

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 7월 25일 (25.07.2019)

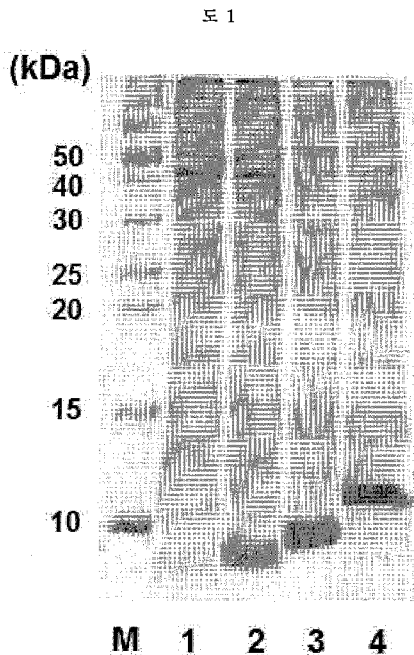


(10) 국제공개번호
WO 2019/143193 A9

- (51) 국제특허분류: *C07K 14/605* (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C07K 14/635 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/000782
- (22) 국제출원일: 2019년 1월 18일 (18.01.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0006875 2018년 1월 19일 (19.01.2018) KR
10-2018-0018232 2018년 2월 14일 (14.02.2018) KR
10-2018-0018255 2018년 2월 14일 (14.02.2018) KR
10-2018-0018278 2018년 2월 14일 (14.02.2018) KR
- (71) 출원인: 주식회사 펩진 (PEPGENE INC.) [KR/KR];
29131 충청북도 영동군 영동읍 대학로 310, 15동 409-2
호, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 김성건 (KIM, Sung Gun); 34200 대전시 유성구
상대남로 26, 913동 2504호, Daejeon (KR). 탁상범 (TAK,
Sang Bum); 08647 서울시 금천구 금하로 24나길 48, 102
동 608호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인지담 (JIDAM IP LAW FIRM); 13494
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 670, 유스페이스2
B-608, Gyeonggi-do (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,
ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: N-TERMINAL FUSION PARTNER FOR PRODUCING RECOMBINANT POLYPEPTIDE, AND METHOD FOR PRODUCING RECOMBINANT POLYPEPTIDE USING SAME

(54) 발명의 명칭: 제조합 폴리펩타이드 생산용 N-말단 융합 파트너 및 이를 이용하여 제조합 폴리 펩타이드를 생산하는방법



(57) Abstract: The present invention relates to a new N-terminal fusion partner, a fusion polypeptide comprising the fusion partner and a target polypeptide, and a method for producing a target polypeptide using same. If a new fusion partner according to the present invention is used, the yield of a target polypeptide (recombinant polypeptide) can be improved compared to a prior art fusion partner. The present invention is particularly useful when producing a target polypeptide having a relatively low molecular weight and an easily degradable amino terminus by using genetic recombination technology. Also, a fusion polypeptide comprising the fusion partner according to the present invention is protected from proteases and the like of a host cell by being induced to be expressed in the form of an inclusion body inside the host cell and, thus, can stably produce a target polypeptide. Therefore, the present invention can provide a method for producing a recombinant peptide having improved stability and yield, compared to when a prior art fusion partner is used.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 N-말단 융합 파트너, 상기 융합 파트너와 목적 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 이를 이용하여 목적 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 융합 파트너를 사용하면, 종래 융합 파트너 대비 목적 폴리펩타이드 (제조합 폴리펩타이드)의 수율을 향상시킬 수 있다. 특히, 상대적으로 분자량이 작으며 분해되기 쉬운 아미노 말단을 갖는 목적 폴리펩타이드를 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조하는 경우에 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 융합 파트너를 포함하는 융합 폴리펩타이드는 숙주세포 내에서 내포체 형태로 발현이 유도됨으로써 숙주세포의 단백질 분해효소 등으로부터 보호되어 안정적으로 목적 폴리펩타이드를 생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 종래의 융합 파트너를 사용한 경우보다 안정성 및 수율이 향상된 제조합 펩타이드 생산 방법을 제공할 수 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2019 년 9 월 6 일 (06.09.2019)

(15) 정정사항에 관한 정보:

2019 년 9 월 6 일 (06.09.2019) 자 공지 참조

명세서

재조합 폴리펩타이드 생산용 N-말단 융합 파트너 및 이를 이용하여 재조합 폴리펩타이드를 생산하는 방법

5

기술분야

본 발명은 신규한 N-말단 융합 파트너, 상기 융합 파트너와 목적 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드 및 이를 이용하여 목적 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것이다.

10

배경기술

최근 유전공학 및 생명공학 기술의 발달로 대장균, 효모, 동식물세포 등을 이용하여 유용한 외래 단백질이 많이 생산되고, 이들 단백질이 의약품 등으로 널리 이용되고 있다. 구체적으로, 면역 조절제, 효소 저해제 및 호르몬 같은 의
15 약 및 연구용 단백질이나 반응 첨가 효소와 같은 산업용 단백질에 대한 생산 공정 기술 개발 및 산업화가 추진되고 있다.

이중에서도 유전자 재조합 기술은 여러 타겟 단백질들의 핵산을 발현벡터에 클로닝하여 재조합 발현벡터를 얻고, 이를 적당한 숙주세포에 형질전환시켜 배양함으로써 타겟 단백질(목적 폴리펩타이드)을 생산하는 방법이다. 다만, 숙주
20 세포에 내재된 분해 효소(예를 들어, 프로테아제(protease) 또는 펩티다제(peptidase))에 의해 타겟 단백질의 전체 또는 일부가 분해되어 수율이 낮아지거나, 융합 파트너로 사용하는 펩타이드의 크기가 제조하고자 하는 타겟 단백질의 크기에 비해 너무 커서 수율이 현저히 떨어지는 문제가 있다.

따라서, 유전자 재조합 기술을 이용하여 타겟 단백질을 대량 생산하고자
25 하는 경우, 타겟 단백질을 안정적으로 발현시키면서도 생산 수율을 향상시킬 수 있는 융합 파트너를 개발하는 것이 중요하다.

기술적 과제

본 발명의 목적은 재조합 폴리펩타이드를 생산하기 위한 신규한 아미노산
30 서열로 이루어진 N-말단 융합 파트너를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 N-말단 융합 파트너와 목적 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드, 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터를 포함하는
5 숙주세포를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 폴리펩타이드를 이용하여 목적 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

10 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은, 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너; 목적 폴리펩타이드; 및 상기 N-말단 융합 파트너와 상기 목적 폴리펩타이드 사이에 링커를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다:

[일반식 1]

15 Met-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-(Z)_n

상기 일반식 1에서,

Xaa1 내지 Xaa6은, 서로 독립적으로, 이소루신(Ile, I), 글리신(Gly, G), 알라닌(Ala, A), 프롤린(Pro, P), 발린(Val, V), 루신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 티로신(Tyr, Y), 트립토판(Trp, W), 아스파라긴
20 (Asn, N), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 아르기닌(Arg, R), 리신(Lys, K), 히스티딘(His, H), 아스팔트산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

25 상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

본 발명의 다른 측면은, 상기 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드, 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 및 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 측면은, 상기 숙주세포를 배양하는 단계, 상기 숙주세포에서 발현된 융합 폴리펩타이드를 정제하는 단계 및 상기 정제된 융합 폴리펩
30

타이드를 절단 효소와 배양하여 목적 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 재조합 폴리펩타이드의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

5 본 발명에 따른 신규한 융합 파트너를 사용하면, 종래 융합 파트너 대비 목적 폴리펩타이드(재조합 폴리펩타이드)의 수율을 향상시킬 수 있다. 특히, 상대적으로 분자량이 작으며 분해되기 쉬운 아미노 말단을 갖는 목적 폴리펩타이드를 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조하는 경우에 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 융합 파트너를 포함하는 융합 폴리펩타이드는 숙주세포 내에서 내포체 형태
10 로 발현이 유도됨으로써 숙주세포의 단백질 분해효소 등으로부터 보호되어 안정적으로 목적 폴리펩타이드를 생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 종래의 융합 파트너를 사용한 경우보다 안정성 및 수율이 향상된 재조합 펩타이드 생산 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

 도 1은 재조합 대장균에서 발현된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG001), 레인 2: PG07-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG002), 레인 3: PG15-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG003); 레인 4: PG43-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG004)).
20

 도 2는 재조합 대장균에서 발현된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 1: H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG001), 레인 2: PG07-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG002), 레인 3: PG15-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG003); 레인 4: PG43-H6TEV-hPTH1-34(균주 번호 PG004)).
25

 도 3a은 PG15-H6TEV-hPTH 1-34를 대량으로 생산하기 위한 유가식 배양 시간에 따른 광학밀도(O.D.600) 및 IPTG 투여시간을 나타낸 그래프이다.

 도 3b는 유가식 배양을 통해 재조합 대장균으로부터 생산된 PG15-H6TEV-hPTH 1-34를 시간 별로 샘플링한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.
30

도 4는 재조합 대장균에서 발현된 PG15(Δ 2-7)-H6TEV-hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: PG15(Δ 2-7)-H6TEV-hPTH 1-34, 레인 2: PG15-H6TEV-hPTH 1-34).

도 5는 PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 2번째 또는 3번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 6은 PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 4번째 또는 5번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 7은 PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 6번째 또는 7번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 8a는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG07-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실선, 파선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도, 전도도(conductivity), 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 8b는 크로마토그래피를 통해 정제한 PG07-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 s: 정제 전 시료, 레인 2~4: 통과액 분획, 레인 8~11: 용출액 분획). 화살표는 PG07-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

도 9a는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실선, 파선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도, 전도도(conductivity), 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 9b는 크로마토그래피를 통해 정제한 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 s: 정제 전 시료, 레인 2~4: 통과액 분획, 레인 8~11: 용출액 분획). 화살표는 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

도 10a는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG43-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실선, 파선, 점선들은

각각 280 nm 파장에서의 흡광도, 전도도(conductivity), 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 10b는 크로마토그래피를 통해 정제한 PG43-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 s: 정제 전 시료, 레인 2~4: 통과액 분획, 레인 8~11: 용출액 분획). 화살표는 PG43-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

도 11은 TEV 프로테아제를 이용하여 정제된 각 시료의 융합 폴리펩타이드를 절단한 후 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 C: TEV 프로테아제를 처리하지 않은 시료, 레인 T: TEV 프로테아제를 처리한 시료, 레인 1: PG07-H6TEV-hPTH1-34, 레인 2: PG15-H6TEV-hPTH1-34, 레인 3: PG43-H6TEV-hPTH1-34).

도 12는 TEV 프로테아제를 이용하여 정제된 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드를 절단한 후 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 C: TEV 프로테아제를 처리하지 않은 시료, 레인 T: TEV 프로테아제를 처리한 시료).

도 13a는 등전점 차이를 이용하여 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드로부터 PG15-H6TEV와 hPTH1-34를 분리한 결과를 나타낸 것이다(크로마토그램에서 실선, 파선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도, 전도도(conductivity), 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 13b는 등전점 차이를 이용하여 분리한 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드의 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 s: 정제 전 시료, 레인 1~3: 통과액 분획, 레인 5~9: 용출액 분획).

도 14a는 평균 소수성 차이를 이용하여 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드로부터 PG15-H6TEV와 hPTH1-34를 분리한 결과를 나타낸 것이다(크로마토그램에서 실선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도 및 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 14b는 평균 소수성 차이를 이용하여 분리한 PG15-H6TEV-hPTH1-34 융합 폴리펩타이드의 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 s: 정제 전 시료, 레인 1~5: 1st peak 분획, 레인 1~7: 2nd peak 분획).

도 15는 hPTH 1-34 표준물질의 분자량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에 따라 정제된 hPTH 1-34의 분자량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 미국약전(USP)의 hPTH 1-34 동정 기준시험법으로 표준물질 hPTH 1-34와 본 발명에 따른 재조합 hPTH 1-34의 체류시간 및 순도를 확인한 그래프이다.

도 18은 역상 크로마토그래피 및 미국약전(USP)의 hPTH 1-34 동정 기준시험법 중 펩타이드 맵핑 방법을 통해 표준물질 hPTH 1-34와 본 발명에 따른 재조합 hPTH 1-34의 동등성을 분석한 결과이다.

도 19는 재조합 대장균에서 생산된 총 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG005), 레인 2: PG07-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG006), 레인 3: PG15-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG007), 레인 4: PG22-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG008), 레인 5: PG29-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG009), 레인 6: PG36-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG010), 레인 7: PG43-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG011)).

도 20은 재조합 대장균의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 T: 총 분획, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 1: H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG005), 레인 2: PG07-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG006), 레인 3: PG15-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG007), 레인 4: PG22-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG008)).

도 21은 재조합 대장균의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 T: 총 분획, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 5: PG29-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG009), 레인 6: PG36-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG010), 레인 7: PG43-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG011)).

도 22는 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 PG43의 2번째 또는 3번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 23은 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 PG43의 4번째 또는 5번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 24는 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 PG43의 6번째 또는 7번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

5 도 25는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도 및 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 26은 크로마토그래피를 통해 정제한 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 정제 전 시료, FT: 통과액 분획, 레인 E: 용출액 분획). 화살표는 PG43-H6TEV-GLP-1 K28R
10 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

도 27은 TEV 프로테아제를 이용하여 정제된 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드를 절단한 후 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 C: TEV 프로테아제를 처리하지 않은 시료, 레인 T: TEV 프로테아제를 처리한 시료).

15 도 28은 본 발명에 따라 정제된 GLP-1K28R의 분자량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 29는 재조합 대장균에서 생산된 총 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG012), 레인 2: PG07-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG013), 레인 3: PG15-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG014), 레인 4: PG22-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG015), 레인 5: PG29-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG016), 레인 6: PG36-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG017), 레인 7: PG43-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG018)).

도 30은 재조합 대장균의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 5: PG29-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG016), 레인 6: PG36-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG017), 레인 7: PG43-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG018)).

도 31은 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 PG43의 2번째 또는 3번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 32는 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 PG43의 4번째 또는 5번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

5 도 33은 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 PG43의 6번째 또는 7번째 아미노산 잔기를 이소루신(I), 아스파라긴(N), 아르기닌(R), 아스팔트산(D)으로 치환한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다.

도 34는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG43-H6TEV-GLP-2 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실선, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도 및 용출 완충액의 비율을 나타냄).

10 도 35는 크로마토그래피를 통해 정제한 PG43-H6TEV-GLP-2 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 정제 전 시료, FT: 통과액 분획, 레인 1~5: 용출액 분획). 화살표는 PG43-H6TEV-GLP-2 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

15 도 36은 TEV 프로테아제를 이용하여 정제된 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드를 절단한 후 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 C: TEV 프로테아제를 처리하지 않은 시료, 레인 T: TEV 프로테아제를 처리한 시료).

도 37은 본 발명에 따라 정제된 GLP-2A2G의 분자량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

20 도 38은 재조합 대장균에서 발현된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG019), 레인 2: PG07-H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG020), 레인 3: PG15-H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG021), 레인 4: PG43-H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG022)).

25 도 39는 재조합 대장균에서 발현된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 1: H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG019), 레인 2: PG07-H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG020), 레인 3: PG15-H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG021), 레인 4: PG43-
30 H6TEV-Ecallantide(균주 번호 PG022)).

도 40은 재조합 대장균에서 발현된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG023), 레인 2: PG07-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG024), 레인 3: PG15-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG025), 레인 4: PG43-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG026)).

도 41은 재조합 대장균에서 발현된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드들의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 3: PG15-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG025), 레인 4: PG43-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG026)).

도 42는 재조합 대장균에서 생산된 총 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 1: H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG027), 레인 2: PG07-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG028), 레인 3: PG15-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG029), 레인 4: PG43-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG030)).

도 43은 재조합 대장균의 총세포 분획을 가용성 및 불용성 분획으로 분리한 후 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 가용성 분획, 레인 I: 불용성 분획, 레인 1: H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG027), 레인 2: PG07-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG028), 레인 3: PG15-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG029), 레인 4: PG43-H6TEV-hPTH1-84(균주 번호 PG030)).

도 44는 크로마토그래피를 통해 불용성 분획 내의 PG07-H6TEV-hPTH1-84 융합 폴리펩타이드를 정제한 결과이다(크로마토그램에서 실색, 점선들은 각각 280 nm 파장에서의 흡광도 및 용출 완충액의 비율을 나타냄).

도 45는 크로마토그래피를 통해 정제한 PG07-H6TEV-hPTH1-84 융합 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 S: 정제 전 시료, FT: 통과액 분획, 레인 1~5: 용출액 분획). 화살표는 PG07-H6TEV-hPTH1-84 융합 폴리펩타이드를 나타낸다.

도 46은 TEV 프로테아제를 이용하여 정제된 PG07-H6TEV-hPTH1-84 융합 폴리펩타이드를 절단한 후 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다(레인 M: 마커 단백질, 레인 C: TEV 프로테아제를 처리하지 않은 시료, 레인 T: TEV 프로테아제를 처리한 시료).

도 47은 본 발명에 따라 정제된 hPTH1-84의 분자량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 48은 균주 PG001, PG003, PG031, PG032 및 PG033에서 발현시킨 각각의 융합 폴리펩타이드들의 구조를 도식화한 것이다.

5

발명의 실시를 위한 최선의 형태

본 발명의 일 실시예는 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너; 목적 폴리펩타이드; 및 상기 N-말단 융합 파트너와 상기 목적 폴리펩타이드 사이에 링커를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다:

10 [일반식 1]

Met-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-(Z)_n

상기 일반식 1에서,

Xaa1 내지 Xaa6은, 서로 독립적으로, 이소루신(Ile, I), 글리신(Gly, G), 알라닌(Ala, A), 프롤린(Pro, P), 발린(Val, V), 루신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 티로신(Tyr, Y), 트립토판(Trp, W), 아스파라긴(Asn, N), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 아르기닌(Arg, R), 리신(Lys, K), 히스티딘(His, H), 아스팔트산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

구체적으로, 상기 Xaa1 내지 Xaa6은, 서로 독립적으로, 이소루신(Ile, I), 프롤린(Pro, P), 루신(Leu, L), 아스파라긴(Asn, N), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개,

25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

5 재조합 미생물 시스템을 이용하여 여러 종류의 목적 폴리펩타이드를 생산하는 경우, 그 타겟 물질의 물성에 따라 숙주세포 내 효소에 의한 분해, 낮은 발현 수준, 부적절한 단백질 폴딩 및/또는 낮은 mRNA 안정성 등으로 인해 수율이 저하될 우려가 있다. 예를 들어, 종래 융합 파트너로 활용되는 MBP (maltose binding protein), 글루타티온 S-전달효소 (glutathione-S-
10 transferase), 티오레독신(thioredoxin), SUMO, 유비퀴틴 등은 각각 397, 216, 106, 101, 76 개의 아미노산을 갖는데, 비교적 저분자량의 목적 폴리펩타이드 등을 생산할 때 수율이 좋지 못한 문제가 있었다.

이에 반해, 본 발명에 따른 상기 N-말단 융합 파트너는 7개 내지 43개의 아미노산으로 이루어진 상대적으로 분자량이 작은 펩타이드로서, 이를 적용하여
15 hPTH 1-34 등의 목적 폴리펩타이드를 생산하는 경우 기존의 융합 파트너들을 활용한 경우보다 향상된 수율로 hPTH 1-34를 수득할 수 있다. 예를 들어, 재조합 융합 폴리펩타이드에서 hPTH 1-34의 비율을 아래 표 1에 개략적으로 나타내었다.

【표 1】

융합 파트너	아미노산 개수	분자량 (kDa)	목적 펩타이드 비율 (%)*
MBP(Maltose binding protein)	397	44.2	8
글루타티온 S-전달효소	216	23.8	12
티오레독신	106	11.7	23
SUMO	101	11.1	24
유비퀴틴	76	8.4	29
서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합 파트너	7 - 43	0.8 - 4.7	62 - 37

*hPTH1-34를 기준으로 링커를 포함하여 계산

20 표 1에 나타난 바와 같이, 종래의 융합 파트너들은 융합 폴리펩타이드에서 hPTH 1-34의 비율이 8% 내지 29%에 그치는 반면, 본 발명에 따른 융합 파트너가 융합된 융합 폴리펩타이드에서의 hPTH 1-34의 비율은 37% 내지 62%로 확인된다. 따라서, 동일한 농도의 융합 폴리펩타이드로부터 얻을 수 있는 hPTH 1-34의 양이 종래 융합 파트너 대비 더 높으므로 최종 생산 수율이
25 향상될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 융합 파트너는 융합 폴리펩타이드의 불용성 발현을 유도하여 융합 폴리펩타이드가 불용성 내포체로서 숙주세포 내로 고농도로 축적되게 할 수 있다. 따라서, 대장균(*Escherichia coli*) 등의 숙주세포 내에서 프로테아제 및 펩티다제에 의해 전부 혹은 일부가 분해 혹은 절단될 우려가 있는

5 목적 폴리펩타이드를 고수율로 수득하기 용이한 장점이 있다.

예를 들어, 상기 N-말단 융합파트너는 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 2]

Met-Xaa1-Ile-Arg-Pro-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 2에서,

Xaa1은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의

15 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

또한, 상기 Xaa1은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N),

20 아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터

25 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터

30 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 8, 30, 52, 74, 96 또는 118의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa1은 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa1은 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 10, 32, 54, 76, 98 또는 120의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa1은 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 11, 33, 55, 77, 99 또는 121의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 N-말단 융합파트너는 하기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 3]

Met-Asn-Xaa2-Arg-Pro-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 3에서,

Xaa2는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N), 아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의

아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n 이 1의 정수인 경우, 상기 Z 는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n 이 1의 정수인 경우, 상기 Z 는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

또한, 상기 Xaa2는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa2는 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 12, 34, 56, 78, 100 또는 122의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa2는 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 13, 35, 57, 79, 101 또는 123의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa2는 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 14, 36, 58, 80, 102 또는 124의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 N-말단 융합파트너는 하기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 4]

Met-Asn-Ile-Xaa3-Pro-Leu-His-(Z) n

상기 일반식 4에서,

Xaa3은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

5 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

또한, 상기 Xaa3은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수
10 있다. 구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N), 아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기
15 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는
20 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 15, 37, 59, 81, 103 또는 125의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

25 또한, 상기 Xaa3은 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 16, 38, 60, 82, 104 또는 126의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa3은 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터
30 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열로

이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa3은 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는
5 서열번호 17, 39, 61, 83, 105 또는 127의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 5]

10 Met-Asn-Ile-Arg-Xaa4-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 5에서,

Xaa4는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

15 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

또한, 상기 Xaa4는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수
20 있다. 구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N), 아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기
25 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는
30 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터

시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 8, 40, 62, 84, 106 또는 128의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

5 또한, 상기 Xaa4는 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 19, 41, 63, 85, 107 또는 129의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

10 또한, 상기 Xaa4는 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 20, 42, 64, 86, 108 또는 130의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

15 또한, 상기 Xaa4는 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 21, 43, 65, 87, 190 또는 131의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 N-말단 융합파트너는 하기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 6]

20 Met-Asn-Ile-Arg-Pro-Xaa5-His-(Z)_n

상기 일반식 6에서,

Xaa5는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

25 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

또한, 상기 Xaa5는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수
30 있다. 구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N),

아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n 이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n 이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n 이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 22, 44, 66, 88, 110 또는 132의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa5는 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 23, 45, 67, 89, 111 또는 135의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa5는 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 24, 46, 68, 90, 112 또는 134의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa5는 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 25, 47, 69, 91, 113 또는 135의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 N-말단 융합파트너는 하기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[일반식 7]

Met-Asn-Ile-Arg-Pro-Leu-Xaa6-(Z) n

상기 일반식 7에서,

Xaa6은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

5 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

또한, 상기 Xaa6은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택될 수
10 있다. 구체적으로, 상기 Xaa1은 이소루신(Ile, I), 아스파라긴(Asn, N), 아르기닌(Arg, R) 및 아스팔트산(Asp, D)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기
15 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 구체적으로, 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는
20 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다.

일 구체예로, 상기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 26, 48, 70, 92, 114 또는 136의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

25 또한, 상기 Xaa6은 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인 및 글루타민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 27, 49, 71, 93, 115 또는 137의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa6은 아르기닌, 리신 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터
30 선택될 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열로

이루어진 N-말단 융합파트너는 서열번호 28, 50, 72, 94, 116 또는 138의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 Xaa6은 아스팔트산 또는 글루탐산일 수 있다. 일 구체예로, 상기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너는
5 서열번호 29, 51, 73, 95, 117 또는 139의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

상기 일반식 1 내지 7에 있어서, 상기 n이 0의 정수인 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 7개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 본 발명에서 7개의 아미노산으로 이루어진 N-말단 융합 파트너를 “PG07”로 명명하였다. 또한,
10 상기 n이 1의 정수인 경우, 상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 8개, 15개, 22개, 29개 또는 36개의 아미노산일 수 있다. 이 경우, 상기 N-말단 융합 파트너는 15개, 22개, 29개, 36개 또는 43개의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 본 발명에서 15개, 22개, 29개, 36개 또는 43개의 아미노산으로 이루어진 N-말단 융합
15 파트너를 각각 순서대로 “PG15”, “PG22”, “PG29”, “PG36”, “PG43”으로 명명하였다.

상기 N-말단 융합 파트너는 샤페론 10(chaperone 10, GroES proteon)의 N-말단 유도체일 수 있다. 또한, 상기 N-말단 융합 파트너는 7 내지 43개의 아미노산을 갖는 펩타이드로서, 서열번호 119의 N-말단에서 C-말단으로 7 내지
20 43개의 연속적인 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.

구체적으로, 상기 N-말단 융합 파트너는 서열번호 8 내지 139 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 융합 파트너의 아미노산 갯수는 목적 폴리펩타이드의 특성에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 7개, 8개, 9개, 10개, 13개, 15개, 17개, 22개, 25개, 27개, 29개, 30개, 33개, 38개, 40개,
25 43개 등일 수 있다. 일 구체예로서, 상기 N-말단 융합 파트너는 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은, 전술한 바와 같은 신규한 N-말단 융합 파트너, 목적 폴리펩타이드 및 상기 N-말단 융합 파트너와 상기 목적 폴리펩타이드 사이에 링커를 포함하는 융합 폴리펩타이드를 제공한다.

30 상기 링커는 친화성 태그를 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어

"친화성 태그"는 재조합 융합 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 핵산에 도입될 수 있는 펩타이드 또는 핵산 서열로서 다양한 목적으로 사용될 수 있으며, 예를 들어 목적 폴리펩타이드의 정제 효율을 높이기 위한 것일 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 친화성 태그는 당업계에 공지된 임의의 적합한 물질을 원하는 바에 따라 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 사용되는 친화성 태그는 폴리히스티딘 태그(서열번호 7 또는 8), 폴리라이신 태그(서열번호 9 또는 10), 또는 폴리아르기닌 태그(서열번호 11 또는 12)일 수 있다.

또한, 상기 링커는 프로테아제 인식 서열을 포함할 수 있다. 프로테아제란, 특정 아미노산 서열을 인식하여, 인식한 서열 내의 펩타이드 결합이나 그 서열의 마지막 아미노산과 융합된 폴리펩타이드의 첫번째 아미노산과의 펩타이드 결합을 절단하는 단백질 분해효소이다. 본 발명에 따른 융합 폴리펩타이드는 프로테아제 인식 서열을 갖는 링커를 포함함으로써, 최종 단계에서 폴리 펩타이드 정제시 절단효소 인식 서열이 포함된 아미노 말단(친화성 태그를 사용한 경우에는 친화성 태그도 포함)과 목적 폴리펩타이드의 N-말단을 분리시켜 목적 폴리펩타이드를 회수할 수 있다.

구체적으로, 상기 프로테아제 인식 서열은 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 서열, 엔테로키나아제 인식 서열, 유비퀴틴 가수분해효소 인식 서열, 인자 Xa, 퓨린 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인식 서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 프로테아제 인식 서열은 서열번호 146 내지 150의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용된 용어 "목적 폴리펩타이드"는 재조합 생산 시스템을 통해 수득하고자 하는 폴리펩타이드를 의미한다.

상기 목적 폴리펩타이드는 본 발명에 따른 N-말단 융합 파트너와 융합을 통해, 발현수준이 향상될 뿐만 아니라, 불용성 내포체 형태로 세포 내에 축적됨으로써 숙주세포 내 효소에 의한 분해로부터 보호될 수 있어, 결과적으로 더 높은 수율로 수득될 수 있다. 또한, 상기 목적 폴리펩타이드는 서열번호 18 내지 27의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 목적 폴리펩타이드는 2 kDa 내지 15 kDa, 2.5 kDa 내지 14 kDa, 3 kDa 내지 13 kDa, 3.5 kDa 내지 12 kDa, 4 kDa 내지 11 kDa의 분자량을 갖는 것일 수 있다.

구체적으로, 상기 목적 폴리펩타이드는 인간 부갑상선 호르몬 1-34(hPTH

1-34), 인간 부갑상선 호르몬 1-84(hPTH 1-84), 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 리라글루타이드(liraglutide) 전구체 펩타이드, 엑세나타이드(exenatide), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2), 테두글루타이드(teduglutide), 에칼란타이드(ecallantide),
 5 네시리타이드(nesiritide), 인슐린 및 인슐린 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

상기 인간 부갑상선 호르몬의 아미노 말단 단편인 hPTH 1-34(Human Parathyroid Hormone 1-34)는, 갑상선에 의해 분비되는 115개 아미노산(aa)의 프리-프로-펩타이드(prepropeptide) 형태로 발현되어 신호서열 및 프로펩타이드
 10 제거 후에 혈액으로 분비되는 펩타이드로서, 혈액 내 칼슘 농도를 증가시키는 작용을 하며 뼈 형성을 자극하는 것으로 알려져 있다. hPTH 1-34는 인간 부갑상선 호르몬의 아미노 말단 부위의 34개의 아미노산을 갖는 펩타이드로, 테리파라타이드(Teriparatide)로 지칭되기도 한다. 예를 들어, 상기 hPTH 1-34 폴리펩타이드는 서열번호 151의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기
 15 아미노산 서열은 서열번호 292의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

또한, 상기 인간 부갑상선 호르몬 1-84(hPTH 1-84)는, 갑상선에 의해 분비되는 115개 아미노산(aa)의 프리-프로-펩타이드로부터 유래한 84개의 아미노산을 갖는 펩타이드로, 혈액 내 칼슘 농도를 증가시키는 작용을 하며 뼈
 20 형성을 자극하는 것으로 알려져 있다. hPTH 1-84는 일반적으로 희귀질환인 저칼슘혈증(hypocalcemia) 또는 부갑상선 기능저하증(hypoparathyroidism)의 치료제로 사용된다. 예를 들어, 상기 hPTH 1-84 폴리펩타이드는 서열번호 628의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 633의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다. 상기 목적 폴리펩타이드는 서열번호 151, 340, 341, 484, 485, 628, 638, 642 및 652의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산
 25 서열로 이루어진 것일 수 있다.

또한, 상기 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1)은 31개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다. 이와 관련하여, 리라글루타이드는 이의 유사체로서 GLP-1의 28번째 라이신이 아르기닌으로 치환(K28R)되어 있으며, 20번째 라이신 잔기의 아미노 그룹에 팔미트산과 글루탐산으로 구성된 N-Palmitoyl-L-glutamic
 30 acid가 결합되어 있는 형태를 갖는다. 리라글루타이드는 제2형 당뇨병 또는

비만을 치료제로 사용될 수 있으며, 일반적으로 리라글루타이드는 N-Palmitoyl-L-glutamic acid가 결합되어 있지 않은 리라글루타이드 전구체 펩타이드(GLP-1K28R)를 생산하고, 이의 20번째 라이신 잔기에 N-Palmitoyl-L-glutamic acid를 결합시키는 공정으로 생산할 수 있다(Dunweber, Jensen et al. 2007). 예를 들어,

5 상기 GLP-1 폴리펩타이드는 서열번호 340의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 475의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다. 또한, 상기 리라글루타이드 전구체 펩타이드(GLP-1K28R)는 서열번호 341의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 476의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

10 또한, 상기 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2)는 33개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다. 이와 관련하여, 테두글루타이드는 이의 유사체로서 GLP-2의 2번째 알라닌이 글리신으로 치환(A2G)되어 있는 형태이다. 테두글루타이드는 희귀질환인 단장증후군(Short Bowel Syndrome), 화학 요법 유발성 설사(Chemotherapy-Induced Diarrhea) 및 장피 누공(Enterocutaneous

15 Fistula)의 치료제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 GLP-2 폴리펩타이드는 서열번호 484의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 619의 염기서열로 코딩될 수 있다. 또한, 상기 테두글루타이드 폴리펩타이드(GLP-2A2G)는 서열번호 485의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 620의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

20 또한, 상기 에칼란타이드는 60개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드로서, 인간 혈장 내 칼리크레인(kallikrein)의 저해할 수 있으며, 결과적으로 고분자량을 갖는 칼리크레인이 브래디키닌(Bradykinin)으로 전환되는 것을 저해하는 작용을 한다. 에칼란타이드는 희귀질환인 유전성 혈관부종(Hereditary Angioedema)의 치료제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기

25 에칼란타이드 폴리펩타이드는 서열번호 642의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 647의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

또한, 상기 네시리타이드는 32개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드로서, 인간 심실 심근(ventricular myocardium)의 분비되는 B형 나트륨이뇨 펩타이드(natriuretic peptide)이다. 네시리타이드는 울혈성

30 심부전증의 치료제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 네시리타이드

폴리펩타이드는 서열번호 652의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 657의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

또한, 상기 엑세나타이드 폴리펩타이드는 서열번호 638의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 639의 염기서열로 코딩될 수 있고, 상기 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1) 폴리펩타이드는 서열번호 640의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 아미노산 서열은 서열번호 641의 염기서열에 의해 코딩될 수 있다.

한편, 본 발명에 따른 융합 폴리펩타이드는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너와 목적 폴리펩타이드가 서로 상이한 등전점을 가짐으로써 목적 폴리펩타이드가 고순도로 용이하게 정제될 수 있다. 단백질의 등전점(isoelectric point, pI)은 단백질이 순 전하를 띠지 않는 pH로, 단백질은 이의 등전점에 따라 분리될 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 서열번호 8 내지 139의 아미노산 서열을 갖는 N-말단 융합 파트너의 pI 값은 9.5 내지 10.5일 수 있다. 구체적으로, 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119의 아미노산 서열을 갖는 N-말단 융합 파트너의 pI 값은 각각 9.52, 11.72, 10.27, 10.27, 10.43, 10.42일 수 있다.

또한, 목적 폴리펩타이드의 예시로서 hPTH 1-34, hPTH 1-84, 리라글루타이드 전구체 펩타이드, 테두글루타이드, 에칼란타이드, 네시리타이드의 pI 값은 각각 8.29, 9.10, 5.53, 4.17, 5.58, 10.95이다. 즉, 목적 폴리펩타이드들의 pI 값과 N-말단 융합 파트너 및 이를 포함하는 융합 파트너들의 pI 값은 실질적으로 상이하다. 따라서, 이온 교환 크로마토그래피, 등전점 침전법 등의 방법을 이용하여 융합 파트너로부터 목적 폴리펩타이드의 정제를 이온 교환 크로마토그래피, 등전점 침전법 등의 방법을 이용하여 용이하게 할 수 있다.

또한, 상기 융합 파트너, 링커 및 목적 폴리펩타이드를 포함하는 신규한 융합 폴리펩타이드는 서열번호 160 내지 291, 343 내지 474, 487 내지 618, 630 내지 632, 644 내지 646 및 654 내지 656의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

본 발명의 다른 측면은, 전술한 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 제공할 수 있고, 예를 들어, 160 내지 291, 343 내지 474, 487

내지 618, 630 내지 632, 644 내지 646 및 654 내지 656의 아미노산 서열 중 어느 하나를 코딩할 수 있으며, 상기 뉴클레오타이드는 서열번호 294, 295, 478 내지 483, 621 내지 627, 635 내지 637, 649 내지 651 및 659 내지 661의 염기서열 중 어느 하나의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

5 본 발명의 또 다른 측면은, 전술한 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 분자를 포함하는 발현벡터를 제공한다. 본 발명에서 사용된 용어 "벡터"는 숙주세포에 도입되어 숙주세포 유전체 내로 재조합 및 삽입될 수 있다. 또는, 상기 벡터는 에피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다. 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 10 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 및 이의 유사체들을 포함한다. 바이러스 벡터의 예로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 플라스미드는 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커를 포함할 수 있고, 플라스미드를 유지하는 숙주세포는 선택적인 조건하에서 배양될 수 있다.

15 본 발명에서 사용된 용어 "숙주세포"는 재조합 발현벡터가 도입될 수 있는 원핵세포 또는 진핵세포를 나타낸다. 본 발명에서 사용된 용어, "형질도입"은, 당업계에 공지된 기술을 사용하여 세포 내로 핵산(예를 들어, 벡터)을 도입하는 것을 의미한다.

 본 발명의 다른 측면은, 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 20 상기 숙주세포는, 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드가 포함되도록 형질전환되어, 목적 폴리펩타이드의 발현 및/또는 분비에 이용될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 바람직한 숙주세포는 대장균 세포, 불사의 하이브리도마 세포, NS/O 골수종 세포, 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, 인간 양수 유래 세포(CapT cell) 또는 COS 세포를 포함한다. 25 예를 들어, 본 발명에서 융합 폴리펩타이드를 발현시키는데 사용된 숙주 균주는 대장균 BL21(DE3)이며, 상기 유전자 및 이들의 사용 방법은 당업계에 공지되어 있다.

 본 발명의 또 다른 측면은, (a) 전술한 숙주세포를 배양하는 단계, (b) 숙주세포에서 발현된 융합 폴리펩타이드를 정제하는 단계 및 (c) 상기 정제된 30 융합 폴리펩타이드를 절단 효소와 배양하여 목적 폴리펩타이드를 회수하는

단계를 포함하는 목적 폴리펩타이드(재조합 폴리펩타이드)의 생산방법을 제공한다.

상기 (a) 단계에서는, 본 발명의 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 갖는 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 배양한다.

5 이때, 상기 숙주세포는 임의의 발효 방식으로 배양될 수 있다, 예를 들어, 회분식, 유가식, 반연속식 및 연속식 발효 방식이 이용될 수 있다. 실시예에서, 발효 배지는 복합 배지 혹은 제한 배지로부터 선택될 수 있다. 특정 실시예에서, 제한 배지가 선택된다. 제한 배지는 낮은 수준의 아미노산, 티아민과 같은
10 비타민 또는 다른 성분들로 보충될 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 배양 절차 및 무기염 배지의 상세한 설명은 문헌(Riesenberg, Schulz et al. 1991)에 기재되어 있다.

예를 들어, 융합 폴리펩타이드의 생산은 발효기 배양에서 달성될 수 있다. 예를 들어, 2 L의 제한 배지를 함유하는 발효기에서 37°C의 온도에서 배양하고, 염산이나 암모니아 첨가를 통해 pH 6.8로 유지할 수 있다. 용존 산소는 교반
15 속도 및 발효기 내로 공기 유속(air flow rate) 증가, 또는 필요에 따라 순수산소 주입을 통해 과량으로 유지할 수 있다. 발효기 내의 세포를 고농도로 배양하기 위해 세포 배양 동안 포도당 혹은 글리세롤이 포함된 주입 용액(feeding solution)을 배양액에 전달할 수 있다.

또한, 상기 조건을 유지하다가, 유도를 위한 목표 배양액의 광학
20 밀도(optical density), 예를 들어, 600 nm 파장에서 특정 값의 광학 밀도(A600)에 도달하면, IPTG를 첨가하여 융합 폴리펩타이드의 발현이 개시될 수 있다. 유도 시 세포의 광학 밀도, IPTG 농도, pH, 온도, 용존 산소 수준, 각각을 변화시켜 최적의 발현 조건을 결정할 수 있다. 또한, 유도 시 세포의 광학 밀도는 A600 30 내지 300의 범위에서 변화시킬 수 있다. IPTG 농도는 0.01 mM
25 내지 1.0 mM 범위로, pH는 5.5 내지 7.5 범위로, 온도는 15°C 내지 37°C 범위로, 그리고 공기 유속은 1 vvm(분당 배지 리터당 공기 리터) 내지 5 vvm 범위로 변화시킬 수 있다. 유도 후 4시간 내지 48시간 후에, 발효기로부터의 배양액을 원심분리하여 세포를 수거하고, 세포 펠렛은 -80°C 온도에서 냉동할 수 있다. 배양액 시료는 재조합 융합 폴리펩타이드 발현 정도 분석을 위해 SDS-PAGE 등의
30 방법으로 분석할 수 있다.

한편, 숙주세포 배양은 15℃ 내지 40℃의 온도 및 약 5.5 내지 약 7.5의 pH 조건에서 행해질 수 있다. Lac 계열 프로모터를 가진 발현 구조물이 사용될 때, 발현은 IPTG를 약 0.01 mM 내지 약 1.0 mM의 최종 농도로 배양물에 첨가하여 유도할 수 있다.

