



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0123145
(43) 공개일자 2016년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/62 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/62 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0053313
(22) 출원일자 2015년04월15일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
최홍열
경기도 성남시 중원구 산성대로452번길 8-1 (금광동)
김동일
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 1302호 (송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

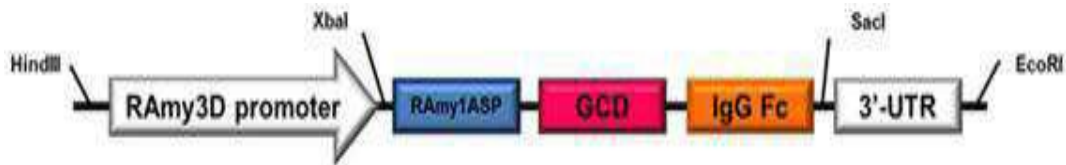
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인간 I g G F c 절편을 융합한 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 이의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오타이드 및 이를 이용한 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편 융합 단백질을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc를 융합하여 식물 발현 시스템에서 인간 베타-글루코세레브로시다제의 대량생산을 가능하게 하므로, 융합 단백질의 정성, 정량적 분석을 용이하게 하고 이의 혈중 반감기를 향상시킬 수 있어 개선된 인간 베타-글루코세레브로시다제의 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8257 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 302/01045 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

남형진

인천광역시 남구 재념이길 147-21, 201동 204호 (용현동)

(72) 발명자

강승훈

경기도 안산시 단원구 능안로 107 (신길동) 보령제약 중앙연구소

권준영

인천광역시 부평구 안남로 272, 107동 1702호 (청천동, 금호아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2013M3A9B6075887
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	차세대응용오믹스사업
연구과제명	글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.20 ~ 2018.11.19이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	10051171
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업핵심기술개발사업
연구과제명	식물발현계로부터 희귀질환 바이오베타 생산
기 여 율	1/2
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2015.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase) 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 분비 신호 서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)는 서열번호 2인 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 5

제4항의 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포.

청구항 6

제5항에 있어서 상기 식물은 담배, 벼, 밀, 보리, 감자, 토마토, 상추, 옥수수 및 애기장대로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 식물인 것을 특징으로 하는, 식물 형질전환세포.

청구항 7

- 1) 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase) 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 1)단계의 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 2)단계의 식물 형질전환세포로부터 인간 IgG Fc 절편이 융합된 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)를 얻는 단계;를 포함하는 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)의 대량 생산 방법.

청구항 8

제7항의 방법으로 생산된 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase) 및 인간 IgG Fc 융합 재조합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서 상기 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)의 N 말단에 단백질 분비 신호 서열의 C 말단이 융합되고 C 말단에는 IgG Fc 절편의 N말단이 융합된 것을 특징으로 하는, 재조합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드 및, 이를 이용한 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편 융합 단백질을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리소좀 축적 질환(lysosomal storage disorder)은 리소좀효소의 유전적 이상으로 인해 분해되지 않고 남은 기질이 리소좀내에 축적되어 세포기능에 장애가 일어나는 질환의 총칭이다. 리소좀 축적 질환의 치료는 효소대체치료법으로 이루어지고 있다. 효소대체치료법이란 리소좀 축적 질환 환자에게 결핍된 특정한 효소를 in vitro 상에서 합성된 기능성 효소로 대체시키는 치료법을 말한다. 이러한 질환은 유아기 때 치료를 받을수록 치료 효과가 좋다고 알려져 있다. 현재 효소 대체 치료가 가능한 리소좀 축적 질환에는 고셔병(Gaucher disease), 파브리병(Fabry disease), 폼페병(Pompe disease), 뮤코다당체침착병(Mucopolysaccharidosis, MPS) 1형, 2형, 6형이 있다. 이들 중 고셔병은 리소좀 효소인 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase)의 결핍을 특징으로 한다.

[0003] 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase)는 글루코스핑고지질 글루코세레브로시다(글루코실세라미드, GlcCer)를 가수분해하여 글루코스와 세라미드를 생산하는 막 결합 리소좀 효소로서, 열성 유전자 장애(염색체 1의 q21-q31)에 의해 결핍이 야기된다. 따라서 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase)를 재조합 기술에 의해 대량 생산할 수 있다면 고셔병의 효소대체치료제로서 사용될 가능성이 있다. 상업적인 면에서는 E.coli 등과 같은 원핵 세포나 효모와 같은 저비용의 진핵 세포에서 생산하는 것이 바람직하나 이 경우 비-글리코실화되거나 당패턴이 변화된 rGCR이 유도된다는 점이 한계로 작용해 왔다. 따라서 여전히 글루코세레브로시다제를 대량으로 얻을 수 있는 새로운 기술에 대한 필요성이 있다.

