(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 2 월 11 일 (11.02.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/021796 A1

(51) 국제특허분류:
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/002464

(22) 국제출원일: 2015 년 3 월 13 일 (13.03.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2014-0100010 2014 년 8 월 4 일 (04.08.2014) KR

(71) 출원인: **경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: **이균오 (LEE, Kyun Oh)**; 660-300 경상남도 진주시 내동로 348 번길 10, 109 동 304 호, Gyeongsangnam-do (KR). **유재용 (YOO, Jae Yong)**; 627-894 경상남도 밀양시 하남읍 시서안길 9-8, Gyeongsangnam-do (KR). **고기성 (KO, Ki Seong)**; 668-801 경상남도 남해군 남해읍 망운로 19 번길 68-2, Gyeongsangnam-do (KR). **이상열 (LEE, Sang Yeol)**; 660-290 경상남도 진주시 진주대로 829 번길 21, 101 동 1801 호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 302-868 대전시 서구 한밭대로 745, 12 층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

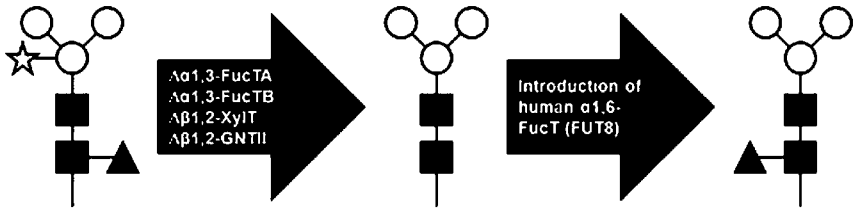
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: PLANT FOR SYNTHESIZING HUMANIZED PAUCIMANNOSE N-GLYCAN, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 인간화 저-만노스형 엔-당질 합성 식물 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a plant for producing a protein containing a humanized paucimannose N-glycan, and to a method for producing a protein containing a humanized customized paucimannose N-glycan, using the same.

(57) **요약서**: 본 발명은 인간화된 저-만노스형 엔-당질을 포함하는 단백질을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 인간화된 맞춤형 저-만노스형 엔-당질을 포함하는 단백질의 생산방법에 관한 것이다.

WO 2016/021796 A1

명세서

발명의 명칭: 인간화 저-만노스형 엔-당질 합성 식물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체 및 상기 식물체를 이용한 인간화 저-만노스형 엔-당질(humanized paucimannose type N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 생명공학 기술의 눈부신 성장은 의약품, 식품, 환경, 농업, 해양, 바이오 에너지, 생물 공정 및 측정 시스템 등 여러 분야의 산업화를 이루어냈다. 이 중 바이오의약품 분야는 부가가치가 가장 크고, 전 세계적으로 거대한 규모의 시장을 형성하고 있으며 급속도로 성장하고 있다. 바이오의약품이란 재조합 DNA 기술을 이용하여 생물세포에서 생산된 진단, 예방 및 치료용 단백질, 호르몬, 백신 등의 의약품을 말한다. 잘 알려진 바이오의약품으로는 자가면역질환(autoimmune disease)의 치료에 사용되는 Remicade, Enbrel, Humira, Cimzia, Simponi, Remsima 등을 포함한 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) 억제 항체류, B-세포성 림프종 및 백혈병의 치료에 사용되는 Rituxan, HER2 수용체 과발현성 유방암 치료에 사용되는 Herceptin, 안과 치료에 사용되는 혈관생성 억제 항체류인 Avastin과 Lucentis, 다발성경화증의 치료에 사용되는 인터페론(interferon β1α), 당뇨병 환자에 사용되는 인슐린(insulin), 적혈구 생성 촉진 인자(Erythropoietin: EPO), 라이소좀 저장 질환(Lysosomal Storage Disease: LSD)의 치료에 사용되는 Cerezyme과 Fabrazyme 등이 있다(Lawrence, Nat Biotechnol 25, 380-382, 2007; Walsh, Nat Biotechnol 28, 917-924, 2010).

[3] 이러한 바이오의약품은 주로 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포나 인간 섬유아세포(human fibroblast)와 같은 동물 세포 배양 시스템을 이용하여 생산되고 있다. 동물 세포를 이용한 바이오의약품 생산 시스템은 고효율 단백질 발현 시스템이 구축되어 있고 단백질의 접힘(protein folding)과 번역 후 변형(Post-Translational Modification)이 인체에서 생산된 단백질과 유사하기 때문에 단백질의 구조와 관련된 부작용이 적은 바이오의약품을 생산할 수 있다는 이점을 가지고 있다(Schmidt et al., Protein Expr Purif 10, 226-236, 1997). 하지만 우발적인 감염성 프라이온단백질(PrP^{Sc}) 보유 개체의 출연과 동물성 바이러스 병원체의 오염에 의한 바이오의약품 생산 공장 폐쇄에 관한 보고는 동물 및 동물 세포의 구성 요소를 사용한 바이오의약품 생산 시스템과 방식의 안정성에 관한 심각한 우려를 제기하고 있다. 따라서 이러한 한계를 극복하고 급증하는 바이오의약품의 수요를 충족시키기 위해서 더욱

안전하고 효율적인 새로운 생산 시스템의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[4] 한편 식물 세포는 동물 세포와 유사한 단백질 번역 후 변형 시스템을 가지고 있고 병원성 바이러스와 프라이온 등의 오염으로부터 안전할 뿐 아니라 동물 세포 시스템에 비해 세포주나 계통 확립이 용이하고 배양 조건이 까다롭지 않아 바이오의약품을 효율적이고 경제적으로 생산할 수 있는 잠재성을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 아직까지 식물 세포를 이용한 바이오의약품 생산이 활발하게 이루어지지 않는 이유는 단백질 번역 후 변형 중 하나인 단백질의 당질화(glycosylation) 과정이 인체에서 진행되는 것과 차이를 나타내기 때문이다. 특히 포유 동물의 엔-당질(N-glycan) 구조에 없는 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기가 식물에서 생산된 당단백질에 특이적으로 부가된다. 이러한 식물 특이적 엔-당질 구조를 포함한 바이오의약품을 인체 치료에 사용할 경우 알레르기를 포함한 심각한 면역 반응이 유발될 수 있다는 우려가 제기되고 있다(Jin et al., Glycobiology 18, 235-241, 2008). 따라서 식물을 이용한 바이오의약품 생산 시스템을 개발하기 위해서는 체계적이고 효율적인 단백질 발현 및 분리 시스템을 확립함과 동시에 인체에서 생산되는 단백질과 동일한 엔-당질 구조를 가지는 당단백질을 생산할 수 있도록 단백질의 당질화 과정을 재구성하는 연구 개발이 반드시 필요하다.

[5] 본 발명에서는 고셰병(Gaucher disease) 치료 효소로 사용되는 베타-글루코세레브로시다아제(-glucocerebrosidase)와 같이 대식세포의 표면에 존재하는 만노스 수용체(mannose receptor)를 통한 선택적 내포작용(endocytosis)으로 라이소좀(lysosome) 안으로 전달되기 위하여 저-만노스형 엔-당질(humanized paucimannose type N-glycan)을 가져야하는 당단백질 바이오의약품을 효율적이고 경제적으로 생산할 수 있는 식물을 개발하고자 한다.

[6] 또한 본 발명은 식물 유래 바이오의약품의 알레르기를 포함한 면역 부작용을 피하기 위하여 식물 특이적인 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않고 인체 유래의 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 포함하는 엔-당질을 식물에서 생산하는 것에 관한 것이다.

[7] 본 발명에서 개발된 맞춤형 엔-당질을 생산하는 식물은 기존의 대식세포 표적화 바이오의약품 생산을 위해 사용되던 뉴라미니데이즈(neuraminidase), 갈락토시데이즈(galactosidase), 헥소사미니데이즈(hexosaminidase)를 이용한 복잡한 효소 처리공정을 거치지 않고 세포 내에서 바로 Man_3 GlcNAc[Fuc(16)]GlcNAc 구조의 인간화 저-만노스형 엔-당질을 생산할 수 있게 함으로써 대식세포 표적화 바이오의약품의 생산 비용과 시간을 대폭 줄일 수 있게 한다.

[8] 또한 본 발명에서 개발된 맞춤형 엔-당질을 생산하는 식물은 인체에 치명적인 병원성 바이러스와 프라이온 등의 오염으로부터 안전하기 때문에 대식세포

표적화 바이오의약품을 더욱 경제적이고 안전하게 생산할 수 있게 한다.

[9] 인간화 저-만노스형 엔-당질 구조를 가지는 당단백질을 생산하는 식물을 만들기 위하여 4개의 식물 내재 당전이효소의 활성을 제거하고 1개의 인간 유래 당전이효소의 활성을 도입하는 당질공학(glycoengineering) 기술을 이용하고자 한다.

[10] 한국공개특허 제2013-0125337호에는 '고-만노오스형 N-글라이칸을 생산하는 식물체 및 이를 이용한 고-만노오스형 N-글라이칸의 생산방법'이 개시되어 있고, 국제출원특허 PCT/US2007/060642에는 '식물에서 N-글리칸의 인간화 및 최적화 조성물 및 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 인간화 저-만노스형 엔-당질 합성 식물에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서,
알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA),
알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 B(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB),
베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT) 및
N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 II(beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII) 유전자에 T-DNA가 삽입된 기능상실 4중 돌연변이체(quadruple mutant: *qm*)에 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 유전자를 도입한 형질전환 식물체(quadruple mutant with FUT8: *qmF*)를 제작하여 상기 *qmF* 식물체로부터 식물 특이적인 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 $Man_3GlcNAc[Fuc(\alpha1,6)]GlcNAc$ 구조의 인간화 저-만노스형 엔-당질을 포함하는 단백질을 생산함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[12] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA), 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 II(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB),
베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT) 및
베타1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 II(β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII)의 기능이 상실된,
알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체를 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 4중 돌연변이 식물체에 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을

코딩하는 유전자가 삽입되어, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체를 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 캘러스 및 종자를 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은

[16] (1) FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 기능이 상실된, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체를 제조하는 단계; 및

[17] (2) 상기 (1)단계에서 제조된 4중 돌연변이 식물체를 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 FUT8 유전자를 과발현하고, FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질 기능이 상실된 형질전환 식물체를 선발하는 단계를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체를 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 식물체 내에서 외래 당단백질 코딩 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 제공한다.

