

(19)대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년09월26일 10-0628024 2006년09월19일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2005-7000098	(65) 공개번호	10-2005-0028011
(22) 출원일자	2005년01월03일	(43) 공개일자	2005년03월21일
번역문 제출일자	2005년01월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/KR2003/001310	(87) 국제공개번호	WO 2004/005520
국제출원일자	2003년07월02일	국제공개일자	2004년01월15일

(30) 우선권주장	1020020038165	2002년07월03일	대한민국(KR)
------------	---------------	-------------	----------

(73) 특허권자	(주)넥스젠 대전광역시 유성구 원촌동 65-1
-----------	------------------------------

(72) 발명자	이선교 대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 108동 703호
----------	--------------------------------------

유제근 대전 동구 용전동 한숲아파트 112동 301호

박선희 경기 고양시 덕양구 행신동 햇빛마을 2005동 206호

(74) 대리인	특허법인세신
----------	--------

심사관 : 신원혜

(54) 식물에서 상피세포재생인자 및 인간 혈청 알부민을포함하는 융합 폴리펩타이드의 생산 방법

요약

본 발명은 상피세포재생인자 (EGF) 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법에 관한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 식물에서 상피세포재생인자 (EGF) 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드의 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

상피세포재생인자 (이하 "EGF"라 약칭함)는 다음과 같은 다양한 기능이 있다. 예컨대, 당뇨병성 족부궤양, 욕창 등의 궤양 부위에 EGF를 도포함으로써 피부 재생을 도와 증세 악화로 인한 사지 절단을 막을 수 있으며, 난치성 만성 피부 궤양과 위 궤양 등의 치료가 가능하다. 또한, EGF는 각막 손상, 제왕절개 등의 수술 후 수술 부위의 피부 재생과 상흔을 최소화하는데 효과가 있으며, 화상 환자의 피부 재생을 촉진하고, 주름 개선과 피부 재생 촉진을 위한 노화 방지용 기능성 화장품의 원료로도 사용되고 있다. 이에, 이러한 EGF의 생산을 위한 여러 시도들이 있었다.

첫째, 인간의 소변과 같은 천연의 원천으로부터 직접 EGF를 생산하려는 시도들(Gregory, H. et al., *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 356(11):1765-74(1975); and Savage CR Jr. et al., *Anal Biochem.* 111(1):195-202(1981))이 있었다. 그러나, 이러한 방법은 정제 과정 중에 침전 및 농축 과정이 빈번하여 회수율이 낮고 대량 생산 공정에는 적합하지 못했다.

둘째, 인간 EGF를 코딩하는 유전자를 대장균 (Smith et al., *J Gen Microbiol.*, 128(Pt 2):307-18(1982); and Taniyama et al., *Jpn J Cancer Res.* 77(2): 145-52(1986)), 바실러스 서브틸리스균 (Yamagata, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (10):3589-93(1989)) 또는 효모 (Urdea et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(24):7461-5(1983))에서 발현시켰다. 그러나, 이러한 방법은 몇가지 단점이 있었다. 예를 들어, 숙주세포에서 발현되는 EGF의 경우 세포 내에서 쉽게 단백질 분해 효소에 의하여 분해되어 유전자 발현을 몇 수율이 낮았다. 또한, 순도가 높은 인간 EGF를 얻기 위해서는 고속액체 크로마토그래피 컬럼을 사용하는 등 여러 공정 단계가 필요하여 가격이 매우 비싸지는 문제점이 있다.

이를 해결하기 위하여 단백질 분해효소로부터 EGF를 보호하기 위해 EGF를 세포 밖으로 분비시키는 발현 벡터를 이용하는 생산 방법을 보고하였다 (대한민국 등록특허 제 102993 호). 상피세포재생인자가 세포 밖으로 분비되도록 형질전환된 대장균을 이용하여 기존의 내독소 문제나 세포 내 불순 단백질의 오염을 감소시켰다. 또한, 역상 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 1차 정제한 후, 음이온 교환수지를 이용하여 2차 정제하고, 최종단계로 방사 압축된 C₁₈ 컬럼을 이용한 역상 고속액체 크로마토그래피법을 이용하여 EGF를 정제하였으나 복잡한 정제과정 등으로 인하여 생산가격 등이 문제가 될 수 있으며 제품화 시의 상피세포재생인자의 안정성이 문제가 될 수 있다.

그리고 융합 단백질을 이용한 EGF의 생산에 관한 연구가 있었지만 EGF를 포함하는 융합 단백질의 생산 후 엔도펩티데이스로 융합 부위를 절단하여 EGF만을 정제하는 번거로운 방법을 사용하고 있다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허 문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허 문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 더욱 간편한 방법, 특히 식물 반응기를 이용함으로써 높은 안정성을 가진 EGF를 생산하는 새로운 방법을 개발하기 위해 예의 연구하였다. 그 결과, 본 발명자들은 알부민 특히, 안정성을 보이는 인체 유래의 혈청 단백질인 알부민을 EGF의 융합파트너로 선택하였으며, EGF를 생산하기 위해 식물 반응기를 이용할 경우 간편하게 고순도로 생산하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 인간 상피세포재생인자 유전자 및 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 폴리타이드를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 피부 보호를 위한 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 인간 상피세포재생인자 (EGF) 및 상기 EGF의 C-말단 및 N-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하며 인간 혈청 알부민에 의해 EGF의 안정성이 증가한 융합 폴리펩타이드를 제공한다.

본 발명자들은 더욱 간편한 방법, 특히 식물 반응기를 이용함으로써 더 높은 안정도로 EGF를 생산하기 위한 신규한 방법을 개발하기 위해 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 EGF를 알부민에 결합시킴으로써, 특히 인간 혈청 알부민이 높은 안정도를 나타내고 EGF를 생산하기 위해 식물 반응기를 이용하게 되면 간편하게 높은 순도로 제조할 수 있음을 확인하였다.

본원에 사용된 단어 "상피세포재생인자 (이하 EGF라 약칭함)"는 다르게 표시되지 않는한 인간 상피세포재생인자를 의미한다. 인간 EGF 자체는 53 아미노산 폴리펩타이드이고 그의 아날로그는 폴리펩타이드 사슬에 있는 수많은 아미노산에서 차이가 난다. 이러한 다양성은 미국 특허 제 3,917,824호에 기재되어 있다. 가장 바람직하게는, 인간 EGF는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드이다.

본원에서 사용된 단어 "알부민"은 다르게 표시되지 않는한 인간 혈청 알부민 (이하 HSA로 약칭함)을 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 인간 혈청 알부민은 EGF의 C-말단에 연결된다. 실시예 12에 기재된 바와 같이, 융합 단백질에 있는 EGF, EGF-HSA는 HSA-EGF에 있는 EGF보다 훨씬 안정하다.

본원에서 사용된 표현 "EGF-HSA"는 EGF 및 EGF의 C-말단에 연결된 HSA를 포함하는 융합 단백질을 의미한다. 본원에서 사용된 표현 "HSA-EGF"는 EGF 및 EGF의 N-말단에 연결된 HSA를 포함하는 융합 단백질을 의미한다. EGF 및 HSA 사이에 있는 "-" 표시는 EGF 및 HSA 사이에 형성된 결합 (공유 결합)이다. 또한, 이러한 연결은 본원에서 부착, 연결 또는 융합으로 표현된다. EGF는 인공 펩타이드를 통해 또는 바람직하게는 HSA에 직접 연결될 수 있다.

EGF에 대한 언급으로써 "안정도"는 EGF가 본래 갖고 있는 활성 즉, 어떠한 조건이나 환경 하에서 시간이 지남에 따른 분열 활성을 유지하는 것을 의미한다.

융합 파트너 HSA에 결합한 EGF는 원래의 EGF에 비해 더 높은 안정도를 나타낸다. 또한, 그의 융합 파트너 HSA에 결합한 EGF는 그의 융합 파트너 HSA에 의해 영향을 받지 않으면서 그의 활성을 유지할 수 있다. HSA는 융합 단백질이 적용되는 인간에 대해 비-면역유도적이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, EGF 및 EGF의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 인간 혈청 알부민을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 EGF의 3'-말단에 연결되며, EGF-HSA가 생산될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, EGF를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열의 뉴클레오타이드 1-159를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 이러한 뉴클레오타이드 서열은 EGF의 알려진 뉴클레오타이드 서열을 변형시킴으로써 본 발명자들에 의해 신규하게 제조된다. 더 자세하게는, 본 발명의 신규한 서열은 (i) 박테리아 또는 식물체 세포, 바람직하게는 식물체 세포 중의 하나에서 발현되기에 적합한 코돈의 용도를 포함하고, (ii) dir 55%의 GC 함량을 가지고, (iii) 식물체에서 인트론 또는 인트론-유사 서열을 피할수 있도록 제조된다. EGF의 신규한 뉴클레오타이드 서열은 식물체 세포에서 발현하는데 매우 큰 장점이 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기에 기재된 본 발명의 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 상기 뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

단어 "기능적으로 연결된"은 핵산 발현 조절 서열 (프로모터, 신호 서열, 또는 전사 조절인자 결합 부위의 어레이) 및 이차 뉴클레오타이드 서열 사이가 기능적으로 연결된 것을 의미하고, 상기 발현 조절 서열은 이차 서열에 상응하는 핵산의 전사 및/또는 번역에 영향을 준다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, EGF의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열의 1-159 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

본 발명의 벡터 시스템은 삼부르크의 문헌 (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001))에 기재된 바와 같이 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 제조될 수 있으며, 상기 문헌은 참조로서 삽입된다.

일반적으로, 벡터는 클로닝 또는 발현의 목적으로 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 진핵 또는 원핵 숙주 세포에서 사용하기 위해 제조될 수 있다.