[0004] 과거 15년 내지 20년 동안 미생물 및 동물세포 배양에 집중적인 연구가 수행되어왔으나, 현재는 식물세포 배양을 이용하여 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 발현시스템이 연구되고 있다. 의약품, 기능성 단백질, 산업용 효소 및 기능성 2차 대사산물의 생산을 위한 형질전환 식물 또는 식물 세포 배양의 이용은 최근 분자 농업(molecular farming)이라고 불리고 있다.

[0005] 식물세포 배양은 동물세포 배양 및 미생물과 비교하였을 때 여러 가지 장점을 가지고 있다. 미생물과 비교하면, 식물 세포는 진핵 세포이기 때문에 거의 모든 번역 후 변형(post-translational modification)을 수행할 수 있고 생산된 재조합 단백질의 생물학적 활성을 천연형과 유사하게 유지시킬 수 있다. 동물 세포 시스템에 비해 특히 뛰어난 점은 오염 위험성이 없다는 점이며, 이는 식물 세포가 어떠한 인간 병원균도 갖지 않기 때문이다. 또한 식물세포의 배지나 배양조건이 동물세포에 비해 간단하고 저렴하다. 따라서 식물세포배양으로 생산되는 단백질은 원핵세포 시스템 또는 동물세포 시스템에 비하여 안전하고, 특히 사람의 질병치료에 사용되는 단백질의 생산에 있어서는 더욱 안전함이 입증되었다(Doran, 2000. Curr. Opin. Biotech. 11:199-204).

[0006] 식물세포 배양에 이러한 장점이 있는 반면, 식물 현탁 세포 배양을 이용하여 외래 단백질을 식물세포 밖으로 분비시켜 생산하는 경우 일반적으로 식물세포 밖으로 분비되어 생산되는 재조합 단백질의 수율은 총 세포외분비 단백질의 0.05-0.5 %에 불과하다(James et al., 2000, Protein Expr. Purif. 19:131-138). 이러한 낮은 생산수율은 일반적으로 식물세포 밖으로 배출된 단백질이 배지 내의 pH, 염분농도 등과 같은 물리적인 요인에 의하여 변성이 일어나거나 단백질불해효소에 의하여 분해되어 단백질의 활성이 떨어지기 때문이라고 알려져 있다. 따라서 이러한 문제점을 극복하여 재조합 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 식물 세포 배양 방법에 대한 연구가 필요한 실정이며, 글루코세레브로시다제를 식물 세포에서 효과적으로 대량 생산 및 수득하기 위한 배양방법에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 단백질 분비 신호 서열, 인간 IgG Fc 절편 및 인간 베타-글루코세레브로시다제를 융합하고 이를 식물 발현 시스템에서 발현시키는 경우, 인간 IgG-Fc 절편이 융합된 인간 베타-글루코세레브로시다제를 대량으로 생산할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포, 상기 식물 형질전환세포에서 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 융합 단백질을 만드는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 생산된 재조합 융합 단백질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은
- [0015] 1) 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase) 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0016] 2) 상기 1)단계의 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및
- [0017] 3) 상기 2)단계의 식물 형질전환세포로부터 인간 IgG Fc 절편이 융합된 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)를 얻는 단계;를 포함하는 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase)의 대량 생산 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc 융합 재조합 단백질을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제 및 인간 IgG Fc를 융합하여 식물 발현 시스템에서 인간 베타-글루코세레브로시다제의 대량생산을 가능하게 하므로, 융합 단백질의 정성, 정량적 분석을 용이하게 하고 이의 혈중 반감기를 향상시킬 수 있어 개선된 인간 베타-글루코세레브로시다제의 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 단백질 분비 신호 서열 (RAmy1ASP), 인간 베타-글루코세레브로시다제(GCD) 및 인간 IgG Fc 절편의 융합 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 구조를 나타낸 도이다.
- 도 2는 상기 도 1의 발현 벡터의 백본(backbone)을 나타낸 도이다.
- 도 3은 융합 폴리뉴클레오티드가 발현벡터에 도입되었는지 여부 및 상기 발현벡터가 아그로박테리아에 도입되었

는지 여부를 PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다(13-1 : 세포주).

