



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0006002
(43) 공개일자 2012년01월17일

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0147656(분할)

(22) 출원일자 2011년12월30일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2008-0135655

원출원일자 2008년12월29일

심사청구일자 2008년12월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 중암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

이지원

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

송중암

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

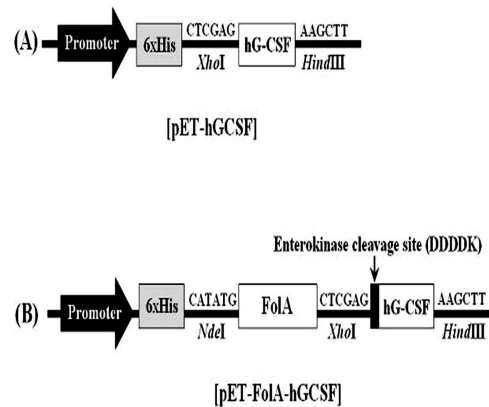
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 이수소 엽산 환원효소를 융합발현파트너로 이용한 가용성 재조합 단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; Fola)를 융합발현파트너로 이용하는 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)인 Fola 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현백터를 제조하는 단계, 2) 상기 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계, 및 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법, 및 상기 제조방법에 의해 제조된 재조합 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 Fola는 스트레스 환경하에서도 자체 구조적 안정성을 유지할 수 있는 대장균내 단백질로 이 단백질의 유전자를 융합발현파트너로 사용하여 재조합 단백질을 제조하는 방법은 기존의 융합발현파트너가 가지고 있는 가용성 및 접힘(folding) 능력을 향상시켜 목적 단백질의 구조적 안정성을 유지하며 높은 생산 수율로 발현시킬 수 있으므로, 의료용 및 산업용 단백질 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

한경연

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

박진승

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

서혁성

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

안금영

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

이중환

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

이은정

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

권수정

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; FolA)의 유전자, 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현백터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, FolA는 서열번호 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 외래 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 외래 단백질은 인간 과립구 군체 자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; hG-CSF)인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 발현백터는 FolA의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 단백질 제한효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위(enterokinase cleavage site), 제네나제(Genenase) I 인식부위 및 퓨린(Furin) 인식부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 발현백터는 골격 백터로서 pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a(+), pET-22b(+), 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균(*E.coli*)인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 배양은 단백질의 3차 구조 형성을 방해하는 스트레스 환경 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 스트레스 환경 조건은 2-HEDS(2-hydroxyethylidisulfide)가 첨가된 조건인 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 제조방법.

청구항 11

제 5항의 제조방법에 의해 제조된 재조합 단백질에 추가적으로 엔테로키나아제(enterokinase)를 첨가하는 단계를 포함하는 FoIA가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법.

청구항 12

융합발현파트너로서 FoIA의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 FoIA의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 14

제 13항에 있어서, 단백질 제한효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위(enterokinase cleavage site), 제네나제(Genenase) I 인식부위 및 퓨린(Furin) 인식부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 도 2(B)로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 16

제 12항의 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터.

청구항 17

제 15항에 있어서, 발현벡터는 골격 벡터로서 pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a(+), pET-22b(+), 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

청구항 18

제 16항의 발현백터가 형질도입된 형질전환체.

청구항 19

제 1항의 제조방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질.

청구항 20

제 5항의 제조방법에 의해 제조된 Fola가 제거된 가용성 외래 단백질.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; Fola)를 융합발현파트너로 이용하는 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)인 Fola 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현백터를 제조하는 단계, 2) 상기 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계, 및 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 제조방법, 및 상기 제조방법에 의해 제조된 재조합 단백질에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 과립구 군체 자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; hG-CSF)는 특정 hG-CSF 수용체(hG-CSFR)에 조합을 통해 중성호성 과립구 직계에 수용된 세포의 증식, 성장 및 성숙을 자극한다(Hartung et al., *Curr. Opin. Hematol.* 5:221-225, 1998). 상기 hG-CSF는 통상적으로 인간의 여러 종류의 호중구 감소증 치료에 사용된다. 이것은 임상적 사용이 허용된 소수의 성장인자중 하나이다. 특히, hG-CSF는 화학적 영양(CT)-유도 혈구감소증의 감소에 사용된다(Viens et al., *J. Clin. Oncology.* 20(1):24-36, 2002). 또한, 상기 hG-CSF는 임시 보조제로서 감염성 질병에 치료제로서 사용되어져 왔다(Hubel et al., *J. Infectious Diseases.* 185:1490-1501, 2002).

[0003] 대장균은 다른 숙주에 비해 상대적으로 빠른 성장 속도로 인한 고농도 배양이 가능하며 이미 모든 유전 정보가 밝혀져 있기 때문에 대량의 재조합 단백질을 생산하기 위한 균주로서 많이 사용되고 있다. 그러나 원핵세포인 대장균은 진핵세포에서 일어나는 여러 단계의 단백질 활성화형 3차 구조 형성과정을 수행할 수 없으므로 대장균 내에서 여러 유용한 외래 단백질을 활성화형으로 만드는 것은 아직도 큰 문제로 남아있다. 대장균의 단백질 발현 속도를 낮추어 목적 단백질의 가용도(solubility)를 높이기 위해, 대장균의 단백질 발현속도를 낮추어 저온 발현을 실행(Hammarstrom et al., *Protein Sci.* 11:313-321, 2002)하거나, 다양한 프로모터를 사용하여 유도 조건을 최적화(Qing et al., *Nat Biotechnol.* 22:877-882, 2004), 분자 샤페론 또는 단백질 접힘 조절자와 목적 단백질의 동시발현(de Marco and De Marco, *J Biotechnol.* 109:45-52, 2004) 등 많은 방법이 시도되고 있지만, 가장 보편적으로 사용하는 방법은 융합발현파트너와 목적 단백질을 동시에 발현시키는 융합발현시스템의 활용이다. 실제로 대장균 내에서 외래 단백질의 가용성 높은 발현을 유도하는 여러 융합발현파트너가 지난 수년 동안 연구되고 보고되어 왔다(Esposito and Chatterjee, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:353-358, 2006; Kapust and Waugh, *Protein Sci.* 8:1668-1674, 1999; Sachdev and Chirgwin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:933-937, 1998).

[0004] 대장균 내에서 과다 발현되는 재조합 단백질은 발현시 봉입체(inclusion body)로 알려진 불용성 응집체를 형성하는 경우가 많다고 알려져 있으며, 응집체로 발현된 재조합 단백질의 경우 접힘(folding) 중간체가 분자 상호간의 다이설파이드 결합(intermolecular disulfide bond) 또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 숙주세포의 다른 단백질 불순물들[샤페론(chaperon), 라이보솜(ribosome) 또는 초기인자 등]과 비선택적으

로 결합함으로써 제조합 단백질의 응집체 내 순도가 떨어지는 단점이 있다. 또한, 이렇게 발현된 단백질을 활성형으로 만들기 위해서는 구아니딘-하이드로클로라이드(Guanidine hychloride)나 우레아(urea)같은 변성제를 사용하여 용해시킨 후 희석하는 리폴딩(refolding) 과정을 거쳐야 하는데 이때 단백질이 활성형으로 접히지 않는 등 생산 수율이 감소하는 문제점이 있다(Marston, F. A., *Biochem. J.* 240(1):1-12, 1986).

