



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0091174
(43) 공개일자 2017년08월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/00 (2006.01) C07K 14/39 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/00 (2013.01)
C07K 14/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7021127(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년04월03일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2009-7022979
원출원일자(국제) 2008년04월03일
심사청구일자 2013년03월29일
- (85) 번역문제출일자 2017년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2008/001814
- (87) 국제공개번호 WO 2008/120107
국제공개일자 2008년10월09일
- (30) 우선권주장
60/909,904 2007년04월03일 미국(US)
60/940,212 2007년05월25일 미국(US)

- (71) 출원인
옥시레인 유케이 리미티드
영국 엠1 2에이피 맨체스터 피카딜리 49 피카딜리
하우스 수트 313
- (72) 발명자
칼레워트, 니코, 룩, 마크
벨기에 비-9850 한스베케-네벨레 베진호플란 15
베르베켄, 와우터
벨기에 9860 란드스카우터 스투이벤버그 35
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 무한

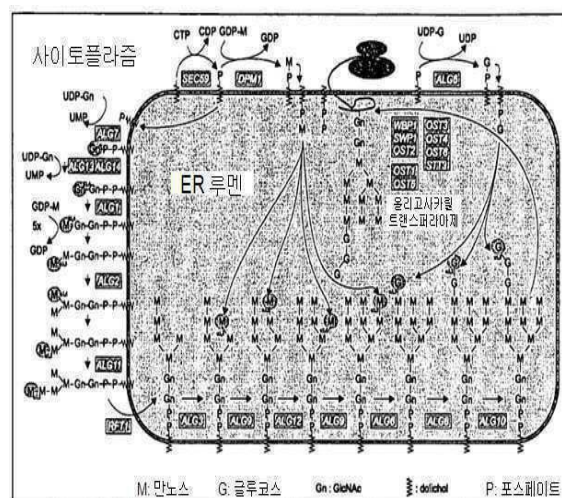
전체 청구항 수 : 총 126 항

(54) 발명의 명칭 분자의 글리코실화

(57) 요약

타겟 단백질의 N-글리코실레이션 형의 제조에 유용한 제조방법 및 유전적으로 엔지니어드된 세포가 개시되어 있다. 대사성 질환과 같은 다양한 질병의 치료에 유용한 변성 N-글리코실레이션을 갖는 분자 및 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/52 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

(72) 발명자

마르셀 드 포크, 카렌, 재클린

벨기에 비-9820 마레베케 독터 드 그루이테르스트
라트 7

게이젠스, 스티븐, 크리스티안, 조제프

벨기에 비-9770 크루이슈템 아이쇼베드리에스트라
트 25

구에르팔, 모우나

벨기에 비-9051 겐트-드론겐 비크스트라트 29

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카 (*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아테니니보란스(*Arxula adenivorans*)세포를 제공하는 단계; 및

상기 세포에 타겟 단백질을 인코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하고, 상기 세포는 변성 N-글리코실레이션 형에서 타겟 단백질을 생성하는, 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 분리하는 단계를 더 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 외인성 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 내인성 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 포유류 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 사람의 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 병원체 단백질, 리소솜 단백질, 성장 인자, 사이토카인, 케모카인, 이들의 항체 또는 항원-결합 단편 또는 융합 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 융합 단백질은 병원체 단백질, 리소솜 단백질, 성장 인자, 사이토카인, 또는 케모카인과 이들의 항체 또는 항원-결합 단편의 융합인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 지질침착질환(LSD)과 관련된 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의

제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 글리고세레브로시다제 또는 갈락토세레브로시다제인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 타겟 단백질은 알파-L-이두로니다제, 베타-D-갈락토시다제, 베타-글루코시다제, 베타-헥소사미니다제, 베타-D-만노시다제, 알파-L-푸코시다제, 아릴설파타제 B, 아릴설파타제 A, 알파-N-아세틸갈락토사미니다제, 아스파틸글루코사미니다제, 이두로네이트-2-설파타제, 알파-글루코사미나이드-N-아세틸트랜스퍼라제, 베타-D-글루코로니다제, 히알루로니다제, 알파-L-만노시다제, 알파-뉴라미니다제, 포스포트랜스퍼라제, 액시드 리파제, 액시드 세라미다제, 스팅고미엘리나제, 티오에스테라제, 카텝신 K, 및 리포프로테인 리파제로 이루어지는 군으로부터 선택된 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

변성 N-글리코실레이션 형에는 하나 이상의 N-글리칸 구조를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 17

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 18

제12항에 있어서,

하나 이상의 N-글리칸은 $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 19

제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형이 균일한 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 20

제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형이 실질적으로 균일한 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

변성 글리코실레이션을 함유하는 변성 타겟 단백질의 분획이 적어도 약 20%인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 22

제20항에 있어서,

변성 글리코실레이션을 함유하는 변성 타겟 단백질의 분획이 적어도 약 30%인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 23

제20항에 있어서,

변성 글리코실레이션을 함유하는 변성 타겟 단백질의 분획이 적어도 약 40%인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 25

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 26

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 27

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 28

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 29

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성 글리코실레이션은 $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 적어도 하나의 N-글리코실레이션 활성이 결핍되도록 유전적으로 엔지니어드된 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 ALG3 활성인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 OCH1 활성인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 MNS1 활성인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 34

제30항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 MNN9 활성인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나 이상의 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자의 결손을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나 이상의 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 변이형의 발현을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나 이상의 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 기능적 발현을 방해하는 RNA 분자의 도입 또는 발현을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나 이상의 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 발현을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 발현된 단백질은 세포 중에 외인성 핵산에 의해 인코딩된 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 40

제38항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 글루코실트랜스퍼라제 활성인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 ALG6인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 42

제38항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 알파-만노시다제인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 43

제38항에 있어서,

상기 알파-만노시다제는 소포체에 의해 타겟되는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 알파-만노시다제 폴리펩타이드 및 HDEL 소포체 보유 펩타이드를 포함하는 용융 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 45

제42항에 있어서,

상기 알파-만노시다제는 pH 최적값이 5.1 미만인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 46

제38항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 글루코스 잔기를 제거할 수 있는 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 47

제38항 또는 제46항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 α -1,3-글루코시다제 활성을 갖는 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서,

상기 단백질은 글루코시다제 II인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 49

제46항 내지 제48항에 있어서,

상기 단백질은 글루코시다제 II의 알파 및 베타 서브유닛 중 하나 또는 모두를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 50

제46항에 있어서,

상기 단백질은 뮤타나제인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 51

제1항에 있어서,

상기 세포는 적어도 2 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 52

제51항에 있어서,

상기 적어도 2 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성은 ALG3 활성의 결핍 및 ALG6 활성의 증가를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 53

제1항에 있어서,

상기 세포는 적어도 3 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 54

제51항에 있어서,

상기 적어도 3 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성은 ALG3 활성의 결핍, ALG6 활성의 증가 및 글루코시다제 II의 증가를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 55

제38항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 외인성 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 56

제38항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 포유류 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 57

제56항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 사람의 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 58

제38항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 하등 진핵생물의 단백질인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 59

제45항에 있어서,

상기 하등 진핵 생물은 진균, 트리파노소마, 또는 원생동물인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조 방법.

청구항 60

제58항에 있어서,

상기 하등 진핵 생물은 타이파노소마 부루세이(*Typanosoma brucei*), 트리코더마 하르시아눔(*Trichoderma harzianum*) 및 아스퍼길러스(*Aspergillus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서,

변성에는 타겟 단백질의 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체의 발현을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 62

제61항에 있어서,

상기 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체로 MNN4를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 63

제61항에 있어서,

상기 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체로 PN01을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 64

제61항에 있어서,

상기 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체로는 MNN6를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 65

제61항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

당단백의 만노실 잔기의 적어도 약 30%이상이 인산화된 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 OCH1 활성이 결핍되도록 유전적으로 엔지니어드 되어 있지 않은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,
당단백의 부가 프로세싱을 더 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 68

제67항에 있어서,
상기 부가 프로세싱은 인 비트로(in vitro)에서 이루어지는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 69

제67항에 있어서,
상기 부가 프로세싱은 인 비보(in vivo)에서 이루어지는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 70

제67항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부가 프로세싱은 변성 당단백에 이소성 부분을 추가하는 것을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 71

제55항에 있어서,
상기 이소성 부분은 폴리머 또는 담체인 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 72

제67항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부가 과정은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 효소적 또는 화학적 처리를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 73

제67항에 있어서,
상기 부가 과정은 상기 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 만노시다제, 만나나제, 포스포디에스테라제, 글루코시다제, 또는 글리코실트랜스퍼라제로 처리하는 것을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 74

제72항에 있어서,
상기 부가 과정은 상기 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 플루오르화 수소산으로 처리하는 것을 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 75

제67항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부가 과정은 상기 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 인산화를 포함하는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조방법.

청구항 76

단백질이 제1항 내지 제75항의 방법으로 생산된, 변성 N-글리코실레이션을 갖는 분리 단백질.

청구항 77

적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카 (*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adenivorans*)의 분리 세포.

청구항 78

제77항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성이 ALG3 활성인 분리 세포.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성이 OCH1 활성인 분리 세포.

청구항 80

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성이 MNS1 활성인 분리 세포.

청구항 81

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성이 MNN9 활성인 분리 세포.

청구항 82

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 유전자 인코딩 단백질의 결손을 포함하는 분리 세포.

청구항 83

제77항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 변이형의 발현을 포함하는 분리 세포.

청구항 84

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 기능적 발현을 방해하는 RNA 분자의 도입 또는 발현을 포함하는 분리 세포.

청구항 85

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 발현을 포함하는 분리 세포.

청구항 86

제85항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성은 글루코실트랜스퍼라제 활성인 분리 세포.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 ALG6인 분리 세포.

청구항 88

제85항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 알파-만노시다제인 분리 세포.

청구항 89

제88항에 있어서,

상기 알파-만노시다제는 소포체를 타겟으로 하는 분리 세포.

청구항 90

제88항 또는 제89항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 알파-만노시다제 폴리펩타이드 및 HDEL 소포체 보유 펩타이드를 포함하는 용융 단백질인 분리 세포.

청구항 91

제85항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 글루코스 잔기를 제거할 수 있는 단백질인 분리 세포.

청구항 92

제85항 또는 제91항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 α -1,3-글루코시다제 활성을 갖는 단백질인 분리 세포.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서,

상기 단백질은 글루코시다제 II인 분리 세포.

청구항 94

제91항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질은 글루코시다제 II의 알파 및 베타 서브유닛 중 하나 또는 모두를 포함하는 분리 세포.

청구항 95

제91항에 있어서,

상기 단백질은 뮤타네즈인 분리 세포.

청구항 96

제77항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 적어도 2 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 분리 세포.

청구항 97

제96항에 있어서,

상기 적어도 2 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성은 ALG3 활성의 결핍 및 ALG6 활성의 증강을 포함하는 분리 세포.

청구항 98

제77 항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 유전적으로 엔지니어드되어 적어도 3 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하는 분리 세포.

청구항 99

제98항에 있어서,

상기 적어도 3 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성은 ALG3 활성의 결핍, ALG6 활성의 증강 및 글루코시다제 II의 증강을 포함하는 분리 세포.

청구항 100

제77항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 OCH1 활성이 결핍되도록 유전적으로 엔지니어드 되어 있지 않은 분리 세포.

청구항 101

제85항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 사람의 단백질인 분리 세포.

청구항 102

제77항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변성에는 변성 당단백의 만노실 인산화를 촉진시키는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체의 발현을 포함하는 분리 단백질.

청구항 103

제102항에 있어서,

상기 만노실 인산화에 영향을 주는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체로 MNN4를 포함하는 분리 단백질.

청구항 104

제103항에 있어서,

상기 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체로 PN01을 포함하는 분리 단백질.

청구항 105

변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질을 도입함으로써 질병이 치료될 수 있는 개체에 제76항의 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질을 투여함으로써 질병을 치료하는 방법.

청구항 106

제105항에 있어서,

상기 질병은 대사성 질환인 치료 방법.

청구항 107

제106항에 있어서,

상기 대사성 질환은 지질침착질환(LSD)인 치료 방법.

청구항 108

제107항에 있어서,

상기 지질침착질환은 고세병, 테이-삭스병, 폼페병, 니만피크병, 또는 파브리병인 치료 방법.

청구항 109

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 단백질은 지질침착질환과 관련이 있는 단백질인 치료 방법.

청구항 110

제109항에 있어서,
상기 단백질은 글루코세레브로시다제 또는 알파-갈락토시다제인 치료 방법.

청구항 111

제109항에 있어서,
상기 단백질은 알파-L-이두로니다제, 베타-D-갈락토시다제, 베타-글루코시다제, 베타-헥소사미니다제, 베타-D-만노시다제, 알파-L-푸코시다제, 아릴설파타제 B, 아릴설파타제 A, 알파-N-아세틸갈락토사미니다제, 아스파틸 글루코사미니다제, 이두로네이트-2-설파타제, 알파-글루코사미니드-N-아세틸트랜스퍼라제, 베타-D-글루코로니다제, 히알루로니다제, 알파-L-만노시다제, 알파-뉴라미니다제, 포스포트랜스퍼라제, 액시드 리파제, 액시드 세라미다제, 스팅고미엘리나제, 티오에스테라제, 카텝신 K, 및 리포프로테인 리파제로 이루어지는 군으로부터 선택된 치료 방법.

청구항 112

제105항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서,
개체의 질병이 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질을 투여함으로써 치료가능한지 여부를 결정하는 단계를 더 포함하는 치료 방법.

청구항 113

제105항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 개체는 사람인 치료 방법.

청구항 114

적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 세포로부터 수득한 세포 용해물과 타겟 단백질을 접촉하는 단계를 포함하고, 상기 세포 용해물과 상기 타겟 단백질을 접촉시킴으로써 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 수득할 수 있는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션의 제조 방법.

청구항 115

N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 타겟 단백질을 접촉하는 단계를 포함하고, 상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질은 적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 세포로부터 수득하고, 상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 상기 타겟 단백질을 접촉시킴으로써 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션형을 수득할 수 있는 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션의 제조 방법.

청구항 116

적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 실질적인 숫자로 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)의 실질적으로 순수한 배양 세포.

청구항 117

제87항에 있어서,

상기 배양 세포는 하나 이상의 세포 아집단을 포함하고, 각 아집단은 상이한 변성 글리코실레이션 활성을 포함하는 배양 세포.

청구항 118

SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2를 포함하는 분리 뉴클레오타이드 시퀀스.

청구항 119

적어도 80% 이상 동일한 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2인 시퀀스를 포함하는 분리 뉴클레오타이드 시퀀스.

청구항 120

제118항 또는 제119항에 있어서,

분리 뉴클레오타이드 시퀀스에 의해 인코딩된 폴리펩타이드.

청구항 121

(a) 매우 엄격한 조건 하에 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 보체로 혼성화된 뉴클레오타이드 시퀀스; 또는

(b) 상기 뉴클레오타이드 시퀀스의 보체를 포함하는 분리 핵산.

청구항 122

제118항 내지 제121항 중 어느 한 항의 핵산 시퀀스를 포함하는 벡터.

청구항 123

제118항 내지 제121항 중 어느 한 항의 핵산 시퀀스를 포함하는 발현 벡터.

청구항 124

제123항의 발현 벡터 또는 폴리펩타이드를 발현하는 세포의 자손을 포함하는 배양 세포.

청구항 125

폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건 하에서 제124항의 세포를 배양하는 것을 포함하는 단백질 제조 방법.

청구항 126

제125항에 있어서,

세포를 배양한 후에, 세포가 배양된 배지 또는 세포로부터 폴리펩타이드를 분리하는 단계를 더 포함하는 단백질 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글리코실화 분자, 특히 단백질 및 지질 분자를 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대부분의 생물약제(예컨대, 재조합 단백질)를 제조하기 위한 고성능의 발현 시스템이 개발 중이다. 상기 생물약제들의 생물학적 활성은 이들의 변성(예컨대, 인산화 또는 글리코실화)에 의존적이다. 효모-기반의 발현 시스템은 단백질을 분비 및 변형하는 유전자 조작 및 미생물 발효의 결합이다. 그러나, 효모 세포 중에서 생산된 재조합 당단백은 주로 불균일(heterogeneous) 하이-만노스 및 하이퍼-만노스 글리칸 구조를 나타내는데, 이는, 특히 글리코실레이션은 생물학적으로 현저한 역할을 하는 경우에, 단백질 구조, 다운스트림 프로세싱, 및 후속의 치료적 용도에 불리한 영향을 나타낼 수 있다.

발명의 내용

- [0003] 본 발명은, (a) 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포 중에서 단일 유전자 결손(single gene deletion, Outer CHain elongation(OCH1) deletion)에 의해, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 IV, 도 1) 백본 상에 α -1,2-링크된 만노스 잔기를 갖는 글리코실화된 단백질을 실질적으로 균일하게 생산한다는 점, (b) 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(OCH1 결손이 있는 경우 및 없는 경우 모두)의 ER에 타겟되도록 엔지니어드된 알파-1,2-만노시다제의 과발현으로 인해, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ N-글리칸 구조(구조식 IV, 도 1)를 운반하는 글리코실화된 단백질을 실질적으로 균일하게 생산한다는 점, (c) 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포에 있어서 아스파라긴 링크된 글리코실레이션 3(ALG3) 효소 활성을 불활성화시킴으로써, 글리코실레이트된 글리칸이 매우 증강된다는 점, (d) 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포에서 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 유전자의 와일드 타입형(MNN4)이 과발현됨으로 인해, α -1,2-링크된 만노스 잔기의 과인산화가 이루어진다는 점을 기초로 하였다. 따라서, 유전적으로 엔지니어드된 세포(예컨대, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*), 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 또는 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포)를, 동종의 비-유전적 엔지니어드된 세포로부터 생성된 타겟 분자의 N-글리코실레이션 형과 비교하였을 때, 변성 N-글리코실레이션 형을 갖는 타겟 분자를 생성하는 방법에 사용할 수 있다. N-글리코실레이션된 타겟 분자(예컨대, N-글리코실레이션된 단백질)를 대사성 질환(예컨대, 지질침착질환)을 갖고 있는 환자에 투여함으로써, 질병의 증상을 개선시킬 수 있었고, 제조 방법 및 세포는 예컨대 지질침착질환과 같은 대사성 질환의 치료를 위한 N-글리코실레이션된 타겟 분자의 제조에 유용하게 사용되었다.
- [0004] 본 발명은 또한, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) HAC1 유전자의 스플라이싱 형에 근거한 것이다. HAC1 유전자, Hac1p로 인코딩된 단백질은 전사 활성화자(transcriptional activator)로, 안접힌 단백질 반응(UPR, Unfolded Protein Response)이라고 하는 DNA 시퀀스 모티프에 결합됨으로써 타겟 유전자의 전사를 활성화시킨다. Hac1p 타겟 유전자들 중에는, 샤페론(chaperones), 폴라아제(folase) 및 지질-및 이노시톨 대사와 관련된 단백질을 인코딩하는 것들이 있다. Hac1p 스플라이싱 형은, 스플라이싱되지 않은 HAC1 mRNA에 의해 인코딩된 형 보다 더욱 강력한 전사 활성화자이기 때문에, Hac1p 전사 인자의 스플라이싱 형의 과발현으로 인해 ER 막의 증가뿐만 아니라 본태성(native) 또는 이종(heterologous) 단백질의 발현도 증가되게 된다. 따라서, Hac1p 전사 인자의 스플라이싱 형은, 다양한 진핵 세포(예컨대, 진균 세포(예컨대, 알로위아 리포리티카 또는 본 명세서에 따른 다른 효모 세포), 식물 세포, 또는 동물 세포(예컨대, 사람 세포와 같은 포유류 세포)에 있어서 UPR의 동시적 활성화 및 타겟 분자의 발현에 의해 막 및 분비 단백질의 생성을 증가시키는 데 사용될 수 있다.
- [0005] 본 발명은 또한, 알로위아 리포리티카에서 발현될 때, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (구조식 I, 도 4) 구조를 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 IV, 도 4), $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (구조식 V, 도 4) 및 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VI, 도 4)로 전환시킬 수 있는 MNS1 만노시다제의 변이 형에 근거한 것이다. 따라서, MNS1과 같이 만노시다제의 변이 형을 발현하는 유전적으로 엔지니어드 된 진핵 세포(예컨대, 진균 세포(예컨대, 알로위아 리포리티카 또는 본 명세서에 따른 다른 효모 세포), 식물 세포, 또는 동물 세포(예컨대, 사람 세포와 같은 포유류 세포)를, 동종의 비-유전적 엔지니어드된 세포로부터 생성된 타겟 분자의 N-글리코실레이션 형과 비교하였을 때, 변성 N-글리코실레이션 형을 갖는 타겟 분자를 생성하는 방법에 사용할 수 있다. 따라서, 본 명세서의 세포 및 제조 방법은 지질침착질환과 같은 대사성 질환의 치료를 위하여 N-글리코실화된 타겟 분자의 제조에 유용하다.
- [0006] 일 측면으로는, 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조 방법이 개시되어 있다. 상기 제조 방법에는, 타겟 단백질을 인코딩하고 있는 핵산을 세포에 도입하는 단계가 포함되어 있는데, 상기 세포는 변성 N-글리코실레이션 형으로 타겟 단백질을 생성하는데, 상기 세포는 적어도 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)(또는 동종이형 효모 세포 관련 종)이다. 상기 제조 방법은, 또한, 적어도 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) (또는 동종이형 효모 세포 관련 종)를 제공하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 또한, 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0007] 구체적으로, 타겟 단백질은 내인성 단백질이거나 외인성 단백질일 수 있다. 타겟 단백질은 사람의 단백질과 같이 포유류의 단백질일 수 있다. 타겟 단백질은 예컨대, 병원체 단백질, 리소좀 단백질, 성장 인자, 사이토카인, 케모카인, 이들의 항체 또는 항원-결합 단편 또는 융합 단백질일 수 있다. 융합 단백질은, 예컨대 병원체 단백질, 리소좀 단백질, 성장 인자, 사이토카인 또는 케모카인과 이들의 항체 또는 항원-결합 단편과의 융합일 수 있다. 타겟 단백질은, 예컨대 지질침착질환(LSD, Lysosomal storage disorder)과 관련된 단백질일 수 있다. 타

겟 단백질은, 예컨대 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 갈락토세레브로시다제(galactocerebrosidase), 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 베타-D-갈락토시다제(beta-D-galactosidase), 베타-글루코시다제(beta-glucosidase), 베타-헥소사미니다제(beta-hexosaminidase), 베타-D-만노시다제(beta-D-mannosidase), 알파-L-푸코시다제(alpha-L-fucosidase), 아릴설파타제 B(arylsulfatase B), 아릴설파타제 A(arylsulfatase A), 알파-N-아세틸갈락토사미니다제(alpha-N-acetylgalactosaminidase), 아스파틸글루코사미니다제(aspartylglucosaminidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-20sulfatase), 알파-글루코사미나이드-N-아세틸트랜스퍼라제(alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase), 베타-D-글루코로나다제(beta-D-glucuronidase), 히알루로나다제(hyaluronidase), 알파-L-만노시다제(alpha-L-mannosidase), 알파-뉴라미니다제(alpha-neuraminidase), 포스포트랜스퍼라제(phosphotransferase), 액시드 리파제(acid lipase), 액시드 세라미다제(acid ceramidase), 스펅고미엘리나제(sphingomielinase), 티오에스테라제(thioesterase), 카텝신 K(cathepsin K), 및 리포프로테인 리파제(lipoprotein lipase)일 수 있다.

[0008] 구체적으로, 변성 N-글리코실레이션 형은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 등과 같은 하나 이상의 N-글리칸 구조를 함유할 수 있다. 구체적으로는, 상기 변성 글리코실레이션은 예컨대, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 일 수 있다.

[0009] 구체적으로, 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형은 균일(homogeneous) 또는 실질적으로 균일할 수 있다. 예컨대, 변성 글리코실레이션을 함유하는 변성 타겟 단백질의 분획은 적어도 약 20% 이상, 적어도 약 30% 이상, 적어도 약 40% 이상, 적어도 약 50% 이상, 적어도 약 55% 이상, 적어도 약 60% 이상, 적어도 약 65% 이상, 적어도 약 70% 이상, 적어도 약 75% 이상, 적어도 약 80% 이상, 적어도 약 85% 이상, 적어도 약 90% 이상, 또는 적어도 약 95% 이상일 수 있다.

[0010] 구체적으로, 상기 세포는 적어도 하나의 N-글리코실레이션 활성이 결핍되도록 유전적으로 엔지니어드될 수 있다. N-글리코실레이션 활성은, 예컨대, ALG3 활성, OCH1 활성, MNS1 활성 또는 MNN9 활성일 수 있다.

[0011] 구체적으로, 하나 이상의 변성(modification)으로는, (a) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자의 결손(deletion); (b) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 변이형의 발현(expression); (c) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 기능적 발현을 방해하는 RNA 분자의 도입(introduction) 또는 발현(expression); (d) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질(예컨대, ALG6 또는 알파-만노시다제(예컨대, 소포체를 타겟으로 하는 알파-만노시다제) 발현(expression)일 수 있다. 발현된 단백질은 세포 중에서 외인성 핵산으로 인코딩된 단백질일 수 있다. 발현된 단백질은 pH 최적값이 7.5 미만(예컨대, pH 최적값이 5.1 미만)인 알파-만노시다제일 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 포유류 단백질(예컨대, 사람 단백질) 또는 하등 진핵 생물(예컨대, 진균, 트리파노소마, 또는 원생동물) 단백질일 수 있다. 상기 하등 진핵 생물은 타이파노소마 부루세이(*Typanosoma brucei*), 트리코더마 하르지아눔(*Trichoderma harzianum*), 아스퍼길러스(*Aspergillus*) 및 본 명세서에 기재된 다른 하등 진핵 생물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0012] 구체적으로, N-글리코실레이션 활성은 글루코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase) 활성일 수 있다. 구체적으로, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 ALG6 또는 알파-만노시다제이다. 알파-만노시다제는 소포체에 타겟될 수 있다. 예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 알파-만노시다제 폴리펩타이드 및 HDEL 소포체 보유 펩타이드(endoplasmic reticulum retention peptide)를 포함하는 용융 단백질일 수 있다.

[0013] 구체적으로, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 글루코스 잔기를 제거할 수 있는 단백질일 수 있다. 예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 α -1,3-글루코시다제 활성을 갖는 단백질, 예컨대 이에 한정되는 것은 아니나 글루코시다제 II(예컨대, 글루코시다제 II의 알파 및 베타 서브유닛 중 하나 또는 모두를 포함) 또는 뮤타나제(mutanase)일 수 있다.

[0014] 구체적으로, 상기 세포는 본 명세서에 기재된 변성(modified) N-글리코실레이션 활성과 같은 적어도 2 이상의 변성(modified) N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드될 수 있다. 적어도 2 이상의 변성(modified) N-글리코실레이션 활성으로는 예컨대, ALG3 활성의 결핍(deficiency) 및 ALG6 활성의 증강(elevated level)을 포함할 수 있다.

[0015] 구체적으로, 상기 세포는 본 명세서에 기재된 변성(modified) N-글리코실레이션 활성과 같은 적어도 3 이상의 변성(modified) N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드될 수 있다. 적어도 3 이상의 변성

(modified) N-글리코실레이션 활성으로는 예컨대, ALG3 활성의 결핍, ALG6 활성의 증강 및 글루코시다제 II의 증강을 포함할 수 있다.

- [0016] 구체적으로, 상기 세포는 OCH1 활성이 결핍되도록 유전적으로 엔지니어드 되어 있지 않는다.
- [0017] 구체적으로, 변성으로는, 타겟 단백질의 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체의 발현을 포함할 수 있다. 타겟 단백질의 만노실 인산화에 영향을 줄 수 있는 단백질 또는 이들의 생물학적 활성 변이체는 MNN4, PNO1, 또는 MNN6일 수 있다. 구체적으로, 당단백의 만노실 잔기의 적어도 약 30% 이상이 인산화될 수 있다.
- [0018] 구체적으로, 상기 방법은 당단백의 부가 프로세싱(additional processing)을 포함할 수 있다. 부가 프로세싱은 인 비트로 또는 인 비보에서 일어날 수 있다. 부가 프로세싱은 변성 당단백에 이소성 부분(heterologous moiety)을 추가하는 것을 포함할 수 있다. 이소성 부분은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 효소적 또는 화학적 처치를 포함할 수 있다. 예컨대, 부가 프로세싱은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 만노시다제, 만나나제, 포스포디에스테라제, 글루코시다제, 또는 글리코실트랜스퍼라제로 처리하는 것을 포함할 수 있다. 부가 프로세싱은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형을 플루오르화 수소산으로 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0019] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조 방법을 개시하고 있다. 본 발명은 하기와 같은 단계: 적어도 하나의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드 된 진핵 세포(예컨대, 진균 세포, 식물 세포, 또는 동물 세포)를 제공하는 단계; 타겟 단백질을 인코딩하는 핵산을 상기 세포에 도입하는 단계로, 상기 세포가 변성 N-글리코실레이션 형으로 타겟 단백질을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0020] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조 방법을 개시하고 있다. 상기 발명은: 적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 세포로부터 수득한 세포 용해물(cell lysate)과 타겟 단백질을 접촉하는 단계를 포함하고, 상기 세포 용해물과 상기 타겟 단백질을 접촉시킴으로써 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션형을 수득할 수 있다.
- [0021] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션 형의 제조 방법을 개시하고 있는데, 상기 방법은 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 타겟 단백질을 접촉하는 단계를 포함하고, 상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질은 적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 세포로부터 수득하고, 상기 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 상기 타겟 단백질을 접촉시킴으로써 타겟 단백질의 변성 N-글리코실레이션형을 수득할 수 있다.
- [0022] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 변성 N-글리코실레이션을 갖는 분리 단백질을 개시하고 있다.
- [0023] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성을 포함하도록 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)의 분리 세포(또는 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포)를 개시한다. N-글리코실레이션 활성은, 예컨대, ALG3 활성, OCH1 활성, MNS1 활성 또는 MNN9 활성일 수 있다. 상기 변성은 (a) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자의 결손(deletion); (b) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 변이 형(mutant form)의 발현(expression); (c) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 기능적 발현을 방해하는 RNA 분자의 도입(introduction) 또는 발현(expression); 또는 (d) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 발현(expression)일 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 예컨대 ALG6일 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 예컨대 사람 단백질과 같은 포유류 단백질일 수 있다. 상기 변성은 변성 당단백의 만노실 인산화를 촉진시킬 수 있는 단백질(예컨대, MNN4 또는 PNO1) 또는 이들의 생물학적 활성 변이체의 발현을 포함한다.
- [0024] 또 다른 관점으로는, 본 발명은 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질을 투여함으로써 치료 가능한 질병의 치료 방법을 개시한다. 본 발명은 상기의 방법으로 수득한 단백질을 개체(subject)에 투여하는 과정을 포함하는데, 상기 개체는 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질의 투여로 치료 가능한 질병을 갖고 있거나, 갖고 있는 것으로 의심되는 환자이어야 한다. 상기 치료 방법은 다음과 같은 단계: (a) 투여 단계, 및/또는 (b) 개체의 질병이 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질을 투여함으로써 치료가능한지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 상기 개

체는 사람과 같은 포유류일 수 있다. 상기 질환은, 예컨대, 암, 면역학적 질환(immunological disorder)(예컨대, 염증 상태) 또는 대사성 질환(metabolic disorder)일 수 있다. 대사성 질환으로는, 고세병(Gaucher disease), 테이-삭스병(Tay-Sachs disease), 폼페병(Pompe disease), 니만피크병(Niemann-Pick disease), 또는 파브리병(Fabry disease)과 같은 지질침착질환(lysosomal storage disorder)일 수 있다. LSD와 관련된 단백질로는, 예컨대 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 알파-갈락토시다제(alpha-galactosidase)일 수 있다. 단백질은, 예컨대, 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 베타-D-갈락토시다제(beta-D-galactosidase), 베타-글루코시다제(beta-glucosidase), 베타-헥소사미니다제(beta-hexosaminidase), 베타-D-만노시다제(beta-D-mannosidase), 알파-L-푸코시다제(alpha-L-fucosidase), 아릴설파타제 B(arylsulfatase B), 아릴설파타제 A(arylsulfatase A), 알파-N-아세틸갈락토사미니다제(alpha-N-acetylgalactosaminidase), 아스파틸글루코사미니다제(aspartylglucosaminidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-20sulfatase), 알파-글루코사미나이드-N-아세틸트랜스퍼라제(alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase), 베타-D-글루코로니다제(beta-D-glucuronidase), 히알루로니다제(hyaluronidase), 알파-L-만노시다제(alpha-L-mannosidase), 알파-뉴라미니다제(alpha-neuraminidase), 포스포트랜스퍼라제(phosphotransferase), 액시드 리파제(acid lipase), 액시드 세라미다제(acid ceramidase), 스펅고미엘리나제(sphingomyelinase), 티오에스테라제(thioesterase), 카텡신 K(cathepsin K), 및 리포프로테인 리파제(lipoprotein lipase)일 수 있다.

[0025] 또 다른 관점에서, 본 발명은 적어도 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 활성(본 명세서에 기재된 변성 등과 같은)을 포함하도록 실질적인 숫자로 유전적으로 엔지니어링된, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adenivorans*)의 실질적으로 순수한 배양 세포를 제공한다. 상기 배양 세포는 하나 이상의 세포 아집단(subpopulations)을 포함하고, 각 아집단은 상이한 변성 글리코실레이션 활성을 포함한다.

[0026] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 (a) SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2를 포함하는 분리 뉴클레오타이드 시퀀스; (b) 적어도 80% 이상 동일한 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2인 시퀀스를 포함하는 분리 뉴클레오타이드 시퀀스; (c) 분리 뉴클레오타이드 시퀀스 (a) 또는 (b)에 의해 인코딩된 폴리펩타이드를 제공한다. 구체적으로, 분리된 핵산 시퀀스는 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2이다.

[0027] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 (a) 매우 엄격한 조건 하에 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 보체로 혼성화된 뉴클레오타이드 시퀀스; 또는 (b) 상기 뉴클레오타이드 시퀀스의 보체를 포함하는 분리 핵산(isolated nucleic acid)을 개시한다.

[0028] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 (a) 본 명세서에 기재된 핵산 시퀀스를 포함하는(또는 이루어지는) 분리 뉴클레오타이드 시퀀스; (b) 본 명세서에 기재된 핵산 시퀀스와 적어도 80% 이상 동일한 시퀀스를 포함하는 분리 뉴클레오타이드 시퀀스; (c) 분리 뉴클레오타이드 시퀀스 (a) 또는 (b)에 의해 인코딩된 폴리펩타이드를 제공한다. 구체적으로, 분리 핵산 시퀀스는 본 명세서에 기재된 핵산 시퀀스이다.

[0029] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 (a) 매우 엄격한 조건 하에 본 명세서에 기재된 핵산 시퀀스의 보체와 혼성화된 뉴클레오타이드 시퀀스; 또는 (b) 상기 뉴클레오타이드 시퀀스의 보체를 포함하는 분리 핵산이 개시되어 있다.

[0030] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 (a) 상기 핵산 시퀀스를 포함하는 벡터, 또는 (b) 상기 (a)의 벡터를 함유하는 배양 세포를 개시한다. 상기 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 벡터 중의 상기 핵산 시퀀스는 발현 조절 시퀀스(expression control sequence)와 링크될 수 있다.

[0031] 또 다른 관점에서는, 본 발명은 단백질 제조 방법을 개시한다. 상기 방법은, 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건 하에 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 또한, 세포 배양 후에, 세포가 배양된 배지 또는 세포로부터 폴리펩타이드를 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 세포는, 예컨대, 상기 핵산 시퀀스를 포함하는 벡터를 함유하는 배양세포일 수 있다.

[0032] 타겟 분자(예컨대, 타겟 단백질), N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질, 및 상기 기재된 변성 N-글리코실레이션 분자(이들을 모두 "본 발명의 분자"로 언급함)는 분리될 수 있으나, 반드시 분리되어야 하는 것은 아니다. 본 명세서에서 분자에 사용된 "분리(isolated)"라는 용어는, 자연적으로 동반되는 컴포넌트(예컨대, 단백질 또는 다른 자연적으로 발생하는 생물학적 또는 유기 분자)로부터 분리 또는 정제된 분자 또는 이들의 단편을 의미한다. 재조합 분자(예컨대, 재조합 단백질)는 항상 분리된다. 전형적으로, 본 발명의 분자들은 제제 중 동일한 타입의 총 분자에 대하여 적어도 60 중량%로 구성되는 경우, 예컨대 샘플 중 동일한 타입의 총 분자 60%인 경우

에 분리된다. 예컨대, 변성 글리코실레이션 단백질은, 제제 또는 샘플 중 총 단백질의 적어도 60 중량%인 경우에 분리된다. 구체적으로, 제제 중 본 발명의 분자는, 제제 중 동일한 타입의 총 분자의 적어도 75 중량%, 적어도 90 중량%, 또는 적어도 95 중량%으로 구성된다.

[0033] 본 명세서에서, 타겟 분자의 "변성 N-글리코실레이션 형(altered N-glycosylation type)"은, 호스트 세포(예컨대 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*), 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 또는 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포)를 유전적으로 엔지니어드함으로써 제조된 타겟 분자의 N-글리코실레이션 형을 의미하고, 이는 유전적으로 엔지니어드된 세포로서 동종의 유전적으로 엔지니어드된 세포로부터 제조된 타겟 분자의 N-글리코실레이션 형과는 구별된다. 따라서, 타겟 분자의 변성 글리코실레이션 형은, 예컨대 N-글리코실레이션되지 않은 타겟 분자의 형을 말한다. 더욱이, 타겟 분자의 변성 글리코실레이션 형은, 예컨대 하나 이상의 N-링크된 글리칸의 변형 인산화를 갖는 타겟 분자의 형일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서, "다른 관련 종의 동종이형 효모 세포(other related dimorphic yeast cell species)"는 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)와 관련된 효모를 의미하는데, 이들은 아르술라(*Arxula*), 디포다스쿠스(*Dipodascus*)(예컨대 디포다스쿠스 알비두스(*D. albidus*), 디포다스쿠스 인젠스(*D. ingens*), 또는 디포다스쿠스 스페시퍼(*D. specifer*)), 갈락토마이세스(*Galactomyces*)(예컨대, 갈락토마이세스 리시(*G. reesii*) 또는 갈락토마이세스 게오텐리움(*G. geotrichum*)), 스포로파키더마(*Sporopachyderma*), 스테파노아스쿠스(*Stephanoascus*)(예컨대, 스테파노아스쿠스 시페리(*S. ciferii*)), 위커하미엘라(*Wickerhamiella*) 및 자이코아스쿠스(*Zygoascus*)와 같은 디포다스카시예(*Dipodascaceae*)에 속한다. 특히, 메치니코비아(*Metchnikowia*)(예컨대, 메치니코비아 풀케리마(*M. pulcherrima*) 또는 메치니코비아 아가베스(*M. agaves*)) 및 스테파노아스쿠스(*Stephanoascus*)(아르술라(*Arxula*)(예컨대 아르술라 아데니니보란스(*A. adeninivorans*) 또는 or 아르술라 테레스트리스(*A. terrestris*))와 같은 종의 26S-rDNA 시퀀스의 D1/D2 도메인을 분석한 *Y. 리폴리티카(Y. lipolytica)* 및 칸디다 종(*Candida species*)(예컨대, 칸디다 아피콜라(*C. apicola*), 단, 칸디다 알비칸스(*C. albicans*), 칸디다 말토사(*C. maltosa*) 또는 칸디다 트로피칼리스(*C. tropicalis*)는 제외) 클레이드(clade)의 효모들이다.

[0035] "폴리펩타이드(Polypeptide)" 또는 "단백질(protein)"은 서로 상호교환적으로 사용되었고, 길이 또는 변성(post-translational modification)에도 불구하고, 아미노산의 펩타이드-링크된 체인을 의미한다.

[0036] 본 발명에는, 본 명세서에서 기재된 와일드-타입, 전체-길이의(full-length), 성숙한(mature) "타겟 단백질" 또는 "N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질"의 (i)생물학적으로 활성화된 변이체(biologically active variants) 및 (ii) 생물학적으로 활성화된 단편(biologically active fragments) 또는 이들의 생물학적으로 활성화된 변이체가 개시되어 있다. 전체-길이의(full-length), 성숙한(mature), 와일드-타입 단백질 또는 단백질의 단편의 생물학적으로 활성화된 변이체는, 부가(additions), 결손(deletions) 또는 치환(substitutions)을 포함한다. 치환된 단백질들은 일반적으로 50 이하(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 50 이하)의 컨저버티브 아미노산 치환(conservative amino acid substitutions)을 갖는다. 컨저버티브 치환은 하나의 아미노산을 유사한 성질을 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것을 말한다. 컨저버티브 치환은 다음의 그룹 중에서의 치환을 포함한다: 발린(valine), 알라닌(alanine) 및 글리신(glycine); 류신(leucine), 발린(valine), 및 이소류신(isoleucine); 아스파르트산(aspartic acid) 및 글루탐산(glutamic acid); 아스파라긴(asparagines) 및 글루타민(glutamine); 세린(serine), 시스테인(cysteine), 및 트레오닌(threonine); 리신(lysine) 및 아르기닌(arginine); 및 페닐알라닌(phenylalanine) 및 티로신(tyrosine). 비극성의 소수성 아미노산(non-polar hydrophobic amino acids)에는 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 포함한다. 극성의 중성 아미노산(polar neutral amino acids)에는, 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양 전하의(염기성) 아미노산에는 알기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음 전하의(산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 상기 극성, 염기성 또는 산성 그룹 중의 하나를 같은 그룹의 다른 것으로의 치환은 컨저버티브 치환이다.

[0037] 결손 변이체(Deletion variants)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 개의 아미노산 세그먼트(2 이상의 아미노산) 또는 비접촉(non-contiguous) 단일 아미노산이 결핍될 수 있다.

[0038] 부가(부가 변이체)는, 다음을 포함하는 용융 단백질을 포함한다: (a) 적어도 5 이상의 아미노산을 함유하는 전체-길이의(full-length), 와일드-타입(wild-type), 성숙한(mature) 폴리펩타이드 또는 이들의 단편; 및 (b) 내부(internal) 또는 말단의(terminal)(C 또는 N) 부적절(irrelevant)하거나 이종의(heterologous) 아미노산 시

퀸스. 상기 용융 단백질에 관한 설명에 있어서, "이종 아미노산 시퀀스(heterologous amino acid sequences)"라 함은, (a) 이외의 아미노산 시퀀스를 의미한다. 본 명세서의 펩타이드 및 이종 아미노산 시퀀스를 함유하는 용융 단백질은, 시퀀스 중에서 자연적으로 발생된 단백질의 전부 또는 일부에 상응하지 않는다. 이종 시퀀스는, 예컨대, 재조합 단백질(예컨대, FLAG, 폴리히스티딘(polyhistidine)(예컨대, 헥사히스티딘(hexahistidine)), 헤마글루타닌(hemagglutinin, HA), 글루타치온-S-트랜스퍼라제(glutathione-S-transferase, GST), 또는 말토스-결합 단백질(maltose-binding protein, MBP))의 정제에 사용되는 시퀀스이다. 이종 시퀀스는 진단 또는 검출 마커(diagnostic or detectable markers), 예컨대, 루시페라제(luciferase), 연녹 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 또는 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)로 유용한 단백질일 수 있다. 구체적으로는, 상기 용융 단백질은 다른 단백질로부터 단일 시퀀스를 함유한다. 특정 호스트 세포(예컨대 효모 호스트 세포)에 있어서는, 타겟 단백질의 발현 및/또는 분비가 이종 시그널 시퀀스의 사용을 통해 증가될 수 있다. 구체적으로는, 상기 용융 단백질은, 면역 반응 유도(예컨대, 항체 제너레이션; 아래 참조) 또는 소포체 또는 골지체 보유 시그널(retention signals)에 유용한 담체(예컨대 KLH)를 함유할 수 있다. 이종 시퀀스는 길이가 다양할 수 있고, 어떤 경우에는 이종 시퀀스가 부착되어 있는 전체-길이의(full-length) 타겟 단백질보다 더 긴 시퀀스일 수 있다.

[0039] 본 명세서에서, "단편(fragment)"은 전체-길이의(full-length), 미성숙(immature) 단백질 보다 짧은 폴리펩타이드의 단편(segment)을 의미한다. 단백질의 단편은 말단(카복시 또는 아미노-말단) 및/또는 내부 결손을 가질 수 있다. 일반적으로, 단백질 단편은 길이가 적어도 4(예컨대, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 18, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 또는 적어도 100 또는 그 이상)인 아미노산일 수 있다.

[0040] 타겟 단백질 또는 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 생물학적 활성 단편 또는 생물학적 활성 변이체는, 적어도 와일드-타입, 전체-길이의, 성숙한 단백질 활성의 적어도 25% (예컨대, 적어도: 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 97%; 98%; 99%; 99.5%, 또는 100% 이상)이다. 타겟 단백질의 경우, 적절한 활성은 유전적으로 엔지니어드된 세포에서 타겟 단백질이 변성 N-글리코실레이션될 수 있는 것을 말한다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 경우, 적절한 활성은 N-글리코실레이션 활성을 말한다.

[0041] 사용 의도에 따라, 단백질, 생물학적 활성 단편, 또는 이들의 생물학적 활성 변이체는, 예컨대 진균류(효모 포함), 선충류(nematode), 곤충, 식물, 조류, 파충류, 또는 포유류(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 저빌(gerbil), 개, 고양이, 염소, 돼지, 소, 말, 고래, 원숭이, 또는 사람)과 같은 어느 종일 수도 있다. 구체적으로, 생물학적 활성 단편 또는 생물학적 활성 변이체에는 단백질의 면역성(immunogenic) 또는 항원성(antigenic) 단편을 포함한다. 면역성 단편은, 목적하는 동물에 있어서, 적절한 전체-길이의, 미성숙 단백질이 면역 반응(예컨대, 항체 반응 또는 세포 면역 반응)을 자극할 수 있는 정도의 적어도 25% (예컨대, 적어도: 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 97%; 98%; 99%; 99.5%, 또는 100% 또는 그 이상)일 수 있다. 단백질의 항원성 단편은 적절한 전체-길이의, 미성숙 단백질이 단백질에 특이적인 항체 또는 단백질에 특이적인 T 세포에 의해 인식될 수 있는 정도의 적어도 25% (예컨대, 적어도: 30%; 40%; 50%; 60%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 97%; 98%; 99%; 99.5%, 또는 100% 또는 그 이상)일 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 "N-글리코실레이션 활성(N-glycosylation activity)"이라 함은, (i) N-링크된 글리칸을 타겟 분자(예컨대, 올리고사카릴트랜스퍼라제(oligosaccharyltransferase) 활성)에 부가할 수 있는 능력; (ii) N-링크된 글리칸을 타겟 분자로부터 제거하는 능력, (iii) 타겟 분자 상에 하나 이상의 N-링크된 글리칸 변성, (iv) 돌리콜-링크된 올리고사카라이드(dolichol-linked oligosaccharides) 변성, 또는 (v)상기 (i-iv)활성을 보조하는 능력을 의미한다. 이와 같이, N-글리코실레이션 활성에는, 예컨대, N-글리코시다제 활성(N-glycosidase activity), 글리코시다제 활성(glycosidase activity), 글리코실트랜스퍼라제 활성(glycosyltransferase activity), 당 뉴클레오타이드 합성(sugar nucleotide synthesis), 변성(modification) 또는 트랜스포터 활성(transporter activity)을 포함한다. 타겟 분자에서 하나 이상의 N-링크된 글리칸의 변성은, 만노실포스포릴트랜스퍼라제 활성(mannosylphosphoryltransferase activity), 키아제 활성(kinase activity), 예컨대, 만노실포스포릴트랜스퍼라제(mannosylphosphoryltransferase), 키나제(kinase) 또는 타겟 분자 상에 N-링크된 글리칸의 인산화 상태를 변화시키는 포스파타제 활성(phosphatase activity)을 포함한다.

[0043] 본 명세서에서, 세포의 "유전적 엔지니어(genetically engineer)" 또는 "유전적으로 엔지니어드된 세포(genetically engineered cell)" 등의 용어는, 세포에 대하여 인공적으로 발생된 유전적 변형을 의미하는 것으로, 유전적으로 엔지니어드되지 않은 세포(예컨대, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라

아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*), 또는 동종이형 효모 세포 관련 중, 식물 세포, 또는 동물 세포(예컨대, 사람 세포와 같은 포유류 세포))와 비교하였을 때 세포 중에서 적어도 하나의 변성 N-글리코실레이션 활성을 유발한다. 따라서, 인공적으로 발생된 유전적 변형에는, 예컨대 자연 변이는 포함되지 않는다. 인공 유전적 변형의 예로는 아래 "유전적으로 엔지니어드된 세포(Genetically Engineered Cells)"를 참조한다.

[0044] 본 명세서에서, 핵산 또는 폴리펩타이드에 사용되는 "와일드 타입(wild-type)"이라는 용어는, 생물학적 유기체가 자연에 존재하는 것과 같이 생물학적 유기체 안에서 발생되거나 생성된 핵산 또는 폴리펩타이드를 의미한다.

[0045] 본 명세서에서, 호스트 세포 중의 핵산 또는 호스트 세포에서 생성된 폴리펩타이드에 사용되는 "이종(heterologous)"이라는 용어는, 개체 세포와 동종이 아닌 세포로부터 유래하지 않는 핵산 또는 폴리펩타이드(예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질)를 말한다. 따라서, 본 명세서에서 "이종" 핵산, 단백질들은 개체 세포와 동종의 세포에서 발생되거나 생성된 것들을 의미한다.

[0046] 본 명세서에서, 핵산 및 특정 호스트 세포에 사용된 "외인성(exogenous)"이라는 용어는, 자연에서 발견된 특정 세포에서는 발생되지 않는(그리고 얻어질 수 없는) 핵산을 의미한다. 따라서, 자연적으로 발생되지 않는 핵산이 개체 세포로 도입되면 개체 세포에 대하여 외인성이 된다. 자연적으로 발생되지 않는 핵산은 핵산 시퀀스 또는 핵산 시퀀스의 단편을 함유할 수 있는데, 이들은 전체로서는 자연 중에 존재하지 않는 핵산이다. 예컨대, 발현 벡터에 게놈 DNA 시퀀스를 함유하는 핵산 분자는 자연적으로 발생되지 않는 핵산이고, 따라서 호스트 세포에 도입되면 호스트 세포에 대하여 외인성이 되는데, 이는 핵산 분자 전체로는(게놈 DNA와 벡터 DNA의 결합으로) 자연적으로 존재하지 않기 때문이다. 따라서, 전체로는 자연 중에 존재하지 않는 벡터, 자연적으로 복제되는 플라스미드, 또는 바이러스(예컨대, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 또는 헤르페스 바이러스)는 자연적으로 발생되지 않는 핵산이다. PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 처리(restriction endonuclease treatment)으로 생성된 게놈 DNA 단편 및 cDNAs는 자연적으로 발생되지 않는 핵산인데, 이들은 자연적으로는 분리된 분자로 존재하지 않기 때문이다. 자연적으로는 발견되지 않는 배열인 프로모터 시퀀스 및 폴리펩타이드-인코딩 시퀀스(예컨대, cDNA 또는 게놈 DNA)를 함유하는 핵산은 자연적으로 발생되지 않는 핵산이다. 자연적으로 발생하는 핵산은 특정 세포에 대하여 외인성일 수 있다. 예컨대, 효모 x 의 세포로부터 분리된 전체 크로모솜(entire chromosome)은, 크로모솜을 효모 y 의 세포에 도입한 후에는, 효모 y 의 세포라는 관점에서는 외인성 핵산이다.

[0047] 상기로부터, "외인성(exogenous)" 핵산은 "동종(homologous)" 또는 "이종(heterologous)" 핵산일 수 있다. 반면, 본 명세서에서 핵산 또는 유전자(또는 핵산 또는 유전자로 인코딩된 단백질) 및 특정 세포에서 사용된 "내인성(endogenous)"이라는 용어는 자연적으로 발견되는 특정 세포에서 발생하는(그리고 수득될 수 있는) 핵산 또는 유전자를 의미한다.

[0048] 상기 개념에서와 같이, 알로위아 리폴리티카(*Y. lipolytica*) 세포로 형질전환된 알로위아 리폴리티카(*Y. lipolytica*) ALG6 단백질을 인코딩하는 발현 플라스미드는, 상기 세포의 관점에서 외인성 핵산이다. 그러나, ALG6 단백질 코딩 시퀀스 및 이에 의해 제조된 ALG6 단백질은 세포의 관점에서는 동종이다. 이와 유사하게, 알로위아 리폴리티카(*Y. lipolytica*) 세포로 형질전환된 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) ALG6 단백질을 인코딩하는 발현 플라스미드는, 세포의 관점에서는 외인성 핵산이다. 그러나, 상기 예와는 반대로, ALG6 단백질 코딩 시퀀스 및 이에 의해 제조된 ALG6 단백질은 세포의 관점에서는 이종이다.

