



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0077640
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/27 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0135648

(22) 출원일자 2008년12월29일

심사청구일자 2008년12월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

이지원

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

송중암

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

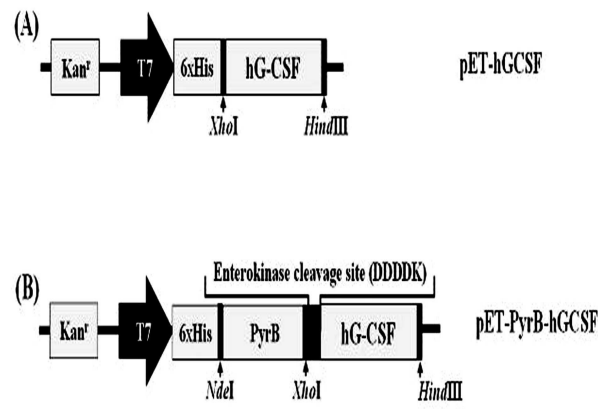
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이스 촉매 사슬을 융합발현파트너로 이용한 가용성 재조합 단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이스 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)를 융합발현파트너로 이용하는 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1) 융합 발현파트너(fusion expression partner)인 PyrB, 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 PyrB는 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, 의약품 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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A050750, ROA-2007-000-20084-0, M102KK010011-08K11

부처명 보건복지부, 과학기술부, 한국과학재단

연구사업명 보건의료기술연구개발 사업, 국가지정연구실 사업, 미생물 유전체 활용기술 개발 사업

연구과제명 초고감도 감염질환 진단 나노바이오센서의 개발, 생체나노프로브를 활용한 초고감도 나노바이오센서 기술, 병원성 미생물 유전체 정보 기반 차세대 나노입자 복합백신개발

주관기관 고려대학교 산학협력단, 고려대학교 산학협력단, 광주과학기술원

연구기간 2005년 5월 1일 ~ 2009년 3월 31일, 2007년 6월 25일 ~ 2012년 5월 31일, 2008년 5월 1일 ~ 2009년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)의 유전자, 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 발현벡터를 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, PyrB는 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, 발현벡터는 PyrB의 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, 발현벡터는 골격 벡터로서 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 단백질 제한효소를 처리하는 단계를 포함하는 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법.

청구항 12

융합발현파트너(fusion expression partner)로서 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 유전자 컨스트럭트는 PyrB의 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 푸린(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 16항에 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 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)를 융합발현파트너로 이용하는 재조합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 1) 융합 발현파트너(fusion expression partner)인 PyrB, 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.

배경 기술

[0002] 인체 내에 호중구계 과립구 또는 단구성 대식세포의 군체가 형성된다는 사실은 골수 분화 증식 실험을 통해 이미 알려졌다, 생체 내 이러한 군체를 형성하도록 자극하는 특정 인자가 존재한다는 사실이 알려졌다(Pluznik and Sachs, *J. Cell. Physiol.* 66(3):319-324, 1965; Bradley and Metcalf, *Aust. J. Exp. Bio. Med. Sci.* 44(3):287-299, 1996). 군체형성자극인자(Colony Stimulating Factor)로 총칭되는 인자들(인터루킨, EPO, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF 등)은 전구 간세포(progenitor stem cell)로부터 혈구 세포의 증식과 분화를 조절하는 역할을 하는데(Nicola, N. A., *Annu. Rev. Biochem.* 58:45-77, 1989), 특이성에 따라 다음과 같이 분류할 수 있다: 1) M-CSF(단구성 대식세포 자극인자)는 주로 단구성 대식세포의 군체를 형성시키며, 2) GM-CSF(과립성 백혈구 및 단구성 대식세포 자극인자)는 과립성 백혈구 또는 단구성 대식세포의 간세포를 증식/분화시켜 군체를 형성을 자극하고, 3) multi-CSF(다능성 세포 자극인자)는 미분화된 다능성 세포의 간세포에 작용하여 다능성 세포의 군체를 형성시키고, 4) G-CSF(과립구 군체 자극인자)는 과립성 백혈구 군체를 형성시킨다(Burgess et al., *J. Biol. Chem.* 252(6):1998-2003, 1977; Burgess et al. 1980, *Biochem. J.* 185(2):301-314, 1980; Nicola et al., *J. Biol. Chem.* 258(14):9017-9023, 1983).

[0003] 인간 과립구 군체 자극인자(granulocyte colony-stimulating factor; hG-CSF)는 약 20 KDa의 당단백질로서 유전자는 17번 염색체(chromosome)에 존재한다. 거식세포(macrophage), 활성화 T세포, 섬유아세포 또는 내피세포에 의해 주로 생산되며 호중구 콜로니의 증식, 전구 세포로부터의 호중구 세포로의 분화 및 성숙 호중구 세포의 활성화 등 역할을 한다고 알려져 있다(Nagata et al., *EMBO. J.* 5(3):575-581, 1986). 실제 hG-CSF는 생체 외에서 호중구의 군집 형성을 자극하고, IL-3와 함께 작용해서 아세포, 지혈세포 및 대식세포의 군체 형성을 자극하며, 일부 백혈병 마이엘로마 세포주(myeloid leukemic line)는 hG-CSF에 의해 성숙되는 것으로 알려져 있다.

[0004] hG-CSF의 임상적 용도는 다음과 같다: 1) 혈액 악성 종양 환자의 호중구 감소증에 대해 용량 의존적으로 호중구의 수를 증가시키고, 2) 악성, 임파종, 폐암, 난소암, 고환종양, 요도 상피암 및 급성 백혈병 등 각종 암에 대한 항암치료시에 화학요법으로 인한 호중구 감소증을 신속하게 회복시킬 수 있으며, 3) 골수 이형성 증후군에 의한 호중구 감소증을 신속하게 회복시키며, 4) 급성 비임파성 백혈병 및 만성 골수 백혈병의 골수 이식시 발

생하는 호중구 감소증을 회복시키며, 5) 선천성 또는 특발성 호중구 감소증 및 재생 불량성 빈혈에 따른 호중구 감소증을 회복시키며, 6) 항종양 화학요법에 의한 점막염 또는 열성 호중구 감소증의 발생을 방지하거나 감소시킨다(Drug Evaluations Annual 1993, American Medical Associations p.2232-2333).

