



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0024310
(43) 공개일자 2018년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43586 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0110261
(22) 출원일자 2016년08월29일
심사청구일자 2016년08월29일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이원중
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 생명공학부
29호관 511호(송도동, 인천대학교)
백지은
경기도 부천시 원미구 중동로 108, 123동 1404호
(74) 대리인
차준용

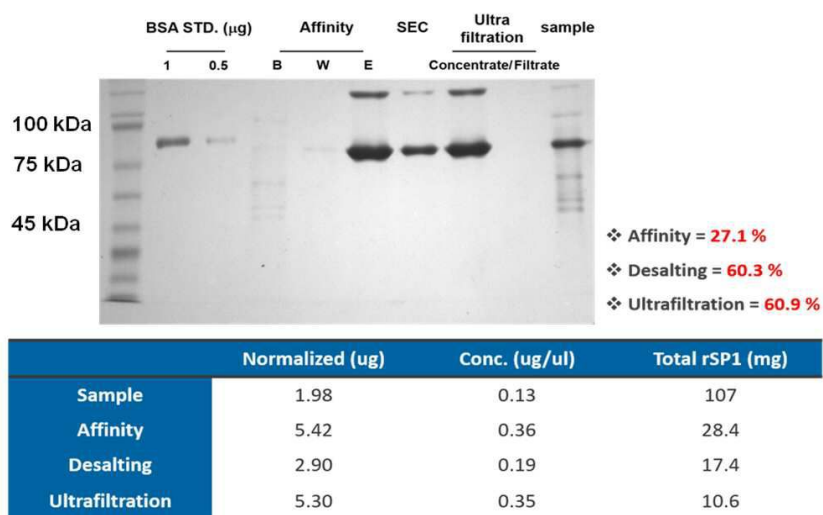
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법

(57) 요약

본 발명은 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 재조합 단백질 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포 배양에 의해 생산된 재조합 SP1 단백질을 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 이용해 정제할 때 용출 버퍼(Elution buffer)에 프룩토오스(Fructose)를 소정량 첨가함으로써, 재조합 SP1의 응집(Aggregation) 현상을 억제하고, 후속의 초미세여과(Ultrafiltration)를 통한 농축 후에도 이러한 응집 현상을 현저하게 감소시켜 고농도의 재조합 SP1을 대량으로 생산할 수 있도록 한, 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법, 이에 의해 생산된 재조합 SP1 단백질, 및 이의 세포사멸(Apoptosis) 억제, 세포 배양 배지 첨가물, 바이오 의약품 생산용의 세포주 제작, 항-산화 소재 내지 (기능성) 화장품 소재로의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)
C07K 1/16 (2013.01)
C07K 1/22 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0336989
부처명	중소기업청
연구관리전문기관	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	산학협력 기술개발사업(지방중소기업R&D센터)
연구과제명	누에 SP 단백질의 항노화 기능을 이용한 기능성 화장품 소재로의 개발
기 여 율	1/1
주관기관	인천대학교 산학협력단
연구기간	2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

누에의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 재조합 단백질 생산방법으로서,
 생산된 재조합 SP1을 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 이용하여 정제하되,
 상기 사이즈 배제 크로마토그래피의 용출(Elution) 과정에서 사용되는 용출 버퍼(Elution buffer)에 프룩토오스(Fructose)를 첨가하는 것을 특징으로 하는,
 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 2

a) SP1 발현 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환된 세포를 제작하는 단계;
 b) 형질전환된 세포를 배양하여 재조합 SP1을 생산하는 단계;
 c) 재조합 SP1이 생산된 세포를 파쇄한 후, 친화 크로마토그래피(Affinity chromatography)를 수행하여 세포 불순물로부터 SP1을 1차적으로 분리하는 단계;
 d) 분리물에 대해 프룩토오스(Fructose)가 첨가된 용출 버퍼(Elution buffer)를 이용한 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 수행하여 SP1을 정제하는 단계; 및
 e) 정제물을 초미세여과(Ultrafiltration)하여 농축시키는 단계;를 포함하는,
 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
 상기 SP1 발현 벡터에는 히스티딘 태그(Histidine tag)가 부착되어 있는 것을 특징으로 하는,
 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 4

제2항에 있어서,
 상기 SP1 발현 벡터는 pET23a 벡터에 SP1 유전자가 삽입된 것임을 특징으로 하는,
 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 5

제2항에 있어서,
 상기 대장균은 BL21(DE3) 균주인 것을 특징으로 하는,
 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 c) 단계는,

