



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월10일

(11) 등록번호 10-1674977

(24) 등록일자 2016년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/74 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7025821

(22) 출원일자(국제) 2009년04월16일

심사청구일자 2014년04월16일

(85) 번역문제출일자 2010년11월17일

(65) 공개번호 10-2011-0021784

(43) 공개일자 2011년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/001768

(87) 국제공개번호 WO 2009/128272

국제공개일자 2009년10월22일

(30) 우선권주장

61/124,528 2008년04월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007136107 A1*

GenBank Accession Number AB187597

(2005.03.05.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

가부시키가이샤 아네로파마 · 사이엔스

일본국 토쿄도 츄오쿠 니혼바시 카부토쵸 19-8 야
에스 케이에이치 빌딩 4층

(72) 발명자

시마타니-시바타 유코

일본국 3908621 나가노 마츠모토시 아사히 3-1-1

시미즈 히토미

일본국 3908621 나가노 마츠모토시 아사히 3-1-1

요네쿠라 히로미

일본국 3920012 나가노 수와시 시가 2204

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 발현 벡터

(57) 요 약

E. coli-유래 플라스미드와 형질전환체 유래 플라스미드를 융합시켜 제조한 종래의 셔틀 벡터는 E. coli와 상기 형질전환체 박테리아 모두에서 기능을 하며, 비-E. coli 형질 전환체에서만 오직 기능을 하는 발현벡터는 전무하다. 본 발명은 (1) E. coli 이외의 혐기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위 및 (2) 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA로부터 형성된 단백질 발현 단위 및 혐기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 플라스미드 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터는 오직 형질 전환체에서만 복제되고, 다른 병원성 또는 호기성 박테리아에서 형질 전환체의 복제 위험을 제거하며, 치료학적으로 적용을 위한 매우 안전하고 신뢰할만한 벡터 및 유전자 전달체를 제공할 수 있다.

명세서

청구범위

청구항 1

비피도박테리아(*Bifidobacterium*)에서 기능을 하는 *OriV* 부위 및 *RepB* 유전자를 포함하는 pTB6 rep 단위; 및

(a) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA와 비피도박테리아에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위를 포함하는, 비피도박테리아에서만 복제될 수 있는 비피도박테리아 형질전환용 플라스미드 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, *OriV* 부위 및 *RepB* 유전자를 포함하는 pTB6 rep 단위는 서열번호 4의 1796번째 내지 3391번째의 염기서열로 나타내어지는 DNA인 것을 특징으로 하는 플라스미드 벡터.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 변환시키는 활성을 갖는 단백질인 것을 특징으로 하는 플라스미드 벡터.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 변환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소(cytosine deaminase), 나이트로리덕테이즈(nitroreductase), 및 베타글루쿠로니다제(β-glucuronidase)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 플라스미드 벡터.

청구항 9

제 8항에 있어서, 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 변환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소인 것을 특징으로 하는 플라스미드 벡터.

청구항 10

서열번호 4의 염기서열(pBif iCD)로 기재되는 DNA 서열로 구성되는 플라스미드 벡터.

청구항 11

(1) 비피도박테리아에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위 및 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위, 및 (2) (a) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 및 비피도박테리아에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위를 포함하며, 비피도박테리아 및 *E. coli* 모두에서 복제될 수 있는 셔틀 플라스미드를 생산하는 단계, 및

상기 셔틀 플라스미드로부터 *E. coli*에서 기능하는 플라스미드 복제 단위를 제거하는 단계를 포함하는,

비피도박테리아에서 기능을 하는 *OriV* 부위 및 *RepB* 유전자를 포함하는 pTB6 rep 단위를 포함하며 비피도박테리아에서만 복제될 수 있는 비피도박테리아 형질전환용 플라스미드 벡터를 제조하는 방법.

청구항 12

제 1항, 제 5항, 제 7항, 제 8항, 제 9항 및 제 10항 중 어느 한 항에 따른 플라스미드 벡터로 형질전환된 비피도박테리아를 포함하는 유전자 전달체.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 비피도박테리아는 비피도박테리아 롱검(*Bifidobacterium longum*), 비피도박테리아 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*), 비피도박테리아 아니말리스(*Bifidobacterium imalis*), 비피도박테리아 인판티스(*Bifidobacterium infantis*), 비피도박테리아 써모필룸(*Bifidobacterium thermophilum*), 비피도박테리아 슈도롱검(*Bifidobacterium pseudolongum*), 비피도박테리아 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*) 및 비피도박테리아 브레비(*Bifidobacterium breve*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 유전자 전달체.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 비피도박테리아는 비피도박테리아 롱검인 것을 특징으로 하는 유전자 전달체.

청구항 17

제 12항에 있어서, 상기 유전자 전달체는 혐기 환경의 종양 조직에서 성장할 수 있으며, (a) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 활성을 갖는 단백질을 발현시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 유전자 전달체.

청구항 18

제 17항에 있어서, 혐기 환경인 종양 조직에서 성장할 수 있으며, 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시

키는 활성을 갖는 단백질을 발현시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 유전자 전달체.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 유전자 전달체는 비피도박테리아 롱검 105-A/pBifiCD(National Institute of Technology and Evaluation Patent Miroorg isms Depository Accession No. NITE BP-491)인 것을 특징으로 하는 유전자 전달체.

청구항 20

제 12항의 유전자 전달체를 포함하는 고형 종양 치료 약물용 약학적 조성물.

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 협기성 질환 치료를 위한 유전자 전달체로서 유용한 형질전환된 협기성 미생물의 제조에 사용되는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해서 형질전환된 협기성 미생물을 포함하는 유전자 전달체, 상기 유전자 전달체를 포함하는 약학적 조성물, 및 상기 유전자 전달체를 포함하는 협기성 질환 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

유전공학의 분야에 있어서, 박테리오파지(phages), 동물 또는 식물 바이러스, 플라스미드 등은 미생물의 형질전환을 위한 발현 벡터로서 널리 사용된다. 유전자 산물의 표적 단백질을 발현하도록 형질전환된 미생물로 E. coli, 효모 등이 널리 이용된다. 이러한 형질전환된 미생물은 표적 단백질을 발현시키는 것을 목적으로 하고 있으며, 상기 미생물 자체를 이용하는 것은 고려하지 않는다.

[0003]

근래에, 형질전환된 미생물 자체를 이용하는 것과 관련하여 형질전환된 협기성 박테리아를 유전자 전달체로 이용하여 악성 종양을 치료하기 위한 방법이 관심을 받고 있다; 예를 들어, 형질전환된 클로스트리디움(Clostridium)을 이용하여 종양 위치에 유전자를 전달하는 방법(특허문현 1 내지 3 참조)이 제시되고 있으며, 또한, 형질전환된 비피도박테리아 롱검(Bifidobacterium longum)을 고형 종양의 치료에 활용하는 방법이 제안되고 있다(비특허문현 1 및 2 참조).

[0004]

또한, 고형 종양의 치료를 위한 유용한 유전자 전달체로서, 형질전환된 비피도박테리아에 있어서, 사이토신 탈아미노효소(cytosine deaminase, 이하 CD라고 부름)을 발현하도록 형질전환된 비피도박테리아는 효소-전구약물(enzyme-prodrug) 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대한다(특허문현 4 및 비특허문현 3 내지 4 참조). CD는 항종양 활성을 갖는 5-플루오로우라실(5-fluorouracil, 이하 5-FU라고 부름)의 전구약물(전구체)인 5-플루오로사이토신(5-fluorocytosine)(이하, 5-FU라고 부름)을 5-FU로 전환하는 효소이다.

[0005]

이러한 형질전환된 박테리아 제작에는 박현 벡터가 필요하다.

[0006]

그러나, 유전공학의 분야에서 일반적으로 E. coli를 형질전환시키는데 이용된 E. coli 유래 플라스미드 벡터가 E. coli 이외의 다른 박테리아에서 자연적으로는 복제가 불가능하기 때문에, 상기 형질전환 박테리아의 제작에 있어서 형질전환된 박테리아에서 복제가 가능하도록 플라스미드 벡터를 변환시키는 것이 필요하다.

[0007]

상기 문현에서, 악성 종양의 치료를 위한 이러한 형질전환된 벡터의 제작에 사용되는 발현 벡터는 이미 공지되었으며, 특허문현 1 내지 3에서 E. coli와 클로스트리디움 모두에서 복제가 가능한 pNTR500F, pCD540FT 등의 셔틀 플라스미드(shuttle plasmid)를 발표하였다.

- [0008] 더욱이, 특허문헌 4에서는 상기 셔틀 플라스미드 pBLES100-S-eCD 및 E. coli와 비피도박테리아 (*Bifidobacterium*) 모두에서 복제가 가능한 셔틀 플라스미드 pBLES100-S-eCD의 제작에 사용된 셔틀 플라스미드 pBLES100를 보고하였다.
- [0009] 또한, 셔틀 플라스미드 pBLES100-S-eCD에 비교하여 100배 이상의 높은 효율로 비피도박테리아 통검에 형질전환되는 셔틀 플라스미드 pAV001-HU-eCD 역시 보고된 바 있다(특허문헌 5 참조).
- [0010] 더욱이, 셔틀 플라스미드 pAV001에 삽입된 표적 유전자의 DNA가 부분적으로 변이된 셔틀 플라스미드 pAV001-HU-eCD의 단일-염기 변이 플라스미드인 셔틀 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968가 보고되었다(특허문헌 6 참조).
- [0011] 더욱이, 예를 들어 E. coli와 비피도박테리아 모두에서 복제되는 셔틀 플라스미드 pDG7, E. coli와 클로스트리디움 모두에서 복제되는 셔틀 플라스미드 pEBM3 및 pECM2, 및 E. coli와 락토마실러스 등에서 복제되는 셔틀 플라스미드 pLP825가 보고된 바 있다(비특허문헌 5 참조).
- [0012] 이하 기재한 바와 같이, E. coli 이외의 형질전환체 제조에 이용하기 위한 다양한 플라스미드가 보고되었으며, 이러한 플라스미드는 E. coli와 E. coli를 제외한 박테리아 형질전환체 모두에서 복제되는 모든 셔틀 벡터이며, 오직 E. coli를 제외한 형질전환 박테리아에서만 복제되는 플라스미드 벡터는 알려지지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) US Pat. No. 6416754
 (특허문헌 0002) US Pat. No. 6652849
 (특허문헌 0003) US Pat. No. 2003/0103952
 (특허문헌 0004) JP, A, 2002-97144
 (특허문헌 0005) WO 2006-57289
 (특허문헌 0006) WO 2007-136107

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) Yazaw et al., 종양 유전자 Ther., 7, 269-274(2000)
 (비특허문헌 0002) Yazaw et al., Breast 종양 Res. Treat., 66, 165-170(2001)
 (비특허문헌 0003) Nakamur et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2362-2366(2002)
 (비특허문헌 0004) Fujimori et al., Curr. Opin. 약물 Discov. Devel., 5, 200-203(2002)
 (비특허문헌 0005) Aless dr Argn i et al., Microbiology.; 142: 109-114(1996)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 형질 전환체 유전자 전달체를 이용하여, 고형 종양 또는 허혈성 질환과 같은 협기 환경 내의 질환(이하, 협기성 질환이라고 부름)을 치료하는 방법에 있어서, 사용되는 유전자 전달체는 협기 상태에서 질환을 보이는 조직에서만 오직 생존 및 증식하는 비병원성, 절대 협기성 미생물이며, 협기 상태가 아닌 정상 조직에서는 생존 또는 증식하지 않는 것이 요구된다.
- [0016] 더욱이, 유전자 전달체 내 유전자를 형질전환시키는 것은 상기 유전자 전달체 이외의 병원성 박테리아, 호기성 박테리아 또는 조건 협기성 미생물로 수평적으로 이동되지 않아야 하며, 만약 상기 형질전환되는 유전자가 수평

적으로 이동되었다 할지라도, 그 박테리아에서 복제되지 않아야하는 것이 매우 중요하다. 이러한 이유로, 형질 전환체 유전자 전달체를 제조하는데 사용되는 발현 벡터는 오직 상기 형질 전환체에서만 복제되고, 상기 형질 전환체를 제외한 특히 병원성, 또는 호기성 박테리아 또는 조건 협기성 미생물에서 복제되지 않는 것이 요구된다.

[0017] 지금까지 보고된 대부분의 발현벡터는 상기 형질 전환체 박테리아, 및 예를 들어 *E. coli*와 같은 상기 형질 전환체 박테리아를 제외한 박테리아 모두에서 복제되는 셔틀 벡터였으나, 이들은 오직 비-*E. coli* 형질 전환체에서만 복제되는 발현 벡터가 아니다.

[0018] 본 발명의 목적은 오직 비-*E. coli* 형질 전환체에서만 오직 복제되며, 특히, *E. coli*와 같은 병원성, 또는 호기성 박테리아 또는 조건 협기성 미생물과 같은 다른 박테리아에서 복제되지 않는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0019] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발현 벡터에 의해서 형질전환된 협기성 미생물로 구성되는 유전자 전달체, 상기 유전자 전달체를 포함하는 약학적 조성물, 및 상기 형질 전환체 박테리아를 포함하는 협기성 질환 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명자들은 이전에 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질 중에서 CD를 발현하는 유전자를 표적 유전자로서 선별하였다; 그 후, 상기 표적 유전자가 삽입된 플라스미드 벡터로서, CD 발현 유전자를 갖고 있는 *E. coli*의 플라스미드와 비피도박테리아 룽검-유래 플라스미드가 융합된 셔틀 플라스미드 pBLES100-S-eCD를 제조하였다. 본 발명자들은 상기를 이용하여 비피도박테리아 룽검 105A를 제조함하여 제조된 비피도박테리아 룽검 105A/pBLES100-S-eCD가 악성 종양 치료에 유용한 유전자 절달체라는 것을 발견하고, 보고한바 있다(특허문현 4).

[0021] 상기 융합된 플라스미드를 더욱 향상시키기 위하여, 본 발명자들은 비피도박테리아 룽검 105A/pAV001-HU-eCD-M968 및 이의 제조방법을 보고한바 있으며, 여기서 플라스미드 pAV001-HU-eCD의 단일-염기 변이 체인 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968는 삽입된 표적 유전자의 DNA의 부분적 변이에 의해서 생성되며, 비피도박테리아 룽검 105A은 상기를 이용하여 재조합되었다(특허문현 6).

[0022] 이러한 모든 플라스미드는 비피도박테리아 및 *E. coli* 모두에서 복제되는 셔틀 플라스미드이므로, 이들이 어떠한 원인으로든 *E. coli*에 수평적으로 이동되었을 때, *E. coli*에서 복제된다.

[0023] 본 발명자들은 상기 문제들을 해결하기 위하여 집약적인 연구를 수행하였으며, 상기 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968로부터 *E. coli*의 복제개시점을 포함하고 있는 단편인 pUC 오리(ori)를 제거함으로써, 플라스미드 pBifiCD를 제조하였다. *E. coli* JM109 컴페턴트 세포(competent cell)(Takar Bio Inc.)는 열 쇼크에 의해서 본 발명의 플라스미드 pBifiCD로 형질전환되지 않았으며, 수평적 이동의 가능성이 없다는 것이 확인되었다.

[0024] 본 발명의 플라스미드로 형질전환된 박테리아는 예를 들어, 재조합 비피도 박테리아 룽검 105-A인, 비피도박테리아 룽검 105-A/pBifiCD(National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depository(NPMD), 2-5-8 Kazusakamatari Kisarazu-city Chiba 292-0818 Japan, Date of deposit: 19 February 2008, Accession No. NITE BP-491)은 우수한 CD 발현 활성을 나타내며, 상기 CD가 항종양 물질 5-FU으로 변환되는 전구약물 5-FC와의 조합으로 사용될 때, 현저한 종양 성장 억제 효과를 보이며, 이는 고형 종양의 우수한 치료제로서 유용함을 나타낸다.

[0025] 놀랍게도, 이러한 재조합 비피도박테리아는 높은 플라스미드 유지 안정성(plasmid retention stability)을 갖는 것이 추가로 밝혀졌으며, 또한 *E. coli*의 복제개시지점을 포함하고 있지 않기 때문에, *E. coli*로 수평적 이동이 발생한다 할지라도, 이들이 *E. coli*에서 복제될 가능성은 없다. 따라서, 상기 재조합 박테리아는 매우 안전하며 고품질의 유전자 전달체로서 제시된다.

[0026] 따라서, 본 발명은 하기와 관련된다:

[0027] <1> *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함하지 않는, 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 벡터인 발현 벡터;

- [0028] <2> <1>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 협기성 미생물은 *E. coli* 이외의 장내 세균이다,
- [0029] <3> <2>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 *E. coli* 이외의 장내 세균은 비피도박테리아(*Bifidobacterium*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 및 클로스트리디움(*Clostridium*)으로 구성된 군으로부터 선택된다,
- [0030] <4> <1> 내지 <3>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 발현 벡터는 *E. coli* 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위 및 (2) 표적활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 및 협기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자로 포함되는 DNA 단편으로 포함되는 단백질 발현단위를 포함한다,
- [0031] <5> <4>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 *E. coli* 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위는 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 및 클로스트리디움으로 구성된 군으로부터 선택되는 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위이다,
- [0032] <6> <5>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 *E. coli* 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위는 비피도박테리아에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위이다,
- [0033] <7> <6>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 비피도박테리아에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위는 *OrIV* 부위 및 *RepB* 유전자를 포함하는 *pTB6 rep* 단위이다,
- [0034] <8> <7>에 따른 발현 벡터에 있어서, *OrIV* 부위 및 *RepB* 유전자를 포함하는 *pTB6 rep* 단위를 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 1796번째에서 3391번째의 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내어지는 DNA이다,
- [0035] <9> <4> 내지 <8>에 따른 발현 벡터에 있어서, 협기성 미생물에서 기능을 하는 상기 프로모터 및 종결인자는 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 및 클로스트리디움으로 구성되는 군으로부터 선택되는 박테리아에서 기능을 한다,
- [0036] <10> <9>에 따른 발현 벡터에 있어서, 협기성 미생물에서 기능을 하는 상기 프로모터 및 종결인자는 비피도박테리아에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자이다,
- [0037] <11> <10>에 따른 발현 벡터에 있어서, 비피도박테리아에서 기능을 하는 상기 프로모터 및 종결인자는 비피도박테리아에서 기능을 하는 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자이다,
- [0038] <12> <11>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 비피도박테리아에서 기능을 하는 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자는 비피도박테리아-유래 히스톤(histone) 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자이다,
- [0039] <13> <12>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자는 각각 서열번호 4의 7번째 내지 367번째 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 1676번째 내지 1789번째의 염기서열에 의해서 나타내어지는 DNA이다,
- [0040] <14> <4> 내지 <13>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 표적 활성을 갖는 단백질은 협기 환경 내에서 질환에 대한 치료 활성을 갖는 단백질이다,
- [0041] <15> <14>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 협기 환경 내에서 질환에 대한 치료 활성을 갖는 단백질은 (a) 항종양 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이다,
- [0042] <16> <15>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 협기 환경 내에서 질환에 대한 치료 활성을 갖는 단백질은 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이다,
- [0043] <17> <16>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소(cytosine deaminase), 나이트로리덕테이즈(nitroreductase), 및 베타글루쿠로니다제(beta-glucuronidase)로 구성되는 군으로부터 선택된다,
- [0044] <18> <17>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소이다,
- [0045] <19> <18>에 따른 발현 벡터에 있어서, 사이토신 탈아미노효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 4의 395번째 내지 1675번째의 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내어지는 DNA이다,

- [0046] <20> <4> 내지 <19> 중 어느 하나에 따른 발현 벡터는 추가적으로 (3) 약물 저항성, 영양요구성(auxotrophy), 및 배양액 선택성으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 선택 마커 활성 유전자 단위를 포함한다,
- [0047] <21> <20>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 선택 마커 활성을 약물 저항성은 스펙티노마이신(spectinomycin) 저항성, 암피실린(ampicillin) 저항성, 테트라사이클린(tetracycline) 저항성, 네오마이신(neomycin) 저항성, 및 카나마이신(kanamycin) 저항성으로 구성된 군으로부터 선택되는 약물 저항성이다,
- [0048] <22> <21>에 따른 발현 벡터에 있어서, 상기 선택 마커 활성을 스펙티노마이신 저항성이다,
- [0049] <23> <22>에 따른 발현 벡터에 있어서, 선택 마커 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 DNA는 스펙티노마이신 아데닐전이효소(adenyltransferase)를 암호화하는 DNA이다,
- [0050] <24> <23>에 따른 발현 벡터에 있어서, 스펙티노마이신 아데닐전이효소 및 이의 프로모터 서열을 암호화하는 DNA를 포함하는 DNA는 서열번호 4의 3398번째 내지 4476번째 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내어지는 DNA이다,
- [0051] <25> <24>에 따른 발현 벡터에 있어서, 서열번호 4의 염기서열(pBif iCD)로 기재되는 DNA 서열을 포함한다,
- [0052] 더욱이, 본 발명은 하기와 관련된다,
- [0053] <26>(1) E. coli 이외의 혐기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위 및 (2) 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA와 혐기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위 을 포함하며, E. coli 및 E. coli 이외의 숙주 박테리아 모두에서 복제되는 셔틀 플라스미드를 생산하는 단계, 및
- [0054] 상기 셔틀 플라스미드로부터 E. coli에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 제거하는 단계 포함하는 발현 벡터 제조 방법,
- [0055] 더욱이, 본 발명은 하기와 관련된다,
- [0056] <27> <1> 내지 <25> 중의 어느 하나에 따른 발현 벡터에 의해서 형질전환된 혐기성 미생물을 포함하는 유전자 전달체,
- [0057] <28> <27>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 혐기성 미생물은 E. coli 이외의 장내 세균이다,
- [0058] <29> <28>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 E. coli 이외의 장내 세균은 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 및 클로스트리디움으로 구성된 군으로부터 선택된다,
- [0059] <30> <29>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 E. coli 이외의 장내 세균은 비피도박테리아이다,
- [0060] <31> <30>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 비피도박테리아는 비피도박테리아 아돌레센티스(Bifidobacterium adolescentis), 비피도박테리아 아니말리스(Bifidobacterium imalis), 비피도박테리아 인판티스(Bifidobacterium infantis), 비피도박테리아 써모필룸(Bifidobacterium thermophilum), 비피도박테리아 슈도롱검(Bifidobacterium pseudolongum), 비피도박테리아 비피둠(Bifidobacterium bifidum), 비피도박테리아 브레비(Bifidobacterium breve), 및 비피도박테리아 롱검(Bifidobacterium longum)으로 구성된 군으로부터 선택된다,
- [0061] <32> <31>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 비피도박테리아는 비피도박테리아 롱검이다,
- [0062] <33> <27> 내지 <32> 중의 어느 하나에 유전자 전달체에 있어서, 혐기 환경의 종양 조직에서 성장할 수 있으며, 혐기 환경인 질환에 대하여 치료적 활성을 갖는 단백질을 발현할 수 있다,
- [0063] <34> <33>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 혐기 환경인 종양 조직내에서 성장할 수 있으며, 상기 혐기 환경인 질환에 대하여 치료 활성을 갖는 단백질은 (a) 항종양 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이다,
- [0064] <35> <34>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 혐기 환경인 종양 조직내에서 성장할 수 있으며, 상기 혐기 환경인 질환에 대하여 치료 활성을 갖는 단백질은 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이다,
- [0065] <36> <35>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는

단백질은 사이토신 탈아미노효소, 나이트로리덕테이즈, 및 베타글루코나이다제로 구성된 군으로부터 선택된다,

[0066] <37> <36>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소이다, 및

[0067] <38> <37>에 따른 유전자 전달체에 있어서, 상기 유전자 전달체는 비피도박테리아 롱검 105-A/pBifiCD(National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depositary(NPMD) Accession No. NITE BP-491)이다.

[0068] 더욱이, 본 발명은 하기와 관련된다:

[0069] <39> <27> 내지 <38>중 어느 하나에 따른 유전자 전달체를 포함하는 약학적 조성물,

[0070] <40> <34> 내지 <38>중 어느 하나에 따른 유전자 전달체, 및 상기 유전자 전달체가 발현할 수 있으며 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시킬 수 있는 활성을 갖는 단백질에 의해서 항종양 물질로 전환할 수 있는 항종양 물질 전구체를 조합으로 포함하는 약학적 조성물, 및

[0071] <41> <40>에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소이며, 상기 항종양 물질 전구체는 5-플루오로사이토신(5-fluorocytosine)이다.

[0072] 더욱이, 본 발명은 하기와 관련된다:

[0073] <42> 항종양 활성을 갖는 단백질을 치료학적으로 유효하게 발현시킬 수 있는 충분한 양의 <34> 내지 <38> 중 어느 하나에 따른 유전자 전달체를 포함하는 고형 종양 치료제,

[0074] <43> 항종양 물질 전구체를 치료학적으로 유효한 양의 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질을 발현시킬 수 있는 충분한 양의 <34> 내지 <38> 중 어느 하나에 따른 유전자 전달체, 및 치료학적으로 유효한 양의 항종양 물질로 전환될 수 있으며 상기 유전자 전달체가 발현한 수 있는 단백질에 의해서 전환되는 항종양 물질 전구체의 조합을 포함하는 고형 종양을 위한 치료제, 및

[0075] <44> <43>에 따른 고형 종양 치료제에 있어서, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질은 사이토신 탈아미노효소이며, 상기 항종양 물질 전구체는 5-플루오로사이토신이다.

[0076] 본 발명의 활용에 있어서, (a) 항종양 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 또는 (b) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA는 이하, '표적 단백질을 암호화하는 DNA'로 불릴 수 있다.

발명의 효과

[0077] 본 발명의 발현 벡터는 다른 형질 전환체 박테리아가 아닌 특히 E. coli에서 기능을 하는 복제개시점을 포함하고 있지 않으며, 형질전환된 박테리아 이외의 특히 E. coli와 같은 병원성, 또는 절대혐기성 또는 조건혐기성 박테리아서 복제될 가능성이 없는 매우 안전한 벡터이다.

