



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월05일

(11) 등록번호 10-2703633

(24) 등록일자 2024년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/245 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/12* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/245 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7014900
(22) 출원일자(국제) 2017년11월09일
심사청구일자 2020년11월05일
(85) 번역문제출일자 2019년05월23일
(65) 공개번호 10-2019-0084995
(43) 공개일자 2019년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2017/051230
(87) 국제공개번호 WO 2018/085888
국제공개일자 2018년05월17일
(30) 우선권주장
2016904572 2016년11월09일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
J. Exp. Med., Vol. 200, pp. 35-46 (2004)

(73) 특허권자
그리피스 유니버시티
오스트레일리아 퀸즐랜드 4111 나탄 커셀스 로드 170
더 유니버시티 오브 아델라이드
오스트레일리아 5005 사우스 오스트레일리아 아델라이드 노스 테라스
(72) 발명자
제닝스 마이클 폴
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4179, 맨리, 35 브리타니아 스트리트
데이 크리스토퍼
오스트레일리아, 퀸즐랜드 4215, 래브라도, 2/72 보타니컬 드라이브
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 16 항

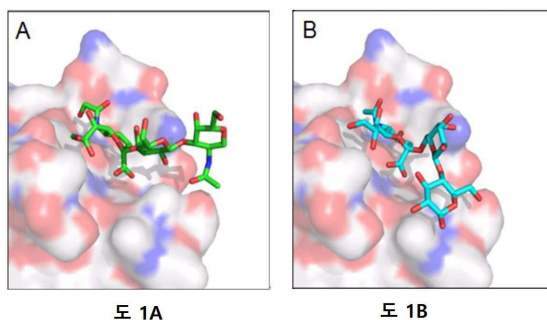
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 서브틸라제 세포독소 B 서브유닛 돌연변이체

(57) 요약

α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 갖는 글리칸 및 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합할 수 있는 돌연변이체 서브틸라제 세포독소 B 서브유닛 단백질이 제공된다. 돌연변이체 SubB 단백질은 하나 이상의 아미노산 서열 TTSTE의 결실을 갖고, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합하는 능력을 손실시키지 않으면서 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합하는 이전에 기재되지 않은 능력을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/1232 (2013.01)

C12N 9/52 (2021.08)

G01N 33/574 (2013.01)

G01N 33/57492 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

G01N 2400/10 (2013.01)

(72) 발명자

페이턴 애드리엔 웹스터

오스트레일리아, 사우스 오스트레일리아 5063, 파크사이드, 49 포스터 스트리트

페이턴 제임스 클리랜드

오스트레일리아, 사우스 오스트레일리아 5063, 파크사이드, 49 포스터 스트리트

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 단백질 또는 이의 단편으로서, 상기 단백질 또는 이의 단편이 아미노산 서열 TTSTE (서열번호 3)를 포함하고, 여기서 아미노산 서열 TTSTE가 결실 돌연변이에 의해 변형되고, 여기서 TTSTE의 밑줄 친 잔기가 결실되고,

상기 단리된 단백질 또는 이의 단편이 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산에 결합할 수 있는 것인, 단리된 단백질 또는 이의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, TTSTE (서열번호 3)의 밑줄 친 잔기의 결실을 추가로 포함하는, 단리된 단백질 또는 이의 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 단백질 또는 이의 단편.

청구항 4

α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸 및 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편을 포함하는, 단리된 분자 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸이 종양 세포 또는 고양이(feline) 혈액 세포에 의해 발현되는, 단리된 분자 복합체.

청구항 6

α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 검출하는 시험관 내(*in vitro*) 방법으로서, 상기 방법이 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편을 샘플과 결합시킴으로써, 단리된 단백질 및 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 검출 가능한 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산이 종양 세포 또는 고양이 혈액 세포에 의해 발현되는, 시험관 내 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산이 인간 투여용의 제조법 글리코실화 약물, 항체, 및 다른 치료학적 생체분자를 포함하는 샘플 또는 제제 속 오염물인, 시험관 내 방법.

청구항 9

글리칸 또는 글리칸을 발현하는 세포를 단리시키는 시험관 내(*in vitro*) 방법으로서,

글리칸이 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하고,

상기 방법이

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편을 샘플과 결합시킴으로써, α 2-3-연결된 *N*-글

리콜릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산을 포함하는 글리칸, 및 단리된 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 복합체를 형성하는 단계; 및

단백질 또는 세포를 단리시키는 단계를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포가 종양 세포 또는 고양이 혈액 세포인, 시험관 내 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, α 2-3-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산을 포함하는 글리칸이 인간 투여용의 재조합 약물, 항체, 및 다른 치료학적 생체분자를 포함하는 제제 또는 제형 속 오염물인, 시험관 내 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편을 포함하는, α 2-3-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산을 발현하는 종양 세포를 검출하기 위한 진단 제제.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 14

제13항의 단리된 핵산을 포함하는 유전적 작제물.

청구항 15

제14항의 유전적 작제물을 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 16

α 2-3-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리콜릴뉴라민산을 검출하기 위한 키트로서,

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 단백질 또는 이의 단편, 상기 단리된 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 단리된 핵산, 상기 단리된 핵산을 포함하는 유전적 작제물, 또는 상기 유전적 작제물을 포함하는 숙주 세포를 포함하는, 키트.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 박테리아 독소 단백질에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산에 결합하는 능력을 유지하면서 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산에 결합하는 능력을 갖는 돌연변이체 서브틸라제 세포독소 B 서브유닛 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] AB5 독소는 2단계 과정으로 그들의 효과를 발휘한다: (i) 표적 세포 표면 상의 특이적 글리칸 수용체에 대한 5량체 B 서브유닛의 결합; (ii) AB5 독소의 내부화에 이은 필수 숙주 기능의 A 서브유닛 매개 억제 또는 손상¹. AB5 독소의 B 서브유닛은 세포 표면 글리칸 수용체를 인식하여 홀로톡신의 내부화 및 세포내 트래피킹을 지시한다. 이러한 단백질-글리칸 상호작용의 특이성은 숙주 감수성 및 조직 친화성을 결정하기 때문에 병인에 중요하다. 또한, AB5 독소 B 서브유닛과 그들의 동족체 글리칸 사이의 5가 상호작용은 매우 높은 친화도 결합을 일으켜 그들을 글리칸 검출을 위한 강력한 리간드로 만들었고, 주목할 만한 예는 조직병리학적 색전에서 강글리오사이드 GM1의 검출² 및 막에서 지질 래프트의 표지화³를 위한 콜레라 독소 B 서브유닛의 사용이다.

[0003] 문헌(참조: 2004 Paton *et al.*)에 서브틸라제 세포독소(SubAB)라 칭명되는 원형을 갖는 박테리아 AB5 독소의 새로운 하위 계열의 발견 및 초기 생물학적 특성화가 기재되었다⁴. SubAB의 경우에, A 서브유닛(SubA)은 필수 소포체 샤페론 BiP/GRP78에 대해 정교한 특이성을 갖는 서브틸라제 계열 세린 프로테아제인 것으로 밝혀졌다⁵. 구조적 연구는, 대부분의 서브틸라제와 달리, SubA가 정교한 기질 특이성을 설명하는 비정상적으로 깊은 활성 부위 틈새를 포함한다는 것을 나타냈다⁵. SubA는 다양한 세포 과정에서 BiP의 역할을 시험하기 위한 강력한 도구인 것으로 입증되었고, 그것은 또한 암 치료제로서 잠재력을 갖는다^{6,7}. 의미있게, 글리칸 어레이 분석은 독소의 B 서브유닛(SubB)이 인간이 합성할 수 없는 시알산인 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산(Neu5Gc)으로 종결되는 글리칸에 대한 고도의 결합 특이성을 갖는다는 것을 나타냈다⁸. 어레이 상의 모든 글리칸 중에서, 가장 좋은 결합은 Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -에서 일어났다. 어레이에 대한 표지된 독소의 결합은 Neu5Gc가 Neu5Ac로 변경되면 20배 감소되었고; Neu5Gc 결합이 α 2-3으로부터 α 2-6으로 변경되면 30배 이상; 시알산이 제

거되면 100배 감소되었다. 어레이 상에 제시된 구조에 대한 결합의 전체적인 패턴은 SubB가 말단 α2-3-연결된 Neu5Gc에 대해 높은 친화도를 갖고, 끝에서 두 번째 잔기에 대해서는 거의 구별되지 않음을 나타냈다. SubB-Neu5Gc 복합체의 결정 구조는 이러한 특이성의 기초를 나타냈다. Neu5Gc와 Neu5Ac를 구별하는 N-아세틸 잔기의 메틸 그룹 상이 추가의 하이드록실은 SubB의 Tyr78^{OH} 및 Met10의 주쇄와의 수소 결합과 상호작용한다⁸. 이러한 주요 상호작용은 Neu5Ac로 발생할 수 없으므로 Neu5Gc에 대한 뚜렷한 선호도를 설명한다. 구조적 데이터에 따라, 중요 잔기는 예측된 결합 포켓에서 돌연변이 유발되었고, 이는 글리칸 인식, 세포 결합 및 독성을 폐기했다. SubB 아미노산 S12 및 Y78은 Neu5Gc와 중요한 안정화 결합을 형성한다⁸. S12A 돌연변이는 글리칸 결합을 완전히 폐기한 반면, Neu5Gc와 Neu5Ac를 구별하는 C¹¹ OH 그룹과의 상호작용을 방해하는 Y78F 돌연변이는 글리칸 결합을 90%까지 감소시켰고, Neu5Ac에 비해 Neu5Gc에 대한 돌연변이체 SubB 단백질의 선호도를 폐기했다⁸.

[0004] 인간 암에서 비정상적인 글리코실화의 가장 두드러진 형태는 Neu5Gc에 의해 종결된 글리칸의 발현이다. Neu5Gc는 인간이 CMAH 유전자의 불활성화 돌연변이 때문에 Neu5Gc를 합성할 수 없기 때문에¹³, 정상적인 건강한 인간 세포에서 상당한 수준으로 발현되지 않는다⁹⁻¹². 그럼에도 불구하고, 연구는, 암 환자에서 Neu5Gc 제시가 Neu5Gc의 가장 풍부한 공급원인 붉은 육류 및 유제품의 식이 섭취를 통한 Neu5Gc 흡수에 의해 설명될 수 있음을 시사한다¹⁴. Neu5Gc의 발현은 흔히 침습성, 전이 및 종양 등급과 관련이 있기 때문에, Neu5Gc의 존재는 예후적으로 중요하다¹⁰. 암 세포 상의 Neu5Gc 글리칸의 우선적인 표현은 시알산 수송체인 시알린의 발현을 현저하게 유도하여 세포 표면에서 Neu5Gc 및 다른 시알산의 표현을 증가시키는 저산소 종양 환경에 의해 적어도 부분적으로 설명될 수 있다¹⁵. 시알릴-접합체가 접착을 조절하고 세포 이동성을 촉진한다는 사실 때문에, 표면 시알릴화에서 이러한 변화는 종양 세포의 콜론화 및 전이 잠재력에 영향을 미칠 수 있다¹⁶. Neu5Gc와 같은 비정상적인 시알산의 증가된 수준은 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 및 폐암에서 관찰되었다^{11,12}. 중요하게는, 암 세포에 Neu5Gc의 도입은 세포의 공간 및 세포 내 모두에서 발견되는 가용성 당단백질에서 가장 두드러지고, Neu5Gc는 암 세포로부터 주위 조직으로 분비된 당단백질에서 우세한 시알산이다⁹. 암에서 Neu5Gc의 발현은 또한 Neu5Gc에 대한 제노자가항체의 생산을 구동하는 것으로 공지되어 있다^{17,18}. 이러한 항-Neu5Gc 항체는 인간 암종에서 새로운 진단법, 예측학 및 치료법에 대한 잠재력을 결정하기 위해 조사 중이다¹⁷.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 α2-3-연결된 N-글리코릴뉴라민산을 갖는 글리칸 및 α2-6-연결된 N-글리코릴뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합할 수 있는 돌연변이체 서브틸라제 세포독소 B 서브유닛 단백질(SubB)에 관한 것이다. 따라서, 돌연변이체 SubB 단백질은 α2-3-연결된 N-글리코릴뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합하는 능력을 손실시키지 않고 α2-6-연결된 N-글리코릴뉴라민산을 갖는 글리칸에 결합하는 이전에 기재되지 않은 능력을 갖는다. 이는 이전에 가능했던 것보다 더 광범위한 범위의 N-글리코릴뉴라민산-함유 글리칸을 검출하고 표적화하는데 사용될 수 있는 돌연변이체 SubB 단백질을 제공한다.

[0006] 본 발명의 양태는 SubB의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 단백질을 제공하고, 여기서 상기 아미노산 서열 TTSTE(서열번호: 3)의 하나 이상의 아미노산 잔기가 변형되고, 상기 단리된 단백질은 α2-3-연결된 N-글리코릴뉴라민산 및 α2-6-연결된 N-글리코릴뉴라민산에 결합할 수 있다.

[0007] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기는 아미노산 서열 TTSTE(서열번호: 3)에서 밀줄친다.

[0008] 하나의 구현예에서, 밀줄친 아미노산 모두가 결실된다.

[0009] 하나의 특별한 구현예에서, 단리된 단백질은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 또 다른 특별한 구현예에서, 단리된 단백질은 아미노산 서열 TTSTE(서열번호: 3)에서 밀줄친 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실을 포함한다. 적합하게, 이 구현예의 단리된 단백질은 Neu5Ac 글리칸, 예를 들어, Neu5Ac-α2-6-lac 및 Neu5Ac-α2-3-lac에 결합할 수 있다. 하나의 구현예에서, 밀줄친 아미노산 모두가 결실된다.

[0011] 이 양태는 또한 단리된 단백질의 변이체, 단편 및 유도체를 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 제1 양태의 단리된 단백질 및, α2-3-연결된 N-글리코릴뉴라민산 및/또는 α2-6-연결

된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸을 포함하는, 단리된 분자 복합체를 제공한다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 양태는 제1 양태의 단리된 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0014] 하나의 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다.
- [0015] 또 다른 구현예에서, 조성물은 진단 조성물이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 검출하는 방법으로서, 상기 방법이 제1 양태의 단리된 단백질을 샘플과 조합함으로써 제1 양태의 단리된 단백질 및, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 검출가능한 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 검출 방법을 제공한다.
- [0017] 일부 구현예에서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 종양 세포 또는 고양이(feline) 혈액 세포에 의해 발현될 수 있다.
- [0018] 또 다른 구현예에서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 재조합 글리코실화 약물, 항체 및, 인간 투여용의 다른 치료적 생체분자(biomolecule)를 포함하는 샘플 또는 제제 중 오염될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태는 글리칸 또는 상기 글리칸을 발현하는 세포를 단리시키는 방법으로서, 상기 글리칸이 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하고, 상기 방법이 본원에 개시된 단리된 단백질을 샘플과 조합함으로써 단리된 단백질 및, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 복합체를 형성하는 단계 및 단백질 또는 세포를 단리시키는 단계를 포함하는, 단리 방법을 제공한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 세포는 종양 세포 또는 고양이 혈액 세포이다.
- [0021] 또 다른 구현예에서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 재조합 글리코실화 약물, 항체 및, 인간 투여용의 다른 치료적 생체분자를 포함하는 제제 또는 제형 중 오염될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 제1 양태의 단리된 단백질, 또는 상기한 양태의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 단계를 포함하는, 치료 방법을 제공한다.
- [0023] 적합하게, 제1 양태의 단리된 단백질은 세포독성제에 커플링된다.
- [0024] 본 발명의 추가의 양태는 제1 양태의 단리된 단백질을 인코딩(encoding)하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 추가의 양태는 제2 양태의 단리된 핵산을 포함하는 유전적 작제물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 추가의 양태는 상기한 양태의 유전적 작제물을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 추가의 양태는 상기한 양태의 단리된 단백질에 결합하거나 이에 대해 상승되는 항체 또는 항체 단편을 제공한다.
- [0028] 적합하게, 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 TTSTE (서열번호: 3)에서 밀줄 친 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.
- [0029] 본 발명의 관련 양태는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 검출하거나 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 발현하는 종양 세포의 치료적 표적화에 사용하기 위한 것과 같은 단리된 단백질, 단리된 핵산, 조성물, 유전적 작제물 및/또는 항체를 포함하는 키트(kit)를 제공하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 지시되지 않는 한, "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 배타적이기보다 포괄적으로 사용되어 명시된 정수 또는 정수의 그룹이 하나 이상의 다른 명시되지 않은 정수 또는 정수의 그룹을 포함할 수 있다.
- [0031] "본질적으로 ~로 구성된다"는 것은 본 맥락에서 단리된 단백질 또는 면역원성 단편이 언급된 아미노산 서열 이외에 1개, 2개 또는 3개 이하의 아미노산 잔기를 갖는다는 것을 의미한다. 추가의 아미노산 잔기는 언급된 아미노산 서열의 *N*- 및/또는 C-말단에서 발생할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0032]

또한, 부정관사 "a" 및 "an"은 단수 또는 그렇지 않으면 부정관사가 언급하는 하나 이상의 대상체를 제외하는 것으로 판독되지 않아야 한다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, "하나의" 단백질은 하나의 단백질, 하나 이상의 단백질 또는 복수의 단백질을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1. (A) Neu5Gc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc(X-선 결정 구조(참조: Byres et al., 2008)로부터 결정됨) 및 (B) Neu5Gc α 2-6Gal β 1-3Glc(X-선 결정 구조로 모델화됨)와의 복합체 중 SubB의 표면 표현. 트리스카라이드 (Trisaccharide)는 그린 또는 시안 스틱으로 도시되고, 레드 및 블루 잔기는 각각 산소 및 질소를 나타낸다.

도 2. Neu5Gc α 2-6Gal β 1-3Glc(시안 스틱으로 도시됨)로 모델화된 야생형 및 SubB 돌연변이체의 표면 표현. 돌연변이된 SubB 잔기는 그레이 스틱으로서 도시되고, 레드 및 블루 잔기는 각각 산소 및 질소를 나타낸다.

도 3. FITC-표지된 인간 및 소 혈청에 대한 조작된 SubB의 ELISA. ELISA 플레이트 상에 코팅된 SubB (A) 및 SubB Δ S106/ Δ T107 (B)은 FITC-표지된 인간 및 소 혈청 단백질을 포획할 수 있었다. 오차 막대는 이중 검정의 평균으로부터 +1SD를 나타낸다.

도 4. 렉틴 중복 검정. SubB Δ S106/ Δ T107의 니트로셀룰로스 상에 스폿팅된 인간 또는 소 AGP의 일련의 희석액에 대한 결합(표시된 스폿 당 단백질의 총량).

도 5. 인간 및 소 알파-1-산 당단백질 트립신 소화로부터 NeuAc 및 NeuGc 옥소늄 이온. (a) 소 알파-1-산 당단백질로부터의 펩타이드 TFMLAASWN[Hex2HexNAc2NeuAc1NeuGc1+Man3GlcNAc2]GTK에 상응하는 1183.163+의 m/z 에서 글리코펩타이드 이온 및 (b) NeuAc-특이적 274.1 및 292.1, 및 NeuGc-특이적 290.1 및 308.1을 포함하여 풍부한 옥소늄 이온을 나타내는 인간 알파-1-산 당단백질로부터의 펩타이드 QDQCIYN[Hex3HexNAc3NeuAc2+Man3GlcNAc2]TTYLNQQR에 상응하는 1122.284+의 m/z 에서 글리코펩타이드 이온의 MS/MS 스펙트럼의 저질량 영역. (c) 인간 및 소 알파-1-산 당단백질 트립신 소화의 LC-MS/MS 분석의 모든 MS/MS 스펙트럼으로부터 총 이온 강도의 비율로서 NeuAc- 및 NeuGc-특이적 옥소늄 이온의 강도. (d) MS, ELISA, Biacore 및 도트 블롯에 사용된 인간 및 소 AGP의 단백질 겔.

도 6. Z-바이오테크 어레이의 SubB 야생형 (WT) 및 SubB Δ S106/ Δ T107 결실 돌연변이체(2M) 원시 이미지. 영역 A (각 서브어레이의 오른쪽 하단의 상단 및 3개의 스폿) Neu5Gc 글리칸. 영역 B (각 서브어레이의 하부) Neu5Ac 글리칸. 영역 C (각 서브어레이의 우측) 대조군 스폿.

도 7. Z-바이오테크 Neu5Ac/Gc 글리칸 어레이와 SubB WT 상호작용. Neu5Gc 글리칸은 블루로, Neu5Ac는 레드로 도시된다.

도 8. Z-바이오테크 Neu5Ac/Gc 글리칸 어레이와 SubB Δ S106/ Δ T107 결실 돌연변이체 (Sub2M) 상호작용. Neu5Gc 글리칸은 블루로, Neu5Ac는 레드로 도시된다.

