



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월22일
 (11) 등록번호 10-1950245
 (24) 등록일자 2019년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/07 (2010.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/0601 (2013.01)
C12N 1/12 (2019.02)
 (21) 출원번호 10-2017-0025781
 (22) 출원일자 2017년02월27일
 심사청구일자 2017년02월27일
 (65) 공개번호 10-2017-0140762
 (43) 공개일자 2017년12월21일
 (30) 우선권주장
 1020160072743 2016년06월10일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 EP00049632 A2*
 JP62179384 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
 부산광역시 영도구 해양로 385(동삼동)
 (72) 발명자
강도형
 제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2670 (행원리)
박건후
 제주특별자치도 제주시 화삼로 32, 207동 401호 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인(유한) 대아

전체 청구항 수 : 총 11 항

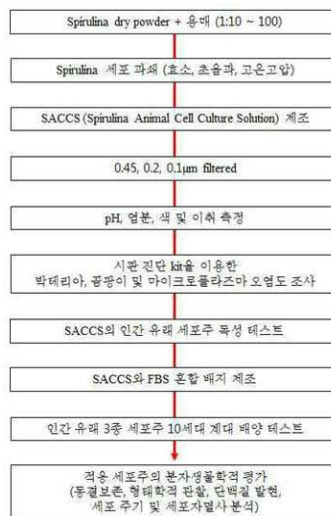
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법**

(57) 요약

본 발명은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득한 다음, 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 여과하여 제조되는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 남조류 스피롤리나 추출물을 함유한 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCs)은 세포배양용 혈청 대체제로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
C12N 5/04 (2013.01)
C12N 5/0602 (2013.01)
C12N 2500/70 (2013.01)

이영득
 제주특별자치도 서귀포시 과원동로 21

- (72) 발명자
이수진
 제주특별자치도 제주시 화삼로 32, 207동 401호
오철홍
 제주특별자치도 제주시 남광로 181, 311동 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PE99511
 부처명 해양수산부
 연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
 연구사업명 한국해양과학기술원 연구운영비 지원
 연구과제명 해양 유래 펙틴 원천소재의 분리·정제 및 응용기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 한국해양과학기술원
 연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PN66921
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 재단법인 한국연구재단
 연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업
 연구과제명 해양 생물기반 소태아혈청(FBS) 대체 serum-free 바이오소재 원천기술개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 한국해양과학기술원
 연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 초음파 추출, 효소 추출 및 고온고압 추출을 병행하여 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득하는 단계; 및

(b) 수득한 남조류 스피롤리나 추출물을 여과하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCs)으로 회수하는 단계;를 포함하고,

이때 상기 (a) 단계는 용매 추출 공정을 포함하지 않는,

남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 남조류 스피롤리나 속은 스피롤리나 맥시마(Spirulina maxima), 스피롤리나 플라텐시스(Spirulina platensis), 스피롤리나 게이트레리(Spirulina geitleri), 스피롤리나 사이아메제(Spirulina siamense), 스피롤리나 메이어(Spirulina major), 스피롤리나 서브살사(Spirulina subsalsa), 스피롤리나 프린세프스(Spirulina princeps), 스피롤리나 락시시마(Spirulina laxissima), 스피롤리나 쿠르타(Spirulina curta) 및 스피롤리나 스피롤리노이데스(Spirulina spirulinoides)로 구성된 군에서 선택되는 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득한 다음, 정화 (clarification)시키는 것을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 0.45 μm 필터, 0.2 μm 필터 및 0.1 μm 필터를 이용하여 순차적으로 여과하는 것을 특징으로 하는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법.

청구항 7

제1항, 제2항, 제5항 또는 제6항의 방법으로 제조된 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액

(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS).

청구항 8

제1항, 제2항, 제5항 또는 제6항의 방법으로 제조된 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액 (Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)이 적절한 부피비율(%v/v)로 포함된 세포 배양용 배지를 이용하는, 세포의 배양방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 세포 배양용 배지에서 상기 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액은 0.1~20%의 부피비율(%v/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는, 세포의 배양방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 세포 배양용 배지에 추가로 포함되는 혈청(serum)은 0.1~19.9%의 부피비율(%v/v)로 포함하되 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액과의 총 부피비율(%v/v)이 세포 배양용 배지에 대해 0.1~20%인 것을 특징으로 하는, 세포의 배양방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 세포 배양용 배지에서 배양되는 세포는 혈청 0.1~20%의 부피비율(%v/v)로 초기 배양한 다음, 상기 세포 배양용 배지 중 혈청의 부피비율(%v/v)을 순차적으로 감소시키고, 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 부피비율(%v/v)을 순차적으로 증가시키는 세포 배양용 배지에서 배양되는 것을 특징으로 하는, 세포의 배양방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 세포 배양용 배지에서 순차적으로 감소시킨 혈청의 부피비율(%v/v)은 0.09~19.99%이고, 순차적으로 증가시킨 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 부피비율(%v/v)은 0.01~19.91%인 것을 특징으로 하는, 세포의 배양방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 세포는 동물세포, 곤충세포 또는 식물세포인 것을 특징으로 하는, 세포의 배양방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.) 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득한 다음, 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 여과하여 제조되는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포 배양은 의학, 면역학 및 생물학 연구에 가장 중요한 기반 기술 중 하나이다. 인간 계능 분석 및 단백질 분석을 통한 생명현상연구, 난치병 치료 및 재생의학학을 위한 줄기세포 연구, 식·의약품 원료로 사용되는 천연물 및 생리활성 물질의 독성 및 안전성 검사, 질병의 원인분석을 통한 진단법 및 예방법 개발, 항생제, 항암제 및 백신과 같은 신약 후보 물질 스크리닝을 통한 신약 개발 및 기전 분석, 의학 및 산업적으로 사용되는 각종 재조합 펩타이드 및 단백질 생산 등 세포 배양의 활용분야는 점점 확장되고 있으며, 그 중요성은 더욱 부각되고 있다. 세포 연구의 중요성은 생체에서 유래된 세포가 하나의 생체 모델로 인식되고 생체를 대신하여 연구되기 때문이다.

[0003] 동물세포의 배양은 1885년 Roux에 의해 병아리 수정란 배양에서부터 시작되어 많은 연구자의 노력으로 다양한 동물 유래 세포를 대상으로 한 세포 배양 기술이 개발되어 오다가 1952년 Gey에 의해 최초의 인간 유래 불멸화 세포주인 HeLa 세포주가 확립되었고 세포 연구의 기틀이 마련되었다.

[0004] 생체에서 유래된 살아있는 세포를 실험실의 평판접시 위에서 안정적으로 배양하기 위해서는 세포배양용 배지가 반드시 필요하다. 세포배양은 합성배지(synthetic media)에 혈청(serum)을 10~20% 농도로 첨가하여 사용하는데, 합성배지는 각종 영양성분, 비타민 및 무기질을 포함하고 있으며, 혈청의 경우 구성성분이 완전히 밝혀지지 않았지만 세포의 성장, 분열 및 분화 등에 관여하는 세포에 필수적인 호르몬, 부착인자 및 성장인자를 포함하고 있다. 동물세포 배양에 필수적인 혈청은 소태아, 송아지, 말, 양, 돼지, 개, 염소 등의 동물에서 분리하여 사용되는데, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)이 가장 일반적으로 사용된다.

[0005] 소태아혈청이 가장 많이 사용되는 이유는 혈청을 원활히 공급하기 위해 혈액의 양이 많은 큰 개체가 필요한데 전 세계적으로 축산되는 동물 가운데 소가 가장 적합하기 때문이고, 동물세포의 배양에 있어 다른 종으로부터 유래한 혈청의 면역글로불린이 면역거부 반응을 유도하는데 그로 인하여 다양한 부작용이 유발된다. 소태아혈청의 경우 어미 소로부터 출산하기 이전의 소태아에서 분리하기 때문에 최소한의 고유 면역글로불린만을 가지므로 타 동물 유래 혈청에 비하여 면역거부반응이 상대적으로 적게 유발되어 세포배양에 가장 적합하다.

[0006] 세포배양을 위한 소태아혈청의 제조과정을 보면 임신한 어미 소의 자궁에서 소태아를 적출하여 소태아 심장에 바늘을 꽂아 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 사용하는데 이 과정이 매우 비윤리적이고 비환경적이다. 또한, 생산과정의 어려움과 희소성으로 산업적으로 생산 가능한 소태아혈청 제품은 매우 높은 가격이 책정되는 고비용 구조의 심각한 문제점이 있다. 또, 국제사회의 동물 실험 자제권고로 높아지는 세포 연구 의존도는 소태아혈청 공급의 불안정화와 산·학·연의 연구재료비 부담으로 이어지고 있다. 이에 미국 FDA(US Food and Drug Administration), 유럽연합의 EMEA(European Medicines Agency) 및 국제사회는 소태아혈청 사용의 자제와 혈청 대체제 개발을 권고하고 있는 실정이다.

[0007] 최근 소태아혈청 대체제로 무혈청배지가 각광받고 있다. 무혈청 배지는 비윤리적, 비환경적, 고비용 문제점을 가진 혈청을 사용하지 않는 세포배양용 배지로 합성배지에 세포배양에 필수적인 다양한 호르몬과 성장인자를 재조합 단백질 합성 기술로 생산하여 첨가해줌으로 혈청의 사용을 불필요하게 한 세포배양용 배지이다.

[0009] 무혈청 배지는 국내·외적으로 그 수요가 급증하고 있는데, 특히 의약품산업 시장에 있어 의존도가 높아지고 있다. 그 원인은 세포배양을 통해 생산하게 되는 재조합 단백질 의약품의 경우 소태아혈청 사용으로 인해 의도하지 하지 않은 미지의 항원을 가진 재조합 단백질이 합성되어 잠재적인 부작용을 초래할 수 있으므로 의약품으로 인·허가 받는 과정이 매우 어렵고 비용이 많이 드는 반면, 무혈청 배지에서 배양된 세포를 통해 생산되는 재조합 단백질 의약품은 구성성분의 명확함으로 부작용의 우려가 적고 고순도 재조합 단백질을 생산할 수 있는 장점이 있기 때문이다.

[0010] 하지만, 무혈청 배지에서 세포배양이 가능한 세포주의 종류가 한정적이고, 배양을 위한 세포주 적응 과정이 번거로우며 소태아혈청을 사용하는 대신 재조합 단백질의 첨가가 필요하기 때문에 여전히 고비용 문제점이 있다. 특히, 산업적 재조합 펩타이드 및 단백질 생산 분야 이외에 세포배양이 기반이 되는 세포신호전달, 기전분석, 기능성 및 신약 후보 물질 스크리닝, 화장품·식품·의약품 원료의 세포 독성 및 안전성 테스트 등 전반적인 의

학, 면역학 및 생물학 연구 분야에는 적용하기 힘든 한계성이 있다.

