



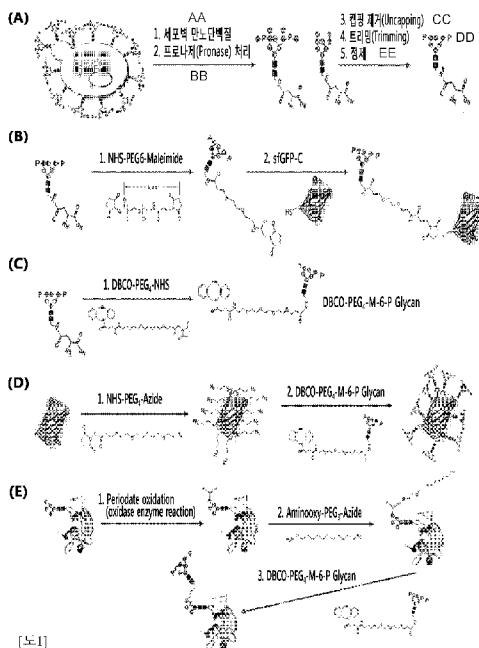
- (51) 국제특허분류:
C07K 1/107 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005853
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 2일 (02.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0078235 2015년 6월 2일 (02.06.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 오두병 (OH, Doo Byoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강지연 (KANG, Ji Yeon); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권오석 (KWON, Oh Suk); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING MANNOSE-6-PHOSPHATE GLYCAN-ADDED GLYCOPROTEIN USING GLYCAN DERIVED FROM YEAST CELL WALL MANNOPROTEIN

(54) 발명의 명칭 : 효모 세포벽 만노단백질 유래의 당사슬을 이용한 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법



[도 1]

AA ... Cell wall mannoprotein
BB ... Pronase treatment
CC ... Uncapping
DD ... Trimming
EE ... Purifying

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing mannose-6-phosphate glycan and a method for preparing mannose-6-phosphate glycan-added glycoprotein.

(57) 요약서: 본 발명은 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법 및 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법에 관한 것이다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 효모 세포벽 만노단백질 유래의 당사슬을 이용한 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법, 및 세포벽 만노 단백질에 프로나제 (pronase) 또는 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 당질화를 통해서 당사슬이 부가되는 당단백질들은 현재 전세계 재조합 단백질 의약품 시장의 60 % 이상을 차지하며 시장을 주도하고 있다. 특히, 당사슬은 당단백질 의약품의 치료 효능, 체내 지속성, 타겟팅 및 면역반응 등에서 중요한 역할을 하기에 의약품의 품질을 결정하는 주요 인자로 부각되고 있다. 당사슬이 부가되는 반응은 크게 N-결합 또는 O-결합 당질화 (N-linked or O-linked glycosylation)의 두 가지 형태가 있으며, 이 중 N-결합 당질화를 통해서 부가되는 당사슬을 N-당사슬 (N-glycan)이라 부르며 소포체에서 합성이 시작된다.
- [4] 상기 N-당사슬의 초기 생합성 과정은 진핵 미생물인 효모에서부터 고등동물인 포유류에 이르기까지 거의 동일한 과정으로 보존되어 있다. 그러나, 골지체로 넘어간 당사슬은 각 종에 특이적으로 다양한 당사슬 수식 과정을 거치게 되며, 그 결과로 효모, 곤충, 식물 및 동물 등에서 완전히 다른 형태의 당사슬들이 만들어지게 된다.
- [5] 동물 세포에서는 많은 당단백질들이 Trimannosyl core 당사슬 ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)에 GlcNAc, 갈락토즈 및 시알산이 부가된 복합형 (complex type) N-당사슬 ($\text{Neu5Ac}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)을 가지고 있으나, 당단백질의 종류에 따라서는 소포체에서 넘어온 형태인 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 구조를 갖는 고만노스형 (high-mannose type) 당사슬을 가지고 있는 경우가 있다. 또한, 불필요한 물질들을 분해하여 재활용하도록 하는 소화와 자기 분해 기능을 가진 라이소좀으로 가는 당단백질들은 고만노스형 당사슬에 만노스-6-인산 (mannose-6-phosphate)이 부가되기도 한다.
- [6] 이 경우 골지체에서 GlcNAc-PT (N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase)가 라이소좀으로 이동할 당단백질들의 3차 구조를 인식하여 GlcNAc-인산을 당사슬의 만노스 잔기에 부가한다. 그리고, 여기에 uncovering 효소 (N-acetylglucosamine-1-phosphodiester a-N-acetylglucosaminidase)가 작용하여 바깥쪽 GlcNAc 잔기만을 제거하는 2단계 과정으로 만노스-6-인산이 형성된다. 이렇게 형성된 만노스-6-인산을 양이온 의존적 만노스-6-인산 수용체 (Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor, CD-MPR)가 인식하여 이를 내포 (endosome)를 거쳐

라이소좀으로 이동시킨다. 그러나, 이때 CD-MPR과 결합하지 못한 당단백질들은 세포 밖으로 분비되게 된다. 이렇게 분비된 당단백질들을 다시 세포 반응(endocytosis)를 통해서 라이소좀으로 이동시키는 "분비-재도입 (secretion-recapture) 경로"가 존재하며 주로 양이온 비의존적 만노스-6-인산 수용체 (cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-MPR)가 그 기능을 한다고 알려져 있다.

[7]

[8] 한편, 라이소좀 저장질환 (lysosomal storage disease)은 선천적인 유전자 이상으로 라이소좀에 존재하는 분해효소의 활성이 결핍되어 대사물질이 축적되어 발생하는 질환들이다. 이러한 질환을 선천적으로 갖고 태어난 환자들은 치료를 받지 못하면 대부분 젊은 나이에 죽음을 맞이하게 된다.

[9] 하지만, 상기 환자들에게 만노스-6-인산 당사슬을 가진 재조합 효소를 투여하면, 상기에서 설명한 "분비-재도입 경로"의 만노스-6-인산 수용체인 CI-MPR이 이를 인식하고 세포 작용에 의해서 라이소좀으로 이동시켜서 축적된 대사물질을 대신 분해해 줄 수 있다. 따라서, 효소 치료제에서는 만노스-6-인산 당사슬이 많이 부가되도록 하는 것이 중요하다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 만노스-6-인산 당사슬이 다량 부착된 재조합 효소 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 효모로부터 수득한 세포벽 만노단백질로부터 만노스-6-인산 당사슬을 수득하고, 이렇게 수득된 당사슬에 가교제 (crosslinker)를 부착하여 목적 단백질에 만노스-6-인산 당사슬을 결합시키는 방법을 개발하였고, 상기 방법을 이용하여 제조된 단백질을 라이소좀 저장 질환의 치료에 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 효모로부터 분리된 세포벽 만노단백질로부터 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 단계; 및 (b) 가교제 (crosslinker)를 사용하여 상기 만노스-6-인산 당사슬과 목적 단백질을 결합시키는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[14]

[15] 본 발명의 다른 하나의 목적은 세포벽 만노 단백질에 프로나제 (pronase) 또는 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법을 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명을 통해 당사슬 생합성 경로가 재설계된 효모의 세포벽으로부터 손쉽게 얻을 수 있는 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질에 부착함으로써, 세포 내 라이소솜으로 도입될 수 있는 목적 단백질을 제조할 수 있다. 또한, 이를 통해 만노스-6-인산 함량이 높아 치료 효능이 우수한 효소 치료제들을 저렴하게 생산할 수 있다. 나아가, 만노스-6-인산 당사슬을 세포 탈출을 위한 펩타이드, 지질 또는 나노물질 등과 결합시켜 라이소솜이 아닌 세포질 또는 핵 내로 유용물질을 전달하는데 활용할 수 있다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 당사슬 생합성 경로가 재설계된 효모의 세포벽 만노단백질로부터 얻은 말단에 아스파라진이 위치하는 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질에 부착하는 방법을 나타내는 모식도이다. (A) 효모의 세포벽 유래 만노단백질 (mannoprotein)에 프로나제 (pronase)를 처리하여 아스파라진이 연결된 당사슬을 얻은 후, 바깥쪽 만노스를 제거하는 캡 제거 (uncapping) 과정과 α -만노시다제 처리를 통해서 말단의 자유로운 만노스를 트리밍 (trimming)하고 인산이 부착된 당사슬들만을 이산화티타늄 (TiO_2)을 이용하여 분리하면, 라이소솜 타겟팅 능력이 높은 만노스-6-인산 당사슬이 아스파라진 잔기에 연결된 형태를 얻을 수 있다. (B) 아스파라진이 연결된 만노스-6-인산 당사슬을 NHS-PEG₆-말레이미드와 반응시키면 NHS가 아스파라진 잔기의 아민기와 결합한 형태가 만들어진다. 그리고 이를 C-말단에 시스테인 잔기를 넣어준 sfGFP-C (superfolder green fluorescent protein)와 반응시키면 말레이미드 그룹이 시스테인 잔기의 SH 그룹과 결합하여 만노스-6-인산 당사슬이 sfGFP와 결합된 형태를 얻을 수 있다. (C) DBCO-PEG₄-NHS를 아스파라진이 연결된 만노스-6-인산 당사슬에 처리하면, NHS 그룹이 아민기와 결합하여 DBCO 반응기를 가진 만노스-6-인산 당사슬 (DBCO-PEG₄-M-6-P glycan)이 만들어진다. (D) 목적 단백질에 NHS-PEG₄-아자이드를 처리하여 라이신과 알지닌 잔기들의 아민 그룹에 아자이드 반응기가 부착된 단백질을 준비하여 이를 DBCO 반응기를 가진 만노스-6-인산 당사슬과 결합되도록 할 수 있다. 즉, DBCO와 아자이드가 연결되는 click chemistry 반응을 통해서 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질의 라이신 및 알지닌 잔기들에 결합시킬 수 있다. 이때 목적 단백질에 부착되는 만노스-6-인산 당사슬의 개수는 처음 NHS-PEG₄-아자이드를 목적 단백질에 결합시킬 때 물비를 조절 함으로서 원하는 개수로 부착이 가능하다. (E) 목적 단백질이 당단백질이라면 페리오데이트 (periodate) 산화 반응을 이용하여 당사슬에 알데하이드 기를 도입하여 만노스-6-인산 당사슬을 부착시킬 수 있다. 이때, 시알산이 부가된 복합형 당사슬이라면 페리오데이트 농도를 낮춤으로서 선택적으로 산화시켜서 알데하이드 기를 도입할 수 있다. 또 다른 방법으로는 갈락토스 옥시데이즈 (galactose oxidase) 또는 유사 효소 등을 이용하여 갈락토스,

만노즈, GlcNAc 등의 잔기에 알데하이드 기를 도입할 수도 있다. 상기의 방법들을 이용하여 알데하이드 기를 형성한 후에는 Aminoxy-PEG4-Azide를 반응시켜서 아자이드 기를 도입하고 여기에 DBCO 반응기를 가진 만노스-6-인산 당사슬을 반응시키는 click chemistry를 이용하여 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조할 수 있다.

[20] 도면에서 당사슬을 나타내는 기호는 미국 Consortium for Functional Glycomics (<http://www.functionalglycomics.org/>)의 양식을 따랐으며, 인산은 P로 표시하였다 (사각형: GlcNAc, 원: 만노스, 인산: P).

[21]

[22] 도 2는 sfGFP-C 발현을 위한 pColdII-sfGFP-C 벡터의 모식도이다.

[23]

[24] 도 3은 sfGFP-C의 발현 및 정제 과정 중에서 수득된 분획을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석한 결과이다. 1: sfGFP-C 발현을 유도 하기 전 세포 용해물, 2: 발현이 유도된 후 불용성 세포 용해물, 3: 발현이 유도된 후 가용성 세포 용해물, 4: 컬럼에 세포 용해물 상층액을 흘려 용출된 용액 (flow through), 5: 컬럼에 세척 완충액을 흘려 얻은 용출액, 6-8: 컬럼에 용출 완충액을 흘려 얻은 용출액, 화살표: sfGFP-C 단백질 밴드.

[25]

[26] 도 4는 산화 과정에 의해서 생성된 sfGFP-C의 이황화 결합을 제거하기 위한 환원실험 결과이다. 이황화 결합을 환원시키기 위해 DTT, 2-ME, 또는 TCEP를 처리하여 비교 확인하였다. P는 SDS-PAGE의 표본 완충액을 이용하여 환원 조건에서 분석한 대조군, N은 비환원 조건의 대조군, 그리고 DTT, 2-ME, 또는 TCEP를 처리하여 환원 시킨 후 분석한 결과이다.

[27]

[28] 도 5는 말레이미드-PEG₆-당사슬을 sfGFP-C 단백질의 시스테인 잔기에 결합시킨 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다. 1: 결합시키지 않은 sfGFP-C 단백질 대조군, 2-6: Maleimide-PEG₆-당사슬과 sfGFP-C 단백질을 각각 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 8 : 1, 및 16 : 1의 몰비로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[29]

[30] 도 6은 말레이미드를 이용하여 sfGFP-C 단백질에 결합된 만노스-6-인산 당사슬을 만노스-6-인산에 결합하는 렉틴인 Dom9을 이용하여 블로팅 (blotting)으로 분석한 결과이다. 1과 2는 말레이미드-PEG₆-당사슬과 sfGFP-C 단백질을 각각 8 : 1과 16 : 1의 몰비로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[31]

[32] 도 7은 NHS-PEG₆-말레이미드를 이용해 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 결합시킨 결과를 IEF (isoelectric focusing)로 분석한 것이다. 1: 결합시키지 않은 sfGFP-C 단백질 대조군, 2-4: 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 각각 1 : 1, 2 : 1, 및 4 : 1의 몰비로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[33]

[34] 도 8은 DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 결합시킨 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다. 여기서 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질은 NHS-PEG₄-Azide를 sfGFP-C 단백질에 반응시켜서 라이신과 알지닌 잔기의 아민기에 아자이드가 연결된 형태로 제조한 것이다. 1: 결합시키지 않은 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질 대조군, 2-5: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 각각 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 및 8 : 1로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[35]

[36] 도 9는 DBCO-아자이드 반응을 통해서 만노스-6-인산 당사슬이 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질에 결합된 것을 Dom9 블로팅으로 확인한 결과이다. 1: Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질 대조군, 2-5: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 각각 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 및 8 : 1로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[37]

[38] 도 10은 DBCO와 아자이드의 커플링 반응을 이용해 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 결합시킨 결과를 isoelectric focusing (IEF)으로 분석한 것이다. 1: 결합시키지 않은 sfGFP-C 단백질 대조군, 2-4: 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 각각 1 : 1, 2 : 1, 및 4 : 1의 몰비로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[39]

[40] 도 11은 sfGFP-C 단백질에 결합된 당사슬을 MALDI-TOF로 분석한 결과이다. 이산화티타늄 (TiO₂) 정제 과정이 없거나 (A), 정제 과정을 거쳐서 (B) 분리한 당사슬의 분석결과를 보여준다. 인산이 부착되어 있는 것은 알칼리성 인산가수 분해효소를 추가로 처리하여 확인하였다 (C). 도면의 당사슬을 나타내는 기호는 도 1과 같다.

[41]

[42] 도 12는 DBCO-PEG₄-당사슬을 Azide-PEG₃-fetuin (A) 또는 Azide-PEG₃-RNase B (B) 단백질에 결합시킨 결과를 SDS-PAGE로 분석한 것이다. 여기서 Azide-PEG₃-fetuin 단백질은 Aminoxy-PEG₃-Azide를 1 mM 농도의 페리오데이트 (periodate)로 산화시킨 페투인 (fetuin)에 결합시켜서 제작하였고, Azide-PEG₃-RNase B 단백질은 Aminoxy-PEG₃-Azide를 10 mM 농도의 페리오데이트로 산화시킨 RNase B에 결합시켜서 제작하였다. 1: 아자이드 기를 포함하지 않은 당단백질 페투인 (A)과 RNase B (B) 대조군, 2: Aminoxy-PEG₃-azide를 반응시킨 당단백질 반응물, 3: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 1 : 1로 결합시킨 반응물, 4: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 4 : 1로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[43]

[44] 도 13은 DBCO와 아자이드 반응을 통해서 만노스-6-인산 당사슬이 결합된 페투인 (A)과 RNase B (B)를 Dom9 블로팅으로 분석한 결과이다. 1: Azide-PEG₃-당단백질, 2: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 1 : 1로

결합시킨 반응물, 3: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 4 : 1로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[45]

[46] 도 14는 DBCO와 아자이드의 copper-free click chemistry 반응을 통해서 제작된 만노스-6-인산 당사슬이 결합된 페투인이 세포 내 라이소솜으로 타겟팅 되는 것을 확인한 결과이다. 만노스-6-인산 당사슬이 결합하지 않은 페투인 (A)과 DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-Fetuin단백질을 각각 1 : 1 (B) 및 4 : 1 (C)로 결합시킨 반응물을 녹색 형광물질로 표지하고, Fabry fibroblast 세포에 처리하였다. 여기서 빨간색 형광은 라이소솜을 나타낸다.

[47]

[48] 도 15는 제조합 발현 및 정제 과정에서 수득한 GOase H1가 포함된 분획들을 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 1: 발현이 유도된 후 가용성 세포 용해물, 2: 컬럼에 세포 용해물 상층액을 흘려 용출된 용액 (flow through), 3: 컬럼에 세척 완충액을 흘려 얻은 용출액, 4-9: 컬럼에 용출 완충액을 흘려 얻은 용출액, 화살표: GOase H1단백질 밴드.

[49]

[50] 도 16은 GOase H1 oxidation 반응을 통해 얻은 Azide-PEG₃-RNase B와 DBCO-PEG₄-당사슬을 결합시킨 후 SDS-PAGE (A)와 Dom9 블로팅 (B)으로 분석한 결과이다. 1: RNase B 단백질 대조군, 2: Aminooxy-PEG₃-azide를 반응시킨 RNase B 단백질, 3: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 1:1로 결합시킨 반응물, 4: DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질을 각각 4:1로 결합시킨 반응물을 나타낸다.

[51]

[52] 도 17은 효모의 세포벽 만노단백질로부터 얻은 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질에 부착하는 방법을 나타내는 모식도이다. (A) 효모의 세포벽 만노단백질을 변성한 후에 PNGase 효소를 처리하여 당사슬을 얻은 후, 바깥쪽 만노스를 제거하는 캡 제거 (uncapping) 과정과 α -만노시다제 처리를 통해서 말단의 자유로운 만노스를 트리밍 (trimming)하고 인산이 부착된 당사슬들만을 이산화티타늄 (TiO₂)을 이용하여 분리하면, 라이소솜 타겟팅 능력이 높은 만노스-6-인산 당사슬을 얻을 수 있다. (B) 상기의 만노스-6-인산 당사슬을 Aminooxy-PEG₃-azide와 반응시키면 옥시아민 (oxyamine) 기가 당사슬의 환원말단에 결합해서 아자이드 기를 갖는 만노스-6-인산 당사슬 (Azide-PEG₃-glycan)이 만들어진다. (C) 목적 단백질에 DBCO-PEG₄-NHS를 처리하여 라이신과 알지닌 잔기들의 아민 그룹에 DBCO 반응기가 부착된 단백질을 준비하여 이를 아자이드 반응기를 가진 만노스-6-인산 당사슬과 결합되도록 할 수 있다. 즉 DBCO와 아자이드가 연결되는 click chemistry를 이용하여 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질에 결합시킬 수 있다.

[53]

- [54] 도 18은 Aminooxy-PEG₃-azide와 만노스-6-인산 당사슬을 반응시켜서 준비한 Azide-PEG₃-당사슬과 DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 결합시킨 결과를 SDS-PAGE (A)와 Dom9 블로팅 (B)으로 분석한 것이다. 1: sfGFP-C 단백질 대조군, 2: DBCO-PEG₄-NHS를 반응시킨 sfGFP-C 단백질, 3: Azide-PEG₃-당사슬과 DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 1 : 1로 반응시킨 결과물, 4: Azide-PEG₃-당사슬과 DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 4 : 1로 반응시킨 결과물을 나타낸다.

