



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0010003
(43) 공개일자 2017년01월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/24 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7036507
- (22) 출원일자(국제) 2015년05월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년12월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/032744
- (87) 국제공개번호 WO 2015/184008
국제공개일자 2015년12월03일
- (30) 우선권주장
62/003,136 2014년05월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
아카데미아 시니카
대만 11529 타이페이 난강 섹션 2 아카데미아 로
드 128
- (72) 발명자
차이, 청-아이
중화민국 11529 타이페이 난강 섹션 2 아카데미아
로드 128 아카데미아 시니카 내
왕, 치-휴이
미국 캘리포니아 92067 란초 산타페 피.오.박스
8154
- (74) 대리인
김해중

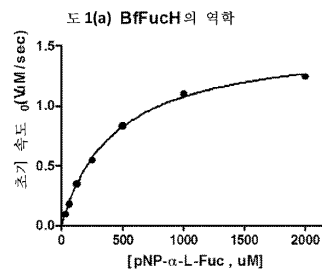
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 박테로이드 기원의 푸코시다제 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본원의 개시내용은 α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), 및 α-(1,6) 푸코시다제 활성을 갖는 α-푸코시다제에 관한 것이다. 본원의 개시내용은 또한 α-푸코시다제를 포함하는 조성물, 및 당접합체에서 α-(1,2), α-(1,3), α-(1,4), 및/또는 α-(1,6)-연결된 푸코스를 절단하는데 있어서 α-푸코시다제를 생산하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 시험관내 푸코스의 개선된 효소적 가수분해를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 당단백질의 변성 또는 기능적 저하 없이 천연 당단백질에서 코어 푸코스의 효율적인 절단에 유용하다. 본 발명의 조성물 및 방법은 치료학적 항체와 같은 Fc 융합 단백질 또는 항체의 Fc 당가공을 촉진시킬 수 있다.

대표도



도 1(b)

파라미터	값
Kcat	183.8 s ⁻¹
Km	437.0 uM
Kcat/Km	0.42 s ⁻¹ /uM
Vmax	1.544 uM/sec

도 1(c)

파라미터	상대적 활성 (%)
pNP-α-D-Glc	0
pNP-α-D-Gal	0
pNP-α-D-GlcNAc	0
pNP-α-D-GalNAc	0
pNP-α-D-Man	0
pNP-α-L-Fuc	100
pNP-β-L-Fuc	0
pNP-α-L-Rha	0

(52) CPC특허분류

A61K 39/42 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
C12Y 302/01 (2013.01)
C12Y 302/01051 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/003,104	2014년05월27일	미국(US)
62/003,908	2014년05월28일	미국(US)
62/020,199	2014년07월02일	미국(US)
62/110,338	2015년01월30일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 α -푸코시다제 및 적어도 하나의 글리코시다제를 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 88% 서열 동일성을 갖는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 글리코시다제가 엔도글리코시다제인, 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 엔도글리코시다제가 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제(NAG), EndoA, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, 및 이의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 글리코시다제가 엑소글리코시다제인, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 효소가 재조합 박테로이드 α -L-푸코시다제인, 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 효소가 당접합체에서 N- 및/또는 O-연결된 글리칸에 존재하는 α -(1,2), α -(1,3), α -(1,4), 및 α -(1,6)-연결된 푸코스를 가수분해시킬 수 있는, 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 4 내지 9의 pH 최적을 갖는, 조성물.

청구항 11

상기 당접합체를, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 α -푸코시다제와 접촉시킴을 포함하는, 당접합체에서 하나 이상의 푸코스를 제거하기 위한 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 갖는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 α -푸코시다제가 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 단리된 폴리펩타이드를 포함하는, 방법.

청구항 14

제 10항에 있어서, 상기 당접합체가 α -(1,2), α -(1,3), α -(1,4), 및 α -(1,6)-연결된 푸코스로부터 선택된 하나 이상의 푸코스를 포함하는, 방법.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 α -(1,2), α -(1,3), α -(1,4), 및/또는 α -(1,6)- 연결된 푸코스가 당접합체에서 N- 및/또는 O-연결된 글리칸에 존재하는, 방법.

청구항 16

제 10항에 있어서, 상기 당접합체가 당지질, 당단백질, 올리고사카라이드 또는 당펩타이드인, 방법.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 당접합체가 당단백질인, 방법.

청구항 18

제 15항에 있어서, 상기 당단백질이 코어 푸코스를 포함하는, 방법.

청구항 19

제 16항에 있어서, 상기 코어 푸코스가 코어 α -(1,3)-연결된 푸코스 또는 코어 α -(1,6)-연결된 푸코스인, 방법.

청구항 20

제 10항에 있어서, 하나 이상의 엔도글리코시다제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 하나 이상의 엔도글리코시다제가 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제(NAG), EndoA, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, 및 이의 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

[0001]

본 출원은 2014년 5월 27일자 출원된 미국 가출원 미국 일련 번호("USSN") 제62/003,136호, 2014년 5월 27일자로 출원된 USSN 제62/003,104호, 2014년 5월 28일자 USSN 제62/003,908호, 2014년 7월 2일자로 출원된 USSN 제 62/020,199호 및 2015년 1월 30일자로 출원된 USSN 제62/110,338호의 우선권을 주장한다. 이의 내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

배경 기술

[0003]

푸코스는 당접합체의 많은 O- 또는 N-연결된 올리고사카라이드 구조의 중요한 성분이다. 푸코스-함유 글리칸은 발육 및 아포토시스를 포함하는 많은 생물학적 반응에 관여하고 염증, 암 및 남성 섬유증의 병리에 관여한다. 당접합체의 탈푸코실화는 당접합체의 생물학적 효과를 이해하기 위한 중요한 과정이다.

[0004]

α -L-푸코시다제(α -푸코시다제)는 주로 갈락토스 또는 N-아세틸글루코사민에 부착된 푸코스의 α -(1,2), α -(1,3), α -(1,4), 및 α -(1,6) 연결체를 가수분해시킴에 의해 당접합체의 비-환원 말단으로부터 푸코스 잔기의 제거에 관여하는 엑소-글리코시다제이다.

[0005] 인간 혈청 IgG 및 치료학적 항체 둘다는 과하게 푸코실화된 것으로 널리 공지되어 있다. 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)은 치료학적 항체의 임상적 효율에 관여하는 중요한 이펙터 기능 중 하나인 것으로 밝혀졌다. ADCC는 림프구 수용체(FcγR)의 항체 Fc 영역으로의 결합시 유발된다. ADCC 활성은 α-(1,6) 연결체를 통해 N-연결된 Fc 올리고사카라이드의 가장 안쪽의 GlcNAc에 부착된 푸코스의 양에 의존한다.

발명의 내용

[0006] **발명의 요약**

[0007] 따라서, 본 발명은 시험관내 푸코스의 개선된 효소적 가수분해를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 당단백질의 변성 또는 기능 퇴화 없이 본래의 당단백질에서 코어 푸코스의 효율적인 절단을 위해 유용하다. 본 발명의 조성물 및 방법은 Fc 융합 단백질 또는 치료학적 항체와 같은 항체의 Fc 당가공(glycoengineering)을 촉진시킬 수 있다. 본 발명은 또한 당접합체 상의 푸코스 위치를 구분하기 위한 글리칸 서열 분석의 응용을 제공한다. 상기 당접합체는 당지질, 당단백질, 올리고사카라이드 또는 당펩타이드일 수 있다.

[0008] 하나의 측면에서, 본 발명은 서열번호 1과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 α-푸코시다제에 관한 것이다. 일부 양태에서, α-푸코시다제는 서열번호 1과 적어도 88%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 양태에서, α-푸코시다제는 서열번호 1과 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 특정 양태에서, α-푸코시다제는 서열번호 2와 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 서열번호 1 및 2는 88%의 서열 동일성을 공유한다.

[0009] 본원에 기재된 푸코시다제는 하나 이상의 α(1,2), α(1,3), α(1,4), 및 α(1,6)-연결된 푸코스를 가수분해시킬 수 있다. 상기 푸코스는 당접합체에서 N- 및/또는 O-연결된 글리칸에 존재할 수 있다. 특정 양태에서, α-푸코시다제는 제조항 박테로이드 α-푸코시다제이다.

