



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0023099
(43) 공개일자 2018년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/565 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/565 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0107046
(22) 출원일자 2016년08월23일
심사청구일자 2016년08월23일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
오덕재
서울특별시 광진구 아차산로 76길 31 광나루 현대아파트 103-1045호
김수연
경기도 하남시 신평로 81 204동 1101호 (덕풍동, 진모루현대아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

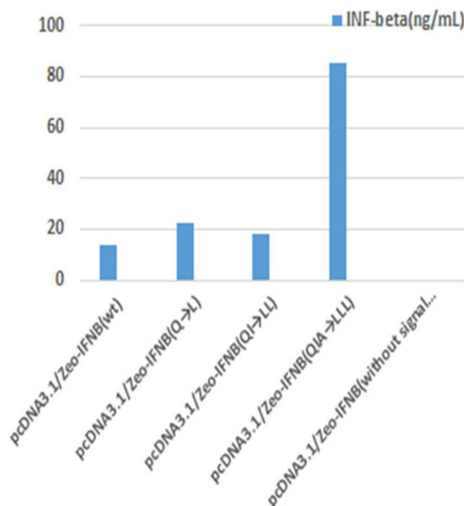
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 및 이를 이용한 목적 단백질의 생산방법에 관한 것이다 본 발명에 따른 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체는 소수성 부위의 소수성 성질 및 알파-헬릭스 구조를 보다 강화시킨 것으로서, 이를 재조합 벡터 및 숙주세포 시스템에 적용한 결과, 종래의 기술에 비해 숙주 세포의 재조합 단백질 발현량이 현저하게 증진됨을 확인할 수 있었는데, 본 발명을 이용하여 목적 단백질의 생산 효율을 효과적으로 증진시킬 수 있을 것이다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

박지혜

경기도 남양주시 도농로 34 302동 403호 (도농동,
부영아파트3단지)

김경주

서울특별시 광진구 군자로12길 46 일성아파트
102-403

정재명

경기도 이천시 대월면 사동1리 146-3번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711029537

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 박터 엔지니어링과 세포배양 공정기술 기반의 고부가가치 단백질 의약품 생산 증대화

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산에서 8 내지 10번째의 Gln-Ile-Ala이 Leu-Leu-Leu으로 치환된, 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체.

청구항 2

제1항의 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 유전자.

청구항 4

제2항의 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 목적 단백질은 인터페론-베타인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 벡터는 pcDNA3.1/Zeo인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 벡터가 숙주세포에 도입된, 형질전환체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 숙주세포는 CHO 세포 (Chinese Hamster Ovary cell) 또는 HEK 293 세포 (Human Embryonic Kidney 293 cell)인 것을 특징으로 하는, 형질전환체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 및 이를 이용한 목적 단백질의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 재조합 단백질의 생산 분야의 궁극적인 목표는 높은 특이성과 함께 우수한 생산 효율을 갖는 재조합 단백질 생산 기술을 개발하는 데 있다. 이러한 목표를 달성하기 위하여, 재조합 벡터 및 숙주세포 시스템에 관한 연구가

진행되고 있으며, 일례로서, 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 및 대장균 (*E. coli*) 등과 같은, 숙주세포에서 목적 단백질을 발현시키기 위한 다양한 발현 벡터들이 개발되어 왔다. 그러나 상기 목적 단백질의 발현에 있어서, 재조합된 단백질이 숙주세포 내에서 불용성 봉입체 (Inclusion body)로 변환되거나 단백질 분해효소에 의해 분해되고, 발현 과정에서 화학 변형 (Chemical modification)에 실패하는 등 상당한 정도의 결함 요인이 여전히 존재하는 실정이다.