[55]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 (a) 효모로부터 분리된 세포벽 만노단백질로부터 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 단계; 및 (b) 가교제 (crosslinker)를 사용하여 상기 만노스-6-인산 당사슬과 목적 단백질을 결합시키는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법을 제공한다.
- [57] 본 발명의 목적상 상기 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질은 가교제를 사용하여 목적 단백질에 만노스-6-인산 당사슬을 결합시킨 당단백질일 수 있다.
- [58] 상기 당단백질은 만노스-6-인산 당사슬을 가지고 있으므로 만노스-6-인산 수용체를 통해 세포 내 라이소솜으로 이동할 수 있다. 즉, “분비-재도입 경로”의 만노스-6-인산 수용체인 CI-MPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor)이 만노스-6-인산 당사슬을 인식하고 내포 작용에 의해서 당단백질을 라이소솜으로 이동시킬 수 있으므로, 효소 치료제로서 라이소솜 표적화 효과를 기대할 수 있다. 나아가, 상기 만노스-6-인산 당사슬을 내포 탈출을 위한 펩타이드, 지질 또는 나노물질 등과 결합시켜 라이소솜이 아닌 세포질 또는 핵 내로 유용물질을 전달하는데 활용할 수 있다.
- [59] 이에, 본 발명에서는 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 생산하기 위하여, 먼저 만노스-6-인산 당사슬을 세포벽으로부터 분리한 만노단백질로부터 수득하고, 상기 수득한 당사슬을 가교제를 사용하여 목적 단백질과 결합시킴으로써 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조하는 방법을 개발하였다.
- [60]
- [61] 본 발명에서 용어, “목적 단백질”은 만노스-6-인산 당사슬을 부착하고자 하는 단백질을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 목적 단백질은 본 발명의 제조방법에 의해 만노스-6-인산 당사슬을 결합하여 사용할 수 있는 것이라면 그 종류가 제한되지 않고, 사용하고자 하는 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 즉, 예를 들어 라이소솜 표적화를 목적으로 하거나, 내포된 후 내포탈출하여 세포질 또는 핵 내로 전달하고자 하는 등 만노스-6-인산 당사슬을 결합시키고자 하는 목적에 따라 목적 단백질이 달라질 수 있으며, 본 발명의 예에 제한되지 않는다.

- [62] 상기 목적 단백질은, 이에 제한되지 않지만 예를 들어 병원체 단백질 (pathogen protein), 라이소좀 단백질 (lysosomal protein), 성장 인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 케모카인 (chemokine), 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (antigen-binding fragment), 또는 융합 단백질 (fusion protein)일 수 있고, 상기 라이소좀 단백질 (lysosomal protein)은 라이소좀 저장질환 (lysosomal storage disease)과 관련된 분해효소일 수 있다.
- [63] 상기 라이소좀 저장질환은 구체적으로 파브리병 (Fabry's disease), 점액다당류증 I (mucopolysaccharidosis I), 파버 질병 (Farber disease), 고셔병 (Gaucher disease), GM1-강글리오시드증 (GM1-gangliosidosis), 테이-삭스병 (Tay-Sachs disease), 샌드호프병 (Sandhoff disease), GM2 활성화제 질병 (GM2 activator disease), 크라베병 (Krabbe disease), 이염성백질이영양증 (metachromatic leukodystrophy), 니만-피크병 (Niemann-Pick disease), 샤이에 질병 (Scheie disease), 헌터 질병 (Hunter disease), 산필립포 질병 (Sanfilippo disease), 모르키오병 (Morquio disease), 마로토-라미 질병 (Maroteaux-Lamy disease), 히알루로니다아제 결핍증 (hyaluronidase deficiency), 아스파르트글루코사민뇨증 (aspartylglucosaminuria), 푸코시드축적증 (fucosidosis), 만노시도시스 (mannosidosis), 윈들러 병 (Schindler disease), 사이알산축적증 유형 1 (sialidosis type 1), 폼피병 (Pompe disease), 피크노디소토시스 (Pseudotumor), 세로이드 리포푸신증 (ceroid lipofuscinosis), 콜레스테롤 에스테르 축적 질병 (cholesterol ester storage disease), 월만병 (Wolman disease), 다중 술포타아제 결손증 (Multiple sulfatase deficiency), 갈락토시알리도시스 (galactosialidosis), 뮤코리피드증 (mucopolysaccharidosis), 시스틴축적증 (cystinosis), 시알산 축적 질병 (sialic acid storage disorder), 마리네스코-췌글렌 증후군 (Marinesco-Sjogren syndrome)을 갖는 킬로미크론 보유 질병 (chylomicron retention disease), 헤르만스키-푸드락 증후군 (Hermansky-Pudlak syndrome), 체디아크-히가시 증후군 (Chediak-Higashi syndrome), 다논병 (Danon disease), 또는 겔레오피직 이형성증 (Gelsolin dysplasia)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 목적 단백질이 라이소좀 저장질환 (lysosomal storage disease)과 관련된 분해효소인 경우, 상기 목적 단백질은, 예를 들어 산성 알파 글루코시다아제 (acid alpha glucosidase), 알파 갈락토시다아제 (alpha galactosidase), 알파-L-이두로니다아제 (alpha-L-iduronidase), 베타-D-갈락토시다아제 (beta-D-galactosidase), 베타-갈락토시다아제 (beta-glucosidase), 베타-헥소사미니다아제 (beta-hexosaminidase), 베타-D-만노시다아제 (beta-D-mannosidase), 알파-L-푸코시다아제 (alpha-L-fucosidase), 아릴 설��파타아제 B (arylsulfatase B), 아릴 설��파타아제 A (arylsulfatase A), 알파-N-아세틸갈락토사미니다아제 (alpha-N-acetylgalactosaminidase), 아스파르트글루코사미니다아제 (aspartylglucosaminidase),

인두로네이트-2-술포타아제 (iduronate-2-sulfatase),
 알파-글루코사미니드-N-아세틸전달효소 (alpha-glucosaminide-Nacetyltransferase),
 베타-D-글루코로니다아제 (beta-D-glucoronidase), 히알루로니다아제
 (hyaluronidase), 알파-L-만노시다제 (alpha-L-mannosidase), 알파-뉴라미니다아제
 (alpha-neuraminidase), 인산전달효소 (phosphotransferase), 산성 리파아제 (acid
 lipase), 산성 세라미다아제 (acid ceramidase), 스펅고마이엘리나제
 (sphingomyelinase), 티오에스테라제 (thioesterase), 카텝신 K (cathepsin K), 또는
 지단백질지방분해효소 (lipoprotein lipase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[65] 또한, 상기 목적 단백질은 가교제와 연결되는 시스테인, 라이신 또는 알지닌 잔기를 포함하는 것일 수 있으며, 당사슬이 포함된 당단백질일 수도 있으나 이에 제한되지 않는다.

[66]

[67] 이하, 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법을 구체적으로 설명한다.

[68]

[69] (a) 단계는, 분리된 세포벽 만노단백질로부터 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 단계로서, 상기 당사슬은 당사슬 환원 말단 잔기의 알데하이드 기 또는 당사슬 말단에 연결된 아스파라진을 이용하여 가교제를 통해 목적 단백질과 결합할 수 있다.

[70]

구체적으로, (a) 단계는 분리된 세포벽 만노단백질에 효소를 처리하여 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 것일 수 있다. 상기 효소는 예컨대, 프로나제 (pronase) 또는 N-당사슬을 유리하는 효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 프로나제 (pronase)를 처리하는 경우 아스파라진이 말단에 위치한 당사슬을 분리할 수 있으며, N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하는 경우 아스파라진이 없는 만노스-6-인산 당사슬을 분리할 수 있다. 본 발명에서 용어 "N-당사슬 (N-linked glycan)"은 당사슬이 아스파라진의 NH_2 기와 연결된 형태를 말하며, "N-당사슬을 유리하는 효소"는 구체적으로 N-당사슬의 GlcNAc-Asn 결합을 절단하는 효소 또는 GlcNAc-GlcNAc 결합을 절단하는 효소일 수 있다. 예를 들어, 상기 N-당사슬을 유리하는 효소는 펩티드-N-글리코시다제 (peptide-N-glycosidase, PNGase), 또는 엔도글리코시다제 (endoglycosidase, ENGase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71]

따라서, 상기 (a) 단계에서 사용되는 효소는 당사슬의 분리 조건, 당사슬과 결합하고자 하는 단백질의 종류 등 만노스-6-인산 당사슬을 분리하기 위한 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 이에 따라 가교제 및 결합 반응이 달라질 수 있다.

[72]

또한, 상기 (a) 단계는 상기 분리된 당사슬에서 바깥쪽 만노스를 제거하여 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[73]

[74] 상기 세포벽 만노단백질 (cell wall mannoprotein, CWM)은 만노스-6-인산 당사슬을 수득하기 위하여 먼저 분리하는 것으로, 구체적으로는 효모, 더욱 구체적으로는 천연 효모에 비하여 만노스인산이 과량 부가되도록 조작한 효모, 보다 구체적으로는 효모 특이적 당사슬 생합성 경로가 제거되어 만노스인산이 과량 부가되도록 조작한 효모, 보다 더 구체적으로는 *OCH1* 결손, *MNN1* 결손, *YIMPO1* 과발현 및 *MNN4* 과발현으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 유전형질을 가져 만노스인산이 과량 부가되도록 조작한 효모, 더욱 더 구체적으로는 *OCH1* 결손 및 *MNN1* 결손을 가지는 효모일 수 있고, 가장 구체적으로는 효모 특이적인 당사슬 생합성 경로가 제거된 *OCH1* 결손 및 *MNN1* 결손을 가지는 효모에서 *YIMPO1* 또는 *MNN4* 을 과발현하는 효모일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[75] 본 발명에서 용어 "*OCH1* 결손" 및 "*MNN1* 결손"은 상기 유전자들의 결실과 동일한 의미로 사용되는 것으로 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 기능이 상실된 것을 의미하며, "*YIMPO1* 과발현"은 외래 유전자인 *YIMPO1*이 과발현 된 것을 의미하고, "*MNN4* 과발현"은 *MNN4*의 발현 수준이 천연 효모에 비하여 높은 상태를 의미한다.

[76] 상기 효모는 구체적으로는 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 *OCH1* 및 *MNN1* 유전자가 결손된 *och1 Δmnn1* 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 균주에 YEp352-YIMpo1 벡터를 도입하여 형질전환 효모 *och1 Δmnn1*/YEp352-YIMpo1 균주 (기탁번호 제KCTC12674BP)를 제작하고 이로부터 핫 구연산 완충액 (hot citrate buffer)을 이용하여 세포벽 만노단백질을 추출하였다.

[78]

[79] (a) 단계에는, 상기 분리된 세포벽 만노단백질에서 단백질을 개별 아미노산 수준으로 분해하여 아스파라진이 연결된 형태의 당사슬을 분리하기 위해, 단백질 분해 효소를 처리하는 단계가 포함될 수 있다.

[80] 상기 단백질 분해 효소는 구체적으로 파파인, 브롬렐레인, 판크레아틴, 트립신, 프로나제 (pronase), 서브틸리신 (subtilisin), 서브틸리신 칼스버그 (subtilisin carlsberg), 알칼라아제 (alcalase), 페스칼라제 (pescalase), 및 맥사자임 (maxazyme)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 효소일 수 있고, 더욱 구체적으로는 프로나제 (pronase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[81] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 분리된 세포벽 만노단백질에 프로나제를 처리하여 55 °C에서 48 시간 반응시키고 이를 탄소 컬럼을 이용해 정제함으로써 말단에 아스파라진이 위치하는 당사슬을 제조하였다.

[82]

[83] 상기 분리된 세포벽 만노단백질로부터 아스파라진이 없는 만노스-6-인산

당사슬을 분리하기 위해서는 세포벽 만노단백질을 변성 (denaturation)시킨 후에 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하여 당사슬을 유리하고, 이를 탄소 컬럼을 이용해 정제하여 사용할 수 있다. 이와 같이 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하여 분리된 당사슬은 말단에 아스파라진이 없으나, 평형 조건에서 일부 당사슬의 환원 말단이 알데하이드 기로 존재하게 되므로, 상기 알데하이드 기를 가교제와 결합시킴으로써 목적 단백질과 결합이 가능하다. 또한, 평형 조건에 의해 환원 말단이 알데하이드 기로 존재하는 당사슬의 농도는 일정 수준으로 유지될 수 있다.

[84] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 분리된 세포벽 만노단백질을 변성시킨 후에 N-당사슬을 유리하는 효소의 일 예로서, PNGase F 효소 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 제조사에서 제공하는 방법을 따라서 처리하고 반응하여 N-당사슬을 유리하였으며, 이를 탄소 컬럼을 이용해 정제함으로써 당사슬만을 선택적으로 제조할 수 있었다.

[85]

[86] 상기 프로나제 또는 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하여 수득한 당사슬은 만노스-1-인산-6-O-만노스 결합을 포함할 수 있어서, 상기 제조된 당사슬에서 세포 내 라이소좀으로 표적화에 효과적일 수 있도록, 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정을 추가로 포함될 수 있다. 즉, 만노스-6-인산 (인산-6-O-만노스)이 부가된 당사슬을 가지는 당단백질을 제조하는 과정을 추가로 포함할 수 있다. 이와 같은 과정을 통하여 말단에 아스파라진 잔기를 갖거나, 갖지 않는 $P_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 당사슬을 제조할 수 있다.

[87] 구체적으로 이와 같은 과정은 약산 가수분해 또는 캡핑 제거 (uncapping) 효소를 이용하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 약산은 0.1 내지 5 M의 포름산 (formic acid)이고, 상기 캡핑 제거 (uncapping) 효소는 셀룰로모나스 (*Cellulomonas*) 속 세균의 α -만노시다제 (α -mannosidase) 또는 셀룰로시마이크로비움 셀룰란스 (*Cellulosimicrobium cellulans*) 유래의 CcGH92_5일 수 있으나, 이는 약산 가수분해 또는 캡핑 제거의 일 예일 뿐, 이에 제한되는 것은 아니다.

[88] 나아가, 상기 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정과 함께 비환원 말단의 자유로운 만노스들을 제거할 수 있는 만노시다제를 당사슬에 처리하는 단계를 수행할 수 있다. 이러한 단계는 상기 두 처리 과정을 동시 또는 순차적으로 진행하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89] 구체적으로, 약산 가수분해 또는 캡핑 제거 (uncapping) 효소를 이용하여 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정과 함께, 비환원 말단의 자유로운 만노스들을 제거할 수 있는 만노시다제를 당사슬에 처리할 수 있다. 상기 만노시다제는 구체적으로 α -만노시다제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 과정을 통하여 비환원 말단의 자유로운 만노스들이 제거된 $P_2\text{-Man}_6\text{GlcNAc}_2$ 당사슬을 제조할 수 있다.

- [90] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 상기 프로나제 처리 후 정제된 말단에 아스파라진이 위치하는 당사슬, 또는 PNGase 처리 후 정제된 당사슬에 0.5 M 포름산을 처리하여 바깥쪽 만노스를 캡 제거 (uncapping)하고, α -1,2-만노시다제와 반응시킨 뒤 정제 과정을 거쳐서 만노스-6-인산 당사슬을 수득하였다.
- [91]
- [92] 나아가, 상기 (a) 단계를 통해 수득한 당사슬에는 고만노즈형 당사슬이 존재할 수 있으므로, 상기 (a) 단계에 만노스-6-인산 당사슬을 선택적으로 분리하기 위한 단계를 추가로 포함시킬 수 있다.
- [93] 이를 위해 만노스-6-인산 당사슬에 친화성을 가지는 물질을 이용할 수 있으며, 그 예로, 이산화티타늄 (TiO_2)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [94] 상기 이산화티타늄을 이용하는 예로서, 이산화티타늄 (TiO_2) 비드, 이산화티타늄 파티클 또는 이산화티타늄을 포함하는 컬럼을 이용한 분리 정제 과정을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [95] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 이산화티타늄 (TiO_2) 비드를 이용하여 만노스-6-인산이 부가된 당사슬들만을 분리 정제하였으며, 이를 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석한 결과, 고만노즈형 당사슬들은 제거되고 만노스-6-인산 당사슬들만이 분리된 것을 확인하였다 (도 11B).
- [96]
- [97] (b) 단계는 가교제 (crosslinker)를 사용하여 상기 (a) 단계에서 수득한 만노스-6-인산 당사슬을 목적 단백질과 결합시켜, 최종적으로 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조하는 단계이다.
- [98] 상기 가교제 (crosslinker)는 이의 한쪽 말단에 아스파라진 기 또는 알데하이드 기와 연결될 수 있는 반응기를 가지는 것일 수 있다. 상기 아스파라진 기 또는 알데하이드 기와 연결될 수 있는 반응기는 예를 들어, 엔하이드록시석신이미드 (NHS, N-hydroxysuccinimide), 옥시아민 (oxyamine), 아이소티오시아네이트 (isothiocyanate), 아이소시아네이트 (isocyanate), 설포닐클로라이드 (sulfonyl chloride), 알데히드 (aldehyde), 카보디이미드 (carbodiimide), 아실아자이드 (acyl azide), 언하이드라이드 (anhydride), 플루오로벤젠 (fluorobenzene), 카보네이트 (carbonate), 이미도에스터 (imidoester), 에폭사이드 (epoxide) 및 플루오로페닐에스터 (fluorophenyl ester)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [99] 또한, 상기 가교제는 다른 한쪽 말단에 말레이미드 (maleimide), DBCO (Dibenzocyclooctyne), DTME (Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 비닐설폰 (vinylsulfone), 아자이드 (azide), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드 (iodoacetyl nitrophenylazide), 아이소시아네이트 (isocyanate), 피리딜다이설파이드 (pyridyldisulfide), 하이드라자이드 (hydrazide) 및 하이드록시페닐 아자이드 (hydroxyphenyl azide)로

이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[100] 만노스-6-인산 당사슬을 부가하고자 하는 목적 단백질이 당단백질이라면 화학적 또는 효소적인 방법으로 산화 반응을 유도하여, 상기 목적 단백질의 당사슬에 알데하이드 (aldehyde)기를 도입하고, 여기에 결합 하는 반응기를 이용하여 가교 반응을 할 수 있다.

[101] 예를 들어, 화학적인 방법으로는 페리오데이트 (periodate) 산화 반응을 이용할 수 있으며, 이때 시알산이 부가된 복합형 당사슬이라면 페리오데이트 농도를 낮춤으로써 선택적으로 산화시켜서 알데하이드 기를 도입할 수 있다. 또 다른 방법으로는 갈락토스 옥시데이즈 (galactose oxidase) 또는 유사 효소 등을 이용하여 갈락토스, 만노즈, GlcNAc 등의 잔기에 알데하이드 기를 선택적으로 도입할 수도 있다. 상기의 방법들을 이용하여 알데하이드 기를 형성한 후에는 여기에 반응하는 그룹을 가진 가교제를 이용하여 만노스-6-인산 당사슬을 부가할 수 있다. 그러나 상술한 방법들은 산화 반응의 일 예시에 관한 것으로, 당단백질의 당사슬에 알데하이드 기를 도입할 수 있는 한, 이에 제한되는 것은 아니다.

[102] 나아가, 상기 가교제는 PEG (polyethylene glycol), 플루로닉 (pluronic), 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone) 및 폴리옥사졸린 (polyoxazolin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 비이온성 친수성 고분자; 또는 폴리-L-락트산 (poly-L-lactic acid), 폴리-글리콜산 (poly-glycolic acid), 폴리-D-락트산-co-글리콜산 (poly-D-lactic-co-glycolic acid), 폴리-L-락트산-co-글리콜산 (poly-L-lactic-co-glycolic acid), 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산 (poly-D,L-lactic-co-glycolic acid), 폴리-카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리-발레로락톤 (polyvalerolactone), 폴리-하이드록시 부티레이트 (polyhydroxybutyrate) 및 폴리-하이드록시 발러레이트 (polyhydroxyvalerate)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생분해성 폴리에스테르계 고분자;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[103] 또한, 상기 가교제는 보다 구체적인 예로서, 각 말단에 NHS 및 말레이미드 기를 가지는 PEG 중합체, 각 말단에 DBCO 및 NHS 기를 가지는 PEG 중합체, 각 말단에 NHS 및 아자이드 (azide) 기를 가지는 PEG 중합체, 또는 각 말단에 옥시아민 (oxyamine) 및 아자이드 기를 가지는 PEG 중합체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[104] 본 발명에서 상기 가교제는 상기 기술된, 만노스-6-인산 당사슬과 목적 단백질을 결합시킬 수 있다면, 어떠한 형태의 가교제를 사용하더라도 무방하며, 이는 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[105] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 가교제로 NHS-PEG₆-말레이미드를 이용하여 말단에 아스파라진이 위치하는 만노스-6-인산 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 결합시켰다 (도 1B). NHS-PEG₆-말레이미드의 NHS

(N-hydroxysuccinimide)기는 아스파라진이 위치하는 만노스-6-인산 당사슬에서 아스파라진이 가지는 아민기 (-NH₂)와 결합할 수 있으며, 말레이미드 기는 목적 단백질인 sfGFP-C 단백질에서 시스테인이 가지는 티올기 (-SH)와 결합할 수 있어 결과적으로 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조할 수 있다 (도 5 및 도 6).

