(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월24일
(11) 등록번호 10-1942093
(24) 등록일자 2019년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2402 (2013.01)
C12N 5/0025 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0001791
(22) 출원일자 2018년01월05일
심사청구일자 2018년01월05일
(56) 선행기술조사문헌
US7371366 B2
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
김동일
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 1302호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
최홍열
인천광역시 연수구 새말로 154, 305동 510호(연수동, 연수주공3차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

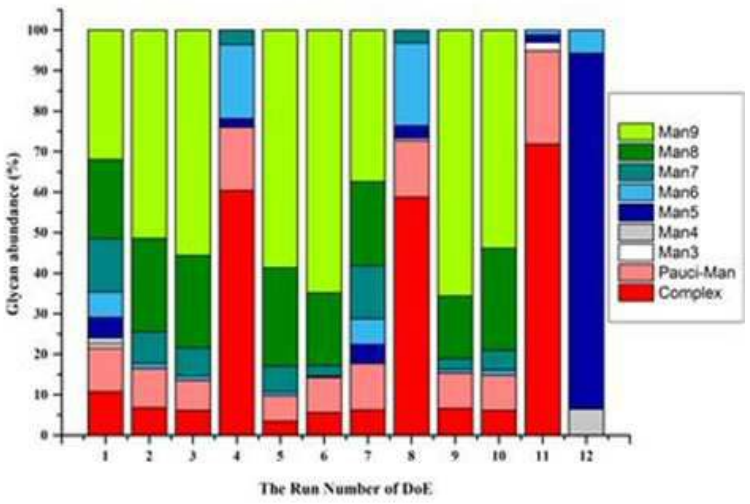
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 **만노시다제 억제제를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물 및 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 만노시다제 억제제는, 형질전환 벼 세포배양 시스템에서 생산하는 치료용 효소인 인간 리소좀 효소의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있다. 특히 만노즈가 7개 이상인 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 현저하게 증대시켜, M6P(mannose-6-phosphate) 콘쥬게이션(conjugation)에 유리한 당쇄구조 형성을 증대시킬 수 있다. 또한 본 발명의 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물 및 생산 방법은 동물원성 물질을 전혀 사용하지 않아 안전하게 치료용 효소의 생산 시스템에서 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12Y 302/0102 (2013.01)
(72) 발명자
김선달
인천광역시 연수구 한진로 65-4, 2동 B01호(옥련동, 송광빌라)
이치헌
인천광역시 남구 재넘이길 111-7, 203호(용현동)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020140037082 A
BMB Rep., 2015, Vol. 48, No. 8, pp.438-444.
Glycoconj J, 2009, Vol. 26, pp. 1109-1116.
Journal of Biotechnology, 2017, Vol. 249, pp. 42-50.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711060374
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발
연구과제명 글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 인하대학교
연구기간 2017.11.20 ~ 2018.11.19
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

키프넨신 및 스와인소닌을 1 : 1 내지 1 : 4 의 혼합 농도비로 포함하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 키프넨신은 조성물 내 2.5 내지 5 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 키프넨신은 만노시다제 I 을 억제하는 것을 특징으로 하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 스와인소닌은 조성물 내 5 내지 10 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 스와인소닌은 만노시다제Ⅱ를 억제하는 것을 특징으로 하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 인간 리소좀 효소는 산 알파-글루코시다제(Acid alpha glucosidase, GAA)인 것을 특징으로 하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 조성물.

청구항 10

키프넨신 및 스와인소닌을 1: 1 내지 1 : 4 의 혼합 농도비로 포함하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 증대용 배지 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

키프넨신 및 스와인소닌을 1: 1 내지 1 : 4 의 혼합 농도비로 포함하는 배지에서 인간 리소좀 효소를 생산하는 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 인간 리소좀 효소 내 8 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 증대 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물 및 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 리소좀 축적 질환(lysosomal storage disorder)은 리소좀효소의 유전적 이상으로 인해 분해되지 않고 남은 기질이 리소좀내에 축적되어 세포기능에 장애가 일어나는 질환의 총칭이다. 이러한 리소좀 축적 질환의 치료는 효소대체치료법으로 이루어지고 있으며, 효소대체치료법이란 리소좀 축적 질환 환자에게 결핍된 특정한 효소를 *in vitro* 상에서 합성된 기능성 효소로 대체시키는 치료법을 말한다.

[0004] 치료에 사용되는 효소의 경우, 단백질의 N-당쇄의 말단이 만노즈 혹은 만노즈-6-인산으로 노출되어야 목적 세포로의 전달이 가능하고 치료효과가 있다. 또한 이러한 질환은 유아기 때 치료를 받을수록 치료 효과가 좋다고 알려져 있다. 현재 효소 대체 치료가 가능한 리소좀 축적 질환에는 고셔병(Gaucher disease), 파브리병(Fabry disease), 폼페병(Pompe disease), 뮤코다당체침착병(Mucopolysaccharidosis, MPS) 1형, 2형, 6형이 있다. 이들 중 폼페병은 리소좀 효소인 산 알파-글루코시다제(acid-α glucosidase, GAA)의 결핍을 특징으로 한다.

[0005] 한편, 대다수의 리소좀 축적 질환 치료제는 동물세포배양을 통해 생산한다. 하지만 상기 동물세포배양 시스템은 동물원성 바이러스 등에 대한 오염 위험이 있어 안전하지 못하다는 단점이 있다. 이와 관련하여 2009년 Genzyme 사의 동물세포배양 생산시설에서 동물원성 바이러스가 발견되어 고셔병 치료제인 Cerezyme™과 파브리병 치료제 Fabrazyme™의 생산이 중단된 바 있다. 특히, 리소좀 축적 질환 등의 희귀병에 대한 치료제는 대체의약품의 개발이 부족한 실정이며 치료제 생산에 차질이 생길 경우 희귀병 환자들은 치료를 받지 못하게 된다. 따라서 동물세포배양 시스템을 대체할 수 있는, 동물원성 오염원으로부터 안전하게 대체의약품 생산을 할 수 있는 방안 마련이 필수적이다.

[0006] 반면 식물세포배양 시스템은 동물원성 물질을 전혀 사용하지 않기 때문에 안전하고, 다양한 전략으로 글리칸 제어가 가능하다는 장점이 있으며 cGMP 시설의 적용이 용이한 시스템이다. Protalix 사는 당근세포배양 시스템을 이용하여 고셔병 치료제 ELELYSO™를 개발하였고, 2012년 최초로 FDA로부터 허가를 받았다. 이는 식물세포배양 시스템이 희귀병 치료제 생산에서 동물세포배양 시스템을 대체할 수 있는 유용한 시스템이라는 것을 시사한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 식물세포배양 시스템 중 하나인 형질전환 벼 세포배양 시스템을 이용하여 연구하던 중, 만노시다제 억제제를 이용하여 형질전환 벼 세포배양에서 생산할 수 있는 인간 리소좀 효소의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 증대시킬 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은, 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소의 생산성 증대용 배지 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 리소좀 효소 내 고만노즈 타입 N-당쇄 증가용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는 배지에서 인간 리소좀 효소를 생산하는 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 만노시다제 억제제는, 형질전환 벼 세포배양 시스템에서 생산하는 치료용 효소인 인간 리소좀 효소의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있다. 특히 만노즈가 7개 이상인 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 현저하게 증대시켜, M6P(mannose-6-phosphate) 콘쥬게이션(conjugation)에 유리한 당쇄구조 형성을 증대시킬 수 있다. 또한 본 발명의 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물 및 생산 방법은 동물원성 물질을 전혀 사용하지 않아 안전하게 치료용 효소의 생산 시스템에서 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 만노시다제 억제제 처리에 따른 세포 중량 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 만노시다제 억제제 처리에 따른 세포 생존도 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 만노시다제 억제제 처리에 따른 목적단백질 생산량 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 변화를 MINITAB 14 등고선도를 통해 통계적으로 나타낸 도이다.