[21] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[22] 본 발명에 따른 맞춤형 인간화 저-만노스형 엔-당질 생산 식물체(*qmF*)는 고셰병(Gaucher disease) 치료 효소로 사용되는 베타-글루코세레브로시다아제(β-glucocerebrosidase)와 같이 저-만노스 말단을 가지는 엔-당질(N-glycan)을 포함한 당단백질 의약품의 생산에 이용될 수 있으므로 바이오의약품 분야에서 유용할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA), 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 B(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB), 베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT), 및 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 II(beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII) 유전자에 T-DNA가 삽입된 기능상실 돌연변이체(*qm*)를 선별하고 이들을 교배하여 식물 특이적인 β1,2-xylose와 α1,3-fucose 잔기를 포함하지 않고 고-만노스형과 저-만노스형 엔-당질을 생산하는 4중 돌연변이 식물체(*qm*)를 제작하고 *qm* 식물체에 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 유전자를 도입하여 기능을 나타나게 함으로써 $Man_3GlcNAc[Fuc(\alpha1,6)]GlcNAc$ 구조의 인간화 저-만노스형 엔-당질을 주로 생산하는 식물체(*qmF*)를 제작하는 과정을 모식화한 것이다.

[24] 도 2는 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 유전자가 애기장대 Ubiquitin 1 프로모터(*Ubi1P*)의 조절 하에 항구적으로 발현되는 유전자 구성체 중 Ubiquitin 1 프로모터(Ubi1P): 앞쪽 소문자 700-nt, 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 유전자: 중간 대문자 1,728-nt, Ubiquitin 1 polyadenylation 신호 (Ubi1 polyA): 뒤쪽 소문자 370-nt 서열(서열번호 30)을 나타낸 것이다.

[25] 도 3은 인간 유래 *FUT8* 유전자를 *qm* 식물체에 도입하기 위한 바이너리 벡터의 유전자 지도와 제한효소 자리를 나타낸 것이다.

[26] 도 4는 애기장대 *FucTA*, *FucTB*, *XylT* 및 *GnTII* 유전자에 T-DNA가 삽입되어 유전자의 기능이 완전히 상실되거나 심각하게 억제된 4중 돌연변이체 *qm*과 *qm* 식물체에 인간 유래 FUT8 유전자가 도입되어 기능을 나타내는 *qmF* 식물체에 관한 것이다. 도 4A에는 애기장대의 WT, *qm* 그리고 *qmF* 식물체의 표현형을 나타내었다. 도 4B는 WT, *qm* 그리고 *qmF* 식물체의 게놈 DNA를 주형으로 *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 및 T-DNA 유전자 서열에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하여 *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 유전자의 T-DNA 삽입 돌연변이 및 동형접합체 형성 여부를 지노타이핑(genotyping)하여 나타내었다. 도 4C에는 WT, *qm* 그리고 *qmF* 식물체에서 분리된 RNA를 주형으로 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction)을 통하여 *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 및 인간 유래 *FUT8* 유전자의 발현을 확인한 결과를 나타내었다.

[27] 도 5는 면역 블롯과 친화성 블롯 분석을 이용한 WT, *qm* 및 *qmF* 식물체의 당질 구조를 분석한 결과를 나타낸 것이다. CBB: Coomassie brilliant blue (CBB) stain, Anti-HRP: horseradish peroxidase (HRP: α1,3-fucose와 β1,2-xylose 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 특이적으로 결합) 항체를 이용한 면역 블롯,

Anti-fucose: α1,3-fucose 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 특이적인 항체를 이용한 면역 블롯, Anti-xylose: β1,2-xylose 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 특이적인 항체를 이용한 면역 블롯, ConA: Concanavalin A (ConA: 중간 또는 비환원 말단에 만노스나 포도당 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 특이적인 렉틴)를 이용한 친화성 블롯, GS-II: 열대 아프리카 콩과 식물인 *Griffonia simplicifolia* 의 씨앗에서 분리된 렉틴(비환원 말단에 α- 또는 β-GlcNAc 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 특이적으로 결합)을 이용한 친화성 블롯, LCA: *Lens Culinaris* Agglutinin (LCA: 비환원 말단 α-mannose 잔기와 코어 α1,6-fucose 잔기를 함유한 엔-당질을 가진 펩티이드에 강하게 결합)을 이용한 친화성 블롯

[28] 도 6은 MALDI-TOF 질량분석을 이용한 야생형 (WT) 식물체의 엔-당질 구조를 분석한 결과를 나타낸 것이다. WT 식물체에서 분리된 단백질은 고-만노스형(high-mannose type)의 $Man_5GlcNAc_2$(m/z 1579.44850) 구조와 식물 특이적인 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose)와 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 잔기를 포함한 저-만노스형의 $Man_3XylFucGlcNAc_2$(m/z 1505.4685) 구조의 엔-당질을 주로 포함하고 있는 것으로 나타났다.

[29] 도 7은 MALDI-TOF 질량분석을 이용한 *qm* 식물체의 전체 엔-당질 구조를 분석한 결과를 나타낸 것이다. *qm* 식물체에서 분리된 단백질은 식물 특이적인 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose)와 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 잔기가 결여된 $Man_3GlcNAc_2$(m/z 1171.3641) 구조의 저-만노스형의 엔-당질과 $Man_5GlcNAc_2$(m/z 1579.4537) 구조의 고-만노스형 엔-당질을 주로 포함하고 있는 것으로 나타났다.

[30] 도 8은 MALDI-TOF 질량분석을 이용한 *qmF* 식물체의 전체 엔-당질 구조를 분석한 결과를 나타낸 것이다. *qmF* 식물체에서 분리된 단백질은 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 포함한 $Man_3GlcNAc[Fuc(\alpha1,6)]GlcNAc$(m/z 1345.4059) 구조의 인간화 저-만노스형 엔-당질과 $Man_5GlcNAc_2$(m/z 1579.4623) 구조의 고-만노스형 엔-당질을 주로 포함하고, 식물 특이적인 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose)와 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 잔기를 포함한 엔-당질이 부재한 것으로 나타났다.

[31] 도 9는 WT, *qm* 및 *qmF* 식물체에 존재하는 각 구조의 엔-당질의 상대적인 양(면적비율: Peak Area %)을 보여주는 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA), 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 B(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB),
베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT) 및
베타1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈
II(β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII)의 기능이 상실된,

알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체를 제공한다.

[33] 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능을 상실한 4중 돌연변이 식물체는 *FucTA*, *FucTB*, *XylT* 및 *GnTII* 유전자 각각의 염기서열의 일부 또는 전체가 제거되거나 T-DNA를 포함한 외래 유전자가 삽입된 것을 특징으로 한다.

[34] 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능을 상실시키는 방법은 당업계에 공지된 방법, 즉, 게놈 변형 (genome modification), 유전자 결실(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 삽입, 상동 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포존 태깅(transposon tagging) 등의 방법일 수 있으며, 바람직하게는 T-DNA가 삽입된 식물체의 형질전환(transformation) 집단에서 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 유전자 발현이 결여됨으로써 상기 단백질의 기능을 상실시키는 방법일 수 있다.

[35] 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 범위는 각각 서열번호 2, 4, 6 및 8의 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 각각 서열번호 2, 4, 6 및 8의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 각각 서열번호 2, 4, 6 및 8의 아미노산 서열을 갖는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[36] 또한, 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질을 코딩하는 유전자는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 *FucTA, FucTB, XylT* 및 *GnTII* 유전자 cDNA 서열은 각각 서열번호 1, 3, 5 및 7로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 *FucTA, FucTB, XylT* 및 *GnTII* 유전자는 각각 서열번호 1, 3, 5 및 7의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[37] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 기능 상실은 각각 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 유전자에 T-DNA가 삽입되어 이루어 질 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 4중 돌연변이 식물체에 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형

엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체를 제공한다.

[39] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 식물체에서, 변형된 엔-당질(N-glycan)은 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 저-만노스형 엔-당질일 수 있으며, 바람직하게는 $Man_3GlcNAc[Fuc(\alpha1,6)]GlcNAc$일 수 있다.

[40] 상기 *FUT8* 유전자의 삽입은 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시킴으로써 수행되어질 수 있다.

[41] 상기 *FUT8* 유전자는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, *FUT8* 유전자 cDNA 서열은 서열번호 9로 이루어진 염기서열을 포함할 수 있다.

[42] 본 발명의 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[43] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[44] 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다.

[45] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를

적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[46] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 톡소플라빈(toxoflavin)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[48] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[49] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[50] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터는 애기장대 유비퀴틴 1 프로모터, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자 및 애기장대 유비퀴틴 1 폴리아데닐화(polyadenylation) 신호를 갖는 뉴클레오타이드(서열번호 30)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[51] 본 발명의 식물체는 이에 한정되지 않지만, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류일 수 있으며, 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토,

수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튤립, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)이다.

[52] 본 발명의 일 구현 예에서는 *FucTA*, *FucTB*, *XylT* 및 *GnTII* 유전자의 발현이 제거된 *qm* 식물체에 인간 유래 *FUT8* 유전자의 발현이 도입되어 기능을 나타내는 애기 장대를 선별하였다.

[53] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 캘러스 및 종자를 제공한다.

[54] 또한, 본 발명은

[55] (1) FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 기능이 상실된, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체를 제조하는 단계; 및

[56] (2) 상기 (1)단계에서 제조된 4중 돌연변이 식물체를 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 FUT8 유전자를 과발현하고, FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질 기능이 상실된 형질전환 식물체를 선발하는 단계를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[57] 상기 (1)단계의 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체는 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 기능이 각각 상실된 별개의 돌연변이 식물체를 교배하여 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 식물체를 선발하는 단계에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다.

[58] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 (1) 단계의 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능을 상실한 식물체를 확인하는 방법에 있어서, 한 개의 T-DNA가 각각 *FucTA, FucTB, XylT* 및 *GnTII* 유전자 내에만 삽입되어 이들 유전자의 발현이 제거되거나 심각하게 억제된 라인을 선별하기 위해서는 선택 배지에서 제초제 또는 항생제 내성의 분리 비율을 분석하거나, *FucTA, FucTB, XylT* 및 *GnTII* 유전자와 T-DNA에 특이적인 프라이머 쌍을 사용한 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통한 형질전환 식물체의 게놈 DNA 내에 존재하는 돌연변이 유전자 및 T-DNA 삽입 여부를 분석하는 방법 등을 통해 T-DNA 삽입된 식물체를

선별할 수 있다. 또한 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 통한 이들 유전자의 전사체 발현 분석을 통해 형질전환체의 상동염색체에 모두 T-DNA 삽입된 애기장대 동형접합체 라인을 선별할 수 있다.

[59] 또한 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 (2) 단계의 인간 유래 *FUT8* 유전자를 도입하여 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8)의 기능을 나타내는 식물체를 확인하는 방법에 있어서, *FUC8* 유전자의 발현을 나타내는 라인을 선별하기 위해서는 선택 배지에서 제초제 또는 항생제 내성의 분리비율을 분석하거나, *FUT8* 유전자 특이적인 프라이머 쌍을 사용한 중합효소 연쇄 반응을 통한 형질전환 식물체의 게놈 DNA 내에 존재하는 *FUT8* 유전자 삽입 여부를 분석하는 방법 등을 통해 형질전환 식물체를 선별할 수 있다. 또한 역전사 중합효소 연쇄반응을 통한 상기 유전자의 전사체 발현을 분석할 수 있다.