얻어진 펠릿(Pellet)을 Lysis buffer에 서스펜션시킨 후 소니케이션한 다음 원심분리하여 상등액과 펠릿으로 분리하고,

상기 상등액에 존재하는 SP1을 친화 크로마토그래피를 수행하여 분리하는 것임을 특징으로 하는,

프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 상등액에는 SP1의 수용성 형태(Soluble form)가 존재하고, 상기 펠릿에는 SP1의 불용성 형태(Insoluble form)가 존재하는 것을 특징으로 하는,

프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 8

제2항에 있어서,

상기 프룩토오스는 2 M의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는,

프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 9

제2항에 있어서,

상기 d) 단계를 통해 이미다졸(Imidazole)이 제거되는 것을 특징으로 하는,

프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따라 생산된,

재조합 SP1 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서,

세포사멸(Apoptosis)을 억제하기 위한 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서,

인간세포에서 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸(Apoptosis)을 억제하기 위한 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 내재성 아포토시스는 스타우로스포르린(Staurosporine; STS)에 의해 유발되는 것임을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 14

제10항에 있어서,

바이오 의약품 생산용 세포 배양 배지의 첨가물, 또는 바이오 의약품 생산을 위한 세포주 제작에 사용되는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 바이오 의약품은 치료용 단백질로서 모노클론 항체인 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 16

제10항에 있어서,

항-산화 효과 및 활성산소 억제 효과를 갖는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서,

화장품 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 18

제17항에 있어서,

기능성 화장품 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는,

재조합 SP1 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서,
항-노화 기능성 화장품 소재로 사용되는 것을 특징으로 하는,
재조합 SP1 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 재조합 단백질 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포 배양에 의해 생산된 재조합 SP1 단백질을 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 이용해 정제할 때 용출 버퍼(Elution buffer)에 프룩토오스(Fructose)를 소정량 첨가함으로써, 재조합 SP1의 응집(Aggregation) 현상을 억제하고, 후속의 초미세여과(Ultrafiltration)를 통한 농축 후에도 이러한 응집 현상을 현저하게 감소시켜 고농도의 재조합 SP1을 대량으로 생산할 수 있도록 한, 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법, 이에 의해 생산된 재조합 SP1 단백질, 및 이의 세포사멸(Apoptosis) 억제, 세포 배양 배지 첨가물, 바이오 의약품 생산용의 세포주 제작, 항-산화 소재 내지 (기능성) 화장품 소재로의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 바이오 의약 산업에서 생물 배양기를 통해 동물세포를 배양하는 과정에서 일어나는 세포사멸(Apoptosis)이 큰 문제로 대두되고 있다. 생물 배양기에서의 세포 대량 배양시 세포는 저산소증이나 영양분 부족, 전단응력 등과 같은 세포사멸이 유도되는 환경들에 놓이게 된다. 세포사멸에 의해 세포의 생존율(Cell viability)이 감소하게 되면 결과적으로 재조합 단백질의 생산량이 감소하게 된다. 게다가 세포 배양에서 일어나는 세포사멸은 원하지 않는 부산물을 만들 위험성을 높이고, 이러한 부산물을 제거하기 위해서는 또 다른 정제 과정을 필요로 한다.

[0003] 따라서, 바이오 의약품의 생산성을 증대시키고, 생산 공정에서의 추가 공정의 필요성을 배제하기 위해 세포사멸 억제 물질을 개발하여 세포 배양 배지 첨가물로 활용하는 방법이 필요하다.

[0004] 한편, 국내 화장품 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 기능성 화장품의 시장 규모가 급속히 커지고 있다. 과학의 발달과 함께 인간의 수명은 점점 연장되고 있고 여기에 저출산 등의 요인으로 인해 급속히 고령화 사회로 접어들었다. 이에 대해 화장품 산업 분야에서도 장기적인 관점에서의 대응이 필요한 상황이며, 특히 기능성 화장품에 대한 관심은 점점 높아질 것으로 예상된다. 이에 소비자 욕구에 부합되는 보다 높은 효능의 기능성 화장품의 개발이 요구되고 있다. 구체적으로 인간은 시간이 흐름에 따라서 생리적인 기능이 저하되는 노화 현상을 경험하게 된다. 개개인에 따라 노화의 정도가 차이 나게 되는데, 이러한 개개인의 생체적인 노화 정도를 판단할 수 있는 가장 큰 지표가 되는 것이 피부이다. 피부는 외부 환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부 변화는 많은 부분이 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수 있다. 특히 외부인자 중 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소는 피부 노화의 가장 중요한 원인으로 간주되고 있다. 활성산소는 피부세포 및 조직 손상을 주도하고 항-산화 방어체계를 파괴한다.

