



(51) 국제특허분류:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/004990

(22) 국제출원일:

2023년 4월 13일 (13.04.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0046441 2022년 4월 14일 (14.04.2022) KR

10-2022-0087398 2022년 7월 15일 (15.07.2022) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김용성 (KIM, Yong Sung); 16504 경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 60, #6303-2502, Gyeonggi-do (KR). 박성욱 (PARK, Seong-Wook); 16496 경기도 수원시 팔달구 중부대로223번길 69-19, #B-402, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

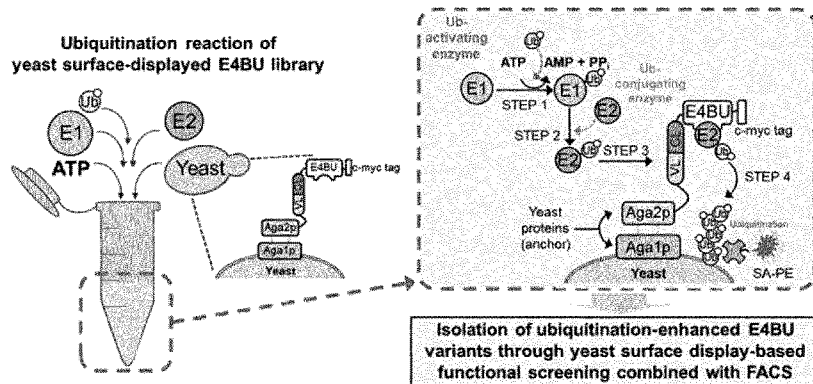
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL,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

공개:

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

(54) Title: U-BOX VARIANT OF E3 LIGASE WITH ENHANCED UBIQUITIN LIGASE ACTIVITY

(54) 발명의 명칭: 유비퀴틴 리가제 활성이 증가된 E3 리가제의 U-박스 변이체



(57) Abstract: The present invention relates to a U-box domain variant of E4B (E4BU) having allosteric regulation that can enhance the ubiquitination activity by increasing the ubiquitin-conversion rate of ubiquitin (Ub)-bound ubiquitin conjugating enzyme (E2) (E2-Ub), a nucleic acid encoding same, an expression vector, a recombinant cell, and a method for preparing same.

(57) 요약서: 본 발명은 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)가 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킬 수 있는 다른 자리 입체적 변화 (allosteric regulation)를 포함하는, E4B의 U-box 도메인 (E4BU) 변이체, 이를 코딩하는 핵산, 발현벡터, 재조합 세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.



명세서

발명의 명칭: 유비퀴틴 리가제 활성 이 증가된 E3 리가제의 U-박스 변이체

기술분야

- [1] 본 발명은 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)이 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킬 수 있는 다른 자리 입체적 변화 (allosteric regulation)를 포함하는, E4B의 U-box 도메인 (E4BU) 변이체, 이를 코딩하는 핵산, 발현벡터, 재조합 세포 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 일반적으로 세포 내 단백질 분해는 오토파지 경로 (Autophagy pathway)를 통해 오토파고솜 (Autophagosome)과 오토라이소솜 (Autolysosome)을 거쳐 단백질이 분해되는 경로와, 프로테아솜 (proteasome)에 의해 단백질이 분해되는 두 가지 경로를 통해 이뤄지고, 이 중 80%는 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)에 의해 표지된 후 프로테아솜에 의해 세포질과 핵에서 분해된다. 이러한 유비퀴틴에 의한 단백질 분해 조절 시스템은 손상된 단백질이나 불필요한 단백질을 제거하여 세포의 항상성을 유지하는 기능을 담당할 뿐 아니라, 시간에 따라 정교하게 조절되어야 하는 세포주기 과정이나 전사 조절 과정에도 참여한다.
- [4] 76개의 아미노산으로 구성된 단백질인 유비퀴틴은 일련의 효소계, 즉 ubiquitin activating enzyme (E1), ubiquitin conjugating enzyme (E2), 및 ubiquitin ligase enzyme (E3)가 캐스케이드 형식으로 관여하며, E1이 ATP 의존적 반응에 의해 Ub를 활성화하고, E2로 전달하여 Ub가 결합된 E2 (E2-Ub)를 형성한다. 결합 도메인과 기질 인식 도메인으로 구성된 E3는 이러한 E2-Ub 결합체와 기질단백질 (substrate protein, substrate)을 근접하게 위치시켜 E2-Ub에서 기질단백질의 라이신 잔기로 Ub의 이동을 촉진한다. Ub는 기질단백질에 하나 또는 여러 개의 라이신 잔기에 결합되거나 연속적인 Ub 분자를 유비퀴틴 사슬로 연쇄/다중 표지시키는 폴리-유비퀴틴화 (poly-ubiquitination, poly-Ub)사슬을 형성할 수 있다. 특히 라이신-48 폴리-유비퀴틴 화는 ATP-의존성 단백질 분해효소 복합체인 26S 프로테아솜 (26S proteasome)에 전달되고, 접힘이 풀리며 분해가 되며, 이 과정을 유비퀴틴-프로테아솜 시스템 (ubiquitin-proteasome system, UPS)이라 한다. 이러한 UPS에서 E1은 2개, E2는 38여개, E3는 600개 이상의 종류가 있다고 알려져 있다. 이 중에서 E3는 특징적 도메인 구조 존재여부 및 Ub를 전달하는 기작의 차이에 따라 RING (Really Interesting New Gene)-type E3 ligases, HECT (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus)-type E3 ligases, RBR (RING-Between-RING)-type E3 ligases, 그리고 U-box-type E3 ligases로 나뉘어진다. 이 중에서도 U-box-type과

RING-type E3 ligases가 가장 풍부한 유형으로 각각 U-box 도메인과 RING 도메인을 가지고 있어, E2-Ub complex의 앵커 역할을 한다. U-box 도메인과 RING 도메인은 E2-Ub complex의 Ub와 기질 단백질의 아미노기 사이의 근접성을 제공하기 위해 E2-Ub에 직접적으로 결합을 하여 결합 부위 외의 다른 자리의 입체성 조절을 통해 촉매의 활성을 자극하고, 근접해 있는 기질 단백질의 유비퀴틴화 속도를 제어하게 된다. 이러한 E3는 E2-Ub와 기질단백질 양쪽 모두에 결합하며, 유비퀴틴화 될 기질 단백질을 인지할 수 있는 특이성을 제공한다. 즉, 기질 단백질의 poly-Ub화는 E3 효소에 의해 결정이 되고, 모든 기질 단백질에는 특정 E3가 결합하는 인식 부위와 유비퀴틴화가 진행되는 Ub 연결부위가 존재한다. 약 10만 종의 단백질이 존재하는 세포 내의 환경을 고려하면, 각 E3는 기질 특이성이 있지만, 동시에 중복성 (redundancy)과 다중성 (multiplicity)을 함께 지닌다.

- [5] 이러한 E3를 통해 표적단백질을 poly-Ub화 시켜 UPS를 통한 단백질의 분해를 유도하는 기술로 연구된 것이 PROTAC (Proteolysis-targeting chimera, PROTAC) 기술이다. 일반적으로 PROTAC은 E3 결합 모듈-링커-표적단백질 결합 모듈의 3가지 파트로 구성된 헤테로-2기능성 (hetero-bifunctional) 소분자 의약품으로, 표적 단백질을 인지하여 특이적으로 결합하는 소분자와 E3를 특이적으로 인지하여 결합할 수 있는 소분자를 가운데의 링커로 연결한 물질이 하나의 화합물로 사용되고 있다. 이러한 PROTAC은 표적단백질을 특이적으로 인지하는 소분자가 표적 단백질과 결합하고, E3를 특이적으로 인지하는 소분자가 E3를 인지하여 결합하였을 때, E3와 표적단백질이 위치적으로 가까워지게 되고, E3에 의한 표적 단백질의 poly-Ub화를 유도하게 된다. 세포 내부에서의 poly-Ub화의 유도는 결국 ATP-의존성 단백질 분해효소 복합체인 26S 프로테아좀에 poly-Ub화 된 표적단백질이 인지되어 UPS를 통한 분해를 가져오게 된다. 하지만 이러한 PROTAC과 같은 소분자 화합물의 경우 소분자 화합물이라는 근본적인 한계를 가지게 된다. 즉 일반적으로 알려진 소분자 의약품의 단점인 소수성 결합 포켓 (Hydrophobic pocket)이 존재하지 않는 단백질의 표면에는 결합이 어려워 표적하기 어려우며, 세포 특이성을 가지지 못하기 때문에 일반 세포에 작용하여 부작용을 동반할 가능성이 있다. 그리고, 생체분자의약품과 비교하여 반감기가 낮아 생체 내에서 빠른 분해가 되고, 따라서 생체이용률 (bioavailability)이 낮다는 한계점도 갖고 있다. 지금까지 연구된 PROTAC 기술에 활용된 E3는 대표적으로 β -TrCP, MDM2, cIAP/XIAP, VHL, CRBN의 5종이 존재하고 있으며, 일부 E3 ligase의 경우 (예, β -TrCP, MDM2)의 경우 효능이 미약하다. 이러한 한계를 극복하기 위한 방법 중 하나로 소분자 의약품이 아닌 생체분자를 이용하여 표적단백질의 분해를 유도하기 위한 기술로 단백질 기반의 표적단백질분해제 (Biological Proteolysis-targeting chimera, BioPROTAC)가 연구되고 있다. BioPROTAC은 기질단백질과 결합하는 바인더(binder)와 E3 결합 모듈 혹은 E2 결합 모듈을 융합한 단백질로, 기질 단백질과의 특이적 결합을 제공하는 모듈은 항체 절편 (nanobody, single chain variable fragment(scFv)) 등을 이용하고, E3 결합 모듈 혹은 E2 결합

모듈은 RING-type E3의 기질수용체 도메인 혹은 U-box-type E3의 U-box 도메인을 이용한다. BioPROTAC은 대표적으로 ubiquibodies, antibody RING-mediated destruction (ARMeD), affinity-directed protein missile (AdPROM) 기술이 있다. 이러한 bioPROTAC의 경우 앞에서 소분자 의약품이 가지고 있던 문제점을 대부분 극복할 수 있어 소수성 결합 포켓 (Hydrophobic pocket)이 존재하지 않는 단백질의 표면에도 결합이 용이하며, 세포 특이성을 가질 수 있어 표적 세포 특이적으로 작용할 수 있고, 소분자 의약품과 비교하여 반감기가 높아 생체이용률 (bioavailability) 또한 높다. 하지만, bioPROTAC은 스스로 세포질 내부에 위치할 수 없어, 세포 내로 전달하기 위해 DNA, mRNA transfection 등의 인위적인 발현 시스템을 사용해야 사용이 가능해, 치료 등의 목적으로 생체 내 적용이 어렵다는 단점이 있다. 최근에 항체-약물결합체 (antibody-drug conjugate, ADC)처럼, 항체-PROTAC 결합체 (antibody-PROTAC conjugate) 기술이 보고되었다. 하지만, 항체-PROTAC 결합체 기술도 E3를 특이적으로 결합할 수 있는 E3 결합 모듈의 개발이 전제되어, 난제 표적단백질에 대한 PROTAC 기술의 한계를 여전히 지닌다. 또한 ADC의 기본적인 한계인 위치 특이적 결합, 제조 등의 CMC (chemistry, manufacturing, control) 문제를 해결해야 하는 단점이 있다.

- [6] bioPROTAC에서 표적 단백질의 poly-Ub화를 유도하기 위한 도메인으로 cullin-RING-type E3 (CRLs)와 U-box-type E3가 주로 사용되고 있다. CRLs의 경우 E3중 가장 큰 family로, 8가지 타입으로 나뉘게 되며, CRL 복합체에서 기본적으로 E3 유도체의 경우 주로 cullin-RING E3 ubiquitin ligase (CRLs)로, 복합체를 이루어 기능하는 E3의 scaffold 역할을 하는 1) Cullin, 2) E2-Ub가 결합하는 RING 도메인, 3) 기질 특이성을 결정하는 기질수용체(substrate receptor), 4) cullin과 기질수용체를 연계하는 어댑터 (adaptor)로 구성되어 있다. 특히, 기질수용체는 표적단백질인에 결합하는 도메인 (substrate protein-binding domain)과 어댑터 단백질에 결합하는 어댑터 결합 도메인 (adaptor binding domain)으로 구성되어 있다. 따라서 2개의 도메인으로 구성된 기질수용체는 기질단백질을 E3에 가깝게 위치하도록 하는 역할을 한다. U-box-type E3의 경우 표적단백질과 결합을 하는 표적단백질 결합 도메인과 E2-Ub와 결합하는 U-box 도메인으로 나뉘어져 있고, E2-Ub와 표적단백질을 위치적으로 가깝게 배치하여 E2-Ub의 Ub를 표적단백질로 전달하는 방식을 가진다. U-box-type E3는 다시 단일 단백질 형태의 Monomeric U-box-type E3 (예, E4B)와 Homodimeric U-box-type E3 (예, CHIP, Prp19)로 나뉜다. [Nordquist et al., (2010). Biochemistry 49, 347-355]

- [7] U-box-type E3는 Zn이온이 존재해야 접합이 가능한 RING-type E3와는 달리 Zn이온이 존재하지 않아도 접합이 가능하여, 엔지니어링에 보다 더 적합한 E3 ligase로 생각된다. 그 중에서도, 대표적인 Monomeric U-box-type E3인 E4B의 U-box 도메인 (E4BU, GenBank accession code: NM_001105562)의 경우 단일분자로 E2-Ub와 결합하여 주변 단백질을 무작위적으로 유비퀴틴화 시키는 특성을 가지고 있고, CHIP이나 Prp19와 같이 homodimeric 형태로 E3 ligase 활성을 보이

는 다른 U-box-type E3와는 달리 단일체로 E3 ligase 활성을 가진다. 또한 E4B의 U-box 도메인의 경우 E4B 전체 1302개 아미노산 중 C-말단의 76개의 아미노산으로 이루어진 짧은 U-box 도메인만을 사용하여도 E2 UbcH5 family를 인지하여 E3 ligase의 활성을 보일 수 있고, 4개의 알파 나선과 3개의 베타 가닥으로 이루어진 8.8 kDa 크기의 작은 단백질로 다른 단백질과 융합하여도 발현 및 정제에 큰 영향을 미치지 않아 보다 bioPROTAC의 개발의 용이함을 가지고 있다. 인간 E4BU와 E2 UbcH5c간의 결합을 이루는 구조 결정이 존재하고 있으며 (PDB number: 3L1Z), E4BU의 L1236, M1237, D1238, M1253, I1257, R1260, H1261, N1264, P1269, F1270, R1272 잔기가 E2 UbcH5b의 A2, K4, R5, K8, K61, F62, S94, P95, A96 잔기와 수소 결합, 정전 상호작용, 소수성 결합을 이루는 것으로 알려져 있다.

- [8] 이러한 기술적 배경하에서, E4BU의 유비퀴틴화 활성 향상을 위해, 이전 연구에서 파지 디스플레이 기술을 이용하여 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 선별을 진행하였으며, 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 D1268N과 N1271T 돌연변이를 가지는 변이체 (E4BU(NT))를 보고하였으며 [Starita et al., (2013) PNAS E1263-E1272], 우리는 E4BU(NT)를 기반으로 하여 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 보다 더 향상시킨 E4BU 변이체를 선별하여 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] **발명의 요약**

- [11] 상기에 명시된 Monomeric U-box-type E3인 E4B의 U-box 도메인(E4BU)의 표적 단백질로의 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체를 개발하고자 하였다.

- [12] 본 발명은 구체적으로 효모 표면 디스플레이 기술을 이용하여 효모 표면의 폴리-유비퀴틴화 (poly-ubiquitination, poly-Ub)를 유도하여, 이전 연구에서 알려진 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU(NT)를 기반으로 보다 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 표적 단백질로의 유비퀴틴화 활성을 증가시키는 E4BU 변이체를 개발하고자 하였다.