[0010] 바람직한 양태에서, α-푸코시다제는 4 내지 9에서 최적의 pH를 나타낸다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기된 α-푸코시다제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 적어도 하나의 글리코시다제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 글리코시다제는 엑소글리코시다제일 수 있다. 상기 엑소글리코시다제는 시알리다제, 갈락토시다제, 알파-푸코시다제, 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 상기 글리코시다제는 엔도글리코시다제일 수 있다. 상기 엔도글리코시다제는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제(NAG), EndoA, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0012] 본 발명의 조성물은 시험관내 당접합체의 탈푸코실화를 수행하기 위해 유용하다. 특히, 본원에 기재된 조성물은 시험관내 당단백질의 코어 탈푸코실화를 수행하기 위해 유용하다. 일부 양태에서, 상기 코어 탈푸코실화는 코어 α(1,6) 탈푸코실화이다. 특정 양태에서, 상기 코어 탈푸코실화는 코어 α(1,3) 탈푸코실화이다. 상기 탈푸코실화는 당단백질의 변성 또는 기능 퇴화 없이 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면은 시험관내 당접합체의 탈푸코실화를 수행하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 상기된 본 발명의 α-푸코시다제와 당접합체를 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 당접합체는 α(1,2), α(1,3), α(1,4), 및 α(1,6)-연결된 푸코스로부터 선택되는 하나 이상의 푸코스를 포함한다. 상기 푸코스는 당접합체에서 N- 및/또는 O-연결된 글리칸에 존재한다.

[0014] 일부 양태에서, 상기 당접합체는 당단백질이다. 일부 양태에서, 상기 당단백질은 코어 푸코스를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 코어 푸코스는 코어 α-(1,3)-연결된 푸코스 또는 코어 α-(1,6)-연결된 푸코스이다.

[0015] 일부 양태에서, 상기 방법은 당접합체를 적어도 하나의 글리코시다제와 접촉시킴을 추가로 포함한다. 특정 양태에서, 상기 글리코시다제는 엔도글리코시다제이다. 엔도글리코시다제는 N-글리칸에서 올리고사카라이드의 가변 부분을 절단하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 엔도글리코시다제의 예는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제(NAG), EndoA, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 엑소글리코시다제

[0016] 코어 탈푸코실화를 위해, 상기 당접합체는 연속으로 또는 동시에 엔도글리코시다제 및 α-푸코시다제로 처리할 수 있다. 상기 코어 탈푸코실화는 코어 α(1,3) 탈푸코실화 또는 α(1,6) 탈푸코실화일 수 있다.

[0017] 본 발명의 하나 이상의 양태의 세부사항은 하기에 제시되어 있다. 본 발명의 다른 특징 또는 이점은 하기의 도

면 및 여러 양태에 대한 상세한 기재, 및 또한 첨부된 청구항으로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

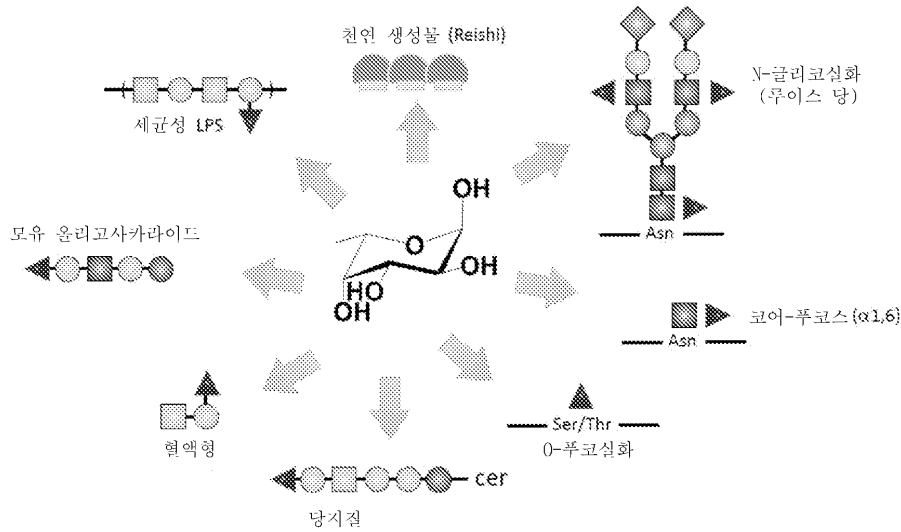
- [0018] 도 1은 BfFucH의 생화학적 성질을 보여준다.
- 도 2는 (a) BfFucH의 pH 프로파일 (b) BfFucH의 효소 활성에 대한 온도 효과 (c) BfFucH의 효소 활성에 대한 금속 이온 효과를 보여준다.
- 도 3은 리튬산에 대한 BfFucH 처리의 시간 과정을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] Fc 글리칸에서 코어 푸코스 잔기의 부재는 푸코실화되지 않은 항체가 상당히 증가된 친화성으로 FcγRIIIa 수용체에 결합함에 따라 IgG의 ADCC 활성을 상당히 증가시키는 것으로 공지되어 있다. FcγRIIIa 결합 및 ADCC를 개선시키기 위해, 여러 전략이 개발되었고 이는 α-(1,6) 푸코실트랜스퍼라제의 발현 수준을 폐지시키거나 감소시키는 생산 세포주의 개발을 포함하는, IgG의 푸코실화를 감소시키기 위해 개발되었다. 푸코실화를 감소시키기 위한 또 다른 전략은 RNAi를 사용하여 α-(1,6) 푸코실트랜스퍼라제 유전자를 사일렌싱시킴을 포함한다. 그러나, N-글리칸의 코어 탈푸코실화는 주로 N-글리칸이 2개의 Fc 도메인 사이에 매립되어 있기 때문에 시험관 내 효소적으로 성취될 수 없었다. 효소적 탈푸코실화 효율은 입체 장애로 인해 매우 낮았고, 즉, 푸코스 잔기로의 α-푸코시다제의 접근은 Fc 도메인 부분에 의해 차단된다.
- [0020] 다수의 α-푸코시다제는 당업계에 공지되어 있다. 이의 예는 터보 코르누투스(*Turbo cornutus*), 샤로니아 람파스(*Charonia lampas*), 바실러스 풀미난스(*Bacillus fulminans*), 아스퍼길러스 나이거(*Aspergillus niger*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 소 신장(Glyko), 닭 간(참조: Tyagarajan et al., 1996, *Glycobiology* 6:83-93)으로부터의 α-푸코시다제 및 크산토모나스 마니호티스(*Xanthomonas manihotis*)(Glyko, PROzyme)로부터의 α-푸코시다제 II를 포함한다. 일부 푸코시다제는 또한 시판되고 있다(제조원: 무엇보다 Glyko, Novato, Calif; PROzyme, San Leandro, Calif.; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, Calif.). 이들 α-푸코시다제의 어떠한 것도 먼저 당단백질을 변성시키는 것 없이 N-연결된 글리칸으로부터 코어 푸코스를 효율적으로 절단시킬 수 없었다.
- [0021] WO 2013/12066은 소 신장으로부터의 α-푸코시다제에 의한 (Fuc α1,6) GlcNAc-리투시말의 탈푸코실화를 기재하였다. WO 2013/12066에 기재된 바와 같이, (Fuc α1,6) GlcNAc-리투시말의 반응 혼합물은 (Fuc α1,6) GlcNAc-리투시말에서 푸코스를 완전히 제거하기 위해 20일 동안 37°C에서 소 신장으로부터의 α-푸코시다제(Prozyme으로부터 시판되는)로 항온처리하였다. 면역글로불린의 열 불안정성은 당업계에 공지되어 있다[참조: Vermeer et al., *Biophys J.* Jan 78: 394-404 (2000)]. Fab 단편은 열 처리에 가장 민감한 반면, Fc 단편은 pH 감소에 가장 민감하다. 항체는 WO 2013/12066에 기재된 바와 같이 20일 동안 37°C에서와 같은 장기 열 처리 후에는 CD20에 대한 결합 친화성을 상당히 상실하는 것으로 고려된다.
- [0022] 현재 공지된 α-푸코시다제의 제한은 특정 N-연결된 글리칸의 효과적인 가공을 방해하였다. 따라서, 인간 치료제의 개발을 위한 Fc 융합 단백질 또는 항체의 Fc 당가공을 위해 적합한 신규한 α-푸코시다제가 요구된다.
- [0023] 본원의 개시내용은 N-연결된 글리칸으로부터 코어 푸코스를 효율적으로 절단할 수 있는 세균 α-푸코시다제의 예상치 않은 발견에 관한 것이다.
- [0024] 본원의 개시내용은 N-연결된 글리칸으로부터 코어 푸코스를 효율적으로 절단할 수 있는 세균 α-푸코시다제의 예상치 않은 발견에 관한 것이다.
- [0025] 일부 예에서, α-푸코시다제는 박테로이드 프라길리스(*Bacteroides fragilis*)로부터 α-푸코시다제(BfFucH)일 수 있다. 일부 예에서, α-푸코시다제는 박테로이드 테타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*) 기원의 α-푸코시다제(BtFucH)일 수 있다. 상기 α-푸코시다제는 세균, 효모, 바쿨로바이러스/곤충, 또는 포유동물 세포로부터 발현될 수 있다. 일부 양태에서, α-푸코시다제는 재조합 박테로이드 α-푸코시다제일 수 있다. 일부 형태에서, 상기 α-푸코시다제는 이. 콜라이(*E. coli*)로부터 발현되는 재조합 박테로이드 α-푸코시다제일 수 있다.
- [0026] α-푸코시다제는 하나 이상의 α(1,2), α(1,3), α(1,4), 및 α(1,6)-연결된 푸코스를 가수분해시킬 수 있다. 상기 푸코스는 당접합체에 N-및/또는 O-연결된 글리칸에 존재할 수 있다. 상기 푸코스는 코어 α-(1,3) 푸코스