도 9. Z-바이오테크 어레이 상의 글리칸.

도 10. 1% 정상 인간 혈청에 스파이킹된 소 AGP를 갖는 SubB WT.

도 11. 1% 정상 인간 혈청에 스파이킹된 소 AGP를 갖는 SubB 2M(Δ S106/ Δ T107 결실 돌연변이체).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

본 발명은 α 2-3-연결된 또는 α 2-6-연결된 Neu5Gc 중 어느 하나에서 종결되는 글리칸에 결합할 수 있는 아미노산 서열 TTSTE의 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 갖는 조작된 돌연변이체 서브틸라제 세포독소 B 서브유닛 (SubB) 단백질에 관한 것이다. 단리된 단백질은 특정 종양 세포에 의해 발현되고 또한 유형 A 고양이 혈액 세포에 의해 발현된 것과 같이 α 2-3-연결된 *N*-글리코릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코릴뉴라민산을 포함하는 글리칸을 검출시키는 방법에 사용될 수 있다. 이러한 글리칸은 또한 약물 및 다른 생체분자 체제 중 오염될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 양태는 α 2-3-연결된 *N*-글리코릴뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코릴뉴라민산을 포함하는 글리칸 또는 이러한 글리칸을 발현하는 세포를 정제, 제거 또는 고갈시키는 것에 관한 것일 수 있다. 본 발명의 추가의 양태는 특정 종양 세포에 대한 항암제의 표적화된 전달을 위한, 단리된 단백질의 치료적 용도에 관한 것이다.

[0035]

본 발명의 목적을 위해, "단리된"이란 자연 상태에서부터 제거되거나 그렇지 않으면 인간 조작을 받은 물질을 의

미한다. 단리된 물질은 자연 상태에서 통상적으로 동반되는 성분이 부분적, 실질적 또는 본질적으로 존재하지 않거나 고갈될 수 있다. 단리된 물질은 천연, 화학적 합성 또는 제조합 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 단리된 물질은 농축된, 부분적으로 정제된 또는 정제된 형태일 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같이, "샘플"은 더 큰 본체의 대표인 임의의 단편, 조각, 부분 또는 일부일 수 있다. 샘플은 약제, 약물, 항체 또는 다른 치료적 제형 또는 제제 또는 인간, 동물 또는 다른 생물학적 공급원으로부터 수득된 것과 같은 생물학적 샘플일 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직 샘플, 예를 들어, 생검, 얼룩, 조직 단편 또는 세포 펠렛 또는 뇨, 혈청, 혈장, 뇌척수액 또는 타액을 포함하는 체액 샘플을 포함하는 것과 같은 체액 샘플일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 일반적으로 본원에 사용된 바와 같이, "조성물"은 하나 이상의 다른 성분, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 염, 완충제 및/또는 안정화제와 함께 단리된 단백질, 핵산, 유전적 작제물, 항체 또는 다른 분자를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 하나의 특별한 구현예에서, "진단" 조성물은 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 단백질의 검출을 촉진시키는 하나 이상의 다른 분자 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 이후 보다 상세히 기재될 효소 기질, 2차 항체, 색 시약, 표지 및 촉매(예: "검출 시약")를 포함할 수 있다. 다른 특별한 구현예에서, "약제학적" 조성물은 이후 보다 상세히 기재될 본원에 개시된 단리된 단백질의 치료적 투여를 촉진시키는 하나 이상의 다른 분자 성분(예: 담체, 희석제 또는 부형제)을 포함할 수 있다.

[0038] "단백질"이란 아미노산 중합체를 의미한다. 아미노산은 당업계에서 충분히 이해되는 바와 같은 천연 또는 비천연 아미노산, D- 또는 L-아미노산일 수 있다. 용어 "단백질"은 50개 이하의 아미노산을 갖는 단백질을 기재하는데 전형적으로 사용되는 "펩타이드" 및 50개 이상의 아미노산을 갖는 단백질을 기재하는데 전형적으로 사용되는 "폴리펩타이드"를 포함하고 포함한다.

[0039] 본원에 일반적으로 사용된 바와 같이, "글리칸"은 당단백질, 당지질 또는 다른 탄수화물 함유 거대분자이고, 펩타이드글리칸, 당단백질, 당펩타이드, 당지질 단백질 등으로서 칭명될 수 있는 분자를 포함한다. 특별한 글리칸은 *N*-글리코실뉴라민산(Neu5Gc)을 포함한다. 글리칸은 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함할 수 있다. 적합하게, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 말단 시알산이다. 예로써, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 Neu5Gc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -에 서와 같은 말단 시알산이고; α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 Neu5Gc α 2-6Gal β 1-3Glc-의 말단 시알산이다.

[0040] 진술한 내용으로부터 이해되는 바와 같이, 본 발명의 바람직한 양태는 아미노산 서열 TTSTE의 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 갖는 SubB 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 단리된 단백질을 제공하고, 상기 단리된 단백질은 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸 및 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸에 결합할 수 있다. 본 발명의 관련 양태는 제1 양태의 단리된 단백질 및, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸을 포함하는, 단리된 분자 복합체를 제공한다.

[0041] 이러한 맥락에서, " α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산에 결합할 수 있는"이란 단리된 단백질이 또한 야생형 SubB 단백질에 필적할 만한 친화도로 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합하면서 야생형 SubB 단백질보다 실질적으로 더 큰 친화도로 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합한다는 것을 의미한다. 특별한 구현예에서, 단리된 단백질은 약 5-15nM, 약 7-12nM 또는 약 8-10nM의 친화도로 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합한다. 특별한 구현예에서, 단리된 단백질은 약 8-20nM, 10-18nM 또는 약 14-16nM의 친화도로 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합한다.

[0042] 아미노산 서열 TTSTE는 통상적으로 야생형 SubB 단백질에 존재한다. 야생형 SubB 단백질은 서열번호: 2에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

```
1      MTIKRFFVCA GIMGCLSLNP AMAEWTGDAR DGMFSGVVIT QFHTGQIDNK PYFCIEGKQS
61     AGSSISACSM KNSSVWGASF STLYNQALYF YTTGQPVRIY YKPGVWYTPP FVKALTSNAL
121    VGLSTCTTST ECFGPD RKKN S
```

[0043]

[0044] 밑줄 친 잔기는 성숙한 형태의 SubB에 부재하는 N-말단 영역이다. 따라서, 본원에 사용된 넘버링은 글루타메이트 잔기 24에서 시작한다(즉, Glu24 = 잔기 1). 이 넘버링을 사용하여, **블드체** 잔기 TTSTE (서열번호: 3)는 "T104-E108 루프"에 상응한다. α 2-6 구조의 3원 당이 SubB 단백질 표면 위에서 역 중첩되어 SubB 잔기 T104-

E108을 포함하는 루프와 접촉하게 한다는 것이 제안된다. 이 루프는 C103 및 C109 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화된다. 생성되는 입체 장애는 SubB의 원래의 글리칸 어레이 분석에서 관찰된 α 2-6-연결된 Neu5Gc 구조의 상당히 더 불량한 결합을 고려하여 결합 포켓으로의 말단 Neu5Gc의 도킹을 왜곡시킨다⁸. 루프에서 하나 이상의 잔기의 변형은 또한 α 2-3 구조에 대한 결합을 허용하면서 돌연변이체 SubB 단백질의 α 2-6 구조에 대한 결합을 향상시킨다. 일반적으로, 루프의 "높이"를 감소시키거나 낮추는 아미노산 결실 또는 치환은 α 2-6-연결된 Neu5Gc 구조의 향상된 결합에 유리할 수 있다. 이러한 맥락에서, "높이"는 아미노산 R 그룹이 3D 공간에서 펩타이드 백본으로부터 돌출되거나 연장되는 거리의 함수일 수 있다(예: 발린은 류신보다 더 높은 높이를 갖는다). 따라서, 하나의 구현예에서, 루프의 하나 이상의 TTSTE (서열번호: 3) 잔기의 결실이 바람직하다(본원에서 "결실 돌연변이체"로서 지칭됨). 바람직하게는, 이들은 TTSTE (서열번호: 3)에서 밀줄 친다. 서열 번호: 2의 성숙한 SubB 아미노산 서열의 넘버링에 기초하여, 잔기 S106 및/또는 T107이 결실된다. 특히 바람직한 구현예에서, 잔기 S106 및 T107이 결실된다.

[0045] 따라서, 돌연변이체 SubB 단백질의 하나의 특별한 구현예는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함한다:

```
1 EWTGDARDGM FSGVVITQFH TGQIDNKPYP CIEGKQSAGS SISACSMKNS SVWGASFSTL
61 YNQALYFYTT GQPVRIYYKP GVWTPPPFVK ALTSNALVGL STCTTECFGP DRKKNS
```

[0046]

[0047] 또 다른 구현예에서, 단리된 단백질은 아미노산 서열 TTSTE (서열번호: 3)에서 밀줄 친 아미노산 잔기의 결실을 포함한다.

[0048] 서열번호: 2에서 성숙한 SubB 아미노산 서열의 넘버링에 기초하여, 잔기 T107 및 E108이 결실된다. 표 1에 제시된 데이터로부터 명백한 바와 같이, T107 및 E108이 결여된 단리된 단백질 "결실 돌연변이체"는 또한 α 2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합하면서 야생형 SubB 단백질보다 실질적으로 더 큰 친화도로 α 2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산 글리칸에 결합한다. 그러나, S106 및 T107 결실 돌연변이체(예: 서열번호: 1)와 대조적으로, T107 및 E108 결실 돌연변이체는 Neu5Ac- α 2-6-lac 및 Neu5Ac- α 2-3-lac(예: 표 1 참조)와 같은 Neu5Ac 글리칸을 포함하는 글리칸에 광범위하게 결합할 수 있다. WT SubB는 Neu5Ac- α 2-6-lac에 검출가능하게 결합하지 않는다는 것이 또한 주시된다. 따라서, T107 및 E108 결실 돌연변이체 단백질은 Neu5Gc 글리칸, 예를 들어, α 2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산 글리칸 및 α 2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 글리칸 및 또한 Neu5Ac 글리칸, 예를 들어, Neu5Ac- α 2-6-lac 및 Neu5Ac- α 2-3-lac에 결합하거나 이들을 검출하기 위한 유용한 단백질일 수 있다.

[0049] 본원에 개시된 단리된 단백질의 변이체, 단편 및 유도체도 또한 제공된다. 적합하게, 단리된 단백질의 변이체, 단편 및 유도체는 α 2-3-연결된 및 α 2-6-연결된 Neu5Gc에서 종결되는 글리칸에 결합하는 능력을 유지한다. 특별한 구현예에서, 이는 α 2-3-연결된 및 α 2-6-연결된 Neu5Gc에서 종결되는 글리칸에 결합하는 본원에 개시된 단리된 단백질의 능력의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 펩타이드 "변이체"는 본원에 개시된 단리된 단백질의 아미노산 서열과 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 본원에 개시된 펩타이드 "변이체"는 상이한 아미노산에 의해 결실되거나 치환된 하나 이상의 아미노산을 가질 수 있다. 일부 아미노산은 펩타이드의 생물학적 활성을 변화시키지 않고 치환되거나 결실될 수 있다(보존적 치환)는 것이 당업계에서 충분히 이해된다.

[0051] 각각의 단백질 및 핵산 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 본원에 일반적으로 사용된 용어는 "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성 백분율" 및 "실질적인 동일성"을 포함한다. 각각의 핵산/단백질이 각각 (1) 단지 핵산/단백질에 의해 공유되는 완전한 핵산/단백질 서열의 하나 이상의 부분 및 (2) 핵산/단백질 사이에서 발산하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있기 때문에, 서열 비교는 전형적으로 "비교 윈도우" 상의 서열을 비교하여 서열 유사성의 국부적 영역을 동정하고 비교함으로써 수행된다. "비교 윈도우"는 기준 서열과 비교되는 전형적으로 6, 9 또는 12개의 인접 잔기의 개념적 세그먼트를 의미한다. 비교 윈도우는 각각의 서열의 최적 정렬을 위한 기준 서열과 비교하여 약 20% 이하의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하기 위한 서열의 최적 정렬은 컴퓨터화된 알고리즘의 구현(Intelligenetics의 Geneworks 프로그램; Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA의

GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 본원에 참조로 인용됨) 또는 검사 및 선택된 임의의 다양한 방법에 의해 생성된 최선의 정렬(즉, 비교 윈도우에 대해 최고 백분율 상동성을 유도함)에 의해 수행될 수 있다.

- [0052] 서열 유사성 및 동일성은 알고리즘 GAP(Wisconsin Package, Accelrys, San Diego USA)를 참조하여 통상적으로 정의된다. GAP는 니들만 및 브니쉬(Needleman and Wunsch) 알고리즘을 사용하여 일치 수를 최대화하고 갭의 수를 최소화하는 2개의 완전 서열을 정렬시킨다. 일반적으로, 갭 생성 패널티 = 12 및 갭 확장 패널티 = 4와 함께 디폴트 매개변수가 사용된다.
- [0053] 문헌(참조: Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410)의 방법을 사용하는 BLAST 계열의 알고리즘, psi-Blast 알고리즘(참조: Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402), FASTA(문헌(참조: Pearson and Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448)의 방법을 사용함), Smith-Waterman 알고리즘(참조: Smith and Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197), 또는 일반적으로 디폴트 매개변수를 사용하는 상기 문헌(참조: Altschul *et al.* (1990))의 TBLASTN 프로그램이 또한 참조된다.
- [0054] 서열 분석의 상세한 논의는 문헌[참조: Unit 19.3 of CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.* (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-2015)]에서 찾을 수 있다.
- [0055] 서열 비교는 본원에 기재된 관련 서열의 전장에 대해 수행될 수 있다.
- [0056] 용어 "서열 동일성"은 서열이 비교 윈도우에서 동일하다는 정도를 고려하여 표준 알고리즘을 사용하여 적절한 정렬과 관련된 정확한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 일치 수를 포함하는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용된다. 따라서, "서열 동일성 백분율"은 비교 윈도우에 대해 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예: A, T, C, G, I)가 두 서열에서 발생하여 일치된 위치의 수를 산출하는 위치의 수를 결정하고, 일치된 위치의 수를 비교 윈도우 중 총 위치의 수(즉, 윈도우 크기)로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산된다. 예를 들어, "서열 동일성"은 DNASIS 컴퓨터 프로그램(윈도우 버전 2.5; 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 Hitachi Software engineering Co., Ltd.로부터 이용 가능함)에 의해 계산된 "일치 백분율"을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한 본원에 개시된 단리된 펩타이드의 단편을 제공한다. 일부 구현예에서, 단편은 본원에 개시된 단리된 단백질의 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115개의 인접 아미노산을 포함하거나, 본질적으로 이들로 이루어지거나, 이들로 이루어질 수 있다.
- [0058] 본원에 개시된 단리된 펩타이드의 유도체도 또한 제공된다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같이, "유도체" 단백질 또는 펩타이드는, 예를 들어, 다른 화학적 잔기와 결합 또는 복합체화, 번역후 변형(예: 인산화, 유비퀴틴화, 글리코실화), 화학적 변형(예: 가교결합, 아세틸화, 비오틴화, 산화 또는 환원 등), 표지(예: 형광단, 효소, 방사성 동위원소)와의 결합 및/또는 당업계에 이해되는 바와 같은 추가의 아미노산 서열의 포함에 의해 변경되었다.
- [0060] 이와 관련하여, 당업자는 단백질의 화학적 변형에 관한 보다 광범위한 방법론에 대해 문헌[참조: Chapter 15 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Eds. Coligan *et al.* (John Wiley & Sons NY 1995-2015)]을 참조한다.
- [0061] 추가의 아미노산 서열은 융합 단백질을 생성하는 융합 파트너 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예로써, 융합 파트너 아미노산 서열은 단리된 융합 단백질의 검출 및/또는 정제를 도울 수 있다. 비제한적인 예는 금속 결합(예: 폴리히스티딘) 융합 파트너, 말토스 결합 단백질(MBP), 단백질 A, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST), 형광성 단백질 서열(예: GFP), 에피토프 태그, 예를 들어, myc, FLAG 및 헤마글루티닌 태그를 포함한다.
- [0062] 본 발명의 단리된 펩타이드, 변이체 및/또는 유도체는 화학적 합성 및 재조합 DNA 기술을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 생성될 수 있다.
- [0063] 화학적 합성은 고체 상 및 용액 상 합성을 포함한다. 이러한 방법은 당업계에 익히 공지되어 있지만, 문헌[참조: Chapter 9 of SYNTHETIC VACCINES Ed. Nicholson (Blackwell Scientific Publications) 및 Chapter 15 of CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2014)]에 제공된 화학적 합성 기술의 예가 참조된다. 이와 관련하여, 국제 공보 제WO 99/02550호 및 국제 공보 제WO 97/45444호도 또한 참조된다.
- [0064] 재조합 단백질은, 예를 들어, 문헌[참조: Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold

Spring Harbor Press, 1989), 특히 Sections 16 and 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2014), 특히 Chapters 10 and 16; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. NY USA 1995-2014), 특히 Chapters 1, 5 and 6]에 기재된 바와 같은 표준 프로토콜을 사용하여 당업자가 편리하게 제조할 수 있다.

- [0065] 검출, 정제 및/또는 치료 방법에 유용할 수 있는 단리된 단백질의 "유도체"의 특별한 구현에는 다음과 같이 기재된다.
- [0066] 본 발명의 양태는 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 검출하는 방법으로서, 상기 방법이 본원에 개시된 단리된 단백질을 샘플과 조합함으로써 제1 양태의 단리된 단백질 및, α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 검출가능한 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 검출 방법을 제공한다.
- [0067] α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산은 종양 세포, 및 특정 혈액 세포, 예를 들어, 고양이 혈액 세포에 의해 발현되는 글리칸의 성분일 수 있다. 특별한 구현예에서, α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸은 인간 암종에 의해 발현될 수 있고, 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 및 폐암에서 증가된 발현이 검출된다. 다른 특별한 구현예에서, N-글리코실뉴라민산은 고양이과의 "A" 혈액 그룹을 정의하는 반면, N-아세틸뉴라민산은 고양이과의 "B" 혈액 그룹을 정의한다.
- [0068] 따라서, 단리된 단백질은 환자 샘플, 예를 들어, 생검, 체액 샘플, 얼룩 등에서 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산-발현 종양 세포의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 단리된 단백질은 고양이 혈액 샘플에서 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 것과 같이 N-글리코실뉴라민산 글리칸을 발현하는 혈액 세포를 검출함으로써 고양이 혈액형 분류에 사용될 수 있다.
- [0069] 다른 특별한 구현예에서, α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸은 약물, 항체 또는, 인간 투여용 다른 치료적 생체분자를 포함하는 제제 또는 제형에 존재할 수 있다.
- [0070] 제조할 글리코실화 약물, 항체 및, 인간 투여용 다른 치료적 생체분자는 흔히 비인간 시알산 N-글리코실뉴라민산(Neu5Gc)을 합성할 수 있고/있거나 대사적으로 혼입할 수 있는 비인간 포유동물 세포주에서 생산된다. 일부 인간은 높은 수준의 순환성 항-Neu5Gc 항체를 갖는다. 예로써, 임상적으로 효과적인 항-EGFR mAb 세특시맵은 공유 결합된 Neu5Gc를 가질 수 있다. 정상 인간의 항-Neu5Gc 항체는 Neu5Gc-특이적 방식으로 세특시맵과 상호 작용하고 시험관내에서 면역 복합체를 생성한다. 이러한 항체는 생체내 세특시맵 (또는 다른 치료적 항체) 클리어런스를 향상시킬 수 있다. 따라서, 약물, 항체 및 다른 치료적 생체분자의 Neu5Gc 오염은 이러한 약물이 투여된 환자의 반감기, 효능 및 면역 반응에 악영향을 미칠 수 있다. Neu5Gc 결핍 세포 및 배지를 사용하여 Neu5Gc 오염을 피할 수는 있지만, 이것이 모든 경우에 최적의 해결책은 아닐 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 구현예는 약물, 항체 또는, 인간 투여용 다른 치료적 생체분자에서 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산의 검출을 제공한다. 본 발명의 다른 구현예는 약물, 항체 또는, 인간 투여용 다른 치료적 생체분자로부터 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산-함유 오염물의 단리, 고갈 또는 제거를 제공한다.
- [0071] 따라서, 단리된 단백질(예: 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것과 같은 본원에 개시된 단리된 단백질) 또는 이의 단편 또는 변이체를 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산의 검출을 촉진시키는 제제에 커플링시키거나, 결합하거나, 부착시키거나 또는 그렇지 않으면 연결시키는 것이 유리할 수 있다. 바람직한 형태에서, 단리된 단백질은 표지에 공유 결합된다.
- [0072] 다른 구현예에서, 표지된 2차 결합제, 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸에 결합될 경우 단리된 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0073] 상기 구현예 중 어느 하나에 따라서, 표지는 크로모젠, 촉매, 비오틴, 아비딘, 디곡시게닌, 효소, 형광 발색단, 화학발광 분자 또는 방사성 동위원소를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 형광 발색단은, 예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 알렉사 염료, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITL), 알로피코시아닌(APC), 텍사스 레드, FAM, ROX, Cy5, Cy3, 또는 R-피코에리트린(RPE)일 수

