

명세서

발명의 명칭: 생체 내 지속시간이 연장된 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체

기술분야

- [1] 본 발명은 단백질을 포함하는 생체분자를 멀티머 형태의 중합체로 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 숙주세포로부터 재조합 발현시킨 생체분자를 유비퀴틴화 시스템을 이용하여 증가된 생체내 지속시간을 갖는 다기능성 다중특이적 생체분자 중합체로 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단백질 (protein), 펩타이드 (peptide), 폴리펩타이드 (polypeptide), 항체 (antibody), DNA 및 RNA를 포함하는 생체분자 (biomolecules) 및/또는 소분자화합물 (small molecule chemical compounds)을 멀티머 형태 (multimeric form)로 제작하는 것은 다양한 장점을 갖는다. 예를 들어, 2이상의 동종 또는 이종의 단백질을 융합 (fusion) 또는 가교제 (cross linker or cross-linking agent)를 사용하여 연결함으로써, 단백질의 용해성, 겔화, 열안정성 및 pH 안정성 등 물리화학적 특성을 개선할 수 있다. 예를 들어, 가교제를 통해 다중연결되어 형성된 라케이즈 (laccase), 클레아 (CLEA, cross-linked enzyme aggregate)는 전분 산화 시 더욱 향상된 안정성과 성능을 보였으며, 또 다른 효소인 니트릴 히드라타아제 (nitrile hydratase)의 클레아는 아크릴로니트릴 (acrylonitrile)의 아크릴아마이드 (acrylamide)로의 전환에 탁월한 활성 증가를 보이며 36번 재활용되는 동안 활성을 잃지 않았다.
- [4] 또한, 많은 단백질들은 세포 내에서 복합체 (complex)를 형성하여 복잡한 기능을 수행하며, 이는 단백질의 근접효과 (proximity effect)에 의한 것으로 알려졌다. 예를 들어, 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 분해에 필요한 효소인 셀룰라아제 (cellulase), 베타 글루코시다아제 (β -glucosidase), 헤미셀룰라아제 (Hemicellulase) 등을 스캐폴드 (scaffold)를 사용하여 복합 혼합물 형태로 제조한 셀룰라아제 (Novozymes Cellic® CTec3)는 리그노셀룰로오스 (lignocellulose) 분해에 있어 3.5배 이상 증가된 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 또한, 이와 같은 멀티머 형태의 단백질은 채널링 효과 (channeling effect)를 나타낸다. 즉, 커플링 반응 (coupled reaction)에 관여하는 효소들이 인접하여 존재하면 중간체의 전달이 효율적으로 이루어져 전체 반응의 효율이 크게 증가한다. 또한, 비드 (bead) 또는 기판 (substrate)에 고정화된 단백질을 이용하여 임의의 물질을 분석하거나, 검출대상 물질을 분리 및/또는 정제함에 있어서도, 동종 또는 이종의 단백질을 멀티머 형태로 사용하는 것은 이것의 효율성 증가를 위해 바람직한 것으로 제안되고 있다.

- [5] 이와 같이, 멀티머 형태의 단백질이 산업적 및 의약적 용도에서 다양한 장점을 제공함에도 불구하고, 이러한 구조의 단백질을 제작하는 하는 것은 어려운 것으로 알려졌다. 예를 들어, 멀티머 단백질을 유전자 단계에서 인-프레임 (in-frame)으로 디자인하여 새로운 퓨전효소로서 개발, 생산하는 방법이 있다. 하지만 새로운 단백질을 디자인하여 생산해야 하기 때문에 개발시간이 오래 걸리고 현실적으로 2개 이상의 효소를 퓨전하는 것은 어렵다. 또한 화학적 가교제 (chemical cross-linker)를 사용한 단백질 멀티머 구조체 (CLEA) 제작 방법의 경우에는 화학적 결합이 특정부위에서 일어나지 않고 단백질 표면 어디에서든지 일어날 수 있기 때문에 활성을 저해할 수 있다. 멀티머 구조를 형성하는 단백질을 합성 또는 미생물 발현으로 제조할 수 있어야 하고, 이들 단백질의 활성부위 (active site)가 방해받지 않아야 한다.
- [6] 목적하는 단백질을 분리 및/또는 정제하기 위한 방법으로서 유비퀴틴을 사용하는 방법이 제안된 바 있다. 먼저 유비퀴틴과 결합된 단백질을 엔코딩 (encoding) 하는 유전자를 원핵세포 (procaryotic cells)에서 발현시켜 유비퀴틴과 연결된 융합단백질을 제조하고, 이를 유비퀴틴 절단효소로 처리하여 목적하는 단백질만을 유비퀴틴 융합단백질로부터 효과적으로 분리 및 정제하고자 하는 방법이다. 미국특허출원 제10/504,785호는 재조합 유전자의 발현 및 발현된 단백질의 정제에 관한 것이며, 유비퀴틴 유사 단백질 (Ubl)의 C-말단 도메인을 엔코딩하는 뉴클레오티드가 목적하는 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드에 작동적으로 (operatively) 결합된 융합단백질을 제조하고, 이를 숙주세포에서 발현시키는 것을 기술한다. 한국특허출원 제10-2005-0050824호는 재조합 단백질을 발현함에 있어서 유비퀴틴을 융합파트너로 이용하는 것을 기술한다. 또한, 한국특허출원 제10-2015-0120852호는 단백질 정제에 유비퀴틴 컬럼을 이용하는 것에 관한 것이며, 폴리유비퀴틴 체인을 컬럼에 로딩하고, E2를 포함하는 *in vitro* 유비퀴틴화를 이용하여 단백질을 정제하는 것을 기술한다. 또한, 미국특허출원 제12/249,334호는 재조합 단백질을 발현시켜 재조합에 있어서의 문제점인 수용성과 폴딩 문제를 해결하기 위한 것이며, 재조합 단백질의 발현 및 분리, 정제를 용이하게 하고 단백질의 활성을 높이기 위해, Ulp1 프로테아제 (Ubl-specific protease 1)에 의해 인식되는 절단 부위를 지닌 SUMO를 이용하는 것을 기술한다. 그러나 이들 방법은 단백질 발현에 유비퀴틴을 이용하는 것을 기술하고 있을 뿐, 멀티머 형태의 단백질을 제조하는 것을 기술하거나 시사하고 있지 않으며, 분리 정제하고자 하는 단백질이 유비퀴틴과 무작위로 결합하므로, 여전히 분리 또는 분석효율에 한계를 갖는다.
- [7] 한편, 생체분자, 예컨대, 단백질 또는 펩타이드, 또는 재조합 생산된 단백질 또는 펩타이드는 짧은 혈청 반감기를 나타내는 불안정한 분자들이다. 특히, 이들 단백질 또는 펩타이드는 진단 또는 치료 목적으로 수용액 내에서 제조될 때 매우 불안정하다. 또한, 이와 같은 단백질 또는 펩티드 약물들은 생체내에서 짧은 혈청 반감기 때문에 불리하며, 높은 빈도 또는 더 높은 용량으로 투여되어야

한다. 그러나 약물의 빈번한 투여는 여러가지 다양한 부작용을 야기하고 환자에게 불편함을 초래한다. 예를 들어, 약물의 빈번한 투여가 요구되는 환자, 예를 들어, 당뇨병 환자 또는 다발성 경화증을 앓고 있는 환자에 있어서 발생하는 문제점들이 많이 알려져 있다. 이와 같은 생체분자의 *in vivo* 안정성을 높이거나 반감기를 증가시키기 위한 다양한 방법이 연구되어 왔다. 일 예로서, 단백질 또는 펩타이드 등의 생체분자에 반감기를 증가시킬 수 있는 성분을 공유적으로 부착시키는 것이다. 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG와 같은 폴리머를 폴리펩티드들에 부착시키면 이들 펩티드들의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있는 것은 널리 알려져 있다.

- [8] 이에 본 발명자들은 단백질의 활성이 저해되지 않고 높은 집적도를 가지며 증가된 생체내 지속시간 또는 반감기를 갖는 다기능성 다중특이적 생체분자 중합체를 제조하는 방법을 개발하고자 부단히 노력하였다. 그 결과, 유비퀴틴과 결합된 생체분자를 숙주세포로부터 제조함 발현시키고, 이를 유비퀴틴화 관련 효소와 *in vitro*에서 반응시켜, 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 결합된 다기능성 멀티머 생체분자 중합체를 형성시킴으로써 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] [선행기술문헌]

[11] [특허문헌]

[12] (특허문헌 1) 한국특허출원 제10-2005-0050824호

[13] (특허문헌 2) 한국특허출원 제10-2015-0120852호

[14] (특허문헌 3) 미국특허출원 제12/249,334호

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 이와 같이, 본 발명의 목적은 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 목적 생체분자가 결합되어 증가된 생체내 지속시간을 갖는 다기능성 다중특이적 생체분자 (multivalent multimeric biomolecules)를 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 다른 목적은 폴리유비퀴틴 스캐폴드에 목적 생체분자가 결합되어 증가된 생체내 지속시간을 갖는 다기능성 다중특이적 생체분자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 다른 목적은 상기 다기능성 다중특이적 생체분자를 포함하는 약학조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다기능성 다중특이적 생체분자를 포함하는 약학조성물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[20]

기술적 해결방법

- [21] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 2개 이상의 유비퀴틴이 공유결합되어

형성된 폴리유티퀴틴 스캐폴드, 및 서로 다른 결합 부위 (binding sites)에 대해 특이적인 결합 모이어티 (binding moieties)를 포함하는 2개 내지 10개의 생체분자로 구성된, 다기능성 다중특이적 생체분자 중합체로서, 상기 생체분자는 다른 생체분자, 저분자 화합물 (small molecule chemical compounds) 또는 나노입자와 특이적으로 결합하는 활성부위 (active sites)를 포함하고, 상기 유티퀴틴의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 직접 결합되거나 링커에 의해 결합되며; 상기 생체분자의 생체 내 안정성 및/또는 지속시간을 연장하는 캐리어 (carrier)가 상기 유티퀴틴의 N-말단 또는 C-말단에 직접 결합되거나 링커에 의해 결합된 것인, 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체 (multivalent multispecific multimeric biomolecule complex)을 제공한다.

- [22] 이와 관련된 일 실시예에서, 상기 링커는 GGGGS 또는 EAAAK가 1개 내지 30개 반복하여 조합된 것일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 이와 관련된 다른 일 실시예에서, 상기 유티퀴틴의 N-말단에 결합된 생체분자는 상기 멀티머 생체분자 중합체의 원위 말단 (distal end)일 수 있으며, 상기 유티퀴틴의 C-말단 또는 N-말단, 또는 둘 모두에 결합된 생체분자는 멀티머 생체분자 중합체의 근위 말단 (proximal end) 일 수 있다.
- [23] 본 발명에서, "중합체"는 함께 연결된 일련의 생체분자의 단량체 군을 의미한다. 중합체는 선형 또는 분지형 (분기형태)일 수 있다. 중합체가 분지형 일 경우, 각각의 중합체 사슬은 "중합체 아암 (arm)"으로 언급될 수 있다. 개시제 모이어티에 연결된 중합체 아암의 말단은 근위 말단 (proximal end)이고, 중합체 아암의 성장하는-사슬 말단은 원위 말단 (distal end)이다.
- [24] 본 발명에서 "링커"는 두 개의 기를 함께 연결하는 화학 모이어티를 의미한다. 링커는 분해성 또는 비-분해성일 수 있다. 분해성 링커는 그 중에서도 가수분해성, 효소적 분해성, pH 민감성, 광불안정성, 또는 디설피드 링커일 수 있다. 다른 링커는 동종이기능성 및 이종이기능성 링커를 포함한다.
- [25] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 캐리어는 생체분자의 생체내 지속시간을 증가시키는 기능을 하는 것으로서, 알부민, 항체단편, Fc domain, transferrin, XTEN (genetic fusion of non-exact repeat peptide sequence), CTP (carboxy-terminal peptide), PAS (proline-alanine-serine polymer), ELK (elastin-like peptide), HAP (homo-amino acid polymer), GLK (gelatin-like protein), PEG (poly ethylene glycol), 및 지방산 (fatty acid)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 다른 일 실시예에서, 상기 폴리유티퀴틴 스캐폴드는 유티퀴틴의 하나 이상의 라이신이 아르기닌 또는 알라닌을 포함한 다른 아미노산으로 치환된 것인 공여체 유티퀴틴과 N-말단으로부터 6번째, 11번째, 27번째, 29번째, 33번째, 48번째 또는 63번째 라이신이 아르기닌 또는 알라닌을 포함한 다른 아미노산으로 치환된 것인 수용체 유티퀴틴이 공유결합을 통해 연결되어 형성된 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 상기 유티퀴틴의

N말단에서부터 73번째 류신이 프롤린을 포함한 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.