[0005] 상기 설명한 바와 같이 의료용으로 매우 유용한 hG-CSF를 다량으로 얻기 위하여 여러 가지 유전공학적 시도가 이루어졌다. 그 중 hG-CSF 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시키는 방법이 주로 연구되어 왔다(Misawa and Kumagai 1999, *Biopolymers*. 51(4):297-307, 1999).

[0006] 융합발현파트너(fusion expression partner)로 사용되기 위해서는 자체 단백질의 높은 가용성 발현률, 효과적인 3차 구조 형성 및 높은 생산량 등의 특징을 가져야 한다. 단백질의 구조적 안정성 및 생산량 증가에 대한 연구는 다양한 방면으로 진행되고 있다. 상기 구조적 안정성은 단백질이 3차 구조를 형성하기 어려운 환경 조건(높은 온도, 낮은 pH, 높은 삼투압 및 단백질 구조 저해 물질이 포함되어 있는 환경)에서 정제된 단백질의 기능 유지 시간을 통해 확인하는 방법이 보고된 바 있으나(Park et al., *Appl. Microb. Biotech.* 75(2):347-355, 2007) 이는 정제된 단백질에 여러 스트레스를 가하는 것으로 단백질의 구조적 안정성을 분석하는 반면, 본 발명자들은 스트레스에 반응하여 발현되는 세포 내 단백질의 구조적 안정성을 직접분석하는 방법을 최초로 시도하였다.

[0007] 대장균은 다른 숙주세포에 비해 성장 속도가 빠르기 때문에 고농도 배양이 가능하며 전체 유전 정보가 밝혀져 있기 때문에 대량의 재조합 단백질을 생산하기 위한 균주로써 많이 사용되고 있다. 일반적으로 활성형의 3차 구조를 형성하기 위해서는 구조 형성에 도움을 주는 다양한 단백질(molecular chaperone)의 도움이 필요하고 여러 변형과정을 거쳐야 한다. 그러나 대장균은 진핵 세포에서 일어나는 단백질 3차 구조 형성과정을 완벽하게 수행하지 못하기 때문에 인간 유래의 의료용 단백질이나 산업용 효소 등 상대적으로 복잡한 구조를 가지는 단백질들을 직접 생산할 경우 불용성 응집체를 형성할 가능성이 높다(Ding et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:2102-2108, 2002). 따라서 대장균 내에서 목적 단백질의 가용도를 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).

[0008] 상기 설명한 바와 같이 대장균을 이용하여 재조합 단백질을 발현시켰을 경우, 정확한 3차구조 형성에 실패하여 발현된 대부분의 단백질은 불용성 응집체를 형성하게 된다. 또한 이렇게 생성된 재조합 단백질의 비활성 불용성 응집체를 활성형으로 만들기 위해 구아니딘-하이드로클로라이드(Guanidine hychloride) 또는 우레아(urea) 같은 변성제를 사용하여 용해시킨 후 회석하는 리폴딩(refolding) 등의 번역 후 공정(post-translational process)이 필요하므로 단백질 발현 후 추가적인 공정을 요구하여 경제적 비효율성의 요인을 제공하게 된다(Marston, F. A., *Biochem. J.* 240(1):1-12, 1986).

[0009] 이러한 문제점을 극복하기 위해서 대장균 내에서 안정적으로 생산되는 것으로 알려진 가용성 단백질을 융합발현파트너로 활용하여 목적 단백질의 N-말단에 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 용

합발현파트너의 발굴이 필요하며 더불어 새로운 개념의 융합발현파트너 라이브러리 구축이 요구된다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 대장균에서 고부가가치의 의료용 또는 산업용 재조합 단백질을 가용성 상태로 발현시키기 위한 새로운 개념의 융합발현파트너 개발에 노력하던 중, 올바른 구조 형성이 어려운 2-HEDS(2-hydroxyethyl disulfide) 등의 스트레스 환경에서도 자체 구조적 안정성을 유지할 수 있는 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)을 발굴하여 목적 단백질인 hG-CSF의 융합발현파트너로 이용하여 대장균에서 발현한 결과, 높은 가용성의 hG-CSF를 발현하였고 PyrB를 제거한 후에도 hG-CSF는 가용성 상태로 남아있었다. 결과적으로 가용성 hG-CSF의 발현량을 증가시키며 구조적 안정성을 유지시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 단백질의 접힘을 저해하는 강력한 스트레스 환경에서도 자체 구조적 안정성을 유지하는 대장균내 단백질인 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬을 다양한 목적 단백질에서 활용 가능한 범용성 융합발현파트너로 이용하여 천연형과 동일한 구조의 재조합 단백질을 가용성 상태로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)의 유전자, 및 외래단백질의 유전자를 연결한 발현백터를 제조하는 단계;

[0014] 2) 상기 발현백터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

[0015] 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 있어서, PyrB의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함하는 발현백터에 단백질 제한효소를 처리하는 단계를 포함하는 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 융합발현파트너로서 PyrB의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현백터를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 발현백터가 형질도입된 형질전환체를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0021] 아울러, 본 발명은 상기 재조합 융합 단백질에 추가적으로 단백질 제한효소를 처리하여 제조된 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질을 제공한다.

