



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년05월13일  
 (11) 등록번호 10-1385050  
 (24) 등록일자 2014년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/63* (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2010-7000811  
 (22) 출원일자(국제) 2008년06월13일  
 심사청구일자 2013년06월10일  
 (85) 번역문제출일자 2010년01월13일  
 (65) 공개번호 10-2010-0037602  
 (43) 공개일자 2010년04월09일  
 (86) 국제출원번호 PCT/CA2008/001139  
 (87) 국제공개번호 WO 2008/151440  
 국제공개일자 2008년12월18일  
 (30) 우선권주장  
 60/944,344 2007년06월15일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 WO2003007867 A2  
 WO2004065540 A2  
 US7125978 B1

(73) 특허권자  
**메디카고 인코포레이티드**  
 캐나다, 퀘벡 쥐1브이 3브이9, 세인트-포이, 슈트  
 600, 루트드 레그리즈, 1020  
**유니베르시떼 드 루앙**  
 프랑스 세텍스 몽 생 파냥 76821 뒤 토마스 베케  
 트 1  
**상뜨르 나시오날 드 라 리쉴레쉴 샹띠피끄**  
 프랑스, 75794 파리 세텍스 16, 뒤 미셀-앙즈 3  
 (72) 발명자  
**다우스트, 마르크-안드레**  
 캐나다 퀘벡 쥐1엑스 4엔4 퀘벡 뒤 루이즈-피제  
 3925  
**마르케-블뤼, 에스텔르**  
 프랑스 에프-76270 상트-마르틴 로르티에 뒤 도라  
 쥐 26  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**송봉식, 정삼영**

전체 청구항 수 : 총 20 항

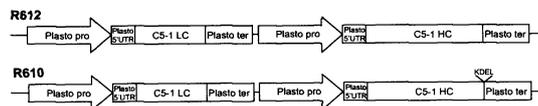
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **식물에서 당단백질 생산의 변형**

**(57) 요약**

식물, 식물의 일부, 또는 식물 세포에서 N-글리코실화 프로파일이 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결된, 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질(GNT1-GalT)을 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결된, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 식물에서 공-발현시키는 단계를 포함한다. 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열이 공-발현되어 식물, 식물의 일부, 또는 식물 세포에서 N-글리코실화 프로파일이 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질이 합성된다.

**대표도**



(72) 발명자

**바르도, 유리엘**

프랑스 에프-76230 상트-마르틴 로르티에 뒤 뒤 보  
브뢰일 67

**부렐, 카롤**

프랑스 에프-76760 보르당빌 그랑 뒤 269

**파이, 로익**

프랑스 에프-76160 상트 자크 쉬 다르네탈 뒤 드  
카나디앙 3056

**르루즈, 페트리스**

프랑스 에프-76530 그랑 쿠론느 뒤 데자이에 그라  
네 10

**베지나, 루이스-필리페**

캐나다 퀘벡 쥐0에이 2알0 너빌 루트 138 206

**고모, 베로니크**

프랑스 에프-76000 루앙 파크 비발디 뒤 차세리브  
르 61

**아퀸, 스테파니**

스위스 체하-1024 에쿠블렌스 아베뉴 뒤 티르 페데  
랄 102

**리후이, 크리스토프**

캐나다 퀘벡 쥐1브이 3브이9 상트 포이 스위트 600  
루트 드 레글리즈 1020 내

**파칼레, 토마스**

캐나다 퀘벡 쥐1알 2씨2 퀘벡 뒤 프레이저 245 아  
파트먼트 106

**소르일레, 크리스토프**

프랑스 에프-94100 상트 마우 드 포제 뒤 뒤 포

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

푸코실화 및 자일로실화가 감소된 관심의 단백질을 합성하는 방법으로서,

제 1 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 식물, 식물의 일부 또는 식물 세포에 도입하는 단계; 및

야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교했을 때 10 % 미만의 푸코실화 및 자일로실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하도록 제 1 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 일시적으로 공-발현시키는 단계

를 포함하고,

제 1 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:18의 아미노산 1-354를 포함하는 하이브리드 단백질을 암호화하고,

하이브리드 단백질은 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제의 세포질 꼬리, 막통과 도메인, 줄기 영역(CTS 도메인)을 포함하고,

제 1 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결되고,

제 2 뉴클레오티드 서열은 관심의 단백질을 암호화하고,

제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 푸코실화 및 자일로실화가 감소된 관심의 단백질을 합성하는 방법.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 제 1 조절 영역은 제 1 플라스토시아닌 프로모터 또는 제 1 35S 프로모터이고, 제 2 조절 영역은 제 2 플라스토시아닌 프로모터 또는 제 2 35S 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 식물에서 활성인 제 3 조절 영역에 작동 가능하게 연결된, 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 식물에서 발현시키는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제 3 항에 있어서, 관심의 단백질은 식물 생량 kg 당 최대 1.5g의 양으로 합성되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제 3 항에 있어서, 제 3 조절 영역은 플라스토시아닌 프로모터 또는 35S 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제 2 항에 있어서, 식물에서 활성인 제 3 조절 영역에 작동 가능하게 연결된, 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 식물에서 발현시키는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제 6 항에 있어서, 제 3 조절 영역은 제 3 플라스토시아닌 프로모터 또는 제 3 35S 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서, 관심의 단백질은 항체 또는 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 조절 영역 2A에 작

동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열 2A, 및 식물에서 활성인 조절 영역 2B에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열 2B를 포함하며, 2A와 2B의 각각에 의해 암호화된 산물을 조합하여 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서, 조절 영역 2A는 플라스토시아닌 프로모터이며, 조절 영역 2B는 플라스토시아닌 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

SEQ ID NO:17(GNT1-GalT)의 뉴클레오티드 1-1062를 포함하는 핵산.

**청구항 12**

서열 SEQ ID NO:18의 아미노산 1-354를 포함하며, 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코나미닐트랜스페라제의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GalT.

**청구항 13**

제 12 항의 하이브리드 단백질을 암호화하는 핵산.

**청구항 14**

제 11 항 또는 제 13 항의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물 세포.

**청구항 15**

제 12 항의 하이브리드 단백질을 포함하는 식물 세포.

**청구항 16**

제 3 항에 있어서, 관심의 단백질은 항체이며, 잎 생량 kg 당 최대 1.5g의 양으로 합성되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 1 항에 있어서, 합성된 관심의 단백질은 푸코실화, 자일로실화 또는 이들 모두를 결여하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 1 항에 있어서, 합성된 관심의 단백질은 야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교했을 때 5% 미만의 푸코실화 및 자일로실화를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 1 항에 있어서, 합성된 관심의 단백질은 야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교했을 때 2% 미만의 푸코실화 및 자일로실화를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제 1 항에 있어서, 제1 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:17(GNT1-GalT)의 뉴클레오티드 1-1062를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 식물에서 당단백질 생산을 변형하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 당단백질 생산이 변형된 식물을 제공한다.

**배경 기술**

- [0002] 면역글로불린(IgG)은 다양한 자연물의 특이적 항원 대응물에 대해 특이적인 친화성을 가진 복잡한 헤테로멀티머 단백질이다. 오늘날 일반화된 IgG-생산 셀라인 분리와 IgG 관련 발전 및 분자 엔지니어링 기술의 출현은 일반적인 생명과학 시장에 그리고 바이오치료제로서의 그들의 발전에 깊은 영향을 미쳤다. 치료용 단클론성 IgG(단클론성 항체, mAb)는 신규 항염제와 항암제의 현 시장을 지배하고 있으며, 개선된 용도나 새로운 용도를 위한 수백 개의 신규 후보들이 현재 연구 임상개발 중이다. mAb에 대한 연간 시장 요구는 수 그램(진단용), 수 킬로그램(항-독소)에서부터 백 또는 수백 킬로그램(바이오-디펜스, 항암, 항감염, 항염증)까지의 범위이다.
- [0003] 상업적 규모에서 CHO 세포 배양물이 여전히 그들의 바람직한 생산 숙주이지만, 이들 배양물에 필요한 시설은 규모의 조정이 쉽지 않고, 이들의 건설 및 유지 비용이 매우 높은데다가 꾸준히 증가하는 추세이며, GMP 하에서 이들의 비준이 여전히 건설 후 3년간의 평균을 요구하기 때문에, mAb의 생명과학 시장에 대한 충분한 영향력을 확보하기 위해서 대안의 생산 시스템이 개발되어야 한다는 것이 일반적으로 인정되고 있다. 초기 개발 단계에서도 만족할만한 수율 및 생산성을 가진 CHO 셀라인의 선별은 비용이 많이 드는 긴 과정으로 남아 있다. 현 세포 배양 시스템의 현재의 재현성, 품질 및 안전성 특징을 만족하면서 업스트림 비용(더 높은 수율, 더 간단한 기술 및 인프라구조)을 줄이고, 리드 타임을 단축하며, 용량 유연성을 증대시킨 새로운 생산 시스템이 모든 개발 단계에서 생명과학 시장을 위한 mAb 및 백신의 개발에 유의미한 영향을 미칠 것 같다.
- [0004] 식물은 생명과학에서 현재 이용되는 mAb 및 몇몇 다른 단백질의 생산에 적합한 숙주이다(Ko and Koprowski 2005; Ma et al., 2005; Yusibov et al., 2006, 최근 리뷰 참조). 안정한 트랜스제닉 식물 계통에서는 200mg/kg 생량(FW)까지의 수율로 mAb가 생산되었고, 일시 발현을 통해서는 20mg/kg FW까지의 비율로 mAb가 생산되었다(Kathuria, 2002). Giritch 등(2006)은 IgG에 대해서 200-300mg/kg 일 중량의 발현 수준을 보고하고 있으며, 여기서 인용된 한 최대량은 멀티-바이러스 기반 일시 발현 시스템의 사용에 의한 500mg/kg이다.
- [0005] 식물과 포유동물의 N-글리코실화 과정은 상이하다. 포유동물 세포에서는 N-글리코실화의 후기 단계에서  $\beta$ -1,4-갈락토오스,  $\alpha$ -1,6-푸코오스(베타-1,4-갈락토오스, 알파-1,6-푸코오스) 및 말단 시알산 잔기가 글리칸 복합체에 추가된다. 그러나, 식물에서는  $\beta$ -1,3-갈락토오스,  $\alpha$ -1,3-푸코오스(베타-1,3-갈락토오스, 알파-1,3-푸코오스),  $\alpha$ -1,4-푸코오스 및  $\beta$ -1,2-자일로오스(알파-1,4-푸코오스 및 베타-1,2-자일로오스) 잔기가 추가된다. 알파-1,3-푸코오스 및  $\beta$ -1,2-자일로오스는 일부 식물 알레르겐의 글리코-에피토프의 구성성분으로서, 이들 잔기는 잠재적으로 면역원성인 것으로 생각되며, 항체를 포함하여 치료용 단백질 상에 이들이 발생하는 것은 바람직하지 않다.
- [0006] Golgi로부터 다시 ER로 펩티드가 확실히 복귀하도록 하기 위해 펩티드의 C-말단에 KDEL 서열을 추가하는 것이 전형적으로 사용된다. 이 접근법은 담배 잎의 아그로-침윤을 사용하여 비-푸코실화 및 비-자일로실화된 항체를 생산하는데 사용되었다(Sriraman et al., 2004). 그러나, 추가된 KDEL 펩티드가 잠재적으로 면역원성이기 때문에 이 접근법은 치료 단백질의 생산에 대해 제한된 응용성을 가진다.
- [0007] 또한, 푸코실트랜스페라제 및 자일로실트랜스페라제의 발현을 변형시킴으로써  $\alpha$ -1,3-푸코오스(알파-1,3-푸코오스) 및  $\beta$ -1,2-자일로오스(베타-1,2-자일로오스)의 부가를 제어할 수 있었다. 이끼(*Physcomitrella patens*; Koprivova et al., 2004) 및 *Arabidopsis thaliana*(Strasser et al., 2004)에서는 글리칸 복합체 상에  $\alpha$ -1,3-푸코오스 및  $\beta$ -1,2-자일로오스를 추가하는 능력을 결여한 돌연변이가 생산되었다. 또한, *Lemna minor*에서는  $\alpha$ -1,3-푸코실트랜스페라제 및  $\beta$ -1,2-자일로실트랜스페라제 유전자에 표적화된 간섭 RNA(RNAi)의 발현에 의해 식물 푸코실트랜스페라제 및 자일로실트랜스페라제 발현의 부분적인 억제가 달성되었다(Cox et al., 2006). 그러나, 이들 효소 활성의 완전한 억제는 몇몇 식물 중에서 유해한 효과를 가지는데, 이것은 이들이 화분형성 및 종자형성과 같은 중요한 발생학적 사건을 방해하기 때문이다. mRNA의 RNAi-유도된 특이적 변성은 시간 경과에 따라 불안정해질 수 있으며, 환경 요인에 민감하다고 보고된 대로 치료제 생산에 사용되는 식물-기반 플랫폼에서 광범위하게 이용될 수 없다.
- [0008] WO 03/078637에는 식물 글리칸 상에 말단  $\beta$ -1,4-갈락토오스(GalT)의 부가를 촉매하는 인간 갈락토실트랜스페라제의 사용이 개시된다. GalT를 발현시키고, 자일로실트랜스페라제의 막통과 도메인과의 융합에 의해 그것의 활성을 시스 Golgi에 표적화한 결과, 말단 갈락토오스가 부가되고 식물 특이적 잔기를 지닌 N-글리칸은 감소하였다(또한, Bakker et al., 2006 참조). 이들 식물을 재조합 IgG를 함유하는 식물과 교배시킨 결과, 푸코오스와 자일로오스를 함유하는 글리칸이 상당히 감소하였지만, 이러한 감소는 가변적이었다.
- [0009] 베타-연결된 만노오스에 베타-1,4-연결된 N-아세틸글루코사민(G1nNAc)을 부착함에 의한 분할된 GlcNAc의 생산은

N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III(GnT-III; EC 2.4.1.144)에 의해 촉매된다. 이 효소를 식물에 도입하는 것이 설명되었으며(Rouwendal et al., 2007), GnT-III를 발현하는 식물은 2개의 GlnAc 잔기를 지닌 분할된 N-글리칸 복합체를 가진 단백질을 포함했다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0010] 본 발명은 식물에서 당단백질 생산을 변형하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 당단백질 생산이 변형된 식물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 목적은 식물에서 당단백질 생산을 변형하는 개선된 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0012] 본 발명은 SEQ ID NO:17(GNT1-GalT; 도 5d)의 뉴클레오티드 1-1077을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 1-1077과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 (A)를 갖는 핵산을 제공하며, 이때 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 결정되고, 상기 뉴클레오티드 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO:14(GalT)의 뉴클레오티드 5-1198을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 5-1198과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 제 1 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 (B)를 갖는 핵산을 제공하며, 이때 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 결정되고, 상기 제 1 핵산 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화하며, 35S 또는 플라스토시아닌 프로모터를 포함하는 제 2 핵산 서열에 제 1 핵산 서열이 작동 가능하게 연결된다.
- [0014] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO:26(GNT1-GnT-III)의 뉴클레오티드 1-1641을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 1-1641과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 (C)를 갖는 핵산을 설명하며, 이때 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 결정되고, 상기 뉴클레오티드 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO:16(GnT-III)의 뉴클레오티드 1-1460을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 1-1460과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 제 1 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 (D)을 갖는 핵산을 설명하며, 이때 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 결정되고, 상기 제 1 핵산 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화하며, 35S 또는 플라스토시아닌 프로모터를 포함하는 제 2 핵산 서열에 제 1 핵산 서열이 작동 가능하게 연결된다.
- [0016] 또한, 상기 설명된 (A), (B), (C) 또는 (D)의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자가 제공된다.
- [0017] 또한, 본 발명은 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제의 CTS 도메인을 포함하고, SEQ ID NO:18의 서열을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GalT에 관한 것이다. SEQ ID NO:18의 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:17에 의해서 암호화될 수 있다. 또한, 상기 설명된 하이브리드 단백질을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자가 제공된다. 또한, 뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:17을 포함하는 핵산을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자가 제공된다.
- [0018] 본 발명은 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제의 CTS 도메인을 포함하고, SEQ ID NO:20의 아미노산 서열을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GnT-III을 포함한다. SEQ ID NO:21의 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:26에 의해서 암호화될 수 있다. 또한, 상기 설명된 하이브리드 단백질을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자가 제공된다. 또한, 뉴클레오티드 서열 SEQ ID NO:26을 포함하는 핵산을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자가 제공된다.
- [0019] 본 발명에 따라서, 식물 또는 식물의 일부에서 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)의 촉매 도메인과 융합된

N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GaIT를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 방법 (1)이 제공되며, 이때 제 1 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결되고, 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0020] 상기 설명된 제 1 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 일시적으로 발현될 수 있거나, 또는 안정하게 발현될 수 있다. 더욱이, 제 1 조절 영역은 아마도 제 1 조직-특이적 프로모터이며, 제 2 조절 영역은 제 2 조직-특이적 프로모터이다. 제 1 및 제 2 조직-특이적 프로모터는 각각 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 관심의 단백질을 합성하는 방법 (2)를 제공한다. 이 방법은 상기 설명된 방법(방법 1)과 같으며, 관심의 단백질이 항체일 수 있다. 관심의 단백질이 항체인 경우, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 조절 영역 2A에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열 2A, 및 식물에서 활성인 조절 영역 2B에 작동 가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열 2B를 포함하며, 2A 및 2B의 각각에 의해 암호화된 산물을 조합하여 항체를 생산한다. 조절 영역 2A는 플라스토시아닌 프로모터일 수 있고, 조절 영역 2B는 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 설명된 방법 (1) 또는 (2)에 있어서, 식물에서 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 방법을 제공하며, 제 3 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 3 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다. 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 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-p10일 수 있다. 제 3 조직-특이적 프로모터는 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

[0023] 본 발명은 식물에서 관심의 단백질의 발현을 추진하는 식물 발현 시스템을 제공하며, 이때 관심의 단백질은 변형된 글리코실화 패턴을 포함한다. 예를 들어, 관심의 단백질은 푸코실화가 감소되거나, 자일로실화가 감소되거나, 또는 푸코실화와 자일로실화가 모두 감소된 N-글리칸을 포함할 수 있다. 또는 달리, 관심의 단백질은 단백질이 푸코실화된 잔기, 자일로실화된 잔기, 또는 푸코실화와 자일로실화가 모두 된 잔기를 결여하고, 증가된 갈락토실화를 나타내는 변형된 글리코실화 패턴을 포함할 수 있다. 더욱이, 말단 갈락토오스가 부가될 수 있으며, 그 결과 야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교하여 관심의 단백질의 푸코실화 및 자일로실화가 감소하거나 제거된다.

[0024] 본 발명은 식물, 식물의 일부, 또는 식물 세포에서 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III(GnT-III)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GnT-III을 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 공-발현시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 공-발현시켜서 N-글리코실화 프로파일이 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는 N-글리코실화 프로파일이 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법 (3)을 제공하며, 이때 제 1 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결되고, 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0025] 상기 방법 (3)에 설명된 제 1 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 일시적으로 발현될 수 있거나, 또는 안정하게 발현될 수 있다. 더욱이, 제 1 조절 영역은 아마도 제 1 조직-특이적 프로모터이며, 제 2 조절 영역은 제 2 조직-특이적 프로모터이다. 제 1 및 제 2 조직-특이적 프로모터는 각각 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

[0026] 또한, 식물, 식물의 일부, 또는 식물 세포에서 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GaIT)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GaIT를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제를 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열, 및 관심의 단백질을 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 공-발현시키는 단계, 및 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 공-발현시켜서 N-글리코실화 프로파일이 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는 N-글리코실화 프로파일이 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법 (4)가 제공되며, 이때 제 1 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결되고, 제 2 뉴클

레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결되며, 제 3 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 3 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0027] 상기 방법 (4)에 설명된 제 1 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 일시적으로 발현될 수 있거나, 또는 안정하게 발현될 수 있다. 더욱이, 제 1 조절 영역은 아마도 제 1 조직-특이적 프로모터이며, 제 2 조절 영역은 제 2 조직-특이적 프로모터이다. 제 1 및 제 2 조직-특이적 프로모터는 각각 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

[0028] 본 발명은 식물, 식물의 일부, 또는 식물 세포에서 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III(GnT-III)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질 GNT1-GnT-III을 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열, 및 관심의 단백질을 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 공-발현시키는 단계, 및 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 공-발현시켜서 N-글리코실화 프로파일의 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는 N-글리코실화 프로파일의 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법 (5)를 설명하며, 이때 제 1 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 1 조절 영역에 작동 가능하게 연결되고, 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결되며, 제 3 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 제 3 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0029] 상기 방법 (5)에 설명된 제 1 뉴클레오티드 서열, 제 2 뉴클레오티드 서열 및 제 3 뉴클레오티드 서열은 식물에서 일시적으로 발현될 수 있거나, 또는 안정하게 발현될 수 있다. 더욱이, 제 1, 제 2 및 제 3 조절 영역은 아마도 조직-특이적 프로모터이다. 예를 들어, 조직-특이적 프로모터는 각각 플라스토시아닌 프로모터일 수 있다.

### 발명의 효과

[0030] 본원에 설명된 방법에 따르면, 과민 반응에 연관되거나, 또는 알레르겐 반응에 연관된다고 알려진 글리칸을 결여한 관심의 단백질이 높은 수율로 생산될 수 있다. 이것은 관심의 단백질과 함께 글리코-조작된 효소를 공-발현시킴으로써 달성되며, 그 결과 야생형 식물에서 생산되는 것에 비해 덜 면역원성인 단백질이 생산된다.