있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [0075] 효소는 서양 고추냉이 퍼옥시다제(HRP), 알칼리성 포스페이트(AP), β -갈락토시다제 또는 글루코스 옥시다제일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 기질은 디아미노반지딘(DAB), 불변 레드, 3-에틸벤즈티아졸린 설펜 산(ABTS), 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸륨(NBT), 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘(TNB) 및 4-클로로-1-나프톨(4-CN)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 화학발광 기질의 비제한적인 예는 HRP 및 과산화수소의 존재하에 산화되어 여기 상태 생성물(3-아미노프탈레이트)을 형성하는 LuminolTM이다.
- [0076] 방사성 동위원소 표지는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁵¹Cr 및 ⁹⁹Tc를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0077] 직접적인 시각적 표지의 경우에, 콜로이드성 금속 또는 비금속 입자, 염료 입자, 유기 중합체, 라텍스 입자, 리 포솜, 미니셀 또는 신호 생성 물질을 함유하는 다른 소포 등을 사용할 수 있다.
- [0078] 표지된 단리된 단백질은 조직화학, 유동 세포 계측법, 형광 현미경 및 ELISA, 신체 이미징(예: PET 스캔) 및 핵 의학과 같은 검출 시스템에 사용될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0079] 추가의 양태에서, 본 발명은 글리칸 또는 상기 글리칸을 발현하는 세포를 단리시키는 방법으로서, 상기 글리칸 이 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하고, 상기 방법이 본원 에 개시된 단리된 단백질을 샘플과 조합함으로써 단리된 단백질 및, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 복합체를 형성하는 단계; 및 글리칸 또는 세포를 단리시키는 단계를 포함하는, 단리 방법을 제공한다.
- [0080] 이러한 맥락에서, 용어 "단리시키는"은 바람직하게는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸 또는 이를 발현하는 세포를 정제, 농축 또는 고갈 또는 제거하는 것을 의미한다.
- [0081] 일부 구현예에서, 단리된 단백질(예: 서열번호: 1의 아미노산 서열 포함) 또는 이의 단편 또는 변이체는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸 또는 이를 발현하는 세포의 검출을 촉진시키는 상기한 표지에 커플링된다. 비제한적인 예는 종양 세포 또는 고양이 혈액 세포의 유 동 세포 계측 분류를 촉진시키는 형광성 표지(상기한 바와 같음)를 포함한다.
- [0082] 또 다른 구현예에서, 본원에 개시된 단리된 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸 또는 이를 발현하는 세포의 단리, 농축, 정 제, 고갈 또는 제거를 촉진시키는 기질에 커플링되거나, 결합되거나, 부착되거나 그렇지 않으면 연결될 수 있다.
- [0083] 본원에 개시된 단리된 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체는 비드, 매트릭스, 가교결합된 중합체, 겔, 입자, 표 면 또는 다른 고체 또는 반고체 기질일 수 있는 기질에 커플링되거나, 결합되거나, 부착되거나 그렇지 않으면 연결될 수 있다. 특별한 구현예에서, 기질은 세파로스, 아가로스, 단백질 A, 단백질 G, 자기 비드, 상자성 입 자 또는 센서 칩 표면(예: BIACore 또는 표면 플라스몬 공명을 위한)일 수 있거나 이들을 포함할 수 있다. 적 합하게, 샘플은 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함할 수 있거 나 이를 포함하는 것으로 의심될 수 있는 분자 또는 이를 발현하는 세포의 혼합물을 포함한다.
- [0084] 특정 구현예에서, 기질에 커플링되거나 결합되거나 부착되거나 그렇지 않으면 연결된 본원에 개시된 단리된 단 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민 산을 포함하는 글리칸 또는 이를 발현하는 세포의 단리, 농축, 정제, 고갈 또는 제거를 촉진시키는 크로마토그 래피(예: 친화도 크로마토그래피), 자기 비드 고갈 또는 다른 기술에 적합할 수 있다.
- [0085] 특별한 구현예에서, α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산은 샘플 중 오 염물로서 존재할 수 있고, 이에 의해 단리된 단백질과 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 사이에 형성된 복합체는 샘플로부터 오염물을 제거한다. 특별한 예는 상기 기재된 바와 같 이 제조할 글리코실화 약물, 항체 및 인간 투여용 다른 치료적 생체분자를 포함하는 제제 또는 제형이다.
- [0086] 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 것과 같이 본원에 개시된 단리된 단백질 또는 단편, 변이체 또는 유도 체는 α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸을 발현하 는 종양 세포에 항암 화합물의 표적 전달용으로 적합할 수 있다. α 2-3-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 *N*-글리코실뉴라민산 모두에 결합하는 능력은 본 발명이 야생형 SubB 단백질을 사용하여 제공될 수

있는 것보다 훨씬 더 효과적인 표적화된 전달 시스템을 제공한다는 것을 의미한다.

- [0087] 따라서, 본 발명의 추가의 양태는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 단리된 단백질 또는 본원에 개시된 조성물을 대상체에게 투여함으로써 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 발현하는 암 세포를 선택적으로 표적화하는 단계를 포함하는, 치료 방법을 제공한다.
- [0088] 상기한 바와 같이, 일부 종양 세포는 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸을 발현하는 반면, 정상 세포는 전형적으로 이들 당을 발현하지 않는다. 특별한 구현예에서, α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 포함하는 글리칸은 인간 암 종에 의해 발현될 수 있고, 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 및 폐암에서 증가된 발현이 검출되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0089] 한 구현예에서, 단리된 단백질은 α2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 발현하는 종양 세포에의 결합, 이의 사멸 또는 불능화를 촉진시키는 세포독성제에 커플링되거나 결합되거나 부착되거나 그렇지 않으면 연결될 수 있다.
- [0090] 세포독성제는 방사성 핵종, 화학요법 약물, 돌연변이원, 독소, 유사분열 억제제 또는 다른 항증식제, 프로-세포사멸제, DNA 삽입제 또는 종양 세포의 사멸 또는 불능화를 돕거나 일으키는 임의의 다른 제제일 수 있다.
- [0091] 방사성 핵종의 비제한적인 예는 ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ⁹⁰Yt, ¹⁹³Pt, ¹⁷⁷Lu, ¹³⁴Eu 및 ⁶⁷Ga를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0092] 화학요법 약물, 돌연변이원, 독소, 유사분열 억제제, 프로-세포사멸제 및 DNA 삽입제는 독소루비신, N-아세틸-γ-칼리케아마이신, 메이탄시노이드, 탁소이드, 아우리스타틴 및 듀오카르마이신을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 화학요법 약물, 돌연변이원, 독소, 유사분열 억제제, 프로-세포사멸제 및 DNA 삽입제는 절단가능하거나 절단가능하지 않은 링커에 의해 단리된 단백질에 커플링되어 절단가능한 접합체를 형성할 수 있다. 전형적으로, 절단가능한 접합체는 절단가능한 링커가 절단되어 약물을 세포로 방출시키는 종양 세포에 의해 내부화된다. 절단가능하지 않은 링커의 경우, 이들은 약물이 표적화된 종양 세포에 전적으로 국한되는 것이 필수적이고, 표적화된 종양 세포로부터 인접 세포, 조직 또는 체액으로 약물의 "누출"이 없는 경우에 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 화학요법 약물, 돌연변이원, 독소, 유사분열 억제제, 프로-세포사멸제 및 DNA 삽입제는 표적화된 종양 세포 내부에서 내재화시 활성화되는 프로드럭의 형태일 수 있다.
- [0093] 치료 용도와 관련된 양태에서, 단리된 단백질(예: 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함함), 또는 이의 단편 또는 변이체는 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다.
- [0094] 적절하게, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0095] "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"란 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 특별한 투여 경로에 따라, 당업계에 익히 공지된 다양한 담체가 사용될 수 있다. 이러한 담체는 당, 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 맥아, 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 리포솜 및 다른 지질계 담체, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충 용액, 유화제, 등장성 식염수 및 하이드로클로라이드, 브로마이드 및 설페이트를 포함하는 광물 산 염과 같은 염, 유기산, 예를 들어, 아세트레이트, 프로피오네이트 및 말로네이트 및 발열원 부재 물을 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0096] 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제를 기재하는 유용한 참조문헌은 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)]이다.
- [0097] 임의의 안전한 투여 경로가 본 발명의 조성물을 환자에게 제공하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 비경구, 설하, 구강, 정맥내, 관절내, 근육내, 피부내, 피하, 흡입, 안내, 복강내, 뇌실내, 경피 등이 사용될 수 있다. 근육내 및 피하 주사는, 예를 들어, 면역요법 조성물, 단백질성 백신 및 핵산 백신의 투여에 적절하다.
- [0098] 투여 형태는 정제, 분산액, 현탁액, 주사제, 용액, 시럽, 트로키제, 캡슐제, 좌제, 에어로졸, 경피 패치 등을 포함한다. 이들 투여 형태는 또한 이러한 목적을 위해 구체적으로 설계된 조절 방출 장치 또는 이러한 방식으로 추가로 작용하도록 변형된 이식체의 다른 형태를 주사 또는 이식함을 포함할 수 있다. 치료제의 조절 방출은 치료제를, 예를 들어, 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알콜, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 특정 셀룰로스 유도체, 예를 들어, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스를 포함하는 소수성 중합체로 코팅함으로써 수행될 수 있다.

또한, 조절 방출은 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구를 사용함으로써 수행될 수 있다.

- [0099] 경구 또는 비경구 투여에 적합한 본 발명의 조성물은 각각 본 발명의 하나 이상의 치료제의 소정량을 함유하는 캡슐, 사세 또는 정제와 같은 별개의 단위, 불말 또는 과립, 또는 수성 액체, 비수성 액체, 수중유 에멀전 또는 유중수 액체 에멀전 중의 용액 또는 현탁액으로서 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 약학 방법에 의해 제조될 수 있지만, 모든 방법은 하나 이상의 필요한 성분을 구성하는 담체와 상기한 바와 같은 하나 이상의 제제를 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 본 발명의 제제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하고 긴밀하게 혼합한 후, 필요한 경우, 생성물을 목적하는 형태로 성형함으로써 제조된다.
- [0100] 상기 조성물은 투여 제형과 양립가능한 방식 및 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 투여량은 적절한 기간 동안 환자에게 유익한 반응을 일으키기에 충분해야 한다. 투여되는 제제(들)의 양은 의사의 판단에 따르는 인자인 나이, 성별, 체중 및 일반적 건강 상태를 포함하여 치료될 환자에 따라 달라질 수 있다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 개시된 단리된 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 적합하게, 항체 또는 항체 단편은 야생형 SubB 단백질(예: 서열번호: 2의 아미노산 서열을 포함함)에 결합하지 않거나 그것이 본원에 개시된 단리된 단백질(예: 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함함)에 결합하는 친화도와 비교하여 적어도 5배 또는 10배 더 낮은 친화도로 결합한다. 적합하게, 항체 또는 항체 단편은 아미노산 서열 TTSTE의 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기를 포함하는 서열번호: 1의 에피토프에 결합한다.
- [0102] 본원에 사용된 바와 같이, "항체"는 면역글로불린이거나, 면역글로불린을 포함한다. 용어 "면역글로불린"은 면역글로불린 아이소타입 IgA, IgD, IgM, IgG 및 IgE 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 포유동물 면역글로불린 유전자 복합체의 임의의 항원 결합 단백질 생성물을 포함한다. 용어 "면역글로불린"에 키메라 또는 인간화되거나 그렇지 않으면 천연 발생적이거나 인간 개입(예: 재조합 DNA 기술)에 의해 생산되는지와 관계 없이 변경된 또는 변이체 아미노산 잔기, 서열 및/또는 글리코실화를 포함하는 면역글로불린이 포함된다.
- [0103] 항체 단편은 Fab 및 Fab'2 단편, 디아바디 및 단일쇄 항체 단편(예: scVs)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 전형적으로, 항체는 각각 CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열을 포함하는 각각의 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 CDR1, 2 및/또는 3 아미노산 서열의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 바람직한 항체 단편은 적어도 하나의 전체 경쇄 가변 영역 CDR 및/또는 적어도 하나의 전체 경쇄 가변 영역 CDR을 포함한다.
- [0104] 항체 및 항체 단편은 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 모노클로날 항체는, 예를 들어, 문헌(참조: Kohler & Milstein, 1975, Nature **256**, 495)의 논문에 기재된 표준 방법 또는, 예를 들어, 문헌(참조: Chapter 2 of Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY)에 기재된 바와 같은 이의 보다 최근 변형에 의해 단리된 단백질(예: 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함함) 또는 이의 단편 또는 변이체가 접종된 생산 종으로부터 유래된 비장 또는 다른 항체 생산 세포를 불멸화시킴으로써 생산될 수 있다. 항체는 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산을 적합한 숙주 세포에서 발현시킴으로써 재조합 합성 항체 또는 항체 단편으로서 생산될 수 있다는 것이 또한 이해될 것이다. 재조합 합성 항체 또는 항체 단편 중쇄 및 경쇄는 동일한 숙주 세포에서 상이한 발현 벡터로부터 공발현될 수 있거나 숙주 세포에서 단일쇄 항체로서 발현될 수 있다. 재조합 항체 발현 및 선택 기술의 비제한적인 예는 문헌(참조: Chapter 17 of Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY *supra* and Zuberbuhler *et al.*, 2009, Protein Engineering, Design & Selection **22** 169)에 제공된다.
- [0105] 항체 및 항체 단편은 "외래" 항체에 유해한 면역 반응을 일으키지 않고 다른 종에서 생산되거나 다른 종으로부터 유래되는 한 종에 투여가능하도록 변형될 수 있다. 인간의 맥락에서, 이것은 다른 종에서 생산되거나 다른 종으로부터 유래되는 항체의 "인간화"이다. 이러한 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 일반적으로 인간 항체 스캐폴드 또는 백본 상에서 비인간 항체 상보성 결정 영역(CDR)의 재조합 "그래프팅"을 포함한다.
- [0106] 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 표지된다. 표지는 상기한 바와 같을 수 있다.
- [0107] 본 발명은 또한 본원에 개시된 단리된 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산 또는 이의 단편 또는 변이체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 단리된 핵산은 서열번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 단백질 또는 이의 단편 또는 변이체를 인코딩한다.
- [0108] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "핵산"은 일본쇄 또는 이본쇄 DNA 및 RNA를 나타낸다. DNA는 게놈 DNA 및 cDNA를 포함한다. RNA는 mRNA, RNA, RNAi, siRNA, cRNA 및 자가촉매적 RNA를 포함한다. 핵산은 또한 DNA-RNA 하

이브리드일 수 있다. 핵산은 전형적으로 A, G, C, T 또는 U 염기를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 그러나, 뉴클레오타이드 서열은 다른 염기, 예를 들어, 이노신, 메틸리시토신, 메틸이노신, 메틸아데노신 및/또는 티오우리딘을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- [0109] 단리된 핵산의 변이체도 또한 고려된다.
- [0110] 하나의 구현예에서, 핵산 변이체는 서열번호: 1을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0111] 또 다른 구현예에서, 핵산 변이체는 높은 엄격도 조건하에 서열번호: 1을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 하이브리드화할 수 있다.
- [0112] 높은 엄격도 조건은 문헌[참조: Chapters 2.9 and 2.10 of Ausubel *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1995-2015), 특히 페이지 2.9.1 내지 2.9.20]에 기재된 바와 같이 당업계에 익히 공지되어 있다.
- [0113] 일반적으로, 엄격도는 하이브리드화 및/또는 세척 동안 하나 이상의 인자의 농도에 의존한다. 이러한 인자는 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이 이온 강도, 세척 유형 및/또는 농도, 온도, 시간, 변성제 유형 및/또는 농도를 포함할 수 있다.
- [0114] 높은 엄격도 조건의 특이적인 비제한적 실시예는 다음을 포함한다: -
- [0115] (i) 적어도 약 31% v/v 내지 적어도 약 50% v/v 포름아미드 및 42°C에서 하이브리드화를 위한 적어도 약 0.01 M 내지 적어도 약 0.15M 염 및 42°C에서 세척을 위한 적어도 약 0.01M 내지 적어도 약 0.15M 염;
- [0116] (ii) 65°C에서 하이브리드화를 위한 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS, 및 (a) 0.1 x SSC, 0.1% SDS; 또는 (b) 약 1시간 동안 65°C 초과 온도에서 세척하기 위한 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 1% SDS; 및
- [0117] (iii) 약 20분 동안 68°C 이상에서 세척하기 위한 0.2 x SSC, 0.1% SDS.
- [0118] 일반적으로, 세척은 $T_m = 69.3 + 0.41 (G + C) \%$ -12°C에서 수행된다. 일반적으로, 이중 DNA의 T_m 은 일치되지 않은 염기의 수가 1% 증가할 때마다 약 1°C씩 감소한다.
- [0119] 하나의 양태에서, 단리된 핵산은 하나 이상의 다른 유전적 성분에 작동가능하게 연결되거나 결합되는 단리된 핵산을 포함하는 유전적 작제물에 존재한다. 유전적 작제물은 단리된 핵산의 치료적 전달 또는 숙주 세포에서 재조합 단백질 생산에 적합할 수 있다.
- [0120] 대체로, 유전적 작제물은 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이 플라스미드, 박테리오파지, 코스미드, 효모 또는 박테리아 인공 염색체의 형태로 존재하거나 이들의 유전적 성분을 포함한다. 유전적 작제물은 재조합 DNA 기술에 의한 조작 및/또는 본 발명의 핵산 또는 인코딩된 단백질의 발현을 위해 박테리아 또는 다른 숙주 세포에서 단리된 핵산의 유지 및 증식용으로 적합할 수 있다.
- [0121] 숙주 세포 발현의 목적상, 유전적 작제물은 발현 작제물이다. 적합하게, 발현 작제물은 발현 벡터에서 하나 이상의 추가의 서열에 작동가능하게 연결되는 본 발명의 핵산을 포함한다. "발현 벡터"는 플라스미드와 같은 자기 복제 염색체와 벡터 또는 숙주 게놈으로 통합되는 벡터일 수 있다.
- [0122] "작동가능하게 연결된"은 상기 추가의 뉴클레오타이드 서열(들)이 바람직하게는 전사를 개시, 조절 또는 달리 조절하기 위해 본 발명의 핵산에 대해 위치되는 것을 의미한다.
- [0123] 조절성 뉴클레오타이드 서열은 일반적으로 발현에 사용되는 숙주 세포에 적합할 것이다. 다양한 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 다양한 숙주 세포에 대해 당업계에서 공지되어 있다.
- [0124] 전형적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오타이드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 전사 개시 및 종결 서열, 번역 개시 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0125] 당업계에 공지된 구성적, 억제성 또는 유도성 프로모터가 본 발명에 의해 고려된다.
- [0126] 발현 작제물은 또한 재조합 단백질이 상기한 바와 같이 융합 단백질로서 발현되도록 융합 파트너(전형적으로 발

