



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0079544
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0138115

(22) 출원일자 2010년12월29일

심사청구일자 2010년12월29일

(30) 우선권주장

1020090135281 2009년12월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충남 논산시 내동 26 건양대학교 산학협력단

(72) 발명자

이우일

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 308동 303호

오나리

충청남도 공주시 신관동 주공4단지아파트 402동 604호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

경일호

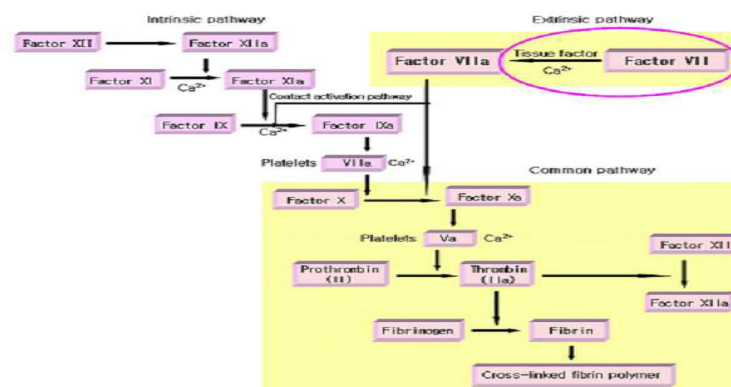
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 재조합 혈액응고인자 VII을 함유하는 발현벡터 및 재조합 혈액응고인자 VII의 분리정제방법

(57) 요약

본 발명은 FVII을 포함하는 재조합 발현벡터를 구축하고, 상기 재조합 벡터를 피키아 파스토리스에 형질전환 후 정확한 조절기작으로 발현시켜 정제된 고순도의 재조합 단백질 혈액응고인자 VII 제조에 관한 것으로서, 피키아 파스토리아 시스템을 이용하여 간단하고 경제적인 방법으로 산업적으로 중요한 단백질인 FVII을 발현 정제할 수 있게 된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박양진

대전광역시 동구 가양2동 163-1번지 203호

유환구

경기도 광명시 광명5동 189-24호 202호

유현오

서울특별시 강남구 논현동 노현프라임아파트 702호

김중철

서울특별시 동작구 사당동 1134번지 사당대아아파트 102동 905호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 혈액응고인자 VII(blood coagulation factor VII) 유전자를 포함하는 도 9에 기재된 개열지도를 갖는 재조합 발현벡터 pPF7.

청구항 2

혈액응고인자 VII cDNA를 pBluescripts 벡터에 클로닝하여 pTF7 벡터를 제조하고 이를 *E. coli*를 통해 정제한 후 AOX1과 HIS4를 지닌 효모 벡터 pPIC9K에 클로닝하는 과정을 통하여 혈액응고인자 VII cDNA를 함유하는 제1항의 발현벡터 pPF7를 제조하는 단계;

상층액(supernatant)을 부은 후 발현을 유도하기 위하여 cell pellet을 OD₆₀₀으로 히스티딘 결여 배지인 BMMY에서 재 부유(resuspend) 하는 단계;

발현을 유지하기 위하여 100% 메탄올을 최종 0.5% 농도가 될 때까지 24시간 마다 배양하는 단계;

24, 48, 72, 96시간에 실온에서 2~3분 동안 최대 속도로 원심분리하는 단계; 및

피키아(*Pichia*)배양액을 원심분리하여 상층액을 얻은 후 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF를 포함하는 Tris-HCL 완충용액(pH 7.5) 2ℓ로 희석한 다음, DEAE-Sephacel column chromatography(2.0 X 10 cm)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 혈액응고인자 VII 분리정제방법.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 혈액응고인자 VII 유전자를 함유하는 발현벡터 및 혈액응고인자 VII의 분리정제방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 혈액응고인자 VII을 포함하는 재조합 발현벡터를 구축하고, 상기 재조합 벡터를 피키아 파스트리스에 형질전환 후 정확한 조절기작으로 발현시켜 정제한 고 순도의 재조합 단백질 혈액응고인자 VII의 분리정제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

혈액응고인자 VII(Blood coagulation factor VII; 이하, 'FVII'라 함)는 비타민 K에 의존하는 플라스마 단백질로 혈액응고 개시에 있어서 결정적인 역할을 한다. 혈액과 조직 내에는 50종 이상의 물질들이 혈액응고에 관여하는데 혈액을 응고시키는데 관여하는 것을 전응고물질(procoagulants)이라 하고, 혈액응고를 방지하는 것을 항응고물질(anticoagulants)이라고 한다. 혈액과 조직 내에는 이 상반된 두 물질 군이 항상 평형을 이루지만 보통은 항응고물질이 우세하여 응고가 일어나지 않도록 한다. 그러나 혈관이 손상을 받으면 이 부위에서 항응고물질보다 전응고물질(procoagulants)이 우세하게 되며, 간에서 비타민 K의 작용으로 혈액 속에 있는 혈장단백질의 하나인 프로트롬빈(prothrombin)은 칼슘이온(Ca²⁺)이나 혈소판 등의 작용으로 트롬빈(thrombin)이 되고, 트롬빈은 다시 프브리노겐(fibrinogen)에 작용하여 피브린(fibrin)을 만드는 과정을 통하여 혈액이 응고된다.

