(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월28일
(11) 등록번호 10-1634380
(24) 등록일자 2016년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
C07K 14/4705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0089284
(22) 출원일자 2015년06월23일
심사청구일자 2015년08월26일
(56) 선행기술조사문헌
WO2015080631 A1*
Loison F. et al., MOLECULAR THERAPY 11(2):pp.205-214 (2004.11.13.)*
US 5629172 A
KR 1020080074556 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생산기술연구원
충청남도 천안시 서북구 입장면 양대기로길 89
(72) 발명자
이우종
경기도 성남시 분당구 내정로166번길 42, 120동 101호 (수내동, 파크타운삼익아파트)
김성건
충청북도 영동군 영동읍 눈어치로 22-10, 101동 1403호 (설계주공아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인명인

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법에 관한 것으로, 본 발명에 의할 경우, TLR5 아고니스트 단백질을 생물공학적으로 생산한 후, 용이하게 분리 및 정제할 수 있는데, 특히 분리 및 정제를 위해 사용된 퓨전 파트너를 효과적으로 제거함으로써, 퓨전 파트너에 의한 면역반응 유발 및 TLR5와의 결합 저해 가능성을 최소화시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 2319/20 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/95 (2013.01)

(72) 발명자
이동목
대구광역시 달서구 월서로 14, 101동 804호 (상인동, 상인역e편한세상1단지아파트)

안희경
대구광역시 동구 안심로73길 22, 102동 708호 (신서동, 롯데캐슬레전드)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 14-CM-EB-09
부처명 방위사업청, 산업통상자원부
연구관리전문기관 민군기술협력센터
연구사업명 민군겸용기술개발사업
연구과제명 Entolimod 개량형 방사선 피폭 치료제 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국생산기술연구원
연구기간 2014.06.24 ~ 2019.06.23

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 결합되어 형성된 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 암호화하는 유전자에, 유비퀴틴을 암호화하는 유전자가 결합되어 있고, 상기 유비퀴틴 암호화 유전자에 정제용 태그를 암호화하는 유전자가 결합되어 형성된 융합 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계 (a);

상기에서 제조한 벡터로 호스트를 형질전환시킨 후, 상기 융합 유전자를 발현시켜 융합 단백질을 생산하는 단계 (b);

상기 융합 단백질에 융합되어 있는 정제용 태그가 결합하는 컬럼에, 상기에서 생산된 융합 단백질을 결합시켜 융합 단백질을 회수하는 단계 (c); 및

상기에서 회수한 융합 단백질에 유비퀴틴 특이 프로테아제 (UBP1)를 처리하여 유비퀴틴이 결합한 부위를 절단한 후, TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 회수하는 단계 (d); 를 포함하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질은,

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 서열번호 6에 기재된 링커를 매개로 하여 결합된 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 유비퀴틴을 암호화하는 유전자는, TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 암호화하는 유전자의 5' 말단에 결합하고,

상기 정제용 태그를 암호화하는 유전자는, 상기 유비퀴틴을 암호화하는 유전자의 5' 말단에 결합하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 호스트는,

대장균인 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 단계 (d)의 유비퀴틴 절단 효소의 처리는,

융합 단백질을 컬럼에 결합시킨 상태에서 처리하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 단계 (d)의 유비퀴틴 절단 효소의 처리는,

융합 단백질을 컬럼으로부터 용리(elution)시킨 후, 처리하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 융합 유전자는,

서열번호 7의 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 유비퀴틴은,

유비퀴틴 절단효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 17

제9항에 있어서,

상기 유비퀴틴은,

유비퀴틴의 일부분이되, 유비퀴틴 절단효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 18

제9항에 있어서,

상기 정제 태그는,

히스티딘 태그 (His-tag) 또는 라이신(lysine)이 6개 연속적으로 결합한 라이신 태그인 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 19

제9항에 있어서,

상기 단계 (c)는,

생산된 융합 단백질을 언폴딩(unfolding)한 후, 컬럼에 결합시켜 재접힘(refolding)함으로써 융합 단백질을 회수하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 20

제9항에 있어서,

상기 단계 (c)는,

생산된 융합 단백질을 언폴딩(unfolding)하고, 재접힘(refolding)한 후, 컬럼에 결합시켜 융합 단백질을 회수하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법.

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 생물공정을 통해 생산된 후, 용이하게 분리 정제가 가능하며, 더욱이 융합 파트너가 효과적으로 제거될 수 있는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 엔톨리모드(entolimod)는 미 국방부의 지원을 받아 클리블랜드 바이오랩스 (Cleveland Biolabs) 사에서 개발한 방사선 피폭 치료제로서, 본 발명에서는 기 개발된 엔톨리모드를 일부 변경한 '개량형 엔톨리모드'를 TLR5 아고니스트로 생산하고자 한다.