현 벡터에 의해 제공됨)를 인코딩하는 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

- [0127] 발현 작제물은 또한 선택 마커, 예를 들어, amp^R , neo^R 또는 kan^R 을 인코딩하는 추가의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0128] 단리된 핵산의 상처 또는 대상체로의 전달에 관한 특별한 구현예에서, 발현 작제물은 적합하게 동물 세포에서 작동가능한 프로모터(예: CMV, α A-크리스탈린 또는 SV40 프로모터)를 포함하는 플라스미드 DNA의 형태로 존재할 수 있다. 다른 구현예에서, 핵산은 아데노바이러스, 백시니아, 렌티바이러스 또는 아데노 관련 바이러스 벡터와 같은 바이러스 작제물의 형태로 존재할 수 있다.
- [0129] 추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산 분자 또는 유전적 작제물로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0130] 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포는 포유류 세포(예: *HeLa*, *Cos*, *NIH-3T3*, *HEK293T*, *Jurkat* 세포), 효모 세포(예: 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)), 바쿨로바이러스 발현 시스템을 사용하거나 사용하지 않고 사용된 곤충 세포(예: *Sf9*, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)), 식물 세포(예: 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 패오닥틸룸 트리코누툼(*Phaeodactylum tricornutum*)) 또는 박테리아 세포, 예를 들어, 이. 콜리(*E. coli*)를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 숙주 세포(원핵 세포이든 또는 진핵 세포이든지)에 유전적 작제물의 도입은, 예를 들어, 문헌[참조: CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-2015), 특히, Chapters 9 and 16]에 기재된 바와 같이, 당업계에 익히 공지되어 있다.
- [0131] 본 발명의 관련 양태는 단리된 단백질을 발현시키고, α 2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 검출하거나 α 2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 발현하는 종양 세포의 치료적 표적화에 사용하기 위한 것과 같이, 단리된 단백질, 단리된 핵산, 유전적 작제물 및/또는 항체를 포함하는 키트를 제공하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0132] 예로써, α 2-3-연결된 N-글리코실뉴라민산 및/또는 α 2-6-연결된 N-글리코실뉴라민산을 검출하기 위한 키트는 표지되거나 표지되지 않을 수 있는 단리된 단백질, 임의로 단리된 단백질에 결합하는 항체와 같은 표지된 2차 결합제, 임의로 AP 또는 HRP와 같은 효소를 위한 하나 이상의 기질 및 사용 설명서를 포함할 수 있다.
- [0133] 또 다른 예에서, 단리된 단백질 발현을 위한 키트는 단리된 단백질을 인코딩하는 유전적 작제물, 단리된 단백질의 형질감염 및 발현에 적합한 숙주 세포 및 사용 설명서를 포함할 수 있다.
- [0134] 본 발명을 용이하게 이해하고 실제적인 효과를 나타낼 수 있도록, 다음 비제한적인 실시예를 참조한다.
- [0135] 실시예
- [0136] **도입부**
- [0137] 암에서 이의 공지된 관련성 및 비암성 인간 조직에서의 이의 정상적으로 낮은 수준 때문에, 혈청 및 조직에서 다량의 Neu5Gc의 검출은 비정상적으로 간주되고, 종양의 존재를 나타내는 것이다. 이것은 Neu5Gc에 대한 SubB의 특이성을 이용하여 다양한 암에 대한 고처리량 진단 스크리닝 테스트를 개발할 가능성을 높인다. 그러나, α 2-6-연결된 Neu5Gc에 대한 불량한 친화도는 이러한 시험의 민감도에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서, 본 발명자들은 높은 친화도를 갖는 두 가지 유형의 구조를 인식하는 능력을 갖는 SubB 돌연변이체를 설계하는 관점에서 SubB와 α 2-3-연결된 또는 α 2-6-연결된 Neu5Gc 중 어느 하나에서 종결되는 글리칸 사이의 상호작용을 조사하였다.
- [0138] **결과**
- [0139] **SubB의 글리칸 결합 부위의 구조-유도 돌연변이**
- [0140] α 2-3-연결된 구조에 대한 선호도를 위한 분자 기준을 이해하기 위해, 본 발명자들은 SubB 및 Neu5Gc α 2-3Gal1b1-3G1cNAc(X-선 결정학에 의해 결정됨) 대 Neu5Gc α 2-6Gal1 β 1-3G1c 사이의 상호작용을 비교했다(도 1). 전자 글리칸의 하위 말단 당이 이전에 보고된 바와 같이⁸ 용매로 자유롭게 확장되는 반면, α 2-6 구조의 3원 당은 SubB 표면 위에서 다시 중첩되어 SubB 잔기 T104-E108을 포함하는 루프와 밀접하게 접촉되게 한다. 이 루프는 C103과 C109 사이의 디설파이드 결합에 의해 안정화된다. 생성되는 입체 장애는 원래의 글리칸 어레이 분석에서 관찰된 α 2-6-연결된 Neu5Gc 구조의 상당히 더 불량한 결합을 고려하여 말단 Neu5Gc의 결합 포켓으로의 도킹을 왜곡시킨다.

[0141] α 2-6-연결된 시알산이 결장암의 통상적인 마커이고^{19,20}, 다양한 암에서 예후와 관련되기 때문에²¹, 본 발명자들은 T104-E108 루프의 높이를 감소시키기 위해 일련의 치환 및/또는 결실 돌연변이체를 설계함으로써 SubB에 대한 α 2-6-연결된 Neu5Gc 구조의 결합을 향상시키기 위해 분자 공학을 사용했다. 본 발명자들은 이들 SubB 돌연변이체와 Neu5Gc α 2-6Gal β 1-3G1c 사이의 상호작용을 모델링하고, 그들이 도 2에 도시된 바와 같이 α 2-3-연결된 Neu5Gc 결합에 상당히 영향을 미치지 않으면서 α 2-6-연결된 Neu5Gc의 인식을 향상시킬 것을 예측했다. 그런 다음, 본 발명자들은 재조합 *subB* 유전자를 삭제하고, 재조합 이. 콜리로부터 C 말단 His₆-태그 융합 단백질을 다양한 단백질을 발현시키고 정제하였다(방법 참조). 단일 또는 이중 아미노산 치환(T107A 및 S106A/T107A), 이중 결실 돌연변이체(Δ S106/ Δ T107) 및 삼중 돌연변이체(Δ S106/ Δ T107/E108D)를 갖는 SubB 단백질은 성공적으로 정제되었다.

[0142] **조작된 SubB 돌연변이체의 표면 플라스몬 공명**

[0143] 이어서, 정제된 SubB 및 다양한 돌연변이체 유도체를 Biacore 칩 상에 고정시키고, 다양한 Neu5Ac- 또는 Neu5Gc-종결 구조(유리 시알산, 시알산- α 2-3-락토스 및 시알산- α 2-6-락토스) 뿐만 아니라 인간 및 소 α 1-당단백질(AGP)에 대한 결합 친화도에 대해 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 시험하였다(표 1). 인간 AGP 글리칸은 Neu5Ac를 함유하고^{22,23}, 소 AGP 글리칸은 Neu5Ac 및 Neu5Gc를 모두 함유한다²³. MS 글리코프로테오믹(glycoproteomic) 분석(도 5)을 수행하여 SPR 연구에 사용된 인간 및 소 AGP에서 Neu5Ac 및 Neu5Gc 분포를 확인하였다. 야생형 SubB는 글리칸 어레이 결과로부터 예측된 바와 같이, 나노몰 결합 친화도가 관찰된 α 2-3-연결된 Neu5Gc-락토스 및 유리 Neu5Gc에 대해 높은 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌다. α 2-6-연결된 Neu5Gc-락토스(최대 농도 25 μ M로 시험됨)에 대해 결합이 관찰되지 않았고, 2.2 μ M 친화도가 α 2-3-연결된 Neu5Ac에 대해 관찰되었는데 - 등가의 Neu5Gc 구조와 비교하여 결합이 300배 이상 감소했다. 야생형 SubB는 또한 소 AGP와 비교하여 인간 AGP에 대해 13배 감소된 결합 친화도를 가졌다. SubB_{T107A}의 돌연변이는 야생형 단백질과 비교하여 임의의 시험된 구조에 대한 결합에 대해 유의한 효과를 갖지 않았다. SubB_{S106A/T107A}는 α 2-6-연결된 구조에 대한 결합을 개선시켰지만, 이 개선은 Neu5Ac 및 Neu5Gc 모두에 대해 나타났다. 시험된 모든 연결 당에 대해 관찰된 나노몰 범위 친화도는 SubB_{S106A/T107A}가 우수한 전반적인 시알산 인식 액틴이라는 것을 나타낸다. SubB Δ S106/ Δ T107/E108D 돌연변이체는 α 2-6-연결된 Neu5Ac 구조에 대한 결합을 변경시키지 않고 α 2-6-연결된 Neu5Gc의 인식을 개선시켰다. 그러나, α 2-3-연결된 Neu5Ac와 α 2-3-연결된 Neu5Gc 사이의 친화도 차이는 야생형에 대해 관찰된 300배와 비교하여 50배로 감소되었다. SubB Δ S106/ Δ T107 돌연변이체는 야생형 단백질과 비교하여 Neu5Gc 대 Neu5Ac 관별에 대해 유의하게 향상되었고, 두 구조 사이에 상당히 상이하지 않은 결합 친화도(각각 15.3 nM 대 8.5 nM; $P = 0.12$)로 α 2-3-연결된 Neu5Gc 및 α 2-6-연결된 Neu5Gc에 결합하는 능력을 가졌다. 따라서, SubB Δ S106/ Δ T107은 향상된 Neu5Gc 대 Neu5Ac 식별 및 α 2-3- 및 α 2-6-연결된 Neu5Gc 구조 모두를 인식하는 능력의 최적의 조합을 나타냈다. SubB Δ T107/ Δ E108 결실 돌연변이체는 또한 α 2-3-연결된 N-글리코실릴뉴라민산 글리칸에 결합하면서 야생형 SubB 단백질보다 실질적으로 더 큰 친화도로 α 2-6-연결된 N-글리코실릴뉴라민산 글리칸에 결합된다. 그러나, SubB Δ S106/ Δ T107과 대조적으로, SubB Δ T107/ Δ E108은 야생형 SubB 또는 SubB Δ S106/ Δ T107에 의해 검출가능하게 결합되지 않은 Neu5Ac- α 2-6-lac와 같은 Neu5Ac 글리칸에 광범위하게 결합할 수 있다.

[0144] 닭에서 생산된 항-Neu5Gc 항체가 대조군으로 사용되었고, Neu5Gc 함유 글리칸에 대해 시험된 임의의 SubB 단백질보다 낮은 선택도 및 낮은 친화도를 나타냈다.

[0145] **야생형 SubB, SubBS106A/T107A 및 SubB Δ S106/ Δ T107의 글리칸 어레이 분석.**

[0146] 바람직한 Neu5Gc-특이적 SubB Δ S106/ Δ T107 돌연변이가 SPR 분석에 포함되지 않는 비시알릴화된 구조에 대한 특이성을 도입했는지를 평가하기 위해, 글리칸 어레이 분석을 SubB 야생형, SubB Δ S106/ Δ T107 및 SubBS106A/T107A 돌연변이체에 대해 수행했다(표 4). 야생형 SubB는 글리칸 어레이 상의 402개의 구조 중 단지 4개에 대한 상당한 결합을 나타냈다: Neu5Gc α 2-3 Gal, Neu5Gc α 2-3 Gal β 1-4G1cNAc 및 2개의 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4G1cNAc 말단화 구조. 이는 SubB8의 이전에 공개된 글리칸 어레이 분석과 일치한다(www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_1579#). SubB Δ S106/ Δ T107만이 어레이 상의 4개의 구조에 대한 중요한 결합을 나타냈다. 이들은 Neu5Gc α 2-3Gal 또는 Neu5Gc α 2-6 Gal로 종결되는 구조로 제한되었다. SubBS106A/T107A는 Neu5Gc 및 Neu5Ac를 함유하는 구조를 포함하는 어레이 상의 총 18개의 글리칸에 결합된다. 그것은 또한 글리코사미노글리칸(헤파린 및 콘드로이틴-

6-설페이트) 및 설페이트화 락토사민 구조를 포함하는 설페이트화 구조를 인식했다(표 4). SubBS106A/T107A는 또한 어레이 상의 모노사카라이드(Neu5Ac, Neu5Gc, 9-Nac-Neu5Ac, 3-O-Su-GlcNAc)의 음으로 하전된 범위를 인식했다.

[0147] **인간 및 소 단백질/혈청에 대한 조작된 SubB의 ELISA**

[0148] 생물학적 샘플에서 Neu5Gc의 존재를 검출하는 조작된 돌연변이체의 능력을 평가하기 위해, ELISA 검정이 수행되었다. SubB의 희석 시리즈로 코팅된 접시를 사용하여, 인간 및 소 공급원으로부터 표지된 혈청 단백질을 시험하였다. 소의 혈청 단백질을 함유하는 Neu5Gc의 차별적인 인식에서 2배 향상이 SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ 로 동정되었다(도 3).

[0149] **인간 대 소 AGP의 검출**

[0150] 인간 및 소 AGP를 식별하는 능력을 독립적으로 확인하기 위해(소 AGP만이 상당한 수준의 Neu5Gc-말단 글리칸을 나타낸다), 연속적으로 희석된 당단백질을 니트로셀룰로스 필터 상에 스폿팅하고, 세척 및 블로킹 후, 필터를 정제된 비오틴화 SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ 로 중첩시켰다. 이어서, 결합된 렉틴을 스트렙타비딘-AP를 사용하여 세척된 필터 상에서 검출시켰다(도 4). 소 AGP에 대한 SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ 결합은 약 200ng/스폿까지 검출가능한 반면, 인간 AGP에 대한 유의한 결합은 시험된 최대량(12.5 μ g/스폿)에서도 검출가능하지 않았다. 이 차별적인 힘은 상기 SPR 데이터와 일치한다.

[0151] **추가된 글리칸 어레이**

[0152] Z-바이오테크 글리칸 어레이에서 분석된 다양한 Neu5Ac 및 Neu5Gc 글리칸 구조는 도 9에 도시되고, 어레이의 일례는 도 6에 도시된다. 표 3은 도 9의 글리칸을 도 7 및 8의 어레이 데이터와 연결하는 코드를 제공한다. 도 7에 요약된 어레이 데이터는 Neu5Gc 구조에 대한 결합이 야생형 SubB에 의해 바람직하지만, 배경 위 5000개 초과인 형광 단위와 결합된 4/40 Neu5Ac 글리칸 및 5000개 미만의 결합을 갖는 14/41 Neu5Gc 구조가 있다는 것을 보여준다. 모든 Neu5Ac 구조는 배경 위 약간의 결합을 등록한다. 도 8에서 또한 명백한 바와 같이, Neu5Gc 구조에 대한 결합은 SubB 2M에 의해 바람직하다. Neu5Ac 글리칸은 배경 위 5000개 초과인 형광 단위와 결합되지 않고, 5000개 미만의 결합을 갖는 5/41 Neu5Gc 구조만이 결합된다. 7/14 Neu5Ac 글리칸만이 배경 위 임의의 결합을 갖는다. 이 결과는 Neu5Gc에 대한 특이성 측면에서 WT SubB에 의해 수득된 결과 및 Neu5Gc 함유 글리칸의 상이한 결합 및 표현의 인식 개선에 대한 명확한 향상을 보여준다.

[0153] **SubB 2M을 사용하여 혈청 내 단백질을 함유하는 Neu5Gc의 온 칩 스크리닝의 추가 개발.**

[0154] 도 10 및 11을 참조하면, 모든 검정은 시그마-알드리치로부터 수득된 1% 정상 인간 혈청의 배경에서 수행되었다. 야생형 SubB는, 혈청 이하로 떨어지는 값으로 제공된 혈청으로부터 관찰된 모든 결합이 Neu5Gc 함유 단백질이 스파이킹되는 경우에만 조절되기 때문에, 분석될 수 없었다. 이것은 SubB WT가 혈청에 비해 Neu5Gc 단백질에 대한 선호도를 갖지만 단백질의 부재하에 높은 수준으로 혈청에 결합된다는 것을 나타낸다(도 10). 도 11에서, SubB 2M은 31.25nM와 62.5nM 사이의 농도로부터 혈청 배경 이상의 반응으로 훨씬 잘 수행되었다. 이는 약 2 μ g/mL의 단백질 농도이다.

[0155] **논의**

[0156] Neu5Gc는 인간 암종에서 중요한 진단 및 예후적 마커이고, 유방암, 난소암, 전립선암, 결장암 및 폐암에서 증가된 Neu5Gc 발현이 검출된다^{11,12}. 야생형 SubB는 Neu5Gc에서 종결되는 글리칸에 대한 전례가 없는 특이성을 갖지만, α 2-6-연결된 Neu5Gc에 불량하게 결합되었고, 비록 약하지만 α 2-3-연결된 Neu5Ac 구조를 인식했다⁸. α 2-6-연결된 Neu5Gc에 대한 SubB의 인식을 향상시키고 Neu5Gc에 대해 더 특이적하도록 하기 위해, 본 발명자들은 T104-E108 루프를 중점적으로 하여 구조-보조 변형을 사용하여 SubB를 조작했다.

[0157] 이 루프의 조작은 동일한 두 가지 아미노산의 변형을 통해 두 개의 특이적인 결과를 나타냈다. 첫째, S106 및 T107의 알라닌 치환(S106A/T107A)은 Neu5Gc에 대한 특이성의 상실을 초래하여 결합(α 2-3 및 α 2-6) 또는 시알산 유형(Neu5Ac 또는 Neu5Gc)에 관계없이 모든 시험된 말단 시알릴화 글리칸에 결합할 수 있는 렉틴을 생성시켰다. 두 번째는 동일한 2개의 아미노산의 결실(Δ S106/ Δ T107)은 결합(α 2-3 및 α 2-6)에 관계없이 Neu5Gc에 대한 절묘한 특이성을 갖는 렉틴을 생성시켰다. SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ 돌연변이체는 야생형 SubB와 비교하여 Neu5Gc 함유 구조의 인식에 대해 유의적으로 향상되었다. SubB $_{\Delta S106/\Delta T107}$ 은 또한 α 2-3-연결된 Neu5Gc 또는 α 2-6-연결된

Neu5Gc 구조에 결합하는 능력에는 차이가 없어서 야생형 단백질에 비해 상당한 개선을 가능하게 했다. S106 및 T107 아미노산 외의 SubB 단백질의 추가의 변형은 특이성에서 유의한 개선을 나타내지 않았다. E108D 돌연변이가 또한 첨가된 SubB Δ S106/ Δ T107 단백질인 SubB Δ S106/ Δ T107/E108D 돌연변이체 단백질은 SubB Δ S106/ Δ T107 돌연변이체보다 α 2-3-연결된 Neu5Gc와 α 2-3-연결된 Neu5Ac를 구별하기 더 어려웠고, SubB Δ S106/ Δ T107 돌연변이체보다 인간 α 1-산 당단백질에 대해 더 강하게 결합했다(SubB Δ S106/ Δ T107보다 SubB Δ S106/ Δ T107/E108D에 의해 결합된 24배 더 많은 단백질). 대조적으로, SubB Δ T107/ Δ E108 결실 돌연변이체는 α 2-6-연결된 N-글리코릴뉴라민산 글리칸 및 α 2-3-연결된 N-글리코릴뉴라민산 글리칸 뿐만 아니라 SubB Δ S106/ Δ T107에 의해 검출가능하게 결합되지 않는 Neu5Ac 글리칸, 예를 들어, Neu5Ac- α 2-6-lac 및 Neu5Ac- α 2-3-lac에 결합된다.

[0158] 이러한 개선된 SubB 돌연변이체는 생물학적 샘플, 특히 암을 갖거나 암을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터의 혈청 및 다른 체액을 시험하기 위한 새로운 도구를 제공한다.

[0159] 방법

[0160] SubB의 구조 모델링.

[0161] SubB 돌연변이체의 3차원 구조는 Phyre2를 사용하여 모델링하였다²⁴. Neu5GC α 2-6Gal β 1-3Glc는 PDB ID: 4EN8로부터 획득했고²⁵, Coot를 사용하여 SubB 및 SubB 돌연변이체 구조로 모델링하였다²⁶.

[0162] SubB 돌연변이체의 구축 및 발현.

[0163] 돌연변이는 정방향 프라이머 pETSubBF 및 표 2에 나열된 각각의 돌연변이체 특이적 역방향 프라이머를 사용하여 직접 고충실도 PCR에 의해 subB 코딩 서열(3' 말단 근처)로 도입되었다. PCR 산물을 pET-23(+)(Novagen)의 BamHI 및 XhoI 부위로 클로닝하고, 이. 콜리 BL21(DE3)로 형질전환시켰다. SubB 유도체는 이미 기재된 바와 같이 Ni-NTA 친화도 크로마토그래피에 의해 His₆-태그된 융합 단백질로서 발현되고 정제되었다⁴. 단백질은 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색으로 판단했을 때 >95% 순수했다.

[0164] SubB 및 조작된 SubB 돌연변이체의 표면 플라즈몬 공명.

[0165] 표면 플라즈몬 공명(SPR)은 이전에 기재된 바와 같이 Biacore T100 시스템(GE)을 사용하여 실행했다²⁷. 간단히, SubB, SubB 돌연변이체 및 항-Neu5Gc IgY(SiaMab; 이전에 Sialix/GC-Free Inc., San Diego, CA, USA)는 NHS 포획 키트를 사용하여 시리즈 S 센서 칩 CM5(GE)의 유동 셀 2-4에 고정시키고, 유동 셀 1을 블랭크 고정화로서 실행했다. 인간 및 소 공급원(시그마-알드리치; 표 1 참조)으로부터 모노사카라이드, 디사카라이드, 올리고사카라이드 및 α 1-산 당단백질을 초기 범위 발견 실험에서 0.01-100 μ M로 유동시켰다. 농도를 조정하고, 모든 데이터를 Biacore T100 평가 소프트웨어를 사용하여 단일 주기 동력학을 사용하여 분석했다.

[0166] α 1-산 당단백질의 질량 분광 분석.