[0003]

혈액응고는 작용기전에 따라 혈관 벽이나 주위 조직의 손상으로부터 시작되는 외인성 경로(extrinsic pathway)와 혈액자체에서 시작되는 내인성 경로(intrinsic pathway)로 나뉜다(도 1 참조). 이 중 외인성 경로는 혈관 벽의 조직이 손상되면 세포막에 존재하는 Tissue factor(TF)가 순환 중인 혈액에 노출되어 혈액 내에 존재하는 FVII 또는 활성 Factor VII(FVIIa: 총 FVII 단백질 질량 중 약 1%에 해당하는 양으로 혈액 중에 존재) 간의 복합체의 형성에 의해 개시 된다. 이 복합체는 촉매능력을 갖게 되며 세포 표면에서 Factor X(FX)에 작용하여 활성화된 Factor X(FXa)로 변환시키고, FXa는 Factor IX(FIX)을 활성 Factor IX (FIXa)으로 변화시키는 연속적인 혈액응고반응(blood coagulation cascade)을 진행시킨다(도 2 참조).

- [0004] 이처럼 의약적 관심이 증폭되고 있는 실정 아래에 인간조직인자와 FVII는 복합체를 형성한다. 인간조직인자(human tissue factor, HTF)의 세포외 도메인(extracellular domain)과 active site-inhibited FVIIa의 복합체에 대한 x-ray crystal structure가 처음 보고된 후, 활성화된 FVII와 TF 모델이 molecular dynamics simulations 기법에 적용되어 TF와 결합되지 않은 독립적인 자이모젠(zymogen, 효소 전구체) 형태의 FVII 구조와 TF의 복합체를 형성하는 FVII 사이의 비교 설명이 시도되었다. 표피성장인자 1(Epidermal growth factor 1; EGF 1) 모듈(module)은 칼슘이온에 대한 친화성이 있으며, 이 EGF 1과 칼슘이온의 결합은 FVII와 TF의 결합에 대한 높은 친화력을 유지시키는 구조형태(conformation)에 있어 Gla와 EGF 1 modules를 안정화시키는 것으로 NMR spectroscopy의 한 연구에 의해 보고되었고, EGF 2 domain의 Glu-Gln-Tyr 트리펩티드 모티프(tripeptide motif)는 생물학적 활성에 아주 중요하다고 알려져 있다.
- [0005] 이러한 FVII는 혈액 중에 0.5mg/ml(10nmol/L)의 농도로 존재하며, 염색체 13q34에 위치하고 9개의 exon으로 구성되며 염색체 상에서 12kb 정도를 차지한다. 다른 비타민 K 의존성(vitamin K-dependent) 혈액응고 인자들인 Factor IX, X, 프로트롬빈, 단백질(protein) C들과 구조적 및 기능적으로 연관되어 있는 FVII는 406개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 10개의 감마-카르복시글루탐산(gamma-carboxyglutamic acid, Gla)잔기를 포함하며 HTF와의 결합에 있어서 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 글루탐산(glutamic acid)이 감마 카르복실화(gamma carboxylation)에 의해 변형된 N-말단에 GLA 도메인(domain)과 표피성장인자(EGF)와 상동성(homology)이 있는 두 개의 EGF 1과 EGF 2 도메인 그리고 C-말단에 세린 프로테아제(serine protease) 도메인으로 구성되어 있다(도 3 참조).
- [0006] 또한 비타민 K 의존 단백질인 FVII는 13% 정도가 당화되어 있고 간에서 합성된다. 단일 사슬 지모젠(zymogen)으로서 혈장 내에 존재하며 반감기는 2~4시간 정도이며, 전구체는 Arg152~Ile153위치에서 FXa에 의한 단백질가수분해 분할(proteolytic cleavage)에 의해 2-사슬형태로 활성화된다. FVII 데이터베이스 상에 약 238종의 돌연변이(mutation)가 보고되었으며, 출혈을 나타내는 빈도는 이중 2% 정도인 것으로 알려져 있으며, 재조합 활성화형 FVIIa는 사전 지혈제로 개발 되어왔다.
- [0007] HTF와 FVII의 두 구조에 대한 면밀한 분석은 FVII는 피부 기능성의 작은 펩타이드 분자들을 중심으로 다른 단백질 분해효소의 일부분들이 융합하며 진화되어온 단백질 구조로 보이며, HTF 또한 이들 작은 펩타이드 및 효소들의 생물학적 파트너로 진화 되어온 것으로 추정된다. 이러한 구조적 분석의 결과는 이들 두 단백질들의 피부 기능성 펩타이드 소재로서 또한 의약제재의 소재로서 중요한 생물소재임을 나타내주고 있다.
- [0008] 수술 또는 위험한 외상에 관련하여 과도하게 출혈을 수반하는 경우 혈액 수혈이 필요한 피험자는 어떤 출혈도 경험하지 않는 피험자보다 더 많은 합병증을 나타낸다는 것은 잘 알려져 있으며, 한 사람 혈액 또는 혈액생성물(혈소판, 백혈구, 응고결합 치료용 혈장유래 농축물 등)의 투여를 필요로 하는 보통 정도의 출혈도 바이러스(간염, HIV, 파코바이러스 및 기타)가 전파될 위험과 그에 관련된 합병증을 가져올 수 있다. 그러므로 대량 혈액 수혈을 필요로 하는 대규모 출혈은 폐 및 신장 기능의 손상을 포함하여 다수 기관 기능장애의 발생을 가져올 수 있으며, 일단 합병증을 유발한 이후에는 다수의 cytokine 치료를 수행하거나 또는 염증성 반응을 치료하기 위한 그리 성공적이지 않은 과정들이 행해진다. 이러한 증상들로부터 벗어나기 위해 수술뿐만 아니라 위험한 조직손상의 치료에서 주된 목표는 출혈을 피하거나 또는 최소화 하는 것이며 이를 목적으로 한 생물의 약제제로는 FVII이 가장 합리적인 후보물질 중의 하나로 주목받고 있는 실정이다.
- [0009] 현재 재조합 FVII는 Nobo 사 제품을 중심으로 판매되고 있다. 현재 Novo사는 baby hamster kidney(BHK) cell에서 생산되는 FVII 재조합 단백질을 비롯하여, FVII 내의 아미노산 잔기들을 변형시킨 유도체를 및 최종산물의 조성 등에 대한 특허를 다수 보유하고 있다. 이러한 현황으로 인해 학회의 산업적인 관심이 나타나게 되고 연구함에 있어서 FVII의 분리·정제 측면에서 보면 생체 존재량이 낮기 때문에 분자 복제가 필요하다.
- [0010] 따라서, 본 발명자는 FVII를 암호화하는 cDNA를 합성하고, 유전자 재조합 기술을 이용하여 적절한 발현백터를 구

