



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0141602
(43) 공개일자 2019년12월24일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/78 (2006.01) A61K 38/50 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61P 37/02 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 9/78 (2013.01)
A61K 38/50 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0069007
(22) 출원일자 2019년06월11일
심사청구일자 2019년06월11일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180068375 2018년06월14일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
(주) 에빅스젠
서울특별시 서초구 반포대로 222 (반포동)</p> <p>(72) 발명자
지은혜
서울특별시 광진구 능동로 28길 20
안건영
서울특별시 강남구 테헤란로 48길 10, 903호
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 피씨알</p> |
|---|--|

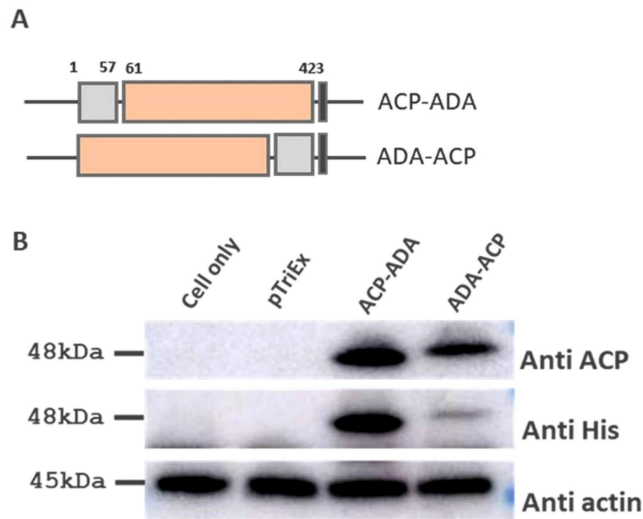
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 세포 투과 펩티드 및 아데노신 탈아미노화효소의 융합 단백질을 포함하는 중증복합면역결핍증 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 아데노신 탈아미노화효소의 세포 투과성이 증가되어 있으므로 중증복합면역결핍증 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61P 37/02 (2018.01)

C12Y 305/04004 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

(72) 발명자

백이용

경기도 고양시 일산서구 후곡로 10, 901동 601호

최준섭

경기도 용인시 처인구 포곡읍 둔전로 15, 108동
401호

구혜정

경기도 광명시 하안로 154, 201동 107호

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 세포 투과 펩티드; 및
서열번호 2의 아미노산 서열로 기재되는 아데노신 탈아미노화효소를 포함하는 융합 단백질.

청구항 2

제1항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 5

하기 단계를 포함하는 융합 단백질을 생산하는 방법:

- (a) 제4항의 숙주세포를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및
- (b) 배양 배지로부터 융합 단백질을 회수하는 단계.

청구항 6

제1항의 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 중증복합면역결핍증 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중증복합면역결핍증은 아데노신 탈아미노화효소 결핍증인 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소의 융합 단백질 및 이를 포함하는 중증복합면역결핍증 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 중증복합면역결핍증(Severe Combined Immunodeficiency, SCID)은 면역계의 발달 과정에 관련된 유전자의 이상으로 T 림프구가 결여되고, B 림프구 매개 면역기능의 장애가 일어나는 일차면역결핍질환이다. 중증복합면역결

핍증 환자는 면역체계에 관여하는 T 림프구와 B 림프구가 존재하지 않거나 거의 없으므로 세균이나 바이러스, 곰팡이와 같은 감염에 대단히 취약하다. 또한, 건강한 사람에게는 심한 감염을 일으키지 않는 미생물이 중증복합면역결핍증 환자들에서는 생명을 위협하는 감염을 일으킬 수 있다. 심지어 질병을 일으키지 않는 미생물도 중증복합면역결핍증 환자들에서는 심한 감염을 일으킬 수 있다.

[0004] 중증복합면역결핍증은 X-염색체 연관성 중증복합면역결핍증(X-linked Severe Combined Immunodeficiency: X-SCID)과 상염색체 열성 유전 중증복합면역결핍증으로 분류할 수 있다. 상염색체 열성 유전 중증복합면역결핍증은 ADA(adenosine deaminase) 결핍증, Jak3(Janus kinase 3) 결핍증, IL-7R α (interleukin-7 receptor α) 결핍증, RAG1(recombination activating gene 1) 또는 RAG2 결핍증, Artemis 결핍증 및 CD45 결핍증이 알려져 있다.

[0005] ADA 결핍증은 아데노신 탈아미노화효소(ADA)라는 효소를 코딩하는 20번 염색체의 긴팔(20q12-13.11)에 유전자변이가 생겨 발생한다. ADA는 T 림프구의 대사에 필수적인 효소이며, 이 효소가 결핍되면 림프구 내에 독성 대사산물이 축적되어 림프구가 죽게 된다. 치료 방법으로 정상 ADA 유전자를 갖는 조혈모세포를 이식하는 방법과 PEG-ADA(Polyethylene glycol-modified adenosine deaminase: Andagen)를 근육주사로 투여하는 효소보충치료 방법이 있다.

[0006] 한편, 세포 투과 펩티드(Cell Penetrating Peptides, CPP)는 약 10-60개 정도의 짧은 펩티드로 이루어진 세포막 투과성 펩티드로 대부분 단백질-투과 도메인(protein-transduction domain)이나 막-이동 시퀀스(membrane-translocating sequence)로부터 유도된다. 외부 물질의 일반적인 세포 내 유입 경로와는 달리 CPP는 세포막을 손상시키지 않으면서 세포 내로 이동하고, 세포막을 통과하지 못하는 것으로 알려져 있는 DNA나 단백질까지도 세포 내로 전달시킬 수 있다고 알려져 있다.

[0007] 본 발명자들은 HIV(human immunodeficiency virus)의 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid) 유래 세포 투과 펩티드를 연구한 결과, ADA의 세포 투과성을 높일 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1. Molecular Therapy vol. 17, Issue 4, 577-578, 2009

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소를 포함하는 융합 단백질 및 이를 유효성분으로 포함하는 중증복합면역결핍증 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 세포 투과 펩티드; 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 기재되는 아데노신 탈아미노화효소를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0013] 본 명세서에 사용된 용어, '세포 투과 펩티드(Cell Penetrating Peptides, CPP)'는 약 10개 내지 60개 정도의 짧은 펩티드로 이루어진 세포막 투과성 펩티드로 세포막을 손상시키지 않으면서 세포 내로 이동하고, 세포막을 통과하지 못하는 DNA나 단백질까지 세포 내로 전달할 수 있다.

[0014] 본 명세서에 사용된 용어, '아데노신 탈아미노화효소(adenosine deaminase)'는 아데노신의 아미노기를 탈아미노화시키는 효소이며, 아데노신이 가수분해되어 이노신(inosine)과 암모니아(ammonia, NH₃)가 생성되는 과정을 촉매한다.

[0015] 본 명세서에 사용된 용어, '융합 단백질(conjugate)'은 세포 투과 펩티드와 생물학적 또는 약제학적으로 활성을

가지는 단백질이 화학적 물리적 공유 또는 비공유 결합으로 연결된 물질을 의미한다.

- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 세포 투과 펩티드에 결합되어 융합 단백질이 될 수 있는 '생물학적 또는 약제학적 활성을 갖는 단백질'이란 생체 내의 생리현상을 조절할 수 있는 단백질을 의미한다. 단백질, 펩티드를 포함하고, 단백질 또는 펩티드와 연결된 지방, 탄수화물 및 화합물(chemical compound), 또는 형광표지물질 등을 포함한다. 예를 들어, 단백질로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 아데노신 탈아미노화효소가 사용할 수 있다. 상기 세포 투과 펩티드는 아데노신 탈아미노화효소의 C-말단 또는 N-말단과 연결되어 융합 단백질을 형성할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 세포 투과 펩티드는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩(coding)될 수 있으며, 서열번호 2의 아미노산 서열로 기재되는 아데노신 탈아미노화효소는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열에 의하여 코딩될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호 3(ACP-ADA) 또는 서열번호 4(ADA-ACP)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 양상은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0021] 본 명세서에 사용된 용어, '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)'는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide) 또는 리보뉴클레오티드(ribonucleotide)의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 뿐만 아니라 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 변형될 수 있으며, 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 7(ACP-ADA) 또는 서열번호 8(ADA-ACP)으로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 양상은 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0026] 본 명세서에 사용된 용어, '벡터(vector)'는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCR79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, CMV, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0027] 상기 재조합 벡터는 상기 폴리뉴클레오티드 서열과 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 명세서에 사용된 용어, '작동적으로 연결된'은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0029] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 재조합 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHCR79, pUC19, pET 등), 파지 (예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0030] 상기 재조합 벡터는 세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소 융합 단백질의 정제를 용이하게 하는 태그(tag) 서열, 예를 들어, 연속된 히스티딘 코돈, 말토우즈 바인딩 단백질 코돈 및 Myc 코돈 등을 포함할 수 있고, 융합 단백질의 가용성(solubility)을 증가시키기 위한 융합파트너(partner) 등을 추가로 포함할 수 있다.

