 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2012-0093223 <b>(43) 공개일자</b> 2012년08월22일
<b>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)</b> <i>C07K 14/415</i> (2006.01) <i>C07K 1/34</i> (2006.01) <i>C07K 1/16</i> (2006.01) <i>C12N 15/29</i> (2006.01) <b>(21) 출원번호</b> 10-2012-7010044 <b>(22) 출원일자(국제)</b> 2010년09월21일 <b>심사청구일자</b> 없음 <b>(85) 번역문제출일자</b> 2012년04월19일 <b>(86) 국제출원번호</b> PCT/CA2010/001489 <b>(87) 국제공개번호</b> WO 2011/035423 <b>국제공개일자</b> 2011년03월31일 <b>(30) 우선권주장</b> 61/244,786 2009년09월22일 미국(US)	<b>(71) 출원인</b> <b>메디카고 인코포레이티드</b> 캐나다, 퀘벡 쥐1브이 3브이9, 세인트-포이, 슈트 600, 루트드 레그리즈, 1020 <b>(72) 발명자</b> <b>베지나 루이-필립</b> 캐나다 퀘벡 쥐0에이 2알0 너빌 206 루트 138 <b>쿠뛰르 마농</b> 캐나다 퀘벡 쥐3에이 2에이5 생 오거스틴 드 테스 무어 뒤 드 라 사셀 4765 <b>(74) 대리인</b> <b>송봉식, 정삼영</b> <b>(뒷면에 계속)</b>

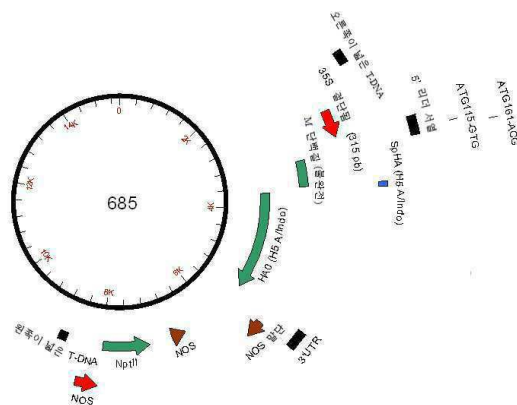
전체 청구항 수 : 총 26 항

**(54) 발명의 명칭 식물-유래 단백질의 제조방법**

**(57) 요약**

식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질의 제조방법이 제공된다. 본 방법은 아포플라스트-편재화된 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계, 식물 또는 식물 물질로부터 프로토플라스트/스페로플라스트 분획 및 아포플라스트 분획을 생성하는 단계, 및 아포플라스트 분획을 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 아포플라스트 분획은 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함할 수 있다. 대안으로 단백질 또는 상부구조물 단백질은 세포벽 분해 효소 조성물을 사용하여 식물 물질을 분해함으로써 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질로부터 얻어서 분해된 분획을 생성한다. 분해된 분획은 여과되어 여과된 분획을 생성하고, 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질은 여과된 분획으로부터 회수된다.

**대표도**



(72) 발명자

**파케 대니**

캐나다 퀘벡 쥐6지 2비1 생 장 크리스토폴 뢰 페리  
에 805

**다르기스 미셸**

캐나다 퀘벡 쥐2씨 1엠4 퀘벡 생 자크 6358

**두스트 마르크-앙드레**

캐나다 퀘벡 쥐1엑스 4엔4 퀘벡 뢰 루이스-피셋  
3925

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a. 아포플라스트-편제화된 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계;
- b. 프로토플라스트/스페로플라스트 분획, 및 아포플라스트 분획을 생성하는 단계; 및
- c. 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 아포플라스트 분획을 회수하는 단계를 포함하는, 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질의 제조방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 단계 또는 생성 단계(단계 b)에서 아포플라스트 및 프로토플라스트 분획은 세포벽 분해 효소 조성물에 의해 식물 또는 식물 물질의 처리에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 세포벽 분해 효소 조성물은 하나 이상의 펙티나아제, 하나 이상의 셀룰라아제, 또는 하나 이상의 펙티나아제 및 하나 이상의 셀룰라아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 세포벽 분해 효소 조성물은 하나 이상의 리파아제, 프로테아제 또는 펙티나아제를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 얻는 단계(단계 a)에서 식물은 펩티드, 단백질, 단백질 로제트, 단백질 복합체, 프로테아좀, 메타볼론, 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체, 단백질 나노입자, 글리코 단백질, 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 바이러스 유사 입자, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질, 키메라 단백질, 키메라 단백질 복합체, 키메라 단백질 나노입자, 키메라 글리코단백질, 키메라 항체, 키메라 단클론성 항체, 키메라 단일 사슬 단클론성 항체, 키메라 혈구응집소, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질로부터 선택되는 단백질 또는 상부구조물 단백질을 암호화하는 핵산 서열로 형질전환되며, 식물 또는 식물 물질이 수확되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 핵산은 일시적 방법으로 식물에 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 핵산은 식물의 게놈 내에서 안정하게 통합되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 얻는 단계(단계 a)에서 식물이 성장되고, 식물 또는 식물 물질이 수확되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제5항에 있어서, 핵산은 단클론성 항체 또는 인플루엔자 혈구응집소를 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질은 뉴라미니다아제 또는 M 단백질을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 식물 물질은 잎, 및 배양된 식물 세포의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, d) 아포플라스트 분획으로부터 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 정제 단계는 심층 여과를 사용하여 아포플라스트 분획을 여과하여 정제된 추출물을 생성한 다음, 크기 배제 크로마토그래피, 양이온 교환 수지 또는 친화도 크로마토그래피, 또는 그것의 조합을 사용하여 정제된 추출물을 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

- a. 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계;
- b. 세포벽 분해 효소 조성물을 사용하여 식물 물질을 분해하여 분해된 분획을 생성하는 단계;
- c. 분해된 분획을 여과하여 여과된 분획을 생성하고, 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 여과된 분획으로부터 회수하는 단계

를 포함하는, 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질의 제조방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 세포벽 분해 효소 조성물은 하나 이상의 펙티나아제, 하나 이상의 셀룰라아제, 또는 하나 이상의 펙티나아제 및 하나 이상의 셀룰라아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 세포벽 분해 효소 조성물은 하나 이상의 펙티나아제, 하나 이상의 셀룰라아제, 또는 하나 이상의 펙티나아제 및 하나 이상의 셀룰라아제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 17

제15항에 있어서, 얻는 단계(단계 a)에서 식물은 펩티드, 단백질, 단백질 로제트, 단백질 복합체, 프로테아좀, 메타볼론, 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체, 단백질 나노입자, 글리코 단백질, 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 바이러스 유사 입자, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질, 키메라 단백질, 키메라 단백질 복합체, 키메라 단백질 나노입자, 키메라 글리코단백질, 키메라 항체, 키메라 단클론성 항체, 키메라 단일 사슬 단클론성 항체, 키메라 혈구응집소, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질로부터 선택되는 단백질 또는 상부구조물 단백질을 암호화하는 핵산 서열로 형질전환되며, 식물 또는 식물 물질이 수확되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 핵산은 일시적 방법으로 식물에 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 핵산은 식물의 게놈 내에 안정하게 통합되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 20

제17항에 있어서, 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질은 단클론성 항체 또는 인플루엔자 혈구응집소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 21

제15항에 있어서, 식물 물질은 잎 및 배양된 식물 세포의 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 22

제14항에 있어서, d) 세포 파편 및 불용성 물질로부터 여과된 분획에서 단백질 또는 상부구조물 단백질을 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 분리 단계는 원심분리에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서, 분리 단계는 침출 여과에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25

제15항에 있어서, d) 여과된 분획으로부터 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질을 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 정제 단계는 여과 분획의 침출 여과로 정제된 추출물을 생성하는 단계 후, 양이온 교환 수지, 크기 배제 수지, 친화도 수지, 또는 그것의 조합을 사용하여 정제된 추출물을 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 식물-유래 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 식물 및 식물 조직으로부터 단백질 상부구조물을 포함하는 단백질을 얻는 방법을 제공한다.

#### 배경 기술

[0002] *E. coli*, 곤충 세포 배양물, 및 포유동물 세포 배양물과 같은 숙주 세포에서 현존하는 재조합 발현 전략은 배양물 배지에서 매우 높은 수준으로 단백질을 발현시키고 분비한다. 이 시스템을 사용하여 높은 수준의 발현, 적절한 단백질 폴딩 및 번역 후 단백질의 변형이 달성된다. 더 나아가, 세포내 단백질이 다른 성분들(DNA, 비히클, 막, 안료 등)로부터 용이하게 분리될 수 있기 때문에 발현된 단백질의 정제는 단순화된다. 식물 또는 효모 발현 시스템에 대해, 세포 벽은 배양 배지에 발현된 단백질의 분비를 방지한다.

[0003] 다른 접근들이 세포-추출물을 만드는 과학에서 널리 사용된다. 세포벽을 파괴하고 그것의 내용물을 방출시키기 위한 기계적 접근은 보통 단백질 또는 세포 성분의 특정 분류에 대해 선택적이지 않다. 세포 배양물 배지로 관심의 단백질의 발현을 지시하는 것은, 세포내 오염물질을 원심분리 또는 여과에 의해 제거되도록 하고, 관심의 단백질의 단순하고 빠른 농축을 허용한다. 또한 관심의 단백질 상부구조물이 백신 조제물 중에서 사용되기 전에 식물 또는 식물 물질 중에 존재하는 일부 또는 모든 단백질, DNA, 막 단편, 소수포, 안료, 탄수화물 등으로부터 단백질 로제트(rosette), 나노입자, 거대 단백질 복합체, 항체 또는 바이러스-유사 입자(VLP) 등을 포함하는 관심의 단백질 또는 단백질 상부구조물을 분리하는 것이 바람직할 수 있다.

[0004] 면역글로불린(IgG)은 다양한 특성의 특이적 항원 상대에 대해 특징적인 친화도를 가지는 복합체 헤테로멀티머 단백질이다. 오늘날, IgG-생성 셀라인의 통상적인 분리, 및 IgG 방향진화에 대한 기법 및 분자공학의 출현은 바이오신약학(biotherapeutics)에 그리고 일반적인 생명과학 시장에서 그것들의 진화에 크게 영향을 미쳤다. 치료용 단클론성 IgG(단클론성 항체, mAbs)는 새로운 항-염증 및 항-암 약물의 현존하는 시장을 지배하며, 수백 가지의 새로운 후보자들이 현재 개선되거나 또는 신규의 용도를 위한 연구 및 임상 개발하에 있다. mAb에 대한 해마다의 시장의 요구는 몇 그램(진단), 몇 킬로그램(항-독소)으로부터 1 또는 수백 킬로그램(생체-방어, 항-암, 항-감염, 항-염증)의 범위에 있다. 식물로부터 변형된 글리코단백질을 생성하는 방법은 WO 2008/151440에서 설

명된다(본원에 참고로써 포함됨).

- [0005] 관심의 단백질을 포함하는 조직액을 제공하기 위해 진공 및 원심분리 과정을 포함하여 식물의 세포내 공간으로부터 단백질을 추출하는 방법은 PCT 공개 WO 00/09725 (Turpen et al.)에서 설명된다. 이 접근은 진공 및 원심 분리하에서 미세섬유의 망상조직을 통과하는 작은 단백질(50 kDa 또는 그 이하)에 대해 적합하지만, 항체 또는 VLP와 같은 거대 단백질, 상부구조물 단백질, 단백질 로제트, 나노입자, 거대 단백질 복합체에 대해서는 적합하지 않다.
- [0006] McCormick et al 1999 (Proc Natl Acad Sci USA 96:703-708)은 발현된 단백질을 세포의 구간으로 표적화하는 단일-사슬 Fv (scFv) 에피토프에 융합된 쌀 아밀라아제 신호 펩티드의 사용 후, scFv 폴리펩티드의 회수를 위한 잎 및 줄기 조직의 진공 인필트레이션(vacuum infiltration)을 개시한다. Moehnke et al., 2008 (Biotechnol Lett 30:1259-1264)는 아포플라스트(apoplastic) 추출을 사용하여 담배로부터 재조합 식물 알레르겐을 얻기 위한 McCormick의 진공 인필트레이션 방법의 사용을 설명한다. PCT 공개 WO 2003/025124 (Zhang et al)는 뮤린 신호 서열을 사용하여 아포플라스트 공간으로 표적화하는 식물에서 scFv 면역글로불린의 발현을 개시한다.
- [0007] 바이러스-유사 입자(VLP)는 인플루엔자 백신을 제조하기 위해 사용될 수 있다. VLP와 같은 상부구조물(suprastructure)은 바이러스 캡시드 구조를 모방하지만, 게놈이 없고, 따라서 제2 감염을 위한 수단을 복제하거나 제공할 수 없다. VLP는 강한 면역 반응을 자극하기 위해 개선된 대안의 분리된 (가용성) 재조합 항원을 제공한다. VLP는 특정 바이러스 단백질의 발현시 조립되고, 그것의 동족 바이러스의 단백질과 비슷한 외부 표면이 존재하지만, 실제 바이러스 입자와 달리 유전물질을 포함하지 않는다. 천연 바이러스의 구조와 유사한 미립자 및 다가의 구조에서 항원의 존재는 균형 잡힌 체액 및 세포 성분에 대해 면역 반응의 향상된 자극을 달성한다. 분리된 항원에 의한 자극에서 이러한 개선은 피막 바이러스에 대해 특히 사실인 것으로 믿어지는데, 피막 VLP는 그것의 천연 막-결합 상태의 표면 항원이 존재하기 때문이다(Grgacic and Anderson, 2006, Methods 40, 60-65). 더 나아가, 나노입자 구조를 가지는 인플루엔자 VLP는 재조합 혈구응집소(HA)(즉, 모노머 HA, 또는 로제트(rosette)로 조직화된 HA; HA의 3-8개 트리머의 조립체)와 비교하여 더 양호한 백신 후보자가 되는 것으로 나타났다, 그것들은 체액과 세포 면역 반응을 둘 다 활성화시킬 수 있다(Bright, R.A., et. al., 2007, Vaccine 25, 3871-3878).
- [0008] 인플루엔자 VLP는 모두 10가지의 인플루엔자 단백질의 공동-발현으로부터 배양된 포유동물 세포에서 얻어졌다(Mena et al., 1996, J. Virol. 70, 5016-5024). 몇몇 바이러스 단백질은 VLP의 생성에서 불필요하며, 백신 개발 프로그램에서 인플루엔자 VLP는 M1과 함께 2가지의 주된 항원 외피 단백질(HA 및 NA)의 공동-발현으로부터 또는 HA와 M1만의 공동-발현으로부터 만들어졌다(Kang et al., 2009, Virus Res. 143, 140-146). Chen et al. (2007, J. Virol. 81, 7111-7123)은 HA 단독으로 VLP 형성을 구동하고, 출아(budding)할 수 있으며, M1 공동-발현은 그것의 시스템에서 생략될 수 있다는 것을 나타내었다. 그러나, HA는 VLP를 만드는 포유동물 세포의 표면에서 시알산화된 글리코단백질과 결합하기 때문에, 바이러스 시알리다아제는 공동-발현되어 출아 후 세포 생성으로부터 VLP의 방출을 허용한다.
- [0009] PCT 공개 WO 2006/119516 (Williamson 및 Rybicki)은 식물에서 인플루엔자 A/Vietnam/1194/2004의 전장 및 절단된 인간-코돈 최적화 H5 HA의 발현을 개시한다. 절단된 구성체는 막 앵커링(anchoring) 도메인이 없다. HA 단백질의 가장 많은 축적은 ER을 표적으로 하는 구성체에 의해 얻어졌다. 막 표적 도메인이 없는 구성체는 검출 가능한 HA를 획득하지 않았다. VLP의 생성은 보고되지 않았다.
- [0010] 지질 피막을 포함하는 인플루엔자 HA VLP의 생성은 WO 2009/009876 및 WO 2009/076778 (D'Aoust et al.; 둘 다 참고로써 본원에 포함됨)에서 발명자들에 의해 이미 설명되었다. 피막 바이러스에 대해, 지질층 또는 막이 바이러스에 의해 보유되는 것이 유리할 수 있다. 지질의 조성물은 시스템에 따라 다양할 수도 있고(예를 들어, 식물-생성 피막 바이러스는 피막에서 식물 지질 또는 피토테롤을 포함한다), 개선된 면역 반응에 기여할 수도 있다.
- [0011] HBV 표면 항원(HBsAg)을 발현시키는 유전자이식 담배에서 피막 VLP의 조립체는 Mason et al.(1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11745-11749)에 의해 설명되었다. 식물-생성 HBV VLP는 비경구로 투여될 때 마우스에서 강한 B- 및 T-세포 면역 반응을 유발하지만(Huang et al., 2005, Vaccine 23, 1851-1858), 섭취 연구를 통한 경구 면역화는 단지 보통의 면역 반응을 유발하는 것으로 나타났다(Smith et al., 2003, Vaccine 21, 4011-4021). Greco (2007, Vaccine 25, 8228-8240)는 HBsAg와 융합에서 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 에피토프가 유전자이식 담배 및 애기장대(*Arabidopsis*)에서 발현될 때 VLP로서 축적되어 2가의 VLP 백신을 만든다는 것을 나타내었다.

[0012] 유전자이식 담배 및 감자 식물에서 바이러스 캡시드 단백질(NVCP)의 발현은 비-피막 VLP의 조립체를 초래하였다(Mason et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5335-5340). NVCP VLP는 아그로인필트레이션된(agroinfiltrated) 니코티아나 벤탐미아나(*N. benthamiana*) 잎(Huang et al. 2009, Biotechnol. Bioeng. 103, 706-714)에서 생성되었고, 그것의 면역원성은 마우스에서 경구 투여시 증명되었다(Santi et al., 2008, Vaccine 26, 1846-1854). 건강한 성인 지원자에게 VLP 형태로 215-751  $\mu$ g의 NVCP를 함유하는 생감자의 2 또는 3회 투여량의 투여는 면역화된 지원자의 95%에서 면역 반응의 발생을 초래하였다(Tacket et al. 2000, J. Infect. Dis. 182, 302-305). 비-피막 VLP는 또한 HBV 코어 항원(HBcAg; Huang et al., 2009, Biotechnol. Bioeng. 103, 706-714) 및 인유두종바이러스(HPV) 주 캡시드 단백질 L1(Varsani et al., 2003, Arch. Virol. 148, 1771-1786)의 발현으로부터 얻어졌다.

[0013] 더 단순한 단백질 또는 단백질 상부구조물 생성 시스템, 예를 들어 단지 하나 또는 소수의 바이러스 단백질의 발현에 의존하는 것이 바람직하다. 식물 시스템에서 단백질 또는 단백질 상부 구조물, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 항체 또는 VLP와 같은 단백질 로제트, 나노입자, 거대 단백질 복합체의 생성은 그것들이 온실 또는 필드에서 성장될 수도 있고, 무균 조직 배양 방법 및 조작을 필요로 하지 않는다는 점에서 유리하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 식물 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 식물 단백질로부터 용이하게 분리되며, 여전히 단백질의 구조적 특징을 보유하는 단백질, 또는 상부구조물의 제조방법이 요망된다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 식물-유래 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 식물 및 식물 조직으로부터 단백질 상부구조물을 포함하는 단백질을 얻는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 목적은 식물-유래 단백질의 개선된 제조방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명은 아포플라스트 분획 내에서 편제화된 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계; 프로토플라스트 및 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 아포플라스트 분획을 생성하는 단계; 및 아포플라스트 분획을 회수하는 단계를 포함하는, 식물-유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조방법 (A)을 제공한다. 본 방법은 아포플라스트 분획으로부터 식물 유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 식물-유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 키메라 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질일 수 있다. 식물-유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 식물에 이종성일 수 있다. 식물 유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 단백질 로제트, 단백질 복합체, 프로테아솜, 메타볼론, 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체, 단백질 나노입자, 글리코단백질, 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 바이러스 유사 입자, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질, 키메라 단백질, 키메라 단백질 복합체, 키메라 단백질 나노입자, 키메라 글리코단백질, 키메라 항체, 키메라 단클론성 항체, 키메라 단일 사슬 단클론성 항체, 키메라 혈구응집소, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질을 포함할 수 있다. 식물 유래 단백질은 키메라 마우스 인간 단클론성 항체, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 C2B8를 포함할 수 있다. 식물 유래 VLP는 인플루엔자 혈구응집소를 포함할 수 있다.

[0018] 아포플라스트 및 프로토플라스트 분획은 효소 조성물에 의한 식물 또는 식물 물질의 처리에 의해 생성될 수 있다. 효소 조성물은 하나 이상의 펙티나아제, 하나 이상의 셀룰라아제, 또는 하나 이상의 펙티나아제 및 하나 이상의 셀룰라아제를 포함할 수 있다. 더 나아가서, 원한다면, 효소 조성물은 리파아제 또는 프로테아제를 포함하지 않고, 조성물은 부가된 리파아제 또는 프로테아제를 포함하지 않는다.

[0019] 식물 또는 식물 물질은 식물을 성장, 수확 또는 성장 및 수확함으로써 얻을 수 있다. 식물 물질은 식물의 일부 또는 모두, 식물 세포, 잎, 줄기, 뿌리 또는 배양된 식물 세포 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 상기 설명한 식물 유래 단백질, 또는 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조 방법을 제공하며(방법 A), 단백질 또는 상부구조물 단백질을 암호화하는 핵산은 일시적 방법으로 식물에 도입된다. 대안으로, 핵산은 식물의 게놈에 안정하게 통합된다.



- [0021] 본 발명은 아포플라스트 분획으로부터 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 정제하는 단계를 더 포함하는, 상기 설명한(방법 A) 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조방법을 제공한다. 정제 단계는 심층 여과를 사용하여 아포플라스트 분획을 여과하여 정제된 추출물을 생성한 다음, 양이온 교환 수지, 친화도 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 또는 그것의 조합을 사용하여 정제된 추출물을 크로마토그래피하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0022] 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 아포플라스트로부터 얻은 단백질은 번역 후 변형된 단백질의 중간체 형태로서 더 균질하고, 또는 다양한 세포내 구간, 예를 들어 미토콘드리아, 엽록체, 및 다른 세포 기관에서 일어나는 다른 형태의 처리를 포함하는 단백질은 공동-추출되지 않는다. 제조된 단백질의 높은 정도의 균질성은 전형적으로 더 높은 품질의 단백질을 포함하는 제제를 초래하며, 더 높은 효능, 더 긴 반감기, 또는 더 양호한 면역원성 능력을 포함하는 유리한 특성을 가지는 생성물을 초래할 수 있다. 예를 들어 고-만노오스 글리코실화를 함유하는 혈액 단백질은 복합체 글리코실화를 포함하는 단백질보다 더 용이하게 혈액 순환에서 제거된다. 아포플라스트 분획에서 만들어지는 글리코실화된 단백질은 더 많은 복합체-형태 글리코실화를 나타낸다. 따라서, 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 제조된, 세포-벽 분해를 수반하는 아포플라스트-유래 단백질은, 예를 들어 순환에서 더 양호한 반감기를 나타낸다.
- [0023] 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 단백질 로제트, 단백질 복합체, 단백질 나노입자, 항체, 단클론성 항체, VLP를 포함할 수 있다. VLP는 하나 이상의 인플루엔자 HA 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상부구조물 단백질은 키메라 상부구조물 단백질일 수 있으며, 예를 들어 단클론성 항체는 키메라 단클론성 항체일 수 있고, 또는 인플루엔자 HA 폴리펩티드는 키메라 HA 폴리펩티드일 수 있다. 상부구조물 단백질이 VLP이면, 식물-유래 VLP는 혈구응집반응 활성을 더 포함할 수 있다. 식물 또는 식물 물질은 식물을 성장, 수확 또는 성장 및 수확함으로써 얻을 수 있다. 식물 물질은 식물의 일부 또는 모두, 식물 세포, 잎, 줄기, 뿌리 또는 배양된 식물 세포 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계, 세포벽 분해 효소 조성물을 사용하여 식물 물질을 분해하여 분해된 분획을 생성하는 단계, 및 분해된 분획을 여과하여 여과된 분획을 생성하는 단계 및 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 여과된 분획으로부터 회수하는 단계를 포함하는 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조방법(B)을 제공한다.
- [0025] 효소 조성물은 하나 이상의 펙티나아제, 하나 이상의 셀룰로오스, 또는 하나 이상의 펙티나아제 및 하나 이상의 셀룰라아제를 포함할 수 있다. 더 나아가서, 원한다면 효소 조성물은 리파아제 또는 프로테아제를 포함하지 않고, 또는 조성물은 부가된 리파아제 또는 프로테아제를 포함하지 않는다. 식물-유래 상부구조물 단백질은 키메라 식물-유래 상부구조물 단백질일 수 있다. 식물 유래 단백질 상부구조물은 단백질 로제트, 단백질 복합체, 프로테아좀, 메타볼린, 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체, 단백질 나노입자, 글리코단백질, 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 바이러스 유사 입자, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질, 키메라 단백질, 키메라 단백질 복합체, 키메라 단백질 나노입자, 키메라 글리코단백질, 키메라 항체, 키메라 단클론성 항체, 키메라 단일 사슬 단클론성 항체, 키메라 혈구응집소, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질 및 바이러스 피복 단백질을 포함할 수 있다. 식물 유래 단클론성 항체는 키메라 마우스 인간 단클론성 항체, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 C2B8을 포함할 수 있다. 식물 유래 VLP는 인플루엔자 혈구응집소를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 상기 설명한 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조 방법을 제공하며(방법 B), 단백질 또는 상부구조물 단백질을 암호화하는 핵산은 일시적 방법으로 식물에 도입된다. 대안으로 핵산은 식물에 게놈에 안정하게 통합된다.
- [0027] 본 발명은 세포 파편 및 불용성 물질로부터 여과된 분획에서 단백질 또는 상부구조물 단백질을 분리하는 단계를 더 포함하는 상기 설명한 식물 유래 VLP의 제조방법을 제공한다(방법 B). 분리 단계는 원심분리, 심층 여과에 의해, 또는 원심분리와 심층 여과 둘 다에 의해 수행되어 정제 분획을 만들 수 있다. 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있고, 예를 들어 정제된 추출물은 양이온 교환 수지, 친화도 수지, 크기 배제 크로마토그래피, 또는 그것의 조합을 사용하여 정제될 수 있다.
- [0028] 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 단백질 로제트, 단백질 복합체, 단백질 나노입자, 글리코단백질, 항체, 단클론성 항체, VLP를 포함할 수 있다. VLP는 하나 이상의 인플루엔자 HA 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상부구조물 단백질은 키메라 상부구조물 단백질일 수 있고, 예를 들어 단클론성 항체는 키메라 단클론성 항체,



또는 인플루엔자 HA 폴리펩티드일 수 있고, 키메라 HA 폴리펩티드일 수 있다. 상부구조물 단백질이 VLP이면, 식물-유래 VLP는 혈구응집반응 활성을 더 포함할 수 있다.

[0029] 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 식물 유래 지질을 포함하는 식물-제조 VLP는 다른 제조 시스템 중에서 만들어진 VLP보다 더 강한 면역 반응을 유발할 수 있고, 생 전바이러스(live whole virus) 백신 또는 약독 전바이러스 백신에 의해 유발되는 면역 반응과 비교할 때, 이 식물-제조 VLP에 의해 유발되는 면역 반응은 더 강하다.

