(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 12 월 9 일 (09.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/246616 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/002138

(22) 국제출원일: 2021 년 2 월 19 일 (19.02.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0066116 2020 년 6 월 1 일 (01.06.2020) KR

(71) 출원인: 인천대학교 산학협력단 (**INU RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 22012 인천시 연수구 아카데미로 119, Incheon (KR).

(72) 발명자: 박준태 (**PARK, Joon Tae**); 22000 인천시 연수구 해송로 143, 101동 703호, Incheon (KR). 국명욱 (**KUK, Myeong Uk**); 21032 인천시 계양구 임학서로42번길 3, 401호, Incheon (KR).

(74) 대리인: 차준용 (**CHA, Joon Yong**); 08390 서울시 구로구 디지털로26길 111 1809호, Seoul (KR).

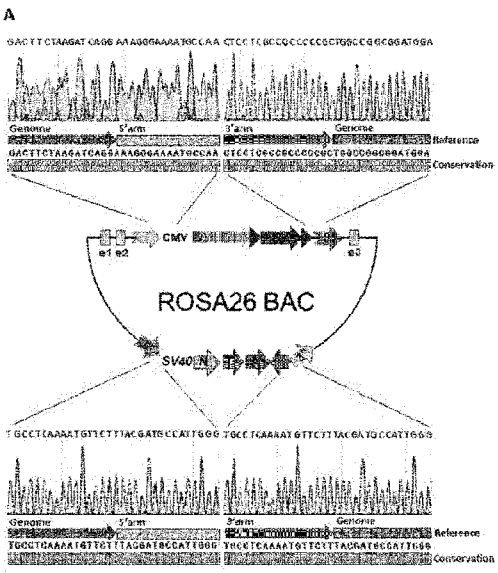
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK,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

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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** ARTIFICIAL CHROMOSOME COMPRISING TOL2 TRANSPOSON SYSTEM AND PROTEIN PRODUCTION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: TOL2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to an artificial chromosome comprising a Tol2 transposon system and a protein production method using same, specifically to an artificial chromosome comprising a pair of Tol2 inverted terminal repeats (ITRs), and more specifically, to an artificial chromosome comprising: a first cassette including a gene of interest (GOI) and a promoter; and a second cassette including a pair of Tol2 inverted terminal repeats (ITRs), and a protein production method using the artificial chromosome.

(57) 요약서: 본 발명은 Tol2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체, 보다 구체적으로는 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하는 제1 카세트와 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 제2 카세트를 포함하는 인공 염색체를 제공하고, 상기 인공 염색체를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것이다.

WO 2021/246616 A1

명세서

발명의 명칭: TOL2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법

기술분야

[1] 본 발명은 Tol2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체, 보다 구체적으로는 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하는 제1카세트와 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 제2카세트를 포함하는 인공 염색체를 제공하고, 상기 인공 염색체를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 포유동물 세포주는 인간생성 단백질의 경우와 같이 번역 후 수식(당화)과 같은 복잡한 단백질을 생성하는 능력으로 인해 바이오 의약품을 생산하는데 주로 사용되는 발현 시스템이다. 시장에 나와 있는 대부분의 바이오 의약품은 포유류 세포로 만들어지며 CHO 세포가 가장 큰 비율을 차지한다. 재조합 CHO(rCHO) 세포는 현탁 배양, 빠른 세포 성장 속도, 높은 재조합 단백질 생산, 및 물리적 스트레스에 적응하는 능력이 있어서, rCHO는 안정적인 발현 수준을 가질 수 있었다. 따라서, CHO 세포는 단백질을 생산하는 1차 숙주 세포로 선택되는데, 바이오 의약품에서 가장 중요한 것은 적은 시간과 비용으로 많은 단백질을 생산하는 것이다. 이를 해결하기 위해 벡터 수식(vector modification)이 종종 사용된다.

[3] 통상의 벡터 시스템이 주로 바이오 의약품에 사용된다. 통상의 벡터 시스템은 재조합 단백질을 생성하기 쉽다. 이 시스템은 가장 일반적이고 어렵지 않고 간단하며 대부분의 재조합 단백질은 이제 이러한 시스템을 통해 만들어진다. 그러나 이 시스템은 단백질 생산이 일정하지 않으며 생성이 진행됨에 따라 생산량이 감소한다. 이 약점은 "위치 색채 효과(position chromatic effect)" 때문이다. 대용량(최대 500Kb)으로 인해 BAC은 대부분의(전부는 아님) 관심 유전자의 발현을 위한 요소들을 포함할 수 있다. 이러한 조건으로 인해 BAC의 경우 BAC은 어디에나 통합되어 있어도 위치 색채 효과를 피할 수 있다. 따라서, 발현량이 일정하게 유지되기 때문에 바이오 의약품에 유리하다. ROSA26 BAC은 마우스 유전자좌에서 잘 발현되는 유전자좌로 만들어진 BAC이다. 바이오 의약품은 BAC가 주로 사용되는 곳이다. 기존의 실험은 이 ROSA26 BAC의 성능을 보여준다. Rosa26 유전자좌를 갖는 BAC은 CHO 세포에서 재조합 단백질 생산에 큰 이점을 가지며, 통상의 벡터 시스템을 사용하는 재조합 CHO 세포와 비교하여 비생산성(specific productivity)을 향상시키는 것으로 보고되었다.

[4] DNA 트랜스포존은 수년간 포유류 세포에서 재조합 단백질 생산을 촉진하기 위해 사용되어 왔다. DNA 트랜스포존은 세포 내에서 움직이거나 복제되는 유전자 시스템이다(일부 세포는 고유의 기능으로 가지고 있음). 이 시스템은 유전자 치료분야 또는 형질 전환을 위한 비바이러스(non-viral) 전달 도구로 사용되어 왔다. 이 비바이러스성 벡터 시스템은 또한 원래의 DNA를 복제하여 여러 유전자좌에 통합할 수 있는 매우 우수한 능력을 가지고 있다. 트랜스포존 시스템은 "잘라서 붙이기" 메커니즘으로 작동한다. 이 시스템에는 두 가지 구성 요소가 필요하다. 트랜스포사제 부위 및 유전자 전이를 일으키는 트랜스포사제를 운반하는 것은 한 쌍의 역위말단반복(ITR)이다. 일반적으로 두 종류의 벡터가 필요하다. 한 유형의 벡터는 선택을 위한 전이유전자 및 유전자와 유전자의 양쪽 끝에 역위말단반복(ITR)이 있어야 한다; 공여자 벡터. 또 다른 유형의 벡터는 트랜스포사제 유전자를 가져야 한다; 헬퍼 벡터. 2개의 벡터가 세포 내로 공동-형질주입된 경우, 공여체 벡터의 ITR로 둘러싸인 서열은 트랜스포사제에 의해 세포의 게놈으로 효과적으로 "잘라서 붙이기"가 된다. 이 시스템은 재조합 세포주의 개발에 효과적으로 사용되고 있다. 주로 사용되는 트랜스포존 시스템은 Sleeping Beauty, PiggyBac, Tol2이다.

[5] 이들 중 본 발명자는 Tol2 트랜스포존 시스템을 채택했다. 일본 쌀 물고기(Japanese rice fish)(Oryzias latipes) 또는 메다카로 알려진 물고기에서 유래한 hAT 슈퍼 패밀리에 속하는 Tol2 트랜스포존은 자연에서 발견된 유일한 척추동물 트랜스포존이다. 이 도구는 주로 게놈을 수식하는데 사용되는 도구이며 닭, 마우스 및 인간 세포에서 잘 전치되는 것으로 나타났다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명에서는 새로운 단백질 발현 시스템이 개발되었다. 이 시스템은 BAC를 사용하는 통상의 시스템보다 더 안정적인 발현 수준을 가지고 있다; GOI는 주변 유전자좌의 영향을 받지 않기 때문이다. Tol2 트랜스포존 시스템을 통합함으로써, 발현 수준은 전형적인 BAC 시스템의 발현 수준보다 높다. 본 발명자는 이 시스템이 생산한 세포주가 기존의 시스템보다 더 안정적인 발현 수준을 생성한다는 것을 확인했으며, 이것이 더 많은 단백질을 만든다는 것도 실험으로 확인했다.

기술적 해결방법

[7] 기존의 BAC system은 사이즈가 큰 유전자 서열을 담고 있는 BAC을 세포에 형질 주입하여 재조합 단백질을 얻는다. Plasmid와 달리 BAC은 수용력이 크기 때문에 차세대 재조합 단백질을 생산하는 것에 매우 적합하다. Tol2 트랜스포존 시스템은 플라스미드(plasmid)의 수용력을 상승시켜주는 능력이 존재하고 잘라내기 및 붙여 넣기(cut and paste) 기능으로 발현량을 증가시키는 능력 때문에 현 생물 제약 분야에 많이 사용되고 있다.

[8] Tol2 트랜스포존 시스템은 cut-and-paste 메커니즘으로 매개되는데 이는 표적부위의 재배열 또는 변형을 유발시키지 않고, 표적부위와 관련하여 선호도를 나타내지 않는다. 그래서 Tol2 system을 도입한 벡터는 기존의 발현 벡터보다 단백질 발현량이 우세하고, 안정적으로 발현한다.

[9] 이와 같은 Tol2 트랜스포존 시스템의 특징을 인공 염색체 시스템에 적용하고자, 본 발명의 일 실시예에서는, 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체를 제공한다.