[0049] 본 명세서에서, "프로모터(promoter)"라 함은, 유전자를 전사할 수 있는 DNA 시퀀스를 의미한다. 프로모터는 RNA 폴리머라제에 의해 인식되는데, 이로 인해 전사가 유발된다. 따라서, 프로모터는 RNA 폴리머라제와 직접 결합하거나 리크루트먼트에 관련된 DNA 시퀀스를 포함한다. 프로모터 시퀀스는, 또한 "인핸서 구역(enhancer regions)"을 포함하는데, 이는 유전자-클러스터(gene-cluster)에서 유전자의 전사 수준을 증가시키기 위한 하나 이상의 DNA 구역(즉, 일련의 전사 인자와 마찬가지로 트랜스-액팅 팩터)이다. 상기 인핸서는, 전형적으로 코딩 구역의 5' 말단이지만, 프로모터 시퀀스로부터 분리될 수 있고, 유전자의 인트론 구역(intronic region) 또는 유전자 코딩 구역의 3' 사이일 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 "작동 가능하게 링크된(operably linked)"이라 함은, 발현 시퀀스가 목적하는 코딩 시퀀스의 발현을 효과적으로 조절하기 위하여 유전적 구조(genetic construct)로 포함(incorporate)되는 것을 의미한다.

[0051] 본 명세서에서 핵산 시퀀스(예컨대, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2로 표현되는 HAC1 시퀀스)의 변이체들은, 와일드타입 핵산 시퀀스와 동종(동일)인 적어도 약 70% (e.g., 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)의 동종 시퀀스이다. 상기 와일드 타입 시퀀스들은 자연형으로부터 분리될 수 있고 또는 재조합 또는 합성 방법으로 생성될 수 있다. 따라서, 와일드 타입 시퀀스 핵산은

사람 핵산 시퀀스, 원숭이 핵산 시퀀스, 설치류 핵산 시퀀스, 또는 목적하는 동종의 와일드 타입 핵산을 함유하는 다른 종의 자연적으로 발생된 핵산 시퀀스를 가질 수 있다. 본 명세서에서, "동종(homologous)" 또는 "동종 핵산 시퀀스(homologous nucleic acid sequence)" 등의 용어는, 적어도 특정된 비율의 뉴클레오타이드 레벨에서 상동(homology)으로 특정된 시퀀스를 의미하고, 시퀀스 아이덴티티(sequence identity)와 혼용되어 사용된다. 상동 또는 아이덴티티 퍼센트는, 예컨대, 디폴트 세팅(default settings)을 사용하여, 스미스 앤 워트만(Smith and Waterman((1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489))의 알고리즘을 사용하는, 갭 프로그램(Gap program)(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI)으로 결정될 수 있다. 구체적으로, 프로브와 타겟 사이의 상동은 약 50% 내지 약 60% 범위이다. 구체적으로, 프로브와 타겟 핵산 사이의 상동은 약 55% 내지 65%, 약 65% 내지 75%, 약 70% 내지 80%, 약 75% 내지 85%, 약 80% 내지 90%, 약 85% 내지 95%, 약 90% 내지 100% 사이이다.

[0052] 본 명세서에서, "프로브(probe)"라는 용어는, 다양한 길이의 핵산 시퀀스를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 적어도 10 내지 6,000 뉴클레오타이드를 포함한다. 구체적으로, 프로브는 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 50, 또는 적어도 75 또는 100 인접하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 길이가 긴 프로브는 일반적으로 자연 상태에서 또는 재조합 기원(직접, 화학적 합성과의 반대)으로부터 얻어지며, 타겟 시퀀스에 매우 특이적이고, 길이가 긴 올리고머(oligomers)보다 타겟에 혼성화되는 속도가 느리다. 프로브는 단일 또는 더블 스트랜드 핵산 분자일 수 있다.

[0053] 구체적으로, 본 명세서의 변이체 핵산은 목적하는 와일드 타입 핵산(예컨대, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2으로 표시되는 HAC1 핵산 시퀀스)의 구역(region), 부분(portion), 도메인(domain) 또는 단편(segment)에 대하여 부분적으로 상보적인(예컨대, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 상보적인) 하나 또는 양쪽 스트랜드를 포함하는 시퀀스를 갖는다. 구체적으로는, 목적하는 변이체 핵산 시퀀스는, 와일드 타입 핵산 시퀀스의 구역(region), 부분(portion), 도메인(domain) 또는 단편(segment)에 대하여 완전히 상보적인(즉, 100% 상보적인) 하나 또는 양쪽 스트랜드를 포함하는 시퀀스를 갖는다. "상보성(complementarity)"을 갖는 시퀀스라 함은, 질소성 염기의 수소결합 성질로 인한 특정 질소성 염기 간의 화학적 친화성(즉, 아데닌과 우라실(DNA 또는 변성 RNA의 경우에는 티민)이 서로 짝이 되고, 구아닌과 시토신이 서로 짝을 이루는 부위에서 역방향 중복(antiparallel duplex)을 형성할 수 있는 것과 같은 염기 서열을 갖는 2개의 핵산 체인의 성질)을 의미한다. 따라서, 완전히 상보적인 시퀀스는, 뉴클레오타이드 시퀀스가 역방향 중복(antiparallel duplex)을 형성할 때 염기 시퀀스의 완전한 일대일 상응(즉, 아데닌 대 우라실/티민 및 구아닌 대 시토신)을 갖는 두 개의 시퀀스이다.

[0054] 혼성화는 두 개의 핵산 시퀀스의 동종을 측정하는 데 또한 사용될 수 있다. 본 명세서에서 핵산 시퀀스, 또는 이의 단편 또는 변이체는, 표준 혼성화 기술에 따라 혼성화 프로브(hybridization probe)로 사용될 수 있다. 테스트 물질(예컨대 진핵 세포)로부터 DNA 또는 RNA로의 목적하는 특정 프로브의 혼성화(예컨대, HAC1 뉴클레오타이드 시퀀스의 프로브, 예컨대, SEQ ID NOS:1 또는 2로 표시되는 HAC1 뉴클레오타이드 시퀀스)는, 테스트 물질 중 프로브에 상응하는 DNA 또는 RNA(예컨대, HAC1 뉴클레오타이드 시퀀스)의 존재에 대한 표지가 된다. 혼성화 조건은 당업자에게 알려져 있으며, 문헌(Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991)을 통하여서도 현재의 프로토콜을 확인할 수 있다. 적절한 혼성화 조건은, 30℃에서 2X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서의 혼성화하고, 이어서 50℃에서 1 X SSC, 0.1% SDS 에서 세척한다. 엄격한 조건은, 45℃에서 6X 소듐 클로라이드/소듐 시트레이트(SSC)에서의 혼성화하고, 이어서 65℃에서 0.2 X SSC, 0.1% SDS 에서 세척한다.

[0055] 특별히 정의한 바 없으면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자가 일반적으로 사용되는 의미와 동일하다. 본 명세서에서 기재된 것과 유사 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으며, 하기에 실시예를 기재하였다. 본 명세서에 기재된 모든 간행물, 특허출원, 특허, Genbank Accession Nos, 및 다른 참조들은 전체로 본 명세서에 참조로 포함된다. 정의를 포함하여, 본 명세서의 내용과 서로 상반되는 경우에는 조절이 필요하다. 물질, 방법, 및 실시예들은 본 발명의 일 실시예이고, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 다른 특징 및 장점, 즉 변성 N-글리코실레이션 분자의 제조 방법은 하기 상세한 설명 및 청구항을 통하여 더욱 명백할 것이다.

[0057] 상세한 설명

[0058] 본 명세서의 방법 및 유전적으로 엔지니어드 된 세포는, 비-유전적으로 엔지니어드된 세포에서 생성된 타겟 분

자의 N-글리코실레이션 형과 비교하였을 때 변성 N-글리코실레이션 형을 갖는 타겟 분자(예컨대, 타겟 단백질 또는 타겟 폴리콜(dolichol))을 생성하는 데 사용될 수 있다. 글리코실화된 타겟 분자(예컨대, 글리코실화된 단백질)을, 대사성 질환(예컨대, 지질침착질환(lysosomal storage disorders))을 갖는 환자에 투여함으로써, 질병의 증상을 경감시킬 수 있다. 따라서, 본 명세서의 방법 및 세포는 지질침착질환(lysosomal storage disorders)과 같은 대사성 질환을 치료하기 위한 변성 N-글리코실화된 타겟 분자의 제조에 유용하다. 본 발명의 방법 및 세포는 다양한 다른 분야, 예컨대 식품료 산업; 제약 산업(예컨대, 백신); 농업 산업; 및 화학 산업 등에 또한 유용하다.

[0059] 변성 N-글리코실레이션 분자

[0060] 본 명세서에서 타겟 분자라 함은, 유전적으로 엔지니어드된 세포(예컨대, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)(또는 다른 관련 종의 동종이형 효모) 세포; 식물 세포 또는 동물 세포)로부터 하나 이상 N-글리코실레이션 활성에 의해 변성 N-글리코실레이션되는 분자를 의미한다. 구체적으로, 타겟 분자는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*)(또는 다른 관련 종의 동종이형 효모) 분비 패스웨이의 하나 이상의 단계를 통하여 수송되어, 개체 세포의 기관에 의해 변성 N-글리코실레이션된다. 타겟 분자는 내인성 또는 외인성일 수 있다.

[0061] 타겟 단백질, 이들의 생물학적 활성 단편, 또는 이들의 생물학적 활성 변이체는, 상기의 부가, 결손 또는 치환을 함유하는 단백질을 포함할 수 있다. 적합한 타겟 단백질로는, 병원성 단백질(예컨대, 과상풍 독소(tetanus toxoid); 디프테리아 독소(diphtheria toxoid); 바이러스성 표면 단백질(viral surface proteins)(예컨대, 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus CMV) 당단백 B, H 및 gCIII; 사람 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus 1, HIV-1) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 엡스테인 바 바이러스(Epstein Barr virus, EBV) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 바리셀라-조스터 바이러스(varicella-zoster virus, VZV) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 사람 파필로마 바이러스(human papilloma virus, HPV) 외피 당단백(envelope glycoproteins); 인플루엔자 바이러스 (Influenza virus) 당단백; 및 간염 패밀리 표면 항원(Hepatitis family surface antigens)), 리소솜 단백질(lysosomal proteins)(예컨대, 글루코세레브로시다제(glucocerebrosidase), 세레브로시다제(cerebrosidase), 또는 갈락토세레브로시다제(galactocerebrosidase)), 인슐린(insulin), 글루카곤(glucagons), 성장인자(growth factors), 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokines), 항체(antibodies) 또는 이들의 단편, 또는 항체 또는 항체 단편에 대한 단백질 용융(예컨대, protein-Fc)을 포함할 수 있다. 성장인자(Growth factors)로는, 예컨대, 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF), 골형성인자(bone morphogenic protein, BMP), 과립구 콜로니 자극 인자(Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF), 그랜ulo마크로파지 콜로니 자극인자(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 신경 성장 인자(Nerve growth factor, NGF); 뉴로트로핀(Neurotrophin), 혈소판-유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO), 트롬보포이에틴(Thrombopoietin, TPO), 미요스타틴(Myostatin, GDF-8), 성장 분화 인자(Growth Differentiation factor-9, GDF9), 베이직 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF or FGF2), 상피 성장인자(Epidermal growth factor, EGF), 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor, HGF)을 포함할 수 있다. 사이토카인(Cytokines)으로는, 예컨대, 인터류킨(interleukins)(예컨대, IL-1 내지 IL-33 (예컨대, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, 또는 IL-15))을 포함할 수 있다. 케모카인(Chemokines)으로는, 예컨대, I-309, TCA-3, MCP-1, MIP-1 α MIP-1 β RANTES, C10, MRP-2, MARC, MCP-3, MCP-2, MRP-2, CCF18, MIP-1 γ 에오타신(Eotaxin), MCP-5, MCP-4, NCC-1, Ck β 10, HCC-1, Leukotactin-1, LEC, NCC-4, TARC, PARC, 또는 Eotaxin-2을 포함할 수 있다. 또한, 암 당단백(tumor glycoproteins)(예컨대, 암-관련 항원(tumor-associated antigens)), 예컨대, 암배 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사람 뮤친(human mucins), HER-2/neu, 및 전립선-특이 항원(prostate-specific antigen, PSA) [R. A. Henderson and O. J. Finn, Advances in Immunology, 62, pp. 217-56 (1996)]. 구체적으로는, 타겟 단백질은 지질침착질환과 관련될 수 있는데, 타겟 단백질로는, 예컨대, 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 베타-D-갈락토시다제(beta-D-galactosidase), 베타-글루코시다제(beta-glucosidase), 베타-헥소사미니다제(beta-hexosaminidase), 베타-D-만노시다제(beta-D-mannosidase), 알파-L-푸코시다제(alpha-L-fucosidase), 아릴설파타제 B(arylsulfatase B), 아릴설파타제 A(arylsulfatase A), 알파-N-아세틸갈락토사미니다제(alpha-N-acetylgalactosaminidase), 아스파틸글루코사미니다제(aspartylglucosaminidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-2-sulfatase), 알파-글루코사미나이드-N-아세

틸트렌스퍼라제(alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase), 베타-D-글루코로나다제(beta-D-glucuronidase), 히알루로나다제(hyaluronidase), 알파-L-만노시다제(alpha-L-mannosidase), 알파-뉴라미니다제(alpha-neuraminidase), 포스포트랜스퍼라제(phosphotransferase), 액시드 리파제(acid lipase), 액시드 세라미다제(acid ceramidase), 스팅고미엘리나제(sphingomyelinase), 티오에스테라제(thioesterase), 카텡신 K(cathepsin K), 및 리포프로테인 리파제(lipoprotein lipase)를 포함할 수 있다.

[0062] 타겟 단백질은 또한 용융 단백질일 수 있다. 용융 단백질로는, 예컨대, (i) 본 명세서에 기재된 단백질 또는 이들의 단편과 (ii) 이들의 항체 또는 단편과의 용융을 포함한다. 명세서에 기재된 바와 같이, "항체 단편"이라 함은 항원-결합 단편, 예컨대 Fab, F(ab')₂, Fv, 및 단일 사슬 Fv (scFv) 단편을 의미한다. 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬로, scFv로부터 유래된 항체의 큰 사슬 또는 가벼운 사슬의 다양한 영역에 포함된다. 또한, 디아보디(diabodies)(문헌[Poljak (1994) Structure 2(12):1121-1123; Hudson et al. (1999) J. Immunol. Methods 23(1-2):177-189, 상기 문헌들에 기재된 내용은 전체로서 본 명세서에 참조됨]) 및 인트라보디(intrabodies)(문헌[Huston et al. (2001) Hum. Antibodies 10(3-4):127-142; Wheeler et al. (2003) Mol. Ther. 8(3):355-366; Stocks (2004) Drug Discov. Today 9(22): 960-966, 상기 문헌에 기재된 내용은 전체로서 본 명세서에 참조됨])을 본 발명의 방법에 사용할 수 있다.

[0063] 타겟 단백질은 또한 하나 이상의 폴리머, 담체(carrier), 애드ju반트(adjuvant), 항체독소(immunotoxin), 또는 검출가능한(예컨대, 형광(fluorescent), 발광(luminescent) 또는 방사성(radioactive)) 부분과 결합할 수 있다. 예컨대, 타겟 단백질은 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol)과 결합할 수 있는데, 상기 폴리머 부분을 예컨대 동일한 단백질의 분자량을 증가시키고/증가시키거나 서클레이션 레지던스 시간(circulation residence time)을 증가시키는데 사용할 수 있다. 구체적으로, 타겟 분자를 돌리콜(dolichol)이거나 돌리콜을 함유할 수 있다.

[0064] 유전적으로 엔지니어드된 세포

[0065] 본 명세서에는 적어도 하나 이상의 변형 N-글리코실레이션 활성을 갖는 유전적으로 엔지니어드된 세포가 기재되어 있는데, 상기 세포들은 변형 N-글리코실레이션 형을 갖는 하나 이상의 타겟 분자의 생성에 유용하다. 유전적 엔지니어링에 적합한 세포에는, 예컨대 진균 세포(예컨대, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 본 명세서에 기재된 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포), 식물세포, 또는 동물세포(예컨대, 선충류(nematode), 곤충, 식물, 조류, 파충류 또는 포유류(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 저빌(gerbil), 개, 고양이, 염소, 돼지, 소, 말, 고래, 원숭이 또는 사람))를 포함한다. 세포들은 프라이머리 세포(primary cells), 임모탈 세포(immortalized cells) 또는 형질전환된 세포(transformed cells)일 수 있다. 상기 세포들은 동물, 예컨대, 사람을 제외한 포유류에 존재하는 세포일 수 있다. 상기 세포들은, 본 명세서에 기재된 바와 같이 유전적으로 엔지니어드되기 전에, 다양한 상업적인 경로로 획득하거나 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection (Rockville, MD))과 같은 연구 기관을 통하여 획득할 수 있다. 타겟 분자는 본 명세서에 기재된 타겟 단백질 등과 같은 단백질을 포함한다. 타겟 단백질은 또한 돌리콜(dolichol)을 포함한다.

[0066] 세포의 유전적 엔지니어링은 다음과 같은 유전적 변형을 포함한다: (i) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 내인성 유전자의 제거; (ii) N-글리코실레이션 활성 (즉, N-글리코실레이션 활성을 갖는 변이체 단백질의 발현)을 갖는 단백질(예컨대, 내인성 또는 외인성 단백질)의 변이체 형을 인코딩하는 재조합 핵산의 도입; (iii) N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 기능적 발현을 방해하는 RNA 분자의 도입 또는 발현; (iv) N-글리코실레이션 활성(즉, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 발현)을 갖는 단백질의 와일드 타입(예컨대, 내인성 또는 외인성)을 인코딩하는 재조합 핵산의 도입; 또는 (v) 인코딩된 단백질의 발현을 변경하기 위한 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 내인성 유전자의 프로모터 또는 인핸서 요소(elements)의 변경(altering). RNA 분자는, 예컨대 스몰-인터페어링 RNA(small-interfering RNA (siRNA)), 쇼트 헤어핀 RNA(short hairpin RNA (shRNA)), 안티센스 RNA(anti-sense RNA) 또는 마이크로 RNA(micro RNA (miRNA))를 포함한다. 상기 (ii)에는, 예컨대, 내인성 유전자(예컨대 동종 재조합(homologous recombination)에 의해)를 상기 교체된 내인성 유전자에 비하여 더 큰 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자로의 교체를 포함한다. 유전적 엔지니어링에는 또한, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 내인성 유전자를, 부가(예컨대, 이중 시퀀스), 삭제, 또는 치환(예컨대, 점 돌연변이(point mutations); 보전적 또는 비보존적 변이(conservative or non-conservative mutations)와 같은 변이)로 변경하는 것을 포함한다. 변이는 또한 특이적으로(예컨대, 사이트-디렉티드 변이(site-directed mutagenesis) 또는 동종 재조합(homologous recombination); 실시예 참조) 도입될 수 있거나, 또는 랜덤하게(예컨대, 문헌[Newman

and Ferro-Novick (1987) J. Cell Biol. 105(4):1587]에 기재된 바에 따른 화학적 변이 유발일 수 있으며, 상기 문헌의 내용은 전체로서 본 명세서에 참조됨) 도입될 수도 있다.

[0067] 본 명세서에 기재된 유전적 변형은 다음 중 하나 이상을 유발할 수 있다; (i) 유전적으로 변형된 세포에서의 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 증가, (ii) 유전적으로 변형된 세포에서의 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 감소, (iii) 유전적으로 변형된 세포에서의 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 로컬화(localization) 또는 세포내 분포(intracellular distribution) 변화, 또는 (iv) 유전적으로 변형된 세포에서의 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 비율 변화. N-글리코실레이션 활성의 증가는 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질의 과발현, 내인성 유전자(예컨대, 유전자 복제(gene duplication)) 또는 유전자로 인코딩된 단백질의 발현 증가를 자극하는 내인성 유전자의 프로모터 또는 인핸서의 변형으로 인한 것일 수 있다. 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 감소는, N-글리코실레이션 변성 활성을 갖는 하나 이상의 변이형(예컨대, 도미넌트 네가티브 형(dominant negative form))의 과발현, N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질의 발현을 감소하는 하나 이상의 방해 RNA 분자의 도입 또는 발현, 또는 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 발현하는 하나 이상의 내인성 유전자의 삭제로 인한 것일 수 있다.

[0068] 하나 이상의 내인성 유전자의 삭제 또는 분열 방법은 본 명세서의 실시예에 기재되어 있다. 예컨대, 동종 재조합에 의한 유전자 분열을 위하여, "유전자 교체(gene replacement)" 벡터를 선택적 마커 유전자(selectable marker gene)를 포함하는 방법으로 생성할 수 있다. 선택적 마커 유전자는, 5' 및 3' 말단에서, 동종 재조합을 매개하기에 충분한 길이의 유전자 부분에서 작동가능하게 링크될 수 있다. 선택적 마커는 호스트 셀 옥스트로피(complement host cell auxotrophy)를 보완하거나(complement) 또는 항생물질 저항(antibiotic resistance)을 제공하는 유전자의 하나 이상일 수 있으며, URA3, LEU2 및 HIS3 유전자를 포함한다. 다른 적절한 선택적 마커로는 CAT 유전자를 포함하는데, 이는 효모 세포, 또는 lacZ 유전자에 클로람페니콜 저항성을 부여하는데, β -갈락토시다제의 발현으로 인해 블루 콜로니(blue colonies)로 된다. 유전자 교체 벡터(gene replacement vector)의 선형화된 DNA 단편을 공지 기술을 사용하여 세포로 도입한다. 선형 단편(linear fragments)의 계놈으로의 도입 및 유전자의 분열은 선택 마커에서 결정될 수 있고, 예컨대 서던 블롯 분석(Southern blot analysis)으로 다양화될 수 있다.

[0069] 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같이, 선택 마커는 선택 과정에서 사용한 후에, 후속적으로 호스트 세포의 계놈으로부터, 예컨대 Cre-loxP 시스템을 사용하여 제거할 수 있다.

[0070] 또한, 유전자 교체 벡터(gene replacement vector)를 분열될 유전자의 부분을 포함하는 방법으로 형성할 수 있는데, 상기 부분에는 내인성 유전자 프로모터 시퀀스(endogenous gene promoter sequence) 및 인코딩(encodes) 또는 유전자의 코딩 시퀀스의 불활성 단편이 없다. "불활성 단편"은 유전자의 전체 길이의 코딩 시퀀스(full-length coding sequence)로부터 생성된 단백질 활성의, 예컨대, 약 10% 미만 (예컨대, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, or 0%)을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자 단편이다. 유전자의 상기 부분을 벡터 중에, 알려지지 않은 프로모터 시퀀스를 유전자 시퀀스에 작동가능하게 링크되지만, 정지 코돈 및 전사 종료 시퀀스는 유전자 시퀀스 부분에 작동가능하게 링크되는 방법으로 삽입한다. 상기 벡터는 후속적으로 유전자 시퀀스의 부분에서 선형화될 수 있고 세포로 형질 전환될 수 있다. 단일 동종 재조합(single homologous recombination) 방법으로, 상기 선형화된 벡터(linearized vector)를 유전자의 내인성 카운터파트(endogenous counterpart)에 포함(integrated)시킨다.

[0071] 발현벡터는 자발적이거나(autonomous) 또는 포합적(integrative)일 수 있다.

[0072] 재조합 핵산(예컨대, 와일드 타입을 인코딩하고 있는 핵산 또는 N-글리코실리에이션 활성을 갖는 단백질의 변이형)을, 플라스미드, 파지(phage), 트랜스포손(transposon), 코스미드(cosmid) 또는 바이러스 입자(virus particle)과 같은 발현 벡터의 형태로 세포에 도입시킬 수 있다. 재조합 핵산은 염색체외(extrachromosomally)로 유지될 수 있거나, 효모 세포 크로모솜 DNA(yeast cell chromosomal DNA)으로 포함될 수 있다. 발현 벡터는, 선택된 조건(예컨대, 우라실 생합성에 필요한 효소를 인코딩하고 있는 URA3 또는 트립토판 생합성에 필요한 효소를 인코딩하고 있는 TRP1)에서, 세포 생육(cell viability)에 있어서 목적하는 핵산으로 형질전환된 상기 세포들의 선택 및/또는 검출이 가능하도록 하는데 필요한 단백질로 인코딩하는 선택 마커 유전자를 포함할 수 있다(미국특허 제4,704,362호 참조). 발현 벡터는 또한 자발적 복제 시퀀스(autonomous replication sequence (ARS))를 포함할 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제4,837,148호에는, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 플라스미드를 유지(maintaining)하기 위한 적당한 방법을 제공하는 자발적 복제 시퀀스가 개시되어 있다. 미국 특허 제4,837,148호의 기재는, 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.

- [0073] 포합적 벡터(Integrative vectors)는, 예컨대, 미국 특허 제4,882,279호에 기재되어 있다(상기 기재는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다). 포합적 벡터는 일반적으로 적어도 제1 삽입가능한 DNA 단편(first insertable DNA fragment), 선택 마커 유전자(selectable marker gene), 및 제2 삽입가능한 DNA 단편(second insertable DNA fragment)이 연속적으로 배열된 시퀀스(serially arranged sequence)를 포함한다. 제1 및 제2 삽입가능한 DNA 단편은 각각 약 200(예컨대, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 또는 약 1000 또는 이상) 길이의 뉴클레오타이드이고, 형질전환될 종의 게놈 DNA 의 부분과 동종인 뉴클레오타이드 시퀀스를 갖는다. 발현을 위하여 목적하는 유전자(예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자)를 함유하는 뉴클레오타이드 시퀀스를 제1 및 제2 삽입가능한 DNA 단편 사이에, 마커 유전자의 전 또는 후에, 상기 벡터에 삽입한다. 포합적 벡터(Integrative vectors)는 효모 형질전환 전에 선형화되어 목적하는 뉴클레오타이드 시퀀스를 호스트 셀 게놈에 포함(integration)시킬 수 있다.
- [0074] 발현 벡터는 효모(예컨대, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*), 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adenivorans*) 또는 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포) 프로모터의 조절 하에 재조합 핵산을 특징지우는데, 효모 안에서 발현되도록 한다. 효모 프로모터로는, 예컨대 ADC1, TPI1, ADH2, hp4d, POX, 및 Gal10 (see, e.g., Guarente et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(23):7410) 프로모터를 포함한다. 부가적으로 적합한 프로모터가 문헌(Zhu and Zhang (1999) Bioinformatics 15(7-8):608-611) 및 미국특허 제6,265,185호에 기재되어 있는데, 상기 각 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다. 발현 벡터가 동물 세포, 예컨대, 포유류 세포에 도입될 때, 발현 벡터는 목적하는 호스트 세포 내에서 발현에 적합한 동물 세포 프로모터의 조절 하에 재조합 핵산을 특징지운다. 포유류 프로모터의 예로는 SV40또는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus (CMV)) 프로모터를 포함한다.
- [0075] 프로모터는 컨스티튜티브(constitutive) 또는 유도적(inducible)일 수 있다. 컨스티튜티브(constitutive) 프로모터는 표준 배양 조건(standard culturing conditions)에서 균일한 발현을 나타내는 프로모터이다. 유도적(inducible) 프로모터는 하나 이상의 유도 신호(induction cues)에 반응하는 프로모터이다. 예컨대, 유도적 프로모터는 화학적으로 조절되거나(예컨대, 프로모터의 전사적 활성이, 알코올, 테트라사이클린, 스테로이드, 메탈, 또는 다른 작은 분자의 존재 또는 부재에 따라 조절됨), 또는 물리적으로 조절(예컨대, 프로모터의 전사적 활성이 무게 또는 온도 등과 같은 물리적 유도인자의 존재 또는 부재에 따라 조절됨)될 수 있다. 유도적 프로모터는 하나 이상의 전사적 인자로 인해 간접적으로 조절될 수 있는데, 이들은 화학적 또는 물리적 신호에 의해 직접적으로 조절된다.
- [0076] 세포의 유전적 엔지니어링에는 또한, 내인성 유전자(예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질로 인코딩된 유전자)의 활성을 포함하는데, 이는 호스트 세포 내에 존재하나 일반적으로는 세포에서 발현되지 않고 또는 세포안에서 현저한 수준으로는 발현되지 않는다. 예컨대, 내인성 유전자의 조절 시퀀스(regulatory sequence)(예컨대, 유전자 프로모터 또는 인핸서)는 변형될 수 있고, 작동가능하게 링크된 코딩 시퀀스의 발현 증가를 나타낸다. 동종 재조합(Homologous recombination) 또는 타겟팅(targeting)이 조절 시퀀스를 갖는 유전자와 일반적으로 관련된 조절 구역(regulatory region)을 교체 또는 무력화시키는 데 사용될 수 있는데, 이는 유전자로 하여금 세포를 상응하는 비-유전적 엔지니어드된 세포에서 보다 더 높은 수준으로 발현이 되도록 하거나, 또는 상응하는 비-유전적 엔지니어드된 세포에서 상이한 조절 또는 유도 패턴을 나타내도록 한다. 유전자의 조절 시퀀스(예컨대, 프로모터 또는 인핸서)의 변경을 도입하는 적절한 방법은 미국 특허 공개 제20030147868호에 개시되어 있고, 이는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0077] 다른 유전적으로 엔지니어드된 변형 또한 조건적일 수 있다. 예컨대, Cre-loxP 시스템(예컨대, 문헌 [Gossen et al. (2002) Ann. Rev. Genetics 36:153-173] 및 미국 특허출원 제20060014264호 참조, 상기 각 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함됨)과 같은 사이트-특이적 DNA 재조합효소를 사용하여 유전자를 조건적으로 제거할 수 있다.
- [0078] 스페로플라스트 기술(spheroplast technique) 또는 전체-세포 리튬 클로라이드 효모 형질전환 방법(whole-cell lithium chloride yeast transformation method)을 사용하여, 재조합 핵산을 세포로 도입할 수 있다. 플라스미드 또는 선형 핵산 벡터(linear nucleic acid vectors)를 세포로 형질전환시키는데 유용한 방법은, 예컨대, 미국 특허 제4,929,555호, 문헌[et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:1929], 문헌[Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163]; 미국 특허 제4,879,231호; 및 문헌[Sreekrishna et al. (1987) Gene 59:115]에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다. 전기천공(Electroporation) 및 PEG1000 전체 세포(whole cell) 형질전환 과정을 또한 사용할 수 있는데, 이는 문헌 [Cregg and Russel, Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols, Chapter 3, Humana Press, Totowa, N.J., pp. 27-39 (1998)]에 기재되

어 있고, 이는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다. 동물세포의 트랜스펙션(Transfection)은, 예컨대, 칼슘 포스페이트(calcium phosphate), 전기천공, 열 쇼크(heat shock), 리포솜(liposomes), 또는 FUGENE 또는 LIPOFECTAMINE 같은 트랜스펙션 시약을 사용하여 벡터를 세포로 도입하거나, 네이키드(naked) 핵산 벡터를 세포와 용액 중에서 접촉시킴으로써 특징지을 수 있다(문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition vol. 1,2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press]; [Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989]참조, 상기 문헌들은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0079] 요구되는 생화학적 물질(세포 세포영양으로 인한)의 부재 하에 형질전환 후 영양요구성 세포(auxotrophic cells) 배양, 새로운 페노타입(phenotype)의 선택 또는 검출, 또는 형질전환체 중에 함유된 저항 유전자(resistance gene)의 존재에서 효모에 독성이 있는 항생물질(antibiotic)의 존재 하에 배양 등을 포함하는 적절한 기술로 형질전환된 효모 세포를 선택할 수 있으며, 상기 기재한 기술들에 한정되는 것은 아니다. 형질전환체는 또한 발현 카세트를 게놈으로 포함시킴으로써 선택 및/또는 검증할 수 있는데, 이는 예컨대, 서던 블롯 또는 PCR 분석으로 평가할 수 있다.

[0080] 벡터를 목적하는 타겟 세포에 도입하기에 앞서, 벡터를 대장균(*Escherichia coli* (*E. coli*))과 같은 박테리아성 세포 중에 배양(예컨대, 증폭)시킨다. 벡터 DNA를 당업계에 공지된 방법을 통하여 박테리아 세포로부터 분리할 수 있고, 박테리아 환경(bacterial milieu)으로부터 벡터 DNA가 정제된다. 정제된 벡터 DNA를 페놀, 클로로포름, 및 에테르로 강하게 추출하여, 대장균(*E. coli*) 단백질이 플라스미드 DNA 제제 중에 남아있지 않도록 하는데, 이는 이들 단백질이 포유류 세포에 독성이 있을 수 있기 때문이다.

[0081] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 유전자, 예컨대 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하고 있는 유전자의 발현(예컨대, 과발현), 변형체의 도입, 삭제에 유전적 엔지니어링을 사용할 수 있다. 상기 유전자로는, 예컨대, ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2, ALG11, RFT1, ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ANL1, ALG10, ALG5, OST3, OST4, OST6, STT3, OST1, OST5, WBP1, SWP1, OST2, DPM1, SEC59, OCH1, MNN9, VAN1, MNN8, MNN10, MNN11, HOC1, MNN2, MNN5, MNN6, KTR1, YUR1, MNN4, KRE2, KTR2, KTR3, MNN1, MNS1, MNN4, PNO1, MNN9, 글루코시다제 I, 글루코시다제 II, 또는 엔도만노시다제(endomannosidase)를 포함한다. 예컨대 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자로는, 상기 유전자를 함유하는 임의의 종(예컨대, 하등 진핵생물(예컨대, 진균(효모 포함) 또는 트리파노소마(trypansomes)), 식물 또는 동물(예컨대, 곤충, 조류, 파충류 또는 포유류(예컨대, 마우스 또는 래트와 같은 설치류, 개, 고양이, 말, 염소, 소, 돼지, 사람이 아닌 영장류 또는 사람))일 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자를 수득할 수 있는 전형적인 진균류 중으로는 하기를 포함하며, 다만 이에 한정되는 것은 아니다: 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 보비스(*Pichia bovis*), 피치아 카나데니스(*Pichia canadensis*), 피치아 카르소니(*Pichia carsonii*), 피치아 파리노스(*Pichia farinose*), 피치아 퍼멘탄스(*Pichia fermentans*), 피치아 플럭섬(*Pichia fluxuum*), 피치아 멤브라네파시엔스(*Pichia membranaefaciens*), 칸디다 발리다(*Candida valida*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 아스칼라피다룸(*Candida ascalaphidarum*), 칸디다 암픽시아에(*Candida amphixiae*), 칸디다 안타티카(*Candida Antarctica*), 칸디다 아틀란티카(*Candida atlantica*), 칸디다 에트모파에리카(*Candida atmosphaerica*), 칸디다 블라타에(*Candida blattae*), 칸디다 카포필라(*Candida carpophila*), 칸디다 세라바이시다룸(*Candida cerambycidarum*), 칸디다 카울리오테스(*Candida chauliodes*), 칸디다 코리달리스(*Candida corydalis*), 칸디다 도세이(*Candida dosseyi*), 칸디다 더블리니엔시스(*Candida dubliniensis*), 칸디다 에르가텐시스(*Candida ergatensis*), 칸디다 프럭투스(*Candida fructus*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 페르멘타티(*Candida fermentati*), 칸디다 길리에르몽디(*Candida guilliermondii*), 칸디다 하에물로니(*Candida haemulonii*), 칸디다 인섹타멘스(*Candida insectamens*), 칸디다 인섹토룸(*Candida insectorum*), 칸디다 인터미디아(*Candida intermedia*), 칸디다 제프레이시(*Candida jeffresii*), 칸디다 케이퍼(*Candida kefir*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 루시타니아에(*Candida lusitaniae*), 칸디다 릭소필라(*Candida lyxosophila*), 칸디다 말토사(*Candida maltosa*), 칸디다 멤브라니파시엔스(*Candida membranifaciens*), 칸디다 밀리에리(*Candida milleri*), 칸디다 올레오피라(*Candida oleophila*), 칸디다 오레고넨시스(*Candida oregonensis*), 칸디다 파라실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 퀴트루사(*Candida quercitrusa*), 칸디다 셰하테아(*Candida shehatei*), 칸디다 템노칠라에(*Candida temnochilae*), 칸디다 테누이스(*Candida tenuis*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 츠치야에(*Candida tsuchiyae*), 칸디다 시놀라보란티움(*Candida sinolaborantium*), 칸디다 소자에(*Candida sojae*), 칸디다 비스와나티(*Candida viswanathii*), 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*), 피치아 멤브라네파시엔스(*Pichia membranaefaciens*), 피치아 실베스트리스(*Pichia silvestris*), 피치아 멤브라네파시엔스(*Pichia membranaefaciens*), 피치아 초다티(*Pichia chodati*), 피치아 멤브라네파시엔스(*Pichia membranaefaciens*), 피치아 마이누스쿨레(*Pichia minuscule*), 피치아 파스토리스

(*Pichia pastoris*), 피치아 수도폴리몰파(*Pichia pseudopolymorpha*), 피치아 퀴컴(*Pichia quercuum*), 피치아 로베르시(*Pichia robertsii*), 피치아 사이토이(*Pichia saitoi*), 피치아 실베스트리시(*Pichia silvestrisi*), 피치아 스트라스베르겐시스(*Pichia strasburgensis*), 피치아 테리콜라(*Pichia terricola*), 피치아 반리지(*Pichia vanriji*), 슈도지마 안타티카(*Pseudozyma Antarctica*), 로도스포리디움 토룰로이테스(*Rhodosporidium toruloides*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 사카로마이세스 바야누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로마이세스 몸슈리쿠스(*Saccharomyces momdshuricus*), 사카로마이세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 비스포러스(*Saccharomyces bisporus*), 사카로마이세스 셰발리에리(*Saccharomyces chevalieri*), 사카로마이세스 델브루엑키(*Saccharomyces delbrueckii*), 사카로마이세스 엑시구스(*Saccharomyces exiguous*), 사카로마이세스 페르멘타티(*Saccharomyces fermentati*), 사카로마이세스 프라길리스(*Saccharomyces fragilis*), 사카로마이세스 막시아누스(*Saccharomyces marxianus*), 사카로마이세스 멜리스(*Saccharomyces mellis*), 사카로마이세스 로제이(*Saccharomyces rosei*), 사카로마이세스 룩시(*Saccharomyces rouxii*), 사카로마이세스 우바룸(*Saccharomyces uvarum*), 사카로마이세스 윌리아누스(*Saccharomyces willianus*), 사카로마이코데스 루드비기(*Saccharomycodes ludwigii*), 사카로마이콥시스 캡슐라리스(*Saccharomycopsis capsularis*), 사카로마이콥시스 피불리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*), 엔도마이세스 호르테이(*Endomyces hordei*), 엔도마이콥시스 포불리게라(*Endomycopsis fobuligera*), 사추리스포라 사이토이(*Saturnispora saitoi*), 시조사카로마이세스 옥토스포러스(*Schizosaccharomyces octosporus*), 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 사카로마이세스 다이렌시스(*Saccharomyces dairensis*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 토룰라스포라 페르멘타티(*Torulaspora fermentati*), 사카로마이세스 페르멘타티(*Saccharomyces fermentati*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 토룰라스포라 로제이(*Torulaspora rosei*), 사카로마이세스 로제이(*Saccharomyces rosei*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 사카로마이세스 로제이(*Saccharomyces rosei*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 사카로마이세스 델브루엑키(*Saccharomyces delbrueckii*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 사카로마이세스 델브루엑키(*Saccharomyces delbrueckii*), 지고사카로마이세스 망골리쿠스(*Zygosaccharomyces mongolicus*), 도룰라스포라 글로보사(*Dorulaspora globosa*), 데바리오마이세스 글로보서스(*Debaryomyces globosus*), 토룰롭시스 글로보사(*Torulopsis globosa*), 트리코스포론 쿠타네움(*Trichosporon cutaneum*), 트리코놉시스 바리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*), 윌리옵시스 캘리포니카(*Williopsis californica*), 윌리옵시스 사추러너스(*Williopsis saturnus*), 지고사카로마이세스 비스포러스(*Zygosaccharomyces bisporus*), 지고사카로마이세스 비스포러스(*Zygosaccharomyces bisporus*), 데브리오마이세스 디스포루아(*Debaryomyces disporua*), 사카로마이세스 비스포라스(*Saccharomyces bisporas*), 지고사카로마이세스 비스포러스(*Zygosaccharomyces bisporus*), 사카로마이세스 비스포러스(*Saccharomyces bisporus*), 지고사카로마이세스 멜리스(*Zygosaccharomyces mellis*), 지고사카로마이세스 프리오리아누스(*Zygosaccharomyces priorianus*), 지고사카로마이세스 룩심(*Zygosaccharomyces rouxiim*), 지고사카로마이세스 룩시(*Zygosaccharomyces rouxii*), 지고사카로마이세스 바케리(*Zygosaccharomyces barkeri*), 사카로마이세스 룩시(*Saccharomyces rouxii*), 지고사카로마이세스 룩시(*Zygosaccharomyces rouxii*), 지고사카로마이세스 메이저(*Zygosaccharomyces major*), 사카로마이세스 루시(*Saccharomyces rousii*), 피치아 아노말라(*Pichia anomala*), 피치아 보비스(*Pichia bovis*), 피치아 카나덴시스(*Pichia Canadensis*), 피치아 카르소니(*Pichia carsonii*), 피치아 파리노스(*Pichia farinose*), 피치아 페르멘탄스(*Pichia fermentans*), 피치아 플럭숨(*Pichia fluxuum*), 피치아 멤브라네아에파시엔스(*Pichia membranaefaciens*), 피치아 슈도폴리몰파(*Pichia pseudopolymorpha*), 피치아 퀴컴(*Pichia quercuum*), 피치아 로베르시(*Pichia robertsii*), 슈도지마 안타티카(*Pseudozyma Antarctica*), 로도스포리디움 토룰로이테스(*Rhodosporidium toruloides*), 로도스포리디움 토룰로이테스(*Rhodosporidium toruloides*), 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 사카로마이세스 바이아누스(*Saccharomyces bayanus*), 사카로마이세스 비스포러스(*Saccharomyces bisporus*), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 셰발리에리(*Saccharomyces chevalieri*), 사카로마이세스 델브루엑키(*Saccharomyces delbrueckii*), 사카로마이세스 페르멘타티(*Saccharomyces fermentati*), 사카로마이세스 프라길리스(*Saccharomyces fragilis*), 사카로마이세스 루드비기(*Saccharomycodes ludwigii*), 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*), 토룰라스포라 델브루엑키(*Torulaspora delbrueckii*), 토룰라스포라 글로보사(*Torulaspora globosa*), 트리코놉시스 바리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*), 윌립시스 캘리포니카(*Williopsis californica*), 윌립시스 사추누스(*Williopsis saturnus*), 지고사카로마이세스 비스포러스(*Zygosaccharomyces bisporus*), 지고사카로마이세스 멜리스(*Zygosaccharomyces mellis*), 지고사카로마이세스 룩시(*Zygosaccharomyces rouxii*) 또는 당업계에서 공지

되어 있는 다른 진균(예컨대 효모). 전형적인 하등 진핵 생물로는 하기의 다양한 아스페길러스 종을 포함하며, 다만 이에 한정되는 것은 아니다: 아스페길러스 카에지엘러스(*Aspergillus caesiellus*), 아스페길러스 칸디두스(*Aspergillus candidus*), 아스페길러스 카네우스(*Aspergillus carneus*), 아스페길러스 클라바투스(*Aspergillus clavatus*), 아스페길러스 데플렉투스(*Aspergillus deflectus*), 아스페길러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스페길러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스페길러스 글라우쿠스(*Aspergillus glaucus*), 아스페길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*), 아스페길러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스페길러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*), 아스페길러스 파라시티쿠스(*Aspergillus parasiticus*), 아스페길러스 페니실로이데스(*Aspergillus penicilloides*), 아스페길러스 레스트릭투스(*Aspergillus restrictus*), 아스페길러스 소자에(*Aspergillus sojae*), 아스페길러스 시도위(*Aspergillus sydowi*), 아스페길러스 타마리(*Aspergillus tamari*), 아스페길러스 테레우스(*Aspergillus terreus*), 아스페길러스 우스투스(*Aspergillus ustus*) 또는 아스페길러스 베시컬러(*Aspergillus versicolor*). N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자를 획득할 수 있는 전형적인 원생동물 중으로는, 하기를 포함하여, 다만 이에 한정되는 것은 아니다: 블라스토크리티디아(*Blastocrithidia*), 크리티디아(*Crithidia*), 엔도트리파눔(*Endotrypanum*), 헤르페토모나스(*Herpetomonas*), 레이슈마니아(*Leishmania*), 랩토모나스(*Leptomonas*), 피토모나스(*Phytomonas*), 트리파소노마(*Trypanosoma*)(예컨대, 트리파소노마 브루세이(*T. brucei*), 트리파소노마 감비엔스(*T. gambiense*), 트리파소노마 로데시엔스(*T. rhodesiense*), 및 트리파소노마 크루지(*T. cruzi*)) 및 월란시아나(*Wallaceina*).

[0082] 본 명세서에 기재된 바와 같이 유전적 엔지니어링을 통하여, 유전자(예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질을 인코딩하는 유전자) 및/또는 본 명세서에서 기재된 유전자의 하나 이상의 조합(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 또는 20 또는 그 이상)을 발현, 변형체로의 도입, 또는 삭제할 수 있다.

[0083] 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 ALG3(Genbank Accession Nos: XM_503488, Genolevures Ref: YALIOE03190g) 유전자 또는 이들의 유전자 산물(예컨대, mRNA 또는 단백질)이 결합되어 있다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 ALG6 (Genbank Accession Nos: XM_502922, Genolevures Ref: YALIOD17028g) 단백질을 발현(예컨대, 과발현)된다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 MNN4 유전자(Genbank Accession Nos: XM_503217, Genolevures Ref: YALIOD24101g)를 발현한다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 OCH1 및/또는 MNN9 유전자 또는 이들의 유전자 산물(예컨대, mRNA 또는 단백질)이 결합되어 있다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 OCH1 유전자 또는 이들의 유전자 산물(예컨대, mRNA 또는 단백질)이 결합되어 있지 않다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)의 글루코시다제 II와 같은 글루코시다제 II의 알파 또는 베타 서브유닛 (또는 알파 및 베타 서브유닛 모두)을 발현한다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 *T. 하르지아눔* (*T. harzianum*)의 뮤타나제와 같은 뮤타나제를 발현한다. 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 상기 변형의 조합을 가질 수 있다.

[0084] 예컨대, 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 ALG3 (예컨대, Genbank Accession Nos: XM_503488, Genolevures Ref: YALIOE03190g) 유전자 또는 이의 유전자 산물(예컨대 mRNA 또는 protein)이 결합되어 있을 수 있고, ALG6 (예컨대, Genbank Accession Nos: XM_502922, Genolevures Ref: YALIOD17028g) 단백질을 과발현할 수 있으며; 글루코시다제 II(예컨대, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 또는 본 명세서에 기재된 다른 종)의 글루코시다제 II의 알파 및 베타 서브유닛 중 하나 또는 양쪽 모두를 과발현할 수 있고; 알파-1,2-만노시다제를 과발현할 수 있고; 다음으로 구성된 하나 이상 (이들의 조합 포함)을 과발현할 수 있다: 글루코시다제(glycosidase), 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase), 당-뉴클레오타이드 트랜스포터(sugar-nucleotide transporter), 당-뉴클레오타이드 변형 효소(sugar-nucleotide modifying enzyme). 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 OCH1 유전자 또는 이들의 유전자 산물(예컨대, mRNA 또는 단백질)이 결합되어 있지 않다.

[0085] 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 만노시다제 활성(예컨대, α -만노시다제 활성)을 함유할 수 있다. 만노시다제 활성은 소포체의 타겟이 될 수 있다. 만노시다제는 pH 최적이 적어도 7.5 미만(예컨대, 적어도 7.4 미만, 적어도 7.3 미만, 적어도 7.2 미만, 적어도 7.1 미만, 적어도 7.0 미만, 적어도 6.9 미만, 적어도 6.8 미만, 적어도 6.7 미만, 적어도 6.6 미만, 적어도 6.5 미만, 적어도 6.4 미만, 적어도 6.3 미만, 적어도 6.2 미만, 적어도 6.1 미만, 적어도 6.0 미만, 적어도 5.9 미만, 적어도 5.8 미만, 적어도 5.7 미만, 적어도 5.6 미만, 적어도 5.5 미만, 적어도 5.4 미만, 적어도 5.3 미만, 적어도 5.2 미만, 적어도 5.1 미만, 적어도 5.0 미만, 적어도 4.9 미만, 적어도 4.8 미만, 또는 적어도 4.7 미만).

- [0086] 만노시다제는 MNS1일 수 있다.
- [0087] 예컨대, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 만노시다제(예컨대, 알파-1,2-만노시다제 또는 본 명세서에 기재된 다른 만노시다제)를 과발현할 수 있으나, OCH1 유전자 또는 이의 유전자 산물(예컨대 mRNA 또는 protein)은 결여되지 않는다. 만노시다제는 단백질의 와일드 타입 형 또는 만노시다제 및 HDEL ER-보유 아미노산 시퀀스를 함유하는 용융 단백질과 같은 변이체형일 수 있다(실시예 참조)(N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은 HDEL 시퀀스를 포함하는 용융 단백질로 엔지니어드될 수 있다).
- [0088] 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형의 만노실 인산화를 증강시킬 수 있는 활성을 포함할 수 있다. 예컨대, N-글리칸(예컨대, MN4, MN6, PNO1)의 인산화를 증강시키는 활성으로 인코딩된 핵산을 유전적으로 엔지니어드된 세포에 도입할 수 있는데, 상기 세포는 타겟 분자의 N-글리코실레이션 인산화를 증가시킬 수 있다.
- [0089] 실시예에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포는 변성 N-글리코실레이션 분자로부터 인산화시키는 만노스 잔기(예컨대 콩(Jack Bean)으로부터 수득된 만노시다제)를 제거할 수 있는 활성을 포함할 수 있다.
- [0090] 실시예에서, 유전적으로 변형된 세포는, Man₅GlcNAc₂으로부터 글루코스 잔기를 제거할 수 있다. 예컨대, 유전적으로 변형된 세포는 α-1,3-글루코시다제 활성을 갖는 단백질을 과발현하며, 이의 예로는 뮤타나제 또는 글루코시다제 II(예컨대, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 또는 본 명세서에 기재된 다른 종의 글루코시다제 II)의 알파 및 베타 서브유닛의 하나 또는 둘 모두가 있으며, 상기 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0091] N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질은, 단백질이 발현되는 세포와는 다른 타입(예컨대, 다른 종)인 세포로부터 유래된 실시예에서, 단백질을 인코딩하는 핵산은 목적하는 특정 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 예컨대, 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)로부터 N-글리코실레이션 형을 갖는 단백질로 인코딩된 핵산은 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*)와 같은 효모 세포 중에서 발현을 위하여 코돈-최적화될 수 있다. 상기 코돈-최적화는 목적하는 세포 내에서 단백질의 발현을 증가시키는데 유용할 수 있다. 단백질을 인코딩하는 핵산을 코돈-최적화하는 방법은 공지된 방법을 사용하거나 문헌[Gao et al. (Biotechnol. Prog. (2004) 20(2): 443 -448), Kotula et al. (Nat. Biotechn. (1991) 9, 1386 - 1389), and Bennetzen et al. (J. Biol. Chem. (1982) 257(6):2036-3031)]에 기재된 바에 따른다.
- [0092] 세포를 또한, 유전적으로 엔지니어드하여 포유류(예컨대, 사람) 글리코실레이션 패스웨이를 매개하는 N-글리칸을 현저하게 생성하도록 할 수 있다. 예컨대, N-글리코실레이션 활성을 갖는 사람 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 세포에 도입할 수 있다. 실시예에서, 사람 단백질을 세포에 도입할 수 있고, N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 내인성 효모 단백질을 억제(suppress, 예컨대 삭제(deleted) 또는 변이유발(mutated)). 진균 글리코실레이션 패스웨이의 "휴머니징(humanizing)" 기술이 예컨대, 문헌[Choi et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(9):5022-5027; Verveken et al. (2004) Appl. Environ. Microb. 70(5):2639-2646; and Gerngross (2004) Nature Biotech. 22(11):1410-1414]에 기재되어 있으며, 상기 기재는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0093] 유전적 엔지니어링이 단백질의 발현 또는 외인성 단백질(내인성 단백질의 변이형 포함)의 발현의 변화와 관련이 있는 경우에, 유전적으로 엔지니어드된 세포가 단백질을 발현하는지 결정하기 위하여 다양한 기술을 사용할 수 있다. 예컨대, 단백질을 인코딩하고 있는 mRNA 또는 단백질 자체의 존재를, 예컨대 노던 블롯(Northern Blot) 또는 RT-PCR 분석 또는 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석을 사용하여 각각 검출할 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질의 세포내 로컬화(intracellular localization)를 서브셀룰러 분류(subcellular fractionation) 및 면역형광법(immunofluorescence)을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 분석할 수 있다.
- [0094] 부가적인 유전적 변형 및 이들을 본 명세서에 기재된 세포에 도입하기 위한 방법을, 예컨대 미국 특허 제 7,029,872호, 제5,272,070호, 및 제6,803,225호, 및 미국 특허출원 제20050265988호, 제20050064539호, 제20050170452호 및 제20040018588호에 기재된 바에 따를 수 있으며, 상기 각 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조로서 포함된다.
- [0095] Man₅GlcNAc₂ 및 Man₃GlcNAc₂의 인 비보(*in vivo*) 생산을 가능하게 하기 위하여 동종이형 효모 종(dimorphic yeast species)에서 수행된 엔지니어링 스텝은 다른 효소 중에서 수행된 엔지니어링 스텝과는 다를 수 있는 반면, 동종이형 효모에서 변성 당단백(Man₅GlcNAc₂ 및 Man₃GlcNAc₂ 코어 N-글리칸 구조를 갖는)을 인 비보에서 생

성하기 위한 엔지니어링 기술로 하기 문헌에 개시된 방법을 채용하는 것은 당업자에게 명백하다: 미국 특허 제 7,326,681호 및 미국 특허출원 제20040018590호, 제20060040353호, 및 제20060286637호(상기 문헌의 기재는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다). 채용된 방법을 사용하여 사람-형 하이브리드(human-type hybrid) 및 복합 N-글리칸으로 변성 당단백을 생산할 수 있다. 상기 복합 N-글리칸은 GlcNAc 잔기를 갖고 상기 코어 글리칸에서 개시되는 2 내지 5 의 브랜치를 가질 수 있으며, 예컨대 갈락토스(galactose), 프럭토스(fucose) 및 시알산 잔기(sialic acid residues)로 더욱 연장될 수 있다.

