(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 8 월 15 일 (15.08.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/167348 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/001920

(22) 국제출원일: 2024 년 2 월 8 일 (08.02.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0018238 2023 년 2 월 10 일 (10.02.2023) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 김병기 (**KIM, Byung Gee**); 06631 서울특별시 서초구 서초대로 346, 1타운동 1102호(서초동, 서초동 동아빌라트), Seoul (KR). 이욱재 (**LEE, Uk Jae**); 08816 서울특별시 관악구 신림로 3가길 45-19 윤슬오피스텔 303호, Seoul (KR). 김은정 (**KIM, Eun Jung**); 14248 경기도 광명시 안현로 36, 406동 1502호(하안동, 하안 4단지고층주공아파트), Gyeonggi-do (KR).

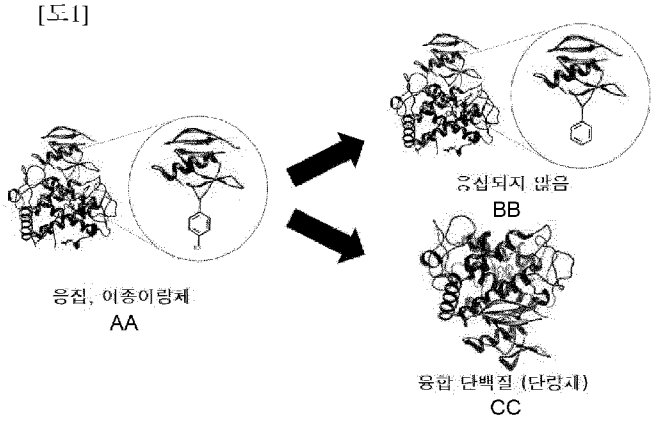
(74) 대리인: 특허법인코리아나 (**KOREANA PATENT FIRM**); 06132 서울특별시 강남구 강남대로 94길 94(역삼동, 케이피빌딩), Seoul (KR).

(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,

(54) Title: PROTEIN ENGINEERING STRATEGIES FOR MEDICAL TYROSINASE AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 발명의 명칭: 의료용 티로시나아제를 위한 단백질 공학 전략 및 이의 응용

[도1]



AA ... Aggregated heterodimer
BB ... Not aggregated
CC ... Fusion protein (monomer)

(57) Abstract: The invention of the present application relates to protein engineering strategies for medical tyrosinase and to applications thereof. The invention of the present application suggests two protein engineering strategies for using tyrosinase as a medical protein. A first strategy is connecting tyrosinase, which is composed of two subunits, into one to simplify the licensing processing of medical tyrosinase, and a second strategy is inducing mutants that do not cause aggregation. The invention of the present application suggests protein engineering that does not cause a reduction of activity of tyrosinase, thus having great significance from an enzyme engineering perspective and having significant implications in terms of applicability in various applications and industrial fields using tyrosinase. In addition, the invention of the present application is a strategy for use as a medical protein, and thus is not limited to the tyrosinase enzyme and has high utility value as a method available for inducing mutants or producing fusion proteins from various proteins through protein engineering.

WO 2024/167348 A1

[다음 쪽 계속]

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 역내 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))

(57) 요약서: 본원발명은 의료용 티로시나아제를 위한 단백질 공학 전략 및 이의 응용에 관한 것이다. 본원발명은, 티로시나아제를 의료용 단백질로 사용하기 위한 두 가지 단백질 공학 전략을 제시하고 있다. 첫 번째는 의료용 티로시나아제의 허가 과정의 간소화를 위해 두 개의 서브 유닛으로 구성된 티로시나아제를 하나로 연결시켜주는 전략이고, 두 번째는 응집현상이 일어나지 않도록 하는 돌연변이를 일으키는 전략이다. 본원발명은 티로시나아제의 활성 감소를 일으키지 않는 단백질 공학을 제시하고 있기 때문에 효소 공학적인 관점에서 큰 의미를 가지며, 티로시나아제를 이용하는 다양한 응용 및 산업 분야에 적용할 수 있다는 점에서 시사하는 바가 크다. 또한, 본원발명은 의료용 단백질로 사용하기 위한 전략이므로, 티로시나아제 효소에 한정되는 것이 아니라, 다양한 단백질들을 단백질 공학적으로 돌연변이를 일으키거나 융합 단백질을 만들 때, 이용할 수 있는 방법으로 활용 가치가 높다.

명세서

발명의 명칭: 의료용 티로시나아제를 위한 단백질 공학 전략 및 이의 응용

기술분야

[1] 본원발명은 티로시나아제를 의료용 단백질로 사용하기 위한 단백질 공학 전략에 관한 것이다.

배경기술

[2] 티로시나아제 (EC 1. 14. 18. 1) 는 티로신 (L-Tyrosine) 을 다이하이드록시페닐알라닌 (L-Dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 으로 하이드록실화시키고, 추가적인 산화과정을 통해 퀴논 (Quinone) 을 만드는 효소이다. 티로시나아제의 기질은 티로신에만 한정되지 않으며, 티로시나아제는 모노페놀형 기질에 전반적으로 작용하는 높은 기질 특이성을 보인다.

[3] 티로시나아제의 반응을 통해 퀴논형의 물질이 생산되면, 주변의 다른 페놀, 아민, 티올 그룹들과 같은 친핵체들과 함께 마이클 어디션 (Michael Addition) 반응이나 쉬프 베이스 (Schiff's Base) 반응을 통해 가교를 이룰 수 있게 된다. 이러한 이유로 카테콜 (Catechol) 형 물질의 생산이나 멜라닌을 생산하는 연구들이 많이 수행된바 있다. 또 다른 측면으로는, 생체 고분자에 모노페놀형 물질을 접합하여, 가교를 통해 생체재료를 만들거나 코팅을 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 이렇게 생체고분자의 가교를 하이드로젤 생산, 스캐폴드 생산 및 세포 코팅 등에 적용하는 연구가 진행된 바 있다.

[4] 티로시나아제의 단백질 공학은 굉장히 까다롭게 여겨진다. 티로시나아제는 제 3 형 구리 함유 효소로, 돌연변이가 생기게 되면 활성을 잃기 때문이다 (비특허문헌 1). 티로시나아제를 이용한 단백질 공학으로, 광활성화 티로시나아제를 생산하여 빛에 의해 티로시나아제가 활성화되고, 생체 내에서 멜라닌을 합성할 수 있는 기술이 보고된 바 있다 (비특허문헌 2).

[5] 한편, 방선균 유래 티로시나아제는 단백질 구조상 평평한 구조를 가지고 있다고 보고된 바 있어서, 생체 고분자 기질에 높은 활성을 가지고 있다. 단백질 기질인 젤라틴과 티라민을 치환한 히알루론산에서, 방선균 유래 티로시나아제가 버섯 유래 티로시나아제와 바실러스 메가터리움 유래 티로시나아제보다 훨씬 더 높은 활성을 보인 사례가 보고되었다 (비특허문헌 3). 상기 비특허문헌 3 에서, 1w% 티라민 치환 히알루론산과 3w% 젤라틴이 가교화되는 시간을 측정하였을 때, 50초 이내로 젤화가 이루어지는 것이 확인되었다. 또한, 항염증 효과를 위해 티라민 치환 히알루론산과 에피갈로카테킨 갈레이트 치환 히알루론산을 섞은 조합으로 티로시나아제가 7초 이내에 젤화가 이루어진 것을 확인한 사례가 보고되었다 (비특허문헌 4). 이와 같이 방선균 유래 티로시나아제를 이용한 하이드로젤 가교 연구가 많이 진행된 바 있다.

[6] 또 다른 연구로는, 방선균 티로시나아제를 이용한 고분자 가교를 통해 세포를 코팅할 수 있고, 이렇게 코팅된 이자 베타 세포가 몸 속으로 전달되어 면역 반응을 회피할 뿐만 아니라, 성공적으로 인슐린을 분비할 수 있다는 사례가 보고되었다 (비특허문헌 5). 이와 같이, 방선균 티로시나아제는 신개념 세포치료제로 각광받고 있다.

[7] 한편, 다른 방선균 유래의 티로시나아제를 이용하여 융합 단백질을 만든 것에 대한 보고가 있다 (비특허문헌 6). 상기 비특허문헌 6 에서는, 스트렙토마이세스 안티바이오티커스 (*Streptomyces antibioticus*) 유래의 티로시나아제를 사용하였고, MelC1 과 MelC2 를 연결하는 링커로 히스택 (His-tag) 을 이용하였다. 또한, 상기 비특허문헌 6 의 목적은 단백질의 분비를 위한 단백질 공학이다.

[8] [선행기술문헌]

[9] [비특허문헌]

[10] (비특허문헌 1) Lee, Nahum, et al. *Applied microbiology and biotechnology* 99.19 (2015): 7915-7924.