축하여 피키아 발현 시스템(Pichia expression system)을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기한 문제를 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 인간의 태반 혈액응고인자 VII를 포함하고 발현시킬 수 있는 재조합 벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기의 재조합 벡터를 발현시켜 고 순도의 재조합 단백질 혈액응고인자 VII의 분리정제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1의 혈액응고인자 VII(blood coagulation factor VII) 유전자를 포함하는 도 9에 기재된 개열지도를 갖는 재조합 발현벡터 pPF7을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 혈액응고인자 VII cDNA를 pBluescripts 벡터에 클로닝하여 pTF7 벡터를 제조하고 이를 *E. coli*를 통해 정제한 후 AOX1과 HIS4를 지닌 효모 벡터 pPIC9K에 클로닝하는 과정을 통하여 혈액응고인자 VII cDNA를 함유하는 제1항의 발현벡터 pPF7를 제조하는 단계; 상층액(supernatant)을 부은 후 발현을 유도하기 위하여 cell pellet을 OD₆₀₀으로 히스티딘 결여 배지인 BMMY에서 재부유 하는 단계; 발현을 유지하기 위하여 100% 메탄올을 0.5% 최종농도까지 24시간 마다 배양하는 단계; 24, 48, 72, 96시간에 실온에서 2~3분 동안 최대 속도로 원심분리하는 단계; 및 피키아 배양액을 원심분리하여 상층액을 얻은 후 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF를 포함하는 Tris-HCL 완충용액(pH 7.5) 2ℓ로 희석한 다음, DEAE-Sephacel column chromatography(2.0 X 10 cm)하는 단계를 포함하는 재조합 혈액응고인자 VII의 분리정제방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 인간의 태반 혈액응고인자 VII 재조합 벡터를 통하여 인간의 태반 혈액응고인자 VII를 대량 생산함으로써 수술 등 대량 출혈이 발생하는 경우 등에 사용되는 의약 등 다양한 분야 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 혈액응고 작용기전 도면이다.
- 도 2는 혈관벽 조직 손상에 의한 TF와 FVII의 복합체에 의한 혈액응고 과정을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 FVII의 일차구조 모식도이다.
- 도 4는 본 발명의 발현벡터 pPF7의 제작과정의 개략 흐름도이다.
- 도 5는 본 발명의 발현벡터 pPF7의 아가로스 겔 전기영동 결과 사진이다.
- 도 6은 본 발명에 의한 방법으로 정제된 재조합 FVII의 SDS-PAGE 분석 결과 사진이다.
- 도 7은 본 발명에 의한 방법으로 제조된 재조합 FVII의 DSML 정제에 대한 SDS-PAGE 분석 결과 사진이다.
- 도 8은 본 발명에 의한 방법으로 제조된 재조합 FVII의 활성도 측정결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 혈액응고인자 VII 유전자를 포함하는 발현벡터 pPF7의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0018] <실시예 1>

[0019] FVII cDNA 증폭

[0020] 인간 태반(Human placenta)으로부터 상용의 RNA purification kit(ATGene ltd)를 사용하여 FVII mRNA를 얻었고, 이를 다시 RT-PCR를 이용하여 FVII cDNA를 제조하였다. 상기 제조된 FVII cDNA를 주형으로 하여 Taq DNA polymerase를 이용한 PCR(polymerase chain reaction) 반응에 의해 증폭된 FVII cDNA를 얻었다.

