

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 12월 4일 (04.12.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/193176 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 9/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/004803
- (22) 국제출원일: 2014년 5월 29일 (29.05.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0061895 2013년 5월 30일 (30.05.2013) KR
10-2013-0148287 2013년 12월 2일 (02.12.2013) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이명규 (LEE, Myung Kyu); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정봉현 (CHUNG, Bong Hyun); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 문정희 (MOON, Jeong Hee); 305-806 대전시

유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이가비 (LEE, Ga Bi); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

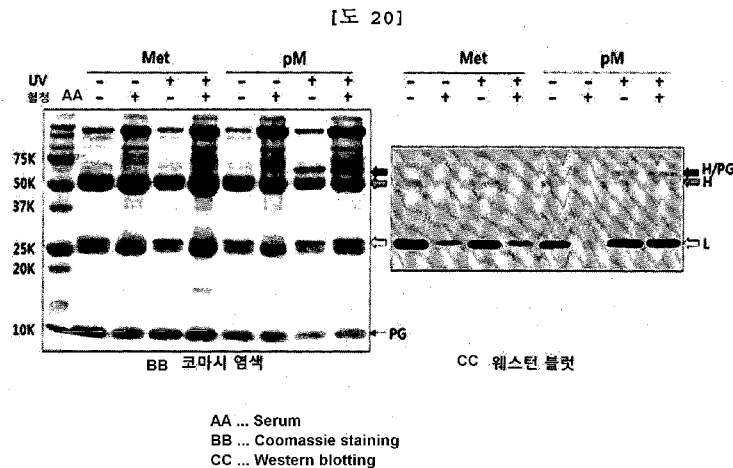
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,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

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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHIONYL TRNA SYNTHETASE FOR BIOSYNTHESIS OF PHOTOMETHIONINE-LABELED PROTEIN AND METHOD FOR PREPARING PHOTOACTIVE PROTEIN G VARIANT USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 광활성 메티오닌 표지단백질 생합성을 위한 메티오닐 tRNA 합성효소 및 이를 이용한 광활성 단백질 G 변이체 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a methionyl tRNA synthetase (MRS) for the biosynthesis of a photomethionine-labeled protein and a method for preparing a photoactive protein G variant using same and, more particularly, to an MRS variant in which alanine (SEQ ID NO: 12) is substituted by glycine, leucine (SEQ ID NO: 13) by serine, tyrosine (SEQ ID NO: 260) by phenylalanine, isoleucine (SEQ ID NO: 297) by valine, and histidine (SEQ ID NO: 301) by leucine from the N-terminus of the amino acid sequence of a wild-type Escherichia coli methionyl tRNA synthetase. The MRS variant effectively confirms the biosynthesis of a photomethionine-labeled target protein and thus can be utilized for the biosynthesis of a photomethionine-labeled target protein. In addition, a photomethionine-introduced protein G variant, in which a plasmid encoding the MRS variant (MRS5m) and a PG-C3 plasmid, in which, in the third antibody-binding domain of protein G, SEQ ID NOs: 32, 35, and 40 are substituted by a methionine (Met) residue and SEQ ID NO: 37 by an arginine (Arg) residue, are introduced into Escherichia coli and then refined, has a specific covalent bond with an antibody when subject to UV irradiation, and thus the photomethionine-introduced protein G variant using the MRS variant can be utilized for producing a highly sensitive biochip, biosensor, or cell-capturing chip.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/193176 A1



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

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 광활성 메티오닌 표지단백질 생합성을 위한 메티오닐 tRNA 합성효소 및 이를 이용한 광활성 단백질 G 변이체 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 야생형 대장균 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 아미노산 서열 N-말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌이 글리신으로, 13 번째 위치의 류신이 세린으로, 260 번째 위치의 티로신이 페닐알라닌으로, 297 번째 위치의 이소류신이 발린으로 및 301 번째 위치의 히스티딘이 류신으로 치환된 MRS 변이체는 효과적으로 pM 이 표지된 표적 단백질을 생합성함을 확인함으로써, 상기 MRS 변이체는 pM 이 표지된 표적 단백질의 생합성에 유용하게 이용할 수 있다. 또한, 상기 MRS 변이체 MRS5m 을 코딩하는 플라스미드 및 단백질 G 의 세 번째 항체결합 부위(PG-C3)의 32, 35 및 40 위치를 메티오닌(Met) 잔기로, 37 번 위치를 아르기닌(Arg) 잔기로 치환한 PG-C3 플라스미드를 대장균 내로 도입한 후 정제한 pM 도입 단백질 G 변이체는 UV 를 조사하면 항체와 특이적인 공유 결합을 형성하므로, 상기 MRS 변이체를 이용하여 pM 도입된 단백질 G 변이체는 고감도 바이오칩(biochip), 바이오센서(biosensor) 및 세포 포획용 칩 제조에 유용하게 이용할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

광활성 메티오닌 표지단백질 생합성을 위한 메티오닐 tRNA 합성효소 및 이를 이용한 광활성 단백질 G 변이체 제조방법

【기술분야】

본 발명은 생체 내에서 표적 단백질에 광메티오닌(photomethionine, pM)을 도입하기 위한 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS) 및 이를 이용한 광활성 메티오닌 모사체인 pM 도입 단백질 G 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

【배경기술】

생체 고분자 간의 광활성에 의한 공유결합 형성은 많은 분자 간 결합에 중요한 정보를 제공하여 구조와 기능 연구에 중요한 역할을 하게 된다. 이 방법은 단백질-단백질 결합(Suchanek et. al., Nat Methods, 2, 261-7, 2005; Chou et. al., Chem Sci, 2, 480-83), 단백질-지질 결합(Gubbens et. al., Chem Biol, 16, 3-14, 2009), 단백질-핵산 결합(Pingoud et. al., Mol Biosyst, 1, 135-41, 2005)등에 중요한 정보를 제공하는 도구로 사용되고 있다.

단백질에 광활성기를 도입하기 위해, N-하이드록시숙시니미드(N-hydroxysuccinimide) 기에 결합시킨 디아지린(diazirine), 벤조페논(benzophenone) 및 아지드(azide)기와 같은 광활성기를 단백질의 라이신(lysine) 잔기의 아민기에 결합할 수 있으나, 이 경우 친수성 아미노산이 소수성으로 변화되어 오히려 선택적으로 분자와 단백질 간의 결합을 방해하고, 비특이적인 결합을 유발할 수 있다. 이와 같은 단점을 보완하기 위해, Jung은 단백질의 특정위치에 시스테인(cysteine) 잔기를 도입하고, 광활성기와 말레이미드(maleimide) 기를 결합시킨 물질을 시스테인을 도입하여 단백질에 광활성기를 도입하였다(Jung et. al., Anal Chem, 81, 936-42, 2009).

생체 내 단백질 생합성 단계에서 비자연계 아미노산을 단백질에 도입하려는

연구들도 시행되고 있다(Davis and Chin, Nat Reviews Mol Cell Biol, 13, 168-182, 2012). 미국 Scripps 연구소의 Schulz 박사팀은 자연계에서는 호박 종결 코돈(amber stop codon)인 TAG를 인지하는 아미노산 tRNA_{CUA} 합성효소 및 tRNA_{CUA} 쌍을 활용하여 특정 아미노산 모사체를 단백질의 특정 위치에 도입하는 연구를
 5 수행하여, 성공적으로 다양한 아미노산 모사체를 단백질 생합성 단계에서 도입하였다(Xie and Schulz, Nat Reviews Mol Cell Biol, 7, 775-82, 2006). 미국 CALTECH의 Tirrell 교수팀은 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 변이체를 제작하여 비자연계 아미노산의 도입을 연구하였다. 특히, MRS 중 메티오닌의 결합부위로 알려진(Crepin et. al., J Mol Biol, 332, 59-72, 2003)
 10 Leu13, Tyr260 및 His301 위치에 변이를 유도하여, 아지도노르류신(azidonorleucine)을 대장균의 디하이드로포레이트 환원효소(dihydrofolate reductase)의 메티오닌 잔기에 성공적으로 도입하였다(Tanrikulu et. al., Proc Nat Acad Sci USA, 106, 15285-90, 2009).

생체 내 단백질 생합성 단계에서 광활성을 가지는 비자연계 아미노산을
 15 단백질에 도입하려는 연구들도 시행되고 있다. Tippmann 등은 아미노산 tRNA_{CUA} 합성효소/tRNA_{CUA} 시스템을 이용하여 4'-[3-(트리플루오로메틸)-3H-디아진-3-일]-1-페닐알라닌(4'-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazin-3-yl]-l-phenylalanine, TfmdPhe)을 대장균 내에서 Z 도메인 단백질에 성공적으로 도입하였다(Tippmann et. al., ChemBioChem, 8, 2210-14, 2007). 또한, 피롤리실(pyrrolysyl, Pyl) tRNA_{CUA}
 20 합성효소/PyltRNA_{CUA} 시스템을 사용하여, 대장균 및 동물세포에서 디아지린 기를 도입한 라이신을 표적 단백질에 성공적으로 도입하였으며, 광활성에 의한 단백질 간의 공유결합을 유도할 수 있음을 확인하였다(Chou et. al., Chem Sci, 2, 480-83). 그러나 상기 잔기들은 크거나(bulky) 긴 탄소 사슬을 지니고 있어, 표적물질과 정교하게 공유결합을 이루는 데에 단점을 가진다. 이와 같은
 25 문제점들은 류신 또는 메티오닌과 매우 유사한 광류신(photoleucine, pL; L-2-amino-4,4-azi-pentanoic acid) 또는 광메티오닌(photomethionine, pM; L-2-amino-5,5-azi-hexanoic acid)을 이용하여 해결이 가능하다. Suchanek 등(Nat Methods, 2, 261-7, 2005)은 동물세포 배양시 메티오닌 또는 류신이 없는 배지에 아미노산 영양원으로서 pM 또는 pL의 광활성 아미노산 모사체들을 첨가하여 단백질을 생합성

한 후, 단백질에 표지된 광활성 아미노산 모사체를 단백질 간의 결합 분석에 활용하였다. 그러나 본 발명자들이 메티오닌 종속영양(methionine auxotroph) 대장균인 E. coli B834에서 메티오닌이 없는 최소 배지에 pM을 첨가하여 단백질을 발현한 결과 단백질 발현이 매우 낮게 나타났다.

5

항체는 항원에 매우 특이적으로 결합하기 때문에 질병의 진단 및 치료에 관련된 의학적 연구와 생물학적인 물질을 분석하는데 광범위하게 사용되어왔다 (Curr. Opin. Biotechnol. 12 (2001) 65-69, Curr. Opin. Chem. Biol. 5(2001) 40-45). 최근에는 면역학적 측정법의 일환으로 항체를 고체지지물질에 고정화하고

10 전류, 저항, 질량의 변화 및 광학적인 특징 등을 측정하는 면역센서가 개발되었다 (affinity biosensors. vol. 7: Techniques and protocols). 그 중 광학적인 특징을 이용한 표면 플라즈몬 공명에 기초를 둔 면역센서가 상업화되었는데, 표면 플라즈몬 공명에 기초를 둔 바이오센서는 정성적인 정보(두 분자들이 특이적으로

15 결합을 하는지)와 정량적인 정보(반응 속도(Kinetics)와 평형상수(equilibrium constants))를 제공할 뿐만 아니라 표지 없이 실시간으로 감지할 수 있어, 항원과 항체 결합을 측정하는데 특히 유용하다(J. Mol. Recognit. 1999, 12, 390-408).

면역센서에서는 고체지지물질에 항체를 선택적이고 안정적으로 고정화시키는 것이 매우 중요하다. 항체를 고정화하는 기술에는, 크게 화학적

20 고정화방법과 물리적인 고정화방법의 두 가지가 있다. 물리적인 방법(Trends Anal. Chem. 2000 19, 530-540)은 재현성이 적고 단백질을 변성시키기 때문에 거의 사용되지 않고 있으며 화학적인 방법(Langumur, 1997, 13, 6485-6490)이 단백질을 공유결합으로 잘 결합시켜 재현성이 좋고 적용범위가 넓어 많이 사용되고 있다. 그러나 화학적인 방법으로 항체를 고정화시킬 때, 항체가 비대칭 거대분자이기

25 때문에 항체가 방향성을 잃거나 항원을 결합하는 활성을 잃게 되는 경우가 있다(Analyst, 1996, 121(3): 29R-32R).

항체의 항원결합능력을 더 좋게 하기 위해 항체를 고체지지물질에 결합시키기 전에 지지체를 사용하는 경우가 있으며, 이 지지체로 단백질 G를 사용하는 기술이 공지되어 있다.

단백질 G(Protein G)는 대부분의 포유동물 면역글로블린 G(IgG) Fc 부위와 강한 결합을 하는 단백질로서, 항체칩 제조시 항체의 배향성을 높인 고감도 칩 제작에 매우 유용하다. 또한, 단백질 G를 나노입자 등에 결합시키고 항체를 결합시켜, 표적지향적 전달체 제조에 활용 가능하다. 그러나, 단백질 G와 항체의 결합은 가역적이기 때문에 혈액 시료를 사용하는 경우 혈액 내 항체로 대체될 수 있어 (Saleemuddin, Adv Biochem Eng Biotechnol, 64, 203-26, 1999), 이들 간에 공유 결합 형성이 중요하다. 이들 분자 간의 공유 결합은 화학적으로 유도할 수 있으나, 이들 분자들에 비특이적인 수식을 유발시키는 단점이 있다.

이에, 본 발명자들은 생합성된 단백질 내에 광메티오닌(photomethionine, pM)의 도입을 증진하고 이를 통해 항체-특이성이 향상된 단백질 G 변이체를 개발하기 위해 노력한 결과, 대장균 내에서 pM이 도입된 표적 단백질의 발현을 증진시킬 수 있는 대장균 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 변이체를 성공적으로 제작하였다. 또한, 상기 MRS 변이체인 MRS5m을 코딩하는 플라스미드 및 단백질 G의 세 번째 항체결합 부위(immunoglobulin G binding region C3, PG-C3)의 32, 35 및 40 번째 위치를 Met 잔기로, 37 번째 위치를 Arg 잔기로 치환한 PG-C3 플라스미드를 대장균 내로 도입한 후 정제하여 광활성 모사체 도입 단백질 G 변이체를 획득하고, 상기 단백질 G 변이체 및 항체에 UV를 조사하여 특이적인 공유 결합을 형성하는 것을 확인함으로써, 상기 광활성 메티오닌 모사체 도입 단백질 G 변이체를 고감도 바이오칩(biochip), 바이오센서(biosensor) 및 세포 포획용 칩 제조에 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 생체 내에서 표적 단백질에 광메티오닌(photomethionine, pM)을 도입하기 위한 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 변

이체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 단백질 G(protein G)의 첫 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C1, PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C2, PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C3, PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체, 상기 단백질 G 변이체에 pM을 도입한 광활성을 갖는 단백질 G 변이체 및 이의 제조 방법을 제공하기 위한 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 야생형 대장균 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌(Ala)이 글리신(glycine)으로, 13 번째 위치의 류신(leucine)이 세린(serine)으로, 260 번째 위치의 티로신(tyrosine)이 페닐알라닌(phenylalanine)으로, 297 번째 위치의 이소류신(isoleucine)이 발린(valine)으로 또는 301 번째 위치의 히스티딘(histidine)이 류신으로 치환된 아미노산 서열로 구성된, 표적 단백질에 광메티오닌(photomethionine, pM) 도입을 위한 MRS 변이체 및 이의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 MRS 변이체를 포함하는 표적 단백질에 대한 pM 도입용 시약 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 표적 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는,

표적 단백질로의 pM의 도입 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 단백질 G(protein G)의 첫 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C1, PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C2, PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C3, PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체 및 이의 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된, 광활성을 갖는 광메티오닌(photomethionine, pM) 도입 단백질 G 변이체를 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 상기 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 각각 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 단백질 G 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, pM 도입 단백질 G 변이체의 제조 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체, 및 항체 또는 이의 단편이 결합된 융합 단백질을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체에 결합된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 바이오 칩 및 바이오 센서를 제공한다.

5 아울러, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체에 결합된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항체 표지 정맥주사용 나노입자 전달체를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 야생형 대장균 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase,
10 MRS) 변이체는 야생형 MRS보다 효과적으로 광메티오닌(photomethionine, pM)이 도입된 표적 단백질을 생합성 할 수 있는 변이체이므로, 본 발명의 MRS 변이체를 통해 생합성된 pM 표지 단백질은 향후 특정 단백질과 특이적으로 결합하는 다른 고분자들을 분석하는데 중요한 도구로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 MRS 변이체를 이용하여 pM이 도입된 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항
15 체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 혈액 시료 분석용 항체칩, 고감도 바이오칩(biochip), 바이오센서(biosensor) 및 세포 포획용 칩 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

20 도 1은 광메티오닌(photomethionine, pM) 표지 단백질을 클로닝하기 위한 pET-28at 벡터의 제조를 모식한 도이다. 6xH은 히스티딘(Histidine) 태그를 나타내며, tc는 트롬빈 절단 부위(Trombin cleavage site)를 나타낸다.

도 2는 GFP/FIH 접합 단백질을 발현하기 위한 pET-GFP/FIH 플라스미드의 제조를 모식한 도이다.

25 도 3은 카복시 말단이 일부 절단된 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)(MRS 1-548)를 pBAD/Myc-HisA 벡터에 클로닝한 pBAD-MRSwt 플라스미드의 제조를 모식한 도이다.

도 4는 야생형 MRS를 통한 MRS 변이체의 제조를 모식한 도이다. 검은색

역삼각형은 기존 메티오닌 잔기의 위치로 알려진 13, 260 및 301 부위의 변이를 나타내며, 회색 역삼각형은 본 발명에서 대상으로 하는 12 및 297 부위의 변이를 나타낸다. 검정색 삼각형은 정지 코돈(stop codon)을 나타낸다. 각 위치에 해당하는 야생형의 아미노산은 아래에 표기하였다.

5 도 5는 MRS 변이체(MRS5pm)에 의한 pM 표지 6xH-EGFP의 발현의 증가를 나타낸다. Ara는 0.02 % L-아라비노오즈(L-arabinose)를, IPTG는 1 mM의 IPTG를 나타내며, M9a는 M9BV + CMS-MET를 나타낸다. X는 메티오닌 영양원을 포함하지 않은 배지에서 대장균을 배양한 경우를 나타내며, M은 메티오닌을 포함한 배지에서 대장균을 배양한 경우를 나타내고, pM은 pM을 메티오닌 영양원으로 포함한
10 배지에서 대장균을 배양한 경우를 나타낸다. 발현된 6xH-EGFP 단백질은 적색 화살표로 표시하였다.

도 6은 야생형 MRS 또는 MRS5pm 변이체 및 메티오닌(Met) 또는 pM의 결합 구조를 예상한 도이다. MRSwt-pM의 적색 별은 야생형 MRS 및 pM이 결합하기 위해 pM이 야생형 MRS의 결합부위에 접근할 때 분자적인 충돌이 일어나, 결합이
15 용이하지 않음을 보인다.

도 7은 MRS 변이체(MRS5pm)에 의한 pM 표지 6xH-FIH의 발현의 증가를 나타낸다. Ara는 0.02 % L-아라비노오즈(L-arabinose)를, IPTG는 1 mM의 IPTG를 나타내며, M9a는 M9BV + CMS-MET를 나타낸다. M은 메티오닌을 포함한 배지에서 대장균을 배양한 경우를 나타내고, pM은 pM을 메티오닌 영양원으로 포함한
20 배지에서 대장균을 배양한 경우를 나타낸다. 발현된 6xH-EGFP 단백질은 적색 화살표로 표시하였다.

도 8은 pM 표지 6xH-EGFP의 정제를 나타낸다. 1은 배양한 대장균을 초음파 파쇄하고 원심분리하여 수득한 상등액을 나타내며, 2는 크로마토그래피에 결합하지 않고 통과(flow through)한 정제되지 않은 용출액을 나타내고, 3은 30 mM
25 히스티딘(histidine)으로 세척한 용출액을 나타내며, 4 및 5는 150mM 이미다졸(imidazol)로 용출되어 수득한 정제된 6xH-EGFP를 나타낸다.

도 9는 FIH 이량체의 구조를 나타내는 도이다. 검은색 원은 카복시 말단에 이량체 형성에 관여하는 부분을 나타내며, 초록색 원 및 적색 별은 이량체 형성 부분에 존재하는 3 개의 메티오닌 잔기를 나타내고, 초록색 원은 이 중 매우

근접하게 존재하는 2 개의 메티오닌 잔기를 나타낸다.

도 10은 365 nm의 UV 조사 유무에 의한 FIH의 이량체화를 확인한 도이다. A는 코마시에(coomassie)로 염색한 SDS-PAGE를 나타내며, B는 항-6xH 항체에 대한 웨스턴블롯(western blot)을 나타낸다.

5 도 11은 제작한 pET-PG 및 pET-2xPG 플라스미드 구조를 모식화한 도이다.

도 12는 제작한 pET-2xPG 변이체 플라스미드 구조를 모식화한 도이다:

●: 변이 후 발현되는 아미노산 및 위치들 표시;

▲: 종료 코돈 표시; 및

★: 도입된 시스테인(cysteine) 위치 표시.