예를 들어, 벡터가 원핵 세포에서 발현하기 위해 제조된다면, 전사를 개시하기 위한 강력한 프로모터 (예, pL_A프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, *tac* 프로모터 및 T7 프로모터), 리보솜 결합 부위 또는 번역 개시 및 전사/번역 중지 서열을 포함한다. 특히, *E. coli*가 숙주세포로서 사용될 경우, *E. coli*에 있는 트립토판 생합성을 위해 프로모터 및 오페론에 있는 오퍼레이터 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 및 파지 λ의 왼쪽방향 프로모터 (pL_A프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 서열로써 사용될 수 있다. 숙주 세포로써 바실러스가 사용될 경우, 바실러스 슈린겐시스의 독신 단백질을 코딩하는 유전자에 대한 프로모터 (*Appl. Environ. Microbiol.* 64:3932-3938(1998); and *Mol. Gen. Genet.* 250:734-741(1996)) 또는 바실러스에 있는 다른 작동가능한 프로모터가 조절 서열로써 사용될 수 있다.

원핵 세포에 사용가능한 수많은 통상적인 벡터들은 당업자들에게 잘 알려져 있고, 적당한 벡터의 선별은 선별의 문제이다. 본 발명에서 사용된 통상적인 벡터는 pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX series, pET series, pUC19, λgt⁺ 4λB, λ-charon, λΔz1 및 M13을 포함하며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

예를 들어, 발현 벡터가 진핵 숙주 세포를 위해 제조될 경우, 그 중에서도, 동물 세포, 표유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물의 바이러스 (예, 아데노바이러스 레이트 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5 K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)로부터의 프로모터가 사용될 수 있다. 벡터는 일반적으로 전사체의 폴리아데닐화 부위를 포함한다. 상업적으로 이용가능한 바이러스-기초의 벡터의 예는 pcDNA 3 (Invitrogen; 사이토메갈로 바이러스 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함), pSI (Promega; SV 40 프로모터 및 폴리아데닐화 신호 포함), pCI (Promega; 사이토메갈로 바이러스 프로모터 및 폴리아데닐화 신호를 포함), 및 pREP7 (Invitrogen; RSV 프로모터 및 SV 40 폴리아데닐화 신호 포함).

발현 벡터가 효모에 대해 제조될 경우, 포스포글리세레이트 키나아제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나아제, 락타아제, 에놀라아제 및 알코올 디하이드롤라아제에 대한 유전자의 프로모터가 조절 서열로서 사용될 수 있다.

발현 벡터가 식물 세포에 대해 제조될 경우, 당업계에 알려진 다양한 식물체-기능적 프로모터가 사용될 수 있으며, 콜리플라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 슈가케인 바실리폼 바이러스 프로모터, 코메리나 옐로우 모틀 바이러스 프로모터, 리볼로스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제의 소단위 (ssRUBISCO)로부터의 빛-유도성 프로모터, 쌀 사이토졸릭 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스 (*Arabidopsis*)로부터의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터, 쌀 액틴 1 유전자 프로모터 및 만노핀 신타아제 및 옥토판 신타아제 프로모터를 포함한다.

또한, 본 발명의 발현 벡터는 발현된 융합 단백질을 간편하게 분리할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니지만 글루타치온 S-트랜스퍼라아제 (Pharmacia, USA), 말토오즈 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6X His (hexahistidine; Qiagen, USA)를 포함한다.

가장 바람직한 서열은 6X His이며, 이는 항원성을 나타내지도 않고 외래 융합 단백질의 요구되는 폴딩에 영향을 주지 않기 때문이다. 이러한 추가 서열 때문에 발현된 융합 단백질은 빠르고 간편한 방법으로 친화 크로마토그래피로 분리할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 융합 단백질은 친화 크로마토그래피에 의해 분리된다. 예를 들어, 글루타치온 S-트랜스퍼라아제의 경우, 글루타치온을 포함하는 용출 완충액이 사용되며, 외래 단백질을 빠르고 간편하게 분리하기 위해 6X His를 사용하는 경우, Ni-NTA His-결합 레진 (Novagen, USA)가 사용된다.

본 발명의 발현백터는 형질전환된 숙주를 선별 가능하게 할 수 있는 하나 또는 그 이상의 마커를 포함하는 것이 바람직하며, 예를 들어, 암피실린, 젠타마이신, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 네오마이신, 제네티신 및 테트라사이클린과 같은 항생체에 내성을 갖는 유전자, URA3 유전자, 금속 이온과 같은 다른 독성 화합물에 저항성을 가진 유전자가 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기에 기재된 본 발명의 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 형질전환체를 제공한다.

형질전환체를 제조하는데 유용한 숙주는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 원핵세포 숙주, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스, 살모넬라 타이피뮤리움, 세라티아 마르센세스 및 다양한 슈도모나스, 코리네박테리움 및 스트렙토마이세스가 사용될 수 있다.

진핵세포에서, 효모 (사카로마이세스 세레비시애), 곤충 세포, 인간 세포 (예, CHO, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물체 세포가 사용될 수 있다.

숙주 세포의 형질전환은 당업계에 알려진 수많은 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 숙주세포로서, 원핵세포를 사용하는 경우, CaCl₂ 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 헨슨 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); and Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기영동이 형질전환을 위해 사용될 수 있다. 또한, 숙주세포로서, 진핵세포를 사용하는 경우, 미세주입 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기충격 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개의 형질감염 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 입자 충격법 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990))이 형질전환을 위해 사용될 수 있다. 또한, 식물세포가 숙주세포로써 사용될 경우, 아그로박테리움-매개의 형질전환이 가장 바람직한 방법이며, 이는 원형질체로부터 인접한 식물체의 재분화를 위해 필요한 우회를 가능하게 하기 때문이다 (미국 특허 제 5,004,863호, 5,349,124 및 5,416,011호 참조).

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, EGF 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공하며, 하기 단계를 포함한다: (a) 상기 기재된 형질전환체를 발현시키기 위한 조건하에서 배양하는 단계; 및 (b) 생산된 융합 폴리펩타이드를 수득하는 단계.

형질전환체를 배양하기 위한 다양한 방법은 삼부르크 등의 방법 (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001))과 같이 당업계에 잘 알려져 있으며, 상기 문헌은 참조로써 삽입된다. 연속적인 공정을 위한 세포 성장 동안 또는 배치 배양을 위한 성장의 마지막 중에서 상기 수득과정을 수행할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 수득은 분리된 형태에 있는 융합 단백질을 수득하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질이 대용량으로 형질전환된 박테리아에 의해 발현될 경우, 일반적으로는 프로모터 유도 후에 발현되며, 그러나 발현은 지속되고, 단백질이 불용성 침전물을 형성하게 된다 (즉, 인클루전 바디). 인클루전 바디의 분리를 위한 적합한 몇가지 프로토콜이 있다. 인클루전 바디를 형성한 융합 단백질은 적합한 완충액을 이용하여 희석 또는 투석을 통해 재형성될 수 있다. 그리고 난뒤, 융합 단백질은 암모늄 설페이트, 크기 차별 여과 (울트라필트레이션) 및 컬럼 크로마토그래피 (크기, 네트 표면 전하, 소수성 또는 친화도에 의존)의 사용에 의해 용해도 분획화를 포함하는 당업계에 알려진 기본 방법으로 수행될 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하며, EGF 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법을 제공한다: (a) 하기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열로 식물 세포를 형질전환하는 단계: (i) 상기 기재된 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 식물 세포에서 기능을 하며 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서

열에 기능적으로 연결된 RNA 분자를 생산하게 하는 프로모터; 및 (iii) 식물 세포에서 기능을 하고 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 유발하는 3'-비-번역된 부위; (b) 형질전환된 식물 세포를 선별하는 단계; (c) 상기 형질전환된 세포로부터 식물체를 재분화시키는 단계; 및 (d) 상기 재분화된 식물체로부터 상기 융합 폴리펩타이드를 수득하는 단계.

상기에 기재된 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다른 숙주세포에 비교하여 식물체에서 발현하기에 훨씬 적합하다. 또한, 식물체에 있는 융합 단백질의 발현은 박테리아 숙주에서의 발현에 비해 몇가지 이점을 갖고 있다. 첫째, 박테리아 숙주에서 발현된 융합 단백질은 일반적으로 상기에 기재된 바와 같이 불용성 인클루전 바디를 형성하며, 본래 갖고 있는 활성을 가진 분리된 융합 단백질을 수득하기 위해 복잡하고 비용- 및 시간-소모성 단계를 필요로 한다. 그러나, 본 발명의 방법에 따르면, 식물체에서 발현된 융합 단백질은 수용성이고 활성을 띠기 때문에; 본래 갖고 있는 활성을 가진 분리된 융합 단백질을 수득하기 위해 복잡하고 비용- 및 시간-소모성 단계를 필요로 한다. 두번째로, 융합 단백질 자체를 포함하는 형질전환된 식물체는 본래 물질로서 제공될 수 있다. 세번째로, 융합 단백질을 생산하는 식물체는 독성을 갖지 않으며 인간에 해를 끼치지 않는다. 마지막으로, 생물반응기로써 식물체는 생산 시스템을 간편하게 하며 생산 비용을 상당히 감소시킨다.

본 발명에 사용된 3'-비-번역된 부위는 아그로박테리움 튜메파시엔스 (nos 3' 말단) (Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983))의 노팔린 신타아제 유전자로부터, 아그로박테리움 튜메파시엔스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터의 것, 감자 또는 토마토로부터의 프로테아제 인히비터 I 또는 II의 3'-말단, CaMV 35S 터미네이터를 포함한다.