[0005] 따라서, 현재 피부 노화에 큰 영향을 미치는 활성산소에 의한 노화를 방지하여 피부 노화를 지연시키고 예방하는 것이 중요하며, 이와 관련하여 항-산화 작용이 뛰어난 새로운 화장품 소재 개발의 필요성이 높아지고 있는 시점이다.

[0006] 본 발명자는 선행 연구를 통해, 누에(Silkworm)의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)이 인간을 포함한 포유동물 세포에 대해 세포사멸 억제 효과가 있으며, 항-산화 작용도 함께 발휘함을 확인한 바 있다. 즉 SP1 단백질을 생산할 수 있는 유전자를 활용하여 세포사멸 저항성 세포를 제작하면 세포가 그 배양 중 발생하는 여러 스

트레스로부터 저항성을 갖게 되고, 이를 이용하여 항체 등의 바이오 의약품 생산을 위한 세포주를 개발할 수 있을 것이다. 또한 SP1의 항-산화 기능은 피부 노화를 억제하는 기능성 화장품 소재로의 가능성도 함께 제시해 주고 있다.

- [0007] 이처럼 SP1의 바이오 산업에서의 활용도를 높이기 위해서는 SP1을 재조합 단백질로 대량 생산해야 할 필요가 있다. 이 경우 생산된 재조합 SP1 단백질은 바이오 의약품 생산용 세포 배양 배지의 첨가물로 사용될 수도 있으며, 항-산화 작용을 활용한 항-노화 화장품 소재로도 그 개발 가능성이 매우 크다.
- [0008] 이와 관련하여, 본 발명자는 SP1 발현 벡터를 제작하여 대장균에 넣어 형질전환된 세포를 제작함으로써 SP1을 재조합 단백질로 생산하고, 이를 정제하는 연구를 수행하였다.
- [0009] SP1 유전자가 들어가 있는 발현 벡터에는 C 말단에 히스티딘 태그(Histidine tag)가 붙어 있기 때문에, 배양된 세포에 있는 수용성 SP1을 세포 파쇄 후 Histidine tag에 대해 결합이 가능한 친화 칼럼(Affinity column)을 이용하여 1차적으로 세포 불순물로부터 SP1을 분리할 수 있다. 이어서 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 이용하여 SP1을 정제하고, 정제된 SP1의 농도를 높이기 위해 초미세여과(Ultrafiltration)을 통해 농축할 수 있다.
- [0010] 그러나, SP1의 정제 과정에서 SP1의 농도가 높아질 경우 응집(Aggregation) 현상이 발생하며, 특히 초미세여과 후에 이러한 응집 현상이 심하게 발생하는바, 고농도의 재조합 SP1을 생산하기 위해서는 이러한 문제를 해결해야만 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001) Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of Bombyx mori. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285: 224-228.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 본 발명자는 예의 연구를 거듭한 결과, 사이즈 배제 크로마토그래피의 용출 과정에 있어 용출 버퍼에 프룩토오스를 첨가할 경우, 생산된 재조합 SP1의 응집 현상이 (초미세여과 후에도) 효과적으로 억제됨을 확인하고 본 발명에 이르렀다. 이렇게 정제된 재조합 SP1은 이를 배양 배지에 첨가하였을 경우 여전히 세포사멸 억제와 항-산화 효과를 유지하였다.
- [0013] 즉, 본 발명은 프룩토오스를 사용하여 정제시의 응집 현상 없이 고농도의 SP1을 재조합 단백질의 형태로 대량 생산할 수 있는 새로운 방법과, 이처럼 생산된 재조합 SP1 단백질의 생물학적 기능에 기초한 다양한 용도를 제 공함을 기술적 과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 누에의 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)의 재조합 단백질 생산방법으로서, 생산된 재조합 SP1을 사이즈 배제 크로마토그래피(또는 분자체 크로마토그래피, Size exclusion chromatography)를 이용하여 정제하되, 상기 사이즈 배제 크로마토그래피의 용출(또는 용리, Elution) 과정에서 사용되는 용출 버퍼(Elution buffer)에 프룩토오스(Fructose)를 첨가하는 것을 특징으로 하는, 프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법을 제공한다.