[60] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체를 제공한다.

[61] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 형질전환 식물체에서 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능 상실 및 FUT8 유전자 발현에 의한 엔-당질 분석법으로는 면역 블롯 및 친화성 블롯 분석법을 포함할 수 있다. FucTA, FucTB, XylT, GnTII 및 FUT8의 활성은 당업계에 공지된 어떠한 방법으로도 분석할 수 있으며, 바람직하게는 알파1,3-퓨코스, 베타1,2-자일로스(각각 1:10000 희석, Agrisera), HRP(horseradish peroxidase)(1:10000 희석, Sigma) 항체를 이용해 식물 특이적 단당류와 복합형 엔-당질을 탐지하는 면역 블로팅(immunoblotting)과 ConA(Concanavalin A)(Sigma)를 이용한 만노스형 엔-당질 탐지, GS-II(*Griffonia simplicifolia*)(Molecular probes) 렉틴을 이용한 N-아세틸글루코사민형(GlcNAc type) 엔-당질 탐지, LCA(*Lens culinaris*)(USBiological) 렉틴을 이용한 알파1,6-퓨코스를 포함하는 엔-당질을 탐지하는 친화성 블로팅(affinoblotting)을 수행하여 분석할 수 있고, 또는 전체 엔-당질을 펩타이드:N-글라이카네이즈 에이(peptide:N-glycanase A: PNGase A)로 잘라낸 후 MALDI-TOF 질량 분석을 통하여 전체 엔-당질 프로파일링을 통하여 분석할 수 있다.

[62] 상기 면역 블롯 및 친화성 블롯에는 퍼옥시데이즈(Horseradish peroxidase: HRP), 알칼리포스포테이즈, β-갈락토시데이즈, 유레이즈, 카탈레이즈, 글루코스옥시데이즈, 락트산 탈수소 효소, 아밀레이즈 또는 바이오틴-아비딘 복합체 등의 효소가 사용될 수 있고, 형광 면역 측정법의 경우에는 플루오레세인이소티오시아네이트, 테트라메틸로다민이소티시아네이트, 치환 로다민이소티오시아네이트, 디클로로리아진이소티오시아네이트, 알렉사(Alexa) 또는 알렉사플루오로(AlexaFluoro) 등의 형광성 물질 또는 형광단이 사용될 수 있으며, 방사 면역 측정법에는 트리티움, 요오드, 인, 황 등의

방사성 동위원소가 사용될 수 있으며, 발광 면역 측정법에는 루시퍼레이즈 방법, 루미놀 퍼옥시데이즈 POD 방법 등이 디옥세탄 화합물 등의 발광성 물질 등과 함께 사용될 수 있다. 아비딘-바이오틴 방법, 스트랩토아비딘-바이오틴 방법 등을 이용할 때처럼 항체가 필요에 따라서는 표지 물질과 결합될 수도 있다. 표지 물질과 항체의 결합은 효소 면역 측정법에 있어서는 글루타르알데히드법, 말레이미드법, 피리딜디술피드법, 과요오드산법 등의 방법이 사용될 수 있으며, 방사 면역 측정법에 있어서는 클로라민T법, 볼턴-헌터법 등의 방법이 사용될 수 있다.

[63] 면역학적 측정 방법으로는 상기 예시한 4가지 방법 이외에, 면역 침강법, 면역비탑법, 웨스턴 블로팅법, 면역 염색법, 면역 확산법 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 통상의 면역 블롯 방법(immunoblotting)을 모두 포함할 수 있다.

[64] 상기 엔-당질을 가지는 단백질의 정제 및 분석 방법은 공지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 공지된 방법은 크로마토그래피법, 전기영동법, 질량분석법 등의 통상의 당업계에 공지된 방법을 모두 포함한다. 바람직하게는 HPLC(high performance liquid chromatography) 프로파일링, MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization) 질량분석법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[65] 또한, 본 발명은 상기 식물체 내에서 외래 당단백질 코딩 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법을 제공한다.

[66] 상기 식물체 내에서 외래 당단백질 코딩 유전자의 발현은 상기 외래 당단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시킴으로써 수행할 수 있다.

[67] 상기 외래 당단백질은 인간 베타-글루코세레브로시다아제(β-glucocerebrosidase), 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), 인간 성장 호르몬(Human Growth Hormone, hGH), B형 간염 백신(hepatitis B vaccine), 인슐린, 인터루킨, 인터페론, 혈소판 유도 성장 인자, 헤모글로빈, 엘라스틴, 콜라겐, 섬유아세포 성장 인자, 인간 성장 인자, 인간 혈정 알부민, 콜로니 촉진 인자(colony-Stimulatin Factors, CSFs) 및 항체를 포함하나 이에 한정하지 않는다.

[68] 상기 당단백질의 생산방법은 식물체의 조직 또는 세포 내에서 인간화된 저-만노스형 엔-당질을 가지는 단백질을 발현시키고, 상기 발현된 외래 당단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하나, 이에 한정하지 않고 당업계에 공지된 방법에 의한 것을 포함한다.

[69] 상기 발현된 외래 당단백질의 정제는 염석법, 투석법, 크로마토그래피법, 전기영동법 및 초원심분리법 등의 방법을 이용할 수 있다. 취급 규모가 큰 경우에는 염농도 또는 pH를 변화시켜 이에 대한 용해도가 다른 단백질을

원심조작으로 분리하는 방법(염석)을 일반적으로 사용한다. 또한, 단백질의 정전기적 상호작용의 차이를 이용한 이온크로마토그래피나 단백질 분자의 크기나 형태에 따라 분리시키는 여과크로마토그래피, 특이적인 분자간 상호작용을 이용한 친화성 크로마토그래피, 원심력에 대한 침강속도의 차이를 이용하여 용액 내 또는 설탕 등의 밀도구배 내에서 생체물질을 분리시키는 초원심분리법이 가능할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 공지된 통상의 방법을 모두 포함할 수 있다.

[70] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 제공한다.

[71] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물을 제공한다. 상기 의약 조성물은 바이오의약품과 유사한 의미이며, 재조합 DNA 기술을 이용하여 생물세포에서 생산된 진단, 예방 및 치료용 단백질, 호르몬, 백신 등의 의약품을 말한다.

[72]

[73] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[74]

[75] **실시예 1. 인간 유래 *FUT8* 유전자의 발현을 위한 바이너리 벡터 구축**

[76] 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8)의 효소활성을 위한 *FUT8* 유전자의 도입을 위해, 서열번호 18 및 19의 프라이머(표 2 참고)를 이용한 PCR 방법을 이용하여 인간 cDNA 라이브러리로부터 *FUT8* 유전자를 암호화하는 cDNA를 분리하였고, 염기서열을 시퀀싱(sequencing)으로 분석하였다. 서열이 확인된 *FUT8* 유전자는 항구적으로 발현되는 Ubiquitin 1 프로모터(*Ubi1P*)의 조절 하에 발현되도록 유전자 구성체를 제작하였고, 톡소플라빈(toxoflavin)에 내성을 나타내게 하는 선택성 마커인 toxoflavin lyase(*tflA*) 유전자를 포함하는 바이너리 벡터에 유전자 구성체를 넣어 *FUT8* 유전자 발현 벡터를 구축하였다. 상기 결과를 도 2와 도 3에 나타내었다.

[77]

[78] **실시예 2. T-DNA가 삽입된 애기장대 *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 유전자의 기능상실 4중 돌연변이 식물체(*quadruple mutant*: *qm*) 및 인간 유래 *FUT8* 유전자를 도입한 *qmF* 식물체 제조**

[79] 1. 식물 재료 및 성장 조건

[80] 애기장대 WT(*Arabidopsis thaliana* Columbia), *qm* 및 *qmF* 식물체의 종자를 멸균하여 3% 수크로스(sucrose) 및 0.25% 젤라틴 검이 보충된 염 혼합물을 포함하는 MS 배지(Duchefa, http://www.duchefa-biochemie.nl/)를 이용하여 보광(supplemental lighting)(8 시간 암기/16 시간 명기; 120 μmol m^{-2} sec^{-1})을 갖는 성장 챔버에서 22℃ 및 70% 습도 조건으로 배양하였다. 상기 식물들의 표현형

차이는 도 4A에 나타내었다.

[81]

[82] 2. *FUT8* 유전자를 도입한 *qmF* 식물체 제조

[83] 실시예 1에서 구축한 바이너리 벡터는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 이용하여 *qm* 식물체에 도입하였다. 형질전환된 *qmF* 이형접합성 식물체는 바이너리 벡터에 포함된 *tflA* 유전자에 의해 나타나는 톡소플라빈(toxoflavin) 저항성을 이용하여 선별하였다. 또한 단일 복제체(single copy)로서 존재한다는 것을 확인하기 위해 멘델 분리 비율을 확인하였다. 상기 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[84]

[85] 표 1

[Table 1]

라인	전체	저항성	감수성	χ^2
4	100	74	23	0.05
6	100	82	18	2.61

[86]

[87] 표 1에 나타낸 바와 같이, 톡소플라빈을 포함하는 배지에서 이형접합성 *qmF* 식물 라인의 자손 개체들의 비율을 확인하였다. χ^2 검증을 통하여 T-DNA 삽입 복제수(copy number)를 평가하였고, 라인 4와 라인 6의 χ^2 검증 유의 수준은 각각 0.05와 2.61이다. *FUT8* 유전자를 단일 복제체(single copy)로 가진 것으로 확인된 qmF 식물 라인으로부터 수득한 자손 개체들은 다시 한 번 톡소플라빈을 포함하는 배지에서 저항성 테스트를 통해 동형접합성 *qmF* 식물체를 획득하였다.

[88]

[89] 3. 삽입 서열의 유전자형 검사(Genotyping)

[90] *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 유전자에 T-DNA가 삽입된 각각의 애기장대 종자를 Arabidopsis Biological Resource Center(http://abrc.osu.edu/)의 T-DNA 돌연변이체 콜렉션으로부터 수득하였다. 수득한 식물체 중 상동염색체에 모두 T-DNA 삽입된 애기장대 동형접합체 라인을 선별하기 위하여 표 2의 프라이머 쌍을 사용한 PCR과 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 선별된 유전자 돌연변이 동형접합체들을 각각 교배하였고, 유전자형 검사를 통해 *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 유전자의 4중 돌연변이 동형접합체인 *qm* 식물체를 선별하였다. 상기 결과를 도 4B에 나타내었다.