[0030] 숙주 세포로부터 얻는 단백질 추출물의 조성물은 복잡체이고, 전형적으로 분리된 관심의 단백질 또는 상부구조물과 함께 세포내 및 세포간 성분을 포함한다. 아포플라스트 분획의 제조 다음에 세포내 단백질 및 성분을 분리하는 단계는, 관심의 단백질 또는 상부구조물이 풍부하게 되고 제조 방법 내에서 효능을 증가시키기 때문에 유리하다. 거의 없는 효율적인 단계를 포함하여 더 단순한 과정을 가지는 것은 상당한 수율 증가, 및 비용 감소를 초래할 수 있다. 또한 세포벽 분해 효소를 사용하여 세포벽을 분해하는 과정은 프로토플라스트가 추출 과정 동안 무결함으로 남아있지 않더라도 상부구조물 단백질 수율을 증가시키는 것으로 발견되었다. 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 세포벽 분해 단계는 세포벽의 폴리머 성분을 헐겁게 할 수 있고, 세포벽 내에서 다른 관련된 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 방출을 돕는다. 이 프로토콜은 또한 세포내 성분 내에서 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 오염물질을 최소화할 수 있다.

[0031] 식물 세포벽을 분해하는 방법은 알려져 있고, 세포벽을 분해하는 효소 카테일 혼합물은 다양할 수 있다. 본 발명은 사용되는 세포벽 분해 방법에 의해 제한되지 않는다.

[0032] 균질화, 블렌딩 또는 그라인딩을 수반하는 식물-유래 VLP의 제조방법과 비교할 때, 본원에서 설명되는 방법은 더 적은 파괴, 및 식물-유래 상부구조물 단백질 추출물의 오염을 초래한다. 본원에서 설명되는 방법은 식물 조직의 아포플라스트 분획을 제공하며, 그것은 프로토플라스트 및 그것의 성분의 완전함을 유지할 수 있다. 본원에서 설명되는 방법은 프로토플라스트, 또는 프로토플라스트의 부분이 그것의 완전함을 상실하고, 더 이상 무결함이 아니라해도, 단백질, 또는 상부구조물 단백질 정제에 효과적이다.

[0033] 이 방법은 표준 조직 파괴 기법, 예를 들어 균질화, 블렌딩 또는 그라인딩을 수반하는 상부구조물 단백질 추출 방법과 비교할 때, 더 높은 수율의 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 제공할 수 있다. 더 큰 수율은, 부분적으로 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 구조적 완전함 및 VLP의 경우에 지질 피막을 파괴하는 전단력의 감소에 기인할 수 있다. 아포플라스트 분획으로부터 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조는, 아포플라스트 분획이 상당히 감소되거나, 또는 세포질 단백질이 없기 때문에 유리할 수 있다. 따라서, 아포플라스트 분획에서 모노머, 다이머, 트리머 또는 상부구조물 단백질의 분획을 포함하는 다른 단백질 및 물질로부터 상부구조물 단백질의 분리는 용이하게 수행된다. 그러나, 프로토플라스트 제조물, 또는 프로토플라스트 제조물의 부분이 무결함이 아니더라도, 증가된 수율의 단백질 또는 상부구조물 단백질은 또한 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 얻을 수 있다.

[0034] 아포플라스트로 분비되는 상부구조물 글리코단백질을 포함하는 글리코단백질, 예를 들어 단클론성 항체는 완전한 돌연변이를 가지는 더 높은 백분율의 N-글리칸을 포함하며, 세포벽을 분해하지 않는 추출 방법, 예를 들어 블랜더 추출 식물과 비교하여 말단의 N-아세틸글루코사민 또는 갈락토오스 잔기(복합체 N-글리칸)를 포함한다. 복합체 N 글리칸을 포함하는 상부구조물 글리코단백질, 예를 들어 단클론성 항체는 말단의 만노오스 잔기(미성숙 N 글리칸)를 포함하는 단클론성 항체와 비교할 때 혈류에서 증가된 반감기의 유리한 특성을 나타내는 것으로 발견되었다

[0035] 세포벽의 효소 분해를 사용하여, 완전한 돌연변이를 가지는 N-글리칸을 포함하는 아포플라스트 항체의 풀을 유리시킬 수 있다. 이 추출 방법은 복합체 N-글리칸을 함유하는 글리코실화된 항체가 풍부한 집단, 또는 균질한 집단의 회수를 허용하고, 프로토플라스트 분획에서 글리코실화된 항체의 미성숙 형태를 분리시킬 수 있다. 미성숙 N-글리칸을 함유하는 항체의 풀이 요망된다면, 프로토플라스트 분획이 보유될 수 있고, 항체들은 프로토플라스트 분획으로부터 정제될 수 있다.

[0036] 본 발명의 VLP는 또한 표준 조직 파괴 기법을 사용하여 얻은 것보다 더 큰 혈구응집반응 활성을 나타내는 것으로 특징으로 한다. 이 개선된 혈구응집반응 활성은 더 큰 수율의 무결함 VLP(용액 중에서 HA 모노머가 거의 없음 또는 트리머 없음), 무결함 지질 피막을 가지는 더 큰 수율의 무결함 VLP, 또는 그것의 조합으로부터 초래될 수 있다.

[0037] VLP를 사용하여 제조된 백신은 전바이러스로 제조된 백신과 비교할 때, 그것들이 비-감염성이라는 이점을 제공

한다. 따라서, 생물학적 오염물질은 문제되지 않으며, 생성에 필요로 되지 않는다. 식물-제조 VLP는 온실 또는 필드에서 성장되는 발현 시스템을 허용함으로써 추가적인 이점을 제공하며, 따라서 상당히 더 경제적이고, 규모 확대에 적합하다.

[0038] 추가적으로, 식물은 시알산 잔기를 단백질로 합성하고 부가하는데 수반되는 효소를 포함하지 않는다. VLP는 뉴라미니다아제(NA)의 부재하에서 만들어질 수 있고, NA를 공동발현시키거나, 또는 생성 세포를 처리하거나 또는 시알리다아제(뉴라미니다아제)로 추출하거나, 식물 중에서 VLP 생성을 보장할 필요가 없다.

[0039] 본 발명의 이 개요는 본 발명의 모든 특징을 필수적으로 설명하지 않는다.

### 도면의 간단한 설명

[0040] 본 발명의 이런 및 다른 특징들은 첨부되는 도면으로 기준이 만들어지는 다음의 설명으로부터 더 명백하게 될 것이다:

**도 1**은 H5 A/Indonesia/5/05 혈구응집소의 발현을 위한 CPMVHT-기반 발현 카세트 (구성체 685)의 개략적인 표시를 나타낸다.

**도 2**는 a) PacI (35S 프로모터의 위쪽)로부터 AscI (NOS 종결자의 바로 아래쪽)의 H5/Indo (구성체 번호 685)를 발현시키는 구성체 부분의 핵산 서열(SEQ ID NO. 1)을 나타낸다. A/Indonesia/5/2005로부터 H5의 코딩 서열은 밑줄로 되어 있다. 도 2b는 구성체 번호 685에 의해 암호화되는 H5 A/Indonesia/5/05 혈구응집소의 아미노산 서열 (SEQ ID NO. 2)을 나타낸다.

**도 3**은 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 혈구응집소 (HA)-함유 구조의 특징을 나타낸다. 분해된 식물 추출물의 원심분리 후, 펠렛을 재현탁하였고, SEC에 의해 분별하였다. 도 3a는 분획 당 전체 가용성 단백질 함량을 나타낸다(속이 찬 삼각형; 최대값의 %, 좌측 Y-축; Bradford법을 사용하여 결정). 수집한 분획의 혈구응집반응 활성(속이 찬 막대; 우측 Y-축)을 또한 나타낸다. 도 3b는 SEC 용리 분획의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 분획을 아세톤에 의해 침전시켰고, 분석 전 샘플 부하 버퍼를 감소시키는 1/40 부피로 재현탁하였다. 겔을 0.1% Coomassie R-250 용액으로 염색하였다. 정제된 VLP를 대조군으로서 실행하였다. HAO 모노머에 대응하는 밴드를 화살표에 의해 나타낸다. MW - 분자량 표준(kDa); C - 정제된 VLP (대조군); 레인 7 내지 10 및 14 내지 16은 도 3A에서 나타내는 SEC 분석으로부터 용리되는 분획 수에 대응한다.

**도 4**는 효소 분해 후 Comitrol™ 균질기를 사용하여 기계적 균질화에 의해 얻은 단백질 프로파일의 비교를 나타낸다. 샘플을 변성 샘플 장약 버퍼 중에서 처리하였고, 단백질을 용리 분획의 SDS-PAGE 분석에 의해 분리하였다. 겔을 0.1% Coomassie R-250 용액으로 염색하였다. MW - 분자량 표준 (kDa); 레인 1 - 25 µl 효소 혼합물; 레인 2 - 25 µl 식물 조직의 효소 분해 및 레인 3 - Comitrol 균질기로 얻은 5 µl 추출물.

**도 5**는 알팔파 플라스토시아닌 프로모터 및 5' UTR, A/Indonesia/5/2005 (Construct # 660)로부터의 H5의 혈구응집소 암호화 서열, 알팔파 플라스토시아닌 3' UTR 및 종결자 서열을 포함하는 HA 발현 카세트의 핵산 서열 (SEQ ID NO: 9)을 나타낸다.

**도 6**은 HA-VLP의 양이온 교환 수지 상의 HA-VLP의 포획이 아포플라스트 분획에서 HA-VLP의 분리를 직접적으로 형성한다는 것을 나타낸다. 샘플을 비-환원성, 변성 샘플 로딩 버퍼 중에서 처리하였고, 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하였다. 겔을 0.1% Coomassie R-250 용액으로 염색하였다. 레인 1: 원심분리 후 아포플라스트 분획, 레인 2-3: 연속적인 마이크로여과 후 아포플라스트 분획; 레인 4: 양이온 교환의 로딩; 레인 5: 양이온 교환의 분획을 통한 흐름. 레인 6; 양이온 교환으로부터 용리, 10×농축; 레인 7: 분자량 표준(kDa).

**도 7**은 분해 버퍼에 NaCl의 첨가 없이 정제 후 H5/Indo VLP (도 7a) 및 H1/Cal VLP (도 7b) 및 분해 버퍼에 NaCl의 첨가가 있는 H1/Cal VLP (도 7c)의 나노입자 트래킹 분석(NTA)을 나타낸다. NTA 실험은 NanoSight LM20 (NanoSight, Amesbury, UK)으로 수행하였다. 기기는 블루 레이저(405 nm), 샘플 챔버 및 Viton 볼소고무 o-링을 장착한다. 비디오를 실온에서 기록하였고, NTA 2.0 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 샘플을 60초 동안 기록하였다. 셔터 및 게인(gain)을 수동으로 선택하여서, 최적의 입자 해상도를 얻었다.

**도 8**은 다른 버퍼를 사용하여 효소 분해에 의해 만들어진 H3/Brisbane VLP의 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 레인 1) 순수한 재조합 HA 표준(5 µg, Immune Technology Corp제. IT-003-0042p) 레인 2 내지 5는 다음의 버퍼 중에서 수행되는 원심분리된 7 µl의 효소 추출물을 함유한다: 레인 2) 600mM 만니톨 + 125mM 시트레이트 + 75mM NaPO<sub>4</sub> + 25mM EDTA + 0.04% 바이실라이트 pH6.2, 레인 3) 600mM 만니톨 + 125mM 시트레이트 + 75mM NaPO<sub>4</sub>

+ 50mM EDTA + 0.04% 바이실파이트 pH6.2, 라인 4) 200mM 만니톨 + 125mM 시트레이트 + 75mM NaPO<sub>4</sub> + 25mM EDTA + 0.03% 바이실파이트 pH6.2, 라인 5) 200mM 만니톨 + 125mM 시트레이트 + 75mM NaPO<sub>4</sub> + 50mM EDTA + 0.03% 바이실파이트 pH6.2. 화살표는 HAO의 면역검출 신호를 나타낸다.

도 9는 구성체 #590의 조립체에 대해 합성된 DNA 단편의 서열을 나타낸다(LC 단편; (SEQ ID NO.15).

도 10은 구성체 #592 (HC fragment)의 조립체에 대해 합성된 DNA 단편의 서열을 나타낸다(SEQ ID NO.16).

도 11a 및 도 11b는 각각 구성체 #595 (도 11A) 및 #R472 (도 11B)의 개략적 표현을 나타낸다.

도 12는 세포벽의 기계적 파괴(블렌더 추출) 및 효소 분해에 의해 생성된 추출물로부터 정제된 항체의 SDS-PAGE 비교를 나타낸다. 각각의 추출 방법에 대해, 두 가지를 로트를 처리하였고 독립적으로 정제하였다.

도 13a는 세포벽의 기계적 파괴(블렌더 추출) 및 효소 분해에 의해 정제된 C2B8 상의 올리고만노시드 N-글리칸의 비율의 비교를 나타낸다. 도 13B는 세포벽의 기계적 파괴(블렌더 추출) 및 효소 분해에 의해 정제된 C2B8 상의 복합체 N-글리칸의 비율의 비교를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 본 발명은 식물-유래 단백질의 제조 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 식물 및 식물 조직으로부터 단백질을, 또는 상부구조물 단백질을 얻는 방법을 제공한다.
- [0042] 다음의 설명은 바람직한 구체예가 있다.
- [0043] 본 발명은 관심의 단백질 또는 단백질 상부구조물을 얻는 방법을 제공한다. 관심의 단백질은 프로토플라스트/스페로플라스트 구간을 제외한 식물 세포 부분에 대응하는 아포플라스트 또는 세포외 구간에 존재할 수 있다. 본 방법은 식물 세포 주변의 셀룰로오스 식물 세포벽을 제거하는 단계, 분해하는 단계 또는 분해하고 제거하는 단계를 수반한다. 세포벽을 분해함으로써 세포벽의 폴리머 성분은 헐겁게 되고, 관심의 단백질 또는 단백질 상부구조물은 더 용이하게 방출될 수 있다. 이 방법을 사용함으로써, 관심의 단백질 또는 단백질 상부구조물은 풍부하게 되는데, 대부분의 숙주-세포 단백질 및 성분을 함유하는 프로토플라스트/스페로플라스트 구간이 아포플라스트로부터 분리되기 때문이다. 이하에서 주목하는 바와 같이, 공정 동안 프로토플라스트/스페로플라스트 구간의 완전함이 상실된다면, 프로토플라스트/스페로플라스트 구간이 무결함이 아니라면, 및 프로토플라스트/스페로플라스트로부터 숙주 세포 단백질 및 성분의 부분이 아포플라스트 분획에 존재한다면, 본원에서 제공되는 방법은 관심의 단백질 또는 단백질 상부구조물을 얻는데 훨씬 효과적이다. 이하에서 설명하는 방법을 사용하여, 프로토플라스트/스페로플라스트 구간의 완전함이 상실된다면, 단백질 또는 단백질 상부구조물은 미토콘드리아, 엽록체, 및 다른 세포 기관을 포함하는 무결함 세포 기관으로부터 여전히 분리될 수 있고, 여전히 유리한 결과가 얻어질 수 있다.
- [0044] "단백질" 또는 "관심의 단백질"(이 용어들은 상호호환가능하게 사용된다)은 식물 또는 식물의 부분 내에서 발견되는 뉴클레오티드 서열, 또는 암호 영역에 의해 암호화되는 단백질 또는 단백질 서브유닛을 의미한다. 단백질은 약 1 내지 약 100 kDa 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 kDa, 또는 그 중의 임의의 양으로 분자량을 가질 수 있다. 단백질은 모노머, 다이머, 트리머, 또는 멀티머일 수 있다.
- [0045] 상부구조물 단백질, 단백질 상부구조물, 또는 상부구조물 단백질로 칭해지는 단백질 상부구조물은 2개 이상의 폴리펩티드로 구성되는 단백질 구조이다. 폴리펩티드는 동일하거나 또는 다를 수 있으며; 다르다면 그것들은 약 1:1 내지 약 10:1 또는 더 큰 비율로 존재할 수 있다. 상부구조물 단백질은, 제한되는 것은 아니지만, 단백질 로제트, 단백질 복합체, 단백질 나노입자, 글리코단백질, 항체, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 바이러스 유사 입자, 프로테아좀, 메타볼론, 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체, 키메라 단백질, 키메라 단백질 복합체, 키메라 단백질 나노입자, 키메라 글리코단백질, 키메라 항체, 키메라 단클론성 항체, 키메라 단일 사슬 단클론성 항체, 키메라 혈구응집소(HA)를 포함할 수 있다. 단백질 상부구조물이 VLP라면, VLP는 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 및 바이러스 피복 단백질로부터 선택될 수 있다. 식물 유래 VLP는 인플루엔자(HA)를 포함할 수 있다.
- [0046] 조립될 때, 전형적으로 단백질 상부구조물(단백질 상부구조물)은 거대하며, 예를 들어 75kDa 초과, 예를 들어 약 75 내지 약 1500 kDa 또는 그 중의 임의의 분자량을 가진다. 예를 들어, 단백질 상부구조물은 약 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380,

400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500 kDa, 또는 그 중의 임의의 양의 분자량을 가질 수 있고, 단백질 상부구조물을 구성하기 위해 함께 합쳐지는 서브유닛은 더 적은 분자량일 수 있고, 예를 들어 각 서브유닛은 약 1 kDa 내지 약 500 kDa, 또는 그 중의 임의의 양의 분자량을 가질 수 있다. 단백질 상부구조물은 예를 들어 단백질 나선 중의 잔기와 수소 결합된 하나 이상의 아미노산을 가지는 2차 구조, 3-차원 배치를 가지는 3차 구조, 또는 다중-서브유닛 복합체를 형성하는 다중 폴딩 단백질 또는 감긴(coiled) 단백질 분자를 나타내는 단백질을 포함할 수 있다.

[0047] 다중단백질 복합체(또는 단백질 복합체)는 2이상의 연결된 폴리펩티드 사슬의 군을 포함할 수 있다. 다른 폴리펩티드 사슬이 다른 단백질 도메인을 함유하면, 결과된 멀티단백질 복합체는 다양한 촉매 기능을 가질 수 있다. 단백질 복합체는 또한 단일 폴리펩티드 사슬 내에서 다양한 촉매 도메인을 포함하는 멀티효소 폴리펩티드일 수 있다. 단백질 복합체는 전형적으로 4차 구조 형태이다. 표준 단백질 분리 프로토콜을 사용하여 전형적으로 무결함으로 존재하지 않지만, 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 얻어질 수 있는 단백질 복합체의 예는 프로테아좀(펩티드 및 단백질의 분해에 대해), 메타볼론(산화 에너지 생성에 대해), 리보솜(단백질 합성에 대해; 예를 들어 Pereira-Leal, J.B.; et. al., 2006, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 361(1467):507-517에서 설명되는 바와 같음), 전사복합체, 재조합 복합체, 광합성 복합체, 막수송 복합체, 핵공 복합체를 포함한다. 본 방법은 안정한 또는 약한 단백질 도메인-단백질 도메인 상호작용을 가지는 것을 특징으로 하는 단백질 복합체를 얻기 위해 사용될 수 있다.

[0048] 단백질, 또는 단백질 상부구조물의 예는, 제한되는 것은 아니지만 공업 효소, 예를 들어 셀룰라아제, 크실라아제, 프로테아제, 페록시다아제, 서브틸리신, 단백질 보충물, 기능식품(nutraceutical), 개량신약(value-added product), 또는 먹이, 음식 또는 먹이와 음식 둘 다의 사용에 대해 그것의 단편, 약제학적으로 활성인 단백질, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 성장 인자, 성장 조절제, 항체, 항원 및 그것의 단편 또는 번역화 또는 백신접종 등에 유용한 그것의 유도체를 포함한다. 관심의 추가 단백질은, 제한되는 것은 아니지만, 인터류킨, 예를 들어 IL-1 내지 IL-24, IL-26 및 IL-27 중 하나 이상, 사이토카인, 에리트로포이에틴(EPO), 인슐린, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF 또는 그것의 조합, 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 혈액 응고 인자, 예를 들어 인자 VIII, 인자 IX, 또는 tPA hGH, 수용체, 수용체 작용제, 항체, 뉴로폴리펩티드, 인슐린, 백신, 성장 인자, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 표피 성장 인자, 케라틴세포성장 인자, 형질전환성장인자, 성장 조절제, 항원, 자가항원, 그것의 단편, 또는 그것의 조합을 포함한다.

[0049] 단백질 상부구조물의 비-제한적 예는 항체이다. 항체는 약 100 내지 약 1000 kDa, 또는 그것의 임의의 양의 분자량을 가지는 글리코단백질이다. 항체는 디설파이드 결합에 의해 연결되는 4개의 폴리펩티드 사슬, 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함한다. 예를 들어, 제한하는 것으로 생각되어서는 안 되지만, 각 경쇄는 대략 25 kDa, 예를 들어 약 20 내지 약 30 kDa 또는 그 중의 임의의 양, 또는 예를 들어 약 20 내지 약 300 kDa 또는 그 중의 임의의 양의 분자량을 가질 수 있고, 2개의 도메인, 하나의 가변 도메인( $V_L$ )과 하나의 불변 도메인( $C_L$ )으로 구성된다. 각 중쇄는 대략 50 kDa, 예를 들어 약 30 내지 약 75 kDa, 또는 그 중의 임의의 양, 또는 그 이상, 예를 들어 약 30 내지 약 500 kDa 또는 그 중의 임의의 양의 분자량을 가질 수 있고, 불변 및 가변 영역으로 구성된다. 중쇄 및 경쇄는 유사하지만 동일하지 않는 아미노산 서열의 군으로 구성되는 다수의 상동 섹션을 함유한다. 이 상동 유닛은 약 110개의 아미노산으로 구성되며, 면역글로불린 도메인으로 불린다. 중쇄는 하나의 가변 도메인( $V_H$ ) 및 3 또는 4개의 불변 도메인 (항체 분류 또는 이소형에 의존하여  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , 및  $C_{H4}$ )을 함유한다.  $C_{H1}$ 과  $C_{H2}$  도메인 사이의 영역은 힌지 영역으로 불리며, Y-형 항체 분자의 2개의 Fab 암(arm) 사이에서 유연성을 허용하고, 그것들을 개방 및 폐쇄하여 고정된 거리에 의해 분리되는 2개의 항원 결정소에 결합하는 공간을 제공한다.

[0050] 단백질 상부구조물의 다른 비-제한적 예는 VLP이다. VLP는 HA0 전구체 형태, 또는 디설파이드 브릿지 형태에 의해 함께 보유되는 HA1 또는 HA2 도메인을 포함할 수 있다. VLP은 약 20 nm 내지 1  $\mu$ m, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150 160, 170, 180, 190, 또는 200 nm, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어 100 nm의 평균 크기를 가질 수 있고, 지질 막을 포함할 수 있다.

[0051] 단백질 또는 상부구조물 단백질은 하나 이상의 지질, 인지질, 핵산, 막 등을 더 포함할 수 있다. 2개 이상의 폴리펩티드는 공유결합, 디설파이드 브릿지, 전하 상호작용, 소수성 인력, 반데르발스힘, 수소 결합 등에 의해 연결될 수 있다. 단백질 상부구조물의 예는 단클론성 항체, 키메라 단클론성 항체, 단일 사슬 단클론성 항체, 또



는 피막되거나, 또는 피막되지 않을 수 있는 바이러스 유사 입자(VLP), 예를 들어 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질 또는 바이러스 피복 단백질이다.

[0052] 단백질, 또는 상부구조물 단백질은 식물 숙주 세포를 포함하는 적당한 숙주 세포 중에서 생성될 수 있고, 원한다면 추가로 정제될 수 있다. 키메라 단클론성 항체, 인플루엔자 VLP, 및 키메라 VLP가 본원에서 예시되지만, 본원에서 설명되는 방법은 임의의 사이토줄 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질, 또는 아포플라스트에서 편재화하는 또는 아포플라스트로 분비되는 임의의 식물-유래 단백질 또는 상부구조물 단백질 일 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 방법을 제공한다. 본 방법은 아포플라스트 내에서 편재화된 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계; 식물 물질로부터 프로토플라스트/스페로플라스트 분획, 및 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 아포플라스트 분획을 생성하는 단계, 및 아포플라스트 분획을 회수하는 단계를 수반한다. 원한다면, 식물 유래 단백질 또는 상부구조물 단백질은 아포플라스트 분획으로부터 정제될 수 있다.

[0054] 본 발명은 또한 단백질 또는 상부구조물 단백질이 식물 유래 지질 피막, 예를 들어 식물-유래 지질 피막을 포함하는 VLP를 포함하는 단백질 또는 상부구조물 단백질의 제조방법을 제공한다. 본 방법은 관심의 상부구조물 단백질, 예를 들어 VLP를 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계, 식물 또는 식물 물질을 효소 조성물로 처리하여 하나 이상의 아포플라스트 단백질 복합체 및 프로토플라스트/스페로플라스트 분획을 생성하는 단계, 및 하나 이상의 아포플라스트 단백질 복합체를 프로토플라스트 분획으로부터 분리하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 아포플라스트 단백질 복합체는 식물 유래 지질 피막을 포함하는 상부구조물 단백질 또는 VLP를 포함한다.

[0055] 본 발명은 또한 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 식물 또는 식물 물질을 얻는 단계, 세포벽 분해 효소 조성물을 사용하여 식물 물질을 분해해서 분해된 분획을 생성하는 단계, 및 분해된 분획을 여과하여 여과된 분획을 생성하는 단계 및 여과 분획으로부터 식물-유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 식물 유래 단백질, 또는 상부구조물 단백질의 제조 방법을 제공한다. 이 방법에서, 프로토플라스트의 완전함은 필요로 되지 않는다.

[0056] 프로토플라스트는 세포벽이 완전하게 또는 부분적으로 제거된 식물 세포이다. 스페로플라스트는 세포벽의 부분적 제거를 가질 수 있다. 프로토플라스트, 스페로플라스트, 또는 프로토플라스트와 스페로플라스트 둘 다(프로토플라스트/스페로플라스트) 본원에서 설명되는 바와 같이 사용될 수 있고, 본원에서 사용되는 용어는 상호호환 가능하다. 세포벽은 기계적으로(예를 들어, 균질화, 블렌딩을 통해) 파괴되고 제거될 수 있고, 세포벽은 완전하게 또는 부분적으로 효소에 의해 분해될 수 있고, 또는 세포벽은 기계적 및 효소 방법의 조합을 사용하여, 예를 들어 균질화 다음에 세포벽의 분해를 위한 효소 처리에 의해 제거될 수 있다. 프로토플라스트는 또한 배양된 식물 세포, 예를 들어 액체 배양 식물 세포, 또는 고체 배양 식물 세포로부터 얻어질 수 있다.

[0057] 식물 조직 배양물, 배양된 식물 세포, 및 프로토플라스트, 스페로플라스트 등에서 출발하는 표준 기준은 다음을 포함한다: MK Razdan 2<sup>nd</sup> Ed.에 의한 *Introduction to Plant Tissue Culture*(참고로써 본원에 포함되는 Science Publishers, 2003), 또는 예를 들어, 하기 URL: [molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm](http://molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm) 참조. 프로토플라스트 (또는 스페로플라스트) 생성 및 조작에 관한 방법 및 기술은, 예를 들어 Davey MR et al., 2005 (참고로써 본원에 포함되는 *Biotechnology Advances* 23:131-171)에서 검토된다. 일반적 방법 및 단백질 생화학, 분자 생물학 등의 원칙에서 출발하는 표준 기준 작업은, 예를 들어 Ausubel et al, *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1998 and Supplements to 2001; 참고로써 본원에 포함됨); Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989 (참고로써 본원에 포함됨); Kaufman et al, Eds., *Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine*, CRC Press, Boca Raton, 1995 (참고로써 본원에 포함됨); McPherson, Ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1991 (참고로써 본원에 포함됨)을 포함한다.

[0058] 방출을 위한 식물 세포 벽 또는 프로토플라스트 또는 스페로플라스트를 분해하는데 유용한 효소는 당업자에게 알려져 있고, 셀룰라아제(EC 3.2.1.4), 펙티나아제(EC 3.2.1.15), 크실라나아제(EC 3.2.1.8), 키티나아제(EC 3.2.1.14), 헤미셀룰라아제, 또는 그것의 조합을 포함할 수 있다. 적당한 효소의 비-제한적 예는 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제, 및 펙티나아제, 예를 들어 MACEROZYME<sup>TM</sup> (대략 셀룰라아제: 0.1U/mg, 헤미셀룰라아제: 0.25U/mg, 및 펙티나아제: 0.5U/mg를 함유)를 포함하는 다-성분 효소 혼합물을 포함한다. 상업적 효소, 효소 혼합물 및 공급업자의 다른 예는 표 1에서 열거된다(*Introduction to Plant Tissue Culture*, MK Razdan 2<sup>nd</sup> Ed.,

Science Publishers, 2003 참조).

