

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

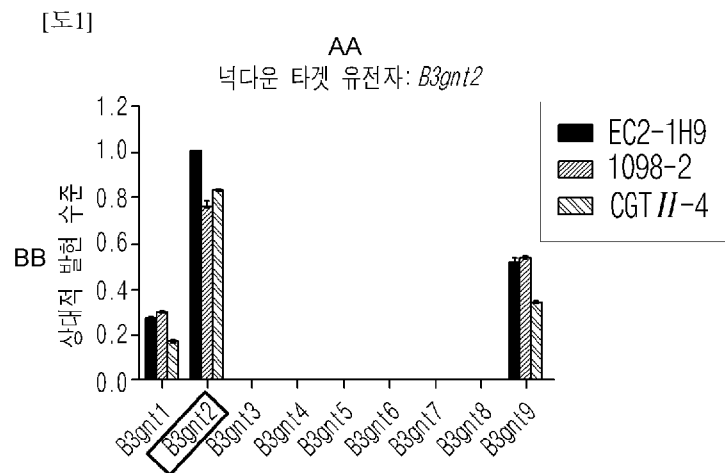
WO 2018/030738 A1

2018 년 2 월 15 일 (15.02.2018) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/85* (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12P 21/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008521
- (22) 국제출원일: 2017 년 8 월 7 일 (07.08.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0100674 2016 년 8 월 8 일 (08.08.2016) KR
10-2017-0098912 2017 년 8 월 4 일 (04.08.2017) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김정희 (KIM, Jung-Hoe); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이충근 (LEE, Chung Ge-un); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 박찬영 (KWAK, Chan Yeong); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR PREPARATION OF RECOMBINANT GLYCOPROTEIN HAVING N-LINKED GLYCAN ANTENNA STRUCTURE REINFORCED BY INHIBITION OF POLYLACTOSAMINE BIOSYNTHESIS

(54) 발명의 명칭: 폴리락토사민 생합성 저해에 의한 N-결합 당쇄 안테나구조가 강화된 재조합 당단백질 제조방법



AA ... Knock down target gene: *B3gnt2*
BB ... Relative expression level

(57) Abstract: In the present invention, it was confirmed that polylactosamine was reduced in recombinant human-derived erythropoietin produced by inhibiting (knocking down) the expression of the $\beta 3gnt2$ gene, which is involved in polylactosamine biosynthesis, or from a cell line with the knocked out $\beta 3gnt2$ gene, and thus triple and/or quadruple antenna structures of N-glycan was increased, leading to positive roles in increasing the half-life of glycoprotein and the efficacy of glycoprotein. Therefore, it was confirmed that a recombinant glycoprotein with an increased half-life can be produced through the method of the present invention.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/030738 A1



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 폴리락토사민의 생합성에 관여하는 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 발현을 억제(녹다운)하거나 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹아웃시킨 세포주로부터 생산된 재조합 인간 유래 에리스로포이에틴에서 폴리락토사민의 감소를 확인, 그에 따른 N-글리칸의 삼중 및/또는 사중 안테나 구조 증가를 확인함으로써 당단백질의 반감기 증가 및 당단백질 효능에 긍정적인 역할이 가능함을 확인한 바, 본 발명의 방법을 통해 반감기를 증가시킨 재조합 당단백질의 제조가 가능함을 확인하였다.

명세서

발명의 명칭: 폴리락토사민 생합성 저해에 의한 N-결합 당쇄 안테나구조가 강화된 재조합 당단백질 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 $\beta 3\text{gnt}2(\text{UDP-GlcNAc}:\beta\text{Gal } \beta\text{-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase})$ 유전자의 발현을 억제(knock-down), 또는 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃(knock-out)하는 단계를 통해 폴리락토사민의 생합성 억제함으로써 반감기가 증가된 당단백질(glycoproteins) 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 당화(glycosylation)는 포유동물 세포에서 주요한 번역 후 수식에 해당되고, 두 분류, N- 및 O- 연결 당화로 나뉜다. N-연결 당화는 다수의 당단백질에서 Asn(Asn-X-Ser/Thr 모티프)에 부착되어 있다. 당화는 효소 활성, 단백질 안정성, 및 면역원성에 영향을 준다.
- [4] 뉴라민산(neuraminic acid; Neu)의 아실유도체의 총칭인 시알산(sialic acid)은 당화 과정에 요구되는 당전구체 구성의 필수 성분으로 지금까지 자연계에서 약 50 여종의 시알산이 부가된 당쇄 전구체들이 발견되었다. 시알산은 포유류에 있어서 세포간 상호작용, 세포 내의 시그널을 결정하는 전구체의 역할, 당단백질의 안정화 등 세포 내의 생물학적 현상에 중요한 역할을 한다. 시알산은 1936년 Blix에 의해 소 타액선(bovine salivary gland)의 뮤신(mucin)으로부터 최초로 분리되었고, 9개의 탄소로 구성되어 있으며 COOH- 기를 가지고 있는 산성당(acidic sugar)으로서 알려져 있다. 또한, 시알산은 치환기의 차이에 의해 23 종류의 시알산이 보고되어 있으며 이들은 생물종이나 조직에 특이적인 분포를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 고등동물에서 시알산은 당단백질, 당지질, 올리고당 당쇄의 Gal, GlcNAc, GalNAc 및 시알산에 각각 특이적인 시알산 전이효소의 작용에 의해 α -글리코시드 결합으로 연결되어 있다.
- [5] 복합당질 당쇄의 시알산은 세포막 표면에 존재하는 당쇄 구조에서 가장 말단에 위치하고 있기 때문에 세포와 세포외 환경과의 접촉에 직접적으로 관여하고 있을 것으로 예상되었고, 오래전부터 체액 중의 혈구세포나 당단백질의 수명이 시알산의 제거에 의해 단축되는 것으로 알려져 있다. 이러한 예로서 적혈구 세포막의 시알산이 제거되면(asialylation) 갈락토스가 세포 표면에 노출되어 쿠퍼(Kupffer) 세포 표면상의 갈락토스와 특이적으로 결합하는 수용체 렉틴(lectin)과 결합함으로써, 수용체 매개된 내포작용(receptor-mediated endocytosis)에 의해 순환계로부터 제거되며, 시알산이 제거된 아사이알로(asialo) 당단백질도 간세포(hepatocyte) 표면의 렉틴에 의해 결합되어 적혈구 세포와 비슷한 경로로 순환계로부터 제거된다. 또한, 시알로 결합을 가지는 당단백질인

알파-안티트립신(alpha-antitrypsin), 콜린에스테라제(cholinesterase), 융모성
고나도트로핀(chorionic gonadotropin), CTLA4Ig, 인자 VIII(Factor VIII),
감마-글루타밀트랜스퍼라아제(gamma-glutamyltransferase), 과립구 콜로니
자극인자(granulocyte colony-stimulating Factor, G-CSF) 및
황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)은 시알산이 결합된 당단백질의 경우
시알산이 결합되지 않은 것에 비해 당단백질의 반감기가 현저하게 증가하는
것으로 보고되었다(Ngantung FA. et al., 2006, Biotechnol. Bioeng 95(1), 106-119).

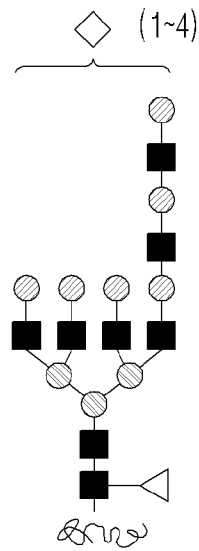
[6]

[7] 시알로 결합을 가진 당단백질 중에서 에리스로포이에틴(erythropoietin, EPO)은
적혈구 생성을 유도하는 당단백질 호르몬으로서, 제조용 EPO는 빈혈치료제로
이용되고 있다. 야생형의 EPO는 N- 결합 당쇄 3개 및 O- 결합 당쇄 1개를 가지며,
하나의 N- 결합 당쇄에는 최대 4개의 시알산(sialic acid)이, 하나의 O- 결합
당쇄에는 최대 2개의 시알산이 결합할 수 있어서 잠재적으로 한 분자의 EPO는
총 14개의 시알산이 결합할 수 있다. 상기 당단백질과 마찬가지로 EPO
단백질에서 시알산이 당쇄에 결합되어 있는 경우, 간에 존재하는
탈시알로당단백수용체와의 결합을 막아 간에서 EPO가 분해되는 것을 방지한다.

[8]

[9] 폴리락토사민은 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, GlcNAc)와
갈락토오스(Galactose)가 연속적으로 반복되는
구조(Galbeta1-4GlcNAcbeta1-3)_n로 당단백질 상에 존재하는 당사슬의 기초 구조
중의 하나이다. 일례로 EPO 같은 모델당단백질에서 폴리락토사민은 전체
N-글리칸 중 약 10 내지 20%를 차지하는데 마우스를 이용한 실험에서
폴리락토사민이 포함된 EPO는 상기 시알산에 의한 당단백질의 표면상의
갈락토오스 보호 효과와 무관하게 체내 반감기가 현저히 감소한다는 것이 보고
되었다.

[10]



※ 폴리락토사민
:GlcNAc 과 Gal의 반복구조

[11] (그림 1. 폴리락토사민의 구조적 특징)

[12]

[13] 1970년대 DNA의 특정 서열을 인지해 자르는 제한효소가 발견될 것을 시작으로 유전자 조작기술은 시대에 시대를 거듭하여 급격하게 발전해 왔다. 하지만 제한효소를 활용한 유전자 조작기술은 그 한계가 명확했다. 구체적으로, 제한효소는 6~8 개 정도의 인식할 수 있는 유전자 서열의 길이가 매우 짧아, 약 46(4,096) 개의 순서쌍 밖에 구분하지 못하는 문제가 존재했다. 반면에 CRISPR/CAS9 시스템은 이러한 한계가 없어 이론적으로 인간 이상의 고등 생명체에도 적용 가능하다.

[14] CRISPR/CAS9 시스템은 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 게놈 편집 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(gRNA)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 nuclease로 구성된다. 이러한 CRISPR/CAS9 시스템을 이용하면 세포나 동물에 플라스미드(Plasmid) DNA를 도입하여 특정 유전자의 기능을 억제할 수 있는 녹-아웃(knock-out)이 가능하다.

[15] CRISPR/CAS9 시스템은 불과 몇 년 전에 과학자들에 의해 발견된 것으로, 박테리아 등 단세포 유기체가 박테리오파지로부터 스스로를 지키는 아주 오래된 방법이다. 유기체가 박테리오파지의 DNA를 잘라 자신의 유전자에 붙여 기억하여 적응면역을 통해 살아남는 것으로 수백만 년에 걸쳐 진화되었고, 이것이 연구실에서 유기체의 DNA를 빠르게 편집할 수 있는 간단하고 명쾌한 방법으로 연구되었다. 구체적으로, 본래의 CRISPR/CAS9 시스템은 박테리아가 이전에 침입했던 바이러스의 DNA 일부를 자신의 유전체에 저장해둔 후,

바이러스가 침입할 때에 그 정보를 다시 꺼내어 바이러스 DNA만을 찾아 절단하는 데 쓰는 박테리아의 자기보호 메커니즘이다. 이를 유전체공학에 이용함으로써, 특정 유전자의 염기서열을 찾아가는 시발체(Primer)를 제작해 절단 효소인 Cas9 효소와 짝을 이루어 표적이 되는 DNA 염기서열에 달라붙어 DNA 절단이 일어난다. 따라서 DNA 복원(수선) 과정에서 돌연변이가 발생하게 된다.

[16]

[17] 이에 본 발명자들은 당단백질의 분해 저항성을 높여, 체내 활성을 높이기 위한 방법으로 당단백질에서 폴리락토사민(polylactosamine)의 함량을 줄이기 위해 siRNA를 이용하여 폴리락토사민 합성에 관여하는 유전자를 녹-다운(knock-down)시킨 CHO 세포주, 및 CRISPR/CAS9 시스템을 이용하여 폴리락토사민 합성에 관여하는 유전자를 녹-아웃(knock-out)시킨 CHO 세포주를 구축하였으며, 이로부터 생산된 당단백질은 폴리락토사민 감소에 따라 삼중(Tri-) 및/또는 사중 안테나(Tetra-antennary) 구조가 증가하였고, 이로 인한 당단백질의 반감기 증가는 당단백질의 효능에 긍정적인 역할을 할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[18]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[19] 본 발명의 목적은 폴리락토사민의 생합성이 억제된 세포주로부터 반감기가 증가된 당단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[20]

과제 해결 수단

[21] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 당단백질을 생성하는 세포주에서 폴리락토사민(Polylactosamine)의 생합성을 억제시키는 단계를 포함하는, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 재조합 세포주를 제공한다.

[23] 또한, 본 발명은

[24] 1) 상기 재조합 세포주를 배양하는 단계; 및

[25] 2) 상기 단계 1)의 배양액에서 재조합 당단백질을 분리하는 단계를 포함하는 반감기가 증가된 재조합 당단백질의 제조방법을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분리된, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 제공한다.

[27] 아울러, 본 발명은 서열번호 10 내지 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 염기서열; 및 서열번호 14로 기재되는 염기서열로 구성되는 Cas9 유전자를 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.

