



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월12일

(11) 등록번호 10-2201154

(24) 등록일자 2021년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/12 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)

C07K 7/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/1241 (2013.01)

A61K 47/64 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-0034433

(22) 출원일자 2019년03월26일

심사청구일자 2019년03월26일

(65) 공개번호 10-2020-0113764

(43) 공개일자 2020년10월07일

(56) 선행기술조사문헌

김아현, 'Polyglutamate domain의 접합에 의해 용해도 증가된 재조합 E.coli TAT-Cre recombinase 제작', 가천대학교 일반대학원, 석사논문 (2018.06) 1부.*

US20170258933 A1

CN102827873 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

가천대학교 산학협력단

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)

주식회사 루미맥

서울특별시 송파구 동남로2길 4, 지하(문정동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박태식

경기도 성남시 수정구 복정로72번길 16, 203호(복정동)

김영규

서울특별시 서초구 신반포로33길 66, 101동 1006호(잠원동, 신반포청구아파트)

이은직

서울특별시 마포구 창전로 26, 103동 2103호(신정동, 서강GS아파트)

(74) 대리인

김정수

전체 청구항 수 : 총 16 항

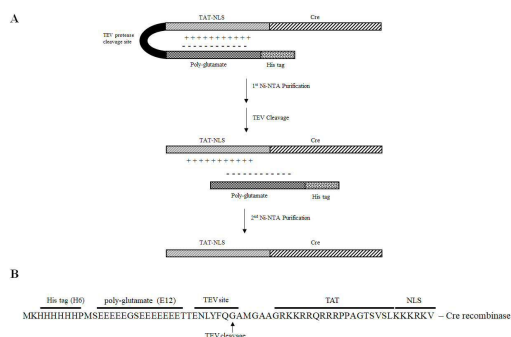
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법, 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 TEV 프로테아제와 반응시켜 생성물을 얻는 단계; 및 얻어진 생성물을 정제하여 TAT-Cre 단백질을 얻는 단계를 포함하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법은 치료 및 연구에 사용되는 유효 단백질의 제조방법으로서 의학 및 약학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)

C12Y 207/07 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

C07K 2319/21 (2013.01)

C07K 2319/23 (2013.01)

C07K 2319/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3A9B6069338

부처명 미래창조과학기술부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 대사체 분석시스템 기반 희귀성 자가면역질환 진단 및 치료기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 가천대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2019.11.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계;
- (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; 및
- (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계(a)의 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 His 태그 및 GST 태그 중 어느 하나를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계(a)의 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 TEV 프로테아제 인식 부위를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계(a)의 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 TAT 펩타이드 N-말단에 글리신(glycine, G), 메티오닌(methionine, M) 및 알라닌(alanine, A)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 잔기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계(b)에서 상기 발현이 IPTG 0.05 내지 5 mM로 유도되는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 IPTG가 숙주세포에서 1 내지 5시간 동안 유도되는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계(b)에서 상기 발현이 대장균을 숙주세포로 하여 수행되는 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법.

청구항 8

- (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계;
- (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계;
- (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계;
- (d) 단계(c)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 TEV 프로테아제와 반응시켜 생성물을 얻는 단계; 및

(e) 단계(d)에서 얻어진 생성물을 정제하여 TAT-Cre 단백질을 얻는 단계를 포함하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 단계(d)에서 상기 반응이 25 내지 35 °C에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 단계(d)에서 상기 반응이 pH 7.0 내지 pH 9.0에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 의해 제조된 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단백질이 46 kDa인 것을 특징으로 하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질.

청구항 13

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의해 제조된 TAT-Cre 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 단백질이 42 kDa인 것을 특징으로 하는 TAT-Cre 단백질.

청구항 15

제11항의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고가 단백질, 핵산, 펩타이드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템.

청구항 16

삭제

청구항 17

제13항의 TAT-Cre 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고가 단백질, 핵산, 펩타이드, 펩타이드, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템.

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아미노산 서열번호 1로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 발현시킨 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 전달 도메인(protein transduction domain, PTD) 또는 트로이 펩타이드(Trojan peptide)라고도 불리는 세포 침투성 펩타이드(cell penetrating peptide, CPP)는 희귀한 독성을 갖는 다양한 단백질의 효율적인 세포

내 전달을 가능하게 한다. CPP는 HIV-1 유래의 TAT₄₇₋₅₇(YGRKKRRQRRR), 폴리아르기닌 9(RRRRRRRRR) 및 페너트라틴₄₃₋₅₇(RQIKIWFAQRRMKWKK)과 같이 5 내지 30개의 아미노산 잔기 길이의 올리고펩타이드이다. 전사(transcription)의 트랜스-활성화제인 TAT은 염기성 펩타이드(아르기닌 및 라이신)이며 PTD로서 역할을 한다. 양친매성이면서 강한 양이온인 TAT₄₇₋₅₇은 수용체-의존성 지질 래프트(lipid raft)-의존성 대음세포작용(macropinocytosis)를 통해 세포 내로 내재화된다. TAT PTD에 의해 세포질로 전달된 카르고(cargo)는 SV-40 거대 T 항원으로부터 핵 위치 결정 서열(nuclear localization sequence, NLS)로 인해 핵으로 이동(translocation)된다.

[0003] 양이온의 CPP 태그 서열을 포함하는 다양한 단백질이 대장균에서 생산되었다. 그럼에도 불구하고, 일부 경우에서 이들 단백질의 대장균에서의 발현이 발현된 외래 단백질이 전체 세포 단백질의 2 % 이상을 구성하는 경우에 세포질 또는 세포 내막·외막 사이에서 봉입체(inclusion body)로 알려진 불용성 단백질을 응집체를 생성한다. 기능적으로 활성이 있는 단백질을 생산하기 위해서 봉입체를 정제할 필요가 있으며, 봉입체 분리, 카오트로픽 제제 chaotropic agent)로 변성에 의한 가용화, 리폴딩 및 리폴딩 반응으로부터 가용성 단백질의 정제와 같은 고유-유사 형태(native-like conformation)를 복구하는 번거로운 과정이 필요하다. 일정량의 불용성 단백질은 정확하게 리폴딩되며, 정확한 리폴딩 정도는 리폴딩 절차에 대한 선택뿐만 아니라 단백질 서열의 특성에 의존한다. 일반적으로 그 형태를 회복시킴으로써 응집된 단백질을 풀기 위해서 변성제인 계면 활성제 또는 고농도(2 ~ 8 M)의 우레아 또는 염산구아니딘(guanidine hydrochloride)을 첨가한다.

[0004] Cre 재조합효소(recombinase)는 부위-특이적 유전자의 재조합을 유도하거나 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 목적 유전자의 발현을 조절하기 위해 널리 이용되어 왔다. Cre 인식 부위인 각각 34 bp로 구성된 2개의 loxP 부위는 "플록스드 대립유전자(floxed allele)"라고 불리는 표적 부위를 측면에 위치시킨다. Cre 매개 재조합은 측면에 있는 2개의 loxP 부위에 대한 융합을 일으키고, 이러한 DNA 부분을 방출한다. 또한 β-갈락토시다제(galactosidase)와 같은 플록스드 수용체(floxed reporter) 유전자 또는 세포 내 형광 단백질이 Cre의 효과를 시각적으로 나타낸다. TAT이 융합된 Cre는 세포 내로 Cre의 침투를 향상시키는데 사용되어 왔다.