[0005] 이러한 문제점을 극복하기 위해서 대장균 내에서 안정적으로 생산되는 것으로 알려진 가용성 단백질을 융합발현 파트너로 활용하여 목적 단백질에 융합시켜 목적하는 폴리펩타이드를 생산하는 방법들이 연구되었다. 지금까지 안정한 가용성 단백질로 많이 연구된 대표적인 융합발현파트너로는 말토오즈 결합단백질(Maltose binding protein, MBP), 베타-갈락토시다제(β -galactosidase), 싸이오레독신(Thioredoxin, Trx) 및 글루타티온-에스-전달효소(Glutathione-S-transferase, GST) 등이 있다. 이러한 융합발현파트너는 친화 크로마토그래피(affinity chromatography) 방법을 이용하여 원하는 목적 단백질을 쉽게 정제할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Bach et al., *J. Mol. Biol.* 312(1):79-93, 2001; Smith and Johnson, *Gene*. 67(1):31-40, 1988; LaVallie et al., *Biotechnology(NY)*. 11(2):187-193, 1993). 그러나 이러한 융합발현파트너들은 이미 여러나라에 특허로 등록되어 있어 그 쓰임에 많은 제약이 따른다. 따라서 융합발현파트너로서의 기능을 할 수 있는 새로운 융합발현파트너의 발굴이 필요하며 더불어 새로운 개념의 융합발현파트너 라이브러리 구축이 요구된다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 대장균에서 고부가가치의 의료용 또는 산업용 제조합 단백질을 가용성 상태로 발현시키기 위한 새로운 개념의 융합발현파트너 개발에 노력하던 중, 올바른 구조 형성이 어려운 2-HEDS(2-hydroxyethylhydrosulfide) 등의 스트레스 환경에서도 자체 구조적 안정성을 유지할 수 있는 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; FoIA)를 발굴하여 목적 단백질인 hG-CSF의 융합발현파트너로 이용하여 대장균에서 발현한 결과, 높은 가용성의 hG-CSF을 발현하였고 FoIA를 제거한 후에도 hG-CSF는 가용성 상태로 남아있었다. 결과적으로 가용성 hG-CSF의 발현량을 증가시키며 구조적 안정성을 유지시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 단백질의 접힘을 저해하는 강력한 스트레스 환경에서도 자체 구조적 안정성을 유지하는 대장균내 단백질인 이수소 엽산 환원효소를 다양한 목적 단백질에서 활용 가능한 범용성 융합발현파트너로 이용하여 천연형과 동일한 구조의 제조합 단백질을 가용성 상태로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0009] 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; FoIA)의 유전자, 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현백터를 제조하는 단계;
- [0010] 2) 상기 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- [0011] 3) 상기 형질전환체를 배양하여 제조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 제조합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 있어서, FoIA의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함하는 발현백터에 단백질 제한효소를 처리하는 단계를 포함하는 FoIA가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 융합발현파트너로서 FoIA의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 발현백터가 형질도입된 형질전환체를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은 상기 재조합 융합 단백질에 추가적으로 단백질 제한효소를 처리하여 제조된 F₀IA가 제거된 가용성 외래 단백질을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 강력한 스트레스 환경에서도 구조적 안정성을 유지하고 발현량이 증가되는 대장균 이수소 엽산 환원 효소(Dihydrofolate reductase; F₀IA)를 융합발현파트너로 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 방법으로 기존의 융합발현파트너가 가지고 있는 가용성과 접합에 관한 한계를 극복할 수 있으므로 고부가가치의 의료용 또는 산업용 재조합 단백질을 생산함에 있어 폭 넓게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 정상적인 환경 및 2-HEDS 스트레스 환경에서의 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 단백질체(proteome)를 비교 분석 결과를 나타내는 그림이다.

(A)는 정상적인 환경 하에서 대장균 단백질체의 2차원 겔 전기영동의 이미지를 나타내는 그림이다.

(B)는 2-HEDS 스트레스 환경에서의 대장균 단백질체의 2차원 겔 전기영동의 이미지를 나타내는 그림이다.

(C)는 정상적인 환경 및 2-HEDS 스트레스 환경에서의 F₀IA의 상대적인 스팟 강도를 비교한 그래프이다.

도 2는 인간 과립구 군체 자극인자(hG-CSF)의 단독 발현백터, 및 정제를 위한 His₆ tag 및 F₀IA 융합발현파트너를 잘라낼 수 있도록 엔테로키나아제 절단 부위를 삽입한 백터 디자인을 나타내는 그림이다.

(A)는 hG-CSF의 단독 발현백터를 나타내는 그림이다.

(B)는 His₆ tag 및 엔테로키나아제 절단 부위를 포함한 hG-CSF의 융합 발현을 위한 플라스미드 백터를 나타내는 그림이다.

도 3은 hG-CSF의 단독 발현, 및 F₀IA와 융합 발현을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 그림이다(M: 분자 마커; S: 재조합 대장균 유래 세포 용해물의 가용성 분획; 및 IS: 재조합 대장균 유래 세포 용해물의 불용성 분획).

(A)는 hG-CSF 단독 발현의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 그림이다.

(B)는 hG-CSF와 F₀IA 융합 발현의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 그림이다.

(C)는 hG-CSF의 단독 발현, 및 F₀IA와 hG-CSF의 융합 발현 세포의 가용성(%)을 나타내는 그래프이다.

도 4는 정제한 hG-CSF의 SDS-PAGE 분석과 그의 웨스턴 블랏(Western blot) 분석 결과를 나타내는 그림이다(M: 분자 마커; 1: 재조합 세포 용해물의 가용성 분획; 2: 정제된 hG-CSF의 가용성 분획; 및 3: 정제된 hG-CSF의 불용성 분획)(화살표는 정제한 hG-CSF를 나타낸다).

(A)는 엔테로키나아제 처리에 의해 F₀IA를 제거한 후, 정제한 재조합 hG-CSF의 가용성을 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

(B)는 엔테로키나아제 처리에 의해 F₀IA를 제거한 후, 정제한 재조합 hG-CSF의 웨스턴 블랏 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

도 5는 정제한 hG-CSF와 천연의 hG-CSF의 단백질 2차 구조의 변형여부 확인을 위한 원평광 이색성 분광(CD) 분석의 결과를 나타내는 그래프이다.

(A)는 F₀IA:hG-CSF로부터 분리된 정제한 재조합 hG-CSF를 원평광 이색성 분광(CD)으로 분석한 결과를 나타내는

그림이다.