[0167] 인간 혈장(Sigma-Aldrich G9885) 및 소 혈장(Sigma-Aldrich G3643)으로부터 AGP(6M 구아니디늄 클로라이드 중 1mg, 50mM Tris-HCl pH8)를 각각 10mM 디티오프레이트 및 25mM 아크릴아미드로 환원시키고 알킬화시켰다. 이어서, 단백질을 4 용적의 1:1 메탄올:아세톤을 첨가하고, -20°C에서 16시간 동안 배양하여 침전시킨 다음, 원심분리하여(18,000rcf, 10분) 펠렛을 수집했다. 침전된 단백질을 50 μ L의 50mM Tris-HCl pH8에 재현탁시키고, 1 μ g 트립신(Trypsin Gold, Promega)으로 소화시켰다(37°C, 16h). 이어서, 소화된 펩타이드를 C18 ZipTips(Millipore)로 탈염시켰다.

[0168] SubB 및 조작된 SubB Δ S106/ Δ T107 돌연변이체의 ELISA 분석.

[0169] 블랙 96-well NUNC Maxisorp 플레이트의 웰은 1.25 μ g의 단백질에서 4°C에서 밤새 시작하는 100mM 중탄산염/탄산염 코팅 완충제(pH 9.6)에서 2배로 연속 희석된 SubB 또는 SubB Δ S106/ Δ T107 단백질로 코팅시켰다. 웰을 실온에서 1시간 동안 블로킹 용액(3% BSA)를 첨가하기 전에 인산염 완충 식염수, 0.05% Tween-20(PBS-T)으로 3회 세척했다. 정상 인간 혈청 및 소 혈청 중 단백질은 순수한 혈청을 100 μ M FITC 염료(Peirce)와 조합하고 얼음에서 1시간 동안 배양하여 형광적으로 표지하였다. 과량의 염료를 1kDa 크기 배제 스핀 컬럼을 사용하여 제거했다. 100 μ L의 FITC-표지된 정상 인간 혈청 또는 소 혈청을 SubB 또는 SubB Δ S106/ Δ T107로 코팅된 웰에 첨가하고, 웰을 1시간 동안 실온에서 배양했다. 웰을 PBS-T로 3회 세척했다. 100 μ L의 PBS를 형광이 485/535nm에서 측정되기

전에 각 웰에 첨가했다. 형광 단위 값은 이중의 평균 \pm SD로서 나타내고, 평균 형광 단위는 SubB 단백질이 차감된 것을 제외한 모든 시약을 함유하는 웰에 대해 수득되었다. 임의의 음의 값은 0으로 간주되었다.

[0170] SubB 중첩 실험.

[0171] 정제된 SubB Δ S106/ Δ T107은 제조업자의 지침에 따라 EZ-Link[®] Sulfo-NHS-비오티닐화 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 비오티닌으로 표지했다. 정제된 인간 및 소 α -1 산 당단백질(Sigma cat. nos. G9885 및 G3643)을 물에 5mg/ml로 용해시키고, 5 μ l 용적의 일련의 2배 희석액을 니트로셀룰로스 필터에 스폿팅하고, 37°C에서 밤새 통풍건조시켰다. 이어서, 필터를 2시간 동안 0.05% Tween 20(TTBS)을 갖는 Tris-완충된 식염수 중 5% 탈지유로 블로킹했다. TTBS에서 3회 세척한 후, 필터는 TTBS 중의 1 μ g/ml 비오티닌-SubB Δ S106/ Δ T107로 중첩시키고, 4°C에서 밤새 배양했다. 이어서, 필터를 TTBS에서 3회 세척하고, 결합된 비오티닌-SubB Δ S106/ Δ T107은 스트렙타비딘-알칼리성 포스파타제 접합체(Roche)를 사용하여 검출시켰다. 필터는 발색성 니트로-블루 테트라졸륨/X-포스페이트 기질 시스템(Roche)을 사용하여 전개시켰다.

[0172] SubB 및 조작된 SubB 돌연변이체의 글리칸 어레이 분석.

[0173] 표 3에 제시된 데이터의 경우, 글리칸 어레이 슬라이드는 이전에 기재된 바와 같은 Arrayit Spotbot Extreme 접착 프리터를 사용하여 SuperEpoxy 3(Arrayit) 활성화 기질에서 인쇄했다²⁸. 각 서브어레이의 경우, 2 μ g의 SubB 단백질을 최종 용적 500 μ L로 항-His 태그 항체(세포 신호전달) 및 Alexa555 2차 및 3차 항체(래빗 항-마우스; 염소 항-래빗)로 2:1:0.5:0.25의 비율로 예비복합체화했다. 이 500 μ L 항체 단백질 복합체를 커버슬립 없이 65 μ L 유전자 프레임(Thermo Scientific)에 첨가했다. 세척 및 분석을 이전에 기재된 바와 같이 수행했다²⁷.

[0174] Neu5Ac/Neu5Gc 글리칸 어레이

[0175] 도 6 내지 9에 도시된 데이터의 경우, Neu5Ac/Neu5Gc 글리칸 어레이는 Z-바이오테크(<http://www.zbiotech.com/neu5gc-xenoantigen-microarray.html>)로부터 입수했다. 어레이는 제조업자의 지침에 따라 각 서브어레이 영역에 적용된 총 2 μ g의 단백질을 사용하여 수행했다. 마우스 항-His IgG(단백질과의 몰 비 1:1), 래빗 항-마우스 Alexa 555 IgG(마우스 IgG 0.5몰량) 및 염소 항-래빗 Alexa 555 IgG(래빗 IgG 0.5몰량)로 검출하였다. 단백질을 1시간 동안 배양하고, 1xPBS에서 3회 세척했다. 슬라이드를 488, 532 및 647 레이저를 사용하여 Innoscan 1100AL에서 스캔했다. 어레이는 Mapix 소프트웨어로 분석했다. 모든 데이터는 532 레이저 채널에서 취했고, 배경 차감 형광이 분석에 사용되었다.

[0176] 명세서 전반에 걸쳐, 목적은 본 발명을 임의의 하나의 구현에 또는 특이적 특징의 수집에 제한하지 않고 본 발명의 바람직한 구현예를 기재하는 것이었다. 따라서, 당업자는, 본 개시에 비추어, 다양한 변형 및 변화가 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않고 예시된 특정 구현예에서 수행될 수 있음을 이해될 것이다.

[0177] 본원에 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특허 및 과학 문헌은 본원에 참조로 인용된다.

[0178] 참조문헌

1. Beddoe, T., Paton, A.W., Le Nours, J., Rossjohn, J. & Paton, J.C. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci* **35**, 411-8 (2010).
2. Petr, T. et al. Histochemical detection of GM1 ganglioside using cholera toxin-B subunit. Evaluation of critical factors optimal for in situ detection with special emphasis to acetone pre-extraction. *Eur J Histochem* **54**, e23 (2010).
3. Kenworthy, A.K., Petranova, N. & Edidin, M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* **11**, 1645-55 (2000).
4. Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U.M., Wang, H. & Paton, J.C. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med* **200**, 35-46 (2004).
5. Paton, A.W. et al. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* **443**, 548-52 (2006).
6. Backer, J.M. et al. Chaperone-targeting cytotoxin and endoplasmic reticulum stress-inducing drug synergize to kill cancer cells. *Neoplasia* **11**, 1165-73 (2009).
7. Martin, S. et al. Targeting GRP78 to enhance melanoma cell death. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 675-82 (2010).
8. Byres, E. et al. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* **456**, 648-52 (2008).
9. Inoue, S., Sato, C. & Kitajima, K. Extensive enrichment of N-glycolylneuraminic acid in extracellular sialoglycoproteins abundantly synthesized and secreted by human cancer cells. *Glycobiology* **20**, 752-62 (2010).
10. Malykh, Y.N., Schauer, R. & Shaw, L. N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* **83**, 623-34 (2001).
11. Marquina, G. et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* **56**, 5165-71 (1996).
12. Samraj, A.N., Laubli, H., Varki, N. & Varki, A. Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer. *Front Oncol* **4**, 33 (2014).
13. Varki, N.M. & Varki, A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* **87**, 851-7 (2007).
14. Lofling, J.C., Paton, A.W., Varki, N.M., Paton, J.C. & Varki, A. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. *Kidney Int* **76**, 140-4 (2009).
15. Yin, J. et al. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res* **66**, 2937-45 (2006).

[0179]

16. Dennis, J.W., Laferte, S., Yagel, S. & Breitman, M.L. Asparagine-linked oligosaccharides associated with metastatic cancer. *Cancer Cells* **1**, 87-92 (1989).
17. Padler-Karavani, V. et al. Human xeno-autoantibodies against a non-human sialic acid serve as novel serum biomarkers and immunotherapeutics in cancer. *Cancer Res* **71**, 3352-63 (2011).
18. Pham, T. et al. Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood* **114**, 5225-35 (2009).
19. Murayama, T. et al. Colon carcinoma glycoproteins carrying alpha 2,6-linked sialic acid reactive with Sambucus nigra agglutinin are not constitutively expressed in normal human colon mucosa and are distinct from sialyl-Tn antigen. *Int J Cancer* **70**, 575-81 (1997).
20. Sata, T., Roth, J., Zuber, C., Stamm, B. & Heitz, P.U. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. *Am J Pathol* **139**, 1435-48 (1991).
21. Hedlund, M., Ng, E., Varki, A. & Varki, N.M. alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Res* **68**, 388-94 (2008).
22. Imre, T. et al. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**, 1472-83 (2005).
23. Nakano, M., Kakehi, K., Tsai, M.H. & Lee, Y.C. Detailed structural features of glycan chains derived from alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* **14**, 431-41 (2004).
24. Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. & Sternberg, M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**, 845-58 (2015).
25. Yamashita, S. et al. Carbohydrate recognition mechanism of HA70 from Clostridium botulinum deduced from X-ray structures in complexes with sialylated oligosaccharides. *FEBS Lett* **586**, 2404-10 (2012).
26. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
27. Shewell, L.K. et al. The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E5312-20 (2014).

[0180]

[0181]

[표 1]

Neu5Gc 결합 단백질의 표면 플라스몬 공명 분석

| SubB 변이체/ 형태 | 인간 $\alpha 1$ -AGP | 소 $\alpha 1$ -AGP | Neu5Ac- $\alpha 2$ -3-lac | Neu5Gc- $\alpha 2$ -3-lac | Neu5Ac- $\alpha 2$ -6-lac | Neu5Gc- $\alpha 2$ -6- lac | 유리 Neu5Ac | 유리 Neu5Gc | Man5 | 말도스 | 락토스 | GT2 | 콘드로이틴 6 설페이트 |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|------|------|------|------------------|-----------------|
| 항-Neu5Gc 항체 (IgY IgY) | n.t. | n.t. | 246 ± 46 μM | 2.34 ± 0.85 μM | n.t. | n.t. | NCDI | 35.7 ± 4.2 μM | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| 야생형 SubB | 2.12 ± 0.56 μM (Rmax=125) | 155.8 ± 22 nM (Rmax=525) | 2.24 ± 0.93 μM | 6.62 ± 2.17 nM | NCDI | NCDI | NCDI | 18.1 ± 5.9 nM | NCDI | NCDI | NCDI | NCDI | NCDI |
| S106A/T107A | 723 ± 129 nM (Rmax=142) | 164 ± 10 nM (Rmax=499) | 489 ± 171 nM | 1.52 ± 0.50 nM | 348 ± 52 nM | 8.05 ± 0.14 nM | 3.27 ± 0.29 μM | 6.81 ± 1.6 nM | NCDI | NCDI | NCDI | 8.97 ± 2.2 μM | 33.0 ± 7.6 μM |
| T107A | n.t. | n.t. | 4.18 ± 1.6 μM | 15.2 ± 0.02 nM | NCDI | 208 ± 123 nM | NCDI | 16.8 ± 0.99 nM | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| ΔS106/ΔT107 | 1.65 ± 0.42 μM (Rmax=7) | 115 ± 37 nM (Rmax=299) | NCDI | 15.3 ± 5.8 nM | NCDI | 8.53 ± 0.15 nM | NCDI | 17.8 ± 4.0 nM | NCDI | NCDI | NCDI | NCDI | NCDI |
| ΔS106/ΔT107/ E108D | 2.82 ± 0.15 μM (Rmax=165) | 32.5 ± 2.6 nM (Rmax=276) | 371 ± 64 nM | 7.38 ± 0.72 nM | NCDI | 3.45 ± 0.87 nM | NCDI | 45.1 ± 1.2 nM | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| ΔT107/ΔE108 | 308 ± 24 nM (Rmax=542)** | 98.8 ± 43 nM (Rmax=865)** | 9.65 ± 0.70 nM | 4.32 ± 0.65 nM | 4.94 ± 0.35 nM | 3.71 ± 0.41 nM | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| ΔS106/ΔT107/ ΔE108* | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |

* 단백질 불용성

** 상이한 경우에 수행됨. 이전 단백질과 비교하여 3배의 추가 단백질이 포함됨.

[0182]

[0183]

표 1 범례: 정제된 트리- 및 모노사카라이드 및/또는 인간 또는 소 $\alpha 1$ -산 당단백질(AGF)에 대한 야생형 SubB, 다양한 돌연변이체 유도체 및 항-Neu5Gc IgY 항체의 결합 친화도는 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 SPR에 의해 결정되었다. NCDI는 농도 의존 상호작용이 100 μM까지의 농도에서 관찰되지 않았음을 나타낸다; ND: 수행되지 않음; Rmax: 단백질에 결합된 분석물의 반응 단위(RU)의 총량(그 수가 많을수록 더 많은 글리칸/당단백질이

고정된 SubB에 의해 결합되었다).

[표 2]

올리고뉴클레오타이드

| 프라이머 | 서열 5'-3' |
|--|---|
| pETSubBF | TTGTAAGGATCCGGAGGTGCATATGACG (서열번호: 4) |
| pETSubB _{T107A} R | GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTTCCTGTCAGGACCAAAACATTCTGCCGATG TG GTGCAGGTTG (서열번호: 5) |
| pETSubB _{S106A/T107A} R | GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTTCCTGTCAGGACCAAAACATTCTGCCGCT GTGGTGCAGGTTG (서열번호: 6) |
| pETSubB _{ΔS106/ΔT107} R | GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTTCCTGTCAGGACCAAAACATTCTGTGGTGC AGGTTGATAACCC (서열번호: 7) |
| pETSubB _{ΔS106/ΔT107/E108D} R | GATTATCTCGAGTGAGTTCTTTTCCTGTCAGGACCAAAACAGTCTGTGGTG CAGGTTGATAACCC (서열번호: 8) |

[0186] [표 3]

도 7-9를 위한 글리칸 코드

| Gc 글리칸 ID | Neu5Gc 글리칸 | Ac 글리칸 ID | Neu5Ac 글리칸 |
|-----------|------------|-----------|------------|
| GC-1 | N002G | AC-1 | N002 |
| GC-2 | N003G | AC-2 | N003 |
| GC-3 | N005G | AC-3 | N005 |
| GC-4 | N012G | AC-4 | N012 |
| GC-5 | N013G | AC-5 | N013 |
| GC-6 | N015G | AC-6 | N015 |
| GC-7 | N022G | AC-7 | N022 |
| GC-8 | N023G | AC-8 | N023 |
| GC-9 | N025G | AC-9 | N025 |
| GC-10 | N032G | AC-10 | N032 |
| GC-11 | N033G | AC-11 | N033 |
| GC-12 | N042G | AC-12 | N042 |
| GC-13 | N043G | AC-13 | N043 |
| GC-14 | N045G | AC-14 | N045 |
| GC-15 | N052G | AC-15 | N052 |
| GC-16 | N053G | AC-16 | N053 |
| GC-17 | N055G | AC-17 | N055 |
| GC-18 | N112G | AC-18 | N112 |
| GC-19 | N113G | AC-19 | N113 |
| GC-20 | N115G | AC-20 | N115 |
| GC-21 | N122G | AC-21 | N122 |
| GC-22 | N123G | AC-22 | N123 |
| GC-23 | N125G | AC-23 | N125 |
| GC-24 | N133G | AC-24 | N133 |
| GC-25 | N134G | AC-25 | N134 |
| GC-26 | N135G | AC-26 | N135 |
| GC-27 | N144G | AC-27 | N144 |
| GC-28 | N145G | | |
| GC-29 | N155G | AC-29 | N155 |
| GC-30 | N212G | AC-30 | N212 |
| GC-31 | N213G | AC-31 | N213 |
| GC-32 | N215G | AC-32 | N215 |
| GC-33 | N222G | AC-33 | N222 |
| GC-34 | N223G | AC-34 | N223 |
| GC-35 | N225G | AC-35 | N225 |
| GC-36 | N233G | AC-36 | N233 |
| GC-37 | N235G | | |
| GC-38 | N245G | | |
| GC-39 | N255G | AC-39 | N255 |
| GC-40 | N003G1 | | |
| GC-41 | N003G2 | | |

[0187]

[0188] [표 4]

| 수 구조 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106/ΔT107A |
|---------|---|--|-----------------|------------------|
| 모노사카라이드 | | 배경 이상 평균 배수 값 (Ave 배경+ 평균의 3x 표준 오차) | | |
| | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106/ΔT107A |
| 1 | Fuco-sp3 | -0.003 | 0.119 | 0.250 |
| 2 | Galα-sp3 | -0.533 | 0.117 | 0.058 |
| 3 | Galβ-sp3 | 0.000 | 0.167 | 0.109 |
| 4 | GalNAcα-sp0 | -0.006 | 0.253 | 0.168 |
| 5 | GalNAcα-sp3 | -0.010 | 0.531 | 0.445 |
| 6 | GalNAcβ-sp3 | 0.004 | 0.154 | 0.249 |
| 7 | Glcα-sp3 | 0.002 | 0.183 | 0.006 |
| 9 | Glcβ-sp3 | -0.001 | 0.156 | 0.767 |
| 10 | GlcNAcβ-sp3 | 0.001 | 0.128 | 0.748 |
| 14 | GlcN(Glc)β-sp4 | 0.006 | 0.153 | 0.423 |
| 15 | HOCH ₂ (HOCH) ₂ CH ₂ NH ₂ | -0.011 | 0.103 | 0.119 |
| 16 | Mannα-sp3 | 0.016 | 0.172 | 0.122 |
| 18 | Mannβ-sp4 | -0.003 | 0.372 | 0.300 |
| 19 | MannNAcβ-sp4 | 0.021 | 0.086 | 0.056 |
| 20 | Rhamα-sp3 | 0.002 | 0.205 | 0.237 |
| 22 | GlcNAcβ-sp4 | -0.001 | 0.178 | 0.211 |
| 37 | 3-O-Su-Galβ-sp3 | -0.039 | 0.151 | 0.140 |
| 38 | 3-O-Su-GalNAcα-sp3 | -0.002 | 0.123 | 0.027 |
| 43 | 6-O-Su-GlcNAcβ-sp3 | -0.272 | 0.195 | 0.118 |

