 부화(수정막·난막을 가수분해하거나 파괴하고 밖으로 나오는 것)하여 유생(幼生)으로 되기 전까지의 개체를 말하며 형질전환 가금 제작을 위한 바이러스 감염이 이루어지는 시기이다. 본 발명에서 바이러스 입자로 감염시키는 단계는 바람직하게는 난할의 마지막 단계인 X기이다. X기는 갓 낳은 난 상태로 내배엽 형성의 처음 징후들이 나타나고 배반엽의 후부(posterior region)에서 그물 같은 층을 형성하는 작은 세포들의 무리(cluster)들이 관찰된다.

<22> 총 140개의 계란에 동물세포의 형질전환에 사용한 것과 동일한 재조합 LNC-GCSFW 바이러스를 주입하여 17마리의 Go 형질전환 병아리를 부화시켰으며, 모든 부화된 병아리의 혈액에서 hG-CSF가 발현됨을 확인하였다. 그 중 13마리의 병아리를 대상으로 혈액 중 hG-CSF의 농도를 ELISA 방법으로 확인하였다.

<23> 형질전환 닭으로부터 생산된 hG-CSF의 생물학적 활성도는 대장균에서 생산한 것에 비해 생물학적 활성도가 현저히 높아, 본 발명에 의한 형질전환된 가금으로부터 hG-CSF를 생산하는 방법이 종래 형질전환 대장균으로부터 생산한 것에 비해 효과가 우수함을 증명할 수 있었다.

<24> 또한 본 발명에 의해 형질전환된 닭 (Go)에 도입된 hG-CSF 유전자는 다음 세대인 G_1 세대의 닭에도 생식선을 통해 유전되어, 본 발명에 의해 단순한 형질전환 가금이 아니라 새로운 hG-CSF 형질전환 가금의 품종을 확립할 수 있음을 확인하였다.

<25> 본 발명의 실시예에서는 기재하지 않았으나, 본 발명에 의해 형질전환된 가금류가 생산한 알(卵) 역시 hG-CSF를 함유하고 있을 것으로 기대할 수 있다. 따라서 본 발명에 의해 형질전환된 가금류의 알은 포유동물과는 달리 특유한 hG-CSF의 공급원으로서 보다 편리하게 이용할 수 있을 것이다.

효 과

<26> 이상과 같이 본 발명의 레트로바이러스 벡터에 의하면 사람의 hG-CSF 유전자를 효율적으로 전이시켜 여러 동물의 세포와 가금류를 hG-CSF 유전자를 발현할 수 있도록 효율적으로 형질전환 할 수 있다. 또한 형질전환 된 동물 세포나 가금을 생체 반응기로 사용하여 hG-CSF를 경제적으로 대량으로 생산할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<27> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<28> **실시예 1 : CMV 프로모터 통제 하에 hG-CSF 단백질을 발현하는 레트로바이러스벡터의 제작 (Plasmid pLNC-GCSFW의 구축)**

<29> 등록특허 제696571호에 기재된 방법에 따라 본 발명자가 plasmid pGEM-Teasy (미국의 Promega사에서 구입)에 WPRE sequence (Donello et al., 1998, J Virol. 72: 5085-5092)를 삽입하여 구축한 Plasmid pGEM-Teasy-WPRE를 EcoRI enzyme으로 처리하여 분리한 WPRE sequence를 동일한 EcoR I enzyme으로 처리한 pUC18-GCSF (전북대 cytokine bank에서 구입)에 도입하여 pUC18-GCSFW를 구축하고 cloning하였다. Cloning한 pUC18-GCSFW에 Spe I, Mungbean nuclease, 그리고 Hind III enzyme을 차례로 처리하여 hG-CSF cDNA와 WPRE sequence가 연결된 DNA

조각을 분리하고, 분리한 서열번호 2의 hGCSF-WPRE 조각을 Cla I, Mungbean nuclease, 그리고 Hind III로 처리한 pLNCX(Miller and Rosman, 1989, Biotechniques 7: 980-990)에 ligation하여 최종적으로 pLNC-GCSFW plasmid (7914 bp)를 구축하였다(도 1). 플라스미드 pLNC-GCSFW의 개열지도는 도 2에 도시된 바와 같다.