또한 융합 단백질 발현시 불필요한 부분을 제거하기 위하여 효소에 의해 특이적으로 절단되는 서열, 발현 조절 서열 및 세포 내 전달을 확인하기 위한 마커(marker) 또는 리포터 유전자 서열을 포함할 수 있다.

- [0032] 본 발명의 다른 양상은 상기 재조합 벡터를 포함하는 숙주세포, 즉, 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0033] 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있다. 원핵세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 및 *E. coli* W3110 등이 있다. 진핵세포에 형질전환시키는 경우 숙주세포로, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, SP2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.
- [0034] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주세포 내로의 운반은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주세포가 원핵세포인 경우, CaCl₂ 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0035] 상기 형질전환된 숙주세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당해 기술 분야에 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 숙주세포를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및 배양 배지로부터 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소의 융합 단백질 생산 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 세포 배양은 대규모 세포 배양일 수 있으며, 세포 배양 방법은 통상적으로 사용되는 세포 배양법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 배양 방법은 이로 한정되는 것은 아니지만, 회분 배양법(batch culture), 반복 회분 배양법(repeated batch culture), 유가 배양법(fed-batch culture), 반복 유가 배양법(repeated fed-batch culture), 연속 배양법(continuous culture) 및 관류 배양법(perfusion culture)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 배양 배지로부터 융합 단백질을 회수하는 단계는 당해 기술 분야에 공지된 다양한 분리 및 정제방법을 통해 수행할 수 있다. 통상적으로 세포 조각(cell debris), 배양 불순물 등을 제거하기 위하여 세포 용해물을 원심분리한 후, 침전, 예를 들어, 염석(황산암모늄 침전 및 인산나트륨 침전), 용매 침전(아세톤, 에탄올, 이소프로필 알콜 등을 이용한 단백질 분획 침전) 등을 수행할 수 있고, 투석, 전기영동 및 각종 컬럼 크로마토그래피 등을 수행할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 중증복합면역결핍증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 명세서에 사용된 용어, '중증복합면역결핍증(Severe Combined Immunodeficiency, SCID)'은 유전자 이상으로 T 림프구가 결여되고, B 림프구 매개 면역기능의 장애가 일어나는 질환이다. 본 질환을 갖는 환자는 면역 기능이 정상적으로 작동하지 못하므로 만성적인 감염에 시달리게 된다.
- [0043] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 중증복합면역결핍증은 아데노신 탈아미노화효소 결핍증일 수 있다. 아데노신 탈아미노화효소가 결핍되면 림프구 내에 독성 대사산물이 축적되어 사멸하므로 T 림프구 및 B 림프구가 정상적으로 발달할 수 없게 된다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 융합 단백질 이외에 필요에 따라 약학적 조성물에 있어서 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0045] 이러한 약학적으로 허용되는 담체는 약품 제조시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스,

폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 상기 담체는 본 발명의 약학적 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1 중량% 내지 약 99.99 중량%, 바람직하게는 약 90 중량% 내지 약 99.99 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 첨가제는 약 0.1 중량% 내지 약 20 중량%로 포함될 수 있다.

[0047] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으나, 국소 투여 방식으로 피부에 직접 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고, 도고제, 로션, 연고 등을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니된다.

발명의 효과

[0051] 세포 투과 펩티드와 아데노신 탈아미노화효소의 융합 단백질은 아데노신 탈아미노화효소의 세포 투과성이 증가되어 있으므로 중증복합면역결핍증 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1의 A는 세포 투과 펩티드-아데노신 탈아미노화효소(activated cell penetrating peptide-adenosine deaminase, ACP-ADA 또는 ADA-ACP) 단백질의 개략적인 구조를 나타내며, B는 재조합 단백질의 발현 여부를 293FT 세포에서 확인한 결과를 나타낸다.

도 2의 A는 ACP-ADA 또는 ADA-ACP 발현 벡터와 pDsRed 벡터를 공동으로 형질주입한 후 형광신호를 확인한 결과를 나타내며, B는 ACP-ADA 및 ADA-ACP의 활성을 측정된 결과를 나타낸다.

도 3의 A는 대장균에서 ACP-ADA를 발현시킨 후 분리 정제한 결과를 나타내며, B는 분리 정제한 ACP-ADA의 활성을 측정된 결과를 나타낸다.

도 4의 A는 분리 정제한 ACP-ADA를 HeLa 세포에 처리한 후 형광 신호를 확인한 결과를 나타내며, B는 형광 신호를 수치화한 그래프를 나타낸다.

도 5는 ADA가 결핍된 세포에 ADA를 전달하고, 세포 내의 ADA 를 확인한 결과를 나타낸다. A는 세포 내 투과된 ACP-ADA 단백질 관찰 결과를 나타내며, B는 ADA 활성 측정 결과를 나타낸다.

도 6은 ADA 유전자 발현 hetero (+/-) 마우스에 bovine ADA와 ACP-ADA를 주입하고, 혈액에서 단핵세포(Mononuclear cells)를 분리하여 ADA 활성을 측정된 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실험 방법

[0057] 1. 세포 투과 펩티드-아데노신 탈아미노화효소 결합체 발현을 위한 재조합 벡터 제작

[0058] 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide)로는 ACP(activated cell penetrating peptide, 이하 ACP로 기재

합: 서열번호 1)를 사용하였다. ACP와 아데노신 탈아미노화효소(adenosine deaminase, 이하 ADA로 기재함: 서열번호 2)가 결합된 재조합 단백질 발현을 위해 재조합 벡터를 제작하였다.

[0060] 1-1. ADA 유전자 증폭

[0061] 인간 ADA 유전자의 N-말단에 HindIII(New England Biolabs, NEB; 미국), C-말단에 XhoI(New England Biolabs)이 작용할 수 있는 제한효소 인식서열(recognition sequence)을 추가하였다. 이를 위해 293FT 세포주의 게놈 DNA(genomic DNA)를 주형으로 하여 제한효소 인식서열을 포함하는 PCR 프라이머(primer)로 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR로 기재함)을 수행하였다. PCR에 사용한 프라이머 서열과 PCR 조건을 표 1 및 표 2에 기재하였다.

표 1

	서열번호	서열
Forward from HindIII-ADA	서열번호 9	CCC AAG CTT GGC CCA GAC GCC CGC
Reverse from ADA-XhoI	서열번호 10	CCC TCG AGG AGG TTC TGC CCT GCA GAG

표 2

PCR 반응물		PCR 사이클		
dH ₂ O	35.5 μ l	94 $^{\circ}$ C	2 분	
2.5 mM dNTP	4 μ l	94 $^{\circ}$ C	30초	30회
F 프라이머 (10 uM)	2 μ l	55 $^{\circ}$ C	30초	
R 프라이머 (10 uM)	2 μ l	72 $^{\circ}$ C	30초	
주형	1 μ l	72 $^{\circ}$ C	5분	
Taq polymerase	0.5 μ l	4 $^{\circ}$ C	무한대	
10x buffer	5 μ l			
total	50 μ l			

[0067] 1-2. 재조합 벡터 제작

[0068] ACP 서열을 포함하는 pTriEx 벡터와 상기 1-1의 PCR 결과물에 HindIII 및 XhoI을 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 절단하고, PCR Purification Kit(Cosmo, 한국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 pTriEx 벡터 단편과 PCR 결과물을 분리하였다.