[28]

발명의 효과

[29] 본 발명은 폴리락토사민의 생합성에 관여하는 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 발현을 억제(녹다운)하거나 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹아웃시킨 세포주로부터 생산된 재조합 인간 유래 에리트로포이에틴에서 폴리락토사민의 감소를 확인, 그에 따른 N-글리칸의 삼중 및/또는 사중 안테나 구조 증가를 확인함으로써 당단백질의 반감기 증가 및 당단백질 효능에 긍정적인 역할이 가능함을 확인한 바, 본 발명의 방법을 통해 반감기를 증가시킨 재조합 당단백질의 제조가 가능함을 확인하였다.

[30]

도면의 간단한 설명

[31] 도 1은, CHO 세포 내 폴리락토사민 합성 유전자 후보군($\beta 3\text{gnt}1\sim 9$)의 발현 양상을 비교한 도이다.

[32] 도 2는, $\beta 3\text{gnt}2$ 의 발현 억제(knock-down)를 위한 siRNA의 위치 및 서열을 나타낸 도이다.

[33] 도 3은, siRNA-1, siRNA-2 및 siRNA-3에 의한 유전자 발현 양상 및 그에 따른 웨스턴 블로팅 결과를 통해 siRNA 후보군 중 siRNA-2를 선정한 결과를 확인한 도이다:

[34] 도 3a: siRNA-1, siRNA-2 및 siRNA-3에 의한 유전자 발현 양상 확인 결과;

[35] 도 3b: siRNA-1, siRNA-2 및 siRNA-3에 의한 웨스턴 블로팅 결과;

[36] 도 3c: siRNA-2에 의한 웨스턴 블로팅 결과;

[37] 도 3d: siRNA-2에 의한 웨스턴 블로팅의 상대적 강도 확인 결과.

[38] 도 4는, siRNA-2에 의한 폴리락토사민 억제에 의한 당쇄 구조의 정량적 변화를 확인한 도이다:

[39] 도 4a: siRNA-2에 의한 폴리락토사민 비율 감소 확인;

[40] 도 4b: siRNA-2에 의한 삼중(Tri-) 및 사중 안테나(Tetra-antennary) N-글리칸의 증가 확인.

[41] 도 5는, siRNA-2에 의한 폴리락토사민 Glycan 구조들의 전체적인 프로파일 확인을 위한 MALDI-TOF MS 결과이다:

[42] 도 5a: 대조군;

[43] 도 5b: siRNA-2 처리군.

[44] 도 6은, siRNA-2에 의한 폴리락토사민 구조의 정량적 변화 확인을 위한 LC/MS 결과이다:

[45] 도 6a: 대조군;

[46] 도 6b: siRNA-2 처리군.

[47] 도 7은, gRNA-1, gRNA-2, gRNA-3 및 gRNA-4에 의해 $\beta 3\text{gnt}2$ 의 녹아웃(knock-out)된 결과를 나타낸 도이다:

- [48] 도 7a: CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 벡터의 개열 지도;
- [49] 도 7b: T7 Endonuclease 1(T7E1) 어세이 후, 아가로스 겔 결과;
- [50] 도 7c: T7 Endonuclease 1(T7E1) 어세이 후, 유전자의 삽입/결실 빈도(Indel) 결과(gRNA-1: 1, gRNA-2: 2, gRNA-3: 3, gRNA-4: 4).
- [51] 도 8은, CRISPR/Cas9 시스템을 통해 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자가 녹아웃된 성공적으로 형질전환된 클론 선택 결과를 나타낸 도이다(1= gRNA-1, 2= gRNA-2, 3= gRNA-3, 4= gRNA-4):
- [52] 도 8a: 유동세포계측법(Flow cytometry) 수행 결과;
- [53] 도 8b: 대조군(WT)과 비교해서 인델(indel)이 확인된 클론들을 선별한 후 생거-시퀀싱(sanger-sequencing) 결과(삭제, 삽입 및 PAM 서열(GGC, AGG, CCC, CCT)).
- [54] 도 9는, $\beta 3\text{gnt}2$ 의 녹-아웃을 통한 폴리락토사민의 발현 감소 확인한 도이다:
- [55] 도 9a: 선택된 클론(클론 1: gRNA-1의 9 / 클론 2: gRNA-4의 2 / 클론 3: gRNA-4의 12 / 클론 4: gRNA-4의 16)의 웨스턴 블로팅;
- [56] 도 9b: 폴리락토사민 비율 감소 확인;
- [57] 도 9c: 삼중(Tri-) 및 사중 안테나(Tetra-antennary) N-글리칸의 증가 확인.
- [58]

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [60]
- [61] 본 발명은 당단백질을 생성하는 세포주에서 폴리락토사민(Polylactosamine)의 생합성을 억제시키는 단계를 포함하는, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [62] 상기 당단백질은 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 알파-안티트립신(alpha-antitrypsin), 콜린에스테라제(cholinesterase), 융모성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin), CTLA4Ig, Factor VIII, 감마-글루타미드 트랜스퍼라아제(gamma-glutamyltransferase), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony-stimulating Factor, G-CSF) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며, 구체적으로는 에리스로포이에틴일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [63] 상기 폴리락토사민의 생합성 억제를 위해서 구체적으로는 $\beta 3\text{gnt}2$ (UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2) 유전자의 발현을 녹-다운(knock-down)시키거나, $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃(knock-out)시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [64] 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 mRNA는 서열번호 1로 기재되는 염기서열로 구성될 수 있다.

- [65] 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 발현의 녹-다운은, 구체적으로 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 억제제를 처리하거나, 또는 $\beta 3\text{gnt}2$ mRNA에 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, shRNA 및 miRNA로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 당단백질을 생산하는 세포주에 형질감염시키는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 $\beta 3\text{gnt}2$ mRNA에 결합하는 siRNA를 당단백질을 생산하는 세포주에 형질감염시키는 것일 수 있다.
- [66] 상기 siRNA는 서열번호 2, 서열번호 4 및 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [67] 상기 siRNA는 상기 표적서열에 상동인 독립적인 센스 RNA 가닥 및 이에 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하거나 상기 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥이 루프에 의해 연결된 스템-루프 구조의 단일 RNA 가닥일 수 있다.
- [68] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고, 스템-루프(stem-loop)의 구조를 이루는 헤어핀 구조를 가질 수 있는데, 이를 특히 shRNA(short hairpin RNA)라 지칭한다. 한편, 상기 이중사슬 또는 스템 부위는 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수도 있다. 전체 길이는 10 내지 80 염기, 바람직하게는 15 내지 60 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 40 염기이다. 또한, 상기 루프 영역은 서열에 특별한 의미가 없으며, 단지 센스서열과 안티센스서열을 적당한 간격으로 연결하기 위하여 3-10 정도의 염기를 가지고 있으면 족하다. 종래에 siRNA의 루프 영역으로 많이 사용되어온 예들은 다음과 같다: AUG(Sui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(8):5515-5520, 2002), CCC, CCACC 또는 CCACACC(Paul et al., Nature Biotechnology 20:505-508, 2002), UUCG(Lee et al., Nature Biotechnology 20:500-505), CTCGAG, AAGCUU(Editors of Nature Cell Biology Whither RNAi, Nat Cell Biol. 5:489-490, 2003), UUCAAGAGA(Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052, 2002) 및 TTGATATCCG(www.genscript.com의 default spacer). siRNA 말단 구조는 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조(protruding structure)와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조가 모두 가능하고 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 표적유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 짝을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.
- [69] 더불어, 본 발명에 따른 siRNA에서, 센스 RNA 가닥 및/또는 안티센스 RNA가닥은 이의 당 부분, 뉴클레오베이스 부분 또는 인터뉴클레오타이드 구조

내에 최소한 1개의 화학적 변형을 포함하는 것이 가능하다. 이러한 변형은 생체 내에서 뉴클레아제에 의해 siRNA의 파괴를 저해하는 것을 가능하게 할 수 있다. 본 발명에 따른 siRNA의 안정성과 생적합성을 생체 내에서 향상시킬 수 있는 모든 화학적 변형이 본 발명의 범위에 포함된다. 당 부분 에 대한 바람직한 변형 중에서, 언급될 수 있는 것은 2'-데옥시, 2'-플루오로, 2'-아미노, 2'-티오, 또는 2'-O-알킬과 같은 리보오스의 포지션 2', 그리고 바람직하게는 리보뉴클레오타이드 상의 정상 2'-OH 그룹을 대체하는 2'-O-메틸 또는 LNA의 포지션 2' 및 4' 사이에 있는 메틸렌 브릿지의 존재에서 일어나는 변형이다. 뉴클레오베이스의 경우, 5-브로모-유리딘, 5-이오도-유리딘, N3-메틸-유리딘, 2,6-디아미노퓨린(DAP, 5-메틸-2'-데옥시시티딘, 5-(1-프로피닐)-2'-데옥시-유리딘(pdU), 5-(1-프로피닐)-2'-데옥시시티딘(pdC)과 같은 변형된 염기 또는 콜레스테롤과 결합한 염기를 이용하는 것이 가능하다. 마지막으로, 인터뉴클레오타이드 골격의 바람직한 변형은 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 메틸포스포네이트, 포스포로디아미데이트 그룹에 의한 골격에 있는 포스포디에스터 그룹을 치환하는 것을 포함하거나, 펩타이드 결합에 의해 연결된 N-(2-아미노에틸)-글리신(PNA, 펩타이드 핵산)으로 구성되는 골격을 이용한다. 다양한 변형(염기, 당, 골격)은 몰포리노(morpholino) 타입의 변형된 핵산(몰포린 링에 고정되고 포스포로디아미데이트 그룹에 의해 연결된 염기) 또는 PNA(펩타이드 결합에 의해 연결된 N-(2-아미노에틸)-글리신 단위에 고정된 염기)에 결합될 수 있다.

- [70] 상기 형질감염은 리포펙타민(Lipofectamine), Dojindo사의 Hilymax, Eugene, jetPEI, Effectene 및 DreamFect으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포좀, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기천공법(electroporation), 열충격(heatshock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법을 이용하는 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 수행될 수 있다.
- [71] 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 녹-아웃은 구체적으로, $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃시킬 수 있는 재조합 벡터를 당단백질을 생성하는 세포주에 형질전환하는 것일 수 있다.
- [72] 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃시킬 수 있는 재조합 벡터는 구체적으로, 서열번호 10 내지 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 가이드 RNA(guide RNA; gRNA)를 암호화하는 염기서열 및 서열번호 14로 기재되는 염기서열로 구성되는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 것일 수 있고, 상기 재조합 벡터는 Cas9 유전자와 형광단백질을 코딩하는 유전자가 결합되어 있는 구조를 포함하는 것일 수 있다.
- [73] 구체적으로, 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃시킬 수 있는 재조합 벡터는 서열번호 15 내지 18로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [74] 상기 방법에 있어서, 상기 세포주는 포유동물 세포(mammalian cells), 효모 세포(yeast cells) 또는 곤충 세포(insect cells)를 사용할 수 있고, 상기 포유동물 세포는 중국 햄스터 난소 세포(chinese hamster ovary cells, CHO), HT-1080, 인간 림프아구(human lymphoblastoid), SP2/0(마우스 골수종), NS0(마우스 골수종), 베이비 햄스터 신장세포(baby hamster kidney cells, BHK), 인간 배아 신장세포(human embryonic kidney cells, HEK), PERC.6(인간 망막세포) 및 EC2-1H9 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며, 중국 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cells, CHO)인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [75]
- [76] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 폴리락토사민 합성 관련 9종류의 유전자 후보군의 발현양상을 확인한 결과, $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자가 가장 발현량이 높아 폴리락토사민 구조 합성에 가장 크게 관여할 타겟 유전자로 선정하였으며, $\beta 3\text{gnt}2$ 의 발현을 저해할 타겟 siRNA를 제작하였다(도 1 및 도 2 참조). 본 발명에서 제작한 siRNA에 의한 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 발현 억제와 그로 인한 폴리락토사민의 합성저해를 확인하기 위해 siRNA 처리된 CHO 세포에서 생산된 EPO를 대상으로 락토사미닐 반복(lactosaminyl repeat) 구조와 특이적으로 결합하는 렉틴(LEL)을 이용해 면역 블로팅을 수행하였고, 그 결과 siRNA-2 처리에 의해 $\beta 3\text{gnt}2$ 발현이 저해된 EPO는 약 70%의 시그널 감소를 나타내는 것을 확인하였다(도 3 참조).
- [77] 또한, 본 발명자들은 폴리락토사민 억제에 의한 당쇄 구조의 정량적 변화를 확인하였고, 그 결과 총 N-글리칸에서 폴리락토사민이 차지하는 비율이 기존의 약 19%에서 2% 가량으로 현저히 감소했음을 확인하였으며(도 4a), 폴리락토사민 구조가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(도 5 및 도 6). 또한, 삼중(tri-) 및 사중 안테나(tetra-antennary) N-글리칸의 비율이 증가함을 확인하였다(도 4b 참조).
- [78] 또한, 본 발명자들은 CRISPR/Cas9 시스템을 통한 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 녹아웃 재조합 벡터를 제조하였고, 상기 재조합 벡터를 형질전환하여 녹아웃 효율을 확인하기 위해 T7E1 어세이를 수행한 결과 WT DNA에 비해 삽입된 세포의 DNA는 미스매치된 DNA 영역이 T7E1에 의해 잘려서 멀티 밴드(multi band)를 보이는 것을 확인하였으며(도 7b 참조), 유동세포계측법 및 생거-시퀀싱을 통해 녹아웃된 서열을 확인하였다(도 8 참조). 또한, $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자가 녹아웃된 클론(클론 1: 15007-9 / 클론 2: 15402-2 / 클론 3: 15402-12 / 클론 4: 15402-16)으로부터 분리된 EPO는 모두 LEL와의 반응이 나타나지 않았으며(도 9a 참조), 총 N-글리칸에서 폴리락토사민이 차지하는 비율이 기존의 약 15%에서 2% 가량으로 현저히 감소했음을 확인하였다(도 9b 참조). 또한, 폴리락토사민이 감소함과 동시에 부가적으로 삼중(Tri-antennary) 및 사중 안테나(Tetra-antennary) N-글리칸의 비율이 증가함을 확인하였다(도 9c 참조).

