



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0006285
(43) 공개일자 2014년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/61 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0071753
(22) 출원일자 2012년07월02일
심사청구일자 2012년07월02일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
최한석
서울특별시 송파구 풍납동 현대훼미리타운 B동 901호
송정아
서울특별시 송파구 문정로 83 (문정동, 문정래미안아파트) 103동 1103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

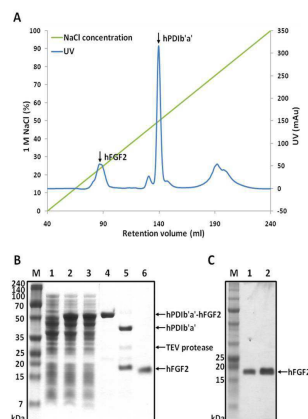
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 인간 PDIB' a' 도메인을 이용한 인간 FGF2 재조합 단백질의 대장균 내 발현 및 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 PDIB' a' 도메인을 이용한 인간 FGF2 재조합 단백질의 대장균 내 발현 및 정제방법에 관한 것으로, 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 또는 hPDIB' a' 도메인 유전자 중 어느 하나의 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장 인자 2(human fibroblast growth factor; hFGF2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다. 또한 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하며, 상기 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2)을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

구본경

서울특별시 송파구 토성로3길 12, 201동 201호(풍
납동, 칼라하우스)

유한봉

서울특별시 동작구 사당로8길 30 (사당동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100029522

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업기초의학분야(MRC)

연구과제명 인간지방줄기세포 이용 역분화 만능 줄기세포 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 또는 hPDIB 'a' 도메인 유전자 중 어느 하나의 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장 인자 2(human fibroblast growth factor; hFGF2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 hFGF2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 2이고, 상기 hPDIB 'a' 도메인 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 도 1a (e)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제 1 항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 대장균은 BL21(DE3)인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제 5 항에 따른 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 hPDI 태그- 또는 hPDIB 'a' 도메인 태그-hFGF2 재조합 단백질을 발현시키는 단계;

담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질분해효소(protease)를 처리하여 상기 hPDI 태그 또는 hPDIB 'a' 도메인 태그를 제거하는 단계; 및

상기 hPDI 태그 또는 hPDIB 'a' 도메인 태그가 제거된 hFGF2 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2) 생산방법.

청구항 9

제 8 항에 따른 생산방법에 의해 생산된 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2).

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 PDIB 'a' 도메인을 이용한 인간 FGF2 재조합 단백질의 대장균 내 발현 및 정제방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 섬유아세포 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2; FGF2)는 23개의 FGF 구성원으로 이루어진 커다란 섬유아

세포 성장 인자들 패밀리의 하나로서, 중추신경계 내의 FGF 구성원 중 가장 풍부하다(J Comp Neurol 379(2)(1997) 226-46, Neuroscientist 16(4) (2010) 357-73). 이는 다양한 세포 형태에 있어서, 증식, 분화, 발달 및 생존의 조절 매개체로서 중요한 역할을 하고(Int J Dev Biol 40(1) (1996) 403-10, Endocr Rev 18(1) (1997) 26-45), 신경계에서 분열 촉진 활성(mitogenic activity)을 가진다(Int J Dev Biol 40(1) (1996) 403-10). 또한, FGF2는 잠재적인 혈관형성(angiogenic) 효과, 평활근 세포(smooth muscle cells)의 성장 촉진, 상처 치유 및 조직 회복과 더불어(Endocr Rev 18(1) (1997) 26-45), 인간 및 마우스 배아줄기(embryonic stem; ES) 세포의 다분화능(pluripotent) 상태를 유지하는 것으로 보고되었다(Dev Biol 227(2) (2000) 271-8). 따라서 FGF2는 상업적 중요성을 가진 잠재적인 치료제로서 기대된다(J Cardiovasc Pharmacol 21 Suppl 1 (1993) S31-49).

[0003] FGF2에 대한 치료제로서의 잠재성 때문에, 높은 생산성을 가진 인간 FGF2(human FGF2; hFGF2)를 분리하기 위한 시도가 있었다. 소의 여러 장기들에서 분리되었으나, 매우 낮은 단백질 양에 비해 높은 비용이 소요되었다. 이는 수용성 형태로서 원핵세포 시스템에서 발현되었고, 결합 파트너 없이 크로마토그래피를 사용하여 분리되었다. 재조합 hFGF2(recombinant hFGF2; rhFGF2)는 다양한 발현벡터에서 만들어졌고, 양이온 교환 크로마토그래피 및/또는 해파린 친화 크로마토그래피의 조합에 의해 낮은 수율로 분리되었다(J Biol Chem 263(31) (1988) 16297-302, Methods Enzymol 198 (1991) 96-116, Biochim Biophys Acta 1131(3) (1992) 307-10, J Chromatogr A 746(1) (1996) 17-24), J Chromatogr B Biomed Sci Appl 737(1-2) (2000) 25-38, Acta Pharmacol Sin 23(9) (2002) 782-6, Protein Expr Purif 27(2) (2003) 267-71). 대장균에서 봉입체(inclusion body)로서 발현된 hFGF2의 재접힘(refolding)에 대한 연구가 수년간 수행되었다(Growth Factors 18(4) (2001) 261-75, Biotechnol Res Int (2011) 973741). 봉입체로서 표적 단백질의 발현은 수용성 형태보다 보통 더 높은 생산 수율을 가진다(Curr Opin Biotechnol 12(2) (2001) 202-7). 그러나 그 재접힘 과정은 비효율적일 뿐만 아니라 생물학적 활성을 가지는 적절한 단백질 접힘이 일정하게 일어나지 않는다. 재접힘 방법은 분리 과정에서 표적 단백질의 응집 또는 잘못 접힘(misfolding)이 빈번히 일어나는 단점을 가진다. 이러한 결점을 보완하기 위해서, 대장균에서 수용성 형태로서 His6, 말토스 결합 단백질(maltose binding protein; MBP), 글루타치온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase; GST) 또는 티오레독신(thioredoxin; Trx)과 같은 다양한 결합 시스템과 함께 재조합 hFGF2를 분리하는 방법이 보고되었으나(Biochim Biophys Acta 1250(1) (1995) 29-34, Biochimie 77(3) (1995) 162-6, Protein Expr Purif 27(2) (2003) 267-71, Biochemistry (Mosc) 74(2) (2009) 221-5), 그 생산성 및 효율성은 여전히 주목할 만하지는 않다.

