



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월25일
(11) 등록번호 10-1311435
(24) 등록일자 2013년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/64 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7011967
(22) 출원일자(국제) 2006년10월19일
심사청구일자 2011년10월19일
(85) 번역문제출일자 2008년05월19일
(65) 공개번호 10-2008-0080096
(43) 공개일자 2008년09월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/060065
(87) 국제공개번호 WO 2007/076166
국제공개일자 2007년07월05일
(30) 우선권주장
60/728,259 2005년10월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20050040336 A1*
US20050176099 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인트렉손 코퍼레이션
미국, 버지니아 24060, 블랙버그, 슈트 1400,
1750 크레프트 드라이브
(72) 발명자
리드, 토마스
미국, 버지니아 24060, 블랙버그, 에이퍼티. 디,
콤포크라프트 런13600
(74) 대리인
황이남

전체 청구항 수 : 총 11 항

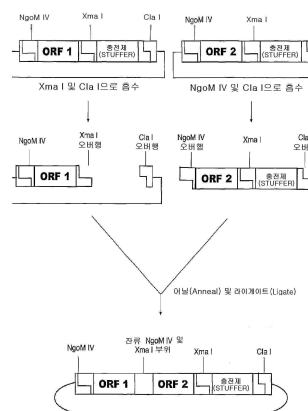
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 모듈 융합 단백질 발현 생성물의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 모듈러 융합 단백질 발현 생성물의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 사용된 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 폴리펩티드 모듈을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 순차적, 방향적 클로닝에 관한 것이다. 각각의 복제가능한 요소 또는 모듈은 소정의 제한효소 인식부위에 의해 측면에 위치하는 관심 개방 관독틀(open reading frame)을 포함한다. 상기 방법은 모듈을 사용하는 방법 및 재조합 DNA 기술을 위한 출발물질로써 이들 모듈을 함유하는 벡터를 포함한다. 상기 발명의 한가지 이점은 각각의 뒤이은 클로닝 단계를 계획하고 측정할 필요없이 융합 단백질의 다수의 변형이 신속하고 쉽게 만들어지는 것이 가능하다는 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

모듈 개방 판독틀을 형성하기 위하여 연속적으로 정렬된 하기의 구성요소 a) 내지 e)를 포함하는 벡터로서,
하기의 구성요소 a) 내지 e)는 모듈 개방 판독틀을 형성하기 위하여 서로 결합된 구조(in-frame linked)이고,
하기 제 1 제한효소 인식부위는 적어도 두 개의 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 단일 사슬 오버행(overhang)을 생산하는 제한효소에 감수성(susceptible)이고,

하기 제 2 제한효소 인식부위는 적어도 두 개의 뉴클레오티드를 포함하는 제 2 단일사슬 오버행을 생산하는 제한 효소에 감수성이며, 하기 제 1 및 제 2 오버행은 서로 상보적이어서, 적합한 조건하에 서로 어닐링(annealing)할 수 있는 것을 특징으로 하는 벡터:

- a) 적어도 2 개의 아미노산을 포함하는 제 1 아미노산 군을 암호화하는 제 1 제한효소 인식부위;
- b) 상기 제 1 제한효소 인식부위에서 적어도 2개의 아미노산 암호서열을 갖는 구조인 관심 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 개방 판독틀;
- c) 적어도 2 개의 아미노산을 포함하고, 상기 제 1 개방 판독틀의 관심 폴리펩티드 암호서열을 갖는 구조인 제 2 아미노산 군을 암호화하고, 상기 제 1 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 제 2 제한효소 인식부위;
- d) 적어도 3개의 스페이스 아미노산을 암호화하고, 암호서열이 상기 제 2 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 구조인 스페이스 폴리뉴클레오티드 서열; 및
- e) 적어도 2 개의 아미노산을 포함하고, 적어도 3개의 스페이스 아미노산의 암호서열을 갖는 구조인 제 3 아미노산 군을 암호화하는 제한효소 인식부위로서, 상기 제 1 제한효소 인식부위 및 상기 제 2 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하지 않은 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 제 3 제한효소 인식부위.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 제 1 제한효소 인식부위는 NgoM IV 제한 효소에 의해 인식되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

제 1항 또는 제 7항에 있어서,

상기 제 2 제한효소 인식부위는 Xma I 제한 효소에 의해 인식되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징

으로 하는 벡터.

청구항 9

제 1항 또는 제 7항에 있어서,

상기 제 3 제한효소 인식부위는 Cla I 제한효소에 의해 인식되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제 1항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 개방 판독틀이 제 1 개방 판독틀과 제 2 제한효소 사이에 삽입되고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 판독틀의 각각은 제 1 개방 판독틀과 제 2 제한효소 군 모두를 갖는 구조이며, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 판독틀의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 제 1 또는 제 2 제한효소 인식부위의 어느 한쪽에서 발생하는 제 1 과 제 2의 제한 군(restriction groups) 사이의 개방 판독틀내 제한효소 인식부위를 가지지 않는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

a) 제 1 및 제 2 단일사슬 오버행을 갖는 선형의 벡터를 만들기 위해 제 2 및 제 3 제한효소 인식부위를 인식하

는 제한 효소로 제 1항 또는 제 7항의 벡터를 흡수하는(digesting) 단계로서, 상기 제 1 및 제 2 단일사슬 오버행은 서로 컴패터블하지 않으며(incompatible);

b) 제 1 삽입물을 제공하는 단계로서, 상기 제 1 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 1 및 제 2 단일사슬 오버행과 컴패터블한(compatible) 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하는 단계;

c) 라이게이션된 발현 벡터(ligated expression vector)를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 1 삽입물을 라이게이션하는 단계로서, 상기 적어도 한 개의 개방 관독들 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 1 단일 사슬 오버행으로 어닐링하고, 상기 적어도 한 개 개방 관독들 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 2 단일사슬 오버행과 어닐링(annealing)하며, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재생성(recreation)하는 단계를 포함하며;

상기 제 1 개방 관독들 및 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은, 서로의 구조가 라이게이션되는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드의 제조방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

a) 제 3 및 제 4 단일사슬 오버행을 가진 선형의 벡터를 만들기 위해 부가적이며 재생성된 제 3 제한효소 인식부위를 인식하는 제한 효소를 가지고 제 21항의 라이게이션된 발현 벡터를 흡수하는 단계로서, 상기 제 3 및 제 4 단일사슬 오버행은 서로 컴패터블하지 않은 단계;

b) 제 2 삽입물을 제공하는 단계로서, 상기 제 2 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 3 및 제 4 단일사슬 오버행과 컴패터블한 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하는 단계;

c) 새로이 라이게이션된 발현 벡터를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 2 삽입물을 라이게이션하는 단계로서, 상기 적어도 한 개의 개방 관독들의 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 3 단일사슬 오버행과 어닐링(annealing), 상기 적어도 한 개의 개방 관독들의 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 4 단일사슬 오버행으로 어닐링하고, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재생성하는 단계를 포함하며,

상기 모든 개방 관독들은 상호구조(in frame with one another)로 라이게이션된 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드의 제조방법.

청구항 24

a) 제 1 및 제 2 단일사슬 오버행을 가진 선형의 벡터를 만들기 위해, 제 2 및 제 3 제한효소 인식부위를 인식하는 제한효소를 가지고 제 9항의 벡터를 흡수하는 단계로서, 상기 제 1 및 제 2 단일 사슬 오버행은 서로 컴패터블하지 않은 단계;

b) 제 1 삽입물을 제공하는 단계로서, 상기 제 1 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 1 및 제 2 단일사슬 오버행과 컴패터블한 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하는 단계;

c) 라이게이션된 발현 벡터를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 1 삽입물을 라이게이션하는 단계로서, 상기 적어도 한 개의 개방 관독들 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 1 단일 사슬 오버행과 어닐링(annealing)하고, 상기 적어도 한 개 개방 관독들의 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 2 단일사슬 오버행과 어닐링(annealing)하며, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재생성하는 단계를 포함하고,

상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들에서, 상기 제 1 개방 관독들은 상호구조로 라이게이션(ligated in

frame with one another)되는 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드의 제조방법.

청구항 25

- a) 제 1 및 제 2 폴리뉴클레오티드 시약을 제공하는 단계로서, 상기 각각의 시약은 관심 개방 관독들을 포함하고, 상기 각각의 개방 관독들은 적어도 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위에 의해 측면에 위치하고, 상기 소정 부위 중 두 개는 컴퓨터블한 오버행을 갖는 단계;
- b) 두 개의 다른 오버행을 가지는 폴리뉴클레오티드를 생성하며, 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave), 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제 1 폴리뉴클레오티드 시약을 흡수하는 단계;
- c) 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제 2 폴리뉴클레오티드 시약을 흡수하는 단계로서, 관심 개방 관독들을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 방출되고, 상기 방출된(released) 폴리뉴클레오티드는 두 개의 다른 오버행을 가지며, 상기 오버행 중 하나는 b) 단계에서 흡수된 폴리뉴클레오티드의 오버행과 컴퓨터블한 단계;
- d) b) 단계에서 생성된 폴리뉴클레오티드와 c) 단계의 관심 개방 관독들을 포함하는 상기 방출된 폴리뉴클레오티드를 함께 혼합, 어닐링 및 라이게이션하는 단계로서, 개방 관독들의 융합을 포함하는 제 3 폴리뉴클레오티드가 생성되고, 관심 개방 관독들간의 접합점은 상기 세 개의 소정의 제한효소 인식부위에서 절단하는 엔도뉴클레아제로 더 이상 흡수할 수 없고, 관심 개방 관독들의 융합을 인접하는 서열은 상기 세 개의 소정의 제한효소 인식부위를 포함하는, 제 1항의 벡터를 제조하는 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

- a) 제 1 및 제 2 폴리뉴클레오티드 시약을 제공하는 단계로서, 상기 각각의 시약은 관심 개방 관독들을 포함하고, 각각의 개방 관독들은 적어도 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위에 의해 측면에 위치하고, 상기 소정 부위 중 두 개는 컴퓨터블한 오버행을 갖는 단계;
- b) 두 개의 컴퓨터블하지 않은 오버행을 가진 폴리뉴클레오티드를 생성하고, 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 제 1 폴리뉴클레오티드 시약을 흡수하는 단계;
- c) 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제 2 폴리뉴클레오티드 시약을 흡수하는 단계로서, 상기 제한 엔도뉴클레아제 중의 하나는 단계 b)의 제한 엔도뉴클레아제와 동일하며, 개방 관독들을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 방출되며, 상기 방출된 폴리뉴클레오티드는 두 개의 컴퓨터블하지 않은 오버행을 갖는 단계;
- d) b) 단계에서 생성된 폴리뉴클레오티드와 c) 단계의 관심 개방 관독들을 포함하는 상기 방출된 폴리뉴클레오티드를 함께 혼합하여, 어닐링 및 라이게이션하는 단계로서, 개방 관독들의 융합을 포함하는 제 3 폴리뉴클레오티드가 생성되고, 관심 개방 관독들의 융합은 상기 소정의 제한효소 인식부위에 의해 측면에 위치하며, 관심 개방 관독들간의 접합점은 상기 세 개의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위가 결여되는 단계를 포함하는, 제 1항의 벡터를 제조하는 방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 분자 생물학 방법 및 상기 방법을 수행하기 위한 생성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 모듈 단백질을 암호화하는 핵산의 클로닝 방법에 관한 것이며, 여기서 모듈은 소정 위치에 순차적으로 추가될 수 있다.