효 과

[0022] 본 발명은 강력한 스트레스 환경에서도 구조적 안정성을 유지하고 발현량이 증가되는 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)을 융합발현파트너로 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 방법으로 기존의 융합파트너가 가지고 있는 가용성과 접힘에 관한 한계를 극복할 수 있으므로 고부가가치의 의료용 또는 산업용 재조합 단백질을 생산함에 있어 폭 넓게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0024] 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.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은
- [0029] 1) 융합발현파트너(fusion expression partner)로서 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이즈 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)의 유전자, 및 외래 단백질의 유전자를 연결한 발현 벡터를 제조하는 단계;
- [0030] 2) 상기 발현벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- [0031] 3) 상기 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 이를 수득하는 단계로 구성되는 재조합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 PyrB는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 상기 서열과 90% 이상의 높은 상동성을 가지는 서열은 모두 사용가능하다.
- [0033] 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.
- [0034] 상기 제조방법에 있어서, 단계 2)의 숙주세포는 대장균(*E.coli*)을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 발현벡터의 PyrB의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 제한효소 인식부위를 추가적으로 포함시켜 제조한 재조합 융합 단백질에 단백질 제한효소를 처리하는 단계를 포함하는 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 상기 제조방법에 있어서, 단백질 제한효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위(enterokinase cleavage site), 제네나제(Genenase) I 인식부위 및 푸린(Furin) 인식부위로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 엔테로키나제 인식부위인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 본 발명자들은 대장균 단백질체(proteome) 중 산화제인 2-HEDS(2-hydroxyethyldisulfide)에 대항하여 높은 가

용도로 고수율 발현되는 단백질이 존재하고, 그 단백질은 자체 접힘 능력이 우수하여 결국 목적 단백질의 가용도를 높이고 활성형을 유지시켜줄 수 있는 융합발현파트너로 사용될 수 있을 것이라는 가정 하에, 대장균의 일반 환경에서의 단백질체와 2-HEDS 스트레스 상태에서의 단백질체를 2차 전기영동 및 MALDI-TOF을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 올바른 구조 형성을 저해하는 스트레스 환경에서 가용성 상태로 발현량이 7배 이상 증가한 단백질인 PyrB를 동정하였다(도 1 참조). 대부분의 단백질이 불용성 응집체를 이루거나 발현량이 줄어드는 환경 하에서 PyrB 단백질의 가용성 발현량이 반대로 증가한다는 결과를 통해서 PyrB 단백질은 구조적으로 매우 안정할 뿐만 아니라 본래의 기능이 스트레스에 대항하는 메카니즘에 관련되어있음을 알 수 있다. 따라서 스트레스에 따른 대장균 단백질체 분석을 통해서 확보한 PyrB가 융합발현파트너로서 이용할 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 본 발명자들은 PyrB 단백질을 융합발현파트너로서의 효율성을 검증하기 위해, PyrB를 hG-CSF의 아미노 말단에 융합하여 대장균용 발현 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 제조(도 2 참조)한 후, 대장균 균주에 형질도입하여 형질 전환체를 제조하여 목적 단백질을 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), PyrB를 융합발현파트너로 사용하여 발현한 제조합 hG-CSF는 가용성 발현량이 20배 이상으로 현저히 증가한 것을 알 수 있었다(도 3B 및 도 3C참조). 따라서 PyrB를 융합발현파트너로 사용하였을 경우 불용성 응집체를 형성하기 쉬운 hG-CSF를 가용성 상태로 발현할 수 있도록 유도하는데 있어서 탁월한 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

[0039] 본 발명자들은 의학적 치료용으로 사용되는 hG-CSF가 항원항체반응을 피하기 위해 융합발현파트너로부터 분리되어야 함을 근거로, PyrB를 hG-CSF로부터 분리하더라도 단독으로 남은 hG-CSF가 가용성 상태를 유지할 수 있는지 알아보기 위해, 엔테로키나아제(enterokinase)를 이용하여 제조합 hG-CSF로부터 PyrB를 제거한 후, 금속 크로마토그래피를 이용하여 제조합 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, PyrB가 제거된 제조합 hG-CSF는 여전히 가용성 상태로 존재하고 있음을 확인하였다(도 4 참조).

[0040] 본 발명자들은 PyrB 단백질을 융합발현파트너로 이용한 hG-CSF의 생산방법이 hG-CSF 고유의 구조를 유지하도록 유도하여 발현시키는지를 알아보기 위해, 상기 정제된 제조합 hG-CSF와 상업적으로 판매되고 있는 hG-CSF의 단백질 2차 구조의 변형 여부를 원평광 이색성 분광(CD) 분석을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 정제된 제조합 hG-CSF가 치료용으로 쓰이고 있는 hG-CSF와 동일한 단백질 2차 구조를 가짐을 확인하였다(도 5 참조).

[0041] 따라서, 본 발명의 PyrB를 융합발현파트너로 이용한 제조합 단백질의 제조방법은 의료용 또는 산업용 발현 제조합 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.

[0042] 또한, 본 발명은 융합발현파트너로서 PyrB의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트, 및 상기 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0043] 상기 발현벡터는 골격 벡터에 융합 파트너로서 PyrB의 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.

[0044] 상기 발현벡터는 PyrB의 유전자와 외래 단백질의 유전자가 작동 가능하도록 연결되기 위해, PyrB의 유전자와 외래 단백질 유전자 사이에 단백질 절단효소 인식부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 연결될 수 있다. 융합발현 파트너와 목적 단백질이 산업용 단백질일 경우, 융합발현파트너가 목적 단백질의 기능을 저하할 수도 있으며,

의학용 단백질일 경우는 항원항체 반응을 야기할 수 있으므로 융합발현파트너는 제거되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 단백질 절단효소 인식부위는 Xa 인자 인식부위, 엔테로키나제 인식부위, 제네나제(Genenase) I 인식부위 또는 퓨린(Furin) 인식부위가 단독으로 사용되거나 어느 두 개 이상을 순차적으로 연결하여 사용할 수 있다.

[0045] 상기 발현백터는 PyrB의 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.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 발현백터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제공한다.