[0005] 선행문헌[Q. Lin, et al., BMC Biotechnol 4 (2004) 25]에 따르면, 발현된 TAT-Cre의 양이 비융합된 Cre의 양보다 적었지만, 비융합된 Cre의 용해도는 TAT-Cre의 것보다 상대적으로 높았다. 이러한 결과로 판단할 때, 강한 양이온성인 TAT이 대장균 세포질에서 TAT-Cre의 낮은 용해도의 원인이 될 수 있다고 추론하였다. 따라서, TAT-Cre의 낮은 용해도를 개선할 수 있는 기술의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2018-0006402호 (2018.01.17)
(특허문헌 0002) 한국 공개특허 제10-2016-0013730호 (2016.02.05)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Lilie, H., et al., Biol. Chem. 2013; 94(8):995-1004
(비특허문헌 0002) Biochemistry. 2010; 49(36):7854-7866

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 발명자들은 음전하를 띤 폴리글루타메이트 서열(EEEEEGSEEEEE, 서열번호 1)의 첨가가 TAT-Cre의 용해도 및 대장균에서의 생산 수율을 향상시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 일단 서열번호 1에 기재된 폴리글루타메이트가 부착된 TAT-Cre를 정제하고 TEV 프로테아제로 처리시 고순도 및 활성을 갖는 TAT-Cre를 얻었으며, 그 수율이 TAT-Cre 단독의 발현과 비교하여 더 높다는 것을 발견하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일측면에 따라, (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법이 제공된다.

[0011] 일 구현예에서, 단계(a)의 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 His 태그 및 GST 태그 중 어느 하나를 더 포함할 수 있고, TEV 프로테아제 인식 부위를 더 포함할 수 있다. 또한, 단계(a)의 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 TAT 펩타이드 N-말단에 글리신(glycine, G), 메티오닌(methionine, M) 및 알라닌(alanine, A)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 잔기를 더 포함할 수 있다.

[0012] 일 구현예에서, 단계(b)에서 상기 발현이 IPTG 0.05 내지 5 mM로 유도될 수 있고, 상기 IPTG가 숙주세포에서 1 내지 5시간 동안 유도되는 것일 수 있다. 또한, 상기 발현이 대장균을 숙주세포로 하여 수행되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 측면에 따라, (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계; (d) 단계(c)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 TEV 프로테아제와 반응시켜 생성물을 얻는 단계; 및 (e) 단계(d)에서 얻어진 생성물을 정제하여 TAT-Cre 단백질을 얻는 단계를 포함하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법이 제공된다.

[0014] 일 구현예에서, 단계(d)에서 상기 반응이 25 내지 35 °C에서 이루어질 수 있고, pH 7.0 내지 pH 9.0에서 이루어질 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 제조방법에 의해 제조된 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질이 제공된다.

[0016] 일 구현예에서, 상기 단백질이 46 kDa인 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 제조방법에 의해 제조된 TAT-Cre 단백질이 제공된다.

[0018] 일 구현예에서, 상기 단백질이 42 kDa인 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고가 단백질, 핵산, 펩타이드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템이 제공된다.

[0020] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질을 포함하는 세포 투과용 약학적 조성물이 제공된다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 TAT-Cre 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고가 단백질, 핵산, 펩타이드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템이 제공된다.

[0022] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 상기 TAT-Cre 단백질을 포함하는 세포 투과용 약학적 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 의해, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열이 삽입된 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질이 재조합 TAT-Cre 단백질의 용해도 및 수율을 향상시킨다는 것이 밝혀졌다. 또한, 폴리글루타메이트-TAT-Cre를 발현하는 세포의 성장을 증가시켜 목적 단백질의 생산을 증대하는 것을 확인하였다.

[0024] 따라서, 본 발명의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법은 치료 및 연구에 사용되는 유효 단백질의 제조방법으로서 의학 및 약학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 재조합 H6-E12-TAT-Cre에 대한 제작(construction) 및 아미노산 서열을 나타낸다. 도 1A는 재조합 H6-E12-TAT-Cre의 제작을 나타내는 개략도이고, 도 1B는 His 태그(H6)와 TEV 프로테아제 절단 부위를 운반하는 pETM11 벡터에 클로닝된 폴리글루타메이트(E12) 및 TAT-NLS-Cre의 아미노산 서열이다.

도 2는 IPTG 유도 후에 H6-TAT-Cre 또는 H6-E12-TAT-Cre에 대한 세포 단백질 발현을 나타낸다. 도 2A는 전체 세포 단백질에서 E12를 포함하거나 포함하지 않는 His-태그된 TAT-Cre를 쿠마시 블루로 염색한 SDS-폴리아크릴아미드 겔이다. 이 염색(SDS-PAGE 후 12 % 겔에서)은 E12를 포함하지 않는 H6-TAT-Cre(42 kDa) 또는 H6-E12-TAT-Cre(46 kDa)로 형질 전환된 대장균에서 가용성 및 불용성 분획의 총 세포 단백질을 시각화하였다. 도 2B는 E12 유무에 관계없이 His 태그가 붙은 TAT-Cre를 분석한 웨스턴 블랏팅 결과이다. His 태그된 단백질은 42 kDa(H6-TAT-Cre) 또는 46 kDa(H6-E12-TAT-Cre) 수준에서 항-His 태그 항체에 의해 검출되었다. GAPDH(35 kDa)는 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 3은 재조합 단백질을 발현하는 대장균 균주의 성장 및 재조합 TAT-Cre 단백질의 정제를 나타낸다. 도 3A는 TAT-Cre 또는 E12-TAT-Cre로 형질 전환된 세포의 성장을 나타내는 그래프이다. 성장은 정상 구간(stationary phase)까지 600 nm에서 흡광도를 측정하여 매시간 평가하였다. TAT-Cre를 발현시키는 IPTG 유도는 대장균의 기하급수적 성장 단계에서 37 °C에서 3시간 배양한 후에 시작하였다. 도 3B는 Ni-친화 크로마토그래피에 의한 TAT-Cre의 정제를 나타낸 결과이다. IPTG 유도된 세포의 용해물은 쿠마시 블루 염색을 수행하였다. 세포 용해물은 H6-E12-TAT-Cre 플라스미드-형질전환된 대장균으로부터 초음파 처리에 의해 수득하였다. His 태그된 단백질이 Ni-킬럼에 결합하고 세포 용해물의 다른 성분이 킬럼을 통과하기 때문에, 첫번째 유액(flow-through, 1st FT)은 H6-E12-TAT-Cre를 포함하지 않았다. 킬럼을 30 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 세척하고, 용출 완충액으로 H6-E12-TAT-Cre(46 kDa)를 용리시켰다. TEV 프로테아제로 처리한 후에 용출물을 다시 킬럼을 통과시켜 킬럼에 부착한 His 태그된 H6-E12를 분리하였으며, 두 번째 유액(flow-through, 2nd FT)에 포함된 TAT-Cre를 얻었다. M은 분자 크기 마커를 나타낸다.

도 4는 재조합 TAT-Cre의 Cre 재조합 활성 및 293FT 세포에 대한 TAT-Cre의 세포 독성에 대한 무세포 분석을 나타낸다. 도 4A는 무세포 시스템에서의 TAT-Cre 활성에 대한 분석을 개략적으로 나타낸 개략도이다. pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE를 HindIII로 절단하여 선형화시키고, 정제된 TAT-Cre의 재조합 효소 활성을 평가하였다. 도 4B는 재조합 TAT-Cre 활성의 무세포 분석을 나타낸 겔 사진이다. HindIII-선형화된 플라스미드를 다양한 농도의 TAT-Cre와 반응시켰다. 혼합물을 37 °C에서 1시간 동안 반응시키고, 70 °C에서 10분 동안 가열하여 TAT-Cre를 불활성화시켰다. 플라스미드 DNA의 재조합을 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다. M은 1 kb 래더(ladder) 마커를 나타낸다. 도 4C는 TAT-Cre에 노출된 포유류 293FT 세포의 생존율을 나타낸 그래프이다. 세포를 다양한 농도의 TAT-Cre로 24시간 동안 처리하였다. 반응시킨 후 CCK-8 분석에 의해 세포 생존율을 측정하였다. 결과는 용매(vehicle) 처리 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표현하였다. *는 50 % 글리세롤(vehicle)을 처리한 대조군(n=3)과 비교하여 p<0.05임을 나타낸다.

