



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0092171  
(43) 공개일자 2019년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 9/64* (2006.01) *A61K 38/48* (2006.01)  
*A61K 8/66* (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)  
*A61Q 19/00* (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)  
*C07K 1/22* (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*C12N 9/6437* (2013.01)  
*A61K 38/4846* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0011630

(22) 출원일자 2018년01월30일

심사청구일자 2018년01월30일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

이우일

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트  
308동 303호

(74) 대리인

특허법인도담, 김대영

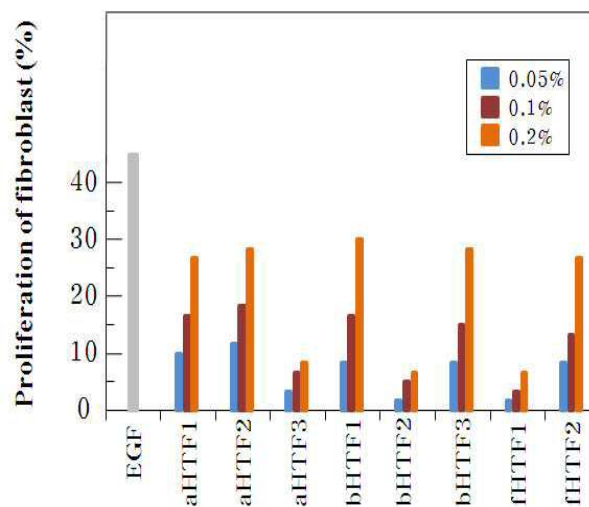
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 혈액응고인자 FVII의 재조합 EGF2-Catalytic domain 유래 피부 기능성 펩타이드군 제조

### (57) 요약

본 발명은, 혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain 유전자의 발현 벡터를 구축하고 단백질 발현을 실시한 후 크로마토그래피 시스템을 통하여 재조합 EGF2-Catalytic domain을 고순도로 정제하고 화학 처리 및 단백질 분해 효소를 이용하여 재조합 EGF2-Catalytic domain을 단편화하는 방법에 관한 것이다. 또한 각각의 단편화된 EGF2-Catalytic domain 유래의 펩타이드는 세포활성화 효과와 콜라겐 생합성 촉진효과에서 단백질 활성도가 나타내었다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

*A61K 8/66* (2013.01)  
*A61P 17/02* (2018.01)  
*A61Q 19/00* (2013.01)  
*A61Q 19/08* (2013.01)  
*C07K 1/22* (2013.01)  
*C12N 15/70* (2013.01)  
*C12Y 304/21021* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| 과제고유번호   | 2017-B-G014-010104                  |
| 부처명      | 교육부                                 |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                              |
| 연구사업명    | 산학공동기술개발지원사업                        |
| 연구과제명    | 인간 단백질 유래 EGF유사 펩타이드 주성분의 화장품 원료 개발 |
| 기 여 율    | 1/1                                 |
| 주관기관     | 건양대학교산학협력단                          |
| 연구기간     | 2017.08.01 ~ 2018.01.31             |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain이 포함된 발현벡터 pRECA를 구축하고 이를 대장균 BL21(DE3)pLysS에 대한 형질전환을 통해 최적화된 발현 조건을 바탕으로 재조합 EGF2-Catalytic domain을 발현하고 친화성 크로마토그래피를 통한 고순도의 재조합 EGF2-Catalytic domain의 생산정제방법.

#### 청구항 2

제1항의 방법에 의해 생산정제된 재조합 EGF2-Catalytic domain을 BNPS-Skatole, CNBr, Iodosobenzoic acid 중 하나로 처리하여 EGF2-Catalytic domain을 단편화하고 이를 DEAE-Sephacel column chromatography를 사용하여 각각 cFVIIIF1, cFVIIIF2, cFVIIIF3와 bFVIIIF1, bFVIIIF2, bFVIIIF3 그리고 iFVIIIF1, iFVIIIF2, iFVIIIF3의 단편화된 펩타이드군을 생산제조하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 기재된 방법에 의해 생산된 혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain 분획물을 유효성분으로 포함하는 창상치유용 피부외용제 조성물.

#### 청구항 4

제2항에 기재된 방법에 의해 생산된 혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain 분획물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 피부 탄력 증진 또는 주름 개선용인 것인, 화장품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain 유전자의 발현 벡터를 구축하고 단백질 발현을 실시한 후 재조합 EGF2-Catalytic domain을 단편화하는 방법에 관한 것으로 보다 상세하게는 PCR, 제한효소 그리고 T4 DNA Ligase 반응을 통하여 혈액응고인자 FVII의 EGF2-Catalytic domain가 삽입된 재조합 발현 벡터를 구축하고 이를 대장균에 삽입하여 재조합 EGF2-Catalytic domain을 발현하였으며, 생산된 재조합 EGF2-Catalytic domain를 크로마토그래피 시스템을 통하여 고순도로 정제하고 이후 단백질 분해 효소 및 화학 처리하여 EGF2-Catalytic domain를 단편화하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 혈액응고인자(blood coagulation factor) VII은 비타민 K의존성 단백질 분해 효소로서 세포 표면 수용체의 조직인자(tissue factor)와 결합하여 factor X와 factor IX을 활성화 시켜 혈액응고의 형성에 중요한 역할을 한다. 이 복합체는 정상 지혈 작용뿐만 아니라 다른 혈전 질병 작용이 있는 생체 내의 혈액 응고작용이 이들 복합체에 의해 개시된다. Factor VII의 생물학적인 중요성에도 불구하고 생물 종으로부터 FVII의 분리 및 정제는 아주 적은 양으로 존재하기 때문에 상당히 난처하고 많은 노동력이 필요한 일이 된다. Molecular cloning을 통한 효과

적인 다량의 FVII제조는 연구 및 산업적 차원에서 커다란 기여가 기대된다.