[0078] 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 유전자 전달체는 높은 플라스미드 유지 안정성을 갖고 있으며, 상기 기재한 바와 같이 만일 상기 벡터가 형질 전환체 이외의 특히 E. coli와 같은 병원성, 또는 절대혐기성 또는 조건혐기성 박테리아에 수평적으로 이동된다 할지라도, 이러한 박테리아에서 복제될 위험은 전혀 없다. 따라서, 본 발명의 유전자 전달체는 매우 안정적이며, 고품질의 유전자 전달체로서 유용할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 선택 마커 플라스미드(pSPCM-pUCori)를 제조하는 단계를 나타내는 다이어그램이다(단계 1).

도 2는 선택 마커 활성 단백질 플라스미드(pHU-eCDm-SPCM-pUCori)를 제조하는 단계를 나타내는 다이어그램이다(단계 2).

도 3은 셔틀 플라스미드(pCDshuttle)를 제조하는 단계를 나타내는 다이어그램이다(단계 3).

도 4는 플라스미드 'pBifiCD'를 제조하는 단계를 나타내는 다이어그램이다(단계 4).

도 5는 B. 롱俭 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 항종양 효과를 나타내는 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080]

본 발명의 발현 벡터는 협기성 박테리아, 특히 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 또는 클로스트리디움과 같은 *E. coli*를 제외한 장내 세균에서 기능을 하는 플라스미드 벡터이며, 상기 형질전환된 박테리아가 아닌 *E. coli*와 같은 박테리아에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함하고 있지 않은 발현 벡터이다.

[0081]

보다 구체적으로, 이것은 예를 들어 발현 벡터는 (1) *E. coli* 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위, 및 (2) 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA, 및 협기성 환경에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위를 포함하며, 상기 형질전환된 박테리아가 아닌 박테리아 특히, *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함하지 않는 발현벡터이다.

[0082]

현재까지 보고된 대부분의 플라스미드 벡터는 유전자 형질감염 기술에 대한 축적된 정보와 형질 감염의 확실성으로 인하여, *E. coli*-유래 플라스미드와 형질 전환체 박테리아-유래 플라스미드를 융합하여 제조되었다. 이들은 *E. coli* 및 형질 전환체 박테리아에서 모두 기능을 하는 셔틀 벡터이며, 오직 비-*E. coli* 형질 전환체 박테리아에서만 기능하는 발현 벡터가 아니다.

[0083]

본 발명의 발현 벡터는 예를 들어, (1) *E. coli* 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위 및 (2) 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 및 협기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위를 필수적으로 구성하고 있으며, 특히 상기 형질 전환체 박테리아를 제외한 *E. coli* 박테리아에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함하지 않는다.

[0084]

*E. coli*를 제외한 협기성 미생물에서 기능을 하는 본 발명의 발현 벡터의 플라스미드 복제 단위는 *E. coli* 이외의 협기성 미생물, 예를 들면 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 또는 클로스트리디움과 같은 장내 세균에서 기능을 하며, 형질 전환체 박테리아 이외의 협기성 미생물에서 기능을 하지 않는 한, 모든 플라스미드 복제 단위일 수 있다; 이의 예는 *E. coli* 이외의 비피도박테리아와 같은 협기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함한다. 구체적인 예는 서열번호 4의 1796번째 내지 3391번째의 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내어지는 DNA를 포함한다.

[0085]

더욱이, 본 발명의 발현 벡터의 단백질 발현 단위의 프로모터 및 종결인자는 예를 들어, 비피도박테리아, 락토바실러스, 엔테로코커스, 스트렙토코커스, 또는 클로스트리디움과 같은 장내 세균과 같은 협기성 미생물에서 기능을 하는 한, 어떠한 프로모터와 종결인자일 수 있다; 이의 예는 협기성 미생물에서 기능을 하는 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자를 포함하며, 예를 들어 비피도박테리아-유래 히스톤 유사 DNA 결합 단백질 또는 이의 단일염기 다형성을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자 DNA이다. 구체적인 예는 서열번호 4의 7번째 내지 367번째 염기서열, 및 이의 단일염기 다형성의 1676번째 내지 1786번째 염기서열로 나타내어지는 DNA를 포함한다.

[0086]

더욱이, 본 발명의 발현 벡터는 추가적으로 (3) 선택 마커 활성 유전자 단위를 포함할 수 있다. 본 발명의 발현 벡터가 갖고 있는 선택 마커 활성은 본 발명의 플라스미드 벡터에 의해서 형질전환된 협기성 미생물을 선택하는데에만 한정되지 않는다; 스펙티노마이신 저항성, 암피실린 저항성, 테트라사이클린 저항성, 네오마이신 저항성 또는 카나마이신 저항성과 같은 약물 저항성 및 영양요구성을 포함하며, 스펙티노마이신 저항성이 바람직하다.

[0087]

상기 선택 마커 활성 유전자 단위의 예는 예를 들어, 스펙티노마이신 저항성 활성을 보이는 단백질 또는 이의 단일-염기 변이, 및 이의 프로모터 서열을 암호화하는 DNA를 포함하는 DNA를 포함한다; 예를 들어 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*)-유래 스펙티노마이신 아데닐전이효소(이하, AAD9 카세트(cassette)로 부름) 또는 이의 단일염기 다형성을 암호화하는 DNA. 구체적인 예는 서열번호 4의 3398번째 내지 4476번째 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내어지는 DNA를 포함한다.

[0088]

본 발명에서 일컫는 '단일-염기 변이'는 최소 하나의 부위 염기가 변이되는 것을 의미하고(이하, SNP라고 부름), 오직 하나의 부위의 SNP 뿐만 아니라, 복수 부위의 SNP들을 포함한다.

[0089]

본 발명의 발현 벡터의 단백질 발현 단위로 포함되는 유전자는 예를 들어, 본 발명의 협기성 질환 치료제가 약성 종양 치료제로 이용될 때, 항종양 활성을 갖는 단백질 또는 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질을 발현하고, 거대 DNA(최소 약 10 kb) 또는 수용 세포에 대하여 독성인, 형질전환을 억제하

는 DNA가 아닌 이상, 모든 DNA일 수 있다.

[0090] 상기 항종양 활성을 갖는 유전자에 의해서 발현되는 단백질은 예를 들어 사이토카인(cytokine)을 포함하며, 상기 사이토카인의 구체적인 예는 인터페론 알파(interferons(IFN)-alpha), 베타(beta) 및 감마(gamma), 과립구 대식세포 집락 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 인터루킨-1 알파(interleukins-1 alpha, IL-1 alpha), 1 베타(1 beta), 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 및 18, 종양 괴사 인자 -알파(Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF-alpha), 림프독소(lymphotoxin-beta, LT-beta), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 대식세포 집락 자극 인자(macrophage colony stimulating factor, M-CSF), 대식세포 이동 억제인자(macrophage migration inhibition factor, MIF), 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF), T 세포 활성 공동자극 인자 B7(CD80) 및 B7-2(CD86), KIT 리간드, 및 온코스타틴 M(oncostatin M)을 포함한다. 더욱이, 예는 엔도스타틴(endostatin), 앤지오스타틴(angiostatin), 및 크링글(kringles) 1, 2, 3, 4, 및 5와 같은 혈관신생 억제 성분을 포함한다.

[0091] 이러한 단백질의 서열들은 다양한 생물에서 알려져 있으며, 본 발명에서 사용한 항종양 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA는 서열정보에 기반한 PCR과 같은 공지된 기술을 이용함으로써, 획득될 수 있다.

[0092] 더욱이, 상기 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질의 예는 하기를 포함한다: 5-플루오로사이토신(이하, 5-FC 이라고함)을 항종양 활성 성분 5-플루오로우라실(이하, 5-FU 이라고함)로 전환시키는 효소인 사이토신 탈아미노효소(이하, CD라고함); 5-아지리디노-2,4-디니트로벤자마이드(5-aziridino-2,4-dinitrobenzamide)(이하, CB1945라고함)를 항종양 활성 알킬화제로 전환시키는 효소인 나이트로리더테이즈; 간시클로버(ganciclovir)를 항종양 활성 대사산물로 전환시키는 효소인 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 1 티미딘 키나제(herpes simplex virus 1 type thymidine kinase)(이하, HSV1-TK라고함); 및 글루코리니드화된(glucuronidated) 항종양 활성 성분을 항종양 활성 성분으로 전환시키는 효소인 베타글루루코로니다제를 포함한다. 바람직한 예는 5-FC를 5-FU로 전환시키는 효소인 CD를 포함한다.

[0093] CD를 암호화하는 DNA는 예를 들어, *E. coli*-유래 CD를 암호화하는 DNA를 포함하고 있는 플라스미드 pAdex 1 CSCD(Riken Gene bank RDB No. 1591), 또는 유사하게 *E. coli*-유래 CD를 암호화하는 DNA를 포함하고 있는 플라스미드 pMK116로부터 분리한 DNA(D. A. Mead et al., Protein Engineering 1: 67-74(1986))일 수 있다.

[0094] *E. coli*-유래 CD를 암호화하는 DNA의 예는 서열번호 4의 395번째 내지 1675번째의 염기서열 또는 이의 단일염기 다형성의 염기서열로 나타내는 DNA를 포함한다.

[0095] 더욱이, 본 발명의 혐기성 질환용 치료제가 허혈성 질환에 사용될 때, 허혈성 질환 치료에 유용한 신생혈관 촉진 활성을 갖는 단백질은 본 발명의 발현 벡터의 단백질 발현 단위로 삽입되는 유전자로 사용될 수 있다. 구체적인 예로는 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor 2, FGF2), 내피세포성장인자(endothelial cell growth factor, ECGF), 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 및 간세포생장인자(hepatocyte growth factor, HGF)를 포함한다.

[0096] 유사하게, 이러한 단백질의 서열은 다양한 유기체에서 알려져 있으며, 본 발명에서 사용된 신생혈관 촉진 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자는 서열 정보에 기반한 PCR 방법과 같은 종래의 알려진 기술을 이용하여 획득될 수 있다.

[0097] 본 발명의 벡터는 예를 들어 *E. coli*를 제외한 혐기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위, 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA와 혐기환경에서 기능을 하는 프로모터와 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위, 및 선택 마커 활성 유전자 단위를 포함하고, 혐기 미생물에 형질전환되었을 때, 혐기 미생물내에서 기능을 할 수 있는 플라스미드이고, 상기 형질전환체를 제외한 박테리아, 특히 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 포함하지 않는 한, 어느 벡터도 포함할 수 있다.

[0098] 예로는 상기 문헌에서 공지된 셜틀 플라스미드 pBLES100(특허문헌 4), pAV001(특허문헌 5), pBRASTA101(Tanaka et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2): 422-425), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, etc.(비특허문헌 5)내로 삽입되어 제조된 플라스미드, 상기 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 및 혐기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하고 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 제거한 DNA 단편을 포함한다.

[0099] 이의 다른 예로는 예를 들어, pNTR500F, pCD540FT, 등(특허문헌 1 내지 3), pBLES100-S-eCD(특허문헌 4), pAV001-HU-eCD(특허문헌 5), pAV001-HU-eCD-M968(특허문헌 6) 등과 같은 플라스미드에 다른 특정 단백질 발현 단위와 함께 삽입된 단백질 발현 단위를 재조합하고, 추가적으로 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제단위

를 제거하여 제조된다.

- [0100] 본 발명의 발현 벡터의 구체적인 예는 예를 들어, *E. coli*를 제외한 혐기성 미생물에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위로서, 비피도박테리아에서 기능을 하는 RepB 유전자 및 OriV 부위를 포함하는 pTB6 rep 단위를 갖는 벡터, 혐기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편으로서, 비피도박테리아-유래 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자, 표적 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA로서 5-FC를 5-FU로 전환시키는 CD 효소를 암호화하는 DNA, 및 선택 마커 활성 유전자 단위로서 엔테로코커스 페칼리스-유래 스펙티노마이신 아데닐전이효소를 암호화하는 DNA(AAD9 카세트)를 포함한다.
- [0101] 보다 구체적인 예는 서열번호 4의 염기서열에 의해서 나타내는 pBifiCD를 포함한다.
- [0102] 본 발명의 벡터는 예를 들어 하기의 방법에 의해서 제조될 수 있다.
- [0103] 예를 들어, 본 발명의 벡터 하기(1) 내지 (4)에 의해서 제조될 수 있다:
- [0104] (1) 예를 들어 pUC ori와 같은 *E. coli*의 복제개시점과 예를 들어 AAD9 카세트(이하, 선택 마커 플라스미드라고 부름)와 같은 선택 마커 활성 유전자 단위를 포함하는 플라스미드 제조하기(이하, 단계 1로 부름);
- [0105] (2) 상기 선택 마커 플라스미드의 선형 플라스미드를 준비하고, 선택 마커 활성 유전자 단위 및 단백질 발현 단위를 갖는 플라스미드(이하, 선택 마커 활성 단백질 플라스미드라고 부름)를 제조하기 위하여, 이를 예를 들어 비피도박테리아-유래 히스톤 유사 DNA 결합 단백질을 암호화하는 유전자의 프로모터 및 종결인자와 같은 프로모터 및 종결인자, 및 (a) 항종양 활성을 갖는 단백질 또는 (b) 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질, 예를 들어 CD를 포함하는 단편(이하, 단백질 발현 단위라고 부름)과 라이게이션(ligation)시키기(이하, 단계 2라고 부름);
- [0106] (3) 상기 선택 마커의 선형 플라스미드를 준비하고, *E. coli* 복제개시점, 선택 마커 활성 유전자 단위, 단백질 발현 단위, 및 플라스미드 복제 단위를 갖는 플라스미드(이하, 셔틀 플라스미드라고 부름)를 제조하기 위하여, 이를 *E. coli*를 제외한 혐기성 미생물에서 기능을 하는 복제개시점과 비피도박테리아에서 기능을 하는 RepB 유전자 및 OriV 부위를 포함하는 pTB6 rep 단위의 DNA 단편을 라이게이션시키기(이하, 단계 3이라고 부름); 및
- [0107] (4) 이런 셔틀 플라스미드로부터 *E. coli* 복제개시점을 제거하기(이하, 단계 4라고 부름).
- [0108] 각 단계의 과정은 상기 문헌에 기재되어 있는 알려진 방법에 따라서 수행될 수 있다.
- [0109] 또한, 상기 벡터는 기본적인 방법에 의해서 표적활성을 갖는 다른 단백질을 암호화할 수 있는 DNA와 혐기성 미생물에서 기능을 하는 프로모터 및 종결인자를 포함하는 DNA 단편을 포함하는 단백질 발현 단위를 상기 언급한 다양한 셔틀 플라스미드, 예를 들어 pBLES100(특허문헌 4), pAV001(특허문헌 5), pBRASTA101(Tanak et al., 2005, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(2): 422-425), pDG7, pEBM3, pECM2, pLP825, 등(비특허문헌 5) pNTR500F, pCD540FT, 등(특허문헌 1 내지 3)에 삽입시키고, 유사하게 표준방법에 의해서 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 제거하여 제조될 수 있다.
- [0110] 더욱이, *E. coli* 복제개시점을 포함하는 단편의 pUcanori가 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968(특허문헌6)로부터 제거된 본 발명의 플라스미드 pBifiCD와 동일한 방식으로, 본 발명의 벡터는 또한 플라스미드 pNTR500F, pCD540FT(특허문헌 1 내지 3), pBLES100-S-eCD(특허문헌 4), pAV001-HU-eCD(특허문헌 5) 등으로부터 *E. coli*에서 기능을 하는 플라스미드 복제 단위를 제거하여 제조될 수 있다.
- [0111] 더욱이, 본 발명의 벡터는 또한 pNTR500F, pCD540FT(특허문헌 1 내지 3), pBLES100-S-eCD(특허문헌 4), pAV001-HU-eCD(특허문헌 5), pAV001-HU-eCD-M968(특허문헌 6) 등의 플라스미드에 다른 단백질 발현단위에 삽입한 단백질 발현단위를 제조합하고, 그 후 *E. coli*에서 기능을 하는 이의 플라스미드 복제 단위를 제거하여 제조할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 혐기성 질환 치료를 위한 유전자 전달체는 본 발명의 발현벡터를 이용하여 공지된 유전자 공학 방법에 따라 형질전환된 다른 혐기성 미생물을 형질전환시켜 제조될 수 있다.
- [0113] 본 발명의 발현 벡터에 의해서 형질전환된 혐기성 미생물은 고형 종양과 같은 혐기성 질환을 치료하는데 사용되기 때문에, 이러한 혐기성 미생물이 반드시 혐기성이고, 비병원성이여야 한다; 클로스트리디움 또는 살모넬라(*Salmonella*)와 같은 병원성 박테리아는 만약 이들이 비병원성으로 만들어진 경우 사용될 수 있으며, 락토바실러스와 같은 조건 혐기성 미생물은 혐기성으로 강제적으로 변형된다면 사용될 수 있다.

- [0114] 바람직한 예는 비병원성 혐기성 박테리아를 포함한다; 비병원성 엔테로박테리아가 더욱 바람직하며, 그 중에서 비피도박테리아가 가장 바람직하다.
- [0115] 비피도박테리아의 예는 비피도박테리아 아돌레센티스, 비피도박테리아 아니말리스, 비피도박테리아 인판티스, 비피도박테리아 써모필룸, 비피도박테리아 슈도롱검, 비피도박테리아 비피둠, 비피도박테리아 브레비, 및 비피도박테리아 롱검을 포함하며, 비피도박테리아 롱검이 가장 바람직하다.
- [0116] 이러한 박테리아는 상업적으로 이용가능한 것 또는 기탁 기관(depository institution)으로부터 쉽게 사용가능한 박테리아이다. 예를 들어, 비피도박테리아 롱검 ATCC-15707, 비피도박테리아 비피둠 ATCC-11863, 비피도박테리아 인판티스 ATCC-15697 등은 ATCC(The American Type Culture Collection)로부터 손쉽게 획득할 수 있다.
- [0117] 각각의 박테리아 종은 이에 한정되지 않으며, 비피도박테리아 롱검 종의 예는 비피도박테리아 롱검 105-A 종, 비피도박테리아 롱검 aE-194b 종, 비피도박테리아 롱검 bs-601 종, 및 비피도박테리아 롱검 M101-2 종을 포함하며, 그 중 비피도박테리아 롱검 105-A 종이 바람직하다.
- [0118] 비피도박테리아 브레비 종의 예는 비피도박테리아 브레비 표준 종(JCM1192), 비피도박테리아 브레비 aS-1 종, 및 비피도박테리아 브레비 I-53-8W 종이 포함되며, 그 중 비피도박테리아 브레비 표준 종과 비피도박테리아 브레비 aS-1 종이 바람직하다.
- [0119] 비피도박테리아 인판티스 종의 예는 비피도박테리아 인판티스 표준 종(JCM1222) 및 비피도박테리아 인판티스 I-10-5 종을 포함하며, 그 중 비피도박테리아 인판티스 표준 종 및 비피도박테리아 인판티스 I-10-5 종이 바람직하다.
- [0120] 더욱이, 비피도박테리아 락텐티스(*Bifidobacterium lactentis*) 종의 예는 비피도박테리아 락텐티스 표준 종(JCM1220)을 포함한다.
- [0121] 본 발명의 유전자 전달체는 본 발명의 발현 백터에 의해서 형질전환된 혐기성 미생물을 포함하며, 이는 혐기성 환경 내의 조직에서 자랄 수 있으며, 표적 활성을 갖는 단백질을 발현할 수 있는 한, 이에 한정되지 않으며, 더욱이 상기 형질전환체가 아닌 특히 병원성, 또는 호기성 또는 혐기성 미생물에 수평적으로 이동되는 가능성이 매우 낮거나 없어야 한다.
- [0122] 본 발명의 유전자 전달체의 바람직한 예는 혐기 환경 내의 종양 조직에서 자랄 수 있으며, 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자 전달체를 포함한다. 보다 바람직한 예는 혐기 환경 내의 종양 조직에서 자랄 수 있으며, 5-FC를 5-FU로 전환시킬 수 있는 CD 효소를 발현할 수 있는 비피도박테리아를 포함한다. 더욱 바람직한 예는 NPMD(Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation Patent Microorganisms Depositary)(일본, 치바-켄, 키사라주-시, 카주사카마타리 2-5-8, 우편번호 292-0818)에 2008년 2월 18일 기탁번호 "NITE BP-491"로 기탁된, pBifiCD(비피도박테리아 롱검 105-A/pBifiCD; NPMD 기탁번호 NITE ABP-491)에 의해서 형질전환된 비피도박테리아 롱검 105-A 종을 포함한다.
- [0123] 본 발명의 유전자 전달의 제조는 일반적인 실험 교과서인 예를 들어, 유전자 매뉴얼(Kodansha), 유전자 조작 실험방법 야수유키 타카기(Yasuyuki Takagi)편(Kodansha), 분자 클로닝(Molecular Cloning), Cold Spring Harbor Laboratory(1982), Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory(1989), 또는 Methods in Enzymol., 194(1991)에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0124] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 본 발명의 유전자 전달체를 포함하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 더욱이, 본 발명의 혐기성 질환의 치료제는 상기 본 발명의 유전자 전달체를 포함하는 한, 특별히 한정되지 않는다.
- [0125] 더욱이, 본 발명의 혐기성 질환을 위한 약학적 조성물 또는 치료제는 본 발명의 유전자 전달체를 둘 또는 그 이상을 포함할 수 있다.
- [0126] 더욱이, 본 발명의 혐기성 질환을 위한 약학적 조성물 또는 치료제는 본 발명의 유전자 전달체 이외의 혐기성 질환을 위한 약학적 조성물 또는 치료제, 혐기성 질환 치료효과를 나타내는 화합물과 조합으로 사용될 수 있다.
- [0127] 더욱이, 본 발명의 혐기성 질환을 위한 약학적 조성물 또는 치료제는 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 한, 추가적으로 본 발명의 유전자 전달체를 제외한 성분을 포함할 수 있다. 이러한 추가적 성분의 예는 약학적으로 허용가능한 서포트(supprot), 첨가제, 및 희석제를 포함한다.
- [0128] 본 발명의 약학적 조성물 또는 혐기성 질환 치료제의 복용량은 특정하게 한정되지 않으며, 이의 예는 본 발명의

유전자 전달체를 포함하는 액체 약제 또는 고형을 포함한다. 상기 액체 약제는 본 발명의 유전자 전달체의 협기성 박테리아의 배양액을 정제하고, 여기에 적합한 생리 식염수, 액체 대체제 또는 약물 첨가제를 첨가하고, 이를 앰플, 바이얼(vial)에 채워서 제조될 수 있다. 상기 고형 제형은 적합한 보호제를 액체 약제에 첨가하고, 이를 앰플, 바이얼 등에 채운 후, 동결건조 또는 L-건조(L-drying)하거나 또는 액체 약제에 적합한 보호제를 첨가한 후, 동결건조 또는 L-건조한 후, 이를 앰프, 바이얼에 첨가하여 제조될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성을 또는 협기성 질환 치료제를 투여하는 방법에 있어서, 경구 투여 및 비경구 투여 모두 가능하나, 비경구 투여가 더욱 가능하며, 예를 들어 정맥 주사, 피하 주사, 국소 주입, 또는 뇌실내 투여가 가능하며, 정맥 주사가 가장 바람직하다.

[0129] 본 발명의 약학적 조성을 또는 협기성 질환 치료제의 유전자 전달체의 함량은 질환 부위에서 충분히 자랄 수 있으며, 활성 단백질의 치료학적으로 효과적인 양을 발현하는 한, 특정하게 한정되지 않는다. 그러나 경제적 관점 및 부작용을 최소화하기 위하여, 상기 함량은 요구되는 치료학적 효과를 줄 수 있는 가장 작은 양인 것이 바람직하다.

[0130] 본 발명의 협기성 질환을 위한 약학적 조성을 또는 치료제에 있어서 유전자 전달체의 함량은 환자의 질환의 정도, 체중, 나이 또는 성에 따라서 적절히 선택되며, 회복의 정도에 따라서 적절히 증가 또는 감소할 수 있다.

[0131] 예를 들어, 본 발명의 협기성 질환 치료제가 고형 종양 치료제로서 사용되면, 상기 함량은 협기성 미생물 자체가 나타내는 항종양 활성, 이용한 협기성 미생물에 의해서 생성된 항종양 활성을 갖는 단백질의 종류, 항종양 물질 전구체로부터 전환되는 항종양 물질의 치료학적으로 효과적인 양, 상기 이용한 협기성 미생물에 의해서 생성되는 활성 단백질의 양 등에 따라서 적절히 결정된다.

[0132] 구체적으로, 정맥 투여의 경우에 있어서, 특히 박테리아 덩어리 때문에 고정화(embolization)되는 것과 같은 위험을 감소시키기 위하여 필요하므로, 가낭 낮은 농도로 주입하고, 상기 투여를 여러 번으로 나누거나 또는 상기 투여를 적합한 유체 대체제에 희석하고, 연속 주사에 의해서 투여되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 성인의 경우, 본 발명의 협기성 미생물의 세포를 하루에 1 kg 체중당 106 내지 1012 cfu를 1회 내지 다수로 나누어, 하루 내지 수일에 걸쳐, 연속적 또는 적절한 간격으로 투여된다. 보다 구체적으로, 본 발명의 협기성 미생물 세포를 104 내지 1010 cfu/ml을 포함하고 있는 제형을 성인에게 1 내지 1000 ml 직접 또는 접합한 유체 대체제에 희석되어 투여되고, 하루에 한번 또는 다수로 나누어 수일에 걸쳐 투여된다.