[0031] 본원에 설명된 대로, 일시 발현 시스템을 사용하여 관심의 단백질을 생산하는 간단한 발현 시스템이 사용될 수 있지만, 본 방법은 안정한 형질전환 시스템과 함께 사용될 수도 있다. 따라서, 본 발명은 일시 발현 시스템에만 제한되지는 않는다.

[0032] 일시적 공-발현을 사용함으로써 본원에 설명된 시스템은 긴 생산 시간을 피하고, 엘리트 돌연변이 또는 글리코-조작된 트랜스제닉 계통의 선별 과정과 모 계통으로서 이들을 후속 사용하는 것(예를 들어, Bakker, 2005에 설명된 것)을 피할 수 있다. 또한, 돌연변이 또는 글리코-조작된 식물에서 흔히 부딪히는 생산성, 화분생성, 종자형성(Bakker et al., 2005) 및 생육성(Boisson et al., 2005)에 관한 수반되는 문제들을 피할 수 있다. 본원에 설명된 대로, 관심의 단백질과 변형 키메라 인간 갈락토실트랜스페라제의 공-발현은 생산 동력학이나 수율에는 영향을 미치지 않는다.

[0033] 본원에 설명된 일시 발현 시스템은 잎 생량 kg 당 1.5g의 고 품질 항체에 달하는 발현 수준을 산출하며, 이것은 멀티-바이러스 기반 시스템 및 트랜스제닉 식물을 포함하는 다른 발현 시스템을 사용한 식물에서 항체에 관해 보고된 추적 수준을 초과하는 것이다.

[0034] 또한, 본원에 설명된 접근법, 예를 들어 GalT 또는 GalT-GNT1의 발현을 포함하는 접근법은 안정하게 형질전환된 식물에서도 사용될 수 있다. 상기 설명된 많은 이점들을 나타내는 한 본 발명은 일시 발현 시스템에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 개요가 반드시 본 발명의 모든 특징을 설명하는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 본 발명의 이들 특징 및 다른 특징이 첨부된 도면을 참조하여 하기 설명으로부터 더욱 분명해질 것이다.

도 1a는 C5-1 발현을 위해 조립된 플라스토시아닌-기반 카세트를 도시한다. R610은 C5-1 LC와 C5-1 HC-KDEL을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, R612는 C5-1 LC와 C5-1 HC를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. C5-1 LC: C5-1 경쇄 암호화 서열; C5-1 HC: C5-1 중쇄 암호화 서열. 도 1b는 플라스토시아닌 프로모터 및 5'UTR(SEQ ID NO:23)에 대한 뉴클레오티드 서열을 도시하며, 전사 시작 부위는 볼드체로 표시하고, 번역 시

작 코돈은 밑줄로 표시한다. 도 1c는 플라스토시아닌 3' UTR 및 터미네이터(SEQ ID NO:24)에 대한 뉴클레오티드 서열을 도시하며, 종결 코돈을 밑줄로 표시한다.

도 2는 침묵화 억제인자 HcPro와 공-발현된 또는 공-발현되지 않은 R610 및 R612(플라스토시아닌 기반 발현 카세트)로 침윤된 *Nicotiana benthamiana*의 잎에서 C5-1 항체의 축적을 도시한다. 나타난 값은 3개 식물에 대한 6개 측정치(주사기) 또는 약 12개 식물(250g)의 각 침윤 배치에 대한 6개 측정치로부터 얻어진 평균 측정 수준 및 표준편차에 해당한다.

도 3은 주사기- 및 진공-침윤된 식물의 추출물에 축적된 C5-1의 단백질 블롯 분석을 도시한다. 도 3a는 R612(분비, 라인 1) 또는 R610(ER-보유, 라인 2)로 침윤된 식물로부터의 추출물에 대한 퍼옥시다제-콘주게이트 염소-항 마우스 IgG(H+L)를 사용한 면역블롯팅을 도시한다. C1: 시판 뮤린 IgG1(Sigma M9269) 100ng, 전기영동 이동도에 대한 대조군으로 로딩; C2: 의사-침윤된 바이오매스(빈 벡터)로부터 추출된 총 단백질 12 µg; C3: 의사-침윤된 바이오매스(빈 벡터)로부터 추출된 총 단백질 12 µg에 스파이크된 시판 뮤린 IgG1(Sigma M9269) 100ng. 도 3b는 R612(분비, 라인 1) 또는 R610(ER-보유, 라인 2)로 침윤된 식물로부터의 추출물에 대한 퍼옥시다제-콘주게이트 인간 IgG1을 사용한 활성 면역블롯팅을 도시한다. C1: 하이브리도마로부터 정제된 대조군 C5-1 2 µg(Khoudi et al., 1997); C2: 의사-침윤된 바이오매스(빈 벡터)로부터 추출된 총 단백질 75 µg.

도 4는 R612(분비, 라인 1) 또는 R610(ER-보유, 라인 2)로 침윤된 식물로부터 정제된 항체의 분석을 도시한다. 도 4a는 비-환원 조건에서 수행된 조 추출물 및 정제된 항체의 SDS-PAGE를 도시한다. 도 4b는 환원 조건에서 수행된 정제된 항체의 SDS-PAGE를 도시한다. 도 4c는 퍼옥시다제-콘주게이트 인간 IgG1을 사용하여 수행된 정제된 항체의 활성 면역블롯팅을 도시한다. 도 4d는 상이한 침윤 배치로부터 6개 로트의 정제된 C5-1 중의 오염물의 비교를 도시한다. C: 시판 뮤린 IgG1 (Sigma M9269) 2.5 µg, 전기영동 이동도에 대한 대조군으로 로딩.

도 5a는 갈락토실트랜스페라제 발현의 네이티브(R622) 및 하이브리드(R621) 버전을 위한 조립된 카세트의 예를 대표하여 도시한다. GNTI-CTS: N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 I의 CTS 도메인; GalT-Cat: 인간 β-1,4-갈락토실트랜스페라제의 촉매 도메인; GalT(R622의): 인간 β-1,4-갈락토실트랜스페라제. 도 5b는 GalT (UDP-Gal: 베타GlcNac 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 폴리펩티드 1, 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 I)에 대한 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:14)을 도시하며, ATG 시작 부위는 밑줄로 표시하고, 막통과 도메인은 이탤릭체와 밑줄로 표시하며, 볼드체의 서열은 인간 베타-1,4-GalT의 촉매 도메인에 해당하고, FLAG 에피토프는 이탤릭체로 표시한다. 도 5c는 GalT(UDP-Gal: 베타GlcNac 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 폴리펩티드 1, 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제 I)에 대한 아미노산 서열(SEQ ID NO:15)을 도시한다. 막통과 도메인은 밑줄과 이탤릭체로 표시하며, 볼드체의 서열은 인간 베타-1,4-GalT의 촉매 도메인에 해당하고, FLAG 에피토프는 이탤릭체로 표시한다.

도 5d는 GNTIGalT의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:17)을 도시하며, ATG 시작 부위는 밑줄로 표시하고, 막통과 도메인(CTS)은 밑줄과 이탤릭체로 표시하며, 볼드체의 서열은 인간 베타-1,4-GalT의 촉매 도메인에 해당하고, FLAG 에피토프는 이탤릭체로 표시한다. 도 5e는 GNTIGalT의 아미노산 서열(SEQ ID NO:18)을 도시하며, 막통과 도메인(CTS)은 밑줄과 이탤릭체로 표시하고, 볼드체의 서열은 인간 베타-1,4-GalT의 촉매 도메인에 해당하고, FLAG 에피토프는 이탤릭체로 표시한다. 도 5f는 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1; SEQ ID NO:21)의 CTS 도메인(세포질 꼬리, 막통과 도메인, 줄기 영역)의 뉴클레오티드 서열을 도시한다. 도 5g는 CTS의 아미노산(SEQ ID NO:22)을 도시한다. 도 5h는 GntI-GntIII의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:26)을 도시한다. 도 5i는 GntI-GntIII의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 20)을 도시한다. 도 5j는 GntIII의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:16)을 도시한다. 도 5k는 GntIII의 아미노산 서열(SEQ ID NO:19)를 도시한다.

도 6은 단백질에 대한 염색, 또는 웨스턴 분석에서 C5-1을 발현하는 식물로부터 얻어진 추출물의 프로파일을 도시한다. 맨 위 패널은 코마시 염색된 PAGE 겔을 도시한다. 위에서 두 번째 패널은 β-1,4-갈락토오스와 특이적으로 결합하는 *Erythrina cristagali* 응집소(ECA)를 사용한 친화성 검출을 도시한다. 위에서 세 번째 패널은 항-α-1,3-푸코오스 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. 맨 아래 패널은 항-β-1,2-자일로오스 특이적 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 도시한다. R612: C5-1 단독 발현; R612 + R622: GalT와 C5-1 공-발현(공-침윤); R612 + R621: GNT1-GalT와 C5-1 공-발현.

도 7은 일련의 구성물로 주사기-침윤된 *Nicotiana benthamiana* 식물로부터 분리된 C5-1의 트립신에 의한 글리코펩티드 EEQFNSTFR(SEQ ID NO:13)의 N-글리코실화를 측정하기 위한 MALDI-TOF 질량 분광분석을 도시한다. 글리코펩티드의 N-글리코실화는 예비 HPLC에서의 분리 후에 측정되었다. 진공 침윤 후에도 유사한 결과가 얻어졌다. 도 7a는 R612(C5-1; 도 1 참조)의 발현 후 트립신에 의한 글리코펩티드의 MALDI-TOF 질량 분광분석을 도시한다. 도 7b는 네이티브 GalT(R622, 도 5 참조)와 함께 C5-1(R612, 도 1 참조)을 발현시킨 후 트립신에

의한 글리코펩티드의 MALDI-TOF 질량 분광분석을 도시한다. 도 7c는 GNTIGa1T(R621, 도 5 참조)와 함께 C5-1(R612, 도 1 참조)을 발현시킨 후 트립신에 의한 글리코펩티드의 MALDI-TOF 질량 분광분석을 도시한다. 도 7c의 삽입부는 이 스펙트럼의 m/z 2650-2800를 확대한 것에 해당하며, R612 식물(화살표)에서 검출된 주 복합체 이온 J이 부재함을 나타낸다. A: GlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; B: Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; C: GalGlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; D: GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; E: Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; F: GalGlcNAcMan<sub>3</sub>(Xy1)GlcNAc<sub>2</sub>; G: GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; H: GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>(Fuc)GlcNAc<sub>2</sub>; I: Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; J: GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>(Xy1)(Fuc)GlcNAc<sub>2</sub>; K: GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; L: Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; M: Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0037] 본 발명은 식물에서 당단백질 생산을 변형하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 당단백질 생산이 변형된 식물을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 식물에서 관심의 단백질의 발현을 추진하기 위한 식물 발현 시스템을 설명한다. 설명된 발현 시스템을 사용함으로써 변형된 글리코실화 패턴을 포함하는 관심의 단백질, 예를 들어 푸코실화가 감소되거나, 자일로실화가 감소되거나, 또는 푸코실화와 자일로실화가 모두 감소된 N-글리칸을 가진 관심의 단백질이 얻어질 수 있다. 또는 달리, 단백질이 푸코실화, 자일로실화 또는 이들 모두를 결여하고, 증가된 갈락토실화를 포함하는 변형된 글리코실화 패턴을 포함하는 관심의 단백질이 얻어질 수 있다. 더욱이, 본원에 설명된 대로, 번역-후 변형의 조정, 예를 들어 말단 갈락토오스의 부가는 발현된 관심의 단백질의 푸코실화 및 자일로실화의 감소를 가져오는데, 예를 들어 관심의 단백질은, 야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교하여, 10% 미만의 푸코실화 및 자일로실화(즉, N-글리칸 잔기의 10% 미만이 푸코실화 및 자일로실화된다), 또는 5% 미만의 푸코실화 및 자일로실화(즉, N-글리칸 잔기의 5% 미만이 푸코실화 및 자일로실화된다), 1% 미만의 푸코실화 및 자일로실화(즉, N-글리칸 잔기의 1% 미만이 푸코실화 및 자일로실화된다)를 포함할 수 있거나, N-글리칸 잔기의 약 0.1 내지 약 2%가 푸코실화 및 자일로실화되거나, N-글리칸 잔기의 약 0.5 내지 약 1.5%가 푸코실화 및 자일로실화되거나, 또는 N-글리칸 잔기의 약 0.7 내지 약 1.0%가 푸코실화 및 자일로실화된다. 따라서, 과민 반응을 유발하거나 알레르겐 반응에 관련될 수 있는 글리칸을 결여하는 관심의 단백질이 높은 수율로 생산될 수 있으며, 이 단백질은
- [0039] 발현될 수 있는 관심의 단백질의 비제한적 예는 항체와 같은 단백질 복합체를 포함한다. 아그로-침윤된 식물, 예를 들어 *Nicotiana benthamiana*에서 이러한 단백질 복합체의 발현은 1.5g/kg FW(대략 25% TSP)에 달하는 단백질 수준을 생산했다. 관심의 단백질의 분비된 형태 및 ER-보유된 형태에 대해서는 각각 558 및 757 mg/kg/FW의 평균 수준이 달성되었다. 제공된 비제한적 예에서, 이 발현 수준은 멀티-바이러스 일시 발현 시스템(Giritch et al., 2006)을 사용하여 생산된 항체에서보다 3배 높은 발현 수준으로 항체에 대해 얻어졌다.
- [0040] 식물과 전형적인 포유동물의 N-글리코실화의 차이가 가진 영향이 치료제 생산에 식물을 사용하는 개념을 둘러싼 주된 관심이었다. 식물-특이적 글리칸의 발생은 혈류에서 식물-제조 단백질의 반감기를 단축하는데 기여하거나, 또는 이러한 글리칸은 환자에서 과민 반응을 유발할 수 있다.
- [0041] 식물에서 제조된 당단백질 상의 코어 α-1,3-푸코오스 및 β-1,2-자일로오스의 존재는 이들이 일부 식물 알레르겐 상에서도 발견되기 때문에 업계에서 조절해야 할 도전과제로서 인식된다. 이에 더하여, 코어 푸코오스, 심지어 CHO 세포로부터의 IgG에서 발견되는 α-1,6-푸코오스의 제거가 ADCC 활성을 증가시킬 것이라고 현재 보고되고 있다. 본원에 설명된 시스템의 특징은 번역-후 변형의 조정을 달성할 수 있는 능력으로서, 예를 들어 말단 갈락토오스의 부가와 푸코실화 및 자일로실화의 감소 또는 억제(야생형 식물에서 생산된 동일한 단백질에 비해)가 동시에 달성된다는 것이다. 또는 달리, 역시 야생형 식물에서 생산된 동일한 단백질에 비해 갈락토실화의 양은 증가하면서 푸코실화의 정도는 감소할 수 있다.
- [0042] 푸코실화, 자일로실화 또는 갈락토실화의 양의 조정은 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 항-알파-1,3-푸코오스 항체를 사용하여 푸코오스-특이적 면역신호(푸코실화)의 존재 또는 부재를 검출하고, 항-베타-1,2-자일로오스 항체를 사용하여 자일로실화, 또는 예를 들어 도 6에 도시된 대로 자일로오스-특이적 면역신호의 존재 또는 부재를 검출함으로써 측정될 수 있다. 또는 달리, 도 7에 도시된 대로, MALDI-TOF 질량 분광분석을 사용하여 단백질 또는 단백질의 일부분의 N-글리코실화 프로파일을 측정할 수 있다. 또한, 당업자에게 알려진 단백질 또는 단백질의 일부분의 N-글리칸 프로파일을 측정하는 다른 방법도 사용될 수 있다.
- [0043] 하기 더 상세히 설명된 대로, 진공-기반 아그로-침윤 시스템이 사용되었고, 이것은 양, 품질 및 재현성의 면에

서 관심의 단백질, 예를 들어 항체의 생산에 적합한 것으로 판명되었다. 확장형 침윤 기술로의 진행은 소규모 과일 및 유닛에서 1일 당 수 g의 항체의 생산을 허용하며, 이것은 대단히 짧은 시간 틀 안에서 임상시험용 물질을 생산하고, 연간 수 kg까지의 시장 규모로 허가된 제품을 공급하는데 있어서 이러한 일시 발현 시스템을 사용할 수 있게 한다. 단일 친화성 크로마토그래피 단계 후에 침윤된 잎으로부터 고 품질 항체가 얻어졌다. 그러나, 본원에 설명된 방법은 안정하게 형질전환된 식물에도 적용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0044] 전사-후 유전자 침묵화(PTGS)는 식물에서 트랜스젠의 발현이 제한되는데 연관될 수 있으며, 침묵화 억제인자, 제한되지는 않지만, 예를 들어 감자 바이러스 Y로부터의 HcPro의 공-발현을 사용함으로써 트랜스젠 mRNA의 특이적 변성을 상쇄할 수 있다(Brigneti et al., 1998). 다른 침묵화 억제인자도 본 분야에 잘 공지되어 있고, 본원에 설명된 대로 사용될 수 있으며(Chiba et al., 2006, Virology 346:7-14; 참고자료로 본원에 포함됨), 제한되지는 않지만, 예를 들어 TEV-p1/HC-Pro(담배 식각 바이러스-p1/HC-Pro), BYV-p21, 토마토 덩굴위축 바이러스 p19(TBSV p19), 토마토 주름 바이러스의 캡시드 단백질(TCV-CP), 오이 모자이크 바이러스 2b(CMV-2b), 감자 바이러스 X의 p25(PVX-p25), 감자 바이러스 M의 p11(PVM-p11), 감자 바이러스 S의 p11(PVS-p11), 블루베리 스킴 바이러스 p16(BScV-p16), 감귤 트리스테자 바이러스 p23(CTV-p23), 포도 잎말림-관련 바이러스-2의 p24(GLRaV-2 p24), 포도 바이러스 A의 p10(GVA-p10), 포도 바이러스 B의 p14(GVB-p14), 어수리 잠복형 바이러스 p10(HLV-p10), 또는 마늘 일반 잠복형 바이러스 p16(GCLV-p16)이 있다. 따라서, 식물에서 높은 수준의 단백질 생산을 더욱 보장할 수 있도록 침묵화 억제인자, 예를 들어 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-p10이 GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III 또는 이들의 조합과 함께 공-발현될 수 있다.

[0045] 일시적 발현을 사용하여 생산된 정제 산물의 코마시 염색은 다양한 오염물이 소량 존재함을 나타낸다. 이들 단편은 산물 관련인 것 같고, 활성 블롯에 의해 밝혀진 대로 70kDa를 넘는 오염물은 모두 적어도 하나의 Fab를 함유했다(도 3b). 식물 추출물에 존재하는 산물 관련 오염물의 정제 및 양은 포유동물 세포 생산 시스템에서 관찰된 것과 유사하다. 따라서, 치료용 항체의 정제에 전형적으로 사용되는 정제 트레인(예를 들어, 음이온 교환, 친화성 및 양이온 교환)에 의해서 치료용 단백질에 대해 규제당국에 의해 요구되는 순도가 쉽게 얻어진다.

[0046] 본 발명은 글리코실화 패턴의 변형을 특징으로 하는 식물에서 관심의 단백질을 합성하는 방법을 제공한다. 이 방법은 관심의 단백질을 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT; SEQ ID NO:14), 제한되지는 않지만, 예를 들어 포유동물 GalT, 또는 인간 GalT를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 함께 공-발현시키는 것을 포함하며, 다른 출처로부터의 GalT 역시 사용될 수 있다. 또한, GalT의 촉매 도메인(예를 들어, SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 370-1194, 도 5b의 볼드체 서열, 또는 SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 238-1062, 도 5d의 볼드체 서열)이 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1; 예를 들어, SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 34-87 포함; 도 5d)의 CTS 도메인(즉, 세포질 꼬리, 막통과 도메인, 줄기 영역)과 융합될 수 있으며, SEQ ID NO:18의 아미노산 12-29(도 5e)를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하여 하이브리드 효소 GNT1-GalT를 생산하고, 이 하이브리드 효소가 관심의 단백질과 공-발현될 수 있다. 또한, 관심의 단백질과 함께 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III(GnT-III; SEQ ID NO:16; 도 5j), 제한되지는 않지만, 예를 들어 포유동물 GnT-III 또는 인간 GnT-III을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 공-발현시키는 것이 포함되며, 다른 출처로부터의 GnT-III 역시 사용될 수 있다. 추가로, GnT-III과 융합된 GNT1의 CTS를 포함하는 하이브리드 효소 GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:26; 도 5d)도 사용될 수 있으며, 아래 설명된다.

[0047] GalT mGalT, 또는 hGalT 또는 다른 출처로부터의 GalT를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 고정하기 위한 다른 방법은 GalT를 HDEL, KDEL(둘 다 세포질 망상구조 보유 서열), N-당단백질 생합성에 관련된 단백질의 CTS, 제한되지는 않지만, 예를 들어 글루코시다제 I의 CTS, 글루코시다제 II의 CTS, 만노시다제 I의 CTS, 만노시다제 II의 CTS, 베타-1,2-자일로실트랜스페라제의 CTS, 알파-1,2-푸코실트랜스페라제의 CTS와 융합시키는 것을 포함한다. 또한, GalT의 촉매 도메인이 HDEL, KDEL(둘 다 세포질 망상구조 보유 서열), 글루코시다제 I의 CTS, 글루코시다제 II의 CTS, 만노시다제 I의 CTS, 만노시다제 II의 CTS, 베타-1,2-자일로실트랜스페라제의 CTS, 알파-1,2-푸코실트랜스페라제의 CTS와 융합될 수 있다.