- [0003] FVII은 amino 말단에 있는  $\gamma$ -carboxy glutamic acid가 많은 domain 그리고 2개의 epidermal growth factor (EGF) 유사 domain 과 trypsin 같은 serine protease domain 즉 catalytic domain의 4개 도메인으로 구성된다. 인간조직인자 (human tissue factor, HTF)와 복합체를 형성하는 경우에  $Ca^{2+}$  이온의 존재 하에서 FVII의 domain중 EGF2-Catalytic domain만이 복합체 형성에 직접적으로 관여한다. 또한 HTF와 복합체를 형성하는 경우에  $Ca^{2+}$  이온의 존재 하에서 FVII의 domain중 EGF2-Catalytic domain만이 직접적으로 복합체 형성에 관여한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0004] FVII은 생체의 안전성에 중요한 기능을 하는 요소로서 대중요법 및 예방의학 수준에서 그 사용의 필요성이 많지만 이를 인체로부터 추출하는 것은 거의 불가능하며, 재조합 기법을 통해 얻는 경우에도 단백질 정제 시 따르는 기술적 어려움 때문에 소량만을 획득할 수 있을 뿐이다.
- [0005] 본 발명의 목적은, FVII의 4개의 도메인에서 실질적으로 조직인자와의 복합체 형성에 관여하는 EGF2-Catalytic domain 부분만을 6xHis의 정제 특이성을 가진 발현 벡터에 삽입하고 이를 대장균에서 발현시킴으로써 EGF2-Catalytic domain을 대량으로 생산하고, 이를 친화성 크로마토그래피를 통하여 단편화된 FVII을 정제함으로써 고순도의 생물학적 활성도를 측정한다. 또한 FVII의 재조합 단백질을 화학처리 및 효소화 반응을 통하여 재조합 EGF2-Catalytic domain 유래 여러 펩타이드 군들을 제조하고 기본적인 세포 활성화 테스트를 실시함으로써 EGF2-Catalytic domain 유래의 여러 기능성 펩타이드 제조 시스템을 개발한다.

### 과제의 해결 수단

- [0006] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 특징에 따르면, 본 발명은, 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통하여 EGF2-Catalytic domain 유전자 증폭하고 각각 pRSET-A vector와 EGF2-Catalytic domain에 BamH I과 EcoR I으로 제한 효소반응을 처리한 후 T4 Ligase를 이용하여 재조합 벡터 pRECA를 구축하였으며 이를 BL21(DE3)pLysS에 형질전환한다.
- [0007] 또한 형질전환체의 colony를 agar plat 내에서 5-10개씩 선별하고 유도물질(IPTG)을 첨가하여 재조합 EGF2-Catalytic domain의 단백질을 발현한다.
- [0008] 발현된 EGF2-Catalytic domain 단백질을 확인하기 위하여 SDS-PAGE 및 western blot을 수행하였으며, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 통하여 고순도로 정제하였다. 정제된 단백질 (3.2~3.6mg/ml)을 50 ml Refolding buffer (50 mM Tris-HCl, 2.5 M Urea, 5 mM EDTA, 1.2 mM reduced glutathione, 0.3 mM oxidized glutathione, pH 8.5)으로 희석하고 그 후에 10℃에서 20시간동안 incubation하고, digestion buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)에 의해서 투석 (Dialysis)하여 단백질 재활성을 실시한다.
- [0009] 정제된 단백질 EGF2-Catalytic domain의 활성은 Tissue Factor, FX와의 preincubation을 통하여 FX를 활성 FXa로의 변환을 유도한 다음 이 활성화된 FXa를 chromogenic substrate인 peptidyl-p-nitroaniline (pNA), Spectrozyme FXa (MeO-CO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.ACOH, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA)를 사용하여 유리된 p-nitroaniline을 405 nm에서 측정하여 간접적으로 재조합 EGF2-Catalytic domain의 촉매 활성도를 측정한다.
- [0010] 이 후 BNPS-Skatole, CNBr, Iodosobenzoic acid를 사용하여 재조합 FVII의 단편화가 시도 되었고, DEAE-Sephacel colum (1.5 X 10 cm) chromatography를 사용하여 0 - 0.5 M NaCl gradient elution에 의해 펩타이드의 분리 정제가 시도 되었다. 용출되는 펩타이드들은 254 nm에서 측정 되었고 automatic fraction collector에 의해 수집하였으며 각각 cFVIIIF1, cFVIIIF2, cFVIIIF3와 bFVIIIF1, bFVIIIF2, bFVIIIF3 그리고 iFVIIIF1, iFVIIIF2, iFVIIIF3로 명명하고 세포활성화 효과 (MTT assay)와 콜라겐 생합성 촉진효과를 측정하여 단편화된 각각의 EGF2-Catalytic domain 펩타이드에 대한 단백질 활성도를 확인한다.

### 발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따른 FVII의 EGF2-Catalytic domain의 재조합 단백질 발현 및 정제 시스템에 따르면 EGF2-Catalytic domain 단백질을 대장균에서 대량으로 발현할 수 있으며 친화성 크로마토그래피를 통하여 고순도의 EGF2-Catalytic domain을 생산할 수 있다. 또한 생산한 재조합 EGF2-Catalytic domain을 화학 처리 및 단백질

분해 효소 처리함으로써 단백질을 단편화할 수 있으며, 단편화된 EGF2~Catalytic domain 또한 고유의 단백질 활성도를 가지고 있음을 확인하였다.

### 도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 PCR 반응을 통해 증폭한 EGF2-Catalytic domain 유전자의 아가로스 겔 전기영동 분석 결과.
- 도 2는 pRSET\_A과 EGF2-Catalytic domain 유전자에 대한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과.
- 도 3은 클로닝 벡터 pRECA의 재조합 여부 확인을 위한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과.
- 도 4는 재조합 FVII 유전자의 확인을 위한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과.
- 도 5는 EGF2-Catalytic domain 발현에 대한 SDS-PAGE 분석 결과.
- 도 6은 EGF2-Catalytic domain 발현에 대한 SDS-PAGE 분석과 Western blot 분석 결과.
- 도 7은 크로마토그래피를 통한 EGF2-Catalytic domain의 정제 결과.
- 도 8은 단백질 분해 효소를 통한 재조합 EGF2-Catalytic domain의 융합 단백질 절단 결과에 대한 SDS-PAGE 분석 결과.
- 도 9는 재조합 EGF2-Catalytic domain의 단백질 활성도 분석.
- 도 10은 재조합 FVII 과 CNBr 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram
- 도 11은 BNPS-skatole로 취급된 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram.
- 도 12는 50% Iodosobenzoic acid로 취급된 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram.
- 도 13은 재조합 HTF 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity.
- 도 14는 재조합 FVII 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity.
- 도 15는 재조합 FVII 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity.
- 도 16은 재조합 FVII 유래 펩타이드군들의 type I collagen 합성 촉진효과.
- 도 17은 Human dermal fibroblast에서 type I collagen mRNA발현에 대한 재조합 FVII 유래 펩타이드군들의 효과.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 고순도의 재조합 인간상피세포 성장인자의 생산 및 정제방법의 구성을 자세히 설명한다.
- [0015] 도 1은 PCR 반응을 통해 증폭한 EGF2-Catalytic domain 유전자의 아가로스 겔 전기영동 분석 결과로서, Lane 1; molecular standard (kb), lane 2; 증폭된 EGF2-Catalytic domain 유전자.
- [0016] 도 2는 pRSET\_A과 EGF2~Catalytic domain 유전자에 대한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과로서, Lane 1; Molecular standard (kb), Lane 2; EGF2 ~ Catalytic domain 유전자, Lane 3; EGF2 ~ Catalytic domain (BamH I & EcoR I 처리), Lane 4; pRSET-A vector, Lane 5; pRSET-A vector (BamH I & EcoR I 처리).
- [0017] 도 3은 클로닝 벡터 pRECA의 재조합 여부 확인을 위한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과로서, Lane 1; molecular standard (kb), Lane 2; Blue colony 1, Lane 3; Blue colony 2, Lane 4; Blue colony 3, Lane 5; White colony 1, Lane 6; White colony 2, Lane 7; White colony 3, Lane 8; pRSET-A vector.
- [0018] 도 4는 재조합 FVII 유전자의 확인을 위한 아가로스 겔 전기영동 분석 결과로서, Lane 1; Molecular standard (kb), Lane 2; pRSET-A, Lane 3; pRSET-A (BamH I & EcoR I 처리), Lane 4; White colony 2, (BamH I & EcoR I 처리), Lane 5; White colony 3 (BamH I & EcoR I 처리).
- [0019] 도 5는 EGF2-Catalytic domain 발현에 대한 SDS-PAGE 분석 결과로서, Lane 1; Molecular weight marker, Lane