- [106] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 DBCO-PEG₄-NHS와 NHS-PEG₄-Azide의 두 개의 가교제를 이용하여 말단에 아스파라진이 위치하는 만노스-6-인산 당사슬과 sfGFP-C 단백질을 결합시켰다 (도 1C). 이때, DBCO-PEG₄-NHS의 NHS기는 상기 NHS-PEG₆-말레이미드를 가교제로 사용한 경우와 마찬가지로 아스파라진이 위치하는 만노스-6-인산 당사슬에서 아스파라진이 가지는 아민기와 결합하는 역할을 하여 DBCO-PEG₄-당사슬을 제작할 수 있다. 한편, DBCO의 경우 아자이드와 결합되는 copper-free click chemistry를 이용하여 목적 단백질과 결합할 수 있으므로, 먼저 목적 단백질인 sfGFP-C 단백질을 NHS-PEG₄-Azide와 적당한 물 비로 반응시켜 원하는 숫자의 Azide-PEG₄가 sfGFP-C 단백질의 라이신과 알지닌 잔기의 아민기에 연결된 Azide-PEG₄-sfGFP-C를 제작한 뒤, 이를 상기 제작한 DBCO-PEG₄-당사슬과 DBCO와 아자이드의 결합 반응을 통해 결합시킬 수 있고, 결과적으로 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조할 수 있다 (도 8 및 도 9).
- [107] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는 MALDI-TOF 질량 분석 (도 11) 및 IEF (Isoelectric focusing) 분석 (도 7 및 도 10)을 통해, 상기 NHS-PEG₆-말레이미드 및 DBCO-PEG₄-NHS를 가교제로 하여 sfGFP-C 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 성공적으로 부착되었음을 확인하였다.
- [108] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는 가교제로 Aminooxy-PEG₃-Azide와 DBCO-PEG₄-NHS의 두 개의 가교제를 이용하여 아스파라진이 없는 만노스-6-인산 당사슬과 목적 단백질을 결합시켰다 (도 17). 이때, Aminooxy-PEG₃-Azide의 옥시아민 (oxyamine) 기는 아스파라진이 없는 당사슬 환원 말단의 알데하이드 기와 결합하는 역할을 하여 Azide-PEG₃-당사슬을 제작할 수 있다. 한편, 아자이드의 경우 DBCO와 결합되는 copper-free click chemistry를 이용하여 목적단백질과 결합할 수 있으므로, 먼저 목적 단백질을 DBCO-PEG₄-NHS와 적당한 물 비로 반응시켜 원하는 숫자의 DBCO-PEG₄가 목적 단백질의 라이신과 알지닌 잔기의 아민기에 연결된 Azide-PEG₄-단백질을 제작한 뒤, 이를 상기 제작한 Azide-PEG₃-당사슬과 DBCO와 아자이드의 결합 반응을 통해 결합시킬 수 있고, 결과적으로 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질을 제조할 수 있다 (도 17).
- [109] 상기 사용된 sfGFP-C, NHS-PEG₆-말레이미드, DBCO-PEG₄-NHS, 및 Aminooxy-PEG₃-Azide는 모두 예시적인 것으로, 목적 단백질은 만노스-6-인산 당사슬과 결합할 수 있다면 상기 설명한 바와 같이 그 목적에 따라 당업자가 적절하게 선택할 수 있으며, 가교제 역시 목적 단백질과 효모 세포벽 만노단백질

유래 만노스-6-인산 당사슬을 결합시킬 수 있다면 제한 없이 사용될 수 있다.

[110]

[111] 본 발명은 다른 하나의 양태로서, 분리된 세포벽 만노단백질로부터, 만노스-6-인산 당사슬을 제조하는 방법을 제공한다.

[112] 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법에 대하여는 상기 설명한 바와 같다.

[113] 상기 제조방법은 분리된 세포벽 만노단백질에 프로나제 (pronase)를 처리하여 아스파라진이 말단에 위치한 당사슬을 분리하는 단계, 또는 세포벽 만노단백질에 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하여 당사슬을 수득하는 단계를 포함하는 것일 수 있고, 상기 당사슬들에서 바깥쪽 만노스를 제거하는 단계를 추가로 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[114] 또한, 상기 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정은 약산 가수분해 또는 캡핑 제거 (uncapping) 효소를 이용하는 것일 수 있고, 상기 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정과 함께 만노시다제를 당사슬에 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[115] 상기 제조방법은 만노스-6-인산 당사슬을 선택적으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있고, 이는 이산화티타늄 (TiO₂)을 이용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[116]

발명의 실시를 위한 형태

[117] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[118]

[119]

[120] 실시예 1. 세포벽 만노단백질의 수득을 위한 효모 균주의 제작

[121]

[122] 본 발명자들은 효모 특이적인 당사슬 생합성 경로가 제거된 *och1mnn1Δ* 균주에서 *YIMPO1*을 과발현하는 균주 (*och1mnn1Δ/YIMpo1p*, KCTC12674BP)로부터 세포벽 만노단백질 (cell wall mannoproteins; CWMs)을 얻었고, 상기 균주는 하기와 같은 과정으로 제작되었다.

[123]

[124] 실시예 1-1. *och1Δmnn1* 균주의 제작

[125]

[126] L3262 균주 (*MATaura3-52leu2-3,112his4-34*)로부터 Cre/*loxP* 시스템을 이용한 다중 유전자 결손 방법 (U. Gueldener *et al*, 2002, *Nucleic Acids Res* 30: e23; J.H. Hegemann, S.B. Heick, 2011, *Methods Mol Biol* 765: 189-206)을 이용하여 *OCH1*과 *MNN1* 유전자들이 결손된 *S. cerevisiae och1Δmnn1Δ* 균주를 제작하였다.

[127] 우선, *OCH1* 유전자를 결손하기 위한 *loxP*-URA3-*loxP* 결손 카세트를 Och1_pUG72_F (서열번호 1)와 Och1_pUG72_R (서열번호 2) 프라이머를 이용하여 pUG72 벡터로부터 증폭하여 제작하였다. 1 M 소르비톨 (sorbitol)이 첨가된 SC-Ura 배지에서 형질전환된 균주들을 선별한 후, Och1_CF (서열번호 3)과 Och1_CR (서열번호 4) 프라이머들을 이용한 염색체 DNA를 주형으로 한 중합효소 연쇄반응을 이용하여 *OCH1* 유전자 결손을 확인하였다. 이어서 *MNN1* 유전자 결손을 위한 *loxP*-kanMX-*loxP* 카세트를 pUG6를 주형으로 하고, Mnn1_pUG6_F (서열번호 5)와 Mnn1_pUG6_R (서열번호 6) 프라이머들을 이용하여 제작하였으며, 상기 제작된 *och1Δ* 균주에 형질전환하였다. 1 M 소르비톨 (sorbitol)과 200 mg/ℓ G418이 첨가된 YPD 배지에서 형질전환된 균주를 선별하였으며, *MNN1* 유전자 결손의 확인은 염색체 DNA를 주형으로 한, Mnn1_CF (서열번호 7)와 Mnn1_CR (서열번호 8) 프라이머들을 이용한 중합효소 연쇄반응을 이용하여 확인하였다. 그리고, 유전자들의 결손을 위해서 들어간 선별용 마커들은 상기의 논문들에 보고된 바와 같이, pSH68 벡터를 형질전환하고 2 % 포도당 대신에 2 % 갈락토스가 첨가된 SC-Leu 배지에서 Cre 단백질을 발현시켜서 제거하였다. 마지막으로 Cre 단백질 발현을 위한 pSH68은 YPD 배지에서 연속 배양을 통해서 제거하였으며, 적절한 선별 배지에서의 성장을 확인하여 최종 *mnn1Δoch1Δ* 균주를 선별하였다.

[128]

[129] 상기 기술된 사용된 프라이머의 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

[130]

[131] [표1]

프라이머	서열
Och1_pUG72_F	5'-atgtctaggaagttgtccacctgatcgctacaaggaaatcaaaaTACGCTGCAGGTCGACAACC-3'(서열번호 1)
Och1_pUG72_R	5'-ttatttatgacctgcattttatcagcatcttcttccagctcccACTAGTGGATCTGATATCACC-3' (서열번호 2)
Och1_CF	5'-AATGGGGGAGCGCTGATTCTC-3' (서열번호 3)
Och1_CR	5'-TCTACGGAAGGACGTTGAGA-3' (서열번호 4)
Mnn1_pUG6_F	5'-aacgtaatcttgcggtatttaacgctagttaagaaagtgtactgtgtaTACGCTGCAGGTGACAACC-3' (서열번호 5)
Mnn1_pUG6_R	5'-gttcacaaaggctagtaccataaacagttagaaaaaacactggttaatgcACTAGTGGATCTGATATCACC-3'(서열번호 6)
Mnn1_CF	5'-ATCATTGCGAGGTCTCAATTGG-3' (서열번호 7)
Mnn1_CR	5'-GATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG-3' (서열번호 8)

[132] * 서열번호 1, 2, 5, 6의 소문자는 *OCH1*과 *MNN1* 유전자의 측면서열과 상동성이 있는 부분임

[133]

[134] 실시예 1-2. YIMpo1 발현 벡터의 제작

[135]

[136] *S. cerevisiae*의 *GAPDH*의 프로모터 (0.8 kb) 및 터미네이터 (0.2 kb)는 L3262 균주의 염색체 DNA로부터 각각 ScGAPDHp-F1 (서열번호 9)/ScGAPDHp-R1 (서열번호 10)과 ScGAPDHt-F1 (서열번호 11)/ScGAPDHt-R1 (서열번호 12) 프라이머들을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해서 증폭하였다. 증폭된 DNA 절편은 pDrive 벡터 (QIAGEN, Germany)에 각각 삽입하여 pDrive-ScGAPDHp와 pDrive-ScGAPDHt 벡터들을 제작하였다. 재조합효소 *EcoRI*과 *KpnI*을 사용하여 pDrive-ScGAPDHp로부터 *ScGAPDH* 프로모터를 절단하였으며, 같은 재조합 효소로 절단된 YEp352 벡터에 삽입하여 YEp352-GAPDHp 벡터를 제작하였다. 다음으로 *KpnI*과 *PstI* 효소를 사용하여 pDrive-ScGAPDHt로부터 *ScGAPDH* 터미네이터를 절단하여 같은 재조합 효소로 절단된 YEp352-GAPDHp 벡터에 삽입하여 YEp352-GAP 벡터를 제작하였다. *YIMPO1* 유전자 (1.935-kb)는 *Y. lipolytica* SMS397A의 염색체 DNA로부터 YIMPO1_F1 (서열번호 13)과 YIMPO1_R1 (서열번호 14) 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응으로 증폭하였다. 여기에 *KpnI* 제한 효소를 처리하여 절단한 단편을 YEp352-GAP 벡터의 *KpnI* 위치에 삽입하여 YEp352-YIMpo1 벡터를 제작하였다.

[137]

[138] [표2]

프라이머	서열
ScGAPDHp-F1	5'-AGTCGAATTCATACTAGCGTTGAATGTTAGCG-3' (서열번호 9)
ScGAPDHp-R1	5'-AGTCGGTACCTTTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTC-3' (서열번호 10)
ScGAPDHt-F1	5'-AGTCGGTACCGGATCCTCTAGAGTGAATTTACTTTAAATCTTGCAT-3' (서열번호 11)
ScGAPDHt-R1	5'-AGTCCTGCAGATCCACAATGTATCAGGTATCT-3' (서열번호 12)
YIMPO1_F1	5'-AGTCGGTACCATGGTGCTGCACCCGTTTC-3' (서열번호 13)
YIMPO1_R1	5'-AGTCGGTACCCTACTCAAACCTCCTCGCGAATCCA-3' (서열번호 14)

[139]

[140] 실시예 1-3. *och1*Δ*mnn1*Δ/YIMpo1p 균주의 제작

[141]

[142] 상기 실시예 1-1에서 제작한 *OCH1*과 *MNN1* 유전자가 결손된 *och1*Δ*mnn1*Δ 균주에 실시예 1-2에서 제작한 YEp352-YIMpo1 벡터가 도입된 형질전환 효모 *och1*Δ*mnn1*Δ/YEp352-YIMpo1 (YIMpo1p)을 제작하였다.

[143] 상기 YEp352-YIMpo1 벡터가 *och1*Δ*mnn1*Δ 효모에 도입된 형질전환체는 *och1*Δ*mnn1*Δ/YEp352-YIMpo1으로 명명되었고, 이를 특허 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약 규정에 따라, 2014 년 9 월 4 일자로 한국생명공학연구원 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB) 내 유전자 은행 (Korea Collection for Type Cultures, KCTC)에 기탁번호 제KCTC12674BP로 기탁하였다.

[144]

[145]

[146] 실시예 2. 아스파라진 잔기가 연결된 만노스-6-인산 당사슬의 준비

[147]

[148] 상기 실시예 1.에서 제작한 효모 특이적인 당사슬 생합성 경로가 제거된 *och1*Δ*mnn1*Δ에서 *YIMPO1*을 과발현하는 균주 (*och1*Δ*mnn1*Δ/YIMpo1p, KCTC12674BP)로부터 세포벽 만노단백질 (cell wall mannoproteins; CWMs)을 얻고, 여기에 프로나제 (pronase)를 처리하여 아스파라진이 연결된 형태로 당사슬을 분리하였다. 이로부터 바깥쪽 만노스를 제거하는 캡 제거 (uncapping) 과정과 α-1,2-만노시다제를 처리하는 트리밍 (trimming) 과정을 거쳐서 라이소좀 표적화에 효율적인 만노스-6-인산 당사슬을 아스파라진이 연결된 형태로 얻었다 (도 1A).

[149]

[150] 실시예 2-1. 세포벽 만노단백질의 준비

[151]

[152] 효모의 세포벽 만노단백질은 기존에 보고된 핫 구연산 완충액 (hot citrate buffer: 20 mM sodium citrate buffer, pH 7.0)을 이용한 방법을 따라서 추출하였다 (Park et al, 2011, Appl Environ Microbiol 77: 1187-1195).

[153]

[154] 실시예 2-2. 프로나제 (Pronase) 처리 및 아스파라진-당사슬의 정제

[155]

[156] 상기 실시예 2-1.을 통하여 준비된 세포벽 만노단백질 10 mg에 프로나제 (pronase, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 mg를 처리하여 55 °C에서 48 시간 반응하였다. 이를 통하여 단백질은 개별 아미노산 수준으로 분해되며, 아스파라진이 연결된 형태의 당사슬 (아스파라진-당사슬)들이 생성된다. 이렇게 생성된 아스파라진-당사슬을 분리하기 위해 탄소 컬럼 (Graphite Carbon

Cartridge, GRACE, Deerfield, IL)을 이용해 정제하였다. 0.1 % TFA (trifluoro acid)를 포함한 80 % ACN (Acetonitrile)과 증류수로 차례로 세척하고 시료를 로딩한 뒤, 다시 증류수로 세척하였다. 0.075 % TFA를 포함하는 25 % ACN으로 당사슬을 용출하였고 이를 진공 건조시켰다.

[157]

[158] 실시예 2-3. 만노스-6-인산 당사슬 형성 및 정제

[159]

[160] 상기 실시예 2-1. 및 2-2.를 통해서 준비된 당사슬은 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man-P-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 또는 $(\text{Man-P})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 의 구조를 갖는데, 세포 내 라이소솜으로 표적화를 위해서는 바깥쪽 만노스가 캡 제거 (uncapping)되고 트리밍 (trimming) 과정을 거쳐야 한다. 이를 위해서 약산 가수분해와 α -1,2-만노시다제 처리를 차례로 수행하였다.

[161] 먼저 건조된 아스파라진-당사슬에 0.5 M 포름산 (formic acid) 100 μl 를

처리하고 80 °C에서 1 시간 동안 반응시켜 바깥쪽 만노스를 캡 제거 (uncapping)하였다. 그리고 여기에 α -1,2-만노시다제를 최종 농도 1 μg 이 되게 하여 37 °C에서 16 시간 이상 반응시켰다. 그 다음 상기 실시예 2-2.에서 사용한 탄소 컬럼을 이용한 방법으로 아스파라진-당사슬을 정제하였다.

[162] 이렇게 정제된 아스파라진-당사슬의 농도는 아스파라진 잔기에 있는 아민기에 결합하여 형광을 내는 플루오레스카민 (fluorescamine)을 이용하여 정량하였다 (Ullrich O et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999). 플루오레스카민 자체는 형광이 없으나 1차 아민기와 결합하여 형광을 나타내는 복합체를 형성한다. 류신을 표준용액으로 하여 0-20 nmol로 사용하였고, 건조된 아스파라진-당사슬에 0.5 M 소듐 보레이트 (sodium borate, pH 8.0) 0.4 ml를 넣고 강하게 교반하면서 1 mM 플루오레스카민 0.1 ml를 첨가하였다. 여기 (excitation) 390 nm, 방출 (emission) 470 nm에서 형광을 측정하여 농도를 정량하였다.

[163]

[164]

[165] 실시예 3. sfGFP-C 단백질 발현 및 정제

[166]

[167] 실시예 3-1. sfGFP-C 발현 벡터 제작

[168]

[169] C-말단에 시스테인 잔기를 도입한 sfGFP-C 단백질의 발현을 위한 벡터를 제작하였다. sfGFP-C는 서열번호 15과 16의 프라이머를 사용하여 통상의 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭하였다.

[170]

[171] sfGFP-C_BamHI_F: 5'- GCGGATCCATGAGCAAAGGTGAAGAACTGTTTAC-3' (서열번호 15)

[172] sfGFP-C_HidIII_R: 5'- GCAAGCTTTTGTAGCAAGAACCACCTTTTTCGAAC-3'

(서열번호 16)

[173]

[174] 증폭한 DNA는 *Bam*HI과 *Hind*III 제한효소로 절단하고, 통상의 유전자 재조합 방법을 이용하여 pColdII 벡터에 클로닝하여, pColdII-sfGFP-C 벡터를 제작하였다 (도 2). 발현된 sfGFP-C의 아미노산 서열과 이의 발현을 위한 염기 서열은 서열번호 17과 18로 나타내었다.

[175]

[176] 실시예 3-2. sfGFP-C 단백질의 발현

[177]

[178] pColdII-sfGFP-C 벡터를 발현용 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환으로 도입하여 단백질을 발현하였다. 형질전환체는 암피실린 (100 mg/ml)이 포함된 LB 배지로 37 °C에서 배양하고, 다음날 이를 TB (Terrific Broth) 배지에 접종하여 37 °C에서 본 배양을 수행하였다. 600 nm에서 흡광도가 0.8에 도달했을 때, 1 mM IPTG (isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 sfGFP-C의 발현을 유도한 후 15 °C에서 24 시간을 더 배양하였고, 이후 원심분리를 통해서 배양한 세포들을 수확하였다.

[179]

[180] 실시예 3-3. sfGFP-C 단백질의 정제

[181]

[182] 상기 실시예 3-2.의 배양을 통해서 얻은 세포 침전물을 용해 완충액 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.1 mg/ml lysozyme)에 재현탁시키고 초음파 분해로 세포를 용해시켰다. 상기 세포 용해물을 4 °C에서 20 분 동안 6,000 X g 조건으로 원심 분리한 후, 불용성 부분이 제거된 세포 용해물을 정제 완충액 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)으로 미리 평형화해 둔 Ni-NTA 컬럼 (Qiagen, USA)에 로딩 (loading)하여 정제하였다. 컬럼 부피의 20 배에 해당하는 정제 완충액으로 세척한 후, 용출액 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)으로 sfGFP-C 단백질을 용출하였다. 상기 각 단계에서 용출된 분획을 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 3).