도 4는 형질전환된 세포주에서 얻어진 총 단백질량과 목적 단백질량을 정량 분석한 결과를 나타낸 도이다(13_2, 13_4, 13_5, 13_6, 13_7, 13_8, 13_12, 13_14, 13_20, 13_22, 13_25 : 세포주).

도 5는 도 4의 결과로부터 선별한 7개의 세포주에서 재조합 단백질의 용적 생산성(volumetric productivity)을 측정된 결과를 나타낸 도이다(13-5, 13-6, 13-7, 13-8, 13-12, 13-14, 13-20 : 세포주).

도 6은 형질전환 벼 세포 배양을 통하여 인간 IgG Fc 절편 및 인간 베타-글루코세레브로시다제가 융합된 재조합 단백질을 생산하는 전체 과정을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β -glucocerebrosidase; 이하 'GCD'라 한다) 및 인간 IgG Fc 절편(human IgG Fc fragment)이 융합된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0022] 상기 융합 폴리뉴클레오티드는 인간 IgG Fc 절편 및 단백질 분비 신호 서열이 융합되어 식물세포에서 재조합 단백질을 대량 생산을 가능하게 한다.
- [0023] 본 발명의 “단백질 분비 신호 서열”은 재조합 단백질이 세포 밖으로 분비되게 하는 신호 서열이다. 이와 같은 신호 서열에 의하여 상기 재조합 단백질은 발현된 후 세포 밖으로 분비되므로, 세포를 파열하는 과정 없이 효율적으로 정제할 수 있으며 재조합 단백질을 코딩하는 유전자의 앞쪽에 위치할 수 있다. 상기 단백질 분비 신호 서열은 서열번호 1로 기재되는 서열인 Rice α -amylase 1A (RAmy1A)의 신호 펩티드(signal peptide) 유전자 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에서 “GCD”는 글루코스핑고지질 글루코세레브로시다(글루코실세라미드, GlcCer)를 가수분해하여 글루코스과 세라미드를 생산하는 막 결합 리소좀 효소이다. 본 발명의 GCD 서열은 서열번호 2로 기재되는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 인간 IgG Fc 절편에서 “Fc 절편”은 항체 분자의 기능적인 단편 중 하나이며, 상기 인간 IgG Fc 절편을 코딩하는 유전자는 당 업계에서 공지된 서열을 사용할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 단백질 분비 신호 서열, GCD 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 벡터는 목적인 코딩 서열과 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는 데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서(enhancer), 종결신호 및 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 신호는 공지되어 있다.
- [0028] 상기 벡터는 프로모터, 3' UTR(untranslated region)을 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 프로모터는 숙주에 천연, 동종, 외래 또는 이종일 수 있다. 외래는 전사 개시 영역이 도입되는 야생형 숙주에서는 발견되지 않는 전사 개시 영역을 의미한다. 프로모터는 원하는 결과에 따라 선택할 수 있으며 당업계에 공지된 적합한 식물 프로모터를 사용할 수 있다. 상기 식물 프로모터는, 콜리 플라워 모자이크 바이러스(Cauliflower Mosaic Virus)의 35S 프로모터, 오픈 신테타제(opine synthetase) 프로모터(nos, mas, ocs 등), 유비퀴틴 프로모터, 액틴 프로모터, 리불로스 바이포스페이트(RubP) 카르복실라제 소형 서브유닛 프로모터, 및 알코올 데하이드로게나제 프로모터, 다센 모자이크 바이러스(Dasheen mosaic virus), 콜레라 바이러스(예 ; 콜레라 바이러스 아데닌 메틸트랜스퍼라제 프로모터; Mitra et al., 1994, Plant Mol. Biol. 26:85), 토마토 스팟 윌트 바이러스(tomato spotted wilt virus), 담배 래틀 바이러스(tobacco rattle virus), 담배 피사 바이러스, 담배 링 스팟 바이러스(tobacco ring spot virus), 토마토 링 스팟 바이러스, 오이 모자이크 바이러스, 땅콩 스템프 바이러스(peanut stump virus), 알팔파 모자이크 바이러스, 사탕수수 바실리형 베드나바이러스(sugarcane bacilliform badnavirus) 및 벼의 알파-아밀라아제 3D(Rice α -amylase 3D; RAmy3D) 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 벼의 알파-아밀라아제 3D(Rice α -amylase 3D; RAmy3D) 프로모터일 수 있다. 상기 알파-아밀라아제는 벼의 알파-아밀라아제 3D, 벼의 알파-아밀라아제 3E 또는 벼의 알파-아

밀라아제 1A일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서 3' UTR 부위는 mRNA 상에서 정지코돈 이후에 단백질로 번역되지 않는 mRNA 영역을 의미한다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제공한다.