[0004] 한편 한국특허출원 제 10-2008-7020664호는 FGF2에 결합할 수 있고 선천적인 면역성에 예상되는 영향 없이 시험관 내 및 생체 내에서 혈관형성 전 활성을 억제할 수 있는 섬유아세포 성장 인자-2 (FGF2)-결합 펩타이드를 개시하고 있지만, 이는 합성 펩타이드의 용도에 관한 것으로서, FGF2를 분리하기 위한 태깅 시스템에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 또는 hPDIb' a' 도메인 유전자 중 어느 하나의 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장 인자 2(human fibroblast growth factor; hFGF2) 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2)의 생산방법 및 상기 생산방법에 의해 생산된 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2)을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 따라서, 본 발명자들은 최적화된 조건 하에서 효율성을 증가시키기 위해 간소화된 공정을 통해 재조합 hFGF2를 분리하였고, hFGF2에 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI) 및 hPDIb' a' 도메인의 태깅을 통해 대장균에서 전체 길이의 수용성 단백질을 성공적으로 분리하였다. 분리된 hFGF2의 생물학적 활성을 섬유아세포 Balb/c 3T3 세포(fibroblast Balb/c 3T3

cell)에서 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은 인간 단백질 이황화물 이성질화효소(human protein disulfide isomerase; hPDI)를 코딩하는 유전자 또는 hPDIb' a' 도메인 유전자 중 어느 하나의 유전자; 및 인간 섬유아세포 성장 인자 2(human fibroblast growth factor; hFGF2) 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다. 상세하게는 상기 hFGF2 유전자는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하고, 상기 hPDI 유전자는 서열번호 2이고, 상기 hPDIb' a' 도메인 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 것을 특징으로 한다. 보다 상세하게는 상기 재조합 발현백터는 도 1a(e)의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명에 있어서, “백터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.

[0011] 본 발명에서 있어서, “발현 백터”는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 백터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0012] 본 발명에서 사용한 Gateway Vector system은 엔트리백터와 목적백터로 구성되며, 상기 엔트리백터는 목적유전자의 양말단에 attL1, attL2를 갖는 백터이며, 목적백터는 attR1, attR2를 포함하는 백터이다. 상기 엔트리백터와 상기 목적백터는 재조합효소에 의해 LR반응을 일으키며, 목적백터의 attR1과 attR2를 엔트리백터의 attL1과 attL2로 치환하게 된다. 이 과정에서 엔트리백터에 포함되어 있던 목적유전자가 목적백터로 전달되게 된다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현백터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 상세하게는 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하고, 보다 상세하게는 대장균 BL21(DE3)인 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배지에서 배양하여 hPDI 태그- 또는 hPDIb' a' 도메인 태그-hFGF2 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus; TEV) 단백질분해효소(protease)를 처리하여 상기 hPDI 태그 또는 hPDIb' a' 도메인 태그를 제거하는 단계; 및 상기 hPDI 태그 또는 hPDIb' a' 도메인 태그가 제거된 hFGF2 재조합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2) 생산방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 생산방법에 의해 생산된 hFGF2 재조합 단백질(rhFGF2)을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 사용한 유전공학기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.(2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1,2,3, John Wiley & Sons, Inc.(1994)) 등을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 인간 PDIb' a' 도메인을 이용한 인간 hFGF2 재조합 단백질의 대장균 내 발현 및 정제방법에 관한 것

으로서, hPDIb'a' 도메인과의 태깅을 통해 대장균 내에서 용해도 및 안정도가 증가된 FGF2 단백질을 분리, 정제하는 방법에 대한 것이다. 이렇게 얻어진 FGF2 단백질은 혈관신생, 근육근육세포 성장촉진, 상처치유, 조직 회복 등에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 hPDIb'a'-hFGF2 발현벡터의 제작 과정 및 도메인 구조의 모식도를 나타낸다. (a)는 pOGWA-hPDIb'a'-TEVrs-hbFGF의 벡터 지도를 나타낸다. 대장균 내에서 융합 단백질의 발현은 IPTG 유도 T7 프로모터에 의해 조절되고, 선택 마커는 암피실린(Amp(R))이다. (b)는 His8-hFGF2, hPDI-hFGF2 및 hPDIb'a'-hFGF2 융합 단백질의 모식도를 나타낸다. 화살표는 TEV 단백질분해효소(TEV protease)의 절단 위치를 나타낸다.

도 2는 SDS-PAGE를 이용하여 대장균 내에서 3개의 태그들로 융합된 rhFGF2의 발현을 분석한 결과이다. 단백질 발현은 0.5 mM IPTG 에 의해 (A) 37℃ 및 (B) 18℃에서 유도되었다. His8, 옥타히스티딘(octahistidine); hPDI, 인간 PDI의 전체길이(full-length), hPDIb'a', 인간 PDI의 b'a' 도메인; M, 분자량 사이즈 마커; C, 대조구로서 IPTG 유도 전의 총 세포 단백질; I, IPTG 유도 후의 총 세포 단백질; P, 불용성 세포 펠렛; S, 세포 초음파 처리 후 수용성 상등액.