<30> 상기 발현벡터인 pLNC-GCSFW는 2007년 9월 13일자로 국제기탁기관인 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁수탁번호 KCTC 11200BP를 부여받았다.

<31> **실시예 2 : LNC-GCSFW 레트로바이러스에 의해 유전자가 전이된 여러 동물세포에서의 hG-CSF의 발현**

<32> 레트로바이러스 벡터인 pLNC-GCSFW를 PT67 패키징 세포(Clontech, USA)에 전이 및 발현하여 G418 (800 ㎍/㎖)이 첨가된 선별용액으로 2주간 배양하였다. G418이 함유된 선별용액에서 살아남은 PT67 세포로부터 수확한 바이러스 스톡을 GP2-293(Clontech, USA) 세포에 감염시켜 G418 (800 ㎍/㎖)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 G418-저항성 GP2-293-LNC-GCSFW 세포에 인산칼슘 방법으로 20 ㎍의 pVSV-G (Clontech, USA)로 전이 및 발현하여 37℃, 5% CO_2조건에서 8시간 배양 후 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 레트로바이러스를 포함한 배양액을 수확하였다.

<33> 수확한 배양액을 0.45 ㎛ 기공-크기의 셀룰로즈 아세테이트 필터를 이용하여 여과한 후, 바이러스가 함유된 배양액으로 소의 태아섬유아세포(Bovine Fetal Fibroblast), 닭의 배아섬유아세포 (Chicken Fetal Fibroblast), 사람의 세포인 HeLa 세포, 쥐의 세포인 NIH3T3 세포, 그리고 돼지의 태아섬유아세포(Porcine Fetal Fibroblast)를 감염시켰다.

<34> 감염된 세포를 G418 (800 ㎍/㎖)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별한 다음 선별된 G418-저항성세포의 배양액을 취하여 배양액 중의 hG-CSF 농도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 다음과 같이 측정하였다. Standard에 해당하는 재조합 hG-CSF (Komabiotech, Korea), 대조구와 실험구의 세포 배양액을 전날 anti-human G-CSF monoclonal antibody (BD Biosciences, USA)로 coating시켜둔 96 well plate에 100 ㎕씩 첨가하여 4℃에서 16시간 반응시킨 후 수세한 다음, biotinylate rat anti-human G-CSF monoclonal antibody (BD Biosciences, USA)를 처리하였다. 다시 수세한 후 각 well에 streptavidin-HRP conjugate (BD Biosciences, USA) 용액을 첨가하여 반응시킨 후, 수세 과정을 재실시하고 기질인 TMB (tetramethylbenzidine, Komabiotech, Korea)를 첨가하여 암조건에서 20분간 반응시켰다. 반응 후, microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 다음 standard hG-CSF의 흡광도와 비교하여 최종 농도를 결정하였다. 도 3에서 확인할 수 잇듯이, 여러 동물 세포 중 닭의 세포에서 hC-GSF가 가장 많이 생산됨을 확인할 수 있었다. 도 3의 X 축에서 세포명 다음의 "LNC-GCSFW"는 해당 세포에 LNC-GCSFW 바이러스가 전이 된 것을 의미한다.