[91] 유전자형 검사를 위해 게놈 DNA는 페놀-클로로포름을 이용하여 애기장대의 잎으로부터 추출하였다. 각 유전자에 특이적인 프라이머(표 2 참고)의 조합을

이용한 PCR로 T-DNA의 삽입 부위 및 동형접합성을 확인하였다. PCR 반응 조건은 하기와 같다; 1회, 95℃에서 2분(변성); 30회, 95℃에서 20초(변성), 58℃에서 40초(어닐링), 72℃에서 1분(신장); 및 1회, 72℃에서 5분. PCR은 e-Taq DNA 중합효소 혼합물(SolGent)을 이용하여 수행하였다.

[92]

[93] 4. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 FucTA, FucTB, XylT, GnTII 및 FUT8 유전자의 발현분석

[94] 전체 RNA는 NucleoSpin RNA Plant Kit(Macherey-Nagel)를 이용하여 메뉴얼에 따라 애기장대의 잎 조직으로부터 추출하였다. 추출된 전체 RNA는 ReverTraAce-a kit(Toyobo)를 사용하여 cDNA를 제작하였다. 1 ㎕의 상기 단일 가닥 cDNA를 후속 PCR의 주형(template)으로 사용하였다. *FucTA*, *FucTB*, *XylT*, *GnTII* 및 *FUT8* 유전자의 발현을 각각 확인하기 위하여 표 2에서 명시한 정방향 및 역방향 프라이머 세트를 이용하였다. 튜불린 프라이머는 RNA 함량의 대조군으로 이용하였다. PCR 반응 조건은 하기와 같다; 1회, 95℃에서 2분(변성); 30회, 95℃에서 20초(변성), 58℃에서 40초(어닐링), 72℃에서 1분(신장); 및 1회, 72℃에서 5분. RT-PCR은 e-Taq DNA Polymerase 혼합물(SolGent)을 이용하여 수행하였다.

[95]

[96] 표 2

[Table 2]
본 발명에서 사용된 프라이머

프라이머	염기서열(5'->3')	용도	서열번호
FucTA-F	GAGGAGGCAAAAATTACATGTATATGCTCATCC	유전자형 검사	11
FucTA-R	CAGCGACTAGAGATTGGAAGAACTTCTCTGTG	유전자형 검사, RT-PCR	12
FucTB-F	TGTCTCCGGTACAGCCAAAAACTGAGAG	유전자형 검사, RT-PCR	13
FucTB-R	AAGCAGCAGGGTTAGCTGCGAGATACTT	유전자형 검사, RT-PCR	14
XylT-F	CACAGAGAGGAATGATGGAATCTTCAGCTT	유전자형 검사	15
XylT-R	ATTCAACATCTCATCATTCACCAGCCG	유전자형 검사, RT-PCR	16
GnTII-F	GGTGGATGATGAACACTGTATGGGATGG	유전자형 검사	17
GnTII-R	TCATGGAGATGCACTGCTACTGCTGTAAC	유전자형 검사, RT-PCR	18
FucTA-LB	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	유전자형 검사	19
FucTB-LB	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	유전자형 검사	20
XylT-LB	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTC	유전자형 검사	21

GnTII-LB	TGTGCCAGGTGCCCACGGAATAG	유전자형 검사	22
FucTA-RTF	ATGGGTGTTTTCTCCAATCTTCGAGGT	RT-PCR	23
XylT-RTF	ATGAGTAAACGGAATCCGAAGATTCTGAA	RT-PCR	24
GnTII-RTF	ATGGCAAATCTTTGGAAGAAGCAGA	RT-PCR	25
FUT8-F	CCATGGCAATTACTGTCTCATTAGTGAACAAT	RT-PCR	26
FUT8-R	ACTAGTTATTTCTCAGCCTCAGGATATGTGGG	클로닝, RT-PCR	27
Tubulin-F	ATCGATTCCGTTCTCGATGT	클로닝, RT-PCR	28
Tubulin-R	ATCCAGTTCCTCCTCCCAAC	RT-PCR	29

[97]

[98] **실시예 3. 면역 블랏 및 친화성 블랏 분석을 이용한 WT, *qm* 그리고 *qmF* 식물체의 엔-당질 분석 및 검증**

[99] 면역 블랏 및 친화성 블랏 분석을 위해 3주생의 WT, *qm* 및 *qmF* 식물체에서 전체 단백질을 추출하였다. 전체 단백질 추출물을 10% SDS-PAGE 젤에 전개하였고 나이트로 셀룰로오스막(Hybond-ECL, Amersham)에 이동시켰다. 식물체 특이적인 당 잔기를 갖는 엔-당질을 면역 블로팅으로 측정하기 위해 막을 α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스(Agrisera) 또는 HRP(Sigma)에 대한 항체로 표지하였다. 또한 고-만노스형 엔-당질과 GlcNAc 말단을 가지는 엔-당질을 친화성 블랏으로 측정하기 위해 각각 ConA(Sigma)과 GS-II 렉틴(Molecular Probes)을 이용하였다. 그리고 α1,6-퓨코스 당 잔기를 갖는 엔-당질을 친화성 블랏으로 측정하기 위해 주로 만노스 잔기를 포함한 엔-당질을 가진 펩타이드를 인지하지만 엔-당질이 α1,6-퓨코스 잔기를 포함할 경우 친화성이 강력히 증가되는 LCA 렉틴(USBiological)을 이용하였다.

[100] 애기장대 *qm* 식물체가 식물 특이적인 α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스 잔기가 없는 저-만노스형 맞춤형 엔-당질을 가지는 단백질을 생산하는지를 확인하고 *qmF* 식물체가 인간화된 α1,6-퓨코스 당 잔기를 포함하는 맞춤형 저-만노스형 엔-당질을 가지는 단백질을 생산하는지 확인하기 위해 본 발명자는 항-HRP, 항-퓨코스, 항-자일로스 항체를 이용한 면역 블랏과 ConA, GS-II, LCA를 이용한 친화성 블랏 분석을 수행하였다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다.

[101] 도 5에 나타낸 바와 같이, 항-HRP, 항-퓨코스, 항-자일로스 항체는 WT 식물체로부터 유래된 단백질에만 반응하였고, *qm* 와 *qmF* 식물체로부터 유래된 단백질에는 반응하지 않았다. 이러한 결과는 α1,3-퓨코스 및 β1,2-자일로스 잔기를 포함하는 저-만노스형 및 복합형 엔-당질이 *qm* 와 *qmF* 식물체에는 합성되지 않는다는 것을 보여주었다. 대조적으로, ConA는 *qm* 와 *qmF* 식물체로부터 분리된 단백질과 강한 반응을 나타내었으나, WT에서 분리된 단백질과는 약한 반응을 나타내었고, GS-II의 경우 야생형, *qm* 및 *qmF* 식물체에 거의 유사한 반응을 나타내었다. 이것은 만노스형 엔-당질의 양이 *qm* 및 *qmF* 식물체에서 증가되었다는 것을 나타낸다.

[102] 또한 주로 만노스 잔기를 포함한 엔-당질을 가진 펩타이드를 인지하지만 엔-당질이 α1,6-퓨코스 잔기를 포함할 경우 친화성이 강력히 증가되는 LCA는 WT 및 *qm* 식물체로부터 분리된 단백질과는 약한 반응을 나타내었으나, *qmF* 식물체에서 특히 강한 반응을 보여주었다. 이것은 인간화된 α1,6-퓨코스 잔기를 포함하는 인간화된 맞춤형 저-만노스형 엔-당질의 양이 *qmF* 식물체에서 특이적으로 증가되었다는 것을 보여준다.

[103]

[104] **실시예 4. MALDI-TOF(Matrix-assisted laser-desorption time-of-flight) 질량 분석을 이용한 WT,** ***qm*** **및** ***qmF*** **식물체의 엔-당질 분석 및 검증**

[105] 1. 엔-당질 분리, 정제 및 퍼메틸화(permethylation)

[106] WT, *qm* 및 *qmF* 식물체로부터 엔-당질 정제를 위한 단백질을 Bakker 등의 방법(Bakker 등, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:7577-7582)에 따라 추출하였다. 상기 단백질을 트립신을 이용하여 분해하였고 고정된 엔-당질을 PNGase A(Peptide N-Glycosidase A)(Prozyme, 미국)에 의해 방출시켰다. 상기 샘플을 C18 Sep-Pak 카트리지를 통과시킨 후 동결 건조시켰다. 탄수화물 분획물을 다이메틸설폭사이드(DMSO)에서 용해시킨 후 Anumula 및 Taylor의 방법(Anumula 및 Taylor, 1992, Aanl. Biochem. 203:101-108)에 따라 퍼메틸화(permethylation) 시켰다.

[107]

[108] 2. MALDI-TOF(Matrix-assisted laser-desorption time-of-flight) 질량 분석

[109] 본 발명자들은 리플렉터 양이온 모드(reflector positive ion mode)에서 MALDI-TOF 질량 분석법을 50%(v/v) 메탄올 용액 내의 20 mg ml^{-1} 다이하이록시벤조산(DHBA)을 이용하여 수행하였다. 스펙트럼을 LTQ

XL(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용함으로써 수득하였다.

[110] 정량적이고 비교 구조적인 정보를 얻기 위해서, 식물체로부터 추출된 당단백질을 MALDI-TOF 질량분석법(mass spectrometry)에 이용하였다. 상기 결과를 도 6 내지 도 9에 나타내었다.

[111] WT로부터 수득한 엔-당질의 질량 스펙트럼은 고-만노스형 엔-당질과 α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스 잔기를 포함하는 다양한 구조의 엔-당질이 WT에서 생성된다는 것을 보여주었다(도 6). *qm* 식물체로부터 수득한 엔-당질의 질량 스펙트럼은 α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스 잔기를 포함하는 저-만노스 및 복합형 엔-당질이 *qm* 식물체에서는 생성되지 않고 주로 α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스를 포함하지 않는 저-만노스형과 고-만노스형 엔-당질이 생성되고 있다는 것을 보여주었다(도 7). 이들에 비해 *qmF* 식물체에서 분리된 엔-당질의 질량 스펙트럼은 주로 α1,6-퓨코스 잔기를 포함하는 저-만노스형과 고-만노스형 엔-당질이 생성되지만, α1,3-퓨코스, β1,2-자일로스 잔기를 포함하는 식물 특이적인 저-만노스형 엔-당질이 생성되지 않는 것을 보여주었다(도 8).