도 5는 만노시다제 억제제 처리에 의한 목적단백질 생산량을 MINITAB 14 등고선도를 통해 통계적으로 나타낸 도이다.

도 6은 만노시다제 억제제 처리에 따른 목적단백질의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 증대를 HPLC를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 도 7에서 각 피크에 해당하는 숫자가 나타내는 N-당쇄 구조를 나타낸 도이다.

도 9는 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 증대를 렉틴 블랏을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 야생형 형질전환 벼 세포 유래 목적단백질의 N-당쇄를 말디토프 질량분석(MALDI-TOF)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 만노시다제 억제제 처리에 의한 목적단백질의 N-당쇄 변화를 말디토프 질량분석(MALDI-TOF)을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 "N-당쇄"는 당단백질에 결합하는 당사슬의 일종으로, 단백질의 Asn 잔기에 결합한다. 또한 Man_3-$GlcNAc_2$를 기본으로 하여 복잡하고 다양한 구조로 발달이 이루어지며 단백질의 생합성과 동시에 발생한다. N-당쇄의 구조로는 콤플렉스 타입(Complex Type), 하이브리드 타입(Hybrid Type) 및 고만노즈 타입(High-Mannose Type)이 있다. 일반적으로 식물 내 식물분비 단백질 및 식물세포표면 단백질에서는 N-아세틸글루코사민과 갈락토오스까지 추가된 콤플렉스 타입 N-당쇄 구조가 나타난다.

[0021] 상기 "만노시다제 억제제"는 식물유래 알칼로이드의 일종으로, 당단백질의 당사슬 프로세싱에 있어 만노시다제를 저해시킴으로써 고만노즈 및 혼성형 당사슬을 형성시킬 수 있는 물질이다.

[0022] 상기 만노시다제 억제제는 키프넨신, 스와인소닌, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 만노시다제 억제제를 사용하면 치료용 효소인 인간 리소좀 효소의 N-당쇄를 고만노즈 타입으로 형성시킬 수 있으며, 특히 만노즈 함량이 높은 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 증대시킬 수 있다.

[0023] 상기 키프넨신은 1 내지 8 μM 의 농도로 조성물, 바람직하게는 배지 조성물 내에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 7 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 6 μM, 가장 바람직하게는 2.5 내지 5 μM의 농도로 포함될 수 있다. 또한 상기 키프넨신은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)와 골지(golgi) 내 만노시다제Ⅰ을 억제할 수 있다.

[0024] 상기 스와인소닌은 2 내지 14 μM 의 농도로 조성물, 바람직하게는 배지 조성물 내에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 3 내지 13 μM, 더욱 바람직하게는 4 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 5 내지 10 μM의 농도로 포함될 수 있다. 또한 상기 스와인소닌은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)와 골지(golgi) 내 만노시다제Ⅱ를 억제할 수 있다.

[0025] 상기 혼합물 내 키프넨신 및 스와인소닌은 1 : 1 내지 1 : 6 의 혼합비로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 1 : 1 내지 1 : 5, 더욱 바람직하게는 1 : 1 내지 1 : 4 의 혼합비로 포함될 수 있다.

[0026] 상기 키프넨신, 스와인소닌, 또는 이들의 혼합물을 상기와 같은 농도 또는 혼합비로 사용하면 형질전환 벼 세포 배양 시스템에서 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소를 효과적으로 생산할 수 있다.

[0027] 상기 고만노즈 타입 N-당쇄는 4 내지 9개의 만노즈를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 7 내지 9개의 만노즈를 포함할 수 있다.

[0028] 치료용 효소의 경우, 단백질의 N-당쇄 말단이 만노즈 혹은 만노즈-6-인산으로 노출되어야 목적 세포로의 전달이 가능하고 치료효과가 나타난다. 특히 리소좀 축적 질환 치료를 위해서는 만노즈-6-인산으로 노출되는 의약용 단백질의 생산이 필요하다. 그러나 상기 만노즈의 함량이 6개 미만, 예컨대 5개의 만노즈 구조일 경우에는 인산화되기 위한 자리가 부족하여 치료 효과가 떨어지게 된다. 따라서 본 발명에서 생산되는, 4 내지 9개의 만노즈, 바람직하게는 7 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄는 치료용 효소인 인간 리소좀 효소의 치료효과를 더욱 증대시킬 수 있다.

[0029] 상기 인간 리소좀 효소는 산 알파-글루코시다제(Acid alpha glucosidase, GAA)일 수 있다. 상기 산 알파-글루코시다제는 희귀질환인 폼페병의 대체효소치료법에 쓰이는 효소로서, 형질전환 벼 세포 시스템을 이용하여 생산될 수 있다.

[0030] 본 발명의 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소 생산용 조성물을 이용하면 형질전환 벼 세포배양 시스템에서 생산하는 인간 리소좀 효소의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있다. 특히 만노즈가 7개 이상인 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 현저하게 증대시켜, M6P(mannose-6-phosphate) 콘쥬게이션(conjugation)에 유리한 당쇄구조 형성을 증대시킬 수 있다. 또한 동물원성 물질을 전혀 사용하지 않아 안전하게 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소를 생산할 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소의 생산성 증대용 배지 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 "배지(culture media)"는 인 비트로에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세

포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다.

[0034] 상기 배지는 세포가 최소 증식 및/또는 생존하는데 필요한 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질 및 미량원소 등을 포함할 수 있다.

[0035] 상기 배지는 AA(Amino acid) 배지, MS(Murashige & Skoog), N6, WHITE, SH(Schenk & Hiderbrandt) 및 당 고갈 배지로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 바람직하게는 N6 및 당 고갈 배지로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있다.

[0037] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는, 리소좀 효소 내 고만노즈 타입 N-당쇄 증가용 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 만노시다제 억제제는 리소좀 효소 내 4 내지 9개의 만노즈, 바람직하게는 7 내지 9개의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄를 효과적으로 증가시킬 수 있다.

[0039] 또한 본 발명은 만노시다제 억제제를 포함하는 배지에서 인간 리소좀 효소를 생산하는 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소의 생산 방법을 제공한다.

[0040] 상기 형질전환 벼 세포는 야생형 형질전환 벼 세포, *gnt1* 유전자가 넉아웃된 형질전환 벼 세포, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 또한 상기 형질전환 벼 세포는 목적 단백질인 산 알파-글루코시다제를 생산할 수 있으며, 상기 *gnt1* 유전자가 넉아웃된 형질전환 벼 세포는 만노즈 5개 구조가 우세한 N-당쇄를 형성할 수 있다. 또한 상기 형질전환 벼 세포는 유도성 프로모터가 도입된 세포일 수 있다. 한편, 상기 생산 방법 내 기타 구성요소에 관한 자세한 설명은 상기 생산용 조성물에 관한 기재와의 중복성을 피하고자 생략한다.