- [0011] 특성화되지 않은 혈청 조성물의 성질 및 혈청의 로트-대-로트(lot-to-lot) 변화에 따른 불확실성을 극복하기 위해 혈청 대체제 또는 무혈청 배지 배양물을 사용하는 것이 바람직하다(Pei et al., Arch Androl. 49(5):331-42, 2003). 아울러, 세포 배양물에서 성장시킨 치료 용도를 위한 세포, 재조합 단백질 또는 백신의 경우, 동물-유래 성분의 부가는 인간에게 투여시 잠재적 바이러스 오염, 전염성해면상뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE) 감염 우려 및/또는 동물 단백질의 잠재적 면역원성 효과로 인해 바람직하지 않다. 혈청 대체제는 세포 배양물에 대한 소태아혈청의 영향을 최소화할 뿐만 아니라 인간 세포의 배양물에 사용되는 동물 단백질의 양을 최소화하기 위해 개발되었다. 혈청 대체제, 예컨대 KNOCKOUT™ 혈청 대체제(Invitrogen, 캘리포니아)는 혈청이 부족하고 세포성장에 필수적인 영양소 및 다른 단백질들을 함유하는 화학적으로 규정된 배양물 배지라고 한다. KNOCKOUT SRTM는, 대부분이 상업적 제형에 포함되는 짧은 반감기를 갖는 단백질 인자들을 함유한다. KNOCKOUT SRTM은 부착 인자의 부족으로 인해 피더(feeder) 세포의 플레이팅에 있어서 소태아혈청의 대체제로 사용될 수 없으며, 따라서 상기 제형에 부적절한 세포 부착을 초래한다. PC-1™ 무혈청 배지(Lonza, 메릴랜드)는 특수 변형된 DMEM/F12 배지 베이스에서 제형화된 저-단백질, 무혈청 배지이고, 공지된 양의 인슐린, 트랜스페린, 지방산 및 특히 단백질을 갖는 완전한 HEPES 완충 시스템을 함유한다. PC-1 배지 중의 트랜스페린은 용액 중에서 2~4주 반감기를 나타낸다. Cellgro COMPLETE™(Cellgro, 버지니아)는 DMEM/F12, RPMI 1640 및 맥코이(McCoy) 5A의 혼합을 기제로 하는 무혈청 저-단백질 제형이다. Cellgro COMPLETE™는 인슐린, 트랜스페린, 콜레스테롤, 성장 또는 부착 인자를 함유하지 않는다. Cellgro COMPLETE™는 미량 원소 및 고분자량 탄수화물, 잉여 비타민, 비-동물 단백질원, 및 소혈청 알부민(1g/L)의 혼합물을 포함한다. Cellgro FREETM(Cellgro, 버지니아)는 임의의 호르몬이나 성장 인자도 함유하지 않은 무혈청 무단백질 성장 배지이다.
- [0012] 한편, 클로렐라 열수 추출물을 이용하여 세포 배양 배지를 제조하는 기술 또한 개발되었다. 그러나 클로렐라는 그 세포벽이 셀룰로오스로 되어 있어, 배지에 이용하기 위하여는 클로렐라의 세포벽을 파쇄시킬 필요가 있다. 그러나 세포벽의 파쇄 과정에서 클로렐라의 활성 성분들이 파괴될 뿐 아니라, 세포벽 파쇄 단계, 즉 전처리 단계에 비용이 발생하게 된다. 더군다나 클로렐라는 상당히 크기가 작기 때문에(스피롤리나의 약 10 내지 100 분의 1 정도), 클로렐라의 건조 단계 역시 비용이 상당히 요구되는 문제가 있다.
- [0013] 무혈청 배지는 또한 국제특허 공보번호 W02009023194, W02008137641, W02006017370, W02001011011, W02007071389, W02007016366, W02006045064, W02003064598, W02001011011, US특허 공보번호 US20050037492, US20080113433, US20080299540, US 특허번호 5,324,666, 6,162,643, 6,103,529, 6,048,728, 7,709,229 및 유럽특허 출원번호 EP2243827에 기술되어 있다.
- [0014] 결국, 소태아혈청 대체제는 소태아혈청이 가지는 비윤리적, 비환경적 및 고비용 문제점과 무혈청 배지의 문제점인 적용 가능한 세포주의 제한에 따른 연구 분야의 한계성 및 고비용을 극복할 수 있어야 한다. 더 나아가 소태아혈청 대체제에 사용되는 소재는 의학·바이오연구 및 산업 분야에 즉시 적용될 수 있도록 그 소재의 영양학적 인 우수성과 안전성이 국제사회에서 입증되어야 할 것이고 원료 소재의 원활한 공급으로 수요와 공급의 균형을 조화롭게 맞출 수 있어야 할 것이다.
- [0015] 스피롤리나 속(Spirulina sp.)은 남조류의 일종으로 WHO에서 완전식품, 슈퍼푸드 등으로 인정받아 의료, 건강, 기아해방프로그램 등에 이용되고 있으며, NASA에서는 우주식량으로서 연구·개발을 진행하고 있고, FDA 및 식약처에 그 안전성을 인정받은 생물 소재이다. 친환경적인 스피롤리나 속(Spirulina sp.)은 피코시아닌, 베타카로틴, Ca-Sp, GLA 및 Immolina 등의 생리활성물질을 함유하여 세포 활성 및 면역시스템을 촉진하는 것으로 보고되었고, 노화 및 각종 질병의 원인인 활성산소를 억제하는 항산화 효과가 녹황색야채의 20배에 이르고 Kg당 우유 갈슘의 10배, 당근 베타카로틴의 20배, 시금치 철분의 50배, 계란의 5배 높은 단백질 함유량이 있으며, 미네랄, 비타민, EPA 및 천연색소 등 영양학적으로 완벽한 생물 소재이다. 스피롤리나 속(Spirulina sp.)은 세포분열 및 세포성장 속도가 매우 빨라 단위면적당 생산량이 육상 동·식물에 비해 훨씬 높고, 육상 동·식물에 비교하여 생산비용이 매우 적게 들며, 환경이 척박한 사막 지역에서도 배양이 가능하고 대량배양 후 원료 수거가 용이할 뿐만 아니라 이미 800억 원 규모의 국내 시장이 형성되어 있어 의학·바이오연구 및 산업 분야에 큰 활용 잠재력을 가진 생물자원이다.
- [0016] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 동물 유래 질병(예컨대, 전염성해면상뇌증(Transmissible Spongiform Encephalopathy: TSE) 감염)으로부터 안전하고, 저렴한 가격으로 사용가능한 세포배양용 혈청 대체제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.)으로부터 추출되어 제조된 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)을 합성배지(synthetic media)에 첨가하여 이용시 혈청이

포함된 배지와 대등한 조건에서 인간 유래 3종의 세포주를 10세대 이상 장기 계대 배양할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2004-0088169호(공개일: 2004.10.16)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS), 이의 제조방법, 및 이를 이용한 세포의 배양방법을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0023] (a) 남조류 스피룰리나 속(Spirulina sp.) 시료로부터 남조류 스피룰리나 추출물을 수득하는 단계; 및

[0024] (b) 수득한 남조류 스피룰리나 추출물을 여과하여 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)으로 회수하는 단계;를 포함하는, 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한,

[0026] 상기 방법으로 제조된 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)을 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한,

[0028] 상기 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)이 적정한 부피비율(%v/v)로 포함되는, 세포 배양용 배지의 제조방법을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한,

[0030] 상기 방법으로 제조되고, 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)이 적정한 부피비율(%v/v)로 포함된 세포 배양용 배지를 이용하는, 세포의 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따른 방법으로 제조된 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)은 동물 유래 질병으로부터 안전하고, 저렴한 가격으로 사용가능한 세포배양용 혈청 대체재를 제공함으로써 종래 세포배양에서 이용되는 혈청의 의존도를 낮출 수 있는 효과가 있으며, 친환경적 해양생물 소재의 혈청 대체재로서의 유용성을 제시함으로써 기초학문의 연구와 산업적 분야에 이용가치가 높을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS) 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 대한 개발 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)과 소태아혈청(FBS)을 비교한 것으로, (A)는

- 원액의 pH 및 염분도 및 (B)는 합성배지에 10%로 첨가 후 pH 및 염분도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 진단 키트를 사용하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)의 오염도를 조사한 것으로, (A)는 박테리아 오염도, (B)는 곰팡이 오염도 및 (C)는 마이크로플라스마 오염도를 나타낸 것이다.
- 도 4는 성분분석에 따른 검사 성적서를 나타낸 것으로, (A)는 FBS의 일반성분 및 무기질 성분분석, (B)는 스피롤리나 원말의 일반성분 및 무기질 성분분석 및 (C)는 SACCS의 일반성분 및 무기질 성분분석을 나타낸 것이다.
- 도 5는 HeLa 세포주를 이용한 SACCS의 세포독성 및 생존율을 검증한 것이다.
- 도 6은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서의 세포주의 배양상태를 시험한 것으로, (A)는 HeLa 세포주, (B)는 HCT116 세포주 및 (C)는 HEK293 세포주의 배양 상태를 나타낸 것이다.
- 도 7은 FBS 및 SACCS가 함유된 배지에서 적응된 HeLa 세포주를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 FBS 및 SACCS가 함유된 배지에서 적응된 HeLa 세포주의 단백질 발현 양상을 확인한 것이다.
- 도 9는 FBS 및 SACCS가 함유된 배지에서 적응된 HeLa 세포주의 세포 주기를 분석한 것이다.
- 도 10은 FBS 및 SACCS가 함유된 배지에서 적응된 HeLa 세포주의 자외선에 의한 세포자멸사를 분석한 것이다.
- 도 11은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서의 H460 세포주의 배양 결과이다.
- 도 12는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서 배양된 H460 세포주의 형태학적 관찰 결과이다.
- 도 13은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서의 T24 세포주의 배양 결과이다.
- 도 14는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서 배양된 T24 세포주의 형태학적 관찰 결과이다.
- 도 15는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 A549 세포주의 배양 결과이다.
- 도 16은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 IMR90 정상 세포주의 배양 결과이다.
- 도 17은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배지에서 배양된 IMR90 정상 세포주의 형태학적 관찰 결과이다.
- 도 18은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)에서 배양된 CHO-K1 세포주의 형태학적 관찰 결과이다.
- 도 19는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 CHO-K1 세포주의 배양 결과이다.
- 도 20은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 CHO-K1 세포주의 회분식 배양 결과이다.
- 도 21은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 CHO-GSR 세포주의 배양 결과 및 형태학적 관찰 결과이다.
- 도 22는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용한 CHO-GSR 세포주의 회분식 배양 결과이다.
- 도 23은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 이용 시CHO-GSR 세포주의 단위 세포당 항체 생산성 분석 결과이다.
- 도 24는 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)에서 배양된 CHO-GSR 세포주 유래 항체의 N-glycosylation profile 분석 결과이다.
- 도 25는 광생물배양기 및 수로형배양기 스피롤리나 유래 SACCS의 내독소를 검사한 결과이다.
- 도 26은 FBS 및 SACCS의 삼투압 분석 결과이다.

도 27은 FBS 및 SACCS의 세포 독성 평가 결과이다.

상기 도면들에서, “F”는 FBS를 의미하며, “S”는 SACCS를 의미한다.

또한 “F5 : S5”는 FBS 50% : SACCS 50%를 의미하며, 마찬가지로 “F3:S7”은 FBS 30% : SACCS 70%를, “F1:S9”는 FBS10% : SACCS 90%를 의미한다. 다른 숫자들의 경우도 마찬가지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0035] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것을 달성하는 방법은 첨부된 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.
- [0036] 그러나 본 발명은 이하에 개시되는 실시예들에 의해 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0037] 또한, 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기술 등이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그에 관한 자세한 설명은 생략하기로 한다.
- [0038] 본 발명은 혈청 대체 소재 개발의 일환으로 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.)을 활용하여 제조되고, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)의 개발 및 상기 세포 배양액을 이용한 세포의 배양방법에 관한 것이다.
- [0039] 즉, 본 발명은 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.) 추출물을 활용한 혈청 대체제, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 것으로, 남조류 스피롤리나 속 유래 추출물을 활용하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)을 제조한 다음, 상기 세포 배양액과 혈청(예컨대, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS))을 적절한 혼합비율로 합성배지에 첨가하여 세포 배양용 배지를 제조하였다. 그 다음, 상기 세포 배양용 배지의 세포주 배양능(인간 유래 3종의 세포주를 대상으로 10세대 이상 장기 계대 배양)을 확인함으로써 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 혈청 대체 비율을 확립하고 혈청 대체 소재로서의 스피롤리나 속(Spirulina sp.)의 활용 가능성을 확인하였다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)의 제조를 위해 스피롤리나 속 건조분말을 효소, 초음파 및 고온고압 처리하여 스피롤리나 속 세포를 파쇄하고, 원심분리한 다음, 상층액을 스피롤리나 추출액으로 회수하였으며, 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마의 제거를 위하여 필터로 여과하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액을 제조하였다(실시예 1 참조).
- [0041] 본 발명의 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)과 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 비교하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, SACCS 또는 FBS가 함유된 합성배지의 색, 질감, 향, pH 및 염분도가 매우 유사한 것으로 나타났다(실시예 2 참조).
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)의 제조과정에서 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마로 인한 SACCS의 오염 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 0.45µm, 0.2µm 및 0.1µm 필터를 이용하여 순차적으로 여과된 각각의 SACCS의 샘플에서 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마가 검출되지 않은 것으로 확인되었다(실시예 3 참조).
- [0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)의 영양성분을 분석하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 스피롤리나 원말은 FBS에 비하여 일반성분 및 무기질 함량이 높은 것으로 나타났으나, SACCS는 영양성분이 다소 소실된 것으로 확인되었다(실시예 4 참조).
- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)으로 처리된 HeLa 세포의 세포독성 및 생존율을 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, SACCS로 처리된 HeLa 세포의 세포 독성은 없었으며, SACCS가 처리되지 않은 HeLa 세포(non-treated)에 비해 약 15% 증가된 세포 생존율을 나타내었고, 증류수로 처리된 HeLa 세포(control)에 비해 약 10% 증가된 세포 생존율을 나타내었다(실시예 5 참조).
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지가

HeLa 세포 배양에 적합한지 확인하였다. 그 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, SACCS를 함유하는 배지를 이용할 경우 HeLa 세포는 배양 초기인 1세대부터 중기 3세대 및 후기 10세대에 이르기까지 HeLa 세포의 성장률이 안정하게 나타나는 것으로 확인되었다. 특히, FBS의 사용을 50% 절감하고 SACCS로 50% 대체한 [FBS 50% : SACCS 50%](%v/v) 배지는 [FBS 100%](%v/v) 컨트롤 배지에 비해 40% 이상 높은 세포 생존율을 나타내었고, SACCS로 70% 대체한 [FBS 30% : SACCS 70%](%v/v) 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지와 유사한 세포 생존율을 나타내었다(실시예 6 참조).