(B)는 상업용 표준 hG-CSF를 원평광 이색성 분광(CD)으로 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 용어 "외래 단백질(heterologous protein)" 또는 "목적 단백질(target protein)"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 용어 "재조합 단백질(recombinant protein)" 또는 "융합단백질(fusion protien)"은 원래의 외래단백질의 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다. 본 발명의 융합발현파트너와 목적 단백질이 연결된 재조합 융합 단백질 형태 또는 단백질 절단효소에 의해 융합발현파트너가 재조합 융합 단백질로부터 제거된 목적 단백질의 재조합 단백질을 의미한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 이수소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; FdIA)의 유전자, 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현벡터를 제조하는 단계;
- [0026] 2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- [0027] 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0028] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 FdIA는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 서열과 90% 이상의 높은 상동성을 가지는 서열은 모두 사용가능하다.
- [0029] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 외래 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 단백질을 사용하는 것이 바람직하고, 인간 과립구 군체 자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; hG-CSF)를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 제조방법에 있어서, 단계 2)의 숙주세포는 대장균(*E.coli*)을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 발현벡터의 FdIA의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함시켜 제조한 재조합 융합 단백질에 단백질 제한효소를 처리하는 단계를 포함하는 FdIA가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 제조방법에 있어서, 단백질 제한효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위(enterokinase cleavage site), 제네나제(Genenase) I 인식부위 및 퓨린(Furin) 인식부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 엔테로키나제 인식부위인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 본 발명자들은 대장균 단백질체(proteome) 중 산화제인 2-HEDS(2-hydroxyethyl disulfide)에 대항하여 높은 가용도로 고수율 발현되는 단백질이 존재하고, 그 단백질은 자체 접힘 능력이 우수하여 결국 목적 단백질의 가용

도를 높이고 활성형을 유지시켜줄 수 있는 융합발현파트너로 사용될 수 있을 것이라는 가정 하에, 대장균의 일반 환경에서의 단백질과 2-HEDS 스트레스 상태에서의 단백질을 2차 전기영동 및 MALDI-TOF을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 올바른 구조 형성을 저해하는 스트레스 환경에서 가용성 상태로 발현량이 4.5배 이상 증가한 단백질인 FoIA를 동정하였다(도 1 참조). 대부분의 단백질이 불용성 응집체를 이루거나 발현량이 줄어드는 환경 하에서 FoIA 단백질의 가용성 발현량이 반대로 증가한다는 결과를 통해서 FoIA 단백질은 구조적으로 매우 안정할 뿐만 아니라 본래의 기능이 스트레스에 대항하는 메카니즘에 관련되어있음을 알 수 있다. 따라서 스트레스에 따른 대장균 단백질체 분석을 통해서 확보한 FoIA가 융합발현파트너로서 이용할 수 있음을 알 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 FoIA 단백질을 융합발현파트너로서의 효율성을 검증하기 위해, FoIA를 hG-CSF의 아미노 말단에 융합하여 대장균용 발현 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 제조(도 2 참조)한 후, 대장균 균주에 형질도입하여 형질 전환체를 제조하여 목적 단백질들을 함유하는 산물을 획득한 다음, 상기 산물을 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 대장균 내에서 단독 발현한 hG-CSF가 대부분 불용성 응집체를 형성하는 반면에(도 3A 참조), FoIA를 융합발현파트너로 사용하여 발현한 재조합 hG-CSF는 가용성 발현량이 90% 이상으로 현저히 증가한 것을 알 수 있었다(도 3B 및 도 3C참조). 따라서 FoIA를 융합발현파트너로서 사용하였을 경우 불용성 응집체를 형성하기 쉬운 hG-CSF를 가용성 상태로 발현할 수 있도록 유도하는데 있어서 탁월한 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

[0035] 본 발명자들은 의학적 치료용으로 사용되는 hG-CSF가 항원항체반응을 피하기 위해 융합발현파트너로부터 분리되어야 함을 근거로, FoIA를 hG-CSF로부터 분리하더라도 단독으로 남은 hG-CSF가 가용성 상태를 유지할 수 있는지 알아보기 위해, 엔테로키나아제(enterokinase)를 이용하여 재조합 hG-CSF로부터 FoIA를 제거한 후, 금속 크로마토그래피를 이용하여 재조합 hG-CSF를 정제한 다음, SDS-PAGE 및 웨스턴블랏(Western blot)을 이용하여 분석하였다. hG-CSF는 인체 내에서 먼저 전구체로 만들어지고, 이 전구체가 프로티아제(protease)에 의한 변화과정을 거쳐 Thr-Pro-Leu의 N-말단 아미노산 서열을 가지는 hG-CSF로 만들어진다. 그러나, 대장균에서 발현시킬 경우 아미노 펩티다아제 효소역가에 따라 시작코돈(start codon)에 해당하는 메티오닌(methionine)이 N-말단에 존재하게 되어 경우에 따라 N-말단의 메티오닌이 제거되지 않은 단백질이 혼재하게 되는데 정제과정 중에 이의 제거가 매우 어렵고, 비활성의 불용성 단백질로 발현될 경우 활성을 가지는 가용성 형태로 만들어주는 과정을 거쳐야 하는데, 이때 수율이 떨어지는 단점이 있다. 본 발명에서는 엔테로키나아제로 절단하여 메티오닌(methionine)이 제거된 hG-CSF를 제조함으로써 이러한 단점을 극복하였다. 상기 분석 결과, FoIA가 제거된 재조합 hG-CSF는 여전히 가용성 상태로 존재하고 있음을 확인하였다(도 4 참조).

[0036] 본 발명자들은 FoIA 단백질을 융합발현파트너로 이용한 hG-CSF의 생산방법이 hG-CSF 고유의 구조를 유지하도록 유도하여 발현시키는지 여부를 알아보기 위해, 상기 정제된 재조합 hG-CSF와 상업적으로 판매되고 있는 hG-CSF의 단백질 2차 구조의 변형 여부를 원평광 이색성 분광(CD) 분석을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 정제된 재조합 hG-CSF가 치료용으로 쓰이고 있는 hG-CSF와 동일한 단백질 2차 구조를 가짐을 확인하였다(도 5 참조).

[0037] 따라서, 본 발명의 FoIA를 융합발현파트너로 이용한 재조합 단백질의 제조방법은 의료용 또는 산업용 발현 재조합 단백질을 높은 비율의 가용성 단백질로 발현할 수 있으며 천연형과 동일한 단백질 구조를 형성할 수 있으므로, 불용성 응집체에 요구되었던 변성제나 환원제에 의한 리폴딩(refolding) 과정을 생략할 수 있어 효율적인 생산 공정을 구축할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 융합발현파트너로서 FoIA의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0039] 상기 발현벡터는 골격 벡터에 융합 파트너로서 FoIA의 유전자와 외래 단백질의 유전자가 작동 가능하게 연결되어 포함되며, 상기 골격 벡터는 pT7, pET/Rb, pGEX, pET28a(+), pET-22b(+), 및 pGEX로 이루어진 군으로부터 선택되는 대장균에 형질전환 가능한 다양한 벡터를 사용하는 것이 바람직하고, pET28a(+))를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 발현벡터는 FoIA의 유전자와 외래 단백질의 유전자가 작동 가능하도록 연결되기 위해, FoIA의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결될 수 있다. 융합발현파트너와 목적 단백질이 산업용 단백질일 경우, 융합발현파트너가 목적 단백질의 기능을 저하할 수도 있으며, 의학용 단백질일 경우는 항원항체 반응을 야기할 수 있으므로 융합발현파트너는 제거되는 것이 바람직하다. 이

때, 상기 단백질 절단효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위, 제네나제(Genenase) I 인식부위 또는 푸린(Furin) 인식부위가 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다.