[0047] 상기 발현백터는 융합발현파트너로서 PyrB의 유전자 및 외래 단백질의 유전자를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 PyrB는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 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.

[0048] 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0049] 아울러, 본 발명은 재조합 융합 단백질에 추가적으로 엔테로키나아제(enterokinase)를 첨가하여 제조된 PyrB가 제거된 가용성 외래 단백질을 제공한다.

[0050] 본 발명의 PyrB를 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.

실시예

[0051] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0052] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> 대장균 단백질체 분석

[0054] <1-1> 대장균에서 가용성 단백질의 회수

[0055] 본 발명자들은 대장균 BL21(DE3) 균주를 선택하여 단백질체 분석을 실시하였다. 8시간 이상 배양된 종균 배양액의 일부를 LB 배지에 접종한 다음 배양기에서 37℃에서 200 rpm으로 배양하였고(대조균), 단백질의 올바른 접힘을 저해하여 고유의 3차 구조를 이루지 못하게 하는 스트레스 하에서의 단백질체를 얻기 위해 2-HEDS(10 mM)을 포함하는 LB 배지에 종균 배양액의 일부를 접종하여 동일한 조건에서 배양하였다(실험균). 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) 캡스(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 캡스(CHAPS), 1% w/v DTT, 1% w/v 이동성 양

성전해질(carrier ampholyte), pH 4.7]에 현탁하여 2차원 겔 전기영동(2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2D-PAGE)용 시료로 -80℃에 냉동보관하였다.

[0056] <1-2> 2차원 겔 전기영동을 통한 대장균 단백질체 분석

[0057] 2차원 겔 전기영동을 이용하여 실시예 <1-1>의 방법으로 수득한 대조군과 실험군의 단백질체를 분석하였다.

[0058] 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 전기영동한 후, 은-염색(silver staining)을 통해서 단백질 스팟을 검출하였다. 염색된 겔은 GS-710 밀도계(densitometer)를 이용하여 스캐닝한 후 PDQuest 소프트웨어 버전 6.1을 이용하여 단백질 스팟을 확인하였다. 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 7배 이상 증가한 단백질의 스팟을 선정하였다(도 1).

[0059] <실시예 2> MALDI-TOF-MS 분석 및 단백질 동정

[0060] 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.

[0061] 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 7배 이상 증가한 단백질은 대장균 아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이스 촉매 사슬(Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain; PyrB)로 확인되었다(표 1).

표 1

[0062] 2-HEDS 스트레스 조건에서 발현량이 7배 이상 증가한 단백질의 동정 결과

유전자 이름	유전자 접근 번호 ^a	단백질 이름	등전점(pI)/분자량(kDa)		서열 유사성(%)
			이론값 ^b	실험값 ^c	
pyrB	POA786	아스파라긴산 카르바모일트랜스퍼레이스 촉매 사슬	6.13/34.28	6.25/35.40	23%

[0063] a: 유전자 접근 번호: ExpASY Proteomics Server(<http://www.expasy.org/>)에서 유전자 정보 검색용 식별번호이다.

[0064] b:이론값은 Compute pI/Mw tool(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 수집하였다.

[0065] c:실험값은 이차원 전기영동 젤 이미지로부터 산출하였다.

[0066] <실시예 3> hG-CSF의 단독 발현 벡터(pET-hGCSF) 및 PyrB 융합 발현벡터(pET-PyrB-hGCSF)의 제조

[0067] 본 발명자들은 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>의 방법으로 선정된 환경 스트레스 하에 가용성 발현량이 증가한 대장균 단백질 PyrB를 융합발현파트너로 포함하는 발현벡터를 제조하였다.

[0068] 인간 유래 G-CSF의 cDNA 서열을 포함하는 벡터를 주형으로 하여 hG-CSF 유전자의 염기 서열을 갖는 두 종류의 합성 DNA[프라이머 I: 5'-CTCGAGGACGATGACGA TAAACCCCCCTGGGCCCTGCC-3(서열번호: 2)']와 프라이머 II: 5'-AAGCTTTCAGGGCTGGGCAA GGTGGCG-3(서열번호: 3)']를 사용하여 PCR에 의해 재조합 hG-CSF를 코딩하는 유전자를 증폭하였다. hG-CSF는 시작코돈이 제거되고 정지코돈을 갖는 총 175개의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하였으며 hG-CSF의 N-말단 부위에는 *XhoI* 제한효소 부위에 바로 이어서 엔테로키나아제(enterokinase)에 의한 절단부위(DDDDK; 서열번호: 6)를 갖도록 설계하였다. PCR은 DNA 중합효소반응 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). PCR이 종료된 다음 증폭된 DNA를 1% 아가로스 젤(agarose gel)을 이용하여 분리하고 증폭된 DNA의 양쪽 말단을 *XhoI*과 *HindIII*으로 절단하여 pET-28a(+)(Novagen) 발현벡터의 제한효소 *XhoI*과 *HindIII* 자리에 삽입하였고, 이와 같이 만들어진 플라스미드를 'pET-hGCSF'라고 명명하였다.

[0069] 또한, 대장균 유래의 PyrB의 유전자를 획득하기 위해, *E. coli* strain BL21(DE3)[F⁻ *ompT* *hsdS_B*(rB⁻mB⁻)]의 게놈(genomic) DNA를 추출하고 이를 주형으로 하여 정지 코돈을 제외한 311개 아미노산(서열번호: 1)로 구성된 PyrB를 PCR 방법으로 증폭하였다. 이때 5' 말단에 *NdeI* 제한효소 인식 서열을, 3' 말단에 *XhoI* 제한효소 인식서열을 넣어 PCR을 수행함으로써 증폭된 DNA절편의 5'말단에 *NdeI*, 3'말단에 *XhoI* 제한 효소 부위를 갖도록 하였다. 상기 PCR을 위한 프라이머는 다음과 같다: 1) 5'-CAT ATG GCT AAT CCG CTA TAT CAG-3(서열번호: 4)' 및 2) 5'-CTC GAG CAG TAC CAG ATC GCG ATT-3(서열번호: 5)'. 상기 제조한 pET-hGCSF 플라스미드를 *NdeI*과 *XhoI*으로 처리하여 벡터의 *NdeI*과 *XhoI* 자리에 PCR을 통해 증폭된 PyrB의 유전자를 *NdeI*과 *XhoI*으로 각각 처리하여 삽입하였고, 이를 'pET-PyrB-hGCSF'라고 명명하였다.

