

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 11월 22일 (22.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/157945 A2

- (51) 국제특허분류: 미분류
(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003811
(22) 국제출원일: 2012년 5월 15일 (15.05.2012)
(25) 출원언어: 한국어
(26) 공개언어: 한국어
(30) 우선권정보: 10-2011-0046458 2011년 5월 17일 (17.05.2011) KR
(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동 1번지), 500-712 Gwangju (KR).
(72) 발명자: 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 전상용 (JON, Sang Yong) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 전영수 (JUN, Young Soo) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 이상은 (LEE, Sang Eun) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 광주과학기술원 생명과학과, 500-

712 Gwangju (KR). 이미리암 (LEE, Miriam) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과, 500-712 Gwangju (KR). 김성현 (KIM, Sung Hyun) [KR/KR]; 광주광역시 북구 오룡동 1번지 광주과학기술원 생명과학과 118호, 500-480 Gwangju (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

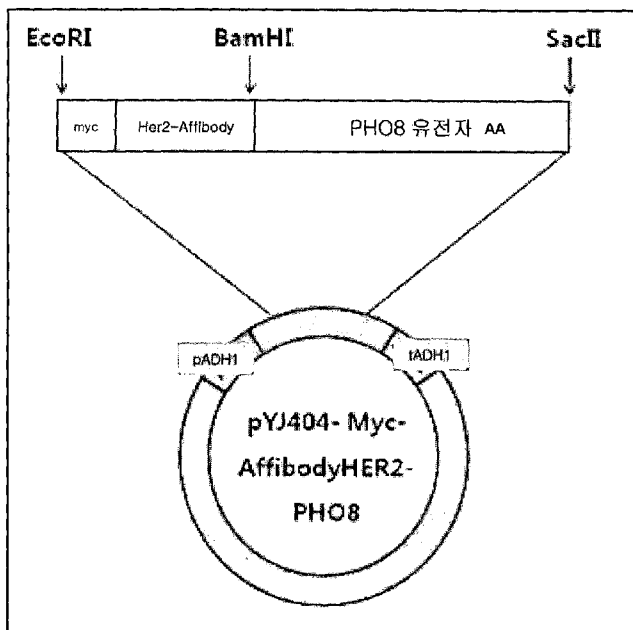
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR EXPRESSING A TARGET PROTEIN AT THE SURFACE OF A VACUOLE, AND DRUG DELIVERY CARRIER

(54) 발명의 명칭: 액포 표면에 목적단백질의 발현 방법 및 약물전달체

Fig. 1



AA ... PHO8 gene

(57) Abstract: The present invention relates to a method for expressing a target protein at the surface of a vacuole of a microorganism, and to a drug delivery carrier. More particularly, the present invention relates to a method comprising the steps of: (a) creating a vector including a nucleotide sequence encoding a fusion protein containing a target protein and a vacuole-targeting transmembrane protein; (b) transforming a microorganism containing a vacuole using said vector; and (c) expressing the fusion protein from the transformed microorganism. According to the present invention, the expressed fusion protein targets the vacuole and the target protein of the fusion protein is expressed at the surface of the vacuole. The present invention relates to a method for preparing a drug delivery carrier which is safe and easily applied in a clinical setting by fusion expressing the target protein and vacuole targeting transmembrane protein on the surface of a vacuole of a yeast. Further, the present invention relates to a method for preparing a drug delivery carrier which is cost-efficient when the method of the present invention is industrialized, using yeast having more economically advantageous culturing conditions.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 미생물의 액포 표면에 목적 단백질을 전시하는 방법 및 약물전달체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제작하는 단계; (b) 상기 벡터를 이용하여 액포를 포함하는 미생물을 형질전환시키는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 미생물에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 상기 융합 단백질의 목적 단백질은 상기 액포의 표면에 전시된다. 본 발명은 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을 효모의 액포 표면에 융합 발현하여 입상으로 적용하기 안전하고 용이한 약물전달체 제작 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 보다 경제적인 배양조건을 갖고 있는 효모를 이용함으로써 본 발명을 산업화 하였을 때 비용효율적인 약물전달체 제작 방법을 제공한다.

【명세서】

【발명의 명칭】

액포 표면에 목적단백질의 발현 방법 및 약물전달체

5 【기술분야】

본 발명은 미생물의 액포 표면에 목적 단백질을 전시하는 방법 및 약물전달체에 관한 것이다.

【배경기술】

10 암, 종양, 종양-관계된 질환들 및 종양성 질환은 매우 심각하여 종종 삶을 위협하는 상태를 유발한다. 빠른-증식성 세포들의 성장으로 특징 지워지는 상기의 질병 치료에 대한 효과적인 치료제를 동정하기 위하여 수많은 연구들이 진행되어 왔다. 상기 치료제는 환자의 생존을 연장시키고 종양성과 연관된 빠른-증식성 세포 성장을 억제하며 종양성의
15 퇴행에 효과적이다. 일반적으로, 외과적 수술 및 방사선 치료법이 암의 치료를 위해 일차적으로 실시되며, 생존율이 낮을 지라도 특정 암에 대한 화학치료법은 암의 치료에 효과적이다.

현재, 화학치료법, 방사선치료법 및 면역치료법을 포함하는 대부분의 암 치료법은 암 세포에서 간접적으로 아폽토시스를 유도함으로써 기능한다.
20 정상적인 아폽토틱 기작의 결점으로 인해 아폽토시스를 실행하지 않는 암 세포의 무능력은 화학치료법, 방사선치료법 또는 면역치료법-유도된 아폽토시스에 대한 저항성의 증가와 연관되어 있다. 아폽토시스 결점으로 인하여 최근 치료 프로토콜에 대한 다른 기원의 인간 암의 일차적인 또는 획득된 저항성이 암 치료법에서 주된 문제이다(Lowe, *et al.*,
25 *Carcinogenesis*, 21: 485(2000); Nicholson, *Nature*, 407: 810(2000)).

보다 효과적인 암 치료를 개선하기 위한 시도로, 단일클론항체의 특이적 타겟팅을 통한 치료법이 1970년대에 개발되었다. 현재, 최소한 15종 이상의 단일클론항체가 인간을 위한 용도로 승인되어 있다. 세포-특이적 마커와의 상호작용에 기반한 항체는 여러 가지 기작에 따라
30 직접적인 세포독성을 나타낼 수 있는데, 예를 들어, 성장인자 수용체들의 차단(Baselga, J. and Mendelsohn, *J. Pharmacol. Ther.*, 64:

127154(1994)), 아팍토시스의 유도(Trauth, B. C., *et al.*, *Science*, 245: 301305(1989)), 항-이디오타입 항체의 형성(Fagerberg, J., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 38: 149159(1994)) 또는 항체-의존성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC; Steplewski, Z., *et al.*, *Science*, 221: 865867(1983)) 및 보체-매개된 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC; Ballare, C., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 41: 1522(1995)) 같은 간접적인 효과 등을 포함한다. 한편, 항체에 의해 유도된 세포독성은 불충분한 경우가 많아 다양한 독성물질들[예컨대, 방사선 동위원소 및 화학치료제(chemotherapeutic drugs)]과 함께 사용하여 치료효능을 증대시킨다. 최근에, 약 20-30%의 유방암에서 과다발현 되는 인간 표피성장인자 수용체 2(human epidermal growth factor 2, HER2/neu)를 타겟팅하는 인간화된 단일클론항체인 트라스투주맙(trastuzumab, Herceptin)이 유방암 치료법에 이용되고 있다(WO 2006/098978 A1; WO 2009/042618 A1). 하지만, 유방암 치료제로서 트라스투주맙은 승인을 받았음에도 불구하고 많은 부작용을 초래한다. 예를 들어, 열, 구역질, 구토, 주입 반응, 설사, 감염, 증가된 감기, 두통, 피로, 호흡곤란, 발진, 호중성 백혈구 감소, 빈혈 및 근육통 등이 대표적인 부작용이다.

비록 단일클론항체가 종양 타겟팅을 위한 매우 매력적인 특성을 제공할 지라도, 단일클론항체는 고비용, 다양한 부작용 및 제한적인 효과를 나타낼 뿐 아니라, 큰 크기로 인하여 혈액 내 제거의 어려움, 간 유입 및 낮은 조직 침투율을 나타내는 단점을 가진다. 이를 극복하기 위해, F(ab), 디아바디(diabody), scFv, Fv 및 다양한 단일 도메인 항체 같은 항체 단편들을 이용하는 방법들이 개발되었다. 이러한 항체 단편을 이용한 접근방법은 몇 가지 제한점을 가지지만 매우 유용하다. 가수분해 및 수명(shelf-life) 같은 안정성 문제를 해결하기 위해, 트리넥틴(trinectins), 안티칼린(anticalins) 및 애피바디(affibody) 리간드 같은 다른 단백질 스캐폴드에 기반된 노력들이 시도되고 있다.