[0021] 상기 PCR에 이용되는 FVII 유전자 증폭을 위한 프라이머(primer)는 다음과 같다.

[0022] 센스 프라이머: 5'cg gaa ttc gac cag ctg atc tgt gtg 3'

[0023] 안티센스 프라이머: 5' cc gga ttc ggg aaa tgg ggc tcg cag 3'

[0024] PCR 반응은 하기 표 1의 조성물로 1차 PCR을 2회 실시하였다.

표 1

1차 PCR 조성물

물 질	양
10X Taq buffer	5 μ l
dNTP	4 μ l
primer each	10pmole
인간태반 cDNA	1 μ l
멸균수	35 μ l
DMSO	2 μ l
Taq pol	1 μ l(1 unit/ μ l)

[0026] 상기 표 1의 PCR 반응물은 95℃에서 5분간 반응 후 94℃에서 1분, 52℃에서 1분간 35 사이클을 실시하였다.

[0027] 상기 1차 PCR을 수행한 반응물에 하기의 표 2의 조성물을 첨가하여 다시 2차 PCR을 실시하였다.

표 2

2차 PCR 조성물

물 질	양
10X Taq buffer	5 μ l
dNTP	4 μ l
primer each	10pmole
1차 PCR 반응물	2 μ l
멸균수	31 μ l
DMSO	2 μ l
Taq pol	1 μ l(1 unit/ μ l)

[0029] 상기 표 2의 PCR 반응물은 95℃에서 5분간 반응 후 94℃에서 1분, 72℃에서 1분 20초로 35 사이클을 실시하였다.

- [0030] 상기 1차 및 2차에 걸친 PCR을 통하여 증폭된 약 1.22kb의 FVII cDNA를 제한효소 처리하여 반응물을 1% 아가로스 젤(agarose gel)상에서 전기영동하였다. 그 후, 에티디움 브로마이드(EtBr)로 염색하여 자외선 상에서 FVII cDNA 밴드만을 면도칼로 분리한 후, BIO 101사(vista, CA, USA)의 진클린 II 키트를 사용하여 아가로스겔로부터 FVII cDNA를 순수 정제하여 멸균수에 녹였다.
- [0031] <실시예 2>
- [0032] FVII cDNA를 포함한 재조합 벡터의 제조 및 형질전환
- [0033] (1)플라스미드 및 균주
- [0034] DNA 조작을 위한 플라스미드로 pBluscript를 사용하였다. 균주로는 *E. coli* DH5 α , JM109를 사용하였다.
- [0035] (2)재조합벡터의 제조
- [0036] PCR을 통하여 확보된 FVII cDNA는 pPIC9K 벡터와 같은 대장균-효모 왕복벡터(*E. coli*-Yeast shuttle vector)를 이용하여 클로닝 하였으며, 먼저 *E. coli* 숙주 시스템에서 클로닝 한 후 효모 시스템(Yeast system)으로 도입하는 방법을 사용하였다. 상기 실시예 1의 증폭된 FVII cDNA를 pBluescripts 벡터에 클로닝하여 pTF7 벡터를 제조하고 이를 *E. coli*를 통해 정제한 후 AOX1과 HIS4를 지닌 효모벡터(yeast vector) pPIC9K에 클로닝하는 과정을 통하여 FVII cDNA 함유 pPF7 발현벡터를 제조하였다(도 4 참조).
- [0037] 즉, 상기 실시예 1의 증폭된 FVII cDNA를 pBluescripts 벡터에 삽입하기 위하여 pBluescripts 벡터를 제한효소 EcoR I/Not I로 절단한 후 아가로스 겔 상에서 전기 영동하여 절단된 벡터만을 순수 분리하여 상기 실시예 1의 증폭된 FVII cDNA를 섞은 다음 T4 DNA ligase를 첨가하여 4℃에 12시간 반응시켰다. 본 배양한 *E. coli* DH5 α 는 1ml를 마이크로튜브(microtube)에 옮긴 후, 얼음에서 10분 동안 놓은 후에 원심분리하여 그 펠렛(pellet)에 500 μ l의 칼슘클로라이드(CaCl_2)를 첨가하고, 다시 20분 동안 얼음에 놓아두었다. 이것을 다시 원심분리하여 그 펠렛에 50 μ l의 CaCl_2 를 첨가하여 competent cell을 만든다. 라이게이션(ligation) 시킨 산물(product)를 CaCl_2 방법을 사용한 competent cell에 첨가한 후, 30분 동안 얼음에 놓아두었다. 이것을 42℃ water bath에서 45초 동안 열 충격 한 다음 얼음에서 다시 2분 동안 놓아두고, LB 배양액 900 μ l를 가해준 후 37℃ incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 이렇게 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 된 재조합 벡터 pTF7을 암피실린 항생제를 포함한 LB에서 선별한 후 PCR과 제한효소 처리를 통한 검증실험으로 확인하였다.
- [0038] 상기 형질전환체 pTF7 벡터를 제한효소 EcoR I/Not I로 절단한 후 절단된 FVII cDNA를 제한효소 EcoR I/Not I로 절단된 pPIC9K와 섞어 준 후 T4 DNA ligase를 첨가하여 4℃에 12시간 반응시켰다. 이것을 위의 competent cell 제작 방법을 이용하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 시킨 후 재조합 벡터 pPF7을 암피실린 항생제를 포함한 LB에서 선별하여 최종적으로 FVII cDNA가 삽입된 재조합 벡터 pPF7를 확보하였다(도 9 참조).
- [0039] FVII cDNA의 pPF7벡터로의 삽입여부를 확인하기 위하여 상기 재조합 벡터 pPF7을 제한효소 EcoR I/Not I를 처리하여 아가로스 겔(agarose gel) 전기영동을 하였다.
- [0040] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0041] lane 1은 marker DNA를 나타내고, lane 2는 pPIC9K를 나타내며, lane 3은 FVII cDNA를 나타내고, lane 4는 EcoR I/Not I 처리된 발현벡터 pPF7을 나타낸다.
- [0042] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, lane4는 pPF7 벡터를 제한효소 EcoR I/Not I 으로 처리한 결과물로서 약 1,200bp 크기의 insert DNA를 보여주고 있다. 이러한 결과로부터 FVII cDNA가 pPF7벡터의 EcoR I/Not I 제한효소 작용부위에 삽입되어 있음을 알 수 있었다.
- [0043] (3)재조합 벡터의 피키아 파스토리스로의 형질전환