[0069] 분리한 pTriEx 벡터 단편과 PCR 결과물을 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 결합(라이게이션, ligation)시켰다. 결합 조건은 표 3에 기재하였다.

표 3

dH ₂ O	4.1 μ l
T4 DNA Ligase buffer (10x)	1 μ l
HindIII-ADA-XhoI PCR 산물 (30 ng)	1.6 μ l
ACP가 포함된 pTriEx 벡터 (50 ng)	2.3 μ l
T4 DNA Ligase (400 units/ μ l)	1 μ l
total	10 μ l

[0073] 한편, ACP의 N-말단에 ADA 유전자가 연결(ADA-ACP)된 재조합 벡터는 HindIII와 XhoI 대신 NcoI과 HindIII를 사용한 것을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 제작하였다.

[0075] **1-3. 형질전환(transformation) 및 DNA 염기서열 분석**

[0076] 컴피턴트 세포(competent cell)와 라이게이션 산물을 혼합한 후 42°C에서 1분 동안 반응시켰다. 이후 컴피턴트 세포에 LB 액체배지를 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양하고, 항생제가 포함된 LB 고체배지에 배양액을 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 배양 후 라이게이션이 제대로 이루어진 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 콜로니(colony)를 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 16시간 진탕 배양(shake culture)하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 원심분리하여 대장균 펠렛(pellet)을 수거하고, Plasmid extraction miniprep kit(intron, 한국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수거한 대장균 펠렛에서 pTriEx ACP-ADA 또는 pTriEx ADA-ACP 재조합 벡터를 분리하였다. 분리한 재조합 벡터는 UV 방법으로 농도를 측정하고, 코스모(Cosmo co. Ltd.; 대한민국)에 서열분석을 의뢰하였다.

[0078] **1-4. 박테리아 발현용 ADA-ACP 재조합 벡터 제작**

[0079] 제작된 pTriEx ACP-ADA 및 pTriEx ADA-ACP 벡터를 NcoI과 XhoI으로 절단하고, pET28a 벡터를 같은 제한효소로 절단하였다. 이후 1-2 및 1-3과 동일한 방법으로 재조합 벡터를 분리하고, 서열분석을 의뢰하였다.

[0081] **2. 동물세포에서 ACP-ADA, ADA-ACP 발현 확인**

[0082] **2-1. ACP-ADA, ADA-ACP의 발현 분석**

[0083] 293FT 세포주를 10% FBS 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신이 추가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 가습 항온기에서 배양하였다. 배양한 293FT 세포를 5x10⁵/웰(well)의 밀도로 6웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 제조사의 프로토콜에 따라 lipofector EZ reagent(APTABI, 한국)를 사용하여 pTriEx ACP-ADA 또는 pTriEx ADA-ACP의 재조합 벡터 DNA 1 µg을 각각 형질주입(transfection)하였다. 이후, 48시간 동안 추가로 배양하였다.

[0084] 배양한 세포를 PBS로 세척하고, 파이펫팅(pipetting)으로 세포를 플레이트에서 분리하였다. 분리한 세포에 RIPA 버퍼(10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 140 mM NaCl 및 1 mM PMSF)를 첨가하여 세포를 용해시키고, 얼음에 30분 동안 방치하였다. 이후 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 20분)하여 세포 잔해를 제거하고, 세포 용해물(cell lysate)인 상등액만 회수하였다. 분리된 세포 용해물의 단백질 농도를 Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent(Bio-Rad, 미국)로 측정하고, 단백질 20 µg을 10% SDS-PAGE((sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis))로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane)으로 이동시킨 후, PVDF 막을 5% 탈지 우유(skim milk)로 블로킹(blocking)하였다. PVDF 막을 일차 항체(ACP, His 및 Actin 항체)와 4°C에서 16시간 반응시킨 후 세척하고, 이차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, ECL(Pierce™ ECL Western Blotting Substrate(Thermo Scientific™, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 단백질 밴드를 검출하였다. 검출은 Amersham™ Imager 600(GE Healthcare Life Science, 미국)을 사용하였다.

[0086] **2-2. ACP-ADA, ADA-ACP의 아데노신 탈아미노화효소 활성 측정**

[0087] 2-1과 동일한 방법으로 293FT 세포주에 pTriEx ACP-ADA 또는 pTriEx ADA-ACP 재조합 벡터 DNA 1 µg을 각각 형질주입하여 48시간 동안 배양하였다. 이때 형질주입 여부를 확인하기 위하여 pDsRed 벡터를 공동으로 형질주입하였다. 배양 후 세포를 PBS로 1회 세척하고, 플레이트에 PBS 1 ml을 추가한 후 파이펫팅으로 세포를 분리하여 원심분리(6,000 rpm, 3분)하였다. 상등액은 제거하고, 세포의 펠렛(pellet)을 회수한 후 Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (BioVision, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 ADA 활성을 측정하였다.

[0089] **3. 대장균에서 ACP-ADA, ADA-ACP 발현 확인**

[0090] **3-1. 대장균 배양 및 용해**

[0091] 상기 1-4에서 제작한 pET28a ACP-ADA 벡터의 발현 여부를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0092] 대장균 BL21(DE3)(Thermo Fisher)에 pET28a ACP-ADA 벡터 또는 pET28a-ADA 벡터를 각각 형질전환시키고, LB(Luria-Bertani) 고체배지에 도말하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 16시간 후 형성된 콜로니를 LB 액체배지에 접종하고, 37°C에서 추가로 전배양하였다. 약 16시간 후 OD 값이 0.5 내지 0.6에 도달한 전배양액 250 μ l를 LB 액체배지 250 ml에 접종하고, 배양액의 OD 값이 0.5 내지 0.6이 되도록 37°C에서 3시간 내지 4시간 동안 배양하였다. 배양액의 OD 값이 0.5 내지 0.6에 도달하면 배양액에 IPTG(Isopropyl β -D-thiogalactoside) 0.5 mM을 첨가하고, 37°C에서 5시간 동안 추가로 배양하였다. 5시간 후 배양액을 원심분리하여 BL21 펠렛을 수득하고, 수득한 펠렛을 용해 버퍼(20 mM Tris buffer 및 HCl 8.0, 50 mM KCl, 20 mM 이미다졸(imidazole), 1 mM EDTA)에 현탁시켰다. 이후 초음파 파쇄기로 대장균을 파쇄(amplitude 30 내지 35%)하고, 대장균 파쇄물을 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 0.45 μ m 필터로 여과하였다.

[0094] **3-2. ACP-ADA 정제**

[0095] 단백질 정제는 AKTA Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC) 시스템(GE Healthcare Life Science)을 사용하였다. 전평형 버퍼(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 30 mM 이미다졸)로 Histap 컬럼(5 ml)을 평형화(equilibrium)시키고, 3-1.에서 회수한 상층액을 로딩하였다. 이후, 용출 버퍼(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 500 mM 이미다졸)로 단백질을 용출시켰다. 용출된 각 분획을 SDS-PAGE로 확인한 후 순도가 높은 분획만을 모아 아미콘(Amicon; Millipore, 미국)으로 농축하고, 저장 버퍼(storage buffer: 20 mM Tris, 20% 글리세롤, 1 mM DTT(dithiothreitol))로 버퍼 교환을 수행하였다. 순도가 높지 않은 분획들 또한 아미콘으로 농축한 후 이온 교환 크로마토그래피 컬럼(anion exchange column:Q-column)으로 정제하였다. 이때 컬럼은 전평형 버퍼(20mM Tris-HCl, pH 8.0)로 평형화시켰으며, 용출버퍼(20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl)로 단백질을 용출시켰다. 용출된 각 분획들을 SDS-PAGE로 확인하고, 순도가 높은 분획들을 상기와 동일한 방법으로 농축 및 버퍼 교환을 수행하였다.

[0097] **3-3. ACP-ADA의 아데노신 탈아미노화효소 활성 측정**

[0098] 정제된 ACP-ADA와 ADA의 농도를 Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent(Bio-Rad, 미국)로 측정하였다. 측정된 농도를 기준으로 ACP-ADA를 1, 2, 5 및 10 ng으로 희석하고, ADA는 0.1, 0.2, 0.5 및 1 ng으로 희석하였다. 희석한 단백질을 기질로 하여 Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (BioVision, 미국)로 ADA 활성을 측정하였다.