- [0015] 상기 저장 단백질 1(SP1)은 누에 체액(Silkworm hemolymph)으로부터 분리된 곤충 헤모시아닌 단백질의 일종으로서, 누에의 암컷-특이적 단백질이며, 메티오닌이 많은 부분(10% 이상) 함유되어 있다.
- [0016] 구체적으로, 상기 저장 단백질 1(SP1)은 하기 서열목록에 의해 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.
- [0017] [SP1 아미노산 서열] 이 중 본 발명에서 사용된 SP1은 16번인 Thr부터 해당됨.

```

<210> 2
<211> 747
<212> PRT
<213> Bombyx mori sex-specific storage-protein SP1
<400> 2
Met Arg Val Leu Val Leu Leu Ala Cys Leu Ala Ala Ala Ser Ala Thr
  1           5           10          15
Ala Ile Ser Gly Gly Tyr Gly Thr Met Val Phe Thr Lys Glu Pro Met
          20          25          30

Val Asn Leu Asp Met Lys Met Lys Glu Leu Cys Ile Met Lys Leu Leu
          35          40          45
Asp His Ile Leu Gln Pro Thr Met Phe Glu Asp Ile Lys Glu Ile Ala
          50          55          60
Lys Glu Tyr Asn Ile Glu Lys Ser Cys Asp Lys Tyr Met Asn Val Asp

          65          70          75          80
Val Val Lys Gln Phe Met Glu Met Tyr Lys Met Gly Met Leu Pro Arg
          85          90          95
Gly Glu Thr Phe Val His Thr Asn Glu Leu Gln Met Glu Glu Ala Val

          100          105          110
Lys Val Phe Arg Val Leu Tyr Tyr Ala Lys Asp Phe Asp Val Phe Met
          115          120          125
Arg Thr Ala Cys Trp Met Arg Glu Arg Ile Asn Gly Gly Met Phe Val
          130          135          140
Tyr Ala Phe Thr Ala Ala Cys Phe His Arg Thr Asp Cys Lys Gly Leu
          145          150          155          160
Tyr Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Ile Tyr Pro Tyr Phe Phe Val Asp Ser
          165          170          175

His Val Ile Ser Lys Ala Phe Met Met Lys Met Thr Lys Ala Ala Lys
          180          185          190
Asp Pro Val Leu Trp Lys Tyr Tyr Gly Ile Thr Val Thr Asp Asp Asn
          195          200          205
Leu Val Val Ile Asp Trp Arg Lys Gly Val Arg Arg Ser Leu Ser Gln
          210          215          220
Asn Asp Val Met Ser Tyr Phe Met Glu Asp Val Asp Leu Asn Thr Tyr
          225          230          235          240
Met Tyr Tyr Leu His Met Asn Tyr Pro Phe Trp Met Thr Asp Asp Ala

```

[0019]

245 250 255
Tyr Gly Ile Asn Lys Glu Arg Arg Gly Glu Ile Met Met Tyr Ala Asn
260 265 270
Gln Gln Leu Leu Ala Arg Met Arg Leu Glu Arg Leu Ser His Lys Met
275 280 285
Cys Asp Val Lys Pro Met Met Trp Asn Glu Pro Leu Glu Thr Gly Tyr
290 295 300
Trp Pro Lys Ile Arg Leu Pro Ser Gly Asp Glu Met Pro Val Arg Gln
305 310 315 320

Asn Asn Met Val Val Ala Thr Lys Asp Asn Leu Lys Met Lys Gln Met
325 330 335
Met Asp Asp Val Glu Met Met Ile Arg Glu Gly Ile Leu Thr Gly Lys
340 345 350
Ile Glu Arg Arg Asp Gly Thr Val Ile Ser Leu Lys Lys Ser Glu Asp
355 360 365
Ile Glu Asn Leu Ala Arg Leu Val Leu Gly Gly Leu Glu Ile Val Gly
370 375 380
Asp Asp Ala Lys Val Ile His Leu Thr Asn Leu Met Lys Lys Met Leu

385 390 395 400
Ser Tyr Gly Gln Tyr Asn Met Asp Lys Tyr Thr Tyr Val Pro Thr Ser
405 410 415
Leu Asp Met Tyr Thr Thr Cys Leu Arg Asp Pro Val Phe Trp Met Ile
420 425 430
Met Lys Arg Val Cys Asn Ile Phe Thr Val Phe Lys Asn Met Leu Pro
435 440 445
Lys Tyr Thr Arg Glu Gln Phe Ser Phe Pro Gly Val Lys Val Glu Lys
450 455 460