또는 코어 α-(1,6) 푸코스일 수 있다.

[0027] 반응식 1은 다양한 푸코스-함유 당접합체를 보여준다.



[0028]

[0029] 효소를 위해 적합한 기질의 예는 모유 올리고사카라이드, Globo H, 루이스 혈액 그룹(Lewis blood groups)(a, b, x, y), 및 시알릴 루이스 a (SLe^a)와 같은 암 관련 탄수화물 항원 및 x (SLe^x)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 당업계에 공지된 보고와는 달리, α-푸코시다제는 말단 시알산을 절단하는 것 없이 시알릴 루이스 a (SLe^a) 및 x (SLe^x)를 가수분해시킬 수 있다. 모유 올리고사카라이드는 α-(1,2), α-(1,3) 및/또는 α-(1,4) 연결된 푸코스를 함유할 수 있다.

[0030] 조성물

[0031] 본 발명은 또한 상기된 α-푸코시다제의 조성물에 관한 것이다. 상기 α-푸코시다제는 서열번호 1과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 α-푸코시다제는 서열번호 1과 적어도 88% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 기능성 변이체를 포함한다. 일부 양태에서, α-푸코시다제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 양태에서, α-푸코시다제는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 서열번호 2는 서열번호 1과 88% 서열 동일성을 갖는다.

[0032] 본원에 기재된 바와 같은 변이체 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 서열번호 1 또는 2로부터 변화한 것이지만 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 효소의 동일하거나 유사한 기능을 나타내는 것들이다.

표 1

표 1
<p>서열번호 1</p> <p>QQKYQPTEANLKARSEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWTMTNNNLNKEYAKLAGGFYPSK FDADKWVAAIKASGAKYICFTTRHHEGFMSMFDTKYSDYNIVKATPFKRDRVVKELADACAKHG IKLHFYYSHIDWYREDAPQGRGTGRRTGRPNPKGDWKSYYQFMNNQLTELLTNYGPIGAIWFD GWWDDINPDFDWELPEQYALIHRLQPACLVGNHHQTPFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSG QSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKTLIHVYLVKAAGKDANLLMNIGPQPDGELPEV AVQRLKEVGEWMSKYGETIYGTRGGLVAPHDWGVTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPIVDKK VVKAVVFADKTPVRFTKNKEGIVLELAKVPTDQVYVVELTID</p> <p>서열번호 2</p> <p>QSSYQPGEENLKAREEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWTMTNNNLNKEYAKLAGGFYPSK FDADKWVAAIKASGAKYICLTSRHHDFMSMFDQYSDFNIVKATPFKRDIKELAAACSKQG IKLHFYYSHLDWTREDYPWGRTGRGTGRSNPQGDWKSYYQFMNNQLTELLTNYGPGAIWFD GWWDDGNPFGNWELPEQYAMIHKLQPGCLIGNHHQTPFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSG QSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKTLIHVYLVKAAGKNANLLMNIGPQPDGELPEV AVQRLKEMGEWMNQYGETIYGTRGAVAPHDWGVTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPLADKK VVKAVLFKNGTPVRFTKNKEGVLLFTEIPKDIQVYVVELTID</p>

[0033]

[0034]

본원에 사용된 바와 같이 서열과 관련하여 퍼센트(%) 서열 동일성은, 필요하다면, 최대% 서열 동일성을 성취하기 위해 서열을 정렬하고 겹을 도입한 후, 표준 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기와 동일함, 후보 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기의 %로서 정의된다. % 서열 동일성을 결정할 목적의 정렬은, 예를 들어, BLAST, ALIGN 또는 메갈리근(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업자의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 성취될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장 상에 최대 정렬을 성취하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적당한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0035]

본 발명의 α-푸코시다제의 폴리펩타이드는 이들의 단리 또는 정제의 원조를 위해 유도체화되거나 변형될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드는 직접적으로 그리고 특이적으로 분리 수단에 결합할 수 있는 리간드 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된다. 대안적으로, 폴리펩타이드는 결합 쌍의 하나의 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형되고, 분리 수단은 결합 쌍의 다른 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된 시약을 포함한다. 임의의 적합한 결합 쌍을 사용할 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드가 결합 쌍의 하나의 구성원의 첨가에 의해 유도체화되거나 변형된 바람직한 양태에서, 상기 폴리펩타이드는 바람직하게 히스티딘-태그되거나 비오틴-태그된다. 전형적으로, 히스티딘 또는 비오틴 태그의 아미노산 암호화 서열은 유전자 수준에 포함되고 단백질은 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현된다. 히스티딘 또는 비오틴 태그는 전형적으로 폴리펩타이드의 하나의 말단, 즉 N-말단 또는 C-말단에 존재한다. 히스티딘 태그는 전형적으로 6개의 히스티딘 잔기로 이루어지만 이 보다 더 길 수 있고 전형적으로 7, 8, 9, 10 또는 20개 이하의 아미노산 또는 이 보다 짧은 길이, 예를 들어, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산일 수 있다. 추가로, 히스티딘 태그는 하나 이상의 아미노산 치환, 바람직하게 상기 정의된 바와 같은 보존적 치환을 함유할 수 있다.

[0036]

조성물의 응용

[0037]

본 발명의 조성물은 시험관내에서 당접합체의 탈푸코실화를 수행하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 당접합체를 상기된 본 발명의 α-푸코시다제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 당접합체는 α-(1,2), α-

(1,3), α-(1,4), 및 α-(1,6)-연결된 푸코스로부터 선택된 하나 이상의 푸코스를 포함한다. 상기 푸코스는 당 접합체에서 N- 및/또는 O-연결된 글리칸에 존재할 수 있다.

[0038] 일부 양태에서, 상기 당접합체는 당단백질이다. 일부 양태에서, 상기 당단백질은 코어 푸코스를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 코어 푸코스는 코어 α-(1,3) 연결된 푸코스 또는 코어 α-(1,6) 연결된 푸코스이다.

[0039] 일부 양태에서, 상기 방법은 당접합체를 적어도 하나의 글리코시다제와 접촉시킴을 추가로 포함한다. 특정 양태에서, 상기 글리코시다제는 엔도글리코시다제이다. 엔도글리코시다제는 N-글리칸에서 올리고사카라이드의 가변 부분을 제단하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 엔도글리코시다제의 예는 엔도-베타-N-아세틸글루코사미니다제 (NGA), EndoA, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH, EndoM, EndoS, 및 이의 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0040] 코어 탈푸코실화를 위해, 당접합체는 연속으로 또는 동시에 엔도글리코시다제 및 α-푸코시다제로 처리할 수 있다. 코어 탈푸코실화는 코어 α(1,3) 탈푸코실화 또는 α(1,6) 탈푸코실화일 수 있다.