[10] 구체적으로 상기 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)은 Tol2 좌측 ITR 및 Tol2 우측 ITR을 포함하며, 각각의 염기서열은 아래와 같다;

[11] [서열번호 1] Tol2 좌측 ITR

[12] TGCGAAGATACGGCCACGGGTGCTCTTGATCCTGTGGCTGATTTTGGACT
GTGCTGCTCGCAGCTGCTGATGAATCACATACTTCCTCCATTTTCTTCCACT
GATTGACTGTTATAATTTCCCTAATTTCCAGGTCAAGGTGCTGTGCATTGTG
GTAATAGATGTGACATGACGTCACTTCCAAAGGACCAATGAACATGTCTGA
CCAATTTCATATAATGTGAAAACGATTTTCATAGGCAGAATAAATAACATT
TAAATTAAACTGGGCATCAGCGCAATTCAATTGGTTTGGTAATAGCAAGGG
AAAATAGAATGAAGTGATCTCCAAAAAATAAGTACTTTTTGACTGTAAATA
AAATTGTAAGGAGTAAAAAGTACTTTTTTTTCTAAAAAAATGTAATTAAGT
AAAAGTAAAAGTATTGATTTTTAATTGTACTCAAGTAAAGTAAAAATCCCC
AAAAATAATACTTAAGTACAGTAATCAAGTAAAATTACTCAAGTACTTTAC
ACCTCTGGTTCTTGACCCCCTACCTTCA

[13] [서열번호 2] Tol2 우측 ITR

[14] ACCCATATCCACTCTGTTCCACACAGGTCAGAGGTTTGTCCAGGAGTTCT
TGACAGAGGTGTAAAAAGTACTCAAAAATTTTACTCAAGTGAAAGTACAA
GTACTTAGGGAAAATTTTACTCAATTAAAAGTAAAAGTATCTGGCTAGAAT
CTTACTTGAGTAAAAGTAAAAAAGTACTCCATTAAAATTGTACTTGAGTAT
TAAGGAAGTAAAAGTAAAAGCAAGAAAGAAAACTAGAGATTCTTGTTTAA
GCTTTTAATCTCAAAAAACATTAAATGAAATGCATACAAGGTTTTATCCTG
CTTTAGAACTGTTTGTATTTAATTATCAAACTATAAGACAGACAATCTAAT
GCCAGTACACGCTACTCAAAGTTGTAAAACCTCAGATTTAACTTCAGTAGA
AGCTGATTCTCAAAATTGTTAGTGTCAAGCCTAGCTCTTTTGGGGCTGAAA
AGCAATCCTGCAGTGCTGAAAAGCCTCTCACAGGCAGCCGATGCGGGAAG
AGGTGTATTAGTCTTGATAGAGAGGCTGCAAATAGCAGGAAACGTGAGCA
GAGACTCCCTGGTGTCTGAAACACAGGCCAGATGGG

[15] 구체적으로 상기 인공 염색체는 제1카세트 및 제2카세트를 포함하고, 상기 제1카세트는 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하고, 제2카세트는 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함할 수 있다.

[16] 구체적인 실시예에서 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 서열번호 3 및 4의

염기서열로 이루어진다.

[17] 구체적인 실시예에서, 상기 제1카세트는 인공 염색체의 엑손 사이에서 상동 재조합을 위한 5' 상동성 암(homologous arm); CMV 프로모터; 관심 유전자; 항생제 내성 유전자; 상동 재조합을 위한 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 포함할 수 있다.

[18] 구체적인 실시예에서, 상기 제2카세트는 인공 염색체의 내성 유전자와의 상동 재조합을 위한 5' 상동성 암(homologous arm); Tol2 좌측 암(arm); 양 측면에 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 포함하는 항생제 내성 유전자; Tol2 우측 암(arm); SV40 프로모터; 항생제 내성 유전자; 인공 염색체의 내성 유전자와의 상동 재조합을 위한 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 포함할 수 있다.

[19] 상기 카세트는 구체적으로 DNA 카세트(DNA cassette)로, 세포 내로 도입되어 발현되도록 만들어진 유용유전자를 포함한 일련의 유전자들을 포함하는 구조체(construct)를 지칭한다.

[20] 상기 관심 유전자(GOI)는 전이 유전자 또는 목적 유전자로 지칭될 수 있고, 관심유전자 단백질을 암호화하는 DNA와 관련하여 RNA 전사 개시 신호, 프로모터 또는 인핸서와 같은 전사되지 않는 플랭킹 영역을 포함하지 않는다. 관심 유전자는 세포 내에서 목적 단백질을 생산하기 위하여 도입될 수 있으며 상기 관심 단백질을 인코딩하는 유전자를 의미하고, 기능성 RNA를 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 관심 유전자는 형질감염(이는 본 발명과 관련하여 또한 형질도입)을 통한 포유동물 숙주 세포와 같은 세포로 도입되고 목적하는 생성물(관심 유전자 발현 생성물, 예를 들어 이종성 단백질)을 암호화하는 DNA 서열을 언급하는 경우 본원에 사용된다. 관심 유전자는 소포체 및/또는 세포질 막에 걸친 전좌 및/또는 분비를 매개하고/하거나 촉진시키는 신호 펩타이드를 암호화하고 분비 전 또는 분비 동안에 제거되는 신호 펩타이드 암호화 서열에 기능적으로 부착될 수 있다.

[21] 프로모터는 하나 이상의 핵산 서열의 발현을 위해 숙주 세포에 의해 인지되는 핵산 서열이다. 프로모터 서열은 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하는 전사 제어 서열을 함유한다. 프로모터는 돌연변이체, 절단되고 하이브리드 프로모터를 포함하는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 보여주는 임의의 핵산 서열일 수 있고 숙주 세포에 상동성 또는 이종성의 세포외 또는 세포내 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자로부터 수득될 수 있다. 본 발명에 따른 프로모터는 유도성 및 비-유도성 프로모터를 포함한다. 핵산 서열은 프로모터의 제어하에 있고 프로모터는 상기 핵산에 대해 이의 기능을 발휘한다. 본 발명의 세포/벡터는 흔히 상기 프로모터를 함유한다.

[22] 상기 프로모터는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터이고, 보다 바람직하게는 제2프로모터는 U6 프로모터, H1 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터,

아데노바이러스 후기 프로모터, 벡시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, 인간 연장인자 1α(hEF1α) 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, E2F 프로모터 AFP 프로모터 또는 알부민 프로모터이고, 가장 바람직하게는 CMV(cytomegalo virus) 프로모터이다.

[23] 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 항생제 내성 유전자는 마커 유전자로 사용되고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 제네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나 인공 염색체 제조시 상동 재조합이 성공적으로 완료되었는지 여부를 확인하기 위하여 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함하는 것이 바람직하다.

[24] 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 인공 염색체의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 포함할 수 있다. 구체적인 실시예에 따르면 상기 제1카세트는 인공 염색체의 엑손 사이에서 상동 재조합을 위한 상동성 암(homologous arm)을 포함하고, 상기 제2카세트는 상기 인공 염색체가 포함하고 있는 항생제 내성 유전자와 상동 재조합을 위한 상동성 암(homologous arm)을 포함하는 것이 바람직하다.

[25] 상기 인공 염색체가 포함하고 있는 항생제 내성 유전자는 상기 제1카세트 및 제2카세트에 포함되어 있는 내성 유전자와 상이한 제3의 항생제 내성 유전자인 것이 바람직하다. 이와 같이 제1카세트, 제2카세트 및 인공 염색체에 포함된 항생제 내성 유전자가 각각 상이하기 때문에 인공 염색체 제조시 상동 재조합이 성공적으로 완료되었는지 여부를 용이하게 확인할 수 있다.

[26] 구체적인 실시예에서, 상기 제1카세트의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)은 Rosa26의 엑손 2와 엑손 3 사이의 상동 재조합을 위해 설계되었으며, Rosa26 좌측 암 및 Rosa26 우측 암은 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기서열을 갖는다.

[27] 또한 상기 제2카세트의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)은 Rosa26의 클로람페니콜(Cam) 내성 유전자의 상동 재조합을 위해 설계되었으며, 클로람페니콜 좌측 암 및 클로람페니콜 우측 암은 각각 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열을 갖는다.

[28] 상기 인공 염색체는 BAC(bacterial artificial chromosome), PAC(P1-derived artificial chromosome), YAC(Yeast atificial chromosome) 및 코스미드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 BAC(bacterial artificial

chromosome)이다.

[29] 이들 인공 염색체는 DNA 증폭을 위해 사용되는 개개의 세포에서 세포 분화 동안 복제 및 보존을 위해 필요한 복제 개시 서열(replication origin sequence)을 포함한다는 점에서 공통점을 갖는다. 코스미드, BAC 및 PAC는 박테리아 유래 복제 개시점을 가지며, YAC는 효모 유래 복제 개시점을 가지며, MAC는 포유동물 세포의 복제 개시점을 가지며, HAC는 인간 세포의 복제 개시점을 갖는다. 또한 본 발명에 따라 사용된 인공 염색체는, 인공 염색체를 갖고 있는 세포의 선별을 가능케 하는, 일반적으로 항생제 내성을 갖는 선택 표지인자를 가질 수 있다.

[30] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 인공 염색체를 포함하는 세포를 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 포유동물 세포이며, 상기 포유동물 세포는 COS 세포, CHO 세포, VERO 세포, MDCK 세포, WI38 세포, V79 세포, B14AF28-G3 세포, BHK 세포, HaK 세포, NS0 세포, SP2/0-Ag14 세포, HeLa 세포, HEK293 세포 및 PER.C6 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[31] 상기 세포는 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 더 포함할 수 있다. 즉 상기 세포는 상기 인공 염색체와 상기 Tol2 트랜스포사제 벡터로 공동-형질감염될 수 있다.