10 도 13은 제작한 pET-PG 변이체 플라스미드 구조를 모식화한 도이다:

●: 변이 후 발현되는 아미노산 및 위치들 표시;

▲: 종료 코돈 표시; 및

★: 도입된 시스테인 위치 표시.

도 14는 정상 MRS(MRSwt) 또는 MRS5m 도입에 의한 pM 표지 단백질 G의
15 발현량을 나타낸 도이다:

1: MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현, LB, 아라비노오스(arabinose) MRSwt 유도(induction) 전;

2: MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현, MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현. LB, 아라비노오스 MRSwt 유도 후;

20 3: MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV+1/2 CSM-Met 결핍(starvation);

4: MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ Met 포함된 CSM-Met;

5: MRSwt 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ pM 포함된 CSM-Met;

25 6: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV+1/2 CSM-Met 결핍;

7: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ Met 포함된 CSM-Met;

8: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ pM 포함된 CSM-Met;

9: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ 0 mg/ml pM 포함된 CSM-Met;

10: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ 0.05 mg/ml pM 포함된 CSM-Met;

5 11: MRS5m 및 6H-2xPG2m 공동 발현, M9BV로 용해한 IPTG 유도+ 0.1 mg/ml pM 포함된 CSM-Met;.

도 15는 6H-2xPG2m의 정제 양상을 나타낸 도이다:

1 및 6: 초음파 분쇄(sonication) 후 침점물(pricipitate);

2 및 7: 초음파 분쇄 후 상층액(supernatant);

10 3 및 8: Ni-NTA 아가로오스(agarose)에 결합하지 않는 분획(fraction);

4 및 9: 10 mM 이미다졸(imidazole) 용출; 및

5 및 10: 150 mM 이미다졸 용출.

도 16은 6H-2xPG3m 정제 양상을 나타낸 도이다:

1 및 5: 초음파 분쇄 후 상층액(supernatant);

15 2 및 6: Ni-NTA 아가로오스(agarose)에 결합하지 않는 분획(fraction);

3 및 7: 60 mM 이미다졸(imidazole) 용출; 및

4 및 8: 150 mM 이미다졸 용출.

도 17은 자외선 특이 pM 표지 6H-2xPG4m와 IgG 또는 Fc간의 광활성 공유결합 형성을 나타낸 도이다.

20 도 18은 자외선 특이 pM 표지 6H-PG4m과 IgG 또는 Fc 간의 광활성 공유 결합 형성을 나타낸 도이다.

도 19는 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2ME) 존재 유무에 따른 자외선 특이 pM 표지 6H-PG4m 또는 6H-PG4m과 IgG 또는 Fc 간의 광활성 공유 결합 양상을 나타낸 도이다.

25 도 20은 IgG와 단백질 G의 공유결합에 의한 혈액내 항체의 치환 억제능을 나타낸 도이다.

도 21은 IgG와 단백질 G의 공유결합체가 혈액내 항원 포획시 유용성을 나타낸 도이다.

도 22는 IgG와 단백질 G의 공유결합체가 혈액내 항원의 검출 효능을 나타낸

도이다. 기존에 많이 사용되는 streptavidin(SA)/biotinylated IgG(bIgG)시스템을 대조군으로 사용함.

rEGFR: 재조합 epidermal growth factor 수용체 ectodomain.

IgG1: 항EGFR 인간항체 (Erbixux)

5 fIgG2: FITC 표지항 EGFR rat 항체

A: 6H-2xPG4m 및

B: 6H-PG4m

도 23은 IgG와 단백질 G의 공유결합체가 혈액내 특정 세포 포획시 유용성을 나타낸 도이다.

10 도 24은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)의 3차 구조를 나타낸 도이다:

녹색: PG-C1과 비교하여 약간의 기능적 차이를 갖는 아미노산 변이;

빨간색: 기능적 차이가 비교적 큰 아미노산 변이;

파란색: 본 발명에서 치환한 아미노산들(Q32, N35, N37 및 D40)로 3차

15 구조에서 보전이 매우 잘 되어 있음;

노란색-분홍색: PG-C2;

하늘색-흰색: PG-C3, 치환부위는 분홍색 및 흰색으로 표시; 및

녹색: 항체 Fc 부위.

20 **【발명의 실시를 위한 최선의 형태】**

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 표적 단백질에 광메티오닌(photomethionine, pM) 도입을 위한 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의 변이체를 제공한다.

25 상기 MRS 변이체는 야생형 대장균 MRS의 아미노산 서열 N-말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌(Ala)이 글리신(glycine)으로, 13 번째 위치의 류신(leucine)이 세린(serine)으로, 260 번째 위치의 티로신(tyrosine)이 페닐알라닌(phenylalanine)으로, 297 번째 위치의 이소류신(isoleucine)이 발린(valine)으로 또는 301 번째 위치의 히스티딘(histidine)이 류신으로 치환된

아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 야생형 대장균 MRS는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 야생형 대장균 MRS는 C-말단이 제거된 서열로부터 만들어지는 것이
5 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 표적 단백질은 표적 단백질로는 본 실시예에서 사용한 녹색형광 단백질(enhanced green fluorescence protein, EGFP) 및 FIH(factor inhibiting hypoxia inducible factor) 뿐만 아니라 모든 단백질을 사용할 수 있다.

10 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 표적 단백질 클로닝을 위한 벡터를 제조하였으며, 이를 사용하여 6x히스티딘(6xH)이 태그된 표적 단백질로 녹색형광 단백질(enhanced green fluorescence protein)(EGFP), FIH(factor inhibiting hypoxia inducible factor) 및 EGFP-FIH을 발현하기 위한 유전자를 클로닝하였다(도 1 및 도 2 참조). 또한, C-말단이 제거된 야생형 MRS 유전자를
15 클로닝하여 점돌연변이를 통한 MRS 변이체를 제조하였다(도 3 및 도 4 참조).

또한, 본 발명자들은 상기 제조한 표적 단백질 발현 벡터를 *E. coli* B834에 형질전환하여, 이를 메티오닌 영양원으로 메티오닌 또는 pM을 포함하는 배지에서 EGFP, FIH 또는 GFP-FIH의 표적 단백질을 발현한 결과, 메티오닌 처리시에는 표적 단백질이 발현되었으나, pM 처리시에는 표적 단백질이 거의 발현되지 않음을
20 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 상기 제조한 표적 단백질 발현 벡터 및 MRS 변이체 발현 벡터를 동시에 *E. coli* B834에 형질전환하여, 이를 메티오닌 영양원으로 메티오닌 또는 pM을 포함하는 배지에서 표적 단백질을 발현한 결과, 야생형 MRS가 발현되는 조건에서 메티오닌 처리시에는 EGFP, FIH 또는 GFP-FIH의 표적 단백질이
25 발현되었으나, pM 처리시에는 표적 단백질이 거의 발현되지 않음을 확인하였으며(도 5 및 도 7 참조), 이전에 알려진 13, 260 및 301 위치에 변이를 유발한 MRS1pm 및 MRS3pm 변이체는 야생형 MRS와 마찬가지로 pM에 의한 단백질 발현의 증가를 보이지 않음을 확인하였다. 그러나, MRS5pm 변이체를 발현시킨 경우에는 메티오닌을 처리했을 때와 마찬가지로 pM을 처리한 경우에도 6xH-EGFP

단백질이 발현됨을 확인하였다(도 5 및 도 7 참조). 이를 통해, 본 발명자들은 야생형 MRS와 메티오닌의 결합은 용이하나, 메티오닌에 비해 돌출된 디아지린기를 가지는 pM의 구조로 인하여, 야생형 MRS와 같이 Ala12 및 Ile297을 가지는 MRS는 리간드 결합 부위에 pM이 접근할 수 있는 공간이 부족하므로 pM의 결합이 어려운
 5 반면, MRS5pm 변이체는 메틸기를 제거하기 위해 Ala12 및 Ile297 잔기를 각각 글리신과 발린으로 치환하여 MRS의 리간드 결합 부위로 pM의 접근이 용이한 효과를 가짐을 확인하였다(도 8 참조).

또한, pM의 결합을 최적화하기 위하여 기존에 알려진 기질의 결합 부위인 Leu13, Tyr260 및 His301을 각각 세린, 페닐알라닌 및 류신으로 치환함으로써,
 10 EGFP, FIH 또는 GFP-FIH의 표적 단백질에 pM의 도입 효과가 향상됨을 확인하였다(도 9 참조).

또한, 본 발명자들은 pM이 표지된 표적 단백질을 Ni-NTA-아가로오즈 크로마토그래피를 통하여 pM이 표지된 6xH-표적 단백질을 부분 분리정제하여(도 8
 참조), SDS-폴리아크릴아미드 겔 및 웨스턴블롯팅을 통해 365 nm의 UV를 조사하여
 15 광활성 공유 결합을 통해 GFP-FIH 표적 단백질의 이량체(dimer)가 형성됨을 확인하였다(도 10 참조).

따라서, 본 발명의 MRS 변이체는 pM이 표지된 표적 단백질을 유의적으로 생합성 할 수 있음을 확인하였다.

20 또한, 본 발명은 야생형 대장균 MRS를 점 돌연변이를 통해 만들어지는 표적 단백질에 pM 도입을 위한 MRS 변이체의 제조 방법을 제공한다.

상기 MRS 변이체는 전체 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌이 글리신으로, 13 번째 위치의 류신이 세린으로, 260 번째 위치의 티로신이 페닐알라닌으로, 297 번째 위치의 이소류신이 발린으로 또는 301 번째 위치의
 25 히스티딘이 류신으로 치환된 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 MRS 변이체는 야생형 대장균 MRS 유전자에 돌연변이를 도입하는 것으로 제작할 수 있다. 핵산의 염기 서열에 원하는 돌연변이를 도입하는 방법은 점 돌연변이(point mutation), 축퇴성(degeneracy)을 유발하는

올리고뉴클레오타이드를 이용한 PCR, 핵산을 포함하는 세포 변이유발제 또는 방사선 노출과 같이 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다.

또한, 본 발명은 MRS 변이체를 포함하는 표적 단백질에 대한 pM 도입용
5 시약 조성물을 제공한다.

본 발명의 MRS 변이체를 포함하는 시약 조성물은 효과적으로 pM이 도입된 표적 단백질을 생합성 할 수 있으므로, 상기 시약 조성물을 이용하여 pM이 표지된 표적 단백질을 유의적으로 생합성 할 수 있다.

10 또한, 본 발명은 1) 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

15 3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 표적 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는 표적 단백질로의 pM의 도입 방법을 제공한다.

상기 발현 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터인 것이 바람직하고, 플라스미드 벡터를 사용하는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

20 상기 배양은

1) MRS 변이체 발현 플라스미드 및 표적 단백질 발현용 플라스미드를 동시에 대장균에 형질전환하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 형질전환체에 L-아라비노스를 첨가하여 MRS 변이체의 발현을 유도하는 단계;

25 3) 상기 단계 2)의 형질전환체의 배양 배지에 메티오닌을 제거하는 단계; 및

4) pM 함유 최소배지에서 pM 표지 단백질을 발현하는 단계로 이루어지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 코돈의 축퇴성으로

인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

상기 발현 벡터의 제작 시에는, 상기 MRS 변이체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

본 발명의 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

본 발명에 따른 상기 발현벡터를 적절한 숙주 세포인 대장균(*E. coli*)에 형질전환시킨 후, 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 본 발명에 따른 MRS 변이체를 대량 생산할 수 있다. 숙주세포의 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 상기 숙주세포로의 발현벡터 도입 방법은 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다.

또한, 본 발명은 단백질 G(protein G)의 첫 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C1, PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C2, PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C3, PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체를 제공한다.

상기 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 단백질 G의 두 번째 항체 결합 부위는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 단백질 G의 세 번째 항체 결합 부위는 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위, 두 번째 항체 결합 부위 또는 세 번째 항체 결합 부위는 1 개 또는 2 개 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 단백질 G의 치환된 항체 결합 부위는 도 21과 같이 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(서열번호 2: TYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE), 두 번째 항체 결합 부위(서열번호 3: TYKLIVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE) 및 세 번째 항체 결합 부위(서열번호 4: TYKLIVINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFTVTE) 간 아미노산 서열 및 3차 구조가 서로 보존되어 있다(Olsson et al., Eur J Biochem, 168, 319-24, 1987).

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현백터를 제공한다.

또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된, 광활성을 갖는 광메티오닌(photomethionine, pM) 도입 단백질 G 변이체를 제공한다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 먼저 서열 내부에는 메티오닌(methionine, Met) 잔기가 없는 단백질 G의 세 번째 항체결합 부위 (PG-C3, 서열번호 4, Olsson et al., Eur J Biochem, 168, 319-24, 1987)에 330-370 nm 자외선 조사에 의하여 공유결합 형성을 유도하는 메티오닌 모사체인 광활성 메티오닌을 도입하기 위하여, 일 실시예에서 제조한 6x히스티딘(6xH)이 태그된 pET-28at 벡터(도 1)에 1개 또는 2개 단백질 G 모티프(motif)를 포함한 벡터를 제조하였다(도 1 및 도 11 참조).

또한, 본 발명자들은 Met 잔기가 도입된 PG-C3 변이체를 코딩하는 유전자를 제조하기 위하여, 2개 PG-C3 모티프가 포함되고 모티프 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln32)이 Met으로 치환된 pET-2xPG1m, 2개 PG-C3 모티프가 포함되고 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp40) 및 Gln32가 Met으로 치환된 pET-2xPG2m, 2개 PG-C3 모티프가 포함되고 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn37)이 아르기닌(Arg)으로 치환되고 Asp40 및 Gln32가 Met으로 치환된 pET-2xPG3m, 및 2개 PG-C3 모티프가 포함되고 Asn37이 Arg으로 치환되고 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn35), Asp40 및 Gln32가 Met으로 치환된 pET-2xPG4m 플라스미드와 1개 PG-C3 모티프가 포함되고 모티프 N-말단으로부터 Gln32가 Met로 치환된 pET-PG1m, 1개 PG-C3 모티프가 포함되고 Gln32 및 Asp40이 Met로 치환된 pET-PG2m, 1개 PG-C3 모티프가 포함되고 Asn37이 Arg으로 치환되고 Gln32 및 Asp40이 Met로 치환된 pET-PG3m, 및 1개 PG-C3 모티프가 포함되고 Asn37이 Arg으로 치환되고 Gln32, Asp40 및 Asn35가 Met로 치환된 pET-PG4m 플라스미드를 제조하였다(도 12 및 도 13 참조).

또한, 본 발명자들은 pM 표지 단백질 G 변이체의 발현을 위하여, 일 실시예에서 제조한 메티오닐 tRAN 합성효소 변이체(MRS5m) 유전자를 코딩하는 플라스미드와 상기 PG-C3 Met 변이체 유전자를 코딩하는 플라스미드를 동시에 Met 영양요구주(auxotroph) 대장균 (*E. coli* B834)에 형질전환시킨 다음, pM을 포함하는 최소 배지에서 단백질을 발현시켜 6xH 태그된 6H-2xPG1m, 6H-2xPG2m, 6H-2xPG3m1, 6H-2xPG3m2 및 6H-2xPG4m, 및 6H-PG1m, 6H-PG2m, 6H-PG3m1, 6H-PG3m2 및 6H-PG4m을 획득하였다. 상기 pM 표지 6H-PG 변이체가 MRS5m에 의해 발현이 증가함을 확인하였다(도 14 참조).

또한, 본 발명자들은 상기 발현된 단백질 G 변이체들은 6xH기가 결합되어 있으므로 Ni-NTA 아가로우즈 크로마토그래피로 부분정제하여 발현 여부를 확인한 결과, 단계 농도구배(step gradient)시 대부분의 6H-2xPG2m은 150 mM 이미다졸(imidazole)에서 용출됨을 확인하였으며, 따라서, 다른 변이체들도 같은 조건으로 부분 정제하였다. 상기 부분정제한 변이체들의 발현 양상을 SDS-PAGE로 확인한 결과, 단량체뿐만 아니라, 이량체, 삼량체 및 사량체 등의 올리고머를 형성함을 확인하였다(도 15 및 도 16 참조). 또한, 이량체를 적출하여 LC/MS/MS 질량분석한 결과, 이량체 위치의 밴드도 PG-C3 서열을 포함하는 유도체이며 pM 표지율이 50% 이상임을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 상기 정제한 pM 표지 단백질 G 변이체와 인간 항체 IgG간의 공유결합을 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석 및 공유결합 형성능 분석을 수행한 결과, UV 조사시 pM 도입 단백질 G, 및 IgG 중쇄(heavy chain) 및 Fc 부위와 공유결합이 효과적으로 유도되고, 이때 Met으로 치환된 잔기 수가 많을수록 공유 결합 형성률도 함께 증가함을 확인하였다(도 17 내지 도 19 참조)

또한, 본 발명자들은 상기 정제한 pM 표지 단백질 G 변이체의 공유결합에 의한 혈액내 항체의 치환 억제능을 확인하기 위하여, UV 조사하여 바이오틴화된 IgG(bIgG) 중쇄(bH)와 공유결합시킨 6H-PG4m에 혈청을 처리한 후 SDS-PAGE, 코마시(Coomassie) 염색 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행한 결과, 상기 결합체가 혈청 처리에 의하여 영향을 거의 받지 않음을 확인하였다(도 20 참조).

또한, 본 발명자들은 상기 정제한 pM 표지 단백질 G 변이체의 혈액내 단백질 검출능을 확인하기 위하여, pM 표지 6H-PG4m과 인간 항체를 혼합하고 UV를

처리하여 공유결합을 유도한 후 면역침전법(immunoprecipitation)을 수행한 결과, UV를 조사한 군에서 6H-HER2는 면역침전 후 회수율이 최대 40% 가량 더 높게 나타나는 것을 확인함으로써, 상기 pM 도입 단백질 G 변이체의 혈액내 단백질 검출능이 우수함을 확인하였다(도 21 참조).

5 또한, 본 발명자들은 상기 정제한 pM 표지 단백질 G 변이체의 혈액내 항원 분석능 및 혈액내 세포 분석시 유용성을 확인한 결과, UV 조사한 pM 표지 6H-2xPG4m/항체 시스템에서 감도 및 항체 특이적 세포 포획능이 우수함을 확인함으로써, 상기 pM 도입 단백질 G 변이체를 바이오 칩 및 바이오센서; 및 세포 포획에 이용할 수 있음을 확인하였다(도 22 참조).

10 따라서, 본 발명의 pM 도입 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 혈액 시료 분석용 항체칩, 고감도 바이오칩(biochip) 및 바이오센서(biosensor) 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

15 또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열에서, N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)을 메티오닌(Met)으로 치환시키거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이
20 아르기닌(Arg)으로 치환시키는 단계를 포함하는 단백질 G 변이체의 제조 방법을 제공한다.

본 발명의 pM 도입 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 상기 단백질G 변이체의 제조 방법은 혈액 시료 분석용 항체칩, 고감도 바이오칩 및 바이오센서 개발에 유용하게
25 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은

1) 상기 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및

세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산
 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의
 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로
 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된
 5 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를
 포함하는 발현 벡터를 각각 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를
 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 단백질 G 변이체를
 10 발현시키는 단계를 포함하는, pM 도입 단백질 G 변이체의 제조 방법을 제공한다.

상기 단계 1)의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지
 벡터 및 바이러스 벡터인 것이 바람직하고, 플라스미드 벡터를 사용하는 것이 보다
 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의
 15 축퇴성으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을
 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는
 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한
 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는
 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함됨을
 20 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와
 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실,
 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에
 포함된다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA
 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

25 상기 발현 벡터의 제작 시에는, 상기 단백질 G 변이체를 생산하고자 하는
 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator),
 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열
 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체, 또는 광활성을 갖는 pM 도입 단백질 G 변이체에 항체가 결합된 융합 단백질을 제공한다.

상기 단편은 항체의 Fc 부위인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 pM 도입 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 상기 단백질 G 변이체에 항체가 결합된 융합 단백질은 고감도 바이오칩, 바이오센서 및 세포 포획용 칩 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체, 또는 광활성을 갖는 pM 도입 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 바이오칩을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 바이오센서를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 세포 포획 시스템을 제공한다.

본 발명의 pM 도입 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 고감도 바이오칩, 바이오센서 및 세포 포획용 칩 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된 단백질 G 변이체에 결합된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항체 표지 정맥주사용 나노입자 전달체를 제공한다.

본 발명의 pM 도입 단백질 G 변이체는 고배향성뿐만 아니라 UV 조사에 의해 항체와 특이적으로 고효율 공유 결합을 형성하므로, 항체를 나노입자에 고정시켜 표적지향적 주사용 나노입자 운반체 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 표적 단백질 클로닝을 위한 벡터의 제조

표적 단백질 클로닝을 위한 벡터를 제조하기 위하여, pET-28a(+) 벡터(Novagen, 미국)의 NdeI과 BamHI 사이에 3 개의 메티오닌 잔기를 제거하였다.