[0133] 더욱이, 질환에 걸린 조직에 직접 투여와 관련된 국소 투여의 경우, 상기 박테리아 세포는 집락화되고, 상기 질환에 걸린 조직 전체에서 최대한 많이 증식하는 것이 요구되므로, 상기 질환에 걸린 조직의 다수의 위치에 고농도로 투여하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 성인의 경우, 본 발명의 협기성 미생물 세포를 1 kg 체중당 106 내지 1012 cfu를 하루에 1회 내지 다수로 나누어 투여되거나, 필요에 따라 매일 또는 하루 내지 수일의 적절한 간격으로 투여된다. 보다 구체적으로, 본 발명의 협기성 미생물 세포를 104 내지 1010 cfu/ml을 포함하고 있는 제형을 성인에게 1 내지 1000 ml 직접투여하고, 바람직하게 하루에 1회 내지 다수로 나누어 투여하거나 필요에 따라서 매일 또는 하루 내지 수일에 걸쳐 투여된다.

[0134] 질환에 걸린 조직 내에서 상기 박테리아가 치료기간 중에 사라지는 것이 관찰된다면, 상기 치료는 우선 중지하고, 그 뒤 박테리아가 상기와 유사한 방법으로 투여된다.

[0135] 본 발명의 유전자 전달체 또는 협기성 질환 치료제가 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 단백질을 발현시킬 수 있는 유전자가 삽입된 협기성 박테리아인 경우, 본 발명의 유전자 전달체를 유효성 분으로 포함하는 고형 종양을 위한 약학적 조성을 또는 치료제는 상기 유전자 전달체에 의해서 발현되는 단백질에 의해 전환되는 유효한 양의 항종양 물질로 전환될 수 있는, 상당량의 항종양 물질과 조합으로 사용된다. 이러한 항종양 물질 전구체는 본 발명의 유전자 전달체를 유효 성분으로 포함하는 고형 종양을 위한 약학적 조성을 또는 치료제에 포함될 수 있으나, 항종양 물질 전구체를 포함하는 약학적 조성을 본 발명의 유전자 전달체를 유효성 분으로 포함하는 고형 종양을 위한 약학적 조성을 또는 치료제와 조합으로 사용되는 것이 바람직하다.

[0136] 본 발명에서 사용된 상기 항종양 물질 전구체는 전구체(prodrug) 상태에서 정상 조직에서 부작용이 거의 없는 항종양 물질 전구체이며, 항종양 물질로 변환된 후, 고형 종양을 표적으로 하는 치료에 있어서 높은 치료효과가 있는 한, 특정하게 한정되지 않는다. 상기 예는 5-FU의 전구약물인 5-FC, 항종양 -활성 알킬화제로 전환되는 CB1945, 항종양 활성 대사산물로 전환되는 간시클로버 및 글루쿠로니드화된 항종양 활성 성분을 포함한다.

[0137] 이러한 방식으로 본 발명의 고형종양을 위한 약학적 조성을 또는 치료제가 항종양 물질 전구체와 조합으로 이용될 때, 본 발명의 고형 종양을 위한 약학적 조성을 또는 치료제를 투여하는 방법은 항종양 물질 전구체를 포함

하는 약학적 조성물을 투여하는 방법과 동일하거나 상이할 수 있으며, 이러한 투여는 동시에 또는 분리하여 수행될 수 있다; 상기 항종양 물질 전구체를 포함하는 약학적 조성물의 투여는 바람직하게 본 발명의 고형 종양을 위한 약학적 조성물 또는 치료제를 투여한 후, 본 발명의 유전자 전달체가 종양 세포에서 자랄 수 있는 충분한 시간을 준뒤에 수행된다.

[0138] 더욱이, 본 발명의 고형 종양을 위한 약학적 조성물 또는 치료제가 항종양 물질 전구체와 조합으로 이용되면, 정상 항종양 물질 전구체를 이용한 고형 종양 치료 방법과 비하여 유전자 전달체는 오직 혐기 환경 내의 종양 세포 조직에서만 집락을 이루고 증식하고, 국소적으로 활성 단백질을 상기 부위에서 생성하므로, 부작용은 현저하게 억제될 수 있으며, 상기 항종양 물질 전구체의 복용량은 다양한 범위에서 결정될 수 있다.

[0139] 항종양 물질 전구체를 포함하는 약학적 조성물의 형태는 특정하게 제한되지 않으며, 파우더, 알약 또는 캡슐과 같은 정상 경구 제형, 또는 좌약 또는 주사와 같은 비경구 투여의 어느 하나일 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 정상 약학적 방법에 의해서 제조될 수 있다.

[0140] 항종양 물질 전구체의 복용량은 조합으로 이용되는 유전자 전달체의 종양 조직내에서의 성장을 및 항종양 물질 전구체가 항종양 물질로의 전환되는 비율에 따라 적합하게 선택될 수 있다. 상기 유전자 전달체의 복용량을 결정하는 것과 동일한 방법으로, 환자의 질환 심각성, 체중, 나이에 따라서 적합하게 선택될 수 있으며, 회복에 따라서 적합하게 증가 또는 감소시킬 수 있다.

[0141] 예를 들어, 실제 치료에서 상기 복용량은 사용되는 항종양 물질 전구체 및 전환되는 항종양 물질의 종류, 상기 항종양 물질 전구체로부터 전환된 항종양 물질의 치료학적으로 효과적인 복용량, 항종양 물질 전구체를 항종양 물질로 전환시키는 활성을 갖는 혐기성 미생물에 의해서 생성되는 활성 단백질의 종류, 및 상기 사용된 혐기성 미생물에 의해서 생성된 활성 단백질의 양 등에 따라서 적합하게 결정될 수 있다.

[0142] 구체적으로, 예를 들어, 본 발명의 유전자 전달체인 CD 유전자를 갖는 비피도박테리아 통검 105-A/pBifiCD(NITE BP-491)를 활성성분으로 포함한 약학적 조성물과 항종양 물질 전구체인 5-FC를 활성성분으로 포함하는 약학적 조성물이 조합으로 투여되었을 때, 종양 조직 내에서 상기 박테리아가 집락화되며 증식되고, 상기 박테리아가 혈액 및 정상 조직에서 사라지는 것을 확인한 후, 5-FC는 성인기준으로 1 내지 100 mg/1일/kg으로 하루에 한번 또는 여러 번 치료기간 동안 연속적으로 투여될 수 있다. 상기 투여방법은 바람직하게 경구 투여일 수, 있으나 정맥투여나 항문 투여와 같은 비경구 투여도 수행될 수 있다.

[0143] 본 발명에서 일컫는 'X와 Y와의 조합'은 X와 Y가 다른 구성인 경우와 X와 Y가 동일한 구성(예를 들어, X와 Y를 포함하는 구성)을 포함한다. X와 Y가 다른 구성일 때, X와 Y는 각각 추가적으로 다른 성분으로 포함할 수 있다.

[0144] 본 발명의 혐기성 질환을 위한 약학적 조성물 또는 치료제는 혐기성 환경 내의 질환에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 다양한 종류의 고형 종양에 적용될 수 있다. 상기 고형 종양의 예는 라지 보웰 종양(large bowel cancer), 두경부암, 유방암, 폐암, 식도암, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 췌도세포암, 육모성 암, 결장암, 신장암, 부신피질암(adrenal cortex cancer), 방광암, 고환암, 전립선암, 고환암, 난소암, 자궁암, 갑상선암, 악성 유암종(malignant carcinoid cancer), 피부암, 악성 흑색종, 골육종, 연부 조직 육종, 신경모세포종, 빌름스 종양(Wilms' cancer), 망막아세포종, 흑색종, 및 편평암(squamous tumor)을 포함한다.

[0145] 더욱이, 혐기 환경 내의 다른 질환의 예는 심근경색 또는 동맥경화성 동맥폐색증과 같은 혀혈성 질환, 및 버거씨 병과 같은 하지 혀혈성 질환을 포함한다.

[실시예]

[0146] 본 발명보다 보다 구체적으로 하기의 참조 실시예 및 실시예를 참조에 의해서 기재되나, 본 발명의 기술적 반경은 이러한 실시예에 의해서 한정되지 않는다.

<참조 실시예 1>

DNA 주형의 제조

[0148] 각 실시예에서 주형으로 사용한 플라스미드 DNA의 농도는 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ 로 조정되었으며, -30°C 냉동고에서 사용하기 전까지 보관되었다. 각 실시예에서 주형으로 사용한 플라스미드 DNA는 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

플라스미드 구성요소 및 이들의 새로운 플라스미드에서의 역할

플라스미드		Role in the new 플라스미드
명칭	구성요소	
pBLES100	AAD 9 카세트	SPCM 저항성 유전자(containing 스펙티노마이신 아데닐전이효소 CDS, 이의 프로모터, 리보솜 결합 부위, 종결인자)
pBLES100	pTB6(OriV 및 RepB)	비파도박테리아 롱겹내의 복제 단위
pBluescript II SK+	pUCanori	<i>Escherichia coli</i> 내의 복제개시점
pAV001-HU-eCD-M968	HU 프로모터부터 HU 종결인자까지	CD 유전자(HU 프로모터, 리보솜 결합 부위, HU-eCD-M968 CDS, 종결인자를 포함)

[0151] <참조 실시예 2>

[0153] 프라이머의 제조

PCR 증폭 및 확인에 사용된 각각의 프라이머는 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 100 마이크로몰(μM) 스톡 용액(stock solution)으로 녹였다. 이는 추가적으로 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 20 마이크로몰(μM) 프라이머 용액으로 희석되었다. 이는 사용하기 전까지 $-30^{\circ}C$ 냉동고에서 보관되었다. 상기 사용한 프라이머는 하기 표 2에 나타낸다.

표 2

플라스미드 제조 및 확인을 위한 프라이머

프라이머 명	서열 (5' > 3')	목적
pUCori_F1	AGAGAGATCTTGAGCAAAAGGCCAG <u>Bgl II</u>	
pUCori_R1	GAGACTAGTGA T CGAGAAGGATCCGTAGAAAAGATCAAAG <u>G</u>	pUC ori 증폭
AAD9_F1	AGAACTAGTAGAAAGCTTAGAGTCGACT <u>CG</u> ATTTCGTT C <u>TG</u>	
	<i>Bcu I Xho I BamH I</i>	
AAD9_R1	CAGAGATCTAAAAAAATTGAAAAAAAGTGTTCACC <u>Bgl II</u>	AAD9 카세트의 증폭
HUeCD_F3	AAGAGGATCCGTCTCCTGCTGGCCTATGC <u>BamHI</u>	
HUeCD_R1	AGAACTAGTCCGGAATAATA <u>CG</u> TTGGAC <u>Bcu I</u>	HU-eCD-M968의 증폭
HUeCD_inner R1	GCTACGAGCAGAAGGTAACGTTGTAA <u>CG</u> ATGG	
HUeCD_inner F1	CGATTACAAACGTTGAC <u>CT</u> CTGCTCGTAGCGATTACTCG	
OriV-Rep_outer_F1	AGAACTAGTCC <u>CC</u> AGGAC <u>CT</u> CGT <u>CT</u> ACG <u>Bcu I</u>	
OriV-Rep_outer_R1	AGAGTCGACA <u>GG</u> CCCGAAC <u>GG</u> TA <u>GG</u> GC <u>Sal I</u>	OriV-Rep의 증폭
OriV-Rep_inner_F1	CCGTTGAAG <u>CC</u> GGGGAGT <u>CC</u> GT <u>TT</u> CTG <u>CG</u> CG <u>TT</u> GAC	*1
OriV-Rep_inner_R1	GAAACGGCA <u>CT</u> CCCG <u>GG</u> CT <u>CA</u> AC <u>GG</u> GT <u>CC</u> GT <u>CG</u> A <u>GT</u> G	*1
Check primer F1	TGACTTAGAGGAATT <u>ACT</u> ACCTG	
Check primer R2	AAAGTGGCGGAAAGCGCCAC	

*1: 잠정적인 리보솜 결합 부위 및 잠재적인 mRN B의 시작 코돈 전사의 끝과

[0155]

<참조 실시예 3>

[0156]

아가로스 젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)

[0157]

하기 각각의 실시예의 아가로스 젤 전기영동은 하기와 같이 수행되었다.

[0158]

샘플은 필요에 따라 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 10배로 희석되었으며, 분석을 위해서 0.8% 또는 2% 아가로스 젤과 $1 \times TBE$ 버퍼($0.5 \mu\text{g/ml}$ 브롬화에티디움 포함)를 이용하여 전기영동을 수행하였다. 상기 아가로스 젤의 농도는 DNA 샘플의 사이즈에 따라서 결정되었다. DNA 문자 사이즈 마커를 전기영동시 다른 레인(lane)에 넣음으로서, 상기 샘플의 DNA 사이즈를 확인하였다.

[0159]

정량적으로 샘플을 측정해야 할 때에는 FastRuler DNA 래더, Low Range(Fermentas)와 같은 정량 마커, 또는 FastRuler DNA 래더, Middle Range(Fermentas)를 이용하였다. 정량 마커의 각 벤드의 양은 약 5 ng 내지 50 ng이었다.

[0160]

상기 전기영동 후, 상기 젤은 UV를 이용하여 조사하였으며, 상기 샘플의 DNA 농도는 정량 마커의 DNA 농도와 샘플의 농도를 비교하여 측정하였다.

[0161]

<실시예 1>

[0163] 선택 마커 플라스미드(pSPCM-pUCori)의 제조(단계 1)

[0164] 플라스미드 pSPCM-pUCori는 하기의 단계에 따라서 제조되었다.

[0165] (1) pUCanori 단편의 제조(약 700 bp)

[0166] pUCanori의 PCR 증폭 조건의 검증

[0167] pBluescript II SK+를 주형으로 이용하여, PCR 혼합물을 멸균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 10 pg/ μ l pBluescript II SK+ 5 μ l, 5×PrimeStarTM 버퍼 10 μ l, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μ l, 20 uM pUCori-F1 프라이머 0.5 μ l, 20 uM pUCori-R1 프라이머 0.5 μ l, PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μ l, 및 증류수 29.5 μ l를 열음 위에서 혼합하여 준비하였다.

[0168] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0169] [수학식 1]

Denature 98°C 10 sec	}	x 30 cycles
Anneal 45°C 5 sec		
Extension 72°C 40 sec		
72°C 60 sec		
4°C ∞		

[0170]

[0171] PCR이 완료된 후, 상기 반응 혼합물의 1 μ l 및 3 μ l를 참조 실시예 3에 기재된 바와 같이 아가로스 젤 전기영동을 수행하여, PCR 산물을 확인하였다. 젤은, 2% 분석 아가로스 젤(analytical agarose gel)을 이용하였다.

[0172] 아가로스 젤 분석결과로부터, 표적 단일 밴드의 증폭이 약 700bp에 있으며, 상기 증폭량은 약 1 μ g이었다.

[0173] 추가 PCR

[0174] 추가 PCR은 5 튜브 이상의 조건에서 수행되었으며, 전체 약 10 μ g의 PCR 산물이 획득되었다.

[0175] 정제(단백질 제거 및 농도)

[0176] 상기 PCR 반응 혼합물이 전부 혼합된 후, 이들은 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)를 이용하여 정제되었으며, 프라이머 및 단백질은 표준 방법에 의해서 제거되었다. DNA 용리를 위해서 0.1×TE 50 μ l를 이용하였다.

[0177] 상기 정제된 PCR 산물은 0.1×TE를 이용하여 10배 회석되었으며, 아가로스 젤 전기영동을 이용하여 정량화하였다. 젤은, 2% 분석 아가로스 젤(analytical agarose gel)을 이용하였다.

[0178] PCR 산물의 제한 효소 처리

[0179] 상기 정제된 PCR 산물은 하기와 같이 Bcu I 및 Bgl II 제한효소를 이용하여 분리되었다.

[0180] 10×버퍼 O(효소를 포함한 버퍼) 10 μ l 및 Bgl II 55 유닛을 5 μ g의 상기 정제된 PCR 산물에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 상기 총량이 100 μ l가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 단백질은 참조 실시예 4에 기재된 방법에 따라서 제거되었다. 10×버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) 30 μ l 및 Bcu I 255 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 상기 총량이 300 μ l가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기 혼합물을 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)를 이용하여 정제하였으며, 0.1×TE 50 μ l를 이용하여 용리하였다.

[0181] 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0182] 제한 효소에 의해서 분리된 상기 PCR 산물 및 이의 1/10 부피의 10×로딩 버퍼(Takar Bio Inc.)를 잘 혼합하여 전기영동을 위한 샘플을 만들었다. 정제를 위한 2% 아가로스 젤은 1×TAE 버퍼(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 브롬화에티디움 포함)로 채워진 전기영동 용기(Mupid, Cosmo Bio Co., Ltd.)에서 세팅되고, 상기 전기영동 샘플이 여기에 적용되고, 전기영동은 50V의 낮은 온도(4°C 세팅)에서 수행되었다. 문자량 마커(FastRuler DNA 래더, Low Range, Fermentas)는 동시에 다른 레인에 넣고 달렸다.

[0183] 상기 DNA 유동성을 UV 핸드 모니터(UV hand monitor, UVP)를 이용하여 365 nm에서 UV를 아가로스 젤에 조사하여 확인할 수 있다. 전기영동을 시작한 지 130분이 지난 후, 약 700 bp의 표적 밴드가 상기 젤을 따라 약 1/2 위치에 도달하면, 상기 젤을 전기영동 용기에서 꺼냈다.

[0184] 상기 젤을 365 nm에서 UV를 이용하여 조사하면서, 상기 표적 DNA 밴드는 멸균된 나이프 칼(Sterile Surgical Blades, Ruettgers HmbH & Co. KG)을 이용하여 잘라냈다. 상기 잘라낸 젤은 잘게 슬라이스하였으며, 멸균된 2 ml 마이크로튜브에 넣었으며, 상기 튜브의 무게는 미리 측정했다.

아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0185] 상기 잘라낸 젤이 들어있는 2 ml 마이크로튜브의 무게를 측정하고, 상기 젤의 무게를 미리 측정한 빈 튜브의 무게를 차감하여 계산하였다. 제조업체의 지시에 따라, QIAquick Gel Extraction Kit를 이용하여 상기 젤로부터 DNA를 추출하였다. 마지막 단계에서 DNA의 용리는 0.1×TE의 50 μl 을 적용하였다.

[0186] 정제된 PCR 산물의 일부는 0.1×TE로 10배 희석되었으며, 상기 정제된 PCR 산물을 정량적으로 분광 광도(Spectrophotometer)를 이용하여 분석하였다. 아가로스 젤 전기영동은 2% 분석 아가로스 젤을 이용하여 수행하였다.

[0187] PCR 산물의 제한효소 처리에 사용된 DNA 단편, 상기 아가로스 젤로부터 잘라낸 DNA 단편 및 정제에 있어서, 아가로스 젤 분석에서 단일 밴드가 확인되었다. 더욱이, 흡광계를 이용하여 측정한 DNA 농도 측정 결과로부터, 농도는 66 ng/ μl 였다. 더욱이, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 1.911이었다.

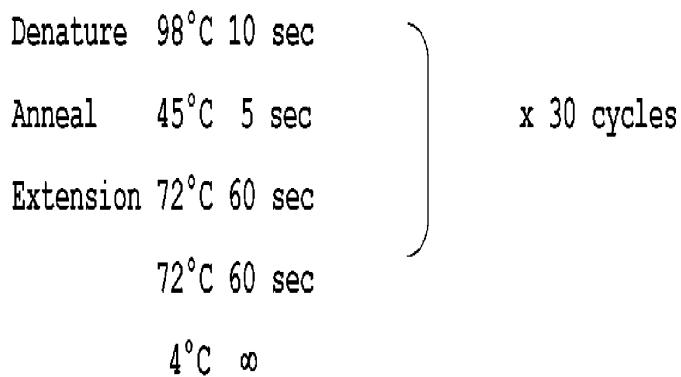
[0188] (2) AAD 9 단편의 제조(약 1.1 kbp)

AAD 9 유전자의 PCR 증폭을 위한 조건의 검증

[0189] pBLES100을 주형으로 이용하여 PCR 혼합물을 멸균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 10 pg/ μl pBLES100 5 μl , 5× PrimeStarTM 버퍼 10 μl , dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μl , 20 uM AAD9-F1 프라이머 0.5 μl , 20 uM AAD9-R1 프라이머 0.5 μl , PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μl , 및 0.1×TE 29.5 μl 를 얼음 위에서 첨가하여 제조한다.

[0190] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0191] [수학식 2]



[0192]

[0193] PCR이 완료된 후, 상기 반응 혼합물의 1 μl 및 3 μl 을 아가로스 젤 전기영동을 수행하여, PCR 산물을 확인하였다. 젤은, 2% 분석 아가로스 젤(analytical agarose gel)을 이용하였다.

[0194]

[0195] 아가로스 젤 분석 결과로부터, 약 1.1 kbp의 표적 단일 밴드의 증폭이 확인되었다. 상기 생성량은 약 1 μg 이었다.

[0197]

추가 PCR

[0198]

상기와 동일한 방식으로, 추가 PCR은 5개의 튜브에서 수행되었으며, 총 약 10 μg 의 PCR 산물이 획득되었다.

[0199]

정제(단백질 제거 및 농도)

[0200]

상기 PCR 반응 혼합물이 전부 혼합된 후, 이들은 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)을 이용하여 정제되었으며, 프라이머 및 단백질은 표준 방법에 의해서 제거되었다. DNA 용리를 위해서 0.1×TE 50 μl 를 이용하였다.

[0201]

상기 정제된 PCR 산물은 0.1×TE를 이용하여 10배 회석되었으며, 아가로스 젤 전기영동을 이용하여 정량화하였다. 젤은, 2% 분석 아가로스 젤(analytical agarose gel)을 이용하였다.

[0202]

PCR 산물의 제한 효소 처리

[0203]

상기 정제된 PCR 산물은 하기와 같이 Bcu I 및 Bgl II 제한효소를 이용하여 분리되었다.

[0204]

10×버퍼 O(효소를 포함한 버퍼) 10 μl 및 Bgl II 36 유닛을 5 μg 의 상기 정제된 PCR 산물에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 상기 총량이 100 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 단백질을 제거하였다. 10×버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) 30 μl 및 Bcu I 165 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 상기 총량이 300 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기 혼합물을 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)를 이용하여 정제하였으며, 0.1×TE 50 μl 를 이용하여 용리를 하였다.

[0205]

아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0206]

제한 효소에 의해서 분리된 PCR 산물을 상기 기재한 "아가로스 젤에 의한 분획 및 제거" 방법과 동일한 방법으로 130분 동안 전기영동을 수행하여 분획한 후, 약 1.1 kbp의 표적 밴드를 잘라냈다. 젤은, 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하였다.

[0207]

아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0208]

상기 잘라낸 젤이 들어있는 2 ml 마이크로튜브의 무게를 측정하고, 상기 젤의 무게를 미리 측정한 빈 튜브의 무게를 차감하여 계산하였다. 제조업체의 지시에 따라, QIAquick Gel Extraction Kit를 이용하여 상기 젤로부터 DNA를 추출하였다. 마지막 단계에서 DNA의 용리는 0.1×TE의 50 μl 를 적용하였다.

[0209]

정제된 PCR 산물의 일부는 0.1×TE로 10배 회석되었으며, 상기 정제된 PCR 산물은 정량적으로 분광 광도계를 이용하여 분석하였다. 아가로스 젤 전기영동은 2% 분석 아가로스 젤을 이용하여 수행하였다.

[0210]

PCR 산물의 제한효소 처리에 사용된 DNA 단편, 상기 아가로스 젤로부터 잘라낸 DNA 단편 및 정제에 있어서, 아가로스 젤 분석에서 단일 밴드를 확인하였다. 더욱이, 흡광계를 이용하여 측정한 DNA 농도 측정 결과로부터, 농도는 40 ng/ μl 였다. 더욱이, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 1.911이었다.

[0211]

(3) pUcanori 단편 및 AAD 9 단편의 라이케이션(Ligation)

[0212]

라이케이션 반응 혼합물(반응 혼합물 1)은 멸균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , pUcanori 단편(66 ng/ μl) 0.75 μl (50 ng), AAD 9 단편(40 ng/ μl) 6.25 μl (250 ng), 5 u/ μl T4 DNA 리가아제(Ligase) 1 μl , 및 0.1×TE 8 μl 를 넣어 상기 정제된 pUcanori 단편(약 700 bp)과 정제된 AAD9 단편(약 1.1 kbp)의 분자 비율은 1:3이었으며, 상기 분자량에 대한 비율은 1:5였다.

[0213]

대조군으로서, 반응 혼합물(반응 혼합물 2) 오직 정제된 AAD9 단편에 의해서 제조된다. 즉, 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , AAD 9 단편(40 ng/ μl) 6.25 μl (250 ng), 5 u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 8.75 μl 를 얼음 위에서 혼합하고, 라이케이션 반응 혼합물(반응 혼합물 2)을 제조하였다..

[0214]

AAD 9 단편은 플라스미드 pBLES100(특허문현4: JP, A, 2002-97144)을 주형으로 이용하므로, 이의 소량만이 첨가된다 한다 할지라도, E. coli의 형질전환의 다음 단계에서 백그라운드(backgroud)로 콜로니가 형성된다. 반응 혼합물 2는 이러한 백그라운드를 확인하기 위해서 대조군으로 이용되었다.

[0215]

유전자 중폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 22°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, 라이케이션을 수행하였다.

[0216]

[수학식 3]

 22°C 5 min (라이케이션 반응) 65°C 5 min (반응 종료) 4°C ∞

[0217]

(4) *E. coli*의 형질전환

[0219]

E. coli JM109의 형질전환은 라이케이션 반응 이후, $1 \mu\text{l}$ 의 용액을 이용하여 열 충격(heat shock)에 의해서 수행되었다. 상기 형질전환의 수행 과정은 Takara *E. coli* JM109 컴파운트 세포(Takara Bio Inc.)의 제품 지시에 기재된 방법에 따라서 수행되었다. 형질전환 이후의 SOC 혼탁에 있어서, $100 \mu\text{l}$ 의 원액(original liquid), 및 SOC에 의해서 10배 희석된 $100 \mu\text{l}$ 를 2개의 LB 아가 배지($75 \mu\text{g}/\text{ml}$ SPCM 포함)에 옮겨놓았다. 라이케이션 반응 혼합물 1 및 2를 이용하여 형질전환된 *E. coli*를 접종시킨 플레이트는 각각 플레이트 1과 플레이트 2이라고 정했다. 이러한 플레이트는 37°C 로 세팅된 배양기에 두고, 하룻밤 동안 배양하였다. 상기 플레이트에 형성된 콜로니의 수는 계수되었다.

