
TVMV 프로테아제 대량 생산용 백터 및 대량 생산 방법



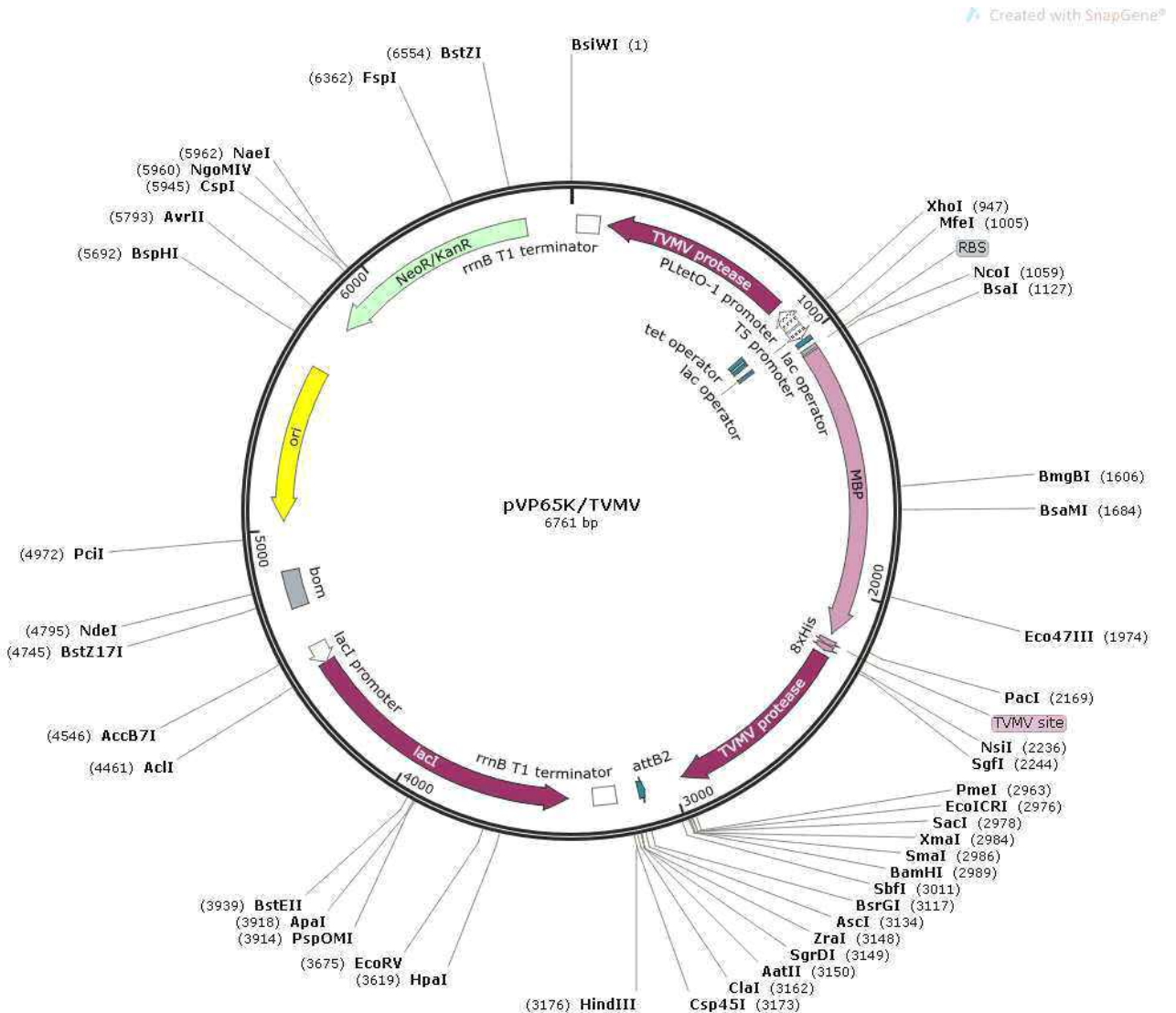
대표발명자 : 채명기 교수

TVMV 프로테아제 대량 생산용 벡터 및 대량 생산 방법

□ 기술개요

- 본 발명은 TVMV 프로테아제 대량 생산용 벡터 및 이를 이용한 TVMV 프로테아제 대량 생산 방법에 관한 것임
- 담배 정맥 반점형성 바이러스 유래 (TVMV) 프로테아제 코딩 유전자를 T5 프로모터 하위 (downstream)에 가지는 벡터 및 이를 이용함으로써, TVMV 프로테아제를 우수한 수율로 생산할 수 있으며, TVMV 프로테아제를 수용성 발현시킬 수 있음
- TVMV 프로테아제를 우수한 활성을 가지도록 정제할 수 있으며, TVMV 프로테아제를 대량으로 생산할 수 있고, 배양 및 정제가 간편하여 배양 공정을 단순화시킬 수 있는, TVMV 프로테아제 대량 생산용 벡터 및 이를 이용한 TVMV 프로테아제 대량 생산 방법에 관한 것임

□ 대표도면



□ 기술의 특징 및 우수성

- 본 발명의 벡터 및 이를 사용하는 생산 방법은 TVMV 프로테아제를 우수한 수율로 생산할 수 있고, 수용성 발현시킬 수 있으며, TVMV 프로테아제의 활성 저하를 최소화하면서 높은 순도로 정제할 수 있음
- 또한, 대량으로 생산할 수 있고, 저비용으로 TVMV 프로테아제를 생산할 수 있으며, 배양 및 정제가 간편하여 TVMV 프로테아제 생산 공정을 단순화시킬 수 있음

[표] 기술의 특징 및 우수성

종래기술 문제점	<ul style="list-style-type: none"> • 기질의 특정부위를 인식해 절단하는 엔도펩티다제 (endopeptidase)의 경우 고부가치의 단백질 의약품 및 산업용 효소를 고순도로 분리정제하는데 있어서 산업적으로 중요한 효소임 • 단백질분해효소는 세포 외부로 분비되어 단백질성 기질을 분해하는 특성으로 인하여 세포 내에서 매우 낮은 농도로 존재하고, 생산수율이 낮다는 단점이 있음 • 엔도펩티다제 중 하나인 TVMV 프로테아제를 높은 수율로 수득하고 수용성 발현이 가능하며, 수득한 TVMV 프로테아제의 활성을 최대로 저하시키면서 정제하는 방법에 관해서는 개발되지 않았음