한편, 백신 운반 시스템으로서 많이 이용되는 것이 바이러스 리포솜을 이용하는 방법이다. 바이러스 리포솜은 특정 타겟으로 핵산을 운반하도록 지시하는 동시에 체액 및 세포질 소기관 내에 존재하는 핵산-

분해 효소에 대한 보호 기능을 할 수 있다. 종양 항원은 종양세포와
 정반대인 반 정상 세포의 백그라운드에서 발현된다. 핵산 백신화는 암
 백신 디자인의 유용한 수단일 수 있는 항원 발현의 분자적인 면역-생리학적
 조작 가능성을 제공한다. 외래 DNA 분자를 리포솜으로 성공적으로 세포
 5 내로 운반한 예는 Nicolau 및 Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-
 190(1982) 및 Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176(1987)에
 개시되어 있다. 한편, 리포솜을 이용한 동물세포의 형질전환에 가장 많이
 이용되는 시약으로는 Lipofectamine(Gibco BRL)이 있다. 또한, 리포솜
 내에 항암제를 넣어서 암세포에 전달하는 방법이 이용되고 있다. 하지만,
 10 리포솜을 이용한 항암제의 운반은 항암제의 누출을 초래할 가능성이 매우
 큰 단점이 있다.

효모의 액포(yeast vacuole)는 효모에 존재하는 주요 세포
 소기관으로, 포유류의 리소솜(lysosome)과 유사하다. 즉, 액포는 인지질
 이중막으로 둘러싸여 있으며 다양한 막단백질과 함께, 내부에는 가수 분해
 15 효소를 포함한다. 효모의 액포에 대한 연구의 장점은 고등 진핵생물에
 비하여 다양한 유전자분자학적 접근에 더욱 용이하다는 것이며, 특히,
 단백질 타겟팅 연구가 활발한 실정이다.

본 발명에서는 종래의 리포솜 기반 항암치료제의 운반에 대한
 단점을 효과적으로 극복하기 위하여, 상기 효모 유래 액포-기반된
 20 항암치료용 약물전달 시스템을 개발하였다. 본 연구에 대한 수많은
 시도들은 보다 넓은 스펙트럼의 종양성 질환을 치료하는 데 중점을 두고
 있는 실정이다.

상술한 바와 같이, 종래의 암 치료법은 독성 및 한계점을 가지기
 때문에 보다 효과적인 암 치료수단을 개발하는 것이 시급히 요구되고 있는
 25 실정이다.

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

【발명의 상세한 설명】**【기술적 과제】**

본 발명자들은 단백질 또는 펩타이드의 약물전달체로서 인체에 보다 안전하고 용이하게 제조할 수 있는 약물전달체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미생물의 액포가 단백질 또는 펩타이드의 약물전달체로 이용될 수 있음을 규명하였고, 이러한 액포 약물전달체가 용이하게 제조될 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 미생물의 액포 표면에 목적단백질을 전시하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 약물 전달체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

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

【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 미생물의 액포 표면에 목적 단백질을 전시하는 방법을 제공한다:

(a) 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 벡터를 이용하여 액포를 포함하는 미생물을 형질전환시키는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 미생물에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계, 상기 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 상기 융합 단백질의 목적 단백질은 상기 액포의 표면에 전시된다.

본 발명자들은 단백질 또는 펩타이드의 약물전달체로서 인체에 보다 안전하고 용이하게 제조할 수 있는 약물전달체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미생물의 액포가 단백질 또는 펩타이드의 약물전달체로 이용될 수 있음을 규명하였고, 이러한 액포 약물전달체가 용이하게 제조될 수 있음을

규명하였다.

본 발명의 미생물의 액포 표면에 목적 단백질을 전시하는 방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

- 5 단계 (a): 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막 통과 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 벡터의 제작

본 발명에서 벡터는 전형적으로 발현 벡터로 구축될 수 있다.

- 10 상기 벡터는 플라스미드, 파아지 또는 코스미드와 같은 레플리콘으로서, 이에 또 다른 DNA 절편이 부착되어 부착된 절편의 복제를 초래한다. 용어 '레플리콘'은 생체 내에서 DNA 복제의 자가 단위로서 작용하는 모든 유전적 인자(예를 들면, 플라스미드, 염색체 및 바이러스 등)를 의미한다.

- 15 본 발명에 사용되는 '발현 벡터'는 숙주 세포에서 발현되는 유전자를 포함하는 DNA 분자를 가리킨다. 전형적으로, 유전자의 발현은 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한 특정 조절 요소의 조절 하에 위치하게 된다. 발현하고자 하는 유전자는 조절 요소에 작동적으로(operatively) 연결된다.

본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현할 수 있도록 구축된다. 일반적으로, 발현 벡터는 프로모터-유전자-전사 종결서열의 발현 컨스트럭트를 포함한다.

- 20 예를 들어, 숙주 세포가 효모인 경우, 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 프로모터는 GAL10 프로모터, GAL1 프로모터, ADH1 프로모터, ADH2 프로모터, PHO5 프로모터, GAL1-10 프로모터, TDH3 프로모터, TDH2 프로모터, TDH1 프로모터, PGK 프로모터, PYK 프로모터, ENO 프로모터 및 TPI 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 25 상기 발현 컨스트럭트에서 이용가능한 전사 종결서열은 ADH1 터미네이터, CYC1 터미네이터, GAL10 터미네이터, PGK 터미네이터, PHO5 터미네이터, ENO 터미네이터 및 TPI 터미네이터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- 30 본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 숙주 세포에서 작동하는 복제 원점을 포함한다. 예를 들어, 숙주 세포가 효모인 경우, 발현 벡터에 포함되는 복제 원점은 2플라스미드 복제 시스템 및 ARS(autonomous

replicating sequences)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 ARS의 예는 ARS1 및 ARS3를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 발현 벡터는 CEN(centromeric sequences)를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이는 유사분열 및 감수분열 안정성을 제공하고, 예를 들어 CEN3, CEN4 및 CEN11이 있다.

본 발명에서 제작되는 발현 벡터는 선별 작업을 용이하게 하기 위하여, 선택마커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포가 효모인 경우, 상기 선택 마커는 UAR3, LEU2, HIS3, TRP1, ADE2 및 LYS2 같은 영양요구성(auxotrophic) 선택마커 또는 CAN1 및 CYH2과 같은 약물 저항성 선택마커를 포함한다.

벡터의 제조 시, 발현 컨스트럭트는 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과 단백질의 융합 단백질을 발현하도록 제작된다.

본 발명에 이용되는 액포 타겟팅 막 통과 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 다양한 액포 타겟팅 막 통과 단백질에 대한 것이고, 바람직하게는 PHO8 단백질, CPS1 단백질, VAM3 단백질, NYV1 단백질, VPH1 단백질을 포함한다.

가장 바람직하게는, 상기 액포 타겟팅 막 통과 단백질은 PHO8 단백질이다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 목적 단백질 또는 단백질 약물은 상기 액포 타겟팅 막 통과 단백질의 N-말단에 결합되어 있다.

목적 단백질 및 액포 타겟팅 막 통과 단백질은 직접 또는 간접적(예컨대, 링커에 의한 연결)으로 연결될 수 있다. 바람직하게는, 상기 융합 단백질의 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과 단백질은 링커로 연결되어 있다.

본 명세서에서, 용어 “링커”는 링커로서 이용되는 당업계에 공지된 어떠한 펩타이드 링커도 포함한다. 바람직한 펩타이드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함한다. Thr 및 Ala과 같은 다른 중성 아미노산들도 링커 서열에 포함될 수 있다. 링커에 적합한 아미노산 서열은 Maratea et al., *Gene* 40:39-46(1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8562(1986); 미국 특허 제4,935,233호, 제4,751,180호 및 제5,990,275호에 개시되어 있다. 링커 서열은 1-50 아미노산 잔기로

구성될 수 있다. 예시적인 링커 서열은, “Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser”, “Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser”, “Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly”, “Gly Ser Thr Ser Gly Lys Pro Ser Glu Gly Lys Gly” 또는 “Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser” 이다.

본 발명에서 액포 표면 전시 되는 단백질 또는 펩타이드는 어떠한 단백질 또는 펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 의해 액포 표면 전시되는 단백질 또는 펩타이드는 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달단백질 또는 그 일부분, 항체 또는 그 일부분, 단쇄항체, 어피바디, 펩타이드 앵타머, 앵타이드, 결합단백질 또는 그 결합도메인, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자 및 혈액 응고 인자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 상세하게는, 본 발명의 약물전달체에 의해 운반되는 단백질 또는 펩타이드는 인슐린, IGF-1(insulin-like growth factor 1), 성장호르몬, 에리쓰로포이에틴, G-CSFs(granulocyte-colony stimulating factors), GM-CSFs(granulocyte/macrophage-colony stimulating factors), 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-1 알파 및 베타, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 인터루킨-2, EGFs(epidermal growth factors), 칼시토닌(calcitonin), ACTH(adrenocorticotropic hormone), TNF(tumor necrosis factor), 아토비스반(atobisban), 부세레린(buserelin), 세트로렉릭스(cetrorelix), 데스로레린(deslorelin), 데스모프레신(desmopressin), 디노르핀 A (dynorphin A) (1-13), 엘카토닌(elcatonin), 엘레이도신(eleidosin), 엡티피바타이드(eptifibatide), GHRH-II(growth hormone releasing hormone-II), 고나도레린(gonadorelin), 고세레린(goserelin), 히스트레린(histrelin), 류프로레린(leuprorelin), 라이프레신(lypressin), 옥트레오타이드(octreotide), 옥시토신(oxytocin), 피트레신(pitressin), 세크레틴(secretin), 신칼라이드(sincalide), 테르리프레신(terlipressin), 티모펜틴(thymopentin), 티모신(thymosine) α1, 트리프트레린(triptorelin), 바이발리루딘(bivalirudin),

5 카르베토신(carbetocin), 사이클로스포린, 엑세딘(exedine),
란레오타이드(lanreotide), LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone),
나파레린(nafarelin), 부갑상선 호르몬, 프람린타이드(pramlintide), T-20
(enfuvirtide), 타이말파신(thymalfasin), 지코노타이드, 항체, 항원,
어피바디, 펩타이드 앵타머 및 앵타이드를 포함한다.