구체적으로, pET-28a(+)를 주형으로 사용하여, N-말단에 6x histidine tag (6xH)을 도입하는 정방향 프라이머(TET-Xba-F)(서열번호 6: 5'-TTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC-3') 및 역방향 프라이머(ET-Bam-R)(서열번호 7: 5'-GCGCGGATCCGCGCGGCACCGCCGC-3')를 사용하여 PCR로 증폭한 후, 증폭된 DNA를 XbaI 및 BamHI으로 잘라 pET-28a(+)의 XbaI/BamHI 위치에 삽입하여, pET-28at라 명명하였다.

그 결과, 도 1에서 나타낸 바와 같이 상기 제조한 pET-28at 벡터는 NdeI-BamHI 사이의 3 개의 메티오닌 잔기는 제거되었으나, 트롬빈(thrombin) 절단부위를 유지하고 있어 6xH 부위의 절단이 가능한 벡터를 제조하였으며, 본 발명에서 향상된 녹색형광 단백질(enhanced green fluorescence protein)(EGFP) 및 EGFP-FIH(factor inhibiting hypoxia inducible factor), 단백질 G(protein G)를

클로닝하기 위한 벡터로 사용하였다(도 1).

<실시에 2> pET-28at에 표적 단백질 발현 유전자 클로닝

표적 단백질을 발현하기 위하여, 상기 <실시에 1>에서 제조한 pET-28at
5 벡터에 단백질 발현 유전자를 클로닝하였다.

구체적으로, EGFP 단백질의 유전자를 얻기 위하여, pEGFP-N3(BD Biosciences Clontech, 미국)를 주형으로 하여, 정방향 프라이머(GFP-Bam-F)(서열번호 8: 5'-CGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3') 및 역방향 프라이머(GFP-Xho-R)(서열번호 9: 5'-CCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTC-3')를 사용하여 PCR로 증폭한 후,
10 pET-28at 벡터의 BamHI/XhoI 위치에 삽입하였으며, pET-GFP라 명명하였다.

GFP-FIH 접합된 단백질의 유전자를 얻기 위하여, pEGFP-N3(BD Biosciences Clontech, 미국)를 주형으로 하고 GFP-Bam-F 정방향 프라이머 및 GFP/FIH-R 역방향 프라이머(서열번호 10: 5'-CGCCGCTGTCCCGCCGAGAGTGATCCCG-3')를 사용하여 FIH와 연결하기 위한 EGFP 유전자를 증폭하였으며, pET-FIH(Lee등, Biol Chem, 278,
15 7558-63, 2003)를 주형으로 하고 GFP/FIH-F 정방향 프라이머(서열번호 11: 5'-ACTCTCGGCGGGACAGCGGCGGAGGCTG-3') 및 FIH-Xho-R 역방향 프라이머(서열번호 12: 5'-TTCCCTCGAGACCCCTGGCAGGCTAG-3')를 사용하여 EGFP와 연결하기 위한 FIH 유전자를 증폭하였다. 두 종류의 증폭된 DNA를 혼합하여 GFP-Bam-F 및 FIH-Xho-R 프라이머를 사용해 PCR로 GFP-FIH 접합 유전자를 증폭하여, 이를 pET-28at 벡터의
20 BamHI 및 XhoI 위치에 삽입하였고, 이를 pET-GFP/FIH로 명명하였다(도 2).

<실시에 3> 카복시 말단이 절단된 MRS 클로닝

광메티오닌(photometionine, pM: L-2-amino-5,5-azi-hexanoic acid) 표지 단백질을 합성하기 위한 MRS(methionyl tRNA synthase)를 제조하기 위하여, 야생형
25 MRS 유전자를 클로닝하여 이의 변이체를 제조하였다.

구체적으로, 대장균(*E. coli* BL21) 게놈 DNA 추출물을 주형으로 하고, MRS-Nco-F 정방향 프라이머(서열번호 13: 5'-AATTCATGGCTCAAGTCGCGAA-3') 및 MRS-Kpn-R 역방향 프라이머(서열번호 14: 5'-CAGCGGTACCTTATTCTTTAGAGGCTCCACC-3')를 사용해 서열번호 5의 염기서열로 구성된 대장균 MRS 유전자를 PCR로 증폭하였고,

이를 pBAD/Myc-HisA 벡터(Invitrogen 사, 미국)의 NcoI/KpnI 위치에 삽입하였고, 이를 pBAD-MRSwt으로 명명하였다(도 3).

야생형 MRS로부터 변이체 MRS를 제조하기 위해, 상기 pBAD-MRSwt 벡터를 주형으로 하여 점돌연변이(point mutagenesis) 방법을 통해 다양한 점 변이체를 5 제조하였다(도 4).

구체적으로, MRS 변이체 제조에 사용한 프라이머는 [표 1]에 정리하였다. 변이 생성을 포함하는 프라이머쌍을 이용해 도 4과 같은 구성으로 PCR을 한 유전자를 정제하여 섞어, 이를 주형으로 다시 BAD-F 및 MRS-Kpn-R 프라이머로 10 PCR하여 변이가 포함된 산물을 얻었다. 그 후, NcoI/KpnI로 절단하여 pBAD/Myc-HisA 벡터의 NcoI/KpnI에 삽입하여 pBAD-MRS1m을 제조하였다. 다른 변이체들도 정해진 프라이머쌍을 사용하여 동일한 방법으로 변이체를 제조하여, pBAD-MRS3m, pBAD-MRS4m 및 pBAD-MRS5m을 제조하였다(도 4).

【표 1】

15 MRS 및 변이체 클로닝을 위해 사용한 프라이머의 염기서열

이름	염기서열(5'→3')
MRS-Nco-F	AATTCCATGGCTCAAGTCGCGAA(서열번호 13)
MRS-Kpn-R	CAGCGGTACCTTATTCTTTAGAGGCTTCCACC(서열번호 14)
BAD-F	ATGCCATAGCATTTTTATCCA(서열번호 15)
MRS-A12G-F	GACGTGCGGCCTGCCGTACGCTAACGGCTCAATCC(서열번호 16)
MRS-A12G-R	ACGGCAGGCCGCACGTCACCAGAATTTTCTT(서열번호 17)
MRS-L13G-F	GGGCCGTACGCTAACGGCTCAATC(서열번호 18)
MRS-L13G-R	GATTGAGCCGTTAGCGTACGGCCCTGCGCACGTCACCAG(서열번호 19)
MRS-AL/GS-F	GACGTGCGGCTCGCCGTACGCTAACGGCTCAATC(서열번호 20)
MRS-AL/GS-R	ACGGCGAGCCGCACGTCACCAGAATTTTCTTCGC(서열번호 21)
MRS-Y260F-F	ACCGATTGGCTTCATGGGTTCTTTCAAGAATCTGTGCGA(서열번호 22)
MRS-Y260F-R	AAGAACCCATGAAGCCAATCGGTGCGTCCAGC(서열번호 23)
MRS-I297V-F	GGTAAAGATGTTGTTTACTTCCTGAGCCTGTTCTGGCC(서열번호 24)

MRS-I297V-R	GGCTCAGGAAGTAAACAACATCTTTACCGATGAAGTGGTACAG(서열번호 25)
MRS-H301L-F	GATATTGTTTACTTCCTGAGCCTGTTCTGGCCTGC(서열번호 26)
MRS-H301L-R	CAGAACAGGCTCAGGAAGTAAACAATATCTTTACC(서열번호 27)

● MRS-Nco-F 및 MRS-Kpn-R는 MRS의 1 내지 548 서열을 증폭하여 pBAD/Myc-HisA 벡터에 도입하기 위한 프라이머 세트이다.

● MRS-A12G-F 및 MRS-A12G-R는 12번째 알라닌을 글리신으로 치환하기 위한 프라이머 세트임.

5 ● MRS-L13G-F 및 MRS-L13G-R는 13번째 류신을 글리신으로 치환하기 위한 프라이머 세트임.

● MRS-AL/GS-F 및 MRS-AL/GS-R는 12 및 13번째 알라닌-글리신을 글리신-세린 치환하기 위한 프라이머 세트임.

10 ● MRS-Y260F-F 및 MRS-Y260F-R는 260번째 티로신을 페닐알라닌으로 치환하기 위한 프라이머 세트임.

● MRS-I297V-F 및 MRS-I297V-R는 297번째 이소류신을 발린으로 치환하기 위한 프라이머 세트임.

● MRS-H301L-F 및 MRS-H301L-R는 301번째 히스티딘을 류신으로 치환하기 위한 프라이머 세트임.

15

<실시예 4> 메티오닌 종속 영양 대장균(*E. coli* B834)에서 pM 표지 단백질 발현 확인

외부 MRS를 발현하지 않을 때 pM 표지 단백질의 발현을 확인하기 위해, 메티오닌 종속 영양 대장균인 *E. coli* B834에서 pM이 표지된 EGFP, FIH 또는 GFP/FIH 단백질의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 6xH 태그를 가지는 표적 단백질을 발현시키기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 제조한 pET-GFP, pET-FIH 또는 pET-GFP/FIH 벡터를 *E. coli* B834에 형질전환(transformation)한 후, 카나마이신(kanamycin)에 저항성을 가지는 콜로니를 선별하여, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 카나마이신을 포함하는 LB 배지에서 하루 동안 배양하였다. 그런 다음, 배양한 대장균은 2000 xg에서 15 내지 20 분간 원심분리하여 수득하고, M9B(48 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 9 mM NaCl, 및 19 mM

25

NH₄Cl)으로 2 회 세척한 후, M9BV+1/2 CMS-MET 용액 (M9B + 0.4 % 포도당, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 0.1 M FeCl₃, 1 mg/ml 티아민(thiamine), 0.2 mg/ml 니코틴아미드(nicotinamide), 0.2 mg/ml 폴릭산(folic acid), 0.2 mg/ml 콜린 클로라이드(choline chloride) 및 0.02 mg/ml 리보플라빈(riboflavine) + 375
 5 μ g/ml CSM-MET(메티오닌을 제외한 19개 아미노산 혼합물))에 1/5로 희석하여 분산하였다. 분산한 대장균은 37°C에서 2 내지 3 시간 동안 더 배양한 후, 375 μ g/ml CSM-MET 및 50 μ g/ml 메티오닌 또는 pM을 가하고, 1 mM IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)로 20°C에서 12 내지 16 시간 동안 단백질 발현을 유도하였다. 그런 다음, 세포는 원심분리하여 PBS로 세척하고, 수분을 마이크로
 10 피펫으로 최대한 제거한 다음, 젖은 세포를 100 mg/ml 농도로 증류수에 희석하였다. 그런 다음, 5 μ l를 동량의 2xSDS 완충용액과 혼합하여 100°C에서 2 분간 가열하여 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 발현을 분석하였다.

그 결과, 메티오닌 처리시에는 표적 단백질이 발현되었으나, pM 처리시에는 표적 단백질이 거의 발현되지 않음을 확인하였다.

15

<실시에 5> *E. coli* B834에서 MRS에 의한 pM 표지 6xH-EGFP 단백질 발현 확인.

약 28 KDa의 분자량을 가지며 분자 내에 모두 7개의 메티오닌을 포함하는 6xF-EGFP 및 상기 <실시에 3>에서 제조한 MRS 변이체를 이용하여, *E. coli* B834에서 pM이 표지된 6xH-EGFP 단백질 발현을 확인하였다.

20

구체적으로, 상기 <실시에 3>에서 제조한 pBAD-MRSwt 또는 pBAD-MRS1m 내지 pBAD-MRS5m 및 pET-GFP를 *E. coli* B834에 형질전환한 후, 암피실린 및 카나마이신에 모두 저항성을 가지는 콜로니를 선별하여 암피실린 및 카나마이신을 포함하는 LB 배지에서 하루 동안 배양하였다. 배양한 대장균은 2000 xg에서 15
 내지 20 분간 원심분리하여 수득하고, 암피실린 및 카나마이신을 포함하는 LB
 25 배지에 1/20로 희석하여 분산하였다. 분산한 대장균은 1 시간 동안 더 배양한 후, 0.02 % L-아라비노오즈(L-arabinose)를 37°C에서 2 시간 동안 처리하여 야생형 MRS 또는 MRS 변이체를 발현하였다. 그런 다음, 표적 단백질인 EGFP를 발현하기 위하여, 상기 대장균을 M9B로 2 회 세척하고, M9BV+1/2 CMS-MET 용액에 1/2 내지 1/3로 희석한 다음, <실시에 4>와 동일한 방법으로 표적 단백질의 발현을

유도하였다. 배양 후, 원심분리하여 수득한 젖은 세포를 100 mg/ml 농도로 물에 희석한 다음, 5 μ l를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 발현을 분석하였다.

그 결과, 도 5에서 나타낸 바와 같이 외부 MRS의 발현이 되지 않을 때와 마찬가지로, 야생형 MRS가 발현되는 조건에서는 메티오닌 처리시 단백질의 발현이 높게 나타났으나, pM 처리시에는 EGFP 단백질이 거의 발현되지 않음을 확인하였다. 또한, 이전에 알려진 13, 260 및 301 위치에 변이를 유발한 MRS1pm 및 MRS3pm 변이체는 야생형 MRS와 마찬가지로 pM에 의한 단백질 발현의 증가를 보이지 않음을 확인하였다. 그러나, MRS5pm 변이체를 발현시킨 경우에는 메티오닌을 처리했을 때와 마찬가지로 pM을 처리한 경우에도 6xH-EGFP 단백질이 발현됨을 확인하였다(도 5). 아울러, 6xH-EGFP는 메티오닌 또는 pM을 처리하지 않은 경우, IPTG에 의한 단백질의 발현이 이루어지지 않아, pM 처리시 발현된 6xH-EGFP에는 pM이 포함되어 있음을 확인하였다(도 5).

상기 결과는 도 6에서 나타내는 바와 같이 야생형 MRS와 메티오닌의 결합은 용이하나, 메티오닌에 비해 돌출된 디아지린기를 가지는 pM의 구조로 인하여, 야생형 MRS 또는 MRS1pm 및 MRS3pm 변이체와 같이 Ala12 및 Ile297을 가지는 MRS는 리간드 결합 부위에 pM이 접근할 수 있는 공간이 부족하므로 pM의 결합이 어려움을 나타낸다. 반면에, MRS5pm 변이체는 메틸기를 제거하기 위해 Ala12 및 Ile297 잔기를 각각 글리신과 발린으로 치환하여 MRS의 리간드 결합 부위로 pM의 접근이 용이한 효과를 가짐을 확인하였다(도 6). 또한, pM의 결합을 최적화하기 위하여 기존에 알려진 기질의 결합 부위인 Leu13, Tyr260 및 His301을 각각 세린, 페닐알라닌 및 류신으로 치환한 함으로써, 6xH-EGFP 등의 표적 단백질에 pM의 도입 효과가 향상됨을 확인하였다(도 6).

25 <실시예 6> *E. coli* B834에서 MRS에 의한 pM 표지 6xH-FIH 단백질 발현.

약 45 KDa의 분자량을 가지며 분자 내에 모두 10개의 메티오닌을 포함하는 6xFIH 및 상기 <실시예 3>에서 제조한 MRS 변이체를 이용하여 *E. coli* B834에서 pM이 표지된 6xH-FIH 단백질을 발현하였다.

구체적으로, pBAD-MRSwt 또는 pBAD-MRS1m 내지 pBAD-MRS5m 및 pET-FIH을 *E.*

coli B834에 형질전환한 후, 상기 <실시예 5>와 동일한 방법으로 MRS 및 FIH 단백질을 발현하였다. 배양 후, 원심분리하여 수득한 젖은 세포를 100 mg/ml 농도로 물에 희석한 다음, 5 μ l를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 단백질 발현을 분석하였다.

- 5 그 결과, 도 7에서 나타내는 바와 같이 MRS5pm 변이체를 발현시킨 경우에는 메티오닌을 처리했을 때보다 pM을 처리한 경우에 6xH-FIH 단백질이 유의적으로 발현됨을 확인하였다. 아울러, MRS4pm 변이체를 발현시킨 경우 6xH-FIH에 pM 표지 단백질의 발현되었으나, 야생형 및 MRS5pm 변이체를 발현시킨 경우에 비해 xH-FIH에 pM 표지 단백질이 적게 발현됨을 확인하였다(도 7). MRS4pm 변이체는
- 10 MRS5pm 변이체에서 치환한 5 개의 아미노산 잔기 중 Leu13을 세린으로 치환하는 것을 제외한 네 개의 아미노산 잔기만 치환한 변이체이므로, 상기 결과는 MRS 변이체에 의한 pM 표지 단백질의 발현에서 Leu13 잔기를 세린으로 치환하는 것이 중요함을 확인하였다.

15 <실시예 7> pM 표지 6xH-EGFP 및 6xH-FIH 단백질 부분 분리 정제

발현된 pM 표지 단백질을 정제하기 위하여 Ni-NTA-아가로오즈 크로마토그래피를 통하여 pM이 표지된 6xH-표적 단백질을 부분 분리정제하였다.

- 구체적으로, pM이 표지된 6xH-표적 단백질의 분리를 위하여 상기 <실시예 5> 또는 <실시예 6>에서 배양한 MRS5pm 변이체를 포함하여 pM 표지 단백질을
- 20 발현한 대장균을 원심분리하여 세포를 수득하였다. 그런 다음, 배양액 100 ml 당 세포 파괴용 완충액(20 mM 트리스-HCl(Tris-HCl), 300 mM NaCl, 2 mM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 1 mM PMSF 및 5 % glycerol) 1 내지 2 ml에 분산한 후, 초음파 파쇄하였다. 파쇄액은 15,000 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 상등액을 수득하고, 이를 Ni-NTA-아가로오즈 크로마토그래피로 부분
- 25 분리정제하였다.

그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 단계 구매 Ni-NTA-아가로오즈 크로마토그래피 중 150mM 이미다졸(imidazole) 농도에서 6xHis-태그된 표적 단백질을 부분 분리정제함을 확인하였다(도 8).

<실시예 8> pM 표지 6xH-EGFP 및 6xH-FIH 단백질의 광활성 공유 결합 분석

발현된 표적 단백질에 표지된 pM의 광활성을 가지는 것을 확인하기 위하여, 발현된 표적 단백질의 광활성 공유 결합을 분석하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 7>에서 부분 분리정제한 pM 표지 단백질에 365 nm 파장의 UV를 조사하여 단백질간의 이량체(dimer) 형성을 확인하였다.

그 결과, 단량체(monomer)로 존재한다고 알려진 EGFP 단백질 간의 이량체를 형성하지 않음을 확인하였다. 또한, 도 9에서 나타낸 바와 같이 6xH-FIH는 C-말단으로 이량체를 형성한다고 알려져 있으며, 이량체 형성 부위에 3 개의 메티오닌 잔기가 존재하고, 이 중 2 개의 잔기가 서로 대응되는 FIH 메티오닌 잔기와 매우 밀접한 구조를 보이는 것으로 알려져 있다(도 9). 그러나, FIH 단백질 또한 본 발명의 배양 및 IPTG로 인한 유도 조건에서는 LB 배지에서의 IPTG 유도 조건(Lee등, Biol Chem, 278, 7558-63, 2003)과 다르게 UV 조사시 단백질이 침전물로 존재함을 확인하였다.

15 <실시예 9> pM 표지 6xH-GFP/FIH 단백질의 부분 분리 정제 및 광활성 공유 결합 분석

상기 <실시예 8>의 단백질에서 광활성 공유결합이 형성되지 않음을 극복하기 위해, FIH의 아미노말단에 EGFP를 결합하여 발현한 GFP/FIH 단백질을 대장균에서 발현하였다.

구체적으로, pBAD-MRS5m 및 상기 <실시예 2>에서 제조한 pET-GFP/FIH를 *E. coli* B834에 형질전환한 후, 상기 <실시예 5>와 동일한 방법으로 MRS 변이체 및 GFP/FIH 단백질을 발현하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 7>과 동일한 방법으로 Ni-NTA-아가로오즈 크로마토그래피를 통하여 pM이 표지된 6xH-GFP/FIH 단백질을 부분 분리정제하였으며, 365 nm 파장의 UV를 조사하여 단백질 간의 이량체(dimer) 형성을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전개 후 코마시에 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie brilliant blue R-250) 염색 및 웨스턴블롯팅(western blotting) 분석을 통해 확인하였다.

웨스턴블롯팅을 위하여, SDS-PAGE 후 니트로셀룰로오즈(nitrocellulose, NC) 멤브레인으로 단백질을 이동시켜 6xH 특이 마우스 단일클론항체(Aviva Systems

biology, 미국) 및 겨자무과산화수소(Horse-radish peroxidase)가 결합된 항
 마우스 IgG 염소 항체(Millipore, 미국)를 순차적으로 결합시켰다. 그런 다음,
 Amersham ECL 웨스턴블롯팅 검출시약(GE Healthcare, 미국)을 처리하여 확인하였다.

그 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이 6xH-GFP/FIH 단백질을 소량 분리
 5 정제하였으며(도 10A), 6xH는 이 tag를 인위적으로 넣어준 단백질인 GFP-FIH에만
 존재하므로, 단백질이 완전히 정제되지 않아 72 KDa 위치에 몇 개 단백질 밴드가
 존재하나, 6xH 특이 항체에 반응하는 밴드는 1 개뿐임을 알 수 있어, 386 nm의 UV
 조사시 pM이 표지된 6xH-GFP/FIH 단백질이 이량체를 형성하는 것을 웨스턴블롯팅을
 통하여 확인하였다(도 10B).