[0059]

셀룰라아제의 또 다른 명칭, 및 형태는 엔도-1,4-β-D-글루카나아제; β-1,4-글루카나아제; β-1,4-엔도글루칸 히드롤라아제; 셀룰라아제 A; 셀룰로진 AP; 엔도글루카나아제 D; 알칼리 셀룰라아제; 셀룰라아제 A 3; 셀룰렉스 트리나아제; 9.5 셀룰라아제; 아비셀라아제; 판셀라아제 SS 및 1,4-(1,3;1,4)-β-D-글루칸 4-글루카노히드롤라아제를 포함한다. 펙티나아제(폴리갈락투로나아제)의 또 다른 명칭, 및 형태는 펙틴 데폴리머라아제; 펙티나아제; 엔도폴리갈락투로나아제; 펙톨라아제; 펙틴 히드롤라아제; 펙틴 폴리갈락투로나아제; 엔도-폴리갈락투로나아제; 폴리-α-1,4-갈락투로나이드 글리카노히드롤라아제; 엔도갈락투로나아제; 엔도-D-갈락투로나아제 및 폴리(1,4-α-D-갈락투로나이드) 글리카노히드롤라아제를 포함한다. 크실라나아제의 또 다른 명칭, 및 종류는 헤미셀룰라아제, 엔도-(1→4)-β-크실란 4-크실라노히드롤라아제; 엔도-1,4-크실라나아제; 크실라나아제; β-1,4-크실라나아제; 엔도-1,4-크실라나아제; 엔도-β-1,4-크실라나아제; 엔도-1,4-β-D-크실라나아제; 1,4-β-크실란 크실라노히드롤라아제; β-크실라나아제; β-1,4-크실란 크실라노히드롤라아제; 엔도-1,4-β-크실라나아제; β-D-크실라나아제를 포함한다. 키티나아제의 또 다른 명칭, 및 형태는 키토텍스트리나아제; 1,4-β-폴리-N-아세틸글루코사미니다아제; 폴리-β-글루코사미니다아제; β-1,4-폴리-N-아세틸 글루코사미니다아제; 폴리[1,4-(N-아세틸-β-D-글루코사미니드)] 글리카노히드롤라아제를 포함한다.

# 표 1

프로토플라스트 분리에 대해 상업적으로 이용가능한 효소의 비-제한적 예

효소	공급원	공급업자
셀룰라아제		
Cellulase ONOZUKA R-10	<i>Trichoderma viride</i>	Kinki Yakult Mfg. Col. Ltd. 8-12, Shingikancho Nishinomiya, Japan
Cellulase ONOZUKA RS	<i>T. viride</i>	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
Cellulase YC	<i>T. viride</i>	Seishin Pharma Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama Nagareyama-shi, Chiba-kan, Japan
Cellulase CEL	<i>T. viride</i>	Cooper Biomedical Inc. Malvern, PA, USA
Cellulysin	<i>T. viride</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Driselase	<i>Irpex locteus</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
Melcelase P-1	<i>T. viride</i>	Meiji Seiki Kaisha Ltd. No.8, 2-Chome Kyobashi, Chou-Ku, Japan
Multifect CX GC	<i>T. viride</i>	Genencor
Multifect CX B	<i>T. viride</i>	Genencor
헤미셀룰라아제		
Hellcase	<i>Helix pomatia</i>	Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers, France
Hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Hemicellulase H-2125	<i>Rhizopus</i> sp.	Sigma, Munchen
Rhozyme HP 150	<i>Aspergillus niger</i>	Genencor Inc., South San Francisco, CA, USA
펙티나아제		
MACERASE	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
MACEROZYME R-10	<i>R. arrhizus</i>	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
Multifect Pectinase FE	<i>A. niger</i>	Genencor
PATE	<i>Bacillus polymyza</i>	Farbwerke-Hoechst AG, Frankfurt, FRG
Pectinol	<i>Aspergillus</i> sp.	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Philadelphia, PA 19105, USA
Pectolyase Y-23	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharma Co. Ltd., Japan
Zymolyase	<i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma Chemical Co., USA

[0060]

[0061]

특정 효소 또는 효소의 조합 및 농도 및 반응 조건의 선택은 VLP를 포함하는 프로토플라스트 및 아포플라스트 분획으로부터 얻어지는 사용된 식물 조직의 형태에 의존할 것이다. 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제 및 펙티나아제의 혼합물, 예를 들어 펙티나아제 MACEROZYME™ 또는 Multifect는 0.01% 내지 2.5% (v/v), 예를 들어 0.01,



0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 또는 2.5% (v/v), 또는 그 중의 임의의 양의 범위에 있는 농도로 사용될 수 있다. MACEROZYME™ 또는 Multifect는 단독으로, 또는 다른 효소, 예를 들어 셀룰라아제, 펙티나아제, 헤미셀룰라아제, 또는 그것의 조합과 조합하여 사용될 수 있다. 셀룰라아제는 0.1% 내지 5%, 예를 들어 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.5, 3.75, 4.0, 4.25, 4.5, 4.75, 5.0% (w/v) 또는 그 중의 임의의 양의 범위에 있는 농도로 사용될 수 있다.

[0062] 효소 용액(또 다르게는 세포벽 분해 조성물, 분해 용액으로서 언급됨)은 일반적으로 버퍼 또는 버퍼 시스템, 삼투압 조절제 및 하나 이상의 염, 2가의 양이온 또는 다른 첨가제를 포함할 수 있다. 버퍼 또는 버퍼 시스템은 효소 활성 및 단백질(들)의 안정성, 또는 VLP에 적당한 범위에서 pH를 유지하기 위해, 약 pH 5.0 내지 약 8.0의 범위내에서, 또는 그 중의 임의의 값 내에서 정제하기 위해 선택된다. 사용된 선택 pH는 회수되는 VLP에 따라서 다양할 수 있으며, 예를 들어 pH는 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 또는 그 중의 임의의 pH일 수 있다. 버퍼 또는 버퍼 시스템의 예는, 제한되는 것은 아니지만, MES, 포스페이트, 시트레이트 등을 포함한다. 하나 이상의 버퍼 또는 버퍼 시스템은 효소 용액(분해 용액) 중에서 합쳐질 수 있고; 하나 이상의 버퍼는 0 mM 내지 약 200 mM의 농도, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 또는 190 mM 또는 그 중의 임의의 양으로 존재할 수 있다. 적합성에 의존하여, 원한다면 삼투압 조절제 성분이 첨가될 수 있다. 삼투압 조절제 및 그것의 농도는 효소 용액의 삼투압 강도를 상승시키기 위해 선택된다. 삼투압 조절제의 예는 만니톨, 소르비톨 또는 다른 당 알코올, 다양한 폴리머 길이의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등을 포함한다. 삼투압 조절제의 농도 범위는 식물 중, 사용된 삼투압 조절제의 형태, 및 선택된 식물 조직의 형태(기원의 종 또는 기관, 예를 들어 잎 또는 줄기)에 의존하여 다양할 수 있고 - 일반적으로 범위는 0M 내지 약 0.8 M, 예를 들어 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 또는 0.75 M, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 nM 만니톨, 또는 그 중의 임의의 양이다. 삼투압 조절제의 농도는 또한 백분율(w/v)로서 표현될 수 있다. 일부 식물 또는 조직 형태에 대해, 약간 고장성인 재제를 사용하는 것이 유리할 수 있는데, 이는 세포벽으로부터 형질세포막의 분리를 용이하게 할 수 있다. 삼투압 조절제는 또한 분해 동안 생략될 수 있다.

[0063] 식물 분해에 대해 설정한 다른 변수는 온도이다. 온도는 원한다면 분해 과정 동안 조절될 수 있다. 유용한 온도는 4℃ 내지 40℃ 또는 그 중의 임의의 온도, 예를 들어 약 4℃ 내지 15℃, 또는 그 중의 임의의 온도, 또는 약 4℃ 내지 22℃, 그 중의 임의의 온도이어야 한다. 선택한 온도에 의존하여, 다른 분해 실험 변수는 최적의 추출 조건을 유지하도록 조절될 수 있다.

[0064] 양이온, 염 또는 둘 다는, 0.5-50mM로 또는 그 중의 임의의 양으로  $Ca^{2+}$ , 또는  $Mg^{2+}$  와 같은 2가의 양이온, 약 0 내지 750 mM, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 750 mM으로 염, 예를 들어  $CaCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $CuSO_4$ ,  $KNO_3$  등으로 원형질막 안정성을 개선시키기 위해 첨가될 수 있다. 킬레이터, 예를 들어 EDTA, EGTA를 제한되는 것은 아니지만, 약 0 내지 약 200 mM, 또는 그 중의 임의의 양, 예를 들어 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mM, 또는 그 중의 임의의 양, 산화를 방지하기 위한 환원제, 제한되는 것은 아니지만, 소듐바이설파이트 또는 아스코르브산을 0.005-0.4% 또는 그 중의 임의의 양으로, 예를 들어 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4% 또는 그 중의 임의의 양, 특이적 효소 억제제(하기 참조), 및 원한다면 잎 노화의 억제제, 예를 들어 시클로헥시미드, 키네티ن, 또는 하나 이상의 폴리아민을 포함하는 다른 첨가제가 또한 첨가될 수 있다.

[0065] 분해 용액은 또한 약 0 내지 약 600 mM의 만니톨, 약 0 내지 약 500 mM의  $NaCl$ , 약 0 내지 약 50mM의 EDTA, 약 1% 내지 약 2% v/v의 셀룰로오스, 약 0 내지 약 1% v/v의 펙티나아제, 약 0.03 내지 약 0.04%의 소듐 테타바이설파이트, 약 0 내지 약 125 mM의 시트레이트 또는 약 0 내지 75mM의  $NaPO_4$  중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0066] 식물 물질은 식물 세포벽에 효소 또는 효소 조성물의 접근을 향상시키기 위해 처리될 수 있다. 예를 들어, 잎의 표면은 효소 조성물로 처리 전에 제거되거나 '벗겨질' 수 있다. 식물 물질은 작은 조각으로 절단될 수 있고(수작업으로, 또는 Urschel slicer와 같은 잘게 자르거나 절단하는 장치에 의해); 절단 식물 물질은 부분적인 진공 하에서 효소 조성물에 의해 더 인필트레이션될 수 있다(Nishimura and Beevers 1978, Plant Physiol 62:40-43; Newell et al., 1998, J. Exp Botany 49:817-827). 식물 물질의 기계적 교란은 또한 효소 조성물로 처리 전 또는 처리 동안 식물 조직에 적용될 수 있다(Giridhar et al., 1989, Protoplasma 151:151-157). 게다가, 배양된

식물 세포, 액체 또는 고체 배양물 중 하나는 프로토플라스트 또는 스페로플라스트를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0067] 불활성화된 리파아제 또는 프로테아제가 없거나 또는 있는 효소 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 프로테아제 또는 리파아제 억제제는 효소 조성물에 포함될 수 있다. 리파아제 억제제의 예는 RHC80267 (SigmaAldrich)를 포함하며; 프로테아제 억제제의 예는 E-64, Na<sub>2</sub>EDTA, 펩스타틴, 아프로티닌, PMSF, Pefabloc, Leupeptin, 베스타틴 등을 포함한다.

[0068] 효소 조성물 중에서 식물 물질을 혼합 또는 교반하는 임의의 적당한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 식물 물질은 트레이 또는 팬에서 또는 회전식 진탕기(orbital shaker)를 통해 부드럽게 교반 또는 진탕될 수 있고, 회전 또는 진동 드럼 중에서 텀블링될 수 있다. 프로토플라스트(및/또는 스페로플라스트) 손상을 최소화하기 위해 그것들이 분해 수프로부터 제거될 때까지 예방 조치가 취해져야 한다. 분해 용기는 그에 맞춰 선택되어야 한다.

[0069] 비-제한적 예로서, 500 mM 만니톨 중의 1.5% 셀룰라아제(Onozuka R-10) 및 0.375% MACEROZYME<sup>TM</sup>을 포함하는 효소 조성물, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 및 5 mM MES (pH 5.6)은 일부 담배 조직으로부터 프로토플라스트 (또는 스페로플라스트) 생성을 위해 사용될 수 있다. 본원에서 설명되는, 만니톨의 농도는 또한 약 0 내지 약 500mM, 또는 그 중의 임의의 양으로 다양할 수 있다. 본원에서 개시되는 정보가 제공된다면, 당업자는 *Nicotiana sp*의 수명 및 유형에 대한, 또는 VLP의 생성을 위해 사용되는 다른 종에 대한 적당한 효소 조성물을 결정할 수 있을 것이다.

[0070] 세포벽의 파괴, 또는 세포벽의 부분적 소화 시, 프로토플라스트 분획(프로토플라스트 및/또는 스페로플라스트를 포함) 및 "아포플라스트 분획"이 얻어진다. 대안으로, "분해된 분획"이 얻어질 수 있다. 하기 주목하는 프로토플라스트 분획의 완전함은 본원에서 설명되는 고수율의 단백질을 만들기 위해 필요로 되지 않을 수 있고, 따라서 아포플라스트 분획 또는 분해된 분획은 단백질, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 VLP, 바이러스 피막 단백질, 바이러스 구조 단백질, 바이러스 캡시드 단백질, 바이러스 피복 단백질의 추출을 위해 사용될 수 있다.

[0071] "아포플라스트 분획"은 프로토플라스트의 완전함을 유지하는 것을 보조하기 위해 사용될 수 있는 삼투압 조절제 및/또는 다른 성분의 존재하에서 식물 물질의 세포벽 분해 효소를 사용하여 효소 분해, 또는 부분적 효소 분해 후 얻어지는 분획을 의미한다. 아포플라스트 분획은 파괴된 프로토플라스트 (또는 스페로플라스트)로부터 생기는 일부 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 아포플라스트 분획은 프로토플라스트 분획으로부터의 성분의 약 0 내지 약 50% (v/v) 또는 그 중의 임의의 양, 또는 프로토플라스트 분획으로부터의 성분의 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% (v/v) 또는 그 중의 임의의 양을 포함할 수 있다.

[0072] "분해된 분획"은 식물 물질의 세포벽 분해 효소를 사용하여 효소 분해, 또는 부분적 효소 분해 후 남은 분획을 의미하지만, 프로토플라스트의 완전함이 필요로 되지 않고, 분해된 분획은 무결함, 파괴된 또는 무결함과 파괴된 둘 다의 프로토플라스트를 포함할 수 있다. 분해된 분획을 만들기 위해 사용되는 세포벽 분해 효소를 포함하는 조성물은 삼투압 조절제를 포함할 수 있고, 또는 삼투압 조절제는 프로토플라스트를 얻기 위해 사용되는 표준 과정에서 존재하는 양과 비교할 때 감소된 양으로 존재할 수 있고, 또는 삼투압 조절제는 조성물이 없을 수 있다. 분해된 분획은 아포플라스트 분획 및 프로토플라스트/스페로플라스트 분획을 포함하지만, 프로토플라스트/스페로플라스트 분획은 무결함일 수도 있고 아닐 수도 있다. 분해된 분획은 세포내 성분 및 세포밖 성분을 함유한다. 삼투압 조절제가 프로토플라스트/스페로플라스트 무결함을 유지하기 위해 사용된다면 세포내 성분은 프로토플라스트/스페로플라스트의 형태로 발견될 수 있다. 분해 용액 중에서 삼투압 조절제가 사용되지 않는다면, 프로토플라스트/스페로플라스트가 파괴될 수 있고, 세포내 및 세포밖 성분은 분해된 분획에서 조합될 수 있다. 본원에서 설명되는, 관심의 단백질, 또는 관심의 단백질 상부구조물은 임의의 적당한 기법을 사용하여 분해된 분획의 성분으로부터 분리될 수 있다. 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 세포벽 분해 단계는 세포벽의 폴리머 성분을 헐겁게 할 수 있고, 그렇지 않다면 세포벽에 걸린 단백질 또는 상부구조물 단백질의 방출에 도움을 준다. 이 프로토콜은 또한 세포벽 성분에 의해 단백질 또는 상부구조물 단백질의 오염을 최소화한다. 단백질 또는 상부구조물 단백질은 저속 원심분리 후 여과, 침출 여과, 퇴적, 침전, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 암모늄 설페이트 침전, 또는 그것의 조합을 사용하여 효소 분해 후 세포 파편으로부터 분리하여 관심의 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 분리된 분획을 얻을 수 있다.

[0073] 삼투압 조절제가 사용된다면, 프로토플라스트/스페로플라스트 분획, 또는 프로토플라스트를 포함하는 분획은 임의의 적당한 기법, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 침출 여과, 퇴적, 침전 또는 그것의 조합을 사용하여 아포플라스트 분획으로부터 분리되어 관심의 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는, 및/또

는 관심의 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 프로토플라스트/스페로플라스트를 포함하는 분리된 분획을 얻을 수 있다.

[0074] 분리된 분획은, 예를 들어 상청액(원심분리, 퇴적 또는 침전된다면), 또는 여과액(여과된다면)일 수 있고, 단백질 또는 상부구조물 단백질을 풍부하게 한다. 분리된 분획은 분리, 정제, 농축 또는 그것의 조합, 예를 들어 추가적인 원심분리 단계, 침전, 크로마토그래피 단계(예를 들어 크기 배제, 이온교환 크로마토그래피), 겔선 흐름 여과, 또는 그것의 조합으로 추가로 처리될 수 있다. 정제된 단백질 또는 상부구조물 단백질의 존재는, 예를 들어 천연 또는 SDS-PAGE, 적절한 검출 항체를 사용하는 웨스턴 분석, 모세관 전기이동, 또는 당업자에게 명백한 임의의 다른 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0075] 아포플라스트는 원형질막 밖의 식물 세포 부분이며, 식물의 세포벽 및 세포내 공간을 포함한다. 프로토플라스트(및/또는 아포플라스트)의 완전함은 분해 및 추가 공정 동안 유지되는 것이 바람직하지만, 단백질 또는 상부구조물 단백질을 풍부하게 하기 위해서 프로토플라스트가 무결함으로 남아있을 필요는 없다.

[0076] 합성 동안, 단백질 또는 상부구조물 단백질은 원형질막 밖으로 배출된다. 상부구조물 단백질이 VLP라면, 그것들은 약 20nm 내지 1 $\mu$ m, 또는 그 중의 임의의 양의 평균 크기를 가진다. 상부구조물 단백질이 항체라면, 그것들은 약 100 kDa 내지 약 1000 kDa, 또는 그 중의 임의의 양으로 분자량을 가진다. 일단 합성되면, 그것의 크기에 기인하여, 단백질 또는 상부구조물 단백질은 원형질막과 세포벽 사이에 걸린 채로 남아 있을 수 있고, 분리 또는 추가 정제를 위해 식물 단백질을 얻기 위해 사용되는 표준 기술 방법의 사용으로 접근가능하지 않을 수 있다. 수율을 최대로 하고, 세포 단백질을 갖는 상부구조물 단백질 분획의 오염물질을 최소로 하며, 단백질 또는 상부구조물 단백질의 완전함을 유지하기 위해서, 필요한 경우, 관련 지질 피막 또는 막, 프로토플라스트(및/또는 스페로플라스트)에서 기계적 손상을 최소화하는 단백질 또는 상부구조물 단백질을 방출하기 위한 세포벽의 파괴 방법, 예컨대 본원에서 설명되는 효소 방법이 유용할 수 있다. 그러나, 공정 동안 모든 프로토플라스트의 완전함이 유지되는 것이 필요로 되지 않는다.

[0077] 상부구조물 단백질, 예를 들어 식물에서 생성되는 VLP는 식물-유래 지질과 함께 복합체로 될 수 있다. 식물-유래 지질은 지질 이중층의 형태일 수 있고, VLP 주변의 피막을 더 포함할 수 있다. 식물 유래 지질은 식물의 원형질막의 지질 성분을 포함할 수 있으며, VLP는 제한되는 것은 아니지만, 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 글리코스핑고리피드, 피토스테롤 또는 그것의 조합을 포함하여 생성된다. 식물-유래 지질은 또 다르게는 '식물 지질'로서 언급될 수 있다. 피토스테롤의 예는 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, 스티그마스테롤, 시토스테롤, 24-메틸콜레스테롤 및 콜레스테롤을 포함한다(Mongrand et al., 2004, J. Biol. Chem. 279:36277-86).

[0078] 폴리펩티드 발현은 식물의 임의의 세포내 또는 세포밖 공간, 세포 기관 또는 조직을 표적으로 할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 특정 위치로 편재화 하기 위해서, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 하나의 펩티드 또는 리더 서열을 암호화하는 핵산 서열에 연결될 수 있다. 대안으로 신호 펩티드는 수송 펩티드 또는 신호 서열, 또는 리더 서열로서 언급될 수 있다. 발현된 폴리펩티드의 아포플라스트로 편재화를 지시하는 신호 펩티드 또는 펩티드 서열은, 제한되는 것은 아니지만 쌀 아밀라아제 신호 펩티드(McCormick 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:703-708), 아미노산 서열을 가지는 단백질 디설파이드 이소머라아제 신호 펩티드(PDI) 서열을 포함한다:

[0079] MAKNVAI FGLLFSLLLVPSQIFAE; SEQ ID NO. 10,

[0080] 식물 발병 관련 단백질(PRP; Szyperski et al. PNAS 95:2262-2262), 예를 들어 담배 식물 발병 관련 단백질 2(PRP), 인간 단클론성 항체 신호 펩티드(SP 또는 리더 서열), 또는 단백질에 대해 천연인 임의의 신호 펩티드.

[0081] 일부 예에서, 예를 들어 폴리펩티드가 신호 펩티드 또는 수송 펩티드의 부재하에서 발현되고, 분비될 때, 발현된 폴리펩티드는 특이적 세포내 또는 세포밖 공간(예컨대 아포플라스트), 세포기관 또는 조직에 축적될 수 있다.

[0082] 용어 "바이러스 유사 입자"(VLP), 또는 "바이러스-유사 입자" 또는 "VLP"는 자기-조립(self-assemble) 구조를 말하며, 바이러스 표면 단백질, 예를 들어 인플루엔자 HA 단백질, 또는 키메라 인플루엔자 HA 단백질을 포함한다. VLP 및 키메라 VLP는 일반적으로 형태상으로 및 항원적으로 감염 시 생성된 비리온과 유사하지만, 복제에 충분한 유전정보가 없고, 따라서 비-감염성이다.

[0083] "키메라 단백질" 또는 "키메라 폴리펩티드"는 하나의 폴리펩티드와 융합되는 2 이상의 공급원으로부터, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 2 이상의 인플루엔자 유형 또는 서브타입을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. 키메라 단백질 또는 폴리펩티드는 폴리펩티드 또는 단백질의 나머지와 동일한(즉, 천연) 또는 이중성인

하나의 펩티드를 포함할 수 있다. 키메라 단백질 또는 키메라 폴리펩티드는 키메라 뉴클레오티드 서열로부터 전 사물로서 생성될 수도 있고, 무결함으로 남아있을 수도 있고, 필요하다면, 키메라 단백질 또는 키메라 폴리펩티 드는 합성 후 절단될 수 있다. 무결함 키메라 단백질, 또는 키메라 단백질의 절단 부분은 멀티머 단백질을 형성 하는 것과 관련될 수 있다. 키메라 단백질 또는 키메라 폴리펩티드는 또한 디설파이드 브릿지(즉, 멀티머 단백 질)를 통해 관련된 서브유닛을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 2 이상의 공급 원으로부터 아미노산 서열을 포함하는 키메라 폴리펩티드는 서브유닛으로 처리될 수 있고, 서브유닛은 키메라 단백질 또는 키메라 폴리펩티드를 만드는 디설파이드 브릿지를 통해 연결된다. 키메라 단백질의 비-제한적 예는 키메라 단클론성 항체, 예를 들어 C2B8, 또는 키메라 VLP이며, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 미국 가특허 출원 61/220,161 및 PCT/CA2010/000983 (본원에 참고로써 포함됨)에서 설명되는 690, 691, 696, 734, 737, 745 또는 747 (표 2)로 넘버링된 단백질 및 VLP 생성 구성체이다.

[0084] 단백질 또는 상부구조물 단백질을 글리코단백질일 수 있고, 세포벽 분해에 의한 추출을 수반하는 본원에서 설명 되는 방법은 변형된 성숙 N-글리칸을 함유하는 글리코단백질의 회수에 바람직한 WO 20008/151440 (식물 내에서 글리코단백질 생성을 변형; 본원에 참고로써 포함됨)에서 설명되는 N-글리코실화 프로필을 변형하기 위한 글리 코단백질 및 하나 이상의 효소를 공동발현시키는 식물에 적용될 수 있다. 예를 들어, 성숙 N-글리칸은 크실로오 스 및 푸코오스 잔기가 없을 수 있고, 또는 환원된 푸코실화, 크실화, 또는 푸코실화와 크실화 둘다의 N-글리칸 을 나타낼 수 있다. 대안으로, 변형된 글리코실화 패턴을 포함하는 단백질이 얻어질 수 있으며, 단백질은 푸코 실화, 크실화, 또는 둘 다 없고, 증가된 갈락토실화를 포함한다.

[0085] 변형된 N-글리코실화 프로필은 식물, 식물의 부분, 또는 식물 세포 내에서 베타-1,4갈락토실트랜스퍼라아제 (GalT)의 촉매 도메인에 융합된 N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라아제(GNT1)의 CTS 도메인(즉, 세포질 꼬리, 막 관통 도메인, 줄기 영역)을 포함하는 혼성 단백질(GNT1-GalT)을 암호화하는 제1 뉴클레오티드 서열(제1 뉴클레 오티드 서열은 식물 내에서 활성인 제1 조절 영역에 작동가능하게 연결됨), 및 관심의 상부구조물 단백질을 암 호화하는 제2 뉴클레오티드 서열(제2 뉴클레오티드 서열은 식물 내에서 활성인 제2 조절 영역에 작동가능하게 연결됨)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 공동 발현함으로써 얻어질 수 있으며, 제1 및 제2 뉴클레오티드 서 열을 공동 발현하여, WO 20008/151440에서 설명하는 바와 같이 변형된 N-글리코실화 프로필을 갖는 글리칸을 포 함하는 관심의 상부구조물 단백질을 합성한다.

[0086] 상부구조물 단백질은 인플루엔자 혈구응집소(HA)일 수 있고, 폴리펩티드를 구성하는 각각 2이상의 아미노산 서 열은 키메라 HA, 또는 키메라 인플루엔자 HA를 만드는 다른 HA로부터 얻어질 수 있다. 키메라 HA는 또한 합성 후 절단된 이중성 신호 펩티드(키메라 HA 전-단백질)를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 설명되는 본 발명에서 사용될 수 있는 HA 단백질의 예는 WO 2009/009876; WO 2009/076778; WO 2010/003225에서 찾을 수 있다(본원에 참고로써 포함됨). 키메라 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 "키메라 핵산", 또는 "키메라 뉴클레오 티드 서열"로서 설명될 수 있다. 키메라 HA로 구성되는 바이러스-유사 입자는 "키메라 VLP"로서 설명될 수 있다. 키메라 VLP는 2010년 6월 25일 출원된 PCT 출원 No. PCT/CA2010/000983, 및 미국 가특허 출원 61/220,161 (2009년 6월 24일 출원; 본원에 참고로써 포함됨)에서 더 설명된다. VLP는 천연 또는 키메라 HA의 발현으로부터 얻을 수 있다.