[0002] 이 출원은 출원번호. 60/728,259, 60/803,913, 60/821,682, 60/821,958, 10/682,764 (US2004/0185556, PCT/US2004/013517, W02005/040336), 11/233,246, and US20040572011P (W02005116231)과 관련한 주제를 가진다. 각각의 이들 특허 및 출원은 참조로 여기에 병합된다.

배경기술

[0003] 재조합 DNA 기술 및 핵산을 복제하는 분자 생물학적 방법은 이 분야에 알려져 있다. 이러한 방법들은 제한 엔도 뉴클레아제(endonuclease), 리가제(ligases), 뉴클레오티드/뉴클레오티드 키나제(nucleotide/nucleoside kinases) 및 포스파타아제(phosphatases), 중합효소 및 원하는 재조합 핵산을 생성시키기 위한 기타 분자 생물학적 도구를 사용하여 핵산을 처리하는 것을 포함한다. 몇몇의 실습 책자가 분자생물학 조사자들을 위한 참조 서적으로 기술되었다. 이들 참조 책자의 예는 Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; and Joseph Sambrook and David Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press를 포함한다.

[0004] 이 기술의 문제점은 키메라 내에서 모듈 요소가 소망 위치에 쉽게 삽입될 수 있는 키메라 단백질 발현 생성물을 피하는 방법론이 부족하다는 것이다. 일반적으로, 하이브리드 또는 키메라 단백질은 성공적으로 만들어지는 반

면, 합성의 목표는 모듈을 더 추가하는 소정 기구를 제조함 없이 최종 종점 생성물을 향해 있다. 본 발명의 한 측면은 키메라 및 그 변형의 미래 수요를 숙고하고, 각각의 하나를 대상으로 한 스크래치로부터 개시하는 것 없이 그들을 제조하는 것이 가능하게 함으로 이러한 문제점에 초점을 맞추고 있다. 본 발명의 한 실시형태는 일반적으로 융합 단백질 발현 생성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 실시형태는 조립식(pre-engineered) 모듈을 가진 융합 단백질 발현 생성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다른 측면은 블록 분자 또는 모듈을 형성하는 것에 관한 것이며, 여기서 모듈은 키메라 단백질 발현 카세트내에 삽입가능하도록 사전 설계된 것이다. 상기 즉각적인 발명은, 상기 개시된 방법에 사용될 수 있는 조작 모듈의 라이브러리를 계획하고 있다. 한 실시형태에 있어서, 모듈은 소정의 제한효소 인식부위(restriction site)로 만들어진다.

[0005] 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열의 상세한 설명

[0006] SEQ ID NO:1은 핵산 모듈의 예이다. 상기 모듈은, 5 '-소정의 제한효소 인식부위 - 관심 폴리펩티드 개방 판독틀(ORF) - 소정의 제한효소 인식부위 - 충전제 - 소정의 제한효소 인식부위-3 '의 5' - 3' 구조를 가지고 있다. 상기 소정의 제한효소 인식부위 및 충전제는 또한 포유류의 아미노산을 암호화하고, 관심 폴리펩티드의 구조를 이루며, 그 결과로, 전체 모듈은 혼합 개방 판독틀이 된다. SEQ ID NO:1은 도 11에 나타내어진다.

[0007] SEQ ID NO:2는 SEQ ID NO:1에 의해 암호화된 폴리펩티드이다.

발명의 상세한 설명

[0008] 본 발명의 간단한 설명

[0009] 본 발명은 모듈러 키메라 단백질 발현 생성물의 제조 방법 및 상기 방법에 이용된 조성물에 관한 것이다. 특히, 상기 발명은, 폴리펩티드 모듈을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 순차적, 방향적 클로닝에 관한 것이다. 각각의 복제가능한 요소 또는 모듈은 소정의 제한효소 인식부위에 의해 측면에 위치하는 관심 개방 판독틀(open reading frame)을 포함한다. 상기 방법은 모듈을 사용하는 방법 및 재조합 DNA 기술을 위한 출발물질로써 이들 모듈을 함유하는 벡터를 포함한다. 상기 발명의 한가지 이점은 각각의 뒤이은 클로닝 단계를 계획하고 측정할 필요없이 융합 단백질의 다수의 변형이 신속하고 쉽게 만들어지는 것이 가능하다는 것이다.

[0010] 본 발명의 한 실시형태는, 일반적으로 융합 단백질 발현 생성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다른 실시형태는, 조합 모듈을 가진 융합 단백질 발현 생성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다른 측면은 블록 분자 또는 모듈을 형성하는 것에 관한 것이며, 여기서 모듈은 키메라 단백질 발현 카세트내에 삽입가능하도록 사전 설계된 것이다. 상기 즉각적인 발명은, 상기 개시된 방법에 사용될 수 있는 모듈의 라이브러리를 계획하고 있다. 한 실시형태에 있어서, 모듈은 소정의 제한효소 인식부위로 만들어진다.

[0011] 각각의 복제가능한 요소 또는 모듈은, 이를 테면, 전장 단백질 또는 폴리펩티드, 또는 기능 도메인, 구조 도메인, 효소 도메인, 억제 도메인, 결합 도메인, 위치 신호, 에피토프, 엑손, 또는 기타 소망되는 하위 구성요소와 같은 관심 개방 판독틀을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0012] 보존된 도메인 데이터베이스, 또는 CDD로 일컬어지며, 미 국립의학도서관을 통해 이용가능한 모듈러 단백질 정보로 유도된 데이터베이스는, 단백질 계통 및 단백질 종을 교차하여 보존된 아미노산 서열 상동성을 기초로 한 도메인을 구별하는 하나의 소스(resource)를 나타낸다.

[0013] 전장 단백질의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 키나제(kinases), 키나제 소단위체(kinase subunits), 포스파타아제(phosphatases), 포스파타아제 소단위체, 펩티드 리간드(peptide ligands), 프로테아제(proteases), 프로테아제 소단위체, 효소 소단위체, DNA 결합 단백질 소단위체, g-단백질 소단위체, 이온 채널 소단위체(ion channel subunits), 세포막 수용체 소단위체(membrane receptor subunits)를 포함한다.

[0014] 기능 도메인의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, DNA 결합 도메인, 전사 활성 도메인, 이합체화 도메인(dimerization domains), 촉매 도메인, 인산화 도메인, 조절 도메인, 사멸도메인, 플렉스트린 상동 도메인(pleckstrin homology domains), 리피드 결합 도메인(lipid binding domains), 호르몬 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 징크 핑거 영역(zinc finger regions), 류신 지퍼(leucine zipper) 영역, g-단백질 결합 도메인, 글리코실화 도메인(glycosylation domains), 아실화 도메인 및 막통과 도메인(transmembrane domains)을 포함한다.

[0015] 구조 도메인의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 알파 나선형 영역, 베타 시트 영역(beta sheet regions), 산성 영역(acidic regions), 염기성 영역, 비친수성 도메인, 사슬 내 이황화물 결합 도메인, 보인자(co-factor)

결합 도메인 및 금속 이온 결합 도메인을 포함한다.

[0016] 효소 도메인의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 효소 활성 부위, 인산화 촉매 도메인, 포스포타아제 촉매 도메인, 아데닐 시클라아제 촉매 도메인, 대사 효소 활성 부위, 프로테아제 활성 부위, 폴리메라아제 활성 부위, 리파제 활성 부위, 당분해 통로 효소 활성 부위, 뉴클레오타이드 합성 효소 활성 부위 및 아미노산 합성 효소 활성 부위를 포함한다.

[0017] 억제 도메인의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 키나제 억제 소단위 결합 영역, 포스포타아제 억제 소단위 결합 영역 및 알로스테릭 리간드 결합 영역을 포함한다.

[0018] 결합 도메인의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 스테로이드 호르몬 결합 도메인, 펩티드 호르몬 결합 도메인, 기질 결합 도메인, ATP 결합 도메인, PDZ 도메인, SH3 도메인, SH2 도메인, PB1 도메인, 약품 결합 도메인, g-단백질 결합 도메인, DNA 결합 도메인, 리피드 결합 도메인, 탄수화물 결합 도메인 및 이합체화 도메인을 포함한다.

[0019] 위치 신호의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 소포체 위치 신호, 핵 위치 신호, 미토콘드리아 위치 신호, 플라즈마 세포막 위치 신호 및 근소포체(sarcoplasmic reticulum) 위치 신호를 포함한다.

[0020] 에피토프의 비제한적 예는, 몇 개의 예를 들자면, 적혈구응집소(hemagglutinin) 에피토프, c-Myc 에피토프, FLAG^R, His6, 산성 영역, 염기성 영역 및 항체 결합을 포함한다.

[0021] 자연적으로, 단백질 도메인은 자주 엑손과 관련이 있다. 자연적인 엑손 셔플링(natural exon shuffling)은, 진핵세포(eukaryotes)내 모듈러 단백질의 존재를 위한 하나의 설명이다. 엑손의 개방 해독들은, 따라서 본 발명에 의한 관심 개방 해독들을 나타낸다. 이 기술분야의 기술자는 일부 엑손이 접목 부위(splice sites)에 대응하는 말단에서 코돈(codons)을 엮절렸음(split)을 인식할 것이다. 이러한 것이 발생하는 경우, 정확한 개방 해독들을 포함하는 상기 엑손의 일부 또는 부분은 관심 개방 관독들(ORF of interest)이다.

[0022] 모듈은, 자연적으로는 발견되지 않는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수도 있다. 여기에 사용된 것으로서, 상기 용어 모듈은, 소정의 제한효소 인식부위에 의해 측면에 위치하는 관심 개방 관독들을 포함하는 개방 관독들을 암호화하는 핵산을 의미한다. 본 발명의 방법 및 생성물은 포유류 조직에 이용되며, 상기 모듈은 포유류 정지코돈(stop codon)이 부족해야 한다.

[0023] 본 발명의 모듈은, 이를 테면 벡터와 같이 더 큰 폴리뉴클레오타이드의 부분일 수 있다. 상기 벡터는, 원형 플라스미드, 발현 벡터, 바이러스 벡터, 또는 인공 염색체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 모듈에서 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위는, 상기 모듈의 내에서 유일하다. 본 발명의 한 실시형태에서, 모듈의 소정 제한효소 인식부위는, 벡터 또는 상기 모듈을 포함하는 기타 핵산내에서 유일하다. 이러한 문맥에서, 소정의 제한효소 인식부위는 벡터내 유일한 클로닝 부위를 제공하며, 모듈러 클로닝의 방향성을 제공한다.