[112]

[113] 표 3

[Table 3]

측정된 m/z	엔-당질 구조	WT (%)	*qm* (%)	*qmF* (%)
1171.3928	$Man_3GlcNAc_2$	0.64	26.57	12.22
1331.4238	$Man_3XylGlcNAc_2$	3.50	ND	ND
1345.4227	$Man_3FucGlcNAc_2$	0.54[a]	ND	23.32[b]
1375.4401	$Man_4GlcNAc_2$	0.53	1.64	1.61
1416.4695	$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$	0.35	17.57	6.15
1505.4685	$Man_3XylFucGlcNAc_2$	19.15	ND	ND
1535.4751	$Man_4XylGlcNAc_2$	1.54	ND	ND
1576.4882	$GlcNAcMan_3XylGlcNAc_2$	1.97	ND	ND
1579.4950	$Man_5GlcNAc_2$	21.90	24.54	19.72
1590.4923	$GlcNAcMan_3FucGlcNAc_2$	0.51[c]	ND	12.54[d]
1750.5334	$GlcNAcMan_3XylFucGlcNAc_2$	9.64	ND	ND
1783.5295	$Man_6GlcNAc_2$	9.43	9.36	8.10
1987.5796	$Man_7GlcNAc_2$	7.93	8.22	6.89
1995.5853	$GlcNAc_2Man_3XylFucGlcNAc_2$	10.40	ND	ND
2191.6177	$Man_8GlcNAc_2$	6.11	6.50	4.82
2395.6563	$Man_9GlcNAc_2$	5.86	5.60	4.63
Total		100	100	100

[114] [a]$Man_3FucGlcNAc_2$=$Man_3GlcNAc$[Fuc(α1,3)]GlcNAc, [b]$Man_3FucGlcNAc_2$=Man_3 GlcNAc[Fuc(α1,6)]GlcNAc, [c]$GlcNAcMan_3FucGlcNAc_2$=$GlcNAcMan_3$ GlcNAc[Fuc(α1,3)]GlcNAc, [d]$GlcNAcMan_3FucGlcNAc_2$=$GlcNAcMan_3$ GlcNAc[Fuc(α1,6)]GlcNAc; ND, not detected; Man, 만노스; Xyl, 자일로스; GlcNAc, N-아세틸글루코사민; Fuc, 퓨코스; Gal, 갈락토오스

[115]

[116] 상기 표 3은 WT, *qm* 및 *qmF* 식물체로부터 수득한 엔-당질의 MALDI-TOF MS 분석 결과를 나타낸 것이다. 상기 수치는 각 구조의 엔-당질의 상대적인 양(면적비율: Peak Area %)을 나타낸 것이다. 상기 결과를 도 9에 나타내었다.

[117] WT, *qm* 및 *qmF* 식물체로부터 수득한 엔-당질의 정량 분석을 분석 이전에 퍼메틸화에 의해 유도체로 생성된 엔-당질을 이용하여 MALDI-TOF 질량분석에 의해 수행하였다. 양호한 이온 통계를 얻기 위해, 제시된 스펙트럼을 100 레이저 샷의 다양한 스펙트럼으로부터 생성하였다. 전체 통합된 동위 원소 집단의 적분된 피크 면적을 상대적 정량 분석으로 측정하였다.

[118] 상기 실험결과를 종합해 볼 때, 본 발명자는 애기장대에서 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA), 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 B(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB), 베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT) 및 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 II(β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII)의 활성 부족은 골지체에서 식물 특이적인 엔-당질 형성을 완전히 억제하게 만들고, 식물 특이적인 엔-당질 형성 결함은 $Man_3GlcNAc_2$ 형태를 갖는, 저-만노스형 엔-당질의 축적을 유도한다는 것을 확인하였다. 또한 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 유전자를 *qm* 식물체에 도입하여 지속적으로 발현시킴으로써 알파1,6-퓨코스를 가지는 인간화된 맞춤형 저-만노스형 엔-당질($Man_3GlcNAc[Fuc(\alpha1,6)]GlcNAc$)을 주요한 생성물로 축적한다는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 A(core α1,3-fucosyltransferase A: FucTA), 알파1,3-퓨코실트랜스퍼레이즈 B(core α1,3-fucosyltransferase B: FucTB), 베타1,2-자일로실트랜스퍼레이즈(β1,2-xylosyltransferase: XylT) 및 베타1,2-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼레이즈 II(β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II: GnTII)의 기능이 상실된, 알파1,3-퓨코스(α1,3-fucose) 및 베타1,2-자일로스(β1,2-xylose) 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능을 상실한 4중 돌연변이 식물체는 *FucTA*, *FucTB*, *XylT* 및 *GnTII* 유전자 각각의 염기서열의 일부 또는 전체가 제거되거나 T-DNA를 포함한 외래 유전자가 삽입된 것을 특징으로 하는 4중 돌연변이 식물체.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII의 기능 상실은 게놈 변형 (genome modification), 유전자 결실(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 삽입, 상동 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포존 태깅(transposon tagging)의 방법으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 4중 돌연변이 식물체.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII는 각각 서열번호 2, 4, 6 및 8의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 4중 돌연변이 식물체.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 4중 돌연변이 식물체에 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)은 Man_3 GlcNAc[Fuc(α1,6)]GlcNAc 인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 FUT8 유전자의 삽입은 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 애기장대 유비퀴틴 1 프로모터, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자 및 애기장대 유비퀴틴 1 폴리아데닐화(polyadenylation) 신호를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

[청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튤립, 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

[청구항 10] 제5항에 따른 형질전환 식물체의 캘러스.

[청구항 11] 제5항에 따른 형질전환 식물체의 종자.

[청구항 12] (1) FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 기능이 상실된, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 4중 돌연변이(quadruple mutant: *qm*) 식물체를 제조하는 단계; 및

(2) 상기 (1)단계에서 제조된 4중 돌연변이 식물체를 인간 유래 알파1,6-퓨코실트랜스퍼레이즈(α1,6-fucosyltransferase: FUT8) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환하여 FUT8 유전자를 과발현하고, FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질 기능이 상실된 형질전환 식물체를 선발하는 단계를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 (1)단계의 4중 돌연변이(quadruple mutant:

qm) 식물체는 FucTA, FucTB, XylT 및 GnTII 단백질의 기능이 각각 상실된 별개의 돌연변이 식물체를 교배하여 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 식물체를 선발하는 단계에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

[청구항 14] 제12항의 방법에 의해 제조된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질을 생산하는 형질전환 식물체.

[청구항 15] 제5항의 식물체 내에서 외래 당단백질 코딩 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 식물체 내에서 외래 당단백질 코딩 유전자의 발현은 상기 외래 당단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시킴으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법.

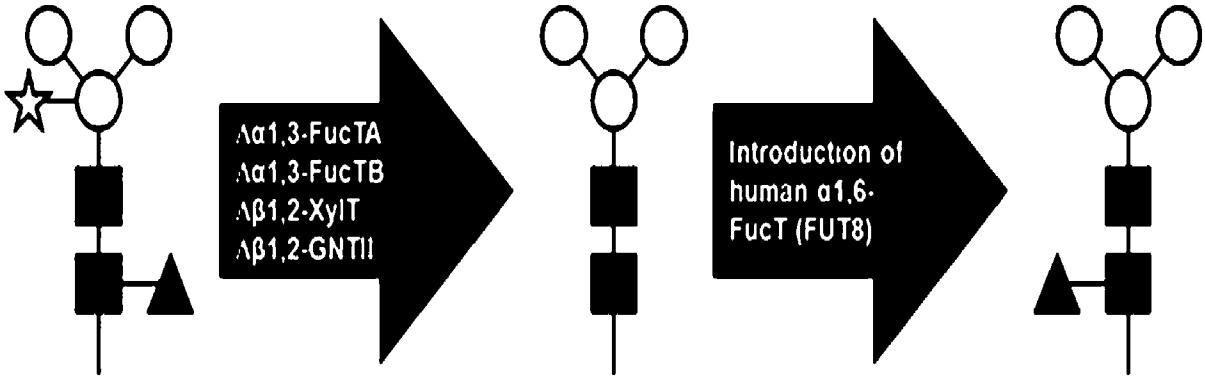
[청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 발현된 외래 당단백질을 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 발현된 외래 당단백질의 정제는 염석법, 투석법, 크로마토그래피법, 전기영동법 및 초원심분리법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질의 생산 방법.

[청구항 19] 제15항 내지 제18항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스 잔기를 포함하지 않고 알파1,6-퓨코스(α1,6-fucose) 잔기를 함유하는 인간화 저-만노스형 엔-당질(N-glycan)을 포함하는 단백질.

[청구항 20] 제19항의 단백질을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물.

[Fig. 1]

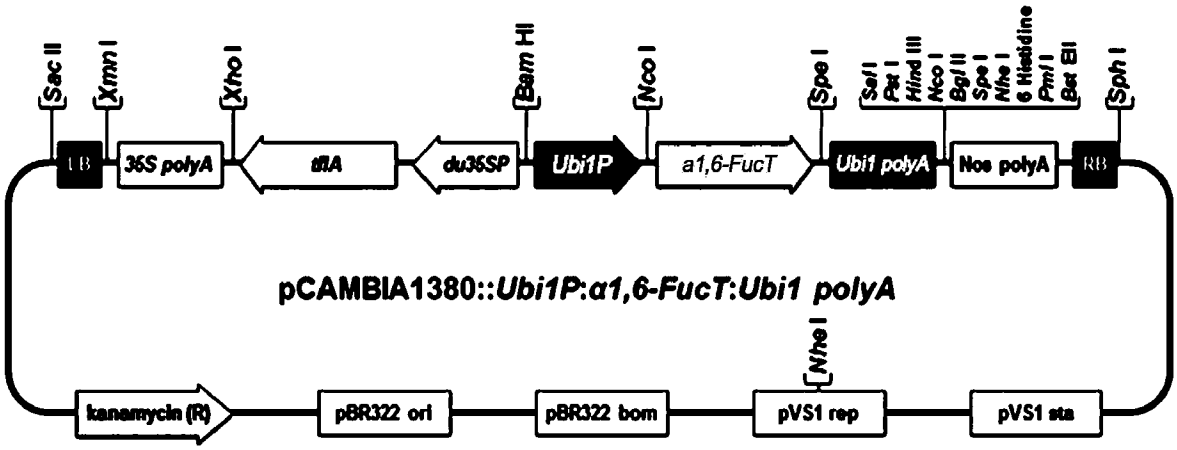


[Fig. 2]