[0087] 본 발명에 의해 제공되는 방법에 따라서 제조되는 VLP의 HA는 전개 또는 확인될 수 있는 알려진 서열 및 변이체 HA 서열을 포함한다. 더 나아가, 본원에서 설명되는 바와 같이 생성된 VLP는 뉴라미니다아제(NA) 또는 예를 들 어 M1 (M 단백질), M2, NS 등에 대한 다른 성분들을 포함하지 않는다. 그러나, NA 및 M1은 HA와 함께 공동 발현 될 수도 있고, HA 및 NA를 포함하는 VLP가 바람직하다.

[0088] 일반적으로 용어 "지질"은 지용성(친유성)의 자연적으로 발생하는 분자를 말한다. 본 발명의 일부 양태에 따라 서 생성되는 키메라 VLP는 식물-유래 지질과 함께 복합체로 될 수 있다. 식물-유래 지질은 지질 이중층의 형태 일 수 있고, VLP 주변의 피막을 더 포함할 수 있다. 식물 유래 지질은 식물의 원형질막의 지질 성분을 포함할 수 있으며, VLP가 생성된다면, 인지질, 트리-, 디- 및 모노글리세라이드 뿐만 아니라 지용성 스테롤 또는 스테 롤을 포함하는 대사물질을 포함하여 생성된다. 예는 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티 딜이노시톨, 포스파티딜세린, 글리코스핑고지질, 피토스테롤 또는 그것의 조합을 포함한다. 식물-유래 지질은 또 다르게는 '식물 지질'로서 언급될 수 있다. 피토스테롤의 예는 캄페스테롤, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 브라시카스테롤, 델타-7-스티그마스테롤, 델타-7-아베나스테롤, 다우노스테롤, 시토스테롤, 24-메틸콜레스테롤, 콜레스테롤 또는 베타-시토스테롤을 포함한다(Mongrand et al., 2004, J. Biol Chem 279:36277-86). 당업자가 용이하게 이해할 것이기 때문에, 세포의 원형질막의 지질 조성물은 세포 또는 유기체, 또는 세포가 얻어지는 중



의 배양물 또는 성장 조건에 따라 변할 수 있다.

- [0089] 세포막은 일반적으로 지질 이중층 뿐만 아니라 다양한 작용을 위한 단백질을 포함한다. 특정 지질의 편재화된 농도는 '지질뿔목(lipid raft)'으로서 언급되는 지질 이중층에서 발견될 수 있다. 이 지질뿔목 마이크로도메인은 스펅고리피드 및 스테롤 중에서 풍부하게 될 수 있다. 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 지질뿔목은 엔도 및 엑소시토시스, 바이러스 또는 다른 감염성 약제의 유입 및 이출, 세포내 신호전달, 세포내 및 세포밖 매트릭스와 같은 세포 또는 유기체의 다른 구조적 성분과 상호작용에서 중요한 역할을 가질 수 있다.
- [0090] 지질 피막을 포함하는 VLP는 이전에 WO 2009/009876; WO 2009/076778, 및 WO 2010/003225 (본원에 참고로써 포함됨)에서 설명되었다. 인플루엔자 바이러스에 대해서, 본원에서 사용되는 용어 "혈구응집소" 또는 "HA"는 인플루엔자 바이러스 입자의 구조적 글리코단백질에 관한 것이다. 본 발명의 HA는 임의의 서브타입으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, HA는 인플루엔자 서브타입 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, 또는 H16, 또는 B형 인플루엔자 또는 C형 인플루엔자일 수 있다. 본 발명의 재조합 HA는 또한 임의의 혈구응집소 서열을 기반으로 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 인플루엔자 혈구응집소의 구조는 잘-연구되어 있고, 2차, 3차 및 4차 구조로 높은 정도의 보존을 증명한다. 아미노산 서열이 변할 수 있다 해도 이 구조적 보존은 관찰된다(예를 들어, 본원에서 참고로써 포함되는 Skehel and Wiley, 2000 Ann Rev Biochem 69:531-69; Vaccaro et al 2005 참조). HA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 잘 알려져 있고, 예를 들어 본원에 참고로써 포함되는 BioDefense 및 Public Health Database (현재 Influenza Research Database; Squires et al., 2008 Nucleic Acids Research 36:D497-D503) (예를 들어, URL: biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza) 또는 National Center for Biotechnology Information (NCBI; 예를 들어, URL: ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&cmd=search&term=influenza)에 의해 보유되는 데이터베이스로부터 이용가능하다.
- [0091] 본 발명은 또한 인간 또는 숙주 동물, 예를 들어 영장류, 말, 돼지, 새, 양, 조류 수금류, 철새, 메추리, 오리, 거위, 가금류, 닭, 낙타, 개, 고양이과, 고양이, 호랑이, 표범, 사향 고양이, 밍크, 스톤 마틴, 페럿, 가정용 애완동물, 가축, 마우스, 래트, 바다표범, 고래 등을 감염시키는 바이러스의 인플루엔자 VLP를 포함하는 VLP를 제조, 분리 또는 제조하고 분리하는 방법에 관한 것이다. 일부 인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 숙주 동물을 감염시킬 수 있다. 인플루엔자 바이러스의 혈구응집소에서 아미노산 변형은 허용된다. 이 변형은 연속적으로 확인되는 새로운 바이러스주를 제공한다. 새로운 바이러스주 사이의 감염성은 다를 수 있다. 그러나, 이후에 VLP를 형성하는 혈구응집소 트리머의 형성은 유지된다. 본 발명은 또한 VLP를 포함하는 HA 서브타입 또는 서열 또는 키메라 HA, 또는 종의 기원에 상관없이, 임의의 식물-유래 VLP의 제조방법을 포함한다.
- [0092] 상부구조물 단백질의 정확한 폴딩은 단백질의 안정성, 멀티머의 형성, 단백질의 형성 및 기능에 중요할 수 있다. 단백질의 폴딩은, 제한되는 것은 아니지만 하나 이상의 카페론 단백질 등의 존재하에서 단백질의 서열, 단백질의 상대적 풍부함, 세포내 혼잡도, 결합될 수 있는 보조인자의 이용가능성 또는 폴딩된, 부분적으로 폴딩된 또는 폴딩되지 않은 단백질과 일시적으로 연결된 보조인자의 이용가능성을 포함하는 한 가지 이상의 인자에 의해 영향을 받을 수 있다.
- [0093] 열충격 단백질(Hsp) 또는 스트레스 단백질은 카페론 단백질의 예이며, 단백질 합성, 세포내 수송, 미스폴딩의 방지, 단백질 응집의 방지, 단백질 복합체의 조립 및 분해, 단백질 폴딩 및 단백질 분해를 포함하는 다양한 세포 처리에 참여할 수 있다. 이러한 카페론 단백질의 예는, 제한되는 것은 아니지만 Hsp60, Hsp65, Hsp 70, Hsp90, Hsp100, Hsp20-30, Hsp10, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, TF55, FKBP, 시클로필린, ClpP, GrpE, 유비퀴틴, 칼넥신, 및 단백질 디설파이드 이소머라아제를 포함한다(예를 들어, Macario, A.J.L., *Cold Spring Harbor Laboratory Res.* 25:59-70. 1995; Parsell, D.A. & Lindquist, S. *Ann. Rev. Genet.* 27:437-496 (1993); 미국특허 5,232,833 참조). 카페론 단백질, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, Hsp40 및 Hsp70은 키메라 HA의 폴딩을 보장하기 위해 사용될 수 있다(모두 본원에 참고로써 포함되는 2010년 6월 25일에 출원된 PCT 출원 No. PCT/CA2010/000983, 및 2009년 6월 24일 출원된 미국 가특허 출원 No. 61/220,161; WO 2009/009876 및 WO 2009/076778). 단백질 디설파이드 이소머라아제(PDI; 등록번호 Z11499)가 또한 사용될 수 있다.
- [0094] 일단 회수되면, 단백질 또는 상부구조물 단백질은, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 전자 현미경, 광산란, 크기 배제 크로마토그래피, HPLC, 웨스턴 블롯 분석, 또는 전기영동법, ELISA, 활성 기반 분석, 예를 들어 혈구응집반응 분석, 또는 임의의 다른 분석에 의해 구조, 크기 효능 또는 활성에 대해 평가될 수 있다. VLP의 크기, 농도, 활성 및 조성물을 평가하는 이런 방법 및 다른 방법들은 당업계에 알려져 있다.
- [0095] 조제용 크기 배제 크로마토그래피에 대해, 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 조제물이 본원에서 설명

되는 방법에 의해 얻어질 수 있고, 불용성 물질은 원심분리에 의해 제거된다. PEG에 의한 침전이 또한 유리할 수 있다. 회수된 단백질은 전통적인 방법(예를 들어, Bradford 분석, BCA)을 사용하여 정량화될 수 있고, 추출물은, 예를 들어 SEPHACRYL™, SEPHADEX™, 또는 유사한 배지, 이온 교환 컬럼을 사용하는 크로마토그래피, 또는 친화 컬럼을 사용하는 크로마토그래피를 사용하여 크기 배제 컬럼을 통과하고, 활성 단편이 수집된다. 단백질 복합체는 또한, 예를 들어 Dynabeads™ (Invitrogen)가 있는 친화성 기반 자력 분리를 사용하고, Dynabeads™으로부터 단백질 복합체를 용리하여 얻을 수 있다. 또한 크로마토그래피와 분리 프로토콜의 조합이 사용될 수 있다. 크로마토그래피 또는 분리 후, 분석은 단백질 전기영동, 면역블롯, ELISA, 바람직한 활성 기반 분석에 의해 추가로 정제되어 상부구조물 단백질의 존재를 확인할 수 있다.

[0096] 상부구조물 단백질이 VLP라면, 혈구응집반응 분석은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 VLP-함유 분획의 혈구응집반응 활성을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만, 다른 동물로부터의 RBC에 결합하는 HA의 능력은 RBC 표면에서 이 시알산들의 존재하에서 시알산 α2,3 또는 α2,3에 대한 HA의 친화도에 의해 구동된다. 인플루엔자 바이러스로부터 말 및 조류 HA는 칠면조, 닭, 오리, 기니아 피그, 인간, 양, 말 및 소를 포함하는 모든 몇몇 종으로부터의 적혈구를 교차시키는 반면; 인간 HA는 칠면조, 닭, 오리, 기니아 피그, 인간 및 양에 결합할 것이다(Ito T. et al, 1997, Virology, 227:493-499; Medeiros R et al, 2001. Virology 289:74-85).

[0097] 혈구응집반응 억제(HI, 또는 HAI) 분석은 또한 백신에 의해 유발되는 항체의 효능을 증명하기 위해 사용될 수 있고, 또는 키메라 HA 또는 키메라 VLP를 포함하는 백신 조성물은 재조합 HA에 의해 적혈구(RBC)의 응집반응을 억제할 수 있다. 혈청 샘플의 혈구응집반응 억제 항체 역가는 마이크로역가 HAI에 의해 평가될 수 있다(Aymard et al 1973). 임의의 몇몇 종으로부터 적혈구가 사용될 수 있다 - 예를 들어 말, 칠면조, 닭 등. 이 분석은 HA에서 항원 자리의 적절한 존재를 확인하여, VLP의 표면에서 HA 트리머의 조립체에 간접적인 정보를 제공한다.

[0098] 교차-반응성 HAI 역가는 또한 백신 서브타입과 관련된 바이러스의 다른 바이러스주에 대한 면역 반응의 효과를 증명하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 인플루엔자형 또는 서브타입의 HDC를 포함하는 키메라 혈구응집을 포함하는 백신 조성물로 면역화된 피험자의 혈청은 전바이러스 또는 바이러스 입자의 제2 바이러스주가 있는 HAI 분석에서 사용될 수 있고, HAI 역가가 결정되었다.

[0099] 본 발명의 방법에 의해 제조되는 인플루엔자 VLP는 백신을 보충하고, 그것을 더 효율적으로 만들거나, 또는 필요한 투여량을 감소시키기 위해 현존하는 인플루엔자 백신과 함께 사용될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 백신은 하나 이상의 인플루엔자 바이러스를 겨냥할 수 있다. 적당한 백신의 예는, 제한되는 것은 아니지만 Sanofi-Pasteur, ID Biomedical, Merial, Sinovac, Chiron, Roche, MedImmune, GlaxoSmithKline, Novartis, Sanofi-Aventis, Serono, Shire Pharmaceuticals 등으로부터 상업적으로 이용가능한 것을 포함한다. 원한다면, 본 발명의 VLP는 당업자에게 알려진 것과 같은 적당한 애드juv언트와 혼합될 수 있다. 더 나아가서, 본 발명에 따라서 만들어지는 VLP는 다른 단백질 성분과 함께 공동-발현될 수도 있고, 또는 다른 VLP 또는 인플루엔자 단백질 성분, 예를 들어 뉴라미니다아제(NA), M1, 및 M2와 함께 복원될 수도 있다. 또한 말라리아 항원, HIV 항원, 호흡기세포융합바이러스(RSV) 항원 등과 같은 백신 단백질로 만들어지는 다른 VLP와 함께 공동-발현 또는 복원될 수 있다.

[0100] 단백질 또는 상부구조물 단백질을 포함하는 유전자이식 식물, 식물 세포, 식물 물질 또는 종자의 형질전환 방법, 및 재생은 당업계에 확립되어 있고 당업자에게 알려져 있다. 형질전환되고 재생된 식물을 얻는 방법은 본 발명에서 중요하지 않다.

[0101] "형질전환"은 유전자형으로, 표현형으로 또는 둘 다로 나타나는 유전정보(뉴클레오타이드 서열)의 이종간 전달을 의미한다. 키메라 구성체로부터 숙주까지 유전정보의 이종간 전달은 유전성일 수 있고(즉, 숙주의 게놈 내에서 통합된다), 유전 정보의 전달은 안정한 것으로 고려되거나, 또는 전달이 일시적일 수 있고, 유전 정보의 전달은 유전성이 아닐 수 있다.

[0102] 용어 "식물 물질"은 식물로부터 유래된 임의의 물질을 의미한다. 식물 물질은 완전한 식물, 조직, 세포, 또는 그것의 임의의 분획을 포함할 수 있다. 더 나아가, 식물 물질은 세포내 식물 성분, 세포밖 식물 성분, 식물의 액체 또는 고체 추출물, 또는 그것의 조합을 포함할 수 있다. 더 나아가, 식물 물질은 식물 잎, 줄기, 열매, 뿌리 또는 그것의 조합으로부터 식물, 식물 세포, 조직, 액체 추출물, 또는 그것의 조합을 포함할 수 있다. 식물 물질은 임의의 처리 단계를 받지 않은 식물 또는 그것의 부분을 포함할 수 있다. 식물의 부분은 식물 물질을 포함할 수 있다. 식물 또는 식물 물질은 임의의 방법에 의해 수확 또는 얻어질 수 있으며, 예를 들어 전체 식물이



사용될 수도 있고, 또는 잎 또는 다른 조직이 설명되는 방법으로 사용을 위해 특별히 제거될 수도 있다. VLP를 발현하고 분비하는 유전자이식 식물은 또한 본원에서 설명되는 공정을 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다.

[0103] 본 발명의 구성체는 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접적인 DNA 형질전환, 마이크로-주사, 전기천공법, 침윤 등을 사용하여 식물 세포에 도입될 수 있다. 이러한 기법의 검토를 위해, 예를 들어 Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierman and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed. (1988); 및 Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants* 참조. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison-Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997). 다른 방법은 예를 들어 프로토플라스트, 마이크로-주사, 입자 총 방법 또는 위스커, 및 진공 인필트레이션을 사용하는 직접적인 DNA 흡수, 리포솜의 사용, 전기천공법을 포함한다. 예를 들어, Bilang, et al. (Gene 100: 247-250 (1991), Scheid et al. (Mol. Gen. Genet. 228: 104-112, 1991), Guerche et al. (Plant Science 52: 111-116, 1987), Neuhaus et al. (Theor. Appl Genet. 75: 30-36, 1987), Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987); Howell et al. (Science 208: 1265, 1980), Horsch et al. (Science 227: 1229-1231, 1985), DeBlock et al., Plant Physiology 91: 694-701, 1989), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), Liu and Lomonosoff (J. Virol Meth, 105:343-348, 2002), 미국 특허 4,945,050; 5,036,006; 5,100,792; 6,403,865; 5,625,136, (모두 본원에 참고로써 포함됨) 참조.

[0104] 일시적 발현 방법은 본 발명의 구성체를 발현시키기 위해 사용될 수 있다(본원에 참고로써 포함되는 Liu and Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348 참조). 대안으로, PCT 공개 WO 00/063400, WO 00/037663 (참고로써 본원에 포함됨)에서 설명되는 바와 같은 진공-기반 일시적 발현 방법이 사용될 수 있다. 이 방법은, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, 아그로-이노쿨레이션(Agro-inoculation) 또는 아그로-인필트레이션(Agro-infiltration)을 포함할 수 있지만, 그러나, 다른 일시적 방법이 또한 상기 주목한 바와 같이 사용될 수 있다. 아그로-이노쿨레이션 또는 아그로-인필트레이션 중 하나에 의해, 요망되는 핵산을 포함하는 아그로박테리아(*Agrobacterium*)의 혼합물은 조직, 예를 들어 잎, 식물의 공기 부분(줄기, 잎 및 꽃을 포함), 식물의 다른 부분(줄기, 뿌리, 꽃), 또는 전체 식물의 세포내 공간으로 들어간다. 표피를 가로지른 후, 아그로박테리아는 세포에 t-DNA 복제물을 감염시키고 전달한다. t-DNA는 에피솜으로 전사되고, mRNA가 번역되어 감염 세포 중에서 관심의 단백질의 생성을 야기하지만, 핵 내부의 t-DNA의 통과는 일시적이다.

[0105] 본원에서 설명되는 서열을 하기에 요약한다.

SEQ ID NO:	설명	도면
1	핵산 서열(구성체 685)	2A
2	SEQ ID NO:1에 의해 암호화되는 아미노산 서열	2B
3	pBinPlus.2613c: AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG	
4	Mut-ATG115.r: GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGT TGAAGATCGCTCACGCAAGAAAGACAAGAGA	
5	Mut-ATG161.c: GTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAA CGTTTTCTTTCACTGAAGCGA	
6	LC-C5-1.110r: TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG	
7	ApaI-H5 (A-Indo).lc: TGTCGGGCCCATGGAGAAAATAGTGC TTCTTCTTGCAAT	
8	H5 (A-Indo)-StuI.1707r: AAATAGGCCTTTAAATGCAAATTC TGCATTGTAACGA	
9	핵산 서열(구성체 660)	5
10	PDI 신호 펩티드: MAKNVAlFGLLFSLLLVPSQIFAE	
11	Plasto-443c	
12	supP19-plasto.r	
13	supP19-lc	
14	SupP19-SacI.r	
15	C2B8의 LC 단편	9
16	C2B8의 HC 단편	10

[0106]

[0107] 본 발명의 하기 실시예에서 추가로 예시될 것이다. 그러나, 이 실시예는 단지 예시적인 목적이고, 본 발명의 범주를 어떤 방식으로 제한하는 것으로 사용되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다.

[0108] 발현 카세트의 조립체

[0109] VLP의 생성을 위해 사용될 수 있는 구성체는 모두 본원에 참고로써 포함되는 미국 가특허 출원 No. 61/220,161 및 PCT/CA2010/000983(본원에 참고로써 포함됨), WO 2009/009876, WO 2009/076778 및 WO2010/003225(모두 본원에 참고로써 포함됨)에서 설명된다. 구성체는 또한 표 2에서 열거되는 것을 포함할 수 있다. 이 구성체의 조립체는 WO 2009/009876, WO 2009/076778, WO2010/003225 및 US 61/220,161에서 설명된다. 그러나 알려진 HA를 포함하는 다른 구성체는 제한되는 것은 아니지만, 표 2에서 제공되는 것, 및 유사한 또는 다른 조절 요소 및 프로모터와 조합되는 것을 포함하며, 또한 본원에서 설명되는 VLP의 생성을 위해 사용될 수 있다.

표 2

혈구응집소 생성을 위해 사용될 수 있는 구성체의 비-제한적 예

카세트 번호	대응하는 HA	HA 약어
540	바이러스주 A/New Caledonia/20/99 (H1N1)로부터의 SpPDI-H1	H1/NC
560	2X35S/CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-H1 A/California/4/2009	H1/Cal WT
580	2x35S/CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-H1 A/New Caledonia/20/99	H1/NC
660	바이러스주 A/Indonesia/5/2005 (H5N1)로부터의 H5	H1/Indo
663	H5 A/Indonesia/5/2005	H1/Indo
685	CPMV-HT 발현 카세트에서 H5 A/Indonesia/5/2005	H1/Indo
686	CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-H5 A/Indonesia/5/2005	H1/Indo
690	H5 A/Indonesia/5/05 백본에서 H1 A/Brisbane/59/07 수용체-결합 (RB) 도메인	H1/Bris
691	H5 A/Indonesia/5/05 백본에서 H1 A/Brisbane/59/07 에스티라아제 및 수용체-결합 도메인(E1-RB-E2)	H1/Bris
696	H1 A/New Caledonia/20/99 백본에서 H5 A/Indonesia/5/05 수용체-결합 (RB) 도메인	H1/Indo
732	CPMV-HT 발현 카세트에서 H1 A/Brisbane/59/2007	H1/Bris
733	CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-H1 A/Brisbane/59/2007	H1/Bris
734	CPMV-HT 발현 카세트에서 H5 A/Indonesia/5/05 백본 중의 H1 A/Brisbane/59/07 수용체-결합(RB) 도메인	H1/Bris
735	CPMV-HT 발현 카세트에서 H3 A/Brisbane/10/2007	H3/Bris
736	CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007	H3/Bris

[0110]

737	CPMV-HT 발현 카세트에서 키메라 SpPDI-H3 A/Brisbane/10/2007 (엑토도메인) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + Cyto 꼬리)의 조립체	H3/Bris-H5/Indo 키메라
738	CPMV-HT 발현 카세트에서 HA B/Florida/4/2006	B/Flo
739	CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-HA B/Florida/4/2006	B/Flo
745	CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-HA B/Florida/4/2006 (엑토도메인) + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + Cyto 꼬리)	B/Flo
747	2X358-CPMV-HT 발현 카세트에서 SpPDI-HA B/Florida/4/2006 + H5 A/Indonesia/5/2005 (TmD + Cyto 꼬리)	B/Flo
774	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)의 HA	H1/Bris
775	A/Solomon Islands 3/2006 (H1N1)의 HA	H1/Solomon
776	A/Brisbane 10/2007 (H3N2)의 HA	H3/Bris
777	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)의 HA	H3/Wisc
778	B/Malaysia/2506/2004의 HA	B/Malaysia
779	B/Florida/4/2006의 HA	B/Flo
780	A/Singapore/1/57 (H2N2)의 HA	H2/Sing
781	A/Anhui/1/2005 (H5N1)의 HA	H5/Anhui
782	A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)의 HA	H5/Vietnam
783	A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1)의 HA	H6/HongKong
784	A/Equine/Prague/56 (H7N7)의 HA	H7/Prague
785	A/HongKong/1073/99 (H9N2)의 HA	H9/HongKong
787	H1 A/Brisbane/59/2007	H1/Bris
790	H3 A/Brisbane/10/2007	H3/Bris
798	HA B/Florida/4/2006	B/Flo

[0111]

[0112]

CPMV-HT 발현 카세트는 5'에서 Cowpea mosaic 바이러스 (CPMV) RNA2로부터 뉴클레오타이드 1-512에 의해 위치 115 및 161에서 돌연변이된 ATG로 그리고 3'에서 CPMV RNA2 (3' UTR에 대응)로부터 뉴클레오타이드 3330-3481에 의해 옆에 있는 관심의 암호화 서열을 포함하는 mRNA의 발현을 제어하는 35S 프로모터, 다음에 NOS 종결자를 포함하였다. 플라스미드 pBD-C5-1LC, (Sainsbury et al. 2008; Plant Biotechnology Journal 6: 82-92 및 PCT 공개 WO 2007/135480)를 CPMV-HT-계 혈구응집 발현 카세트의 조립체에 대해 사용하였다. CPMV RNA2의 위치 115 및 161에서 ATG의 돌연변이를 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85 (1995))에 존재하는 PCR-기반 걸찰 방법을 사용하여 행하였다. 주형으로서 pBD-C5-1LC를 사용하여 2가지의 별개의 PCR을 수행하였다. 제1 증폭을 위한 프라이머는 pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 3) 및 Mut-ATG115.r (SEQ ID NO: 4)이었다. 제2 증폭을 위한 프라이머는 Mut-ATG161.c (SEQ ID NO: 5) 및 LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6)이었다. 이어서 2개의 단편을 혼합하였고, 프라이머로서 pBinPlus.2613c (SEQ ID NO: 3) 및 LC-C5-1.110r (SEQ ID NO: 6)를 사용하여 제3 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다. 결과 단편을 PacI 및 ApaI로 분해하였고, 동일한 효소로 분해된 pBD-C5-1LC로 클로닝하였다. 만들어진 발현 카세트를 828로 칭하였다.

[0113]

**CPMV-HT 발현 카세트 중의 H5 A/Indonesia/5/2005의 조립체(구성체 번호 685).**

[0114]

이 카세트의 조립체는 본원에 참고로써 포함되는 WO 2009/009876, WO 2009/076778 및 WO2010/003325에서 설명된다.

[0115]

간략하게, A/Indonesia/5/2005로부터의 H5의 암호화 서열을 다음과 같이 CPMV-HT로 클로닝하였다: 제한 자리 ApaI (처음 ATG의 바로 위쪽) 및 StuI (정지 코돈의 바로 아래쪽)을 주형으로서 구성체 번호 660 (D'Aoust et al., Plant Biotechnology Journal 6:930-940 (2008))을 사용하여 프라이머 ApaI-H5 (A-Indo).1c (SEQ ID NO: 7) 및 H5 (A-Indo)-StuI.1707r (SEQ ID NO: 8)로 PCR 증폭을 수행함으로써 혈구응집 암호화 서열에 부가하였다. 구성체 660은 알팔파 플라스토시아닌 프로모터 및 5' UTR, A/Indonesia/5/2005 (Construct # 660)로부터의 H5의 혈구응집 암호화 서열, 알팔파 플라스토시아닌 프로모터 3' UTR 및 종결자 서열(SEQ ID NO: 9; 도 5)을 포함한다. 결과 단편은 ApaI 및 StuI 제한 효소로 분해되었고, 앞서 동일한 효소로 분해한 구성체 번호

828로 클로닝되었다. 결과 카세트를 구성체 번호 685으로 칭하였다(도 1, 2).

[0116] **침묵 억제자**

[0117] 전사 후 유전자 침묵(PTGS)은 식물 전이유전자의 발현을 제한하는데 수반될 수 있고, 감자 바이러스 Y(HcPro)로부터 침묵 억제자의 공동 발현이 사용되어 전이유전자 mRNA의 특정 분해에 대응할 수 있다(Brigneti et al., 1998). 대안의 침묵 억제자는 당업계에 잘 알려져 있고, 본원에서 설명되는 바와 같이(Chiba et al., 2006, Virology 346:7-14; 참고로써 본원에 포함됨), 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, TEV-p1/Hc-Pro (담배식각바이러스-p1/Hc-Pro), BYV-p21, 토마토덤불성장위축바이러스의 p19(TBSV p19), 토마토 크링클 바이러스의 캡시드 단백질 (TCV -CP), 오이 모자이크 바이러스의 2b; CMV-2b), 감자 바이러스 X의 p25(PVX-p25), 감자 바이러스 M의 p11(PVM-p11), 감자 바이러스 S의 p11(PVS-p11), 블루베리 스킵 바이러스의 p16(BScV-p16), 시트러스 트리스테자 바이러스의 p23(CTV-p23), 포도 잎말림-관련 바이러스-2의 p24(GLRaV-2 p24), 그레이프바인 바이러스 A의 p10, (GVA-p10), 그레이프바인 바이러스 B의 p14(GVB-p14), 어수리(Heracleum) 잡재 바이러스의 p10(HLV-p10), 또는 마늘 잡재 바이러스 바이러스의 p16(GCLV-p16)로 사용될 수 있다. 따라서, 침묵 억제제, 예를 들어 제한되는 것은 아니지만, HcPro, TEV -p1/Hc-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 또는 GVA-p10는 식물 내 높은 수준의 단백질 생성을 추가로 보장하기 위해 관심의 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 함께 공동발현될 수 있다.