10

<실시예 10> 메티오닌 도입을 위한 단백질 G(protein G) 벡터 제조

상기 <실시예 3>에 기재된 방법으로 획득한 MRS를 이용하여 pM 표지 단백질
 G(protein G)를 획득하기 위하여, 먼저, 상기 <실시예 1>에서 제조한 pET-28at
 벡터에 1개 또는 2개 단백질 G 모티프(motif)를 포함한 벡터를 제조하였다.

15 구체적으로, pET-2XFcBP(Jung et al., Anal Chem, 81, 936-42, 2009)를
 주형으로 하기 [표 2]의 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain
 reaction: PCR)을 수행하여 1개 또는 2개 단백질 G의 세 번째 항체결합
 부위(immunoglobulin G-binding region C3: PG-C3, Olsson et al., Eur J Biochem,
 168, 319-24, 1987, 서열번호 4)가 들어 있는 PCR 산물을 얻었다. 그 다음, 상기
 20 PCR 산물을 제한효소 BamHI 및 XhoI으로 절단하여 pET-28at 벡터(도 1)의
 BamHI/XhoI 부위(site)로 클로닝하고, 상기 1개 또는 2개 PG-C3을 포함한
 플라스미드를 각각 pET-PG 및 pET-2xPG라 명명하였다(도 11).

【표 2】

프라이머	서열(5'→3')
PG-Bam-F	ATAGGATCCTGCTGCGGCGGGACAACCTACAACTTGTTATT
정방향 프라이머	(서열번호 28)
PG-Xho-R	GCGCCTCGAGTTATTCAGTTACCGTAAAGGTC
역방향 프라이머	(서열번호 29)

<실시예 11> 메티오닌 치환 단백질 G 플라스미드 제조

단백질 G와 항체 결합 구조(Sauer-Eriksson et al., Structure, 3, 265-78, 1995)를 바탕으로 32, 35, 40 위치에 도입하기 위하여, 상기 <실시예 10>에 기재된 방법으로 획득한 2개 PG-C3 모티프가 포함된 pET-2xPG 플라스미드 및 1개 PG-C3
5 모티프가 포함된 pET-PG 플라스미드 내 PG-C3를 메티오닌으로 치환하여 변이 단백질 G 플라스미드를 제조하였다.

구체적으로, 메티오닌을 도입을 위하여 치환시킨 아미노산 잔기 번호들은 PG-C3 모티프를 기준으로 하였으며, Met으로 치환시키는 잔기들은 단백질 G와 항체 간의 3차 결합 구조를 바탕으로 선정하였다. 그 다음, 변이체 제조를 위하여 도
10 3의 모식도와 같이 하기 [표 3]의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다. 먼저, 32 번째 글루타민(Glutamine, Gln32)을 메티오닌으로 치환하기 위하여 상기 <실시예 10>에 기재된 방법으로 획득한 pET-2xPG를 주형으로 하기 [표 3]의 프라이머 세트 중 ET-Xba-F/PG-Q32M-R 및 PG-Q32M-F/Ins-Cla-R를 사용하여 PCR을 수행하고 각 PCR 산물을 획득하였다. 상기 획득한 PCR 산물을 혼합하고, 이를
15 주형으로 하기 [표 3]의 프라이머 세트 중 ET-Xba-F/Ins-Cla-R를 사용하여 PCR DNA를 획득한 후, BamHI 및 ClaI으로 절단 및 정제하여 insert 1 DNA를 획득하였다. 그 다음, pET-2xPG를 주형으로 하기 [표 2]의 프라이머 세트 중 Ins-Cla-F/PG-Q32M-R 및 PG-Q32M-F/ET-R를 사용하여 상기와 같이 PCR을 수행하여 각 PCR 산물을 획득하였다. 상기 획득한 PCR 산물을 혼합하고, 이를 주형으로 하기 [표 3]의
20 프라이머 세트 중 Ins-ClaI-F/ET-R를 사용하여 PCR DNA를 획득한 후, ClaI 및 XhoI으로 절단 및 정제하여 insert 2 DNA를 얻었다. 그 후, 상기 insert 1 DNA 및 insert 2 DNA를 혼합하여 pET-28at의 BamHI/XhoI 부위 내로 클로닝하여 pET-2xPG1m 플라스미드를 획득하였다. 그 다음, 상기 pET-2xPG1m 플라스미드를 주형으로 상기와 같은 방법으로 PCR을 수행하여 PG-C3 모티프의 40 번째
25 아스파르트산(aspartic acid, Asp40) 및 Gln32가 Met으로 치환된 pET-2xPG2m을 제조하였다. 또한, 상기 pET-2xPG2m 플라스미드를 주형으로 상기와 같은 방법으로 PCR을 수행하여 37 번째 아스파라긴(asparagine, Asn37)을 아르기닌(arginine, Arg)으로 치환되고, Asp40 및 Gln32가 Met으로 치환된 pET-2xPG3m을 제조하였다. 그 다음, 상기 pET-2xPG3m 플라스미드를 주형으로 상기와 같은 방법으로 PCR을

수행하여 35 번 아스파라긴(Asn35), Asp40 및 Gln32가 Met으로 치환되고, Asn37이 Arg으로 치환된 pET-2xPG4m을 제조하였다(도 12).

【표 3】

프라이머 세트	서열(5'→3')
PG-Bam-F	ATAGGATCCTGCTGCGGCGGGACAACCTACAACTTGTATT(서열번호 30)
PG-XhoI-R	GCGCCTCGAGTTATTCAGTTACCGTAAAGGTC(서열번호 31)
PG-Q32M-F	AAAGCCTTCAAAATGTACGCTAACGAGAACGG(서열번호 32)
PG-Q32M-R	GTTAGCGTACATTTTGAAGGCTTTTCTGCAGTTTCTGC(서열번호 33)
PG-D40M-F	GACAACGGTGTATGCGGTGTTTGGACTTATGATG(서열번호 34)
PG-D40M-R	CCAAACACCCATAACACCGTTGTCGTTAGCG(서열번호 35)
PG-N37R-F	GCTAACGACCGCGGTGTTATGGGTGTTTGG(서열번호 36)
PG-N37-R	CATAACACCGCGGTGTTAGCGTACATTTT(서열번호 37)
PG-35,37-F	GCTATGGACCGCGGTGTTATGGGTGTTTGG(서열번호 38)
PG-35,37-R	CATAACACCGCGGTCCATAGCGTACATTTTGAAGGC(서열번호 39)
Ins-Cla-F	GAAGTGATCGATGCGTCTGAATTA(서열번호 40)
Ins-Cla-R	TAATTCAGACGCATCGATCACTTC(서열번호 41)
ET-Xba-F	TTCCCCCTAGAAATAATTTTGTTTAAC(서열번호 42)
ET-R	TTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAG(서열번호 43)

5

또한, Protein G 모티프가 1개 있는 변이체를 제조하기 위하여, 도 13의 모식도와 같이 상기에 기재된 방법으로 획득한 pET-2xPG1m, pET-2xPG2m, pET-2xPG3m 및 pET-2xPG4m 변이 플라스미드를 주형으로 상기 [표 3]의 프라이머 세트 중 ET-Xba-F/PG-XhoI-R로 PCR을 수행하여 1 개 PG 모티프가 들어 있는 PCR DNA를

10 획득하였다. 상기 획득한 PCR DNA를 정제 후 BamHI 및 XhoI을 이용하여 절단하고 pET-28at의 BamHI/XhoI 부위로 클로닝하였다. 각각의 PG 변이 플라스미드들은 pET-PG1m, pET-PG2m, pET-PG3m 및 pET-PG4m이라 명명하였다(도 13).

<실시예 12> MRS 변이체에 의한 pM 표지 단백질 G 발현벡터 및 형질전환체의 제작

pM 표지 단백질 G 변이체 발현을 위하여, 상기 <실시예 3>에서 제조한 pBAD-MRS5m 플라스미드와 상기 <실시예 11>에 기재된 방법으로 획득한 각각의 PG-C3 변이체들을 코딩하는 플라스미드를 Met 영양요구주(auxotroph) 대장균 *E. coli* B834로 형질전환하였다. 그 다음, 상기 MRS5m 및 PG-C3 변이체 플라스미드들을 모두 포함하는 형질전환 *E. coli* 콜로니들을 100 µg/ml 엮피실린(ampicillin) 및 50 µg/ml 카나마이신(kanamycin)이 함유된 LB 고체배지에서 선별하고, 이를 LB 액체배지에 현탁하여 24 시간 배양하였다. 그 다음, 상기 양액을 1/10 내지 1/20 부피로 희석하여 엮피실린 및 카나마이신이 함유된 LB 액체배지에서 1 내지 2 시간 배양한 다음, 0.02% L-아라비노스(L-arabinose)를 2 시간 동안 37℃에서 처리하여 MRS5m을 발현시켰다. 그 다음, 상기 MRS5m 발현 대장균을 M9B 용액(48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 9 mM NaCl 및 19 mM NH₄Cl)로 2번 세척하고, M9BV+1/2 CMS-MET 용액[M9B+0.4% 글루코오스(glucose), 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 0.05 mM MnCl₂, 0.1 M FeCl₃, 1 mg/ml 티아민(thiamine), 0.2 mg/ml 니코틴아마이드(nicotinamide), 0.2 mg/ml 엽산(folic acid), 0.2 mg/ml 염화콜린(choline chloride) 및 0.02 mg/ml 리보플라빈(riboflavine)+375 µg/ml CSM-MET(methionine을 제외한 19개 아미노산 혼합물)]에 1/2 내지 1/3로 희석시켰다. 그 다음, 상기 대장균을 37℃에서 1 내지 2시간 또는 18℃에서 3시간 더 배양하여 Met을 결핍시킨 다음, 375 µg/ml CSM-MET를 50 µg/ml 메티오닌 또는 50-100 µg/ml pM이 되게 가하고, 1 mM IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)로 18℃에서 16 내지 20 시간 단백질 발현을 유도하였다. 각 발현된 단백질들은 2개의 PG-C3 모티프를 갖고 있는 경우에는 6H-2xPG1m, 6H-2xPG2m, 6H-2xPG3m1, 6H-2xPG3m2 및 6H-2xPG4m으로, 1개의 PG-C3 모티프를 갖고 있는 경우에는 6H-PG1m, 6H-PG2m, 6H-PG3m1, 6H-PG3m2 및 6H-PG4m으로 명명하였다.

그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, MRS5m에 의해 pM 표지 6H-2xPG2m의 발현의 증가하고, 정상 MRS(MRSwt)에 의해서는 pM 단독 처리시 단백질 발현이 매우 낮지만, MRS5m에 의해서는 pM 단독 처리시에도 Met 처리시와 유사하게 단백질의 발현이 현저하게 증가됨을 확인하였다(도 14). 또한 pM 처리농도를 100 µg/ml로 두 배 늘렸을 때, 유의적으로 단백질 발현량도 같이 증가하며, 다른 Met 변이체들도

6H-2xPG2m과 유사하게 MRS5m에 의한 pM 표지 단백질의 발현이 증가되는 양상을 나타냄을 확인하였다.

<실시에 13> 단백질 G 변이체 부분 분리 정제 및 질량분석

5 상기 <실시에 12>에 기재된 방법으로 발현된 단백질 G 변이체들은 모두 용해된 형태로 발현되었으며, 이들 단백질의 아미노말단에 6xH기가 결합되어 있어 Ni-NTA-agarose(Qiagen, 미국) 크로마토그래피로 부분 정제하였다.

구체적으로, 상기 <실시에 12>에 기재된 방법으로 6H-2xPG1m, 6H-2xPG2m, 6H-2xPG3m1, 6H-2xPG3m2 및 6H-2xPG4m, 및 6H-PG1m, 6H-PG2m, 6H-PG3m1, 6H-PG3m2
10 및 6H-PG4m가 발현된 형질전환 *E. coli*를 원침시킨 다음, 100 ml 배양액당 세포파괴용 완충액(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2 mM 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol), 1 mM PMSF 및 5% 글리세롤(glycerol)) 1 내지 2 ml에 분산시키고 초음파 파쇄를 하였다. 상기 파쇄액은 15,000 rpm에서 10 내지 20 분간 원침시킨 다음, 상층액을 모아 Ni-NTA-agarose 크로마토그래피로 부분
15 분리정제하였다. 상기 정제한 상층액은 SDS-PAGE를 수행하여 6H-2xPG1m, 6H-2xPG2m, 6H-2xPG3m1, 6H-2xPG3m2 및 6H-2xPG4m, 및 6H-PG1m, 6H-PG2m, 6H-PG3m1, 6H-PG3m2 및 6H-PG4m 단백질 G 변이체의 발현 여부를 확인하였다.

그 결과, 도 15 및 도 16에 나타난 바와 같이, 단계 농도구배(step gradient)시 대부분의 6H-2xPG2m는 150 mM 이미다졸(imidazole)에서 용출됨을
20 확인하였으며, 따라서, 다른 변이체들도 같은 조건으로 부분 정제하였다. 흥미롭게도 정제된 Met 또는 pM 표지 6H-2xPG2m은 단량체(monomer)뿐만 아니라 이보다 양은 적지만 이량체(dimer), 삼량체(trimer) 및 사량체(tetramer) 등 다량체(oligomer)를 형성함을 확인하였다(도 15). 상기 결과는 본래 아미노산에 비해 소수성인 Met 도입으로 SDS 존재하에서, 그리고 가열하는 조건에 따라 안정한
25 형태인 올리고머 형성이 유도되는 것으로 여겨진다. 그러나, PG-C3의 이량체 및 다량체 형성은 궁극적으로 항체가 고배향성을 갖도록 포획하는 데에는 악영향을 줄 수 있다. Asn37은 항체의 Fab의 CH1 부위에 결합에 있어서 중요하나, Fc 부위 결합에는 영향을 주지 않으므로, 이를 타이로신(tyrosin, Tyr)으로 치환하여 Fab 결합을 최소화할 수 있다고 보고되고 있다(Jung et al., Anal Chem, 81, 936-42,

2009). 한편, 6xH-2xPG2m의 Asn37을 Tyr으로 치환하여도 다량체 형성을 감소시키지는 못하였으나, Asn37을 Arg으로 치환한 6H-2xPG3m의 경우 올리고머 형성이 감소됨을 확인하였다(도 16).

또한, 상기 SDS 상의 단량체 및 이량체 부분을 적출하여, 타이로신
5 효소분해 후 추출한 절단 펩타이드들에 대해 LC/MS/MS mass 분석을 수행한 결과, 모두 PG-C3 서열을 함유하는 것을 확인함으로써, 이량체 위치의 밴드도 단백질 G 유도체임을 확인하였다. 또한, 질량 분석에 의한 pM 표지율은 18℃에서 메티오닌을 결핍시키는 경우에 50-70%로 가장 높게 나타남을 확인하였다.

10 <실시예 14> 단백질 G 변이체에 의한 인간 항체(immunoglobulin G, IgG)간의 공유 결합 확인

pM 표지 단백질 G 변이체와 인간 항체간의 공유결합을 확인하기 위하여, SDS-PAGE 분석 및 공유결합 형성능 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 13>에 기재된 방법으로 정제한 6H-2xPG4m 단백질
15 G 변이체 및 항-EGFR 인간단일클론항체(Erbix, Merck, USA) 또는 Fc 분획(abcam, 미국)을 혼합하여 아이스에서 365 nm UV를 30 분간 조사한 후, SDS-PAGE를 수행하여 공유결합 유무를 관찰하였다(도 17).

또한, 상기 <실시예 13>에 기재된 방법으로 정제한 6H-PG3m 또는 6H-PG4m
단백질 G 변이체, 및 항-EGFR 인간단일클론항체 또는 Fc 분획을 혼합하여
20 아이스에서 365 nm UV를 30 분간 조사한 후, SDS-PAGE를 수행하여 공유결합 유무를 관찰하고, Image J 프로그램으로 밴드들의 밀도를 측정하였으며, IgG 중쇄 공유결합률 및 Fc 공유결합률을 계산하였다(도 18):

$\text{IgG 중쇄 공유결합률(\%)} = [\text{H-PG 밀도} / (\text{H-PG 밀도} + \text{H 밀도}) \times 100]$; 및

$\text{Fc 공유결합률} = [\text{Fc-PG 밀도} / (\text{Fc-PG 밀도} + \text{Fc 밀도}) \times 100]$.

25 또한, 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol)의 존재 유무에 따라 상기와 같이 6H-PG3m 또는 6H-PG4m 단백질 G 변이체, 및 Fc 분획 간의 공유결합 유무를 관찰하고, 공유결합률을 계산하였다(도 19).

그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, PG-C3 변이체와 IgG간의 공유결합은 pM 표지 PG-C3 변이체와 IgG 또는 Fc 혼합액에 UV 조사시에만 형성되었으며, 1

개의 단백질 G 분자에 2 개의 IgG 중쇄(heavy chain, H) 또는 Fc 부위가 단백질 G 농도 의존적으로 결합함을 확인함으로써, 단백질 G 변이체는 IgG 중쇄에 특이성을 나타냄을 확인하였다(도 17). 또한, pM 표지 PG-C3과 IgG 또는 Fc 간의 공유 결합 형성은 메티오닌(Met) 치환 수에 비례하여 6H-2xPG1m에 비해 6H-2xPG2m이 공유 결합을 더 잘 형성하였으며, 37번 Arg을 도입한 6H-2xPG3m은 6H-2xPG2m에 비해 유사한 공유 결합능을 나타내었다. 6H-2xPG3m의 35번 위치에 메티오닌을 더 도입한 6H-2xPG4m은 6H-2xPG3m에 비해 가장 높은 공유 결합 형성능을 나타내었다. 6H-2xPG3m 및 6H-2xPG4m등 2개 PG-C3 부위를 갖는 경우에는 1 분자당 2 분자의 IgG 중쇄 및 Fc 부위와도 공유 결합을 하는 것을 확인하였다.

또한, 도 18에 나타난 바와 같이, 1개 PG-C3 부위를 갖는 6H-PG3m 및 6H-PG4m은 1 분자 항체 중쇄와 결합하는 것으로 나타났으며, 자외선 조사에 의한 공유 결합 형성능을 분석한 결과도 예상대로 3 개 메티오닌을 갖는 6H-PG4m이 2개 메티오닌을 갖는 6H-PG3m에 비해 높게 나타남을 확인하였다. 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol) 존재시 pM 표지 6H-PG3m은 $41.5 \pm 1.8\%$, 6H-PG4m은 $53.0 \pm 1.0\%$ 공유결합률로 중쇄와 공유 결합을 형성함을 확인하였다. 또한 pM 표지 6H-PG3m 및 6H-PG4m은 인간 Fc 분획과의 공유 결합을 형성하였으며, 공유결합률은 각각 $35.8 \pm 1.7\%$ 및 $52.1 \pm 1.0\%$ 로 IgG의 중쇄에 대한 결합률과 유사하게 나타남을 확인하였다(도 18).

또한, IgG 1 분자에는 2 분자 단백질 G 결합 부위를 갖고 있으므로, 이중 2-머캅토에탄올(2ME)존재하의 SDS-PAGE에서 50% 단백질 G와 IgG 공유결합 형성 확률은 이론적으로 1개 이상의 Protein G가 IgG와 공유결합 확률이 75%이며, 35%일 경우에는 58%이다. 도 19에 나타난 바와 같이, 6H-PG3m의 경우 35.2%(+2ME) 및 57.4 %(-2ME), 6H-PG4m의 경우 48.2%(+2ME) 및 68.5%(-2ME)의 결합률을 나타냄을 확인하였으며, 따라서 상기 결과는 이론적 계산치에 근접함을 확인하였다(도 19).

<실시예 15> IgG 및 단백질 G의 공유결합에 의한 혈액내 항체의 치환 억제능 확인

단백질 G는 다양한 항체칩 제조에 매우 유용하나 혈액 시료처리시 가역적으로 혈액내 IgG로 치환되는 단점이 있으며, 이들 간의 공유결합은 이를 억제할 수 있다. 따라서, IgG 및 단백질 G의 공유결합에 의한 혈액내 항체의 치환

억제능을 분석하기 위하여, SDS-PAGE, 코마시 염색 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

구체적으로, PBS에 평형시킨 5 mg 인간 IgG(Erbix)에 500 μ g의 바이오틴(biotin)-NHS(N-hydroxysuccinimide)를 1 시간 동안 결합시킨 다음, 투석시켜 바이오틴화된 IgG(bIgG)를 제조하였다. 그 다음, 상기 제조한 bIgG 20 μ g와 10 μ g의 Met 또는 pM 표지된 6H-PG4m을 혼합하고 상기 <실시예 14>와 같이 UV 조사 후 SDS-PAGE를 수행하였다.

그 결과, 제조한 바이오틴화된 IgG 및 pM 표지 6H-PG4m이 자외선 조사 후 공유 결합을 형성함을 확인하였다.