[0044] 상기 pPF7 벡터를 피키아 파스토리스로 도입하기 위해 제한 효소 SalI(Promega)을 처리하여 선형화 시킨 뒤, 순수 정제하여 다시 3차 멸균수로 녹였다. 상기의 pPF7 벡터는 인비트로젠(Invitrogen)사의 스피로플라스트(spheroplast) 제조시약 및 방법에 의해 피키아 파스토리스 GS115(his4)에 형질전환 되었다. 상기의 재조합 미생물을 YPD 배지에서 미드-로그 상태(mid-log phase)로 배양하여 수득한 후 3차 멸균수, SED(19ml의 1M 소르비톨, 25mM EDTA, pH 8.0과 1ml의 1M DTT), 1M 소르비톨로 차례로 세척하고, 20ml의 SCE(1M 소르비톨, 1mM EDTA, 10mM 소듐 사이트레이트 완충용액, pH 5.8)완충용액에 재 부유시킨 후 10ml씩 두 튜브로 나누었다. 한 튜브는 자이몰레이즈(Zymolase)의 적정처리 시간을 결정하는데 사용하였다. 800nm에서 흡광도를 측정하여 자이몰레이즈 처리의 적정시간을 결정하였다. 제한효소 SalI 처리로 선형화된 약 10 μ g의 pPF7 DNA으로 피키아 파스토리스의 형질전환을 시도 하였다. 피키아 파스토리스 형질전환체의 선별을 위해 사용된 배지는 RDB 평판배지이며 이의 조성은 1M소르비톨, 2% 텍스트로즈, 1.34% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 바이오틴, 5 $\times 10^{-3}$ % 아미노산들(히스티딘 제외)이다. 또한 여기서 일차로 선별된 형질전환체의 유전자 복수 삽입(multicopy intergration) 여부를 선별하기 위하여 다양한 농도의 YPD-G418(1% 효모추출액, 2% 펩톤, 2% 텍스트로즈, 다양한 양(0.25-3.0mg/ml)의 G418) 평판배지에서 형질전환체를 배양하였다. pPIC9K 벡터에는 세균에서 유래된 카나마이신 유전자가 있으며 이 유전자는 피키아 파스토리스가 G418 항생제에 대한 내성을 가지게 하는 역할을 한다. pPF7 DNA 재조합 유전자가 피키아 파스토리스 내로 형질전환시 카나마이신 유전자도 같이 삽입되므로 다수의 유전자가 삽입될수록 G418 항생제에 농도에 비례적인 내성 균주가 만들어 진다. 따라서, 모든 형질전환체에 대한 단백질의 발현량을 측정하여 형질전환체를 선별하였다.

[0045] <실시예 3>

[0046] FVII cDNA를 포함한 재조합 벡터의 발현

[0047] 발현조건의 최적화를 위해서 통상적으로 염색체에 삽입되어 있는 목표유전자의 Copy Number가 많은 형질 전환체의 콜로니를 배양 접시 내에서 5~10개씩 선별하였다. 발현조건은 온도, 배지조건, 유도물질이 첨가될 경우, 유도물질(일반적으로 Methanol)의 농도, 기타의 외분비 경로를 택할 경우 안정화 물질(Casamino acid, PMSF, Zn²⁺ 등)을 기준으로 하였다. 발현양의 최적화는 먼저 50ml 이하의 배지 량에서 시작하며 1개의 형질전환체당 2개의 동일한 배양을 실시하였다. 각각의 균주에 대한 가장 많은 발현량을 나타내는 형질 전환체를 선별하였다. 발현된 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석, Spectrophometric assay 등이 수행된 후 각각에 대한 활성을 비교 하였다.