[0220]

형질전환이 상기 정제된 pUCanori 단편과 정제된 AAD9 단편(라이케이션 반응 혼합물 1)의 라이케이션 산물을 이용하여 수행되었을 때, 28개와 37개의 콜로니가 10배 희석한 박테리아 액체의 $100 \mu\text{l}$ 배지당 선택배지에서 생성되었으나, 대조군의 반응 혼합물 2를 이용하여 형질전환을 수행하였을 때에는 콜로니가 형성되지 않았다. 상기 백그라운드는 매우 낮았으며, 이는 라이케이션 및 형질전환이 성공적으로 수행되었다는 것을 의미한다.

[0221]

(5) 플라스미드 확인

[0222]

재조합 *E. coli*의 배양

[0223]

플레이트 1에서 콜로니 6개를 무작위적으로 선택하였으며, 이들을 이용하여 배양을 수행하였다. 멸균된 100 ml 유리 에를렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flask)를 $2 \times \text{LB}$ 20 ml 로 채운 후, $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 스펙티노마이신 $20 \mu\text{l}$ 를 여기에 첨가한 후, 이를 잘 혼합하였다. 각각의 콜로니는 플래티넘 루프를 이용하여 얻어서 상기 언급한 배지에 혼탁하였다. 이들은 37°C 로 세팅된 진탕 배양기에 넣고, 19.5 시간 동안 37°C 에서 진탕시켰다.

[0224]

플라스미드 DNA의 추출

[0225]

각 배양액의 1.5 ml 을 2개의 멸균된 2 ml 마이크로튜브에 넣었다. 상기 남아있는 배양액을 플라스미드의 추출이 완료될 때까지 아이스 위에 놓았다. 플라스미드 DNA는 GeneEluteTM 플라스미드 Miniprep Kit의 제품 지시에 따라서 나누어진 배양액으로부터 추출하였다. 플라스미드 DNA의 용리를 위해서 마지막 단계에서 $0.1 \times \text{TE}$ $50 \mu\text{l}$ 를 사용하였다.

[0226]

플라스미드 DNA 농도의 측정

[0227]

상기 추출된 플라스미드는 $0.1 \times \text{TE}$ 를 이용하여 20배로 희석되었으며, DNA 농도는 분광 광도계를 이용하여 측정되었으며, 그 순도는 $A_{260}/280$ 비율을 이용하여 확인하였다.

[0228]

재조합 *E. coli*로부터 플라스미드 DNA를 추출한 2번의 결과로부터, DNA의 순도를 나타내는 $A_{260}/280$ 비율은 1.944 내지 1.972였으며, 상기 플라스미드 DNA의 순도는 우수하였다. 분리된 양은 2회 추출의 혼합을 합쳤을 때 최소 $5 \mu\text{g}$ 이었다.

[0229]

제한 효소에 의한 절단

[0230]

Bcu I만을 이용한 절단, *Bgl* II만을 이용한 절단, *Bcu* I 및 *Bgl* II를 모두 이용한 절단은 플라스미드 DNA 100 ng 을 이용하여 수행하였다. 상기 반응 조건은 효소의 제품 지시에 따라서 수행되었다. 상기 반응 부피는 $20 \mu\text{l}$ 이었다.

[0231]

6개의 모든 콜로니 종에 있어서, 약 700 bp 와 약 1.1 kbp 의 2개의 밴드가 *Bcu* I 및 *Bgl* II의 두 가지 종류의 효

소에 의해서 절단을 수행하였을 때 검출되었다.

[0232] 더욱이, 약 1.8 kbp의 하나의 벤드는 Bcu I 또는 Bgl II의 단일 효소에 의해서 절단을 수행하였을 때 검출되었다. 이는 모든 종에 있어서 상기 플라스미드 사이즈 및 구성이 정해져 있다는 것을 의미한다.

플라스미드 DNA 서열의 확인

[0234] 상기 제한 효소에 의해서 절단된 플라스미드 DNA 용액 20 μl 는 10×로딩 버퍼 2 μl 와 잘 혼합한 후, 이 혼합물은 표준 방법에 의해서 전기영동을 수행하였다.

[0235] 서열 반응은 상기 전기영동에 의해서 추출된 플라스미드를 이용하여 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit를 이용하여 수행하였다. 서열 프라이머로서, 하기 표 3에 나타난 프라이머 세트 1 및 2가 이용되었다.

[0236] 상기 서열의 정렬은 GENETY(R)ATSQ 분석 소프트웨어(Genetyx Corporation)를 이용하여 수행되었다. 정렬을 한 후, 상기 플라스미드 염기서열은 상기 지정된 서열(서열번호 1)과 비교하였다.

[0237] 6 개의 종 가운데서, 4개 종의 플라스미드 서열은 상기 지정된 서열번호 1과 일치하였으나, 나머지 2개 종의 플라스미드는 각각 치환 및 결손된 염기서열이었다.

[0238] 하나의 종은 서열번호 1과 일치되는 4개 종으로부터 선택되었으며, 상기 종으로부터 추출된 플라스미드는 'pSPCM-pUCori'이라고 정했다.

표 3

시퀀싱 프라이머

프라이머 이름	서열 (5'→3')	세트
37_R_5181	AAA TAT CTC TTG CCA GTC AC	Set 1
060723-spmsec	CAT GTT TGG ATC AGG AGT TGA G	Set 1
41_F-seq13	AGC AAG AAA TGG TAC CGT GG	Set 1
060219-pAV001-2	TTT GCT TGG TAA AGC ATT ATG G	Set 1
42_F-seq_28down	GAC TTA GAG GAA TTA CTA CC	Set 1
38_F_5980	ATA CCA AAA GAT ATT GCG GG	Set 1
060723-spmsec	AAT GGA GAA GAT TCA GCC ACT G	Set 1
pUC ori-1	AAG GCC AGC AAA AGG C	Set 2
060219-pAV001-3	GAC GAT AGT TAC CGG ATA AGG C	Set 2
060219-pAV001-3	GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT C	Set 2
40_R-seq_16down	ATT AGC AGA GCG AGG TAT GT	Set 2
39_R_6495	GCA AGC AGC AGA TTA CGC GC	Set 2
HU IV (F)	AGT GCC GCA GGG CGT	Set 3
HU IV (R)	ACG CCC TGC GGC ACT	Set 3
060403_HU upstream cloning	TTT GCT TAG TCC ATG TTG TCA TCA	Set 3
pAVeCD1482_atg	ATG GCA TAC AAC AAG TCT GAC CTC	Set 3
CD seq (F)	GCG CAT GGC AAA CGC TGA AAT GGC AGA TTG	Set 3
CD seq (R)	GTG ATG CCG CGA CGT TTT GGA TAC GTA TCG	Set 3
CD892_D314A	CGC GTT AAA GAG ATG CTG GAG T	Set 3
R-pTB6 R7	GTC TGG GGA GTC CTG CGT TC	Set 4
pBLES100_F3	TAT GCT GAG GCC ATG TCC AAT GAG A	Set 4
R-pTB6 R6	GTC AGG TCG TTG AGC AGG AAC	Set 4
pTB6 F5 (pBLES100 F5)	GAA GAT CGA GCG CCA GTA CGT GAA	Set 4
060219-pAV001-1	GTG AAC ACC TCG CCG TAC C	Set 4
36_F_4754	CAA CCG CGA ACA TCA TGC GC	Set 4

[0239]

[0240] <실시예 2>

[0241] 선택 마커 활성 단백질 플라스미드(pHU-eCDm-SPCM-pUCori)의 제조(단계 2)

[0242] (1) 선형 플라스미드 pSPCM-pUCori의 제조

[0243] 플라스미드의 분리

[0244] pSPCM-pUCori는 하기 기재된 제한 효소 Bcu I, Xho I, 및 Bam HI을 이용하여 분리되었다. Xho에 의한 분리는 분리되지 않은 플라스미드에 의한 형질전환시 백그라운드를 감소시키기 위하여 수행되었다.

[0245] 10×버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) 25 μ l 및 Bcu I 100 유닛이 pSPCM-pUCori 5 μ g에 첨가되었으며, 0.1×TE를 이용하여 총량이 250 μ l 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 이의 100 ng을 꺼내고, 분해가 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0246] 상기 효소 반응 혼합물을 포함하는 튜브는 확인을 기다리는 동안 얼음에 보관하였다. 분리를 확인한 후, 단백질을 상기 효소 반응 혼합물로부터 제거하였다.

[0247] 10×버퍼 Bam HI(효소를 포함한 버퍼) 20 μ l 및 Bam HI 80 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 총량이 200 μ l 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 이의 100 ng을 꺼내고, 분해가 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0248] 상기 효소 반응 혼합물을 포함하는 튜브는 확인을 기다리는 동안 얼음에 보관하였다. 분리를 확인한 후, 단백질을 상기 효소 반응 혼합물로부터 제거하였다.

[0249] 10×버퍼 R(효소를 포함한 버퍼) 50 μ l 및 Xho I 400 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 총량이 500 μ l 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 이의 100 ng을 꺼내고, 분해가 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0250] 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0251] 상기 제한효소에 의해서 분리된 백터는 상기 실시예 1의 "아가로스 젤에 의한 분획 및 제거"에 기재된 동일한 방법에 의해서 75분 동안 전기영동을 수행하여 분획하였으며, 약 1.8 kbp에서 표적 밴드를 잘라냈다. 젤은, 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하였다. 문자량 마커로서, FastRuler DNA 래더, Middle Range(Fermentas)를 사용하였다.

[0252] 아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0253] 상기 실시예 1의 "아가로스 젤로부터 DNA의 용리"에 기재된 동일한 방법에 의해서 잘라낸 젤로부터 DNA를 용리하였다.

[0254] 상기 아가로스 젤 정제에 사용된 백터의 일부는 0.1×TE를 이용하여 3배 희석되었으며, 분광 광도계를 이용하여 정량 분석되었다. 이는 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 상기 백터가 약 1.8 kbp에서 단일 밴드를 생성하는지 확인하고자 하였다.

[0255] 상기 플라스미드 pSPCM-pUCori 제한 효소 처리에 이용된 DNA 단편, 상기 아가로스 젤로부터 DNA 단편의 제거 및 정제에 있어서, 이는 아가로스 젤 분석에서 단일 밴드를 나타냄을 확인할 수 있었다. 흡광계를 이용한 DNA 측정에 있어서, 상기 농도는 21 ng/ μ l이었다. 더욱이, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 2.049이었다.

[0256] (2) 인서트(insert)의 제조(HU-eCD 단편)

[0257] 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968(특허문현 5: WO 2007/136107)를 이용하여, HU-eCD-M968를 포함하는 DNA 단편(비피도박테리아의 HU 단백질의 N 말단 9개 아미노산 및 E. coli-유래 CD가 융합된 단백질, 5-FC 기질에 대한 친화도(affinity)를 증가시키기 위하여 변이된 단백질) HU 프로모터, 및 HU 종결인자는 PCR에 의해서 증폭되었다.

[0258] 두 단계의 PCR(첫 번째 PCR 및 두 번째 PCR)은 하기에 따라 수행되었으며, HU-eCD 단편이 제조되었다.

[0259] 첫 번째 PCR

[0260] PCR 증폭을 위한 조건의 검증

[0261] PCR 증폭조건은 2 가지 종류의 단편(HU-eCD 단편 1 및 HU-eCD 단편 2)을 이용하여 시험하였다.

[0262] pAV001-HU-eCD-M968을 주형으로 이용하여, PCR 혼합물(HU-eCD 단편 1)은 멸균된 0.2 ml PCR 투브(Bio-BIK)에 10 pg/ml pAV001-HU-eCD-M968 5 µl, 5×PrimeStarTM 버퍼 10 µl, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 µl, 20 uM HUECD F3 프라이머 0.5 µl, 20 uM HUECD inner R1 프라이머 0.5 µl, PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 µl, 및 0.1×TE 29.5 µl를 얼음 위에서 첨가하여 제조하였다. 이 혼합물의 3개 투브는 동일한 방법으로 제조되었다.

[0263] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 투브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0264] [수학식 4]

Denature 98°C 10 sec	}	x 30 cycles
Anneal 55°C 5 sec		
Extension 72°C 100 sec		
72°C 60 sec		
4°C ∞		

[0265]

[0266] 동일한 방법으로, pAV001-HU-eCD-M968를 주형으로 이용하여 멸균된 0.2 ml PCR 투브(Bio-BIK)에 10 pg/ml pAV001-HU-eCD-M968 5 µl, 5×PrimeStarTM 버퍼 10 µl, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 µl, 20 uM HUECD inner F1 프라이머 0.5 µl, 20 uM HUECD R1 프라이머 0.5 µl, PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 µl, 및 0.1×TE 29.5 µl를 얼음 위에서 첨가하여 제조하였다. 이 혼합물의 8개 투브는 동일한 방법으로 제조되었다.

[0267] 동일한 방법으로, 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 투브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0268] [수학식 5]

Denature 98°C 10 sec	}	x 30 cycles
Anneal 55°C 5 sec		
Extension 72°C 6 sec		
72°C 60 sec		
4°C ∞		

[0269]

[0270] PCR 반응이 완료된 후, 상기 반응 혼합물은 하나의 투브에서 혼합하였다.

[0271] 상기 PCR 산물은 PCR 반응이 완료된 후, 반응 혼합물의 1 µl 및 3 µl를 이용하여 검증되었다. HU-eCD 단편 1 및 2를 확인하기 위하여, 0.8% 분석 아가로스 젤 및 2% 분석 아가로스 젤을 각각 이용하였다.

[0272] HUECD 단편 1의 PCR 산물의 아가로스 젤 분석 결과를 통해서, 약 1.7 kbp의 표적 단일 밴드 증폭을 확인하였다. 상기 산물의 양은 최소 4.5 µg이었다.

[0273] 더욱이, HUECD 단편 2의 PCR 산물의 아가로스 젤 분석에서, 약 150 bp의 표적 단일 밴드의 증폭이 확인되었다.

산물의 양은 약 8 μg 이었다.

[0274] PCR 정제 키트에 의한 정제

[0275] 상기 PCR 산물은 QIAquick PCR 정제 키트의 과정 매뉴얼에 따른 정제를 수행하였으며, 이를 위해 상기 프라이머를 제거하였다. 상기 정제의 마지막 단계에서 PCR 산물의 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0276] 상기 정제된 PCR 산물은 상기 기재한 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'와 동일한 방법에 의해서 분획되었다. HU-eCD 단편 1은 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤 을 이용하여 65분 동안 전기영동을 수행하였으며, 약 1.7 kbp의 표적밴드를 잘라냈다. HU-eCD 단편 2는 정제를 위해서 2% 아가로스 젤 을 이용하여 65분 동안 전기영동을 수행하였으며, 약 150 bp의 표적밴드를 잘라냈다.

[0277] 아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0278] DNA는 상기 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법에 의해서 용리되었다.

[0279] 정제된 PCR 산물의 정량분석

[0280] 정제된 PCR 산물의 일부는 $0.1 \times \text{TE}$ 를 이용하여 3배 희석되었으며, 분광 광도계를 이용하여 정량적으로 분석되었다. HU-eCD 단편 1의 농도 및 HU-eCD 단편 2의 농도는 모두 $47 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이었으며, 그 산물은 약 $2.3 \mu\text{g}$ 이었다.

[0281] 두 번째 PCR

[0282] PCR 증폭을 위한 조건의 검증

[0283] 상기 정제된 HU-eCD 단편 1 및 정제된 HU-eCD 단편 2를 주형으로 이용하였으며, 이들을 연결하기 위한 PCR 조건을 시험하였다.

[0284] 주형의 제조

[0285] 정제된 HU-eCD 단편 1(약 1.7 kbp) 517 ng 및 정제된 HU-eCD 단편 2(약 150 bp) 47 ng을 혼합한 후, 상기 농도를 $0.1 \times \text{TE}$ 를 이용하여 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 조정하였다. 상기 두 단편의 분자 비율은 1:1이었다.

[0286] 프라이머 혼합물의 제조

[0287] 20 μM Hu-eCD F3 프라이머 $10 \mu\text{l}$ 및 20 μM Hu-eCD R1 프라이머 $10 \mu\text{l}$ 를 동량 혼합하였다.

[0288] PCR 혼합물의 제조

[0289] 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Hu-eCD 단편 1 및 2 혼합물의 $1 \mu\text{l}$, $5 \times \text{PrimeStarTM 베퍼} 10 \mu\text{l}$, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μl , PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μl , 및 $0.1 \times \text{TE} 32.5 \mu\text{l}$ 를 멀균된 0.2 mL PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가한 후, 얼음 위에서 혼합하여 PCR 반응 혼합물을 만들었다. 상기 반응 혼합물의 3개 튜브를 동일한 방법으로 제조하였다.

[0290] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, 98 °C에서 10초, 72 °C에서 100초의 사이클을 5회 반복한 후, 상기 준비한 프라이머 혼합물 2 μl 를 첨가하고, 이를 72 °C에서 혼합하고, 하기의 반응을 유전자 증폭기에서 수행하였다. 상기 반응을 완료한 후, 3개의 PCR 튜브 내의 반응 혼합물은 하나의 튜브 내에서 혼합되었다.

[0291]

[수학식 6]

Denature 98°C 10 sec
 Anneal 60°C 5 sec
 Extension 72°C 100 sec

} x 30 cycles

72°C 60 sec

4°C ∞

[0292]

[0293]

상기 PCR이 완료된 후, 반응 혼합물의 $1 \mu\text{l}$ 및 $3 \mu\text{l}$ 은 0.8% 분석 아가로스 젤 및 $1\times\text{TBE}$ 버퍼($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 브롬화 에티디움)를 이용하여 전기영동을 하였다.

[0294]

두 번째 PCR 단편의 아가로스 젤 분석에 의해서 약 1.8 kbp에서 표적 단일 밴드가 증폭되었다는 것을 확인하였다. 상기 산물의 양은 약 $13 \mu\text{g}$ 이었다.

[0295]

PCR 정제 키트에 의한 정제

[0296]

상기 PCR 산물은 QIAquick PCR 정제 키트를 위한 과정 매뉴얼에 따라서 정제의 대상이 되었으며, 이를 위해 상기 프라이머를 제거하였다. 상기 정제의 마지막 단계에서 DNA 용리에는 $0.1\times\text{TE}$ $50 \mu\text{l}$ 가 적용되었다.

[0297]

상기 프라이머가 제거된 PCR 산물의 일부는 $0.1\times\text{TE}$ 를 이용하여 50배 희석되었으며, 분광 광도계에 의해서 정량 분석되었다.

[0298]

PCR 산물의 제한 효소 처리

[0299]

상기 정제된 PCR 산물은 제한 효소 Bcu I 및 Bam HI 를 이용하여 절단되었다.

[0300]

$10\times$ 버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) $25 \mu\text{l}$ 및 Bcu I 100 유닛은 정제된 PCR 산물 $5 \mu\text{g}$ 에 첨가되고, $0.1\times\text{TE}$ 를 이용하여 총량이 $250 \mu\text{l}$ 이 되도록 하였다. 37°C 에서 2시간 동안 반응시킨 후, 이의 100 ng을 꺼내서 DNA의 내부 분해(internal decomposition)가 일어나지 않는 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0301]

효소 반응 혼합물이 들어있는 상기 튜브는 확인을 기다리는 동안 얼음에서 저장되었다. 전기영동에 의한 확인을 바친 후, 단백질은 상기 효소 반응 혼합물로부터 제거되었다.

[0302]

$10\times$ 버퍼 Bam HI (효소를 포함한 버퍼) $20 \mu\text{l}$ 및 Bam HI 80 유닛이 여기에 첨가되었으며, 총량은 $0.1\times\text{TE}$ 를 이용하여 $200 \mu\text{l}$ 로 만들었다. 37°C 에서 2시간 동안 반응한 후, 이의 100 ng을 꺼내서 DNA의 내부 분해(internal decomposition)가 일어나지 않는 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0303]

효소 반응 혼합물이 들어있는 상기 튜브는 확인을 기다리는 동안 얼음에서 보관하였다. 전기영동에 의한 확인을 바친 후, 상기 효소 반응 혼합물을 QIAquick PCR 정제 키트를 이용하여 정제되었다.

[0304]

아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0305]

상기 제한 효소에 의해서 분리된 PCR 산물은 상기 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'에 기재된 동일한 방법에 의해서 분획되었으며, 약 1.8 kbp의 표적 밴드를 잘라냈다. 상기 젤은 분석을 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하였으며, 전기영동 시작 후 75분이 지난 후, 약 1.8 kbp의 표적 밴드가 상기 젤의 1/3의 위치에 도달했을 때, 상기 전기영동을 종료하였다. DNA 문자량 마커로서, FastRuler DNA 래더, Middle Range(Fermentas)를 이용하였다.

[0306]

아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0307]

DNA는 상기 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법에 의해서 잘려지 젤로부터 용리되었다.

[0308]

아가로스 젤 정제에 이용한 PCR 산물의 일부는 $0.1\times\text{TE}$ 를 이용하여 3배 희석되었으며, 분광 광도계에 의해서 정

량적으로 분석되었다. 전기영동에 의한 확인은 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 수행되었다.

[0309] 상기 PCR 산물을 제한 효소 처리되고, 아가로스 젤 정제를 한 후, 상기 DNA 농도는 흡광계에 의해서 측정되었으며, 이는 41 ng/ μl 로 확인되었다. 더욱이, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 1.932였다. 더욱이, 아가로스 젤을 이용한 전기영동에 있어서 약 1.8 kbp에서 단일밴드가 존재했다.

[0310] (3) 선형 pSPCM-pUCori 및 HU-eCD 단편의 라이케이션

[0311] 라이케이션 반응 혼합물(반응 혼합물 1) 및 대조군 반응 혼합물(반응 혼합물 2 및 반응 혼합물 3)는 하기에 따라 제조되었다.

[0312] 반응 혼합물 1

[0313] 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , pSPCM-pUCori(21 ng/ μl) 2.4 μl (50 ng), HU-eCD 단편(41 ng/ μl) 3.7 μl (150 ng), 5 u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 8.9 μl μl 를 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가하였으며, 선형 pSPCM-pUCori(약 1.8 kbp)에 대하여 the HU-eCD 단편(약 1.8 kbp)의 분자 비율이 1:3(사이즈에 대한 비율 또한 1: 3)이었으며, 혼합은 얼음 위에서 수행되어 라이케이션 반응 혼합물을 만들었다(반응 혼합물 1).

[0314] 반응 혼합물 2

[0315] 유사하게, 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , pSPCM-pUCori(21 ng/ μl) 2.4 μl (50 ng), 5u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 12.6 μl 를 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가하였으며, 혼합은 얼음 위에서 수행되어 pSPCM-pUCori 단편만을 포함한 반응 혼합물을 만들었다(반응 혼합물 2).

[0316] 반응 혼합물 3

[0317] 유사하게, 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , HU-eCD 단편(41 ng/ μl) 3.7 μl (150 ng), 5u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 11.3 μl 를 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가하였으며, 혼합은 얼음 위에서 수행되어 HU-eCD 단편만을 포함한 반응 혼합물을 만들었다(반응 혼합물 3).

[0318] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 22°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, 라이케이션을 수행하였다.

[0319] [수학식 7]

22°C 5 min (라이케이션 반응)

65°C 5 min (반응 종료)

4°C ∞

[0320]

[0321] 절단 이후 남아있는 플라스미드에 의한 백그라운드의 비율은 반응 혼합물 2 및 반응 혼합물 3을 이용하여 측정하였다.

[0322] (4) E. coli의 형질전환

[0323] E. coli JM109의 형질전환은 실시예 1에 기재된 'E. coli 형질전환'에 기재된 동일한 방법에 의한 라이케이션 반응 이후, 1 μl 의 상기 용액을 이용하여 수행되었다.

[0324] 상기 벡터의 라이케이션 산물 및 인서트(라이케이션 반응 혼합물 1)를 이용한 형질전환에 있어서, 34 내지 38개의 콜로니는 선택 배지 당 박테리아 액체를 10배 희석한 100 μl 에서 생성되었지만, 오직 벡터만이 라이케이션된 대조군 반응 혼합물 2 및 인서트만이 라이케이션된 대조군 반응 혼합물 3을 이용한 형질전환에서는 0 내지 1개의 콜로니가 생성되었다. 상기 백그라운드는 매우 낮았으며, 이는 라이케이션 및 형질전환이 성공적으로 수행됨을 의미한다.