또한, bIgG 20 μ g와 10 μ g의 메티오닌 또는 pM 표지된 6H-PG4m을 30 mM 이미다졸(imidazole) 존재하에서 10 μ l의 Ni-NTA-아가로스 비드(agarose bead, Quiagen, Germany)에 결합시킨 다음, 상기 비드를 세척완충액(20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl 및 30 mM imidazole, pH 7.5)으로 두 번, TBS(20 mM Tris, 150 mM NaCl 및 0.05% Tween 20, pH 7.5)로 두 번 세척한 다음, 인간 혈장(Sigma-Aldrich, USA) 및 2% BSA(bovine serum albumin) 용액을 150 μ l씩 2시간 동안 두 번 처리하였다. 그 후, 상기 비드를 다시 세척완충액 및 TBS로 3 번씩 씻어준 다음, 30 μ l의 용출완충액(20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl 및 150 mM imidazole, pH 7.5)으로 용출하였다. 용출된 bIgG는 SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 분리하고, 코마시에 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie brilliant blue R-250) 염색(도 20, 왼쪽) 또는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고 스트렙타비딘-퍼옥시데이즈(streptavidin-peroxidase)를 이용하여 시각화하였다(도 20, 오른쪽).

그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 코마시 염색에 의하여 전체 단백질 양상을 분석한 결과 IgG의 경쇄(light chain)(bL) 밴드, 및 pM 표지 및 자외선 조사군에서는 혈장 처리에 의한 변화가 미미하였으나 다른 군들에서는 변화가 대부분이 사라졌으며, bIgG의 중쇄(bH) 및 6H-PG4m 결합체(bH-PG)도 혈청 처리에 의하여 거의 감소되지 않음을 확인하였다(도 20, 왼쪽). 또한, 웨스턴블롯팅에 의하여 분석한 양상도 비록 bH 및 bH-PG 밴드들의 신호는 미약하지만, 이와 유사하게 pM 표지 및 자외선 조사군에서는 bL, bH 및 bH-PG 밴드들이 혈청처리에 의하여 영향을 거의 받지 않지만, 나머지 군에서는 혈청 처리에 의하여 단백질 G에 결합된 bIgG가 80%이상 해리되는 양상을 나타냄을 확인하였다(도 20, 오른쪽).

따라서, 상기 결과를 통해 IgG-단백질 G 변이 공유결합체는 혈액시료 분석용 항체칩 등의 개발에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였으며, 이와 더불어 항체 표지 정맥주사용 표적지향적 나노입자 전달체 제조시에도 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

5

<실시예 16> 면역침전법에 의한 IgG 및 단백질 G의 공유결합체의 혈액내 단백질 검출능 분석

단백질 G는 다양한 항체칩 제조에 매우 유용하나 혈액 시료처리시 혈액내 항체에 의해 가역적으로 해리되는 단점이 있어 혈액내 단백질 검출 및 세포 포획에
10 사용할 수 없다. 따라서, pM 표지 단백질 변이체의 혈액내 단백질 검출을 위한 이용 가능성을 확인하기 위하여, 면역침전법(immunoprecipitation)을 수행하였다.

구체적으로, 면역침전을 위하여 10 µg의 pM 표지 6H-PG4m을 Sulfo Link-커플링 레진(coupling resin)(Thermo Sci, 미국) 10 µl에 부착시킨 다음, 2% BSA를 1시간 처리하였다. 다음 레진을 세척완충액으로 3번 씻어준 다음, 20 µg의
15 항 HER2 인간단일클론 항체(Herceptin)를 처리하고, 일부는 365 nm 자외선을 30분 간 조사하여 공유 결합을 유도하였다. 6H-HER2 단백질(Sino Biological Inc, China) 5 µg를 인간혈청 및 2% BSA 100 µl를 섞어준 다음, pM 표지된 6H-PG4m 레진에 1시간 동안 항체와의 결합을 유도하였다. 다음 레진을 세척완충액 200 µl으로 4번 세척하고, 레진의 용액을 충분히 제거한 다음, 1% SDS 용액으로 용출하였다. 용출
20 용액내 HER2의 양은 SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 분리하고, 코마시에 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie brilliant blue R-250) 염색(도 21, 왼쪽) 또는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 이동시키고 항 6xHis 마우스 항체(Abcam, 미국) 및 퍼옥시데이즈 표지 항 마우스-IgG 염소항체 (Life Technologies, 미국)를 이용하여 시각화하였다 (도 21, 오른쪽).

25 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, 전체적으로 면역침전된 6H-HER2는 자외선을 조사한 군에서 인간혈청 처리와 관계없이 면역침전 후 회수율이 20-30%로 높게 나타났으며, 흥미롭게도 인간혈청을 처리한 경우에는 회수율이 40% 가량으로 더 높게 나타남을 확인하였다. 반면, 자외선을 조사하지 않은 군에서는 인간혈청을 처리하지 않은 군에서도 회수율이 10% 미만의 회수율을 나타냈으며, 인간

혈청을 처리한 경우에는 2%미만의 회수율을 나타남을 확인함으로써, 단백질 G에 자외선 조사에 의해 항체를 공유 결합시킨 경우, 혈액내 항원 분석에 매우 유용함을 확인하였다(도 21).

5 <실시예 17> 단백질 G에 항체를 공유결합 시킨 단백질 칩의 혈액내 항원분석능 확인

고배향성 항체가 결합된 단백질 칩의 혈액 시료내 항원 분석시 매우 유용한 도구로 사용될 수 있다. 따라서, 광활성 단백질 G를 슬라이드글라스에 공유 결합시키고 항체를 자외선 조사에 의하여 고배향성을 갖게 고정시켜 혈액 시료내 항원 분석을 수행하였다.

구체적으로, 먼저 항원 검출을 위하여 알데하이드기로 활성화된 슬라이드글라스(CEL Vantage Aldehyde Microarray Slides; Arrayit Co., 미국)에 12 x 8 mm의 6개 웰(well)을 만든 다음 각 웰에 PBS에 용해시킨 50 mM N-(2-아미노에틸)말레이미드 염산염(N-(2-aminoethyl)maleimide hydrochloride)(Tokyo Chemical Ind, 일본)을 100 μ l씩 가하고 1시간 결합시킨 다음, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5를 150 μ l 처리하여 자유 알데히드를 제거하고, TBST(20 mM Tris-HCl, 150 mM 염화 나트륨(sodium chloride), 0.05% Tween 20, pH 7.5)로 세 번 세척하였다. 다음 6H-2xPG4m 및 6H-PG4m을 1 mg/ml 및 0.2 mg 농도로 PBS에 녹이고 10 mM TCEP (Thermo Sci, 미국)를 처리한 다음, 슬라이드글라스 위에 0.5 μ l씩 스팟팅(spotting) 하고, 1시간 동안 설프하이드릴기(sulfhydryl) 특이적으로 고정하고, 다음 100 mM 2-머캅토에탄올(mercaptoethanol)을 2% BSA-TBS 용액 150 μ l를 가하여 자유 말레이드기 및 비특이 단백질 결합을 최소화하였다. 0.1 mg/ml 인간 IgG(Erbix)를 TBS에 용해시키고 웰당 100 μ l씩 가하여 단백질 G와 30분간 결합시킨 다음, 자외선을 30분 조사하여 공유 결합을 이들간의 유도하였다. 대조군으로는 스트렙타비딘(streptavidin)을 PBS에 1 mg/ml 및 0.2 mg/ml 농도로 용해시키고, 0.5 μ l씩 스팟팅하였다. 다음 2% BSA를 100 mM Tris-HCl, pH 7.5에 용해시켜 웰당 150 μ l씩 처리하여 자유 알데히드기 및 비특이 단백질 결합을 제거하였다. 각각의 웰은 TBST로 세 번 세척한 다음 바이오틴화된 인간항-EGFR 항체(Erbix)를 2% BSA-TBS에 10 μ g/ml 농도로 녹인 다음 웰당 100 μ l 가하고 1시간

동안 교반시켜 항체를 고정시킨 후 TBST로 세척하였다. 항원 분석을 위하여, 재조합 EGFR 단백질(Sino Biological Inc, China)을 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)이 들어있는 인간 혈액에 각각 1, 0.05 및 0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 가하고, FITC로 표지된 항 EGFR-rat 항체 (Abcam, 미국)를 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가한 다음, 웰당 100 μl 씩
5 가하고 1 시간 동안 교반시켰다. 각 웰들을 150 mM 이미다졸(imidazole)이 들어 있는 TBS 및 TBST로 순차적으로 세척한 다음 슬라이드글라스 형광스캐너로 Ex488 nm/Em515 nm에서 형광신호를 분석하였다.

그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이, 스트렙타비딘/바이오틴-항체 시스템이나 자외선을 조사하지 않은 pM-표지 6H-2xPG4m/항체 시스템에 비해
10 자외선을 조사한 pM-표지 6H-2xPG4m/항체 시스템에서 적어도 5배 이상 높은 감도를 나타냄을 확인함으로써(도22 가운데), 상기 단백질 G가 바이오 칩 및 센서 개발시 매우 유용함을 확인하였다(도 22).

<실시에 18> 단백질 G에 항체를 공유결합 시킨 단백질 칩의 혈액내 세포 분석시 15 유용성 확인

고배향성 항체가 결합된 단백질 칩의 혈액 시료내 암세포 분석시에도 매우 유용한 도구로 사용될 수 있다. 따라서, 광활성 단백질 G를 슬라이드글라스에 공유 결합시키고 항체를 자외선 조사에 의하여 고배향성을 갖게 고정시켜 혈액 시료내 암세포 분석을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시에 18>에 기재된 방법으로 준비된 단백질 G/항체 슬라이드는 표면에 말레이드기를 도입한 다음, 1 mg/ml 농도의 2xPG4m 용액을 2 μl 스팟팅하고, 1시간 동안 고정시키고, 각 웰들에 항 HER2 또는 EGFR 인간항체를 자외선 조사하거나 하지 않은 상태에서 고정시켰다. 다음 HER2를 발현하는 T67 세포 및 EGFR을 발현하는 A549 세포를 10% FBS 및 10% 인간혈청이 들어있는 DMEM
20 배지 100 μl 에 10,000개 세포를 분산시켜 각 웰들에 넣어준 다음, 매우 느린 속도로 1시간 동안 교반시키었다. 대조군 슬라이드로는 알데하이드 슬라이드에 1 mg/ml 스트렙타비딘을 2 μl 스팟팅하여 준비하였다. 슬라이드에 인간혈청을 처리한 다음, PBS로 세척하였다. 그 다음, 배지 용액에 10,000개 A549 세포 및 바이오틴화된 항-EGFR 인간항체 1.5 μg 를 동시에 가하여 30분 간 섞어준 다음,

스트렙타비딘이 코팅된 웰에 100 μ l씩 분주하고 매우 느린 속도로 1시간 동안 교반시키었다. 모든 웰들을 10% FBS가 들어있는 DMEM 배지에 두번 세척한 다음, 스팟팅한 부위에 붙어 있는 세포를 분석하였다.

- 5 그 결과, 도 23에 나타낸 바와 같이, 자외선을 조사한 6H-2xPG4m/항체 시스템에서 항체특이적인 세포 포획이 spotting한 부위에서 관찰되었으나(도 23), 자외선을 조사하지 않은 6H-2xPG4m/항체 시스템이나 streptavidin/biotin-항체 시스템에서는 항체특이적인 세포 포획이 매우 낮게 나타남을 확인함으로써(결과는 보이지 않음), 광활성 단백질 G 변이체가 혈액내 특정세포 포획을 위하여 매우 유용함을 확인하였다(도 23).

【청구의 범위】**【청구항 1】**

야생형 대장균 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase, MRS)의
아미노산 서열 N-말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌(Ala)이 글리신(glycine)으로,
5 13 번째 위치의 류신(leucine)이 세린(serine)으로, 260 번째 위치의
티로신(tyrosine)이 페닐알라닌(phenylalanine)으로, 297 번째 위치의
이소류신(isoleucine)이 발린(valine)으로 또는 301 번째 위치의
히스티딘(histidine)이 류신으로 치환된 아미노산 서열로 구성된, 표적 단백질에
광메티오닌(photomethionine, pM) 도입을 위한 MRS 변이체.

10

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 야생형 대장균 MRS는 서열번호 1의 아미노산 서열로
구성되는 것을 특징으로 하는 MRS 변이체.

15 **【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 야생형 대장균 MRS는 C-말단이 제거된 것을
특징으로 하는 MRS 변이체.

【청구항 4】

20 야생형 대장균 MRS를 점 돌연변이를 통해 전체 아미노산 서열에서 N-
말단으로부터 12 번째 위치의 알라닌을 글리신으로, 13 번째 위치의 류신을
세린으로, 260 번째 위치의 티로신을 페닐알라닌으로, 297 번째 위치의 이소류신을
발린으로 또는 301 번째 위치의 히스티딘을 류신으로 치환시키는 단계를 포함하는,
표적 단백질에 pM 도입을 위한 MRS 변이체의 제조 방법.

25

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 야생형 대장균 MRS는 서열번호 1의 아미노산 서열로
구성되는 것을 특징으로 하는 MRS 변이체의 제조 방법.

【청구항 6】

제 1항의 MRS 변이체를 포함하는 표적 단백질에 대한 pM 도입용 시약 조성물.

5 【청구항 7】

1) 표적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제 1항의 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

10 2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 표적 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는, 표적 단백질로의 pM 도입 방법.

【청구항 8】

15 단백질 G(protein G)의 첫 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C1, PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C2, PG-C2) 및 세 번째 항체 결합 부위(immunoglobulin G binding region C3, PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민(Gln), 35 번째 위치의 아스파라긴(Asn) 또는 40 번째 위치의
20 아스파르트산(Asp)이 메티오닌(Met)으로 치환되거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴(Asn)이 아르기닌(Arg)으로 치환된 아미노산 서열로 구성된, 단백질 G 변이체.

【청구항 9】

25 제 8항에 있어서, 상기 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1)는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 단백질 G 변이체.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 단백질 G의 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2)는

서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 단백질 G 변이체.

【청구항 11】

제 8항에 있어서, 상기 단백질 G의 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)는
5 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 단백질 G 변이체.

【청구항 12】

제 8항에 있어서, 상기 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두
번째 항체 결합 부위(PG-C2) 또는 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)는 1 개 또는 2
10 개 포함되는 것을 특징으로 하는 단백질 G 변이체.

【청구항 13】

제 8항의 단백질 G 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
15

【청구항 14】

제 13항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

【청구항 15】

20 단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2)
및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의
아미노산 서열 N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민, 35 번째 위치의
아스파라긴 또는 40 번째 위치의 아스파르트산이 메티오닌으로 치환되거나, 또는
37 번째 위치의 아스파라긴이 아르기닌으로 치환된 아미노산 서열로 구성된,
25 광활성을 갖는 pM 도입 단백질 G 변이체.

【청구항 16】

단백질 G의 첫 번째 항체 결합 부위(PG-C1), 두 번째 항체 결합 부위(PG-C2)
및 세 번째 항체 결합 부위(PG-C3)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의

아미노산 서열에서, N-말단으로부터 32 번째 위치의 글루타민, 35 번째 위치의 아스파라긴 또는 40 번째 위치의 아스파르트산을 메티오닌으로 치환시키거나, 또는 37 번째 위치의 아스파라긴을 아르기닌으로 치환시키는 단계를 포함하는, 단백질 G 변이체의 제조 방법.

5

【청구항 17】

1) 제 1항의 MRS 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제 14항의 발현 벡터를 각각 제조하는 단계;

10 2) 상기 단계 1)의 발현 벡터를 동시에 대장균에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 pM이 표지된 단백질 G 변이체를 발현시키는 단계를 포함하는, pM 도입 단백질 G 변이체의 제조 방법.

【청구항 18】

15 제 15항의 pM 도입 단백질 G 변이체에 항체가 결합된 융합 단백질.

【청구항 19】

제 15항의 pM 도입 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 바이오 칩.

20 【청구항 20】

제 15항의 pM 도입 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 바이오 센서.

【청구항 21】

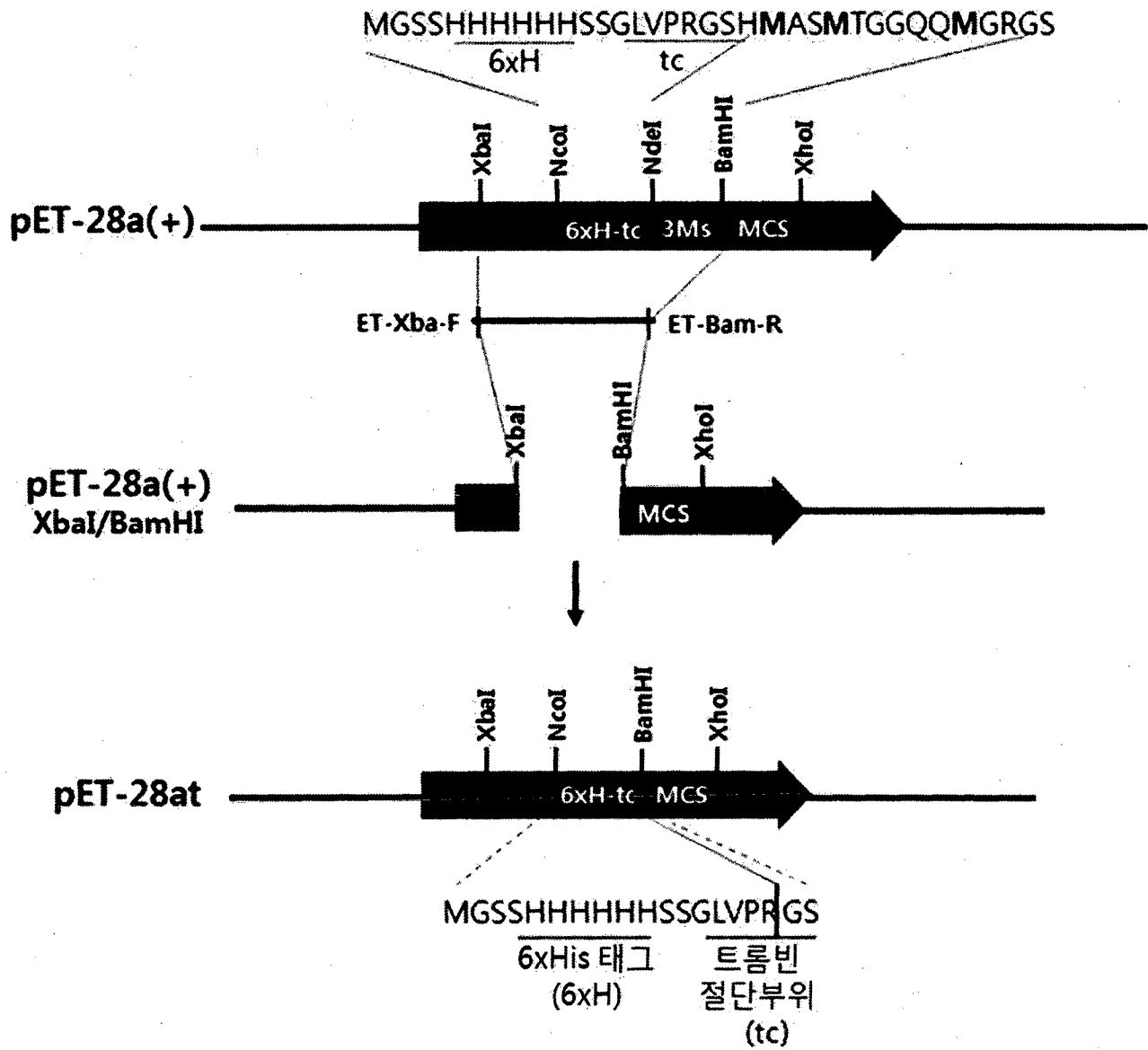
25 제 15항의 pM 도입 단백질 G 변이체에 고배향성 항체가 결합된 세포 포획 시스템.

【청구항 22】

제 15항의 단백질 G 변이체에 결합된 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항체 표지 정맥주사용 나노입자 전달체.