<35> **실시예 3 : 레트로바이러스 벡터인 LNC-GCSFW에 의해 hG-CSF 유전자를 발현하는 형질전환된 닭의 생산**

<36> 먼저, 계란에 주입할 고농도로 농축된 바이러스 스톡을 다음과 같은 방법으로 준비하였다. 실시예 2에서 제조된 레트로바이러스 벡터의 유전자가 도입된 G418-저항성 GP2-293-LNC-GCSFW 세포의 배양액 100 ml의 바이러스 스톡을 4℃에서 16,700 rpm으로 90분간 vertical rotor (Beckman 70Ti)를 이용하여 원심분리를 한 다음, 상등액을 완전히 제거한 후 침전물에 100 ml의 0.1 X HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)이나 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 첨가하여 4℃에서 16시간 방치한 후 재부유하였다. 그 결과 약 1,000배로 농축된 바이러스 스톡은 0.45 ㎛ 기공-크기의 셀룰로즈 아세테이트 필터를 이용하여 여과한 후 -70℃에 보관한 후 사용하였다.

<37> 계란에 virus를 주입하고 부화시키는 방법으로는 ex-ovo culture 방법(Petitte and Mozdziak, 2002, Transgenic Animal Technology, second ed., Academic Press, San Diego, 2002, pp. 279-306)을 사용하였다. 즉, X기의 난의 내용물을 peptri dish에 옮긴 후 배자에 polybrene (10 ㎍/ml) 이 첨가된 농축된 virus 용액 5 ㎕ 정도 주입한다. Virus가 주입 된 계란의 내용물은 다시 지름이 약 33 mm인 구멍이 뚫린 빈 난각에 모두 옮긴 후 파라필름(parafilm)으로 구멍을 밀봉한 다음 37.7℃의 온도와 상대습도 60% 조건의 부화기에 입란하여 3일간 전란시키면서 발생시킨다. 발생 4일째에는 다시 계란의 내용물을 다른 빈 난각에 옮긴 다음 부화 때까지 37.7℃의 온도와 상대습도 70% 조건하에서 발생시킨다. 전란은 발생 19일째부터는 하지 않으며, 발생 20일 째부터는 병아리가 난각에서 쉽게 나올 수 있게끔 하기 위해 난각을 밀봉하고 있는 parafilm을 petridish의 뚜껑으로 대체하였다.

<38> 그 결과, 총 140개의 계란에 재조합 LNC-GCSFW virus를 주입하여 17마리의 Go 형질전환 병아리를 부화시켰으며, 모든 부화된 병아리의 혈액에서 hG-CSF가 발현됨을 확인하였고, 그 중 13마리의 병아리를 대상으로 혈액 중 hG-CSF의 농도를 ELISA 방법으로 확인하였다 (도 4). 도 4의 X축 아래에 ELISA를 행한 Go 닭의 고유번호와 성

(sex)을 나타내었다.

<39> **실시예 4 : 닭으로부터 생산된 hG-CSF의 생물학적 활성도 비교**

<40> 형질전환 닭으로부터 생산된 hG-CSF의 생물학적 활성도는 MNFS-60 세포의 증식 정도를 측정하여 비교하였다.

<41> 먼저 2.5 × 10^4개의 MNFS-60 세포를 96 well plate의 각 well에 Fetal Calf Serum이 5% 첨가된 50 ㎕의 RPMI 1640과 50 ㎕의 닭 혈청 시료 (혹은 대장균에서 생산한 여러 농도의 hG-CSF(독일의 Strathmann Biotech 회사에서 구입)가 혼합된 배양액에 18시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 tritiated thymiodine (0.5 μCi/well)을 첨가한 후 4시간 동안 배양한 다음 수거한 세포를 scitillation counter로 방사선 양을 측정하였다. 그 결과 형질전환 닭에서 생산된 hG-CSF("-○-○-○-"로 표시)가 대장균에서 생산한 hG-CSF("-●-●-●-"로 표시)에 비해 생물학적 활성도가 현저히 높음을 확인하였다(도 5).

<42> **실시예 5 : hG-CSF 유전자의 생식선 전이**

<43> hG-CSF 유전자가 발현하는 17마리의 Go 닭 중 9마리가 수컷이었다. 이들 9 마리의 수컷의 정액 내에 hG-CSF 유전자가 염색체에 삽입된 정자가 존재하는지의 여부를 PCR을 통해 조사하였다.