- [13] 본 발명은 구체적으로 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 보다 증가시킨 E4BU 변이체를 선별하기 위해 이전 연구에서 알려진 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체인 E4BU(NT)를 기반으로 한 E4BU 라이브러리를 효모 표면에 발현하고, E1 ubiquitin activating enzyme (UBA1, GenBank accession code: NM_153280), E2 ubiquitin conjugating enzyme (UbcH5b, GenBank accession code: NM_181838), Adenosine triphosphate (ATP), Magnesium dichloride (MgCl₂), Ub (GenBank accession code: AC126309)와 함께 반응시켜 효모 표면 단백질의

poly-Ub화를 유도하여, 궁극적으로 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 보다 증가시킨 E4BU 변이체를 선별하고자 하였다.

- [14] 본 발명은 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU의 변이체를 제공한다. 더욱 구체적으로 표 2에서 제시하는 바와 같이 E4BU(NT)의 잔기에 돌연변이가 도입된 E4BU(#7), E4BU(#8), E4BU(#9), E4BU(#10) 변이체를 선별하였다.
- [15] 본 발명은 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU의 변이체를 사용하여 진행되는 유비퀴틴화 반응에서 증가된 유비퀴틴화 활성을 확인하기 위해, 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합한 형태로 구축하여 표적 단백질의 라이신48-linked poly-Ub화를 관찰하고자 하였다. 구체적으로, 본 발명에서는 동일한 항-GFP 나노바디의 C-말단에 E4BU(NT) 혹은 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 보다 증가시킨 E4BU의 변이체인 E4BU(#7), E4BU(#8), E4BU(#9), E4BU(#10)을 융합한 BioPROTAC의 경우 생체 외 실험에서 유의미한 라이신48-linked poly-Ub화의 차이를 보이며, 이는 E4BU의 변이체가 표적 단백질로의 유비퀴틴-전이를 보다 빠르게 유도하여 유비퀴틴화 활성이 증가하였음을 제시한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 표적 단백질로의 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제시한다.
- [17] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 유비퀴틴(Ubiquitin, Ub)가 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킬 수 있는 다른 자리 입체적 변화 (allosteric regulation)를 포함하는, E4B의 U-box 도메인 (E4BU) 변이체를 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한, 상기 E4BU 변이체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [20] 본 발명은 또한, 상기 발현벡터로 형질전환된 재조합 세포를 제공한다.
- [21] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 E4BU 변이체의 제조방법을 제공한다:
- [22] (a) 상기 재조합 세포를 배양하여 E4BU 변이체를 생성시키는 단계; 및
- [23] (b) 상기 생성된 E4BU 변이체를 회수하는 단계.
- [24] 본 발명은 또한, 상기 E4BU 변이체의 제조방법을 제공한다: (1) GFP 표적능을 가지는 나노바디의 C-말단에 E4BU 변이체가 연결된 핵산(nucleic acids)을 클로닝한 벡터를 제조하는 단계; (2) 상기 제조된 발현벡터를 단백질 발현용 대장균 세포에 형질전환 하여 발현하는 단계; 및 (3) 상기 발현된 단백질을 정제 및 회수하는 단계.
- [25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1a은 효모 표면 디스플레이 기술을 이용하여 E4BU 단백질을 효모 표면에 발현시킨 후 효모 표면 단백질의 poly-Ub화를 유도하는 실험의 모식도이다.
- [27] 도 1b는 유세포분석기를 이용하여 E4BU(WT) 및 E4BU(NT)의 효모 표면 단백질 유비퀴틴화 정도를 측정한 결과이다.
- [28] 도 2a는 E4BU(NT)와 E2 UbcH5b간의 결합을 나타낸 모델링 구조와, E4BU(NT)의 유비퀴틴화 활성을 향상시키기 위한 라이브러리의 도입 잔기를 표시한 모식도이다.
- [29] 도 2b는 효모 표면 디스플레이 기술을 통해 효모 표면에 발현된 E4BU(NT)의 유비퀴틴화 활성을 향상시키기 위한 라이브러리의 Fluorescence Associated Cell Sorting (FACS)기기를 이용한 선별 과정이다.
- [30] 도 2c는 유세포분석기를 이용하여 효모 표면에 발현된 E4BU(NT) 및 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체들의 효모 표면 단백질 유비퀴틴화 정도를 측정한 결과이다.
- [31] 도 3a는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질의 모식도이다.
- [32] 도 3b는 상기 도 3a의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10))을 정제 후 환원성 또는 비 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE를 통해 분석한 것이다.
- [33] 도 3c는 상기의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10))을 이용하여 GFP에 대한 결합능을 평가하기 위해, ELISA를 통해 GFP 1, 10, 100 nM 농도에 대하여 결합능을 평가한 결과이다.
- [34] 도 3d는 상기 3a의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10))을 이용하여 E2 UbcH5b에 대한 결합능을 평가하기 위해, ELISA를 통해 E2 UbcH5b 0.2, 2, 20 μ M 농도에 대하여 결합능을 평가한 결과이다.
- [35] 도 3e는 상기 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8))을 정제 후 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과이다.
- [36] 도 4a는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질이 생체 외 유비퀴틴화 실험에 의해 표적 단백질인 GFP를 poly-Ub화 시키는 실험의 모식도이다.
- [37] 도 4b는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8))을 정제하여 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질간의 유비퀴틴화 활성 정도를 비교하기

위해 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8)) 각각의 0, 187, 375, 750 nM 농도에 대하여 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다.

- [38] 도 4c는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#8))을 정제하여 유비퀴틴화 실험 요소의 존재 유/무 조건에서의 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.
- [39] 도 4d는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#8))의 농도에 따른 유비퀴틴화 정도를 확인하기 위해 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질 0, 187, 375, 750, 1500 nM 농도에 대하여 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.
- [40] 도 4e는 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#8))의 농도에 따른 유비퀴틴화 정도를 확인하기 위해 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질 0, 187, 375, 750, 1500 nM 농도에 대하여 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 웨스턴 블랏을 통해 평가한 결과이다.
- [41] 도 4f는 동일 농도의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#8))의 반응 시간에 따른 유비퀴틴화 정도를 확인하기 위해 1500 nM의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질을 동일 조건에서 각각 0, 1.5, 3, 7, 15, 30, 60분간 반응시키는 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.
- [42] 도 4g는 상기 도 4f의 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel 분석 결과를 이용하여 라이신48-linked poly-Ub화 되지 않은 Ub 단량체의 잔여량을 측정하여 일차 지수적 감소 방정식을 통한 선형 그래프로 나타낸 결과이다.
- [43] 도 4h는 동일 농도의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질(vhhGFP4-E4BU(NT), vhhGFP4-E4BU(#8))의 반응 시간에 따른 유비퀴틴화 정도를 확인하기 위해 1500 nM의 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 E4BU 단백질을 각각 0, 1.5, 3, 7, 15, 30, 60분간 반응시킨 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 웨스턴블랏을 통해 평가한 결과이다.

[44]

[45] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[46] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[47] 본 발명은 일 관점에서, 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)가 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킬 수 있는 다른 자리 입체적 변화 (allosteric regulation)를 포함하는, E4B의 U-box 도메인 (E4BU) 변이체에 관한 것이다.

[48] 구체적으로, 본 발명은 Monomeric U-box-type E3인 E4B의 U-box 도메인(E4BU)의 표적 단백질로의 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체에 관한 것이다.

[49] “다른 자리 입체적 변화”는 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)가 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 활성 부위 (active site)가 아닌 다른 자리에 결합하여 이루어지는 반응 능력 조절을 의미한다.

[50] 본 발명에 따른 E4BU 변이체는 알려진 마우스 E4BU 변이체인 E4BU(NT) [Starita et al., (2013) PNAS E1263-E1272]의 돌연변이를 인간 E4BU에 도입한 (D1268N, N1271T) 인간 E4BU(NT)인 서열번호 3의 서열 중 10번째 내지 25번째 아미노산 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된 것이다.

[51]

E4BU protein	Amino acid sequence								SEQ ID
E4BU(WT)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	2
	DAPDEFRDPLMDTLMTDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTDPFNQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								
E4BU(NT)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	3
	DAPDEFRDPLMDTLMTDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTNPFTRQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								

[52] 본 발명에 따른 E4BU 변이체는 서열번호 4 내지 7로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[53]

E4BU(#7)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	4
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSFILEHLLDSPTNVFTRQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								
E4BU(#8)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	5
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSFILRHLLFSPTNVFTRQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								
E4BU(#9)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	6
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSNILRHLLNSPTNPFTRQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								
E4BU(#10)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	7
	DAPDEFRDPLVDTLMTDPVRLPSGTIMDRSFILRHLLISPTDYTRQRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH								

※E4BU 아미노산의 서열 번호는 GeneBank Accession code: NM_001105562를 기준으로 정의되었다.

※주형 E4BU(WT)과 비교하여 달라진 서열은 굵은 글자로 나타내었다.

[54] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 E4BU 변이체를 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 E4BU 변이체를 코딩하는 핵산을 분리하여 E4BU 변이체를 재조합적으로 생산할 수 있다.

[55] “핵산”은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 본 발명의 IL21 변이체를 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[56] 상기 E4BU 변이체를 암호화하는 DNA는 통상적인 분자생물학적 수법을 사용하여 (예를 들어, CH3A(EW) 및 CH3B(RVT) DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성할 수 있으며, 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝

하거나(DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.

- [57] 본 명세서에서 사용되는 용어, "발현벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 벡터의 성분으로는 일반적으로 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 항생제 내성 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 전사 종결 서열. E4BU 변이체를 코딩하는 핵산은 프로모터 및 전사 종결 서열 등과 같이 작동적으로 연결되어 있다.
- [58] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사 조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 따라 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [59] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lacUV5* 프로모터, *lpp* 프로모터, *pLλ* 프로모터, *pRλ* 프로모터, *rac5* 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, *SP6* 프로모터, *trp* 프로모터 및 *T7* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤모글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 *tk* 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [60] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 E4BU 변이체를 생성시키기 위해 사용된 숙주세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*, 예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.

- [62] 다만, 동물세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [63] 본 발명은 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는 E4BU 변이체의 제조방법에 관한 것이다:
- [64] (a) 상기 재조합 세포를 배양하여 E4BU 변이체를 생성시키는 단계; 및
- [65] (b) 상기 생성된 E4BU 변이체를 회수하는 단계.
- [66] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선택된 숙주세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.
- [67] 상기 E4BU 변이체의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [68]
- [69] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [70] 실시예 1. 유비퀴틴화 활성이 향상된 E4BU 변이체를 선별하기 위한 효모 표면 디스플레이 기술의 고안
- [71] 본 발명에서는 유비퀴틴화 활성이 향상된 E4BU 변이체를 선별하기 위해서 먼저 효모 표면 디스플레이 기술을 이용하여 효모 표면에 E4BU(WT) 및 E4BU(NT)를 발현하였다. 본 발명에서는 활성화된 RAS 형태를 표적하는 세포침투 간섭 항체(inRas37) [Shin, et al., (2020), Sci Adv, 6, eaay2174]의 경쇄 C-말단에 글라이신, 세린으로 이루어진 2개 아미노산 길이의 링커가 달린 인간 E4BU(WT)과 이전 연구에서 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨다 알려진 마우스 E4BU 변이체인 E4BU(NT) [Starita et al., (2013) PNAS E1263-E1272]의 돌연변이를 인간 E4BU에 도입한 (D1268N, N1271T) 인간 E4BU(NT)를 융합한 형태로 효모 (*Saccharomyces cerevisiae* JAR200)의 표면에 발현하였고, E1 UBA1, E2 UbcH5b, ATP, MgCl₂, Ub 조건 하에서 생체 외 유비퀴틴화 반응을 통해 효모 표면 단백질의 poly-Ub화를 유도하였다.
- [72] [표1]

Light chain	Amino acid sequence	SEQ ID
CT03	10 20 27a 28 30 40 50 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSRDGKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW 60 70 80 90 100 ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYWMYTFGGGTKEIKR	1

※상기 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 규정에 의해 정의되었다.

[73] [표2]

E4BU protein	Amino acid sequence	SEQ ID
E4BU(WT)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPLMDLTMDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTDPFNRTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	2
E4BU(NT)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPLMDLTMDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTNPFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	3
E4BU(#7)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPIIDLTMDPVRLPSGTIMDRSFILEHLLDSTNVFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	4
E4BU(#8)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPIIDLTMDPVRLPSGTIMDRSFILRHLLSPTNVFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	5
E4BU(#9)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPIIDLTMDPVRLPSGTIMDRSNILRHLLSPTNPFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	6
E4BU(#10)	1227 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 DAPDEFRDPLVDLTMDPVRLPSGTIMDRSILRHLLSPTDYVTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH	7

※E4BU 아미노산의 서열 번호는 GeneBank Accession code: NM_001105562 를 기준으로 정의되었다.

※주형 E4BU(WT)과 비교하여 달라진 서열은 굵은 글자로 나타내었다.

[74]

[75] 구체적으로 N-말단에 Aga2p가 융합된 형태의 상기 표 1의 서열번호 1의 CT03 경쇄의 C-말단에 글라이신, 세린 링커으로 이루어진 GS 링커가 융합된 상기 표 2의 서열번호 2의 E4BU(WT)과 서열번호 3의 E4BU(NT)를 유전자적으로 합성하여 Aga2p-CT03-GS linker-E4BU 단백질의 순서로 pCTCON 플라스미드에 *NheI*/*BamHI* 제한 효소를 이용하여 클로닝하였다. 구축된 플라스미드는 효모에 형질 전환하여 SD-CAA + URA(SDU-CAA) 배지 플레이트에서 30 °C 조건으로 3일간 배양하였다. 배양된 콜로니는 진탕 플라스크에서, SDU-CAA 배지에 접종하여 2일간 200 rpm, 30 °C에서 배양하였다. 구체적으로 Na₂HPO₄ (Biobasic, #S0404) 5.4 g/L, NaH₂PO₄·H₂O(Biobasic, #SB0880) 8.6 g/L, Glucose(Sigma, #G8270) 20 g/L, Yeast nitrogen base(BD, #233520) 1.7 g/L, Ammonium sulfate(Biobasic, #ADB0060) 5 g/L, Bacto casamino acid(BD, #223050) 5 g/L, Uracil (Sigma, #V001964) 0.004 g/L, pH 6.5의 배지 조건에서 진탕 플라스크 (Duran)에 50ml 접종 시, 시작 흡광도 (OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 하여 2일간 200 rpm, 30 °C에서 배양하였다. 최종 흡광도가 10-12가 되었을 때, SGU-CAA 배지를 이용하여 Aga2p-CT03-GS linker-E4BU의 효모 표면 발현을 유도하였다. 구체적으로 Na₂HPO₄ 5.4 g/L, NaH₂PO₄·H₂O 8.6 g/L, Galactose 20 g/L, Yeast nitrogen base 1.7 g/L, Ammonium sulfate 5 g/L, Bacto casamino acid 5 g/L, Uracil 0.004 g/L, pH 6.5 배지 조건에서 시작 흡광도가 0.5-1이 되도록 하여 2일간 200 rpm, 20 °C에서 배양하였다.

[76] 이후 효모 표면에 발현된 E4BU(WT) 및 E4BU 변이체의 효모 표면 단백질의 유비퀴틴화 활성을 측정하기 위해서, 유비퀴틴화 반응 요소들과 반응시켜 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후, 유세포분석기를 이용하여 측정하였다.

[77] 도 1a는 효모 표면에 발현된 E4BU(WT) 및 E4BU 변이체의 효모 표면 단백질 poly-Ub화 기작을 모식도로 나타낸 것이다.