[0004] 엔톨리모드는 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*)의 플라젤린(flagellin) 단백질에서 유래하였고, TLR5(Toll-like receptor-5)와의 결합 및 활성화를 통해 방사능 노출로 인한 세포사를 막아주는 것으로 확인되었다. 실제로 체르노빌 원전 사고현장에 투입된 소방관들이 노출된 방사선량과 비슷한 정도를 원숭이에 노출시킨 후 엔톨리모드를 투여한 결과, 약 67%가 생존했으며, 물질을 투여하지 않은 원숭이의 생존율은 약 25%에 그쳤다는 보고도 있다.

[0005] 엔톨리모드는 총 4개의 도메인(D0, D1, D2, D3) 구성된 살모넬라 엔테리카의 플라젤린 단백질 중 TLR5와 직접적으로 결합하는 D0 도메인 및 D1 도메인으로만 구성되어 있고, 정제 및 절단을 위한 6-히스티딘 태그 및 엔테로키나아제 인식 서열을 포함한 34개의 아미노산 잔기(MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPM)가 아미노 말단에 포함되어 있다.

[0006] 그런데, 기존의 엔톨리모드는 아미노 말단에 결합된 상기 34개 아미노산 잔기에 의해 면역반응의 유발 및 TLR5와의 결합저해 가능성이 있으므로 제거될 필요가 있다.

[0007] 하지만, 엔톨리모드는 내부 아미노산 서열이 프로테아제에 취약한 구조를 갖기 때문에, 프로테아제의 일종인 엔테로키나아제를 처리할 경우, 그 구조가 파괴되는 문제가 수반될 수 있다.

[0008] 따라서, 새로운 개념의 엔톨리모드 및 그 생산방법이 개발되어야 할 필요가 있는 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-1287905호 (등록일자 2013년 07월 15일)에는, 플라젤린을 이용한 방사선으로부터의 보호방법으로, 환자에게 NF-kB를 유발하는 시약의 약학적으로 수용가능한 양을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 아폽토시스를 유발하는 하나 이상의 치료로부터 환자를 보호하는 방법이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제10-2012-0104177호 (공개일자 2012년 09월 20일)에는, 암을 치료하기 위한 TLR5 및 효능제의 용도로서, 플라젤린과 같은 TLR5 효능제를 제공하여 암과 감염성 질병들을 치료하는 방법들과 약제에 관한 것이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하고자 하는 것으로, 분리 및 정제가 용이하고, 분리 및 정제를 위해 사용된 퓨전 파트너를 효과적으로 제거함으로써, 퓨전 파트너에 의한 면역반응 유발 및 TLR5와의 결합 저해 가능성을 최소화시킨 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 결합되어 형성된 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질에 유비퀴틴이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 융합 단백질을 제공한다.

[0014] 본 발명의 TLR5 아고니스트는 세포의 수용체인 TLR5와 특이적으로 결합하여 세포 내 선천면역을 활성화시키는 작용을 함으로써, 방사선 피폭에 따른 세포 손상을 제어할 수 있다.

[0015] 미생물을 이용한 생물공정으로 TLR5 아고니스트 단백질을 생산하기 위해서는 '생산된 TLR5 아고니스트 단백질'을 분리 정제하기 위한 고려를 해야 한다. 이와 같은 필요에 의해 클리블랜드 바이오랩스 (Cleveland Biolabs) 사에서는 살모넬라 엔테리카의 플라젤린 단백질 중 TLR5와 직접적으로 결합하는 D0 도메인 및 D1 도메인에, 정제 및 절단을 위한 6-히스티딘 태그 및 엔테로키나아제 인식 서열을 포함한 34개의 아미노산 잔기(MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPM)를 부가시켜 엔톨리모드를 생산한 바가 있다.

[0016] 그런데, 융합파트너로 결합된 상기의 34개 아미노산 서열은 면역반응 유발 및 TLR5와의 결합 저해 가능성이 있기 때문에 제거되는 것이 바람직한데, D0 도메인 및 D1 도메인이 구조적으로 프로테아제에 취약한 특성

이 있어 엔테로키나아제 인식 서열이 있음에도 불구하고, 이를 처리하여 상기 융합파트너(34개 아미노산 서열)를 제거하지 못한 채 사용하고 있는 실정이다.

[0017] 본 발명에서는 이와 같은 문제점을 해결하고자 안출된 것으로, 본 발명에서 융합파트너로 사용한 유비퀴틴은, 유비퀴틴 절단 효소, 일 예로 유비퀴틴 특이 프로테아제(UBP1)라는 효소에 의해 절단될 수 있는데, 유비퀴틴 절단 효소는 기질 특이성 (specificity)이 매우 높아, 단백질(엔톨리모드) 내 다른 부위는 절단하지 않고, 유비퀴틴이 결합된 부위만을 선택적으로 자를 수 있는 장점이 있다. 본 발명은 상기와 같은 유비퀴틴의 특성을 이용하여, 융합파트너들이 깔끔히 제거된 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질 (이하, '개량형 엔톨리모드'라고도 함)을 생산하고, 본 발명을 완성한 것이다.