[0041] 상기 만노시다제 억제제를 포함하는 배지에서 인간 리소좀 효소를 생산하는 형질전환 벼 세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소의 생산 방법을 이용하면, 형질전환 벼 식물세포의 추가적인 유전자 변형을 거치지 않고도, 세포 배양 중에 만노시다제 억제제 처리를 통해 간편하게 만노시다제를 억제함으로써 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소를 생산할 수 있다. 특히 만노즈가 7개 이상인 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 현저하게 증대시켜, M6P(mannose-6-phosphate) 콘쥬게이션(conjugation)에 유리한 당쇄구조 형성을 증대시킬 수 있다. 또한 동물원성 물질을 전혀 사용하지 않아 안전하게 고만노즈 타입 N-당쇄를 갖는 인간 리소좀 효소를 생산할 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] **실시예 1. 실험 재료 및 조건 설정**

[0046] 실시예 1-1. 세포주 선정 및 배지환경 조성

[0047] 본 연구를 위해 야생형(wild-type) 벼 세포주(D84 #6)와 글리코엔지니어드(glycoengineered) 벼 세포주(D86 #44)를 사용하였다. 또한 상기 두 세포주는 유전자총법 형질전환(particle bombardment-mediated transformation) 된 세포주이며 전북대학교 식물분자생물학 연구실에서 분양받아 사용하였다.

[0048] 형질전환된 벼 현탁세포를 배양하기 위한 생장 배지로는 N6 배지(Chu 등, 1975)를 사용하였다. 여기에 탄소원으로서 30 g/L 수크로오스, 생장조절제로서 2.0 mg/L 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)와 0.2 mg/L 카이네틴(kinetin)을 첨가하였고 배지의 pH는 5.8로 설정하였다. 배지는 500-mL 진탕 삼각플라스크(Erlenmeyer flask)에서 고압증기멸균기로 멸균 후 사용하였다. 배양 조건은 진탕배양기에서 28℃, 120 rpm, 암조건으로 배양하였다. 또한 목적 단백질을 생산하는 단계에서는 위와 같은 배양조건에서 수크로오스를 첨가하지 않은 N6 배지로 치환하여 목적 단백질 생산을 위한 프로모터의 발현을 유도하였다.

[0050] 실시예 1-2. 만노시다제 억제제 처리 농도 결정

[0051] 본 발명의 만노시다제 억제제인 키프넨신(Kifunensine, KIF)과 스와인소닌(Swainsonine, SWA) 첨가물 농도의 처리 농도를 결정하기 위해 우선, 각 첨가물의 적용 가능 수준을 파악하였으며, 키프넨신 및 스와인소닌의 적용 가능한 수준의 농도는 각각 0 내지 5 μM 및 0 내지 10 μM 으로 확인하였다. 그 후 상기 농도 범위 내의 키프넨신과 스와인소닌의 단독 처리 농도와 혼합 처리 농도를 최적으로 결정하기 위해 실험 계획법(design of experiment, DoE), 그 중에서도 중심합성계획법(Central composite design)을 실시하였다. 상기 실험 계획법을 통해 만노시다제 억제제 처리 농도를 결정하였고, 이를 표 1에 나타내었다.

표 1

Cell lines	Run Order	Kifunensine (μM)	Swainsonine (μM)
D84 #6	#1	2.5	0.0
	#2	2.5	5.0
	#3	2.5	10
	#4	0.0	10
	#5	2.5	5.0
	#6	5.0	10
	#7	5.0	0.0
	#8	0.0	5.0
	#9	5.0	5.0
	#10	2.5	5.0
	#11	0.0	0.0
D86 #44	#12	0.0	0.0

[0052]

[0053] 실험 결과 상기 표 1에서와 같이 12개의 실험 조건(#1 내지 #12)을 결정하였다. 이 중 11개 조건(#1 내지 #11)은 D84 세포주를 이용한 실험군으로서, #1 및 #7 의 경우는 키프넨신의 단독 처리 조건, #4 및 #8 의 경우 스와인소닌의 단독 처리 조건, #3, #6 및 #9 의 경우 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 조건, #2, #5 및 #10은 실험 계획법에서 사용한 중심점(Center Point)을 나타낸다. 상기 중심점은 중심합성계획법 상에서 중심점에서의 반복실험을 통해 통계적으로 오차가 적은 회귀모형을 만들거나 순수오차를 구하여 모델의 적합성 결여검정을 하기 위하여 사용하였다. 또한 #11 은 대조군으로서 만노시다제 억제제를 처리하지 않은 야생형 D84 벼세포주이다.

[0054] 또다른 대조군인 #12 은 만노시다제 억제제를 처리하지 않은 야생형 중 *gnt1* 유전자를 넉아웃시킨 D86 벼세포주이다. 또한 상기 D86 벼세포주는 만노즈 5개 구조가 우세한 N-당쇄를 형성하는 세포주이다.

[0055] 이하, 다른 실험에서도 실험군과 대조군을 포함한 표 1의 12개 조건(#1 내지 #12)에 대해 실험을 실시하였다.

[0057] **실시예 2. 만노시다제 억제제 처리에 따른 세포 생장 확인**

[0058] 만노시다제 억제제인 키프넨신과 스와인소닌이 세포 생장에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 중량(dry cell weight, DCW) 및 세포 생존도를 측정하였고 이를 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 1 에서와 같이, 키프넨신의 경우 단독 처리 시 세포 중량을 빨리 감소시키는 반면, 스와인소닌의 경우 단독 처리 시 세포 중량에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 이는 또한, 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 시 키프넨신의 처리 비율이 높아질수록 세포 중량을 빨리 감소시키는 것을 통해서도 확인할 수 있었다.

[0060] 또한 도 2에서와 같이, 키프넨신의 경우 단독 처리 시 세포사멸을 빨리 야기하는 반면, 스와인소닌의 경우 단독 처리 시 세포사멸을 빨리 야기시키지 않는 것을 확인하였다. 이는 또한, 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 시 키프넨신의 처리 비율이 높아질수록 세포사멸이 빨리 야기되는 것을 통해서도 확인할 수 있었다.

[0062] **실시예 3. 만노시다제 억제제 처리에 따른 목적단백질 생산성 측정**

[0063] 만노시다제 억제제인 키프넨신과 스와인소닌 각각이 목적단백질 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 목적 단백질인 산 알파-글루코시다제(Acid alpha glucosidase, GAA) 생산량을 측정하였고 이를 도 3에 나타내었다.

[0064] 도 3에서와 같이, 키프넨신의 경우에는 단독 처리 시 목적단백질 생산성을 저하시켰으나 스와인소닌의 경우 단독 처리 시 목적단백질 생산에 큰 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이는 또한, 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 시 키프넨신의 처리 비율이 높아질수록 목적단백질 생산성이 저하되는 것을 통해서도 확인할 수 있었다.

[0066] **실시예 4. 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 변화 및 목적단백질 생산량의 통계적 분석**

[0067] 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 및 목적단백질 생산량에 미치는 영향을 통계적으로 확인하기 위해, 통계분석용 소프트웨어인 MINITAB 14를 이용하여 등고선도를 작성하였으며, 이를 각각 도 4 및 도 5 에 나타내었다.

[0068] 도 4에서와 같이, 키프넨신과 스와인소닌의 처리 농도를 증가시켰을 때 고만노즈 타입 N-당쇄 함량이 증대되는 경향을 확인할 수 있었으며, 특히 키프넨신의 처리 농도 증가가 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 증대시키는 것을 확인하였다.

[0069] 반면 도 5에서와 같이, 목적단백질 생산량에 있어서는 키프넨신의 처리 농도 증가가 목적단백질 생산량을 증대시키지 않음을 확인하였다.