Ile Thr Thr Asp Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Glu Tyr Asp Met Asp
465 470 475 480
Ile Ser Asn Ala Met Tyr Leu Asp Ala Thr Glu Met Gln Asn Lys Thr
485 490 495
Ser Asp Met Thr Phe Met Ala Arg Met Arg Arg Leu Asn His His Pro
500 505 510
Phe Gln Val Ser Ile Asp Val Met Ser Asp Lys Thr Val Asp Ala Val
515 520 525
Val Arg Ile Phe Leu Gly Pro Lys Tyr Asp Cys Met Gly Arg Leu Met

530 535 540
Ser Val Asn Asp Lys Arg Leu Asp Met Phe Glu Leu Asp Ser Phe Met
545 550 555 560
Tyr Lys Leu Val Asn Gly Lys Asn Thr Ile Val Arg Ser Ser Met Asp
565 570 575

```

Met Gln Gly Phe Ile Pro Glu Tyr Leu Ser Thr Arg Arg Val Met Glu
      580              585              590
Ser Glu Met Met Pro Ser Gly Asp Gly Gln Thr Met Val Lys Asp Trp
      595              600              605

Trp Cys Lys Ser Arg Asn Gly Phe Pro Gln Arg Leu Met Leu Pro Leu
      610              615              620
Gly Thr Ile Gly Gly Leu Glu Met Gln Met Tyr Val Ile Val Ser Pro
      625              630              635              640
Val Arg Thr Gly Met Leu Leu Pro Thr Leu Asp Met Thr Met Met Lys
      645              650              655
Asp Arg Cys Ala Cys Arg Trp Ser Ser Cys Ile Ser Thr Met Pro Leu
      660              665              670
Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Ile Asp Met Ala Ser Phe Phe Thr Ser
      675              680              685
Asn Met Lys Phe Ala Asp Val Met Ile Tyr Arg Lys Asp Leu Gly Met
      690              695              700
Ser Asn Thr Ser Lys Thr Val Asp Thr Ser Glu Met Val Met Met Lys
      705              710              715              720
Asp Asp Leu Thr Tyr Leu Asp Ser Asp Met Leu Val Lys Arg Thr Tyr
      725              730              735
Lys Asp Val Met Met Met Ser Ser Met Met Asn
      740              745

```

[0023]

[0024]

상기 SP1을 누에 체액으로부터 분리, 정제하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 한국등록특허 제10-0530506호, 또는 본 발명자의 선행 연구인 「Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001) Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 224-228.」 및 「Rhee, W. J., E. H. Lee, J. H. Park, J. E. Lee, and T. H. Park (2007) Inhibition of HeLa cell apoptosis by storage-protein 2. *Biotechnol. Prog.* 23: 1441-1446.」를 참조하여 SP1을 수득할 수 있다.

[0025]

구체적으로, 본 발명은

[0026]

a) SP1 발현 벡터를 대장균에 도입하여 형질전환된 세포를 제작하는 단계;

[0027]

b) 형질전환된 세포를 배양하여 재조합 SP1을 생산하는 단계;

[0028]

c) 재조합 SP1이 생산된 세포를 파쇄한 후, 친화 크로마토그래피(Affinity chromatography)를 수행하여 세포 불순물로부터 SP1을 1차적으로 분리하는 단계;

[0029]

d) 분리물에 대해 프룩토오스(Fructose)가 첨가된 용출 버퍼(Elution buffer)를 이용한 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 수행하여 SP1을 정제하는 단계; 및

[0030]

e) 정제물을 초미세여과(Ultrafiltration)하여 농축시키는 단계;를 포함하는,

[0031]

프룩토오스를 이용한 누에의 저장 단백질 1의 재조합 단백질 생산방법을 제공한다.

[0032]

상기 SP1 발현 벡터(예컨대, pET23a 벡터에 SP1 유전자가 삽입된 것)에는 히스티딘 태그(Histidine tag)가 부착되어 있을 수 있다. 이를 통해 배양된 세포에 있는 수용성 SP1을 세포 파쇄 후 Histidine tag에 대해 결합이 가능한 친화 칼럼(Affinity column)을 이용하여 1차적으로 세포 불순물로부터 SP1을 분리할 수 있다. 한편 벡터에

삽입되는 저장 단백질 1(SP1) 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number) NM_001113276인 것일 수 있으며, 상기 대장균은 BL21(DE3) 균주일 수 있다.