[0003] 이와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위한 방안 중 하나로서, 재조합 단백질의 분비 (secretion)를 촉진시키는 인자를 벡터 시스템을 도입함으로써, 불용성 봉입체의 형성 등을 감소시켜 재조합 단백질의 발현량, 즉 생산효율을 증진시키는 방안이 있다. 일반적으로, 숙주세포는 전구체 단백질 (precursor protein)에 존재하는 신호 펩타이드 (signal peptide)에 의해 세포질 내 존재할 단백질과 세포 밖으로 분리될 단백질을 구분한다, 이와 관련하여, 전구체 단백질에 신호 펩타이드가 포함되어 있지 않은 경우, 그 단백질은 분비되지 않아 외부로 발현되지 않을 뿐만 아니라, 상기 신호 펩타이드를 구성하는 아미노산의 성질에 따라 단백질의 발현 양상이 변화할 수 있다는 사실이 보고된 바 있으며, 이에, 신호 펩타이드의 존재 유무 및 이들의 성질은 재조합 단백질의 생산에 중요한 영향을 미친다.

[0004] 한편, 항 바이러스 활성을 갖는 인간 인터페론 (Interferon)은 세포 증식을 억제하고, 자연 면역반응을 조절하는 중요한 사이토카인 류의 단백질 군으로, 이 중에서도 인터페론-베타 (interferon-beta; IFN- β)는 5 개의 알파 헬릭스를 가지고 있는 구형 단백질로서, 크기는 25 kD, 당쇄를 제거하면 20 kD를 나타낸다. 현재, 인터페론-베타의 임상 적용에 관한 연구는 활발하게 진행 중에 있으며, 이 중에서도 다발성경화증 (Multiple Sclerosis)의 완화 및 경감을 위한 치료제로 각광을 받고 있고, 이 외에도 간염 및 흑색종 등에 대한 치료 효과가 보고된 바 있다. 이러한 인터페론-베타의 생산과 관련하여, CHO 세포를 이용한 인간 인터페론-베타의 생산 과정에서 발생하는 집합화 현상을 감소시키기 위한 방법으로, 글리세롤 또는 저온 배양법을 이용하거나, 다공성 미립담체 (Macroporous microcarrier)를 사용하는 방법 등이 알려져 있으나 (한국 공개특허 10-2009-0123622), 인터페론-베타의 신호 펩타이드를 이용한 방법에 대해서는 보고된 바가 없는 상황이다.

[0005] 이러한 배경 하에서, 임상적으로 유의적인 활성을 나타내는 인터페론-베타의 생산효율을 증진시키고, 이에 따른 생산비용을 절감시킬 수 있는 새로운 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 재조합 단백질의 생산효율을 증진시키기 위하여 예의 노력한 결과, 소수성 부위가 변이된 인터페론-베타 신호 펩타이드 또는 이의 유전자를 이용하여, 숙주세포의 재조합 단백질 발현량을 현저하게 향상시킬 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은, 소수성 아미노산으로 변이된, 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은, 목적 단백질의 발현을 증진시키기 위한 상기 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체를 포함하는 재조합 벡터 및 이에 따른 형질전환체를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 생산방법을 제공하는데 있다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산에서 8 내지 10번째의 Gln-Ile-Ala이 Leu-Leu-Leu으로 치환된, 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 유전자는 서열번호 6의 염기서열로 이루어질 수 있다.