[0325] (5) 플라스미드의 확인

[0326] 재조합 E. coli의 배양

- [0327] 실시예 1에 기재된 '재조합 E. coli의 배양' 섹션에 기재된 방법에 따라서 실시되었다. 배양은 20.5 시간 동안 수행되었다.
- [0328] 플라스미드 DNA의 추출
- [0329] 실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA 추출' 섹션에 기재된 방법에 따라서 수행되었다.
- [0330] 플라스미드 DNA의 농도 측정
- [0331] 실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA 농도 측정' 섹션에 기재된 방법에 따라 수행되었다.
- [0332] 상기 6개지 종의 재조합 E. coli로부터 추출된 DNA의 농도를 측정할 때, DNA의 순도를 나타내는 A260/280 비율은 1.904 내지 1.916이었으며, 상기 플라스미드 DNA의 순도는 매우 높았다. 생성량은 최소 5 μg 이었다.
- [0333] 제한 효소에 의한 절단
- [0334] Bcu I 자체에 의한 절단, Bam HI 자체에 의한 절단 및 Bcu I 및 Bam HI를 모두 이용한 절단은 플라스미드 DNA 100 ng을 이용하여 수행하였다. 상기 반응 조건은 효소의 제품지시와 동일하였다. 상기 반응 부피는 20 μl 였다.
- [0335] 아가로스 젤 전기영동
- [0336] 아가로스 젤 전기영동은 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 수행하였다.
- [0337] 6개의 클로닝(cloning) 종에 있어서, 약 1.8kbp의 하나의 밴드는 두 가지 종류 제한효소 Bcu I 및 Bam HI를 이용한 절단으로부터 검출되었다. 더욱이, 약 3.6 kbp의 한 밴드는 Bcu I 또는 Bam HI 효소 하나를 이용한 절단으로부터 검출되었다. 이는 모든 클로닝 종을 위한 플라스미드 크기 및 구성은 구상된 바와 같다를 의미한다.
- [0338] 플라스미드 DNA 서열의 검증
- [0339] 시퀀싱(Sequencing)은 상기 실시예 1이 기재된 '플라스미드 DNA 서열의 검증' 섹션에 기재된 동일한 방법에 의해서 추출된 플라스미드를 이용하여 수행되었다. 프라이머로는 실시예 1에 기재된 표 3의 프라이머 세트 1, 2, 및 3을 이용하였다. 정렬 후, 상기 플라스미드 서열은 지정된 서열(서열번호 2)와 비교하였다.
- [0340] 6개의 클로닝 종의 플라스미드 서열은 모두 서열번호 3과 일치하였으며, 모든 케이스에서 상기 표적 종이 획득되었다는 것을 확인하였다. 하나의 종은 모든 클로닝 종으로부터 선택되었으며, 이러한 종으로부터 추출된 플라스미드는 'pHU-eCDm-SPCM-pUCori'라고 정했다.
- [0341] <실시예 3>
- [0342] 셔틀 플라스미드(pCDshuttle)의 제조(단계 3)
- [0343] (1) 선형 플라스미드 pHU-eCDm-SPCM-pUCori의 제조
- [0344] 플라스미드의 절단
- [0345] pHU-eCDm-SPCM-pUCori는 제한효소 Bcu I, Hind III, 및 Sal I를 이용하여 하기와 같이 절단되었다. Hind III에 의한 절단은 이후의 단계의 형질전환시 백그라운드를 억제하기 위하여 수행되었다.
- [0346] $10\times$ 버퍼 O(효소를 포함한 버퍼) 10 μl 및 Sal I 34 유닛이 pHU-eCDm-SPCM-pUCori 5 μg 에 첨가되었으며, 0.1 \times TE를 이용하여 총량이 100 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 6시간 동안 반응시킨 후, 이의 50 ng을 꺼내서, 분해(decomposition)이 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.
- [0347] 효소 반응 혼합물이 들어있는 상기 튜브는 확인을 기다리는 동안 열음에서 보관되었다. Sal I에 의한 절단을 확인한 후, 상기 효소 반응 혼합물은 QIAquick PCR 정제 키트를 이용하여 정제되었다.
- [0348] $10\times$ 버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) 20 μl 및 Bcu I 50 유닛을 여기에 첨가하였으며, 0.1 \times TE를 이용하여 총량이 200 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 단백질을 제거하였다.
- [0349] $10\times$ 버퍼 R(효소를 포함한 버퍼) 10 μl 및 Hind III 29 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1 \times TE를 이용하여 총량이 100 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기 DNA 용액은 정제되었으며, QIAquick PCR

정제 키트를 이용하여 농축되었다.

[0350] 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0351] 상기 제한효소에 의해서 절단된 벡터는 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'과 동일한 방법에 의해서 분획되었으며, 약 3.6 kbp의 표적 밴드를 잘라냈다. 전기영동은 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하여, 50 V에서 90분 동안 수행되었다. 분자량 마커로서, Quick-Load 1kbp DNA 래더(NEB)를 이용하였다.

[0352] 아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0353] DNA는 상기 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법에 의해서 잘라낸 젤로부터 용리되었다.

[0354] 아가로스 젤 정제에 이용된 벡터의 일부는 $0.1 \times TE$ 에 의해서 3배 희석되었으며, 분광 광도계에 의해서 정량 분석되었다.

[0355] 플라스미드 pHU-eCDm-SPCM-pUCori의 제한효소에 의한 처리 및 아가로스 젤에 의한 정제 이후, DNA 단편의 흡광도를 측정하였을 때, 상기 농도는 $13 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 이었다. 더욱이, 순도를 나타내는 A_{260}/A_{280} 비율은 1.961이었다.

[0356] (2) Or iV-RepB 유전자의 제조(인서트)

[0357] PCR 주형으로서 이용한 pBLES100에 있어서, RepB 유전자의 ORF의 C 말단부위 및 membB 유전자로 추정되는 유전자의 ORF의 N 말단부위를 복제하였다. membB의 ORF의 전사를 막기 위하여, 리보솜 결합 부위로 추정되는 부위와 membB의 전사 시작 코돈 ATG를 다른 염기로 치환하였다. 이러한 경우, RepB의 아미노산 서열이 변화되지 않는 디자인을 하였다. 두 단계의 PCR(첫 번째 PCR 및 두 번째 PCR)을 하기와 같이 수행하여 Or iV-RepB 유전자를 만들었다.

[0358] 첫 번째 PCR

[0359] PCR 증폭 조건의 검증

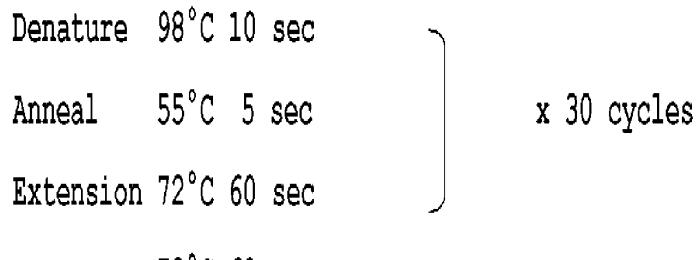
[0360] PCR 증폭 조건은 두 종류의 단편(Or iV-RepB 유전자 1 및 Or iV-RepB 유전자 2)를 위해서 검증하였다.

[0361] Or iV-RepB 유전자 1

[0362] pBLES100을 주형으로 이용하여, 멸균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 $10 \text{ pg}/\text{ml}$ pBLES100 $5 \mu\text{l}$, $5 \times \text{PrimeStarTM}$ 버퍼 $10 \mu\text{l}$, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) $4 \mu\text{l}$, 20 uM OriV-rep outer F1 프라이머 $0.5 \mu\text{l}$, 20 uM OriV-rep inner R1 프라이머 $0.5 \mu\text{l}$, PrimeSTARHS DNA 중합효소 $0.5 \mu\text{l}$, 및 $0.1 \times TE$ $29.5 \mu\text{l}$ 를 얼음 위에서 첨가하여 준비하였다. 상기 혼합물의 3개 튜브를 동일한 방법을 준비하였다.

[0363] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C 에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0364] [수학식 8]



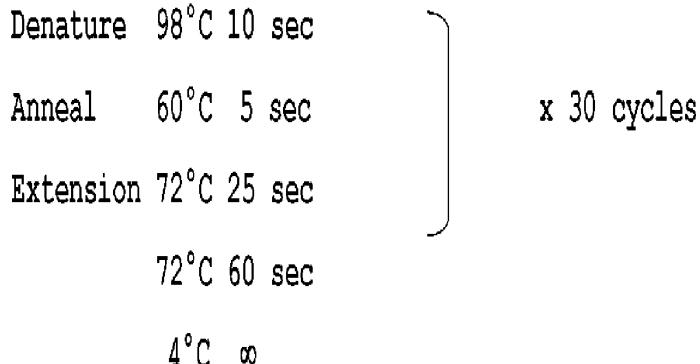
[0365]

[0366] Or iV-RepB 유전자 2

[0367] 동일한 방법으로, pBLES100을 주형으로 이용하여, PCR 혼합물을 멸균된 0.2 ml PCR튜브(Bio-BIK)에 10 pg/ml pBLES100 5 μ l, 5×PrimeStarTM 베퍼 10 μ l, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μ l, 20 uM OriV-rep inner F1 프라이머 0.5 μ l, 20 uM OriV-rep outer R1 프라이머 0.5 μ l, PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μ l, 및 0.1×TE 29.5 μ l를 얼음 위에서 첨가하여 준비하였다. 상기 혼합물의 3개 튜브를 동일한 방법을 준비하였다. 상기 혼합물의 3개 튜브를 동일한 방법을 준비하였다.

[0368] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0369] [수학식 9]



[0370]

[0371] 상기 PCR 산물을 확인하였으며, 산물의 양은 PCR이 완료된 후 상기 반응 혼합물 1 μ l를 각각 분석하였다. 젤은 2% 분석 아가로스 젤을 이용하였다.

[0372] OriV-RepB 유전자 1의 PCR 산물의 아가로스 젤 분석 결과로부터, 약 1.3 kbp의 표적 단일 밴드의 증폭이 확인되었다. 상기 산물의 양은 약 4.5 μ g이었다.

[0373] 더욱이, OriV-RepB 유전자 2의 PCR 산물의 아가로스 젤 분석 결과에서 약 400 bp 표적 단일 밴드의 증폭이 확인되었다. 상기 산물의 양은 약 4.5 μ g이었다.

[0374] PCR 정제 키트에 의한 정제

[0375] 상기 PCR 산물은 정제되었으며, 표준 방법(the operational procedure of QIAquick PCR purification kit)에 따라서 농축되었다.

[0376] PCR 산물의 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0377] 상기 정제되고 농축된 PCR 산물은 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'와 동일한 방법에 의해서 분획되었다. OriV-RepB 유전자 1에 있어서, 전기영동은 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하여 80분 동안 수행되었다. 약 1.3 kbp의 표적 밴드가 젤을 따라 약 1/2 위치에 도달하면, 전기영동을 종료하였다. 분자량 마커로 FastRuler DNA 래더, Middle Range를 이용하였다. 반면, OriV-RepB 유전자 2에 있어서, 전기영동은 정제를 위해서 2% 아가로스 젤을 이용하여 80분 동안 수행되었다. 약 400 bp의 표적 밴드가 젤을 따라 약 1/2 위치에 도달하면, 전기영동을 종료하였다. 분자량 마커로 FastRuler DNA 래더, Middle Range를 이용하였다.

[0378] 아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0379] DNA는 상기 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법으로 잘라낸 젤로부터 용리되었다.

[0380] 정제된 PCR 산물의 정량 분석

[0381] 정제된 PCR 산물의 일부는 0.1×TE를 이용하여 4배 희석되었으며, 및 분광 광도계를 이용하여 정량 분석되었다.

[0382] 상기 아가로스 젤 정제 이후 PCR 산물은 흡광계를 이용한 측정을 수행하였을 때, OriV-RepB 유전자 1 및 OriV-RepB 유전자의 농도는 각각 37 ng/ μ l 및 67 ng/ μ l이었다.

[0383] 두 번째 PCR

[0384] PCR 증폭 조건의 검증

[0385] 상기 정제된 OriV-RepB 단편 1 및 정제된 OriV-RepB 단편 2은 주형으로 이용되었으며, 이들은 연결시키기 위한 PCR 조건을 실험하였다.

[0386] 주형의 제조

[0387] 정제된 OriV-RepB 단편 1(약 1.3 kbp) 325 ng 및 정제된 OriV-RepB 단편 2(약 400 bp) 100 ng을 혼합한 후, 상기 농도를 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 조정하였다. 정제된 OriV-RepB 단편 1에 대한 정제된 OriV-RepB 단편 2의 혼합 비율은 분자량 비율로서 1:1이었다.

[0388] 프라이머 혼합물의 제조

[0389] OriV-rep outer F1 프라이머 20 uM 및 OriV-rep outer R1 프라이머 20 uM는 동량으로 혼합되었다.

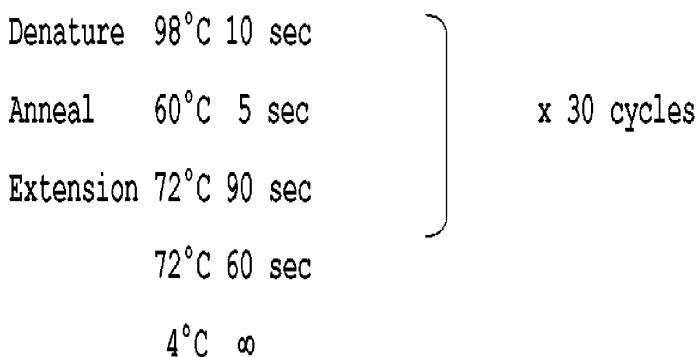
[0390] PCR 혼합물의 제조

[0391] 반응 혼합물 멸균된 0.2 mL PCR튜브(Bio-BIK)에 1 ng/ μl OriV-RepB 1 및 2 혼합물 1 μl , 5×PrimeStarTM 버퍼 10 μl , dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μl , PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μl , 및 $0.1 \times TE$ 32.5 μl 를 첨가한 후, 열음 위에서 혼합하여 제조되었다. 상기 혼합물의 3개 튜브를 동일한 방법을 준비하였다.

[0392] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, PCR을 수행하였다.

[0393] 98 °C 10초, 72°C 70초의 사이클을 5회 반복한 후, 상기 제조한 프라이머 혼합물 2 μl 를 첨가한 후, 72 °C에서 혼합하고, 하기의 반응을 유전자 증폭기에서 수행하였다.

[0394] [수학식 10]



[0395]

[0396] 상기 PCR이 완료된 후, 상기 반응 혼합물의 0.5 μl 및 1 μl 를 0.8% 분석 아가로스 젤 및 1×TBE 버퍼($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 브롬화에티디움)를 이용하여 전기영동하였다.

[0397] 두 번째 PCR 단편의 아가로스 젤 분석으로, 약 1.6 kbp의 표적 단일 랜드의 증폭이 확인되었다. 상기 단일 랜드의 산물은 최소 $6 \mu\text{g}$ 이었다.

[0398] PCR 정제 키트에 의한 정제

[0399] 상기 PCR 산물은 QIAquick PCR 정제 키트의 과정 매뉴얼에 따라서 정제되고, 상기 프라이머를 제거하였다. 상기 정제의 마지막 단계에서 DNA의 용리는 $0.1 \times TE$ 50 μl 를 적용하였다.

[0400] 상기 프라이머가 제거된 PCR 산물의 일부는 $0.1 \times TE$ 를 이용하여 20배 충석되었으며, 분광 광도계에 의해서 정량 분석되었다.

[0401] PCR 산물의 제한 효소 처리

[0402] 상기 정제된 PCR 산물을 제한 효소 Bcu I 및 Sal I를 이용하여 절단시켰다.

[0403] $10 \times$ 버퍼 0(효소를 포함한 버퍼) 10 μl 및 Sal I 25 유닛을 상기 정제된 PCR 산물 5 μg 에 첨가하고, $0.1 \times TE$ 를

이용하여 총량이 100 μl 가 되도록 만들었다. 37°C에서 6시간 동안 반응시킨 후, 이의 50 ng을 꺼내, DNA가 내부 분해(internal decomposition)되지 않는 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 확인하였다.

[0404] 효소 반응 혼합물을 포함하는 튜브는 확인하는 동안 얼음에서 보관하였다. 전기영동에 의한 확인이 끝난 후, QIAquick PCR 정제 키트를 이용하여 DNA를 정제하였다.

[0405] 10×버퍼 T go(효소를 포함한 버퍼) 20 μl 및 Bcu I 110 유닛을 여기에 첨가하고, 0.1×TE를 이용하여 총량이 200 μl 가 되도록 만들고, 단백질을 제거하였다.

PCR 산물의 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0407] 상기 제한 효소에 의해서 절단된 PCR 산물은 상기 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'와 동일한 방법으로 분획되었으며, 약 1.6 kbp의 표적 밴드를 잘라냈다. 젤은, 정제를 위해서 0.8% 아가로스 젤을 이용하였으며, 전기영동을 시작한 지 90분이 지난 후, 1.6 kbp의 표적 밴드가 젤을 따라 약 1/3 위치에 도달하면, 전기영동을 종료하였다. 분자량 마커로 Quick-Load 1kb DNA 래더(NEB)를 이용하였다.

아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0409] DNA는 상기 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법에 의해서 잘려진 젤로부터 용리되었다.

[0410] 정제된 PCR 산물의 일부는 0.1×TE를 이용하여 3배 희석되었으며, 분광 광도계를 이용하여 정량 분석되었다.

[0411] 상기 제한 효소 처리 및 아가로스 젤 정제 이후, 상기 PCR 산물은 흡광계를 이용한 측정에서 DNA 농도가 16 ng/ μl 이었다. 더욱이, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 2.041이었다.

[0412] (3) 선형 pHU-eCDm-SPCM-pUCori 및 Or iV-RepB 유전자의 라이케이션

[0413] 라이케이션 반응 혼합물(반응 혼합물 1) 및 대조군 반응 혼합물(반응 혼합물 2 및 반응 혼합물 3)은 하기와 같이 제조되었다.

[0414] 반응 혼합물 1

[0415] 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , pHU-eCDm-SPCM-pUCori(13 ng/ μl) 3.8 μl (50 ng), Or iV-RepB 단편(16.5 ng/ μl) 3.9 μl (65 ng), 5u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 7.3 μl 를 얼음 위에서 멀균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가한 후, 선형 pHU-eCDm-SPCM-pUCori(약 3.6 kbp) 대 Or iV-RepB 유전자(약 1.6 kbp)의 분자 비율이 1:3(분자량에 의한 비율은 1:1.3)이 되도록 혼합하여 라이케이션 반응 혼합물(반응 혼합물 1)을 만들었다.

[0416] 반응 혼합물 2

[0417] 동일한 방법으로, 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , pHU-eCDm-SPCM-pUCori(13 ng/ μl) 3.8 μl (50 ng), 5 u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 11.2 μl 를 얼음 위에서 멀균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가하고 혼합하여, pHU-eCDm-SPCM-pUCori만 첨가된 반응 혼합물을 만들었다(반응 혼합물 2).

[0418] 반응 혼합물 3

[0419] 동일한 방법으로, 5×Rapid 라이케이션 버퍼 4 μl , Or iV-RepB 단편(16.5 ng/ μl) 3.9 μl (65 ng), 5u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 11.1 μl 를 얼음 위에서 멀균된 0.2 ml PCR 튜브(Bio-BIK)에 첨가하고 혼합하여, Or iV-RepB 유전자만 첨가된 반응 혼합물을 만들었다(반응 혼합물 3).

[0420] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 22°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓고, 라이케이션을 수행하였다.

[0421]

[수학식 11]

22°C 5 min (라이게이션 반응)

65°C 5 min (반응 종료)

4°C ∞

[0422]

[0423] 절단되지 않은 플라스미드로 인한 백그라운드의 비율은 반응 혼합물 2로부터 측정되었으며, 주형으로 이용한 플라스미드 DNA의 존재로 이한 백그라운드의 비율은 반응 혼합물 3으로부터 측정하였다.

[0424]

(4) *E. coli*의 형질전환

[0425]

E. coli JM109의 형질전환은 실시예 1에 기재된 '*E. coli*의 형질전환'에 기재된 동일한 방법에 의해서 라이게이션 반응이 끝난 후, 상기 용액 $1 \mu\text{l}$ 를 이용하여 수행되었다.

[0426]

상기 법터 및 인서트(라이게이션 반응 혼합물 1)의 라이게이션 산물을 이용한 형질전환에서, 238 및 216 콜로니가 형질 전환 후 $100 \mu\text{l}$ 의 원래의 박테리아 혼탁액 기준으로 선택 배지에서 형성되었지만, 법터만이 라이게이션된 대조군 반응 혼합물 2에서는 콜로니가 발견되지 않았으며, 인서트만을 라이게이션 한 대조군 반응 혼합물 3을 이용한 형질전환에서는 8개와 6개의 콜로니가 형성되었다. 백그라운드는 매우 낮았으며. 이는 라이게이션 및 형질전환이 성공적으로 수행되었다는 것을 의미한다.

[0427]

(5) 플라스미드의 확인

[0428]

재조합 *E. coli*의 배양

[0429]

실시예 1에 기재된 '재조합 *E. coli*의 배양' 섹션에 기재된 방법에 따라서 수행되었다. 배양은 22.5시간 동안 수행되었다.

[0430]

플라스미드 DNA의 추출

[0431]

실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA의 추출' 섹션의 방법에 의해서 수행되었다.

[0432]

플라스미드 DNA 농도의 특정

[0433]

실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA 농도의 특정' 섹션의 방법에 의해서 수행되었다.

[0434]

순도를 나타내는 A_{260/280} 비율은 1.951 내지 1.958였으며, 상기 플라스미드 DNA의 순도는 높았다. 산물의 양은 최소 $10 \mu\text{g}$ 이었다.

[0435]

제한 효소에 의한 절단

[0436]

Bcu I만을 이용한 절단, Sal I만을 이용한 절단, 및 Bcu I 및 Sal I를 모두 이용한 절단은 플라스미드 100 ng을 이용하여 수행되었다. 상기 반응 조건은 효소의 제품 지시에 따랐다. 반응 부피는 $20 \mu\text{l}$ 이었다.

[0437]

아가로스 젤 전기영동

[0438]

실시예 1에 기재된 '아가로스 젤 전기영동' 섹션의 방법에 의해서 수행되었다. 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하였다.

[0439]

상기 6개의 후보 종에 있어서, 약 3.6 kbp 및 1.6 kbp의 두 개의 밴드는 Bcu I 및 Sal I의 두 가지 종류의 효소를 이용한 절단에서 검출되었다. 더욱이 약 5.2 kbp의 하나의 밴드는 Bcu I 또는 Sal I만을 각각 이용한 절단에서 검출되었다. 이는 모든 후보 종에 있어서, 상기 플라스미드 사이즈 및 구성이 설계된 바와 같다는 것을 의미한다.

[0440] 플라스미드 DNA 서열의 확인

[0441] 시퀀싱은 상기 실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA 서열의 확인' 섹션의 동일한 방법에 의해서 추출된 플라스미드를 이용하여 수행되었다. 프라이머로서, 실시예 1의 표 3에 기재된 프라이머 세트 1, 2, 3, 및 4를 이용하였다. 정렬 이후, 상기 플라스미드 염기서열은 지정된 서열(서열번호 3)과 비교하였다.

[0442] 6개의 클로닝 종 중 4개 종의 플라스미드 서열은 서열번호 3과 일치하였으며, 이는 표적 종으로부터 획득되었다는 것을 의미한다. 나머지 2개 종은 pTB 6 rep 단위 내에서 단일 염기가 결손되었다. 한 종은 서열번호 3과 일치되는 상기 3개의 종으로부터 선택되었으며, 이로부터 추출된 플라스미드는 'pCDshuttle'로 정의되었다.

[0443] (6) 비피도박테리아의 형질전환

[0444] 컴피턴트 세포의 제조

[0445] 비피도박테리아 통검 Re-105 글리세롤 스타크(glycerol stock was)은 상온에서 녹인 뒤, 잘 섞어주었다. 멸균된 유리 시험 투브에 IMR 조건 배지 10 mL, 및 녹인 박테리아 액체 100 μL를 여기에 첨가한 후, 잘 섞어 준다. 이를 밀봉된 용기에 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 넣어두고, 배양을 37°C에서 24시간 동안 수행하였다(첫 번째 배양액).

[0446] 상기 첫 번째 배양액을 잘 섞어준 후, 이의 100 μL를 측정하고 IMR 조건 배지 10 mL가 들어있는 시험 투브에 접종하는데 이용하고, 이를 밀봉된 용기에 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 넣어두고, 배양을 37°C에서 18시간 동안 수행하였다(두 번째 배양액).

[0447] IMR 조건 배지 30 mL을 4개의 50 mL 부피 멸균된 플라스틱 투브(BD FalconTM tubes, Becton, Dickinson and Company, Jap) 각각에서 나누어 담았다. 이러한 투브는 37°C 배양기에서 미리 데웠으며, 두 번째 배양액의 1.5 mL을 각각에 첨가한 후, 잘 섞어주었다. 뚜껑을 살짝 닫은 후, 상기 투브를 밀봉된 용기에 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 넣었으며, 배양은 37°C에서 수행하였다. 배양은 1시간 35분이 지난 후 혼탁도(파장 600 nm)가 0.213이 되었을 때 종료하였으며, 상기 배양액이 들어있는 투브는 얼음으로 이동시켰다. 이들은 4°C에서 5분 동안 8000 rpm으로 원심분리하였다. 상기 상층액은 클린 벤치에서 제거하였으며, 미리 얼음에서 차갑게 해둔 PBS 버퍼 5 mL을 박테리아 세포가 들어있는 각각의 투브에 첨가하고, 상기 박테리아 세포를 조심스럽게 혼탁시켰다. 상기 박테리아 혼탁액이 들어있는 4개의 투브는 하나의 투브로 합친 후, 이를 4°C에서 5분 동안 8000 rpm으로 원심분리하였다. 상기 상층액은 클린 벤치에서 제거하였으며, 미리 얼음에서 차갑게 해둔 KMR 버퍼 360 μL를 다시 혼탁하기 위하여 박테리아 세포에 첨가하였다. 상기 박테리아 혼탁은 약 720 μL였다. 얼음 위에 밤새 세워두고, 컴피턴트 세포를 만들었다. 박테리아 혼탁은 이의 일부를 동량의 KMR 버퍼에 희석시켜서 제조되었으며, 이를 2배 희석된 컴피턴트 세포로 정의하였다.

[0448] 형질전환

[0449] 상기 컴피턴트 세포 80 μL를 미리 차갑게 만든 1.5 mL 부피 멸균된 마이크로튜에 넣었다. pCDshuttle 578 ng(1 μL)을 여기에 첨가한 후, 파이펫으로 조심스럽게 혼합하였다. 양성 대조군으로 비피도박테리아 B. 통검 Re-105A에서 복제되는 것이 증명된 pAV001-HU-eCD-M968 498 ng(2 μL)을 상기와 동일한 방법으로 컴피턴트 세포와 혼합시켰다. 동일한 방법으로, 상기 2배 희석된 컴피턴트 세포 및 pCDshuttle 578 ng(1 μL)은 혼합되었다. 각각의 상기 혼합물을 미리 차갑게 해둔 큐벳(BM cuvettes, BM Equipment Co., Ltd.)으로 이동시켰다. 이러한 과정에서 DNA가 첨가되지 않은 컴피턴트 세포 또한 다른 큐벳에 넣었다(음성 대조군).