- [27] 본 발명에서 "생체분자"는 생체 내에서 생물학적 활성을 갖는 분자들을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 생체분자는 인슐린, 인슐린 유사체, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드류, GLP-1 및 글루카곤 이중 작용제, GLP-1 및 GIP 이중 작용제, GLP-1 및 글루카곤 및 GIP 삼중 작용제, 엑센딘-4 (exendin-4), 엑센딘-4 (exendin-4) 유사체, 인슐린 분비 펩타이드 및 그 유사체, 인간 성장 호르몬 (human growth hormone), 성장호르몬 방출 호르몬 (GHRH), 성장 호르몬 방출 펩타이드, 과립구집락자극인자 (G-CSF), 항비만 펩타이드, 지프로테인 관련 수용체 (G-protein-coupled receptor), 랩틴, GIP (Gastric inhibitory polypeptide), 인터루킨류, 인터루킨 수용체류, 인터루킨 결합 단백질류, 인터페론류, 인터페론 수용체류, 사이토카인 결합 단백질류, 마크로파지 활성화인자, 마크로파지 펩타이드, B 세포인자, T세포인자, 알러지 억제인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사인자 (TNF), 종양 억제인자, 전이 성장인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, α -락트알부민, 아포리포단백질-E, 적혈구 생성인자 (EPO), 고당쇄화 적혈구생성인자, 안지오프이에틴류, 헤모글로빈, 크롬빈, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 트롬보모듈린, 혈액인자 VII, VIIa, VIII, IX, 및 XIII, 플라즈미노젠 활성화인자, 피브린-결합 펩타이드, 유로키나제, 스트렙토키나제, 히루딘, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장인자 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 안지오프이에틴, 안지오프이에틴, 골 형성 성장인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 아트리오펩틴, 연골 유도인자, 엘카토닌, 결합조직 활성화인자, 조직인자 경로 억제제, 여포자극 호르몬 (FSH), 황체 형성 호르몬 (LH), 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH), 신경 성장인자류, 부갑상선 호르몬 (PTH), 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 부신피질 호르몬, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출인자, 갑상선 자극호르몬 (TSH), 오토탁신, 락토페린, 미오스타틴, 수용체, 수용체 길항물질, 섬유아세포 성장인자 (Fibroblast growth factor), 아디포넥틴 (Adiponectin), 인터루킨 수용체 길항제 (interleukin receptor antagonist), 세포표면항원, 바이러스 유래 백신 항원, 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 항체 단편류로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [28] 본 발명에서 "결합부위"는 다른 물질 또는 성분과 결합이 되는 부위를 의미하고, "결합모이어티"는 다른 물질 또는 성분과 결합이 가능한 부분을 포함하는 성분을 의미한다. 또한, 본 발명에서, "활성부위"는 리간드 또는 수용체와 반응하여 활성을 유발하는 부위를 의미한다.
- [29] 또한, UCT (Ubiquitin C-terminal Tag)는 유비퀴틴의 C-terminal 부위의 특정서열을 의미하며, UCT는 다른 유비퀴틴의 특정 라이신과 공유결합을 통해 컨쥬게이션이 이루어진다.

- [30] 또한, 본 발명은 (i) 유비퀴틴 C-말단 태그 (tag)가 융합 또는 링커에 의해 결합된 생체분자 (bio-molecules)를 원핵세포 또는 진핵세포를 포함하는 숙주세포로부터 제조함 발현시키고, 및 (ii) 상기 숙주세포의 용해물 (cell lysates) 또는 정제산물에 유비퀴틴화를 위한 E1, E2 및 E3 효소, 또는 E1 및 E2 효소를 가하고 반응시키는 것을 포함하고, 폴리유비퀴틴 스캐폴드, 서로 다른 결합 부위 (binding sites)에 대해 특이적인 결합 모이어티 (binding moieties)를 포함하는 2개 이상의 생체분자, 및 생체내 지속시간을 연장하는 캐리어(carrier)가 상기 유비퀴틴의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 링커로 결합된, 다기능성 다중특이적 생체분자 중합체를 제조하는 방법으로서, 상기 폴리유비퀴틴 스캐폴드는 2개 이상의 유비퀴틴이 공유결합을 통해 연결되어 형성되고, 상기 생체분자는 2개 내지 10개의 생체분자로 구성되고, 다른 생체분자, 저분자 화합물 (small molecule chemical compounds) 또는 나노입자와 특이적으로 결합하는 활성부위 (active sites)를 가지며, 상기 유비퀴틴의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 링커로 결합된 것인, 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체 (multivalent multispecific multimeric biomolecule complex)를 제조하는 방법을 제공한다.
- [31] 이와 관련된 일 실시예에서, 상기 E2 효소는 유비퀴틴의 N-말단으로부터 6번째, 11번째, 27번째, 29번째, 33번째, 48번째 또는 63번째의 라이신과 결합하거나, E2-25K 유비퀴틴 컨주게이션 (ubiquitin conjugating) 효소 또는 유비퀴틴 컨주게이션 효소 복합체인 Ucb13-MMS2 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32] 이와 관련된 다른 일 실시예에서, 상기 유비퀴틴 C-말단 태그는, 2개 이상의 유비퀴틴이 헤드-투-테일 (head-to-tail) 또는 분기 형태 (branched type or iso-peptide branch type) 형태로 반복 연결된 것일 수 있으며, 여기서 상기 헤드-투-테일 또는 분기 형태로 연결되는 유비퀴틴은, N 말단에서부터 75번째 및 76번째 글라이신이 발린을 포함한 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다.
- [33]

발명의 효과

- [34] 본 발명에 따르면, 생체분자 중합체 또는 복합체들 간의 연결이 폴리유비퀴틴 스캐폴드를 통해 이루어지고, 폴리유비퀴틴은 이에 결합된 생체분자들 사이의 간격과 방향성을 유지해 주는 견고한 스캐폴드 (rigid scaffold) 또는 링커 (linker)로서 작용한다. 따라서, 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체가 활성부위의 방해를 받지 않고 제조될 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명에 따르면, 상기 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체는, 생체 내 지속시간을 증가시킬 수 있는 분자와 결합되어 제공됨으로써, 증가된 생체 내 안정성 및 효능 지속시간이 요구되는 약물의 제조에 이용될 수 있다.
- [36] 본 발명에서 생체분자는 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 항체, 항체 단편,

DNA 및 RNA로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 예를 들어, 이중 단백질을 사용하여 선형 다기능성 멀티머 중합체에 모듈화된 기능성을 부여할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 상기 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체는, 생체 내 지속시간을 증가시킬 수 있는 분자와 결합되어 제공됨으로써, 생체분자에 대해 생체 내에서 증가된 안정성 및 효능 지속시간을 제공할 수 있다.

[37]

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 본 발명의 선형 다기능성 멀티머 융합 단백질 (UniStac)을 제조하는 과정을 도시한 것이다.
- [39] 도 2 및 도 3은 본 발명의 UniStac 반응에 의해 형성된 멀티머 형태의 UCT 융합단백질을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 4는 본 발명의 선형 다기능성 멀티머 융합 단백질의 다양한 응용 형태를 도시한 것이다.
- [41] 도 5는 E1-E2만을 이용한 UniStac 제조 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 6은 본 발명의 선형 다기능성 멀티머 융합 단백질의 제조 및 이를 고정화하여 이용하는 것을 개략적으로 나타낸 것이다.
- [43] 도 7은 헤드-투-테일 (Head-to-tail) UCT 및 UniStac 방법을 개략적으로 나타낸 것이다.
- [44] 도 8은 본 발명에 따라 제조한 자일로스 환원효소 (Xylose Reductase) (XR)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [45] 도 9는 본 발명에 따라 제조한 옥살로아세테이트 디카르복실라아제 (Oxaloacetate decarboxylase) (OAC)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [46] 도 10은 본 발명에 따라 제조한 자일리톨 탈수소효소 (Xylitol dehydrogenase) (XDH)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [47] 도 11은 본 발명에 따라 제조한 Triose-phosphate isomerase (TIM)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [48] 도 12는 본 발명에 따라 제조한 Aldolase (ALD)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [49] 도 13은 본 발명에 따라 제조한 Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP)을 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [50] 도 14는 본 발명에 따라 제조한 피루베이트 옥시다아제 (Pyruvate oxidase) (POPG)를 GPC로 정제한 후 SDS-PAGE로 확인한 결과이다.
- [51] 도 15는 자일로스 환원효소 활성을 분석한 결과이다.
- [52] 도 16은 자일로스 환원효소 안정성을 분석한 결과이다.
- [53] 도 17은 옥살로아세테이트 디카르복실라아제의 활성을 분석한 결과이다.

- [54] 도 18은 옥살로아세테이트 디카르복실라아제의 안정성을 분석한 결과이다.
- [55] 도 19는 자일리톨 탈수소효소의 활성을 분석한 결과이다.
- [56] 도 20은 자일리톨 탈수소효소의 안정성을 분석한 결과이다.
- [57] 도 21은 피루베이트 옥시다아제의 활성을 분석한 결과이다.
- [58] 도 22는 3개의 효소, TIM, ALD 및 FBP가 결합된 구조의 UniStac Polymer를 나타낸다.
- [59] 도 23은 TIM, ALD 및 FBP 효소에 의한 시너지 효과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 24는 단백질 A (Protein A) 및 단백질 G (Protein G) 선형 다기능성 멀티머 복합체를 제조하고 그 결과를 확인한 것이다.
- [61] 도 25는 유비퀴틴 C-말단 태그의 76글라이신의 c-말단부에 아스파르트산 (aspartate)이 연장된 hGH을 제조하고 확인한 결과이다.
- [62] 도 26은 E3로부터 시작된 중합체를 제조하고 이를 확인한 것이다.
- [63] 도 27은 DUB의 유무에 따른 hGH 중합체의 제조 결과를 확인한 것이다.
- [64] 도 28은 단백질 A 단위체가 고정화된 비드 및 단백질 A 중합체가 고정화된 비드에 대한 인간 유래 IgG의 결합 활성을 나타낸 것이다.
- [65] 도 29는 유비퀴틴의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 각각 결합된 선형의 다기능성 멀티머 생체분자 중합체 구조, 및 이의 제조 결과에 관한 것이다.
- [66] 도 30은 이중 유비퀴틴에 캐리어가 결합된 생체분자 중합체와 인간 혈청 알부민의 비교시 혈중 반감기는 동등한 수준이고 생체흡수율(AUC)은 더 우수한 것을 나타내는 PK 프로파일 결과이다.
- [67] 도 31은 Fc based 수용체 단백질을 발현하는 유전자가 연결된 pcDNA3.1(+) 벡터를 나타낸다.
- [68] 도 32은 Fc based 수용체 단백질을 발현을 확인한 결과를 나타낸다.
- [69] 도 33은 IgG Fc 항체에 특이적으로 결합하는 Fc based 수용체 단백질을 발현을 확인한 결과를 나타낸다.
- [70] 도 34 및 도 35는 Fc based 수용체 단백질 정제 결과를 나타낸다.
- [71] 도 36은 SDS-PAGE 분석법을 통해 유비퀴틴-IL-1RA를 확인한 결과를 나타낸다.
- [72] 도 37은 유비퀴틴-IL-1RA의 정제 과정을 나타낸다.
- [73] 도 38 및 도 39는 His-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 정제 결과를 나타낸다.
- [74] 도 40은 SDS-PAGE 분석법을 통해 His-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA를 확인한 결과를 나타낸다.
- [75] 도 41 및 42는 His-SUMO 태그가 제거된 유비퀴틴-IL-1RA를 확인하는 결과를 나타낸다.
- [76] 도 43 및 도 44는 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 정제 결과를 나타낸다.
- [77] 도 45는 SDS-PAGE 분석법을 통해, 수용체와 공여체의 컨쥬게이션 정도를

확인한 결과를 나타낸다.