도 3은 대장균 내에서 rhFGF2의 분리에 대한 것이다. (A) 절단 반응 후, hFGF2의 Hi-trap Q HP 크로마토그램을 나타낸다. 절단된 hFGF2 및 hPDIb'a'는 상이한 등전점(isoelectric point)으로 인해 명백하게 분리되었다. (B) 양이온 교환 및 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 대장균으로부터 분리된 hPDIb'a'-hFGF2를 나타낸다. lane 5는 hPDIb'a'가 거의 완전하게 절단되었다는 것을 나타낸다. M, 분자량 마커; lane 1, 음성대조구로서 IPTG 유도 전 총 세포; lane 2, IPTG로 처리한 총 세포; lane 3, 세포 초음파 처리 후 수용성 분획; lane 4, SP Sepharose 크로마토그래피를 이용하여 분리한 hPDIb'a'-hFGF2 융합 단백질(53 kDa); lane 5, TEV 프로테아제로 절단된 hPDIb'a' 태그: hPDIb'a' (36 kDa) 및 rhFGF2(17 kDa); lane 6, 최종 분리된 rhFGF2 (17 kDa). (C) 분리된 rhFGF2의 최종 순도를 확인하기 위한 실버 염색된 10% SDS 젤 전기영동을 나타낸다. M, 분자량 마커; lane 1, 0.75ug rhFGF2; lane 2, 1.5ug rhFGF2.

도 4는 대장균으로부터 분리된 rhFGF2의 MALDI-TOF MS 분석결과를 나타낸다. (A) hFGF2(156 aa)의 트립신 분해 펩타이드 지도. (B, C) 환원 상태(B) 및 비환원 상태(C)에 있어서 hFGF2의 MALDI-TOF MS 결과.

도 5는 분리된 rhFGF2의 Balb/c 3T3 세포에 대한 효과를 나타낸다. 여러 농도의 분리된 FGF2가 섬유아세포 Balb/c 3T3 세포와 함께 24시간 동안 배양되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0020]

<실시예 1> hFGF2 발현벡터의 제작 및 발현

[0021]

155개 아미노산을 가진 성숙(mature) hFGF2을 코딩하는 DNA 서열(GenBank: AAA52448.1)은 유전자 합성 서비스를 통해 합성하였다(바이오니아, 대전, 한국). 성숙 hFGF2의 발현 수준을 개선하기 위해서, 대장균에서의 발현을 위한 DNA 서열을 최적화하였다. hPDIb'a' 태그 및 hFGF2 사이의 절단을 위하여, hFGF2의 N-말단에 위치한 담배 식각 바이러스 인식 사이트(Tobacco Etch Virus recognition site; TEVrs; ENLYFQ~G)를 삽입하였다. 또한, BP 반응을 위하여 3'-말단에는 attB1 사이트(ggggacaagtgtgtacaaaaagcaggcttc-서열번호 4) 및 5'-말단에는 attB2 사이트(accagctttctgtacaaagtgtgtcccc-서열번호 5)를 삽입하였다. 합성된 DNA는 BP 재조합(인비트로젠, CA, 미국)을 이용하여 pDONOR207로 서브클로닝 하였고(Genome Res 10(11) (2000) 1788-95), 최종 벡터는 pENTR-TEVrs-hFGF2라고 명명하였다. 발현 벡터를 만들기 위해서, pENTR-TEVrs-hFGF2에 있는 hFGF2를 LR 재조합(인비트로젠, CA, 미국)에 의해 제작된 pDEST-hPDIb'a'로 옮겼다(Genome Res 10(11) (2000) 1788-95). 대장균 발현을 위해 코돈 최적화된 인간 PDI는 pBSK 벡터 내에 합성되었다(Epoch Biolabs, Inc.). hPDIb'a' 도메인은 SacI 및 KpnI 효소 사이트를 각각 포함하는 포워드 프라이머(5'-GCGCGAGCTCATTGAATTTACAGAACAAACGGCG-3'-서열번호 6) 및 리버스 프라이머(5'-CATTTTACGTTTCTCGTTCAGC-3'-서열번호 7)를 사용하여 PCR을 통해 증폭하였다. PCR 산물을 SacI 및 KpnI 효소로 처리한 후, pDEST-hPDIb'a'를 얻기 위하여 pDEST-OGWA 벡터로 서브클로

닝 하였다(Anal Biochem 343(2) (2005) 313-21). hPDIb' a' -TEVrs-hFGF2 결합 단백질을 코딩하고 있는 최종 구조체는 pOGWA-hPDIb' a' -TEVrs-hFGF2로 명명하였고, DNA 서열분석을 통해 확인하였다(마크로젠, 한국). 과발현 실험을 위한 다른 태그들을 포함하는 추가적인 발현 벡터들을 만들기 위해서, pENTR-TEVrs-hFGF2를 LR 재조합을 통하여 각각 pDEST-His8 및 pDEST-hPDI 내로 서브클로닝 하였다. 그로 인해 만들어진 최종 발현 벡터는 pOGWA-hPDI-TEVrs-hFGF2 및 pET28a(+)-His8-hFGF2라고 명명하였다. 도 1은 hPDIb' a' -hFGF2 발현벡터를 제작하는 과정(a) 및 각 태그 단백질과 hFGF2의 융합 단백질에 대한 모식도를 나타낸다(b).

[0022] 3종류의 다른 결합 태그의 발현 수준을 비교하기 위하여, 3종류의 발현 벡터를 대장균 BL21(DE3) 숙주세포 내로 형질전환하였다. 형질전환체는 50ug/ml 앰피실린이 포함된 LB 배지에 37℃에서 A₆₀₀이 0.6에 도달할 때까지 배양하였고, 0.5mM 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG)로 37℃, 4시간 동안 또는 18℃, 18시간 동안 발현을 유도하였다. 배양 후, 발현 수준을 10% 트리스-글리신 젤(tris-glycine gel)을 사용하여 SDS-PAGE를 통해 분석하였다. 그 결과, 37℃에서는 모든 융합 단백질이 수용성 형태로 발현되지는 않았고, 단지 hPDI 태그된 hFGF2만이 99% 이상 수용성 형태로 발현되었다(표 1 및 도 2A). 하지만, 18℃에서는 IPTG로 유도시, 각각 20.4kDa, 77.2kD 및 52.9kD에서 수용성 형태로 발현되었다(표 1 및 도 2B). 과발현 과정에서 봉합체(inclusion body)가 형성되기 쉬운데, 낮은 온도는 대사발현을 완화시키고, 정확한 단백질 접힘을 촉진하는데 도움이 된다. 낮은 온도를 이용하는 데 있어서 장점은 수용성 단백질의 발현을 향상시킬 뿐만 아니라 특이적인 활성도 증가시킨다. 비록 hPDI 태그된 hFGF2의 용해도가 hPDIb' a' 태그된 단백질보다 높지만, hPDI의 각 도메인을 시험한 후에 hPDI의 b' a' 도메인이 더 작은 크기를 가지고도 hPDI와 같이 수용성이고 안정적인 hFGF2의 발현을 가능하게 한다는 사실을 밝혀냈기 때문에, hPDIb' a' -TEVrs-hFGF2 구조체가 선택되었고 분리를 위해 사용되었다.