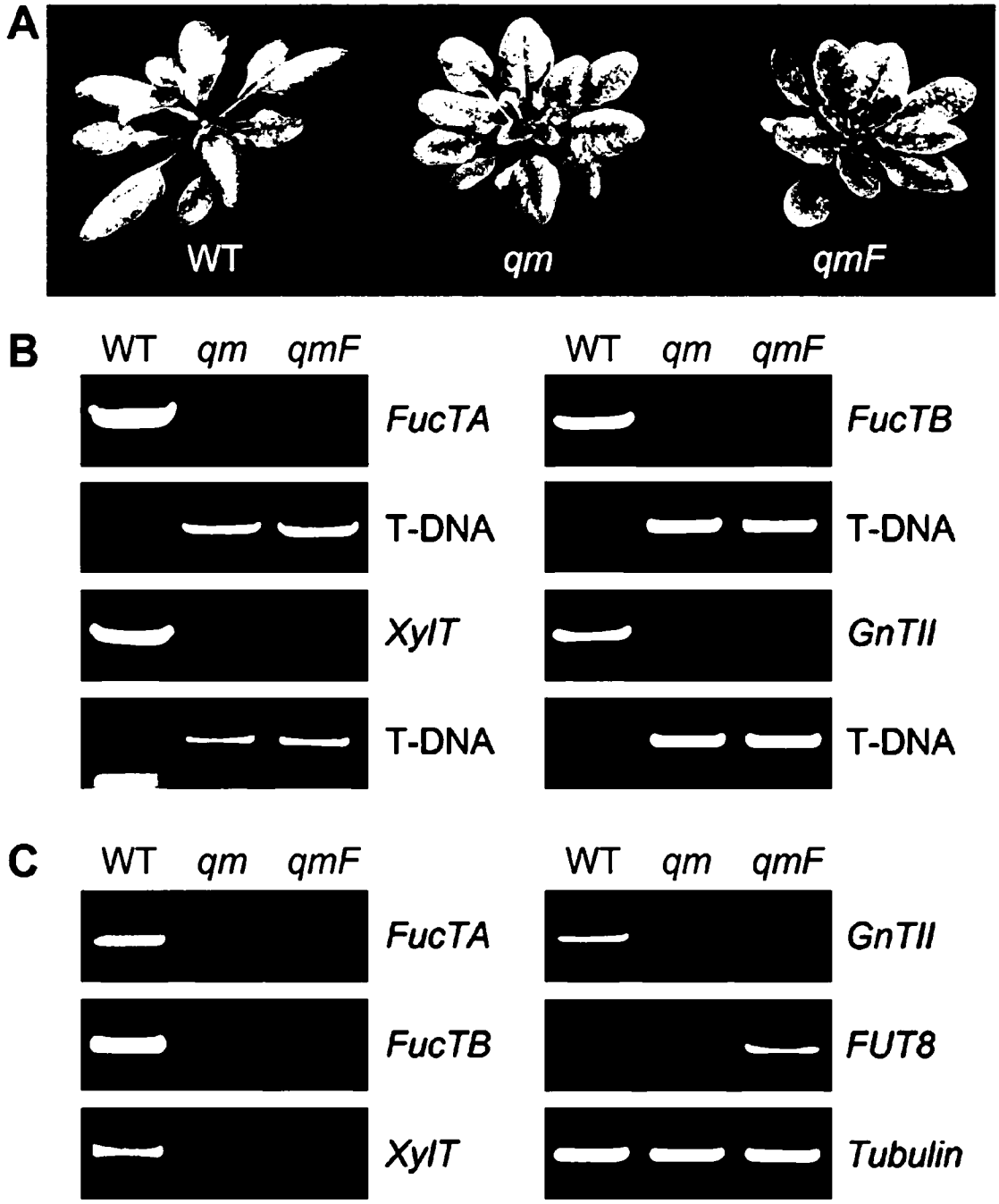
Ubi1P:FUT8:Ubi1 polyA 유전자

ggatccaattttgtaatatcccgggatatttcacaaattgaacatagactacagaattttagaaaacaaa
ctttctctctcttatctcacctttatcttttagagagaaaaagttcgatttccggttgaccggaatgtat
ctttgtttttttttgttttgtaacatatttcgttttccgatttagatcggatctccttttccgttttgtcg
gaccttcttccggtttatccggatctaataatatccatcttagacttagctaagtttggatctgttttttt
ggttagctcttgtcaatcgcctcatcatcagcaagaaggtgaaatttttgacaaataaatcttagaatca
tgtagtgtctttggaccttgggaatgatagaaacgatttgttatagctactctatgtatcagaccctgac
caagatccaacaatctcataggttttgtgcatatgaaaccttcgactaacgagaagtggtcttttaatga
gagagatatctaaaatgttatcttaaaagcccactcaaatctcaaggcataaggtagaaatgcaaatttg
gaaagtgggctgggccttttgtggtaaaggcctgtaacctagcccaatattagcaaaaccctagacgcgt
acattgacatatataaacccgcctcctccttgtttagggtttctacgtgagagaagacgaaacacaaacc
ATGGGGCCTTGGACTGGTTCCTGGCGTTGGATTATGCTCATTCTTTTTGCCTGGGGGACCTTGCTGTTTT
ATATAGGTGGTCACTTGGTACGAGATAATGACCATCCTGATCACTCTAGCCGAGAACTGTCCAAGATTCT
GGCAAAGCTTGAACGCTTAAAACAGCAGAATGAAGACTTGAGGCGAATGGCCGAATCTCTCCGGATACCA
GAAGGCCCTATTGATCAGGGGCCAGCTATAGGAAGAGTACGCGTTTTAGAAGAGCAGCTTGTTAAGGCCA
AAGAACAGATTGAAAATTACAAGAAACAGACCAGAAATGGTCTGGGGAAGGATCATGAAATCCTGAGGAG
GAGGATTGAAAATGGAGCTAAAGAGCTCTGGTTTTTCCTACAGAGTGAATTGAAGAAATTAAAGAACTTA
GAAGGAAATGAACTCCAAAGACATGCAGATGAATTTCTTTTGGATTTAGGACATCATGAAAGGTCTATAA
TGACGGATCTATACTACCTCAGTCAGACAGATGGAGCAGGTGATTGGCGGGAAAAAGAGGCCAAAGATCT
GACAGAACTGGTTCAGCGGAGAATAACATATCTTCAGAATCCCAAGGACTGCAGCAAAGCCAAAAAGCTG
GTGTGTAATATCAACAAAGGCTGTGGCTATGGCTGTCAGCTCCATCATGTGGTCTACTGCTTCATGATTG
CATATGGCACCCAGCGAACACTCATCTTGGAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTACTGGTGGATGGGAGAC
TGTATTTAGGCCTGTAAGTGAGACATGCACAGACAGATCTGGCATCTCCACTGGACACTGGTCAGGTGAA
GTGAAGGACAAAAATGTTCAAGTGGTCGAGCTTCCCATTGTAGACAGTCTTCATCCCCGTCCTCCATATT
TACCCTTGGCTGTACCAGAAGACCTCGCAGATCGACTTGTACGAGTGCATGGTGACCCTGCAGTGTGGTG
GGTGTCTCAGTTTGTCAAATACTTGATCCGCCCACAGCCTTGGCTAGAAAAAGAAATAGAAGAAGCCACC
AAGAAGCTTGGCTTCAAACATCCAGTTATTGGAGTCCATGTCAGACGCACAGACAAAGTGGGAACAGAAG
CTGCCTTCCATCCCATTGAAGAGTACATGGTGCATGTTGAAGAACATTTTCAGCTTCTTGCACGCAGAAT
GCAAGTGGACAAAAAAAGAGTGTATTTGGCCACAGATGACCCTTCTTTATTAAAGGAGGCAAAAACAAAG
TACCCCAATTATGAATTTATTAGTGATAACTCTATTTCCTGGTCAGCTGGACTGCACAATCGATACACAG
AAAATTCACTTCGTGGAGTGATCCTGGATATACATTTTCTCTCTCAGGCAGACTTCCTAGTGTGTACTTT
TTCATCCCAGGTCTGTCGAGTTGCTTATGAAATTATGCAAACACTACATCCTGATGCCTCTGCAAACTTC
CATTCTTTAGATGACATCTACTATTTTGGGGGCCAGAATGCCCACAATCAAATTGCCATTTATGCTCACC
AACCCCGAACTGCAGATGAAATTCCTATGGAACCTGGAGATATCATTGGTGTGGCTGGAAATCATTGGGA
TGGCTATTCTAAAGGTGTCAACAGGAAATTGGGAAGGACGGGCCTATATCCCTCCTACAAAGTTCGAGAG
AAGATAGAAACGGTCAAGTACCCCACATATCCTGAGGCTGAGAAATAActagtatcaagaatcccatctc
ttgcttgctttttttgttgtcttccctttgatagggtttgtttttcttgtttcagtgactttctatgtt
aaaagataatgtcagtaaaaggatttggttttctattattctgaatcgattacggaagattcttgcttaa
ttccaatctatacaagtatcgtgaaataatgaccgtttatgtgattaggagacgtgtttcattaataaaa
tataagatcaatacattgttagtagtgataaactatgtacaaattgtattgattgtaaaagaaacacaat
aggttccttttttctacaatatattgtgacagactctctgttttaacgaatgaattaaatttgtcgac

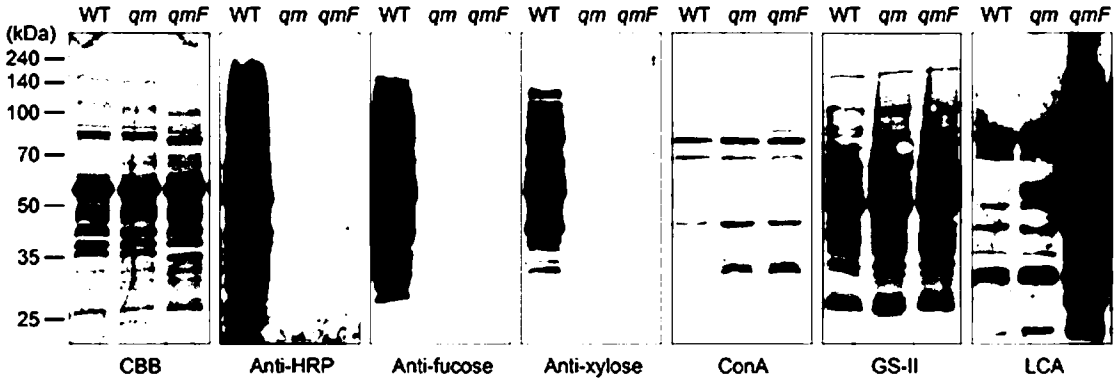
[Fig. 3]


Sac II
Xmn I
Xho I
BamHI
Nco I
Spe I
Sal I
Pst I
Hind III
Nco I
Bgl II
Spe I
Nhe I
6 Histidine
Pml I
Bst EII
Sph I
LB
35S polyA
tfdA
du35SP
Ubi1P
a1,6-FucT
Ubi1 polyA
Nos polyA
RB
pCAMBIA1380::Ubi1P:a1,6-FucT:Ubi1 polyA
Nhe I
kanamycin (R)
pBR322 ori
pBR322 bom
pVS1 rep
pVS1 sta