도 5는 293FT 세포에서의 TAT-Cre 변환 효율을 나타낸 형광 현미경 이미지이다. 293FT 세포를 Lipofectamine 3000을 통해 pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE로 24시간 동안 형질 감염시켰다. 그 후에 TAT-Cre 단백질을 다양한 농도로 투여하고 세포를 37 °C 및 5 % CO₂에서 24시간 또는 48시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포는 형광 현미경을 이용하여 이미지를 얻었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; 및 (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함하는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[0027]

본 발명의 제조방법은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계[즉, 단계(a)]를 포함한다. 단계(a)는 TAT-Cre를 코딩하는 플라스미드에 폴리글루타메이트(E12) 서열을 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현하는 플라스미드를 제작하는 단계이다.

[0028]

TAT-Cre는 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 DNA 서열의 조작시 세포막의 통과를 돕는 역할은 한다. 그러나, 강한 양전하를 띤 아르기닌이 풍부한 TAT 서열이 봉입체를 형성하여 재조합 TAT-Cre의 수용이 낮은 문제점이 있다. 이

를 해결하기 위해서 양전하를 띤 TAT 펩타이드 근위에 음으로 하전된 폴리글루타메이트(E12) 서열을 삽입하여 TAT 펩타이드를 중화시킬 수 있다.

- [0029] 또한, 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자는 His 태그 및 GST 태그 중 어느 하나를 더 포함할 수 있고, 바람직하게는 His 태그를 더 포함할 수 있다. His 태그된 단백질은 Ni-컬럼에 결합하므로 Ni-친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 단백질을 얻을 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자는 TEV 프로테아제 인식 부위를 더 포함할 수 있다. TEV(담배식각 바이러스, Tobacco etch virus) 프로테아제는 27 kDa의 TEV에 의해 만들어지는 핵내 단백질 가수분해 효소이다. TEV 프로테아제는 생산하고자 하는 단백질의 C-말단이나 N-말단에 TEV 프로테아제의 인식 서열을 넣고 His 태그 또는 GST 태그를 융합시켜 재조합 단백질을 제조할 수 있다. 이렇게 만들어진 재조합 단백질은 상기 태그의 친화력으로 단백질을 고순도로 분리정제한 후 융합시켜준 태그를 제거하기 위해 TEV 프로테아제를 처리할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자는 유연성을 보장하고 TEV 절단으로 인한 또 다른 가능한 입체 장애를 방지하기 위해 TAT 펩타이드 N-말단에 글리신(glycine, G), 메티오닌(methionine, M) 및 알라닌(alanine, A)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산 잔기를 더 포함할 수 있다(도 1B 참조).
- [0032] 본 발명의 제조방법은 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계[즉, 단계(b)]를 포함한다. 단계(b)는 대장균에서의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질의 발현을 IPTG를 사용하여 유도하는 단계이다.
- [0033] 단계(b)에서 상기 발현이 IPTG 0.05 ~ 5 mM, 바람직하게는 0.1 ~ 2 mM, 가장 바람직하게는 0.5 mM로 숙주세포에서 1 ~ 5시간 동안, 바람직하게는 2 ~ 4시간 동안, 가장 바람직하게는 3시간 동안 유도되는 것일 수 있다. 또한, 상기 IPTG가 35 ~ 40 °C, 바람직하게는 37 °C에서 유도되는 것일 수 있다. 상기 발현된 단백질은 숙주 세포로부터 얻을 수 있으며, 구체적으로 숙주 세포에 용해 완충액을 첨가하여 용해시킨 후 원심 분리 등의 방법으로 상층액 또는 펠렛으로 얻을 수 있다.
- [0034] 본 발명의 제조방법은 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계[즉, 단계(c)]를 포함한다. 단계(c)는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 Ni-친화성 크로마토그래피로 정제하는 단계이다. 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 Ni-컬럼에 로딩하고 30 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 세척한 후 용출 완충액으로 용출시키는 Ni-친화성 크로마토그래피로 1차 정제할 수 있다.
- [0035] 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질이 대장균에서 제조되는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자가 코딩된 플라스미드를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 바람직하게 대장균을 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli BL21(DE3), E. coli C43(DE3), E. coli JM109, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776 및 E. coli W3110 등이 있다.
- [0037] 본 발명의 유전자가 코딩된 플라스미드를 숙주 세포 내로 형질전환하는 법은, 열쇼크 방법, CaCl₂ 방법[Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)], 하나한 방법[Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)] 및 전기 천공 방법[Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)] 등에 의해 실시될 수 있으며, 상업적으로 구매가능한 형질전환용 키트를 사용할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 TAT-Cre를 코딩하는 유전자에 삽입하여 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 얻는 단계; (b) 단계(a)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 유전자를 발현시켜 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 얻는 단계; (c) 단계(b)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 정제하는 단계; (d) 단계(c)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 TEV 프로테아제와 반응시켜 생성물을 얻는 단계; 및 (e) 단계(d)에서 얻어진 생성물을 정제하여 TAT-Cre 단백질을 얻는 단계를 포함하는 TAT-Cre 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0039] 상기 제조방법에서 단계(a) 내지 단계(c)는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법에서 설명한 바와 같다.
- [0040] 본 발명은 단계(c)에서 얻어진 폴리글루타메이트-TAT-Cre 재조합 단백질을 TEV 프로테아제와 반응시켜 생성물을

얻는 단계[즉, (d)]를 포함한다. 단계(d)는 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질로부터 폴리글루타메이트를 분리시키는 단계이다. 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질은 TEV 프로테아제 인식 부위를 갖고 있어 TEV 프로테아제와 반응시켜 폴리글루타메이트를 간단하게 제거할 수 있다.

[0041] 여기에서, 상기 반응이 25 ~ 35 °C, 바람직하게는 27 ~ 33 °C, 가장 바람직하게는 30 °C에서 pH 7.0 ~ pH 9.0, 바람직하게는 pH 7.5 내지 pH 8.5, 가장 바람직하게는 pH 8.0에서 0.5 ~ 3시간 동안, 바람직하게는 1 ~ 2시간 동안, 가장 바람직하게는 1시간 동안 수행되는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 제조방법은 단계(d)에서 얻어진 생성물을 정제하여 TAT-Cre 단백질을 얻는 단계[즉, (e)]를 포함한다. 단계(e)는 폴리글루타메이트가 분리된 TAT-Cre 단백질을 Ni-친화성 크로마토그래피로 정제하는 단계이다. 단계(d)에서 얻어진 TEV 프로테아제가 처리된 생성물을 Ni-컬럼에 재로딩하여 Ni-친화성 크로마토그래피로 2차 정제함으로써 His가 태그된 폴리글루타메이트는 컬럼에 남고, TAT-Cre 단백질은 유액(flow-through)에 포함되어 간단하게 TAT-Cre 단백질을 얻을 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질을 제공한다.