표 1

[0023]

		태그 크기 (kDa)	융합 단백질 크기 (kDa)	Expression level (%)		Solubility (%)	
				37℃	18℃	37℃	18℃
hFGF2 (17.3 kDa)	His8 ¹	3.1	20.4	41.1	60.8	17.3	89.3
	hPDI-	59.8	77.1	83.6	75.1	99.6	95.0
	hPDIb'a'-	35.6	52.9	93.3	70.3	34.5	85.1

[0024] ¹ TEVrs 없음.

[0025] <실시예 2> 재조합 hFGF2의 분리

[0026] 배양된 세포는 30분 동안 3,500 rpm으로 원심분리하여 수확한 후, 세포 펠렛은 용해 완충액(lysis buffer)(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 5% 글리세롤 (v/v), 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드 (Phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF))에 10ml/g 비율로 재현탁하였다. 용해물은 세포 파괴를 위해 초음파 처리한 후, 12,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 상등액은 Whatman™ 실린지 필터(0.45um, GE Healthcare)를 통하여 여과하였고, 이미 완충액 A(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 5% 글리세롤 (v/v))로 평형화된 5ml Hi-trap SP HP 컬럼(GE Healthcare)을 사용하였다. 모든 컬럼 분석은 FPLC system (AKTA prime, Amersham pharmacia)에서 수행하였다. 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하기 위하여, Hi-trap SP HP 컬럼은 완충액 A로 2배의 컬럼 부피(column volume; CV)로 씻어냈고, 완충액 A에 0 - 1 M NaCl의 선형 구배(linear gradient)로 녹였다. hPDIb' a' -hFGF2 결합 단백질을 포함하는 분획을 모았고, NaCl의 최종 농도가 0.1M이 될 때까지 완충액 A로 희석한 후, 30ug의 결합 단백질을 절단하기 위해서, 1ug의 TEV 프로테아제(protease)로 처리하였다(1:30 (w/w)). 절단 조건은 1 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol; DTT)을 20℃에서 16시간 동안 처리하는 것으로 하였다. 단백질의 절단 후, hFGF2는 2차 음이온 교환 크로마토그래피를 통하여 분리하였다. 절단 반응 혼합액은 5ml Hi-trap Q HP 컬럼(GE Healthcare)을 통과시켰는데, 이는 완충액 B(1 mM DTT가 첨가된 완충액 A)로 평형화된 것이었다. 컬럼을 완충액 B로 2배의 컬럼 부피로 씻어냈다. hPDIb' a' 도메인(pI 4.61) 및 hFGF2(pI

9.58)의 등전점(isoelectric point)을 구별하기 위해 단백질 샘플을 완충액 B에 0 - 1 M NaCl의 선형 구배(linear gradient)로 녹였다. 분리된 hFGF2가 포함된 분획을 모았고, 10kDa 차단 원심분리 필터(Millipore Corp.)를 사용하여 농축시켰다. 그 후, 1 X PBS 완충액(137 mM NaCl, pH 7.4, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄)을 이용하여 Hi-Prep 26/10 탈염 컬럼(GE Healthcare)으로 탈염하였다. 마지막으로, 생물학적 활성 측정 및 이후의 연구를 위하여, 분리된 hFGF2를 분취하고(aliquoted), 동결건조하였다(lyophilized). 분리 과정에서 모든 분획은 10% 트리스-트리신(tris-tricine) SDS-PAGE에 의해 분석되었다. 단백질의 농도는 BSA를 표준으로 하여 브래드포드(Bradford) 방법에 의해 측정되었다(Anal Biochem 72 (1976) 248-54). 대부분의 용합 단백질은 절단되었고, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 잘 분리되었다(도 3A, 도 3B).

[0027] 단백질은 SDS-PAGE 겔에서 분리되었다(Nature 227(5259) (1970) 680-5). 단백질 샘플은 100 mM DTT를 포함하는 샘플 완충액에서 100℃에서 10분 동안 변성화되었다. 샘플은 10% 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔에 로딩되었다. 단백질 밴드는 Coomassie brilliant blue R-250(AMRESCO LLC, OH, USA)로 염색하고, ImageJ program (<http://imagej.nih.gov/ij>)에 의해 분석하였다. 최종 분리된 hFGF2를 염색하고 제조사의 지시에 따라 Silver Stain Plus® kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)로 확인하였다. 밴드들이 깨끗하게 보이면, 5% 아세트산(v/v)으로 15분 동안 처리하여 반응을 멈췄다. 겔은 충분한 물로 씻어냈고, 보관을 위하여 5% 글리세롤(v/v) 및 0.02% 소듐 아지드(sodium azide)(w/v)가 포함된 수용액으로 밤새도록 반응시켰다. hFGF2의 최종 순도를 확인하기 위해서, 최종적으로 분리된 hFGF2를 실버 염색법에 의해 염색한 결과, 다른 불순물은 발견되지 않았다(도 3C). 1L 배양을 통하여 ~2.5 mg의 매우 순수한 rhFGF2를 더 효과적으로 얻을 수 있었다.

