



등록특허 10-2590910



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월18일

(11) 등록번호 10-2590910

(24) 등록일자 2023년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/36 (2006.01) B01D 61/24 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 1/36 (2013.01)

B01D 61/243 (2022.08)

(21) 출원번호 10-2021-0013035

(22) 출원일자 2021년01월29일

심사청구일자 2021년01월29일

(65) 공개번호 10-2022-0109705

(43) 공개일자 2022년08월05일

(56) 선행기술조사문헌

US20140171356 A1*

US20200291065 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이진우

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 702호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)

김철훈

서울특별시 마포구 대흥로 175, 102동 902호(대흥동, 신촌그랑자이)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 11 항

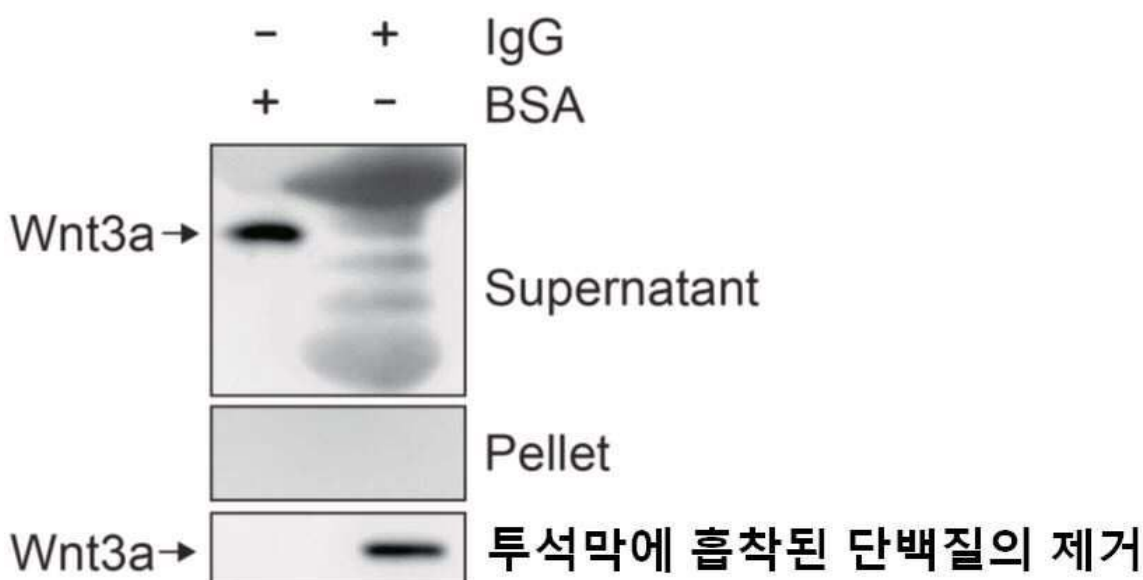
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 Wnt 단백질의 생체적합성 정제 방법

(57) 요약

본 발명은 Wnt 단백질의 활성과 수용성을 유지하면서 이를 정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 계면활성제가 포함된 Wnt 단백질 용액에 알부민을 첨가한 뒤 투석으로 계면활성제를 선택적으로 제거하는 간단한 공정을 통해 세포 독성의 계면활성제-의존성 수용성 상태를 생체적합성의 알부민-의존성 수용성 상태로 효율적으로 전환할 수 있다. 이에, 본 발명은 산업적 활용도가 높은 Wnt 단백질의 친수성과 고유의 생물학적 활성이 유지되는 효율적인 정제 및 장기 보관 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C07K 1/12 (2013.01)

C07K 1/34 (2013.01)

C07K 14/4702 (2013.01)

(72) 발명자

권순성

서울특별시 종로구 통일로16길 8-3, 117동 201호(
무악동, 인왕산아이파크)

여주혜

서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 112동 2704호
(반포동, 반포 래미안아이파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315659
과제번호	2018R1A6A1A03023718
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 중점연구소지원사업
연구과제명	난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톤 제어 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711109899
과제번호	2019R1A2C3002354
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	PCDH19 돌연변이에 의한 뇌질환 프로세스 규명
기 여 율	50/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 Wnt 단백질의 정제방법:

- (a) Wnt 단백질 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 계면활성제를 첨가하는 단계;
- (b) 상기 계면활성제가 첨가된 생물학적 시료에 소혈청알부민(BSA)을 첨가하는 단계; 및
- (c) 상기 소혈청알부민(BSA)이 첨가된 생물학적 시료에 대해 상기 계면활성제가 선택적으로 제거될 수 있는 투석막(dialysis membrane)을 이용하여 투석을 수행하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 Wnt 단백질은 Wnt3a인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 계면활성제는 CHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate), CHAPSO(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate), NP-40(nonyl phenoxypolyethoxylethanol), 디옥시콜레이트(deoxycholate), SDS(소듐 도데실 설페이트), 트리톤(Triton) X-100(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-114(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-45(Polyethylene glycol 4-tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-405(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether, Polyoxyethylene (40) isooctylphenyl ether), 디기토닌(digitonin), 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 계면활성제는 CHAPS인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 CHAPS는 상기 생물학적 시료 내 0.1 - 5 v/v%로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 투석 막은 5 - 50 kDa의 컷오프 값을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 소혈청알부민은 상기 생물학적 시료 내에 0.1 - 20 mg/mL의 농도가 되도록 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 Wnt 단백질의 수용성 증진 방법:

- (a) Wnt 단백질과 계면활성제를 포함하는 생물학적 시료에 소혈청알부민(BSA)을 첨가하는 단계; 및
- (b) 상기 소혈청알부민(BSA)이 첨가된 생물학적 시료에 대해 상기 계면활성제가 선택적으로 제거될 수 있는 투석 막(dialysis membrane)을 이용하여 투석을 수행하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 Wnt 단백질은 Wnt3a인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 계면활성제는 CHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate), CHAPSO(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate), NP-40(nonyl phenoxypolyethoxyethanol), 디옥시콜레이트(deoxycholate), SDS(소듐 도데실 설페이트), 트리톤(Triton) X-100(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-114(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-45(Polyethylene glycol 4-tert-octylphenyl ether), 트리톤 X-405(Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether, Polyoxyethylene (40) isooctylphenyl ether), 디기토닌(digitonin), 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 계면활성제는 CHAPS인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 독성이 없는 천연 단백질을 이용하여 Wnt 단백질에 친수성을 부여하는 신규한 Wnt 단백질 정제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] Wnt 단백질은 세포 표면 수용체에 결합하는 높은 보존성을 갖는 분비되는 신호전달 분자 패밀리를 형성하는 분비성 당단백질로서 종양발생, 및 배아 발생 과정에서 세포 운명의 조절 및 형태화(patterning)를 포함한 여러 발생과정에 관여한다. Wnt 단백질은 리간드와 결합을 통해 연속된 세포 내 생물학적 과정을 개시하고 최종적으로 β -카테닌 및 DNA 결합 단백질 TCF의 핵 내 활성을 통해 표적 유전자의 전사를 일으킨다. Wnt 단백질은 또한 골 형성 과정과 연관된 매우 다양한 세포 운명에 관여하는데, 예를 들어 중간엽 줄기세포에 골격발생 운명을 결정하는데 영향을 주는 sox9의 발현 수준을 조절하거나, 세포를 조골세포 또는 연골세포로 분화시키는데 영향을 준다.

[0004] 한편, Wnt 단백질은 번역 후 변형(post-translational modification)의 일환으로 지방에 의한 변형 즉, 팔미트화(palmitoylation)가 일어나며, 이러한 변형은 Wnt 단백질의 분비와 Wnt 수용체에 대한 활성에 있어 필수적이거나, 한편으로는 Wnt가 불수용성인 상태로 존재하는 가장 큰 원인이 된다. 이에, 재조합적으로 생산된 소수성의

Wnt 단백질을 고순도로 분리, 정제하는 것은 매우 어려운 과정이다.