- [78] 도 46는 μ CE-SDS 분석법을 이용한 컨쥬게이션 수율 분석 결과를 나타낸다.
- [79] 도 47는 컨쥬게이션의 정제 과정을 나타낸다.
- [80] 도 48 및 도 49는 Ni-sepharose로 정제된 컨쥬게이션 확인 결과를 나타낸다.
- [81] 도 50 및 도 51는 정제된 컨쥬게이션 확인 결과를 나타낸다.
- [82] 도 52 및 도 53은 SDS-PAGE (Reducing과 Native 조건)에서 최종 UniStac 중합체를 확인한 결과이다.
- [83] 도 54는 μ CE-SDS 분석법을 이용한 monomer를 확인한 결과를 나타낸다.
- [84] 도 55는 SEC-HPLC을 이용한 monomer를 확인한 결과를 나타낸다.
- [85] 도 56은 공여체 단백질 (D-192), UniStac 단백질 (C-193), 및 Human-serum albumin을 캐리어로 하는 수용체 단백질을 사용한 융합 단백질 (C-192; 비교군)의 구조를 나타낸다.
- [86] 도 57은 융합 단백질 (C-192 및 D-192)의 피하 투여 후 시간에 따른 혈중 약물 농도 그래프를 나타낸다.
- [87] 도 58은 융합 단백질 (C-193 및 D-192)의 피하 투여 후 시간에 따른 혈중 약물 농도 그래프를 나타낸다.
- [88]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [89] 본 발명은 일 실시예에서, (i) 유비퀴틴 C-말단 태그 (tag)가 융합 또는 링커에 의해 결합된 생체분자 (bio-molecules)를 원핵세포 또는 진핵세포를 포함하는 숙주세포로부터 제조할 발현시키고, 및 (ii) 상기 숙주세포의 용해물 (cell lysates) 또는 정제산물에 유비퀴틴화를 위한 E1, E2 및 E3 효소, 또는 E1 및 E2 효소를 가하고 반응시키는 것을 포함하여, 폴리유비퀴틴 스캐폴드, 서로 다른 결합 부위 (binding sites)에 대해 특이적인 결합 모이어티 (binding moieties)를 포함하는 2개 이상의 생체분자, 및 생체내 지속시간을 연장하는 캐리어(carrier)가 상기 유비퀴틴의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 링커로 결합된, 다기능성 다중특이적 생체분자 중합체를 제조하는 방법으로서, 상기 폴리유비퀴틴 스캐폴드는 2개 이상의 유비퀴틴이 공유결합을 통해 연결되어 형성되고, 상기 생체분자는 다른 생체분자, 저분자 화합물 (small molecule chemical compounds) 또는 나노입자와 특이적으로 결합하는 활성부위 (active sites)를 가지며, 상기 유비퀴틴의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 링커로 결합된 것인, 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [90] 본 발명에서, 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체 또는 복합체의 형성을 개시하는 이니시에이터 (initiator)는 E3, E2, E1, 프리 유비퀴틴 (free ubiquitin), 또는 E3의 목적 기질 (substrate) 일 수 있다. 여기서, 상기 E2 효소는 유비퀴틴의 라이신 중 48번 또는 63번에 결합할 수 있으며, 상기 E2 효소는

E2-25K 유비퀴틴 컨주게이션 (ubiquitin conjugating) 효소이거나, 유비퀴틴 컨주게이션 효소 복합체 Ucb13-MMS2일 수 있다.

- [91] 본 발명에서 상기 생체분자는 바람직하게는 상기 유비퀴틴의 N-말단에 각각 결합한다. 또한, 상기 멀티머 생체분자 중합체는 2 내지 30개의 생체분자로 구성될 수 있다.
- [92] 본 발명의 UniStac 반응을 도 1에 개략적으로 나타낸다.
- [93] 또한, UniStac 반응에 의해 형성된 멀티머 형태의 UCT 융합단백질을 확인한 결과를 도 2 및 도 3에 나타낸다.
- [94] 또한, 본 발명의 다기능성 다중특이적 멀티머 생체분자 중합체는 다양한 형태로 제작될 수 있다. 구체적인 예시들을 도 4, 도 6 및 도 7에 나타낸다. 즉, 제1 도면은 도 1과 같이 유비퀴틴 C 말단 태깅된 효소(enzyme)와 UniStac 혼합물을 반응시킨 후, 여과 (filtration) 하여 UniStac 선형 효소 폴리머를 제조하는 과정을 개략적으로 도시한 것이다. 제2 도면은, 유비퀴틴 C 말단 태깅된 효소와 UniStac 혼합물을 반응시킨 후, 가교제 (crosslinker)와 함께 침전 (precipitation) 시켜 UniStac 효소응집체 (aggregate)를 제조하는 과정을 도시한 것이다. 제3 도면은 유비퀴틴 C 말단 태깅된 단백질을 기판 또는 비드 상에 고정화하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

- [95]
- [96] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[97]

[98] [제조예]

[99] 제조예 1: C-말단 융합 단백질의 클로닝, 발현 및 정제

- [100] 본 발명의 실시예에서 사용된 UCT (Ubiquitin C-terminal Tag) (서열번호: 1) 단백질을 융합체를 엔코딩하는 유전자는 Genscript Inc.사에 의뢰하여 제조하였다.

- [101] C-말단에 유비퀴틴 태그를 포함하지 않는 Ub out 유전자 구조물을 제조하기 위해 패스트 클로닝 시스템 (fast cloning system) (Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y (2011). Fast cloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. BMC Biotechnol 11, 92.)을 사용하였다. 이 방법은 제한효소 및 리가아제가 없는 조건에서 PCR 산물에 직접 Dpn1만 처리하면 Dpn1이 폴리머라제와 함께 아직 밝혀지지 않은 기전을 통해 제한효소 및 리가아제의 역할을 수행하여 유전자 연결 (삽입, 제거 또는 치환)이 가능한 기술이다. 이 방법에서, 퓨전 폴리머라제 (Phusion polymerase, Thermo Fisher Scientific)와 양 말단이 오버랩핑 되도록 디자인된 프라이머를 사용하여, 삭제될 영역을 제외하고 모든 벡터 상에서 PCR (95°C 3분, 95°C 15초 - 55°C 1분 - 72°C 1분/kb 18회 반복, 72°C 5분, 12°C 20분)을 수행하였다. 다음, PCR 결과물에 대한

Dpn1 처리를 1시간 동안 37°C에서 수행하고, *E. coli* DH5 α (Novagen)에 형질전환한 후 목적하는 플라스미드를 수득하였다. 모든 유전자 구성물을 상업적인 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

- [102] UCT 융합 단백질 과발현을 위해, 각 유전자 구성물을 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) (XR, TIM, ALD), *Rosetta* pLysS DE3 (Novagen) (XDH, OAC, POPG), *Origami2* DE3 (Novagen) (FBP) 균주에 형질전환하였다. 단백질 발현 플라스미드 (pET21a, Genscript)를 포함하는 세포를 37°C, LB 배지(Miller)에서 인큐베이션하였다. OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 이르면, 단백질 발현을 250 μ M의 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)(IPTG)를 사용하고 16°C에서 20시간 동안 유도하였다. 다음, 원심분리 (3,500 rpm으로 4°C에서 15분)한 후, 세포 펠릿을 용해 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) 중에 재현탁하고, 소니케이션 (50% amplitude, pulse on 3초-off 5초, 최종 15분)으로 용해시켰다. 이어서, 상기 용해물을 14,000 rpm으로 4°C에서 30분간 추가로 원심분리하였다. N-말단 His-tag를 포함하는 단백질의 수용성 분획을 니켈 친화 및 FPLC 완충액 (Ni-NTA Agarose, QIAGEN, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)으로 사전 평형화한 Superdex 75 pg 겔 필터레이션 컬럼 16/600 (GE Healthcare)을 사용하는 겔여과 크로마토그래피로 정제하였다. 모든 UCT 단백질을 효소활성 분석을 위해 100 μ M로 농축하였다. 모든 타겟 단백질을 SDS-PAGE로 평가하였다. 도 8 내지 도 14는 타겟 (목적) 단백질을 확인한 결과를 나타낸다. 본 발명에서 사용된 UCT 융합 단백질은 아래 표 1과 같다.

[103]

[104] [표1]

UCT 단백질 융합체	분자량 (kDa)	서열번호
Xylose Reductase (XR)	57.382	서열번호: 2
Xylitol dehydrogenase (XDH)	59.1	서열번호: 3
Oxaloacetate decarboxylase (OAC)	44.6	서열번호: 4
Triose-phosphate isomerase (TIM)	47.6	서열번호: 5
Aldolase (ALD)	55.563	서열번호: 6
Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP)	49.3	서열번호: 7
Pyruvate oxidase (POPG)	86.032	서열번호: 8

[105]

[106] **제조예 2: UniStac 선형 구조체 제조**

[107] 본 발명에서 선형 다기능성 멀티머 형태의 융합단백질을 제조하기 위한 반응을 UniStac 반응으로 명명하였다. UniStac 반응 (전체 부피 50 μ L)을 UniStac 완충액

(25 mM HEPES (Sigma-aldrich), pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 반응을 위한 UniStac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 본 발명의 UCT 단백질 융합체에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간 동안 셰이킹하여 수행하였다.