[0044] 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질은 46 kDa의 크기를 갖는 단백질로서 폴리글루타메이트가 삽입되어 목적 단백질의 총 단백질의 양을 증가시킬 뿐만 아니라 가용성 단백질의 양을 증가시키고 불용성 단백질의 양을 감소시키는 것을 확인하였다(표 1 참조). 또한, 폴리글루타메이트-TAT-Cre 플라스미드로 형질 전환된 숙주 세포에서 TAT-Cre 플라스미드로 형질 전환된 숙주 세포에 비하여 성장 속도가 증가되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질의 제조방법은 치료 및 연구에 사용되는 유효 단백질의 제조방법으로서 의학 및 약학 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 TAT-Cre 단백질을 제공한다.

[0046] 상기 TAT-Cre 단백질은 42 kDa의 크기를 갖는 단백질로 수율이 1.5배 이상 증가하였을 뿐만 아니라, 무세포 시스템 및 포유류 세포에서 TAT-Cre 단백질의 활성이 유지됨을 확인하였다. 이에, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리글루타메이트 서열을 삽입하는 것이 TAT-Cre 단백질의 활성에는 영향을 미치지 않고 목적 단백질의 발현 및 정제를 개선하는 새로운 방법임을 확인하였다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고는 단백질, 핵산, 펩타이드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템을 제공한다.

[0048] 상기 카르고는 세포 투과성 펩타이드와 결합하여 세포 내로 이동할 수 있는 모든 물질을 포함하며, 예를 들어 세포 투과 효율을 높이길 원하는 모든 물질, 구체적으로 약물의 유효 물질, 보다 더 구체적으로 단백질, 핵산, 펩타이드, 미네랄, 포도당을 예로 들 수 있는 당, 나노 입자, 생물학적 제제, 바이러스, 조영물질 또는 기타 화학 물질을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 약물은 질병, 상해 또는 특정 증상을 완화, 예방, 치료 또는 진단하기 위한 물질을 포함하는 광범위한 개념이다.

[0050] 또한, 본 발명은 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질을 포함하는 세포 투과용 약학적 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 폴리글루타메이트-TAT-Cre 융합 단백질은 유효성분인 카르고를 효율적으로 세포 내로 투과시키는 전달체로서 약학적으로 사용될 수 있다. 이를 통해 유효성분의 효능을 높일 수 있고, 그 결과 투여량을 낮출 수 있으므로, 약물 투여에 따른 부작용을 최소화하고 치료 효율을 높일 수 있다.

[0052] 상기 약학적 조성물은 1 ~ 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도, 바람직하게는 1 ~ 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 투여 받을 대상의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구, 직장, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여할 수 있다.

[0053] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 희석제 및 부형제로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡셀제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 현탁제, 유제,

좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 또한 상기 약학적 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 TAT-Cre 단백질; 및 상기 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 융합된 카르고를 포함하고, 상기 카르고는 단백질, 핵산, 펩타이드, 지질, 당지질, 미네랄, 당, 조영물질, 약물 및 화학물질로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 카르고 전달 시스템을 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명은 상기 TAT-Cre 단백질을 포함하는 세포 투과용 약학적 조성물을 제공한다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] <실시예>

[0062] 1. 재료 및 방법

[0063] (1) 원핵 플라스미드의 제작

[0064] pETM11은 His 태그(H6) 및 TEV 프로테아제 인식 부위(TEV 부위)가 뒤따르는 T7 프로모터를 포함한다. E12(E12EEEEEGSEEEEEEE, 서열번호 1)가 코딩된 올리고뉴클레오타이드를 PCR에 기초한 시험관 내 돌연변이 유발(*in vitro* mutagenesis)을 통해 H6와 pETM11의 TEV 부위 사이에 삽입하였다. TAT 펩타이드(GRKKRRQRRPPAGTSVSL)가 코딩된 DNA 단편, NLS(KKKRKV)가 코딩된 단편 및 Cre가 코딩된 단편을 TEV 부위의 C-말단에 PCR을 이용하여 조립하였다. 염기서열 분석(sequencing)을 통해 플라스미드의 정확한 구조를 확인하였다.

[0066] (2) 재조합 단백질의 발현 및 정제

[0067] Cre 발현 플라스미드, H6-TAT-Cre 또는 H6-E12-TAT-Cre를 BL21(DE3) 세포에 형질 감염시킨 다음, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카나마이신이 보충된 1 L의 Luria-Bertani(LB) 배지에서 밤새 배양하였다. 0.5 mM 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 처리하여 재조합 단백질의 발현을 37 °C에서 3시간 동안 유도하였다. 세포 성장은 광학 밀도(흡광도) 600 nm(OD₆₀₀)에서 10시간 동안 매시간마다 측정하였다. 세포를 원심 분리에 의해 수거하고, 용해 완충액[5 mM 이미다졸, 500 mM의 NaCl, 5 % 글리세롤, 4 mM β -머캅토에탄올(mercaptoethanol) 및 20 mM Tris-HCl, pH 8.0]을 첨가하여 초음파 처리하였다. 세포 용해액을 4 °C에서 20분 동안 15,000 $\times g$ 에서 원심 분리하여 상층액 및 펠렛(봉입체 함유됨)을 얻었다.

[0068] 상층액에서 His 태그된 각각의 단백질은 Ni-NTA Agarose Beads(QIAGEN 사)를 통해 정제하고, 세척 완충액[30 mM 이미다졸, 500 mM NaCl, 5 % 글리세롤, 4 mM β -머캅토에탄올(mercaptoethanol), 0.05 % Tween 20 및 20 mM Tris-HCl, pH 8.0]으로 세척하였다. His 태그된 TAT-Cre 및 E12-TAT-Cre를 용출 완충액[250 mM 이미다졸, 500 mM NaCl, 5 % 글리세롤, 4 mM β -머캅토에탄올(mercaptoethanol), 0.05 % Tween 20 및 20 mM Tris-HCl, pH 8.0]으로 용출하였다.

[0069] 그 후 용출액을 pH 8.0에서 30 °C에서 1시간 동안 TEV 프로테아제와 함께 먼저 반응시키고 황산 암모늄으로 침전시킨 후 용해 완충액으로 농축시켰다. 반응 혼합물은 다시 Ni-친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 용출된 두번째 유액(2nd flow-through)을 SnakeSkin™ Dialysis Tubing(Thermo Scientific사)에서 투석 완충액[500 mM NaCl, 50 % 글리세롤 및 20 mM Tris-HCl, pH 7.5]으로 4 °C에서 밤새 투석하였다. 마지막으로 TAT-Cre 단백질을 Costar Spin-X 8160 Centrifuge 튜브 필터(Thermo Scientific사)로 멸균시켰다.

[0071] (3) 쿠마시 블루 염색 및 웨스턴 블랏 분석

[0072] 15,000 $\times g$ 에서 10분간 원심 분리한 후, H6-TAT-Cre 또는 H6-E12-TAT-Cre 플라스미드로 형질 전환된 세포로부터 정제되지 않은 상층액 및 펠렛(봉입체 함유됨)을 수득하였다. 펠렛을 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 세척하고, 85 °C로 가열하여 1 % SDS 용액으로 완전히 변성시키고, 완전히 가용화될 때까지 초음파 처리하였다. SDS 처리된 펠렛의 용액을 상층액과 합하여 "총 세포 단백질"로 표시하였다. 단백질 수준은 BCA 단백질 분석 시약(Thermo Scientific사)을 사용하여 측정하였다.