[0005] Willert 등에 의해 CHAPS와 같은 계면활성제를 이용한 분리 방법이 제시된 후(*Nature* 423 (6938): 448-452 (2003)) Wnt 단백질의 표준 정제법이 되었으며 이를 통해 정제된 Wnt가 시약으로 상용화 되었으나, 계면활성제는 세포 독성이 있기 때문에 계면활성제 기반 Wnt 제제를 생물 시스템에 적용하는데 한계가 있다. 이에 최근 재생 의학의 발달 등으로 인해 계면활성제에 의한 오염이나 독성이 없고, 수용성이면서도 생물학적 활성을 유지하는 Wnt 제제에 대한 수요가 크게 증가하고 있다. 현재까지 대안으로서 리포솜으로 Wnt 단백질을 포집하거나, Wnt 단백질을 분비하는 세포를 우태아혈청(FBS)을 포함하는 배양액에 넣고 조건화배지(conditioned media)를 만드는 방법이 제안되었으나, 리포솜은 고가일 뿐 아니라 효율이 낮고 역시 독성을 나타내며, 우태아혈청은 동물성 오염물질이 포함될 위험이 있고 구성 성분이 일정하지 않아 품질관리가 되지 않는 단점이 있다. 이에, 산업적 활용도가 높은 Wnt 단백질에 대한 효율적인 정제방법의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 특허등록공보 제9,937,126호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 연구 및 의약 개발 분야에서의 산업적 활용도가 높은 Wnt 단백질의 활성을 증진시키고, 특히 번역 후 팔미트화(palmitoylation)로 인해 감소된 Wnt 단백질의 수용성을 회복함으로써 생체적합성과 고유의 생물학적 활성이 유지된 채 장기간 보관할 수 있는 효율적인 정제 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 현재 표준적인 Wnt 단백질의 정제 방법으로 사용되는 계면활성제 기반 정제 방법에 알부민 첨가 단계 및 투석을 통한 계면활성제의 선택적 제거 단계를 순차적으로 추가하는 간단한 공정 개량을 통해 우수한 활성과 수용성을 유지하면서도 세포 독성이 전혀 없는 고순도의 Wnt 단백질을 수득할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 Wnt 단백질의 정제방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 Wnt 단백질의 수용성 증진 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 Wnt 단백질의 정제방법을 제공한다:

[0016] (a) Wnt 단백질 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 계면활성제를 첨가하는 단계;

[0017] (b) 상기 계면활성제가 첨가된 생물학적 시료에 알부민을 첨가하는 단계; 및

[0018] (c) 상기 알부민이 첨가된 생물학적 시료에 대해 상기 계면활성제가 선택적으로 제거될 수 있는 투석막(dialysis membrane)을 이용하여 투석을 수행하는 단계.

[0019] 본 발명자들은 연구 및 의약 개발 분야에서의 산업적 활용도가 높은 Wnt 단백질의 활성을 증진시키고, 특히 번역 후 팔미트화(palmitoylation)로 인해 감소된 Wnt 단백질의 수용성을 회복함으로써 생체적합성과 고유의 생물학적 활성이 유지된 채 장기간 보관할 수 있는 효율적인 정제 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 현재 표준적인 Wnt 단백질의 정제 방법으로 사용되는 계면활성제 기반 정제 방법에 알부민 첨가 단계 및 투석을 통한 계면활성제의 선택적 제거 단계를 순차적으로 추가하는 간단한 공정 개량을 통해 우수한 활성과 수용성을 유지하면서도 세포 독성이 전혀 없는 고순도의 Wnt 단백질을 수득할 수 있음을 발견하였다.