[0118] p19의 구조는 WO 2010/0003225 (본원에 참고로써 포함됨)에서 설명된다. 간단하게, 토마토덤불위축바이러스(TBSV)의 p19 단백질의 암호화 서열을 Darveau et al. (Methods in Neuroscience 26: 77-85(1995))에서 나타내는 PCR-기반 결찰 방법에 의해 알팔파 플라스토시아닌 발현 카세트에 연결하였다. PCR의 제1 라운드에서, 플라스토시아닌 프로모터의 절편을 프라이머 Plasto-443c를 사용하여 증폭하였다:

[0119] 주형으로서 구성체 660 (본원에서 참고로써 포함되는 WO 2010/0003225)을 가지는

[0120] GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTG (SEQ ID NO:11)

[0121] 및 supP19-plasto.r

[0122] CCTTGATAGCTCGTTCCATTTCTCTCAAGATG (SEQ ID NO:12). 병행하여, p19의 암호 서열을 함유하는 다른 단편을 주형으로서 Voinnet et al. (The Plant Journal 33: 949-956 (2003))에서 설명하는 구성체 35S:p19를 사용하여 프라이머 supP19-1c

[0123] ATGGAACGAGCTATACAAGG (SEQ ID NO:13)

[0124] 및 SupP19-SacI.r

[0125] AGTCGAGCTCTACTCGCTTTCTTTTTCGAAG (SEQ ID NO:14)로 증폭하였다. 이어서 증폭 생성물을 혼합하였고, 프라이머 Plasto-443c 및 SupP19-SacI.r로 증폭의 제2 라운드(조립 반응)를 위한 주형으로서 사용하였다. 결과 단편을 BamHI (플라스토시아닌 프로모터에서) 및 SacI (p19 암호화 서열의 말단)으로 분해하였고, 앞서 동일한 제한 효소로 분해한 구성체 번호 660으로 클로닝하여, 구성체 번호 R472를 제공하였다. 플라스미드를 사용하여 전기천공법에 의해 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)(AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA)를 형질전환하였다. 모든 아그로박테리움 투메파시엔스(*A. tumefaciens*) 균주의 완전함을 제한 지도작성에 의해 확인하였다. R472를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스(*A. tumefaciens*) 균주를 "AGL1/R472"로 칭하였다.

[0126] HcPro 구성체(35HcPro)를 Hamilton et al. (2002)에서 설명하는 바와 같이 제조하였다. 모든 클론을 구성체의 완전함을 확인하기 위해 서열화하였다. 플라스미드를 사용하여 전기천공법에 의해 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)(AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA)를 형질전환하였다. 모든 아그로박테리움 투메파시엔스(*A. tumefaciens*) 균주의 완전함을 제한 지도작성에 의해 확인하였다.

[0127] **식물 바이오매스, 접종물, 아그로인필트레이션, 및 수확의 제조**

[0128] 니코티아나 벤탐미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물을 상업적 토란 기질로 채운 평지에서 종자로부터 성장시켰다. 식물을 16/8 광주기 및 25℃ 낮/20℃ 밤의 온도 섭생 하에서 온실 중에서 성장시켰다. 파종 3주일 후, 개개의 묘목을 골라서, 화분에 옮기고, 동일한 환경 조건하에서 추가 3주 동안 온실 중에서 성장하도록 두었다. 6주 후, 식물은 평균 80 g의 중량 및 30 cm의 길이를 가진다.

[0129] 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주 AGL1를 D'Aoust et al 2008 (Plant Biotechnology Journal 6:930-940)에



서 설명하는 방법을 사용하여 하기에서 확인되는 구성체로 트랜스펙션(전기천공법) 하였다. 트랜스펙션된 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 0.6 내지 1.6의 OD<sub>600</sub>에서 10 mM 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES), 20 μM 아세토시린곤, 50 μg/ml 카나마이신 및 25 μg/ml의 카르베니실린 pH5.6으로 보충한 YEB 배지 중에서 성장시켰다. 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 현탁액을 사용 전 원심분리하였고, 인필트레이션 배지 중에서 재현탁하였다(10 mM MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM MES pH 5.6).

[0130] 식물을 D'Aoust et al (상기함)에서 설명한 바와 같이 아그로인필트레이션하였다. 간략하게, 진공-인필트레이션을 위해, 아그로박테리움 투메파시엔스(*A. tumefaciens*) 현탁액을 원심분리하였고, 인필트레이션 배지 중에서 재현탁하고 4℃에서 밤새 저장하였다. 인필트레이션 당일, 배양물 배치를 2.5 배양물 부피로 희석하였고, 사용전에 가온하였다. 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*)의 전체 식물을 2분 동안 20-40 Torr 진공 하에서 밀폐 스테인리스 스틸 탱크 중의 박테리아 현탁액에 거꾸로 넣었다. 달리 특정되지 않는다면, 모든 인필트레이션을 1:1 비율로 R472 (균주 AGL1/R472)에 의한 박테리아 형질전환으로 공동-인필트레이션하여 수행하였다. 진공 인필트레이션 후, 수확까지 4-6일의 인큐베이션 기간 동안 식물을 온실에 되돌렸다.

[0131] **잎 샘플링 및 전체 단백질 추출(기계적 균질화)**

[0132] 제4일, 제5일, 제6일, 제7일 및 제8일의 인큐베이션 후, 식물의 공기 부분을 수확하였고, 즉시 사용하였다. 전체 가용성 단백질을 1% Triton X-100 및 0.004% 소듐 메타바이설파이트를 함유하는 차가운 50 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl의 3부피로 식물 조직을 균질화함으로써 추출하였다. 식물 조직을 POLYTRON™을 사용하여 기계적으로 균질화하였고, 차가운 50 mM Tris pH 8, 0.15 M NaCl의 1부피 중에서 막자사발로 또는 COMITROL™로 그라인딩하였다. COMITROL™로 사용한 버퍼는 또한 0.04% 소듐 메타바이설파이트를 함유하였다. 균질화 후, 그라인딩한 식물 물질의 슬러리를 5분 동안 4℃에서 5,000 g로 원심분리하였고, 미정제 추출물(상청액)을 분석을 위해 유지하였다. 정제된 미정제 추출물의 총 단백질 함량을 기준 물질로서 소혈청 알부민을 사용하여 Bradford 분석(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다.

[0133] **세포벽 분해에 의한 VLP 추출**

[0134] 잎 조직을 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물로부터 수집하였고, ~1 cm<sup>2</sup> 조각으로 절단하였다. 잎 조각을 실온에서(RT) 30분 동안 500 mM 만니톨 중에서 담금질하였다. 이어서 만니톨 용액을 제거하였고, 효소 혼합물(프로토플라스트 용액(500 mM 만니톨, 10mM CaCl<sub>2</sub> 및 5 mM MES/KOH (pH 5.6) 중에서 트리코데르마 비리데(*Trichoderma viride*)(Onozuka R-10; 3% v/v)의 셀룰라아제의 혼합물 및 *Rhizopus* sp. (MACEROZYME™; 0.75% v/v; 둘 다 Yakult Pharmaceuticals제)의 펙티나아제의 혼합물)로 변경하였다. 사용한 비율은 100 mL 용액 당 20 g의 잎 조각이었다. 이 제조물을 얇은 용기에(~11x18 cm) 편평하게 펼쳤고, 40 rpm 및 26℃에서 회전식 진탕기 중에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.

[0135] 대안으로, VLP 추출을 다음과 같이 수행할 수 있다: 식물을 실시예 1에서 설명한 AGL1/#685로 아그로인필트레이션하였다. 잎 조직을 인필트레이션 6일 후에 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물로부터 수집하였고, ~1 cm<sup>2</sup> 조각으로 절단하였다. Multifect Pectinase FE, Multifect CX CG 및 Multifect CX B (Genencor)를 1:2.5 (w/v) 비율의 신선한 바이오매스:분해 버퍼를 사용하여 600 mM 만니톨, 75 mM 시트레이트, 0.04% 소듐 바이설파이트 pH 6.0 버퍼 중에서 각각 1.0% (v/v)로 첨가하였다. 바이오매스를 15시간 동안 실온에서 오비탈셰이커 중에서 분해하였다.

[0136] 인큐베이션 후, 잎 파편을 여과에 의해 제거하였다(250 또는 400 μm 메쉬의 나일론 필터). 현탁액 중의 프로토플라스트를 200xg (15 min)에서 원심분리에 의해 수집한 다음에 5000xg (15분)에서 상청액의 원심분리로 상청액을 추가로 정제하였다. 대안으로, 15분 동안 5000 xg 1회 원심분리 단계를 사용하였다. 이어서 70mL의 상청액을 70,000xg에서 30분 동안 원심분리하였다. 결과 펠렛을 1.7mL의 PBS 중에서 재현탁하였고, 즉시 분석하거나 또는 냉동시켰다.

[0137] **단백질 분석**

[0138] H5에 대한 혈구응집 분석은 Nayak and Reichl (2004)에 의해 설명되는 방법을 기반으로 하였다. 간략하게, 시험 샘플(100 μL)의 연속 2회 희석을 100 μL PBS를 함유하는 V-자 바닥형 96-웰 마이크로역가 플레이트 중에서 만들었고, 웰 당 100 μL의 희석 샘플을 남겼다. 0.25% 터키 레드 혈액 세포 현탁액(Bio Link Inc., Syracuse,



NY)의 100 마이크로역가를 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 완전한 혈구응집반응을 나타내는 가장 높은 희석의 역수를 혈구응집반응 활성으로서 기록하였다. 병행하여, 재조합 HA5 표준(A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT)을 PBS 중에서 희석하였고 각 플레이트 중에서 대조군으로서 실행하였다.

#### [0139] ELISA

[0140] HA5 표준을 1% Triton X-100으로 처리에 의해 파괴한 정제된 바이러스-유사 입자로 제조한 다음, 1분 동안 Tissue Lyser™(Qiagen) 중에서 기계적 교반을 하였다. U-자 바닥형 96-웰 마이크로역가 플레이트를 50 mM 카보네이트-바이카보네이트 코팅 버퍼 중에서 4℃에서 16-18시간 동안 10 µg/mL의 포획 항체로 코팅하였다. 모든 세척을 pH 7.4 0.1% Tween-20을 함유하는 0.01 M PBS (포스페이트-버퍼 식염수)로 수행하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 3회 세척하였고, 1시간 동안 37℃에서 PBS 중에서 1% 카세인으로 차단하였다. 차단 단계 후, 플레이트를 3회 세척하였다. HA5 표준을 모크(mock) 추출물(AGL1/R472 단독으로 인필트레이션된 잎 조직으로부터 제조) 중에서 희석하여 500 내지 50 ng/mL의 표준 곡선을 만들었다. 정량화를 위한 샘플을 마이크로플레이트를 부하하기 전 1% Triton X-100 중에서 처리하였다. 플레이트를 1시간 동안 37℃에서 추가로 인큐베이션하였다. 세척 후, 1:1000로 희석한 HA5 (CBER/FDA)에 대해 상승된 양 다클론성 항체를 첨가하였고, 플레이트를 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 세척 후, 1:1000으로 희석한 겨자무과산화효소-콘쥬게이트 토끼 항-양 항체를 첨가하였고, 플레이트를 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 SureBlue TMB 과산화효소 기질(KPL)로 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 반응을 1N HCl의 첨가에 의해 중단시키고, A<sub>450</sub> 값을 Multiskan Ascent 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다(Thermo Scientific).

[0141] 실시예 1: 식물 조직의 효소 추출은 상승된 상대적 활성을 가지는 많은 양의 HA를 방출한다.

[0142] 본 효소 추출 방법으로부터 얻은 HA의 양 및 상대적 활성을 통상적인 기계적 추출 방법으로부터 얻은 HA의 양 및 상대적 활성과 비교하였다. 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물을 AGL1/685로 인필트레이션하였고, 잎을 5 내지 6일 인큐베이션 기간 후 수확하였다. 잎 균질물을 다음과 같이 제조하였다: 2그램의 잎을 Polytron 균질기로 균질화하였고; 4g의 잎을 막자사발로 그라인딩하였고; 25kg의 잎을 추출 버퍼(50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.0, 1:1 w/v의 비율) 중에서 COMITROL™ 처리기(Urschel Laboratories) 균질화하였다. 효소 추출을 다음과 같이 수행하였다: 20그램의 수확한 잎을 상기 설명한 바와 같은 Macerozyme 펙티나아제 및 Onozuka R-10 셀룰라아제로 분해를 받게 하였다. 분해 후, 잎 파편을 여과에 의해 제거하였다(나일론 필터, 250 µm 메쉬). 현탁액 중의 프로토플라스트를 200xg (15분)에서 원심분리에 의해 제거하였고, 상청액을 5000xg (15분)에서 원심분리에 의해 추가로 정제하였다.

[0143] 이 식물 추출물의 각각에서 HA의 양 및 상대적 활성을 표 3에 나타낸다. 효소 추출 방법으로부터 얻은 HA의 양은 기계적 방법으로부터 얻은 것보다 상당히 더 크다.

### 표 3

회수된 HA-VLP는 다른 기계적 또는 효소적 방법에 의해 만들어진 식물

추출물을 형성한다. 활성-기반 및 ELISA 비교를 위해, 데이터를 새로운

바이오매스 액체 추출물의 상대적 부피에 따라서 정상화하였다. Comitrol 추출을

사용하여 얻은 단백질을 100%로 설정하였고, 다른 방법들을 이 값과 비교하였다.

추출 방법	상대적 활성	양*
Comitrol™ 추출	100%	100%
Polytron 추출	50%	150%
Mortar 추출	100%	220%
Digestion 추출	440%	570%

\*양을 ELISA 분석에 의해 평가하였다

[0144]

- [0145] **실시예 2: 식물 조직의 효소 분해는 VLP로 조직화된 HA를 방출한다.**
- [0146] 본원에서 설명하는 효소 추출법이 의해 얻은 HA가 VLP로서 조직화된다는 것을 증명하기 위해 분별원심과 크기배제 크로마토그래피(SEC)의 조합을 사용하였다. 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 AGL1/685로 아그로인필트레이션하였다. 잎을 인필트레이션 후 6일에 식물로부터 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단한 다음 분해하였고, 조대-여과(coarse-filtered)하였고 실시예 1에서 설명한 바와 같이 원심분리하였다.
- [0147] 이어서 정제한 샘플을 70,000xg에서 원심분리하여 VLP를 분리시켰다. VLP를 함유하는 원심분리 펠렛을 포스페이트 버퍼 식염수의 1/50 부피(PBS; 0.1M 소듐 포스페이트, 0.15M NaCl pH 7.2) 중에서 부드럽게 재현탁한 후, SEC 컬럼에 장약하였다.
- [0148] 32 ml SEPHACRYL™ S-500 고해상도 비드(S-500 HR : GE Healthcare, Uppsala, Sweden, Cat. No. 17-0613-10)의 SEC 컬럼을 평형/용리 버퍼(50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH8)로 제조하였다. SEC 크로마토그래피를 평형화된 컬럼에 1.5 mL VLP 샘플의 장약으로 수행하였고, 45 mL의 평행화/용리 버퍼로 용리하였다. 용리액을 1.7 mL의 분획 중에서 수집하였고, 각 분획의 단백질 함량을 10  $\mu\text{L}$ 의 용리액 분획과 200  $\mu\text{L}$ 의 희석한 Bio-Rad 단백질 염료 시약(Bio-Rad, Hercules, CA)의 혼합에 의해 평가하였다. 각각의 분리를 Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA)으로 교정에 의해 진행하였다. Blue Dextran 2000과 숙주 단백질 둘 다의 용리 프로파일의 비교를 각각의 분리에 대해 수행하여, 분리의 균일성을 보장하였다.
- [0149] SEC 용리 분획의 단백질 분석
- [0150] 정제한 미정제 추출물의 총 단백질 함량을 기준 표준으로서 소혈청 알부민을 사용하는 Bradford 분석(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다. SEC 용리액 분획 중에 존재하는 단백질을 아세톤으로 침전시켰고(Bollag et al., 1996), SDS-PAGE 분석 또는 면역블롯 분석 각각에 대해 변성 샘플 장약 버퍼(0.1M Tris pH 6.8, 0.05% 브로모페놀 블루, 12.5% 글리세롤, 4% SDS 및 5% 베타-머캅토에탄올)의 0.25 부피 또는 0.05부피 중 하나에서 재현탁하였다. SDS-PAGE에 의한 분리를 환원 조건하에서 수행하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250를 단백질 염색을 위해 사용하였다.
- [0151] H5에 대한 혈구응집반응 분석을 Nayak and Reichl (2004)에 의해 설명한 방법을 기준으로 수행하였다. 간략하게, 시험 샘플(100  $\mu\text{L}$ )의 연속적인 이중 희석을 100  $\mu\text{L}$  PBS를 함유하는 V-자 바닥형 96-웰 마이크로역가 플레이트 중에서 만들었고, 웰 당 100  $\mu\text{L}$ 의 희석 샘플을 남겼다. 100 마이크로역가의 0.25% 터키 레드 혈액 세포 현탁액 (Bio Link Inc., Syracuse, NY)을 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 완전한 혈구응집반응을 나타내는 가장 높은 희석의 역수를 혈구응집반응 활성으로서 기록하였다. 병행하여, 제조함 H5 표준(A/Vietnam/1203/2004 H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT)을 PBS 중에서 희석하였고, 각 플레이트 상에서 대조군으로서 실행하였다.
- [0152] 도 3A는 혈구응집반응 활성이 컬럼의 허공용적에 대응하는 분획 중에서 농축된다는 것을 나타내고, 혈구응집반응 활성이 고분자량 구조 기관으로부터 유래한다는 것을 확인한다. SDS-PAGE 분석(도 3B)은 그 동일한 허공용적 분획(분획 7-10)이 또한 가장 높은 HA 함량으로 존재하며, 대략 75 kDa으로 검출가능한 HAO 모노머에 대응하는 밴드를 가진다는 것을 나타낸다.
- [0153] **실시예 3: 식물 조직의 효소 분해는 오염물질이 거의 없는 HA-VLP를 방출한다.**
- [0154] 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 AGL1/685로 아그로인필트레이션하였다. 인필트레이션 6일 후 잎을 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 조대-여과하였고, 실시예 1에서 설명한 것과 같이 원심분리하였다.
- [0155] 잎의 제어된 효소 분해는 세포벽을 적어도 부분적으로 제거하였고, 따라서 세포벽과 원형질막 사이의 공간에 존재하는 단백질 및 성분의 추출 배지로 방출을 허용하였다. 대부분의 세포내 단백질 및 성분이 여전히 손상되지 않았고, 대부분의 무결함 프로토플라스트 내에 함유되었기 때문에, 초기 원심분리 단계는 그것의 제거를 허용하였고, 따라서 도 4에서 나타내는 바와 같은 세포밖 식물 단백질 및 성분(아포플라스트 분획)에 더하여 세포벽 분해 효소를 포함하는 결과 용액을 제공한다.
- [0156] 도 4는 앞서 설명한 잎 조직의 제어된 효소 분해 후 얻은 결과 용액의 SDS-PAGE 분석을 나타내며, 레인 1은 사

용된 효소 혼합물을 나타내고, 라인 2는 효소 분해 후 결과 용액을 나타낸다. Comitrol™로부터 미정제 추출물의 단백질 함량을 비교를 위해 라인 3에 제공한다. 라인 2에 존재하는 추출물에 대한 바이오매스:버퍼 비율은 1:5 (w/v)인 한편, 라인 3에 존재하는 추출물에 대해 1:1 (w/v)이었다. 각각의 라인 2 및 3은 따라서 동일한 양의 출발 물질로부터 유래되는 단백질을 함유한다. 대략 동일한 버퍼:식물 비율에 대해, 기계적 식물 추출물은 대략 3.5-4 mg/ml의 단백질 농도를 함유하는 한편, 본 발명에 따라서 얻은 효소 식물 추출물은 대략 1 mg/ml의 단백질 농도로 존재하였다.

[0157] 라인 3에 존재하는 주요 오염물질이 RubisCo (리불로오스-1,5-비스포스페이트 카르복실라아제 옥시게나아제)가 되는 것을 발견하였는데, 이것은 2종류의 단백질 서브유닛으로 만들어진 다: 거대-사슬 (L, 약 55 kDa) 및 소-사슬 (S, 약 13 kDa). 총 8개의 거대-사슬 다이머 및 8개의 소-사슬은 보통 RubisCo 540 kDa로 더 큰 복합체와 함께 서로 조립된다. 이 식물 단백질 오염물이 기계적 추출 방법으로부터 나오는 식물 추출물 중에서 다량으로 발견되는 한편 (도 4의 화살표를 참조), 그것은 본원에서 설명하는 효소 분해 방법에 의해 얻은 식물 추출물에 사실상 없다. 따라서, 본 발명의 방법은 그 중에서도 공정의 초기 단계에서 이런 주된 식물 단백질 오염물질을 제거한다.

[0158] **실시예 4: 식물 조직의 효소 분해는 양이온 교환 수지에서 직접 포획될 수 있는 조건에서 HA-VLP를 방출한다.**

[0159] 니코티아나 벤타미아나 (*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 바와 같이 AGL1/685로 아그로필트레이션 하였다. 잎을 인필트레이션 6일 후에 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 회전식 진탕기 중에서 실온에서 15시간 동안 분해하였다. 분해 버퍼는 1:2.5 비율(w/v)의 바이오매스:분해 버퍼를 사용하여 600 mM 만니톨, 75 mM 시트레이트, 0.04% 소듐 바이 설파이트 pH 6.0 버퍼의 용액 중에서 각각 1.0% (v/v) Multifect Pectinase FE, 1.0% (v/v) Multifect CX CG orand 1.0% (v/v) Multifect CX B (모두 Genencor제)를 함유하였다.

[0160] 분해 후, 아포플라스트 분획을 400  $\mu\text{m}$  나일론 필터를 통해 여과하여 굵은 미분해 식물 조직을 제거하였다 (<5%의 출발 바이오매스). 이어서 여과한 추출물을 5000xg에서 15분 동안 실온에서 원심분리하여 프로토플라스트 및 세포내 오염물질을 제거하였다 (단백질, DNA, 막, 소포, 염료 등). 다음에, 상청액을 0.65  $\mu\text{m}$  유리 섬유 필터 (Sartopore2/Sartorius Stedim) 및 0.45/0.2  $\mu\text{m}$  필터를 사용하여 심층 여과한 후, 크로마토그래피 하였다.

[0161] 정제한 아포플라스트 분획을 평형화/용리 버퍼 (50 mM  $\text{NaPO}_4$ , 100 mM NaCl, 0.005% Tween 80 pH 6.0)로 평형화시킨 양이온 교환 컬럼 (Poros HS Applied Biosystems)에 장약하였다. 일단 UV가 원래의 0으로 되면, 추출물을 증가하는 농도의 NaCl (500 mM)을 함유하는 평형화/용리 버퍼로 단계-용리하였다. 필요하다면, 크로마토그래피 분획을 10 kDa MWC를 장착한 Amicon™ 기기를 사용하여 10회 농축하였다. 단백질 분석을 이전의 실시예에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0162] 상기-언급한 조건 하에서, 대부분의 효소 및 식물 단백질이 양이온 교환 수지에 결합하지 않았지만, HA-VLP는 결합하였고, 따라서 용리 분획 중의 HA-VLP 중에서 상당히 풍부하게 제공하였다 (도 6). 게다가, 도 6에서와 같이, 라인 4 및 5, 셀룰라아제 및 펙티나아제는 pH 7하에서 양이온 교환 컬럼에 결합하지 않았다. 결과적으로, HA 혈구응집반응 활성을 기반으로 한 HA-VLP의 회수는 양이온 교환 컬럼 상의 장약 전의 92%, 용리 분획에서 66%이었다. 194의 정제 인자를 양이온 교환 수지로부터 용리한 분획에서 측정하였다.

[0163] **실시예 5: 분해 버퍼에 NaCl의 첨가**

[0164] 니코티아나 벤타미아나 (*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 관심의 혈구응집소를 발현시키는 구성체 (H1/Cal WT, B/Flo, H5/Indo 또는 H1/Cal X179A)를 운반하는 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) AGL1 균주로 아그로인필트레이션하였다. 하기 주목하는 것을 제외하고, 잎을 인필트레이션 6일 후에 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 실시예 4에 따라서 분해하였다. 여과, 원심분리 및 정제를 실시예 4에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0165] NaCl를 HA-VLP 회수율에서 그것의 잠재적인 효과를 평가하기 위해 분해 버퍼에 첨가하였다. 현탁된 이점은 HA와 식물 세포 또는 정제 동안 제거된 현탁액 중의 입자의 비-특이적 결합의 잠재적 예방과 HA-VLP의 콜로이드 안정성의 달성 및/또는 유지 및/또는 개선의 잠재적 효과이었다.

[0166] 분해 버퍼에 500 mM NaCl의 첨가는 원심분리에 의해 프로토플라스트 및 세포 파편의 제거 후 바이오매스의 그램 당 HA-VLP 회수 수율의 증가를 초래하였다. 그러나, 이 증가는 H1/Cal WT 및 B/Flo 균주에 대해서만 주목한 한편, H5에 대한 회수 수율은 이 접근에 의해 유의하게 증가되지 않았다 (표 4).

표 4

HA-VLP 회수 수율상 분해 단계에서 NaCl의 첨가 효과(혈구응집반응 활성 단위에 의해 측정, dil: 희석의 역수)

HA 바이러스주	분해조건	HA중의 농도 (dil /ml)	수율 (dil/g)	증가된 수율 (X-배) <sup>1</sup>
H5 Indo/05 (#972)	Ø NaCl	4608	12,430	1.2
	500 mM NaCl	4608	14,921	
H1 CA/07 WT (#604)	Ø NaCl	384	1,206	2.1
	500 mM NaCl	768	2,481	
H1 CA/07 X-179A (#605)	Ø NaCl	96	299	8.1
	500 mM NaCl	768	2,419	
B Flo/4 (475)	Ø NaCl	16	52	7.5
	500 mM NaCl	128	392	

<sup>1</sup> NaCl이 있는 수율(dil/g) / NaCl이 없는 수율(dil/g)

[0167]

[0168]

분해 동안 500 mM NaCl의 첨가는 분해 동안 HA-VLP의 방출의 증가를 더 초래하였으며, 교대로 H1/Cal WT와 H1/Cal X-179A 균주(표 5) 둘 다에 대해, 그러나 H5/Indo 균주에 대해서는 아닌 정제 후 증가된 회수율을 야기하였다.

표 5

정제 단계 후 HA-VLP 회수 수율(혈구응집반응 활성 단위에 의해 측정)에서 분해 단계에 NaCl 첨가의 효과

HA 바이러스주	분해조건	심층여과 <sup>1</sup> 후 회수	회수의 증가 (X-배)
H5/Indo (#972)	Ø NaCl	100%	1.0
	500 mM NaCl	100%	
H1/Cal WT (#604)	Ø NaCl	25%	3.0
	500 mM NaCl	75%	
H1/Cal X-179A (#605)	Ø NaCl	50%	2.0
	500 mM NaCl	100%	

<sup>1</sup> 회수는 원심분리 분해 추출과 비교하여 심층 여과 후 얻은 혈구응집 활성%로 표현된다.