[0048] GNT1-GalT, 또는 GNT1-GnT-III 서열을 포함하는 하이브리드 효소의 사용은 GalT, 또는 GnT-III의 촉매 도메인을 N-글리칸 복합체 돌연변이의 초기 단계가 발생하는 시스-Golgi 장치에 위치시킨다. 이론과 결부시키고 싶지는 않지만, 글리칸 돌연변이의 초기 단계에서 GalT 활성의 격리는 돌연변이 중인 글리칸 상에  $\beta$ -1,4-갈락토오스를 부가할 수 있고, 그렇지 않을 경우 식물에서 발생할 수 있는 단백질의 푸코실화 및 자일로실화를 효과적으로 억제하는 결과를 가져올 수 있다. 유사하게, 글리칸 돌연변이의 초기 단계에서 GnT-III 활성의 격리는 베타

-연결된 만노오스 상에 GlcNAc 잔기를 부가하여 분할 중인 GlnAc를 생산할 수 있고, 그렇지 않을 경우 식물에서 발생할 수 있는 단백질의 푸코실화 및 자일로실화를 효과적으로 억제하는 결과를 가져올 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질은 GalT 촉매 도메인과 융합된 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 효소, 예를 들어 GNT1-GalT(R621; 도 5a 및 5d), 또는 GnT-III 촉매 도메인과 융합된 CTS 도메인을 포함하는 하이브리드 효소, 예를 들어 GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:26; 도 5h)와 공-발현될 수 있다. 자일로실화 및 갈락토실화된 단백질은 그대로 포함하면서 감소된 푸코실화 수준을 포함하는 관심의 단백질을 원하는 경우, 미변형(네이티브) GalT가 관심의 단백질과 공-발현될 수 있다. 분할 중인 GlnAc 잔기를 포함하는 변형된 글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 원하는 경우, 미변형(네이티브) GnT-III이 관심의 단백질과 공-발현될 수 있다. 식물 최적화 핵산 서열을 사용하여 미변형 또는 네이티브 GalT 또는 GnT-III 효소를 생산할 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 사실이다.

[0049] 따라서, SEQ ID NO:17(GNT1-GalT)의 뉴클레오티드 1-1062를 포함하거나, SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 1-1062와 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열이 제공되며, 상기 뉴클레오티드 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다. 서열은 식물 최적화될 수 있다. 또한, SEQ ID NO:14(GalT)의 뉴클레오티드 1-1224를 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 1-1224와 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열이 제공되며, 상기 핵산 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다. 서열은 식물 최적화될 수 있다. 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 결정된다.

[0050] 또한, SEQ ID NO:18(GNT1-GalT; 도 5e), 또는 SEQ ID NO:15(GalT; 도 5c)에 제시된 아미노산 서열이 개시된다.

[0051] SEQ ID NO:26(GNT1-GnT-III)의 뉴클레오티드 1-1641을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 1-1641과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산이 제공되며, 상기 핵산 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다. 서열은 식물 최적화될 수 있다. 또한, SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 232-1641(GnT-III; 또는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 1-1460)을 포함하거나, 또는 SEQ ID NO:26의 뉴클레오티드 232-1641(또는 SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 1-1460)과 약 80% 내지 100% 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 핵산 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열이 제공되며, 상기 핵산 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다. 서열은 식물 최적화될 수 있다. 서열 동일성은 프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11을 파라미터로 사용하여 측정되며, 상기 뉴클레오티드 서열은 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화한다.

[0052] 또한, SEQ ID NO:20(GNT1-GnT-III; 도 5i), 또는 SEQ ID NO:19(GnT-III; 도 5k)에 제시된 아미노산 서열이 개시된다.

[0053] 관심의 단백질의 "변형된 글리코실화"는 변형된 글리코실화(예를 들어, 본원에 설명된 대로)를 포함하는 관심의 단백질의 N-글리칸 프로파일의 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질의 N-글리칸 프로파일과 상이하다는 의미이다. 글리코실화의 변형은 관심의 단백질에서 하나 이상의 글리칸의 증가 또는 감소, 또는 GlnAc의 분할을 포함할 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질은 감소된 자일로실화를 나타내거나, 감소된 푸코실화를 나타내거나, 또는 감소된 자일로실화와 감소된 푸코실화를 모두 나타낼 수 있다. 또는 달리, 관심의 단백질의 N-글리칸 프로파일은 갈락토실화의 양은 증가하고, 선택적으로 자일로실화, 푸코실화 또는 이들 둘 다의 양이 감소하는 방식으로 변형될 수 있다. 추가로, 분할된 GlnAc가 생산될 수 있으며, 이것은 단백질의 푸코실화 및 자일로실화의 양을 감소시킬 수 있다.

[0054] 관심의 단백질의 "감소된 자일로실화" 또는 "감소된 푸코실화"는, 관심의 단백질을 분리하고, 자일로실화 또는 푸코실화를 동일한 방법을 사용하여 측정된 경우, 관심의 단백질 상에서 검출가능한 N-글리칸의 자일로실화, 푸코실화 또는 자일로실화와 푸코실화 모두의 양이 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질 상에서 검출가능한 자일로실화, 푸코실화 또는 이들 모두의 양보다 10% 미만임을 의미한다. 예를 들어, 관심의 단백질은, 야생형 식물에서 생산된 동일한 관심의 단백질과 비교하여, 푸코실화된, 자일로실화된, 또는 푸코실화와 자일로실화가 모두 된 N-글리칸 잔기를 5% 미만 포함할 수 있거나, 관심의 단백질 상에서 검출가능한 N-글리칸 잔기의 1% 미만이 푸코실화되거나, 자일로실화되거나, 또는 푸코실화와 자일로실화가 모두 될 수 있거나, 관심의 단백질 상에서 검출가능한 N-글리칸 잔기의 약 0.1 내지 약 2%가 푸코실화 및 자일로실화될 수 있거나, N-글리칸 잔기의 약 0.5 내지 약 1.5%가 푸코실화 및 자일로실화되거나, 또는 N-글리칸 잔기의 약 0.7 내지 약 1.0%가 푸코실화 및 자일로실화된다.

[0055] 도 6 및 7에 도시된 대로, 본원에 설명된 방법을 사용함으로써 변형된 글리코실화 프로파일을 나타내는 관심의 단백질이 생산될 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질이 GNT1-GalT와 공-발현된 경우 면역학적으로 검출 불가능한 푸코오스 또는 자일로오스 잔기를 가진 관심의 단백질이 생산되었다. 관심의 단백질의 에피토프의 MALDI-TOF 분석은 관심의 단백질이 GalT 또는 GNT1-GalT(도 7a-c, c-삽입부 참조)와 공-발현되었을 때 글리코실화 패턴이 변형된 관심의 단백질이 얻어질 수 있음을 입증한다. 예를 들어, 도 7a는 야생형 식물에서 발현된 관심의 단백질의 에피토프에 대한 글리코실화 패턴을 도시한다. 관심의 단백질은 몇 개의 자일로실화 및 푸코실화된 잔기를 포함한다(각각 피크 H 및 J, 도 7a). 관심의 단백질이 GalT와 공-발현되었을 때는 이들 잔기가 감소하거나 부재한다(도 7b). 더욱이, GalT와 공-발현되었을 때는 관심의 단백질에서 갈락토실화된 잔기가 증가할 뿐만 아니라(피크 C, F, K 참조, 도 7b) 새로 자일로실화된 잔기도 관찰된다(피크 F). 관심의 단백질과 GNT1-GalT의 공-발현은 자일로실화 및 푸코실화된 잔기가 1% 미만이고(도 7c-삽입부 참조), 갈락토실화된 잔기가 증가(피크 K, 도 7c)한 것을 특징으로 하는 N-글리칸 프로파일을 가져온다.

[0056] 따라서, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 제공하는 단계, 식물을 성장시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 A)을 제공한다. GalT를 암호화하는 제 1 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하고, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 모두가 감소하게 된다. 더욱이, 이 방법을 사용하면, GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질의 갈락토실화 양에 비해 관심의 단백질의 갈락토실화의 정도가 증가할 수 있다.

[0057] 또한, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT; SEQ ID NO:14; 도 5b)를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 식물 또는 식물의 일부에서 일시적 방식으로 발현시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 B)이 제공된다. GalT를 암호화하는 제 1 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하며, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 모두가 감소하게 된다. 더욱이, GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질의 갈락토실화의 양에 비해 관심의 단백질의 갈락토실화의 정도가 증가할 수 있다. 발현 단계는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 일시적으로 공-발현시키거나, 또는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정하게 공-발현시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 GalT (인간 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제; GNT1-GalT; SEQ ID NO:17; 도 5d)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 포함하는 제 1 하이브리드 단백질을 암호화하는 제 1 하이브리드 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 제공하는 단계, 식물을 성장시키는 단계, 및 제 1 하이브리드 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 C)을 제공한다. GNT1-GalT를 암호화하는 제 1 하이브리드 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하며, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화 및 자일로실화가 감소하게 된다. 예를 들어, 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 둘 다의 정도가 GNT1-GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질과 비교하여 그 양의 약 0.5 내지 약 5% 또는 약 0.5 내지 약 2%까지 감소할 수 있다.

[0059] 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 GNT1-GalT를 암호화하는 제 1 하이브리드 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 식물 또는 식물의 일부에서 일시적 방식으로 발현시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 추가의 대안적 방법(방법 D)이 제공된다. GNT1-GalT를 암호화하는 제 1 하이브리드 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하며, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화 및 자일로실

화가 감소하게 된다. 예를 들어, 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 둘 다의 정도가 GNT1-GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질과 비교하여 그 양의 약 0.5 내지 약 5% 또는 약 0.5 내지 약 2%까지 감소할 수 있다. 발현 단계는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 일시적으로 공-발현시키거나, 또는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정하게 공-발현시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 유전자 침묵화 억제인자, 예를 들어 HcPro를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 제공하는 단계, 식물을 성장시키는 단계, 및 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 추가의 대안적 방법(방법 E)을 제공한다. GalT를 암호화하는 제 1 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하며, 이로써 GalT를 발현하지 않는 야생형 식물을 사용하여 생산된 관심의 단백질에 비해 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화 및 자일로실화가 감소하게 된다. 관심의 단백질의 갈락토실화의 정도는 GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질의 갈락토실화의 양에 비해 증가할 수 있다. 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 서열의 발현은 갈락토실트랜스페라제 및 관심의 단백질의 높은 수율을 보장한다.

[0061] 또한, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 베타-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 유전자 침묵화 억제인자, 예를 들어 HcPro를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 식물 또는 식물의 일부에서 일시적 방식으로 발현시키는 단계, 및 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 F)이 제공된다. GalT를 암호화하는 제 1 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상에 베타-1,4-갈락토오스를 부가하며, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화 및 자일로실화가 감소하게 된다. 관심의 단백질의 갈락토실화의 정도는 GalT를 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질의 갈락토실화의 양에 비해 증가할 수 있다. 침묵화 억제인자를 암호화하는 제 3 서열의 발현은 갈락토실트랜스페라제 및 관심의 단백질의 높은 수율을 보장한다. 발현 단계는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 일시적으로 공-발현시키거나, 또는 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정하게 공-발현시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] 따라서, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GnT-III)를 암호화하는 제 1 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 제공하는 단계, 식물을 성장시키는 단계, 및 제 1 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 G)을 제공한다. GnT-III을 암호화하는 제 1 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상의 베타-연결된 만노오스(분할 중인 GlnAc)에 베타-1,4-연결된 N-아세틸글루코사민(GlnAc) 잔기를 부가하며, 이로써 GnT-III을 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질에 비해 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 모두가 감소하게 된다. GnT-III을 암호화하는 서열(제 1 뉴클레오티드 서열), 관심의 단백질을 암호화하는 서열(제 2 뉴클레오티드 서열), 또는 제 1 뉴클레오티드 서열과 제 2 뉴클레오티드 서열 모두가 일시적으로 발현될 수 있다. 서열들이 일시적으로 발현되는 경우, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 유전자 침묵화 억제인자, 예를 들어 HcPro를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열이 또한 사용될 수 있으며, 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 GnT-III(N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제; GNT1-GnT-III; SEQ ID NO:20)의 촉매 도메인과 융합된 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제(GNT1)의 CTS 도메인을 암호화하는 제 1 하이브리드 단백질을 암호화하는 제 1 하이브리드 뉴클레오티드 서열, 및 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물을 제공하는 단계, 식물을 성장시키는 단계, 및 제 1 하이브리드 뉴클레오티드 서열 및 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 N-글루코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성하는 단계를 포함하는, N-글루코실화가 변

형된 관심의 단백질을 합성하는 대안적 방법(방법 H)을 제공한다. GNT1-GnT-III을 암호화하는 제 1 하이브리드 서열과 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열의 공-발현은 관심의 단백질의 성숙 중인 글리칸 상의 베타-연결된 만노오스(분할 중인 GlnAc)에 베타-1,4-연결된 N-아세틸글루코사민(GlnAc)을 부가하고, 이로써 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화 및 자일로실화가 감소하게 된다. 예를 들어, 푸코실화, 자일로실화, 또는 이들 둘 다의 정도가 GNT1-GnT-III을 발현하지 않는 야생형 식물에서 생산된 관심의 단백질과 비교하여 그 양의 약 0.5 내지 약 5% 또는 약 0.5 내지 약 2%까지 감소할 수 있다. GNT1-GnT-III을 암호화하는 서열(제 1 뉴클레오티드 서열), 관심의 단백질을 암호화하는 서열(제 2 뉴클레오티드 서열), 또는 제 1 뉴클레오티드 서열과 제 2 뉴클레오티드 서열 모두가 일시적으로 발현될 수 있다. 서열들이 일시적으로 발현되는 경우, 식물에서 활성인 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 유전자 침묵화 억제인자, 예를 들어 HcPro를 암호화하는 제 3 뉴클레오티드 서열이 또한 사용될 수 있으며, 제 1, 제 2 및 제 3 뉴클레오티드 서열을 발현시켜서 변형된 글리코실화를 포함하는 관심의 단백질을 합성할 수 있다.

[0064] 높은 수율을 보장하기 위해서 관심의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 변형할 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 서열은 또한 세포질 망상구조(ER) 내에 단백질을 보유하는데 있어서 활성인 서열을 암호화하는 서열, 제한되지는 않지만, 예를 들어 KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu) 서열, 또는 다른 공지된 ER 보유 서열, 예를 들어 HDEL, 또는 KKSS과 융합될 수 있다.

[0065] 또한, 관심의 단백질 복합체가 생산되는 경우, 상기 설명된 방법 A-H 중 어느 방법에서 사용된 제 2 뉴클레오티드 서열은 단백질 복합체의 2개 이상의 펩티드 또는 도메인을 암호화할 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질이 항체인 경우, 제 2 뉴클레오티드 서열은 2개의 제 2 뉴클레오티드 서열 2A 및 2B를 포함할 수 있으며, 이들은 각각 항체의 일부분을 암호화하는데, 예를 들어 뉴클레오티드 2A는 항체의 경쇄를 암호화할 수 있고, 서열 2B는 항체의 중쇄를 암호화할 수 있다. 이러한 구성물의 비제한적 예가 도 1에 제공되는데, 여기서 R216 및 R610의 각 구성물은 2개의 제 2 뉴클레오티드 서열로서, 식물에서 활성인 조절 영역, 제한되지는 않지만, 예를 들어 플라스토시아닌 프로모터에 작동 가능하게 연결된 C5-1 LC(C5-1의 경쇄)를 암호화하는 2A 및 식물에서 활성인 조절 영역, 제한되지는 않지만, 예를 들어 도 1b 또는 SEQ ID NO:23의 뉴클레오티드 556-999를 포함하는 플라스토시아닌 프로모터(US 7,125,978, 참고자료로 본원에 포함됨)에 작동 가능하게 연결된 C5-1의 중쇄(C5-1 HC)를 암호화하는 2B를 포함한다. 도 1에 도시된 대로, R610을 참조하면 KDEL 서열이 펩티드 2A 또는 2B 중 하나의 c-말단 영역에 융합될 수 있는데, 제한되지는 않지만, 예를 들어 KDEL 서열은 항체가 ER과 함께 보유되는 것을 보장하기 위해서 항체의 중쇄와 융합될 수 있다.

[0066] 제 2 뉴클레오티드 서열에 의해서 암호화된 각 단백질은 글리코실화될 수 있다.

[0067] 방법 A-H 중 어느 하나에 의해서 생산된 관심의 단백질은 식물로부터 회수될 수 있다. 더욱이, 관심의 단백질은 당업자에게 알려진 표준 기술을 사용하여 부분적으로 정제되거나 정제될 수 있다.

[0068] 뉴클레오티드 서열들을 식물에서 공-발현시키는 경우, 원하는 뉴클레오티드 서열을 각각 표준 형질전환 기술, 일시 형질전환 기술을 사용하여 식물에 도입할 수 있거나, 하나 이상의 원하는 뉴클레오티드 서열을 각각 발현하는 둘 이상의 식물을 교배하여 필요한 뉴클레오티드 서열 조합을 공-발현하는 식물을 획득하거나, 또는 상기 기술들이 조합될 수 있다. 예를 들어, GalT, GNT1-GalT, GalT 및 GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, GNT1-Gnt-III 및 Gnt-III, 또는 이들의 조합을 암호화하는 서열을 발현하는 안정하게 형질전환된 식물을 사용하여 일시 발현이 수행될 수 있다.

[0069] 따라서, 본 발명은 또한 N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질의 생산을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있는 식물을 생산하는 방법(방법 I)을 제공한다. 이 방법은 GalT, GNT1-GalT, 또는 GalT와 GNT1-GalT 모두를 암호화하는 하나 이상의 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제공하는 단계, 및 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 단계를 포함한다. 관심의 단백질을 생산하기 위하여, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정한 형질전환, 또는 일시 형질전환을 포함하는 표준 기술을 사용하여 플랫폼 식물에 도입하고, 생산된 관심의 단백질이 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하도록 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시키거나, 또는 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현하는 제 2 식물과 교배시키는데, 이 방식으로 생산된 관심의 단백질은 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함한다. 관심의 단백질이 식물로부터 추출될 수 있으며, 원한다면 관심의 단백질을 표준 방법에 의해 분리 및 정제할 수 있다.

[0070] 따라서, 본 발명은 또한 N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질의 생산을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있는 식물을 생산하는 방법(방법 J)을 제공한다. 이 방법은 GnT-III, GNT1-GnT-III, 또는 GnT-III와 GNT1-GnT-III 모두를 암호화하는 하나 이상의 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제공하는 단계, 및 하나 이상의 뉴클레

오티드 서열을 발현시키는 단계를 포함한다. 관심의 단백질을 생산하기 위하여, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정한 형질전환, 또는 일시 형질전환을 포함하는 표준 기술을 사용하여 플랫폼 식물에 도입하고, 생산된 관심의 단백질이 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하도록 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시키거나, 또는 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현하는 제 2 식물과 교배시키는데, 이 방식으로 생산된 관심의 단백질은 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함한다. 관심의 단백질이 식물로부터 추출될 수 있으며, 원한다면 관심의 단백질을 표준 방법에 의해 분리 및 정제할 수 있다.

[0071] 따라서, 본 발명은 또한 N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질의 생산을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있는 식물을 생산하는 방법(방법 K)을 제공한다. 이 방법은 GalT, GNT1-GalT, GalT 및 GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, GnT-III 및 GNT1-GNT-III, 또는 이들의 조합을 암호화하는 하나 이상의 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제공하는 단계, 및 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 발현시키는 단계를 포함한다. 관심의 단백질을 생산하기 위하여, 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 안정한 형질전환, 또는 일시 형질전환을 포함하는 표준 기술을 사용하여 플랫폼 식물에 도입하고, 생산된 관심의 단백질이 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함하도록 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현시키거나, 또는 제 1 뉴클레오티드 서열을 발현하는 식물을 제 2 뉴클레오티드 서열을 발현하는 제 2 식물과 교배시키는데, 이 방식으로 생산된 관심의 단백질은 N-글리코실화가 변형된 글리칸을 포함한다. 관심의 단백질이 식물로부터 추출될 수 있으며, 원한다면 관심의 단백질을 표준 방법에 의해 분리 및 정제할 수 있다.

[0072] GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, 관심의 단백질, 또는 이들의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 식물에서의 발현 수준이 증가하도록 최적화된 코돈일 수 있다. 코돈 최적화는 올리고뉴클레오티드 빌딩 블록의 합성에 적합한 DNA 뉴클레오티드를 선별하고, 이어서 식물에서의 코돈 용법에 근접하도록 구조 유전자 또는 이들의 단편으로 효소 조립하는 것을 의미한다.

[0073] 식물에서 외래 서열의 발현을 최적화하기 위하여, 야생형 또는 합성 서열일 수 있는 뉴클레오티드 서열을 사용하거나, 또는 필요에 따라 상응하는 단백질, 예를 들어 GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, 관심의 단백질, 또는 이들의 조합이 미변형 뉴클레오티드 서열에 의해서 암호화되었을 때 생산될 수 있는 것보다 높은 수준으로 생산되도록 변경될 수 있다. 제한되지는 않지만, 예를 들어 서열은 서열 비교 기술, 제한되지는 않지만, 예를 들어 BLAST(GenBank를 통해 입수가 가능함; 디폴트 파라미터 사용)를 사용하여 측정했을 때 야생형 서열과 적어도 약 80% 동일성을 포함하는, 식물에서의 코돈 용법에 대해 최적화된 합성 서열일 수 있다. 또한, 유용한 생물학적 특성, 제한되지는 않지만, 예를 들어 항원성을 나타내는 관심의 단백질을 암호화하는 서열의 단편 또는 일부분, 또는 이들의 유도체를 식물 조직에서 발현시킬 수 있다고 생각된다.

