



등록특허 10-2617593



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월29일

(11) 등록번호 10-2617593

(24) 등록일자 2023년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/70 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0066236
(22) 출원일자 2023년05월23일
심사청구일자 2023년05월23일
(30) 우선권주장
1020220062789 2022년05월23일 대한민국(KR)
(65) 공개번호 10-2023-0163939
(43) 공개일자 2023년12월01일
(56) 선행기술조사문헌
KR100844497 B1

(73) 특허권자
주식회사 백스다임
서울특별시 강남구 봉은사로63길 11, 3층 335호(삼성동, 명화빌딩)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
손명현
서울 강남구 삼성로 150 206동 1201호
김도다
경기도 시흥시 옥구천서로 373번길 8-1, 영남5차 아파트 502동 203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 11 항

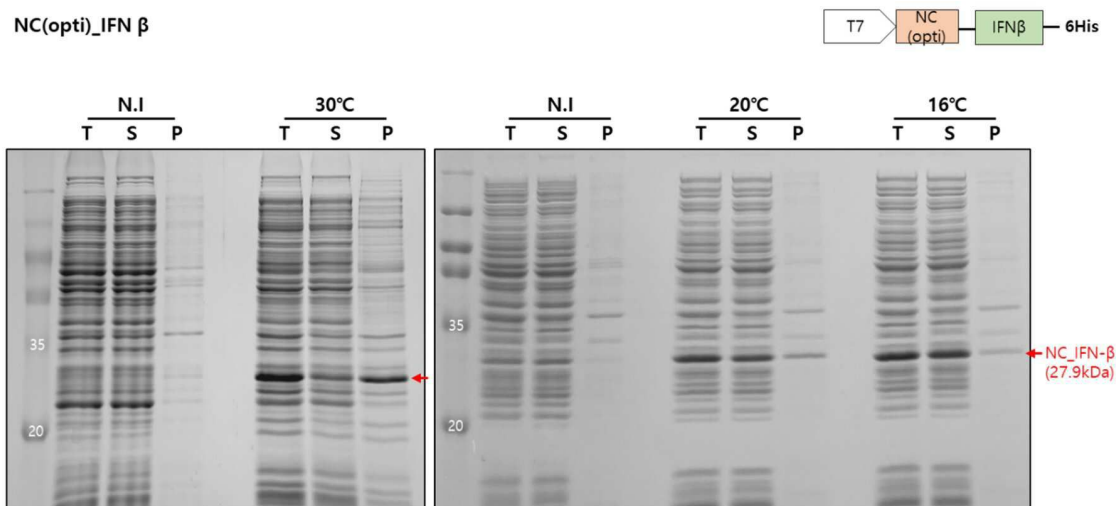
심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 바이러스 뉴클레오캡시드를 이용한 목적 단백질 발현 플랫폼

(57) 요약

본 발명의 목적 단백질 발현 벡터는 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, 본 발명의 목적 단백질 생산 방법은 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 2319/85 (2013.01)

C12N 2740/16022 (2013.01)

(72) 발명자

박성현

인천광역시 계양구 안남로573번길 16, 5동 208호(
효성동, 뉴서울1차아파트)

김성재

서울특별시 강남구 개포로110길 15, 110동 1003호
(일원동, 일원동우성7차아파트)

김승후

서울특별시 중랑구 겸재로29길 27, 103동 603호(면
목동, 아남리치카운티아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

목적 단백질의 융합 파트너로서 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 목적 단백질 발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오캡시드는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 아미노산을 유지하면서, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 발현 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오캡시드는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 35번, 38번 및 48번의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 발현 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 벡터는 목적 단백질을 대장균에서 발현하기 위한 것인, 목적 단백질 발현 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 목적 단백질 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 7

목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터를 제작하는 단계;

상기 목적 단백질 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 생산 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것인, 목적 단백질 생산 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오패시드는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 아미노산을 유지하면서, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 생산 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 인간면역결핍바이러스(HIV)의 뉴클레오패시드는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 35번, 38번 및 48번의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는, 목적 단백질 생산 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 숙주 세포는 대장균인, 목적 단백질 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 뉴클레오패시드를 이용한 목적 단백질 발현 플랫폼에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 바이러스 뉴클레오패시드를 융합 파트너로 이용하여 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질을 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현 벡터, 형질전환 숙주 세포 및 목적 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현대의 생명공학에 있어서 핵심은 재조합 단백질의 생산이며, 그 중에서도 중요한 것은 재조합 단백질의 고유 활성을 유지하면서 다량으로 생산하는 것이다. 이렇게 생산된 재조합 단백질은 외래 단백질의 생산 및 회수, 기능 연구를 위한 결정화, 산업화 등에 매우 중요하다.

[0004] 현재까지 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 많은 재조합 단백질 생산 연구가 진행되어 왔는데, 이는 대장균의 조작이 쉽고, 성장 시간이 짧고, 발현이 안정적이고, 비용이 적게 들고, 규모를 쉽게 바꿀 수 있는 장점이 있기 때문이다. 그러나, 대장균에서 생산된 외래 기원의 재조합 단백질은 발현 레벨이 낮거나, 적절한 "전사 후 샤페론(post-translational chaperons)"이나 "전사 후 과정(posttranslational processing)"이 없기 때문에, 생산된 재조합 단백질의 불가용성 단백질 응집체(inclusion body)로 형성되는 단점이 지적되고 있다(Francois Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, Current Opinion in Biotechnology (1999), 10:411-421).