[0070] <실시예 4> 재조합 단백질의 가용성 발현 및 SDS-PAGE를 이용한 확인

[0071] <4-1> 대장균 형질전환체의 제조

[0072] 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 발현벡터인 pET-hGCSF 및 pET-PyrB-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.

[0073] <4-2> 대장균 형질전환체의 배양 및 유전자 발현

[0074] 상기 재조합 발현 벡터로 형질 전환된 대장균 형질전환체를 이용하여 단독의 hG-CSF 및 PyrB와 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 3 내지 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 불

용성 응집체를 각각 $5 \times$ 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 식 1에 따라 용해도(%)를 계산하였다.

수학적 식 1

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

[0075]

[0076] 그 결과, PyrB 없이 hG-CSF가 단독 발현된 경우 가용성 정도는 4% 미만에 불과한 반면에, PyrB와 hG-CSF가 융합 발현된 경우에는 80%로 현저히 증가된 것을 확인하였다(도 3).

[0077] <실시예 5> PyrB가 분리되는 재조합 hG-CSF의 정제 및 이의 분석

[0078] 본 발명자들은 상기 <실시예 4>에서 제조한 융합발현 벡터(pET-PyrB-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.

[0079] 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. PyrB와 융합발현된 융합단백질[(His $\times$ 6)PyrB-(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 $\times$ 6)PyrB-(엔테로키나아제 부위)hGCSF에 엔테로키나아제 용액(enterokinase solution)[엔테로키나아제 5 μL , 10 $\times$ 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 PyrB가 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).

[0080] <실시예 6> 원편광 이색성 분광(CD) 분석을 통한 단백질 2차 구조 확인

[0081] 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-

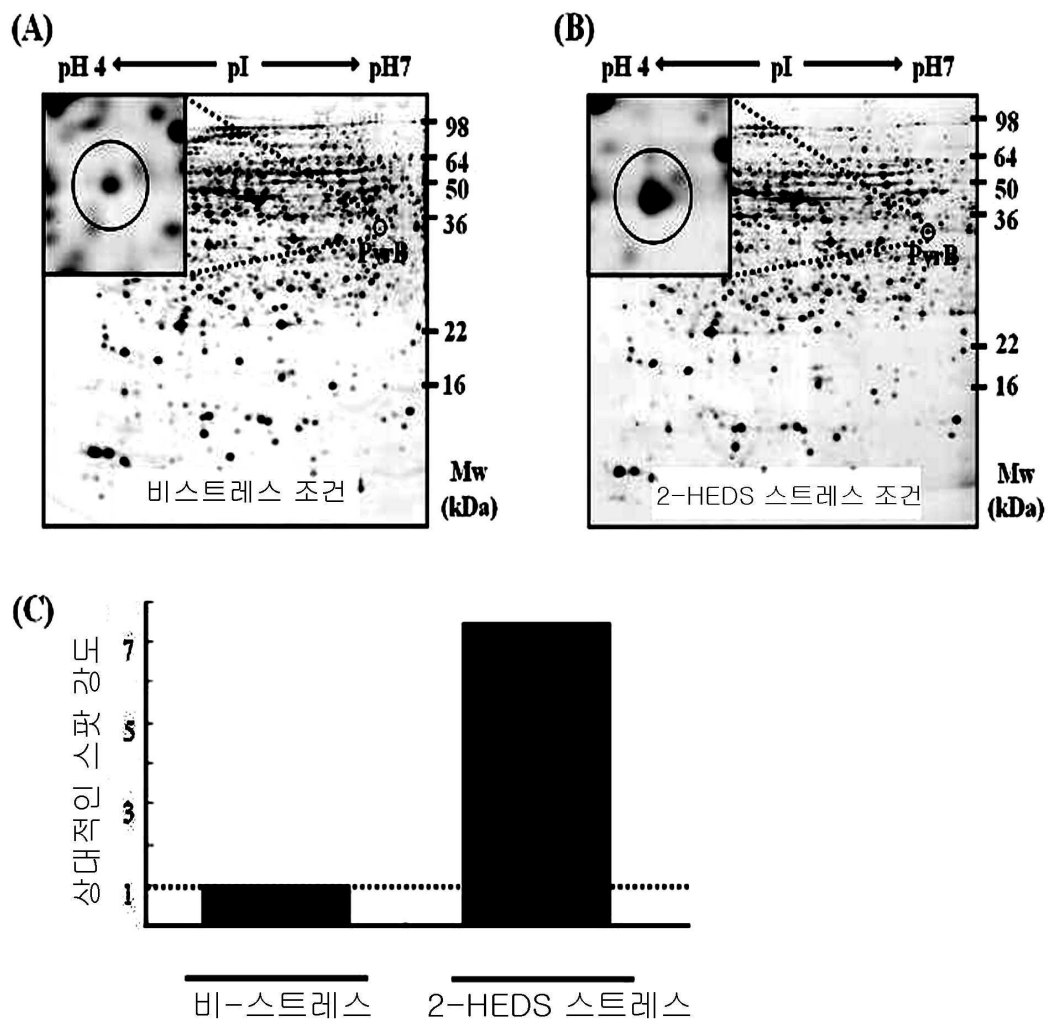
CSF[Grasin Prefilled-Syringe(Filgrastim), Kirin, Japan)]의 단백질 2차 구조를 비교 분석한 결과, 동일한 단백질 2차 구조를 가짐을 확인하였다(도 5).