[0033] 상기 c) 단계의 세포 파쇄 및 친화 크로마토그래피는, b) 단계를 거쳐 수득된 펠릿(Pellet)을 Lysis buffer에 서스펜션시킨 후 소니케이션한 다음 원심분리하여 상등액과 펠릿으로 분리하고, 상기 상등액에 존재하는 SP1을 친화 크로마토그래피를 수행하여 분리하는 것일 수 있다. 이 경우 상기 분리된 상등액에는 SP1의 수용성 형태(Soluble form)가 존재하고, 상기 분리된 펠릿에는 SP1의 불용성 형태(Insoluble form)가 존재하게 된다.

[0034] 상기 d) 단계의 사이즈 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography) 수행시 용출 버퍼(내지 용출 용매)에 프록토오스를 첨가하는 양은 재조합 SP1의 뭉침 방지에 적절한 양, 예컨대 2 M 정도의 농도가 되도록 첨가될 수 있다. 또한 상기 용출 버퍼로는 단백질 정제를 위한 사이즈 배제 크로마토그래피에 있어 당분야에서 통상적으로 사용되는 종류의 것을 특별한 제한없이 채택하여 사용할 수 있다. 한편 본 단계를 거치면 이미다졸(Imidazole)과 같은 불순물이 제거되어 순수한 재조합 SP1 단백질을 정제할 수 있게 된다.

[0035] 상기 e) 단계는 d) 단계를 거친 정제물을 초미세여과(또는 한외여과, Ultrafiltration)하여 농축시키는 단계로서, 본 발명의 경우 상기 프록토오스의 첨가에 따라 이처럼 고농도로 농축하여도 재조합 SP1이 응집되지 않는 차별화된 장점이 있다.

[0036] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 전술한 바와 같은 방법에 따라 생산/정제된 재조합 SP1 단백질이 제공된다.

[0037] 본 발명에 따른 재조합 SP1 단백질은 인간을 비롯한 포유동물의 세포사멸(아포토시스 또는 에이파토시스; Apoptosis), 특히 내재성 아포토시스 경로(Intrinsic apoptosis pathway)에 의해 유발되는 세포사멸, 예컨대 스타우로스포린(Staurosporine; STS)에 의해 유발되는 내재성 아포토시스를 특이적으로 억제하는 물질로 사용될 수 있다. 이를 통해 본 발명은 세포 배양시 세포의 생존율(Cell viability)을 증가시켜 바이오 의약품 등의 생산성을 크게 높일 수 있다. 한편 본 발명의 대량 생산 대상인 SP1은 Bcl-2 종류, 30K 단백질 또는 IAP(Inhibitor of apoptosis protein)와 같은 기존의 아포토시스 억제제와는 어떠한 서열상 일치성(Sequence homology)도 공유하지 않는바, 신규한 아포토시스 억제제로 취급될 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명자는 SP1의 인간세포 아포토시스에 대한 효과, 구체적으로 헬라세포(HeLa cell)에 대한 SP1의 항-아포토시스 효과를 실험을 통해 확인한 바 있다.

[0039] 따라서, 본 발명에 따른 재조합 SP1 단백질은 바이오 의약품(예컨대, 단백질) 생산용 세포 배양 배지의 첨가물, 또는 바이오 의약품(예컨대, 단백질) 생산을 위한 세포주 제작에 적합하게 사용될 수 있다. 여기서 상기 바이오 의약품은 치료용 단백질로서 모노클론 항체일 수 있다.

[0040] 아울러, 본 발명에 따른 재조합 SP1 단백질은 세포사멸(Apoptosis) 억제 효과와 더불어, 항-산화 효과 및 활성 산소 억제 효과를 갖는다. 그 결과 본 발명에 따른 재조합 SP1 단백질은 일반 화장품은 물론, 항-노화 등 기능성 화장품의 소재로도 매우 적합하게 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 재조합 SP1 단백질 생산방법은 정제 과정에서 발생하는 SP1의 응집 현상을 효과적으로 억제할 수 있으며, 특히 이러한 응집 억제 효과가 초미세여과를 통한 농축 후에도 현저하게 발휘되어 고농도의 재조합 SP1 단백질을 대량 생산할 수 있게 하는 장점이 있다.

[0042] 또한, 이렇게 정제된 재조합 SP1 단백질을 배양 배지에 첨가하였을 경우, 여전히 세포사멸(Apoptosis) 억제와 항-산화(및 활성산소 억제) 효과를 유지하였다.