[0450] 형질전환(전기천공법)은 전기천공법 시스템(Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 이용하여 수행되었다. 상기 형질전환기는 2.0 kV로, 축전기는 25 마이크로 F(micro F)로, 저항성기는 200 오메가(omega)로 조정되었으며, 상기 시스템의 지시 매뉴얼에 따라서 작동시켰다.

[0451] 전기 쇼크 이후, IMR 액체 배지 800 μL와 비타민이 첨가된 50 μL 액체의 혼합물을 바로 큐벳에 넣고, 멸균된 2 mL 마이크로튜에 넣었다. 각각의 투브는 동일한 실험의 대상이 되었으며, 이러한 2 mL 투브는 뚜껑을 열고, 건조기에 넣었다. 건조기 내의 공기는 진공 펌프를 이용하여 제거되었으며, 이를 이산화탄소로 채웠다. 이러한 과정은 건조기 내의 공기를 이산화탄소로 대체하기 위하여 3회 반복되었으며, 상기 건조기는 그 후 37°C로 세팅된 배양기에 넣고 3시간 동안 배양하였다.

[0452] 배양 후, 각각의 박테리아 혼탁은 잘 섞어준 후, 이의 100 μL를 측정하고, IMR 아가 배지(agar medium)(75 μg/

m^l SPCM 포함)의 2장의 시트(sheet)에 올려놓았다. 이러한 시트는 산소제거/이산화탄소 생성제(aeroPack(R)-aero, Mitsubishi Gas Chemical Company)와 함께 밀봉된 용기에 넣고, 37°C로 세팅된 배양기에 넣고 3시간 동안 배양하였다.

[0453] 콜로니(colony)의 배양

[0454] 상기 pCDshuttle에 의해서 형질전환된 6개의 콜로니들을 임의로 선택하였으며 APS-2S-2.5R 조건 배지 10 m^l이 들어있는 시험튜브에 접종하였다. 대조군으로서, APS001c 마스터 세포 은행 글리세롤 스타크(master cell bank glycerol stock(2007.3.22 제조됨, Serial No: 004-0127)을 상온에서 녹인 후, 이의 100 μl를 APS-2S-2.5R 조건 배지 10 m^l이 들어있는 시험튜브에 접종하였다. 이렇게 접종된 시험 튜브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 놓고 37°C에서 24시간 동안 세워서 배양을 수행하였다(첫 번째 배양액).

[0455] 상기 첫 번째 배양액을 잘 섞어준 후, 이의 100 μl를 측정하고 APS-2S-2.5R 조건 배지 10 m^l이 들어있는 시험튜브에 접종하였다. 이들은 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고, 37°C에서 24시간 동안 세워서 배양을 수행하였다(두 번째 배양액).

[0456] 플라스미드의 추출

[0457] 플라스미드 추출 및 정제는 APS001c를 제외한 첫 번째 배양액 2 m^l을 이용하여 QIAprep Spin Miniprep Kit에 따라 수행하였다. 상세한 사항은 상기 키트의 제품 지시에 따랐다.

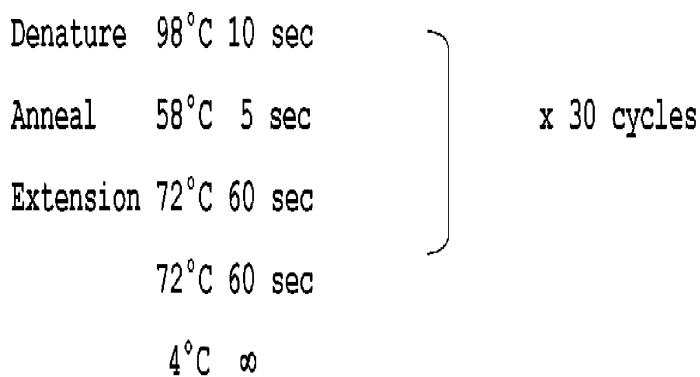
[0458] 플라스미드의 확인(PCR)

[0459] PCR은 주형으로서 추출된 상기 플라스미드를 이용하여 수행하였으며, 플라스미드의 존재/부재를 확인하였다. PCR 혼합물은 멸균된 0.2 m^l PCR 튜브(Bio-BIK)에 플라스미드 DNA 5 μl, 5×PrimeStarTM 버퍼 10 μl, dNTP 혼합물(각각 2.5 mM) 4 μl, 20 uM Check F1 프라이머 0.5 μl, 20 uM Check R2 프라이머 0.5 μl, PrimeSTARHS DNA 중합효소 0.5 μl, 및 0.1×TE 29.5 μl 를 얼음 위에서 첨가하여 제조하였다.

[0460] 동일한 방법으로, PCR 혼합물은 양성대조군으로서, E. coli에서 추출한 플라스미드 pCDshuttle의 농도를 10 pg/m^l으로 조절하여 제조한 주형 용액을 이용하여 만들었다.

[0461] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 98°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓았다.

[0462] [수학식 12]



[0464] 상기 PCR 산물의 확인은 PCR 반응이 완료된 후 상기 반응 혼합물 1 μl를 이용하여 수행하였다. 젤은 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하였다.

[0465] <실시예 4>

[0466] 플라스미드 'pBif iCD'의 제조(단계 4)

[0467] (1) Preparation of pUcanori-free 단편

[0468] 제한 효소에 의한 플라스미드의 절단

[0469] pCDshuttle은 제한 효소 Bgl II 및 Bam HI에 의해서 하기와 같이 절단되었다.

[0470] 10×버퍼 Bam HI(효소를 포함한 버퍼) 20 μl 및 Bam HI 69 유닛을 pCDshuttle 10 μg 에 첨가하고, 0.1×TE를 이용하여 총량이 200 μl 가 되도록 만들고, 섞어주었다. 37°C에서 3시간 10분 동안 반응시킨 후, 이의 50 ng을 꺼내서 분해가 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 이를 확인하였다.

[0471] 효소 반응 혼합물을 포함하는 튜브는 확인하는 동안 얼음에서 보관하였다. Bam HI에 의한 절단이 완료된 후, 단백질은 상기 효소 반응 용액으로부터 제거되었다.

[0472] 10×버퍼 O(효소를 포함한 버퍼) 10 μl 및 Bgl II 45 유닛을 여기에 첨가한 후, 0.1×TE를 이용하여 총량이 100 μl 가 되도록 만들고, 섞어주었다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 이의 100 ng을 꺼내서 분해가 완료된 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하여 이를 확인하였다.

[0473] 효소 반응 혼합물을 포함하는 튜브는 확인하는 동안 얼음에서 보관하였다.

[0474] 0.1×TE를 상기 제한 효소에 의해서 절단된 플라스미드 DNA 용액 100 ng에 첨가하여, 총량이 10 μl 이 되도록 만들고 여기에 10×로딩 버퍼 1 μl 를 첨가하고, 잘 섞어준다. 이를 전기영동의 샘플로 이용하였다. 젤은 0.8% 분석 아가로스 젤을 이용하였다.

[0475] 아가로스 젤에 의한 분획 및 제거

[0476] 상기 제한효소에 의해서 절단된 벡터를 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤에 의한 분획 및 제거'와 동일한 방법에 의해서 120분 동안 전기영동을 수행하였으며,

[0477] 약 4.5 kbp의 표적 DNA 밴드가 약 650 bp의 원하지 않는 밴드로부터 충분히 멀어지는 것을 확인하고, 4.5 kbp의 DNA 밴드를 잘랐다. 문자량 마커는 Quick-Load 1kbp DNA 래더를 이용하였다.

[0478] 아가로스 젤로부터 DNA의 용리

[0479] DNA는 상기 실시예 1에 기재된 '아가로스 젤로부터 DNA의 용리'에 기재된 동일한 방법에 의해서 잘려진 젤로부터 용리되었다.

[0480] 아가로스 젤에 의해서 정제된 벡터의 일부는 0.1×TE를 이용하여 15배 희석되었으며, 분광 광도계를 이용하여 정량 분석되었다.

[0481] 상기 제한효소에 의해서 절단되고, 아가로스 젤에 의해서 정제된 pCDshuttle은 흡광계를 이용하여 측정되었으며, DNA의 농도는 47 ng/ μl 이었으며, 순도를 나타내는 A260/280 비율은 1.937이었다.

[0482] (2) 정제된 pUcanori-free 단편의 셀프-라이게이션(self-ligation)

[0483] 상기 정제된 pUcanori-free 단편(약 4.5 kbp)을 셀프-라이게이션 수행을 하였다. 5×Rapid 라이게이션 버퍼 4 μl , pUcanori-free 단편(47 ng/ μl) 1 μl (47 ng), 5 u/ μl T4 DNA 리가아제 1 μl , 및 0.1×TE 14 μl 를 멀균된 0.2 mL PCR 튜브(Bio-BIK)에 넣고 얼음 위에서 혼합하여 라이게이션 반응 혼합물을 만들었다. 상기 반응 혼합물의 튜브 20개를 제조하였다.

[0484] 유전자 증폭기는 하기의 조건으로 세팅되었으며, 블록 온도가 22°C에 다다르면, 상기 튜브를 그 위에 올려놓았다.

[0485]

[수학식 13]

22°C 5 min (라이게이션 반응)

65°C 5 min (반응 종료)

4°C ∞

[0486]

정제(단백질 제거 및 농도)

[0488]

상기 라이게이션 반응 혼합물의 20개 투브는 하나의 멀균된 마이크로튜브로 합쳐졌으며, 그 후 단백질을 제거하였다. DNA 용해는 $0.1 \times \text{TE}$ $10 \mu\text{l}$ 를 이용하여 수행되었다.

[0489]

(3) 비피도박테리아의 형질전환

[0490]

형질전환

[0491]

비피도박테리아 롱검 Re-105 컴퍼틴트 세포의 형질전환(전기천공법)은 상기 정제된 라이게이션 반응 산물 500 ng ($5 \mu\text{l}$)을 이용하여 수행되었다. 백그라운드 대조군으로서, 라이게이션 반응의 대상이 아닌 pUcanori-free 단편 500 ng ($10 \mu\text{l}$)을 각각의 투브에서 동일한 방법으로 컴퍼틴트 세포와 혼합시켰다. 상기 전기천공법 실험은 실시예 3에 기재된 '형질전환'과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0492]

콜로니의 배양

[0493]

상기 정제된 라이게이션 반응 산물에 의해서 형질전환된 8개의 콜로니는 임의로 선택되었으며, 실시예 3에 기재된 '콜로니의 배양'과 동일한 방법으로 배양되었다.

[0494]

플라스미드의 추출

[0495]

플라스미드 추출 및 정제는 실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA의 추출'과 동일한 방법에 의해서 상기 첫 번째 배양액의 1.5 ml 을 이용하여 수행하였다.

[0496]

플라스미드의 확인(PCR)

[0497]

PCR은 실시예 3에 기재된 '플라스미드의 확인'과 동일한 방법에 의해서 상기 주형으로서 추출된 플라스미드 DNA를 이용하여 수행되었다.

[0498]

상기 PCR 산물은 PCR이 완료된 후, 반응 혼합물 $1 \mu\text{l}$ 를 이용하여 확인하였다. 젤은 0.8% 및 2%의 두 종류 분석 아가로스 젤을 이용하였다.

[0499]

(4) 플라스미드 서열의 확인

[0500]

배양

[0501]

B. 롱검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종 글리세롤 스택은 녹인 후, 잘 섞어주었으며, 이의 $100 \mu\text{l}$ 을 10 ml APS-2S-2.5R 조건 배지가 들어있는 시험 투브에 접종하였다. 이 시험 투브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣었으며, 배양은 37°C 에서 24시간 동안 세워서 수행되었다(첫 번째 배양액). 상기 첫 번째 배양액이 잘 섞여진 후, 이의 $100 \mu\text{l}$ 를 측정하였으며, 10 ml APS-2S-2.5R 조건 배지가 들어있는 두 개의 시험 투브에 접종시키는데 이용하였다. 이러한 시험 투브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣었으며, 배양은 37°C 에서 24시간 동안 세워서 수행되었다(두 번째 배양액).

[0502] 플라스미드의 추출

[0503] 플라스미드 추출 및 정제는 QIAprep Spin Miniprep Kit에 의해서 두 번째 배양액의 적합한 양을 이용하여 수행하였다.

[0504] 4개의 15 mL 부피 멸균된 플라스틱 투브(BD FalconTM, Becton, Dickinson and Company, Japan)를 두 번째 배양액 2.5 mL로 채운 후, 30 mM GTA 버퍼 7.5 mL을 각각의 투브에 첨가하였다. 이를 잘 섞어준 후, 25°C에서 15분 동안 12000 rpm에서 원심분리하였으며, 상기 상층액을 파이펫을 이용하여 제거하였다. 30 mM GTA 버퍼 10 mL을 상기 투브의 박테리아 세포에 첨가한 후, 이를 25°C에서 15분 동안 12000 rpm에서 원심분리하였으며, 상기 상층액을 파이펫을 이용하여 제거하였다. 상기 박테리아 세포가 들어있는 두 개의 투브를 하나로 합친 후, N-아세틸무라미데이즈(N-acetyl muramidase) 용액(동결건조된 N-아세틸무라미데이즈(N-acetyl muramidase) 산물을 30 mM GTA 버퍼에 첨가하여 3000 유닛/mL로 세이카가쿠 사(Seikagaku Corporation)에서 제조) 1 mL을 각각에 첨가하고 이를 잘 섞어 주었다. 이러한 투브를 50°C에서, 3시간으로 세팅된 항온수조에서 배양한 후, 20 mg/mL 프로테이나아제 K(Proteinase K)(QIAGEN) 250 μL를 여기에 첨가한 후, 잘 섞고 60°C, 30 분으로 세팅된 항온수조에서 배양을 수행하였다. 상기 두 개의 투브는 하나로 합쳤다.

[0505] 버퍼 P1(키트에 포함됨) 동량을 상기 투브에 첨가한 후, 혼합시켰다(A). 이 혼합물을 4개의 15 mL 부피 플라스틱 투브에 나눴으며, A와 동량의 라이시스 용액(Lysis solution)(0.2 M NaOH/2% SDS)을 여기에 첨가한 후, 텁블링(tumbling)에서 혼합되었으며, A 부피의 1.4배의 버퍼 N3(키트에 포함됨)을 여기에 첨가한 후, 텁블링(tumbling)에서 혼합되었으며, 상기 박테리아 세포는 세균 분해(bacteriolysis) 및 중화(neutralization)되었다. 25°C에서 15분 동안 12000 rpm에서 원심분리한 후, 상층액은 15 mL 부피 플라스틱 투브에 모았다. 상기 모든 액체는 QIAquick Spin Column(included with kit)의 8개의 컬럼(column)을 이용하여 정제되었다. 상기 정제 방법은 키트의 실험 매뉴얼에 따랐다. 마지막 단계의 DNA 용리는 0.1×TE 50 μL를 이용하여 수행하여, 약 400 μL의 플라스미드 용액을 얻었다.

[0506] 플라스미드 DNA 서열의 확인

[0507] 시퀀싱은 상기 실시예 1에 기재된 '플라스미드 DNA 서열의 확인' 섹션에 기재된 동일한 방법에 의해서 추출된 플라스미드를 이용하여 수행되었다. 프라이머로는 실시예 1에 기재된 표 3의 프라이머 세트 1, 3, 및 4를 이용하였다. 정렬 후, 상기 플라스미드 염기서열은 지정된 서열(서열번호 4)과 비교되었다.

[0508] 클로닝 종으로부터 추출된 플라스미드의 전체 서열을 확인하는 결과는 B. 롱검 Re-105A/pBifiCD 플라스미드 서열이 서열번호 4와 일치한다는 것이었다. 이 클로닝 종으로부터 추출된 플라스미드는 'pBifiCD'로 정했다.

[0509] <테스트 실시예 1>

[0510] 형질전환 확인 및 비피도박테리아의 기본 특성

[0511] (1) 형질전환 확인 of B. 롱검 Re-105A

[0512] pCDshuttle 및 고리닫기(ring-closing)로부터 pUCanori 부위를 제거하여 형성된 셀프-라이제이션산물 및 pCDshuttle을 이용한 B. 롱검 Re-105의 형질전환 결과를 확인하였다.

[0513] 상기 동일한 컴피턴트 세포를 플레이트 1 내지 5에 사용하였다. 플라스미드가 첨가되지 않은 음성 대조군(플레이트 No. 1)에서는 콜로니 수가 1개 내지 0개였다.

[0514] 그러나, 심지어 비피도박테리아에서 복제되는 것이 이미 증명된 셔틀 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968(특허문현 5; WO 2007-136107)를 이용하여 형질전환된 양성 대조군(plate 5)에서도, 콜로니의 수는 5 개 및 2 개였으며, 음성 대조군과의 콜로니 수의 차이는 작았다. 이는 플레이트 1 내지 5에 이용된 컴피턴트 세포의 형질전환 효율이 낮다는 것을 의미한다.

[0515] 반면, 플레이트 6에서는 사용한 컴피턴트 세포의 농도를 2배로 희석시키고, pCDshuttle을 이용하여 형질전환을 수행하였을 때, 최소 500개의 콜로니가 플레이트당 생성되었다. 플레이트 6에 대한 음성 대조군은 실험하지 않았지만, 이는 플레이트 6의 콜로니가 플라스미드 pCDshuttle에 의해서 매우 성공적으로 형질전환되었다는 것을 추측할 수 있다. 더욱이, 컴피턴트 세포의 농도가 형질전환 효율에 크게 영향을 끼친다는 것을 발견하였다.

[0516] 더욱이, pCDshuttle로부터 pUCanori가 제거된 단편의 라이제이션 케이스와 pCDshuttle로부터 pUCanori가 제거

된 단편의 라이케이션이 수행되지 않은 케이스를 비교하였을 때, 형질전환의 결과(차례로, 플레이트 3 및 4), 콜로니의 수는 플레이트 3에서 3개 및 8 개였으며, 플레이트 4에서는 1개 및 2 개로, 콜로니 수는 두 케이스 모두에서 매우 적었다.

[0517] 상기 결과는 표 4에 있다.

표 4

B.longum Re-105A의 형질전환

cfu/ 플레이트

플레이트 번호	컴파턴트 세포	DNA	플레이팅 (100 µL)
1	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	-	1 0
2	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle	2 6
3	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle without pUC ori ligation +	3 8
4	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pCDshuttle without pUC ori ligation -	1 2
5	<i>B.longum</i> Re-105A (x1)	pAV001-HU-eCD-M968	5 2
6	<i>B.longum</i> Re-105A (x2 dilution)	pCDshuttle	>500 >500

[0518]

(2) 형질전환된 *B. longum* Re-105A의 플라스미드 확인

[0520]

8개의 *B. longum* Re-105A/pBifiCD 클로닝 종 및 6개의 *B. longum* Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종으로부터 추출된 플라스미드를 주형으로 이용하여 Check 플라스미드로 PCR을 수행하였을 때, 약 500bp에서 증폭산물이 *B. longum* Re-105A/pBifiCD 클로닝 종에서 검출되었다. *B. longum* Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종에 있어서, 약 1.1 kbp에서 증폭 산물이 검출되었다. 따라서, 모든 클로닝 종은 플라스미드를 가지고 있다는 것을 확인되었다. 또한, pBifiCD는 pUCanori 단편을 가지고 있지 않다는 것을 나타낸다.

[0521]

<테스트 실시 예 2>

[0522]

사이토신 탈아미노효소 활성의 확인

[0523]

사이토신 탈아미노효소(CD) 활성은 8개의 *B. longum* Re-105A/pBifiCD 클로닝 종 및 6개의 *B. longum* Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종을 이용하여 확인되었다.

[0524]

APS-2S-2.5R 조건 배지의 두 번째 배양액 1 mL 각각을 Tris 버퍼(pH 8.4)를 이용하여 3회 세척한 후, 초음파로 분해한 후, 전체 단백질을 추출하였다. 상기 전체 단백질량은 변형된 로우리(Lowry) 방법에 의해서 정량적으로 측정되었으며, 5-플루오로사이토신(5-FC)을 기질로 이용한 효소반응은 전체 단백질 5 µg을 이용하여 수행되었다. 상기 효소반응에 의해서 형성된 5-플루오로우라실(5-FU) 및 남은 5-FC의 양은 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)를 이용하여 측정되었으며, CD 효소 활성이 산출되었다.

[0525]

상기 *B. longum* Re-105A/pBifiCD 클로닝 종 및 *B. longum* Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종으로부터 측정한 CD 활성 결과로부터, 8개의 *B. longum* Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 CD 활성은 전체 단백질의 8.07 - 10.29(평균: 8.74)

단위s/ μ g이었으며, 박테리아 종 사이의 차이는 거의 없었다.

[0526] 더욱이, 상기 6개의 *B. longum* Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종의 CD 활성은 전체 단백질의 8.13 - 9.66(평균: 8.69) 단위s/ μ g이었으며, 유사하게 박테리아 종사이의 차이는 거의 없었다.

[0527] 두 개의 클로닝 종의 CD 활성은 *B. longum* Re-105A/pBif iCD 클로닝 종의 CD 활성의 평균수치가 약간 강하다는 점을 제외하면 거의 같았다; pUcanori 단편의 제거로 CD 활성에 있어서 감소가 없다는 것이 아니라, 이는 성공적으로 작용한다는 것을 의미한다.

[0528] pCDshuttle 및 pBif iCD가 비피도박테리아에서 복제되며, 적합한 CD 활성을 갖고 있는다는 것을 이 테스트를 통해서 증명하였다. 상기 측정 결과는 표 5에 나타낸다.

표 5

종	피크 영역		전환비율 (%)	단백질 농도 (mg/ml)	CD 활성 (유닛/mg 전체 단백질)
	5-FU	5-FC			
<i>B. longum</i> Re-105A /pCDshuttle	#1	83317	874312	9.40	0.2556
	#2	85159	867227	9.66	0.2985
	#3	71781	843867	8.47	0.3572
	#4	68331	840645	8.13	0.3662
	#5	69681	837294	8.31	0.3798
	#6	68460	841469	8.14	0.3775
<i>B. longum</i> Re-105A /pBif iCD	#1	75600	829106	9.03	0.2805
	#2	72268	838034	8.58	0.303
	#3	67964	843275	8.07	0.3188
	#4	68377	837315	8.16	0.3324
	#5	71344	835183	8.51	0.3753
	#6	77285	870090	8.82	0.2805
	#7	85810	814454	10.29	0.3053
	#8	70636	832980	8.45	0.373

[0529]

<테스트 실시 예 3>

플라스미드 유지 안정성의 확인

[0530] 스페티노마이신을 포함한 배지의 배양액에 의해서 충분히 활성화된 배양액에 스페티노마이신이 포함되지 않은 배지를 여기에 첨가하였을 때, 플라스미드 유지 안정성(plasmid retention stability)을 하기와 같이 확인하였

다.

[0533] SPCM이 첨가된 배지에서의 선택 배양

[0534] 2개의 B. 롱검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 글리세로 스택 및 하나의 B. 롱검 Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종의 글리세로 스택을 녹인 후, 잘 섞어주고, 이의 100 μl 를 측정하고, APS-2S-2.5R 조건 배지 10 $\text{m}\ell$ 이 들어있는 테스트 투브에 접종하는데 이용하였다. 또한, APS001canMCB(Serial No. 004-0116)에 대한 접종이 동일한 방법에 의해서 수행되었다. 이러한 테스트 투브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣었으며, 배양은 37°C에서 24시간 동안 상기 투브를 세워서 수행하였다(첫 번째 배양액). 상기 첫 번째 배양액을 잘 섞어 준 후, 이의 100 μl 를 측정하고, APS-2S-2.5R 조건 배지 10 $\text{m}\ell$ 이 들어있는 두 개의 테스트 투브에 접종하는데 이용하였다. 이러한 테스트 투브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고, 배양은 37°C에서 24시간 동안 상기 투브를 세워서 수행하였다(두 번째 배양액).

[0535] SPCM 비첨가 배지에서의 비선택적 배양

[0536] 비선택적 APS-2S-2.5R 조건 배지가 들어있는 10 $\text{m}\ell$ 테스트 투브를 미리 37°C로 세팅된 항온수조에서 데운 후, 상기 배지에 클린 벤치에서 SPCM이 첨가된 두 번째 배양액을 각각 10 μl 를 접종시켰다(0.1% 박테리아 접종). 상기 접종 후, 각각의 테스트 투브는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고 37°C로 세팅된 배양기에 넣었다. 이러한 일련의 과정을 상기 배지의 온도변화를 최소화하기 위해서 신속하게 수행하였다. 이러한 테스트 투브를 24시간 동안 배양한 후, 각각의 배양액을 접종물로 이용하여 비선택적 APS-2S-2.5R 조건 배지에 계대배양(subculturing)을 상기와 동일한 방법으로 반복하였다.

[0537] 상기 세 번째 계대(passage)를 한 후, 상기 비선택적 APS-2S-2.5R 조건 배지의 배양액은 교반 웰(shaking well)에 의해서 섞어준 후, 이의 100 μl 를 측정하고, 협기성 희석제(102배 희석액) 9.9 $\text{m}\ell$ 을 첨가하고 잘 섞어 주었다. 상기 102배 희석액은 동일한 방법으로 희석하여 104배 희석액을 만들고, 이를 106배 희석액을 만들었다. 상기 106배 희석액의 100 μl 를 각각 5개 시트의 BL 아가 배지에 놓았다. 상기 플레이트는 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 봉인된 용기에 놓고, 협기성 배양을 37°C로 세팅된 배양기에서 2시간 동안 수행하였다.