[0024] 발명의 상세한 설명

[0025] 다수의 단백질은 자연적 모듈이다. 예를 들자면, 핵 수용체(nuclear receptor)는 DNA 결합 도메인, 리간드 결합 도메인, 이합체화 도메인 및 활성화 도메인을 가지고 있다. 상기 수용체들간에 기능 도메인을 교환하여 키메라 수용체를 만드는 것은 종종 바람직한 것이며, 그 때문에 도메인 기능성이 연구될 수 있고/또는 새로운 연구 및 치료 도구가 만들어질 수 있다. 순수한 세포 또는 치료 활성을 갖는 융합 단백질을 합성하는 것도 바람직하다. 이를 테면, 단백질 키나제 D 활성을 조절하는 키메라 다중리간드(chimeric polyligands)가 설계되어 왔으며, 다양한 이형 단백질 소스(heterologous protein sources)로부터 합성되어 왔다(미국특허출원번호 60/728,259 참조).

[0026] 본 발명의 한 측면은, 융합 단백질의 조합 모듈성 및 융합 단백질 발현 카세트내 원하는 위치에 병합될 수 있는 개방 관독들의 블록 생성을 준비하는 것에 관한 것이다. 다른 말로 하자면, 본 발명은 LEGO^R 형성 블록 또는 연동 모듈러 바닥(interlocking modular flooring)과 유사한 방식으로, 함께 이용되는 것으로 지칭된 구성요소의 재고(inventory)를 포함한다. 본 발명의 부가적인 측면은, 이들 모듈러 융합 단백질을 쉽고 편리하게 제조하는 방법이다. 이러한 점에서, 본 발명의 한 실시형태는 구성(component) 단백질 도메인의 모듈러 클로닝 방법을 포함한다.

[0027] 클로닝의 편리를 위하여, 접촉 말단에서 컴팩트하며, 순차적으로 삽입 및 복제될 수 있는 모듈러 요소를 만드는 것이 바람직하다. 발명의 한 실시형태는, 자연적 특성의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 및 분열을 활용함으

로써 이를 성취한다. 본 발명의 다른 측면은 한쪽 측이 제한 효소 흡수(digestion)를 위해 한번 사용되고, 다른 측이 제한 효소 흡수를 위해 원하는 만큼 사용되는 개방 판독틀 인접 서열을 갖는 모듈을 포함하는 것이다. 다른 말로 하자면, 상기 모듈에서 소정의 제한효소 인식부위는, 모듈 성분의 순환적, 순차적 클로닝을 달성하도록 사용될 수 있으며, 훼손될 수 있다.

실시예

[0042] 실시예 1: 두 개의 벡터로 개시하는 방법

[0043] 모듈러 융합 단백질은 다음의 방법을 사용하고, 소정의 제한효소 인식부위에 측면에 위치하는 관심 개방 판독틀(ORF)을 각각 포함하는 두 개의 출발 시약으로 만들어진다. 관심 개방 판독틀(ORF)을 측면으로 하는 제한효소 인식부위의 예는, 제한 효소 NgoM IV 및 Cla I; 또는 Xma I 및 Cla I에 의해 인식되는 서열들이다 (도 1 참조). 도 1을 참조하자면, 상기 방법의 한 실시형태는 두 개의 핵산 출발 시약을 사용한다. 하나의 시약은, NgoM IV 부위에 의해 5' 단(end)상에 측면에 위치하고, 그리고 Xma I 부위 및 Cla I 부위에 의해 3' 단상에 측면으로 위치하는 관심 개방 판독틀(ORF 1)을 포함하는 원형의 DNA이다. 다른 말로 하자면, 첫 번째 시약은, 5'로부터 3'으로 다음 특징: --NgoM IV-ORF 1-Xma I-충전제(Stuffer)-Cla I-- 을 가진 DNA를 포함하며, 두 번째 시약은 또한, NgoM IV 부위에 의해 5' 단(end)상에 측면에 위치하고, 그리고 Xma I 부위 및 Cla I 부위에 의해 3' 단상에 측면으로 위치하는 관심 개방 판독틀(ORF 2)을 포함하는 원형의 DNA이다. 상기 충전제는, DNA를 부착하고 결합하는 두 개의 상이한 제한 효소를 위한 충분한 공간을 허용하는 뉴클레오티드를 나타낸다. 상기 용어 "충전제(stuffer)"는, "스페이스(spacer)"와 동의어이며, 상기 두 용어는 여기서 바꾸어 쓸 수 있다. 일반적으로, 상기 충전제 또는 스페이스는 인접 개방 판독틀의 구조이어야 하며, 코돈이 3개의 염기 길이이므로, 3배의 길이를 가져야 한다. 표본적인 충전제는, GGAGGCGGA일 것이며, GlyGlyGly를 암호화한다. 상기 충전제/스페이스는, 다른 아미노산 조성물을 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명에 의한 모듈러 클로닝 방법은, 3' Xma I 오버행(overhang) 및 5' Cla I 오버행을 가진 선형의 DNA를 산출하기 위하여, Xma I 및 Cla I를 가진 제 1원형 DNA 시약을 절단하는 것을 포함한다. 이 DNA 절편은 수용체 DNA이며, 제 2원형 DNA 시약으로부터 삭제된 삽입물을 수용할 것이다. 분리된 용기에서, 공여체(donor)로 일컬어지는 상기 제 2원형 DNA 시약은 3' Cla I 오버행(overhang) 및 5' NgoM IV 오버행을 가진 방출된 선형의 DNA를 산출하기 위하여, NgoM IV 및 Cla I로 절단된다. 상기 제 2 DNA 절편은, 다음으로 그의 선형화된 벡터 백본 DNA(linearized vector backbone DNA)로부터 정제된다. 이들 제한 흡수(restriction digestions)는, 컴패터블한 접착 말단을 가진 제 1 및 2 DNA 절편을 생성할 수 있다.

[0045] 이들 제 1 및 2 DNA 절편이, 제 3 원형 DNA 절편을 형성하기 위하여 함께 혼합되어, 어닐링(annealing) 및 라이게이션(ligation)되는 경우, 상기 제 1 DNA에 있던 Xma I 및 제 2 DNA에 있던 NgoM IV는 상기 제 3 원형 DNA에서 사멸된다. 현재 이러한 DNA의 잔류 영역은 Xma I 또는 NgoM IV의 추가 흡수에서 방지되지만, 제 3 순환 DNA의 결실을 맺는 융합 개방 판독틀을 인접하는(flanking) 서열은 여전히 그대로의 5' NgoM IV 및 3' Xma I 그리고 순차적, 순환적 클로닝 단계에 유용한 Cla I를 포함한다. 이 과정은, 방향적, 연속적, 모듈러 클로닝 현상을 성취하도록 다수에 걸쳐 반복될 수 있다. 도 1에 묘사된 실시예에 있어서, 모듈 추가의 방향은 융합 단백질의 N-말단에서 C-말단으로 진행되며; 한편 도 2에 묘사된 실시예에 있어서, 모듈 추가의 방향은 융합 단백질의 C-말단에서 N-말단으로 진행된다. NgoM IV, Xma I, 및 Cla I 엔도뉴클레아제에 의해 인식된 제한효소 인식부위는, 모듈에서 사용될 시에 순환적, 연속적 클로닝을 허용하는 3개의 부위를 나타낸다.

[0046] 이 기술분야의 기술자는, 상기 순서가 시약 전부를 걸쳐 일관되는 한, NgoM IV 부위 및 Xma I 부위가 서로 교환될 수 있다는 것을 인지한다(실시예를 위한 도 4를 참조). 이 기술분야의 기술자는, 또한 다른 제한효소 인식부위군이 여기 기술된 연속적, 방향적 클로닝을 달성할 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 제한 엔도뉴클레아제를 선택하기 위한 바람직한 기준(criteria)은, 1) 컴패터블 접착 말단(compatible cohesive ends)을 생성하지만, 서로 라이게이션(ligation)하는 것에 의해 부위들이 사멸되는 한 쌍의 엔도뉴클레아제를 선택하는 것, 2)처음 두 개중 어느 하나와 컴패터블한(compatible) 접착성 말단을 생성하지 않는 제 3 제한 뉴클레아제를 선택하는 것이다. 이러한 기준이, 연속적, 방향적 클로닝을 위한 체계로써 사용되는 경우, 단백질 하위도메인, 모듈, 및 기타 암호화 영역 또는 발현 성분은 원하는 바대로 조합적으로 집합될 수 있다.

[0047] 상기 선택 기준 번호 1과 관련하여, 다른 제한 엔도뉴클레아제가 이 방법을 달성하도록 사용될 수 있다. 이를테면, NgoM IV, Xma I, TspI, BspE I 및 Age I은 모두는, 그들이 그들 저마다의 인식 부위를 포함하는 DNA를 삭제하는 경우, 상보성 오버행(complementary overhangs)을 만든다. 그러므로, 일반적으로, 어닐링되어(annealed) 라이게이션되는(ligated) 시에 인식 부위가 사멸되는 이들 효소 중 두 개는, 여기 기술된 이 실시예

및 기타 다른 실시예에 사용된 NgoM IV 및 Xma I과 동일한 방식의 쌍으로써 사용될 수 있다.

[0048] 제한 엔도뉴클레아제 선택에 대한 추가 기준은, 융합 단백질이 발현될 종(species)에 대해서 암호 선호도(codon usage)/성향을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, NgoM IV 및 Xma I은, 이들 모두가 포유류 세포에 의해 인식되는 암호를 사용할 수 있으므로 바람직한 한 쌍이다. 추가 선택 기준은 또한 상기 암호(codons)에 의해 암호화된 아미노산의 특성을 포함할 수 있다. 이를 테면, 이의 암호가 하전된(charged) 아미노산을 암호화하는 제한 엔도뉴클레아제 인식부위를 피하는 것이 바람직할 것이다. 도 1에 나타내어진 실시형태에서, NgoM IV 및 Xma I은, 상대적으로 바이오뉴트럴(bioneutral)이며: NgoM IV은 포유류의 AlaGly를 암호화하고, Xma I는 포유류의 ProGly를 암호화한다(도 11 또한 참조). 이 기술의 기술자는, 상기 방법이 다른 종(species)들에 사용된 암호를 이용함으로써 기타 다른 종에도 적용할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0049] 실시예 2: 하나의 벡터로 개시하는 방법

[0050] 암호화 영역 모듈을 방향적으로 및 연속적으로 집합하는 다른 방법은 원형 DNA외에 선형 DNA를 사용하는 것이다. 이를 테면, 상기 기술된 연속적 클로닝 과정처럼, 암호화 영역을 측면으로 하는 제한효소 인식부위는 제한 효소 NgoM IV 및 Cla I; 또는 Xma I 및 Cla I에 의해 인식되는 서열이다. 도 3을 참조하면, 제 1 원형 DNA 시약은 3' Xma I 오버행 및 5' Cla I 오버행을 가진 선형 DNA를 산출하기 위하여 Xma I 및 Cla I로 절단된다. 상기 제 1 DNA 시약이 수용체이다. 제 2 시약은, 보충 올리고뉴클레오티드(complimentary oligonucleotides)를 합성하여 어닐링(annealing)하거나 또는 오버행(overhang)을 생성시키도록 적합한 제한 효소를 흡수함으로써 뒤따르는 PCR 증폭에 의해 생성되는, 선형의 이중나선(double-stranded) DNA 절편이다. 상기 제 2 선형 DNA는 상기 제 1 선형 DNA 수용체의 접촉 말단에 컴패터블 3' Cla I 오버행 및 5' NgoM IV 오버행을 갖는다.