[0070] 따라서 상기 실시예 2 내지 4를 통해 만노시다제 억제제 중 키프넨신은 세포 중량, 세포 생존도, 목적단백질 생산량을 감소시키지만 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 증대시킬 수 있음을 확인하였으며, 특히 키프넨신과 스와인소닌을 혼합하여 처리할 경우 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 현저하게 증대시킬 수 있음을 확인하였다.

[0072] **실시예 5. 만노시다제 억제제 처리에 따른 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 측정**

[0073] 실시예 5-1. N-당쇄 타입 및 함량 분석

[0074] 만노시다제 억제제 처리에 따라 고만노즈 타입(High-Mannose Type)의 N-당쇄가 형성되는지 알아보기 위해, 처리 후 목적 단백질인 산 알파-글루코시다제(Acid alpha glucosidase, GAA)의 N-당쇄를 다음과 같은 방법을 통해 분석하였다. 우선 정제된 GAA를 트립신과 키모트립신을 포함한 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 8.0)와 37℃의 조건으로 하룻밤동안 반응시켰다. 이후 GAA의 당쇄를 절단하기 위해 글라이코아미다제 A(glycoamidase A(Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan))를 포함하는 버퍼(0.5 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0)에 37℃의 조건으로 하룻밤동안 반응시켰다. 상기 반응을 통해 분리된 당쇄 말단을 2-아미노벤즈아미드(2-aminobenzamide)로 형광표지한 뒤 친수성 초고성능화 액체 크로마토그래피(Hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography, HILIC-UPLC)을 이용하여 N-당쇄 분석을 실시하였으며, 이를 도 6에 나타내었다.

[0075] 도 6와 같이, 대조군인 야생형 벼세포(#11) 유래 N-당쇄의 경우 식물 특이적 잔기 core α1,3-linked fucose, β1,2-linked xylose를 포함하는 콤플렉스 타입(complex type) N-당쇄가 가장 우세하게 나타났다. 또다른 대조군인 *gnt1* 녹아웃 벼세포(#12) 유래 N-당쇄의 경우 만노즈 5개 형태의 당쇄가 가장 우세하게 나타났다.

[0076] 반면, 실험군 중 키프넨신만 처리한 군(#1, #7)에서는 만노즈 4 내지 9개의 고만노즈 타입 N-당쇄 함량이 급격히 증가하였고, 스와인소닌만 처리한 실험군(#4, #8)에서는 하이브리드 타입(Hybrid Type) 당쇄가 두드러지게 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 중심점을 포함한 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 조건의 경우(#2, #3, #5, #6, #9, #10) 만노즈 9개의 고만노즈 타입 N-당쇄가 60 % 이상 형성됨을 확인할 수 있었다. 특히 고만노즈 타입 N-당쇄 중 만노즈 9개 구조 당쇄는 *in vitro* 에서 만노즈-6-인산(M6P)형태의 당쇄를 형성하기에 적합한 구조이며, 이를 통해 본 실험에서 DoE을 통해 선정한 최적의 처리 농도 조건 중 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리 조건(#2, #3, #5, #6, #9, #10)을 이용하여 만노즈 9개 구조를 가진 고만노즈 타입 N-당쇄를 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0078] 실시예 5-2. 만노즈 수에 따른 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 정량분석

[0079] 만노즈 수에 따른 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 정확하게 측정하기 위해, UPLC를 이용하여 정량분석을 실시하였다. 또한 본 실험의 만노시다제 억제제 처리가 만노즈 7개 이상을 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄를 현저하게 증대시키는 것을 확인하기 위해 만노즈 함량이 더 높은 8개 이상의 만노즈를 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄 구조의 정량 값을 표 2에 나타내었다.

표 2

[0080]

	11	8	4	1	7	2(*)	5(*)	10(*)	3	6	9	12
Kifunensine (μM)	0.0	0.0	0.0	2.5	5.0	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	0.0
Swainsonine (μM)	0.0	5.0	10	0.0	0.0	5.0	5.0	5.0	10	10	5.0	0.0
Man8	0.00	0.00	0.00	19.55	20.75	23.09	24.27	25.17	22.80	17.91	15.47	0.00
Man9	0.00	0.00	0.00	31.93	37.39	51.39	58.62	53.88	55.59	64.85	65.64	0.00
HM (%) (Man8 & Man9)	0.00	0.00	0.00	51.48	58.14	74.48	82.89	79.04	78.39	82.76	81.11	0.00

[0081] 실험 결과 표 2와 같이, 키프넨신과 스와인소닌을 혼합하여 처리한 실험 조건에서(#2, #3, #5, #6, #9, #10) 만노즈 7개 이상, 그 중에서도 8개 이상을 포함한 고만노즈 타입 N-당쇄의 함량은 74 % 이상, 최대 약 83 % 까지 증대시킬 수 있음을 확인하였고, 이 중 만노즈 9개 이상을 포함한 고만노즈 타입 N-당쇄의 함량도 최대 약 65 % 까지 증대시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 키프넨신의 단독 처리 시(#1, #7) 만노즈 7개 이상, 그 중에서도 8개 이상을 포함한 고만노즈 타입 N-당쇄의 함량이 최대 약 58 % 까지 증대됨과 비교하여도 약 1.4배 증대된 수치이며, 이를 통해 키프넨신과 스와인소닌의 혼합처리 시 더욱 우수한 고만노즈 타입 N-당쇄의 함량 증대 효과가 나타남을 확인하였다.

[0083] **실시예 6. HPLC를 통한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 증대 확인**

[0084] 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량의 증대를 더욱 가시적으로 확인하기 위해 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)를 실시하였고 이를 도 7에 나타내었다. 도 7에 기재된 바와 같이 각 그래프의 결과는 순서대로 #11, #8, #4, #1, #7, #2, #5, #10, #3, #9, #6, #12의 실험 결과를 나타내며, 도 7에서 각 피크에 해당하는 숫자가 나타내는 N-당쇄 구조를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 3, 6, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19 피크가 고만노즈 타입 N-당쇄 구조를 나타내며, 이 중에서 특히 14, 15, 17, 18, 19 피크가 만노즈 7개 이상을 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄를 나타낸다.

[0085] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, HPLC 분석 결과 만노시다제 억제제를 혼합하여 처리하였을 때 고만노즈 함유를 나타내는 피크들이 더욱 증대됨을 확인하였다. 따라서 본 실험의 만노시다제 억제제 처리가 만노즈 7개 이상을 포함하는 고만노즈 타입 N-당쇄를 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0086]

[0087] **실시예 7. 렉틴 블랏을 통한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량 증대 확인**

[0088] 만노시다제 억제제 처리에 의한 고만노즈 타입 N-당쇄 함량의 증대를 정성적으로 확인하기 위해 렉틴 블랏을 실시하였다. 렉틴 블랏은 단백질 표면에 고만노스형 N-당쇄 유무를 확인하기 위한 분석 실험으로, 목적단백질 말단의 만노스 N-당쇄에 친화력을 지닌 콘카나발린 A(concanavalin A)를 사용하여 렉틴 블로팅을 실시하였으며, 이에 대한 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9의 ConA는 콘카나발린 A를 의미한다.

[0089] 실험 결과 표 1의 #1 내지 #12 조건에 대응되는 도 9의 Lane 1 내지 12 중에서, 야생형 벼세포 유래 당쇄(#11) 결과와 비교하여, 실험군에 해당하는 모든 조건(#1 내지 #10)에서 만노즈 말단의 구조가 증대된 것을 확인하였다. 이를 통해 만노시다제 억제제 처리가 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 증대시키는 것을 확인하였다.