[0074] GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, 및 관심의 단백질의 발현 수준 및 트랜스젠 단백질 생산을 최대화하기 위하여, 핵산 서열을 시험할 수 있으며, 암호화 영역을 Sardana 등(Plant Cell Reports 15:677-681; 1996)에 개략된 것과 유사한 과정을 사용하여 식물에서 유전자의 발현에 대해 최적화되도록 변형할 수 있다. 쌍떡잎 식물에서 높게 발현된 유전자로부터의 코돈 용법표가 Murray 등(Nuc Acids Res. 17:477-498; 1989)을 포함하는 몇몇 출처로부터 입수가 가능하다. 더욱이, 서열 최적화는 또한 코돈 직렬 반복부의 감소, 숨은 스플라이스 부위의 제거, 반복 서열의 감소(역전 반복부 포함)를 포함할 수 있으며, 예를 들어 Leto 1.0(Entelechon, 독일)을 사용하여 결정할 수 있다.

[0075] 따라서, 본 발명은 상기 방법(방법 A-K) 중 어느 하나에 설명된 방법에 있어서, GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, 관심의 단백질, 또는 이들의 조합을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열이 식물에서의 발현을 위해 최적화된 N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질을 합성하는 방법(방법 L)을 제공한다.

[0076] 더욱이, 본 발명은 식물에서 활성인 조절 영역에 각각 작동 가능하게 연결된, GalT, GNT1-GalT, GnT-III, GNT1-GnT-III, 또는 이들의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 식물, 식물 세포, 또는 종자에 관한 것이다. 식물, 식물 세포, 또는 종자는 하나 이상의 관심의 단백질을 암호화하는 제 2 뉴클레오티드 서열을 더 포함할 수 있으며, 제 2 뉴클레오티드 서열은 식물에서 활성인 하나 이상의 제 2 조절 영역에 작동 가능하게 연결된다. 제 1 뉴클레오티드 서열, 제 2 뉴클레오티드 서열, 또는 제 1 뉴클레오티드 서열과 제 2 뉴클레오티드 서열 모두는 식물, 식물 세포 또는 식물 종자에서의 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다.

[0077] "작동 가능하게 연결된"은 유전자 발현의 매개나 조정과 같은 의도된 기능을 수행하기 위해 특정 서열들이 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 것을 의미한다. 작동 가능하게 연결된 서열들의 상호작용은, 예를 들어 작동 가능하게 연결된 서열들과 상호작용하는 단백질에 의해 매개될 수 있다. 전사 조절 영역과 관심의 서열이 작동 가능하게 연결된 경우, 이 서열들이 기능적으로 연결됨으로써 전사 조절 영역에 의해 관심의 서열의 전사

가 매개되거나 조정될 수 있다.

- [0078] 용어 "식물의 일부"는 전체 식물, 식물로부터 얻어진 조직, 제한되지는 않지만, 예를 들어 잎, 잎과 줄기, 뿌리, 잎, 줄기 및 선택적으로 식물의 꽃 부분을 포함하는 기생(氣生)부, 식물로부터 얻어진 세포 또는 원형질체를 포함하여 식물로부터 유래된 어떤 부분을 의미한다.
- [0079] 용어 "식물 물질"은 식물로부터 유래된 어떤 재료를 의미한다. 식물 물질은 전체 식물, 조직, 세포, 또는 이들의 어떤 분획을 포함할 수 있다. 더욱이, 식물 물질은 세포내 식물 성분, 세포외 식물 성분, 식물의 액체 또는 고형 추출물, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 식물 물질은 식물 잎, 줄기, 열매, 뿌리 또는 이들의 조합으로부터의 식물, 식물 세포, 조직, 액체 추출물, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 식물 물질은 어떤 가공 단계를 거치지 않은 식물 또는 그것의 일부를 포함할 수 있다. 그러나, 식물 재료가, 제한되지는 않지만, 크로마토그래피, 전기영동 등을 비롯한 본 분야에 일반적으로 공지된 기술을 이용한 부분적 또는 실질적 단백질 정제를 포함하여, 하기 정의된 최소한의 가공 단계 또는 더 강한 가공 단계를 거칠 수 있다는 것도 고려된다.
- [0080] 용어 "최소 가공"은 식물 물질, 예를 들어 관심의 단백질을 포함하는 식물 또는 그것의 일부를 부분적으로 정제하여 식물 추출물, 균질물, 식물 균질물의 분획 등(즉, 최소한으로 가공된)을 수득하는 것을 말한다. 부분적 정제는, 제한되지는 않지만, 식물 세포 구조를 파괴하여 가용성 식물 성분, 및 불용성 식물 성분을 포함하는 조성물을 얻는 것을 포함할 수 있으며, 불용성 식물 성분은, 제한되지는 않지만, 예를 들어 원심분리, 여과 또는 이들의 조합에 의해 분리될 수 있다. 이와 관련하여, 진공 또는 원심분리 추출을 사용하여 잎의 세포외 공간 또는 다른 조직에서 분비된 단백질을 쉽게 획득할 수 있거나, 또는 롤러나 그라인딩 등을 통과시킴으로써 가압하에 조직을 추출하여 세포외 공간에서 단백질을 압착해서 짜내거나 자유롭게 유리시킬 수 있다. 또한, 최소 가공은 가용성 단백질의 조 추출물의 제조를 포함할 수 있으며, 이러한 제조에서는 부수적인 식물 산물로 인한 오염은 무시할 만하다. 더욱이, 최소 가공은 잎으로부터 가용성 단백질을 수성 추출한 후, 어떤 적합한 염을 사용하여 침전시키는 것을 포함할 수 있다. 다른 방법은 대규모 침전 및 즙 추출을 포함할 수 있으며, 이러한 추출물은 바로 사용할 수 있다.
- [0081] 식물 재료 또는 조직 형태의 식물 물질은 피험자에게 경구 송달될 수 있다. 식물 물질은 다른 음식과 함께 식이요법 보충제의 일부로서 투여되거나, 또는 캡슐화될 수 있다. 또한, 식물 물질 또는 조직은 식감을 높이거나 개선하기 위해 농축될 수 있으며, 또는 필요에 따라 다른 재료, 원료 또는 제약 부형제와 함께 제공될 수 있다.
- [0082] 관심의 단백질을 포함하는 식물은 필요와 상황에 따라서 다양한 방식으로 피험자, 예를 들어 동물 또는 인간에게 투여될 수 있다고 생각된다. 예를 들어, 식물로부터 얻어진 관심의 단백질은 그것을 사용하기 전에 조 형태, 부분 정제된 형태, 또는 정제된 형태로 추출될 수 있다. 단백질이 정제되어야 하는 경우, 그것은 식용 또는 비-식용 식물에서 생산될 수 있다. 더욱이, 단백질이 경구 투여되는 경우, 식물 조직을 수집하여 피험자에게 바로 공급하거나, 또는 공급 전에 수집된 조직을 건조하거나, 또는 수집하기 전에 동물이 식물을 뜯어 먹도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 범위에서는 수집된 식물 조직을 동물 사료의 사료 보충제로서 제공하는 것도 고려된다. 식물 조직을 거의 추가 가공하지 않고 동물에게 제공하는 경우, 투여되는 식물 조직은 식용인 것이 바람직하다.
- [0083] 실시예에 더 상세히 설명한 대로, GalT, GNT1-GalT, 및 관심의 단백질이 일시적 방식으로 식물에 도입되었다. 적합한 항체를 사용한 면역학적 분석은 형질전환된 세포에 MWr 150kDa의 단백질이 존재했음을 입증했다(도 2, 3a 및 3b). 또한, 어느 한 구성물을 발현하는 식물로부터 얻어진 추출물에서 GalT 또는 GNT1-GalT를 검출할 수 있었고, 식물에서 GNT1-GalT가 발현되었을 때는 관심의 단백질의 변경된 N-글리코실화가 관찰되었다(도 6). 따라서, 재조합 발현된 GalT, 또는 GNT1-GalT는 "*in planta*"시 생물학적으로 활성이다.
- [0084] GalT-FLAG 또는 GNT1-GalT-FLAG(즉, 형질전환체에서 재조합 단백질의 면역검출을 허용하기 위해 FLAG 에피토프를 C-말단에 표지한 GalT 또는 GNT1-GalT)이 식물에 도입되었다. 항-FLAG 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 형질전환된 세포에 적합한 단백질이 존재함을 입증할 수 있다.
- [0085] "유사체" 또는 "유도체"는 GalT(SEQ ID NO:14), GalT의 촉매 도메인(SEQ ID NO:14의 뉴클레오티드 368-1198; 도 5b의 볼드체 서열을 암호화), 또는 GNT1-GalT (SEQ ID NO:17의 뉴클레오티드 248-1077; 도 5d의 볼드체 서열을 암호화)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 어떤 치환, 결실 또는 부가를 포함하며, 단 이 서열은 장외(ectopically) 발현된 GalT(SEQ ID NO:14) 또는 GNT1-GalT(SEQ ID NO:17)의 부재시에 식물에서 생산된 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일과 비교하여, 식물에서 발현되는 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는, 또는 GalT의 CST와 융합되었을 때 식물에서 발현되는 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는, 예

를 들어 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화 또는 이들 모두를 감소시키거나, 또는 관심의 단백질의 갈락토실화를 증가시키는 단백질을 암호화해야 한다. 예를 들어, 이 서열에 의해 암호화된 단백질은 N-글리칸 성숙화 동안 말단 갈락토오스를 부가할 수 있다. 핵산 서열의 유도체 및 유사체는 전형적으로 핵산 서열과 80% 이상의 동일성, 예를 들어 약 80-100% 서열 동일성, 또는 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% 동일성을 나타낸다. 서열 동일성은 BLAST 알고리즘(GenBank: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/)으로 디폴트 파라미터(프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11)를 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 유사체, 또는 그 유도체는 긴축 혼성화 조건(Maniatis et al., Molecular Cloning(A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 387-389 또는 Ausubel et al., (eds) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 2.10.3)에서 본원에 설명된 GalT(SEQ ID NO:14), GNT1-GalT(SEQ ID NO:18) 서열 중 어느 하나와 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 단 이 서열은 GalT(SEQ ID NO:14) 또는 GNT1-GalT(SEQ ID NO:17)의 부재시에 생산된 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일과 비교하여, 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는, 예를 들어 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화 또는 이들 모두를 감소시키거나, 또는 관심의 단백질의 갈락토실화를 증가시키는 단백질을 암호화해야 한다. 예를 들어, 이 서열에 의해 암호화된 단백질은 N-글리칸 성숙화 동안 말단 갈락토오스를 부가할 수 있다. 한 이러한 긴축 혼성화 조건의 예는 65°C에서 16-20시간 동안 7% SDS, 1mM EDTA, 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 적합한 프로브, 제한되지는 않지만, 예를 들어 [감마-32P]dATP 표지된 프로브를 사용하여 혼성화하는 것일 수 있다. 이어서 65°C에서 30분간 5% SDS, 1mM EDTA, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 세척한 다음, 65°C에서 30분간 1% SDS, 1mM EDTA, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 세척한다. 이 버퍼 중에서 세척하는 것을 반복하여 바탕값을 줄일 수 있다.

[0086]

유사하게, 본 발명은 GnT-III(SEQ ID NO:16), GnT-III의 촉매 도메인, 또는 GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:20)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 대한 변형을 포함하며, 단 이 서열은 장의 발현된 GnT-III(SEQ ID NO:16) 또는 GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:26)의 부재시에 식물에서 생산된 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일과 비교하여, 식물에서 발현되는 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는, 또는 GnT-III의 CST와 융합되었을 때 식물에서 발현되는 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는, 예를 들어 GlnAc를 분할하여 관심의 단백질의 글리칸의 푸코실화, 자일로실화 또는 이들 모두를 감소시키는 단백질을 암호화해야 한다. 핵산 서열의 유도체 및 유사체는 전형적으로 핵산 서열과 80% 이상의 동일성, 예를 들어 약 80-100% 서열 동일성, 또는 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% 동일성을 나타낸다. 서열 동일성은 BLAST 알고리즘(GenBank: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/)으로 디폴트 파라미터(프로그램: blastn; 데이터베이스: nr; 익스펙트 10; 필터: 로우 컴플렉시티; 얼라인먼트: 페어와이즈; 워드 사이즈: 11)를 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 유사체, 또는 그 유도체는 긴축 혼성화 조건(Maniatis et al., Molecular Cloning(A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 387-389 또는 Ausubel et al., (eds) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 2.10.3)에서 본원에 설명된 GnT-III(SEQ ID NO:16), GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:26) 서열 중 어느 하나와 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 단 이 서열은 GnT-III(SEQ ID NO:16) 또는 GNT1-GnT-III(SEQ ID NO:26)의 부재시에 생산된 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일과 비교하여, 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는 단백질을 암호화해야 한다. 한 이러한 긴축 혼성화 조건의 예는 65°C에서 16-20시간 동안 7% SDS, 1mM EDTA, 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 적합한 프로브, 제한되지는 않지만, 예를 들어 [감마-32P]dATP 표지된 프로브를 사용하여 혼성화하는 것일 수 있다. 이어서 65°C에서 30분간 5% SDS, 1mM EDTA, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 세척한 다음, 65°C에서 30분간 1% SDS, 1mM EDTA, 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 중에서 세척한다. 이 버퍼 중에서 세척하는 것을 반복하여 바탕값을 줄일 수 있다.

[0087]

"조절 영역", "조절 요소" 또는 "프로모터"는 핵산의 일부분, 항상 그렇지는 않지만 전형적으로는 유전자의 단백질 암호화 영역의 상류를 의미하며, 이것은 DNA 또는 RNA, 또는 DNA와 RNA로 이루어질 수 있다. 조절 영역이 활성이고, 관심의 유전자와 작동 가능하게 회합된 상태이거나, 또는 작동 가능하게 연결된 경우, 이것은 관심의 유전자의 발현을 가져올 수 있다. 조절 요소는 기관 특이성을 매개하거나, 또는 발생적 또는 시간적 유전자 활성화를 조절할 수 있다. "조절 영역"은 프로모터 요소, 기본적 프로모터 활성을 나타내는 코어 프로모터 요소, 외부 자극에 대한 반응을 유도할 수 있는 요소, 음성 조절 요소와 같은 프로모터 활성을 매개하는 요소 또는 전사 인핸서를 포함한다. 또한, 본원에서 사용된 "조절 영역"은 전사 이후에 활성인 요소, 예를 들어 번역 및 전

사 인핸서, 번역 및 전사 리프레서, 상류 활성화 서열, 및 mRNA 불안정성 결정소와 같은 유전자 발현을 조정하는 조절 요소를 포함한다. 후자의 요소 중 몇몇은 암호화 영역에 가까이 위치될 수 있다.

[0088] 본 명세서에서 용어 "조절 요소" 또는 "조절 영역"은 전형적으로 DNA 서열, 제한되지는 않지만, 일반적으로 구조 유전자의 암호화 서열의 상류(5')를 말하며, 이것은 RNA 폴리머라제 및/또는 특정 부위에서 전사가 시작되는데 필요한 다른 인자들을 인식함으로써 암호화 영역의 발현을 제어한다. 그러나, 서열의 인트론, 또는 3'에 위치한 다른 뉴클레오티드 서열도 관심의 암호화 영역의 발현의 조절에 기여할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. RNA 폴리머라제 또는 다른 전사 인자들을 인식함으로써 특정 부위에서의 개시를 보장하는 조절 요소의 예는 프로모터 요소이다. 전부는 아니지만 대부분의 진핵생물 프로모터 요소는 TATA 박스를 함유하며, 이것은 일반적으로 전사 시작 부위 상류에 약 25개 염기쌍으로 놓인 아데노신과 티미딘 뉴클레오티드 염기쌍으로 이루어진 보존된 핵산 서열이다. 프로모터 요소는 전사의 개시를 책임지는 기본적 프로모터 요소뿐만 아니라 유전자 발현을 변형하는 다른 조절 요소들(상기 열거된)도 포함한다.

[0089] 발생학적으로 조절되는 유도성 또는 구성적인 것들을 포함하여 몇 가지 타입의 조절 영역이 있다. 발생학적으로 조절되는, 또는 조절 영역의 제어하에 유전자의 차등 발현을 제어하는 조절 영역은 해당 기관 또는 조직의 발생 도중의 특정 시기에 어떤 기관 또는 기관의 조직 내에서 활성화된다. 그러나, 발생학적으로 조절되는 일부 조절 영역은 특정 발생 단계에서 어떤 기관 또는 조직 내에서 우선적으로 활성화될 수 있으며, 또한 이들은 발생학적으로 조절되는 방식으로, 또는 식물 내의 다른 기관 또는 조직에서도 기본적 수준으로 활성화될 수 있다. 조직-특이적 조절 영역, 예를 들어 종자-특이적 조절 영역의 예는 나쁜 프로모터, 및 크루시페린 프로모터를 포함한다(Rask et al, 1998, J. Plant Physiol. 152:595-599; Bilodeau et al., 1994, Plant Cell 14: 125-130). 잎-특이적 프로모터의 예는 플라스토시아닌 프로모터를 포함한다(US7,125,978, 참고자료로 본원에 포함됨; SEQ ID NO:23; 도 1b).

[0090] 유도성 조절 영역은 유도제에 반응하여 하나 이상의 DNA 서열 또는 유전자의 전사를 직접 또는 간접적으로 활성화할 수 있는 것이다. 유도제의 부재시에는 DNA 서열 또는 유전자가 전사되지 않을 것이다. 전형적으로 유도성 조절 영역에 특이적으로 결합하여 전사를 활성화하는 단백질 인자는 비활성 형태로 존재할 수 있으며, 이것은 이후 유도제에 의해 활성 형태로 직접 또는 간접적으로 전환된다. 그러나, 단백질 인자는 부재할 수도 있다. 유도제는 단백질, 대사산물, 성장 조절제, 제초제 또는 페놀계 화합물과 같은 화학적 제제, 또는 열, 냉기, 염 또는 독성 요소에 의해 직접 부여되거나 또는 바이러스와 같은 병원균 또는 질환 요인의 작용을 통해 간접적으로 부여되는 생리적 스트레스일 수 있다. 유도성 조절 영역을 함유하는 식물 세포는 분무, 물주기, 가열 또는 유사한 방법 등에 의해 세포 또는 식물에 유도제를 외부적으로 적용함으로써 유도제에 노출될 수 있다. 유도성 조절 요소는 식물 또는 비-식물 유전자로부터 유래될 수 있다(예를 들어, Gatz, C. and Lenk, I.R.P., 1998, Trends Plant Sci. 3, 352-358; 참고자료로 본원에 포함됨). 잠재적 유도성 프로모터의 예는, 제한되지는 않지만, 테트라사이클린-유도성 프로모터(Gatz, C, 1997, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 89-108; 참고자료로 본원에 포함됨), 스테로이드 유도성 프로모터(Aoyama, T. and Chua, N.H. 1997, Plant J. 2, 397-404; 참고자료로 본원에 포함됨) 및 에탄올-유도성 프로모터(Salter, M. G., et al., 1998, Plant Journal 16, 127-132; Caddick, M. X., et al., 1998, Nature Biotech. 16, 177-180; 참고자료로 본원에 포함됨), 시토키닌 유도성 IB6 및 CK11 유전자(Brandstatter, I. and Kieber, J. J. 1998, Plant Cell 10, 1009-1019; Kakimoto, T., 1996, Science 274, 982-985; 참고자료로 본원에 포함됨) 및 아우신 유도성 요소 DR5(Ulmasov, T., et al, 1997, Plant Cell 9, 1963-1971; 참고자료로 본원에 포함됨)를 포함한다.

[0091] 구성적 조절 영역은 식물의 여러 부분의 곳곳에서 그리고 식물 발생 동안 내내 계속해서 유전자의 발현을 지시한다. 공지된 구성적 조절 요소의 예는 CaMV 35S 전사체와 관련된 프로모터(Odell et al, 1985, Nature, 313:810-812), 쌀 액틴 1(Zhang et al., 1991, Plant Cell, 3:1155-1165), 액틴 2(An et al., 1996, Plant J., 10:107-121) 또는 tms 2(US 5,428,147, 참고자료로서 본원에 포함된다), 및 트리오스포스페이트 이소머라제 1(Xu et al., 1994, Plant Physiol. 106:459-467) 유전자, 옥수수 유비퀴틴 1 유전자(Cornejo et al., 1993, Plant Mol. Biol. 29:637-646), *Arabidopsis* 유비퀴틴 1 및 6 유전자(Holtorf et al., 1995, Plant Mol. Biol. 29:637-646), 및 담배 번역 개시 인자 4A 유전자(Mandel et al., 1995 Plant Mol. Biol. 29:995-1004)를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "구성적"이 반드시 구성적 조절 영역의 제어하에서 유전자가 모든 세포 타입에서 동일한 수준으로 발현된다는 것을 나타내는 것은 아니며, 이 유전자는 대체로 많은 변형이 관찰되기는 하지만 광범한 세포 타입에서 발현된다.

[0092] 본 발명의 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 본 발명의 뉴클레오티드 서열, 또는 구성물, 또는 벡터에 의해 형질전환된 어떤 적합한 식물 숙주에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주의 예는, 제한되지는 않지만, 자주개자리, 캐

놀라, *Brassica* 종, 옥수수, *Nicotiana* 종, 자주개자리, 감자, 인삼, 완두콩, 귀리, 쌀, 대두, 밀, 보리, 해바라기, 및 목화 등을 포함하는 농작물을 포함한다.