상기 앵타이드는 본 발명자들에 의해 개발되고 특허출원한 펩타이드
물질을 의미하며, 본 발명자들의 특허출원 WO 2010/047515에 개시된 BPB
펩타이드를 의미한다. 상기 BPB는 앵타이드(Aptide)로 명칭이 변경되었다.
WO 2010/047515의 개시 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. Aptide는
10 종래의 펩타이드 앵타머와 유사하게 특정 타겟에 결합하는 펩타이드
물질로서, 종래의 펩타이드 앵타머와는 크게 다른 구조적 특징을 갖는다.

단계 (b): 미생물의 형질전환

본 명세서에서, 용어 “미생물”은 액포를 포함하는 모든 미생물을
15 포함한다. 액포는 막으로 싸인 거대한 세포소기관으로, 세포벽, 세포
함유물과 마찬가지로 후형질에 속한다. 후형질은 원형질에서 2차적으로
생긴 물질을 말한다. 액포는 *Thioploca*, *Beggiatoa* 및 *Thiomargarita* 속에
속하는 박테리아, 진균, 식물세포 및 동물세포에 존재하며 저장 세포기관
역할을 한다. 효모의 액포는 아미노산을 저장하고 독성을 분해하는
20 역할을 한다. 또한 효모의 액포는 그 형태를 신속하게 변화할 수 있는
동적인 구조를 갖고 있다. 액포는 세포 pH의 항상성, 이온의 농도,
삼투압조절, 폴리포스페이트 및 아미노산의 저장 및 소화과정에 관여한다.
스트론튬(Sr^{2+}), 코발트(Co^{2+}) 및 리드 II(Pd^{2+})와 같은 독성 이온은 액포로
이동되어 분해된다.

25 바람직하게는 상기 액포를 포함하는 미생물은 진균 또는
박테리아(예컨대, *Thioploca*, *Beggiatoa* 및 *Thiomargarita*)이며, 보다
바람직하게는 상기 액포를 포함하는 미생물은 진균이며, 가장 바람직하게는
상기 진균은 효모이다.

상기 용어 “효모”는 사카로마이세스(*Saccharomyces*),
30 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*),
스포로보로마이세스(*Sporobolomyces*), 토루로프시스(*Torulopsis*),

트리코스포론(*Trichosporon*), 워커하미아(*Wickerhamia*),
 아쉬바이아(*Ashbya*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 캔디다(*Candida*),
 사이테로마이세스(*Citeromyces*), 크레브로테슘(*Crebrothecium*),
 크립토코커스(*Cryptococcus*), 드바리오마이세스(*Debaryomyces*),
 5 에노마이코프시스(*Endomycopsis*), 지오텐리컴(*Geotrichum*),
 한센룰라(*Hansenula*), 클로엑케라(*Kloeckera*), 리포마이세스(*Lipomyces*),
 피키아(*Pichia*), 로도스포리둠(*Rhodospiridium*) 또는

로도토룰라(*Rhodotorula*) 속(genus)에 속하는 효모이고, 보다 바람직하게는
 사카로마이세스 와 스킨조사카로마이세스에 속하는 효모이고, 가장
 10 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시애, 스킨조사카로마이세스 폼베이다.

상기 용어 “형질전환” 은 상기 제작된 벡터를 미생물 내로 운반하는
 방법을 의미하며, 형질전환 하고자 하는 세포가 원핵세포인 경우에는, 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.
 15 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 있다. 형질전환 하고자 하는
 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell,
 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology,
 20 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)),
 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-
 텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell. Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자
 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-
 9572(1990))등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
 25 효모와 같은 진균의 형질전환의 경우에는, 일반적으로 Lithium acetate
 (R.D. Gietz, Yeast 11, 355360(1995))와 heat shock (Keisuke Matsuura,
 Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, 5:538-544(2005))을
 이용한 형질전환법과 electroporation (Nina SkoluckaAsian, Pacific
 Journal of Tropical Biomedicine, 94-98(2011))에 의해 실시될 수 있다.

30

단계 (c): 융합 단백질의 발현

형질전환 후, 형질전환된 미생물에서 상기 융합 단백질을 발현시킨다. 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 융합 단백질의 목적 단백질은 액포의 표면에 전시된다.

5 융합 단백질의 발현은 형질전환된 미생물(예컨대, 효모)을 배양하여 실시한다. 또한, 발현백터의 프로모터가 유도성 프로모터(inducible promoter)인 경우에는 배지에 적합한 인두서(inducer)를 첨가하여 융합 단백질의 발현을 유도한다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 발현에 의해 형성된 융합 단백질은 미생물(효모) 세포 내에서 타겟팅 되어 미생물의 액포 표면에
10 목적 단백질이 전시되고 단백질 약물은 액포막과 그 내부로 향한 구조의 토폴로지(topology)를 갖는다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (c) 이후에 융합 단백질이 표면 전시된 액포를 분리하는 단계를 추가적으로 포함한다.

15 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 약물 전달체를 제조하는 방법을 제공한다:

(a) 단백질 약물 및 액포 타겟팅 막통과 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 벡터를 이용하여 액포를 포함하는 미생물(예컨대, 효모)을
20 형질전환시키는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 미생물(예컨대, 효모)에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계, 상기 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 상기 융합 단백질의 단백질 약물은 상기 액포의 표면에 전시된다.

본 발명의 약물 전달체 제조방법은 상술한 액포 표면에 목적
25 단백질을 전시하는 방법과 거의 동일하다. 따라서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 액포 타겟팅 막통과 단백질에 결합되어 있으며 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질에 의해 액포의 표면에
30 전시된 단백질 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

본 발명의 약물 전달체는 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조되기

때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 액포 타겟팅 막 통과 단백질은 PH08 단백질 또는 CPS1 단백질, NYV1 단백질, VAM3 단백질, VPH1
5 단백질 등이 있고, 가장 바람직하게는 PH08 단백질이다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단백질 약물은 상기 액포 타겟팅 막 통과 단백질의 N-말단에 결합되어 있다.

본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단백질 약물 및 액포 타겟팅 막 통과 단백질은 링커로 연결되어 있다.

10 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 액포 표면에 전시된 목적 단백질 또는 단백질 약물은 액포막의 바깥쪽을 향한 구조의 토폴로지(topology)를 갖는다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 액포는 진균 또는 박테리아의 액포이고, 보다 바람직하게는 진균의 액포이며, 가장 바람직하게는 효모의
15 액포이다.

【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane)
20 단백질을 효모의 액포 표면에 융합 발현하여 임상으로 적용하는데 안전한 약물전달체를 제공할 수 있다.

(b) 본 발명은 통상적으로 잘 알려진 효모를 이용하여 다양한 단백질 또는 펩타이드 약물을 전달하는 약물전달체를 용이하게 제작할 수 있다.

(c) 본 발명은 보다 경제적인 배양조건을 갖고 있는 효모를
25 이용함으로써 본 발명을 산업화 하였을 때 비용-효율적으로 약물전달체를 제공할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을
30 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 벡터의 모식도를 보여준다.

도 2는 효모에서의 Affibody_{HER2}-PH08 융합단백질의 발현을 확인한

면역 블로팅법 결과를 보여준다. 항-PH08(ALP, alkaline phosphatase) 항체 및 항-myc 항체를 이용하여 Affibody_{HER2}-PH08 융합단백질의 발현을 확인하였다.

도 3은 분리한 액포에서의 Affibody_{HER2}-PH08 융합단백질의 발현을
5 항-PH08 항체 및 항-myc 항체를 이용하여 면역블로팅법으로 확인한 결과를 보여준다.

도 4는 Affibody_{HER2}-액포(타겟팅용 액포)의 형태학적 크기를 전기영동 광 스캐터링 스펙트로포토미터(ELS-8000, Otsuka Electronics)로 보여준 결과이다. 평균 315.6nm의 분포양상을 보여준다.

10 도 5는 Affibody_{HER2}-액포의 모양을 TEM(Transmission Electron Microscopy, Philips Electronic Instrument Corp., Mahwah, NJ)을 이용하여 관찰한 결과이다. 측정 결과, 150-210nm의 구형 모양을 갖고 있음을 보여준다.

도 6은 Affibody_{HER2}-액포에 발현된 affibody_{HER2}의 HER2 바인딩
15 실험(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)의 결과를 보여준다. 음성대조군과 비교하여 Affibody_{HER2}-액포가 19배 이상 잘 결합함을 확인하였다.

도 7은 Affibody_{HER2}-액포의 HER2에 대한 친화력 측정한 결과이다. SPR(surface plasmon resonance, BIAcore X)를 이용하여 Affibody_{HER2}-액포가
20 음성대조군에 비해 3.57배 더 높음을 확인한 결과이다.