[0090] 또한 #12 의 경우 만노즈 5개 구조가 우세한 N-당쇄를 형성하는 *gnt1* 유전자가 넉아웃된 D86 세포주에 대한 결과로서 검출 밴드가 확인되었다. 따라서 본 발명의 만노시다제 억제제 처리를 통해 형질전환 벼 세포주의 추가적인 유전자 조작 없이 첨가물 처리만으로도 간편하게 고만노즈 타입 N-당쇄 함량을 효과적으로 증대시킬 수 있음을 확인하였다.

[0092] **실시예 8. 인간 리소좀 효소 N-당쇄 분석**

[0093] 만노시다제 억제제 처리에 의한 목적 단백질인 인간 리소좀 효소의 N-당쇄 변화를 분석하기 위해 말디토프 질량분석(Matrix Associated Laser Desorption Ionization-Time Of Flight mass spectrometry, MALDI-TOF)을 실시하였다. 이에 대한 야생형 대조군 및 실험군의 결과를 각각 도 10 및 도 11에 나타내었으며, 도 10 및 도 11에

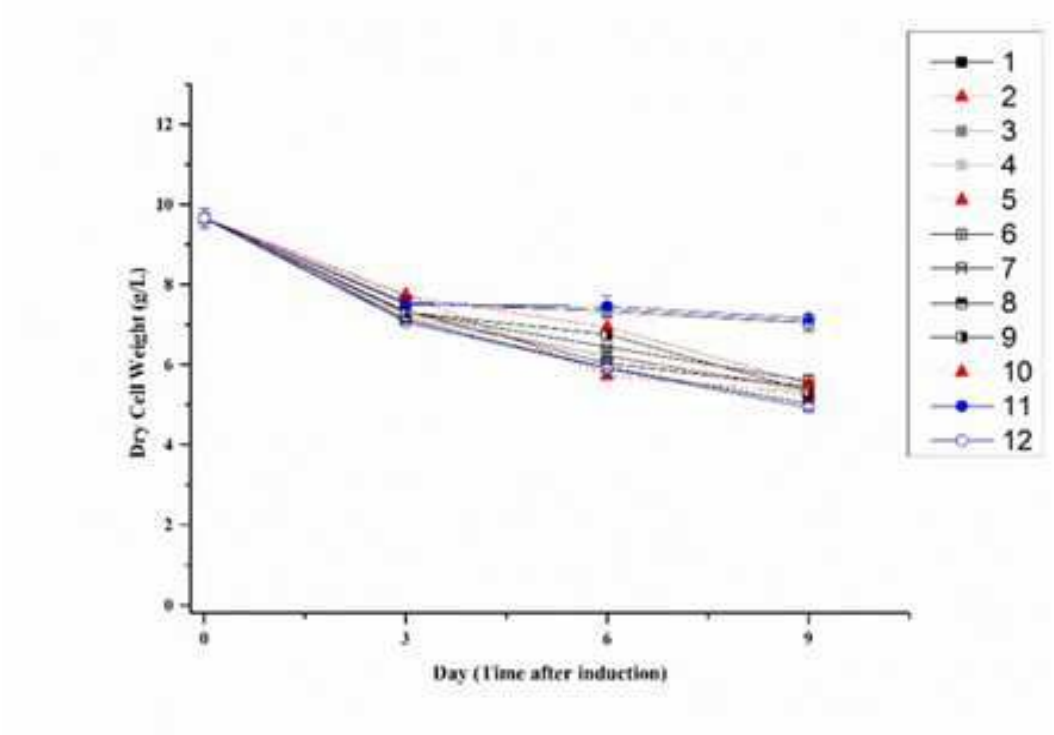
서 녹색의 원형 구조가 만노오즈를 나타낸다.

[0094] 도 10와 같이, 야생형 벼세포 유래 당쇄(#11)에서는 식물 특이적 잔기 core α1,3-linked fucose, β1,2-linked xylose를 포함하는 콤플렉스 타입(complex type) N-당쇄를 확인하였다.

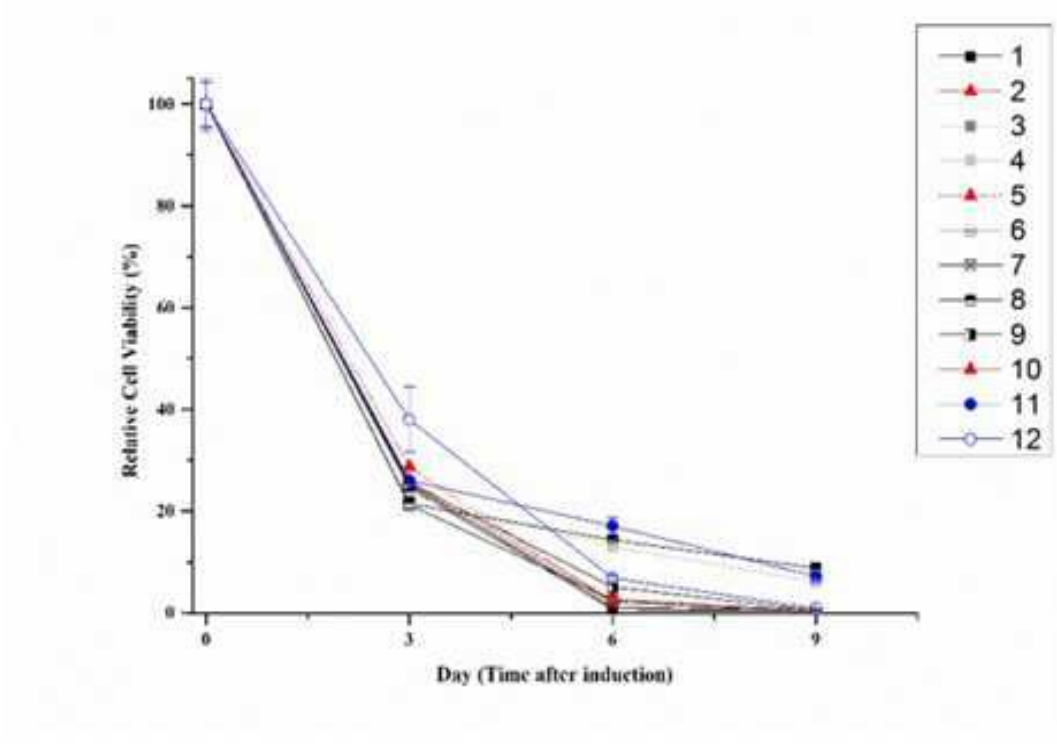
[0095] 반면 도 11의 만노시다제 억제제 처리군(#2, #5, #10)에서는, 콤플렉스 타입(complex type) N-당쇄가 확연히 줄어들고 고만노즈 타입 N-당쇄가 증가한 것을 확인하였다. 따라서 만노시다제 억제제, 이중에서도 키프넨신과 스와인소닌의 혼합 처리를 통해 고만노즈 타입 N-당쇄의 함량을 현저하게 증대시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