- [79] 따라서, 본 발명은 폴리락토사민의 생합성에 관여하는 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 발현을 억제(녹다운)하거나 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹아웃시킨 세포주로부터 생산된 재조합 인간 유래 에리트로포이에틴에서 폴리락토사민의 감소를 확인, 그에 따른 N-글리칸의 삼중 및/또는 사중 안테나 구조 증가를 확인함으로써 당단백질의 반감기 증가 및 당단백질 효능에 긍정적인 역할이 가능함을 확인한 바, 본 발명의 방법을 통해 반감기를 증가시킨 재조합 당단백질의 제조가 가능함을 확인하였다.
- [80]
- [81] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주를 제공한다.
- [82] 또한, 본 발명은
- [83] 1) 상기 재조합 세포주를 배양하는 단계; 및
- [84] 2) 상기 단계 1)의 배양액에서 재조합 당단백질을 분리하는 단계를 포함하는, 반감기가 증가된 재조합 당단백질의 제조방법을 제공한다.
- [85] 상기 당단백질은 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴, 알파-안티트립신, 콜린에스테라제, 융모성 고나도트로핀, CTLA4Ig, Factor VIII, 감마-글루타미트렌스퍼라아제, 과립구 콜로니 자극인자 및 황체형성호르몬으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 구체적으로는 에리트로포이에틴일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [86] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 분리된, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 제공한다.
- [87] 상기 방법으로 분리된 반감기가 증가된 재조합 당단백질은 N-글리칸(glycan)의 삼중(Tri-) 및/또는 사중-안테나(Tetra-antennary) 구조가 증가한 것을 특징으로 한다.
- [88] 아울러, 본 발명은 서열번호 10 내지 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 가이드 RNA(guide RNA; gRNA)를 암호화하는 염기서열; 및 서열번호 14로 기재되는 염기서열로 구성되는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.
- [89] 상기 재조합 벡터는 Cas9 유전자와 형광단백질을 코딩하는 유전자가 결합되어 있는 구조를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 재조합 벡터는 서열번호 15 내지 18로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [90]
- [91] 따라서, 본 발명은 폴리락토사민의 생합성에 관여하는 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 발현을 억제(녹다운)하거나 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹아웃시킨 세포주로부터 생산된 재조합 인간 유래 에리트로포이에틴에서 폴리락토사민의 감소를 확인, 그에 따른 N-글리칸의 삼중 및/또는 사중 안테나 구조 증가를 확인함으로써 당단백질의 반감기 증가 및 당단백질 효능에 긍정적인 역할이 가능함을 확인한 바, 본

발명의 방법을 통해 반감기를 증가시킨 재조합 당단백질의 제조가 가능함을 확인하였다.

[92]

[93] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[94] 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[95]

[96] <실시예 1> 폴리락토사민(Polylactosamine) 합성 유전자의 siRNA의 제작

[97] <1-1> 폴리락토사민 합성 관련 유전자의 확인

[98] 폴리락토사민의 합성은 갈락토스(galactose)에 β 1,3-GlcNAc을 결합시키는 9종류(β 3gnt1~9)의 유전자가 관여하는데, 조직마다 혹은 세포종류마다 특이적으로 관여하는 유전자가 동일하지 않다. 이에 따라 9종류의 유전자 후보군의 발현양상을 비교하기 위해 3종류(EC2-1H9, 1098-2, CGT II-4)의 CHO 세포에서 qPCR을 수행하였다.

[99] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 β 3gnt2 유전자가 가장 발현량이 높아 폴리락토사민 구조 합성에 가장 크게 관여할 타겟 유전자로 선정하고, β 3gnt2의 발현을 저해할 타겟 siRNA를 제작하였다.

[100]

[101] <1-2> β 3gnt2 유전자의 siRNA 제작

[102] β 3gnt2 유전자의 siRNA를 제작하기 위해 siRNA 서열을 디자인하고 합성하였다.

[103] 도 2에 나타낸 바와 같이 코딩 영역 위치에서 햄스터 β 3gnt2 mRNA (GenBank accession no. XM_003502146.2; 서열번호 1)를 억제하는 세 개의 영역(siRNA-499, siRNA-1101 및 siRNA-970)에서 siRNA 서열을 디자인 및 합성하였다. 상기 siRNA에 사용된 올리고뉴클레오티드는 표 1에 기재된 바와 같다.

[104] [표1]

siRNA 이름	올리고뉴클레오티드 이름	올리고뉴클레오티드 서열	cDNA 상 위치
siRNA-1	S-siRNA (서열번호 2)	5'-GAAGAAATGCGCA AAGAA-3'	499
	A-siRNA (서열번호 3)(타겟서열)	5'-TTCTTTGCGCATTT CTTC-3'	
siRNA-2	S-siRNA (서열번호 4)	5'-CTGGAATGTGCCTT CAGAA-3'	1101
	A-siRNA (서열번호 5)(타겟서열)	5'-TTCTGAAGGCACA TTCCAG-3'	
siRNA-3	S-siRNA (서열번호 6)	5'-CATCCCAGAAGTC TTCTAT-3'	970
	A-siRNA (서열번호 7)(타겟서열)	5'-ATAGAAGACTTCT GGGATG-3'	

[105]

[106] <실시예 2> β3gnt2 유전자 녹다운(knock-down) CHO 세포주의 구축

[107] 상기 실시예 <1-2>에서 제작한 β3gnt2 유전자의 siRNA를 이용하여 인간 EPO 생산 CHO 세포주에 형질감염하였다.

[108] 구체적으로, 제조한 인간 EPO 생산 CHO 세포주인 EC2-1H9는 Dr. Hyo Jeong Hong(Department of Systems Immunology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea로부터 제공받았다. 세포는 10% dFBS (dialyzed fetal bovine serum; SAFC, US), 3.5 g/L glucose, 20 nM MTX (methotrexate; Sigma), 및 1% Ab-Am (Antibiotic-Antimycotic solution; Gibco)가 첨가된 MEM-α에서 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양되었다.[109] 상기 실시예 <1-2>에서 제작한 siRNA의 형질감염을 위해 EC2-1H9 세포는 제조업자의 프로토콜에 따라 Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 β3gnt2 특이적 또는 음성 대조군에 대한 siRNA(UGCG-specific siRNA) 10 μM로 형질감염하였다. 형질감염 24시간 후, 배지를 무혈청 배지(CHO-S-SFM II; Gibco)로 교환하고 37°C에서 5% CO₂의 환경에서 추가적으로 3일간 배양하였다.

[110]

[111] <실험예 1> β3gnt2 발현 저해(knock-down)를 통한 폴리락토사민 합성 저해 확인

[112] β3gnt2 유전자의 siRNA 처리에 의한 β3gnt2 유전자의 발현 억제와 그로 인한

폴리락토사민의 합성저해를 확인하기 위해 siRNA 처리된 CHO 세포에서 생산된 EPO를 대상으로 락토사미닐 반복(lactosaminy repeat) 구조와 특이적으로 결합하는 렉틴(Lycopersicon Esculentum Lectin, LEL)을 이용해 면역브로팅(immunoblotting)을 수행하였다.

[113]

[114] <1-1> β3gnt2 유전자 발현 확인

[115] 상기 <실시예 2>에서 구축한 재조합 CHO 세포의 총 RNA는 제조업자의 프로토콜에 따라 RNeasy® Mini (QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. 1.0 μg의 RNA를 이용하여 AccuPower RT-PCR PreMix(Bioneer, Korea)을 이용하여 cDNA로의 역전사를 수행하였다. cDNA는 qPCR를 이용하여 β3gnt2의 mRNA 전사체를 확인하기 위한 템플레이트로 사용되었다. β3gnt2의 qPCR을 위해, 정방향(5'-CTG GCG ATT AAG TCC CTC ATT -3'; 서열번호 8) 및 역방향(5'-CTG GCG ATT AAG TCC CTC ATT -3'; 서열번호 9) 프라이머와 함께 iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

[116]

[117] <1-2> 재조합 인간 유래 에리스로포이에틴(recombinant human erythropoietin; rhEPO)의 분리

[118] 재조합 인간 유래 에리스로포이에틴(rhEPO)을 분리하기 위해, rhEPO를 포함하고 있는 배양 상등액을 취합하고, 0.45 μm-pore-size 멤브레인을 이용해 통과시켰다. 통과시킨 배양 배지는 농축하여 ultrafiltration(AmiconUltra; Millipore, Bedford, MA)을 통해 PBS 버퍼 교환하였다. 그리고, rhEPO는 면역크로마토그래피 컬럼(immunoaffinity chromatography column, MAiiA, Uppsala, Sweden)를 이용해 정제하였다. 샘플을 로딩한 후 PBS로 세척한 뒤, 잔존하는 rhEPO는 0.1 M glycine/0.5 M NaCl, pH 2.8로 용출하고, 용출액은 즉시 1.0 M Tris/HCl, pH 9.0로 중화하였다. 정제된 rhEPO는 농축한 뒤 ultrafiltration(AmiconUltra; Millipore)를 이용하여 증류수로 투석하였다. rhEPO의 농도는 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen)를 이용하여 측정하였다.

[119]

[120] <1-3> 폴리락토사민의 발현 확인을 위한 면역 블로팅

[121] 폴리락토사민의 발현 레벨을 확인하기 위해 렉틴 블랏(Lectin blot) 분석을 수행하였다. 구체적으로, Lycopersicon Esculentum Lectin(LEL)을 이용한 정제된 EPO 블로팅을 위해 상기 정제된 1 μg EPO를 12.5% SDS PAGE에서 전기영동하고 PVDF 멤브레인(Millipore, Billerica, MA)로 옮겼으며, 바이오틴이 라벨된 LEL(Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA)로 블랏하였다. PVDF 멤브레인은 TBS-T[TBS(140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)/0.05% Tween 20]에서 5% BSA와 함께 1시간 동안 실온에서 블로킹(blocking)하였다. 블로킹 이후, 멤브레인은 TBS-T 내에서 1:500으로 희석된 바이오틴이 라벨된 렉틴과 함께 밤새 4°C에서 배양되었다. 이후 상기 멤브레인을 TBS-T로 3회 린스하고

1:5,000으로 희석된 ExtrAvidin-Peroxidase(2.0-2.5 mg/ml)와 함께 1시간 동안 실온에서 배양하여, 마지막으로 TBS-T로 5회 린스하여 Supersignal kit으로 처리하였다.

- [122] 항-EPO 항체를 이용한 리블롯팅(Reblotting)을 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, EPO의 개수 제어를 위해 렉틴 블롯 이후 같은 블롯은 항-EPO 항체를 이용하여 리블롯팅을 실시하였다. 즉, 멤브레인은 스트리핑 버퍼(stripping buffer)(CANDOR Bioscience GmbH, Wangen im Allgäu, Germany)와 함께 30분간 실온에서 배양하였으며 TBS-T로 5회 세척하였다. 상기 멤브레인은 5% BSA와 함께 1시간 동안 실온에서 블록하였고 TBS-T에서 1:10,000로 희석한 마우스 항-EPO 항체(100 ug/ml, Santa Cruz, CA)와 함께 밤새 배양하였다. 배양 후, 상기 멤브레인은 TBS-T로 5회 세척하였으며, Supersignal kit을 이용하여 처리되었다. 블로팅 지수는 렉틴 블롯에서 밴드 강도로써 계산되었으며 항-EPO 항체를 이용하여 웨스턴 블롯에서 리블롯 밴드 강도에 의해 나뉘었다.

- [123] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 siRNA-1 처리보다 siRNA-2 및 siRNA-3에 의한 $\beta 3\text{gnt}2$ 발현 저해 효과가 큰 것을 확인하였으며(도 3a 및 도 3b), siRNA-2 처리에 의해 $\beta 3\text{gnt}2$ 발현이 저해된 EPO는 blotting 결과 약 70%의 시그널 감소를 나타내는 것을 확인하였다(도 3c 및 도 3d).