[0189]

| | | | | |
|---------|---|---------|-----------------|------------------|
| 44 | GlcAα-sp3 | -0.022 | 0.120 | -0.308 |
| 45 | GlcAβ-sp3 | -0.009 | 0.306 | 0.100 |
| 46 | 6-H ₃ PO ₃ Glcβ-sp4 | 0.012 | 0.196 | 0.113 |
| 47 | 6-H ₃ PO ₃ Manα-sp3 | 0.000 | 0.223 | 0.040 |
| 48 | Neu5Acα-sp3 | 0.009 | 0.219 | 1.192 |
| 49 | Neu5Acα-sp9 | 0.002 | 0.137 | 1.848 |
| 52 | Neu5Gcα-sp3 | 0.004 | 0.163 | 2.205 |
| 54 | 9-NAc-Neu5Acα-sp3 | -0.020 | 0.108 | 1.292 |
| 55 | 3-O-Su-GlcNAcβ-sp3 | -0.001 | 0.131 | 1.403 |
| 말단 갈락토스 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106A/T107A |
| 75 | Galα1-2Galβ-sp3 | -0.009 | 0.149 | 0.627 |
| 76 | Galα1-3Galβ-sp3 | 0.014 | 0.259 | 0.352 |
| 77 | Galα1-3GalNAcβ-sp3 | -0.004 | 0.127 | 0.466 |
| 78 | Galα1-3GalNAcα-sp3 | 0.008 | 0.174 | 0.335 |
| 80 | Galα1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.009 | 0.129 | 0.119 |
| 81 | Galα1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.004 | 0.131 | 0.213 |
| 83 | Galα1-6Glcβ-sp4 | 0.008 | 0.217 | 0.109 |
| 84 | Galβ1-2Galβ-sp3 | -0.024 | 0.139 | 0.056 |
| 85 | Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.043 | 0.071 | 0.052 |
| 87 | Galβ1-3Galβ-sp3 | 0.229 | 0.512 | 0.279 |
| 88 | Galβ1-3GalNAcβ-sp3 | 0.002 | 0.188 | 0.173 |
| 89 | Galβ1-3GalNAcα-sp3 | -0.003 | 0.134 | 0.240 |
| 93 | Galβ1-4Glcβ-sp4 | -0.004 | 0.131 | 0.158 |
| 94 | Galβ1-4Galβ-sp4 | -0.065 | 0.134 | 0.154 |
| 97 | Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.004 | 0.143 | 0.095 |
| 100 | Galβ1-6Galβ-sp4 | 0.011 | 0.288 | 0.496 |
| 145 | Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | -0.016 | 0.310 | 0.674 |

| | | | | |
|-----|---|--------|-------|-------|
| 146 | Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2 | 0.085 | 0.187 | 0.144 |
| 147 | Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | 0.003 | 0.162 | 0.380 |
| 150 | 3-O-Su-Galβ1-3GalNAcα-sp3 | 0.003 | 0.146 | 0.372 |
| 151 | 6-O-Su-Galβ1-3GalNAcα-sp3 | 0.009 | 0.118 | 1.387 |
| 152 | 3-O-Su-Galβ1-4Glcβ-sp2 | 0.008 | 0.360 | 0.086 |
| 153 | 6-O-Su-Galβ1-4Glcβ-sp2 | 0.000 | 0.130 | 0.279 |
| 155 | 3-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | -0.014 | 0.219 | 0.838 |
| 157 | 3-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.003 | 0.206 | 0.330 |
| 159 | 4-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.007 | 0.193 | 0.766 |
| 161 | 6-O-Su-Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.004 | 0.129 | 0.146 |
| 163 | 6-O-Su-Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.020 | 0.161 | 0.646 |
| 176 | 3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2 | -0.007 | 0.110 | 0.102 |
| 177 | 3-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | -0.427 | 0.188 | 0.868 |
| 178 | 6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)Glcβ-sp2 | -0.022 | 0.414 | 0.873 |
| 179 | 6-O-Su-Galβ1-3(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | 0.884 | 0.166 | 0.076 |
| 180 | 6-O-Su-Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | 0.003 | 0.057 | 0.613 |
| 181 | 3,4-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.002 | 0.140 | 0.301 |
| 182 | 3,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.018 | 0.218 | 0.950 |
| 183 | 4,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.058 | 0.262 | 0.133 |
| 184 | 4,6-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.003 | 0.396 | 1.760 |
| 189 | 3,6-O-Su ₂ -Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | -0.041 | 0.438 | 4.455 |
| 201 | 3,4-O-Su ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.009 | 0.112 | 0.885 |
| 203 | Galβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | -0.015 | 0.360 | 3.557 |
| 220 | Galα1-3Galβ1-4Glcβ-sp2 | -0.002 | 0.216 | 0.242 |
| 222 | Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.014 | 0.132 | 0.357 |
| 224 | Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp3 | -0.062 | 0.077 | 0.130 |
| 225 | Galα1-4Galβ1-4GlcNAc-sp2 | 0.020 | 0.218 | 0.936 |

| | | | | |
|-----|---|--------|-------|--------|
| 228 | Galβ1-2Galα1-4GlcNAcβ-sp4 | -0.075 | 0.091 | 0.678 |
| 229 | Galβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp4 | 0.002 | 0.210 | 0.230 |
| 231 | Galβ1-4GlcNAcβ1-3GalNAcα-sp3 | 0.000 | 0.206 | 0.742 |
| 232 | Galβ1-4GlcNAcβ1-6GalNAcα-sp3 | 0.008 | 0.168 | 0.640 |
| 254 | Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-sp3 | -0.007 | 0.285 | 0.832 |
| 262 | Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal-sp4 | -0.045 | 0.169 | 0.102 |
| 264 | Galβ1-4Galβ1-4GlcNAc-sp3 | 0.013 | 0.174 | 0.876 |
| 373 | Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ-sp3 | 0.012 | 0.184 | 0.395 |
| 375 | Galα1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.009 | 0.649 | 0.260 |
| 376 | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.098 | 0.231 | 0.381 |
| 377 | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp2 | 0.001 | 0.184 | 0.069 |
| 378 | Galβ1-3GlcNAcα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.001 | 0.214 | 0.824 |
| 379 | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.014 | 0.251 | 0.434 |
| 380 | Galβ1-3GlcNAcα1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.028 | 0.258 | 0.683 |
| 381 | Galβ1-3GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.140 | 0.258 | 0.613 |
| 382 | Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3 | 0.387 | 0.108 | 0.438 |
| 383 | Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp2 | -0.070 | 0.114 | 0.078 |
| 385 | Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.277 | 0.115 | 0.125 |
| 387 | Galβ1-4GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.033 | 0.373 | 0.076 |
| 388 | Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3)GalNAcα-sp3 | 0.008 | 0.152 | 0.229 |
| 504 | (A-GN-M) ₂ -3,6-M-GN-GNβ-sp4 | -0.006 | 0.280 | 0.821 |
| 1A | Galβ1-3GlcVAc | -0.056 | 0.107 | 0.042 |
| 1B | Galβ1-4GlcVAc | -0.023 | 0.203 | 0.523 |
| 1C | Galβ1-4Gal | -0.022 | 0.199 | 0.458 |
| 1D | Galβ1-6GlcVAc | -0.020 | 0.352 | 0.398 |
| 1E | Galβ1-3GalVAc | -0.013 | 0.178 | 0.775 |
| 1F | Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc | 0.081 | 0.395 | -0.131 |

| | | | | |
|----------------|---|---------|-----------------|------------------|
| 1G | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | -0.031 | 0.114 | 0.091 |
| 1H | Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.006 | 0.148 | 0.802 |
| 1I | Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.070 | 0.220 | 0.282 |
| 1J | Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.004 | 0.273 | 0.646 |
| 1K | Gala1-4Galβ1-4Glc | -0.026 | 0.121 | 0.299 |
| 1L | GalNAco1-O-Ser | -0.002 | 0.662 | 0.098 |
| 1M | Galb1-3GalNAco1-O-Ser | 0.030 | 0.192 | -0.725 |
| 1N | Gala1-3Gal | -0.026 | 0.308 | 0.618 |
| 1O | Gala1-3Galβ1-4GlcNAc | -0.003 | 0.217 | 0.103 |
| 1P | Gala1-3Galβ1-4Glc | -0.010 | 0.291 | 0.844 |
| 2A | Gala1-3Galβ1-4Gala1-3Gal | 0.089 | 0.159 | 0.609 |
| 2B | Galβ1-6Gal | 0.321 | 0.104 | 0.136 |
| 2C | GalNAcβ1-3Gal | 0.000 | 0.326 | 0.899 |
| 2D | GalNAcβ1-4Gal | 0.045 | 0.125 | 0.667 |
| 2E | Gala1-4Galβ1-4GlcNAc | 0.017 | 0.524 | 0.023 |
| 2F | GalNAco1-3Galβ1-4Glc | -0.004 | 0.324 | 0.386 |
| 2G | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | -0.001 | 0.113 | 0.750 |
| 2H | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | -0.075 | 0.100 | 0.559 |
| 18B | Galβ1-3GalNAcβ1-3Gala1-4Galβ1-4Glc | -0.016 | 0.142 | 0.757 |
| 18C | Galβ1-3GalNAcβ1-3Gal | 0.091 | 0.208 | 0.659 |
| 18L | Galβ1-4Glc | -0.035 | 0.201 | 0.201 |
| 18M | Galβ1-4Gal | 0.011 | 0.382 | 0.493 |
| 18N | Galβ1-6Gal | 0.000 | 0.093 | 0.185 |
| 말단 N-아세틸 갈락토사민 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106A/T107A |
| 101 | GalNAco1-3GalNAcβ-sp3 | 0.015 | 0.148 | 0.015 |
| 102 | GalNAco1-3Galβ-sp3 | -0.012 | 0.103 | 0.396 |
| 103 | GalNAco1-3GalNAco-sp3 | -0.007 | 0.177 | 0.087 |
| | | | | |
| 104 | GalNAcβ1-3Galβ-sp3 | 0.000 | 0.139 | 0.050 |
| 106 | GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.031 | 0.062 | 0.427 |
| 192 | GalNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | -0.196 | 0.203 | 0.049 |
| 193 | 3-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.253 | 0.175 | 0.161 |
| 194 | 6-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.105 | 0.077 |
| 195 | 6-O-Su-GalNAcβ1-4(3-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | -0.009 | 0.292 | -0.009 |
| 196 | 3-O-Su-GalNAcβ1-4(3-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | -0.028 | 0.148 | 0.810 |
| 197 | 3,6-O-Su ₂ -GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.021 | 0.210 | 0.116 |
| 198 | 4,6-O-Su ₂ -GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.004 | 0.203 | 0.123 |
| 199 | 4,6-O-Su ₂ -GalNAcβ1-4-(3-O-Ac)GlcNAcβ-sp3 | -0.300 | 0.347 | 0.834 |
| 200 | 4-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.108 | 0.109 |
| 202 | 6-O-Su-GalNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | 0.332 | 0.125 | 0.073 |
| 204 | 4-O-Su-GalNAcβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.262 | 0.115 | 0.503 |
| 238 | GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ-sp3 | -0.005 | 0.148 | 0.560 |
| 389 | GalNAcβ1-3Gala1-4Galβ1-4Glcβ-sp3 | -0.018 | 0.127 | 0.044 |
| 1L | GalNAco1-O-Ser | 0.022 | 0.175 | 0.052 |
| 2C | GalNAcβ1-3Gal | -0.009 | 0.142 | 0.070 |
| 2D | GalNAcβ1-4Gal | 0.094 | 0.112 | 0.049 |
| 2F | GalNAco1-3Galβ1-4Glc | 0.000 | 0.125 | 0.145 |
| 푸코실화됨 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106A/T107A |
| 71 | Fuco1-2Galβ-sp3 | -0.075 | 0.272 | 0.066 |
| 72 | Fuco1-3GlcNAcβ-sp3 | -0.262 | 0.077 | 0.114 |
| 73 | Fuco1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.014 | 0.128 | 0.104 |
| 215 | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | -0.018 | 0.228 | 0.095 |
| 216 | Fuco1-2Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.029 | 0.166 | 0.154 |
| 217 | Fuco1-2Galβ1-3GalNAco-sp3 | 0.007 | 0.159 | 0.206 |
| 219 | Fuco1-2Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.000 | 0.136 | 0.145 |
| | | | | |
| 226 | Fuco1-2(Gala1-3)Galβ-sp3 | 0.000 | 0.150 | 0.067 |
| 233 | Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.140 | 0.437 |
| 234 | Fuco1-3(Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | -0.325 | 0.109 | 0.677 |
| 235 | Fuco1-2(GalNAco1-3)Galβ-sp3 | 0.006 | 0.260 | 0.433 |
| 287 | 3-O-Su-Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ-sp3 | -0.029 | 0.125 | 0.507 |
| 288 | Fuco1-3(3-O-Su-Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | -0.007 | 0.268 | 0.546 |
| 359 | Fuco1-2(Gala1-3)Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.738 | 0.343 | 0.102 |
| 360 | Fuco1-2(Gala1-3)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.147 | 0.126 |
| 362 | Fuco1-2(Gala1-3)Galβ1-3GalNAco-sp3 | -0.403 | 0.298 | 0.249 |
| 363 | Fuco1-2(Gala1-3)Galβ1-3GalNAcβ-sp3 | -0.029 | 0.140 | 0.269 |
| 364 | Fuco1-3(Gala1-3)Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.354 | 0.106 | 0.995 |
| 366 | Fuco1-2(GalNAco1-3)Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.022 | 0.160 | 0.418 |
| 368 | Fuco1-2(GalNAco1-3)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.003 | 0.106 | 0.283 |
| 371 | Fuco1-2Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ-sp3 | -0.002 | 0.307 | 0.195 |
| 372 | Fuco1-3(Fuco1-2Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.085 | 0.917 | 0.190 |
| 392 | Fuco1-2(GalNAco1-3)Galβ1-3GalNAco-sp3 | -0.166 | 0.145 | 0.125 |
| 479 | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | -0.022 | 0.344 | 0.329 |
| 480 | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | -0.120 | 0.093 | 0.107 |
| 483 | Fuco1-3(Fuco1-2(Gala1-3)Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.116 | 0.070 |
| 496 | Fuco1-2Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | -0.013 | 0.330 | 0.159 |
| 497 | Fuco1-3(Fuco1-2Galβ1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | -0.012 | 0.177 | 0.086 |
| 538 | Le ^x -6(Le ^x -3)Lac-sp4 | 0.003 | 0.096 | 0.153 |
| 539 | LacNAc1-6(Le ^x -3)Lac-sp4 | 0.000 | 0.135 | 0.177 |
| 541 | Le ^x -6(Le ^x -3)Lac-sp4 | -0.101 | 0.222 | 0.061 |
| 542 | Le ^x Le ^x -6(Le ^x -3)Lac-sp4 | 0.000 | 0.133 | 0.115 |
| 543 | Le ^x -6(Le ^x -3)Lac-sp4 | 0.415 | 0.128 | 0.309 |
| 7A | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | -0.225 | 0.173 | 0.152 |

[0193]

[0194]

[0195]

| | | | | |
|---------|---|---------|-----------------|-----------------|
| 7B | Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.017 | 0.151 | 0.006 |
| 7C | Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.001 | 0.255 | 0.305 |
| 7D | Fuco1-2Galβ1-3(GlcNAc1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.002 | 0.160 | -0.029 |
| 7E | Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | 0.000 | 0.120 | 0.114 |
| 7F | Fuco1-2Gal | -0.217 | 0.117 | -0.589 |
| 7G | Fuco1-2Galβ1-4Glc | 0.409 | 0.154 | 0.452 |
| 7H | Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | -0.009 | 0.109 | 0.356 |
| 7I | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAc | -0.002 | 0.227 | 0.370 |
| 7J | Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAc | -0.010 | 0.199 | 0.991 |
| 7K | GalNAcα1-3(Fuco1-2)Gal | 0.016 | 0.360 | 0.343 |
| 7L | Fuco1-2Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | -0.012 | 0.165 | 0.502 |
| 7M | Galβ1-3(Fuco1-2)Gal | 0.030 | 0.832 | 0.106 |
| 7N | Fuco1-2Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAc | 0.012 | 0.170 | 0.151 |
| 7O | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAc | -0.003 | 0.342 | 0.372 |
| 7P | Fuco1-2Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAc | 0.008 | 0.223 | 0.347 |
| 8A | SO ₃ -3Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAc | 0.011 | 0.169 | 0.636 |
| 8B | SO ₃ -3Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAc | 0.024 | 0.192 | 0.660 |
| 8C | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.004 | 0.104 | 0.337 |
| 8D | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-4(Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.005 | 0.266 | 0.990 |
| 8E | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.004 | 0.309 | 0.522 |
| 8F | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Fuco1-2Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.012 | 0.445 | 0.265 |
| 8G | Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | 0.016 | 0.183 | -0.019 |
| 8H | Fuco1-2Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.013 | 0.690 | 0.314 |
| 8I | Fuco1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | 0.008 | 0.243 | 0.277 |
| 8J | Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-3(Fuca1-2)Galβ1-4Glc | 0.011 | 0.133 | 0.674 |
| 8K | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.023 | 0.243 | 0.429 |
| 8L | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.020 | 0.216 | 0.118 |
| [0196] | | | | |
| 8M | Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.001 | 0.934 | 0.738 |
| 8N | Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.022 | 0.868 | 0.750 |
| 8O | Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | 0.000 | 0.176 | 0.256 |
| 8P | GalNAcβ1-3(Fuca1-2)Galβ1-4Glc | 0.006 | 0.200 | 0.389 |
| 9A | Galβ1-3(Fuca1-2)Galβ1-4(Fuca1-3)Glc | 0.007 | 0.563 | 0.283 |
| 9B | Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Fuco1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3)Galβ1-4Glc | -0.008 | 0.161 | 0.186 |
| 18D | Galα1-3(Fuco1-2)Galβ1-4Glc | -0.004 | 0.259 | 0.459 |
| 18E | GalNAcα1-3(Fuco1-2)Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | 0.002 | 0.116 | 0.149 |
| 19I | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3Gal | 0.004 | 0.183 | 0.181 |
| 19L | Fuco1-2Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3Gal | 0.018 | 0.342 | 0.370 |
| 19M | Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ1-3Gal | 0.018 | 0.193 | 0.453 |
| 19N | Fuco1-2Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ1-3Gal | 0.004 | 0.729 | 0.182 |
| 시알 및 화합 | | SubB WT | SubBAS106/ST107 | SubBS106A/T107A |
| 169 | Neu5Acα2-3Galβ-sp3 | -0.023 | 0.304 | 0.891 |
| 170 | Neu5Acα2-6Galβ-sp3 | 0.018 | 0.132 | 0.861 |
| 171 | Neu5Acα2-3GalNAcα-sp3 | -0.030 | 0.174 | 0.987 |
| 172 | Neu5Acα2-6GalNAcα-sp3 | -0.003 | 0.649 | 0.992 |
| 174 | Neu5Gαα2-6GalNAcα-sp3 | 0.004 | 0.269 | 0.940 |
| 186 | Neu5Acα2-8Neu5Acα2-sp3 | 0.031 | 0.632 | 0.911 |
| 205 | Neu5Acα2-6GalNAcα-sp3 | 0.022 | 0.246 | 0.910 |
| 206 | Neu5Gαα2-3Gal-sp3 | 3.339 | 1.190 | 3.798 |
| 289 | Galα1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-sp3 | 0.009 | 0.454 | 0.809 |
| 290 | Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-sp3 | -0.008 | 0.150 | 0.559 |
| 292 | Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα-sp3 | 0.002 | 0.231 | 1.006 |
| 293 | Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-sp3 | 0.005 | 0.151 | 0.631 |
| 294 | Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | -0.001 | 0.330 | 0.408 |
| 295 | Neu5Acα2-6Galβ1-4Glcβ-sp2 | -0.015 | 0.286 | 0.033 |
| [0197] | | | | |
| 298 | Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 1.248 | 0.255 | 0.278 |
| 299 | Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.006 | 0.266 | 0.816 |
| 300 | Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.308 | 0.478 |
| 303 | Neu5Gαα2-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 2.522 | 1.838 | 3.094 |
| 304 | Neu5Gαα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 1.125 | 2.798 |
| 306 | 9-NAc-Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.005 | 0.129 | 0.261 |
| 315 | Neu5Acα2-3Galβ1-4-(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | -0.003 | 0.459 | 0.980 |
| 317 | Neu5Acα2-3Galβ1-3-(6-O-Su)GalNAcβ-sp3 | 0.007 | 0.201 | 0.019 |
| 318 | Neu5Acα2-6Galβ1-4-(6-O-Su)GlcNAcβ-sp3 | 0.037 | 0.182 | 0.125 |
| 319 | Neu5Acα2-3-(6-O-Su)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.000 | 0.559 | 0.105 |
| 321 | (Neu5Acα2-8)-sp3 | 0.017 | 0.198 | 0.399 |
| 323 | Neu5Acα2-6Galβ1-3GlcNAc-sp3 | 0.126 | 0.166 | 0.116 |
| 324 | Neu5Acα2-6Galβ1-3-(6-O-Su)GlcNAc-sp3 | -0.295 | 0.160 | 0.071 |
| 331 | Neu5Gαα2-3Galβ1-3GlcNAcβ-sp3 | 0.316 | 1.081 | 1.703 |
| 421 | Neu5Acα2-3(GalNAcβ1-4)Galβ1-4Glcβ-sp2 | -0.039 | 0.124 | 0.312 |
| 422 | Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ-sp3 | -0.005 | 0.194 | 0.068 |
| 423 | Fuco1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.843 | 0.150 | 0.603 |
| 426 | Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.141 | 0.196 | 0.116 |
| 428 | Fuco1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4)6-O-Su-GlcNAcβ-sp3 | 0.118 | 0.193 | 0.067 |
| 429 | Fuco1-3(Neu5Acα2-3-(6-O-Su)Galβ1-4)GlcNAcβ-sp3 | 0.066 | 0.063 | 0.091 |
| 433 | Neu5Acα2-3Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-sp3 | 0.753 | 0.143 | 0.132 |
| 434 | Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.029 | 0.144 | 0.034 |
| 527 | Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | 0.401 | 0.088 | 0.377 |
| 528 | Fuco1-3(Neu5Acα2-3Galβ1-4)GlcNAcβ1-3Galβ-sp3 | 0.769 | 0.103 | 2.216 |
| 529 | Neu5Acα2-6(Galβ1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.098 | 0.082 | 0.111 |
| 531 | GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glc-sp2 | -0.021 | 0.114 | 0.072 |
| 532 | Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc-sp2 | 0.053 | 0.345 | 0.181 |
| [0198] | | | | |