[0051] 제 3 원형 DNA를 형성하기 위하여, 이들 제 1 및 제 2 DNA 절편이 함께 혼합, 어닐링 및 라이게이션되는 경우, 상기 제 1 DNA에 있던 Xma I 및 제 2 DNA에 있던 NgoM IV는 상기 제 3 원형 DNA에서 사멸된다. 그러나, 제 3 원형 DNA속에서 결실을 맺는 관심 융합 단백질(ORF 5 - ORF 6)을 인접하는(flanking) 서열은 여전히 그대로의 5' NgoM IV 및 3' Xma I 그리고 연속적인 클로닝 단계에 이어서 사용할 수 있는 Cla I를 포함한다. 이 과정은, 방향적, 연속적, 모듈러 클로닝 현상을 달성하도록 다수에 걸쳐 반복될 수 있다(도 5 참조). NgoM IV, Xma I 및 Cla I 엔도뉴클레아제에 의해 인식된 제한효소 인식부위는, 인접 서열로서 사용되는 시에 원형 모듈을 허용하는 3개의 부위를 나타낸다.

[0052] 실시예 3: 두 개의 선형 이중나선(double-stranded) DNA로 개시하는 방법

[0053] 본 발명의 방법은, 또한 출발 시약으로서 두 개의 선형 DNA를 가지고 실행될 수 있다. 이 실시예에서, NgoM IV과 Xma I 부위는 여기 다른 실시예와 비교하여 교환되었다. 도 4를 참조하면, 상기 두 개의 시약은 1)3' NgoM IV 오버행 및 5' Cla I 오버행을 가진 벡터 백본(back bone)이며, 여기서 관심 개방 판독틀인 ORF Z는 NgoM IV 부위의 상부에 위치하고, Xma I 부위는 ORF Z의 상부에 위치하여 틀을 이룬다; 2)5' Xma I 오버행 및 3' Cla I 오버행을 포함하는 이중나선 DNA 개방 판독틀이며, 여기서, 상기 Xma I 오버행은 관심 개방 판독틀 ORF X의 바로 위에서 틀을 이루고, 상기 ORF X는, ORF X로 역시 틀을 이루는 NgoM IV에 의해 하부를 따른다. 상기 두 개의 출발 시약은 다양한 방법으로 제공되거나 합성될 수 있다. 이를 테면, 몇 개의 예를 들자면, 제한 엔도뉴클레아제 흡수, 화학 합성, PCR 증폭이다. 상기 시약에 존재하는 오버행은 제한 엔도뉴클레아제 흡수의 생성물일 수 있거나 또는 이 기술에 알려진 어댑터(adaptor) 또는 결합체(linker)로서 상기 말단에 추가될 수 있다. 상기 두 개의 출발 시약을 어닐링하고 라이게이션한 결과는, 손상되지 않은 Xma I 부위의 상부에 인접하고, 손상되지 않은 NgoM IV 및 Cla I 부위의 하부에 인접하는 키메라 폴리펩티드(ORF Z - ORF X)이며, 하나 이상의 모듈을 추가하는 것이 바람직할 경우, 상기 방법은 반복될 수 있다. 상기 라이게이션된 NgoM IV/Xma I 영역 (간류 NgoM IV, Xma I 영역으로 나타내어지는)은 더 이상 NgoM IV 또는 Xma I으로 절단될 수 없으며, 그러므로써 보호된다.

[0054] 실시예 4: 모듈 라이브러리

[0055] 상기 실시예에 거론된 출발 시약은 시약 라이브러리 또는 시약 컬렉션(collection)의 요소일 수 있다. 상기 컬렉션의 요소는 다수의 특징을 공유할 수 있다. 상기 공유되는 최소의 특징은, 관심 개방 판독틀을 인접하는 동일한 소정의 제한효소 인식부위(이를 테면, NgoM IV, Xma I, Cla I)를 포함하는 것이다. 또한, 상기 관심 개방 판독틀은, 이들 동일한 제한효소 인식부위를 내부적으로 비우도록 조작된다. 더하여, 적어도 제 1 출발 시약(수용체 DNA)는 원형 DNA이며, 전체 원형 DNA에서, 즉 관심 인접 부위의 개방 판독틀에서 오직 한번 이들의 동일한 제한효소 인식부위를 포함하도록 조작된다. 다른 말로 하자면, 상기 수용체 DNA 벡터는 이들 소정의 제한효소

인식부위가 다른 곳에서도 결여되도록 조작한다.

- [0056] 본 발명의 한 실시형태에서, 공여체 및 수용체 시약 모두는 원형 DNA이며, 관심 개방 판독틀을 제외하곤 동일하다. 다른 실시형태에서, 상기 공여체 원형 DNA 시약은, 관심 인접 제한효소 인식부위의 ORF가 관심 ORF에서 없는 한, 원형 DNA 분자내에서 유일하지 않다는 점에서 수용체 DNA 시약과 동일하지 않다. 이것은 상기 방출된 삽입물(released insert)이 잔여 벡터로부터 정제될 것이기에 가능하다.
- [0057] 이 기술분야의 기술자는, 상기 순서가 시약 전부를 걸쳐 일관되는 한, NgoM IV 부위 및 Xma I 부위가 서로 교환될 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 이 기술분야의 기술자는, 또한 다른 제한효소 인식부위군이 사용될 수 있다는 것을 인식할 수 있다.
- [0058] 한 실시형태에서, 라이브러리 요소(library members)는, 개방 판독틀의 구조를 가지며, 암호가 포유류에 의해 사용될 수 있는 아미노산을 암호화하는, 소정의 제한효소 인식부위에 의해 둘러싸인 포유류 암호로 구성된 관심 개방 판독틀을 포함하는 모듈을 가진다. 도 11은, 폴리라이신 관심 ORF를 갖는 상기 라이브러리 요소의 실시형태를 도시한다. 도 11에서 확인할 수 있는 한 가지는, NgoM IV 인식 서열(GCCGGC)은 AlaGly를 암호화하고; ORF(AAGAAGAAAAAGAAGAAG)은 LysLysLysLysLysLys를 암호화하고; Xma I 인식 서열(CCCGGG)은 ProGly를 암호화하고; 충전제(GGCGGAGGC)는 GlyGlyGly를 암호화하고; Cla I 인식 서열(ATCGAT)은 IleAsp를 암호화한다. 따라서, 모듈 그 자체가 관심 ORF를 포함하는 개방 판독틀이다. 상기 모듈의 라이브러리는, 각각의 관심 개방 판독틀을 인접하는 제한효소 인식부위들에 대하여 일정하도록 조작되며, 이로 인해 모듈들은 각각의 연속적인 클로닝 단계를 설계하지 않아도 삽입될 수 있다. 상기 라이브러리의 다양한 구성요소는, 모든 구성요소가 융합 단백질을 발현하도록 의도된 종(species)의 암호를 사용해야 하며, 모든 관심 ORF는 소정의 제한효소 인식부위가 결여된다는 전제(provision)와 함께 관심 개방 판독틀 및 모듈의 충전제/스페이서 구성요소를 포함한다.
- [0059] 본 즉각적인 발명의 모듈 라이브러리는 이 기술에 알려진 다른 라이브러리, 이를 테면 cDNA로부터 구별된다. cDNA 라이브러리가 일반적으로 벡터 제한효소 인식부위의 측면에 위치하는 단백질 암호 서열을 포함하지만, 상기 단백질 암호 서열은 반드시 개방 판독틀인 것이 아니며, 상기 단백질 암호 서열에 인접하는 벡터 제한효소 인식부위가 상기 단백질 암호 서열에서 없어지도록 조종되지 않았고, 이들 제한효소 인식부위가 상기 인접 암호 서열로 구조되도록 조종되지도 않았으며, 상기 제한효소 인식부위는 본 발명에 의한 순환적 클로닝 단계를 허용하지도 않는다. 본 발명의 라이브러리는, cDNA 라이브러리가 비-암호 서열 3' 및 5' 비해독부위(untranslated region: UTRs)를 가진다는 점에서, cDNA 라이브러리와 더 구별된다. 도 12는 본 발명에 유용한 모듈의 라이브러리의 실시예를 나타낸다.
- [0060] 실시예 5: 동질 다중결합 융합 단백질 형성(Building a homomultimeric fusion protein)
- [0061] 동질 다중결합 융합 단백질의 예는, 이를 테면, ORF 8(도 5 참조) 이량체 또는 다량체를 포함하는 폴리펩티드이다. 관심 개방 판독틀, ORF 8는 길이 또는 구성(coposition)이 자유로울 수 있다. 이를 테면, ORF 8는, 단백질 키나제 D의 펩티드 억제제일 수 있다. 본 발명에 의한 원형 DNA로부터 동질 다량체를 형성할 시에 두 개의 핵산 출발 시약이 동일하다. 그러나, 두 가지의 분리된 제한 흡수가 실행된다. 동일한 표본 제한효소 인식부위를 이용하는 것은 실시예 1에 배치하며, Xma I 및 Cla I와의 흡수는 한 용기에서 실행되고, NgoM FV 및 Cla I 과의 다른 흡수는 다른 용기에서 실행된다. 방출된 삽입물과 선형 벡터 DNA를 혼합, 어닐링 및 라이게이션하는 것은, 융합 이중체의 ORF 8를 초래한다. 이 단계들은, 원하는 수의 모듈이 달성되기까지 다수에 걸쳐 반복될 수 있다. 또한, 도 5에 도시된 바와 같이, 한 단계는 두 개의 선형 DNA 분자로 개시할 수 있다. 이 기술의 기술자는 상기 방법에 허용할 수 있는 변형을 인식할 수 있을 것이다.
- [0062] 실시예 6: 이종 다중결합 융합 단백질의 형성(Building a heteromultimeric fusion protein)
- [0063] 이종 다중결합 융합 단백질의 예는, 적어도 두 개의 비동일 모듈을 포함하는 폴리펩티드이다. 도 6A 내지 6C는 엑손-유래된 관심 ORFs를 포함하는 모듈로부터 형성되는 몇 개의 이종 다중결합 융합 단백질을 도시한다. 도 7A 내지 7C는, 하나의 모듈이 하나의 위치 신호를 포함하는 융합 폴리펩티드의 예를 나타낸다. 도 8A 내지 8C는, 하나의 모듈이 하나의 에피토프 태그(epitope tag)를 포함하는 키메라 폴리펩티드의 예를 나타낸다. 도 9A 내지 9C는, 다른 기능 도메인을 포함하는 모듈로부터 형성된 키메라 단백질의 예를 나타낸다. 여기에 기술된 기타 방법은 이종 다중결합 융합 단백질을 준비하기 위하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질은 포유류 세포에서 다음으로 발현될 수 있다. 도 10은, 본 발명에 의해 만들어진 키메라 단백질 암호 서열을 포함하는 표본적인 발현 카세트를 나타낸다. 상기 융합 단백질은 조사 도구 또는 치료제로써 유용하다.
- [0064] 실시예 7: 단계 조합 합성