[0032] 본 발명에서 식물 형질전환세포의 제조에 이용되는 식물은 쌍자엽 또는 단자엽 식물에 상관없이 어떤 식물도 가능하나, 바람직하게는 담배, 벼, 밀, 보리, 감자, 토마토, 상추, 옥수수 및 애기장대로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 식물일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 식물 형질전환세포의 제조에 이용되는 식물세포는 어떤 식물세포도 가능하나, 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물을 포함할 수 있으며 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관이며, 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 식물 형질전환세포에서 GCD 및 인간 IgG Fc 융합 단백질의 대량 생산 방법을 제공한다.

[0035] 상기 대량 생산 방법은

[0036] 1) 단백질 분비 신호 서열, GCD 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

[0037] 2) 상기 1)단계의 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및

[0038] 3) 상기 2)단계의 식물 형질전환세포로부터 인간 IgG Fc 절편이 융합된 GCD를 얻는 단계; 를 포함한다.

[0039] 본 발명의 대량 생산 방법을 이용하면, 단백질 분비 신호 서열에 의해 분비가 촉진되고 식물 세포 배양 시스템을 이용함에도 불구하고 인간 IgG Fc 절편 및 GCD가 융합된 재조합 단백질의 대량 생산 가능 및 정제를 용이하게 할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 재조합 융합 단백질을 제공한다.

[0041] 상기 재조합 융합 단백질은 GCD와 인간 IgG Fc 절편이 융합된 단백질이다. 상기 재조합 단백질은 통상의 현탁 세포에서 발현된 재조합 단백질을 정제방법으로 정제하여 수득할 수 있으며, 재조합 단백질의 종류에 따라 정제방법을 달리하여 수득할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 대량 생산된 재조합 단백질은 리소솜 축적 질환의 효소대체치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0043] 상기 재조합 단백질은 GCD의 N 말단에 단백질 분비 신호 서열의 C 말단이 융합되고 C 말단에는 IgG Fc 절편의 N 말단이 융합된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1 - 융합 단백질 발현을 위한 벡터의 구축

[0047] 단백질 분비 신호 서열, GCD 및 인간 IgG Fc 절편의 융합 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며 이의 구조를 도 1에 간략하게 나타내었다. 발현 벡터의 백본으로는 pMYN409 벡터를 이용하였으며 이를 도 2에 나타내었다. pMYN409 벡터는 당고갈에 의해 유도되는 유도성 프로모터이다.

[0048] 보다 구체적으로, GCD 유전자의 N 말단 부분에는 Rice α -amylase 1A(RAmy1A)의 신호 서열 유전자를 넣어 단백질의 세포의 분비가 촉진되도록 하였으며, C 말단 부분에는 인간 IgG Fc 절편의 유전자를 overlapping PCR 기법을 이용해서 연결하여 식물 발현 벡터를 구축하였다. 인간 IgG Fc 절편의 융합은 GCD의 정제 및 분석을 용이하게

게 하고 GCD의 혈중 반감기 및 안정성을 높이하고자 하는 목적으로 실시하였다. 상기 식물 발현 벡터를 이후 실험에 사용하였다.

[0049] 클로닝에 사용된 프라이머는 하기의 표 1과 같다.