식물 세포의 형질전환은 당업계에 알려진 통상적인 방법에 따라 수행할 수 있으며, 전기충격 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 입자 충격 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 및 아그로박테리움-유도된 형질전환 (미국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011호)에 따라 수행될 수 있다. 이들 중에서, 아그로박테리움-유도된 형질전환이 가장 바람직하다. 아그로박테리움-유도된 형질전환은 일반적으로 잎 절편 및 자엽 및 배축과 같은 다른 조직을 이용하여 수행할 수 있다.

형질전환된 세포의 선별은 형질전환된 배양을 메타볼릭 인히비터, 항생제 및 제초제와 같은 선별 제제에 노출시킴으로써 수행할 수 있다. 세포가 형질전환되고 선별 유전자에 저항성을 갖는 마커 유전자를 안정적으로 발현하면 배양동안에 성장 및 분화한다. 예를 들어 마커는 반드시 이에 한정되는 것은 아니지만 글리코포스페이트 저항성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템이 있다.

식물 원형질체 또는 다양한 외래 물질로부터의 식물체의 발생 또는 재분화는 당업계에 잘 알려져 있다. 생산된 형질전환 발근된 신초는 적합한 식물체 성장 배지에 치상된다. 아그로박테리움에 의해 유도된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발생 또는 재분화는 당업계에 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다 (미국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 and 5,416,011호).

아울러, 본 발명자들은 담배, 참외, 유채, 수박 및 오이와 같은 신규한 형질전환체 식물체를 개발하기 위해 노력하였으며, 그 결과 특정 식물체의 형질전환을 위한 가장 효율적인 방법을 구축하였다. 이러한 방법은 특허 출원되어 있다 (PCT/KR02/01461, PCT/KR02/01462 및 PCT/KR02/01463).

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 형질전환되어야 하는 식물체는 담배, 참외, 오이, 수박 및 유채이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, EGF의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 1-159를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하고, EGF 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법을 제공한다: (a) 식물체로부터 세포의 계층으로 삽입능력을 갖고 하기 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜메파시엔스를 이용하여 상기 식물체로부터의 외래 물질 (explant material)을 감염시키는 단계: (i) 상기 기재된 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 식물 세포에서 기능을 하며 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 연결된 RNA 분자를 생산하게 하는 프로모터; 및 (iii) 식물 세포에서 기능을 하고 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 유발하는 3'-비-번역된 부위; (b) 재분화된 신초를 얻기 위해 감염된 외래 물질을 재분화 배지에서 재분화시키는 단계; (c) 형질전환된 식물체를 얻기 위해 상기 재분화된 신초를 발근 배지에서 배양하는 단계, 상기 형질전환된 식물체는 (i)의 뉴클레오타이드 서열을 발현하는 능력을 갖고 있는 것을 특징으로 함; 및 (d) 상기 재분화된 식물체로부터 상기 융합 폴리펩타이드를 수득하는 단계.

본 발명에서, 형질전환체에 대해 적합한 외래물질은 발아된 종자로부터 유도된 어떠한 조직도 포함한다. 자엽 및 배축을 이용하는 것이 바람직하며 자엽을 이용하는 것이 가장 바람직하다. 종자의 발아는 적합한 배지를 이용하여 적당한 암/명 조건하에서 수행될 수 있다.

유도된 식물세포의 형질전환은 Ti 플라스미드 (Depicker, A. et al., Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983))를 포함하는 아그로박테리움 튜메파시엔스를 이용하여 수행된다. 더욱 바람직하게는, pBin19, pRD400 및 pRD320과 같은 바이너리 벡터 시스템이 형질전환을 위해 사용될 수 있다 (An, G. et al., Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986)). 본 발명에 유용한 바이너리 벡터는 하기 서열을 포함한다: (i) 식물 세포에서 작동할 수 있는 프로모터; (ii) 프로모터에 기능적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 신호 서열. 상기 벡터는 리포터 분자 (예, 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 바이너리 벡터에 사용된 프로모터의 예는 반드시 이에 한정되는 것은 아니지만 콜리플라우어 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 1' 프로모터, 2' 프로모터 및 노팔린 신테타아제 (nos) 프로모터를 포함한다.

아그로박테리움 튜메파시엔스로 외래물질을 감염시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 가장 바람직하게는 공동배양하기 위해 아그로박테리움 튜메파시엔스의 배양에 자엽을 침지시키는 단계를 포함한다. 아그로박테리움 튜메파시엔스는 식물체 세포로 감염된다.

아그로박테리움 튜메파시엔스로 형질전환된 외래 물질은 신초의 재분화를 성공적으로 유도하는 재분화 배지에서 재분화된다. 형질전환된 식물체는 최종적으로 재분화된 신초의 발근에 의해 발근 배지상에서 생산된다.

본 발명의 방법에 의해 생산된 형질전환된 식물체는 당업계에 알려진 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 형질전환된 식물체로의 조직으로부터의 DNA 시료를 이용하여, 형질전환된 식물체의 게놈에 삽입된 외래 유전자를 확인하기 위해 PCR을 수행한다. 선택적으로는, 매니아티스의 문헌 (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989))에 기재된 것과 같이 형질전환을 확인하기 위해 노던 또는 써던 블로팅이 수행될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 형질전환되는 식물체는 담배, 참외, 오이, 수박 또는 유채이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, EGF를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 기재되는 뉴클레오타이드 서열 1-159를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는 피부 보호용 화장품 조성물을 제공한다: (a) EGF 및 EGF의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하는 용합 폴리펩타이드; 및 (b) 화장품학적으로 허용가능한 담체.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다: (a) 유효성분으로써 EGF 및 EGF의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 약제학적으로 허용가능한 양으로 포함하는 용합 폴리펩타이드; 및 (b) 약제학적으로 허용가능한 담체.

인간 EGF는 상피세포 및 중간엽 세포를 포함하는 수많은 다양한 세포에 대해 분열활성을 가진다. EGF는 그의 분열작용의 결과로 인해 상처 치유의 속도를 증가시키는데 유용한 것으로 보고되었다. 또한, EGF는 위궤양을 치료하는데 유용하다고 보고되었다. EGF의 정리는 카펜터 등의 문헌 (Carpenter et al., in Epidermal Growth Factor, Its Receptor and Related Proteins, *Experimental Cell Research*, 164:1-10(1986))에 제공된다.

EGF의 치료학적 용도에서의 중요한 목적은 안정한 화장품학적/약제학적 EGF 제형의 개발이며, 긴 저장 기간을 갖고 EGF를 장기간 동안 활성의 상태로 유지할 수 있도록 하는 것이다. 그러나, EGF의 본래의 안정도 때문에 안정한 EGF 제형을 개발하는데 문제가 있다. 예를 들어 EGF는 수분의 존재하에서 생물학적 활성을 잃는다. 인간 EGF는 시간이 지남에 따라 활성을 잃고 다양한 종류의 EGF를 생산하게 하여 HPLC에 의해 검출할 수 있다. 이러한 다양한 종류의 EGF 분자는 EGF의 분해에 의해 생성되는 분해 산물인 것으로 믿어진다. 45°C에서의 EGF 배양은 포위된 온도에서 장기간 보관할 때 분해 산물의 형성을 촉진시킨다. 이러한 분해 및 EGF의 생물학적 활성이 감소하는 것이 단점이며, 이는 초과되는 기간 동안 EGF의 액상 또는 고체상 제형을 저장하기에 불가능하기 때문이다. 화장품 분야에서, EGF는 피부 보호로 광범위하게 사용되었다.

본 발명의 융합 단백질 자체는 EGF 각각을 수득하기 위해 절단 처리를 하지 않고 활성 성분으로 사용할 수 있다. 다르게 말하자면, 융합 단백질에 있는 EGF는 적합한 용해도를 나타내기 때문에, 화장품 제형을 제조하는데 적합하다. 특히, 융합 단백질에 있는 EGF는 융합되지 않은 EGF에 비해 훨씬 안정하므로, 융합 단백질을 포함하는 화장품 조성물은 장기간 동안 그의 활성을 유지할 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 융합 단백질은 상기에 기재된 본 발명의 방법에 따라 식물체에서 생산된다. 더욱 바람직하게는, 화장품 조성물에 있는 융합 단백질은 상기에 기재된 본 발명의 방법에 따라 아그로박테리움-유도된 식물 형질전환체에서 제조된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 융합 단백질에 있는 인간 혈청 할부민은 EGF의 C-말단에 연결된다.

본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 다양한 제형으로 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있다.

본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용가능한 담체는 제형에 따라 다양해질 수 있다. 예를 들어 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있다. 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 및 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 있으며, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.

더욱이, 본 발명의 화장품 조성물은 담체 이외에 다른 보조제를 포함할 수 있다. 예를 들어 보존제, 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료 등을 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물에서, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 가장 바람직하게는 국소 투여 방식으로 피부에 직접 적용하는 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 여드름의 심각도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 1 일 투여량으로 대략 0.001 mg/kg-100 mg/kg이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고, 도고제, 로션 및 연고를 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 약제학적 조성물은 위궤양 및 신경퇴행성 질환(미국 특허 제 5,200,396호; 예, 파킨슨씨병) 및 화상을 치료하기 위해 투여될 수 있으며, 이는 EGF와 관련된 분야의 당업자에 의해 인식되는 사항이다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 *E. coli*에서의 알부민-EGF의 클로닝 과정을 도식화한 개념도이다.

도 2는 *E. coli*에서의 EGF-알부민의 클로닝 과정을 도식화한 개념도이다.

도 3은 본 발명의 융합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 pET28a의 유전자 지도를 나타낸다.

도 4는 형질전환체로부터의 세포 파쇄 상등액을 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5는 융합 단백질을 분리한 후 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

도 6은 항-EGF 항체를 이용하여 융합 단백질을 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 본 발명에서 사용된 식물발현용 바이너리 벡터의 유전자 지도이다.

도 8은 각각의 형질전환 식물체에 대한 알부민-EGF의 융합 유전자의 PCR 산물의 결과물을 나타내는 사진이다.