[0041] 상기 발현백터는 FoIA의 유전자와 외래 단백질의 유전자가 작동 가능하게 연결되기 위해, 재조합 단백질의 분리정제가 용이하도록 분리정제용 태그를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결될 수 있다. 이때, 상기 분리정제용 태그는 GST, poly-Arg, FLAG, poly-His 및 c-myc로 구성된 군으로부터 선택된 것이 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 발현백터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제공한다.

[0043] 상기 발현백터는 융합발현파트너로서 FoIA의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 FoIA는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 서열과 90% 이상의 높은 상동성을 가지는 서열은 모두 사용가능하다. 상기 외래 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 생물학적 활성을 갖는 단백질을 사용하는 것이 바람직하고, hG-CSF를 사용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 숙주세포는 대장균(*E.coli*)을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0044] 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0045] 아울러, 본 발명은 재조합 융합 단백질에 추가적으로 엔테로키나아제(enterokinase)를 첨가하여 제조된 FoIA가 제거된 가용성 외래 단백질을 제공한다.

[0046] 본 발명의 FoIA를 융합발현파트너로 이용한 제조방법으로 제조된 재조합 단백질은 높은 비율의 가용성으로 발현되고, 천연형과 동일한 단백질 구조를 형성하므로, 불용성 응집체에 요구되었던 변성제나 환원제에 의한 리폴딩(refolding) 과정을 생략할 수 있다. 고부가가치의 의약품 또는 산업용 재조합 단백질을 목적 단백질로 이용하여 이를 생산할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0048] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] <실시예 1> 대장균 단백질체 분석

[0050] <1-1> 대장균에서 가용성 단백질의 회수

[0051] 본 발명자들은 단백질체 분석을 위해 대장균 BL21(DE3) 균주를 선택하였다. 하룻밤 동안 배양된 종균 배양액의 일부를 정상 조건에서의 단백질체를 얻기 위해, LB 액상배지에 접종한 다음 37℃에서 200 rpm으로 배양하였다(대조군). 스트레스 조건에서의 단백질체를 얻기 위해, 2-HEDS(10 mM)을 포함하는 LB 배지에 종균 배양액의 일부를 접종하여 동일한 조건에서 배양하였다(실험군). 대장균은 모두 OD₆₀₀가 0.5에 도달하였을 때 IPTG(1 mM)에 의해 유도(induction)되었다. 세포배양액을 4℃에서 6,000 rpm으로 원심 분리하여 균체침전물을 회수한 뒤 40 mM 트리스 완충액(Tris buffer)(pH 8.0)으로 2회 세척하였다. 세척된 대장균 침전물을 500 μ l의 파쇄 완충액[lysis buffer; 8M 우레아(urea), 4%(w/v) 쉵스(CHAPS), 40 mM 트리스(Tris), 단백질 분해효소 제한 혼합물(protease inhibitor cocktail)]에 현탁한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 균체 파쇄 후 12,000 rpm, 4℃에서 60분간 원심분리 하여 균체 파쇄물을 제거한 뒤 상등액을 따로 분리하였다. 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit)를 이용하여 분리된 상등액의 단백질 농도를 측정하였다. 30 mg의 가용성 단백질을 포함하고 있는 상등액을 분획하여 재수화 용액[rehydration solution; 2M 싸이오우레아(thiourea), 8M 우레아(urea), 4% w/v 쉵스(CHAPS), 1% w/v DTT, 1% w/v 이동성 양성전해질(carrier ampholyte), pH 4.7]에 현탁하여 2차원 겔 전기영동(2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2D-PAGE)용 시료로 -80℃에 냉동보관하였다.

[0052] <1-2> 2차원 겔 전기영동을 통한 대장균 단백질체 분석

[0053] 2차원 겔 전기영동을 이용하여 실시예 <1-1>의 방법으로 수득한 대조군과 실험군의 단백질체를 분석하였다.

[0054] 상기 냉동보관된 단백질을 pI별로 분리하기 위한 1차원 등전점 분리과정은 바이오-라드 단백질 IEF cell 전기영동장치(Bio-Rad Protein IEF cell electrophoresis system)를 이용하였으며, 선형 pH 4-7 범위의 IPG 겔 스트립(17 cm, ReadyStrip)을 이용하여 재수화 용액에 포함되어 있는 단백질을 하루 밤 동안 재수화 하였다. 500 V에서 2시간, 1000 V에서 30분, 2000 V에서 30분, 4000 V에서 30분, 8000 V에서 70000 Vhr(Volt-hours) 동안 진행하였다. 재수화된 IPG 겔 스트립은 1% DTT를 포함하고 있는 평형화 용액[epuilibrium solution; 50 mM 트리스(Tris), pH 8.6, 6 M 우레아(urea), 30% v/v 글리세롤(glycerol), 2% SDS, 약간의 브로모페놀 블루(bromophenol blue)]에서 15분간 반응시킨 뒤 2.5% 아이오도아세트아마이드(iodoacetamide)가 포함된 평형화 용액에서 15분간 반응시켰다. 평형화된 겔 스트립은 12.5 % 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동 한 뒤, Rabilloud방법[Methods. Mol. Biol. 112:297-305 (1999)]에 따라 은-염색(silver staining)한 후에 UMAX powerlook 1100 scanner로 스캔을 하고 Image Master software v 4.01(Amersham Biosciences)을 이용하여 단백질 스팟을 검출하였다. 단백질 스팟의 부피를 측정하여 37℃ 정상 조건에서 분리한 단백질을 기준으로 2-HEDS(10 mM) 하에서 분리한 단백질의 발현량의 증감을 상대적으로 비교 분석한 뒤, 일반 배양조건의 경우보다 스팟 부피가 4.5배 이상 증가한 단백질을 선정하였다(도 1).

[0055] <실시예 2> MALDI-TOF-MS 분석 및 단백질 동정

[0056] 본 발명자들은 상기 <실시예 1>에 의해 선정된 단백질 스팟을 추출하여 한국기초과학연구소에 기탁하여, MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight)-MS분석을 이용하여 동정하였다.

[0057] 구체적으로, MALDI-TOF-MS 분석을 위해서 상기 <실시예 1>에 의해 선정된 단백질 스팟을 은-염색된 겔로부터 추출하였다(Gharahdaghi F, et al., Electrophoresis, 20:601-605, 1999). 추출된 단백질 스팟을 단백질 스팟을 25 mM 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate, pH 8.0) 용액에서 트립신(trypsin, 10.15 mg/ml) 분해 과정을 37℃에서 하루 밤 동안 진행하였다. 분해된 펩타이드는 5% v/v TFA, 50% v/v ACN 용액을 이용하여 추출하였으며, 이 과정을 세 번 반복한 뒤 진공 원심분리기를 이용하여 건조시켰다. 건조된 펩타이드를 50% ACN/0.1% TFA 용액에 용해시킨 뒤, 한국기초과학연구소에 기탁하여 MALDI-TOF-MS 시스템(Voyager DE-STR instrument; Biosystems, USA)을 이용하여 분자량을 측정하였다. 측정된 펩타이드의 질량 지문(peptide mass fingerprints)은 Prospector 웹사이트 MS-FIT(<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm>)을 이용하여 수행하였으며 단백질 동정을 위한 MS-FIT 데이터베이스로는 Swiss-Prot을 이용하였다. 단백질 동정을 수행한 결과, 2-HEDS 스트레스 하에서 발현량이 4.5배 이상 증가한 단백질은 대장균 이소소 엽산 환원효소(Dihydrofolate reductase; Fola)로 확인되었다(표 1).