표 1

이름	특징	프라이머 서열 (5'→3')	길이 (mer)	Tm (°C)
RGF1	RA1ASP1→	TCTAGAATGCAGGTGCTGAAC	21	56.6
RGF2	←RA1ASP1-GFP	CTCTCGTCGCTCTCCATCCCCGGCTGTCAAGTTGGAG	36	82.1
RGF3	RA1ASP1-GFP→	CTCCAACCTTGACAGCCGGGATGGAGAGCGACGAGAG	36	82.1
RGF4	←GFP	GAGCTCTTAAACTCTTTCTTCACC	24	55.9

[0050]

[0051] 실시예 2 - 재조합 식물 형질전환세포의 제조 및 현탁배양

[0052] 2.1 재조합 식물 형질전환세포의 제조 및 선별

벼(*Oryza sativa* L. cv Dongjin)의 씨를 70% 에탄올과 2% 락스로 처리한 후 캘러스 유도배지에 치상을 하였다. 단백질 분비 신호 서열, GCD 및 인간 IgG Fc 절편이 융합된 폴리뉴클레오티드로 형질전환 되어있는 아그로박테리움 투머파시엔스(*agrobacterium tumefaciens*)를 캘러스와 함께 공동배양을 하여 캘러스 형질전환을 하였고 이를 통해 재조합 식물 형질 전환 세포를 제조하였다. 융합된 폴리뉴클레오티드가 도입되었는지 PCR 기법으로 확인하였으며 이를 도 3에 나타내었다.

[0054] 융합 유전자의 도입을 확인하기 위하여 캘러스를 2,4-디클로로페녹시아세트산(2 mg/ℓ), 수크로오스(30 g/ℓ), MES(0.5 g/ℓ), L-프롤린(0.5 g/ℓ), L-글루타민(0.5 g/ℓ), 카사미노산(casamino acid) (0.3 g/ℓ), 마이오-이노시톨(myo-inositol) (0.01 g/ℓ), 하이그로마이신 B (40 mg/ℓ)가 첨가된 N6 배지에 옮겨 배양하였다. 이후, 하이그로마이신에 저항성이 있는 캘러스를 골라내는 방법으로 단백질 분비 신호 서열, GCD 및 IgG Fc 절편이 융합된 폴리펩티드가 도입된 캘러스를 선별하였다.

[0055] 2.2 현탁배양

[0056] 상기 실시예 2.1에서 얻은 형질전환 벼 세포의 생장 및 유지를 위해 N6 배지(Duchefa)를 사용하였다. 여기에 탄소원으로 30 g/ℓ 수크로오스, 생장조절제로 2.0 mg/ℓ 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-D), 0.2 mg/ℓ 키네티(kinetin), 0.1 mg/ℓ 지베렐린 산(gibberellic acid)을 첨가하였고, MES (0.5 g/ℓ), L-프롤린(0.5 g/ℓ), L-글루타민(0.5 g/ℓ), 카사미노산(casamino acid) (0.3 g/ℓ), 마이오-이노시톨(myo-inositol) (0.01 g/ℓ)를 첨가한 후 배지의 pH는 5.8로 조절하였다. 준비된 배지를 500ml Erlenmeyer 플라스크에 분주하여 121℃, 1기압에서 고압증기멸균하였다. 40 mg/ℓ 하이그로마이신을 0.22 μm 멤브레인 필터(Millipore, USA)로 여과 멸균하였다. N6 배지에 현탁된 벼 세포는 shaking incubator에서 28℃, 120 rpm, 암조건에서 배양하였고, 계대배양은 9일 간격으로 실시하여 식물 형질전환세포를 배양하였다.

[0057] 실시예 3 - 인간 베타-글루코세레브로시다제(human β-glucocerebrosidase) 및 인간 IgG Fc 융합 재조합 단백질의 분석

[0058] 상기 실시예 2.2에서 얻은 배양액에서 하이그로마이신 B에 내성이 있는 캘러스를 선별하여 수크로오스가 없는 N6 배지에 7일간 치상한 뒤 회수하였다. 액화질을 이용하여 세포를 파쇄하고 프로테아제 억제인자가 포함된 PBS 배지에 재현탁한 후 원심분리를 통해 상등액만 회수하였다. GCD 및 인간 IgG Fc 융합 재조합 단백질의 정량 분석을 위하여 총 단백질량은 Bradford 분석법을, 목적 단백질량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 분석법을 사용하였다. Sandwich ELISA를 수행하기 위하여 1차 항원(primary antibody)으로는 Goat anti-human IgG (Fc) (KPL, USA)를 사용하였고, 2차 항원(secondary antibody)으로는 peroxidase-labeled goat anti-human IgG(KPL, USA)를 사용하였다. 기질은 ABTS peroxidase substrate(KPL, USA)로 사용하였고, 발색정도를 405 nm