[0169]

[0170]

효소 분해 동안 NaCl의 첨가로 및 첨가 없이 HA-VLP의 결합 상태를 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)을 사용하여 H5/Indo 및 H1/Cal WT (각각 도 7A 및 7B)에 대해 연구하였다. NaCl이 없이 분해를 수행하였을 때 입자의 단분산제제를 H5에 대해 관찰한 한편, H1/Cal 제제는 입자종의 훨씬 더 큰 배열을 나타내었다. 도 7C에서 발견되는 상당한 단분산 입자 분포에 의해 나타나는 바와 같이, 분해 버퍼에 NaCl의 첨가는 H1/Cal에 대해 HA-



VLP 자기-결합을 감소시켰다. H1/CaI WT-VLP에 대해 150nm에서 입자의 수는 분해 버퍼에 500 mM NaCl의 첨가에 의해 향상되었다(약 5-배).

#### [0171] 실시예 6: 염료 방출의 제어

[0172] 니코티아나 벤탐미아나(*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 관심의 혈구응집소를 발현시키는 구성체 (H5/Indo)를 운반하는 아그로박테리움 AGL1 균주로 아르고인필트레이션하였다. 잎을 인필트레이션 6일 후에 수 집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 분해하였고, 500 mM NaCl 또는 500 mM NaCl 및 25 mM EDTA를 분해 버퍼에 첨가하였다. 여과, 원심분리 및 정제를 실시예 4에서 설명한 바와 같이 수행 하였다.

[0173] 효소 분해 단계 동안 녹색을 가지는 성분의 방출은 녹색을 띤 착색을 가지는 VLP의 정제된 제제를 유발하였다. 따라서 세포벽 분해 용액의 조성물을 조사하였고, 조절하여 감소된 녹색 착색을 가지고, 따라서 증가된 순도를 가지는 VLP 정제 제제를 얻었다. 반드시 이론에 의하는 것을 바라지는 않지만,  $\text{Ca}^{2+}$ 는 세포벽의 중층(middle lamellae)과 함께 구성요소의 체류에 중요한 역할을 하고, 보통 식물 세포벽에 고농도의  $\text{Ca}^{2+}$ 가 있다는 사실이 주어지기 때문에,  $\text{Ca}^{2+}$ -킬레이트 EDTA는 세포벽의 효소 해중합을 가능하게 할 수 있고, 따라서 클로로플라스트와 같은 무결함 세포내 기관을 보존하며, 녹색-염료 성분의 방출을 방지한다.

[0174] 도 6에서 나타내는 바와 같이, 제제의 흡수 시( $\text{OD}_{672\text{nm}} - \text{OD}_{650\text{nm}}$ ) 차이점을 측정하는 것에 의해 평가함으로써 분해 버퍼에 25mM EDTA의 첨가는 정제된 H5-VLP 제제의 녹색 착색을 감소시킨다. 녹색 구성성분들이 많은 양으로 방 출될 때, 또는 적당히 제거될 때, VLP 제제는  $\Delta\text{OD} > 0.040$ 을 나타내었다.

표 6

H5-VLP 제조물의 녹색 착색 시 분해 버퍼에 25 mM EDTA의 첨가 효과.

	$\text{OD}_{672\text{nm}} - \text{OD}_{650\text{nm}}$
0 mM NaCl, 0 mM EDTA	$0.071 \pm 0.061$
500 mM NaCl	$0.087 \pm 0.060$
500 mM NaCl + 25 mM EDTA	$0.010 \pm 0.002$

#### [0175] 실시예 7: 대안의 분해 버퍼 조성물

[0176] 니코티아나 벤탐미아나(*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 관심의 혈구응집소를 발현시키는 구성체 (H5/Indo)를 운반하는 아그로박테리움 AGL1 균주로 아르고인필트레이션하였다. 잎을 인필트레이션 6일 후에 수 집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 분해하였고, 분해 버퍼의 변형으로 표 7-9에서 주목한 바와 같은 0%, 0.25%, 0.5%, 0.75% 또는 1% v/v Multifect Pectinase FE, Multifect CX-CG 셀룰라아제 및 Multifect CX B 셀룰로오스를 포함하였다.

[0178] 하기 표 7 및 8에서 나타내는 바와 같이, 펙티나아제는 분해 버퍼 중에서 비-필수적인 것으로 증명되었다. 유사한 수준의 H5/Indo 또는 H1/CaI WT VLP를 펙티나아제의 존재 또는 부재하에서 본 방법으로 추출할 수 있다. 더 나아가, 이전의 실시예와 비교할 때 셀룰라아제의 농도를 감소시키는 것은 추출량에 상당한 영향을 가지지 않는 것으로 발견되었다(표 9).

표 7

니코티니아 벤타미아나(*N. benthamiana*) 잎의 분해에 의한 H5/Indo VLP의 방출.  
모든 조건을 복제물에서 시험하였다.(혈구응집반응 활성화에 의해 측정된 HA-VLP의  
농도, dil: 희석의 역수)

펙티나아제 (% v/v)	셀룰라아제* (% v/v)	H5 VLP의 농도 (dil/ml)
1	1	1152
0.5	1	6144
0	1	768
0	2	1536

\*Multifect CX GC

표 8

니코티니아 벤타미아나 (*N. benthamiana*) 잎의 분해에 의한 H1/Cal WT VLP의  
방출. 모든 조건을 복제물에서 시험하였다.(혈구응집반응 활성화에 의해 측정된 HA-  
VLP의 농도, dil: 희석의 역수)

펙티나아제 (% v/v)	셀룰라아제* (% v/v)	H1 VLP의 농도 (dil/ml)
1	2	2304
0	2	3840

\* Multifect CX GC 및 Multifect CX B 각각의 1%

표 9

니코티니아 벤타미아나 (*N. benthamiana*) 잎의 분해에 의한 H1/Cal WT의 방출.  
모든 조건을 복제물에서 시험하였다. (혈구응집반응 활성화에 의해 측정된 HA-VLP의  
농도, dil: 희석의 역수)

펙티나아제 (% v/v)	셀룰라아제* (% v/v)	H1 VLP의 농도 (dil/ml)
1.0	1	384
0.75	1	480
0.50	1	480
0.25	1	480

\*Multifect CX GC

실시예 8: 중성 pH 근처의 조건에서 효소 분해

분해 동안 pH를 조절하는 것은 일부 VLP의 추출에 대해 중요할 수 있다. 분해 단계 동안 일어나는 세포벽의 해  
중합이 적절한 버퍼의 조건하에서 용액을 산성화할 수 있는 산성 당을 방출할 수 있다는 것과, 일부 VLP(예컨대  
H3/Bris 및 B/Flo HA를 포함하는 것)는 약간 산성인 조건에서 강한 감수성이 이미 증명되었다는 것을 고려하여,



생성된 VLP의 수율에서 이러한 잠재적 산성화의 영향을 조사하였다.

[0184] 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물을 실시예 1에서 설명한 관심의 혈구응집소를 발현시키는 구성체 (B/Flo, H5/Indo, H3/Bris)를 운반하는 아그로박테리움 AGL1 균주로 아르고인필트레이션하였다. 잎을 인필트레이션 6일 후에 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였고, 실시예 4에 따라서 분해하였고, 분해 조건의 변형은 표 10-14에서 설정된 바와 같이 조절된 분해 버퍼의 pH로 500 mM NaCl; 25 또는 50 mM EDTA; 0.03 또는 0.04 % 소듐 바이설파이트; 0, 100, 200 또는 600 mM 만니톨, 75, 125 또는 150 mM 시트레이트; 및/또는 75 mM NaPO<sub>4</sub>를 포함하였다. 여과, 원심분리 및 정제를 실시예 4에서 설명하였다.

[0185] 다양한 분해 버퍼 조성물을 시험하여 효소 분해의 마지막까지 대략 5.5의 pH를 달성하였고, 시트레이트의 증가된 농도(pH 3.0 내지 5.4의 버퍼 효과) 및 소듐 포스페이트(pH 6.0이상에서 버퍼 효과)의 첨가를 포함하였다. 분해 후 pH가 pH 6.0에 가까울 때, 표 10은 B 균주로부터 VLP를 더 효율적으로 추출하였다는 것을 나타낸다.

### 표 10

B/Flo VLP의 추출 수율에서 분해 버퍼 조성의 효과.

버퍼 조성 <sup>1</sup>	B/Flo VLP (dil/ml)의 농도	단백질 농도 (mg/ml)	분해 후 pH
75 mM 시트레이트 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1	0.92	5.0
75 mM 시트레이트 pH 6.0	0	1.43	5.6
125 mM 시트레이트 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1.5	1.07	5.4
150 mM 시트레이트 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1.5	1.07	5.4
125 mM 시트레이트 + 75mM NaPO <sub>4</sub> + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.5	4	2.19	5.9

<sup>1</sup> 모든 버퍼는 600mM 만니톨, 소듐 메타바이설파이트 0.04%를 함유하였다.

[0186]

[0187] 다음에, pH 6.0에 가까운 최종 pH 값에 도달하기 위해서 더 높은 pH에서 분해를 시작하는 효과를 시험하였다. 표 11에서 나타내는 바와 같이, 이러한 중성 근처의 조건을 가지는 식물 세포의 분해가 가능하였고, H5/Indo VLP에 대한 추출 수율을 손상시키지 않았다.

표 11

H5/Indo VLP의 추출 수율에서 분해 버퍼의 초기 pH 효과.

분해 용액의 초기 pH <sup>1</sup>	H5/Indo VLP의 농도 (dil/ml)	단백질 농도 (mg/ml)	분해 후 pH
6.5	2304	2.79	6.08
6.4	1536	2.31	5.93
6.3	2304	2.40	5.81
6.2	2304	2.09	5.73
6.1	2304	1.72	5.61

<sup>1</sup> 모든 분해 버퍼는 600 mM 만니톨, 소듐 메타바이설파이트 0.04%, 125 mM 시트레이트 + 75 mM NaPO<sub>4</sub> + 500 mM NaCl + 25 mM EDTA를 함유하였다

[0188]

[0189]

분해 용액의 다른 성분들은 VLP의 추출 수율에 부정적으로 영향을 미치지 않고 변할 수 있다는 것을 나타내었다. 표 12는 B/Flo VLP의 추출 수율을 향상시키기 위해서 분해 용액에 사용될 수 있는 한편, 분해 후 pH 5.4-5.7을 얻을 수 있다는 것을 예시한다. 이러한 변형은 시트레이트의 농도를 증가시키고 PO<sub>4</sub> 버퍼를 첨가하는 단계를 포함한다. EDTA의 농도를 증가시키는 것은 일반적으로 더 산성화된 추출물과 더 낮은 VLP 추출 수율을 유발한다는 것을 발견하였다.

표 12

B/Flo VLP의 추출 수율에서 다양한 분해 버퍼 성분의 효과.

버퍼 조성물 <sup>1</sup>					B VLP의 농도 (dil/ml)	단백질 농도 (mg/ml)	분해 후 pH
만니톨 (mM)	시트레이트 (mM)	PO <sub>4</sub> (mM)	EDTA (mM)	pH			
600	75	0	25	6.1	2	1.07	5.0
600	125	0	25	6.1	192	0.83	5.7
600	125	75	25	6.2	192	1.81	5.5
600	125	75	50	6.2	96	1.26	5.4
200	125	75	25	6.2	384	1.05	5.7
200	125	75	50	6.2	96	1.04	5.4
200	125	75	75	6.2	96	1.55	5.4

<sup>1</sup> 모든 버퍼는 500 mM NaCl 및 소듐 메타바이설파이트 0.04%를 함유하였다.

[0190]

[0191]

버퍼 조성물은 추가로 변형되어 H3/Brisbane VLP의 추출 수율을 개선시킨다(표 13).

표 13

H3/Bris VLP의 추출 수율에서 분해 용액중의 만니톨 및 소듐 바이설파이트 농도의 효과.

버퍼 조성물					
만니톨 (mM)	소듐 바이설파이트 (%)	EDTA (mM)	pH	단백질 농도 (mg/ml)	분해 후 pH
600	0.04	25	6.2	1.87	5.7
600	0.04	50	6.2	1.62	5.6
200	0.03	25	6.2	1.89	5.7
200	0.03	50	6.2	1.24	5.6

<sup>1</sup> 모든 버퍼는 125 mM 시트레이트, 75 mM NaPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl를 함유한다.

[0192]

[0193]

표 12 및 표 13에서 나타내는 바와 같이, 만니톨 농도는 VLP 추출 수율에 유의하게 영향을 미치지 않고 200 mM로 감소될 수 있었다. 100 mM로 만니톨 농도의 추가 감소, 및 분해 용액으로부터 만니톨의 전체 생략조차도, 얻은 HA-VLP의 수준에 유의하게 영향을 미치지 않았다(표 14).

표 14

다른 농도의 만니톨이 있는 버퍼에서 수행한 바이오매스의 분해로부터 H5/Indo VLP의 방출.

분해 용액의 만니톨 농도 <sup>1</sup>	H5/Indo VLP의 농도 (dil/ml)	단백질 농도 (mg/ml)
<sup>2</sup> 시행 1: 만니톨 없음	2304	1.62
<sup>2</sup> 시행 1: 600 mM 만니톨	3072	1.73
<sup>2</sup> 시행 2: 100 mM 만니톨	4608	1.77
<sup>2</sup> 시행 2: 600 mM 만니톨	4608	2.0

<sup>1</sup> 모든 버퍼는 75 mM 시트레이트 pH 6.0 + 소듐 메타바이설파이트 0.04%를 함유한다.

<sup>2</sup> 2가지의 시도를 만니톨이 없는 VLP(시행 1)와 100M 만니톨이 있는(시행 2) VLP 대 600mM 만니톨의 추출 수율의 비교를 수행하였다.

[0194]

[0195]

실시예 9: 넓은 다양성의 HA-VLP로 효소 분해의 적합성

[0196]

본원에서 설명한 식물 바이오매스에 대한 효소 분해 방법은 광범위한 종류의 HA-VLP의 추출에 사용될 가능성을 가진다. 앞의 실시예에서 나타내는 H5/Indo, H1/Cal WT VLP, H3/Bris 및 B/Flo를 포함하는 HA-VLP의 추출을 추가하여, 본원에서 설명되는 방법은 또한 표 15에서 나타내는 계절적 H1/Bris 및 H1/NC의 추출에 적당한 것으로 나타났다.

표 15

니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 잎의 분해로부터 계절적 H1/Bris 및 H1/NC VLP의 방출(혈구응집반응 활성에 의해 측정된 HA의 농도, dil: 희석의 역수)

HA 바이러스주	HA의 농도 (dil/ml)
H1/Bri	1536
H1/NC	384

[0197]

[0198] 실시예 10: 항체 제조, 발현 및 분석

[0199] C2B8 발현 카세트의 조립체(구성체 #595)

[0200] C2B8은 비호지킨림프종(NHL) 상에서 발현되는 B-세포 특이적 항원 CD20에 대한 키메라(마우스/인간) 단클론성 항체이다. C2B8은 보체 및 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 매개하며, 시험관 내에서 악성 B-세포주에 대해 직접적인 항증식 효과를 가진다(N Selenko et. al., Leukemia, October 2001, 15 (10); 1619-1626).

[0201] 84 bp의 알팔파 플라스토시아인 프로모터를 포함하는 DNA 단편, 완전 C2B8 경쇄 암호서열 및 완전 알팔파 플라스토시아인 종결자를 합성하였다(LC 단편). LC 단편은 DraIII 제한 자리(플라스토시아인 프로모터 내에서 발견됨) 및 플라스토시아인 종결자 하류의 EcoRI 자리 옆에 있었다. LC 단편의 서열은 도 9에서 나타낸다(SEQ ID NO:15). LC 단편을 함유하는 플라스미드를 DraIII 및 EcoRI로 분해하였고, 구성체 #660 (D' Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940)로 클로닝한 후, 동일한 효소로 분해하였다. 결과 플라스미드를 구성체 번호 590으로 칭하였다. 제2 DNA 단편을 합성하였으며, 이는 84 bp의 알팔파 플라스토시아인 프로모터, 완전 C2B8 중쇄 암호서열 및 완전 알팔파 플라스토시아인 종결자(HC 단편)를 포함한다. HC 단편은 DraIII 제한 자리(플라스토시아인 프로모터 내에서 발견됨) 및 플라스토시아인 종결자 하류의 EcoRI 자리 옆에 있었다. HC 단편의 서열은 도 16에서 나타낸다(SEQ ID NO:16). HC 단편을 함유하는 플라스미드를 DraIII 및 EcoRI로 분해하였고, 구성체 #660 (D' Aoust et al., Plant Biotechnol. J. 2008, 6: 930-940)로 클로닝한 후, 동일한 효소로 분해하였다. 결과 플라스미드를 구성체 번호 592로 칭하였다. 592를 포함하는 아그로박테리움 투메파시안스(*A. tumefaciens*) 균주를 "AGL1/592"로 칭하였다.

[0202] C2B8 발현을 위한 이중 발현 카세트를 포함하는 플라스미드(구성체 #595)를 다음과 같이 조립하였다. 구성체 번호 592를 EcoRI로 분해하였고, Klenow 단편으로 처리하여 평활말단(blunt-end)을 만들었고, SbfI로 분해하였다. SbfI 자리 및 평활말단 옆에 있는 C2B8 중쇄의 발현을 위한 완전 카세트를 포함하는 결과 단편을 구성체 #590에 삽입한 후 SbfI 및 SmaI로 분리하였다. 도 11A는 식물 내 C2B8의 발현을 위해 사용한 구성체 #595의 도식적 표현을 나타낸다.

[0203] P19 발현 카세트의 조립체(구성체 #R472)

[0204] p19 단백질을 암호화하는 구성체 R472를 상기 설명하였다("침묵 억제자"; 도 11B 참조).

[0205] 식물 바이오매스, 박테리아 접종물, 아그로인필트레이션, 및 수확의 제조

[0206] 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물을 16/8 광주기 및 25°C 낮/20°C 밤의 온도 섭생 하에서 온실 중에서 상기 설명한 바와 같이("식물 바이오매스, 접종물, 아그로인필트레이션, 및 수확의 제조") 성장시켰다. 파종 3주일 후, 개개의 묘목을 골라서, 화분에 옮기고, 동일한 환경 조건하에서 추가 3주 동안 온실 중에서 성장하도록 두었다.

[0207] 구성체 #595 또는 #R472를 함유하는 아그로박테리아를 10 mM 2-[N-모르폴리노]에탄술포산(MES), 50 µg/ml



kanamycin 및 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 카르베니실린 pH5.6로 보충한 BBL Select APS LB 브로스 배지 중에서 그것들이  $\text{OD}_{600} > 2.0$ 로 도달할 때까지 성장시켰다. 아그로박테리움 현탁액을 원심분리한 후, 인필트레이션 배지(10 mM  $\text{MgCl}_2$  및 10 mM MES pH 5.6) 중에서 재현탁하였고, 4°C에서 밤새 저장하였다. 인필트레이션 당일, 배양물 배치를 6.7 배양 부피로 희석하였고 가온한 후 사용하였다. 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*)의 전체 식물을 1분 동안 20-40 Torr 진공 하에서 밀폐 스테인리스 스틸 탱크 중의 박테리아 현탁액에 거꾸로 넣었다. 인필트레이션 후, 식물을 수확까지 5일의 인큐베이션 기간 동안 식물을 온실에 되돌렸다. 인필트레이션을 1:1 비율의 군주 AGL1/595 및 AGL1/R472로 수행하였다.

[0208] **잎 샘플링 및 전체 단백질 추출(기계적 추출)**

[0209] 인큐베이션 후, 식물의 공기 부분을 수확하였고, 즉시 사용하였다. 전체 가용성 단백질을 1.5 부피의 차가운 20 mM  $\text{NaPO}_4$  pH 6.0, 0.15 M NaCl 및 2 mM 소듐 메타바이설파이트로 3분 동안 가정용 블렌더 내에서 식물 세포를 균질화함으로써 추출하였다. 균질화 후, 그라인딩한 식물 물질의 슬러리를 Miracloth 상에서 여과하여 큰 불용성 파편을 제거하였다. 1M HCl의 첨가에 의해 추출물의 pH를 4.8로 조절하였고, 15분 동안 18 000g 원심분리에 의해 불용성 물질을 제거하였다(4°C). 상청액을 수집하였고, pH를 Tris 염기 2M에 의해 8.0으로 조절하였다. 불용성 물질을 18 000 g 에서 15분 동안 4°C에서 원심분리하여 제거하였고, 미정제 추출물(상청액)을 수집하였다. 미정제 추출물을 정제한 것의 총 단백질 함량을 표준표준으로서 소혈청 알부민을 사용하여 Bradford 분석(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다.

[0210] **세포벽 분해에 의한 단백질 추출**

[0211] 잎 조직을 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 식물로부터 수집하였고,  $\sim 1 \text{ cm}^2$  조각으로 절단하였다. 잎 조각을 2.425 부피의 분해 용액(75 mM 시트레이트 pH 6.9, 600 mM 만니톨, 1% Multifect Pectinase FE, 1% Multifect CXG, 1% Multifect B)에 넣었다. 이 제조물을 얇은 용기에 편평하게 펼쳤고, 120 rpm 및 18°C에서 회전식 진탕기 중에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 잎 파편을 나일론 필터(250  $\mu\text{m}$  메쉬) 상의 여과에 의해 제거하였다. 추출물을 5 000 g에서 15분 동안 (22°C) 원심분리하였고, 상청액을 수집하고, 0.65  $\mu\text{m}$  유리 섬유 상에서 여과하였다. 추출물을 0.5 M Tris 염기에 의해 pH 6.0으로 조절하였고 PES 막 0.45/0.22  $\mu\text{m}$  상에서 여과하였다.

[0212] **암모늄 설페이트 침전 및 항체 정제**

[0213] 암모늄 설페이트를 단백질 추출물에 서서히 첨가하여 45% 포화에 도달하였다. 추출물을 60분 동안 얼음 위에서 유지하였고, 18 000 g에서 20분 동안 원심분리하였다(4°C). 상청액을 버리고, 펠렛을 사용시까지 냉동시켰다(-80°C).

[0214] 냉동 단백질 펠렛을 해동하였고, 단백질 재현탁 용액의 1/10 부피로(침전 전 부피와 비교하여) 재현탁하였다(50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl). 단백질 용액을 12 000 g에서 20분 동안 원심분리하여 (4°C) 비-가용성 물질을 제거하였다. 단백질 용액을 MabSelect Sure 수지(GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada)에 장약하였다. 컬럼을 10 CV의 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl로 세척하였고, 항체를 6 CV의 100 mM 소듐 시트레이트 pH 3.0에 의해 용리하였다. 용리 부피를 1/10 CV의 2 M Tris pH 7.4, NaCl 150 mM를 함유하는 튜브 내 1 CV 분획 중에서 수집하였다. 용리 분획을 그것의 단백질 함량을 기준으로(Bradford에 의해 측정) 선택하였고, 선택된 분획을 모으고 냉동시킨(-80°C) 후 분석하였다.

[0215] **단백질 정량화 및 SDS-PAGE 분석**

[0216] 총 단백질 함량을 기준 표준으로서 소혈청 알부민(미정제 단백질 추출물) 또는 상업적 리투시맵(Rituxan®<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canada) 중 하나를 사용하여(정제된 항체에 대해) Bradford 분석(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다. Coomassie-염색된 SDS-PAGE를 Laemmli (Nature 1970, 227: 680-685)에 의해 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0217] **ELISA에 의한 C2B8 정량화**

[0218] 멀티웰 플레이트(Immulon 2HB, ThermoLab System, Franklin, MA)를 50 mM 카르보네이트 버퍼(pH 9.6) 중에서 4°C에서 16-18시간 동안 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 단클론성 마우스 항-인간 IgG(Abcam, Ab9243)로 코팅하였다. 다음으로 37°C에서 인산 완충 염수(PBS) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 중의 1% 카세인 중에서 1시간 인큐베이션

을 통해 멀티웰 플레이트를 블로킹(blocked) 하였다. 표준 곡선을 리투시맵(Rituxan®

, Hoffmann-La Roche, Mississauga, Canada)의 희석으로 만들었다. 면역분석을 수행할 때, 모든 희석(대조군 및 샘플)을 모크 점종물(단지 AGL1/R472)로 인필트레이션하고 인큐베이션한 식물 조직으로부터 얻은 식물 추출물 중에서 수행하여 매트릭스 효과를 제거하였다. 플레이트를 단백질 샘플과 함께 인큐베이션하였고, 1시간동안 37℃에서 희석하여 표준 곡선을 만들었다. PBS (PBS-T)중의 0.1% Tween-20로 3회 세척 후, 플레이트를 페록시다아제-컨쥬게이트된 당나귀 항-인간 IgG 항체(1/4000 dilution in blocking solution) (Jackson ImmunoResearch 709-035-149)와 함께 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션 하였다. PBS-T로 세척을 반복하였고, 플레이트를 Sure Blue 페록시다아제 기질(KPL, Gaithersburg, MD)과 함께 인큐베이션하였다. 반응을 1N HCl을 첨가하여 중지시키고, 흡광도를 450nm에서 판독하였다. 각 샘플을 3중으로 분석하였고, 농도를 표준 곡선의 선형 부분에서 보간하였다.

[0219] N-글리칸 분석

[0220] C2B8 (Rituxan™; 50 µg)을 포함하는 샘플을 15% SDS/PAGE 상에서 분리하였다. 중쇄 및 경쇄를 쿠마씨 블루 (Coomassie blue)로 드러내었고, 중쇄에 대응하는 단백질 밴드를 삭제하고 작은 단편으로 절단하였다. 단편을 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> / CH<sub>3</sub>CN (1/1)의 600 µL의 용액으로 각 시기에 15분 동안 3회 세척하였고 건조시켰다.

[0221] 디설파이드 브릿지의 환원은 56℃에서 45분 동안 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중의 0.1M DTT의 600 µL의 용액 중에서 겔 단편의 인큐베이션에 의해 일어났다. 알킬화를 실온에서 30분 동안 1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중의 요오도아세트아미드 55mM의 600 µL의 용액을 첨가함으로써 수행하였다. 상청액을 버렸고, 폴리아크릴아미드 단편을 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.1M / CH<sub>3</sub>CN (1/1) 중에서 다시 한번 세척하였다.

[0222] 다음으로 단백질을 37℃에서 16시간 동안 600 µL의 0.05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중에서 7.5 µg의 트립신(Promega)으로 분해하였다. 200 µL의 CH<sub>3</sub>CN을 첨가하였고, 상청액을 수집하였다. 그 다음에 겔 단편을 200 µL의 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 세척한 다음, 200 µL CH<sub>3</sub>CN로 다시 세척하고, 최종적으로 200 µL 폼산 5%로 세척하였다. 모든 상청액을 모았고 동결건조시켰다.

[0223] 글리코펩티드를 Sep-Pack C18 카트리지 상의 크로마토그래피에 의해 펩티드로부터 분리하였다. 글리코펩티드를 물 중에서 10% CH<sub>3</sub>CN으로 특이적으로 용리한 다음, 337-nm 질소 레이저를 장착한 Voyager DE-Pro MALDI-TOF 기기(Applied Biosystems, USA) 상의 MALDI-TOF-MS에 의해 분석하였다. 매트릭스로서 디히드로벤조산(Sigma-Aldrich)을 사용하여 질량 스펙트럼을 리플렉터 지연 추출 모드로 수행하였다.

[0224] 실시예 11: C2B8 항체 추출 수율의 비교

[0225] 효소 분해를 C2B8 항체의 추출을 위한 기계적 추출과 비교하였다. 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*) 식물을 AGL1/595 및 AGL1/R472로 아그로인필트레이션하였다. 인큐베이션 6일 후, 잎을 수확하였고, 단백질을 효소 분해 또는 기계적 추출에 의해 추출하였다. 추출을 2회 수행하였고, 결과 추출물을 부피, 단백질 농도 및 항체 (C2B8) 함량과 비교하였다. 결과를 표 16에 나타낸다.