[0538] BL-bS 아가 배지로의 복제

[0539] 300 웰에 분리된 콜로니는 임의로 상기 BL 아가 배지로부터 선택되고 이용되었다. 상기 콜로니는 멸균된 이쑤시개를 이용하여 잡은 후, BL-bS 아가 배지와 BL 아가 배지에 차례로 접종하였다. 접종은 시트당 50의 아가 배지의 전체 6개의 시트에서 수행하였다. 접종 후 상기 아가 배지는 밀봉된 용기에, 협기 상태를 유지하기 위하여 상기 용기의 부피에 따른 산소제거/이산화탄소 생성제를 함께 넣었으며, 배양은 37°C에서 하루 동안 수행하였다.

[0540] 배양이 완료된 후 계수는 박테리아의 증식이 보이지 않는 구멍 자국을 이쑤시개로 표시하면서 수행하였으며, 이러한 박테리아 이외의 계수 자국은 증식하는 것으로 볼 수 있다. 플라스미드를 포함하는 박테리아는 SPCM 저항성이므로, 프랄스미드를 포함하는 박테리아의 비율은 SPCM 저항성 박테리아의 비율로 알 수 있다. 상기 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율은 하기의 식에 의해서 결정된다.

[0541] [수학식 14]

방정식 1

$$\text{BL-bS 아가 배지의 박테리아 증식 구멍 표시의 수} \\ \text{플라스미드 함유 박테리아 비율} = \frac{\text{BL 아가 배지의 박테리아 증식 구멍 표시의 수}}{\text{BL 아가 배지의 박테리아 증식 구멍 표시의 수}} \times 100$$

[0542]

- [0543] 플라스미드 유지 안정성을 측정한 결과로부터, B. 롱검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종s #1 및 #5에서 스펙티노마이신 저항성 박테리아의 비율, 즉 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율은 두 종에서 87.7%의 높은 수치였다.
- [0544] 더욱이, B. 롱검 Re-105A/pCDshuttle에서 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율은 80.3%였다.
- [0545] 반면, 셔틀 플라스미드 pAV001-HU-eCD-M968(APS001C: 특허문헌 6; WO 2007-136107)에 의해서 형질전환된 B. 롱검 Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968에서 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율은 본 발명의 B. 롱검 Re-105A/pBifiCD에서 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율보다 낮은 71.7%였다.
- [0546] 본 발명의 플라스미드 pBifiCD는 비피도박테리아 B. 롱검 Re-105A내에서 안정적으로 유지되며, 본 발명의 플라스미드 pBifiCD에 의해서 형질전환된 B. 롱검 Re-105A/pBifiCD는 높은 플라스미드 유지 안정성을 보였다.
- [0547] 더욱이, B. 롱검 Re-105A/pAV001-HU-eCD-M968과 비교하여 상기 두 개의 클로닝 종은 매우 높은 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율을 보였으며, 더욱이, 상기 B. 롱검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종은 B. 롱검 Re-105A/pCDshuttle 클로닝 종에 비하여 높은 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율을 가지고 있으므로, pUCanori 단편을 제거하는 것이 플라스미드를 포함하는 박테리아의 비율을 높일 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0548] 상기 측정 결과는 표 6에 나타난다.

표 6

[0549] **플라스미드 분리(segregation)의 안정성**

종	BL-bS에서의 성장	BL에서의 성장	SPCM 저항성(%)
<i>B. longum</i> Re-105A/pBifi CD #1	263	300	87.7
<i>B. longum</i> Re-105A/pBifi CD #5	263	300	87.7
<i>B. longum</i> Re-105A/pCDshuttle #1	240	299	80.3
APS001C MCB	215	300	71.7

[0550] <테스트 실시예 4>

[0551] **플라스미드 'pBifiCD'의 *E. coli* 형질전환 능력 확인**

[0552] 본 발명의 플라스미드 'pBifiCD'에 의해서 *E. coli*가 형질전환되지 않는다는 확인은 상기 셔틀 플라스미드 'pCDshuttle'를 대조군으로 이용하여 하기와 같이 수행되었다.

[0553] (1) 플라스미드의 제조

[0554] 본 발명의 플라스미드 'pBifiCD' 및 대조군 플라스미드 'pCDshuttle'는 하기와 같이 제조되었다.

[0555] 배양

[0556] APS-2S-2.5R 조건 배지는 실시예 4에서 제조된 플라스미드 'pBifiCD'(B. 롱검 Re-105A/pBifiCD)에 의해서 형질전환된 비피도박테리아를 1% 접종시키고, 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 웰(well)을 저어준 후, APS-2S-2.5R 조건 배지는 이의 1%로 접종되고, 배양은 동일한 방법으로 24시간 동안 수행되었다.

[0557] 유사하게, APS-2S-2.5R 조건 배지는 실시예 3에서 제조된 셔틀 플라스미드 'pCDshuttle'(B. 롱검 Re-105A/pCDshuttle)에 의해서 형질전환된 비피도박테리아를 1% 접종시키고, 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 웰(well)을 저어준 후, APS-2S-2.5R 조건 배지는 이의 1%로 접정되고, 배양은 동일한 방법으로 24시간 동안 수행되었다.

[0558] 플라스미드의 추출

[0559] 상기 각각의 배양액의 2 mL을 30 mM GTA 버퍼(pH 5.5)로 2회 세척한 후, N-아세틸무라미데이즈(N-acetyl muramidase)를 처리하고, 프로테이나아제 K(Proteinase K)를 처리하였다. 정제는 QIAprep Spin MiniPrep Kit에 의해서 수행하여 플라스미드 DNA를 추출하였으며, 플라스미드 DNA를 각각의 케이스에서 약 9 µg

수득하였다.

[0560] (2) *E. coli*의 형질전환

[0561] *E. coli*의 형질전환 JM109 커퍼턴트 세포(Takar Bio Inc.)(100 μl)은 상기 제조한 각각의 'pCDshuttle' 및 'pBifiCD' 플라스미드 50 ng(1 μl)을 이용하여 수행하였다. 상기 형질전환방법은 커퍼턴트 세포에 제공되는 제품지시에 따랐다.

[0562] 열 충격 이후 각각의 박테리아 혼탁 100 μl 를 SOC 배지를 첨가한 배양을 2 개의 LB 아가 배지(75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 스페티노마이신 포함)에 놓고, 37°C에서 밤새 배양하였다.

[0563] 배양 후 상기 각각의 플레이트에서 콜로니의 존재 또는 부재를 확인하는 결과로부터, 콜로니는 대조군 플라스미드 'pCDshuttle'를 이용하여 형질전환된 *E. coli*에서만 검출되었다.

[0564] 반면, 플라스미드 대신 0.1×TE를 첨가한 음성 대조군 또는 본 발명의 'pBifiCD' 플라스미드에 의해서 형질전환된 후에는 콜로니가 검출되지 않았다.

[0565] 본 발명의 'pBifiCD' 플라스미드를 강제로 *E. coli*에 도입한다 할지라도, *E. coli*내에서 복제되지 않는다는 것을 확인하였다.

[0566] 상기 결과는 표 7에 나타난다.

표 7

pCDshuttle 또는 pBifiCD 중 어느 하나를 이용한 *E. coli* JM109의 형질전환

샘플명	플레이트당 콜로니 수
pCDshuttle	35, 53
pBifiCD	0, 0
0.1×TE(음성 대조군)	0, 0

[0568] <테스트 실시예 5>

[0569] B. 통검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 항종양 효과 확인

[0570] (1) B. 통검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 배양된 생세포의 제조(테스트 약물)

[0571] 활성화된 배양은 정상 온도에서 B. 통검 Re-105A/pBifiCD 클로닝 종의 글리세롤 스타크를 녹이고, 이의 적합한 양을 탄산칼슘이 첨가된 액체 배지가 들어있는 테스트 튜브에 접종하고, 이를 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 밀봉된 용기에 넣고 배양기에서 37°C에서 24시간 동안 혼기 배양하여 수행되었다. 그 뒤, 탄산 칼슘이 첨가되지 않은 액체 배지가 들어있는 테스트 튜브에 상기 액체 배지의 적합한 양을 접종시키고, 동일한 혼기 조건에서 18시간 동안 배양하였다(주 배양).

[0572] 상기 액체 배양은 50 mL 부피의 폴리프로필렌 코니칼(polypropylene conical) 튜브(Becton, Dickinson and Company, Japan)로 옮기고, 이 혼합 액체 배양액의 5 mL 을 4배 부피(20 mL)의 차가운(5°C)의 생리 식염수와 잘 섞어주고, 세개의 튜브를 준비한다. 세척은 각각의 튜브를 차가울 때(4°C) 10분 동안 8,000 rpm에서 원심분리하고, 상기 상층액은 버리고 여기에 추가적으로 차가운 생리 식염수 20 mL 을 첨가하여 박테리아를 혼탁시켰다(세척 과정 1). 이러한 세척 과정은 2번 더 수행되었으며, 전체 세 번 세척된 박테리아 액체를 하나의 튜브에 합친 후, 박테리아 혼탁의 부피를 6.5 mL 로 조정하였다. 그리고 상기 박테리아 혼탁은 8 μM 맴브레인(membrane) 필터(polycarbonate, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., K800A025A)를 이용하여 여과되었으며, 상기 여과물에서 모은 살아있는 박테리아(배양된 살아있는 박테리아 용액)는 테스트 약물로 사용하였다.

[0573] (2) 이식된 종양 세포의 배양

[0574] 인간 유방암 세포 주 KPL-1 세포는 1 v/v % 페니실린(50000 U/ mL)/스트렙토마이신(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 56 °C에서 30

분동안 불활성화된(immobilized) FBS(10 v/v %)를 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

[0575] 세포가 가득 차면 1×PBS(-)로 세척하고, 1×트립신-EDTA를 첨가하여 상기 세포를 떼어내고, 원심분리(1000 rpm / 5분)에 의해서 모은 상기 세포는 적합하게 DMEM 배지에 희석하고, 계대 배양하였다.

[0576] 이식 실험에 있어서, 다섯 번째 계대된 세포가 이용되었다. 트립판 블루(Trypan Blue)에 의해서 염색되지 않은 살아있는 세포의 수는 토마 혈마토사이토미터(Thoma hematocytometer)(Thoma 0.1 mm 깊이 ERMA, Tokyo)를 이용하여 계수되었으며, 상기 세포의 수는 여기에 행크 용액(Hank's solution)을 첨가하여 혼탁하여 2.5×10⁶ 세포/ml로 조정하였다.

[0577] (3) 종양을 포함하는 누드 마우스 제조 및 종양의 부피 측정

[0578] 상기 제조한 KPL-1 세포 혼탁 0.2 ml을 누드 마우스의 오른쪽 앞발의 뒷면의 피부에 이식하였다(5×10⁵ 세포/마우스).

[0579] 이식한 후, 상기 종양의 부피는 하기의 식에 의해서 종양의 치수(주요 직경(major diameter), 작은 직경(minor diameter), 두께(thickness))를 칼리퍼(caliper)로 이용하여 측정하여 결정하였다.

$$\text{종양 부피(mm}^3\text{)} = \text{주요 직경(mm)} \times \text{작은 직경(mm)} \times \text{두께(mm)}/2$$

[0581] (4) 그룹화 및 배양된 살아있는 박테리아(테스트 약물), 당원(락툴로오스, lactulose), 및 전구약물(5-FC)의 투여

[0582] 60 내지 95 mm³의 종양 부피를 갖고 있는 16 KPL-1 종양을 포함 마우스를 선택하고, 동일하게 2개의 그룹(한 그룹당 8마리)으로 나누고, 한 그룹을 대조군(무처리군)으로 이용하고, 다른 그룹을 처리된 그룹으로 이용하였다.

[0583] 배양된 살아있는 박테리아(테스트 약물)를 마우스 당 0.3 ml로 정맥으로 상기 처리된 그룹에 하루에 3회 투여를 2일(1일 및 2일)동안 하였다.

[0584] 상기 투여한 배양된 살아있는 박테리아의 전체 부피는 1.8 ml이며, 투여된 세포의 전체 수는 5.9×10⁹ cfu/마우스였다.

[0585] 상기 투여한 살아있는 박테리아의 수는 하기와 같이 측정되었다.

[0586] 살아있는 박테리아 수의 측정

[0587] 배양된 박테리아 액체는 혐기성 희석제에 의해서 106배 희석되었으며, 이의 100 μl를 3개의 BLFS 플레이트에 놓고 봉인된 용기(AneroPack rectangular jar, Mitsubishi Gas Chemical Co., Ltd.)에서 산소제거/이산화탄소 생성제와 함께 37°C 배양기에서 3일 동안 혐기 배양되었다. 투여되는 박테리아의 수는 하기 식에 의해서 30 내지 300개의 콜로니 수가 검출된 플레이트로부터 산출되었다.

[0588] 투여되는 박테리아의 수(cfu)= 콜로니의 수(a)×플레이트의 희석 비율(b)× 1 ml 제조당 전환계수(c)×복용량(ml)

[0589] (a): (P1+P2+P3)/3(3개의 플레이트(P1, P2, P3)의 평균 콜로니 수)

[0590] (b): ×106(106 배 희석)

[0591] (c): ×10(플레이트당 100 μl 씩 놓았음)

[0592] 락툴로오스(lactulose)의 투여

[0593] 락툴로오스 용액은 추가적으로 상기 박테리아의 당(sugar)원으로 상기 처리된 군에 투여될 수 있다.

[0594] 20%(w/v)으로 정제된 물에 녹이고, 20분 동안 121°C에서 오토클레이브(autoclave)된 락툴로오스 용액 1 ml은 하루에 한 번씩 마우스의 복강에 투여되었다.

[0595] 상기 투여 기간은 배양된 살아있는 박테리아의 투여가 완료된 다음날부터 21일(3일에서 23일) 동안이었다.

[0596] 플루사이토신(5-FC) 투여

[0597] 5-FC 용액 0.4 ml을 마우스의 구강으로 세 번씩(대략 9:00, 14:00, 및 18:00) 투여하였다(전체 투여량 1.2 ml).

[0598] 상기 투여 기간은 배양된 살아있는 박테리아의 투여가 완료된 다음날부터 21일(3일에서 23일) 동안이었다.

[0599] (5) 종양 성장 억제 효과의 확인

[0600] 종양 직경은 상기 치료 시작 전과 3일 내지 4일에 한번 씩 시작하는 치료의 24일 후, 모든 마우스에서 측정되었으며, 종양 성장의 효과를 확인하였다.

[0601] 각 그룹의 마우스의 종양 부피의 평균값±SD 가 산출되었으며, 항종양 효과는 대조군에 대한 상대적인 종양 부피 비율(T/C(%))을 지표로 이용하여 판단하였다.

[0602] 상기 대조군 및 치료된 그룹의 종양 부피(평균값±SD)는 표 8에 나타난다.

[0603] 더욱이, 하루 동안 종양 부피의 변화는 도 5에 나타난다.

[0604] 상기 테스트 마지막 날(24일)에 치료된 군의 상대적 종양 부피 비율(T/C(%))은 23.0%이었으며, 현저한 종양 성장 억제 활성이 관찰되었다.

표 8

B.longum RE-105A/pBifiCD 클로닝 종의 항종양 효과

처리	마우스 수	종양크기(mm^3) 평균 ± SD								24일째, T/C(%)	Two-tailed test (p-값)
		day 0	3	7	10	14	17	21	24		
A) 비처리 대조군	8	74.5	122.3	205.3	330.1	560.8	912.0	1612.1	2115.7	23.0	0.002
		12.5	44.2	78.7	212.5	285.4	564.8	763.4	1009.9		
B)APS001F (intact)+5-FC +락툴로오스	8	74.7	92.4	132.3	154.5	270.1	365.6	484.4	486.5	23.0	0.002
		10.7	15.4	54.7	41.8	120.0	180.4	211.8	265.0		

[0605]

[0606] 산업상 이용가능성

[0607] 본 발명의 목적은 형질 전환체 박테리아내에서만 복제하고, 형질 전환체 박테리아 이외의 다른 박테리아, 특히 E. coli와 같이 병원성 또는 절대협기성 또는 조건협기성 박테리아에서 복제하지 않는 발현 벡터, 및 이를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 더욱이, 본 발명의 목적은 상기 발현 벡터, 상기 유전자 전달체를 포함하는 약학적 조성물, 및 상기 박테리아를 포함하는 고형 종양 치료제에 의해서 형질전환된 혐기성 미생물로부터 제조된 유전자 전달체를 제공하는 것이다.

[0608] 본 발명의 벡터는 다른 형질 전환체 박테리아보다 특히 E. coli 박테리아에서 가능을하는 복제개시점을 가지고 있지 않은 안전한 벡터이며, 상기 형질 전환체 박테리아 이외의 특히 E. coli와 같은 병원성, 또는 절대협기성 또는 조건협기성 박테리아에서 복제될 가능성이 전무하다.

[0609] 본 발명의 벡터를 이용하여 형질전환된 유전자 전달체는 높은 플라스미드 유지 안정성(retention stability)이 있으며, 상기 플라스미드가 형질 전환체 박테리아가 아닌 특히 E. coli와 같은 병원성, 또는 절대협기성 또는 조건협기성 박테리아에 수평적으로 이동된다 할지라도, 상기 박테리아에서 복제될 가능성이 없으며, 이는 매우

안전하고 높은 고품질의 유전자 전달체로서 유용할 것이다.

수탁번호

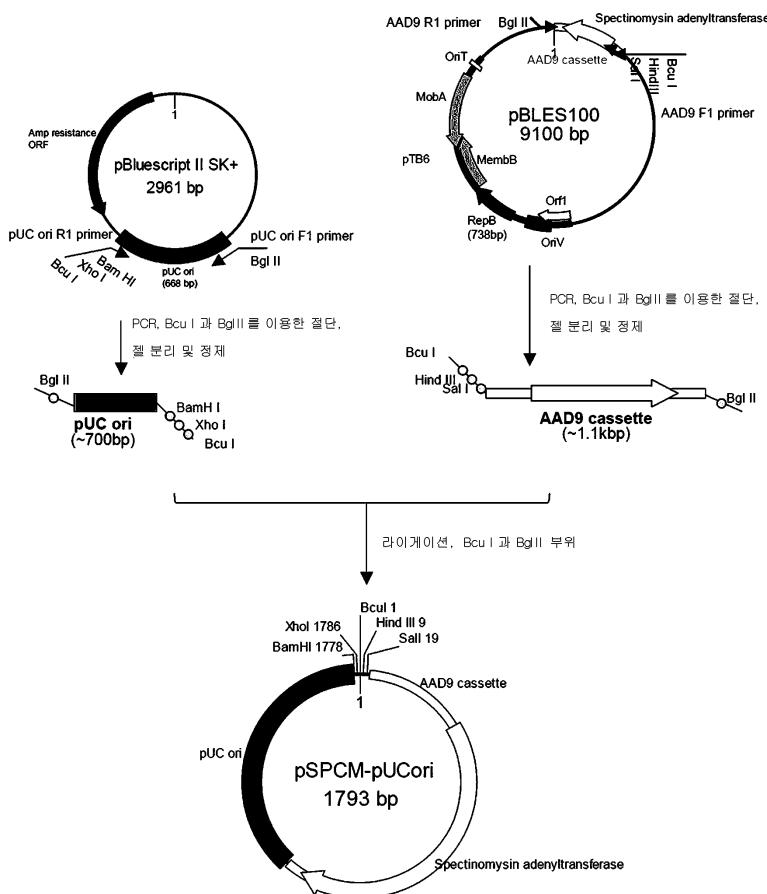
기탁기관명 : INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND EVALUATION PATENT MICROORGANISMS DEPOSITORY

수탁번호 : NITEBP-491

수탁일자 : 20080219

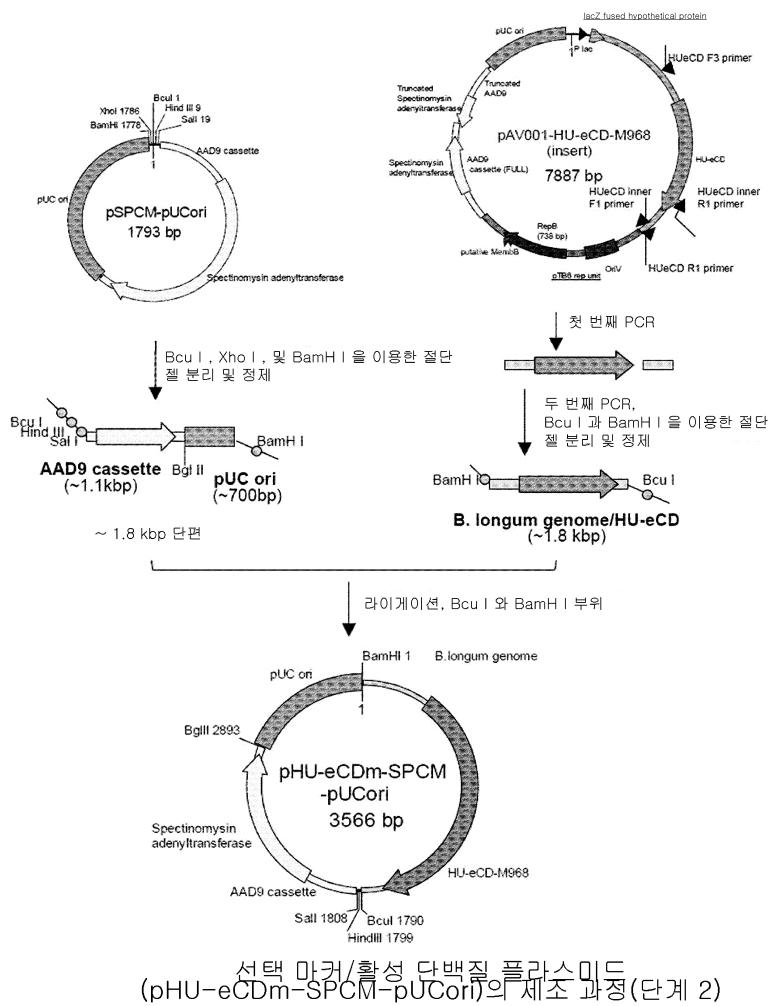
도면

도면1

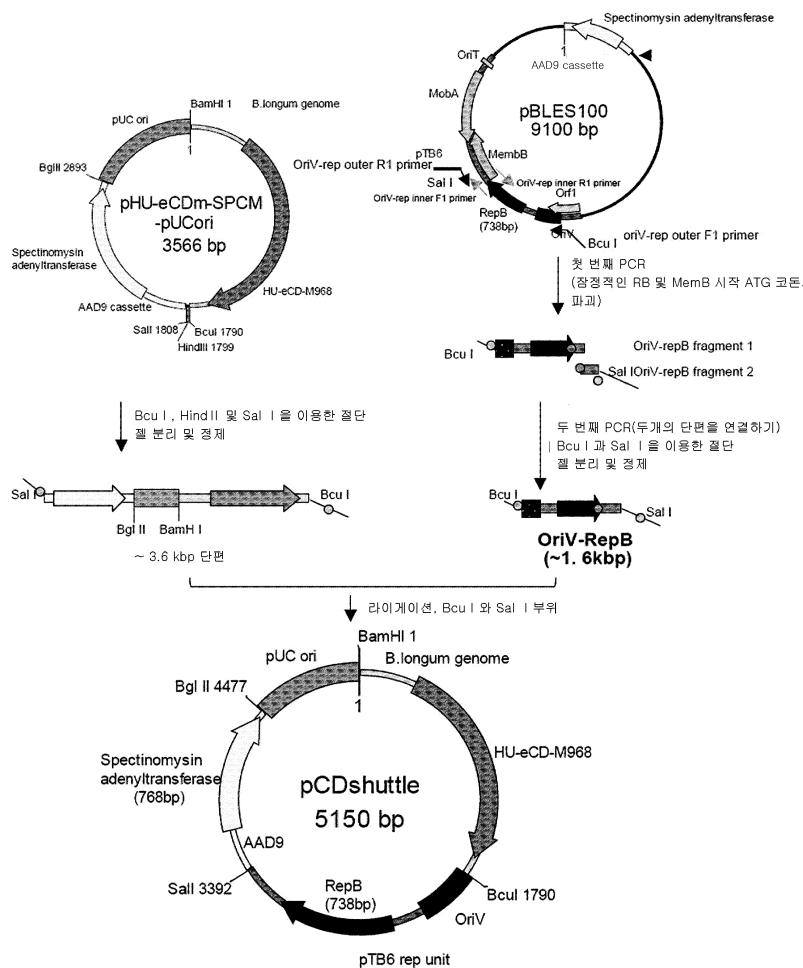


선택 마커 플라스미드(pSPCM-pUCori)의 제조 과정(단계 1)