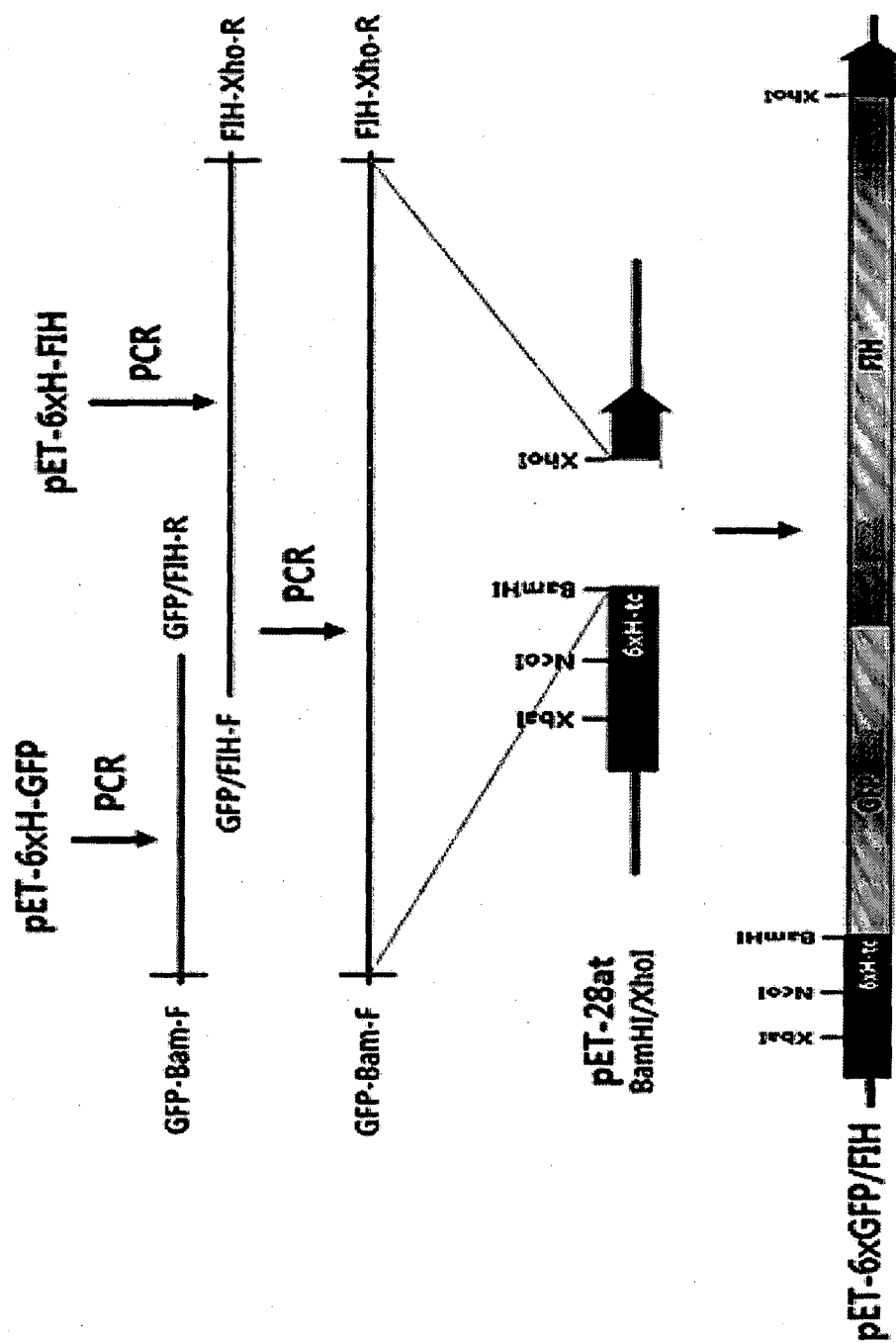
1/22

[도 1]



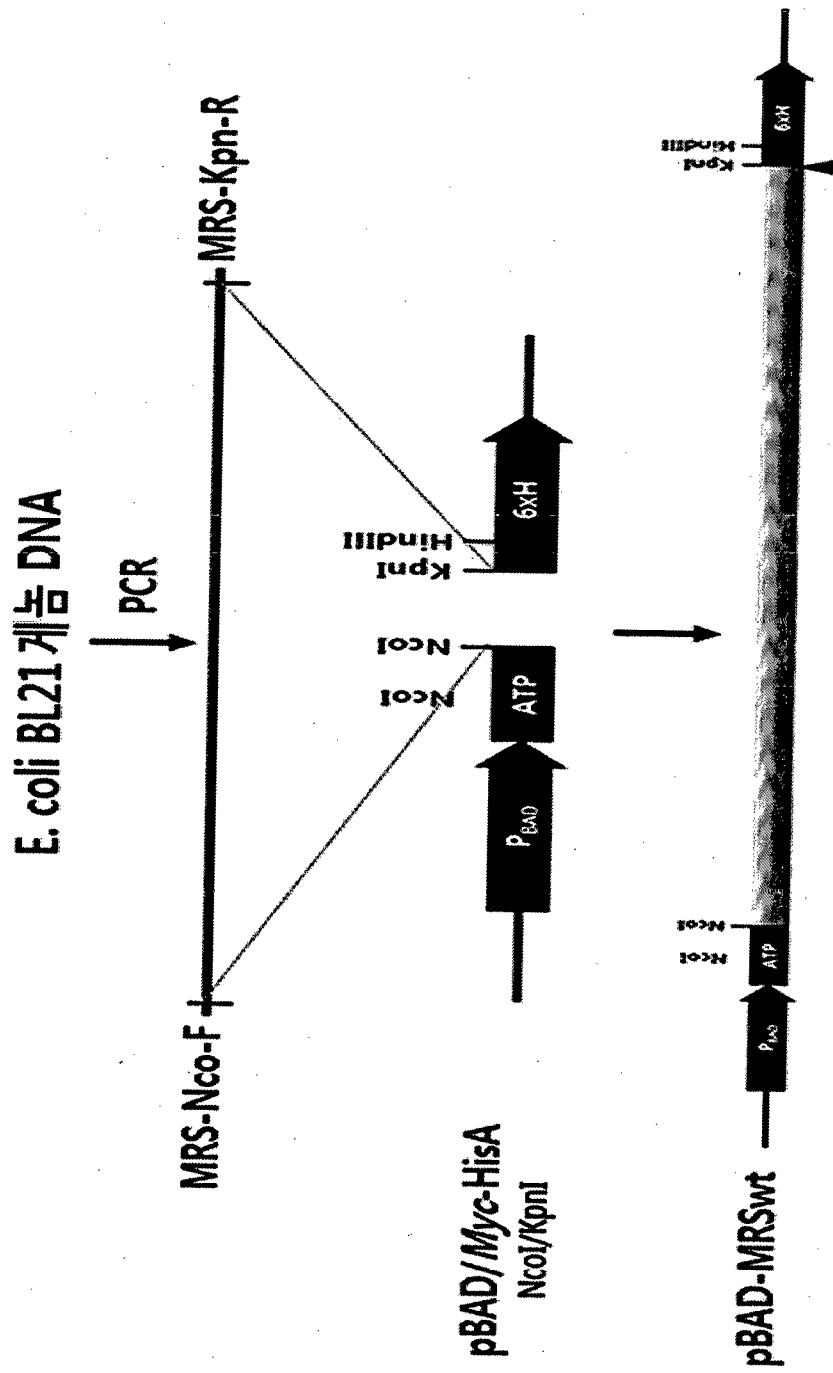
2/22

[도 2]



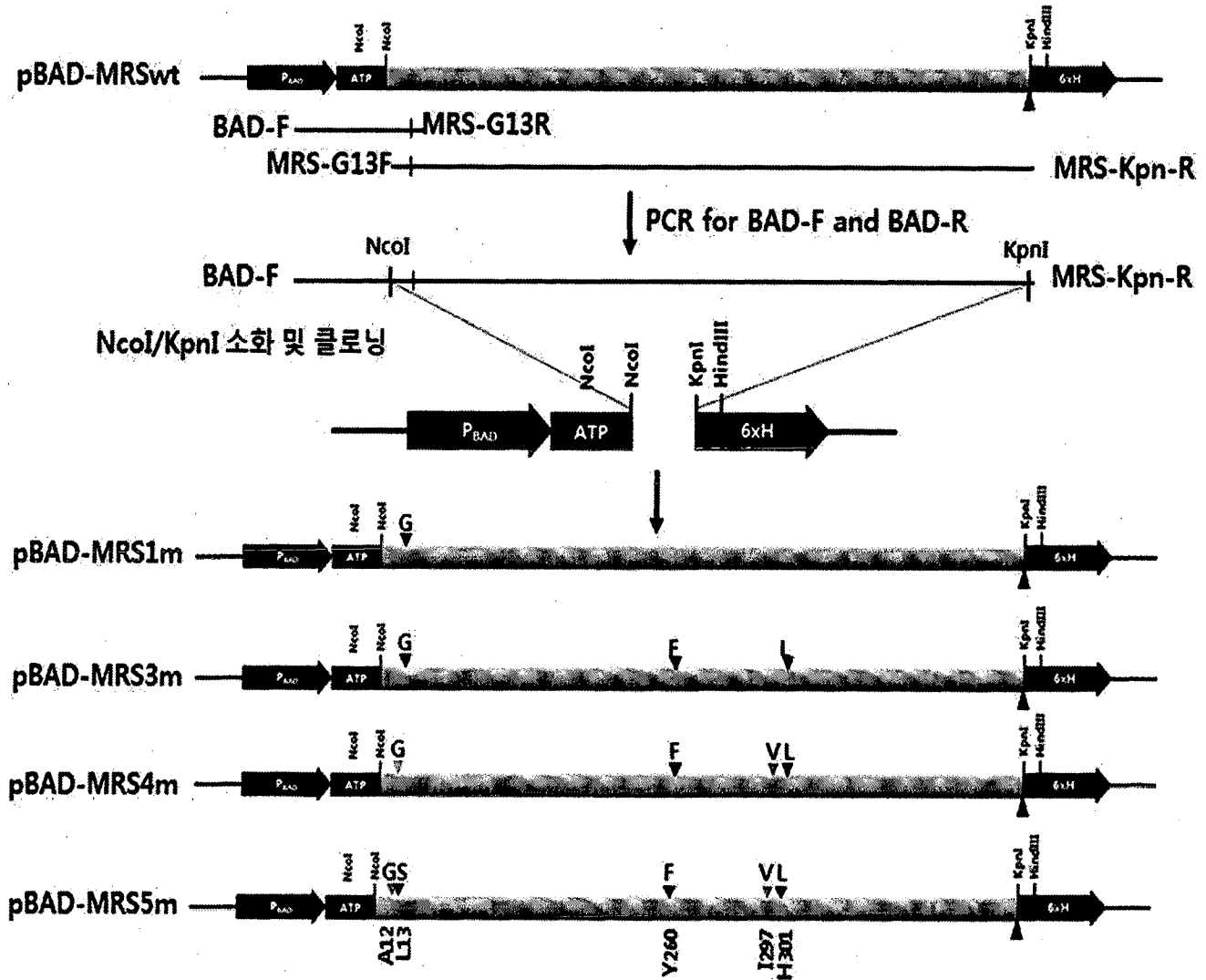
3/22

[도 3]



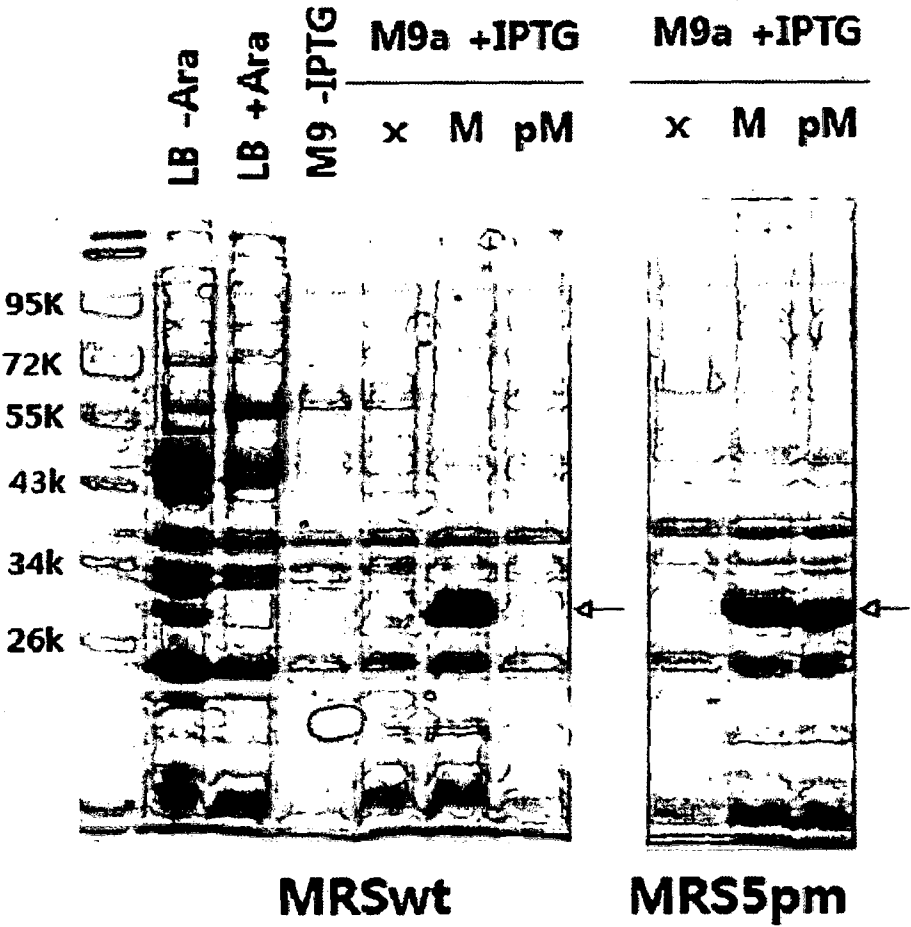
4/22

[도 4]



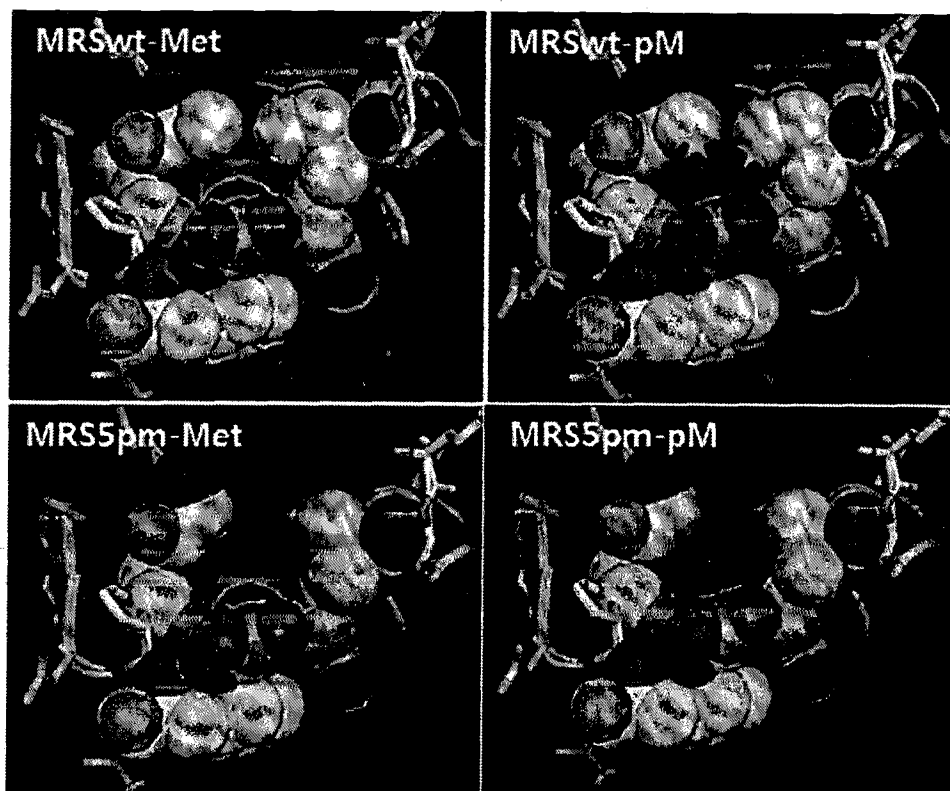
5/22

[도 5]



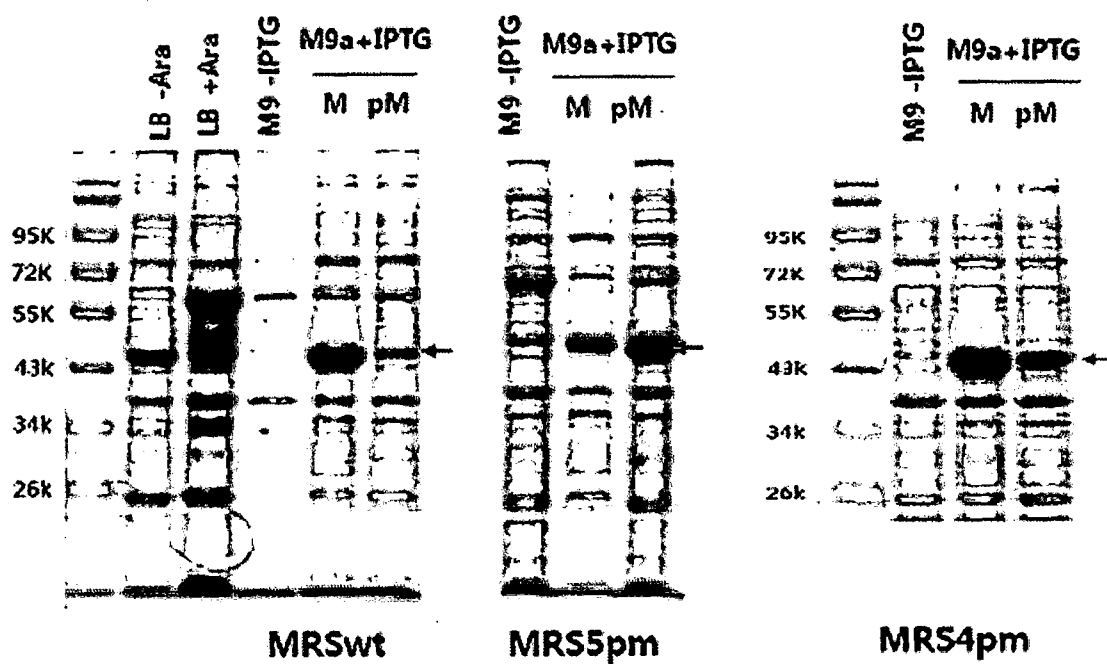
6/22

[도 6]

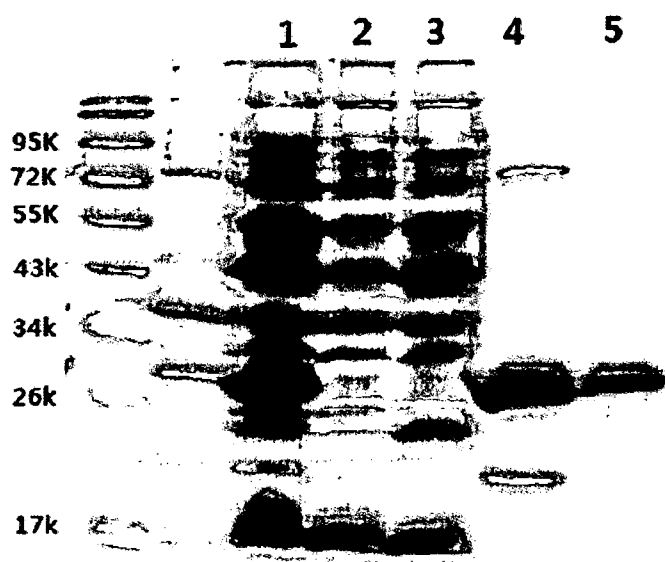


7/22

[도 7]

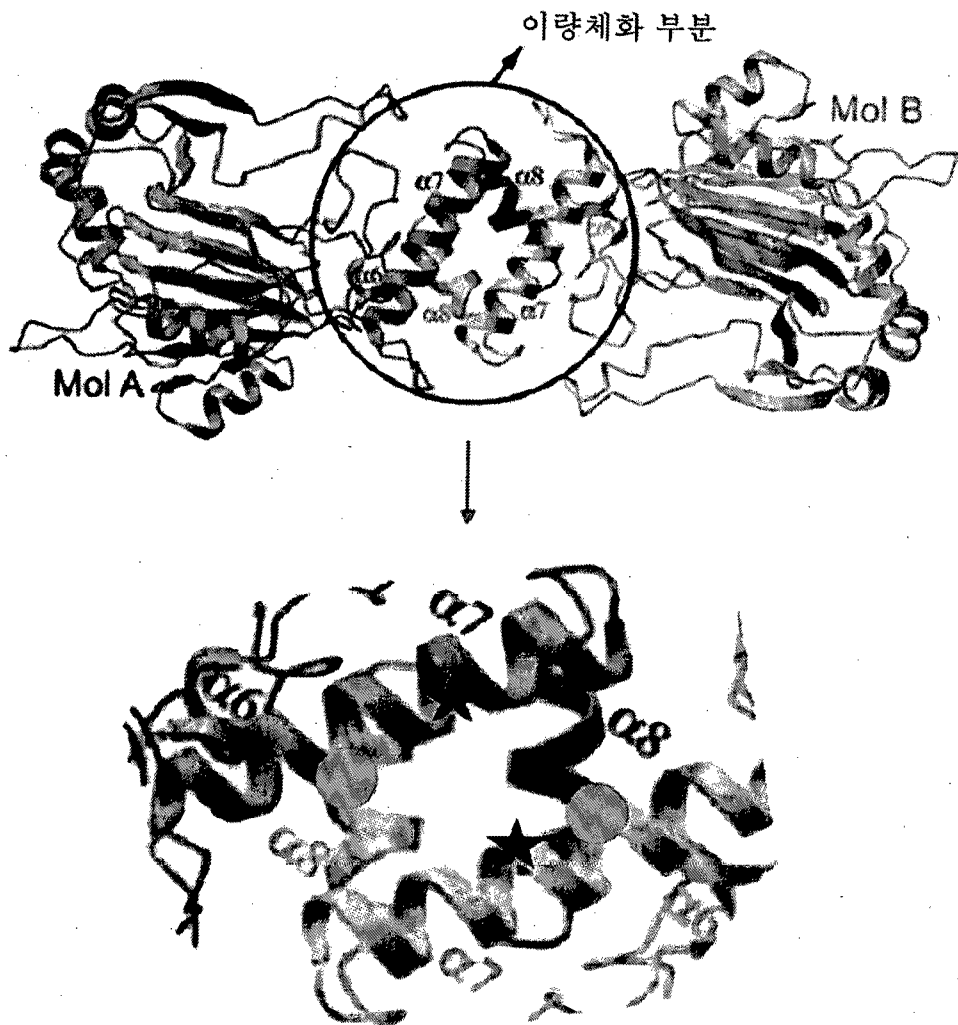


[도 8]