[0096] 실시예에서, N-글리코실레이션 활성을 갖는 변이체 또는 와일드 타입 단백질을 표준 기술을 사용하여 유전적으로 엔지니어드된 세포로부터 분리할 수 있다. 예컨대, 유전적으로 엔지니어드된 세포 내에서의 변이체 또는 와일드 타입 단백질의 발현에 따라, 세포 자체로부터 또는 세포가 배양된 배지로부터 단백질을 분리할 수 있다. 단백질 분리 방법은 공지 방법을 사용하며, 예컨대, 액체 크로마토그래피(예컨대, HPLC), 어피니티 크로마토그래피(affinity chromatography, 예컨대 금속 킬레이션 또는 이뮤노어피니티 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic-interaction chromatography), 침전 또는 용해도 분리(differential solubilization) 방법을 포함한다.

[0097] 실시예에서, N-글리코실레이션 활성을 갖는 분리된 단백질을 냉동(frozen), 동결건조(lyophilized), 또는 불활화(immobilized)하고, 단백질의 활성을 유지할 수 있는 적당한 조건에서 저장할 수 있다.

[0098] 본 발명은 본 명세서에 기재된 유전적으로 엔지니어드된 세포의 실질적으로 순수한 배지(substantially pure culture)를 제공한다. 본 명세서에서, 유전적으로 엔지니어드된 세포의 "실질적으로 순수한 배지(substantially pure culture)"라 함은, 배지 내에서 살아있는 세포의 총 수에 대하여 약 40%미만(즉, 약 35%; 30%; 25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 2%; 1%; 0.5%; 0.25%; 0.1%; 0.01%; 0.001%; 0.0001%; 미만)의 세포가 유전적으로 엔지니어드된 세포, 예컨대 박테리아, 진균(효모 포함), 마이코플라스마(mycoplasma), 또는 원생생물(protozoan) 세포인 배지를 의미한다. 본 명세서에서 "약"이라는 용어는 특정 퍼센트의 상하 15% 범위의 퍼센트를 의미한다. 따라서, 예컨대, 약20%라 함은 17% 내지 23%일 수 있다. 유전적으로 엔지니어드된 세포의 배지는 세포와, 성장, 저장 또는 이동 배지(medium)를 포함한다. 배지는 액체, 반 고형(예컨대 겔 형태의 배지), 또는 냉동될 수 있다. 배지에는 액체 또는 반 고형 배지에서 배양된 세포, 저장된 세포, 또는 냉동 저장 또는 이동 배지(medium)를 포함하는 냉동 또는 이동 배지에서 저장 또는 이동된 세포를 포함한다. 배지는 배양 용기 또는 저장 용기 또는 기질(예컨대, 배양 접시, 플라스크 또는 튜브 또는 저장 바이알 또는 튜브)이다.

[0099] 본 명세서에서 유전적으로 엔지니어드된 세포는, 예컨대 냉동 세포 현탁액(frozen cell suspensions)으로 저장될 수 있고, 예컨대, 글리세롤 또는 수크로스 및 같은 동결방지제(cryoprotectant)를 함유하는 버퍼 중에서 동결건조된 세포(lyophilized cells)로 저장될 수 있다. 또한, 예컨대, 유동 베드 건조(fluidized bed drying) 또는 스프레이 건조(spray drying) 또는 다른 적합한 방법에 의해 수득된 건조 세포 제제로서 저장할 수 있다.

[0100] 변성 N-글리코실레이션 분자의 제법

[0101] 본 명세서에는 타겟 분자의 변성 N-글리코실화 형의 제법이 기재되어 있다. 상기 방법은 일반적으로 유전적으로 엔지니어드된 세포(예컨대, 진균세포(예컨대, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 또는 본 명세서에 기재된 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포), 식물 세포, 또는 동물 세포(예컨대, 선충류, 곤충, 식물, 조류, 파충류, 또는 포유류(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 저빌, 개, 고양이, 염소, 돼지, 소, 말, 고래, 원숭이 또는 사람))하나 이상과 타겟 분자를 접촉하는 단계와 관련이 있다.

[0102] 세포 기반 방법(Cell based methods)은, 적어도 하나의 N-글리코실레이션 활성을 갖도록 유전적으로 엔지니어드된 세포(예컨대, 진균세포(예컨대, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*) 또는 본 명세서에 기재된 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포), 식물 세포, 또는 동물 세포)에, 세포 중에 N-글리코실레이션될 타겟 분자를 인코딩하고 있는 핵산을 도입하는 단계를 포함하며, 상기 세포는 변성 N-글리코실레이션 형에서 타겟 분자를 생성한다.

[0103] 세포를 유전적으로 엔지니어링함으로써 생성된 변형 유형을 하기에 기재하였다(실시예 및 "유전적으로 엔지니어드된 세포" 참조).

[0104] 핵산의 도입 방법은 공지된 방법 또는 본 명세서의 실시예에 기재된 방법에 따른다.

[0105] 타겟 분자(예컨대, 타겟 단백질)의 유전적으로 엔지니어드된 세포로의 도입 또는 발현으로, 세포의 소포체 및/또는 골지체를 통한 타겟 분자의 트래피킹(trafficking)이 유발될 수 있고, 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션

형을 생성할 수 있다.

- [0106] 타겟 분자(예컨대, 유전적으로 변형된 세포에서)의 프로세싱에 따르면, 타겟 분자(예컨대, 타겟 단백질)의 변성 N-글리코실레이션 형은 하나 이상의 N-글리칸 구조를 포함할 수 있다. 예컨대, 타겟 분자의 변형 형은, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 I 또는 VII; 도 4), $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (구조식 I; 도 4), $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (구조식 II; 도 4), $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (구조식 XIV; 도 4), $\text{Glc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VIII; 도 4), 또는 $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 IX; 도 4)(상기에서, "Man"는 만노스; "Glc"는 글루코스; 및 "GlcNAc"는 N-아세틸글루코사민이다)와 같은 특이적 N-글리칸 구조 하나 이상을 함유할 수 있다.
- [0107] 유전적으로 엔지니어드된 세포로부터 생성된 변성 N-글리코실레이션을 갖는 타겟 분자는 균질(즉, 모든 N-글리코실레이션 분자가 동일하게 특이적인 N-글리칸 구조를 함유함)하거나 실질적으로 균질할 수 있다. "실질적으로 균질(substantially homogeneous)"하다는 것은, 변성된 타겟 분자가, 유전적으로 엔지니어드된 세포에 의해 생성된 변성 N-글리코실레이션을 갖는 타겟 분자의 적어도 약 25%(즉, 적어도 약 27%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)라는 의미이다.
- [0108] 유전적으로 엔지니어드된 세포가 N-글리칸의 인산화에 영향을 미치는 N-글리코실레이션 활성을 하나 이상 포함하는 경우에, 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형은 적어도 약 25%(예컨대, 적어도 약 27%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80%)의 인산화된 만노실 잔기를 갖는다.
- [0109] 유전적으로 엔지니어드된 세포의 유전적 변형이 유도 신호(inducing cue, 예컨대, 화학적 또는 물리적 신호)의 존재하에 유도되거나 조건적인 경우에, 유전적으로 엔지니어드된 세포는, 선택적으로, 핵산의 도입 전, 도입된 중에, 또는 도입 후속적으로 유도 제제(inducing agent)의 존재 하에 배양될 수 있다. 예컨대, 타겟 단백질을 인코딩하는 핵산을 도입함에 따라, 세포는 화학적 유도 제제에 노출될 수 있는데, 이는 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질 하나 이상의 발현을 촉진할 수 있다. 다수의 유도 신호에 의해 N-글리코실레이션 활성을 갖는 단백질 하나 이상을 조건적으로 유도하는 경우는, 세포는 다수의 유도 제제와 접촉될 수 있다.
- [0110] 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성화에 의한 프로세싱(processing)에 따라, 변성 타겟 분자를 분리할 수 있다. 변성 타겟 분자는 효모 세포 중에 유지될 수 있고, 세포 용해(cell lysis)로 분리될 수 있으며, 변성 타겟 분자는 코딩 시퀀스(외인성 핵산에 대하여 본태적인 것 또는 발현 벡터로 엔지니어드된 것)에 의해 제공된 매커니즘을 통하여 배양 배지로 분비될 수 있는데, 이는 세포로부터 분자가 분비되도록 한다. 세포 용해물(cell lysate) 또는 배양 배지(culture medium)에 있어서 변성 타겟 분자의 존재를, 분자의 존재를 검출하기 위한 다양한 표준 프로토콜에 의해 규명할 수 있다. 예컨대, 변성 타겟 분자가 단백질인 경우에, 상기 프로토콜은 다음과 같으며, 다만 하기에 한정되는 것은 아니다: 변성 타겟 분자(또는 타겟 분자 그 자체) 특이적인 항체로 이뮤노블롯팅(immunoblotting) 또는 방사성면역침전(radioimmunoprecipitation), 변성 타겟 분자(또는 타겟 분자 그 자체)에 특이적인 리간드의 결합, 또는 변성 타겟 분자(또는 타겟 분자 그 자체)에 특이적인 효소 활성의 시험.
- [0111] 실시예에서, 분리된 변성 타겟 분자를 냉동, 동결건조 또는 불활화하고, 예컨대 변성 타겟 분자가 생물학적 활성을 유지할 수 있는 적절한 조건에서 저장할 수 있다.
- [0112] 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형을 인 비보(예컨대, 유전적으로 엔지니어드된 세포 중)에서 더욱 프로세싱하거나, 또는 인 비트로에서 더욱 프로세싱한 후 유전적으로 엔지니어드된 세포 또는 세포 배지로부터의 분리할 수 있다. 상기 프로세싱은 변성 타겟 분자의 하나 이상의 N-글리칸 잔기의 변형, 또는 N-글리칸 잔기 외에 변성 타겟 분자로의 변성을 포함한다. 상기 변성 타겟 분자의 부가적인 프로세싱은, 폴리머 또는 담체와 같은 이종 부분(heterologous moiety)의 부가(공유 또는 비공유 결합)를 포함할 수 있다. 상기 부가적인 프로세싱은 또한, 변성 타겟 분자의 효소적 또는 화학적 처리일 수 있다. 효소적 처리는 하나 이상의 글리코시다제(glycosidase)(예컨대 만노시다제(mannosidase) 또는 만나나제(mannanase)), 포스포디에스테라제(phosphodiesterase), 포스포리파제(phospholipase), 글리코실트랜스퍼라제(glycosyltransferase) 또는 프로테아제(protease)를, 변성 타겟 분자의 변성을 유도하기에 충분한 시간 동안 변성 타겟 분자와 접촉시킬 수 있다. 효소적 처리는 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 하나 이상의 글루코스 잔기를 제거할 수 있는 효소(예컨대, 만노시다제 또는 글루코시다제 II의 알파 및 베타 서브유닛의 하나 또는 양쪽 모두를 예시로 하며, 이에 한정되는 것은 아님)와

변성 타겟 분자를 접촉시키는 것일 수 있다. 화학적 처리는, 예컨대, 플루오르화 수소산과 같은 산과 변성 타겟 분자를, 변성 타겟 분자의 변성을 유도하기에 충분한 시간 동안 접촉시키는 것일 수 있다. 특정 조건에서 플루오르화 수소산 처리함으로써, 글리칸에 인산은 남겨두는 반면, 글리칸에 포스포디에스테르-링크된 만노스는 제거한다. 변성 타겟 분자는 하나 이상의 N-글리칸으로부터 인산기를 부가 또는 제거함으로써 더욱 프로세싱될 수 있다. 예컨대, 변성 타겟 분자를 만노실 키나아제(mannosyl kinase) 또는 만노실 포스파타제(mannosyl phosphatase)와 접촉시킬 수 있다.

[0113] 실시예에서, 본 명세서에 기재된 변성 타겟 분자는, 분리에 따라, 예컨대 효소적 또는 화학적 수단을 사용하여 이중 부분(heterologous moiety)에 부착될 수 있다. "이중 부분(heterologous moiety)"이라 함은, 변성 타겟 분자에 결합된(예컨대, 공유 결합 또는 비공유 결합) 성분을 의미하는 것으로, 상기 성분은 변성 타겟 분자에 본래 존재하는 성분과는 상이한 성분이다. 이중 부분에는, 예컨대 폴리머, 담체(carrier), 애드juvant(adjuvant), 항체독소(immunotoxin), 또는 검출가능한(예컨대, 형광(fluorescent), 발광(luminescent) 또는 방사성(radioactive)) 부분을 포함한다. 실시예에서, 부가적인 N-글리칸을 변성 타겟변성 타겟가할 수 있다.

[0114] 타겟 분자는 유전적으로 엔지니어드된 세포에서 프로세싱될 수 있으나, 반드시 필요한 것은 아니다. 예컨대, 본 명세서에 변성 N-글리코실레이션 형을 갖는 타겟 분자의 세포-없는 제조 방법(cell-free methods)이 개시되어 있는데, 상기 방법은 적어도 하나의 N-글리코실레이션 활성을 갖도록 유전적으로 엔지니어드된 세포(진균 세포(예컨대, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)) 또는 본 명세서에 기재된 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포), 식물세포, 또는 동물세포(예컨대, 선충류(nematode), 곤충, 식물, 조류, 파충류 또는 포유류(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 저빌(gerbil), 개, 고양이, 염소, 돼지, 소, 말, 고래, 원숭이 또는 사람))로부터 생성된 세포 용해물(cell lysate)을 N-글리코실레이션 조건 하에서 타겟 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는데, 상기 세포 용해물에 타겟 분자를 접촉시킴으로써 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형을 생성할 수 있다.

[0115] "N-글리코실레이션 조건(N-glycosylation conditions)"이라 함은, 혼합물(예컨대, 타겟 분자 및 세포 용해물의 혼합물)을 변성 N-글리코실레이션(상기와 같이)이 가능하게 되는 조건에서 인큐베이션 하는 것을 의미한다.

[0116] 세포 용해물 내에서 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성의 활성(activity) 및 성질(integrity)을 유지하는 세포 용해물을 수득하는 적절한 방법에는, 적절한 버퍼(buffers) 및/또는 억제제(inhibitors)의 사용을 포함할 수 있으며, 이는 세포 용해물 내에서 N-글리코실레이션 활성의 변화를 보존 또는 최소화할 수 있는 것으로, 뉴클레아제(nuclease), 프로테아제(protease) 및 포스파타제(phosphatase) 억제제를 포함한다. 상기 억제제로는, 예컨대, 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), 에틸렌글리콜 비스(P-아미노에틸 에테르) N,N,N1,N1-테트라아세트산(ethylene glycol bis(P-aminoethyl ether) N,N,N1,N1-tetraacetic acid (EGTA))과 같은 킬레이터(chelators), 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)), 아프로티닌(aprotinin), 류페틴(leupeptin), 안티페인(antipain) 등과 같은 프로테아제 억제제(protease inhibitors), 및 포스페이트(phosphate), 소듐 플루오라이드(sodium fluoride), 바나데이트(vanadate) 등과 같은 포스파타제 억제제(phosphatase inhibitors)를 포함한다. 억제제는 목적물의 N-글리코실레이션 활성을 방해하지 않거나 부작용을 최소화할 수 있는 것으로 선택할 수 있다. 효소 활성을 갖는 용해물을 수득하기 위한 적절한 버퍼 및 조건은, 예컨대 문헌[Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999)]에 기재되어 있다.

[0117] 방해 물질을 제거하거나 최소화하기 위하여 세포 용해물을 추가로 프로세싱할 수 있다. 필요하다면, 세포 용해물을 당업자에게 공지된 방법으로 분류할 수 있는데, 예컨대, 서브셀룰러 분류(subcellular fractionation), 및 이온교환, 소수성 및 역상, 사이즈 배제, 어피니티, 소수성 전하-유도 크로마토그래피와 같은 다양한 크로마토그래피 기술을 사용할 수 있다(예컨대, 문헌[Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, third edition, Springer-Verlag, New York (1993); Burton and Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)] 참조).

[0118] 실시예에서, 본래의 성질(intact) 및/또는 기능성(functional)을 유지하는 전체 세포성 기관(cellular organelles)에서 세포 용해물을 제조할 수 있다. 예컨대, 세포 용해물은 하나 이상의 본래의 R(rough) 소포체, 본래의 S(smooth) 소포체, 또는 본래의 골지체 하나 이상을 포함할 수 있다. 본래의 세포성 기관을 함유하는 세포 용해물을 제조하고, 상기 세포성 기관들의 기능성을 시험하는 적절한 방법이 문헌[Moreau *et al.* (1991) J.

Biol. Chem. 266(7):4329-4333; Moreau et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(7):4322-4328; Rexach et al. (1991) J. Cell Biol. 114(2):219-229; and Paulik et al. (1999) Arch. Biochem. Biophys. 367(2):265-273]에 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0119] 본 발명에는 또한, 변성 N-글리코실레이션 형을 갖는 타겟 분자의 제조방법이 개시되어 있는데, 상기 방법에는, N-글리코실화 조건에서 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 분리된 단백질과 타겟 분자를 접촉시키는 단계를 포함하며, N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 분리된 단백질과 타겟 분자를 접촉시킴으로써 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형을 제조할 수 있고, N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질은 적어도 하나의 변성 N-글리코실레이션 활성을 갖도록 유전적으로 엔지니어링된 세포(예컨대, 진균 세포(예컨대, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*)) 또는 본 명세서에 기재된 다른 관련 종의 동종이형 효모 세포), 식물 세포, 또는 동물세포(예컨대, 선충류(nematode), 곤충, 식물, 조류, 파충류 또는 포유류(예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 저빌(gerbil), 개, 고양이, 염소, 돼지, 소, 말, 고래, 원숭이 또는 사람))로부터 제조할 수 있다.

[0120] N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질을 상기 기재된 바와 같이 표준 기술을 사용하여 정제할 수 있다. 타겟 분자의 변성을 유도하기에 충분한 시간 동안, 적절한 버퍼 중에서, 하나 이상의 단백질과 타겟 분자를 접촉시킬 수 있으며, 이는 하기 문헌[Lee and Park (2002) 30(6):716-720 and Fujita and Takegawa (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(3):678-682]에 기재되어 있고, 상기 문헌의 기재는 전체로서 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0121] 실시예에서, 타겟 분자를 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나의 단백질만과 접촉시킬 수 있다. 실시예에서, 타겟 분자를 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 접촉시킬 수 있다. 타겟 분자를 N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 접촉시킴에 있어서, 동시에 접촉시키거나 연속적으로 접촉시킬 수 있다. N-글리코실레이션 활성을 갖는 하나 이상의 단백질과 타겟 분자를 연속적으로 접촉시키는 경우에 있어서, 타겟 분자를 하나 또는 그 이상의 단계 후에 정제할 수 있으나, 반드시 정제하여야 하는 것은 아니다. 즉, 타겟 분자를 단백질 활성 A와 접촉시키고, 단백질 활성 B와 분자를 접촉시키기에 앞서 정제하는 것을 말한다.

[0122] 세포-없는 반응(cell free methods)의 실시예에 있어서, 타겟 분자와 하나 이상의 N-글리코실레이션 활성을 접촉시키기에 앞서, 타겟 분자를 고체상 지지체(solid-phase support)에 링크시키는 것이 바람직하다. 상기 링크는 N-글리코실레이션 변성에 따라 정제를 더 용이하게 할 수 있다. 적절한 고체상은 멀티-웰 분석 플레이트(multi-well assay plates), 파티클(예컨대, 자성(magnetic) 또는 인코딩된 파티클), 칼럼, 또는 막을 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0123] 타겟 분자의 N-글리코실레이션(예컨대, 변성 N-글리코실레이션)의 검출방법으로는, DNA 시퀀서-어시스트(DNA sequencer-assisted(DSA)), 형광물질-어시스트 탄수화물 전기영동(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE))(실시예에 따름) 또는 표면-증강 레이저 탈착/이온화 시간-대비-증발 매스 분석기(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS))를 포함한다. 예컨대, DSA-FACE를 사용한 분석에 있어서, 당단백을 변성한 후에 예컨대 막 위에서 고정화(immobilization)시킨다. 당단백은 디티오프레이트(dithiothreitol (DTT)) 또는 β -머캅토에탄올과 같은 적절한 환원시약으로 환원될 수 있다. 단백질의 설프하이드릴 기(sulfhydryl groups)는 요오드아세트산(iodoacetic acid)과 같은 산을 사용하여 카르복실화될 수 있다. 다음으로, N-glycosidase F와 같은 효소를 사용하여 단백질로부터 N-글리칸을 방출시킬 수 있다. N-글리칸은, 선택적으로 다시 재구성(reconstituted)될 수도 있고, 환원성 아미노화반응(reductive amination)에 의해 유도체화(derivatize)될 수 있다. 이어서, 유도체화된 N-글리칸을 농축할 수 있다. N-글리칸 분석에 적합한 장치로는, 예컨대 ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems)를 포함한다. 데이터 분석은 GENESCAN 3.1 software (Applied Biosystems)를 사용하여 수행할 수 있다. 선택적으로, 분리된 만노프로테인을 하나 이상의 효소로 처리하여 N-글리칸 상타를 확인할 수 있다. 상기 효소로는 전형적으로, 하기 실시예에 기재된 바와 같이 α -만노시다제 또는 α -1,2-만노시다제를 사용할 수 있다. N-글리칸 분석의 부가적인 방법으로는, 예컨대, 질량분석(mass spectrometry)(예컨대, MALDI-TOF-MS), 고압 액체 크로마토그래피(high-pressure liquid chromatography, HPLC)(정상(normal phase), 역상(reverse phase)) 및 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)를 포함한다(예컨대, 글리칸이 라벨링되어 있지 않는 경우에는 간헐적 전류 검출(pulsed amperometric detection)할 수 있고, 글리칸이 적절하게 라벨링되어 있는 경우에는 UV흡수 또는 형광 분석할 수 있다).

[0124] 하기 문헌 [Callewaert et al. (2001) Glycobiology 11(4):275-281] 및 문헌[Freire et al. (2006)

Bioconjug. Chem. 17(2):559-564]을 참조하며, 상기 각각의 문헌은 전체로서 본 발명에 참조로 포함된다.

[0125] Disorders Treatable by N-글리코실레이션 분자로 치료가능한 질병

[0126] 본 명세서에 기재된, 분리된, 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 변성 N-글리코실레이션 단백질 또는 돌리콜(dolichol))을 다양한 질병을 치료하는데 있어서 사용할 수 있는데, 상기 질병은 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대 변성 N-글리코실레이션을 갖는 단백질)를 투여함으로써 치료가능한 질병이다. 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 변성 N-글리코실레이션 당단백 또는 변성 N-글리코실레이션 돌리콜(dolichol))를 투여함으로써 치료 또는 예방 가능한 특정 의학적 증상의 예를 하기에 기술하였다.

[0127] (i) 대사성 질환(metabolic disorder)

[0128] 대사성 질환은 개개의 사람(또는 동물) 세포에 있어서 에너지 생성에 영향을 미치는 질병을 의미한다. 대부분의 대사성 질환은 유전적이나, 식이, 독소, 감염 등으로 인하여 후천적으로 발생하는 경우도 있다. 유전적인 대사성 질환은 대사의 선천적 장애(inborn errors)라고 알려져 있다. 일반적으로 유전적인 대사성 질환은 유전적 결핍(genetic defects)으로 발생되는데, 세포의 대사 과정에 있어서 일부의 단계에 필요한 효소가 결손되거나 부적절하게 형성되었기 때문이다. 대사성 질환의 대부분류는, 탄수화물 대사 장애(disorders of carbohydrate metabolism), 아미노산 대사 장애(disorders of amino acid metabolism), 유기산 대사 장애(disorders of organic acid metabolism, organic acidurias), 지방산 산화 및 미토콘드리아 대사 장애(disorders of fatty acid oxidation and mitochondrial metabolism) 및 포르피린 대사 장애(disorders of porphyrin metabolism), 퓨린 또는 피리미딘 대사 장애(disorders of purine or pyrimidine metabolism), 스테로이드 대사 장애(disorders of steroid metabolism), 미토콘드리아 기능 장애(disorders of mitochondrial function), 퍼옥소조말 기능 장애(disorders of peroxisomal function) 및 지질침착질환(lysosomal storage disorders, LSDs)이 있다.

[0129] 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 분자를 투여함으로써 치료할 수 있는 대사성 질환의 예로는 다음을 포함한다: 유전성 혈색소 침착증(hereditary hemochromatosis), 전신성 백색증(oculocutaneous albinism), 단백질 C 결핍(protein C deficiency), 1형 혈관부종(type I hereditary angioedema), 선천성 과당-이소말타제 결핍증(congenital sucrase-isomaltase deficiency), 크리글러-나자르 2형(Crigler-Najjar type II), 라론 신드롬(Laron syndrome), 유전적 글루세포산화수소(hereditary Myeloperoxidase), 원발성 갑상선기능저하증(primary hypothyroidism), 선천성 QT 간격 연장 증후군(congenital long QT syndrome), 티록신 결합 글로불린 결핍(tyroxine binding globulin deficiency), 선천성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolemia), 선천성 고암죽혈증(familial chylomicronemia), 아베타-리포프로테인에마(abeta-lipoproteinemia), 저 플라즈마 리포프로테인 A레벨(low plasma lipoprotein A levels), 간 손상으로 인한 유전성 폐기증(hereditary emphysema with liver injury), 선천성 갑상선 기능저하증(congenital hypothyroidism), 불완전 골생성증(osteogenesis imperfecta), 선천성 저섬유소원혈증(hereditary hypofibrinogenemia), 알파-란티키모트립신 결핍(alpha-lantichymotrypsin deficiency), 요붕증(nephrogenic diabetes insipidus), 신경뇌하수체 요붕증(neurohypophyseal diabetes insipidus), 아데노신 디아미나제 결핍(adenosine deaminase deficiency), 펠리제우스 메르츠바하 병(Pelizaeus Merzbacher disease), 본 윌러브랜드 병 제2A형(von Willebrand disease type IIA), 5번 응고 인자와 8번 응고 인자의 복합 결핍증(combined factors V and VIII deficiency), 선천성 척추뼈끝 형성이상(spondylo-epiphyseal dysplasia tarda), 맥락막 결손증(choroideremia), I 세포 질환(I cell disease), 바텐 병(Batten disease), 모세혈관 확장성 운동 실조증(ataxia telangiectasias), 상염색체 우성 다낭성 신질환(ADPKD-autosomal dominant polycystic kidney disease), 미세융모내 봉합체 질환(microvillus inclusion disease), 결절성 경화증(tuberous sclerosis), 안-뇌-신 증후군(oculocerebro-renal syndrome of Lowe), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 베어 림프구 증후군(Bare lymphocyte syndrome), 탄지에르 병(Tangier disease), 선천성 간내 담즙울체증(familial intrahepatic cholestasis), 부신백질 이영양증(X-linked adreno-leukodystrophy), 스캇 증후군(Scott syndrome), 헤르만스키 푸드락 증후군 1형 2형(Hermansky-Pudlak syndrome types 1 and 2), 젤위거 증후군(Zellweger syndrome), 점상 연골 이형성증(rhizomelic chondrodysplasia puncta), 상염색체 열성 원발성 과옥살산 뇨증(autosomal recessive primary hyperoxaluria), 모르 트라네저그 신드롬(Mohr Tranebjaerg syndrome), 척수강 및 수포성 근위축(spinal and bullar muscular atrophy), 원발성 섬모 이상운동증(primary ciliary diskenesia (Kartagener's syndrome)), 거인증(giantism) 및 말단비대증(acromegaly), 유즙누출증(galactorrhea), 애디슨씨병(Addison's disease), 부신성 남성화증(adrenal virilism), 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 케톤산증(ketoacidosis), 원발성 또는 속발성 알도스테론증(primary or secondary aldosteronism),

밀러 디커 증후군(Miller Dieker syndrome), 활택뇌증(lissencephaly), 운동 뉴런 장애(motor neuron disease), 어셔 증후군(Usher's syndrome), 비스코트-알드리치 증후군(Wiskott-Aldrich syndrome), 오피츠 증후군(Optiz syndrome), 헌팅턴씨병(Huntington's disease), 유전성 췌장염(hereditary pancreatitis), 항인지질증후군(anti-phospholipid syndrome), 중복 결합조직 질환(overlap connective tissue disease), 쇠그렌 증후군(Sjogren syndrome), 강직-인간 증후군(stiff-man syndrome), 브루가다 증후군(Brugada syndrome), 선천성 핀란드형 신염 증후군(congenital nephritic syndrome of the Finnish type), 더빈-존슨 증후군(Dubin-Johnson syndrome), X-링크된 하이포포스포파테미아(X-linked hypophosphosphatemia), 펜드레드 증후군(Pendred syndrome), 영아기 저혈당증(persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy), 유전성 구상 적혈구증(hereditary spherocytosis), 선천성 철분대사 이상증(aceruloplasminemia), 영아형 신경 세로이드 리포푸신증(infantile neuronal ceroid lipofuscinosis), 거짓 연골 발육 부전 형성이상(pseudoachondroplasia) 및 다발성 골단 이형성증(multiple epiphyseal), 스타트가르트-양 황반 이영양증(Stargardt-like macular dystrophy), X-링크된 차콧-마리-투스 질환(X-linked Charcot-Marie-Tooth disease), 오토소말 도미넌트 레티니티스 피그멘토사(autosomal dominant retinitis pigmentosa), 월콧-렐리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 쿠싱 증후군(Cushing's disease), 근위지대형 근이양증(limb-girdle muscular dystrophy), 뮤코 다당증(mucopolysaccharidosis) type IV, 선천성 가족성 유전분증(hereditary familial amyloidosis of Finish), 앤더슨병(Anderson disease), 육종(sarcoma), 만성 골수성 단구성 백혈병(chronic myelomonocytic leukemia), 심장근증(cardiomyopathy), 얼굴생식기관 형성이상(faciogenital dysplasia), 토리슨 병(Torsion disease), 헌팅턴(Huntington) 및 척수소뇌성 운동질환(spino-cerebellar ataxias), 유전성 하이퍼호모시스테인증(hereditary hyperhomocysteinemia), 다발성신경병증(polyneuropathy), 하부 운동 뉴런 질환(lower motor neuron disease), 망막세포 변성(pigmented retinitis), 혈청검사음성 다발성관절염(seronegative polyarthritis), 간질성 폐섬유증(interstitial pulmonary fibrosis), 레이노드 현상(Raynaud's phenomenon), 베게너 육아종증(Wegner's granulomatosis), 단백뇨(preteinuria), CDG-Ia, CDG-Ib, CDG-Ic, CDG-Id, CDG-Ie, CDG-If, CDG-IIa, CDG-IIb, CDG-IIc, CDG-IId, 엔로스-단로스 증후군(Ehlers-Danlos syndrome), 다발성 외골종(multiple exostoses), 그리셀리 증후군(Griscelli syndrome) (type 1 or type 2), 또는 X-링크된 비특이성 정신박약(X-linked non-specific mental retardation). 또한, 대사성 질환은 하기와 같은 지질침착질환을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다: 패브리 병(Fabry disease), 파버 병(Farber disease), 고세 병(Gaucher disease), GM₁-강글리오사이드증(gangliosidosis), 테이-삭스병(Tay-Sachs disease), 샌드호프병(Sandhoff disease), GM₂ 활성화인자 병(activator disease), 크라베 병(Krabbe disease), 이염색성 백질이영양증(metachromatic leukodystrophy), 니만 피크 병(Niemann-Pick disease) (types A, B, 및 C), 헐러 병(Hurler disease), 쉬에 병(Scheie disease), 헌터 병(Hunter disease), 산필리포 병(Sanfilippo disease), 모르키오 병(Morquio disease), 마로토-라미 병(Maroteaux-Lamy disease), 히알루로다제 결핍(hyaluronidase deficiency), 아스파틸글루코스아민뇨(aspartylglucosaminuria), 푸코사이드 축적증(fucosidosis), 만노시드 축적증(mannosidosis), 쉰들러 병(Schindler disease), 시알리도시스(sialidosis) type 1, 폼페 병(Pompe disease), 농축 이골증(Pycnodysostosis), 세로이드 리포푸신증(ceroid lipofuscinosis), 콜레스테롤 에스테르 저장 질환(cholesterol ester storage disease), 울만 병(Wolman disease), 다발성 설패타제 결핍증(Multiple sulfatase deficiency), 갈락토시알리도시스(galactosialidosis), 무코리피도시스(mucopolipidosis)(types II, III, and IV), 시스티노시스(cystinosis), 시알산 저장 장애(sialic acid storage disorder), 마리네스코-쇠그렌 증후군 동반 킬로미크론 보유 질환(chylomicron retention disease with Marinesco-Sjogren syndrome), 헤르만스키-푸드라크 증후군(Hermansky-Pudlak syndrome), 세디아크-히가시 증후군(Chediak-Higashi syndrome), 다논 병(Danon disease), 또는 겔리오피직 다이스플라시아(Geleophysic dysplasia).

[0130]

대사성 질환의 증상은 그 수도 많고 다양하며, 다음의 하나 이상의 증상을 포함한다: 빈혈(anemia), 피로감(fatigue), 쉽게 멍들(bruising easily), 저 혈중 혈소판(low blood platelets), 간 비대(liver enlargement), 비장 비대(spleen enlargement), 골격 약화(skeletal weakening), 폐질환(lung impairment), 감염(infections)(예컨대, 흉부 감염(chest infections) 또는 폐렴(pneumonias)), 신장 질환(kidney impairment), 진행성 뇌 손상(progressive brain damage), 간질(seizures), 태반 착색(extra thick meconium), 기침(coughing), 천명(wheezing), 과량의 타액(excess saliva) 또는 점액 생성(mucous production), 호흡곤란(shortness of breath), 복통(abdominal pain), 장 폐색(occluded bowel or gut), 수태 이상(fertility problems), 코에의 용종(polyps in the nose), 손/발톱 및 피부의 곤봉지(clubbing of the finger/toe nails and skin), 손 또는 발의 통증(pain in the hands or feet), 각화증(angiokeratoma), 발한 감소(decreased perspiration), 각막 및 수정체의 불투명(corneal and lenticular opacities), 백내장(cataracts), 승모관 탈

출증(mitral valve prolapse and/or regurgitation), 심장비대(cardiomegaly), 체온불균형(temperature intolerance), 보행 곤란(difficulty walking), 삼킴 곤란(difficulty swallowing), 진행성 시력 손실(progressive vision loss), 진행성 청력 손실(progressive hearing loss), 저혈압(hypotonia), 대설증(macroglossia), 무반사(areflexia), 아래 등 통증(lower back pain), 수면 무호흡(sleep apnea), 기좌호흡(orthopnea), 졸음(somnolence), 척추 전만(lordosis), 또는 척추측만증(scoliosis). 단백질의 결핍 또는 결손의 다양한 성질 및 이로 인한 질병의 페노타입(예컨대, 대사성 질환의 증상 발현)으로 인해, 상기 질환은 특정 질환의 증상으로만 특징지어진다. 예컨대, 파브리 병을 갖고 있는 환자는 상기 증상들 중에서 특정 증상을 나타내나, 이에 한정되는 것은 아니다: 체온불균형(temperature intolerance), 각막 말림(corneal whirling), 통증(pain), 피부발진(skin rashes), 오심(nausea), 또는 설사(diarrhea). 고세 병(Gaucher syndrome)을 갖는 환자에서는 비장 비대증(splenomegaly), 간경변(cirrhosis), 경련(convulsions), 긴장 항진(hypertonia), 무호흡(apnea), 골다공증(osteoporosis), 또는 피부 변색(skin discoloration)의 증상이 나타난다.

[0131] 본 명세서의 변성 N-글리코실레이션 분자를 투여하는 것 외에, 대사성 질환은 적절한 영양과 비타민(예컨대 코팩터 치료), 물리 치료, 및 통증 치료 등의 치료를 할 수 있다.

[0132] 주어진 대사성 질환의 특정 성질에 따라, 환자는 어느 연령에서도 여러가지 증상을 나타낼 수 있다. 많은 경우에 있어서, 상기 증상들이 어린 시절에 나타나기도 하고 어른이 된 후에 나타나기도 한다. 예컨대, 파브리 병(Fabry disease)의 증상은 10살 또는 11살 정도 연령의 어린 나이에서 발현된다.

[0133] 본 명세서에 기재된 바 대로, "대사성 질환의 진행의 위험성"이 있는 개체라 함은 질병이 진행하는 경향이 있다는 점이다. 즉, 유전적 경향이 대사성 질환을 진행하여 결과적으로 하기와 같은 효소에 있어서 변이를 유발한다: 알파-L-이두로니다제(alpha-L-iduronidase), 베타-D-갈락토시다제(beta-D-galactosidase), 베타-글루코시다제(beta-glucosidase), 베타-헥소사미니다제(beta-hexosaminidase), 베타-D-만노시다제(beta-D-mannosidase), 알파-L-푸코시다제(alpha-L-fucosidase), 아릴설파타제 B(arylsulfatase B), 아릴설파타제 A(arylsulfatase A), 알파-N-아세틸갈락토사미니다제(alpha-N-acetylgalactosaminidase), 아스파틸글루코사미니다제(aspartylglucosaminidase), 이두로네이트-2-설파타제(iduronate-20sulfatase), 알파-글루코사미나이드-N-아세틸트랜스퍼라제(alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase), 베타-D-글루코로나다제(beta-D-glucuronidase), 히알루로나다제(hyaluronidase), 알파-L-만노시다제(alpha-L-mannosidase), 알파-뉴라미니다제(alpha-neuraminidase), 포스포트랜스퍼라제(phosphotransferase), 액시드 리파제(acid lipase), 액시드 세라미다제(acid ceramidase), 스팅고미엘리나제(sphingomielinase), 티오에스테라제(thioesterase), 카텡신 K(cathepsin K), 또는 리포프로테인 리파제(lipoprotein lipase). "대사성 질환의 진행의 위험성"이 있는 모든 개체에 있어서 나타나는 것은 아니다.

[0134] (ii) 암

[0135] 암은 질병 혹은 제어되지 않는 세포의 분화에 의해 특징지어지는 무질서 혹은 질병의 일종이며, 침범을 통해 인근 조직으로 직접 성장에 의하거나, 다른 부분으로 전이(metastasis, 암 세포가 혈류나 임파시스템(lymphatic system)에 의하여 옮겨지는 것)로 침투되어 확산되는 능력을 갖는다. 암은 모든 연령대의 사람이 걸릴 수 있으나, 나이에 따라 그 위험이 커지는 경향이 있다. 암의 종류는 예를 들면, 폐암(lung cancer), 유방암(breast cancer), 대장암(colon cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 신장암(renal cancer), 위암(stomach cancer), 간암(liver cancer), 골암(bone cancer), 혈액암(hematological cancer), 신경조직암(neural tissue cancer), 흑색종(melanoma), 갑상선암(thyroid cancer), 프로스트레이트암(prostate cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 질암(vaginal cancer), 혹은 방광암(bladder cancer)이 있다.

[0136] 여기에서, "암의 발생 위험"이라는 것은 암이 발생시킬 신체적 소질을 말하며, 즉, 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 돌연변이(mutation)(예를 들어, BRCA1, p53, RB 혹은 APC 내의 돌연변이) 같은 암을 발생시키는 유전적 기질을 말하거나, 암이 발생하는 조건에 노출되는 것을 말한다. 그러므로, "암의 발생 위험"이라는 것은 어떤 화합물의 돌연변이 혹은 발암성 수준(예를 들면, 아크롤레인(Acrolein), 비소(Arsenic), 벤젠(Aenzene), 벤잔{a}트라센(Benz{a}anthracene), 벤조{a}피렌(Benz{a}pyrene), 폴로늄-210(Polonium-210)(라돈), 우레탄(Urethane), 혹은 염화비닐(Vinyl Chloride) 같은 담배 연기속의 발암성 화합물)에 노출되는 것도 포함한다. 또한, "암의 발생 위험"이 있는 개체는 예를 들면 자외선이나 X-선에 노출되거나 혹은 유두종 바이러스(papillomavirus), 엡스타인바 바이러스(epstein-barr virus), B형 간염 바이러스(hepatitis B virus) 혹은 인간 T세포 백혈병 바이러스(human t-cell lymphotropic virus) 같은 암유발 혹은 관계된 바이러스에 노출되는 것을 포함한다. 상기 기재로부터 모든 개체에 있어서 "암의 발생 위험"이 있

는 개체는 아니다.

[0137] “암보유 의심” 개체는 하나 또는 그 이상의 암의 증후를 갖는 것을 포함한다. 암의 증후는 당업자에게는 잘 알려져 있으며, 한정이 없으며, 유방종괴(breast lumps), 유두변이(nipple changes), 유방포낭(breast cysts), 유방통증(breast pain), 체중감소(weight loss), 허약(weakness), 과도한 피로(excessive fatigue), 식이 곤란(difficulty eating), 식욕상실(loss of appetite), 만성적 기침(chronic cough), 악화되는 호흡곤란(worsening breathlessness), 혈액 섞인 기침(coughing up blood), 혈액 섞인 소변(blood in the urine), 혈액 섞인 대변(blood in the stool), 구역(nausea), 구토(vomiting), 간 전이(liver metastases), 폐 전이(lung metastases), 뼈 전이(bone metastases), 더부룩증(abdominal fullness), 붓기(bloating), 복막강 유체(fluid in peritoneal cavity), 질의 출혈(vaginal bleeding), 변비(constipation), 비정상적 팽창(abdominal distension), 결장관통(perforation of colon), 급성복막염(acute peritonitis)(감염, 열, 통증), 통증(pain), 혈액구토(vomiting blood), 심한 발한(heavy sweating), 고열(fever), 고혈압(high blood pressure), 빈혈(anemia), 설사(diarrhea), 황달(jaundice), 어지럼증(dizziness), 냉기(chills), 근육경련(muscle spasms), 결장 전이(colon metastases), 폐 전이(lung metastases), 방광 전이(bladder metastases), 간 전이(liver metastases), 뼈 전이(bone metastases), 신장 전이(kidney metastases), 그리고 췌장 전이(pancreas metastases), 삼기기 곤란함(difficulty swallowing) 혹은 기타 등등이다.

[0138] 여기서 설명된 하나 또는 그 이상의 변성 N-글리코실레이션(N-glycosylation)의 투여 외에, 화학적 치료제(chemotherapeutic agents), 이온성 방사선 치료(ionizing radiation), 면역 치료제(immunotherapy agents) 또는 고온종양치료제(hyperthermotherapy agents)로 암을 치료할 수 있다. 화학적 치료제의 예로는 예컨대, 시스플라틴(cispatin), 카보플라틴(carboplatin), 프로카바진(procarbazine), 메클로에타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 캄포테틴(camptothecin), 아드리아마이신(adriamycin), 이포소파미드(ifosfamide), 메팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 비스설판(bisulfan), 나이트로스우레아(nitrosurea), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide), 베라파밀(verapamil), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 타목시펜(tamoxifen), 탁솔(taxol), 트랜스플라티늄(transplatinum), 5-플루오로우라실(flurouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin), 및 메토틱세이트(methotrexate)를 포함한다.

[0139] (iii) 염증성 질환

[0140] 본 명세서에서, "염증성 질환(inflammatory disorder)"이 있는 개체라 함은, 백혈구(예컨대, B 세포, T 세포, 마크로파지, 모노사이트(monocytes), 또는 수지상 세포(dendritic cells)) 활동을 경유하여 부적절하게 병원성 반응(pathological response), 예컨대 병원성 면역 반응을 유발하는 하나 이상의 물질(예컨대 개체에서 자연적으로 발생하지 않은 물질)에서의 프로세싱을 의미한다. 따라서, 염증 반응에 관여하는 상기 세포들을 "염증성 세포(inflammatory cells)"라고 한다. 부적절하게 유발된 염증반응은, 개체에 대하여 외부 물질(예컨대, 항원, 바이러스, 박테리아, 진균)이 존재하지 않는 경우에 일어날 수 있다. 부적절하게 유발된 반응은, 자기-성분(self-component)(예컨대, 자기-항원(self-antigen))이 염증 세포에 의해 타겟팅(예컨대, 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 자가면역질환(autoimmune disorder))된다. 부적절하게 유발된 반응은, 예컨대, 아나필락시스(anaphylaxis)와 같이, 크기(magnitude) 또는 기간(duration)에 있어서 부적절한 반응일 수 있다. 따라서, 부적절하게 유발된 반응은, 마이크로바이알 감염(예컨대, 바이러스, 박테리아, 또는 진균 감염)의 존재로 인한 것일 수 있다. 염증 질환(예컨대, 자가면역질환(autoimmune disease))의 유형은 다음을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다: 퇴행성관절염(osteoarthritis), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis (RA)), 척추관절염(spondyloarthropathies), POEMS 증후군(POEMS syndrome), 크론씨병(Crohn's disease), 거대 임파절 증식증(multicentric Castleman's disease), 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus (SLE)), 다발성 경화증(multiple sclerosis (MS)), 근육성 이영양증(muscular dystrophy (MD)), 인슐린-의존성 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)), 피부근염(dermatomyositis), 다발성근염(polymyositis), 길리안 베어 증후군과 같은 염증성 신경장해(inflammatory neuropathies such as Guillain Barre syndrome), 웨그너 육아종성 질환과 같은 혈관염(vasculitis such as Wegener's granulomatosis), 결절성 다발 동맥염(polyarteritis nodosa), 류마티스성 다발성 근육통(polymyalgia rheumatica), 측두 동맥염(temporal arteritis), 소로그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 베켓 병(Bechet's disease), 슈러그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 또는 타카야스 관절염(Takayasu's arteritis). 염증성 질환에는 비염(rhinitis), 부비강염(sinusitis), 두드러기(urticaria), 담마진(hives), 혈관 신경 부종(angioedema), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 음식 알

러지(food allergies)(예컨대, 땅콩 알러지), 약물 알러지(drug allergies)(예컨대, 페니실린(penicillin)), 곤충 알러지(insect allergies)(예컨대, 벌 침에 대한 알러지), 또는 마스토사이토시스(mastocytosis)와 같은 알러지 형을 또한 포함한다. 염증성 질환에는 또한 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 및 천식(asthma)을 포함할 수 있다.

[0141] "염증성 질환의 진행의 위험성"이 있는 개체라 함은, 하나 이상의 염증성 질환(예컨대, 하나 이상의 염증성 질환에 대한 유전적 경향(genetic predisposition))의 가족력(family history)이 있거나, 염증을 유도하는 조건(inflammation-inducing conditions)에 하나 이상 노출되는 경우를 의미한다. 예컨대, 개체는 하기와 같은 바이러스성 또는 박테리아성 수퍼항원(viral or bacterial superantigen)에 노출될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다: 스태필로코컬 엔테로톡신(staphylococcal enterotoxins (SEs)), 스트렙토코쿠스 파이로젠 엑소톡신(streptococcus pyogenes exotoxin (SPE)), 스태필로코쿠스 아우레우스 독성 쇼크-중후군 독소(staphylococcus aureus toxic shock-syndrome toxin (TSST-1)), 스트렙토코컬 마이토제닉 엑소톡신(a streptococcal mitogenic exotoxin (SME)) 및 스트렙토코컬 수퍼안티젠(streptococcal superantigen (SSA)). 상기로부터, 모든 개체가 "염증성 질환의 진행의 위험성"이 있는 개체인 것은 아니다.

[0142] "염증성 질환이 있는 것으로 의심되는(suspected of having an inflammatory disorder)" 개체는, 염증성 질환의 하나 이상의 증상을 갖는 개체이다. 염증성 질환의 증상은 공지되어 있고, 하기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 홍반(redness), 부종(swelling) (예컨대, 관절 부종(swollen joints)), 접촉에 의해 열이 발생하는 관절(joints that are warm to the touch), 관절 통증(joint pain), 경직(stiffness), 관절 기능의 소실(loss of joint function), 발열(fever), 오한(chills), 피로감(fatigue), 에너지 손실(loss of energy), 두통(headaches), 식욕 저하(loss of appetite), 근육 경직(muscle stiffness), 불면증(insomnia), 가려움(itchiness), 코 막힘(stuffy nose), 재채기(sneezing), 기침(coughing), 졸림, 간질 또는 통증과 같은 하나 이상의 신경성 증상(one or more neurologic symptoms such as dizziness, seizures, or pain).

[0143] 본 명세서의 하나 이상의 변성 N-글리코실레이션 분자의 투여 외에, 비-스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)), 질병-조절 항-류머티스 약(disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD)), 생물학적 반응 조절제(biological response modifier) 또는 코르티코스테로이드(corticosteroid)에 의해 염증성 질환을 치료할 수 있다. 생물학적 반응 조절제(biological response modifier)로는, 예컨대, 항-TNF 제(anti-TNF agent (예컨대, 용해성 TNF 리셉터 또는 아덜리무맙(adalimumab), 인플릭시맙(infliximab), 또는 에타너셉트(etanercept)와 같은 TNF에 특이적인 항체)를 포함한다.

[0144] 변성 N-글리코실레이션 분자(또는 이의 약제학적 조성물)를 사용하여 본 명세서에 기재된 질병을 치료(예컨대, 하나 이상의 증상의 예방 또는 경감)하기에 적합한 방법을 하기에 기재하였다.

[0145] 약제학적 조성물 및 치료 방법

[0146] 변성 N-글리코실레이션 분자(예를 들어, 타겟 단백질 등의 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형태)는 치료에 효과적일 만큼의 분자 또는 하나 또는 그 이상의 보조제, 첨가제, 담체, 및/또는 희석제를 포함하는 약학 조성물로 포함될 수 있다. 허용가능한 희석제, 담체 및 첨가제들은 수용체의 항상성(예를 들면, 전해질 균형)을 특별히 나쁜 영향을 주지 않는다. 허용가능한 담체들은 생체적합성, 불활성 또는 생흡수성 염, 완충제(buffering agent), 올리고- 또는 폴리당류, 폴리머, 증점제, 방부제 등을 포함한다. 담체의 예로서는, 생리적 식염수(0.15 M NaCl, Ph 7.0 내지 7.4) 등을 들 수 있다. 또 다른 담체의 예로서는, 50 mM 소듐포스페이트, 100 mM 소듐 클로라이드를 들 수 있다. 약학 조성물의 조성물과 투약에 관한 보다 자세한 기술은 예를 들면, 레밍톤의 약품 과학(Remington's Pharmaceutical Science)(Maack Publishing Co., Easton, Pa)에서 찾을 수 있다. 보충적인 활성 화합물들이 또한 상기 조성물로 포함될 수 있다.

[0147] 변성 N-글리코실레이션 분자를 포함하는 약학 조성물의 투약은 대칭적 또는 국부적으로 이루어질 수 있다. 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여에 적합한 조성일 수 있다. 구체적인 투여 형태는, 피하(subcutaneous) 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 복막내 투여, 경피 투여, 수막강내(intrathecal) 투여, 구강 투여, 직장 투여, 볼(buccal) 투여, 국부(topical) 투여, 코(nasal) 투여, 눈 투여, 관절내 투여, 동맥내 투여, 서브 거미 망막(sub-arachnoid) 투여, 기관지 투여, 임파(lymphatic) 투여, 질 투여, 자궁내 투여를 포함한다.

[0148] 투약은 약학 조성물을 통제로 주기적 주입에 의하여 이루어질 수 있고, 또는 외부(예를 들면, IV백) 또는 내부(예를 들면, 생분해성 임플란트, 생 인공 조직, 또는 이식된 N-글리코실레이션 분자 생산 세포의 조직)인 저장 부로부터, 방해 없이 계속적인 정맥내 또는 복막내 투여에 의하여 이루어질 수 있다.