- [108] 반응에 사용된 단백질의 비율은 1 μ M E3 enzyme 당 10 μ M ~ 20 μ M UCT 단백질 융합체 (1:10 ~ 1:20 비율) 농도로 수행하였으며, 이는 UniStac 반응을 통해 1시간 내에 최소 10개 이상의 융합체 모노머가 선형 다기능성 멀티머를 형성되도록 하기 위한 목적으로 설정된 조건이다. 본 발명에서 사용한 E1, E2 및 E3는 각각 다음과 같다:

- [109] [표2]

구분	명칭	서열번호
E1	Yeast UBE1	서열번호: 9
E2	Ubch5a [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P51668)	서열번호: 10
	Ubch7 [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P68036)	서열번호: 11
	E2-25K [<i>Homo sapiens</i>] (UniProtKB - P61086)	서열번호: 12
	Ubc13 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] (UniProtKB - P52490)	서열번호: 13
	MMS2 (UEV - Ubiquitin-conjugating enzyme variant)	서열번호: 14
E3	RSP5 (UniProt ID. P39940)	서열번호: 15
	DOA10 (UniProt ID. P40318)	서열번호: 16
	MARCH5 (UniProt ID. Q9NX47)	서열번호: 17

- [110]

- [111] **제조예 3: E1-E2만을 이용한 UniStac 제조 (E2 platform)**

- [112] E2-25K (GenBank ID-U58522.1) (human E2), Ucb13 (yeast E2)-MMS2 (GenBank ID-U66724.1) (yeast ubiquitin-conjugating enzyme variant) (GenBank ID-U66724.1)를 이용하여 E2-UniStac를 제조하였다. Genscript사에 합성한 재조합 DNA 플라스미드 (plasmid)를 사용하였다. E2-UniStac 반응을 완충액 (50mM Tris pH8.0, 5mM MgCl₂) 조건 하에, E2-UniStac 혼합물 (1 μ M E1, 10 μ M E2, 4 mM ATP)을 자유 유비퀴틴 (free ubiquitin) 용액 (20 μ M)에 첨가하여 반응을 시작하였다. E2-UniStac 반응을 실온에서 1시간 동안 셰이킹하여 수행하였다. 도 5에 그 결과를 나타냈다.

- [113]

- [114] **[실시예]**

- [115] **실시예 1: 자일로스 환원효소 (XR, Xylose reductase) 활성 및 안정성 분석**

- [116]

- [117] **자일로스 환원효소 활성 분석**

- [118] UniStac 반응을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 XR 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간 동안 셰이킹하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. XR의 촉매 활성을 NADH 산화에 의해 유도되는 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 분석하였다.
- [119] 촉매 활성 분석을 위한 반응은, 1 mM MgCl₂ 및 0.02% Tween-20을 함유하는 100 mM NaCl 완충액 (pH 7.0) 내의 XR (10 μ M) 및 xylose (200 mM) 혼합물에 NADH (2 mM)를 첨가하여 개시하였다. XR 은 XR c-말단에 유비퀴틴 태그(tag)를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 UniStac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 그 결과를 도 15에 나타냈다.
- [120] 도 15에 나타낸 것과 같이 본 발명에 따른 XR이 보조기질 (co-substrate)로서 NADH를 사용하여 D-xylose를 자일리톨 (xylitol)로 환원시키는 것을 촉진하였다. 흡광도 (absorbance)는 용액 중 NADH의 양을 나타낸다. XR의 UniStac 폴리머 (아래쪽 곡선)는 모노머 형태 (위쪽 곡선)와 비교하여 보다 더 빠른 NADH 소모를 나타냈다. 두 개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 증가된 반응속도는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 결국, XR UniStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 XR 모노머와 비교하여 10배 증가한 것을 확인하였다.
- [121]
- [122] 자일로스 환원효소 pH 안정성 분석
- [123] NADH 및 Xylose를 첨가하여 반응을 시작하기 전에 XR 모노머 및 UniStac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 16에 나타낸 것과 같이, pH 5.5 및 6.5에서, XR UniStac 폴리머가 유비퀴틴-태그가 없는 모노머 XR 과 비교하여 현저히 향상된 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.
- [124]
- [125] **실시예 2: 옥살로아세테이트 디카르복실라아제 (Oxaloacetate decarboxylase) (OAC)의 활성 및 안정성 분석**
- [126]
- [127] OAC의 활성 분석
- [128] 포도당신생과정 (gluconeogenesis)에 관여하는 OAC는 AST-ALT와 함께 간 손상을 조사하는데 사용된다. UniStac 반응을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂)에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2, 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 OAC 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. OAC 활성 분석은 다음 조건 하에서 NADH 소모가 진행됨에

다른 흡광도 (340 nm) 감소에 기초하였다: 45 mM TEA buffer pH8.0, 0.45 mM MnCl_2 , 2 mM NADH, 11 U of LDH, 5 μM OAC, 2.5 mM.

- [129] OAC은 OACc-말단에 유비퀴틴-태그를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 UniStac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 그 결과를 도 17에 나타냈다.
- [130] 도 17에 나타낸 것과 같이, C-말단에 Ub가 없는 모노머 (OAC)의 활성과 폴리머 (UniStaced OAC)의 활성을 비교한 결과, 폴리머의 활성이 9배 증가하였다. 흡광도 (absorbance)는 용액 중 NADH의 양을 나타낸다. OAC의 UniStac 폴리머 (아래쪽 곡선)은 모노머 형태 (위쪽 곡선)와 비교하여 보다 더 빠른 NADH 소모를 나타냈다. 두 개 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서 증가된 반응속도는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 결국, OAC UniStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 OAC 모노머 (OAC)와 비교하여 9배 증가한 것을 확인하였다.

[131]

[132] **OAC의 안정성 분석**

- [133] NADH 및 옥살로아세테이트 (oxaloacetate)를 첨가하여 반응을 시작하기 전에 OAC 모노머 및 UniStac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 18에 나타낸 것과 같이, pH 4.5 ~ 6.5의 낮은 pH에서, OAC UniStac 폴리머가 유비퀴틴-태그가 없는 모노머 OAC (OAC)와 비교하여 현저히 향상된 pH 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

[134]

- [135] **실시예 3: 자일리톨 탈수소효소 (XDH, Xylitol Dehydrogenase) 활성 및 안정성 분석**

[136]

[137] **XDH 활성 분석**

- [138] XDH는 D-Xylose catabolism 경로에 속하는 효소이며, XR의 결과물인 자일리톨을 NAD^+ 를 사용하여 자일루로스(xylulose)로 전환시키는 것으로 알려졌다. XDH 활성 분석을 위해, 먼저 UniStac 반응을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl_2)에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2, 1 μM E3, 4 mM ATP)을 XDH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. XDH 활성을 340 nm에서 NAD^+ 환원을 모니터링하여 측정하였다. 반응은, 1 mM MgCl_2 및 0.02% Tween-20을 함유하는 100 mM NaCl 완충액 (pH 7.0) 중의 XDH (20 μM) 및 xylose (200 mM) 혼합물에 NADH (2 mM)를 첨가함에 의해 개시하였다. XDH은 XDH C-말단에 유비퀴틴-태그를 포함하지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 UniStac 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않았다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software,

Inc)를 사용하였다. 그 결과를 도 19에 나타냈다.

- [139] 도 19에 나타낸 것과 같이, pH 5.5에서 XDH UniStac 폴리머 (위쪽 곡선)는 이것의 모노머 형태 (아래쪽 곡선)와 비교하여, 보다 더 높은 NADH+ 소모율을 보였다. 두개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 활성의 차이는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 결국, XDH UniStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 XDH 모노머 (XDH)와 비교하여 10배 증가한 것을 확인하였다.

[140]

[141] **XDH 안정성 분석**

- [142] NAD⁺ 및 자일리톨을 가하여 반응을 시작하기 전에 XDH 모노머 및 UniStac 폴리머 둘 모두를 30분간 지시된 pH에서 처리하였다. 도 20에 나타낸 것과 같이, 측정된 모든 pH에서, XR UniStac 폴리머가 XDH와 비교하여 현저히 증가된 pH 안정성을 보였다. 결과는 3회 실험의 평균값을 나타낸다.

[143]

[144] **실시예 4: 피루베이트 옥시다아제 (Pyruvate Oxidase, POPG) 활성 분석**

- [145] POPG는 포도당신생과정에 관여하는 효소인 AST-ALT와 같은 효소를 검출하여 간 손상을 조사하는데 이용되는 것으로 알려져 있다. POPG 활성 분석을 위해, 먼저 UniStac 반응을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂)에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2, 1 μM E3, 4 mM ATP)을 POPG 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간동안 셰이킹하여 수행한 다음, 촉매 활성을 분석하였다. 촉매 활성을 분석하기 위해, ABTS에 의한 피루베이트의 POPG 산화 과정에 의해 생성되는 H₂O₂ 양을 측정하였다. 반응은 소듐포스페이트 (sodium phosphate) 완충액 중의 피루베이트 (pyruvate) (100 mM), 파이로포스페이트 (pyrophosphate) (6 mM), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (10 mM) 및 HRP (horseradish peroxidase) (0.2 U/mL) 혼합물에 POPG (5 μM)를 첨가하여 개시하였다.

- [146] POPG 모노머 (POPG)은 POPG c-말단에 유비퀴틴 태그를 갖지 않는 모노머 형태의 샘플이며, 동일한 유비스택 (UniStac) 혼합 조건에서 폴리머를 형성하지 않는다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 도 21에 나타낸 것과 같이, pH 5.5에서 POPG (위쪽 곡선)는 이것의 모노머 형태 (아래쪽곡선)와 비교하여 보다 더 높은 활성을 나타냈다. 두개의 반응 모두 동일한 양의 모노머를 함유하였다. 따라서, 상기 활성의 차이는 오로지 모노머 사이의 공유결합에 의존하는 것이다. 결국, POPG UniStac 폴리머의 활성이 유비퀴틴-태그가 없는 POPG 모노머 (POPG)와 비교하여 2배 증가한 것을 확인하였다.

[147]

- [148] **실시예 5: 유비퀴틴 효소 시너지 효과 분석**

- [149] 트리오세포스페이트 이소머라제 (triosephosphate isomerase) (TIM), 프룩토오스 비스포스페이트 알돌라아제 (fructose bisphosphate aldolase) (ALD) 및 프룩토오스 비스포스페이트 (fructose bisphosphatase) (FBP)은 DHAP (dihydroxyacetone phosphate)로부터 최종 산물로서 F6P를 생성하기 위한 캐스캐이드 반응을 형성하는 것으로 알려져 있다. UniStac 효소 시너지 효과 분석을 Fructose-6-Phosphate (F6P), TIM 생성물, ALD 및 FBP 효소 복합체를 측정하여 수행하였다. F6P는 포스포글루코오스 이소머라아제 (phosphoglucose isomerase) (PGI)에 의해 글루코오스-6-포스페이트 (Glucose-6-phosphate) (G6P)로 이성체화되고, 기질로서 동량의 NAD⁺이 글루코오스-6-포스페이트 디하이드로게나아제 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) (G6PDH)에 의해 변형된다. 효소활성을, HEPES 완충액 조건 (200 mM HEPES pH7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂) 중의 4 μM TIM, ALD 및 FBP 효소 복합체 혼합물에 2.5 mM의 효소 복합체 (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), 20 U/mL 분석 효소 (PGI 및 G6PDH) 및 2.5 mM NAD⁺ 효소 복합체를 첨가하여 새롭게 생성된 NADH의 양을 340 nm에서 측정하여 결정하였다.
- [150] 효소 복합체 혼합물은 효소 C-말단에 유비퀴틴 태그를 갖지 않고 동일한 UniStac 혼합물 조건에서 폴리머를 형성하지 않는 모노머 형태의 샘플이다. 통계 분석은 Prism 6 (GraphPad Software, Inc)를 사용하여 수행하였다. 지시된 시점에서, 반응을 종료하고 F6P의 양을 F6P가 Glucose-6-phosphate (G6P)로 전환되는데 NAD⁺를 사용하는 phosphoglucose isomerase (PGI)를 이용하여 측정하였다. 흡광도는 F6P의 양을 나타낸다.
- [151] 상기 실험결과를 도 23에 나타내었다. 도 23에 나타낸 바와 같이, 3개의 다른 효소의 UniStac 폴리머 (위쪽 곡선)가 모노머 효소 혼합물 (아래쪽 곡선) 보다 5배 높은 활성을 나타내어, UniStac상기 효소들에 의한 시너지 효과를 확인하였다. 도 22는 3개의 효소, TIM, ALD 및 FBP가 결합된 구조 (UniStac Polymer) 결과물을 나타낸 것이다.
- [152]
- [153] **실시예 6: 유비퀴틴 다단계 표지 (prosthetics) 방법**
- [154] 본 발명의 제조예에 따라 유비퀴틴 C말단 태깅된 생체분자를 합성하였다. 다음, 히드록실아민 (hydroxylamine)을 포함하는 폴리머 (폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol))를 상기 생체분자와 반응시켰다. 그 결과 폴리머가 옥심 연결부위 (oxime linkage)에 의해 유비퀴틴에 의해 표지된 것을 확인하였다. 옥심 연결은 고분자 약물 전달 시스템 (polymeric drug delivery system)이 가능한 도구로 사용이 가능하다.
- [155]
- [156] **실시예 7: Protein A 및 Protein G 선형 멀티머 중합체 제조**
- [157] UniStac 반응 (전체 부피 50 μℓ)을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2, 1

μ M E3, 4 mM ATP)을 단백질 A (Protein A) 또는 단백질 G (Protein G) 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. Genscript에서 합성한 단백질 A (GenBank ID-AAB05743.1), 단백질 G (CAA27638.1)에 해당되는 서열을 포함한 제조용 DNA 플라스미드를 사용하였다. UniStac 반응을 실온에서 1 시간 동안 셰이킹하여 수행한 다음, SDS-PAGE를 수행하였다.