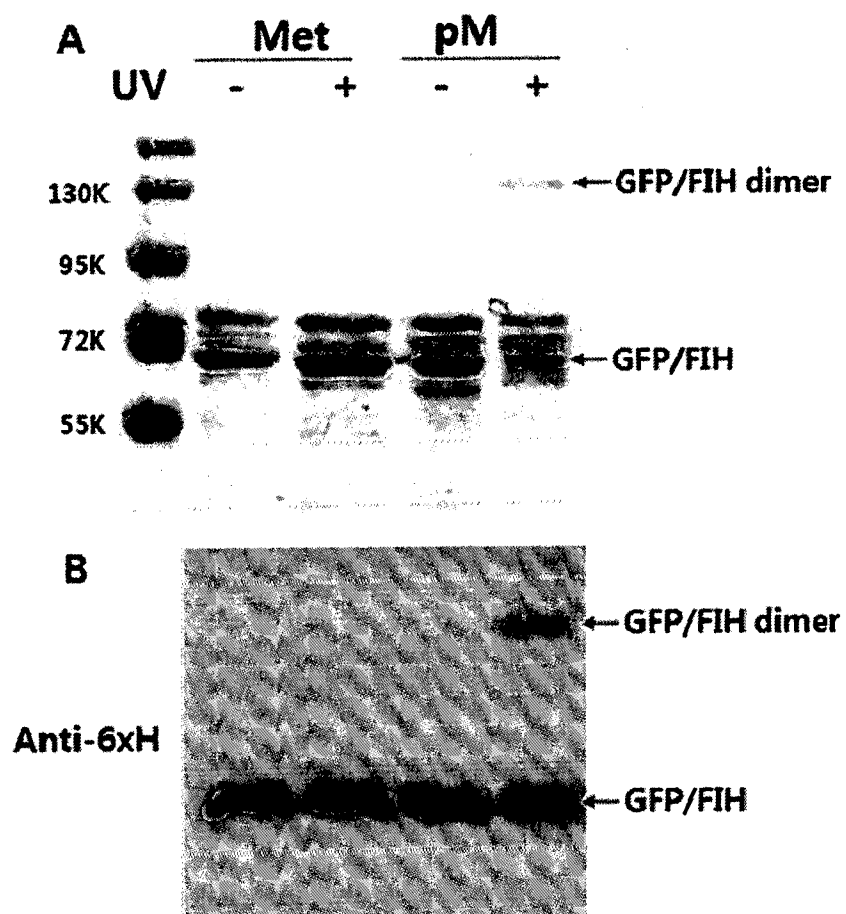
8/22

[도 9]



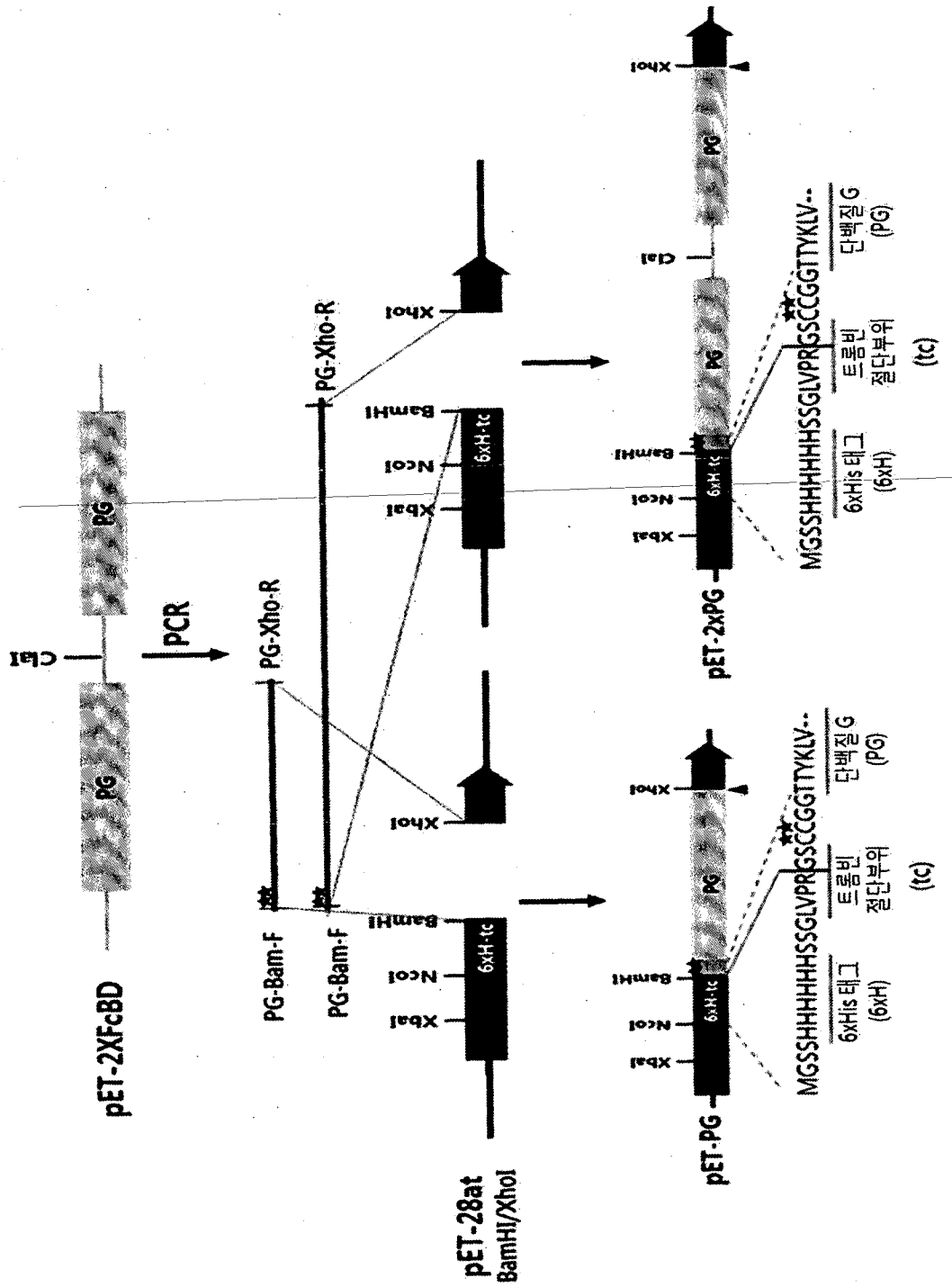
9/22

[도 10]



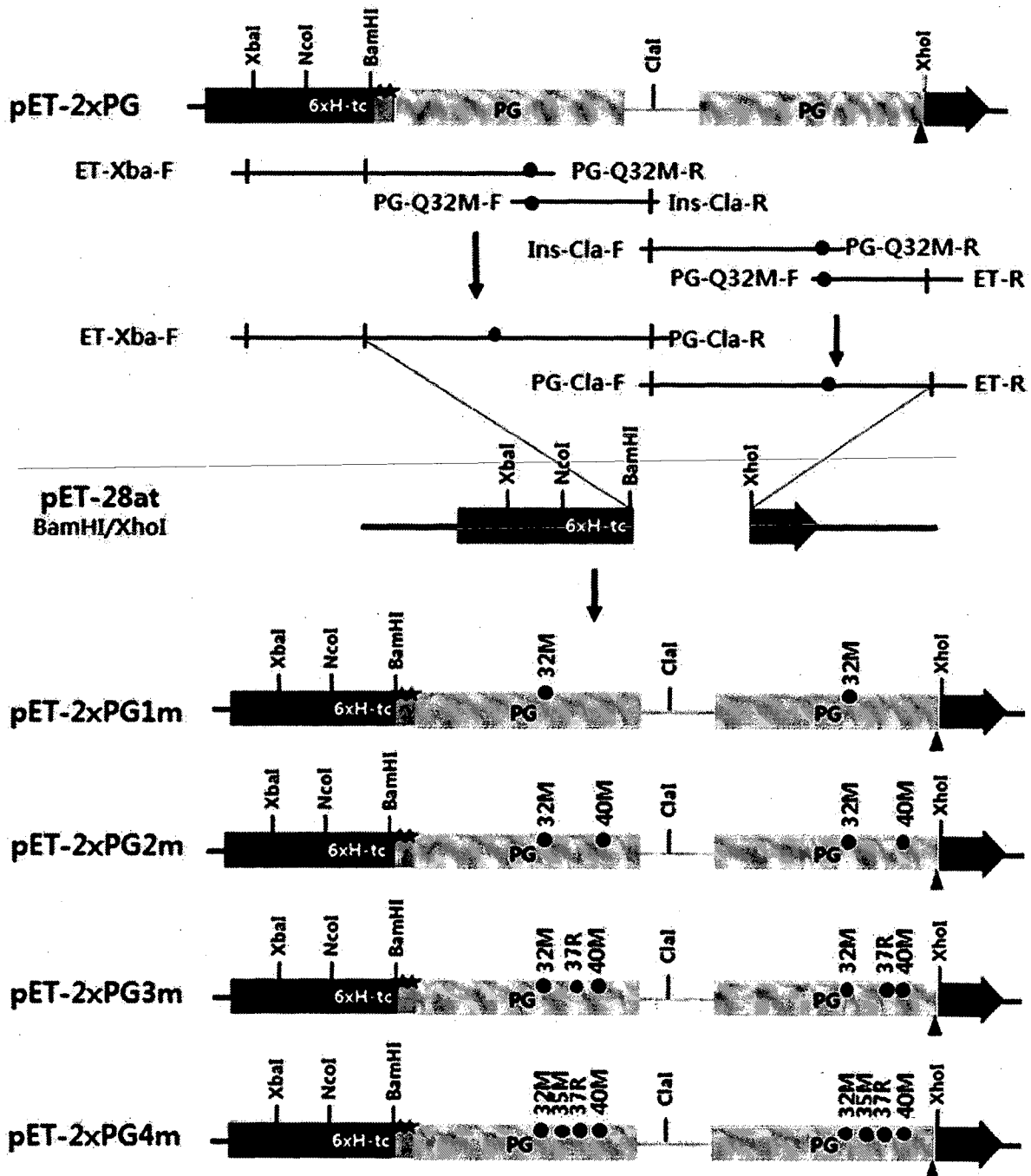
10/22

[도 11]



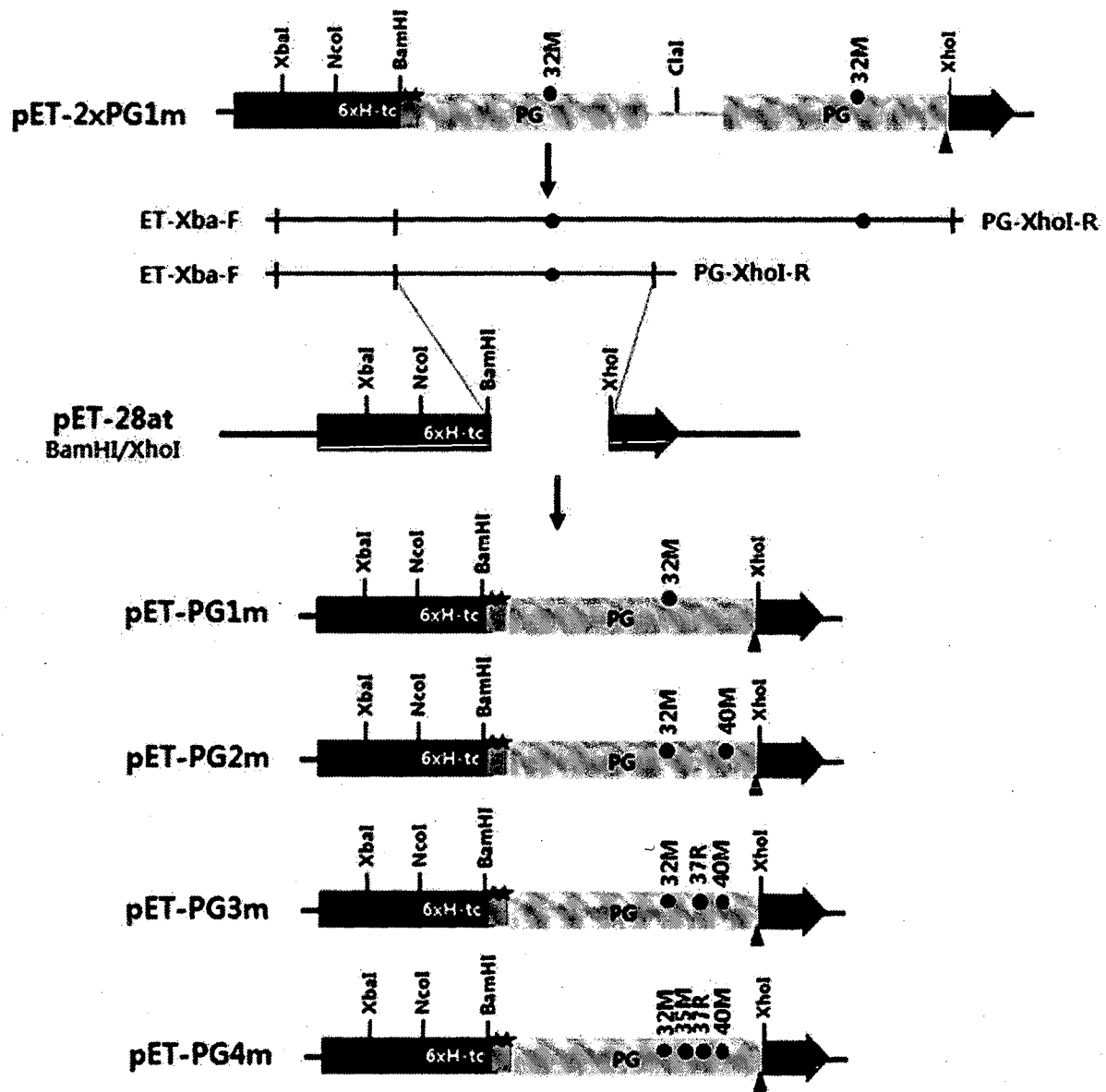
11/22

[도 12]



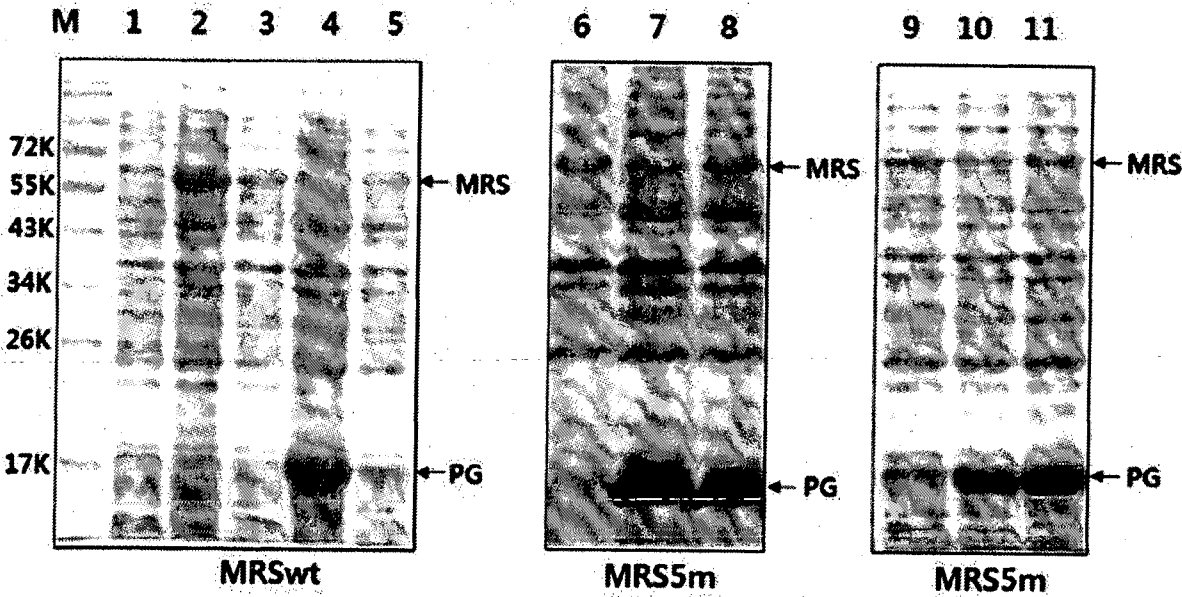
12/22

[도 13]



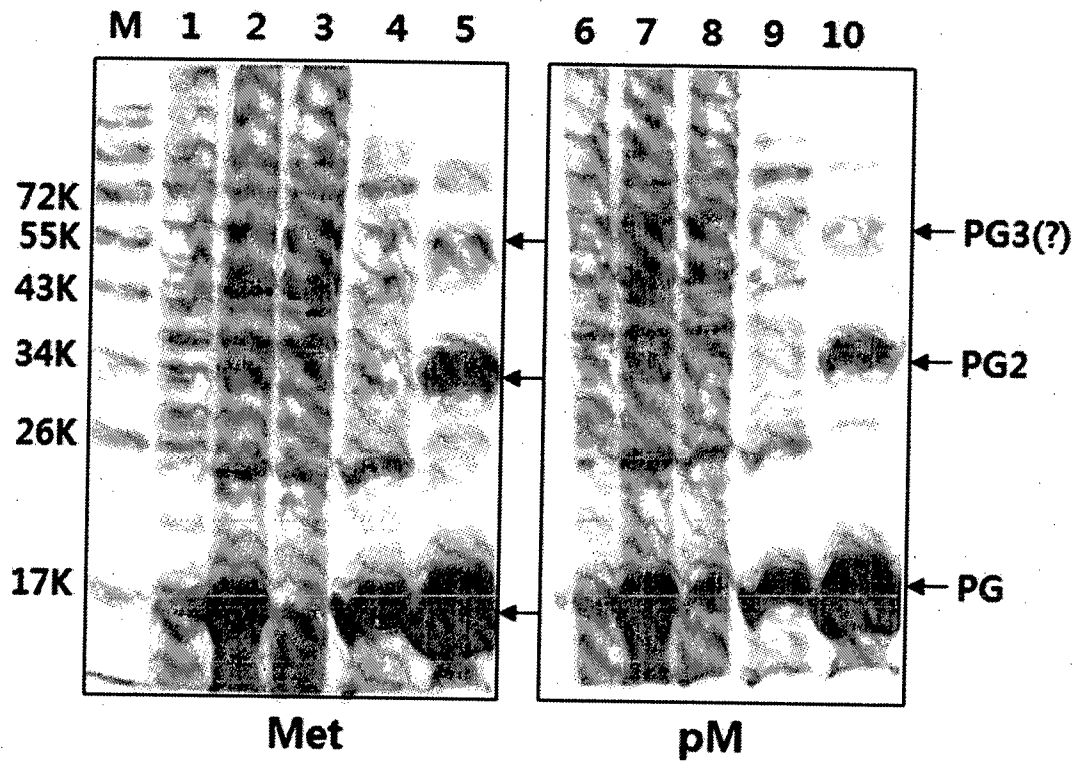
13/22

[도 14]



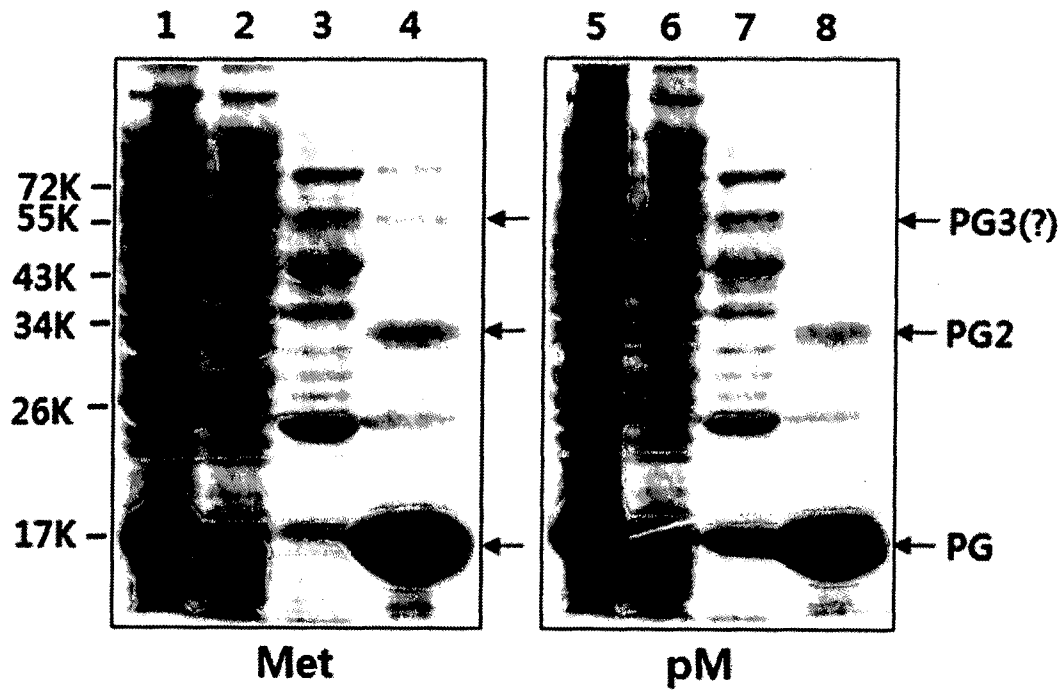
14/22

[도 15]