- [0020] 본 명세서에서 용어 “Wnt 단백질”은 세포 간 신호전달을 담당하는 지질-변형된 분비성 당단백질인 Wnt 패밀리에 속하는 단백질을 의미한다. Wnt 단백질은 다양한 유형의 세포의 증식과 분화를 조절하면서 뼈 형성, 면역 조절, 암, 줄기 세포 재생 등에 관여하고, 특히 동물 세포에서 조직과 장기의 형성을 조정하는데 Wnt 단백질의존적인 Wnt 신호전달 경로가 중요한 역할을 한다. 이에, 재생 의학 분야 등에서 활성과 순도를 유지한 채 Wnt 단백질을 안정적으로 대량 생산하는 것은 중요한 과제가 되어오고 있다.
- [0021] 본 발명의 방법으로 정제될 수 있는 Wnt 단백질은 Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 및 Wnt16을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 구체적으로, 본 발명의 방법을 통해 정제되는 Wnt 단백질은 Wnt3a이다.
- [0023] 본 발명에서, “Wnt 단백질의 활성 유지”는 Wnt 단백질의 생체적합성 또는 생체 내 고유한 기능이 생산, 정제 및 저장 기간을 거치면서 감소하는 정도가 대조군에 비하여 측정 가능할 정도로 유의하게 개선되는 것을 의미한다. 활성(activity)의 유지 또는 증가는 단순한 기능(function)의 유지, 증가 뿐 아니라 안정성(stability)의 증가로 기인한 궁극적인 활성 유지 및 증가를 포함한다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 계면활성제-의존성 수용성 상태를 알부민-의존성 수용성 상태로 전환시키는 본 발명의 방법은 세포 독성을 완전히 제거하면 서도 공정 전 과정에 걸쳐 시료 내 Wnt 단백질을 활성형의 가용성 형태(soluble form)로 지속적으로 유지하여 응집(aggregation)을 차단함으로써 구조적 안정성을 증가시킨다. 이에, 본 발명의 용어 “활성 유지”는 “안정성 유지” 또는 “안정화”와 동일한 의미로 사용된다.
- [0024] 본 명세서에서 “Wnt 단백질을 발현하는 세포”는 Wnt 단백질을 내재적(endogenously)으로 발현하는 세포와 유전자 전달체를 통해 각 단백질의 코딩 핵산 분자가 도입된 형질 도입(transfection) 세포를 모두 포괄한다.
- [0025] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0026] 본 명세서에서 용어 “유전자 전달체”는 원하는 타겟 유전자를 대상 세포에 도입하여 발현시키기 위한 매개체를 의미한다. 이상적인 유전자 전달체는 인체에 무해하고 대량생산이 용이하며 효율적으로 유전자를 전달할 수 있어야 한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “유전자 전달”은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 세포 및 조직 수준에서, 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달체는 유전자 침투 시스템 및 유전자 확산 시스템으로 기재될 수 있다.
- [0028] Wnt 단백질이 이의 발현 세포를 이용한 재조합적 형태로 공급될 경우, 본 발명의 알부민은 상기 발현 세포의 배양 배지에 첨가되거나 상기 배양 배지에서 분리된 Wnt 단백질-포함 시료에 첨가될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 “배지(culture media)”는 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있도록 하는 배지를 의미하며, 세포의 배양에 적절한 것으로 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 세포배양 배지는 동물 세포의 배양에 통상적으로 사용되는 공지의 배지들로서, 예를 들어 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, DMEM-F12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), MacCoy's 5A 배지, AmnioMax, AminoMaxII complete Medium 및 Chang's Medium MesemCult-XF Medium을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, Wnt 단백질 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 모든 시료로서, 조직, 기관, 기관 유사체, 세포 또는 이들의 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “계면활성제(surfactant)”는 극성 부분과 무극성 부분을 동시에 가지고 있어 용액 내 소수성 물질과 친수성 물질 간 형성되는 경계면을 활성화시킴으로써 그 표면 장력을 감소시키는 물질을 의미한다. 본 발명의 계면활성제는 번역 후 팔미트화(palmitoylation)로 인해 지방-변형된 Wnt 단백질의 소수성을 감소시키고 수용성을 증가시키는 역할을 하며, 예를 들어 CHAPS, CHAPSO, NP-40(nonyl phenoxypolyethoxylethanol),

디옥시콜레이트(deoxycholate), SDS(소듐 도데실 설페이트), 트리톤(Triton) X-100, 트리톤 X-114, 트리톤 X-45, 트리톤 X-405, 디기토닌(digitonin), NP-40, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 계면활성제는 CHAPS이다.

[0032] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 CHAPS는 상기 생물학적 시료 내 0.1 - 5 v/v%로 포함된다. 보다 구체적으로는 0.5 - 4 v/v%로 포함되며, 보다 더 구체적으로는 0.7 - 3 v/v%로 포함되고, 가장 구체적으로는 0.8 - 2 v/v%로 포함된다.

[0033] 본 명세서에어 용어 “알부민(albumin)”은 포유동물 유래 알부민의 전체 또는 생물학적 활성을 유지하는 그 기능적 일부를 의미한다. 자연계의 야생형 알부민(예를 들어 GenBank 접근번호 ANC98520.1의 알부민)일 수 있고, 상기 단백질과 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 95% 이상, 가장 구체적으로 98% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 모두 포함할 수 있다. 또한, 상기 알부민과 동일하거나 이에 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질 변이체도 포함할 수 있다. 알부민은 친수성을 부여하여 수분을 끌어들이는 작용을 함으로써 혈액 속의 수분함량을 유지하는 것으로 알려져 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 “생체적합성”은 생체 내에 투여되어 기관의 세포, 조직 또는 체액과 접촉하는 경우 단기적 혹은 장기적 부작용을 일으키지 않는 성질을 의미하며, 구체적으로는 pH 6-8의 생리적 용액(physiological solution)에 노출되었을 때 친수성 상태로 존재하는 가용성(solubility), 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 괴사시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성(tissue compatibility) 및 항응혈성(blood compatibility) 뿐 아니라 생체 투여 후 일정 기간이 경과한 뒤 소멸되는 생분해성(biodegradability)을 포함하는 의미이다.