[0048] 실시예 2의 pPF7 재조합 미생물을 25ml BMGY 배지에 각각 접종 후, 30℃의 조건의 shaking incubator에서 240rpm으로 2일간 배양하였다. 그 뒤, 1,500g로 원심분리하여 재조합 미생물을 모은 후, 0.5% 메탄올(Heymann, Germany)이 함유된 200ml BMMY 배지로 재부유하였다. 재부유액은 배플드 플라스크(baffled flask)에서 240rpm으로 30℃에서 4일간 배양하였고 24시간 마다 메탄올을 최종 0.5%되게 배양액에 첨가해 주었다. 배양액은 배양 시간대별(24hr, 48hr, 72hr, 96hr, 120hr)로 각각 1ml씩 수득하여 원심분리하고, 상층액만을 새 튜브에 모아 다음 분석 전까지 -80℃로 얼려 보관하였다. 위에서 준비된 배지내로 발현, 분비된 FVII 샘플들을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석하여 발현유도 후 96시간이 최적 발현시간대임을 알 수 있었다.

[0049] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0050] lane 1은 단백질 표준 마커를 나타내고, lane 1, 2, 3, 5는 각각 1일, 2일, 3일, 5일 배양 후의 배양액의 SDS-PAGE 전기영동결과를 나타낸다.

[0051] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, lane 5에서 45kDa 정도 크기의 재조합 FVII(화살표 표시)이 피키아 시스템에서 발현되어 세포 밖으로 분비되었음을 알 수 있었다.

[0052] 피키아 배양액을 원심분리하여 상층액을 얻은 후 1mM EDTA, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF를 포함하는 Tris-HCL 완충용액(pH 7.5) 2ℓ 로 희석한 다음, DEAE-Sephacel column chromatography(2.0 X 10cm) 방법으로 재조합 FVII을 분리

정제하여 SDS-PAGE 전기영동으로 확인하였다.

[0053] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0054] lane 1은 단백질 표준 마커를 나타내고, lane 2는 피키아 배양액을 나타내고, lane 3은 DEAE-Sephacel 후 정제된 재조합 FVII 용액을 나타낸다.

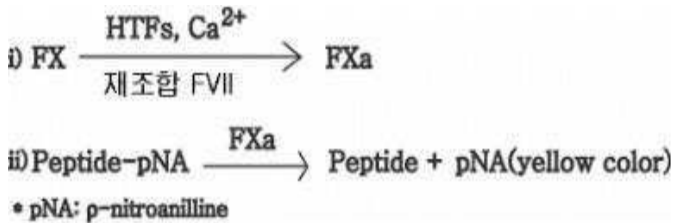
[0055] 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, lane 3에서 45kDa 정도 크기의 재조합 FVII이 피키아 시스템에서 발현되어 세포 밖으로 분비되었음을 알 수 있었다.

[0056] <실시예 4>

[0057] FVII cDNA를 포함한 재조합 벡터의 생물학적 활성도 측정

[0058] 하기의 식에서 요약된 것처럼 두 단계의 반응에 기초하여 우선 FX가 HTF와 FVII에 의해 FXa로 활성화 되고 이 활성화된 FXa를 chromogenic substrate인 peptidyl- p-nitroaniline(pNA), Spectrozyme FXa(MeO-CO-D-CHG-Gly-Arg- pNA.AcOH, American Diagnostica, Greenwich, CT, USA)를 사용하여 유리된 p-NA를 405nm에서 측정하여 간접적으로 재조합 FVII의 catalytic activity를 측정 하였다.

화학식 1



[0059]

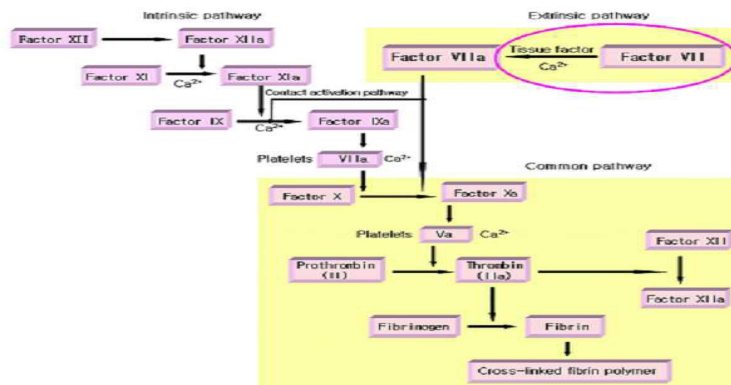
[0060] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0061] Open circle(□)은 상업용의 표준 FVII 시약을 나타내고, Closed circle(■)은 본 발명의 FVII 용액을 나타낸다.