[0005] 이러한 문제들을 해결하기 위하여 재조합 단백질에 MBP, NusA, SUMO, Thioredoxin 또는 GST 등과 같은 수용성이 높은 단백질을 융합시켜 발현시키는 방법이 개발되어 있으나(Dominic Esposito and Deb K Chatterjee, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, Current Opinion in Biotechnology (2006), 17:353-358), 이들 또한 각각 기술적 한계가 있어 새로운 발현 기술의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Francois Baneyx, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, Current Opinion in Biotechnology (1999), 10:411-421.

(비특허문헌 0002) Dominic Esposito and Deb K Chatterjee, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, Current Opinion in Biotechnology (2006), 17:353-358.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 주된 목적은 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질을 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현 벡터를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 발현 벡터로 형질전환되어 상기 목적 단백질의 효율적인 발현을 실현할 수 있는 숙주 세포를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터 및/또는 상기 숙주 세포를 이용하여 상기 목적 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 목적 단백질 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면 목적 단백질, 특히 대장균에서 불용성으로 발현되는 난발현 단백질을 숙주 세포, 특히 대장균에서 효율적으로 발현시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 바이러스 뉴클레오캡시드(NC)의 융합 파트너로서의 활용 가능성을 조사하기 위한 것으로서, 대장균에서 NC를 His-tag와 함께 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 NC의 융합 파트너로서의 활용 가능성을 조사하기 위한 것으로서, 대장균에서 NC를 발현(His-tag 없이 발현)시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 대장균에 도입하고 목적 단백질인 GFP의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 대장균에 도입하고 IPTG 농도를 다르게 처리한 경우의 목적 단백질인 GFP의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 대장균에 도입하고 IPTG 농도를 다르게 처리한 경우 발현된 목적 단백질인 GFP의 형광 신호를 마이크로플레이트 리더로 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 대장균에 도입하고 목적 단백질인 IFN β 의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 7은 융합 파트너 없이 대장균에서 IFN β 를 발현시키고 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 8은 도 6의 실험에 따른 목적 단백질인 IFN β 를 Ni-친화성 크로마토그래피로 정제한 다음 연속 희석하여 IFN β 반응 분석 실험을 수행한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 야생형 NC(wild type)와 함께 실험에 사용한 돌연변이 NC의 아미노산 서열 및 이들과 아연 이온과의 상호작용을 나타낸다.
- 도 10은 도 9의 각 NC를 적용한 경우의 융합 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 일 실시형태에 따른 발현 벡터를 대장균에 도입하고 목적 단백질인 GFP의 발현을 유도한 다음, 아연 친화성 크로마토그래피(Zinc affinity chromatography)로 정제하고 SDS-PAGE 및 GFP의 형광 신호 측정으로 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질을 이중 또는 동종의 숙주 세포에서 효율적으로 발현할 수 있도록 하는 벡터로서, 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오키프시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터가 제공된다.
- [0020] 본 명세서에서 사용된 용어 "목적 단백질"(target protein)은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 벡터에 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 삽입하여 숙주 세포에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 목적 단백질은 항원, 항체, 세포수용체, 효소, 구조 단백질, 혈청 및 세포 단백질로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것일 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "발현 벡터"는 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 이중 또는 동종의 숙주 세포에 도입하여 발현시키기 위한 벡터로서, 원형 또는 선형의 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 DNA 또는 RNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 프로모터 및/또는 터미네이터 서열을 포함할 수 있으며, 복제 개시점, 선택 마커, 폴리아데닐화 신호 등과 같은 벡터로 사용하기 위해 필요한 구성 요소 또한 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 발현 벡터는 플라스미드, 바이러스 벡터, 파지 입자 또는 게놈 삽입물일 수 있으며, 숙주 세포 내로 도입된 후, 숙주 세포의 게놈과 무관하게 복제되거나 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것이거나, 추후 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함시켜 사용하기 위한 것일 수 있다. 특히 후자의 경우 바람직하게는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 용이하게 포함시킬 수 있는 구성 요소로서 통상 다중 클로닝 부위(Multi Cloning Site: MCS)라고 부르는 제한효소 인식 부위를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 바이러스 뉴클레오키프시드를 목적 단백질의 융합 파트너로서 적용할 경우 목적 단백질을 효율적으로, 예를 들어 융합 파트너를 사용하지 않거나 다른 기존의 융합 파트너를 사용하는 경우에 불용성으로 발현되는 단백질을 수용성으로, 발현시킬 수 있다는 새로운 연구 결과를 바탕으로 한다.
- [0026] 특히, 본 발명에서 사용하는 융합 파트너는 그 크기가 매우 작기 때문에(짧은 길이의 펩타이드), 목적 단백질에 대한 간섭을 최소화할 수 있다는 장점이 있다.
- [0027] 또한, 본 발명에 따르면 바이러스 뉴클레오키프시드 고유의 아연 결합 도메인(zinc binding domain)을 이용할 수 있다는 장점이 있다. 예를 들어, 바이러스 뉴클레오키프시드의 아연 결합 도메인을 이용하면, 예를 들어 아연 친화성 정제 방법을 사용하면, 히스티딘 태그와 같은 정제를 위한 별도의 구성 요소 없이도 융합 단백질을 쉽게 정제할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오키프시드는 기존에 알려진 바이러스 뉴클레오키프시드일 수 있으며, 본 발명의 활성, 즉 목적 단백질의 융합 파트너로서 작용하여 목적 단백질이, 특히 대장균에서, 수용성으로 발현되도록 하는 활성이 유지되는 한 상기 바이러스 뉴클레오키프시드의 단편 또는 변이체일 수도 있다.
- [0029] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오키프시드는 레트로바이러스, 예를 들어 HIV-1, SIV, MuLV 등과 같은 레트로바이러스의 뉴클레오키프시드일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오키프시드는 바람직하게는 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)의 뉴클레오키프시드이다.
- [0031] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오키프시드는 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 서열을 유지하면서, 보다 바람직하게는 14번, 17번, 22번, 27번, 35번, 38번, 43번 및 48번의 서열을 유지하면서, 보다 바람직하게는 6번, 9번, 10번,