- [0065] 본 발명의 방법은, 여러 개의 이중 다중결합체를 동시에 조합 합성하는데 유용하다. 흡수, 정제, 혼합 및 라이게이션 단계가 상술된 바와 같다면, 반응 용기는 다음과 같이 결합된다. 이 실시예는, 모듈A, 모듈B, 모듈C, 및 모듈D로써 지정된 별개의 모듈 암호 서열을 각각 포함하는 4개의 원형 DNA 출발 시약으로부터 집합된 모든 가능한 이중 다중결합체 융합 단백질의 합성이다. 예를 들면, 상기 결과되는 이중 다중결합체의 수는 이상적으로 4^4 일 것이며, 각 모듈의 동질 다중결합체뿐만 아니라 모듈A-모듈B-모듈C-모듈D; 모듈B-모듈C-모듈D-모듈A; 모듈C-모듈A-모듈D-모듈B 및 기타를 포함할 것이다.
- [0066] 상기 4개의 다른 원형 DNA 수용체 시약은, Xma I과 Cla I으로 절단함에 의해 선형화되며, 별개의 용기에 놓여진다. 다른 4개의 별개 용기에서, 4개 별개의 삽입물 공여체는, NgoM IV 및 ClaI로 절단된다. 상기 공여체 흡수로부터 방출된 삽입물은, 4개의 DNA 암호화 모듈A, 모듈B, 모듈C, 및 모듈D를 획득하기 위하여 NgoM IV 및 ClaI 오버행과 함께 정제된다. 다음 단계는, 상기 삽입물 각각의 분취액(aliquot)를 각각의 수용체와 함께, 동일한 수용체 용기에서 혼합하는 것이다. 각각의 수용체는 따라서, 4개의 별개 분취액을 얻게 된다. 각각의 수용체에 추가되는 각 삽입물의 질량(molarity)은, 바람직한 화학량론을 달성하기에 충분한 양이다. 이를 테면, 한 기술자가 대략 동일한 수의 각 유형의 이중 다중결합체를 만들기를 원했다면, 그는 대략 동일한 수의 상기 4개 공여체 삽입물의 각 물을 부가했어야 한다. 삽입물 크기, 구성 및 기타 요인은 추가되는 물 수에 영향을 미칠 수 있다. 이들 4개 혼합물을 어닐링하고 라이게이션한 후에, 다음의 이중체 융합이 생성된다.
- [0067] 모듈 A를 포함하는 수용체로부터:
- [0068] 모듈A-모듈A
- [0069] 모듈A-모듈B
- [0070] 모듈A-모듈C
- [0071] 모듈A-모듈D
- [0072] 모듈 B를 포함하는 수용체로부터:
- [0073] 모듈B-모듈A
- [0074] 모듈B-모듈B
- [0075] 모듈B-모듈C
- [0076] 모듈B-모듈D
- [0077] 모듈C를 포함하는 수용체로부터:
- [0078] 모듈C-모듈A
- [0079] 모듈C-모듈B
- [0080] 모듈C-모듈C
- [0081] 모듈C-모듈D
- [0082] 모듈D를 포함하는 수용체로부터:
- [0083] 모듈D-모듈A
- [0084] 모듈D-모듈B
- [0085] 모듈D-모듈C
- [0086] 모듈D-모듈D

- [0087] 상기 융합 단백질 DNA의 모듈에 접촉하는 접촉점이, 이 실시예에 사용된 소정의 제한 효소로 흡수될 수 없기 때문에, 더 많은 삽입물이 상기 선형화 및 분취 단계의 반복에 의해 추가될 수 있다. 상기 조합 합성의 방법은 대량의 키메라를 동시에 생성하는데 유용하다. 상기 키메라는 이어서 세포에서 실험될 수 있다.
- [0088] 실시예 8: 역동적 조합 합성
- [0089] 상기 방법 외에, 본 발명의 모듈 라이브러리는, 역시 대량의 키메라를 동시에 생성할 역동적 조합 합성에 사용될 수 있다. 역동적 조합 합성은, 다수의 컴패터블한 오버행이 동일한 반응 혼합물에 존재하고, 어닐링되어 서로 라이게이션하는 경우 발생한다. 상술한 순환적 방법에 대조하여, 융합 단백질이 N-말단 에서 C-말단(또는 역으로)으로 형성된다는 점에서, 상기 역동적 방법은 전방 배향 및 후방 배향으로 연결되는 삽입물을 초래하며, 특별한 순서는 없다. 상기 융합 단백질 구조의 두 개의 말단이 선택된 모듈(상기 사용된 제 1 및 제 2 시약과 유사한)에 의해 고정되는 한편, 상기 융합 단백질의 "중간"부분은 다양하다.
- [0090] 역동적 조합 합성의 가장 단순한 예에서, 본 발명에 의한 시약 라이브러리로부터의 수용체 DNA 시약은, Xma I 및 Cla I으로 흡수된다. 제 2 DNA 시약은, 이어서 NgoM IV 및 ClaI으로 흡수된다. 더하여, 역시 상기 라이브러리로부터의 제 3 DNA 시약은 Xma I 및 NgoM IV으로 흡수된다. 상기 제 2 및 제 3 흡수 DNA는 분리되며, 이로 인해, 관심 ORF를 포함하는 폴리뉴클레오티드는 유지된다. 다음 단계는, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 DNA 시약을 함께 혼합하여, 어닐링 및 라이게이션(ligation)하는 것이다. 상기 제 3 시약은, 그의 NgoM IV 및 Xma I 오버행 때문에, 상기 제 1 및 제 2 시약과 함께 두 개의 다른 방향으로 어닐링할 수 있으므로, 상기 결실을 맺는 융합 단백질은, 두 개의 다른 배향을 가진 "중간물"을 가질 것이다.
- [0091] 역동적 조합 합성의 좀 더 복잡한 예는, 상술한 제 1 및 제 2 시약으로 NgoM IV 및 Xma I으로 절단된 다중 모듈을 함께 혼합하는 것을 포함한다. 이들 오버행을 가진 복합 DNA가 어닐링되어, 라이게이션되는 경우, 양방향의 배향이 각각의 모듈에 의해 발생된다. 예를 들면, NgoM IV 및 Xma I으로 흡수된(predigested) 5개의 모듈이, 대략 화학량론적인 양으로 혼합되어 라이게이션되는 경우, 5개 모듈의 각각은 전체 가능한 순서 및 배향으로 존재해야 한다. 더하여, 상기 융합 단백질의 "중간"부분의 전체 길이는, 하나 이상의 모듈이 융합 단백질내에 없거나, 몇 배로 존재할 수 있기 때문에 마찬가지로 다양할 수 있다.
- [0092] 도 13은, 역동적 조합 합성의 비-제한 도시이다. 이 도는, 단지 상기 방법으로부터 결과될 수 있는 소수의 가능한 융합 단백질 구성체를 나타낸다. 이 기술의 기술자는 무수의 추가적인 융합 단백질 구성체가 결과될 수 있다는 것을 인식한다.
- [0093] 한 실시형태에 있어서, 본 발명은 모듈 개방 판독들을 형성하기 위하여 연속적으로 정렬된 다음의 요소 각각을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 벡터는,
- [0094] 모듈 개방 판독들을 형성하기 위하여 연속적으로 정렬된 다음의 요소,
- [0095] a) 제 1 아미노산 군을 암호화하는 제 1 제한효소 인식부위, 상기 제 1 아미노산 군은 적어도 2 개의 아미노산을 포함하며;
- [0096] b) 관심 폴리펩티드를 암호화하는 제 1 개방 판독들, 상기 관심 폴리펩티드의 암호 서열은 상기 제 1 제한효소 인식부위에서 적어도 2개의 아미노산 암호 서열을 갖는 구조이며;
- [0097] c) 제 2 아미노산 군을 암호화하는 제 2 제한효소 인식부위, 상기 제 2 아미노산 군은 적어도 2 개의 아미노산을 포함하고, 상기 제 2 제한효소 인식부위의 제 2 아미노산 군 암호 서열은 상기 제 1 개방 판독들의 관심 폴리펩티드 암호 서열을 갖는 구조이고, 상기 제 2 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 제 1 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하지 않으며;
- [0098] d) 스페이스 폴리뉴클레오티드 서열, 상기 스페이스 폴리뉴클레오티드 서열은 적어도 3개 스페이스 아미노산을 암호화하고, 상기 스페이스 서열을 위한 암호서열은 상기 제 2 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 구조이며; 및
- [0099] e) 제 3 아미노산 군을 암호화하는 제 3 제한효소 인식부위, 상기 제 3 아미노산 군은 적어도 2 개의 아미노산을 포함하고, 상기 제 3 제한효소 인식부위의 제 3 아미노산 군 암호 서열은 적어도 3개의 스페이스 아미노산 암호 서열을 갖는 구조이고, 상기 제 3 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 제 1 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하지 않고 상기 제 3 제한효소 인식부위는 상기 제 2 제한효소 인식부위의 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하지 않은 것을 각각 포함하며;