[32] 본 발명의 또 다른 실시예는, 상기 인공 염색체를 이용한 단백질 생산 방법을 제공하며, 상기 단백질 생산 방법은 상기 인공 염색체를 세포에 형질감염시키는 단계를 포함한다.

[33] 구체적으로 상기 단계는 상기 인공 염색체와 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 공동-형질감염시키는 단계일 수 있다.

[34] 상기 트랜스포사제는 예를 들어 플라스미드(벡터)에서 DNA에 의해 암호화되거나, 또는 한편으로 상기 트랜스포사제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA이다.

[35] 따라서, 상기 인공 염색체를 세포에 형질감염시키는 단계 이후에 상기 인공 염색체로 형질감염된 세포에 Tol2 트랜스포사제 mRNA를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[36] 상기 인공 염색체는 5 ~ 15㎍ 또는 33 ~ 70㎍의 양으로 상기 세포에 형질감염될 수 있으며, 바람직하세는 6 ~ 10㎍의 양으로 형질감염되는 것이 바람직하다.

[37] 또한 상기 Tol2 트랜스포사제 mRNA의 처리 중량 비율(인공염색체:mRNA)은 9:0.1 ~ 9:0.9 또는 9:2 ~ 9.5인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[38] 본 발명은 기존의 BAC 시스템에 Tol2 시스템을 적용시킨 새로운 형태의 항체 발현 시스템을 제공한다. 항체 의약품 생산에 있어 벡터의 유전자 수용력이 중요하다. 그래서 수용력이 적은 플라스미드 시스템보다 수용력이 큰 BAC

시스템이 주목받고 있다. 기존의 BAC 시스템은 사이즈가 큰 탓에 세포에 형질 주입되는 양이 적다는 단점이 존재한다. 이에 본 발명은 BA의 발현량을 강화고자 Tol2 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템에 추가하였으며 BAC 시스템에 Tol2 트랜스포존 시스템을 추가함으로 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[39] 도 1은 BAC 기반 벡터 디자인을 나타내는 도면이다; (A) BAC 구조의 개략도. 루시퍼라제 구조물을 엑손 2와 엑손 3 사이의 인트론 영역에 삽입하였다. CMV; CMV 프로모터, KanR; 카나마이신 내성, AmpR: 암피실린 내성, Tol2; Tol2 arm 서열, NeoR: 네오마이신 내성 (B) Tol2 트랜스포존 벡터(Tv)의 개략도. SA; 스플라이스 수용체, SP; 신호 펩티드, SV40; SV40 프로모터 (C) 플라스미드 대조군의 개략도.

[40] 도 2는 재조합 ROSA26 유전자좌의 PCR 스크리닝 결과를 나타내는 도면이다; (A) 엑손2와 엑손3 사이를 표적으로 하는 ROSA26 BAC에서 루시퍼라제 카세트의 재조합은 PCR 스크리닝으로 확인되었다. (B) 엑손2와 엑손3 사이에 표적화된 ROSA26 BAC에서의 Tol2 카세트 재조합은 PCR 스크리닝에 의해 확인되었다. 5'/3'교차 PCR 앰프리콘 시퀀싱. 안정된 세포풀 엠프리콘을 정제하고 PCR 증폭한 다음 직접 시퀀싱하였다. 접합된 PCR 증폭된 생성물의 크로마토그램 서열을 게놈-공여체 경계에서의 기준 서열과 비교하였다.

[41] 도 3은 재조합 세포주의 루시퍼라제 발현 측정 결과를 나타내는 도면이다; 루시퍼라제는 동일한 세포 수를 가진 세포 용해로 측정하였다. (A) 각 재조합 세포주의 발현 수준을 2주 선택 후 안정된 세포주로서 측정하였다. (B) 각 재조합 세포주의 발현 수준을 각 세포주의 단일 클론으로 측정하였다(*P < 0.05, **P < 0.01, Unpaired t test, Means ± S.D., N = 3)

[42] 도 4는 세포주를 실시간 PCR로 분석한 결과를 나타내는 도면이다; 각 세포주의 대표적인 단일클론을 사용하여 실시간 PCR 분석을 수행하였다. (A) 통합량은 각 세포의 gDNA를 사용하여 측정하였다. (B) 전사량은 각 세포의 cDNA를 사용하여 측정하였다. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 쌍이 아닌 t 테스트, 평균 ± SD, N = 3

[43] 도 5는 BAC 및 Tol2 시스템의 최적화 결과를 나타내는 도면이다; BAC 및 Tol2 시스템이 최적의 성능을 달성할 수 있도록 다양한 실험을 수행했다. (A) Tol2 트랜스포사제 형태에 따른 BAC 및 Tol2 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험. -; 음성, +; 양성 (B) BAC의 투여량에 따른 BAC & Tol2 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험 -; 음성, +; 양성 (C) BAC와 Tol2 트랜스포자제 mRNA의 비율에 따른 BAC와 Tol2 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험 -; 음성, +; 양성

발명의 실시를 위한 형태

[44] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는

오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[45]

[46] **<실시예>**

[47] **1. 세균 균주 및 BAC 클론**

[48] SW105 박테리아: 유전자형 F- *mcr*A △(*mrr-hsd*RMS- *mcr*BC) Φ80d *lac*Z M15 △*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *ara*D139 △(*ara, leu*) 7649 *gal*U *gal*K *rsp*L *nup*G [λ *cI* 857(*cro-bio*A) <> *tet*] [(*cro-bio*A) <> *ara*C-PBAD *flpe*]. SW105 박테리아는 국립암연구소(National Cancer Institute)의 Copeland 연구소에서 제공해 주었다. BAC 클론(RP24-85L15)은 BACPAC 리소스 센터(미국 캘리포니아주 오클랜드 소재 CHORI)에서 구입하였다.

[49]

[50] **2. BAC 표적화 카세트(BTC) 및 클로람페니콜(Cam) 표적화 카세트(CTC)의 준비**

[51] BAC 표적화 벡터(BTV) 및 Cam 표적화 카세트(CTV)는 본 발명자가 제작하였다(대한민국 특허출원번호 제10-2020-0061812호) BTV를 XmaI 및 XhoI와 함께 그리고 CTV를 BamHI 및 XhoI와 함께 37℃에서 4시간 동안 배양한다. 소화된 DNA를 0.2% 아가로스 겔에 넣는다. DNA 전기영동 장치(Bioand, cat. no. Mini-ES)에서 그 겔을 100 V에서 30분 동안 작동시킨다. 전기영동 후, LED 트랜스 일루미네이터 아래에서 BTC 및 CTC를 함유하는 DNA 밴드를 절단해 낸다(Maestrogen, cat. No. SLB-01W). 겔 추출 키트(Qiagen, cat. no. 28704)를 사용하여 DNA를 정제한다. Nanodrop 분광광도계(Denovix, cat. no. DS-11)를 사용하여 DNA 농도를 측정하고 DW를 사용하여 DNA를 8-10 ng/μl로 희석한다.

[52]

[53] **3. 통상적 및 BAC 기반 발현 벡터 생성**

[54] 제한효소 및 리가제는 New England Biolabs(NEB)에서 구입하였다. 모든 플라스미드는 그것들을 사용하여 제조하였다. 두 차례의 BAC 재조합을 위해 2개의 카세트를 만들었다. 제1카세트; BTV는 CMV 프로모터에 의해 발현된 루시퍼라제 유전자를 함유하고 및 제2카세트; CTC는 Tol2 트랜스포존 시스템에 대한 Tol2 암(arm) 서열 및 선별에 대한 네오마이신 내성을 포함한다. DH10B 대장균 박테리아에서 클로닝을 수행하였다.

[55]

[56] **4. BAC 재조합**

[57] BAC 재조합은 이득 & 손실 시스템으로 수행하였다. 상동성 재조합에 필요한 재조합 효소 단백질을 보유하는 SW105 대장균을 Rosa26 BAC로 전기 천공시켰다. 적절한 BAC를 포함하는 SW105의 단일 콜로니를 분리한다. 12.5

μg/ml Cam으로 5 ml LB의 종균 배양액에 접종하고 분당 250회전으로 진탕하면서 32℃에서 밤새 인큐베이션 한다. 다음날, 종균 배양액 5ml를 12.5μg/ml Cam으로 500ml의 LB로 희석한다. UV-Vis 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 OD를 측정하여 시간이 지남에 따라 세포 집단의 성장을 검사한다. OD_{600}이 0.4에 도달할 때까지(약 2.5 ~ 3 시간) 32°C에서 진탕(250rpm)하여 배양한다. 열충격 유도성 재조합 효소의 발현을 유도하기 위해, 배양액 플라스크를 42℃ 진탕 수조로 옮긴다. 셀 다운 후, 상층액을 제거하고 적격세포를 만들기 위해 총부피를 1 ml로 조정한다.

[58]

[59] **5. 1차 재조합**

[60] 200 μl 피펫을 사용하여 상층액을 따라낸다. 세포에 800-900 ng의 FC(8-9 ng/μl 농도에서 총 100 μl FC)를 추가하고 1 ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 세포를 2mm 간격 큐벳으로 옮긴다. 큐벳을 전기천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50μF 및 100Ω 저항을 가한다. 1 ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15 ml 원추형 튜브로 옮긴다. 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 더한다. 250rpm로 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. Cam과 다른 농도의 Kan을 함유한 LB 플레이트 당 배양된 세포 500 μl을 시딩한다. 32℃에서 36시간 동안 그 판들을 배양한다. 양성 콜로니는 이득 & 손실 시스템을 사용하여 식별하였다.(도 1A)

[61]

[62] **6. 2차 재조합**

[63] 200 μl 피펫을 사용하여 상층액을 따라낸다. 세포에 800-900 ng의 SC(8-9 ng/μl 농도에서 총 100 μl SC)를 첨가하고 1 ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 세포를 2mm 간격 큐벳으로 옮긴다. 큐벳을 전기천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50μF 및 100Ω 저항을 가한다. 1 ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15 ml 원추형 튜브로 옮긴다. 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 더한다. 250rpm로 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. 상이한 농도의 Aan을 함유하는 LB 플레이트 당 배양 세포 500 μl를 입힌다. 32에서 36시간 동안 그 판들을 배양한다. 양성 콜로니는 증감 선택 시스템을 사용하여 식별하였다(도 1A). BAC DNA는 삽입될 구성 및 BAC의 프라이머 쌍을 사용하여 중합 효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 정확한 재조합에 대해 분석되었다.