- [0014] 본 발명은 상기 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 벡터는 pcDNA3.1/Zeo, 상기 숙주세포는 CHO 세포 (Chinese Hamster Ovary cell) 또는 HEK 293 세포 (Human Embryonic Kidney 293 cell)일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 목적 단백질을 인터페론-베타일 수 있다.
- [0017] 본 발명은 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 생산방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 벡터는 pcDNA3.1/Zeo, 상기 숙주세포는 CHO 세포 (Chinese Hamster Ovary cell) 또는 HEK 293 세포 (Human Embryonic Kidney 293 cell)일 수 있으며, 상기 목적 단백질은 인터페론-베타일 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체는 소수성 부위의 소수성 성질 및 알파-헬릭스 구조를 보다 강화시킨 것으로서, 이를 재조합 벡터 및 숙주세포 시스템에 적용한 결과, 종래의 기술에 비해 숙주세포의 재조합 단백질 발현량이 현저하게 증진됨을 확인할 수 있었는데, 본 발명을 이용하여 목적 단백질의 생산효율을 효과적으로 증진시킬 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은, 본 실시예에 따른 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체의 변이 부위 및 구체적인 아미노산 서열을 개략적으로 나타낸 도이다.
- 도 2는, 본 실시예에 따른 (a) 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 유전자와 인터페론-베타 유전자, 및 (b) 이들의 ligation 여부를 Overlap PCR를 통해 확인한 결과이다.
- 도 3은, 본 실시예에 따른 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 유전자를 포함하는, 재조합 벡터의 개열지도이다.
- 도 4는, Signal peptide를 포함하지 않은 인터페론-베타 유전자를 Colony PCR을 통해 확인한 결과이다.
- 도 5는, 본 실시예에 따른 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 도입한 후, Colony PCR을 통해 확인한 결과이다.
- 도 6은, 신호 펩타이드 변이에 따른 HEK293A 세포 내 인터페론-베타 발현량 변화를 Sandwich ELISA를 이용하여 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [0023] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산에서 8 내지 10번째의 Gln-Ile-Ala이 Leu-Leu-Leu으로 치환된, 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체 또는 이를 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어, "신호 펩타이드"는 약 15 내지 30 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드로서, N 말단에 존재하는 염기성 아미노산 부위 (Basic amino acid region), 소수성 부위 (hydrophobic region), 및 C 말단에 존재하는 절단 부위 (Cleavage region)로 이루어진다. 이 중에서도 상기 소수성 부위는 일반적으로 6 내지 15개의 아미노산 잔기를 포함하고 있으며, 세포 내 소포체 (Endoplasmic reticulum) 막으로 단백질을 표적화하고, 이를 고정화시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서, 신호 펩타이드 내 소수성 부위에 대한 소수성 성질 및 α -helical 구조의 강화는 목적 단백질의 분비 및 발현을 효과적으로 증진시킬 수 있을 것이라는 사실에 기반하여, 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체를 설계하였다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "신호 펩타이드 변이체"는 단백질을 세포 밖으로 분비 또는 발현시키는 신호 펩타이드 본연의 기능을 수행할 수 있는 범위 내에서, 서열번호 1의 인터페론-베타 신호 펩타이드 중 하나 이상의

아미노산 잔기가 결실, 부가, 삽입, 또는 치환된 펩타이드를 의미한다.