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지가 HCT116 세포 배양에 적합한지 확인하였다. 그 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이, FBS 및 SACCS를 함유하는 혼합 배지인 [FBS 70% : SACCS 30%] 배지 및 [FBS 50% : SACCS 50%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지에 비해 약 10% 증가된 생존율을 나타내었다(실시예 7 참조).

[0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지가 HEK293 세포 배양에 적합한지 확인하였다. 그 결과, 도 6C에 나타난 바와 같이, FBS를 SACCS로 50% 대체한 [FBS 50% : SACCS 50%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지에 비하여 45% 이상 높은 세포 생존율을 나타내었고, SACCS로 70% 대체한 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지 대비 30% 높은 세포 생존율을 나타내었다(실시예 8 참조).

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지에서 동결 전후에 따른 세포 배양 상태를 검증하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 현미경 관찰시 동결 전후에 따른 SACCS에 적응 배양된 세포는 세 그룹([FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 또는 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지) 모두에서 형태학적으로 유사하게 나타난 것으로 확인되었다(실시예 9 참조)

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지에서 적응 배양된 HeLa 세포의 하우스 키핑 단백질(House keeping protein, HKP) 및 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 배양된 세포 모두에서 동일한 수준의 α -Tubulin, β -Actin, GAPDH 및 pHSP27 단백질이 발현되는 것을 확인함으로써 SACCS에서 적응 배양된 세포의 HSP 단백질 발현 양상 및 스트레스 정도가 FBS 적응 세포와 유사함을 확인하였다(실시예 10 참조).

[0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지에서 적응 배양된 HeLa 세포의 세포 주기를 조사하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 장기간 적응 배양된 HeLa 세포의 세포주기는 매우 유사한 것으로 나타났다(실시예 11 참조).

[0051] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배지에서 적응 배양된 HeLa 세포의 세포자멸사의 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 자외선 조사에 의해 [FBS 100%] 컨트롤 배지에서 약 45.6%의 세포자멸이 유도되었고 [FBS 50% : SACCS 50%] 배지에서 약 36.3%, [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 약 36.6%의 세포자멸이 확인되었다. SACCS가 함유된 배지에서 배양된 HeLa 세포의 경우 [FBS 100%] 컨트롤 배지와 비교하여 약 10% 이내의 범위에서 자외선 의한 세포자멸사 유도에 조금 더 강한 내성을 나타내었다(실시예 12 참조)

[0052] 따라서, 본 발명은 일 관점에서,

[0053] (a) 남조류 스피롤리나 속(*Spirulina* sp.) 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득하는 단계; 및

[0054] (b) 수득한 남조류 스피롤리나 추출물을 여과하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(*Spirulina* Animal Cell Culture Solution, SACCS)으로 회수하는 단계;를 포함하는, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액에 관한 것이다.

[0055] 본 발명에 있어서,

[0056] 상기 남조류 스피롤리나 속(*Spirulina* sp.)은 스피롤리나 맥시마(*Spirulina maxima*), 스피롤리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*), 스피롤리나 게이트레리(*Spirulina geitleri*), 스피롤리나 사이아메제(*Spirulina siamense*), 스피롤리나 메이어(*Spirulina major*), 스피롤리나 서브살사(*Spirulina subsalsa*), 스피롤리나 프린세스(*Spirulina princeps*), 스피롤리나 락시시마(*Spirulina laxissima*), 스피롤리나 쿠르타(*Spirulina*

curta) 및 스피롤리나 스피롤리노이데스(Spirulina spirulinoides)로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 바람직하게는 스피롤리나 맥시마(Spirulina maxima)이다.

- [0057] 상기 스피롤리나(Spirulina sp.)는 미세조류인 헤마토코커스 속(Haematococcus sp.) 또는 클로렐라 속(Chlorella sp.)으로 대체하여 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 있어서,
- [0059] 상기 남조류 스피롤리나 속 시료는 건조분말된 상태 또는 동결건조된 상태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서,
- [0061] 상기 (a) 단계에서 상기 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득하는 단계는 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 효소 추출, 분쇄 추출, 고온고압 추출 또는 환류냉각 추출을 통해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 바람직하게는 효소 추출, 초음파 추출 또는 고온고압 추출이다. 여기서, 상기 초음파 추출은 초음파 분쇄기 또는 초음파 온탕기를 이용할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서,
- [0063] 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 예컨대, 인산 완충 식용수, 생리 식용수를 추가로 포함시켜 추출할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서,
- [0065] 상기 (a) 단계에서 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득한 다음, 정화(clarification)시키는 것을 추가로 수행하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 정화는 원심분리(centrifugation)하여 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 바람직하게는 10,000rpm으로 30분간 원심분리하여 수행될 수 있다.
- [0066] 본 발명에 사용된 용어 "정화(clarification)"는 "정제(purification)"와 혼용하여 사용할 수 있으며, 남조류 스피롤리나 속 시료로부터 남조류 스피롤리나 추출물을 수득시 형성되는 침전물 등의 불순물을 제거하는 것을 의미한다.
- [0067] 본 발명에서의 "정화" 단계는 일반적으로 이하의 단독 또는 그의 다양한 조합을 포함하는, 예컨대, 여과, 석출, 응집 및 침강의 하나 이상의 단계, 더욱 상세하게는, 심층 여과(depth filtration, DF), 정밀여과(microfiltration, MF), 나노여과(nanofiltration, NF), 한외여과(ultrafiltration, UF), 멸균 여과(sterile filtration), 멤브레인 크로마토그래피(membrane chromatography, MC) 및 원심분리(centrifugation)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 기법을 이용하여 수행될 수 있으며, 본 발명에서의 정화 단계를 통해 남조류 스피롤리나 추출물에 포함되어 있는 불순물, 특히 헥산 불순물, 세포 파쇄물(cell debris) 및 내독소(endotoxin) 등이 제거될 수 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서,
- [0069] 상기 (b) 단계에서 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 0.45 μ m 필터, 0.2 μ m 필터 및 0.1 μ m 필터를 이용하여 순차적으로 여과할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 여기서, 상기 (b) 단계의 여과는 세포 배양에 유용한 남조류 스피롤리나 추출물의 유용물질(예컨대, 영양소)을 보존하고, 박테리아, 곰팡이 또는 마이크로플라스마의 제거를 위해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 남조류 스피롤리나 세포 배양액의 제조방법에서 상기 세포 배양액의 잠재적 바이러스 오염을 효과적으로 제거하기 위하여 자외선 및 감마선 조사를 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명의 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조방법에서 상기 세포 배양액의 세포 배양 적합성을 검증하기 위해, 세포 배양액의 색, 향(이취), pH 및 조성성분(예컨대, 염분도)의 확인 및 박테리아, 곰팡이 및/또는 마이크로플라스마의 오염도를 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명은 다른 관점에서,
- [0074] 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCs)이

적정한 부피비율(%v/v)로 포함되는, 세포 배양용 배지의 제조방법에 관한 것이다.

- [0075] 상기 '%w/w'는 'volume/volume'을 의미하며, 바람직하게는 'mL/mL'를 단위로 한다.
- [0076] 본 발명에 있어서,
- [0077] 상기 세포 배양용 배지에서 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액은 0.1~20%의 부피비율(%v/v)로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%이다.
- [0078] 본 발명에 있어서,
- [0079] 상기 세포 배양용 배지에 추가로 포함되는 혈청(serum)은 0.1~19.9%일 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%의 부피비율(%v/v)로 포함되되 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액과의 총 부피비율(%v/v)이 세포 배양용 배지에 대해 0.1~20%일 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%이다.
- [0080] 상기 혈청은 동물 혈액일 수 있으나 이에 한정되지 아니하고, 바람직하게는 포유동물(예: 돼지, 말, 소, 염소, 양 및 개) 혈액으로부터 유래된 혈청이며, 더욱 바람직하게는 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이다.
- [0081] 여기서, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액 및/또는 소태아혈청이 포함되는 합성배지(synthetic media)는 세포배양용 기본 배지(basal medium)로 MEM(Minimum Essential Medium), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM-F12, RPMI(Roswell Park Memorial Institute), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium), M199, Ham's F12, Ham's 10, NCTC 109, NCTC 135, NeuroCult Basal Medium 등이 있으며, 이 외에 당해 업계에서 이용되는 배지이면 충분하며, 각종 영양성분, 미네랄, 무기질, 비타민, 아미노산, 펩타이드를 포함하는 재조합 단백질, 부착인자, 성장인자 및 호르몬으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명은 또 다른 관점에서,
- [0084] 상기 방법으로 제조되고, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCs)이 적정한 부피비율(%v/v)로 포함된 세포 배양용 배지를 이용하는, 세포의 배양방법에 관한 것이다.
- [0085] 본 발명에 있어서,
- [0086] 상기 세포 배양용 배지에서 상기 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액은 0.1~20%의 부피비율(%v/v)로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%이다.
- [0087] 본 발명에 있어서,
- [0088] 상기 세포 배양용 배지에 추가로 포함되는 혈청(serum)은 0.1~19.9%의 부피비율(%v/v)로 포함되되 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액과의 총 부피비율(%v/v)이 세포 배양용 배지에 대해 0.1~20%일 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%이다.
- [0089] 상기 혈청은 동물 혈액일 수 있으나 이에 한정되지 아니하고, 바람직하게는 포유동물(예: 돼지, 말, 소, 염소, 양 및 개) 혈액으로부터 유래된 혈청이며, 더욱 바람직하게는 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이다.
- [0090] 본 발명에 있어서,
- [0091] 상기 세포 배양용 배지에서 배양되는 세포는 세포 배양용 배지 중 혈청의 부피비율(%v/v)은 0.1~20%, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%로 초기 배양한 다음, 상기 세포 배양용 배지 중 혈청의 부피비율(%v/v)을 순차적으로 감소시키고 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 부피비율(%v/v)을 순차적으로 증가시키는 세포 배양용 배지에서 배양되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0092] 본 발명에 있어서,
- [0093] 상기 세포 배양용 배지에서 순차적으로 감소시킨 혈청의 부피비율(%v/v)은 0.09~19.99%일 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%일 수 있고, 순차적으로 증가시킨 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 부피비율(%v/v)은 0.01~19.91%일 수 있으며, 바람직하게는 1~15%, 더욱 바람직하게는 5~10%이다.
- [0094] 본 발명에 있어서,

- [0095] 상기 세포는 동물세포일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니고, 곤충세포 또는 식물세포일 수 있으며, 예컨대, HeLa(Human adenocarcinoma), HCT116(Human colorectal carcinoma), HEK293(Human embryonic Kidney 293), HEK293F(Human embryonic Kidney 293F), COS(African green monkey kidney fibroblast-like), BHK(Baby hamster kidney), CHO(Chinese hamster ovary), 골수종 세포, Sf9(Spodoptera frugiperda) 및 주목(Taxus species)일 수 있고, 바람직하게는 HeLa, HCT116 및 HEK293이다.
- [0097] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0099] **실시예 1: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 제조**
- [0100] 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.) 세포의 배양
- [0101] 본 발명에서 사용되는 미세조류인 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.)의 배양용 배지는 NaCl 29.23g; KCl 1.105g; MgSO₄ · 7H₂O 11.09g; 트리스 베이스((HOCH₂)₃CNH₂) 1.21g; CaCl₂ · 2H₂O 1.83g; 및 NaHCO₃ 0.25g을 포함하고, 3.0mL의 미량 영양용액(trace metal solution)을 추가로 포함할 수 있다. 미량 영양용액은 NaNO₃ 281.3mg; NaH₂PO₄ · H₂O 21.2mg; Na₂ · EDTA 16.35mg; FeCl₃ · 6H₂O 11.8mg; MnCl₂ · 4H₂O 675μg; CoCl₂ · 6H₂O 37.5μg; ZnSO₄ · 7H₂O 37.5μg; Na₂MoO₄ 22.5μg; 비타민 B1 0.375μg 및 바이오틴(biotin) 0.188μg을 포함한다. 배지 및 미량 영양용액을 해수에 용해시켜 사용할 수 있고, 제조된 배지는 고압멸균기를 이용하여 가압 멸균하고 여과지를 통해 여과하여 배양액으로 사용할 수 있다.
- [0102] 상기 배양액에는 질소원으로 NaNO₃을 공급하여 질소 함유 배양액으로 제조될 수 있고, 이때, 질소원은 상기 배지 내에 37.0~38.0mg/L의 농도로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 질소원의 농도가 37.0mg/L 미만인 경우에는 세포 분열을 위한 영양원인 질소원의 결핍으로 인해 미세조류의 생육이 저하되어 균체량이 저하되는 문제가 있고, 38.0mg/L를 초과하는 경우에는 미세조류의 광합성을 통해 축적된 유기물은 많으나 지질 함량이 적은 문제가 있다.
- [0103] 필요에 따라, 상기 스피롤리나 속(Spirulina sp.)은 미세조류인 헤마토코커스 속(Haematococcus sp.) 또는 클로렐라 속(Chlorella sp.)으로 대체하여 사용할 수 있다.
- [0105] 남조류 스피롤리나 속 유래 세포 배양액의 제조방법
- [0106] 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCs)의 제조를 위해 남조류 스피롤리나 속 건조분말을 효소, 초음파 처리한 후 고온고압 처리하여 스피롤리나 속 세포를 파쇄하였다. 10,000rpm 30분간 원심분리를 통해 세포 찌꺼기를 제외한 상층액을 남조류 스피롤리나 추출액으로 회수하였으며, 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마의 제거를 위하여 0.45 μm, 0.2 μm 및 0.1 μm 필터를 이용하여 순차적으로 여과하였다. 구체적인 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액의 제조과정은 도 1에 나타내었다.
- [0107] 이렇게 스피롤리나 속 세포를 초음파 및 고온고압의 복합 처리를 하는 것은, 초음파 처리를 통하여 스피롤리나의 세포벽을 물리적으로 약하게 만들고, 고온고압 처리를 통하여 세포 유효성분을 효과적으로 추출할 수 있기 때문이다. 이러한 초음파 및 고온고압의 복합 처리를 통하여 배양 환경 및 수확 시기가 다른 스피롤리나 원료로부터 상당히 유사한 수준의 추출액을 수득할 수 있게 되는데, 균일한 SACCs를 얻는 것이 가능하게 된다. 즉, 배치별(Lot.)로 유의한 차이가 없는 결과물을 얻을 수 있어, 서로 다른 배치들을 이용하더라도 세포배양능은 거의 유사한 것을 확인하였다. 또한 음파/고온고압 복합 추출법을 사용함으로써 세포 순수배양에 중요한 오염원을 최소화하는 것이 가능해진다. 본 발명자들이 확인한 결과, 초음파 및 고온고압의 복합 처리를 통하여 제조한 배양액에서 내독소, 마이크로플라스마, 곰팡이 및 박테리아 오염이 검출되지 않았다.
- [0108] 반면, 스피롤리나 속 세포를 용매 추출(예컨대, 열수 추출)하는 경우 용매 속 스피롤리나에 열전달 효율이 일정하지 않아 추출 효율이 낮고, 추출물에 함유된 유효 성분의 회수율이 낮아 결과적으로 배치 별 variation 편차가 클 가능성이 매우 높다. 그러므로 본 발명의 SACCs는 스피롤리나 속 세포를 초음파 및 고온고압의 복합 처리를 통하여 추출하여 제조하는 것이 바람직하며, 용매 추출은 이용하지 않는 것이 좋다.
- [0109] 필요에 따라, 상기 SACCs는 스피롤리나 속(Spirulina sp.) 유래 추출물 대신 미세조류인 헤마토코커스 속