[64]

[65] **7. 접합 PCR 및 시퀀싱**

[66] 완성된 BAC이 템플릿으로 사용되었다. 제조자의 지시에 따라 QIAfilter 플라스미드 미디 키트(12243; Qiagen)를 사용하여 템플릿을 단리 및 정제하였다. 랜딩 패드 밖으로 향한 프라이머는 벡터 백본에서 프라이머와 짝을 이루었다. 카세트 외부의 서열, 즉 BAC의 서열을 표적으로 하는 프라이머는 카세트 내부의

서열을 표적으로 하는 프라이머와 쌍을 이룬다. 카세트의 5' 및 3' 부분을 표적으로 하는 두 쌍의 프라이머가 있다. 이 영역을 Solg ™ 2x Taq PCR Smart mix(STD02-M50h; Solgent)를 사용하여 3회 PCR로 증폭시키고 1% 아가로스 겔에서 시각화하였다. PCR 단편을 Solg ™ 겔 및 PCR 정제 시스템(SGP04-C200; 용매)을 사용하여 정제하고 접합 PCR에 사용된 프라이머로 마크로젠으로 서열분석하였다.

[67]

[68] **8. 세포 배양**

[69] CHO-DG44(A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 세포는 4 mM L-글루타민(PAA), 4500 mg/L 포도당, 소듐피루브산염, 태아 소 혈청(FBS), Pen/Strep(Gibco) 및 HT-보충(Gibco); CHO 세포 배지를 보충한 DMEM/고포도당 배지(Hyclone)에서 유지되었다. 세포는 150 rpm에서 진탕시키며 37℃ 5% CO_2, 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[70]

[71] **9. 형질주입**

[72] 리포펙션: BAC 및 대조군 플라스미드를 Lipofectamine ™ 2000 형질주입 시약으로 형질주입시키기 위해 잠깐 사용하였다. 6 μg DNA 및 12 μL Lipofectamine ™ 2000 형질주입 시약(제어 DNA 0.3 μg 첨가)을 Opti-MEM(Gibco) 무혈청 배지에서 함께 인큐베이션 하였고 20분 동안 6 웰 배양 플레이트(SPL)에서 3ml의 CHO 세포 배지에 플레이팅된 3 x 10^6 CHO-DG44 세포에 첨가하였다. BAC DNA는 원형으로 형질주입에 사용된다. BAC 및 Tol2 트랜스포사제 벡터의 양의 비율은 9:1이다. 500g/ml 지네티신 디설페이트 G418(Invitrogen)을 사용하여 형질주입 2주 후 세포주 선택을 시작하였다. 형질주입 2주 후 안정된 세포풀을 분석하였다. 이어서 세포를 HiRes(Roche)로 계수하였다.

[73]

[74] **11. 클론 선택 및 안정성**

[75] 희석기술을 제한하여 단일 세포 클론을 수득하였다. 안정된 세포풀의 세포를 웰 당 0.8 밀도로 96웰 조직 배양 플레이트(SPL)에 플레이팅하였다. 높은 생성물 농도를 나타내는 웰에서 나온 클론을 이어서 팽창시키고 이들의 비생산성(specific productivities)을 분석하였다. 상이한 CHO-DG44 세포주의 클론 안정성을 125 mL 삼각 플라스크(Corning)에서 모니터링하였다. 세포를 항생제 압력 없이 37℃ 5% CO2, 150 rpm에서 배양하였다. 세포를 3일마다 2 x 10^5 세포/ml로 신선한 배지에 통과시켰다. 3일에 한 번씩 특이적이고 체적적인 생산성을 측정했다.

[76]

[77] **12. 제어 플라스미드 그룹, BAC 및 BAC w/Tol2 세포주의 생성.**

[78] 생산 클론 대조군 플라스미드 그룹, Tv가 없는 BAC 그룹 및 Rosa26 BAC 그룹

w/Tv는 CHO-DG44(A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 나온 무혈청 적응 숙주 세포주에서 생성되었다. 리포펙타민 ™ 2000(11668030; Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 형질주입을 수행하였다. 간단히 말하면, 12 μL 리포펙타민 ™ 2000 및 원형 BAC DNA(또는 플라스미드)를 총부피 300 μL Opti-MEM 배지 무혈청에서 복합체화시켰다. 형질주입 실험 전날, CHO 세포 배지에서 성장한 3 x 10^5 세포/mL 숙주 세포를 6개의 웰 플레이트에 시딩하여 실험 당일에 사용하였다. DNA 및 리포펙타민의 혼합물을 세포를 함유하는 각각의 웰에 적가하고 가습 CO_2 인큐베이터(Forma ™ Series 3 Water Jacketed CO_2 인큐베이터; Thermo Fisher Science)에서 37℃ 및 5% CO2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 후, 3X 혈청 배지로 교체한다(세포 성장에 사용되는 30㎖의 배지에 6㎖의 FBS를 첨가함). C418 세포 배지에 G418을 첨가하여 2주 동안 세포를 선택하였다. G418의 농도는 500 μg/ml이었다. 선택된 형질주입 세포를 96웰(SPL)에서 웰당 0.8 세포로 인큐베이션하였다. 각 웰의 배지 부피는 150 μL이었다. 세포가 배양된 96개의 웰-플레이트는 37℃ 및 5% CO_2의 가습 인큐베이터에서 2주 동안 인큐베이션되었다. 각 세포주에 대해 30 개의 단일클론이 무작위로 선택되었다. 세포는 6개의 웰 플레이트로 옮기고 인큐베이션하였다.

[79]

[80] **13. 비생산성(Specific productivity) 결정**

[81]

[82] *재조합 CHO 세포주의 발현 수준을 결정하기 위해, 루시퍼라제를 동일한 수의 세포에서 측정하였다. 세포 수는 Cedex HiRes(Roche)를 사용하여 계수하였고, 루시퍼라제는 다중 모드 판 계기(PerkinElmer)로 측정하였다. 15ml 튜브와 cfg(2000rpm, 2분)에 1 x 10^6 세포를 넣는다. 상층액을 제거한 후, PBS 및 cfg(2000 rpm, 2분)를 첨가하였다. 상층액을 제거한 후, PBS 50 μl 및 1 X 용해 완충액 50 μl를 첨가하고 소용돌이 치게(vortexing)하여 펠렛을 방출한다. 준비된 각 샘플을 흰색 96개의 웰에 넣고 각 웰에 50μl의 LARII를 추가한다(용해된 세포:LARII = 1:1)

[83]

[84] **14. gDNA 및 cDNA의 준비**

[85] 게놈 DNA(gDNA)는 안정된 재조합 CHO 세포주로부터 제조되었다; 2 x 10^6 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 제작자의 지시에 따라 Solg ™ 게놈 DNA 준비 키트(SGD41-C100; SPL)를 사용하여 gDNA를 분리하고 정제하였다. 매뉴얼에 따라 Rnasy Mini Kit(74104; QIAGEN)를 사용하여 2 x 10^6 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 정제된 RNA를 RNAse가 없는 물에 -80℃에서 저장하였다. Phusion RT-PCR 키트(F-546S; Thermo Fisher Scientific, MA, USA, MA, USA)를 사용하여 총 RNA를 제작자의 지시에 따라 역전사시켰다. gDNA 및 cDNA의 순도 및 농도는 DS-11 분광광도계(DeNovix)로 측정하여 결정했다.

[86]

[87] **15. mRNA**

[88] Tol2 트랜스포사제 mRNA를 Rosa26 BAC로 형질주입시켰다. MEGAscript ™ T7 전사 키트(AM1333; Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 트랜스포사제 벡터(Tv)로부터 Tol2 트랜스포사제 mRNA를 증폭시켰다. 템플릿 플라스미드를 Tol2 트랜스포사제의 하류의 SalI 부위로 선형화시켜 전사시켰다. 그렇지 않으면, 원형 플라스미드 템플릿은 RNA 폴리머라제가 매우 연작용적이기 때문에 매우 길고 이질적인 RNA 전사체를 생성한다.

[89]

[90] **16. 실시간 PCR(qPCR) 분석**

[91] qPCR은 SYBR 방법을 이용하여 CFX Connect ™ 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad)으로 수행되었다. 모든 프라이머는 Snap Gene(GSL Biotech LLC, IL, USA)을 사용하여 설계되었고 Macrogen으로 합성되었다. 프라이머는 루시퍼라제 유전자에서 200 bp 단편 및 내부 대조군으로서 작용하는 200 bp 살림 유전자 GAPDH를 증폭시키고 데이터를 정규화하도록 설계되었다. qPCR은 비템플릿(non-template) 대조군 및 음성 대조군을 포함하여 20ng의 gDNA 또는 1μL cDNA로 95℃에서 5분 동안 변성시킨 후 94℃에서 30초 동안, 57℃에서 30초 동안 그리고 70℃에서 10초 동안 40회 수행하였다.