13번, 14번, 17번, 19번, 22번, 25번, 27번, 28번, 31번, 32번, 33번, 35번, 37번, 38번, 40번, 43번, 46번, 48번 및 51번의 서열을 유지하면서, 상기 서열 동일성을 만족하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 본 발명에서 바이러스 뉴클레오키프를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기 서열과 50% 이상, 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기 서열 또는 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기 서열을 포함한다. 바람직하게는 서열번호 1에서 14번, 17번, 22번 및 27번의 서열을 유지하는, 보다 바람직하게는 14번, 17번, 22번, 27번, 35번, 38번, 43번 및 48번의 서열을 유지하는, 보다 바람직하게는 6번, 9번, 10번, 13번, 14번, 17번, 19번, 22번, 25번, 27번, 28번, 31번, 32번, 33번, 35번, 37번, 38번, 40번, 43번, 46번, 48번 및 51번의 서열을 유지하는 아미노산 서열을 암호화하면서, 상기 서열 동일성을 만족하는 염기 서열을 포함한다.

[0033] 본 명세서에서 서열 동일성은 아미노산 서열과 참조 아미노산 서열 사이 또는 뉴클레오타이드 서열과 참조 뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 동일성을 의미한다. 서열 동일성은 비교 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열의 위치를 비교하여 결정할 수 있다. 비교 서열의 위치를 같은 아미노산 또는 염기가 차지하는 경우, 이때 분자들은 그 위치에서 동일하다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열들 사이의 동일성 정도는 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에 의해 공유되는 위치에서 동일한 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 수의 함수이다. 예를 들어, FASTA 또는 BLAST를 포함하는 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램을 사용하여 두 서열 사이의 동일성을 계산할 수 있다.

[0034] 본 발명의 발현 벡터는 원핵 및 진핵을 포함한 모든 생물 중에서 선택된 세포에서 목적 단백질을 발현하기 위한 것일 수 있으나, 바람직하게는 대장균속(*Escherichia*) 미생물에서 목적 단백질을 발현하기 위한 것이며, 보다 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)에서 목적 단백질을 발현하기 위한 것이다.

[0035] 본 발명의 발현 벡터는 다른 구성 요소, 예를 들어 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위, 예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS); 목적 단백질과 융합 파트너 사이의 간격을 부여하기 위한 링커 서열; 태그 서열, 예를 들어 히스티딘 태그 서열; 및/또는 발현된 융합 단백질의 일부를 잘라내기 위한 프로테아제 인식 부위 암호화 서열을 더 포함할 수 있다. 이들 각각은 필요에 따라 다양하게 배치될 수 있으며, 또한 다양한 수로 포함될 수 있다.

[0036] 구체적인 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질의 N-말단에 바이러스 뉴클레오키프가 연결되도록 구성된다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 본 발명의 발현 벡터는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 바이러스 뉴클레오키프 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)) 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.

[0037] 다른 구체적인 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질은 C-말단에 바이러스 뉴클레오키프가 연결되도록 구성된다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 본 발명의 발현 벡터는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 목적 단백질 암호화 부위 또는 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 클로닝 부위(예를 들어 제한효소 인식 부위, 예를 들어 다중 클로닝 부위(MCS)), 바이러스 뉴클레오키프 암호화 부위 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.

[0038] 또 다른 구체적인 일 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는 사용자가 목적 단백질의 N-말단에 융합 파트너를 연결시킬 것인지, 반대로 목적 단백질의 C-말단에 융합 파트너를 연결시킬 것인지를 선택하여 적용할 수 있도록 구성된다. 이러한 실시형태의 구체적인 예시로서, 본 발명의 발현 벡터는 5'에서 3' 방향으로 순서대로 프로모터, 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 제1클로닝 부위, 바이러스 뉴클레오키프 암호화 부위, 목적 단백질 암호화 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 제2클로닝 부위 및 터미네이터가 작동 가능하게 연결된 컨스트럭트를 포함한다.

[0039] 본 발명의 발현 벡터는 목적 단백질 및 융합 파트너 암호화 DNA의 전사(transcription)가 박테리오파지 T7 시스템에 의해 조절되도록 T7 프로모터 및 T7 터미네이터를 포함할 수 있다. 이에 따르면 대장균에서 목적 단백질의 보다 효과적인 생산이 가능하다.