- [0093] 본 발명의 하나 이상의 키메라 유전자 구성물은 3' 미번역 영역을 더 포함할 수 있다. 3' 미번역 영역은 폴리아데닐화 신호 및 mRNA 프로세싱 또는 유전자 발현을 행할 수 있는 어떤 다른 조절 신호를 함유하는 DNA 세그먼트를 포함하는 유전자의 부분을 말한다. 폴리아데닐화 신호는 일반적으로 mRNA 전구물질의 3' 단부에 폴리아데닐산 트랙의 부가를 행하는 것을 특징으로 한다. 일반적으로 폴리아데닐화 신호는 변형이 드문 정규 형태 5'-AATAAA-3'에 대한 상동체의 존재에 의해서 인식된다. 또한, 본 발명의 키메라 유전자 구성물 중 하나 이상은 필요에 따라 번역 인핸서든 전사 인핸서든 인핸서를 더 포함할 수 있다. 이들 인핸서 영역은 당업자에게 잘 알려져 있으며, ATG 개시 코돈과 인접 서열을 포함할 수 있다. 전체 서열의 번역을 보장하려면 개시 코돈과 암호화 서열의 리딩 프레임의 위상이 같아야 한다.
- [0094] 적합한 3' 영역의 비-제한적 예는 아그로박테리움 종양 유도(Ti) 플라스미드 유전자의 폴리아데닐화 신호, 예를 들어 노팔린 신타제(Nos 유전자) 및 식물 유전자, 예를 들어 대두 저장 단백질 유전자 및 리볼로오스-1,5-비스포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO) 유전자의 작은 서브유닛을 함유하는 3'-전사 미번역 영역이다.
- [0095] 변형된 식물 세포의 확인을 돕기 위하여, 본 발명의 구성물은 선택성 마커를 포함하도록 더 조작될 수 있다. 유용한 선택성 마커는 항생제, 예를 들어 젠타마이신, 히그로마이신, 카나마이신과 같은 화학물질, 또는 포스포노스리신, 글리코세이트, 클로로솔푸론 등과 같은 제초제에 대한 내성을 제공하는 효소를 포함한다. 유사하게, 색 변화로 확인할 수 있는 화합물을 생성하는 효소, 예를 들어 GUS(베타-글루쿠로니다제), 또는 발광물질, 예를 들어 루시페라제 또는 GFP가 사용될 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명의 키메라 유전자 구성물을 함유하는 트랜스제닉 식물, 식물 세포 또는 종자가 본 발명의 일부로서 고려된다. 식물 세포로부터 전체 식물을 재생하는 방법도 본 분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 형질전환된 식물 세포를 적합한 배지에서 배양하며, 배지는 항생제와 같은 선별제를 함유할 수 있고, 이 경우 형질전환된 식물 세포의 확인을 용이하게 할 수 있는 선택성 마커가 사용된다. 일단 유합조직이 형성되면 공지된 방법에 따라서 적합한 식물 호르몬을 사용하여 싹(shoot) 형성이 촉진될 수 있고, 싹은 식물의 재생을 위한 발근 배지로 옮겨진다. 다음에, 이 식물을 사용하여 종자로부터 또는 영양번식 기술을 이용하여 반복 생성을 확립할 수 있다. 또한, 트랜스제닉 식물은 조직 배양을 사용하지 않고도 생성될 수 있다.
- [0097] 또한, 본 발명의 조절 요소는 형질전환, 또는 일시 발현이 행해질 수 있는 일련의 숙주 유기체 내에서의 발현을 위해 관심의 암호화 영역과 조합될 수 있다. 이러한 유기체는, 제한되지는 않지만, 외떡잎 및 쌍떡잎 식물, 제한되지는 않지만, 예를 들어 옥수수, 시리얼 식물, 밀, 보리, 귀리, *Nicotiana* 종, *Brassica* 종, 대두, 콩, 완두콩, 자주개자리, 감자, 토마토, 인삼 및 *Arabidopsis*를 포함한다.
- [0098] 안정한 형질전환 방법 및 이들 유기체의 재생 방법은 본 분야에 확립되어 있으며, 당업자에게 공지되어 있다. 형질전환되어 재생된 식물을 얻는 방법은 본 발명에서 중요하지 않다.
- [0099] "형질전환"은 유전자형, 표현형, 또는 이 양자의 방식으로 나타나는 유전자 정보(뉴클레오티드 서열)의 이종간 전달을 의미한다. 키메라 구성물로부터 숙주로 유전자 정보의 이종간 전달이 유전성이면 유전자 정보 전달이 안정적이라고 생각되고, 또는 전달이 일시적이면 유전자 정보의 전달은 유전성이 아니다.
- [0100] 본 발명은 안정 또는 일시 발현 시스템과 함께 사용하기 적합한 키메라 구성물을 포함하는 적합한 벡터를 더 포함한다. 또한, 유전자 정보가 하나 이상의 구성물 안에 제공될 수 있다. 예를 들어, 관심의 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 한 구성물에 도입될 수 있고, 관심의 단백질의 글리코실화를 변형하는 단백질을 암호화하는 두 번째 뉴클레오티드 서열은 별개의 구성물을 사용하여 도입될 수 있다. 다음에, 이들 뉴클레오티드 서열이 본원에 설명된 대로 식물에서 일시적으로 공-발현될 수 있다. 또한, 관심의 단백질과 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는 단백질을 모두 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 구성물도 사용될 수 있다. 이 경우, 뉴클레오티드 서열은 프로모터 또는 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질을 암호화하는 제 1 핵산 서열을 포함하는 제 1 서열, 및 프로모터 또는 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는 단백질을 암호화하는 제 2 핵산 서열을 포함하는 제 2 서열을 포함할 것이다.
- [0101] "공-발현"은 둘 이상의 뉴클레오티드 서열이 식물, 및 식물의 동일한 조직에서 거의 동시에 발현되는 것을 의미한다. 그러나, 뉴클레오티드 서열이 정확히 동시에 발현될 필요는 없다. 오히려 둘 이상의 뉴클레오티드 서열은 암호화된 산물들이 상호작용할 기회를 가지는 방식으로 발현된다. 예를 들어, 관심의 단백질의 글리코실화

를 변형하는 단백질은 관심의 단백질이 발현되는 시기 전에 또는 그 시기 동안에 발현될 수 있으며, 이로써 관심의 단백질의 글리코실화의 변형이 일어나게 된다. 둘 이상의 뉴클레오티드 서열은 일시 발현 시스템을 사용하여 공-발현될 수 있는데, 이때 둘 이상의 서열은 두 서열이 모두 발현되는 조건에서 거의 동시에 식물에 도입된다. 또는 달리, 뉴클레오티드 서열 중 하나, 예를 들어 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 플랫폼 식물이 안정적인 방식으로 형질전환될 수 있고, 이와 함께 관심의 단백질을 암호화하는 추가 서열이 일시적 방식으로 플랫폼 식물에 도입된다. 이 경우, 관심의 단백질의 글리코실화 프로파일을 변형하는 단백질을 암호화하는 서열은 원하는 발생 단계 동안 원하는 조직에서 발현되거나, 또는 유도성 프로모터를 사용하여 그것의 발현이 유도될 수 있고, 관심의 단백질을 암호화하는 추가 서열이 유사한 조건에서 동일한 조직에서 발현될 수 있으며, 이로써 뉴클레오티드 서열들의 공-발현이 보장되게 된다.

[0102] 본 발명의 구성물은 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접 DNA 형질전환, 마이크로-인젝션, 전기천공 등을 이용하여 식물 세포에 도입될 수 있다. 이러한 기술에 관해서는, 예를 들어 Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, p. 421-463 (1988); Geierman and Corey, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed.(1988); 및 Miki and Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. In *Plant Metabolism*, 2d Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell(eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. London, p. 561-579 (1997)를 참조한다. 다른 방법은 직접 DNA 흡수, 리포솜의 사용, 전기천공, 예를 들어 원형질체, 마이크로-인젝션, 마이크로-프로젝타일 또는 휘스커를 사용하는 방법, 및 진공 침윤을 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), 미국특허 제4,945,050호; 제5,036,006호; 및 제 5,100,792호, 1995년 5월 10일 제출된 미국 특허출원 제08/438,666호, 및 1992년 9월 25일 제출된 제 07/951,715호를 참조한다(모두 참고자료로서 본원에 포함된다).

[0103] 하기 설명된 대로, 일시 발현 방법을 사용하여 본 발명의 구성물을 발현할 수 있다(Liu and Lomonosoff, 2002, *Journal of Virological Methods*, 105:343-348 참조; 참고자료로서 본원에 포함된다). 또는 달리, Kapila 등 (1997, 참고자료로서 본원에 포함된다)에 의해서 설명된 진공-기반 일시 발현 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법은, 제한되지는 않지만, 예를 들어 아그로-접종 또는 아그로-침윤 방법을 포함할 수 있으며, 상기 주지된 대로 다른 일시적 방법도 사용될 수 있다. 아그로-접종 또는 아그로-침윤에서는 원하는 핵산을 포함하는 아그로 박테리아의 혼합물을 조직의 세포간 공간, 예를 들어 잎, 식물의 기생부(줄기, 잎 및 꽃 포함), 다른 식물 부분(줄기, 뿌리, 꽃), 또는 전체 식물에 도입한다. 표피의 교차 후에 아그로박테리아가 t-DNA 카피들을 감염시켜서 세포로 전달한다. t-DNA는 에피솜에서 전사되고 mRNA 번역되어 감염된 세포에서 관심의 단백질을 생산하며, 핵 내부에서 t-DNA의 통과는 일시적이다.

[0104] "관심 유전자", "관심 뉴클레오티드 서열", 또는 "관심 암호화 영역"은 숙주 유기체, 예를 들어 식물에서 발현될 어떤 유전자, 뉴클레오티드 서열, 또는 암호화 영역을 의미한다. 이들 용어는 상호 교환하여 사용된다. 이러한 관심 뉴클레오티드 서열은, 제한되지는 않지만, 관심 단백질이 산물인 유전자 또는 암호화 영역을 포함할 수 있다. 관심 단백질의 예는, 제한되지는 않지만, 예를 들어 산업용 효소, 단백질 보충물, 건강보조제, 부가가치 제품, 또는 사료, 식품 또는 사료와 식품 모두에 사용하기에 알맞은 이들의 단편, 제약 활성 단백질, 제한되지는 않지만, 예를 들어 성장인자, 성장 조절제, 항체, 항원, 및 이들의 단편, 또는 면역화 또는 백신화에 유용한 이들의 유도체 등을 포함한다. 추가 관심 단백질은, 제한되지는 않지만, 인터류킨, 예를 들어 IL-1에서 IL-24, IL-26 및 IL-27 중 하나 이상, 사이토카인, 에리트로포이에틴(EPO), 인슐린, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF 또는 이들의 조합, 인터페론, 예를 들어 인터페론-알파, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 혈액응고인자, 예를 들어 인자 VIII, 인자 IX 또는 tPA hGH, 수용체, 수용체 아고니스트, 항체, 신경폴리펩티드, 인슐린, 백신, 성장인자, 제한되지는 않지만, 예를 들어 표피 성장인자, 각질세포 성장인자, 형질전환 성장인자, 성장 조절제, 항원, 자가항원, 이들의 단편, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0105] 관심 뉴클레오티드 서열이 식물에 직접 또는 간접적으로 독성인 산물을 암호화하는 경우, 본 발명의 방법을 사용하여 원하는 조직 내에서만 또는 식물 발생의 원하는 단계에서만 관심 유전자를 선택적으로 발현시킴으로써 이러한 독성이 식물 전체적으로 감소될 수 있다. 이에 더하여, 일시 발현으로 인한 제한된 발현 기간은 식

물에서 독성 산물이 생산되는 경우 그 영향을 감소시킬 수 있다.

[0106] 관심의 암호화 영역 또는 관심의 뉴클레오티드 서열은 본 발명의 뉴클레오티드 서열, 또는 핵산 분자, 또는 유전자 구성물, 또는 벡터를 포함하거나 또는 이들로 형질전환된 어떤 적합한 식물 숙주에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주의 예는, 제한되지는 않지만, *Arabidopsis*, 예를 들어 캐놀라를 포함하는 농작물, *Brassica* 종, 옥수수, *Nicotiana* 종, 자주개자리, 감자, 인삼, 완두콩, 귀리, 쌀, 대두, 밀, 보리, 해바라기, 및 목화를 포함한다.

[0107] 하기 실시예에서 더 상세히 설명된 대로, N-글리코실화가 변형된 관심의 단백질의 합성, 제한되지는 않지만, 예를 들어 항체, C5-1이 GalT, 또는 GNT1-GalT를 공-발현하는 식물에서 생산되었다.

[0108] 서열목록:

서열	SEQ ID NO:	서열	SEQ ID NO:
XmaI-pPlas.c	1	GNT1-GalT (뉴클레오티드 서열)	17
SacI-ATG-pPlas.r	2	GNT1-GalT 아미노산	18
SacI-PlasTer.c	3	GnT-III 아미노산	19
EcoRI-PlasTer.r	4	GNT1-GnT-III 아미노산	20
Plasto-443c	5	GNT1의 CTS 도메인 (뉴클레오티드)	21
Plas+LC-C51.r	6	GNT1의 CTS 도메인 (아미노산)	22
LC-C51.c	7	플라스토시아닌 프로모터 및 5'UTR	23
LC-C51XhoSac.r	8	플라스토시아닌 3' UTR 및 터미네이터	24
Plas+HC-C51.r	9	FgalTSpe	25
HC-C51.c	10	GNT1-GnT-III (뉴클레오티드)	26
HC-C51XhoSac.r	11	FgalT	27
HC-C51KDEL(SacI).r	12	RgalTFlagStu	28
트립신 클리코웹터트	13	FGNT	29
GalT I (뉴클레오티드)	14	RGBTSpe	30
GalT I 아미노산	15		
GnT-III (뉴클레오티드)	16		

[0109]

[0110] 실시예

[0111] 실시예 1

[0112] 발현 카세트 R610, R612, R514(도 1a), R621 및 R622(도 5a)의 조립

[0113] 모든 조작은 Sambrook and Russel(2001)로부터의 일반 분자생물학 프로토콜을 이용하여 행하였다.

[0114] R610, R612(도 1a)

[0115] 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 아래 제시한다:

**XmaI-pPlas.c:** SEQ ID NO:1

5'-AGTTCCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTC-3' SEQ ID NO:1

**SacI-ATG-pPlas.r:** SEQ ID NO:2

5'-AATAGAGCTCCATTTTCTCTCAAGATGATTAATTAATTAATTAGTC-3'  
SEQ ID NO :2

**SacI-PlasTer.c:** SEQ ID NO:3

5'-AATAGAGCTCGTTAAATGCTTCTTCGTCCTATTATAATATGG-3'  
SEQ ID NO:3

**EcoRI-PlasTer.r:** SEQ ID NO:4

5'-TTACGAATTCCTCTCCTAATTGGTGTACTATCATTTATCAAAGGGGA-3'  
SEQ ID NO:4

**Plasto-443c:** SEQ ID NO:5

5'-GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTGTC-3' SEQ ID NO:5

**Plas+LC-C51.r:** SEQ ID NO:6

5'-ATCTGAGGTGTGAAAACCATTTTCTCTCAAGATG-3' SEQ ID NO:6

**LC-C51.c:** SEQ ID NO:7

5'-ATGGTTTTACACCTCAGATACTTGG-3' SEQ ID NO:7

**LC-C51XhoSac.r:** SEQ ID NO:8

5'-ATATGAGCTCCTCGAGCTAACACTCATTCTGTGAAGC-3' SEQ ID  
NO:8

**Plas+HC-C51.r:** SEQ ID NO:9

5'-CAAGGTCCACACCCAAGCCATTTTCTCTCAAGATG-3' SEQ ID NO:9

**HC-C51.c:** SEQ ID NO:10

5'-ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGC-3' SEQ ID NO:10

**HC-C51XhoSac.r:** SEQ ID NO:11

5'-ATAAGAGCTCCTCGAGTCATTACCAGGAGAGTGGG-3' SEQ ID NO:11

**HC-C51KDEL(SacI).r:** SEQ ID NO:12

5'-ATAAGAGCTCTCAAAGTTCATCCTTTTACCAGGAGAGTGGG-3' SEQ ID  
NO:12

[0116]

[0117] 첫 번째 클로닝 단계는 자주개자리 플라스토시아닌 유전자의 상류 및 하류 조절 요소를 함유하는 수용체 플라스미드를 조립하는 것이었다. 플라스토시아닌 프로모터(미국특허 제7,125,978호, 참고자료로서 본원에 포함된다) 및 5'UTR 서열을 올리고뉴클레오티드 프라이머 XmaI-pPlas.c(SEQ ID NO:1)와 SacI-ATG-pPlas.r(SEQ ID NO:2)를 사용하여 자주개자리 게놈 DNA로부터 증폭했다. 얻어진 증폭 산물을 XmaI 와 SacI로 분해하고, 동일한 효소로 미리 분해해 둔 pCAMBIA2300에 라이게이션하여 pCAMBIA-promoPlasto를 만들었다. 유사하게, 플라스토시아닌 유전자의 3'UTR 서열 및 터미네이터(도 1c; SEQ ID NO:24의 뉴클레오티드 1-399)를 프라이머 SacI-PlasTer.c(SEQ ID NO:3)와 EcoRI-PlasTer.r(SEQ ID NO:4)를 사용하여 자주개자리 게놈 DNA로부터 증폭하고, 산물을 SacI와 EcoRI로 분해한 후, pCAMBIA-PromoPlasto의 동일한 부위에 삽입하여 pCAMBIAPlasto를 만들었다.

[0118]

직렬 구성물로서 자주개자리의 플라스토시아닌 프로모터 아래에 C5-1 경쇄와 C5-1 중쇄 암호화 서열을 함유하도록 플라스미드 R610 및 R612를 제조했다. R610은 조립된 IgG의 ER에 보유되도록 디자인했으며, C5-1의 중쇄 부분에 융합된 KDEL 서열을 포함했고, R612는 분비되도록 디자인했다.

- [0119] Darveau 등(1995)에 의해 설명된 PCR-매개 라이게이션 방법을 사용하여 C5-1 발현 카세트의 조립을 수행했다. 플라스토시아닌 프로모터의 하류에 경쇄 암호화 서열을 조립하기 위한 첫 단계는 주형으로서 pCAMBIAPlasto를 사용하고 프라이머로서 Plasto-443c(SEQ ID NO:5)와 Plas+LC-C51.r(SEQ ID NO:6; 밑줄친 부분 오버랩)를 사용하여 RCR에 의해 초기 ATG 하류의 D'Aoust 등(미국특허 제7,125,978, 참고자료로서 본원에 포함된다)에 의해 설명된 자주개자리 플라스토시아닌 프로모터의 처음 443개 염기쌍(bp)(도 1b의 뉴클레오티드 556-999 또는 SEQ ID NO:23)을 증폭하는 것이었다.
- [0120] 병행하여 경쇄 암호화 서열을 프라이머로서 LC-C51.c(SEQ ID NO:7)과 LC-C51 XhoSac.r.(SEQ ID NO:8; 밑줄친 부분 오버랩)를 사용하여 플라스미드 pGA643-kappa (Khoudi 등, 1999)로부터 PCT-증폭했다.
- [0121] 얻어진 두 증폭 산물을 함께 혼합하여 세 번째 PCR 반응에서 주형으로서 사용했으며, 프라이머는 Plasto-443c(SEQ ID NO:5)와 LC-C51XhoSac.r(SEQ ID NO:8)을 사용했다. 첫 번째 반응에서 사용된 프라이머 Plas+LC-C51.r(SEQ ID NO:6)과 LC-C51.c(SEQ ID NO:7)의 오버랩이 세 번째 반응 동안 증폭 산물의 조립을 유도한다. 세 번째 PCR 반응에서 얻어진 조립된 산물을 DraIII와 SacI로 분해하고, DraIII와 SacI로 분해해 둔 pCAMBIAPlasto에 라이게이션하여 플라스미드 R540을 만들었다.
- [0122] 주형으로서 pCAMBIAPlasto를 사용하고 프라이머로서 Plasto-443c(SEQ ID NO: 5)와 Plas+HC-C51.r(SEQ ID NO:9; 밑줄친 부분 오버랩)을 사용하여 PCR에 의해 플라스토시아닌의 초기 ATG 상류의 443bp(도 1b의 뉴클레오티드 556-999 또는 SEQ ID NO:23)를 증폭하여 중쇄 암호화 서열을 플라스토시아닌 상류 조절 요소에 융합시켰다.
- [0123] 이들 반응의 산물을 혼합하고, 프라이머 Plasto-443c(SEQ ID NO:5)와 HC-C51 XhoSac.r(SEQ ID NO:11)을 사용하여 세 번째 PCR 반응에서 조립했다. 얻어진 단편을 DraIII과 SacI로 분해하고, DraIII과 SacI 부위 사이에서 pCAMBIAPlasto에 라이게이션했다. 얻어진 플라스미드를 R541로 명명했다.
- [0124] 주형으로서 플라스미드 R541을 사용하고 프라이머 Plasto-443c(SEQ ID NO:8)와 HC-C51KDEL(SacI).r(SEQ ID NO:12)을 사용하여 PCR 증폭에 의해 중쇄 암호화 서열의 C-말단에 KDEL 태그를 부가했다. 얻어진 단편을 pCAMBIAPlasto의 동일한 부위에 클로닝된 DraIII과 SacI로 분해하여 플라스미드 R550을 만들었다.
- [0125] 동일한 바이너리 플라스미드 상에서 경쇄 및 중쇄 발현 카세트의 조립을 다음과 같이 수행했다: R541 및 R550을 EcoRI로 분해하고 블런팅한 다음, HindIII로 분해하고, R540의 HindIII 및 SmaI 부위에 라이게이션하여 R610(KDEL 보유)과 R612 (KDEL 미보유; 도 1 참조)를 만들었다.
- [0126] *R621* 및 *R622*(도 5a) - 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 아래 제시한다:

**FgalT SEQ ID NO:27**

5'-GACTCTAGAGCGGGAAGATGAGGCTTCGGGAGCCGCTC-3' SEQ ID NO:27

**RgalTFlagStu SEQ ID NO:28**

5'- AAGGCCTACG CTACTTGTCAT CGTCATCTTT GTAGTCGCAC GGTGTCCCG AAGTCCAC -3' SEQ ID NO: 28

**FGNT SEQ ID NO:29**

5'-ATCGAAATCGCACGATGAGAGGGAACAAGTTTTGC-3' SEQ ID NO: 29

**RGNTSpe SEQ ID NO:30**

5'-CGGGATCCACTAGTCTGACGCTTCATTTGTTCTTC-3' SEQ ID NO: 30

**FgalTSpe SEQ ID NO:25**

5'-GGACTAGTGCACTGTGCTGCCCGCCTGC-3' SEQ ID NO: 25

[0127]

- [0128] GalT 및 GNTIGalT 발현을 위한 플라스미드를 pBLTI121(Pagny et al., 2003)로부터 조립했다. 인간 β(1,4)-갈락토실트랜스페라제(hGalT) 유전자(UDP 갈락토오스: β-N-아세틸글루코사미니드: β(1,4)-갈락토실트랜스페라제; EC 2.4.1.22)를 EcoRI 분해에 의하여 pUC19-hGalT(Watzele et al., 1991)로부터 분리했다. Klenow 처리 후, 1.2kb hGalT 단편을 SmaI 부위에서 pBLTI221에 클로닝한 결과, 플라스미드

pBLTI221hGalT를 얻었다. 다음에, 증폭 프라이머 FGaIT(SEQ ID NO:27)와 RGalT FlagStu(SEQ ID NO:28)를 사용하여 PCR에 의해 암호화 영역의 C-말단 단부에 FLAG 태그를 융합시켰다. 다음에, 이 XbaI-StuI 단편을 바이너리 벡터 pBLTI121에 클로닝하여 R622를 만들었다. 막통과 도메인에 해당하는 N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 I(GNTI)로부터의 처음 77개 아미노산을 주형으로서 N-GNTI를 암호화하는 *N. tabacum* cDNA(Strasser et al, 1999)를 사용하고 프라이머로서 FGNT(SEQ ID NO:29)와 RGNTSpe(SEQ ID NO:30)를 사용하여 PCR에 의해 증폭했다. 증폭 산물을 pGEM-T 벡터에 먼저 클로닝하고, 얻어진 플라스미드를 ApaI와 BamHI로 분해하고 pBLTI221에 라이제이션하여 플라스미드를 만들어 pBLTI221-GNTI로 명명했다. 프라이머로서 FGaITSpe(SEQ ID NO:25)와 RgalTFlagStu(SEQ ID NO:28)를 사용하여 pBLTI221hGalT 상에서 PCR 증폭하여 hGalT의 촉매 도메인을 얻고, 5' 및 3' 단부에 각각 SpeI 및 StuI 부위를 만들었다. 다음에, 동일한 부위(SpeI 및 StuI)를 사용하여 SpeI/StuI hGalT 단편을 pBLTI221-GNTI에 클로닝하여 pBLTI221-GNTIGaIT를 만들었다. 마지막으로, pBLTI221-GNTIGaIT를 XbaI와 StuI로 분해하여 GNTIGaIT 암호화 서열(도 5d; SEQ ID NO:17)을 분리하고, 이 단편을 바이너리 벡터 pBLTI121에 클로닝하여 R621을 만들었다.

- [0129] 모든 클론을 서열화하여 구성물의 완전성을 확인했다. 플라스미드들을 사용하여 *Agrobacterium tumefaciens*(AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA)를 형질전환했는데, *E. coli* 형질전환(W.S. Dower, Electroporation of bacteria, In "Genetic Engineering", Volume 12, Plenum Press, New York, 1990, J.K. Setlow eds.)과 마찬가지로 Gene Pulser II 장치(Biorad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 전기천공 (Hofgen and Willmitzer, 1988)에 의해 형질전환했다. 제한 지도화에 의해 모든 *A. tumefaciens* 균주의 완전성을 확인했다.
- [0130] HcPro 구성물을 Hamilton 등(2002)에 설명된 대로 제조했다.
- [0131] 실시예 2
- [0132] 식물 바이오매스의 제조, 접종물, 아그로-침윤, 및 수거
- [0133] 시판 피트모스 용토로 채운 플랫에서 *Nicotiana benthamiana* 식물을 종자로부터 성장시켰다. 식물은 16/8 광주기 및 25°C(주)/20°C(야)의 온도 체제 하에 온실에서 성장시켰다. 파종 3주 후에 각 묘목을 선별하여 화분에 옮겨 심고 온실에서 동일한 환경 조건하에 3주 더 성장시켰다.
- [0134] *Agrobacterium* 균주 R612, R610, R621, R622 또는 35SHcPro를 이들의 OD600이 0.6 내지 1.6에 도달할 때까지 10mM 2-[N-모르폴리노]에탄술폰산(MES), 20 μM 아세토시링곤, 50 μg/ml 카나마이신 및 25 μg/ml 카르베니실린 pH 5.6으로 보충된 YEB 배지에서 성장시켰다. 사용하기 전에 *Agrobacterium* 현탁액을 원심분리하고, 침윤 배지(10mM MgCl2 및 10mM MES pH 5.6)에 다시 현탁시켰다.
- [0135] Liu and Lomonosoff(2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348)에 설명된 대로 주사기-침윤을 수행했다.
- [0136] 진공-침윤시에는 *A. tumefaciens* 현탁액을 원심분리하고, 침윤 배지에 다시 현탁시킨 다음 4°C에서 하룻밤 보관했다. 침윤 당일 배양물 배치를 2.5 배양물 부피로 희석하고 가운한 후 사용했다. *Nicotiana benthamiana* 전체 식물을 20-40 Torr 진공하의 기밀 스테인리스 스틸 탱크 안의 박테리아 현탁액 중에 2분간 거꾸로 놓아두었다. 주사기 또는 진공 침윤 후, 식물을 다시 온실로 되돌려보내 수거시까지 4-5일간 인큐베이션했다.
- [0137] 잎 표본채취 및 총 단백질 추출
- [0138] 인큐베이션 후, 식물의 기생부를 수거하여 -80°C에서 동결시켜 조각으로 분쇄한 다음, 1.5g 또는 7.5g씩 부표본으로 나누었다. 차가운 50mM 트리스 pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.1% 트리톤 엑스-100, 1mM 불화 페닐메탄술폰 및 10 μM 키모스타틴 3 부피에서 동결-분쇄한 식물 재료의 각 부표본을 균질화(Polytron)하여 총 가용성 단백질을 추출했다. 균질화 후, 슬러리를 4°C에서 20분간 20,000g으로 원심분리하고, 맑은 초 추출물(상청액)을 분석용으로 보관했다. 기준 물질로서 소 혈청 알부민을 사용하는 Bradford 분석(Bio-Rad, Hercules, CA)에 의해 맑은 초 추출물의 총 단백질 함량을 측정했다.
- [0139] 실시예 3
- [0140] 단백질 분석, 면역블롯팅 및 ELISA
- [0141] C5-1은 항-인간 뮤린 IgG이므로 인간 IgG에 대한 특징적인 친화성을 통해서(활성 블롯) 또는 항-마우스 IgG에 대한 면역활성에 의해서 검출과 정량을 수행할 수 있다.

- [0142] 총 조 추출물 또는 정제된 항체로부터 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 코마시 블루 R-250 또는 G-240으로 염색하거나, 2볼타 폴리비닐렌 멤브레인(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) 위에서 전기이동시켜 면역검출했다. 면역블롯팅 전에 4°C에서 16-18시간 동안 트리스-완충 식염수 중의 5% 탈지유 및 0.1% 트윈-20으로 멤브레인을 차단했다.
- [0143] 다음의 항체와 함께 인큐베이션하여 면역블롯팅을 수행했다: 피옥시다제-콘주게이트된 염소 항-마우스 IgG(H+L) 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat# 115-035-146)(TBS-T 중 2% 탈지유 중 0.04 µg/ml), 피옥시다제-콘주게이트된 인간 IgG 항체(Gamunex® Bayer Corp., Elkhart, IN)(TBS-T 중 2% 탈지유 중 0.2 µg/ml) 또는 다클론성 염소 항-마우스 IgG 항체(중쇄 특이적)(Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)(TBS-T 중 2% 탈지유 중 0.25 µg/ml). 피옥시다제-콘주게이트된 당나귀 항-염소 IgG 항체(Jackson ImmunoResearch)(TBS-T 중 2% 탈지유 중 0.04 µg/ml)를 중쇄-특이적 항체로 처리된 멤브레인에 대한 2차 항체로서 사용했다. 기질로서 루미놀(Roche Diagnostics Corporation)을 사용하여 화학발광에 의해 면역반응성 복합체를 검출했다. 인간 IgG 항체의 양고추냉이 피옥시다제-효소 콘주게이션을 EZ-Link Plus® 활성화 피옥시다제 콘주게이션 키트(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 수행했다.
- [0144] ELISA 정량 분석
- [0145] 멀티웰 플레이트(Immulon 2HB, ThermoLab System, Franklin, MA)를 4°C에서 16-18시간 동안 50mM 탄산염 버퍼(pH 9.0) 중에서 IgG1 중쇄(Sigma M8770)에 특이적인 염소 항-마우스 항체 2.5 µg/ml로 코팅했다. 다음에, 멀티웰 플레이트를 37°C에서 인산염-완충 식염수(PBS)(Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 중의 1% 카세인 중에서 1시간 인큐베이션하여 차단했다. 정제된 마우스 IgG1 대조군(Sigma M9269)의 희석물을 사용하여 표준 곡선을 작성했다. 면역분석을 수행할 경우, 모든 희석물(대조군 및 샘플)을 의사 접종물로 침윤시켜 인큐베이션한 식물 조직으로부터 얻어진 식물 추출물에서 수행하여 어떤 매트릭스 효과를 제거했다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 단백질 샘플 및 표준 곡선 희석물과 함께 인큐베이션했다. PBS 중의 0.1% 트윈-20(PBS-T)으로 3번 세척한 후, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 피옥시다제-콘주게이션된 염소 항-마우스 IgG(H+L) 항체(차단 용액 중 0.04 µg/ml)(Jackson ImmunoResearch 115-035-146)와 함께 인큐베이션했다. PBS-T 세척을 반복하고, 플레이트를 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) Sure Blue 피옥시다제 기질(KPL, Gaithersburg, MD)과 함께 인큐베이션했다. 1N HCl을 가하여 반응을 중단시키고, 450nm에서 흡광도를 읽었다. 각 샘플을 3번 분석하고, 농도를 표준 곡선의 선형 부분에 삽입했다.
- [0146] 실시예 4
- [0147] IgG 정제
- [0148] 잎 재료로부터 C5-1의 정제는 동결된 *N. benthamiana* 잎(100-150g)을 취하는 단계, 20mM 인산나트륨, 150mM NaCl 및 2mM 나트륨 메타-바이술파이트, pH 5.8-6.0을 가하는 단계, 및 시판 블렌더를 사용하여 실온에서 2-3분간 블렌딩하는 단계를 포함했다. Miracloth™(Calbiochem, San Diego, CA)에서 조 여과하여 불용성 섬유를 제거하고, 10mM 불화 페닐메탄술폰닐(PMSF)을 여과물에 가했다. 1M HCl로 추출물의 pH를 4.8±0.1로 조정하고, 2-8°C에서 15분간 18,000g으로 원심분리하여 맑게 만들었다. 맑은 상청액을 2M 트리스로 pH 8.0±0.1로 조정한다. 다음, 2-8°C에서 15분간 18,000g으로 원심분리하여 다시 맑게 만들고, 차례로 0.8 및 0.2 µm 멤브레인(Pall Corporation, Canada)에서 여과했다. 여과된 재료를 유효면적 0.2 제곱 피트의 100kDa 분자량 컷-오프 한외여과 멤브레인(GE Healthcare Biosciences, 캐나다)을 사용하여 접선방향 흐름 여과에 의해 농축하여 맑은 재료의 부피를 5 내지 10배까지 감소시켰다. 다음에, 농축된 샘플을 재조합 단백질 G-Sepharose Fast Flow(Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, Cat. # P4691)의 5mm x 5cm 칼럼에 적용했다 (1mL 칼럼 부피). 이 칼럼을 5 칼럼 부피의 20mM 트리스-HCl, 150mM NaCl pH 7.5로 세척했다. 100mM 글리신 pH 2.9-3.0으로 항체를 용출시키고, 계산된 부피의 1M 트리스-HCl pH 7.5를 함유하는 관에 수집하여 즉시 중성 pH로 만들었다. 용출된 항체 분획을 모아서 2-8°C에서 15분간 21,000g으로 원심분리하고, 분석시까지 -80°C에 보관했다. 정제 후, 친화성 칼럼은 제조자의 지시에 따라서 세정하여 보관했다. 정제 성능에는 그다지 변화없이 동일한 크로마토그래피 매질을 몇 번의 정제에 다시 사용할 수 있다(최대 10 사이클 시험).
- [0149] 실시예 5
- [0150] N-글리코실화 분석
- [0151] C5-1(50 µg)을 포함하는 샘플을 15% SDS/PAGE에서 전개시켰다. 중쇄 및 경쇄가 코마시 블루를 사용하여 드러났으며, 중쇄에 해당하는 단백질 밴드를 절제하여 작은 단편으로 잘랐다. 단편들을 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN(1/1) 용액

600 μL으로 매번 15분씩 3번 세척하고 건조시켰다.

[0152] 56℃에서 45분간 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중의 0.1M DTT 용액 600 μL 중에서 겔 단편을 인큐베이션하여 이황화 다리를 환원시켰다. 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 중의 55mM 요도아세타미드 용액 600 μL를 가하여 실온에서 30분간 알킬화를 수행했다. 상청액을 버리고, 폴리아크릴아미드 단편을 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN(1/1) 중에서 다시 한번 세척했다.

[0153] 다음에, 37℃에서 16시간 동안 0.05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 600 μL 중의 트립신(Promega)을 7.5 μg을 사용하여 단백질을 분해시켰다. CH<sub>3</sub>CN 200 μL를 가하고 상청액을 수집했다. 다음에, 겔 단편을 0.1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 200 μL로 세척한 다음, 200 μL CH<sub>3</sub>CN으로 다시 한번 세척하고, 마지막으로 5% 포름산 200 μL로 세척했다. 모든 상청액을 모아서 동결 건조시켰다.

[0154] HPLC에 의한 펩티드 분리를 C18 역상 칼럼(4.5x250mm)에서 0.1% TFA 중의 선형 구배 CH<sub>3</sub>CN을 사용하여 수행했다. 분획들을 수집하여 동결건조시키고, 337nm 질소 레이저가 장착된 Voyager DE-Pro MALDI-TOF 기기(Applied Biosystems, USA)에서 MALDI-TOF-MS에 의해 분석했다. 알파-시아노-4-히드록시신남산(Sigma-Aldrich)을 매트릭스로서 사용하여 반사경 지연 추출 방식으로 질량 스펙트럼 분석을 수행했다.

[0155] 실시예 6

[0156] 아그로-침윤된 *Nicotiana benthamiana* 앞에서 일시 IgG 발현의 정량

[0157] 강한 플라스틱시아닌-기반 발현 카세트가 완전히 조립된 IgG의 많은 축적을 유도할 수 있는지의 여부를 시험하기 위해서, 뮤린 항-인간 IgG인 C5-1(Khoudi et al., 1997)의 경쇄 및 중쇄의 암호화 서열을 플라스틱시아닌 프로모터 및 5' 미번역 서열의 하류에 직렬 구성물로 조립하고, 도 1에 제시된 pCambia 바이너리 플라스미드의 동일한 T-DNA 세그먼트 상에 플라스틱시아닌 3' 미번역 및 전사 종결 서열을 측면 위치시켰다.

[0158] R612 및 R610 발현 카세트(실시예 1 참조) 모두에서 경쇄 및 중쇄 암호화 서열은 C5-1(Khoudi et al., 1999)로부터 네이티브 신호 펩티드를 함유했지만, R610에서는 중쇄의 C-말단에 KDEL 펩티드의 암호화 서열이 부가되어 조립된 IgG가 Golgi 장치로 이동하는 것이 금지되었다.

[0159] 클로닝 단계 및 *Agrobacterium tumefaciens*(AGL1)에 플라스미드의 전달 후, 3개 *Nicotiana benthamiana* 식물의 각 잎에 플라스미드 R612 또는 R610으로 형질전환된 *Agrobacterium* 균주를 주사기-침윤시키고, 실시예 2에 설명된 대로 분석 전 6일 동안 온실 조건에서 인큐베이션했다. 인큐베이션 기간 후, 각 식물의 잎(대략 20g 바이오매스)을 동결시켜 분쇄한 다음, 동결 분말을 혼합하여 균질한 샘플을 만들고, 이것으로부터 추출용으로 1.5g씩 2개의 부표본을 취했다(각 식물로부터; 실시예 3 참조). 포착용으로 다클론성 염소 항-마우스 IgG1 중쇄를 사용하고 검출용으로 피옥시다제-콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG(H+L)을 사용하여 효소-결합 면역수착 분석(ELISA)에 의해 각 샘플로부터 총 단백질 추출물 중의 C5-1의 함량을 정량했다(실시예 3 참조).

[0160] 도 2에 도시된 대로, R612의 침윤은 생량 kg 당 106mg의 항체의 축적을 가져왔고, 항체(R610)의 ER-보유된 형태는 동일한 조건에서 211mg/kg FW에 달했다.

[0161] 전사-후 유전자 침묵화(FTGS)가 아그로-침윤된 *Nicotiana benthamiana* 식물에서 트랜스젠의 발현을 제한한다고 밝혀졌고, 감자 바이러스 Y로부터의 침묵화 억제인자(HcPro)의 공-발현이 트랜스젠 mRNA(Brigneti et al., 1998)의 특이적 변성을 상쇄했으므로, C5-1의 발현을 증가시키는 효능에 대해서 HcPro 구성물(Hamilton et al., 2002)의 공-침윤을 시험했다. R612 및 R610과 HcPro의 공-발현은 HcPro의 부재하에 관찰된 것과 비교하여 각각 5.3배 및 3.6배까지 항체 축적 수준을 증가시켰다. HcPro의 존재시 플라스틱시아닌-제어된 C5-1 발현은 R612에 대해 558mg/kg FW, R610에 대해 757mg/kg FW의 평균값에 달했다(도 2). 최대 C5-1 발현 수준은 R612- 및 R610-침윤된 잎 모두로부터 일부 추출물에서 1.5g/kg FW(총 가용성 단백질의 25%)를 초과했다.

[0162] 아그로-침윤 발현 시스템의 확장성을 평가하기 위해서, Kapila 등(1997)으로부터 개조된 진공 침윤 과정 후 C5-1의 축적을 정량했다. 이 일련의 실험에서 전체 식물의 기생부를 R612 + HcPro 또는 R610 + HcPro로 진공-침윤시키고, 수거 전 6일 동안 온실로 되돌려보냈다. 대규모 생산 시스템을 대표하는 데이터를 제공하기 위한 노력으로서, 몇 개 식물로부터 약 250g 로트의 잎/잎꼭지의 배치를 동결시키고 균질한 샘플로 분쇄한 다음, 배치 당 재료 7.5g씩 부표본을 수집하여 분석했다. ELISA 정량에 의해 밝혀진 대로, 평균 C5-1 축적 수준은 R612 및 R610 침윤에 대해 각각 238 및 328mg/kg FW에 달했다(도 2).

[0163] 실시예 7

[0164] 생산된 항체의 특성화

[0165] 주사기- 및 진공-침윤 실험 후, 단백질 블롯 분석(실시예 3 참조)을 사용하여 분비된 형태(R612) 및 ER-보유된 형태(R610)의 단백질을 생산하는 식물에서 C5-1 IgG 조립 및 단편화의 수준을 밝혔다. 먼저 H+L 퍼옥시다제-콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG로 프로브한 웨스턴 블롯을 사용하여 C5-1 분자 상에서 그 기원과는 관계없이 최대 항체의 존재를 강조했다. 도 3a에 도시된 대로, 모든 단백질 추출물은 사용된 아세포 표적화 전략이나 침윤 방법에 상관없이 유사한 분자 크기의 단편을 유사한 상대량으로 함유했다. 각 경우에 약 150kDa에서 완전 항체에 해당하는 주 밴드(≥85%)가 드러났으며, 약 135kDa와 약 100kDa에 2개의 작은 밴드가 있었는데, 이것은 항체가 주로 완전히 조립된 형태(H2L2)로 축적되었다는 것을 나타낸다. 흥미로운 것은 뮤린 중앙 셀라인(MOPC-21; Sigma #M9269)으로부터 정제된 대조군 IgG1에도 전기영동 이동도가 유사한 단편들이 존재했다는 점인데, 이것은 식물 및 포유동물 셀라인에서 야기된 단편화가 유사했으며, 아마도 공통된 단백질 분해 활성의 결과였으리라는 것을 시사한다. 또한, 검출용의 항-마우스 중쇄 특이적 항체를 사용해서도 유사한 결과가 얻어졌다.