[92]

[93] **17. 클론 안정성.**

[94] 선택 압력이 없는 CHO 세포 배지(상기 참조) 해동 후 20 계대(71-73 일)에 걸쳐 진탕 플라스크에서 CHO-DG44/Ctrl, CHO-DG44/e2e3 및 CHO-DG44/e2e3 + Tol2 rCHO 세포주의 클론 안정성을 모니터링하였다. 세포를 3 일마다 1 x 10^5 세포/mL로 신선한 배지에 통과시켰다. 각각의 분리 전에 세포 농도, 생존력 및 생성물 농도를 모니터하였다.

[95]

[96] **<실험예>**

[97] **1. BAC 기반 벡터 설계의 최적화**

[98] 재조합 단백질 생산에 적합한 BAC에 기초한 강력한 발현 벡터를 설계하기 위해 2가지 전략이 사용되었다. 첫째, 다양한 BAC에서 높은 수준의 발현을 갖는 것으로 알려진 Rosa26 BAC가 사용되었다. 둘째, 상당한 양의 DNA를 트랜스포존시킬 수 있는 것으로 알려진 Tol2 트랜스포존 시스템이 BAC 시스템에 추가되었다.

[99] 2가지 이전의 전략에 의해 생성된 새로운 벡터 시스템(BAC 및 Tol2 시스템)은 2개의 BAC 재결합을 통해 구성되었다(도 1A).

[100] 첫 번째 전략을 위해 murine Rosa26과 함께 BAC를 사용하기로 결정했다. Rosa26 유전자 자리는 허용되는 염색질을 함유하는 것으로 잘 알려져 있으며, 표적 전이유전자 통합을 위한 마우스 유전자 변형 분야에서 널리 사용된다. 본

발명자는 루시퍼라제 유전자를 발현하는 CMV 프로모터에 통합되고 이를 Rosa26과 재조합하는 일련의 카세트를 구성하였다(도 1B).

[101] 이 카세트는 Rosa26의 엑손 2와 엑손 3 사이의 상동 재조합을 위해 설계되었다. 이 카세트 생산을 위해, 원하는 구조물을 복제하여 벡터(BTV)를 생성하고, 완성된 벡터를 XmaI 및 XhoI을 사용하여 분해하여 선형 카세트(BTC)를 형성하였다(도 1B).

[102] 두 번째 전략적 접근과 관련하여 Tol2 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템에 도입했다. 트랜스포존 시스템이 작동하려면 두 가지 조건이 충족되어야 한다. 트랜스포사제가 DNA 구조를 인식하기 위해서는 한 쌍의 ITR(역위 말단 반복: inverted terminal repeats)이 있어야 한다. ITR은 Tol2 트랜스포존 시스템에서 Tol2 암(arm)이라고 한다. 또 하나의 조건은 DNA 구조를 지닌 단백질인 트랜스포사제의 존재이다. 첫 번째 조건을 만족시키기 위해, Rosa26의 Cam26의 위치에서 또 다른 유형의 카세트 재조합은 Tol2 암 서열 및 네오마이신 내성 유전자로 설계되었다(도 1D). 포유류 선택을 위해 네오마이신 내성이 추가되었다. 이 카세트 생산을 위해, 원하는 구조물을 복제하여 벡터(CTV)를 생성하고, 완성된 벡터를 BamHI 및 XhoI를 사용하여 분해하여 선형 카세트(CTC)를 형성하였다(도 1C).

[103] 그리고 두 번째 조건을 위해 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터(Tv)를 발명했다(도 1D). 제조된 BAC-기반 항체 발현 시스템을 비교하기 위해 대조군 벡터를 제조하였다(도 1E). 각각의 카세트의 5' 및 3' 접합의 하류 프라이머를 설계하여 PCR을 수행하였으며, 2개의 카세트가 Rosa26 BAC에 대한 상동 재조합을 성공적으로 완료했는지 여부를 결정하였다. 실제 서열과 비교하기 위해 PCR 생성물을 확인하고 서열 분석하였다. 정확한 서열이 일치함을 확인했다(도 2).

[104]

[105] **2. 기존 시스템보다 우수한 발현 수준**

[106] 본 발명자는 정상적인 플라스미드와 강력한 벡터 시스템을 개발했다. 이들은 다른 BAC-기반 발현 벡터의 성능을 확인하기 위해 CHO-DG44 세포로 형질주입되었다. 대조군 플라스미드 그룹, Tv가 없는 Rosa26 BAC 그룹 및 Tv가 없는 Rosa26 BAC 그룹이 3 개의 세포주 그룹으로 구성되었다. 리포펙타민을 사용하여 형질주입을 수행하고, G418을 사용하여 스크리닝을 통해 안정된 세포주를 수집하였다. 이 안정된 세포주는 일시적인 발현 수준을 확인했다. 세포 내 루시퍼라제는 각 세포주에서 동일한 세포 수를 사용하여 측정하였다.

[107] 실험 결과, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv는 대조군 플라스미드 그룹보다 2배 더 높았고, Tv가 없는 BAC 그룹보다 1.8배 더 높았다(도 3A).

[108] 그 후 단일클론 수준에서 발현 수준을 확인하기 위해 후속 실험을 수행하였다. 각 세포주는 2주 동안 96웰을 사용하여 단일클론 수준에서 배양되었다. 각 세포주에서 30개의 세포를 무작위로 선택하여 배양을 위해 6웰로 옮기고, 각

세포주에서 일정한 30개 세포에서 루시퍼라제를 측정하였다.

[109] 단일클론을 각 그룹에서 가장 높은 발현 수준과 비교할 때, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv의 클론은 대조군 플라스미드 그룹보다 3.4배 높았고, Tv 클론이 없는 BAC 그룹보다 2.3배 더 높았다(도 3B).

[110] 세포의 배가 시간(doubling time)은 성장 속도를 알려준다. Tol2를 사용한 BAC 기반 시스템의 안정성을 확인하기 위해, 각 그룹에서 가장 높은 발현 수준을 갖는 세포를 선택하고 30일 동안 배치로 배양하였다. 3일마다 성장률을 측정하였다.

[111] 결과는 Rosa26 BAC 그룹 w/Tv의 성장률이 가장 안정적임을 보여주었다(도 3C). 결과적으로, Rosa26 BAC은 플라스미드보다 더 높은 발현 능력을 가지며 Tol2 트랜스포존 시스템이 첨가될 때 증가하였다.

[112]

[113] **3. 유전자 카피 수와 mRNA 전사의 차이점**

[114] 3개의 세포주의 발현 수준을 안정된 세포주 수준 및 단일클론 수준에서 확인하였다. 발현 수준의 원인을 결정하기 위해, 유전자 카피 수(gene copy number, gcn) 및 mRNA를 각 세포주에서 단일 세포 중에서 가장 높은 루시퍼라제를 발현하는 개체를 사용하여 확인하였다. 루시퍼라제를 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 형질주입된 세포의 gDNA를 사용하여 실시간 PCR(qPCR)을 수행하여 각 세포주에서 gDNA에 통합된 DNA 수의 차이를 결정하였다.

[115] 측정된 결과는 대조군 플라스미드 그룹 클론의 gcn이 1 일 때, Tv 클론이 없는 BAC 그룹의 gcn은 0.66이고 Rosa26 BAC 그룹 w/Tv 클론의 gcn은 0.76임을 나타낸다(도 4A).

[116] 트랜스포존을 사용할 때 본 발명자는 gcn에서 현저한 차이를 찾지 못했다. 전사될 mRNA의 차이를 결정하기 위해 cDNA를 사용하여 qPCR 실험을 수행하였다. cDNA는 이전 실험에서 사용된 동일한 클론에서 얻은 동일한 양의 RNA를 사용하여 합성되었다. 이어서 전사될 루시퍼라제 mRNA를 루시퍼라제를 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 측정하였다. 결과적으로, Tv 클론이 없는 BAC 그룹의 mRNA 양은 대조군 플라스미드 그룹 클론의 것보다 70% 낮았고, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv 클론의 경우 2.5배였다(도 4B).

[117] 분석에 따르면, BAC의 사용은 플라스미드 전사의 양보다 더 많이 발생한다. 트랜스포존 시스템과 함께 사용하면 전사량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[118]

[119] **4. BAC 최적화**

[120] Tol2를 갖춘 BAC 시스템은 종래의 시스템 또는 BAC 시스템보다 훨씬 더 강한 발현 수준을 갖는 것으로 밝혀졌다. 또한 Tol2를 사용하여 BAC 기반 시스템을 향상시키기 위해 최고의 효율성을 위한 최적의 조건을 찾았다.

[121] 본 발명자는 세 가지 유형의 Tol2 트랜스포사제 유전자, BAC DNA 및 트랜스포사제를 최적화했다. 먼저, 최적의 트랜스포사제 유전자 유형이 Tol2를 갖는 BAC 기반 시스템을 보다 효율적으로 작동시키는 것으로 확인되었다. BAC, 트랜스포사제 플라스미드 및 트랜스포사제 mRNA의 조건은 이전 실험에서와 동일한 조건하에서 수행되었다. 형질주입된 루시퍼라제 발현 플라스미드(대조군), 형질주입된 BAC 및 트랜스포사제 플라스미드, 형질주입된 BAC 및 트랜스포사제 mRNA의 세 그룹으로 실험을 수행하였다.

[122] 결론적으로, mRNA를 가진 그룹이 가장 높은 발현 수준을 나타냈다. mRNA 그룹은 대조군보다 6배 더 높았고, 플라스미드 그룹은 3배 더 높았다.

[123] 요약하면, Tol2를 갖춘 BAC 시스템을 가장 효율적으로 사용하려면 트랜스포사제를 플라스미드 형태가 아닌 mRNA 형태로 사용해야 한다(도 5A).