[0100] **4. ACP-ADA의 세포막 투과성 분석**

[0101] HeLa 세포와 GM02606 세포를 10% FBS와 15% FBS 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신이 추가된 DMEM과 RPMI1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂의 가습 항온기에서 각각 배양하였다. 배양한 HeLa 세포와 GN02606 세포를 각각 1x10⁵/웰, 8x10⁵/웰의 밀도로 글라스가 들어 있는 12웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 3.에서 정제한 ACP-ADA 3 mM을 세포에 처리하여 24시간 또는 3시간 동안 배양한 후 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 세척한 세포를 3.7% 포르말데하이드로 20분 동안 고정시키고, 0.2% 트리톤 X-100(Triton X-100)이 포함된 PBS를 처리하여 세포막 투과성을 증가시켰다. 다음으로 세포에 3% BSA를 처리하여 1시간 동안 블로킹(blocking)시키고, 자체 생산한 ACP 항체와 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 Alexa 488 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS로 3회 세척하였다. 세포를 튜블린 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)와 상온에서 2시간 반응시키고, PBS로 3회 세척하였다. 다음으로 Cy3 2차 항체(Cy3-conjugated secondary antibody; Jackson ImmunoResearch, 미국)를 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS로 3회 세척한 다음, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindol)로 10분 동안 염색하였다. HeLa 세포와

GM02606 세포가 부착된 글라스를 떼어내어 슬라이드 글라스 위에 올려놓고, 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscopy; LSM 700, Zeiss, 독일)으로 관찰하였다.

[0103] **5. ADA가 결핍된 세포에서 ACP-ADA의 세포막 투과성 확인**

[0104] **5-1. ACP-ADA의 투과성 분석**

[0105] GM02606 세포주를 15% FBS 및 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신이 추가된 RPMI1640을 사용하여 37℃, 5% CO₂의 가습 항온기에서 배양하였다. 배양한 GM02606 세포를 2x10⁶/웰(well)의 밀도로 6웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 3.에서 정제한 ACP-ADA 3 mM을 세포에 처리하여 3시간 동안 배양한 후 세포를 harvest하여 원심분리(5000 rpm, 5분) 하였다. 분리한 세포에 RIPA 버퍼(10 mM Tris-Cl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 140 mM NaCl 및 1 mM PMSF)를 첨가하여 세포를 용해시키고, 얼음에 30분 동안 방치하였다. 이후 4℃에서 원심분리(14,000 rpm, 20분)하여 세포 잔해를 제거하고, 세포 용해물(cell lysate)인 상등액만 회수하였다. 분리된 세포 용해물의 단백질 농도를 PierceTM BCA protein assay kit(Thermo, 미국)로 측정하고, 단백질 20 μg을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane)으로 이동시킨 후, PVDF 막을 5% 탈지 우유(skim milk)로 블로킹(blocking)하였다. PVDF 막을 일차 항체(ADA, ACP 및 Actin 항체)와 4℃에서 16시간 반응시킨 후 세척하고, 이차 항체를 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후, ECL(PierceTM ECL Western Blotting Substrate(Thermo ScientificTM, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 단백질 밴드를 검출하였다. 단백질 밴드의 검출을 위하여 AmershamTM Imager 600(GE Healthcare Life Science, 미국)을 사용하였다.

[0107] **5-2. ACP-ADA의 아데노신 탈아미노화효소 활성 측정**

[0108] 5-1과 동일한 방법으로 GM02606 세포주에 상기 3.에서 정제한 ACP-ADA 3 mM을 세포에 처리하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 harvest하여 원심분리(5,000 rpm, 5분)하였다.

[0109] 그 다음, 상등액을 제거하고, 세포의 펠렛(pellet)을 회수한 후 Adenosine Deaminase Activity Assay Kit (BioVision, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 ADA 활성을 측정하였다. 구체적으로, ADA에 의하여 생산되는 Inosine을 다시 반응시켜 2차 생산된 Uric acid를 측정하기 위하여, 세포 및 혈장의 샘플을 키트 내 시약과 반응 시킨 다음, 293nm의 파장을 가진 ELISA Leader를 사용하여 측정하였다.

[0111] **6. ADA 유전자 발현 hetero (+/-) 마우스에서 ACP-ADA의 아데노신 탈아미노화효소 활성 측정**

[0112] **6-1. 실험 동물 준비**

[0113] 실험 동물은 Jackson lab으로부터 모체(JAX #003265 - FVB;129-Adatm1Mw Tg(PLADA)4118Rkmb/J, Michael R. Blackburn et al., 1998, Melissa B. Aldrich et al., 2003)를 구입하여 교배시킨 후, ADA 유전자 발현 hetero 마우스를 얻어 사용하였다. 동물 사육실은 55±15% 습도와 23±3℃의 온도를 유지하였다. 실내의 조명은 12h 명/암(light/dark) 주기로 유지하였다. 동물 실험은 (주)노터스 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Case and Use committee)에 의해 승인되었고, 동물은 프로토콜의 지침에 따라 처리하였다.

[0115] **6-2. ADA hetero (+/-) 마우스에 단백질 투여**

[0116] 구입한 Bovine ADA(creative enzyme, 미국)와 정제한 ACP-ADA 단백질 100U/kg을 정맥 투여 하였다. 어떤 물질도 투여하지 않은 ADA 유전자 발현 hetero (+/-) 마우스의 혈액을 대조군으로 사용하였다. 단백질 투여 후 1, 6, 24시간 후, 해당 동물을 에터(ether)를 이용하여 마취하고, 후대정맥에서 주사기를 이용하여 약 0.7ml의 혈액을 채취한 다음, 혈액 시료에 7 μl의 헤파린(heparin, sodium heparin 500IU/ml)을 첨가하였다.