| | | | | |
|-----|---|---------|-----------------|------------------|
| 533 | (Neu5Acu2-8)2Neu5Acu2-3(GalNAcβ1-4)Galβ1-4Glc-sp2 | -0.001 | 0.163 | 0.381 |
| 534 | Neu5Acu2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | 0.633 | 0.113 | 0.115 |
| 536 | Neu5Acu2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.028 | 0.126 | 0.260 |
| 537 | Neu5Acu2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp4 | 0.547 | 0.102 | 0.619 |
| 540 | Le ¹ -6(6'SLN1-3')Lac-sp4 | 0.062 | 0.350 | 0.580 |
| 10A | Neu5Acu2-3Galβ1-3(Fuco1-4)GlcNAc | -0.007 | 0.088 | 0.864 |
| 10B | Neu5Acu2-3Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAc | -0.002 | 0.294 | 0.791 |
| 10C | Neu5Acu2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.207 | 0.193 | 0.974 |
| 10D | Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-6(Neu5Acu2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc | 0.024 | 0.156 | 0.628 |
| 10E | Neu5Acu2-3Galβ1-3(Neu5Acu2-6)GalNAc | 0.118 | 0.122 | 0.957 |
| 10H | Neu5Acu2-6Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuco1-3)Glc | 0.015 | 0.109 | 0.421 |
| 10I | Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Neu5Acu2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc | 0.422 | 0.096 | 0.632 |
| 10J | Neu5Acu2-6Galβ1-3GlcNAcβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Galβ1-4Glc | 0.246 | 0.097 | 0.915 |
| 10K | Neu5Acu2-3Galβ1-4GlcNAc | -0.021 | 0.129 | 0.758 |
| 10L | Neu5Acu2-6Galβ1-4GlcNAc | 0.384 | 0.186 | 0.753 |
| 10M | Neu5Acu2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.047 | 0.411 | 0.795 |
| 10N | Galβ1-3(Neu5Acu2-6)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | -0.037 | 0.463 | 0.925 |
| 10O | Neu5Acu2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.000 | 0.135 | 0.384 |
| 10P | Neu5Acu2-3Galβ1-3(Neu5Acu2-6)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 0.079 | 0.083 | 0.527 |
| 11A | Neu5Acu2-3Galβ1-4Glc | 0.001 | 0.099 | 0.835 |
| 11B | Neu5Acu2-6Galβ1-4Glc | 0.188 | 0.345 | 0.687 |
| 11C | (Neu5Acu2-8Neu5Ac)n (n<50) | 0.007 | 0.132 | 0.599 |
| 18A | Neu5Acu2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 1.213 | 0.351 | 0.669 |
| 18K | 9-NAc-Neu5Ac | -0.001 | 0.183 | 0.968 |
| 18O | Neu5Gc | 0.035 | 0.283 | 0.650 |
| 19K | Neu5Acu2-3Galβ1-4(Fuco1-3)GlcNAcβ1-3Gal | 0.009 | 0.124 | 0.851 |
| 만노스 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106/ΔT107A |

| | | | | |
|---------------|--|---------|-----------------|------------------|
| 119 | Mano1-2Manβ-sp4 | 0.015 | 0.105 | 0.086 |
| 120 | Mano1-3Manβ-sp4 | 0.063 | 0.076 | 0.377 |
| 121 | Mano1-4Manβ-sp4 | -0.006 | 0.110 | 0.112 |
| 122 | Mano1-6Manβ-sp4 | 0.426 | 0.133 | 0.065 |
| 123 | Manβ1-4GlcNAcβ-sp4 | 0.035 | 0.233 | 0.213 |
| 124 | Mano1-2Mano-sp4 | 0.033 | 0.119 | 0.058 |
| 258 | Mano1-3(Mano1-6)Manβ-sp4 | 0.039 | 0.663 | 0.291 |
| 495 | Mano1-3(Mano1-3)(Mano1-6)(Mano1-6)Manβ-sp4 | 0.360 | 0.077 | 0.137 |
| 5A | GlcNAcβ1-2Man | 0.580 | 0.106 | 0.338 |
| 5B | GlcNAcβ1-2Mano1-6(GlcNAcβ1-2Mano1-3)Man | 0.411 | 0.176 | 0.070 |
| 5C | Mano1-2Man | -0.002 | 0.133 | 0.959 |
| 5D | Mano1-3Man | -0.008 | 0.389 | 0.154 |
| 5E | Mano1-4Man | 0.021 | 0.384 | 0.407 |
| 5F | Mano1-6Man | 0.007 | 0.220 | 0.306 |
| 5G | Mano1-6(Mano1-3)Man | 0.034 | 0.059 | 0.121 |
| 5H | Mano1-6(Mano1-3)Mano1-6(Mano1-3)Man | -0.001 | 0.207 | 0.019 |
| 말단 N-아세틸글루코사민 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106/ΔT107A |

| | | | | |
|-----|---|--------|-------|--------|
| 113 | GlcNAcβ1-3GalNAco-sp3 | 0.000 | 0.146 | 0.060 |
| 114 | GlcNAcβ1-3Manβ-sp4 | 0.186 | 0.267 | 0.018 |
| 115 | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-Asn | -0.008 | 0.232 | -0.007 |
| 117 | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp4 | 0.004 | 0.159 | 0.015 |
| 118 | GlcNAcβ1-6GalNAco-sp3 | -0.005 | 0.132 | 0.146 |
| 149 | GlcNAcβ1-4(6-O-Su)GlcNAcβ-sp2 | 0.006 | 0.138 | 0.483 |
| 167 | GlcNAcβ1-4-[HOO(CH ₂)CH ₂]-3-O-GlcNAcβ-sp4 | -0.009 | 0.138 | 0.048 |
| 168 | GlcNAcβ1-4-[HOO(CH ₂)CH ₂]-3-O-GlcNAcβ-L-alanyl-D-4-glutaminy1-L-lysine | -0.001 | 0.118 | 0.096 |
| 246 | GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNAco-sp3 | -0.006 | 0.080 | 0.414 |
| 247 | GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAco-sp3 | -0.015 | 0.126 | 0.341 |

| | | | | |
|------|--|---------|-----------------|------------------|
| 248 | GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-sp2 | -0.007 | 0.097 | 0.084 |
| 250 | GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.020 | 0.133 | 0.278 |
| 251 | GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | -0.002 | 0.071 | 0.210 |
| 252 | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp4 | -0.001 | 0.103 | 0.351 |
| 253 | GlcNAcβ1-6Galβ1-4GlcNAcβ-sp2 | -0.005 | 0.103 | 0.102 |
| 255 | GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAco-sp3 | -0.009 | 0.123 | 0.003 |
| 395 | GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3 | -0.012 | 0.225 | 0.746 |
| 493 | (GlcNAcβ1-4)β-sp4 | -0.015 | 0.067 | 0.076 |
| 503 | (GlcNAcβ1-4)β-sp4 | -0.005 | 0.124 | 0.175 |
| 505 | (GN-M) ₂ -3,6-M-GN-GNβ-sp4 | -0.007 | 0.129 | 0.091 |
| 4A | GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.007 | 0.189 | 0.150 |
| 4B | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.001 | 0.230 | 0.511 |
| 4C | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.003 | 0.096 | 0.062 |
| 4D | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | -0.001 | 0.113 | 0.227 |
| 4E | 박테리아 세포벽 푸라일 디사카라이드 | -0.009 | 0.089 | 0.045 |
| 4F | GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | -0.010 | 0.071 | 0.051 |
| 18G | 6-O-Su-GlcNAc | 0.002 | 0.190 | 0.046 |
| 18H | GlcNAc | 0.014 | 0.184 | 0.591 |
| 글루코스 | | SubB WT | SubBΔS106/ΔT107 | SubBΔS106/ΔT107A |

| | | | | |
|-----|---------------------|--------|-------|-------|
| 110 | Glcu1-4Glcβ-sp3 | -0.016 | 0.065 | 0.121 |
| 111 | Glcβ1-4Glcβ-sp4 | -0.005 | 0.114 | 0.089 |
| 112 | Glcβ1-6Glcβ-sp4 | -0.002 | 0.080 | 0.572 |
| 164 | GlcAβ1-3GlcNAcβ-sp3 | -0.010 | 0.136 | 0.564 |
| 165 | GlcAβ1-3Galβ-sp3 | 0.095 | 0.862 | 0.075 |
| 166 | GlcAβ1-6Galβ-sp3 | 0.007 | 0.156 | 0.181 |
| 240 | (Glcu1-4)β-sp4 | -0.014 | 0.060 | 0.110 |
| 241 | (Glcu1-6)β-sp4 | -0.007 | 0.144 | 0.507 |

[0199]

[0200]

[0201]

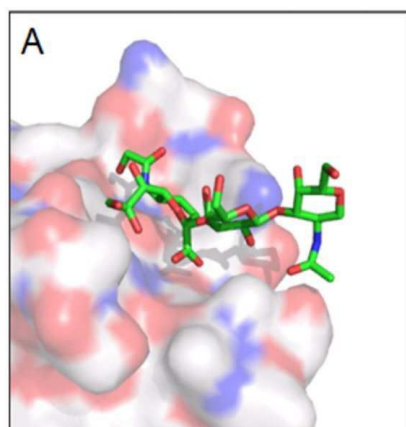
| | | | | |
|------------------------------------|--|---------|-----------------|-----------------|
| 390 | (Glcα1-4)β-sp4 | -0.001 | 0.104 | 0.069 |
| 391 | (Glcα1-6)β-sp4 | -0.016 | 0.130 | 0.094 |
| 492 | (Glcα1-6)β-sp4 | 0.029 | 0.102 | 0.451 |
| 502 | (Glcα1-6)β-sp4 | -0.017 | 0.135 | 0.229 |
| 181 | GlcA | -0.005 | 0.193 | -0.072 |
| 18J | 6-O-(H ₂ PO ₃)-Glc | 0.000 | 0.244 | 0.026 |
| 19O | Glcα1-4Glcα1-4 | 0.013 | 0.121 | 0.184 |
| 19P | Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-4 | -0.002 | 0.220 | 0.361 |
| 저분자량 카라기난 및 글리코아미노글리칸(GAGS) | | SubB WT | SubBAS106/ΔT107 | SubBS106A/T107A |
| 12A | 네오펜테드라오스-41,3-디-O-설페이트(Na+) | -0.001 | 0.087 | 0.156 |
| 12B | 네오펜테드라오스-41-O-설페이트(Na+) | 0.063 | 0.217 | 0.216 |
| 12C | 네오펜테드라오스-2,4,41,3,5-테트라-O-설페이트(Na+) | -0.007 | 0.098 | 0.498 |
| 12D | 네오펜테드라오스-41,3,5-트리-O-설페이트(Na+) | -0.017 | 0.097 | 0.027 |
| 12E | 네오펜테드라오스-41,3,5,7-테트라-O-설페이트(Na+) | -0.016 | 0.290 | 0.266 |
| 12F | 네오펜테드라오스-41,3,5,7,9-펜타-O-설페이트(Na+) | 0.001 | 0.283 | 0.532 |
| 12G | ΔUA-2S-GlcNS-6S | -0.009 | 0.120 | 0.377 |
| 12H | ΔUA-GlucNS-6S | -0.002 | 0.219 | 0.239 |
| 12I | ΔUA-2S-GlucNS | 0.072 | 0.101 | 0.014 |
| 12J | ΔUA-2S-GlcNAc-6S | -0.007 | 0.229 | 0.189 |
| 12K | ΔUA-GlcNAc-6S | 0.017 | 0.146 | 0.031 |
| 12L | ΔUA-2S-GlcNAc | -0.009 | 0.272 | 0.154 |
| 12M | ΔUA-GlcNAc | -0.004 | 0.075 | 0.471 |
| 12N | ΔUA-GalNAc-4S (펠타 디-4S) | -0.001 | 0.125 | 0.166 |
| 12O | ΔUA-GalNAc-6S (펠타 디-6S) | -0.007 | 0.156 | 0.148 |
| 12P | ΔUA-GalNAc-4S,6S (펠타 디-disE) | 0.004 | 0.192 | 0.109 |
| 13A | ΔUA-2S-GalNAc-4S (펠타 디-disB) | -0.002 | 0.599 | 0.064 |
| 13B | ΔUA-2S-GalNAc-6S (펠타 디-disD) | -0.001 | 0.167 | 0.226 |
| | | | | |
| 13C | ΔUA-2S-GalNAc-4S-6S (펠타 디-disS) | 0.001 | 0.132 | 0.087 |
| 13D | ΔUA-2S-GalNAc-6S (펠타 디-UA2S) | -0.007 | 0.115 | 0.087 |
| 13E | ΔUA-GlcNAc (펠타 디-4A) | 0.000 | 0.117 | 0.102 |
| 14M | ΔUA-→2S-GlcN-6S | -0.147 | 0.092 | 0.125 |
| 14N | ΔUA-→GlcN-6S | 0.009 | 0.209 | 0.142 |
| 14O | ΔUA-→2S-GlcN | -0.051 | 0.098 | 0.198 |
| 14P | ΔUA-→GlcN | 0.027 | 0.100 | 0.232 |
| 고분자량 카라기난 및 글리코아미노글리칸(GAGS) | | SubB WT | SubBAS106/ΔT107 | SubBS106A/T107A |
| 625 | (GlcAβ1-4GlcNAcβ1-3) _n -NH ₂ -올 | -0.012 | 0.143 | 0.418 |
| 13F | (GlcAβ1-3GlcNAcβ1-4) _n (n=4) | -0.011 | 0.143 | 0.048 |
| 13G | (GlcAβ1-3GlcNAcβ1-4) _n (n=8) | -0.009 | 0.151 | 0.178 |
| 13H | (GlcAβ1-3GlcNAcβ1-4) _n (n=10) | -0.003 | 0.160 | 0.494 |
| 13I | (GlcAβ1-3GlcNAcβ1-4) _n (n=12) | 0.004 | 0.162 | 0.802 |
| 13J | (GlcA/IdoAαβ1-4GlcNAcα1-4) _n (n=200) | 0.027 | 0.179 | 1.058 |
| 13K | (GlcA/IdoAβ1-3(ε4/6S)GalNAcβ1-4) _n (n<250) | 0.040 | 0.260 | 0.068 |
| 13L | ((ε2S)GlcA/IdoAαβ1-3(ε4S)GalNAcβ1-4) _n (n<250) | 0.159 | 0.135 | 0.070 |
| 13M | (GlcA/IdoAβ1-3(ε6S)GalNAcβ1-4) _n (n<250) | 0.467 | 0.202 | 1.857 |
| 13N | HA - 4 10mM | -0.016 | 0.219 | 0.299 |
| 13O | HA - 6 10mM | -0.009 | 0.455 | 0.446 |
| 13P | HA - 8 9.7mM | -0.004 | 0.598 | 0.446 |
| 14A | HA 10 7.83mM | 0.006 | 0.094 | -0.004 |
| 14B | HA-12 6.5mM | 0.290 | 0.101 | 0.005 |
| 14C | HA-14 5.6mM | -0.012 | 0.132 | 0.030 |
| 14D | HA-16 4.9mM | -0.002 | 0.133 | 0.048 |
| 14E | HA 30000 da 2.5mg/ml | 0.005 | 0.149 | 0.058 |
| 14F | HA 107000 da 2.5mg/ml | 0.007 | 0.264 | 0.060 |
| 14G | HA 190000 da 2.5 mg/ml | 0.019 | 0.075 | 0.084 |
| | | | | |
| 14H | HA 220000 da 2.5 mg/ml | 0.586 | 0.082 | 0.104 |
| 14I | HA 1600000 da 2.5 mg/ml | -0.0005 | 0.087 | 0.105 |
| 14J | 해커린 설페이트 5 mg/ml | 0.01278 | 0.093 | 0.106 |
| 14K | β1-3 글루칸 | 0.00477 | 0.094 | 0.110 |
| 복합체 B-글리칸 | | SubB WT | SubBAS106/ΔT107 | SubBS106A/T107A |
| 627 | (Sia2-6A-GN-M) ₂ -3,6-M-GN-GNβ-sp4 | 0.02051 | 0.095 | 0.112 |
| 19A | Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6Man)β1-4GlcNAcβ1-4(Fucα1-6)GlcNAc | 0.01818 | 0.098 | 0.113 |
| 19B | Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-4)Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)Manα1-6Man)β1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.00915 | 0.099 | 0.116 |
| 19C | Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.00848 | 0.101 | 2.135 |
| 19D | Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.00745 | 0.103 | 1.151 |
| 19E | Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.00316 | 0.103 | 0.156 |
| 19F | Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fucα1-6)GlcNAc | 0.00284 | 0.103 | 0.172 |
| 19G | Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-4)Manα1-3(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | 0.00056 | 0.104 | 0.175 |
| 19H | GlcNAcβ1-2(GlcNAcβ1-4)Manα1-3(GlcNAcβ1-2Manα1-6)GlcNAcβ1-4Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc | -1E-05 | 0.105 | 0.175 |
| 1.보다 큰 배수 값은 측정보다 상당히 높은 결합을 나타낸다. | | | | |

[0204]

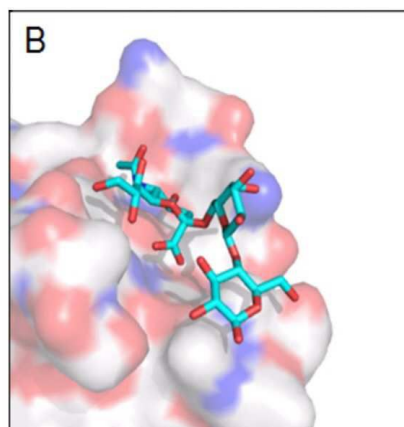
[0202]