[0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 알부민은 혈청 알부민(serum albumin)이다.

[0036] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 알부민은 상기 생물학적 시료 내에 0.1 - 20 mg/mL의 농도가 되도록 첨가된다. 보다 구체적으로는 0.5 - 15 mg/mL 농도가 되도록 첨가하며, 보다 더 구체적으로는 1 - 10 mg/mL 농도가 되도록 첨가하고, 보다 더 구체적으로는 2 - 8 mg/mL 농도가 되도록 첨가하며, 가장 구체적으로는 4 - 6 mg/mL 농도가 되도록 첨가한다.

[0037] 본 명세서에서 용어 “투석(dialysis)”은 의학적 관점에서 신장 기능이 상실된 환자에서 혈액의 노폐물을 제거하기 위한 혈액 투석, 혈액 여과, 혈액 여과 투석 및 치료용 혈장 교환(therapeutic plasma exchange: TPE)을 포함하나, 이에 제한되지 않고 투석 대상 용액의 종류와 무관하게 일정 크기의 공극(pore)을 가지는 반투과성막을 이용하여 비균질 용액 내 특정 용질을 선택적으로 제거하거나 그 농도를 감소시키는 모든 과정을 포괄하는 의미이다.

[0038] 본 발명에 따르면, 본 발명은 숙주 세포에서 지방-변형된 체 재조합적으로 생산된 Wnt 단백질에 대하여 표준적인 계면활성제 기반 정제를 1차적으로 수행한 뒤, 계면활성제를 대신하여 Wnt 단백질에 수용성을 부여할 알부민을 첨가한 후 저분자 물질인 계면활성제와 고분자 물질인 알부민의 분자량 차이에 기반하여 계면활성제만이 통과할 수 있는 적절한 공극의 투석막을 이용하여 세포 독성의 계면활성제를 선택적으로 제거한다. 이에, 투석 단계는 상용화된 정제 방법에서 나타나는 Wnt 제제의 세포 독성을 해결하면서도 전 공정에 걸쳐 Wnt 단백질의 친수성이 상실되는 순간을 완전히 차단, Wnt 단백질의 응집(aggregation)을 방지하고 구조적 안정성을 지속시킬 수 있는 핵심적인 수단이 된다.

[0039] 이에, 본 발명의 투석 막은 65-70 kDa의 평균 분자량을 가지는 알부민과 30-50 kDa의 평균 분자량을 가지는 Wnt 단백질이 통과할 수 없을 정도의 컷오프 값을 가지는 반투과성막이라면 제한없이 사용될 수 있다. 구체적으로는, 상기 투석 막은 5 - 50 kDa의 컷오프 값을 가진다. 보다 구체적으로는 5 - 40 kDa의 컷오프 값을 가지며, 보다 더 구체적으로는 5 - 30 kDa의 컷오프 값을 가지고, 가장 구체적으로는 5 - 20 kDa의 컷오프 값을 가진다.

[0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 Wnt 단백질의 수용성 증진 방법을 제공한다:

[0042] (a) Wnt 단백질과 계면활성제를 포함하는 생물학적 시료에 알부민을 첨가하는 단계; 및

[0043] (b) 상기 알부민이 첨가된 생물학적 시료에 대해 상기 계면활성제가 선택적으로 제거될 수 있는 투석 막(dialysis membrane)을 이용하여 투석을 수행하는 단계.

[0044] 본 발명에서 이용되는 Wnt 단백질, 계면활성제, 알부민 및 투석 막에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중

복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0047] (a) 본 발명은 Wnt 단백질의 활성과 수용성을 유지하면서 이를 정제하는 방법을 제공한다.

[0048] (b) 본 발명은 계면활성제가 포함된 Wnt 단백질 용액에 알부민을 첨가한 뒤 투석으로 계면활성제를 선택적으로 제거하는 간단한 공정을 통해 Wnt 단백질의 수용성이 지속적으로 유지된 상태에서 세포 독성의 계면활성제-의존성 수용성 상태를 생체적합성의 알부민- 의존성 수용성 상태로 효율적으로 전환할 수 있다.

[0049] (c) 본 발명은 산업적 활용도가 높은 Wnt 단백질의 친수성과 고유의 생물학적 활성이 유지되는 효율적인 정제 및 장기 보관 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 CHAPS 농도에 따른 Wnt3a 단백질의 용해도를 분석한 면역 블롯팅 결과를 보여주는 그림이다.