[0028] <실시예 3> MALDI-TOF MS 분석에 의한 재조합 결합 단백질의 확인

[0029] 분리된 재조합 결합 단백질의 확인을 위하여, 샘플을 10% TCA로 침전시킨 후, 침전된 샘플을 50mM 이오도아세트아미드(iodoacetamide; IAA)가 포함된 IA 완충액(0.5 M Tris-HCl, pH 8.0, 5% 글리세롤 (v/v), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 % SDS)에 현탁하였고, 상온에서 30분 동안 유지하였다. 샘플을 14.4% SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 재조합 결합 단백질과 연관된 밴드를 자른 후에, 트립신으로 처리하였다. Voyager-DE™ STR을 이용하여 MALDI-TOF MS를 수행하였다. Data Explorer™ 소프트웨어(Applied Biosystems, Framingham, MA)를 사용하여 결과를 분석하였다. 그 후, 얻어진 펩타이드 질량을 Mascot peptide mass fingerprinting search program(Matrix Science, Boston; MA)으로 NCBI 데이터베이스에서 검색하였다(Nature 440(7082) (2006) 363-7).

[0030] 분리된 rhFGF2를 확인하기 위해서, MALDI-TOF MS 분석을 환원 및 비환원 조건에서 수행하였다. 분리된 rhFGF2의 MALDI-TOF MS 분석 결과는 대부분의 트립신 분해 펩타이드 질량이 rhFGF2와 관련된 것으로 관측되었다(도 4A 및 4B). 또한, rhFGF2의 4개 시스테인 잔기가 비환원 조건에서 이오도아세트아미드(iodoacetamide)와 함께 변형되는 것을 확인하였다(도 4C). 이는 rhFGF2의 4개 시스테인 잔기 모두가 유리상태라는 것을 의미한다.

[0031] <실시예 4> rhFGF2의 활성 측정

[0032] 섬유아세포 Balb/c 3T3 세포(fibroblast Balb/c 3T3 cell)에 있어서, 분리된 rhFGF2의 생물학적 활성을 WST-1(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolol]-1,3-benzene disulfonate) assay를 통해 측정하였다(J Immunol Methods. 16; 65(1-2) (1983) 55-63). Balb/c 3T3 세포는 10% 우아혈청(bovine calf serum; BCS) 및 항생제(100 U/ml 페니실린 G, 100ug/ml 스트렙토마이신 설페이트)가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포는 0.25% 트립신-EDTA(GIBCO Invitrogen)으로 모았고, 96-웰 플레이트(4.5 x 10³ cells per well in 100ul)에 접종하고, 5% CO₂로 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 여러 농도(0.05, 0.1, 1, 5, 10, 20 및 50 ng/ml)의 분리된 rhFGF2를 최종 부피가 200ul가 되도록 각 웰에 처리하였고, hFGF2의 효과를 최대화시키기 위해서 41시간 동안 배양하였다. 각 농도별로 세 번씩 반복하였고, 판매하는 재조합 단백질(hFGF2, Peprotech)을 같은 조건에서 양성 대조구로서 사용하였다. 41시간 배양 후에, 20ul의 세포 증식 시약 WST-1(Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche)을 각 웰에 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 계속적으로 반응시켰다. 세포수에 직접적으로 비례하는 광학 밀도는 ELISA plate reader에 의해 450nm에서 측정하였다. FGF2는 많은 세포

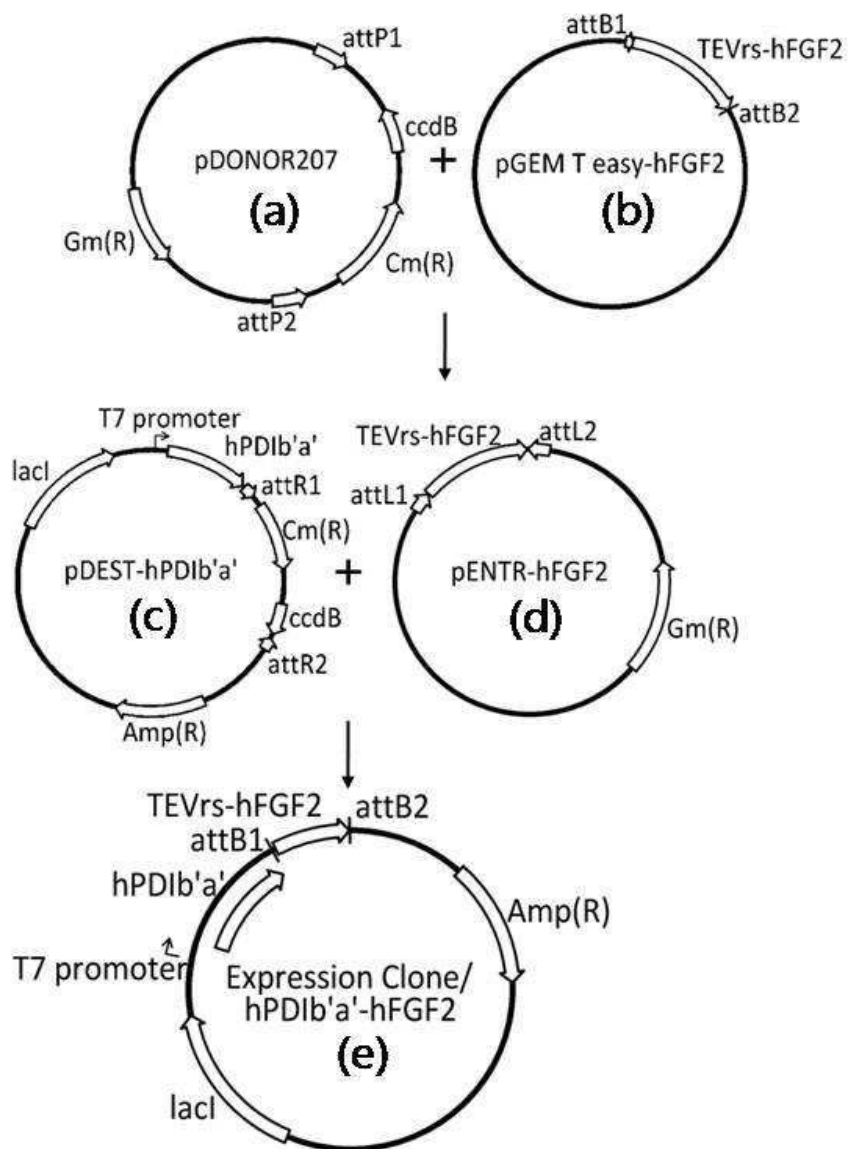
형태의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 분리된 rhFGF2의 생물학적 활성을 확인하기 위해서, 섬유아세포 Balb/c 3T3 세포의 증식을 WST-1 assay로 측정한 결과, 분리된 rhFGF2는 상업적으로 판매하는 hFGF2의 생물학적 활성과 유사하거나 약간 높게 나타났다. 활성은 1 ng/ml 에서부터 기하급수적으로 증가하였고, 최대값은 20 ng/ml 부근이었다(도 5).