[0040] 상기과 같은 본 발명의 발현 벡터는 예를 들어 기존의 발현 벡터를 기반으로 통상적인 재조합 방식을 사용하여 제작할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 다른 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 목적 단백질 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다.
- [0042] 본 발명에서 숙주 세포는 원핵 및 진핵을 포함한 모든 생물의 세포에서 선택된 것일 수 있으나, 바람직하게는 대장균속(*Escherichia*) 미생물의 세포이며, 보다 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)이다.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환" 또는 "도입"은 폴리뉴클레오타이드를 숙주로 도입하여 폴리뉴클레오타이드가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 발현 벡터로 형질전환시키는 방법은 전기천공법(electrophoration), 인산칼슘(CaPO_4)법, 염화칼슘(CaCl_2)법, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-텍스트란법, 양이온 리포좀법 또는 초산 리튬-DMSO법을 포함할 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 일 실시형태에 따르면, 목적 단백질을 이중 또는 동종의 숙주 세포에서 효율적으로 생산할 수 있는 방법으로서, 목적 단백질 및 상기 목적 단백질의 융합 파트너로서 바이러스 뉴클레오캡시드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 목적 단백질 발현 벡터를 제작하는 단계; 상기 목적 단백질 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 목적 단백질 생산 방법이 제공된다.
- [0045] 이때 목적 단백질 발현 벡터에 관한 사항 및 목적 단백질 발현 벡터의 도입에 관한 사항 등의 구체적인 사항은 앞서 기술된 사항을 참조할 수 있다.
- [0046] 형질전환체의 배양을 위해 숙주 세포에 적합한 것으로 알려진 배양 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 대장균인 경우, LB(Luria-Bertani) 배지에서 16 내지 37℃의 온도로 배양하는 방법을 사용할 수 있다. 발현 벡터에 항생제 선택 마커(예를 들어, 항생제인 암피실린(ampicillin) 저항성 유전자)의 구성 요소가 있다면, 이때 배지에 해당 항생제(예를 들어, 암피실린)를 첨가하여 배양함으로써 발현 벡터가 포함된 대장균의 증식을 우선적으로 유도할 수 있다. 또한 발현 벡터에 목적 단백질 암호화 DNA의 전사 및/또는 번역을 조절하는 구성 요소, 예를 들어 lac 오페론 관련 구성 요소가 있다면, 관련 물질, 예를 들어 IPTG를 첨가하여 목적 단백질의 발현을 유도할 수 있다.
- [0048] 이하의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위해 제시한 것으로 하기 내용이 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0050] [실시예]
- [0051] 제조예 1
- [0052] 바이러스 뉴클레오캡시드(NC)의 융합 파트너로서의 활용 가능성을 조사하기 위해, HIV 바이러스의 NC를 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 1). 이때 정제를 위한 6개의 히스티딘도 추가 적용하였다.
- [0053] 목적 단백질의 발현이 T7 프로모터에 의해 조절되도록 설계된 pGEMEX-1(Promega) 벡터를 기반으로 제작하였으며, NC를 암호화하는 서열로서 서열번호 2의 서열을 사용하였다.
- [0055] 제조예 2
- [0056] 상기 제조예 1과 비교하여 6개의 히스티딘이 제외된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 2).
- [0058] 실시예 1
- [0059] 목적 단백질인 GFP(green fluorescent protein)를 N-말단에 NC가 융합 파트너로 연결된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 3).
- [0060] 상기 제조예 2와 같은 방식을 사용하되, pGEMEX-1(Promega) 벡터의 MCS에 NC를 암호화하는 서열(서열번호 2)과 목적 단백질 암호화 서열을 삽입하였다.
- [0061] 제작된 벡터에서 NC 및 GFP 암호화 서열 부위는 서열번호 4와 같으며, 발현될 것으로 예상되는 NC+GFP 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 5와 같다.
- [0063] 실시예 2
- [0064] 목적 단백질인 인간 유래 IFN β (interferon-beta)를 N-말단에 NC가 융합 파트너로 연결된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 6). 이때 정제를 위한 6개의 히스티딘도 추가 적용하였다.
- [0065] 상기 실시예 1과 같은 방식을 사용하되, NC를 암호화하는 서열로서 대장균 코돈 최적화 서열인 서열번호 3의 서

열을 사용하였다.

[0066] 제작된 벡터에서 NC 및 IFN β 암호화 서열 부위는 서열번호 6과 같으며, 발현될 것으로 예상되는 NC+IFN β 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 7과 같다.

[0068] 비교예 1

[0069] 상기 실시예 2와 같은 방식을 사용하되, 목적 단백질인 인간 유래 IFN β 를 NC가 융합 파트너로 연결되지 않고 N-말단에 6개의 히스티딘이 연결된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다(도 7).

[0071] 실험예 1

[0072] 상기 제조예 1, 제조예 2, 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 벡터를 대장균 Shuffle/T7/pLysS에 형질전환시켜 배양하였다. Shuffle/T7/pLysS는 BL21 star (DE3) pLysS One ShotTM vitrogenTM competent 대장균에서 pLysS 플라스미드를 Mini-prep을 통해 추출하고 pLysS를 SHuffle®T7(NEB) competent 대장균에 도입한 후 pLysS에 포함되어 있는 항생제 마커인 클로람페니콜(chloramphenicol: CM)로 선별해서 만든 것이다. 모든 형질전환된 대장균은 50 μ g/ml의 암피실린(ampicillin) 및 34 μ g/ml의 클로람페니콜이 포함된 LB 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 16 내지 37 $^{\circ}$ C로 설정하였다. 대장균의 OD600값이 0.5 이상이 되면, T7 프로모터를 활성화시키기 위해 IPTG를 0 μ M 내지 1mM 수준으로 첨가하고, 단백질이 충분히 생산될 수 있도록, IPTG를 넣어준 이후부터 30 $^{\circ}$ C에서는 3시간 또는 16 ~ 20 $^{\circ}$ C에서는 16시간 정도를 배양하였다. 충분히 배양된 대장균은 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 보관하였다. 그 다음, LB 배지의 5ml에 해당되는 대장균 수확물에 PBS 0.3ml을 넣고 초음파 분해를 하여, 용해물(lysate)을 만들었다. 그리고 용해물을 원심분리하여 용해 분획(soluble fraction)과 펠렛 분획(pellet fraction)으로 나누었고, 총 용해물(total lysate), 용해 분획(soluble fraction), 펠렛 분획(pellet fraction)을 구분하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0073] 먼저 제조예 1 및 제조예 2의 벡터를 각각 대장균에 도입하여 NC의 발현을 유도한 결과, 도 1 및 도 2와 같이, 16 $^{\circ}$ C 및 20 $^{\circ}$ C 모두에서 정상적으로, 즉 예상되는 크기 및 수용성으로, 대량으로 발현되는 것으로 나타났다. 특히, 도 2와 같이, His-tag가 없는 경우에도 거의 100% 수용성으로 발현되는 것으로 나타났다. 이는 NC가 목적 단백질의 발현 효율 증가 목적, 특히 수용성으로 발현되도록 하는 목적의 융합 파트너 용도로서 활용될 가능성이 있음을 보여준다.