2; BL21(DE3)의 수용성 단백질, Lane 3; BL21(DE3)의 봉입체 단백질, Lane 4; 발현이 유도된 BL21(DE3)의 수용성 단백질, Lane 5; 발현이 유도된 BL21(DE3)의 봉입체 단백질, Lane 6; Molecular weight marker.

[0020] 도 6은 EGF2-Catalytic domain 발현에 대한 SDS-PAGE 분석과 Western blot 분석 결과로서, Lane 1; Molecular weight marker, Lane 2; 발현되지 않은 BL21(DE3)의 Cell lysate, Lane 3; 발현이 진행된 BL21(DE3)의 Cell lysate, Lane 4; Western blot에 의해 나타난 재조합 EGF2-Catalytic domain의 signal band.

[0021] 도 7은 크로마토그래피를 통한 EGF2-Catalytic domain의 정제 결과로서, (a) 친화성 크로마토그래피 과정에서의 Chromatogram, (b) 단일물질로 정제된 EGF2-Catalytic domain의 SDS-PAGE 분석.

[0022] 도 8은 단백질 분해 효소를 통한 재조합 EGF2-Catalytic domain의 융합 단백질 절단 결과에 대한 SDS-PAGE 분석 결과. Lane 1; Molecular weight marker (kDa), Lane 2; 반응 전 EGF2-Catalytic domain, Lane 3; 절단 처리 후 EGF2-Catalytic domain.

[0023] 도 9는 재조합 EGF2-Catalytic domain의 단백질 활성도 분석. Closed quadrangle; 전체의 FVII, Open quadrangle; 본 연구에서 발현되고 정제된 재조합 EGF2-Catalytic domain 용액.

[0024] 도 10은 재조합 FVII 과 CNBr 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram: F1; cFVIIIF1, F2; cFVIIIF2, F3; cFVIIIF3.

[0025] 도 11은 BNPS-skatole로 취급된 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram: F1; bFVIIIF1, F2; bFVIIIF2, F3; bFVIIIF3.

[0026] 도 12는 50% Iodosobenzoic acid로 취급된 반응 혼합용액이 DEAE-Sephacel column에 의해 분획된 chromatogram: F1; iFVIIIF1, F2; iFVIIIF2, F3; iFVIIIF3.

[0027] 도 13은 재조합 HTF 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity로서, EGF (epidermal growth factor)가 양성 대조군으로 사용되었다.

[0028] 도 14는 재조합 FVII 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity로서, EGF (epidermal growth factor)가 양성 대조군으로 사용되었다.

[0029] 도 15는 재조합 FVII 유래 펩타이드군의 cell proliferation activity로서, EGF (epidermal growth factor)가 양성 대조군으로 사용되었다.

[0030] 도 16 재조합 FVII 유래 펩타이드군들의 type I collagen 합성 촉진효과로서, L-ascorbic acid가 양성 대조군으로 사용되었다.

[0031] 도 17은 Human dermal fibroblast에서 type I collagen mRNA발현에 대한 재조합 FVII 유래 펩타이드군들의 효과로서, Fibroblast는 0.1%의 펩타이드 존재하에서 12시간 동안 배양 되었다. Human dermal fibroblast로부터 얻은 total RNA를 주형으로 RT-PCR이 수행되었다. 1; 200  $\mu$ M Ascorbic acid, 2; bFVII2, 3; iFVII2, 4; cFVII2, 5; bFVII1.

[0033] 1. 재조합 EGF2-Catalytic domain의 증폭

[0034] EGF2-Catalytic domain은 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)에 의해서 증폭하였으며, 유전자 증폭을 위한 primer는 각각 pF: CC GGATCC GAC CAG CTG ATC TGT GTG와 pR: CG GAATTC GGG AAA TGG GGC TCG CAG으로 design 되었다. BamH I 및 EcoR I 연속부위가 DNA Clonig을 위하여 primer 5' 말단에 삽입 되었으며, extra base pair는 그 제한효소의 처리에 대한 효율성을 감안하여 임의적으로 삽입되었다. PCR 반응은 Taq polymerase (Intron), Taq 10X buffer, Forward primer (Bioneer), reverse primer (Bioneer), dNTP (Solgent), dd H2O 넣어 반응액을 준비하고, 95 $^{\circ}$ C/2min 그리고 28cycle (95 $^{\circ}$ C/30sec, 65 $^{\circ}$ C/30sec, 72 $^{\circ}$ C/1min)로 반응을 수행하였다. 이 후 아가로스 겔 전기영동을 통하여 증폭 여부를 분석하였으며, 그 결과 EGF2-Catalytic domain의 해당하는 DNA가 957 bp로 증폭되었음을 확인하였다.

[0036] 2. pRSET-A vector와 EGF2-Catalytic domain 제한효소반응

[0037] 각각 pRSET-A vector와 EGF2-Catalytic domain에 BamH I과 EcoR I으로 효소반응을 진행하였다. 반응액을

Vortex를 이용하여 섞어준 후, 원심분리를 13,000 rpm에서 3~5 sec 수행하고, 37℃ Water Bath에서 2시간 동안 반응을 하였다. 그 후 65℃에서 10분 동안 Heat Inactivation 반응을 수행하였다.