[124]

- [125] <실험예 2> $\beta 3\text{gnt}2$ 발현 저해(knock-down)를 통한 rhEPO의 안테나(antennary) 구조 증가 확인

- [126] $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 siRNA를 통한 폴리락토사민 억제에 의한 당쇄 구조의 정량적 변화를 확인하기 위해 LC/MS 및 MALDI를 이용한 N-글리칸 질량분석을 수행하였다.

- [127] 구체적으로, 정제된 rhEPO는 100 mM 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate) 및 5 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol)의 수용액에서 급속 열 순환(25-100°C)에 의해 변성되었다. 냉각시킨 후, 2.0 μl (또는 1000 U)의 펩티드 N-글리코시다아제(glycosidase) F를 첨가한 후, 혼합하여 16시간 동안 37°C 워터 베이스에서 배양하였다. rhEPO 분해물은 카트리지에 로딩해 두고 순수한 물로 염 및 다른 버퍼 물질을 제거하기 위해 씻어 내었다. N-글리칸은 40% 아세토니트릴(acetonitrile)/0.05% 트리플루오로 아세트산(trifluoroacetic acid)의 첨가에 의해 물(산성 분획물; acidic fraction)에서 용출되었다. 샘플은 진공 하에 건조시켰다. rhEPO N-글리칸 분획은 물에 재용해시키고, 1.0 μl (rhEPO 1 μg 에 해당)는 스테인리스 강 표적 플레이트에 스폿팅하였다. 중성 글리칸은 양이온 모드($[\text{M}+\text{Na}]^+$ 또는 $[\text{M}+\text{H}]^+$)에서 분석된 반면, 산성 글리칸은 음이온 모드($[\text{M}+\text{H}]^-$)에서 분석되었다. 각각의 획득한 스펙트럼은 현장에서 3개의 임의의 위치(총 2400개의 레이저 샷)에서 800 레이저 샷으로부터 결합된 신호를 나타내었다. 질량 스펙트럼은 m/z 2000-4500의 범위에 걸쳐 기록되었다. 말토올리고당 래더(maltooligosaccharide ladder)는 외부 질량 교정에 사용하였다. MS 피크는

5.0의 신호 대 잡음비로 필터링하고, 화합물 질량 및 강도 목록을 얻기 위해 디콘볼루션을 수행하였다. N- 글리칸 분석을 합치고 2.0 μL (800 ng EPO에 해당)의 양을 자동 시료 주입기로 다공성 흑연 탄소 나노-LC 칩(Agilent)에 주입하였다. 급속 글리칸 용출 구배를 (A) 3.0% 아세토니트릴/0.1% 포름산 수용액 및 (B) 90.0% 아세토니트릴/0.1% 포름산 수용액을 사용하여, 20분 동안 6%에서 100% B로 상승하도록 분석용 칼럼에 0.3 μL /분으로 적용하였다. 남아있는 비-글리칸 화합물을 100% B로 씻어낸 다음 재평형시켰다. MS 스펙트럼은 스펙트럼 당 1.5초의 획득 시간으로 m/z 500-2000의 질량 범위에서 양이온 모드로 획득되었다.

[128] 그 결과, 도 4 내지 도 6에 나타낸 바와 같이 총 N-글리칸에서 폴리락토사민이 차지하는 비율이 기존의 약 19%에서 2% 가량으로 현저히 감소했음을 확인하였으며(도 4a), MALDI-TOF MS 및 LC/MS 결과 폴리락토사민 구조가 줄어든 것을 확인할 수 있었다(도 5 및 도 6).

[129] 또한, 폴리락토사민이 감소함과 동시에 부가적으로 삼중(tri-) 및 사중 안테나(tetra-antennary) N-글리칸의 비율이 증가함을 확인하였다(도 4b). 이는 폴리락토사민 합성에 사용될 구성성분(component)들이 안테나 분기(Antenna branching)에 사용되었기 때문으로 보인다. 문헌에 의하면, 이중 안테나(Bi-antennary) 당쇄구조를 갖는 EPO는 사중 안테나(Tetra-antennary) 당쇄구조를 갖는 EPO에 비해 *in-vivo* 활성이 약 85% 감소하는 것으로 보고된 바 있다(Takeuchi et al, PNAS, 1989). 따라서, 폴리락토사민 감소와 그에 따른 사중 안테나 구조의 증가는 당단백질의 반감기 증가와 당단백질 효능에 긍정적인 역할을 할 수 있는 결과라 할 수 있다.

[130]

[131] <실시예 3> $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 녹아웃(knock-out) CHO 세포주의 구축

[132] <3-1> 재조합 인간 EPO를 생산하는 CHO 세포의 준비

[133] 재조합 인간 EPO를 생산하는 CHO 세포인 EC2-1H9 세포는 Dr. Hyo Jeong Hong (Antibody Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yuseong-gu, Daejeon, Korea)로부터 제공받았다. 세포는 10% (v/v) dFBS (Gibco), 3.5 g/L glucose, 20 nM MTX (methotrexate; Sigma), 및 1% (v/v) Ab-Am (antibiotic-antimycotic solution; Gibco)로 보충된 MEM- α (Gibco)에서 37°C, 5%의 CO_2 를 포함하는 가습 환경에서 유지되었다.

[134]

[135] <3-2> CRISPR/Cas9 시스템을 통한 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 녹아웃 재조합 벡터의 제조 및 형질전환

[136] $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹아웃시키기 위한 재조합 벡터를 제조하기 위해 사용한 gRNA(guide RNA)를 암호화하는 DNA 서열은 CHO-K1 계통에 특화된 웹 기반 CRISPR 디자인 툴인 CPRISPy로부터 얻었다. 이와 같은 gRNA는 차이니스 햄스터의 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 특이적으로 인식하여 각각이 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 DNA

가닥을 녹아아웃하도록 고안된 gRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열(합성 올리고뉴클레오티드)이다. 이는 하기 표 1의 서열번호 10 내지 13으로 나타내었다

[137] [표2]

	유전자 내 위치	염기서열	서열번호
gRNA-1	15007	TGTTCCAGTACGCCCCGGGAA (-)	서열번호 10
gRNA-2	15181	AGTCTTTAAATCTGTCCGGC (-)	서열번호 11
gRNA-3	15385	GTAGTGAGAGTCTTCTTGTT (+)	서열번호 12
gRNA-4	15402	GTTGGGCAAGACGCCCCCGG (+)	서열번호 13

[138]

[139] gRNA 서열을 암호화하는 DNA 서열(gRNA-1, gRNA-2, gRNA-3, gRNA-4)은, gRNA를 발현하는 U6 프로모터 및 발현된 gRNA를 인식하는 GFP가 태그된 Cas9 효소를 포함하는, pCas-Guide-EF1a 벡터(Origene, Rockville, Maryland)로 삽입되었다. 상기 벡터는 생체 내 전사시에 서열번호 10 내지 13의 염기서열로 표시되는 DNA로부터 gRNA를, 서열번호 14의 염기서열로 표시되는 Cas9 DNA 서열로부터 Cas9 mRNA를 생성하는 주형으로 사용되었다. 이때 Cas9 유전자는 링커인 2A 펩타이드를 통해 GFP를 암호화하는 유전자와 연결되어 있어, 한 번에 Cas9 단백질과 GFP 단백질이 발현될 수 있다. 상기 과정을 통해 제작한 재조합 벡터의 개열 지도는 도 7에 나타내었으며, 재조합 벡터의 전체 염기서열은 서열번호 15 내지 18로 나타내었다.

[140] 상기 제조된 pCas-B3gnt2-EF1a 벡터는 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 상기 실시예 <3-1>의 EC2-1H9 세포로 형질전환되었다.

[141]

[142] <실험예 3> β3gnt2 유전자 녹-아웃(knock-out) 결과

[143] <3-1> T7E1 어세이(assay)

[144] CRISPR/Cas9 시스템에 의해 지놈의 특정부위가 삽입(edition)되었을 때 해당 지놈 영역에 비상동성 말단 접합(Non Homologous end-joining; NHEJ)이 발생한다. 이런 형태의 DNA를 변성(denaturation)한 뒤 온도를 낮춰서 혼성화(hybridization)시키면 삽입되지 않은 와일드 타입(WT)의 DNA와 삽입된 클론의 DNA가 미스매치(Mismatch) 형태로 결합하는 이질성 염기쌍(hetero duplex)이 생기며 T7E1 은 이러한 미스매치된 DNA 영역을 인지하여 자르게

된다.

- [145] 상기 실시예 <3-2>에서 CRISPR/Cas9 시스템을 통해 B3gnt2 유전자가 녹-아웃된 안정화된 세포주(stable cell line) 구축에 앞서 gRNA에 의한 유전자의 삽입/결실의 빈도(Indel, %)를 측정하는 T7E1 assay을 수행하였다.
- [146] 구체적으로, 형질전환된 세포에서 Genomic DNA를 추출하여 정량한 뒤 200 ng의 genomic DNA를 주형(template)으로 하여 PCR을 수행하였고, 사용된 프라이머쌍은 4종류의 gRNA의 인식부위를 모두 커버하는 범위(849 bp)로 제작하였다(정방향: 5'- GCA TTG TGG ATC ACG TCA CCT ATA AAC -3'(서열번호 19)/역방향: 5'- CCA GAT ATG AGA AAT GAG TGT TGG ACG -3'(서열번호 20)). 2 μ l의 PCR products를 1.5% Agarose gel을 이용해 전기영동하였고 제대로 된 product 사이즈를 확인한 후 키트(qiaquick per purification kit; Qiagen)를 이용해 정제하였다. 정제된 PCR product의 DNA 농도를 정량한 뒤 10X NEB buffer 2 ul + PCR product 200 ng + DDW를 최종 19 μ l로 맞추었고 서모사이클러(thermocycler)를 이용해 DNA를 변성(denaturation) 및 혼성화(hybridization)하여 어닐링된(Annealed) DNA 단편(fragment)에 T7 Endonuclease 1(T7E1) 1 μ l를 첨가한 뒤 37°C에서 15분 반응시켰다. 이후, proteinase K를 이용해 T7E1을 불활성화시키고 다시 1.5% Agarose gel에서 전기영동하여 대조군과 비교하였으며, 불완전하게 매치된(Non-perfectly matched) DNA가 T7E1에 의해 잘려진 비율이 어느정도 되는지 확인하였다. 전체 밴드의 세기(intensity)(잘려나가지 않은 WT 위치의 밴드 + 잘려나간 단편들의 밴드) 및 잘려나간 단편들(특정위치를 절단하므로 두 위치에서 단편들의 밴드가 생겨남)의 밴드의 세기의 비율을 Indel(% , genome edition efficiency)로 계산하였다.
- [147] 그 결과, 도 7b에 나타낸 바와 같이 4종류의 gRNA를 이용한 녹-아웃 효율 확인 결과 T7E1에 의해 잘리지 않는 WT DNA에 비해 삽입된 세포의 DNA는 미스매치된 DNA 영역이 T7E1에 의해 잘려서 멀티 밴드(multi band)를 보이는 것을 확인하였다(도 7b). 즉, 4종류의 gRNA가 모두 녹-아웃 작동을 하였다는 것을 확인하였다.
- [148]
- [149] <3-2> 생거-시퀀싱(sanger-sequencing)
- [150] 상기 <실시예 3>에서 CRISPR/Cas9 시스템을 통해 β 3gnt2 유전자가 녹아웃된 세포는 유동세포계측법(Flow cytometry (Beckman coulter Inc, Brea, CA))을 통해 성공적으로 형질전환된 클론을 3주간 선택하였다(도 8a). 선택된 클론(클론 1: gRNA-1의 9 / 클론 2: gRNA-4의 2 / 클론 3: gRNA-4의 12 / 클론 4: gRNA-4의 16)은 게놈 DNA에 기초한 PCR에 따른 생거-시퀀싱에 의해 확인되었다(도 8b).
- [151]
- [152] <실험예 4> β 3gnt2 유전자 녹-아웃을 통한 폴리락토사민 합성 저해 및 안테나 구조 증가 확인

[153] <4-1> 폴리락토사민 합성 저해 확인

[154] 상기 $\beta 3gnt2$ 유전자가 녹-아웃 되었음이 확인된 EC2-1H9 세포 5.0×10^6 는 10%(v/v) dFBS, 3.5 g/L glucose, 1% (v/v) Ab-Am solution, 및 20 nM MTX이 보충된 MEM- α 를 포함하는 T175 배양 플라스크에 배양하였다. 재조합 인간 유래 에리스로포이에틴(rhEPO)을 포함하는 배양 배지를 SDS-PAGE에 사용되었고, 이어서 PVDF 멤브레인(Millipore Corp., Bedford, MA)으로 옮겼다. 5% BSA와 함께 TBS-T (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, with 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 실온에서 2시간 동안 블로킹 후, PVDF 멤브레인은 바이오틴이 라벨된 렉틴(Lycopersicon Esculentum Lectin; LEL)과 함께 4°C에서 16시간 동안 배양되었다. TBS-T를 이용하여 5분간 3회 세척한 후, 멤브레인은 1시간 동안 실온에서 ExtrAvidin-peroxidase (Sigma)와 함께 배양한 후 ECL 키트(Thermo Scientific; Rockford, IL)로 전개시켰다.