[0018] 유비퀴틴은 목적단백질의 발현을 도와주는 발현유도체로 알려져 있는 단백질인데, 정제공정 중 유비퀴틴 절단효소, 일 예로 유비퀴틴 특이 프로테아제 (Ubiquitin Specific Protease-1, UBP1)에 의하여 절단되어 제거될 수 있다. 본 발명에서 유비퀴틴은 전체 시퀀스 외에 일부 시퀀스만을 사용할 수도 있다.

[0019] 본 발명의 융합 단백질에 있어서, 상기 TLR5 아고니스트 단백질은 일 예로 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 서열번호 6에 기재된 링커를 매개로 하여 결합된 것일 수 있다. 서열번호 2에 기재된 폴리펩타이드 및 서열번호 4에 기재된 폴리펩타이드는 그 결합에 의해 접힘으로써, TLR5와 직접적으로 결합할 수 있는 D0 도메인 및 D1 도메인이 형성된다. 이때, 서열번호 2에 기재된 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 폴리펩타이드는 링커에 의해 결합될 수 있는데, 그 링커는 일 예로 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0020] 본 발명의 융합 단백질에 있어서, 상기 유비퀴틴은 바람직하게 TLR5 아고니스트 단백질의 아미노 말단에 융합되어 있는 것이 좋다.

[0021] 본 발명의 융합 단백질에 있어서, 상기 유비퀴틴은, 바람직하게 유비퀴틴 절단 효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 포함하고 있는 것이 좋고, 유비퀴틴 절단 효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 가지고 있다면, 유비퀴틴 전체가 아닌 일부라 하더라도 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 융합 단백질에 있어서, 상기 유비퀴틴 절단 효소는 다양한 것들이 있는데, 일 예로 YUH1 (yeast ubiquitin C-terminal hydrolase 1) 또는 유비퀴틴 특이 프로테아제 (UBP1)일 수 있다.

[0023] 본 발명의 융합 단백질에 있어서, 상기 융합 단백질은, 바람직하게 유비퀴틴의 아미노 말단에 정제용 태그가 더 결합되어 있는 것이 좋은데, 정제용 태그가 결합되어 있을 경우, 분리 정제를 용이하게 할 수 있는 장점이 있다. 이때, 상기 정제용 태그는 당업계에 알려진 다양한 정제용 태그를 사용할 수 있으나, 일 예로는 히스티딘 태그 (His-tag) 도는 라이신(lysine)이 6개 연속적으로 결합하여 형성된 라이신 태그를 사용할 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 결합되어 형성된 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 암호화하는 유전자에, 유비퀴틴을 암호화하는 유전자가 결합되어 있고, 상기 유비퀴틴 암호화 유전자에 정제용 태그를 암호화하는 유전자가 결합되어 형성된 융합 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계 (a); 상기에서 제조한 벡터로 호스트를 형질전환시킨 후, 상기 융합 유전자를 발현시켜 융합 단백질을 생산하는 단계 (b); 상기 융합 단백질에 융합되어 있는 정제용 태그가 결합하는 컬럼에, 상기에서 생산된 융합 단백질을 결합시켜 융합 단백질을 회수하는 단계 (c); 및 상기에서 회수한 융합 단백질에 유비퀴틴 절단 효소를 처리하여 유비퀴틴이 결합한 부위를 절단한 후, TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 회수하는 단계 (d); 를 포함하는 것을 특징으로 하는 TLR5 아고니스트 단백질의 생산방법을 제공한다. 이하, 하기에서는 상기 각 단계를 세분화하여 더욱 구체적으로 설명하고자 한다.

[0027] **<단계 (a): 융합 유전자를 포함하는 벡터의 제조>**

[0028] 본 단계는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 결합되어 형성된 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질을 암호화하는 유전자에, 유비퀴틴을 암호화하는 유전자가 결합되어 있고, 상기 유비퀴틴 암호화 유전자에 정제용 태그를 암호화하는 유전자가 결합되어 형성된 융합 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계이다. 유전자의 결합 및 벡터 제조 등은 당업계에 널리 알려진 기술을 이용할 수 있으므로, 이에 관한 구체적인 기재는 생략하기로 한다.

[0029] 본 단계에 있어서, 상기 TLR5 아고니스트(agonist) 단백질은, 일 예로 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 폴

리펩타이드와 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드가 서열번호 6에 기재된 링커를 매개로 하여 결합된 것일 수 있다.

[0030] 본 단계에 있어서, 상기 유비퀴틴을 암호화하는 유전자는 바람직하게 TLR5 아고니스트 단백질을 암호화하는 유전자의 5' 말단에 결합하고, 상기 정제용 태그를 암호화하는 유전자는, 바람직하게 상기 유비퀴틴을 암호화하는 유전자의 5' 말단에 결합하는 것이 좋다.

[0031] 본 단계에 있어서, 상기 융합 유전자는 일 예로, 서열번호 7의 핵산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0032] 본 단계에 있어서, 상기 유비퀴틴은 바람직하게 유비퀴틴 절단효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 포함하고 있는 것이 좋은데, 유비퀴틴 절단효소에 의해 절단되는 아미노산 서열을 포함하고 있는 것이라면, 유비퀴틴의 일부분도 사용 가능하다.