[0041] 본 발명의 방법은 모노클로날 항체로부터 Fc 당가공을 수행하는데 유용할 수 있다. 가공의 예시적 방법은, 예를 들어, 문헌[참조: Wong et al USSN12/959,351]에 기재되어 있고, 이의 내용은 본원에 참조로 인용된다. 바람직하게, 모노클로날 항체는 치료학적 모노클로날 항체이다. 일부 예에서, 균일하게 당화된 모노클로날 항체를 제조하기 위한 방법은 (a) 모노클로날 항체를 α-푸코시다제 및 적어도 하나의 엔도글리코시다제와 접촉시켜 단일 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 갖는 탈푸코실화된 항체를 생성하는 단계 및 (b) 적합한 조건하에서 GlcNAc로 탄수화물 모이어티를 부가하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 글리칸은 엔도-GlcNAcase 및 예시적 푸코시다제로 처리함에 이어서 예시적 엔도-S 돌연변이체 및 글리칸 옥사졸린으로 처리하여 제조될 수 있다.

[0042] 특정 예에서, 본 발명의 방법에 따른 모노클로날 항체는 리톡시맙이다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 탄수화물 모이어티는 $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-3/\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}_2(\alpha 2-6/\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}(\alpha 2-3)\text{GalGlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 및 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0043] 일부 양태에서, 상기 탄수화물 모이어티는 슈가 옥사졸린이다.

[0044] 본 발명의 방법에서 단계 (b)는 슈가 쇠 연장을 유도할 수 있다. 슈가 쇠 연장을 위한 한가지 방법은 효소-촉매된 당화 반응을 통한 것이다. 당화 반응은 부가 반응이고 산, 물 등의 수반되는 제거 없이 진행하기 때문에 효소-촉매된 당화 반응 중에서 슈가 공여체로서 당 옥사졸린을 사용한 당화가 올리고사카라이드를 합성하는데 유용하다는 것이 당업계에서 널리 공지되어 있다(문헌참조: Fujita, et al., Biochim. Biophys. Acta 2001, 1528, 9-14).

[0045] 단계 (b)에서 적합한 조건은 적어도 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분, 80분, 90분 또는 100분, 바람직하게는 60분 미만 동안 반응 혼합물의 항온처리를 포함한다. 항온처리는 바람직하게 실온, 보다 바람직하게 대략적으로 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C 또는 45°C, 및 가장 바람직하게는 대략 37°C에서 수행한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "푸코스" 및 "L-푸코스"는 상호교환적으로 사용된다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "코어 푸코스" 및 "코어 푸코스 잔기"는 상호교환적으로 사용되고 α1,3-위치 또는 α1,6-위치에서 아스파라긴-결합된 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코스를 언급한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "α-(1,2) 푸코시다제"는 올리고사카라이드로부터 α-(1,2) 연결된 L-푸코스 잔기의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 엑소글리코시다제를 언급한다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "α-(1,4) 푸코시다제"는 올리고사카라이드로부터 α-(1,4) 연결된 L-푸코스의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 엑소글리코시다제를 언급한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "글리칸"은 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 또는 모노사카라이드를 언급한다.

글리칸은 슈가 잔기의 단량체 또는 중합체일 수 있고 직쇄 또는 측쇄일 수 있다. 글리칸은 천연 슈가 잔기(예를 들어, 글루코스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸 뉴라민산, 갈락토스, 만노스, 푸코스, 헥소스, 아라비노스, 리보스, 크실로스 등) 및/또는 변형된 슈가(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 2'-데옥시리보스, 포스포만노스, 6' 설포 N-아세틸글루코사민 등)를 포함할 수 있다.

- [0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "N-글리칸", "N-연결된 글리칸", "N-연결된 당화", "Fc 글리칸" 및 "Fc 당화"는 상호교환적으로 사용되고 Fc-함유 폴리펩타이드에서 아스파라긴 잔기의 아미드 질소에 연결된 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)에 의해 부착된 N-연결된 올리고사카라이드를 언급한다. 용어 "Fc-함유 폴리펩타이드"는 Fc 영역을 포함하는 항체와 같은 폴리펩타이드를 언급한다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당화 패턴" 및 "당화 프로파일"은 상호교환적으로 사용되고 효소적으로 또는 화학적으로 당단백질 또는 항체로부터 방출되고 이어서 이들의 탄수화물 구조에 대해, 예를 들어, LC-HPLC, 또는 MALDI-TOF MS 등을 사용하여 분석되는 N-글리칸 종의 특징적인 "핑거프린트"를 언급한다. 예를 들어, 문헌[the review in Current Analytical Chemistry, Vol. 1, No. 1 (2005), pp. 28-57; 본원에 이의 전문이 참조로 인용된다]을 참조한다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당가공된 Fc"는 본원에 사용된 경우 효소적으로 또는 화학적으로 변화되거나 가공된 Fc 영역 상의 N-글리칸을 언급한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Fc 당가공"은 당가공된 Fc를 제조하기 위해 사용되는 효소적 또는 화학적 공정을 언급한다.
- [0054] Fc 영역의 당화 프로파일과 관련된 용어 "균질의", "균일한", "균일하게" 및 "균질성"은 상호교환적으로 사용되고 어떠한 소량의 전구체 N-글리칸도 없는 하나의 목적하는 N-글리칸 종에 의해 제공된 단일 당화 패턴을 의미하기 위해 의도된다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "IgG", "IgG 분자", "모노클로날 항체", "면역글로불린", 및 "면역글로불린 분자"는 상호교환적으로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 "분자"는 또한 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당접합체"는 적어도 하나의 슈가 모이어티가 적어도 하나의 다른 모이어티에 공유적으로 연결된 모든 분자를 포괄한다. 상기 용어는 구체적으로 공유적으로 부착된 슈가 모이어티를 갖는 모든 생분자를 포괄하고, 예를 들어, N-연결된 당단백질, O-연결된 당단백질, 당지질, 프로테오글리칸 등을 포함한다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당지질"은 하나 이상의 공유적으로 연결된 슈가 모이어티(즉, 글리칸)를 함유하는 지질을 언급한다. 슈가 잔기(들)은 모노사카라이드, 디사카라이드, 올리고사카라이드 및/또는 폴리사카라이드 형태일 수 있다. 슈가 모이어티(들)은 슈가 잔기의 단일 비측쇄를 포함할 수 있거나 하나 이상의 측쇄로 구성될 수 있다. 특정 양태에서, 슈가 모이어티는 설페이트 및/또는 포스페이트 그룹을 포함할 수 있다. 특정 형태에서, 당단백질은 O-연결된 슈가 모이어티를 함유하고; 특정 양태에서, 당단백질은 N-연결된 슈가 모이어티를 함유한다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "당단백질"은 공유적으로 부착된 하나 이상의 올리고사카라이드 쇠(예를 들어, 글리칸)를 포함하는 아미노산 잔기를 언급한다. 예시적 아미노산 서열은 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질을 포함한다. 예시적 당단백질은 당화된 항체 및 항체형 분자(예를 들어, Fc 융합 단백질)를 포함한다. 예시적 항체는 모노클로날 항체 및/또는 이의 단편, 폴리클로날 항체 및/또는 이의 단편 및 Fc 도메인 함유 융합 단백질(예를 들어, IgG1의 Fc 영역 또는 이의 당화 부분을 함유하는 융합 단백질)을 포함한다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "N-글리칸"은 당접합체로부터 방출되지만 질소 연결을 통해 당접합체에 이전과 같이 연결되어 있는 슈가의 중합체를 언급한다(하기 N-연결된 글리칸의 정의를 참조한다).
- [0060] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "O-글리칸"은 당접합체로부터 방출되지만 산소 연결을 통해 당접합체에 이전과 같이 연결되어 있는 슈가의 중합체를 언급한다(하기 O-연결된 글리칸의 정의를 참조한다).
- [0061] 본원에 사용된 바와 같은 야생형 효소의 기능성 변이체는 야생형 대응물과 동일한 효소적 활성을 소유하고 전형적으로 야생형 대응물의 아미노산 서열과 높은 아미노산 서열 상동성, 예를 들어, 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 상동성을 공유한다. 2개의 아미노산 서열의 "% 동일성"은 문헌[참조: Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, 문헌(참조: Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993)에서 변형된]의 알고리즘을 사용하여 결정한다. 상기 알고리즘은 NBLAST 및 XBLAST 프로그램으로 도입된다(버전