- [0118] **6-3. ACP-ADA의 아데노신 탈아미노화효소 활성 분석**
- [0119] 마우스에서 분리한 혈액을 원심분리(1000rpm, 10분) 하였다. 원심분리 후, 혈액만 채취하여 Histopaque 1077 용액 위에 올리고, 원심분리(400xg, 30분)하여 적혈구(RBC), 단핵세포(mononuclear cells) 및 혈장(plasma)을 분리하였다. 분리된 세포 중 단핵세포만 회수하여 1X PBS를 첨가한 후 원심분리(250xg, 10분) 하였다. 그 다음, 상등액을 제거하고, 세포의 펠렛을 회수한 후, Adenosine Deaminase Activity Assay Kit(BioVision, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 ADA 활성을 측정하였다.
- [0121] **실험 결과**
- [0122] **1. ACP-ADA, ADA-ACP 백터의 발현 확인**
- [0123] 도 1의 A와 같이 제작된 ACP-ADA, ADA-ACP 백터의 세포 내 발현 유무를 확인하기 위하여 293FT 세포에 형질주입한 후 웨스턴 블롯을 수행하였다. 도 1의 A에서 진한 회색 사각형은 재조합 단백질(ACP-ADA, ADA-ACP)의 C-말단에 결합된 His 태그(tag)를 나타낸다.
- [0124] 그 결과, 도 1의 B에 나타난 바와 같이 ACP 항체, 재조합 단백질(ACP-ADA, ADA-ACP)의 C-말단에 결합되어 있는 His 특이적 항체를 사용한 웨스턴 블롯에서 재조합 단백질의 예상 크기(48 kDa)와 상응하는 밴드를 확인할 수 있었다. 이 결과는 ACP-ADA 및 ADA-ACP가 세포 내에서 정상적으로 발현되는 것을 의미한다.
- [0126] **2. ACP-ADA, ADA-ACP의 아데노신 탈아미노화효소 활성 확인**
- [0127] **2-1. 세포 내에서 ACP-ADA, ADA-ACP의 활성 확인**
- [0128] 293FT 세포에서 ACP-ADA, ADA-ACP의 활성을 측정한 결과, 도 2의 B에 나타난 바와 같이 대조군(pTriEx)과 비교하여 ACP-ADA 또는 ADA-ACP를 형질주입한 경우 ADA 활성이 50배 이상 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 도 2의 A에 나타난 바와 같이 각 실험군 사이에 형질주입 효율은 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다.
- [0129] 본 실험을 통하여 세포 내에서 발현되는 ACP-ADA, ADA-ACP 단백질이 ADA 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.
- [0131] **2-2. 정제된 ACP-ADA의 활성 확인**
- [0132] 대장균 BL21(DE3)에서 분리 정제된 ACP-ADA의 활성을 측정한 결과, 도 3의 B에 나타난 바와 같이 단백질 농도가 증가할수록 활성이 증가하다가 일정한 값으로 수렴하는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험을 통하여 정제된 ACP-ADA의 비(比)활성(specific activity)이 20 U/mg인 것을 알 수 있었다.
- [0134] **3. ACP-ADA의 세포막 투과 활성 확인.**
- [0135] ACP-ADA 3 mM을 HeLa 세포와 GM02606 세포에 각각 24시간, 3시간 동안 처리한 후 세포 투과 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 4의 A와 도 4의 C에 나타난 바와 같이 ACP-ADA 처리군에서는 ACP-ADA가 세포 내로 유입되어 녹색 형광이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(튜블린-적색 형광, 핵-청색 형광). 또한, 도 4의 B에 나타난 바와 같이 대조군 대비 ACP-ADA 처리군에서는 녹색 형광의 신호가 현저하게 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0137] **4. ADA가 결핍된 세포에서 ACP-ADA의 투과 및 아데노신 탈아미노화효소 활성 확인**
- [0138] ADA가 결핍된 세포에 ACP-ADA가 세포 내로 투과되어 ADA 활성이 향상되는지 확인하기 위하여, ADA가 결핍된 특성을 나타내는 GM02606 세포주를 대상으로, ACP-ADA의 세포 내 투과성 및 ADA 활성 증가 효과를 분석하였다.
- [0140] **4-1. 세포 내로의 ACP-ADA의 투과 확인**
- [0141] 대장균에서 분리 정제된 ACP-ADA를 ADA가 결핍된 세포 내로 투과되는지 여부를 확인하기 위하여 GM02606 세포에 세포막 투과를 시킨 후 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0142] 그 결과, 도 5의 A에 나타난 바와 같이 ADA와 ACP 항체를 사용한 웨스턴 블롯에서 재조합 단백질의 예상 크기 (48 kDa)와 상응하는 밴드를 확인하여, ACP-ADA가 세포 내로 투과된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0144] **4-2. 세포 내에서 ACP-ADA의 활성 확인**

[0145] 대장균에서 분리 정제된 ACP-ADA를 ADA가 결핍된 세포(GM02606)에 세포막 투과를 시킨 후 활성을 측정된 결과, 도 5의 B에 나타난 바와 같이 대조군 (GM02606)과 비교하여 ACP-ADA를 투과 시킨 GM02606 세포에서는 ADA의 활성이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0146] 본 실험을 통하여 세포 내에서 전달된 ACP-ADA 단백질이 ADA 활성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0148] **5. ADA hetero (+/-) 마우스에서 ACP-ADA의 탈아미노화효소 활성 확인**

[0149] 구입한 bovine ADA와 대장균에서 분리 정제된 ACP-ADA를 ADA hetero (+/-) 마우스에 주입한 후 1, 6, 24시간 후 혈액을 채취하여 단핵세포 내 활성을 측정된 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 bovine ADA를 주입한 후 1, 6시간, ACP-ADA를 주입한 후 1, 6, 24시간에서 통계적으로 유의하게 탈아미노화효소의 활성이 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히 대조군에 비해 ACP-ADA의 주입 후 24시간 후에 채취한 혈액 내 단핵세포에서의 ADA활성이 약 3배 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

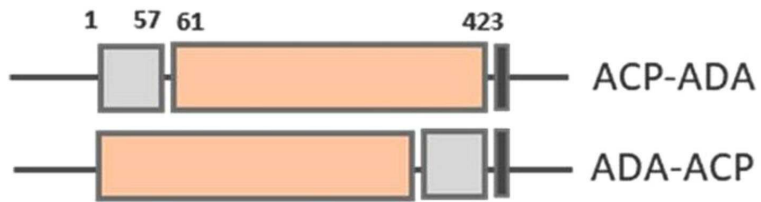
[0150] 본 실험을 통하여 ACP-ADA 단백질이 in vivo 수준에서도 ADA 활성을 유지한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0152] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