표 1

[0058] 2-HEDS 스트레스 조건에서 발현량이 4.5배 이상 증가한 단백질의 동정 결과

유전자 이름 ^a (유전자 접근번호)	단백질 이름 ^a	등전점(pI)/ 분자량(kDa)	서열 유사성 ^b (%)	접힘 변화
folA (P0ABQ4)	이소소 엽산 환원효소	4.84/17.99	22	4.69±0.19

[0059] a:유전자 접근 번호: ExpASY Proteomics Server(<http://www.expasy.org/>)에서 유전자 정보 검색용 식별번호이다.

[0060] b:이론값은 Compute pI/Mw tool(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 수집하였다.

[0061] <실시예 3> hG-CSF의 단독 발현 벡터, 및 Fola 융합 발현벡터의 제조

[0062] 본 발명자들은 Fola를 융합발현파트너로 이용하여 hG-CSF의 가용성 발현 유도를 확인하기 위해, hG-CSF의 단독

발현, 및 상기 융합발현파트너와의 융합 발현을 위한 발현백터를 각각 제조하였다.

[0063] hG-CSF의 단독 발현백터를 제조하기 위해서 hG-CSF의 5'-말단에 *Xho*I, 3'-말단에 *Hind* 제한효소 인지부위를 포함하도록 인간 유래 G-CSF의 cDNA 서열을 가지는 백터를 주형으로 하여 hG-CSF 유전자의 염기 서열을 갖는 두 종류의 합성 DNA[프라이머 I: 5'-CTCGAGGACGATGACGATAAAACCCCTGGGCCCTGCC-3(서열번호: 2)'과 프라이머 II: 5'-AAGCTTTCAGGGCTGGGCAAGGTGGCG-3(서열번호: 3)']를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)하였다. 상기 PCR은 DNA 중합효소반응용 완충액[0.25 mM dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl(pH8.8), 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100]에 주형(template) DNA 100 ng, 각각의 프라이머 50 pmol을 넣은 다음, Taq DNA 중합효소를 이용하여 수행하였고 반응 조건으로는 95℃에서 30초(denaturation), 52℃에서 30초(annealing), 72℃에서 60초(elongation)로 설정하여 총 30회 수행하였다(이하, 기술되는 모든 PCR은 특별한 언급이 없는 한 상기의 조건을 따른 것이다). hG-CSF는 시작코돈이 제거되고 정지코돈을 갖는 총 175개의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하였으며 hG-CSF의 N-말단 부위에는 *Xho*I 제한효소 부위에 바로 이어서 엔테로키나아제(enterokinase)에 의한 절단부위(DDDDK; 서열번호: 6)를 갖도록 설계하였다. 증폭된 hG-CSF를 코딩하는 유전자를 *Xho*I/*Hind*III로 잘라내고 잘려진 단편을 대장균 발현백터 pET-28a(+)(Novagen)의 *Xho*I/*Hind*III 자리에 삽입하였다. 이렇게 만들어진 플라스미드를 'pET-hGCSF'라고 명명하였다.

[0064] 융합발현백터를 제조하기 위해서 대장균[*E. coli* strain BL21(DE3) [*F*⁻ *ompT* *hscS*_B(rB mB⁻)]의 게놈(genomic) DNA를 추출하고 이를 주형으로 하여 정지 코돈을 제외한 159개 아미노산(서열번호: 1)으로 구성된 F_{olA}를 5'-말단에 *Nde*I, 3'-말단에 *Xho*I 제한효소 인지부위를 포함하도록 설계하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)하였다. 상기 PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다: 1) 5'-CAT ATG ATC AGT CTG ATT GCG GCG-3(서열번호: 4)' 2) 5'-CTC GAG CCG CCG CTC CAG AAT CTC-3(서열번호: 5)'. 이렇게 증폭된 F_{olA}를 코딩하는 *Nde*I/*Xho*I 단편을 잘라낸 후 상기 단독발현 백터의 *Nde*I/*Xho*I 자리에 삽입하였고 이를 'pET-F_{olA}-hGCSF'라고 명명하였다(도 2).

[0065] <실시예 4> 재조합 단백질의 가용성 발현 및 SDS-PAGE를 이용한 확인

[0066] <4-1> 대장균 형질전환체의 제조

[0067] 본 발명자들은 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1 109-135, IRS press 1985)에 의해 상기 <실시예 3>에서 제조한 발현백터인 pET-hGCSF 및 pET-F_{olA}-hGCSF를 대장균 BL21(DE3)(Studier and Moffatt, *J. Mol. Biol.* 189(1):113-130, 1986)에 열충격 방법으로 형질전환시킨 형질전환체를 제조한 다음, 카나마이신이 포함된 LB배지(+100 mg/L 카나마이신)에서 배양하여 카나마이신에 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다.

[0068] <4-2> 대장균 형질전환체의 배양 및 유전자 발현

[0069] 상기 재조합 발현 백터로 형질 전환된 대장균 형질전환체를 이용하여 단독의 hG-CSF 및 F_{olA}와 융합된 hG-CSF를 생산하였다. 8시간 이상 배양된 종균 배양액의 일부를 본 배양 LB배지(+100 mg/L 카나마이신)에 접종(1%)한 다음 37℃에서 200 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD₆₀₀가 0.5에 이르렀을 때에 1 mM IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside)를 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건으로 4시간 더 배양한 다음 세포배양액을 4℃에서 6,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체 침전물을 회수하였고, 회수된 균체 침전물을 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 현탁한 다음, 초음파 파쇄기(Branson Sonifier)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄 후에 원심분리(13,000 rpm × 10분)하여 상층액과 단백질 응집체를 분리하고, 분리한 상층액과 불용성 응집체를 각각 5 × SDS(0.156 M 트리스-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 37.5% 글리세롤, 37.5 mM DTT)와 1:4로 섞어 100℃에서 10분간 끓였다. 끓인 시료는 12% SDS-PAGE 겔(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)(12% Tris-Glycine gel)에 로딩하고 120 V에서 3시간 동안 시료를 전개한 다음, 쿠마시 염색 방법으로 염색한 후 탈색함으로써 각각의 재조합 단백질의 발현량을 농도계(Densitometer, Bio-Rad, USA)로 확인하고, 수학적 1에 따라 용해도(%)를 계산하였다.