- [0100] 상기 요소 (a) 내지 (e)는, 상기 모듈 개방 관독들을 형성하기 위하여 서로 결합된 구조(in-frame linked)이다.
- [0101] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 요소가 5' 에서 3' 방향으로 정렬된 벡터를 포함하며, 상기 요소(a)는 벡터의 5' 말단에 있다. 또 다른 실시형태는, 요소가 3' 에서 5' 방향으로 정렬되고, 상기 요소(a)는 벡터의 3' 말단에 있는 클레임(claim) 벡터를 포함한다.
- [0102] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 상기 모듈 개방 관독들의 5' 부분에 작동가능하게 결합된 프로모터(promoter)를 더 포함하는 벡터를 포함한다. 상기 프로모터는 세균 또는 포유류 프로모터를 포함할 수 있다. 기타 실시형태는, 제 3 제한효소 인식부위에 대하여 3'인 비해독영역을 더 포함하는 벡터를 포함한다.
- [0103] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 상기 제 1 또는 제 2 제한효소 인식부위의 어느 한쪽에서 발생하는 제 1 및 제 2 제한 군 사이의 개방 관독들내 제한효소 인식부위를 가지지 않는 벡터를 포함한다.
- [0104] 다른 실시형태에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드의 제조방법을 포함하며, 상기 방법은,
- [0105] a) 제 1 및 제 2 단일 사슬 오버행을 가진 선형의 벡터를 만들기 위해 제 2 및 제 3 제한효소 인식부위를 인식하는 제한 효소로 상기로부터 벡터를 흡수하는 단계, 상기 제 1 및 제 2 오버행은 서로 컴패터블하지 않으며;
- [0106] b) 제 1 삽입물을 제공하는 단계, 상기 제 1 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 1 및 제 2 오버행과 컴패터블한 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하며;
- [0107] c) 라이게이션된 발현 벡터를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 1 삽입물을 라이게이션하는 단계, 상기 적어도 한 개 개방 관독들 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 1 단일 사슬 오버행으로 어닐링하고, 상기 적어도 한 개 개방 관독들 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 2 단일 사슬 오버행으로 어닐링하고, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재생성(recreate)하는 것을 포함하며,
- [0108] 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들에서, 상기 제 1 개방 관독들은 서로 의 구조로 라이게이션된다.
- [0109] 다른 실시형태에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드의 제조방법을 포함하며, 상기 방법은,
- [0110] a) 제 3 및 제 4 단일 사슬 오버행을 가진 선형의 벡터를 만들기 위해 추가적이며 및 재생성된 제 3 제한효소 인식부위를 인식하는 제한 효소로 상기로부터 라이게이션된 발현 벡터를 흡수하는 단계, 상기 제 3 및 제 4 오버행은 서로 컴패터블하지 않으며;
- [0111] b) 제 2 삽입물을 제공하는 단계, 상기 제 2 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 3 및 제 4 오버행과 컴패터블한 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들의 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하며;
- [0112] c) 새로이 라이게이션된 발현 벡터를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 2 삽입물을 라이게이션하는 단계, 상기 적어도 한 개의 개방 관독들 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 3 단일 사슬 오버행과 어닐링하고, 상기 적어도 한 개의 개방 관독들 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 4 단일 사슬 오버행으로 어닐링하고, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재창조하는 것을 포함하며,
- [0113] 상기 모든 개방 관독들은 상호구조(in frame with one another)이다.
- [0114] 다른 실시형태에서, 본 발명은 융합 폴리펩티드의 제조방법을 포함하며, 상기 방법은,
- [0115] a) 제 1 및 제 2 단일 사슬 오버행을 가진 선형의 벡터를 만들기 위해, 제 2 및 제 3 제한효소 인식부위를 인식하는 제한 효소를 가지고 상기로부터 벡터를 흡수하는 단계, 상기 제 1 및 제 2 오버행은 서로 컴패터블하지 않으며;
- [0116] b) 제 1 삽입물을 제공하는 단계, 상기 제 1 삽입물은 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들은 상기 제 1 및 제 2 오버행과 컴패터블한 5' 및 3' 오버행을 포함하고, 상기 적어도 하나의 추가적인 개방 관독들 각각은 적어도 하나의 추가적인 관심 폴리펩티드를 암호화하며;
- [0117] c) 라이게이션된 발현 벡터를 형성하기 위하여 선형 벡터내에 상기 제 1 삽입물을 라이게이션하는 단계, 상기 적어도 하나의 개방 관독들 5' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 1 단일 사슬 오버행과 어닐링하고, 상기 적어도 하나의 개방 관독들 3' 오버행의 라이게이션은 상기 선형 벡터의 제 2 단일 사슬 오버행과 어닐링하고, 상기 3' 오버행의 라이게이션은 제 3 제한효소 인식부위를 재생성(recreate)하는 것을 포함하며, 상기 적

어도 하나의 추가적인 개방 판독틀에서, 상기 제 1 개방 판독틀은 상호구조로 라이게이션된다(ligated in frame with one another).

[0118] 본 발명의 추가적인 실시형태는, 융합 단백질 DNA 구성체의 제조 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다.

[0119] a) 제 1 및 제 2 폴리뉴클레오타이드 시약을 제공하는 단계, 상기 각각의 시약은 관심 개방 판독틀을 포함하고, 상기 각각의 관심 개방 판독틀은 적어도 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레오타제 인식부위에 의해 측면에 위치하고, 상기 소정 부위 중 두 개는 컴패터블한 오버행을 가지며;

[0120] b) 두 개의 다른 오버행으로 폴리뉴클레오타이드를 생성하고, 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제 1 폴리뉴클레오타이드 시약을 흡수하는 단계;

[0121] c) 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도뉴클레아제로 상기 제 2 폴리뉴클레오타이드 시약을 흡수하는 단계, 관심 개방 판독틀을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 방출되고, 상기 방출된 폴리뉴클레오타이드는 두 개의 다른 오버행을 가지며, 상기 오버행 중 하나는 b)단계에 흡수된 폴리뉴클레오타이드의 오버행과 컴패터블하며;

[0122] d) b) 단계에서 생성된 폴리뉴클레오타이드와 c)단계의 관심 개방 판독틀을 포함하는 상기 방출된 폴리뉴클레오타이드를 함께 혼합하여, 어닐링 및 라이게이션하는 단계, 여기서 개방 판독틀의 융합을 포함하는 제 3 폴리뉴클레오타이드가 생성되고, 관심 개방 판독틀간의 접합점은 상기 세 개의 소정의 제한효소 인식부위에서 절단하는 엔도뉴클레아제로 더 이상 흡수할 수 없고, 관심 개방 판독틀의 융합을 인접하는 서열은 상기 세 개의 소정의 제한효소 인식부위를 포함한다.

[0123] 이 방법에서, 제 1 폴리뉴클레오타이드는 원형 DNA일 수 있다. 또한, 이 방법에서, 제 1 및 제 2 폴리뉴클레오타이드는 원형 DNA이다. 더하여, 상기 소정의 제한효소 인식부위는 NgoM IV, Xma I 및 Cla I를 위한 인식 서열일 수 있다.

[0124] 상기 방법은, a) 내지 d) 단계를 반복함에 의해 순환적으로 반복될 수 있으며, 상기 a) 단계에서 형성된 제 1 폴리뉴클레오타이드는 d)단계에서 생성된 제 3 폴리뉴클레오타이드로서 대체된다.

[0125] 추가 실시형태는, 융합 단백질 DNA 구성체의 제조 방법을 포함하며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다.

[0126] a) 제 1 및 제 2 폴리뉴클레오타이드 시약을 제공하는 단계, 상기 각각의 시약은 관심 개방 판독틀을 포함하고, 상기 각각의 개방 판독틀은 적어도 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레오타제 인식부위에 의해 측면에 위치하고, 상기 소정 부위 중 2개는 컴패터블한 오버행을 가지며;

[0127] b) 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도클레아제로 상기 제 1 폴리뉴클레오타이드 시약을 흡수하고, 두 개의 컴패터블하지 않은 오버행으로 폴리뉴클레오타이드를 생성하는 단계;

[0128] c) 상기 소정의 제한 엔도뉴클레아제 인식부위 중 두 개에서 절개하는(cleave) 두 개의 다른 제한 엔도클레아제로 상기 제 2 폴리뉴클레오타이드 시약을 흡수하는 단계, 상기 제한 엔도클레아제 중 하나는 b) 단계의 제한 엔도뉴클레아제와 동일하고, 관심 개방 판독틀을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 방출되고, 상기 방출된 폴리뉴클레오타이드는 두 개의 컴패터블하지 않은 오버행을 가지며;

[0129] d) b) 단계에서 생성된 폴리뉴클레오타이드와 c)단계의 관심 개방 판독틀을 포함하는 상기 방출된 폴리뉴클레오타이드를 함께 혼합하여, 어닐링 및 라이게이션하는 단계, 여기서 개방 판독틀의 융합을 포함하는 제 3 폴리뉴클레오타이드가 생성되고, 관심 개방 판독틀의 융합은 상기 소정의 제한효소 인식부위에 의해 측면에 위치하고, 관심 개방 판독틀간의 접합점은 상기 세 개의 소정의 제한효소 인식부위가 결여되어 있다.

[0130] 본 발명의 다른 측면은, 분리된 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리이며, 여기서 각각의 폴리뉴클레오타이드는 적어도 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레아제에 의해 측면에 위치하는 개방 판독틀을 포함하며, 상기 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레아제 중 두 개는 서로 컴패터블하지 않고, 상기 세 개의 소정의 제한 엔도뉴클레아제 중 두 개는 서로 컴패터블하며, 각각의 관심 개방 판독틀은 상기 소정의 제한효소 인식부위가 결여되어 있다. 더 구체적으로, 상기 라이브러리는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 각각의 폴리뉴클레오타이드는 하나의 관심 개방 판독틀을 포함하며, 각각의 개방 판독틀은 NgoM IV로 절개할 수 있는 서열에 의해 하나의 말단 상의 측면에 놓여지고, 각

각의 관심 개방 관독들은, Xma I 및 Cla I로 절개할 수 있는 서열에 의해 다른 말단 상의 측면에 놓여지며, 각각의 관심 개방 관독들은 NgoM IV, Xma I 및 Cla I에 의해 절개할 수 있는 서열이 결여되어 있다.