[0043] 따라서, 본 발명은 세포사멸 억제가 필요하거나 항-산화 소재가 필요한 분야에 있어 이런 기능을 갖고 있는 SP1

을 대량으로 생산하는 과정에서 발생하는 문제를 해결하여 생산성을 극대화할 수 있는 방법이 된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 재조합 SP1 단백질의 SDS-PAGE, Western blot 및 I-TASSER 결과이다.

도 2는 재조합 SP1 단백질의 각 정제 과정에서의 수율 분석 결과이다.

도 3은 재조합 SP1 단백질의 항-아포토시스 및 항-산화 효과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

실시예

(1) 미생물 배양 및 SP1 생산

플레이트(w/Amp.)에 스트리킹(Streaking)되어 있는 BL21(DE3)-pET23a(+)-SP1 균주의 콜로니를 수집하여 LB broth(w/Amp.) 5mL에 종 배양(OD600 0.6~0.8)한 후, 1L LB broth에 접종하여 본 배양(OD600 0.6~0.8)하였다.

IPTG(0.5 mM)를 넣고 30℃에서 12시간 동안 인큐베이션하여 인덕션(Induction)하였다.

펠릿(Pellet)을 Lysis buffer에 서스펜션시킨 후, 소니케이션하고 원심분리를 실시하여 상등액과 펠릿을 분리하였다.

이때, 상등액에 SP1의 가용성(수용성) 형태(Soluble form)가, 펠릿에 SP1의 불용성 형태(Insoluble form)가 존재하였고, 상기 상등액에서 SP1을 정제하기 위해 여과(Filtration)를 실시하였다.

(2) SP1 정제 및 농축

여과(Filtration)한 상등액에 대해 His-Trap 컬럼을 이용하여 친화 크로마토그래피(Affinity chromatography)를 수행하였다.

재조합 SP1 단백질의 His-tag으로 바인딩(Binding)이 되었고 세척(Washing) 및 용출(Elution) 과정을 거쳐 SP1 단백질을 분리해 내었다.

용출 과정에서 혼합되어 있는 것으로 세포 독성이 있는 물질인 이미다졸을 제거하기 위해 사이즈 배제 크로마토그래피를 수행하였다.

크기에 따라 나오는 순서가 달라지는 원리를 이용하여, 크기가 작은 이미다졸보다 먼저 나오는 SP1 단백질을 취하였다. 이때 SP1 단백질의 응집을 막기 위해 프록토오스 2 M 용액을 사용하였다.

이렇게 분리한 SP1 단백질을 용액을 초미세여과하여 농축시켜 정량하였다.

실험예

(1) 재조합 SP1 단백질의 SDS-PAGE, Western blot 및 I-TASSER 결과

상기 실시예에 따라 생산된 재조합 SP1(rSP1)의 수용성 형태(lane #1), 리폴딩된 형태(Refolded form)(lane #2) 및 불용성 형태(lane #3)를 각각 로딩한 SDS-PAGE의 결과를 도 1A에 나타내었다. 이때 각각 2, 1 및 0.5 μg 로딩된 BSA standard를 이용하여 정량하였다.

또한, 안티-히스 태그 항체(Anti-His tag antibody)를 이용하여 수용성 형태(lane #1), 불용성 형태(lane #2) 및 정제된 rSP1(lane #3)를 각각 웨스턴 블롯하여 도 1B에 나타내었다.

[0062] 이들을 통해, 본 발명에 따라 생산된 재조합 SP1을 검출하고 정량할 수 있었다.

[0063] 또한, I-TASSER를 통해 rSP1의 구조를 예상하여 시각화한 결과를 도 1C에 나타내었다.

[0064] (2) 재조합 SP1 단백질의 각 정제 과정에서의 수율 분석 결과

[0065] 각 정제 과정에서의 수율을 분석하기 위해, 해당 과정의 생산물들을 SDS-PAGE 하여 밴드 정량(Band quantification)하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0066] 도 2에서 보듯이, 본 발명에 따른 경우 높은 수율 및 농도로 재조합 SP1 단백질을 최종 수득할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0067] (3) 재조합 SP1 단백질의 항-아포토시스 및 항-산화 효과