[155] 리블로팅(reblotting)을 위해, 상기 멤브레인은 스트리핑 버퍼(stripping buffer)(Candor Bioscience GmbH, Weissensberg, Germany)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 스트리핑 시켰다. PVDF 멤브레인은 TBS-T로 5분 동안 3회 세척한 후, 1:5000으로 희석된 RP 라벨된 항-마우스 IgG 항체(Santa Cruz)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 멤브레인은 ECL 용액(Thermo Scientific; Rockford, IL)으로 전개시켰다.

[156] 그 결과, 도 9a에 나타낸 바와 같이 $\beta 3gnt2$ 유전자가 녹아웃된 클론(클론 1: gRNA-1의 9 / 클론 2: gRNA-4의 2 / 클론 3: gRNA-4의 12 / 클론 4: gRNA-4의 16)으로부터 분리된 EPO는 모두 LEL와의 반응이 나타나지 않았다(도 9a).

[157]

[158] <4-2> 안테나 구조 증가 확인

[159] 상기 $\beta 3gnt2$ 유전자가 녹-아웃 되었음이 확인된 EC2-1H9 세포 5.0×10^6 는 10%(v/v) dFBS, 3.5 g/L glucose, 1% (v/v) Ab-Am solution, 및 20 nM MTX이 보충된 MEM- α 를 포함하는 T175 배양 플라스크에 배양하였다. 배양 배지는 3일 안에 혈청이 없는(serum-free) 배지(CHO-S-SFM II; Gibco)로 교체하였다. 2일 후, 배양 배지를 수집하여 0.45 μ m 필터(Sartorius, Gottingen, Germany)로 필터한 후, 인산 완충 생리식염수(phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4))로 4°C에서 밤새 투석하였다. rhEPO를 정제하기 위해, 배양 배지는 EPO 정제 젤(MAIA Diagnostics, Uppsala, Sweden)을 이용하였다. 정제된 rhEPO는 4°C에서 밤새 증류수로 투석되었다. 농도는 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen)를 이용하여 측정하였으며, 사용시까지 -80°C에 보관하였다.

[160] 구체적으로, 정제된 rhEPO는 100 mM 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate) 및 5 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol)의 수용액에서 급속 열 순환(25-100°C)에 의해 변성되었다. 냉각시킨 후, 2.0 μ l(또는 1000 U)의 펩티드 N-글리코시다아제(glycosidase) F를 첨가한 후, 혼합하여 16시간 동안 37°C 워터 베이스에서 배양하였다. rhEPO 분해물은 카트리지에 로딩해 두고 순수한 물로

염 및 다른 버퍼 물질을 제거하기 위해 씻어 내었다. N-글리칸은 40% 아세토니트릴(acetonitrile)/0.05% 트리플루오로 아세트산(trifluoroacetic acid)의 첨가에 의해 물(산성 분획물; acidic fraction)에서 용출되었다. 샘플은 진공 하에 건조시켰다. rhEPO N-글리칸 분획은 물에 재용해시키고, 1.0 μ L(rhEPO 1 μ g에 해당)는 스테인리스 강 표적 플레이트에 스폿팅하였다. 중성 글리칸은 양이온 모드($[M+Na]^+$ 또는 $[M+H]^+$)에서 분석된 반면, 산성 글리칸은 음이온 모드($[M-H]^-$)에서 분석되었다. 각각의 획득한 스펙트럼은 현장에서 3개의 임의의 위치(총 2400개의 레이저 샷)에서 800 레이저 샷으로부터 결합된 신호를 나타내었다. 질량 스펙트럼은 m/z 2000-4500의 범위에 걸쳐 기록되었다. 말토올리고당 래더(maltooligosaccharide ladder)는 외부 질량 교정에 사용하였다. MS 피크는 5.0의 신호 대 잡음비로 필터링하고, 화합물 질량 및 강도 목록을 얻기 위해 디콘볼루션을 수행하였다. N- 글리칸 분획을 합치고 2.0 μ L(800 ng EPO에 해당)의 양을 자동 시료 주입기로 다공성 흑연 탄소 나노-LC 칩(Agilent)에 주입하였다. 급속 글리칸 용출 구배를 (A) 3.0% 아세토니트릴/0.1% 포름산 수용액 및 (B) 90.0% 아세토니트릴/0.1% 포름산 수용액을 사용하여, 20분 동안 6%에서 100% B로 상승하도록 분석용 칼럼에 0.3 μ L/분으로 적용하였다. 남아있는 비-글리칸 화합물을 100% B로 씻어낸 다음 재평형시켰다. MS 스펙트럼은 스펙트럼 당 1.5초의 획득 시간으로 m/z 500-2000의 질량 범위에서 양이온 모드로 획득되었다.

[161] 그 결과, 도 9b에 나타낸 바와 같이 총 N-글리칸에서 폴리락토사민이 차지하는 비율이 기존의 약 15%에서 2% 가량으로 현저히 감소했음을 확인하였다(도 9b).

[162] 또한, 폴리락토사민이 감소함과 동시에 부가적으로 사중 안테나(tetra-antennary) N-글리칸의 비율이 증가함을 확인하였다(도 9c).

[163] 이는 폴리락토사민 합성에 사용될 구성성분(component)들이 안테나 분기(Antenna branching)에 사용되었기 때문으로 보인다. 문헌에 의하면, 이중 안테나(Bi-antennary) 당쇄구조를 갖는 EPO는 사중 안테나(Tetra-antennary) 당쇄 구조를 갖는 EPO에 비해 in-vivo 활성이 약 85% 감소하는 것으로 보고된 바 있다(Takeuchi et al, PNAS, 1989). 따라서, 폴리락토사민 감소와 그에 따른 사중 안테나 구조의 증가는 당단백질의 반감기 증가와 당단백질 효능에 긍정적인 역할을 할 수 있는 결과라 할 수 있다.

[164]

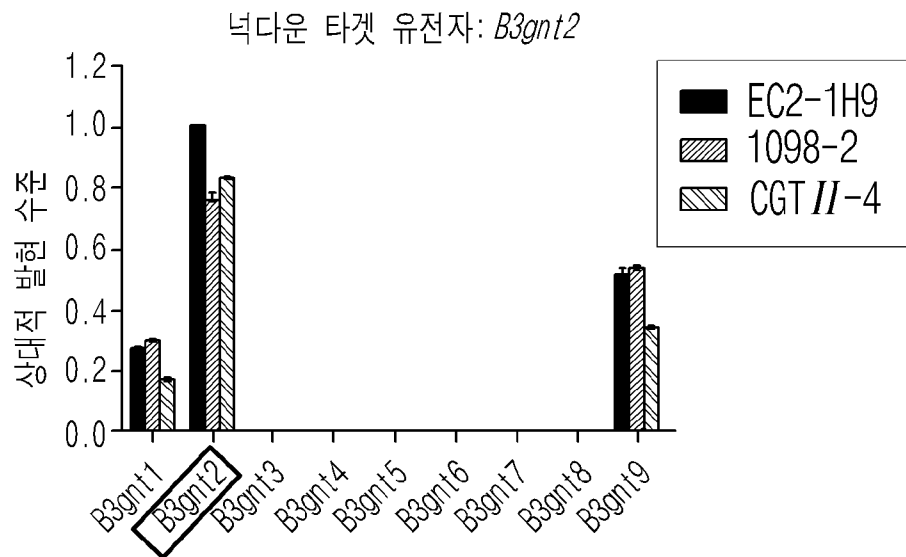
청구범위

- [청구항 1] 당단백질을 생성하는 세포주에서 폴리락토사민(Polylactosamine)의 생합성을 억제시키는 단계를 포함하는, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 폴리락토사민의 생합성을 억제시키는 단계는 $\beta 3\text{gnt}2$ (UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2) 유전자의 발현을 녹-다운(knock-down)시키거나, $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자를 녹-아웃(knock-out)시키는 단계를 포함하는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 mRNA는 서열번호 1로 기재되는 염기서열로 구성되는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 발현의 녹-다운은 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자 억제제를 처리하거나, 또는 $\beta 3\text{gnt}2$ mRNA에 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, shRNA 및 miRNA로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 당단백질을 생산하는 세포주에 형질감염시키는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 2, 서열번호 4 및 서열번호 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 기재되는 염기서열을 포함하는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 6] 제 2항에 있어서, 상기 $\beta 3\text{gnt}2$ 유전자의 녹-아웃은 재조합 벡터를 당단백질을 생성하는 세포주에 형질전환시키는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법으로, 여기서 상기 재조합 벡터는 서열번호 10 내지 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 가이드 RNA(guide RNA; gRNA)를 암호화하는 염기서열; 및 서열번호 14로 기재되는 염기서열로 구성되는 Cas9(CRISPR associated protein 9) 유전자를 포함하는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 Cas9 유전자와 형광단백질을 코딩하는 유전자가 결합되어 있는 구조를 포함하는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 15 내지 18로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 반감기가 증가된 재조합 당단백질을 생산하는 재조합 세포주의 제조방법.

- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 상기 당단백질은 에리스로포이에틴(erythropoietin), 트롬보포이에틴(thrombopoietin), 알파-안티트립신(alpha-antitrypsin), 콜린에스테라제(cholinesterase), 융모성 고나도트로핀(chorionic gonadotropin), CTLA4Ig, Factor VIII, 감마-글루타밀트랜스퍼라아제(gamma-glutamyltransferase), 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony-stimulating Factor, G-CSF) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 반감기가 증가된 제조합 당단백질을 생산하는 제조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 상기 세포주는 포유동물 세포(mammalian cells), 효모 세포(yeast cells) 및 곤충 세포(insect cells)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로부터 제조되는, 반감기가 증가된 제조합 당단백질을 생산하는 제조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 11] 제 1항에 있어서, 상기 세포는 중국 햄스터 난소 세포(chinese hamster ovary cells; CHO), HT-1080, 인간 림프아구(human lymphoblastoid), SP2/0(마우스 골수종), NS0(마우스 골수종), 베이비 햄스터 신장세포(baby hamster kidney cells; BHK), 인간 배아 신장세포(human embryonic kidney cells; HEK), PERC.6(인간망막세포) 및 EC2-1H9로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 반감기가 증가된 제조합 당단백질을 생산하는 제조합 세포주의 제조방법.
- [청구항 12] 제 1항의 방법으로 제조된, 반감기가 증가된 제조합 당단백질을 생산하는 세포주.
- [청구항 13] 1) 제 12항의 제조합 세포주를 배양하는 단계; 및
2) 상기 단계 1)의 배양액에서 제조합 당단백질을 분리하는 단계;를 포함하는, 반감기가 증가된 제조합 당단백질의 제조방법.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 당단백질은 에리스로포이에틴, 트롬보포이에틴, 알파-안티트립신, 콜린에스테라제, 융모성 고나도트로핀, CTLA4Ig, Factor VIII, 감마-글루타밀트랜스퍼라아제, 과립구 콜로니 자극인자 및 황체형성호르몬으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 반감기가 증가된 제조합 당단백질의 제조방법.
- [청구항 15] 제 13항에 있어서, 상기 제조합 당단백질은 삼중(Tri-) 또는 사중-안테나(Tetra-antennary) 구조가 증가한 것인, 반감기가 증가된 제조합 당단백질의 제조방법.
- [청구항 16] 서열번호 10 내지 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 가이드 RNA를 암호화하는 염기서열; 및
서열번호 14로 기재되는 염기서열로 구성되는 Cas9 유전자를 포함하는, 제조합 벡터.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 제조합 벡터는 Cas9 유전자와 형광단백질을

- 코딩하는 유전자가 결합되어 있는 구조를 포함하는 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 18] 제 16항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 15 내지 18로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 것인, 재조합 벡터.
- [청구항 19] 제 13항의 방법으로 분리된, 반감기가 증가된 재조합 당단백질.