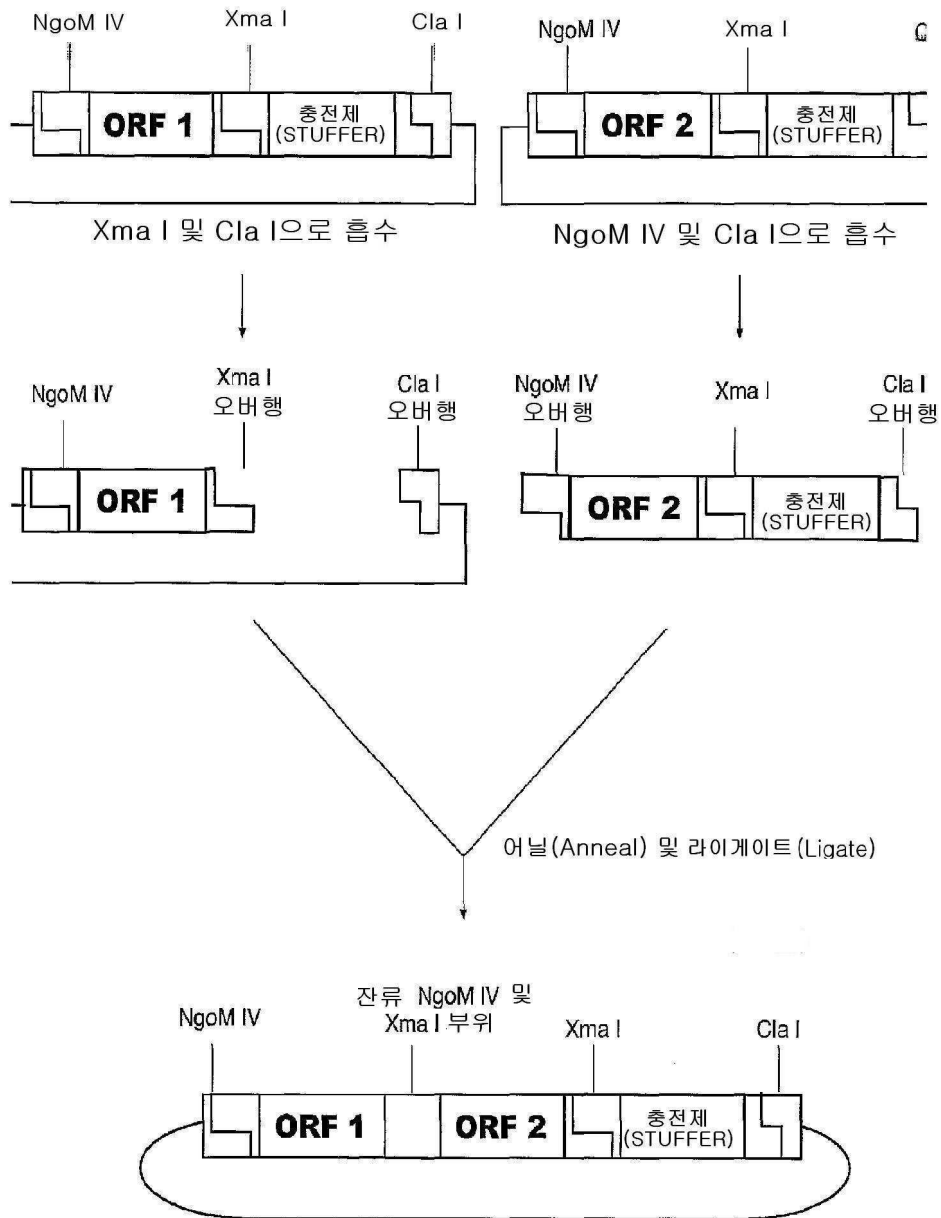
- [0131] 본 발명은 또한, 이들 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 벡터를 포함하는 호스트 세포를 포함한다.
- [0132] FIGURE 14A는, 키메라 단백질 유전자 구성체를 포함하는 벡터를 나타내며, 상기 유전자 구성체는, 형질전환동물(transgenic animals)을 생성하는 데 유용한 단위로서 상기 벡터로부터 분리될 수 있다. 이를 테면, 상기 유전자 구성체, 또는 외래도입유전자(transgene)는, 제한 엔도뉴클레아제 흡수에 의해 상기 벡터 백본으로부터 분리된다. 상기 외래도입유전자는 이어서 퍼틸라이즈드 마우스 에그스(fertilized mouse eggs)의 전핵(pronuclei)내로 주입되거나 또는 상기 외래도입유전자는 배줄기세포를 변형하는데 사용된다. 도 14의 유전자 구성체를 포함하는 벡터는 상기 외래도입유전자의 세포 형질전환(transient transfection)에도 유용하며, 상기 외래도입유전자의 프로모터 및 암호는 호스트 기관에 최적이다.
- [0133] 도 14B 및 14C의 유전자 구성체와 연결된 폴리뉴클레오티드 서열은, 상기 외래도입유전자의 바이러스 게놈 및/또는 호스트 게놈내에 삽입(integration)을 용이하게 하기 위한 게놈 삽입 도메인을 포함한다.
- [0134] 도 14D는 안정적인 세포줄기를 생성시키는데 유용한 키메라 단백질 유전자 구성체를 포함하는 벡터를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

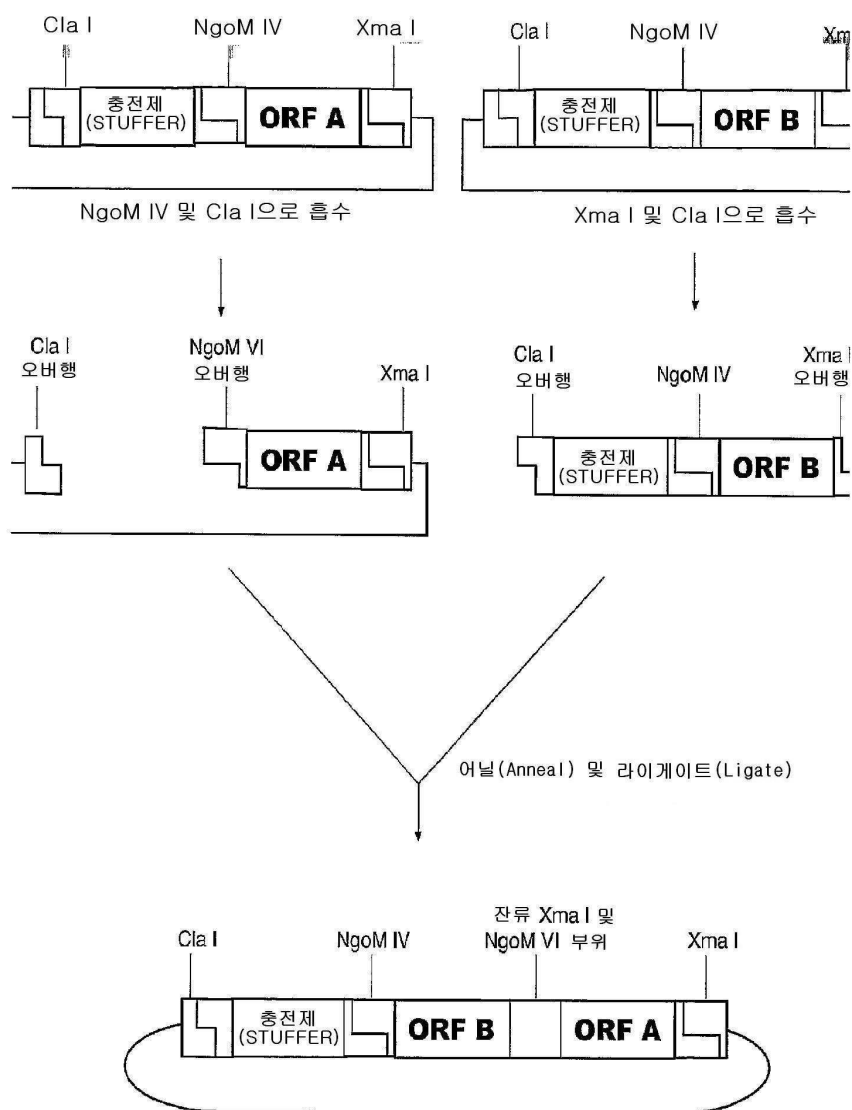
- [0028] 도 1은, 두 개의 원형 DNA 출발 시약을 이용하여, N-말단 내지 C-말단 방향의 융합 단백질을 형성하는 방법을 나타낸다.
- [0029] 도 2는, 두 개의 원형 DNA 출발 시약을 이용하여, C-말단 내지 N-말단 방향의 융합 단백질을 형성하는 방법을 나타낸다.
- [0030] 도 3은, 한 원형 DNA 출발 시약 및 한 선형 DNA 출발 시약을 이용하여, N-말단 내지 C-말단 방향의 융합 단백질을 형성하는 방법을 나타낸다.
- [0031] 도 4는, 두 개의 선형 DNA 출발 시약을 이용하여, N-말단 내지 C-말단 방향의 융합 단백질을 형성하는 방법을 나타낸다.
- [0032] 도 5는, N-말단 내지 C-말단 방향의 융합 단백질을 형성하는 순환 방법을 나타낸다.
- [0033] 도 6A-6C는, 키메라 폴리펩티드의 예를 나타내며, 여기서 모듈은 엑손 부분으로부터 유래된다.
- [0034] 도 7A-7C는, 키메라 폴리펩티드의 예를 나타내며, 여기서 모듈은 위치 신호를 포함한다.
- [0035] 도 8A-8C는, 융합 단백질의 예를 나타내며, 여기서 모듈은 에피토프 태그(epitope tag)를 포함한다.
- [0036] 도 9A-9C는, 융합 단백질의 예를 나타내며, 여기서 모듈은 별개의 기능 도메인을 포함한다.
- [0037] 도 10은 본 발명의 방법에 의해 만들어진 키메라 단백질 암호 서열을 포함하는 발현 카세트의 예를 나타낸다.
- [0038] 도 11은 소정의 제한효소 인식부위 및 충전제의 측면에 위치하는 관심 개방 관독들(ORF)을 포함하는 모듈의 예를 나타낸다.
- [0039] 도 12는, 본 발명에 유용한 모듈의 라이브러리의 예를 나타낸다. 상기 라이브러리 멤버는 사이트 I, 사이트 II 및 사이트 III로써 나타내어진 동일한 소정의 제한효소 인식부위를 가진다. 개방 관독들은 크기는 묘사되지 않으므로, 길이가 다양할 수 있다. 한 실시형태에서, 상기 라이브러리 멤버는 벡터 DNA에 포함된다. 한 실시형태에서, 상기 벡터는 원형 플라스미드이다.
- [0040] 도 13은, 동력 조합 합성에 의한 융합 단백질의 제조 방법을 나타낸다. 이 도에서, 약어는 다음과 같다: N4은 NgoM IV를 나타내며; X1은 Xma I를 나타내며; C1은 Cla I를 나타내며; fwd는 전방을 의미하며; rev 은 역을 의미하며; V는 잔류 NgoM IV 및 Xma I 부위를 나타낸다.
- [0041] 도 14A-14D는, 모듈, 키메라 폴리펩티드 유전자 구성체의 예를 나타낸다.