[0033] 본 단계에 있어서, 상기 정제용 태그는 다양한 정제용 태그를 사용할 수 있고, 일 예로는 히스티딘 태그 (His-tag) 또는 라이신(lysine)이 6개 연속적으로 결합하여 형성된 라이신 태그를 사용할 수 있다.

[0035] **<단계 (b): 융합 단백질의 생산>**

[0036] 본 단계는 상기에서 제조한 벡터로 호스트를 형질전환시킨 후, 상기 융합 유전자를 발현시켜 융합 단백질을 생산하는 단계이다.

[0037] 본 단계에 있어서, 상기 호스트는 전 단계에서 구축한 벡터가 도입되어 벡터 내부에 도입된 유전자가 발현될 수 있는 호스트, 즉 유전공학적으로 호스트-벡터 시스템(host-vector system)이 구축되어 있는 호스트라면 어느 것이나 사용할 수 있는데, 일 예로는 가장 널리 알려진 대장균을 사용할 수 있다. 이때, 유도 프로모터(inducible promoter)를 사용하는 벡터를 이용할 경우, 융합 단백질의 발현을 위해 유도물질을 사용할 수도 있다.

[0039] **<단계 (c): 융합 단백질의 회수>**

[0040] 본 단계는 융합 단백질에 융합되어 있는 정제용 태그가 결합하는 컬럼에, 상기에서 생산된 융합 단백질을 결합시켜 융합 단백질을 회수하는 단계이다.

[0041] 상기에서 생산된 융합 단백질은 호스트 내에 존재하거나 호스트 외부로 분비될 수 있는데, 어느 경우라 하더라도 융합 단백질을 세포 내/외 단백질 또는 기타의 물질들로부터 분리하는 공정이 요구된다.

[0042] 본 단계에서는 융합 단백질에 융합되어 있는 정제용 태그를 이용하여 분리 정제를 수행할 수 있는데, 정제용 태그가 결합하는 컬럼(레진)을 사용하여 목적으로 하는 융합 단백질만 결합시키고, 나머지 물질들은 용출시켜 분리 정제가 가능한 것이다.

[0043] 한편, 본 단계는 바람직하게 생산된 융합 단백질을 언폴딩(unfolding)한 후, 컬럼에 결합시켜 재접힘(refolding)함으로써 융합 단백질을 회수할 수 있다. 또한, 본 단계는 생산된 융합 단백질을 언폴딩하고, 재접힘한 후, 컬럼에 결합시켜 융합 단백질을 회수할 수 있다.

[0044] 생산된 융합 단백질이 내포체 형태 (inclusion body)로 발현되는 경우, 이 형태로는 생물학적 활성을 기대하기 힘들기 때문에, 고유의 형태(form)로 되돌리기 위한 공정이 요구되는데, 이것을 언폴딩 및 재접힘 과정이라 한다. 언폴딩 및 재접힘 과정은 공지의 기술을 사용하여 수행 가능하기 때문에 이에 관한 구체적 기재는 생략하기로 한다.

[0046] **<단계 (d): TLR5 아고니스트 단백질의 회수>**

[0047] 본 단계는 상기에서 회수한 융합 단백질에 유비퀴틴 절단효소를 처리하여 유비퀴틴이 결합한 부위를 절단한 후, TLR5 아고니스트 단백질을 회수하는 단계이다.

[0048] 면역반응 유발 및 TLR5와의 결합 저해 가능성을 최소화시키기 위해서는 융합 단백질에 결합한 융합 파트너를 제거해야 하는데, 본 단계에서는 유비퀴틴 절단효소를 사용하여 융합 파트너를 제거하는 것이다.

[0049] 본 단계에 있어서, 상기 유비퀴틴 절단효소의 처리는 일 예로 융합 단백질을 컬럼에 결합시킨 상태에서 처리할 수 있고, 또한, 융합 단백질을 컬럼으로부터 용리(elution)시킨 후, 처리할 수도 있다.

[0050] 본 단계에 있어서, 상기 유비퀴틴 절단 효소는 다양한 것들이 있는데, 일 예로 YUH1 (yeast ubiquitin C-terminal hydrolase 1) 또는 유비퀴틴 특이 프로테아제 (UBP1)일 수 있다.

발명의 효과

[0052] 본 발명에 의할 경우, TLR5 아고니스트 단백질을 생물공학적으로 생산한 후, 용이하게 분리 및 정제할 수 있는데, 특히 분리 및 정제를 위해 사용된 퓨전 파트너를 효과적으로 제거함으로써, 퓨전 파트너에 의한 면역반응 유발 및 TLR5와의 결합 저해 가능성을 최소화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 K6UbKMRC011의 유전자 배열 모식도이다.

도 2는 K6UbKMRC011 유전자의 염기서열이다.

도 3은 K6UbKMRC011의 단백질 서열이다.

도 4는 pAP-K6UbKMRC011 플라스미드 모식도이다.

도 5는 대장균에서 발현된 K6UbKMRC011의 발현 수준 및 용해도 분석 결과이다.