표 16

세포벽의 기계적 파괴(블렌더 추출) 및 효소 분해에 대한 추출 수율의 비교

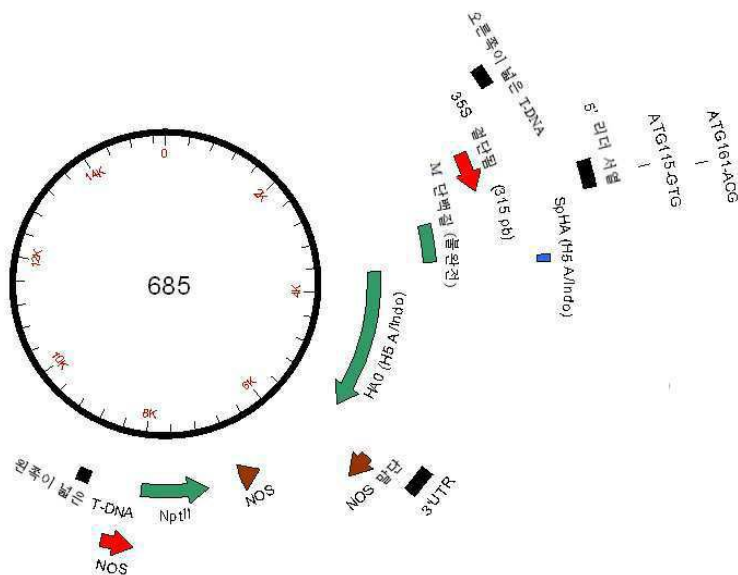
추출 로트	처리된 바이오매스 (g)	미정제 추출물 부피(ml)	추출물 중의 단백질 농도 (mg/ml)	C2B8 농도 (%TSP)	C2B8 추출 수율 (mg C2B8/kg FW)
블렌더, 로트 no. 1	700	1400	2,42	3,33%	161,4
블렌더, 로트 no. 2	700	1480	2,47	3,65%	190,5
분해, 로트 no. 1	700	2337	1,45	4,89%	236,6
분해, 로트 no. 2	700	2233	1,64	4,68%	244,9

[0226]

- [0227] 700 g의 바이오매스, 기계적 추출은 평균 1440 ml의 단백질 추출물을 생성한 한편, 분해는 2285 ml의 단백질 추출물을 생성하였다. C2B8 항체의 백분율은 블렌더에서 생성된 추출물에서보다(추출된 단백질의 3.29%의 평균값) 분해로부터의 추출물에서 더 높았다(추출된 단백질의 479%의 평균값). 함께, 더 높은 부피의 추출물과 추출 결과에서 발견한 더 높은 농도의 항체는 기계적 추출(175.95 mg C2B8/kg 생중량)보다 분해에 대해 37% 더 높은 추출 수율(240.75 mg C2B8/kg 생중량)을 초래한다.
- [0228] **실시예 13: 정제된 C2B8 항체의 비교(단백질 함량)**
- [0229] C2B8 항체를 실시예 10에서 설명한 단백질 A 상의 친화도 크로마토그래피에 의한 추출물로부터 정제하였다. 기계적 추출 또는 분해에 의해 얻은 추출물로부터 정제된 생성물을 그것의 단백질 함량을 기준으로 비교하였다. 각 추출 로트로부터 정제된 항체의 전기영동 프로필을 도 12에 나타낸다. 결과는 블렌더 추출 또는 세포벽 분해 중 하나로부터 정제된 생성물의 프로필이 유사하다는 것을 나타낸다.
- [0230] **실시예 14: 정제된 C2B8 항체의 비교(N-글리코실화)**
- [0231] 단백질의 N-글리코실화는 N-X-S/T 서열을 함유하는 분비 단백질의 아스파라긴 상에서 복합체 글리칸 구조의 첨가가 있으며, N은 아스파라긴이고, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이고, S/T는 세린 또는 트레오닌이다. 단백질의 번역 동안, 및 그것의 수송이 분비 경로를 가로지르는 동안 전구체 글리칸을 소포체 내에 첨가하고, N-글리칸은 돌연변이된다. 소포체(ER) 내의 고-만노오스형 N-글리칸으로부터, 식물 내의 N-글리칸 돌연변이는 글루코오스 잔기의 부가 및 제거, 말단부의 만노오스의 제거 및 N-아세틸글루코사민, 크실로오스, 푸코오스 및 갈락토오스 잔기의 부가를 포함한다. 식물 내 N-글리칸 돌연변이는 Post-translational modification of therapeutic proteins in plants (Curr. Opin. Plant Biol. 2004, 7: 171-181)에서 Gomord et al.에 의해 설명된다. N-글리코실화 경로의 효소는 분비 경로의 각 구간에서 정확한 위치에, 즉 소포체, 시스-골지, 중앙(medial)-골지 및 트랜스-골지에 위치된다. 따라서, 단백질의 N-글리코실화 패턴은 추출 순간의 그것의 위치에 따라서 다를 것이다. 앞서 본 발명자들은 항체의 특정 비율이 아포플라스트를 표적으로 하지만 고만노오스형의 미성숙 N-글리칸을 함유한 니코티아나 벤타미아나(*N. benthamiana*)의 아그로필트레이션을 사용하여 만들어졌다는 것을 관찰하였다(Vezina et al., Plant Biotechnol. J. 2009 7: 442-455). 유사한 관찰을 다른 곳에서 보고하였다(Sriraman et al., Plant Biotechnol. J. 2004, 2, 279-287). 두 경우 모두에서, 특정 비율의 항체 상에서 미성숙 N-글리칸의 존재는 추출 순간에 분비 경로의 초기 구간 내 항체 존재의 결과로서 설명되었다.
- [0232] 다음의 연구는 세포벽 분해에 의해 분비된 글리코단백질의 추출이 복합체 N-글리칸을 함유하는 재조합 단백질을 바람직하게 추출하는지 여부를 시험한다. 아포플라스트로 분비된 항체 및 다른 글리코단백질은 완전한 그것의 돌연변이를 가지는 N-글리칸을 함유하는 것으로 기대된다. 성숙 N-글리칸은 대부분 통상적으로 말단의 N-아세틸글루코사민 또는 갈락토오스 잔기를 함유하며, 또한 복합체 N-글리칸으로 명명된다. 대조적으로, 대부분 분비 경로 도중의 단백질에서 발견되는 미성숙 N-글리칸은 말단의 만노오스 잔기를 포함한다. C2B8 (Rituxan<sup>TM</sup>) 상의 N-글리칸의 높은 만노오스 함량은 혈액 스트림 내에서 감소된 반감기와 관련되었다(Kanda et al., Glycobiology 2006, 17: 104-118). 이 내용에서, 식물로부터 복합체 N-글리칸을 함유하는 아포플라스트 글리코단백질의 추출에 바람직할 수 있는 추출 방법이 바람직하다.
- [0233] 정제된 C2B8 항체 상의 N-글리코실화의 비교 분석을 실시예 10에서 설명한바와 같이 수행하였다. 결과는 분해된 바이오매스로부터 정제된 항체가 상당히 더 낮은 비율의 올리고만노시드 N-글리칸(도 13A) 및 당연한 귀결로서 상당히 더 높은 비율의 복합체 N-글리칸(도 13B)을 함유한다는 것을 증명한다.
- [0234] 세포벽 분해에 의한 추출은 또한 변형된 성숙 N-글리칸을 함유하는 글리코단백질의 회수에 바람직하도록 WO 20008/151440에서 설명되는 N-글리코실화 프로필을 변형시키기 위해 글리코단백질과 하나 이상의 효소를 공동-발현시키는 식물에 사용될 수 있었다. 예를 들어, 성숙 N-글리칸은 환원될 수 있거나, 또는 자일로스 및 푸코오스 잔기가 없을 수 있다.
- [0235] N-글리코실화의 변형 방법은 베타-1,4갈락토실트랜스퍼라아제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 함께 관심의 단백질(GalT; WO 20008/151440의 SEQ ID NO:14로서 제공됨), 예를 들어 제한되는 것은 아니지만 포유동물 GalT, 또는 인간 GalT를 공동 발현시키는 단계를 수반할 수 있지만, 다른 공급원으로부터 GalT가 또한 사용될 수 있다. GalT의 촉매 도메인(예를 들어 WO 20008/151440에서 설명되는 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 370-1194)은 또한 N-아세틸글루코사미닐 트랜스퍼라아제의 CTS 도메인에 융합되어(GNT1; 예를 들어, WO 20008/151440에서 제공되는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 34-87을 포함한다), GNT1-GalT 혼성 효소를 만들 수

[0237] 현재 본 발명의 하나 이상의 바람직한 구체예는 예로써 설명된다. 본 발명은 실질적으로 본원에서 앞서 설명한 바와 같이 그리고 실시예 및 도면에 대해서 모든 구체예, 변경 및 변형을 포함한다. 다수의 변형 및 변형이 특허청구범위에서 정의하는 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변형의 예는 실질적으로 동일한 방법으로 동일한 결과를 달성하기 위해서 본 발명의 임의의 양태에 대해 알려진 동등물의 치환을 포함한다.

도면1





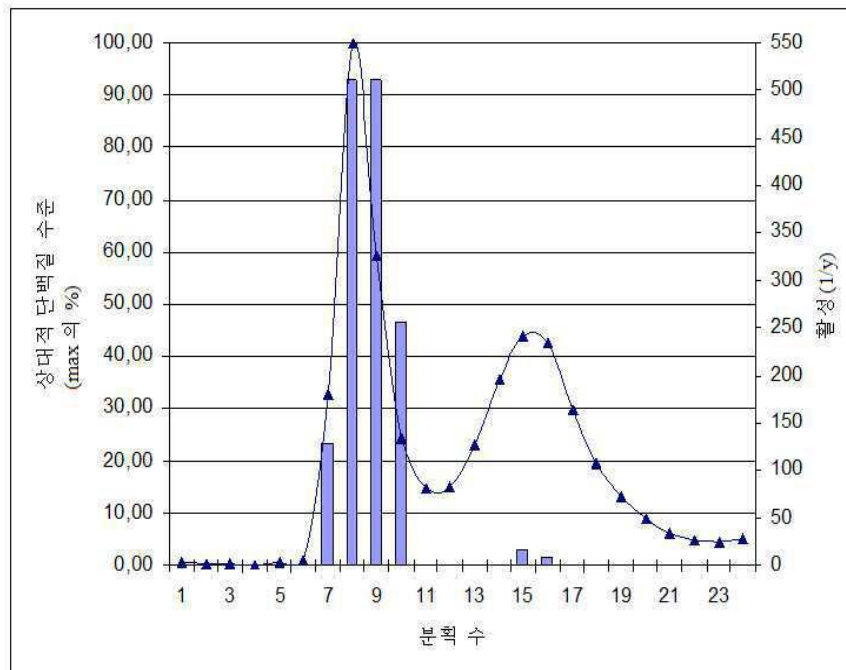
도면2a

TTAATTAAGAATTGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTA  
TTGAGAAGATAGTGGAAAAAGGAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATC  
GTTGAAGATGCCTCTGCGGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAA  
AGAAGACGTTCCAAACCAGCTCTCAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAAGGATG  
ACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGT  
ATTAAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACTCTCTAAACT  
TCTCTCATCTCTTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTGCCTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAAGT  
CGTGCCTCGGCACCACTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTA  
GTGCGCGGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGTGTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTG  
CTGGAGGCTGCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATC  
TCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGCTGATTGGTCTATAA  
GAAATCTAGTATTTCTTGTAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCT  
TCTGTATATTCTGCCAAATTTGTGCGGCCCATGGAGAAAAATAGTGCTTCTTCTTCTGCAATAGTCAGTCT  
TGTAAAAGTGATCAGATTTGCAATTGGTTACCATGCAAAACAATTCACAGAGCAGGTTGACACAATCA  
TGAAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGC  
GATCTAGATGGATGAAGCCTCTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCC  
AATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAAGCCCAATCCAACCAATG  
ACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAAGTGAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAT  
TTTGAGAAAAATTCAAATCATCCCCAAAGTTCTTGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA  
GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCTTTTAAAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAAGAACAGTACA  
TACCCAAATAAAGAAAAAGTACAAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTGGTACTGTGGGGAATTC  
CCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCCAACCACTATATTTCCATTGGGA  
CATCAACACTAAACAGAGATTGGTACCAAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGA  
AGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAATGGAAATTT  
ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGA  
ATATGGTAACGTCAACACCAAGTGTCAAACTCCAATGGGGCGGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA  
ACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAATCAAAAGAGATTAGTCTTGCACAA  
GGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAG  
GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACTAGCAATGAGCAG  
GGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAGAAATCCACTCAAAAGCAATAGATGGAGTACCAATAAGGTCA  
ACTCAATCATTTGACAAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTGGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGG  
AGAATAGAGAATTTAAACAAGAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAT  
TCTGGTTCTCATGGAAAAATGAGAGAACTTAGACTTTCATGACTCAAAATGTTAAGAACCTCTACGACA  
GGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAT  
GTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACATATCCGCAATTTAGAAAGAGCA  
AGATTTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAAATTGGAATCAATAGGAACCTTACCAAACTACTGCAAT  
TTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTC  
CAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAAGGCCATATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTC  
GGTGTGCAATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTT  
CTTTGTGAGCTCTGTTTAGCAGGTCTGCCCTTACGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTTATTA  
AAAAAAGGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTGCGGCTTGCAGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATT  
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACTGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAG  
TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCG  
CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGCGCGCC

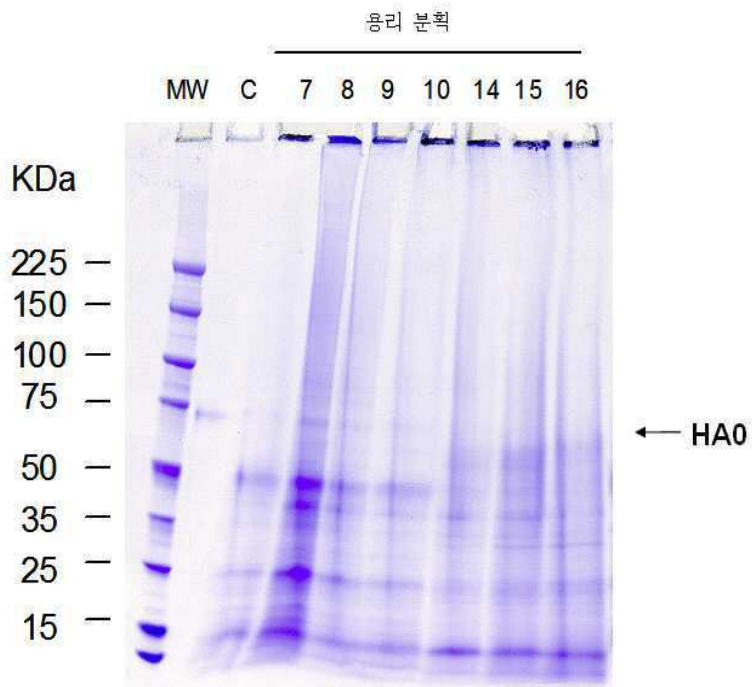
도면2b

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDGVKPLILRDCS  
VAGWLLGNPMDDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEEKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASS  
GVSSACPYLGSFNRNVWLIIKNSTYPTIKKSYNNNTNQEDLLVLWGIHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIG  
TSTLNQLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGN  
CNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKSNNRLVLATGLRNSPQRESRRKRGLFGAIAGFIEGGWQ  
GMVDGWYGYHHSNEQSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFFNNLERRIENLNKKM  
EDGFLDVWWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELNGCFEYHKCDNECMESIR  
NGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCNSGLSQCRICI

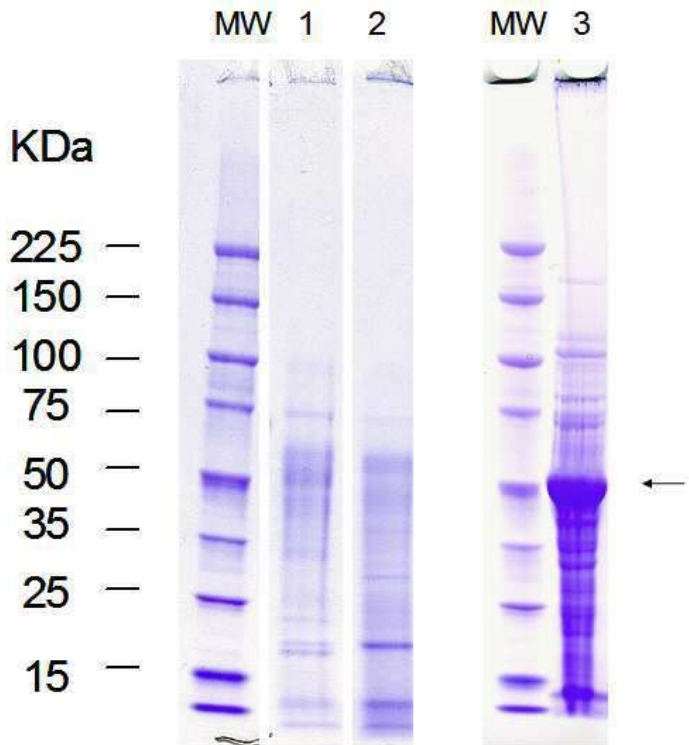
도면3a



도면3b



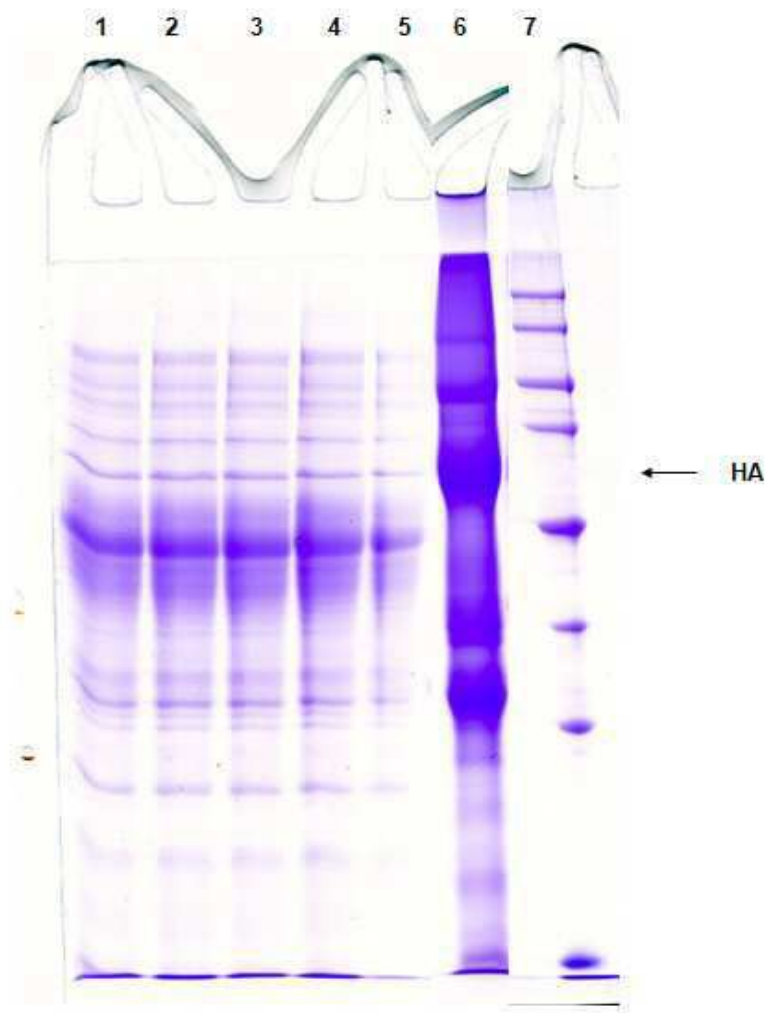
도면4



도면5

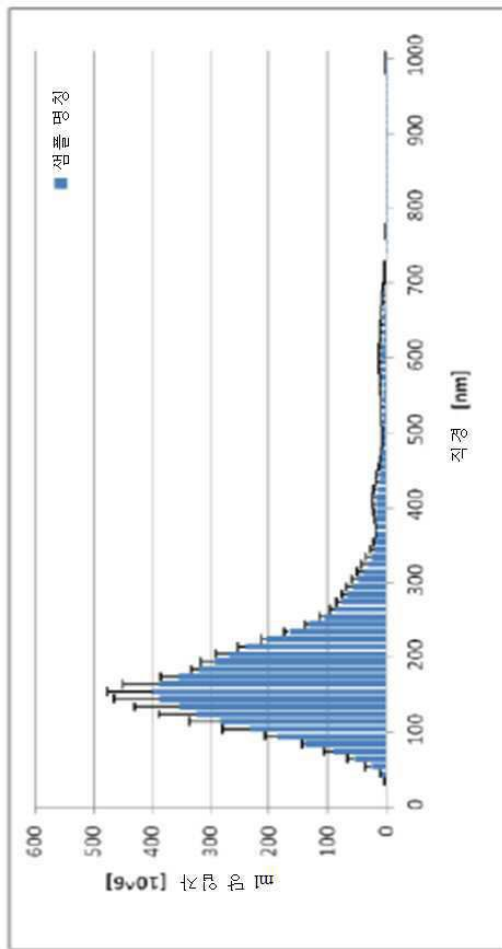
AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAAGTTAGC  
AAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAAATCATTATTAAACATTAG  
AGTAAAGAAATATGGATGATAAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTG  
AGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAA  
TAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATAT  
CATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCAT  
TAGAGAGATGTACCATTAGAGAAATTTTGGCAAGTCATTAAAAAGAAAGAAATAAATTATTTTTAAAT  
TAAAAGTTGAGTCATTTGATTAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTG  
TATTAGTAATTAGAAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA  
GTCAGTTAACTCATTATATTTTATATTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACCGGTATATTAATCCCTCCAAA  
AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGA  
TAACATCCAATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGC  
ACATCTACATTATCTAATACACATTTCTCCACACATCTGACCCACACAAAAACCAATCCACATCTTT  
ATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTCAAACACATACAAAAG  
GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTCTTGCAATA  
GTCAGTCTTGTAAAAGTGATCAGATTGTGACATTGGTTACCATGCAAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGAC  
ACAATCATGGAAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAGAGACACACAACGGGAA  
GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGG  
GAACCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAA  
CCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAATGAAACACCTATTGAGCAGAATA  
AACCATTTTGAGAAAAATCAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTT  
AGCTCAGCATGTCCATCGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC  
AGTACATACCCAAACATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGG  
AATTCACCATCCTAATGATGGCGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCAACACCTATATTTCCAT  
TGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAA  
GTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGA  
AATTTCTATTGCTCCAGAAATATGCATACAAAATTTGCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGA  
ATTGGAATATGGTAAGTCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT  
TCCACAACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAACAGATTAGTCCCTTG  
CAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGAGAGAGCAGAAAGAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTAT  
AGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG  
AGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCAACAAAT  
GGTCAACTCAATCATTTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAAGCCGTTGGAAGGGAATTTAATACTTAG  
AAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGCTGGACTTATAATGCC  
GAACCTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTTATGACTCAAAATGTTAAGAACCTCTAC  
GACAAAGTCCGATCAGCTTAGGGATAATGCAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA  
CAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGATATAAGAAACGGAACGTACAACATCCGCAGTATTGAGAAG  
AAGCAAGATTTAAAGAGAGAGAAATAAGTGGGGTAAATTTGGAATCAATAGGAACTTACCAAAATCT  
GTCAATTTATTCACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGAT  
GTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAAATTTGCATTTAAGAGCTTAAGTTAAAATGCTTCTTCGTCT  
CCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTAAATTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTGTTA  
TGAAATACTATTTGTATGAGATGAACCTGGTGAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAAATCAG  
AATGTTTCTCCATAAATACTAGACATGAAGACCTGCCGCGTACAATTGCTTATATTTGAACAACTA  
AAATTTGAACATCTTTTGGCACAACCTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATGGTCAAGTTCAATA  
GATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAACTCAACGTTATTAACACTCAATTT  
TATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

도면6

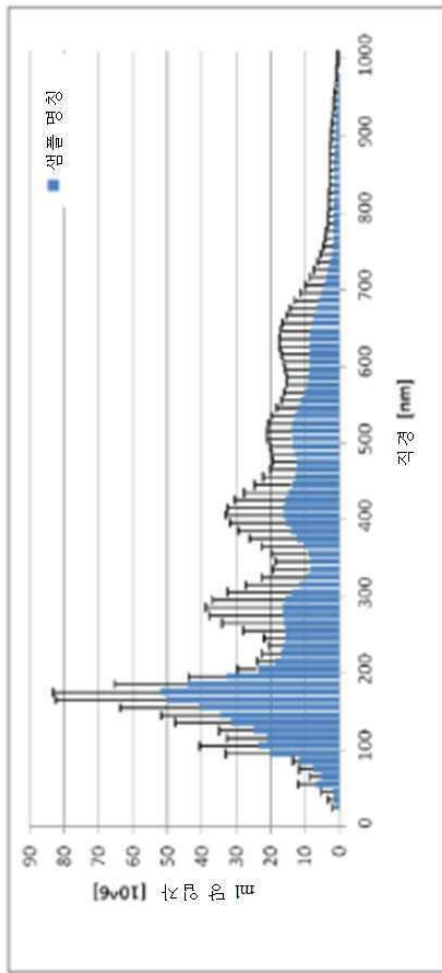




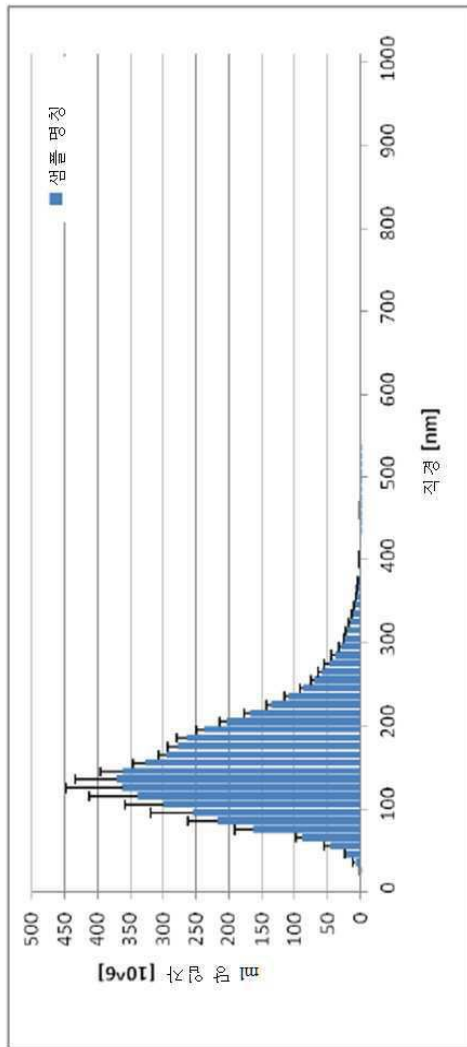
도면7a



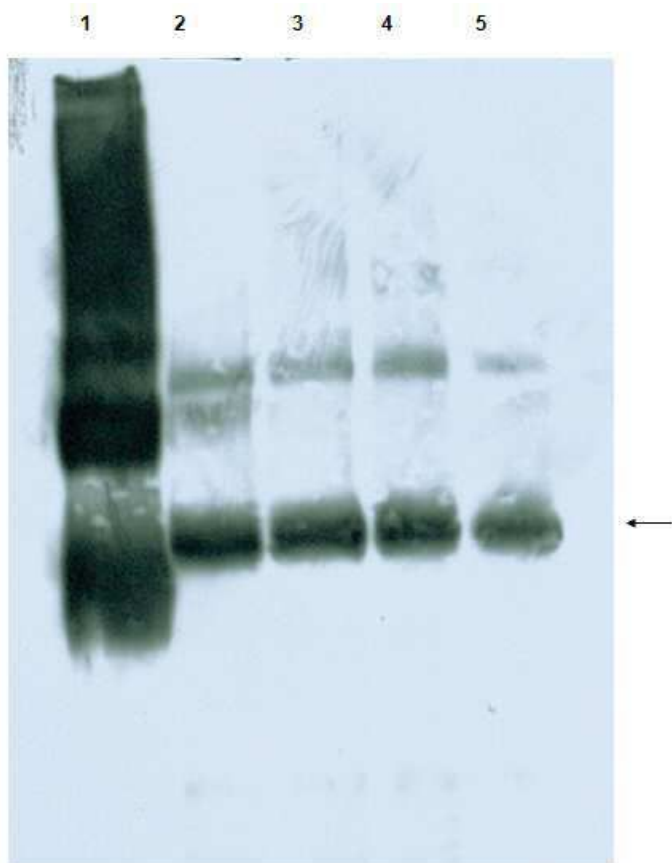
도면7b



도면7c



도면8



도면9

```

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACT
AATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAG
CTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCC
CAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAAATGACTTGCA
GGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
CCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCCG
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGG
CTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTT
CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCC
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAGACGTCGTTAAATGCTTCTTCGTCTCTATTT
ATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGT
TGTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAATGTAATTCATTTA
CATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATACTAACTAGACATGAAGAC
CTGCCGCGTACAATTGTCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTGCCA
CAACTTTATAAGTGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAA
TAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAAC
ACTAATTTTATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGA
ATTC
    
```

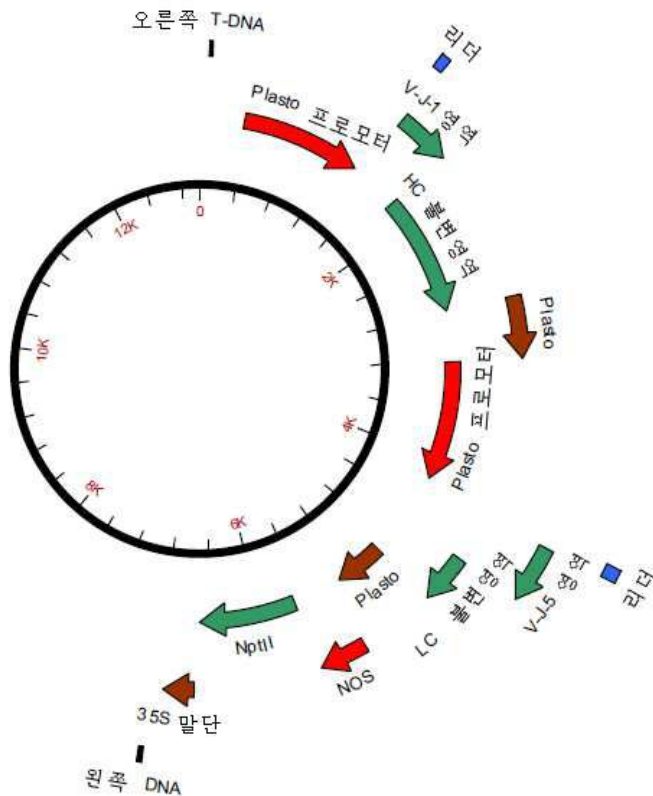
#590 (LC 단편 ; SEQ ID NO.15).