[11] (비특허문헌 2) Lee, Uk-Jae, et al. *Advanced Science* 9.7 (2022): 2103503.

[12] (비특허문헌 3) Kim, Su-Hwan, et al. *Biomaterials* 178 (2018): 401-412.

[13] (비특허문헌 4) Kim, Su-Hwan, et al. *Biomaterials* 242 (2020): 119905.

[14] (비특허문헌 5) Kim, Minji, et al. *Science advances* 7.26 (2021): eabf7832.

[15] (비특허문헌 6) Ryu, Jaewook, et al. *Applied and environmental microbiology* 85.20 (2019): e01350-19.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 티로시나아제의 이종 이량체 구조는 몸 속으로 들어갔을때, 면역 반응을 일으킬 수 있는 가능성이 더 높으며, 의료용 단백질로 제조하고 사용하기 위해서는 이종 이량체 구조보다 단량체 구조가 유리하다. 또한, 단백질의 두 개의 서브 유닛에 대해 각각 의료용 허가를 받기 위해서는 두 번의 새로운 평가가 요구되어지는데, 독립적으로 단백질을 발현하고, 정제를 진행하게 되면, 단백질의 활성에도 큰 저해가 있을 것으로 판단된다. 이에, 단백질 두 개의 서브 유닛을 하나로 합쳐서 융합 단백질로 만든 후에, 의료용 단백질 평가를 진행하는 것이 효과적이다.

[17] 한편, 방선균 유래 티로시나아제는 MelC1 이라는 캐디 단백질과 MelC2 라는 촉매 단백질로 구성되어지고, MelC1 은 샤페론처럼 작용하여 MelC2 의 구조적 접힘을 돕기 때문에 발현이 필수적이다. 하지만, MelC1 과 MelC2 를 함께 발현하면, MelC1 이 응집되는 현상이 보고된바 있다 (Matoba, Yasuyuki, et al. "Activation mechanism of the Streptomyces tyrosinase assisted by the caddie protein." Biochemistry 56.41 (2017): 5593-5603). 이러한 응집현상은 단백질의 정제 후에 추가로 발생하는 손실로 여겨질 수 있고, 단백질을 분석하는 과정에서 어려움이 있으며, 효소의 정제된 산물이 일정하지 않는 단점이 있다. 특히, 질량분석의 경우

에는 컬럼을 막히게 할 수 있다. 그렇기 때문에, 티로시나아제를 응집현상 없이 발현하는 기술이 요구되어진다.

과제 해결 수단

[18] 본원 발명자들은, 상기한 과제를 해결하기 위하여, 티로시나아제를 의료용 단백질로 사용하기 위한 두가지 단백질 공학 전략을 제시하고 있다.

[19] 첫 번째는 의료용 티로시나아제의 허가 과정의 간소화를 위해 두 개의 서브 유닛으로 구성된 티로시나아제를 하나로 연결시켜주는 전략이고, 두 번째는 응집현상이 일어나지 않도록 하는 돌연변이를 일으키는 전략이다.

[20] 구체적으로, 본원발명은 하기를 제공한다.

[21] [1] MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제로서, 상기 링커는 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커인, 융합 티로시나아제.

[22] [2] [1] 에 있어서,

[23] 상기 MelC2 단백질이 링커를 통해 상기 MelC1 단백질의 C 말단에 연결되거나, 또는,

[24] 상기 MelC1 단백질이 링커를 통해 상기 MelC2 단백질의 C 말단에 연결된, 융합 티로시나아제.

[25] [3] [1] 또는 [2] 에 있어서,

[26] 활성 pH 는 pH 6 내지 10 인, 융합 티로시나아제.

[27] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 있어서,

[28] 상기 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제인, 융합 티로시나아제.

[29] [5] [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 있어서,

[30] 상기 MelC1 단백질은 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질인, 융합 티로시나아제.

[31] [6] 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는, 변이된 티로시나아제.

[32] [7] [6] 에 있어서,

[33] 활성 pH 는 pH 6 내지 10 인, 변이된 티로시나아제.

[34] [8] [6] 또는 [7] 에 있어서,

[35] 상기 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제인, 변이된 티로시나아제.

[36] [9] 티로시나아제를 제조하는 방법으로서,

[37] MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계, 및

[38] 상기 융합 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

[39] [10] 하이드로젤을 합성하는 방법으로서,

[40] MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계,

[41] 상기 융합 티로시나아제를 정제하는 단계, 및

[42] 모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 상기 융합 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

[43] [11] 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법으로서,

[44] 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계,

[45] 상기 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계, 및

[46] 상기 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

[47] [12] 하이드로젤을 합성하는 방법으로서,

[48] 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계,

[49] 상기 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계,

[50] 상기 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계, 및

[51] 모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 상기 변이된 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 효과

[52] 본원발명에 따르면, 티로시나아제의 두 개의 서브 유닛이 하나로 연결되기 때문에, 티로시나아제 제조 시, 티로시나아제의 중합 효소로서의 장점을 유지하면서도 단백질의 분리 및 정제를 한 번만 해도 되는 효과가 있다. 또한, 본원발명은 티로시나아제를 의료용 단백질로 사용하고자 할 때 허가 과정이 간소화되는 이점이 있다.

[53] 또한, 본원발명에 따르면, 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되기 때문에, 단백질의 정제 후에 추가로 발생하는 손실을 억제할 수 있고, 효소의 정제된 산물을 일정하게 수득할 수 있는 이점이 있다.

[54] 티로시나아제는 구리 함유 효소로 돌연변이를 일으키면 활성을 잃기 쉬워 연구가 상당히 까다로운 효소로 밝혀져 있다. 이에, 본원발명은 티로시나아제의 활성 감소를 잃으키지 않는 단백질 공학을 제시하고 있기 때문에 효소 공학적인 관점에서 큰 의미를 가진다. 티로시나아제는 멜라닌 합성, 하이드로젤 가교, 세포 코팅, 단백질 변형 등에 적용될 수 있기 때문에, 이러한 티로시나아제의 단백질 공학 전략은 티로시나아제를 이용하는 다양한 응용 및 산업 분야에 적용할 수 있다는 점에서 시사하는 바가 크다.

[55] 또한, 본원발명은 의료용 단백질로 사용하기 위한 전략이므로, 티로시나아제 효소에 한정되는 것이 아니라, 다양한 단백질들을 단백질 공학적으로 돌연변이를 일으키거나 융합 단백질을 만들 때 이용할 수 있는 방법으로 활용 가치가 높다.

[56] 본원발명은 티로시나아제를 의약품으로 사용하기 위한 단백질의 공학적 방법 및 자체적 물질에 대한 내용을 모두 포함한다.

도면의 간단한 설명

[57] 도 1 은 야생형 티로시나아제와, 본원발명에 따른 변이 티로시나아제 및 융합 티로시나아제를 비교한 모식도이다.

[58] 도 2 는 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래 티로시나아제의 구조 (PDB ID: 6J2U) 를 이미지화한 것이다.

[59] 도 3 은 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래 티로시나아제의 MelC1 단백질에 Y91F 돌연변이를 수행한 SaTYR Y91F 의 발현 양상이다.

[60] 도 4 는 대조군 (SaTYR WT) 과 돌연변이군 (SATYR Y91F) 의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

[61] 도 5 는 대조군 (SaTYR WT) 과 돌연변이군 (SATYR Y91F) 의 활성을 비교한 결과이다.

[62] 도 6 은 돌연변이군 (SATYR Y91F) 의 pH 에 따른 활성을 평가한 결과이다.

[63] 도 7 은 본원발명에 따른 융합 티로시나아제의 구성 및 모식도이다.

[64] 도 8 은 융합 티로시나아제의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

[65] 도 9 는 융합 티로시나아제의 pH 에 따른 활성을 평가한 결과이다.

[66] 도 10 은 융합 티로시나아제의 발현 후 세포 배양액이다.

[67] 도 11 은 융합 티로시나아제의 활성을 분석한 결과이다.

[68] 도 12 는 링커의 유연성에 따른 융합 티로시나아제의 활성을 비교한 결과이다.

[69] 도 13 은 링커의 길이에 따른 융합 티로시나아제의 SDS-PAGE 분석 결과이다.

[70] 도 14 는 링커의 길이에 따른 융합 티로시나아제의 활성을 비교한 결과이다.

[71] 도 15 는 개량 티로시나아제의 젤화를 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[72] 이하, 본원발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본원발명은 다양한 형태로 변경되어 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 구현예에 한정되는 것은 아니다.

[73] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본원발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[74] 한 구현예에서, 본원발명은 MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제로서, 상기 링커는 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커인, 융합 티로시나아제에 관한 것이다.

[75] 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제는 MelC2 단백질이 링커를 통해 MelC1 단백질의 C 말단에 연결되거나, 또는, MelC1 단백질이 링커를 통해 MelC2 단백질의 C 말단에 연결된다. 바람직하게는, 본원발명의 융합 티로시나아제는 MelC1 단백질이 링커를 통해 MelC2 단백질의 C 말단에 연결된다.