[0033]

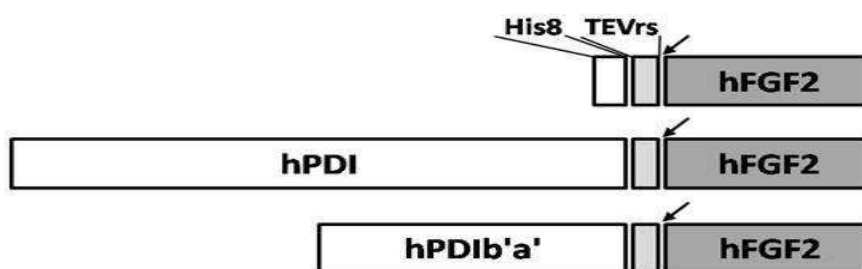
잔여 내독소(endotoxin)의 양은 정량시험인 Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test (Lonza, Basel, Switzerland)을 통하여 측정하였다. 10ug/ml 샘플 또는 내독소 표준용액(1.0, 0.5, 0.25, 0.1 EU/ml) 중 50ul를 미리 따뜻하게 해 둔 37℃의 내독소(endotoxin)가 없는 마이크로플레이트 웰에 나누어 담았다. 각각의 웰에는 생물학적 내독소 시험(limulus amebocyte lysate; LAL) 시약 50ul를 첨가하였다. 웰들은 37℃에서 10분 동안 유지되었다. 그 후, 미리 따뜻하게 해 둔 100ul의 발색 기질(chromogenic substrate) 용액을 각각의 웰에 첨가하였고, 37℃에서 6분 동안 유지하였다. 그리고 나서 100ul의 정지 시약(25% (v/v) 아세트산)을 첨가하고, 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 405nm에서 분석하였다. 흡광도 분석 후에, 표준용액을 통해 얻어진 표준곡선을 이용하여 내독소(endotoxin) 단위를 계산하였다. LAL assay를 이용하여 분리된 hFGF2의 잔여 내독소 수준을 측정하였고, 결과는 약 0.38 EU/ug이었다. 이 수치는 1ug 당 1.0 EU 이하의 수치를 갖는 상업적인 재조합 단백질과 비교해서도 수용가능한 수준이었다.