[0166] 추출물에 존재하는 항체 단편의 실체를 시험하기 위해서, 블롯팅한 단백질을 C5-1의 항원인 퍼옥시다제-콘쥬게이트된 인간 IgG1으로 프로브하는 활성 블롯을 사용했다. 완전-조립된 항체의 실체는 약 150kDa로서 도 3b에서 볼 수 있다. 또한, 웨스턴 블롯에서 관찰된 단편화 패턴을 100kDa 밴드(도 3a 참조)를 제외하고 활성 블롯(도 3b) 상에서 볼 수 있다. 이론과 결부시키려는 것은 아니지만, 이 결과는 100kDa 단편이 C5-1 항체의 Fab 영역을 함유하지 않고, 적어도 부분적으로는 항체 조립 중간체인 중쇄의 다이머로 구성될 가능성이 있다는 것을 시사한다.

[0167] 실시예 8

[0168] 항체 정제 및 정제 산물의 특성화

[0169] 단일 단백질 G 친화성 크로마토그래피 단계를 사용하여 바이로매스로부터 항체를 정제하고, 얻어진 산물을 SDS-PAGE에 의해 분석했다(실시예 4 참조). 도 4a에 제시된 코마시 염색된 겔은 단백질 G로부터의 용출물 분획에서 150kDa에 주 밴드를 나타낸다. 이 밴드는 분비된 형태와 ER-보유된 형태 모두에서 정제된 산물의 85%를 초과하는 양을 나타내며, 오염물의 함량은 두 형태에서 동일하다(도 4a, 레인 4 및 5). 다클론성 항-마우스 IgG로 프로브한 웨스턴 블롯 분석에 의해 정제된 C5-1 분획 중의 주 오염물은 뮤린 IgG 기원임이 밝혀졌다(데이터 도시하지 않음). 환원 조건에서 약 26kDa와 약 55kDa에서 2개의 주 산물이 검출되었는데, 이들은 각각 경쇄 및 중쇄의 분자량에 해당한다(도 4b, 레인 2). ER-보유된 항체의 중쇄는 아포플라스트 항체(도 4b, 레인 3)의 중쇄보다 더 높은 전기영동 이동도를 나타냈는데, 이것은 C-말단에 존재하는 추가 KDEL 아미노산에 의한 결과와 ER에서의 보유로 인한 N-글리코실화의 차이에 의한 결과가 합쳐진 것으로서 해석된다. 도 4c는 정제된 항체(150kDa)가 인간 IgG1과 결합했으며, 75, 90, 100 및 120kDa의 오염 단편도 마찬가지로 있음을 나타내는데, 이것은 적어도 하나의 Fab 세그먼트가 이들 단편에 존재한다는 것을 강조한다. 100kDa 단편에 Fab의 존재는 조 추출물 분석으로부터 얻어진 결과와는 대조적이었는데, 이 경우에는 100kDa가 인간 IgG와 결합하지 않았다. 조 추출물에서 100kDa로 이동하는 Fab-함유 단편의 양이 이 활성 블롯을 사용하여 검출하기에는 너무 낮았거나, 또는 100kDa로 이동하는 단편이 하나는 중쇄 다이머(Fab 없음)이고 나머지 하나는 항원-결합 영역을 함유하는 것인 2개의 상이한 분자로 구성되었을 것으로 가정된다.

[0170] 2개의 상이한 침윤 배치와 각 배치로부터의 3개의 상이한 정제 로트로부터의 정제 산물을 사이드-바이-사이드 비교하여 항체 생산에 대한 이 시스템의 재현성을 평가했다. 정제 로트의 코마시-염색된 SDS-PAGE 분석은 모든 로트에서 매우 유사한 상대량으로 동일한 밴드가 존재함을 나타냈다(도 4d).

[0171] 실시예 9

[0172] 인간 갈락토실트랜스페라제의 공-발현에 의한 항체 N-글리코실화의 변형

[0173] 일시 공-발현을 사용하여 일시 발현 동안 초기 단백질의 글리코실화를 제어할 수 있는지의 여부를 조사하기 위해서, 네이티브 인간 β-1,4-갈락토실트랜스페라제(GalT)를 포함하는 플라스토시아닌 발현 카세트를 제조했다. R622는 GalT(도 5b)를 포함했고, R621은 N-아세틸글루코사미닐 트랜스페라제(GNTI; GNT1GalT, 도 5a)의 CTS 도메인에 융합된 GalT 촉매 도메인을 포함했다. GNT1이 ER 및 시스-Golgi 장치에서 복합체 N-글리칸 합성의 초기 단계에서 작용하기 때문에 N-아세틸글루코사미닐 트랜스페라제(GNTI)의 CTS 도메인을 인간 GalT 촉매 도메인의 멤브레인 앵커리지로서 선택하였다(Saint-Jore-Dupas et al., 2006). 이론과 결부시키려는 것은 아니지만, 단백질 성숙화의 초기 단계에서 GalT 활성을 격리하는 것은 성숙 중인 글리칸 상에 β-1,4-갈락토오스의 부가 및 코어의 푸코실화와 자일로실화의 효과적인 억제를 가져올 수 있다. 이들 구성물을 C5-1과 함께 식물에 공-침윤

시켰다.

- [0174] *Nicotiana benthamiana* 식물에 R612(C5-1의 분비형), R612+R621(GNT1GalT) 또는 R612+R622(GalT)를 HcPro의 존재하에 침윤시켰다(실시에 2 참조). 도 6은 이들 바이오매스 샘플로부터 정제된 C5-1의 면역학적 분석을 도시한다.
- [0175]  $\beta$ -1,4-갈락토오스와 특이적 결합하는 *Erythrina cristagali* 응집소(ECA)를 사용하여 친화성 검출에 의해 항체의 갈락토실화를 평가했다. 예상된 대로, C5-1가 단독 발현되었을 때는 갈락토오스가 검출되지 않았다(R612; 도 6). R512+R622 (GalT)로 공-침윤한 후 정제한 C5-1에서는 갈락토실화가 관찰되었지만, R612+R621 (GNT1GalT, 도 6)로 공-침윤한 것으로부터는 관찰되지 않았다. 항- $\alpha$ -1,3-푸코오스 항체를 사용하여 수행한 웨스턴 블롯에서는 갈락토실트랜스페라제 없이 발현된 대조군 C5-1에 대해서 N-글리칸의 푸코실화가 드러났다. 아그로-침윤 방법에 상관없이 GNT1GalT와 공-발현된 항체에서는 N-글리칸의 푸코실화가 검출되지 않았으며, 네이티브 GalT와 공-발현은 항체의 푸코실화의 검출가능한 감소를 가져오지 않았다(도 6). 항- $\beta$ -1,2-자일로오스 특이적 항체를 사용해서도 유사한 결과가 얻어졌는데, GNT1GalT와 공-발현된 C5-1에서는 자일로오스-특이적 면역신호가 완전히 부재했고, C5-1가 GalT와 공-발현되었을 때는 이들이 존재했다(도 6).
- [0176] 완전-조립된 IgG의 직접 육안 평가를 위한 코마시 염색된 겔, 및 웨스턴 블롯 및 활성 블롯을 동일한 추출물에 대해 수행했다. 이 데이터에 기초하면, 설명된 항체 발현 시스템의 수율은 1.5g/kg 생량에 달하고, 조 추출물에서 산물의 85% 이상은 약 150kDa의 풀-사이즈 테트라머 IgG로 구성된다.
- [0177] 중쇄의 C-말단에 KDEL 펩티드의 부가는 Golgi로부터 다시 ER로 항체가 복귀하는 것을 매개함으로써 항체 축적(2-10x)을 증가시키기 위해서 이미 사용되고 있다(Schillberg et al., 2003). 본원에 설명된 발현 시스템을 사용하여 C5-1의 중쇄에 KDEL 펩티드를 부가하면 침묵화 억제인자 HcPro를 사용하지 않았을 때도 C5-1의 수율이 2배가 되었다. KDEL의 존재 또는 부재시 C5-1의 수율의 차이는 HcPro를 사용하여 침묵화를 감소시켰을 때 상당히 감소하였다. ER-보유된 형태 및 분비된 형태의 항체를 생산하는 식물로부터의 조 추출물에서 관찰된 단편이 크기와 상대량에서 동일했기 때문에 ER-보유는 산물의 질에 영향을 미치지 않았다.
- [0178] 예비 HPLC 상에서 C5-1을 분리하고, MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 트립신 글리코펩티드 EEQFNSTFR(SEQ ID NO:13)의 N-글리칸 프로파일을 분석했다. 도 7a에 도시된 대로, C5-1이 단독 발현되었을 때는 그것의 N-글리칸 집단이, 안정한 발현에서 관찰된 바와 같은(Bardor et al., 2003) 푸코실화 및 자일로실화된 올리고당류로 구성된 이온을 포함하여, 복합체 형태로 주로 나타났다. Man-8 및 Man-9 같은 미성숙 ER-특이적 글리칸의 존재는, 일시 발현에 의해 생산된 식물-유래 항체에 대해 이미 보고된 바와 같이(Sriraman et al., 2004) "도중의" 단백질의 단편과 관련될 수 있다.
- [0179] 항체 C5-1과 네이티브 GalT의 공-발현은 N-글리칸 구조의 유의한 변형을 가져왔지만, 고-만노오스-타입 N-글리칸에 해당하는 이온은 여전히 풍부했다. 주요 복합체인 푸코실화 및 자일로실화된 N-글리칸(J)은 소실되었고, 부분적으로 갈락토실화된 올리고당류가 새로 검출되었으며, 이들 중 일부는 식물-특이적 돌연변이와 갈락토오스 확장, 예를 들어 GalGlcNAcMan<sub>3</sub>(Xy1)GlcNAc<sub>2</sub>(도 7b)를 모두 숨기고 있었다. 이로써 C5-1과 인간  $\beta$ -1,4-갈락토실트랜스페라제의 공-발현이 식물-유래 항체의 효과적인 글리코-조작을 가져왔음이 입증되었다.
- [0180] C5-1과 GNT1GalT의 공-발현은 N-글리칸 집단이 GalT/C5-1의 집단과는 상당히 상이한 정제된 C5-1 체제를 산출했다. 도 7c에 도시된 대로, 미성숙 올리고만노오스 N-글리칸과 함께 갈락토실화된 하이브리드 및 비-갈락토실화된 하이브리드(Gal GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(K) 및 GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(G))가 존재했다. 이론과 결부시키고 싶지는 않지만, Bakker 등(2006)의 가설 대로라면 GlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(G)와 Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(B)는 성숙한 N-글리칸 형성의 중간체라기보다는 내인성 글리코시다제에 의한 하이브리드 GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>의 변성으로부터 유래된 단편일 수 있다. GNT1 막 고정의 효과가 두드러졌는데, 합성 효소 GNT1GalT가 C5-1과 일시적으로 공-발현되었던 식물로부터 정제된 C5-1는 식물-특이적  $\alpha$ -1,3-푸코오스 또는  $\beta$ -1,2-자일로오스를 숨기고 있는 글리칸을 미량( $\leq$  99%)도 함유하지 않았으며, 이것은 일시 공-발현 동안 푸코실화 및 자일로실화의 완전한 변형이 달성되었음을 입증한다.
- [0181] 모든 인용문헌은 참고자료로 본원에 포함된다.
- [0182] 본 발명은 하나 이상의 구체예에 관하여 설명되었다. 그러나, 청구항에 한정된 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 다수의 변화 및 변형이 만들어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

[0183] 참고자료:

Bakker, H. *et al.* An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7577-7582 (2006).

Boisson, M. *et al.* Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J.* **20**, 1010-1019 (2001).

Brigneti, G. *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**, 6739-6746 (1998).

Chua, Y.L., Watson, L.A., & Gray, J.C. The transcriptional enhancer of the pea plastocyanin gene associates with the nuclear matrix and regulates gene expression through histone acetylation. *Plant Cell* **15**, 1468-1479 (2003).

Cox, K.M., *et al.* Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1591-1597 (2006).

D'Aoust, M. A. *et al.* Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. *Molecular Farming*, pp 1-12. Rainer Fischer and Stefan Schillberg (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2004).

Darveau, A., Pelletier, A. & Perreault, J. PCR-mediated synthesis of chimeric molecules. *Methods Neurosc.* **26**, 77-85 (1995).

Elmayan, T. & Vaucheret, H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* **9**, 787-797 (1996).

Fischer, R. *et al.* Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 113-116 (1999).

[0184]

Fischer, R., Drossard, J., Commandeur, U., Schillberg, S. & Emans, N. Towards molecular farming in the future: moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 101-108 (1999).

Giritch, A. *et al.* Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14701-14706 (2006).

Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R. & Faye, L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol.* **23**, 559-565 (2005).

Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**, 4671-4679 (2002).

Hiatt, A., Cafferkey, R. & Bowdish, K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78 (1989).

Hiatt, A. & Pauly, M. Monoclonal antibodies from plants: a new speed record. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14645-14646 (2006).

Hibino, Y., Ohzeki, H., Sugano, N. & Hiraga, K. Transcription modulation by a rat nuclear scaffold protein, P130, and a rat highly repetitive DNA component or various types of animal and plant matrix or scaffold attachment regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 282-287 (2000).

Höfgen, R. & Willmitzer, L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Res.* **16**, 9877 (1988).

Hull, A. K. *et al.* Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax. *Vaccine* **23**, 2082-2086 (2005).

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. & Angenon, G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* **122**, 101-108 (1997).

[0185]

Kathuria, S.R. *et al.* Functionnal recombinant antibodies against human chorionic gonadotropin expressed in plants. *Curr. Sci.* **82**, 1452-1456 (2002).

Ko, K. *et al.* Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8013-8018 (2003).

Ko, K. & Koprowski, H. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res.* **111**, 93-100 (2005).

Koprivova, A. *et al.* Targeted knockouts of physcomitrella lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 517-523 (2004).

Khoudi, H. *et al.* Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 135-143 (1999).

Liu, L. & Lomonosoff, G.P. Agroinfection as a rapid method for propagating Cowpea mosaic virus-based constructs. *J. Virol. Methods* **105**, 343-348 (2002).

Ma, J. K-C., Drake, P.M.W., Chargelegue, D., Obregon, P. & Prada, A. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine* **23**, 1814-1818 (2005).

Misaki, R., Fujiyama, K. & Seki, T. Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochem. Biophys. Res Com.* **339**, 1184-1189 (2004).

Paccalet *et al.* Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. *Plant Biotech. J.* **5**, (2007).

Pagny, S. *et al.* Protein recycling from the Golgi to the endoplasmic reticulum is very active in plants but has a minor contribution to calreticulin retention. *Plant Cell* **12**, 739-752 (2000).

Pagny, S. *et al.* Structural requirements for Arabidopsis B1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the Golgi. *Plant J.* **33**, 189-203 (2003).

[0186]

Peterson, E., Owens, S.M. & Henry, R. L. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse. *AAPS J.* **8**, E383-E390 (2006).

Petrucci, S. *et al.* A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnol. J.* **4**, 511-527 (2006).

Pwee, K-H. & Gray, J.C. The pea plastocyanin promoter directs cell-specific but not full light-regulated expression in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **3**, 437-449 (1993).

Rodriguez, M. *et al.* Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 188-194 (2005).

Rouwendaal, G.J.A. *et al.* Efficient introduction of a bisecting GlnAc residue in tobacco N-glycans by expression of the gene encoding human N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology* **17**, 334-344 (2007)

Saint-Jore-Dupas, C. *et al.* Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 3182-3200 (2006).

Sambrook J., and Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. (2001).

Sandhu, J.S., Webster, C.I., & Gray, J.C. A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol. Biol.* **37**, 885-896 (1998).

Schillberg, S., Fischer, R. & Emans, N. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 433-445 (2003).

[0187]

Sharp, J. M. & Doran, P. M. Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 338-346 (2001).

Sriraman, R. *et al.* Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core- $\alpha$ (1-3)-fucose residues. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 279-287 (2004).

Strasser, R., Altmann, F., Mach, L., Glössl, J. & Steinkellner, H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking  $\beta$ 1,2 linked xylose and core  $\alpha$ 1,3-linked fucose. *FEBS Lett.* **561**, 132-136 (2004).

Szittyá, G. *et al.* Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* **22**, 633-640 (2003).

Verch, T, Yusibov, V. & Koprowski, H. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J. Immunol. Methods* **220**, 69-75 (1998).

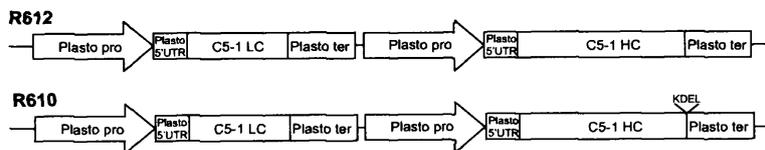
Watzel, G., Bachofner, R. & Berger, E.G.. Immunocytochemical localization of the Golgi apparatus using protein-specific antibodies to galactosyltransferase. *Eur. J. Cell. Biol.* **56**, 451-458 (1991).

Yusibov, V., Rabindran, S., Commandeur, U. Twyman, R.M. & Fischer, R. The potential of plant virus vectors for vaccine production. *Drugs R.D.* **7**, 203-217 (2006).

[0188]

도면

도면1a



도면1b

```

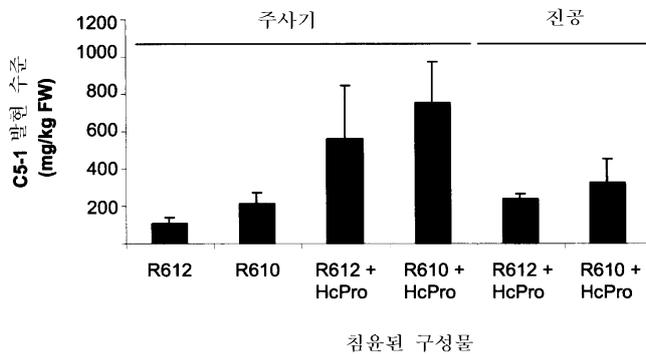
AGAGGTACCC CGGGCTGGTA TATTTATATG TTGTCAAATA ACTCAAAAAC
CATAAAAAGTT TAAGTTAGCA AGTGTGTACA TTTTACTTGT AACAAAAATA
TTCACCTACT ACTGTTATAA ATCATTATTA AACATTAGAG TAAAGAAATA
TGGATGATAA GAACAAGAGT AGTGATATTT TGACAACAAT TTTGTTGCAA
CATTTGAGAA AATTTTGTG TTCTCTCTTT TCATTGGTCA AAAACAATAG
AGAGAGAAAA AGGAAGAGGG AGAATAAAAA CATAATGTGA GTATGAGAGA
GAAAGTTGTA CAAAAGTTGT ACCAAAATAG TTGTACAAAT ATCATTGAGG
AATTTGACAA AAGCTACACA AATAAGGGTT AATTGCTGTA AATAAATAAG
GATGACGCAT TAGAGAGATG TACCATTAGA GAATTTTGG CAAGTCATTA
AAAAGAAAGA ATAAATTAT TTTAAAATTA AAAGTTGAGT CATTGATTA
AACATGTGAT TATTTAATGA ATTGATGAAA GAGTTGGATT AAAGTTGTAT
TAGTAATTAG AATTTGGTGT CAAATTTAAT TTGACATTTG ATCTTTTCCT
ATATATGACC CCATAGAGTC AGTTAACTCA TTTTATATTT TCATAGATCA
AATAAGAGAA ATAACGGTAT ATTAATCCCT CCAAAAAAAA AAAACGGTAT
ATTTACTAAA AAATCTAAGC CACGTAGGAG GATAACAGGA TCCCGTAGG
AGGATAACAT CCAATCCAAC CAATCACAAC AATCCTGATG AGATAACCCA
CTTTAAGCCC ACGCATCTGT GGCACATCTA CATTATCTAA ATCACACATT
CTTCCACACA TCTGAGCCAC ACAAAAACCA ATCCACATCT TTATCACCCA
TTCTATAAAA AATCACACTT TGTGAGTCTA CACTTTGATT CCCTCAAAC
ACATACAAAG AGAAGAGACT AATTAATTA TTAATCATCT TGAGAGAAA
TG
    
```

도면1c

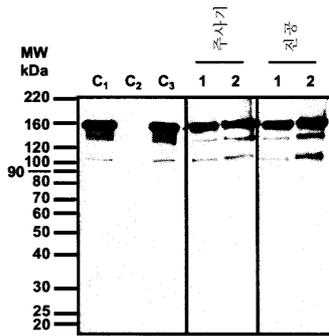
```

TAAGTTAAAA TGCTTCTTCG TCTCCTATTT ATAATATGGT TTGTTATTGT
TAATTTTGT CTTGTAGAAG AGCTTAATTA ATCGTTGTG TTATGAAATA
CTATTTGTAT GAGATGAACT GGTGTAATGT AATTCATTTA CATAAGTGGA
GTCAGAATCA GAATGTTTCC TCCATAACTA ACTAGACATG AAGACCTGCC
GCGTACAATT GTCTTATATT TGAACAATA AAATTGAACA TCTTTTGCCA
CAACTTTATA AGTGGTTAAT ATAGCTCAAA TATATGGTCA AGTTCAATAG
ATTAATAATG GAAATATCAG TTATCGAAAT TCATTAACAA TCAACTTAAC
GTTATTAACT ACTAATTTTA TATCATCCCC TTTGATAAAT GATAGTACA
    
```