[0026] 본 발명에 따른 인터페론-베타 (Interferon-beta) 신호 펩타이드 변이체는 서열번호 1의 아미노산에서 8 내지 10번째 서열이 페닐알라닌 (Phenylalanine; Phe), 트립토판 (Tryptophan; Trp), 이소류신 (Isoleucine; Ile), 류신 (Leucine; Leu), 프롤린 (Proline; Pro), 메티오닌 (Methionine; Met), 발린 (Valine; Val), 또는 알라닌 (Alanine; Ala) 등의 소수성 아미노산으로 변이될 수 있고, 바람직하게 Leu-Leu-Leu으로 치환된, 서열번호 2로 표시되는 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0027] 또한 상기 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자는 바람직하게, 서열번호 2로 표시되는 아미노산을 코딩할 수 있는 모든 종류의 염기서열을 포함할 수 있고, 가장 바람직하게, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으며, 상기 서열번호 6으로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 목적 단백질 발현 증진용 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 외부 DNA 서열을 포함하는 DNA 작제물을 의미한다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 재조합 벡터는 숙주세포에서 목적 단백질을 발현 (expression)하거나 목적 RNA를 전사 (transcription)할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 벡터의 일례로서, 플라스미드 벡터, 박테이로파지 벡터, 코스미드 벡터, YAC (Yeast Artificial Chromosome) 벡터 등일 수 있으며, 본 발명의 목적상 플라스미드 벡터, 보다 구체적으로, pcDNA3.1/Zeo일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 상기 재조합 벡터는, 숙주세포 내 재조합 펩타이드, 즉, 목적 단백질의 발현을 증진시키기 위하여 목적 단백질 유전자의 5' 말단에 신호 펩타이드 변이체 유전자가 삽입되어 있도록 구축될 수 있으며, 이 밖에도 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선별될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자, 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위 등을 포함하도록 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 일례로서, 본 발명의 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자 및/또는 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 프로모터, 전사 종결 서열 등의 통상적인 유전자 발현 조절 서열과 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다. 상기 "작동 가능하게 연결된(operatively linked)"은 유전자 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오타이드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 상기 유전자 발현 조절 서열은 작동 가능하게 연결됨으로써 다른 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 용어, 본 발명에서 사용되는 용어, "형질전환"은, 본래의 세포가 가지고 있던 것과 다른 종류의 외래 유전자가 있는 DNA사슬 조각 또는 플라스미드가 숙주 세포에 도입되어 원래 세포에 존재하던 DNA와 결합함으로써 세포의 유전형질을 변화시키는 분자생물학적 기술을 일컫는다. 본 발명의 목적상, 상기 형질전환은 상기 신호 펩타이드 변이체를 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 숙주세포 내로 삽입되어 목적 단백질을 발현하는 것을 의미하며, 상기 숙주세포는 바람직하게 CHO 세포 (Chinese Hamster Ovary cell) 또는 HEK 293 세포 (Human Embryonic Kidney 293 cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에서, "목적 단백질"은 상기의 재조합 벡터 및 숙주 시스템을 통해 궁극적으로 발현시키고자 하는 단백질로서, 바람직하게 인슐린, 사이토카인 (인터루킨, 종양괴사인자, 인터페론, 콜로니자극인자, 케모카인 등), 에리트로포이에틴 등 임상적 활용성이 높은 단백질일 수 있으며, 보다 바람직하게 인터페론-베타일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는, 인터페론-베타 신호 펩타이드의 소수성 부위가 변이된, 변이체를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 형질전환시켰으며 (실시예 1 내지 2 참조), 그 결과, 기존의 인터페론-베타 신호 펩타이드 또는 다른 변이체를 이용한 경우에 비해, 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터가 도입된 형질전환체의

인터페론-베타 발현량이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다 (실시예 3 참조).

[0036] 이에, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 수득하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[0037] 상기 형질전환체는, 전술한 바와 같이 숙주세포에 상기 제조합 벡터를 도입하여 제조할 수 있고, 상기 도입 방법은 공지의 기술, 즉 화학적인 방법, 열 충격법, 전기 천공법 등을 이용하여 도입할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 형질전환체의 배양물로부터 본 발명의 목적 단백질은 당업계에 공지된 방법에 의해 분리 또는 회수될 수 있다. 예를 들어, 목적 단백질은 이에 제한되는 것은 아니나, 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 전통적인 방법에 의해서 배양물로부터 분리할 수 있다. 아울러, 목적 단백질은 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별 용해도 (예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), 또는 추출을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예 1. 인터페론-베타 발현 증진용 제조합 벡터의 제조

[0043] 1-1. 인터페론-베타 신호 펩타이드 유전자의 변이

[0044] 우선, Human Interferon-beta signal peptide를 코딩하는 oligonucleotide (63bp)를 주형 (template)으로 PCR을 수행하였다. 구체적으로, 50 μ l의 PCR 반응 용액 [template (1 μ l), primer F (100pmole, 1 μ l), primer R (100pmole, 1 μ l), polymerase (1 μ l), dNTP (2.5mM, 5l), 5 $\times$ buffer (10 μ l), 증류수 (31 μ l)]을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 1) 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 (denaturation); 2) 58 $^{\circ}$ C에서 1분간 (annealing); 3) 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 (extention) 반응시킨 뒤, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰고, 이와 같은 과정을 18번 반복 (18 cycles)하였다.