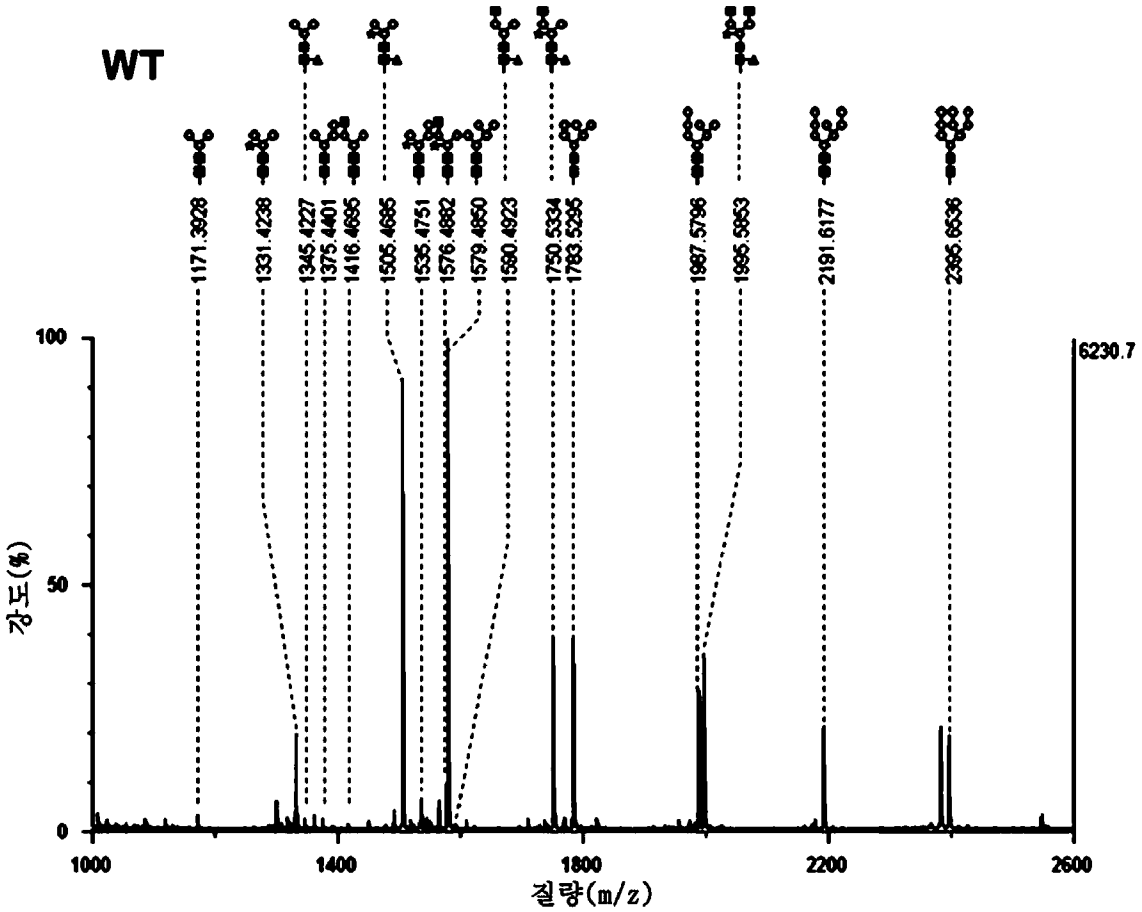
[Fig. 4]


A
WT
qm
qmF
B
WT qm qmF
FucTA
T-DNA
XylT
T-DNA
WT qm qmF
FucTB
T-DNA
GnTII
T-DNA
C
WT qm qmF
FucTA
FucTB
XylT
WT qm qmF
GnTII
FUT8
Tubulin

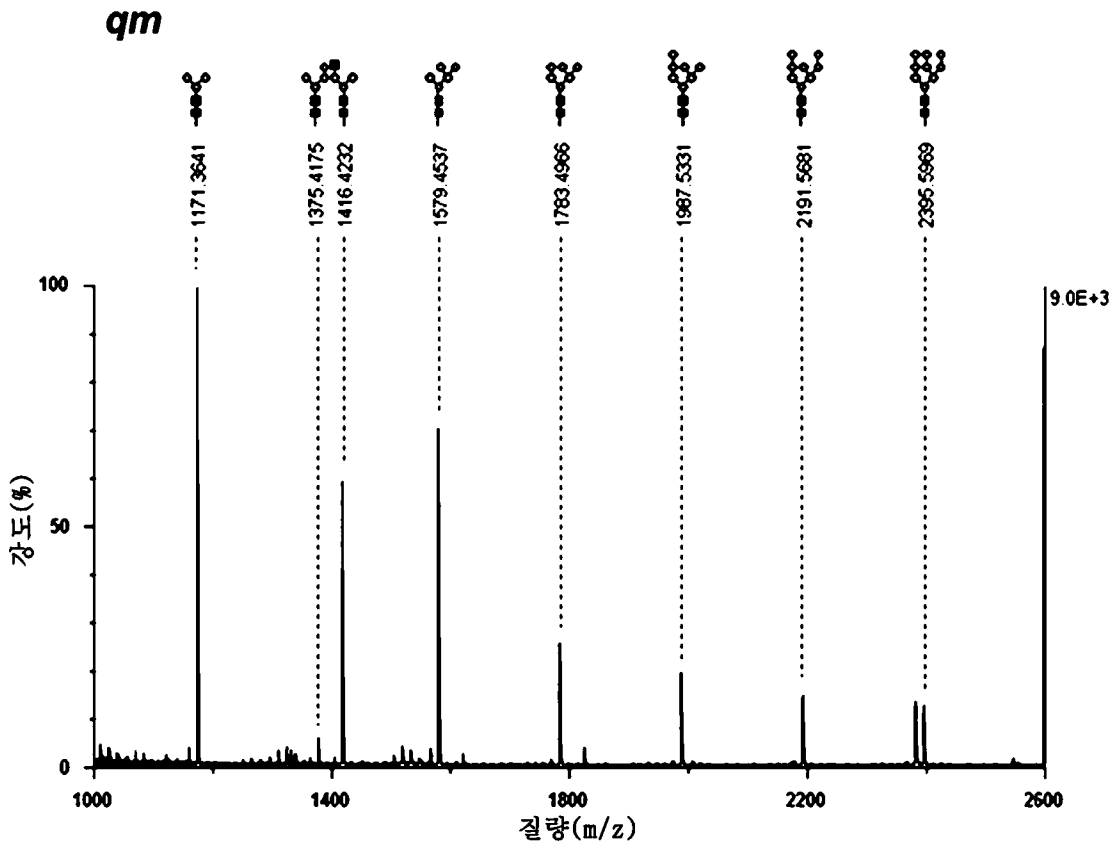
[Fig. 5]


WT qm qmF WT qm qmF WT qm qmF WT qm qmF WT qm qmF WT qm qmF WT qm qmF
(kDa)
240
140
100
70
50
35
25
CBB
Anti-HRP
Anti-fucose
Anti-xylose
ConA
GS-II
LCA

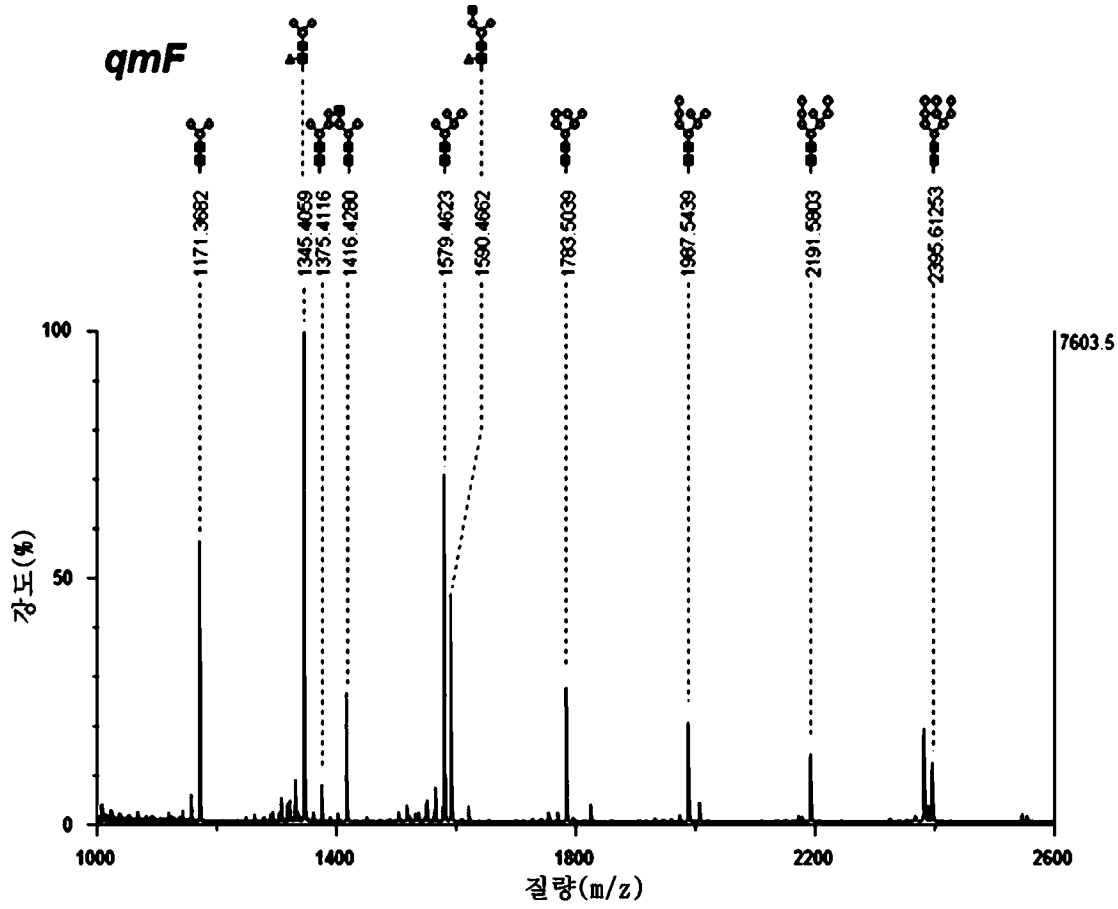
[Fig. 6]


WT
1171.3928
1331.4238
1345.4227
1375.4401
1416.4685
1505.4685
1535.4751
1576.4882
1579.4850
1580.4923
1750.5334
1783.5295
1987.5796
1995.5953
2191.6177
2395.6536
6230.7
100
50
0
강도(%)
1000
1400
1800
2200
2600
질량(m/z)