<44> hG-CSF 유전자에 특이적인 primer 쌍으로 서열번호 3의 5'-AGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGC-3' 와 서열번호 4의 5'-GTACGACACCTCCAGGAAGCTCTG-3'을 사용하였다. 총 PCR 반응 cycle 수는 35이며 각 cycle 당 혼합액(reaction mixture)을 94℃에서 30초, 54℃에서 30초, 그리고 72℃에서 30초로 반응시켰다. PCR 반응을 위한 혼합액(50 ㎕)은 genomic DNA 1 ㎍, 10 pmol의 각 primer, 5㎕의 10X PCR buffer (미국의 Promega에서 구입),1.5 mM $MgCl_2$,각 0.2 mM의 dNTP, 그리고 2.5U의 Taq polymerase(Promega에서 구입)를 혼합하여 준비하였다. 총 9마리의 수컷 정액 sample 중에서 6 마리의 sample에서 예정된 398 bp의 증폭된 DNA band를 확인할 수 있었다 (도 6). 도 6에서 "M"은 molecular size marker, "P"와 "N"은 각각 plasmid pLNC-GCSFW와 비형질전환 닭의 정액을 PCR 한 것을 나타낸다. 각 Lane 위의 숫자는 각 수탉의 고유번호를 의미한다.

<45> 대조군으로 GAPDH (glyceraldehydes phosphate dehydrogenase) 유전자에 대한 primer 쌍 (5'-TGATGCCCCCATGTTTGTGA-3' (서열번호 5) 과 5'-CAAGAAGGGAACACGCAGGG-3' (서열번호 6)을 사용하였는데 모든 정액 sample 에서 예정된 691 bp의 band가 나타났다.

<46> 이상의 결과로 9 마리의 수컷 Go 형질전환 닭 중에서 6 마리의 생식선에 hG-CSF 유전자가 전이되었음을 확인할 수 있었다.

<47> **실시예 6 : LNC-GCSFW 레트로바이러스 벡터에 의해 전이된 hG-CSF 유전자의 다음 세대로의 유전**

<48> LNC-GCSFW 레트로바이러스 벡터에 의해 Go 형질전환 닭에 의해 전이된 hG-CSF 유전자가 다음 세대인 G1 세대의 닭에도 유전되는지의 여부를 Southern blot을 통해 조사하였다. Southern blot의 probe는 hG-CSF 유전자에 특이적인 primer 쌍(5'-CATGAAGCTGATGGCCCTGC-3' (서열번호 7) 와 5'-GCTCTGCAGATGGGAGGCAA-3' (서열번호 8) 을 이용하여 PCR로 생산한 541 bp DNA fragment를 이용하였다.

<49> 도 6의 003 수탉과 비형질전환 암탉과의 교미에서 생산된 3마리의 G_1 닭의 혈액에서 채취한 DNA를 Hind III 제한효소로 처리한 다음 Southern blot을 한 결과 hG-CSF 유전자가 1마리에서는 각 세포당 2 copy 나머지 2마리에서는 각 세포당 1 copy가 존재함을 확인하였다 (도 7). 도 7에서 M은 molecular size marker, P는 palsmid pLNC-GCSFW를 Hind III로 처리한 후 Southern blot한 것이고, N은 형질전환 닭이 아닌 정상 닭의 혈액 DNA를 Hind III로 처리한 후 Southern blot한 것이다. 각 Lane 위의 1~3은 각 G_1 닭의 혈액 DNA를 Hind III로 처리한 후 Southern blot한 것이다.

도면의 간단한 설명

<50> 도 1은 pLNC-GCSFW의 제작 과정을 보여주는 개략 흐름도이다.

<51> 도 2는 플라스미드 pLNC-GCSFW의 개열지도이다.