[0039] 3. 대장균 BL21(DE3)내에서 EGF2-Catalytic domain의 클로닝

[0040] 클로닝의 과정은 기본적인 Molecular Cloning의 방법을 따랐다. PCR을 통하여 확보된 유전자와 pRSET-A vector는 제한효소 반응을 수행된 상태에서 T4 Ligase 를 이용하여 25℃에서 30분 동안 Water Bath에서 반응을 진행하였다. 그 후 70℃에서 10분 동안 Heat Inactivation을 수행한 후 BL21(DE3)내에 형질전환 하였다. 클로닝 과정에 사용된 pRSET-A vector는 항생물질 Ampicillin에 대한 저항성을 이용하여 콜로니를 선별 하였다.

[0041] 이후 올바른 클로닝 여부를 판단하기 위하여 각각 pRSET-A vector와 EGF2-Catalytic domain을 제한효소 BamH I과 EcoR I으로 반응하여 절단시키고, 0.7% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. pRSET-A vector가 BamH I과 EcoR I 제한효소를 이용하여 linearize 된 형태로 된 것을 확인하였으며 절단된 벡터는 선형이기 때문에 super coil 형태가 사라졌으므로 확인하였다. 또한 pRSET-A vector의 크기는 2.9 kb이므로 Lane 8에서 control과 똑같은 위치의 band를 확인하였다. 그러나 Lane 6과 Lane 7에서는 insert DNA 957 bp가 함께 cloning 되어 3.0 kb 보다 더 위쪽인 3857bp에 band가 나타난 것으로 외부 DNA 삽입이 성공적으로 이루어졌음이 이 확인되었다. [도면 3, 4]

[0043] 4. Plasmid pRECA의 발현

[0044] BL21(DE3)pLysS에 삽입되어있는 형질전환체의 colony를 agar plat 내에서 5~10개씩 선별하였다. 발현조건은 온도, 배지조건, 유도물질이 첨가될 경우 유도물질(IPTG)의 농도, 기타의 외분비 경로를 택할 경우 안정화 물질(Casamino acid, PMSF, Zn<sup>2+</sup>등)을 기준으로 하고, 발현량 최적화는 먼저 50 ml 이하의 배지량에서 시작하며 1개의 형질전환체 당 2 개의 동일한 배양을 실시하였다.

[0045] 각각의 균주에 대한 가장 많은 발현량을 나타내는 형질전환체를 선별하여 LB-Amp medium 500 ml에 5 ml를 inoculation하고, 37℃ Shaking incubator에서 3시간 동안 배양하였다. UV spectrophotometer를 이용하여 OD 550에서 측정한 결과 0.5에 도달하였다. 그 다음에는 발현량을 유도하기 위하여 IPTG(Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside)의 최종농도가 1 mM이 될 수 있도록 가하고, 4시간동안 37℃ Shaking incubator에서 배양을 하였다. 발현된 단백질을 확인하기 위하여 원심분리를 5,000g/4℃에서 10분 동안 수행하여 cell harvest를 하였다. 이 후 SDS-PAGE를 통하여 각각의 균주에 대한 발현량을 분석하였으며, 또한 발현된 단백질은 supernatant (soluble)에서는 발현되지 않았고, pellet (insoluble)에서 발현된 것을 알 수 있었다. [도면 5]

[0046] 발현된 EGF2-Catalytic domain 단백질을 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. Antibody로는 Anti-His G-HRP Antibody (Invitrogen)를 사용하였고, detection의 측정은 Opti-4CNTM Substrate Kit (Bio-rad)를 사용하여 확인하였다. western blot을 수행한 결과, 39 kDa에서 Antibody와 결합하여, HRP에 의해 발색되어 나타남으로서 EGF2-Catalytic domain 단백질이 발현이 강한 적갈색으로 확인 되었다. [도면 6]

[0048] 5. 재조합 융합단백질의 정제와 재활성

[0049] 250 ml culture medium에서 Harvest된 cell pellet 1.08 g을 binding buffer (20 mM Tris-HCl, 6M Guanidine HCl, 500 mM NaCl, 5mM Imidazole, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0)로 suspend를 수행하였다. cell 분해를 위해서 Sonication을 수행하였다 (Total 5min, pulses 15 sec and interval 15 sec). cell 분해물은 원심분리기를 이용하여 12,000g, 4℃에서 25분 동안 수행하며, 상층액은 Ni-NTA affinity column을 이용하여 로딩하였다. 컬럼에 로딩한 후 120 ml washing buffer (20 mM Tris-HCl, 8 M Urea, 500 mM NaCl, 20mM Imidazole, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0)로 씻어주고, 60 ml Elution buffer (20 mM Tris-HCl, 8 M Urea, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazole, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0)를 이용하여 컬럼에서 단백질을 정제하였다. 이 중 200mM의 imidazole 분획에서 용출된 시료를 SDS-PAGE으로 분석하였으며, 그 결과 39 kDa에서 Ni-NTA column에서 단일 물질로 정제되었음을 확인하였다. [도면 7]

[0051] 6. 재조합 융합단백질의 재활성

[0052] 재활성은 정제된 단백질 (3.2~3.6mg/ml)을 50 ml Refolding buffer (50 mM Tris-HCl, 2.5 M Urea, 5 mM EDTA, 1.2 mM reduced glutathione, 0.3 mM oxidized glutathione, pH 8.5)으로 희석하였다. 그 후에 10℃에서 20시간 동안 incubation하고, digestion buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)에 의해서 투석 (Dialysis)하고, 12,000 g, 4℃에서 25분 동안 원심분리하였다.

[0054] 7. 융합단백질의 enzymatic cleavage

[0055] 정제된 단백질 EGF2-Catalytic domain과 Enterokinase를 함께 혼합한 반응물을 37℃ incubator에서 4시간동안 반응을 하였다. 그 후 cleavage 확인 여부를 위하여 SDS-PAGE를 수행하여 분석하였다. 그 결과, 39 kDa 보다 약간 적어 보이는 정제된 EGF2-Catalytic domain 단백질을 확인 하였다. [도면 8]

[0057] 8. 정제단백질의 활성화 측정

[0058] 정제된 단백질 EGF2-Catalytic domain의 활성화는 Tissue Factor, FX와의 preincubation을 통하여 FX를 활성 FXa로의 변환을 유도한 다음 이 활성화된 FXa를 chromogenic substrate인 peptidyl-p-nitroaniline (pNA), Spectrozyme FXa (MeO-CO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.ACOH, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA)를 사용하여 유리된 p-nitroaniline을 405 nm에서 측정하여 간접적으로 재조합 EGF2-Catalytic domain의 촉매 활성도를 측정하였다. 분석 결과는 Peptidyl substrate의 분해속도가 재조합 EGF2-Catalytic domain양에 의존 하는 형태로 일어나고 있음을 보여주고 있으며, 전체 FVII 활성도의 대략 80% 정도의 활성도를 보여주고 있다. [도면 9]

[0060] 8. 재조합 FVII의 단편화

[0061] BNPS-Skatole, CNBr, Iodosobenzoic acid를 사용하여 재조합 FVII의 단편화가 시도 되었고, DEAE-Sephacel colum (1.5 X 10 cm) chromatography를 사용하여 0 - 0.5 M NaCl gradient elution에 의해 펩타이드의 분리 정제가 시도 되었다. 용출되는 펩타이드들은 254 nm에서 측정 되었고 automatic fraction collector에 의해 수집되었다.