- 5 유도제를 첨가한 후, 배양액은 일정 기간, 예를 들어, 약 12시간 동안 배양할 수 있는데, 이 기간에 재조합 단백질이 발현된다. 유도제를 첨가한 후, 배양액은 약 4시간 내지 48시간 동안 배양할 수 있다.

세포 배양액은 원심분리하여 세포가 존재하지 않는 배지(상등액)를 제거하고 세포를 회수할 수 있다. 예를 들어, 세포배양액은 12,000 rpm 조건에서
 10 30분간(4℃) 원심분리하고 상등액을 제거하여 불용성 분획을 얻을 수 있다. 원심분리에 의해 얻은 불용성 분획에 불용성 내포체 형태로 존재하는 재조합 융합 폴리펩타이드의 가용화를 위해 불용성 분획을 요소나 염산구아니딘과 같은 카오토티크제(chaotropic agent)가 포함된 완충액으로 재현탁할 수 있다. 실시예에서, 세포는 고압 기계적 세포 파쇄 장치(예를 들어,
 15 마이크로플루다이저(Microfluidizer))를 사용하여 파괴한다. 재현탁된 세포는 예를 들어, 초음파 처리를 사용하여 파괴할 수 있다. 당업계에 공지된, 세포를 용해시키는데 적합한 임의의 방법을 이용하여 세포 내 축적된 내포체들을 회수할 수 있다. 예를 들어, 실시양태에서, 화학적 및/또는 효소적 세포 용해 시약, 예를 들어, 세포벽 용해 효소(lysozyme) 및 EDTA가 사용될 수 있다.

- 20 상기 (b) 단계에서는, 상기 (a)단계에서 배양한 숙주세포에서 발현된 융합 폴리펩타이드를 정제한다.

이때, 불용성 분획에는 불용성 내포체 형태로 발현된 융합 폴리펩타이드가 주로 존재한다. 불용성 분획에 존재하는 내포체의 가용화는 카오토티크제가 포함된 변성 조건하에서 수행할 수 있다. 내포체 가용화 조건은,
 25 카오토티크제가 포함된 완충액의 사용을 포함할 수 있고, 내포체 가용화 완충액은 카오토티크제로 요소 또는 염산구아니딘, 인산나트륨 또는 트리스 완충액 및 염화나트륨을 포함할 수 있다. 또한, 친화성 크로마토그래피를 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)에 의해 수행하는 경우, 내포체 가용화 완충액은 이미다졸을 포함한다. 실시예에서, 내포체 가용화 완충액은 4 M
 30 내지 10 M의 요소 또는 3 M 내지 8 M의 염산구아니딘을 포함할 수 있다. 또한,

내포체 가용화 완충액은 5 mM 내지 100 mM 인산나트륨 또는 트리스(pH 7 내지 9)를 포함할 수 있다. 내포체 가용화 완충액은 0 M 내지 1 M 염화나트륨을 포함할 수 있다. 또한, IMAC을 위한 내포체 가용화 완충액은 0 mM 내지 50 mM의 이미다졸을 포함할 수 있다. 이때, 내포체 가용화 완충액은, 8 M 요소, 20 mM

5 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4를 포함하고, 용해된 세포의 원심분리로 얻어진 불용성 분획을 재현탁하여 불용성 분획의 융합 폴리펩타이드의 내포체를 가용화할 수 있다.

예를 들어, 내포체 가용화 완충액으로 불용성 분획의 내포체를 가용화시키는 경우, 2°C 내지 8°C 온도에서 약 1시간 내지 6시간 동안 진탕 배양한 후

10 12,000 rpm (12,000×g) 조건에서 30분간(4°C) 원심분리하여 불용성 분획에 존재하는 파쇄된 세포 잔해를 제거하고 가용화된 융합 폴리펩타이드가 포함되어 있는 상등액을 얻는다. 상등액은 적층형 필터(depth filter) 및 막 필터로 여과하여 불용성 및 고형 성분을 제거하여 정제용 컬럼에 주입될 수 있도록 한다.

또한, 불용성 내포체 형태로 발현된 후 가용화된 재조합 융합

15 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드는 크기 배제, 음이온 또는 양이온 교환, 소수성 상호작용, 또는 친화성 크로마토그래피 방법에 의해 다른 단백질 및 세포 잔해로부터 분리하거나 정제할 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 융합 폴리펩타이드는 폴리히스티딘 태그(6-histidine tag)가 포함되어 있으므로 Ni-sepharose FF가 충전되어 있는 HisTrap

20 FF 5 mL 컬럼(GE Healthcare)을 이용하여 정제할 수 있다. 가용화된 재조합 융합 폴리펩타이드는 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템에 장착된 S9 시료 펌프를 이용하여 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)으로 평형화된 HisTrap FF 5 mL 컬럼 내로 주입되도록 하고, 내포체 가용화 완충액으로 세척 후 용출 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM

25 염화나트륨, 500 mM 이미다졸, pH 7.4)의 비율을 100%로 단계적 증가시켜 컬럼에 결합된 융합 폴리펩타이드를 용출시키고 분획을 수집할 수 있다.

상기 (c) 단계에서는, 전술한 방법으로 정제된 융합 폴리펩타이드를 절단 효소와 배양하여 목적 폴리펩타이드를 회수한다.

이때, 융합 폴리펩타이드는 절단효소에 의해 적합하게 절단될 수 있어,

30 목적 폴리펩타이드를 적합한 형태로 유리시킬 수 있다. 정제된 융합

폴리펩타이드 분획에는 8 M의 요소가 첨가되어 있으므로 절단효소의 변성을 막기 위해 희석 완충액(20 mM 트리스, pH 7.4)를 이용하여 요소 농도가 1 M이 되도록 희석하는 것이 바람직하다. 융합 폴리펩타이드는 정제 후 요소 농도가 1 M이 되도록 희석되어 20 mM 트리스, pH 7.4, 1 M 요소, 62.5 mM 염화나트륨, 62.5 mM 이미다졸을 함유하는 완충액에 존재할 수 있다. 재조합 융합 폴리펩타이드는 절단효소와 반응하여 친화성 태그 및 절단효소 인식 서열이 포함된 아미노 말단 융합 파트너와 목적 폴리펩타이드로 절단된다. 프로테아제 절단 방법은 당업계에 공지되고 제조사의 지시서를 포함한 문헌에 기재된 임의의 적합한 방법이 이용될 수 있다. 바람직하게는, 정제 후 요소 농도가 1 M이 되도록 희석된 융합 폴리펩타이드에 TEV 프로테아제를 최종 농도가 500 nM이 되도록 첨가하고 실온에서 6시간 이상 절단 반응이 진행될 수 있도록 한다. 예를 들어, TEV 프로테아제에 의해 재조합 융합 폴리펩타이드는 약 60% 내지 약 100%가 절단된다.

재조합 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 수율은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) 또는 웨스턴 블롯(Western blot) 분석에 의해 결정할 수 있다. SDS-PAGE로 전기영동된 겔(gel)은 염색(staining), 탈색(destaining), 디지털 영상화 과정을 거쳐 재조합 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 대략적인 정량 및 정성 분석이 가능하다.

또한, 정제된 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 농도는 당업계에 공지되고 문헌에 기재된 방법에 의한 흡광도 분광법으로 결정될 수 있다.

정제된 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 수율 또는 순도를 결정하기 위한 웨스턴 블롯 분석은 SDS-PAGE 겔 상에서 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 이동시키고, 목적 폴리펩타이드에 특이적인 항체를 이용하는 당업계에 공지된 적합한 방법에 따라 수행될 수 있다. 실시예에서, 목적 폴리펩타이드의 순도를 측정하기 위한 방법 중 하나로 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)방법을 이용할 수 있다.

정제된 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 수율은 배양액의 부피당 정제된 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 양(예를 들어, g 또는 mg의 단백질/리터의 배양액 부피), 융합 폴리펩타이드의 백분율(예를 들어,

재조합 융합 폴리펩타이드의 양/전체 세포 단백질(total cell protein)의 양), 및 건조 균체량(dry cell weight)에 대한 백분율 또는 비율을 포함한다. 본원에 기재된 폴리펩타이드의 수율의 척도는 완전한 형태로 발현된 해당 폴리펩타이드의 양을 기준으로 한다.

5 수율이 배양액 부피에 대한 정제된 융합 폴리펩타이드 또는 목적 폴리펩타이드의 양으로 표현되는 경우, 배양된 세포 밀도 혹은 세포 농도가 수율을 결정하는데 고려될 수 있다.

또한, 절단효소로 절단된 후 얻어진 목적 폴리펩타이드의 수율은 약 0.54 g/L 내지 약 13.5 g/L일 수 있다. 본 발명에서, 목적 폴리펩타이드의 수율은 5
10 ml 내지 2L 이상의 규모에서 약 0.54 g/L 일 수 있다.

본 발명의 구체예는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 융합 파트너와 재조합된 융합 폴리펩타이드를 이용하여 목적 폴리펩타이드를 수득함으로써, 목적 폴리펩타이드가 세포 내에서 효소에 의해 분해되거나, 부적절한 폴딩이 발생하는 등의 문제점을 최소화하여 목적 폴리펩타이드를 고수율로 생산하는
15 방법을 제공할 수 있다. 구체적인 생산 방법의 일 예시는 실시예를 통해 설명하기로 한다.

발명의 실시를 위한 형태

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단,
20 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 제조 및 생산

실시예 1.1. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension
25 polymerase chain reaction(OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG43(서열번호 119) 중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140) 및 TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 hPTH 1-34의 아미노산 서열(서열번호 151)이 포함되어 있다.

30 대조군으로서 사용된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드(H6TEV-hPTH 1-34)는

아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 hPTH 1-34의 아미노산 서열(서열번호 151)이 포함되어 있다. 각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식 서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 294 내지 296에 해당하며, 대조군은 서열번호 293에 해당한다.

아래 표 2에 기재한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK419, pSGK476, pSGK477 및 pSGK478를 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 2】

균주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG001	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK419	H6TEV-hPTH1-34
PG002	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK476	PG07-H6TEV-hPTH1-34
PG003	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK477	PG15-H6TEV-hPTH1-34
PG004	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK478	PG43-H6TEV-hPTH1-34

제작된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다. 제작된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들을 이용하여 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질도입된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들은 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액(cell stock)을 만들고, 이를 -80°C 온도의 냉동고에 보관하였다.

실시에 1.2. 형질전환된 세포의 배양 및 hPTH 1-34의 발현

-80°C 온도에서 보관된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μl 를 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에

첨가하여 37℃ 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균 배양된 대장균 2 ml는 카나마이신이 50 µg/ml의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37℃ 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때, IPTG의 최종
 5 농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를 측정하였다.

실시에 1.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM
 10 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000×g, 4℃ 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 µl의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여
 15 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

실시에 1.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 hPTH 1-34의 확인

50 µl의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 µl의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer 2× concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95℃ 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내
 20 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후, 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다. 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

도 1을 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV-hPTH 1-34(5.9 kDa의 분자량)의 밴드는 본원 발명에 따른 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드들과 비교하여 가장 낮은 발현 수준을 나타냈다. 본 발명에 따른 융합 파트너인 PG7, PG15 및 PG43이 융합된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드인 PG07-H6TEV-hPTH 1-34(6.9 kDa의 분자량), PG15-H6TEV-hPTH
 30 1-34(7.9 kDa의 분자량) 및 PG43-H6TEV-hPTH 1-34(10.6 kDa의 분자량)의 발현

수준은 대조군(H6TEV-hPTH 1-34) 대비 증가된 것이 확인할 수 있다. 덴시토미터 분석을 통해 PG7, PG15 및 PG43 중 P15의 융합에 의한 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현 수준이 모든 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 중 가장 높은 것으로 확인되었다.

또한, 도 2를 참조하면, 대조군을 포함한 모든 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드는 가용성 분획에서는 관찰되지 않고 모두 불용성 분획에서 나타나는 것을 알 수 있다.

실시예 1.5. PG15-H6TEV-hPTH 1-34 대량 생산을 위한 유가식 배양

문헌(Riesenberg, Schulz et al. 1991)에 기재되어 배지 조성을 이용하여 2 L의 제한 배지를 함유하는 37°C의 발효기에서 세포를 배양하고, 염산과 암모니아 첨가를 통해 pH 6.8로 유지하였다. 발효기 내의 세포를 고농도로 배양하기 위해 세포 배양 동안 포도당이 포함된 주입 용액(feeding solution)을 배양액에 주입하였다. 배양 8시간 후 1.0 mM 농도의 IPTG를 첨가하여 11시간 동안 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현을 유도하였다.

그 후, SDS-PAGE 분석을 통해 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현 수준을 확인하였다. SDS-PAGE 분석결과, IPTG에 의한 발현 유도 후 세포 성장 및 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현 수준은 지속적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 덴시토미터 분석결과 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현 수준은 총 단백질의 약 27%로 확인되었다(도 3).

실시예 1.6. N-말단 융합 파트너의 아미노산 치환에 의한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준 향상

PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 N-말단 서열이 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보기 위해 PG15의 아미노산 서열의 2번부터 7번까지 총 6개의 아미노산을 결실시킨 PG15(Δ 2-7)-H6TEV-hPTH1-34(서열번호 339)의 발현 플라스미드를 제작하여 대장균 내 발현 수준을 PG15-H6TEV-hPTH1-34와 비교하였다. 형질전환부터 SDS-PAGE를 이용한 발현수준 분석은 실시예 1.2 내지 1.4와 동일하게 수행하였다.

SDS-PAGE 젤의 덴시토미터 분석을 통해 PG15(Δ 2-7)-H6TEV-hPTH1-34의 발현수준은 PG15-H6TEV-hPTH1-34와 비교하여 5배 이상 감소하는 것으로 확인되었다(도 4). 따라서, PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 2번부터 7번까지 서열이 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준에 크게 영향을 주는 것을

확인하였다.

또한, PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화가 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 아미노산 잔기를 이소루신, 아스파라긴, 아르기닌, 아스팔트산으로 치환한 총 21개의 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체를 제작하여 PG15-H6TEV-hPTH1-34와의 세포 내 발현수준을 비교하였다.

hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현을 위한 플라스미드 DNA는 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)방법을 이용하여 제작하였다. 위치 지정 돌연변이를 위한 주형(template)은 PG15-H6TEV-hPTH1-34 발현 플라스미드인 pSGK477을 사용하였고 프라이머는 각각의 변이체의 아미노산 치환부위의 염기서열이 변경된 정방향(forward) 및 역방향(reverse)의 단일가닥 DNA 올리고머를 이용하였다. 실험에 사용된 프라이머를 하기 표 3에 나타내었다.

【표 3】

No.	PG15 mutants	Oligomer sequence		서열번호
1	PG15-N2I	F-primer	GGAGATATACATATGATTATTCGTCATTGCAT	서열번호 297
		R-primer	ATGCAATGGACGAATAATCATATGTATATCTCC	서열번호 298
2	PG15-N2N	F-primer	-	
		R-primer	-	
3	PG15-N2R	F-primer	GGAGATATACATATGGCGATTCGTCATTGCAT	서열번호 299
		R-primer	ATGCAATGGACGAATGGCGCATATGTATATCTCC	서열번호 300
4	PG15-N2D	F-primer	GGAGATATACATATGGATATTCGTCATTGCAT	서열번호 301
		R-primer	ATGCAATGGACGAATATCCATATGTATATCTCC	서열번호 302
5	PG15-I3I	F-primer	-	
		R-primer	-	
6	PG15-I3N	F-primer	GATATACATATGAATAACCGTCATTGCATGAT	서열번호 303
		R-primer	ATCATGCAATGGACGGTTATTCATATGTATATC	서열번호 304
7	PG15-I3R	F-primer	GATATACATATGAATCGCCGTCATTGCATGAT	서열번호 305
		R-primer	ATCATGCAATGGACGGCGATTTCATATGTATATC	서열번호 306
8	PG15-I3D	F-primer	GATATACATATGAATGATCGTCATTGCATGAT	서열번호 307
		R-primer	ATCATGCAATGGACGATTCATATGTATATC	서열번호 308
9	PG15-R4I	F-primer	ATACATATGAATATTATTCATTGCATGATCGC	서열번호 309
		R-primer	GCGATCATGCAATGGAATAATATTCATATGTAT	서열번호 310
10	PG15-R4N	F-primer	ATACATATGAATATTAACCCATTGCATGATCGC	서열번호 311
		R-primer	GCGATCATGCAATGGGTTAATATTCATATGTAT	서열번호 312
11	PG15-R4R	F-primer	-	
		R-primer	-	
12	PG15-R4D	F-primer	ATACATATGAATATTGATCCATTGCATGATCGC	서열번호 313
		R-primer	GCGATCATGCAATGGATCAATATTCATATGTAT	서열번호 314
13	PG15-P5I	F-primer	CATATGAATATTCGTATTTTGCATGATCGCGTG	서열번호 315
		R-primer	CACGCGATCATGCAAAATACGAATATTCATATG	서열번호 316

14	PG15-P5N	F-primer	CATATGAATATTCGTA AACT TGCATGATCGCGTG	서열번호 317
		R-primer	CACGCGATCATGCAAG TT ACGAATATTCATATG	서열번호 318
15	PG15-P5R	F-primer	CATATGAATATTCGTC CGCT TGCATGATCGCGTG	서열번호 319
		R-primer	CACGCGATCATGCAAG CG ACGAATATTCATATG	서열번호 320
16	PG15-P5D	F-primer	CATATGAATATTCGTC GATT TGCATGATCGCGTG	서열번호 321
		R-primer	CACGCGATCATGCAAA TC ACGAATATTCATATG	서열번호 322
17	PG15-L6I	F-primer	ATGAATATTCGTC CAATT TCATGATCGCGTGATC	서열번호 323
		R-primer	GATCACGCGATCATGA ATT GGACGAATATTCAT	서열번호 324
18	PG15-L6N	F-primer	ATGAATATTCGTC CAAA CCATGATCGCGTGATC	서열번호 325
		R-primer	GATCACGCGATCATG TTT GGACGAATATTCAT	서열번호 326
19	PG15-L6R	F-primer	ATGAATATTCGTC ACGC CATGATCGCGTGATC	서열번호 327
		R-primer	GATCACGCGATCATG CGT GGACGAATATTCAT	서열번호 328
20	PG15-L6D	F-primer	ATGAATATTCGTC AGAT CATGATCGCGTGATC	서열번호 329
		R-primer	GATCACGCGATCATG CT GGACGAATATTCAT	서열번호 330
21	PG15-H7I	F-primer	AATATTCGTC ATTG ATCGCGTGATCGTC	서열번호 331
		R-primer	GACGATCACGCGAT CAAT CAATGGACGAATATT	서열번호 332
22	PG15-H7N	F-primer	AATATTCGTC AA CGATCGCGTGATCGTC	서열번호 333
		R-primer	GACGATCACGCGAT CTT CAATGGACGAATATT	서열번호 334
23	PG15-H7R	F-primer	AATATTCGTC CGCG ATCGCGTGATCGTC	서열번호 335
		R-primer	GACGATCACGCGAT CGC CAATGGACGAATATT	서열번호 336
24	PG15-H7D	F-primer	AATATTCGTC GATG ATCGCGTGATCGTC	서열번호 337
		R-primer	GACGATCACGCGAT CCA ATGGACGAATATT	서열번호 338

각각의 변이체에 대한 위치 지정 돌연변이 후 얻어진 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다.

제작된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현 플라스미드들을 이용하여 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들을 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80°C 온도의 냉동고에 보관하였다.

-80°C 온도에서 보관된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μl 를 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균 배양된 대장균 2 ml은 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때, IPTG의 최종

농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를 측정하였다.

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000×g, 4℃ 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 μ l의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

50 μ l의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 μ l의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer 2× concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95℃ 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후, 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다. 그 결과를 도 5 내지 도 7에 나타내었다.

대조군인 PG15-H6TEV-hPTH1-34의 발현 수준과 비교하여 PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 PG15의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화에 의해 발현 수준이 향상된 변이체와 감소된 변이체들을 확인하였다. 특히, 덴시토미터 분석을 통해 4번째 잔기가 아스파르트산으로 치환된 변이주와 7번째 잔기가 아르기닌으로 치환된 변이주는 대조군 대비 3배 이상 발현 수준이 향상되었다.

실시예 2. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 회수 및 정제

실시예 2.1. 세포 파쇄 및 불용성 내포체 회수

플라스크 규모에서 발현된 세포의 냉동된 세포 펠렛을 50 ml의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액을 첨가하여 해동하였다. 재현탁된 세포는 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 파쇄하였다. 용해된 세포는 12,000 rpm(12,000×g) 조건에서 30분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 재조합 융합 폴리펩타이드가 포함된 불용성 내포체 분획을 회수하였다.

실시예 2.2. 불용성 내포체 가용화

회수된 불용성 내포체 분획에 20 ml의 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)을 첨가하고 25°C 온도에서 4시간 동안 진탕배양하여 불용성 분획 내 내포체 형태의 재조합 융합 폴리펩타이드가 가용화될 수 있도록 하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 12,000 Xg에서 30분간 원심분리하고 상등액을 막필터(0.45/0.2 μ m)를 통해 여과하였다.

실시예 2.3. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 정제

가용화된 불용성 분획 내의 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C 분획 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)으로 미리 평형화된 HisTrap FF 1 ml 컬럼(GE Healthcare)에 주입하였다. 주입이 완료된 후 컬럼은 5배 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하고, 5배 컬럼 부피의 용출 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 500 mM 이미다졸, pH 7.4)을 단계적으로 100%가 되도록 증가시켜 컬럼의 수지에 결합되어 있는 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드를 용출하였다. 용출 후 얻어진 분획의 결과를 각각 도 8a 내지 도 10b에 나타내었다.

실시예 3. 프로테아제 처리를 통한 링커 서열 절단

약 5 ml의 정제된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 분획을 합친 후 140 ml의 희석 완충액(20 mM 트리스, pH 7.4)을 첨가하여 요소의 농도가 1 M이 되도록 희석하였다. 희석된 재조합 융합 폴리펩타이드에 TEV 프로테아제의 최종 농도가 500 nM이 되도록 첨가하고 실온에서 12시간 동안 절단 반응이 진행될 수 있도록 하였다.

TEV 프로테아제에 의한 절단 여부를 확인하기 위해, 절단 후 SDS-PAGE 분석을 수행하여 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다. 한편, 도 9a를 참조하면, 7.9 kDa의 PG15-H6TEV-hPTH 1-34은 거의 100%의 수율로 N-말단 융합 파트너, 6 히스티딘 태그 및 TEV 프로테아제 인식서열 융합체인 PG15-H6TEV 단편과 목적 폴리펩타이드인 hPTH 1-34단편으로 분리되는 것을 확인하였다.

실시에 4. hPTH 1-34 정제

실시에 4.1. 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 hPTH 1-34 분리 및 정제

PG15-H6TEV-hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에서, TEV 프로테아제의 절단에 의해 유리된 hPTH 1-34의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C
 5 분획 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. TEV 프로테아제로 절단된 각각의 시료를 결합 완충액(20 mM 아세트산 암모늄, pH 9.3)으로 완충액 교환 후 동일 완충액으로 미리 평형화된 HiTrap SP FF 1 mL 컬럼(GE Healthcare)에 주입하였다. 주입이 완료된 후 컬럼을 5배 컬럼 부피의 결합 완충액으로 세척하고, 5배 컬럼
 10 부피의 용출 완충액(20 mM 아세트산 암모늄, 500 mM 염화나트륨, pH 9.3)을 점진적으로 100%가 되도록 선형으로 10배의 컬럼 부피 동안 증가시켜 컬럼의 수지에 결합되어 있는 hPTH 1-34를 용출하였다. 분획 수집기의 정제 분획은 상기에 기재된 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다.

제조합 융합 폴리펩타이드(PG15-H6TEV-hPTH 1-34)의 절단에 의해 유리된
 15 hPTH 1-34의 pI는 정제용 태그 및 절단효소 인식 서열이 포함된 아미노 말단 융합 파트너(PG15-H6TEV)의 pI보다 약 3이 낮다. 구체적으로, pH 9.3의 완충액에서 11.72의 pI 값을 갖는 PG15-H6TEV는 양전하를 갖고 8.29의 pI 값을 갖는 hPTH 1-34는 양전하를 가지므로, 이온 교환 크로마토그래피를 이용한 PG15-H6TEV와 hPTH 1-34의 분리가 용이하다. PG15-H6TEV-hPTH 1-34이 절단되어 PG15-
 20 H6TEV와 hPTH 1-34가 혼합되어 있는 시료를 양이온 교환 수지가 충전되어 있는 HiTrap SP FF 1 mL 컬럼에 주입하였다. 도 13a 및 13b를 참조하면, 음이온을 띄고 있는 hPTH 1-34는 양이온 교환 수지에 결합되지 않고 통과액(flow through) 분획에서 확인되었고 양이온을 띄고 있는 PG15-H6TEV는 양이온 교환 수지에 결합 후 염화나트륨 농도 증가에 의해 용출되는 것을 확인하였다. 따라서 비교적 높은
 25 pI 값을 갖는 본 발명에 따른 N-말단 융합 파트너들은 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 제거 가능하므로 hPTH 1-34의 분리 정제를 용이하게 할 수 있다.

실시에 4.2. 소수성 상호작용 크로마토그래피를 통한 hPTH 1-34 분리 및 정제

PG15-H6TEV-hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에서, TEV 프로테아제의 절단에

의해 유리된 hPTH 1-34의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C
 분획 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피
 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. TEV 프로테아제로 절단된 각각의 시료를
 결합 완충액(50 mM 인산 나트륨, 1.5 M 황산 암모늄, pH 7.0)으로 완충액 교환
 5 후 동일 완충액으로 미리 평형화된 HiTrap Butyl HP 1 mL 컬럼(GE Healthcare)에
 주입하였다. 주입이 완료된 후 컬럼을 5배 컬럼 부피의 결합 완충액으로
 세척하고, 5배 컬럼 부피의 용출 완충액(50 mM 인산 나트륨, pH 7.0)을
 점진적으로 100%가 되도록 선형으로 30배의 컬럼 부피 동안 증가시켜 컬럼의
 수지에 결합되어 있는 hPTH 1-34를 용출하였다. 분획 수집기의 정제 분획은
 10 상기에 기재된 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다.

재조합 융합 폴리펩타이드(PG15-H6TEV-hPTH 1-34)의 절단에 의해 유리된
 hPTH 1-34의 평균 소수성(GRAVY) 값(-0.671)은 정제용 태그 및 절단효소 인식
 서열이 포함된 아미노 말단 융합 파트너(PG15-H6TEV)의 평균 소수성 값(-1.272)
 보다 0.488만큼 높으므로 소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용한 PG15-
 15 H6TEV와 hPTH 1-34의 분리가 용이하다. 도 14a 및 14b에 나타난 바와 같이,
 대부분의 PG15-H6TEV와 hPTH 1-34는 소수성 상호작용 수지에 결합하여
 통과액(flow through) 분획에서 검출되지 않았다. 황산 암모늄이 포함되어 있지
 않은 용출 완충액 비율이 서서히 증가됨에 따라 낮은 평균 소수성을 갖는 PG15-
 H6TEV부터 용출되었고 용출 완충액 비율이 더 올라가 황산 암모늄 농도가
 20 낮아지면서 hPTH 1-34가 용출되는 결과를 확인하였다. 따라서 상대적은 낮은
 평균 소수성 값을 갖는 본 발명에 따른 N-말단 융합 파트너들은 소수성 상호작용
 크로마토그래피를 이용하여 제거 가능하므로 hPTH 1-34의 분리 정제를 용이하게
 할 수 있다.

실시에 5. 절단 후의 hPTH 1-34의 분자량 분석

25 완전한 형태의 PG15-H6TEV-hPTH 1-34의 발현 유무, TEV 프로테아제에
 의한 정확한 절단 및 절단 후 얻어진 hPTH 1-34의 변형(modification) 유무를
 확인하기 위해 MALTI-TOF MS를 이용한 분자량 분석을 실시하였다. hPTH 1-34
 표준 물질의 분자량을 측정한 결과와 본 발명에 따라 수득된 hPTH 1-34의
 분자량을 측정한 결과를 도 15 및 도 16에 나타내었다.

30 도 15 및 도 16를 참고하면, PG15-H6TEV-hPTH 1-34로부터 수득된 hPTH 1-

34의 분자량은 이론적인 분자량과 오차범위 이내에서 일치하였으므로 대장균 내에서 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의한 아미노 혹은 카르복시 말단의 부분적인 절단이나 분해 없이 완전한 형태로 발현된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 TEV 프로테아제는 PG15-H6TEV-hPTH 1-34 내 인식서열인 ENLFQ
5 서열을 인식하고 마지막 아미노산인 Q(글루타민)와 hPTH 1-34의 첫번째 아미노산인 S(세린) 사이의 펩타이드 결합을 정확하게 절단하는 것으로 판단된다.

실시에 6. 정제된 hPTH 1-34의 역상 HPLC 분석

미국약전(USP 39, Officail Monographs, Teriparatide, 6058-6062)에 명시되어 있는 hPTH 1-34의 동정(identification) 기준시험법으로 표준품 hPTH
10 1-34(USP Catalog #1643962)와 본 발명을 통해 생산된 재조합 hPTH 1-34을 역상 HPLC로 분석하였다. 그 결과, 두 hPTH 1-34 모두 동일한 체류시간을 보였고 재조합 hPTH 1-34의 순도는 99.5% 이상으로 확인되었다(도 17).

또한, 미국약전(USP)에 hPTH 1-34의 동정(identification) 방법 중 추가적으로 펩타이드 맵핑(peptide mapping) 방법을 통해 표준품 hPTH 1-34(USP
15 Catalog #1643962)와 본 발명을 통해 생산된 재조합 hPTH 1-34의 동등성을 분석하였다. 상기 두 hPTH 1-34에 각각 Staphylococcus aureus V8 protease를 처리하여 5개의 펩타이드 조각(peptide fragment)으로 분리한 후 역상 HPLC로 분석해 본 결과, 두 hPTH 1-34에서 분리된 5개의 펩타이드 조각들이 모두 동일한 체류시간을 보여 표준품 hPTH 1-34와 재조합 hPTH 1-34의 동등성이
20 확인되었다(도 18).

실시에 7. 리라글루타이드 전구체 펩타이드(GLP-1K28R) 융합 폴리펩타이드 제조 및 생산

실시에 7.1. GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension
25 polymerase chain reaction (OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG22(서열번호 53), PG29(서열번호 75), PG36(서열번호 97) 및 PG43(서열번호 119) 중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식서열(서열번호 146) 및 GLP-1K28R의 아미노산 서열(서열번호
30 341)이 포함되어 있다.

대조군으로서 사용된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드(H6TEV-GLP-1K28R)는 아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식서열(서열번호 146) 및 GLP-1K28R의 아미노산 서열(서열번호 341)이 포함되어 있다. 각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 478 내지 483에 해당하며, 대조군은 서열번호 477에 해당한다.

아래 표 4에 기재한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK530, pSGK495, pSGK496, pSGK500, pSGK501, pSGK502 및 pSGK497을 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 4】

군주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG005	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK530	H6TEV-GLP-1K28R
PG006	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK495	PG07-H6TEV-GLP-1K28R
PG007	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK496	PG15-H6TEV-GLP-1K28R
PG008	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK500	PG22-H6TEV-GLP-1K28R
PG009	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK501	PG29-H6TEV-GLP-1K28R
PG010	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK502	PG36-H6TEV-GLP-1K28R
PG011	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK497	PG43-H6TEV-GLP-1K28R

제작된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다. 제작된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질도입된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들은 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80℃ 온도의 냉동고에 보관하였다.

실시예 7.2. 형질전환된 세포의 배양 및 GLP-1K28R의 발현

-80℃ 온도에서 보관된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현

플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μ l를 카나마이신이 50 μ g/ml의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균 배양된 대장균 2 ml을 카나마이신이 50 μ g/ml의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때 IPTG를 최종 농도 0.1 mM이 되도록 첨가하여 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를 측정하였다.

실시예 7.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000 $\times$ g, 4°C 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 μ l의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

실시예 7.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 GLP-1K28R의 확인

50 μ l의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 μ l의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer 2 $\times$ concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95°C 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후, 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다. 그 결과를 도 19 및 도 20에 나타내었다.

도 19를 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV-GLP-1K28R(5.1 kDa의 분자량)의 밴드는 SDS-PAGE 겔에서 검출되지 않아 발현 후 세포내 단백질 분해효소에 의해 분해된 것으로 보인다. SDS-PAGE 겔에서 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현은

분자량이 가장 작은 아미노 말단 융합 파트너인 PG07이 융합된 PG07-H6TEV-GLP-1K28R(6.1 kDa의 분자량)부터 확인되었다.

아미노 말단 융합 파트너인 PG15가 융합된 PG15-H6TEV-GLP-1K28R(7.1 kDa의 분자량)의 발현 수준은 PG07-H6TEV-GLP-1K28R 대비 증가하였다. 아미노
5 말단 융합 파트너인 PG15, PG22, PG29, PG36 및 PG43이 융합된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드인 PG15-H6TEV-GLP-1K28R(7.1 kDa의 분자량), PG22-H6TEV-GLP-1K28R(7.9 kDa의 분자량), PG29-H6TEV-GLP-1K28R(8.4 kDa의 분자량), PG36-H6TEV-GLP-1K28R(9.1 kDa의 분자량) 및 PG43-H6TEV-GLP-1K28R(11.7 kDa의 분자량)의 발현 수준은 대조군(H6TEV-GLP-1K28R) 대비 매우 향상된 것이
10 확인되었다.

덴시토미터 분석을 통해 PG07, PG15, PG22, PG29, PG36 및 PG43 중 PG22, PG29, PG36 및 PG43이 융합된 융합 폴리펩타이드들의 발현 수준은 유사하였고 PG07, PG15이 융합된 융합 폴리펩타이드 보다 월등히 높은 것으로 확인되었다(도 20 및 도 21).

또한, 도 20을 참조하면, 대조군을 포함한 모든 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드는 가용성 분획에서는 관찰되지 않고 모두 불용성 분획에서 나타나는 것을 알 수 있다(레인 1: H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG005) 및 레인 2: PG07-H6TEV-GLP-1K28R(균주 번호 PG006)의 경우 목적 펩타이드가 발현되지 않거나 발현 수준이 낮아 가용성 테스트를 수행하지 않았음).

20 실시예 7.5. N-말단 융합 파트너의 아미노산 치환에 의한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현 수준 변화

PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 PG43의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화가 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 아미노산 잔기를 이소루신, 아스파라긴, 아르기닌, 아스팔트산으로
25 치환한 총 22개의 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체를 제작하여 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 와의 세포 내 발현수준을 비교하였다.

GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현을 위한 플라스미드 DNA는 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)방법을 이용하여 제작하였다. 위치 지정 돌연변이를 위한 주형(template)은 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 발현
30 플라스미드인 pSGK497을 사용하였다. 프라이머는 각각의 변이체의 아미노산

치환부위의 염기서열이 변경된 정방향(forward) 및 역방향(reverse)의 단일가닥 DNA 올리고머를 이용하였다. 실험에 사용된 프라이머를 하기 표 5에 나타내었다.

【표 5】

No.	PG43 mutants	Oligomer sequence		서열번호
1	PG43-N2I	F-primer	GGAGATATACATATGATTATTCGTCATTGCAT	서열번호 297
		R-primer	ATGCAATGGACGAATAATCATATGTATATCTCC	서열번호 298
2	PG43-N2N	F-primer	-	
		R-primer	-	
3	PG43-N2R	F-primer	GGAGATATACATATGCGCATTTCGTCATTGCAT	서열번호 299
		R-primer	ATGCAATGGACGAATGCGCATATGTATATCTCC	서열번호 300
4	PG43-N2D	F-primer	GGAGATATACATATGGATATTCGTCATTGCAT	서열번호 301
		R-primer	ATGCAATGGACGAATATCCATATGTATATCTCC	서열번호 302
5	PG43-I3I	F-primer	-	
		R-primer	-	
6	PG43-I3N	F-primer	GATATACATATGAATAACCGTCCATTGCATGAT	서열번호 303
		R-primer	ATCATGCAATGGACGGTTATTCATATGTATATC	서열번호 304
7	PG43-I3R	F-primer	GATATACATATGAATCGCGTCCATTGCATGAT	서열번호 305
		R-primer	ATCATGCAATGGACGGCGATTTCATATGTATATC	서열번호 306
8	PG43-I3D	F-primer	GATATACATATGAATGATCGTCCATTGCATGAT	서열번호 307
		R-primer	ATCATGCAATGGACGATCATTTCATATGTATATC	서열번호 308
9	PG43-R4I	F-primer	ATACATATGAATATTATTCATTGCATGATCGC	서열번호 309
		R-primer	GCGATCATGCAATGGAATAATATTCATATGTAT	서열번호 310
10	PG43-R4N	F-primer	ATACATATGAATATTAACCCATTGCATGATCGC	서열번호 311
		R-primer	GCGATCATGCAATGGGTTAATATTCATATGTAT	서열번호 312
11	PG43-R4R	F-primer	-	
		R-primer	-	
12	PG43-R4D	F-primer	ATACATATGAATATTGATCCATTGCATGATCGC	서열번호 313
		R-primer	GCGATCATGCAATGGATCAATATTCATATGTAT	서열번호 314
13	PG43-P5I	F-primer	CATATGAATATTCGTATTTTGCATGATCGCGTG	서열번호 315
		R-primer	CACGCGATCATGCAAAATACGAATATTCATATG	서열번호 316
14	PG43-P5N	F-primer	CATATGAATATTCGTAACTTGCATGATCGCGTG	서열번호 317
		R-primer	CACGCGATCATGCAAGTTACGAATATTCATATG	서열번호 318
15	PG43-P5R	F-primer	CATATGAATATTCGTGCGTTGCATGATCGCGTG	서열번호 319
		R-primer	CACGCGATCATGCAAGCGACGAATATTCATATG	서열번호 320
16	PG43-P5D	F-primer	CATATGAATATTCGTGATTTGCATGATCGCGTG	서열번호 321
		R-primer	CACGCGATCATGCAAAATCAGGAATATTCATATG	서열번호 322
17	PG43-L6I	F-primer	ATGAATATTCGTCCAATTTCATGATCGCGTGATC	서열번호 323
		R-primer	GATCACGCGATCATGAATTGGACGAATATTCAT	서열번호 324
18	PG43-L6N	F-primer	ATGAATATTCGTCCAACCATGATCGCGTGATC	서열번호 325
		R-primer	GATCACGCGATCATGGTTTGGACGAATATTCAT	서열번호 326
19	PG43-L6R	F-primer	ATGAATATTCGTCCACGCCATGATCGCGTGATC	서열번호 327
		R-primer	GATCACGCGATCATGGCGTGGACGAATATTCAT	서열번호 328
20	PG43-L6D	F-primer	ATGAATATTCGTCCAGATCATGATCGCGTGATC	서열번호 329
		R-primer	GATCACGCGATCATGATCTGGACGAATATTCAT	서열번호 330
21	PG43-H7I	F-primer	AATATTCGTCCATTGATTGATCGCGTGATCGTC	서열번호 331
		R-primer	GACGATCACGCGATCAATCAATGGACGAATATT	서열번호 332
22	PG43-H7N	F-primer	AATATTCGTCCATTGAACGATCGCGTGATCGTC	서열번호 333
		R-primer	GACGATCACGCGATCGTTCAATGGACGAATATT	서열번호 334
23	PG43-H7R	F-primer	AATATTCGTCCATTGCGCGATCGCGTGATCGTC	서열번호 335

		R-primer	GACGATCACGCGATCGCGCAATGGACGAATATT	서열번호 336
24	PG43-H7D	F-primer	AATATTCGTCCATTGGATGATCGCGTGATCGTC	서열번호 337
		R-primer	GACGATCACGCGATCATCCAATGGACGAATATT	서열번호 338

각각의 변이체에 대한 위치 지정 돌연변이 후 얻어진 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다.

제작된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현 플라스미드들을 이용하여 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를
5 형질전환하였다. GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들을 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80°C 온도의
10 냉동고에 보관하였다.

-80°C 온도에서 보관된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μl 를 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균
15 배양된 대장균 2 ml은 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때, IPTG의 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를
20 측정하였다.

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포
25 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000 $\times g$, 4°C 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 μl 의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

50 μl 의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 μl 의 2배 농축된 SDS

시료 완충액(SDS sample buffer 2× concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95℃ 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후, 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다.

도 22 내지 도 24에 나타난 바와 같이, 대조군인 PG43-H6TEV-GLP-1K28R의 발현 수준과 비교하여 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 PG43의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화에 의해 발현 수준이 향상된 변이체와 감소된 변이체들을 확인하였다. 특히, 덴시토미터 분석을 통해 2번째 잔기가 아스팔트산으로 치환된 변이주와 7번째 잔기가 아이소루신, 아스파라긴, 아르기닌, 아스팔트산으로 치환된 변이주들은 대조군 대비 2 내지 3배 이상 발현 수준이 향상되는 것으로 확인되었다.