해결방안	<ul style="list-style-type: none"> • TVMV 프로테아제 대량 생산용 벡터를 제조함. 상기 벡터는 다음과 같은 특징을 가짐 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 담배 정맥 반점형성 바이러스 (TVMV) 프로테아제 코딩 유전자를 T5 프로모터 하위(downstream)에 가짐 ✓ TVMV 프로테아제 코딩 유전자를 PLtetO-1 프로모터 하위에 가짐 ✓ Sgf1 및 Pme1의 제한효소 부위 서열을 포함 ✓ 서열번호 1의 염기서열을 포함 ✓ lac 오퍼레이터를 상기 프로모터와 TVMV 프로테아제 사이에 가짐 ✓ 말토오스 결합 단백질 코딩 유전자를 상기 lac 오퍼레이터와 상기 TVMV 프로테아제 코딩 유전자 사이에 가짐 ✓ 8xHis tag를 코딩하는 유전자를 상기 말토오스 결합 단백질 코딩 유전자와 상기 TVMV 프로테아제 코딩 유전자 사이에 가짐 ✓ 서열번호 8의 염기서열을 포함 • 제조된 벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 TVMV 프로테아제를 수득하는 단계를 포함하는 TVMV 프로테아제 대량 생산 방법 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 미생물은 대장균이고, Rosetta2(DE3)pLysS임 ✓ 배양은 Overnight Express LB 배지에서 배양을 포함 ✓ 배양으로 수득된 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액에 완충용액을 처리하는 단계; 및 상기 완충용액이 처리된 상층액에 용출 완충액을 처리하는 단계;를 포함함 ✓ 상기 완충용액은 50 내지 90 mM의 이미다졸을 포함하고, 상기 용출 완충액은 200 내지 300 mM의 이미다졸을 포함함
기술의 특징 및 우수성	<ul style="list-style-type: none"> • 목적단백질을 코딩하는 유전자와 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하고, 숙주 미생물에서 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 융합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 함유하는 미생물에 관한 것임