- [78] 도 1b는 효모 표면에 발현된 E4BU(WT) 및 E4BU 변이체를 이용하여 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 결과를 유세포분석기를 이용하여 분석한 것이다.
- [79] 구체적으로, E4BU(WT) 및 E4BU 변이체가 발현된 효모 10^7 개를 Avi-6xhis-E1 UBA1 10 μ M, Avi-6xhis-E2 UbcH5b 1 μ M, 바이오틴화된 Avi-6xhis-Ub 100 μ M, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂와 함께 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 완충액 조건에서 2 시간, 37 °C 조건으로 배양하였다. 배양이 끝난 후, PBSF(PBS pH7.4, 0.1% BSA)로 잔여 요소를 워싱하고 1:100 비율의 Mouse anti-c-myc 항체(9E10), 1:600 비율의 Goat anti-mouse IgG Alexa488(Invitrogen, #A11001), 1:600 비율의 SA-PE(Invitrogen, #S866) 시약을 사용하여 효모 표면에 발현된 E4BU(WT) 및 E4BU 변이체의 발현양 및 바이오틴화된 Avi-6xhis-Ub에 의한 효모 표면 유비퀴틴화 정도를 측정하였다. 유세포분석기(FACS Calibur™)를 이용하여 효모 표면 유비퀴틴화를 비교하였을 때, 효모 표면에 발현된 E4BU(WT)과 비교하여 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성의 증가를 유도시키는 것으로 알려진 E4BU(NT) 변이체가 약 1.7 배 더 높은 유비퀴틴화 신호를 보이는 것으로 나타났다. 이는 마우스의 E4BU에 도입되어 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시키는 것으로 알려진 D1139N, N1142T 돌연변이가 인간 E4BU의 D1268N, N1271T로 도입되었을 때에도 동일하게 적용되어 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성의 증가를 유도시킬 수 있는 것과 이러한 돌연변이에 의한 효모 표면 단백질의 유비퀴틴화의 차이를 유세포분석기를 이용하여 유의미하게 확인할 수 있음을 나타낸다. 본 발명에서는 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 보다 증가시킨 E4BU의 변이체를 선별하기 위한 E4BU 라이브러리의 주형으로 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 변이체인 E4BU(NT)를 이용하였다.
- [80] 해당 실시예에서 사용된 재조합 항원단백질 Avi-6xhis-E1 UBA1, Avi-6xhis-E2 UbcH5b, Avi-6xhis-Ub를 생산하기 위해 pET23m 벡터(Addgene)에 Avi-6xhis tag 이 붙은 상태로 발현하도록 E1 UBA1, E2 UbcH5b, Ub을 *NcoI/BamHI* 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 바이오틴화된 항원의 정제를 위해서 상기 발현 플라스미드와 pBirAcm(Avidity, USA) 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 함께 형질 전환 시킨 후, 34 μ g/ml의 클로로암페니콜 (chloramphenicol)과 100 μ g/ml의 암피실린 (ampicillin)이 포함된 LB 아가(agar) 고체 배지(LB+CA)에 도말하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 형질전환체의 단일 콜로니를 채집 후, LB+CA 액체 배지에 5mL에 접종하고 18시간 배양하였다. 전배양액을 250ml의 LB+CA 액체 배지에 OD 0.05의 초기접종 농도로 접종하여 본배양하고, 분광광도계 (Thermo Scientific™, #51119200)로 OD600값을 측정하여 OD600 0.8에 도달한 시점에 0.5 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), 50 μ M D-Biotin 농도가 되도록 첨

가 후 20°C, 150 rpm에서 24시간동안 배양하여 발현을 유도하였다. 이후 4°C, 8000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 대장균 세포를 추출(harvest)하고, 20ml의 Tris-HCl pH8.0 버퍼 (50mM Tris, 300mM NaCl, 1mM 2-mercaptoethanol)로 현탁(resuspension)하여 초음파 세포 분쇄기(SONICS, #VCX 750)를 이용해 세포를 분쇄하였다. 이후 4°C, 15,000 x g에서 20분간 원심 분리하고, 0.45µm SFCA syringe filter(Sartorius, #16533-K)를 이용해 상층액을 여과(filtration)하여 분비된 단백질을 함유하는 배양 상층액을 얻었다. 50ml의 배양 상층액과 Ni-NTA 레진(GE healthcare, #17-5318-02)을 4°C, 1h 동안 결합시킨 후, 상기 혼합액을 컬럼 (Thermo Scientific™, #29924)에 주입하였다. 혼합액을 여과한 후, 해당 컬럼에 30mM의 이미다졸(imidazole)이 포함된 Tris-HCl pH8.0 버퍼를 주입하여 비선택적으로 컬럼에 잔존해 있는 단백질을 용리시킨 후, 300mM의 이미다졸(imidazole)을 포함하는 elution buffer를 컬럼에 주입하고, 1분간 정치 후, 바이오틴화된 단백질을 용리시켰다. 정제된 바이오틴화 단백질 대하여 Centrifugal Filters (Sartorius, #VS2022)을 이용해 최종 완충액 (2mM DTT containing PBS, pH 7.4)으로 이미다졸을 투석하였다. 상기 과정을 통해 정제된 단백질은 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량하였다. 바이오틴화 되지 않은 단백질의 경우 동일한 실험 조건에서 50µM D-Biotin을 넣어주지 않은 상태로 정제를 진행하였다.

[81]

[82] 실시예 2. 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체를 선별하기 위한 효모 표면 발현 디스플레이 라이브러리의 구축

[83] 본 발명에서 유비퀴틴화 활성이 향상된 E4BU 변이체의 선별을 위한 효모 표면 발현 디스플레이 라이브러리를 구축하기 위해서, E4BU(WT)와 E2 Ub_{CH5b}와 같은 family의 E2 Ub_{CH5c}간의 구조(PDB:3l1z)를 기반으로 Alphafold2 프로그램을 이용하여 E4BU(NT)와 E2 Ub_{CH5b}간의 결합 구조를 모델링하였다.

[84] 도 2a는 E4BU(WT)과 E2 Ub_{CH5b}와의 결합구조 모델링 결과와 E4BU(NT) 변이체를 주형으로 디제너레이트 코돈을 사용해 구축한 라이브러리의 디자인을 나타낸 모식도이다.

[85] 구체적으로 E4BU(WT)과 E2 Ub_{CH5c}간의 구조파일과 동일하게 E4BU(NT)의 L1236, M1237, D1238, M1253, I1257, R1260, H1261, N1264, P1269, F1270, R1272 잔기가 E2 Ub_{CH5b}의 A2, K4, R5, K8, K61, F62, S94, P95, A96 잔기와 수소 결합, 정전 상호작용, 소수성 결합을 이룰 것으로 예상되었고, E4BU(WT)과 E2 Ub_{CH5c}간의 유비퀴틴화 활성의 중요한 역할을 하는 잔기인 D1238, M1253, R1272를 제외한 L1236, M1237, I1257, R1260, H1261, N1264, P1269, 그리고 F1270의 직접적으로 E2 Ub_{CH5b}와 상호작용하는 잔기와, 이전 연구에서 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 것으로 예상되는 잔기인 N1268, T1271 잔기까지 포함하여 총 10개의 잔기에 돌연변이를 주는 라이브러리를 구축하였다.

[86] 구체적으로, 1236번 잔기에 MTA (AC/T/A), 1237번 잔기에 VHK (ACG/ACT/GT), 1257번과 1260번 잔기에 VNK (ACG/ACGT/GT), 1261번과 1269번 잔기에 NHC (ACGT/ACT/C), 1264번 잔기에 WWT (AT/AT/T), 1268번 잔기에 RAT (AG/A/T), 1270번 잔기에 TWT (T/AT/T), 그리고 1271번 잔기에 AMT (A/AC/T)를 코딩하는 디제너레이션 코돈을 각각 사용하여 라이브러리를 구축하였다.

[87] [표3]

Position	Designed diversity for library construction	
	Codons used	Residues encoded (%)
1236	MTA	I (50), L (50)
1237	VHK	A (11.11), D (5.56), E (5.56), H (5.56), I (5.56), K (5.56), L (11.11), M (5.56), N (5.56), P (11.11), Q (5.56), T (11.11), V (11.11)
1257, 1260	VNK	A (8.33), D (4.17), E (4.17), G (8.33), H (4.17), I (4.17), K (4.17), L (8.33), M (4.17), N (4.17), P (8.33), Q (4.17), R (12.5), S (4.17), T (8.33), V (8.33)
1261, 1269	NHC	A (8.33), D (8.33), F (8.33), H (8.33), I (8.33), L (8.33), N (8.33), P (8.33), S (8.33), T (8.33), V (8.33), Y (8.33)
1264	WWT	F (25), I (25), N (25), Y (25)
1268	RAT	D (50), N (50)
1270	TWT	F (50), Y (50)
1271	AMT	N (50), T (50)

[88] 구체적으로 상기의 표 3에서 표지하는 아미노산과 확률을 기반으로 돌연변이가 부여될 잔기의 라이브러리를 구축하였으며, 구축된 효모 표면 발현 라이브러리는 3.5×10^7 의 다양성을 가지게 구축되었다.

[89]

[90] 실시예 3. 효모 표면 발현 디스플레이 라이브러리를 이용한 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 선별

[91] 상기 실시예 2에서 구축된 E4BU(NT)를 기반으로 디자인된 E4BU 변이체 라이브러리를 이용하여, 사용하는 Avi-6xhis-E2 Ubch5b 단백질의 농도를 점차 낮추며 진행한 4 회의 FACS 선별을 통해 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 보다 증가시킨 E4BU 변이체를 선별하였다.

[92] 도 2b는 상기 실시예 2에서 구축된 E4BU(NT)를 기반으로 디자인된 E4BU 변이체 라이브러리를 이용하여 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도 향상을 통해 유비퀴틴

화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체를 선별하기 위해 Fluorescence Associated Cell Sorting (FACS)기기를 이용하여 진행된 선별과정을 차수별로 유세포분석기를 이용해 분석한 결과이다.

- [93] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 구축된 E4BU(NT) 변이체 라이브러리를 정제된 Avi-6Xhis-E1 UBA1, Avi-6Xhis-E2 Ubch5b, 바이오틴화된 Avi-6Xhis-Ub, ATP, $MgCl_2$ 와 반응시켜 유비퀴틴화를 유도하고, 바이오틴화된 Avi-6Xhis-Ub가 효모 표면 단백질에 유비퀴틴화 되었을 때, SA-PE를 이용하여 유비퀴틴화 정도가 높은 효모를 선별하는 방식으로 선별을 진행하였다. 총 4회의 FACS 선별을 진행하며 모든 차수에서 Avi-6Xhis-E1 UBA1 10 μM , 바이오틴화된 Avi-6Xhis-Ub 100 μM , ATP 2 mM, $MgCl_2$ 5 mM로, 10 mM HEPES, 60 mM NaCl pH 8.0 완충액 조건에서 동일하게 진행하였지만, 각 차수 별로 1차 선별에서는 Avi-6Xhis-E2 Ubch5c 단백질의 농도를 1 μM , 효모의 숫자는 5×10^8 로 진행하였고, 2차-4차 선별에서는 Avi-6Xhis-E2 Ubch5c 단백질의 농도를 200 nM, 효모의 숫자는 5×10^7 의 조건으로 선별을 진행하였다. 차수가 진행됨에 따라 낮은 농도의 Avi-6Xhis-E2 Ubch5b 조건에서 부유화되는 결과를 보였다.
- [94] 도 2c는 상기 도 2b의 선별 과정을 거쳐 선별된 효모 표면에 발현된 E4BU 변이체와, 동일한 방식으로 효모 표면에 발현된 E4BU(NT)와의 유비퀴틴-전이 유도를 통한 유비퀴틴화 활성 정도 비교를 위해 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 결과를 유세포분석기를 이용하여 분석한 것이다.
- [95] 구체적으로, E4BU(WT), E4BU(NT) 및 E4BU 변이체가 발현된 효모 10^7 개를 Avi-6xhis-E1 UBA1 10 μM , Avi-6xhis-E2 Ubch5b 1 μM , 바이오틴화된 Avi-6xhis-Ub 100 μM , 2 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ 와 함께 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 완충액 조건에서 2 시간, 37 °C 조건으로 배양하였다. 배양이 끝난 후, PBSF(PBS pH7.4, 0.1% BSA)로 잔여 요소들을 워싱하고 1:100 비율의 anti-c-myc mouse IgG (9E10), 1:600 비율의 Goat anti-mouse IgG Alexa488 (Invitrogen), 1:600 비율의 SA-PE (Invitrogen) 시약을 사용하여 효모 표면에 발현된 E4BU(WT) 및 E4BU 변이체의 발현양 및 바이오틴화된 Avi-6xhis-Ub에 의한 효모 표면 유비퀴틴화 정도를 측정하였다. 유세포분석기 (FACS Calibur™)를 이용하여 효모 표면 유비퀴틴화를 비교하였을 때, 선별되어진 E4BU 변이체가 E4BU(NT)과 비교하여 약 1.2 ~ 2 배 향상되었음을 확인하였다.
- [96]
- [97] 실시예 4. 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 구축
- [98] 도 3a는 항-GFP 나노바디(vhhGFP4)의 C-말단에 GS 링커 및 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체가 융합된 단백질의 모식도이다.

[99] 상기 실시예 3에서 선별된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체(E4BU(#7), E4BU(#8), E4BU(#9), E4BU(#10)) 및 주형으로 사용된 E4BU(NT)의 유비퀴틴화 활성을 확인하기 위해 특정 단백질을 표적할 수 있는 항체 절편인 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합시키는 형태로 구축하였다.

[100] [표4]

Protein	Amino acid sequence										SEQ ID
vhgGFP4	1	10	20	30	40	50	52a	60	70		8
	QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTIS										
		80	82a	90	101	110					
	RDDARNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSS										
E4BU(NT)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300			3
	DAPDEFRDPLMDTLMTDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTNPFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH										
E4BU(#7)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300			4
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSFILRHLLNSPTNVFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH										
E4BU(#8)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300			5
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSFILRHLLNSPTNVFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH										
E4BU(#9)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300			6
	DAPDEFRDPIIDTLMTDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTNPFTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH										
E4BU(#10)	1227	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300			7
	DAPDEFRDPLVDTLMTDPVRLPSGTIMDRSILRHLLNSPTDYYTRQTLTESMLEPVPELKEQIQAWMREKQNSDH										

※vhgGFP4 나노바디의 아미노산 위치는 카바트 (Kabat) 규정에 의해 정의되었다.

※E4BU 아미노산의 서열 번호는 GeneBank Accession code: NM_001105562를 기준으로 정의되었다.

※주형 E4BU(NT)과 비교하여 달라진 서열은 굵은 글자로 나타내었다.

[101] 구체적으로 상기 표 4의 서열번호 8의 항-GFP 나노바디 (vhgGFP4)의 C-말단에 글라이신과 세린으로 이루어진 GS 링커 및 E4BU(NT) 혹은 E4BU 변이체 (E4BU(#7), E4BU(#8), E4BU(#9), E4BU(#10))를 유전자적으로 융합하여 6Xhis tag-항-GFP 나노바디-GS 링커-E4BU 변이체의 순서로 pET23m 벡터에 *NcoI/Bam* HI 제한 효소를 이용하여 클로닝하여 vhhGFP4-E4BU(NT)와 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10)를 발현시키는 벡터를 구축하였다.

[102]

[103] 실시예 5. 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 정제

[104] 상기 실시예 4에서 구축된 vhhGFP4 나노바디의 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체인 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10)을 발현 정제하기 위하여, 상기 발현 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시킨 후, 100 µg/ml의 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB 아가(agar) 고체 배지(LB+A)에 도말하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 형질전환체의 단일 콜로니를 채집 후, LB+A 액체 배지 5mL에 접종하고 18시간 배양하였다. 전배양액을 250ml의 LB+A 액체 배지에 OD 0.05의 초기접종 농도로 접종하여 본배양하고, 분광광도계(Thermo Scientific™)로 OD600값을 측정하여 OD600 0.8에 도달한 시점에 0.5 mM IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), 농도가 되도록 첨가 후 20°C, 150 rpm에서 24시간동안 배양

하여 발현을 유도하였다. 이후 4°C, 8000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 대장균 세포를 추출(harvest)하고, 20ml의 Tris-HCl pH8.0 버퍼(50mM Tris, 300mM NaCl, 1mM 2-mercaptoethanol)로 현탁(resuspension)하여 초음파 세포 분쇄기를 이용해 세포를 분쇄하였다. 이후 4°C, 15,000 x g에서 20분간 원심 분리하고, 0.45µm SFCA syringe filter를 이용해 상층액을 여과(filtration)하여 분비된 단백질을 함유하는 배양 상층액을 얻었다. 50ml의 배양 상층액과 Ni-NTA 레진을 4°C, 1h 동안 결합시킨 후, 상기 혼합액을 컬럼에 주입하였다. 혼합액을 여과한 후, 해당 컬럼에 30mM의 이미다졸(imidazole)이 포함된 Tris-HCl pH8.0 버퍼를 주입하여 비선택적으로 컬럼에 잔존해 있는 단백질을 용리시킨 후, 250mM의 이미다졸(imidazole)을 포함하는 elution buffer를 컬럼에 주입하고, 1분간 정치 후, 바이오틴화된 단백질을 용리시켰다. 정제된 바이오틴화 단백질 대하여 Centrifugal Filters (Satorious)을 이용해 최종 완충액(2mM DTT containing PBS, pH 7.4)으로 이미다졸을 투석하였다. 상기 과정을 통해 정제된 단백질은 280nm 파장에서 흡광도와 흡광계수를 이용하여 정량하였다.