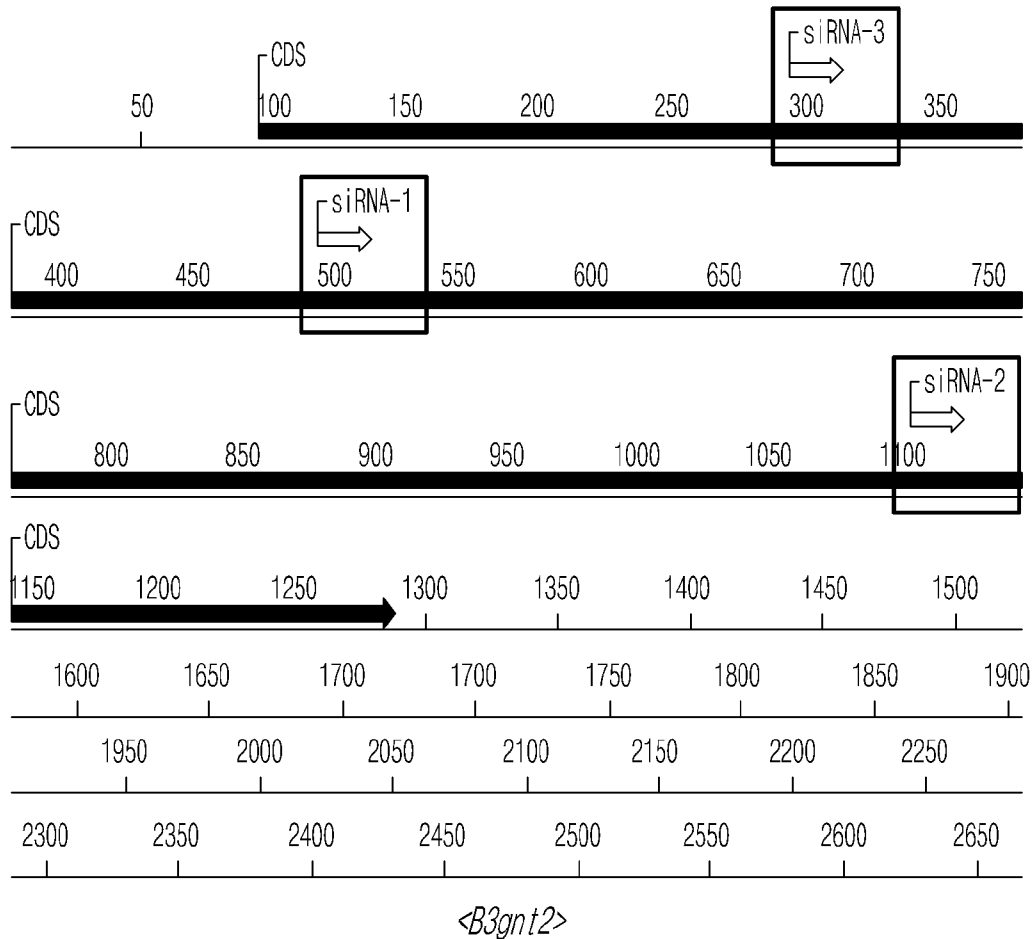
[도1]



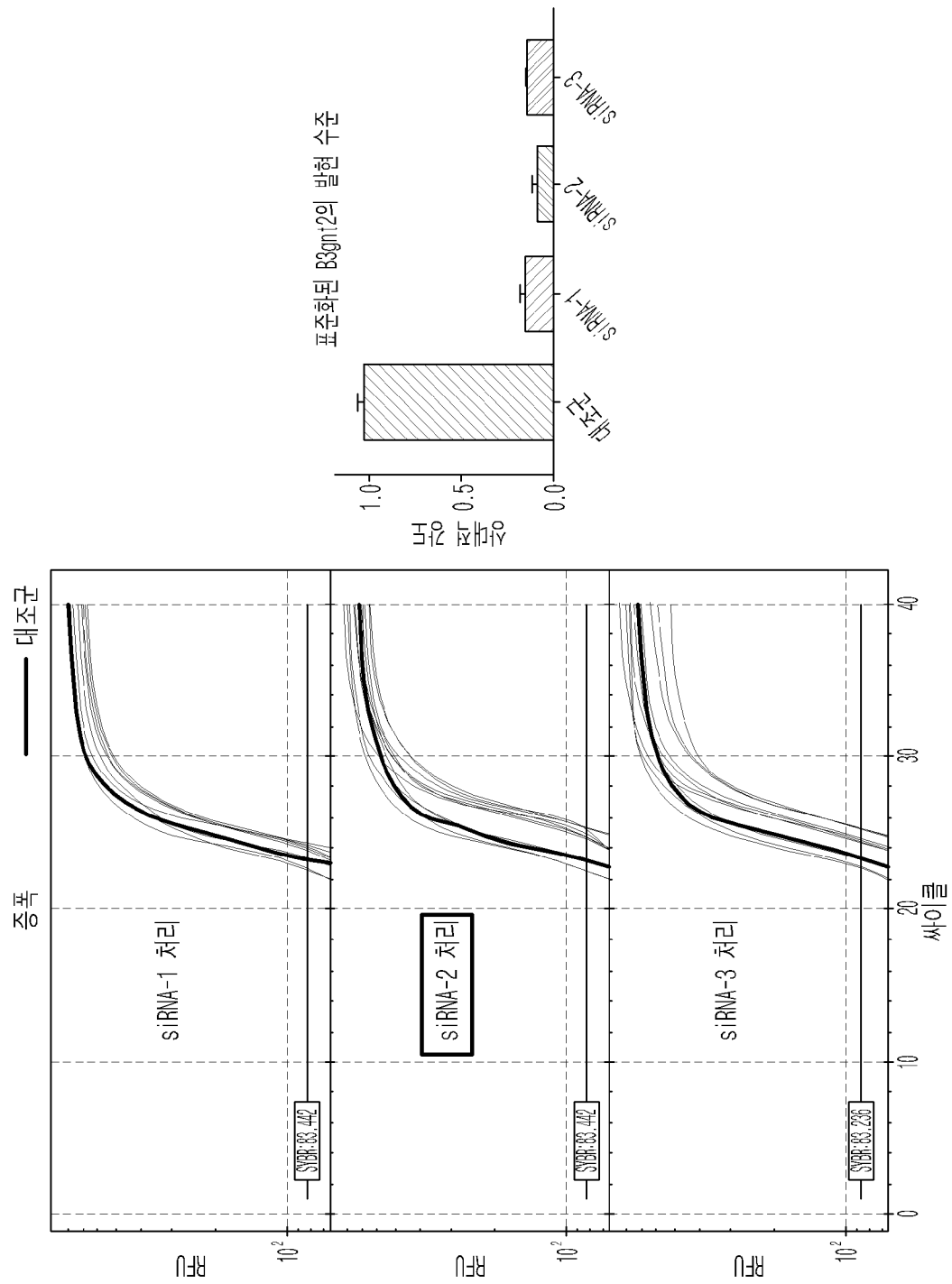
[도2]

✓ *B3gnt2* 유전자의 녹다운을 위한 siRNAs

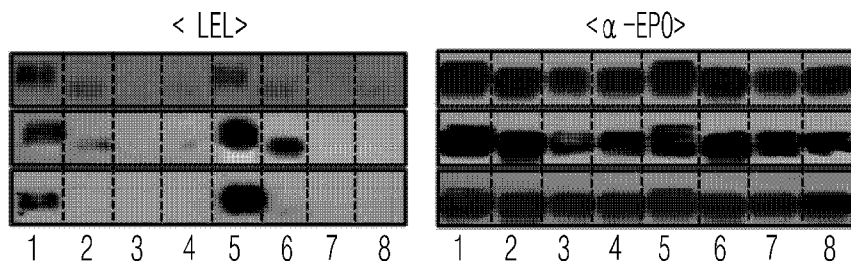
- siRNA 1 : GAAGAAATGCGCAAAGAAA
- siRNA 2 : CTGGAATGTGCCTTCAGAA
- siRNA 3 : CATCCCAGAAGTCTTCTA



[도3a]

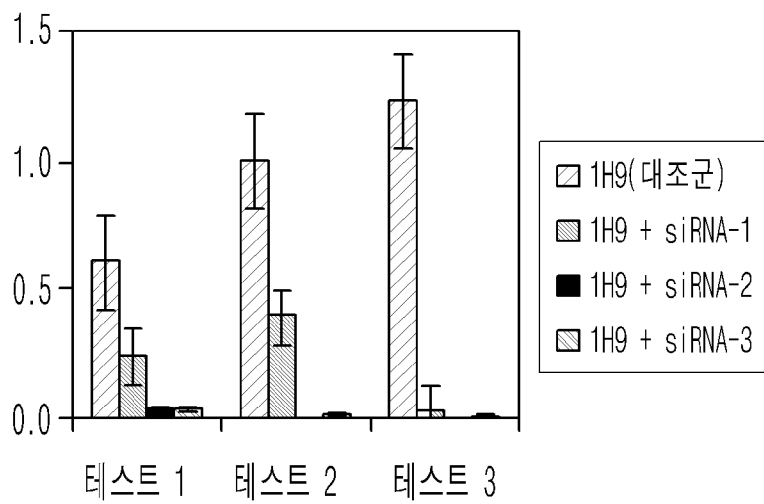


[도3b]

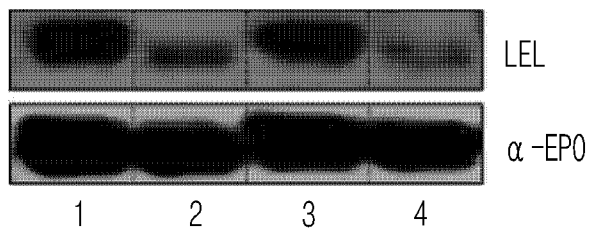


레인 1,5 : EC2-1H9 레인 2,6 : EC2-1H9 + siRNA-1
레인 3,7 : EC2-1H9 + siRNA-2 레인 4,8 : EC2-1H9 + siRNA-3

<LEL를 이용한 렉틴 블로팅, 이어서 α -EP0를 이용한 재 블로팅 >

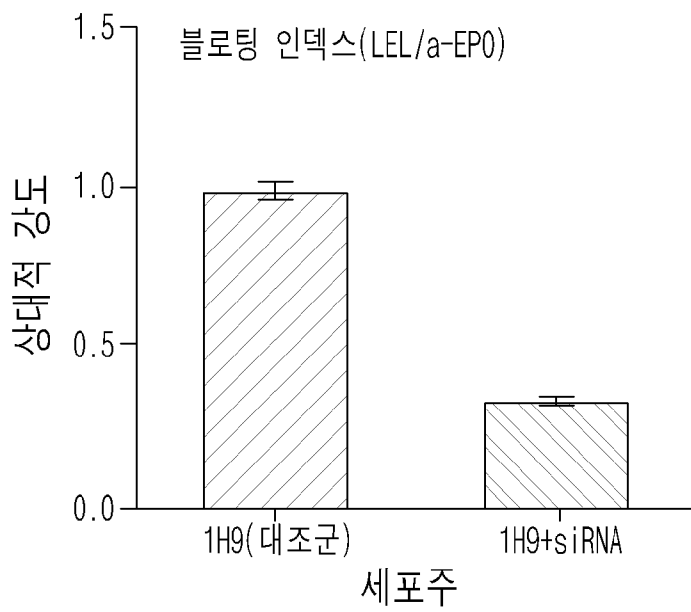


[도3c]

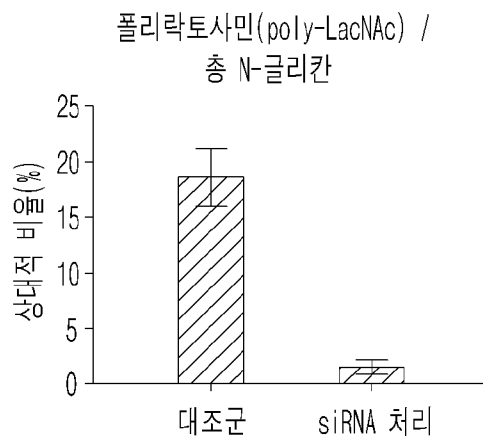


레인 1: EC2-1H9
레인 2: EC2-1H9 + siRNA
레인 3: EC2-1H9-2
레인 4: EC2-1H9-2 + siRNA

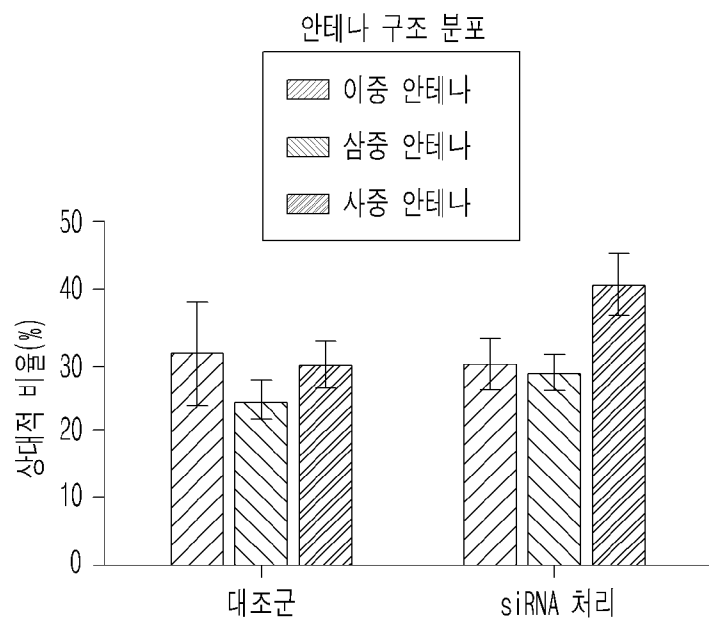
[도3d]