[0073] 30 μg 의 단백질을 12 % 겔에서 SDS-PAGE로 분리하고 쿠마시 블루로 염색하거나 폴리비닐리덴 디플루오라이드(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 3 % 소혈청 알부민(BSA)으로 1

시간 동안 블로킹시키고 His 프로브-HRP[3 % BSA로 1 : 5000 희석, Thermo Scientific사]로 1시간 동안 반응시켰다. 마우스 항-GAPDH 항체[0.1 % Tween 20을 함유하는 Tris-완충 식염수(TBST)로 1 : 5000 희석, Thermo Scientific사]를 멤브레인과 함께 1시간 동안 반응시킨 다음, HRP-컨쥬게이션 마우스 항체[TBST로 1 : 5000 희석, Thermo Scientific사]로 1시간 동안 반응시켰다. 상기 블랏은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce사)를 사용하여 인화(develop)하였다.

[0075] (4) Cre 활성 테스트를 위한 시험관 내 분석

Addgene사(USA)에서 구입한 pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE 플라스미드를 HindIII로 분해시켜 선형화하고, 37 °C에서 1시간 동안 다양한 농도의 TAT-Cre와 50 μ L의 반응 완충액[33 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl 및 10 mM MgCl₂, pH 7.5]을 포함하는 반응 용액 및 300 ng의 선형화된 플라스미드를 첨가하였다. 상기 용액을 70 °C에서 10분 동안 가열하여 Cre를 불활성화시키고, 페놀 추출 및 EtOH 침전에 의해 DNA 단편을 단백질로부터 분리하였다. 분리된 DNA는 아가로스 겔 전기 영동으로 분석하였다.

[0078] (5) 세포 생존율 평가

293FT 세포는 10 % FBS, 1 % 페니실린/스트렙토마이신 용액 및 1 % 비필수 아미노산 용액을 보충한 고포도당(high-glucose) DMEM에서 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양하였다. 세포 생존율은 Cell Counting Kit-8(CCK-8) 분석을 통해 평가하였다. 293FT 세포를 0.1 % 젤라틴 용액으로 코팅한 96-웰 플레이트에 10⁴개/웰로 플레이팅하고, 24시간 또는 48시간 동안 다양한 농도로 TAT-Cre를 처리하였다. 다음으로, CCK-8 비색 용액의 10 %(총 반응량 대비)를 각 웰에 첨가하고 가습 배양기에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 450 nm에서의 흡광도(OD₄₅₀)를 측정하고 OD₆₅₀으로 표준화하였다.

[0081] (6) 형광 이미징

10⁵ 개/웰의 293FT 세포를 0.1 % 젤라틴 용액으로 코팅된 12-웰 플레이트에 플레이팅하고 밤새 배양하여 60 - 70 %의 컨플루언스(confluence)를 확인하였다. 세포를 Lipofectamine 3000(Invitrogen사)을 이용하여 300 ng의 DsRed-floxed 플라스미드로 형질 감염시켰다. 24시간 후, 상이한 기간(0, 4, 6, 8, 12, 24 및 48시간) 동안 서로 다른 용량(0, 1, 2, 4 및 6 μ M)으로 무혈청(serum-free) 배지로 미리 살균한 TAT-Cre를 처리하였다. 형광 현미경(Olympus사, CKX53)을 사용하여 480 nm 또는 580 nm 파장에서 세포 이미지를 얻었다.

[0084] 2. 결과

[0085] (1) 폴리글루타메이트 서열의 첨가를 통한 대장균에서 가용성 TAT-Cre 단백질 발현의 개선 확인

TAT-Cre 단백질의 용해도를 확인하기 위해, 원핵 생물 발현 벡터인 pETM11-TAT-NLS-Cre를 대조군으로 하고 pETM11-E12-TAT-NLS-Cre를 도 1A의 개략도에 따라 제작하였다. 연속적인 글루타메이트 잔기에 의한 입체적 장애를 방지하기 위해 E12 도메인 내에 글리신(glycine, G) 및 세린(serine, S)을 첨가하였다(도 1B 참조). 유연성을 보장하고 TEV 절단으로 인한 또 다른 가능한 입체 장애를 방지하기 위해 N-말단 TAT 태그에 글리신(G), 메티오닌(methionine, M) 및 알라닌(alanine, A)과 같은 여러 아미노산 잔기를 삽입하였다(도 1B 참조).

E12-TAT-Cre 단백질을 발현하는 세포의 경우, TAT-Cre 단백질을 발현하는 대장균과 비교하여 IPTG 유도 후에 가용성 단백질 양이 현저하게 증가하고 불용성 단백질 양이 감소하였다. 또한, 정제 결과에 따르면 E12가 제외된 TAT-Cre(~ 4.9 mg/ L)의 양에 비해 E12 도메인을 첨가시 가용성 TAT-Cre(~ 7.9 mg/ L)의 양이 증가하는 것으로 나타났다(표 1 참조).

표 1

		총 단백질 (mg/mL)	가용성 단백질 (mg/mL)	불용성 단백질 (mg/mL)	정제된 TAT-Cre (mg/L)	용해도 (%)
IPTG 유도: 0h	TAT-Cre	105.2 ± 0.9	85.3 ± 2.3	13.0 ± 0.7	-	86.8 ± 0.2
	E12-TAT-Cre	116.3 ± 3.0	93.6 ± 3.1	19.4 ± 1.6	-	82.8 ± 1.6
IPTG 유도: 3h	TAT-Cre	70.9 ± 7.0	53.9 ± 6.1	10.5 ± 1.7	4.9	83.7 ± 1.5
	E12-TAT-Cre	107.0 ± 5.2	92.5 ± 9.4	7.2 ± 0.5	7.9	92.8 ± 0.3

[0090] 상응하는 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 데이터는 TAT-Cre의 용해도가 E12에 의해 증가함을 확인하였다(도 2A 및 2B 참조). 상기 결과는 단백질의 음으로 하전된 E12 서열이 양전하를 띤 아미노산이 풍부한 TAT 서열을 성공적으로 중화시키고, 이어서 단백질의 용해도를 향상시키는 것으로 나타났다. 더욱이, 동일한 IPTG 유도 조건 하에서 TAT 서열의 중화가 E12-TAT-Cre 단백질의 더 높아진 발현 수준 및 향상된 용해도를 유도하는 것으로 나타난다(표 1 참조). E12가 제외된 TAT-Cre 플라스미드로 형질 전환된 세포는 OD₆₀₀=약 8.8까지 성장할 수 있었다. 대조적으로, E12-TAT-Cre 플라스미드로 형질 전환된 세포는 OD₆₀₀=약 9.6에 도달할 수 있었다. 이러한 결과는 E12가 제외된 TAT-Cre의 더 낮은 발현 수준이 부분적으로 양전하를 띤 TAT 펩타이드에 의한 세포 성장의 억제에 기인할 수 있음을 시사한다(도 3A 참조).

[0092] **(2) TAT-Cre의 정제 및 활성 측정**

[0093] His 태그된 E12-TAT-Cre 단백질(46 kDa)은 2개의 연속적인 Ni-친화성 크로마토그래피 단계를 거쳐 정제되었고, TEV 프로테아제에 의한 절단 반응이 두 단계 사이에서 수행되었다(도 1A 참조). 일단, 세포용해물이 준비되면 Ni-NTA 친화성 컬럼에 로딩하고 His가 태그된 단백질을 컬럼의 레진에 결합시켰다. 그 후, His가 태그된 단백질은 더 높은 이미다졸 농도에 의해 용출되었다. 용출액을 TEV 프로테아제로 처리하고, E12와 TAT 사이에 위치하는 인식/절단 서열을 절단하였다. 얻어진 분해 생성물은 His 태그/E12 및 TAT-Cre 재조합 효소였다. 얻어진 생성물은 추가한 Ni-NTA 컬럼 상에 로딩하였다. TAT-Cre 재조합 효소는 His 태그가 없기 때문에 Ni-NTA 레진에 결합하지 않았고, 따라서 두 번째 Ni-NTA 크로마토그래피 중에 유액 분획을 수집하여 고순도의 TAT-Cre 재조합 효소(42 kDa)를 회수한 반면에, His 태그/E12는 컬럼 내에 유지되었다(도 3B 참조).