[105]

[106] 실시예 6. 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 SDS-PAGE 분석을 통한 물성 평가

[107] 도 3b는 상기 실시예 2에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10) 단백질에 대해 환원성 또는 비환원성 조건에서 15% SDS-PAGE를 통해서 분석한 것이다.

[108] 구체적으로, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10) 모두 환원성 또는 비환원성 조건에서 약 25 kDa의 분자량을 확인하였으며, 이는 이론적 분자량인 25.2 kDa와 일치함을 확인하였다. 상기 5종의 단백질 모두 환원성 또는 비환원성 조건에서 80-90% 순도를 보이는 것으로 관찰되었다. 이는 상기 5종의 단백질이 용액 상태에서 단일체로 존재하며, 비자연적 이황화 결합을 통해 이중체 또는 올리고머를 형성하지 않음을 보여준다.

[109]

[110] 실시예 7. 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 표적 결합능 확인.

[111] 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10) 단백질은 항-GFP 나노바디로 인해 표적 단백질인 GFP와의 결합능을 가지고, C-말단에 융합된 E4BU 변이체 단백질로 인해 E2 Ub_{CH5b}와의 결합능을 가지게 된다. 각각의 도메인의 표적 단백질과의 결합능을 ELISA를 통해 평가하고자 하였다.

- [112] 도 3c 및 도 3d는 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10)의 GFP 혹은 E2 UbcH5b에 대한 특이적 결합을 확인하기 위해, 1, 10, 100 nM의 바이오틴화 된 6xhis-GFP와 0.2, 2, 20 μ M의 바이오틴화 된 Avi-6xhis-E2 UbcH5b와의 결합능을 ELISA로 분석한 결과이다.
- [113] 해당 실시예에서 사용된 항원 6xhis-GFP는 상기 실시예 5와 동일한 방법으로, 사용된 항원 E2 UbcH5b는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 정제를 진행하였다.
- [114] GFP의 경우 정제 후 EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin kit(Thermo Fisher Scientific)의 표준 의정서의 방법으로 바이오틴화 시켜주었고, 바이오틴화된 Avi-6xhis-E2 UbcH5b와 함께 ELISA를 진행을 위한 단백질로 사용되었다.
- [115] 구체적으로, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10) 단백질을 96웰 EIA/RIA 플레이트에 각각 5 μ g/ml 농도로 1시간동안 상온에서 결합시킨 후, 0.1% PBST (PBS, pH 7.4, 0.1% Tween20)로 10분간 3회 세척한다. 이후 2% PBSB (PBS, pH 7.4, 2% Bovine Serum Albumin(BSA))로 1시간 동안 결합한 후 0.1% PBST로 10분간 3회 세척한다. 바이오틴화된 6xhis-GFP 단백질을 각각 1, 10, 100 nM과 0.2, 2, 20 μ M의 농도가 되도록 2% PBSB로 희석하여 상온에서 1시간 동안 결합시킨 후 0.1% PBST로 10분간 3회 세척한다. 표지 항체로 HRP가 접합된 스트렙타비딘(HRP-conjugated Streptavidin, Thermo Fisher Scientific)을 1:20000의 비율로 희석시켜 결합시킨다. 이후 TMB ELISA solution으로 반응시켜 450nm 흡광도를 정량하였다.
- [116] 상기 ELISA 분석을 통해 vhhGFP4-E4BU(NT)와 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8), vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10)는 GFP와 E2 UbcH5b 단백질 모두에서 서로 간의 유의미한 차이가 없는 유사한 수준의 결합능을 보이는 것을 확인하였다. 따라서 효모 표면 발현 라이브러리를 통해 선별된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체들의 유비퀴틴화 활성의 증가는 E2 UbcH5b와의 결합능의 향상으로 인한 것이 아닌, 다른 자리 입체적 변화를 통해 표적 단백질로의 유비퀴틴-전이를 보다 빠르게 유도하여 유비퀴틴화 활성을 증가시키는 것으로 예상되었다.
- [117] 상기 도 2c의 결과를 기반으로 차후 실험은 효모 표면 발현된 형태에서 낮은 유비퀴틴화 유도 경향성을 보인 vhhGFP4-E4BU(#9), vhhGFP4-E4BU(#10)를 제외하고 높은 유비퀴틴화 유도 경향성을 보인 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8)의 두 개 단백질을 이용하여 실험을 진행하였다.
- [118]
- [119] 실시예 8. 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 크기 배제 크로마토그래피를 통한 물성 평가

- [120] 상기 실시예 6, 7에서 물성에 이상이 없고, GFP 결합능 및 E2 UbcH5b와의 결합능이 문제가 없음을 확인한 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 물성을 평가하였다.
- [121] 도 3e는 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질의 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 280nm에서의 mAU 값을 나타낸 그래프이다.
- [122] 구체적으로, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질을 1mg/ml의 농도로 45 μ l 준비한 후 인서트에 넣어 샘플을 준비하였다. 12 mM Phosphate, 137Mm NaCl, 2.7 mM KCl pH 7.4 완충액(PBS pH 7.4 완충액)을 0.75 ml/min의 유속으로 Supderdex200 column (7.8 mm $\times$ 300 mm, Sepax Technologies)에 흘려 주어 압력과 280nm에서의 mAU 값이 안정화될 때까지 기다려 준비하였다. 이후 준비된 샘플을 동일 유속으로 20 μ l 로딩하여 40분 동안의 280nm 에서의 mAU 값을 측정하였다. vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질 모두 크기 배제 크로마토그래피 분석 결과 98% 이상의 단량체 비율을 가지는 것을 확인할 수 있었고, 크기 표시로 사용된 150 kDa의 IgG, 66 kDa의 BSA, 29 kDa의 Carbonic anhydrase와 비교하여 크기와 일치하는 시간에 용출됨을 확인하였다.
- [123]
- [124] 실시예 9. 생체 외 유비퀴틴화 실험 조건에서 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 표적 유비퀴틴화 활성 확인.
- [125] 상기 실시예 7번의 결과에서 표적 단백질인 GFP 및 E2 UbcH5b와의 결합능이 유의미한 차이가 없는 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질에 대해서, 실제 표적 단백질의 유비퀴틴화 활성을 비교하기 위해 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행하였다.
- [126] 도 4a는 항-GFP 나노바디가 융합된 E4BU 변이체가 생체 외 실험 조건에서 표적 단백질을 라이신48-linked poly-Ub화 시키고, 이를 SDS-PAGE를 통해 분석하는 실험 방법에 대한 모식도이다.
- [127] 구체적으로 6xhis-E1 UBA1 (Boston Biochem)과 상기 실시예 1에서 정제된 Avi-6xhis-E2 UbcH5b, Avi-6xhis-Ub, 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 혹은 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8)의 단백질, ATP, MgCl₂를 각 실험의 조건에 맞추어 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 buffer에 정해진 시간동안 반응시킨 후 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel (Bio-Rad, #456109)을 이용하여 분석을 진행하였다.
- [128] 도 4b는 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#7), vhhGFP4-E4BU(#8)을 이용하여 각각의 단백질 0, 187, 375, 750 nM의 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과이다.

- [129] 구체적으로 6xhis-E1 UBA1 50 nM, Avi-6xhis-E2 UbcH5b 1 μ M, vhhGFP4-E4BU 변이체 단백질 0, 187, 375, 750 nM, Avi-6xhis-Ub 30 μ M, 표적 단백질인 6xhis-GFP 0.75 μ M, 2 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ 를 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 buffer에서 50 μ l의 부피로 1 시간 반응시켜 주었다. 이후 5%의 2-메르캅토에탄올이 들어간 조건의 5 $\times$ SDS-PAGE sample loading buffer 10 μ l 첨가 후 95 $^{\circ}C$ 에서 15분간 끓여주어 유비퀴틴화 반응을 멈춰주었다. 유비퀴틴화가 멈춘 반응물을 4-20% gradient TGX gel에 15 μ l 로딩 후, 50 V 조건으로 20분, 90 V 조건으로 100분을 전기영동하여 분석을 진행하였다. 이후 Coomassie Brilliant Blue R-250에서 60 분간 염색 후 단백질 밴드를 확인하였다.
- [130] vhhGFP4-E4BU(NT)와 비교하여 vhhGFP4-E4BU(#7)에서는 vhhGFP4-E4BU(NT)와 유사한 정도의 poly-Ub 밴드가 관찰되었고, vhhGFP4-E4BU(#8)를 사용한 반응물에서는 낮은 농도에서도 보다 진한 poly-Ub 밴드를 관찰할 수 있었다. 따라서 이후 실험은 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체 중에서 가장 활성이 좋은 것으로 생각되는 vhhGFP4-E4BU(#8)을 이용하여 실험을 진행하였다.
- [131] 도 4c는 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8)을 이용하여 유비퀴틴화 실험 요소의 존재 유/무 조건에서의 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.
- [132] 구체적으로 6xhis-E1 UBA1 50 nM, Avi-6xhis-E2 UbcH5b 4 μ M, vhhGFP4-E4BU 변이체 단백질 3 μ M, Avi-6xhis-Ub 50 μ M, 표적 단백질인 6xhis-GFP 1.5 μ M, 2 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ 를 각각 E1 UBA1 부재 조건, E2 UbcH5b 부재 조건, vhhGFP-E4BU 변이체 단백질 부재 조건, Ub 부재 조건, GFP 부재 조건에서, 부재 조건 단백질 외의 다른 요소는 모두 포함된 상태로 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 buffer에서 50 μ l의 부피로 2 시간 반응시켜 주었다. 이후 5%의 2-메르캅토에탄올이 들어간 조건의 5 $\times$ SDS-PAGE sample loading buffer 10 μ l 첨가 후 95 $^{\circ}C$ 에서 15분간 끓여주어 유비퀴틴화 반응을 멈춰주었다. 유비퀴틴화가 멈춘 반응물을 4-20% gradient TGX gel에 15 μ l 로딩 후, 50 V 조건으로 20분, 90 V 조건으로 100분을 전기영동하여 분석을 진행하였다. 이후 Coomassie Brilliant Blue R-250(Bio-Rad, #161436)에서 60 분간 염색 후 단백질 밴드를 확인하였다. 유비퀴틴화 반응 요소 중 E1 UBA, E2 UbcH5b, vhhGFP-E4BU 변이체 그리고 Ub 부재 조건에서는 유비퀴틴화 반응이 진행되지 않아 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드가 관찰되지 않았지만, GFP 부재 조건 및 모든 요소가 다 포함되어 있는 조건에서는 라이신48-linked poly-Ub화가 진행되어 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드가 관찰되었다.
- [133] 도 4d는 생체 외 유비퀴틴화 실험에서 사용되는 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질의 농도에 따른 유비퀴틴화 정도를 확인하기 위해 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 각각의 단백질 0,

187, 375, 750, 1500 nM 농도에 대하여 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.

- [134] 구체적으로 6xhis-E1 UBA1 50 nM, Avi-6xhis-E2 UbcH5b 2 μ M, vhhGFP4-E4BU 변이체 단백질 0, 187, 375, 750, 1500 nM, Avi-6xhis-Ub 50 μ M, 표적 단백질인 6xhis-GFP 0.75 μ M, 2 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ 를 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 buffer에서 50 μ l의 부피로 2 시간 반응시켜 주었다. 이후 5%의 2-메르캅토에탄올이 들어간 조건의 5 $\times$ SDS-PAGE sample loading buffer 10 μ l 첨가 후 95 $^{\circ}C$ 에서 15분간 끓여주어 유비퀴틴화 반응을 멈춰주었다. 유비퀴틴화가 멈춘 반응물을 4-20% gradient TGX gel에 15 μ l 로딩 후, 50 V 조건으로 20분, 90 V 조건으로 100분을 전기영동하여 분석을 진행하였다. 이후 Coomassie Brilliant Blue R-250에서 60 분간 염색 후 단백질 밴드를 확인하였다. 3 회의 동일 조건 실험 진행 결과 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 모두에서 0의 농도 조건을 제외하고 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드가 관찰되었으며, 동일 농도 조건에서 vhhGFP4-E4BU(NT)와 비교하여 vhhGFP4-E4BU(#8)에서 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드가 더 강하게 관찰되었으며, 샘플의 밴드 정량화를 위해 ImageJ software (National Institutes of Health, USA)를 이용하여 각 샘플의 밴드를 비교한 결과 750 nM의 농도 조건에서는 약 2 배, 1500 nM의 농도 조건에서는 약 1.5 배의 밴드 강도를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 자유 Ub의 잔여량을 확인하였을 때, 187 nM의 농도 조건에서부터 vhhGFP4-E4BU(NT)와 비교하여 절반 이하의 자유 Ub 잔여량을 보였으며, 1500 nM 농도에서 약 25 %가량의 GFP 단백질 밴드의 감소를 관찰할 수 있었다. 이를 막대그래프를 통하여 분석하였을 때, 잔여 Ub양을 비교한 결과에서는 187 nM, 375 nM, 750 nM에서 vhhGFP4-E4BU(NT)와 vhhGFP4-E4BU(#8)간에 유의미한 차이를 보였고, 높은 분자량을 가지는 poly-Ub 밴드 강도를 비교하였을 때에는 750 nM, 1500 nM에서, GFP의 잔여량을 비교하였을 때에는 750 nM, 1500 nM의 농도 조건에서 vhhGFP4-E4BU(NT)와 vhhGFP4-E4BU(#8)간에 유의미한 차이를 보였다.

- [135] SDS-PAGE 상에서는 육안으로 관찰하기 힘든 단백질의 밴드 확인 및, 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드를 분석하기 위해서 웨스턴 블랏 실험을 진행하였다.

- [136] 도 4e는 상기 도 4d 실험에서 사용된 것과 동일한 생체 외 유비퀴틴화 반응물을 이용하여 웨스턴 블랏 실험을 통해 라이신48-linked poly-Ub화 밴드 및 라이신48-linked poly-Ub화 된 GFP 밴드를 관찰한 실험이다.