[76] 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제의 활성 pH 는 pH 6 내지 10 이고, 바람직하게는 pH 6 내지 8 이다.

[77] 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제의 발현 온도는 10℃내지 50℃이고, 바람직하게는 15℃내지 30℃이고, 더욱 바람직하게는 15℃내지 20℃이다.

[78] 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제이고, 바람직하게는 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래의 티로시나아제이다.

[79] 본원발명의 융합 티로시나아제의 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질은 당해 분야에 널리 알려져 있는 단백질을 사용할 수 있다. 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제의 MelC1 단백질은 서열번호 1 의 MelC1 단백질이거나, 또는, 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제의 MelC2 단백질은 서열번호 2 의 MelC2 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 서열번호 1 은 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래 티로시나아제의 야생형 MelC1 단백질의 서열이고, 서열번호 2 는 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래 티로시나아제의 야생형 MelC2 단백질의 서열이다.

[80] 본원발명의 융합 티로시나아제에서 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 연결하는 링커는 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커이고, 융합 티로시나아제의 활성의 관점에서, 바람직하게는 10 내지 50개 아미노산 길이의 링커이고, 더욱 바람직하게는 10 내지 40개 아미노산 길이의 링커이고, 가장 바람직하게는 10 내지 30개 아미노산 길이의 링커이다.

[81] 본원발명의 융합 티로시나아제에서 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 연결하는 링커는 당해 분야에 널리 알려져 있는 링커를 사용할 수 있다.

[82] 본원발명의 융합 티로시나아제의 활성의 관점에서, MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 연결하는 링커는 가요성 링커 (flexible linker) 일 수 있다. 본원발명의 융합 티로시나아제에서 사용될 수 있는 가요성 링커는 당해 분야에 널리 알려져 있는 가요성 링커를 사용할 수 있다. 예를 들어, Gly 및 Ser 으로 이루어진 링커를 사용할 수 있고, 서열번호 3 내지 6 에서 선택되는 어느 하나의 링커일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[83] 다른 구현예에서, 본원발명은 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는, 변이된 티로시나아제에 관한 것이다.

[84] 한 구현예에서, 본원발명의 변이된 티로시나아제의 활성 pH 는 pH 6 내지 10 이고, 바람직하게는 pH 6 내지 8 이다.

[85] 한 구현예에서, 본원발명의 변이된 티로시나아제의 발현 온도는 10℃내지 50℃이고, 바람직하게는 15℃내지 30℃이고, 더욱 바람직하게는 15℃내지 20℃이다.

[86] 한 구현예에서, 본원발명의 변이된 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제이고, 바람직하게는, 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래의 티로시나아제이다.

[87] 본원발명의 변이된 티로시나아제의 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질은 당해 분야에 널리 알려져 있는 단백질을 사용할 수 있다. 한 구현예에서, 본원발명의 융합 티로시나아제의 MelC2 단백질은 서열번호 2 의 MelC2 단백질일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[88] 야생형 티로시나아제는 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 일어나는 반면, 본원발명에 따른 변이된 티로시나아제는 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 일어나지 않는다.

[89] 본원발명에 따른 융합 티로시나아제 또는 변이된 티로시나아제는 당해 분야에 널리 알려져 있는 방법에 따라 제조될 수 있다.

[90] 본원발명에 따른 융합 티로시나아제를 제조하는 방법은 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 융합 티로시나아제를 제조하는 방법은 제조된 융합 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서, 본원발명에 따른 융합 티로시나아제를 제조하는 방법은 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명은 티로시나아제의 두 서브 유닛인 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 하나의 단백질로 융합하였기 때문에 티로시나아제의 중합 효소로서의 활성을 유지하면서도 하나의 단백질만 발현 및 정제하면 되는 이점을 가진다.

[91] 다른 구현예에서, 본원발명은 본원발명에 따른 융합 티로시나아제를 이용하여 하이드로젤을 합성하는 방법을 제공한다.

[92] 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 제조된 융합 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 제조된 융합 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함한다. 한 구현예에서, 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성

하는 방법은 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명은 티로시나아제의 두 서브 유닛인 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 하나의 단백질로 융합하였기 때문에 하이드로젤 합성 시 티로시나아제의 중합 효소로서의 활성을 유지하면서도 하나의 단백질만 발현 및 정제하면 되는 이점을 가진다.

[93] 다른 구현예에서, 본원발명은 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본원발명에 따른 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법은 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법은 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법은 제조된 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함한다. 본원발명은 티로시나아제의 MelC1 단백질의 티로신 잔기를 페닐알라닌으로 치환하였기 때문에 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되고, 티로시나아제의 중합 효소로서의 활성을 유지할 수 있는 이점을 가진다.

[94] 다른 구현예에서, 본원발명은 하이드로젤을 합성하는 방법에 관한 것이다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 제조된 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함한다. 본원발명에 따른 하이드로젤을 합성하는 방법은 모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 변이된 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함한다. 본원발명은 티로시나아제의 두 서브 유닛인 MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 하나의 단백질로 융합하였기 때문에 하나의 단백질만 발현 및 정제하면 되는 이점을 가진다. 본원발명은 티로시나아제의 MelC1 단백질의 티로신 잔기를 페닐알라닌으로 치환하였기 때문에 하이드로젤 합성 시 티로시나아제의 MelC1 단백질의 응집이 억제되고, 티로시나아제의 중합 효소로서의 활성을 유지할 수 있는 이점을 가진다.

[95] 하기의 실시예를 통하여 본원발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본원발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 실시예에 의해 본원발명이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[96] **[실시예]**

[97] **실험예 1 : 의료용 티로시나아제의 돌연변이 잔기 선정**

[98] 키메라 소프트웨어 (Chimera software) 를 이용하여, 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래의 티로시나아제의 구조 (PDB ID: 6J2U) 를 이미지화하였고, MelC1 의 Y 잔기를 확인하였다. 그 결과, Y45, Y65, Y91 의 총 3 개의 티로신 잔기를 찾을 수 있었고, Y91 잔기가 가장 외부에 노출되어 있어, 티로시나아제 반응시 가교 결합이 일어나는 것으로 예상할 수 있었다. 결과를 도 2 에 나타낸다.

[99] **실험예 2 : 티로시나아제 돌연변이 균주의 발현 평가**

[100] 구조적 분석을 통해 선정된 MelC1 의 Y91F 돌연변이를 수행하였다. 티로시나아제를 제조하기 위해 대장균 (*E.coli*) BL21(DE3) 에 플라스미드를 넣는 형질전환을 진행하였다. pETDuet 벡터에 MelC1 유전자와 MelC2 유전자를 넣어준 후에, 서열번호 1 의 MelC1 단백질에 Y91F 돌연변이를 도입하였다.

[101] 형질전환된 대장균을 100 μg/mL 농도의 암피실린의 LB (Luria Beratni) 고체 배지에 도포하여 콜로니를 얻었다. 그 콜로니를 4 ml의 LB 액체 배지에서 하룻밤 동안 37℃, 200 rpm 조건에서 배양하였다. 50 ml의 멸균된 TB 배지 (Terrific broth) 에 100 μg/mL 농도의 암피실린을 넣어주고, 이전의 배양액의 4 ml을 첨가하여 37℃, 200 rpm 조건에서 배양하였으며, OD_{600}이 0.6 - 0.8에 도달하였을때, 0.05 mM IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) 와 1mM 의 $CuSO_4$를 넣어주었다. 이를 각각 18℃와 25℃ 및 200 rpm 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 단백질을 수득하기 위해, 4,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하여 세포를 수득하였고, 50 mM 의 Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0) 5 mL 을 첨가하여 세포를 세척하였다. 여기에 다시 50 mM 의 Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0) 5 mL 을 넣은 후, 초음파 파쇄기 (Vibra & cell, USA) 를 이용하여 세포 파쇄를 수행하였다. 세포 파쇄액을 총 분획 (Total Fraction, T) 로 명명하고, 세포 파쇄액을 1.7 mL 튜브에 분주하고, 16,000 rpm 에서 30 분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 세포 추출액의 가용성 분획 (Soluble Fraction, S) 을 얻었다. 그리고, 이를 SDS-PAGE 로 확인한 결과, 18 ℃의 발현 조건에서 더 많은 단백질이 발현되고, 용해도가 높다는 것을 알 수 있었다. 결과를 도 3 에 나타낸다.