2.0)(문헌참조: Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990). BLAST 단백질 탐색은 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드길이=3을 사용하여 수행하여 목적하는 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 획득할 수 있다. 갭이 2개의 서열 간에 존재하는 경우, 갭핑된(Gapped) BLAST는 문헌(참조: Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997)에 기재된 바와 같이 활용될 수 있다. BLAST 및 갭핑된 BLAST 프로그램을 활용하는 경우, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다. 기능성 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기의 부가, 결실 또는 치환을 포함하는 다양한 돌연변이를 가질 수 있다. 상기 변이체는 흔히 야생형 효소의 효소적 활성에 필수적이지 않은 영역 중에 돌연변이를 함유하고, 기능성 도메인 중에 돌연변이를 함유하지 않거나 단지 보존성 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 당업자는 보존성 아미노산 치환이 리포산 리가제 돌연변이체에 만들어져 기능적으로 균등한 변이체를 제공할 수 있고, 즉, 상기 변이체는 특정 리포산 리가제 돌연변이체의 기능성 능력을 보유한다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이 "보존성 아미노산 치환"은 아미노산이 치환된 단백질의 상대적 변화 또는 크기 특징을 변화시키지 않은 아미노산 치환을 언급한다. 변이체는 상기 방법들을 컴파일링하는 문헌[참조: 예를 들어, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, or Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에 발견된 바와 같은 당업자에게 공지된 폴리펩타이드 서열을 변화시키기 위한 방법에 따라 제조될 수 있다. 아미노산의 보존성 치환은 하기의 그룹내 아미노산 중에서 만들어진 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D. 탈푸코실화 시스템에 관여하는 임의의 효소들은 통상적인 기술을 통해 제조될 수 있다. 하나의 예에서, 상기 효소는 천연 공급원으로부터 단리된다. 다른 예에서, 상기 효소는 통상적인 재조합 기술에 의해 제조된다. 필요한 경우, 표적 효소의 암호화 서열은 효소를 제조하기 위해 사용되는 숙주 세포를 기준으로 코돈 최적화시킬 수 있다. 예를 들어, 이. 콜라이 세포가 재조합 기술을 통한 효소를 제조하기 위해 숙주로서 사용되는 경우, 효소를 암호화하는 유전자는 이것이 이. 콜라이에서 통상적으로 사용되는 코돈을 함유하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 양태의 세부사항은 하기에 제시되어 있다. 본 발명의 다른 특징 또는 이점은 하기의 도면 및 여러 양태에 대한 상세한 기재 및 또한 첨부된 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

[0063] 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 입증하기 위해 포함된다. 후속 실시예에 기재된 기술은 본 발명자가 본 발명의 수행에서 잘 기능하는 것으로 발견한 기술을 나타내고 따라서 이의 수행을 위해 바람직한 양상을 구성하는 것으로 고려될 수 있는 것으로 당업자는 이해해야만 한다. 그러나, 당업자는 본원의 개시 내용 측면에서 많은 변화가, 기재되어 있고 여전히 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 동일하거나 유사한 결과를 여전히 수득하는 특정 양태로 만들어질 수 있는 것으로 이해해야만 한다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1: 단백질 발현 작제물**

[0066] α-푸코시다제는 각각 박테로이드 프라길리스(*Bacteroides fragilis*) NCTC 9343 게놈 DNA(ATCC 25285) 및 박테로이드 테타이오타오미크론(*Bacteroides Thetaiotaomicron*) VPI-5482(ATCC 29148)로부터 PCR에 의해 증폭시키고 내부 AcTEV 프로테아제 절단 부위를 갖는 N-말단 폴리-히스티딘과 함께 pET47b+(EMD Biosciences, San Diego, CA)에 클로닝하였다. Endo F1(GenBank: AAA24922.1), Endo F2(GenBank: AAA24923.1), Endo F3(GenBank: AAA24924.1), Endo H(GenBank: AAA26738.1) 및 PNGase F(Genbank: GenBank: J05449.1)와 같은 연구에서 사용되는 다른 효소는 이. 콜라이에 대해 코돈 최적화하였고 각각 N-말단에서 MBP 융합과 함께 pET28a에 클로닝하였다. 클론의 모든 서열은 먼저 분석기(Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer)에 의해 확인하였다.

[0067] 이. 콜라이에서 단백질 발현 작제물을 위해 사용되는 프라이머는 하기 표에 열거한다.

서열번호	프라이머 ^a	서열 (5'→3')	제한 효소 부위	계놈 또는 cDNA 클로부터 유전자 공급원
서열번호 1	<i>BfFucH</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTCAGCAAAGTATCAACCGACA ^b	AsiSI	박테로이드 프라길리스 (<i>Bacteroides fragilis</i>) (<i>BfFucH</i> , 예를 들어, GenBank 승인 번호 YP_212855.1)
서열번호 2	<i>BfFucH</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTAGTCAATTGTAAGTTCTACCA	PmeI	
서열번호 3	<i>BtFucH</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTCAGTCTTCTTACCAGCCTGGT	AsiSI	박테로이드 테타이오타오미크론 (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>) (<i>BtFucH</i> , 예를 들어, GenBank 승인 번호 AAO76949.1)
서열번호 4	<i>BtFucH</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTAGTCAATTGTAAGTTCTACAAC	PmeI	
서열번호 5	<i>EndoF1</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTGCGGTTACCGGTACCACCA	AsiSI	엘리자베스킨기아 미리콜라(<i>Elizabethkingia miricola</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 AAA24922.1)
서열번호 6	<i>EndoF1</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTACCAGCTTTAGAGTACGGGG	PmeI	

[0068]

서열번호	프라이머 ^a	서열 (5'→3')	제한 효소 부위	계놈 또는 cDNA 클로부터 유전자 공급원
서열번호 7	<i>EndoF2</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTGCGGTTAACCTGTCTAACCT	AsiSI	엘리자베스킨기아 미리콜라(<i>Elizabethkingia miricola</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 AAA24923.1)
서열번호 8	<i>EndoF2</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTACGGGTTTCATGATTTTGATCAG	PmeI	
서열번호 9	<i>EndoF3</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTGCGACCGCGCTGGCGGGTT	AsiSI	엘리자베스킨기아 미리콜라(<i>Elizabethkingia miricola</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 AAA24924.1)
서열번호 10	<i>EndoF3</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTAGTTTTAAACCGGTCACGAAC	PmeI	
서열번호 11	<i>EndoH</i> -F	TTCAGGGAGCGATCGCTGCGCCGGCGCCGGTTAAACA	AsiSI	스트렙토마이세스 플리카투스 (<i>Streptomyces plicatus</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 AAA26738.1)
서열번호 12	<i>EndoH</i> -R	GTCATTACGTTTAAACTTACGGGTTACGAACCGCTTCAG	PmeI	
서열번호 13	<i>endoS-F</i>	TTCAGGGAGCGATCGCTACCCACCATGATTCACTCAAT	AsiSI	스트렙토코커스 피오게네스 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 AAK34539.1)
서열번호 14	<i>endoS-R</i>	GTCATTACGTTTAAACTTATTTTTTTAGCAGCTGCCTTTTC	PmeI	
서열번호 15	<i>PNGase F-F</i>	TTCAGGGAGCGATCGCTGCGCCGGCGGACAACCCGT	AsiSI	크리세오박테리움 매닌고세프티쿰 (<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>) (예를 들어, GenBank 승인 번호 J05449.1)
서열번호 16	<i>PNGase F-R</i>	GTCATTACGTTTAAACTTAGTTGGTAACAACCGGCGCAGA	PmeI	

[0069]

[0070] ^a 각각의 유전자의 암호화 서열을 증폭시키기 위한 정배향(F) 및 역배향(R) PCR 반응에 대한 프라이머 쌍.

[0071] ^b 굵게 밑줄친 부분은 제한 효소 인지 부위를 의미한다.

[0072] ^c 이. 콜라이에서 코돈 최적화(예를 들어, 문헌(Puigbo et al., *Nucleic Acids Research* (2007) 35(S2):W126-W130)을 참조한다).

[0073] 단백질 발현 및 정제

[0074] 단백질 발현 작제물은 24시간 동안 16°C에서 0.2 mM 이소프로필 β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 사용하여 단백질 발현을 위해 BL21(DE3)(EMD Biosciences, San Diego, CA)에 형질전환시켰다. 세포는 미세유동화기로 파괴시키고 이어서 원심분리하였다. 상등액을 수거하고 Ni-NTA 아가로스 칼럼 상에 로딩하였고(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 10배의 세척 완충액(인산나트륨 완충액(pH 7.0), 300 mM 염화나트륨, 및 10 mM 이미다졸)으로 세척하였다. 용출은 2배의 용출 완충액(인산나트륨 완충액(pH 7.0), 300 mM 염화나트륨 및 250 mM 이미다졸)을 사용하였고 이어서 완충액을 Amicon Ultra-15 10K(EMD Millipore Chemicals, Billerica, MA)에 의한 반

응 완충액으로 교환하였다. 단백질 순도는 SDS-PAGE에 의해 조사하였고 정량 단백질 농도는 Qubit® 단백질 검정 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 측정하였다. his-태그에 이어서 Ni-NTA 칼럼 정제에 의한 제조합 푸코시다제는 95% 초과 순도와 함께 60 mg/L의 수율로 수득하였다. 단백질 농도는 표준물로서 소 혈청 알부민과 함께 브랜드포드(단백질 검정; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)의 방법에 따라 결정하였다. 효소의 순도 및 분자량은 SDS-PAGE로 조사하였다.