- [137] 구체적으로 도 4d 실험에서 사용된 생체 외 유비퀴틴화 반응물을 15% SDS-PAGE에 전기 영동 시킨 뒤, 니트로셀룰로오스 막에 트랜스퍼시켜주었다. 이후 4% BSA가 함유된 TBST (TBS pH7.4, 0.05% Tween 20) 완충액에서 1 시간동안 막을 블락킹하였다. 이후 TBST 완충액 조건에서 HRP가 융합된 Rabbit anti-GFP 항체(1:1000, Abcam, #ab290) 혹은 anti-K48 Ub linkage 항체(1:1000, Abcam, #ab140601)를 처리 후 상온에서 2 시간동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 막은

HRP가 융합된 Rabbit anti-mouse 항체 (1:4000, Sigma, #9044) 혹은 HRP가 융합된 Goat-anti rabbit 항체 (1:4000, Sigma, #A6154)를 사용하여 상온에서 1 시간 동안 배양되었다. 각 배양 종료 시, 니트로셀룰로오스 막은 5 분동안 3 회 세척하였다. 그 후 West-Q Pico ECL 솔루션 (GenDEPOT)과 ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)를 사용하여 단백질을 시각화 하였다. 웨스턴 블랏 데이터는 ImageJ software를 이용하여 밴드 강도를 정량화 하였다. Anti-K48 Ub linkage 항체를 이용하여 라이신48-linked poly-Ub가 표시된 높은 분자량의 단백질 밴드를 관찰하였을 때, 0 nM의 농도 조건을 제외한 모든 농도 조건에서 평균적으로 vhhGFP4-E4BU(#8)을 처리한 샘플에서 더 진한 밴드 강도를 보이는 것을 확인하였으며, 1500 nM에서는 약 25%가량 높은 밴드 강도를 확인할 수 있었다. 또한 Rabbit anti-GFP 항체를 이용하여 단백질 밴드를 관찰하였을 때, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질에서 모두 GFP, GFP-Ub (단량체), GFP-Ub (이량체), GFP-Ub (다량체)로 예상되는 단백질 밴드가 확인되었고, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질의 농도가 증가함에 따라 GFP 단백질의 밴드 강도가 약해지는 것을 관찰하였다. 이를 막대 그래프를 통하여 분석하였을 때, 높은 분자량의 poly-Ub 밴드 강도의 경우 1500 nM에서, GFP의 잔여량의 경우 187 nM, 750 nM, 1500 nM의 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 농도에서 유의미한 차이를 보였다.

[138] 위 실험을 통하여 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8)를 이용한 생체 외 유비퀴틴화 실험으로 표적 단백질인 GFP 및 다른 유비퀴틴화 요소 단백질에 poly-Ub화 되어 높은 분자량을 가지는 것이 관찰되었고, 이 높은 분자량의 단백질 밴드는 표적 단백질인 GFP가 라이신48-linked poly-Ub가 표시되어 있다는 것을 웨스턴블랏 실험을 통해 확인되었다. 이는 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체인 E4BU(#8)가 항 GFP-나노바디에 융합된 vhhGFP4-E4BU(#8)가 선별의 주형으로 사용된 E4BU(NT)가 융합된 vhhGFP4-E4BU(NT)와 비교하여 더 진한 밴드를 보이는 것을 통해, vhhGFP4-E4BU(NT) 보다 vhhGFP4-E4BU(#8)가 보다 더 표적 단백질의 라이신48-linked poly-Ub화 유도에 효과적임을 확인하였다.

[139]

[140] 실시예 10. 생체 외 유비퀴틴화 실험 조건에서 항-GFP 나노바디 C-말단에 융합된 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체의 표적 유비퀴틴화 반응 속도 확인.

[141] 상기 실시예 9번 실험에서 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질을 이용해서 생체 외 유비퀴틴화 실험을 진행하였을 때, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8)의 처리 농도에 따라 라이신48-linked poly-Ub화 정도가 달라지고, vhhGFP4-E4BU(NT)과 비교하여 vhhGFP4-E4BU(#8)의 라이신48-linked poly-Ub화 되는 정도가 더 강함을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 실험을 통해 확인하였다. 그 후 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 유비퀴틴화 반응 속도를

직접적으로 계산하여 차이를 분석하기 위하여, 유비퀴틴화 반응 시간에 따른 자유 Ub의 잔여량을 측정하는 실험을 진행하였다.

[142] 도 4f는 상기 실시예 5에서 정제된 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질을 사용한 생체 외 유비퀴틴화 실험에서, 반응 시간에 따른 자유 Ub의 잔여량을 확인하기 위해 0, 1.5, 3, 7, 15, 30, 60 분간 생체 외 유비퀴틴화 실험을 반응한 후 환원성 조건에서 15% SDS-PAGE 혹은 4-20% gradient TGX gel을 이용하여 분석한 결과이다.

[143] 구체적으로 6xhis-E1 UBA1 50 nM, Avi-6xhis-E2 UbcH5b 2 μ M, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질 1.5 μ M, Avi-6xhis-Ub 8 μ M, 표적 단백질인 6xhis-GFP 0.75 μ M, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂를 10 mM HEPES, 60 mM NaCl, pH 8.0 buffer에서 50 μ l의 부피로 0, 1.5, 3, 7, 15, 30, 60 분간 반응시켜 주었다. 이후 5%의 2-메르캅토에탄올이 들어간 조건의 5 × SDS-PAGE sample loading buffer 10 μ l 첨가 후 95 °C에서 15분간 끓여주어 유비퀴틴화 반응을 멈춰주었다. 유비퀴틴화가 멈춘 반응물을 4-20% gradient TGX gel에 15 μ l 로딩 후, 50 V 조건으로 20분, 90 V 조건으로 100분을 전기영동하여 분석을 진행하였다. 이후 Coomassie Brilliant Blue R-250에서 60 분간 염색 후 단백질 밴드를 확인하였다. 3 회의 동일 조건 실험 진행 결과 vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 모두에서 생체 외 유비퀴틴화 실험의 반응 시간이 증가함에 따라 자유 Ub의 잔여량이 점차 감소하는 것을 확인하였다. vhhGFP4-E4BU(NT)의 경우, 반응 시간 30분 이상부터 유의미한 자유 Ub의 잔여량의 감소가 관찰되었고, vhhGFP4-E4BU(#8)에서는 15분 이상의 반응 시간부터 유의미한 자유 Ub의 잔여량의 감소가 관찰되었다. 샘플의 밴드 정량화를 위해 ImageJ software를 이용하여 각 샘플의 밴드를 비교하였다.

[144] 도 4g는 상기 도 4f의 실험의 결과를 ImageJ software로 분석한 자유 Ub의 잔여량을 일차 지수적 감쇠 방정식을 이용하여 선형 그래프로 나타낸 결과이다. 그래프를 확인하였을 때, 반응 시간이 7 분이 지난 시점에서부터 유의미한 자유 Ub 잔여량의 차이가 확인되었고, 일차 지수적 감쇠 방정식을 통해 자유 Ub의 반감기를 확인하였을 때, vhhGFP4-E4BU(NT)의 경우 $Ub(t_{1/2})=16.5 \pm 2.6$ 분, vhhGFP4-E4BU(#8)의 경우 $Ub(t_{1/2})=5.6 \pm 1.3$ 분으로 측정되어 vhhGFP4-E4BU(#8)가 vhhGFP4-E4BU(NT)보다 약 3 배 정도 빠른 자유 Ub 잔여량의 감소를 보임을 확인하였으며, 7분, 15분 조건에서 잔여 Ub 량의 유의미한 차이를 보였다.

[145] 도 4h는 상기 도 4f 실험에서 사용된 것과 동일한 생체 외 유비퀴틴화 반응물을 이용하여 웨스턴 블랏 실험을 통해 유비퀴틴화 밴드 및 라이신48-linked poly-Ub 화 된 GFP 밴드를 관찰한 실험이다.

[146] 상기 도 4f에서 사용된 생체 외 유비퀴틴화 반응물을 15% SDS-PAGE에 전기영동 시킨 뒤, 니트로셀룰로오스 막에 트랜스퍼시켜주었다. 이후 4% BSA가 함유된 TBST (TBS pH7.4, 0.05% Tween 20) 완충액에서 1 시간동안 막을 블락킹하였다. 이후 TBST 완충액 조건에서 HRP가 융합된 Rabbit anti-GFP 항체 (1:1000)

혹은 anti-Ub 항체 (1:1000)를 처리 후 상온에서 2 시간동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 막은 HRP가 융합된 Rabbit anti-mouse 항체 (1:4000) 혹은 HRP가 융합된 Goat-anti rabbit 항체 (1:4000)를 사용하여 상온에서 1 시간 동안 배양되었다. 각 배양 종료 시, 니트로셀룰로오스 막은 5 분동안 3 회 세척하였다. 그 후 West-Q Pico ECL 솔루션과 ImageQuant LAS 4000 mini를 사용하여 단백질을 시각화 하였다. 웨스턴 블랏 데이터는 ImageJ software를 이용하여 밴드 강도를 정량화 하였다. Anti-Ub 항체를 이용하여 Ub이 표지된 단백질 밴드를 관찰하였을 때, 0 분의 반응 시간 조건을 제외한 모든 반응 시간 조건에서 높은 분자량을 가지는 단백질 밴드가 관찰되었고, vhhGFP4-E4BU(NT)에서는 15 분 이후의 반응 시간 조건부터, vhhGFP4-E4BU(#8)에서는 7 분 이후의 반응 시간 조건부터 유의미한 자유 Ub의 잔여량 감소가 확인되었다. 또한 Rabbit anti-GFP 항체를 이용하여 단백질 밴드를 관찰하였을 때, vhhGFP4-E4BU(NT) 및 vhhGFP4-E4BU(#8) 단백질에서 모두 GFP, GFP-Ub (단량체), GFP-Ub (이량체), GFP-Ub (다량체)로 예상되는 단백질 밴드가 확인되었다.

[147] 위 실험을 통하여 vhhGFP4-E4BU(NT)와 비교하여 vhhGFP4-E4BU(#8)이 약 3배 가량 빠른 자유 Ub 잔여량의 감소를 보임을 확인하였다.

[148]

산업상 이용가능성

[149] 본 발명에 따른 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체는 E2(UbcH5b)-Ub와 결합하여 다른 자리 입체적인 변화를 통해 기존의 E4BU 단백질보다 향상된 표적 단백질의 라이신48-linked poly-Ub화를 유도할 수 있다. 구체적으로 E1 UBA1, E2 UbcH5b, ATP, MgCl₂, Ub와의 반응 조건 하에서 기존의 E4BU(WT)과 E4BU(NT) 변이체와 비교하여 보다 빠르게 유비퀴틴-전이를 유도하여 기질 단백질로의 향상된 라이신48-linked poly-Ub화를 유도할 수 있다.

[150] 본 발명에 따른 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체가 항-GFP 나노바디의 C-말단에 융합된 BioPROTAC의 경우, 표적 단백질(GFP)의 라이신48-linked poly-Ub화가 유도되고, 이는 기질 특이성을 가질 수 있는 항체절편과 다른 자리 입체적 변화를 통해 E2-Ub의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킨 E4BU 변이체가 융합되었을 때 다양한 표적 단백질의 라이신48-linked poly-Ub화를 유도할 수 있음을 보여준다.

[151]

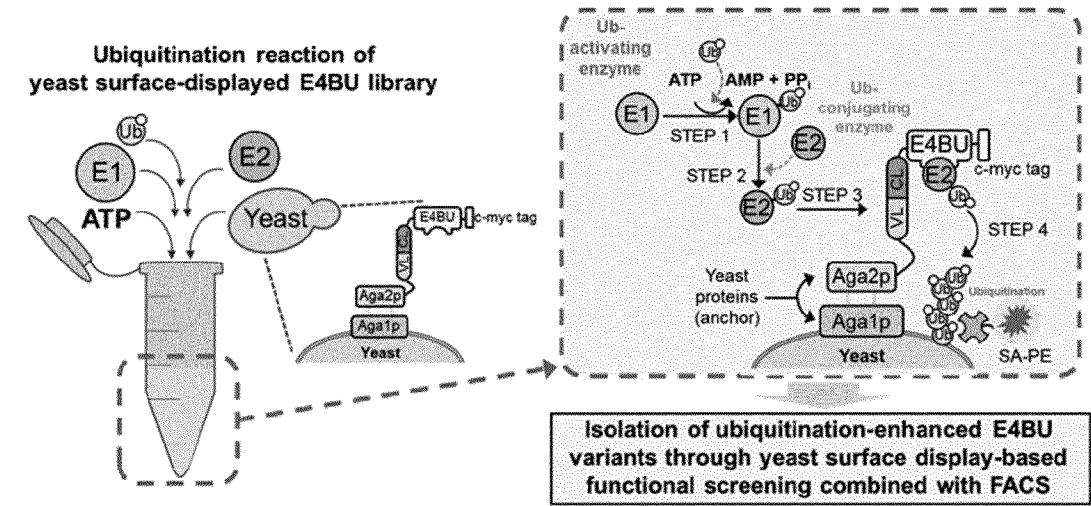
서열목록 Free Text

[152] 전자파일 첨부하였음.

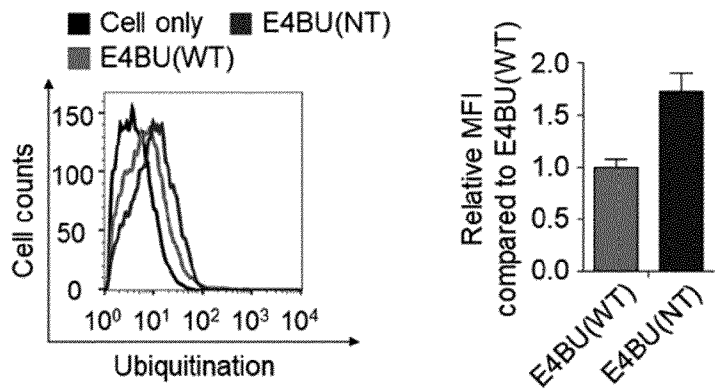
청구범위

- [청구항 1] 유비퀴틴 (Ubiquitin, Ub)가 결합된 E2 (ubiquitin conjugating enzyme) (E2-Ub)의 유비퀴틴-전이 속도를 향상시켜 유비퀴틴화 활성을 증가시킬 수 있는 다른 자리 입체적 변화 (allosteric regulation)를 포함하는, E4B (Monomeric U-box-type E3)의 U-box 도메인 (E4BU) 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 서열번호 3의 서열 중 10번째 내지 25번째 아미노산 중 하나 이상이 다른 아미노산으로 치환된, E4BU 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 4 내지 7로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 서열을 포함하는 E4BU 변이체.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 E4BU 변이체를 코딩하는 핵산.
- [청구항 5] 제4항의 핵산을 포함하는 발현벡터.
- [청구항 6] 제4항의 핵산 또는 제5항의 발현벡터로 형질전환된 재조합 세포.
- [청구항 7] 다음 단계를 포함하는 E4BU 변이체의 제조방법:
 (a) 제6항의 재조합 세포를 배양하여 E4BU 변이체를 생성시키는 단계; 및
 (b) 상기 생성된 E4BU 변이체를 회수하는 단계.