실시예 8. GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 회수 및 정제

실시예 8.1. 세포 파쇄 및 불용성 내포체 회수

플라스크 규모에서 발현된 세포의 냉동된 세포 펠렛을 50 ml의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액을 첨가하여 해동하였다. 재현탁된 세포는 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 파쇄하였다. 용해된 세포는 12,000 rpm (12,000×g) 조건에서 30분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 재조합 융합 폴리펩타이드가 포함된 불용성 내포체 분획을 회수하였다.

실시예 8.2. 불용성 내포체 가용화

회수된 불용성 내포체 분획에 20 ml의 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)을 첨가하고 25℃ 온도에서 4시간 동안 진탕배양하여 불용성 분획 내 내포체 형태의 재조합 융합 폴리펩타이드가 가용화될 수 있도록 하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 12,000×g에서 30분간 원심분리하고 상등액을 (0.45/0.2 μm) 막필터를 통해 여과하였다.

실시예 8.3. GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 정제

7개 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드 중 가장 발현 수준이 높은 PG43-H6TEV-GLP-1K28R를 정제하였다. 먼저, 가용화된 불용성 분획 내의 GLP-1K28R 융합

폴리펩타이드의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C 분획 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)으로 미리 평형화된 HisTrap FF 1 mL 컬럼(GE Healthcare)에 주입하였다.

주입이 완료된 후 컬럼은 5배 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하고, 5배 컬럼 부피의 용출 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 500 mM 이미다졸, pH 7.4)을 단계적으로 100%가 되도록 증가시켜 컬럼의 수지에 결합되어 있는 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드를 용출하였다. 용출 후 얻어진 분획의 결과를 각각 도면에 나타내었다(도 25 및 도 26). 컬럼에 주입된 가용화된 불용성 분획 시료 내의 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드는 대부분 컬럼 내 수지에 결합 후 용출되어 95% 이상의 순도를 보였다.

실시예 9. 프로테아제 처리를 통한 링커 서열 절단

약 5 mL의 정제된 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드의 분획을 합친 후 140 mL의 희석 완충액(20 mM 트리스, pH 7.4)을 첨가하여 요소 농도가 1 M이 되도록 희석하였다. 희석된 재조합 융합 폴리펩타이드에 TEV 프로테아제를 최종 농도가 500 nM이 되도록 첨가하고 실온에서 12시간 동안 절단 반응이 진행될 수 있도록 하였다.

TEV 프로테아제에 의한 절단 여부를 확인하기 위해, 절단 후 SDS-PAGE 분석을 수행하여 그 결과를 도면에 나타내었다(도 27). TEV 프로테아제에 의한 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드(PG43-H6TEV-GLP-1K28R)의 절단 전 후를 SDS-PAGE로 분석해본 결과 7.9 kDa의 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드는 거의 100%의 수율로 아미노 말단 융합 파트너와 6 히스티딘 태그 및 TEV 프로테아제 인식서열 융합체인 PG43-H6TEV와 목적 폴리펩타이드인 GLP-1K28R로 절단되는 것을 확인하였다.

실시예 10. 절단 후의 GLP-1K28R 의 분자량 분석

완전한 형태의 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드(PG43-H6TEV-GLP-1K28R)의 발현 유무, TEV 프로테아제에 의한 정확한 절단 및 절단 후 얻어진 GLP-1K28R의 변형(modification) 유무를 확인하기 위해 MALTI-TOF MS를 이용한 분자량 분석을 실시하였다. 본 발명에 따라 수득된 GLP-1K28R의 분자량을 측정한 결과를 도면에

나타내었다.

도 28을 참고하면, PG43-H6TEV-GLP-1K28R로부터 수득된 GLP-1K28R의 분자량은 3382.59 Da으로 측정되어 이론적인 분자량인 3383.72 Da과 오차범위 이내에서 일치하였으므로 대장균 내에서 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의한 아미노 혹은 카르복시 말단의 부분적인 절단이나 분해 없이 완전한 형태로 발현된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 TEV 프로테아제는 PG43-H6TEV-GLP-1K28R 내 인식서열인 ENLFQ 서열을 인식하고 마지막 아미노산인 Q(글루타민)와 GLP-1K28R의 첫번째 아미노산인 H(히스티딘) 사이의 펩타이드 결합을 정확하게 절단하는 것으로 판단된다.

실시에 11. 테두글루타이드(GLP-2A2G) 융합 폴리펩타이드 제조 및 생산

실시에 11.1. GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG22(서열번호 53), PG29(서열번호 75), PG36(서열번호 97) 및 PG43(서열번호 119) 중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식서열(서열번호 146) 및 GLP-2A2G의 아미노산 서열(서열번호 485)이 포함되어 있다.

대조군으로서 사용된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드(H6TEV-GLP-2A2G)는 아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식서열(서열번호 146) 및 GLP-2A2G의 아미노산 서열(서열번호 485)이 포함되어 있다. 각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 622 내지 627에 해당하며, 대조군은 서열번호 621에 해당한다.

아래 표 6에 기재한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK520, pSGK521, pSGK522, pSGK547, pSGK548, pSGK549 및 pSGK523을 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및

XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 6】

군주	숙주세포	플라스미드	제조합 융합 폴리펩타이드
PG012	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK520	H6TEV-GLP-2A2G
PG013	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK521	PG07-H6TEV-GLP-2A2G
PG014	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK522	PG15-H6TEV-GLP-2A2G
PG015	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK547	PG22-H6TEV-GLP-2A2G
PG016	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK548	PG29-H6TEV-GLP-2A2G
PG017	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK549	PG36-H6TEV-GLP-2A2G
PG018	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK523	PG43-H6TEV-GLP-2A2G

5 제작된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다. 제작된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들을 이용하여 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질도입된 대장균들은

10 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들은 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80°C 온도의 냉동고에 보관하였다.

실시예 11.2. 형질전환된 세포의 배양 및 GLP-2A2G의 발현

15 -80°C 온도에서 보관된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μl 를 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml 이 포함된 시험관에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균 배양된 대장균 2 ml 을 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지

20 200 ml 이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때 IPTG를 최종 농도 0.1 mM 이 되도록 첨가하여 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를 측정하였다.

25 실시예 11.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000×g, 4℃ 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 μ l의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

실시예 11.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 GLP-2A2G의 확인

50 μ l의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 μ l의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer 2× concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95℃ 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다. 그 결과를 도 29 및 도 30에 나타내었다.

도 29를 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV-GLP-2A2G(5.5 kDa의 분자량)의 밴드는 SDS-PAGE 겔에서 검출되지 않아 발현 후 세포내 단백질 분해효소에 의해 분해된 것으로 보인다.

아미노 말단 융합 파트너인 PG07, PG15, PG22, PG29, PG36 및 PG43이 융합된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드인 PG07-H6TEV-GLP-2A2G(6.5 kDa의 분자량), PG15-H6TEV-GLP-2A2G(7.5 kDa의 분자량), PG22-H6TEV-GLP-2A2G(7.5 kDa의 분자량), PG29-H6TEV-GLP-2A2G(8.3 kDa의 분자량), PG36-H6TEV-GLP-2A2G(9.5 kDa의 분자량) 및 PG43-H6TEV-GLP-2A2G(12.1 kDa의 분자량) 중 SDS-PAGE 분석을 통해 발현 확인이 된 것은 PG22-H6TEV-GLP-2A2G, PG29-H6TEV-GLP-2A2G, PG36-H6TEV-GLP-2A2G 및 PG43-H6TEV-GLP-2A2G이었다.

덴시토미터 분석을 통해 PG07, PG15, PG22, PG29, PG36 및 PG43 중 PG43의 융합에 의한 PG43-H6TEV-GLP-2A2G의 발현 수준이 모든 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 중 가장 높은 것으로 확인되었다

또한, 도 30을 참조하면, 발현이 확인된 모든 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드들은 가용성 분획에서는 관찰되지 않고 모두 불용성 분획에서 나타나는 것을 알 수 있다(레인 1: H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG012), 레인 2: PG07-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG013), 레인 3: PG15-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG014) 및 레인 4: PG22-H6TEV-GLP-2A2G(균주 번호 PG015)의 경우 목적 펩타이드가 발현되지 않아 가용성 테스트를 수행하지 않았음).

실시예 11.5. N-말단 융합 파트너의 아미노산 치환에 의한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 수준 변화

PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 PG43의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화가 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 아미노산 잔기를 이소루신, 아스파라긴, 아르기닌, 아스팔트산으로 치환한 총 22개의 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체를 제작하여 PG43-H6TEV-GLP-2A2G와의 세포 내 발현수준을 비교하였다.

구체적으로, GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현을 위한 플라스미드 DNA는 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis) 방법을 이용하여 제작하였다. 위치 지정 돌연변이를 위한 주형(template)은 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 발현 플라스미드인 pSGK523을 사용하였다. 프라이머는 각각의 변이체의 아미노산 치환부위의 염기서열이 변경된 정방향(forward) 및 역방향(reverse)의 단일가닥 DNA 올리고머를 이용하였다. 실험에 사용된 프라이머는 하기 표 7에 나타내었다.

【표 7】

No.	PG43 mutants	Oligomer sequence		서열번호
1	PG43-N2I	F-primer	GGAGATATACATATGA ATT ATTCGTCATTGCAT	서열번호 297
		R-primer	ATGCAATGGACGAATA AAT CATATGTATATCTCC	서열번호 298
2	PG43-N2N	F-primer	-	
		R-primer	-	
3	PG43-N2R	F-primer	GGAGATATACATATG GCG ATTCGTCATTGCAT	서열번호 299
		R-primer	ATGCAATGGACGAAT GCG CATATGTATATCTCC	서열번호 300
4	PG43-N2D	F-primer	GGAGATATACATATG GAT ATTCGTCATTGCAT	서열번호 301
		R-primer	ATGCAATGGACGAAT ATC CATATGTATATCTCC	서열번호 302
5	PG43-I3I	F-primer	-	
		R-primer	-	
6	PG43-I3N	F-primer	GATATACATATGAATA AACG TCCATTGCATGAT	서열번호 303
		R-primer	ATCATGCAATGGACG GTT ATTCATATGTATATC	서열번호 304
7	PG43-I3R	F-primer	GATATACATATGAAT CGCCG TCCATTGCATGAT	서열번호 305
		R-primer	ATCATGCAATGGACG GCG ATTCATATGTATATC	서열번호 306

8	PG43-I3D	F-primer	GATATACATATGAATGATCGTCCATTGCATGAT	서열번호 307
		R-primer	ATCATGCAATGGACGATCATTTCATATGTATATC	서열번호 308
9	PG43-R4I	F-primer	ATACATATGAATATTATTCATTGCATGATCGC	서열번호 309
		R-primer	GCGATCATGCAATGGAATAATATTCATATGTAT	서열번호 310
10	PG43-R4N	F-primer	ATACATATGAATATTAACCCATTGCATGATCGC	서열번호 311
		R-primer	GCGATCATGCAATGGGTTAATATTCATATGTAT	서열번호 312
11	PG43-R4R	F-primer	-	
		R-primer	-	
12	PG43-R4D	F-primer	ATACATATGAATATTGATCCATTGCATGATCGC	서열번호 313
		R-primer	GCGATCATGCAATGGATCAATATTCATATGTAT	서열번호 314
13	PG43-P5I	F-primer	CATATGAATATTCGTATTTTGCATGATCGCGTG	서열번호 315
		R-primer	CACGCGATCATGCAAAATACGAATATTCATATG	서열번호 316
14	PG43-P5N	F-primer	CATATGAATATTCGTAACTTGCATGATCGCGTG	서열번호 317
		R-primer	CACGCGATCATGCAAGTTACGAATATTCATATG	서열번호 318
15	PG43-P5R	F-primer	CATATGAATATTCGTGCTTGCATGATCGCGTG	서열번호 319
		R-primer	CACGCGATCATGCAAGCGACGAATATTCATATG	서열번호 320
16	PG43-P5D	F-primer	CATATGAATATTCGTGATTGTCATGATCGCGTG	서열번호 321
		R-primer	CACGCGATCATGCAAAATCAGCAATATTCATATG	서열번호 322
17	PG43-L6I	F-primer	ATGAATATTCGTCCAATTCATGATCGCGTGATC	서열번호 323
		R-primer	GATCACGCGATCATGAATTGGACGAATATTCAT	서열번호 324
18	PG43-L6N	F-primer	ATGAATATTCGTCCAACCATGATCGCGTGATC	서열번호 325
		R-primer	GATCACGCGATCATGGTTGGACGAATATTCAT	서열번호 326
19	PG43-L6R	F-primer	ATGAATATTCGTCCACGCCATGATCGCGTGATC	서열번호 327
		R-primer	GATCACGCGATCATGGCGTGGACGAATATTCAT	서열번호 328
20	PG43-L6D	F-primer	ATGAATATTCGTCCAGATCATGATCGCGTGATC	서열번호 329
		R-primer	GATCACGCGATCATGATCTGGACGAATATTCAT	서열번호 330
21	PG43-H7I	F-primer	AATATTCGTCCATTGATTGATCGCGTGATCGTC	서열번호 331
		R-primer	GACGATCACGCGATCAATCAATGGACGAATATT	서열번호 332
22	PG43-H7N	F-primer	AATATTCGTCCATTGAACGATCGCGTGATCGTC	서열번호 333
		R-primer	GACGATCACGCGATCGTTCAATGGACGAATATT	서열번호 334
23	PG43-H7R	F-primer	AATATTCGTCCATTGCGCGATCGCGTGATCGTC	서열번호 335
		R-primer	GACGATCACGCGATCGCGCAATGGACGAATATT	서열번호 336
24	PG43-H7D	F-primer	AATATTCGTCCATTGGATGATCGCGTGATCGTC	서열번호 337
		R-primer	GACGATCACGCGATCATCCAATGGACGAATATT	서열번호 338

각각의 변이체에 대한 위치 지정 돌연변이 후 얻어진 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다.

제작된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 변이체 발현 플라스미드들을 이용하여 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질도입된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들은 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50% 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80℃ 온도의 냉동고에 보관하였다.

-80℃ 온도에서 보관된 GLP-2A2G융합 폴리펩타이드의 변이체 발현

플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μ l를 카나마이신이 50 μ g/ml의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 중균 배양하였다. 중균 배양된 대장균 2 ml은 카나마이신이 50 μ g/ml의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다. 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때, IPTG의 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 첨가하여 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를 측정하였다.

발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포 분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 12,000 $\times$ g, 4°C 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 500 μ l의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

50 μ l의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 50 μ l의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer 2 $\times$ concentrate, Sigma)에 혼합한 후, 95°C 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후, 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다.

도 31 내지 도 33에 나타난 바와 같이, 대조군인 PG43-H6TEV-GLP-2A2G의 발현 수준과 비교하여 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 PG43의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화에 의해 발현 수준이 변화된 변이체들을 SDS-PAGE 겔 및 덴시토미터 분석을 통해 확인하였다. PG43의 2번부터 7번까지 6개의 아미노산 잔기의 변화는 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 발현 수준을 크게 향상시키지 못하고 5번째 잔기가 아르기닌으로 치환된 변이주와 7번째 잔기가 아르기닌으로 치환된 변이주는 대조군 대비 50% 이하로 발현 수준이 감소되었다.

실시에 12. GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 회수 및 정제

실시에 12.1. 세포 파쇄 및 불용성 내포체 회수

플라스크 규모에서 발현된 세포의 냉동된 세포 펠렛을 50 ml의 50 mM 인산 나트륨, pH 7.2 완충액을 첨가하여 해동하였다. 재현탁된 세포는 초음파
5 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 파쇄하였다. 용해된 세포는 12,000 rpm (12,000×g) 조건에서 30분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 재조합 융합 폴리펩타이드가 포함된 불용성 내포체 분획을 회수하였다.

실시에 12.2. 불용성 내포체 가용화

회수된 불용성 내포체 분획에 20 ml의 내포체 가용화 완충액(8 M 요소,
10 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)을 첨가하고 25°C 온도에서 4시간 동안 진탕배양하여 불용성 분획 내 내포체 형태의 재조합 융합 폴리펩타이드가 가용화될 수 있도록 하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 12,000×g에서 30분간 원심분리하고 상등액을 (0.45/0.2 μm) 막필터를 통해 여과하였다.

실시에 12.3. GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 정제

7개 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드 중 가장 발현 수준이 높은 PG43-H6TEV-GLP-2A2G를 정제하였다. 먼저, 가용화된 불용성 분획 내의 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C 분획
20 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)으로 미리 평형화된 HisTrap FF 1 ml 컬럼(GE Healthcare)에 주입하였다.

주입이 완료된 후 컬럼은 5배 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하고, 5배 컬럼 부피의 용출 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 500
25 mM 이미다졸, pH 7.4)을 단계적으로 100%가 되도록 증가시켜 컬럼의 수지에 결합되어 있는 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드를 용출하였다. 용출 후 얻어진 분획의 결과를 각각 도면에 나타내었다(도 34 및 도 35). 컬럼에 주입된 가용화된 불용성 분획 시료 내의 GLP-1K28R 융합 폴리펩타이드는 대부분 컬럼 내 수지에 결합 후 용출되어 95% 이상의 순도를 보였다.

실시에 13. 프로테아제 처리를 통한 링커 서열 절단

약 5 ml의 정제된 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드의 분획을 합친 후 140 ml의 희석 완충액(20 mM 트리스, pH 7.4)을 첨가하여 요소 농도가 1 M이 되도록 희석하였다. 희석된 재조합 융합 폴리펩타이드에 TEV 프로테아제를 최종 농도가 500 nM이 되도록 첨가하고 실온에서 12시간 동안 절단 반응이 진행될 수 있도록 하였다.

TEV 프로테아제에 의한 절단 여부를 확인하기 위해, 절단 후 SDS-PAGE 분석을 수행하여 그 결과를 도면에 나타내었다(도 36). TEV 프로테아제에 의한 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드(PG43-H6TEV-GLP-2A2G)의 절단 전 후를 SDS-PAGE로 분석해본 결과 12.1 kDa의 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드는 거의 100%의 수율로 아미노 말단 융합 파트너와 6 히스티딘 태그 및 TEV 프로테아제 인식서열 융합체인 PG43-H6TEV와 목적 폴리펩타이드인 GLP-2A2G로 절단되는 것을 확인하였다.

실시예 14. 절단 후의 GLP-2A2G 의 분자량 분석

완전한 형태의 GLP-2A2G 융합 폴리펩타이드(PG43-H6TEV-GLP-2A2G)의 발현 유무, TEV 프로테아제에 의한 정확한 절단 및 절단 후 얻어진 GLP-2A2G의 변형(modification) 유무를 확인하기 위해 MALTI-TOF MS를 이용한 분자량 분석을 실시하였다. 본 발명에 따라 수득된 GLP-2A2G의 분자량을 측정한 결과를 도면에 나타내었다.

도 37를 참고하면, PG43-H6TEV-GLP-2A2G로부터 수득된 GLP-2A2G의 분자량은 3753.10 Da으로 측정되어 이론적인 분자량인 3752.13 Da과 오차범위 내에서 일치하였으므로 대장균 내에서 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의한 아미노 혹은 카르복시 말단의 부분적인 절단이나 분해 없이 완전한 형태로 발현된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 TEV 프로테아제는 PG43-H6TEV-GLP-2A2G 내 인식서열인 ENLFQ 서열을 인식하고 마지막 아미노산인 Q(글루타민)와 GLP-2A2G의 첫번째 아미노산인 H(히스티딘) 사이의 펩타이드 결합을 정확하게 절단하는 것으로 판단된다. (목적 펩타이드가 발현되지 않아 가용성 테스트를 수행하지 않았음).

실시예 15. 에칼란타이드의 제조 및 생산

실시예 15.1 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

에칼란타이드 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension

polymerase chain reaction (OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기에칼란타이드 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG43(서열번호 119) 중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140) 및 TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및

대조군으로서 사용된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드(H6TEV-Ecallantide)는 아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 에칼란타이드의 아미노산 서열(서열번호 642)이 포함되어 있다. 각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식 서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기에칼란타이드 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(PG07, PG15 및 PG43)은 각각 서열번호 644 내지 646에 해당하며, 대조군은 서열번호 643에 해당한다.

아래 표 8에 기재한 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK512, pSGK513, pSGK514 및 pSGK515를 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 8】

균주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG019	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK512	H6TEV-Ecallantide
PG020	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK513	PG07-H6TEV-Ecallantide
PG021	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK514	PG15-H6TEV-Ecallantide
PG022	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK515	PG43-H6TEV-Ecallantide

에칼란타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 실시예 1.1에서 수행된 것과 동일한 방법으로 제작되어 -80℃ 에서 냉동고에 보관하였다.

실시예 15.2. 형질전환된 세포의 배양 및 에칼란타이드의 발현

-80℃ 에서 보관된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들로 형질전환된 세포의 배양 및 에칼란타이드의 발현은 실시예 1.2와 동일한 방법으로 수행되었다.

실시예 15.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

에칼란타이드 관련 시료의 제조는 실시예 1.3과 동일한 방법으로

수행되었다.

실시예 15.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 에칼란타이드의 확인

실시예 1.4와 동일한 방법 및 조건으로 각 시료의 단백질을 처리한 후, 그 결과를 도 38 및 도 39에 나타내었다.

5 도 38을 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV-Ecallantide(8.8 kDa의 분자량)의 밴드는 타 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드들과 비교하여 가장 낮은 발현 수준을 보였다. 아미노 말단 융합 파트너인 PG7, PG15 및 PG43이 융합된 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드인 PG07-H6TEV-Ecallantide(9.8 kDa의 분자량), PG15-H6TEV-
10 Ecallantide(10.8 kDa의 분자량) 및 PG43-H6TEV-Ecallantide(15.4 kDa의 분자량)의 발현 수준은 대조군(H6TEV-Ecallantide) 대비 증가된 것이 확인되었다. 덴시토미터 분석을 통해 PG7, PG15 및 PG43 중 PG07의 융합에 의한 PG07-H6TEV-Ecallantide의 발현 수준이 모든 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드 중 가장 높은 것으로 확인되었다.

15 또한, 도 39를 참조하면, 대조군을 포함한 모든 에칼란타이드 융합 폴리펩타이드는 가용성 분획에서는 관찰되지 않고 모두 불용성 분획에서 나타나는 것을 알 수 있다.

실시예 16. 네시리타이드의 제조 및 생산

실시예 16.1 네시리타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

20 네시리타이드 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension polymerase chain reaction(OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 네시리타이드 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG43(서열번호 119) 중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140) 및 TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및
25 네시리타이드의 아미노산 서열(서열번호 652)이 포함되어 있다.

 대조군으로서 사용된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드(H6TEV-Ecallantide)는 아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 네시리타이드의 아미노산 서열(서열번호 652)이 포함되어 있다. 각 융합
30 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식 서열과 1개의

종결 코돈을 포함한다. 상기 네시리타이드 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 654 내지 656에 해당하며, 대조군은 서열번호 653에 해당한다.

아래 표 9에 기재한 네시리타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK516, pSGK517, pSGK518 및 pSGK519를 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 9】

균주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG023	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK516	H6TEV-Nesiritide
PG024	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK517	PG07-H6TEV-Nesiritide
PG025	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK518	PG15-H6TEV-Nesiritide
PG026	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK519	PG43-H6TEV-Nesiritide

네시리타이드 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 실시예 1.1에서 수행된 것과 동일한 방법으로 제작되어 -80℃ 온도에서 냉동고에 보관하였다.

실시예 16.2. 형질전환된 세포의 배양 및 네시리타이드의 발현

-80℃ 에서 보관된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드의 발현 플라스미드들이 형질전환된 세포의 배양 및 네시리타이드의 발현은 실시예 1.2와 동일한 방법으로 수행되었다.

실시예 16.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

네시리타이드 관련 시료의 제조는 실시예 1.3과 동일한 방법으로 수행되었다.

실시예 16.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 네시리타이드의 확인

실시예 1.4와 동일한 방법 및 조건으로 각 시료의 단백질을 처리한 후, 그 결과를 도 40 및 도 41에 나타내었다.

도 40을 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV- Nesiritide(5.2 kDa의 분자량)와 아미노 말단 융합 파트너 PG07 이 융합된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드인 PG07-H6TEV-Nesiritide(6.2 kDa의 분자량)의 밴드는 SDS-PAGE 겔에서 검출되지 않아 발현 후 세포내 단백질 분해효소에 의해 분해된 것으로 보인다. SDS-PAGE 겔에서 네시리타이드 융합 폴리펩타이드의 발현은 분자량이 가장 작은 아미노 말단 융합

파트너인 PG15가 융합된 PG15-H6TEV-Nesiritide(7.2 kDa의 분자량)부터 확인되었다. 아미노 말단 융합 파트너인 PG43이 융합된 네시리타이드 융합 폴리펩타이드인 PG43-H6TEV-Nesiritide(11.8 kDa의 분자량)의 발현 수준은 PG15-H6TEV-Nesiritide(7.2 kDa의 분자량) 대비 향상된 것이 확인되었다. 덴시토미터
5 분석을 통해 PG07, PG15, 및 PG43 중 PG43의 융합에 의한 PG43-H6TEV-Nesiritide의 발현 수준이 모든 네시리타이드 융합 폴리펩타이드 중 가장 높은 것으로 확인되었다.

또한, 도 41을 참조하면, 대조군을 포함한 모든 네시리타이드 융합 폴리펩타이드는 가용성 분획에서는 관찰되지 않고 모두 불용성 분획에서
10 나타나는 것을 알 수 있다(레인 1: H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG023) 및 레인 2: PG07-H6TEV-Nesiritide(균주 번호 PG024)의 경우 목적 펩타이드가 발현되지 않아 가용성 테스트를 수행하지 않았음).

실시에 17. hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 제조 및 생산

실시에 17.1. hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 제작

hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension
15 polymerase chain reaction (OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG07(서열번호 9), PG15(서열번호 31), PG43(서열번호 119)중 하나와 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 hPTH 1-84의 아미노산
20 서열(서열번호 18)이 포함되어 있다.

대조군으로서 사용된 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드(H6TEV-hPTH 1-84)는 아미노 말단 융합 파트너가 포함되어 있지 않고, 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 및 hPTH 1-84의 아미노산
25 서열(서열번호 628)이 포함되어 있다. 각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식 서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 635 내지 637에 해당하며, 대조군은 서열번호 654에 해당한다.

아래 표 10에 기재한 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK543, pSGK544, pSGK545 및 pSGK546를 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된
30 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여

절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다.

【표 10】

균주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG027	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK543	H6TEV-hPTH1-84
PG028	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK544	PG07-H6TEV-hPTH1-84
PG029	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK545	PG15-H6TEV-hPTH1-84
PG030	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK546	PG43-H6TEV-hPTH1-84

5 제작된 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 DNA 염기서열
 10 확인을 통해 정확한 클로닝 여부를 확인하였다. 제작된 hPTH 1-84 융합
 폴리펩타이드 발현 플라스미드들을 이용해 염화칼슘을 이용한 화학적인 방법으로
 대장균 BL21(DE3) 세포를 형질전환하였다. hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드의 발현
 플라스미드들이 형질도입된 대장균들은 카나마이신(kanamycin)이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의
 농도로 포함된 LB 고체배지에서 콜로니를 형성하였다. 형질전환된 대장균들은
 10 각각 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지에 배양한 후, 50%
 글리세롤을 배양액과 동일한 부피로 첨가하여 세포 농축액을 만들고, 이를 -80°C
 온도의 냉동고에 보관하였다.

실시예 17.2. 형질전환된 세포의 배양 및 hPTH 1-84의 발현

15 -80°C 온도에서 보관된 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드의 발현
 플라스미드들이 형질전환된 대장균의 세포 농축액을 실온에서 녹인 후 50 μl 를
 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지 5 ml이 포함된 시험관에
 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 12시간 동안 종균 배양하였다. 종균
 배양된 대장균 2 ml을 카나마이신이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 LB 액체 배지
 200 ml이 포함된 플라스크에 첨가하여 37°C 온도의 진탕배양기에서 배양하였다.
 20 배양 약 3시간 후 세포의 광학밀도(OD600)가 약 1.0이 되었을 때 IPTG를 최종
 농도 0.1 mM이 되도록 첨가하여 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드의 발현을
 유도하였다. 발현 유도 4시간 후에 광학 밀도를 측정하여 세포의 광학 밀도를
 측정하였다.

실시예 17.3. 발현 수준 비교 분석을 위한 시료의 제조

25 발현 유도가 된 세포의 광학밀도가 10.0이 되도록 세포를 농축하고 50 mM
 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 재현탁시킨 후 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic
 processor, Cole-Parmer)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 총 세포

분획으로 표지하였다. 세포 파쇄액은 $12,000 \times g$, $4^{\circ}C$ 온도에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하고 가용성 분획으로 표지하였다. 불용성 분획은 $500 \mu l$ 의 $50 mM$ 인산 나트륨, pH 7.2 완충액으로 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 재현탁하고 불용성 분획으로 표지하였다.

5 실시예 17.4. SDS-PAGE 분석을 통한 생산된 hPTH 1-84의 확인

$50 \mu l$ 의 총 세포, 가용성 및 불용성 분획을 각각 $50 \mu l$ 의 2배 농축된 SDS 시료 완충액(SDS sample buffer $2 \times$ concentrate, Sigma)에 혼합한 후, $95^{\circ}C$ 온도에서 5분간 가열하여 각 시료의 단백질이 변성될 수 있도록 하였다. 시료 내 변성된 단백질들은 16% SDS-PAGE 겔 및 TANK 완충액을 이용하여 분자량 크기에 따라 겔 내에서 분리될 수 있도록 하였다. SDS-PAGE 후 겔을 쿠마시 블루(Coomassie blue) R-250이 포함된 염색 완충액으로 염색한 후 탈색 완충액으로 탈색하여 염색된 단백질만 보일 수 있도록 하였다. 그 결과를 도 42 및 도 43에 나타내었다.

도 42를 참조하면, 대조군인 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 융합 파트너가 포함되지 않은 H6TEV-hPTH1-84 (11.2 kDa의 분자량)의 밴드는 타 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드들과 비교하여 가장 낮은 발현 수준을 보였다.

아미노 말단 융합 파트너인 PG07, PG15 및 PG43이 융합된 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드인 PG07-H6TEV-hPTH1-84(12.2 kDa의 분자량), PG15-H6TEV-hPTH1-84(13.2 kDa의 분자량) 및 PG43-H6TEV-hPTH1-84(15.9 kDa의 분자량)의 발현 수준은 대조군(H6TEV-hPTH1-84) 대비 향상된 것이 확인되었다. 덴시토미터 분석을 통해 PG07, PG15, 및 PG43 중 PG15의 융합에 의한 PG15-H6TEV-hPTH1-84의 발현 수준이 모든 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드 중 가장 높은 것으로 확인되었다.

또한, 도 43을 참조하면, 대조군을 포함한 모든 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드는 가용성 분획에서 관찰되었지만 아미노 말단 융합 파트너의 크기가 커질수록 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드의 불용성 분획 비율이 증가하였고 가장 크기가 큰 PG43이 융합된 PG43-H6TEV-hPTH1-84은 총 단백질의 약 70%가 불용성 분획에서 나타나는 것을 알 수 있다.

실시예 18. hPTH1-84 융합 폴리펩타이드의 회수 및 정제

실시예 18.1. 세포 파쇄 및 가용화

4개의 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드들은 가용성 발현비율이 높아 총세포

분획에서 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드를 정제하였다. 플라스크 규모에서 발현된 세포의 냉동된 세포 펠렛을 20 ml의 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)을 첨가하여 해동 및 재현탁하였다. 재현탁된 세포는 초음파 세포 파쇄기(ultrasonic processor, Cole-Parmer)를 이용하여 파쇄하였다. 용해된 세포는 12,000 rpm ($12,000 \times g$) 조건에서 30분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 재조합 융합 폴리펩타이드가 포함된 불용성 내포체 분획을 제거하고 가용성 분획인 상등액을 회수하였다. 가용성 분획 시료는 $12,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하고 상등액을 (0.45/0.2 μm) 막필터를 통해 여과하였다.

실시예 18.2. hPTH1-84 융합 폴리펩타이드 정제

4개의 hPTH1-84 융합 폴리펩타이드 중 가장 발현 수준이 높은 PG15-h6TEV-hPTH1-84를 정제하였다. 먼저, 가용성 분획 내의 hPTH1-84 융합 폴리펩타이드의 정제를 위하여 S9 시료 펌프(Sample pump S9) 및 F9-C 분획 수집기(Fraction collector F9-C)이 장착된 AKTA pure 25 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 이용하였다. 가용화된 불용성 분획 시료는 내포체 가용화 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 50 mM 이미다졸, pH 7.4)으로 미리 평형화된 HisTrap FF 1 mL 컬럼(GE Healthcare)에 주입하였다.

주입이 완료된 후 컬럼은 5배 컬럼 부피의 평형 완충액으로 세척하고, 5배 컬럼 부피의 용출 완충액(8 M 요소, 20 mM 트리스, 500 mM 염화나트륨, 500 mM 이미다졸, pH 7.4)을 단계적으로 100%가 되도록 증가시켜 컬럼의 수지에 결합되어 있는 hPTH1-84 융합 폴리펩타이드를 용출하였다. 용출 후 얻어진 분획의 결과를 각각 도면에 나타내었다(도 44 및 도 45). 컬럼에 주입된 가용화된 불용성 분획 시료 내의 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드는 대부분 컬럼 내 수지에 결합 후 용출되어 90% 이상의 순도를 보였다.

실시예 19. 프로테아제 처리를 통한 링커 서열 절단

약 5 ml의 정제된 hPTH1-84 융합 폴리펩타이드의 분획을 합친 후 140 ml의 희석 완충액(20 mM 트리스, pH 7.4)을 첨가하여 요소 농도가 1 M이 되도록 희석하였다. 희석된 재조합 융합 폴리펩타이드에 TEV 프로테아제를 최종 농도가 500 nM이 되도록 첨가하고 실온에서 12시간 동안 절단 반응이 진행될 수 있도록 하였다.

TEV 프로테아제에 의한 절단 여부를 확인하기 위해, 절단 후 SDS-PAGE 분석을 수행하여 그 결과를 도면에 나타내었다(도 46). TEV 프로테아제에 의한 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드(PG15-h6TEV-hPTH1-84)의 절단 전 후를 SDS-PAGE로 분석해본 결과 13.2 kDa의 hPTH1-84 융합 폴리펩타이드는 거의 100%의 수율로 아미노 말단 융합 파트너와 6 히스티딘 태그 및 TEV 프로테아제 인식서열 융합체인 PG15-H6TEV와 목적 폴리펩타이드인 hPTH 1-84로 절단되는 것을 확인하였다.

실시예 20. 절단 후의 hPTH 1-84의 분자량 분석

완전한 형태의 hPTH 1-84 융합 폴리펩타이드(PG15-H6TEV-hPTH1-84)의 발현 유무, TEV 프로테아제에 의한 정확한 절단 및 절단 후 얻어진 hPTH1-84의 변형(modification) 유무를 확인하기 위해 MALTI-TOF MS를 이용한 분자량 분석을 실시하였다. 본 발명에 따라 수득된 hPTH1-84의 분자량을 측정한 결과를 도 47에 나타내었다.

도면 47을 참고하면, PG15-H6TEV-hPTH1-84로부터 수득된 hPTH 1-84의 분자량은 9425.54 Da으로 측정되어 이론적인 분자량인 9424.73 Da과 분자량과 오차범위 이내에서 일치하였으므로 대장균 내에서 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 의한 아미노 혹은 카르복시 말단의 부분적인 절단이나 분해 없이 완전한 형태로 발현된 것을 확인할 수 있었다.

따라서 TEV 프로테아제는 PG15-H6TEV-hPTH1-84 내 인식서열인 ENLFQ 서열을 인식하고 마지막 아미노산인 Q(글루타민)와 hPTH1-84의 첫번째 아미노산인 S(세린) 사이의 펩타이드 결합을 정확하게 절단하는 것으로 판단된다.

실시예 21. 융합 파트너의 위치에 따른 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준 비교

실시예 21.1. hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드의 추가 제작

hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에 대한 유전자는 overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR) 방법을 이용하여 합성하였다. 이때, 상기 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드는 아미노 말단 융합 파트너로서 PG15(서열번호 31), 6 히스티딘 태그(서열번호 140), TEV 프로테아제 인식 서열(서열번호 146) 또는 hPTH 1-34의 아미노산 서열(서열번호 151)이 포함되어 있다.

각 융합 폴리펩타이드의 유전자는 제한 효소 NdeI, NcoI 및 XhoI의 인식

서열과 1개의 종결 코돈을 포함한다. 상기 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 294 및 295에 해당한다.

아래 표 11에 기재한 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드 pSGK554, pSGK555, pSGK556를 제작하기 위해서, OE-PCR로 합성된 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 유전자 단편을 NdeI 및 XhoI 제한 효소를 이용하여 절단하고, T7 프로모터, lac 작동자 및 LacI 유전자를 포함하여 IPTG에 의한 발현 조절이 가능한 발현벡터 pET26b에 클로닝하였다. 상기 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드 발현 플라스미드들은 실시예 1.1에서 수행된 것과 동일한 방법으로 제작되어 -80℃ 온도의 냉동고에 보관하였다.

【표 11】

균주	숙주세포	플라스미드	재조합 융합 폴리펩타이드
PG031	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK554	PG15-TEV-hPTH1-34
PG032	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK555	H6PG15-TEV-hPTH1-34
PG033	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pSGK556	H6TEV-hPTH1-34-PG15

실시예 21.2. 형질전환된 세포의 배양 및 hPTH 1-34의 발현

상기 표 2에 기재된 균주 PG001, PG003과 상기 표 12의 균주 PG031, PG032 및 PG033 각각을 200 ml의 LB 배지가 포함된 플라스크에서 배양하고 IPTG를 첨가하여 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하였다. 각각의 융합 폴리펩타이드의 구조를 도식화하여 도 48에 나타내었다.

유도 후, 각 배양물 시료의 총 세포 분획을 SDS-PAGE로 발현 수준을 비교 분석하였다(도 48). 아미노 융합 파트너가 융합되어 있지 않는 H6TEV-hPTH1-34(5.9 kDa의 분자량)의 밴드는 검출되지 않았고 H6TEV-hPTH1-34의 아미노 말단에 PG15 태그가 융합된 PG15-H6TEV-hPTH1-34(7.9 kDa의 분자량)은 높은 수준으로 발현되는 것을 확인하였다. PG15-H6TEV-hPTH1-34 내 친화성 태그인 H6(6-histidine tag)가 제거된 PG15-TEV-hPTH1-34(7.1 kDa의 분자량)는 PG15-H6TEV-hPTH1-34와 유사한 수준으로 발현되는 것으로 확인되었다.

반면에 H6 서열을 아미노 말단 서열로 융합 위치를 변경시킨 H6PG15-TEV-hPTH1-34(7.9 kDa의 분자량)의 발현 수준은 발현 유무만 확인할 수 있을 정도로 매우 낮은 것을 알 수 있다. 또한, H6TEV-hPTH1-34의 카르복시 말단에 PG15 태그가 융합된 H6TEV-hPTH1-34-PG15(7.9 kDa의 분자량)는 SDS-PAGE 젤 상에 해당 크기의 밴드가 검출되지 않아 거의 발현되지 않은 것으로 판단된다.

결론적으로 본 발명에 따른 N-말단 융합 파트너인 PG15는 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에서 아미노 말단에 융합되어야 hPTH 1-34의 고발현을 유도하는 것을 알 수 있다. 또한, 친화성 태그는 hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드에서 제거되거나 N-말단 융합 파트너의 카르복시 말단에 위치하는 경우, hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 고발현성은 유지될 수 있다. 그러나, 발현이 유지되지만 N-말단 융합 파트너의 아미노 말단에 위치하는 경우, hPTH 1-34 융합 폴리펩타이드의 발현 수준이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있다.

특허청구범위

1. 하기 일반식 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 N-말단 융합파트너;
목적 폴리펩타이드; 및

상기 N-말단 융합 파트너와 상기 목적 폴리펩타이드 사이에 링커를 포함하는, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 1]

Met-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-(Z)_n

상기 일반식 1에서,

Xaa1 내지 Xaa6은, 서로 독립적으로, 이소루신(Ile, I), 글리신(Gly, G), 알라닌(Ala, A), 프롤린(Pro, P), 발린(Val, V), 루신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 티로신(Tyr, Y), 트립토판(Trp, W), 아스파라긴(Asn, N), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 아르기닌(Arg, R), 리신(Lys, K), 히스티딘(His, H), 아스팔트산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)으로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

2. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 2]

Met-Xaa1-Ile-Arg-Pro-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 2에서,

Xaa1은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

3. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 3]

Met-Asn-Xaa2-Arg-Pro-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 3에서,

Xaa2는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

4. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 4]

Met-Asn-Ile-Xaa3-Pro-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 4에서,

Xaa3은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

5. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 5]

Met-Asn-Ile-Arg-Xaa4-Leu-His-(Z)_n

상기 일반식 5에서,

Xaa4는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

6. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 6]

Met-Asn-Ile-Arg-Pro-Xaa5-His-(Z)_n

상기 일반식 6에서,

Xaa5는 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

7. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합파트너가 하기 일반식 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 융합 폴리펩타이드:

[일반식 7]

Met-Asn-Ile-Arg-Pro-Leu-Xaa6-(Z)_n

상기 일반식 7에서,

Xaa6은 이소루신, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 루신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파라긴, 세린, 트레오닌, 시스테인, 글루타민,

아르기닌, 리신, 히스티딘, 아스팔트산 또는 글루탐산이며,

상기 Z는 서열번호 666으로 표시되는 아미노산 서열의 1번 위치의 아미노산에서부터 시작하는 1개 내지 36개의 아미노산이고,

상기 n은 0 또는 1의 정수이다.

8. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합 파트너는 서열번호 8 내지 139 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 융합 폴리펩타이드.

9. 제 1항에 있어서,

상기 N-말단 융합 파트너는 서열번호 9, 31, 53, 75, 97 또는 119로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 융합 폴리펩타이드.

10. 제 1항에 있어서,

상기 링커는 친화성 태그를 포함하는, 융합 폴리펩타이드.

11. 제 1항에 있어서,

상기 링커는 프로테아제 인식 서열을 포함하는, 융합 폴리펩타이드.

12. 제 11항에 있어서,

상기 프로테아제 인식 서열은 담배 식각 바이러스 프로테아제 인식 서열, 엔테로키나아제 인식 서열, 유비퀴틴 카르복시 말단 가수분해효소 인식 서열, 인자 Xa 인식 서열, 퓨린 인식 서열 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 융합 폴리펩타이드.

13. 제 1항에 있어서,

상기 목적 폴리펩타이드는 인간 부갑상선 호르몬 1-34(hPTH 1-34), 인간 부갑상선 호르몬 1-84(hPTH 1-84), 글루카곤 유사 펩타이드-1(GLP-1), 리라글루타이드(liraglutide) 전구체 펩타이드, 엑세나타이드(exenatide), 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-1), 글루카곤 유사 펩타이드-2(GLP-2), 테두글루타이드

(teduglutide), 에칼란타이드(ecallantide), 네시리타이드(nesiritide), 인슐린 및 인슐린 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 융합 폴리펩타이드.

14. 제1항에 있어서,

상기 목적 폴리펩타이드는 서열번호 151, 340, 341, 484, 485, 628, 638, 642 및 652의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 융합 폴리펩타이드.

15. 제 1항에 있어서,

상기 융합 폴리펩타이드는 서열번호 160 내지 291, 343 내지 474, 487 내지 618, 630 내지 632, 644 내지 646 및 654 내지 656의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 융합 폴리펩타이드.

16. 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드.

17. 제16항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드는 서열번호 294, 295, 478 내지 483, 621 내지 627, 635 내지 637, 649 내지 651 및 659 내지 661의 염기서열 중 어느 하나의 염기서열로 이루어진 것인, 뉴클레오타이드.

18. 제16항에 따른 뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터.

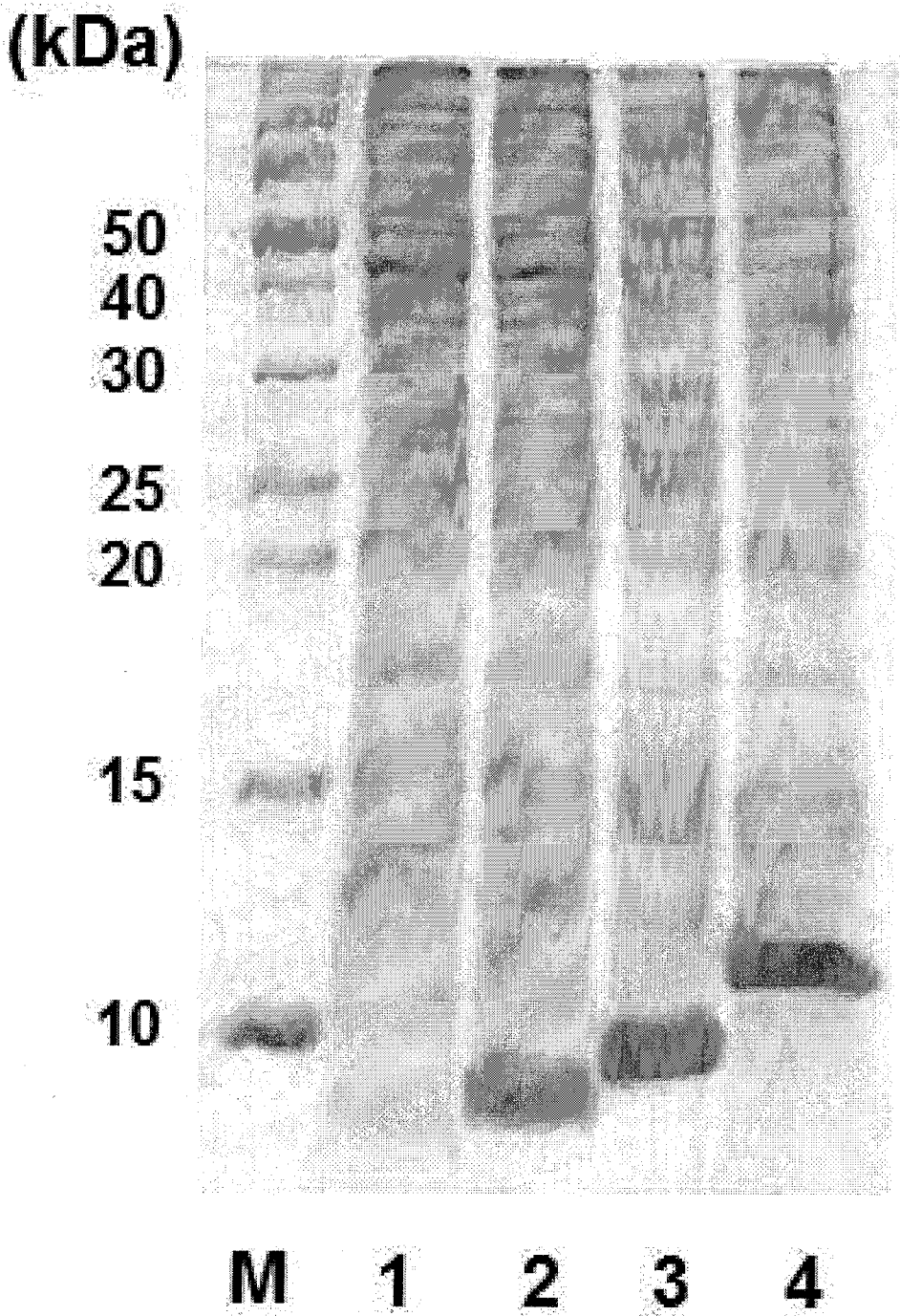
19. 제18항에 따른 발현벡터를 포함하는 숙주세포.

20. (a) 제19항에 따른 숙주세포를 배양하는 단계;

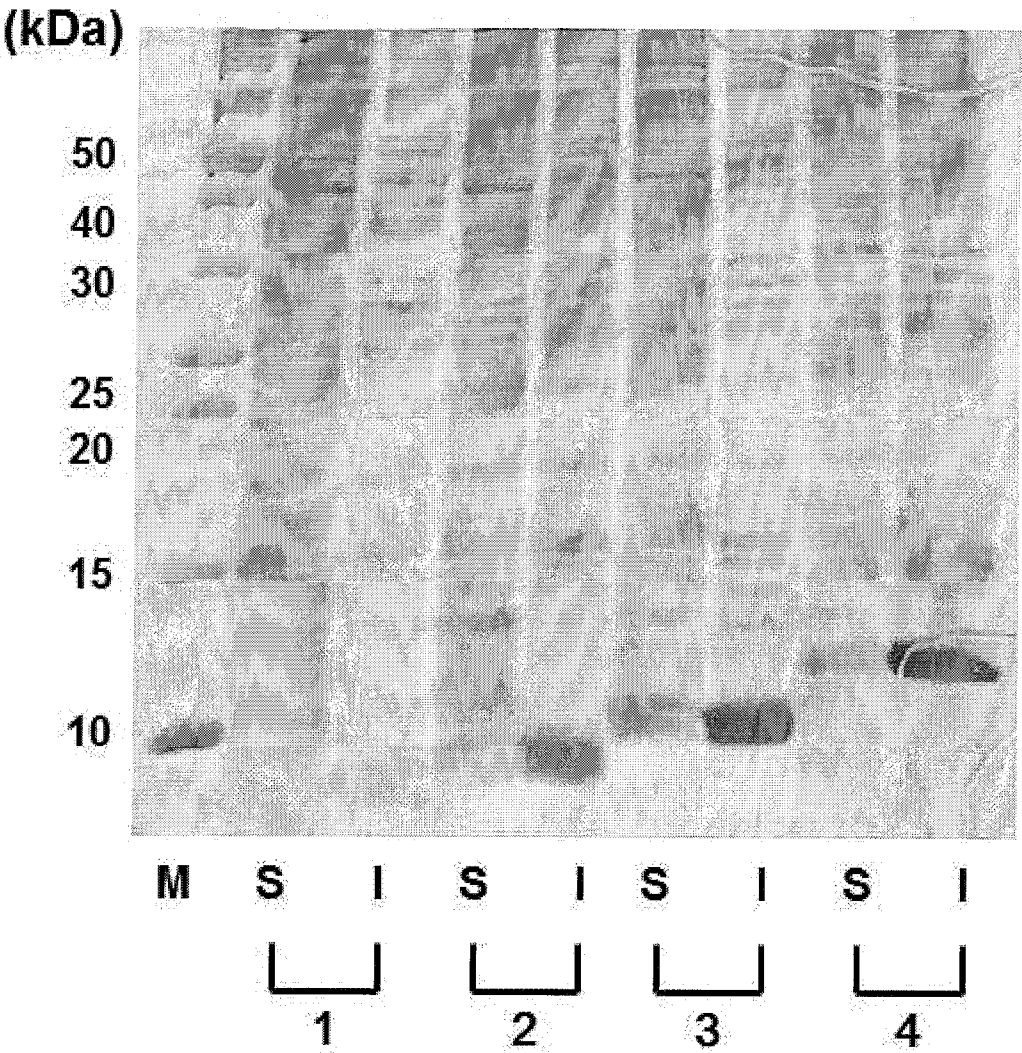
(b) 상기 숙주세포에서 발현된 융합 폴리펩타이드를 정제하는 단계; 및

(c) 상기 정제된 융합 폴리펩타이드를 절단 효소와 배양하여 목적 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는, 목적 폴리펩타이드의 생산방법.