[183]

[184]

[185] 실시예 4. NHS-PEG₆-Maleimide를 이용한 아스파라진-당사슬과 sfGFP-C 단백질의 결합

[186]

[187] NHS-PEG₆-Maleimide (Pierce, Rockford, IL, USA)의 NHS기는 실시예 2.를 통하여 얻은 아스파라진-당사슬의 아민기에 결합할 수 있으며, 이를 통해서 말레이미드 반응기를 가진 당사슬 형태가 되어서 시스테인 잔기를 가진 목적 단백질에 결합시킬 수 있다 (도 1B).

[188]

[189] 실시예 4-1. 아스파라진-당사슬과 NHS-PEG₆-말레이미드와의 반응

[190]

[191] 실시예 2.를 통하여 분리 정제된 아스파라진-당사슬과 NHS-PEG₆--말레이미드와의 반응을 수행하였다. 구체적으로, NHS-PEG₆-

-말레이미드를 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 200 mM이 되도록 준비하였다.

100 μ l의 4 mM 아스파라진-당사슬에 30 μ l의 200 mM NHS-PEG₆-말레이미드와20 μ l의 결합 완충액 (1 mM EDTA가 포함된 PBS (phosphate buffered saline), pH7.2)을 넣어서 최종 반응액이 150 μ l 되게 한 후, 상온에서 3 시간 동안반응시켰다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 NHS-PEG₆-말레이미드는 1,000

Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7, Spectrum labs, Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 결합 완충액에서 투석으로

제거하였다.

[192]

[193] 실시예 4-2. sfGFP-C 단백질의 환원

[194]

[195] sfGFP-C 단백질의 시스테인이 말레이미드와 잘 반응하도록 이황화 결합의

제거를 위한 환원 반응을 수행하였다. 어떠한 환원물질이 이황화 결합을 잘

제거하는지 알아보기 위해서 DTT (dithiothreitol), 2-ME (2-Mercaptoethanol), 및

TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine)를 각각 sfGFP-C와 반응 시킨 후 비교 하였다

(환원물질들은 모두 Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, USA]에서 구입하였다). 최종

반응액 100 μ l에 DTT와 TCEP는 최종농도가 5 mM이 되고, 2-ME는 5 %가 되도록

하고 상온에서 30 분 동안 처리하였다. 그리고 환원물질이 들어가지 않은

SDS-PAGE 표본 완충액 (10 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 M tris pH 6.8, 0.05 %

bromophenolblue)을 넣은 후 비환원 조건에서 SDS-PAGE를 수행하여

분석하였다.

[196] 그 결과 DTT와 2-ME에 의한 단백질의 이황화 결합은 확실하게 제거되지 않아

sfGFP-C 단백질 밴드가 여러 개로 나타난 반면에, TCEP에 의해서는 이황화

결합이 확실하게 제거 되어 하나의 밴드로 나타나는 것을 확인하였다 (도 4).

[197] 따라서 TCEP로 이황화 결합을 제거한 sfGFP-C 단백질을 이용하여

말레이미드-PEG₆-당사슬과의 반응을 진행하였다.

[198]

[199] 실시예 4-3. 말레이미드-PEG₆-당사슬과 sfGFP-C 단백질의 결합

[200]

[201] 실시예 4-1을 통해서 얻어진 말레이미드-PEG₆-당사슬을 실시예 4-2.의

환원반응을 통해서 얻어진 sfGFP-C 단백질과 결합시키는 반응을 수행하였다.

여기서 말레이미드기는 sfGFP-C의 시스테인 잔기의 SH기와 결합된다. 최종

반응액 20 μ l에 1 μ g의 sfGFP-C 단백질과 말레이미드-PEG₆-당사슬을 각각 1 : 1, 2

: 1, 4 : 1, 8 : 1, 및 16 : 1의 물비로 상온에서 3 시간 동안 반응시킨 후, SDS-PAGE로 결합 여부를 확인하였다 (도 5).

[202] 그 결과, 결합 반응을 시키지 않은 sfGFP-C 대조군에 비해서 말레이미드-PEG₆-당사슬과 반응한 경우 처리한 물비에 따라서 단백질의 크기가 증가 하는 것을 확인하였고, 이로부터 당사슬이 부착된 것을 알 수 있었다.

[203]

[204] 실시예 4-4. 만노스-6-인산 당사슬에 결합하는 Dom9-3xFlag 단백질의 준비

[205]

[206] 만노스-6-인산 당사슬에 결합하는 Dom9 단백질을 C-말단에 3 개의 Flag-tag이 연결된 형태 (Dom9-3xFlag, 서열번호 19)로 *Pichia pastoris* 효모에서 발현하기 위한 코돈이 최적화된 DNA의 합성을 DNA 2.0 (Menro Park, CA, USA)에 의뢰하였으며 (서열번호 20), DNA 2.0에서 제공하는 pD912 벡터에 클로닝 되어 있는 상태 (pD912_Dom9-3xFlag)로 상기 합성 DNA를 구입하였다. 이렇게 제작된 pD912_Dom9-3xFlag 벡터를 *P. pastoris* GS115 균주에 형질전환 방법으로 도입하였다.

[207] 구체적으로, *P. pastoris* GS115 콜로니를 10 ml의 YPD (1 % yeast extract, 2 % Bacto peptone, 2 % glucose) 배지에서 하룻밤 동안 30 °C에서 배양하였다. 다음 날 이를 YPD 배지 50 ml에 OD 0.3까지 본 배양을 한 후 30 °C에서 4 내지 5 시간 배양하였다. 배양 후 5 분 동안 6,000 X g에서 원심 분리하여 세포 침전물을 얻고, 이를 40 ml의 차가운 증류수에 현탁시킨 후 다시 5 분 동안 6,000 X g에서 원심 분리하여 세포 침전물을 얻었다. 그리고 이를 20 ml의 차가운 1 M 소르비톨 (sorbitol)에서 현탁시키고 5 분 동안 6,000 X g에서 원심 분리한 후 다시 1 ml 차가운 1 M 소르비톨로 세포 침전물을 현탁시켜 100 μ l씩 1.5 ml 튜브에 담아 균주를 준비하였다.

[208] 상기 균주에 pD912_Dom9-3xFlag 플라스미드 5 μ g을 넣고 얼음에서 10 분 동안 방치한 후 전기천공 큐벳 (electroporation cuvette)으로 옮겨 전기천공법 (voltage: 1500 V, capacitance 50 uF, resistance 200 Ohms, cuvette 2 mm)으로 형질전환한 다음, 100 μ g/ml의 제오신 (zeocin)이 들어 있는 YPD 접시 (YPD-zeocin plate)에 도말하였다. 2 내지 3 일 후 콜로니가 형성되면 크기가 큰 하나의 콜로니를 선택하여 다시 YPD-zeocin 접시에 도말하여 다시 하나의 콜로니를 얻었다.

[209] 상기 콜로니를 YPD-zeocin 배지에 접종하여 30 °C에서 하룻밤 배양한 후, 이를 1.2 l의 BMMY (1 % yeast extract, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6.0), 1.34 % YNB, 0.00004 % biotin, 0.5 % MeOH) 배지에 최종 부피의 1/100이 되도록 넣은 후 30 °C에서 72 시간 동안 본 배양을 수행하였다. 본 배양 시 24 시간마다 최종 0.5 %에 해당하는 MeOH을 추가로 넣어서 유전자 발현을 유도하였다. 72 시간 후 20 분 동안 4 °C에서 6,000 X g의 조건으로 원심 분리하여 배양 상등액을 얻었고, 이를 Lab scale TFF system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) 농축기를 사용해 농축하였다. 배양한 세포 상등액 (1.2 l)을

20 ml까지 농축한 후, 200 ml의 정제 완충액 (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mM NaCl)을 넣은 후 다시 20 ml까지 농축하였다. 이렇게 농축된 시료는 상기 실시예 3-3의 Ni-NTA 컬럼을 이용한 방법으로 정제하였다.

[210]

[211] 실시예 4-5. Dom9-3xFlag 블로팅 (blotting) 분석

[212]

[213] sfGFP-C 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 제대로 결합되었는지 확인하기 위해서 만노스-6-인산에 결합하는 수용체의 도메인인 Dom9 단백질을 이용한 블로팅 (blotting) 분석을 수행하였다.

[214] 말레이미드-PEG₆-당사슬과 결합 반응을 한 sfGFP-C를 12 % SDS-PAGE를 통해서 분리하고, 이를 전기적인 방법 (80 V에서 60 분)을 이용하여 PVDF 막에 옮겼다. 상기 PVDF 막에 5 % 탈지유 (skim milk)를 함유한 TBST (20 mM Tris, 150 mM 염화나트륨, 0.5% Tween 20) 블로킹 완충액을 1 시간 동안 처리하였다. 그리고 일차로 실시예 4-4.에서와 같이 발현하고 정제하여 얻은 Flag2-Dom9 (4 mg/ml)을 1/1,000의 비율로 희석하여 2 시간 동안 처리한 후, TBST 완충액을 이용해 10 분 간격으로 3 회 세척하였다. 상기 PVDF 막에 이차로 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 항-Flag 항체 (Sigma-Aldrich)를 1 : 10,000의 비율로 1 시간 동안 처리한 후, 다시 TBST를 이용해 10 분 간격으로 3 회 세척하였다. 이후 ECL 용액 (GE Healthcare)을 이용해 만노스-6-인산 당사슬이 결합된 단백질을 검출하였다 (도 6).

[215] 그 결과, Dom9-3xFlag이 결합하는 단백질 밴드가 검출되었으나, 그 크기가 예상한 분자량 (25-30 kDa)보다 훨씬 더 큰 분자량 (150-250 kDa)에서 검출되었다. 이러한 결과는 만노스-6-인산 당사슬이 결합한 단백질들이 주로 응집 (aggregation)되어 나타나는 것으로 추정된다.

[216]

[217] 실시예 4-6. Isoelectric focusing (IEF) 분석

[218]

[219] 상기 실시예 4-3. 반응을 통해서 준비된 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 결합되어 있는지를 확인하기 위해 등전점 (pI)에 따라서 단백질을 분리하는 전기영동 기법인 IEF 분석을 수행하였다. IEF 겔은 Novex® pH 3-10 IEF 겔 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)을 사용하였다. 이 방법은 단백질의 고유 pI에 따라 단백질을 분리할 수 있기 때문에 음전하를 띤 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 단백질은 부착되지 않은 단백질보다 낮은 pI 값으로 이동한다.

[220] 상기 실시예 4-3.을 통해 반응이 끝난 각각의 시료 10 μl 를 2X IEF 표본 완충액 (Invitrogen) 10 μl 와 1 : 1로 섞어 준비 하였다. 그 다음 IEF 겔을 챔버 (chamber)에 넣고 챔버 안쪽에는 cathode Buffer, 바깥쪽에는 anode Buffer (Invitrogen)로 채운 후 100 V에서 1 시간, 200 V에서 1 시간, 500 V에서 30 분간 분리 하였다. 분리가 끝난 겔은 고정 완충액 (12 % trichloroacetic acid)에 30 분 동안 처리한 후

중류수로 두 번 세척하였다. 그 다음 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA)로 염색한 후 탈색 완충액 (destaining buffer, 10 % EtOH, 7.5 % acetic acid)으로 세척하고 결과를 확인하였다.

[221] 그 결과 sfGFP-C 단백질은 pI 값이 약 6 정도로 나타났으며, NHS-PEG₆-Maleimide를 통해 당사슬과 결합된 단백질의 경우 pI 값이 5 이하로 낮아져서 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

[222]

[223]

[224] 실시예 5. 두 개의 가교제 (DBCO-PEG₄-NHS와 NHS-PEG₄-Azide)의 커플링 (coupling) 반응을 이용한 만노스-6-인산 당사슬의 단백질 부착

[225]

[226] 만노스-6-인산 당사슬을 단백질에 부착하기 위한 다른 방법으로 DBCO와 아자이드가 결합되는 copper-free click chemistry를 이용하였다 (도 1C와 1D). 즉, 아스파라진-당사슬에 DBCO-PEG₄-NHS (Click Chemistry Tools, San Diego, CA, USA)를 결합시키고, 목적 단백질은 NHS-PEG₄-Azide (Pierce, Rockford, IL, USA)를 결합시킨 후에, 이 둘을 반응시켜서 다수의 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 목적 단백질을 얻을 수 있다.

[227]

[228] 실시예 5-1. DBCO-PEG₄-NHS와 아스파라진-당사슬의 반응

[229]

[230] NHS가 아민기와 결합하는 반응을 이용해서 DBCO-PEG₄-NHS를 실시예 2에서 얻은 아스파라진-당사슬에 반응시켜 DBCO-PEG₄-당사슬을 제작하였다.

[231] 먼저 DBCO-PEG₄-NHS를 DMSO에 녹여 200 mM이 되도록 준비하였다. 4 mM의 아스파라진-당사슬 용액 100 μ l에 30 μ l의 200 mM DBCO-PEG₄-NHS와 20 μ l의 결합 완충액 (PBS, pH7.2)을 넣어서 만든 최종 반응액 150 μ l를 상온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 DBCO-PEG₄-NHS는 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 결합 완충액에서 투석으로 제거하였다.

[232]

[233] 실시예 5-2. NHS-PEG₄-Azide와 sfGFP-C 단백질의 반응

[234]

[235] NHS-PEG₄-Azide를 sfGFP-C 단백질에 반응시켜서 다수의 Azide-PEG₄가 라이신과 알지닌 잔기의 아민기에 연결된 Azide-PEG₄-sfGFP-C를 제작하였다.

[236] 먼저 NHS-PEG₄-Azide를 DMSO에 녹여 500 mM 되게 준비하였다. sfGFP-C (5 μ g/ μ l) 단백질 10 μ l에 4 μ l의 500 mM NHS-PEG₄-Azide와 86 μ l의 결합 완충액 (PBS pH 7.2)을 넣어서 만든 최종 반응액 100 μ l를 상온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 NHS-PEG₄-Azide는 12,400 Da의 분자량 컷 오프를 가지는 투석 멤브레인 (Sigma-Aldrich)을 이용하여 결합

완충액에서 투석으로 제거하였다.

[237]

[238] 실시예 5-3. DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₄-sfGFP-C의 결합

[239]

[240] 상기 실시예 5-1.과 5-2.에서 각각 제작한 DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₄-sfGFP-C를 DBCO와 아자이드의 결합 반응을 통해서 결합시켰다. 최종 반응액 20 μ l에 3 μ g의 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 넣고, DBCO-PEG₄-당사슬을 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 또는 8 : 1의 몰비로 37 °C에서 4 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 당사슬과 sfGFP-C의 결합은 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 8).

[241] 결합 반응을 하지 않은 Azide-PEG₄-sfGFP-C 대조군의 분자량 크기 (25-37 kDa)와 비교하였을 때, DBCO-PEG₄-당사슬과 반응한 단백질들은 크기가 50 kDa 이상으로 크게 증가하여서 다수의 당사슬들이 부착된 것을 확인할 수 있었다.

[242]

[243] 실시예 5-4. Dom9-3xFlag 블로팅 분석

[244]

[245] Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 제대로 결합되었는지를 확인하기 위해서 실시예 4-5.에서와 같은 방법으로 Dom9-3xFlag 단백질을 이용한 블로팅 분석을 수행하였다 (도 9).

[246] 분석 결과 결합 반응을 하지 않은 Azide-PEG₄-sfGFP-C 단백질에서는 밴드가 검출되지 않은 반면, DBCO-PEG₄-당사슬과 결합한 단백질들에서는 모두 밴드가 검출되어 만노스-6-인산 당사슬이 결합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 각각 두 개의 밴드가 검출 되었으며, 작은 크기의 밴드는 SDS-PAGE 분석에서 관찰되었던 50-70 kDa의 밴드로 추정되며, 큰 크기 (120-200 kDa)의 밴드가 추가로 관찰되었다.

[247]

[248] 실시예 5-5. Isoelectric focusing (IEF) 분석

[249]

[250] 상기 실시예 5-3. 반응을 통해서 준비된 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 결합되어 있는지를 확인하기 위해 등전점 (pI)에 따라서 단백질을 분리하는 전기영동 기법인 IEF 분석을 실시예 4-6.과 같은 방법으로 수행하였다.

[251] 그 결과 Azide-PEG₄-sfGFP-C 대조군의 경우 5 정도의 pI 값을 보인 반면, DBCO-PEG₄-당사슬과 결합한 단백질의 경우에는 pI 값이 4 이하로 낮아져서 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 것을 확인할 수 있었다 (도 10).

[252]

[253]

[254] 실시예 6. 당사슬 분석을 통한 효모의 세포벽 단백질 유래 당사슬 부착 확인

[255]

[256] DBCO와 아자이드의 결합을 이용하여 당사슬이 부착된 sfGFP-C로부터

당사슬을 유리하고 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량 분석기 (mass spectrometry)로 분석하여 만노스-6-인산 당사슬이 제대로 부착된 것을 확인하였다.

[257]

[258] 실시예 6-1. 당사슬의 분리 및 정제

[259]

[260] 실시예 5-3.에서 제작된 단백질을로부터 PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법을 따라 *N*-당사슬을 유리하였다. 유리된 당사슬은 실시예 2-2.에서와 같이 탄소 컬럼을 이용하여 정제한 후 건조 하였다.

[261]

[262] 실시예 6-2. 당사슬의 형광 표지

[263]

[264] 질량 분석의 민감도를 높이기 위해서 상기 실시예 6-1.에서 정제한 당사슬에 AA (2-aminobenzoic acid)로 형광을 표지 하였다.

[265] 구체적으로, DMSO 350 μ l에 아세트산 (acetic acid) 150 μ l를 섞은 용액으로부터 100 μ l를 취해서 6 mg의 AA가 들어있는 1.5 ml 튜브에 넣어 용해시켰다. 이 용액 중 100 μ l를 취해서 6 mg의 NaCNBH₂ (sodium cyanoborohydride)가 들어있는 튜브에 넣고 65 °C에서 약 1 내지 2분 가량 반응하여 형광 표지 용액을 만들었다. 이 형광 표지 용액 5 μ l를 건조된 당사슬 시료에 넣고 37 °C에서 16 시간 반응시켰고 시아노 SPE 컬럼 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 정제하였다.

[266]

[267] 실시예 6-3. MALDI-TOF 질량 분석기를 이용한 당사슬 분석

[268]

[269] 실시예 6-1.에서 준비된 AA로 표지된 당사슬의 질량을 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석하였다.

[270] 먼저, 5 mg/ml의 DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)와 ATT (6-Aza-2-thiothymine)를 0.075 % TFA가 포함된 25 % ACN으로 녹여서 매트릭스 용액을 준비하였다. 분석할 당사슬 0.5 μ l를 분석용 타겟 MSP 96 연마 스틸 칩 (polished steel chip)에 올린 후 준비된 매트릭스 용액 0.5 μ l를 올려 건조시킨 후 상기 칩을 MALDI-TOF 질량 분석기로 negative mode에서 분석하였다 (도 11A).

[271] 분석 결과 만노스-6-인산이 하나 또는 두 개가 부착된 당사슬 구조(P-Man_{5,6} GlcNAc₂, P₂-Man₆GlcNAc₂)들과 함께 고만노스형 (high-mannose type) 당사슬 (Man_{5,6}GlcNAc₂)들을 관찰 할 수 있었다. 이로부터 DBCO와 아자이드의 결합 반응을 통해서 효모의 세포벽 단백질 유래 당사슬들을 sfGFP-C 단백질에 성공적으로 부착하였음을 알 수 있었다.

[272]

[273]

[274] 실시예 7. 이산화티타늄 정제를 통한 만노스-6-인산 당사슬의 분리

[275]

[276] 세포 내 라이소솜으로 목적 단백질을 효과적으로 도입시키기 위해서는 만노스-6-인산 당사슬만을 선택적으로 분리하는 것이 바람직하다. 실시예 6.을 통하여 효모의 세포벽 단백질 유래 당사슬을 분석하였을 때 만노스-6-인산 당사슬과 함께 고만노스형 당사슬이 같이 검출되어 만노스-6-인산 당사슬만을 선택적으로 얻기 위해서 이산화티타늄 (TiO_2)을 이용한 분리 정제 과정을 도입하였다.