- [0149] 예를 들어, 미국특허 제4,407,957호, 5,798,113호 및 5,800,828호를 참조하면, 각각의 경우가 명세서 전체에 참고로서 포함되어 있다. 약학 조성물의 투약은 적합한 전달 수단을 이용하여 이루어질 수 있다. 상기 적합한 전달 수단으로서는 펌프(예를 들어, *Annals of Pharmacotherapy*, 27:912 (1993); *Cancer*, 41:1270 (1993); *Cancer Research*, 44:1698 (1984) 등에 전체적으로 참조로서 포함되어 있음); 마이크로인캡슐레이션(예를 들어, U.S. Pat. Nos. 4,352,883; 4,353,888; and 5,084,350 등에 등에 전체적으로 참조로서 포함되어 있음); 지속 방출 폴리머 임플란트(예를 들어, U.S. Pat. Nos. 5,284,761, 5,158,881, 4,976,859 및 4,968,733 및 공개된 PCT 출원 W092/19195, WO 95/05452 등에 각각의 경우가 전체적으로 참조로서 포함되어 있음); 피하로, 정맥내로, 관절내로, 근육내로, 또는 다른 적합한 지점으로 주입; 구강, 캡슐, 액상, 정제(tablet), 환약(pill) 또는 연장 방출 조성물 등을 들 수 있다.
- [0150] 비경구 전달 시스템의 예로서는, 에틸렌-비닐 아세테이트 코폴리머 입자, 오스모틱 펌프(osmotic pump), 이식성 인퓨전 시스템(implantable infusion system), 펌프 전달, 캡슐화된 세포 전달(encapsulated cell delivery), 리포솜 전달, 바늘 전달 주입(needle-delivered injection), 비바늘 주입(needle-less injection), 분무(nebulizer), 에어로졸(aerosolizer), 전기 천공법(electroporation), 경피 패치(transdermal patch) 등을 들 수 있다.
- [0151] 비경구 투약을 위한 적합한 조성물은 알맞게는, 변성 N-글리코실레이션 분자의 무균 수용성 제제를 포함한다. 상기 조성물은 바람직하게는 수용체(예를 들면 생리적 식염수 용액)의 혈액과 등장액이다. 상기 조성물은 1회 복용(unit-dose) 또는 복수회(multi-dose) 복용 형태로 제공될 수 있다.
- [0152] 경구 투여에 적합한 조성물은 분리된 형태로 제공될 수 있으며, 예를 들어 미리 결정된 양의 변성 N-글리코실레이션 분자 캡슐, 교감(cathets), 정제, 또는 로젠지(logenges) 등을 들 수 있다. 또는 예를 들어, 시럽, 엘릭시르(elixir), 에멀전 또는 드라웃(drought) 등의 수용액 내의 현탁액 또는 비-수용액 액체 등을 들 수 있다.
- [0153] 국부 투여에 적합한 변성 N-글리코실레이션 분자(예를 들어, 타겟 단백질 등의 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형태)는 포유류(예를 들어, 인간 환자)에 투여될 수 있다. 예를 들어, 크림, 스프레이, 거품, 젤, 연고(ointment), 고약(slave), 드라이 립(dry rub) 형태로 투여될 수 있다. 드라이 립은 투여 지점에서 재수화(rehydrate)될 수 있다. 상기 변성 N-글리코실레이션 분자는 직접적으로 밴드(bandage), 거즈(gauze), 또는 패치 등으로 직접 주입(예를 들어, 흡수된 후 건조)되어 국부적으로 투여될 수 있다. 변성 N-글리코실레이션 분자는 반-액체(semi-liquid), 겔 상으로 유지될 수 있으며 또는 밴드, 거즈 또는 국부 투여(참조: U.S. Patent No. 4,307,717에 이러한 사항이 전체적으로 참조로서 포함되어 있음)를 위한 패치 내 충분한 액상으로 유지될 수 있다.
- [0154] 치료적으로 효과적인 양의 약학 조성물은 당업자에 의하여 최적 투여 복용량으로 확인될 수 있는 만큼으로 투여 대상에 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 대상체 중량에 대하여 1회당 0.01 $\mu\text{g/kg}$ 내지 10,000 $\mu\text{g/kg}$ 의 규칙적인 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 또 다른 예로서, 사용량은 대상체의 중량에 대하여 1회당 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 30 $\mu\text{g/kg}$, 예를 들어, 대상체 중량에 대하여 1 회당 3 $\mu\text{g/kg}$ 내지 10 $\mu\text{g/kg}$ 으로 투여될 수 있다.
- [0155] 치료적 효과를 극대화하기 위하여, 변성 N-글리코실레이션 분자는 다른 투약 방식에서 우선 투여될 수 있다. 1회 복용량 및 투약 방식은 예를 들면, 포유류의 종류, 상기 포유류의 면역 상태, 포유류의 무게 등을 포함하는 요소들에 의존한다. 특히, 조직 내 N-글리코실레이션 분자의 레벨은 예를 들어, 주어진 처리 방식의 효과를 결정하기 위하여 치료 테스트 과정의 일부인 적절한 스크린 분석(screening assays)을 이용하여 모니터링될 수 있다.
- [0156] 변성 N-글리코실레이션 분자에 대한 복용 회수(frequency)는 의료 숙련자(예를 들면, 의사 또는 간호사)의 치료 판단 및 기술에 의하여 결정된다. 특히, 투여 방식은 최적화된 투여 파라미터들을 확립하는 치료적 시도들에 의하여 수립될 수 있다. 그러나 숙련자들은 치료 대상의 나이, 건강상태, 몸무게, 성별 및 의학적 상태 등에 따라 투여 방식을 변화시킬 수 있다. 상기 복용 회수는 치료가 예방적 차원인지 치료적 차원인지에 따라 변화될 수 있다.
- [0157] 이러한 N-글리코실레이션 분자(예를 들어, 타겟 단백질 등의 타겟 분자의 변성 N-글리코실레이션 형태)의 독성 및 치료 효과 또는 약학 조성물은 알려진 약학적 프로시저에 의하여 결정될 수 있다. 상기 약학적 과정이란, 예를 들어 세포 배양 또는 실험 동물 등을 들 수 있다. 이러한 프로시저들은 예를 들어, LD50(50%의 개체에 대하여 치사량) 및 ED50(50%의 개체에 대하여 치료적으로 효과있는 양)을 결정하기 위하여 사용될 수 있다. 독성 및 치료 효과 간의 복용 비율은 치료 인덱스이며 이것은 LD50/ED50의 비율로 표현될 수 있다. 높은 치료 인덱스를 나

타내는 약학 조성물이 바람직하다. 높은 치료 인덱스(high therapeutic indices)를 나타내는 약제학적 조성물이 바람직하다. 독성의 부작용을 나타내는 약제학적 조성물이 사용될 수 있는 반면, 치료는 정상적인 세포(예컨대, 비-타겟 세포)에 대한 잠재적인 위험을 최소화하여 부작용을 감소시키기 위하여, 상기 화합물이 영향을 받을 조직의 사이트를 타겟할 수 있는 송달 시스템(delivery system)을 디자인 하도록 주의를 기울여야 한다.

[0158] 세포배양 분석(cell culture assays) 및 동물 연구(animal studies)로부터 수득한 데이터를 적절한 개체(예컨대, 사람 환자)에 사용하기 위한 용량 범위를 산정하는데 사용할 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 용량은, 일반적으로 독성을 거의 갖지 않는 ED50 를 포함하는 서클레이팅(circulating) 농도 범위이다. 용량은 사용된 제형에 따라 달라질 수 있고, 투여 경로에 따라 다양할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 약제학적 조성물(예컨대, 개체에 대한 대사성 질환의 치료를 위한)에 있어서, 치료학적으로 유효한 용량을 세포 배양 분석으로부터 산정할 수 있다. 용량은 동물 모델에서 산출하여 IC50(즉, 증상의 하프-맥시멈 인히비션(half-maximal inhibition)을 나타내는 약제학적 조성물의 농도)을 포함하는 서클레이팅 플라스마 농도로 할 수 있다. 상기 정보를 사람에게 유효한 용량인지를 결정함에 사용할 수 있다. 플라스마 레벨은, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

[0159] 본 명세서에서 정의된, 변성 N-글리코실레이션 분자의 "치료학적으로 유효한 양은, 치료된 개체에 있어서 의학적으로 바람직한 결과(예컨대, 대사성 질환에 있어서의 하나 이상의 증상의 경감 또는 암세포의 증식 감소)를 나타낼 수 있는 분자의 양을 의미한다. 변성 N-글리코실레이션 분자의 치료학적으로 유효한 양(즉, 유효량)은 개체 또는 샘플의 체중의 킬로그램 당 화합물의 밀리그램 또는 마이크로그램의 양을 포함한다(예컨대, 킬로그램 당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 500 밀리그램, 킬로그램 당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램 당 약 5 밀리그램, 또는 킬로그램 당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램 당 약 50 마이크로그램)

[0160] 개체는, 포유류, 예컨대, 사람(즉, 사람 환자) 또는 사람이 아닌 영장류(예컨대, 침팬지, 벧분, 또는 원숭이), 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그, 저빌, 햄스터, 말, 가축 형(예컨대, 소, 돼지, 양, 또는 염소), 개, 고양이, 또는 고래일 수 있다.

[0161] 변성 N-글리코실레이션 분자 또는 이의 약제학적 조성물을 다른 치료 방법과의 결합하여 투여할 수 있는데, 다른 치료방법은, 예컨대, 대사성 질환(예컨대 지질침착질환)의 치료 방법이다. 예컨대, 컴비네이션 치료(combination therapy)대사성 질환(예컨대 지질침착질환)을 갖고 있는, 또는 진행의 위험이 있는 환자에게 치료학적 유익을 제공하기 위한 하나 이상의 부가적인 제제를 개체(예컨대, 사람 환자)에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 화합물 또는 약제학적 조성물 및 하나 이상의 부가적인 제제를 동시에 투여할 수 있다. 또한, 변형 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질 또는 돌리콜(dolichol))을 먼저(first in time) 투여하고, 하나 이상의 부가적인 제제를 다음으로(second in time) 투여한다. 하나 이상의 부가적인 제제를 먼저 투여하고(first in time), 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대 단백질 또는 돌리콜(dolichol))를 다음으로(second in time) 투여한다. 변성 N-글리코실레이션 분자를 먼저 또는 현재 투여하고 있는 치료에 교체하거나 증강(augment)할 수 있다. 예컨대, 본 발명에서의 변성 N-글리코실레이션 분자로의 치료에 있어서, 하나 이상의 부가적인 제제의 투여를 중단 또는 감소, 예컨대 저용량 투여할 수 있다. 먼저 이루어진 치료의 투여를 유지할 수도 있다. 어떤 경우에 있어서는 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 용량 또는 투여 스케줄)의 수준이 치료 효과를 나타내는 데 충분한 정도에 이를 때까지 이전의 치료를 계속할 수 있다. 2 개의 치료를 조합하여 진행할 수 있다.

[0162] 미리 이루어진 치료가 특히 독성이 있는 경우에(예컨대, 현저한 부작용 프로파일이 있는 대사성 질환의 치료), 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질 또는 돌리콜(dolichol))을 투여함으로써 독성 없이 동일하거나 향상된 치료적 이익을 제공하기 위하여 충분한 수준으로 이전의 치료 용량을 감소할 수 있다.

[0163] 실시예에 있어서, 개체에 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol) 또는 돌리콜-링크된 지질) 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여한 경우, 제1 치료를 중지하였다. 개체를 제1 미리-선택된 결과(first pre-selected result), 예컨대 상기 기재된 대사성 질환의 하나 이상의 증상의 개선이 있는지 모니터링하였다. 실시예에 있어서, 제1 미리-선택된 결과(first pre-selected result)를 관찰한 결과, 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대 변성 N-글리코실레이션 단백질 또는 변성 N-글리코실레이션 돌리콜)로 수행한 치료를 감소 또는 중단하였다. 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol))를 중단한 후에 제2 미리-선택된 결과(second pre-selected result), 예컨대, 대사성 질환의 악화가 있는지 여부를 모니터링하였다. 제2 미리-선택된 결과(second pre-selected result)를 관찰한 결과, 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol))을 개체에 투여는 회복 또는 증가될 수 있거나(reinstated or increased), 제1 치료의 투여를 회복하거나, 개체에 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol) 또는 돌리콜-링크된 지

질) 및 제1 치료 모듈을 투여하거나, 또는 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol)) 및 제1 치료 레지멘(first therapeutic regimen)의 양을 증가시킬 수 있다.

[0164] N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol))을 질병(예컨대, 대사성 질환)의 하나 이상의 증상에 대한 치료와 함께 투여할 수 있다. 예컨대, 변성 N-글리코실레이션 분자(예컨대, 단백질, 돌리콜(dolichol)) 또는 돌리콜-링크된 지질)를 예컨대, 진통제와 함께 투여할 수 있다(예컨대, 동시에 투여하거나 상기의 복합 레지멘으로하여 투여할 수 있음)

[0165] 실시예에서, 변성 N-글리코실레이션 분자는 그 변성 글리코실화로 인해 의학적으로 의미있는 제품으로 생산하기 위하여 분자의 능력을 증가시킨다. 예컨대, 변성 N-글리코실레이션 분자는 치료제(예컨대, 작은 분자 또는 치료적 펩타이드)를 생성할 수 있는 효소일 수 있으며, 상기 효소 활성은 글리코실레이션에 의해 증가되거나 최적화된다. 상기 제품 또는 상기 제품을 사용하는 방법은 본 발명의 범주에 포함된다.

[0166] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은, 투약 설명과 함께 포장용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0167] 도 1은 효모 소포체에 있어서 N-글리칸 전구체 합성을 도시한 도면이다. 유전자 인코딩된 단백질은 표지된 효소적 전환(indicated enzymatic conversions)을 전달하는 활성을 가지며, 빗금친 박스 안에 표시하였다(예컨대, 좌측 상단의 ALG7). "UDP" 및 "UMP"는 각각, 우리딘 디포스페이트(uridine diphosphate) 및 우리딘 모노포스페이트(uridine monophosphate)이다. "GDP" 및 "GMP"는 각각, 구아노신 디포스페이트(guanosine diphosphate) 및 구아노신 모노포스페이트(guanosine monophosphate)이다. "Gn"은 N-아세틸글루코사민이다. "M"은 모노머릭 만노스(monomeric mannose), "G"는 글루코스(glucose), "Pi"는 포스페이트이다.

도 2는 효모 소포체에 있어서 N-글리칸 프로세싱을 도시한 도면이다.

도 3은 S. 세레비아에(*S. cerevisiae*) 골지체에서의 N-글리칸 프로세싱을 도시한 도면이다. 유전자 인코딩된 단백질은 표지된 효소적 전환(indicated enzymatic conversions)을 전달하는 활성을 가지며, 빗금친 박스안에 표시하였다(예컨대, 좌측 중간의 OCH1).

도 4는 본 명세서에서의 다양한 N-글리칸 구조를 도시한 도면이다.

도 5는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 있어서의 OCH1 유전자 분열(gene disruption)에 대한 클로닝 전략(cloning strategy)을 도시한 도면이다. "PCR"은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 의미한다.

도 6은 MN9 유전자 분열 단편에 대한 클로닝 전략(cloning strategy)을 도시한 도면이다. "PCR"은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 의미한다.

도 7은 와일드 타입 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포 또는 글리코실레이션 변이체(예컨대, och1 c19, Δ mnn9 1 및 Δ och1 Δ mnn9) 세포 및 MTLY60 스트레인 세포로부터 수득된 만노프로테인(mannoproteins)의 N-글리칸 분석을 나타낸 일렉트로페로그램(electroferograms)이다. 특정한 경우, N-글리칸은 1,2-만노시다제로 처리된다. 분석은 DSA-FACE(DNA sequencer-assisted, fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis)를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8" 및 "M9"은, 염기 N-아세틸글루코사민 구조에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수이다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 8은 S. 세레비아에(*S. cerevisiae*) MNS1 발현 벡터에서의 클로닝 전략을 도시한 도면이다. "PCR"은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 의미한다.

도 9는 와일드타입 Mns1p 또는 Mns1p 로 표지된 다양한 변이체(예컨대, R273G, R273L, 또는 R269S/S272G/R273L)를 발현하는 MTLY60 세포로부터 수득한 분비 당단백(secreted glycoproteins)의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 염기 N-아세틸글루코사민 구조에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 10은 MNN4 발현 벡터에 대한 클로닝 전략을 도시한 도면이다.

도 11은 와일드타입 MTL60 또는 표지된 글리코실레이션 변이 세포(glycosylation mutant cells as indicated)로부터 수득한 분비 당단백(secreted glycoproteins)의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그래프이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 키토비오스 코어 구조(chitobiose core structure)에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. "P"는 하나의 인산 잔기를 함유하는 만노프로테인을 나타내고, "PP"는 두 개의 인산 잔기를 함유하는 만노프로테인을 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그래프의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 12는 갈락토시다제 발현 벡터에 대한 클로닝 전략을 도시한 도면이다.

도 13은 와일드타입 MTL60 또는 표지된 글리코실레이션 변이 세포의 다양한 변이로부터 수득한 만노프로테인(mannoproteins) 및 포스포만노프로테인(phosphomannoproteins)의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그래프이다. "alg3"은 ALG3 유전자 결여(knockout)세포를 나타낸다. "ALG6 과발현(ALG6 overexpression)"은 세포 중에서 ALG6 과발현된 단백질 생성물을 의미한다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 아세틸글루코사민 구조(acetylglucosamine structure)에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. "P"는 하나의 인산 잔기를 함유하는 만노프로테인을 나타내고, "PP"는 두 개의 인산 잔기를 함유하는 만노프로테인을 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그래프의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 14는 와일드타입 MTL60 세포들 또는 표지된 글리코실레이션 변이 세포의 다양한 변이로부터 수득한 만노프로테인(mannoproteins) 및 포스포만노프로테인(phosphomannoproteins)의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그래프이다. "alg3"은 ALG3 유전자 결여(knockout)세포를 나타낸다. "ALG6 과발현(ALG6 overexpression)"은 세포 중에서 ALG6 과발현된 단백질 생성물을 의미한다. 하나의 피크는 RNaseB 마커의 Man₅GlcNAc₂와 동일한 위치에서 일어나고, α-1,2-만노시다제 처리 후에 2개의 글루코스 유닛으로 시프트되며, 알파-만노시다제(JB) 절단(digest) 후에 4개의 글루코스 유닛으로 시프트된다. 이는 Man₅GlcNAc₂ 구조와 일치한다. 추가로 2개의 피크가 약 하나 또는 두개의 글리코-단위의 길이로 발생하고, α-1,2-만노시다제 절단(digestion)에 영향을 받지 않는다. 두개의 피크 모두 알파-만노시다제(JB) 절단(digestion)으로 글루코스-유닛 시프트된다. 부가된 효소, 예컨대 JB 만노시다제의 더 높은 염 농도로 인해 작은 시프트가 발생한다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 키토비오스 코어 구조(chitobiose core structure)에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그래프의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 15는 계놈 HAC1 DNA 시퀀스(SEQ ID NO:5)를 갖는 안접힌 단백질 반응(UPR, Unfolded Protein Response)으로 유도된 스트레인 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 수득된 분리 DNA 단편 (SEQ ID NO:1) 시퀀스의 시퀀스 배열(sequence alignment)이다. 박스로 표시한 시퀀스는 비-통상적으로 스플라이싱된 인트론이다.

도 16은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 예정된 5'(top) 및 3'(bottom) 스플라이스 사이트의 시퀀스 배열을 나타낸 도면이다. 굵게 밑줄로 표시한 뉴클레오타이드는 루프 구조임을 나타낸다.

도 17A 및 17B는 DTT-유도 (I) (SEQ ID NO:2) 및 비유도 (NI) (SEQ ID NO:6) 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 배지로부터 수득한 HAC1 cDNA 의 서열 배열의 두개의 부분적인 측면을 나타낸 도면이다.

도 18은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 18개의 아미노산 C-말단 부위의 시퀀스 배열을 나타낸다. 보존된 아미노산은 굵은 표시와 밑줄로 표시하였다.

도 19는 KAR2 mRNA 의 상대적 발현 레벨의 비교를 나타낸 바 그래프(bar graph)이다. 클론 3, 4 및 5(피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GSM5 세포)는 탄소원을 메탄올로 하여 성장한다. "3+", "4+" 및 "5+"는 각각 탄소

원을 메탄올로 하여 성장한 것을 의미하고, "3-", "4-" 및 "5-"는 탄소원을 글루코스로 하여 성장한 것을 의미한다. Y 축은 실시간 PCR을 사용한 KAR2 유전자의 상대적 발현을 의미한다.

도 20은 2 개의 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 클론(클론 6 및 8)에서 Kar2 및 HAC1 mRNA 의 상대적 발현 레벨을 도시한 바 그래프이다. "6+" 및 "8+"은 각각 탄소원을 메탄올로 하여 성장한 것을 의미하고, "6-" 및 "8-"는 탄소원을 글루코스로 하여 성장한 것을 의미한다. Y 축은 실시간 PCR을 사용한 KAR2 유전자의 상대적 발현을 의미한다.

도 21은 Y1MNN6 발현 벡터에 대한 클로닝 전략을 도시한 도면이다.

도 22는 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*), 단독 또는 표지된 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 발현 Y1MNN6의 다양한 클론(Z3, Z4, Z5, U5, U6, 및 U8)으로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 23은 MFManHDEL 발현 벡터의 클로닝 전략을 도시한 도면이다.

도 24는 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 단독 또는 표지된 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 발현 MFManHDEL 의 다양한 클론(9, 11, 10, 3, 5, 및 6)으로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 25는 LIP2preManHDEL 발현 벡터의 클로닝 전략을 도시한 도면이다.

도 26은 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 단독 또는 표지된 och1 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 발현 LIP2ManHDEL 의 다양한 클론(1, 5, 10, 및 11)으로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 키토비오스 코어 구조(chitobiose core structure)에 컨주게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

도 27A 및 27B는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) (Fig. 27A; SEQ ID NO:3) 및 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (Fig. 27B; SEQ ID NO:4)의 HAC1 단백질의 아미노산 시퀀스이다.

도 28은 다양한 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(MTLY60, MTLY60 Δ alg3 and MTLY60 Δ alg3ALG6) 배지에서의 Lip2p 과발현 결과를 도시한 쿠마씨(Coomassie) 블루 염색된 폴리악릴아미드 겔의 사진이다. 아래 샘플들을 겔에 용해시켰다: 레인(Lane) 1("래더(ladder)"), 공지된 분자량을 갖는 단백질의 조합; 레인 2("WT"), 와일드타입(WT) 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(MTLY60) 과발현 Lip2p로부터 수득된 Lip2p 단백질; 레인 3("WT+PGase F"), 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(MTLY60) 과발현 Lip2p로부터 수득되고 PNGase F 효소 처리된 Lip2p 단백질; 레인 4("alg3-ALG6"), alg3 결핍 및 Lip2p 및 ALG6 (MTLY60 Δ alg3ALG6) 모두로부터 과발현된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 Lip2p 단백질; 레인 5("alg3-ALG6+PNGase F"), alg3 결핍 및 Lip2p 및 ALG6 (MTLY60 Δ alg3ALG6) 모두로 과발현된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득되고, PNGase F 효소로 처리된 Lip2p 단백질; 레인 6("alg3"), alg3 결핍 및 Lip2p (MTLY60 Δ alg3) 과발현된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 Lip2p 단백질; 레인 7("alg3 + PNGase F"), PNGase F 효소 처리 alg3 결핍 및 Lip2p (MTLY60 Δ alg3) 과발현 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 Lip2p 단백질; 레인 8("Lip2p 과발현 없는 와일드 타입"), MTLY60 세포로부터 수득된 단백질; 및 레인 9("Lip2p 과발현 없는 와일드 타입+PNGase F"), MTLY60 세포로부터 수득되고 PNGase F 효소 처리된 단백질.

도 29는 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(WT (MTLY60); Δ alg3; Δ alg3 ALG6 과발현; 및 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) (Y1) 또는 트리파소노마 브루세이(Tb)의 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛을 갖는 Δ alg3 과발현 ALG6의 클론)으로부터 수득된 당단백의

N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 키토비오스 코어 구조(chitobiose core structure)에 컨주게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 30은 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3; Δ alg3 ALG6 과발현; 및 HDEL 시퀀스를 함유하는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (Y1)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛을 갖는 Δ alg3 과발현 ALG6 클론)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다.

도 31은 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3; Δ alg3 ALG6 과발현; 및 HDEL 시퀀스를 함유하는 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) (Tb)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛을 갖는 Δ alg3 과발현 ALG6 클론)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다.

도 32는 표지된 바와 같이 다양한 농도의 뮤타나제(mutanase)로 인 비트로(*in vitro*)처리된 alg3ALG6 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 33은 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3; Δ alg3 ALG6 과발현; 및 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛을 갖고, Hp4d 또는 TEF 프로모터 조절 하에 발현된 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 베타 서브유닛을 갖는 Δ alg3 과발현 ALG6 클론)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 34는 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3 ALG6 과발현; 및 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 HDEL-함유 알파 서브유닛을 갖고, Hp4d 또는 TEF 프로모터 조절 하에 발현된 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 베타 서브유닛을 갖는 Δ alg3 과발현 ALG6 클론)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 35는 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3 및 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛 및 TEF 프로모터 조절 하에 발현된 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 베타 서브유닛으로 과발현된 Δ alg3 클론)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 36A 및 36B는 아스퍼길러스 니거(*Aspergillus niger*)(시그널 펩타이드결핍) 글루코시다제 II α 의 성숙한 형태로 인코딩된 cDNA의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것이다. 이는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:7)에서 발현을 위한 코돈-최적의 cDNA (codon-optimized cDNA)이다.

도 37은 아스퍼길러스 니거(*Aspergillus niger*)(시그널 펩타이드 결핍) 글루코시다제 II β 의 성숙한 형태로 인코딩된 cDNA의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것이다. 이는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:8)에서 발현을 위한 코돈-최적의 cDNA (codon-optimized cDNA)이다.

도 38은 표지된 바와 같이 다양한 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포(Δ alg3 및 TEF 또는 hp4d 프로모터 조절 하에 발현된 아스퍼길러스 니거(*Aspergillus niger*)(An)로부터 글루코시다제 II(glucosidase II)의 알파 서브유닛을 갖는 ALG6 과발현)로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그램이다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그램의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그램의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 39A 및 39B는 hp4d 프로모터의 조절 하에 HAC1 cDNA의 스플라이싱 형을 함유하는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포의 두개의 클론(클론 7 및 클론 2)에 있어서 또는 와일드 타입(MTLY60) 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)세포에 있어서 HAC1 (39A) 또는 KAR (39B) 유전자의 상대적 발현 레벨(Y 축)을 도시한 한 쌍의 바 그래프이다.

도 40은 Hac1p 단백질을 발현하는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115 세포의 성장과 비교한, 비어있는 벡터(empty vector)로 형질전환된 와일드 타입 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) GS115 세포의 성장을 도시한 선 그래프이다.

도 41은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포 배지로부터 수득한 설치류 IL-10 (mIL-10) 단백질의 발현 수준과, GS115 배지로부터 수득된 mIL-10 단백질의 발현을 갖는 mIL-10 단백질을 발현하는 세포, 유도 프로모터, AOX1의 조절 하에 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)로부터 수득된 스플라이싱 된 HAC1 단백질 및 mIL-10을 발현하는 세포를 비교한 쿠마씨 블루 염색된 폴리아크릴아마이드 겔(Coomassie blue stained polyacrylamide gel)의 사진이다. 하기 샘플들을 겔에 용해시켰다: 레인(Lane) 1("래더(ladder)"), 공지된 분자량을 갖는 단백질의 조합; 레인 2("Reference "), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 스트레인(GS115)을 발현하는 참조 mIL-10로부터 수득된 단백질; 레인 3("Reference "), 단백질을 PNGase F 효소 처리한 후에 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 스트레인을 발현하는 참조 mIL-10로부터 수득된 단백질; 레인 4("Clone 1"), HAC1 단백질을 유도적으로 발현하는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 발현하는 mIL-10로부터 수득된 단백질; 레인 5("Clone 1"), PNGase F 효소를 갖는 단백질로 처리한 후에 HAC1 단백질을 유도적으로 발현하는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 발현하는 mIL-10로부터 수득된 단백질; 레인 6("Clone 2"), HAC1단백질 1을 유도적으로 발현하는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 발현하는 mIL-10로부터 수득된 단백질; 레인 7("Clone 2"), PNGase F 효소를 갖는 단백질로 처리한 후에 HAC1 단백질을 유도적으로 발현하는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 발현하는 mIL-10로부터 수득된 단백질.

도 42는 LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)를 함유하는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:9)에 있어서 발현을 위해 코돈 최적화된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2 만노시다제를 인코딩하고 있는 전형적인 cDNA 시퀀스의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것이다.

도 43은 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:10)의 GAP 프로모터에 대한 전형적인 뉴클레오타이드 시퀀스의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것이다.

도 44A 내지 44C는 발현벡터 pYLHUXdL2preManHDEL에 대한 전형적인 핵산 시퀀스(SEQ ID NO:11)의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것으로, LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)를 함유하는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 있어서 발현을 위해 코돈 최적화된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2 만노시다제를 인코딩하고 있는 cDNA 시퀀스를 함유한다.

도 45A 내지 45C는 발현벡터 pYLGUXdL2preManHDEL에 대한 전형적인 핵산 시퀀스(SEQ ID NO:12)의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것으로, LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)를 함유하는 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 있어서 발현을 위해 코돈 최적화된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2 만노시다제를 인코딩하고 있는 cDNA 시퀀스를 함유한다.

도 46A 내지 46C는 발현벡터 pYLPUXdL2preManHDEL 에 대한 전형적인 핵산 시퀀스(SEQ ID NO:13)의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것으로, LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)를 함유하는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 있어서 발현을 위해 코돈 최적화된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α-1,2 만노시다제를 인코딩하고 있는 cDNA 시퀀스를 함유한다.

도 47A 내지 47C는 발현벡터 pYLTUXdL2preManHDEL 에 대한 전형적인 핵산 시퀀스(SEQ ID NO:14)의 뉴클레오타이드 시퀀스를 도시한 것으로, LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)를 함유하는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 있어서 발현을 위해 코돈 최적화된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α-1,2 만노시다제를 인코딩하고 있는 cDNA 시퀀스를 함유한다.

도 48은 하기와 같이 표지된 다른 발현 벡터로 형질전환된 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 당단백에 대한 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그래프이다: "hp4dL2ManHDEL" (pYLHUXdL2preManHDEL, 도 44A 내지 44C); "GAPL2ManHDEL" (pYLGUXdL2preManHDEL, 도 45A 내지 45C); "TEF1L2ManHDEL" (pYLTUXdL2preManHDEL, 도 47A 내지 47C). Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그래프의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그래프의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 49는 안정적으로 포함된 발현 벡터(stably integrated expression vector) pYLTUXdL2preManHDEL (도 47A 내지 47C)을 함유하는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 Δoch1 세포로부터 수득된 당단백에 대한 N-글리칸 분석을 도시한 일련의 일렉트로페로그래프이다. 당단백 샘플은 24, 48, 72, 및 96 시간으로 세포 배양하여 수득하였다. 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다. 일렉트로페로그래프의 하부는 RNase B의 분석이다.

도 50은 사람 글루코세레브로시다제(human glucocerebrosidase, GLCM, Swiss Prot entry nr: P04062; SEQ ID NO:15)에 대한 전형적인 핵산 시퀀스로, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 발현되기 위하여 코돈 최적화된 cDNA 으로 화학적으로 합성되었다.

도 51은 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60 (WT; 라인 4 및 6) 및 MTLY60 Δoch1 (Δoch1; 처음부터 3개의 라인)에서 발현된 사람 글루코세레브로시다제의 이동 패턴을 나타낸 이뮤노블롯(immunoblot) 사진이다. 단백질의 분자량(kDa)이, 이뮤노블롯 맨 오른쪽에 분자량 마커로 표시되어 있다.

도 52는 사람 에리스로포이에틴(human erythropoietin, Epo, Swiss Prot entry nr: P01588; SEQ ID NO:16)에 대한 전형적인 핵산 시퀀스로, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 발현되기 위하여 코돈 최적화된 cDNA 으로 화학적으로 합성되었다.

도 53은 사람 α-갈락토시다제 A (AGAL, Swiss Prot entry nr: P06280; SEQ ID NO:17)에 대한 전형적인 핵산 시퀀스로, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 발현되기 위하여 코돈 최적화된 cDNA 으로 화학적으로 합성되었다.

도 54는 와일드 타입 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포 또는 Hac1p 단백질의 스플라이싱 형을 과발현하고 있는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포의 일련의 전자 현미경 사진이다. 세포 중에서 뭉쳐진 지질 막(stacked lipid membranes)의 흩어진 부분(Discrete regions)을 박스에 표시하였다.

도 55는 와일드 타입 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포 (pol1d) 및 표지된 대로 알파-1,2-만노시다제 및 HDEL 시퀀스의 융합 단백질을 발현하는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포로부터 수득된 당단백의 N-글리칸 분석을 나타낸 일련의 일렉트로페로그래프이다. 분석은 DSA-FACE를 사용하여 수행하였다. "M5", "M6", "M7", "M8", "M9"은 염기 N-아세틸글루코사민 구조에 컨쥬게이트된 만노스 잔기의 수를 나타낸다. Y 축은 만노스 구조 각각의 양을 나타내는 상대적인 형광 유닛을 나타낸다. X 축은 겔을 통과하는 각 복합체 만노스 구조(complex mannose structure)의 상대적인 이동성(relative mobility)을 나타낸다. 일렉트로페로그래프의 상부는 이동성 기준으로 사용되는 올리고말토스(oligomaltose)의 분석이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

하기는 본 발명의 실시예이다. 본 발명은 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 플라스미드, 프라이머 및 스트레인

[0170] 표 1에 벡터 구성(예컨대, 발현 벡터)에 사용된 플라스미드 및 본 명세서의 실시예에서 사용된 결손 카세트(deletion cassettes)를 표시하였다. 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*)의 MTLY60 스트레인이 본 실시예에서 사용되었다.

표 1

[0171]

플라스미드
JMP62
pYLTsA
pYLHmL
pYLHmA
JMP113
JMP114
pRRQ2
JME 507
JME 509
JME 461
KS-LPR-URA3
KS-LPR-LEU2
Cre ARS68 LEU2

표 2

[0172]

프라이머	이름	용도
Tcgtatcacgtctctagc (SEQ ID NO:18)	Yloch1 prom fw	Y10CH1 증폭 Y10CH1 P 단편 증폭
Tctctgtatacttgtatgtactg (SEQ ID NO:19)	Yloch1 ter rev	Y10CH1 증폭 Y10CH1 T 단편 증폭
cTAGGGATAACAGGGTAATggtgtgacgaagtatcgag (SEQ ID NO:20)	Y10CH1 Pfrag rev	I-Sce I 사이트를 포함하는 P 단편 증폭
cattaccctgttatccctAGCGAGATCATGGACTGG (SEQ ID NO:21)	Y10CH1 Tfrag fw	I-Sce I 사이트를포함하는 T 단편 증폭
gacGCGCCGCGatgagcttcaacattcccaaac (SEQ ID NO:22)	Y1MNS1 ORF+Ter (Pfrag) S	Y1MNS1 P 단편 (ORF + terminator)의 증폭
cTAGGGATAACAGGGTAATacaaaattcagaaataaaaatactttacag (SEQ ID NO:23)	Y1MNS1 ORF+Ter (Pfrag) AS	Y1MNS1 P frag. (ORF + termin.) + I-SceI 증폭
cattaccctgttatccctAAGTAACATGAGTGCTATGAG (SEQ ID NO:24)	Y1MNS1 Tfrag S	Y1MNS1 T frag. (downstream terminator.) + I-SceI 증폭
cgcTTAATTAAatgcatggaggtattgctg (SEQ ID NO:25)	Y1MNS1 Tfrag AS	Y1MNS1 T frag. (downstream terminator.) 증폭
ggtgcttcgactatcAgTttcggagGgattgggtgattctttttatg (SEQ ID NO:26)	ScMNS1 mut 269-273 S	ScMNS1 mutation primer to shift to mam. Golgi type mannanase => proof of concept in Sc
cataaaaagaatcacccaatCCTccgaaAcTgtagtcgaagcacc (SEQ ID NO:27)	ScMNS1 mut 269-273 AS	Y1MNS1 mutation primer to shift to mam. Golgi type mannanase => proof of concept in Sc
tgaGCGGCCGCTtttctacttcagagctggag (SEQ ID NO:28)	Y1MNN9 P fw	Y1MNN9 KO 프라이머
ggcTTAATTAAttggtagtgatataatgtaacgc (SEQ ID NO:29)	Y1MNN9 T rv	Y1MNN9 KO 프라이머
TAGGGATAACAGGGTAATcagcacataactcatcaag (SEQ ID NO:30)	Y1MNN9 P rv	Y1MNN9 KO 프라이머
ATTACCTGTTATCCCTAGAAGGAGATGTAGCGTAAG (SEQ ID NO:31)	Y1MNN9 T fw	Y1MNN9 KO 프라이머
TGATAAATAGCTTAGATACCACAG (SEQ ID NO:32)	LIP2 rv	시퀀싱에 사용되는 정방향 프라이머
Acatacaaccacacacatc (SEQ ID NO:33)	5' hp4d	시퀀싱에 사용되는 역방향 프라이머
ggcGGATCCatggtgctgcaccggttc (SEQ ID NO:34)	Y1MNN4 BamHI fw	Y1MNN4 증폭을 위한 정방향 프라이머

ggcCCTAGGctactcaaactcctcggaatc (SEQ ID NO:35)	YIMNN4 AvrII rv	YIMNN4 증폭을 위한 역방향 프라이머
GGTCTCGCCAGCGCGCCACCTCTTC (SEQ ID NO:36)	HAC1FW06-003	HAC1 스플라이싱 사이트 주변의 정방향 프라이머 구역
CTAGATCAGCAATAAAGTCGTGCTGGGC (SEQ ID NO:37)	HAC1Rv06-001	HAC1 스플라이싱 사이트 주변의 역방향 프라이머 구역
GGATCCATGTCTATCAAGCGAGAAGAG TCC (SEQ ID NO:38)	HAC1Fw06-002	개시 코돈 및 BamHI 제한사이트를 포함하는 HAC1 유전자의 증폭
CCTAGGCTAGATCAGCAATAAAGTCGTGCTGGGC (SEQ ID NO:39)	HAC1RV06-006	중단 코돈 및 AvrII 제한사이트를 포함하는 HAC1 유전자의 증폭

- [0173] 실시예 2. 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) OCH1 및 MNN9 분열(disruption)
- [0174] *LIP2* 유전자에 있어서 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*)에서의 *OCH1* (GenBank Accession No: AJ563920) 및 *MNN9* (GenBank Accession No: AF441127) 유전자 모두를 유전자 결여시키기 위하여서 피커 (Fickers et al. ((2003) J Microbiol Methods. 55(3):727-37))에 기재된 대로 셋업하였다. *OCH1* 유전자에 따르는 유전자 구성 전략을 도 5에 도시하였다.
- [0175] The *OCH1* KO 단편은 제한 절단(restriction digest) 및 PCR에 의해 플라스미드 Y1OCH1 PUT TOPO로부터 분리되고, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60으로 형질전환된다. 20개의 우라실 독립영양 스트레인(uracil prototrophic strains)을 수득하고, 플라스미드의 게놈 인테그레이션(genomic integration)을 분석하기 위하여 프라이머 *Yloch1 prom fw* (SEQ ID NO:18) 및 *Yloch1 ter rev* (SEQ ID NO:19)을 사용하여 게놈 DNA (gDNA)에 대하여 PCR 스크리닝하였다. 목적하는 사이즈의 단편(즉, 2618 bp vs. 1894 bp 와일드 타입으로)을 2 내지 20 개의 시험용 클론으로 증폭하였다. 몇몇 클론들은 구조(construct)에 있어서 무작위로 포함된 복제물(random integrated copy)를 함유하기 때문에, 양쪽 단편들이 증폭된다.
- [0176] *URA3* 유전자를 제거하기 위하여, 두 개의 포지티브 클론을 에피솜 플라스미드(episomal plasmid) pRRQ2으로 형질전환하였는데, 상기 에피솜 플라스미드(episomal plasmid) pRRQ2는 Cre 리콤비나제(recombinase)를 위한 발현 카세트(expression cassette)를 함유한다. 프라이머 *Yloch1 prom fw* 및 *Yloch1 ter rev* 를 사용하여 PCR에 의해 gDNA에 있어서 *URA3* 유전자의 제거를 스크리닝한다. 상기 포지티브 클론 중에 2328 bp 단편 (incl. *URA3*)은 없고, 1075 bp의 1075 bp (excl. *URA3*) 단편은 존재한다.
- [0177] 변종 DNA 포집(aberrant DNA integration)이 일어났는지 여부를 확인하기 위하여, 2개의 포지티브 클론 상에서 서던 블롯 분석(Southern blot analysis)을 수행하였다. 게놈 DNA (gDNA)는 EcoRV/HindIII으로 이중으로 절단(digest)되고, 아가로스-겔 전기영동(agarose-gel electrophoresis)되고, 니트로셀룰로스 막으로 이동된다. 플라스미드 *Y1OCH1 PT TOPO*로부터 500 bp SpeI/I-SceI 단편으로 막을 프로브하였다. 1456 bp 단편은 $\Delta och1$ PUT으로 존재하고, 2066 bp 단편은 $\Delta och1$ PUT으로, 2893 bp 단편은 와일드 타입 스트레인으로 존재한다.
- [0178] *MNN9*을 불활성화하기 위한 구조 전략(construction strategy)을 셋업하고, 도 6에 도시하였다.
- [0179] 분열 단편은 NotI/PacI 이중 절단(double digest)에 의해 플라스미드 *YIMNN9PUT TOPO*으로 잘라져 MTLY60 및 $\Delta och1$ PT 클론 9으로 형질전환된다. 몇몇의 *URA3* 포지티브 클론을 두개의 스트레인으로부터 수득할 수 있고, 단일 클론을 분리한 후에 gDNA 상에 PCR에 의해 구조적으로 제대로 포함되었는지를 스크리닝한다. 2349 bp 단편을 분열 스트레인(disruptant strains)으로 증폭하는데, 비-형질전환체에 있어서, 2056 bp 단편을 프라이머 *YIMNN9 P fw* 및 *YIMNN9 T rv*을 사용하여 증폭한다(표 2).
- [0180] 변이 스트레인에 의해 합성된 N-글리칸 구조를 분석하기 위하여, 만노프로테인으로부터 유래한 글리칸으로 DSA-FACE를 수행하였다(도 7). 와일드 타입(MTLY60) 스트레인은 메인 코어 타입으로 주로 Man₈GlcNAc₂ (구조식 I; 도 4) 및 상당한 양의 Man₉GlcNAc₂ (구조식 II; 도 4)의 글리칸 구조를 가지며, 후자는 Och1p 활성으로 부가적인 만노스를 함유할 수 있다. 또한, 더 큰 구조물들을 확인할 수 있다. $\Delta och1$ 스트레인은 주로 Man₈GlcNAc₂ (구조식 I) 및 소량의 Man₉GlcNAc₂ (구조식 II; 도 4)을 포함하고, 양쪽 모두 α -1,2-만노시다제($\Delta och1$ α -1,2-만노시다제로 표지된) 처리에 민감하여 Man₈GlcNAc₂ (구조식 IV; 도 4)으로 트리밍된다. *mn9* 스트레인은 $\Delta och1$ 스트레인보다는 Man₉GlcNAc₂ (구조식 II; 도 4)으로 축적되는데, 이는 Mnn9p가 글리칸 구조의 연장(elongation) 및 후속의 활성과 관련이 있음을 의미한다. 이중 변이체 $\Delta och1 \Delta mn9$ 는 $\Delta och1$ 스트레인과 유사한 글리코실

레이션 페노타입(glycosylation phenotype)으로 작용한다.

- [0181] 실시예 3. *MNS1*의 변이유발(Mutagenesis)
- [0182] *MNS1* (ER α -1,2-만노시다제)는 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 의 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 로의 트리밍과 관련이 있고, 센트럴 암(central arm)의 α -1,3-만노스에 링크된 α -1,2-만노스만을 트리밍할 수 있는 엄격한 기질 특이성이 있다. 골지 타입 α -1,2-만노시다제에 대한 기질 특이성을 시프트하기 위하여 *MNS1* 유전자를 변이 유발할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 몇몇 ER 타입 만노시다제의 프라이머리 시퀀스와 골지 타입 만노시다제를 비교하였다. 두 개의 분류에서 다른 점을 갖는 하나의 부위를 규명한다. 또한 골지 타입 만노시다제의 촉매 사이트(catalytic site)에서 효모 *MNS1* 로 결정화되는 올리고사카라이드를 분석하여, 당과 단백질 사이의 가능한 상호작용을 규명한다. 놀랍게도 두개의 방법을 사용하여 규명한 사이트가 동일하였다.
- [0183] 기질 특이성을 변화시키기 위하여, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) (GenBank Accession No: Z49631, sgd: YJR131W)로부터 수득한 *MNS1* 유전자에 대하여 변이를 유발하였다. 3 가지 유형으로 변이가 유발되었는데: 동일한 부분에서 하나의 변이를 갖는 것이 2가지 였고(R273L 및 R273G), 3 개의 변이(R269S/S272G/R273L)를 갖는 것이 한가지 였다:
- [0184] A) R273L (알기닌 273 이 류신으로)
- [0185] B) R273G (알기닌 273 이 글리신으로)
- [0186] C) R269S/S272G/R273L (알기닌 269 이 세린으로/세린 272가 글리신으로/알기닌 273이 류신으로).
- [0187] 모든 변이형 유발에는 Quick Change (Stratagene) mutagenesis kit를 사용하였다. 매우 강한 컨스티튜티브 TPI1 프로모터의 조절 하에 3개의 상이한 변이체 유전자를 발현하는 구조를 생성하였다. 올리고 뉴클레오타이드 cgactatccgggttcggatcattgggtgattctttttatgag (SEQ ID NO:40) 및 CTCATAAAAAGAATCACCCAATGATCCGAACCGGATAGTCG (SEQ ID NO:41)은 변이체 R273L 를 생성하기 위하여 사용되었고, 올리고 뉴클레오타이드 cgactatccgggttcggatcaGGTGGTgattctttttatgag (SEQ ID NO:42) 및 CTCATAAAAAGAATCACCACTGATCCGAACCGGATAGTCG (SEQ ID NO:43)는 변이체 R273L 를 생성하기 위하여 사용되었으며, 올리고 뉴클레오타이드 cgactatccgggttcggatcaGGTGGTgattctttttatgag (SEQ ID NO:42) 및 CTCATAAAAAGAATCACCACTGATCCGAACCGGATAGTCG (SEQ ID NO:43)는 변이체 R273G 를 수득하기 위하여 사용되었으며, 주형(template)으로 와일드 타입 유전자를 사용하였다. 올리고 뉴클레오타이드 ggtgcttcgactatcAgTttcggaGGattgggtgattctttttatg (SEQ ID NO:44) 및 cataaaaagaatcacccaatCCTccgaaAcTgatatgcgaagcacc (SEQ ID NO:45)를 사용하여 변이체 R269S/S272G/R273L 를 수득하였고, 주형 DNA 로 변이체 R273L 를 사용하였다.
- [0188] 올리고 뉴클레오타이드 cccgatatcgatccatgaagaactctgtcggtatttc (SEQ ID NO:46) 및 gggaagcttaacgcgggttcagcgggtccggatcggcaccggcgccaccaacgaccaacctgtggtcag (SEQ ID NO:47)를 사용하는 PCR 반응을 통하여, E-tag의 코딩 시퀀스를 변이체의 3' 말단 및 와일드 타입 *MNS1* 오픈 리딩 프레임(open reading frames)에 부가하여, 발현 후에 단백질 검출이 가능하도록 하였다. 구조 전략(construction strategy)의 개요를 도 8에 나타내었다.
- [0189] 상기 3개의 구조, 및 비-변이 유전자(네거티브 컨트롤로서)를 세레비시아에(*S. cerevisiae*) 스트레인 XW27(MAT aleu2 ura3 trp1 his3 ade2 lys2 och1::LEU2 mnn1::URA3 mnn6::ADE2)에서 형질전환시켰고, 선택 마커(selection marker)로 TRP1 를 사용하였으며, 플라스미드를 XbaI로 절단(digestion)한 후에 세레비시아에(*S. cerevisiae*) 게놈에 TRP1 로쿠스(locus)를 직접 형성하였다. 후자의 스트레인은 당단백에 균일한 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 을 합성할 수 있다. 변이 효소(mutated enzyme)가 활성화되면, 상기 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (구조식 I; 도 4)는 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 IV; 도 4), $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (구조식 V; 도 4) 및/또는 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VI; 도 4)으로 트리밍되어야 한다.
- [0190] 트립토판 독립영양 스트레인(Tryptophan prototrophic strains)을 분리하고, 액체 SDC-trp 배지에 성장시켜 만노프로테인을 생성하였다. 만노프로테인으로부터 유발된 N-글리칸을 DSA-FACE 으로 분석하였다. 도 9를 참조하면, R273G 및 R269S/S272G/R273L 변이체를 함유하는 스트레인으로부터 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (구조식 I; 도 4) 소량은 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 IV; 도 4), $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ (구조식 V; 도 4) 및 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VI; 도 4)로 전환된다. 다른 변이체 또는 와일드 타입 유전자의 발현은 변성 N-글리코실레이션 페노타입을 유발한다. 모든 변이체가 동등하게 잘 발현되었는지를 평가하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)을 수행하였으며, E-tag

(3 아미노산 에피토프(epitope)을 MNS1 단백질에 부가함)에 특이적인 항체를 사용하여 수행하였다. 와일드 타입 MNS1 단백질뿐만 아니라, 모든 변이체 단백질이 동등하게 잘 발현되었다.

[0191] 실시예 4. 인산화 증가

[0192] 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) MNN4 의 발현

[0193] Man₈GlcNAc₂의 인산화를 증가시키기 위하여, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) MNN4 (*P. pastoris* PNO1와 상동)가 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 과발현되어, N-글리칸의 코어 타입 인산화를 증가시켰다.

[0194] 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) MNN4 (XM_503217, _YAL10D24101g) 유전자의 코딩 시퀀스를, 프라이머 ggCGGATCCatgtgtctgcacccgtttc (*YIMNN4 BamHI fw*; SEQ ID NO:34) 및 ggCCCTAGGctactcaaaactcctcggaatc (*YIMNN4 AvrII rv*; SEQ ID NO:35)를 사용하여 증폭시켰다. 상기 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 BamHI 및 AvrII 사이트를 사용하여 플라스미드로 복제하였는데, 이는 선택 마커(selection marker)로 *URA3*Δ1 유전자를 함유하고 랜덤 인테그레이션(random integration)을 향상시키기 위하여 제타 시퀀스(zeta sequences)를 함유하는 플라스미드 pYIHURA3의 hp4d 프로모터로 조절함으로써 ORF를 복제하였다(도 10).

[0195] MTLY60 Δ*och1*에서 형질전환하기에 앞서, MNN4 발현 카세트(expression cassette)를 함유하는 플라스미드를, *URA3* 로커스(locus)에서 인테그레이션하는 Eco47III, *MNN4* 로커스(locus)에서 인테그레이션하는 PvuI 또는 랜덤 인테그레이션하는 RsrII/BstBI으로 절단(digest)하였다. *URA3* 및 *MNN4* 로커스(locus)를 타겟으로하는 형질전환체(Transformants)를 hp4d 프로모터 및 *LIP2* 터미네이터에서 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 분석하였다. 구조상 랜덤 인테그레이션인 형질전환체를 서던 블롯 분석(Southern blot analysis)으로 평가하였다.

[0196] 만노-인산화(manno-phosphorylation)가 증가되었는지를 평가하기 위하여, YPD 배지(medium)에서 48 시간 동안 배양한 후 분비된 당단백으로부터 유래된 N-글리칸을 DSA-FACE 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)을 통하여 분석하였다(도 11). Man₈GlcNAc₂ (구조식 I)의 양은 현저하게 감소하였는데, 빠르게 이동하고 (Man₈GlcNAc₂ (구조식 I; 도 4)와 비교하였을 때) 하나의 (P) (구조식 X 또는 XI; 도 4) 및 두개의 (PP) (구조식 XII; 도 4) 인산 잔기를 각각 포함하는 두개의 구조이다(도 11). 결과적으로, 랜덤 인테그레이션된 발현 카세트(random integrated expression cassettes)가 *URA3* 로커스(locus) 또는 *MNN4* 로커스(locus)에서 상기 순서로 인테그레이션되는 카세트와 비교하였을 때 더 우수한 성능을 가진다,

[0197] 두개의 피크 모두가 Man₈GlcNAc₂ (구조식 I; 도 4) 피크로부터 유래되었다고 가정하여, 인산화된 글리칸(phosphorylated glycans)으로 전환된 Man₈GlcNAc₂의 양을 평가하였다(표 3).