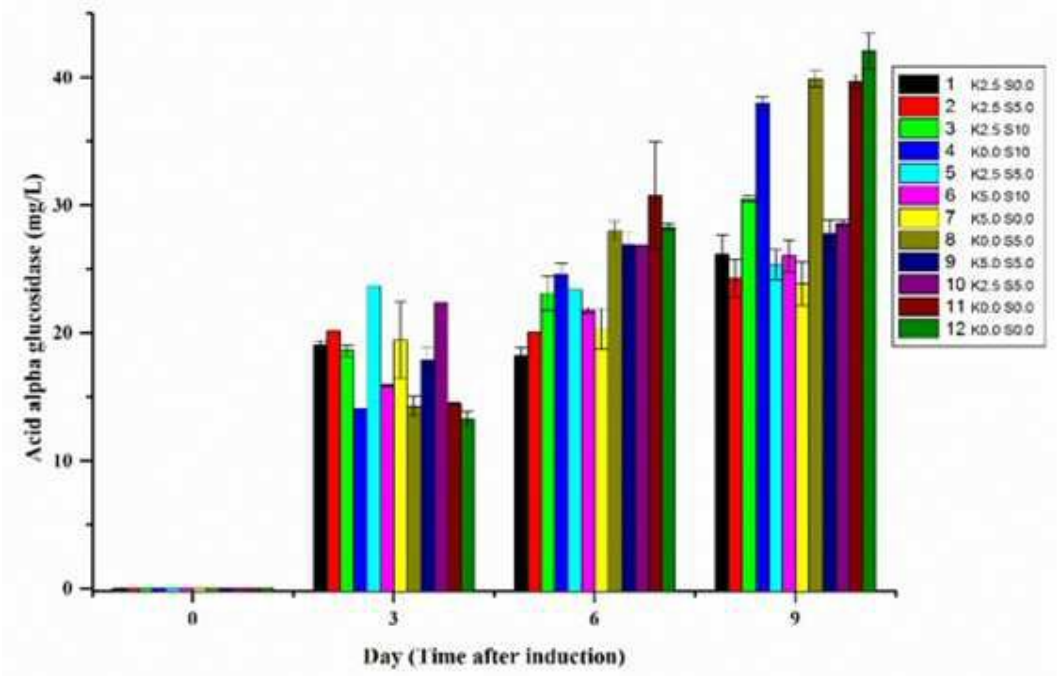
도면1



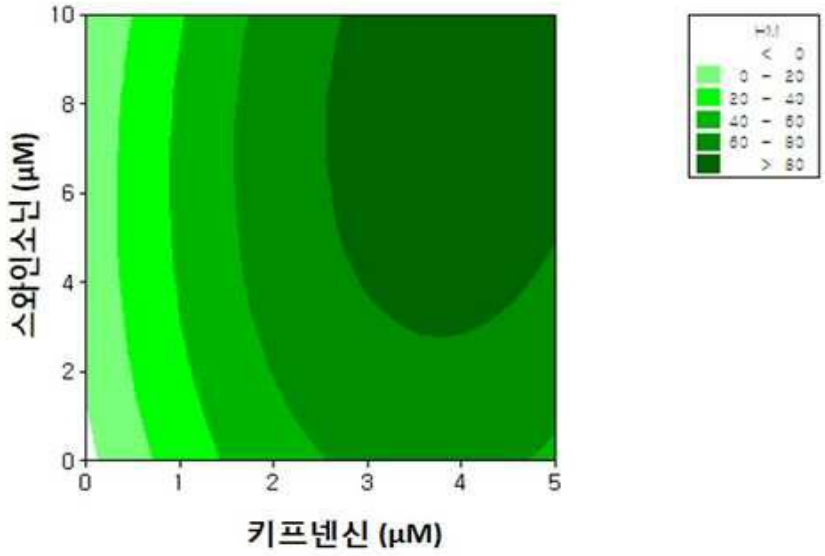
도면2


Relative Cell Viability (%)
Day (Time after induction)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

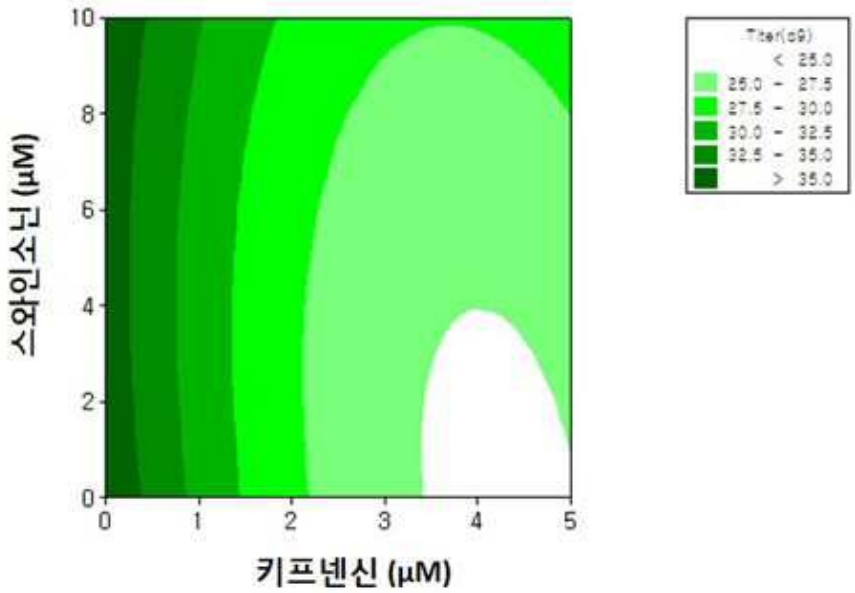
도면3


Acid alpha glucosidase (mg/L)
Day (Time after induction)
1 K2.5 S0.0
2 K2.5 S5.0
3 K2.5 S10
4 K0.0 S10
5 K2.5 S5.0
6 K5.0 S10
7 K5.0 S0.0
8 K0.0 S5.0
9 K5.0 S5.0
10 K2.5 S5.0
11 K0.0 S0.0
12 K0.0 S0.0