도 9는 각각의 형질전환 식물체에 대한 EGF-알부민의 융합 유전자의 PCR 산물의 결과물을 나타내는 사진이다.

도 10은 식물 형질전환체로부터 융합 단백질을 분리한 후 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

도 11은 항-EGF 항체를 이용하여 식물 형질전환체로부터 분리한 융합 단백질을 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진이다.

실시예

실시예 1: EGF를 인코딩하는 신규한 유전자의 합성

53개의 아미노산으로 구성된 천연의 EGF를 코딩하는 본 발명의 유전자를 화학적으로 합성하였다(Plant Biotechnology Institute, National Research Centre, Saskatoon, SK, Canada). 합성된 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 나타내었으며, 이는 공지된 EGF 유전자와 차이가 났다.

실시예 2: 알부민-EGF 융합 유전자의 제작

실시예 1의 EGF 유전자를 증폭하기 위해, EGF를 코딩하는 합성유전자가 제한효소 5'쪽 말단에 *Bam*HI과 3'쪽 말단 *Hind*III의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하고 합성 EGF 유전자를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다: 역방향 프라이머 5'-CCC AAG CTT TCA GCG CAG TTC CCA CCA CTT-3'; 및 정방향 프라이머 5'-CGG GAT CCA ACA GCG ATT CAG AAT GTC CAC-3'. 상기 획득한 PCR 산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 EGF 유전자를 T4 DNA 리가아제(KOSCO CO.,

KOREA)를 이용하여 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단된 플라스미드 pUC18 (Clontech, USA)에 라이게이션하였다. 제조된 벡터를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* DH5α (Clontech, USA)에 형질전환 시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 배양하여 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 상기 형질전환세포로부터 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF 유전자가 삽입된 플라스미드 (EGF/pUC18)를 확인하였다 (도 1 및 도 3 참조).

인간 혈청단백질 알부민의 cDNA를 주형으로 하고 알부민 cDNA의 5'쪽 말단에 *Eco*RI과 3'쪽 말단 *Bam*HI의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하여 PCR을 실시하였다. 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다: 역방향 프라이머 5'-CGG GAT CCA CCG GTA CGC GTA GAA TCG AGA CC-3'; 및 정방향 프라이머 5'-CGG AAT TCA TGA AGT GGG TAA CCT TTA TTT CC-3'. 상기 획득한 PCR산물을 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 알부민 유전자를 T4 DNA 리가아제를 이용하여 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단된 EGF/pUC18 플라스미드에 라이게이션하였다. 제조된 벡터를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* DH5α에 형질전환 시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 배양하여 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 상기 형질전환세포로부터 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 알부민-EGF 융합 유전자가 삽입된 플라스미드 (알부민-EGF/pUC18)를 확인하였다 (도 1 및 도 3 참조).

알부민-EGF의 융합유전자를 pET28a 발현벡터에 옮기기 위하여 알부민-EGF/pUC18을 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단한 후 전기영동을 실시하고 알부민-EGF의 융합유전자를 아가로스젤에서 분리정제 하였다. 이 알부민-EGF의 융합유전자를 T4 DNA 리가아제를 이용하여 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단된 pET28a에 라이게이션하였다. 제조된 플라스미드를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* BL21 (DE3) (Clontech, USA)에 형질전환시킨 후 가나마이신 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 가나마이신 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 알부민-EGF 융합 유전자가 삽입된 플라스미드 (알부민-EGF/pET28a)를 확인하였으며, 구조유전자인 알부민과 상피세포재생인자의 유전자가 인프레임으로 융합된 것을 DNA 염기서열 분석에 의하여 확인하였다 (도 1 및 도 3 참조).

실시예 3: EGF-알부민 융합 유전자의 제작

실시예 1의 EGF 유전자를 증폭하기 위해, EGF를 코딩하는 합성유전자가 제한효소 5'쪽 말단에 *Bam*HI과 3'쪽 말단에 *Hind*III의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하고 합성 EGF 유전자를 주형으로 하여 PCR을 실시하였다. 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다: 역방향 프라이머 5'-CGG GAT CCG CGC AGT TCC CAC CAC TTA AG-3'; 및 정방향 프라이머 5'-CGG AAT TCA TGA ACA GCG ATT CAG AAT GTC CA-3'. 상기 획득한 PCR산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 EGF 유전자를 T4 DNA 리가아제를 이용하여 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단된 플라스미드 pUC18에 라이게이션하였다. 제조된 벡터를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* DH5α에 형질전환시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 배양하여 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 상기 형질전환세포로부터 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF 유전자가 삽입된 플라스미드 (EGF/pUC18)를 확인하였다 (도 1 및 도 3 참조).

인간 혈청단백질 알부민의 cDNA를 주형으로 하고 알부민 cDNA의 5'쪽 말단에 *Bam*HI과 3'쪽 말단에 *Hind*III의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하여 PCR을 실시하였다. 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다: 역방향 프라이머 5'-CCC AAG CTT TCA ACC GGT ACG CGT AGA ATC-3'; 및 정방향 프라이머 5'-CGG GAT CCA AGT GGG TAA CCT TTA TTT CCC-3'. 상기 획득한 PCR산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 알부민 유전자를 T4 DNA 리가아제를 이용하여 *Bam*HI과 *Hind*III으로 절단된 EGF/pUC18 플라스미드에 라이게이션하였다. 제조된 벡터를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* DH5α에 형질전환 시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 배양하여 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 상기 형질전환세포로부터 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF-알부민 융합 유전자가 삽입된 플라스미드 (EGF-알부민/pUC18)를 확인하였다 (도 2 및 도 3 참조).

EGF-알부민/pUC18 플라스미드를 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단한 후 전기영동을 실시하고 EGF-알부민 융합유전자를 아가로스젤에서 분리정제 하였다. 이 EGF-알부민의 융합유전자를 T4 DNA 리가아제를 이용하여 제한효소 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단된 pET28a에 라이게이션하였다. 제조된 플라스미드를 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* BL21 (DE3)에 형질전환시킨 후 가나마이신 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 가나마이신 저항성을 지닌 균주를 선별하였다. 클로닝된 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF-알부민 융합 유전자가 삽입된 플라스미드 (EGF-알부민/pET28a)를 확인하였으며, 구조유전자인 알부민과 상피세포재생인자의 유전자가 인프레임으로 융합된 것을 DNA 염기서열 분석에 의하여 확인하였다 (도 2 및 도 3 참조).

실시예 4: 융합 단백질의 분리

플라스미드 알부민-EGF/pET28a 또는 EGF-알부민/pET28a로 형질전환된 대장균 *E. coli* BL21 (DE3)를 5L 발효조에서 OD₆₅₀ 0.5가 될 때까지 배양한 후 0.5mM IPTG (Duchefa, Netherland)를 가하여 클론된 유전자들의 발현을 유도하였다. 5-6시간 더 배양한 후 세포들을 40 mL의 완충용액 (50 mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA)에 완전히 현탁시킨 후 초음파파쇄기를 사용하여 세포를 파괴한 다음 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액을 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법으로 발현유도 유무에 따른 융합단백질 발현차이를 확인하였다 (도 4 참조).

이 상등액을 결합용 완충용액 (20 mM 포스페이트, 0.5 M NaCl, 10 mM 이미다졸)으로 활성화시킨 니켈-아가로스 컬럼에 가하고 1-3 mL/min의 속도로 통과시켰다. 그리고 난 다음, 다시 결합용 완충용액으로 컬럼을 수회 세척한 후 20, 40, 60, 100, 300, 500 mM 이미다졸 용액 (pH 7.4)을 각각 컬럼에 적용하여 융합 단백질을 컬럼에서 1 mL씩 분획 용출시켜 융합 단백질 알부민-EGF 또는 EGF-알부민을 순수하게 분리 및 정제하였다. 분획 용액을 각각 시료로 하여 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법으로 정제된 융합 단백질 함유 분획을 확인하였다 (도 5 참조).

실시예 5: 웨스턴 블라팅에 의한 융합 단백질의 확인

상기 실시예 4에서 융합 단백질 (알부민-EGF 또는 EGF-알부민)의 존재가 확인된 분획에서 시료를 택하여 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하여 나타난 단백질 밴드를 PVDF 막에 전이한 후, 단백질이 전이된 PVDF 막에 1차 항체 (anti EGF-rabbit, 1:1000 희석, Santa Cruz, USA)를 가하여 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 상기 막에 2차 항체 (rabbit-goat HRP, 1:1000 희석, KPL, USA)를 가하고 다시 1시간 배양을 하고 막을 세척하였다. 항체의 부착이 완결된 후 4-클로로-1-나프톨을 기질로 하여 발색 반응을 실시하여 EGF가 융합된 단백질의 예상 크기에서의 발색 밴드를 조사하여 EGF의 융합 단백질의 존재를 확인하였다 (도 6 참조).