도 8은 Affibody_{HER2}-액포의 HER2 발현 세포에 대한 타겟팅실험 결과를 보여준다. HER2를 발현하는 SKOV-3 세포에 Affibody_{HER2}-액포 30 μ g을 처리하여 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다.

도 9은 Affibody_{HER2}-액포의 HER2 발현 세포에 대한 타겟팅실험
25 결과를 보여준다. HER2를 발현하는 SKOV-3 세포에 음성대조군 30 μ g을 처리하여 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다. 도 8과 비교하여 Affibody_{HER2}-액포의 형광신호가 없음을 보여준다.

도 10은 Affibody_{HER2}-액포의 HER2 미발현 세포에 대한 타겟팅실험 결과를 보여준다. HER2를 발현하지 않는 HeLa 세포에 Affibody_{HER2}-액포 30
30 μ g을 처리하여 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다.

도 11은 Affibody_{HER2}-액포의 HER2 미발현 세포에 대한 타겟팅실험

결과를 보여준다. HER2를 발현하지 않는 HeLa 세포에 음성대조군 30 μ g을 처리하여 공초점 현미경 관찰 결과를 보여준다. 도 10과 비교하여 Affibody_{HER2}-액포의 형광신호가 없음을 보여준다.

5 【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

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

10

실시예

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “%”는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

15

실시예 1: 글루탐산 또는 글루탐산염으로부터 감마아미노부틸산의 생산

1-1. 유기용매가 처리된 다양한 전세포 축매를 이용한 글루탐산으로부터 감마아미노부틸산의 생산

20

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM101, *Lactobacillus paracasei* 및 *Lactobacillus coryniformis*(KCTC)를 배양하여 회수한 뒤 유기용매 처리균과 대조균으로 나누었다. 유기용매 처리균의 경우 회수한 균체에 톨루엔 0.5 %(v/v)을 처리하고 30°C, 200 rpm 조건에서 10 분간 교반하여 미생물의 선택적 투과성을 파괴한 후에 멸균수에 현탁하였다. 대조균은 특별한 처리 과정 없이 바로 멸균수에 현탁하였다. 상기에서 준비한 각각의 미생물 현탁액에 피리독살-5-인산(Pyridoxal 5-phosphate:PLP, Sigma Aldrich) 40 μ M 을 첨가하고, 글루탐산(대상주식회사) 33 wt%을 첨가하여 감마아미노부틸산 생산속도를 측정하였다. 실험 결과를 비교하기 위해

30 유기용매가 처리된 실험균의 생산속도 값에 처리하지 않은 실험균의 생산속도 값을 나누었다. 실험 결과, 도 1 과 같이 유기용매인 톨루엔이

처리된 균은 비처리균보다 약 1.2-5.5 배 감마아미노부틸산의 생산 속도가 향상된 것을 알 수 있었다.

1-2. 유기용매에 따른 전세포 추출물의 글루탐산염으로부터

5 감마아미노부틸산의 생산

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체(*Escherichia coli*)를 배양하고 회수 한 이후 유기용매를 사용하여 미생물의 선택적 투과성을 파괴한 뒤 글루탐산나트륨(Sigma Aldrich)으로부터 감마아미노부틸산의 생산 속도를 분석하였다. 사용된 유기 용매는 모두 소수성 유기용매로
10 톨루엔, 클로로포름, 자일렌 및 벤젠이었다. 처리 조건은 미생물 현탁액에 0.5%(v/v)의 각 유기용매를 처리하고 30°C, 200 rpm 조건에서 10 분간 교반하였다. 상기 준비된 각각의 미생물 현탁액에 PLP 40 μ M 을 첨가하고, 글루탐산나트륨 1%(v/v)을 첨가하여 감마아미노부틸산
15 생산속도를 비교하였다. 그 결과는 도 2 에서 나타내는 것과 같이 소수성 유기용매 처리 후에 감마아미노부틸산의 생산 속도가 약 5-8 배 증가하였다.

1-3. 유기용매 처리로 인한 균체의 GABA 생산활성 증가

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체(*Escherichia coli*)를 배양한 뒤 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 증류수로 한 번 세척한 뒤
20 유기용매와 교반하여 선택적 투과성을 파괴하였다. 이 때 사용된 유기용매는 상기 실시예 1-2 에서 가장 빠른 감마아미노부틸산 생산 속도를 나타낸 톨루엔을 사용하였다. 톨루엔을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군으로 나누었으며, 톨루엔을 처리하는 실험군은 미생물 현탁액에 0.5%(v/v)의 톨루엔을 첨가한 뒤 37°C, 150 rpm 에서 10 분간 교반하였다.
25 교반이 끝난 후 균체를 증류수로 1 회 세척하였다. 상기 준비된 균체들을 아세트이트 완충 용액(pH 4.6, 200 mM)에 현탁한 뒤 PLP 0.04 mM 및 글루타민산나트륨 1%(v/v)를 첨가하여 GABA 생산 속도를 측정하였다. 그 결과 톨루엔이 처리된 균체의 GABA 생산 활성은 5.72 μ mol GABA/mg
30 dcw/min 이었고, 처리 되지 않은 균체의 활성은 0.75 μ mol GABA/mg dcw/min 이었다.

1-4. 완충용액의 pH에 따른 감마아미노부틸산 생산속도 향상

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체(*Escherichia coli*)를 배양하고 배양된 균체에 유기용매인 톨루엔을 실시예 3에서 제시된 방법과 동일한 방법을 사용하여 처리한 뒤 처리된 균체를 각각의 완충용액과
 5 멸균수에 현탁 하였다. 여기서 사용된 완충용액은 농도가 모두 100 mM이며, pH는 각각 4.5, 6.0, 7.0 및 8.0 이었다. pH가 4.5인 완충용액의 제조는 초산을 사용하여 이루어 졌으며, pH가 6.0, 7.0 및 8.0인 완충용액의 제조는 인산을 사용하였다. 상기와 같이 준비된 전세포
 10 추출액의 현탁용액에 PLP 0.04 mM-첨가량을 첨가하고, 여기에 10 wt%의 글루탐산을 첨가하여 반응을 개시하였다. 이후 초기 감마아미노부틸산 생산속도를 측정하여 pH에 따른 감마아미노부틸산 생산속도 변화를 분석하였다. 실험 결과, 도 3에서 나타내는 바와 같이 pH 6의 완충용액을 사용하고, 초기 pH가 3.9가 되었을 때 반응속도가 최대를 나타내었으며, 그 값은 116 g GABA/L/h 이었다.

1-5. 유기용매가 처리된 균체를 사용한 GABA 생산

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체(*Escherichia coli*)를 배양하여 균체를 회수하였다. 이 때 회수된 건조 균체의 양은 3.6 g 이었다. 균체를 멸균수에 현탁한 뒤 톨루엔 0.5%(v/v)을 첨가하고 37℃
 20 에서 10 분간 교반하였다. 톨루엔 처리가 끝나면 원심분리를 하여 균체를 회수하고, 증류수 이용하여 한 번 더 세척하였다. 회수된 균체를 인산 완충용액(pH 6.0, 100 mM) 2 L에 현탁한 뒤 반응조에 투입하고, 여기에 PLP 0.04 mM, 글루타민산 1 kg 및 소포제(Polyoxyalkylene Glycol) 50 ppm을 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응조건은 30℃, 200 rpm 이었다.
 25 반응시작 시 pH가 4.5 였으며, 8 hr 만에 잔류 글루타민산의 농도가 1 wt% 미만으로 감소하였고, 이 때 pH는 5.8 이었다. 여기에 염산용액을 첨가하여 pH를 5.5 까지 감소시킨 뒤 1 hr 더 반응시켜, 잔존한 글루타민산을 모두 GABA로 전환하였다. 생성된 GABA의 총 중량은 690 g 이었으며, 몰 전환율은 98%, 소요된 시간은 총 9 hr 이었다.

1-6. 유기용매가 처리된 균체를 사용한 고농도 GABA 생산

글루탐산 디카르복실라제를 보유하고 있는 균체(*Escherichia coli*)를 배양한 뒤 배양조에 톨루엔 0.25 %(v/v)을 투입하고 30℃에서 10 분간 교반하였다. 교반 후 원심분리를 통해 미생물을 회수하였으며, 이 때 회수된 건조 균체의 중량은 약 50 g 이었다. 미생물을 완충 용액 또는

5 증류수에 현탁한 이후 반응조에 투입하고, PLP 0.04 mM, 글루타민산 8 kg 및 소포제(Polyoxyalkylene Glycol) 500 ppm 을 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응조건은 30℃, 200 rpm 이었으며, 이 외에는 어떤 요소도 조절하지 않았다. 반응시작 시의 pH 는 4.0 이었으며, 반응시작 10 hr 를 경과하여 잔류 글루타민산 농도가 1 wt% 미만으로 감소하였고, 이 때 pH 는

10 5.87 이었다. 이후 염산용액을 첨가하여 pH 를 5.6 까지 감소시킨 후 2 hr 더 반응시켜 잔존한 글루타민산을 모두 GABA 로 전환하였다(도 4). 생성된 GABA 의 농도는 34 wt% 이었으며, 몰 전환율은 98%, 소요된 총 시간은 12 hr 이었다.