[102] **실험예 3 : 돌연변이 티로시나아제의 가교 평가**

[103] 스트렙토마이세스 아버미틸리스 (*Streptomyces avermitilis*) 유래 티로시나아제 대조군 (SaTYR WT) 과 Y91F 돌연변이군 (SaTYR Y91F) 에 대하여, 실험예 2 의 과정을 거쳐 얻은 세포 추출액을 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 히스택 (His-tag) 정제를 진행하였다. 먼저, 1 컬럼 부피 (column volumne) 의 프리-바인딩 완충용액 (pre-binding buffer) (5 mM 이미다졸, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl 완충용액) 을 이용하여, Ni-NTA 의 활성을 유도하고, 세포 추출액을 Ni-NTA 컬럼에 통과시켜 티로시나아제를 컬럼에 결합시킨 뒤, 2 배의 컬럼 부피의 세척 완충용액 (wash buffer) (25 mM 이미다졸, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl 완충용액) 을 이용하여, Ni-NTA 컬럼에 강하게 결합하지 않은 불순물들을 제거하였다. 마지막으로 용

출 완충용액 (elution buffer) (250 mM 이미다졸, 50 mM Tris-HCl) 을 이용하여, Ni-NTA 컬럼으로부터 티로시나아제를 분리해낸 뒤, 이미다졸을 1/2500 수준으로 희석하기 위해 10k 필터를 이용하고 50 mM Tris-HCl 로 완충용액을 교체하여 정제된 티로시나아제를 수득하였다. 그리고, 이를 SDS-PAGE 로 확인한 결과, 대조군에서는 가교가 일어난 티로시나아제가 SDS-PAGE 상단부에 관찰되는 것을 확인할 수 있었고 (상단의 파란색 화살표), 반면, SaTYR Y91F 돌연변이주에서는 가교가 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 결과를 도 4 에 나타낸다.

[104] **실험예 4 : 돌연변이 티로시나아제의 활성 평가**

[105] 정제된 SaTYR WT 와 SaTYR Y91F 의 활성을 비교하고자 티로시나아제 활성 평가를 진행하였다. 1 mM L-티로신, 200 nM SaTYR, 10 μM $CuSO_4$ 를 50 mM 의 Tris-HCl (pH 8.0) 를 첨가하고, 37 ℃ 조건에서 30 초마다 475 nm에서의 흡광도를 조사하였다 (N = 4). 도파 크롬 (Dopachrome) 의 흡광계수 (3600 $M^{-1}cm^{-1}$) 를 이용하여 도파크롬의 생산량을 계산하였다. 그리고, 초기 속도를 계산하기 위해, 10 분 이하에서의 그래프 기울기를 계산하였다. 그 결과, SaTYR Y91F 돌연변이가 대조군보다 높은 도파크롬 생산량을 보였고, 빠른 시간 내에 활성을 보였으며, 초기 속도도 약 1.76배 향상된 결과를 보였다. 결과를 도 5 에 나타낸다.

[106] **실험예 5 : 돌연변이 티로시나아제의 pH에 따른 활성 평가**

[107] 정제된 SaTYR Y91F 돌연변이의 활성을 pH 에 따라 비교하고자 티로시나아제 활성평가를 진행하였다. 1 mM L-티로신, 200 nM SaTYR, 10 μM $CuSO_4$ 를 각각 서로 다른 pH 를 갖는 50 Mm 의 완충용액과 37 ℃ 조건에서 30 초마다 475 nm에서의 흡광도를 조사하였다(N = 4). pH 완충용액은 pH 3, 4, 5, 6 에서는 시트레이트 완충용액, pH 7 에서는 소듐 포스페이트 완충용액, pH 8, 9 에서는 Tris-HCl 완충용액을 사용하였다. 도파크롬(Dopachrome)의 흡광계수 (3600 $M^{-1}cm^{-1}$) 를 이용하여 도파크롬의 생산량을 계산하였다. pH 6, 7, 8, 9 에서 티로시나아제의 활성이 관찰되었다. 결과를 도 6 에 나타낸다.

[108] **실험예 6 : 융합 티로시나아제의 구축**

[109] 티로시나아제를 의료용 단백질로 사용할 때 허가 받아야 할 과정을 줄이고자, MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 융합하여 1개의 단백질로 만드는 단백질 공학을 적용하였다. MelC1-MelC2 순서로 단백질을 연결시켜주기 위해 서열번호 3 의 링커를 연결해주었다. MelC2-MelC1 순서로 단백질을 연결시켜, 융합 단백질의 활성을 링커의 유연성 (flexibility) 에 따라 비교하기 위해 다음과 같이 링커를 구성하였다.

[110] flexible 1 : SGGSGGSGGSAG (서열번호 4), flexible 2 : GGGGSGGGGS (서열번호 5), rigid : AEAAAKEAAAKA (서열번호 6)

[111] **실험예 7: 융합 티로시나아제(MelC1-MelC2)의 발현 및 활성 분석**

[112] MelC1-MelC2 순서로 융합된 티로시나아제의 발현을 확인하였다. 서열번호 1 에 Y91F 돌연변이를 도입한 MelC1 단백질과 서열번호 2 의 MelC2 단백질을 사용하였다.

[113] 총 분획 (T), 가용성 분획 (S), 그리고 정제 후 용출액 (Elution, E) 을 각각 받아서, SDS-PAGE 분석을 한 결과, 발현이 정상적으로 이루어지고 정제 또한 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 대조군 티로시나아제의 활성과 비교한 결과 약 33% 의 활성을 보이는 것을 확인하였다. 결과를 도 8 및 도 9 에 나타낸다.

[114] **실험예 8 : 융합 티로시나아제(MelC2-MelC1)의 발현 및 활성 분석**

[115] MelC2-MelC1 순서로 융합된 티로시나아제의 활성 분석을 위해 티로시나아제 발현을 진행하였다. 서열번호 1 에 Y91F 돌연변이를 도입한 MelC1 단백질과 서열번호 2 의 MelC2 단백질을 사용하였다. 발현 용액에서 색이 짙어지는 것으로 보아, 티로시나아제의 활성으로 인해 멜라닌이 형성된 것으로 예상되었다. 발현한 대장균을 파쇄하여 가용성 분획을 수득한 후, 200 μl 의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 에 L-티로신을 녹인 용액 (2 mM) 에 10 μl 의 가용성 분획을 첨가하여 하룻밤 동안 37 ℃에서 반응시켰다. 그 결과, 멜라닌 생성이 확인되었다. 결과를 도 10 및 도 11 에 나타낸다.

[116] 서열번호 1 의 MelC1 단백질과 서열번호 2 의 MelC2 단백질을 사용하여 제조한 융합 티로시나아제 (MelC2-MelC1) 를 정제하여 실험예 4 와 같은 방법으로 티로시나아제의 활성을 비교한 결과, 융합 티로시나아제는 대조군의 약 53%~64% 의 활성을 보였으며, 융합 티로시나아제 간의 비교에서는 flexible 2 의 링커를 가진 단백질이 다소 높은 활성을 나타냈다. 결과를 도 12 에 나타낸다.

[117] **실험예 9 : 융합 티로시나아제(MelC2-flexible2-MelC1)의 개량**

[118] flexible 2 를 링커로서 사용한 융합 티로시나아제의 활성을 증대시킬 목적으로 링커의 길이를 조절하였다. 서열번호 1 의 MelC1 단백질과 서열번호 2 의 MelC2 단백질을 사용하였다. 링커 1X (GGGGSGGGGS; 10aa, 서열번호 5) 로부터 이의 반복 서열을 가진 2X (20aa), 3X (30aa), 4X (40aa) 링커가 삽입된 4종의 융합 티로시나아제를 제조하였고, 이를 발현 후 정제하여 실험예 4 와 같은 방법으로 활성을 확인하였다. 융합 티로시나아제의 활성은 2X (20aa) 링커가 삽입된 단백질의 도파크롬 생산량이 가장 높게 나타났다. 결과를 도 13 및 도 14 에 나타낸다.

[119] **실험예 10 : 하이드로젤 가교제로서의 티로시나아제**

[120] 티로시나아제를 가교제로 활용할 수 있으므로 실험예 9 에서 제조한 개량된 티로시나아제를 이용하여 하이드로젤화되는 시간을 비교하였다. 서열번호 1 의 MelC1 단백질과 서열번호 2 의 MelC2 단백질을 사용하였다. 1% HA-티라민 200 μl 에 15 μM 의 효소를 넣고 25 ℃ 에서 30 분간 방치하였다. HA-티라민에 대한 활성은 융합 티로시나아제 3X (30aa) 가 가장 높음을 보였다. 결과를 도 15 에 나타낸다.

[121] 이는 티로신에 대한 활성도 (도 14) 와는 일치하지 않았으며, 티로시나아제 효소의 고분자 (HA-티라민) 에 대한 반응성은 상이할 수 있음을 나타낸다. 이로써,

MelC2-MelC1 순서로 융합을 진행한 개량 티로시나아제가 의약품 및 가교제로서의 활용 가능성이 있음을 보였다.