도면2

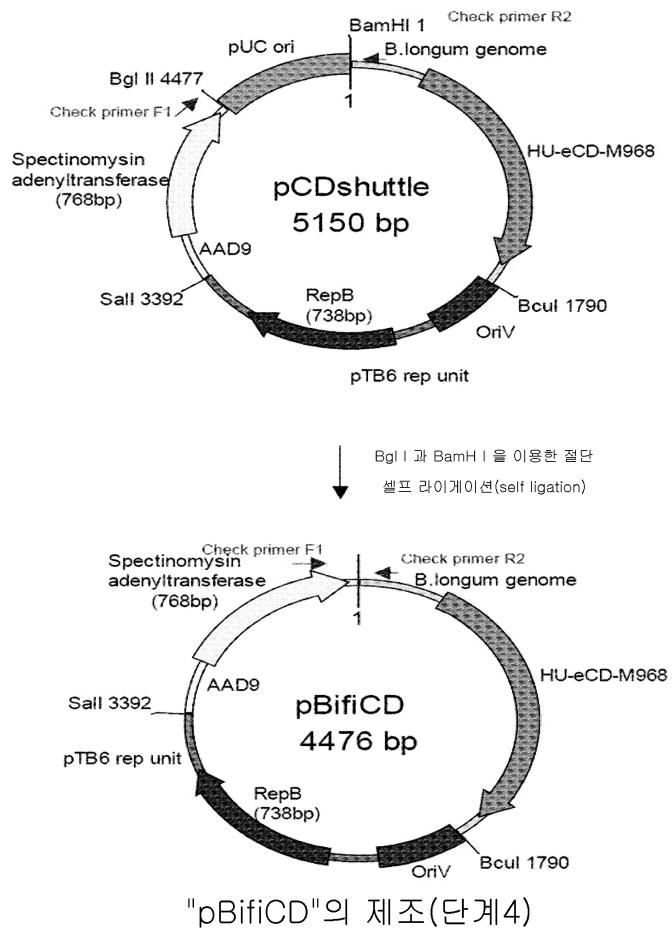


도면3

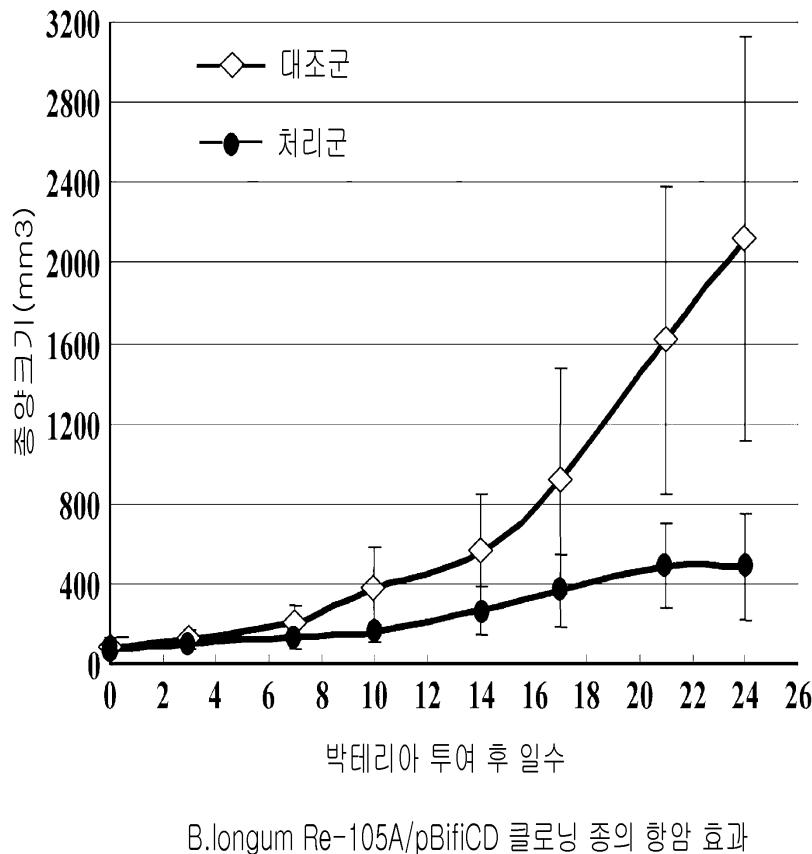


셔틀 플라스미드(pCDshuttle)의 제조 과정(단계3)

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Shimatani-Shibata, Yuko

Shimizu, Hitomi

Yonekura, Hiromi

<120> Expression Vector

<130> 10fpi-10-11

<150> US 61/124,528

<151> 2008-04-17

<160> 4

<170> Patent In version 3.1

<210> 1

<211> 1793

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pSPCM-pUCori

<400> 1

actagtagaa agcttagagt cgactcgatt ttcgttcgtg aatacatgtt ataataacta	60
taactaataa cgtaacgtga ctggcaagag atattttaa aacaatgaat aggtttacac	120
ttactttagt ttatggaaa taaaagatca tatcatatat aatctagaat aaaatiaact	180
aaaataatta ttatctagat aaaaaattt gaagccaatg aaatctataa ataaactaaa	240
ttaagtttat ttaattaaca actatggata taaaataggt actaatcaa atagtggaa	300
ggatataattt gaatacatac gaacaaatta ataaagtcaa aaaaatactt cgaaacatt	360
taaaaaataa ctttatttgtt acttacatgt ttggatcagg agttgagagt ggactaaaac	420
caaatagtga tcttgacttt ttagtcgtc tatctgaacc attgacagat caaagtaaag	480
aaatacttat aaaaaaaattt agaccttattt caaaaaaaaaat aggagataaa agcaacttac	540
gataatttga attaacaattt attattcagc aagaatggt accgtggaaat catccccc	600
aacaagaattt tatttatggaa gaatggttac aagagctta tgaacaagga tacattcctc	660
agaaggaattt aaattcagat ttaaccataa tgcttacca agaaaaacga aaaaataaaaa	720
gaatatacgg aaattatgac ttagaggaat tactacctga tattccattt tctgtatgtga	780
gaagagccat tatggattcg tcagaggaat taatagataa ttatcaggat gatgaaacca	840
actctatattt aactttatgc cgtatgattt taactatggaa cacggtaaa atcataccaa	900
aagatattgc gggaaatgca gtggctgaat cttctccattt agaacatagg gagagaattt	960
tgttagcagt tcgttagttt cttggagaga atattgaatg gactaatgaa aatgtaaatt	1020
taactataaa ctatataat aacagattaa aaaaattata aaaaatttga aaaaatggtg	1080
gaaacacttt ttcaattttt tttagatctt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	1140
gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgttttcc ataggctcg cccccctgac gagcatcaca	1200
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	1260
ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgtt accggatacc	1320
tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttctca tagtcacgc tgttagtac	1380
tcaagttcggt gtaggtcggt cgctccaagc tggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc	1440
ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttggatc caacccggta agacacgact	1500
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtggcggtg	1560
ctacagagtt ctgttagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttgta	1620
tctgcgtct gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tggtagctt tgatccggca	1680
aacaaaccac cgctggtagc ggtggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcccggaa	1740
aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacgga tccttcgtc gtc	1793

<210> 2
<211> 3566
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> plasmid pHU-eCDm-SPCM-pUCori
<400> 2

ggatccgtct tcctgctggc ctagcattt ggttccgcag tgcccactcc aggccgtctg	60
ggcggtgtgg aacggcgct gacattcgcg ttctggcgcc tcggagtgcc gcagggcggtg	120
gcgccttcgg ccactttgt gcaccgcgtg gtgttctact ggctgcgtat tccgcgtggc	180
gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgtct gattcgctta ttttcataacc	240
cccttcgggg aaatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg gggttcgca gaaacatgcg	300
ctagtatcat tggatgacaac atggactaag caaaagtgt tggcccttgc cccaaagg	360
atgccttatg gcataacaaca agtctgacct cgtttgcatt aacgcatttac aaacaattat	420
taacgccccgg ttaccaggcg aagagggct gtggcagatt catctgcagg acggaaaaat	480
cagcgccatt gatgcgaat ccggcgtgtat gcccataact gaaaacagcc tggatgccga	540
acaagggtta gttataccgc cgtttgcgtt gccacatatt cacctggaca ccacgcaaac	600
cgcggacaa ccgaactggc atcagtcgg cacgctgtt gaaggcattt aacgcgtggc	660
cgagcgcaaa gcgttattaa cccatgacga tgtgaaacaa cgccatggc aaacgcgtgaa	720
atggcagatt gccaacggca ttccatgtt gcttgcattt gtccatgtt cggatgcaac	780
gctaactgcg ctgaaagcaa tgctggagt gaagcggaa gtcgcgcgt ggattgtat	840
gcaaatcgct gcctccctc aggaaggat ttgtcgat cccacgggt aagcgttgct	900
ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtggggcg attccgcatt ttgaatttac	960
ccgtgaatac ggcgtggagt cgctgcataa aacccgcctt ctggcgcaaa aatacgaccg	1020
tctcatcgac gttactgtt atgagatcga tgacgagcag tcgcgcattt tcgaaaccgt	1080
tgctgcctg ggcaccatg aaggcatggc cgccgcgtt accgcgcaggc acaccacggc	1140
aatgcactcc tataacgggg cgtataccctc acgcctgttc cgcttgcgtt aatgtccgg	1200
tattaacttt gtcgcacc acccgcttcaaa tattcatctg caaggacgtt tcgatgtt	1260
tccaaaacgt cgccgcataa cgcgcgtt aa agagatgtt gagtccggca ttaacgttgc	1320
ctttggtcac gaigctgtt tcgatccgtt gatccgcgtt ggaacggcgaa atatgttgc	1380
agtgcgtcat atggggctgc atgtttgcgtt gttgtggc tacggcaga ttaacgttgc	1440
cctgaattt atcacccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc	1500

cgccggaaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggttg atgcgctgcg	1560
ccgtcagggtt ccgtacgtt attcggtacg tggcggcaag gtgattgcc gcacacaacc	1620
ggcacaaacc accgtatac tggagcagcc agaageccatc gattacaac gttgaccc	1680
tgctcgttagc gattactcg acgattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggtcgg	1740
gtcttttgt tgggtgctg tgacgtgtt tccaaaccgtt ttattccgga cttagtagaaa	1800
gcttagagtc gactcgattt tcgttcgtga atacatgtta taataactat aactaataac	1860
gtaacgtgac tggcaagaga tattttaaa acaatgaata ggtttacact tacttttagtt	1920
ttatggaaat gaaagatcat atcatatata atctagaata aaattaacta aaataattat	1980
tatctagata aaaaatttag aagccaatga aatctataaa taaactaaat taagtttatt	2040
taattaacaat ctatggatat aaaataggtt ctaatcaaaa tagtgaggag gatatatttgc	2100
aatacatacg aacaattaa taaagtggaa aaaatacttc ggaaacattt aaaaaataaac	2160
cttattggta cttagatgtt tggatcgga gttgagatg gactaaaacc aaatagtgtat	2220
cttgacttt tagtcgtcgt atctgaacca ttgacagatc aaagtaaaga aatactata	2280
caaaaaattt gacctatttca aaaaaaaaaa ggagataaaa gcaacttacg atatattgaa	2340
ttaacaattt ttattcagca agaaatggta ccgtggaatc atcctcccaa acaagaattt	2400
atttatggag aatggttaca agagctttat gaacaaggat acattcctca gaaggaatta	2460
aattcagatt taaccataat gctttacca gcaaaaacgaa aaaataaaag aatatacgga	2520
aattatgact tagaggaattt actacctgtt attccatttt ctgtatgtgag aagagccatt	2580
atggattcgt cagaggaattt aatagataat tatcaggatg atgaaacccaa ctctatatta	2640
actttatgcc gtatgatttt aactatggac acgggtaaaa tcataccaaa agatattgcg	2700
ggaaatgcag tggctgaatc ttctccatta gaacataggg agagaatttt gtttagcgtt	2760
cgttagttatc ttggagagaa tattgaatgg actaatgaaa atgtaaattt aactataaac	2820
tatttaaata acagattaaa aaaattataa aaaaattgaa aaaatggtg aaacacttt	2880
ttcaattttt tttagatcttgc agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc	2940
cggttgcgtt cggtttccca taggctccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc	3000
tcaagtccaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt tccccctgga	3060
agctccctcg tgcgtctcc tggccgacc ctgcccgttta ccggataacct gtccgcctt	3120
ctccctcgg gaagcgtggc gtttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggt	3180
tagtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cgttcagcc cgaccgctgc	3240

gccttatccg gtaactatcg tttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atgccactg	3300
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcggtgc tacagagttc	3360
ttgaagtggt ggcttaacta cgctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgtctg	3420
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagt gtagctttt gatccggcaa acaaaccacc	3480
gctggtagcg gtggttttt tgtttgcag cagcagatta cgccgagaaa aaaaggatct	3540
caagaagatc ttgtatctt ttctac	3566
<210> 3	
<211> 5150	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> shuttle plasmid pCDshuttle

<400> 3

ggatccgtct tcctgctggc ctatgcattt ggttccgcag tgcccactcc aggccgtctg	60
ggcgggtgtgg aacggcgct gacattcgcg ttctggcgg tcggagtgcc gcagggcg	120
gcccggcccg ccactttgtt gcaccgcgtg gtgttctact ggctgcgtat tccgcgtggc	180
gcggcggcca tgaagtggct tgacaagcat aatcttgcgtt gattgtctt ttttcatacc	240
cccttcgggg aaatagatgt gaaaaccctt ataaaacgcg gggttcgca gaaacatgcg	300
ctagtatcat ttagtacaac atggactaag caaaaagtgt tttccctga cccaaagg	360

atgccttatg gcatacaaca agtctgaccc tttcgaaat aacgccttac aaacaattat	420
taacggccgg ttaccaggcg aagaggggt gtggcagatt catctgcagg acggaaaaat	480
cagcgccatt gatgcgaat ccggcgtat gcccataact gaaaacagcc tggatgccga	540
acaagggtta ttataccgc ctgttggtt gccacatatt cacctggaca ccacgcaaac	600
cgccggacaa ccgaactgga atcagtccgg cacgcgtttt gaaggcattt aacgcgtggc	660
cgagcgcaaa gcgttattaa cccatgacga tgtgaaacaa cgccatggc aaacgctgaa	720
atggcagatt gccaacggca ttccatgtt gcgttccat gtgcgtt cggatgcaac	780

gctaactgcg ctgaaagcaa tgctggaagt gaagcaggaa gtcgcgcgt ggattgtatct	840
gcaaatcgct gcctccctc aggaagggat ttgtcgat cccacgggt aacgcgttgc	900
ggaagaggcg ttacgcttag gggcagatgt agtggggcg attccgcatt ttgaattac	960
ccgtgaatac ggcgtggagt cgctgcataa aacttcgcc ctggcggaaa aatacgaccg	1020
tctcatcgac gttactgtt atgagatcga tgacgagcag tcgcgtttt tcgaaaccgt	1080
tgctgcccgt ggcaccatg aaggcatggg cgccgcgtc accgcgcagcc acaccacggc	1140

aatgcactcc tataacgggg cgtatacctc acgcctgttc cgcttgctga aaatgtccgg	1200
tattaacttt gtcgccaacc cgctggtcaa tattcatctg caaggacgtt tcgatacgta	1260
tccaaaacgt cgccgcatac cgccgcgtaa agagatgctg gagtccggca ttaacgtctg	1320
ctttgtcac gatgctgtct tcgatccgtg gtatccgctg ggaacggcga atatgctgca	1380
agtgcgtcat atggggctgc atgttgcca gttgatggc tacggcaga ttaacgatgg	1440
cctgaattta atcacccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcattgc	1500
cgccggaaac agcgccaacc tgattatcct gccggctgaa aatgggtttg atgcgctgcg	1560
ccgtcagggtt ccgtacgtt attcggtagc tggcggcaag gtgattgccca gcacacaacc	1620
ggcacaaacc accgtatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgaccc	1680
tgctcgtagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga ccccgaccga gatggtcgg	1740
gtcttttgt tgggtgctg tgacgttttgc tccaaccgtt ttattccggta ctatgcctcc	1800
aggacctcgta ctacgaggcg ctgagcgagg aatggcgaa aaggacggc gagatcagcg	1860
acccatggc caacgacgag gcggacggat accagecgcc ctcatacgag ccggtaacc	1920
cgaaacgcag gactccccag acgcctccg atggctgtat ctgacgtccg aaaaaaggcg	1980
ctgtgcgccc ttttaaatc tttataat cttttacat tcttttagcc cctccgcagc	2040
cttactctcc caacgggtt cagccgaaac ctacacaaa agggagcga acctacacca	2100
aaaggggagc gaacctacac caaaagggga gcgaacctac accaaaaggagc gagctatata	2160
caccccccgtt tatttaaggt gcaagtttg ctatgctgag gcatgtcca atgagatcg	2220
gaagttcagc aaccaggtaa acaacgtcg gctgaagaag ttgcacgcgg tgacacccgg	2280
cgtgctcatg gcgatcgctt caagggtgag ggagaaggc acggccacgg tggagttctc	2340
gttcgaggag ctgcggcc tcatgcgatt gaggaagaac ctgaccaaca agcagctggc	2400
cgacaagatc gtgcagacga acgcgcgcct gctggcgctg aactacatgt tcgaggattc	2460
ggcaagatc atccagttcg cgctgttccac gaagttcgac accgacccgc aggaggcgac	2520
tctcgccgtt ggggtcaacg aggagttcg gttctgttc aacgacactga ccagccagg	2580
cacgcgttcc gagctggccg agttcgccga cctcaagagc aagtacgcca aggagttcta	2640
ccgcaggccc aagcgttacc gcagctccgg aatctggaaatcggcccg acgagttctg	2700
ccgactgtttt ggcgttccac cgtcgcaat aacccagaca cgatatctga atcagaaggt	2760
tcttcagccaa attcaggagg agtgtggcc tctccttggc ctgaagatcg agcggccagta	2820
cgtgaaacgc aggctgtcg gttcggttt cacattcgcc cgccgaccc ctccgggtat	2880

cgacgccagg cccgtggagg cgaggaagac ggacggcgac ggcaagggcc attggacgag	2940
cgttgccgg tacggcgagg tggcacgac cacggcggt ttcgacgtga cggccgcgg	3000
ggctcacttc gacggcacgg ttgaagccgg ggagtgcgtt ttctgcgcgt ttgacgcgcg	3060
caaccgcgaa catcatgcgc ggaacgcgg aaggctgtc tagccccgt gtccgcgcct	3120
ctggggcggt tgccctgcc atgggtcgat ctggcgctgt tcggccctac gctggctgt	3180
gcgctgcctg atctccctga gcaggtcggc cttggctcg ggggcgttc gctccctgaa	3240
cggccgcctc tccccaggt cctcggcgtc gctcagggtcc aacggctgt caccggacgg	3300
ctcggccgg ttctctccct gtgccgggtt ctccgcgtgt ggcgttgtt cggccatgcg	3360
cagtgcgagg gcctcacct gttcggggt tgcgactcg atttcggtc gtgaatacat	3420
gttataataa ctataactaa taacgtaacg tgactggcaa gagatatttt taaaacaatg	3480
aataggtttta cacttacttt agtttatgg aaatgaaaga tcatatcata tataatctag	3540
aataaaatta actaaaataa ttattatcta gataaaaaat tttagaagcca atgaaatcta	3600
taaaataact aaatthaatg tatttaatta acaactatgg atataaaata ggtactaattc	3660
aaaatagtga ggaggatata tttagataca tacgaacaaa ttaataaagt gaaaaaaata	3720
ttcggaaac attaaaaaa taaccttatt ggtacttaca tgtttgatc aggagtttag	3780
agtggactaa aaccaaatacg tgcgttgatc ttttagtgc tcgtatctga accattgaca	3840
gatcaaagta aagaaatact tataaaaaaa attagaccta ttcaaaaaaa aataggagat	3900
aaaagcaact tacgatatat tgaatttaca attattatc agcaagaaat ggtaccgtgg	3960
aatcatcctc ccaaacaaga atttattttt ggagaatggt tacaagagct ttatgaacaa	4020
ggatacatcc ctcagaagga attaaattca gatTTAACCA taatgcTTA ccaagcaaaa	4080
cgaaaaataa aaagaatata cgaaattat gacttagagg aattactacc tgcatttcca	4140
ttttctgtatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg attaaataga taattatcag	4200
gatgtgaaa ccaactctat attaactta tgccgtatga ttttaactat ggacacgggt	4260
aaaatcatac caaaagat tgcggaaat gcagtggctg aatcttctcc attagaacat	4320
agggagagaa tttgttagc agttcgtagt tatcttgag agaatattga atggactaat	4380
gaaaatgtaa attaactat aaactatTTA aataacagat taaaaaaatt ataaaaaaat	4440
tgaaaaaaatg gtggaaacac tttttcaat ttttttagat cttagacaaa aggccagcaa	4500
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgtt ctggcgTTT tccataggct ccgcggccct	4560
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	4620
agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctgcgtgcgt ctctgttcc gaccctgcgg	4680
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttc tcatagctca	4740

tgctgccctg ggcaccatg aaggcatggg cgcgagtc accgcagcc acaccacggc	1140
aatgcactcc tataacgggg cgtatacc tc acgcgttc cgcttgcga aaatgtccgg	1200
tattaacttt gtcgccaacc cgctggtaa tattcatctg caaggacgtt tcgatacgta	1260
tccaaaacgt cgccgcatca cgccgtaa agagatgtg gagtccggca ttaacgtctg	1320
ctttggtcac gatgtgtct tcgatccgt gtatccgtg ggaacggcga atatgtcga	1380
agtgctgcat atggggctgc atgttgcca gttgatggc tacggcaga ttaacgtgg	1440
cctgaattta atcacccacc acagcgcaag gacgttgaat ttgcaggatt acggcatgc	1500
cgccggaaac agcgccaacc tgattatctt gccggctgaa aatgggttg atgcgtcg	1560
ccgtcagggtt ccggtaacgtt attcggtacg tggcgcaag gtgattgcca gcacacaacc	1620
ggcacaaacc accgtatatac tggagcagcc agaagccatc gattacaaac gttgaccttc	1680
tgctcgttagc gattacttcg agcattactg acgacaaaga cccgaccga gatggtcggg	1740
gtcttttgt tgggtgctg tgacgttttgc tccaaccgtt ttattccggta ctatcctcc	1800
aggacctcgct acgaggcgctg agtggcga aatggcgaa aagggacggc gagatcagcg	1860
acccatggc caacgacgag gggacggat accagccgc ctcatacgag ccgtcaacc	1920
ccgaacgcag gactccccag acgcctcg atggctgtat ctgacgtccg aaaaaaggcg	1980
ctgtgcgccc ttttaaat tttataat cttttacat tcttttagcc cctccgcage	2040
cttactctcc caacgggtt cagccgaaac ctacacaaa aggggagcga acctacacca	2100
aaaggggagc gaacctacac caaaagggga gcaacccatc accaaaaggagctatata	2160
caccccttgtt tatttaaggt gcaagttgtc ctatgtgag gccatgtcca atgagatcgt	2220
gaagttcagc aaccagttca acaacgtcg gctgaagaag ttgcacgccc tgacactgga	2280
cgtgtcatg gcgatcgctt caagggtgag ggagaaggc acggccacgg tggagttctc	2340
gttcgaggag ctgcgcggcc tcatgcgatt gaggaagaac ctgaccaaca agcagctggc	2400
cgacaagatc gtgcagacga acgcgcgcct gctggcgctg aactacatgt tcgaggattc	2460
ggccaagatc atccagttcg cgctgttcac gaagttcgcc accgaccgc aggaggcgac	2520
tctcgccgtt ggggtcaacg aggagttcgc gttcctgtc aacgacactga ccagccagtt	2580
cacgcgttcc gagctggccg agttcgccga cctcaagagc aagtacgcca aggagttcta	2640
ccgcaggccc aagcagtacc gcagctccgg aatctggaaat cggccgcg acgagttctg	2700
ccgactgtttt ggcgttccac cgtggcaat aaccgcaca cgatatctga atcagaaggt	2760
tcttcagcca attcaggagg agtgtggcc tctccttgc ctgaagatcg agcggccagta	2820
cgtgaaacgc aggtgtcggtt gcttcgtttt cacattcgcc cgccgaccc ctccgggtat	2880
cgacgccagg cccgtggagg cgaggaagac ggacggcgcg ggcaaggccc attggacgag	2940

cgttgccggg tacggcgagg tttcacgac cacggcggtt ttcgacgtga cggccgcgg	3000
ggctcacttc gacggcacgg ttgaagccgg ggagtgccgt ttctgcgcgt ttgacgcgcg	3060
caaccgcga catcatgcgc ggaacgcgg aaggcggtt tagcgccgt gtccgcgcct	3120
ctggggcggt tgcgcctgcc atgggtcgat ctggcgctgt tcggccac gctggctgt	3180
gcgcgtgcgt atctccctga gcaggtcgcc ctggcctgt gggcgctt gctccctgaa	3240
cggccgcgtc tccccaggt cctcggcgtc gtcagggtcc aacggctgtt caccggacgg	3300
ctcggccgg ttctccct gtgcgggtt ctccgcgtt gcgcgttgtt cgccatgcg	3360
cagtgcgagg gccttcacct gttcgggct tgcgactcg atttcgttc gtgaatacat	3420
gttataataa ctataactaa taacgttaacg tgactggcaa gagatatttt taaaacaatg	3480
aataggttt cacttacttt agtttatgg aaatgaaaga tcatatcata tataatctag	3540
aataaaatta actaaaataa ttattatcta gataaaaaat ttagaagcca atgaaatcta	3600
taaataaaact aaattaagtt tatttaatta acaactatgg atataaaata ggtactaatac	3660
aaaatagtga ggaggatata ttgaataca tacgaacaaa ttaataaagt gaaaaaaata	3720
ttcggaaac attaaaaaa taaccttatt ggtacttaca ttttggatc aggagtttag	3780
agtggactaa aaccaaatacg tgcatttgc ttttagtgc tcgtatctga accattgaca	3840
gatcaaagta aagaaatact tataaaaaa attagaccta ttcaaaaaa aataggagat	3900
aaaagcaact tacgatatat tgaattaaca attattatc agcaagaaaat ggtaccgtgg	3960
aatcatcctc ccaaacaaga atttattttt ggagaatggt tacaagagct ttatgaacaa	4020
ggatCACATT CTCAGAAGGA ATTAAATTCA GATTAACCA TAATGCTTA CCAAGCAAAA	4080
cgaaaaataa aaagaatata cgaaattat gacttagagg aattactacc tgatattcca	4140
ttttctgtatg tgagaagagc cattatggat tcgtcagagg attaataga taattatcag	4200
gatgtgaaa ccaactctat attaactta tgccgtatga tttaactat ggacacgggt	4260
aaaatcatac caaaagatat tgccggaaat gcagtggctg aatcttctcc attagaacat	4320
aggagagagaa tttgttagc agttcgtagt tatcttgag agaatattga atggactaat	4380
gaaaatgtaa attaactat aaactattta aataacagat taaaaaaatt ataaaaaaat	4440
tgaaaaatg gtggaaacac tttttcaat ttttt	4476