표 3

[0198]

N-글리칸 구조	높이	면적	% 시그널	인산화- 상태
스트레인 Doch1				
M82P (구조식 XII)	18	302	1,02826	18.91045*
M8P (구조식 X 또는 XI)	261	5252	17,88219	
M8 (구조식 I)	928	23816	81,08955	81.08955*
		29370	100	100
스트레인 MU5				
			% 시그널	
M82P (구조식 XII)	1319	19736	27,16773	81.17283*
M8P (구조식 X 또는 XI)	2025	39232	54,00509	
M8 (구조식 I)	539	13677	18,82717	18.82717*
		72645	100	100
스트레인 MZ2				
			%시그널	
M82P (구조식 XII)	1182	17662	27,75299	83.11282*
M8P (구조식 X 또는 XI)	1803	35231	55,35984	
M8 (구조식 I)	419	10747	16,88718	16.88718*
		63640	100	100

- [0199] 표 3에서, 높이 및 면적은 일렉트로페로그램으로부터 결정된 피크의 높이 및 피크의 면적을 의미한다. "% 시그널"이라 함은, N-글리칸 혼합물에서 각 글리칸의 비율을 의미한다. *표시된 숫자들은 인산화된 Man₈Gn₂의 비율(위) 및 비인산화된 Man₈Gn₂의 비율(아래)을 의미한다.
- [0200] *YIMMN4* 유전자를 과발현하고 있는 스트레인에서 패어런트(parent) Δ *och1*에 존재하고 있는 Man₈GlcNAc₂ (구조식 I; 도 4)의 80% 이상이 인산화되어 있음을 확인할 수 있다.
- [0201] 실시예 5. 소포체 내에서 지질-링크된 올리고사카라이드 변성(Lipid-linked Oligosaccharide Modification)에 의한 변성 글리코실레이션(Modifying Glycosylation)
- [0202] 물질 및 방법
- [0203] 스트레인, 배양 조건 및 시약(Strains, culture conditions and reagents)
- [0204] 재조합 플라스미드 DNA의 증폭을 위하여 대장균(*Escherichia coli*) 스트레인 MC1061 또는 TOP10 또는 DH5 α 를 사용하였고, 사용된 플라스미드에 따라 카베니실린(carbenicillin) 100 μ g/mL 또는 카나마이신(kanamycin) 50 μ g/mL 을 공급한 루리아-브로스(Luria-Broth, LB) 배지에서 37 °C의 온도의 서멀 셰이커(thermal shaker) 중에서 배양시켰다.
- [0205] 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 (*ura3 leu2*) 스트레인을 패어런트 스트레인으로 사용하였다. 모든 효모 스트레인은 28°C 인큐베이터에서 배양하였다. YPD 배지(2% 텍스트로스, 2% 박토-펩톤(bacto-peptone) 및 1% 효모 추출물) 또는 합성 텍스트로스 컴플리트(synthetic dextrose complete, SDC) 배지(0.17% YNB w/o 아미노산으로 암모늄 셀레이트 불포함, 1% 글루코스, 0.5% NH₄Cl, 50mM K/Na 포스페이트 버퍼 pH 6.8 및 0.077% 컴플리트 서플먼트 믹스처(Complete Supplement Mixture, Qbiogene Inc, Morgan Irvine, CA))에서 배양하였다. Ura⁺ and Leu⁺ 형질전환체(transformants)를 선택하기 위하여, 0.077% CSM -ura 또는 CSM -leu를 각각 가하였다.
- [0206] 표준 유전학적 기술(Standard genetic techniques)
- [0207] 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)의 형질전환된 항체반응을 일으키는 세포(transformation competent cells)를, 보이스랩(Boisrame et al. (1996) J. Biol. Chem. 271(20):11668-75)의 문헌에 기재된 대로 준비하였고, 상기 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조가 된다. 모든 효모 스트레인으로 부터의 게놈 DNA를 이미 공지된 프로토콜(Epicenter Kit catalogue No. MPY80200; Epicenter Biotechnologies, Madison, WI)에 따라 분리하였다. 상기 프로토콜은 65 °C에서의 비효소적 세포 용해(cell lysis)에 관한 것으로, 후속으로 침전 및 핵산 침전에 의해 단백질을 제거하고 재현탁(resuspension)한다. 10x 버퍼 (200mM Tris-HCl pH8.4 및 500 mM KCl) 5 μ L, 다양한 양의 MgCl₂, 2.5 μ M dNTP, 주형(template) 50ng, 적절한 프라이머 50 pmol 및 Taq 또는 Pfu DNA 폴리머라제 2.5 유닛을 함유하는 최종 부피 50 μ L 에서 PCR 증폭을 수행하였다. 사용된 사이클링 조건은 다음과 같다: 94°C에서 10분간 변성(denaturation)시킨 후, 핫 스타트(hot start)하고, 94°C에서 45초 동안 30 회 사이클링하고, 적절한 어닐링 온도에서(suitable annealing temperature) 45 초 동안 그리고 kb당 1 분 동안 72°C에서 연장(extension)하고 이어서 72°C에서 10 분 동안 연장한다. 겔에서 회수된 DNA 단편(PCR 생성물 또는 단편)을 뉴클레오스핀 익스트랙트 II(NucleoSpin extract II, Macherey-Nagel)를 사용하여 정제한다. VIB 제네틱 서비스 퍼실리티(Genetic Service Facility, Antwerp, Belgium)로 DNA 시퀀싱을 수행한다.
- [0208] 벡터 컨스트럭션(Vector construction)
- [0209] (i) ALG3 유전자의 결손(Knock-out)(유전자 교체(gene-replacement))
- [0210] 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 스트레인의 게놈 DNA로부터 ALG3 유전자(GenBank Accession No: XM_503488, Genolevures: YALIOE03190g)의 프로모터 단편(P)을 PCR 에 의해 증폭하였는데, 정방향 및 역방향 프라이머는 각각, 5' CAGTGGCGCCGACTCCCTCTTTCACTACTATTG3' (SEQ ID NO:48) 및 5'CATTACCTGTTATCCCTACGCTCAGATCCAATTGTTTGGTGGTC3' (SEQ ID NO:49)이었고, Taq 폴리머라제(Invitrogen)를 사용하였다. 과잉의 A 뉴클레오타이드(overhanging A nucleotide)를 T4 DNA 폴리머라제(Fermentas, Ontario, Canada)로 제거하였다. ALG3 유전자의 터미네이터 단편(T)을 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 스트레인의 게놈 DNA로부터 증폭하였으며, 정방향 및 역방향 프라이머는 각각, 5' GTAGGATAACAGGGTAATGCTCTCAAGGACGGACAGATGAGACTGTTATCG3' (SEQ ID NO:50) 및 5' GACTTTAATTAACCTATGTGGACCTCAACCCACATCTCCCGTC3' (SEQ ID NO:51)이었고, 프루프리딩(proofreading) Pfu

DNA 폴리머라제(Fermentas)를 사용하였다. ISceI 제한 사이트(restriction site)를 함유하는 오버랩핑 프라이머 시퀀스로 인해, 양쪽 단편은 PCR에 의해 P-포워드(forward) 프라이머 및 T-리버스(reverse) 프라이머로 링크될 수 있다. 상기 코-앰플리콘(co-amplicon)을 pCR-2.1 TOPO TA (Invitrogen) 벡터로 서브클로닝하고, 시퀀싱함으로써 코-앰플리콘(co-amplicon) 시퀀스를 확인한다. 상기 코-앰플리콘(co-amplicon)을 NotI-PacI 사이트를 사용하여 매개 벡터(intermediate vector)로 클로닝한다.

[0211] (ii) ALG6 유전자의 과발현.

[0212] ALG6 ORF (1725bp)를 ALG6 유전자(GenBank Accession No: XM_502922, Genolevures: YALIOD17028g)의 터미네이터(415bp downstream)와 함께 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 스트레인의 게놈 DNA로부터 PCR에 의해 클로닝하였고, 정방향 및 역방향 프라이머는 각각, 5' CAGTGGATCCATGAAGTCTCTCTATTTCTACTACCG3' (SEQ ID NO:52) 및 5' GACTCCTAGGAAGCTTCCAGGTTACAAGTTGTAC3' (SEQ ID NO:53)이었으며, 프루프리딩(proofreading) Pfu DNA 폴리머라제(Fermentas)를 사용하였다. pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)에서 시퀀스를 클로닝하였고, ALG6 ORF 시퀀스를 상기와 같은 방법으로 시퀀싱하여 확인하였다. 다음으로, BamHI 및 AvrII을 매개로 하는(via) hp4d 프로모터를 함유하는 벡터(pYLHmA)에서 ALG6 ORF를 클로닝하고, 이어서 ALG3의 터미네이터 단편에 존재하는 독특한 제한 사이트(unique restriction sites) ClaI 및 HindIII를 매개로 하는(via) 매개 벡터(intermediate vector)에서 클로닝한다.

[0213] (iii) 선택 마커 카세트(Selection marker cassette)

[0214] 개체의 게놈 DNA로부터 선택적 마터 URA3를 제거하기 위하여, Cre-lox 재조합 시스템(recombination system)을 사용하였는데, 예컨대 피커(Fickers et al. ((2003) J. Microbiol. Methods 55(3):727-737)의 문헌에 기재된 바와 같고, 상기 문헌은 전체로서 본 명세서에 참조된다. 플라스미드 pRRQ2 (hp4d-cre, *LEU2*) (Institut National de Recherche Agronomique (INRA)로부터 기증받음)로부터 Cre 리코비나제(recombinase)의 발현에 있어서, 마커는 두개의 록스 사이트(lox sites) 사이에서 재조합에 의해 삭제(excised)된다. 양쪽의 구조에 있어서, ALG6 과발현 카세트가 있거나 없는 경우에도, 록스 사이트(lox sites)의 측면에 위치한 URA3 선택 마커를 벡터의 P 및 T 단편 사이의 I-SceI 사이트에 도입함으로써 "PUT" 구조를 형성하게 된다.

[0215] 만노프로테인의 제조(*Preparation of mannoproteins*)

[0216] 효모 스트레인을 50 mL 팔콘 튜브(falcon tubes) 중 10 mL 스탠다드 YPD 배지에서 하룻밤 동안 배양하였고, 28 °C 인큐베이터에서 250 rpm으로 회전시켰다. 세포를 4°C에서 4000rpm으로 원심분리하여 펠렛으로 하였다. 상층액을 제거하고, 세포를 2mL의 0.9% NaCl 용액으로 세척하고, 이어서 2mL의 물로 2회 세척하고, 마이크로원심분리관(microcentrifuge tube) 중에서 1.5 mL 의 0.02 M 소듐 시트레이트 pH 7 로 재현탁하였다. 121°C에서 90분간 튜브를 오토클레이브한 후, 튜브를 교반하여(vortexed) 세포 파편(cellular debris)을 원심분리로 펠렛으로 만든다. 상층액을 수집하고, 만노프로테인을 4°C에서 4 부피의 메탄올로 회전하여(rotary motion) 하룻밤 동안 침전시킨다. 알코올 침전된 물질을 원심분리함으로써 침전물을 수득한다. 펠렛을 건조하고 50 µL의 물에 용해시킨다.

[0217] 당 분석(*Sugar analysis*)

[0218] DNA 시퀀서-어시스트(DNA sequencer-assisted, DSA), 형광물질-어시스트 탄수화물 전기영동(fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE)을 캘러워렛(Callewaert et al. (2001; *supra*))의 문헌에 기재된 바와 같이 ABI 3130 DNA 시퀀서로 수행하였다. 간략히 말하면, 당단백을 1시간 동안 RCM 버퍼 (8M 우레아, 360mM Tris pH 8.6 및 3.2 mM EDTA) 중에 50 °C에서 변성시키고, 15 µL RCM을 함유하는 IP 플레이트의 미리 세척해 놓은(prewetted) PVDF 막 상에서 고정시켰다(immobilization). 막의 선 세척(Prewetting)은, 300 µL MeOH로 하였고, 300 µL 물과 50 µL RCM으로 3회 세척하고, 이어서 진공 제거(vacuum removal)하였다. 당단백을 50 µL 0.1M 디티오프레이톨(dithiothreitol)로 1시간 동안 환원시키고 300 µL 물로 3회 세척하였다. 암실에서 50 µL 0.1M 요오드아세트산(iodoacetic acid)으로 30분간 인큐베이션하여, SH 기를 카복시메틸레이트(carboxymethylate)하였고, 300 µL 물로 3회 세척하였다. 후속적으로 플레이트를 100 µL 1% 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone) 360으로 1시간 동안 인큐베이션하여 막의 비 결합 사이트(unoccupied binding sites)를 포화시키고, 이어서 300 µL 물로 다시 3회 세척하였다. 다음으로, 펩타이드로 3시간 동안 다음과 같이 처리하여 N-글리칸을 분리하였다: 50 µL 10mM 트리스-아세테이트(Tris-acetate) pH 8.3 중 N-글리코시다제(glycosidase) F (PNGase F) x U. N-글리칸을 회수하고, 플루오로포어 8-아미노피렌-1,3,6-트리스ัล포네이트(fluorophore 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate, APTS)으로 환원 아미노화(reductive amination)에 의해 유

도체화(derivatized)하였다. 이는, 1.2M 시트르산(citric acid) 중 20 mM APTS 및 DMSO 중 1M NaCNBH₃의 1:1 혼합물 120 mM APTS 및 DMSO 중 1M NaCNBH₃의 1:1 혼합물로, 37 °C에서 하룻밤 동안(overnight, ON) 인큐베이션하고, 420 mM APTS 및 DMSO 중 1M NaCNBH₃의 1:1 혼의 물을 가함(quenching by addition)으로써 이루어진다. 세파덱스(Sephadex) G-10 수지 상에서 사이즈 분류(size fractionation) 함으로써 과량의 라벨(Excess label)을 제거하였다. 잔류 라벨된 N-글리칸을 증발(evaporation)을 통하여 농축시켰다. RNase B 및 올리고말코스 래더(oligomaltose ladder)의 N-글리칸을 사이즈 마커(size markers)로 포함시켰다. Genemapper software (Applied Biosystems)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 라벨된 당에 대한 글리코시다제 절단(Glycosidase digests)을 하룻밤 동안 37°C에서 100mM NH₄AC pH5 에서 수행하였다. 부가적으로 콩으로부터 얻은(Jack bean, JB) 만노스를 하룻밤 동안 절단(digestion)한 후에 가하였고 37°C에서 다시 24시간 동안 방치하였다.

[0219] 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서의 ALG3 유전자의 분열 (Disruption)

[0220] ALG3 유전자 분열을 위하여, ALG3의 프로모터 및 터미네이터 부분을 포함하고, URA3 선택 마커 카세트(selection marker cassette)를 가지며, pYLalg3PUT로 표시되는(designated) 벡터를 생성하였다. NotI 및 PacI 사이트를 포집하여 벡터를 선형으로 하고(linearize), 대장균 관련 DNA 요소(*E. coli* related DNA elements)를 제거하였다. 프로모터 및 터미네이터 사이트에서 이중 동종 재조합(Double homologous recombination)하기 위하여 ALG3을 URA3 선택 마커로 바꾸었는데, 이로 인하여 *alg3::URA3* 변이체 스트레인이 발생하였다. 적용된 결손 전략(knockout strategy)이 피커(Fickers *et al.* (2003; *supra*))의 문헌에 기재되어 있고, Cre-lox 재조합 시스템을 사용할 수 있는데, 이는 효율적인 표지 식별(marker rescue)을 가능하게 한다. 게놈 ALG3 코티그(contig)에서의 포함(integration)에 있어서, Alg3p α-1,6-만노실트랜스퍼라제 활성은 소실되어야 한다. 이는, 몇몇 형질전환체(transformants)의 만노프로테인의 글리코실레이션 패턴을 분석함으로써 확인할 수 있다. 만노프로테인으로부터 유도된 N-글리칸을 DSA-FACE 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)을 통하여 분석하였고, 구조 규명을 위하여 엑소글리코시다제(exoglycosidases)의 선택으로 처리하였다. 24개의 형질전환체 중 7개는 글리코실레이션 프로파일(glycosylation profile)에서 변화되었다(3 개는 도 13에 도시되어 있음). 모든 7개의 형질전환체에 있어서, 게놈에서의 결손 카세트(knockout cassette)의 포함(integration)을 PCR로 확인할 수 있다. 3개의 주요한 글리칸 구조를 프로파일을 분석함으로써 확인할 수 있었다: (i) RNase B의 Man₅GlcNAc₂ 구조(구조식 IV; 도 4)와 동일한 사이즈에서 유전되는(run) 것(구조식 VII; 도 4); (ii) 하나의 글루코스-유닛 엑스트라(glucose-unit extra)만큼의 거리인 것; 및 (iii) 두개의 글루코스-유닛 엑스트라(glucose-unit extra)만큼의 거리인 것(도 13). 이들로부터 상기 세포 중에서 ALG3가 분열되었음을 확인할 수 있다.

[0221] α-1,6-만노실트랜스퍼라제(mannosyltransferase) Alg6p의 과발현

[0222] 제1 글루코실트랜스퍼라제, 즉 Alg6p에 대한 구조적 활성 과발현 카세트(constitutively active overexpression cassette)를 *alg3* 유전자 교체 벡터(replacement vector)로 포함하였다. 상기 벡터는 pYLalg3PUT-ALG6로 표시되었다(designated). 상기 벡터의 NotI/PacI 단편을 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 스트레인으로 형질전환시켰다. 이러한 방법으로, hp4d 프로모터의 조절 하에 ALG3 분열 및 ALG6 과발현이 이루어진다. 게놈에서의 포함(integration)은 다시 PCR로 확인한다. 형질전환체의 절반, 즉 24 중 12의 만노프로테인으로부터 유래된 N-글리칸에 대한 DSA-FACE 분석을 통해 WT 스트레인과 비교하였을 때 글리코실레이션 패턴에 변화가 있음을 확인할 수 있었다. ALG6의 과발현으로 약간의 클론 변화(mild clonal variation)가 발생하였다(도 13).

[0223] N-글리칸 구조의 규명

[0224] 상기 실험으로부터 수득된 글리칸 구조의 성질을 규명하기 위하여, 만노프로테인(상기와 같은)으로부터 유래된 글리칸의 인 비트로 절단(*in vitro* digests)을 엑소글리코시다제(exoglycosidases)의 선택으로 수행하였다. 만노프로테인 글리칸을 다음의 효소, 즉 α-1,2-만노시다제; α-만노시다제(JB) 및 글루코시다제 II로 분석하였다. 관찰된 3개의 글리칸 구조는 Man₅GlcNAc₂ (구조식 VII; 도 4), GlcMan₅GlcNAc₂ (구조식 VIII; 도 4) 및 Glc₂Man₅GlcNAc₂ (구조식 IX; 도 4) (Fig. 14)이다. α-1,6-만노실트랜스퍼라제(mannosyltransferases)(예컨대, Och1p)에 의한 하이 만노스 연장(high mannose elongation)이 없는 것은 거의 없음을 확인할 수 있다.

[0225] N-글리코실레이션 사이트-점유(N-glycosylation site-occupancy)를 증강시키는데 ALG6 과발현이 필요한지 여부를 결정하는데 있어서, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 리파제 2(LIP2)를 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)의 3 개의 다른 스트레인: MTLY60, MTLY60Δ*alg3* and MTLY60 *alg3*ALG6 으로 발현되었

다. TEF 컨스티튜티브 프로모터(constitutive promoter)를 조절하여 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) LIP2 구조를 INRA로부터 획득하였다. 발현 카세트를 상기 스트레인으로 형질전환하였고, 형질전환 세포로부터 준비된 상층액(supernatant)을 SDS-PAGE 분석함으로써 단백질 발현을 규명하였다(도 28). Lip2p 단백질은 2개의 글리코실레이션 사이트를 갖는다. *alg3*-결핍(deficient, "knockout") 효모 스트레인으로부터 유래된 Lip2p 단백질을 용해시켜, 겔을 쿠마씨 블루 염색(Coomassie blue staining)함으로써 3 개의 구별된 밴드로 표시하였다(도 28). 겔 중에서 단백질의 모든 3개의 형이 Lip2p 단백질의 서로 다른 글리코실레이션 형임을 확인하기 위하여, *alg3*-결핍(deficient, "knockout") 효모 스트레인으로부터 획득된 Lip2p 단백질을 PNGase F(당단백으로부터 올리고사카라이드 잔기를 제거하는 효소)으로 처리하였고, 상기와 같이 SDS-PAGE 분석하였다. Lip2p 단백질을 PNGase F으로 처리하면 쿠마씨 블루 염색(Coomassie blue staining)으로 인해 겔 상에 단일 밴드(비-글리코실화된 Lip2p와 동일한 분자량을 가짐)가 나타나는데, 이는 먼저 관찰된 단백질의 모든 3개의 형은 동일한 Lip2p 분자량의 상이한 글리코실레이션 형임을 나타낸다. 이는 *alg3*ALG6 스트레인으로부터 유래된 Lip2p와 동일하다. 그러나, 감소된 글리코실레이션 형 중의 단백질량은 감소된다. 따라서, ALG6의 과발현으로 (적어도 부분적으로는) N-글리코실레이션 사이트-점유(N-glycosylation site-occupancy)가 회복되는데, 이는 *alg3* 결손 변이체 효모 스트레인(knockout mutant yeast strain)에서 감소된 것이다.

[0226] 캡핑 글루코스 구조의 제거

[0227] 다음으로, 모노(구조식 VIII; 도 4) 및 바이 글리코실화된(구조식 IX; 도 4) $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VII; 도 4) 구조를 인 비보(*in vivo*)에서 제거하기 위하여, 세포를 효소 글루코시다제 II의 α -서브유닛이 과발현되도록 유전적으로 엔지니어링하였다. 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) (GenBank Accession No: XM_500574)의 글루코시다제 II의 서브유닛 및 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) (GenBank Accession No: AJ865333)의 글루코시다제 II의 서브유닛을, 단백질을 과발현하도록 두개의 전략으로 독립적으로 복제하였다. 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)의 글루코시다제 II의 서브유닛을 선택하였는데, 이는 이의 자연적 기질이 $\text{GlcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VIII; 도 4)이기 때문이다. 양쪽 유전자 모두를 컨스티튜티브 hp4d 프로모터의 조절 하에 복제하였고, 이들의 플라스미드는 *URA3* 마커를 포함한다. 이들 구조는 *alg3* 변이체 효모 스트레인으로 형질전환되는데, 모두 *ALG6* 과발현되거나 *ALG6* 과발현 되지 않는다.

[0228] 올리고사카라이드를 구조(constructs)를 함유하는 배양 세포로부터 유래된 분비 단백질로부터 준비하였고, 올리고사카라이드의 프로파일(profile)을 DSA-FACE 분석으로 결정하였다. 모든 형질전환체는 동일한 DSA-FACE 프로파일을 가졌으며, 각 글루코시다제 II의 상이한 클론을 도 29에 도시하였다. 이들 결과로부터, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 또는 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) 글루코시다제 II의 과발현은 모노(구조식 VIII; 도 4) 및 바이-글리코실화(구조식 IX; 도 4) $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (구조식 VII; 도 4) 구조의 양에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0229] HDEL 시퀀스로 태그된 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)의 글리코시다제 II α -서브유닛의 발현

[0230] $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 인 비보(*in vivo*)에서 글루코스 잔기를 제거함에 있어서 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) 글루코시다제 II α 서브유닛의 발현의 효과를 증가시키기 위하여, HDEL 태그(tag)로 인코딩된 핵산을 각 두개의 GlcII 효소로 인코딩된 핵산의 3' 말단으로 분자 생물 기술을 사용하여 부가하였다. HDEL 태그(tag)라 함은 골지체로부터 ER로의 복구 메커니즘(retrieval mechanism)으로 사용되는 것을 의미한다. 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*)로부터 HDEL 태그(tag)된 글루코시다제 II 시퀀스로 인코딩된 플라스미드는, hp4d 프로모터의 조절 하에, ALG6 유전자의 발현이 있거나 또는 없이, *alg3* KO 스트레인으로 형질전환된다. 도 30을 참조하면, 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 글루코시다제 II α 서브유닛의 과발현은 글리코실화된 구조에 작은 영향만을 미친다. 반대로, 엑스트라 HDEL 태그(tag)된 트리파소노마 브루세이(*Trypanosoma brucei*) 글루코시다제 II α 서브유닛의 과발현은 모노-글루코스 피크의 감소를 유발한다(도 31).

[0231] 글리코실화된 글리칸의 뮤타나제(Mutanase)로의 처리

[0232] 상기 결과는 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 의 모노-글리코실화 형 감소의 전형적인 예시이다. 당단백으로부터 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 의 바이-글리코실화 형을 감소시키기 위해서, *T. 하르시아눔(T. harzianum)*의 뮤타나제를 하나의 잠재적인 용액으로 조사하였다. 노보자임(Novozyme 234; Bagsvaerd, Denmark)으로부터 효소 제제를 획득하여, 인 비트로에서 올리고

사카라이드를 절단(digest)하는데 사용하였다. 즉, 뮤타나제를 *alg3ALG6* 스트레인(글리칸: $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{GlcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 및 $\text{Glc}_2\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$)으로부터 유래된 올리고사카라이드에 상이한 농도로 가하였다. 도 32의 DSA-FACE 프로파일을 참조하면, 올리고사카라이드 중의 바이-글루코스 피크가 효과적으로 감소하였다.

[0233] 다음으로, *T. 하르지아눔(T. harzianum)*의 뮤타나제를 인 비보에서 과발현하였다. 뮤타나제를 함유하는 HDEL-시퀀스를, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 발현하기 위한 코돈-최적화된 cDNA로 합성하였다. 성숙한 단백질을 TEF1 프로모터로 조절하면서 LIP2 프리 시그널 시퀀스(pre signal sequence)로 복제하였다 (도 33). 상기 구조를, *ALG6* 과발현 시키거나 시키지 않고, *alg3* 변이체 효소 스트레인으로 형질전환시켰다. 구조를 함유하는 배양 세포로부터 올리고사카라이드를 생성하였고, 올리고사카라이드의 프로파일을 DSA-FACE 분석으로 결정하였다. DSA-FACE 프로파일을 통하여, 올리고사카라이드에서 관찰된 바이-글루코스 피크의 감소를 예상할 수 있다. 이러한 결과로부터, 뮤타나제의 인 비보에서의 과발현은, 뮤타나제 과발현되지 않은 세포와 비교하였을 때 올리고사카라이드에서 관찰된 바이-글루코스 피크의 감소에 영향을 미침을 알 수 있다.

[0234] Yl GlsII α - 및 β 서브유닛의 공동 발현(co-expression)

[0235] 글루코시다제 II의 α - 및 β 서브유닛이 헤테로다이머릭 복합체(heterodimeric complex)를 형성하는 것으로 알려져 있는데, β 서브유닛은 ER에 대한 복합체의 복구와 관련이 있고, 기질 인식과 관련이 있으며, α 서브유닛은 촉매 활성을 포함한다. 글루코시다제 II의 α 서브유닛의 과발현은 바이-글루코스 올리고사카라이드 구조에 작은 영향을 미치기 때문에, α - 및 β 서브유닛이 공동 발현된다.

[0236] β 서브유닛(YALIOB03652g)의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)이 게놈 DNA로부터 증폭되고, 상기 게놈 DNA는 PCR을 이용하여 MTLY60 스트레인으로 분리되고, TEF1 및 hp4d 프로모터의 조절 하에 복제된다. 구조는 선택 마커로 LEU2 및 TEF1 및 hp4d 프로모터의 조절 하에 글루코시다제 II의 β 서브유닛으로 만들어진다. 이들은 *ALG6* 과발현되거나 과발현되지 않고 *alg3* 결손 스트레인(knockout strains)으로 형질전환되고, HDEL 시퀀스 태그(sequence tag)되거나 되지 않고 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 글루코시다제 II α 서브유닛을 과발현한다. N-글리칸을 세포로부터 분리된 단백질로부터 준비하였고, N-글리칸의 DSA-FACE 프로파일을 도 33 및 도 34에 도시하였다(*ALG6*과발현된 *alg3* 결손(knockout)). 상기 프로파일로부터, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로부터 글루코시다제 II의 β 서브유닛의 과발현은 글루코실화된 당의 트리밍(trimming)에 있어서 포지티브한 영향을 가짐을 확인할 수 있다. 일반적으로, TEF1 프로모터로 발현될 때 글루코시다제 II의 β 서브유닛의 효율이 향상된다. 글리코실화된 구조는, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 글루코시다제 II α 서브유닛이 HDEL 태그(tag)를 함유할 때 더 많이 감소된다(도 33 및 도 34). *ALG6* 과발현되지 않은 *alg3*-결핍(deficient) 세포에 있어서, 글리코실화 구조의 감소와 관련하여 상이한 세포 군집에서도 유사한 결과를 관찰할 수 있었다(도 35).

[0237] 아스페길러스(*Aspergillus*) GlsII α 및 β 서브유닛의 발현

[0238] *alg3*-결핍 백그라운드(deficient background)에서 발생된 글루코스 함유 구조(glucose bearing structures)로부터 글루코스 잔기를 제거하기 위하여, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) (α -서브유닛 (SEQ ID NO:7; 도 36A 내지 36B) β -서브유닛: (SEQ ID NO:8; 도 37)에서 발현을 위한 코돈-최적화된 cDNA 으로 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*) 성숙(시크날 펩타이드 결핍) 글루코시다제 II α and β 를 합성하였다.

[0239] 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*) (An) 글루코시다제 α 서브유닛을 컨스티튜티브(constitutive) TEF1 및 hp4d 프로모터의 조절 하에 복제하였고, 선택 마커로 URA3 유전자를 함유한다. 발현 카세트(TEF1 및 hp4d의 조절 하에 ORFs)을 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) *alg3ALG6* 스트레인으로 형질전환시켰다. 형질전환체 후보물질(Transformant candidates)을 YPD에서 배양하였고, 분리 단백질로부터의 글리칸을 DSA-FACE 으로 분석하였다. 도 38을 참조하면, 두 개의 글리코실화된 구조는 비-형질전환체(*alg3ALG6*)와 비교하였을 때 형질전환체 스트레인에서 더 적게 존재한다(less abundant).

[0240] 글리코실화 글리칸 구조를 더욱 감소하기 위하여, 선택 마커로 LEU2으로 하고 TEF1 및 hp4d 프로모터의 조절 하에 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*) (An)글루코시다제 II의 β 서브유닛을 구조로 만든다. 상기 구조를 An 글루코시다제 II α -서브유닛을 발현하는 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) *alg3ALG6* 스트레인으로 형질전환시킨다. 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*) 글루코시다제 II의 β 서브유닛의 발현으로 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포에서 글리코실화된 구조의 감소를 예상할 수 있다.

[0241] 실시예6. *HAC1* 인트론(Intron)의 규명(identification) 및 *HAC1* 유전자의 클로닝(cloning) 및 분리(isolation)

- [0242] 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) HAC1 스플라이스 사이트(splice site)
- [0243] 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 진균 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) 및 아스퍼길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*)의 HAC1의 인트론 구역(intronic regions) 사이의 시퀀스 상동(homology)에 기초하여, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) HAC1 (Genbank: XM_500811, Genolevures: Yali0B12716g)의 잠재적인 스플라이스 사이트를 규명하였다. 5' 및 3' 스플라이스 사이트를 특징적인 루프 구조(characteristic loop structure) 내에서 구역화될 것으로 생각되고, 인트론을 29 bp 길이로 계산하였다.
- [0244] 인트론을 규명하기 위하여 스플라이스 사이트 주변으로 프라이머를 진행시켰다. 유전자 특이적 프라이머(gene specific primers)를 갖는 유도(디티오프레이트올(dithiothreitol, DTT) 중에서 성장시킴) 및 비유도 배양(네거티브 컨트롤) 안접한 단백질 반응(UPR, Unfolded Protein Response)을 통하여 분리된 mRNA으로부터 제1 스트랜드 cDNA 를 합성하였다. 이어서 프라이머 HAC1Fw06-003 및 HAC1Rv06-001을 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 물질을 1.5% 아가로스 겔에서 분석하였다.
- [0245] +/- 400 bp 단편은 비-유도 세포로 증폭될 것으로 예상되고: 29 bp 작은 단편은 유도 세포로 증폭될 것으로 예상되었다. 비-유도 세포 및 UPR 유도세포로부터 필요한 사이즈의 단편을 수득하였다. UPR 유도 배지로부터 증폭 산물을 2 개 더 수득하였다. 중간 단편은 비-유도 배지로부터 수득된 밴드와 동일한 사이즈였고, 스플라이싱되지 않은 HAC1로 번역되었다. 낮은, 가장 현저한 밴드를 겔로부터 정제하여 시퀀싱 벡터로 복제하였다. 구조를 시퀀싱한 후에, 스플라이스 사이트를 규명하기 위하여 시퀀스 정렬(sequence alignment)을 수행하였다(도 15). 시퀀스 정렬(sequence alignment)을 통하여, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 및 진균(트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) 및 아스퍼길러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*)) HAC1 시퀀스와 비교하였을 때 예상되는 위치에 스플라이스 사이트가 위치하게 됨을 확인할 수 있다. 스플라이스 사이트는 29 bp 길이다.
- [0246] 활성 전체 길이(active full length) HAC1 시퀀스를 분리하기 위하여, 발현 벡터로의 클로닝에 적합한 제한 사이트를 갖도록 프라이머를 엔지니어링하였다. 프라이머 시퀀스는 다음과 같다: Hac1yIRv07-018: CCTAGGTCACCTCCATCCCAACAGGTTGCTGACGCTCGACTCATAGTGAGCTAGATCAGCAATAAAGTCG (SEQ ID NO:54) 및 HAC1Fw06-002 :GGA TCC ATG TCT ATC AAG CGA GAA GAG TCC (SEQ ID NO:55). 효모 세포 10 mL 배지를 5 mM DTT 존재 하에 1.5 시간 동안 인큐베이션하여, UPR 반응을 유도하였다. 인큐베이션 후에, DTT-처리된 세포로부터 RNA를 분리하였고, 역전사효소(reverse transcriptase)를 사용하여 분리된 RNA 및 주형(template)으로 cDNA 및 상기 프라이머를 사용한 PCR로부터 제 1 스트랜드 cDNA 를 준비하였다. 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 스플라이싱된 HAC1를 함유하는 PCR-증폭된 시퀀스를 pCR-blunt-TOPO 클로닝 벡터에 삽입하였다.
- [0247] 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) HAC1 스플라이스 사이트(splice site) HAC1 유전자의 인트론
- [0248] 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 인트론 구역(intronic regions) 사이의 시퀀스 상동(homology)에 기초하여, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) HAC1의 잠재적인 스플라이스 사이트를 규명하였다(도 16). 5' 및 3' 스플라이스 사이트를 특징적인 루프 구조(characteristic loop structure) 내에서 구역화될 것으로 생각되고, 인트론을 322 bp 길이로 계산하였다.
- [0249] 인트론을 규명하기 위하여 스플라이스 사이트 주변으로 프라이머(HAC1Fw06-004 and HAC1Rv06-005)를 진행시켰다(표 4). 인트론이 제거되면 257 뉴클레오타이드의 단편이 증폭될 것으로 예상되었고, 인트론이 존재하면 579 bp 단편이 증폭될 것으로 예상되었다. UPR 유도 및 비-유도 배지로부터 분리된 mRNA으로부터 제1 스트랜드 cDNA 를 합성하였다. 5mM DTT를 기하급수적으로 성장하는 세포 배지(culture of exponentially growing cells) 10 mL에 가함으로써 UPR을 유도할 수 있다. 세포를 DTT의 존재 하에 1.5 시간 동안 배양하였다. 1.5% 아가로스 겔 전기영동을 통하여 증폭된 물질을 분석하였다. 비-유도 및 유도 세포 모두에 있어서 cDNA 으로부터 대략 257 bp 단편을 수득하였다.

표 4

프라이머 코드	시퀀스 5'--> 3'	정보
HAC1-Kar1	GAATTCATGCCCGTAGATTCTTCTC (SEQ ID NO:56)	정방향 프라이머 Hac1 유전자+ 개시 코돈 및 <i>EcoRI</i> 사이트
HAC1Fw06-004	GAGTCTTCCGAGGATTTCAG (SEQ ID NO:57)	5' 스플라이스 사이트 주위의 정방향 프라이머 Hac1 유전자 구역
HAC1Rv06-005	CCTGGAAGAATACAAAGTC (SEQ ID NO:58)	정지 코돈 근방의 역방향 프라이머 Hac1 유전자

HAC1Rv06-009	CCTAGGCTATTCCTGGAAGAATACAAAGTC (SEQ ID NO:59)	역방향 프라이머 Hac1 유전자 + 정지 코돈 및 <i>AvrII</i> site
ACTppFw07-007	GGTATTGCTGAGCGTATGCAAA (SEQ ID NO:60)	QPCR 에 대한 Act1 정방향 프라이머
ACTppRv07-003	CCACCGATCCATACGGAGTACT (SEQ ID NO:61)	QPCR 에 대한 Act1 역방향 프라이머
HAC1ppFw07-008	CGACCTGGAATCTGCACTTCAA (SEQ ID NO:62)	QPCR 에 대한 Hac1 정방향 프라이머
HAC1ppRV07-004	CGGTACCACCTAAGGCTTCAA (SEQ ID NO:63)	Hac1 역방향 프라이머 QPCR
Kar2ppFw07-009	CCAGCCAACTGTGTGATTCAA (SEQ ID NO:64)	Kar2 정방향 프라이머 QPCR
Kar2ppRv07-005	GGAGCTGGTGAATACCAGTCA (SEQ ID NO:65)	Kar2 역방향 프라이머 QPCR

- [0251] 스플라이싱 되지 않은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) HAC1 유전자의 길이를 다양화하기 위하여, 프라이머 HAC1-Kar1 및 HAC1Rv06-005을 사용하여 게놈 DNA 상에 PCR을 수행하였다. 유도된 세포 배지의 cDNA 으로부터 수득된 PCR 산물과의 길이와 수득된 단편의 길이를 비교하였다. 게놈 DNA로부터 수득된 증폭된 단편은 cDNA 로부터 유래된 암플리콘(amplicon)보다 약 300 bp 길었는데, 게놈 DNA시퀀스에 존재하고 스플라이스된 mRNA에는 존재하지 않는 인트론을 표시하는 동일한 프라이머를 사용하였다.
- [0252] 257 bp의 cDNA 단편을 겔로부터 분리하여, 시퀀싱 벡터로 복제하였다. 스플라이스 사이트를 규명하기 위하여 단편을 복제하고 정렬(alignment)하였다(도 17). 스플라이스된 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) HAC1 유전자를 분리 및 복제하기 위하여, 제한 효소 사이트로 PCR 프라이머를 진행시켜 발현 벡터(HAC1-Kar1 및 HAC1Rv06-009)로 복제하였다. 10 mL 배지에 5 mM DTT를 가하여 1.5 시간 동안 UPR 유도시켰다. 역전사 효소를 사용하여 분리 RNA로부터 제1 스트랜드 cDNA 를 준비하였고, 후속적으로 상기 프라이머를 사용하여 cDNA 주형(template) DNA에서 PCR을 수행하였다. 스플라이스된 HAC1를 분리하였고, 시퀀싱하기 위하여 pCR-blunt-TOPO 클로닝 벡터로 복제하였다. 스플라이스된 유전자를 발현벡터 *pBLHIS IX* 에서 메탄올 유도 AOX1 프로모터로 조절하면서 복제하여, 벡터 *pBLHIS IX ppHAC1spliced* 를 수득하였다. PCR 및 제한 효소 분석을 사용하여 HAC1 유전자를 발현벡터로 삽입하였다.
- [0253] 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 있어서, 스플라이싱에서, 스플라이싱되지 않은 mRNA에 있어서 C-터미널 10 아미노산의 코딩 시퀀스를 18개의 아미노산의 코딩 시퀀스로 치환하였다. 따라서, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서, 스플라이싱되지 않은 HAC1 에 있어서 C-터미널 45 아미노산의 코딩 시퀀스가 스플라이싱으로 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 상동인 18개 아미노산의 코딩 시퀀스로 치환되었음을 확인할 수 있었다.
- [0254] 실시예 7. 스플라이스된 HAC1 유전자의 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)로의 형질전환 및 알로위아 도입
- [0255] 선택 마커로 URA3 유전자 및 hp4d 프로모터의 발현 조절 하에, 스플라이스된 HAC1 cDNA (상기)를 함유하는 벡터 "PYHMAXHAC1ylspliced"로 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포를 형질전환하였다. 벡터의 효모 게놈으로의 포함(Integration)은 PCR 을 사용하여 다양화되었다. PYHMAXHAC1ylspliced로 형질전환된 MTLY60 스트레인을 28℃에서 24 시간 동안 YPG 에서 2mL 배지 중에 배양시켰다. 배양 세포를 YNB로 2회 세척하고, OD₆₀₀ 0.6 으로 희석하고, 50 mM 포스페이트 버퍼(phosphate buffer) pH: 6.8로 버퍼된 YTG에서 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 OD₆₀₀ 0.2로 희석하고, 미드-엑스포넨셜 상(mid-exponential phase)에서 세포를 수득하기 위하여 3 세대를 더 배양하였다. 펠렛으로 하여, 1 mL의 RNApure 액을 1g의 글래스 비드(glass beads)와 함께 세포에 가하였다. 힘차에 흔들어 세포를 파쇄하였다. 150 μ L 클로로포름을 가하고 이소프로판올로 RNA를 침전시켜 파쇄된 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 DNase 로 처리하여 공침된 DNA 불순물을 제거하였다.
- [0256] 총 반응 부피 20 인 iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 RNA 80 ng으로부터 제1 스트랜드 cDNA 를 준비하였다. 리얼 타임 PCR 분석을 위하여 20 ng RNA 등가(equivalent)를 사용하여 세포 중 HAC1 mRNA의 양을 결정하였다. 리얼 타임 PCR에는 검출 시약(fluorescent) (Eurogentec)으로 SYBR green을 사용하여 수행하였다. 세포 중의 HAC1 mRNA 양을 검출하기 위하여 프라이머를 디자인하고, 리얼 타임 PCR 에서의 대조군으로 ACT1 (household gene) 및 KAR2 (UPR responsive gene) 유전자의 양을 결정하기 위하여 또한 프라이머를 디자인하였다. 세포 중에서 각 유전자의 mRNA의 상대량을 발현 컨트롤로 액틴(Actin, a

housekeeping gene)을 사용하여 비교 역시 사이클 값(comparative threshold cycle values)으로부터 산출하였다. UPR 발현을 측정함으로써 세포에 의한 UPR 반응의 유도를 확인하였다. 와일드 타입 스트레인 MTLy60와 비교하였을 때, 컨스티튜티브 프로모터(constitutive promoter)의 조절 하에 HAC1 발현 스트레인에서 HAC1뿐만 아니라 KAR2의 발현 레벨이 높았다(도 39).

[0257] 실시예 8. 스플라이스된 HAC1 유전자의 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)로의 형질전환 및 도입

[0258] 배지

[0259] 하기 시험을 위하여, 3종의 배지를 사용하였다: BMV (Buffered Medium for Yeast: 100 mM 포타슘 포스페이트 pH:6.0/1.34% YNB 아미노산 미 포함/1% 효모 추출물/2% 펩톤); BGMV (Buffered Glycerol-complex Medium for Yeast: 100 mM 포타슘 포스페이트 pH:6.0/1.34% YNB 아미노산 미 포함 /1% 효모 추출물 /2% 펩톤 /1% 글리세롤); 및 BMMY (Buffered Methanol-complex Medium for Yeast: 100 mM 포타슘 포스페이트 pH:6.0/1.34% YNB 아미노산 미 포함 /1% 효모 추출물 /2% 펩톤/0.5% 글리세롤).

[0260] *Pichia* Expression kit (Invitrogen Cat. No. K1710-01)의 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)에 따라 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 형질전환하였다. 포합(integration)을 위한 HIS4 로커스(locus)로의 구조를 타겟하기 위하여 벡터 *pBLHIS IX ppHAC1spliced*를 HIS4 유전자 중에서 선형화(linearized)하였다. DNA 10 마이크로그램을 효모 세포로 형질전환하였다. 단일 콜로니(프라이머 HAC1-Kar1 및 HAC1Rv06-005)의 분리 후에, 게놈 DNA에서 PCR을 사용함으로써 구조의 포합을 유효화하였다. 915 kb 및 1237 kb 단편을 형질전환된 세포로부터 수득된 DNA로부터 증폭하였는데, 비-형질전환체(구조에 포함되지 않은 세포들)에서 1237 kb 단편을 증폭하였다. 플라스미드의 포합(integration)을 위하여 포지티브로 규명된 클론을 10 mL BGMV 배지에서 유도 전에 24 시간 동안 배양하였다. BGMV를 비-유도된 배지에 가하였고, BMV를 유도된 배지에 가하였다. 12시간 마다, 유도된 배지에 0.5% 메탄올(최종 농도)을 공급하였다. 원심분리로 세포를 회수한 후에 24 시간 동안 유도를 수행하였다. RNA를 준비하기 위하여, 세포를 1 mL RNApure (GenHunter Corporation, Nashville, NY) 및 1 g 글래스 비드(glass beads)와 결합하였고, 힘차게 흔들어 용해시켰다. 150 μ L 클로로포름을 가하고 이소프로판올로 침전시켜 RNA를 추출하였다. 추출 및 침전된 RNA를 Qiagen (Cat No. 79254)사 제품인 RNase-free DNase 로 DNase 처리하였다. 총 RNA 400 ng을, oligodT 프라이머 및 Superscript II 역전사 효소(reverse transcriptase) (Invitrogen, Cat. No. 18064-014)를 사용하여 역전사 반응시켰다. 20 ng RNA 등가(equivalent)를 리얼 타임 PCR 반응에 사용하였다. 프라이머 익스프레스 소프트웨어(Primer Express software)(Applied Biosystems)(시퀀스용 프라이머 표 참조)에 의해 프라이머 시퀀스를 디자인하였다. 리얼 타임 PCR 용 SYBR 그린 형광 시약(green fluorescent reagent) (Eurogentec)을 BioRad사의 제품인 iCycler machine에서 시행하였다. mRNA의 상대량을 컨트롤로 하우스키핑 유전자 액틴(housekeeping gene actin)을 사용하여 비교 역시 사이클 값(comparative threshold cycle values)으로부터 산출하였다. UPR-타겟 유전자 KAR2의 발현 분석을 통하여 UPR 정량화(Quantification)를 수행하였다. 메탄올로 유도된 동일한 클론과 비교하였을 때, 유도되지 않은 비교 클론(comparing clones)에 있어서 KAR2의 3 내지 7 폴드 높은 발현(fold higher expression)을 수득하였다(도 19).

[0261] 두 개의 부가적인 클론 6 및 클론 8로부터의 HAC1 mRNA 상대량을 정량 PCR로 결정하였고, Kar2의 mRNA의 상대량과 비교하였다. 양쪽 클론에서 HAC1의 강한 유도가 관찰되었다. KAR2 mRNA의 상대량은 HAC1 mRNA의 상대량과 상관성이 있었으며, HAC1의 높은 발현 레벨로 인하여 KAR2의 높은 발현 레벨이 유발되었다(도 20).

[0262] 형광 플로우 사이토메트리(fluorescence flow cytometry, FFC)를 사용하여 메탄올 유도된 배지의 세포 죽음에 관한 연구를 수행하였고, 비-유도된 배지의 세포 죽음과 비교하였다. 유도 후 12, 36 및 48 시간 경과 후에 세포를 FACScalibur (Becton Dickinson)으로 분석하였다. GlycoSwitchM5 (GSM5)스트레인은 주로 Man₅GlcNAc₂ (구조식 IV; 도 4)의 메인 코어 타입 글리칸 구조를 갖는다. Hac1p 유도가 N-글리칸 구조에 대한 영향을 갖는지 여부를 확인하기 위하여 1 mL 배양배지에서 DSA-FACE 분석을 수행하였다. 스플라이스된 Hac1p의 유도 48 시간 후 수득된 글리칸 프로파일은 페어렌탈 GSM5 스트레인(parental GSM5 strain)의 프로파일과 유사하였다.

[0263] Hac1p 유도가 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 성장을 손상시키는지 여부를 확인하기 위하여 성장곡선을 구성하였다. 빈 벡터 형질전환된 스트레인(empty vector transformed strain)과 비교하였을 때 Hac1p 유도 스트레인에서 성장 결함이 발견되지는 않았다(도 22).

[0264] 실시예 9. YIMN6의 발현

[0265] 세레비시아에(*S. cerevisiae*)에 있어서, MN6은 포스포만노스 잔기(phosphomannose residues)를 N-글리칸으로

이동시킨다. 따라서, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에서 Y1MNN6의 과발현으로 인산화가 증가된다. 더구나, 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 인산화에 대한 부가적인 영향은 Y1MNN4 및 Y1MNN6을 발현함으로써 얻어질 수 있다. PCR 프라이머로 Y1MNN6 BamHI fw (gcgggatccatgcacacgtgcacgaagc (SEQ ID NO:34)) 및 Y1MNN6 AvrII rv (gcgcctaggctaccagtcactatagttctc (SEQ ID NO:35))을 사용하여 게놈으로부터 Y1MNN6 코딩 구역(Genbank Accession No. XM_499811, Genolevures Ref: YALI0A06589g)을 PCR 증폭하였고, hp4d 프로모터로 조절하면서 발현을 위한 pYHMAX 발현 벡터에서 복제하였다(도 21). 랜덤 포합(random integration)을 증가시키기 위하여 제타 시퀀스(zeta sequences)를 사용하여 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60으로 플라스미드를 형질전환하였다. 분비된 당단백을 세포 클론으로부터 수집하였는데, 이들은 우라실이 없는 배지에서 성장한 것으로, 당단백 합성 글리칸의 조성을 DSA-FACE 을 사용하여 분석하였다. 그러나, 인산화의 증가는 관찰되지 않았다(도 22).

[0266] 실시예 10. Hac1p 발현 효과

[0267] 이종 단백질(heterologous proteins)의 분비에 있어서의 Hac1p 과발현 평가

[0268] 유도가능한 AOX1 프로모터(pPICHygppHAC1spliced) 또는 конститу티브(constitutive) GAP 프로모터(pGAPHygHAC1ppspliced)로 조절되는 하이그로마이신 저항 마커(hygromycin resistance marker) 및 스플라이스된 HAC1 cDNA를 포함하는 벡터를 유도가능한 AOX1 프로모터의 조절 하에 mIL-10 단백질을 발현하는 GS115 스트레인으로 형질전환하였다. *Pichia* 발현 키트(Expression kit) (Invitrogen Cat. No. K1710-01, Invitrogen, Carlsbad, CA)의 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)에 따라 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 형질전환하였다. 각 AOX1 또는 GAP 로커스(locus)로 Hac1p 유전자의 포합(integration)을 타겟하기 위하여 AOX1 또는 GAP 프로모터 중에서 벡터를 선형화(linearized)하였다. 플라스미드의 호스트 게놈으로의 포합(integration)은 PCR을 사용하여 확인하였다.

[0269] 포지티브로 확인된 클론으로부터의 선배지(Precultures) (5 ml)를 YPD에서 24 시간 동안 배양하였다. 배지 중 세포의 600 nm (OD₆₀₀) 과장에서의 농도(OD)를 측정하였고, 배지를 OD₆₀₀으로 희석했는데, 이는 24개의 웰 플레이트(well plate) 중 각각의 웰에서 BMGY 매질 2 mL 중의 하나였다. 배지를 BMGY에서 48 시간 동안 배양하고, BMY로 두 번 세척하고, BMMY에서 24 시간 동안 유도하였다. 매 8 시간 내지 12 시간 마다, 배지에 1% 메탄올(최종 농도)를 함유하는 매질로 다시 공급하였다. 유도 후에, 세포의 상층액을 수득하여 상층액 1mL로부터 얻은 단백질을 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA)을 사용하여 침전하였다. 침전된 단백질은 15% SDS-PAGE 하였다.

[0270] SDS-PAGE로부터, 적어도 하나의 단백질 mIL-10 의 발현에 있어서의 클론 변형(clonal variation)은 상이한 클론 사이에서 관찰되었다. 예컨대 구조적으로 Hac1p 단백질을 발현하는 클론에 있어서는(GAP 프로모터로 조절), 발현 레벨에 있어서 향상이 나타나지 않았으나, 유도적으로 Hac1p 단백질을 발현하는 클론에 있어서는(AOX1 프로모터로 조절), 두 개의 클론이 mIL-10 단백질의 발현 수준이 높다는 것을 확인할 수 있었다(도 40 및 도 41). 각 클론에 있어서의 mIL-10 발현을 참조 GS115 mIL-10 발현 스트레인으로 부터 생성된 mIL-10의 발현과 비교하였다.

[0271] 이들 클론에 대하여 새로운 유도를 수행하였다. 24시간 동안 성장시킨 선배지(preculture)를 배플 플라스크(baffled flask) 중에서 20 mL BMGY 에서 OD 1로 희석시켰다. 세포를 BMGY에서 48 시간 동안 배양시키고, 2회 세척하고, 이어서 BMMY에서 유도하였다. 매 8 내지 12 시간 마다, 1% 메탄올(최종 농도)를 함유하는 매질을 배지에 다시 공급하였다. 유도 후에, 세포의 상층액을 수득하여 상층액 1mL로부터 얻은 단백질을 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA)을 사용하여 침전하였다. 침전된 단백질을 15% SDS-PAGE 하기에 앞서, 단백질을 PNGase F로 처리하여(처리하지 않을 수 있음) 모든 글리코실레이션을 제거하였다(도 41). Hac1p-발현 스트레인의 상층액으로부터 수득한 SDS-PAGE 용해 단백질은 75 kDa에서 현저한 밴드를 나타내는데, 이는 참조 스트레인에서는 나타나지 않는 것이다. 상기 밴드는 매스 스펙트로메트리(mass spectrometry)에 의해 Kar2p으로 규명하였는데, 이는 가장 현저한 UPR 타겟 유전자이다. 사이토카인 비드 어레이(cytokine bead array, CBA)를 사용하여, Hac1p 및 mIL-10 단백질의 동시 유도 발현(simultaneous inducible expression)이 mIL-10 단백질의 2 fold 높은 발현(fold higher expression)을 유도할 수 있다(클론 1, 도 41). endoH 처리된 mIL-10 단백질에서 CBA를 수행하였다.