도면의 간단한 설명

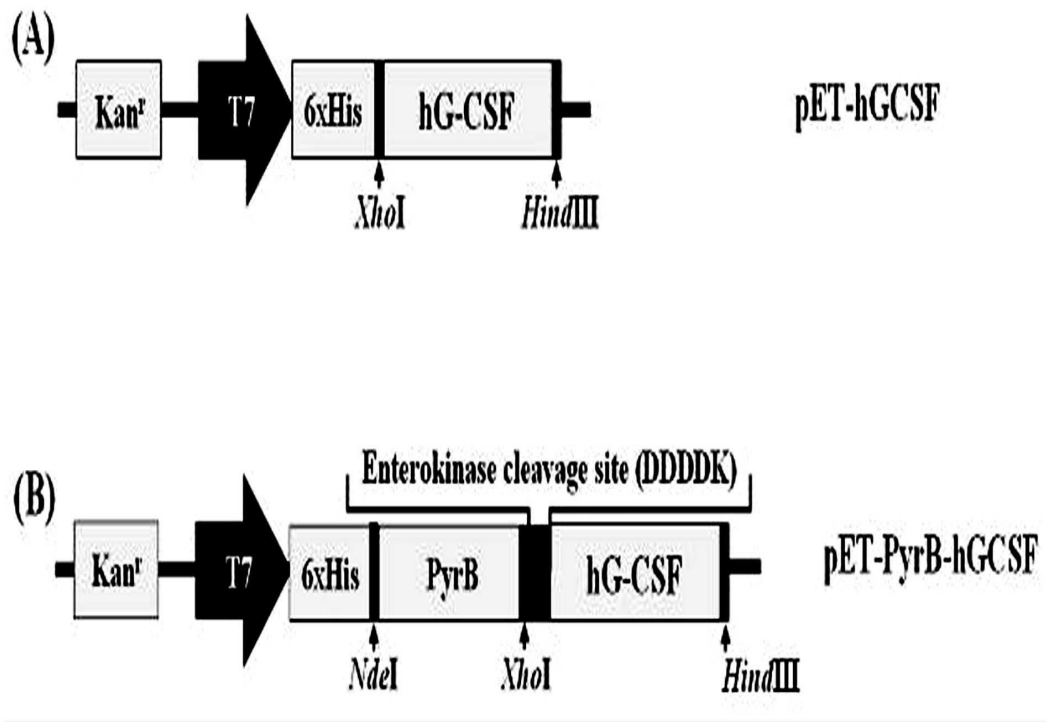
- [0082] 도 1은 정상적인 환경 및 2-HEDS 스트레스 환경에서의 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 단백질체(proteome)를 비교 분석 결과를 나타내는 그림이다.
- [0083] (A)는 정상적인 환경 하에서 대장균 단백질체의 2차원 겔 전기영동의 이미지를 나타내는 그림이다.
- [0084] (B)는 2-HEDS 스트레스 환경에서의 대장균 단백질체의 2차원 겔 전기영동의 이미지를 나타내는 그림이다.
- [0085] (C)는 정상적인 환경 및 2-HEDS 스트레스 환경에서의 PyrB의 상대적인 스팟 강도를 비교한 그래프이다.
- [0086] 도 2는 인간 과립구 군체 자극인자(hG-CSF)의 단독 발현벡터와 PyrB 융합 발현을 위한 벡터 디자인 나타내는 그림이다.
- [0087] (A)는 hG-CSF의 단독 발현벡터를 나타내는 그림이다.
- [0088] (B)는 His₆ tag 및 엔테로키나아제 절단 부위를 포함한 hG-CSF의 융합 발현을 위한 플라스미드 벡터를 나타내는 그림이다.
- [0089] 도 3은 hG-CSF의 단독 발현, 및 PyrB와 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).
- [0090] (A)는 hG-CSF 단독 발현의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 그림이다.
- [0091] (B)는 hG-CSF와 PyrB 융합 발현의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 그림이다.
- [0092] (C)는 hG-CSF의 단독 발현, 및 PyrB와 hG-CSF의 융합 발현 세포의 가용성(%)을 나타내는 그래프이다.
- [0093] 도 4는 정제된 hG-CSF의 SDS-PAGE 분석과 그의 웨스턴 블랏(Western blot) 분석 결과를 나타내는 그림이다(M: 분자 마커; S: 정제된 hG-CSF의 가용성 분획; 및 IS: 정제된 hG-CSF의 불용성 분획)(화살표는 정제된 hG-CSF를 나타낸다).
- [0094] (A)는 엔테로키나아제 처리에 의해 PyrB를 제거한 후, 정제된 재조합 hG-CSF의 가용성을 SDS-PAGE 분석한 결과를 나타내는 그림이다.
- [0095] (B)는 엔테로키나아제 처리에 의해 PyrB를 제거한 후, 정제된 재조합 hG-CSF의 웨스턴 블랏 분석한 결과를 나타내는 그림이다.
- [0096] 도 5는 정제된 hG-CSF의 원평광 이색성 분광(CD) 분석의 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0097] (A)는 PyrB:hG-CSF로 부터 분리한, 정제된 재조합 hG-CSF를 원평광 이색성 분광(CD)으로 분석한 결과를 나타내는 그림이다.
- [0098] (B)는 상업용 표준 hG-CSF를 원평광 이색성 분광(CD)으로 분석한 결과를 나타내는 그림이다.