[0045] 이후, 상기로부터 수득한 PCR product (30.5l)에 Dpn I을 처리하는 단계 등을 포함하는 통상의 Site direct mutation 방법을 사용하여, Human Interferon-beta signal peptide의 소수성 부위 (Hydropobic region)가 변이된, 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체의 유전자를 제조하였으며, 이들의 서열 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

No.	Mutation	Signal peptide sequence
1	INFB3 Interferon-beta(Q→L)	atgaccaacaagtgtctcctcctgattgtctcctgtgtgcttctccactacagctctttcc (서열번호 4)
2	INFB4 Interferon-beta(QI→LL)	atgaccaacaagtgtctcctcctgctggctctcctgtgtgcttctccactacagctctttcc (서열번호 5)
3	INFB5 Interferon-beta(QIA→LLL)	atgaccaacaagtgtctcctcctgctgctgctcctgtgtgcttctccactacagctctttcc (서열번호 6)

[0047]

[0049] 1-2. 인터페론-베타 발현 증진용 제조합 벡터의 제조

[0050] pcDNA3.1/Zeo 플라스미드 벡터에 제한효소인 HindIII와 XbaI을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 처리하여, 플라스미드 벡터를

선형화시켰다. 이후, 상기 실시예 1-1에서 수득한 변이체의 유전자와 original signal peptide를 제외한 Human Interferon-beta 유전자를 상기 pcDNA3.1/Zeo 플라스미드 벡터에 서브클로닝하기 위하여 overlap PCR을 수행하였다. 구체적으로, 50 μ l의 PCR 반응 용액 [template (1 μ l), primer F (100pmole, 1 μ l), primer R (100pmole, 1 μ l), polymerase (1 μ l), dNTP (2.5mM, 5l), 5 $\times$ buffer (10 μ l), 증류수 (31 μ l)]을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 1) 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 (denaturation); 2) 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 (annealing); 3) 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 (extension) 반응시킨 뒤, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰고, 이와 같은 과정을 25번 반복 (25 cycles)하였다. 이후, 이들을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 배양하여 도 2에 나타난 바와 같이, 각각의 인터페론-베타 신호 펩타이드 변이체 유전자와 Human Interferon-beta 유전자가 ligation되었음 (INFB3(Q $\rightarrow$ L), INFB4(QI $\rightarrow$ LL), INFB5(QIA $\rightarrow$ LLL))을 확인하였으며, 이를 통해, pcDNA3.1/Zeo-IFNB(Q $\rightarrow$ L), pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QI $\rightarrow$ LL), pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QIA $\rightarrow$ LLL) 재조합 벡터를 제조하였다. 이와 함께, Signal peptide에 따른 Interferon-beta의 발현량 변화를 비교하고자, wild type signal peptide가 도입된 pcDNA3.1/Zeo-IFNB(wt), signal peptide가 도입되지 않은 pcDNA3.1/Zeo-IFNB(signal peptide w/o)를 함께 제조하였다.

[0051] 이후, competent cell에 상기 재조합 벡터를 하여 도입하여 transfection시킨 후, Colony PCR을 수행하였으며, 그 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 100bp size marker와의 비교를 통해 약 600bp size의 band를 확인할 수 있었다. 또한, 600bp size의 band가 검출된 Colony를 선별하여 LB amp liquid medium에 3ml 가량 배양시키고, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 조건에서 밤새도록 세포 성장시킨 후, Plasmid mini kit을 이용한 mini-prep 방법을 통해 플라스미드 벡터를 수득하였으며, 이들의 sequencing을 실시하여 재차 검증하였다 (미도시).

[0053] 실시예 2. 인터페론-베타 발현 증가용 재조합 벡터를 이용한 형질전환

[0054] HEK293A 세포 및 CHO-DG44 세포에 상기 실시예 1에서 제조한 재조합 벡터를 동일한 조건으로 도입하여 transfection시켰다. HEK293A 세포는 fetal bovine serum 10%가 첨가된 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO) 배지 및 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, CHO-DG44 세포는 fetal bovine serum 10%가 첨가된 DMEM-F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12, GIBCO) 배지에서 배양하였다.