15 1-7. 반응 종결 후 회수된 균체를 이용한 GABA 생산

상기 실시예 1-2 와 동일한 방법으로 미생물 3.6 g 에 톨루엔 0.5 %(v/v)을 처리한 다음, 0.5 kg 의 글루타민산을 기질로 하는 GABA 생성 반응을 실시하였다. 반응이 종결 된 9 시간 뒤에 4000 rpm, 10 min 조건에서 원심분리를 수행하여 미생물을 회수하고, 상기 실시예 1 과 같이

20 증류수로 세척하여 아세트산 완충용액(pH 4.6, 200 mM)에 재현탁한 다음 PLP 0.04 mM 과 글루타민산나트륨 1% (v/v) 을 첨가하여 GABA 생산활성을 측정하였을 때, 그 값은 4.80 $\mu\text{mol GABA/mg dcw/min}$ 이었다. 상기 GABA 전환반응에 이용된 균체를 분리 회수한 다음, 회수 균체 2 g 를 새로이 준비된 균체가 들어 있는 반응조에 투입한 뒤 실시예 1-2 와 같은 동일한

25 반응을 다시 수행하였을 때 전환율은 상기 제 1 차 반응과 거의 동일하였고 총 반응 시간은 6 hr 로 단축되었다.

실시예 2: 배지로부터 감마아미노부틸산의 수득

상기 실시예 1 의 배양액의 균체를 제거하고, 가열 처리 후 탈색

30 과정을 수행하였다. 원심 분리하여 균체를 분리한 후 가열처리 한 배양액을 교반기를 이용하여 활성탄으로 탈색 처리 하였다. 탈색은

배양액에 1.0-15.0% (활성탄 중량/감마아미노부틸산 중량)의 활성탄을 첨가하였다. 가열 처리 후 생성된 변성 단백질은 활성탄과 같이 여과 분리하였으며 농축하여 2-피롤리돈 합성에 사용하였다. 그 결과, 활성탄 양이 증가하면 배양액의 색이 투명해 지는 경향을 보였으며 표 1 은 초기 농도 30.0% (감마아미노부틸산 중량/배양액 부피)의 배양액에 활성탄을 이용하여 탈색할 경우, 사용된 활성탄의 농도에 따른 피롤리돈 합성 회수율을 나타낸 것으로, 사용된 활성탄의 농도가 증가할수록 GABA 의 손실률이 증가하여 회수율이 감소하였으며 활성탄이 부족할 경우 불순 색소를 충분히 제거하지 못해 합성 회수율이 감소하였다. 피롤리돈 합성은 하기 실시예 3-1 에 기재된 방법에 따라 실시되었다.

【표 1】

활성탄 (활성탄 w/GABA w %)	1	2	5	10	15
2-피롤리돈 합성 회수율	90.8	94.8	92.4	90.1	90.1

감마아미노부틸산(4-아미노부틸산)의 손실을 최소화하면서 가장 효과적으로 배양액에 존재하는 불순색소를 제거하기 위해서는 2.0% (중량/중량) 활성탄을 이용하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

실시예 3: 감마아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

실험예: 반응조건에 따른 감마아미노부틸산의 전환 효율 분석

본 발명자들은 감마아미노부틸산(4-아미노부틸산)이 202℃의 녹는점에서 2-피롤리돈과 물로 전환되는 사실로부터 다양한 실험을 진행하였으며, 그 결과 2-피롤리돈의 존재 하에서 4-아미노부틸산이 118℃-120℃에서 용해되기 시작하며 이때 용해된 용액은 2-피롤리돈과 물로 전환하는 사실을 발견하였다. 또한 반응 중에 생성되는 물을 감압 (10-110 mmHg) 하에서 제거 하면, 반응시간이 단축되고 4-아미노부틸산이 2-피롤리돈으로 전환되는 전환율도 높아지는 결과를 얻었으며, 반응 온도가 높을수록 반응 시간이 단축된다는 사실도 발견하였다(표 2-4). 아래의 표 2-4 는 4-아미노부틸산과 2-피롤리돈을 중량비로 1:1 혼합하여 각각 120℃(표 2), 130℃(표 3) 및 140℃(표 4)에서 반응하면서 대기압과 감압 조건에서 시간별로 4-아미노부틸산의 잔류량(%)을 확인한 결과이다. 4-

아미노부틸산의 잔류량은 HPLC(Hewlett Packard 1050 series, Hewlett Packard)로 분석하였다. 반응 중에 부반응은 없었으며, 반응액에서 4-아미노부틸산은 감소하고 2-피롤리돈이 증가하였다.

【표 2】

반응 온도	감압 조건	반응 시간				
		2 시간	4 시간	6 시간	8 시간	10 시간
120℃	대기압	36.3%	18.4%	5.2%	1.5%	0.9%
	감압	29.4%	6.5%	1.2%	0.3%	-

5 【표 3】

반응 온도	감압 조건	반응 시간(시간)						
		1 시간	2 시간	3 시간	4 시간	5 시간	6 시간	7 시간
130℃	대기압	35.7%	25.7%	17.1%	11.1%	5.1%	2.7%	2.1%
	감압	26.8%	19.7%	8.7%	4.0%	0.9%	0.4%	-

【표 4】

반응 온도	감압 조건	반응 시간(시간)				
		1 시간	2 시간	3 시간	4 시간	5 시간
140℃	대기압	25.7%	10.9%	1.5%	1.3%	1.2%
	감압	21.1%	0.7%	0.3%	-	-

3-1. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조(방법 1)

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈(주대상) 500 g 를
 10 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산(주대상) 600 g 를 투입하였다.
 감압 (60-80 mmHg) 하에서 온도를 135℃-145℃로 올리고 교반하면 4-
 아미노부틸산이 용해되면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 반응 중
 생성된 물은 감압 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 반응액이
 투명해지면 반응이 종결되었으므로 진공도를 서서히 높이면서 감압 (10-20
 15 mmHg) 하에서 반응액 속에 남아있는 잔류 수분을 제거하였다. 이후 생성된

2-피롤리돈을 감압증류(1-10 mmHg)하여 수집함으로써 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 980 g(수율 98.5%, 순도 99.5%)을 얻었다.

3-2. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조(방법 2)

5 4-아미노부틸산 1200 g 과 냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기를 준비하였다. 준비된 2 L 의 반응기에 먼저 4-아미노부틸산 200 g 를 투입하였다. 반응기의 온도를 4-아미노부틸산의 녹는점(202℃)까지 올려 4-아미노부틸산이 녹으면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 반응기의 온도를 자연 냉각하면서 여기에 4-아미노부틸산 200 g 을 더 투입하고 용해시켰다. 나머지 4-아미노부틸산 800 g 도 반응기의 온도 135 -145℃ 에서 투입하여 용해시켰다. 반응 중에 생성된 물은 대기압 또는 감압 (40-60 mmHg) 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 반응액이 투명해지면 반응이 종결되었으므로 진공도를 서서히 높이면서 20-30 mmHg 하에서 반응액 속에 남아있는 잔류 수분을 제거하였다. 이후 생성된 2-피롤리돈을 감압증류(1-10 mmHg) 하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 951 g(수율 96%, 순도 99.5%)을 수득하였다. 반응 중에 생성된 물을 대기압에서 제거한 경우에도, 위의 수율 및 순도와 거의 유사한 값으로 2-피롤리돈을 얻을 수 있었으나, 반응시간이 감압 조건보다 2 시간이 더 길었다.

3-3. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조(방법 3)

20 냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 교반기를 멈춘 상태에서 4-아미노부틸산 1200 g 을 투입하였다. 반응기의 온도를 200℃-210℃까지 올리면 일부의 4-아미노부틸산이 녹으면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 교반기를 서서히 가동하여 교반상태를 점검하여 교반이 가능하면 교반을 시작하였다. 교반을 하면서 반응기의 온도를 자연냉각하고, 반응기의 온도 135-145℃에서 나머지 4-아미노부틸산을 용해시켰다. 반응 중에 생성되는 물은 대기압 또는 40-60 mmHg 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 반응액이 투명해지면 반응이 종결되었으므로 진공도를 서서히 높이면서 감압 하에서 반응액 속에 남아있는 잔류 수분을 제거하였다. 이후 생성된 2-피롤리돈을 감압증류(1-10 mmHg)하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 960 g(수율 96.9%, 순도 99.5%)을 수득하였다. 반응 중에 생성된 물을

대기압에서 제거한 경우에도, 위의 수율 및 순도와 거의 유사한 값으로 2-피롤리돈을 얻을 수 있었으나, 반응시간이 감압 조건보다 2 시간이 더 길었다.

5 3-4. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈 500 g 를 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산 600 g 를 투입하였다. 온도를 118℃-120℃로 올리고 이 온도에서 약 10 시간 동안 교반하였다. 반응액의 샘플을 취해 HPLC 로 분석하여 4-아미노부틸산의 잔류 농도 0.9%를 확인하고
10 반응을 종료하였다. 반응 후 생성된 물은 20-30 mmHg 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 이후 반응기에 남아 있는 2-피롤리돈을 감압증류(1-10 mmHg) 하여 수집하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 974 g(수율 97.9%, 순도 99.4%)을 수득하였다.