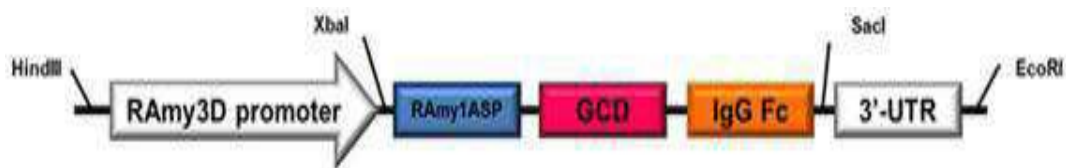
에서의 흡광도로 측정하였다. 표준물질로는 ImmunoPure® human IgG(Pierce, USA)를 사용하였다.

[0059] 상기의 방법으로 여러 세포주에서 재조합 단백질의 정량 분석하여 총 단백질량 대비 목적 단백질량이 높은 세포주를 선별하였으며 그 결과를 도 4에 나타내었다. 또한 선정된 7가지 세포주의 용적 생산성(volumetric productivity)을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

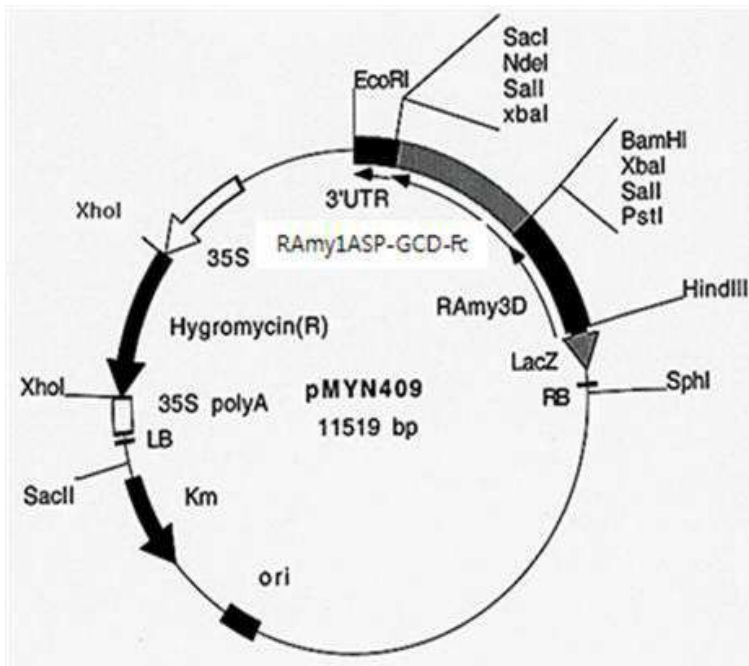
[0060] 도 4 및 5에서 나타나는 바와 같이 식물 세포 배양 방법을 사용하였음에도 불구하고 단백질 분비 신호 서열 및 인간 IgG Fc 절편을 융합함으로써 GCD - 인간 IgG Fc 융합 재조합 단백질을 대량 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한 인간 IgG Fc 절편을 융합으로 인해 목적 단백질의 정량, 정성 분석이 용이해짐을 확인하였다.