[0055] 구체적으로, 3 번째 계대 배양에서, 100 x 20mm cell culture dish 내 10ml의 배지에 1 x 10⁶ cells/dish의 농도로 세포를 씨딩 및 배양하여 70% cell confluence를 나타내면, dish 배지를 8ml씩 교체한 후, 이로부터 1시간 뒤, lipofectamine 2000 (invitrogen)을 사용하여 transfection시켰다. Midi-prep한 DNA (7.5 μ g)를 serum free IMDM/DMEM-F12 (300 μ l)에 첨가하고 Lipofectamin 2000 (12 μ l)을 역시 serum free IMDM/DMEM-F12 (300 μ l)에 첨가하였으며, 이를 5분간 실온에서 incubation한 뒤, DNA와 lipofectamine 2000을 섞어준 후, 실온에서 20분간 incubation하여 DNA-Lipofectamine 2000 complex가 형성되도록 하였다. 이 후, DNA-lipofectamine 2000 complex를 IMDM/DMEM-F12 배지 내 cell이 있는 dish에 첨가하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였고, dish의 배지를 8ml씩 교체한 후, 48시간 후 dish 내 상층액을 수득하였다.

[0057] 실시예 3. 인터페론-베타 발현량 비교

[0058] 본 실시예에서는, Sandwich ELISA를 이용하여 Signal peptide 변이에 따른 Interferon-beta의 발현량 변화를 정량적으로 분석하였다. 구체적으로, standard recombinant protein는 pbl assay science사의 Human Interferon Beta 1a, mammalian (Catalog No: 11410-2)을 사용하였으며, Interferon-beta recombinant protein 농도의 확인 및 보정을 위해 pbl assay science사의 VeriKine™ Human IFN Beta ELISA Kit (Catalog No: 41410)을 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 한편, Incubation은 room temperature (RT), 22 내지 25 $^{\circ}$ C에서 실시하였으며, Wash step에서는 Wash Buffer를 각 Well당 300 μ l씩 사용하였다.

[0060] 그 결과, 하기 표 2, 표 3 및 도 6에 나타난 바와 같이, signal peptide가 도입되지 않은 pcDNA3.1/Zeo-IFNB(signal peptide w/o)의 경우, Interferon-beta가 전혀 발현되지 않았던 반면, pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QIA $\rightarrow$ LLL) 재조합 벡터로 형질전환된 경우, HEK293A 세포 (표 2 및 도 6 참조) 및 CHO-DG44 세포 (표 3 참조) 모두, Interferon-beta의 발현량은 wild type signal peptide가 도입된 pcDNA3.1/Zeo-IFNB(wt)에 비해 현저하게 증진되었으며, 특히, HEK293A 세포에서 Interferon-beta의 발현량은 약 6 배이상 향상됨을 확인할 수 있었다.

[0061] 다만, pcDNA3.1/Zeo-IFNB(Q→L), pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QI→LL)의 경우에는, signal peptide 내 소수성 부위가 변이되었음에도 불구하고, wild type signal peptide가 도입된 재조합 벡터를 이용한 경우에 비해, Interferon-beta의 발현량은 큰 차이를 보이지 않거나 오히려 감소되었는바, signal peptide의 변이가 Interferon-beta와 같은 목적 단백질의 발현량 변화에 유의적인 영향을 미치기 위해서는, Interferon-beta (QIA→LLL) 수준의 변이(서열번호 6)가 이루어져야 함을 알 수 있었다.