- [158] 도 24에 나타난 바와 같이, UniStac 혼합물을 넣지 않은 샘플과 비교하여, UniStac 혼합물을 넣어준 샘플에서 Protein A 또는 Protein G의 monomer band는 감소하였고, 고분자 질량의 밴드 (선형 멀티머 중합체)가 새롭게 나타난 것을 확인하였다. 또한, 일부 선형 멀티머 중합체는 분자량이 수백 kDa까지 증가하여 스택킹 겔 (stacking gel)을 통과하지 못한 것을 확인하였다.

[159]

- [160] 실시예 8: 유비퀴틴 C-말단 태그의 76글라이신의 c-말단에 아스파르트산이 연장된 hGH

- [161] UCT 융합 단백질 과발현을 위해, 각 유전자 구성물을 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) 균주에 형질전환하였다. 본 실시예에서 단백질로서 hGH (서열번호: 18)를 이용하였다. 단백질 발현 플라스미드 (pET21a, Genscript)를 포함하는 세포를 37°C, LB 배지 (Miller)에서 인큐베이션하였다. OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 이르면, 단백질 발현을 250 μ M의 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노사이드 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (IPTG)를 사용하고 16°C에서 20 시간 동안 유도하였다. 다음, 원심분리 (3500 rpm으로 4°C에서 15분) 한 후, 세포 펠릿을 용해 완충액 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 20 mM imidazole) 중에 재현탁하고 소니케이션 (50% amplitude, pluse on 3초-off 5초, 최종 15 분)으로 용해시켰다. 이어서, 상기 용해물을 14,000 rpm으로 4°C에서 30분간 추가로 원심분리하였다. N-말단 His-tag를 포함하는 단백질의 수용성 분획을 니켈 친화 및 FPLC 완충액 (Ni-NTA Agarose - QIAGEN, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl₂)으로 사전 평형화한 Superdex 75 pg 겔 필터레이션 컬럼 16/600 (GE Healthcare)을 사용하는 겔 여과 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 hGH를 100 μ M로 농축하여, SDS-PAGE로 평가하여, 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[162]

- [163] 실시예 9: E3 (Rsp5)로부터 시작된 폴리유비퀴틴 스캐폴드 제조

- [164] UniStac 반응 (전체 부피 50 μ L)을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (0.5 μ M E1, 5 μ M E2 (Ubch5a 또는 Ubch7), 1 μ M E3, 4 mM ATP)을 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간 동안 셰이킹한 다음, SDS-PAGE를 수행하였다.

- [165] 도 26에 나타난 바와 같이, UniStac 혼합물이 없는 샘플과 비교하여 UniStac 혼합물을 넣어준 샘플에서 E3의 양이 줄어든 것을 확인하였다. 이는 E3로부터

시작된 폴리유비퀴틴 스캐폴드 형성으로 인해 분자 질량이 증가한 E3의 밴드가 위쪽으로 이동되었기 때문이다. 또한, Ubch5a E2를 포함한 UniStac 혼합물 (도 26a)과 비교하여, 반응성이 약한 Ubch7 E2를 포함한 UniStac 혼합물 (도 26b)을 첨가한 결과에서는 시간이 지남에 따라 E3 (Rsp5)에 유비퀴틴이 하나씩 추가 연결되어 분자량이 점차 증가되는 과정을 확인하였다.

[166]

[167] 실시예 10: DUB의 유무에 따른 hGH의 중합체 제조

[168] DUB이 함께 존재하는 조건과 DUB이 제외된 조건에서 hGH (서열번호: 18)의 UniStac 반응을 비교하였다. 이때 사용된 hGH는 C-말단에 2개의 유비퀴틴 태그가 헤드-투-테일 (head to tail) 형태로 반복 연결되어 있고, 그 유비퀴틴 태그의 C-말단은 아스파르트산으로 연장된 형태이다. 따라서 DUB을 이용해 유비퀴틴 태그 C-말단의 아스파르트산을 잘라내지 않으면 UniStac 반응이 일어나지 않는다.

[169] 생체분자인 hGH의 중합체 형성을 확인하기 위한 UniStac 반응은 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (1 μM E1, 5 μM E2 (ubch5a), 1 μM E3, 4 mM ATP)을 20 μM hGH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다.

[170] 또한 E3가 제외된 E2-UniStac 반응은 E2-UniStac 완충액 (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, E2-UniStac 혼합물 (1 μM E1, 10 μM E2(Ucb13-MMS2 복합체), 4 mM ATP)을 20 μM hGH 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다.

[171] DUB의 활성을 함께 확인하기 위해 반응은 DUB (YUH1)이 없는 조건과 DUB (YUH1)이 2 μM 들어간 조건에서 각각 동시에 진행하였다. 모든 반응을 실온에서 1 ~ 4시간 동안 웨이킹하여 수행한 다음, SDS-PAGE로 확인하였다.

[172] 도 27에 나타난 것과 같이, DUB이 있는 조건하에서만 hGH의 중합체가 형성되는 것을 확인하였고, DUB이 없는 조건에서는 hGH UCT C-말단의 아스파르트산이 잘리지 않아 중합체 형성되지 않은 것을 확인하였다.

[173]

[174] 실시예 11: 비드에 고정된 Protein A 중합체의 결합 활성

[175] 단백질 A (Protein A) 중합체를 만들기 위한 UniStac 반응을 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였다. UniStac 혼합물 (0.5 μM E1, 5 μM E2 (Ubch5a 또는 Ubch7), 1 μM E3, 4 mM ATP)을 Protein A 단백질 용액에 첨가하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 실온에서 1시간 동안 웨이킹한 다음 50% 농도의 라텍스 비드 (Latex bead)와 함께 1:1 비율로 섞은 다음 상온에서 4시간 동안 웨이킹하며 Protein A 중합체를 비드에 고정화시키는 반응을 수행하였다. 고정화 반응 후, 고정화되지 않은 단백질을 제거하기 위해 PBS 완충액 (10 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)으로 3회 세척을 수행하였다. 세척 후, 인간의 혈청으로부터 얻어진

면역글로불린G (IgG)를 2 mg/mL 농도로 비드에 첨가하여 비드에 고정화된 Protein A 중합체의 결합 활성 분석을 진행하였다. 결합 반응은 상온에서 1시간 동안 셰이킹한 다음, 상기 세척 방법과 동일하게 PBS 완충액으로 3회 세척 후 SDS-PAGE로 확인하였다.

- [176] 도 28에 나타낸 바와 같이, UniStac 혼합물을 첨가하지 않고 나머지를 동일하게 진행하여 Protein A 단위체가 고정화된 비드와 비교하여, 단백질 A 중합체가 고정화된 비드에 대한 인간 유래 IgG의 결합 활성이 15%이상 증가된 것을 확인하였다.
- [177]
- [178] 실시예 12: 유비퀴틴의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 각각 결합된 선형의 다가 생체분자 중합체 제조
- [179] N-말단에 hGH가 결합된 공여체 유비퀴틴(서열번호: 18)과 N-말단에 hGH가 결합된 수용체 유비퀴틴(서열번호: 19) 다이머 (도 29(a)); N-말단에 hGH가 결합된 공여체 유비퀴틴(서열번호: 18)과 C-말단에 hGH가 결합된 수용체 유비퀴틴(서열번호: 20) 다이머 (도 29(b)); 및 N-말단에 hGH가 결합된 공여체 유비퀴틴(서열번호: 18)과 N-말단에 SUMO와 C-말단에 hGH가 각각 결합된 수용체 유비퀴틴(서열번호: 21) 다이머 (도 29(c))를 각각 제조하여, UniStac 다이머 (dimer) 형성을 확인하였다.
- [180] 상기 수용체 유비퀴틴은 73번째 류신이 프롤린으로 치환된 형태이고, 도 29(c)에서 수용체 유비퀴틴의 48번째 또는 도 29(a) 및 (b)에서 63번째 라이신을 제외한 나머지 라이신은 아르기닌으로 치환되어 있는 형태이며, C-말단에는 아스파르트산 (aspartate) 또는 생체분자 (hGH)로 연장되어 있는 형태이다.
- [181] UniStac 반응 (도 29(a) 및 (b))은 UniStac 완충액 (25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂) 중에서 수행하였으며, UniStac 혼합물 (1 μ M E1, 5 μ M E2 (Ubc13-MMS2 복합체), 4 mM ATP)을 10 μ M 수용체 유비퀴틴 단백질과 공여체 유비퀴틴 단백질이 혼합된 용액 (총 유비퀴틴 농도 20 μ M)에 첨가하여 반응을 시작하였다.
- [182] 또한, UniStac 반응 (도 29(c))은 상기 반응과 동일한 조건 하에서 E2를 Ubc13-MMS2 복합체가 아닌 E2-25K로, 수용체 유비퀴틴은 63번째가 아닌 48번째 Lys만 가지는 형태의 단백질로 대체하여 반응을 시작하였다. UniStac 반응을 27°C에서 4시간 동안 셰이킹하여 수행한 다음, SDS-PAGE로 확인하였다. UniStac 반응 (도 29(b))에서는 His-sumo-Ub-hGH 형태의 단백질에 SENP1 효소를 이용해 His-sumo를 잘라낸 Ub-hGH 형태의 수용체 유비퀴틴이 사용되었으며, 이때 잔존하는 SENP1이 UniStac 반응에 포함되어 공여체 hGH, Ubc13과 MMS2의 His-sumo도 함께 잘라내어 반응 후 dimer 및 E2(Ubc13, MMS2)의 밴드 시프트 (band shift)가 되었음을 확인하였다.
- [183] 도 29에 나타낸 것과 같이 생체분자가 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 모두에 각각 결합된 형태 모두에서 UniStac 다이머가 형성된 것을

확인하였다. 본 실시예에서 사용된 단백질 등의 서열번호는 다음과 같다:
 N-말단에 hGH가 결합된 공여체 유비퀴틴(서열번호: 18); N-말단에 hGH가
 결합된 수용체 유비퀴틴(서열번호: 19); C-말단에 hGH가 결합된 수용체
 유비퀴틴(서열번호: 20); N-말단에 SUMO와 C-말단에 hGH가 각각 결합된
 수용체 유비퀴틴(서열번호: 21)

[184]

[185] **실시예 13: 약물동태확인**

[186] 다이유비퀴틴-알부민 (OGB1)과 알부민(OGB3)을 Spraque-Dawley계 수컷
 9주령 랫드에 단회 피하투여한 후, 각 시간대별로 혈액을 채취하여 혈청 중
 약물농도를 분석하였다. 다이유비퀴틴-알부민은 0.833 mg/kg 및 알부민은 1
 mg/kg로 투여하였으며, 군당 수컷 12마리로 구성하였다. 혈중 약물의
 농도분석을 위한 채혈은 투여 전 (Blank), 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 및
 72시간 (총 12 point)에 군당 3마리씩 실시하였다.