수학식 1

$$\text{용해도}(\%) = \frac{\text{상등액단백질총량}(\mu\text{g}) \times 100}{\text{상등액단백질총량}(\mu\text{g}) + \text{침전물단백질총량}(\mu\text{g})}$$

[0070]

[0071]

그 결과, FoIA 없이 hG-CSF가 단독 발현된 경우 가용성 정도는 4% 미만에 불과한 반면에, FoIA와 hG-CSF가 융합 발현된 경우에는 90% 이상으로 현저히 증가된 것을 확인하였다(도 3).

[0072]

<실시에 5> 융합 발현된 hG-CSF의 정제 및 분석

[0073]

본 발명자들은 상기 <실시에 4>에서 제조한 융합발현 벡터(pET-FoIA-hGCSF)로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)를 이용하여 재조합 단백질을 생산한 후 이를 정제 및 분석하였다. 상기 형질전환체는 pET-28a(+)를 사용했기 때문에 발현된 융합 단백질의 N-말단 부위에는 6개의 히스티딘(histidine)이 위치하고 히스티딘의 금속친화력으로 인해 Ni^{2+} 금속 친화 크로마토그래피를 통한 정제가 가능하므로 Ni-NTA 아가로스 비드(Agarose bead)(QIAGEN)를 사용하여 Ni^{2+} 금속 친화 크로마토그래피를 수행 및 정제하였다.

[0074]

구체적으로, 세포를 파쇄한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 분리된 상등액을 금속친화를 이용한 정제를 위해서 Ni-NTA 아가로스 비드(QIAGEN) 500 mL과 결합시켰다. Ni-NTA 아가로스 비드와 반응시키기 전에 결합 완충액(binding buffer)[pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨(NaCl), 10 mM 이미다졸(imidazole)]을 사용하여 세척하였다. FoIA와 융합발현된 융합단백질[(His × 6)FoIA-(엔테로키나아제 부위)hGCSF]이 포함되어 있는 상등액과 Ni-NTA 아가로스 비드의 결합은 4℃에서 진행하였고 2시간 이상 충분히 결합시킨 후, 8 mL의 세척 완충액(washing buffer)[pH 8.0, 50 mM 소듐 포스페이트(sodium phosphate), 300 mM 염화 나트륨(NaCl), 50 mM 이미다졸(imidazole)]을 이용하여 두 번 세척하였다. 다음 단계로 PBS 완충 용액[PBS buffer; 137 mM 염화 나트륨(NaCl), 2.7 mM 염화 칼륨(KCl), 10 mM 제 1인산나트륨(Na_2HPO_4), 2 mM 제 1인산칼륨(KH_2PO_4), pH 7.4]을 이용하여 한번 더 추가로 세척하였다. 아가로스 비드에 붙어 있는 (His × 6)FoIA-(엔테로키나아제 부위)hGCSF에 엔테로키나아제 용액(enterokinase solution)[엔테로키나아제 5 μL , 10 × 엔테로키나아제 완충용액 50 μL , PBS 445 μL (Invitrogen)] 500 μL 을 첨가하여 22℃에서 12시간 반응시키고 용리 분획(elution fraction)을 받아 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 가용성과 불용성 용액을 분리하였다. 분리한 샘플은 SDS-PAGE 분석을 통해 FoIA가 제거된 후에도 hG-CSF가 여전히 가용성 상태로 남아 있음을 확인하였고 이렇게 정제된 hG-CSF는 마우스 항-인간 G-CSF 단일클론 항체(mouse anti-human G-CSF monoclonal antibody)(Clone 3D1, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA)를 이용한 웨스턴 블랏(Western blot) 분석을 통하여 확인할 수 있었다(도 4).

[0075]

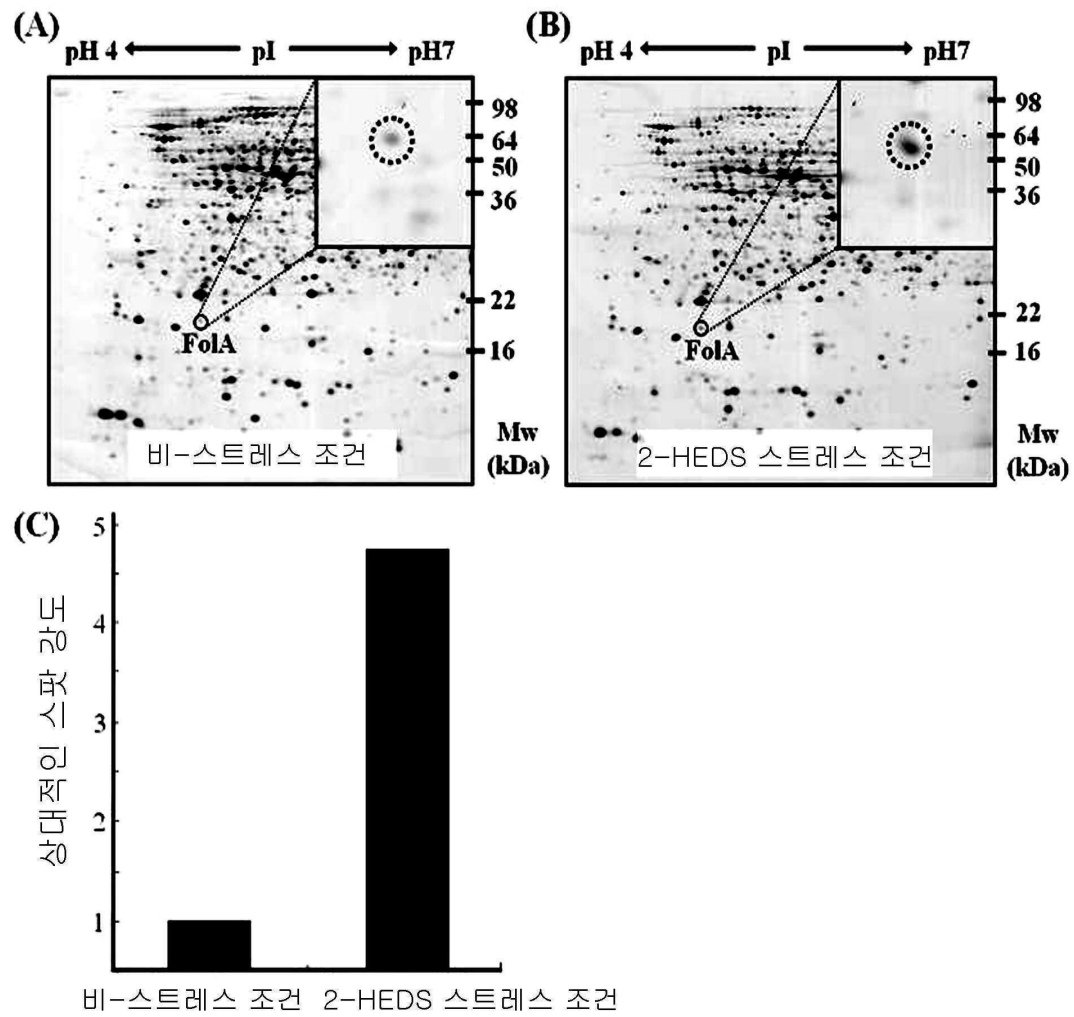
<실시에 6> 원편광 이색성 분광(CD) 분석을 통한 단백질 2차 구조 확인