(Haematococcus sp.) 유래 추출물을 이용하여 세포 배양액으로 제조될 수 있다.

[0111] **실시예 2: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액과 소태아혈청의 비교**

[0112] 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS) 또는 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS) 원액을 최종 농도가 10%가 되도록 합성배지에 첨가한 다음, 색, 질감, 향, pH 및 염분도를 비교하였다.

[0113] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, SACCS 또는 FBS가 함유된 합성배지의 색, 질감, 향, pH 및 염분도가 매우 유사한 것으로 나타났다.

[0115] **실시예 3: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 오염도 측정**

[0116] 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS) 제조과정에서 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마로 인한 SACCS의 오염 여부를 확인하고자, 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마에 대한 특이적인 프라이머를 포함하는 DiaPlexC™ Bacteria Detection Kit(Solgent, Korea), DiaPlexC™ Fungi Detection Kit(Solgent, Korea), DiaPlexC™ Mycoplasma Detection Kit(Solgent, Korea)을 사용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 수행하였다. 필터링 이전의 SACCS(unfiltered), 0.2µm 필터로 여과된 SACCS(0.2µm filtered) 및 0.1µm 필터로 여과한 SACCS (0.1 µm filtered)을 진단 kit에 제공된 양성대조군(positive control) 및 음성대조군(negative control)과 함께 PCR를 수행한 후 1% agarose gel을 사용하여 전기영동하였다.

[0117] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 0.45µm, 0.2µm 및 0.1µm 필터를 이용하여 순차적으로 여과된 각각의 SACCS의 샘플에서 박테리아, 곰팡이 및 마이크로플라스마가 검출되지 않은 것으로 확인되었다.

[0119] **실시예 4: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 영양성분 분석**

[0120] 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.) 원말, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS) 및 FBS의 성분분석은 식약처 인증기관인 제주대학교 생명과학 혁신센터에서 수행하였다. 유리당 분석은 시료 1g에 50% ACN 50mL를 가하여 10분간 초음파 추출(3회) 하였다. 추출된 시료액은 분석조건에 맞도록 희석한 다음 Sep-Pak C18 cartridges(Waters, MA, µSA)를 통과시킨 후, 0.45µm membrane filter(Woongki science co. Ltd., Seoul, Korea)로 여과한 다음, HPLC(Waters 2695, MA, USA)로 분석하였다. 여기서, 유리당 분석 column은 Preval™ Carbohydrate ES(4.6×250 mm, 5µm, Grace, Japan)을 사용하였고 이동상으로는 acetonitrile과 증류수를 7:3으로 혼합하여 사용하였고, 유속은 분당 0.8mL였고, 검출기로는 ELSD를 사용하였다. 유리당 함량은 농도별로 제조한 표준물질(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 HPLC로 분석하여 얻은 표준곡선으로부터 정량하였다. 일반성분, 포화지방, 콜레스테롤, 비타민 A는 식품공전(2015) 및 AOAC법에 의해 수행하였으며, 조지방은 에테르 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 포화지방 및 콜레스테롤은 GC(GC-2010, Shimadzu)로 분석하였다. 비타민 A는 식품공전에 준하여 전처리한 다음, HPLC(Waters 2690)로 분석하였다. 납, 카드뮴 분석은 검체를 도가니에 취해 건조하여 탄화시킨 다음 450~550℃에서 회화한 후, 회분을 물로 적시고 염산 2~4mL를 가하여 수용액상에서 건조한 다음 4% 질산을 가하여 가운데서 녹이고 불용물이 있으면 유리여과기로 여과한 후 20mL로 정용하여 시험용액으로 사용하였다. 납, 카드뮴 표준용액과 시험용액, 블랭크를 ICP-OES(Varian, MPX, AUS)에 주입하여 분석하였다. 표준용액은 표준품 1000mg/L 표준물질을 4% 질산으로 희석하여 혼합된 100mg/L 농도의 Stock 용매를 제조한 후, 시험에 사용된 표준물질은 4% 질산으로 재차 희석하여 표준물질로 하였다. 무기질 분석은 시료 1g을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550℃의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색 또는 회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화하였다. 상기 회분을 염산으로 순차적으로 이용하여 분해한 후 일정량으로 희석하고 여과한 다음, ICP analyzer(Optima8300, Perkin Elmer)를 사용하여 정량하였다.

[0121] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 남조류 스피롤리나 원말은 FBS에 비하여 일반성분 및 무기질 함량이 높은 것으로 나타났으나 SACCS는 영양성분이 다소 소실된 것으로 확인되었다. 상기 영양성분의 소실은 SACCS 제조과정에서 발생한 것으로 추정된다.

[0123] **실시예 5: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액으로 처리된 HeLa 세포의 생존도**

[0124] 세포의 세포독성 및 생존율을 확인하고자 인간 유래 세포인 HeLa 세포주를 사용하였다. HeLa 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제(100µg/ml 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린)을 포함하는 MEM(Minimum Essential Medium)를 사용하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하여 유지되었다.

[0125] 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)에 대한 세포의 세포독성 및 생존율을 확인하고자, 상기와 같이 배양 유지된 HeLa 세포를 96웰 플레이트(well-plate)에 2x10³/ml로 시딩(seeding)한 후 다음날 1%

농도로 SACCs 또는 증류수(control)를 24시간 동안 처리하고 MTT assay kit을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포생존율은 EZ-CyTox kit(Daelillab service CO, Korea)를 이용하였고, EZ-CyTox reagent를 웰(well) 당 10 μ l 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기서, 미처리된 세포(non-treated)는 SACCs 또는 증류수(control)로 처리되지 않은 샘플을 의미한다.

[0126] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, SACCs로 처리된 HeLa 세포의 세포 독성은 없었으며 SACCs가 처리되지 않은 HeLa 세포(non-treated)에 비해 약 15% 증가된 세포 생존율을 나타내었고, 증류수로 처리된 HeLa 세포(control)에 비해 약 10% 증가된 세포 생존율을 나타내었다.

[0127]

실시예 6: 남조류 스피룰리나 유래 세포 배양액을 이용한 HeLa의 배양

[0129] 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCs)를 포함하는 배지가 세포 배양에 적합한지 확인하고자, 다양한 혼합비율로 FBS 및 SACCs가 첨가된 배지를 제조하였다. 더욱 상세하게는, FBS 만을 함유하는 배지[FBS 100%](%v/v) 배지를 컨트롤로 사용하고, FBS 및 SACCs를 다양한 혼합 부피비율(%v/v)로 합성배지에 첨가하여 [FBS 70% : SACCs 30%](%v/v) 배지, [FBS 50% : SACCs 50%](%v/v) 배지 및 [FBS 30% : SACCs 70%](%v/v) 배지를 제조한 뒤 상기 혼합물이 배지에 최종 10% 부피비율(%v/v)이 되도록 제조하였다. 그다음, FBS 및 SACCs를 함유하는 각각의 배지에 실시예 5와 동일한 조건으로 배양 유지된 HeLa 세포를 배양하였다.

[0130] 여기서, 상기 SACCs는 스피룰리나 속(Spirulina sp.) 유래 추출물 대신 미세조류인 헤마토코쿠스 속(Haematococcus sp.) 유래 추출물 또는 클로렐라 속(Chlorella sp.) 유래 추출물을 함유하는 세포 배양액으로 대체하여 사용할 수 있다.

[0131] 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCs)이 포함된 배지에서의 HeLa 세포의 계대 배양 기간에 따른 세포 성장의 효과를 비교하고자, 1세대, 3세대 또는 10세대 계대 배양된 HeLa 세포를 96-웰 플레이트에 2x10³/ml로 시딩(seeding) 한 후 MTT assay kit을 사용하여 3일간의 생존율을 확인하였고, SACCs이 함유된 배지에서의 초기 1세대, 중기 3세대 및 후기 10세대의 세포 성장률을 함께 비교·분석하여 SACCs를 함유하는 배지의 세포 배양능을 평가하였다.

[0132] 그 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, SACCs를 함유하는 배지를 이용할 경우 HeLa 세포는 배양 초기인 1세대부터 중기 3세대 및 후기 10세대에 이르기까지 HeLa 세포의 성장률이 안정하게 나타나는 것으로 확인되었다. 특히, FBS의 사용을 50% 절감하고 SACCs로 50% 대체한 [FBS 50% : SACCs 50%](%v/v) 배지는 [FBS 100%](%v/v) 컨트롤 배지에 비해 40% 이상 높은 세포 생존율을 나타내었고, SACCs로 70% 대체한 [FBS 30% : SACCs 70%](%v/v) 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지와 유사한 세포 생존율을 나타내었다.

실시예 7: 남조류 스피룰리나 유래 세포 배양액을 이용한 HCT116의 배양

[0135] 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCs)이 포함된 배양 배지에서 인간 유래 HCT116 세포주를 10세대 장기 계대 배양하고, 96-웰 플레이트에 2x10³/ml로 시딩(seeding) 한 후 MTT assay kit을 사용하여 3일간 생존율을 확인하였다.

[0136] 그 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이, FBS 및 SACCs를 함유하는 혼합배지인 [FBS 70% : SACCs 30%] 배지 및 [FBS 50% : SACCs 50%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지에 비해 약 10% 증가된 생존율을 나타내었다.

실시예 8: 남조류 스피룰리나 유래 세포 배양액을 이용한 HEK293의 배양

[0139] 남조류 스피룰리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCs)이 포함된 배양 배지에서 인간 유래 HEK293 세포주를 10세대 장기 계대 배양하고, 96-웰 플레이트에 2x10³/ml로 시딩(seeding) 한 후 MTT assay kit을 사용하여 3일간 생존율을 확인하였다.

[0140] 그 결과, 도 6C에 나타난 바와 같이, FBS를 SACCs로 50% 대체한 [FBS 50% : SACCs 50%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지에 비하여 45% 이상 높은 세포 생존율을 나타내었고, SACCs로 70% 대체한 [FBS 30% : SACCs 70%] 배지는 [FBS 100%] 컨트롤 배지 대비 30% 높은 세포 생존율을 나타내었다.

[0141] 결국, 실시예 6~실시예 8의 결과에 따르면 SACCs의 세포주 배양능과 함께 50~70%의 혼합비율로 FBS를 SACCs로 대체할 가능성이 있음을 시사한다.