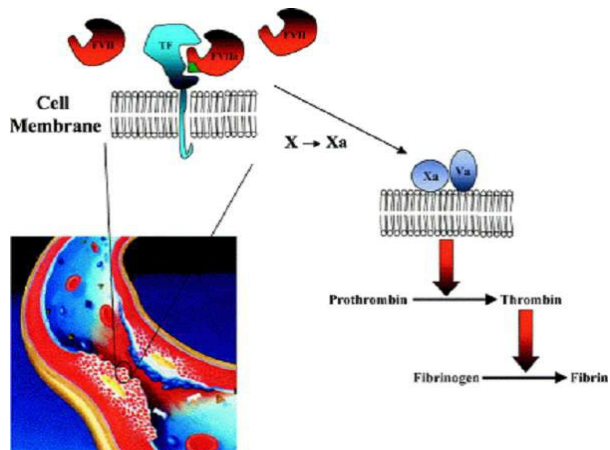
[0062] 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, spectrozyme Xa의 분해속도가 재조합 FVII의 양에 의존하는 형태로 일어나고 있음을 보여주고 있다. 즉 재조합 FVII의 생물학적 활성도를 보여주고 있으며 상업적으로 유용한 FVII의 시약과의 활성도 비교 차원에서 거의 차이가 없음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 본 발명의 재조합 FVII가 성공적으로 발현 되었으며 homogeneous한 상태로 분리 정제되었음을 알 수 있었다.