[277]

[278] 실시예 7-1. 당사슬의 분리 및 정제

[279]

[280] 실시예 2를 통하여 얻은 당사슬은 만노스-6-인산 당사슬 뿐만 아니라 인산기를 갖지 않는 고만노스형 당사슬도 존재하므로 여기에 이산화티타늄을 이용한 정제 과정을 도입하였다.

[281]

이를 간략히 기술하면, 실시예 2-1., 2-2.와 2-3.을 통해서 캡 제거 및 a-1,2-만노시다제 처리 과정을 거친 당사슬을 건조해 놓는다. 그리고 50 mg TiO_2 비드 (GL Sciences, Tokyo, Japan)를 100 μl ACN으로 녹이고, 이 중 50 μl 를 상기의 건조된 당사슬에 넣고 1 ml 로딩 버퍼 (1 M glycolic acid, 80% ACN, 5% TFA) 를 첨가하여 상온에서 30 분 동안 반응하였다. 그 후 1000 X g, 1 분 조건으로 원심 분리하여 침전된 비드를 얻고 나머지 상층액을 다시 한번 새 TiO_2 bead에 결합시켰다. 이렇게 당사슬이 부착된 비드를 100 μl 세척용액 1 (80% ACN, 1% TFA)로 1분간 반응하여 세척하고, 1000 X g, 1 분 조건으로 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 추가로 세척용액 2 (20% ACN, 0.1% TFA) 100 μl 를 넣고 1 분간 반응하여 세척한 후 같은 조건으로 원심 분리하여 침전된 비드를 얻었고 여기에 암모니아수 200 μl 를 넣고 20 분 상온에서 반응한 후 원심 분리하여 만노스-6-인산이 부가된 당사슬들만을 분리 정제 하였다.

[282]

[283] 실시예 7-2. MALDI-TOF 질량 분석기를 이용한 당사슬 분석

[284]

[285] 실시예 7-1의 이산화티타늄을 이용하여 만노스-6-인산 당사슬들이 제대로 분리 정제되었는지 확인하기 위해 실시예 6과 같은 방법으로 PNGase F 를 이용하여 N-당사슬을 유리하고 AA로 표지 한 후, MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 분석하였다 (도 11B). 그 결과 고만노스형 당사슬들은 제거되고, 만노스-6-인산 당사슬들만이 분리 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 만노스-6-인산의 구조의 인산이 실제 존재하는지 확인하기 위해 알칼리성 인산가수 분해효소 (AP)를 처리하여 확인한 결과 인산이 제거된 당사슬 구조를 관찰 할 수 있었다 (도 11C). 이러한 실험을 통하여 이산화티타늄을 이용하게 되면 만노스-6-인산 당사슬만을

선택적으로 분리 정제 할 수 있는 것을 확인하였다.

[286]

[287]

[288] 실시예 8. 만노스-6-인산 당사슬을 당단백질의 당사슬 부위에 결합

[289]

[290] 만노스-6-인산 당사슬을 당단백질의 당사슬 부위에 부착 하기 위해서 페리오데이트 (periodate) 산화 반응을 이용하여 목적 당단백질의 당사슬 부위에 알데하이드 기를 도입하고, 여기에 Aminooxy-PEG₃-Azide (Baseclick)을 반응 시킨 후, 이를 실시예 5에서 제작한 DBCO 반응기를 가진 당사슬 (DBCO-PEG₄-당사슬)과 copper-free click chemistry로 반응시켜서 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 목적 단백질을 얻을 수 있다 (도 1E).

[291]

[292] 실시예 8-1. 페리오데이트 산화 (Periodate oxidation) 반응을 이용한 당단백질의 당사슬에 알데하이드 기 도입

[293]

[294] 모델 당단백질로는 페투인 (fetuin)과 RNase B를 사용하였으며 페리오데이트 산화 반응을 통해서 부착되어 있는 당사슬을 반응성이 높은 알데하이드 기를 갖는 형태로 전환시켜서 가교제가 결합하기 용이하게 만들어 주었다. 페투인의 경우에는 시알산을 갖는 복합형 당사슬이 부착되어 있어서 낮은 농도 (1 mM)의 페리오데이트로 산화가 가능했으나 RNaseB의 경우에는 고만노즈형 당사슬이 부착되어 있어서 높은 농도 (10 mM)의 페리오데이트를 사용해야 했다.

[295] 페투인의 경우 5 mg을 0.1 M 소듐 아세테이트 (sodium acetate, pH 5.5) 완충액 950 μ l에 준비한 후에 20 mM 소듐 페리오데이트 (sodium periodate, Sigma-Aldrich) 용액 50 μ l를 더해서 최종 1 mM 페리오데이트 농도가 되게 한 후 빛을 차단하고 상온에서 30 분 동안 산화 반응을 진행하였다. RNaseB 단백질의 경우 5 mg을 0.1 M 소듐 아세테이트 (pH 5.5) 완충액 500 μ l에 준비 한 후에 20 mM 소듐 페리오데이트 (Sigma-Aldrich)를 500 μ l를 더해서 최종 10 mM 페리오데이트 농도가 되게 한 후 마찬가지로 빛을 차단하고 상온에서 30 분 동안 산화 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 후 반응하지 못하고 남아 있는 소듐 페리오데이트는 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 0.1 M 포타슘 아세테이트 (potassium acetate, pH 5.0) 완충액에서 투석하여 제거하였다.

[296]

[297] 실시예 8-2. Aminooxy-PEG₃-Azide를 당단백질의 당사슬에 결합시키는 반응

[298]

[299] 실시예 8-1에서 페리오데이트 산화 반응을 통해 얻은 알데하이드 기를 갖는 당사슬이 부착되어 있는 페투인과 RNase B 단백질에 Aminooxy-PEG₃-Azide를 반응시켜서 원하는 숫자의 아자이드 반응기가 목적 당단백질에 결합된

Azide-PEG₃-Fetuin 및 Azide-PEG₃-RNase B를 제작하였다.

[300] 먼저 Aminooxy-PEG₃-Azide (Baseclick)를 DMSO에 100 mM의 농도가 되도록 녹여서 용액을 준비하였다. 실시예 8-1에서 제작된 알데하이드 기가 도입된 100 mM의 페투인 996 μ l에 4 μ l의 100 mM Aminooxy-PEG₃-Azide를 넣은 1 ml의 용액 (물비, 1 : 5)을 37 °C에서 12 시간 반응시켰다. 마찬가지로, 알데하이드 기가 도입된 330 mM의 RNase B 단백질 987 μ l에 13 μ l의 100 mM Aminooxy-PEG₃-Azide를 넣어서 만든 1 ml의 용액 (물비, 1 : 5)을 37 °C에서 12 시간 반응시켰다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 Aminooxy-PEG₃-Azide는 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 결합 완충액 (PBS)에서 투석으로 제거하여 Azide-PEG₃-Fetuin 및 Azide-PEG₃-RNase B를 제작하였다.

[301]

[302] 실시예 8-3. DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-당단백질의 결합

[303]

[304] 실시예 5-1에서 제작된 DBCO-PEG₄-당사슬을 실시예 8-2에서 제작한 Azide-PEG₃-Fetuin 및 Azide-PEG₃-RNase B에 DBCO와 아자이드의 copper-free click chemistry 반응을 통해서 결합시켰다.

[305] 반응액 20 μ l에 60 μ M의 Azide-PEG₃-Fetuin과 200 μ M의 Azide-PEG₃-RNase B를 준비하였다. 그리고 각각의 단백질에 대해서 DBCO-PEG₄-당사슬을 1 : 1 및 4 : 1의 물 비로 넣어서 37 °C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 만노스-6-인산 당사슬이 결합 되어서 분자량이 증가한 페투인과 RNase B는 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 12). 페투인의 경우 만노스-6-인산 당사슬이 결합되지 않은 Azide-PEG₃-Fetuin 대조군에 비해서 DBCO-PEG₄-당사슬과 반응한 페투인 단백질의 크기가 증가하는 것을 통해서 당사슬이 부착된 것을 확인할 수 있었다 (도 12A). RNase B의 경우 결합 반응을 하지 않은 Azide-PEG₃-RNase B 대조군 분자량 크기 (16 kDa)와 비교하였을 때 DBCO-PEG₄-당사슬과 반응한 RNase B 단백질의 크기가 75 kDa 이상으로 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (도 12B).

[306]

[307] 실시예 8-4. Dom9-3xFlag 블로팅을 이용한 만노스-6-인산 당사슬 결합 분석

[308]

[309] 실시예 8-3의 결합 반응을 통해 당단백질인 페투인과 RNase B에 만노스-6-인산 당사슬이 제대로 결합 되었는지를 확인하기 위해서 실시예 4-5와 동일한 방법으로 Dom9-3xFlag 단백질을 이용한 블로팅 분석을 수행하였다 (도 13).

[310] 분석 결과 페투인의 경우, 결합 반응을 하지 않은 Azide-PEG₃-fetuin에서는 Dom9-3xFlag 분석에서 밴드가 검출되지 않은 반면, DBCO-PEG₄-당사슬과 1 : 1 및 4 : 1의 물 비로 반응한 페투인들에서는 모두 원래의 크기보다 조금 증가한 위치에서 밴드가 관찰되었다 (도 13A).

- [311] 또한, RNaseB의 경우, 결합 반응을 하지 않은 대조군에서는 밴드가 관찰되지 않은 반면, DBCO-PEG₄-당사슬과 결합 반응을 한 단백질들에서는 모두 밴드가 검출되었다 (도 13B).
- [312] 이러한 결과들은 페투인과 RNAase B에 효과적으로 만노스-6-인산 당사슬이 부착되었음을 확인해준다.
- [313]
- [314] 실시예 8-5. 만노스-6-인산 당사슬이 결합된 당단백질의 라이소솜 타겟팅
- [315]
- [316] 실시예 8-3을 통해서 제작된 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 페투인과 RNase B 단백질들이 세포 내 라이소솜으로 효과적으로 타겟팅 되는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- [317] 상기 실시예 8-3에서 DBCO-PEG₄-당사슬과 1 : 1 및 4 : 1의 몰 비로 반응하여 제작된 만노스-6-인산 당사슬이 부착된 페투인을 Alexa Fluor 488 carboxylic acid succinimidyl ester (Thermoscientipic, Waltham, MA USA)를 사용하여 형광을 표시하였다. 먼저 Alexa Fluor 488 carboxylic acid succinimidyl ester 형광물질을 DMSO에 녹여 7.7 mM의 저장용액 (stock solution)을 준비하였다. 최종 50 mM이 되도록 준비한 페투인 400 μ l 용액에 1 M 소듐 바이카보네이트 (sodium bicarbonate, pH 9.0) 용액 50 μ l를 넣고, 여기에 미리 준비했던 7.7 mM Alexa Fluor 488 carboxylic acid succinimidyl ester 20 μ l를 넣어서 상온에서 1 시간 동안 반응하였다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 Alexa Fluor 488 carboxylic acid succinimidyl ester는 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 결합 완충액 (PBS)에서 투석으로 제거하였다.
- [318] 상기의 과정을 통해서 준비한 페투인 4 mg을 1 x 10⁴ 개의 Fabry fibroblast 세포 (Coriell Institute, Camden, NJ, USA)에 처리한 후 37 °C CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 방치하였다. 반응 후 세포를 완충액 (PBS)으로 3 번 세척한 후 lysotracker deep red (Thermoscientipic, Waltham, MA USA)를 최종농도 50-70 pM로 세포에 처리하여 37 °C CO₂ 인큐베이터에서 1시간 반응 시켜 라이소솜을 염색하였다. 그 후 세포를 완충액 (PBS)으로 3번 세척한 후 2 % 파라포름알데히드 (paraformaldehyde, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 상온에서 20분 동안 반응 시켜 고정시킨 후 마찬가지로 완충액 (PBS)으로 3 번 세척하고 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Thermoscientipic, Waltham, MA USA)를 완충액 (PBS)에 1/300으로 희석하여 세포에 처리한 후 상온에서 15 분 반응 시켰다. 마지막으로 완충액 (PBS)으로 3 번 세척한 후 컨포칼 형광 현미경을 이용하여 형광 이미지를 관찰 하였다 (도 14). 그 결과 DBCO-PEG₄-당사슬을 1 : 1, 4 : 1 몰비로 결합 반응한 페투인들 모두 세포 내 라이소솜으로 타겟팅 되는 것을 확인할 수 있었다.
- [319]
- [320]

- [321] 실시예 9. 산화 효소를 이용한 RNase B의 당사슬 산화를 이용한 만노스-6-인산 당사슬의 결합 반응
- [322]
- [323] 상기 실시예 8에서는 페리오데이트 산화 반응을 이용해서 당단백질의 당사슬에 알데하이드 기를 도입하고 여기에 가교제를 반응시켜서 만노스-6-인산 당사슬과의 결합 반응을 유도하였다. 당사슬에 시알산이 있는 경우에는 낮은 농도 (1 mM)의 페리오데이트를 처리해도 산화 반응을 유도할 수 있으나 시알산이 부가되지 않은 당사슬들의 경우에는 고농도의 페리오데이트 처리가 필요하여 당사슬에 다수의 산화 반응이 일어날 뿐만 아니라 단백질의 Met 잔기들이 산화될 우려가 있다. 본 실시예에서도 RNase B 단백질에 고농도 (10 mM)의 페리오데이트를 처리한 경우 크기가 크게 증가한 것을 관찰하였다 (도 12B와 13B). 따라서 보다 선택적으로 당사슬을 산화시키기 위해서 선행 논문 (Rannes et al, 2011, *J Am Chem Soc*)에 보고된 당사슬 내 만노스 잔기를 산화시킬 수 있는 갈락토스 옥시데이즈 효소 (Galactose oxidase mutant H1, GOase H1)를 이용하여 알데하이드 기를 도입하는 실험을 수행하였다.
- [324]
- [325] 실시예 9-1. GOase H1 효소의 재조합 발현 및 정제
- [326]
- [327] GOase H1 발현 벡터를 제작하기 위해서 선행 논문에 보고된 아미노산 서열의 단백질을 발현하는 유전자를 ThermoFisher scientific (Waltham, MA USA)의 유전자 합성 서비스를 이용하여 합성하였다. 이렇게 합성된 GOase H1을 발현하는 유전자는 서열번호 21과 22의 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)으로 증폭하였다.
- [328]
- [329] GOase H1_EcoRI_F: 5' - GCGAATTCGCAAGCGCACCGATTGGTAGCGC - 3' (서열번호 21)
- [330] GOase H1_HidIII_R: 5' - CGAAGCTTCTGGGTAACACGAATGGTGCTTGC - 3' (서열번호 22)
- [331]
- [332] 증폭한 DNA는 *EcoRI*과 *HindIII* 제한효소로 절단하고, 통상의 유전자 재조합 방법을 이용하여 pColdTF 벡터에 클로닝하여, pColdTF-GOase H1 벡터를 제작하였다. pColdTF-GOase H1 벡터를 발현용 대장균 BL21 (DE3) 균주에 형질전환으로 도입하여 실시예 3-2와 동일한 방법으로 단백질을 발현한 후 마찬가지로 실시예 3-3 과 같은 방법으로 정제 하였다. 정제 후 상기 각 단계에서 용출된 분획을 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 16).
- [333]
- [334] 실시예 9-2. RNase B의 oxidation 및 Aminoxy-PEG₃-Azide의 결합
- [335]

- [336] 실시예 10-1을 통해 정제한 GOase H1을 이용하여 RNase B 단백질의 oxidation 반응을 수행하였다. 먼저, 5 mg의 RNase B 단백질이 들어 있는 용액에 10 mg/ml 농도의 GOase H1 100 μ l와 0.3 mg/ml 농도의 catalase (Sigma-Aldrich) 4 μ l를 넣어서 최종 반응액의 부피를 1,000 μ l를 맞추고 30 °C에서 22 시간 동안 반응시켰다.
- [337] 상기의 GOase H1 반응을 통해서 얻은 산화된 RNase B 단백질에 Aminooxy-PEG₃-Azide를 반응시켜서 Azide-PEG₃가 부가된 Azide-PEG₃-RNase B를 제작하였다. 이를 위하여 산화된 RNase B 단백질 985 μ l에 100 mM의 Aminooxy-PEG₃-Azide 13 μ l를 넣고 37 °C에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 결합 완충액 (PBS)에서 투석으로 반응하지 못하고 남아 있는 Aminooxy-PEG₃-Azide를 제거하였다.
- [338]
- [339] 실시예 9-3. DBCO-PEG₄-당사슬과 Azide-PEG₃-RNase B의 결합
- [340]
- [341] 상기 실시예들을 통해서 제작한 Azide-PEG₃-RNase B와 DBCO-PEG₄-당사슬을 azide와 DBCO의 copper-free click chemistry 반응을 통해서 결합시켰다. 3 μ g의 Azide-PEG₃-RNase B (200 μ M) 와 DBCO-PEG₄-당사슬을 1 : 1, 4 : 1의 몰비로 최종 반응액 20 μ l 로 37 °C에서 4 시간 반응시켰다. 반응 후 당사슬 결합에 의한 RNase B의 크기 변화는 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 16A). 결합 반응을 하지 않은 Azide-PEG₃-RNase B 와 비교한 결과 DBCO-PEG₄-당사슬과 반응한 단백질들은 크기가 약간 증가한 위치에서 단백질 밴드가 검출 되는 것으로부터 당사슬이 부착된 것을 확인할 수 있었다. 또한 RNase B 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 제대로 결합 되었는지를 실시예 4-5 에서와 같은 Dom9-3xFlag 단백질을 이용한 블로팅 방법으로 확인하였다 (도 16B). 분석 결과 반응을 하지 않은 Azide-PEG₃-RNase B 단백질에서는 밴드가 검출 되지 않은 반면에 DBCO-PEG₄-당사슬과 결합 반응을 한 단백질들의 경우 밴드가 검출되어 만노스-6-인산 당사슬이 결합되어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [342]
- [343]
- [344] 실시예 10. 아스파라진이 없는 만노스-6-인산 당사슬을 단백질에 결합
- [345]
- [346] 본 실시예에서는 효모의 세포벽 만노단백질로부터 얻은 아스파라진이 없는 상태의 만노스-6-인산 당사슬을 두 개의 가교제 (Aminooxy-PEG₃-Azide와 DBCO-PEG₄-NHS)를 이용하여 목적 단백질을 결합시켰다 (도 17의 개념도 참조).
- [347]
- [348] 실시예 10-1. PNGase 효소를 이용한 만노스-6-인산 당사슬의 정제
- [349]

- [350] 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 준비된 세포벽 만노단백질 10 mg에 PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 제조사에서 제공하는 방법을 따라서 처리하고 반응하여 N-당사슬을 유리하였다. 이렇게 유래된 당사슬은 탄소 컬럼을 이용해서 실시예 2-2와 동일한 방법으로 정제하였다. 정제 후 진공 건조한 당사슬은 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man-P-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 및 $(\text{Man-P})_2\text{-Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 의 구조를 갖는 것을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 확인할 수 있었다. 따라서 실시예 2-3과 동일한 방법으로 약산 가수분해와 α -1,2-만노시다제 처리를 차례로 수행하여 만노스-6-인산 당사슬을 형성하였으며, 실시예 7의 방법을 이용하여 이들을 정제하였다.
- [351]
- [352] 실시예 10-2. 만노스-6-인산 당사슬과 Aminooxy-PEG₃-Azide 의 반응
- [353]
- [354] 상기 실시예 10-1을 통하여 준비한 만노스-6-인산 당사슬의 환원 말단에 형성되는 알데하이드 기와 반응할 수 있는 Aminooxy-PEG₃-Azide를 이용하여 Azide-PEG₃-당사슬을 제작하였다.
- [355] 먼저, 실시예 10-1의 방법을 통해서 준비한 당사슬과 Aminooxy-PEG₃-Azide를 0.1 M 포타슘 아세테이트 (potassium acetate, pH 5.0) 완충액으로 되어 있는 최종 반응액 150 μl 에 각각 최종 농도 1.3 mM과 6.5 mM의 농도 (당사슬과 Aminooxy-PEG₃-Azide의 몰비 1 : 5)가 되게 하여 37 °C에서 12 시간 반응시켰다. 반응 후 반응하지 못하고 남아 있는 Aminooxy-PEG₃-Azide는 1,000 Da의 분자량 컷 오프 (cut off)를 가지는 투석 멤브레인 (Septra Por7)을 이용하여 PBS 완충액에서 투석으로 제거하였다.
- [356]
- [357] 실시예 10-3. sfGFP-C 단백질과 DBCO-PEG₄-NHS 와의 반응
- [358]
- [359] 실시예 3을 통해서 준비한 sfGFP-C 단백질에 DBCO-PEG₄-NHS를 반응시켜 DBCO-PEG₄ 그룹이 sfGFP-C 단백질의 라이신과 알지닌 잔기의 아민기에 결합된 DBCO-PEG₄-sfGFP-C를 제작하였다.
- [360] sfGFP-C (40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 단백질 10 μl 에 4 μl 의 20 mM DBCO-PEG₄-NHS을 넣고 결합 완충액 (PBS, pH7.2)을 86 μl 넣어 최종 반응액을 100 μl 로 맞추어 상온에서 3 시간 반응시켰다 (sfGFP-C와 DBCO-PEG₄-NHS의 몰비 1 : 5). 반응 후, 반응하지 못하고 남아 있는 DBCO-PEG₄-NHS 는 12,400 Da의 분자량 컷 오프를 가지는 투석 멤브레인 (Sigma-Aldrich)을 이용하여 PBS 완충액에서 투석으로 제거하였다.
- [361]
- [362] 실시예 10-4. Azide-PEG₃-당사슬과 DBCO-PEG₄-sfGFP-C의 결합
- [363]
- [364] 실시예 10-2에서 제작한 Azide-PEG₃-당사슬과 실시예 10-3에서 제작한

DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질을 DBCO와 아자이드의 click chemistry 결합 반응을 통해서 결합시켰다.