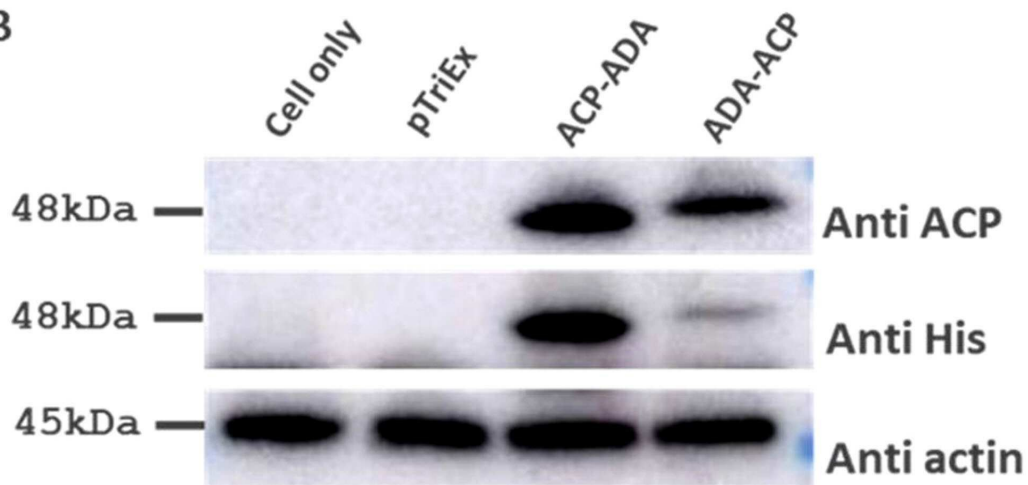
도면

도면1

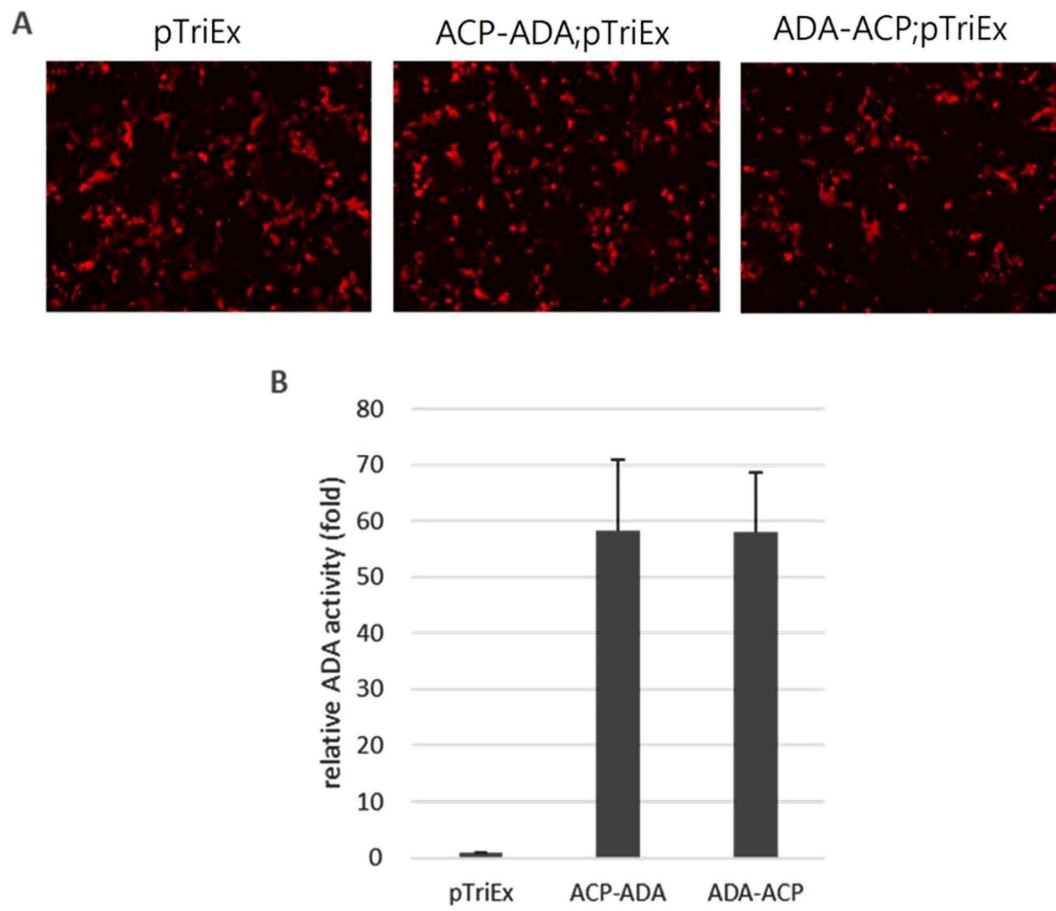
A



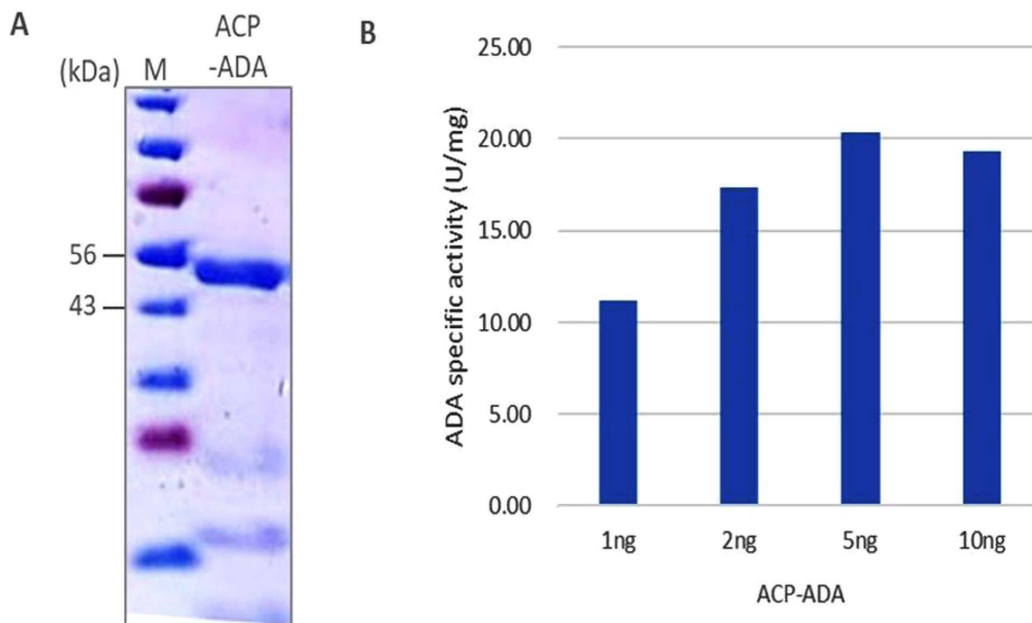
B



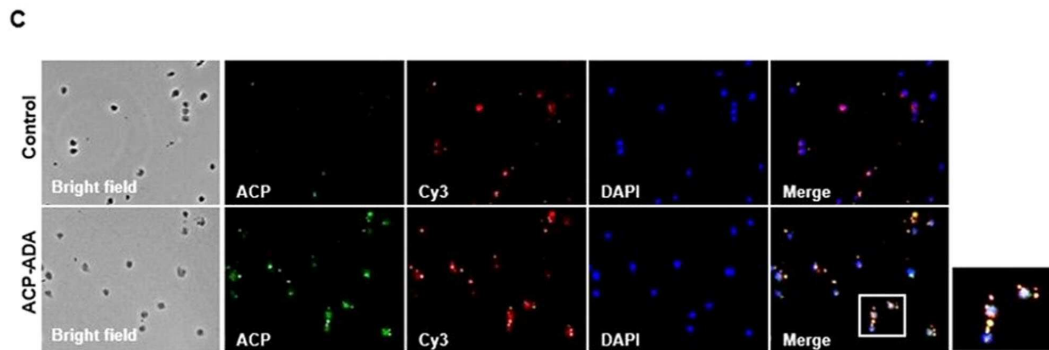
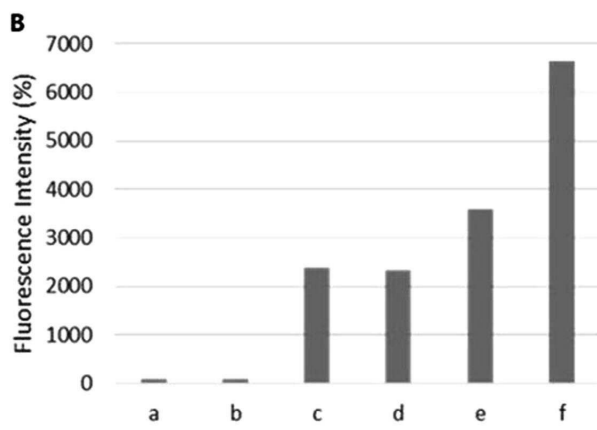
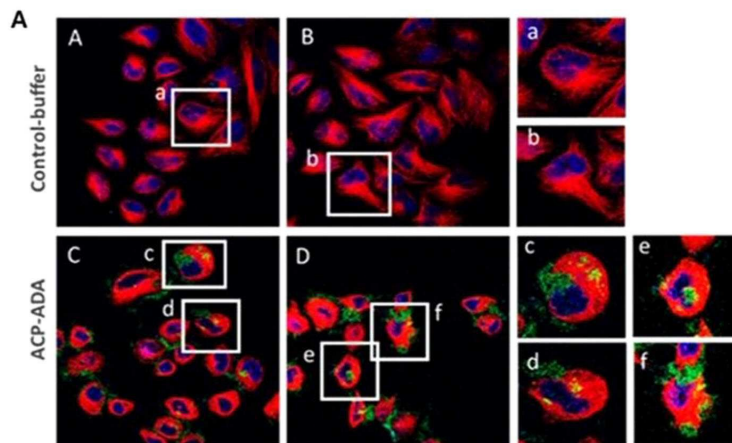
도면2