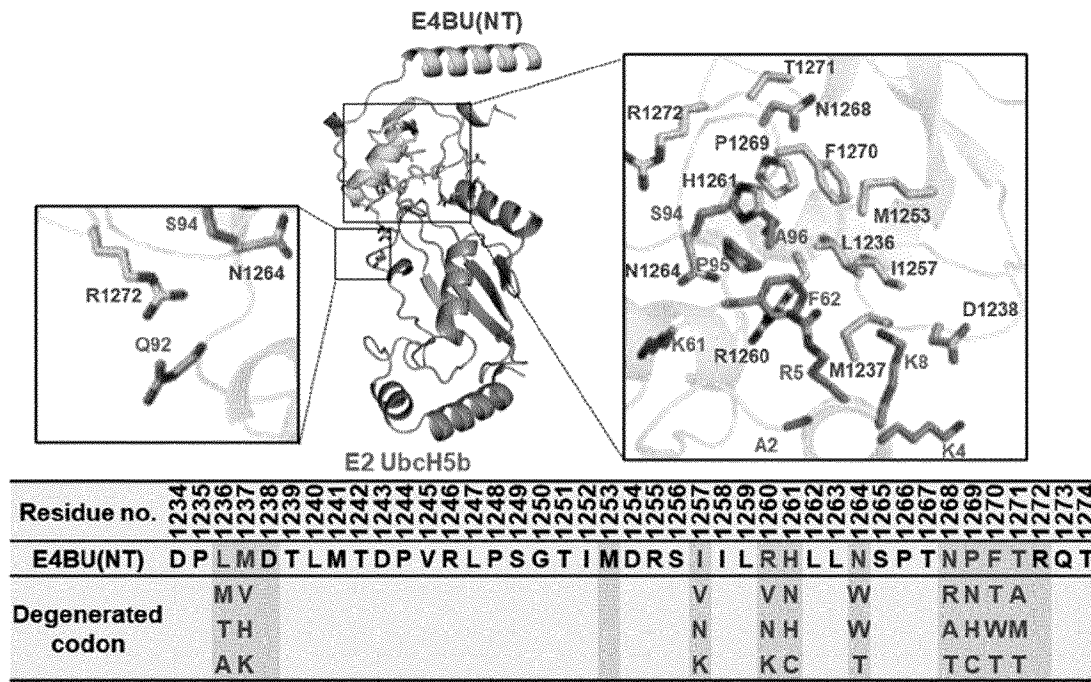
[도 1a]



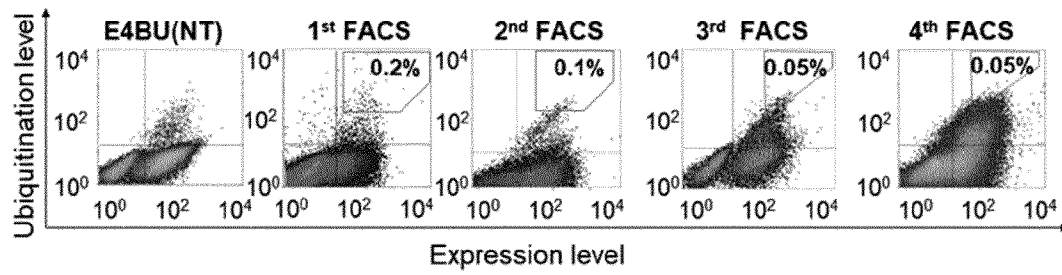
[도 1b]



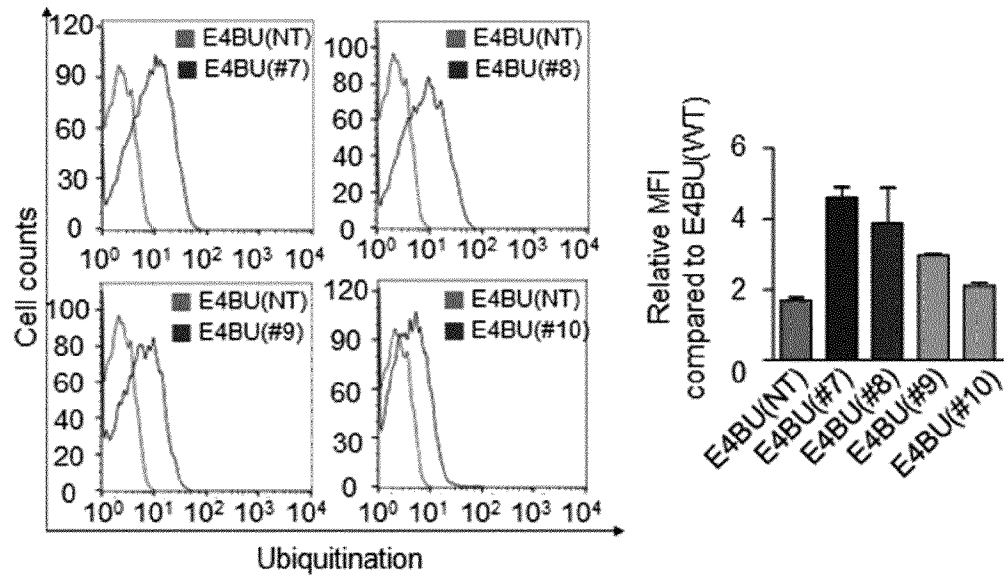
[도 2a]



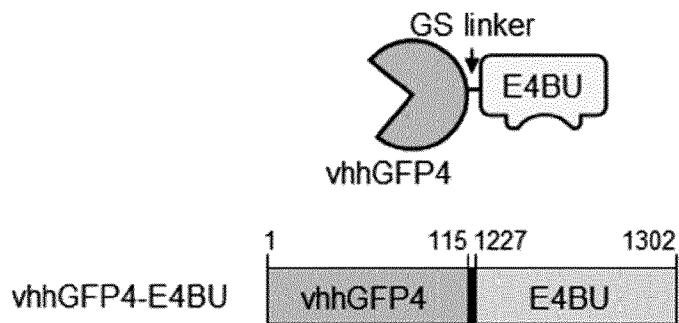
[도2b]



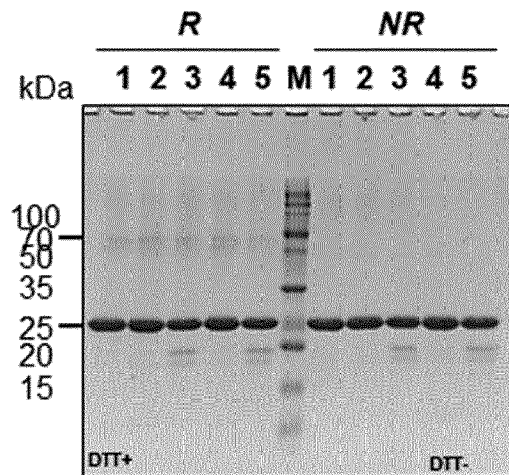
[도2c]



[도3a]



[도3b]



M: Marker

Lane 1: vhhGFP4-E4BU(NT)

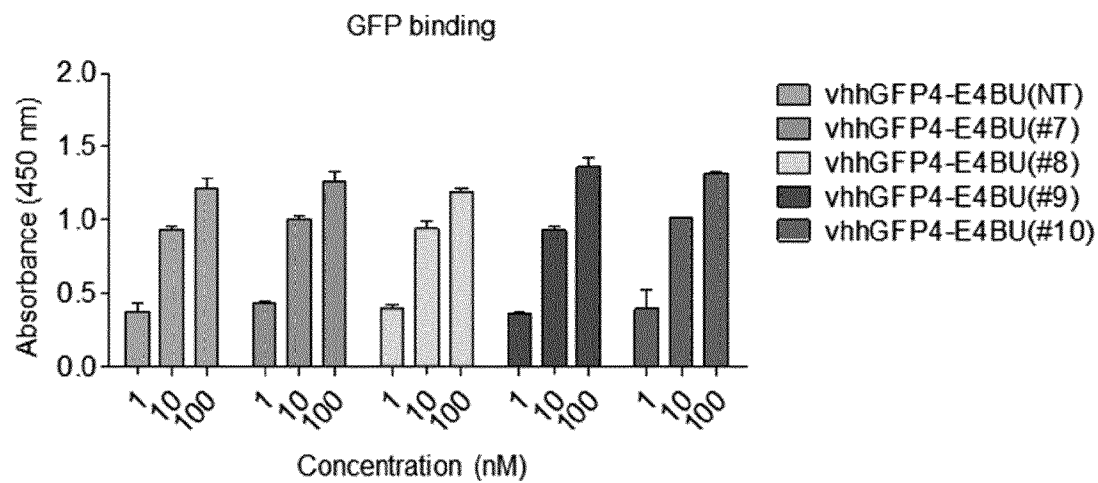
Lane 2: vhhGFP4-E4BU(#7)

Lane 3: vhhGFP4-E4BU(#8)

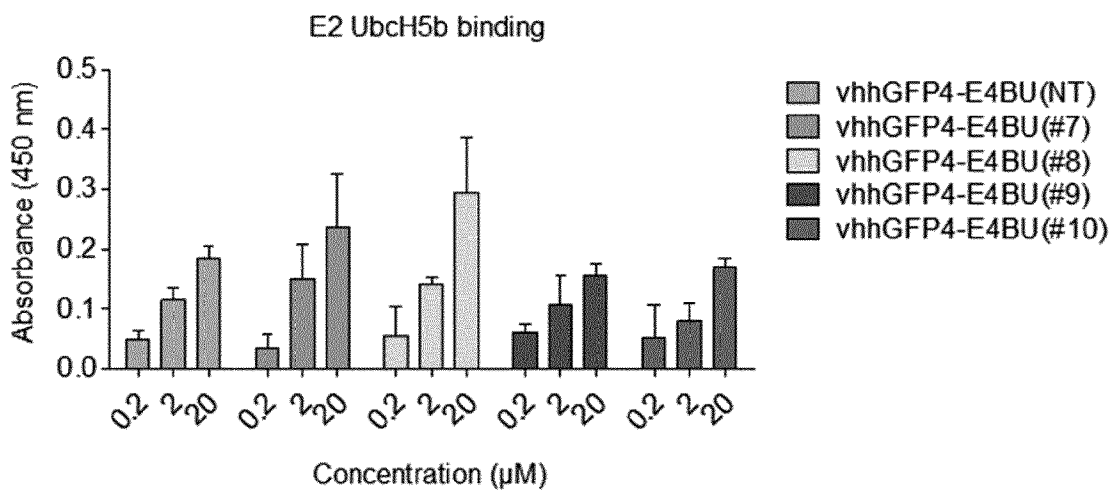
Lane 4: vhhGFP4-E4BU(#9)

Lane 5: vhhGFP4-E4BU(#10)

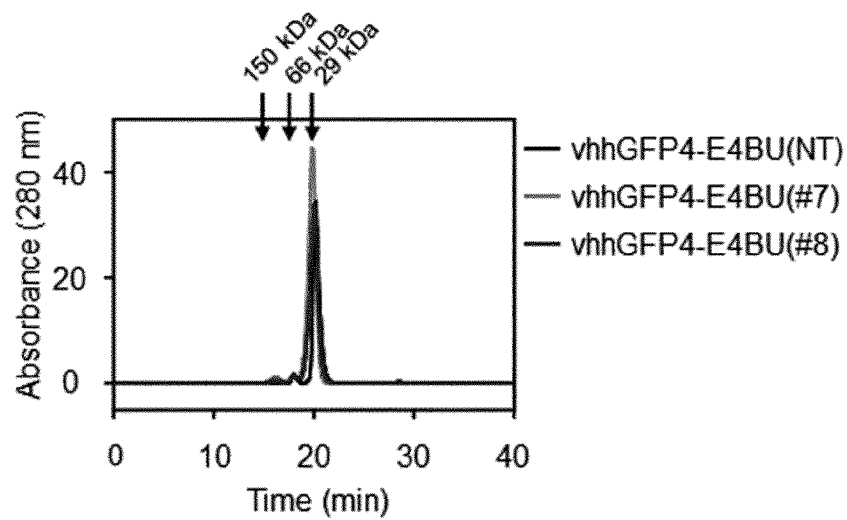
[도3c]



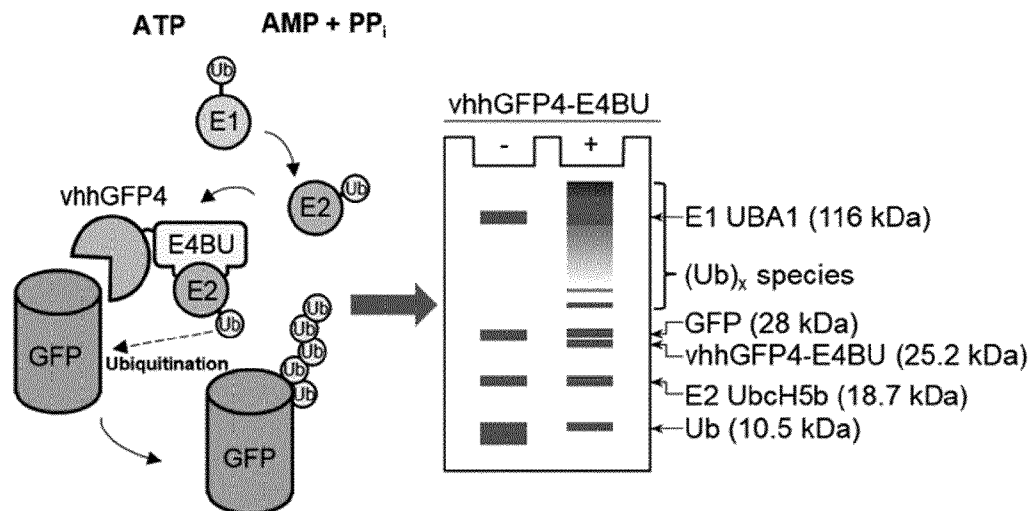
[도3d]



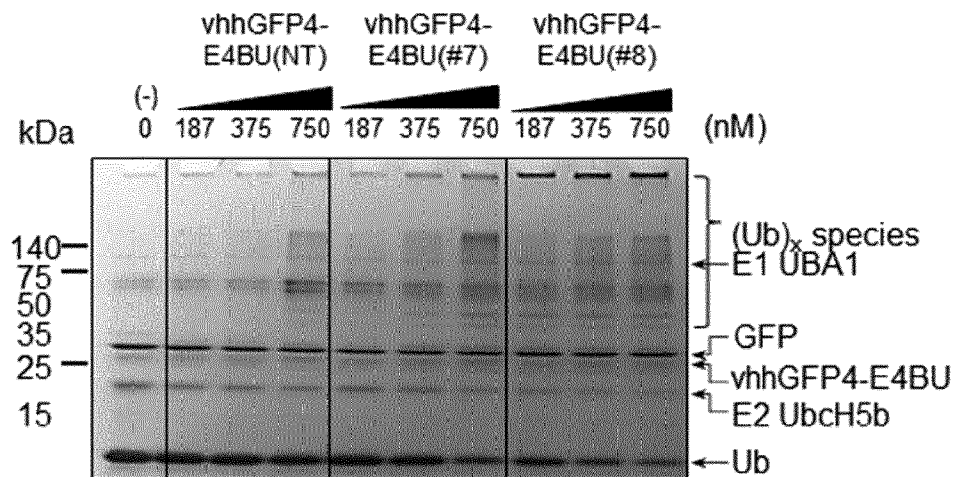
[도3e]



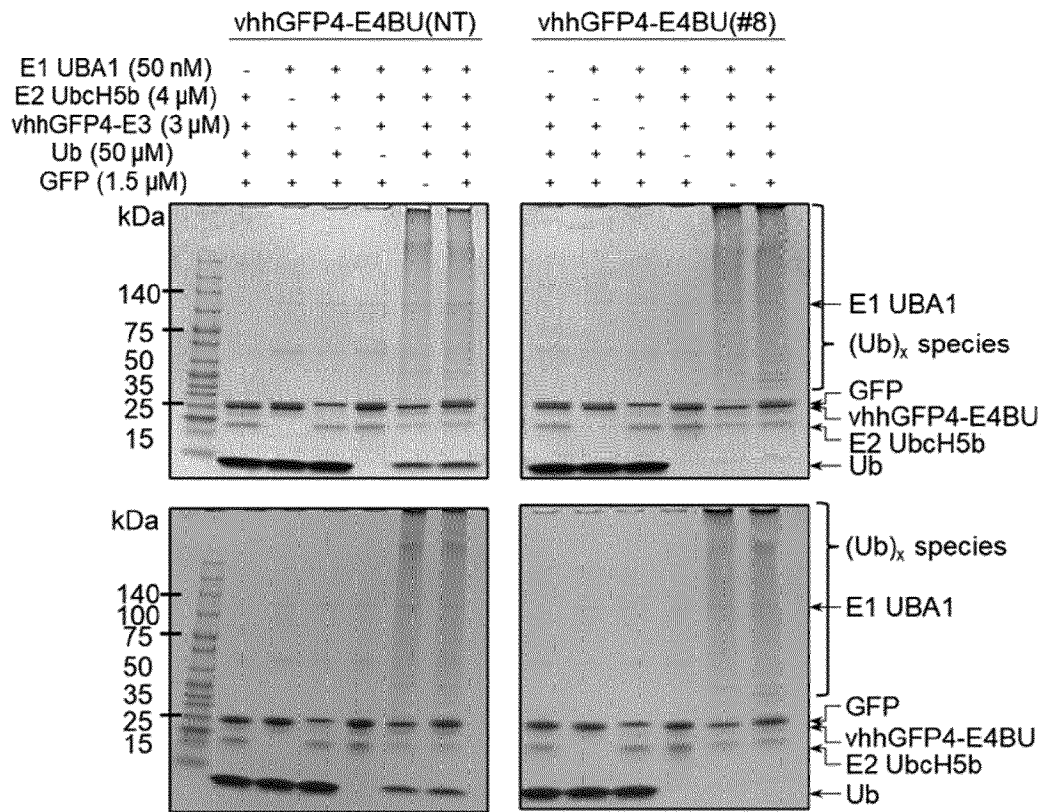
[도4a]