- [365] 최종 반응액 20 μ l 에 120 μ M의 DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질에 Azide-PEG₃-당사슬을 1 : 1, 1 : 4의 몰비로 넣어서 37 °C에서 4 시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 당사슬이 결합하여 분자량이 증가한 sfGFP-C의 결합은 SDS-PAGE로 분석하였다 (도 18A). 분석 결과, 결합 반응을 하지 않은 대조군 DBCO-PEG₄-sfGFP-C 단백질 크기 (25-37 kDa)와 비교하였을 때, Azide-PEG₃-당사슬과 반응한 단백질들은 75 kDa 이상으로 크게 증가한 것을 확인하였고 이를 통해 다수의 당사슬들이 sfGFP-C 단백질에 부착된 것을 확인할 수 있었다.

[366]

- [367] 실시예 10-5. Dom9-3xFlag 블로팅을 이용한 만노스-6-인산 당사슬의 결합 확인

[368]

- [369] 실시예 10-4의 결합 반응을 통해 만노스-6-인산 당사슬이 sfGFP-C 단백질에 제대로 결합 되었는지를 실시예 4-5와 동일한 방법으로 Dom9-3xFlag 블로팅 분석을 통해 확인하였다 (도 18B).

- [370] 분석 결과, 결합 반응을 하지 않은 DBCO-PEG₄-sfGFP-C에서는 Dom9-3xFlag 블로팅 분석에서 밴드가 검출되지 않은 반면, 만노스-6-인산 당사슬과 1 : 1, 4 : 1의 몰비로 결합 반응한 sfGFP-C 단백질에서는 모두 밴드가 검출 되었다. SDS-PAGE 분석 결과와 마찬가지로 작은 크기의 밴드 (37 kDa)와 큰 크기의 밴드 (150 kDa)가 관찰 되었다. 따라서 이러한 결과들은 sfGFP-C 단백질에 만노스-6-인산 당사슬이 효과적으로 부착 되었음을 보여주고 있다.

[371]

- [372] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[373]

[374]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

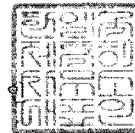
국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 오두병
대한민국 대전 유성구 과학로 125, 한국생명공학연구원
우편번호 305-806

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> och1Δmnn1Δ/YEp352-YIMpo1	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC 12674BP
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☒ [X] 과학적 성질의 설명 ☐ [] 제안된 분류학상의 위치 (적용시 X 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2014년 9월 4일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구원 생물자원센터 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원 우편번호 305-806	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 박두상 서명일: 2014. 09. 11.

 상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2015 년 06 월 02 일
 변리사 손 민



청구범위

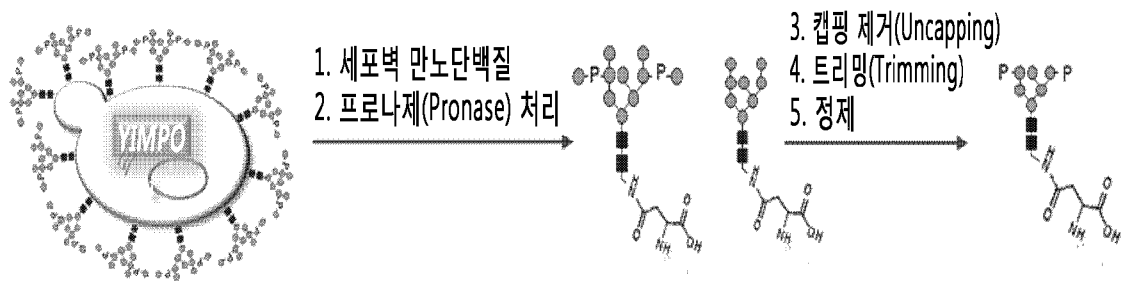
- [청구항 1] (a) 효모로부터 분리된 세포벽 만노단백질로부터 만노스-6-인산 당사슬을 수득하는 단계; 및
(b) 가교제 (crosslinker)를 사용하여 상기 만노스-6-인산 당사슬과 목적 단백질을 결합시키는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬이 부가된 당단백질의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는, 분리된 세포벽 만노단백질에 프로나제 (pronase)를 처리하여 아스파라진이 말단에 위치한 당사슬을 분리하는 단계를 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는, 분리된 세포벽 만노단백질에 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하여 당사슬을 분리하는 단계를 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 4] 제2항 또는 제3항에 있어서, 분리된 당사슬에서 바깥쪽 만노스를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정은 약산 가수분해 또는 캡핑 제거 (uncapping) 효소를 이용하는 것인, 제조방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 만노시다제를 상기 당사슬에 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계는 만노스-6-인산 당사슬을 선택적으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 분리는 이산화티타늄 (TiO₂)을 이용하여 수행되는 것인, 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 가교제 (crosslinker)는 이의 한쪽 말단에 아스파라진기 또는 알데하이드기와 연결될 수 있는 반응기를 가지는 것인, 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 가교제는 한쪽 말단에 엔하이드록시석신이미드 (NHS, N-hydroxysuccinimide), 옥시아민 (oxyamine), 아이소티오시아네이트 (isothiocyanate), 아이소시아네이트 (isocyanate), 설포닐클로라이드 (sulfonyl chloride), 알데히드 (aldehyde), 카보디이미드 (carbodiimide), 아실아자이드 (acyl azide), 언하이드라이드 (anhydride), 플루오로벤젠 (fluorobenzene), 카보네이트 (carbonate), 이미도에스터 (imidoester), 에폭사이드 (epoxide) 및 플루오로페닐에스터 (fluorophenyl ester)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 가교제는 다른 한쪽 말단에 말레이미드 (maleimide), DBCO (Dibenzocyclooctyne), DTME (Dithio-bis-maleimidoethane), BM(PEG)2(1,8-Bis-maleimidodiethyleneglycol), 비닐설포 (vinylsulfone),

- 아자이드 (azide), 이오도아세틸 니트로페닐아자이드 (iodoacetyl nitrophenylazide), 아이소시아네이트 (isocyanate), 피리딜다이설파이드 (pyridyldisulfide), 하이드라자이드 (hydrazide) 및 하이드록시페닐 아자이드 (hydroxyphenyl azide)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 12] 제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 가교제는 PEG (polyethylene glycol), 플루로닉 (pluronic), 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone) 및 폴리옥사졸린 (polyoxazolin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 비이온성 친수성 고분자; 또는 폴리-L-락트산 (poly-L-lactic acid), 폴리-글리콜산 (poly-glycolic acid), 폴리-D-락트산-co-글리콜산 (poly-D-lactic-co-glycolic acid), 폴리-L-락트산-co-글리콜산 (poly-L-lactic-co-glycolic acid), 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산 (poly-D,L-lactic-co-glycolic acid), 폴리-카프로락톤 (polycaprolactone), 폴리-발레로락톤 (polyvalerolactone), 폴리-하이드록시 부티레이트 (polyhydroxybutyrate) 및 폴리-하이드록시 발러레이트 (polyhydroxyvalerate)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생분해성 폴리에스테르계 고분자;를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 가교제는 각 말단에 NHS 및 말레이미드기를 가지는 PEG 중합체, 각 말단에 DBCO 및 NHS기를 가지는 PEG 중합체, 각 말단에 NHS 및 아자이드 (azide)기를 가지는 PEG 중합체, 또는 각 말단에 옥시아민 (oxyamine) 및 아자이드 (azide)기를 가지는 PEG 중합체인, 제조방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 목적 단백질은 병원체 단백질 (pathogen protein), 라이소좀 단백질 (lysosomal protein), 성장 인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 케모카인 (chemokine), 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (antigen-binding fragment), 또는 융합 단백질 (fusion protein)인 것인, 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 라이소좀 단백질 (lysosomal protein)은 라이소좀 저장질환 (lysosomal storage disease) 관련된 분해효소인 것인, 제조방법.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 목적 단백질은 상기 가교제와 연결될 수 있는 시스테인, 라이신 또는 알지닌 잔기를 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 목적 단백질은 당단백질인 것인, 제조방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 목적 단백질에 산화 반응을 유도하여, 목적 단백질의 당사슬 부위에 알데하이드기를 도입하는 단계를 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 19] 제1항에 있어서, 상기 세포벽 만노단백질은 천연 효모에 비하여 만노스 인산이 과량 부가되도록 조작한 효모로부터 분리한 것인, 제조방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 만노스 인산이 과량 부가되도록 조작한 효모는

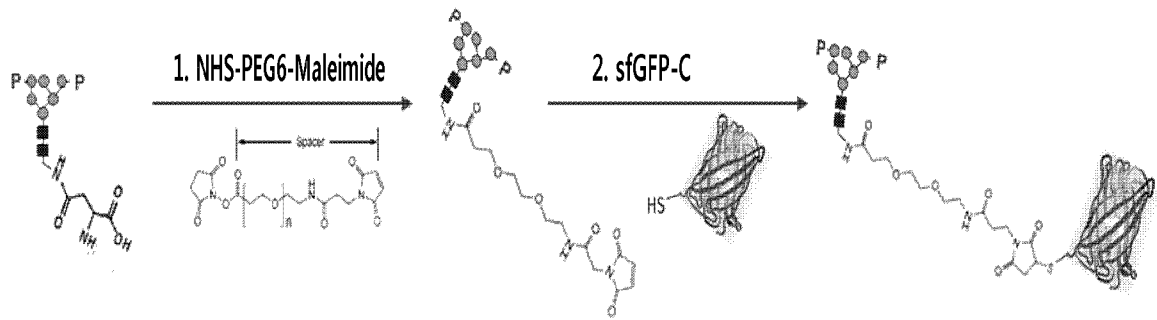
- 효모 특이적 당사슬 생합성 경로가 제거된 것인, 제조방법.
- [청구항 21] 제19항에 있어서, 상기 만노스 인산이 과량 부가되도록 조작한 효모는 *OCH1* 결손, *MNN1* 결손, *YIMPO1* 과발현, 및 *MNN4* 과발현으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 유전형질을 가지는 것인, 제조방법.
- [청구항 22] 분리된 세포벽 만노단백질에 프로나제 (pronase)를 처리하는 단계를 포함하는, 말단에 아스파라진이 위치한 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법.
- [청구항 23] 분리된 세포벽 만노단백질에 N-당사슬을 유리하는 효소를 처리하는 단계를 포함하는, 만노스-6-인산 당사슬의 제조방법.
- [청구항 24] 제22항 또는 제23항에 있어서, 분리된 당사슬에서 바깥쪽 만노스를 제거하는 단계를 추가로 더 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 25] 제24항에 있어서, 상기 바깥쪽 만노스를 제거하는 과정은 약산 가수분해 또는 캡핑 제거 (uncapping) 효소를 이용하는 것인, 제조방법.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 만노시다제를 상기 당사슬에 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 27] 제22항 또는 제23항에 있어서, 만노스-6-인산 당사슬을 선택적으로 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 제조방법.
- [청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 분리는 이산화티타늄 (TiO_2)을 이용하여 수행되는 것인, 제조방법.

[도 1]

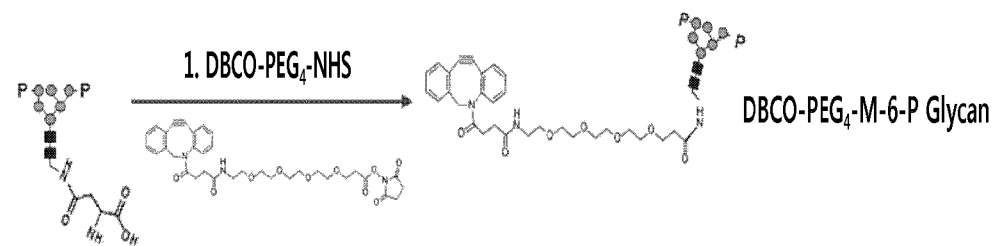
(A)



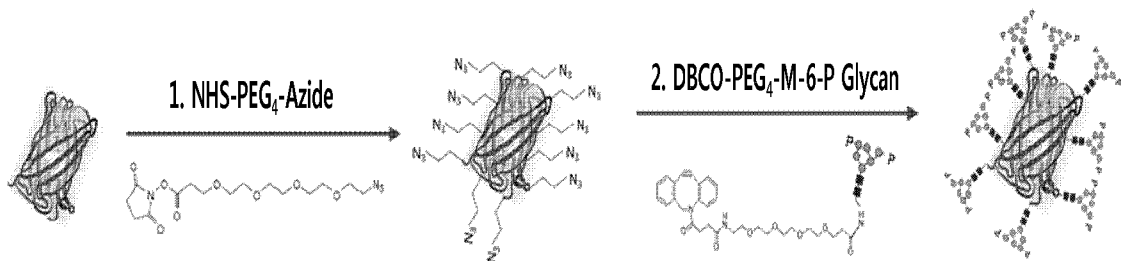
(B)



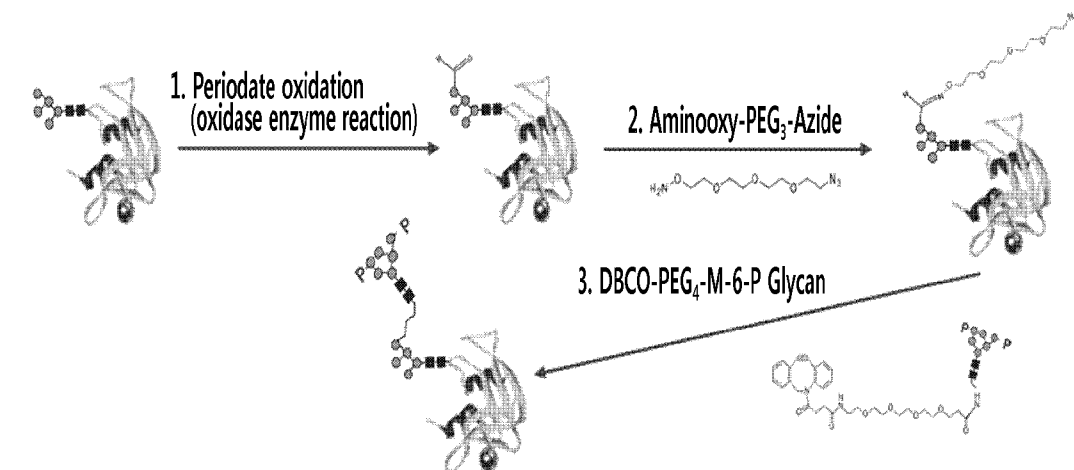
(C)

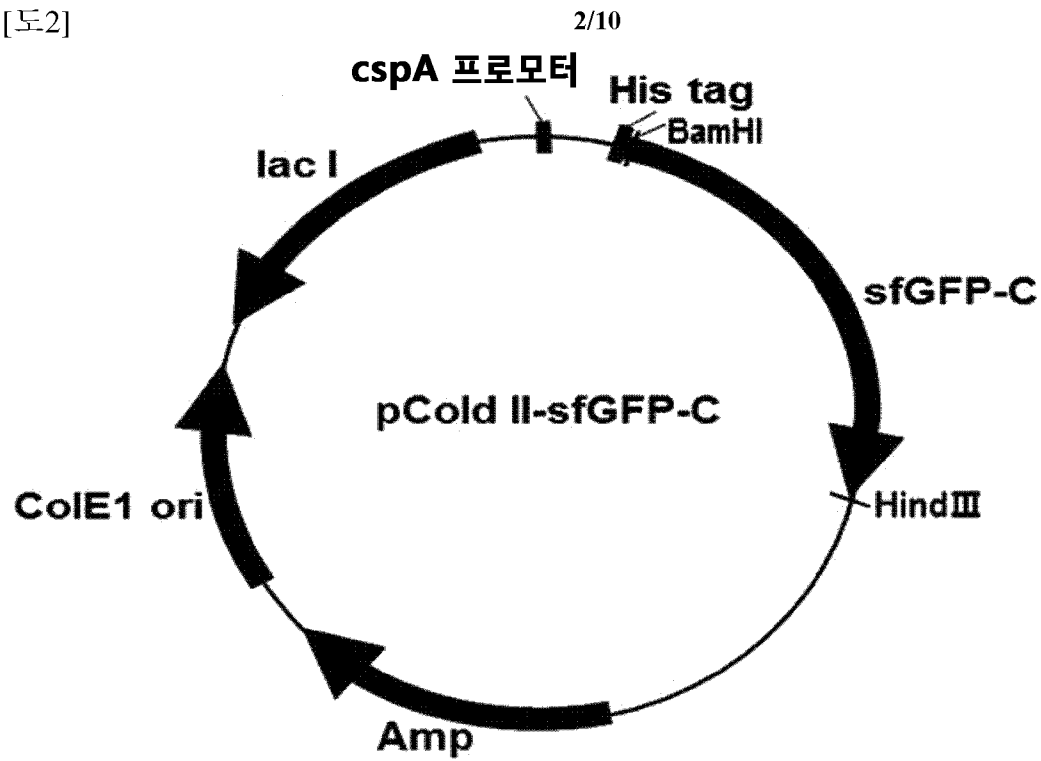


(D)

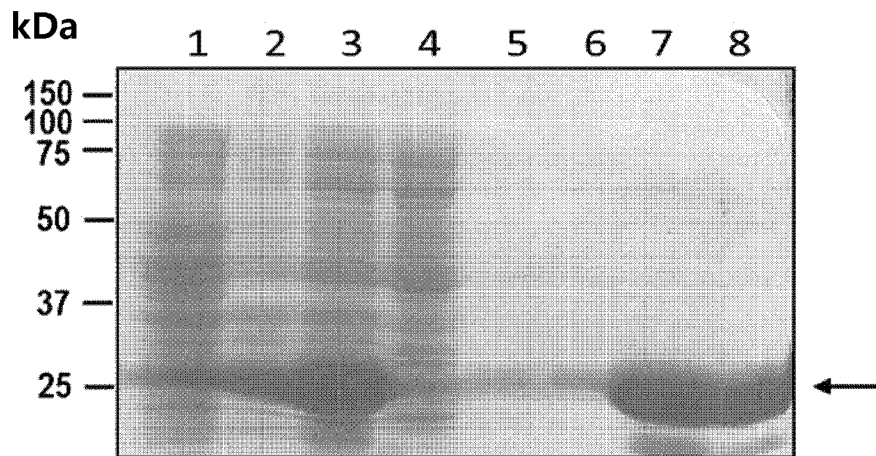


(E)