<52> 도 3은 레트로바이러스 벡터인 LNC-GCSFW에 의해 유전자가 전이된 소(BFF), 닭(CEF), 사람(HeLa), 쥐(NIH3T3) 및 돼지(PFF)의 세포에서 hG-CSF 유전자의 발현을 보여주는 그래프.

<53> 도 4는 레트로바이러스 벡터인 LNC-GCSFW에 의해 형질전환된 닭의 혈액에서의 hG-CSF의 농도를 보여주는

그래프.

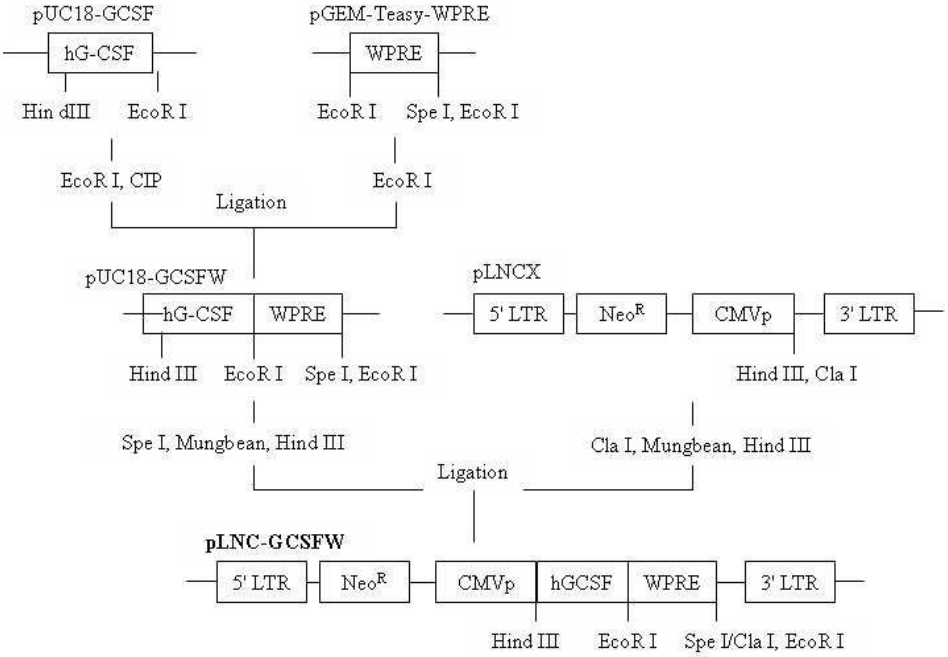
<54> 도 5는 형질전환 닭(－○－○－○－)과 대장균(*E.coli*)(－●－●－●－)에서 생산된 hG-CSF의 생물학적 활성도를 비교하여 보여주는 그래프.

<55> 도 6은 형질전환된 Go 수탉의 정액내에 hG-CSF 유전자가 존재함을 보여주는 PCR 결과 사진.