[0074] 실시예 1의 벡터를 대장균에 도입하여 목적 단백질인 GFP의 발현을 유도한 결과, 도 3과 같이, 16 $^{\circ}$ C 및 20 $^{\circ}$ C 모두에서 정상적으로 발현되는 것으로 나타났다. GFP는 대장균에서 불용성으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 결과는 본 발명의 방식에 따르면 대장균에서 불용성으로 발현되는 단백질을 수용성으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.

[0075] 추가로, 실시예 1의 벡터를 대장균에 도입하고 IPTG 농도를 다르게 처리한 경우의 GFP 발현을 조사한 결과, 도 4와 같이, IPTG가 저농도인 경우에도 IPTG의 농도에 비례하여 효율적으로 발현되는 것으로 나타났으며, 발현된 단백질의 GFP 형광 신호를 마이크로플레이트 리더로 측정한 결과, 도 5와 같이, IPTG의 농도에 비례하여 GFP 형광 신호가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 본 발명의 방식에 따르면 목적 단백질을 본래의 기능을 유지한 상태로 효율적으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.

[0076] 실시예 2 및 비교예 1의 벡터를 각각 대장균에 도입하여 목적 단백질인 IFN β 의 발현을 유도한 결과, 도 6 및 도 7과 같이, 실시예 2의 경우, 비록 30 $^{\circ}$ C에서 불용성으로 발현되는 비율이 상대적으로 높기는 하였지만, 16 $^{\circ}$ C 및 30 $^{\circ}$ C 모두에서 많은 양의 단백질이 정상적으로, 특히 수용성으로 발현되는 것으로 나타난 반면, 비교예 1의 경우, 대부분의 단백질이 불용성으로 발현되는 것으로 나타났다. 이는 본 발명의 방식에 따르면 대장균에서 불용성으로 발현되는 단백질을 수용성으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.

[0077] 추가로, 실시예 2의 벡터를 대장균에 도입하여 목적 단백질인 IFN β 의 발현을 유도하고 Ni-친화성 크로마토그래피로 정제한 다음 초기 200nM을 기준으로 1/2 연속 희석하여 IFN β 반응 분석(Invivogen) 실험을 진행한 결과, 도 8과 같이, 정제물에서 IFN β 반응이 확인되며, 이러한 IFN β 반응이 희석 배수가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 이때 대조군(Con)으로는 배지를 사용하였다. 이러한 결과는 본 발명의 방식에 따르면 목적 단백질을 본래의 기능을 유지한 상태로 효율적으로 발현시킬 수 있음을 보여준다.

[0079] 실시예 3

[0080] 목적 단백질인 대장균 이열성 장독소 B 서브유닛(heat-labile enterotoxin B subunit, LTb)을 N-말단에 NC가 융합 파트너로 연결된 형태로 발현시키기 위한 벡터를 제작하였다. 이때 정제를 위한 6개의 히스티딘을 추가 적

용하였고, 상기 실시예 1과 같은 방식을 사용하였다.

[0082] 실시예 4

[0083] 상기 실시예 3과 같이 벡터를 제작하되, 서열번호 1의 NC 아미노산 서열에서 14번, 17번 및 27번의 시스테인(cysteine: C)이 세린(serine: S)으로 치환된 형태로 발현되도록 하였다(도 9의 $\Delta ZF1$). 이들 잔기는 22번의 히스티딘(histidine: H)과 함께 NC의 첫 번째 아연 결합 도메인에서 아연 이온과 상호작용하는 잔기이다.

[0085] 실시예 5

[0086] 상기 실시예 3과 같이 벡터를 제작하되, 서열번호 1의 NC 아미노산 서열에서 35번, 38번 및 48번의 시스테인이 세린으로 치환된 형태로 발현되도록 하였다(도 9의 $\Delta ZF2$). 이들 잔기는 43번의 히스티딘(H)과 함께 NC의 두 번째 아연 결합 도메인에서 아연 이온과 상호작용하는 잔기이다.

[0088] 실시예 6

[0089] 상기 실시예 3과 같이 벡터를 제작하되, 서열번호 1의 NC 아미노산 서열에서 14번, 17번, 27번, 35번, 38번 및 48번의 시스테인이 세린으로 치환된 형태로 발현되도록 하였다(도 9의 $\Delta ZF1+2$).

[0091] 실험예 2

[0092] 상기 실시예 3 내지 실시예 6의 벡터를 상기 실험예 1과 같은 방식으로 대장균 Shuffle/T7/pLysS에 형질전환시킨 다음, 융합 단백질의 생산을 유도하고, 각각의 생산된 융합 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0093] 이의 결과, 도 10과 같이, 실시예 3 및 실시예 5의 경우 거의 대부분의 융합 단백질이 정상적으로 수용성으로 발현되는 것으로 나타난 반면, 실시예 4 및 실시예 6의 경우 수용성으로 발현되는 융합 단백질의 비율이 약 50% 정도로 감소한 것으로 나타났다. 이는 NC의 첫 번째 아연 결합 도메인에서 아연 이온과 상호작용하는 잔기가 목적 단백질의 수용성 발현에 중요함을 보여준다.