[0075] 박테로이드 프라글리스로부터의 정제된 푸코시다제는 나트륨 도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에서 약 50 kDa의 분자량을 나타냈고 이는 47.3 kDa의 이론적 분자량에 가깝다.

[0076] **실시예 2: 효소적 검정**

[0077] **효소의 특징**

[0078] 산 조건(pH 4.0-6.0)에서 최적의 pH를 갖는, 포유동물 또는 세균 기원의 푸코시다제와 달리, BfFucH는 경미한 조건(pH 7.0 내지 7.5)에서 매우 잘 수행하였다. 추가로, BfFucH는 특정 2가 금속 이온에 의해 영향받지 않고 금속 이온의 외인성 부가는 상기 활성에 영향을 주지 않았다. 그러나, Ni²⁺는 60%까지 효소 활성을 급격히 감소시킬 수 있다. 또한, Zn²⁺ 및 Cu²⁺는 효소 활성을 완전히 차단시킬 수 있다. 킬레이터 EDTA는 효소 활성에 대해 어떠한 효과를 나타내지 않았고, 이는 금속 이온이 촉매 반응에 참여하지 않음을 지적한다. 상기 효소는 기본적으로 활성이고 실온 및 4°C에서 안정하다.

[0079] **N-연결된 글리칸에 대한 효소 활성**

[0080] 본원에 기재된 푸코시다제는 N-글리칸에서 푸코스 위치를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 푸코스가 상이한 위치에 부착된 N-글리칸에 대한 BfFucH 가수분해 활성을 평가하였다. 2개의 합성 당펩타이드인, 0800F 및 0823F를 제조하였다. 당펩타이드 둘다는 각각 당화 부위에서 바깥쪽 GlcNAc 및 가장 안쪽의 GlcNAc에 결합된 푸코스를 갖는다.

[0081] 효소적 검정은 상기 푸코스가 샘플 0800F에서 바깥쪽 GlcNAc로부터만 방출될 수 있지만 푸코스가 가장 안쪽의 GlcNAc에 결합되어 있는 당펩타이드 0823F에서는 방출되지 않음을 밝혔다. 이러한 결과는 N-글리칸에서 GO 구조의 입체 장애가 푸코시다제 가수분해로부터 푸코스를 감싸고 이를 보호할 수 있음을 지적했다. 대조적으로, 0823F가 BfFucH 및 엔도-β-N-아세틸글루코사미니다제(엔도 M)로 윈-포트 반응에서 동시에 처리되는 경우, 코어 푸코스는 용이하게 제거될 수 있다. 상기 결과는 α-푸코시다제가 글리칸에 결합된 푸코스의 위치를 구분하여 사용될 수 있음을 지적했다.

[0082] **올리고사카라이드에 대한 효소 활성**

[0083] 이. 콜라이 균주의 혈청형 086, 0128, 및 0111의 리포폴리사카라이드(LPS)는 다양한 모노사카라이드, 예를 들어, Gal, GalNAc, 및 푸코스를 함유한다. 포름알데하이드 테하이드로게나제(FDH) 커플링된 검정에 의해, 본원 발명자는 BfFucH가 용량 의존적 방식으로 이.콜라이 0128:B12 균주의 LPS로부터 L-푸코스를 유리시킬 수 있음을 확인하였다. 본원 발명자는 또한 2'-푸코실락토스(2'FL), 3'-푸코실락토스(3'FL), 락토-N-푸코펜타오스 I(LNPT I), 글로보 H, 루이스 a (Le^a), 루이스 x (Le^x), 루이스 b (Le^b), 루이스 y (Le^y), 시알릴 루이스 a (SLe^a), 시알릴 루이스 x (SLe^x), 및 pNP(파라-니트로페놀)-α-L-푸코시드를 포함하는 다양한 기질에 대한 효소의 효소적 활성을 시험하였다. 결과는 α-푸코시다제가 모든 기질을 가수분해시킬 수 있음을 보여주었다.

[0084] **실시예 3: 당단백질의 코어 탈푸코실화**

[0085] 알레우리아 아우란티아(*Aleuria aurantia*)는 푸코스에 대한 특이적 프로브로서 광범위하게 사용되는 푸코스-특이적 렉틴(AAL)을 갖는다. AAL은 복잡한 올리고사카라이드 및 당접합체에 대한 푸코스 및 말단 푸코스 잔기를 인지하여 여기에 특이적으로 결합한다. AAL은 코어 탈푸코실화를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 엔도글리코시다제는 N-글리칸에서 올리고사카라이드의 가변 부분을 제단하는데 유용하다. 엔도글리코시다제(Endo F1, Endo F2, Endo F3 및 Endo H) 각테일의 처리 후, 상기 항체(휴미라(Humira) 또는 리툭산(Rituxan))는 높은 AAL-블롯팅 시그널을 보여주었고, 이는 항체에서 코어 푸코스의 존재를 지적한다. 그러나, 엔도글리코시다제(Endo F1, Endo F2, Endo F3 및 Endo H) 및 BfFucH 각테일의 조합 처리 후, 항체(휴미라 또는 리툭산)는 코어 푸코스의 가수분해로 인해 AAL-블롯팅 시그널을 상실했다. 이들 결과는 BfFucH가 코어 탈푸코실화에 대해 활성임을 입증하였다.

[0086] **재료 및 방법**

[0087] 달리 주지되지 않는 경우, 모든 화합물 및 시약은 제조원(Sigma-Aldrich 또는 Merck)으로부터 구입하였다. 항-종양 괴사 인자-알파(TNF α) 항체, 아달리무맙(Humira®)은 제조원(North Chicago, IL)으로부터 구입하였다. 항-인간 CD20 마우스/인간 키메라 IgG1 리툭시맙(Rituxan®)은 제조원(Genentech, Inc.(South San Francisco, CA)/IDEC Pharmaceutical(San Diego, CA))으로부터 구입하였다. TNF 수용체-Fc 융합 단백질 Etanercept(Enbrel®)는 제조원(Wyeth Pharmaceuticals(Hampshire, UK))으로부터 구입하였다. 에포에틴 베타(Recormon®)는 제조원(Hoffmann-La Roche Ltd(Basel, Switzerland))으로부터 구입하였다. 인터페론 β 1a(Rebif®)는 제조원(EMD Serono, Inc.(Boston, MA))으로부터 구입하였다.

[0088] 파라-니트로페닐 α - 또는 β -모노사카라이드, 루이스 슈가, 혈액형 슈가 및 모유 올리고사카라이드는 제조원(Carbosynth Limited.(Berkshire, UK))으로부터 구입하였다. IgG Fc 영역에 대한 주요 항체인 Recormon®, 및 Rebif®는 제조원(Chemicon(EMD Millipore Chemicals, Billerica, MA))으로부터 구입하였다. 비오틴화된 알레우리아 아우란티아(*Aleuria Aurantia*) 렉틴(AAL) 및 HRP-접합된 스트렙타비딘은 제조원(Vector Laboratory(Burlingame, CA))으로부터 구입하였다. 단백질 블롯에 대한 화학발광을 가시화하였고 ImageQuant LAS 4000 생분자 이미지 시스템을 사용하여 정량하였다.

[0089] **BfFucH 활성 분석 방법**

[0090] 효소 활성은 표준 검정 조건으로서, 기질로서 pNP- α -L-Fuc(p-니트로페닐- α -L-Fuc)를 사용하여 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0) 중에서 25°C에서 측정하였다. α -L-푸코시다제 활성의 1 유닛은 25°C에서 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에서 1분당 pNP- α -L-Fuc로부터 1 μ mol의 pNP 및 Fuc의 형성으로서 정의되었다. 미하엘리스(Michaelis) 상수(K_m)에 대한 값, 턴오버 수(K_{cat}) 및 V_{max}는 GraphPad Prism v5 소프트웨어(La Jolla, CA)에 의한 비-선형 회귀 분석에 의해 미하엘리스-멘텐 식(Michaelis-Menten equation)으로부터 pNP- α -L-Fuc에 대해 계산되었다.