[0076]

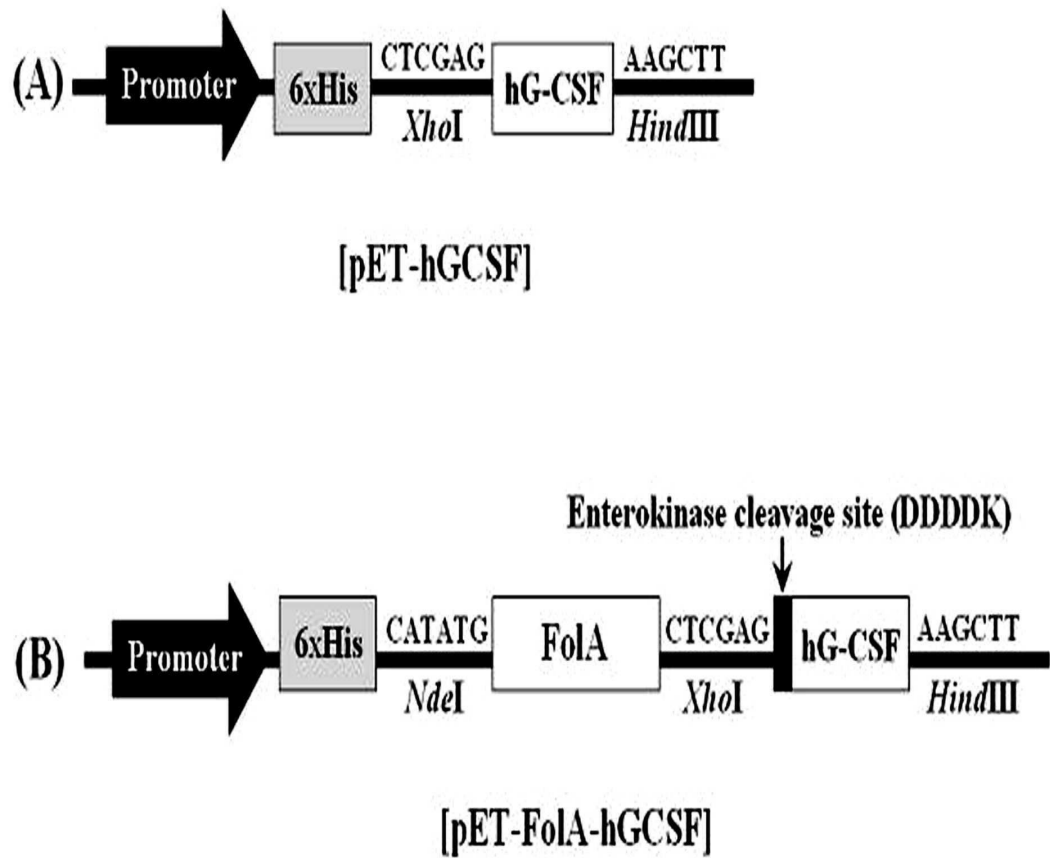
본 발명자들은 EK-AwayTM resin(Invitrogen, Germany, Cat. No. R180-01)을 이용하여 상기 정제 중 사용되었던 엔테로키나아제를 제거하고, 엔테로키나아제가 제거된 용액은 microcon YM-10(Millipore, Ireland)으로 CD 분석을 위해 필요한 양만큼 농축(0.4167 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)하여 분석을 위한 샘플을 준비했다. 상기 준비된 재조합 hG-CSF 샘플은 한국기초과학지원연구원(오창)에 의뢰하여 JASCO J-710 분광편도계(spectropolarimeter)에 의해 원편광 이색성 분광(CD)을 분석하였다. 상기 방법으로 정제된 재조합 hG-CSF와 현재 치료용으로 판매되고 있는 hG-CSF[Grasim Prefilled-Syringe(Filgrastim), Kirin, Japan]의 단백질 2차 구조를 비교 분석한 결과, 동일한 단백질 2차 구조를 가짐을 확인하였다(도 5).