[0063] \*CNBr에 의한 peptide 제조 및 분리

[0064] 재조합 FVII의 CNBr로 취급된 반응 혼합용액에서 DEAE-Sephacel chromatography 기술을 적용 0 - 0.5 M의 NaCl gradient elution에 의해 약 6 종류의 펩타이드 군들이 관측 되었는데 이중 주요 peak 3개를 제외하고는 용출물의 농도 및 resolution이 만족스럽지 않아 에서 지적한대로 3종류의 펩타이드군을 수집 하였다. 각각의 fraction들을 순서대로 cFVIIIF1, cFVIIIF2, cFVIIIF3 로 명명하였다. [도면 10]

[0066] \* BNPS-skatole에 의한 peptide 제조 및 분리

[0067] BNPS-skatole로 취급된 반응 혼합용액으로부터 DEAE-Sephacel column에 의한 200mM 및 500 mM의 NaCl stepwise elution은 4개의 peak군을 보이는데 이중 3 번째 peak를 만드는 용출 물은 signal이 background 수준으로 큰 의미를 만들지 못하는 것으로 간주하고 1, 2, 4 peaks 즉 3종류의 펩타이드 군들로 분획 하였다. 각각의 fraction들을 순서대로 bFVIIIF1, bFVIIIF2, bFVIIIF3로 명명하였다. [도면 11]

[0069] \*Iodosobenzoic acid 취급에 의한 peptide 제조 및 분리

[0070] 재조합 FVII과 50% Iodosobenzoic acid의 반응 혼합용액을 DEAE-Sephacel column에 로딩 후 0 - 1 M의 NaCl stepwise elution은 5개 이상의 잡다한 peak들이 보이는데 이중 3 개의 peak가 주요 분획으로 뚜렷하게 분리 되어졌다. 각각의 fraction들을 순서대로 iFVIIIF1, iFVIIIF2, iFVIIIF3로 명명하였다. [도면 12]

[0072] 9. 세포활성화 효과 (MTT assay)

[0073] 본 연구에서 얻어진 혈액응고인자 재조합 단백질 유래 펩타이드군들의 세포 활성화(cell proliferation) 효과 측정을 위하여, MTT assay를 하였다. 세포주는 사람 섬유아세포를 사용하였으며 24 well plate에 well당  $2 \times 10^5$  cell 수로 세포를 분주하고 24시간 배양하였다. 각 시료를 세포독성을 나타내지 않는 농도로 첨가한 기본배지로 교환하여 24시간 동안 37℃, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 배지를 제거하고 각 well당 phenol red가 없는 500  $\mu$ l의 새 배지와 60  $\mu$ l MTT용액을 넣은 후 2시간 동안 37℃, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 세포를 용해시키고 각각을 100  $\mu$ l씩 96 well plate에 옮긴 후, microplate reader를 이용하여 565nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 재조합 Tissue factor 및 FVII으로부터 화학처리 및 효소처리 방법으로 총 얻어진 펩타이드 군은 모두 17종으로 재조합 HTF 유래 8종 (aHPF1, aHPF2, aHPF3, bHPF1, bHPF2, bHPF3, fHPF1, fHPF2)과 재조합 FVII 유래 9종 (iFVIIIF1, iFVIIIF2, iFVIIIF3, bFVIIIF1, bFVIIIF2, bFVIIIF3, cFVIIIF1, cFVIIIF2, cFVIIIF3)이 얻어졌다. 이들의 세포활성 효과를 조사하기 위하여 사람 섬유아세포의 세포 활성 촉진 효과를 측정하였다. EGF 의 경우, 10ng 의 농도에서 약 45%의 세포활성 촉진 효과를 확인 하였다. 이에 비해, 재조합 단백질 유래 펩타이드군들은 0.2%의 농도에서 약 10% 에서 30%에 걸쳐 세포활성 촉진 효과를 보였으며 이들 중 재조합 인간조직인자 유래 펩타이드들 군중 bHPF2, fHPF1, aHPF3는 상대적으로 낮은 cell proliferation을 보였다. 재조합 FVII 유래 펩타이드들군 중 iFVIIIF2, bFVIIIF2는 상대적으로 우수한 세포활성 촉진 효과를 나타내었다.

[0076] 10. 콜라겐 생합성 촉진효과

[0077] Human dermal fibroblast를 24 well-plate에 seeding하고 overnight 배양한 후 본 연구에서 제조된 재조합 단백질 유래 펩타이드 군들을 각각 첨가하여 48시간 배양 하였다. 배양 상등액을 150  $\mu$ l씩 취해 immuno module에 넣고 4℃에서 overnight 코팅 하였다. 배지를 제거하고 washing buffer (PBS-T : 0.2% tween 20)로 3회 세척한 후 blocking buffer(3% BSA in PBS-T)로 37 ℃에서 1시간 반응시킨 후 Blocking buffer를 제거하고 anti-collagen type I(1:2000)를 37℃에서 90분간 처리하였다. 1차 항체 용액을 제거하고 3회 세척한 후, 2차 항체 (Goat anti-mouse IgG AP: 1:3000)를 37℃에서 90분간 처리하였다. 2차 항체 용액을 제거하고 PBS-T로 5회 세척한 후 1  $\mu$ g/ml 기질 용액을 넣고 37℃에서 40분 동안 반응시킨 다음 50  $\mu$ l stop solution(3N NaOH)을 첨가하고 shaking한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

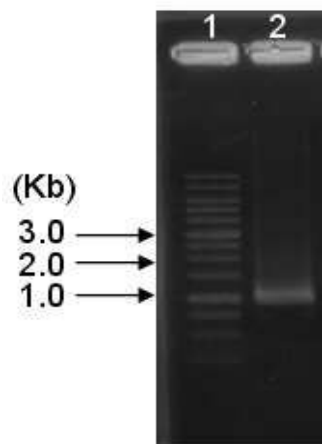
[0078] EGF domain을 함유하고 있는 재조합 혈액응고인자 FVII 유래 펩타이드 9종의 피부조직 재생 및 재구성 등에 미치는 영향을 평가하기 위하여 L-ascorbic acid을 비교군으로 하여 콜라겐 생합성 촉진 효과를 ELISA assay를 이용 조사하였다.