실시예 9: 남조류 스피룰리나 유래 세포 배양액을 포함하는 배지에서의 동결 전후의 세포 배양

- [0144] 실시예 6에서 얻은 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS) 적응 세포의 분자생물학적 평가를 위하여 10세대 계대 배양으로 장기 배양된 HeLa 세포([FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 또는 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지)를 동결보존하였다. 세포 동결보존은 배양된 세포를 인산완충용액으로 세척 후 트립신을 처리하고 원심분리를 수행한 다음, 상등액을 제거하고 세포를 50%(v/v) MEM, 10%(v/v) DMSO 및 40%(v/v) FBS로 구성된 동결 배지에 넣고 -196℃의 액체 질소에 보관하였다. 약 3개월간 동결보존 후 [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 각각 배양되고 동결된 세포를 해동한 다음, 동일한 조건인 [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 배양하였다.
- [0145] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 현미경 관찰시 동결 전후에 따른 SACCS에 적응 배양된 세포는 세 그룹([FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 또는 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지) 모두에서 형태학적으로 유사하게 나타난 것으로 확인되었다.
- [0147] **실시예 10: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 포함하는 배양 배지에서 적응 배양된 세포의 HKP 및 HSP 발현 양상**
- [0148] 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)을 포함하는 배양 배지에서 배양된 세포의 하우스 키핑 단백질(House keeping protein, HKP)과 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)의 발현 양상을 분석하였다.
- [0149] (1) HKP: 세포의 종류, 분화 및 성숙도에 관계없이 항상 일정하게 발현되고, 세포 생존에 필수적인 단백질인 하우스 키핑 단백질(House keeping protein, HKP)의 발현 및 활성을 비교·분석하고자 다양한 분자생물학 실험에 컨트롤로 사용되는 대표적인 하우스 키핑 단백질인 α -Tubulin, β -Actin 및 GAPDH를 지표 마커로 이용하였다.
- [0150] (2) HSP: FBS 및 SACCS 배지에서 장기간 계대 배양된 적응 세포의 스트레스 정도를 확인하고자 세포의 분화, 성숙, 분열 및 사멸에 관여하고, 스트레스 인자로 확인된 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)인 pHSP27 단백질을 지표 마커로 이용하였다.
- [0151] 먼저, FBS 및 SACCS가 함유된 배지에서 적응된 HeLa 세포의 α -Tubulin, β -Actin, GAPDH 및 pHSP27 단백질의 발현량을 확인하기 위해 Western Blot으로 확인하였다. 더욱 상세하게는 실시예 6에서 얻은 SACCS 적응 세포에 RIPA buffer를 처리하여 용해시킨 다음, 15,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상등액은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 상등액에 포함된 단백질의 농도를 측정하였다. 그다음, 상등액에 포함된 30 μ g의 단백질을 12% SDS-PAGE 상에서 분리한 후 PVDF(Polyvinylidene Difluoride, Millipore) 멤브레인으로 전이(transfer)하였다. PVDF 멤브레인은 5% BSA를 함유하는 PBST(PBS + 0.1% Tween 20) 완충용액에서 실온 1시간 동안 블로킹한 다음, 1차 항체로 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 PVDF 멤브레인은 PBST 완충용액으로 세척 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, USA)로 1시간 동안 실온 반응한 다음, PBST 완충용액으로 세척하고 ECL(Enhanced Chemiluminescence) kit를 이용하여 암실에서 X-ray film에 감광시켜 α -Tubulin, β -Actin, GAPDH 및 pHSP27의 양을 분석하였다.
- [0152] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCS 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCS 70%] 배지에서 배양된 세포 모두에서 동일한 수준의 α -Tubulin, β -Actin, GAPDH 및 pHSP27 단백질이 발현되는 것을 확인함으로써 SACCS에서 적응 배양된 세포의 HSP 단백질 발현 양상 및 스트레스 정도가 FBS 적응 세포와 유사함을 확인하였다.
- [0154] **실시예 11: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 포함하는 배양 배지에서 적응 배양된 세포의 세포주기**
- [0155] 정상적인 세포는 일정한 패턴을 가지고 성장과 세포분열을 하는데 이것을 세포 주기라 한다. 세포 주기는 G1, S, G2, M으로 구분되며 G1 주기는 일반적인 세포 성장, S 주기는 DNA 복제, G2 주기는 세포분열을 위한 성장 및 준비 단계가 이루어지고, M 주기에서 세포분열이 일어난다.
- [0156] 따라서, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)에서 적응 배양된 세포가 정상적인 세포주기를 가지는지 확인하고자 하였다. 실시예 6에서 얻은 SACCS 적응 HeLa 세포의 세포주기와 FBS에서 배양된 HeLa 세포의 세포주기를 CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit(Becton Dickinson, CA, USA)를 이용하여 비교·분석하였다. 서로 다른 FBS/ SACCS 부피비율(v/v)로 혼합 제조된 세포 배양액에서 10세대 이상 장기 배양된 각각의 세포를 2x10⁵/ml 개수로 플레이트에 시딩(seeding)하고 다음날 인산완충식염수(PBS, Gibco invitrogen corporation, USA)로 세척 후 1X Trypsin-EDTA(Gibco-invitrigen corporation, USA) 처리하여 세포를 떼어낸 다

음 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 회수된 세포는 RNase A를 첨가하여 실온에서 빛을 차단한 상태로 10분 처리 후 세포핵 내부의 DNA를 선택적으로 염색하는 PI(propidium iodide) 용액으로 4℃에서 10분간 염색하고 유세포 분석기를 이용하여 10,000개의 세포를 동일하게 분석하였다.

[0157] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, [FBS 100%] 배지, [FBS 50% : SACCs 50%] 배지 및 [FBS 30% : SACCs 70%] 배지에서 장기간 적응 배양된 HeLa 세포의 세포주기는 매우 유사한 것으로 나타났다.

[0159] **실시예 12: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 포함하는 배양 배지에서 적응 배양된 세포의 세포자멸사**

[0160] 도 7의 현미경 관찰, 도 8의 하우스 키핑 단백질과 스트레스 단백질 및 도 9의 세포 주기를 분석한 결과, 도 6의 실험결과로 얻은 FBS 및 SACCs 적응 HeLa 세포주의 세포 특성이 매우 유사함을 확인하였다.

[0161] 대부분의 암세포는 세포자멸 시스템을 회피하여 불멸화되어 있는데 암의 발생을 이해하고 정복하기 위해 전 세계 많은 연구자들이 세포자멸 실험을 실시하고 있다. 자외선 조사는 세포를 자외선이라는 강한 에너지에 노출시키므로 세포 내부의 DNA를 파괴하거나 변형시켜 세포자멸사를 유도한다.

[0162] 세포자멸사는 세포가 외부 혹은 내부의 특정 자극을 받고 스스로 자멸하는 면역학적 메커니즘으로 생물이 삶을 유지하는데 매우 중요한 시스템이다. 자외선 조사에 의해 세포자멸사가 유도되면 세포막 성분인 인지질(phosphatidyl serine, PS)이 세포 내부를 향하고 있다가 외부로 뒤집히게 되는데 이러한 원리를 이용하여 뒤집혀서 세포 외부로 노출된 인지질 표면에만 결합하는 Annexin V 단백질을 처리함으로써 세포자멸 과정을 겪고 있는 세포만 특이적으로 선별하게 된다. 인지질에 결합된 Annexin V 단백질은 FITC 형광물질이 부착되어 있기 때문에 유세포 분석기를 이용하여 형광의 강도를 측정하므로 세포자멸 정도를 확인할 수 있는 것이다.

[0163] 따라서, 자외선 조사에 의해 SACCs에서 적응 배양된 세포의 세포자멸사의 정도를 확인하고자, 서로 다른 부피비율로 FBS 및 SACCs가 혼합되어 제조된 세포배양액으로 10세대 이상 장기 배양된 각각의 HeLa 세포를 2x10⁵cells/ml 개수로 시딩(seeding)하고 365nm 파장의 자외선을 1시간 조사한 후 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척하고 원심분리한 다음, binding buffer를 이용하여 1 x 10⁶cells/ml의 세포밀도를 가지도록 조절하였다. 100 µl 용액에 Annexin V-FITC 와 PI를 각각 5 µl 첨가하여 실온에서 15분간 염색한 후 binding buffer 400 µl 첨가 후 세포자멸 정도를 유세포 분석기를 사용하여 측정하였다.

[0164] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 자외선 조사에 의해 [FBS 100%] 컨트롤 배지에서 약 45.6%의 세포자멸이 유도되었고 [FBS 50% : SACCs 50%] 배지에서 약 36.3%, [FBS 30% : SACCs 70%] 배지에서 약 36.6%의 세포자멸이 확인되었다. SACCs가 함유된 배지에서 배양된 HeLa 세포의 경우 [FBS 100%] 컨트롤 배지와 비교하여 약 10% 이내의 범위에서 자외선 의한 세포자멸사 유도에 조금 더 강한 내성을 나타내었다.

[0166] **실시예 13: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 H460 세포주 의 배양**

[0167] SACCs의 FBS 대체 가능성 및 세포주 배양능 평가를 위해 인간 유래 폐암 H460 세포주를 10세대 계대 배양하면서 각각의 세대 마다 세포수를 측정하여 세포 증식을 관찰하였다.

[0169] 그 결과, H460 세포주의 경우 [FBS 100%] 컨트롤 대비 FBS 대체비율 50%에서 112%의 세포증식율, FBS 대체비율 70%에서 101%의 세포증식율을 나타내었고 FBS 대체비율 90% 조건에서 86%의 세포증식율이 각각 확인되었다(도 11). 또한 배양된 세포의 형태는 변화가 없는 것으로 관찰되었다(도 12).

[0171] **실시예 14: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 T24 세포주의 배양**

[0172] 인간 방광암 유래 T24 세포주를 9세대 계대 배양하면서 각각의 세대 마다 세포수를 측정하여 세포 증식을 관찰하였다.

[0174] 그 결과, [FBS 100%] 컨트롤 대비 FBS 대체비율 50%에서 101%의 세포증식율, FBS 대체비율 70%에서 89%의 세포증식율을 나타내었고 FBS 대체비율 90% 조건에서 61%의 세포증식율을 각각 확인하였다(도 13). 또한 배양된 세포의 형태는 변화가 없는 것으로 관찰되었다(도 14).

[0176] **실시예 15: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 A549 세포주의 배양**

[0177] SACCs를 활용하여 인간 폐암 유래 A549 세포주 배양에 적용한 결과, [FBS 100%] 컨트롤 대비 SACCs 적용 모든 실험군에서 세포증식율이 증가된 것을 확인하였다(도 15).

[0179] **실시예 16: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 IMR90 정상 세포의 배양능 평가**

[0180] SACCs를 활용하여 인간 유래 정상 세포주 IMR90에 적용한 결과, FBS 컨트롤 대비 FBS 대체비율 50%에서 109%의

세포증식율, FBS 대체비율 70%에서 107%의 세포증식율을 나타내었다(도 16). 배양된 세포의 형태 또한 유사한 것으로 관찰되었다(도 17).

[0182] 실시예 17: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 CHO-K1 숙주 세포주의 배양능 평가

[0183] 항체 의약품 생산 세포주인 CHO-K1 숙주 세포주에 SACCs를 적용하여 세포 배양을 수행하였다.

[0185] 5 세대 계대 배양 세포와 10세대 계대 배양 세포의 부착 모습을 현미경으로 관찰한 결과, SACCs로 FBS를 70%까지 대체한 세포에서도 정상적인 세포의 모습이 확인되었다(도 18).

[0187] 10세대 계대 배양을 완료하고, 적용 배양 (T25 flask)한 결과, FBS 대비 SACCs로 FBS를 70%까지 대체하여도 세포 성장에 문제가 없는 것이 확인되었다(도 19).

[0189] 한편, 12-well 플레이트에서 회분식 배양 후(day 2-4-6) 세포 수를 관찰한 결과, 회분식 배양이 진행될수록 SACCs로 FBS를 대체한 세포주에서 오히려 향상된 세포생존율이 나타났다(도 20, #1: FBS 100%, #2: FBS 50%: SACCs 50%, #3: FBS 30% : SACCs 70%).

[0191] 실시예 18: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 CHO-GSR 세포주의 배양능 평가

[0192] CHO-GSR 세포주는 CHO-K1 숙주세포에 유전자를 도입하여 치료용 항체 (Rituxan)를 생산하는 세포주이다. 상기 CHO-GSR 세포주에 SACCs를 적용하여 세포 배양을 실시하였다.

[0194] 그 결과, CHO-K1 숙주 세포주의 결과와 마찬가지로 대조군과 유사한 세포 모양이 확인되었다(도 21).

[0196] 또한 10세대 계대 배양을 수행한 결과, FBS 대조군 대비 50% 대체 비율 군에서 85%의 세포 증식율을 확인하였고, 70% 대체 비율군에서 50% 감소된 세포 증식율을 확인하였다(도 21).

[0198] 한편, 12-well 플레이트에서 10세대 계대 배양된 CHO-GSR 세포주의 회분식 배양을 수행한 후(day 2-4-6) 세포 수를 관찰한 결과, FBS 대비 약 80% 세포 수가 확인되었다(도 22).