[124] BAC의 양을 최적화하기 위해, 총 6가지 조건을(예컨대 2, 4, 8, 16, 32 및 64 μg) 비교하였다. 64 μg가 가장 높은 발현 수준을 보였지만, 너무 많은 BAC가 세포를 손상시킬 수 있기 때문에 두 번째로 높은 발현 수준을 갖는 8 μg가 최적의 양으로 선택되었다(도 5B).

[125] Tol2를 갖춘 BAC 기반 시스템은 BAC DNA의 두 조건과 Tol2 mRNA 사이의 비율이 최적일 때 최상의 발현을 생성한다. BAC DNA와 같은 총 5개의 조건(예를 들어 9:0.5, 9:1, 9:3, 9:6 및 9:9)에서 Tol2 mRNA 조건을 비교하였다. 결과적으로 9:3의 비율일 때 표현 수준이 가장 높았다(도 5C). 요약하면, Tol2를 갖춘 BAC 기반 시스템은 Tol2의 유전자가 mRNA의 형태이고, BAC의 양이 8μg이고, BAC 및 Tol2 트랜스포사제 mRNA의 비율이 9:3인 조건 하에서 가장 높은 발현 수준을 가졌다.

[126]

[127] **<검토>**

[128] 이 연구에서 본 발명자는 통상 재조합 단백질 발현 시스템보다 더 강력한 단백질 발현 시스템을 개발했다. 새로운 단백질 발현 시스템을 구축하기 위해 2개의 시스템이 사용되었다. 하나는 위치 효과에 영향을 받지 않는 강력한 단백질 발현 시스템인 BAC 시스템과 매우 강력한 시스템으로 알려진 Tol2 트랜스포존 시스템이다.

[129] BAC 시스템은 매우 강력한 단백질 발현 시스템이다. 안정된 세포주 수준에서 BAC 시스템 단독은 플라스미드 시스템보다 1.8배 높았으며 BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템은 2.1배 더 높게 사용되었다. 결과적으로, 단일 세포 수준에서, BAC 시스템은 플라스미드 시스템보다 2.42배 높았으며, BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템은 3.43배로 가장 높았다. 새로 만든 벡터 시스템이 통상 시스템보다 훨씬 강력하다는 것을 알 수 있다. 형질주입된 세포주의 gDNA 및 cDNA를 분석하였다. 플라스미드 시스템의 gcn이 1 인 경우, BAC 시스템의 gcn은 0.66이고 BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템의 gcn은 0.76이다. 각 시스템과 비교하여, BAC 시스템 단독은 플라스미드 시스템보다 28배 높았고, Tol2

트랜스포존 시스템은 239배로 가장 높았다. gcn의 수의 차이는 눈에 띄지 않았지만, 발현량은 상당히 다른 것으로 관찰되었다. 결론적으로, Tol2 트랜스포존 시스템은 BAC 통합보다는 BAC 전사를 증가시켰다. 새로운 벡터 플랫폼을 최적화하기 위해 실험을 수행하였다. Tol2 플랫폼을 갖춘 BAC에서 최고의 성능을 얻기 위해 최적 유형의 트랜스포사제로 실험했다. 결론적으로, 벡터 유형은 대조군보다 약 3배 더 많았으며, mRNA 유형은 약 6배 더 높았는데, mRNA 유형이 가장 적합하였다.

[130] 요약하면, 본 발명자는 재조합 단백질을 생산하기 위한 매우 강력한 벡터 시스템을 개발했다. BAC 시스템을 사용하는 경우, 재조합 단백질의 발현 수준이 종래의 벡터 시스템의 발현 수준보다 높다는 것이 확인되었다. 다음으로, Tol2 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템과 함께 사용해보니, BAC 시스템만 사용했을 때 발현이 더 강한 것으로 확인되었다. 트랜스포존 시스템이 BAC와 함께 사용될 때, 세포 내로 형질도입된 통합량은 유의하게 변하지 않지만 전사량은 유의하게 증가한다. 종합하면, 이 증거들은 새로 개발된 벡터 시스템이 기존의 벡터 시스템보다 훨씬 강력하고 안정적이라는 것을 보여준다.

[131]

[132] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 인공 염색체는, 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하는 제1카세트와 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 제2카세트를 포함하는 인공 염색체.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함하는 인공 염색체.

[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 인공 염색체의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 포함하는 인공 염색체.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 Tol2 좌측 ITR 및 Tol2 우측 ITR은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 인공 염색체.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 인공 염색체는 BAC, PAC, YAC 및 코스미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 인공 염색체.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 인공 염색체를 포함하는 세포.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 세포는 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 더 포함하는 세포.

[청구항 9] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 인공 염색체를 세포에 형질감염시키는 단계를 포함하는 단백질 생산 방법.

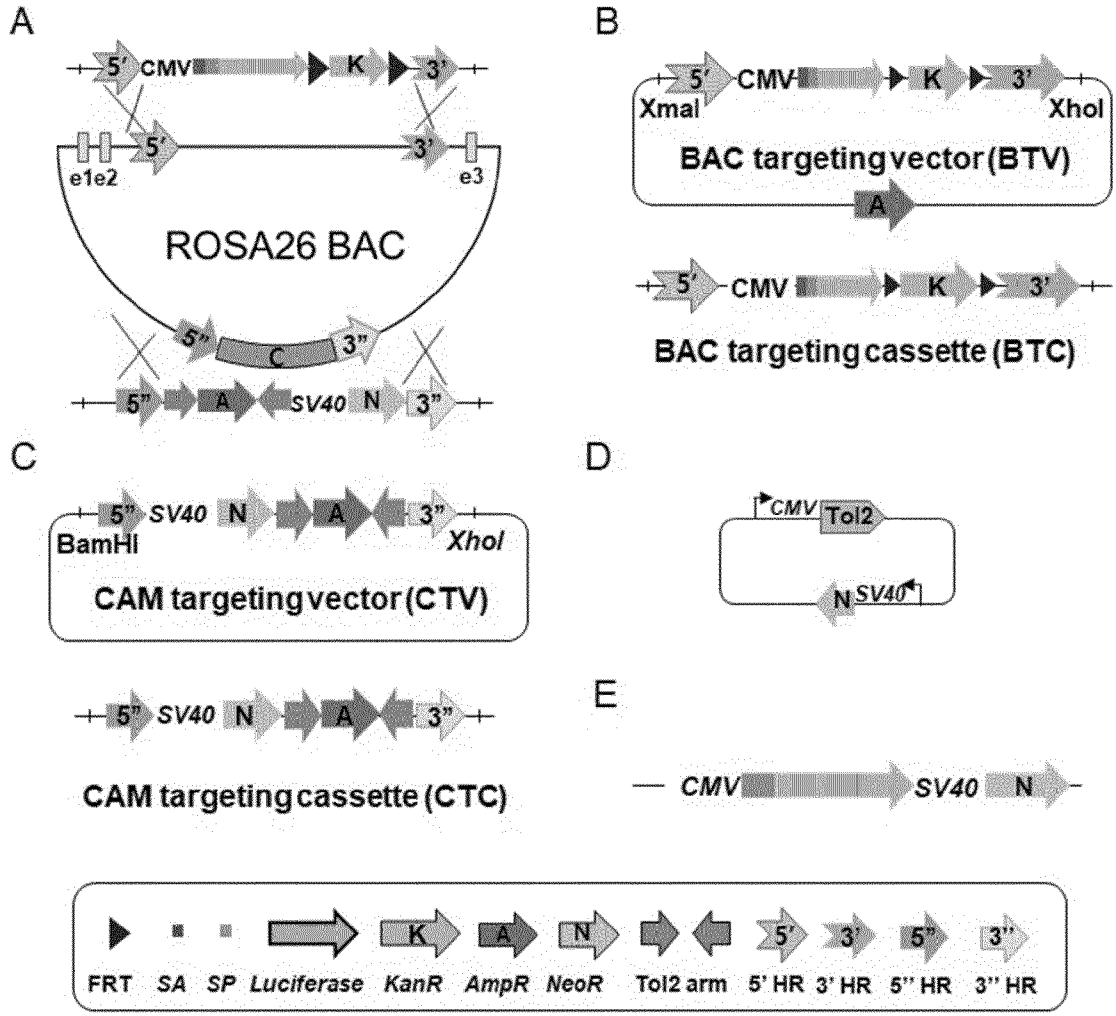
[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 단계는 상기 인공 염색체와 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 공동-형질감염시키는 단계인 단백질 생산 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 인공 염색체로 형질감염된 세포에 Tol2 트랜스포사제 mRNA를 처리하는 단계를 더 포함하는 단백질 생산 방법.