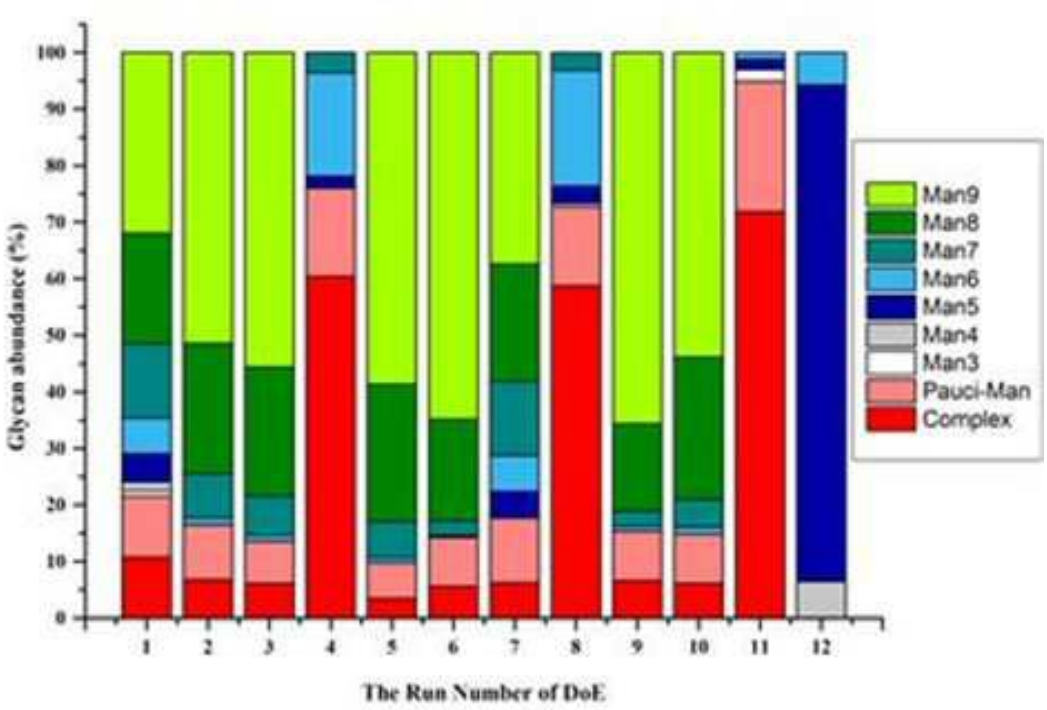
도면4


스와인소닌 (μM)
키프넨신 (μM)
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
5

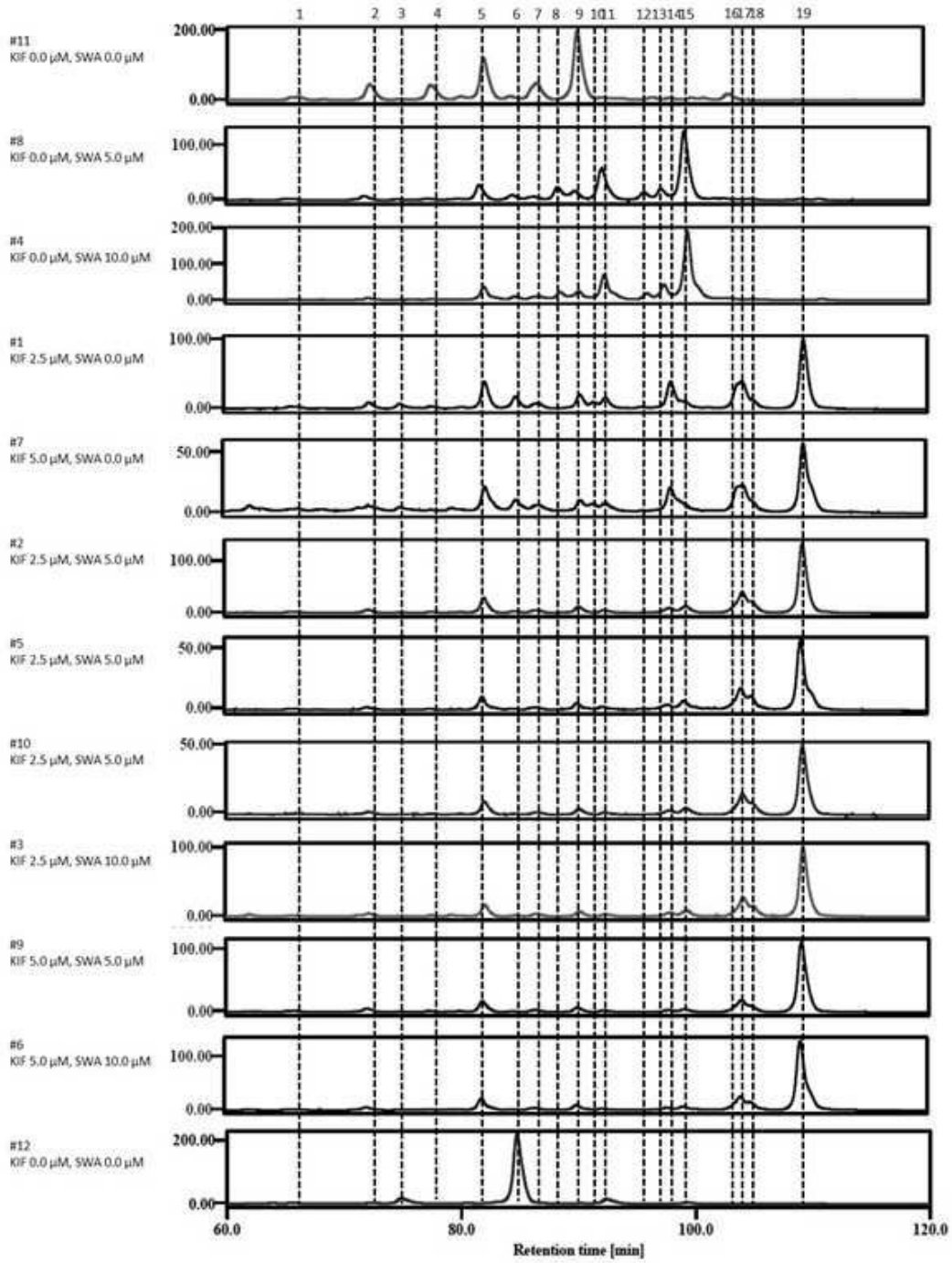
도면5


스와인소닌 (μM)
키프넨신 (μM)
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
5

도면6


Glycan abundance (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
The Run Number of DoE
Man9
Man8
Man7
Man6
Man5
Man4
Man3
Pauci-Man
Complex

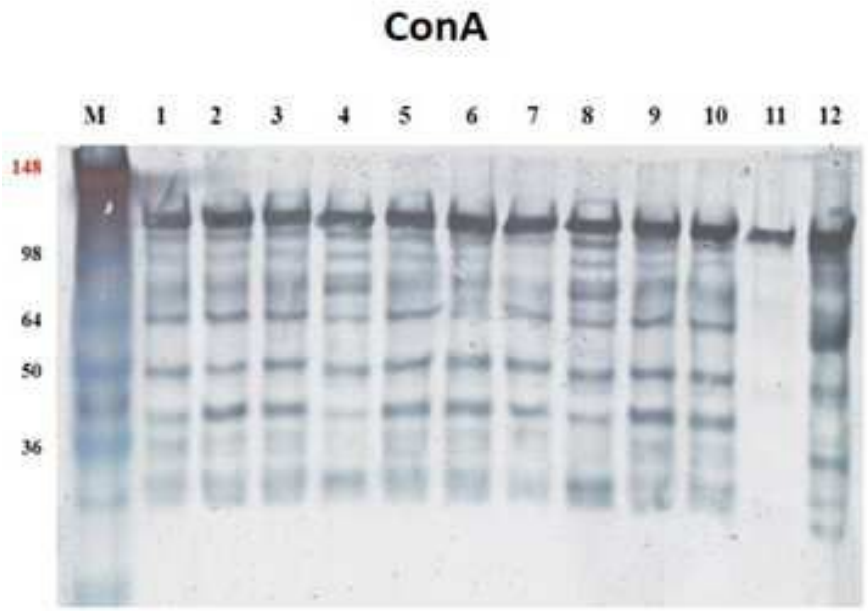
도면7


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
#11
KIF 0.0 μM, SWA 0.0 μM
#8
KIF 0.0 μM, SWA 5.0 μM
#4
KIF 0.0 μM, SWA 10.0 μM
#1
KIF 2.5 μM, SWA 0.0 μM
#7
KIF 5.0 μM, SWA 0.0 μM
#2
KIF 2.5 μM, SWA 5.0 μM
#5
KIF 2.5 μM, SWA 5.0 μM
#10
KIF 2.5 μM, SWA 5.0 μM
#3
KIF 2.5 μM, SWA 10.0 μM
#9
KIF 5.0 μM, SWA 5.0 μM
#6
KIF 5.0 μM, SWA 10.0 μM
#12
KIF 0.0 μM, SWA 0.0 μM
200.00
0.00
100.00
0.00
200.00
100.00
0.00
100.00
0.00
50.00
0.00
100.00
0.00
50.00
0.00
50.00
0.00
100.00
0.00
100.00
0.00
100.00
0.00
200.00
0.00
60.0
80.0
100.0
120.0
Retention time [min]