실시예 6: 알부민-EGF 융합 유전자의 식물 발현용 벡터의 제작

알부민-EGF 융합 유전자를 증폭하기 위해 프라이머 쌍을 디자인하고 합성하였다: 정방향 프라이머 5'-CTAGCTAGCGATGAAGTGGGTAACCTTTAT-3'; 및 역방향 프라이머 5'-CTAGCTAGCCGCGAGTTCCCACCACTTAAGA-3'. 알부민 유전자의 5'-말단에 위치하는 정방향 프라이머가 *NheI* 제한효소부위와 알부민 유전자의 시작 코돈을 갖도록 하며, 3'-말단에 위치하는 역방향 프라이머는 PCR 후 PCR산물에 EGF 유전자의 종결 코돈과 제한효소부위 *NheI*이 생성되도록 디자인하였다. PCR 시료조성은 1.25 unit Taq DNA 중합효소 (Boehringer Mannheim), 2.5 μ L 10 x 완충액 (Boehringer Mannheim), 2 μ L 2.5 mM dNTP, 0.25 μ L 100 pM 프라이머 및 실시예 2에서 제조한 50 ng의 융합된 알부민-EGF 유전자를 포함하는 DNA 총 25 μ L로 수행하였다. PCR은 하기 조건 하에서 MinicycleTM (MJ Research, Inc., USA)이용하여 실시하였다: 95°C에서 전-변성 2분 실시한 뒤 55°C에서 프라이머의 어닐링 1분, 72°C에서 신장 1분, 92°C에서 변성 1분의 조건으로 30회 반응시킨 뒤 72°C에서 후-신장 10분. PCR후 시료를 분석하기 위하여 4°C로 유지하였고 0.8% TAE 아가로스 젤에 전기영동을 하였다. 상응하는 크기의 밴드를 일루션하여 융합된 알부민-EGF DNA 단편을 회수하였다. 정제된 알부민-EGF 유전자 단편을 제한효소 *NheI*으로 절단한 후 제한효소 *XbaI*으로 절단한 식물 발현용 바이너리벡터 pRD400 (Raju et al., *Gene* 211: 383-384(1992))에 도입하여 알부민-EGF 유전자 식물발현용 벡터를 제작하였다 (도 7 참조).

실시예 7: EGF-알부민 융합 유전자의 식물 발현용 벡터의 제작

알부민-EGF 융합 유전자를 증폭하기 위해 프라이머 쌍을 디자인하고 합성하였다: 정방향 프라이머 5'-CTAGCTAGCGATGAACAGCGATTTCAGAATG-3'; 및 역방향 프라이머 5'-CTAGCTAGCCCCGGTACGCGTAGAATCGAGA-3'. EGF 유전자의 5'-말단에 위치하는 정방향 프라이머가 *NheI* 제한효소부위와 EGF 유전자의 시작 코돈을 갖도록 하며, 3'-말단에 위치하는 역방향 프라이머는 PCR 후 PCR산물에 알부민 유전자의 종결 코돈과 제한효소부위 *NheI*이 생성되도록 디자인하였다. 실시예 6과 동일한 방법으로 PCR 증폭하여 확보한 정제된 EGF-알부민 유전자 단편을 제한효소 *NheI*으로 절단한 후 제한효소 *XbaI*으로 절단한 식물발현용 바이너리벡터 pRD400에 도입하여 EGF-알부민 유전자 식물 발현용 벡터를 제작하였다 (도 7 참조).

실시예 8: 식물 형질전환

실시예 8-1: 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 제조

발현 벡터, pRD400::실시에 6의 (알부민-EGF) 또는 pRD400::실시에 7의 (EGF-알부민)를 접합 (conjugation)에 의하여 각각 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (mp90); Plant-cell-rep. 15(11): 799-803 (1996))로 도입시켰다. 발현벡터가 도입된 아그로박테리움을 선발하기 위하여, 접합을 실시한 혼합액을 50 mg/L 가나마이신, 30 mg/L 겐타마이신이 첨가된 LB 고체배지에 도말한 후 28℃에서 2일 배양한 후 선별하였다. 선발된 유전자를 지닌 아그로박테리움을 슈퍼브로스 (BHI 배지, pH 5.6)에 접종한 후 28℃에서 2일간 배양한 후 식물체의 감염에 사용하였다.

실시에 8-2: 참외 형질전환

1% NaOCl 용액으로 소독한 참외 종자를 파종하여 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 100 μ M 아세트시린곤 (acetosyringone)이 함유된 슈퍼 브로스 (Super broth: 37 g/L Brain heart infusion broth(Difco) 및 0.2% 수크로스 (pH 5.6))에서 18시간 동안 28℃에서 배양한 다음, 배양액을 감염 배지를 이용하여 20배로 희석하였다. 상기 감염 배지 (pH 5.6)는 MSB5 (Murashige & Skoog medium including Gamborg B5 vitamins), 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid Monohydrate], 6.0 mg/L 키네티, 1.5 mg/L IAA (Indole-3-acetic acid), 1.0 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μ M 아세트시린곤 및 5% DMSO (dimethylsulfoxide)를 포함한다.

이어, 상기 자엽을 감염 배지 40 mL에 침지시킨 후 아그로박테리움 튜머파시엔스와 함께 20분 동안 배양하였다. 그리고 난 후, 자엽을 공동배양 배지로 옮겨 바깥면이 위쪽을 향하게 하였다 (outface being upward). 공동배양 배지는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 6.0 mg/L 키네티, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 μ M 아세트시린곤 및 5% DMSO를 포함한다. 상기 자엽을 암배양 조건 ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 24시간 night)으로 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양하고 난 뒤, 자엽으로부터 싹을 발생시키기 위해, 자엽을 선발 배지에 치상하고, $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건에서 3주 동안 광배양 하여 싹의 재분화를 유도하였다. 선발 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 6.0 mg/L 키네티, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린을 포함한다. 재분화된 싹을 새로운 선발 배지에 옮겨 2주일 동안 배양하였다.

그리고 난 뒤, 신장된 싹을 발근 배지에 이식하여 2주일 동안 배양하였다. 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 싹을 선별하였다. 발근 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 0.1 mg/L NAA (α -Naphtalene Acetic Acid), 1.0 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.6% 아가, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린을 포함한다.

실시에 8-3: 오이 형질전환

1% NaOCl 용액으로 소독한 오이 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-2와 같은 조건으로 배양하였다. 상기 오이 자엽 절편을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다.

그런 다음, 2일 동안 26℃에서 광배양 조건으로 MSB5, BAP 2 mg/L, NAA 0.01 mg/L가 함유된 공동배양 배지에서 광배양한 다음 4℃에서 4일 동안 아그로박테리움 튜머파시엔스 및 자엽을 공동배양하였다. 공동배양하고 난 후, 자엽을 선발 배지에 넣어 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건에서 배양하였다. 선발 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3% 수크로스, 0.5 g/L MES, 0.4% Phytigel, BAP 2 mg/L, NAA 0.01 mg/L, 카르베니실린 500 mg/L 및 카나마이신 100mg/L을 포함한다. 이어, 재분화된 싹을 일정량의 발근 배지 (NAA 0.01 mg/L, 카나마이신 100 mg/L 및 아가 0.4%)에 옮겨 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건으로 배양하였다. 발근한 개체를 형질전환체로 추정하여 선별하였다.

실시에 8-4: 수박 형질전환

1% NaOCl 용액으로 소독한 수박 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-2와 같은 조건으로 배양하였다. 상기 오이 자엽 절편을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다. 그런 다음, 4.04 g/L MSB5,

BAP 2 mg/L, 0.5 g/L MES 및 0.6% 아가를 포함하는 공동 배양배지 (pH 5.6)에 치상하고, 4000 Lux로 16시간의 광배양 조건에서 2일간 25°C±1°C로 배양하였다. 배양한 자엽은 MSB5, BAP 2 mg/L, 3.0% 수크로즈, 0.5 g/L MES, 0.4% phytagel, 카베니실린 500 mg/L 및 카나마이신 200 mg/L를 포함하는 재분화 배지 (pH 5.6)에 치상 후 7일간 25°C±1°C에서 배양하여 신초의 재분화를 유도하였다. 그리고 난 후, 상기 신초를 카나마이신 200 mg/L를 포함하는 선별 배지에서 4주 동안 배양하여 발근된 신초를 선별하여 이를 형질전환체로 추정하였다.

실시에 8-5: 유채 형질전환

소독한 유채 종자를 과중하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 엽병을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-2와 같은 조건으로 배양하였다. 상기 유채 엽병을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다.

그런 다음 상기 엽병을 MSB5, 3% 수크로즈, 1 mg/mL 2,4-D 및 6.5 g/L 아가 분말을 포함하는 공동 배양배지 (pH 5.8)에 25°C에서 2일 배양한 후 4°C에서 4일 배양하였다. 형질전환된 유채를 선별하기 위하여, 선발 배지로 옮긴 후 2주 동안 25°C, 16h 명/ 8h 암 조건에서 배양하였다. 선발 배지 (pH 5.8)는 MSB5, 3% 수크로즈, 5 g/L MES, 2 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA, 20 mg/L 카나마이신, 500 mg/L Pseudopen 및 6.5 g/L 아가 분말을 포함한다. 신초의 뿌리를 유도하기 위하여 MSB5, 3.0% 수크로즈, 5 g/L MES, 0.1 mg/L NAA, 20 mg/L 카나마이신, 500 mg/L Pseudopen 및 6.5 g/L 아가를 포함하는 뿌리유도 배지 (pH 5.8)로 옮긴 후 뿌리를 유도하였다.

실시에 8-6: 담배 형질전환

소독한 담배 종자를 과중하여 2주 이상 무균 배양한 신선하고 어린 담배잎을 채취하였다. pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-2와 같이 배양하여 상기의 실시예 8-2와 동일한 감염배지에 혼합하였다. 이 감염 용액에 채취한 담배잎을 0.5-1cm²의 크기로 절단하여 10-15분 동안 침지시킨 후, MSB5, 3.0% 수크로즈, 0.5 g/L MES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA 및 0.6% 아가를 포함하는 공동배양 배지 (pH 5.8)로 옮겼다.

상기 담배잎 절편을 암배양 조건 (26 ±1°C, 24시간 밤)으로 2일 동안 공동배양하였다. 공동배양하고 난 뒤, 재분화에 의해 신초를 형성하고 형질전환된 신초를 선발하기 위해, 잎 절편을 선발 배지에 치상하고, 26 ±1°C 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건에서 2주 동안 광배양 하여 신초의 발생을 유도하였다. 선발 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로즈, 0.5 g/L MES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, 0.6% 아가, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린을 포함한다. 신장된 신초를 발근 배지에 이식하여 2주일 동안 배양하며 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다. 발근 배지 (pH 5.6)는 MSB5, 3.0% 수크로즈, 0.5 g/L MES, 0.01 mg/L NAA, 0.6% 아가, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린을 포함한다.