[0094] 이러한 정제 방법을 통해 고순도의 TAT-Cre를 얻었으며, 수율이 7.9 mg/L로 대조군(4.9 mg/L)보다 유의하게 높은 것을 확인하였다(표 1 참조).

[0096] **(3) 무세포 시스템 및 293FT 세포에서 재조합 TAT-Cre의 활성 평가**

[0097] 정제된 TAT-Cre의 활성을 확인하기 위해, 시험관 내 재조합 분석을 무세포 시스템에서 수행하였다. pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE 플라스미드(8.5 kb)를 HindIII로 선형화하였다(도 4A 참조). 이어서, 선형화된 벡터를 정제된 TAT-Cre 재조합 효소의 기질로 사용하였다. 그 결과, floxed-DsRed 유전자는 TAT-Cre 재조합 효소에 의해 용량 의존적으로 재조합되었다. 아가로스 겔 전기 영동은 재조합 산물로서 선형화된 pMSCV-loxP-eGFP-Puro-WPRE 밴드(7788 bp, 도 4B 참조)를 생성하는 반면, 작은 환형의 floxed-DsRed(712 bp)의 다른 반응 생성물은 작은 크기 때문에 겔에서 보이지 않았다. 40 ng의 TAT-Cre를 300 ng의 플라스미드와 반응시켰을 때 LoxP-Cre 재조합 반응이 최대로 나타났다.

[0098] 다음으로, 포유류 세포에서 재조합 TAT-Cre가 기능적으로 활성을 갖는지 확인하였다. DsRed는 pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE 플라스미드에서 loxP와 측면에 있기 때문에, 활성이 있는 TAT-Cre는 DsRed를 제거하고 부위 특이적 재조합을 통해 pMSCV-loxP-eGFP-Puro-WPRE를 생성할 수 있다. 293FT 세포를 pMSCV-loxP-DsRed-loxP-eGFP-Puro-WPRE로 형질 감염시켰으며, 재조합 효소 처리가 수행되지 않은 경우에는 형질 감염된 세포가 근위 프로모터 때문에 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP)만을 발현하기 시작하였다. 재조합 현상이 없다면, DsRed의 업스트림에서 전사가 시작되었고, DsRFP 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF) 직후에 정지 코돈이 있기 때문에 강화된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, eGFP) 전에 전사 단백질로부터의 번역이 중지되었다. 대조적으로, 재조합 효소 처리가 적용되었을 때, 상기 효소는 벡터에서 2개의 loxP 부위를 인식하고 DsRed 서열을 제거함으로써 eGFP의 발현을 가능하게 하였다.

[0099] 293FT 세포에서의 TAT-Cre 매개 재조합 활성 및 TAT-Cre에 대한 세포 독성을 평가하였고, 평가는 TAT-Cre 처리에 대한 다양한 투여량 및 기간에서 수행하였다(도 4C 및 도 5 참조). 24시간 배양 후 4 또는 6 μ M에서 TAT-Cre에 대한 현저한 세포 독성이 관찰되었다(도 4C). TAT-Cre로 형질 감염된 세포를 처리했을 때, eGFP 발현으로 인한 녹색 형광 신호(TAT-Cre 활성의 결과)가 TAT-Cre를 첨가하고 12시간 후에 나타난 반면, DsRed 발현으로부터의 적색 형광 신호는 형질 감염 직후부터 12시간 동안 지속되었다. TAT-Cre를 48시간 동안 배양하였을 때 녹색 형광이 증가하였고, 신호는 처리하는 동안의 TAT-Cre에 대한 농도에 비례하였다. 한편, 48시간 처리 후에 적색 형광은 감소하였고, 상기 형광 신호는 처리하는 동안에 TAT-Cre의 농도에 반비례하고, 생체 내 재조합이 성공적이었으며 시간 및 용량에 의존적이었다(도 5 참조). 이러한 결과는 TAT-Cre에 대한 폴리글루타메이트 태그의 첨가가 대장균에서의 발현 및 정제에 대하여 TAT과 NLS 신호에 대한 활성과 Cre 재조합에 대한 활성을 저해

하지 않음을 시사한다.

[0101] (4) 고찰

[0102] 유전 물질에 대한 전달보다 단백질의 전달이 독성이 더 낮고 형질 도입에 더 효율적이기 때문에 보다 안전하고 유용한 전달 방법으로 간주된다. CPP는 고효율의 단백질 전달을 가능하게 하고, CPP 융합 단백질은 치료 목적이나 단백질 전달에 사용되며 경우에 따라 상업화되어 왔다. CPP 중에서 TAT 펩타이드는 Caco-2 및 MDCK 세포를 제외한 모든 유형의 포유 동물 세포의 원형질막을 통과할 수 있기 때문에 단백질 전달에 이용되어 왔다. NLS와 함께 카르고 단백질은 핵 공극을 통해 핵으로 전달될 수 있다. 대장균이나 다른 박테리아 숙주에서 발현되는 상당량의 TAT 융합 단백질은 종종 봉입체를 형성한다. 연구자들은 배양 온도 및 유도 조건의 최적화를 포함한 다양한 방법으로 봉입체에 축적된 재조합 단백질의 양을 줄이려고 노력해 왔다.

[0103] 본 발명에서는 봉입체 내 재조합 TAT-Cre 단백질의 축적을 극복하기 위해 양전하를 띤 TAT 서열 근처에 음으로 하전된 펩타이드 태그를 삽입하여 대장균 발현 시스템에서 카르고 단백질의 용해도를 향상시켰다. 폴라글루타메이트(E12)에 의한 양전하 TAT 및 고도의 양이온성 NLS의 중화가 봉입체에서 재조합 단백질의 축적을 감소시키고 용해도를 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[0104] TAT-Cre 발현이 총 단백질과 가용성 단백질의 양을 증가시키고 불용성 단백질의 양을 감소시킨다는 것을 발견하였다(표 1 참조). 총 단백질의 양이 더 많은 이유는 E12-TAT-Cre가 발현된 대장균의 증가된 생체량(biomass) 때문일 수 있다(도 3A 참조). 이러한 현상은 TAT 및 NLS 아미노산 서열에 대한 높은 양이온성과 관련될 수 있는 독성의 감소로 인한 것일 수 있다. 일반적인 TAT-Cre 단백질의 발현이 봉입체에서 Cre의 축적을 증가시킨다는 것을 제시하는 다른 보고와 대조적으로, 본 발명자들은 대장균에서 가용성 재조합 TAT-Cre의 실질적인 발현을 확인하였다. E12 도메인의 삽입은 재조합 TAT-Cre의 용해도 및 수율을 더욱 향상시켰다. 이러한 전략이 다른 단백질에 적용 가능할지 여부는 추가로 확인할 수 있다.