도면

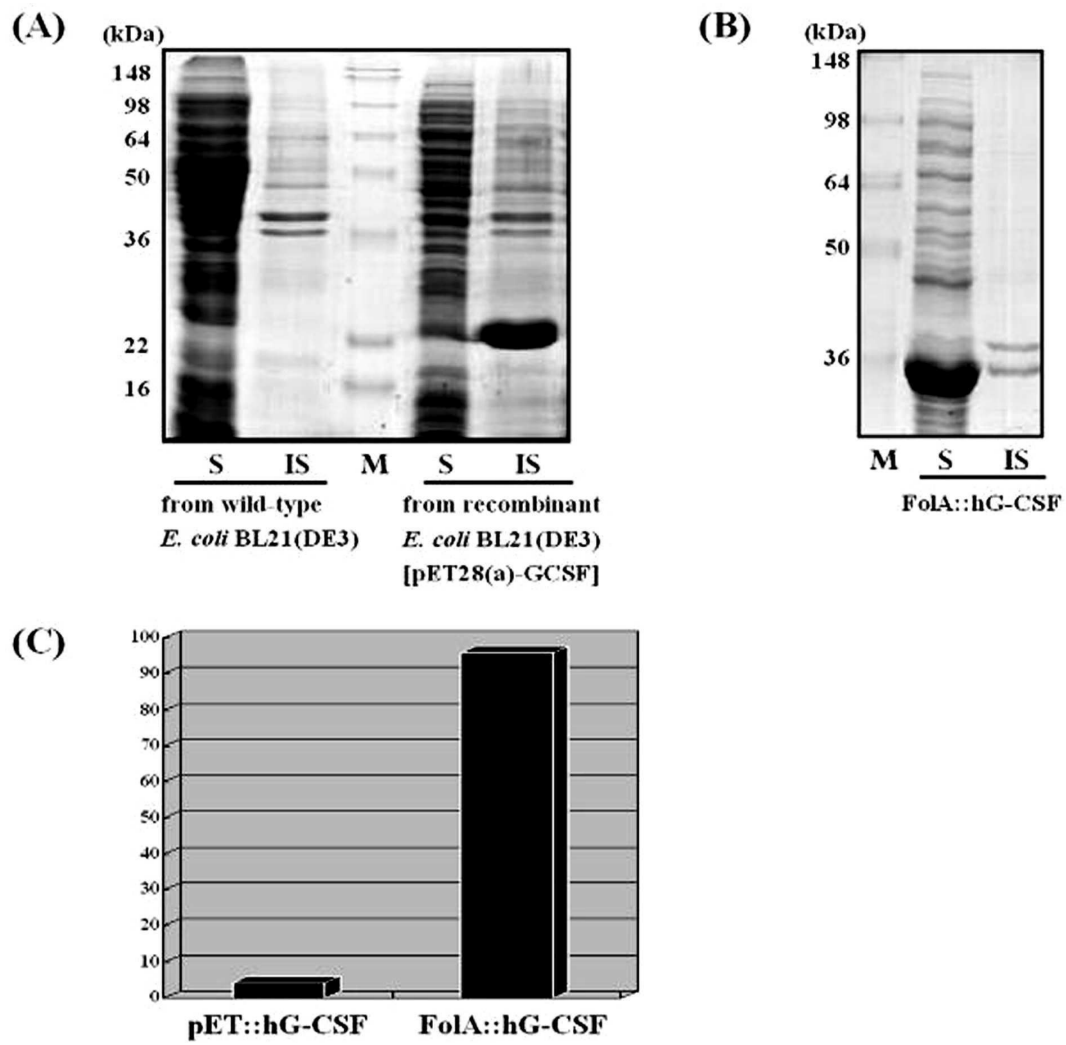
도면1



도면2

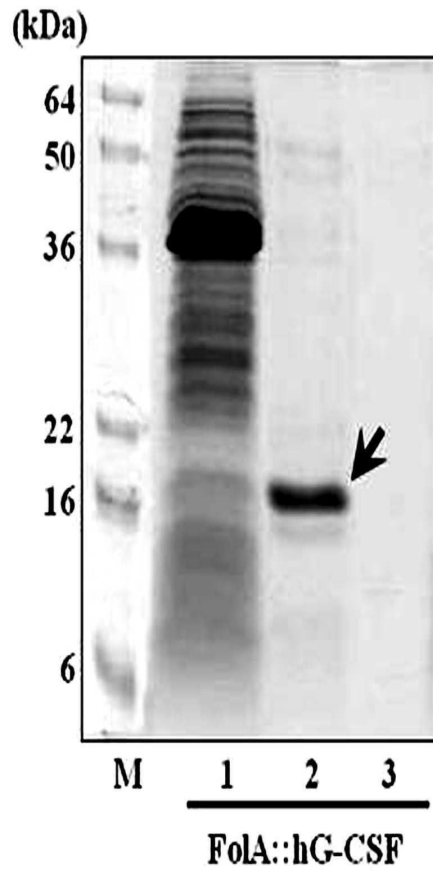


도면3

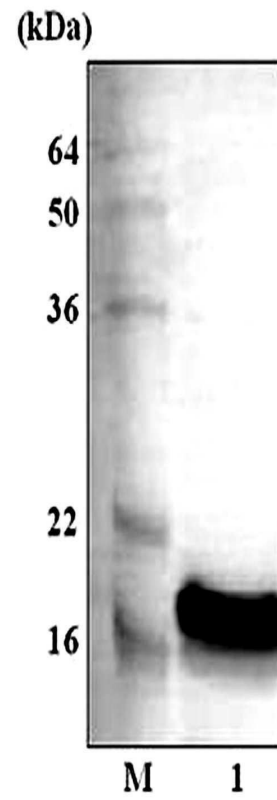


도면4

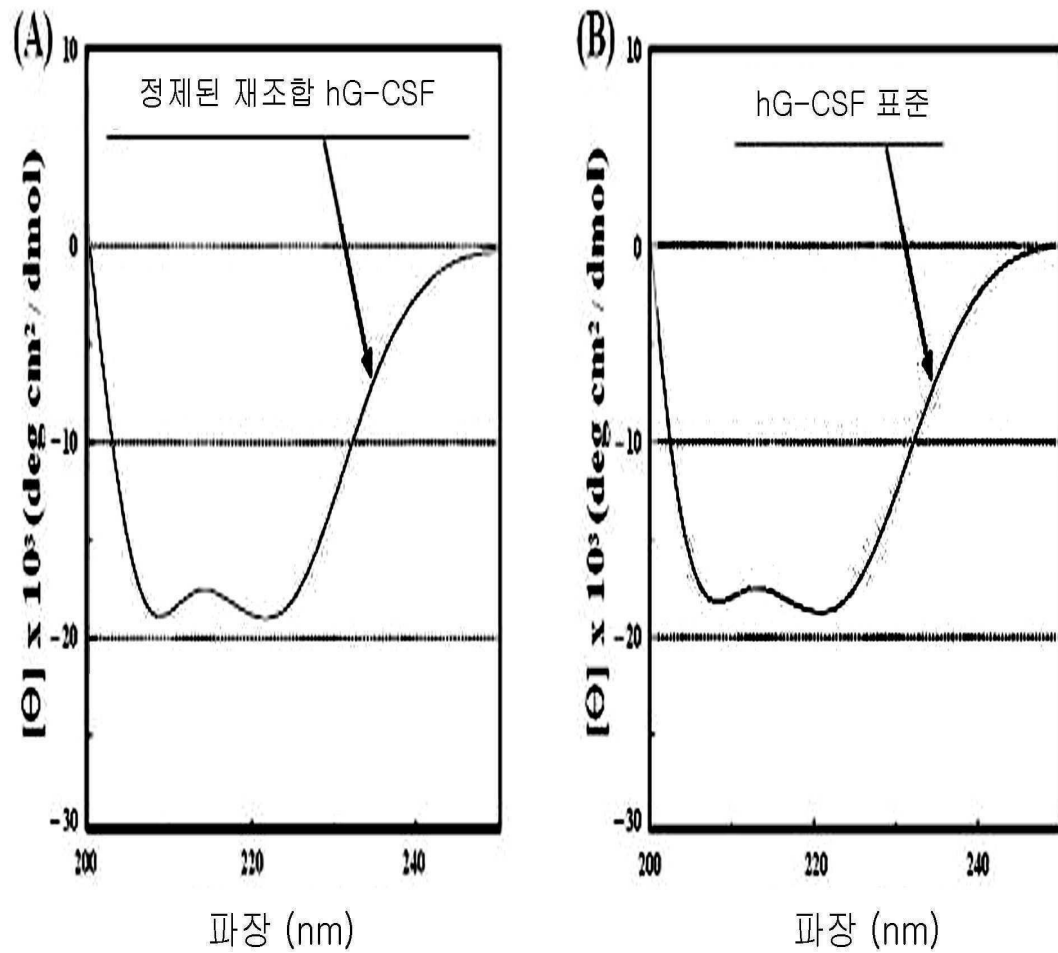
(A)



(B)



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> A preparation method of solubility recombinant protein by use of Dihydrofolate reductase as a fusion expression partner
- <130> 11p-12-59
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 159
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <400> 1

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly Met

1 5 10 15

Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp Phe Lys

20 25 30

Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His Thr Trp Glu

35 40 45

Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile Ile Leu Ser Ser

50 55 60

Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val Lys Ser Val Asp Glu

65 70 75 80

Ala Ile Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Glu Ile Met Val Ile Gly Gly

85 90 95

Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu

100 105 110

Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr

115 120 125

Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp

130 135 140

Ala Gln Asn Ser His Ser Tyr Cys Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg

145 150 155

<210> 2

<211> 39

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hG-CSF primer I

<400> 2

ctcgaggacg atgacgataa aacccccctg ggccctgcc

39

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hG-CSF primer II

<400> 3

aagctttcag ggctgggcaa ggtggcg

27

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fola primer I
 <400> 4
 catatgatca gtctgattgc ggcg 24

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fola primer II
 <400> 5
 ctcgagccgc cgctccagaa tctc 24

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> enterokinase cleavage site
 <400> 6

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5