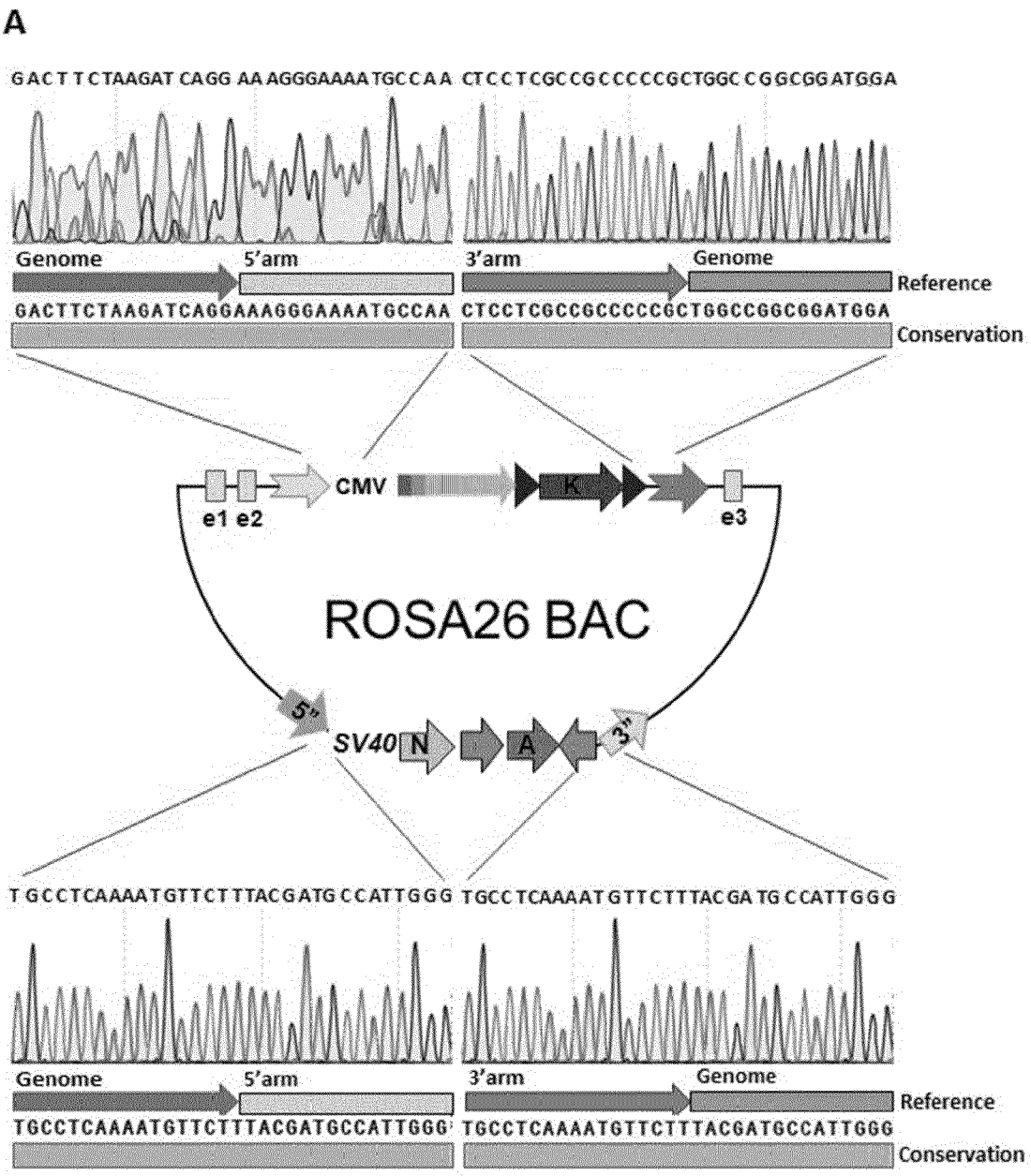
[청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 인공 염색체는 5 ~ 15㎍의 양으로 형질감염되는 단백질 생산 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 Tol2 트랜스포사제 mRNA의 처리 비율(인공염색체:mRNA)은 9:0.1 ~ 9:0.9 또는 9:2 ~ 9.5인 단백질 생산 방법.

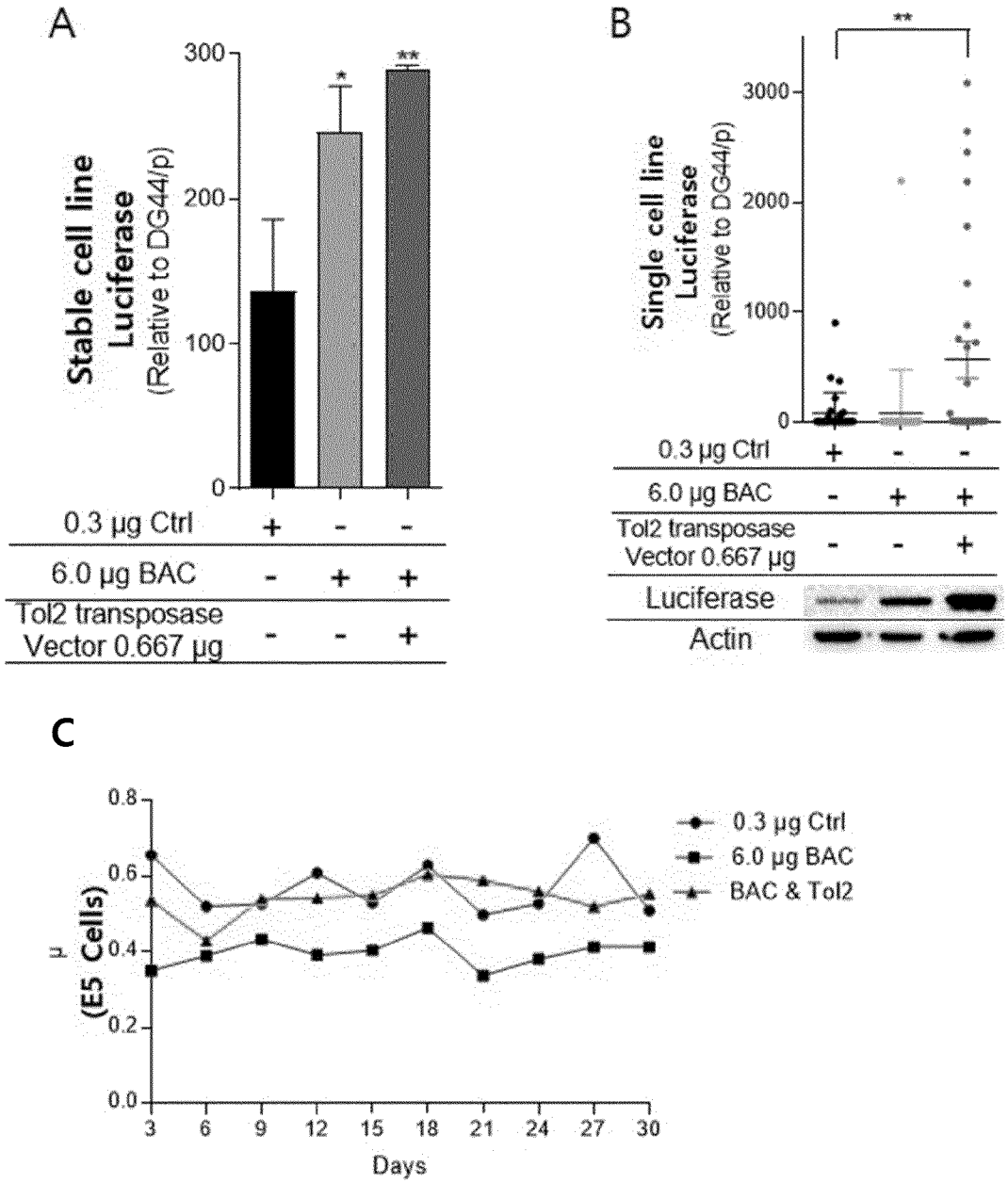
[도1]


A
5′ CMV K 3′
5′
3′
e1e2
e3
ROSA26 BAC
5″ C 3″
5″ A SV40 N 3″
B
5′ CMV K 3′
XmaI
XhoI
BAC targeting vector (BTV)
A
5′ CMV K 3′
BAC targeting cassette (BTC)
C
5″ SV40 N A 3″
BamHI
XhoI
CAM targeting vector (CTV)
5″ SV40 N A 3″
CAM targeting cassette (CTC)
D
CMV Tol2
N SV40
E
CMV SV40 N
FRT SA SP Luciferase KanR AmpR NeoR Tol2 arm 5′ HR 3′ HR 5″ HR 3″ HR

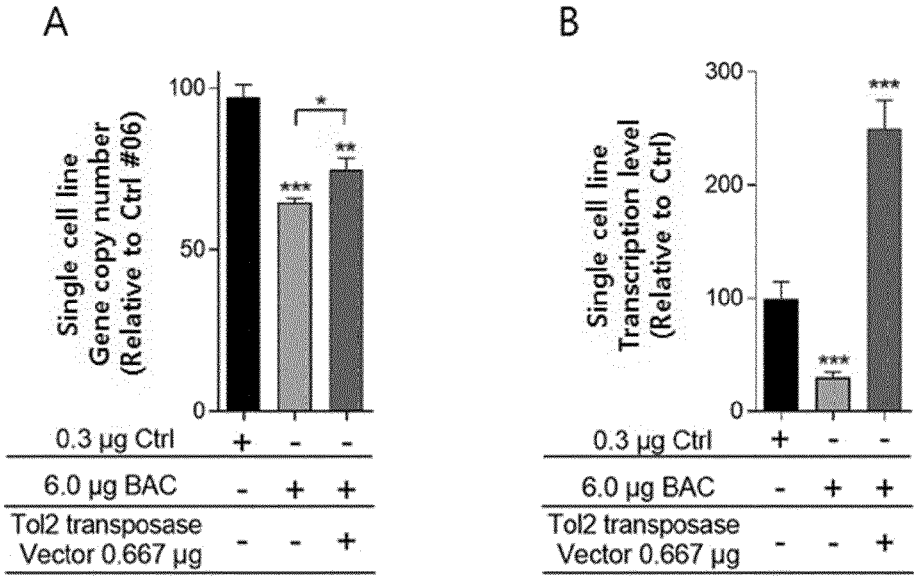
[도2]


A
GACTTCTAAGATCAGGAAAGGGAAAATGCCAA CTCCTCGCCGCCCCCGCTGGCCGGCGGATGGA
Genome
5'arm
3'arm
Genome
Reference
GACTTCTAAGATCAGGAAAGGGAAAATGCCAA CTCCTCGCCGCCCCCGCTGGCCGGCGGATGGA
Conservation
CMV
K
e1 e2
e3
ROSA26 BAC
5'
SV40
N
A
3'
TGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG TGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG
Genome
5'arm
3'arm
Genome
Reference
TGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG TGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG
Conservation