[0105] TAT 펩타이드가 양친매성 CPP보다 독성이 덜하지만, TAT-Cre는 고농도에서 세포 독성을 나타내었다(도 4C 참조). 그러나, 이러한 문제는 TAT이 아닌 Cre의 독성 때문이다. 연장된 Cre의 발현은 심장독성(cardiotoxicity)을 가지고 있으며 Cre의 발현이 세포 생리학에 영향을 줄만큼 충분히 높으면 Cre 단독으로도 세포 독성을 나타낼 수 있다. 관심있는 단백질에 TAT 펩타이드를 삽입시키는 것이 세포 내로 효율적으로 전달될 수 있기 때문에, 이러한 전략은 파킨슨 병 마우스 모델에서 신경독성의 완화, 췌장 베타 세포에서의 분화 촉진 및 면역 요법에 적용되어 왔다. 따라서, TAT을 포함한 아르기닌이 풍부한 CPP는 연구 및 치료 목적을 위한 광범위한 적용 범위를 가지고 있다.

[0106] 일단, His 태그와 함께 E12 서열이 정제 과정 동안에 TEV 프로테아제에 의해 제거되면, 얻어진 TAT 서열은 세포-기반 분석법에 의해 입증된 바와 같이 완전히 노출되고 기능을 나타낸다. 무세포 시스템에서 TAT-Cre 재조합 효소 활성이 완전한 재조합을 수행하지 않음을 발견하였다(도 4B 참조). 이러한 현상은 다른 보고[S.K. Lyu, et al., BMC biotechnology 15 (2015) 7 및 P. Oberdoerffer, et al., Nucleic Acids Research 31 (2003) e140]에서 입증된 가역성 Cre 재조합 때문일 수 있다.

[0107] 대조적으로 플록스드 대립 유전자를 갖는 포유 동물 세포에서 활성을 평가할 때 상기 재조합은 효소에 의해 투여량 및 시간 의존적 방식으로 수행되었다(도 5 참조). 치사율은 유전자 조작된 플록스드 마우스에서 Cre-loxP 재조합 후 조직 특이적인 유전자 녹아웃으로 인해 야기될 때, TAT-Cre를 그 메커니즘의 후속 연구에 사용할 수 있다. 위의 치사율을 막기 위해 타목시펜-유도성 Cre 시스템이 고안되었다. 유도성 시스템의 또 다른 목적은 배아기(embryonic period)에 유전자 결실에 대한 만성적인 영향을 예방하는 것이다. 그럼에도 불구하고, 타목시펜의 투여는 Cre의 유도뿐만 아니라 부작용을 초래한다. TAT-Cre의 적용은 이러한 독성을 예방할 수 있으며, 플록스드 마우스로부터 분리된 초대 세포의 조작을 통하여 심층적인 메커니즘을 깊이 있게 설명할 수 있다.

[0109] (5) 결론

[0110] 본 발명에서는 TAT-Cre에 폴리글루타메이트(polyglutamate) 도메인을 추가하고 대장균에서 발현시켜 얻어진 재조합 단백질의 용해도와 수율을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 또한, E12-TAT-Cre를 발현하는 대장균의 성장 속도가 TAT 및 NLS 서열의 양전하를 중화시킴으로써 증가한다는 것을 발견하였다. 그 결과 TAT-Cre가 세포 및 무세포 시스템에서 기능적이라는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 폴리글루타메이트 도메인의 첨가가 목적 TAT 융합 단백질의 발현 및 정제를 개선하는 새로운 방법임을 시사한다.

[0112] (6) 초록

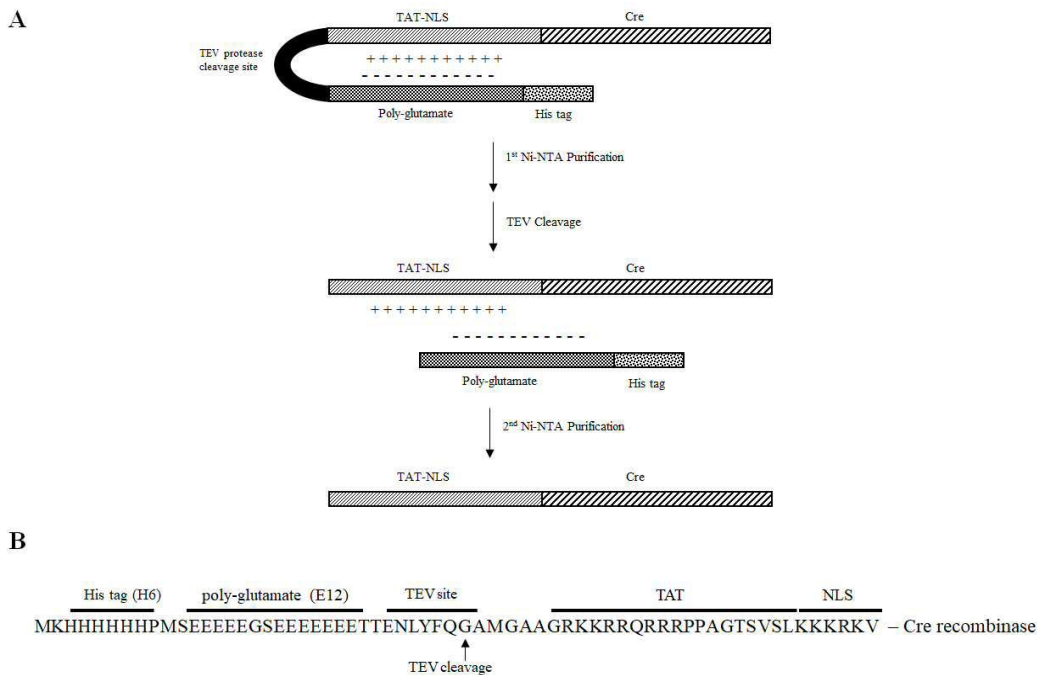
[0113] Cre 재조합효소는 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 위해 DNA 서열을 조작하는 데 널리 사용된다. Cre에 전사 트랜스활성자(Trans-activator of transcription, TAT) 서열을 삽입함으로써 TAT-Cre가 세포막을 통과할 수 있게 되고, NLS(nuclear localization signal)를 첨가하여 효소가 핵으로 전위(translocation)하는 데 도움이 된다. 재조합 TAT-Cre의 수율은 봉입체의 형성에 의해 제한되기 때문에, 양전하를 띤 아르기닌이 풍부한 TAT 서열은 봉입체를 형성하는 반면, 음전하를 띤 서열의 첨가에 의한 중화가 단백질의 용해도를 향상시킨다는 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위해, 음으로 하전된 폴리글루타메이트(E12) 서열을 근위에 삽입함으로써 양전하를 띤 TAT 서열을 중화시켰다.

[0114] E12 태그가 대장균에서 발현될 때 TAT-NLS-Cre(TAT-Cre)와 비교하여 E12-TAT-NLS-Cre(E12-TAT-Cre)의 용해도와 수율을 향상시키는 것을 확인하였다. 또한, E12-TAT-Cre를 발현하는 세포의 성장이 TAT-Cre를 발현하는 세포의 성장과 비교하여 증가하였다. 정제된 TAT-Cre의 효능은 무세포 시스템 및 293FT 세포에서 플루트스트 플라스미드에 대한 재조합 시험에 의해 확인되었다.