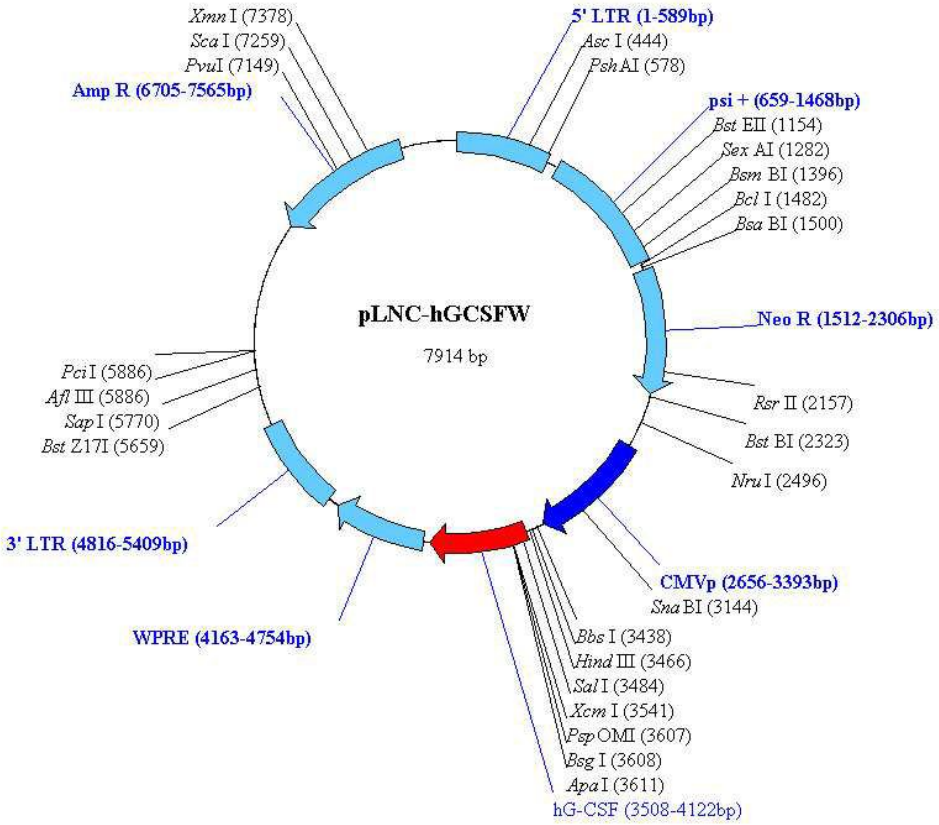
<56> 도 7은 형질전환 닭에 전이된 hG-CSF 유전자가 G1 세대로 유전됨을 보여주는 서던 블럿 결과 사진.