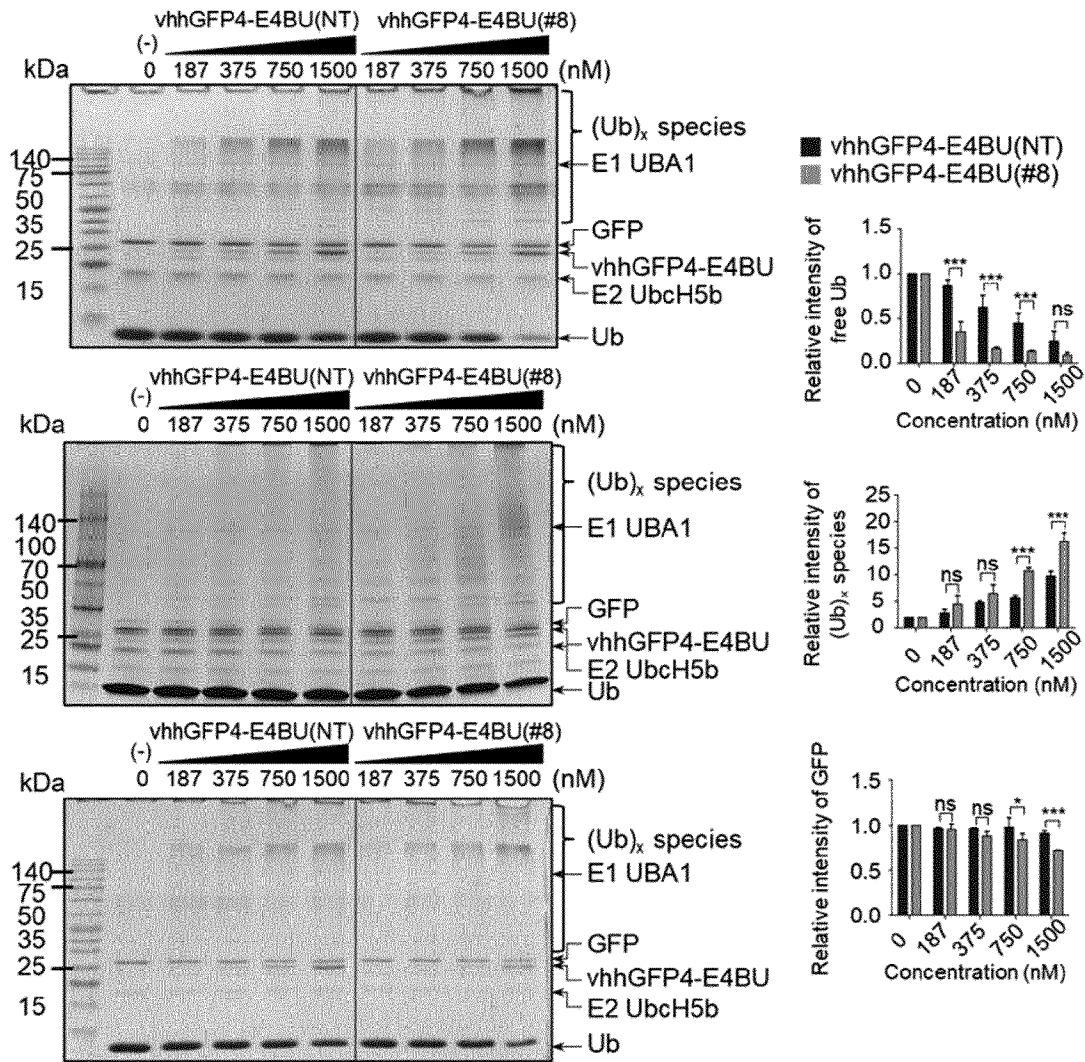
[도4b]



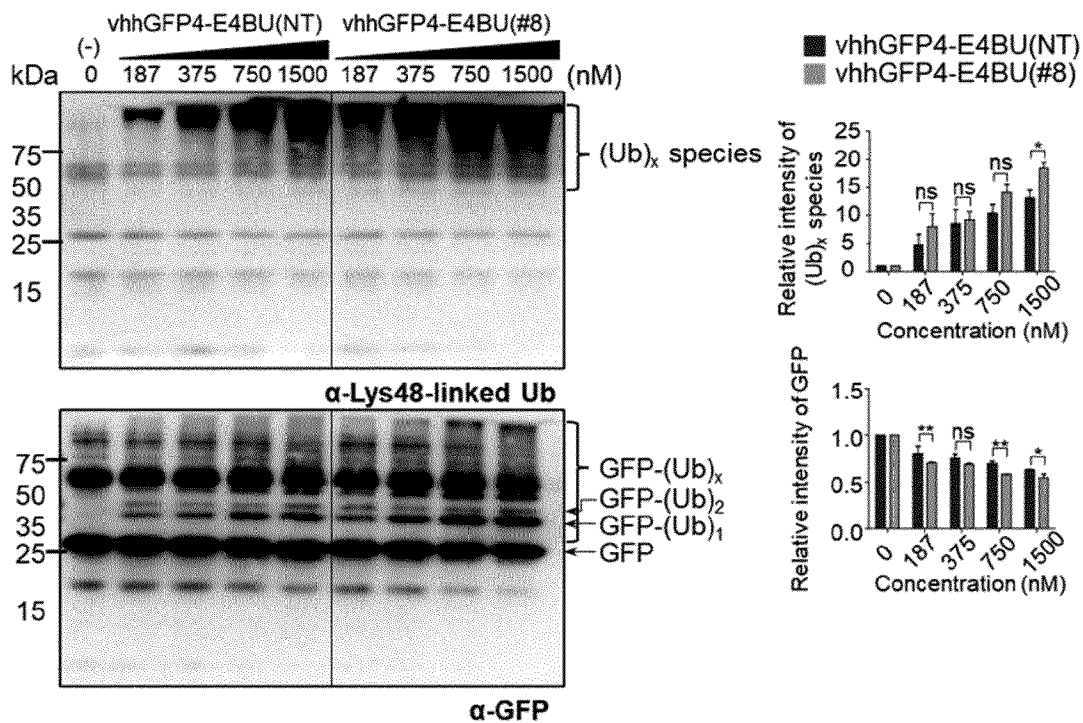
[도4c]



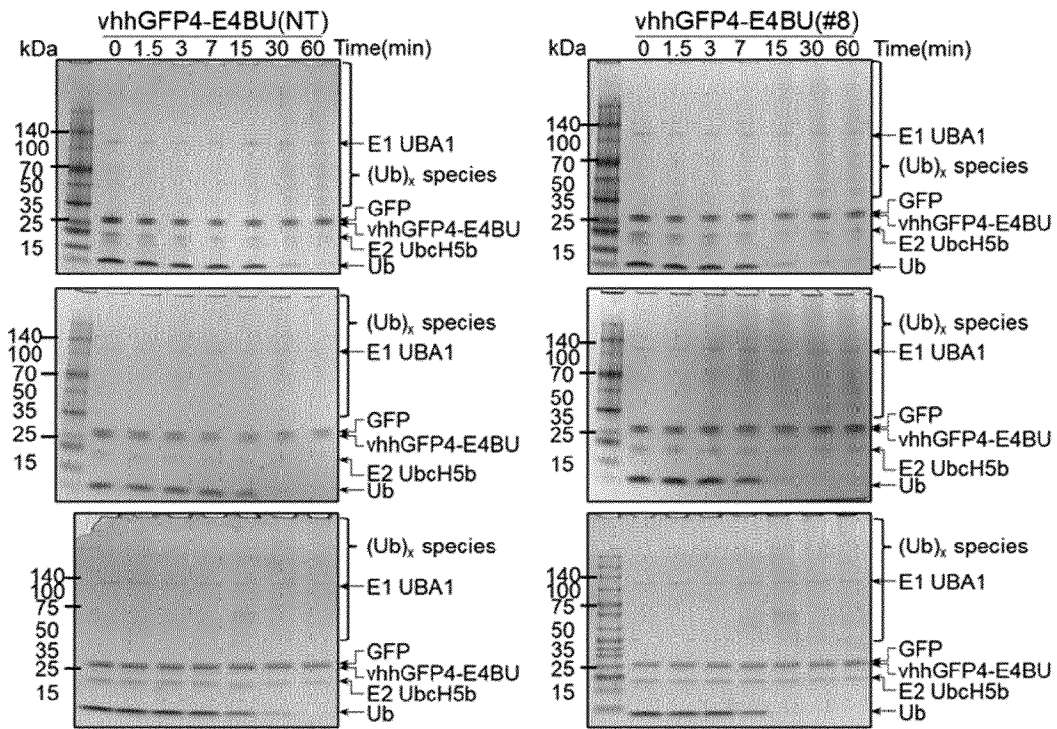
[도4d]



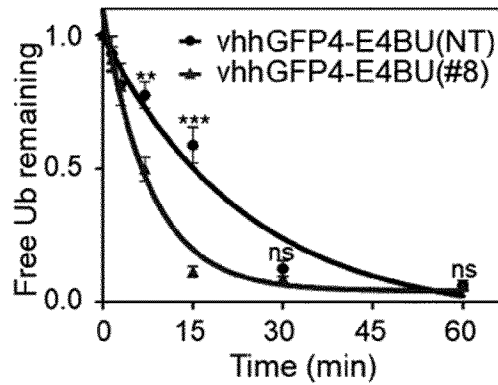
[도4e]



[도4f]



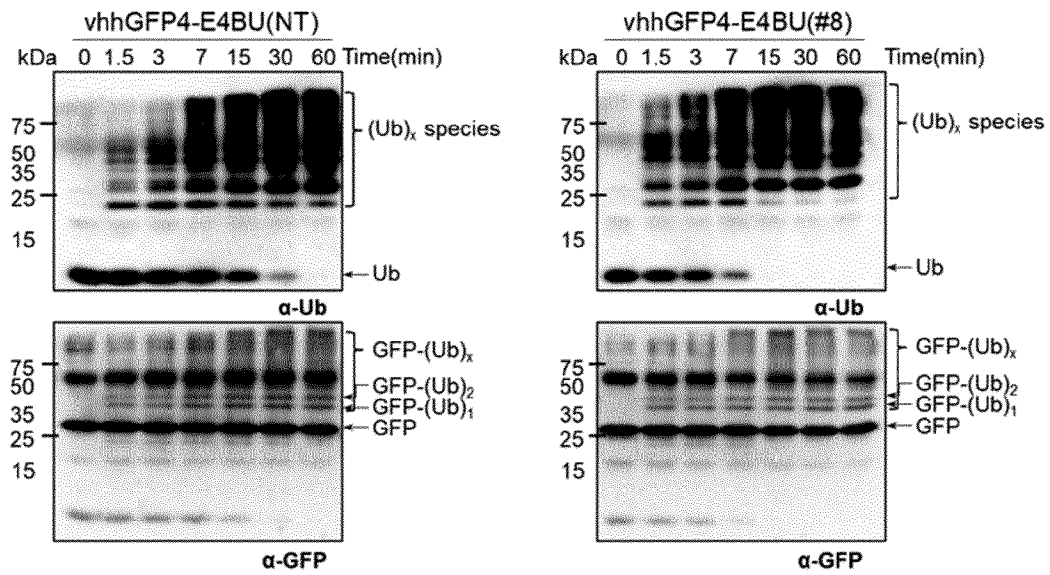
[도4g]



vhhGFP4-E4BU(NT): Ub($t_{1/2}$) = 16.5 ± 2.6 min

vhhGFP4-E4BU(#8): Ub($t_{1/2}$) = 5.6 ± 1.3 min

[도4h]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/004990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/00(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/00(2006.01); A61K 35/76(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/85(2006.01);
C12N 5/06(2006.01); G01N 33/50(2006.01)

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: 유비쿼틴(Ubiquitin), E4B U-box도메인(E4BU), 변이체(mutant), 형질전환
(Transformation), 벡터(vector)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	NCBI, GenBank Accession No. 2KRE_A. Chain A, Ubiquitin conjugation factor E4 B. 01 December 2020. See entire document.	1,4-7 2,3
A	KR 10-2016-0080449 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 08 July 2016 (2016-07-08) See entire document.	1-7
A	KR 10-2000-0005413 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 25 January 2000 (2000-01-25) See entire document.	1-7
A	US 2009-0175827 A1 (BYROM, M. W. et al.) 09 July 2009 (2009-07-09) See entire document.	1-7



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

19 July 2023

Date of mailing of the international search report

19 July 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/004990**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0142111 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 22 December 2015 (2015-12-22) See entire document.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/004990

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/004990

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2016-0080449	A	08 July 2016	KR	10-2256749	B1	25 May 2021
KR	10-2000-0005413	A	25 January 2000	AU	1997-26006	B2	26 April 2001
				AU	2600697	A	22 October 1997
				AU	732547	B2	26 April 2001
				BR	9710415	A	17 August 1999
				CA	2250849	A1	09 October 1997
				EP	0900276	A1	10 March 1999
				JP	2002-503949	A	05 February 2002
				NZ	332482	A	26 May 2000
				US	06528633	B2	04 March 2003
				US	2002-0086401	A1	04 July 2002
				US	2002-086401	A1	04 July 2002
				US	2003-0170866	A1	11 September 2003
				US	2003-170866	A1	11 September 2003
				US	6180379	B1	30 January 2001
				US	6180379	B2	30 January 2001
				US	6528633	B2	04 March 2003
				WO	97-37027	A1	09 October 1997
US	2009-0175827	A1	09 July 2009	AT	534738	T	15 December 2011
				AU	2005-333165	A1	28 December 2006
				AU	2005-333165	B2	19 July 2012
				AU	2007-333106	A1	19 June 2008
				AU	2007-333107	A1	19 June 2008
				AU	2007-333108	A1	19 June 2008
				AU	2007-333109	A1	19 June 2008
				AU	2007-333110	A1	19 June 2008
				AU	2007-342068	A1	17 July 2008
				AU	2012-244061	A1	08 November 2012
				AU	2014-202177	A1	15 May 2014
				AU	2014-202177	B2	04 August 2016
				AU	2014-204455	A1	31 July 2014
				AU	2014-204455	B2	10 September 2015
				AU	2014-204457	A1	31 July 2014
				AU	2014-204457	B2	10 September 2015
				AU	2014-204460	A1	31 July 2014
				AU	2014-204463	A1	31 July 2014
				AU	2014-204463	B2	10 September 2015
				AU	2016-200006	A1	28 January 2016
				CA	2587189	A1	28 December 2006
				CA	2671194	A1	19 June 2008
				CA	2671270	A1	17 July 2008
				CA	2671294	A1	19 June 2008
				CA	2671296	A1	19 June 2008
				CA	2671299	A1	19 June 2008
				CA	2671302	A1	19 June 2008
				CA	2850323	A1	28 December 2006
				CA	2857878	A1	28 December 2006
				CA	2857879	A1	28 December 2006
				CA	2857880	A1	28 December 2006
				CA	2857881	A1	28 December 2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/004990