[0091] **BfFucH의 최적 pH의 활성 측정**

[0092] 푸코시다제 활성에 대한 최적 pH는 나트륨 아세테이트, MES, MOPS, HEPES, Tris-HCl, CHES 완충액을 포함하는, pH 범위 4.0 내지 10.0에서 상기 언급된 표준 효소 검정으로 결정하였다. 모든 반응은 통계학적 평가를 위해 3회 수행하였다.

[0093] **BfFucH의 최적 2가 금속 이온의 활성 측정**

[0094] 금속 요구량에 대한 검정은 표준 검정 조건에서 수행하였다. 효소는 EDTA의 존재 및 부재하에 5 mM의 최종 농도에서 금속 이온(Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, 또는 Ni²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺)과 혼합하였다. 모든 반응은 통계학적 평가를 위해 3회 수행하였다.

[0095] **BfFucH의 최적 온도의 활성 측정**

[0096] 효소 활성에 대한 온도 효과는 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에서 상당량의 정제된 푸코시다제를 pNP- α -L-Fuc로 항온처리함에 의해 결정하였다. 상기 검정이 구성되도록 유지하기 위해, 모든 성분을 잘 혼합하고 10분 동안 검정 온도에서 예비 가열하였고 반응은 효소를 부가함에 의해 개시하였고 일정 온도에서 다중방식 플레이트 판독기(SpectraMax M5, Molecular Devices)로 기록하였다. 온도 범위는 4 내지 80°C였다. 모든 반응은 통계학적 평가를 위해 3회 수행하였다.

[0097] **푸코스 데하이드로게나제-기반(FDH) 검정**

[0098] 푸코스 데하이드로게나제-기반 검정은 이전의 보고로부터 약간 변형되었다. 단지 NADP+하고만 반응하는 활성을 갖는, 제조원(Sigma-Aldrich)에 의해 시판되는 슈도모나스 종 기원의 다른 푸코스 데하이드로게나제와 달리, 메소리조븀 로티(*Mesorhizobium loti*)로부터 기원하는 재조합 형태의 FDH는 단지 NAD+와 기능한다. 형성된 NADH는 25°C에서 다중방식 플레이트 판독기(SpectraMax M5, Molecular Devices)에 의해 340 nm로 여기되는 경우 약 450 nm에서 NADPH 형광에 의해 측정하였다. 상기 방법을 사용함에 의해, 루이스 슈가 및 모유 올리고사카라이드(HMO)와 같은 다양한 올리고사카라이드에서 푸코실-접합체는 5분 이내에서 정량하였다.

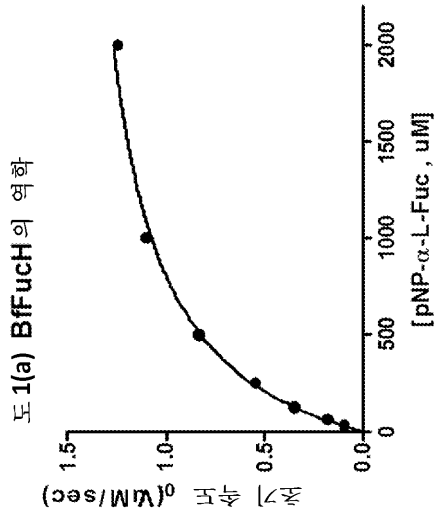
[0099] **면역글로블린 G, Fc-융합 단백질, EPO, 인터페론(IFN β 1a) 및 인플루엔자 헤마글루티닌(HA)의 모노-GlcNAc 또는 GlcNAc-(Fuc α -1,6)의 생성**

[0100]

모든 당단백질은 반응 완충액 50 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에 의해 완충액 교환하였다. 먼저, EndoF1, EndoF2, EndoF3, EndoH 및 EndoS(1 mg/mL)를 포함하는 엔도글리코시다제 콕테일 용액은 당단백질의 Asn에 결합된 GlcNAc를 제외하고는 모든 N-글리칸 쇄를 제거하기 위해 부가하였고 이어서 적절한 양의 푸코시다제를 부가하였다. 당단백질의 GlcNAc에 결합된 코어-푸코스를 완전히 제거하기 위해 48시간 동안 37°C에서 항온처리한다.

도면

도면1



도 1(a) BifFucH의 역학

파라미터	상대적 활성 (%)
pNP-α-D-Glc	0
pNP-α-D-Gal	0
pNP-α-D-GlcNAc	0
pNP-α-D-GalNAc	0
pNP-α-D-Man	0
pNP-α-L-Fuc	100
pNP-β-L-Fuc	0
pNP-α-L-Rha	0

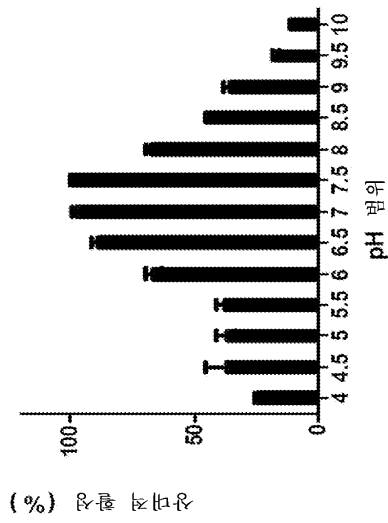
도 1(c)

값	값
Kcat	183.8 s ⁻¹
Km	437.0 uM
Kcat/Km	0.42 s ⁻¹ /uM
Vmax	1.544 uM/sec

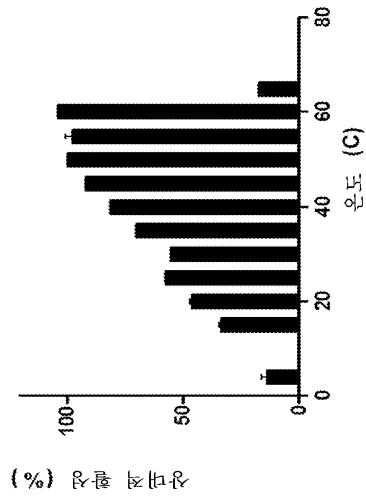
도 1(b)