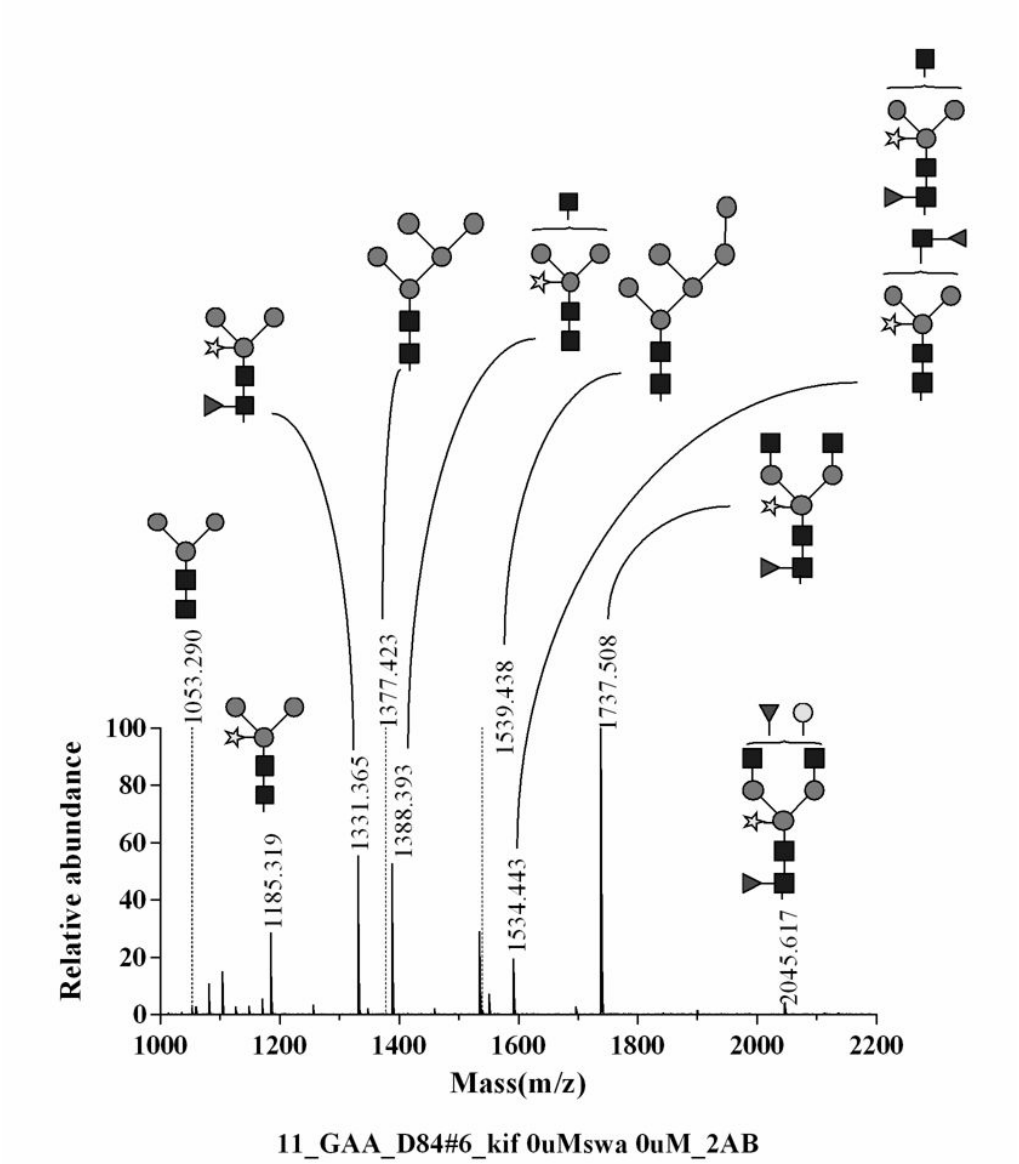
도면8

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	 
16	
17	
18	
19	

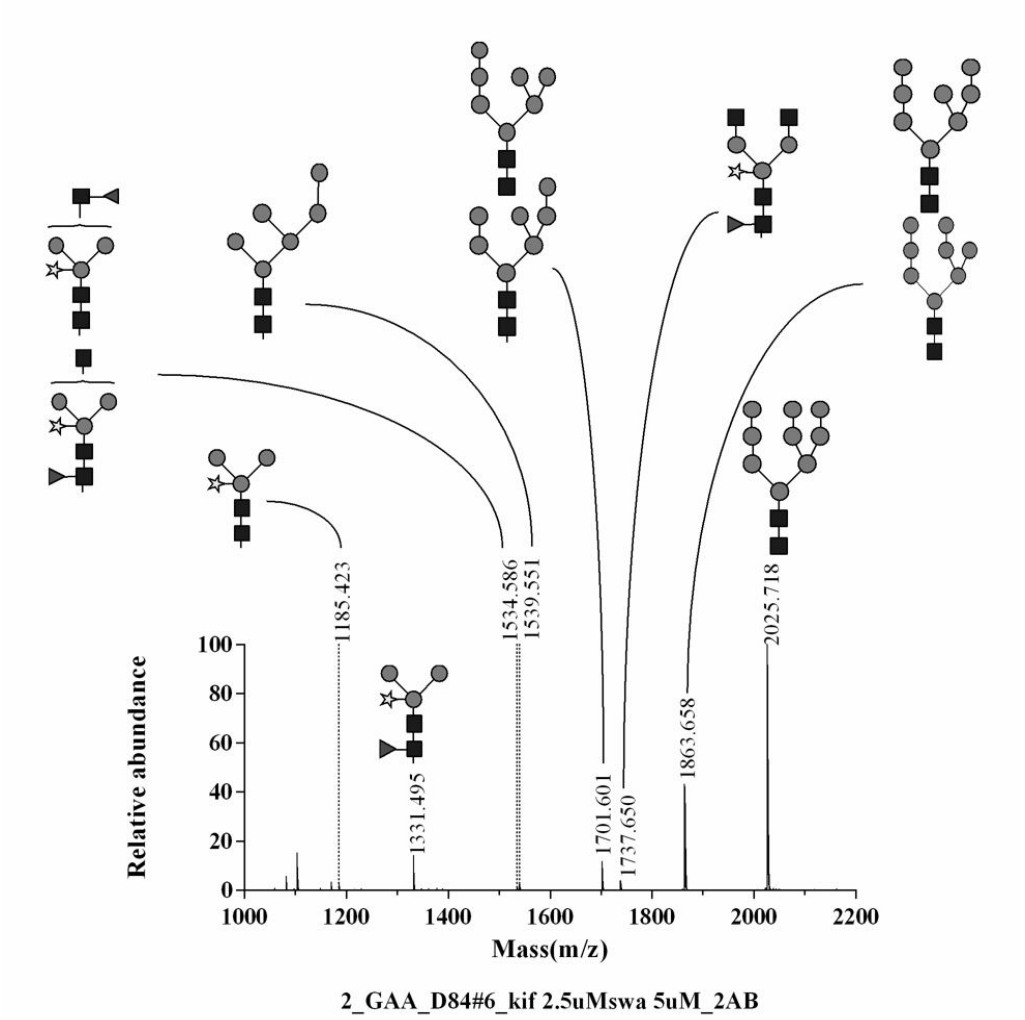
도면9



도면10


Relative abundance
100
80
60
40
20
0
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
Mass(m/z)
1053.290
1185.319
1331.365
1377.423
1388.393
1534.443
1539.438
1737.508
2045.617
11_GAA_D84#6_kif 0uMswa 0uM_2AB

도면11


Relative abundance
100
80
60
40
20
0
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
Mass(m/z)
1185.423
1331.495
1534.586
1539.551
1701.601
1737.650
1863.658
2025.718
2_GAA_D84#6_kif 2.5uMswa 5uM_2AB