산업상 이용가능성

[122] 발명은 의료용 티로시나아제의 단백질 공학에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 각종 다른 의료용 단백질을 생산하기 위한 방법으로 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제로서, 상기 링커는 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커인, 융합 티로시나아제.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 MelC2 단백질이 링커를 통해 상기 MelC1 단백질의 C 말단에 연결되거나, 또는,
상기 MelC1 단백질이 링커를 통해 상기 MelC2 단백질의 C 말단에 연결된, 융합 티로시나아제.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
활성 pH 는 pH 6 내지 10 인, 융합 티로시나아제.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제인, 융합 티로시나아제.

[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 MelC1 단백질은 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질인, 융합 티로시나아제.

[청구항 6] 서열번호 1 의 아미노산 서열에서 Y91F 의 변이를 포함하는 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는, 변이된 티로시나아제.

[청구항 7] 제 6 항에 있어서,
활성 pH 는 pH 6 내지 10 인, 변이된 티로시나아제.

[청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 티로시나아제는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*) 속 유래의 티로시나아제인, 변이된 티로시나아제.

[청구항 9] 티로시나아제를 제조하는 방법으로서,
MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계, 및
상기 융합 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

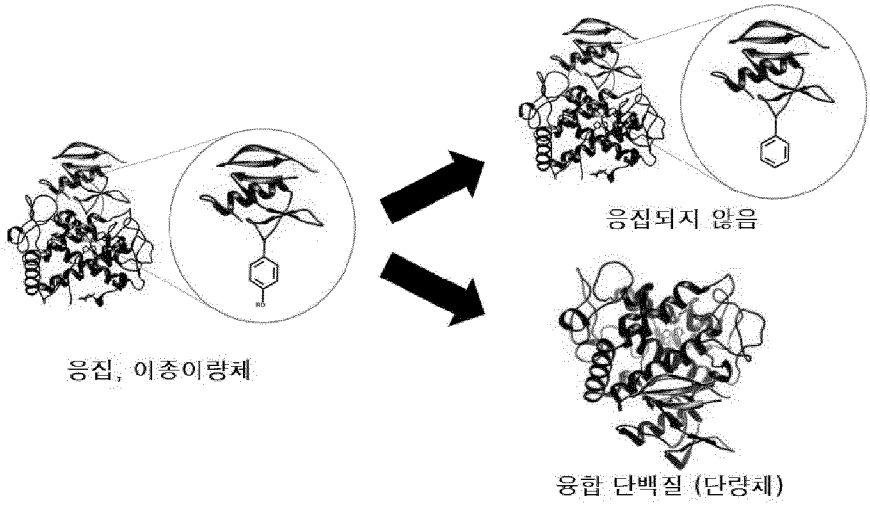
[청구항 10] 하이드로젤을 합성하는 방법으로서,
MelC1 단백질과 MelC2 단백질을 10 내지 60개 아미노산 길이의 링커로 연결하여, MelC1 단백질과 MelC2 단백질이 링커로 연결된 융합 티로시나아제를 제조하는 단계,
상기 융합 티로시나아제를 정제하는 단계, 및
모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 상기 융합 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

[청구항 11] 티로시나아제의 발현 시 MelC1 단백질의 응집이 억제되는 티로시나아제를 제조하는 방법으로서,

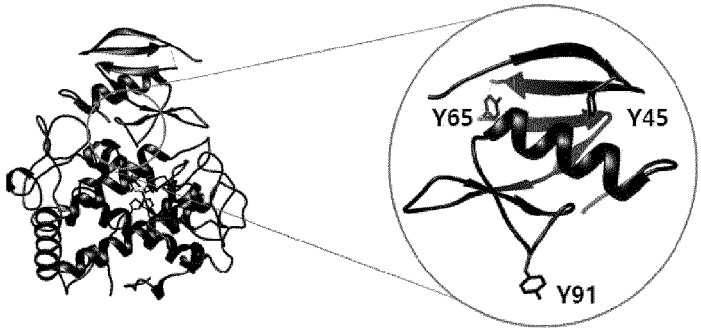
서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계,
상기 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계, 및
상기 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

[청구항 12] 하이드로젤을 합성하는 방법으로서,
서열번호 1 의 위치 91번째의 티로신을 페닐알라닌으로 치환하여 변이된 MelC1 단백질을 제조하는 단계,
상기 변이된 MelC1 단백질 및 MelC2 단백질을 포함하는 변이된 티로시나아제를 제조하는 단계,
상기 변이된 티로시나아제를 정제하는 단계, 및
모노페놀형 구조를 갖는 화합물에 상기 변이된 티로시나아제를 첨가하여, 하이드로젤을 합성하는 단계를 포함하는, 방법.

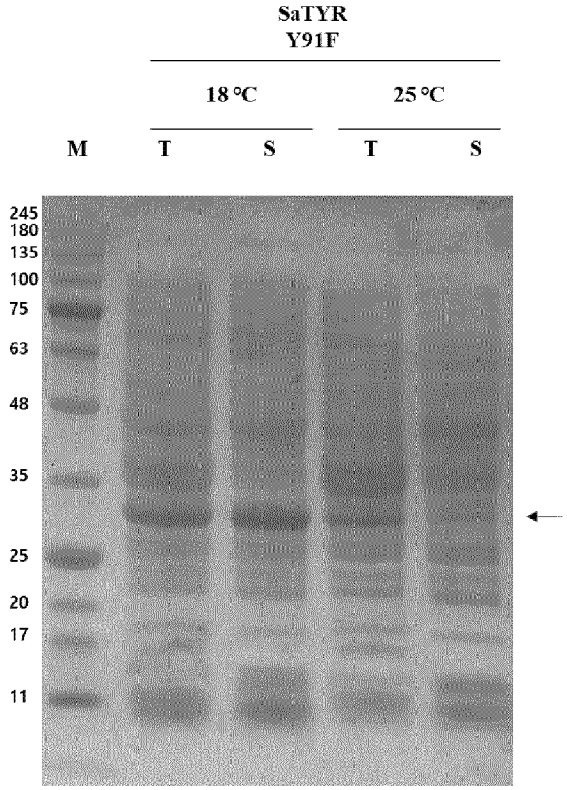
[도1]



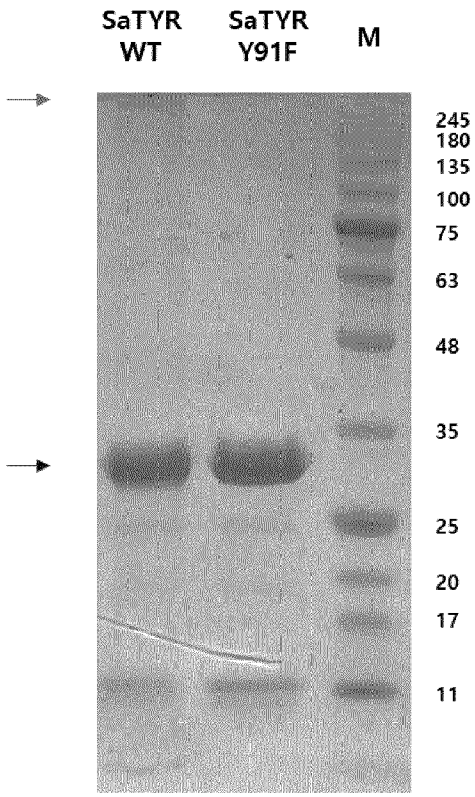
[도2]



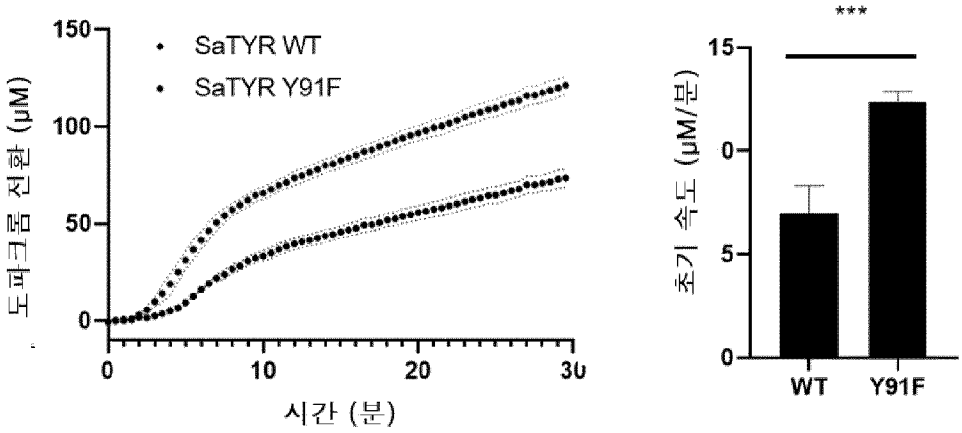
[도3]