도 2는 BSA가 투석 막에 Wnt3a 단백질이 흡착되는 것을 막아주어 투석 후 용이하게 회수됨을 보여주는 면역 블롯팅 결과이다.

도 3은 BSA(5 mg/mL)를 이용하여 회수된 Wnt3a 단백질이 CHAPS가 제거된 후에도 수용성을 유지함을 보여주는 면역 블롯팅 결과이다.

도 4는 BSA(5 mg/mL)가 포함된 Wnt3a 수용액이 4℃에서 1주일 이상 활성에 변화없이 유지되는 것을 보여주는 TOPflash 어레이 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

용해도 분석

[0056] 최종 CHAPS 농도를 0.0025% 또는 1%가 되도록 한 DMEM/F12 1 mL를 Protein Lobind e-튜브에 넣어주었다. 이후 500 ng/mL의 Wnt3a(Carrier-free, R&D systems, Cat. 5036-WN-010/CF)를 상기 DMEM/F12에 첨가한 뒤 섞어주고, 4시간 동안 37℃에서 유지하였다. 4시간 후 27,000 x g, 4℃에서 1시간 동안 원심분리하였다. 1 mL의 상등액을 취한 뒤, 그 중에서 200 µL를 Protein Lobind e-튜브에 옮긴 후, 50 µL의 5 x Laemmli 시료 완충액을 넣은 후 10분 동안 끓여 상등액 시료를 제작하였다.

[0057] 상등액을 걷어낸 e-튜브에 200 µL의 1 x Laemmli 시료 완충액을 넣고, 튜브를 흔들어낸 후 10분 동안 끓여 펠렛 시료를 제작하였다. 이후, 가용성의 Wnt3a, 불용성 Wnt3a 및 응집된 Wnt3a가 어떻게 나뉘어지는지 확인하기 위해 면역 블롯팅을 통한 용해도 어레이(solubility assay)를 수행하였으며, 가용성 Wnt3a를 상등액에서, 불용성 Wnt3a는 펠렛에서 각각 측정하였다. 그 결과, 1% CHAPS에서는 대부분의 Wnt3a가 상등액에 존재하였으나, 0.002% CHAPS에서는 대부분의 Wnt3a가 펠렛에서 나타남으로써, 1% CHAPS에서 Wnt3a의 수용성이 유지됨을 확인하였다(도 1).

투석을 통한 CHAPS의 BSA로의 교체

[0060] 1% CHAPS 수용액 내의 Wnt3a를 BSA와 같이 또는 단독으로 BSA는 빠져나가지 않고 CHAPS는 빠져나가는 분자량 컷 오프 값을 가지는 투석 막을 사용하여 24시간 동안 투석(dialysis)을 수행함으로써 BSA를 수용액에 남기고 CHAPS만 투석 과정을 통해 제거되도록 하였다. 구체적으로, 1mL의 DMEM/F12, 최종 BSA 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12, 또는 최종 IgG 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12를 Protein Lobind e-튜브에 첨가하였다. 1 µg/mL의 Wnt3a (Carrier-free, R&D systems, Cat. 5036-WN-010/CF)를 위의 DMEM/F12에 첨가한 뒤 섞어주었다. 투석 장비(Thermo scientific, Slide-A-Lyzer mini dialysis devices, 10K MWCO, 0.5mL, Cat. 88401)의 투석막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 넣고, Wnt3a를 포함한 용액 500 µL를 투석 장비의 투석막 안에 넣어주었다. 이후 12시간

동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어둔 후, 막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 새로 갈아준 다음 다시 12시간 동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어두었다. 12시간 후, 투석막 안에 있는 용액을 걷어내고 차가운 DPBS를 사용해 동일한 부피가 되게 맞춰주었다. 투석 액 중 200 μL를 걷어낸 후, 50 μL의 5 x Laemmli 시료 완충액을 첨가하여 10분 동안 가열함으로써 용액 시료를 제작하고, 200 μL의 1 x Laemmli 시료 완충액으로 투석막을 훑어낸 후, 10분간 가열함으로써 흡착 시료를 제작하였다. 이후 이들 시료로 면역 블롯팅을 수행하였다.

[0061] 그 결과, BSA가 없을 때는 대부분의 Wnt3a가 투석막에 흡착하여 회수 자체가 되지 않음에 반하여 BSA가 용액에 남아있는 경우 수용성을 유지한 Wnt3a가 용이하게 회수됨을 확인하였다(도 2). 이를 통해 BSA가 투석 과정에서 Wnt3a가 투석막에 흡착되는 것을 방지함을 알 수 있었다.