[0095] 실험예 3

[0096] 상기 실시예 1의 벡터를 상기 실험예 1과 같은 방식으로 대장균 Shuffle/T7/pLysS에 형질전환시킨 다음, 융합 단백질의 생산을 유도하고, 아연 친화성 크로마토그래피(Zinc affinity chromatography)로 정제한 다음 SDS-PAGE 및 GFP 형광 신호 측정(마이크로플레이트 리더 사용)으로 분석하였다.

[0097] 이의 결과, 도 11과 같이, 아연 친화성 크로마토그래피를 통해 상당히 높은 회수율로 융합 단백질을 정제할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 히스티딘 태그와 같은 별도의 정제용 태그 없이 NC의 아연 결합 도메인을 이용하여 효율적인 정제가 가능함을 보여준다.

[0099] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0101] <서열목록>

[0102] 서열번호 1

[0103] 서열명칭 : Amino acid sequence of HIV nucleocapsid

[0104] 서열타입 : AA

[0105] 생물명 : human immunodeficiency virus

[0106] 서열 :

[0107] QRGNFRNQRKTVKCFNCGKEGHI AKNCRAPRKKGCWRCGREGHQMKDCTERQAN

[0109] 서열번호 2

[0110] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid

[0111] 서열타입 : DNA

- [0112] 생물명 : human immunodeficiency virus
- [0113] 서열 :
- [0114] CAGCGGGAAACTTCAGGAACCAGAGAAAACTGTGAAGTGCTTCAATTGCGGAAAGGAGGGCCACATCGCTAAGAACTGCCGCGCCCCAGAAAGAAAGGC
TGCTGGAGATGCGGCAGAGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACAGAGAGACAGGCAAAAC
- [0116] 서열번호 3
- [0117] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding HIV nucleocapsid
- [0118] 서열타입 : DNA
- [0119] 생물명 : synthetic construct
- [0120] 서열 :
- [0121] CAGCGTGGTAACTCCGTAACCAGCGTAAAACCGTTAAATGCTTCAACTGCGGCAAAGAAGGCCACATCGCGAAAACTGCCGTGCGCCGCGTAAAAAAGGC
TGCTGGCGTTGCGGCGGTGAAGGCCACCAGATGAAAGATTGCACCGAACGTCAGGCGAAC
- [0123] 서열번호 4
- [0124] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding fusion protein of NC and GFP
- [0125] 서열타입 : DNA
- [0126] 생물명 : synthetic construct
- [0127] 서열 :
- [0128] AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCTACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGAGAGGGTGAAGGT
GATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACCTGTTCATGGCCAACTTGTCCTACTTTCTCTTATGGTGTTCAA
TGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTCAAAGATGAC
GGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTT
GGACACAAATTGGAATACAACATACTACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAAATTAGACACAACATT
GAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCT
GCCCTTTGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAATATACAAA
- [0130] 서열번호 5
- [0131] 서열명칭 : Amino acid sequence of fusion protein of NC and GFP
- [0132] 서열타입 : AA
- [0133] 생물명 : synthetic construct
- [0134] 서열 :
- [0135] SKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD
GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDPVLLPDNHYLSTQS
ALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK
- [0137] 서열번호 6
- [0138] 서열명칭 : Nucleotide sequence encoding fusion protein of NC and IFN β
- [0139] 서열타입 : DNA
- [0140] 생물명 : synthetic construct
- [0141] 서열 :
- [0142] AAATCTTACAACCTGCTGGGCTTCTGCAGCGTTCTCCAACCTCCAGTGCCAGAAGCTGCTGTGGCAGCTGAACGGTCGCCTGGAATACTGCCTGAAAGAT
CGTATGAACTTCGATATCCCGGAAGAAATCAAACAGTTGCAAGCAGTTCCAGAAAAGAAGATGCGGCGTTAACCATCTACGAAATGCTGCAAAACATTTTCGCT
ATCTTCCGTCAGGATTCCAGCTCCACCGGCTGGAACGAAACCATCGTTGAAAACCTTCTGGCGAACGTTTATCACCAGATCAATCATCTGAAAACCGTGCTG
GAAGAGAACTGGAAAAAGAAGACTTACCCGTTGGTAAACTGATGTCTCGTGCACCTGAAGCGTTACTACGGTCGTATCTGCATTATCTGAAAGCGAAA