SaTYR
Y91F
18 ℃
25 ℃
M
T
S
T
S
245
180
135
100
75
63
48
35
25
20
17
11

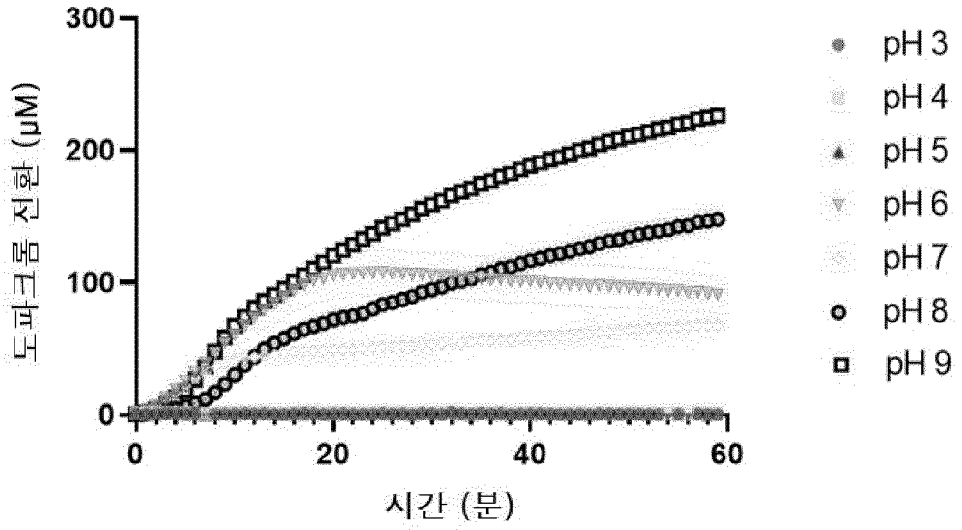
[도4]


SaTYR
WT
SaTYR
Y91F
M
245
180
135
100
75
63
48
35
25
20
17
11

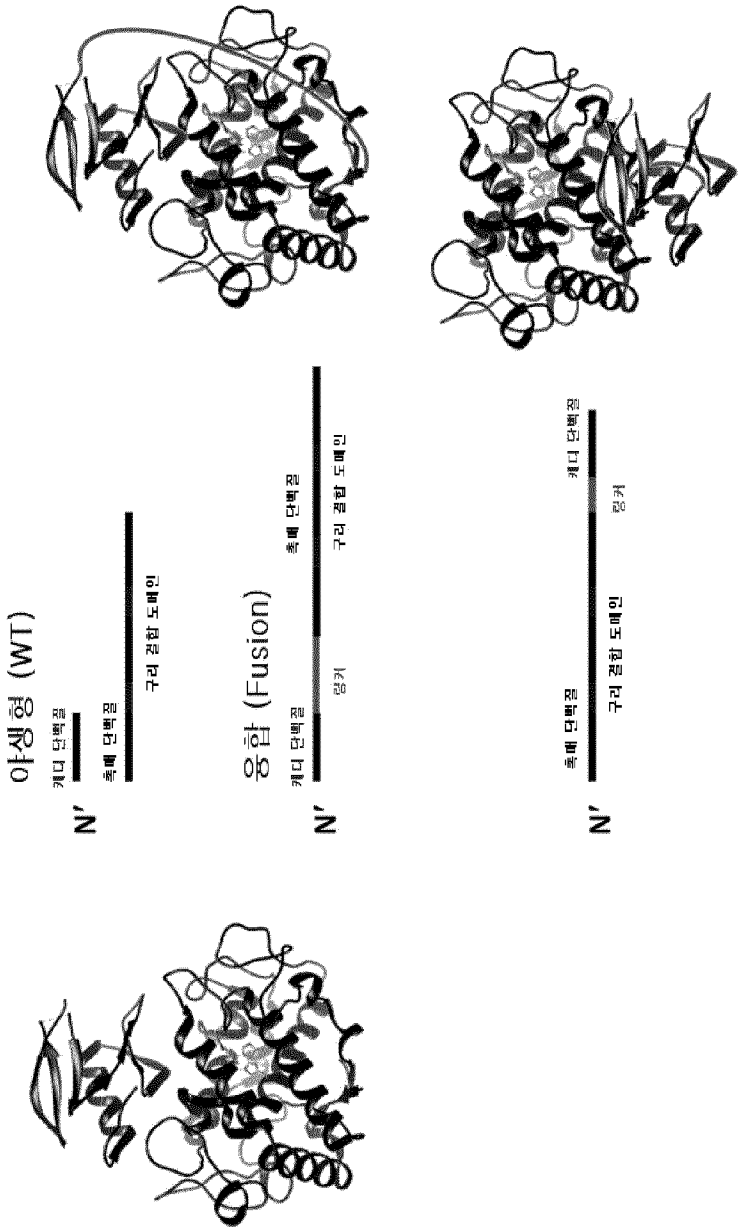
[도5]


SaTYR WT
SaTYR Y91F
도파크롬 전환 (μM)
150
100
50
0
0
10
20
30
시간 (분)
***
초기 속도 (μM/분)
15
0
5
0
WT
Y91F

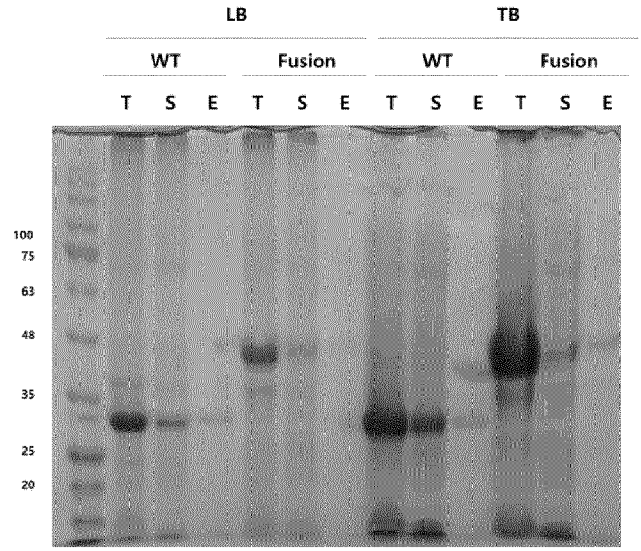
[도6]


도파크롬 전환 (μM)
300
200
100
0
0
20
40
60
시간 (분)
pH 3
pH 4
pH 5
pH 6
pH 7
pH 8
pH 9

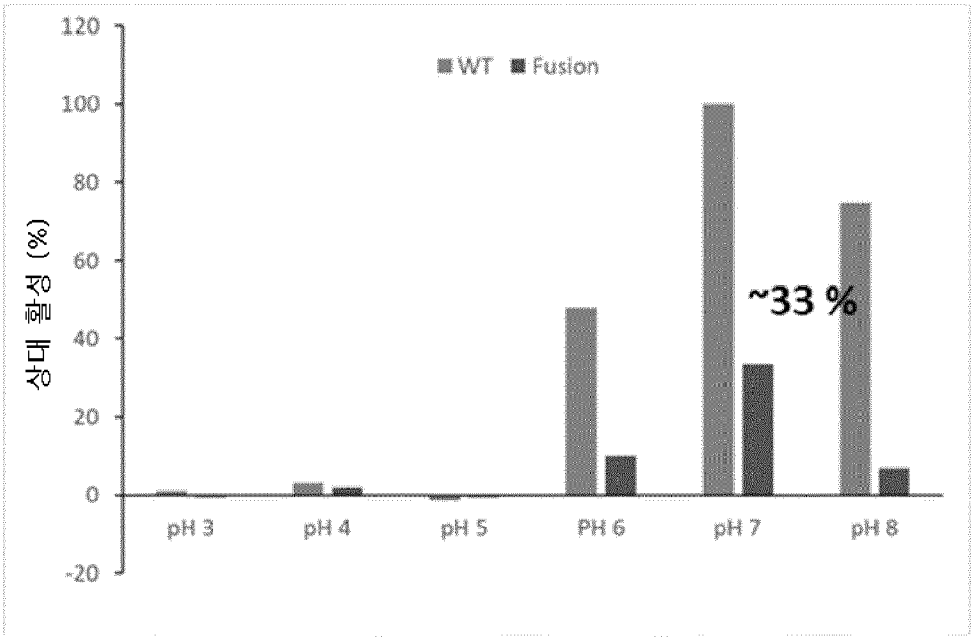
[도7]


야생형 (WT)
캐디 단백질
N'
촉배 단백질
구리 결합 도메인
융합 (Fusion)
캐디 단백질
촉배 단백질
N'
링커
구리 결합 도메인
촉배 단백질
캐디 단백질
N'
구리 결합 도메인
링커

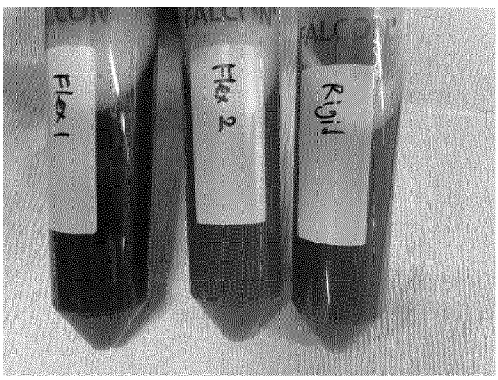
[도8]