[187] 대조군은 수컷 5마리로 구성하였고, 투여 후 1 및 24시간에 채혈을 실시하였다.
 채취한 혈액은 혈청을 분리하여 -70±10°C에서 초저온냉동 보관하였다. 시간별로
 채혈된 검체로부터 약물의 농도분석은 Human serum albumin ELISA kit로
 측정하였다. ELISA 분석은 희석용 버퍼(1x PBS, 1% BSA)와 랫드 공혈청을 1:1로
 혼합한 희석용 혈청을 준비하여 사용하였다. 희석용 혈청에
 다이유비퀴틴-알부민을 800 ng/mL부터 15.625 ng/mL까지 희석하여 각 well에
 분주하였다. 각 검체는 랫드 공혈청과 희석용 버퍼를 사용하여 최종 1:1 희석용
 혈청이 되도록 희석하여 각 well에 분주하였다. Human serum albumin kit의
 Capture와 Detector 항체를 항체 희석 CP 용액에 희석하여 항체 혼합용액을
 조제하였다. 항체 혼합용액을 각 well에 100 µl 분주하여 실온에서 1 시간, 400
 rpm으로 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 완료되면 세척 용액을 300 µL씩
 well에 분주하고 털어내는 과정을 3회 반복하였다. TMB 기질 용액을 각 well에
 100 µL씩 well에 분주하고 실온에서 10분, 400 rpm으로 인큐베이션하고, Stop
 용액을 각 well에 100 µL씩 분주하여 기기에 넣고 흡광도(OD450)를 측정한다.
 알부민은 100 ng/mL부터 2.5 ng/mL까지 희석하여 각 well에 분주하며, 나머지
 검체 희석과 실험과정은 동일하게 진행하여 흡광도를 측정하였다. 농도별로
 측정된 흡광도 수치를 토대로 4 파라미터로 검량선을 산출하며, 검량선 대비
 검체로부터 측정된 흡광도 수치를 토대로 혈청에서의 약물농도를 최종
 산출하였다. 혈청 중 시험물질의 농도 측정 결과에 대하여 약물동태학적
 파라미터를 Phoenix WinNonlin (Ver. 8.1, Pharsight-A Certara company, U.S.A.)로
 산출하여 약물동태를 평가하였다.

[188] 도 30에 나타낸 바와 같이, 다이유비퀴틴-알부민 (OGB1)이 더 높은 혈장농도를
 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 다이유비퀴틴-알부민 (OGB1)을 투여한 군은
 알부민(OGB3)을 투여한 군과 비교하여, AUC가 1.8배, Cmax가 2배 이상 증가한
 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 다이유비퀴틴-알부민 중합체는 더 적은

농도로 더 우수한 약물동태학적 효과를 갖는 것을 알 수 있다.

- [189] 결국, 본 발명의 생체분자 중합체는 생체 내 지속시간을 증가시킬 수 있는 분자와 결합되어 제공됨으로써, 증가된 생체내 효능 지속시간이 요구되는 약학 조성물의 제조에 이용될 수 있다.

[190]

- [191] 실시예 14: **Fc-based** 수용체 단백질 (수용체 단백질) 발현 가능한 재조합 발현 플라스미드 **DNA**의 제조

- [192] 수용체 유비퀴틴의 C-말단에 캐리어(carrier)가 직접 결합된 융합 단백질을 하기의 방법으로 제조하였다. 상기 융합 단백질의 캐리어 단백질로 항체 단편 (IgG Fc domain)을 사용하였고, 상기 융합 단백질을 "Fc-based 수용체 단백질"이라 한다.

- [193] 세포에서 용해성을 발현시키기 위해 단백질을 세포 밖으로 분비하게 하는 시그널 펩타이드 (Signal peptide), 수용체 유비퀴틴, 힌지 (hinge) 및 Fc 유전자를 pcDNA3.1(+) 벡터에 삽입되도록 디자인하였다. pcDNA3.1(+) 벡터는 CMV 프로모터, 암피실린 (Ampicillin) 내성 유전자 등을 가지는 동물세포용 발현 벡터이다.

- [194] 도 31은 Fc-based 수용체 단백질을 발현하는 유전자가 연결된 pcDNA3.1(+) 벡터를 나타낸다. Fc-based 수용체 단백질을 발현하는 염기 서열 및 아미노산 서열을 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

[195]

[표3]

IgGκ(SP)-Fc-based 수용체 단백질 염기 서열			
Signal peptide (IgGκ) (서열번호 22)	ATGGAAACTG ATACTCTGCT GCTGTGGGTG CTGCTGCTGT GGGTGCCCCG CTCAACTGGT		
Ub (A)수용체 유비퀴틴 (서열번호 23)	ATGCAGATCT TCGTGAGGAC CCTGACAGAT CGGACCATCA CACTGGAGGT GGAGCCAAGC GACACCATCG AGAACGTGAG GGCCAGAATC CAGGACCGGG AGGGCATCCC CCCTGATCAG CAGAGACTGA TCTTCGCTGG CCGCCAGCTG GAGGACGGAA GGACCCTGAG CGATTACAAT ATCCAGAAAG AGTCTACACT GCACCTGGTG CTGAGACCGC GCGTCGTGGA T		
Hinge (IgG1)(서열번호 24)	GAGCCAAAAT CTTGTGACAA AACTCATACA TGTCCC		
Fc (IgG1)(서열번호 25)	CCATGTCCCG CACCTGAACT GCTGGGCGGA CCTAGCGTGT TTCTGTTCCC ACCTAAGCCA AAGGACACCC TGATGATCTC CAGGACCCCC GAGGTGACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAGGACC CCGAGGTGAA GTTCAACTGG TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CAAGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACCTATC GGGTGGTGTC TGTGCTGACA GTGCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTATAAGT GCAAGGTGTC TAATAAGGCC CTGCCCCGCTC CTATCGAGAA GACCATCTCC AAGGCCAAGG GCCAGCCAAG AGAGCCCCAG GTGTACACAC TGCCCCCTAG CCGCGACGAG CTGACCAAGA ACCAGGTGTC TCTGACATGT CTGGTGAAGG GCTTCTATCC TTCTGATATC GCTGTGGAGT GGGAGTCCAA TGGCCAGCCA GAGAACAATT ACAAGACCAC ACCACCCGTG CTGGACTCTG ATGGCTCCTT CTTTCTGTAT TCCAAGCTGA CCGTGGATAA GAGCAGATGG CAGCAGGGCA ACGTGTTCCTC CTGTAGCGTG		

	ATGCATGAAG CACTGCATAA TCACTATAACC CAGAAGTCAC TGTCAGTGG TCCCGGTAAA
--	--

[196]

[197] [표4]

IgGκ(SP)-Fc-based 수용체 단백질 아미노산 서열	
Signal peptide (IgGκ) (서열번호 26)	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly
Ub(A)수용체 유비퀴틴 (서열번호 27)	Met Gln Ile Phe Val Arg Thr Leu Thr Asp Arg Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Arg Ala Arg Ile Gln Asp Arg Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Arg Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn IleGlnLysGluSerThrLeuHisLeuValLeuArgProArgValValAsp
Hinge (IgG1)(서열번호 28)	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
Fc (IgG1)(서열번호 29)	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[198] 상기의 Fc-based 수용체 단백질 제조합 발현 벡터를 확보하였다.

[199] Fc-based 수용체 단백질 플라스미드 (Plasmid) DNA를 DH5α 컴피턴트 세포

(Competent cell)에 넣어 42 °C에서 1 분간 열충격 (Heat shock) 처리하여 형질 전환하고 100 µg/mL 앰피실린 (Ampicillin)이 포함된 LB 고체 배지에 도말하였다. 도말된 LB 고체 배지 플레이트는 37 °C에서 16 시간 이상 정치 배양하여 콜로니 (Colony)를 확보하였다. 단일 콜로니 (Colony)를 찍어 5 mL의 LB 배지에 접종한 후, 37 °C, 220 rpm에서 16 시간 배양하였다. 상기 배양액 일부를 앰피실린 (Ampicillin)이 포함된 LB 배지에 접종한 후, 37 °C, 220 rpm에서 16 시간 배양하였다. 배양액은 3,500 rpm에 30 분간 원심분리하여 대장균 펠렛 (Pellet)을 확보한 후, DNA 추출 키트 (QIAGEN)의 P1, P2, P3 용액을 첨가하여 세포벽을 깨고, 단백질을 분리된 DNA 혼탁액을 확보하였다. DNA 추출키트 (QIAGEN)의 정제 칼럼을 이용하여 확보한 DNA 혼탁액으로부터 플라스미드 DNA 펠렛을 확보하여 자연 건조하였다. 건조된 DNA 펠렛에 세포 배양용 물 (Sigma Aldrich)을 첨가하여 녹여준 후, 0.22 µm 필터로 여과시켰다. 최종 추출한 플라스미드 DNA는 나노 드롭 기기 (IMPLEN)를 이용하여 DNA 농도와 순도를 측정 한 후 단백질 발현에 사용하였다.

[200]

[201] 실시예 15: Fc-based 수용체 단백질 (수용체 단백질)의 발현 및 확인

[202] Fc-based 수용체 단백질의 발현

[203] Expi293F 인간 세포 (Human cell)는 인간 배아 신장 (Human Embryonic Kidney) 293 세포주 (Cell line)에서 유래되었으며, 높은 형질 감염과 높은 단백질 발현 효율을 갖는다.

[204] 형질주입 과정 24 시간 전에 Expi293F (Gibco) 세포를 3×10^6 viable cells/mL로 접종하고, 8 % CO₂ 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (Orbital shaker)에 장착하여 37 °C, 80 % 습도 이상, 95 rpm (50-mm shaking diameter) 조건으로 24시간 배양하였다. 세포를 계수하여 세포 생존도 (Cell viability) 및 세포수를 확인하고, 최종 3×10^6 viable cells/mL 농도 및 총 200 mL 부피가 되도록 Expi293 발현 배지 (Expi293 Expression Media Gibco)로 희석하여 1 L Erlenmeyer 플라스크에 접종하였다.[205] Opti-MEM I Reduced Serum Media (Gibco) 배지 12 mL에 Fc based 수용체 단백질 재조합 발현 벡터 DNA 200 µg과 Opti-MEM I Reduced Serum Media (Gibco) 11.2 mL에 ExpiFectamine™ 293 Reagent (Gibco) 640 µL를 각각 희석한 후, 상온에서 5 분간 반응시켰다. ExpiFectamine™ 293 Reagent가 들어있는 용액을 Fc based 수용체 단백질 재조합 발현 벡터 DNA가 들어있는 용액에 넣어 혼합하고 상온에서 12분 반응시켰다. 3×10^6 viable cells/mL이 되도록 접종한 1L 플라스크에 천천히 분주하여 형질 주입(Transfection)시켰다. 8 % CO₂ 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (Orbital shaker)에 장착하여 37 °C, 80 % 습도 이상, 95 rpm (50-mm shaking diameter) 조건으로 18 시간 배양하였다. 18 시간 후에 Enhancer 1 (Gibco) 1.2 mL와 Enhancer 2 (Gibco) 12 mL를 각각 첨가하고, 8 % CO₂ 인큐베이터 안의 오비탈 진탕기 (Orbital shaker)에 장착하여 37 °C, 80 %

습도 이상, 95 rpm (50-mm shaking diameter) 조건으로 7일 배양하였다.