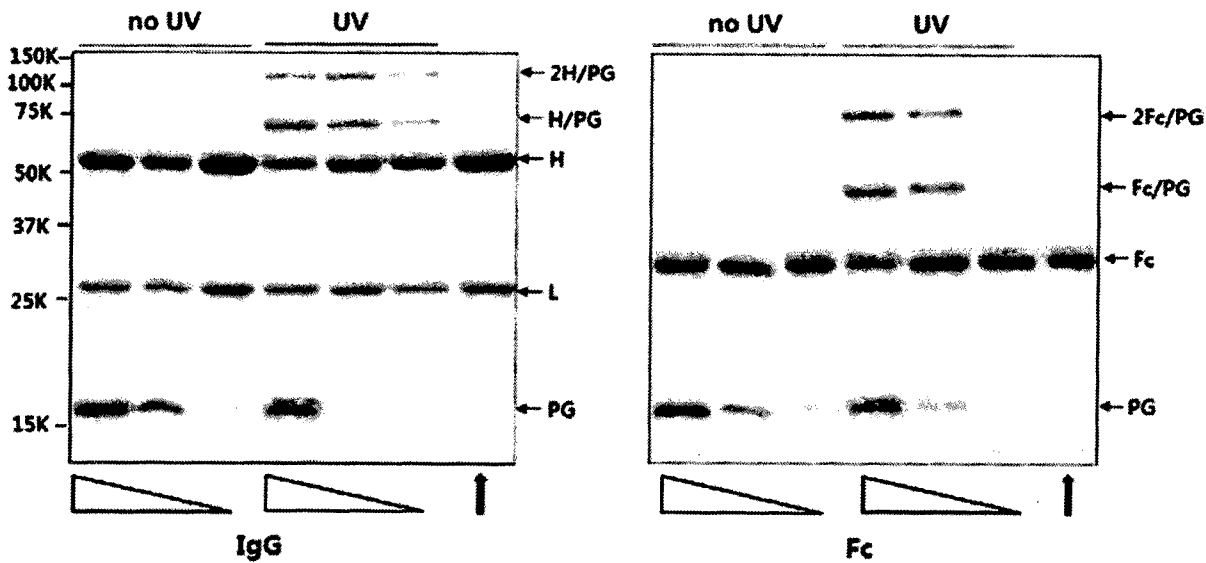


15/22

[도 16]

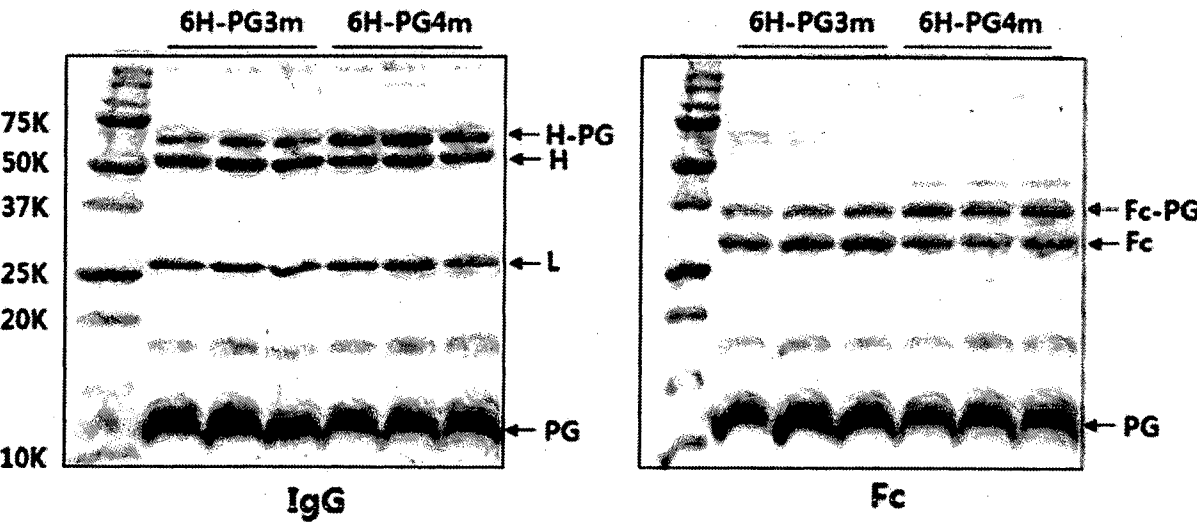


[도 17]



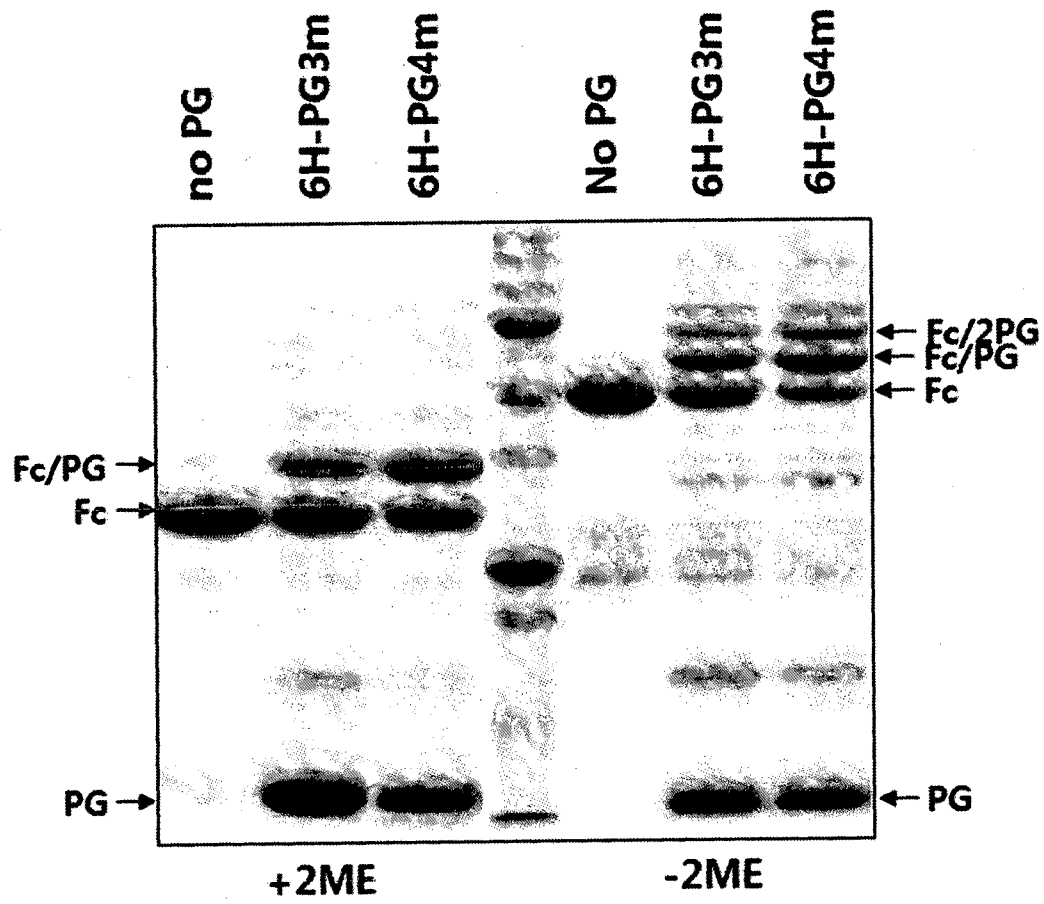
16/22

[도 18]



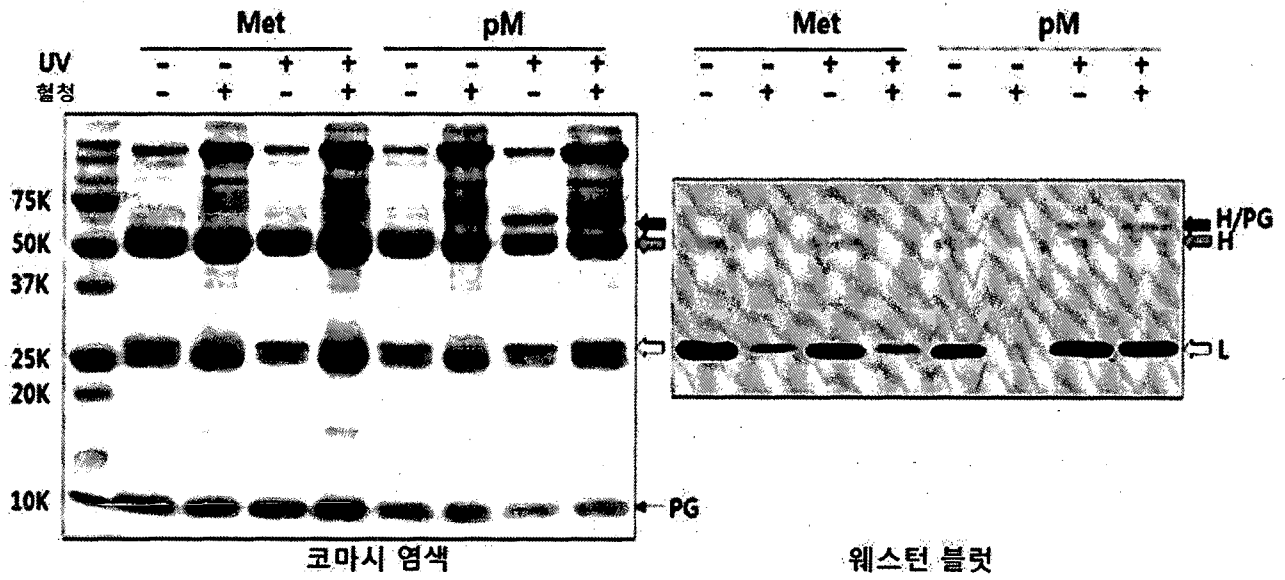
17/22

[도 19]



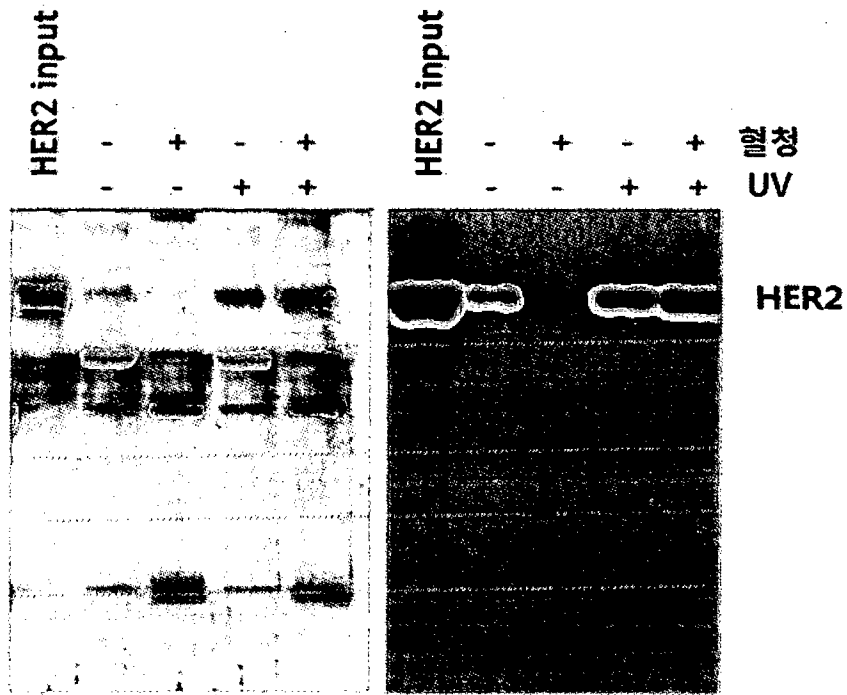
18/22

[도 20]



19/22

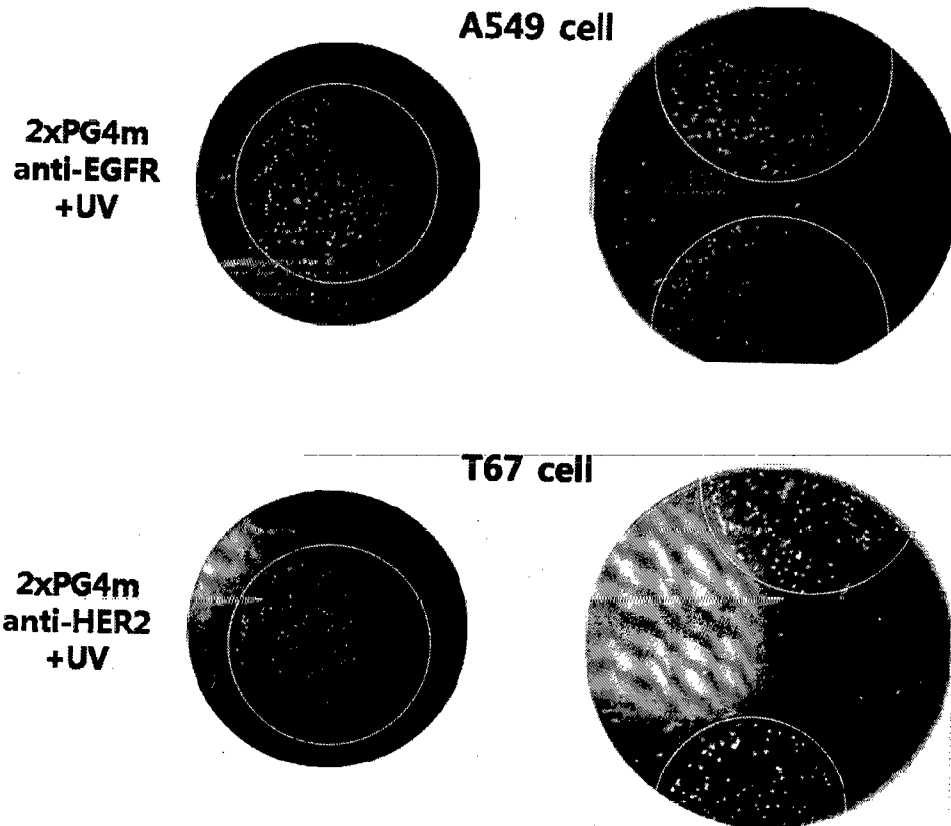
[도 21]



IP: anti-HER2
블롯팅: anti-6xHis

21/22

[도 23]



22/22

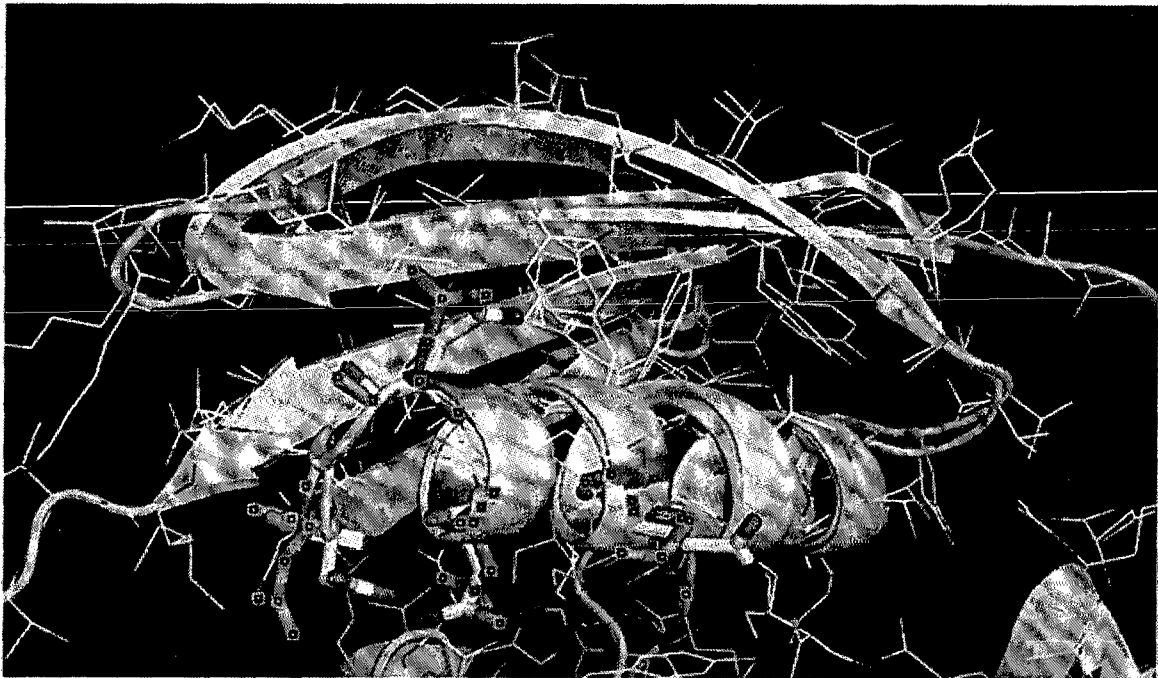
[도 24]

Protein G C1-C3 domains (Olsson et al., Eur J Biochem, 168, 319-24, 1987)

PG-C1: TYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTE

PG-C2: TYKLIVINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFTVTE

PG-C3: TYKLIVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNGVDGVWTYDDATKTFTVTE



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/004803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/00(2006.01)i, C07K 14/47(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/00; C07K 14/00; C12Q 1/68; C07K 14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: methionyl tRNA synthase(methionyl tRNA synthase), substitution, mutant, E.coli (Escherichia coli), photomethioninp, protein G, antibody, biochip

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANRIKULU, I. C. et al., "Discovery of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17 August 2009, vol. 106, no. 36, pp. 15285-15290. See abstract; page 15286, left column; figures 1-2.	1-22
A	SUCHANEK, M. et al., "Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells", Nature Methods, 23 March 2005, vol. 2, no. 4, pp. 261-267. See abstract; pages 261-262; figures 1-2.	1-22
A	CREPIN, T. et al., "Use of analogues of methionine and methionyl adenylate to sample conformational changes during catalysis in Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase", J. Mol. Biol., 05 September 2003, vol. 332, no. 1, pp. 59-72. See abstract; figures 2-6.	1-22
A	KR 10-2008-0000507 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 02 January 2008 See abstract; claims 1-17.	1-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 SEPTEMBER 2014 (22.09.2014)

Date of mailing of the international search report

22 SEPTEMBER 2014 (22.09.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/004803

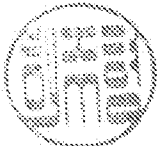
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HINO, N. et al., "Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid", Nature Methods, 17 February 2005, vol. 2, no. 3, pp. 201-206. See abstract; figure 1.	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/004803

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0000507 A	02/01/2008	CN 101506228 A	12/08/2009
		EP 2046816 A1	15/04/2009
		JP 2009-542203 A	03/12/2009
		KR 10-0931027 B1	10/12/2009
		US 2010-0173430 A1	08/07/2010
		US 8541005 B2	24/09/2013
		WO 2008-016221 A1	07/02/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/00(2006.01)i, C07K 14/47(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/00; C07K 14/00; C12Q 1/68; C07K 14/47 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 메티오닐 tRNA 합성효소(methionyl tRNA synthase), 치환, 변이체, 대장균, 광메티오닌, 단백질 G, 항체, 바이오칩		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	TANRIKULU, I. C. 외 4명, `Discovery of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine in vivo`, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009.08.17., 106권, 36호, 15285-15290 페이지. 요약; 페이지 15286, 좌측 칼럼; 도면 1-2 참조.	1-22
A	SUCHANEK, M. 외 2명, `Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells`, Nature Methods, 2005.03.23., 2권, 4호, 261-267 페이지. 요약; 페이지 261-262; 도면 1-2 참조.	1-22
A	CREPIN, T. 외 6명, `Use of analogues of methionine and methionyl adenylate to sample conformational changes during catalysis in Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase`, J. Mol. Biol., 2003.09.05., 332권, 1호, 59-72 페이지. 요약; 도면 2-6 참조.	1-22
A	KR 10-2008-0000507 A (한국생명공학연구원) 2008.01.02 요약; 청구항 1-17 참조.	1-22
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 09월 22일 (22.09.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 09월 22일 (22.09.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HINO, N. 외 5명, `Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid`, Nature Methods, 2005.02.17., 2권, 3호, 201-206 페이지. 요약; 도면 1 참조.	1-22

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0000507 A	2008/01/02	CN 101506228 A	2009/08/12
		EP 2046816 A1	2009/04/15
		JP 2009-542203 A	2009/12/03
		KR 10-0931027 B1	2009/12/10
		US 2010-0173430 A1	2010/07/08
		US 8541005 B2	2013/09/24
		WO 2008-016221 A1	2008/02/07