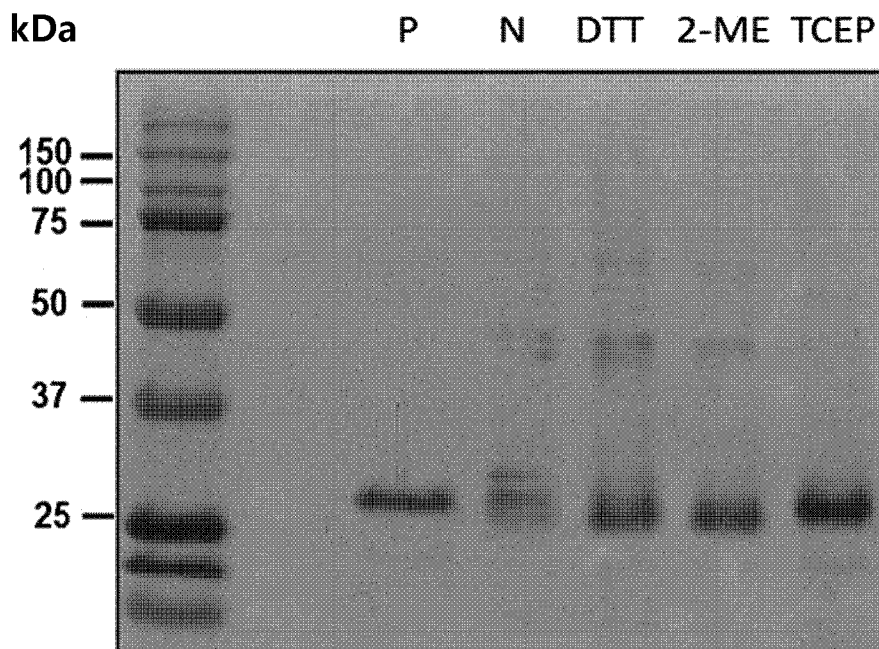


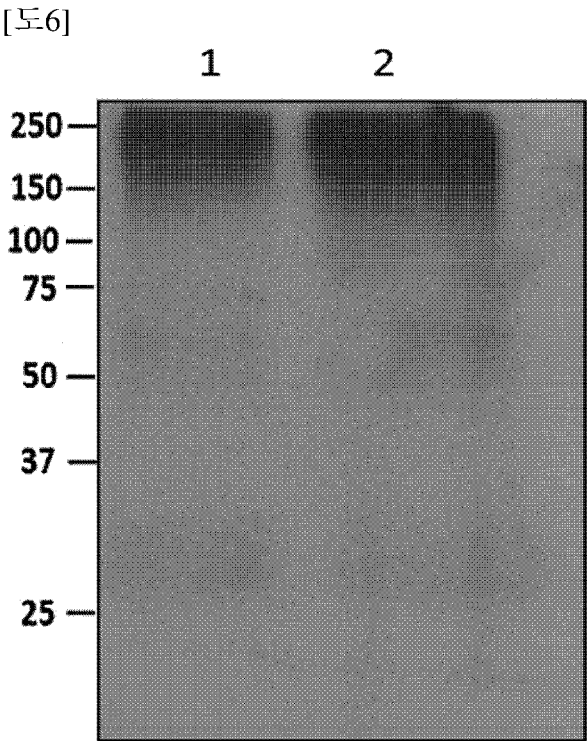
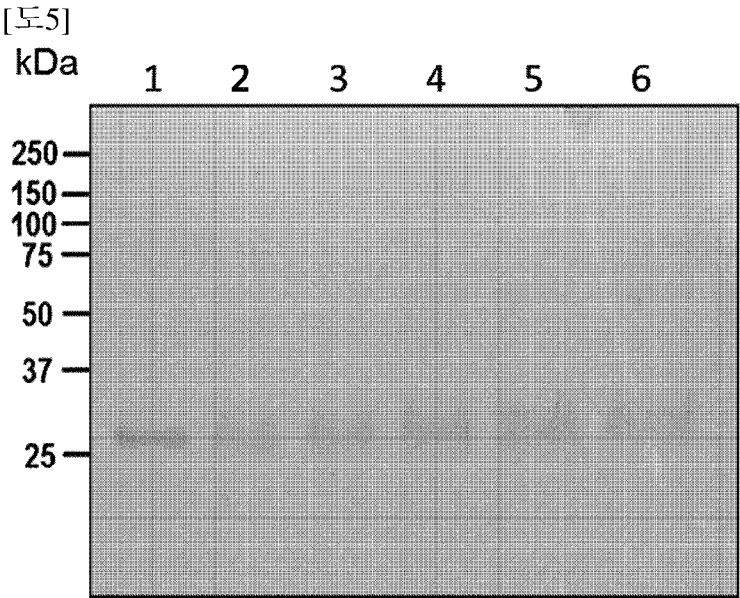


[도3]

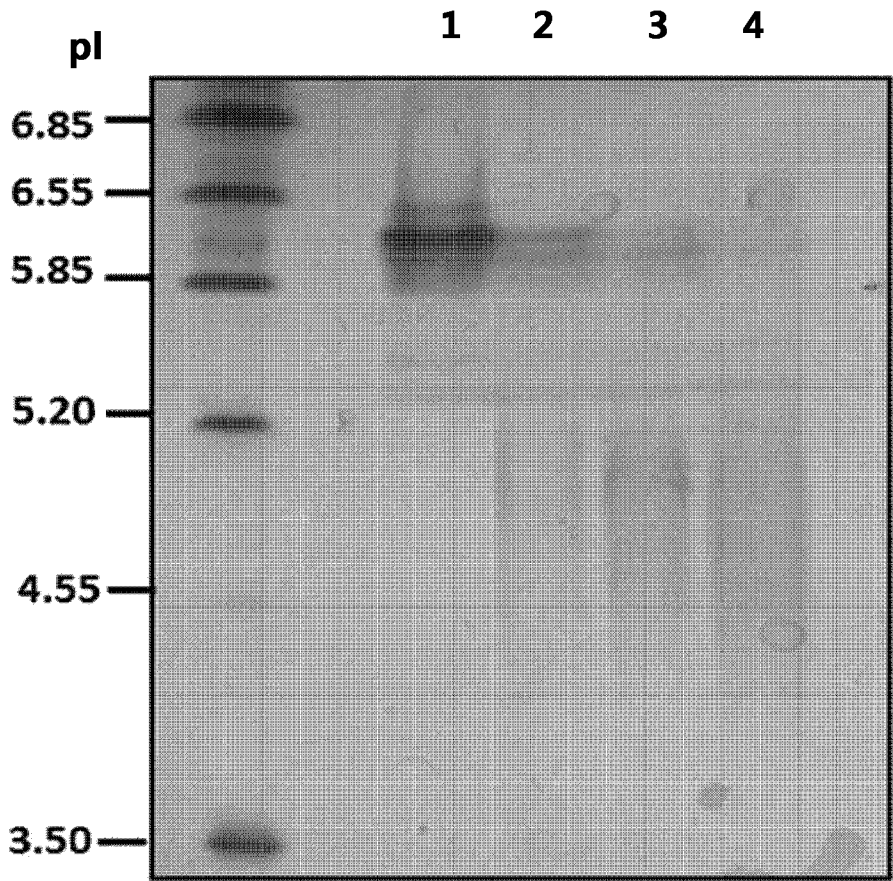


[도4]

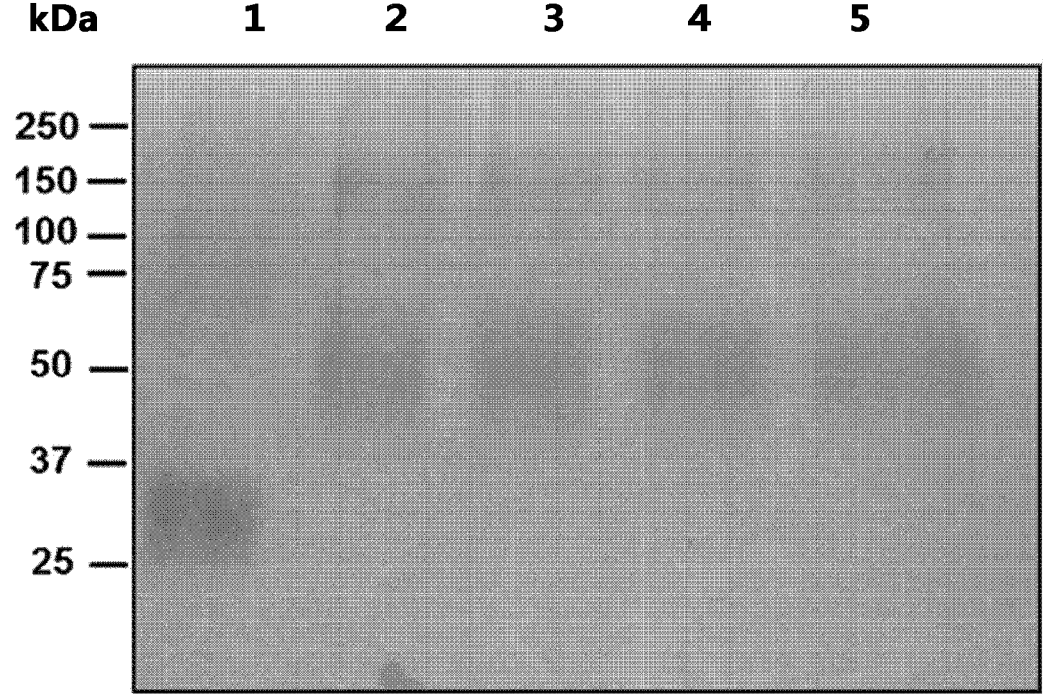




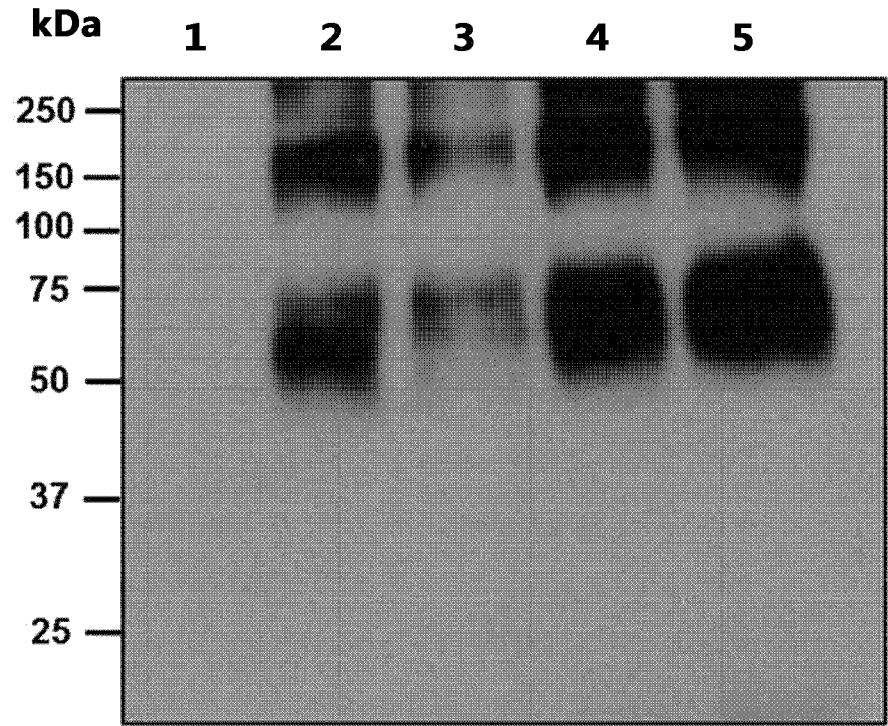
[도7]



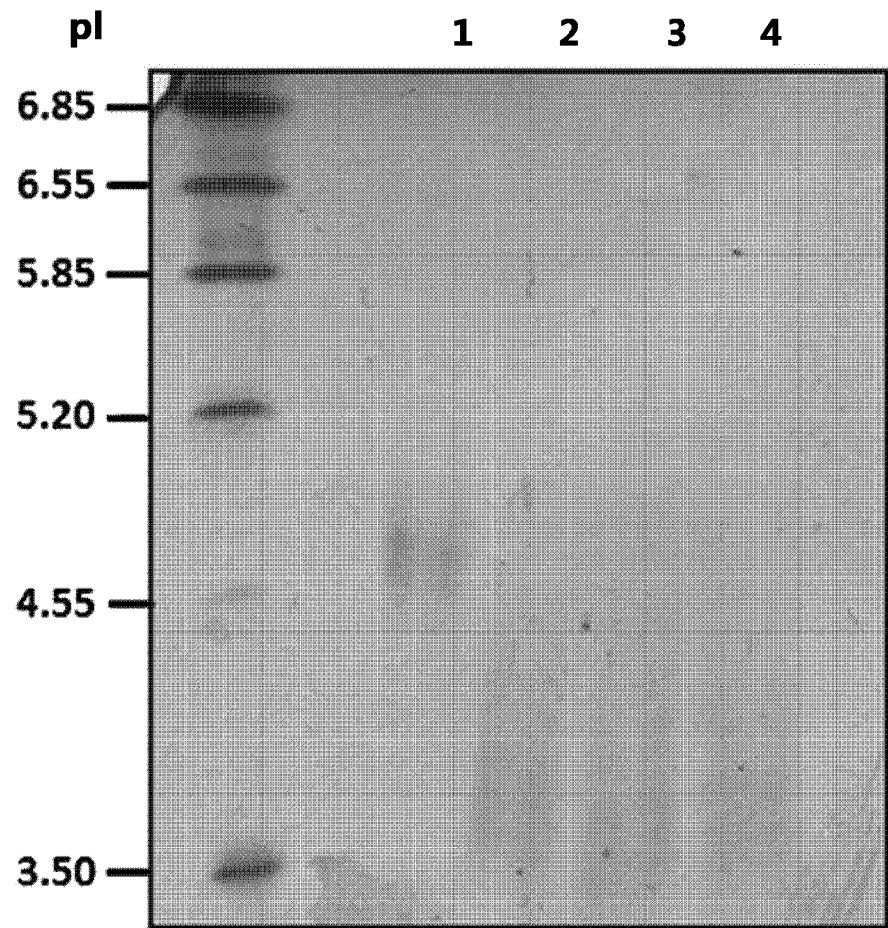
[도8]



[도9]

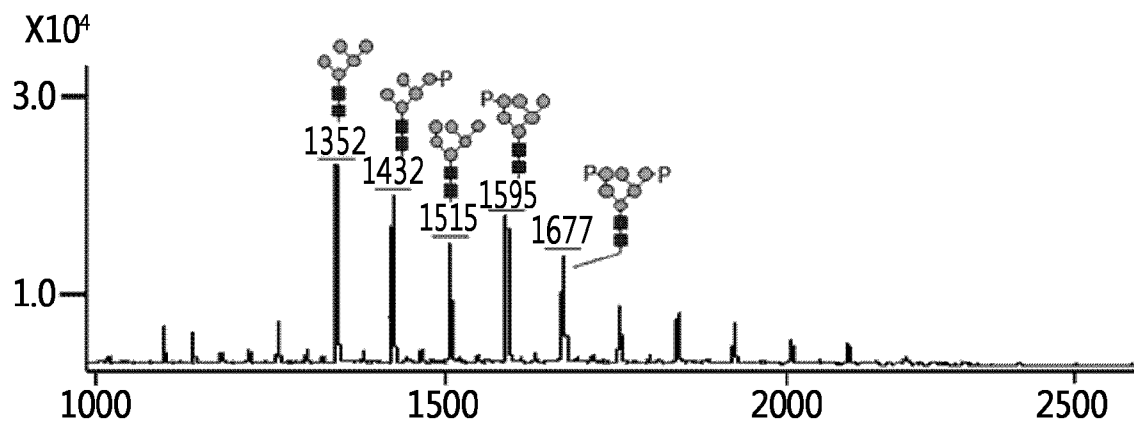


[도10]

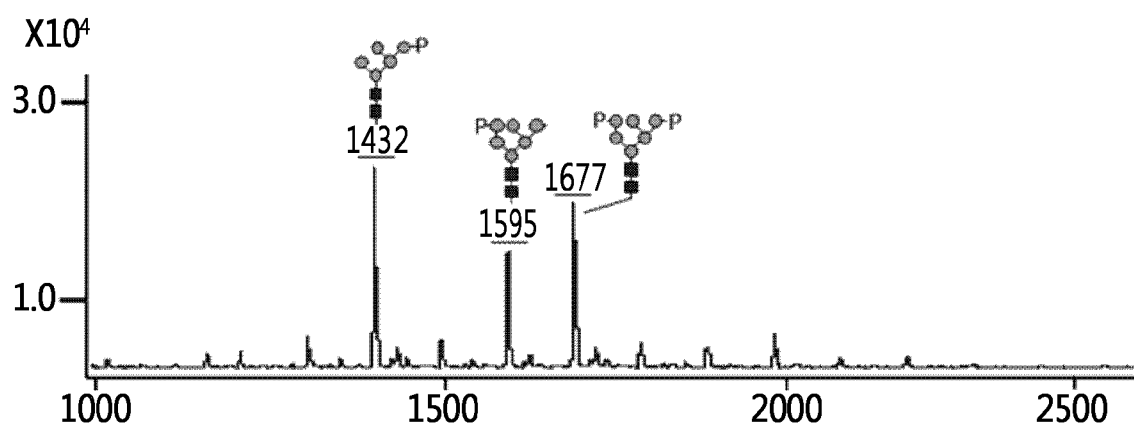


[도11]

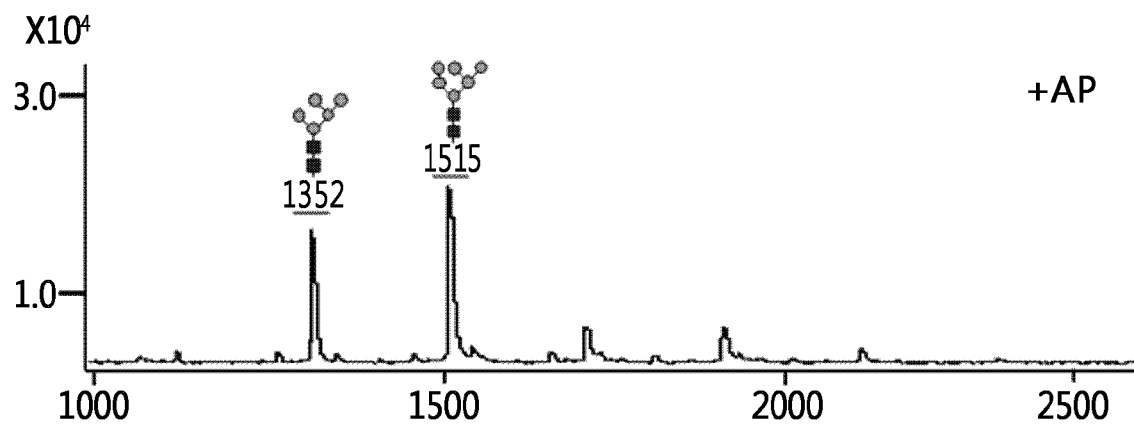
(A)



(B)

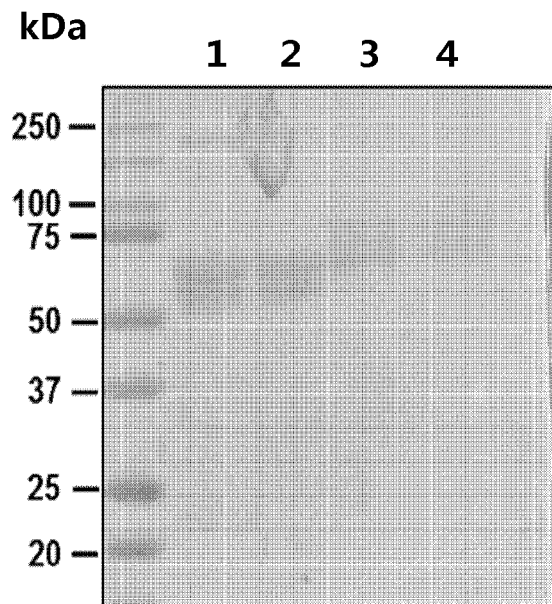


(C)

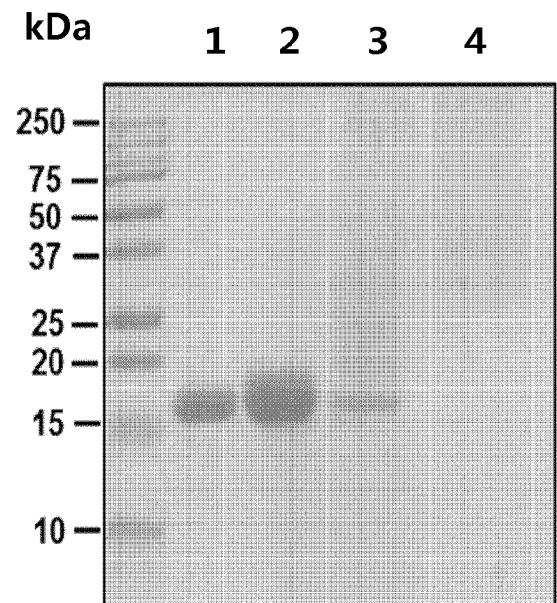


[도 12]