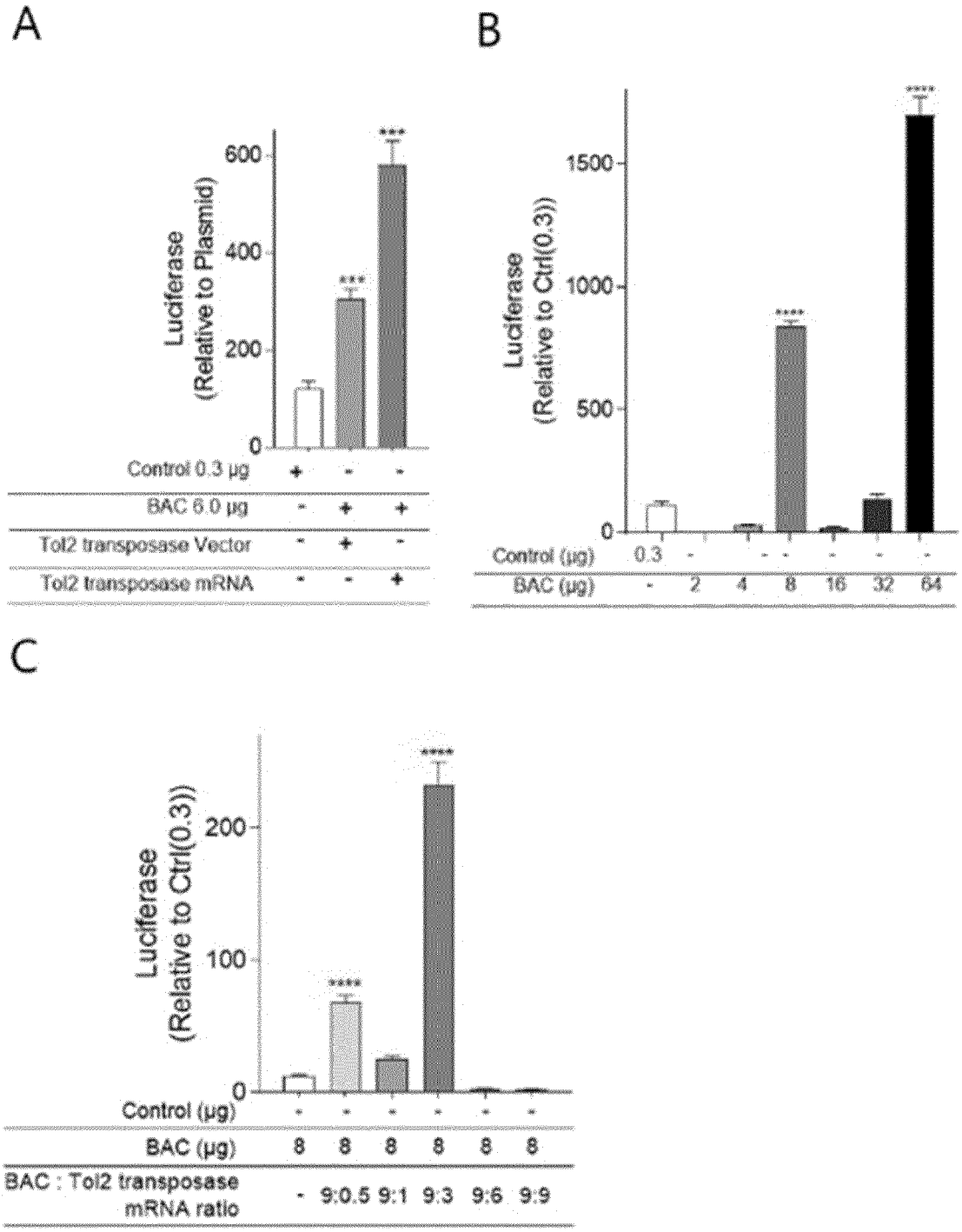
[도3]


A
Stable cell line
Luciferase
(Relative to DG44/p)
300
200
100
0
*
**
0.3 μg Ctrl + - -
6.0 μg BAC - + +
Tol2 transposase Vector 0.667 μg - - +
B
Single cell line
Luciferase
(Relative to DG44/p)
3000
2000
1000
0
**
0.3 μg Ctrl + - -
6.0 μg BAC - + +
Tol2 transposase Vector 0.667 μg - - +
Luciferase
Actin
C
μ (E5 Cells)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Days
0.3 μg Ctrl
6.0 μg BAC
BAC & Tol2

[도4]


A
Single cell line
Gene copy number
(Relative to Ctrl #06)
100
50
0
*
**
***
0.3 μg Ctrl + - -
6.0 μg BAC - + +
Tol2 transposase Vector 0.667 μg - - +
B
Single cell line
Transcription level
(Relative to Ctrl)
300
200
100
0
***
***
0.3 μg Ctrl + - -
6.0 μg BAC - + +
Tol2 transposase Vector 0.667 μg - - +

[도5]


A
Luciferase (Relative to Plasmid)
600
400
200
0
***
***
Control 0.3 μg + - -
BAC 8.0 μg - + +
Tol2 transposase Vector - + -
Tol2 transposase mRNA - - +
B
Luciferase (Relative to Ctrl(0.3))
1500
1000
500
0
****
****
Control (μg) 0.3 - - - - - -
BAC (μg) - 2 4 8 16 32 64
C
Luciferase (Relative to Ctrl(0.3))
200
100
0
****
****
Control (μg) - - - - - -
BAC (μg) 8 8 8 8 8 8
BAC : Tol2 transposase mRNA ratio - 9:0.5 9:1 9:3 9:6 9:9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/002138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85(2006.01); C12N 15/67(2006.01); G01N 33/50(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: TOL2, 트랜스포존 (transposon), 인공염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC), 관심유전자 (GOI), 카세트 (casette), 벡터 (vector)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHAO, L. et al. A piggyBac transposon-and gateway-enhanced system for efficient BAC transgenesis. Developmental Dynamics. 2014, vol. 243, pp. 1086-1094. See abstract; pages 1086-1088; and figure 1.	1-13
Y	BUSSMANN, J. et al. Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish. Development. 201 1, vol. 138, pp. 4327-4332. See abstract; page 4328, left column; page 4330, left column; page 4327, right column; and figure 1.	1-13
Y	KR 10-2012-0128193 A (HANBAT NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 27 November 2012 (2012-11-27) See abstract; claims 1 and 5; figure 1; and SEQ ID NO: 6.	5
A	SUSTER, M. L. et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. Bmc Genomics. 200 9, vol. 10, thesis no. 477, pp. 1-7. See entire document.	1-13

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 May 2021	**31 May 2021**

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0150098 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 28 December 2016 (2016-12-28) See entire document.	1-13
X	KUK, M. U. et al. Protein expression platform using Tol2 transposon in CHO cells. KSBMB International Conference. 2019, abstract no. 17. See entire document.	1-13
X	KUK, M. U. et al. BAC recombineering protocol. KSBMB International Conference. 2019, abstract no. 18. See entire document.	1-13
X	KUK, M. Improvement of BAC recombineering and its application. Ph.D. thesis, Incheon national University Department of Life Science. February 2020. See abstract; and pages 37, 42 and 60.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/002138

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/002138

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2012-0128193 A	27 November 2012	KR 10-1303791 B1	10 September 2013
KR 10-2016-0150098 A	28 December 2016	KR 10-1767456 B1	11 August 2017

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/002138

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/85(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85(2006.01); C12N 15/67(2006.01); G01N 33/50(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TOL2, 트랜스포존 (transposon), 인공염색체 (bacterial artificial chromosome, BAC), 관심유전자 (GOI), 카세트 (casette), 벡터 (vector)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	ZHAO, L. 등, 'A piggyBac transposon-and gateway-enhanced system for efficient BAC transgenesis', Developmental Dynamics, 2014, 243권, 페이지 1086-1094 초록; 페이지 1086-1088; 도면 1	1-13
Y	BUSSMANN, J. 등, 'Rapid BAC selection for tol2-mediated transgenesis in zebrafish', Development, 2011, 138권, 페이지 4327-4332 초록; 페이지 4328, 왼쪽 칼럼; 페이지 4330, 왼쪽 칼럼; 페이지 4327, 오른쪽 칼럼; 도면 1	1-13
Y	KR 10-2012-0128193 A (한밭대학교 산학협력단 등) 2012.11.27 요약; 청구항 1, 5; 도면 1; 서열번호 6	5
A	SUSTER, M. L. 등, 'Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice', Bmc Genomics, 2009, 10권, 논문번호 477, 페이지 1-7 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2016-0150098 A (연세대학교 산학협력단) 2016.12.28 전체 문헌	1-13

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년05월28일(28.05.2021)	**2021년05월31일(31.05.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KUK, M. U. 등,'Protein expression platform using Tol2 transposon in CHO cells', KSBMB International Conference, 2019, 요약번호 17 전체 문헌	1-13
X	KUK, M. U. 등, 'BAC recombineering protocol', KSBMB International Conference, 2019, 요약번호 18 전체 문헌	1-13
X	KUK, M.,'Improvement of BAC recombineering and its application', Incheon national University Department of Life Science, 박사학위 논문, 2020.02 초록; 페이지 37, 42, 60	1-13

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/002138

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/002138

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0128193 A	2012/11/27	KR 10-1303791 B1	2013/09/10
KR 10-2016-0150098 A	2016/12/28	KR 10-1767456 B1	2017/08/11