실시에 9: 식물 형질전환체의 확인

상기 실시예 8에서 확보한 형질전환체의 확인은 다음과 같이 실시하였다.

선발 배지에서 형질전환체로 선발된 신초 10 mg으로부터 에드워드 (Edwards) 방법 (*Nucleic Acids Research*, 19:1349 (1991))을 사용하여 식물 지놈 DNA를 분리한 후, 이를 주형 DNA로 하여 PCR 분석을 실시하였다.

알부민-EGF 융합 유전자로 형질전환된 식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는: 전방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCGATGAAGTGGGTAACCTTTAT-3'이고, 역방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCCGCAGTTCCCACCACTTAAGA-3'이다.

EGF-알부민 융합 유전자로 형질전환된 식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는: 전방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCGATGAACAGCGATTTCAGAATG-3'이고, 역방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCCCGGTACGCGTAGAATCGAGA-3'이다.

PCR 증폭 반응은 Taq 중합효소를 이용하여 다음과 같이 수행하였다: 96℃에서 2분간 전-변성한 후, 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 어닐링, 72℃에서 2분간의 중합 반응을 35회 반복하였고, 추가로 72℃에서 10분간 연장 반응을 하였다. 증폭된 반응 산물은 1.0% 아가로스 겔에서 분석하였다 (도 8 및 도 9 참조).

도 8에서, M 레인은 1 kb 레더이고, 1, 2, 3, 4 및 5 레인은 각각 형질전환된 담배, 유채, 참외, 수박 및 오이의 PCR 유전자를 포함하는 PCR 산물이다. 도 8에서 보는 바와 같이, 알부민-EGF 융합 유전자 (2088bp)에 상응하는 밴드는 각 레인에서 관찰된다.

도 9에서 M 레인은 1 kb 레더이고, 1, 2, 3, 4 및 5 레인은 각각 형질전환된 담배, 유채, 참외, 수박 및 오이의 PCR 유전자를 포함하는 PCR 산물이다. 도 8에서 보는 바와 같이, EGF-알부민 융합 유전자 (2088bp)에 상응하는 밴드는 각 레인에서 관찰된다.

따라서, 실시예 8에 있는 식물은 알부민-EGF 또는 EGF-알부민 융합 유전자로 형질전환되고 외래 융합 유전자를 안정하게 포함하고 있음을 알 수 있다.

실시예 10: 식물 형질전환체에서 융합 단백질의 확인

2.5 mL 추출완충액 (100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 500 mM EDTA, pH 8.0, 1 mg/mL 류페틴, 5 mg/mL BSA, 1 mg/mL DTT 및 30 mg/mL PMSF)을 실시예 8에서 제조한 형질전환 식물체의 잎 1 g에 첨가한 뒤 막자사발에서 미세하게 갈았다. 추출액을 12,000 rpm, 4℃에서 30분 이상 원심 분리한 후 상층액을 취하여 새 튜브로 옮기고 얼음에 보관하였다.

브래드포드 (Bradford)의 방법에 의해 염색제 (protein assay kit, Bio-Rad)를 이용하여 식물 추출액의 단백질을 정량하였다. 동량의 추출물 샘플을 8% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였다 (도 10 참조). 도 10에서, M 레인은 단백질 마커이고, 1, 2, 3, 4 및 5 레인은 각각 형질전환된 담배, 유채, 참외, 수박 및 오이이다. 도 10에서 보는 바와 같이, 알부민-EGF 융합 단백질 (70 kDa)에 상응하는 밴드가 각 레인에서 관찰되었다.

알부민-EGF 융합 단백질에 상응하는 밴드를 PVDF 막에 전이한 후, 단백질이 전이된 PVDF 막에 1차 항체 (항 EGF-토끼, 1:1000 희석, Santa Cruz, USA)를 가하여 1시간 배양을 하였다. 배양 후 막을 세척한 후 2차 항체 (토끼-염소 HRP, 1:1000 희석)를 가하고 다시 1시간 배양을 하고 막을 세척하였다. 항체의 부착이 완결된 후 4-클로로-1-나프톨을 기질로 하여 발색 반응을 실시하였다. 도 11에서 보는 바와 같이, 예상 크기 즉, 70 kDa을 보이는 밴드를 관찰하였으며, 형질전환 식물체에 있는 알부민-EGF 융합 단백질의 존재를 확인하였다.

실시예 11: 식물 형질전환체에서 융합 단백질의 발현 레벨 확인

식물 형질전환체에서 융합 단백질의 발현 레벨을 확인하기 위해, 하기 시약을 제조하였다: 세척 완충액: PBST (0.5% Tween 20 및 PBS, pH 7.4); 희석 완충액: TBST (0.1% BSA, 0.05% Tween 20 및 TBS); TBS (20 mM Tris base, 150 mM NaCl); 블로킹 완충액 (1% BSA, 5% 수크로즈, 0.05% NaN₃ in PBS); 기질 용액 (ABTS 퍼옥시다제 기질, KPL corp., USA); 반응중지 용액 (1 % 소듐 도데실 설페이트 (SDS)); 일차 항체 (퍼옥시다제 표지된-항 인간 IgG, Santa Cruz, USA); 및 이차 항체 (퍼옥시다제 표지된-항 생쥐 IgG, Santa Cruz, USA).

식물 형질전환체로부터 추출되고 분리된 단백질을 78 ng, 36 ng, 18 ng, 9 ng, 4 ng, 2 ng, 1 ng, 576 pg, 288 pg, 144 pg, 72 pg 및 36 pg의 농도로 순차적으로 희석하여 플레이트의 각 웰에 넣고 8시간 동안 4℃에서 보관하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그리고 난 뒤, 일차 항체를 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400 및 1/12800으로 순차적으로 희석한 뒤 플레이트의 각 웰에 첨가하여 4℃에서 2시간 동안 반응시키고 세척 완충액으로 세척하였다.

그리고 난 뒤, 블로킹 완충액 300 μ l를 각 웰에 첨가한 뒤 4℃에서 2시간 동안 놓아 두고 세척 완충액으로 세척하였다. 이차 항체 (1/1000 희석)를 각 웰에 첨가한 뒤 4℃에서 1시간 동안 반응시키고 세척 완충액으로 세척하였다. 기질을 각 웰에 첨가하여 30분 동안 반응시킨 뒤, 반응 중지 완충액 50 μ l를 넣어 반응을 중지시켰다. 마지막으로, ELISA 리더 (TECAN sunrise)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

식물	발현 레벨 (pg/g)			
	야생형	형질전환체		
		EGF	알부민-EGF	EGF-알부민
참외	0	31.70	36.43	41.10
오이	0	25.09	27.24	33.10
수박	0	32.00	14.40	36.10
유채	0	39.01	45.56	49.70
담배	0	42.06	17.95	40.90

표 1에서 보는 바와 같이, EGF 및 EGF의 C-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 형질전환된 형질전환체가 높은 발현 레벨을 나타냄을 알 수 있었다.

실시예 12: 식물 형질전환체에서 융합 단백질의 안정도 확인

첫째로, 식물 형질전환체에서의 융합 단백질의 분리는 다음과 같이 수행하였다: 식물 형질전환체로부터의 조직을 액체 질소하에서 균질화 완충액 (250 mM 수크로즈, 1 M Hepes, 1 mM DTT 및 1 mM MgCl₂)에서 균질화시키고 7000 x g에서 10분 동안 원심분리한 뒤 상등액을 수득하였다. 같은 조건 하에서 원심분리를 1회 더 수행하였다. 추출액을 전-평형화된 퀴아젠 레진 (Qiagen resin) 1 mL로 혼합하여 1시간 동안 차가운 곳에서 부드럽게 혼합하였다. 반응물을 Ni-NTA 아가로스 컬럼 (Qiagen, Germany)으로 부어 넣었다. 그리고 난 뒤, 컬럼을 컬럼 부피의 용출 완충액 (0.3 M NaCl, 20 mM BME, 250 mM 이미다졸 및 50 mM Na-포스페이트 완충액 pH 8.0)으로 세척하였다. 용출액을 투석 완충액 (40 mM Hepes, pH 8.0, 200 mM NaCl 및 1 mM DTT) 500 mL로 2 내지 4시간 동안 2회 투석하였다. 투석하고 난 뒤, 분획의 농도를 단백질 농도 분석 키트 (BioRad, USA)로 확인하였다. 융합 단백질을 포함하는 분획을 SDS-PAGE에 넣은 뒤 순도를 체크하기 위해 코마시 블루 용액으로 염색하였다. 그리고 난 뒤, 웨스턴 블라팅을 수행하였다.