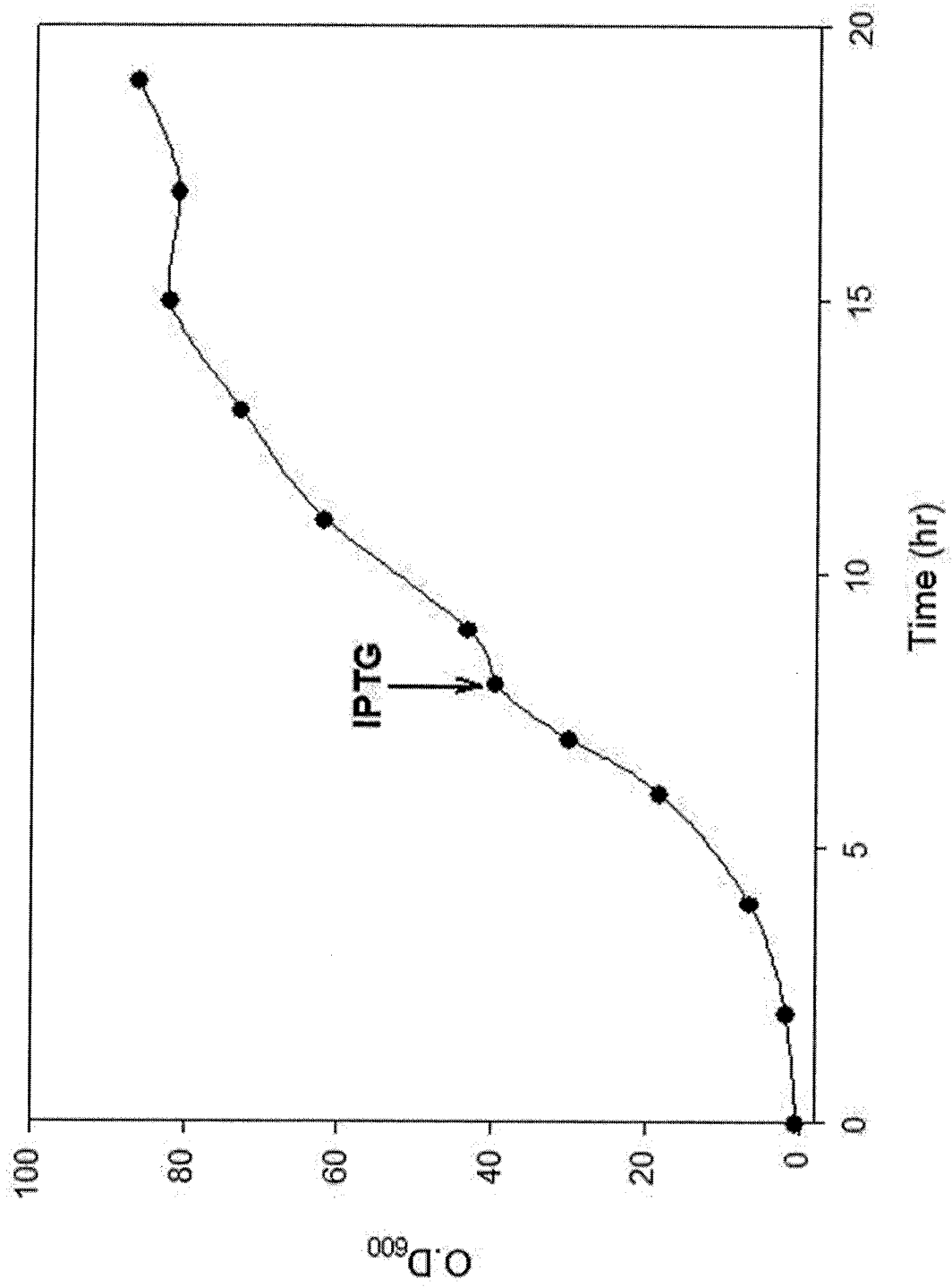
1/54
도 1



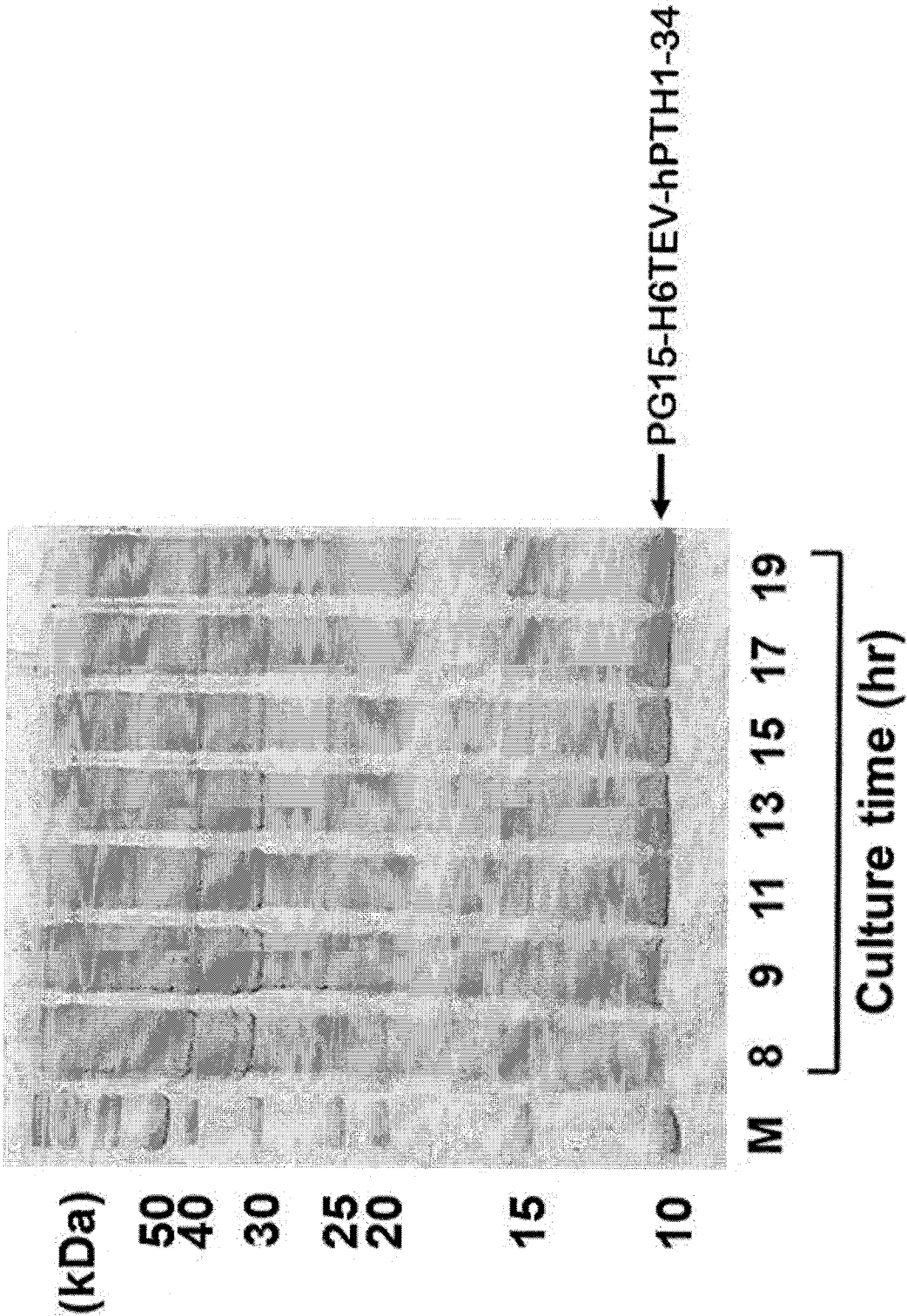
2/54
도 2



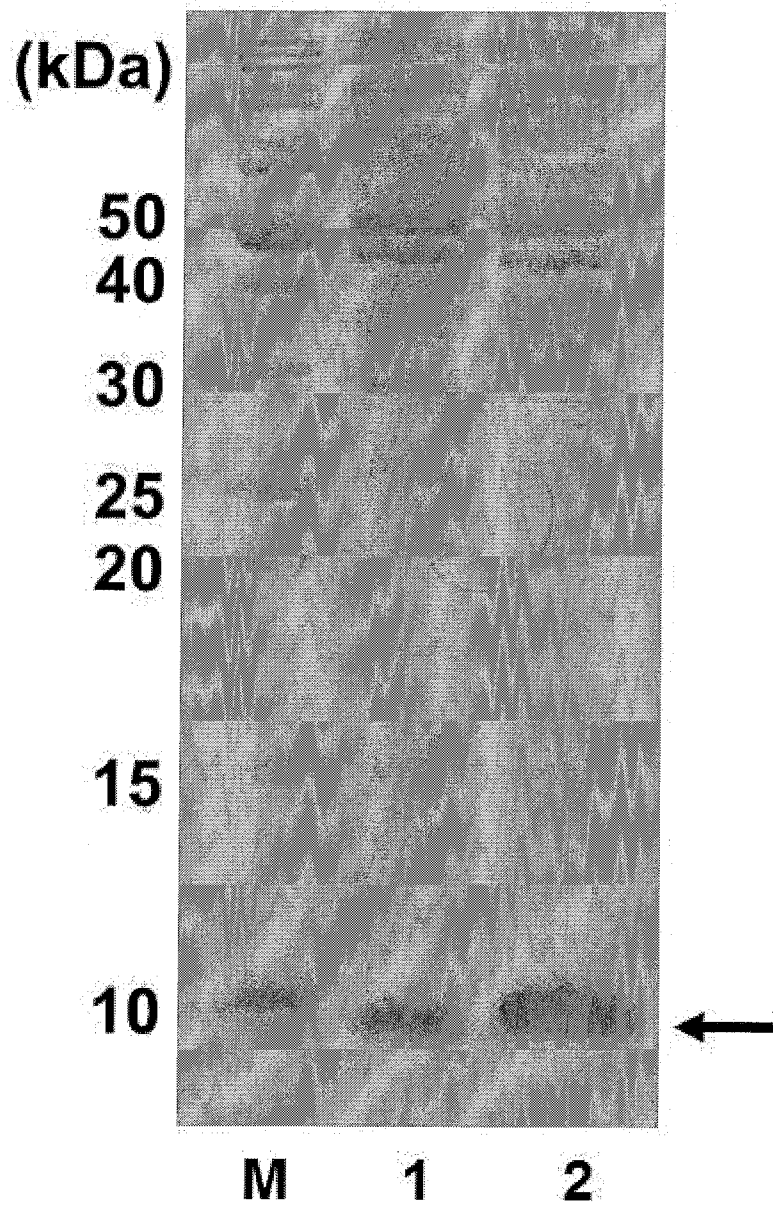
3/54
도 3a



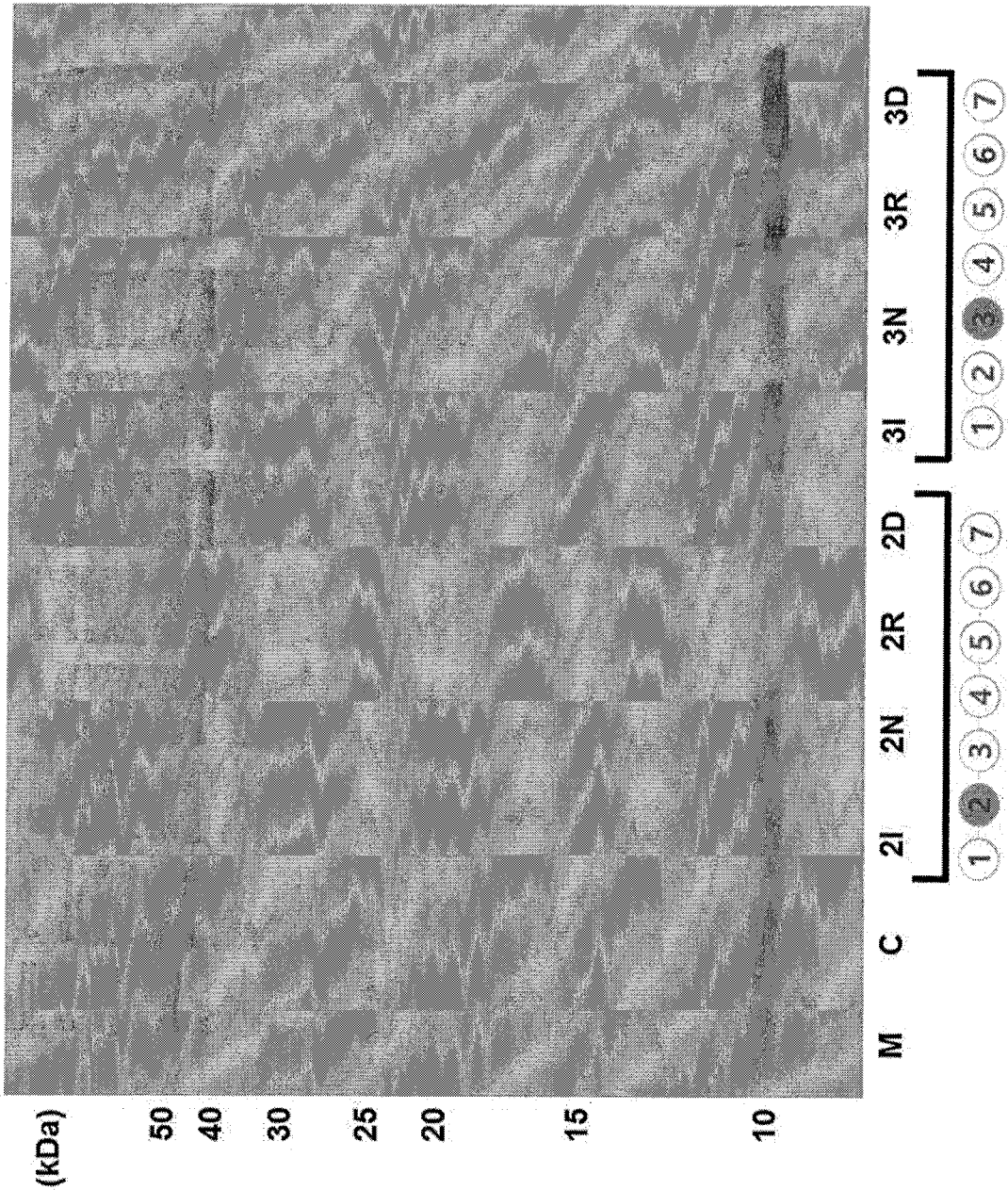
4/54
도 3b



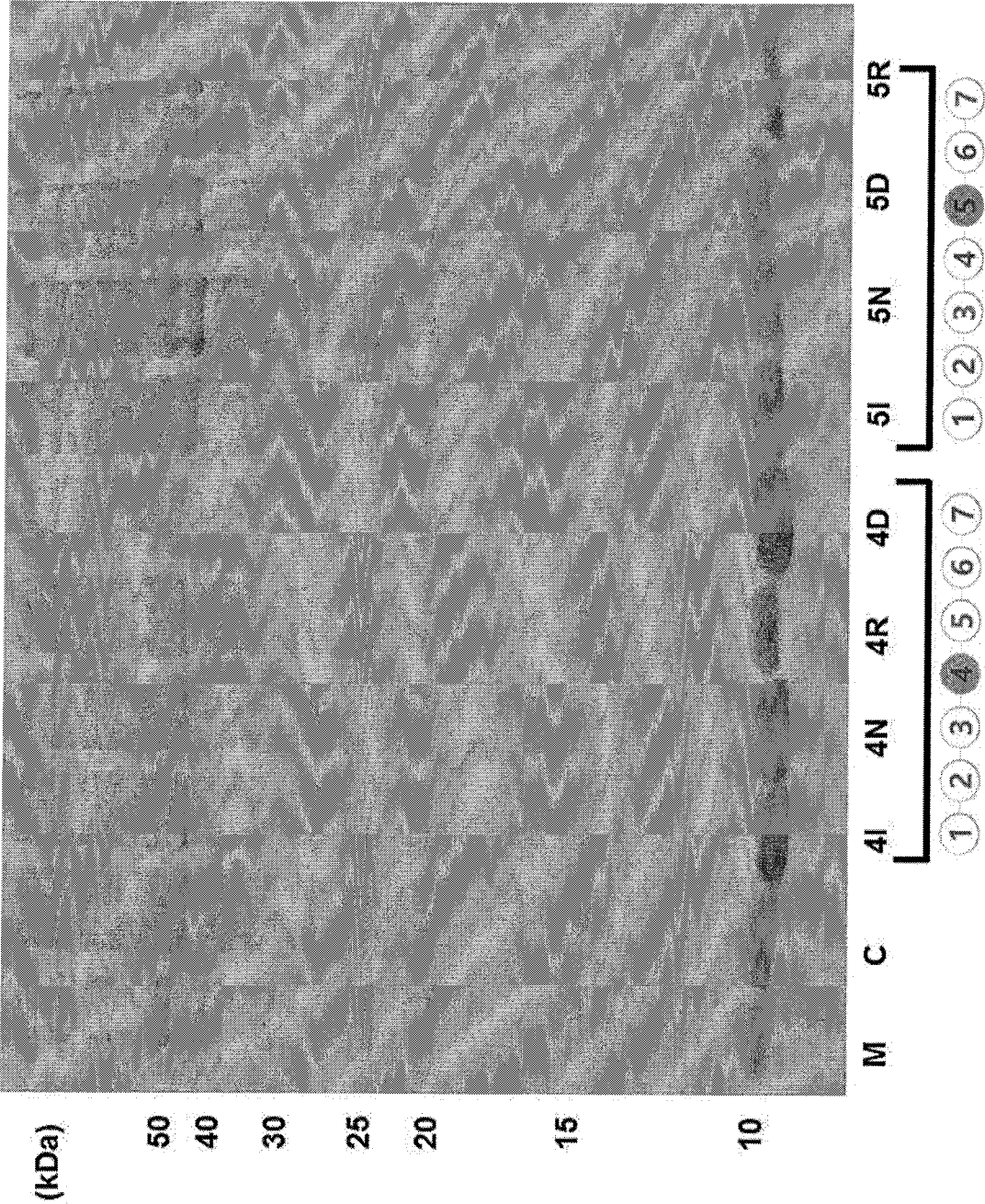
5/54
도 4



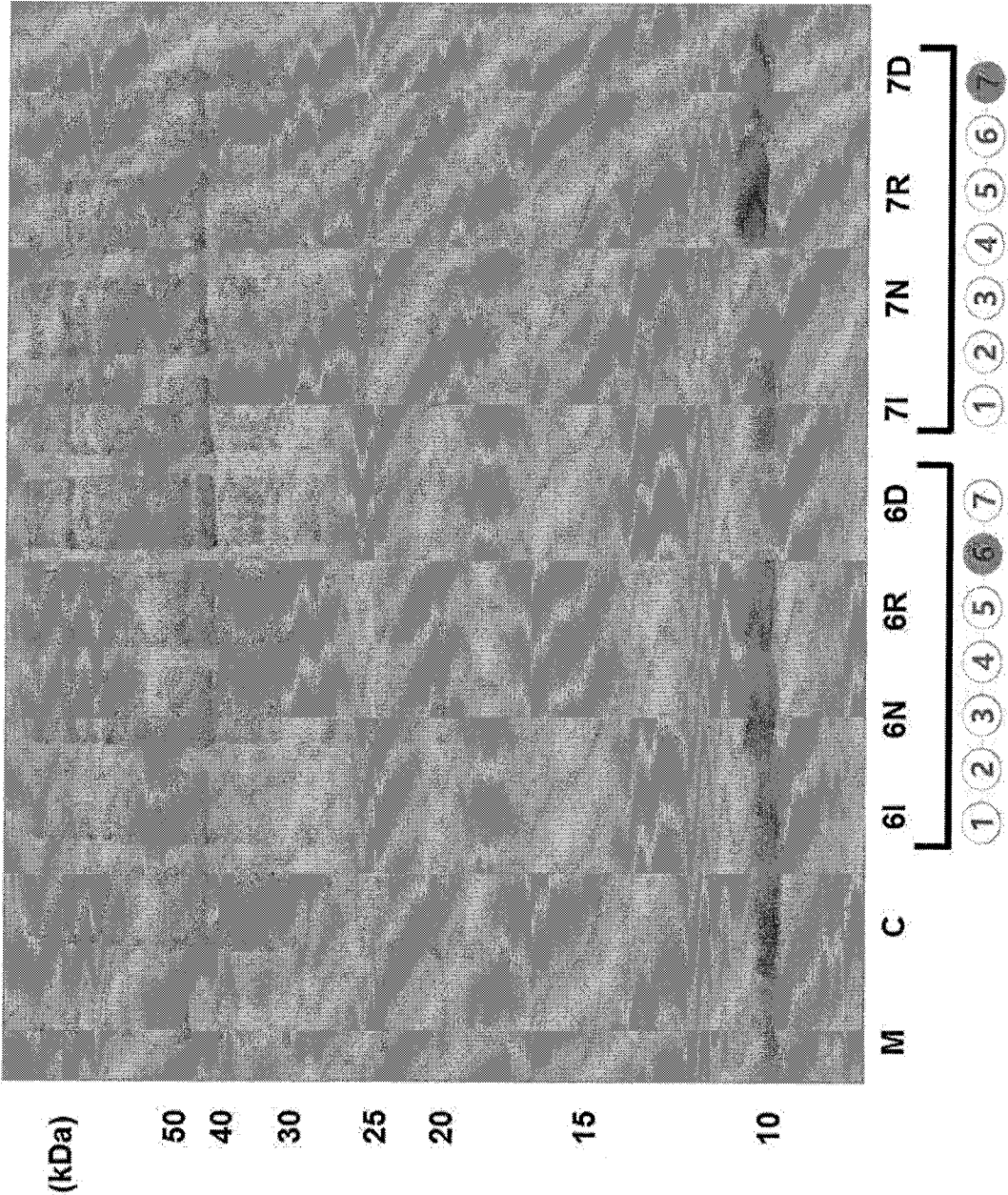
6/54
도 5

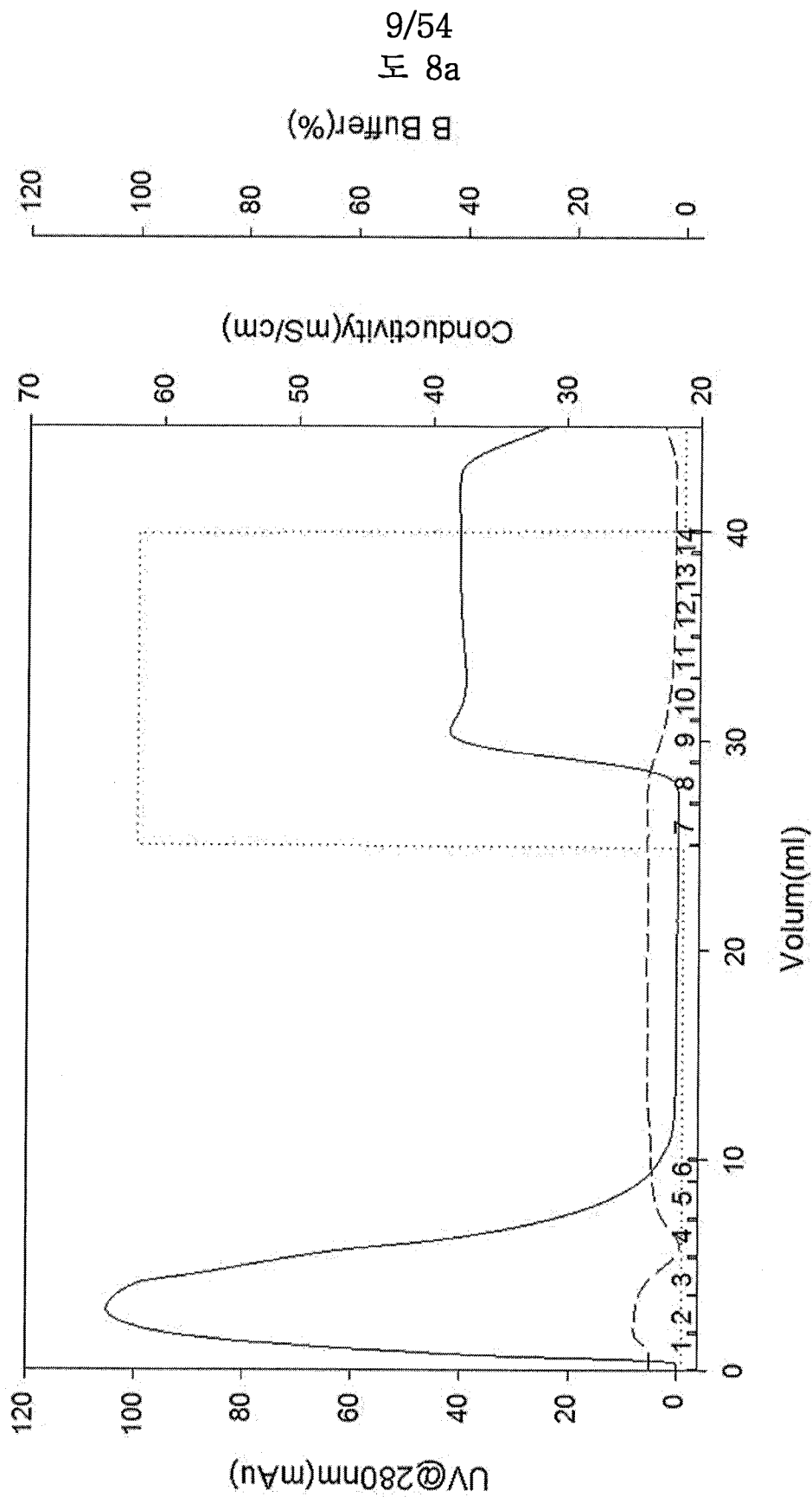


7/54
도 6

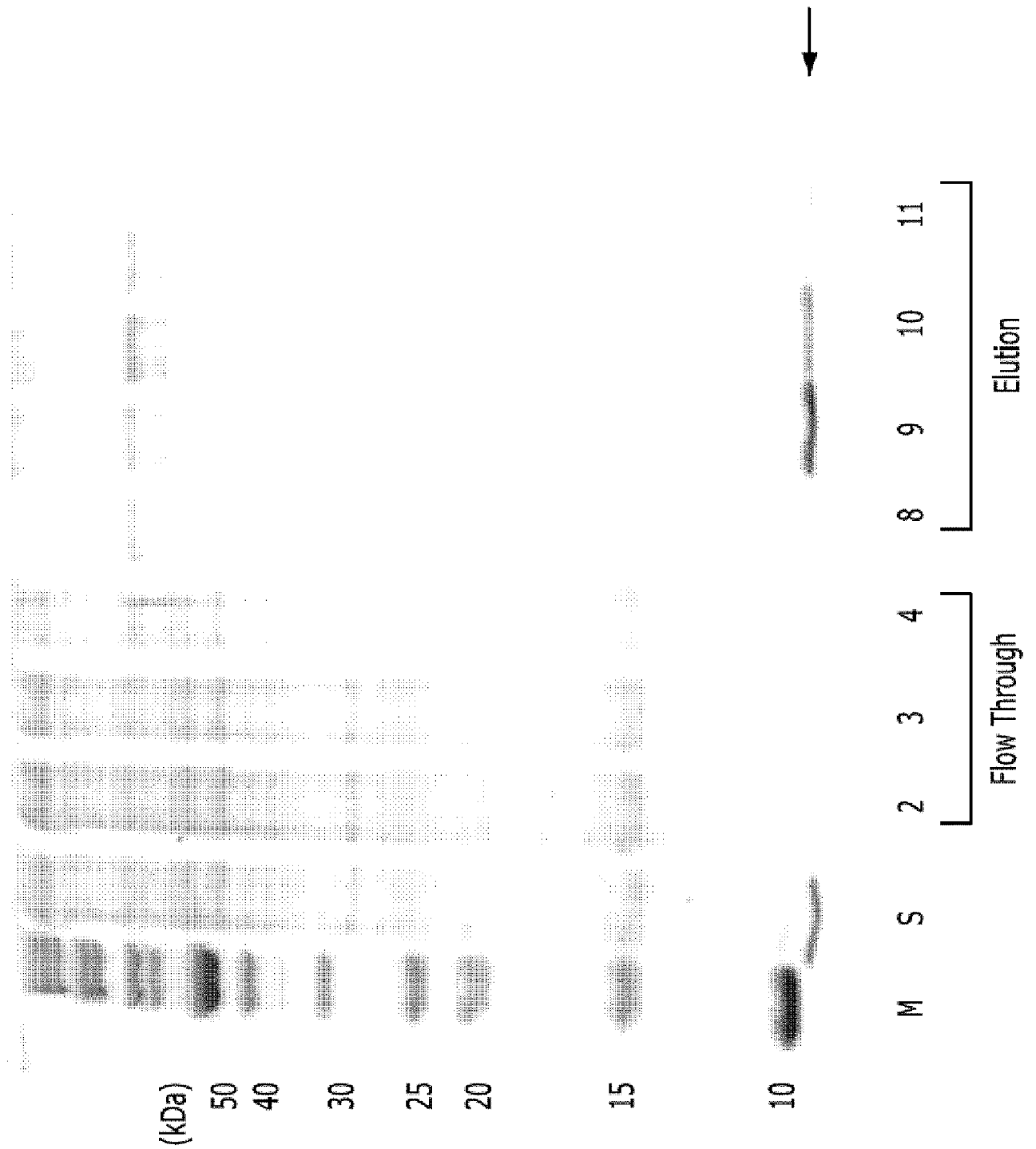


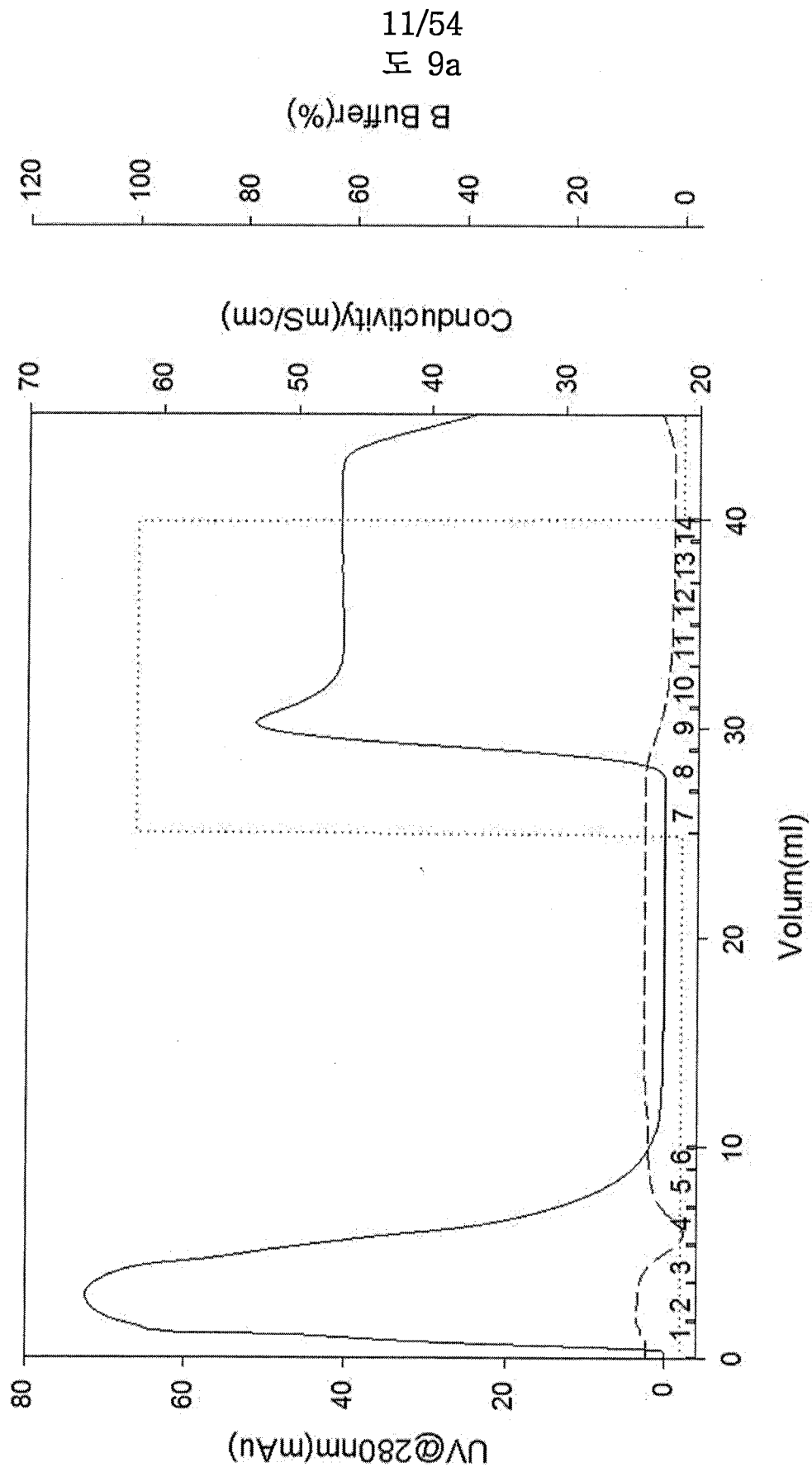
8/54
도 7

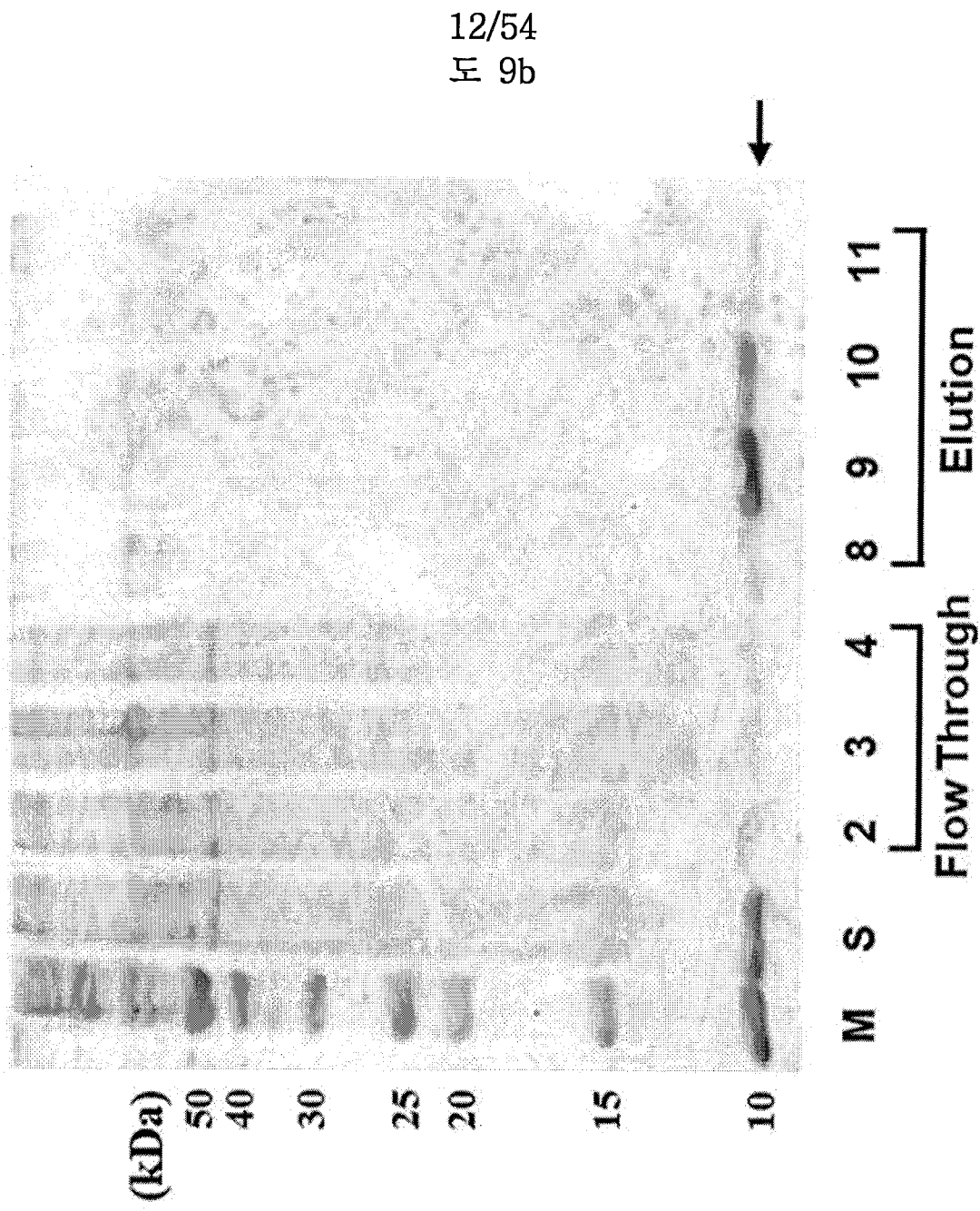


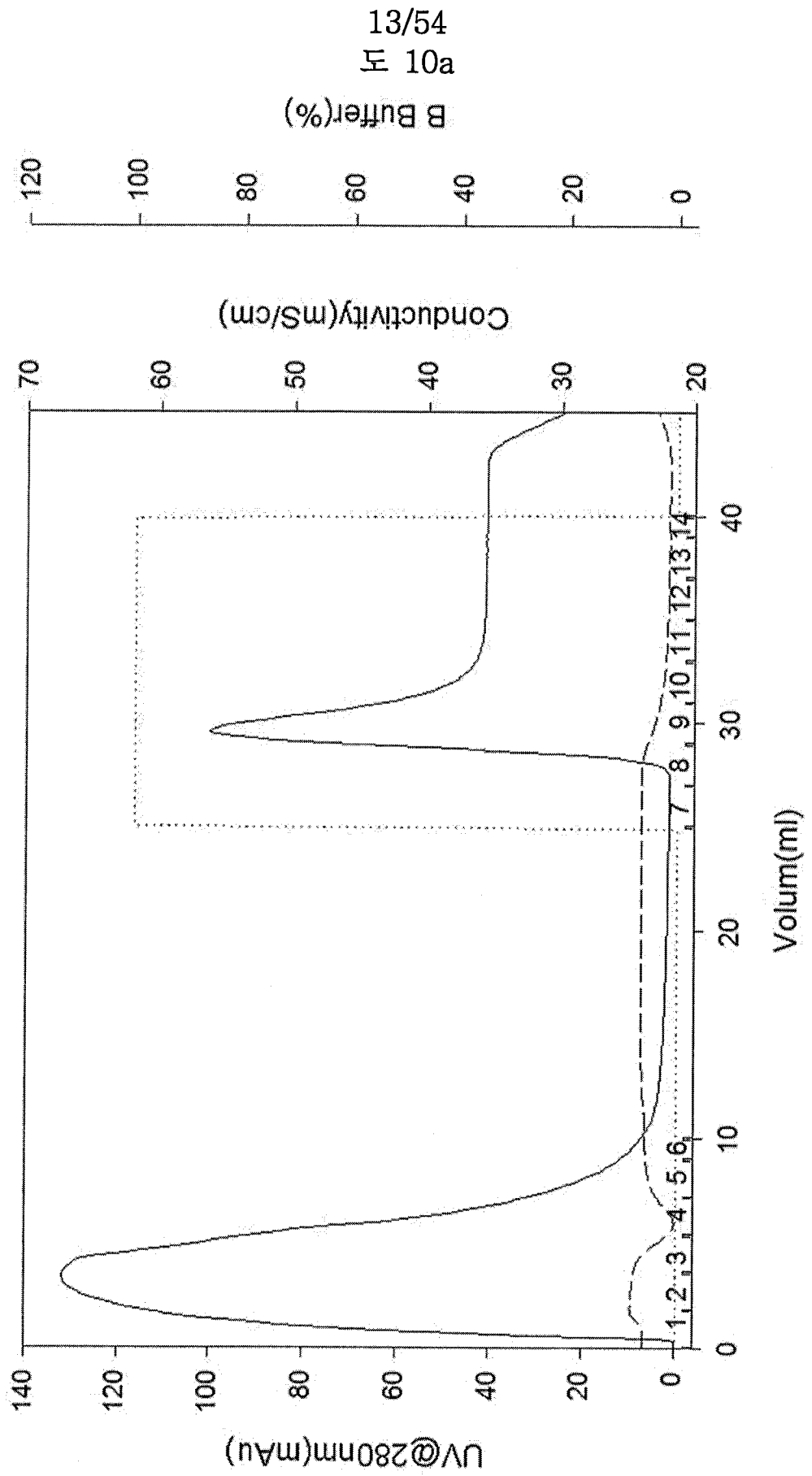


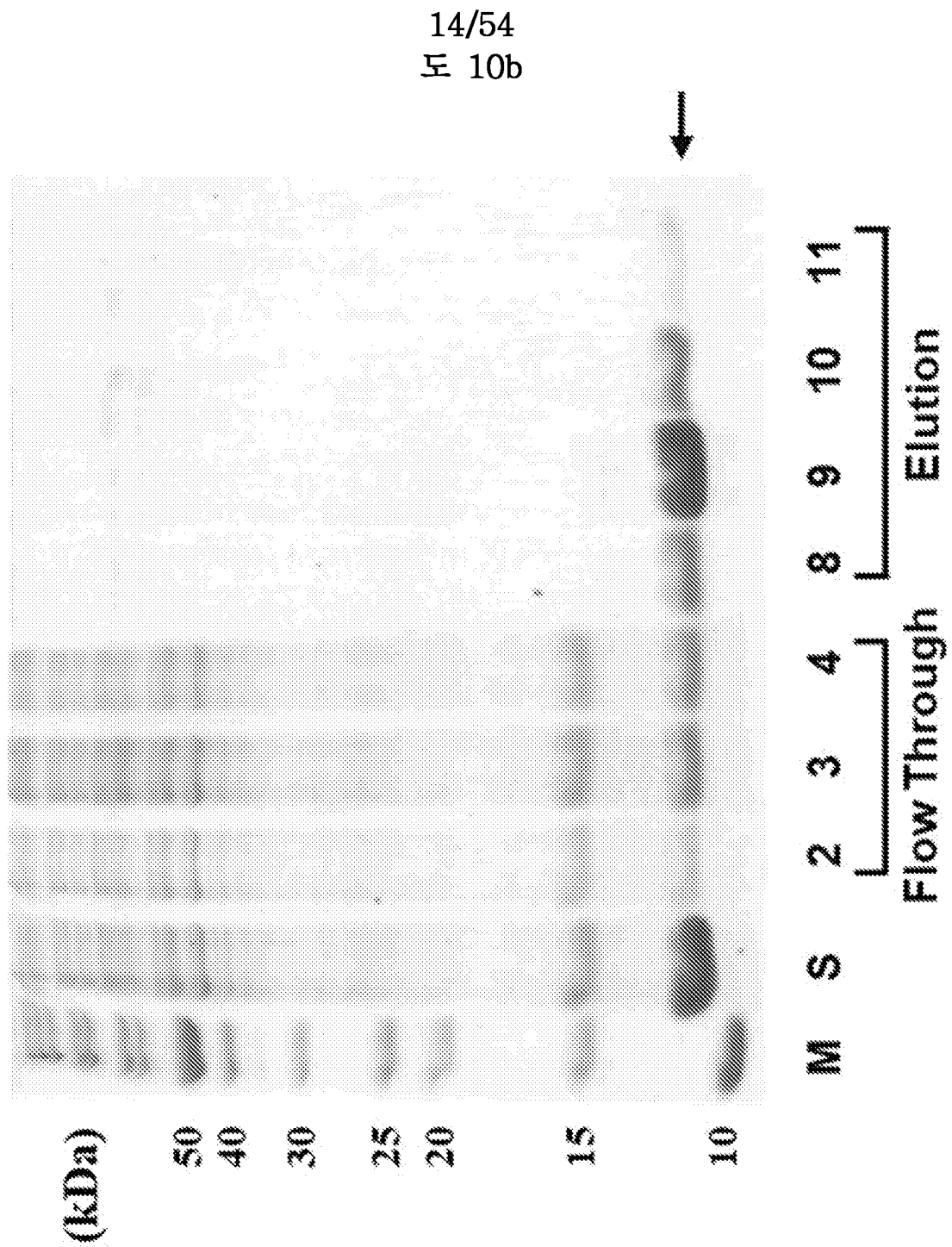
[도8b]