LB
TB
WT
Fusion
WT
Fusion
T S E T S E T S E T S E
100
75
63
48
35
25
20

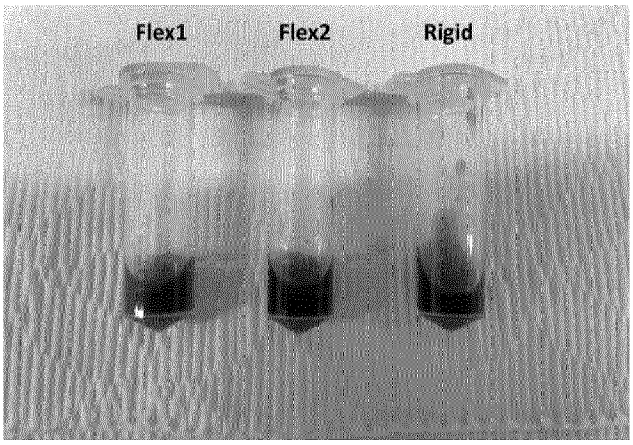
[도9]


120
100
80
60
40
20
0
-20
상대 활성 (%)
WT
Fusion
~33 %
pH 3
pH 4
pH 5
PH 6
pH 7
pH 8

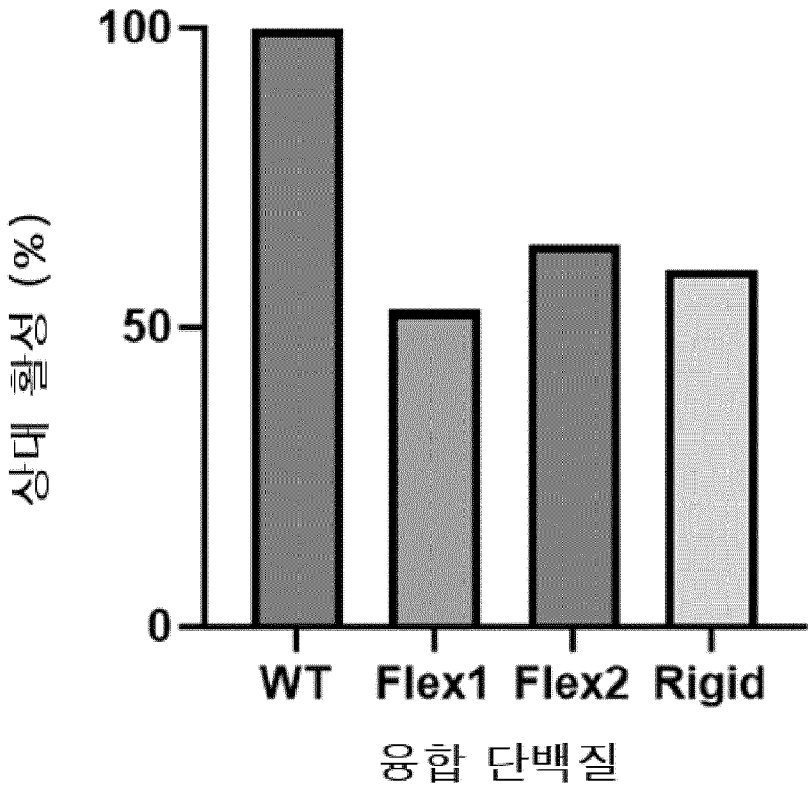
[도10]


Flex 1
Flex 2
Rigid

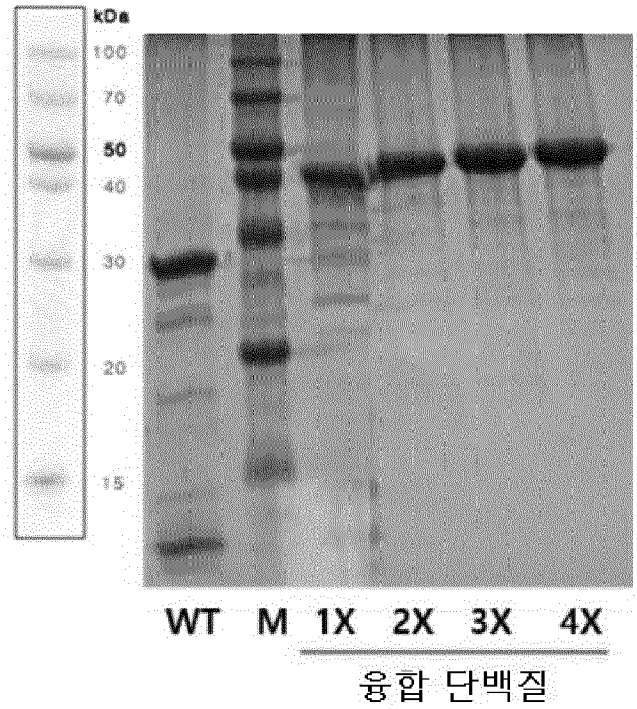
[도11]



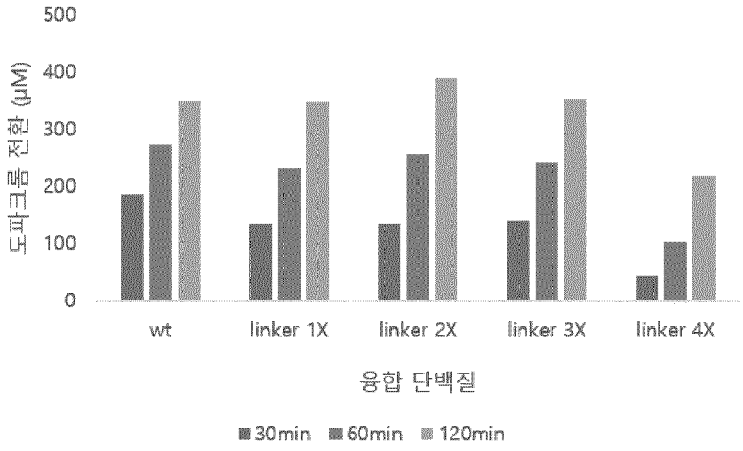
[도12]



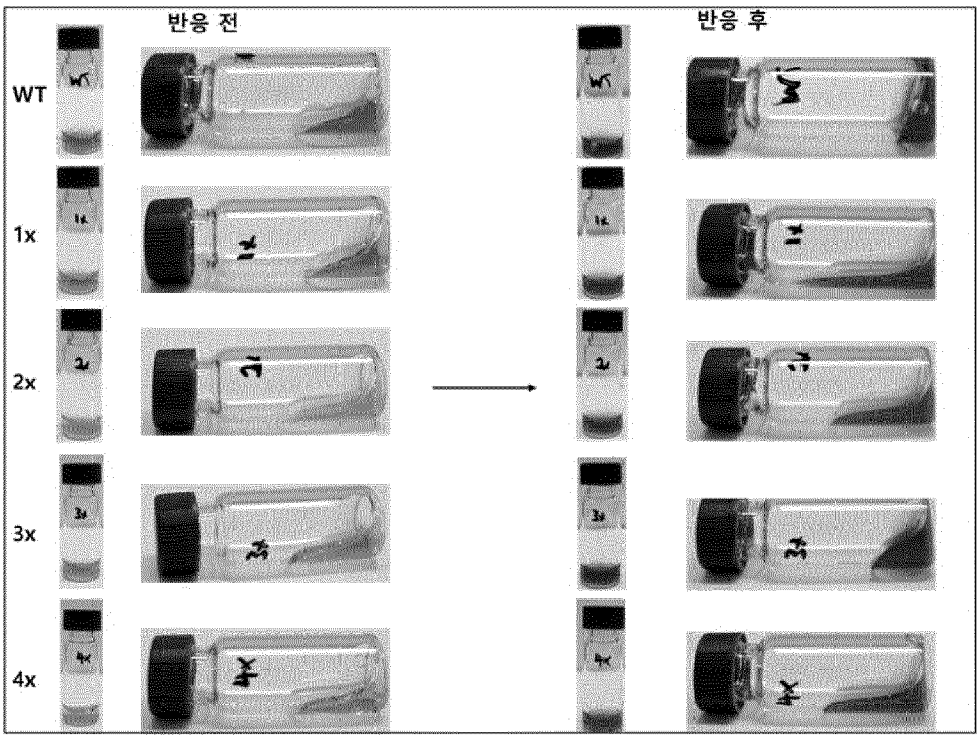
[도13]


kDa
100
70
50
40
30
20
15
WT
M
1X
2X
3X
4X
융합 단백질

[도14]