식물 형질전환체로부터 수득한 융합 단백질의 안정도는 다음의 방법에 따라 확인하였다: 캡처 항체 (생쥐 모노클로날 rhEGF IgG)를 1/1000의 비율로 PBS에 희석하고 ELISA 분석을 하기 위해 100 μ l의 희석액을 플레이트의 각 웰에 넣고, 실온에서 8시간 동안 놓아두었다. 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하고 난 뒤 블로킹 완충액 300 μ l를 넣어 2시간 동안 놓아두었다. 존재하는 융합 단백질 및 표준 단백질 (인간 EGF, KOMA, Korea) 각각 100 μ l를 플레이트에 넣은 뒤 전체를 혼합하여, 실온 또는 4℃에서 8시간 이상 보관하였다. 그리고 난 뒤, 플레이트를 3회 세척하고, 검출 항체 (바이오틴화된 EGF 친화 분리된 염소 IgG, 1/1000 희석) 100 μ l를 플레이트의 각 웰에 넣어 혼합하면서 2시간 동안 놓아 두었다. 세척하고 난 뒤, 100 μ l 스트렙트아비딘-HRP (R & D 시스템)을 PBS에 1:50으로 희석하여 각 웰에 넣은 뒤 1시간 동안 반응시키고 세척하였다. 그리고 난 뒤, 기질 완충액을 PBS에 1:4로 희석하여 각 웰에 넣은 뒤 반응시켰다. 반응 정지 용액 50 μ l를 각 웰에 넣어 반응을 중단시키고, 540-570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

안정도 분석 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

pH	온도 (°C)	EGF	알부민-EGF	EGF-알부민
7.0	4	100	100	99.8
	25	43.0	75.0	91.0
	45	0	13.7	77.6
4.7	4	100	100	100
	25	56.9	91.2	96.7
	45	0	0	94.8

표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질에 있는 EGF는 융합되지 않은 EGF에 비해 높은 안정도를 보였다. 특히, 알부민의 N-말단에 연결된 EGF는 어떠한 보관 조건하에서도 높은 안정성을 나타내었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기 단계를 포함하며, 상피세포재생인자 (EGF) 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법:

(a) 하기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열로 식물 세포를 형질전환하는 단계:

(i) EGF 및 상기 EGF의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 상기 EGF의 안정도는 상기 인간 혈청 알부민에 의해 상승되는 것을 특징으로 함;

(ii) 식물 세포에서 기능을 하며 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 연결된 RNA 분자를 생산하게 하는 프로모터; 및

(iii) 식물 세포에서 기능을 하고 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 유발하는 3'-비-번역된 부위;

(b) 형질전환된 식물 세포를 선별하는 단계;

(c) 상기 형질전환된 세포로부터 식물체를 재분화시키는 단계; 및

(d) 상기 재분화된 식물체로부터 상기 융합 폴리펩타이드를 수득하는 단계.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 식물체는 담배, 참외, 오이, 수박 또는 유채인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 EGF의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열의 1-159 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 인간 혈청 알부민은 상기 EGF의 C-말단에 연결된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

하기 단계를 포함하고, EGF 및 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 식물체에서 생산하는 방법:

(a) 식물체로부터 세포의 계층으로 삽입능력을 갖고 하기 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜메파시엔스를 이용하여 상기 식물체로부터의 외식편 물질 (explant material)을 감염시키는 단계:

(i) EGF 및 상기 EGF의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 인간 혈청 알부민을 포함하는 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열; 상기 EGF의 안정도는 상기 인간 혈청 알부민에 의해 상승되는 것을 특징으로 함;

(ii) 식물 세포에서 기능을 하며 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 연결된 RNA 분자를 생산하게 하는 프로모터; 및

- (iii) 식물 세포에서 기능을 하고 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 유발하는 3'-비-번역된 부위;
- (b) 재분화된 신초를 얻기 위해 감염된 외식편 물질을 재분화 배지에서 재분화시키는 단계;
- (c) 형질전환된 식물체를 얻기 위해 상기 재분화된 신초를 발근 배지에서 배양하는 단계, 상기 형질전환된 식물체는 (i)의 뉴클레오타이드 서열을 발현하는 능력을 갖고 있는 것을 특징으로 함; 및
- (d) 상기 재분화된 식물체로부터 상기 융합 폴리펩타이드를 수득하는 단계.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 식물체는 담배, 참외, 오이, 수박 또는 유채인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

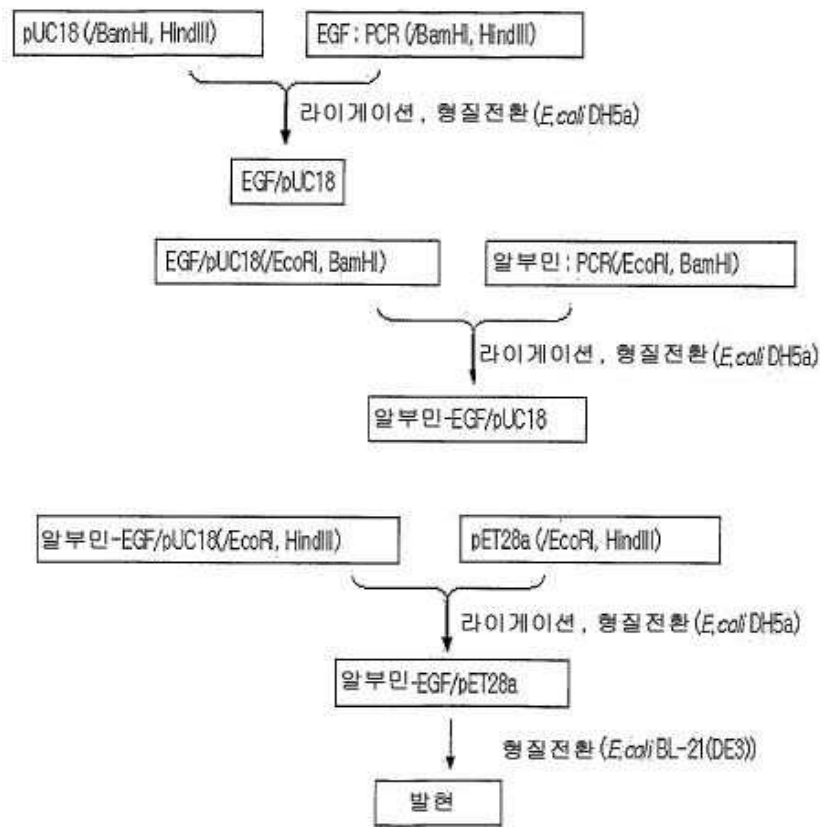
제 5 항에 있어서, 상기 EGF의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열의 1-159 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

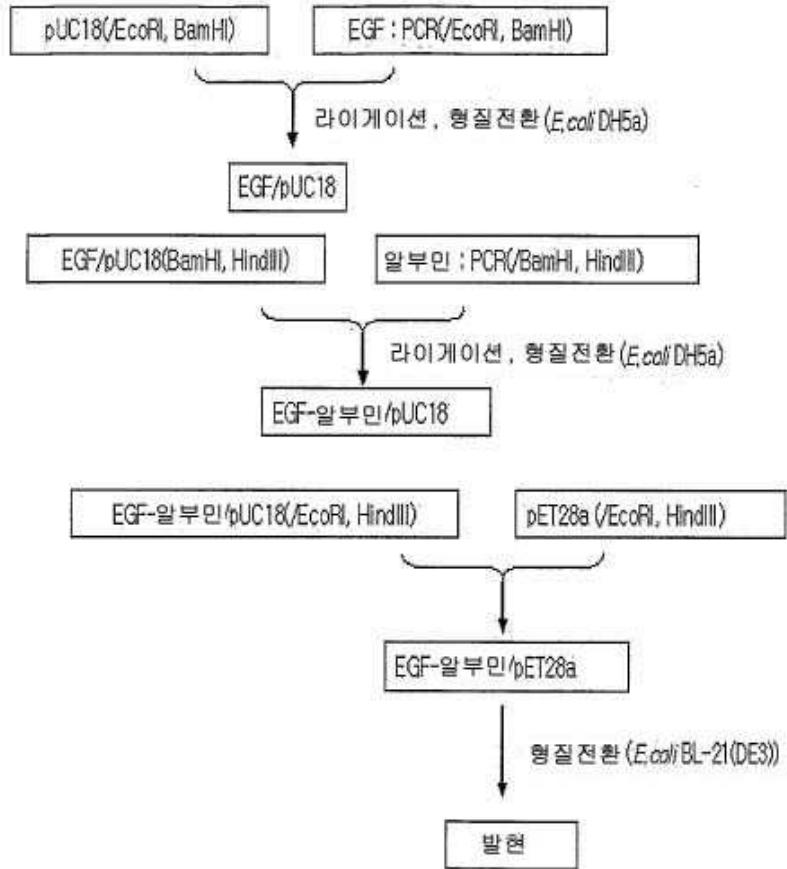
제 5 항에 있어서, 상기 인간 혈청 알부민은 상기 EGF의 C-말단에 연결된 것을 특징으로 하는 방법