표 2

No.	Plasmid DNA	IFN-Beta concentration(ng/mL)
1	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(wt)	14.1±0.5
2	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(Q→L)	22.3±0.4
3	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QI→LL)	18.3±0.5
4	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QIA→LLL)	85.3±0.3
5	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(signal peptide w/o)	0

[0063]

표 3

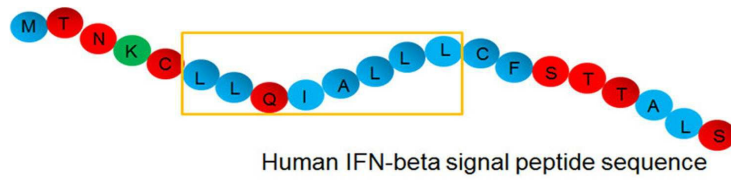
No.	Plasmid DNA	IFN-Beta concentration(ng/mL)
1	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(wt)	30.9±0.2
2	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(Q→L)	35.5±0.3
3	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QI→LL)	22.1±0.2
4	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(QIA→LLL)	58.1±0.4
5	pcDNA3.1/Zeo-IFNB(signal peptide w/o)	0

[0064]

[0066] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

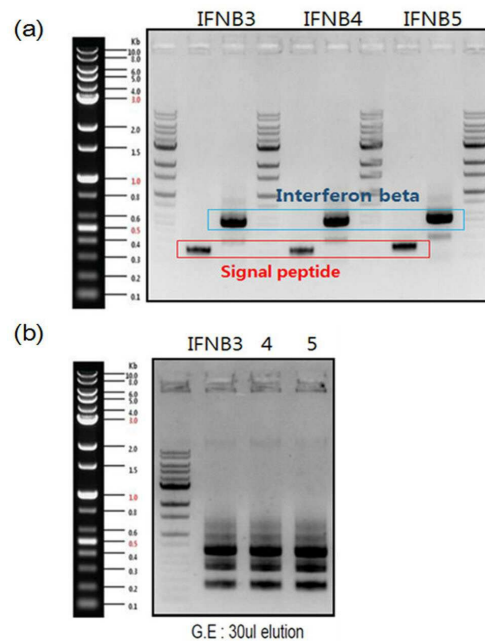
도면

도면1

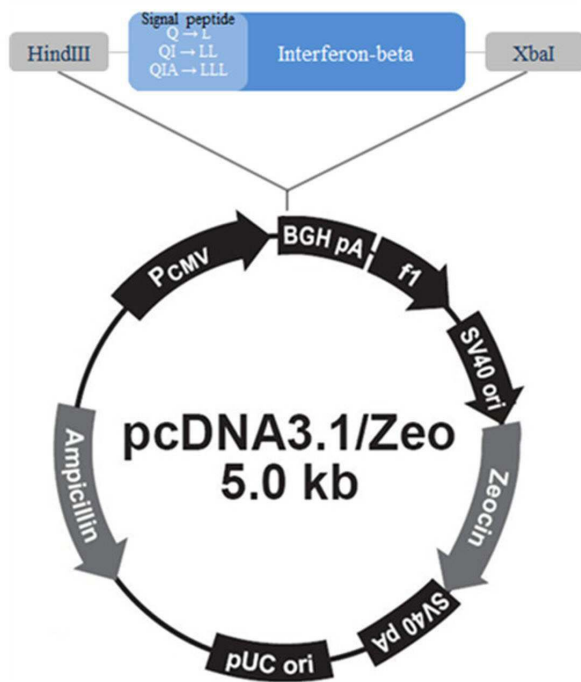


Hydrophobic region	DNA sequence
LLLIALLL (Q→L)	CAA→CTG
LLLLALLL (QI→LL)	CAA ATT→CTG CTG
LLLLLLLLL (QIA→LLL)	CAA ATT GCT → CTG CTG CTG