15 3-5. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈 500 g 를 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산 600 g 를 투입하였다. 감압 (20-30 mmHg) 하에서 온도를 118℃-120℃로 올리고 교반하면 4-아미노부틸산이 용해되면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 생성된 물은 감압 하에서 증류
20 장치를 통해 제거하였다. 약 8 시간 반응 후 반응액의 샘플을 취해 HPLC 로 분석하여 4-아미노부틸산의 잔류 농도 0.3%를 확인하고 반응을 종료하였다. 반응액의 진공도를 서서히 높이면서 남아있는 잔류 수분을 완전히 제거하였다. 이후 반응기에 남아 있는 2-피롤리돈을 감압 증류(1-10 mmHg) 하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 985 g(수율 99%, 순도
25 99.8%)을 수득하였다.

3-6. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈 500 g 를 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산 600 g 를 투입하였다. 감압 (30-50 mmHg) 하에서 온도를 128℃-132℃로 올리고 교반하면 4-아미노부틸산이 용해되면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 생성된 물은 감압 하에서 증류

장치를 통해 제거하였다. 약 8 시간 반응 후 반응액의 샘플을 취해 HPLC 로 분석하여 4-아미노부틸산의 잔류 농도 0.4%를 확인하고 반응을 종료하였다. 반응액의 진공도를 서서히 높이면서 남아있는 잔류 수분을 완전히 제거하였다. 이후 반응기에 남아 있는 2-피롤리돈을 감압 증류(1-10 mmHg) 수집하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 980 g(수율 98.5%, 순도 99.6%)을 수득하였다.

3-7. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈 500 g 를 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산 600 g 를 투입하였다. 감압 (60-80 mmHg) 하에서 온도를 138℃-142℃로 올리고 교반하면 4-아미노부틸산이 용해되면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 생성된 물은 감압 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 약 3 시간 반응 후 반응액의 샘플을 취해 HPLC 로 분석하여 4-아미노부틸산의 잔류 농도 0.3%를 확인하고 반응을 종료하였다. 반응액의 진공도를 서서히 높이면서 남아있는 잔류 수분을 완전히 제거하였다. 이후 반응기에 남아 있는 2-피롤리돈을 감압 증류 (1-10 mmHg) 수집하여 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 985 g(수율 99%, 순도 99.1%)을 수득하였다.

3-8. 4-아미노부틸산으로부터 2-피롤리돈의 제조

냉각 증류 장치가 부착된 2 L 반응기에 2-피롤리돈 500 g 를 넣고 교반하였다. 여기에 4-아미노부틸산 600 g 를 투입하였다. 감압 (70-110 mmHg) 하에서 온도를 145℃-148℃로 올리고 교반하면 4-아미노부틸산이 용해되면서 2-피롤리돈과 물이 생성되었다. 생성된 물은 감압 하에서 증류 장치를 통해 제거하였다. 약 2 시간 반응 후 반응액의 샘플을 취해 HPLC 로 분석하여 4-아미노부틸산의 잔류 농도 0.3%를 확인하고 반응을 종료하였다. 반응액의 진공도를 서서히 높이면서 남아있는 잔류 수분을 완전히 제거하였다. 이후 반응기에 남아 있는 2-피롤리돈을 감압 증류 (1-10mmHg) 하여 수집함으로써 무색의 액체인 고순도 2-피롤리돈 978 g(수율 98.3%, 순도 99.3%)을 수득하였다.

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

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 미생물의 액포 표면에 목적 단백질을 전시(display)하는 방법:

5 (a) 목적 단백질 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

(b) 상기 벡터를 이용하여 액포를 포함하는 미생물을 형질전환시키는 단계; 및

10 (c) 상기 형질전환된 미생물에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계, 상기 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 상기 융합 단백질의 목적 단백질은 상기 액포의 표면에 전시된다.

【청구항 2】

15 다음 단계를 포함하는 약물 전달체를 제조하는 방법:

(a) 단백질 약물 및 액포 타겟팅 막통과(transmembrane) 단백질을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제작하는 단계;

20 (b) 상기 벡터를 이용하여 액포를 포함하는 미생물을 형질전환시키는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 미생물에서 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계, 상기 발현된 융합 단백질은 액포로 타겟팅 되며 상기 융합 단백질의 단백질 약물은 상기 액포의 표면에 전시된다.

25 【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질은 PHO8 단백질, CPS1 단백질, VAM3 단백질, NYV1 단백질 또는 VPH1 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

30 【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질은 PHO8 단백질인

것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 목적 단백질 또는 단백질
5 약물은 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질의 N-말단에 결합되어 있는 것을
특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 목적 단백질 및
10 액포 타겟팅 막통과 단백질은 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 미생물의 액포 표면에 전시된
목적 단백질 또는 단백질 약물은 액포막의 바깥쪽을 향한 구조의
15 토폴로지(topology)를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 액포를 포함하는 미생물은
진균 또는 박테리아인 것을 특징으로 하는 방법.
20

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 액포를 포함하는 미생물은 진균인 것을
특징으로 하는 방법.

25 【청구항 10】

제 9 항에 있어서, 상기 진균은 효모인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (c) 이후에 상기
30 액포를 분리하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

액포 타겟팅 막통과 단백질에 결합되어 있으며 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질에 의해 액포의 표면에 전시된 단백질 약물을 포함하는 약물 전달체.

5

【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질은 PH08 단백질, CPS1 단백질, VAM3 단백질, NYV1 단백질 또는 VPH1 단백질인 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

10

【청구항 14】

제 13 항에 있어서, 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질은 PH08 단백질인 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 15】

제 12 항에 있어서, 상기 단백질 약물은 상기 액포 타겟팅 막통과 단백질의 N-말단에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 16】

제 12 항에 있어서, 상기 단백질 약물 및 액포 타겟팅 막통과 단백질은 링커로 연결된 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 17】

제 12 항에 있어서, 상기 액포 표면에 전시된 목적 단백질 또는 단백질 약물은 액포막의 바깥쪽을 향한 구조의 토폴로지(topology)를 갖는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 18】

제 12 항에 있어서, 상기 액포는 진균 또는 박테리아의 액포인 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

【청구항 19】

제 18 항에 있어서, 상기 액포는 진균의 액포인 것을 특징으로 하는
약물 전달체.

5 **【청구항 20】**

제 19 항에 있어서, 상기 액포는 효모의 액포인 것을 특징으로 하는
약물 전달체.