도 6은 고체상 재접힘된 K6UbKMRC011의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

도 7은 고체상 재접힘된 K6UbKMRC011의 UBP1에 의한 절단 분석 결과이다.

도 8은 컬럼상(on column) 절단을 통한 TLR5 아고니스트 단백질의 분리 및 정제 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0057] **[실시예 1: K6UbKMRC011 발현 대장균의 제작]**

[0058] (1) K6UbKMRC011의 유전자 합성

[0059] 서열번호 2의 아미노산 서열 (서열번호 1의 핵산 서열에 의해 암호화)을 갖는 폴리펩타이드와 서열번호 4의 아미노산 서열 (서열번호 3의 핵산 서열에 의해 암호화)을 갖는 폴리펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열(서열번호 5에 의해 암호화)을 갖는 폴리펩타이드(링커)를 매개로 하여 결합된 후, 접히게 되면 TLR5에 결합할 수 있는 D0 도메인 및 D1 도메인을 형성하게 된다.

[0060] 본 실시예에서는 서열번호 1에 기재된 핵산서열 및 서열번호 3에 기재된 핵산서열이 서열번호 5에 기재된 핵산서열 (링커)을 매개로 하여 형성된 소위 'TLR5 아고니스트 단백질(KMRC011) 암호화 유전자'에 라이신(lysine) 6개가 연속적으로 결합된 라이신 태그(K6)를 암호화하는 유전자 및 유비퀴틴(Ub)을 암호화하는 유전자를 결합시켜 융합 유전자, 'K6UbKMRC011'를 합성하고자 하였는데, 1차 중합효소연쇄반응을 이용해 K6Ub 부분과 KMRC011 부분을 나누어 증폭하고, 2차 중합효소연쇄반응을 통해 K6Ub 부분과 KMRC011 부분을 연결하여 K6UbKMRC011의 전체 유전자를 합성하였다 (도 1 참조 요망).

[0061] K6Ub 부분은 프라이머 K6Ub-NdeI-F 및 KMRC011-R2와 K6Ub 유전자를 함유하고 있는 플라스미드 pUC18-K6Ub을 주형으로 이용하여 증폭하였고, KMRC011 부분은 프라이머 KMRC011-F2 및 KMRC011-BamHI-R2와 서열번호 1, 서열번호 3 및 서열번호 5의 유전자를 함유하고 있는 플라스미드 pUC57-KMRC011를 주형으로 이용하여 증폭하였다 (하기 표 1 참조 요망).

표 1

[0062] K6UbKMRC011 유전자 합성을 위해 중합효소연쇄반응에서 사용된 프라이머의 염기서열

번호	프라이머 이름	프라이머 서열
1	K6Ub-NdeI-F	aatcatatgaagaaaaaaaagaaaaagcagattttcgtcaagact
2	KMRC011-R2	tgttgataacctgcgccatgccacctcttagccttagc
3	KMRC011-F2	gctaaggctaagaggtggcgcgcaggttatcaaca
4	KMRC011-BamHI-R2	attggatccttagcgcagcaggctcag

[0064] K6UbKMRC011의 전체 유전자는 프라이머 K6Ub-NdeI-F 및 KMRC011-BamHI-R와 1차 중합효소연쇄반응의

K6Ub 및 KMRC011 산물들을 주형으로 하여 오버랩-익스텐션(overlap-extension) PCR을 통해 합성하였다. 합성된 K6UbKMRC011 유전자의 핵산 서열 및 핵산 서열로부터 유추된 아미노산 서열은 각각 하기 도 2 (서열번호 7)와 도 3 (서열번호 8)에 나타내었다.

[0066] (2) K6UbKMRC011 발현 플라스미드의 제작

[0067] 증폭된 K6UbKMRC011 유전자는 IPTG에 의해 발현 조절이 되고 tac 프로모터를 함유하고 있는 pAP(AP Technology 사 보유) 발현 플라스미드의 NdeI과 BamHI 제한효소 자리에 삽입하여 pAP-K6UbKMRC011 플라스미드를 제작하였다(도 4 참조 요망).

[0069] (3) K6UbKMRC011의 발현 대장균 제작

[0070] pAP-K6UbKMRC011 플라스미드를 대장균 TG1 (*Escherichia coli* TG1)에 형질전환하여 K6UbKMRC011을 발현하는 대장균 TG1/pAP-K6UbKMRC011 (*Escherichia coli* TG1/pAP-K6UbKMRC011) 최종적으로 제작하였다.

[0072] **[실시예 2: 실시예 1에서 제작한 재조합 대장균을 이용한 K6UbKMRC011의 생산]**

[0073] 상기 실시예에서 제작한 대장균 TG1/pAP-K6UbKMRC011을 이용하여 K6UbKMRC011의 생산능을 확인하고자 하였다. 배양을 위해 효모추출물 5g/L, 트립톤 10g/L, 염화나트륨 10g/L 조성의 배지를 이용하였다. 500mL 배플드 플라스크 (baffled flask)를 이용하여, 37℃, 200rpm에서 600nm의 흡광도가 0.5~1.0이 될 때까지 배양한 후 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가하여 K6UbKMRC011에서 발현을 유도 후 4시간 동안 배양하였다.