[0200] 실시예 19: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액을 이용한 CHO-GSR 세포주의 단위 세포당 치료용 항체 (Rituxan) 생산성 평가

[0201] CHO-GSR 세포주를 T25 flask 내 SACCs에서 배양하면서, 배양 중인 세포의 배양액을 채취하였다. 그리고 채취된 배양액 내 치료용 항체 단백질인 Rituxan의 농도를 측정하였다. 또한 단위 세포당 생산성으로부터 비생산속도를 측정하였다.

[0203] 치료용 항체 단백질의 단위 세포당 생산성을 측정한 결과, SACCs로 FBS를 대체하였을 때 단위 세포당 생산성이 증가하는 경향을 보였으며, 결과적으로 FBS 컨트롤과 유사한 단위 세포당 항체 생산성이 확인되었다(도 23).

[0205] 실시예 20: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액에서 배양된 CHO-GSR 세포주 유래 치료용 항체 (Rituxan)의 N-glycosylation profile 분석

[0206] CHO-GSR 세포주를 T-75 플라스크 내 SACCs에서 (15mL volume) 회분식 배양을 수행하였다. 회분식 배양 6일 후 배양액을 회수하고 항체를 정제하여 Fc fragment CH2 domain의 N-glycosylation profile을 HPLC [Fluorescence detector (360 nm → 425 nm)]를 사용하여 분석하였다.

[0208] 10세대 계대 배양한 CHO-GSR 세포주의 회분식 배양 (6일) 결과 항체의 당쇄화 품질에 큰 차이가 나지 않는 것이 확인되었다(도 24).

[0210] 실시예 21: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 내독성 평가

[0211] SACCs의 내독소 오염 정도를 LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation kit를 사용하여 확인하였다. SACCs 샘플 50ul에 Limulus amoebocyte lysate(LAL)을 50 μl 씩 첨가한 후 10초간 천천히 섞었다. 그리고 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후 Chromogenic substrate를 100 μl 씩 첨가하고, 그 후 37℃에서 6분 동안 반응시켰다. 그 후 25% Acetic acid(stop solution)를 50 μl 씩 첨가하고 흡광도 405nm에서 측정하였다.

[0213] 그 결과, 광생물배양기 원료 유래 SACCs 샘플의 내독소는 약 5EU/mL 이며, 수로형배양기 원료 유래 SACCs 샘플의 내독소는 약 1EU/mL 로 확인되었다(도 25).

[0215] 또한 수로형배양기(ORP, Open Raceway Pond)에 비하여 광생물배양기(PBR, Photobioreactor) 원료의 내독소가 다소 높게 나타났지만, 국제혈청산업협회(ISIA, International Serum Industrial Association)에서 인증하여

현재 전 세계에서 시판되고 있는 소태아 혈청(FBS)의 내독소가 10EU/mL 이하인 것을 감안한다면 SACCS 의 내독소 수치는 적합한 것으로 판단되었다.

[0217] **실시예 22: 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 삼투압 평가**

[0219] 배지 내 삼투압은 동물 세포 배양 시 반드시 고려해야 할 중요한 물리-화학적 요소이다. 삼투압의 증가는 치료용 항체 의약품 품질에 영향을 끼친다.

[0221] 그러므로 어느점 내림법의 원리(osmometer)를 이용하여 FBS 및 SACCS의 삼투압을 측정하였다.

[0223] 그 결과, FBS : SACCS의 비율에 상관없이 유사한 수준의 삼투압을 갖는 것이 확인되었다(도 26).

[0225] **실시예 23: 인간 유래 정상세포 대상 남조류 스피롤리나 유래 세포 배양액의 세포 독성 평가**

[0226] 수로형배양기(ORP-SACCS) 및 광생물배양기(PBR-SACCS) 원료 유래 SACCS의 세포 독성 평가를 수행하였다. 이 때 증류수(D.W, Distilled Water) 및 FBS를 대조군으로 사용하였다. 인간 유래 정상 세포주 IMR90 세포를 96well plate 내 DMEM 배지 200ul에 2x10³으로 seeding 한 후 다음날 증류수, FBS 및 SACCS를 각각 여러 가지 농도로 24시간 또는 48시간 처리하고(각 처리 농도는 부피 %로 표시함), 그 후 MTT assay kit을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0228] 그 결과, 수로형 배양기 및 광생물 배양기 원료 유래 SACCS에는 세포 독성이 없는 것이 확인되었다(도 27).

[0230] 결국, 도 7~도 24에 나타난 바와 같이, 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(SACCS)이 포함된 배양 배지에서 장기간 적응 배양된 세포가 FBS가 포함된 배지에서 적응된 세포와 비슷한 세포학적 특성을 가지고 있기 때문에 SACCS는 일반적인 분자세포생물학 실험 적용이 가능하며 더 나아가 SACCS의 FBS 대체 가능성을 시사한다.

[0231] 결론적으로, 세포배양에 필수적인 소태아혈청이 가지는 비윤리적, 비환경적 및 고비용 문제점과 무혈청 배지의 문제점인 적용 가능한 세포주의 제한에 따른 연구 분야의 한계성을 극복하고 영양학적인 우수성과 안전성이 국제사회에서 입증된 소태아혈청 대체 소재 개발을 위하여 원료 소재의 원활한 공급이 가능하고 FDA 및 식약처에 고시되었으며 영양학적으로 완벽한 생물 소재인 남조류 스피롤리나 속(Spirulina sp.)을 활용하여 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS)을 최초로 개발하였고 인간 유래 3종의 세포주를 대상으로 10세대 이상 장기 계대 배양에 성공하였다.

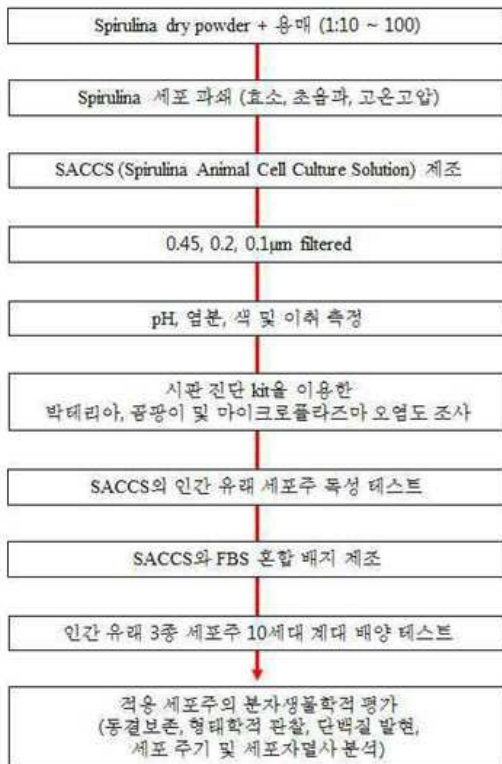
[0232] 지금까지 본 발명에 따른 남조류 스피롤리나 속으로부터 추출되어 제조된 남조류 스피롤리나 추출물을 함유하는 세포 배양액(Spirulina Animal Cell Culture Solution, SACCS), 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포의 배양방법에 관한 구체적인 실시예에 관하여 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서는 여러 가지 실시 변형이 가능함은 자명하다.

[0233] 그러므로 본 발명의 범위에는 설명된 실시예에 국한되어 전해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

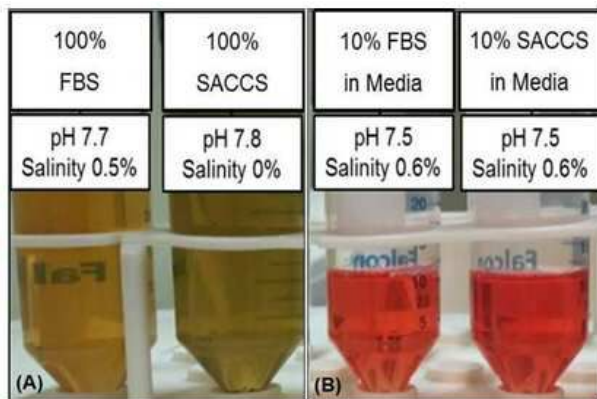
[0234] 즉, 전술된 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술될 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 그 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