[206]

[207] **Fc-based 수용체 단백질의 발현의 확인**

[208] 상기에서 확보한 배양액을 3,500 rpm 조건에서 30 분 이상 원심 분리하여 세포 펠렛을 제외한 Fc-based 수용체 단백질 발현 배양액만 확보하였다. 확보한 배양액은 필터에 여과시켜 불순물을 제거하였다. 배양액으로부터 Fc-based 수용체 단백질 발현 정도를 확인하기 위해 80 μ L를 취하고 5X 비환원성 샘플 로딩 염료 (Non-reducing sample loading dye)를 20 μ L을 넣어 혼합 및 95도에서 10분간 방치하였다.

[209] 발현량을 정성적으로 분석하고자 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 750, 1,000 mg/mL로 희석한 소혈청 알부민 (Bovine Serum Albumin) 80 μ L를 취하여 5X 비환원성 샘플 로딩 염료 (Non-reducing sample loading dye)를 20 μ L을 넣어 혼합 및 95도에서 10분간 방치하였다. 각각의 시료와 사이즈 확인용 마커 단백질을 10 % Tris-Glycine 겔에 로딩하고 80 볼트 (V)에서 약 20 분간, 120 볼트 (V)로 90 분간 단백질을 분리하였다. 겔러닝이 완료되면 쿠마시 브릴리언트 블루 R (Coomassie brilliant blue R)로 가볍게 진탕하면서 염색하고 10 % 아세트산 (Acetic acid)이 포함된 버퍼를 이용하여 가볍게 진탕하면서 염색된 겔의 염색 시약을 제거하였다. 탈색이 완료된 겔은 이미지 파일로 확보하고, 이미지 제이 (Image J) 프로그램을 통해 소혈청 알부민 단백질 밴드양 대비 Fc-based 수용체 단백질의 농도를 정성 및 정량하여, 그 결과를 도 32에 나타내었다.

[210] 도 32에 나타낸 바와 같이, 100 kDa 크기의 Fc based 수용체 단백질이 형성된 것을 확인하였으며, 264.1 mg/mL의 단백질 형성을 확인하였다.

[211]

[212] **Fc-based 수용체 단백질의 타겟 특이성의 확인**

[213] Fc-based 수용체 단백질 타겟 특이적인 발현 여부를 확인하기 위해 Western blotting을 진행하였다. 발현 배양액을 80 μ L를 취하여 5X 비환원성 샘플 로딩 염료 (Non-reducing sample loading dye)를 20 μ L을 넣어 혼합하고, 95도에서 10분간 방치하였다. 준비된 시료와 사이즈 확인용 마커 단백질을 10 % Tris-Glycine 겔에 로딩하고 80 볼트 (V)에서 약 20 분간, 120 볼트 (V)에서 90 분간 단백질을 분리하였다. 겔은 플루오르화 폴리비닐리덴 멤브레인 (PVDF membrane)에 전기 이동 (Transfer) 하고자 0.3 암페어 (A)에서 약 2 시간 단백질을 이동하였다. 상기 멤브레인에 5 % 탈지분유 (Skim milk)가 든 1X PBST (Phosphate Buffer Saline with Tween 20)에 1시간 가볍게 진탕하면서 비특이적 반응을 제거하는 블락킹(blocking)을 진행하였다. 인간 IgG Fc 항체에 특이적으로 결합하는 염소 항-토끼 IgG (H+L), HRP를 이용하여 Fc-based 수용체 단백질에 특이적인 발현 여부를 확인하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. Negative Control은 플라스미드 (Plasmid) DNA를 넣지 않은 샘플이다.

[214] 도 33에서 나타낸 바와 같이, IgG Fc 항체에 특이적으로 결합하는 100 kDa

크기의 Fc-based 수용체 단백질 발현을 확인할 수 있었다.

[215]

[216] **Fc-based 수용체 단백질의 정제**

[217] 상기에서 발현된 Fc-based 수용체 단백질 배양액을 Equilibrium buffer (20 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)로 평형이 이루어진 MabSelect Prism A (Cytiva) 컬럼에 로딩 (loading)하였다. Equilibration buffer를 사용하여 컬럼에 binding 되지 않는 불순물 (impurity)을 제거하고, Elution buffer 1 (50 mM Sodium acetate at pH 4.5)와 Elution buffer 2 (50 mM Sodium acetate at pH 4.0)을 사용하여 step elution으로 수용체 단백질을 회수하였다. 회수된 수용체 단백질에 1 M의 Tris를 첨가하여 회수된 단백질을 pH 7.5 상태로 만든다. pH 적정 후 회수된 수용체 단백질은 25 mM Tris, pH 7.5 buffer로 dialysis를 수행한 후, ultrafiltration을 수행하였다. 10 % in-house gel을 사용하여 SDS-PAGE를 통한 수용체 단백질 정제 결과를 확인하여, 그 결과를 도 34 및 도 35에 나타내었다.

[218]

[219] **실시예 16: 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 (공여체 단백질)의 발현 및 정제**

[220] **유비퀴틴-IL-1RA 단백질의 발현**

[221] 공여체 유비퀴틴의 C-말단에 생체분자가 직접 결합되어 있는 유비퀴틴-생체분자 단백질을 다음과 같이 제조하였다.

[222] 유비퀴틴-생체분자 단백질을 암호화하는 유전자 서열을 His-SUMO 태그가 있는 pET21a vector에 형질전환한 후, 상기 유전자가 삽입된 플라스미드 0.5 µL를 컴피턴트 세포 (competent cell)인 *E. coli* BL21(DE3) 50 µL가 들어있는 E-튜브에 넣었다. 그 후, 태핑 (tapping)하여 혼합한 후 얼음속에서 20 분간 방치하였다. 열충격을 주기 위해 42°C 수조에 E-튜브를 50 초간 방치한 후, 얼음속에서 5분간 방치하였다. 그 후, 신선한 LB 배지 300 µL를 E-튜브에 첨가하여 37진탕 배양기 (shaking incubator)에서 1시간 동안 배양하여 형질전환을 완료하였다. 형질전환이 완료된 세포를 BSC 내에서 100 mg/ml 농도의 암피실린 (ampicillin)이 1/1000 포함된 LB 플레이트에 확산 (spreading)시키고 37°C 정지 배양기 (stationary incubator)에서 밤새 배양하였다. 그 후, 생성된 단일 콜로니를 찍어 100 mg/ml 농도의 암피실린 (ampicillin)이 1/1000 포함된 100 mL에 TB 배지에 접종한 후 37°C, 220 rpm에서 6 시간 seed 배양하였다.

[223] 생체분자로 IL-1RA를 포함하는 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 (Donor, D-192)의 경우, seed 배양액을 100 mg/ml 농도의 암피실린 (ampicillin)이 1/1000 포함된 3 L In-house TB배지에 1:100의 비율로 접종하고 main culture를 수행하였다. Biocanvas fermentor (Centrion) 이용 37°C, 용존산소량 (Dissolved Oxygen) 40 %에서 4시간 배양하고 1 M IPTG stock을 최종 농도 200 µM 로 induction을 수행하였다. 배양액의 용존산소량을 40 %로 맞추기 위해 배양시간동안 impeller의 RPM은 300~700rpm으로 자동 조절되었다. Induction 후 14 시간 더 배양하고 배양을 종료하였다. 배양이 끝난 배양액을 7000 g에 30 분간 원심

분리하여 대장균 wet cell을 확보하였다.

[224] Cedex BIO Analyzer (Roche)를 이용하여 배양 완료 후 잔여 영양소와 Optical density를 측정하여, 하기 표 5에 나타내었다.

[225] [표5]

pH Meter	Acetate (mg/L)	Glucose (mg/L)	Glycerol (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	P (mg/L)	Optical density
7.37	193.9	0.0	1190.7	56.2	6826.9	36.7

[226] SDS-PAGE 분석법을 통해 유비퀴틴-IL-1RA를 확인한 결과를 도 36에 나타내었다. 또한, 상기 유비퀴틴-IL-1RA 단백질의 농도를 측정한 결과, 963.32 mg/L로 분석되었다.

[227]

[228] 유비퀴틴-IL-1RA 단백질의 정제

[229] 유비퀴틴-IL-1RA 단백질은 하기의 과정으로 정제하였다 (도 37).

[230] (A) 용해/조음과 처리

[231] 배양으로 확보한 wet cell을 lysis buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0)를 사용하여 resuspension을 수행하였다. Wet cell 1 g당 lysis buffer 9 mL을 넣어서 수행하였다. Lysis 시료를 얼음에 담아서 sonication을 Pules on/off = 3 sec/5 sec, 45 % amplitude 조건으로 20 분간 수행하였다. Lysate는 14,000rpm에 30 분간 원심분리하여 supernatant만을 확보하였다.

[232] (B) 포획 정제

[233] Ni-sepharose resin (Cytiva)에 lysate를 로딩 (loading)하였다. 샘플 로딩이 끝난 후, wash buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.02 M imidazole)를 사용하여 non-specific 단백질을 충분히 세척하여 제거하였다. 그 후 elution buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.2 M imidazole)를 사용하여 Hig-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질을 회수하였다. 회수된 His-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질은 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 이미다졸 (imidazole)을 제거하였다. Ni 컬럼을 통한 공여체 단백질 정제를 SDS-PAGE로 확인하고 그 결과를 도 38 및 도 39에 나타내었다.

[234] (C) SENP1 효소 분해

[235] His-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 및 SENP1을 100 mg의 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 : 1 mg의 SENP1의 비율로 SENP1 enzyme digestion을 수행하였다. Ni-purification으로 회수된 단백질의 농도 정량을 수행하고, His-SUMO 태그가 부착된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질 양을 기준으로 해당하는 recombinant SNEP1을 혼합하였다. 반응 혼합물은 상온 (15 ~ 25°C)에서 1 시간 동안 방치하였다. SENP1 효소 분해를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 40에 나타내었다.