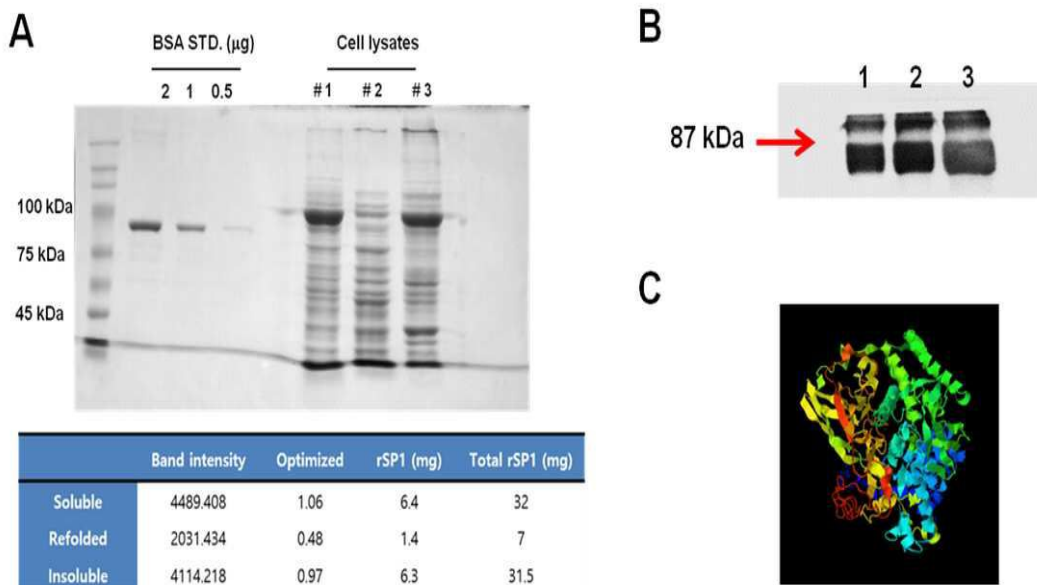
[0068] rSP1의 항-아포토시스(Anti-apoptosis) 효과를 분석하기 위해, rSP1을 세포(예컨대, HeLa 세포)와 함께 인큐베이션한 다음 1 μ M의 스타우로스포린(STS)으로 처리하여 0, 12, 18시간 후 트라이판 블루 배제 분석(Trypan blue exclusion assay)을 통해 세포 생존율(Cell viability)을 측정하고, 그 결과를 도 3A에 나타내었다.

[0069] 또한, rSP1의 항-산화 스트레스(Anti-oxidative stress) 효과를 분석하기 위해, rSP1을 세포와 함께 인큐베이션한 다음, 0.6 M의 H₂O₂로 처리하여 0, 12, 18시간 후 트라이판 블루 배제 분석을 통해 세포 생존율을 측정하고, 그 결과를 도 3B에 나타내었다.

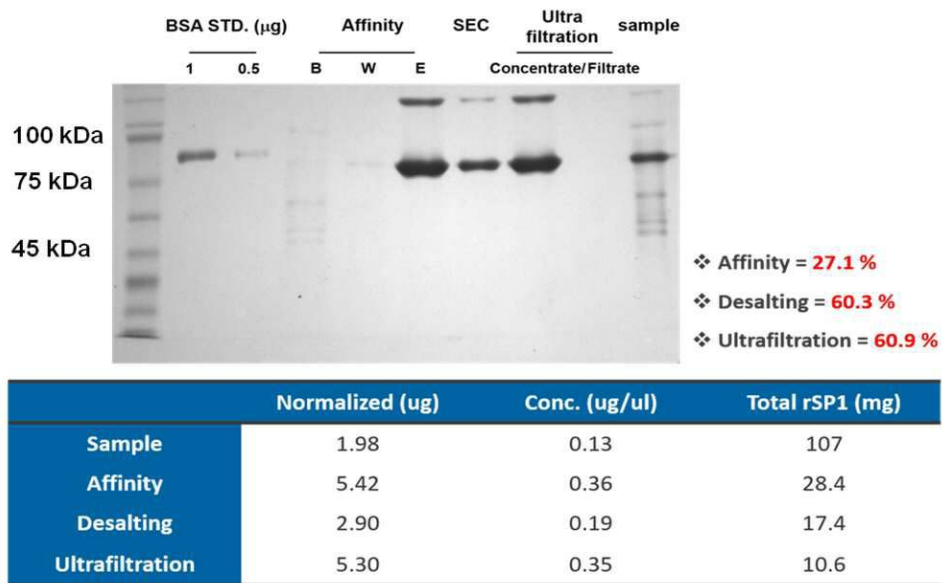
[0070] 도 3A 및 3B에서 보듯이, 본 발명에 따라 프록토오스를 사용하여 정제된 재조합 SP1 단백질은 여전히 우수한 항-아포토시스 및 항-산화 효과를 발휘함을 확인할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