도면3

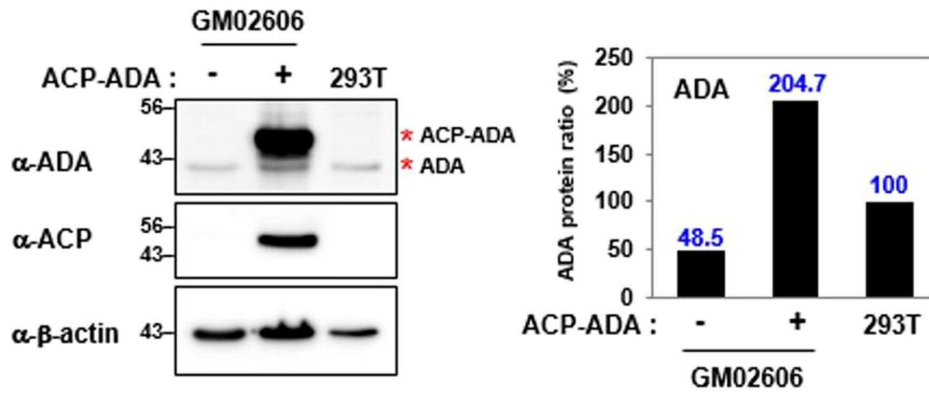


도면4

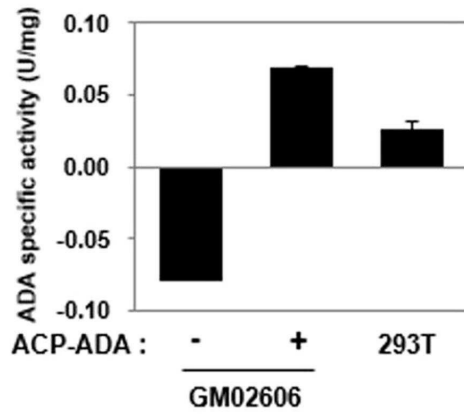


도면5

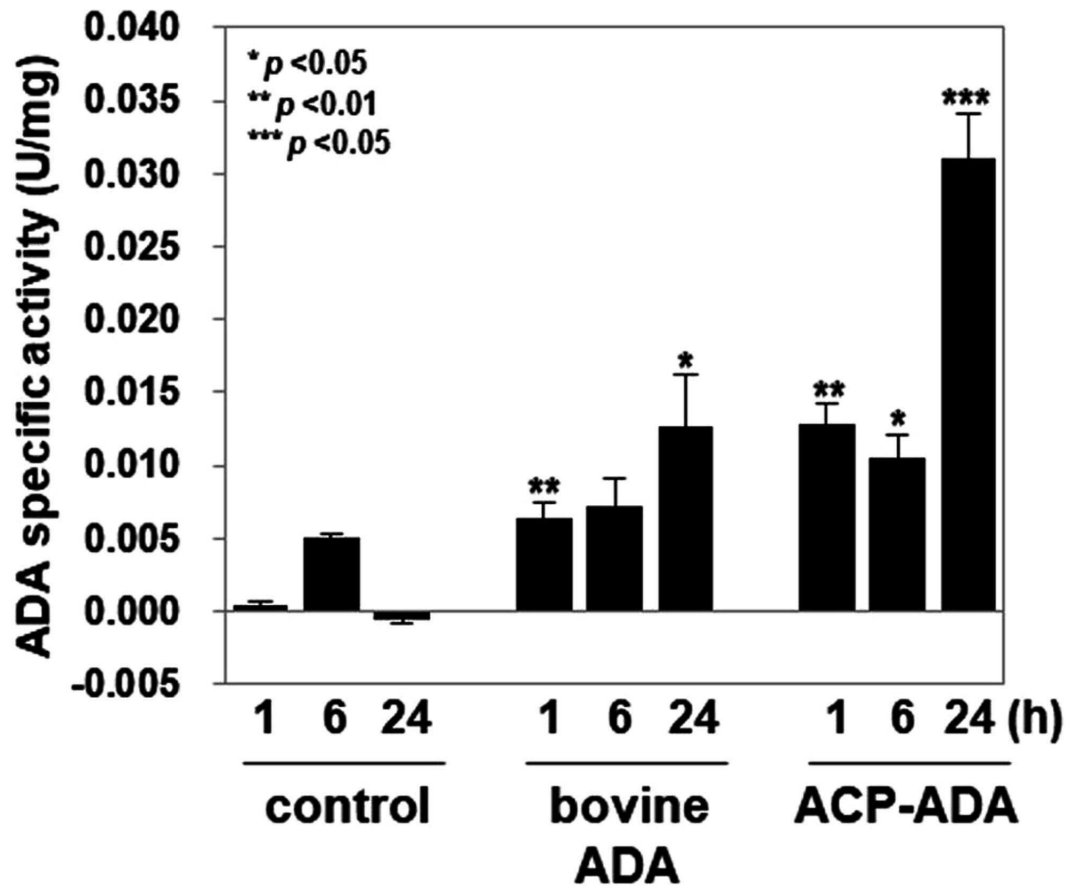
A



B



도면6



서열 목록

- <110> Avixgen Incorporation
 - <120> Pharmaceutical Composition for Treatment of Severe Combined Immunodeficiency comprising Cell Penetrating Peptide and Adenosine Deaminase Conjugate
 - <130> PN180154
 - <160> 10
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 57
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Avixgen's advanced cell-penetrating peptide(ACP) amino acids sequence
 - <400> 1
- Met Gly Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys Thr Val Lys Cys

1 5 10 15
Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro
 20 25 30
Arg Lys Lys Gly Cys Trp Arg Cys Gly Arg Glu Gly His Gln Met Lys
 35 40 45
Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Leu
 50 55

<210> 2

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val

1 5 10 15
His Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg
 20 25 30
Arg Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn
 35 40 45
Val Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys
 50 55 60
Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile Lys
65 70 75 80

Arg Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 85 90 95
Tyr Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val
 100 105 110
Glu Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu
 115 120 125
Val Val Ala Leu Val Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe
 130 135 140
Gly Val Lys Ala Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Asn

145 150 155 160

Trp Ser Pro Lys Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln Thr
 165 170 175

Val Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser Ser
 180 185 190

Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser Gly
 195 200 205

Ile His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val Val
 210 215 220

Lys Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr
 225 230 235 240

His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn
 245 250 255

Met His Phe Glu Ile Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp
 260 265 270

Lys Pro Asp Thr Glu His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln Ala
 275 280 285

Asn Tyr Ser Leu Asn Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu
 290 295 300

Asp Thr Asp Tyr Gln Met Thr Lys Arg Asp Met Gly Phe Thr Glu Glu
 305 310 315 320

Glu Phe Lys Arg Leu Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro
 325 330 335

Glu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly
 340 345 350

Met Pro Pro Ser Ala Ser Ala Gly Gln Asn Leu
 355 360

<210> 3

<211> 430

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACP-ADA amino acids sequence

<400> 3

Met Gly Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys Thr Val Lys Cys
 1 5 10 15
 Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro
 20 25 30
 Arg Lys Lys Gly Cys Trp Arg Cys Gly Arg Glu Gly His Gln Met Lys
 35 40 45
 Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Leu Thr Ser Leu Ala Gln Thr Pro
 50 55 60
 Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His Val His Leu Asp Gly Ser
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly Arg Arg Arg Gly Ile Ala
 85 90 95
 Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu Asn Val Ile Gly Met Asp
 100 105 110
 Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala Lys Phe Asp Tyr Tyr Met
 115 120 125

 Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile Lys Arg Ile Ala Tyr Glu
 130 135 140
 Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val Val Tyr Val Glu Val Arg
 145 150 155 160
 Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys Val Glu Pro Ile Pro Trp
 165 170 175
 Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp Glu Val Val Ala Leu Val
 180 185 190
 Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp Phe Gly Val Lys Ala Arg
 195 200 205
 Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro Asn Trp Ser Pro Lys Val
 210 215 220
 Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln Thr Val Val Ala Ile Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly His
 245 250 255

Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser Gly Ile His Arg Thr Val
 260 265 270

His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val Val Lys Glu Ala Val Asp
 275 280 285

Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly Tyr His Thr Leu Glu Asp
 290 295 300

Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu Asn Met His Phe Glu Ile
 305 310 315 320

Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Trp Lys Pro Asp Thr Glu
 325 330 335

His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln Ala Asn Tyr Ser Leu Asn
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Leu Ile Phe Lys Ser Thr Leu Asp Thr Asp Tyr Gln
 355 360 365

Met Thr Lys Arg Asp Met Gly Phe Thr Glu Glu Glu Phe Lys Arg Leu
 370 375 380

Asn Ile Asn Ala Ala Lys Ser Ser Phe Leu Pro Glu Asp Glu Lys Arg
 385 390 395 400

Glu Leu Leu Asp Leu Leu Tyr Lys Ala Tyr Gly Met Pro Pro Ser Ala
 405 410 415

Ser Ala Gly Gln Asn Leu Leu Glu His His His His His His
 420 425 430

<210> 4

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADA-ACP amino acids sequence

<400> 4

Met Gly Ala Gln Thr Pro Ala Phe Asp Lys Pro Lys Val Glu Leu His
 1 5 10 15

Val His Leu Asp Gly Ser Ile Lys Pro Glu Thr Ile Leu Tyr Tyr Gly
 20 25 30

Arg Arg Arg Gly Ile Ala Leu Pro Ala Asn Thr Ala Glu Gly Leu Leu
 35 40 45
 Asn Val Ile Gly Met Asp Lys Pro Leu Thr Leu Pro Asp Phe Leu Ala
 50 55 60
 Lys Phe Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Ile Ala Gly Cys Arg Glu Ala Ile
 65 70 75 80
 Lys Arg Ile Ala Tyr Glu Phe Val Glu Met Lys Ala Lys Glu Gly Val
 85 90 95
 Val Tyr Val Glu Val Arg Tyr Ser Pro His Leu Leu Ala Asn Ser Lys
 100 105 110