도면

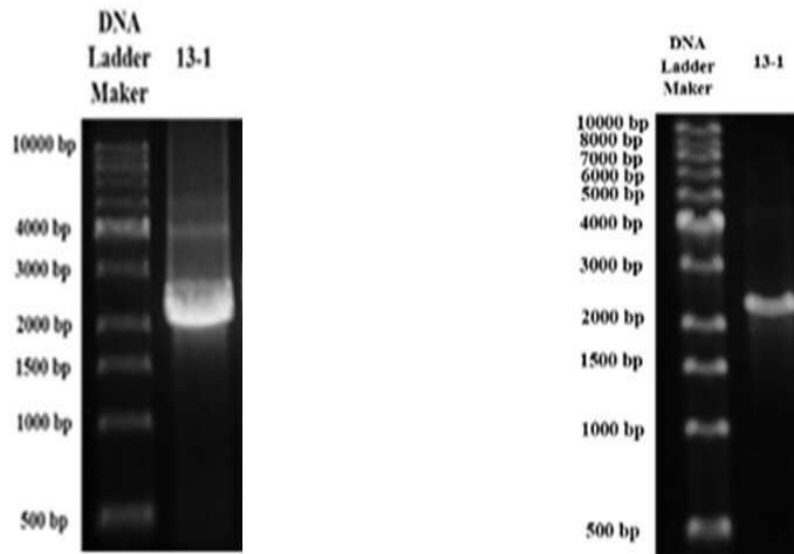
도면1



도면2



도면3



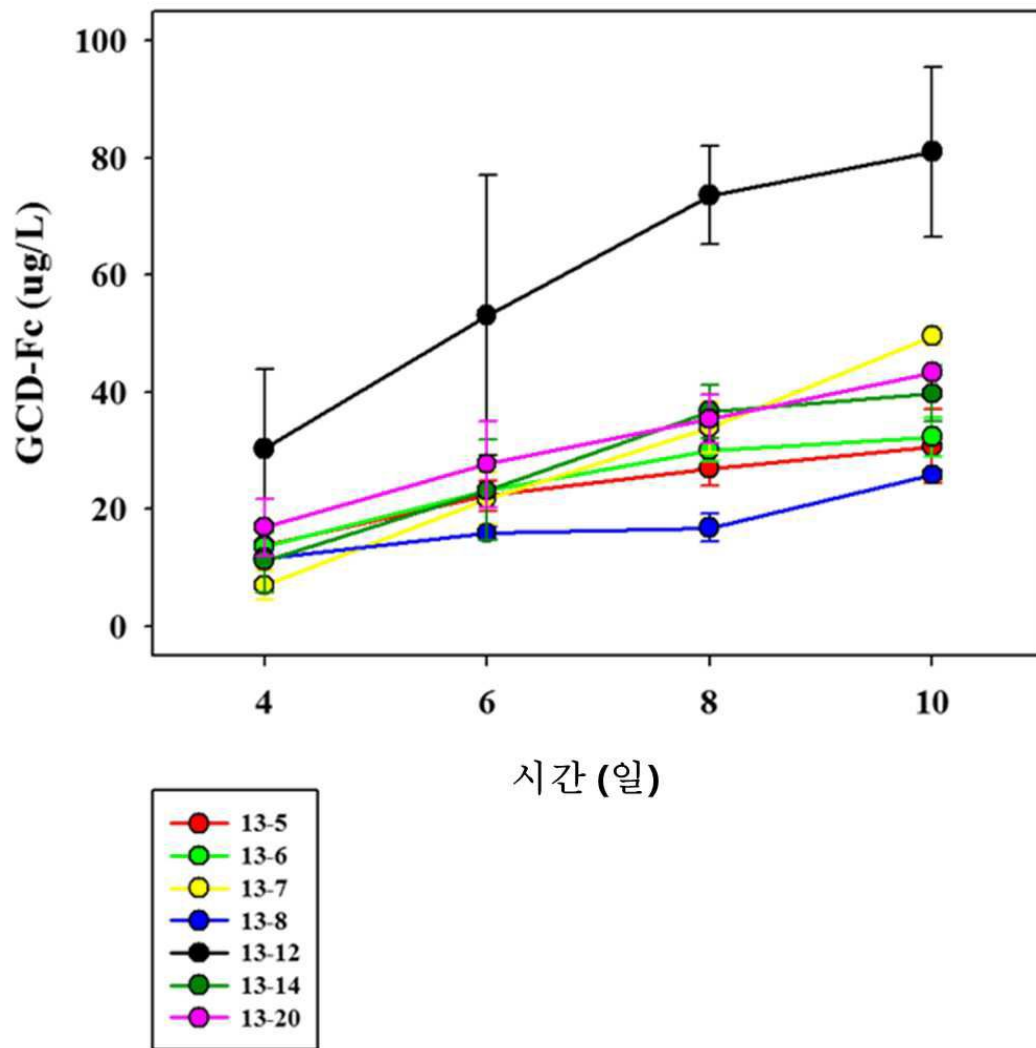
융합 폴리뉴클레오티드가 발현벡터에 도입되었는지 확인한 결과

발현벡터가 아그로박테리아에 도입되었는지 확인한 결과

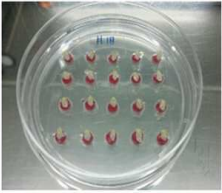
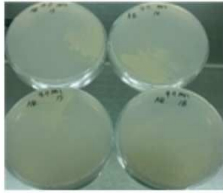
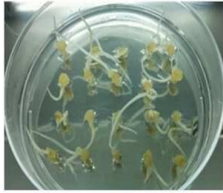
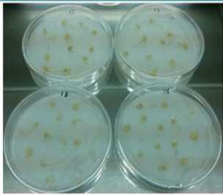
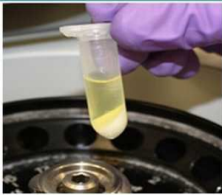
도면4