도면

도면1

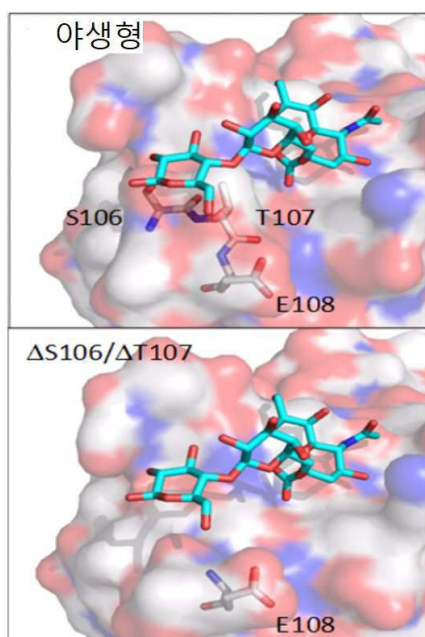


도 1A

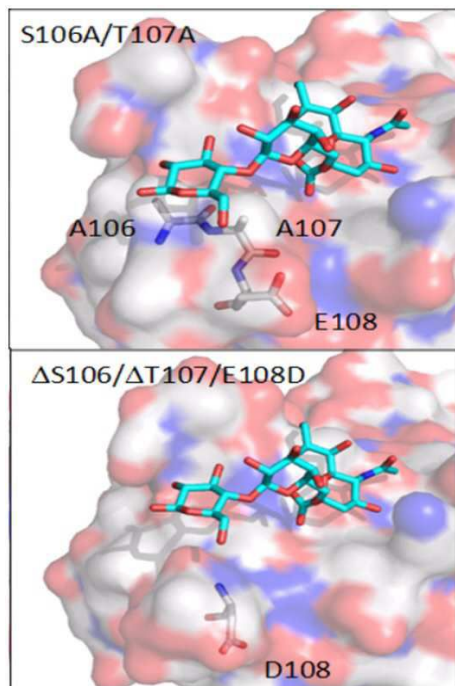


도 1B

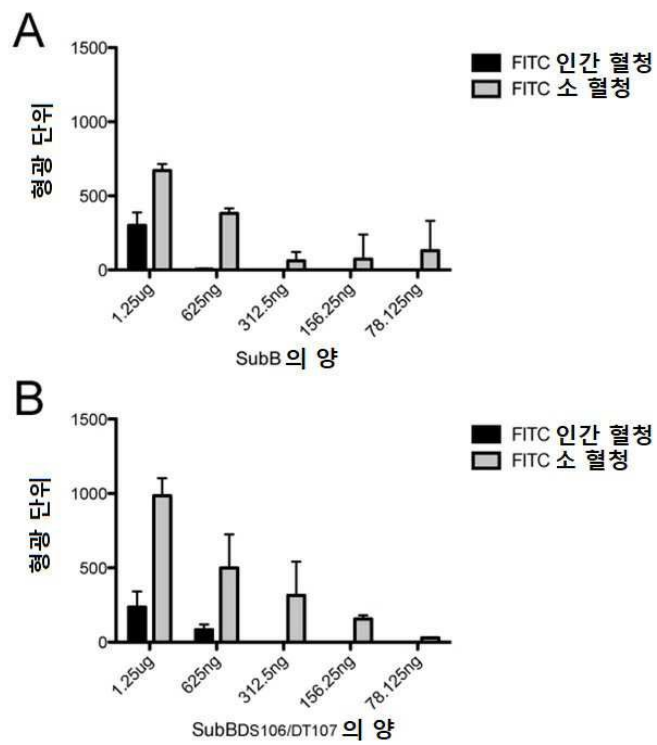
도면2a



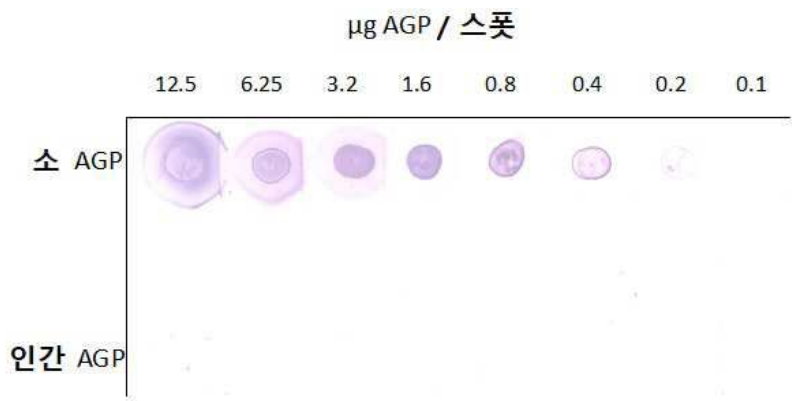
도면2b



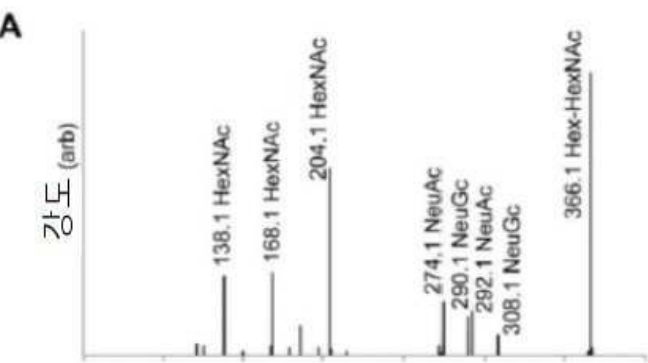
도면3



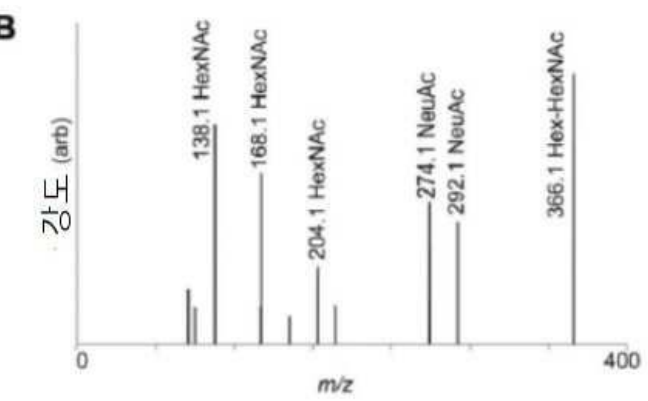
도면4



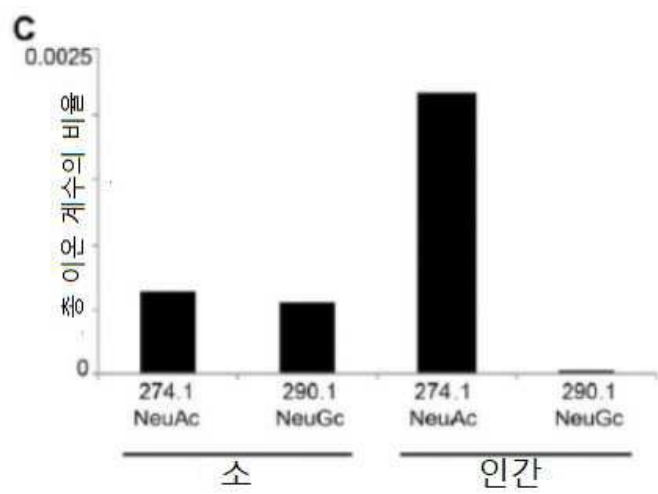
도면5a



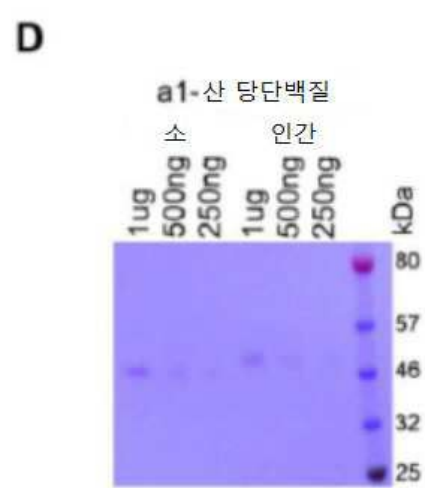
도면5b



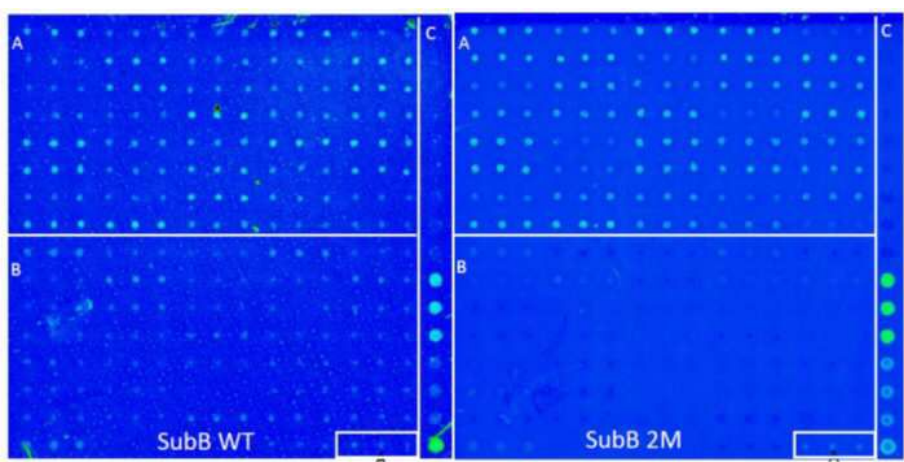
도면5c



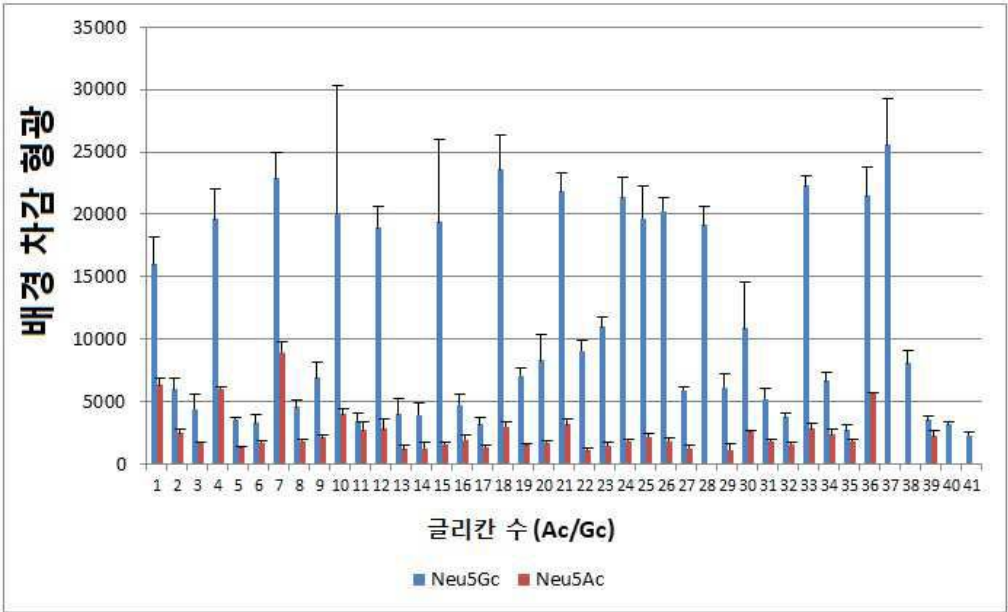
도면5d



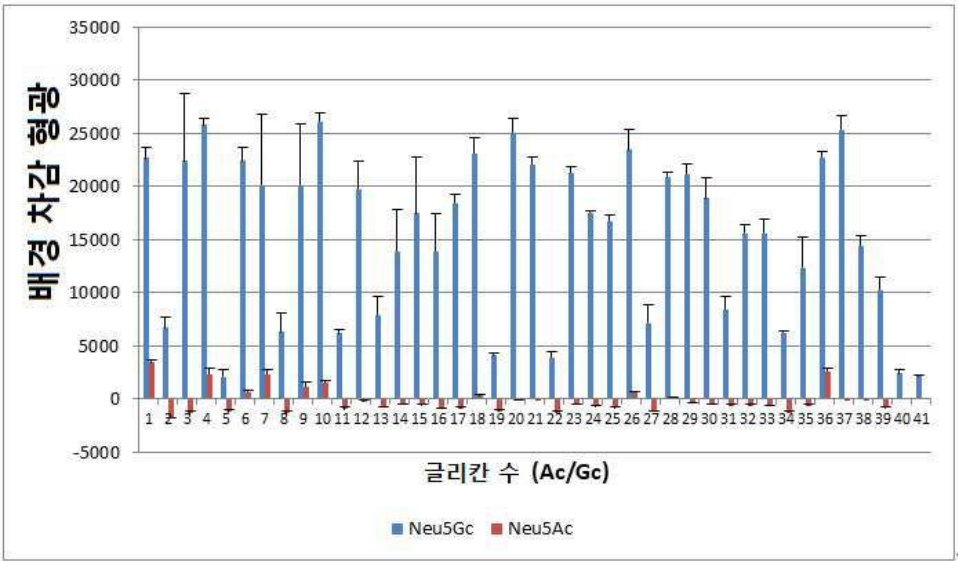
도면6



도면7

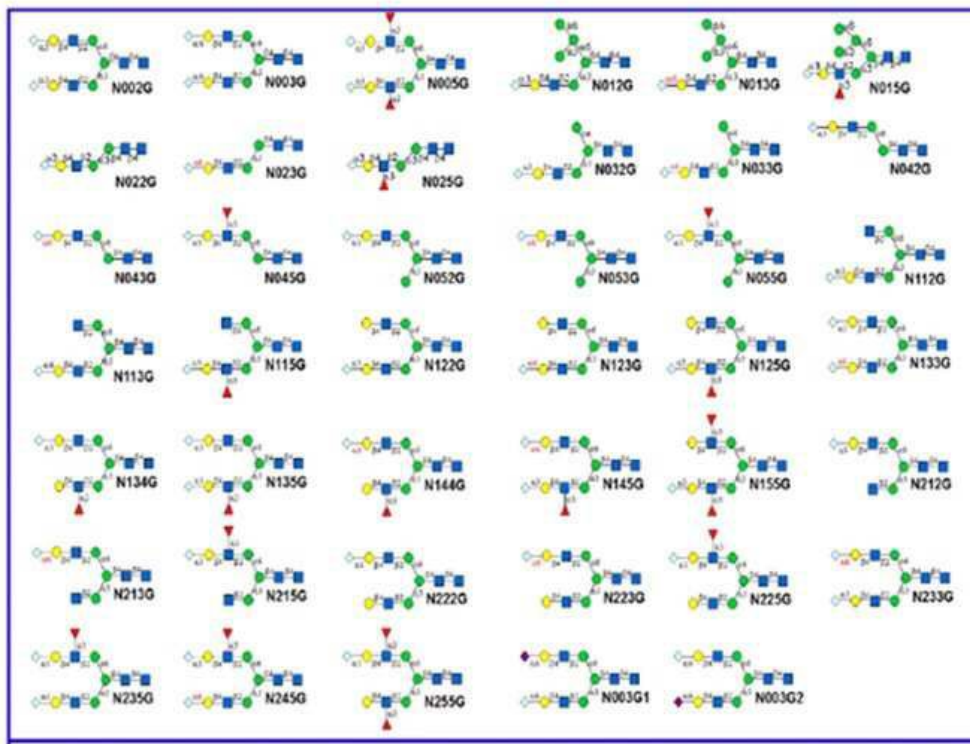


도면8

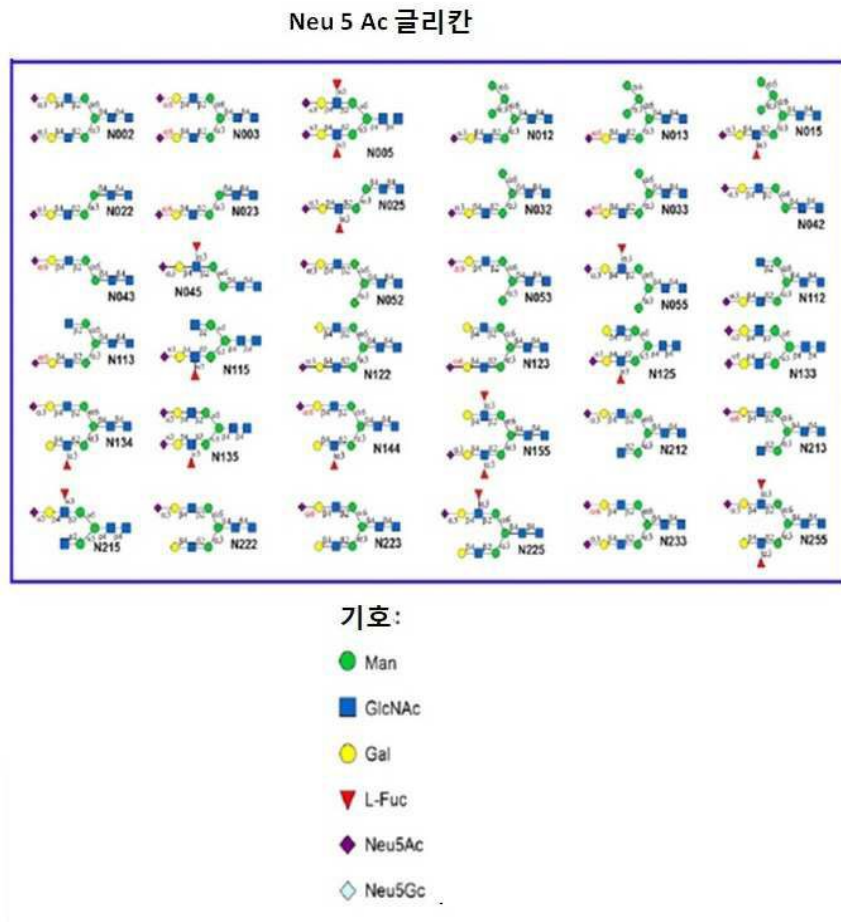


도면9a

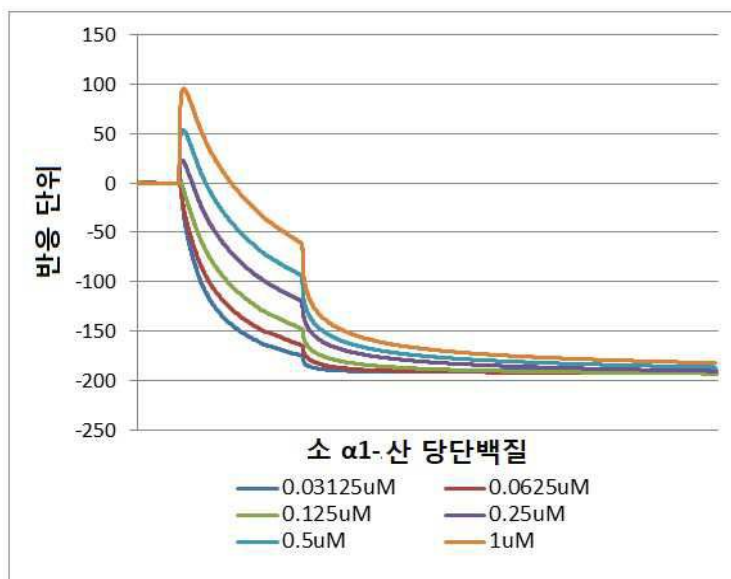
Neu 5 Gc 글리칸



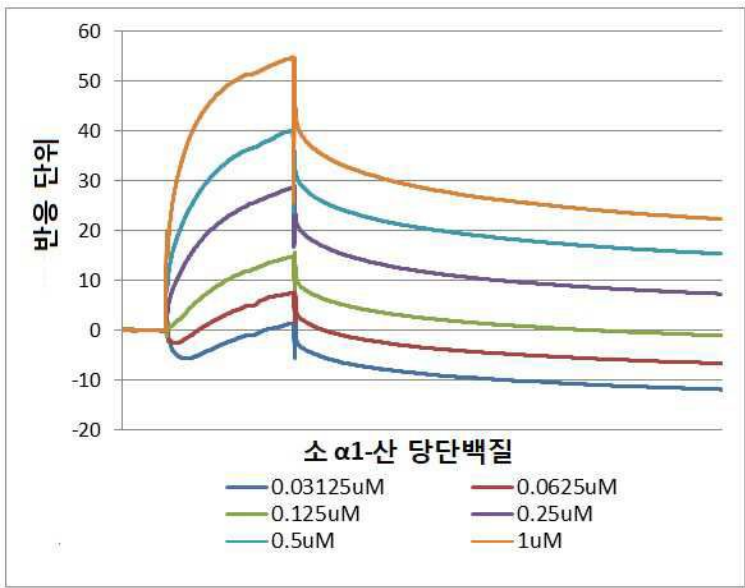
도면9b



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Griffith University
The University of Adelaide

<120> SUBTILASE CYTOTOXIN B SUBUNIT MUTANT

<130> IPA190608-AU

<150> PCT/AU2017/051230

<151> 2017-11-09

<150> AU 2016904572

<151> 2016-11-09

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Glu Trp Thr Gly Asp Ala Arg Asp Gly Met Phe Ser Gly Val Val Ile

1 5 10 15

Thr Gln Phe His Thr Gly Gln Ile Asp Asn Lys Pro Tyr Phe Cys Ile

20 25 30
 Glu Gly Lys Gln Ser Ala Gly Ser Ser Ile Ser Ala Cys Ser Met Lys
 35 40 45
 Asn Ser Ser Val Trp Gly Ala Ser Phe Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Ala
 50 55 60
 Leu Tyr Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Pro Val Arg Ile Tyr Tyr Lys Pro
 65 70 75 80
 Gly Val Trp Thr Tyr Pro Pro Phe Val Lys Ala Leu Thr Ser Asn Ala

85 90 95
 Leu Val Gly Leu Ser Thr Cys Thr Thr Glu Cys Phe Gly Pro Asp Arg
 100 105 110

Lys Lys Asn Ser

115

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Thr Ile Lys Arg Phe Phe Val Cys Ala Gly Ile Met Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Asn Pro Ala Met Ala Glu Trp Thr Gly Asp Ala Arg Asp Gly

20 25 30

Met Phe Ser Gly Val Val Ile Thr Gln Phe His Thr Gly Gln Ile Asp

35 40 45

Asn Lys Pro Tyr Phe Cys Ile Glu Gly Lys Gln Ser Ala Gly Ser Ser
 50 55 60

Ile Ser Ala Cys Ser Met Lys Asn Ser Ser Val Trp Gly Ala Ser Phe
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Ala Leu Tyr Phe Tyr Thr Thr Gly Gln Pro

85 90 95

Val Arg Ile Tyr Tyr Lys Pro Gly Val Trp Thr Tyr Pro Pro Phe Val

100 105 110

Lys Ala Leu Thr Ser Asn Ala Leu Val Gly Leu Ser Thr Cys Thr Thr

115 120 125

Ser Thr Glu Cys Phe Gly Pro Asp Arg Lys Lys Asn Ser

130 135 140

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Residue may be deleted.

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(5)

<223> Residue may be modified or deleted.

<400> 3

Thr Thr Ser Thr Glu

1 5

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

ttgtaaggat ccggaggtgc atatgacg 28

<210> 5

<211> 65

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

gattatctcg agtgagttct ttttctgtc aggacaaaa cattctgccg atgtggtgca 60

ggttg 65

<210> 6

<211> 65

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

gattatctcg agtgagttct ttttcctgtc aggacaaaa cattctgccg ctgtggtgca 60

ggttg 65

<210> 7

<211> 66

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 7

gattatctcg agtgagttct ttttcctgtc aggacaaaa cattctgtgg tgcaggttga 60

taaccc 66

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 8

gattatctcg agtgagttct ttttcctgtc aggacaaaa cagtctgtgg tgcaggttga 60

taaccc 66

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220><221> CARBOHYD

<222> (9)..(9)

<223> Hex2HexNAc2NeuAc1NeuGc1+Man3GlcNAc2

<400> 9

Thr Phe Met Leu Ala Ala Ser Trp Asn Gly Thr Lys

1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> CARBOHYD

<222> (7)..(7)

<223> Hex3HexNAc3NeuAc2+Man3GlcNAc2

<400> 10

Gln Asp Gln Cys Ile Tyr Asn Thr Thr Tyr Leu Asn Val Gln Arg

1 5 10 15