 Val Glu Pro Ile Pro Trp Asn Gln Ala Glu Gly Asp Leu Thr Pro Asp
 115 120 125
 Glu Val Val Ala Leu Val Gly Gln Gly Leu Gln Glu Gly Glu Arg Asp
 130 135 140
 Phe Gly Val Lys Ala Arg Ser Ile Leu Cys Cys Met Arg His Gln Pro
 145 150 155 160
 Asn Trp Ser Pro Lys Val Val Glu Leu Cys Lys Lys Tyr Gln Gln Gln
 165 170 175
 Thr Val Val Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Glu Thr Ile Pro Gly Ser

 180 185 190
 Ser Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys Ser
 195 200 205
 Gly Ile His Arg Thr Val His Ala Gly Glu Val Gly Ser Ala Glu Val
 210 215 220
 Val Lys Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Thr Glu Arg Leu Gly His Gly
 225 230 235 240
 Tyr His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Arg Gln Glu
 245 250 255

 Asn Met His Phe Glu Ile Cys Pro Trp Ser Ser Tyr Leu Thr Gly Ala
 260 265 270
 Trp Lys Pro Asp Thr Glu His Ala Val Ile Arg Leu Lys Asn Asp Gln

<400> 6

atggcccaga cgcccgctt cgacaagccc aaagtagaac tgcatgtcca cctagacgga	60
tccatcaage ctgaaacat cttatactat ggcaggagga gagggatcgc cctcccagct	120
aacacagcag aggggctgct gaacgtcatt ggcattggaca agccgctcac ccttccagac	180
ttcttgcca agtttgacta ctacatgcct gctatcgcgg gctgccgga ggctatcaaa	240
aggatcgctt atgagtttgt agagatgaag gccaaagagg gcgtggtgta tgtggaggtg	300
cggtacagtc cgcacctgct ggccaactcc aaagtggagc caatcccctg gaaccaggct	360
gaaggggacc tcaccccaga cgaggtggtg gccctagtgg gccagggcct gcaggagggg	420
gagcgagact tcggggtcaa ggcccgttcc atcctgtgct gcatgcgcca ccagcccaac	480
tggccccca aggtggtgga gctgtgtaag aagtaccagc agcagaccgt ggtagccatt	540
gacctggctg gagatgagac catcccagga agcagcctct tgccctggaca tgtccaggcc	600
taccaggagg ctgtgaagag cggcattcac cgtactgtcc acgccgggga ggtgggctcg	660
gccgaagtag taaaagaggc tgtggacata ctcaagacag agcggctggg acacggctac	720
cacacctgg aagaccagc cttttataac aggctgcggc aggaaaacat gcacttcgag	780
atctgccctt ggtccagcta cctcactggt gcctggaagc cggacacgga gcatgcagtc	840
attcgctca aaaatgacca ggctaactac tcgctcaaca cagatgacc gctcatcttc	900
aagtccacce tggacactga ttaccagatg accaaacggg acatgggctt tactgaagag	960
gagtttaaaa ggctgaacat caatgcggcc aaatctagtt tcctcccaga agatgaaaag	1020
aggagcttc tcgacctgct ctataaagcc tatgggatgc caccttcagc ctctgcaggg	1080
cagaacctct ga	1092

<210> 7

<211> 1293

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACP-ADA polynucleotides

<400> 7

atgggccagc ggggaaactt caggaaccag agaaaaactg tgaagtgctt caattgcgga	60
aaggagggcc acatcgctaa gaactgccgc gccccagaa agaaaggctg ctggagatgc	120
ggcagagagg gccaccagat gaaggactgc acagagagac aggcaactt aacaagcttg	180
gcccagacgc ccgccttcga caagcccaaa gtagaactgc atgtccacct agacggatcc	240
atcaagcctg aaaccatctt atactatggc aggaggagag ggatcgccct cccagctaac	300

acagcagagg ggctgctgaa cgtcattggc atggacaagc cgctcaccct tccagacttc 360
ctggccaagt ttgactacta catgcctgct atcgcgggct gccgggaggc tatcaaaagg 420
atcgcctatg agttttaga gatgaaggcc aaagagggcg tgggtgatgt ggaggtgcgg 480
tacagtcgcg acctgctggc caactccaaa gtggagccaa tcccctggaa ccaggctgaa 540
ggggactca cccagacga ggtggtggcc ctagtgggcc agggcctgca ggagggggag 600
cgagacttcg gggtaaggc cgggtccatc ctgtgctgca tgcgccacca gcccaactgg 660
tcccccaagg tggtaggact gtgtaagaag taccagcagc agaccgtggt agccattgac 720

ctggctggag atgagacat cccaggaagc agcctcttgc ctggacatgt ccaggectac 780
caggaggctg tgaagagcgg cattcaccgt actgtccacg ccggggaggt gggctcgccc 840
gaagtagtaa aagaggctgt ggacatactc aagacagagc ggctgggaca cggctaccac 900
acctggaag accagccctt ttataacagg ctgcggcagg aaaacatgca cttcgagatc 960
tgcccctggt ccagctacct cactggtgcc tgggaagccgg acacggagca tgcagtcatt 1020
cggctcaaaa atgaccagc taactactcg ctcaacacag atgaccgct catcttcaag 1080
tccaccctgg aactgatta ccagatgacc aaacgggaca tgggctttac tgaagaggag 1140

ttaaaaggc tgaacatcaa tgcggccaaa tctagtttcc tcccagaaga tgaagagg 1200
gagcttctcg acctgctcta taaagcctat gggatgccac cttcagcctc tgcagggcag 1260
aacctcctcg agcaccacca ccaccaccac tga 1293

<210> 8
<211> 1296
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ADA-ACP polynucleotides
<400> 8

atgggcgccc agaccccgc cttcgacaag cccaaagtag aactgcatgt ccacctagac 60
ggatccatca agcctgaaac catcttatac tatggcagga ggagagggat cgccctccca 120

gctaacacag cagaggggct gctgaacgtc attggcatgg acaagccgct cacccttcca 180
gacttctcgg ccaagtttga ctactacatg cctgctatcg cgggctgccg ggaggtatc 240
aaaaggatcg cctatgagtt tntagagatg aaggccaaag agggcgtggt gtatgtggag 300
gtgcggtaca gtccgcacct gctggccaac tccaaagtgg agccaatccc ctggaaccag 360
gctgaagggg acctcaccoc agacgaggtg gtggccctag tgggccaggg cctgcaggag 420
ggggagcgag acttcggggt caaggcccgg tccatcctgt gctgcatgcg ccaccagccc 480

aactggtccc ccaaggtggt ggagctgtgt aagaagtacc agcagcagac cgtggtagcc 540

atlgacctgg ctggagatga gaccatcca ggaagcagcc tcttgcttgg acatgtccag 600

gcctaccagg aggctgtgaa gagcggcatt caccgtactg tccacgccgg ggaggtgggc 660

tcggccgaag tagtaaaaga ggctgtggac atactcaaga cagagcggct gggacacggc 720

taccacacce tgaagacca ggccctttat aacaggctgc ggcaggaaaa catgcacttc 780

gagatctgcc cctggtccag ctacctcact ggtgcctgga agccggacac ggagcatgca 840

gtcattcggc tcaaaaatga ccaggctaac tactcgtca acacagatga cccgctcatc 900

ttcaagtcca cctggacac tgattaccag atgaccaaac gggacatggg ctttactgaa 960

gaggagtta aaaggctgaa catcaatgcg gccaaatcta gtttctccc agaagatgaa 1020

aagagggagc ttctcgacct gctctataaa gcctatggga tgccaccttc agcctctgca 1080

gggcagaacc tcaagcttca gcggggaaac ttcaggaacc agagaaaaac tgtgaagtgc 1140

ttcaattgcg gaaaggagg ccacatcgct aagaactgcc gcgccccag aaagaaaggc 1200

tgctggagat gcggcagaga gggccaccag atgaaggact gcacagagag acaggcaaac 1260

ttactcgagc accacatca ccatcacat cactaa 1296

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward from HindIII-ADA

<400> 9

cccaagcttg gccagacgc ccgc 24

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse from ADA-XhoI

<400> 10

ccctcgagga ggttctgccc tgcagag 27