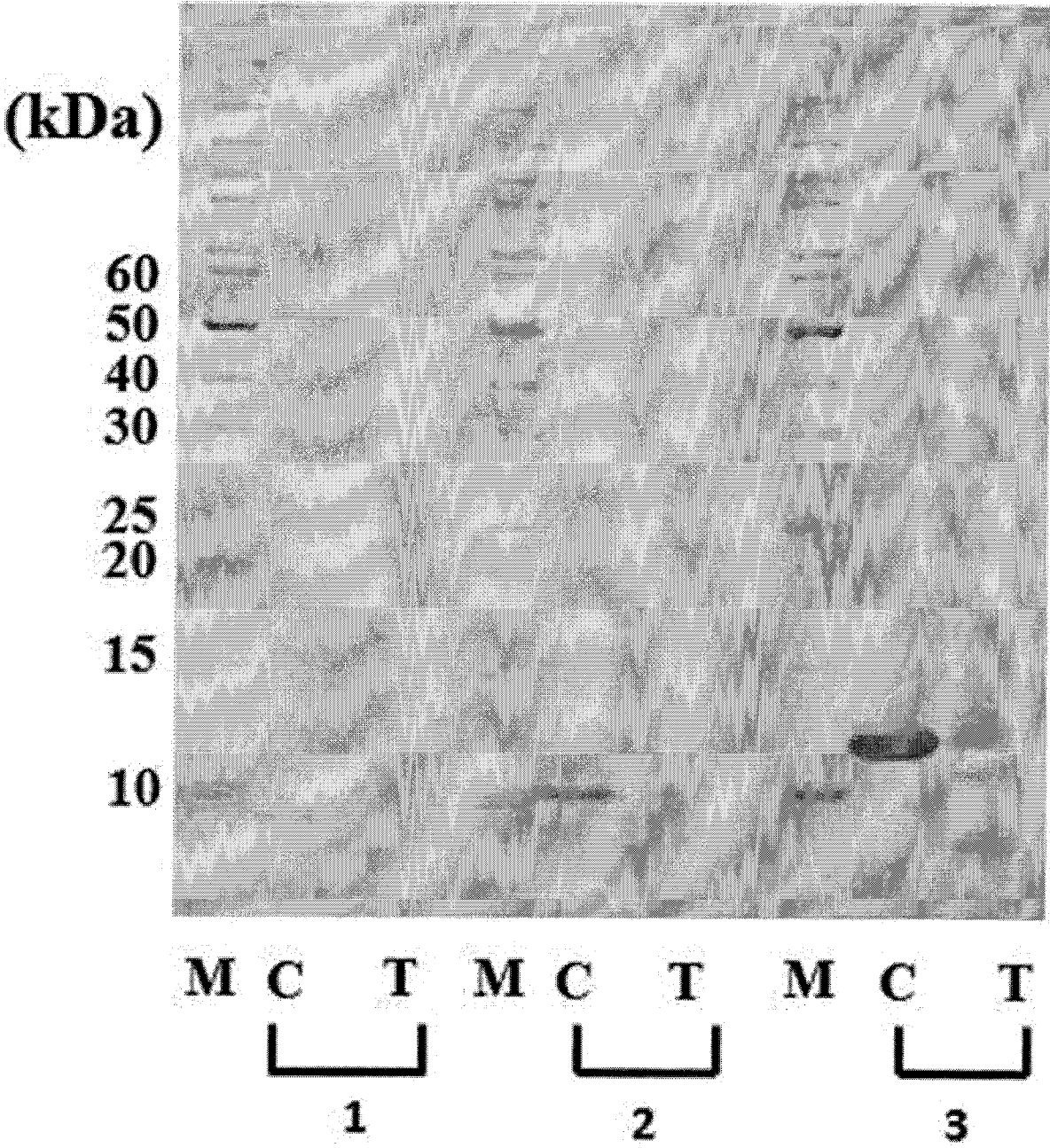




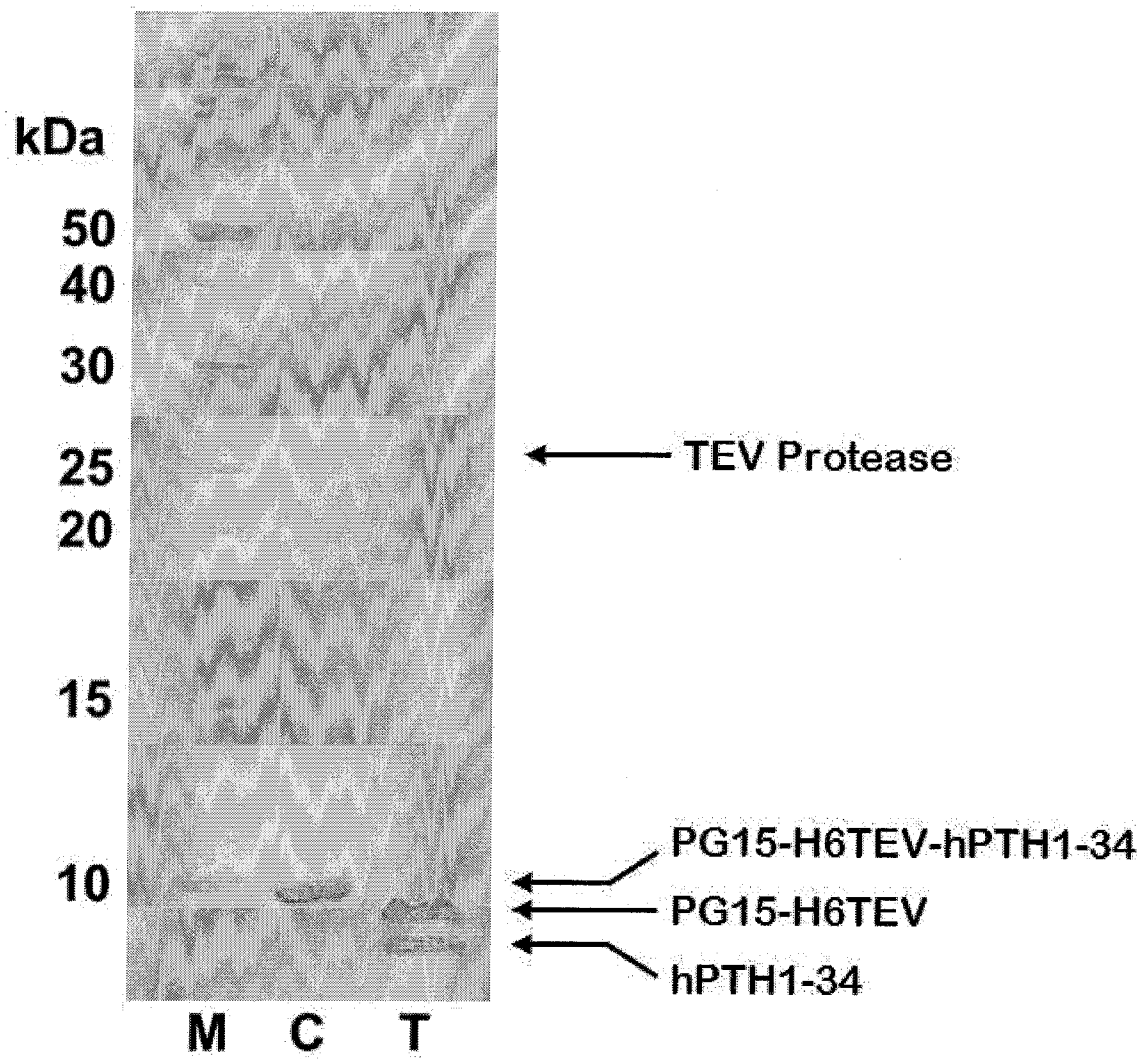


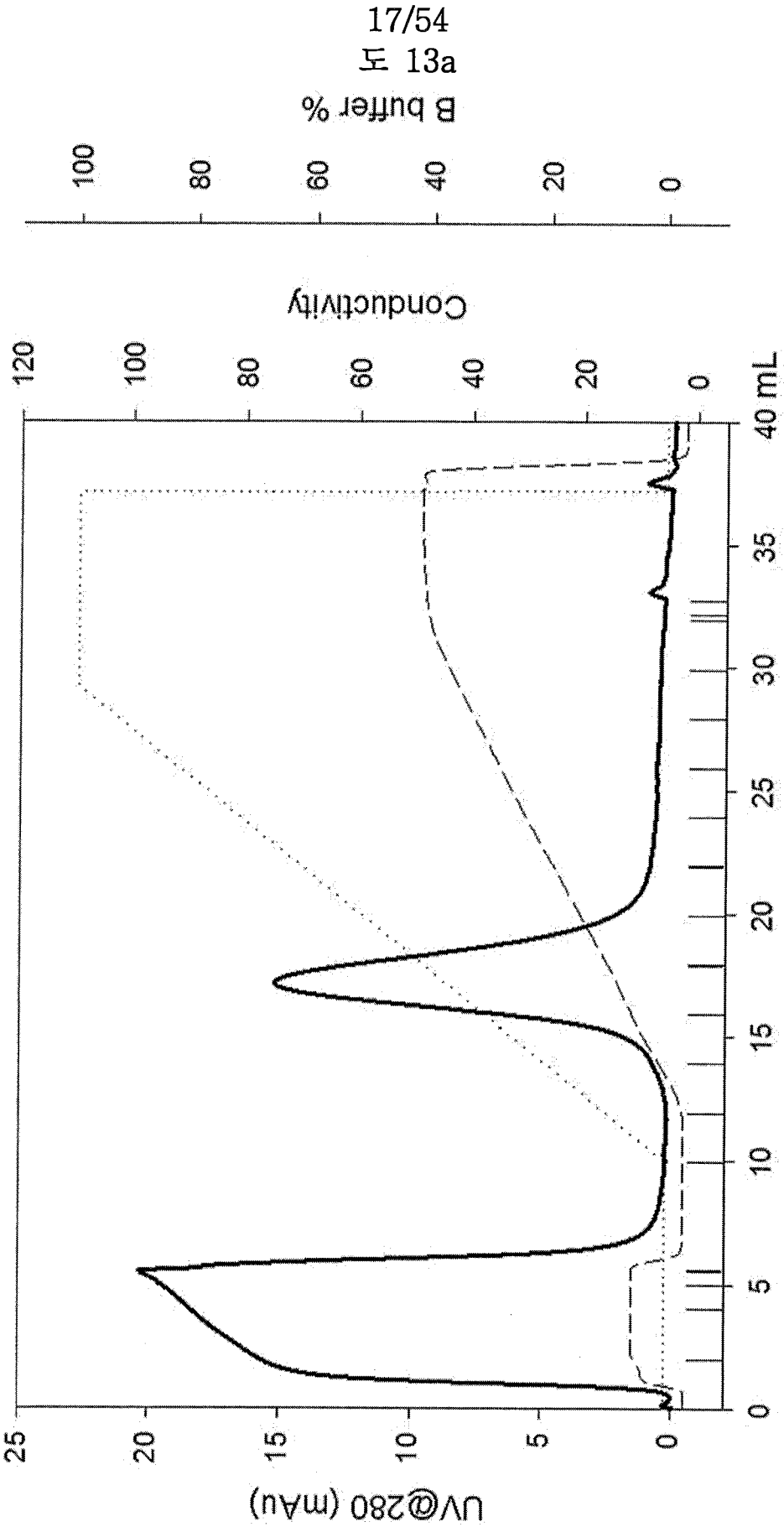


15/54
도 11

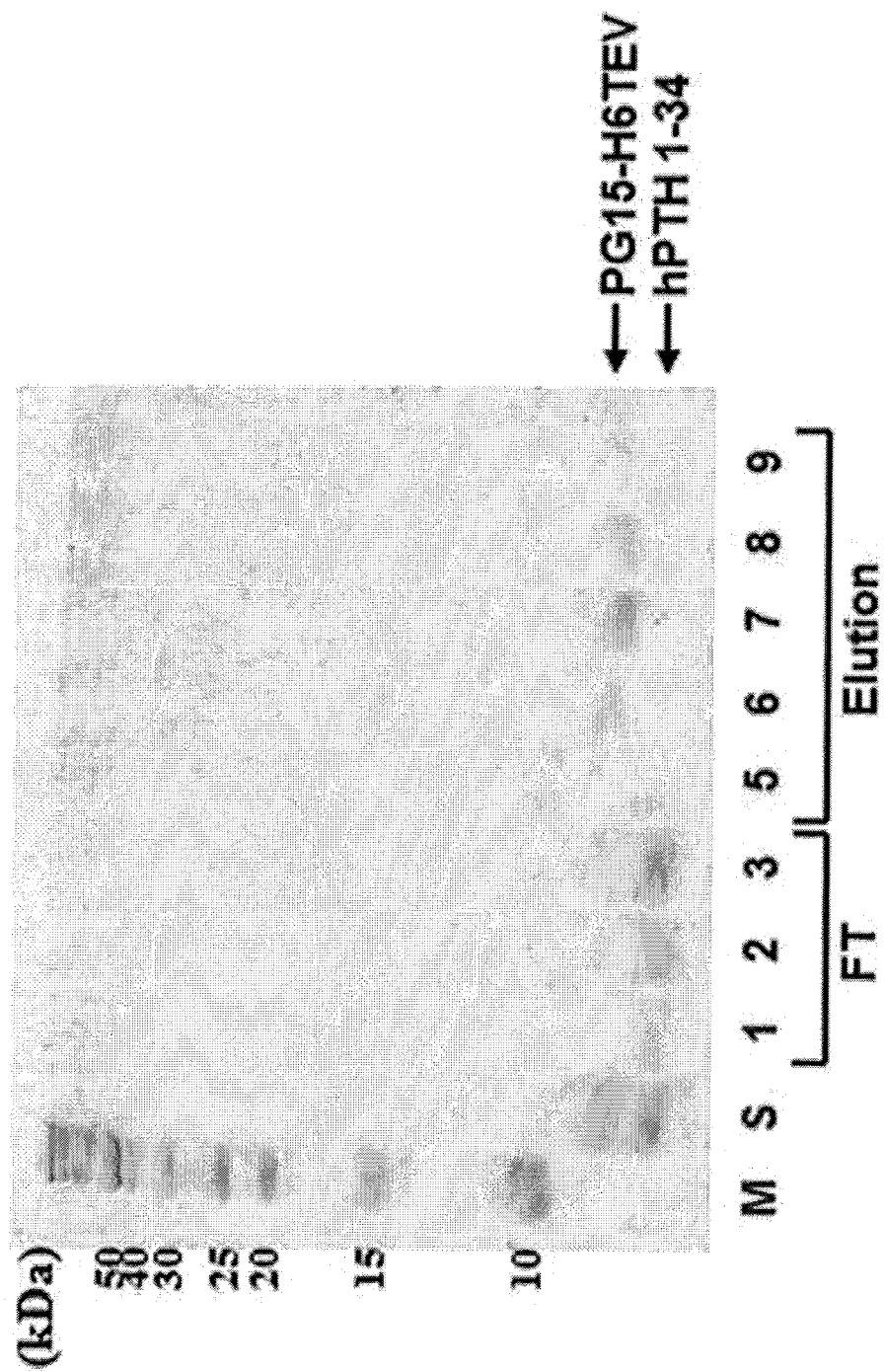


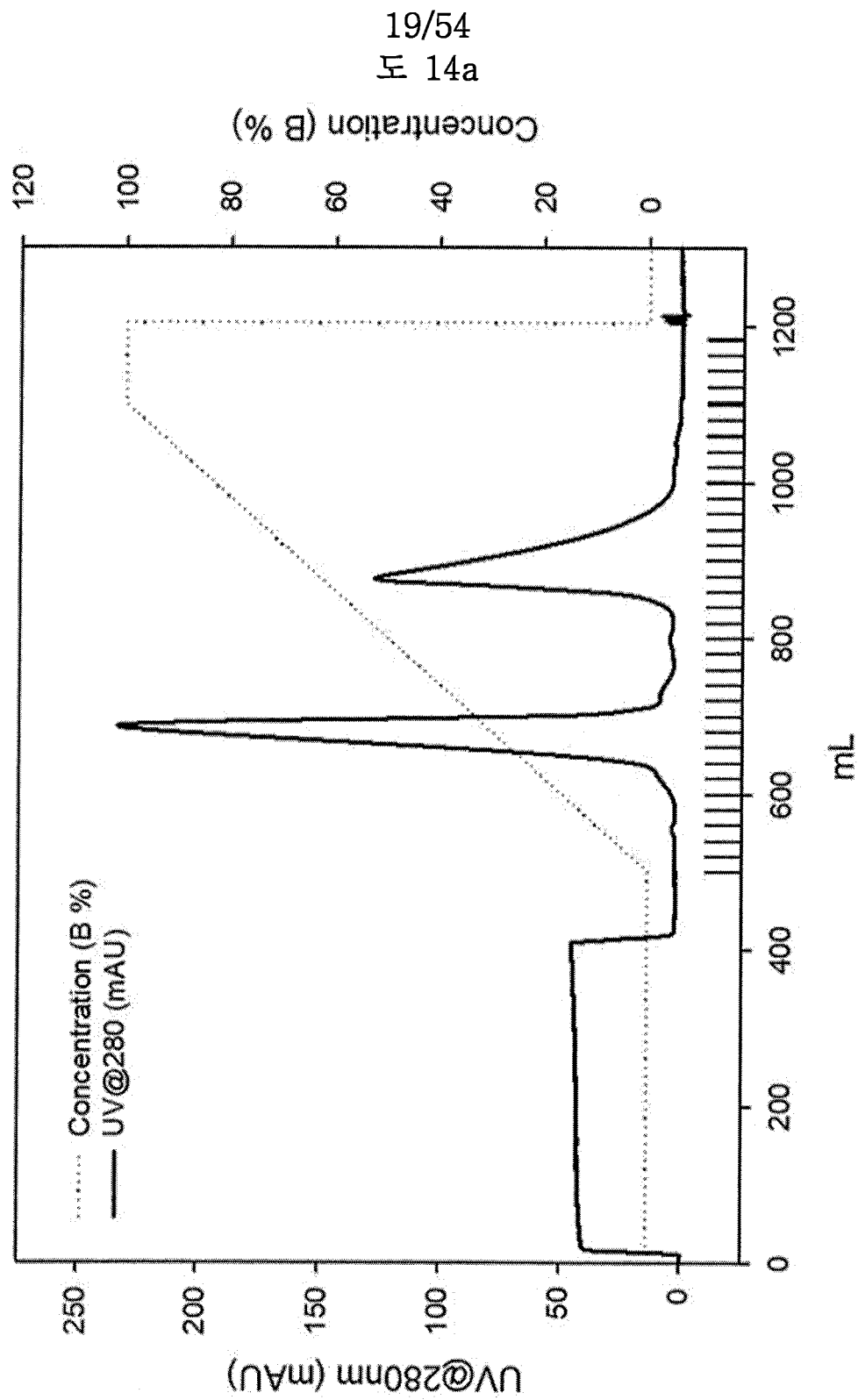
16/54
도 12



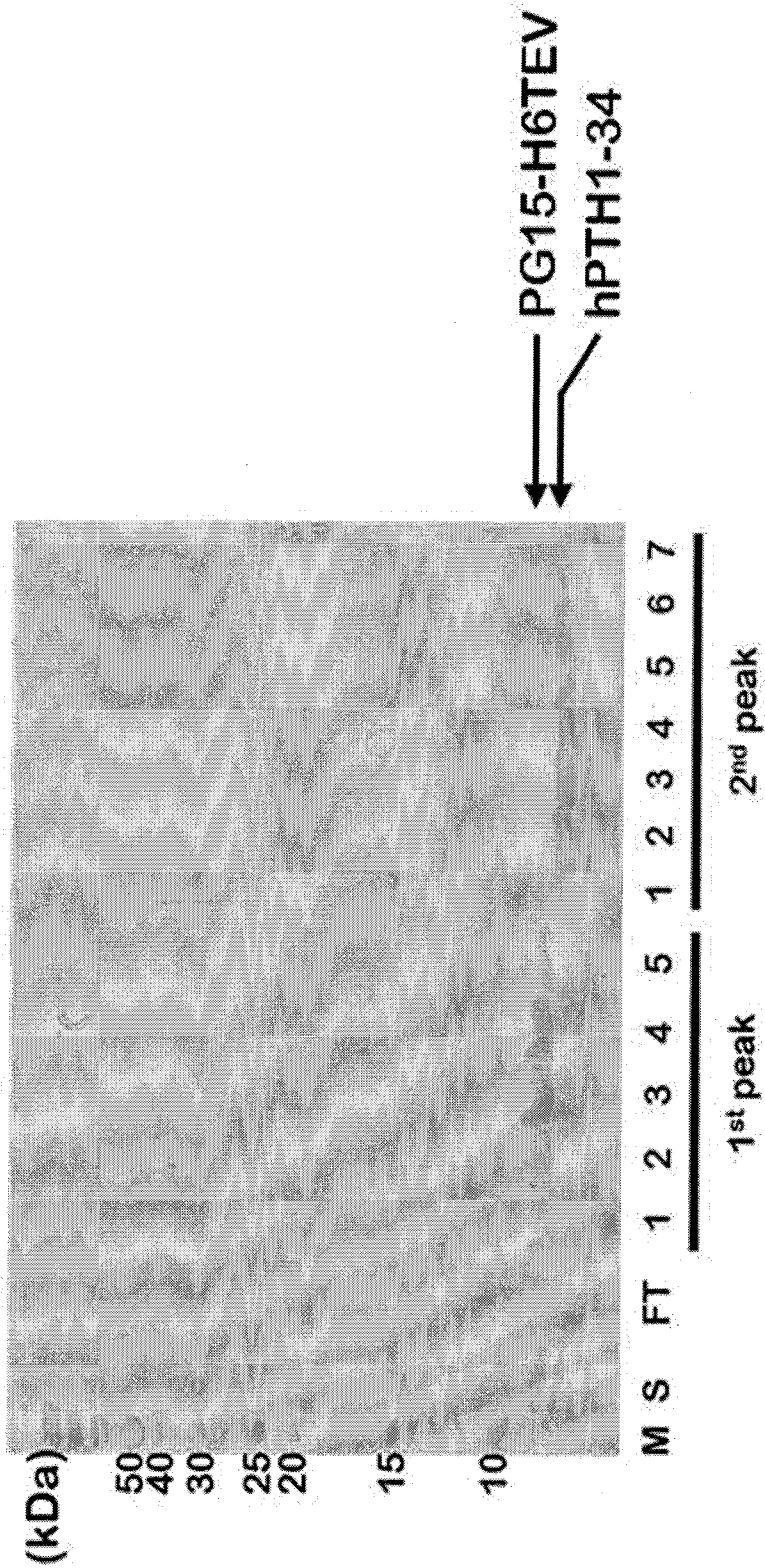


18/54
도 13b

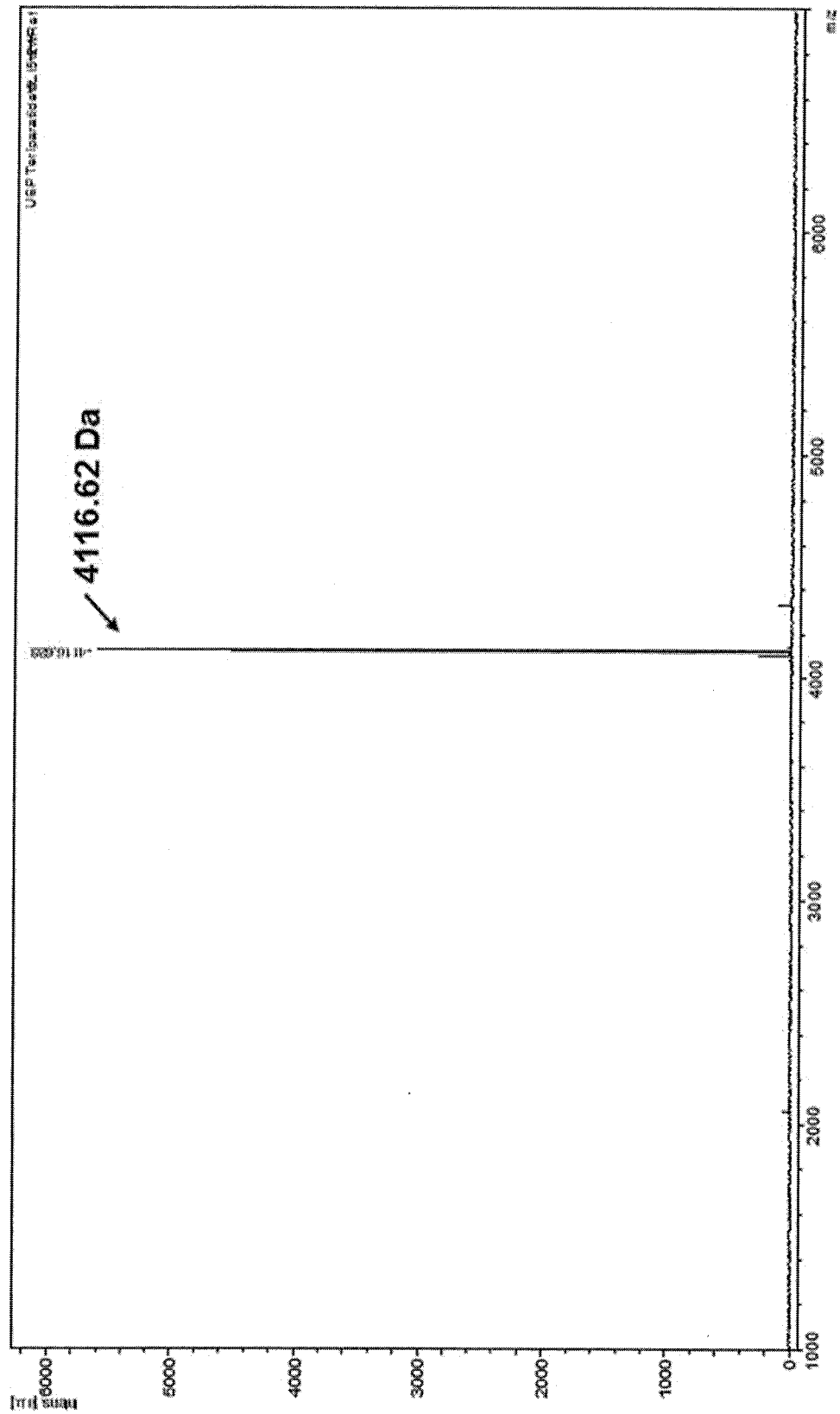




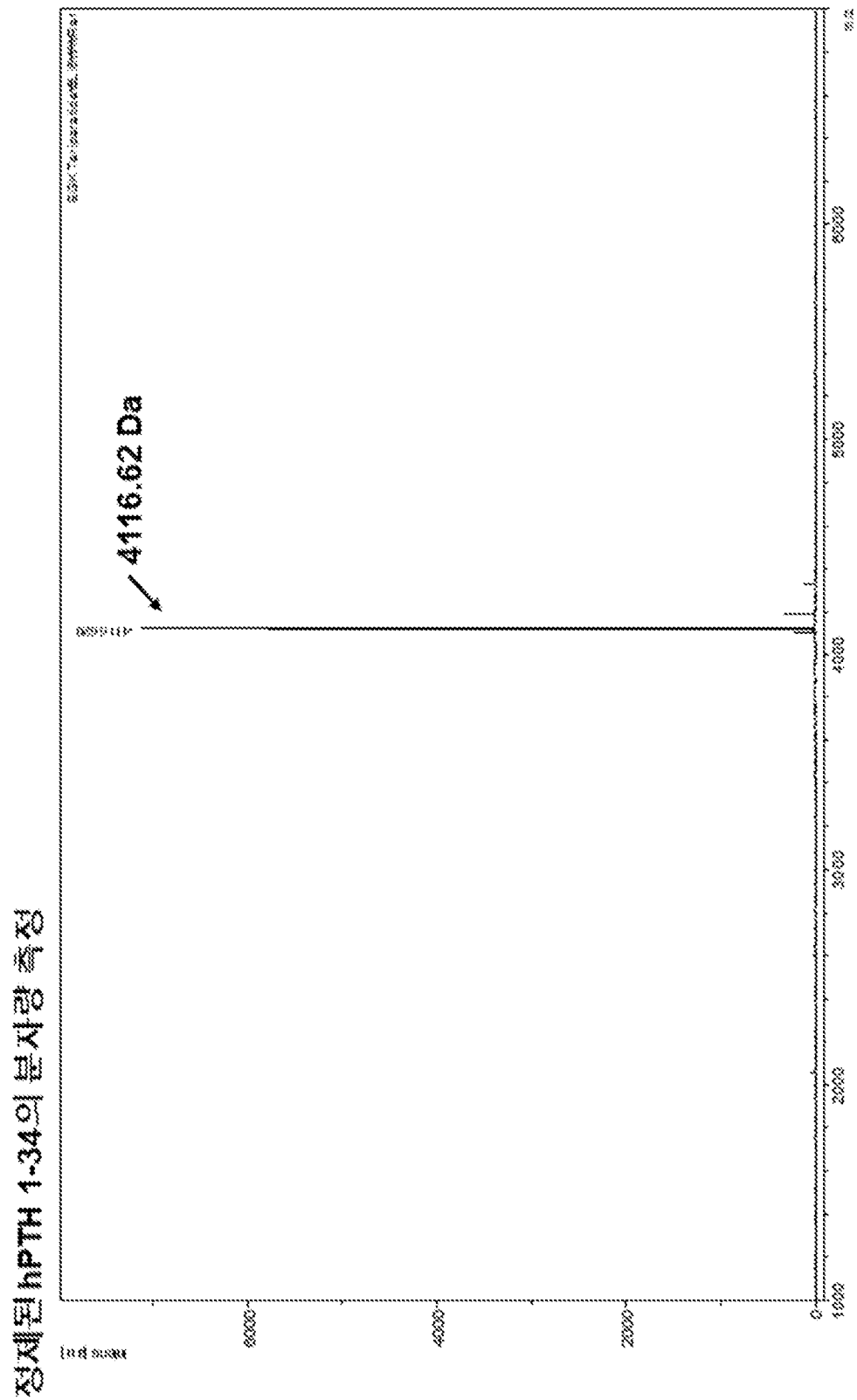
20/54
도 14b



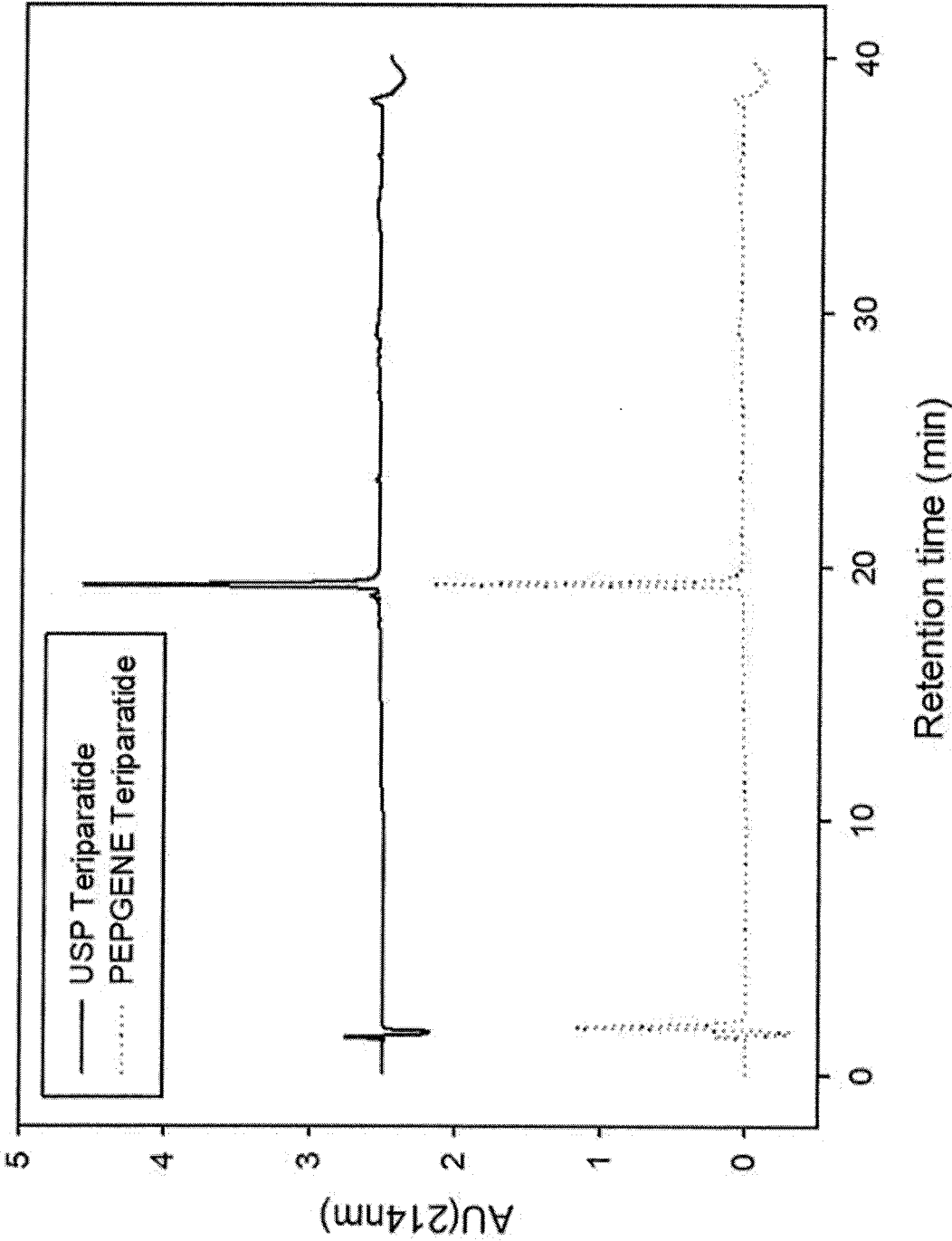
21/54
도 15



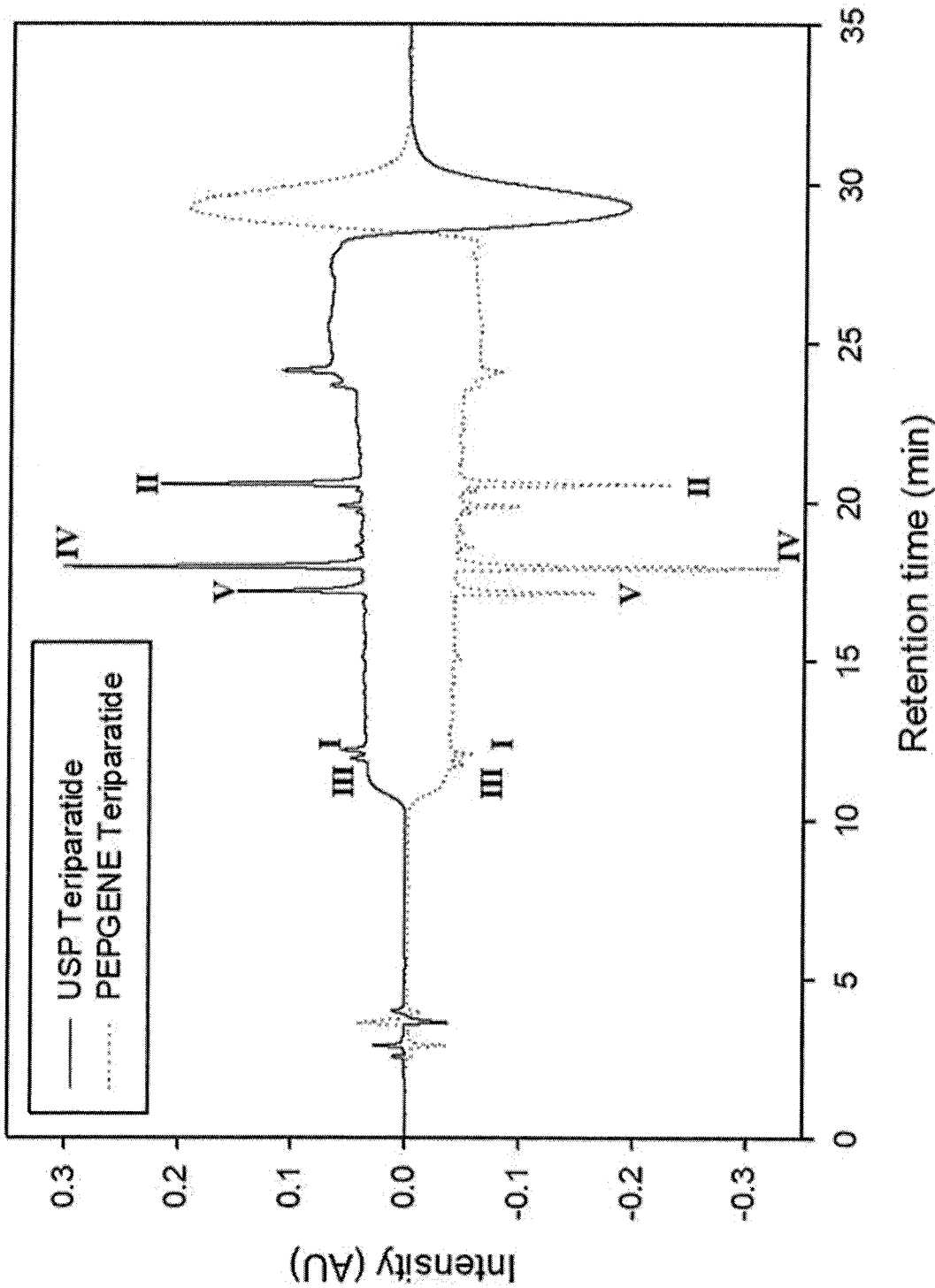
22/54
도 16



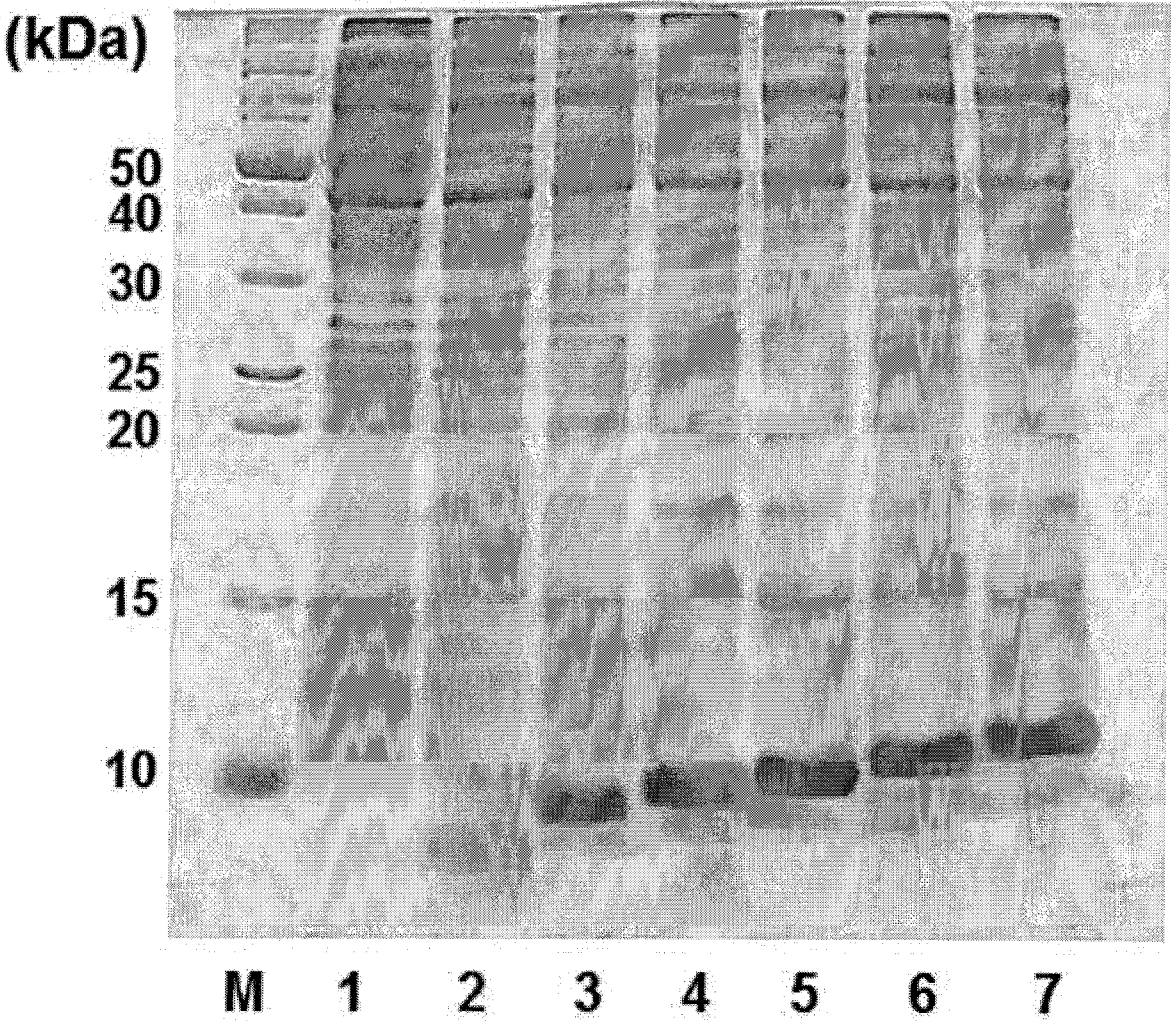
23/54
도 17



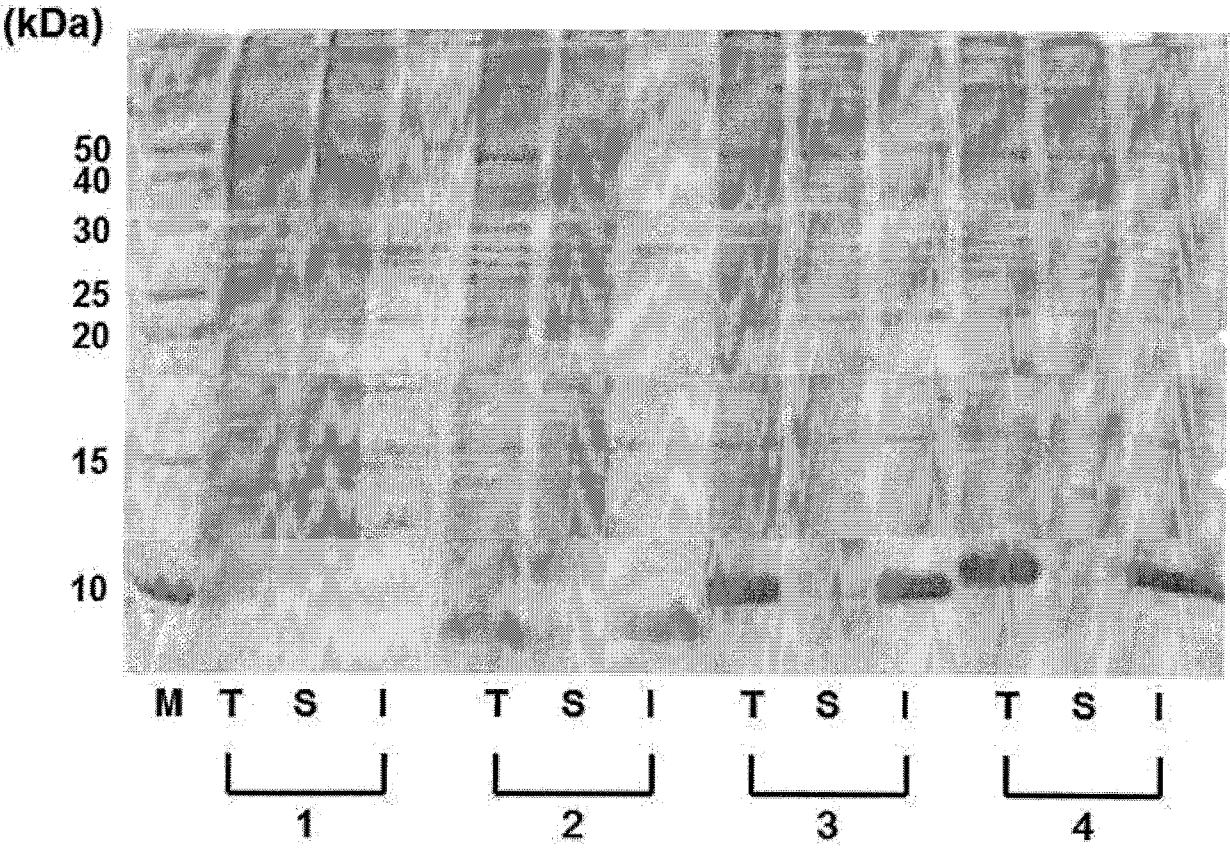
24/54
도 18



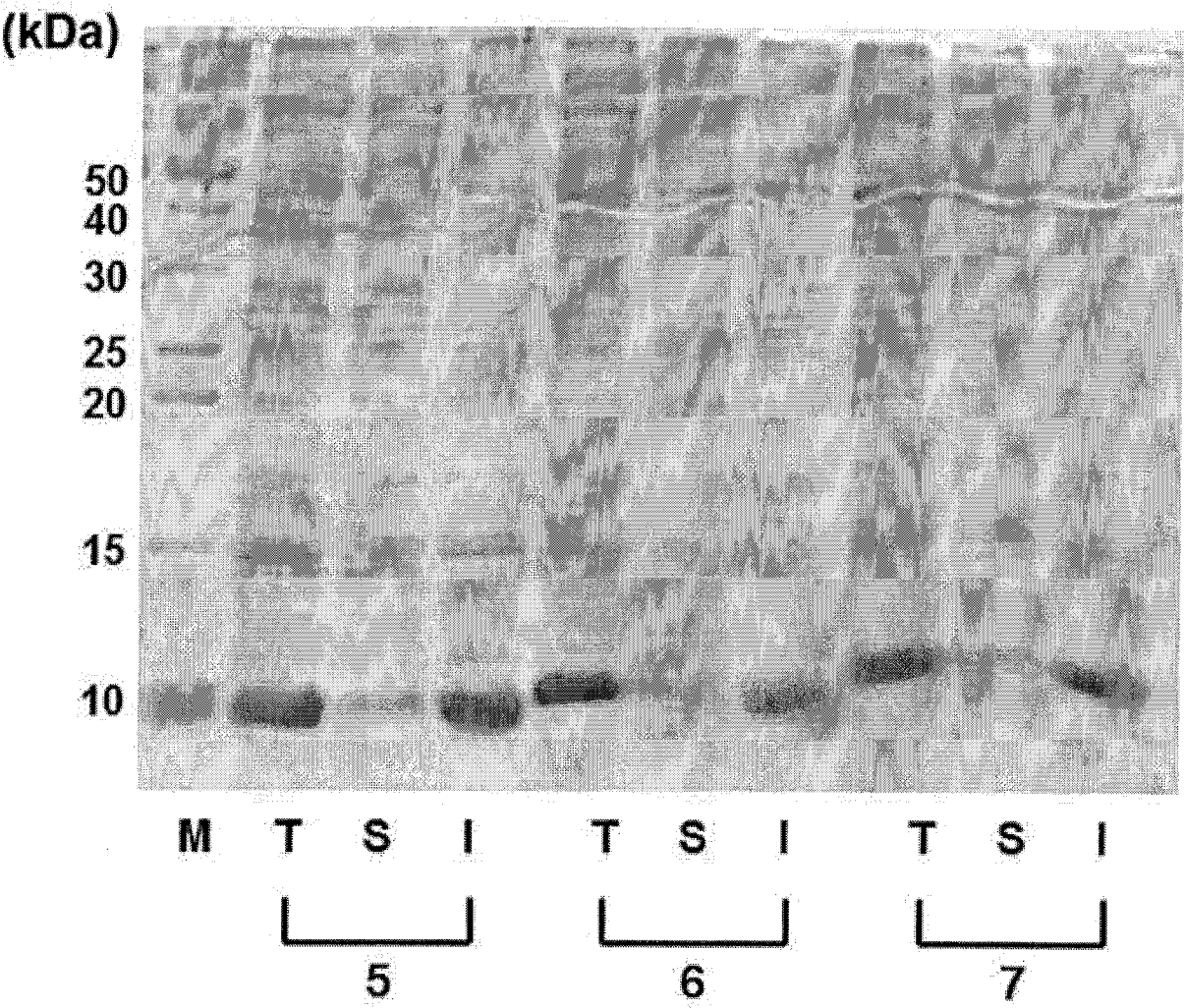
25/54
도 19



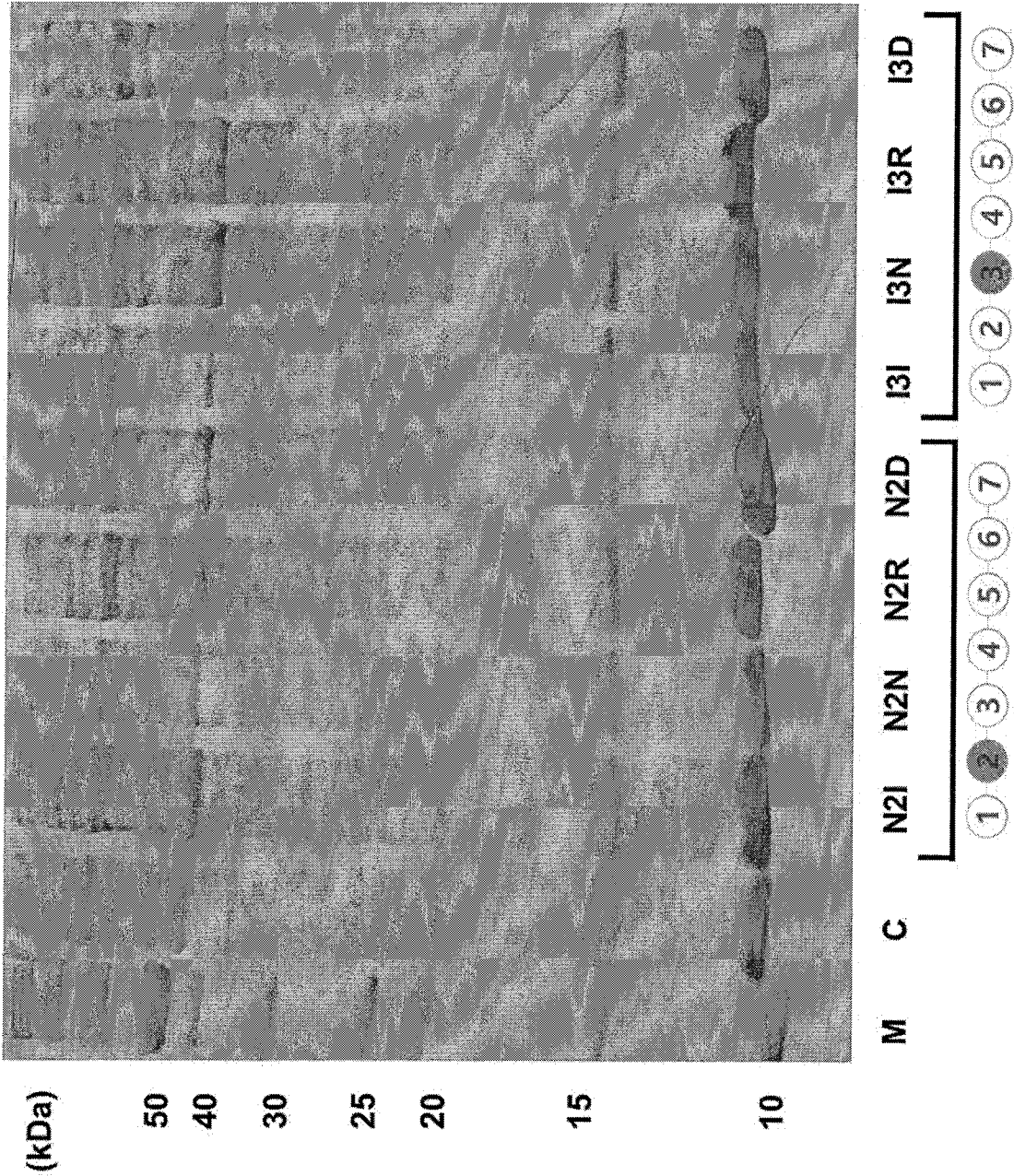
26/54
도 20



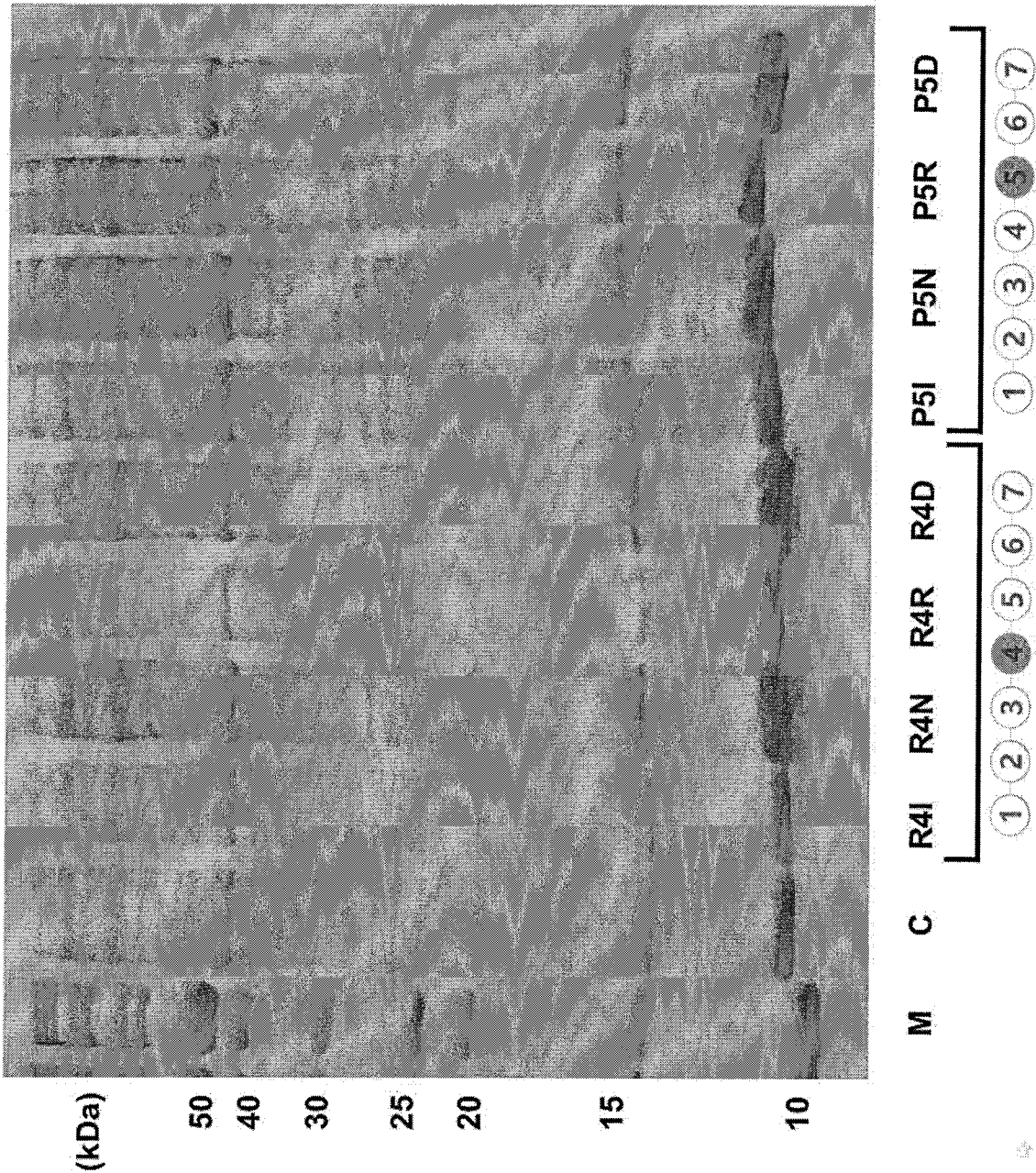
27/54
도 21



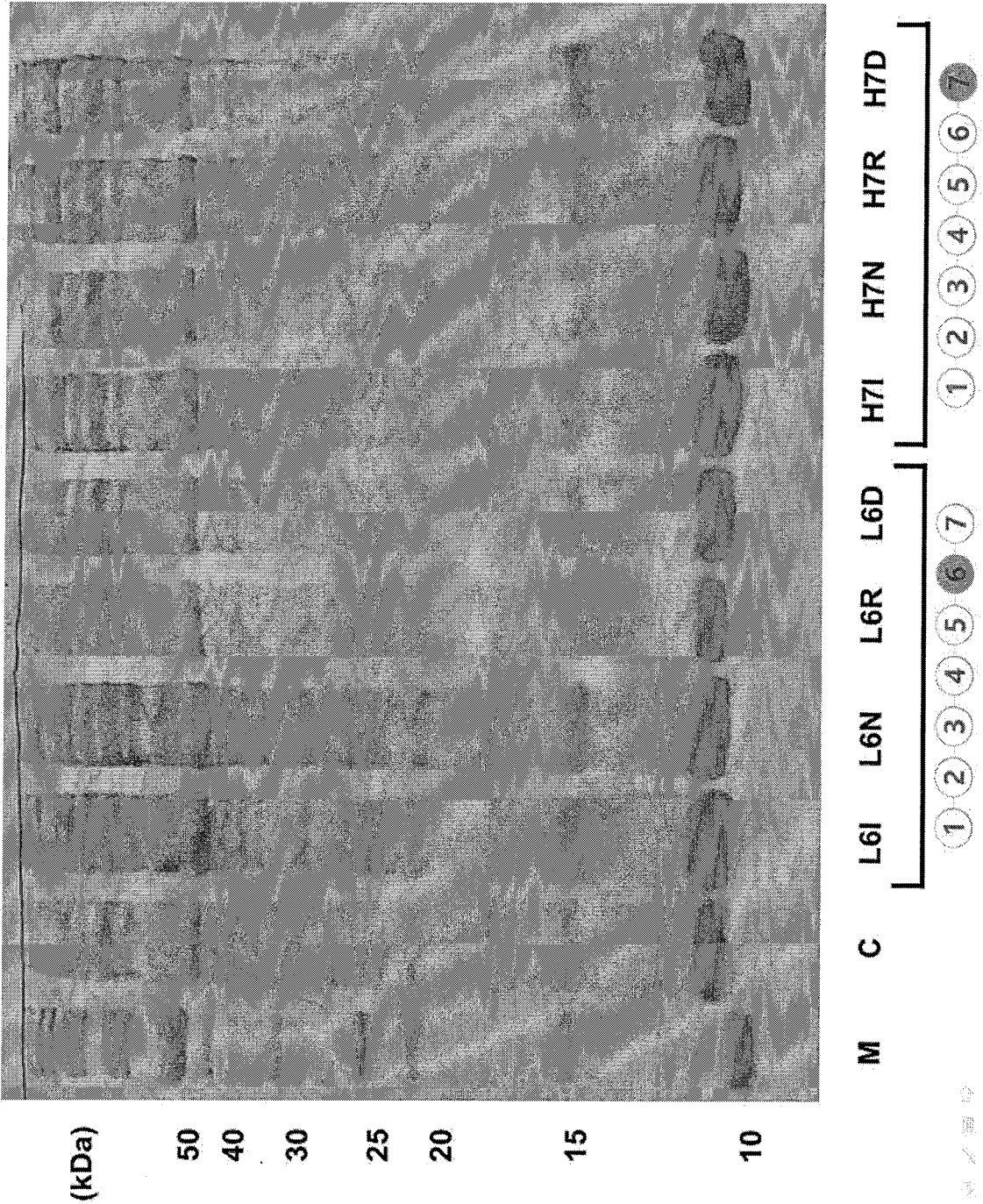
28/54
도 22