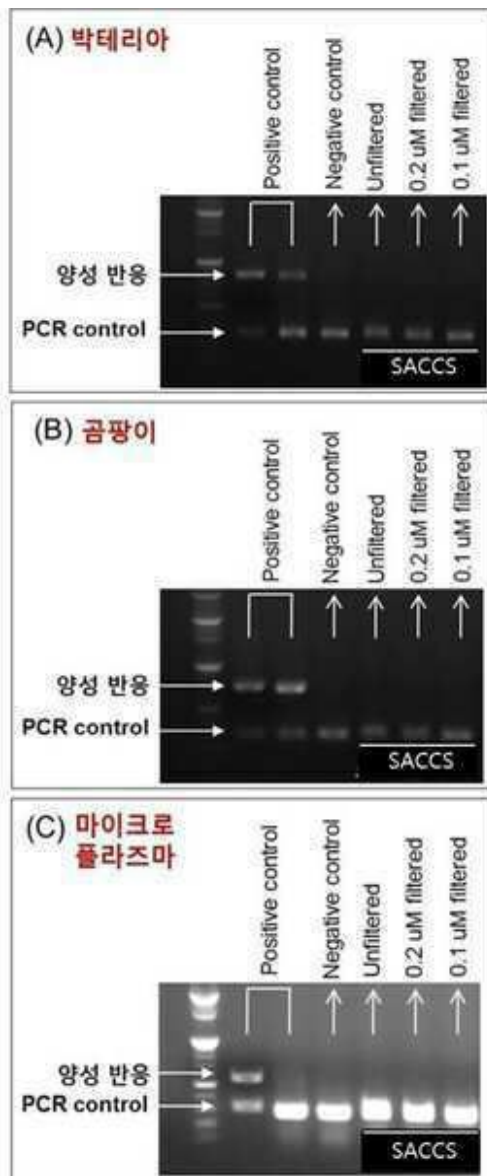
도면1



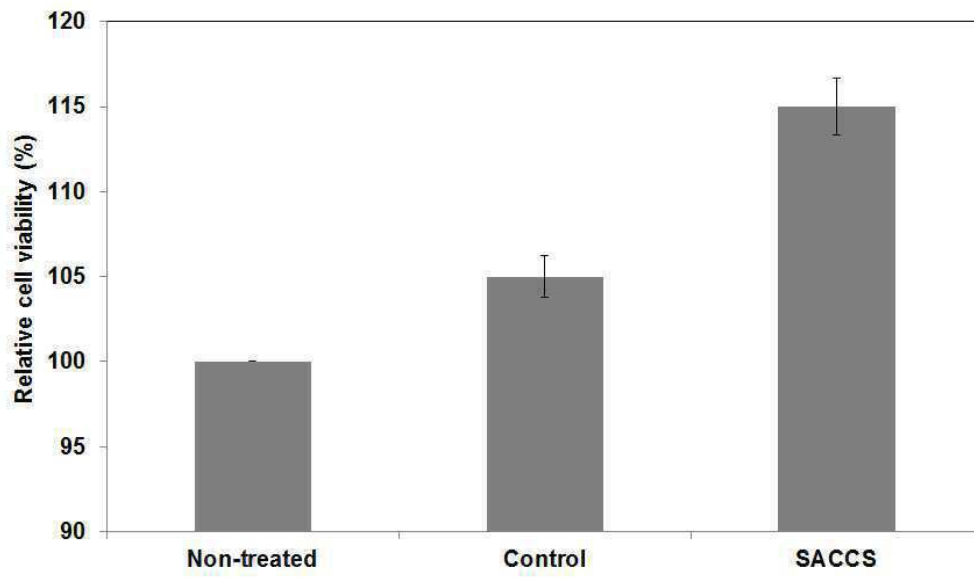
도면2



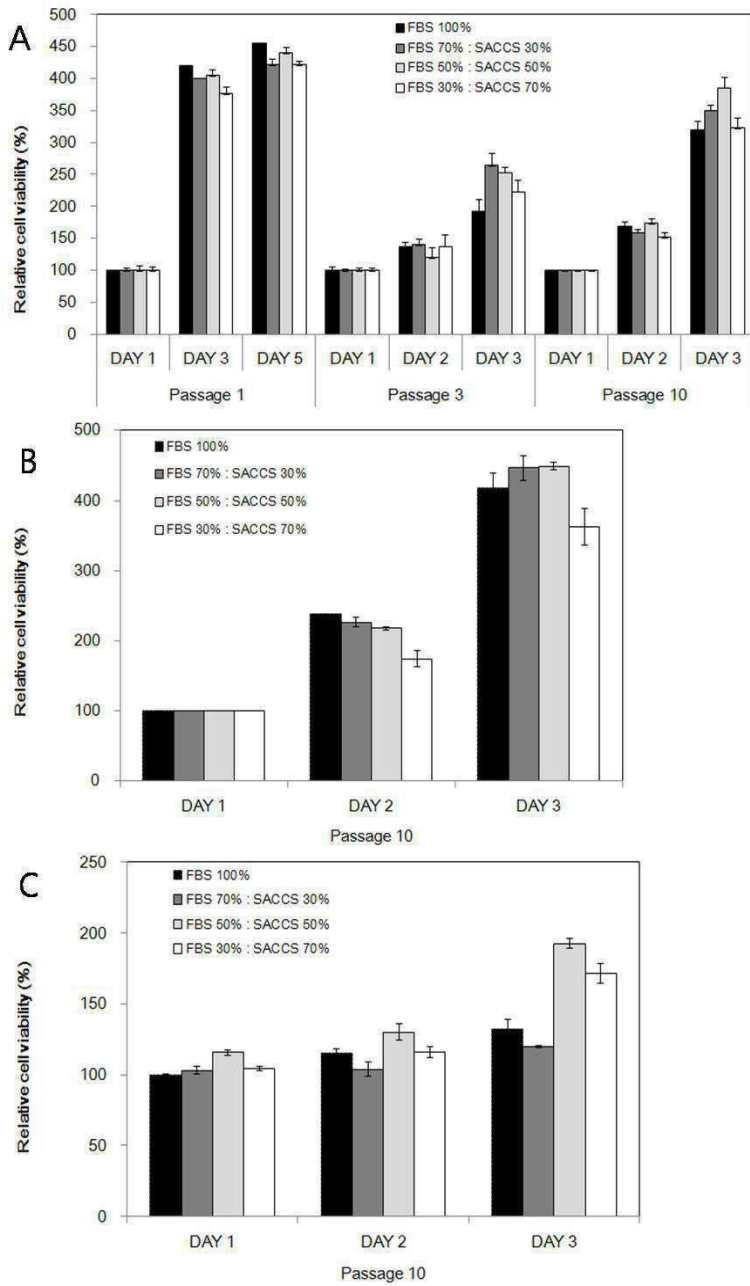
도면3



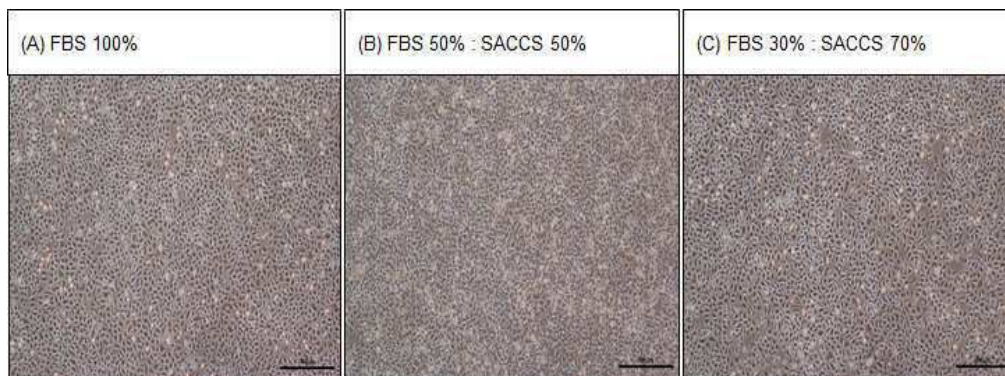
도면5



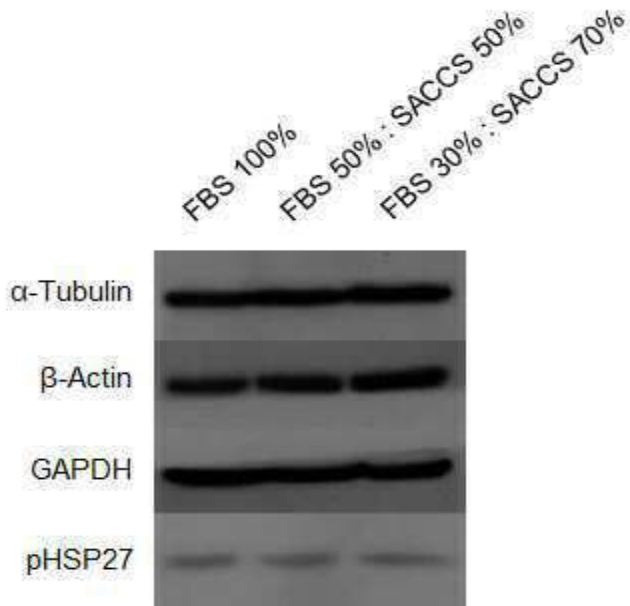
도면6



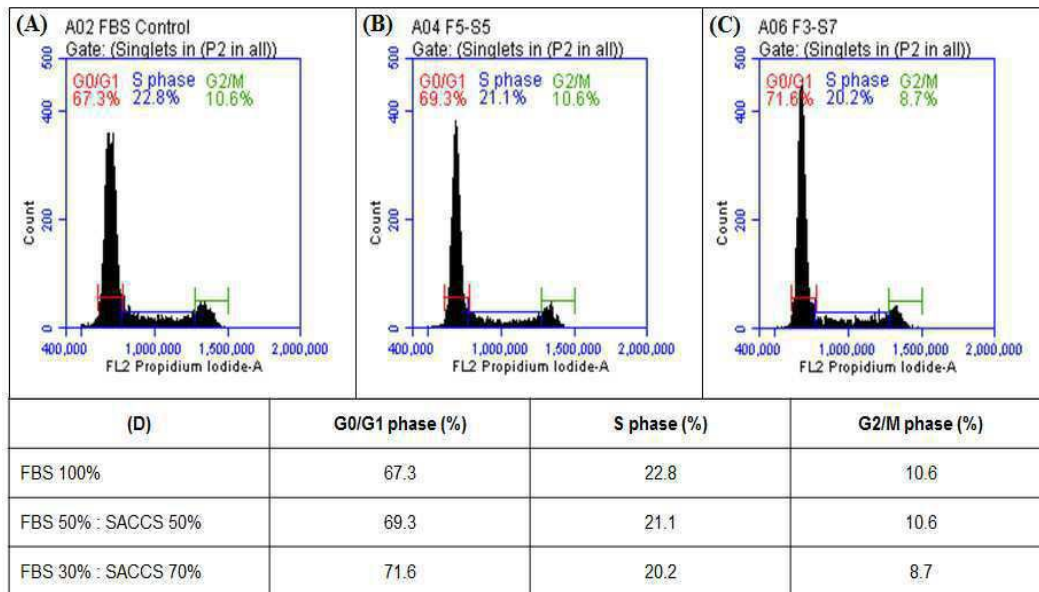
도면7



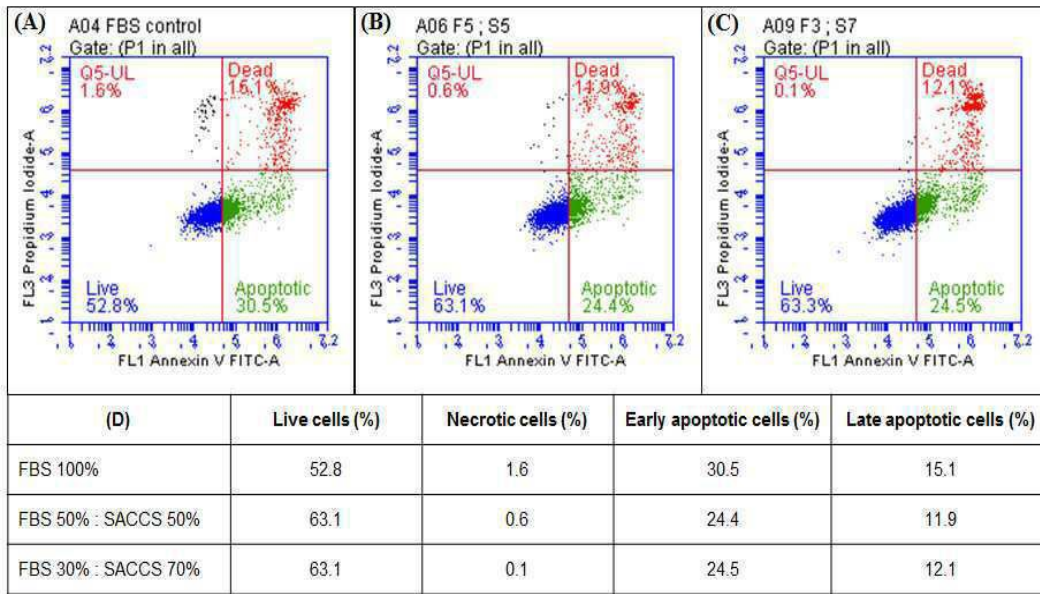
도면8



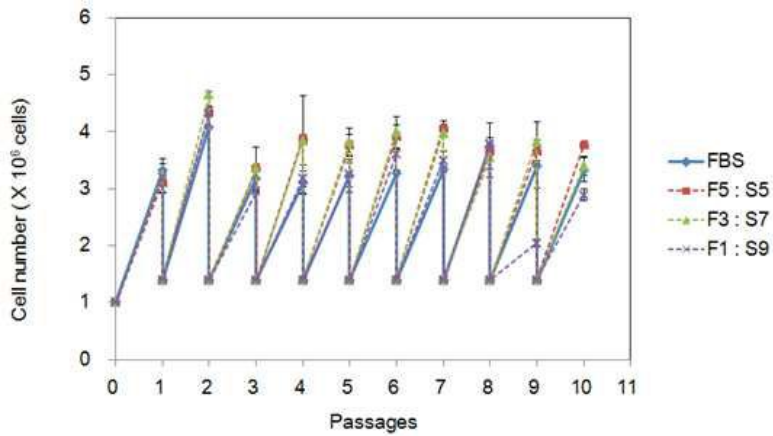
도면9



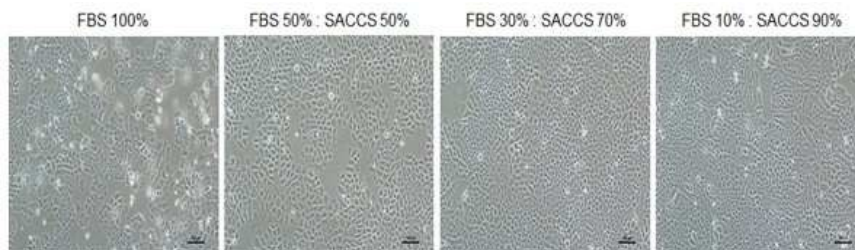
도면10



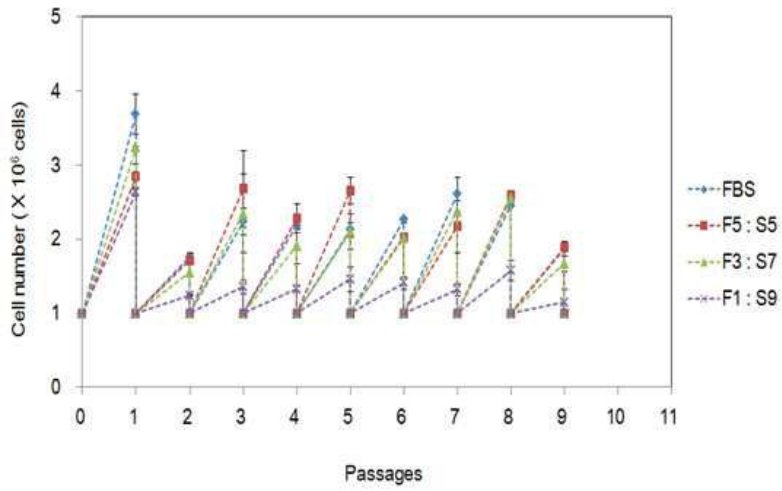
도면11



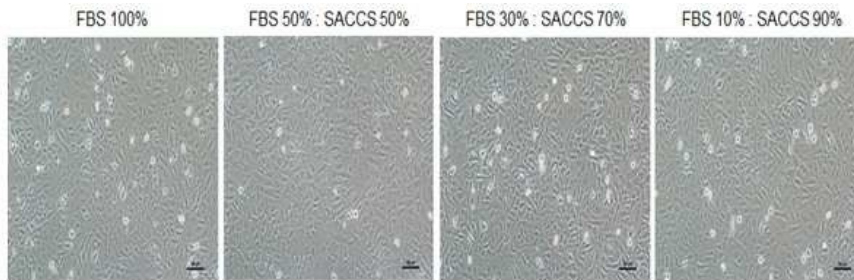
도면12



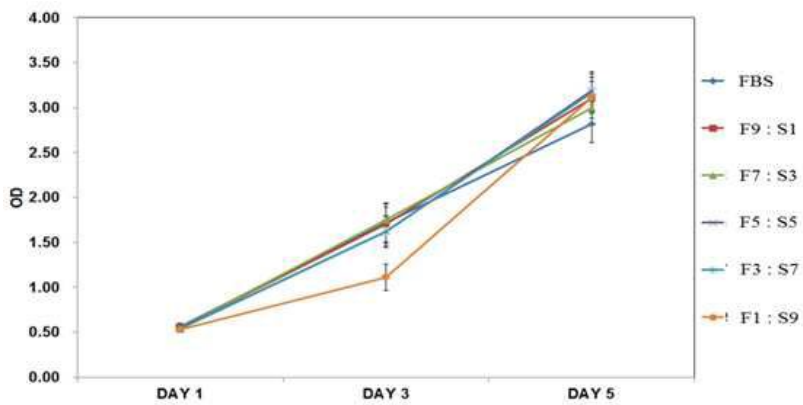