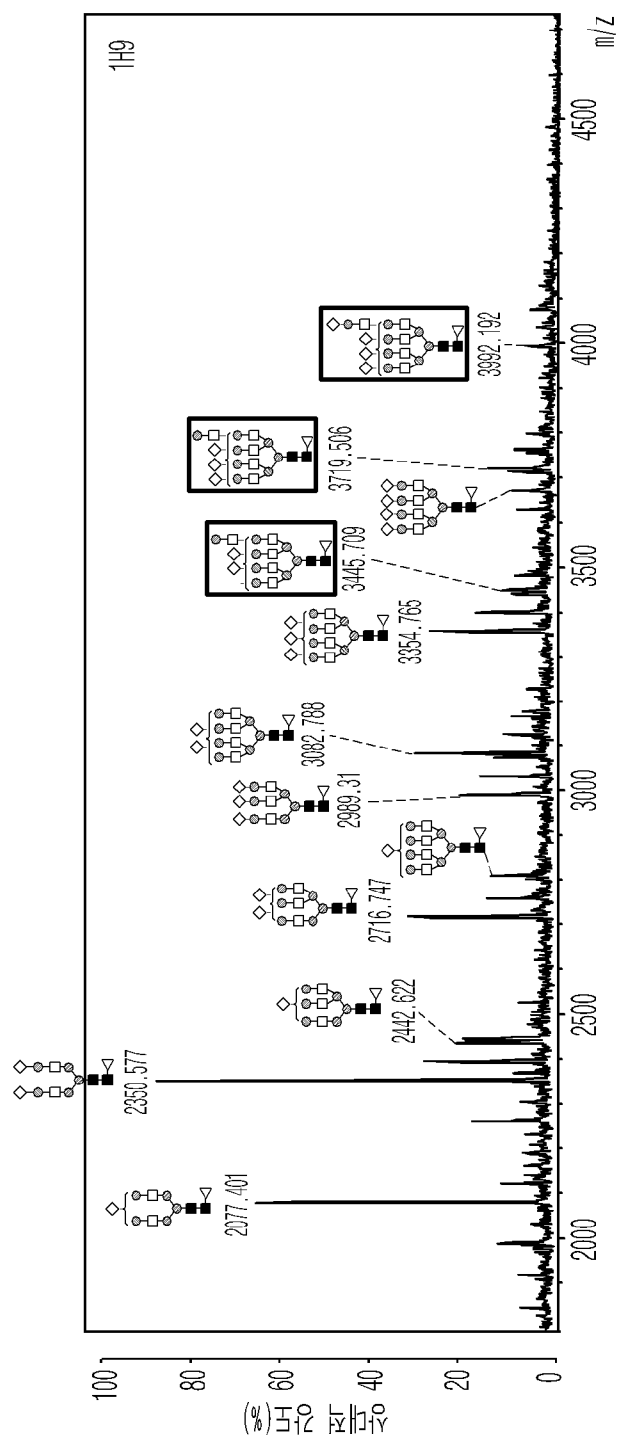
[도4a]



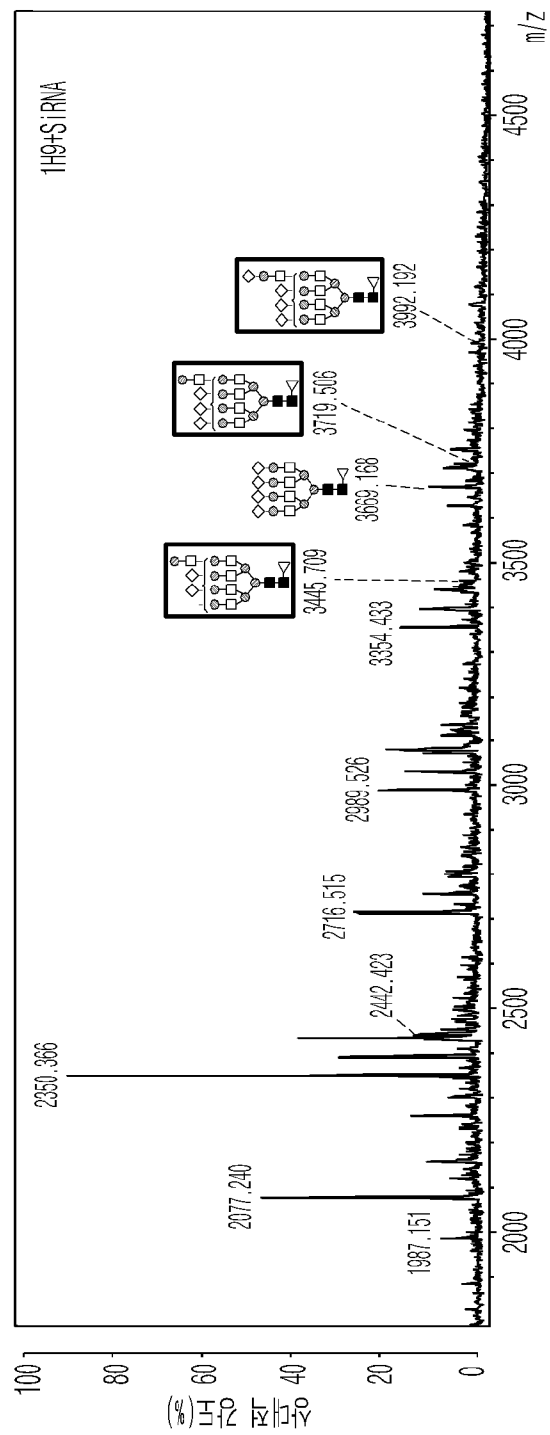
[도4b]



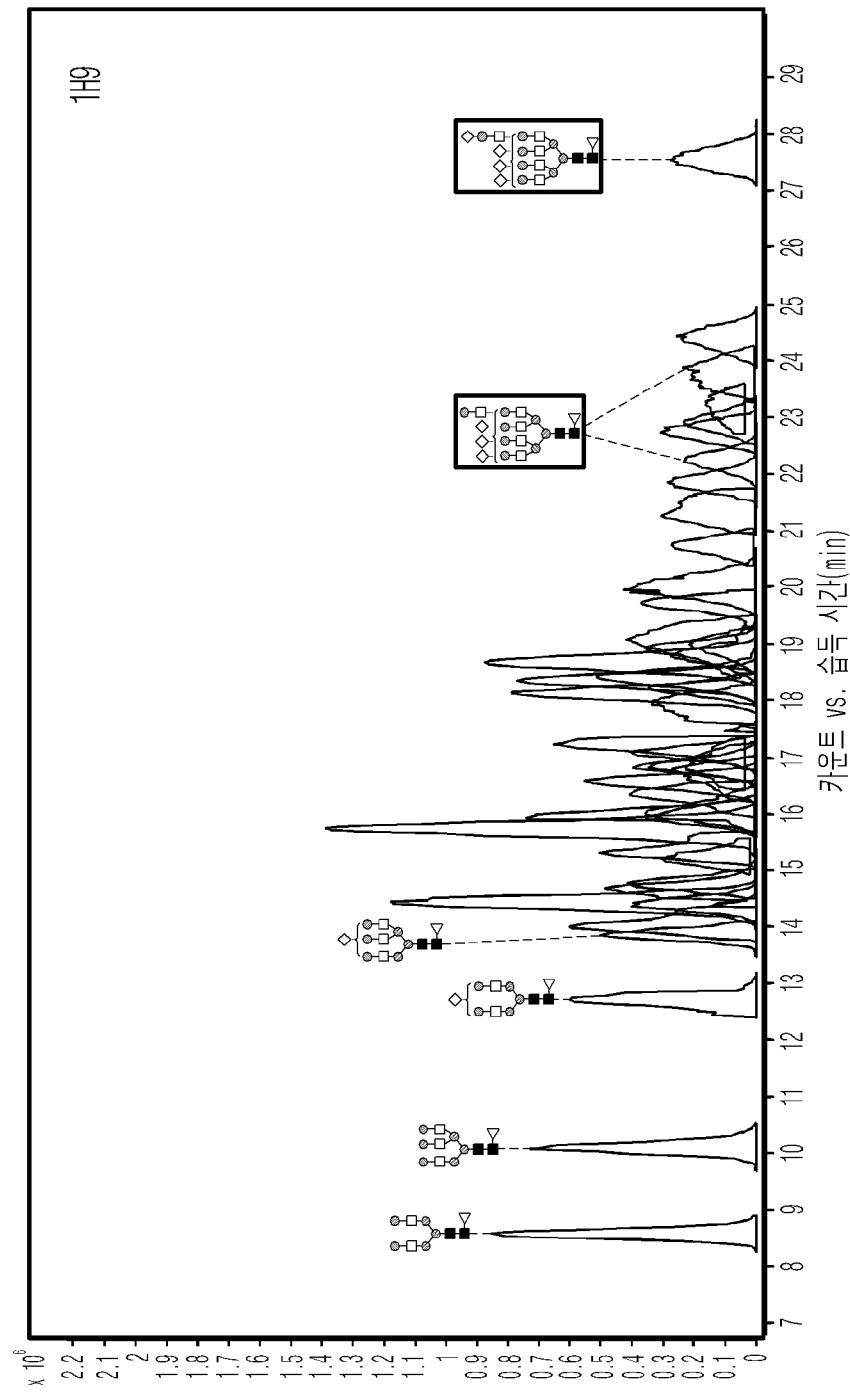
[도5a]



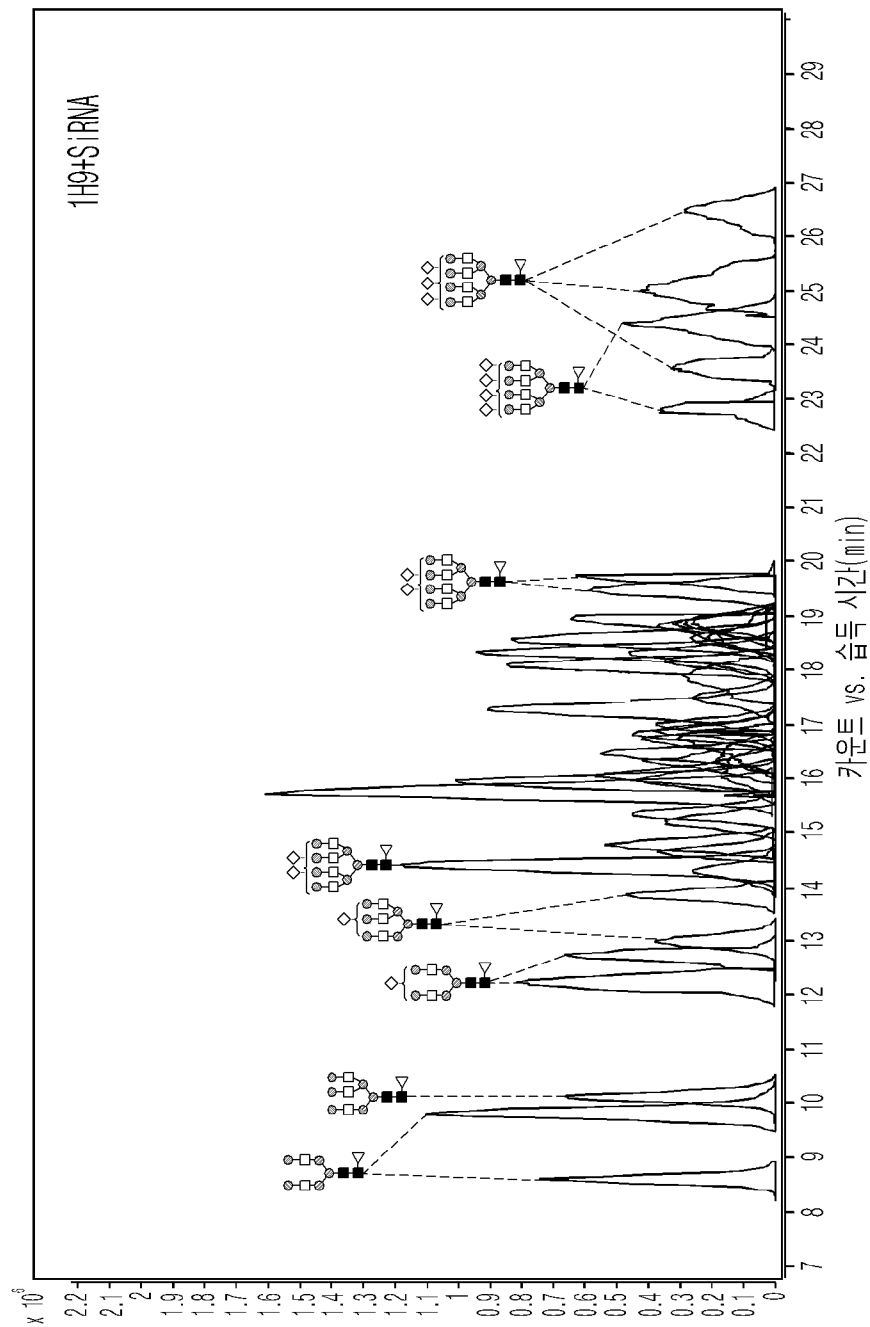
[도5b]