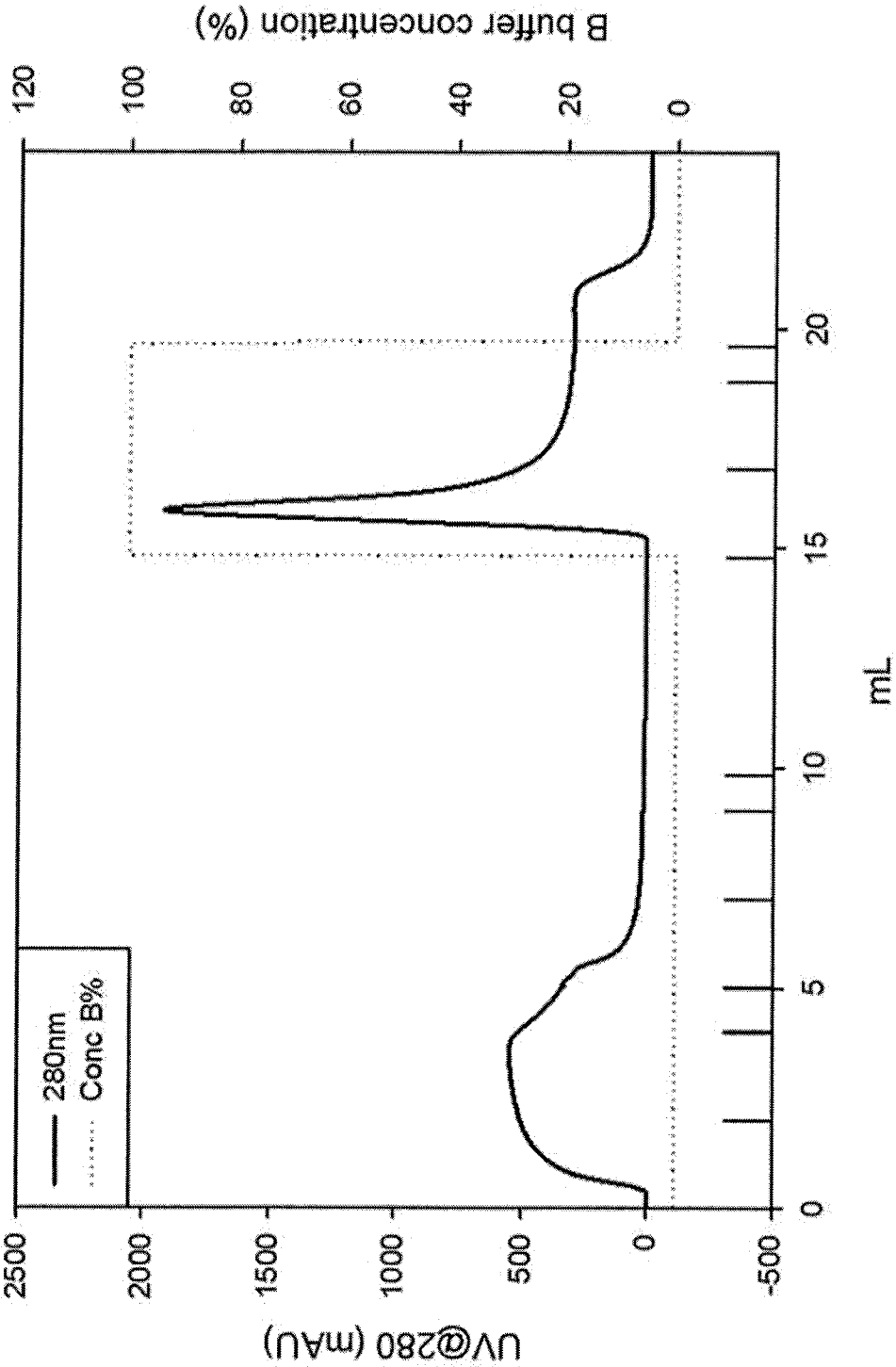
29/54
도 23



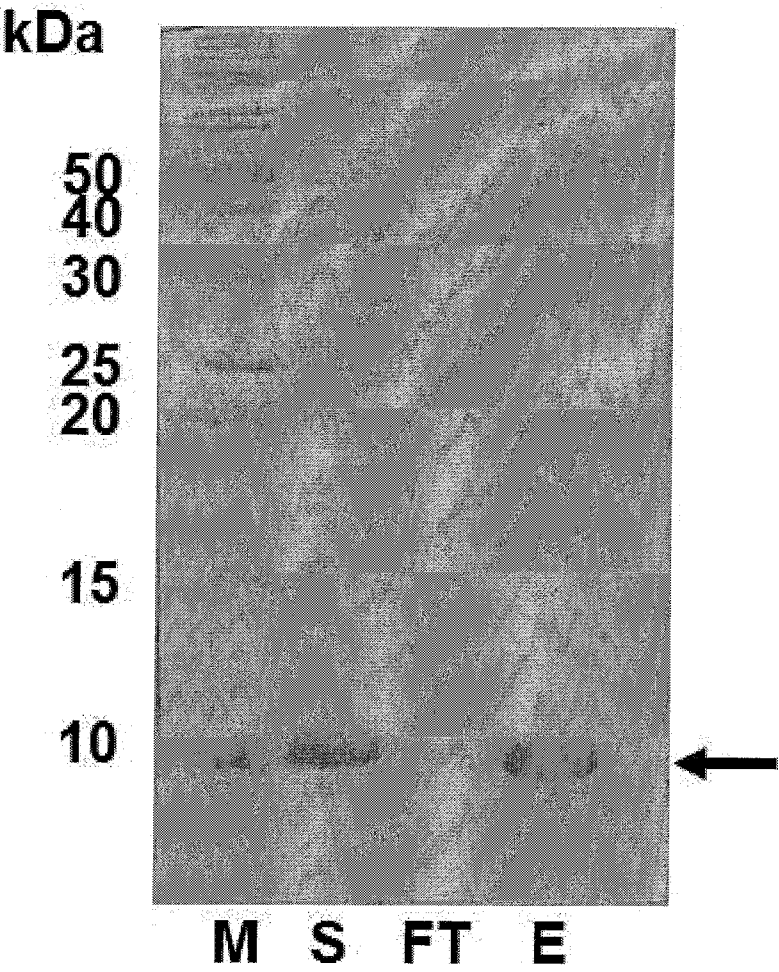
30/54
도 24



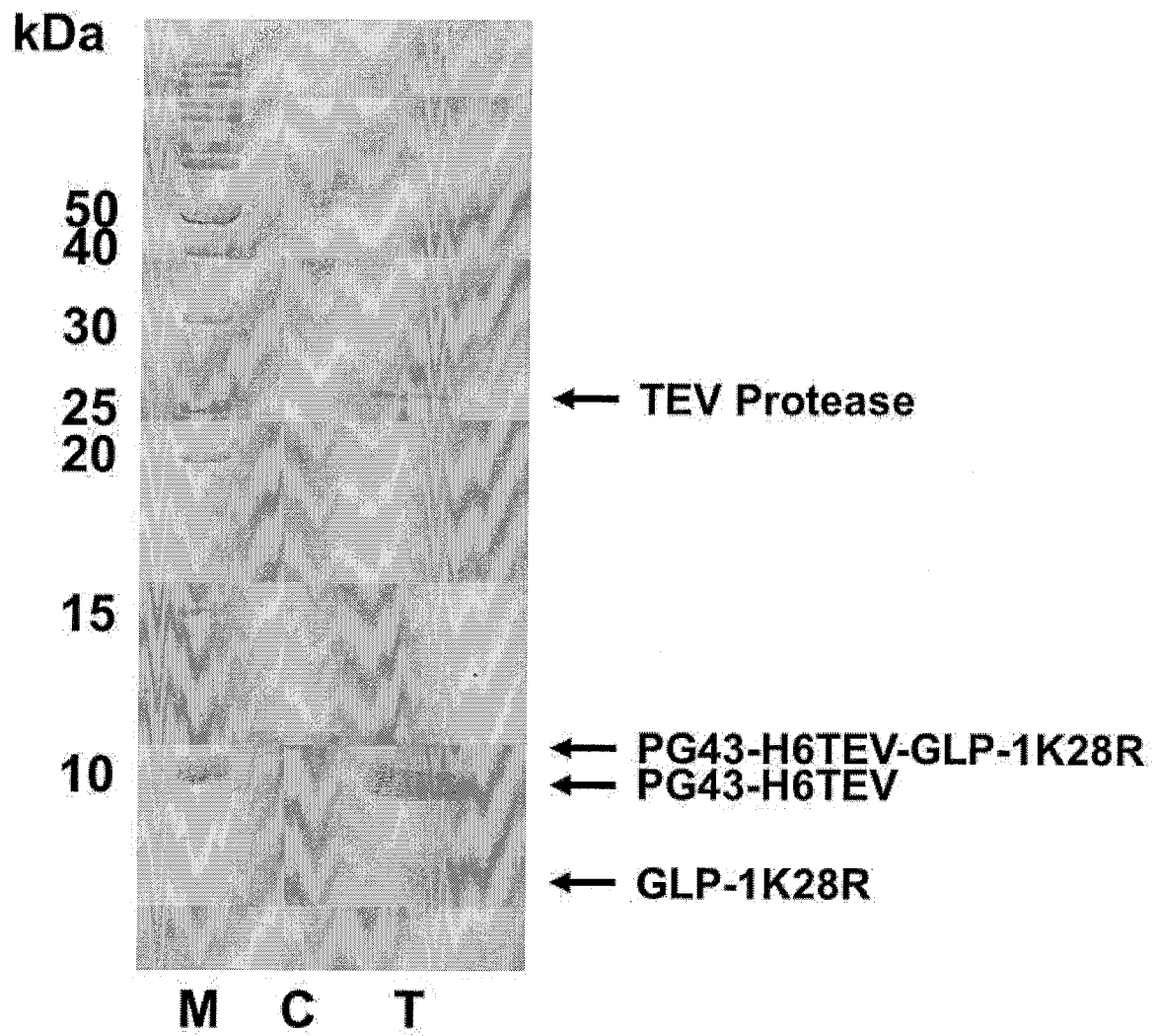
31/54
도 25



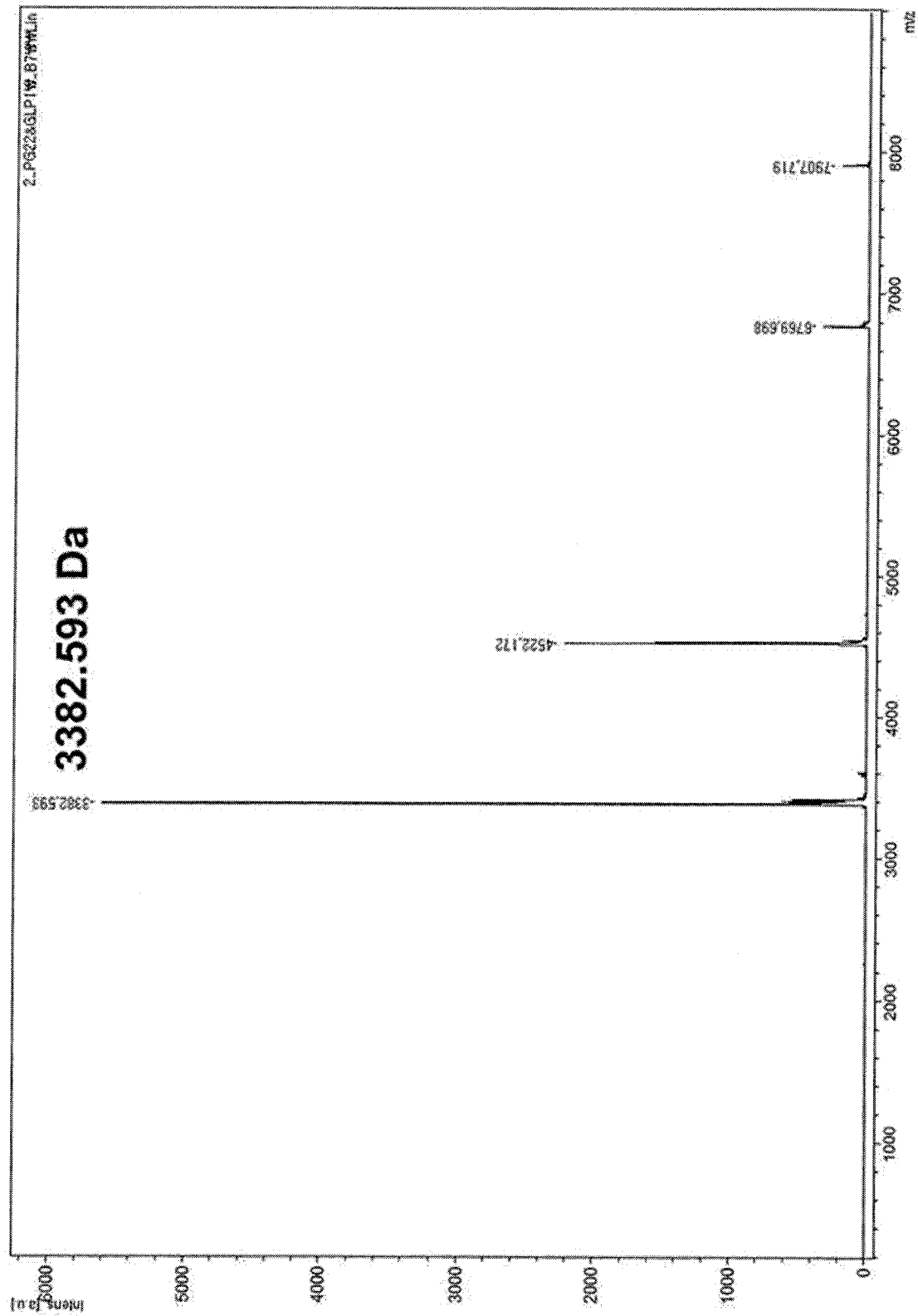
32/54
도 26



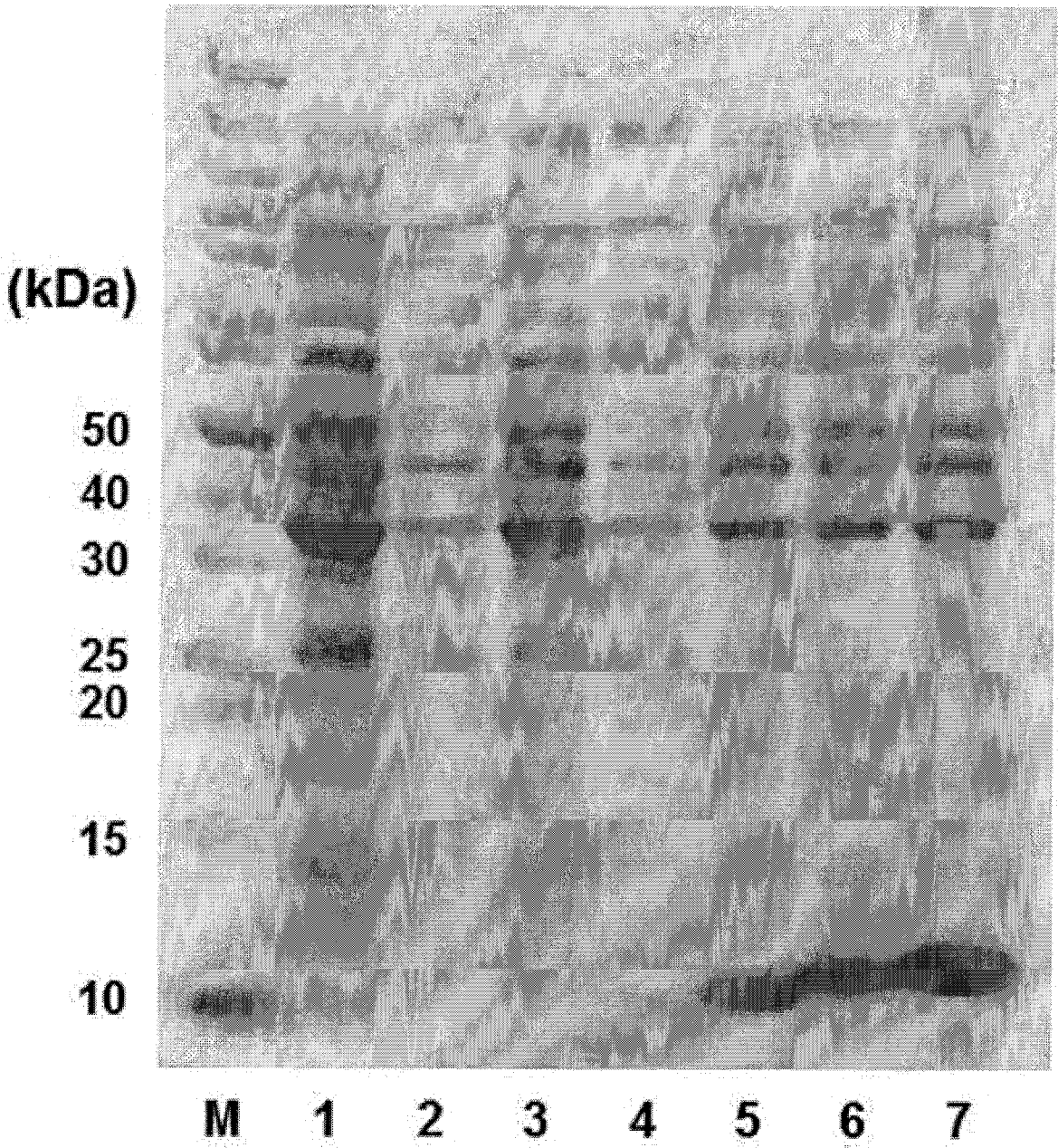
33/54
도 27



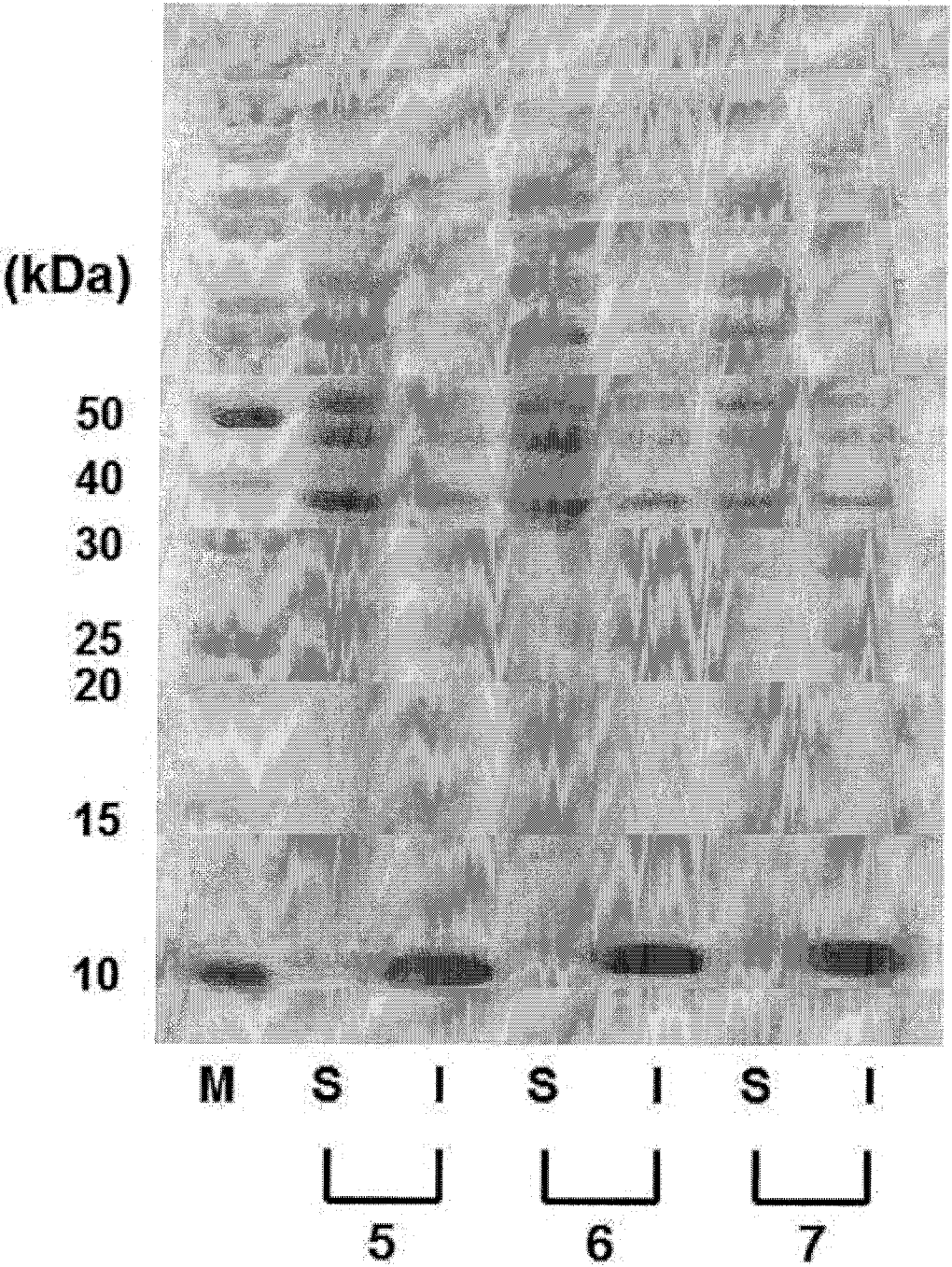
34/54
도 28



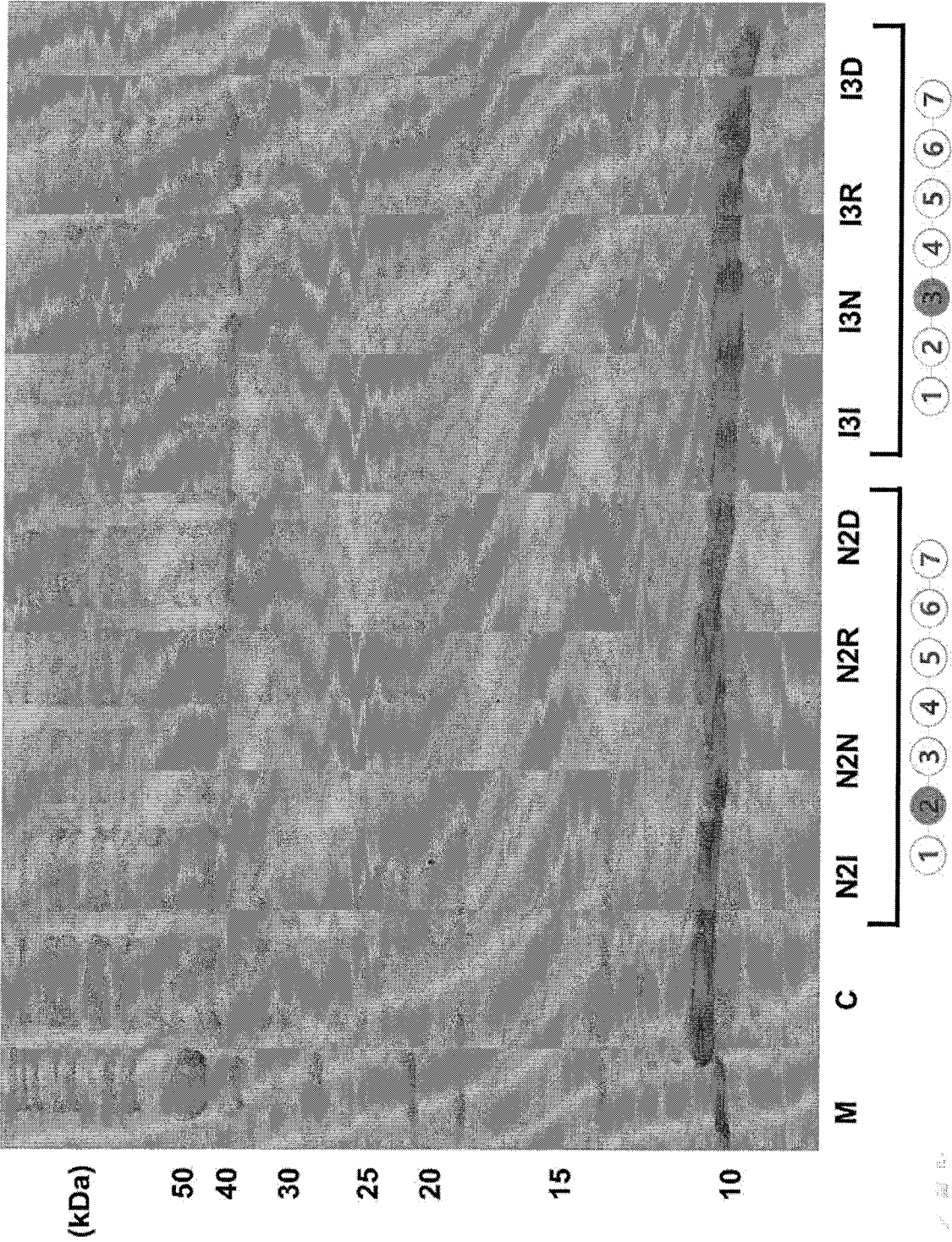
35/54
도 29



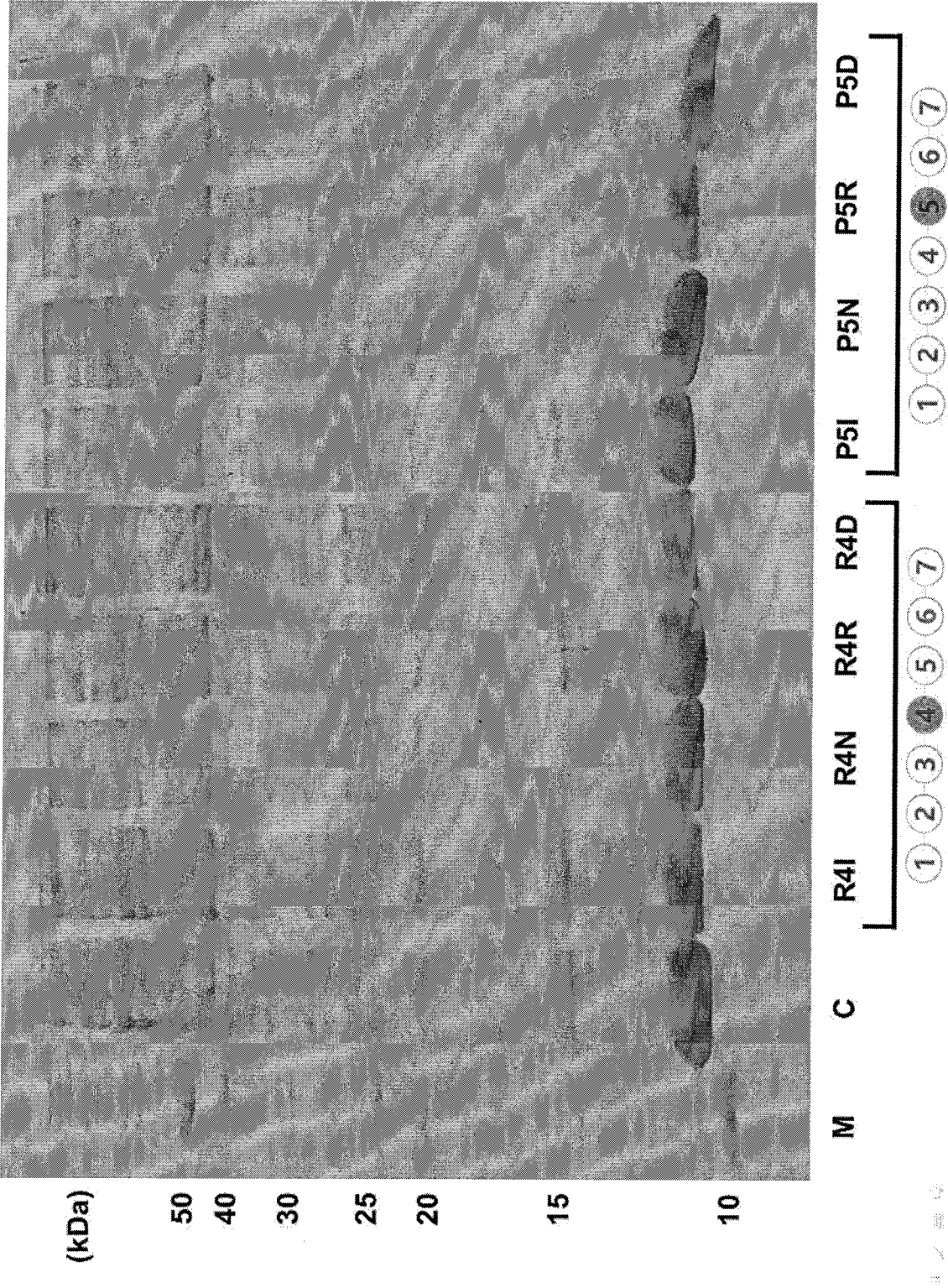
36/54
도 30



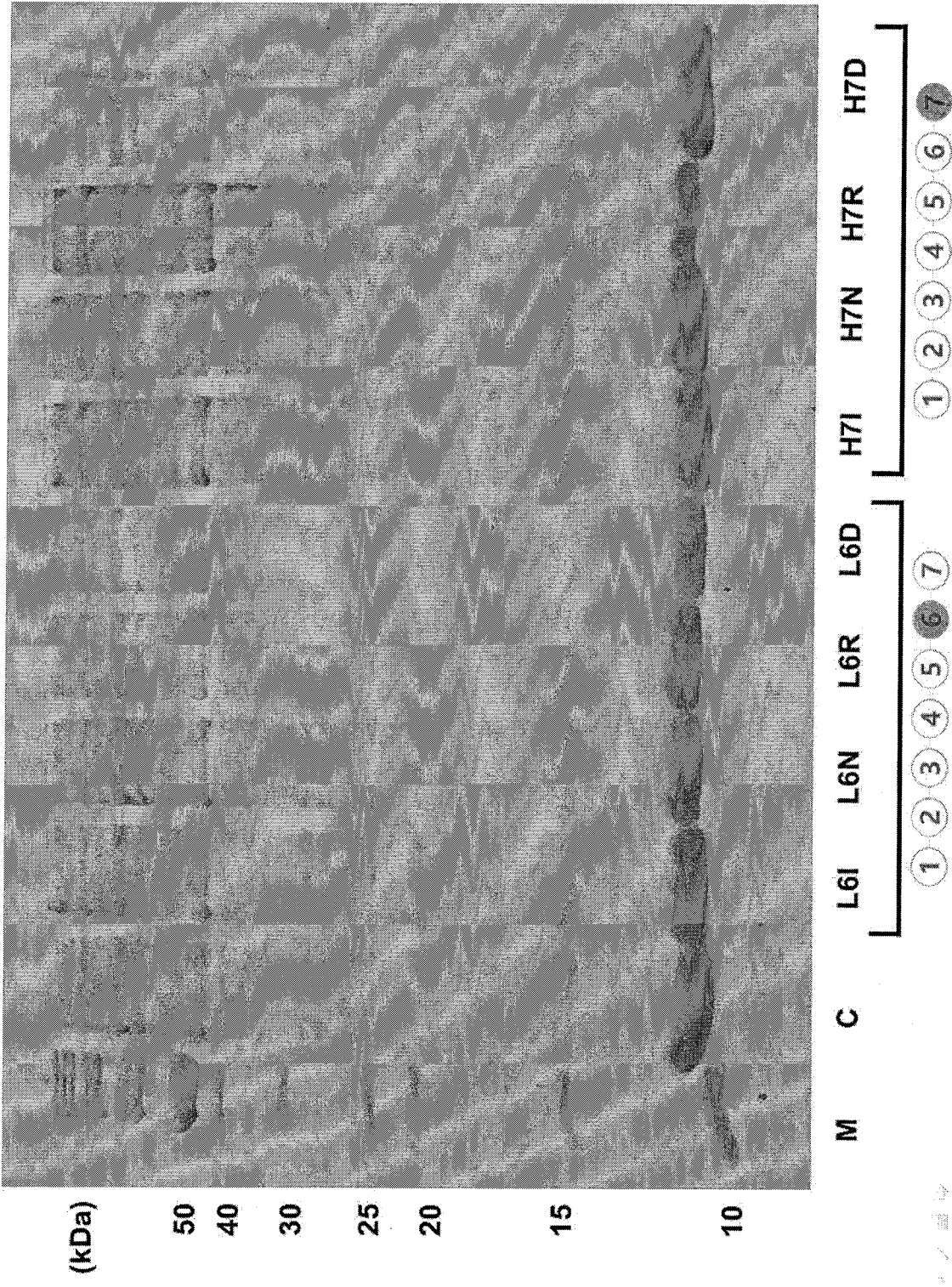
37/54
도 31



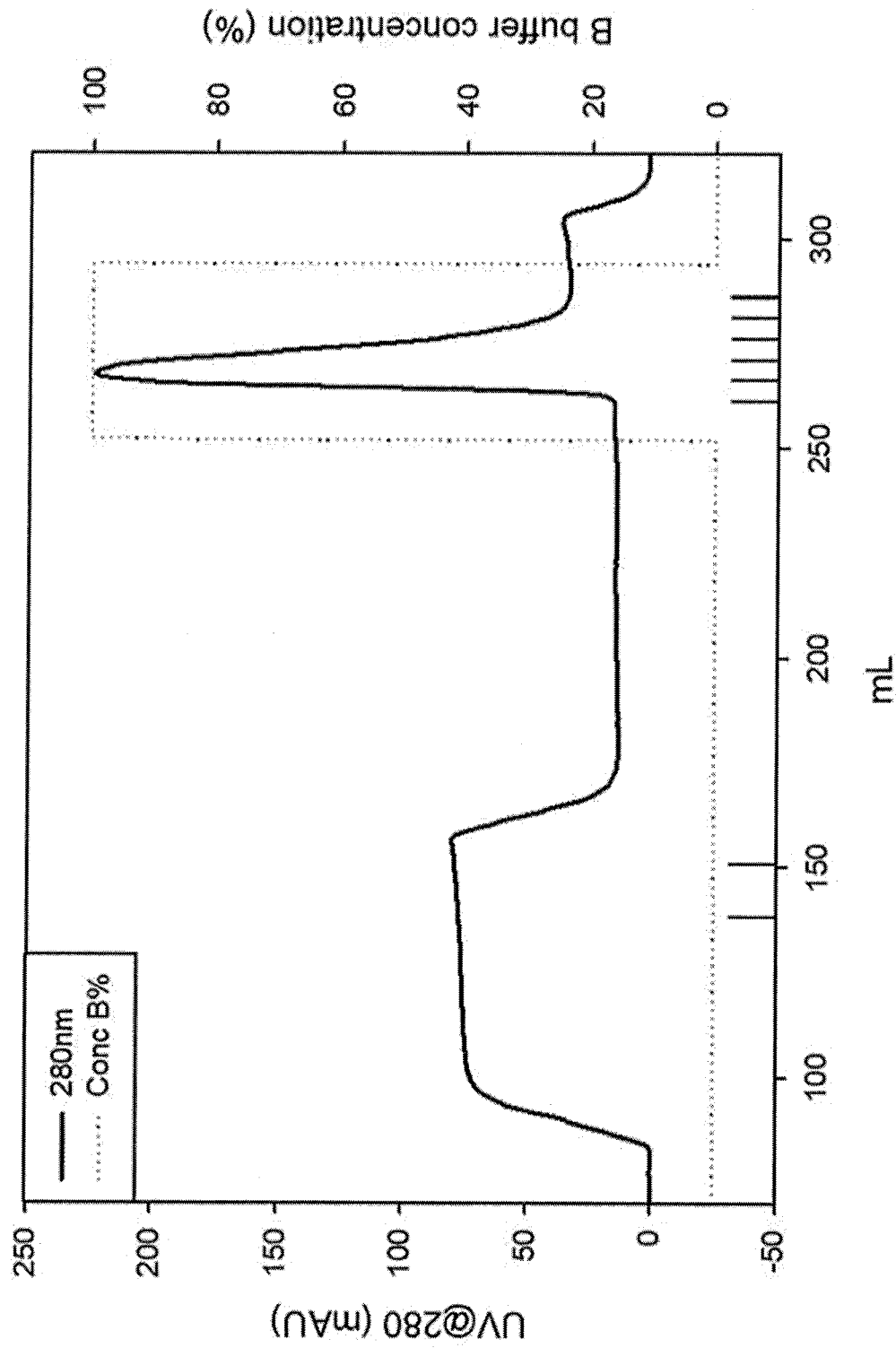
38/54
도 32



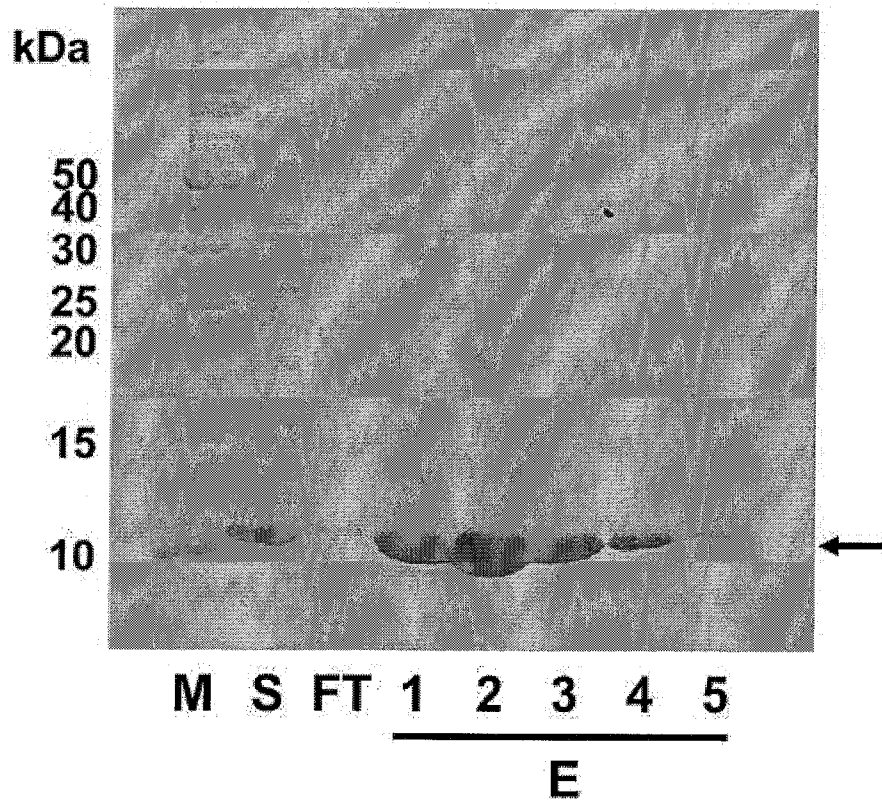
39/54
도 33



40/54
도 34

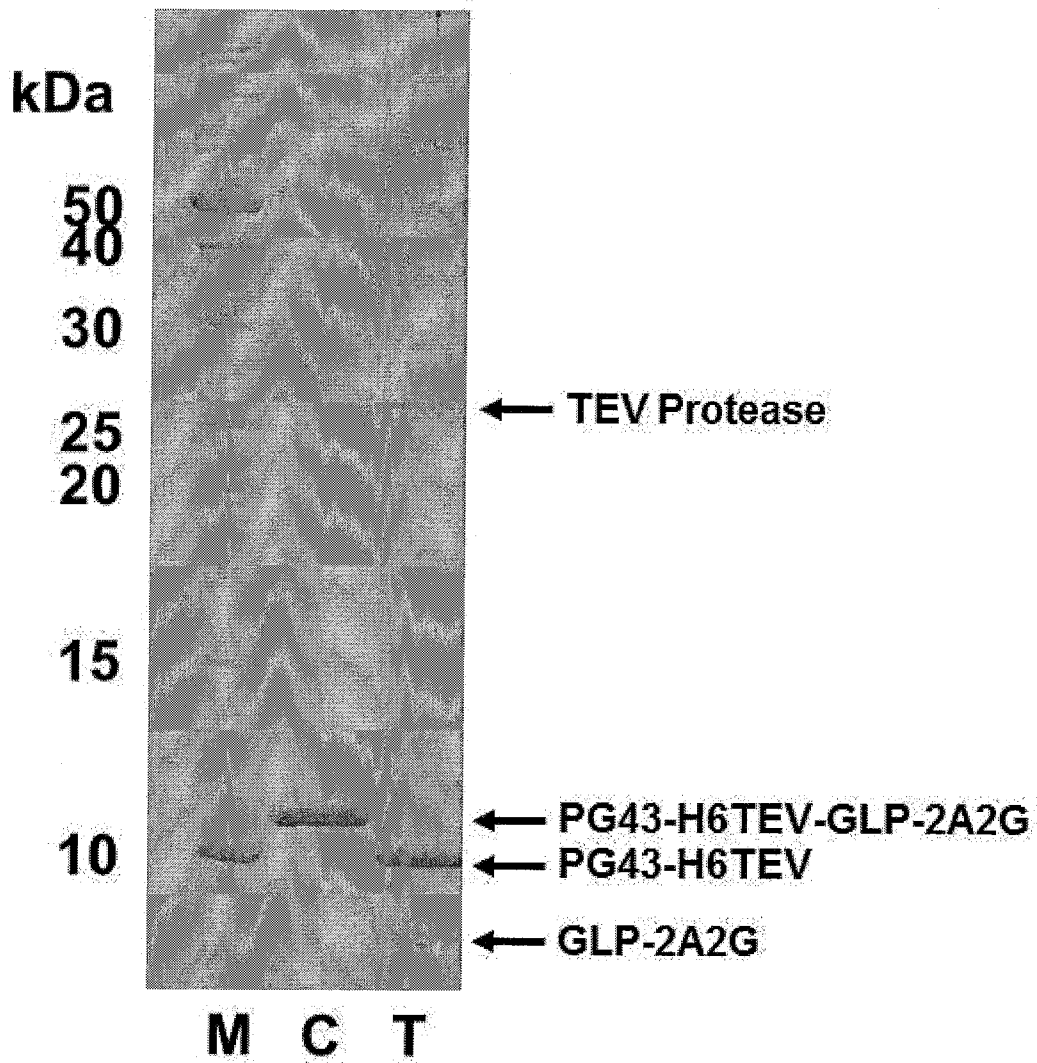


41/54
도 35

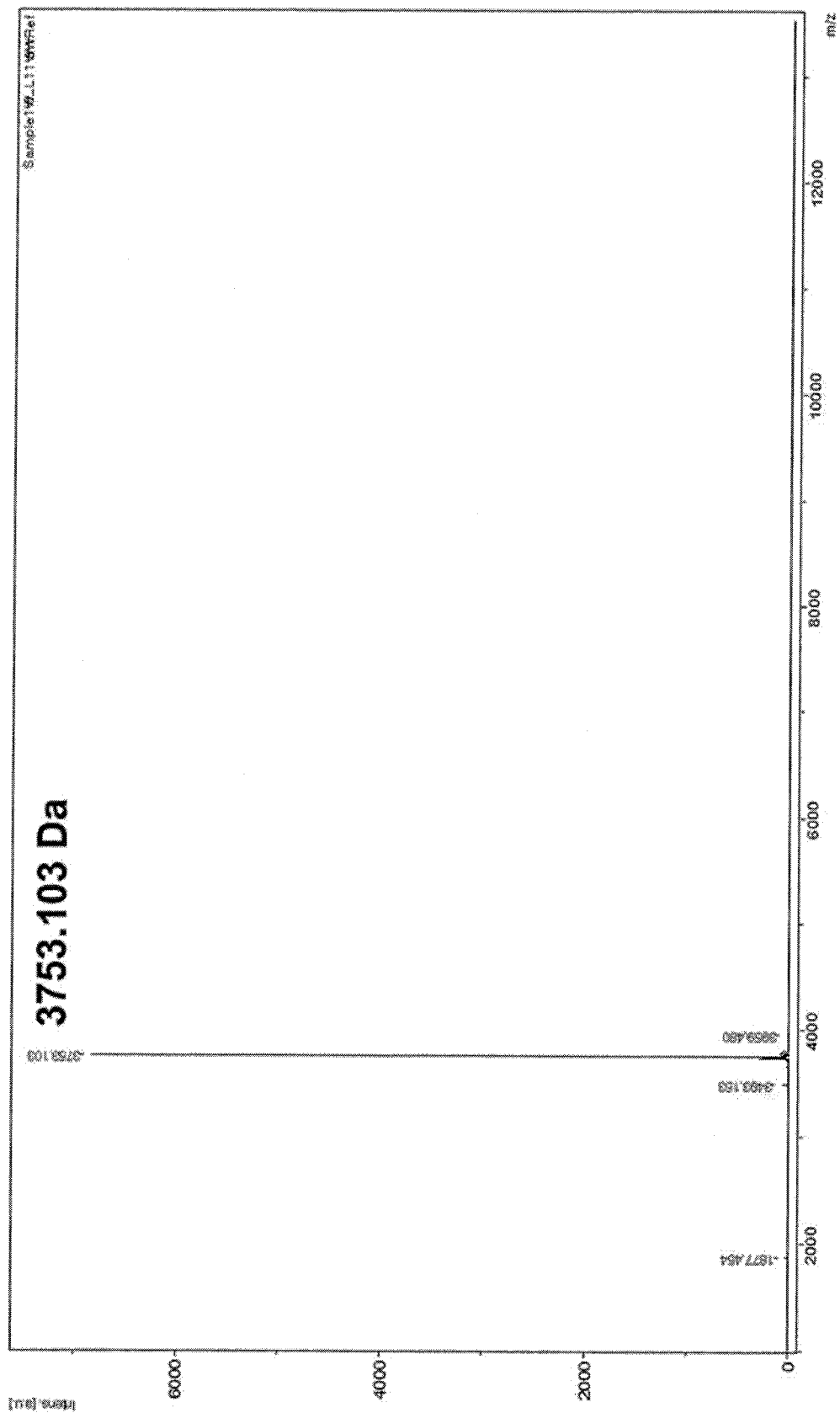


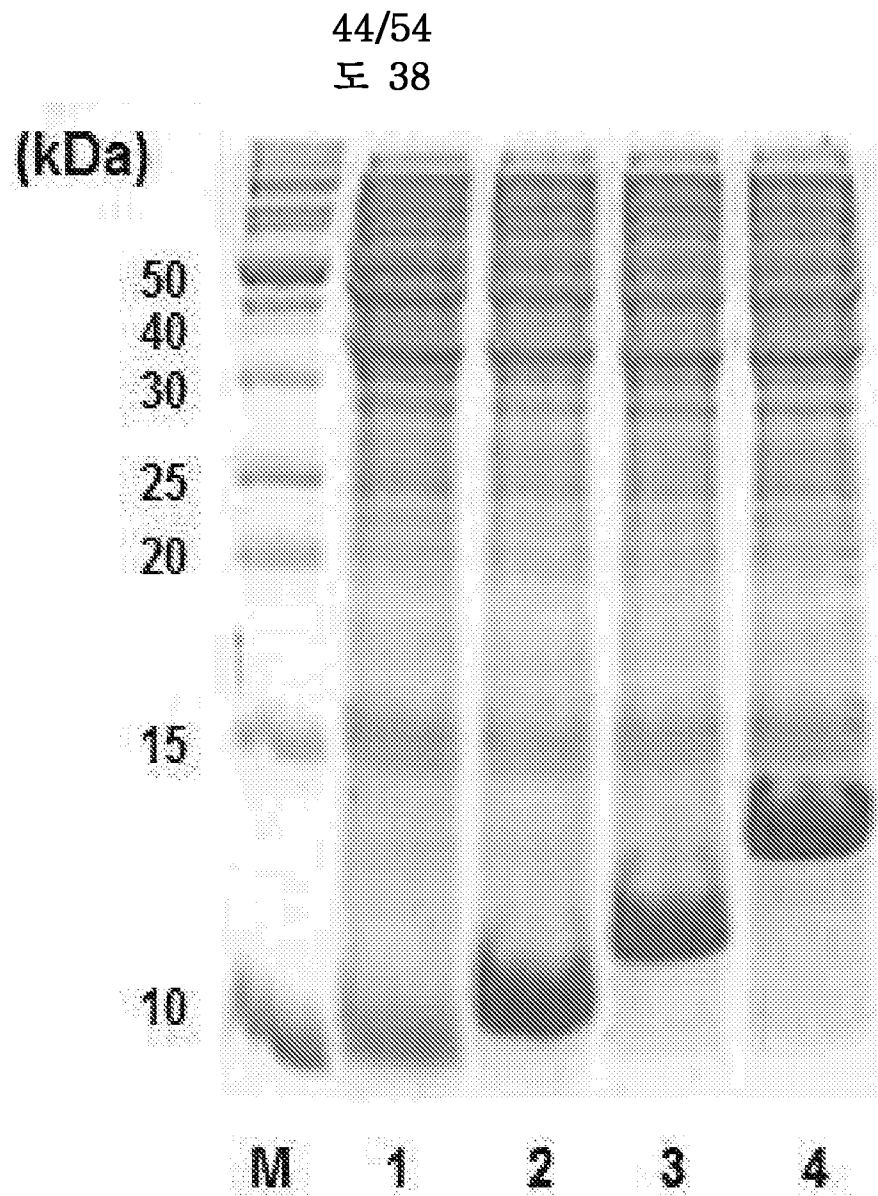
M: marker proteins
S: Sample injected
FT: Flow-through fraction
E: Elution fractions