[0079] 그 결과, 배양된 세포에서의 type I collagen의 합성을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있는 양성대조군인 L-ascorbic acid는 본 연구실험에서 200  $\mu$ M의 농도에서 약 70%의 콜라겐 생합성 촉진 효과를 가지는 것으로 나타났다. 재조합 FVII 유래 펩타이드 군들은 0.2%의 농도에서 약 10 - 60%에 걸쳐 콜라겐 생합성 촉진 효과를 나타내었다. 이들 중 iFVIIIF2, bFVIIIF2, cFVIIIF2는 각각 60, 63, 59%의 매우 우수한 콜라겐 생합성 촉진효과를 나타내었다. 비록 이들 두 군들이 L-ascorbic acid 에 비해, 상대적으로 약간 낮은 콜라겐 생합성 촉진 효과를 보이지만, 다른 연구들의 보고에서 우수한 콜라겐 생합성 촉진효과를 보이는 천연물들에 비해 L-ascorbic acid 의 효과를 비교 기준으로 고려하였을 경우 뛰어난 효과를 갖는 것으로 판단된다.

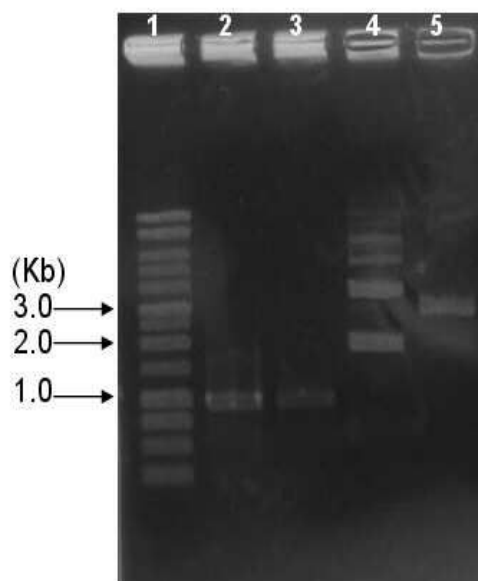
[0080] 또한, 재조합 FVII 유래 펩타이드군들에 의한 type I collagen mRNA 의 발현량을 RT-PCR 을 이용하여 조사하였다. 200 $\mu$ M의 처리가 콜라겐의 mRNA 발현량을 뚜렷하게 증가 시키는 것이 확인 되었다. 또한 iFVIIIF2, bFVIIIF2, cFVIIIF2 펩타이드군들에 의한 콜라겐 mRNA 발현량은 L-Ascorbic acid에 의한 것과 비교할만한 것으로 관측되었다. [도면 17]