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2857901 A1	28 December 2006
		CN 101622348 A	06 January 2010
		CN 101622349 A	06 January 2010
		CN 101622350 A	06 January 2010
		CN 101627121 A	13 January 2010
		CN 101631861 A	20 January 2010
		CN 101675165 A	17 March 2010
		DK 2104737 T3	27 May 2013
		DK 2302055 T3	13 October 2014
		EP 1838852 A2	03 October 2007
		EP 2102341 A2	23 September 2009
		EP 2102342 A2	23 September 2009
		EP 2104734 A2	30 September 2009
		EP 2104735 A2	30 September 2009
		EP 2104736 A2	30 September 2009
		EP 2104736 B1	23 November 2011
		EP 2104737 A2	30 September 2009
		EP 2104737 B1	10 April 2013
		EP 2281886 A1	09 February 2011
		EP 2281886 B1	16 July 2014
		EP 2281887 A1	09 February 2011
		EP 2281888 A1	09 February 2011
		EP 2281888 B1	07 January 2015
		EP 2281889 A1	09 February 2011
		EP 2281889 B1	30 July 2014
		EP 2284265 A1	16 February 2011
		EP 2284265 B1	07 January 2015
		EP 2287303 A1	23 February 2011
		EP 2287303 B1	02 July 2014
		EP 2292755 A1	09 March 2011
		EP 2292756 A1	09 March 2011
		EP 2292756 B1	16 July 2014
		EP 2298893 A1	23 March 2011
		EP 2298894 A1	23 March 2011
		EP 2298894 B1	16 July 2014
		EP 2302051 A1	30 March 2011
		EP 2302051 B1	07 January 2015
		EP 2302052 A1	30 March 2011
		EP 2302052 B1	07 January 2015
		EP 2302053 A1	30 March 2011
		EP 2302054 A1	30 March 2011
		EP 2302054 B1	16 July 2014
		EP 2302055 A1	30 March 2011
		EP 2302055 B1	27 August 2014
		EP 2302055 T1	30 January 2015
		EP 2302056 A1	30 March 2011
		EP 2302056 B1	07 January 2015
		EP 2314688 A1	27 April 2011
		EP 2314688 B1	16 July 2014
		EP 2322616 A1	18 May 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/004990

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2808389 A1	03 December 2014
		EP 2808390 A1	03 December 2014
		ES 2503738 T3	07 October 2014
		ES 2503739 T3	07 October 2014
		ES 2503740 T3	07 October 2014
		ES 2503741 T3	07 October 2014
		ES 2503742 T3	07 October 2014
		ES 2503743 T3	07 October 2014
		ES 2503765 T3	07 October 2014
		ES 2507544 T3	15 October 2014
		ES 2534300 T3	21 April 2015
		ES 2534301 T3	21 April 2015
		ES 2534302 T3	21 April 2015
		ES 2534303 T3	21 April 2015
		ES 2534304 T3	21 April 2015
		HK 1204656 A1	27 November 2015
		IL 199160 A	28 March 2010
		IL 199161 A	28 March 2010
		IL 199162 A	28 March 2010
		IL 199163 A	28 March 2010
		IL 199164 A	28 March 2010
		IL 199165 A	28 March 2010
		JP 2008-519606 A	12 June 2008
		JP 2010-178741 A	19 August 2010
		JP 2012-228254 A	22 November 2012
		JP 2014-012020 A	23 January 2014
		JP 2014-217381 A	20 November 2014
		JP 2014-217384 A	20 November 2014
		JP 2014-217385 A	20 November 2014
		JP 2014-217386 A	20 November 2014
		JP 2014-217387 A	20 November 2014
		JP 2014-223080 A	04 December 2014
		JP 2016-165292 A	15 September 2016
		JP 5389690 B2	15 January 2014
		JP 5596085 B2	24 September 2014
		JP 5620556 B2	05 November 2014
		PL 2302055 T3	27 February 2015
		SI 2302055 T1	30 January 2015
		US 2008-0050744 A1	28 February 2008
		US 2008-0171715 A1	17 July 2008
		US 2008-0176766 A1	24 July 2008
		US 2009-0092974 A1	09 April 2009
		US 2009-0131354 A1	21 May 2009
		US 2009-0163430 A1	25 June 2009
		US 2009-0163434 A1	25 June 2009
		US 2009-0176723 A1	09 July 2009
		US 2009-0192102 A1	30 July 2009
		US 2011-0313025 A1	22 December 2011
		US 2012-0065248 A1	15 March 2012
		US 2012-0282696 A1	08 November 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/004990

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2013-0143945 A1	06 June 2013
		US 2013-0303591 A1	14 November 2013
		US 2014-0031415 A1	30 January 2014
		US 2014-0314833 A1	23 October 2014
		US 2014-0348907 A1	27 November 2014
		US 2014-0348908 A1	27 November 2014
		US 2014-0350086 A1	27 November 2014
		US 2015-0004221 A1	01 January 2015
		US 2015-0005366 A1	01 January 2015
		US 2015-0275213 A1	01 October 2015
		US 2015-0284719 A1	08 October 2015
		US 2015-0284720 A1	08 October 2015
		US 2015-0299705 A1	22 October 2015
		US 2015-0342981 A1	03 December 2015
		US 2015-0344881 A1	03 December 2015
		US 2015-0344883 A1	03 December 2015
		US 2015-0352046 A1	10 December 2015
		US 2015-0361431 A1	17 December 2015
		US 2017-0037404 A1	09 February 2017
		US 7960359 B2	14 June 2011
		US 8058250 B2	15 November 2011
		US 8173611 B2	08 May 2012
		US 8563708 B2	22 October 2013
		US 8765709 B2	01 July 2014
		US 8946177 B2	03 February 2015
		US 9051571 B2	09 June 2015
		US 9068219 B2	30 June 2015
		US 9382537 B2	05 July 2016
		US 9447414 B2	20 September 2016
		US 9506061 B2	29 November 2016
		WO 2006-137941 A2	28 December 2006
		WO 2006-137941 A3	03 January 2008
		WO 2006-137941 A9	08 March 2007
		WO 2008-073915 A2	19 June 2008
		WO 2008-073915 A3	23 October 2008
		WO 2008-073919 A2	19 June 2008
		WO 2008-073919 A3	26 February 2009
		WO 2008-073920 A2	19 June 2008
		WO 2008-073920 A3	26 February 2009
		WO 2008-073921 A2	19 June 2008
		WO 2008-073921 A3	26 February 2009
		WO 2008-073922 A2	19 June 2008
		WO 2008-073922 A3	12 March 2009
		WO 2008-073923 A2	19 June 2008
		WO 2008-073923 A3	11 December 2008
		WO 2008-085797 A2	17 July 2008
		WO 2008-085797 A3	09 October 2008
		WO 2008-085797 A8	16 July 2009
KR 10-2015-0142111 A	22 December 2015	KR 10-1714116 B1	10 March 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/00(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/00(2006.01); A61K 35/76(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/85(2006.01); C12N 5/06(2006.01); G01N 33/50(2006.01) 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: 유비퀴틴(Ubiquitin), E4B U-box도메인(E4BU), 변이체(mutant), 형질 전환(Transformation), 벡터(vector)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	NCBI, GenBank Accession No. 2KRE_A, "Chain A, Ubiquitin conjugation factor E4 B", 2020.12.01 전체 문헌	1,4-7 2,3
A	KR 10-2016-0080449 A (연세대학교 산학협력단) 2016.07.08 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2000-0005413 A (프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지 등) 2000.01.25 전체 문헌	1-7
A	US 2009-0175827 A1 (BYROM, M. W. 등) 2009.07.09 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2015-0142111 A (아주대학교 산학협력단) 2015.12.22 전체 문헌	1-7
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년07월19일(19.07.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년07월19일(19.07.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0080449 A	2016/07/08	KR 10-2256749 B1	2021/05/25
KR 10-2000-0005413 A	2000/01/25	AU 1997-26006 B2	2001/04/26
		AU 2600697 A	1997/10/22
		AU 732547 B2	2001/04/26
		BR 9710415 A	1999/08/17
		CA 2250849 A1	1997/10/09
		EP 0900276 A1	1999/03/10
		JP 2002-503949 A	2002/02/05
		NZ 332482 A	2000/05/26
		US 06528633 B2	2003/03/04
		US 2002-0086401 A1	2002/07/04
		US 2002-086401 A1	2002/07/04
		US 2003-0170866 A1	2003/09/11
		US 2003-170866 A1	2003/09/11
		US 6180379 B1	2001/01/30
		US 6180379 B2	2001/01/30
		US 6528633 B2	2003/03/04
		WO 97-37027 A1	1997/10/09
US 2009-0175827 A1	2009/07/09	AT 534738 T	2011/12/15
		AU 2005-333165 A1	2006/12/28
		AU 2005-333165 B2	2012/07/19
		AU 2007-333106 A1	2008/06/19
		AU 2007-333107 A1	2008/06/19
		AU 2007-333108 A1	2008/06/19
		AU 2007-333109 A1	2008/06/19
		AU 2007-333110 A1	2008/06/19
		AU 2007-342068 A1	2008/07/17
		AU 2012-244061 A1	2012/11/08
		AU 2014-202177 A1	2014/05/15
		AU 2014-202177 B2	2016/08/04
		AU 2014-204455 A1	2014/07/31
		AU 2014-204455 B2	2015/09/10
		AU 2014-204457 A1	2014/07/31
		AU 2014-204457 B2	2015/09/10
		AU 2014-204460 A1	2014/07/31
		AU 2014-204463 A1	2014/07/31
		AU 2014-204463 B2	2015/09/10
		AU 2016-200006 A1	2016/01/28
		CA 2587189 A1	2006/12/28
		CA 2671194 A1	2008/06/19
		CA 2671270 A1	2008/07/17
		CA 2671294 A1	2008/06/19
		CA 2671296 A1	2008/06/19
		CA 2671299 A1	2008/06/19
		CA 2671302 A1	2008/06/19
		CA 2850323 A1	2006/12/28
		CA 2857878 A1	2006/12/28
		CA 2857879 A1	2006/12/28
		CA 2857880 A1	2006/12/28
		CA 2857881 A1	2006/12/28

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CA 2857901 A1	2006/12/28
		CN 101622348 A	2010/01/06
		CN 101622349 A	2010/01/06
		CN 101622350 A	2010/01/06
		CN 101627121 A	2010/01/13
		CN 101631861 A	2010/01/20
		CN 101675165 A	2010/03/17
		DK 2104737 T3	2013/05/27
		DK 2302055 T3	2014/10/13
		EP 1838852 A2	2007/10/03
		EP 2102341 A2	2009/09/23
		EP 2102342 A2	2009/09/23
		EP 2104734 A2	2009/09/30
		EP 2104735 A2	2009/09/30
		EP 2104736 A2	2009/09/30
		EP 2104736 B1	2011/11/23
		EP 2104737 A2	2009/09/30
		EP 2104737 B1	2013/04/10
		EP 2281886 A1	2011/02/09
		EP 2281886 B1	2014/07/16
		EP 2281887 A1	2011/02/09
		EP 2281888 A1	2011/02/09
		EP 2281888 B1	2015/01/07
		EP 2281889 A1	2011/02/09
		EP 2281889 B1	2014/07/30
		EP 2284265 A1	2011/02/16
		EP 2284265 B1	2015/01/07
		EP 2287303 A1	2011/02/23
		EP 2287303 B1	2014/07/02
		EP 2292755 A1	2011/03/09
		EP 2292756 A1	2011/03/09
		EP 2292756 B1	2014/07/16
		EP 2298893 A1	2011/03/23
		EP 2298894 A1	2011/03/23
		EP 2298894 B1	2014/07/16
		EP 2302051 A1	2011/03/30
		EP 2302051 B1	2015/01/07
		EP 2302052 A1	2011/03/30
		EP 2302052 B1	2015/01/07
		EP 2302053 A1	2011/03/30
		EP 2302054 A1	2011/03/30
		EP 2302054 B1	2014/07/16
		EP 2302055 A1	2011/03/30
		EP 2302055 B1	2014/08/27
		EP 2302055 T1	2015/01/30
		EP 2302056 A1	2011/03/30
		EP 2302056 B1	2015/01/07
		EP 2314688 A1	2011/04/27
		EP 2314688 B1	2014/07/16
		EP 2322616 A1	2011/05/18

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2808389 A1	2014/12/03
		EP 2808390 A1	2014/12/03
		ES 2503738 T3	2014/10/07
		ES 2503739 T3	2014/10/07
		ES 2503740 T3	2014/10/07
		ES 2503741 T3	2014/10/07
		ES 2503742 T3	2014/10/07
		ES 2503743 T3	2014/10/07
		ES 2503765 T3	2014/10/07
		ES 2507544 T3	2014/10/15
		ES 2534300 T3	2015/04/21
		ES 2534301 T3	2015/04/21
		ES 2534302 T3	2015/04/21
		ES 2534303 T3	2015/04/21
		ES 2534304 T3	2015/04/21
		HK 1204656 A1	2015/11/27
		IL 199160 A	2010/03/28
		IL 199161 A	2010/03/28
		IL 199162 A	2010/03/28
		IL 199163 A	2010/03/28
		IL 199164 A	2010/03/28
		IL 199165 A	2010/03/28
		JP 2008-519606 A	2008/06/12
		JP 2010-178741 A	2010/08/19
		JP 2012-228254 A	2012/11/22
		JP 2014-012020 A	2014/01/23
		JP 2014-217381 A	2014/11/20
		JP 2014-217384 A	2014/11/20
		JP 2014-217385 A	2014/11/20
		JP 2014-217386 A	2014/11/20
		JP 2014-217387 A	2014/11/20
		JP 2014-223080 A	2014/12/04
		JP 2016-165292 A	2016/09/15
		JP 5389690 B2	2014/01/15
		JP 5596085 B2	2014/09/24
		JP 5620556 B2	2014/11/05
		PL 2302055 T3	2015/02/27
		SI 2302055 T1	2015/01/30
		US 2008-0050744 A1	2008/02/28
		US 2008-0171715 A1	2008/07/17
		US 2008-0176766 A1	2008/07/24
		US 2009-0092974 A1	2009/04/09
		US 2009-0131354 A1	2009/05/21
		US 2009-0163430 A1	2009/06/25
		US 2009-0163434 A1	2009/06/25
		US 2009-0176723 A1	2009/07/09
		US 2009-0192102 A1	2009/07/30
		US 2011-0313025 A1	2011/12/22
		US 2012-0065248 A1	2012/03/15
		US 2012-0282696 A1	2012/11/08

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2013-0143945 A1	2013/06/06
		US 2013-0303591 A1	2013/11/14
		US 2014-0031415 A1	2014/01/30
		US 2014-0314833 A1	2014/10/23
		US 2014-0348907 A1	2014/11/27
		US 2014-0348908 A1	2014/11/27
		US 2014-0350086 A1	2014/11/27
		US 2015-0004221 A1	2015/01/01
		US 2015-0005366 A1	2015/01/01
		US 2015-0275213 A1	2015/10/01
		US 2015-0284719 A1	2015/10/08
		US 2015-0284720 A1	2015/10/08
		US 2015-0299705 A1	2015/10/22
		US 2015-0342981 A1	2015/12/03
		US 2015-0344881 A1	2015/12/03
		US 2015-0344883 A1	2015/12/03
		US 2015-0352046 A1	2015/12/10
		US 2015-0361431 A1	2015/12/17
		US 2017-0037404 A1	2017/02/09
		US 7960359 B2	2011/06/14
		US 8058250 B2	2011/11/15
		US 8173611 B2	2012/05/08
		US 8563708 B2	2013/10/22
		US 8765709 B2	2014/07/01
		US 8946177 B2	2015/02/03
		US 9051571 B2	2015/06/09
		US 9068219 B2	2015/06/30
		US 9382537 B2	2016/07/05
		US 9447414 B2	2016/09/20
		US 9506061 B2	2016/11/29
		WO 2006-137941 A2	2006/12/28
		WO 2006-137941 A3	2008/01/03
		WO 2006-137941 A9	2007/03/08
		WO 2008-073915 A2	2008/06/19
		WO 2008-073915 A3	2008/10/23
		WO 2008-073919 A2	2008/06/19
		WO 2008-073919 A3	2009/02/26
		WO 2008-073920 A2	2008/06/19
		WO 2008-073920 A3	2009/02/26
		WO 2008-073921 A2	2008/06/19
		WO 2008-073921 A3	2009/02/26
		WO 2008-073922 A2	2008/06/19
		WO 2008-073922 A3	2009/03/12
		WO 2008-073923 A2	2008/06/19
		WO 2008-073923 A3	2008/12/11
		WO 2008-085797 A2	2008/07/17
		WO 2008-085797 A3	2008/10/09
		WO 2008-085797 A8	2009/07/16
KR 10-2015-0142111 A	2015/12/22	KR 10-1714116 B1	2017/03/10