Fig. 1

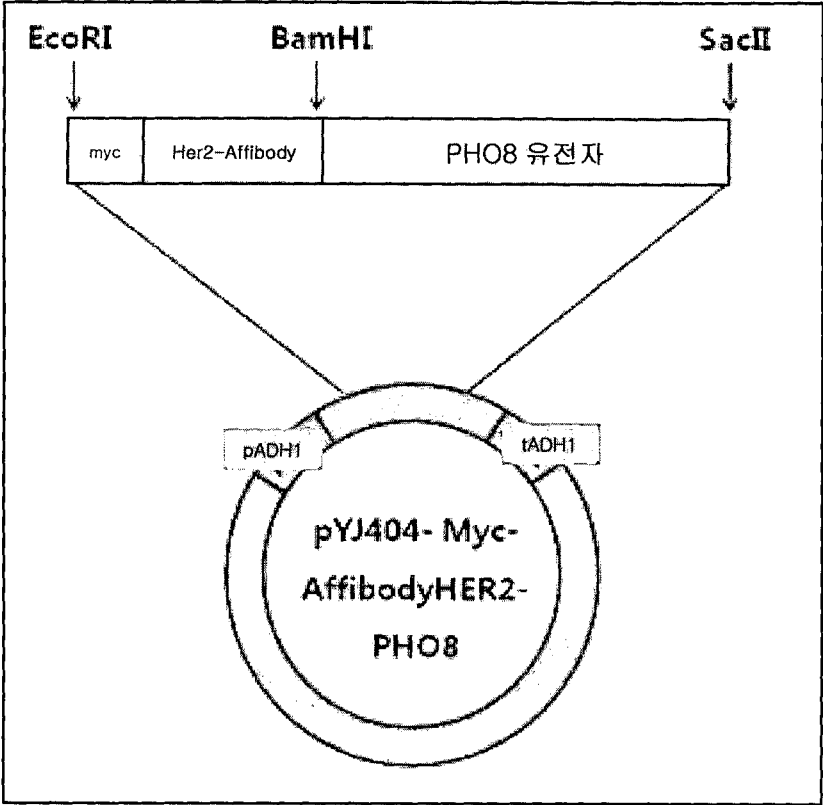


Fig. 2

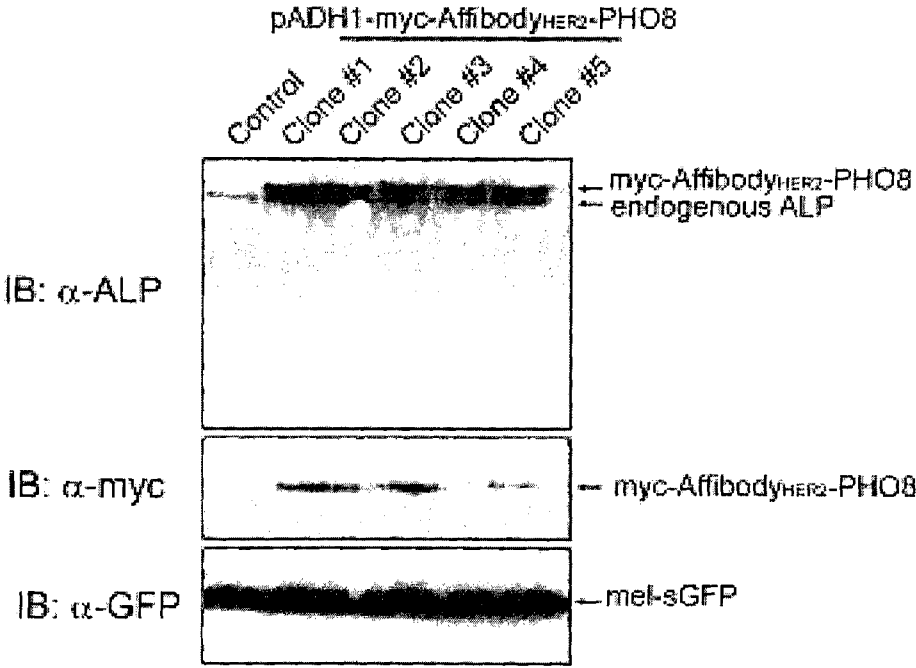


Fig. 3

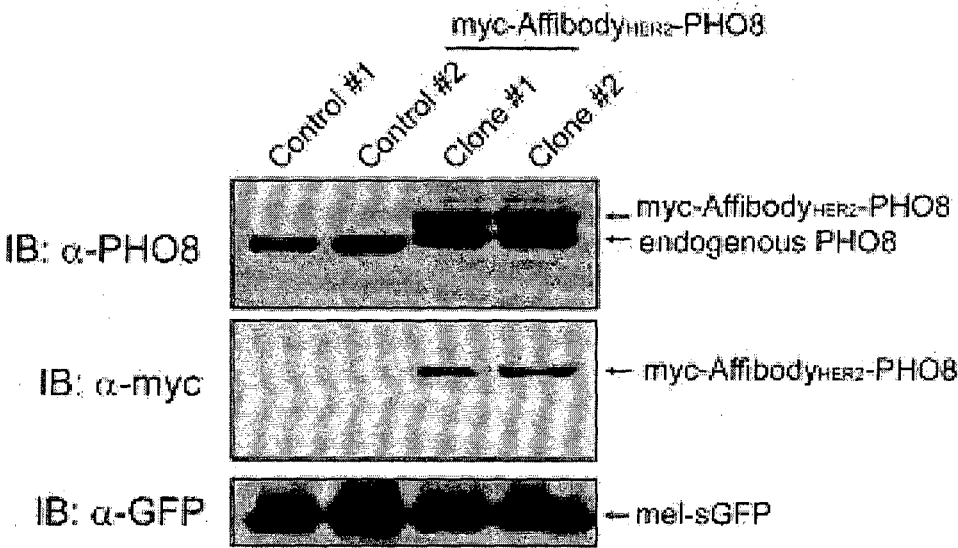


Fig. 4

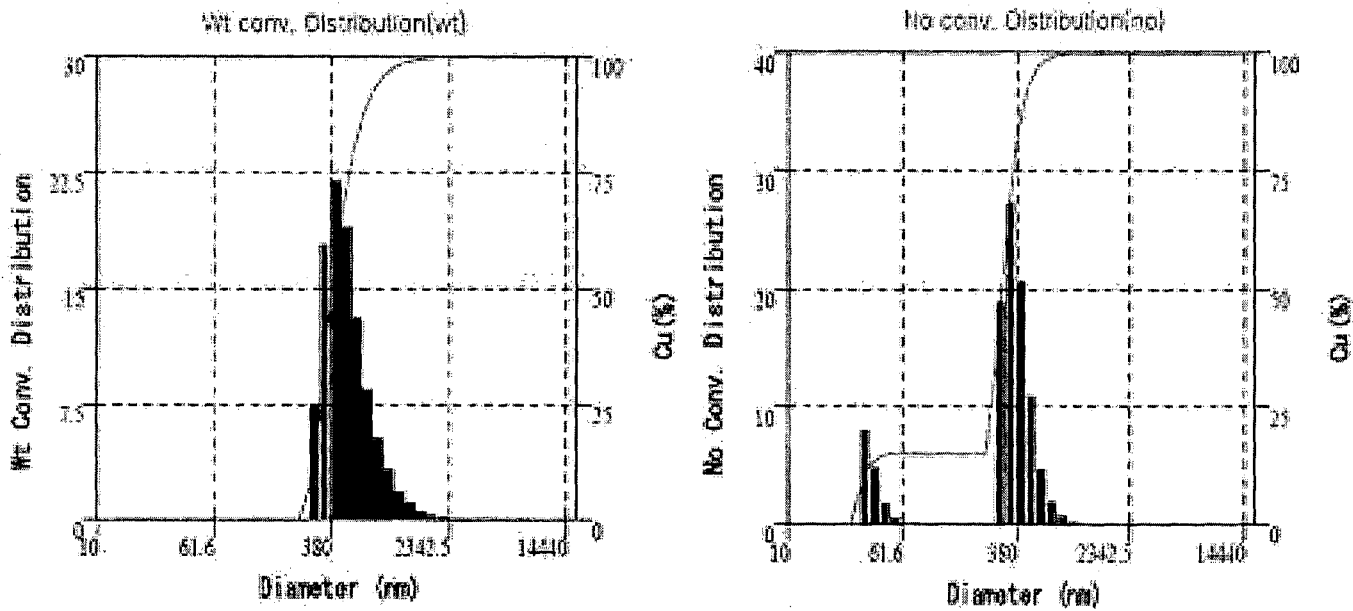


Fig. 5

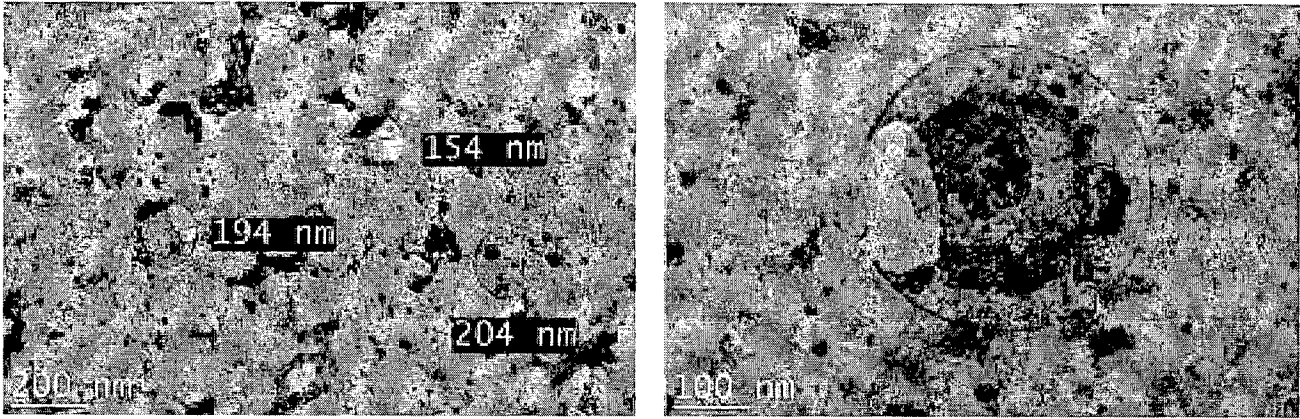
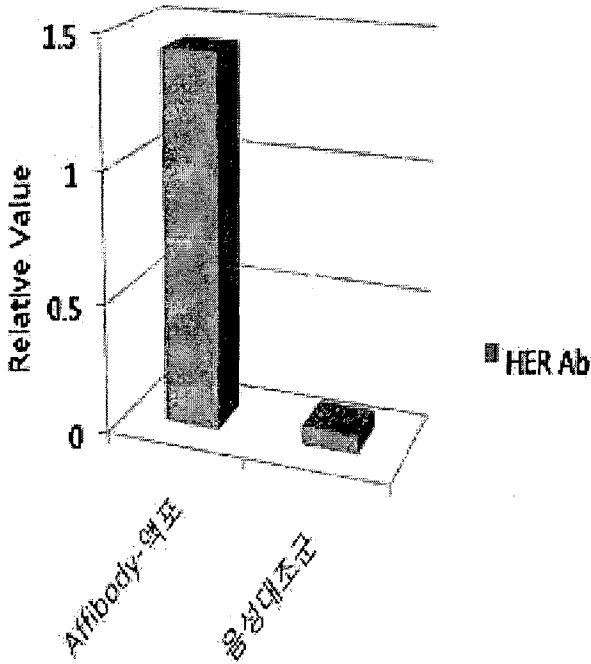