42/54
도 36

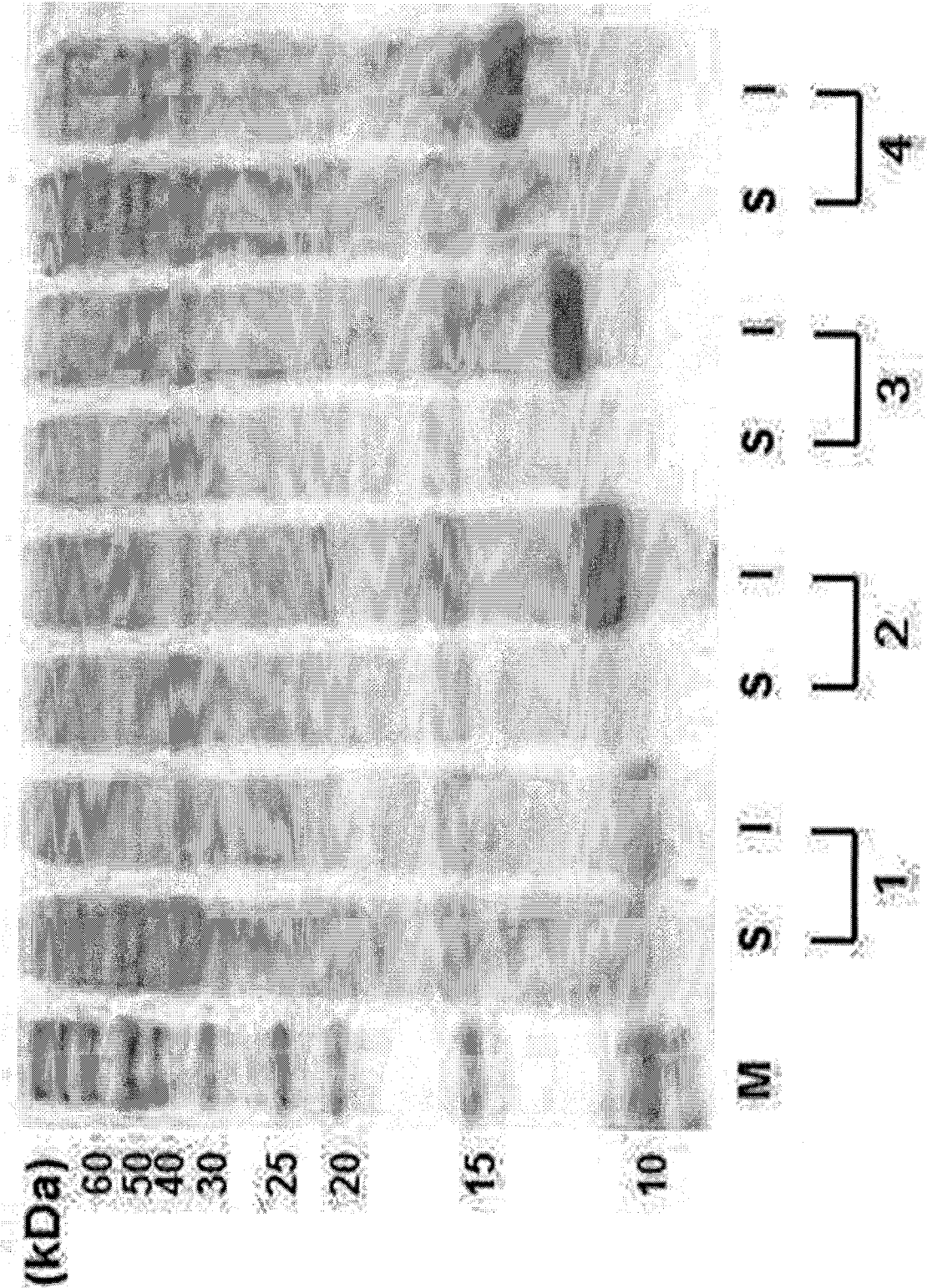


43/54
도 37

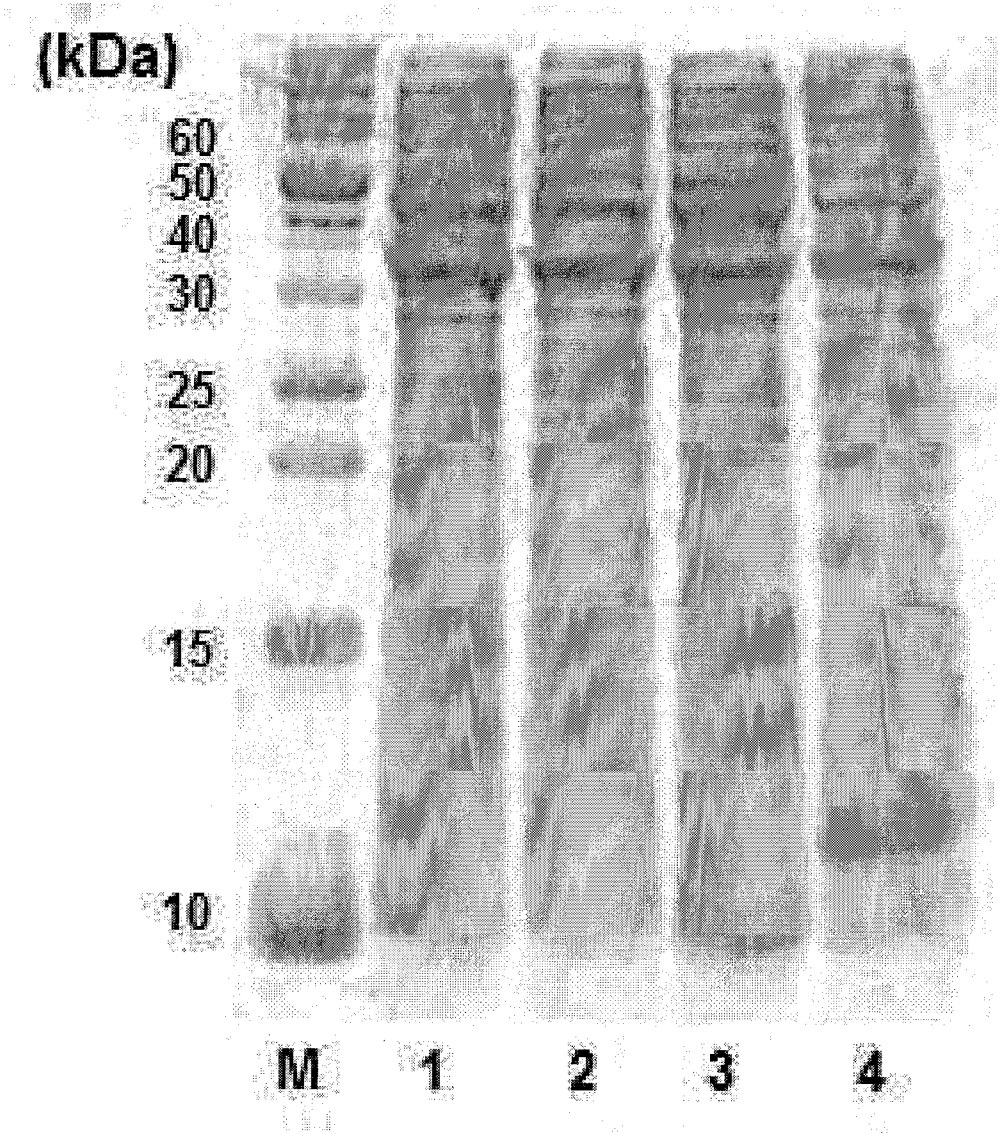




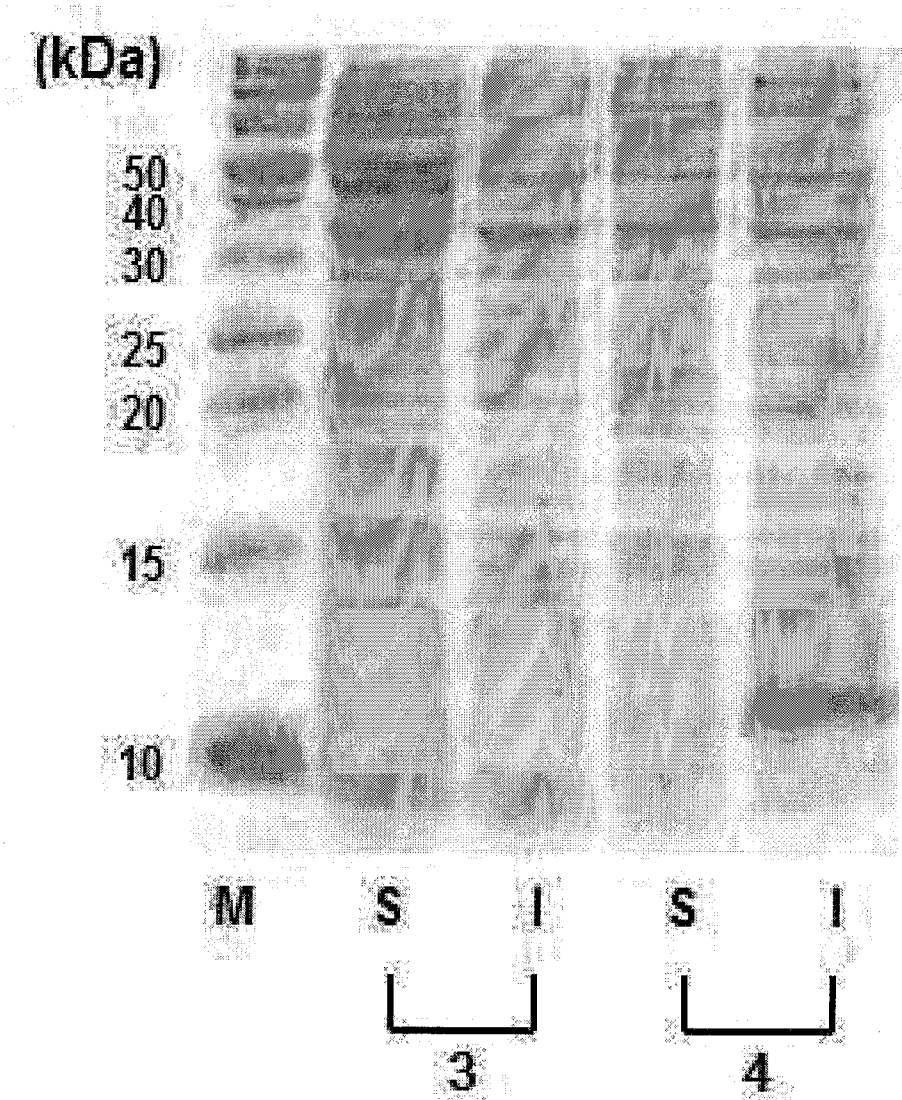
45/54
도 39



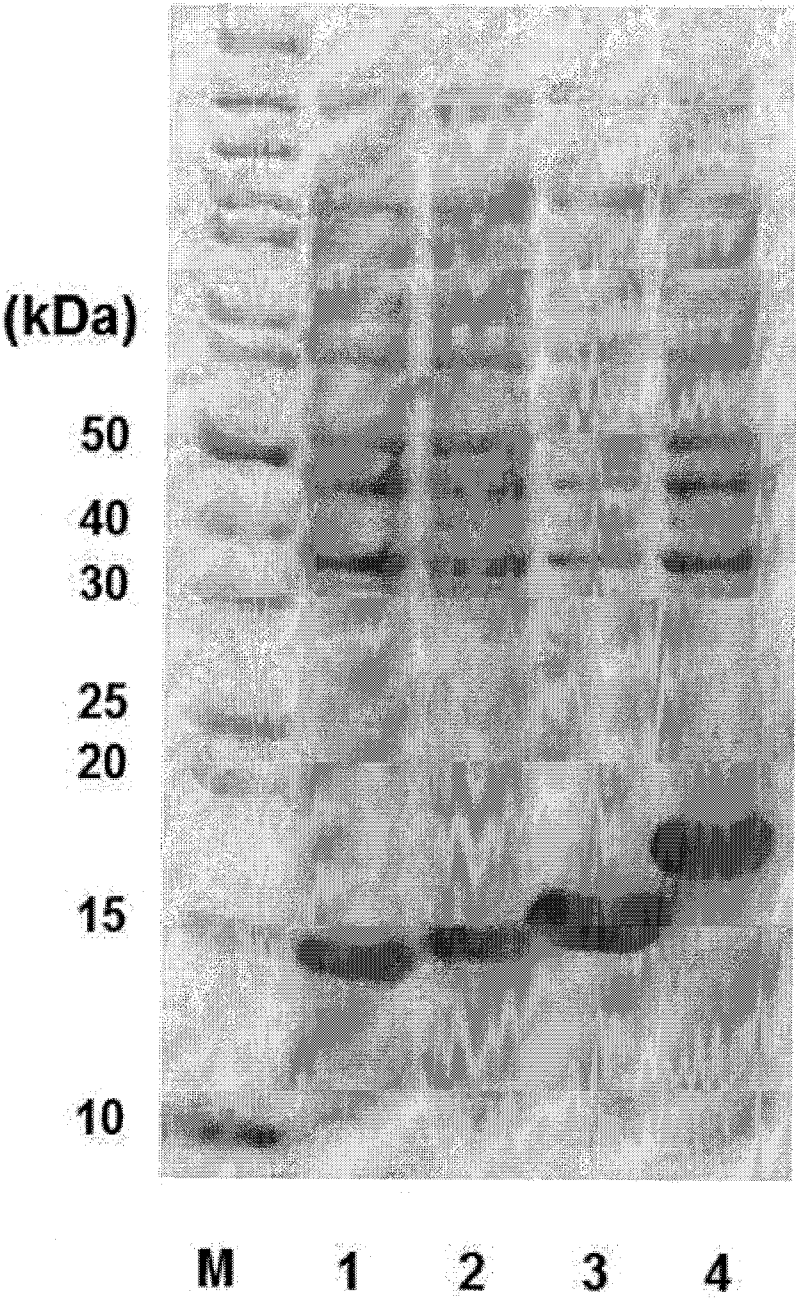
46/54
도 40



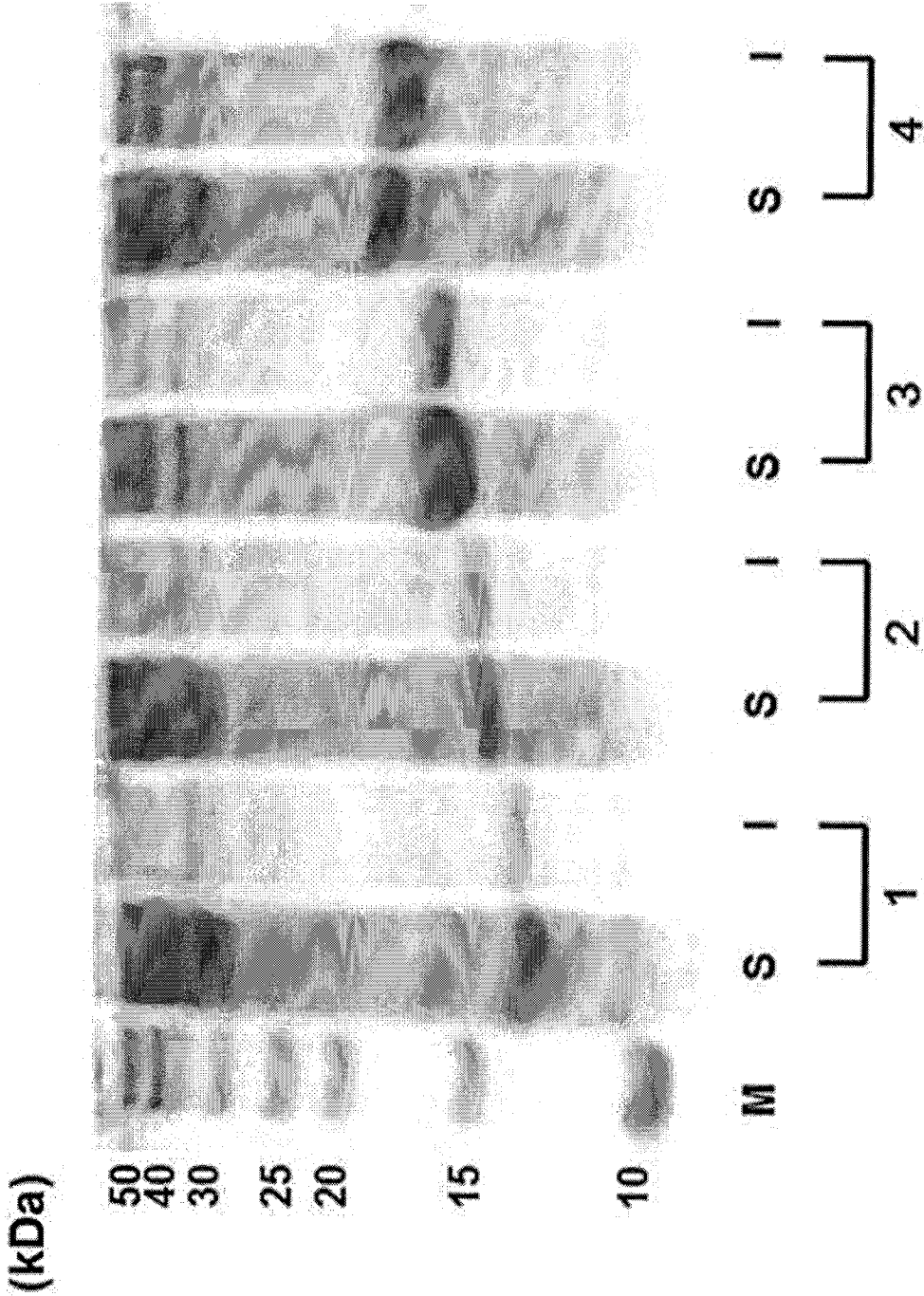
47/54
도 41

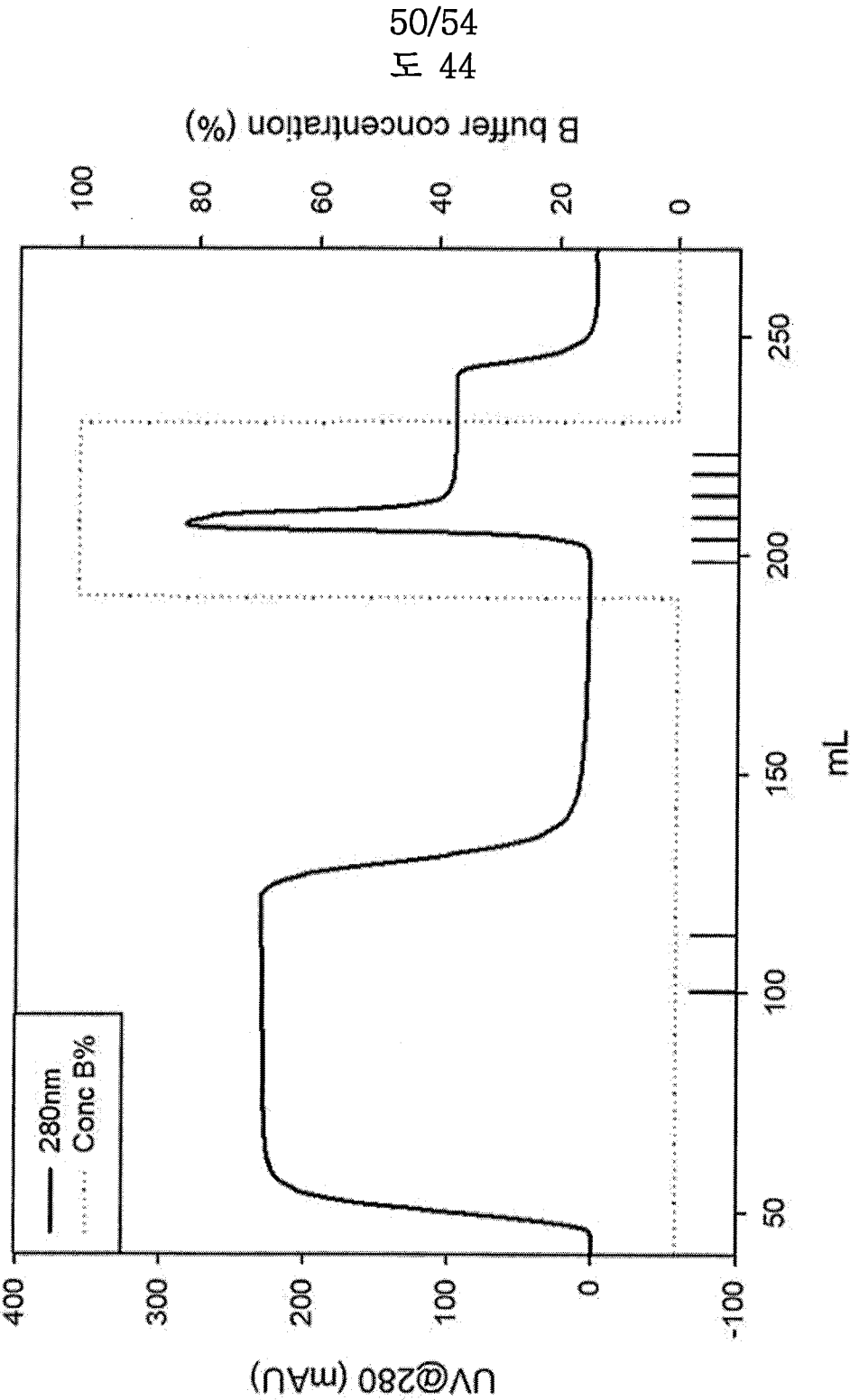


48/54
도 42

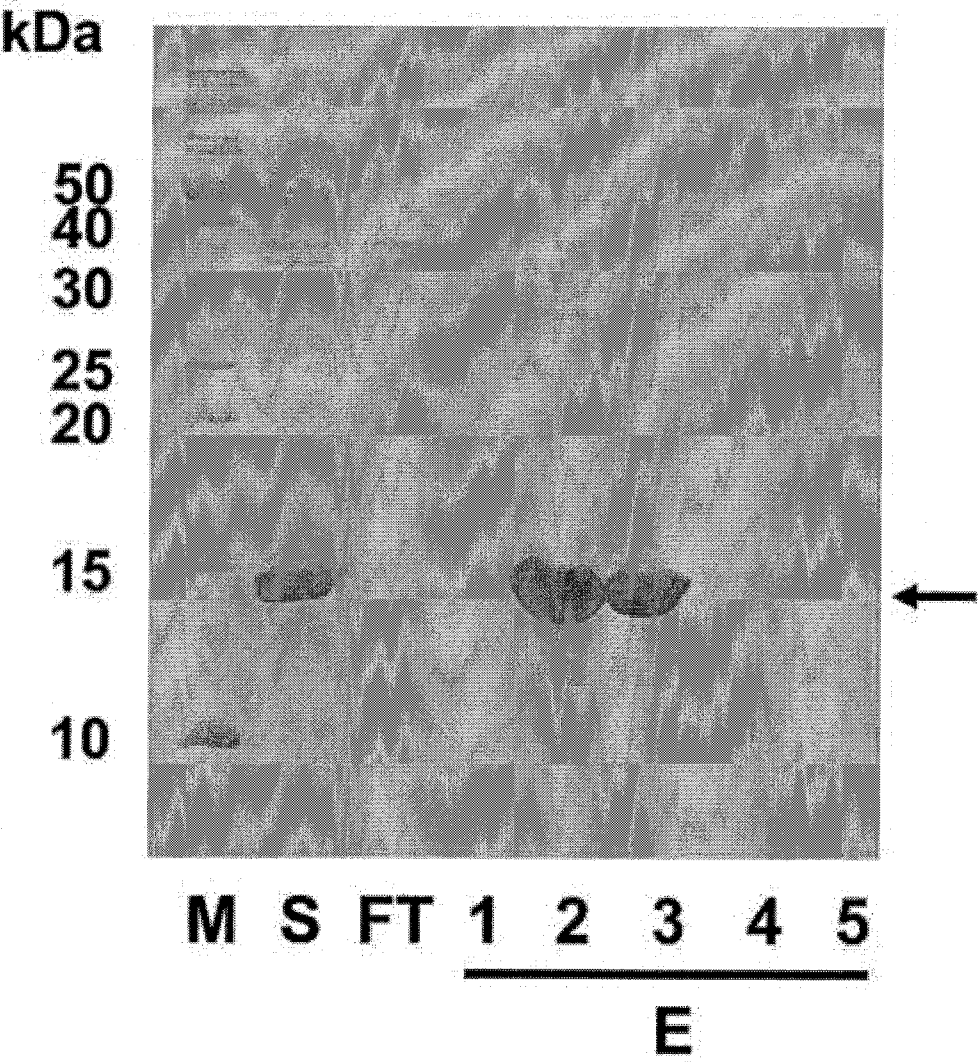


49/54
H 43

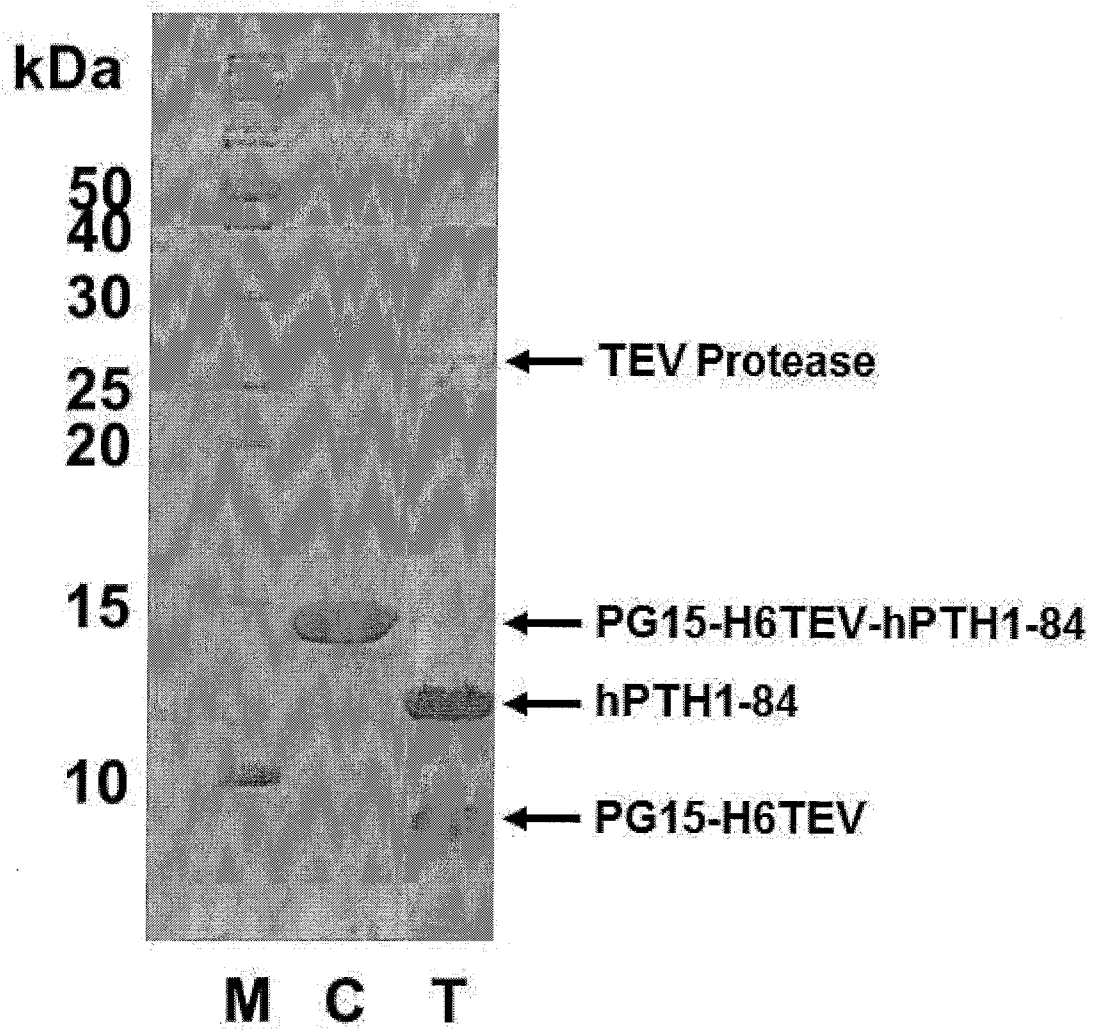




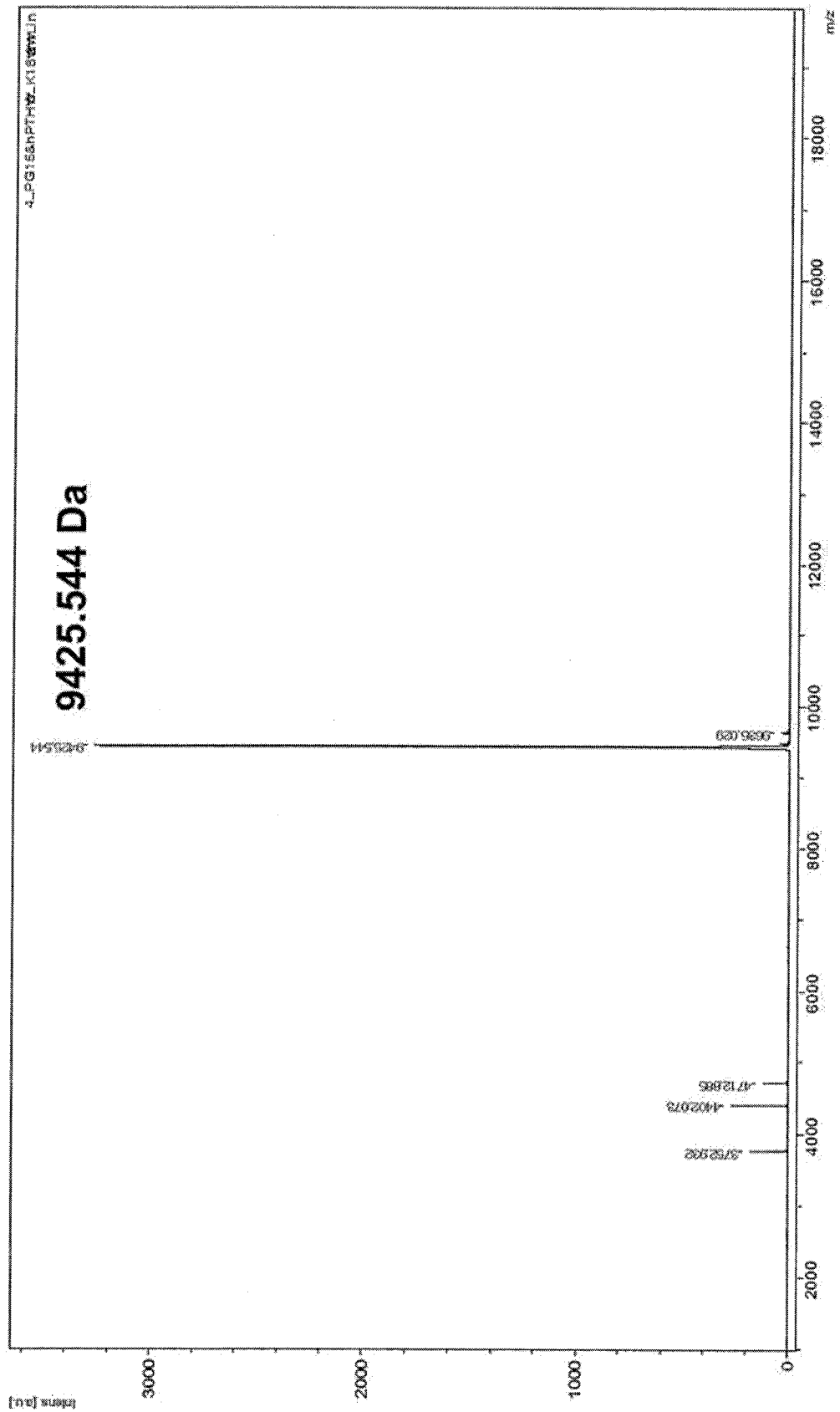
51/54
도 45

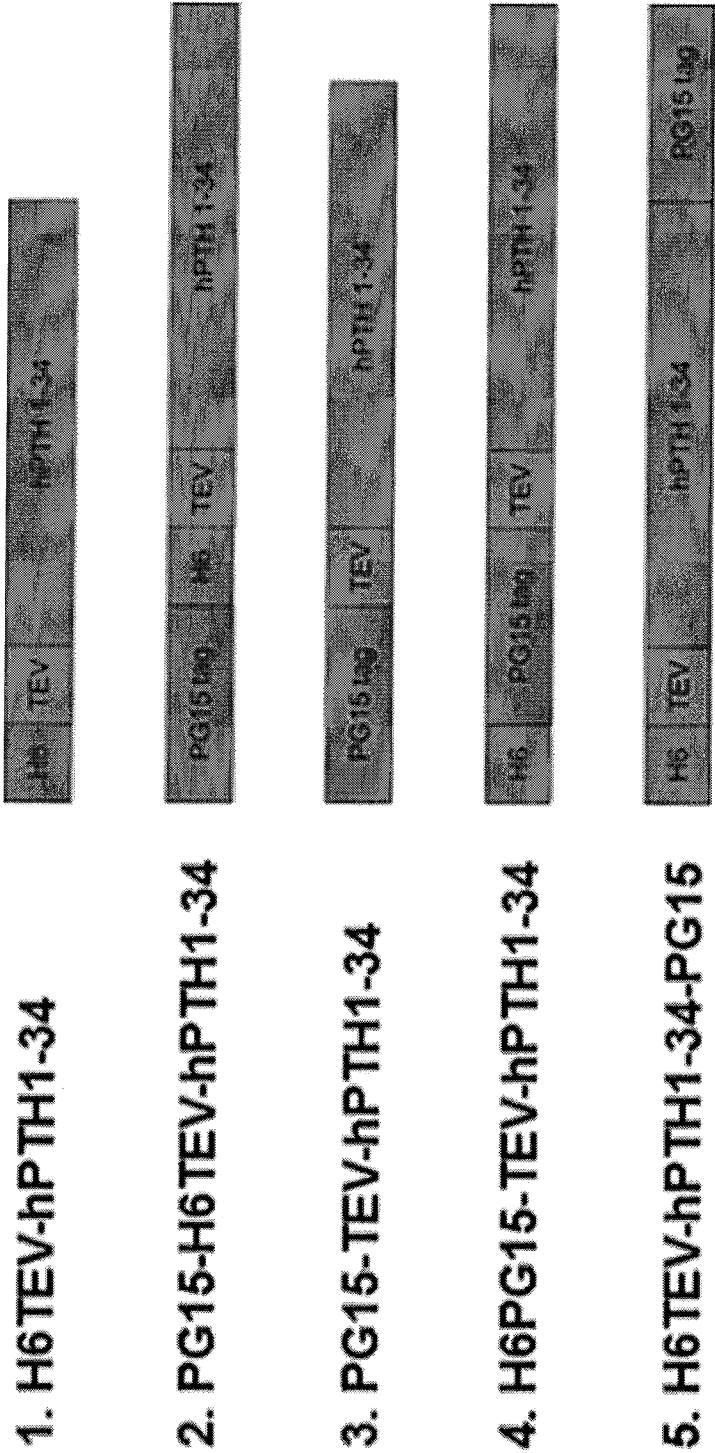


52/54
도 46



53/54
도 47





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/000782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, C07K 14/635(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/605; C07K 19/00; C07K 7/06; C07K 14/635; C07K 7/08; C07K 14/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: N-terminus fusion partner, linker, fusion polypeptide, recombination, groES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KYRATSOUS, C. A. et al. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. Gene. 2009 [electronic publication] 26 March 2009., vol. 440, pages 9-15 See abstract; pages 10-14; and figures 1, 2.	1-14,16,18-20
A		15,17
Y	ANG, D. et al. Pseudo-T-even Bacteriophage RB49 Encodes CocO, a Cochaperonin for GroEL, Which Can Substitute for Escherichia coli's GroES and Bacteriophage T4's Gp31. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2001 [electronic publication] 04 December 2000., vol. 276, no. 12, pages 8720-8726 See page 8723; figure 2.	1-14,16,18-20
Y	KR 10-2014-0069131 A (AMUNIX OPERATING INC.) 09 June 2014 See claims 1, 43-48; paragraph [0019].	11-14
Y	NCBI. Genbank Accession No. EQB77340.1. glucagon-like protein [Camelus ferus]. 19 March 2015 See all sequences.	14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 APRIL 2019 (25.04.2019)

Date of mailing of the international search report

26 APRIL 2019 (26.04.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/000782

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI. Genbank Accession No. ERE79926.1. Parathyroid hormone containing protein [Cricetulus griseus]. 22 March 2015 and Genbank Accession No. XM_006773197.2. PREDICTED: Myotis davidii parathyroid hormone-like (LOC102764295), mRNA. 09 February 2016 See all sequences.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/000782

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0069131 A	09/06/2014	AU 2012-308636 A1	2014 /03/27
		AU 2012-308636 B2	31/08/2017
		AU 2017-268558 A1	21/12/2017
		BR 112014005744 A2	28/03/2017
		CA 2848204 A1	21/03/2013
		CN 103945861 A	23/07/2014
		CN 103945861 B	05/06/2018
		DK 2755675 T3	06/08/2018
		EP 2755675 A2	23/07/2014
		EP 2755675 B1	06/06/2018
		EP 3431098 A1	23/01/2019
		ES 2687651 T3	26/10/2018
		JP 2014-526254 A	06/10/2014
		JP 2017-186374 A	12/10/2017
		JP 6206972 B2	04/10/2017
		NZ 622174 A	24/12/2015
		US 2016-0137711 A1	19/05/2016
		WO 2013-040093 A2	21/03/2013
		WO 2013-040093 A3	08/05/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/605(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, C07K 14/635(2006.01)i, C07K 7/08(2006.01)i, C07K 14/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/605; C07K 19/00; C07K 7/06; C07K 14/635; C07K 7/08; C07K 14/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: N-말단 융합파트너, 링커, 융합폴리펩타이드, 제조합, groES

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KYRATSOS, C. A. 등, 'Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in Escherichia coli', Gene, 2009 [전자공개] 2009.03.26., 제440권, 페이지 9-15 초록; 페이지 10-14; 및 도면 1,2 참조.	1-14, 16, 18-20
A		15, 17
Y	ANG, D. 등, 'Pseudo-T-even Bacteriophage RB49 Encodes CocO, a Cochaperonin for GroEL, Which Can Substitute for Escherichia coli's GroES and Bacteriophage T4's Gp31', THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001 [전자공개] 2000.12.04., 제276권, 제12호, 페이지 8720-8726 페이지 8723; 도면 2 참조.	1-14, 16, 18-20
Y	KR 10-2014-0069131 A (아뮤닉스 오퍼레이팅 인코포레이티드) 2014.06.09 청구항 1, 43-48; 단락 [0019] 참조.	11-14
Y	NCBI, Genbank Accession No.EQB77340.1, 'glucagon-like protein [Camelus ferus]', 2015.03.19 전체 서열 참조.	14

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 04월 25일 (25.04.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 04월 26일 (26.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



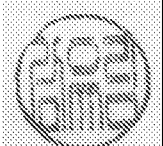
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, Genbank Accession No.ERE79926.1, `Parathyroid hormone containing prote in [Cricetulus griseus]`, 2015.03.22 및 Genbank Accession No.XM_006773197.2, `PREDICTED: Myotis davidii parathyroid hormone-like (LOC102764295), mRNA`, 2016.02.09 전체 서열 참조.	1-20

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2014-0069131 A	2014/06/09	AU 2012-308636 A1	2014/03/27
		AU 2012-308636 B2	2017/08/31
		AU 2017-268558 A1	2017/12/21
		BR 112014005744 A2	2017/03/28
		CA 2848204 A1	2013/03/21
		CN 103945861 A	2014/07/23
		CN 103945861 B	2018/06/05
		DK 2755675 T3	2018/08/06
		EP 2755675 A2	2014/07/23
		EP 2755675 B1	2018/06/06
		EP 3431098 A1	2019/01/23
		ES 2687651 T3	2018/10/26
		JP 2014-526254 A	2014/10/06
		JP 2017-186374 A	2017/10/12
		JP 6206972 B2	2017/10/04
		NZ 622174 A	2015/12/24
		US 2016-0137711 A1	2016/05/19
		WO 2013-040093 A2	2013/03/21
		WO 2013-040093 A3	2014/05/08