도면

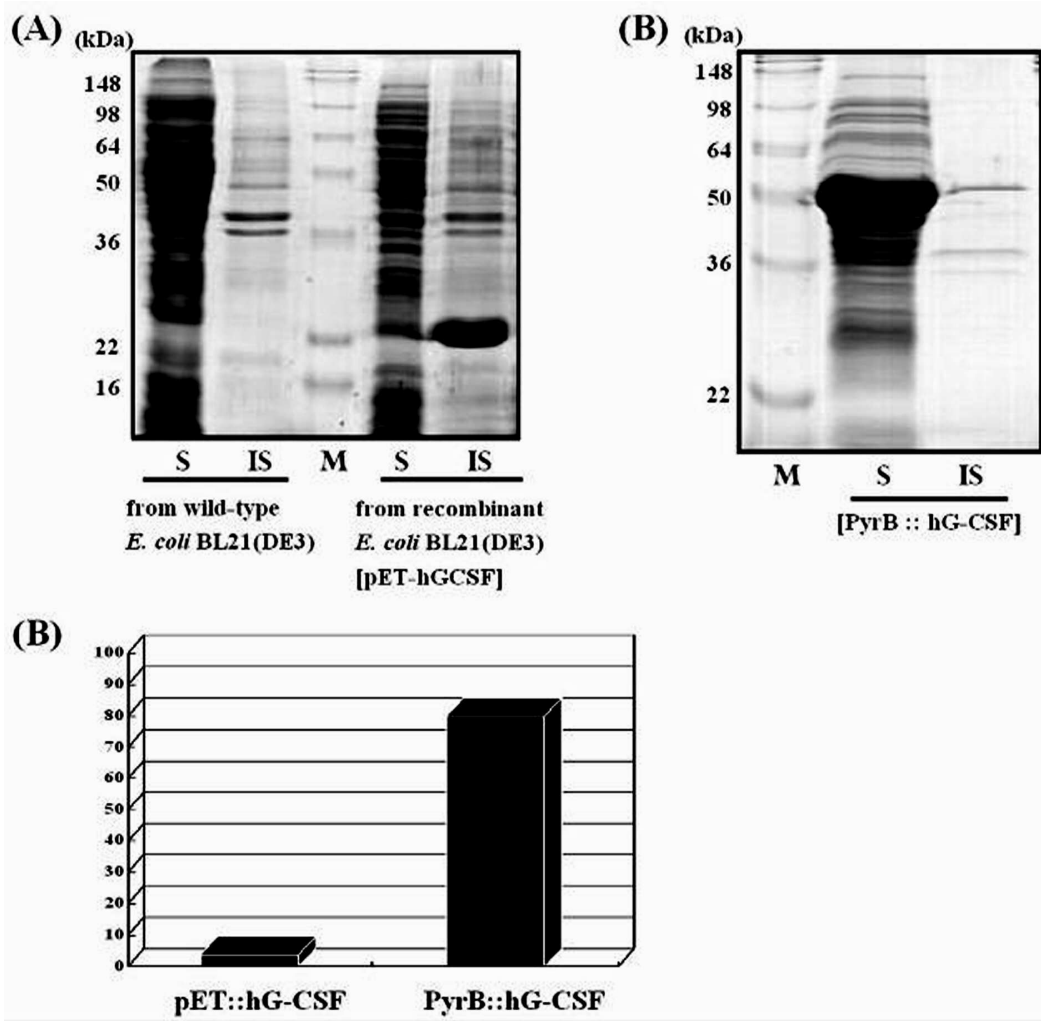
도면1



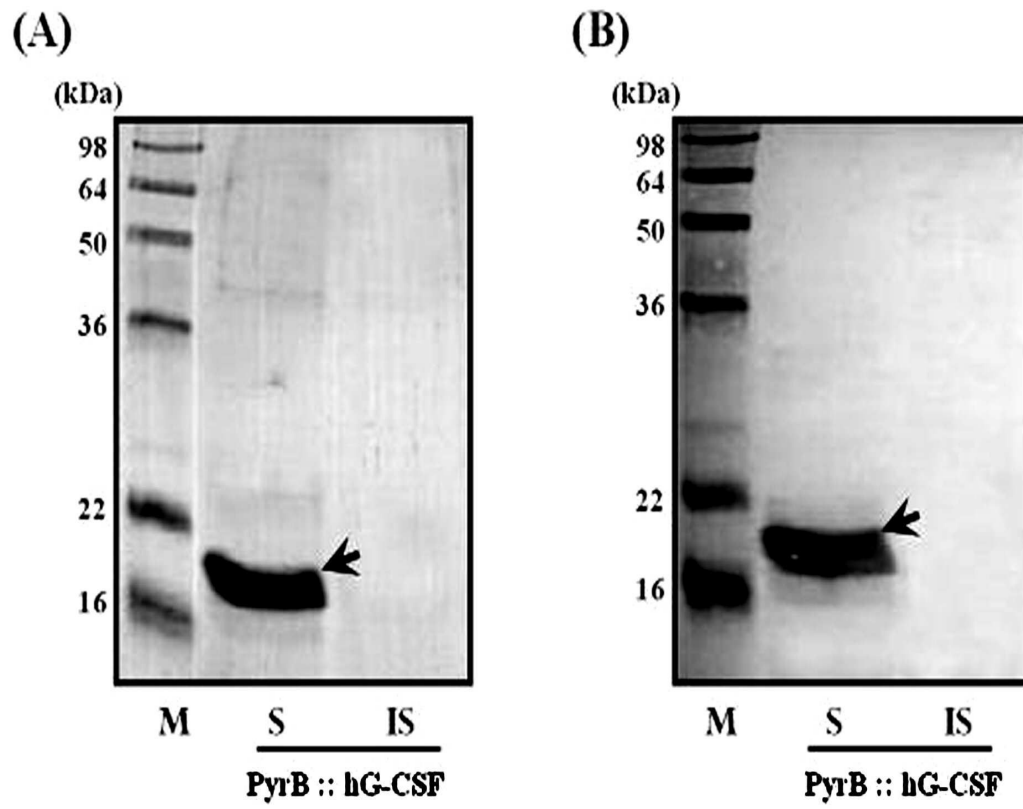
도면2



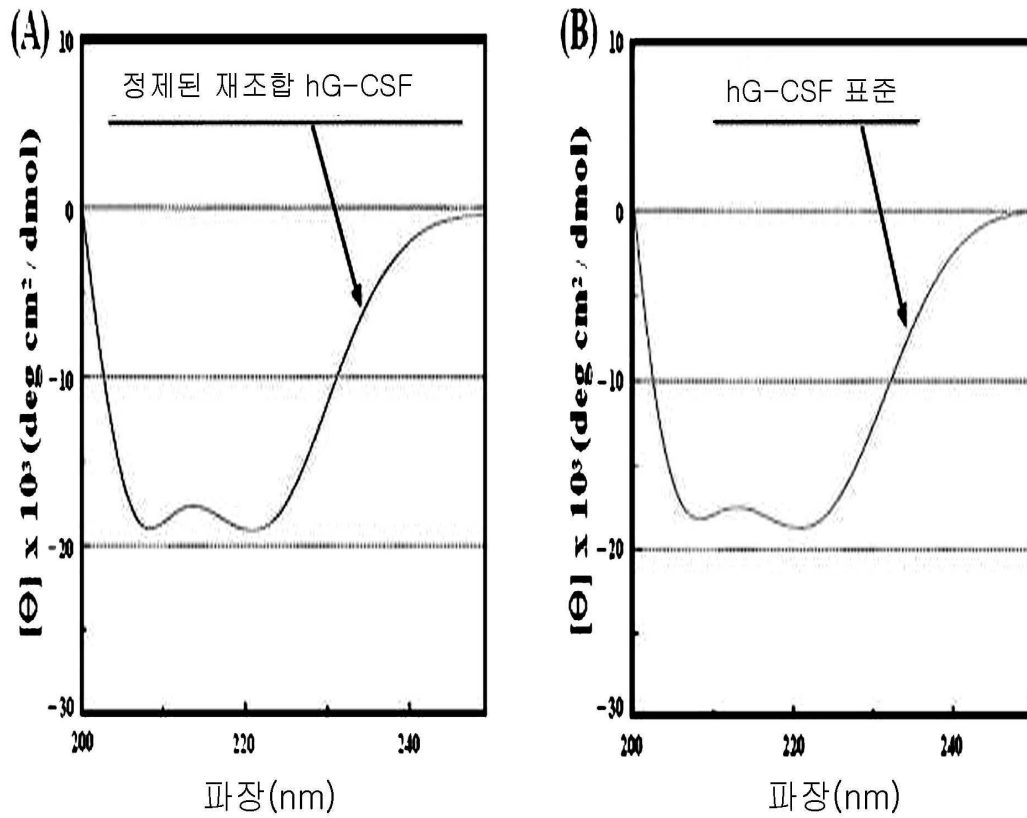
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> A preparation method of solubility recombinant protein by use of Aspartate carbamoyltransferase catalytic chain as a fusion expression partner

<130> 8p-09-05

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 311

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Met Ala Asn Pro Leu Tyr Gln Lys His Ile Ile Ser Ile Asn Asp Leu

1	5	10	15
Ser Arg Asp Asp Leu Asn Leu Val Leu Ala Thr Ala Ala Lys Leu Lys	20	25	30
Ala Asn Pro Gln Pro Glu Leu Leu Lys His Lys Val Ile Ala Ser Cys	35	40	45
Phe Phe Glu Ala Ser Thr Arg Thr Arg Leu Ser Phe Glu Thr Ser Met	50	55	60
His Arg Leu Gly Ala Ser Val Val Gly Phe Ser Asp Ser Ala Asn Thr	65	70	75
Ser Leu Gly Lys Lys Gly Glu Thr Leu Ala Asp Thr Ile Ser Val Ile	85	90	95
Ser Thr Tyr Val Asp Ala Ile Val Met Arg His Pro Gln Glu Gly Ala	100	105	110
Ala Arg Leu Ala Thr Glu Phe Ser Gly Asn Val Pro Val Leu Asn Ala	115	120	125
Gly Asp Gly Ser Asn Gln His Pro Thr Gln Thr Leu Leu Asp Leu Phe	130	135	140