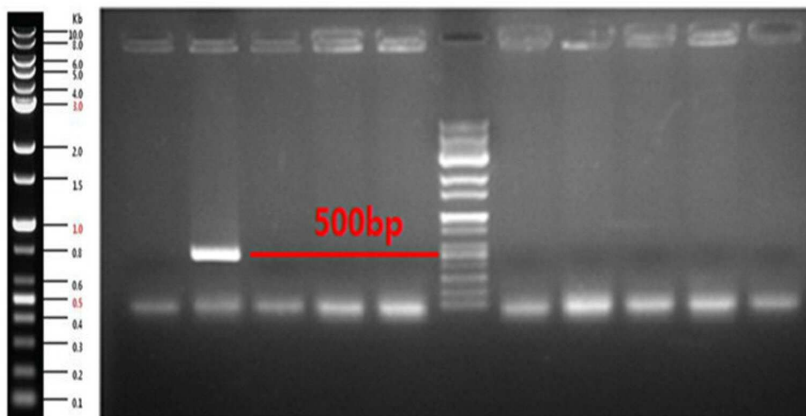
도면2



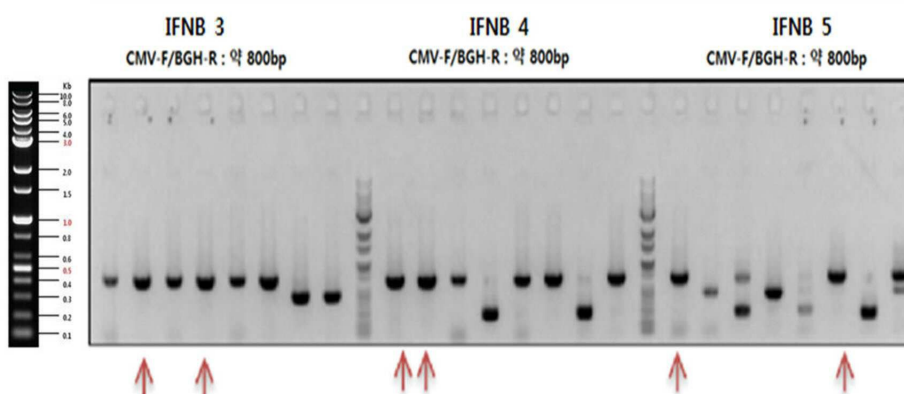
도면3



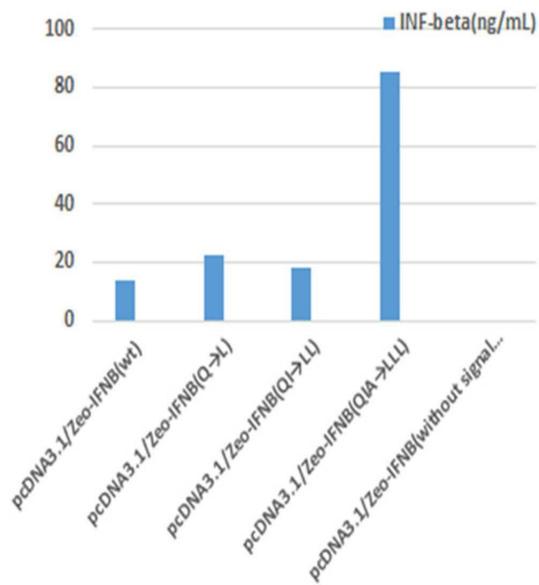
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Sejong Industry-Academy Cooperation Foundation

<120> Interferon-beta signal peptide variant and use thereof

<130> IP-2016-166-KR_P16U10C1397

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Interferon beta signal peptide

<400> 1

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser

20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Interferon beta signal peptide variant 5 protein

<400> 2

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser

20

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Interferon beta signal peptide nucleotide

<400> 3

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tcc 63

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Interferon beta signal peptide variant 3 nucleotide

<400> 4

atgaccaaca agtgtctcct cctgattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tcc 63

<210> 5

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Interferon beta signal peptide variant 4 nucleotide

<400> 5

atgaccaaca agtgtctcct cctgctggct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tcc 63

<210> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Interferon beta signal peptide variant 5 nucleotide

<400> 6

atgaccaaca agtgtctcct cctgctgctg ctctgttgt gcttctccac tacagctctt 60

tcc 63