[0063] *회수된 Wnt3a의 용해도 분석*

[0064] BSA에 의해 회수에 성공한 Wnt3a가 수용성인지를 확인하기 위해 용해도 분석을 수행하였다. 구체적으로, 1mL의 DMEM/F12, 최종 BSA 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12, 최종 인간 혈청 알부민의 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12 또는 최종 IgG 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12를 Protein Lobind e-튜브에 첨가하였다. 1 μg/mL의 Wnt3a (Carrier-free, R&D systems, Cat. 5036-WN-010/CF)를 상기 DMEM/F12에 첨가한 뒤 섞어주었다. 투석 장비(Thermo scientific, Slide-A-Lyzer mini dialysis devices, 10K MWCO, 0.5mL, Cat. 88401)의 투석막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 넣어주었다. Wnt3a를 포함한 용액 500 μL를 투석 장비의 투석막 안에 넣어준 다음 12시간 동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어둔 후, 막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 새로 갈아준 다음 다시 12시간 동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어두었다. 12시간 후, 투석막 안에 있는 용액을 걷어내고, 200 μL의 1 x Laemmli 시료 완충액으로 투석막을 훑어낸 후, 10분간 가열하여 흡착 시료를 제작하였다.

[0065] 투석액 중 400 μL를 Protein Lobind e-튜브에 옮긴 후 27,000 x g, 4℃에서 1시간 동안 원심분리하였다. 이후 e-튜브의 상등액을 수집하여 200 μL를 Protein Lobind e-튜브에 옮긴 후, 50 μL의 5 X Laemmli 시료 완충액을 넣은 후 10분 동안 가열하여 상등액 시료를 제작하였다. 상등액을 제거한 e-튜브에 200 μL의 1 x Laemmli 시료 완충액을 넣고, 튜브를 훑어낸 후 10분 동안 가열함으로써 펠렛 시료를 제작하였다. 이후 이들 시료를 이용하여 면역 블롯팅을 수행하였다.

[0066] 그 결과, BSA가 포함된 경우 대부분의 Wnt3a가 상등액 구획에 존재하여 수용성임을 보여주고 있고, 혈액에 높은 농도로 존재하는 또 다른 단백질인 IgG를 포함시켰을 경우에는 Wnt3a가 투석막에 흡착되는 단계부터 효과를 나타내지 못함을 확인하였다(도 3). BSA는 Wnt3a가 투석막에 흡착되는 것을 막을 뿐 아니라, CHAPS가 투석을 통해 제거되어 농도가 매우 낮아진 상태에서도 Wnt3a를 수용성으로 유지해주는 이중의 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이로서, Wnt3a가 CHAPS 의존성 수용성 상태에서 BSA 의존성 수용성 상태로 성공적으로 이전됨을 확인하였다.

[0068] *TOPflash 어세이*

[0069] BSA에 의해 수용성을 유지하고 있는 Wnt3a가 세포에서 수용체를 활성화시키는 활성을 유지하고 있는지, 또한 이러한 활성이 일반적인 보관 조건인 4℃에서 장기간 유지되는지를 확인하기 위해, canonical Wnt 신호를 측정하는 TOPFlash assay를 수행하였다. 구체적으로, 1mL의 DMEM/F12, 또는 최종 BSA 농도가 5mg/mL인 DMEM/F12를 Protein Lobind e-튜브에 넣어주었다. 1 μg/mL의 Wnt3a(Carrier-free, R&D systems, Cat. 5036-WN-010/CF)를 상기 DMEM/F12에 넣은 후 섞어주었다. 투석 장비(Thermo scientific, Slide-A-Lyzer mini dialysis devices, 10K MWCO, 0.5mL, Cat. 88401)의 투석막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 넣어주고, Wnt3a를 포함한 용액 500 μL를 투석 장비의 투석막 안에 넣어주었다. 이후 12시간 동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어둔 후, 막 밖에 14 mL의 차가운 DPBS를 새로 갈아준 다음 다시 12시간 동안 진탕기(100 rpm, 4℃)에 넣어두었다. 12시간 뒤, 투석막 안에 있는 용액을 걷어내고, Protein Lobind e-튜브에 옮긴 다음 투석액을 이용하여 TOPflash 어세이를 수행함으로써 Wnt3a의 활성을 측정하였다.