[0074] 600nm의 흡광도 15로 보정된 상기 K6UbKMRC011이 발현된 대장균을 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 조건에서 가용성 및 비가용성 분획으로 나눈 후 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 분석을 통해 K6UbKMRC011의 발현수준 및 가용성을 확인하였다.

[0075] 발현된 K6UbKMRC011의 세포 내 발현 수준은 덴시토미터(densitometer) 분석을 통해 약 21%로 확인되었다(도 5 참조 요망). K6UbKMRC011는 대부분 불용성 분획에서 관찰되어 대장균에서 발현된 K6UbKMRC011는 불용성 내포체임을 알 수 있었다.

[0077] **[실시예 3: 실시예 2에서 생산한 K6UbKMRC011의 고체상 재접힘 방법]**

[0078] 대장균에서 발현된 K6UbKMRC011는 불용성 내포체로 발현되었으므로 생물학적 활성 회복을 위해 고체상 재접힘(solid-phase refolding)을 수행하였다. 초음파 파쇄기로 파쇄된 대장균을 원심분리 (12,000 rpm, 20분) 후 얻어진 K6UbKMRC011의 내포체를 완충액 A (pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate, 8 M urea)로 가용화시킨 후 완충액 A로 평형화된 양이온 교환수지 SP Sepharose FF (GE Healthcare)이 충진된 컬럼에 주입하여 가용화된 K6UbKMRC011가 정전기적인력에 의해 양이온 교환수지에 결합되도록 하였다. 완충액 B (pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate)를 위 컬럼에 주입하여 요소(urea)를 제거함으로서 양이온 교환수지에 결합된 K6UbKMRC011의 재접힘을 유도하였다. 완충액 C (pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate, 1 M NaCl)를 위 컬럼에 주입하여 재접힘 K6UbKMRC011이 양이온 교환수지로부터 용출될 수 있도록 하였고 각 분획들을 SDS-PAGE로 분석하였다(도 6 참조 요망).

[0079] 용출된 재접힘 K6UbKMRC011은 모두 가용성 형태인 것으로 확인되었고, UBP1(ubiquitin specific protease-1)에 의한 절단 유무를 확인하기 위해 UBP1을 10 mg/L이 되도록 용출된 재접힘 K6UbKMRC011에 첨가하여 37℃에서 12시간 동안 반응시켜 보았다.

[0080] SDS-PAGE로 분석 결과 대부분의 재접힘된 K6UbKMRC011은 UBP1에 의해 절단되어 K6Ub와 KMRC011로 분리되는 것을 확인하였다(도 7 참조 요망).

[0082] **[실시예 4: 실시예 3에서 고체상 재접힘된 K6UbKMRC011에서 KMRC011을 분리 정제하는 방법 - on column cleavage]**

[0083] 고체상 재접힘된 K6UbKMRC011을 용출하지 않고 양이온 교환수지에 정전기적 결합이 된 상태에서 UBP1 용액 (10 mg/L)을 순환시킴으로서 KMRC011만 분리 및 정제하고자 하였다(도 8 참조 요망).

[0084] 분리 정제된 KMRC011는 아미노말단 서열 분석에서 AQVINTNSLS로 확인되어 UBP1에 의해 정확하게 K6UbKMRC011의 K6Ub 다음이 절단된 KMRC011만 분리 정제된 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

K6UbKMRC 011

도면2

atgaagaaaaaaaagaaaaagcagattttcgtcaagactttgaccggtaaaaccataacattggaagttg
aatcttccgataccatcgacaacgttaagtcgaaaattcaagacaaggaaggtatccctccagatcaaca
aagattgatctttgccggtaagcagctagaagacggtagaacgctgtctgattacaacattcagaaggag
tccaccttacatcttgtgctaaggctaagaggtggcgcgcaggttatcaacaccaactctctgtccctgct
gacccaaaacaatctgaacaaatcccagagctccctgagctccgcgatcgagcgtctgtcctccggcct
gcgtattaatagcgccaaagacgatgccgcgggtcaggcgatcgctaaccgcttcacttccaacattaa
aggcctgactcaggcctcccgtaacgcaaacgacggtattagcatcgctcagactactgaaggtgctct
gaacgaaattaacaacaacctgcagcgcgtccgtgaactgagcgtccaggcaaccaacggtactaactc
tgacagcgatctgaaatccattcaggatgaaattcagcagcgtctggaagaaatcgaccgcgtgtctaac
cagacgcaattcaacggcgtaaaggtgctgtctcaggacaatcagatgaaaatccaagttggtgcgaac
gacggcgagactatcaccatcgatctgcagaaaatcgacgttaaatccctgggtctggacggttttaacg
taaactctccaggtatctctggtggcggtggtggcattctggactccatgggtaccctgatcaacgagga
tgcagcggcggctaagaaatctactgccaaccctctggccagcatcgacagcgctctgagcaaagttga
tgcggtgcgttcttctctgggcgcaatccagaatcgcttcgattccgctatcacgaatctgggcaacacc
gttaccaacctgaactctgctcgtagccgtatcgaagacgcagattatgcgaccgaagtatctaacatgt
ctaaagcacagattctgcagcaggctggtacctctgttctggctcaggcaaaccaggtgccgcaaaacg
ttctgtctctgctgcgctaa