□ 기술의 효과

- 우수한 수율로 TVMV 프로테아제를 생산할 수 있고, 수용성 발현이 가능하며, 활성 저하를 최소화하면서 높은 순도로 정제가 가능함. 또한, 저비용으로 대량 생산이 가능하며, 생산 공정을 단순화시킬 수 있음

□ 기술의 완성도(TRL)

기초 연구 단계		실험 단계		시작품 단계		제품화 단계		사업화
기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념 검증	연구실환경 테스트	유사환경 테스트	파일럿현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종테스트	상용운영
			●					

□ 기술 키워드

한글키워드	재조합단백질, 단백질가수분해 효소, TVMV 프로테아제, 발현, 정제
영문키워드	recombinant protein, protease, TVMV protease, expression, purification

□ 기술의 적용분야

- 본 기술은 단백질 의약품의 전구물질 및 산업용 효소로 사용될 수 있으며, 특히 TVMV 프로테아제의 벡터로 사용가능함

[표] 적용분야

단백질 의약품	산업용 효소
인슐린, 성장호르몬, 빈혈치료제 등의 단백질 의약품	단백질 대량생산

□ 기술경쟁력

- TVMV 프로테아제를 BCA assay kit를 사용하여 정량한 결과 100mL OvernightExpress 배지에서 약 3 mg의 TVMV 프로테아제를 생산한 것을 확인하였으며, 이는 1L의 배지에서는 30mg의 TVMV 프로테아제를 생산할 수 있는 높은 수율을 확인함
- 정제된 TVMV 프로테아제의 활성은 13 Unit/ μ g으로 확인되었음

□ 기술실시에 따른 기업에서의 이점

- TVMV 프로테아제 벡터 및 이의 대량 생산 방법을 통해 말토오스 결합 단백질 등 수용성 향상 태그와 결합되어 발현됨으로써 수용성 발현이 가능하며, 최적화된 농도의 이미다졸을 TVMV 프로테아제 생산 과정 중 처리함에 따라 활성 저해를 최소화 할 수 있음

[표] 재조합 단백질 분야의 SWOT 분석

강점(Strength)	약점(Weakness)
<ul style="list-style-type: none"> • 바이오 신약 시장의 고도 신장 • 기존 small molecule 의약대체 및 신규시장 창출기대 • 국가 연구인프라 구축의 활성화 • 국가의 바이오 선진화에 기여할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> • 인·허가 국가의 leadership 부족 • 지적재산의 인식이 부족 • Regulatory science 경험 부족 • “빨리빨리” 문화
기회요인(Opportunity)	위협요인(Threat)
<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 신약관련 타겟의 증가 • 맞춤형 의약 • 차세대 단백질공학제품 개발 • 고령화 인구증가에 따른 수요 증가 • 미국 내 인허가 절차 변화: generic의 미국 시장 진출 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 시장 신장속도의 저하 (치료용 단백질 및 항체) • R&D 비용 증가 • 임상 3상에서의 failure 증가 • generic과의 경쟁심화 • 보험수가: 의료비 지출을 고려했을 시 generic을 선호 • 맞춤형 의약: 시장 세분화 • 국가간 인허가 사항의 불균형

□ 특허현황

구분	발명의 명칭	출원번호 (출원일)	등록번호 (등록일)	출원국가
1	TVMV 프로테아제 대량 생산용 벡터 및 이를 이용한 TVMV 프로테아제 대량 생산 방법	10-2017-0017899 (2017.02.09.)	10-1919757 (2018.11.13.)	한국