도면

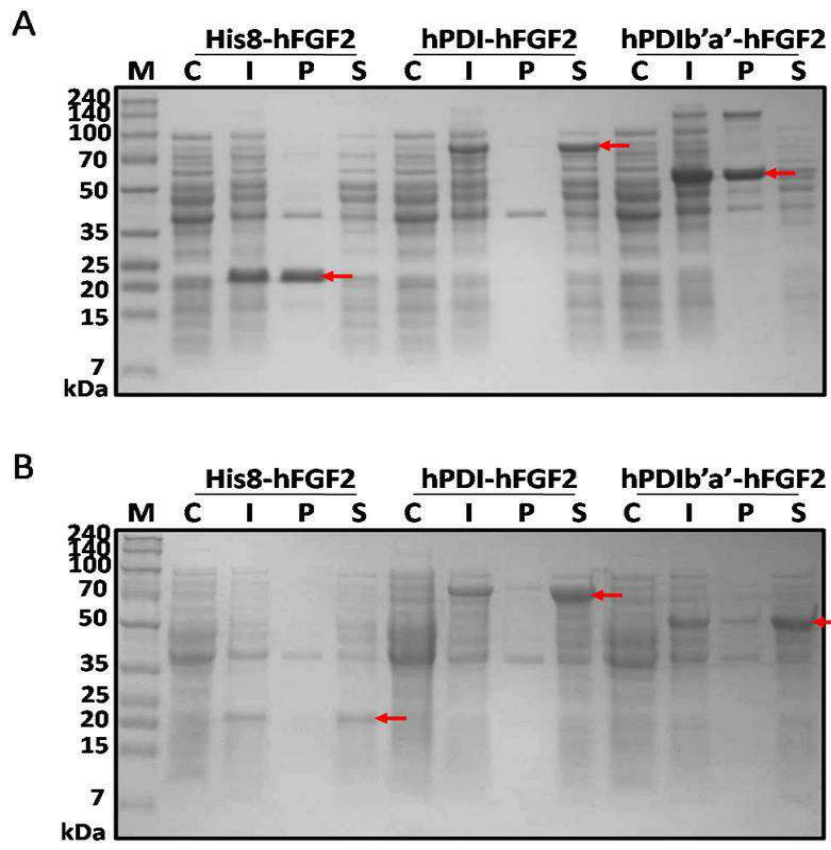
도면1a



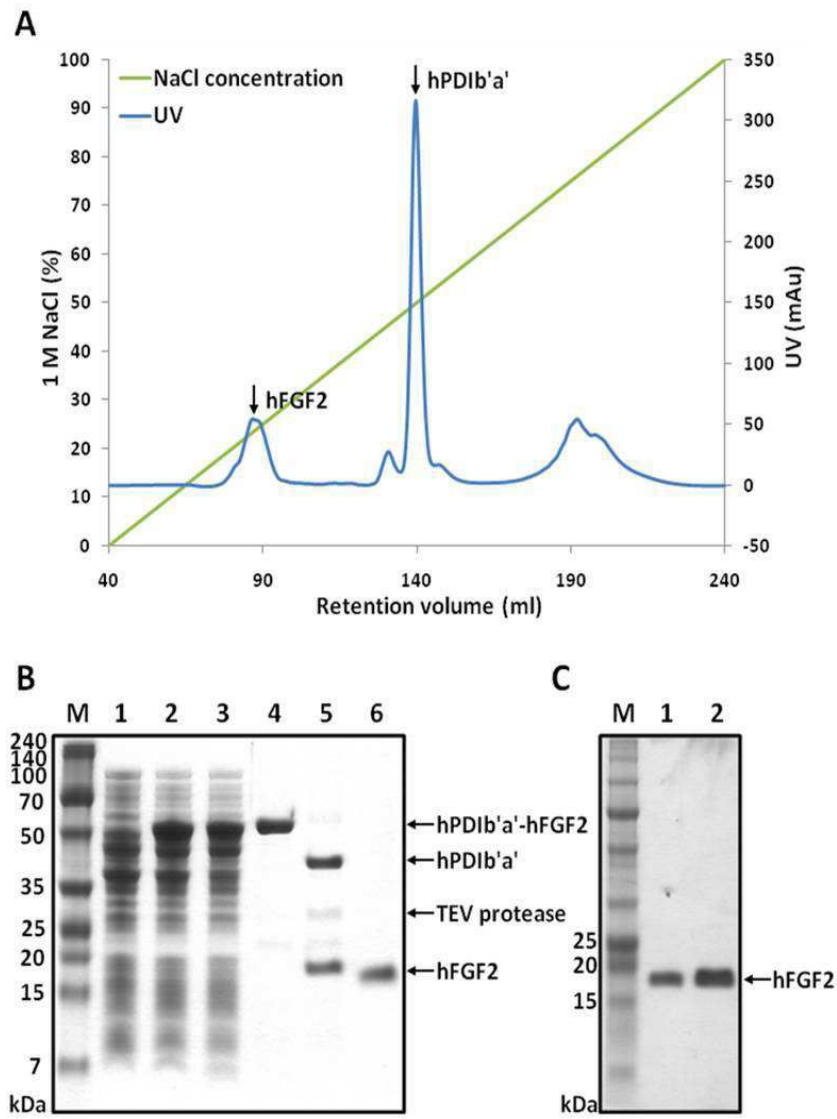
도면1b



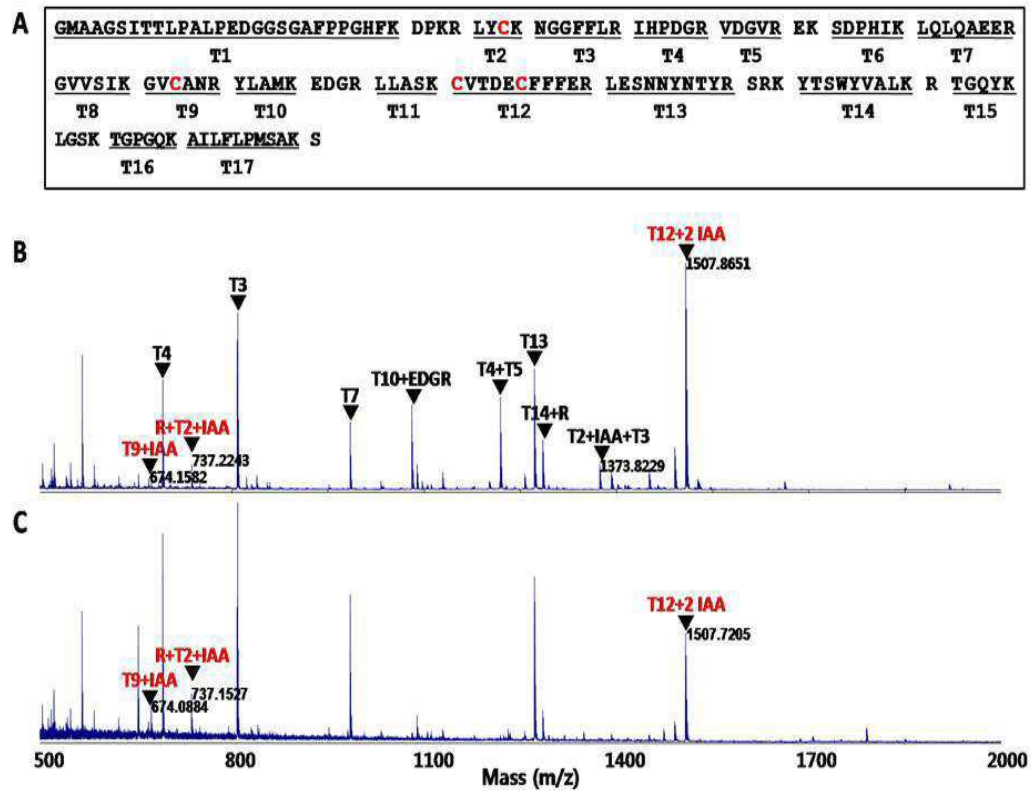
도면2



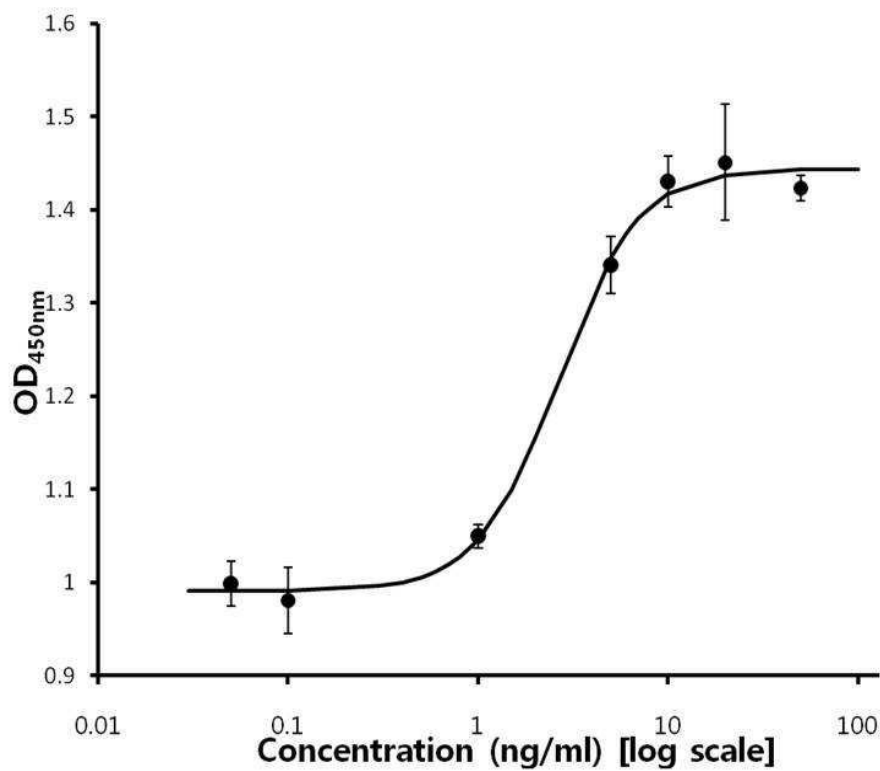
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Expression and purification method of biological active human
FGF2 with human PD1b'a' domain in Escherichia coli

<130> DP-2012-0377

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 468

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggtatggcgc cgggtctat cagcacctg cggcgctgc ctgaagatgg cggtagtggc	60
gcgtttccgc cgggtcattt caaagacceca aaacgcctgt actgcaagaa cggcggtttc	120
tttctgcgca ttcatccaga cggccgtgtt gatgggtcc gcgaaaagag cgatcctcac	180

attaaactgc aactgcaagc ggaagagcgt ggctgtgtga gcattaaagg tgtgtgcgca	240
aatcgttacc tggcaatgaa agaagacggt cgctgtctgg ctagtaaatg tgttaccgat	300
gaatgtttct tctttgagcg cctggagagt aataactata acacctaccg ttctcgtaaa	360
tatacgtctt ggtatgtagc cctgaaacgt acaggtcagt ataagctggg cagcaaaact	420
ggcccaggcc agaaggctat cctgtttctg ccgatgagcg caaagagc	468

<210> 2

<211> 1461

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gacgcaccgg aagaagagga tcatgtcctg gttctgcgca aaagcaactt cgcggaagca	60
ctggccgcac ataaatatct gctggtggaa ttttatgctc cttggtgcgg tcattgcaaa	120
gccctggccc cggagtacgc caaagccgca ggtaaactga aagctgaagg tagcgaaatc	180
cgcttgcaaa aggttgatgc tacggaagag agtgacctgg cgcagcagta tgggtgccgc	240
ggctatccta caattaaatt ctccgtaac ggtgataccg catctccaaa agaataatcc	300
gctggtcgcg aggcggacga tattgttaac tggctgaaga aacgcactgg ccctgccgca	360
accaccctgc ctgatggcgc tgctgccgaa agcctggtcg aaagtagcga agttgccgtc	420
attggtttct ttaaggatgt agaatctgac agtgccaaac agtttctgca agcggcagag	480
gctatcgatg acatcccgtt cggcatcacc tctaacagtg acgtattcag taaataccaa	540

ctggataaag acggcggttg gctgttcaag aaatttgatg aaggtcgcaa caactttgag	600
ggtgaggatga ccaaggagaa cctgctggat tttattaagc acaaccaact gccgctggtt	660
attgaattta cagaacaaac ggccgcaaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatc	720
ctgctgtttc tgccgaagag cgttttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc	780
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	840
aatcagcgta tcttgagatt ctttggcttg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg	900