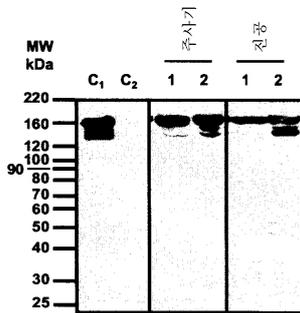
도면2



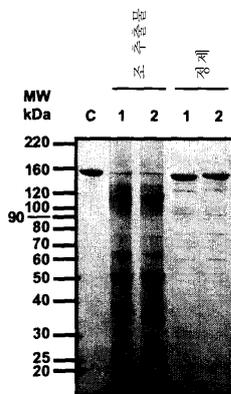
도면3a



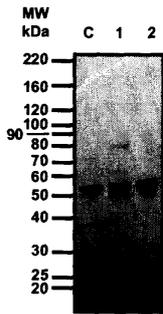
도면3b



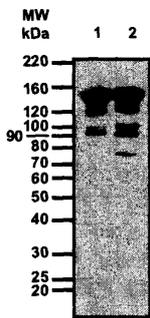
도면4a



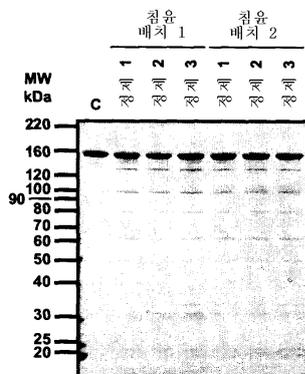
도면4b



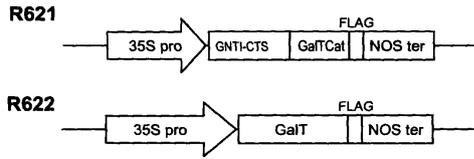
도면4c



도면4d



도면5a



도면5b

ATGAGGCTTCGGGAGCCGCTCCTGAGCGGCAGCGCCGCGATGCCAGGCGCGTCCCTACAGCGGGC  
 CTGCCGCTGCTCGTGGCCGCTGCGCTCTGCACCTTGGCGTCAACCTCGTTTACTACCTGGCTGGC  
 CGCGACCTGAGCCGCTGCCCAACTGGTCGGAGTCTCCACACCGCTGCAGGGCGGCTCGAACAGT  
 GCGCGCCGATCGGGCAGTCTCCGGGGAGCTCCGGACCGGAGGGGGCCGGCCGCGCTCCTCT  
 AGGCGCTCCTCCAGCCGCGCCGGGTGGCGACTCCAGCCAGTCTGGATTCTGGCCCTGGCCC  
 CGCTAGCAACTTGACCTCGGTCCCAGTGCCCCACACCACCGCACTGTCGCTGCCCGCTGCCCTGA  
 GGAGTCCCGCTGCTTGTGGGCCCATGCTGATTGAGTTTAACATGCCTGTGGACCTGGAGCTCGT  
 GGCAAAGCAGAACCCAAATGTGAAGATGGCGGCCGCTATGCCCCAGGGACTGCGTCTCTCCTC  
 ACAAGTGGCCATCATCATTCCATTCCGCAACCGGCAGGAGCACCTCAAGTACTGGCTATATTATT  
 GCACCCAGTCTGCAGCGCCAGCAGCTGGACTATGGCATCTATGTTATCAACCAGGCGGGAGACAC  
 TATATTCAATCGTCTAAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTGAAGGACTATGACTACACCT  
 GCCTTTGTGTTAGTGACGTGGACCTCATTTCAAATGAATGACCATAATGCGTACAGGTGTTTTACAG  
 CCACGGCACATTTCCGTTGCAATGGATAAGTTTGGATTGAGCTACCTTATGTTCAAGTATTTGGAGG  
 TGTCTCTGCTAAGTAACAACAGTTTCTAACCATCAATGGATTCTAATAATATTGGGGCTGGG  
 GAGGAGAAGATGATGACATTTTAAACAGATTAGTTTGTAGAGGCATGTCTATCTCGCCAAATGC  
 TGTGGTCTGGGAGGTGTCGATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAAAATGAACCCAATCCTCAGAG  
 GTTTGACCGAATGCACACACAAGGAGACAATGCTCTCTGATGGTTTGAACCTCACTCACCTACCG  
 GGGCTGGATGTACAGAGATACCCATTGTATACCCAAATCACAGTGGACATCGGGACACCGAGCGAT  
 TACAAGGATGACGATGACAAGATCGATTAG

도면5c

MRLREPLLSGSAAMPGLASLRACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDL SRLPQLVGVSTPLQGGSNSAAAI  
 GQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPPRGGDSSPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVG  
 PMLIEFNMPVDELVAQNPNVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIPFRNRQHLKYWLYLHPVLQRQLD  
 YGIYVINGAGDTIFNRAKLLNVGFQALKDYDYTCFVSDVDLIPMNDHNAYRCSQPRHISVAMDKFGF  
 SLPYVQYFGVVSALSKQFLTINGFPNNYWGWWGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMRHSRD  
 KKNPEPNQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQGLDVQRYPLYTQITVDIGTPSDYKDDDDKID\*

도면5d

ATGAGAGGGTACAAGTTTTGCTGTGATTCCGGTACCTCCTCATCTTGGCTGCTGCGCCTCATCTAC  
 ATACAGATGCGGCTTTTTGCGACACAGTCAGAATATGCAGATCGCCTTGCTGCTGCAATTGAAGCAGAA  
 AATCACTGTACAAGTCAGACCAGATTGCTTATTGACCAAGATTAGCCAGCAGCAAGGAAGAAATAGTTGCT  
 CTTGAAGAACAATGAAGCGTCAGACTAGTGCACTGTCGCTGCCCGCTGCCCTGAGGAGTCCCCGC  
 TGCTTGTGGGCCCATGCTGATTGAGTTTAACATGCCTGTGGACCTGGAGCTCGTGGCAAAGCAGAA  
 CCCAAATGTGAAGATGGGCGGCCGCTATGCCCCAGGGACTGCGTCTCTCCTCACAAGGTGGCCAT  
 CATCATTCCATTCCGCAACCGGCAGGAGCACCTCAAGTACTGGCTATATTATTGACCCAGTCCCTG  
 CAGCGCCAGCAGCTGGACTATGGCATCTATGTTATCAACCAGGCGGGAGACACTATATTCAATCGTG  
 CTAAGCTCCTCAATGTTGGCTTTCAAGAAGCCTTGAAGGACTATGACTACACCTGCTTTGTGTTTGT  
 GACGTGGACCTCATTCCAATGAATGACCAATATGCGTACAGGTGTTTTTACAGCCACGGCACATTT  
 CCGTTGCAATGGATAAGTTTGGATTGAGCTACCTTATGTTCAAGTATTTGGAGGTGCTCTGCTCTA  
 AGTAAACAACAGTTTCAACCATCAATGGATTTCCTAATAATTATTGGGGCTGGGGAGGAGAAGATG  
 ATGACATTTTTAACAGATTAGTTTTAGAGGCATGTCTATATCTCGCCAAATGCTGTGGTGGGAGG  
 TGTCGATGATCCGCCACTCAAGAGACAAGAAAATGAACCCAATCCTCAGAGGTTTACCGAATTTG  
 CACACACAAGGAGACAATGCTCTCTGATGGTTTGAACCTCACTCACCTACCAGGGGCTGGATGTACA  
 GAGATACCCATTGTATACCCAAATCACAGTGGACATCGGGACACCGAGCGATTACAAGGATGACGAT  
 GACAAGATCGATTAG

도면5e

MRGYKFCDFRYLLILAAVAFLYIQMRLFATQSEYADRLAAAEIENHCTSQTRLLIDQISQQQGRVIALEEQ  
 MKRQTSALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDELVAQNPNVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIPFRNR  
 QEHLKYWLYLHPVLQRQLDYGIYVINGAGDTIFNRAKLLNVGFQALKDYDYTCFVSDVDLIPMNDH  
 NAYRCSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGVVSALSKQFLTINGFPNNYWGWWGEDDDIFNRLVFRG  
 MSISRPNAVVGRCRMRHSRDKKNPEPNQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQGLDVQRYPLYTQITVDIG  
 TPSDYKDDDDKID\*

도면5f

TACCTCCTCATCTTGGCTGCTGTCGCTTCATCTACATACAGATGCGGCTTTTT

도면5g

YLLILAAVAFIYIQMRLF

도면5h

GNTI-GNTIII 뉴클레오티드 서열

ATGAGAGGGA ACAAGTTTTG CTGTGATTTC CGGTACCTCC TCATCTTGGC 50  
 TGCTGTCGCC TTCATCTACA CACAGATGCG GCTTTTTGCG ACACAGTCAG 100  
 AATATGCAGA TCGCCTTGCT GCTGCAATG AAGCAGAAAA TCATGTGACA 150  
 AGCCAGACCA GATTGCTTAT TGACCAGATT AGCCTGCAGC AAGGAAGAAT 200  
 AGTTGCTCTT GAAGAACAAA TGAAGCGTCA GACTAGTTCG CCCCTGCTGC 250  
 AGCCGCTGCC GCCCAGCAAG GCGGCCGAGG AGCTCCACCG GGTGGACTTG 300  
 GTGCTGCCCG AGGACACCAC CGAGTATTTC GTGCGCACC AAGCCGGCCG 350  
 CGTCTGCTTC AAACCCGGCA CCAAGATGCT GGAGAGGCCG CCCCCTGGAC 400  
 GGCCGGAGGA GAAGCCTGAG GGGGCCAACG GCTCCTCGGC CCGCGGCCA 450  
 CCCCCTGACC TCCTGAGCGC CCGGGAGCGC ACGGGGGGCC GAGGCGCCG 500  
 GCGCAAGTGG GTGGAGTGG TGTGCTTGC CGGCTGGCAC GGACCCAGCT 550  
 GCGGCGTGCC CACTGTGGTG CAGTACTCCA ACCTGCCAC CAAGGAGCGG 600  
 CTGGTGCCCA GGGAGGTGCC GCGCCGCGTC ATCAACGCCA TCAACGTCAA 650  
 CCACGAGTTC GACCTGCTGG ACGTGCCTT CCACGAGCTG GCGCAGCTGG 700  
 TGGACGCCTT TGTGGTGTGC GAGTCCAAC TCACGGCTTA TGGGAGCCG 750  
 CCGCCGCTCA AGTTCGGGA GATGCTGACC AATGGCACCT TCGAGTACAT 800  
 CCGCCACAAG GTGCTCTATG TCTTCTGGA CCACTTCCCG CCCGGCGGCC 850  
 GGCAGGACCG CTGGATCGCC GACGACTACC TGCGCACCTT CCTCACCCAG 900  
 GACGGCGTCT CGCGGTGCG CAACCTGCGG CCGCAGCACG TCTTCATCAT 950  
 TGACGATGCG GACGAGATCC CGGCCCGTGA CGGCGTCTT TTCCTCAAGC 1000  
 TCTACGATGG CTGGACCGAG CCCTTCGCCT TCCACATGCG CAAGTCGCTC 1050  
 TACGGCTTCT TCTGGAAGCA GCCGGGCACC CTGGAGGTGG TGTCAAGGCTG 1100  
 CACGGTGGAC ATGCTGCAGG CAGTGTATGG GCTGGACGGC ATCCGCCTGC 1150  
 GCCCGGCCA GTACTACACC ATGCCCAACT TCAGACAGTA TGAGAACCCG 1200  
 ACCGGCCACA TCCTGTGCA GTGGTCGCTG GGAGGCCCC TCACTTCGC 1250  
 CCGTGGCAC TGCTCCTGGT GCTTCAACGC CGAGGGCATC TACTTCAAGC 1300  
 TCGTGTCCGC CCAGAATGGC GACTTCCCAC GCTGGGGTGA CTACGAGGAC 1350  
 AAGCGGGACC TGAACACAT CCGCGGCCTG ATCCGCACCG GGGGCTGGTT 1400  
 CGACGGCAGC CAGCAGGAGT ACCCGCCTGC AGACCCAGC GAGCACATGT 1450  
 ATGCGCCCAA GTACCTGCTG AAGAACTACG ACCGGTTCCTA CTACCTGCTG 1500  
 GACAACCCT ACCAGGAGCC CAGGAGCACG GCGCGGGCG GGTGGCCCA 1550  
 CAGGGGTCCC GAGGGAAGGC CGCCCGCCC GGGCAAATG GACGAGCCG 1600  
 AAGTCGAACA AAAACTCATC TCAGAAGAGG ATCTGAATTA G 1641

도면5i

GNTIIGNTIII 웨터드 서열

MRGNKFCDFRYLLILAAVAFIYIQMRLFATQSEYADRLAAAEIENHCTSQTRLLIDQ  
 ISLQQGRIVALEEQMKRQTSSPLLQPLPPSKAAEELHRVDLVLPEDTTEYFVRTKAGGV  
 CFKPGTKMLERPPPGRPEBKPEGANGSSARRPPRYLLSARERTGGRGARRKRWECVCLP  
 GWHGSPCGVPTVVQYSNLPTKERLVPREVPRRVINAINVNHEFDLLDVRFHELGDVVDA  
 FVVCSNFTAYGEPRLKPREMLTNGTFEYIRHKVLYVFLDHFPPGGRQDGIADYLR  
 TFLTQDGVSRRLRNLRPDDVFIIDDADEIPARDGVLFLKLYDGWTEPFPAFHMRSYGF  
 WKQPGTLEVVSGCTVMDLQAVYGLDGI RLRQQYYTMPNFRQYENRTGHILVQWSLGSF  
 LHFAGWHCSWCFTEPIYFKLVSAQNGDFPRWGDYEDKRDNLNIRGLIRTTGGWFDGTQQ  
 EYPPADPSEHMYAPKYLLKNYDRFHYLLDNPYQEPSTAGGWRHRGPEGRPPARGKLD  
 EAEVEQKLI SEEDLN\*

도면5j

GNT III

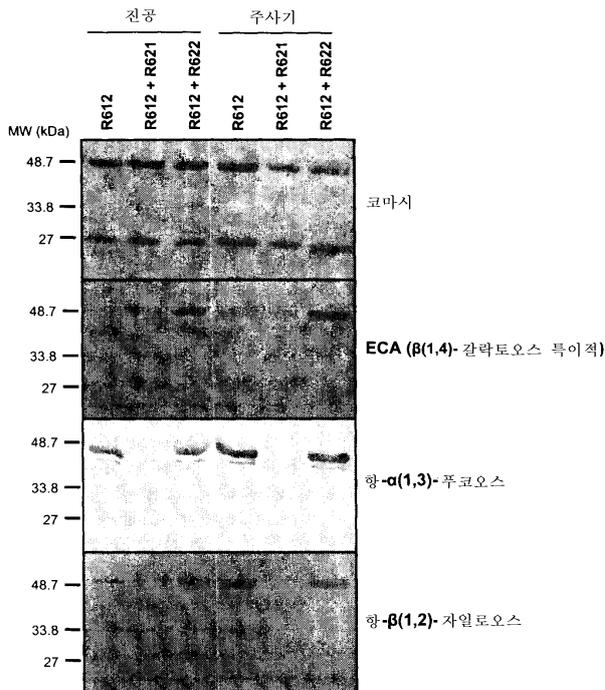
—  
 ACTAGTTCGC CCCTGCTGCA GCCGCTGCCG CCCAGCAAGG CGGCCGAGGA 50  
 GCTCCACCGG GTGGACTTGG TGCTGCCCGA GGACACCACC GAGTATTTTCG 100  
 TGCGCACCAA GGCCGGCGGC GTCTGCTTCA AACCCGGCAC CAAGATGCTG 150  
 GAGAGGCCCG CCCCGGGACG GCCGGAGGAG AAGCCTGAGG GGGCCAACGG 200  
 CTCTTCGGCC CGGCGGCCAC CCGGTACCT CCTGAGCGCC CGGGAGCGCA 250  
 CGGGGGCCCG AGGCGCCCGG CGCAAGTGGG TGGAGTGCGT GTGCCTGCC 300  
 GGCTGGCACG GACCCAGCTG CGGCGTGCC ACTGTGGTGC AGTACTCCAA 350  
 CCTGCCACC AAGGAGCGGC TGGTGCCAG GGAGGTGCCG CGCCGCTCA 400  
 TCAACGCCAT CAACGTCAAC CAGGAGTTCG ACCTGCTGGA CGTGCGCTTC 450  
 CACGAGCTGG GCGACGTGGT GGACGCCCTT GTGGTGTGCG AGTCCAACCT 500  
 CACGGCTTAT GGGAGCCGC GGCCGCTCAA GTTCCGGGAG ATGCTGACCA 550  
 ATGGCACCTT CGAGTACATC CGCCACAAGG TGCTCTATGT CTTCTGAGAC 600  
 CACTTCCCGC CCGCGGCCG GCAGGACGGC TGGATCGCCG ACGACTACCT 650  
 GCGCACCTTC CTCACCCAGG ACGGCGTCTC GCGGCTGCCG AACCTGCCGC 700  
 CCGACGACGT CTTTCATCATT GACGATGCGG ACGAGATCCC GGCCCGTGAC 750  
 GCGGTCCTTT TCCTCAAGCT CTACGATGGC TGGACCGAGC CCTFCGCTT 800  
 CCACATGCGC AAGTCGCTCT ACGGCTTCTT CTGGAAGCAG CCGGGCACCC 850  
 TGGAGGTGGT GTCAGGCTGC ACGGTGGACA TGCTGCAGGC AGTGTATGGG 900  
 CTGGACGGCA TCCGCTGCG CCGCCGCCAG TACTACACCA TGCCCAACTT 1000  
 CAGACAGTAT GAGAACCGCA CCGCCACAT CCTGGTGCG TGGTCGCTGG 1050  
 GCAGCCCCCT GCACTTCGCC GGCTGGCACT GCTCCTGGTG CTTACGCCC 1100  
 GAGGGCATCT ACTTCAAGCT CGTGTCCGCC CAGAATGGCG ACTTCCCACG 1150  
 CTGGGGTGAC TACGAGGACA AGCGGGACCT GAACTACATC CGCGGCCTGA 1200  
 TCCGCACCGG GGGCTGGTTC GACGGCACGC AGCAGGAGTA CCCGCTGCA 1250  
 GACCCACGCG AGCACATGTA TCGCCCAAG TACCTGCTGA AGAACTACGA 1300  
 CCGGTTCCAC TACCTGCTGG ACAACCCCTA CCAGGAGCCC AGGAGCACGG 1350  
 CGGCGGGCCG GTGGCGCCAC AGGGGTCCC AGGGAAGGCC GCCCGCCCGG 1400  
 GGCAAACCTGG ACGAGCGGA AGTCGAACAA AACTCATCT CAGAAGAGGA 1450  
 TCTGAATTAG 1460

도면5k

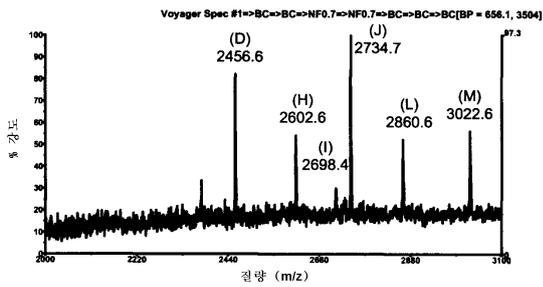
GNTIII 펩티드 서열

TSSPLLQPLPPSKAAEELHRVDLVLPEDTTEYFVVRTKAGGVCFKPGTKMLERPPPPGRPE  
 EKPEGANGSSARRPPRYLLSARERTGGRGARRKWVECVCLPGWHGSPCGVPTVVQYSNL  
 PTKERLVPREVPRRVINAINVNHFDLLDVRFHGLGDVVDVAVVCESNFTAYGEPRLK  
 FREMLTNGTFEYIRHKVLYVFLDHFPFGGRQDGIADYLRFTFLTQDGVSRRLRNLRPDD  
 VFIIDDADEI PARQVLFKLYDGWTEPFAFHRKSLYGFQKPGTLEVVSGCTVDML  
 QAVYGLDGIRLRRRQYYTMPNFRQYENRTGHILVQWSLGSPLHFAWGHCSWCFTPEGIY  
 FKLVSQAQNGDFPRWGDYEDKRDLYIRGLIRTGGWFDGTQOEYPPADPSEHMYAPKYLL  
 KNYDRFHYLLDNPYQEPRSTAAGGWRHRGPEGRPPARGKLDAAEVEQKLISEEDLN\*

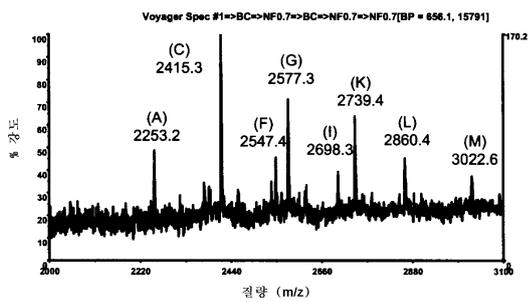
도면6



도면7a

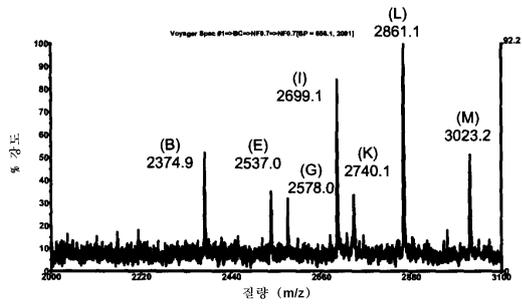
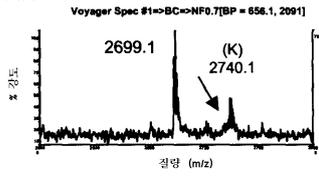


도면7b



도면7c

도 7c 삽입부



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)