도면

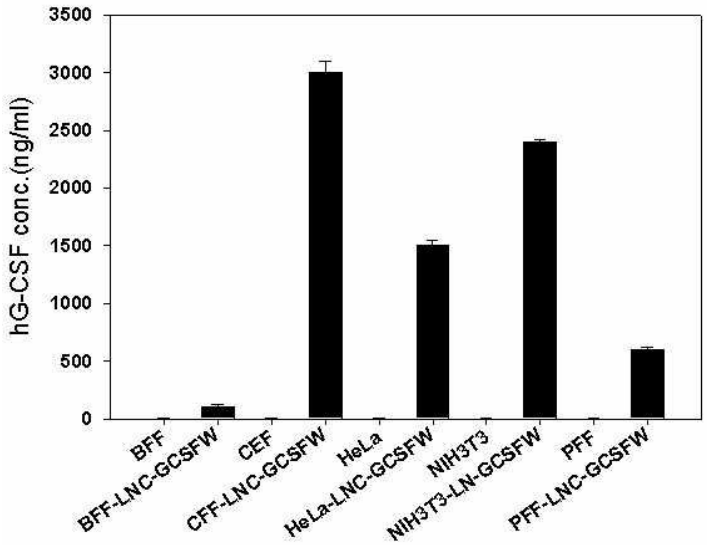
도면1



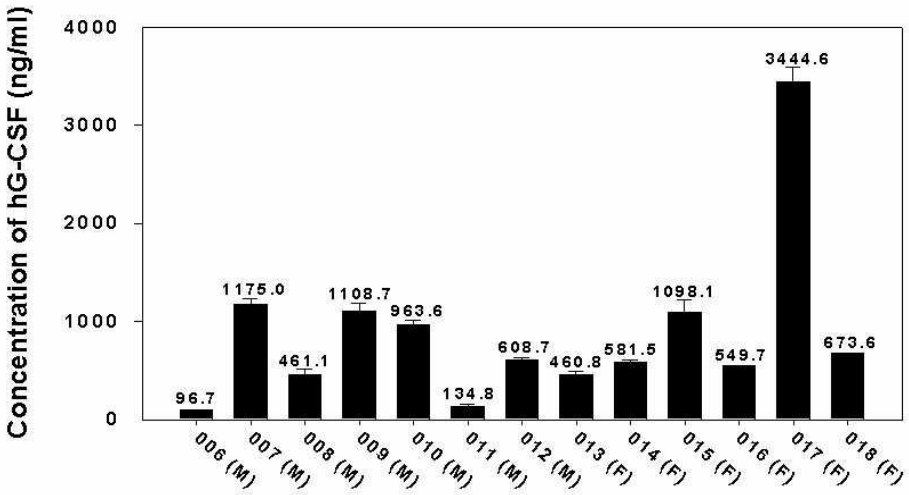
도면2


pLNC-hGCSFW
7914 bp
5' LTR (1-589bp)
Asc I (444)
PshAI (578)
psi + (659-1468bp)
Bst EII (1154)
Sex AI (1282)
Bsm BI (1396)
BclI (1482)
Bsa BI (1500)
Neo R (1512-2306bp)
Rsr II (2157)
Bst BI (2323)
NruI (2496)
CMVp (2656-3393bp)
Sna BI (3144)
Bbs I (3438)
Hind III (3466)
SalI (3484)
Xcm I (3541)
PspOMI (3607)
Bsg I (3608)
ApaI (3611)
hG-CSF (3508-4122bp)
WPRE (4163-4754bp)
3' LTR (4816-5409bp)
PciI (5886)
Afl III (5886)
Sap I (5770)
Bst Z17I (5659)
XmnI (7378)
ScaI (7259)
PvuI (7149)
Amp R (6705-7565bp)

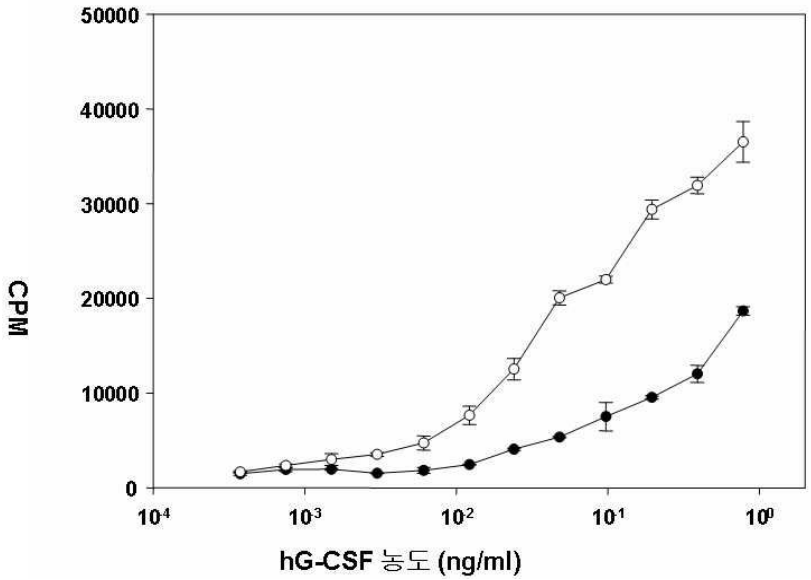
도면3


hG-CSF conc.(ng/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
BFF
BFF-LNC-GCSFW
CEF
CFF-LNC-GCSFW
HeLa
HeLa-LNC-GCSFW
NIH3T3
NIH3T3-LN-GCSFW
PFF
PFF-LNC-GCSFW