[236] (D) His-SUMO 제거

- [237] Equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.02 M imidazole)로 평형이 이루어진 Ni-sepharose resin (Cytiva)에 반응 혼합물을 로딩하였다. 샘플 로딩 (Sample loading)을 진행하고, His-SUMO 태그가 잘려진 유비퀴틴-IL-1RA 단백질은 flow through로 빠지도록 하였다. 샘플 로딩을 완료한 후, equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.02 M imidazole)를 사용하여 나머지 유비퀴틴-IL-1RA 단백질을 회수하고, 회수된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질을 20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer로 dialysis를 수행하여 이미다졸을 제거하였다. His-SUMO가 제거되는 공정을 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 41 및 도 42에 나타내었다.
- [238] (E) 정제
- [239] Equilibrium buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer)로 평형이 이루어진 음이온 교환수지(Anion Exchange Column) 컬럼에 이전단계에서 회수한 유비퀴틴-IL-1RA 단백질을 로딩하였다. 유비퀴틴-IL-1RA 단백질은 flow through로 빠지도록 하였다. 회수된 유비퀴틴-IL-1RA 단백질은 최종 10 mg/mL이 되도록 ultrafiltration을 수행하였다. Polishing을 위한 음이온 교환수지공정 결과를 도 43 및 도 44에 나타내었다.
- [240]
- [241] 실시예 17: 컨쥬게이션
- [242] 컨쥬게이션의 수행 및 수율
- [243] 실시예 18에서 생산된 수용체 단백질과 실시예 19에서 생산된 공여체 단백질을 사용하여 컨쥬게이션을 수행하였다. 수용체와 공여체 단백질의 몰비를 1 : 3으로 진행하였다. 이때의 수용체의 단백질은 10 μ M ~ 50 μ M로 설정가능하다. 이밖에 UniStac 혼합물에는 E1, E2, E3, ATP를 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응은 25 °C에서 16 시간동안 정지상태로 수행하였다.
- [244] 컨쥬게이션 반응 결과물 (C-193)을 4 ~ 12 % gradient SDS-PAGE에 1.12 μ g의 수용체를 로딩하여 컨쥬게이션 정도를 정성분석하여 그 결과를 도 45에 나타내었다.
- [245] 또한, 반응 결과물을 μ CE-SDS 분석법을 사용하여 컨쥬게이션 정도를 정량분석하였다. HT Protein Express Reagent Kit를 사용하여 시료 전처리를 수행한 후, Protein Express Assay Labchip를 사용하여 분석을 수행하여, 수율 분석 결과를 하기 표 6 및 도 46에 나타내었다.
- [246]

[표6]

반응 단계	샘플	Correlative Area	Conjugation yield (%)
반응 전	수용체 단백질	6092.70	97.21
	결합체(C-193)	0.00	
반응 후	수용체 단백질	169.70	
	결합체(C-193)	11150.76	

[247]

[248] [수식 1]

[249]

$$\text{UniStac conjugation yield (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{After Acceptor Corr. Area}}{\text{Before Acceptor Corr. Area}} \times 100 \right)$$

[250] 상기 표 6의 컨쥬게이션 수율은 상기 수식 1을 사용하여 계산하였고, UniStac 컨쥬게이션 수율은 97.21 %로 매우 높은 수용체 특이적 수치를 나타내었다.

[251]

[252] **UniStac 컨쥬게이션의 정제**

[253] 컨쥬게이션 (C-193) 시료만을 회수하기 위하여, 하기의 공정을 사용하여 정제를 수행하였다 (도 47).

[254] 반응 결과물을 equilibrium buffer (25 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl)로 평형이 이루어진 Ni-sepharose resin을 준비한다. loading 시료는 5 M NaCl을 소량 첨가하여 conductivity를 50 mS/cm로 맞춘다. 해당 conductivity로 준비한 샘플을 준비된 column에 로딩을 완료한 후, equilibrium buffer (25 mM Tris, pH 8.0, 0.5 M NaCl)를 사용하여 불순물을 제거하였다. 이후, elution buffer (25 mM Tris, pH 8.0)를 사용하여 컨쥬게이션 (C-193)을 회수하였다. 회수된 컨쥬게이션 (C-193)은 염이 첨가되어 있지 않은 pH 7.0 sodium phosphate buffer로 dialysis를 수행하여 염 및 이미다졸을 제거하였다. Ni 정제 결과를 크로마토그래피를 통해 확인하여 도 48 및 도 49에 나타내었다.

[255] Equilibrium buffer (25 mM sodium phosphate, pH 7.0 buffer)로 평형이 이루어진 음이온 교환 수지 (Anion exchange chromatography) 컬럼에 상기 컨쥬게이션을 로딩하였다. Elution buffer (25 mM sodium phosphate, pH 7.0, 250 mM NaCl)를 사용하여 컨쥬게이션을 회수하여, 그 결과를 도 50 및 도 51에 나타내었다.

[256]

[257] **최종 UniStac**

[258] 상기 컨쥬게이션 (C-193)을 formulation buffer (4.6 mM Histidine, 5.7 mM Tris, pH 7.5, 10 mM Arginine, 0.1 g/mL trehalose)로 dialysis를 통하여 formulation을 수행하였다. 최종 UniStac 산물은 1.1 mg/mL 및 0.5 mg/mL이 되도록 희석하여 준비하였다. 생산된 시료는 -70 °C deep freezer에 보관하였다.

[259]

[260] 실시예 18: 최종 UniStac 중합체의 이화학 분석

[261] 최종 UniStac 중합체 (Drug Substrate, C-193)의 순도를 측정하기 위하여 SDS-PAGE (Reducing과 Native 조건), μ CE-SDS 및 SEC-HPLC 분석을 수행하였다.

[262]

[263] **SDS-PAGE 분석**

[264] 최종 결합체 산물 (DS, C-193)을 Reducing 조건으로 분석하기 위하여, 4-12 % Bis-Tris Plus Gel과 MES SDS Running Buffer를 사용하여 Reducing SDS-PAGE분석을 수행하였다. 준비된 PAGE에 3 μ g씩 시료 loading을 진행하였으며, 결과를 도 52에 나타내었다.

[265] 최종 결합체 산물 (C-193 DS)을 Native 조건으로 분석하기 위하여, 4-15 % T/G-PAG-BC non-SDS와 Tris-Glycine Native Running Buffer를 사용하여 Native-PAGE분석을 수행하였다. 준비된 PAGE에 4.5 μ g씩 시료를 loading을 진행하였으며, 그 결과를 도 53에 나타내었다.

[266]

[267] **μ CE-SDS 분석**

[268] μ CE-SDS (Perkin Elmer Labchip GX II Touch.) 분석법을 사용하여 C-193 DS시료에 포함되어 있는 fragment 포함 정도를 분석하였다. HT Protein Express Reagent Kit (Perkin Elmer)를 사용하여 시료 전처리를 수행한 후, Protein Express Assay Labchip (Perkin Elmer)를 사용하여 분석을 수행하여, 그 결과를 하기 표 7 및 도 54에 나타내었다.

[269] [표7]

UniStac 샘플 농도	Migration time (sec)	Corr. Area	순도 (%)
1.1 mg/mL	23.62	3527.21	98.12
0.5 mg/mL	24.56	3616.85	98.69

[270]

[271] [수식 2]

[272]

$$\text{순도 (\%)} = \left(\frac{C - 193 \text{ Corr. Area}}{\text{Total Corr. Area}} \times 100 \right)$$

[273] 상기 수식 2을 사용하여 monomer 순도를 계산하여 표 7에 나타내었으며, 98 % 이상으로 높은 monomer 순도를 확인하였다.

[274]

[275] **SEC-HPLC 분석**

[276] SEC-HPLC column 및 Alliance e2695 XC HPLC 기기를 사용하여 C-193 DS 시료에 포함되어 있는 High molecular weight의 포함 정도를 분석하였다. C-193 DS 시료 약 30 μ g을 각각 준비된 column에 injection하여 분석을 수행하여, 그 결과를 하기 표 8 및 도 55에 나타내었다.

[277] [표8]

샘플 농도	Retention Time (min)	Area	순도 %
1.1 mg/mL	15.051	2234084	100.00
0.5 mg/mL	15.081	2264850	100.00

[278] 상기 수식 2을 사용하여 monomer 순도를 계산한 결과를 상기 표 8에 나타내었으며, 100 %로 매우 높은 monomer 순도를 확인하였다.

[279]

[280] 실시예 19: 융합 단백질 (C-192, C-193 및 D-192)의 약물동태 비교

[281] 상기 공여체 단백질 (D-192), UniStac 단백질 (C-193), 및 Human-serum albumin을 캐리어로 하는 수용체 단백질을 사용한 융합 단백질 (C-192)를 준비하였다. 해당 3가지 시료에 대한 구조를 하기 도 56에 나타낸다.

[282] 상기 3가지 시료를 사용하여 9주령 수컷 ICR 마우스에 단회 피하투여한 후, 각 시간대별로 혈액을 채취하여 혈중약물 농도를 분석하고 약물동태 파라미터를 산출하고자 약물동태 측정 시험을 실시하였다.

[283] (주)오리엔트 바이오(Orient BIO, Korea)에서 구입한 8주령의 수컷 ICR 마우스를 7일간 검역 및 순화시켰다. 검역 및 순화 후 모든 동물에 대하여 체중을 순위화하였으며, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포되도록 군분리 (채혈 시간당 n=2)를 진행하였다. 그 후, C-192 시험물질을 10 mg/kg, C-193 시험물질을 1 mg/kg 및 D-192 시험물질을 1 mg/kg 용량으로 각각의 마우스에 단회 피하투여하였다. 채혈 시점은 투여 전, C-192 투여 후 2, 6, 8, 10, 16, 32, 24, 48, 72 및 96시간, C-193 투여 후 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24, 32, 40, 48, 56 및 72시간 그리고 D-192 투여 후 1, 2, 3, 4, 5 및 6 시간에 각각 실시하였다. 채취한 혈액은 원심분리를 통해 혈청을 분리하고, 혈중약물농도 분석을 위하여 $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

[284] 시험물질의 혈중 약물 농도를 측정하기 위해, IL-1RA에 특이적인 반응성을 갖는 Human IL-1RA ELISA kit (Abcam, UK)를 사용하였다. 우선, 96 well plate에 표준물질 및 각 시간대별 혈청을 50 μ L씩 분주한 다음, Human IL-1RA ELISA kit에서 제공하는 antibody cocktail을 각 well에 50 μ L씩 분주하여 25°C 혼합장치 (Thermo Micromixer)에서 400 rpm으로 1시간 반응시켰다. Plate well의 용액을 버리고, 잔여물이 남지 않도록 털어주었다. 세척액 300 μ L을 각 well에 분주한 후, 버리고 털어주는 과정을 3회 반복하였다. 발색제를 각 well에 100 μ L씩 분주한 후, 25°C 혼합장치에 400 rpm으로 10분 반응시켰다.

[285] 마지막으로 정지액을 각 well에 100 μ L씩 분주한 뒤, 흡광도 측정기(Multi-Mode Microplate Reader)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 대비 산출된 각 시간대별 혈청 내 약물의 농도는 약물동태 파라미터를 산출하는데 사용되었다. 마우스에서 융합 단백질 (C-192, C-193 및 D-192)의 피하 투여 후 시간에 따른 혈중 약물 농도 그래프를 도 57 및 도 58에 나타내었다.

[286] 또한, 상기 실험 결과를 바탕으로 약물동태 파라미터 산출결과를 하기 표 9에 나타내었다.

[287] [표9]

PK 파라미터	C-192	C-193	D-192
	10 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg
T _{max} (hr)	6	10	1
C _{max} (pg/mL)	4,853,634	1,696,762	250,240
AUC(inf) (pg*hr/mL)	37,378,687	28,185,225	426,747
Half life (hr)	9.3	13.7	0.4

[288] 상기 표 9에 나타낸 바와 같이, 약물의 체내 안정성을 나타내는 반감기를 기준으로 3가지 융합단백질을 비교 평가하면, 인간 혈청 알부민을 캐리어로 하는 융합 단백질 (C-192)는 수용체 단백질 (D-192)와 비교하여, 반감기가 0.4 시간에서 9.3시간으로 약 23배 증가되는 것을 확인하였다.

[289] 또한, Fc를 캐리어로 하는 융합 단백질 (C-193)는 수용체 단백질 (D-192)와 비교하여, 반감기가 0.4 시간에서 13.7 시간으로 약 33배 증가되는 것을 확인하였다.

[290] 결국, 알부민 및 Fc 캐리어가 융합된 융합단백질은 반감기, AUC, Tmax, Cmax를 증가시켜 우수한 약동학적 특성을 가지는 것으로, 적은 용량으로 원하는 부위에 약물을 적용할 수 있는 우수한 의약품으로 활용될 수 있다.