도면2

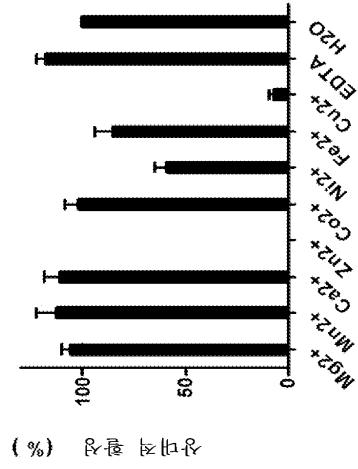
도 2 (a) BffFuchH의 pH 프로파일



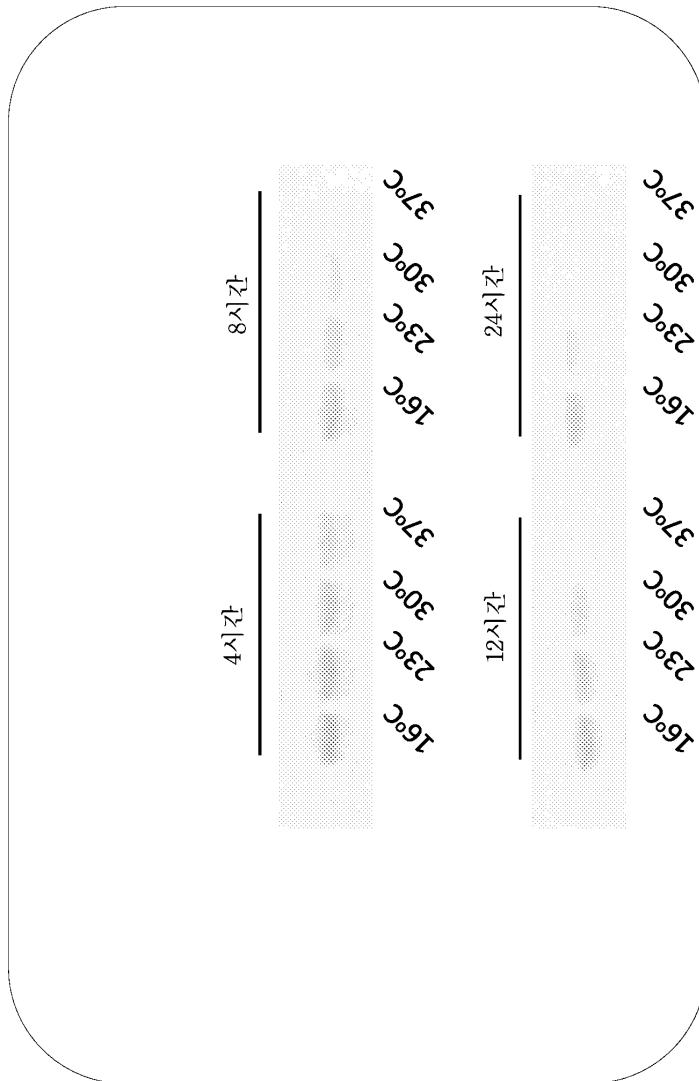
도 2 (b) 상이한 온도에서 BffFuchH의 프로파일



도 2 (c) 푸코시다제, BffFuchH에서 금속 이온 영향



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> WONG, CHI-HUEY

TSAI, TSUNG-I

<120> FUCOSIDASE FROM BACTEROIDES AND METHODS USING THE SAME

<130> G2112-02101

<140> 14/722,612

<141> 2015-05-27

<150> 62/110,338

<151> 2015-01-30

<150> 62/020,199

<151> 2014-07-02

<150> 62/003,908

<151> 2014-05-28

<150> 62/003,104

<151> 2014-05-27

<150> 62/003,136

<151> 2014-05-27

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 414

<212> PRT

<213> Bacteroides sp.

<

400> 1

Gln Gln Lys Tyr Gln Pro Thr Glu Ala Asn Leu Lys Ala Arg Ser Glu

1 5 10 15

Phe Gln Asp Asn Lys Phe Gly Ile Phe Leu His Trp Gly Leu Tyr Ala

 20 25 30

Met Leu Ala Thr Gly Glu Trp Thr Met Thr Asn Asn Asn Leu Asn Tyr

 35 40 45

Lys Glu Tyr Ala Lys Leu Ala Gly Gly Phe Tyr Pro Ser Lys Phe Asp

 50 55 60

Ala Asp Lys Trp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ser Gly Ala Lys Tyr Ile

65 70 75 80

Cys Phe Thr Thr Arg His His Glu Gly Phe Ser Met Phe Asp Thr Lys

 85 90 95

Tyr Ser Asp Tyr Asn Ile Val Lys Ala Thr Pro Phe Lys Arg Asp Val

 100 105 110

Val Lys Glu Leu Ala Asp Ala Cys Ala Lys His Gly Ile Lys Leu His

 115 120 125

Phe Tyr Tyr Ser His Ile Asp Trp Tyr Arg Glu Asp Ala Pro Gln Gly

 130 135 140

Arg Thr Gly Arg Arg Thr Gly Arg Pro Asn Pro Lys Gly Asp Trp Lys

145 150 155 160
 Ser Tyr Tyr Gln Phe Met Asn Asn Gln Leu Thr Glu Leu Leu Thr Asn
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Ile Gly Ala Ile Trp Phe Asp Gly Trp Trp Asp Gln Asp
 180 185 190

 Ile Asn Pro Asp Phe Asp Trp Glu Leu Pro Glu Gln Tyr Ala Leu Ile
 195 200 205
 His Arg Leu Gln Pro Ala Cys Leu Val Gly Asn Asn His His Gln Thr
 210 215 220
 Pro Phe Ala Gly Glu Asp Ile Gln Ile Phe Glu Arg Asp Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 Glu Asn Thr Ala Gly Leu Ser Gly Gln Ser Val Ser His Leu Pro Leu
 245 250 255

 Glu Thr Cys Glu Thr Met Asn Gly Met Trp Gly Tyr Lys Ile Thr Asp
 260 265 270
 Gln Asn Tyr Lys Ser Thr Lys Thr Leu Ile His Tyr Leu Val Lys Ala
 275 280 285
 Ala Gly Lys Asp Ala Asn Leu Leu Met Asn Ile Gly Pro Gln Pro Asp
 290 295 300
 Gly Glu Leu Pro Glu Val Ala Val Gln Arg Leu Lys Glu Val Gly Glu
 305 310 315 320

 Trp Met Ser Lys Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Gly Thr Arg Gly Gly Leu
 325 330 335
 Val Ala Pro His Asp Trp Gly Val Thr Thr Gln Lys Gly Asn Lys Leu
 340 345 350
 Tyr Val His Ile Leu Asn Leu Gln Asp Lys Ala Leu Phe Leu Pro Ile
 355 360 365
 Val Asp Lys Lys Val Lys Lys Ala Val Val Phe Ala Asp Lys Thr Pro
 370 375 380

 Val Arg Phe Thr Lys Asn Lys Glu Gly Ile Val Leu Glu Leu Ala Lys
 385 390 395 400

Val Pro Thr Asp Val Asp Tyr Val Val Glu Leu Thr Ile Asp
 405 410

<210> 2
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Bacteroides sp.
 <400> 2

Gln Ser Ser Tyr Gln Pro Gly Glu Glu Asn Leu Lys Ala Arg Glu Glu
 1 5 10 15
 Phe Gln Asp Asn Lys Phe Gly Ile Phe Leu His Trp Gly Leu Tyr Ala
 20 25 30
 Met Leu Ala Thr Gly Glu Trp Thr Met Thr Asn Asn Asn Leu Asn Tyr
 35 40 45
 Lys Glu Tyr Ala Lys Leu Ala Gly Gly Phe Tyr Pro Ser Lys Phe Asp
 50 55 60
 Ala Asp Lys Trp Val Ala Ala Ile Lys Ala Ser Gly Ala Lys Tyr Ile
 65 70 75 80
 Cys Leu Thr Ser Arg His His Asp Gly Phe Ser Met Phe Asp Thr Gln
 85 90 95
 Tyr Ser Asp Phe Asn Ile Val Lys Ala Thr Pro Phe Lys Arg Asp Ile
 100 105 110
 Ile Lys Glu Leu Ala Ala Ala Cys Ser Lys Gln Gly Ile Lys Leu His
 115 120 125
 Phe Tyr Tyr Ser His Leu Asp Trp Thr Arg Glu Asp Tyr Pro Trp Gly
 130 135 140
 Arg Thr Gly Arg Gly Thr Gly Arg Ser Asn Pro Gln Gly Asp Trp Lys
 145 150 155 160
 Ser Tyr Tyr Gln Phe Met Asn Asn Gln Leu Thr Glu Leu Leu Thr Asn
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Val Gly Ala Ile Trp Phe Asp Gly Trp Trp Asp Gln Asp
 180 185 190
 Gly Asn Pro Gly Phe Asn Trp Glu Leu Pro Glu Gln Tyr Ala Met Ile

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 3
 ttcagggagc gatcgctcag caaaagtatc aaccgaca 38
 <210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 4
 gtcattacgt ttaaacttag tcaattgtaa gttctacca 39
 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 5
 ttcagggagc gatcgctcag tcttcttacc agcctggt 38
 <210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 6
 gtcattacgt ttaaacttag tcaattgtaa gttctacaac 40
 <210> 7
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 7
 ttcagggagc gatcgctgcg gttaccggta ccacca 36
 <210> 8
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 8
 gtcattacgt ttaaacttac cagtctttag agtacgggg 39
 <210> 9
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 9
 tttcaggag cgatcgctgc ggttaacctg tctaacct 38
 <210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 10
 gtcattacgt ttaaacttac gggttcatga tttgatcag 40
 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer
 <400> 11

ttcagggagc gatcgctgcg accgcgctgg cgggtt 36

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

gtcattacgt ttaaacttag tttttaaccg cgtcacgaac 40

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 13

ttcagggagc gatcgctgcg cgggcgccgg ttaaaca 37

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 14

gtcattacgt ttaaacttac ggggtacgaa cgccttcag 39

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 15

ttcagggagc gatcgctacc caccatgatt cactcaat 38

<210> 16
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 16
 gtcattacgt ttaaacttat ttttttagca gctgcctttt c 41

<210> 17
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 17
 ttcagggagc gatcgctgcg ccggcggaca acaccgt 37

<210> 18
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 18
 gtcattacgt ttaaacttag ttgtaacaa ccggcgcaga 40

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 6xHis Tag
 <400> 19
 His His His His His His
 1 5