도면10

CACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAA  
TTAATCATCTTGAGAGAAAAATGGGTTGGAGCCTCATCTTGCTCTTCTTGTGCTGTTGCTACGC  
GTGTCCTGTCCAGGTACAACATGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG  
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCAGCTGGGTAAAACAGAC  
ACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCCTACAATC  
AGAAAGTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTC  
AGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGA  
CTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCACCAAGGGCC  
CATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC  
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG  
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG  
TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC  
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGC  
ACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGA  
TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG  
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA  
CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
AGTACAAGTGCAAGCTTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCC  
AAAGGGCAGCCTAGGGAAACCAAGTGTACACTCTTCCACCATCTAGGGATGAGCTTACTAAGAA  
CCAAGTTTCTCTTACTTGTCTTGTGAAGGGATTTTATCCATCTGACATCGCCGTGGAATGGGAAT  
CCAACGGACAACCCAGAGAACAATTACAAGACTACTCCACCAGTTCTTGATTCTGATGGATCCTTC  
TTTCTTTATTCCAAGCTTACTGTTGATAAGTCCAGATGGCAGCAAGGAAATGTGTTCTCTTGTTC  
TGTTATGCACGAAGCTCTTCAATCATTATATACTCAAAAGTCCCTTTCTCTTCTCCTGGAAAGT  
GAGACGTCGTTAAATGCTTCTCTGTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGT  
CTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATGAAATACTATTTGTATGAGATGAAGTGGTGT  
AATGTAATTCATTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTCCATAACTAAGTACATG  
AAGACCTGCCGCTACAATTGTCTTATATTTGAACAATAAAATTGAACATCTTTGCCACAAC  
TTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAAATATATGGTCAAGTTCAATAGATTAAATGGAATATCAG  
TTATCGAAATTCAATTAACAATCAACTTAACGTTATTAATACTAATTTATATCATCCCTTTGA  
TAAATGATAGTACACCAATTAGGAAGGAGAATTC

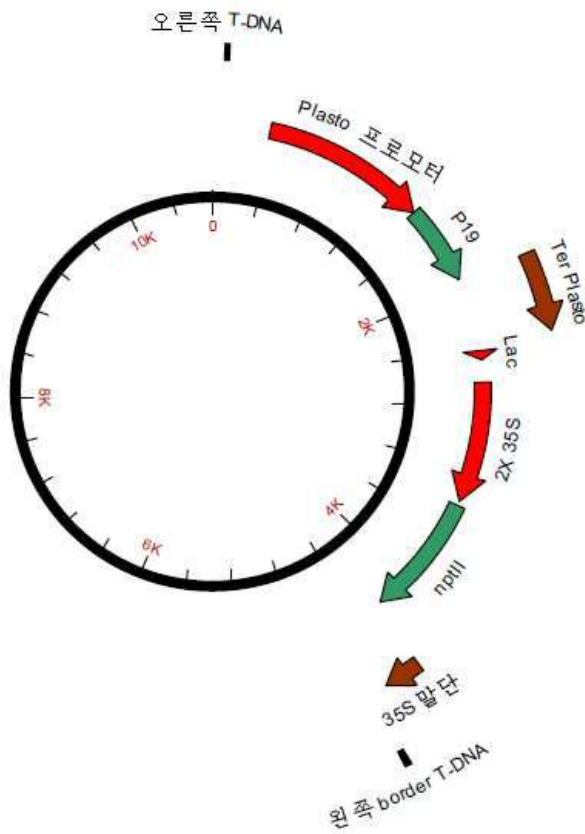
#592 (HC 단편 ; SEQ ID NO :16).

도면11a

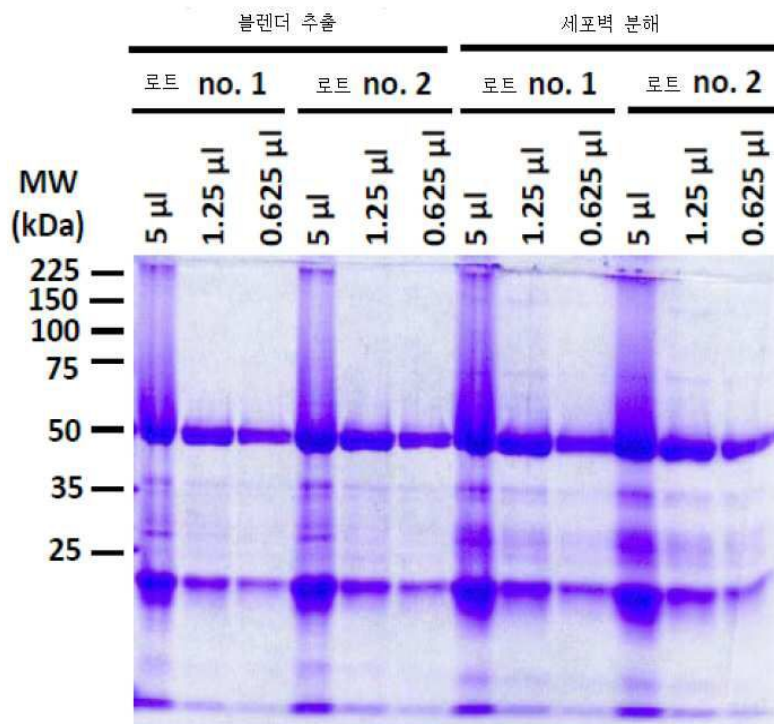




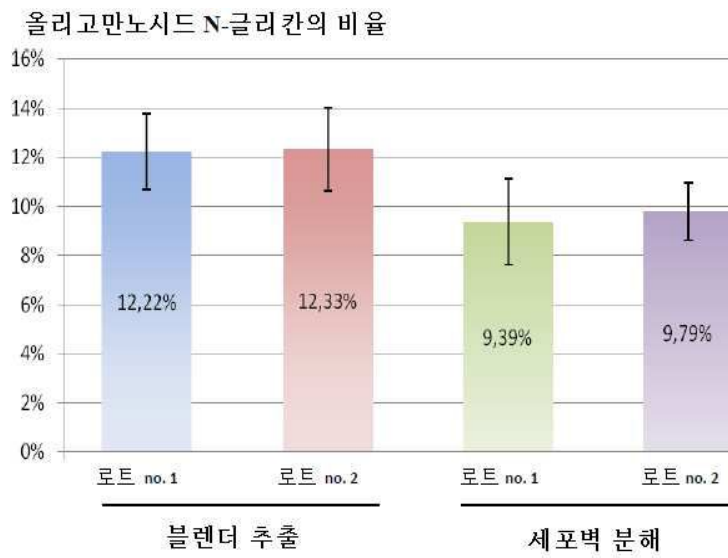
도면11b



도면12



도면13a



통계분석

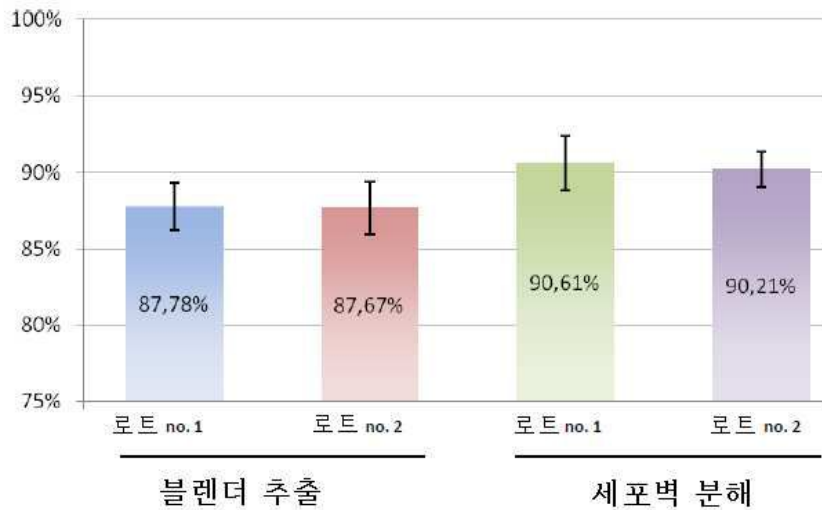
p-값	블렌더, 로트 no. 1	분해, 로트 no. 1	블렌더, 로트 no. 2
분해, 로트 no. 1	$3.3 \cdot 10^{-4}$ (***)		
블렌더, 로트 no. 2	1 (identical)	$1.9 \cdot 10^{-4}$ (***)	
분해, 로트 no. 2	$2.39 \cdot 10^{-3}$ (**)	1 (동일)	$1.41 \cdot 10^{-3}$ (**)

\*\* : 올리고만노시드 N-글리칸의 비율의 차이는 매우 유의하다(0.01 내지 0.1 의 p-값)

\*\*\* : 올리고만노시드 N-글리칸의 비율의 차이는 크게 유의하다(0 내지 0.01 의 p-값)

도면13b

복합체 N-글리칸의 비율



통계분석

p-값	블렌더, 로트 no. 1	분해, 로트 no. 1	블렌더, 로트 no. 2
분해, 로트 no. 1	$3.3 \cdot 10^{-4}$ (***)		
블렌더, 로트 no. 2	1 (동일)	$1.9 \cdot 10^{-4}$ (***)	
블렌더, 로트 no. 2	$2.39 \cdot 10^{-3}$ (**)	1 (동일)	$1.41 \cdot 10^{-3}$ (**)

\*\* : 복합체 N-글리칸의 비율의 차이는 매우 유의하다(0.01 내지 0.1의 p-값)

\*\*\* : 복합체 N-글리칸의 비율의 차이는 크게 유의하다(0 내지 0.01의 p-값)

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Medicago Inc.

VEZINA, Louis-Philippe

DARGIS, Michele

COUTURE, Manon

PAQUET, Dany

D'AOUST, Marc-Andre

<120> METHOD OF PREPARING PLANT-DERIVED PROTEINS

<130> V82625WO

<150> 61/244,786

<151> 2009-09-22

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3067

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized construct 685

<400> 1

ttaattaaga attcgagctc caccgcggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct	60
gtcactttat tgagaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc catcattgcg	120
ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggcccaaa gatggacccc	180
caccacagag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg	240
attgatgtga tatctccact gacgttaagg atgacgcaca atcccactat ctttcgcaag	300
acccttcctc tatataagga agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt	360
tttgataaaa gcgaacgtgg ggaaacccga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc	420
tctcttaaag caaacttctc tcttgtcttt ctgctgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga	480
tcgtgcttcg gcaccagtac aacgttttct ttactgaag cgaaatcaaa gatctctttg	540
tggacacgta gtgcggcgcc attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tcggtgtggt	600
cttgggaaaa gaaagcttgc tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat	660
tctgtctgact ttcggcgggt gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgacctg	720
tacttctttc ttcttcttct tgctgattgg ttctataaga aatctagtat ttcttttgaa	780
acagagtttt cccgtgggtt tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatatctg	840
cccaaatttg tcgggcccac ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt cagtcttgtt	900
aaaagtgatc agatttgcat tggttacat gcaaacaatt caacagagca ggttgacaca	960
atcatggaaa agaacgttac tgttacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac	1020
gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt taagagattg tagtgtagct	1080
ggatggctcc tcgggaacct aatgtgtgac gaattcatca atgtaccgga atggtcttac	1140
atagtggaga aggccaatcc aaccaatgac ctctgttacc cagggagttt caacgactat	1200
gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca aatcatcccc	1260
aaaagtcttt ggtccgatca tgaagcctca tcaggagtta gctcagcatg tccatacctg	1320
ggaagtcctt ccttttttag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacataccca	1380
acaataaaga aaagctacaa taataccaac caagaggatc ttttgggtact gtggggaatt	1440
caccatccta atgatcggcg agagcagaca aggttatatc aaaacccaac cacctatatt	1500
tccattggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aaatagctac tagatccaaa	1560
glaaacgggc aaagtgaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc taatgatgca	1620

atcaacttcg agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag	1680
aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa caccaagtgt	1740
caaactccaa tgggggcat aaactctagt atgccattcc acaacataca ccctctcacc	1800
atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac agggctcaga	1860
aatagccctc aaagagagag cagaagaaaa aagagaggac tatttgagc tatagcaggt	1920
tttatagagg gaggatggca gggaatggta gatggttgg atgggtacca ccatagcaat	1980
gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc	2040
accaataagg tcaactcaat cattgacaaa atgaacactc agtttgagc cgttgaagg	2100
gaatttaata acttagaaag gagaatagag aatttaaaca agaagatga agacgggttt	2160
ctagatgtct ggacttataa tgccgaactt ctggttctca tggaaaatga gagaactcta	2220
gactttcatg actcaaatgt taagaacctc tacgacaagg tccgactaca gcttagggat	2280
aatgcaaagg agctgggtaa cggttgtttc gagttctatc acaaatgtga taatgaatgt	2340
atggaaagta taagaaacgg aacgtacaac tatccgcagt attcagaaga agcaagatta	2400
aaaagagagg aaataagtg ggtaaaattg gaatcaatag gaacttacca aatactgtca	2460
atttattcaa cagtggcgag ttccttagca ctggcaatca tgatggctgg tctatcttta	2520
tggatgtgct ccaatggatc gttacaatgc agaatttgca tttaaaggcc tattttcttt	2580
agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgcat ttctatgttt ggtgagcgg tttctgtgct	2640
cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag ctctgttta gcaggtcgtc	2700
ccttcagcaa ggacacaaaa agattttaat ttatttaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg	2760
gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcggttcaa catttggtcaa taaagtttct	2820
taagattgaa tctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg	2880
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga	2940
ttagagtccc gcaattatc atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact	3000
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga ttctagagtc tcaagcttcg	3060
gcgcgcc	3067
<210> 2	
<211> 568	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized amino acid encoded by Seq Id No: 1	
<400> 2	



Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser  
1 5 10 15  
Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val  
20 25 30  
Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile  
35 40 45  
Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys  
50 55 60  
Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn  
65 70 75 80  
Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val  
85 90 95  
Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn  
100 105 110  
Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu  
115 120 125  
Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser  
130 135 140  
Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe  
145 150 155 160  
Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile  
165 170 175  
Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp  
180 185 190  
Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln  
195 200 205  
Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg  
210 215 220  
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly  
225 230 235 240  
Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn

245                      250                      255  
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile  
 260                      265                      270  
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly  
 275                      280                      285  
  
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser  
 290                      295                      300  
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser  
 325                      330                      335  
 Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile  
 340                      345                      350  
  
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr  
 355                      360                      365  
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys  
 370                      375                      380  
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe  
 405                      410                      415  
  
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp  
 420                      425                      430  
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met  
 435                      440                      445  
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu  
 450                      455                      460  
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly  
 465                      470                      475                      480  
  
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu  
 485                      490                      495

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala  
500 505 510  
Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly  
515 520 525  
Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala  
530 535 540

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly  
545 550 555 560  
Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
565

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized oligonucleotide pBinPlus.2613c

<400> 3

aggaagggaa gaaagcgaaa ggag 24

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized oligonucleotide Mut-ATG115.r

<400> 4

gtgccgaagc acgatctgac aacgttgaag atcgctcacg caagaaagac aagaga 56

<210> 5

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized oligonucleotide Mut-ATG161.c

<400> 5

gtgttcagat cgtgcttcgg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc ga 52

<210> 6

<211> 25

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide LC-C5-1.110r  
 <400> 6  
 tctcctggag tcacagacag ggtgg 25  
 <210> 7

<211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide ApaI-H5 (A-Indo).lc  
 <400> 7  
 tgtcggggccc atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaat 39  
 <210> 8  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide H5 (A-Indo)-StuI.1707r  
 <400> 8  
 aaataggcct ttaaattgcaa attctgcatt gtaacga 37  
 <210> 9  
 <211> 3111  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide construct 660

<400> 9  
 agaggtaccc cgggctggta tatttataatg ttgtcaaata actcaaaaac cataaaagtt 60  
 taagtttagca agtgtgtaca tttttacttg aacaaaaata ttcacctact actgttataa 120  
 atcattatta aacattagag taaagaaata tggatgataa gaacaagagt agtgatattt 180  
 tgacaacaat ttgtttgcaa catttgagaa aattttgttg ttctctcttt tcatttgtca 240  
 aaaacaatag agagagaaaa aggaagaggg agaataaaaa cataatgtga gtatgagaga 300  
 gaaagttgta caaaagttgt accaaaatag ttgtacaaat atcattgagg aatttgacaa 360  
 aagctacaca aataagggtt aattgctgta aataaataag gatgacgcat tagagagatg 420

taccattaga gaatTTTTGG caagtcatta aaaagaaaga ataaattatt tttaaaatta	480
aaagttgagt catttgatta aacatgtgat tatttaatga attgatgaaa gagttggatt	540
aaagttgtat tagtaattag aatttgggtgt caaatTTAAT ttgacatttg atcttttctt	600
atataattgcc ccatagagtc agttaactca tttttatatt tcatagatca aataagagaa	660
ataacggtat attaatccct ccaaaaaaaaa aaaacggtat atttactaaa aaatctaagc	720
cacgtaggag gataacagga tccccgtagg aggataacat ccaatccaac caatcacaac	780
aatcctgatg agataacceca ctttaagccc acgcatctgt ggcacatcta cattatctaa	840
atcacacatt ctccacaca tetgagccac acaaaaacca atccacatct ttatcaccca	900
ttctataaaa aatcacactt tgtgagtcta cactttgatt cccttcaaac acatacaaag	960
agaagagact aattaattaa ttaatcatct tgagagaaaa tggagaaaat agtgcttctt	1020
cttgcaatag tcagtcttgt taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaaacat	1080
tcaacagagc aggttgacac aatcatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac	1140
atactggaaa agacacacaa cgggaagctc tgcgatctag atggagtga gcctctaatt	1200
ttaagagatt gtagttagc tggatggctc ctcggaacc caatgtgtga cgaattcatc	1260
aatgtaccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac	1320
ccaggaggatt tcaacgacta tgaagaactg aaacacctat tgagcagaat aaaccatttt	1380
gagaaaaatc aaatcatccc caaaagtTct tggtcgac atgaagcctc atcaggagtt	1440
agctcagcat gtccatacct gggaagtccc tcctttttta gaaatgtggt atggcttacc	1500
aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaggat	1560
cttttggtag tgtggggaat tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaggctatat	1620
caaaacccaa ccacctatat ttccattggg acatcaacac taaaccagag attggtacca	1680
aaaatagcta ctagatccaa agtaaacggg caaagtggaa ggatggagtt ctcttgaca	1740
atTTTaaac ctaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa	1800
tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat	1860
ggtaactgca acaccaagtg tcaaaactca atgggggcga taaactctag tatgccattc	1920
cacaacatac accctctcac catcggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta	1980
gtccttgcaa cagggtcag aaatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga	2040
ctatttggag ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggt agatggttgg	2100
tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact	2160
caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact	2220
cagtttgagg ccgttgaag ggaatttaac aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac	2280



aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc 2340  
atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag 2400  
gtccgactac agcttaggga taatgcaaag gagctgggta acggttggtt cgagttctat 2460  
cacaaatgtg ataatgaatg tatggaaagt ataagaaacg gaacgtacaa ctatccgcag 2520

tattcagaag aagcaagatt aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata 2580  
ggaacttacc aaatactgtc aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc 2640  
atgatggctg gtctatcttt atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc 2700  
atttaagagc tctaagttaa aatgcttctt cgtctcctat ttataatatg gtttgattatt 2760  
gttaattttg ttctttaga agagcttaat taatcgttgt tgttatgaaa tactatttgt 2820  
atgagatgaa ctggtgtaat gtaattcatt tacataagtg gagtcagaat cagaatgttt 2880  
cctccataac taactagaca tgaagacctg ccgcgtacaa ttgtcttata ttgaacaac 2940

taaaattgaa catcttttgc cacaacttta taagtgggta atatagctca aatatatggt 3000  
caagttcaat agattaataa tggaaatata agttatcgaa attcattaac aatcaactta 3060  
acgttattaa ctactaattt tatatcatcc cctttgataa atgatagtac a 3111

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Medicago sativa

<400> 10

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Glu Glu

20 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthesized oligonucleotide Plasto-443c

<400> 11

gtattagtaa ttagaatttg gtgtc 25

<210> 12

<211> 34

<212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide supP19-plasto.r  
 <400> 12  
 ccttgatatag ctcggtccat tttctctcaa gatg 34  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide supP19-1c  
 <400> 13  
 atggaacgag ctatacaagg 20  
 <210> 14  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Synthesized oligonucleotide SupP19-SacI.r  
 <400> 14  
 agtcgagctc ttactcgctt tctttttcga ag 32  
 <210> 15  
 <211> 1214  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Synthesized LC fragment of C2B8  
 <400> 15  
 cactttgtga gtctacactt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta 60  
 attaattaat catcttgaga gaaaatggat tttcaggtgc agattatcag cttcctgcta 120  
 atcagtgtt cagtcataat gtccagagga caaattgtt tctcccagtc tccagcaatc 180  
 ctgtctgcat ctccaggga gaaggtcaca atgacttgca gggccagctc aagtgttaagt 240  
 tacatccact ggttcacga gaagccagga tcttccccca aaccttgat ttatgccaca 300  
 tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc ttcagtggca gtgggtctgg gactttctac 360  
 tctctcaca tcagcagagt ggaggctgaa gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg 420  
 actagtaacc caccacggt cggagggggg accaagctgg aatcaaacg tacggtggct 480

gcaccatctg tcttcacatt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct 540

gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagt gaaggtggat 600

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc 660

acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc 720

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 780

ggagagtgtt gagacgtcgt taaaatgctt cttcgtctcc tatttataat atggtttgtt 840

attgttaatt ttgttcttgt agaagagctt aattaatcgt tgttgttatg aaatactatt 900

tgtatgagat gaactgggtg aatgtaattc atttacataa gtggagtcag aatcagaatg 960

tttctccat aactaactag acatgaagac ctgccgcta caattgtctt atattgaac 1020

aactaaaatt gaacatcttt tgccacaact ttataagtgg ttaatatagc tcaaataat 1080

ggtcaagttc aatagattaa taatggaaat atcagttatc gaaattcatt aacaatcaac 1140

ttaacgttat taactactaa ttttatatca tccccttga taaatgatag tacaccaatt 1200

aggaaggaga attc 1214

<210> 16

<211> 1919

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized HC fragment of C2B8

<400> 16

cactttgtga gtctacatt tgattccctt caaacacata caaagagaag agactaatta 60

attaattaat catcttgaga gaaaatgggt tggagcctca tcttgcctt ccttgcct 120

gttgctacgc gtgtcctgtc ccaggtacaa ctgcagcagc ctggggctga gctggtgaag 180

cctggggcct cagtgaagat gtcctgcaag gcttctggct acacatttac cagttacaat 240

atgcactggg taaaacagac acctggctgg ggcttgaat ggattggagc tatttatccc 300

ggaaatgggt atacttcta caatcagaag ttcaaaggca aggccacatt gactgcagac 360

aaatcctcca gcacagccta catgcagctc agcagcctga catctgagga ctctgcggtc 420

tattactgtg caagatcgac ttactacggc ggtgactggt acttcaatgt ctggggcgca 480

gggaccacgg tcaccgtctc tgcagctagc accaagggcc catcggctctt cccctggca 540

ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 600

ttcccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc 660

ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc 720

tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc	780
aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc	840
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac	900
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccacgaa	960
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	1020
aagcccgagg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg	1080
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaaca agccctccca	1140
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ctagggaacc acaagtgtac	1200
actctccac catctaggga tgagcttact aagaaccaag tttctcttac ttgtcttg	1260
aagggaatct atccatctga catgccgtg gaatgggaat ccaacggaca accagagaac	1320
aattacaaga ctactccacc agttcttgat tctgatggat ccttctttct ttattccaag	1380
cttactgttg ataagtcag atggcagcaa ggaaatgtgt tctctgttc tgttatgcac	1440
gaagctcttc ataataatta tactcaaaag tccctttctc tttctcctgg aaagtgagac	1500
gtcgttaaaa tgcttcttcg tctctatctt ataatatggt ttgttattgt taattttgtt	1560
cttgtagaag agcttaatta atcgttgttg ttatgaaata ctatttgtat gagatgaact	1620
ggtgtaatgt aattcattta cataagtga gtcagaatca gaatgtttcc tccataacta	1680
actagacatg aagacctgcc gcgtacaatt gtcttatatt tgaacaacta aaattgaaca	1740
tcttttgcca caactttata agtggttaat atagctcaaa tataatgtca agttcaatag	1800
attaataatg gaaatatcag ttatcgaaat tcattaacaa tcaacttaac gttattaact	1860
actaatttta tatcatcccc ttgataaat gatagtacac caattaggaa ggagaattc	1919