도면13



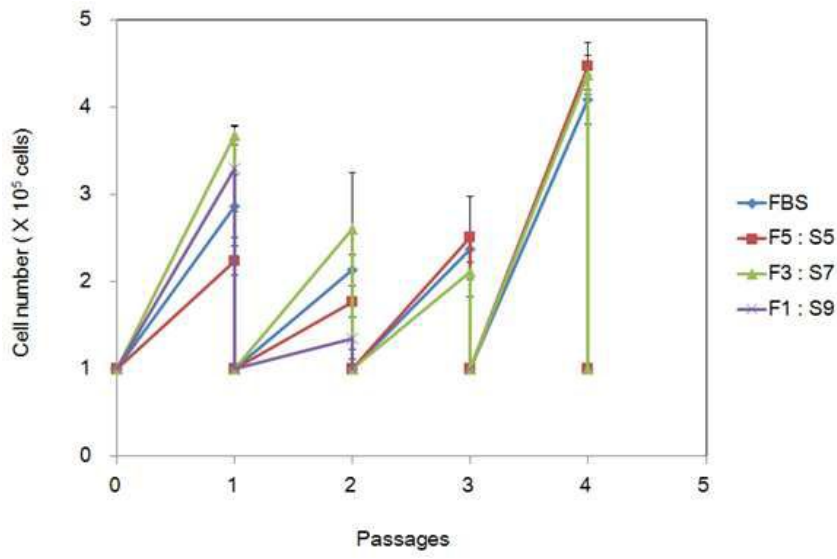
도면14



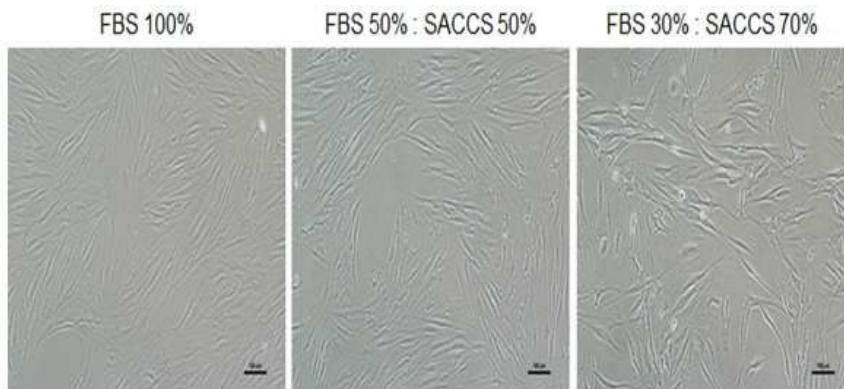
도면15



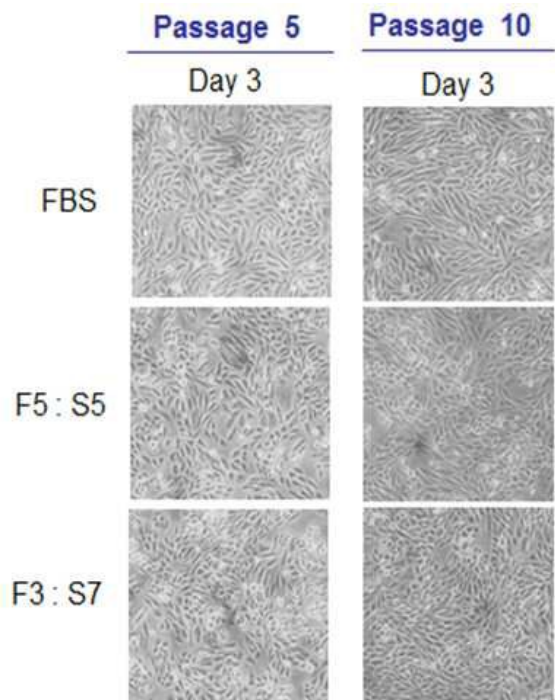
도면16



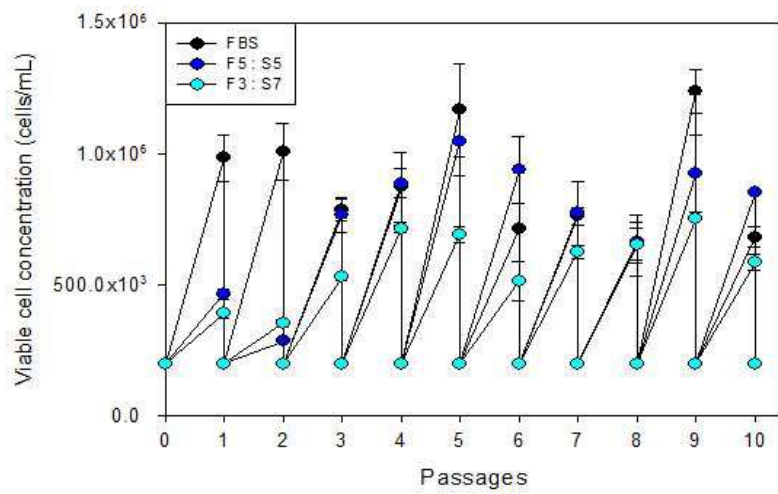
도면17



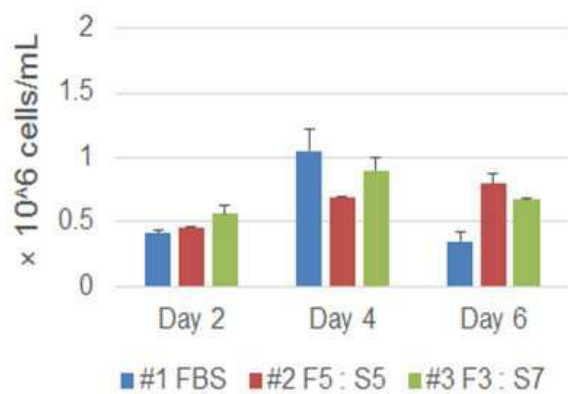
도면18



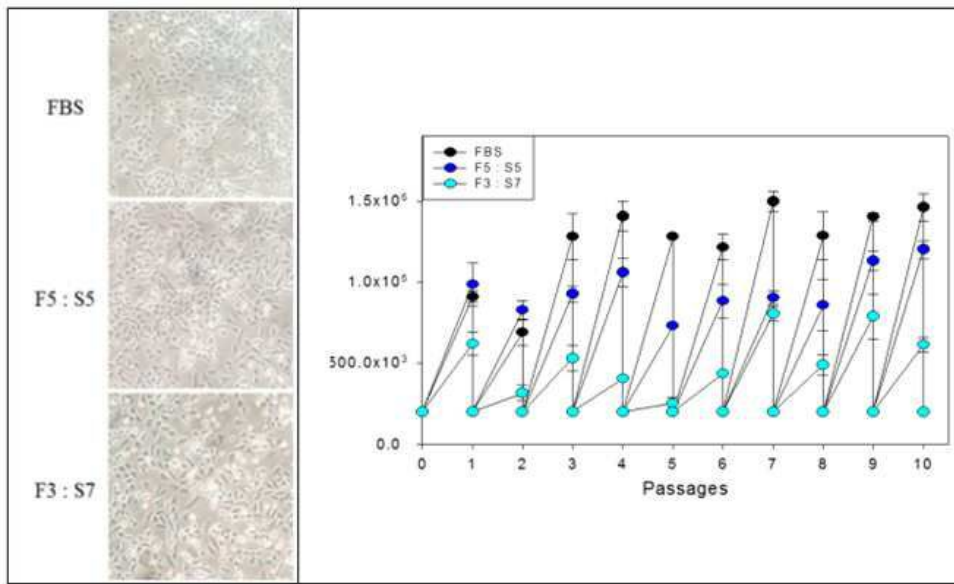
도면19



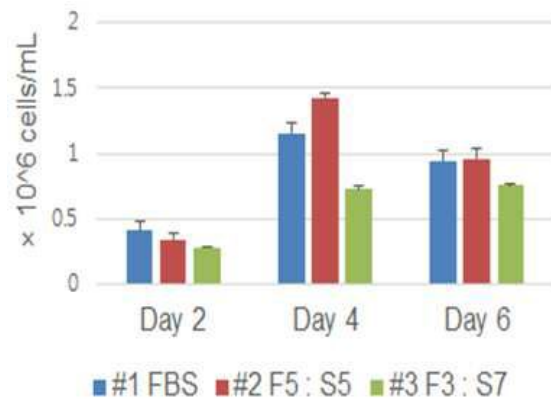
도면20



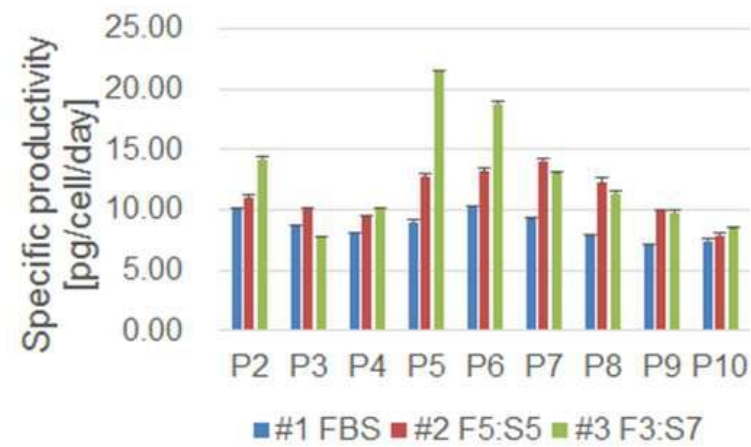
도면21



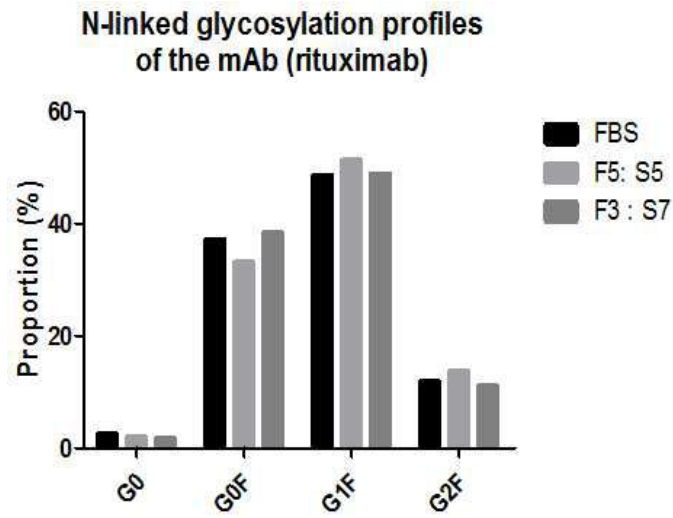
도면22



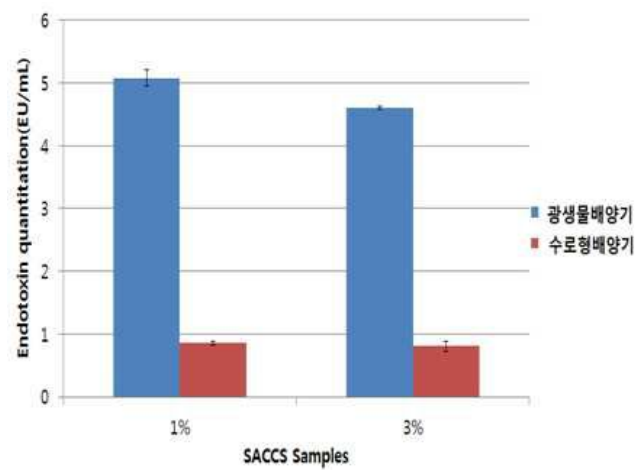
도면23



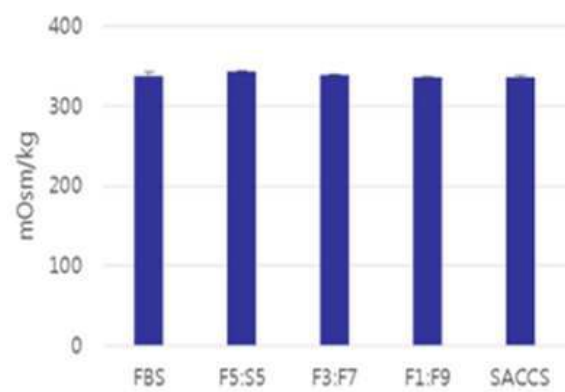
도면24



도면25



도면26



도면27