도면

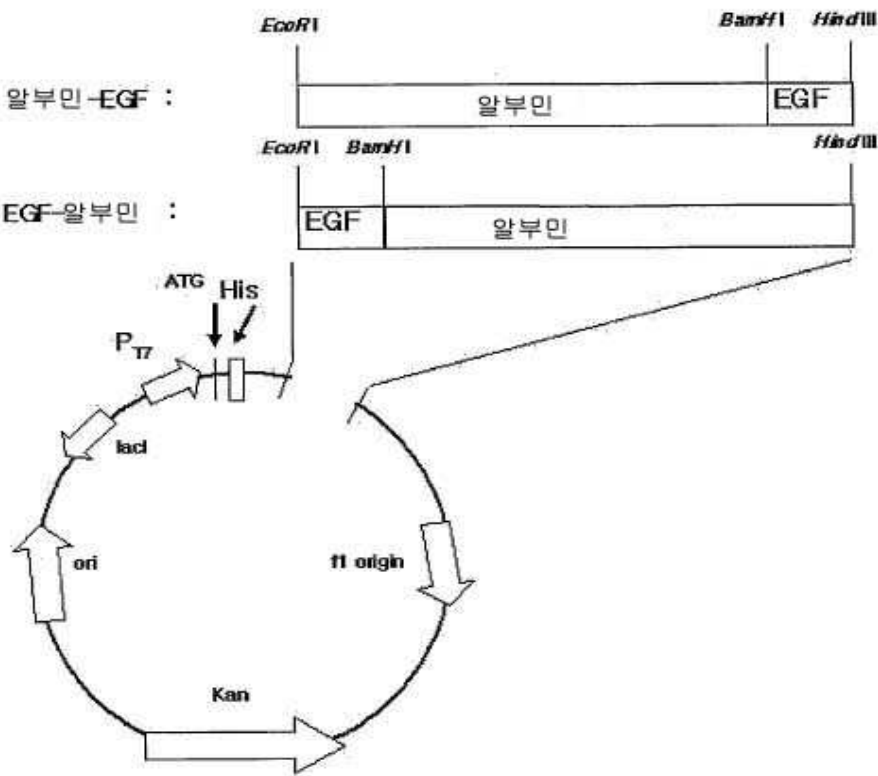
도면1



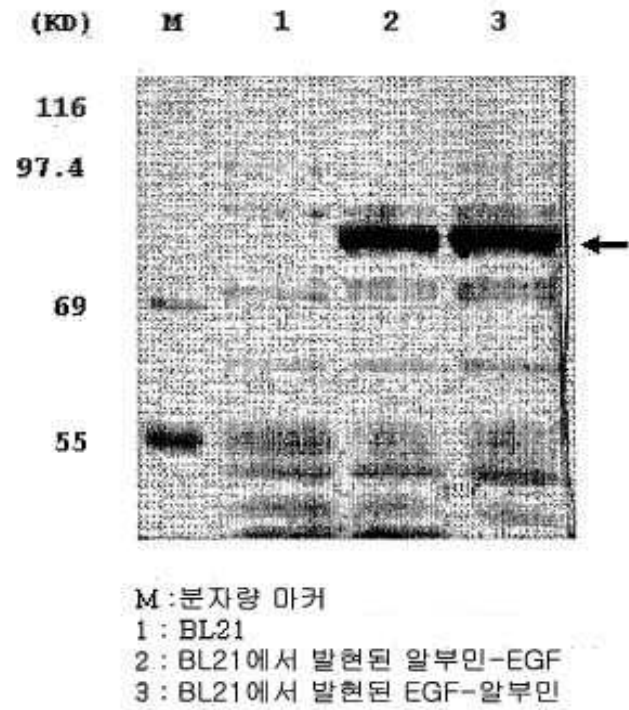
도면2



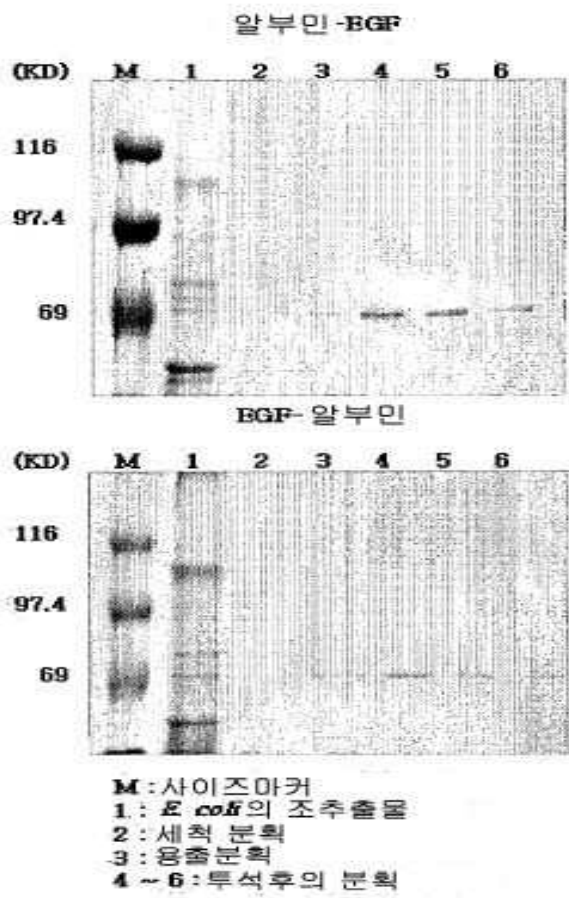
도면3



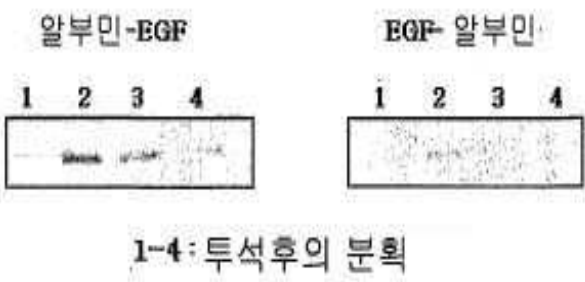
도면4



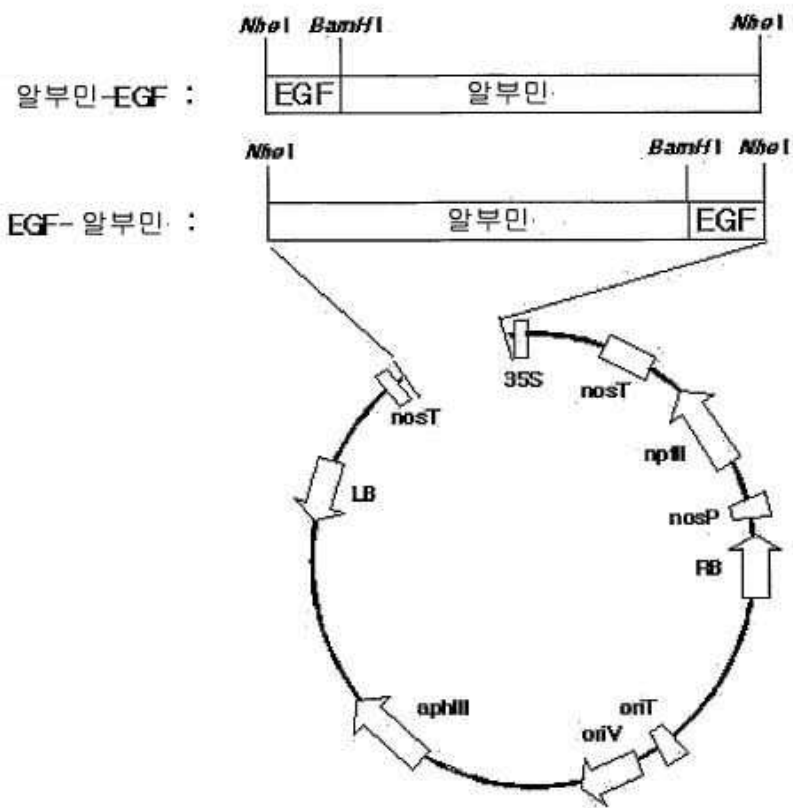
도면5



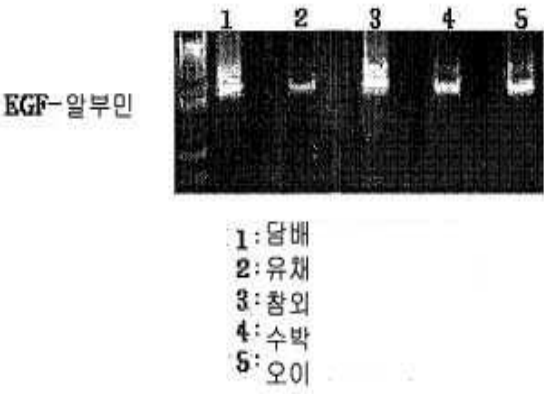
도면6



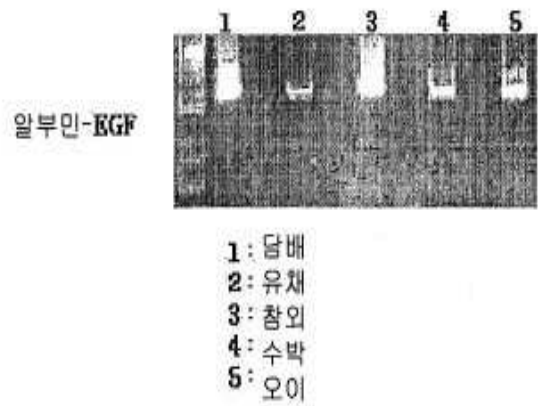
도면7



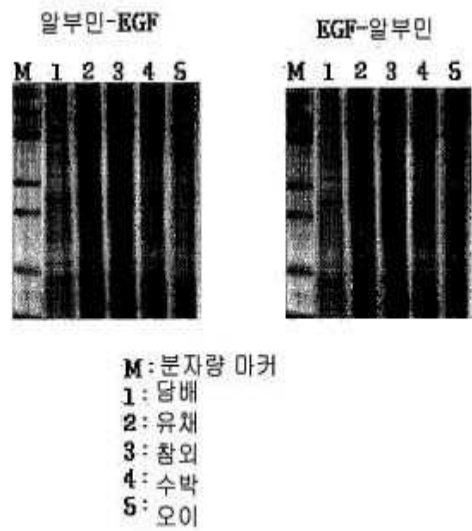
도면8



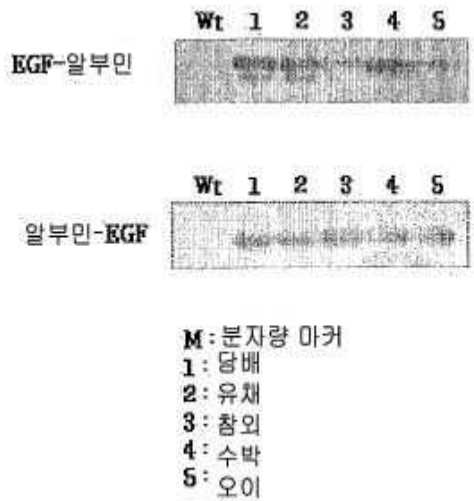
도면9



도면10



도면11



서열목록

서열목록 전자파일 첨부