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa	960
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcttg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc	1020
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctgggtgg gaagaatttt	1080
gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt	1140
gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac	1200
gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta	1260
cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgagg atcgtactgt cattgattat	1320
aatggcgaa gttactctga cggttttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc	1380
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag	1440
gatgacgacc agaaagcggc c	1461
<210> 3	
<211> 801	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 3	
attgaattta cagaacaaac ggccgcaaaa attttcggcg gtgagattaa aacacatatc	60
ctgctgtttc tgccgaagag cgttttctgat tacgatggta aactgagtaa ttttaaaacc	120
gccgcagaat ctttcaaagg taagattctg ttcattttca ttgatagcga ccacacggac	180
aatcagcgta tcttgagatt ctttggcttg aagaaagagg aatgcccggc tgtgcgtctg	240
attacgctgg aagaggaaat gacaaagtac aagccggaga gcgaggaact gactgcagaa	300
cgtatcaccg aattttgtca tcgtttcttg gaggggaaga ttaagccgca tctgatgagc	360
caggaactgc cggaggattg ggacaaacag ccagtgaag ttctgggtgg gaagaatttt	420
gaagatgtgg ctttcgatga gaagaagaat gtgtttgtgg agttctacgc cccgtggtgt	480
gggcactgta aacagctggc gccgatctgg gacaaactgg gcgaaacgta taaagatcac	540
gaaaatattg tgatcgcgaa aatggattct accgcgaatg aagtagaagc ggtaaaagta	600

cactcttttc cgacgtgaa attctttcca gcgagcgcg atcgtactgt cattgattat 660
aatggcgaac gtactctgga cggctttaag aaatttctgg aaagcggcgg ccaggatggc 720
gcgggcgatg atgatgacct ggaagacctg gaagaagcgg aggaaccaga catggaggag 780
gatgacgacc agaaagcggc c 801

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> attB1 site
<400> 4
ggggacaagt ttgtacaaa aagcaggctt c 31

<210>
5
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> attB2 site
<400> 5
accagcttt ctgtacaaa gtggcctccc 29

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> forward primer
<400> 6
gcgcgagctc attgaattta cagaacaaac ggcg 34

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> reverse primer
<400> 7
cattttacgt ttctcgttca gc 22