[0272] 이종 단백질의 표면에서의 Hac1p 과발현 평가

[0273] 유도가능한 AOX1 프로모터(pPICHygppHAC1spliced) 또는 конститу티브(constitutive) GAP 프로모터

(pGAPhygHAC1ppsplliced)로 조절되는 하이그로마이신 저항 마커(hygromycin resistance marker) 및 스플라이스된 *HAC1* cDNA를 함유하는 벡터를, 성숙한 사람의 인터페론-베타/알파-어글루티닌 용융 단백질(interferon-beta/alpha-agglutinin fusion protein)을 발현하는 GlycoswitchMan5 스트레인, 성숙한 마우스의 인터페론 감마/알파-어글루티닌 용융 단백질(interferon gamma/alpha-agglutinin fusion protein), 성숙한 사람의 에리스로포이에틴/알파-어글루티닌 용융 단백질(erythropoietin/alpha-agglutinin fusion protein), 또는 마우스 트롬보모듈린(mouse thrombomodulin)의 알파-어글루티닌(alpha-agglutinin)과 렉틴-유사 도메인(lectin-like domain)의 용융 단백질로 형질전환하였고, 각각은 유도가능한 AOX1 프로모터로 조절하였다.

[0274] *Pichia* 발현 키트(Expression kit) (Invitrogen Cat. No. K1710-01, Invitrogen, Carlsbad, CA)의 전기천공 프로토콜(electroporation protocol)에 따라 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 세포를 형질전환하였다. 각 AOX1 또는 GAP 로커스(locus)로 *Hac1p* 유전자의 포함(integration)을 타겟하기 위하여 AOX1 또는 GAP 프로모터 중에서 벡터를 선형화(linearized)하였다. 플라스미드의 호스트 게놈으로의 포함(integration)은 PCR을 사용하여 확인하였다.

[0275] 포지티브로 확인된 클론으로부터의 선배지(Precultures) (5 ml)를 YPD에서 24 시간 동안 배양하였다. OD₆₀₀ 를 측정하였고, 배지를 OD₆₀₀으로 희석했는데, 이는 24개의 웰 플레이트(well plate) 중 각각의 웰에서 BMGY 매질 2 mL 중의 하나였다. 배지를 BMGY에서 48 시간 동안 배양하고, 탈이온수로 두 번 세척하고, BMMY에서 24 시간 동안 유도하였다(1% 메탄올을 함유하는 배지 매질을 사용함). V5-에피토프에 특이적인 항체로 간접적인 이뮤노스테이닝(indirect immunostaining)에 의해 표면 발현(Surface expression)을 예시하였다. 유도 후에, 0.1% 보바인 세럼 알부민(bovine serum albumin, PBS/BSA)을 공급한 1 mL PBS (pH 7.2) 중의 10⁷ 세포를 항-V5 항체(1 µg/µL; Invitrogen) 1 µg/mL에서 인큐베이션하였고, PBS/BSA으로 세척하고, 1 µL/mL Alexa fluor 488-라벨된 염소 항-마우스 IgG (1 µg/µL; Molecular Probes)으로 인큐베이션하였다. PBS/BSA으로 2회 세척한 후에, 세포를 플로우 사이메트리(flow cytometry)로 분석하였다(표 5). 표 5는 플로우 사이메트리에 의해 결정된 MFI 값이다. MFI 값은 플로우 사이메트리 분석으로부터 얻어진 형광강도의 평균값이다(Mean Fluorescence Intensity).

표 5

[0276]

발현 단백질	와일드 타입 <i>Pichia</i>	<i>Pichia</i> +AOX GAP	<i>Pichia</i> +GAP HAC
마우스 인터페론-감마	36.6	19.9	42.8
사람 EPO	59.5	45.8	66.5
인터페론-베타	22.6	12.4	14.4
사람 트롬보모듈린	95.5	184.1	67.8

[0277] 구조적으로 *Hac1p* 단백질을 발현하는 스트레인에 있어서는, 표면 단백질만을 발현하는 참조 스트레인과 비교하였을 때 모든 4개의 단백질에 대한 표면 발현에 있어서 거의 향상이 없거나 매우 작은 차이만이 관찰되었다. 사람의 인터페론-베타를 발현하는 세포에 있어서는, 표면 발현 수준의 현저한 감소가 관찰되었다. 유도가능한 *Hac1p*을 과발현하는 스트레인에 있어서는(표 5) 하기가 관찰되었다: 1) 사람의 인터페론-감마 표면 발현 스트레인에 있어서, 사람 인터페론-베타 α-어글루티닌 용융 단백질을 발현하는 참조 스트레인과 비교하였을 때 표면 발현 레벨이 1.8-폴드 낮은 것이 관찰되었다; 2) 사람의 에리스로포이에틴 α-어글루티닌 용융 단백질을 발현하는 스트레인 표면에 있어서, 참조 스트레인과 비교하였을 때 표면 발현 레벨의 1.3-폴드 낮은 것이 관찰되었다; 3) 사람의 인터페론-베타를 발현하는 스트레인 표면에 있어서는, 참조 스트레인과 비교하여 표면 발현 수준에서 다른 점이 관찰되지 않았다; 4) 마우스 트롬보모듈린 렉틴-유사 도메인을 발현하는 스트레인 표면에 있어서, 참조 스트레인과 비교하여 표면 발현 레벨의 1.9-폴드 증가가 관찰되었다.

[0278]

포스포리피드 합성에 대한 *Hac1p* 과발현의 효과

[0279]

Hac1p 산물(스플라이스된 *HAC1* cDNA로부터 생산된)의 과발현이 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에 있어서 지질 대사에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위하여, 세포를 상기 스플라이스된 *HAC1* cDNA으로 형질전환하였고, 세포 내에서 지질 대사에 있어서의 *Hac1p*의 영향을 전자 현미경 분석(electron microscopy analysis)을 통하여 결정하였다. 세포를 BMGY에서 48 시간 동안 배양하고, PBS 로 한 번 세척하고, BMMY에서 다시 48 시간 동안 배양하였다. 다음으로, 세포를 1% 메탄올을 함유하는 매질 중에 매 8 내지 12 시간 동안 배양하였다. 바하라엔(Baharaeen et al. (2004) Mycopathologia)의 방법에 따라 전기 현미경 분석을 위해 세포를 준비하였다. 간

단하게는, 글루타알데히드(glutaraldehyde, 3%) 및 파라포름알데히드(para-formaldehyde, pH 7.2에서 0.05 M 소듐 카코딜레이트(sodium cacodylate) 중에 1.5% 버퍼됨)를 함유하는 제1 고정액(primary fixative)을 얼음에서 2 시간 동안 세포와 접촉하였다. 이어서, 세포를 20분 동안 0.05 M 소듐 카코딜레이트(sodium cacodylate)로 3회 세척하였다. 세척한 후에, 세포를 실온에서(room temperature) 1 시간 동안 6%의 과망간산 칼륨(potassium permanganate) 용액과 접촉시킨 후, 20분 동안 0.05 M 소듐 카코딜레이트(sodium cacodylate)로 3회 세척하였다. 실험 결과를 도 54에 도시하였다. 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에 있어서 Hsc1p 산물(스플라이스된 HAC1 cDNA로부터 생산된)의 과발현으로 인해, 도 54의 전자 현미경(electron micrograph (EM) 사진에서 나타난 것처럼, 뭉쳐진 막(stacked membranes)의 분리된 구역(discrete regions)이 형성되게 된다. 이로부터, 지질대사와 관련된 유전자의 전사 활성화에 의해 Hsc1p의 과발현이 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)의 지질 대사에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

[0280] 실시예 11. ManHDEL의 발현

[0281] och1 스트레인에 의해 발현된 당단백에 결합된 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 에 있어서, α -1,2-만노시다제가 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 에서 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로 발현될 수 있다(즉, 골지 타입 α -1,2-만노시다제 활성화). 상기 만노시다제는 분비 시스템의 타겟이 된다.

[0282] S. 세레비아에(*S. cerevisiae*) 프레프로 메이팅 인자(prepro mating factor)에 융합되고 HDEL 시퀀스로 태그된, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2-만노시다제(Genbank accession no. AF212153)는 인 비보에서 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*), 아스페길러스 니거(*Aspergillus niger*) 내에서 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 를 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로 트리밍할 수 있다. hp4d 프로모터의 조절 하에, 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 내에서 발현 구조는 MManHDEL(HDEL 시퀀스로 태그된 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2-만노시다제와 융합하고 S. 세레비아에(*S. cerevisiae*) α -메이팅 팩터 프레프로)를 과발현한다(도 23). 플라스미드 pYHmAXManHDEL 를 제한 효소 NotI 로 절단(digestion)한 후에 발현 카세트를 세포로 형질전환할 수 있고, 이어서 아가로스-겔 전기영동을 이용하여 목적하는 단편을 분리하였다.

[0283] 형질전환된 세포로부터 만노프로테인으로부터 유래된 글리칸을 DSA-FACE 을 사용하여 분석하였다. $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 의 A 마이너 분획만이 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 으로 전환된다(도 24). $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로의 불완전한 전환은 비-최적화된 분비 시그널로 인한 것이다. 따라서, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 분비 시그널을, 잘 발현된 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) LIP2 (LIP2pre)로부터 유래한 분비 시그널로 교체하였다. LIP2pre 시퀀스를 합성 올리고뉴클레오타이드 LIP2pre fw gatccatgaagctttccaccatcctcttcacagcctgcgctaccctggccggtac (SEQ ID NO:66) 및 Lip2prepro rv gtaccggccggcgtttctggagaactgcggcctcagaaggagtgatgggggaagggaggcgccg (SEQ ID NO:67)를 합성하고, DNA를 pYLHmA 벡터(BamHI/AvrII 사이트에서)로 복제함으로써 하기 구조: pYLHmDL2pre로 만들었다. ManHDEL 코딩 시퀀스를 올리고뉴클레오타이드 ManHDEL Eco47III fw (GgcAGCGCTacaaaacgttgatctcccaac (SEQ ID NO:68)) 및 ManHDEL AvrII rv (ggcCCTAGGttacaactcgctcgtagcaag (SEQ ID NO:69))를 사용하여 pGAPZMManHDEL로부터 PCR 증폭하고 pYLHmDL2pre으로 복제하였다. 구조 전략은 도 25에 표시되어 있다. 플라스미드를 NotI 로 절단(digestion) 및 단편을 분리한 후 발현 카세트(컨스티튜티브 프로모터 hp4d의 조절 하에 L2preManHDEL로)를 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) och1 스트레인으로 형질전환시켰다. 분비된 단백질로부터 유래된 글리칸을 DSA FACE 을 사용하여 분석하였다. $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로부터 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로의 전환이 발생하였으나, 반응은 불완전하였다(중간 생성물 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 및 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 뿐만 아니라 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 도 존재함. 도 26)

[0284] $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$, 및 $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 의 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 로의 트리밍을 향상시키기 위하여, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) α -1,2-만노시다제를 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:9; Fig. 4 2)에서 발현시키기 위하여 코돈 최적화하였고, LIP2 프리 시그널 시퀀스로 융합하였다. 상기 융합 구조는 4 개의 상이한 프로모터의 조절 하에 발현되었다: (i) hp4d, (ii) GAP(SEQ ID NO:10; 도 43), (iii) POX2, 및 (iv) TEF1. 최종 발현 플라스미드는 pYLHUXDL2preManHDEL (SEQ ID NO: 11; 도 44A 내지 44C) pYLUXDL2preManHDEL (SEQ ID NO:12; 도 45A 내지 45C) pYLPUXDL2preManHDEL (SEQ ID NO:13; 도 46A 내지 46C) pYLTUXDL2preManHDEL (SEQ ID NO:14; 도 47A 내지 47C)로 명명하였다. 상기 4 개의 플라스미드를, 플라스미드를 NotI로 절단하고 ManHDEL 발현 카세트를 함유하는 단편으로 분리한 후에 알로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) MTLY60 Δ och1 스트레인(실시예 2 에 기재됨)으로 형질전환하였다. hp4d, GAP 및 TEF 프로모터(플라스미드 pYLHUXDL2preManHDEL, pYLUXDL2preManHDEL 및 pYLTUXDL2preManHDEL)의 조절 하에 ManHDEL으로 형

질전환된 스트레인을 YPD에서 배양하였다.

- [0285] 형질전환된 스트레인의 분비된 단백질을로부터 유래된 글리칸을 DSA FACE 를 사용하여 분석하였다. 결과를 도 48에 도시하였다. 또한, 변이체(pYLPUXdL2preManHDEL 플라스미드를 포함하는 변이체 포함)를 올레산(oleic acid, 단백질 생성 조건)을 포함하는 배지에서 배양시키고, 글리칸을 DSA-FACE 를 사용하여 분석하였다. 하나의 벡터, pYLTUXdL2preManHDEL로부터의 데이터를 도 49에 나타내었다. 데이터로부터 알 수 있듯이, 48 시간 배양으로 거의 모든 글리칸이 Man₅GlcNAc₂으로 전환되었다.
- [0286] 실시예 12: 유전자 발현을 조절하는 POX2 프로모터의 배양 조건
- [0287] 새로운 플레이트의 단일 콜로니로부터 배양을 시작하여, 250 rpm 인 오비탈 셰이커(orbital shaker) 중 50 mL 튜브로 28 °C에서 10 mL YPD에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음으로 22 mL 의 생산 배지(production medium)(2.5 mL 올레산 에멀전 포함)를 함유하는 250 mL 셰이크 플라스크(shake flask)를 0.2의 최종 OD600에서 선배양(preculture)하여 접종하였다. 상기 배지를 250 rpm 인 오비탈 셰이커(orbital shaker) 중 28 °C에서 인큐베이션하였다. 96 시간 배양하는 동안 다양한 시간 포인트에서 배지 샘플을 취하였다.
- [0288] 올레산 에멀전(20%)은 하기 방법으로 제조한다:
- [0289] 멸균 50 mL 용기(vessel)에 다음을 가한다;
- [0290] 20 mL 멸균수;
- [0291] 5 mL 올레산; 및
- [0292] 125 µL Tween 40.
- [0293] 에멀전 제형으로 만들기 위하여 75Hz 에서 1 분 동안 초음파 분해처리(Sonication)을 수행하였다.
- [0294] 다음으로 구성되는 배지 생산:
- [0295] 1% 효모 추출물;
- [0296] 2% 트립톤(trypton);
- [0297] 1% 글루코스; 및
- [0298] 50 mM 포스페이트 pH 6.8.
- [0299] 실시예 13: 사람의 글루코세레브로시다제의 발현
- [0300] 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:15; Fig. 50)에서 발현되기 위하여 코돈-최적화된 cDNA 으로 사람의 글루코세레브로시다제(GLCM, Swiss Prot entry nr: P04062)를 화학적으로 합성하였다.
- [0301] 성숙한 단백질의 코딩 시퀀스가 LIP2 프리 시그널 시퀀스의 코딩 시퀀스로 용융되었다. 상기 용융 구조를 올레산 유도 가능한 POX2 조절 하에 복제하였다. 생성된 플라스미드를 pYLPUXL2preGLCM (=pRAN21)으로 명명하였다. 형질전환 전에, 플라스미드를 NotI로 절단(digested)하였고, 발현 카세트를 함유하는 단편을 분리하여 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60, MTLY60 Δ ochI(실시예 2에 기재됨), 및 MTLY60 Δ ochManHDEL (described in Example 11)으로 형질전환되었다. 상기 3개의 스트레인으로부터 수득한 형질전환체를 실시예 12에 따라 배양하였다. 상기 기재된 바와 같이 상층액으로부터 침전된 단백질을 SDS-PAGE 분석하여, 래트 모노클로날 안티-글루코세레브로시다제 항체(Alessandrini et al. (2004) J. Invest. Dermatol 23(6):1030-6)를 사용하여 이뮤노블롯하였다. 전형적인 이뮤노블롯 분석을 도 51에 도시하였다. 도 51을 참조하면, ochI 분열 스트레인에서 번짐 현상(smearing)이 일어나지 않는 반면(레인 1, 2, 및 3), 단백질의 이질성(heterogeneity)을 와일드 타입 세포의 번짐으로부터 확인할 수 있다(레인 4 및 6). ManHDEL을 발현하는 효모의 스트레인으로부터 수득된 단백질 중에서는 단백질의 번짐 현상(smearing)이 관찰되지 않았다. 이로부터, 유전적으로 엔지니어드된 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) 세포 MTLY60 Δ ochI 및 MTLY60 Δ och1ManHDEL을 사용함으로써 타겟 단백질의 더 균질한 균집을 수득할 수 있음을 알 수 있다.
- [0302] 실시예 14: 사람 에리스로포이에틴의 발현
- [0303] 알로위아 리포르티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:16; Fig. 52)에서 발현되기 위하여 코돈-최적화된 cDNA 를 인코딩하는 사람 에리스로포이에틴(Epo, Swiss Prot entry nr: P01588)을 화학적으로 합성하였다. 성숙한 단백질에 대한 cDNA 코딩 시퀀스가 LIP2 프리 시그널 시퀀스의 코딩 시퀀스로 용융되었다. 상기 용융 구조를 올레

산 유도 가능한 POX2 조절 하에 복제하였다. 생성된 플라스미드를 pYLPUXL2prehuEPO 으로 명명하였다. 형질전환 전에, 플라스미드를 NotI로 절단(digested)하였고, 발현 카세트를 함유하는 단편을 분리하여 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60 Δ *ochI*(실시예 2에 기재됨)으로 형질전환하였다. 형질전환체 후보들을 실시예 12에 따라 배양하였고, 분비된 단백질을 R&D 시스템(클론 AE7A5)으로부터 수득한 모노클로날 마우스 항 사람 Epo 항체(monoclonal mouse anti human Epo antibody)를 사용하여 SDS PAGE한 후에 웨스턴 블롯(western blot)으로 분석하였다. 세포로부터 수득한 EPO 생성물은 매우 균일한 글리코실화를 나타내었다.

[0304] 실시예 15: 사람 α -갈락토시다제 A의 발현

[0305] 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) (SEQ ID NO:17; Fig. 53)에서 발현되기 위하여 cDNA 로서 cDNA 인 코딩된 사람의 α -갈락토시다제 A(AGAL, Swiss Prot entry nr: P06280)을 화학적으로 합성하였다.

[0306] 성숙한 단백질에 대한 cDNA 코딩 시퀀스가 LIP2 프리 시그널 시퀀스의 코딩 시퀀스로 용융되었다. 상기 용융 구조를 올레산 유도 가능한 POX2 조절 하에 복제하였다. 생성된 플라스미드를 pYLPUXL2preGalase 으로 명명하였다. 형질전환 전에, 플라스미드를 NotI로 절단하였고, 발현 카세트를 함유하는 단편을 분리하여 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 스트레인 MTLY60 및 MTLY60 Δ *och1MNN4* (실시예 4에 기재됨)으로 형질전환하였다. 상기 2 개의 스트레인으로부터 수득한 형질전환체를 실시예 12에 기재된 바에 따라 배양하였다. 형질전환체로부터 수득한 세포의 단백질을 SDS-PAGE 분석 후에 면역블롯으로 분석하였다. α -갈락토시다제 A(Abcam (ab28962)으로부터 수득한 닭의 폴리클로날 항체 및 Santa Cruz Biotechnology (sc-25823)로부터 공급받은 토끼 폴리클로날 항체)에 특이적인 두 개의 항체를 발현된 사람 α -갈락토시다제 A 단백질을 검출하는데 사용하였다.

[0307] 실시예 16. 와일드타입 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 에 있어서의 만노시다제의 발현

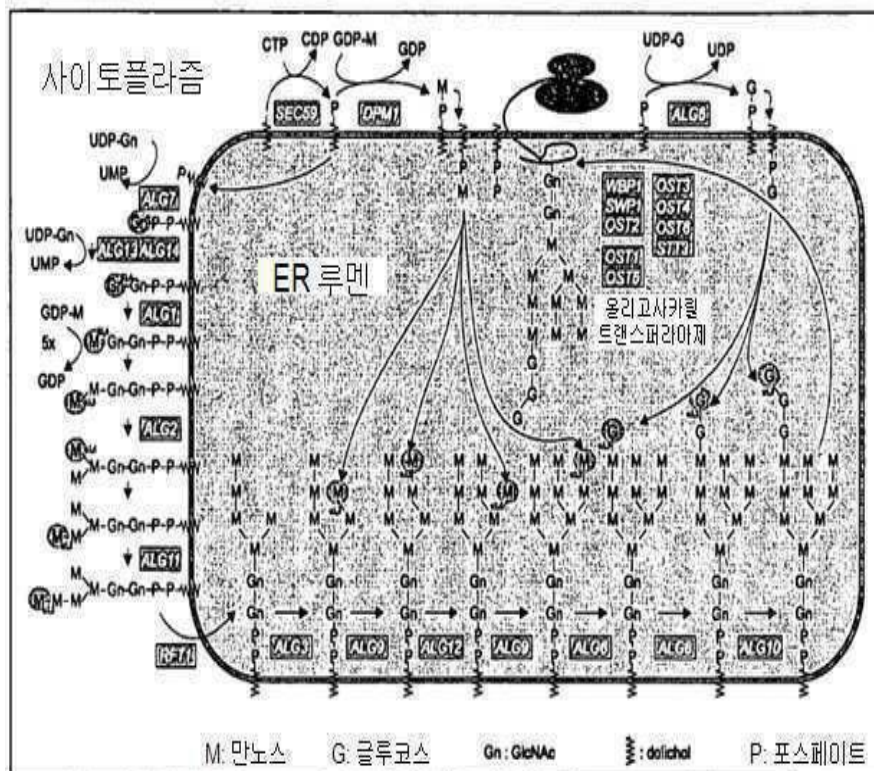
[0308] MannosidaseHDEL 만의 발현으로(기능적인 OCH1 유전자를 함유하는 세포에 있어서) 진균 세포로 발현된 단백질의 더욱 균일한 글리코실레이션을 생성할 수 있는지를 결정하기 위하여, MannosidaseHDEL(실시예 11 참조)를 인코딩하고 있는 핵산을 함유하는 발현 카세트를 와일드 타입 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*) 폴드 세포(pold cells)로 형질전환시켰다. 세포로부터 수득된 분비된 단백질로부터 유래한 글리칸을 DSA-FACE 로 분석하였다(도 55). 분석된 글리칸은 주로 Man₅GlcNAc₂ 로 이루어지고 마이너 파트로 Man₆GlcNAc₂으로 이루어진다. 상기 결과로부터 OCH1 유전자의 분열이 없는 경우 MannosidaseHDEL 만의 발현으로 알로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)에 의해 발현된 단백질의 더 균일한 글리코실레이션이 유발됨을 확인할 수 있었다.

[0309] 다른 구체예

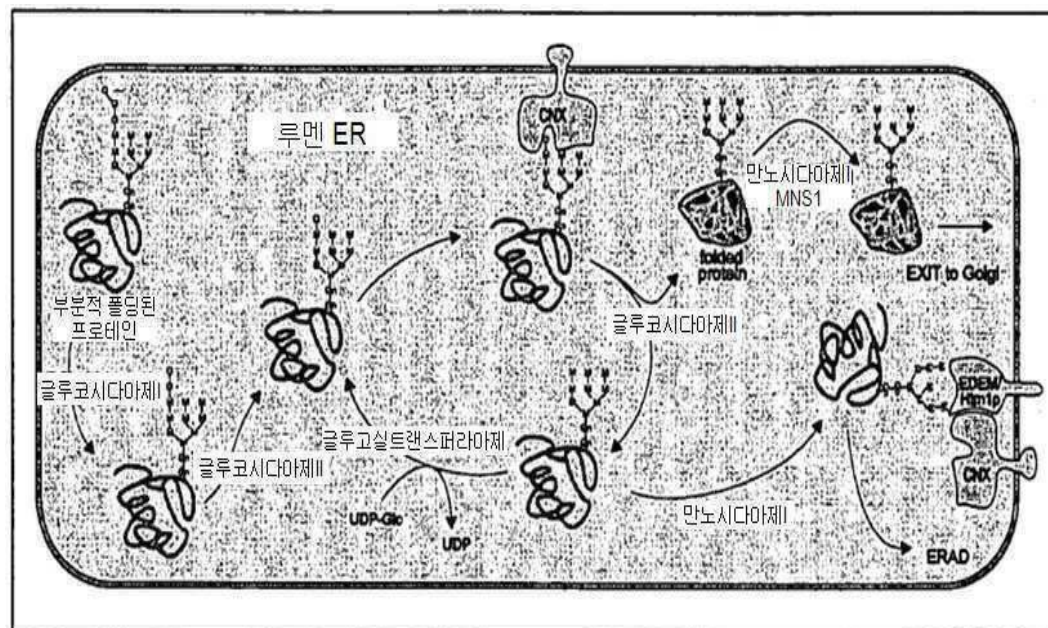
[0310] 본 발명이 상세한 설명의 기재에 의해 기술되었으나, 상기 상세한 설명은 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항에 의하여 정의 된다. 다른 관점, 장점 및 변형들은 하기 청구항에 포함된다.

도면

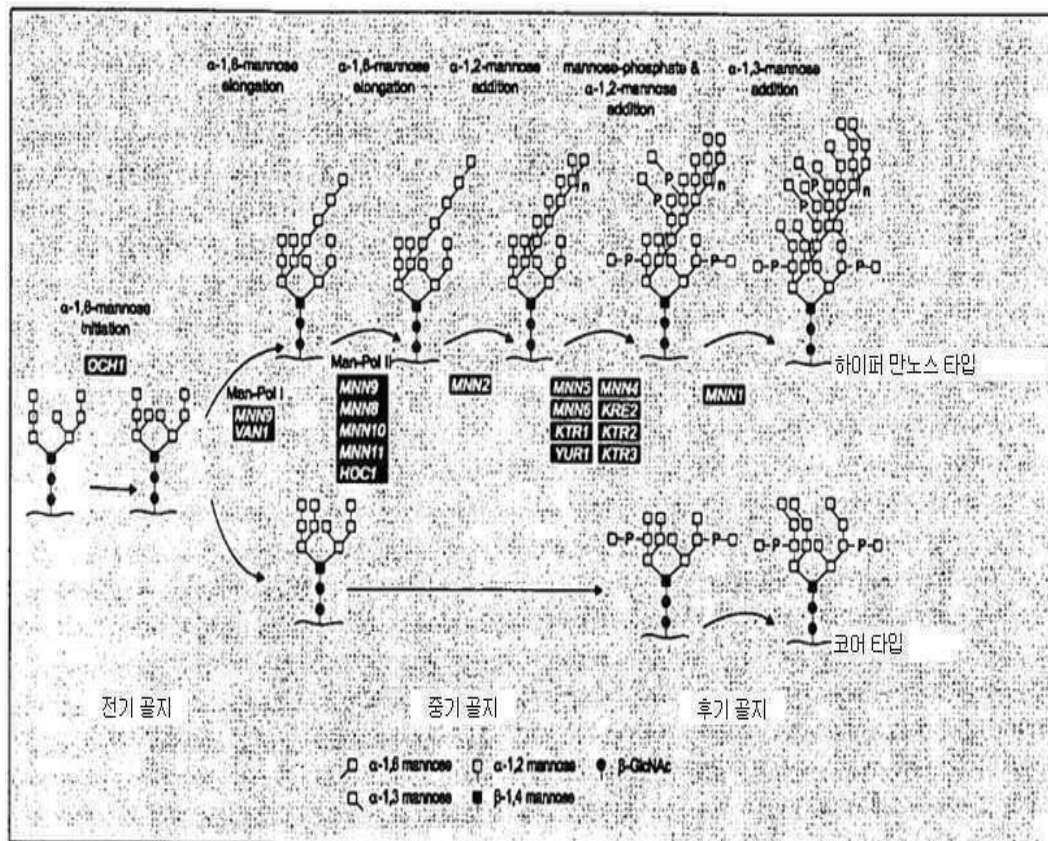
도면1



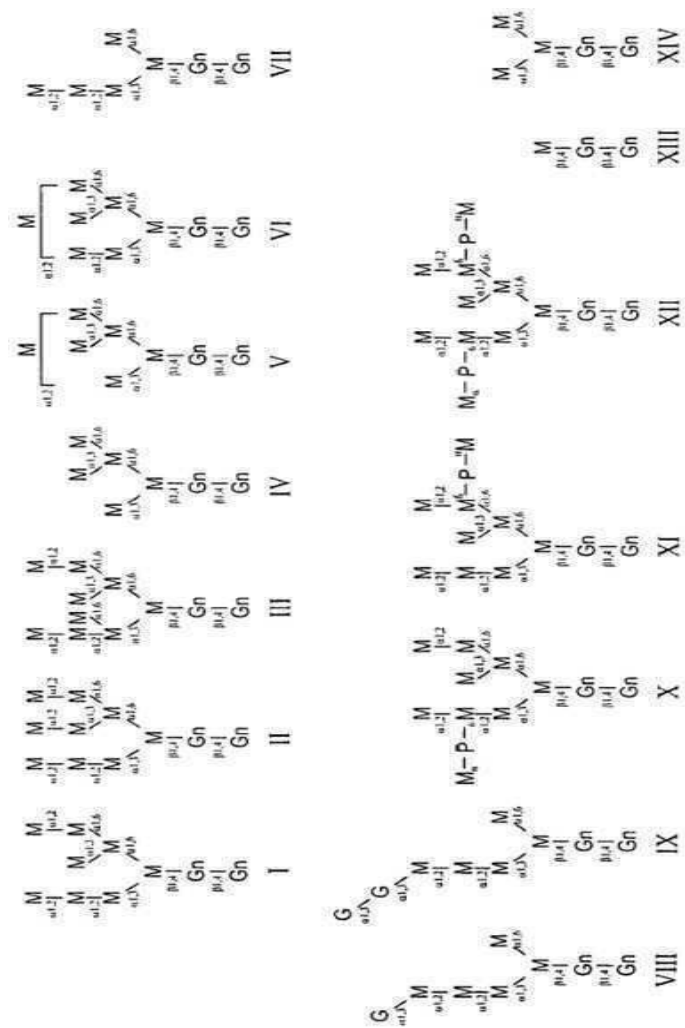
도면2



도면3

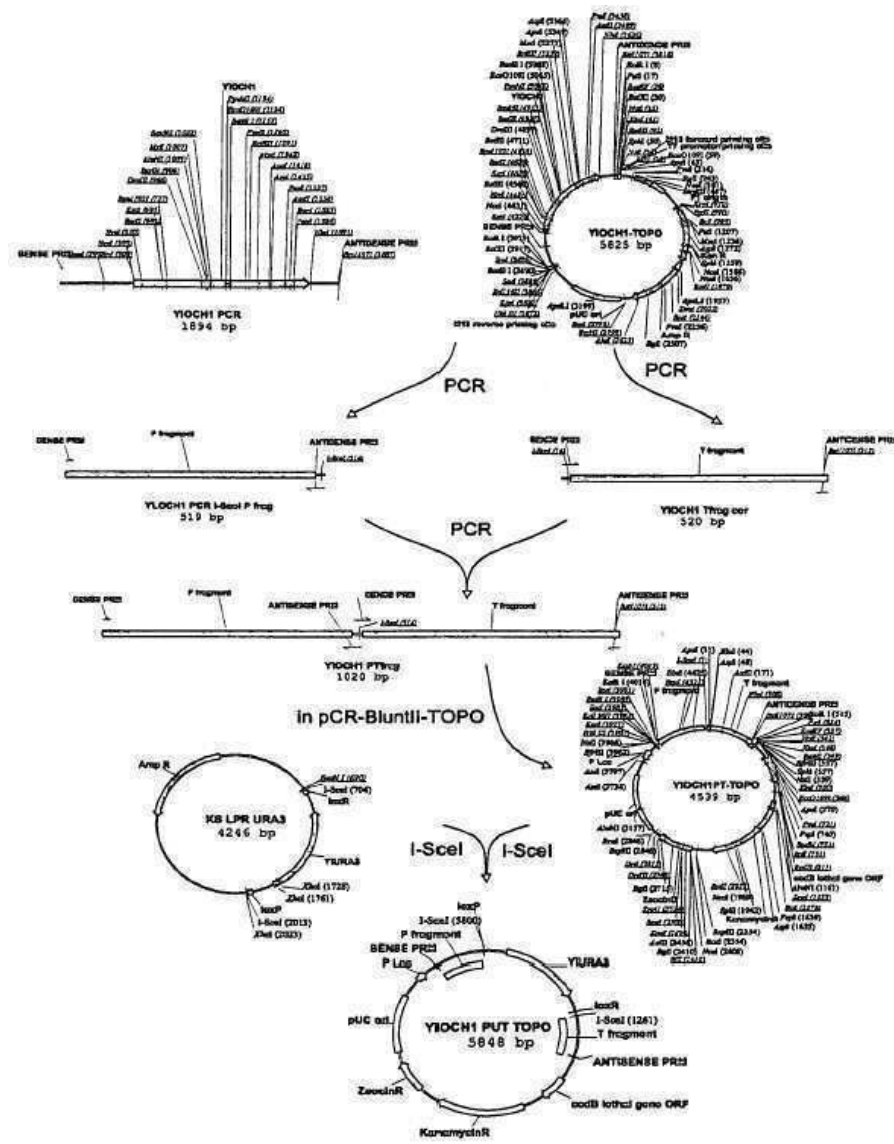


도면4

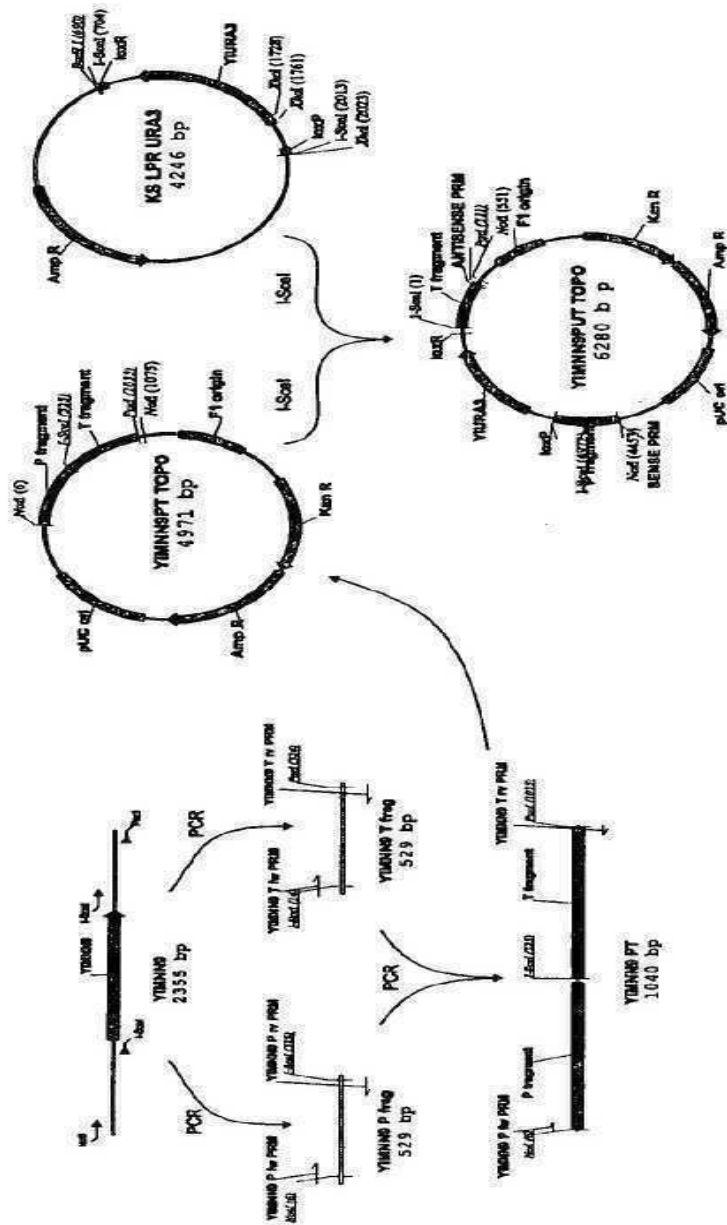


M: 만노스 G: 글루코스 Gn: N-아세틸글루코사민 P: 포스페이트

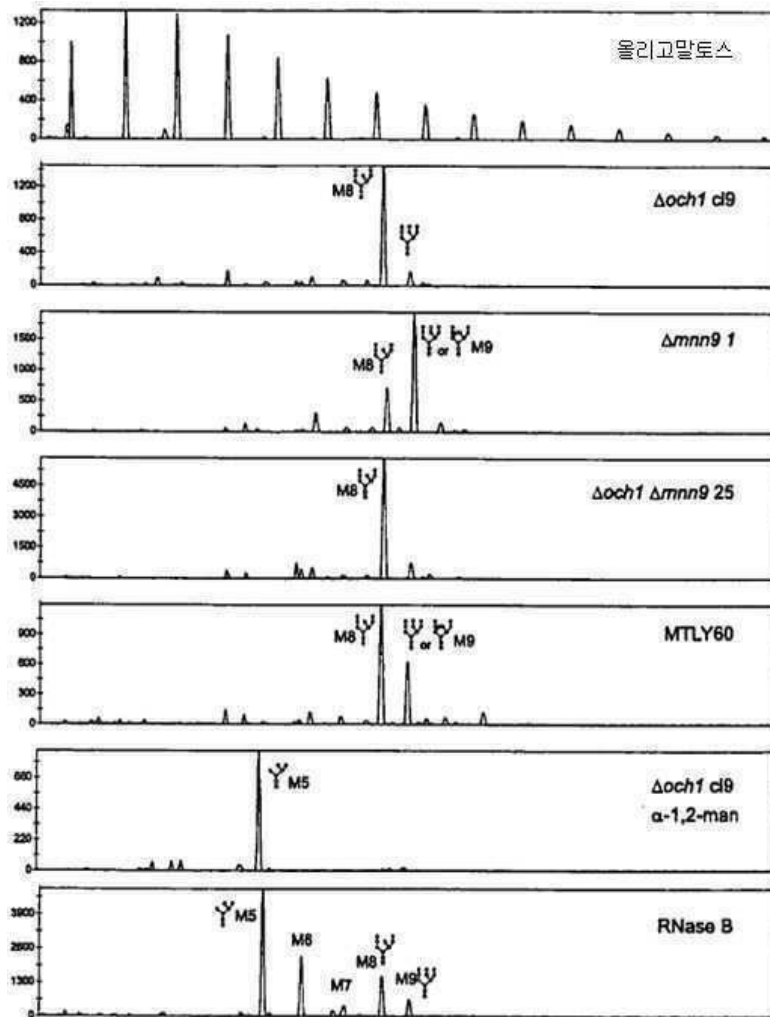
도면5



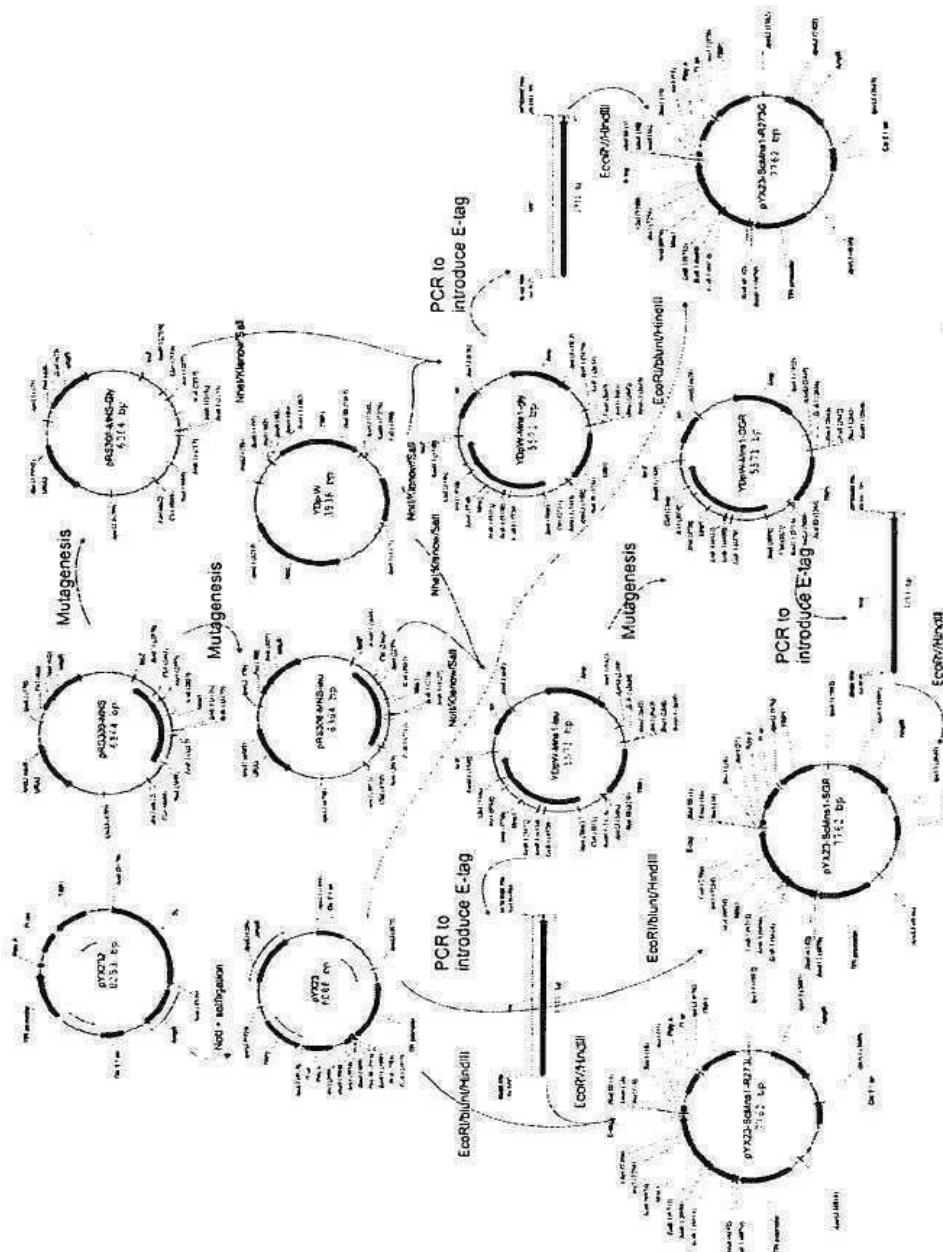
도면6



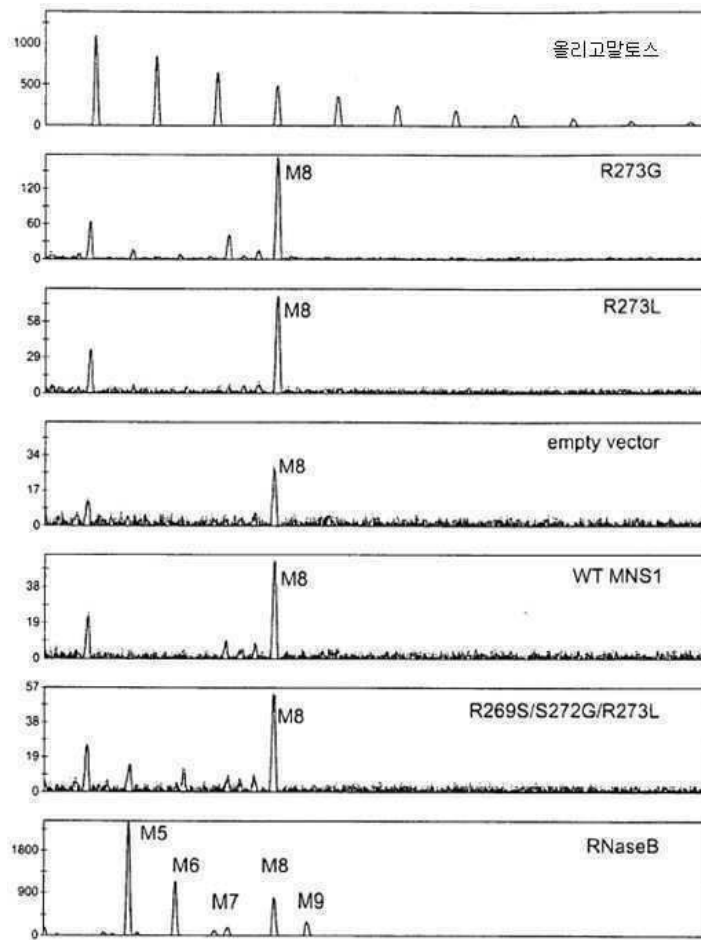
도면7



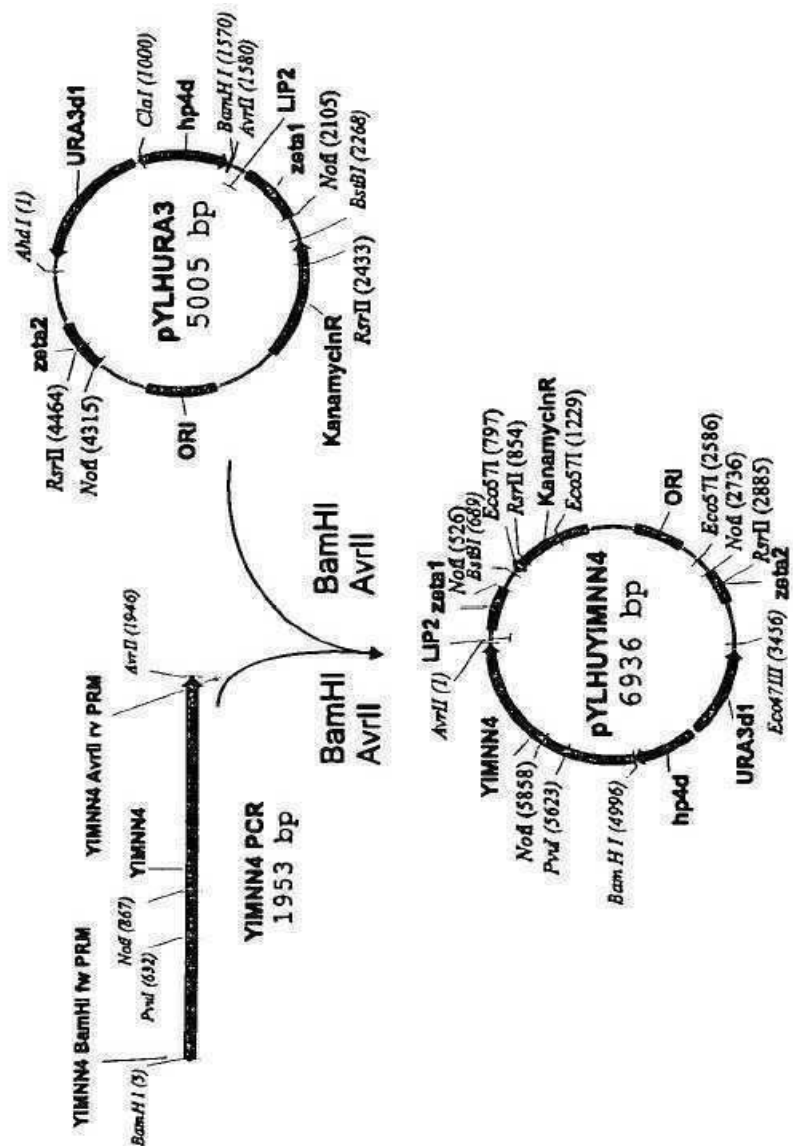
도면8



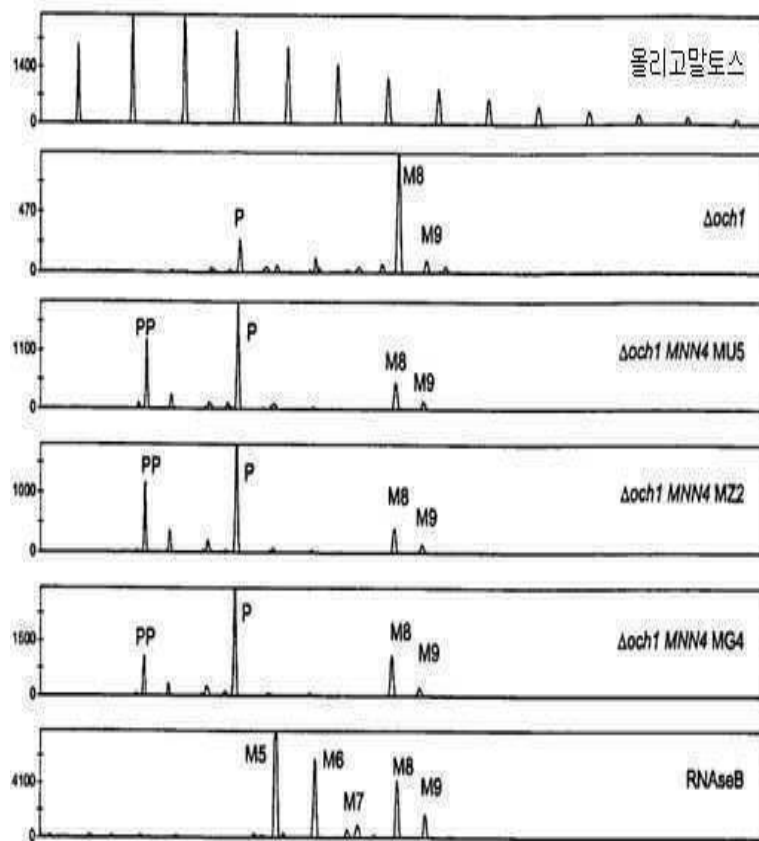
도면9



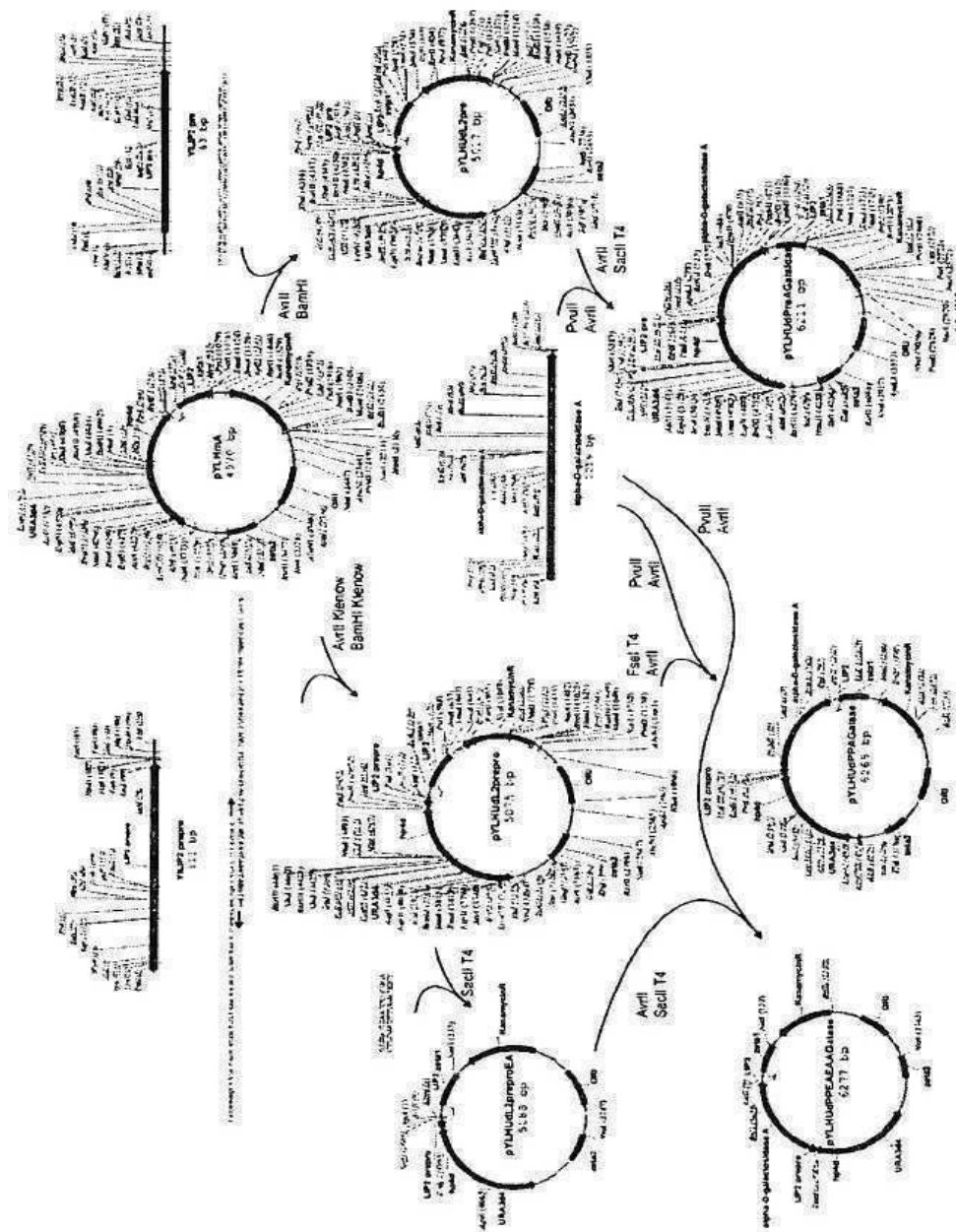
도면10



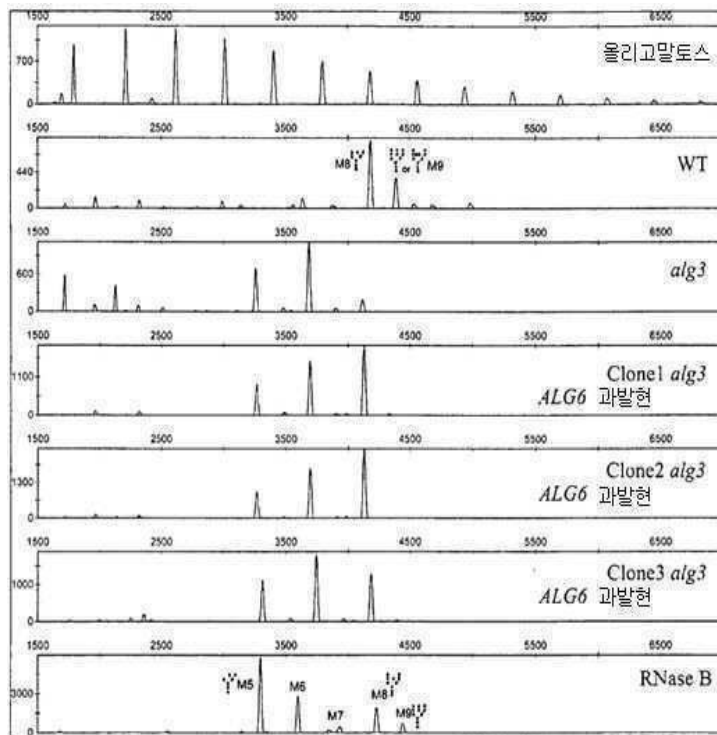
도면11



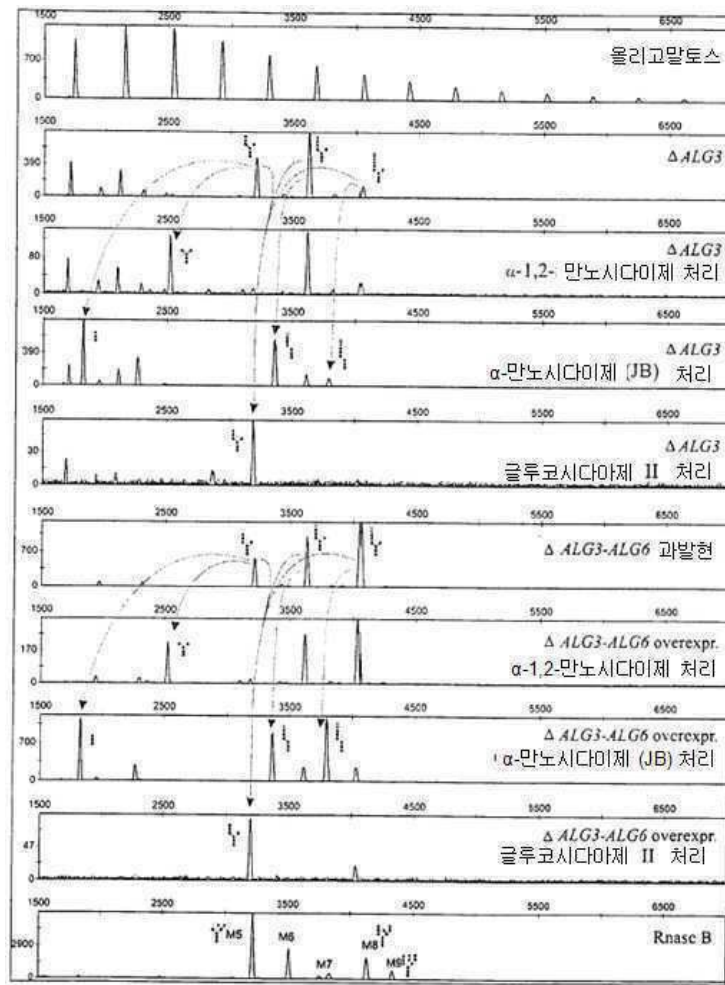
도면12



도면13



도면14



도면15

서열	GGTCTCGCCAGCGCGCCACCCTCTTCAACCACGATAATGAGACCGTCGT
HAC1YL	GGTCTCGCCAGCGCGCCACCCTCTTCAACCACGATAATGAGACCGTCGT
서열	CCCCGACTCTCCTATTGTGAAGACCGAGGAAGTCGACTCTACAACTTTC
HAC1	CCCCGACTCTCCTATTGTGAAGACCGAGGAAGTCGACTCTACAACTTTC
서열	TCCTCCACACGGAGTCCTCCTCCCCCCCCGAAGTAGCTGAGAGCACTGGC
HAC1	TCCTCCACACGGAGTCCTCCTCCCCCCCCGAAGTAGCTGAGAGCACTGGC
서열	TCAGGCTCGCCATCGTCGACTCTGTCTGCGACGAACTGATTATCTTGT
HAC1	TCAGGCTCGCCATCGTCGACTCTGTCTGCGACGAACTGATTATCTTGT
서열	GGACCGGGCGCGTCATCCAG-----C
HAC1	GGACCGGGCGCGTCATCCAGCAGTGATGACTGTGCGAACTACTGACCAGC
서열	AGCGTCGCGACAAAGATTTCWTTTTCATCAAGGACGAGCCCGTTGACGACG
HAC1	AGCGTCGCGACAAAGATTTCATTTTCATCAAGGACGAGCCCGTTGACGACG
서열	AGCTTGGACTGCATGGACTGTCGGATGACTTCACCCTGTTTGAAGACAAC
HAC1	AGCTTGGACTGCATGGACTGTCGGATGACTTCACCCTGTTTGAAGACAAC
서열	AAGCAGCCTGCCCAGCACGACTTTATTGCTGATCTAG
HAC1	AAGCAGCCTGCCCAGCACGACTTTATTGCTGATCTAG