도면

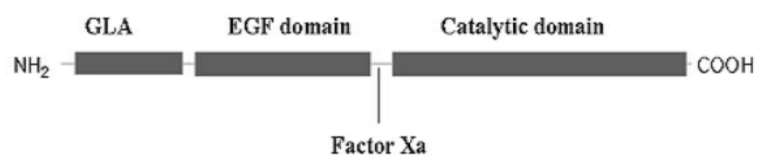
도면1



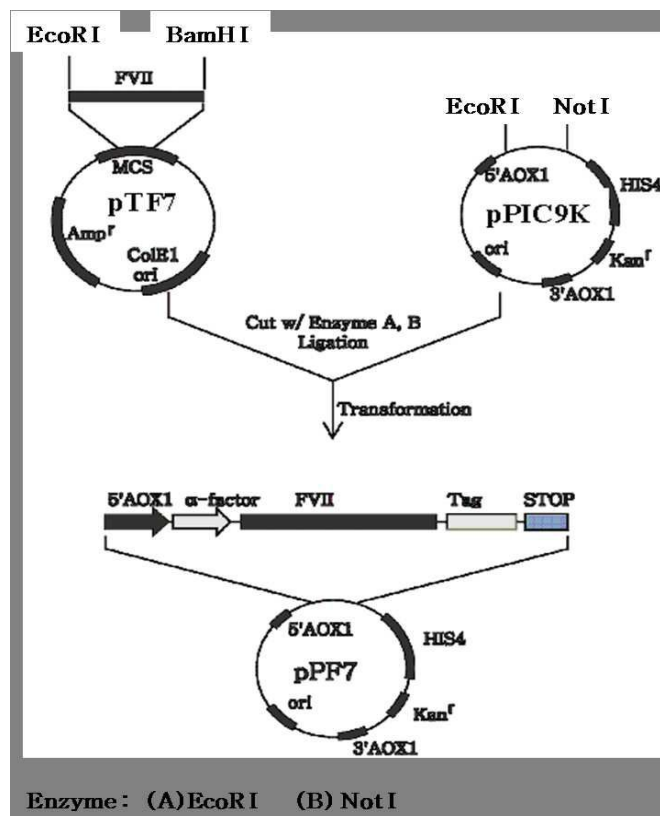
도면2



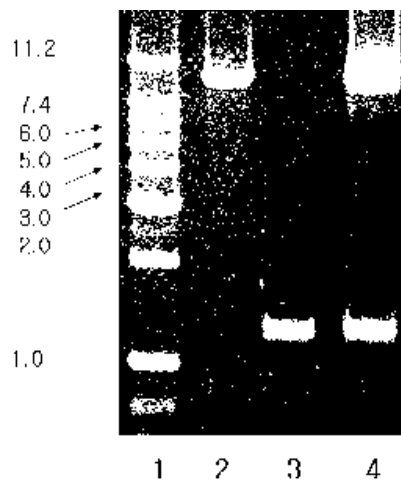
도면3



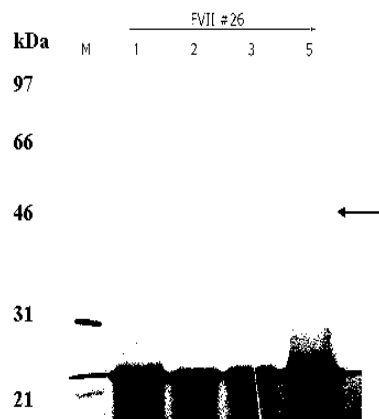
도면4



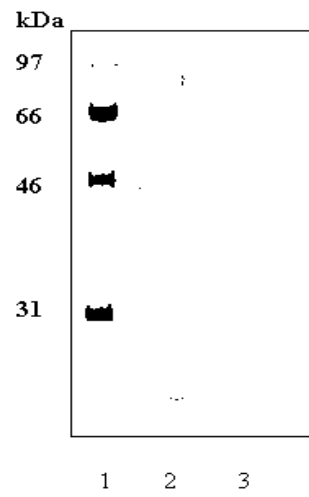
도면5



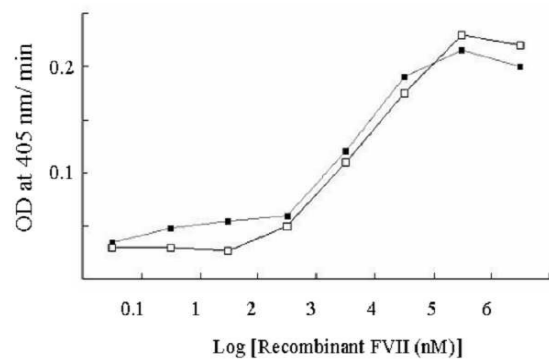
도면6



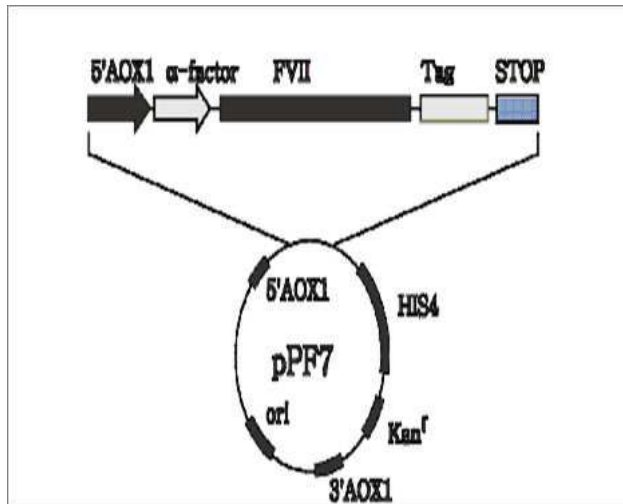
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110>	Konyang university industrial cooperation foundation	
<120>	Expression method of recombinant blood coagulation factor 7 in <i>Pichia pastoris</i>	
<150>	10-2009-0135281	
<151>	2009-12-31	
<160>	1	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	1401	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	cDNA of blood coagulation factor 7	
<400>	1	
	atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctgget	60
	gcaggcgggg tcgctaaggc ctcaggagga gaaacacggg acatgccctg gaagccgggg	120
	cttcacagag tcttcgtaac ccaggaggaa gccacggcg tctgcaccg gcgccggcgc	180
	gccaacgcgt tcttgaggga gctgcggccg ggctccctgg agagggagtg caaggaggag	240
	cagtgtcct tgcaggaggc cgggagatc ttcaaggacg cggagaggac gaagctgttc	300
	tggatttctt acagtgatgg ggaccagtgt gctcaagtc catgccagaa tgggggctcc	360
	tgcaaggacc agctccagtc ctatatctgc ttctgcctcc ctgccttcga gggccggaac	420
	tgtgagacgc acaaggatga ccagctgac tgtgtgaacg agaacggcgg ctgtgagcag	480

tactgcagtg accacacggg caccaagcgc tcctgtcggg gccacgaggg gtactctctg	540
ctggcagacg ggggtgtcctg cacaccaca gttgaatata catgtggaaa aatacctatt	600
ctagaaaaaa gaaatgccag caaaccccaa ggccgaattg tggggggcaa ggtgtgcccc	660
aaaggggagt gtccatggca ggtcctgttg ttggtgaatg gagctcagtt gtgtgggggg	720
acctgatca acaccatctg ggtggtctcc gcggcccact gtttcgacaa aatcaagaac	780
tggaggaacc tgatcgcggt gctgggcgag cagcacctca gcgagcacga cggggatgag	840
cagagccggc ggggtggcga ggtcatcatc ccagcacgt acgtcccggg caccaccaac	900
cacgacatcg cgtgctccg cctgcaccag cccgtggtcc tcttgacca tgtggtgccc	960
ctctgcctgc ccgaacggac gttctctgag aggacgtgg ccttcgtgcg cttctcattg	1020
gtcagcggct ggggccagct gctggaccgt ggcgccacgg ccctggagct catggtgctc	1080
aacgtgcccc ggctgatgac ccaggactgc ctgcagcagt cacggaaggt gggagactcc	1140
ccaaatatca cggagtacat gttctgtgcc ggctactcgg atggcagcaa ggactcctgc	1200
aagggggaca gtggaggccc acatgccacc cactaccggg gcacgtggtc cctgacgggc	1260
atcgtcagct ggggccaggg ctgcgcaacc gtgggccact ttgggggtga caccagggtc	1320
tcccagtaca tcgagtggct gcaaaagctc atgcgctcag agccacgccc aggagtcctc	1380
ctgcgagccc catttccta g	1401