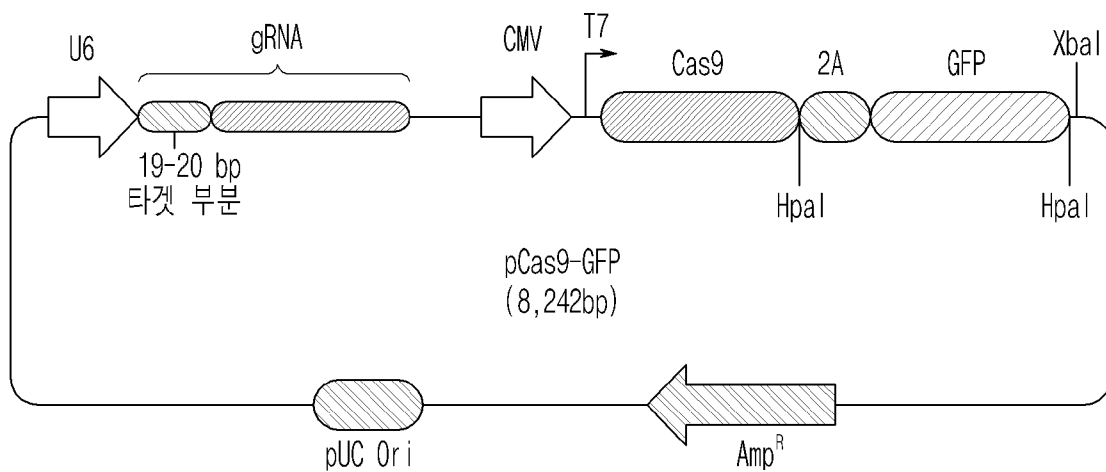
[도6a]



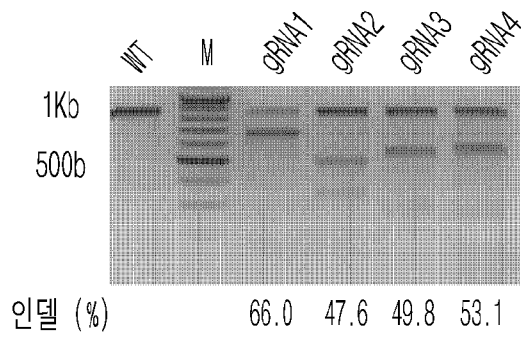
[도6b]



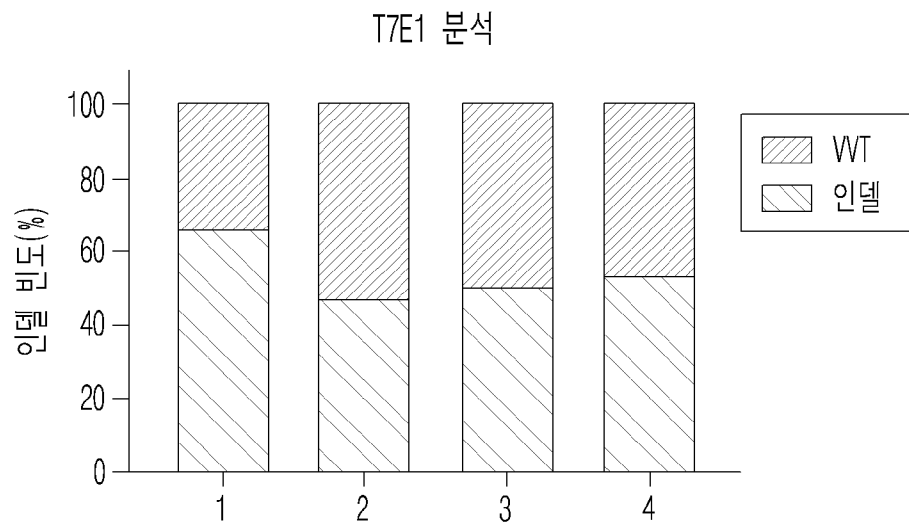
[도7a]



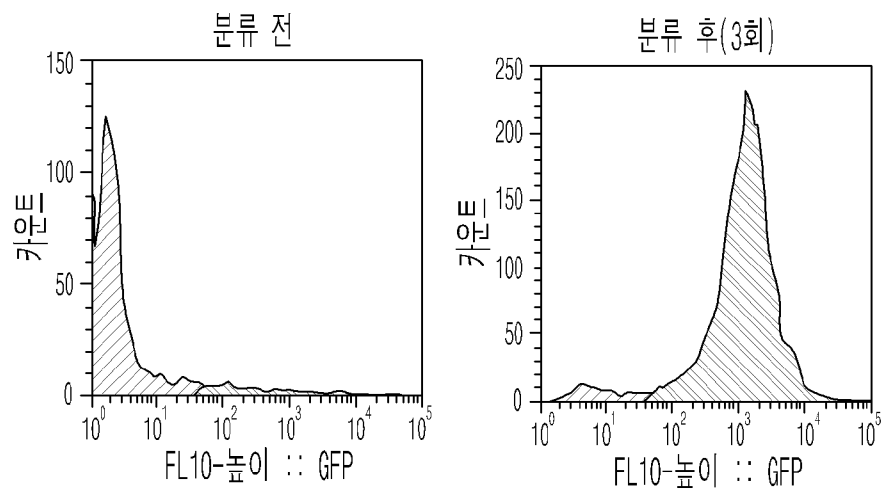
[도7b]



[도7c]



[도8a]



[도8b]

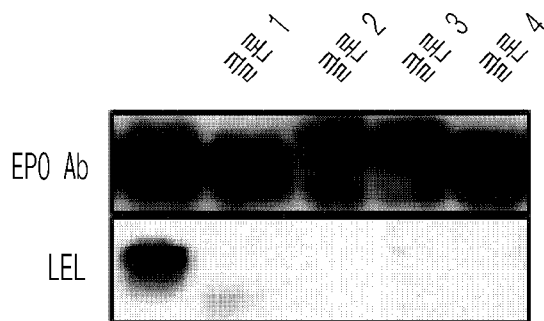
WT GCTCTCTGTTCCAGTACGCCCGGGAAGGGTGAATATCT
 1-1 GCTCTCTGTTCCAGTACGCCCG----G AACTGAATATCT
 1-3 GCTCTCTGTTCCAGTACGCCCG--AGGGTGAATATCT
 1-19 GCTCTCTGTTCCAGTACGCCCGGG---CTGAATATCT
 1-2 -----TCT
 1-9 -----

WT CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCC-GGCAGGT
 2-1 CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCCGGCAGGT
 2-7 CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCCGGCAGGT
 2-8 CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCCGGCAGGT
 2-11 CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCCGGCAGGT
 2-20 CAAATACAAGAGGAAGTCTTTAAATCTGTCCGGCAGGT

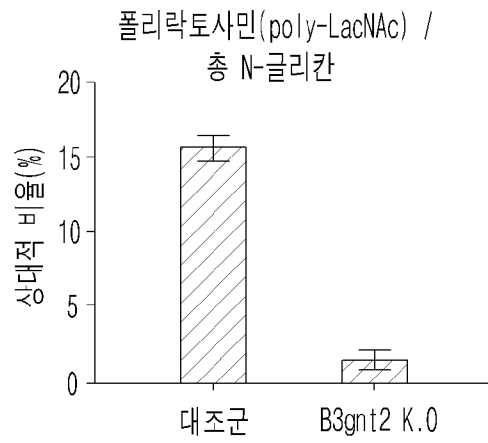
WT GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCTTGCCCAACAA-GAAGACT
 3-1 GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCTTGCCCAACAAAGAAGACT
 3-15 GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCTTGCCCAACAAAGAAGACT
 3-20 GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCTTGCCCAACAAAGAAGACT
 3-4 GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCT-----
 3-10 GGT-----
 3-12 GGTGTCTCCTCGGGGGGCAO-----
 3-19 GGTGTCTCCTCGGGGGGCGTCT-----

WT GGTCAGG GTGGTTGCTCGGGGGG-CGTCTTGCCC AAC
 4-16 GGTCAGG GTGGTTGCTCGGGGGGCGTCTTGCCC AAC
 4-12 GGTCAGG GTGGTTGCTCGGG---CGTCTTGCCC AAC
 4-11 GGTCAGG GTGGTTGCTGG---CGTCTTGCCC AAC
 4-2 GGTC-----GG---CGTCTTGCCC AAC
 4-15 GGTCAGG GTGGTTG-----CCC AAC

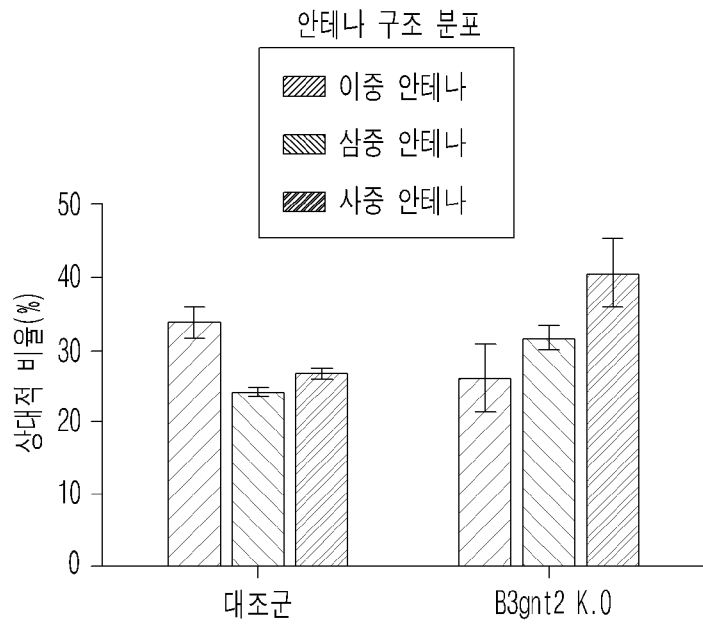
[도9a]



[도9b]



[도9c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/008521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85; C12N 15/09; C07K 14/00; C12N 15/52; C12N 15/113; C12N 9/10; C12P 21/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glycoprotein, polylactosamine, half-life, β 3gnt2, Cas9, guide RNA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0145673 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 30 December 2015 See abstract; paragraphs [0002], [0053]-[0083]; claims 11-15.	19
A		1-18
X	KR 10-2011-0092225 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 17 August 2011 See abstract; paragraphs [0003], [0089]-[0113]; claims 1-16.	19
A	TOGAYACHI, Akira et al., "Beta3GnT2 (B3GNT2), a Major Polylactosamine Synthase: Analysis of B3gnt2-deficient Mice", Methods in Enzymology, 2010, vol. 479, pages 185-204 See the entire document.	1-19
A	SU, Dongmei et al., "Glycosylation-modified Erythropoietin with Improved Half-life and Biological Activity", International Journal of Hematology, 2010, vol. 91, pages 238-244 See the entire document.	1-19
A	STANLEY, Pamela, "What Have We Learned from Glycosyltransferase Knockouts in Mice?", Journal of Molecular Biology, E-pub. 31 March 2016, vol. 428, pages 3166-3182 See the entire document.	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 NOVEMBER 2017 (17.11.2017)

Date of mailing of the international search report

17 NOVEMBER 2017 (17.11.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/008521

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0145673 A	30/12/2015	US 2017-0129932 A1 WO 2015-194704 A1	11/05/2017 23/12/2015
KR 10-2011-0092225 A	17/08/2011	CN 102482674 A CN 102482674 B EP 2534249 A2 EP 2534249 B1 KR 10-1241322 B1 US 2012-0149874 A1 US 8940876 B2 WO 2011-096750 A2 WO 2011-096750 A3	30/05/2012 26/03/2014 19/12/2012 13/07/2016 11/03/2013 14/06/2012 27/01/2015 11/08/2011 05/01/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85; C12N 15/09; C07K 14/00; C12N 15/52; C12N 15/113; C12N 9/10; C12P 21/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 당단백질, 폴리락토사민, 반감기, β 3gnt2, Cas9, 가이드 RNA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0145673 A (한국과학기술원) 2015.12.30 요약; 단락 [0002], [0053]-[0083]; 청구항 11-15 참조.	19
A		1-18
X	KR 10-2011-0092225 A (한국과학기술원) 2011.08.17 요약; 단락 [0003], [0089]-[0113]; 청구항 1-16 참조.	19
A	TOGAYACHI, AKIRA 등, 'beta3Gnt2 (B3GNT2), a major polylactosamine synthase: analysis of B3gnt2-deficient mice' Methods in Enzymology, 2010, 479권, 페이지 185-204 전체 문헌 참조.	1-19
A	SU, DONGMEI 등, 'Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity' International Journal of Hematology, 2010, 91권, 페이지 238-244 전체 문헌 참조.	1-19
A	STANLEY, PAMELA, 'What have we learned from glycosyltransferase knockouts in mice?' Journal of Molecular Biology, E-pub. 2016.03.31, 428권, 페이지 3166-3182 전체 문헌 참조.	1-19

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 11월 17일 (17.11.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 11월 17일 (17.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



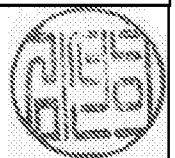
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0145673 A	2015/12/30	US 2017-0129932 A1 WO 2015-194704 A1	2017/05/11 2015/12/23
KR 10-2011-0092225 A	2011/08/17	CN 102482674 A CN 102482674 B EP 2534249 A2 EP 2534249 B1 KR 10-1241322 B1 US 2012-0149874 A1 US 8940876 B2 WO 2011-096750 A2 WO 2011-096750 A3	2012/05/30 2014/03/26 2012/12/19 2016/07/13 2013/03/11 2012/06/14 2015/01/27 2011/08/11 2012/01/05