도면16

5' 스플라이스 사이트	
<i>P. pastoris</i>	atccagcagtgatgacg
<i>S. cerevisiae</i>	atccagccgtgattacg

3' 스플라이스 사이트	
<i>P. pastoris</i>	ggtctgcagcaccat
<i>S. cerevisiae</i>	tgctccgaagcgagt
	*** * *

도면17a

NI.	1	atgcccgtagattcttctcataagacagctagccacttccacctcgtaa	50
I.	1	atgcccgtagattcttctcataagacagctagccacttccacctcgtaa	50
NI.	51	aagagcaaagacggaagaagaaaaggagcagcgtcgagtggaacgtatcc	100
I.	51	aagagcaaagacggaagaagaaaaggagcagcgtcgagtggaacgtatcc	100
NI.	101	tacgtaataggagagcggcccatgcttccagagagaagaaacgaagacac	150
I.	101	tacgtaataggagagcggcccatgcttccagagagaagaaacgaagacac	150
NI.	151	gttgaatttcttgaaaaccacgtcgtcgacctggaatctgcacttcaaga	200
I.	151	gttgaatttcttgaaaaccacgtcgtcgacctggaatctgcacttcaaga	200
NI.	201	atcagccaaagccactaacaagttgaaagaaatacaagatatcattgttt	250
I.	201	atcagccaaagccactaacaagttgaaagaaatacaagatatcattgttt	250
NI.	251	caagggtggaagccttaggtggtaccgtctcagatttggatttaacagtt	300
I.	251	caagggtggaagccttaggtggtaccgtctcagatttggatttaacagtt	300
NI.	301	ccggaagtcgattttcccaaatcttctgatttggaaacctatgtctgatct	350
I.	301	ccggaagtcgattttcccaaatcttctgatttggaaacctatgtctgatct	350
NI.	351	ctcaacttcttcgaaatcggagaaagcatctacatccactcgcagatctt	400
I.	351	ctcaacttcttcgaaatcggagaaagcatctacatccactcgcagatctt	400
NI.	401	tgactgaggatctggacgaagatgacgtcgtgaatatgacgacgaagaa	450
I.	401	tgactgaggatctggacgaagatgacgtcgtgaatatgacgacgaagaa	450
NI.	451	gaggacgaagagttaccaggaaaaatgaaagtcttaaacgacaaaaacaa	500
I.	451	gaggacgaagagttaccaggaaaaatgaaagtcttaaacgacaaaaacaa	500
NI.	501	gagcacatctatcaagcaggagaagttgaatgaacttccatctcctttgt	550
I.	501	gagcacatctatcaagcaggagaagttgaatgaacttccatctcctttgt	550
NI.	551	catccgatttttcagacgtagatgaagaaaagtcaactctcacacattta	600
I.	551	catccgatttttcagacgtagatgaagaaaagtcaactctcacacattta	600
NI.	601	aagttgcaacagcaacaacaacaaccagtagacaattatgtttctactcc	650
I.	601	aagttgcaacagcaacaacaacaaccagtagacaattatgtttctactcc	650

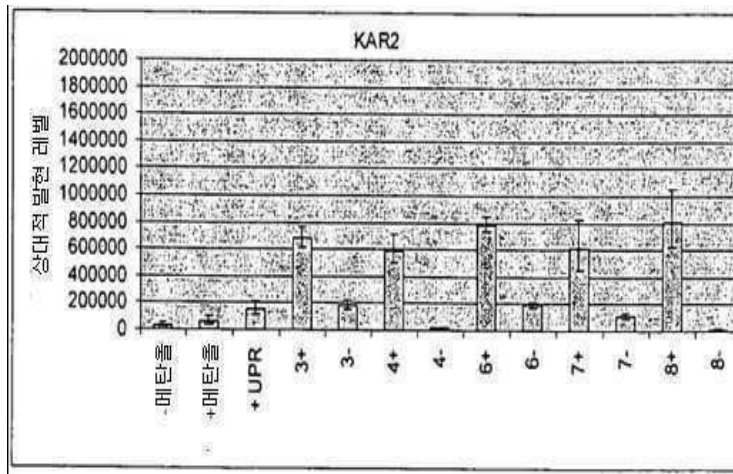
도면17b

NI.	651	tttgagtcttccggaggattcagttgattttattaaccaggttaacttaa	700
I.	651	tttgagtcttccggaggattcagttgattttattaaccaggttaacttaa	700
NI.	701	aaatagagtcgatgagaacttcttgttgagttcaatactttacaata	750
I.	701	aaatagagtcgatgagaacttcttgttgagttcaatactttacaata	750
NI.	751	aaacacgaaaatgacaccgactacattactacagctccatcaggttccat	800
I.	751	aaacacgaaaatgacaccgactacattactacagctccatcaggttccat	800
NI.	801	caatgatttttttaattcttatgacattagcgagtcgaatcggttgcac	850
I.	801	caatgatttttttaattcttatgacattagcgagtcgaatcggttgcac	850
NI.	851	atccagcagtgatgacggattcatctttacacattacagcaggtccatc	900
I.	851	atccag-----	855
NI.	901	ggctttttctctttgattgggggggggaaagtctctgtagcaggaggcg	950
I.	856	-----	855
NI.	951	cagttcagttggcacatatcagttgacatgcatagcgatcaggtgatg	1000
I.	856	-----	855
NI.	1001	tcttggttaactggtatgccaaagtcaaccgttttcggcgtaacctactac	1050
I.	856	-----	855
NI.	1051	tactttaactcttggaattgagatgaaacaatcgcccttggtcgagacgcg	1100
I.	856	-----	855
NI.	1101	tagttaatttaagatgaatcaatttgcaacaaaagaacaaacgaaaaaga	1150
I.	856	-----	855
NI.	1151	taacagcaaaacttaagtttcgtggtctgcagcaccatttaccgctaata	1200
I.	856	-----cagcaccatttaccgctaata	878
NI.	1201	atttgatttaaatgactttgtattcttccaggaatag	1237
I.	879	atttgatttaaatgactttgtattcttccaggaatag	915

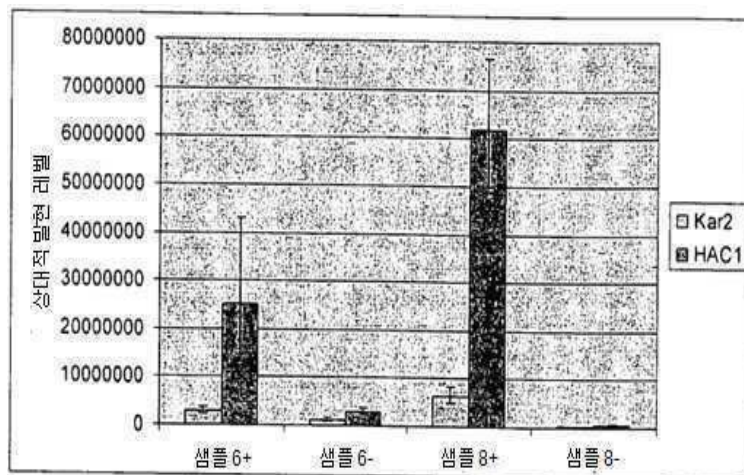
도면18

P.pastoris	1	APFTANAFDLNDFVFFQE	18
		... : : ...	
S.cerevisiae	1	EAQSGLSNFELNDFITS	18

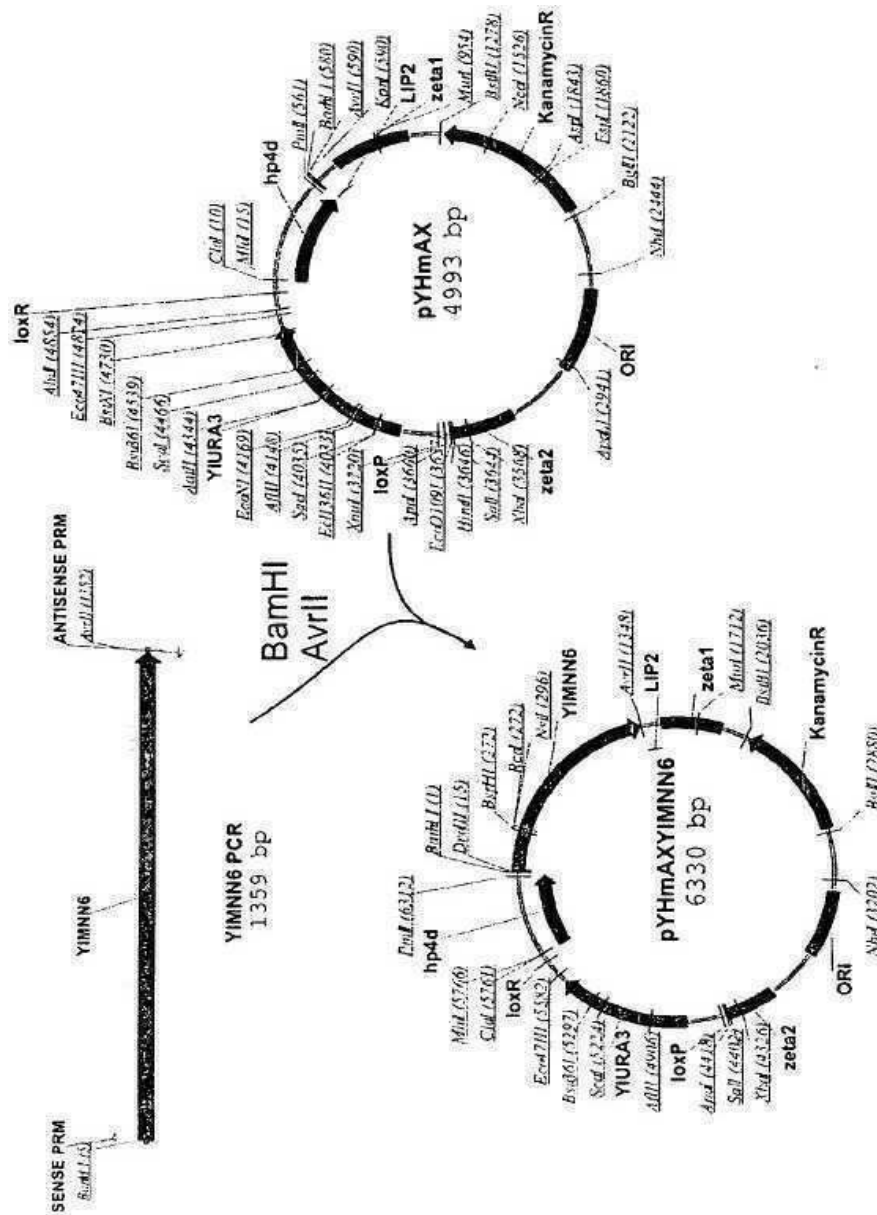
도면19



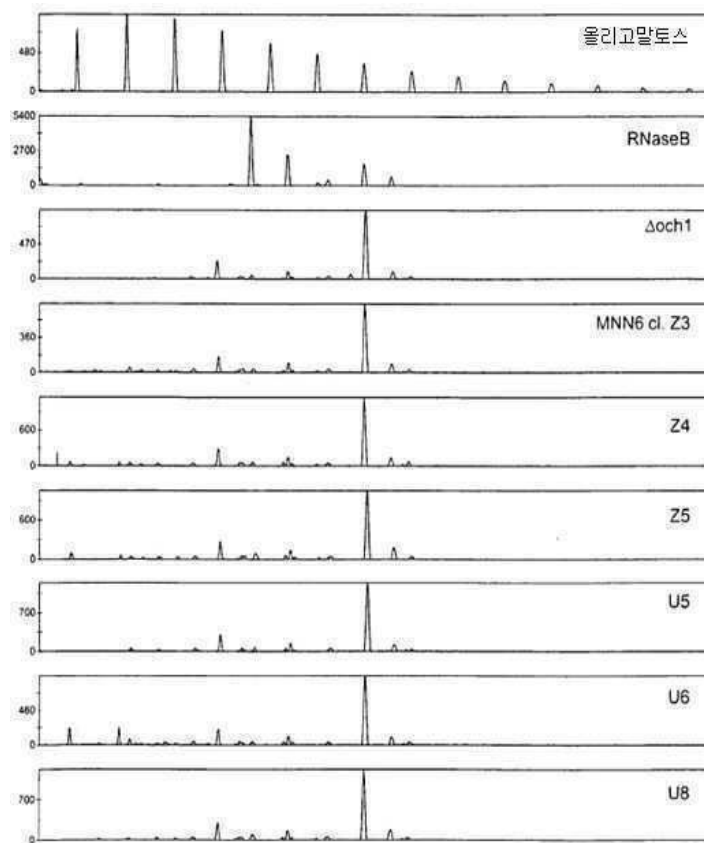
도면20



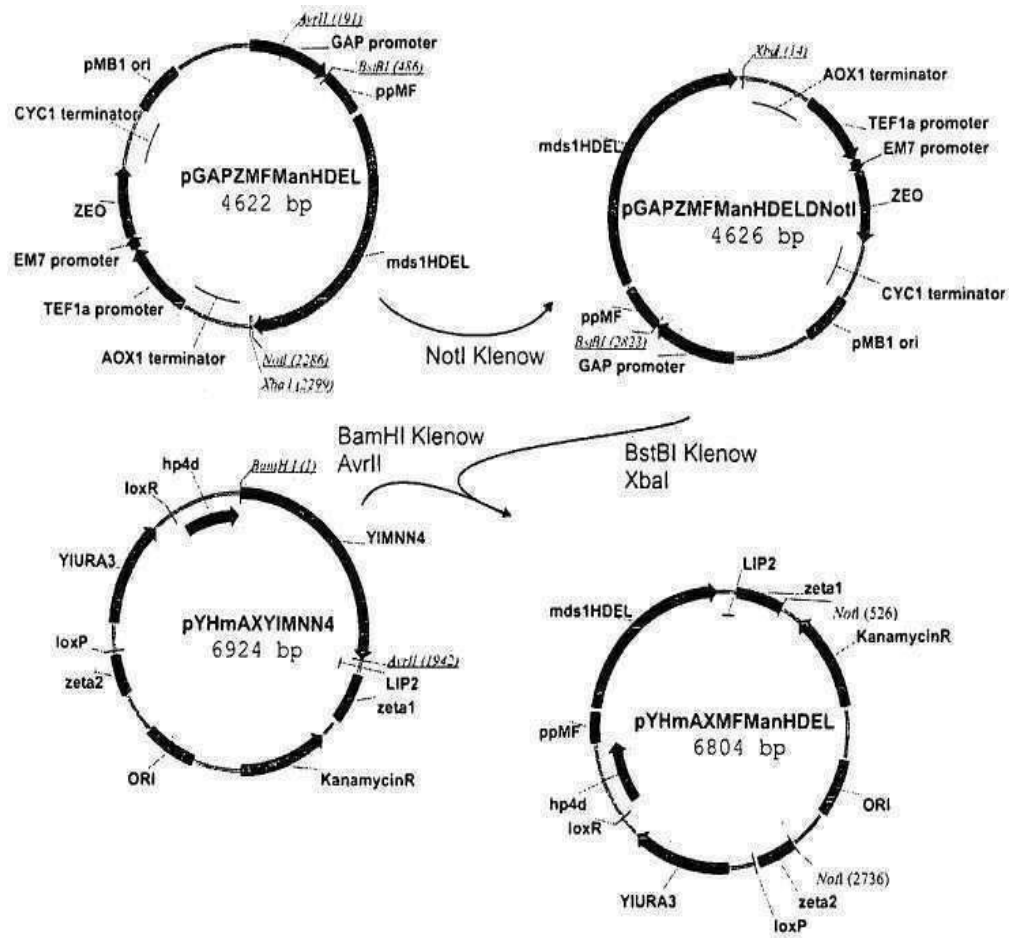
도면21



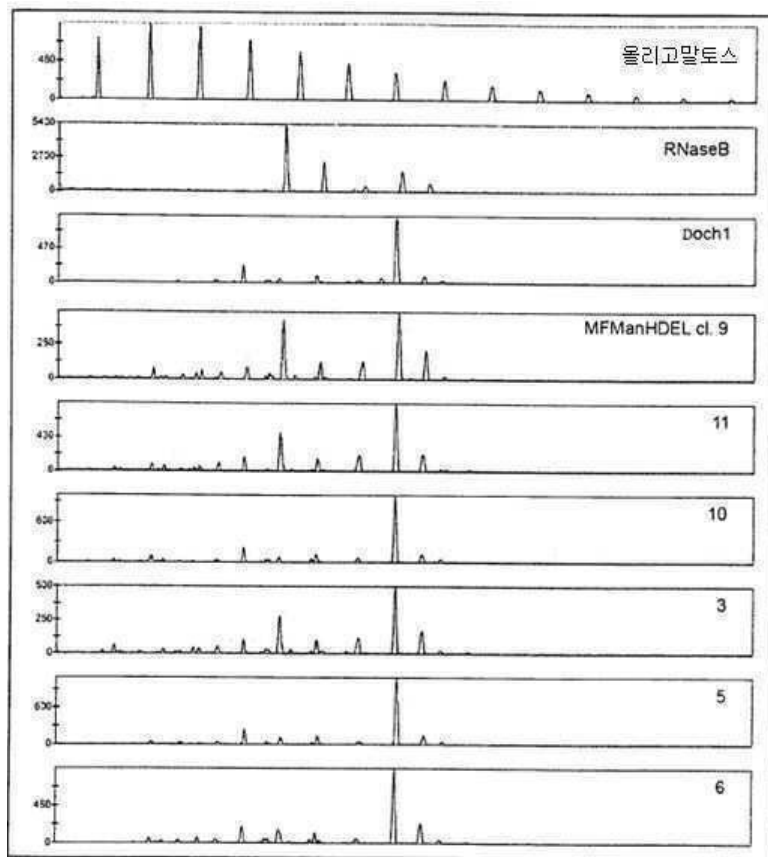
도면22



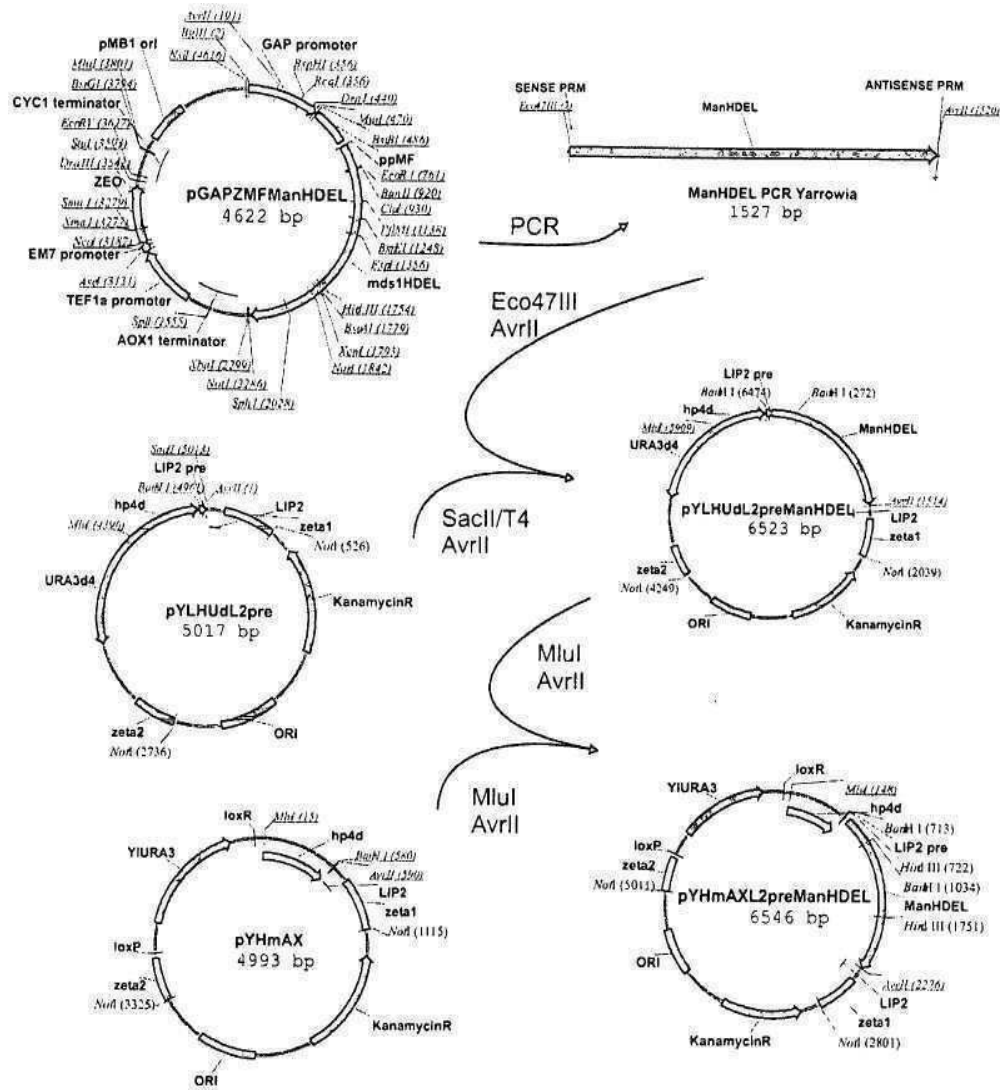
도면23



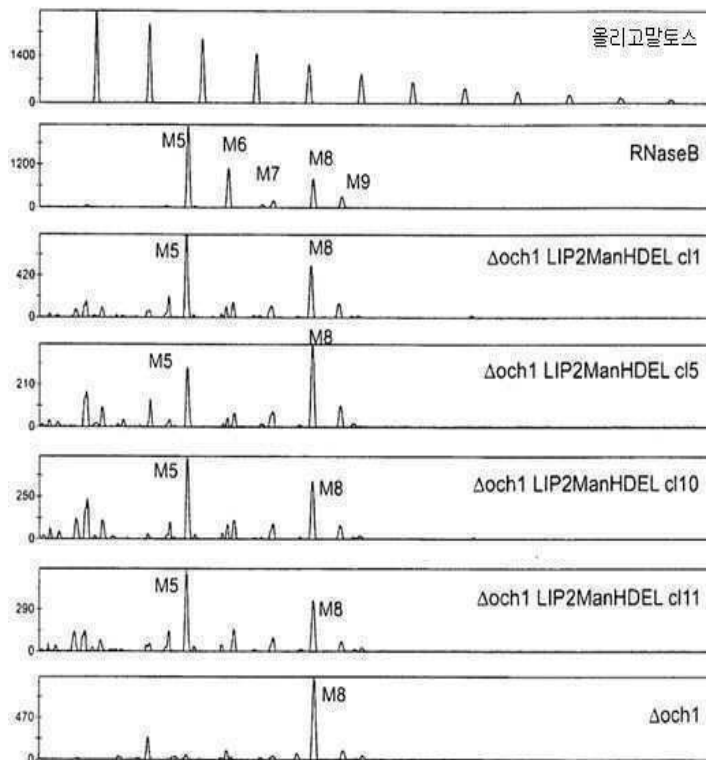
도면24



도면25



도면26



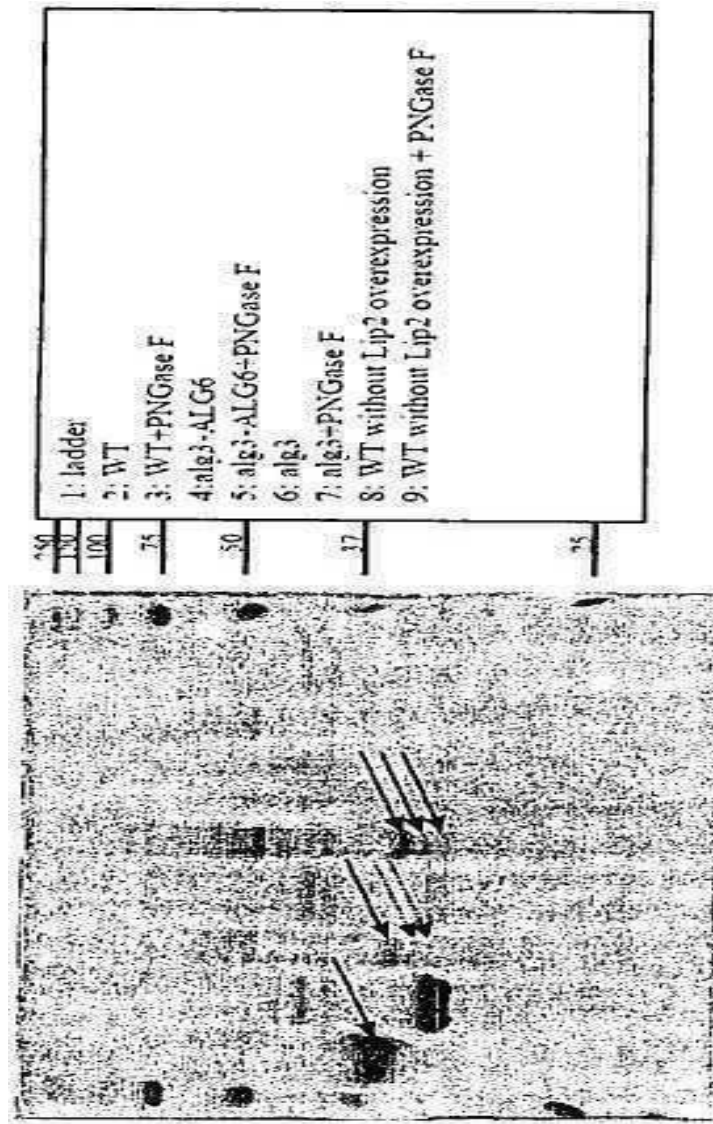
도면27a

MSIKREESFTPTPEDLGSPILTADSPGSPESGDKRKKDLTLP
LPAGALPPRKRAKTENEKEQRRIERIMNRQAHAHASREKKRRH
LEDLEKKCSELSSENNDLHHQVTESKKTNMHLMEQHYSLVAK
LQQLSSLVNMAKSSGALAGVDVPDMSDVSMAPKLEMPAAPS
QPMGLASAPTLFNHDNETVVPDSPIVKTEEVDSTNLLHTESS
PPELAESTGSGSPSSTLSCDETDYLVDRARHPAASAQDFIFIKD
EPVDDELGLHGLSDDFTLFEDNKQPAQHDFIADLAHYESSVSN
LFGGLE

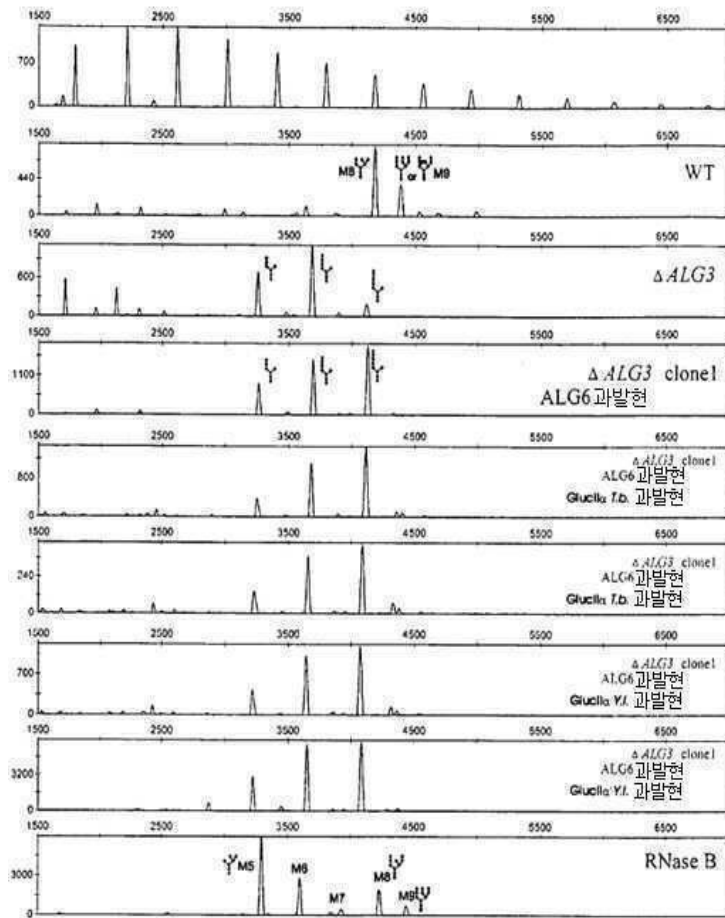
도면27b

MPVDSSHKTASPLPPRKRAKTEEEKEQRRVERILNRRAA
HASREKKRRHVEFLENHVVDLESALQESAKATNKLKEIQDIIV
SRLEALGGTVSDLDLTVPEVDVPKSSDLEPMSDLSTSSKSEKAS
TSTRRLTEDLDEDDVAEYDDEEEDDEELPRKMKVLNDKNKSTS
IKQEKLNELPSPLSSDFSDVDEEKSTLTHLKLQQQQQQPVDNY
VSTPLSLPEDSVDFINPGNLKIESDENFLLSSNTLQIKHENDTD
YITTAPSGSINDFFNSYDISESNRLHHPAAPFTANAFDLNDFVF
FQE

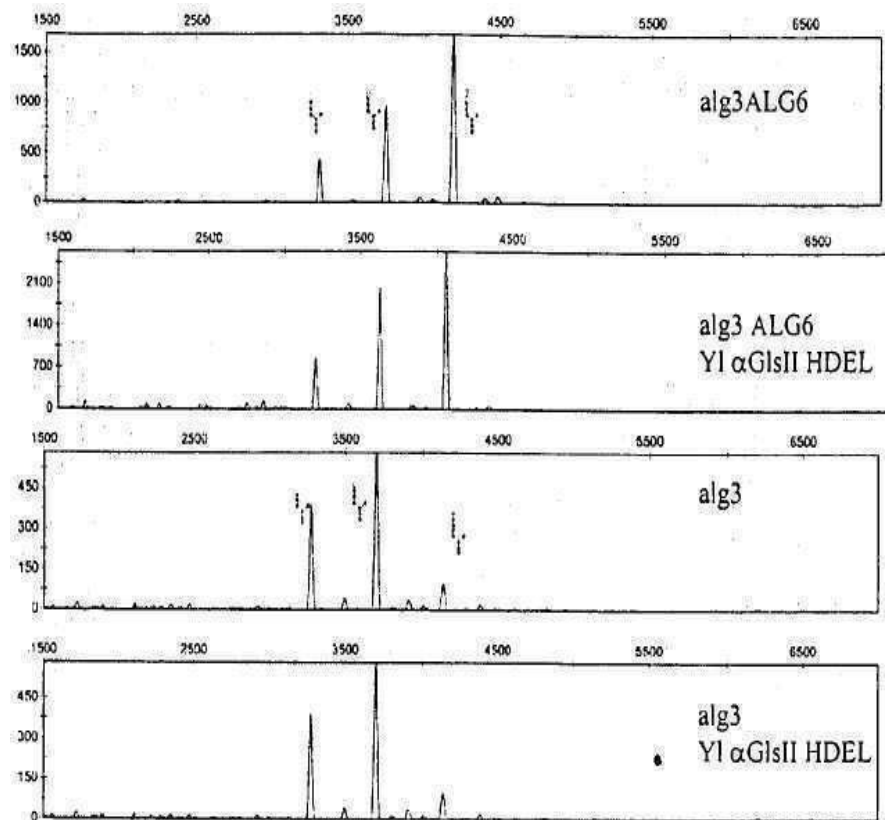
도면28



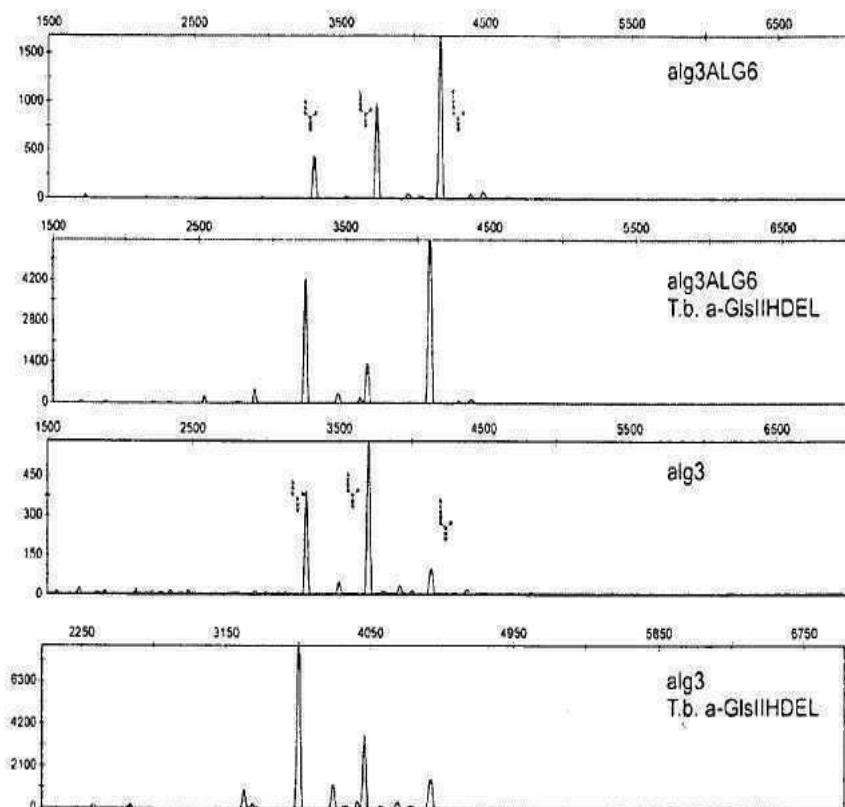
도면29



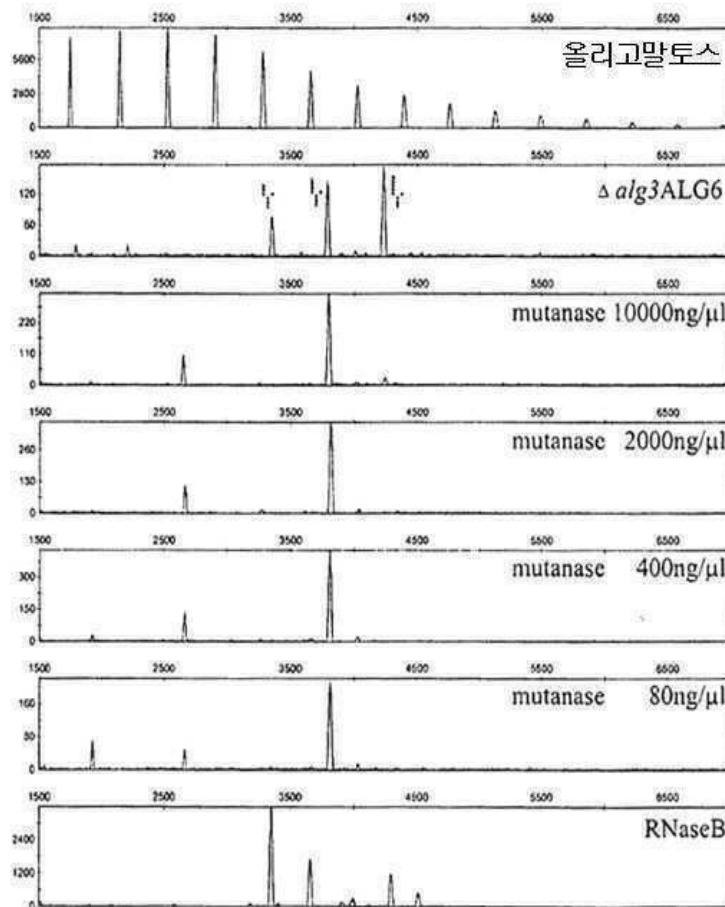
도면30



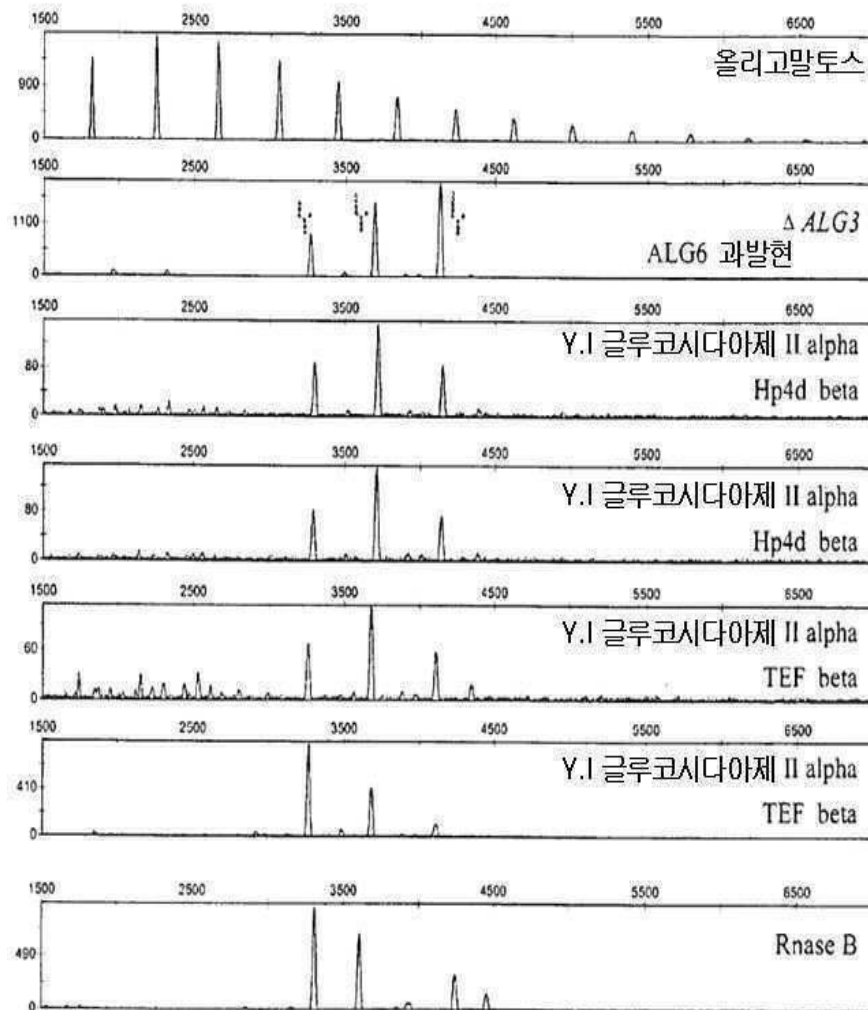
도면31



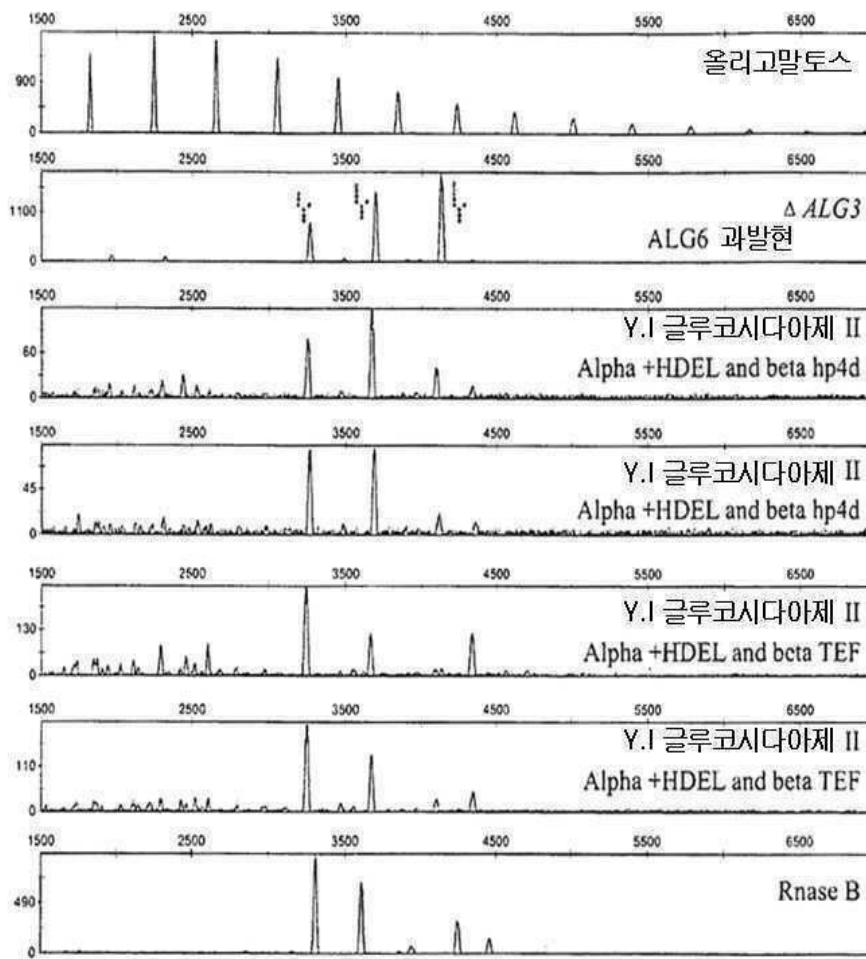
도면32



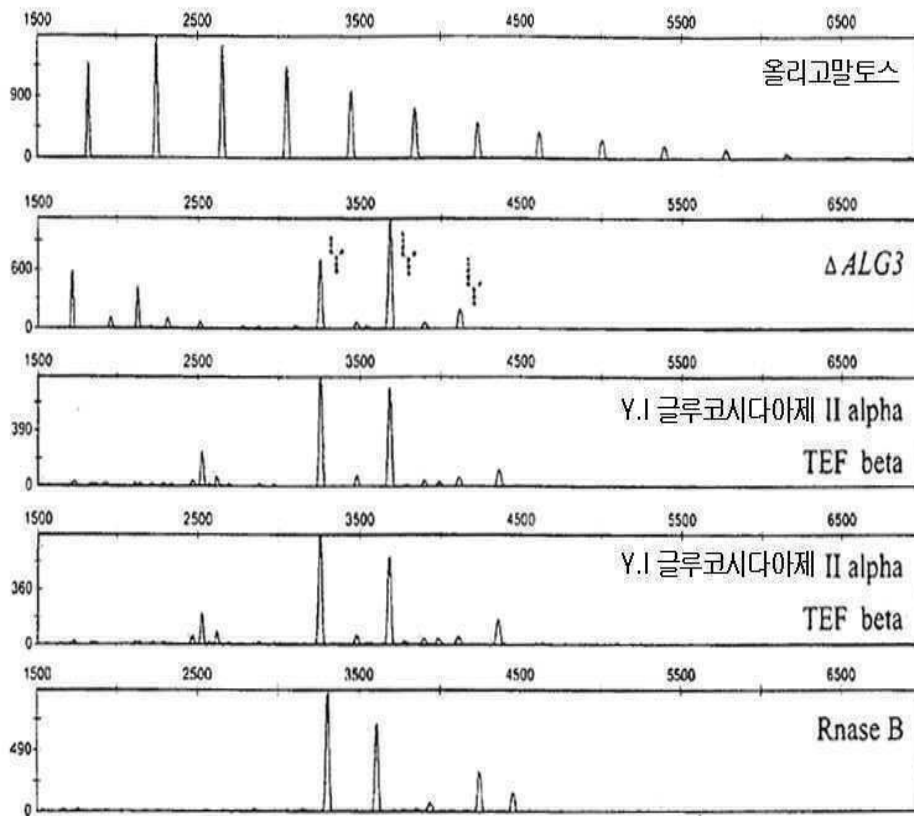
도면33



도면34



도면35



도면36a

gtaaaacacgagaactcaagacctgttctcagctctgcttctgtaagcgaaaccgagccctcgcgacgacgcccgtgcccagggtcttcttgggctctccctacgagctggactcttctctatccagttcaaggacggcagctgcacggcaccatcctgaagtctgtgtctcccaacgaagagtgagctgccctggtgtgtcttctcctggagctggcgccgctcagtggtgtgtggacgaggagaagcgaatgaacggcgacatccagctgcgacacgactctaaggcccgaaggagcgatacaacgagggcgagaagtgggtgctggtcggcgccctggagctgtctaagaccgccacctgcgacccgagaccgagctctggcttaccggagtgctgtacggccccgacaaccagttcaggccgtgatccgacacgcccccttctcgcgactcaagcgagatggcagaccacgtgcagctgaacaacaagggtacctgaacatggagcactggcgacccaagggtggaggtggaggcgagggtgagcagcagaccagggagcagtgctacctgggtggacgagcttctggcggaacaccgacccaagccccgaggccccgagctgtgggctggacatcaccttccccggctacaagcacgtgtcggcatccccgagcagccgactccctgtctctgaaggagacccgagggcgagggcaaccacgagggagccctaccgaatgtacaacggcgacgtgtcagtagcagctgtccttccatgacctgtacggcgccatccccctcatcgagggccaccgaaaggactctaccgtggcggttctggctgaacggcgagacctgggtggagacatgtgaagtctaccttctcccaacccccctggccctggcggtggagccaccaccgacaccagctcactgtgtctctgagctgtgccagctggacgtgtgtgttctgggccccacccccaggagattctaagacctacggcgagctgaccggtacaccagctgccccagcacttgcattgcctaccaccagtgctgatggaactacatcaccgacgaggacgtgaaggaggtggaccgaaacttgacaagtaccagatccccctacgacgtgatctggctggacatcgagtagaccgacgaccgaaagtacttacctgggacccccctgttcttccogaccccatctatgaggagcagctggacgagcttgagcgaagctggctgtgatcatcgacccccacatcaagaaccaggacaagtactctatctgagagatgaagtctaaggacctggccaccaagaacaaggacggcgagattacgacggctgggtgtggccggctcttctacgtgatcgacacctcaaccccgctgccatcaagtggtgggtgtctctgttcaagttcgacaagttcaaggcgacctgtctaacgtgtctatctggaacgacatgaacgacctctgtgttaacggccccgagaccacctgccccaggacaacctgcaccacggcaactgggagcacogagacatccacaacgtgcacggcatccctgggtgaacgccacctacgacgccccctgtggagcgaaagaaggcgagatccgacgaccttcatcctgacccgacttactacggcggtgccagcgaatgtctgcatgtggaccggcgacaaccaggccacctgggagcacctggccgcttctatccccatggtgtgaacaacggaatcgccggcttcccccttccgggtggcgacgtggcggttcttccagaaccccccttaaggagctgtgacccgatgtatcaggccggcatctgtgtatcttcttccgagcccacggccacatcgacacccgacgacgagacccctacatgatcgccgagccccaccgatctatctctcagccatccgactcgataccagctgtgtcccgtgtacaccgcttccacgagggccctgtgaacggcatgcccacgtcgacccccagtagctacgcccacctgggacgagggcggttcccatcgacgaccagctgtacctgggtctaccggcctgtggccaagccccgtgtgtctgaggaggccaccaccgccgacatctacctggctgacgacgagaagtactacga