도면

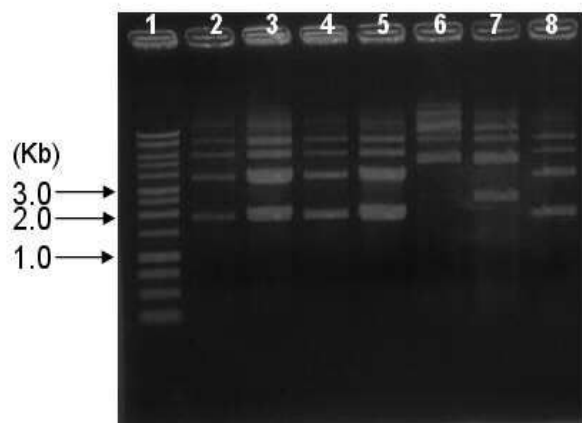
도면1



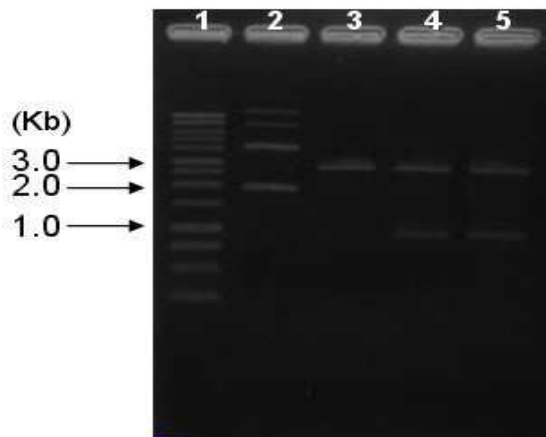
도면2



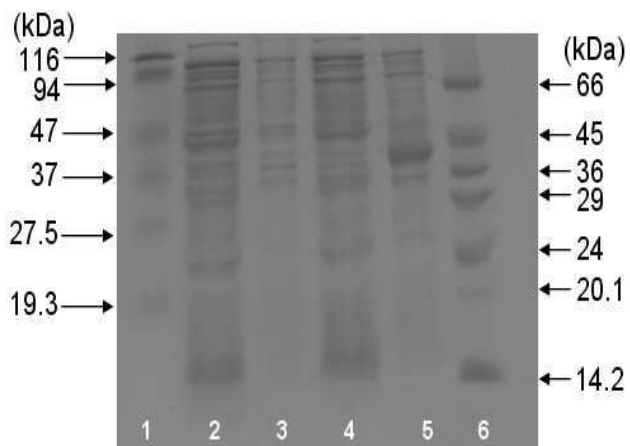
도면3



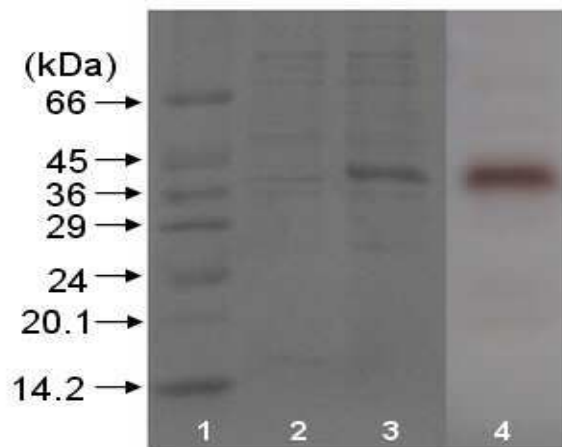
도면4



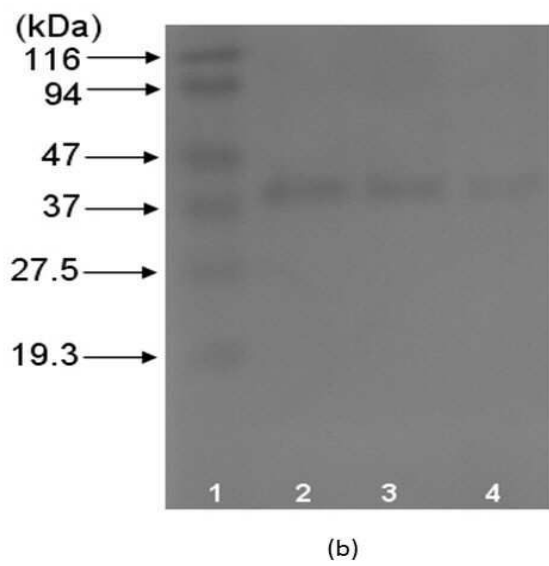
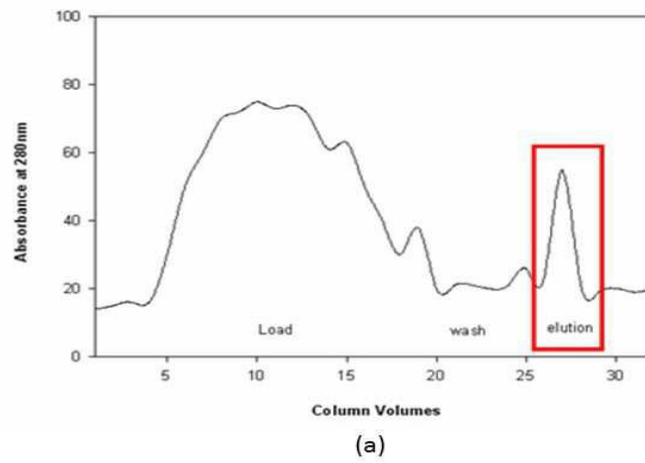
도면5