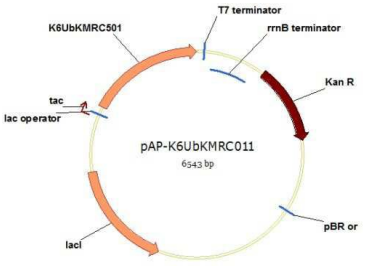
* K6Ub에 해당되는 염기 서열은 밑줄로 표시하였다.
* 링커에 해당되는 염기 서열은 염기 서열은 굵은 글씨의 밑줄로 표시하였다.

도면3

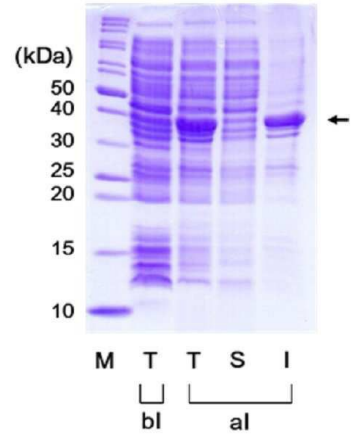
MKKKKKKQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKSKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGR
TLSDYNIQKESTLHLVLRLRGGAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSSAIERLSSGLRINS
AKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQAT
NGTNSDSDLKSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQ
KIDVKSLGLDGFNVNSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVD
AVRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVL
AQANQVPQNVLSLLR

* K6Ub에 해당되는 아미노산 서열은 밑줄로 표시하였다.
* 링커에 해당되는 아미노산 서열은 굵은 글씨의 밑줄로 표시하였다.

도면4

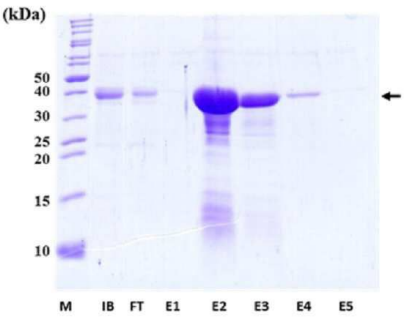


도면5



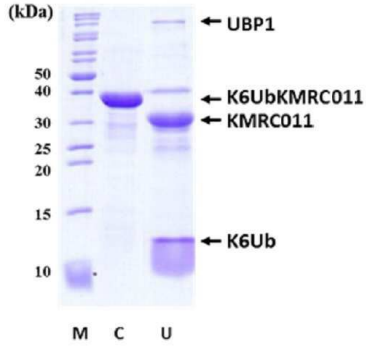
M, 마커 단백질; T, 총 세포 단백질; S, 가용성 단백질 분획; I, 불용성 단백질 분획; bI, 유도 전 세포; aI: 유도 후 세포
화살표는 발현된 K6UbKMRC011의 위치

도면6



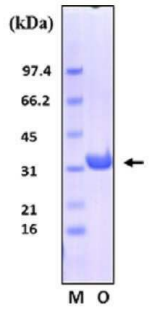
M, 마커 단백질; IB, 가용화된 내포체 단백질; FT, 양이온 교환 수지에 결합되지 않는 단백질 분획; E1 - E5, 용출 분획
화살표는 K6UbKMRC011의 위치를 나타낸다.

도면7



M, 마커 단백질; C, UBP1을 처리하지 않은 K6UbKMRC011; U, UBP1을 처리한 K6UbKMRC011
화살표는 분리 정제된 KMRC011의 위치를 나타낸다.

도면8



M, 마커 단백질; O, 컬럼상 절단을 통해 얻어진 TLR5 아고니스트 (KMRC011)

서 열 목 록

<110> KOREA INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY

<120> Method for production of TLR5 agonist

<130> AP-2015-0129

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 525

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 1

gcgcaggtta tcaacaccaa ctctctgtcc ctgctgaccc aaaacaatct gaacaaatcc 60

cagagctccc tgagctccgc gatcgagcgt ctgtcctccg gcctgcgtat taatagcgcc 120

aaagacgatg ccgcgggtca ggcgatcgct aaccgcttca cttccaacat taaaggcctg 180

actcaggcct cccgtaacgc aaacgacggt attagcatcg ctcagactac tgaaggtgct 240

ctgaacgaaa ttaacaacaa cctgcagcgc gtccgtgaac tgagcgtcca ggcaaccaac 300

ggtactaact ctgacagcga tctgaaatcc attcaggatg aaattcagca gcgtctggaa 360

gaaatcgacc gcgtgtctaa ccagacgcaa ttcaacggcg taaaggtgct gtctcaggac 420

aatcagatga aaatccaagt tggtgcgaac gacggcgaga ctatcaccat cgatctgcag 480

aaaatcgacg ttaaatccct gggtctggac ggttttaacg taaac 525

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 2

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn

1 5 10 15

Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ile Glu Arg Leu Ser

20 25 30

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala

35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ser Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser

50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala

65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val

85 90 95

Gln Ala Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Lys Ser Ile Gln

100 105 110

Asp Glu Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln

115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys

130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln

145 150 155 160

Lys Ile Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn

165 170 175

<210> 3

<211> 315

<212> DNA

<213> Salmonella enterica

<400> 3

accctgatca acgaggatgc agcggcggct aagaaatcta ctgccaaccc tctggccagc 60

atcgacagcg ctctgagcaa agttgatgcg gtgcgttctt ctctgggcgc aatccagaat 120

cgcttcgatt ccgctatcac gaatctgggc aacaccgtta ccaacctgaa ctctgctcgt 180

agccgtatcg aagacgcaga ttatgcgacc gaagtatcta acatgtctaa agcacagatt 240

ctgcagcagg ctggtacctc tgttctggct caggcaaacc aggtgccgca aaacgttctg 300

tctctgctgc gctaa 315

<210> 4

<211> 104

<212> PRT

<213> Salmonella enterica

<400> 4

Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Ala Lys Lys Ser Thr Ala Asn
1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Lys Val Asp Ala Val Arg

20 25 30

Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Thr Asn
35 40 45

Leu Gly Asn Thr Val Thr Asn Leu Asn Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu
50 55 60

Asp Ala Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys Ala Gln Ile
65 70 75 80

Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro
85 90 95

Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
100

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 5

tctccaggta tctctggtgg cggtggtggc attctggact ccatgggt 48

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 6

Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Asp Ser Met Gly

1 5 10 15

<210> 7

<211> 1134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K6UbKMRC011

<400> 7

atgaagaaaa aaaagaaaaa gcagattttc gtcaagactt tgaccggtaa aaccataaca 60

ttggaagttg aatcttccga taccatcgac aacgttaagt cgaaaattca agacaaggaa 120

ggtatccctc cagatcaaca aagattgatc tttgccggta agcagctaga agacggtaga 180

acgctgtctg attacaacat tcagaaggag tccaccttac atcttgtgct aaggctaaga 240

ggtggcgcgc aggttatcaa caccaactct ctgtccctgc tgacccaaaa caatctgaac 300

aaatcccaga gctccctgag ctccgcgatc gagcgtctgt cctccggcct gcgtattaat 360

agcgccaaag acgatgccgc gggtcaggcg atcgctaacc gcttcacttc caacattaaa 420

ggcctgactc aggcctcccg taacgcaaac gacggtatta gcatcgctca gactactgaa 480

ggtgctctga acgaaattaa caacaacctg cagcgcgtcc gtgaactgag cgtccaggca 540

accaacggta ctaactctga cagcgatctg aaatccattc aggatgaaat tcagcagcgt 600

ctggaagaaa tcgaccgcgt gtctaaccag acgcaattca acggcgtaaa ggtgctgtct 660

caggacaatc agatgaaaat ccaagttggt gcgaacgacg gcgagactat caccatcgat 720

ctgcagaaaa tcgacgttaa atccctgggt ctggacggtt ttaacgtaaa ctctccaggt 780

atctctggtg gcggtggtgg cattctggac tccatgggta ccctgatcaa cgaggatgca 840

gcggcggcta agaaatctac tgccaaccct ctggccagca tcgacagcgc tctgagcaaa 900

gttgatgcgg tgcgttcttc tctgggcgca atccagaatc gcttcgattc cgctatcacg 960

aatctgggca acaccgttac caacctgaac tctgctcgta gccgtatcga agacgcagat 1020

tatgcgaccg aagtatctaa catgtctaaa gcacagattc tgcagcaggc tggtacctct 1080

gttctggctc aggcaaacca ggtgccgcaa aacgttctgt ctctgctgcg ctaa 1134

<210> 8

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> K6UbKMRC011

<400> 8

Met Lys Lys Lys Lys Lys Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly
1 5 10 15

Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Ser Ser Asp Thr Ile Asp Asn Val
20 25 30

Lys Ser Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp
50 55 60

Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Gly Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln
85 90 95

Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ile Glu Arg
100 105 110

Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly
115 120 125

Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ser Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln

130 135 140

Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu
145 150 155 160

Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu
165 170 175

Ser Val Gln Ala Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Lys Ser
180 185 190

Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser
195 200 205

Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln

210 215 220

Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp

225 230 235 240

Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val

245 250 255

Asn Ser Pro Gly Ile Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ile Leu Asp Ser Met

260 265 270

Gly Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Ala Lys Lys Ser Thr Ala

275 280 285

Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Lys Val Asp Ala Val

290 295 300

Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Thr

305 310 315 320

Asn Leu Gly Asn Thr Val Thr Asn Leu Asn Ser Ala Arg Ser Arg Ile

325 330 335

Glu Asp Ala Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys Ala Gln

340 345 350

Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val

355 360 365

Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg

370 375