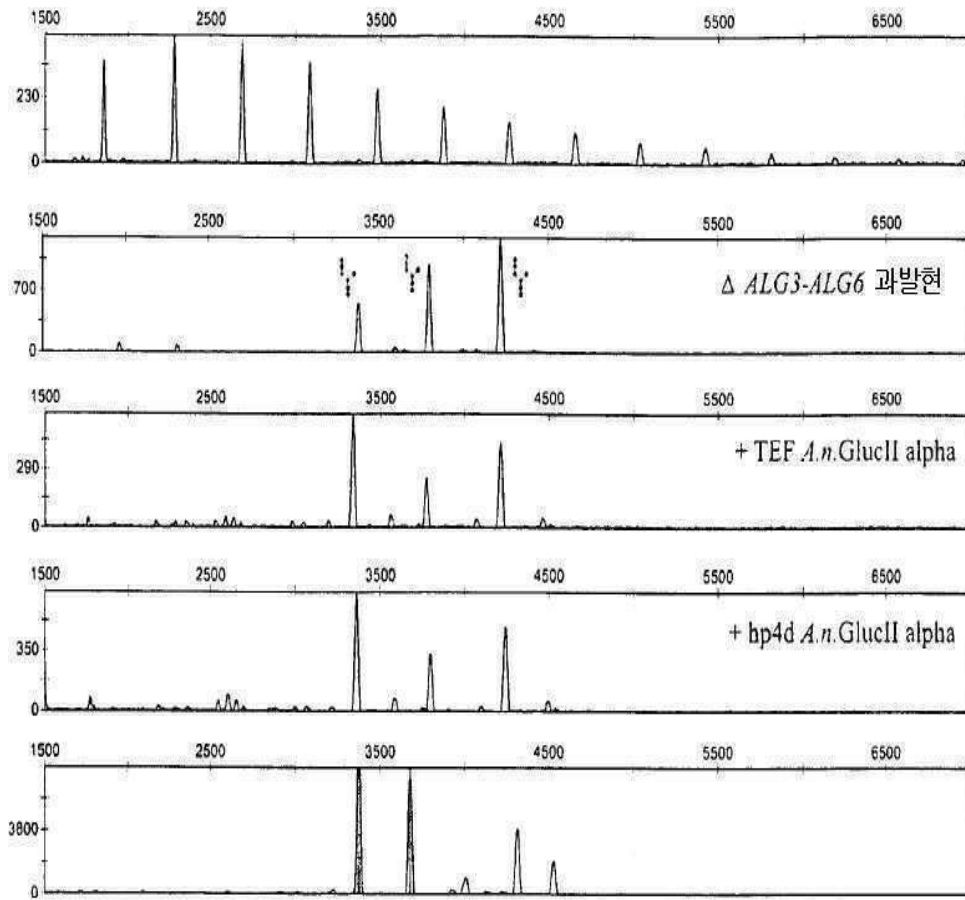
도면36b

ctacttgcactacaccgtgtaccaggcgctggcaagcgacacaccgtgcccgtcccatggagaccgtgccccgtgtgatgcaggggcgccacgtgatccccgaaaggaccgaccccgacgatcttctgccctgatgcgatgggacccctacacctgggtgggtgtgtggacaagaacggccaggccgacggctctgtacgtggacgacggcgagaccttgcactacgagcgaggcgccatcatccatcgacgattccgattccaggagctgccccgtgtctccgaggacgtgggcaccaaggggccccaagaccgccgagtagctcaagaccatggccaacgtgcgagtggagcgagtggtgtgtgtggaccccccaaggagtggaagggaagacctctgtgaccgtgatcgaggacggcgccctctgccgctctaccgcctcatgcagtaccactctcagcccgacggcaaggccgctacgccgtgtgaagaacccccaacgtgggcacggcaagacctggcgaaatcgagttctaatagcctag

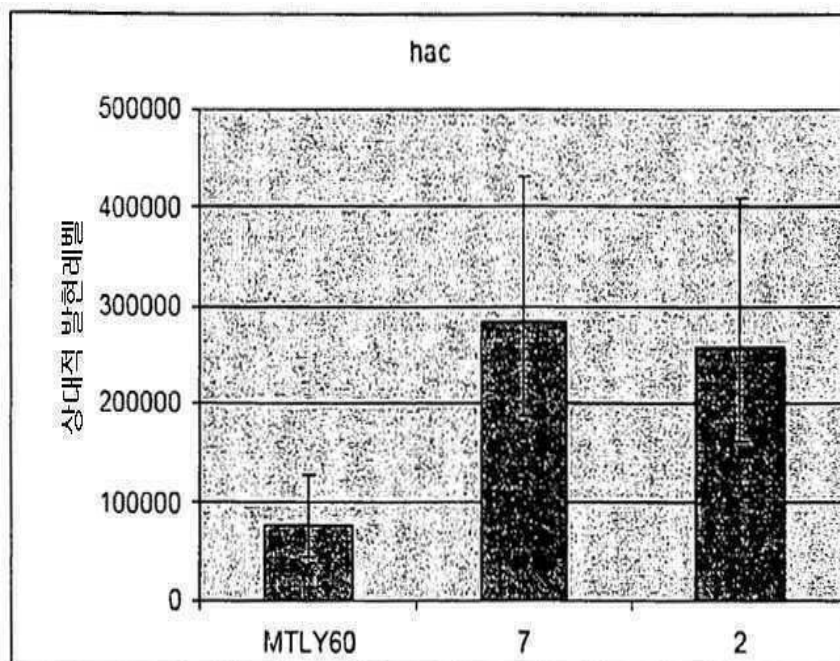
도면37

agcgctggcgacgccttctcgaacccgagggcgtgggccccgagttcgccaagttctacaaggacaccaccaccttcacctgtatctctc
 accccgccatccagattcccttctctccgtgaacgacgactactgtgactgtcccacggctctgacgagccggcacctctgcctgtgcc
 ttctgtctcgaacctctgcctgacccccggtagcgacccggatctgacgacctggagctgacctctgcctgccccggcttctactgtaag
 aacaaggggccacaagccccggctacgtgccctccagcgagttaacgatggcatctgtgactacgagctgtgttgacggatcggatgagt
 gggctcgacccggcggaaccaagtgtaggacaagtgtaggagatcggaaggagtggcgaaagaaggaggagaagcgacagaa
 gtctatgaccggcgctctgaagaagaagaaggacctgctggtcgaggccggacgacagcagaaggaggtcaggacaacatcaagcg
 actggagggtggagatccaggccaggagctgaaggtaacgacctgcaggccgagctggaggaggtggagcagcaggaggcctctaa
 ggtcgtcaaggggcaagaccggcggaaggtgaacgtgctggctggcctcgccaagtctcagtgaggagctgcgaaacgccctgatg
 gacgtgcgaaaggagcgagatgacacccgagcccgagttaaaggaactcgaagagatcctgtctaagttcaagggtggagtacaaccccaa
 cttaacgacgagggcgtagagcgagccgtgcgacttgggaggactacgccgccaaggcgaccctggaggcgccgtgaacaacgc
 ccaggaccgagacctggacgagatcgccaagcccgacgacgagaaggccggcatcaactgggagcagtgaggagaacgaggaggac
 ggctgtgaggctggcctggtgtaccagctggccgcctacctgccccctctctggtggagttcatcagggcaagggtgctgttcgtcgag
 gcctgtggaggacaacggcatcctgccccaggccgacgacctctacctctgagtctaagtggtgtctgaggcccagaggccgtg
 aagtctgccgagaaggagctggcgacaagcagaagcagctgaaggaccacaagctgacctggagaccgactacggcgtgggctcta
 tctccgagccctgaaggcggtgtgtatctctaaggactctggcgagtacacctacgagcactgtttctggaccagaccaagcagatcccc
 aagaaggggcgaggctctacccgaatgggcaagtagaccggcatcggtctgtgtctgtggacgtgctgaacgaggccggcgagatcgt
 gcctgaggatcgagtgacctgcagtacgccaacggccaggctgttgaacggacccgccgatctaccaccgtgatcctgacctgtg
 gcgaggaggacgccatcctgaagggtggccgaggacgagaagtgtgtgtactctatgcacgtgacctctccgccgtgtgtccggcggtg
 acgagggcgccaccgcccccaaccgaaaggacgagctgtaatagccta

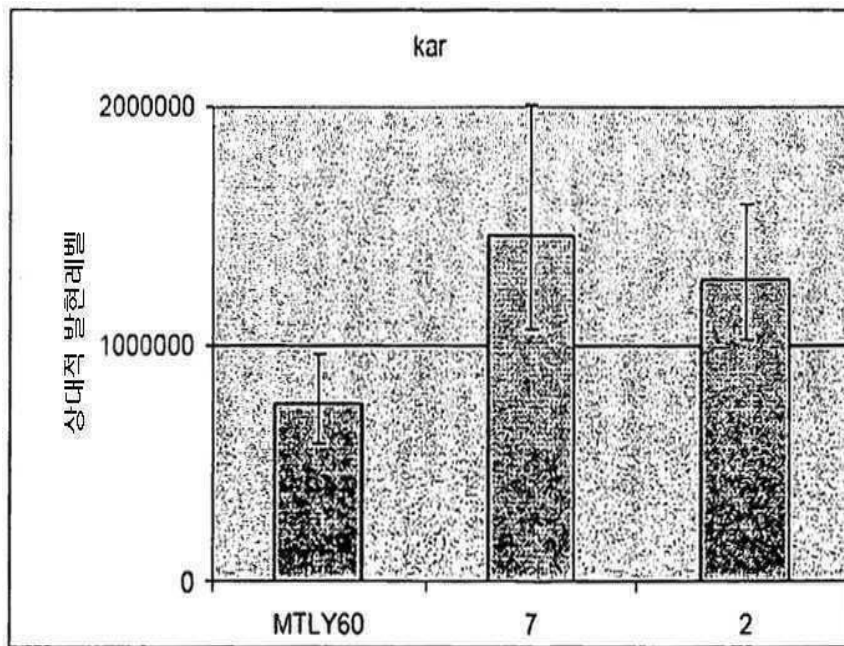
도면38



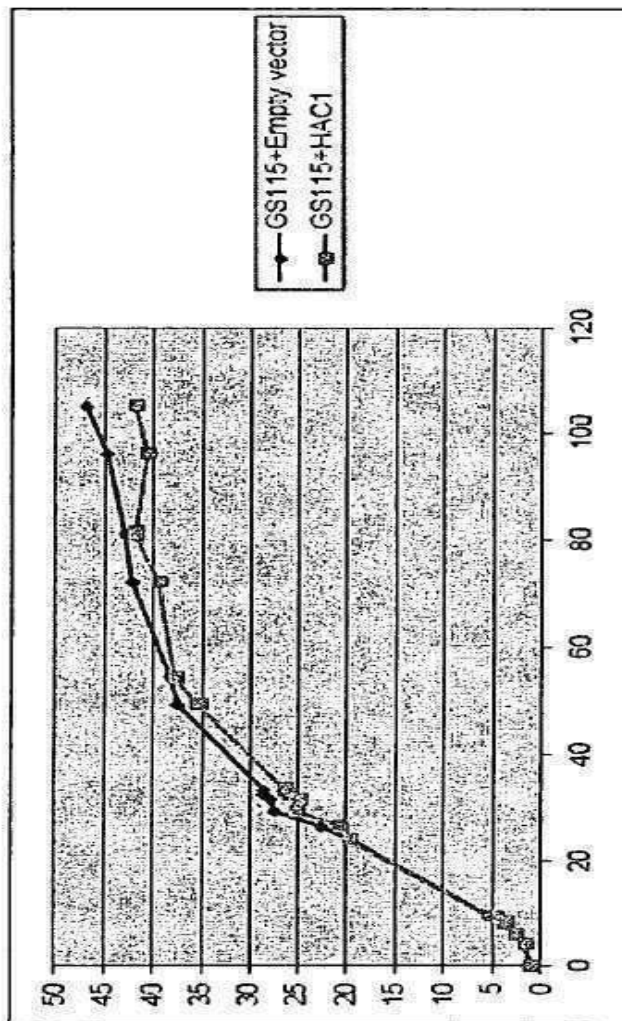
도면39a



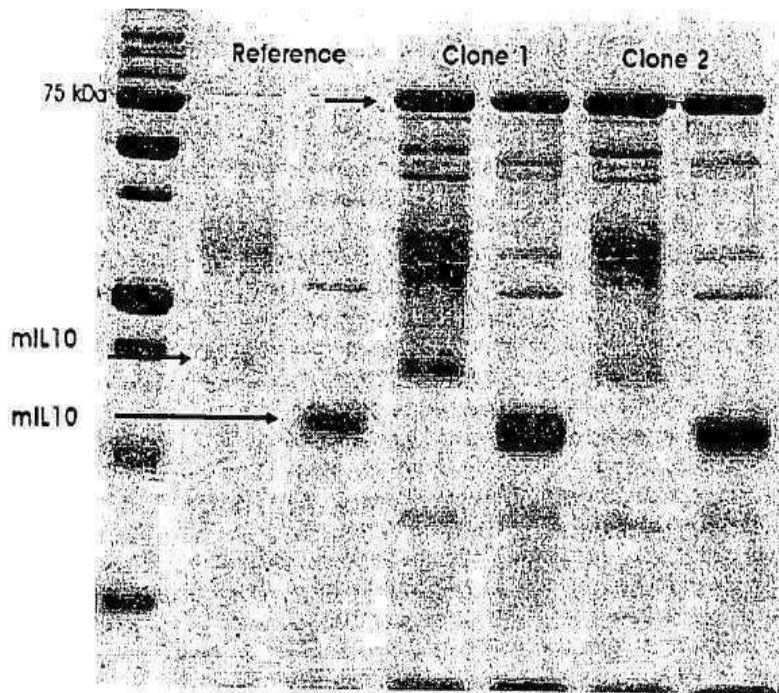
도면39b



도면40



도면41



도면42

gagctcagcgctaccaagcgaggtctcccaacccacccgagccgccgtgtgaaggccgcctccagacctcttgaacgcctacca
ccacttcgcttccccacgacgacctgcacccgtgtctaactcgttcgacgacgagcgaaacggctggggtctcttgcctacgacggc
ctggacaccgccatctgatggcgacgccgacatcgtgaacaccatctgcagtagtgccccagatcaacttcaccaccaccgccgtg
gccaaaccagggaalctctgtgttcgagaccaacatccgatacttggcgccgtctgtctgcctacgacctgtcgcgagggcccttctctt
ctggccaccaaccagacctgggaactctctgtcgcgacaggccagacctggccaacggcctgaaggtggctttaccacccctctg
gcgtgcccgaacccaccgtgttcttaacccaccgtgcgacgacatcggcgcttcttaacaacgtggccgagatcggtctcttggtgctg
gagtggaaccgactgtctgacctgaccggcaacccaccagtagcccgactggccagaaaggcgagttacctgctgaacccaaagg
ctctcccaggcctggccggactgatcggcaccctcgtgtctaccttaacggcaccttccaggactctccggctcttggttgccctgat
ggactctttctacgagtacctgatcaagatgtacctgtacgacccgtggccttcgccactacaaggaccgatgggtgctggccgccgact
ctaccatgccccacctggcctctcaccctctaccgaaaggacctgaccttctgtccttcttaaacggccagctacctctcccaactctgg
acacctggcttcttccgggtggcaactcatctggcgccatcctgtgaacgagcagaagtacatcgacttcggcatcaagctggcct
cttctacttcgccacctacaaccagaccgctctggcatcgccccgagggttcgctgggtggactctgtgaccggcgtggcggtc
tccccctcttctcagctgtggttctactcttctgccggttctgggtgaccgccccctactacatctcgacccgagacctggagctctgt
actacgccctaccgagtgaccggcgactctaagtggcaggacctggcctgggagggccttcttgcctcagggacgcctgtcagccggct
ctgctactcttctatcaacgacgtgacccaggccaacgggtggcgagcctctgacgacatggagttcttctggttcgccgagggccctgaag
tacgctacctgatcttcgccgaggaatctgacgtgcaggtgcagggcaacggcggaacaagttcgtgttaacaccgagggccaccc
ttctctatccgatcttctctcagcagggcgccacctggcccatgacgagctgtaatagcctaggtacc

도면43

cggcggaactgcgtccgaaccagctccagcagcgttttttcggggccattgagccgactgcgaccccgccaacgtgtcttggcccacgcact
 catgtcatgttggtgttgggaaggccacttttaagtagcacaaaggccactgctcgcagcaagggtgtccgaacaaagaaggcgctgcagt
 ggtgcaaacggggcggaaacggcgggaaaaagccacgggggcacgaaftgaggcacgccctcgaatttgagacgagtcacggcccc
 attcgccgcgcaatggctcgccaacggcgggtcttttgcaccacatcagggtaccccaagccaaccttgtgttaaaaagcttaacatatta
 taccgaacgtaggtttggcggggcttgcctcgtctgccaaaggcaacattatataagggtctgcacgccggcicaattgaatctttttcttctt
 ctctctctatattcttctgaattaaacacacatcaaca

도면44a

[illegible]

도면44b

[illegible]

도면44c

cagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcggcgggtttttgttgcaagcagcagattac
 gcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttcttactgaacggtagtccccaccggaattgcggccgctgtcgggaaccgcg
 ttcaggtggaacaggacaccccttgcacttcttggtatcagtagtaggctgatgtattcatagtggggttttcataataaatttactaacggc
 aggcaacattcactcggctlaaacgcaaacggaccgtcttgatctcttgacgcaltgaccaccgagaaatagtgtagtaccgggtgag
 ttattgttctctacacaggcgacgccatcgtclagagttgatgtactaactcagatttactacctacccatccctggtagcacaagcact
 ttgctagatagagtcgacaaggcgggccccctcgagattacctgtatccctacataaactcgtatagcatacaltatacgaagtattct
 gaattccgagaacacacaacatgccccattggacagaccatgcggatacacagggtgtgtagtaccatacactcgtacagacaggtc
 gtctgaccatcatacaagctgaacagcgctccatactgcacgctctctatatacacagttaaattacataccatagctfaacctctaacagtta
 atcttctggaagcctccagccagccttctggtatcgcttggcctctcaataggatctcgggtctggccgtacagacctcggccgacaatta
 tgatatccgttccggtagacatgacatcctcaacagttcggtagtctgtctcgagagcgtctcccttgctgtaagaccaccccgggggtca
 gaataagccagtcctcagagtcgcccttaggtcgggtctgggcaatgaagccaaccacaaactcggggtcggatcgggcaagctcaatgg
 tctgcttggagtagtccgagtgccagtgagagcccttgcaagacagctcggccagcatgagcagacctctggccagcttctcgttgggaga
 ggggactaggaactccttgtagtgggagttctcgtagtcagagacgtcctccttcttctgttcagagacagtttctcggcaccagctcgcag
 gccagcaatgattccgggtccgggtacaccgtggcggttggtagatcggaccactcggcgattcggtagacaccggtactgggtgcttgaca
 gtgttgccaatatctgcgaacttctgtcctcgaacaggaagaaaccgtgcttaagagcaagttccttgagggggagcacagtccggcgta
 ggtgaagtcgtaaatgatgtcgatatgggtcttgatcatgcacacataaggtccgaccttctcggcaagctcaatgagctccttgggtggta
 acatccagagaagcacacaggttgggttcttgggtgccacgagcttgagcactcagcggcaaggcggacttggtagctgtagctcagag
 cttcgtaggaggcgattttgggtggaagaggagactgaaataaatttagtctgcagaactttttatcggaac

도면45a

tagcaggagttatccgaagcgataattaccctgttatccctagcttaccgatacggcggactgcgtccgaaccagctccagcagcgtttttcc
ggggcattgagccgactgcgaccccgccaacgtgtctggcccacgcacatgtcatgttggtgttgaggagccactttttaagtagcaca
aggcacctagctcgagcaaggtgtccgaaccaaaagagcggctgcagtggtgcaaacggggcggaacggcgggaaaaagccacg
ggggcacgaattgaggcacgcccgaatttgagacgagtcacggcccattcggccgcgaatggctcgccaacggccggcttttgc
ccacatcaggttaccccaagccaaaccttgtgttaaaaagcttaacatattatccgaacgttaggtttggcgggcttgctccgtctgtccaa
ggcaacatttatataagggtctgcatcgccggcicaattgaatcttttcttctctctctctatattcattctgaattaaacacacatcaacagg
tccatgaagctttccaccatctcttcacagcctgcgtaccctggccgtaccaagcgaggctctcccaacccaccgagccgctgt
gaagggcgccctccagaccttgggaacgcctaccaccacttcgcttccccacgacgacctgcacccgtgtctaactgttcgacgac
gagcgaacggctggggctcttctgccatcgacggcctggacaccgcatctgtgaggcgacggcgacatcgtaacaccatctgca
gtacgtgccccagatcaacttaccaccaccggcgtggcaaccagggcacatctgtgttcgagaccaacatccgatacctggggcgccgt
ctgtctgcttacgacctgtctgcgagggcccttcttctctgtggccaaccagacctggtgaactctctgtctgcgacaggcccaacct
ggccaacggcctgaagggtggcttttaccacccccttggcgtggccgaccccaccgtgttcttaaccccaccgtgcgacgactggcgcc
tcttctaacaacgtggccgagatcggtctctgtgtgtgagtgagccgactgtctgacctgaccggcaaccccagtagcccaagctgg
cccagaaggcgagcttacctgtgaacccaagggtctcccgaggcctggccggactgatcgacaccttctgtctacatctaagg
caccttcaggaacttccgggtcttggctgtgacctgtgacgttcttctacgagtaacctgatcaagatgtacctgtacgaccccggtgacctg
cccactacaaggaccgatgggtgtgctggccggcactctaccatcgccacctggcctctaccccctctacccgaaggacctgaccttct
gtctcttacaacggccagcttacctctccaaactctggacacctggcttcttccggcgtggcaacttctctggcggcacatctgtgaa
cgagcagaagtacatcgacttggcatcaagctggcctcttctctacttggccacctacaaccagaccgctctggcatcgcccccaggggc
ttcgctgggtggactctgtgaccggcgctggcgctctcccccttctcagttgtggttctacttcttctggcgttctgggtgaccggcc
cctactacatctcgacccgagacctggagctctgtactacggcctaccgagtgaccggcgactctaagtggcaggacctggcctggga
ggccttctctgccatcgaggacgctgtcgagccggctctgctactcttctatcaacgacgtgaccaggccaacgggtggcgagcctct
gacgacatggagcttcttctgggttccggagccctgaagtacgcttaacctgatcttccggagggaatctgacgtgcagggtgcaggccaacg
ggggcaacaagttcgtgttcaacacggggccacccttctctatccgatcttctctcagcagggcgccacctggcccatgacgagctg
taatagcctagggtgtctgtgtgtatctaagctatttatcacttctacaacttctacctcaactatctactttaataaatgaatcgtttattctctatg
attactgtatatcggttcccttaagacaaatcgaattccatgtgtaacactcgtctggagaggttagtcatccgacagggttaacttaatctccca
acaccttattaactctgcgtaactgtaactcttcttggcacgtcgatcttactcaatttctcgtcactatctgtggattgtgtctatctgtctggct

도면45b

ctaatcacatttattgtttattgcccaaacacatttcattgcacgtaagtgaattgtttataacagcgttcgcccaattgctgcgccatcgtcgtccgg
 ctgtctaccgttagggtagtgtgtctcactaccgaggttactagagttgggaaagcgatactgcctcggacacaccacctggtcttacga
 ctgcagagagaatcggcgttacctctcacaagaagccctcagtgccggccgccggggtggcggaagaactccagcatgagatccccggcg
 ctggagagatcatccagccggcgctccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaaggcgcgcggtggaatcgaatatctcgtgatgg
 caggttggcgctcgttggcgttattcgaacccagagtcctcgtcagaagaactcgtcaagaagcgatagaaggcgatgcgctgc
 gaalcgggagcgcgataccgtaaacgacgaggaagcggcagcccattcgccgccaaagctcttcagcaaatcacgggtatgccaacgc
 tatgtcttgatagcgggtccgccacaccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccacctgatattcggcaagcag
 gcaatgccatgggtcacgacgagatctcgtccgtcgggcatgcgcgcttgagccttgcgcgaacagttcggctgcgcgagccctgatg
 ctcttcgtccagatcctcgtatcgacaagaccggcttcacatccgagtagtgcctcgtcgtatcgatgttttcgcttggtggtcgaalgggca
 ggtagccggatcaagcgtatgcagccggcgcttgcacagccatgatgatactttctggcaggagcaaggtgagatgacaggagatc
 ctgccccggcacttcgcccaatagcagccagtcctctccgcttcagtgacaacgtcagcacagctgcgcgaaggaaacggcgccctgcg
 cagccacgatagccgcgctgcctcgtctgcagttcattcagggcacccggacaggtcgggtcttgacaaaaagaaccggcgccctgcg
 ctgacagccggaacacggcgcgcatcagagcagccgaltgtctgttgcgccagtcatagcgaatagcctctccaccacaaagcgccggga
 gaacctgcgtgcaatccatttcttcaatcatgcgaacgatctcatcctgtctcttgatcagatcttgatccccctggccatcagatccttggc
 ggcaagaaagccatccagtttacttgcagggcttcccaccttaccagaggcgccccagctggcaattccggttcgctgtccataa
 aaccgcccaagtctagctatcgccatgtaagcccactgcaagctacctgcttctcttgcggttggttttccctgtccagatagcccagtagct
 gacattatccggggcagcaccgtttctgcggacttgctttctacgtgttcgcttctttagcagcccttgcgcctcagtgcttgcggcag
 cgtgaagctagcttatcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttctcgtcactgac
 tgcgtgcgtcggctgtcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggaatacggttatccacagaatcaggggataacgca
 ggaaaagaactgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaaggccgcttgcgtggcggttttccatagggctccgcccc
 tgacgagcatcacaanaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagcggtttccccctggaagctc
 cctcgtgcgtctcctgttccgacctgcggttaccggataactgtccgcttcttccctcgggaagcggtgcgcttctcatagctcacgct
 gttaggtatctcagttcgtgtaggtcgttcgtccaaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaaccgtcgccttatccggta
 actatcgtcttgatgccaaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagggtatgagg
 cgggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttggatctgcgctctcgtgaagccagttacctc
 ggaaaaagagtggtgtagctcttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcgcggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcgaaaaa

도면45c

aaaggatcacaagaatccttgaatctttcttactgaacggatgcccccaccggaattgcggccgctgtcgggaaccgcgttcaggtggaa
caggacacctcccttgacttcttggtatatacgtataggctgatgtattcatagtggtgttttcataataaattactaacggcaggcaacattc
actcggcttaaacgcaaacggaccgtcttgatactcttgacgcattgaccaccgagaaatagtttagttaccgggtgagttattgttctcta
cacaggcgacgcccacgctagagttgatgtactaactcagatttcactacctaccctatccctgggtacgcacaaagcaccttgctagataga
gtcgcacaaaggcgggccccccctcgagattaccctgtatccctacataacttcgtatagcatattatcgaagttatcigaattccgccca
gagagccattgacgttcttctaatttgaccgatagccgtatagtcagtcataagttcaactaactcgtactattaccataacataact
tactgccccagataagggtccgataaaaagtctgcagactaaatttatctcagtcctctcaccacaaaatgccctctacgaagctcga
gtacgtccacaagtcgcccttgccgctcgaagtctcaagctcgtggcagccaagaaaaaacctgtgtctctctggatgttaccacc
accaaggagctcattgagcttgcgataaggcggacccttatgtgtcatgatcaagaccatcgcacattgacgacttaccctacgcc
ggcactgtgctccccctcaaggaaactgctcttaagcacgggttctctgttcgaggacagaaagttcgcagatattggcaactgtcaagc
accagtaccgggtgtcaccgaatgccgagtggtccgatacccaacgccacgggtgacctgggaaccggaatcattgctggcctgcgag
ctgggtgccgaggaaactgtctcgaacagaagaaggagacgtctctgactacgagaactccagtaagagttcctagccccctcc
caacgagaagctggccagaggtctcgtcatgctggccgagctgtcttgcaagggtctcttgccactggcgagtacccaagcagaccatt
gagctggccgatccgaccccgagttgtgttggttgcttcatgcccagaaccgacctaggcgactctgaggactggcttattctgacccc
cgggtgtgggtcttgacgacaaggagacgctctcggacagcagtaaccgaactgttgaggatgtcatgtctaccggaacgatatcataatt
gtcggccgaggtctgtacggccagaaccgagatcctattgaggagccaagcgataccagaaggctggctgggaggcctaccagaagat
taactgttagaggttagactatggatatgtaatttaactgtgtatatagagagcgtgcaagatggagcgtgttcagcttgtatgatgtcagac
gacctgtctgacgagatgtatggtaactgcacaaactgtgtatccgcatggctgtccaatggggcatgttgtgtgttctcgaattcgtata
acttcgta

도면46a

caagggttgtagggcgaafgtgtacgattccgccaaagtggagactggcgatcggggagaagggttggtgtgttcattgggggatalagaattgttacaaga
ggaaaaaacctactcagtagtgcgatttgaataccacaagtacgagatatacagcaatggtgggagtgcaagatcgggaatgtactgtacc
tctgttactgtactgtacggcactcgtagaacggggcaatacggggggaagcgaatgcccgctgtgttcaatgccacaagctcaggt
aatgtctcagatcgaagctgtgtacctccctgtcaatcatggcaccactgttcgttgaactgtctattactactggacaagcgccagagtgatct
agcgaattcggccctggacatcaccccfatacgcggcacacacatgcccgacaacacgcctctcttattgtagctgaaagtataatgaatgtg
aacgtgtacaatafacaggtaccagcgggaggttacggccaagtgataaccggaaataacctggcttggagatgtcgggtcattgtactga
agtgtccgtgtcgtttccgtcaactgcccaattggacatgtttgttttccgactcttccggccctctcctgtgtctctgtctgtcctggactg
ttgtacccccatttttggccctcattgggttcctcccgcttccacgtctctatgtgttgcaigtgtttcccttatactttccccacagtacacatgtt
atggaggggtctatagatggacatggtgcgaaggcccgcaagggttgattcgaacctttccgcgaaaaaacaagtccaataaccgccgttatt
ctccctcggctctcgtatttcatgaaaactataacctagatacacagggcgaaccttaaccaccagagataactatataaccaaggagatgg
gtctcctaaaaatcacacaagcaacgtgatccafgaagctttccacactctcttcacagcctcgcgolaccctggccgctaccaagcgaggctc
tcccaacccaccggagccggcgctgtgaaggcgccgttccagaaccttgggaacgcttaccaccacttgcgttccccacgacgacct
gcaccccggtgttaactgttcgacgacgagcgaaacggcgttggggctcttcgcatcgacggcctggacaccccgactctgatggcgga
cgccgacatctgtaaacacatctcgcgtacgtgtccccagatcaacttaccaccaccggcgtggccaaccaggcgactctgtgttcgag
accaacatccgatacttggcgccgtgtgtgtcgtacgacctgtcgtgagggcccttctcttggccaccaacaagacctgggtgaa
ctctctgtctcgacagcccaaccttggccaacggctcgaagggtgtttaccaccccccttggcggtgccgacccaccgtgtttctta
acccaccgtggcagatctggcgccctttataacaacgtggccgagatcggtctctgtgtgctgaggtggaccggactgtctgacctgac
cggaacccccagtagcccgacttggccgaaggcgagcttacctgtgaacccaagggtcttccgaggcctggcccggaactg
atcggcacctctgtgtaccttaacggcaaccttcaggaacttccggctctgtgtgacctgatggactttctacgagtacctgatcaa
gatgtacctgtacgaccccggtggccttcccaclacaaggaccagtggtgtgtggccgccgactctaccatcgcccaacctggccctctac
ccctctaccgaaaggacctgaccttctgtctcttacaacggccagctctaccttccaaactctggacacctggcttcttcgccgggtggc
aactctatcttggcgccatctgtctgaacgagcagaagtacatcgacttggcatcaagctggcctcttctacttcgccactacaacagt
gaccggccttgggcatcgccccgagggtctgcttgggtggaactctgtgacccggcgtggcgggctctccccctcttctacgtgtgcttct
acttcttggcggtcttgggtgaccgccccctactatctctcgaccgccgagaccttggagtctctgtactacgcttaccgagtggccggc
gactctaagtggcgacctggcggtggagggccttcttgcacagaggacgctctgtcgaagccggctctgcttacttctatcaacgactg
gaccaggccaacgggtggcgagcctctgacgacatggagcttcttggttccggagggccttgaagtacgcttacctgattctccgag

도면47a

taattacctgttatccctagcttcatcagatagagaccgggtggcggcggtattgtgtcccaaaaaacagcccaattgccccaattgacccca
aatlgaccagtagcgggcccaccccgccgagagcccccctcaccacacatacaaacctccccggttcccacacttgcggttaaggg
cgtagggtactgcagcttggaaclacgcttgtcagacttgtactagtcttctgtcggccatccgggttaacctatgccggacgcaaaatag
actactgaaaatttttgccttgggttgggactttagccaagggtataaaagaccaccgccccgaattaccttccctcttcttctctctctct
gtcaactcacaccggaagatccatgaagcttccaccatctctcagcctgcgclacctggccgclaccaagcgaggctctcccaac
cccaccgagccgcccgtgtgaaaggccgcttccagacctcttgaacgcctaccaccacttgccttccccacgacgacctgcacccc
gtgtctaactgttcgacgagcggaacggttgggctcttctgccatcgacggcctggacaccgccatctgtatggcgacggcgac
atcgtgaacaccatctcagtagcgtccccagatcaacttaccaccaccgcccgtggccaaccaaggcgatctgtgttcgagaccaaca
tccgataacctggcgccgctgtgtctgcctacgacctgtcggagcccccctctctcttgcggccaccaacagacctgggtgaactctctgc
tgcgacaggccacgacctggccaacggcctgaagggtgtgtttaccacccccttggcggtgcccgacccaccgtgtgttcttaaccccac
cgtgcgacgatctggcgccctcttaacaacgtggcgagatcggtctctgtgtgtgagaggacgactgtctgacctgaccggcaac
ccccgtagcccgactggccagaaaggcgagcttacctgtgaaccccaaggcctctccgagggcctggcccgactgatcggcac
cttctgtctaccttaacggcaacttccaggactctccggcttctgtgtcggcctgatggactcttctacgagtacctgatcaagatgtacct
gtacgaccccgtggccttgcgccactacaaggaccgatgggtgtgtggccgacgtctaccatcgcccaacttggcctctcaccctctacc
cgaaaggacctgaccttctgtctcttaaacggccagctctaccttcccaactctggacacctggcttcttccgggtggcaacttcatcc
tggcgcgcatcctgtgaacgagcagaagtacatcgaacttggcatcaagctggcctcttctacttgcacactacaaccagaccgacct
ggcatcggccccgagggcttccctgggtggactctgtgaccggcgctggcggtctctcccccttcttctagcttggcttctacttcttgc
ggcttctgggtgaccgcccctactacatcctgcgacccgagaccctggagctctgtactacgctaccgagtgaccggcgactctaagt
ggcaggacctggcctgggagggccttcttgcacatcaggagacgctgtcagccggcttgcctactcttctatcaacgacgtgaccaggc
caacgggtggcgagcctctgacgacatggagtcttctgttccgagggccctgaagtacgctacctgatcttccgaggaatctgac
gtgacgggtgcaaggccaacggcggaacaagtctgtgttaaacaccgagggccacccccttctctatccgacttctctcagcagggcgcc
acctggcccagacgagctgtaatagcctagggtgtctgtgtatctaaagctatttataacttcttaacttctacttcttaataa
atgaatatcgtttattctctatgattactgtatatgcgttctcttaagacaaatcgaattccatgtgtaacactcgtctggagagttagtcatccga
cagggttaactctaatctcccaacaccttattaactctcgtaacgttaactcttcttccacgtcgalcttaactcaatttctgctcatcatctgtg
gattgttctatcgtctggctctaatatattattgtttatggccaaacaacttcttgcacgtaagtgaattgtttataacagcgttcgccaatt
gctgcgccatcgtcgtccggctgtctaccgttaggggtagtgtgtctcacactaccgaggttactagattgggaaagcgatactgcctcgg

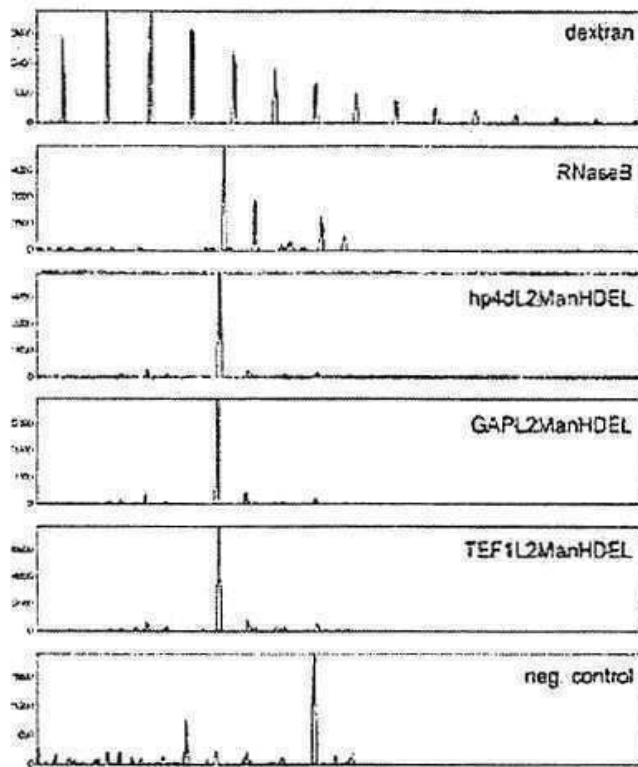
도면47b

acacaccacccttggtcttacgactgcagagagaaatcggcgttacctctccaaaggccctcagtgccgccgccggggtgggctgaagaaac
tccagcatgagatccccgcgctggagggatcatccagccggcgctccggaaaacgattccgaagcccaaccttctatagaaggcgccggcgt
ggaaatcgaatctctgtgatggcaggttggcgctcgtttgctgggtatttcgaacccacagatccccgctcagaagaactgtcaagaaggc
galagaaggcgatgcgctgcgaatcgggagcgccgatalaccgtaaaagcacgaggaagcggtcagccctatcggcccaagctctcagc
aatatcacgggtagccaacgctatgtcctgalagcggttccgccacaccagccggccacagtcgatgaatccgaaaagcgcccaatttc
accatgatattcggcaagcagcgatcgccatgggtcacgacgagatctcggcgctgggcatgcgcgccttgagccctggcgaacagttcg
gctggcgcgagccccctgatgtcttctgccagatcactgtatgcacaagaccggcttccatccgagtagtgcgtcgtcgtatgcggtatgttc
gcttggtggtcgaatgggacggtagccggatcaagcgatagcagccggcgcttgcattgcatacgccatgatggatactttctcggcagagcaa
ggtagatgacagggagatcttccccggcacttcgcccatagcagccagtccttccgcttcacgtgacaacgtcgaagcacagctgcgc
aaggaaacgccctgtctggccagccacgataggccgcgctcctcgtcctgacgttcatcaggcgaccggacaggtcggcttgcacaaaa
gaaccggcgcccccctgcgctgacagccgggaacacggcgccatcagcagccgattgtctgtgtgccagtcataggcaataggctct
ccaccaagcgggcgggagaacctgcgtgcaatccatttgtcaatcatgcgaaacgatctcatctgtctcttgatcagacttgatccct
gcgccatcagatcttggcggaagaaaagccatccagttacttgcagggtctcccaaccttaacagagggcgccccagctggcaatcc
ggttcgttctgtccataaaaacggccagcttagctatgcgcatgtaagcccaactgcaagctacctgctttcttggcgttcggctttccctg
tccagatagccagtagctgacattatccggggtcagcaccgtttctgcggactggtttctacgtgttcctcgttcttagcagcccttgcgc
cctgagtgcttgcggcagcgtgaagctagcttatgcggtgtgaataaccgcacagatgctaaggagaaaaataccgcatcaggcgctcttc
cgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcgagcggatcatcgtcactcaaaagcggtaatacgggttatccag
aatcagggggataacgcaggaaaagacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgcgtgcgttttc
cataggctccgccccctgacgagcatcacaataacgacgtcgaatcagaggttggcgaacccgacagggactataaagataccaggc
gtttccccctggaagctccccctgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgccctttctcccttcgggaagctggcg
ctttctcatagctcacgctgtaggtatatcagttcgggttaggtcgttcgtccaaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaac
gctgcgcctatccggtaactatcgttctgagtcgaacccggtaagacacgacttaccgcaatggcagcagccactggtaaacaggattagc
agagcgagggtatgtaggcgtggtctacagagttcttgaaggtggcgctaactacggctacactagaaggacagtattgtgtatctgcgcctg
ctgaagccagttactctcggaaaaagagtgttgtagctcttgatccggcaacaacaccacgctggtagcgccgggtttttgttgcaagcagc
agattacggcgagaaaaaaggatctcaagaagatcttgcatttcttactgaacgggtgatccccaccggaattgcggccgctgtcggga
accgcgttcaggttgaacaggacacctccctgcacttcttggtatatcagtagtctgatgtattcagagtggggttttcataataaatttact

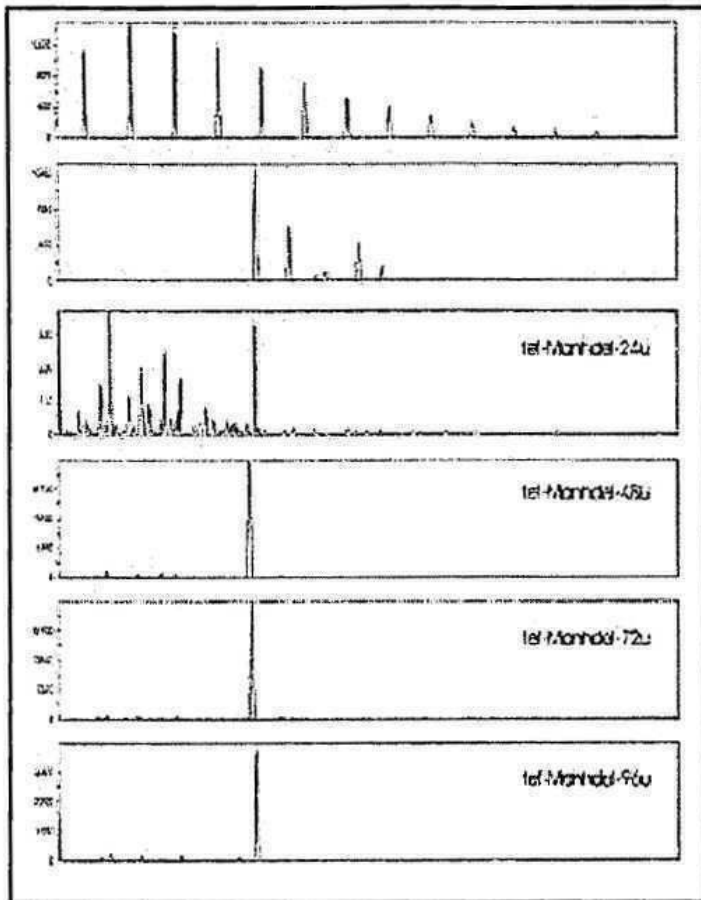
도면47c

aacgcgcaggcaacattcacctggccttaaacgcaaaacggcagcctgtgatattctctgacgcattgaccaccgagaaaatagtgttagttaccg
ggtgagattattgttctctacacagcgcagcccatgctctagagttgatctactaacagatttctactacctacctatccctggtacgcacaa
agcacttttctagatagagtcgacaaaaggcggggccccccctcgagattacctgttatccctacataaactcgtatagcatacatattacgaag
ttattcgaattccgagaacacacaacalgcccatlggcagagaccatgcggatcacagggttctgcagfaccatatactcgtatcagac
aggctcgtcagaccatcatacagctgaacagcgcctccactctgcagcgtctctatatacacagttaaattacatactcaatagcttaaccttaac
agttaaactctgtgaagccctccagccagcctctcgtatcgttggcctcctcaalagatctcgttctggccgtacagaccctggccgac
aattatgatatccgttccggtagacatgacatctcaacagttcgggtactgctgtccgagagcgtcctcctgtctcgaagccaccccggg
ggtcagaataaaggcagctcctcagagtcgcccttaggtcgggtctcgggcaalgaagccaaccacaacacgcgggtcggatcgggcaagctc
aallggctcgttggaggtactgccagtgggccagagagcccttgcaagacagctcggccagcatgagcagaccctcggccagctctcgttg
ggagaggggactaggaacfccttgactgggaggttctcgtatcagagagctcctccttctctgttcagagacaggttctcggccagcct
cgcagggccaagaatgattccgggtccgggtacaccgtgggcgttggtgatctggaccactcggcgattcggtagaccggtagctggtgct
tgacagtggtccaatatctgcgaacttctgtcctcgaacaggagaagaaccgtgcttaagagcaagttccttgaggggggagcagagtccg
gctgtaggtgaagctgtaacatgctgataaagggtcttgatcatgcacacataaaggctccgacctatcggcaagctcaatgagctccttggtg
gtggttaacatccagagaaagcacacaggttggtttcttggtcggccagagcttgagcactcggagcggcaaaaggcggacttgagcagttag
ctcagcttcgtagagggcatttgggtggtgaaggagagactgaaataaatttagctgcagaactttttatcggaaacctatctggggcaggt
gaagtatatgttatgtaatagttiacgagttagtgtaacttatagatagactggactatcgggtatcgggtccaaattagaaagacgtcaatgg
ctctctggggcggaaattcgtataaactctgataagcagagttatccgaagcga

도면48



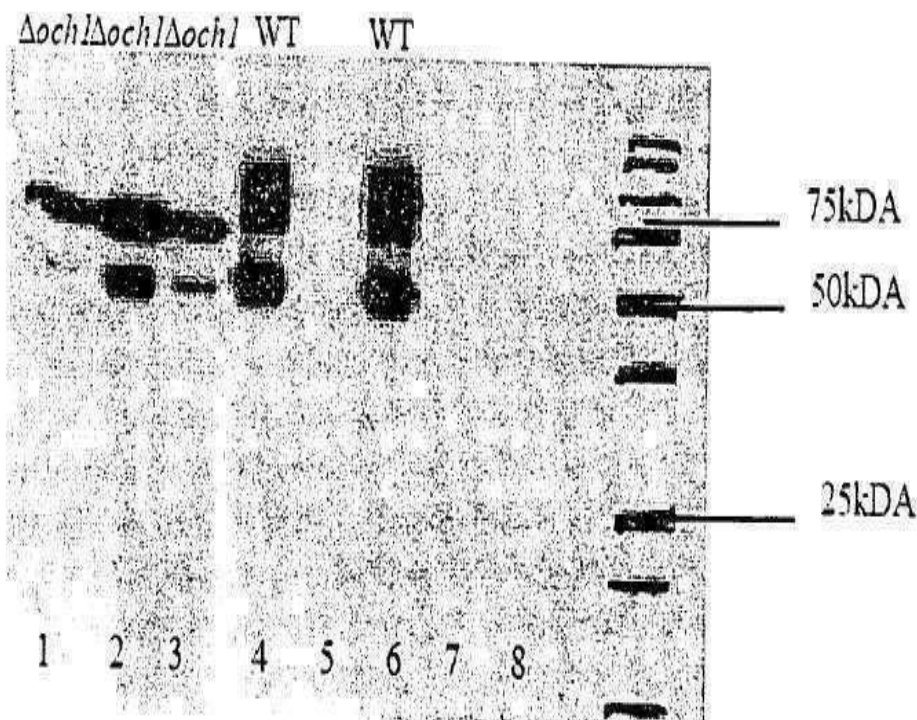
도면49



도면50

gagctcagcgctcgaccctglatcccaagcttttggctactcttctgtggtgtgtgtgtgaacgccacctagtgtgactgttcgaccccc
caccttccccgccctgggcaccttctctcgatcagtgctaccgatctggccgacgaatggagctgtctatgggcccacccaaggccaac
cacaccggcaccggcctgctgctgacctgcagcccagcagaagtccagaagglicaagggtcttcggcggagccatgaccgacggcg
ctgcccgaacatctggccctgtctccccccgtcagaaacctgtctctgaagcttacttctctgaggaggggcatggctacaacatcalcc
gagtgcctatggcctcttgtgacttctctalccgaacctacacctacgccgacaccccgacgacttccagctgcacaacttctccctgcccg
aggaggacaccaagctgaagalccccctgatccaccgagccctgcagctggcccaycgacccgtgtctctgtctggccttccctggacct
ctcccacctgggtcaagaccaacggcgccgtgaacggcaagggtctctgaaggggccagcccggcgacatctaccaccagacctgggc
ccgatacttctgtgaattctctggacgcttacgccgagcacaagctgcagttctgggccgtgaccgccgagaacgagccctctgtggact
gtgtccggctacccctccagtgctctgggcttcaccccgagcaccagcgagacttcatcgcccgagacctgggaccacccctggccaa
ctclaccaccacaacgtgcgactgctgatgctggacgaccagcgactgctgctgccccactgggccaagggtgtgtgaccgaccccg
aggccgccaaatlacgtccacggcatcgtgtccattggatatlggacttctggtctccgccaaaggccacctgggcgagaccaccgact
gtlccccaacacatgctgttcgctctgaggctgtgtgggctctaagttctgggagcagctgtgctgactgggctcttgggaccgaggcat
gcagtaactctcactctatcatccaacctgctgtaccacgtgtgtgggctggaccgactggaaacctggccctgaaccccgaaggcgagacc
caactgggtgcgaaactctgtggacttcccacatcgtggacatcacciaaggacaccttctacaagcagcccatgtltaccacctggggc
acttctctaagttcatccccgagggtctctcagcgagtgggctgtgtggcctctcagaagaacgacctggacgccgtggccctgatgaccc
cgacgyctctgccgtgtgtgtgtgtctgaaccgatcttctaaggacgtgcccctgacctcaaggaccccgccgtgggcttctggagacc
atctctccgggtactctatccacacctacctgtggcgacgacagtaafagcctaagggtacc

도면51



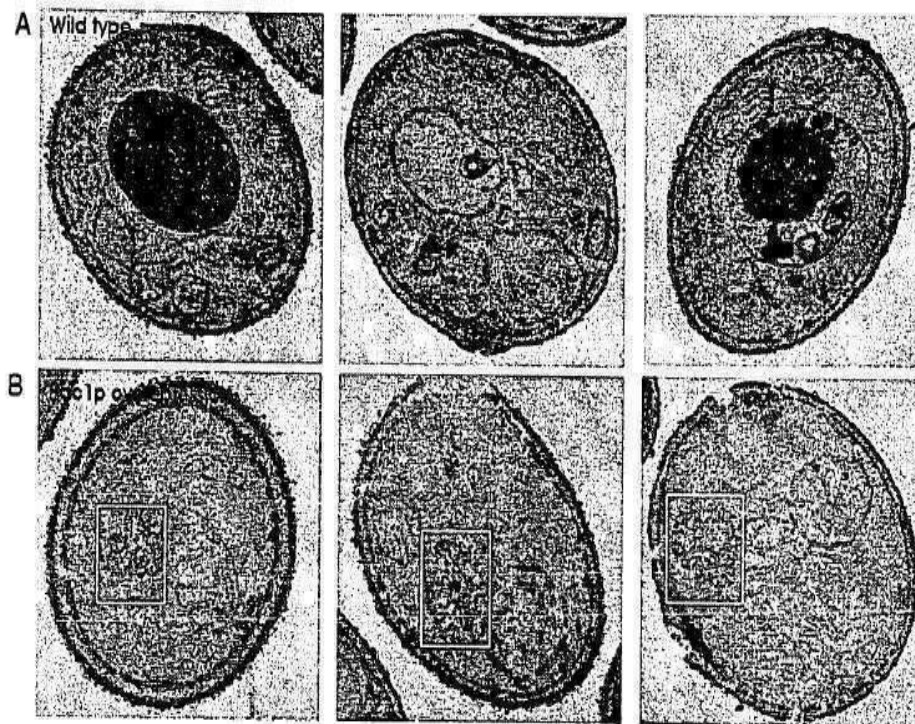
도면52

gctccccccgactgatctgtgactctcagtgctgggaacgatacctgctggaagccaagggaagccgagaacatcaccaccggctgtgcc
gagcacgtgtctcgaacgagaacattaccgtgcccgcacccaaggtgaactctacgctggaagcgaatggaggtgggccagcaggcc
g/ggaggtgtggcagggactggctctgctgtctgaggccgtgctgcgaggacaggctctcctggtgaactctctcagccctgggagcccc
tgcaugctgcacgtggacaaggccgtgtctggcctgctgatctctgaccaccctgctgcgagccctcgggtgctcagaagggaagccatctctcc
ccccgacggccctctgctgccccctgcgaaccatcaccggcgacacctccgaaagctgttccgagtgacttaacttctgcgaggc
aagctgaagctgtacaccggcgaggcttgtcgaaccggcgaccga

도면53

ctggacaacggcctggcccgaacccccaccatgggctggctgcactgggagcgattcatgtgtaacctggactgtcaggaagagcccgga
ctcttgtatctctgagaagctgttcatggaaatggccgagctgatgggtgtctgagggtctggaaggacggcgctacgaglacctgtgtatcg
acgactgttggatggccccccagcgagactctgaggggcgactccagggcgacccccagcgattccccacggcatccgacagctcgc
caactacgtgcactctaagggctgaagctgggcatctacggcgacgtgggcaacaagacctgtgccggcttccccggctcttccgctac
tacgacatcgacggccagaccttggcgactggggcgtggacctgctgaagtgcagggctgttactgtgactctctcagaacctggccg
acggctacaagcacatgtctctggccctgaaccgaaccggccgatctatctgtactcttgtgagtggccctgtacatgtggcccttcaga
agcccaactacaccgagatccgacagtlactgtaaccactggcgaaacttccggacatcgacgactcgtggaaagtatcaagcttattctg
gactggaccttctcaaccaggagcgaatgtcgacgtcggcgaccggcgatggaacgaccccgacatgctgggtgacggcaacttc
ggcctgtcttgggaaccagcaggtgacccagatggccctgtgggctatcatggctgccccctgttcatgtctaacgacctgcgacacatctct
ccccaggccaaggccctgtccaggacaaggacgtgaltgccatcaaccaggacccctgggcaagcagggtaccagctccgacag
ggcgacaacttcgaggtgtgggagcgacccctgtctggcctggcctggggctggccatgatcaaccgacaggagatcgccggacccc
gatcttacaccatcgccgtggcctccctgggaaaggcggtggcctgtaacccgcctgtttcatcaccagctcctgcccgtgaagcgaaa
gctgggattctacgagtgacctctcgaactgcgatctcacatcaacccaccggcaccgtgctgctccagctcgagaacaccatgcagatg
tctctgaaggacctgtg

도면54



도면55