[0070] TOPflash 어세이는 Steady-Glo®Luciferase Assay System(Promega, E2520)을 사용하여 제조자의 설명서에 따라 수행하였다. 매 어세이 시 필요한 만큼 녹여 1x PBS로 1:1로 희석한 후 사용(이하 LAR)하였다.

[0071] 폴리-L-라이신으로 화이트 웰 플레이트(SPL, cat.30196)를 10분간 코팅하고 고압 멸균된 증류수로 2회 세척하였다. 이후 STF 세포를 50,000 cells/well (100 μL)로 씨딩하고 24h 후에 배지를 흡입하여 배양 배지(DMEM + 10% FBS) 100 μL + Wnt3a 포함 용액 50 μL가 되도록 하였다. 12 내지 24시간 후 배지를 제거하고 100 μL의 LAR (50 μL LAR + 50 μL DPBS)를 첨가하였다. 세포가 충분히 용해되도록 최소 10분간 유지하고 1초 동안 발광을 측정하였다.

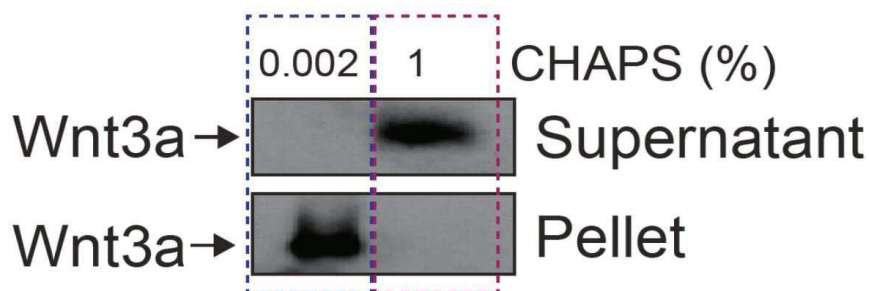
[0072] 그 결과, 투석을 마친 Wnt3a는 BSA가 없는 경우 거의 활성이 없지만, BSA가 있는 경우에는 유의한 활성이 측정되었다. 또한, 이 활성은 Wnt3a-BSA 수용액을 일반적인 보관 조건인 4℃에서 1주일 간 보관한 경우에도 거의 변화가 없음을 확인하였다(도 4).

[0073] 이상의 결과들은 혈청 알부민이 Wnt3a의 수용성과 고유의 생물학적 활성을 유지하도록 하면서도 세포 독성이 없는 안전하고도 생리적인 물질임을 보여줌과 동시에, CHAPS로 분리한 Wnt를 간단한 투석 방법을 통해 혈청 알부민 기반의 Wnt 제제로 효율적으로 전환시킬 수 있음을 보여주었다.

[0075] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

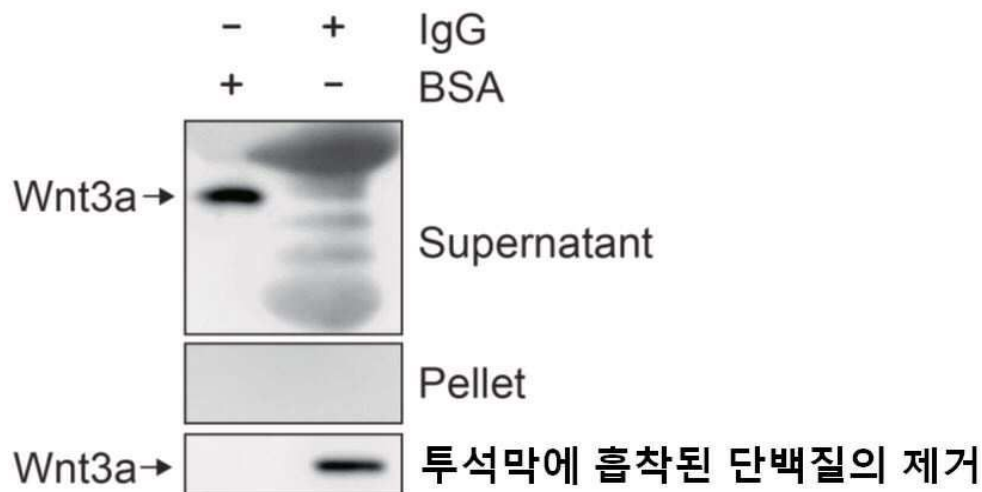
도면1



도면2



도면3



도면4