Fig. 6



4/6

Fig. 7

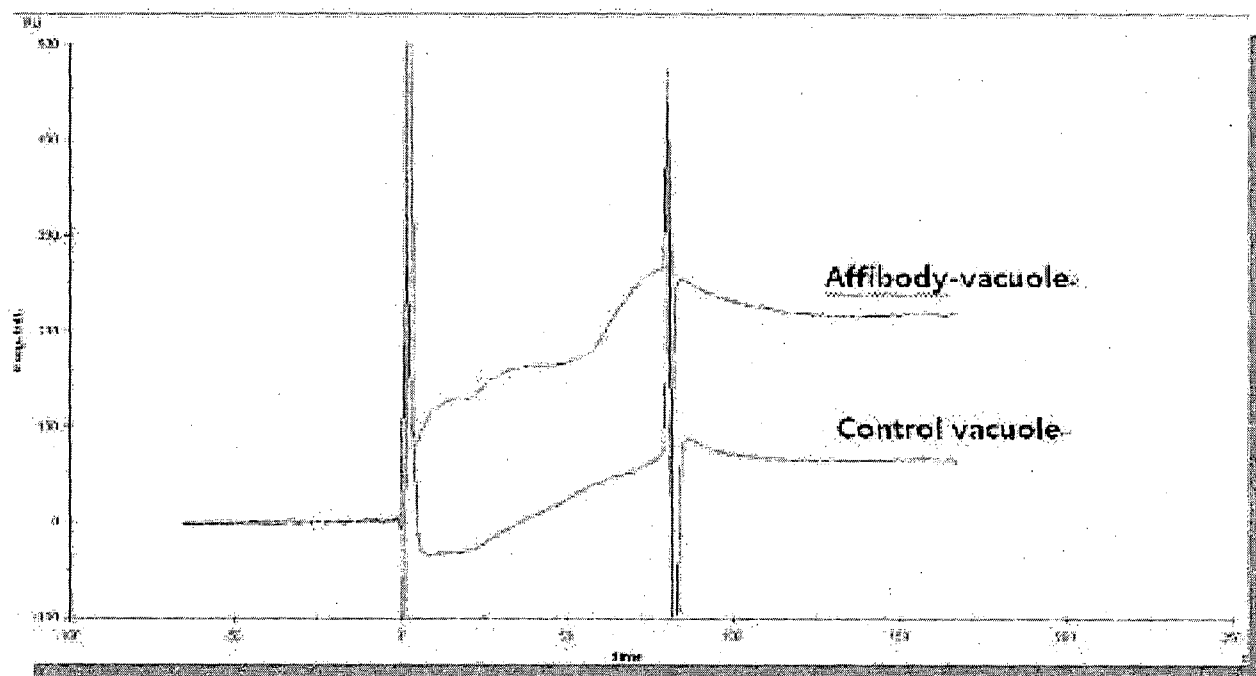
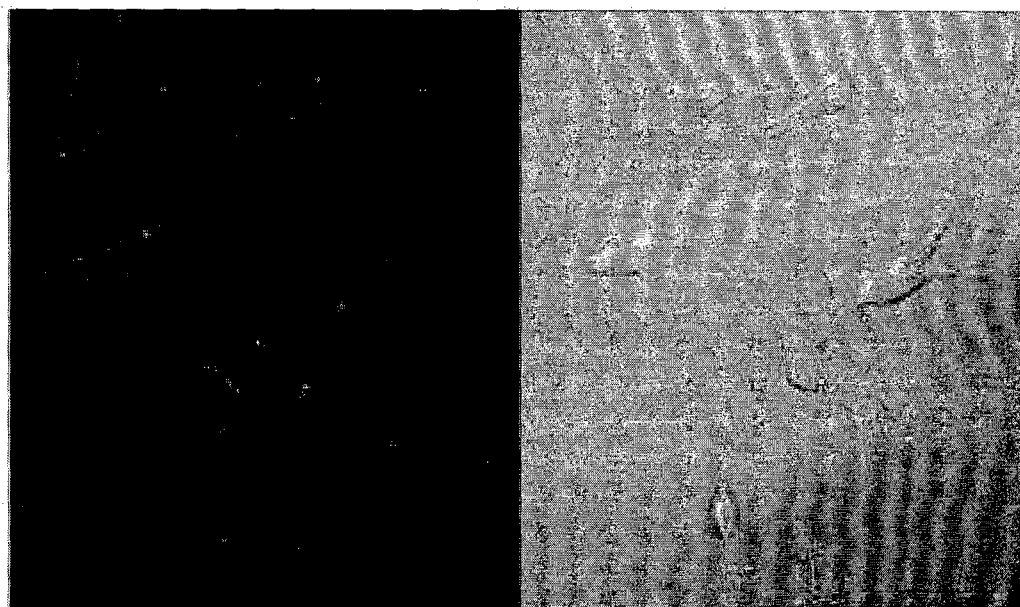


Fig. 8



5/6

Fig. 9

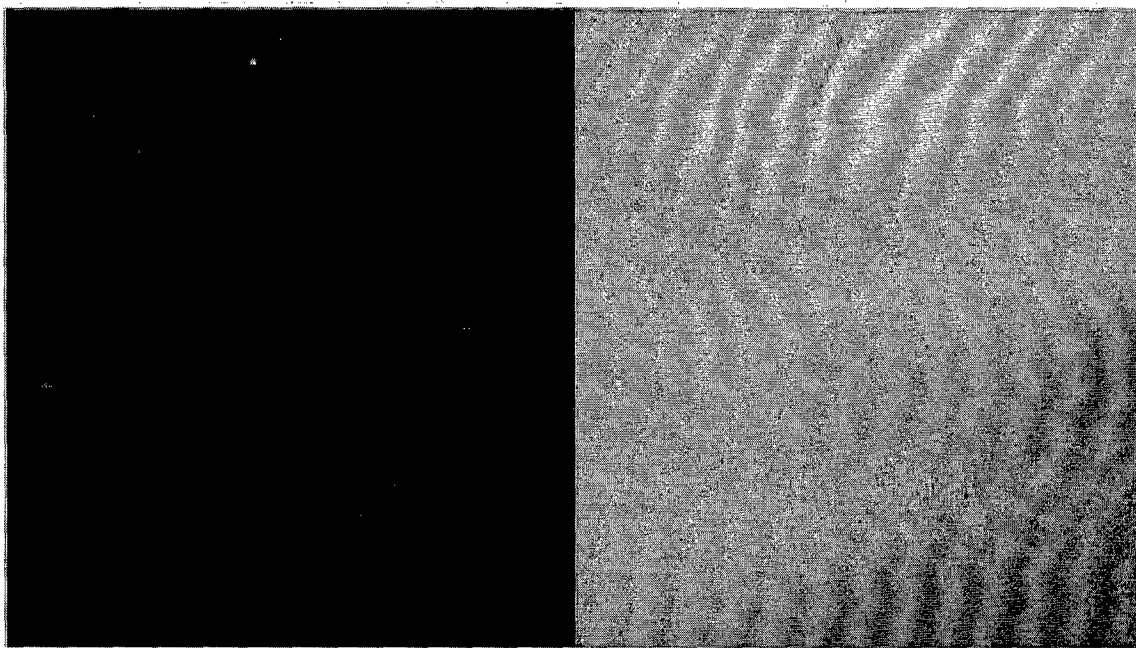
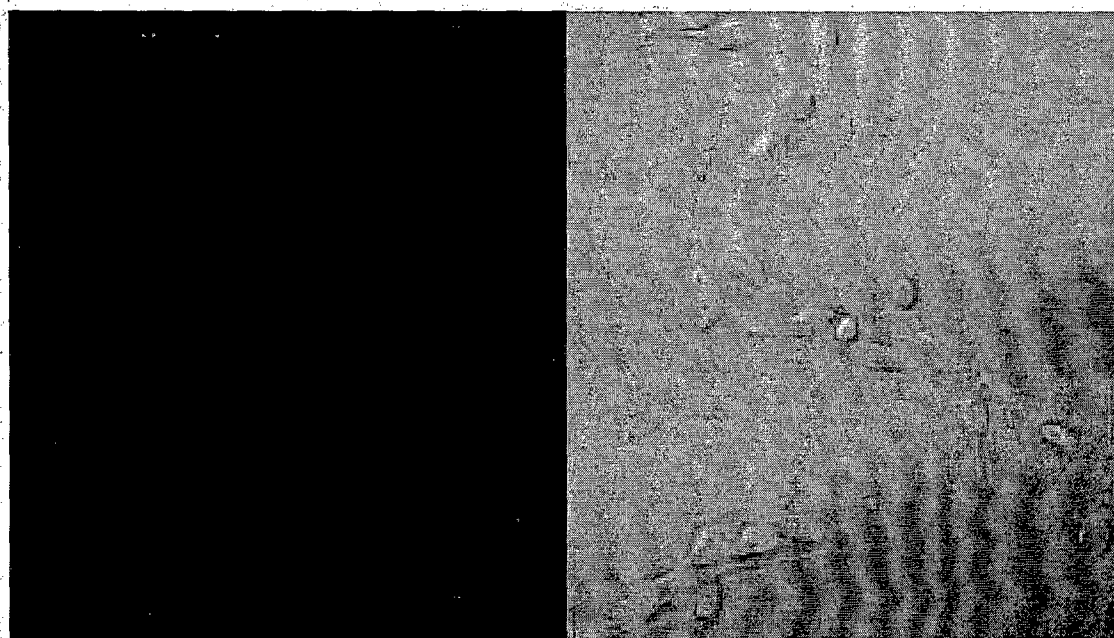


Fig. 10



6/6

Fig. 11