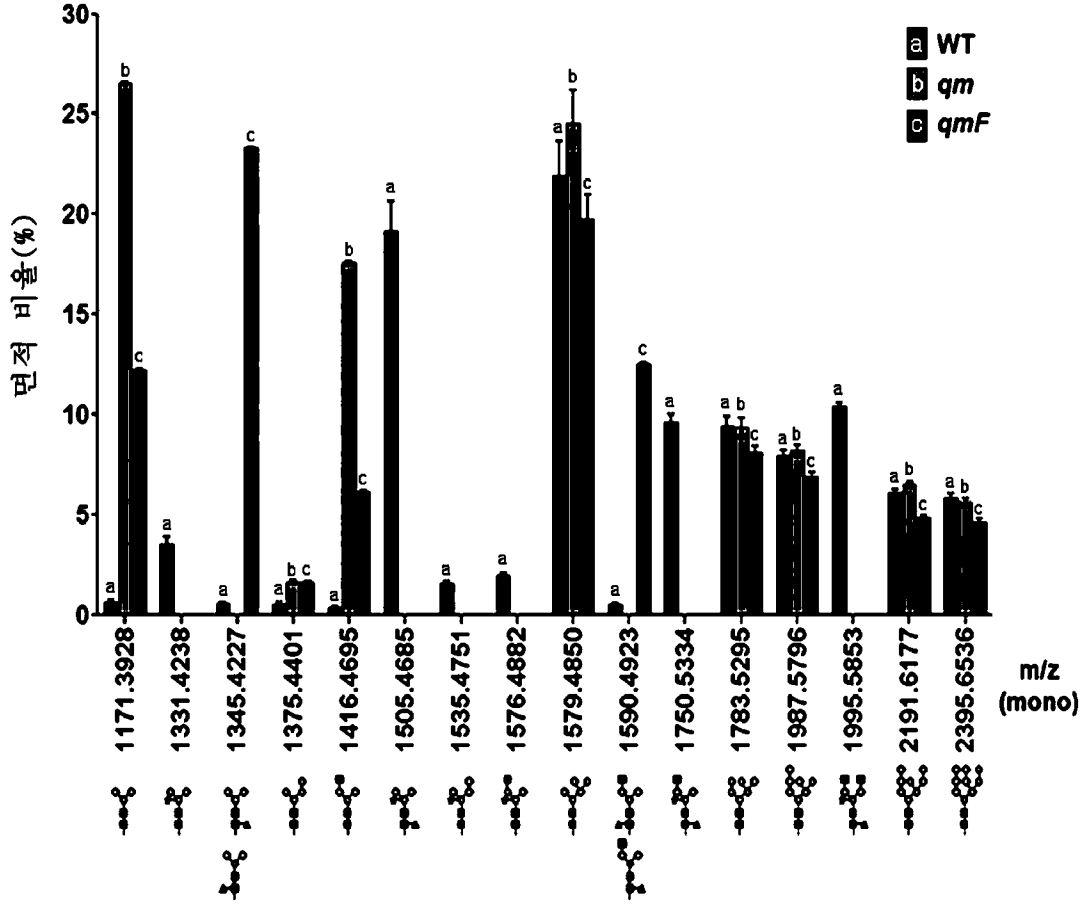
[Fig. 7]


qm
1171.3641
1375.4175
1416.4232
1579.4537
1783.4966
1987.5331
2191.5681
2395.5969
9.0E+3
100
50
0
강도(%)
1000
1400
1800
2200
2600
질량(m/z)

[Fig. 8]


qmF
1171.3682
1345.4059
1375.4116
1416.4280
1579.4623
1580.4662
1783.5039
1987.5439
2191.5903
2395.61253
7603.5
100
50
0
강도(%)
1000
1400
1800
2200
2600
질량(m/z)

[Fig. 9]


a WT
b qm
c qmF
면적 비율(%)
30
25
20
15
10
5
0
1171.3928
1331.4238
1345.4227
1375.4401
1416.4695
1505.4685
1535.4751
1576.4882
1579.4850
1590.4923
1750.5334
1783.5295
1987.5796
1995.5853
2191.6177
2395.6536
m/z
(mono)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/002464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/54(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)

A01H 5/00; C12N 15/82; A01H 1/00; C12N 5/04; C12N 15/54

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: FucTA, FucTB, XylT, GnT II, N-glycan, plant, α1,3-fucose and β1,2-xylose

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STRASSER, R. et al., "Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose", FEBS Letters, 12 March 2004, vol. 561, nos. 1-3, pages 132-136. See abstract; page 134, right column - page 135, right column; figures 1-2.	1-18
A	KR 10-2008-0094064 A (BIOLEX THERAPEUTICS, INC.) 22 October 2008 See abstract; claims 1-28.	1-18
A	US 2008-0141387 A1 (RESKI, R. et al.) 12 June 2008 See abstract; claims 38-51.	1-18
A	KARG, S. R. et al.,"Reduction of N-linked xylose and fucose by expression of rat beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III in tobacco BY-2 cells depends on Golgi enzyme localization domain and genetic elements used for expression," Journal of Biotechnology, 18 January 2010, vol. 146, nos. 1-2, pages 54-65. See abstract; figures 1-2	1-18
A	KR 10-2013-0125337 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 18 November 2013 See abstract; claims 1-7.	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 JUNE 2015 (29.06.2015)	**29 JUNE 2015 (29.06.2015)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2015/002464

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **20**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 20 refers to a multiple dependent claim, which does not meet the requirement of PCT Rule 6.4(a), and thus claim 20 is not clear.

3. ☒ Claims Nos.: **19**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2015/002464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0094064 A	22/10/2008	AU 2007-205935 A1	26/07/2007
		AU 2007-205939 A1	26/07/2007
		CA 2637254 A1	26/07/2007
		CN 101421403 A	29/04/2009
		CN 101426814 A	06/05/2009
		CN 101426814 B	03/04/2013
		EP 1973940 A2	01/10/2008
		EP 1974040 A2	01/10/2008
		EP 1974040 B1	03/10/2012
		EP 1976883 A2	08/10/2008
		EP 1976883 B1	03/10/2012
		JP 2009-523432 A	25/06/2009
		JP 2009-526520 A	23/07/2009
		KR 10-2008-0094918 A	27/10/2008
		US 2008-0066200 A1	13/03/2008
		US 2009-0175886 A1	09/07/2009
		US 2011-0144308 A1	16/06/2011
		US 7884264 B2	08/02/2011
		WO 2007-084672 A2	26/07/2007
		WO 2007-084672 A3	04/10/2007
		WO 2007-084922 A2	26/07/2007
		WO 2007-084922 A3	06/03/2008
		WO 2007-084926 A2	26/07/2007
		WO 2007-084926 A3	24/04/2008
US 2008-0141387 A1	12/06/2008	AU 2004-294912 A1	14/07/2004
		CA 2549932 A1	08/07/2004
		CA 2549932 C	20/08/2013
		EP 1431394 A1	23/06/2004
		EP 1431394 A8	06/07/2005
		EP 1431394 B1	02/08/2006
		JP 04559358 B2	06/10/2010
		JP 2006-511234 A	06/04/2006
		US 7781197 B2	24/08/2010
		WO 2004-057002 A2	08/07/2004
		WO 2004-057002 A3	26/08/2004
KR 10-2013-0125337 A	18/11/2013	WO 2013-169009 A1	14/11/2013

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/002464

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01H 5/00; C12N 15/82; A01H 1/00; C12N 5/04; C12N 15/54

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: FucTA, FucTB, XylT, GnTⅡ, 엔-당질, 식물체, 알파1,3-퓨코스 및 베타1,2-자일로스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	STRASSER, R. 외 4명, `Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose`, FEBS Letters, 2004.03.12., 561권, 1-3호, 132-136 페이지. 요약; 페이지 134, 우칼럼 - 페이지 135, 우칼럼; 도면 1-2 참조.	1-18
A	KR 10-2008-0094064 A (바이오렉스 쎄라퓨틱스, 인코포레이티드) 2008.10.22. 요약; 청구항 1-28 참조.	1-18
A	US 2008-0141387 A1 (RESKI, R. 외 5명) 2008.06.12. 요약; 청구항 38-51 참조.	1-18
A	KARG, S. R. 외 2명, `Reduction of N-linked xylose and fucose by expression of rat beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III in tobacco BY-2 cells depends on Golgi enzyme localization domain and genetic elements used for expression,` Journal of Biotechnology, 2010.01.18., 146권, 1-2호, 페이지 54-65. 요약; 도면 1-2 참조.	1-18
A	KR 10-2013-0125337 A (경상대학교산학협력단) 2013.11.18. 요약; 청구항 1-7 참조.	1-18

☐ 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

"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	국제조사보고서 발송일
2015년 06월 29일 (29.06.2015)	2015년 06월 29일 (29.06.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2015/002464

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 20
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 20은 PCT 규칙 제 6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 다수 종속청구항을 인용하고 있으므로, 청구항 20은 불명료합니다.

3. ☒ 청구항: 19
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/002464

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0094064 A	2008/10/22	AU 2007-205935 A1	2007/07/26
		AU 2007-205939 A1	2007/07/26
		CA 2637254 A1	2007/07/26
		CN 101421403 A	2009/04/29
		CN 101426814 A	2009/05/06
		CN 101426814 B	2013/04/03
		EP 1973940 A2	2008/10/01
		EP 1974040 A2	2008/10/01
		EP 1974040 B1	2012/10/03
		EP 1976883 A2	2008/10/08
		EP 1976883 B1	2012/10/03
		JP 2009-523432 A	2009/06/25
		JP 2009-526520 A	2009/07/23
		KR 10-2008-0094918 A	2008/10/27
		US 2008-0066200 A1	2008/03/13
		US 2009-0175886 A1	2009/07/09
		US 2011-0144308 A1	2011/06/16
		US 7884264 B2	2011/02/08
		WO 2007-084672 A2	2007/07/26
		WO 2007-084672 A3	2007/10/04
		WO 2007-084922 A2	2007/07/26
		WO 2007-084922 A3	2008/03/06
		WO 2007-084926 A2	2007/07/26
		WO 2007-084926 A3	2008/04/24
US 2008-0141387 A1	2008/06/12	AU 2004-294912 A1	2004/07/14
		CA 2549932 A1	2004/07/08
		CA 2549932 C	2013/08/20
		EP 1431394 A1	2004/06/23
		EP 1431394 A8	2005/07/06
		EP 1431394 B1	2006/08/02
		JP 04559358 B2	2010/10/06
		JP 2006-511234 A	2006/04/06
		US 7781197 B2	2010/08/24
		WO 2004-057002 A2	2004/07/08
		WO 2004-057002 A3	2004/08/26
KR 10-2013-0125337 A	2013/11/18	WO 2013-169009 A1	2013/11/14