GAGTACAGCCACTGCGCTTGGACCATTGTTCTGTTGAAATTCTGCGCAATTTCTACTTCATCAACCGTCTGACCGGTTACCTGCGTAAC

[0144] 서열번호 7

[0145] 서열명칭 : Amino acid sequence of fusion protein of NC and IFN β

[0146] 서열타입 : AA

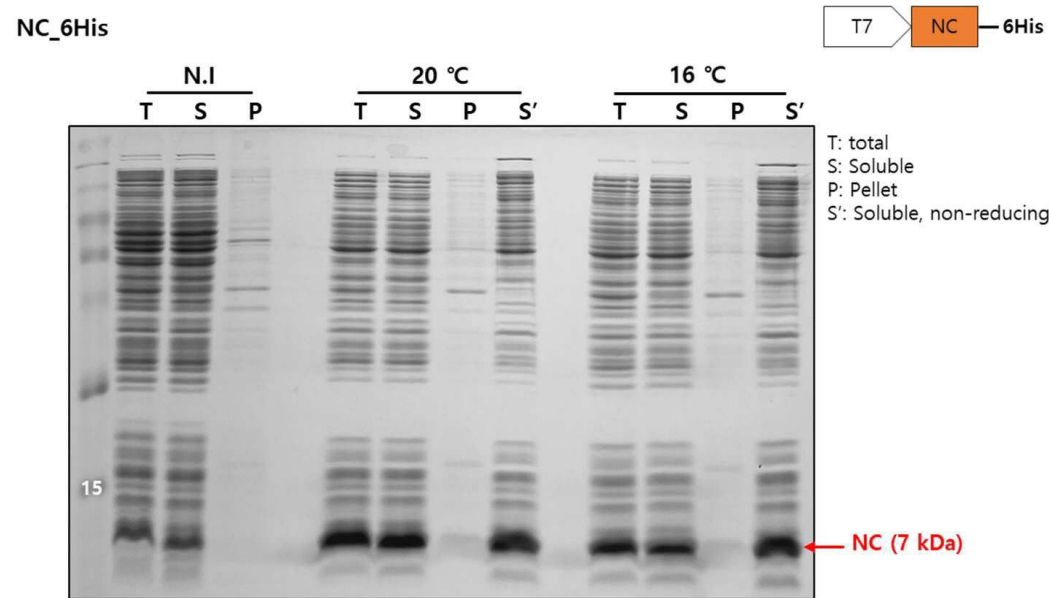
[0147] 생물명 : synthetic construct

[0148] 서열 :

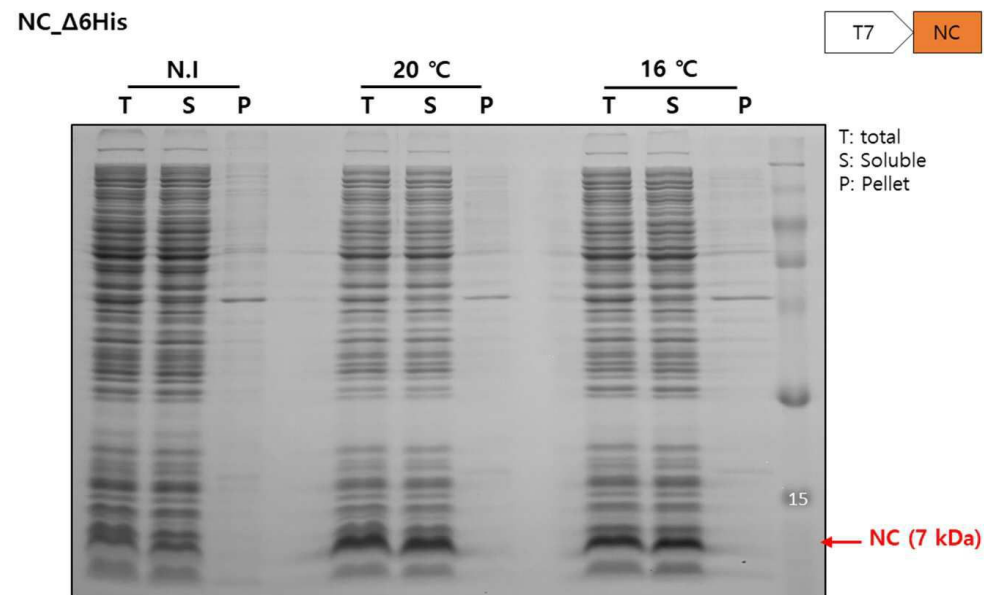
[0149] KSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVL
EEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRLN

도면

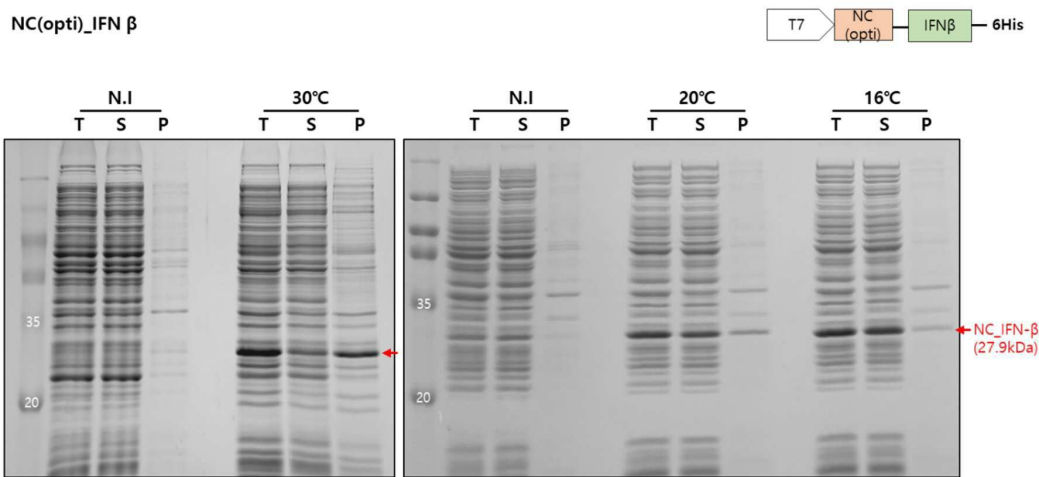
도면1



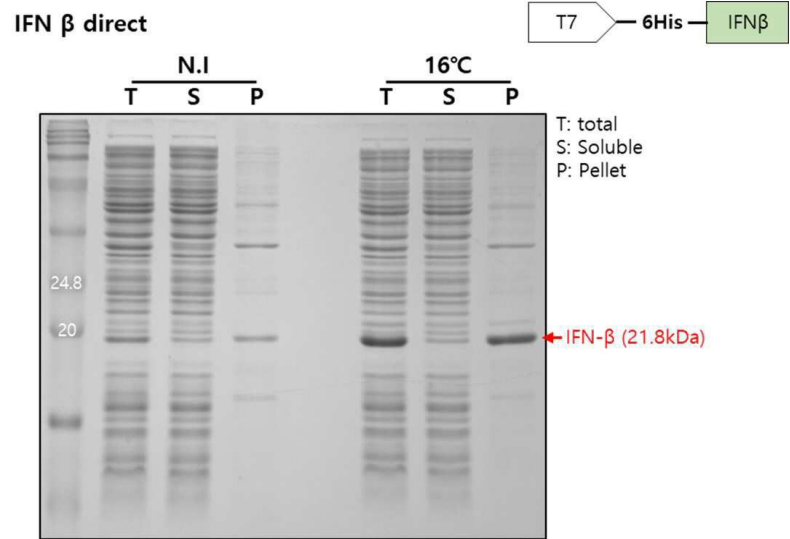
도면2



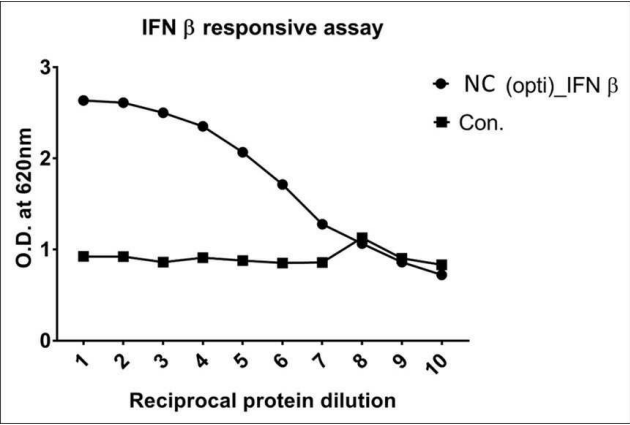
도면6



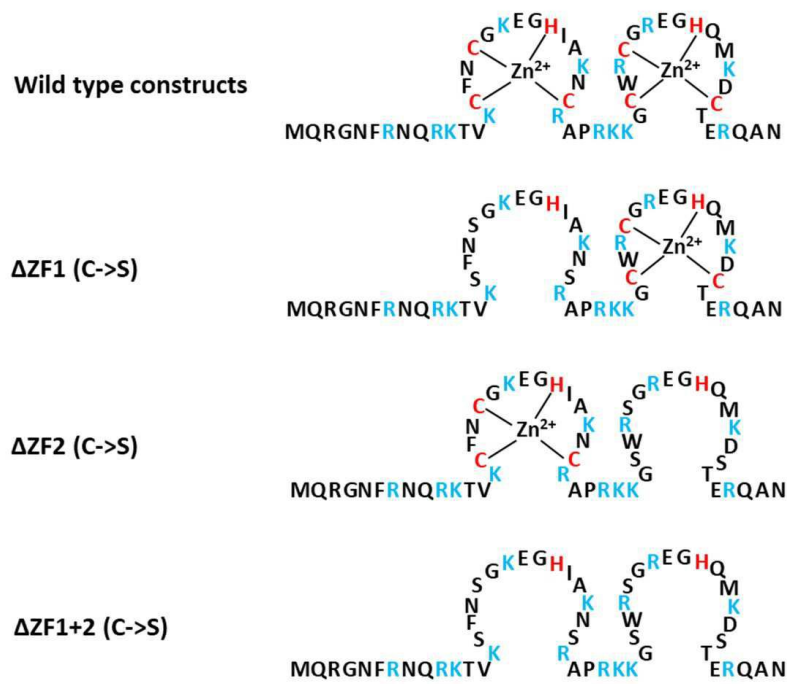
도면7



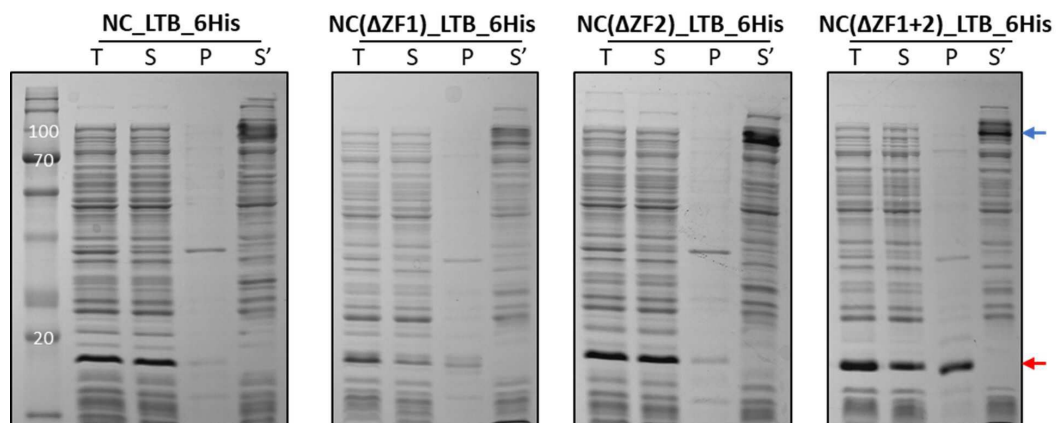
도면8



도면9



도면10

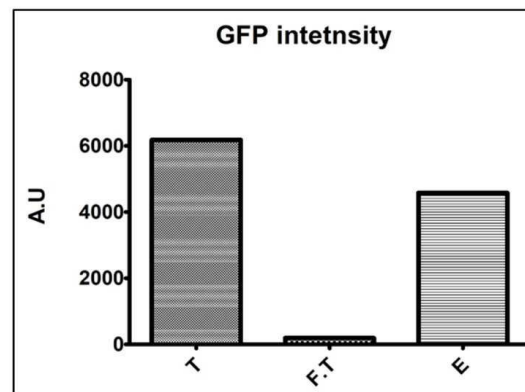


도면11

- SDS PAGE



- GFP



- T : Protein sample loaded to IMAC column
- F.T : Flow-through of IMAC columns
- E : Protein eluted from the IMAC columns

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.