RAmy1ASP-GCD-Fc		
세포주	총 단백질 (ug/ml)	목적 단백질 (ng/ml)
13_5	549.71	123.68
13_6	666.47	112.26
13_7	763.30	547.08
13_8	549.71	123.68
13_12	1062.33	121.36
13_14	794.63	111.45
13_20	652.23	754.12
13_2	638.00	78.12
13_4	489.91	61.66
13_22	504.14	48.76
13_25	754.76	75.04

도면5



도면6

발아	<i>Agrobacterium</i> 배양	캘러스	<i>Agrobacterium</i> -매개 형질전환
			
공동 배양	캘러스 선별 & 계대배양	단백질 발현	벼 세포에서 추출한 단백질 (ELISA & Bradford assay)
			

서열 목록

<110>	INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE	
<120>	Human IgG Fc-fusion human beta-glucocerebrosidase and preparation thereof	
<130>	1_155P	
<160>	2	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	93	
<212>	DNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	1	
	atgcaggtgc tgaacacccat ggtgaacaaa cacttcttgt ccttttcggt cctcatcgtc	60
	ctccttggcc tctcctccaa cttgacagcc ggg	93
<210>	2	
<211>	2193	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	gccccgccct gcatccctaa aagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgtgt ctgcaatgcc	60

acatactgtg actcctttga cccccgacc ttctctgccc ttggtacctt cagccgctat	120
gagagtacac gcagtgggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatac	180
acgggcacag gcctgtact gacctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga	240
tttggagggg ccatgacaga tgctgtgtct ctcaacatcc ttgcctgtc acccctgcc	300
caaaatttgc tacttaaatc gtactttctt gaagaaggaa tcggatataa catcatccgg	360
gtacccatgg ccagctgtga cttctccatc cgcacctaca cctatgcaga caccctgat	420
gatttccagt tgcacaactt cagcctccca gaggaagata ccaagctcaa gataccctg	480
attcaccgag cctgtcagtt ggcccagcgt ccggtttcac tcttggcag cccctggaca	540
tcacccactt ggcctcaagac caatggagcg gtgaatggga aggggtcact caaggacag	600
cccggagaca tctaccacca gacctgggcc agatactttg tgaagttcct ggatgcctat	660
gctgagcaca agttacagtt ctgggcagtg acagctgaaa atgagccttc tgctgggctg	720
ttgagtggat accccttcca gtgcctgggc ttcaccctg aacatcagcg agacttcatt	780
gcccgtgacc taggtcctac cctcgccaac agtactcacc acaatgtccg cctactcatg	840
ctggatgacc aacgcttgct gctgccccac tgggcaaagg tggactgac agaccagaa	900
gcagctaaat atgttcatgg cattgtgtga catttggtacc tggactttct ggctccagcc	960
aaagccacc taggggagac acaccgctg tcccccaaca ccatgtcttt tgcctcagag	1020
gcctgtgtgg gctccaagtt ctgggagcag agtgtgcggc taggtcctg ggategaggg	1080
atgcagtaca gccacagcat catcacgaac ctctgtacc atgtggtcgg ctggaccgac	1140
tggaaccttg cctgaaccc cgaaggagga cccaattggg tgcgtaaatt tgtcgacagt	1200
cccatcattg tagacatcac caaggacacg ttttacaac agcccatgtt ctaccacctt	1260
ggccacttca gcaagttcat tctgagggc tcccagagag tggggtggt tgccagtacg	1320
aagaacgacc tggacgcagt ggcactgatg catcccgatg gctctgctgt tgtggtcgtg	1380
ctaaaccgct cctctaagga tgtgcctctt accatcaagg atcctgctgt gggttctctg	1440
gagacaatct cacctggcta ctccattcac acctacctgt ggcatcgcca ggcagagccc	1500
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca cgtgcccag cacctgaact cctgggggga	1560
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct	1620
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	1680
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	1740
agcacgtacc ggggtgtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	1800
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1860
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	1920

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1980
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	2040
ctggactcgg acggctcctc cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	2100
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	2160
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	2193