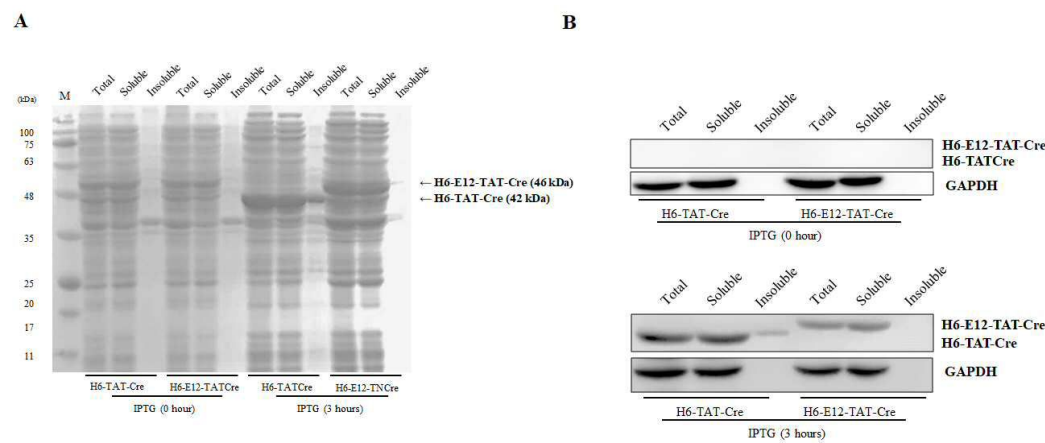
[0115] 종합하면, E12 서열을 TAT-Cre에 삽입시키는 것이 대장균에서의 발현 동안에 TAT-Cre의 용해도를 향상시키고(가능한 TAT 서열의 이온-전하 효과를 중화시킴으로써), 결과적으로 수율을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 방법은 연구 및 치료 목적으로 변환 가능한 단백질의 생산에 적용될 수 있다.

도면

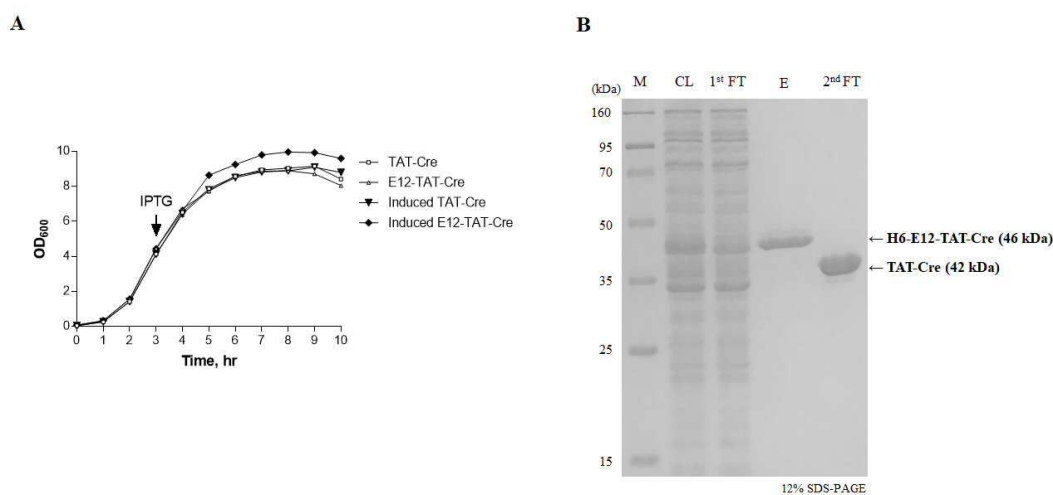
도면1



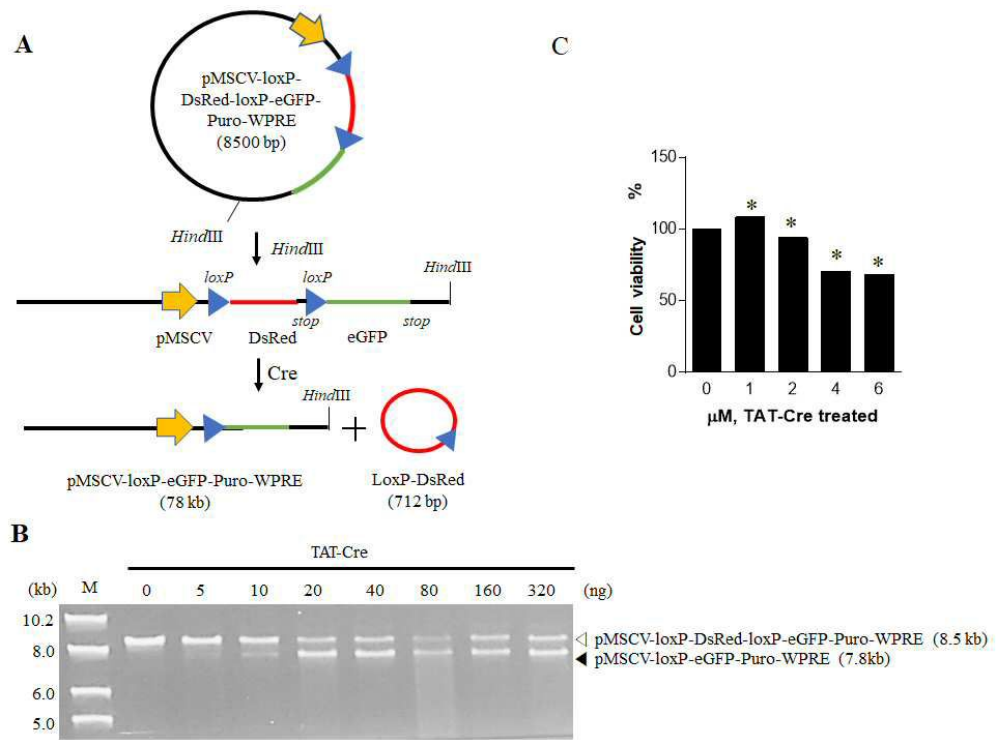
도면2



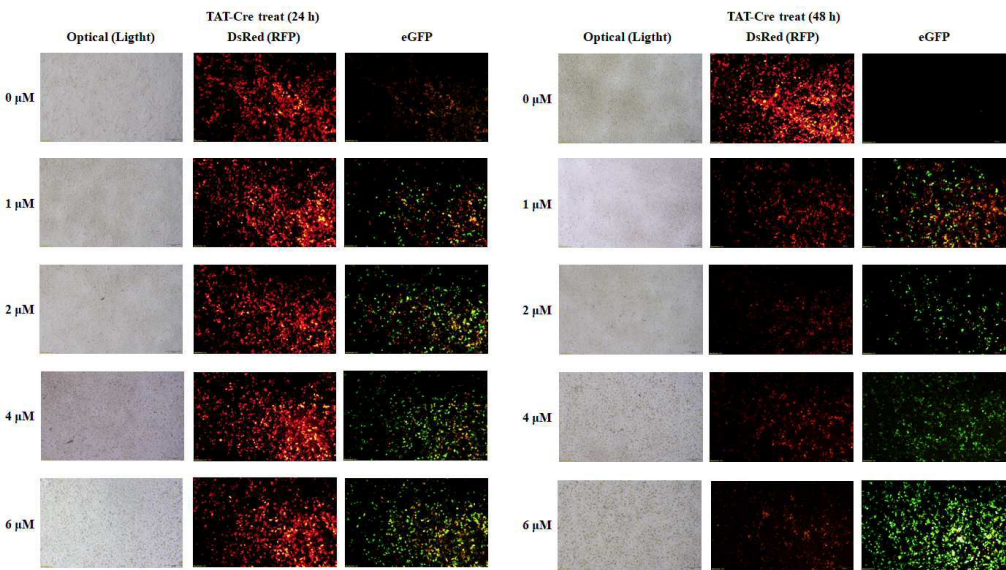
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Gachon University of Industry-Academic cooperation Foundation
- <120> Method for preparing polyglutamate-TAT-Cre fusion protein
- <130> P190202
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polyglutamate

<400> 1

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

1

5

10