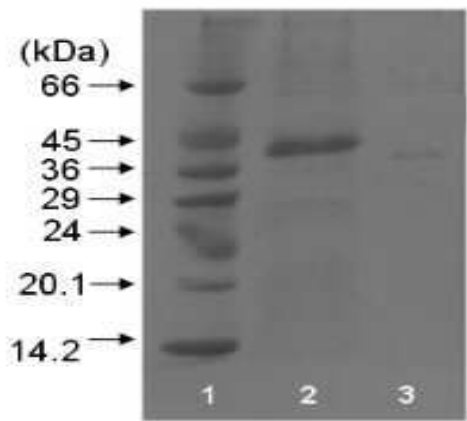
도면6



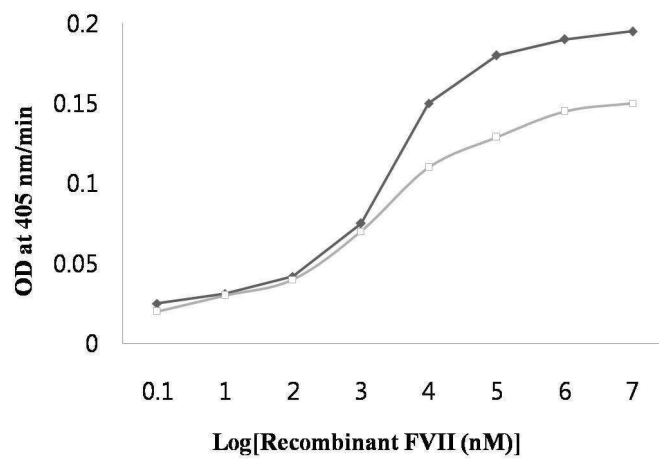
도면7



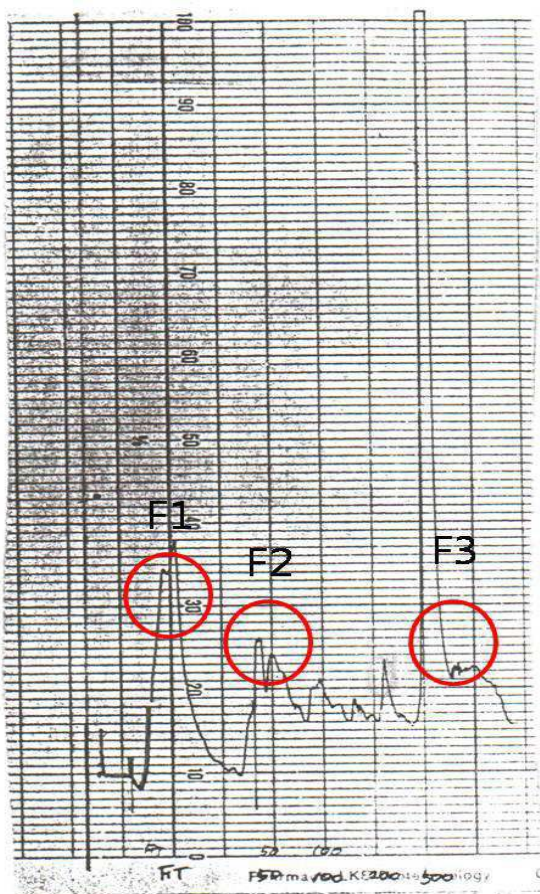
도면8



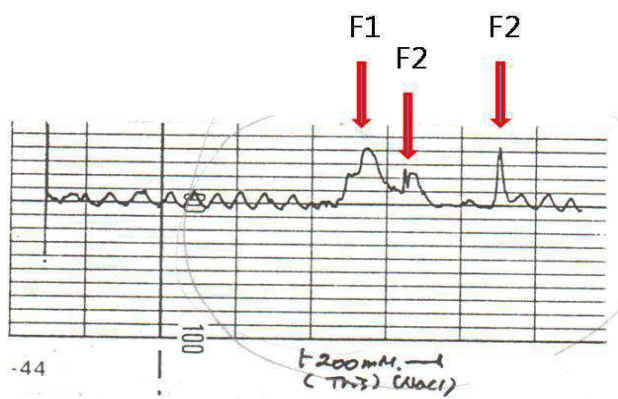
도면9



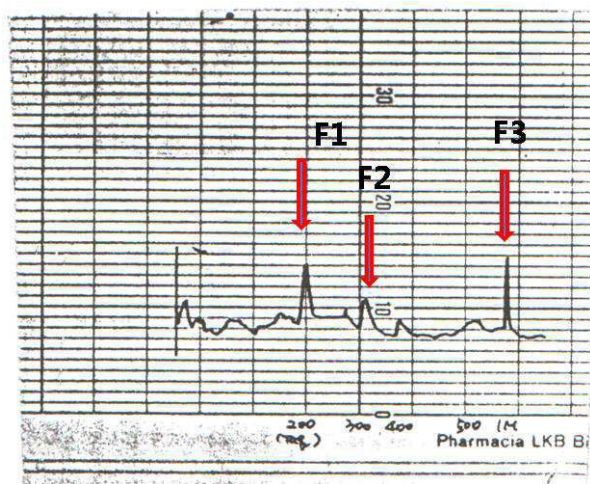
도면10



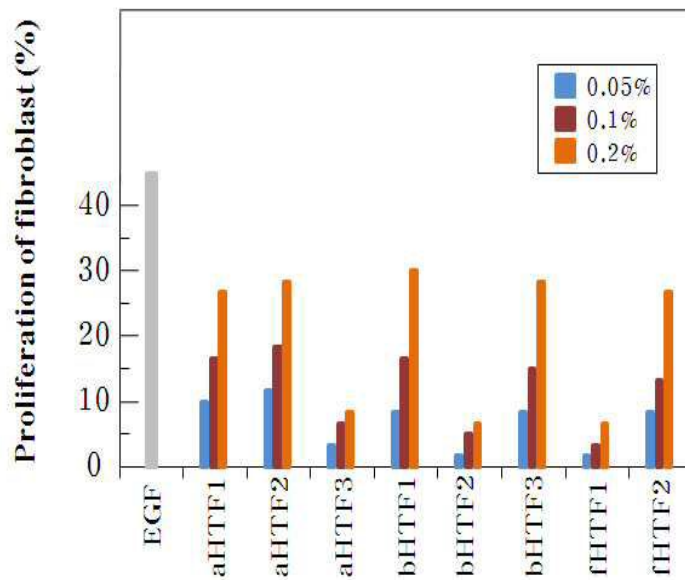
도면11



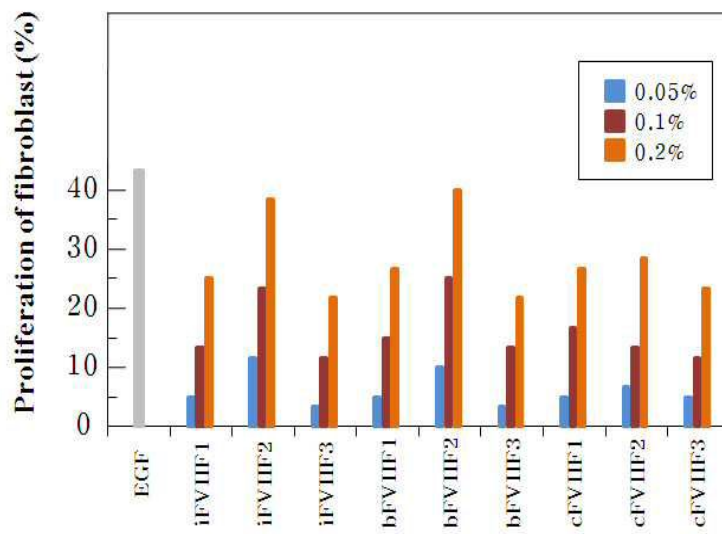
도면12



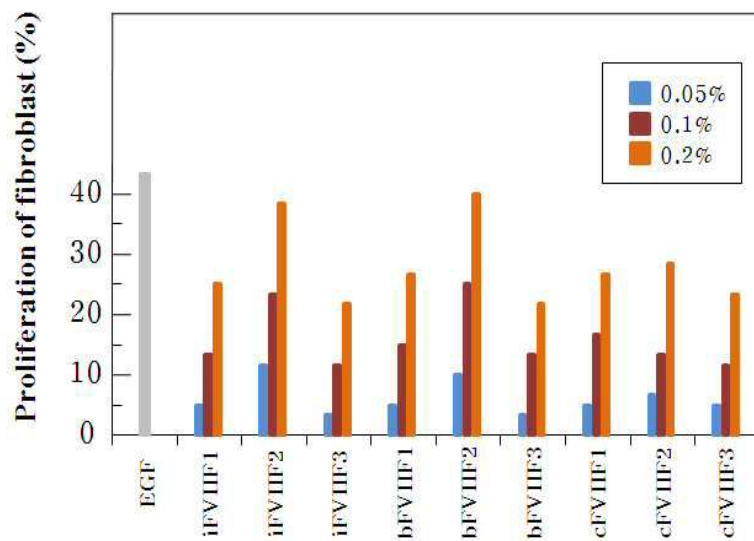
도면13



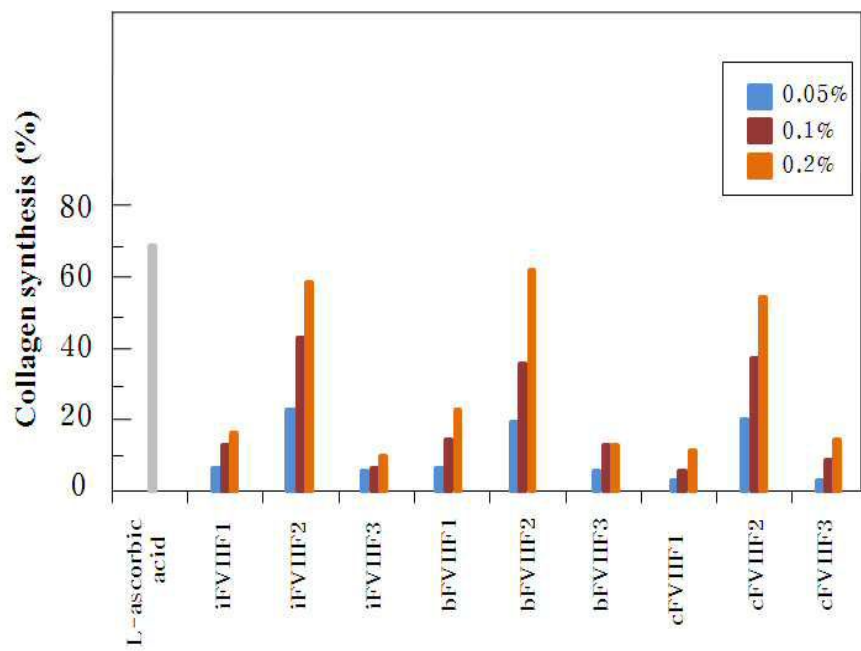
도면14



도면15



도면16



도면17