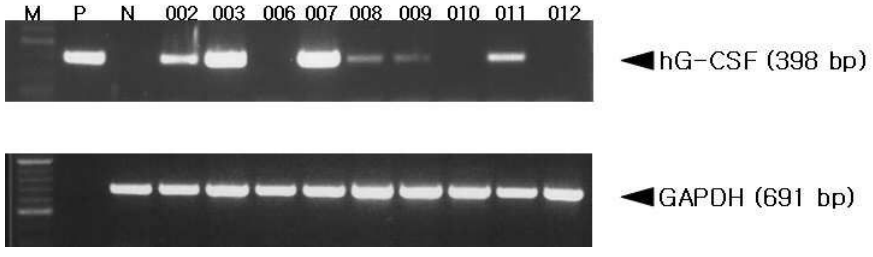
도면4


Concentration of hG-CSF (ng/ml)
4000
3000
2000
1000
0
96.7
1175.0
461.1
1108.7
963.6
134.8
608.7
460.8
581.5
1098.1
549.7
3444.6
673.6
006 (M)
007 (M)
008 (M)
009 (M)
010 (M)
011 (M)
012 (M)
013 (F)
014 (F)
015 (F)
016 (F)
017 (F)
018 (F)

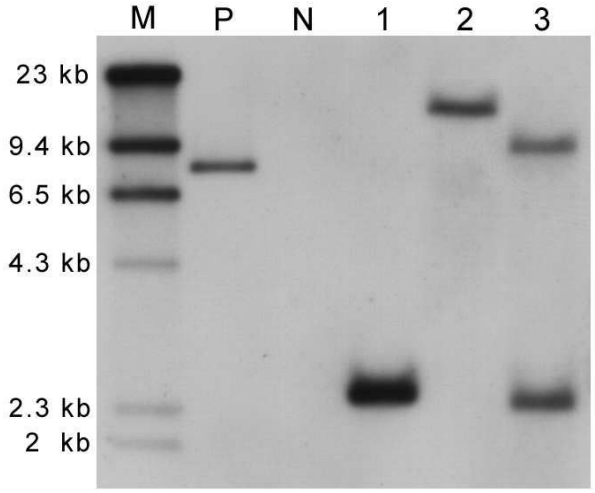
도면5


CPM
50000
40000
30000
20000
10000
0
10-4
10-3
10-2
10-1
100
hG-CSF 농도 (ng/ml)

도면6


M
P
N
002
003
006
007
008
009
010
011
012
hG-CSF (398 bp)
GAPDH (691 bp)

도면7



서 열 목 록

<110> SUN MOK INSTITUTE EDUCATION FOUNDATION
<120> Retrovirus expression vector containing hG-CSF (human granulocyte-colony stimulating factor) gene and Transgenic poultry thereby

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 615
<212> DNA
<213> hG-CSF

<400> 1
atggctggac ctgccaccca gagccccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60

cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gccctgccag ctccctgccc 120

cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg 180

ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc 240

ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag 300

ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag 360

gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacgtc 420

gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg 480

cagcccaccc agggtgccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg 540

gtcctggttg cctcccatct gcagagcttc ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac 600

cttgcccagc cctga 615

<210> 2
<211> 1247
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hGCSF-WPRE

<400> 2
atggctggac ctgccaccca gagccccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60

cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gccctgccag ctccctgccc 120

cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg 180

ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc 240

ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag 300

ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag 360

gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacgtc 420

gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg 480

cagcccaccc agggtgccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg 540

gtcctggttg cctcccatct gcagagcttc ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac 600

cttgcccagc cctgagccaa gggtaccgag ctcgaattcg atttctgttc ctgttaatca 660

acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg ttgctccttt 720

tacgctatgt ggatacgctg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc 780

tttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc 840

cgttgtcagg caacgtggcg tggtgtgcac tgtgtttgct gacgcaaccc ccactggttg 900

gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc gctttccccc tccctattgc 960

cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg 1020

cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa gctgacgtcc tttccatggc tgctcgcctg 1080

tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg ccctcaatcc 1140

agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct 1200

tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc ccgcctg 1247

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
agaagctgtg tgccacctac aagc 24

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gtacgacacc tccaggaagc tctg 24

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
tgatgccccc atgtttgtga 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
caagaaggga acacgcaggg 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7

catgaagctg atggccctgc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
gctctgcaga tgggaggcaa 20