500
400
300
200
100
0
도파크롬 전환 (μM)
wt
linker 1X
linker 2X
linker 3X
linker 4X
융합 단백질
30min
60min
120min

[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/001920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02(2006.01)i; **C12N 15/70**(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 9/02(2006.01); G01N 33/566(2006.01); G01N 33/58(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: 티로시나아제(tyrosinase), MelC1, MelC2, 융합(fusion), 변이(mutant), Y91F, 하이드로젤(hydrogel)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	RYU, Jaewook et al. Tat-dependent heterologous secretion of recombinant tyrosinase by Pseudomonas fluorescens is aided by a translationally fused caddie protein. Applied and Environmental Microbiology. 01 October 2019, vol. 85, no. 20, e01350-19, pp. 1-15.	
DX	See pages 2, 5, 8-9 and 12; and figure 7.	1-4,9,10
DY		5
DA		6-8,11,12
	LEE, Sang-Hyuk. Fine control of tyrosinase dependent monophenol oxidation: production of catechol derivatives and development of functional hydrogels. 서울대학교 박사학위 학위논문 (Ph.D. thesis, Seoul National University). August 2017, pp. 1-343.	
Y	See pages 38, 41, 63, 68, 84, 97 and 235; and figure 1.14.	5-8,11,12
	NCBI Reference Sequence Accession No, WP_010982574.1. MULTISPECIES: tyrosinase cofactor [Streptomyces]. 06 July 2020.	
Y	See the amino acid sequences.	5-8,11-12

☑ 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	Date of mailing of the international search report
17 May 2024	**17 May 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DA	LEE, Nahum et al. Heterologous expression of tyrosinase (MelC2) from Streptomyces avermitilis MA4680 in E. coli and its application for ortho-hydroxylation of resveratrol to produce piceatannol. Applied Microbiology and Biotechnology. 03 June 2015 (online publication date), vol. 99, no. 19, pp. 7915-7924. See entire document.	1-12
A	SONG, Wonmoon et al. Recent advancements in enzyme-mediated crosslinkable hydrogels: in vivo-mimicking strategies. APL Bioengineering. 01 April 2021 (online publication date), vol. 5, article no. 021502, pp. 1-22. See entire document.	1-12
A	EP 1027608 B1 (ODYSSEY THERA, INC.) 20 January 2010 (2010-01-20) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/001920

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 13*ter*.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/KR2024/001920

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 1027608 B1	20 January 2010	EP 0966685 A1	29 December 1999
		EP 0966685 B1	10 August 2005
		EP 1590476 A2	02 November 2005
		EP 1590476 B1	26 September 2012
		EP 1605042 A2	14 December 2005
		EP 2299269 A1	23 March 2011
		EP 2317318 A1	04 May 2011
		EP 2450708 A2	09 May 2012
		EP 2466504 A1	20 June 2012
		JP 2002-508832 A	19 March 2002
		JP 2003-503067 A	28 January 2003
		JP 2004-504817 A	19 February 2004
		JP 2006-518853 A	17 August 2006
		JP 2006-524244 A	26 October 2006
		JP 2007-532132 A	15 November 2007
		JP 2011-139710 A	21 July 2011
		JP 2011-182796 A	22 September 2011
		JP 2013-015525 A	24 January 2013
		JP 4262778 B2	13 May 2009
		JP 4902527 B2	21 March 2012
		JP 5051958 B2	17 October 2012
		JP 5122129 B2	16 January 2013
		US 2001-0047526 A1	29 November 2001
		US 2002-0064769 A1	30 May 2002
		US 2003-0049688 A1	13 March 2003
		US 2004-0229240 A1	18 November 2004
		US 2005-0079547 A1	14 April 2005
		US 2006-0224331 A1	05 October 2006
		US 2007-0148682 A1	28 June 2007
		US 2008-0145315 A1	19 June 2008
		US 2010-0081580 A1	01 April 2010
		US 2011-0207162 A1	25 August 2011
		US 2012-0149597 A1	14 June 2012
		US 2013-0022999 A1	24 January 2013
		US 6270964 B1	07 August 2001
		US 6897017 B1	24 May 2005
		US 7166424 B2	23 January 2007
		US 7306914 B2	11 December 2007
		US 8101364 B2	24 January 2012
		US 8192944 B2	05 June 2012
		WO 01-00866 A1	04 January 2001
		WO 01-88168 A2	22 November 2001
		WO 01-94617 A2	13 December 2001
		WO 02-29417 A2	11 April 2002
		WO 2004-070351 A2	19 August 2004
		WO 2005-100588 A2	27 October 2005
		WO 98-34120 A1	06 August 1998

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/001920

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/02(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/02(2006.01); G01N 33/566(2006.01); G01N 33/58(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: 티로시나아제(tyrosinase), MelC1, MelC2, 융합(fusion), 변이(mutant), Y91F, 하이드로젤(hydrogel)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DX	RYU, JAEWOOK 등, 'Tat-dependent heterologous secretion of recombinant tyrosinase by Pseudomonas fluorescens is aided by a translationally fused caddie protein', Applied and Environmental Microbiology, 2019.10.01, 85권, 20호, e01350-19, 페이지 1-15 페이지 2, 5, 8-9, 12; 도면 7 참조.	1-4,9,10
DY		5
DA		6-8,11,12
Y	이상혁, 'Fine control of tyrosinase dependent monophenol oxidation: production of catechol derivatives and development of functional hydrogels', 서울대학교 박사학위 학위논문, 2017.08, 페이지 1-343 페이지 38, 41, 63, 68, 84, 97, 235; 도면 1.14 참조.	5-8,11,12
Y	NCBI Reference Sequence Accession No, WP_010982574.1, "MULTISPECIES: tyrosinase cofactor [Streptomyces]", 2020.07.06. 아미노산 서열 참조.	5-8,11-12
DA	LEE, NAHUM 등, 'Heterologous expression of tyrosinase (MelC2) from Streptomyces avermitilis MA4680 in E. coli and its application for ortho-hydroxylation of resveratrol to produce piceatannol', Applied Microbiology and Biotechnology, 2015.06.03(온라인 공개일), 99권, 19호, 페이지 7915-7924 전체 문헌 참조.	1-12

☑ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년05월17일(17.05.2024)	**2024년05월17일(17.05.2024)**

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**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/001920

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SONG, WONMOON 등, 'Recent advancements in enzyme-mediated crosslinkable hydrogels: in vivo-mimicking strategies', APL Bioengineering, 2021.04.01(온라인 공개일), 5권, article no. 021502, 페이지 1-22 전체 문헌 참조.	1-12
A	EP 1027608 B1 (ODYSSEY THERA, INC.) 2010.01.20 전체 문헌 참조.	1-12

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/001920

제1기재란 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:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/001920

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
EP 1027608 B1	2010/01/20	EP 0966685 A1	1999/12/29
		EP 0966685 B1	2005/08/10
		EP 1590476 A2	2005/11/02
		EP 1590476 B1	2012/09/26
		EP 1605042 A2	2005/12/14
		EP 2299269 A1	2011/03/23
		EP 2317318 A1	2011/05/04
		EP 2450708 A2	2012/05/09
		EP 2466504 A1	2012/06/20
		JP 2002-508832 A	2002/03/19
		JP 2003-503067 A	2003/01/28
		JP 2004-504817 A	2004/02/19
		JP 2006-518853 A	2006/08/17
		JP 2006-524244 A	2006/10/26
		JP 2007-532132 A	2007/11/15
		JP 2011-139710 A	2011/07/21
		JP 2011-182796 A	2011/09/22
		JP 2013-015525 A	2013/01/24
		JP 4262778 B2	2009/05/13
		JP 4902527 B2	2012/03/21
		JP 5051958 B2	2012/10/17
		JP 5122129 B2	2013/01/16
		US 2001-0047526 A1	2001/11/29
		US 2002-0064769 A1	2002/05/30
		US 2003-0049688 A1	2003/03/13
		US 2004-0229240 A1	2004/11/18
		US 2005-0079547 A1	2005/04/14
		US 2006-0224331 A1	2006/10/05
		US 2007-0148682 A1	2007/06/28
		US 2008-0145315 A1	2008/06/19
		US 2010-0081580 A1	2010/04/01
		US 2011-0207162 A1	2011/08/25
		US 2012-0149597 A1	2012/06/14
		US 2013-0022999 A1	2013/01/24
		US 6270964 B1	2001/08/07
		US 6897017 B1	2005/05/24
		US 7166424 B2	2007/01/23
		US 7306914 B2	2007/12/11
		US 8101364 B2	2012/01/24
		US 8192944 B2	2012/06/05
		WO 01-00866 A1	2001/01/04
		WO 01-88168 A2	2001/11/22
		WO 01-94617 A2	2001/12/13
		WO 02-29417 A2	2002/04/11
		WO 2004-070351 A2	2004/08/19
		WO 2005-100588 A2	2005/10/27
		WO 98-34120 A1	1998/08/06