(A)

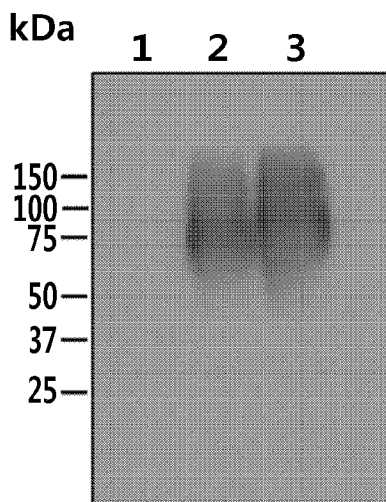


(B)

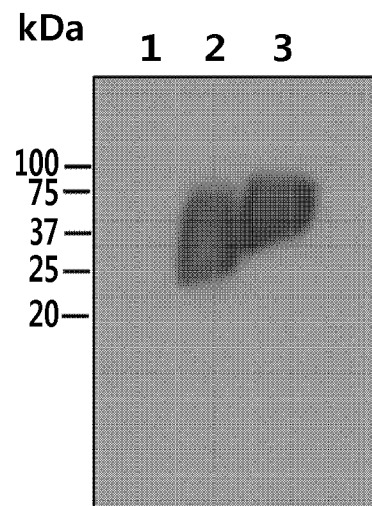


[도 13]

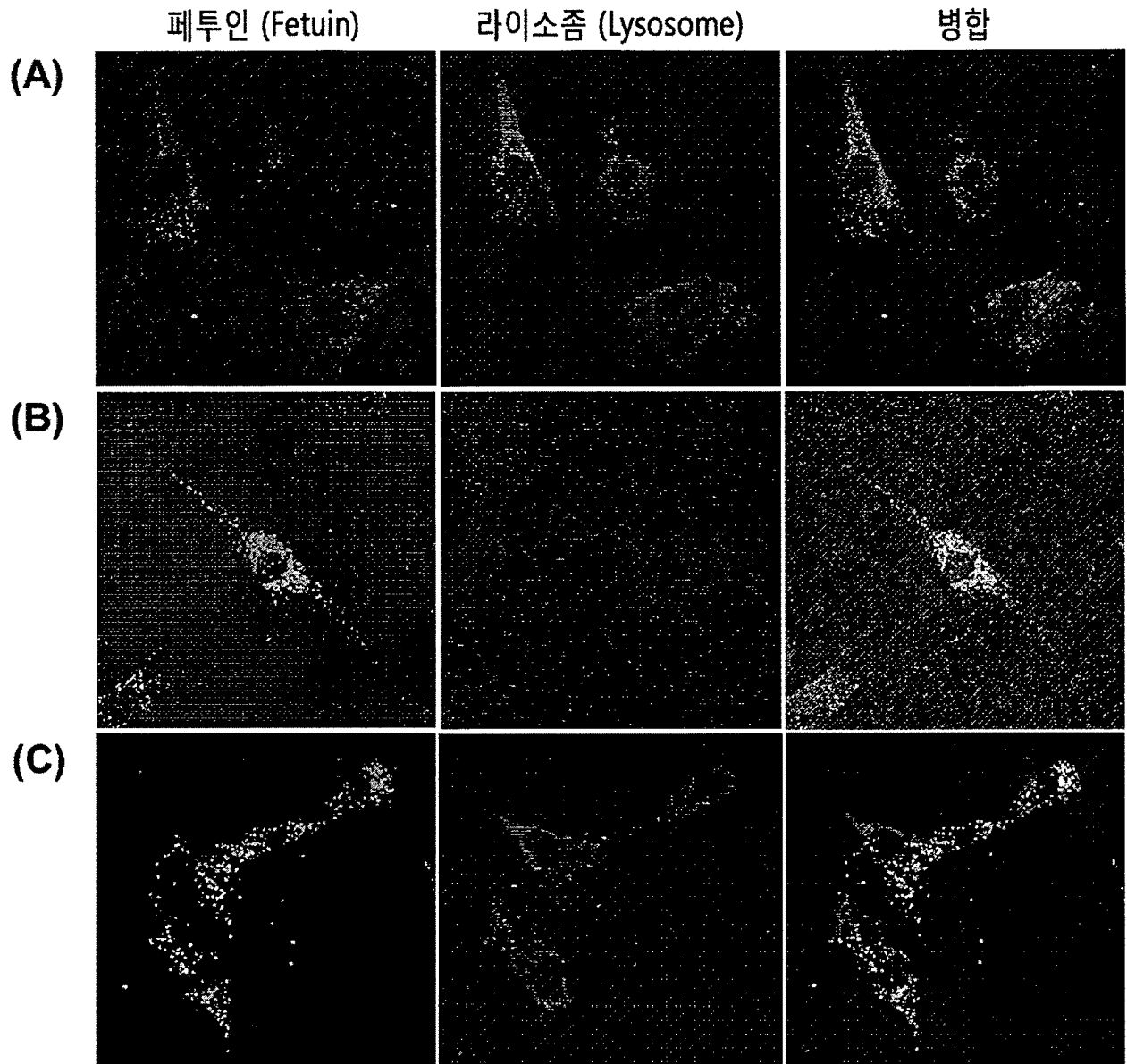
(A)



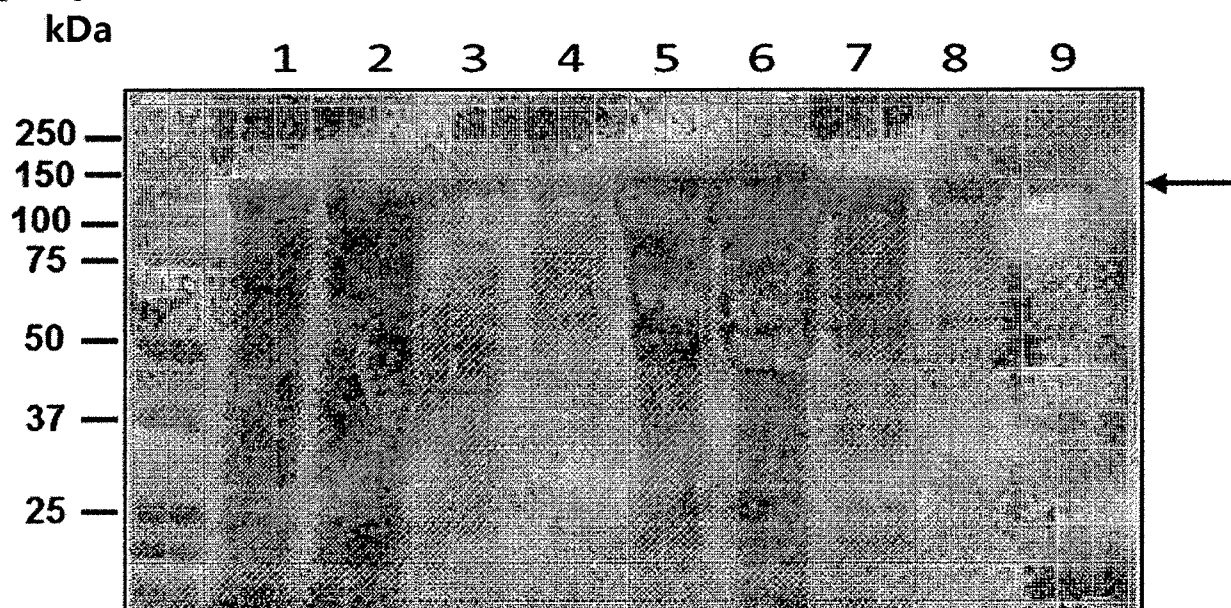
(B)



[도14]

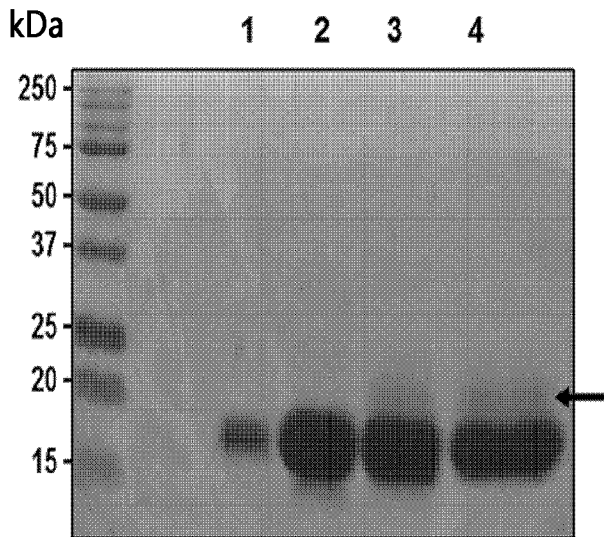


[도15]

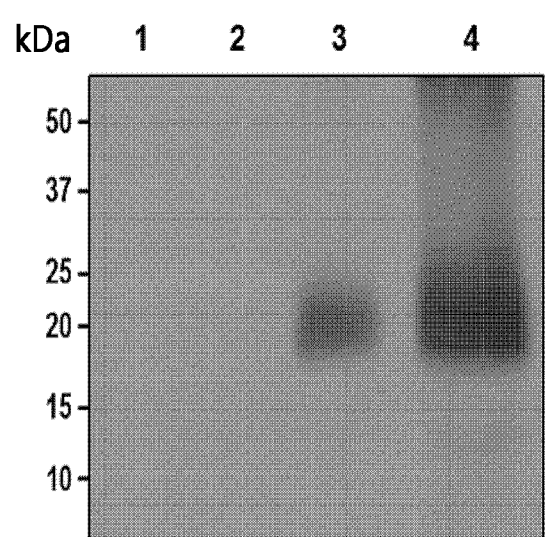


[도16]

(A)

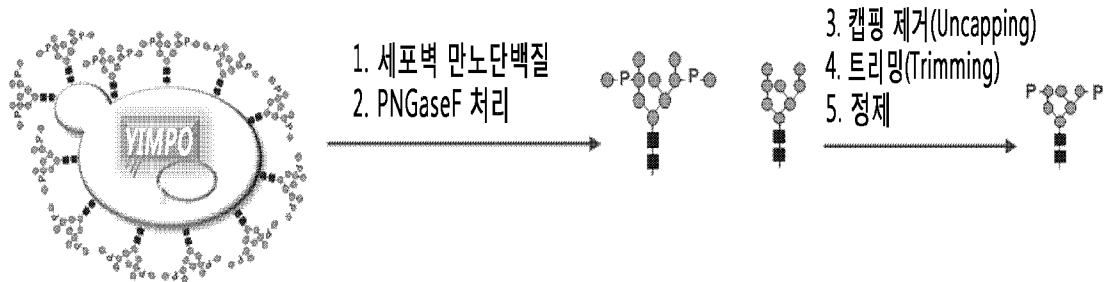


(B)

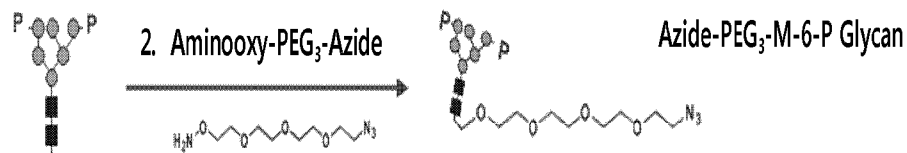


[도17]

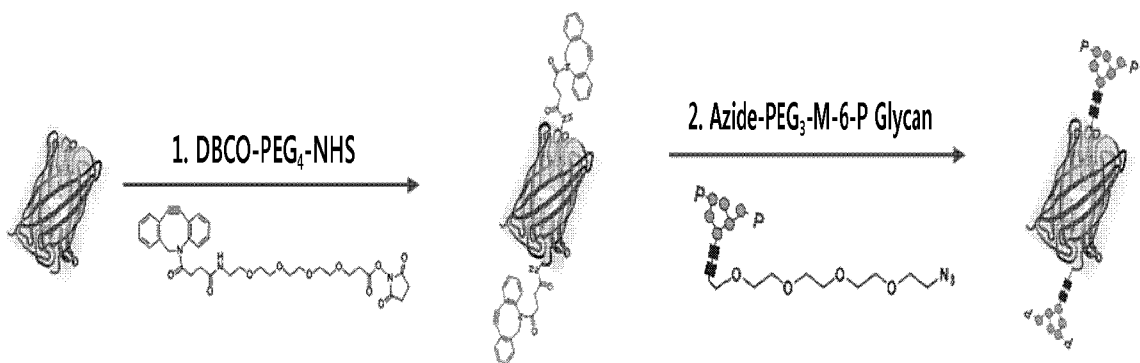
(A)



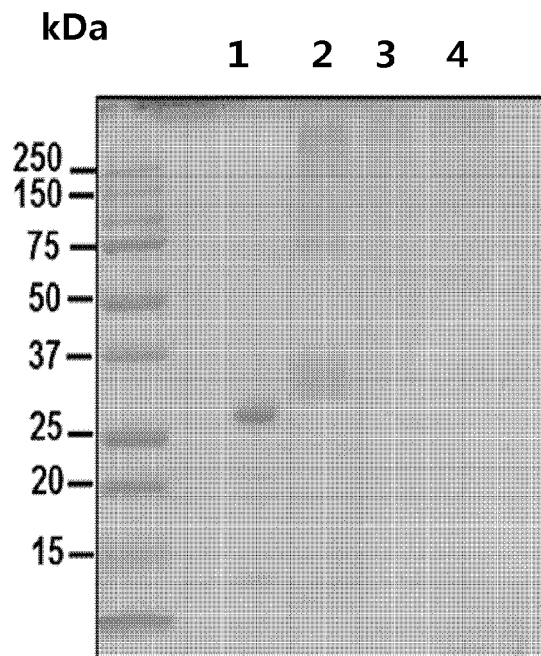
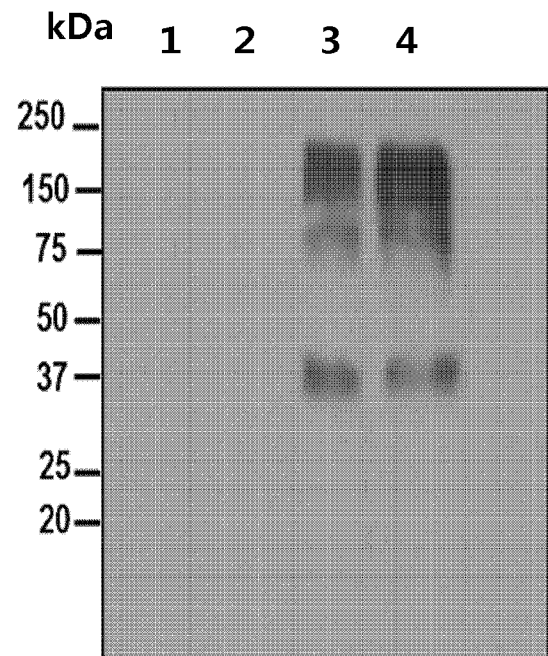
(B)



(C)



[도18]

(A)**(B)**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005853**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 1/107(2006.01)i, C07K 1/14(2006.01)i, C12N 15/81(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)

C07K 1/107; C07H 11/04; C12P 21/00; C12P 19/26; C12N 15/70; C12N 11/10; C08G 65/335; A61P 3/00; C07K 1/14; C12N 15/81

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: cell wall mannoprotein (CWM), mannose-6-phosphate, crosslinking agent, glycoprotein, pronase, PNGase, ENGase, lysosomal storage disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-195757 A (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE et al.) 28 August 2008 See claims 1-14; and paragraphs [0006]-[0007].	1-28
A	KR 10-2015-0042936 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 22 April 2015 See abstract; claims 1-22; and examples 1-7.	1-28
A	KR 10-2004-0026663 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 31 March 2004 See the entire document.	1-28
A	KR 10-2014-0093602 A (OXYRANE UK LIMITED) 28 July 2014 See the entire document.	1-28
A	US 2009-0022702 A1 (ZHU) 22 January 2009 See the entire document.	1-28



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

12 SEPTEMBER 2016 (12.09.2016)

Date of mailing of the international search report

12 SEPTEMBER 2016 (12.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005853

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2008-195757 A	28/08/2008	JP 5069920 B2 WO 2008-096904 A1	07/11/2012 14/08/2008
KR 10-2015-0042936 A	22/04/2015	NONE	
KR 10-2004-0026663 A	31/03/2004	CN 1541275 A CN 1541275 C EP 1408117 A1 EP 1408117 B1 JP 2002-369692 A JP 4742191 B2 US 2005-0064539 A1 US 7579166 B2 WO 02-103027 A1	27/10/2004 07/02/2007 14/04/2004 01/09/2010 24/12/2002 10/08/2011 24/03/2005 25/08/2009 27/12/2002
KR 10-2014-0093602 A	28/07/2014	CA 2812870 A1 CN 103328646 A EP 2622088 A2 JP 2013-539974 A US 2013-0267473 A1 US 9347050 B2 WO 2012-042386 A2	05/04/2012 25/09/2013 07/08/2013 31/10/2013 10/10/2013 24/05/2016 05/04/2012
US 2009-0022702 A1	22/01/2009	US 2002-0137125 A1 US 2005-0058634 A1 US 2006-0281145 A1 US 2010-0173385 A1 US 7001994 B2 US 7723296 B2 US 7786277 B2 US 8399657 B2	26/09/2002 17/03/2005 14/12/2006 08/07/2010 21/02/2006 25/05/2010 31/08/2010 19/03/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 1/107(2006.01)I, C07K 1/14(2006.01)I, C12N 15/81(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 1/107; C07H 11/04; C12P 21/00; C12P 19/26; C12N 15/70; C12N 11/10; C08G 65/335; A61P 3/00; C07K 1/14; C12N 15/81

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: 세포벽 만노단백질, 만노스-6-인산, 가교제, 당단백질, 프로나제, PNGase, ENGase, 라이소좀 저장질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2008-195757 A (TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE 등) 2008.08.28 청구항 1-14; 및 문단 [0006]-[0007] 참조.	1-28
A	KR 10-2015-0042936 A (한국생명공학연구원) 2015.04.22 요약; 청구항 1-22; 및 실시예 1-7 참조.	1-28
A	KR 10-2004-0026663 A (내셔널 인스티튜트 오브 어드밴스드 인더스트리얼 사이언스 앤드 테크놀로지 등) 2004.03.31 전체 문헌 참조.	1-28
A	KR 10-2014-0093602 A (옥시레인 유케이 리미티드) 2014.07.28 전체 문헌 참조.	1-28
A	US 2009-0022702 A1 (ZHU) 2009.01.22 전체 문헌 참조.	1-28

☐ 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

2016년 09월 12일 (12.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 12일 (12.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2008-195757 A	2008/08/28	JP 5069920 B2 WO 2008-096904 A1	2012/11/07 2008/08/14
KR 10-2015-0042936 A	2015/04/22	없음	
KR 10-2004-0026663 A	2004/03/31	CN 1541275 A CN 1541275 C EP 1408117 A1 EP 1408117 B1 JP 2002-369692 A JP 4742191 B2 US 2005-0064539 A1 US 7579166 B2 WO 02-103027 A1	2004/10/27 2007/02/07 2004/04/14 2010/09/01 2002/12/24 2011/08/10 2005/03/24 2009/08/25 2002/12/27
KR 10-2014-0093602 A	2014/07/28	CA 2812870 A1 CN 103328646 A EP 2622088 A2 JP 2013-539974 A US 2013-0267473 A1 US 9347050 B2 WO 2012-042386 A2	2012/04/05 2013/09/25 2013/08/07 2013/10/31 2013/10/10 2016/05/24 2012/04/05
US 2009-0022702 A1	2009/01/22	US 2002-0137125 A1 US 2005-0058634 A1 US 2006-0281145 A1 US 2010-0173385 A1 US 7001994 B2 US 7723296 B2 US 7786277 B2 US 8399657 B2	2002/09/26 2005/03/17 2006/12/14 2010/07/08 2006/02/21 2010/05/25 2010/08/31 2013/03/19