Thr Ile Gln Glu Thr Gln Gly Arg Leu Asp Asn Leu His Val Ala Met	145	150	155
Val Gly Asp Leu Lys Tyr Gly Arg Thr Val His Ser Leu Thr Gln Ala	165	170	175
Leu Ala Lys Phe Asp Gly Asn Arg Phe Tyr Phe Ile Ala Pro Asp Ala	180	185	190
Leu Ala Met Pro Gln Tyr Ile Leu Asp Met Leu Asp Glu Lys Gly Ile	195	200	205
Ala Trp Ser Leu His Ser Ser Ile Glu Glu Val Met Ala Glu Val Asp	210	215	220
Ile Leu Tyr Met Thr Arg Val Gln Lys Glu Arg Leu Asp Pro Ser Glu	225	230	235
			240

Tyr Ala Asn Val Lys Ala Gln Phe Val Leu Arg Ala Ser Asp Leu His
245 250 255

Asn Ala Lys Ala Asn Met Lys Val Leu His Pro Leu Pro Arg Val Asp
260 265 270

Glu Ile Ala Thr Asp Val Asp Lys Thr Pro His Ala Trp Tyr Phe Gln
275 280 285

Gln Ala Gly Asn Gly Ile Phe Ala Arg Gln Ala Leu Leu Ala Leu Val
290 295 300

Leu Asn Arg Asp Leu Val Leu
305 310

<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> PyrB primer I

<400> 4

catatggcta atccgctata tcag

24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PyrB primer II

<400> 5

ctcgagcagt accagatcgc gatt

24

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> enterokinase cleavage site

<400> 6

Asp Asp Asp Asp Lys

1 5