도면

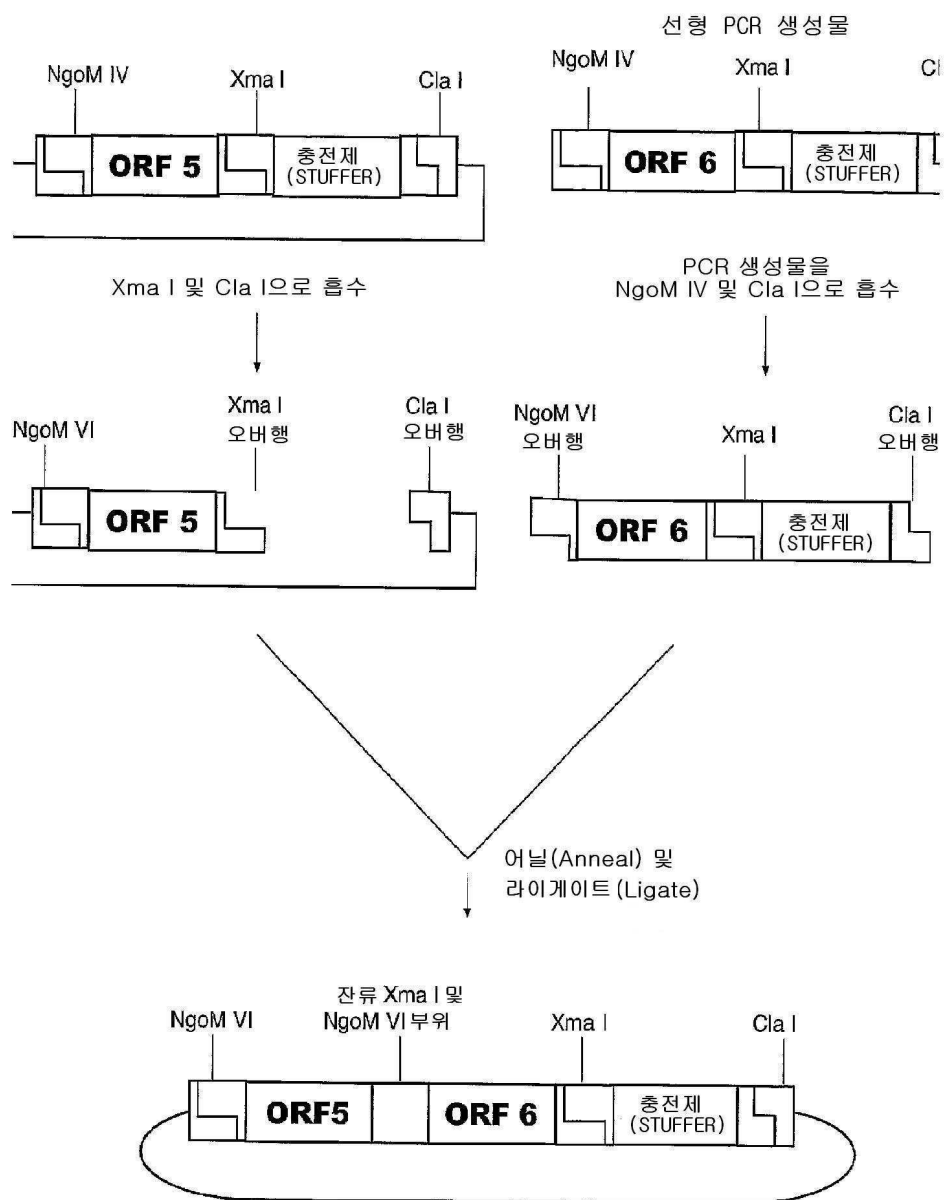
도면1



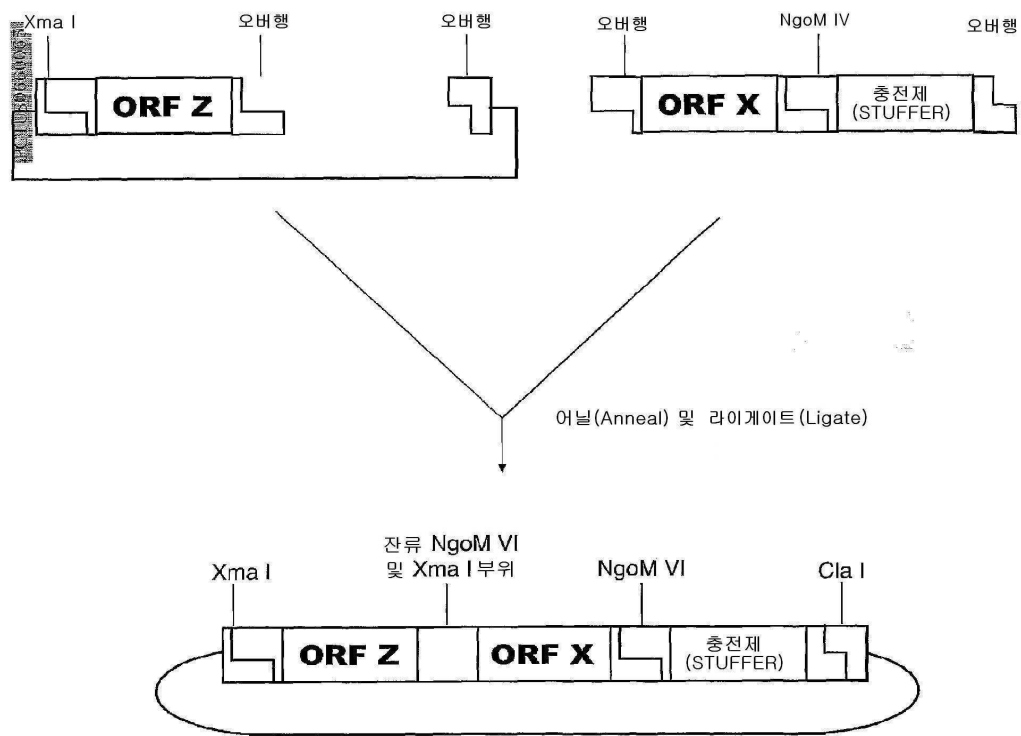
도면2



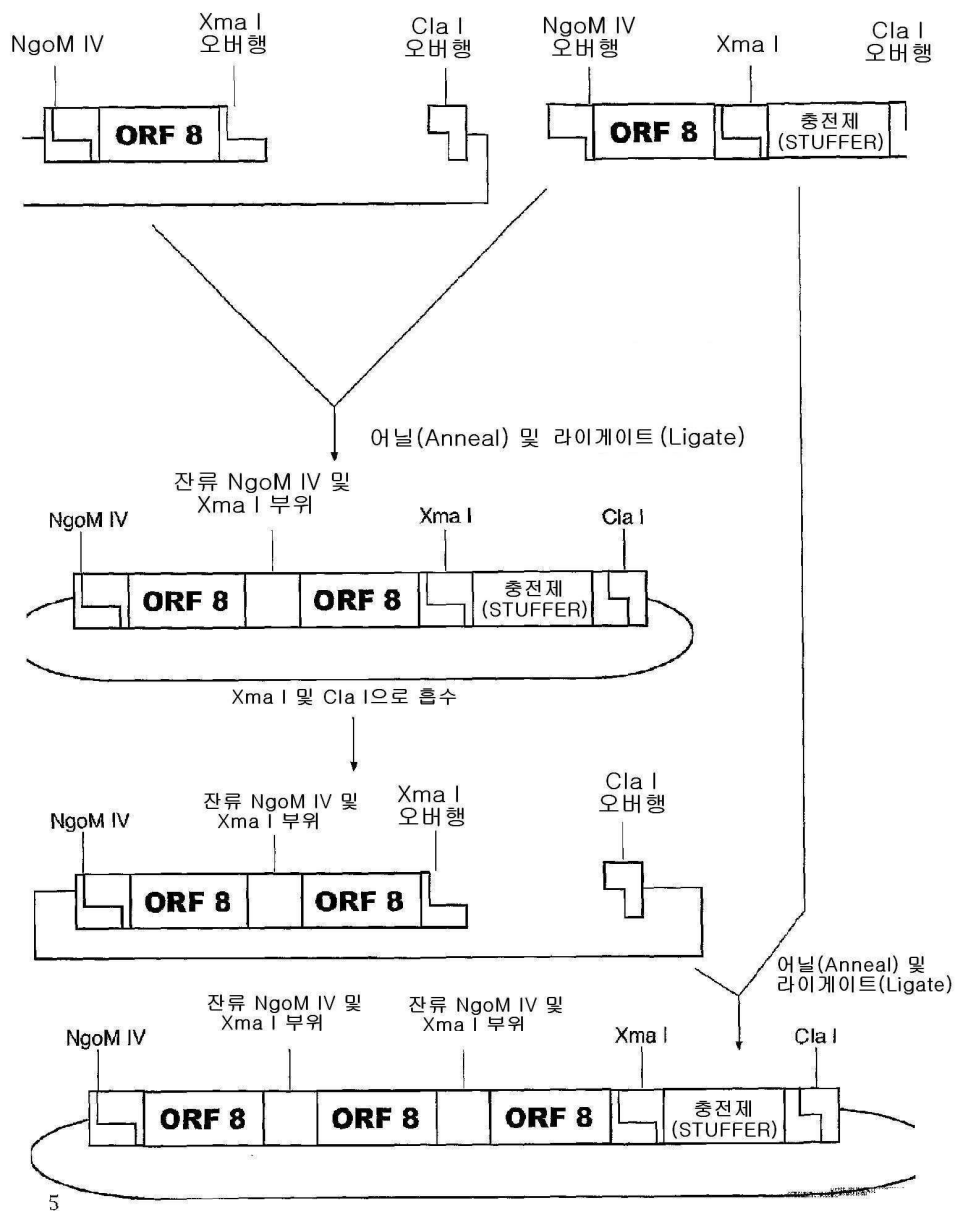
도면3



도면4



도면5



도면6A

부위 I	엑손 R 부분	잔류 부위	엑손 T 부분	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	---------	----------	---------	----------	------------------	-----------

도면6B

부위 I	엑손 D 부분	잔류 부위	엑손 A 부분	잔류 부위	엑손 H 부분	부위 II	충전제 (Stuffer)	부위 III
---------	---------	-------	---------	-------	---------	----------	------------------	-----------

도면6C

부위 I	EXON A 부분	잔류 부위	EXON P 부분	잔류 부위	EXON L 부분	잔류 부위	EXON C 부분	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	--------------	-------	--------------	-------	--------------	-------	--------------	----------	------------------	-----------

도면7A

부분 I	ORF Y	잔류 부위	ORF Z	잔류 부위	위치 신호		부분 II	충전제 (STUFFER)	부분 III
---------	-------	-------	-------	-------	-------	--	----------	------------------	-----------

도면7B

부위 I	위치 신호	잔류 부위	펩티드 3	잔류 부위	펩티드 4	잔류 부위	펩티드 5	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	-------	-------	----------	-------	----------	-------	----------	----------	------------------	-----------

도면7C

부위 I	리간드 X	잔류 부위	리간드 X	잔류 부위	리간드 X	잔류 부위	위치 신호	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	----------	-------	----------	-------	----------	-------	-------	----------	------------------	-----------

도면8A

부위 I	에피토프 (EPITOPE)	잔류 부위	리간드			부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	-------------------	-------	-----	--	--	----------	------------------	-----------

도면8B

부위 I	EXON S 부분	잔류 부위	EXON V 부분	잔류 부위	에피토프 (EPITOPE)	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	--------------	-------	--------------	-------	-------------------	----------	------------------	-----------

도면8C

부위 I	ORF 3	잔류 부위	ORF 9	잔류 부위	EPITOPE	잔류 부위	ORF 7	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	--------------	-------	--------------	-------	----------------	-------	--------------	----------	------------------	-----------

도면9A

부위 I	세포질 도메인	제한 부위	막통과 도메인 (transmembrane domain)	제한 부위	세포외 도메인	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	---------	-------	-----------------------------------	-------	---------	----------	------------------	-----------

도면9B

부위 I	DNA 결합 도메인	잔류 부위	호르몬 결합 도메인	잔류 부위	이합체화 도메인 (DIMERIZATION Domain)	잔류 부위	활성화 도메인	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	---------------	-------	---------------	-------	--------------------------------------	-------	---------	----------	------------------	-----------

도면9C

부위 I	기질 인식 도메인	잔류 부위	촉매 도메인	잔류 부위	억제 도메인	잔류 부위	결합 도메인	부위 II	충전제 (STUFFER)	부위 III
---------	-----------	-------	--------	-------	--------	-------	--------	----------	------------------	-----------

도면10

프로모터	키메릭 단백질 암호 서열	스탑 (STOP)	폴리-A (POLY-A)
------	---------------	--------------	------------------

도면11

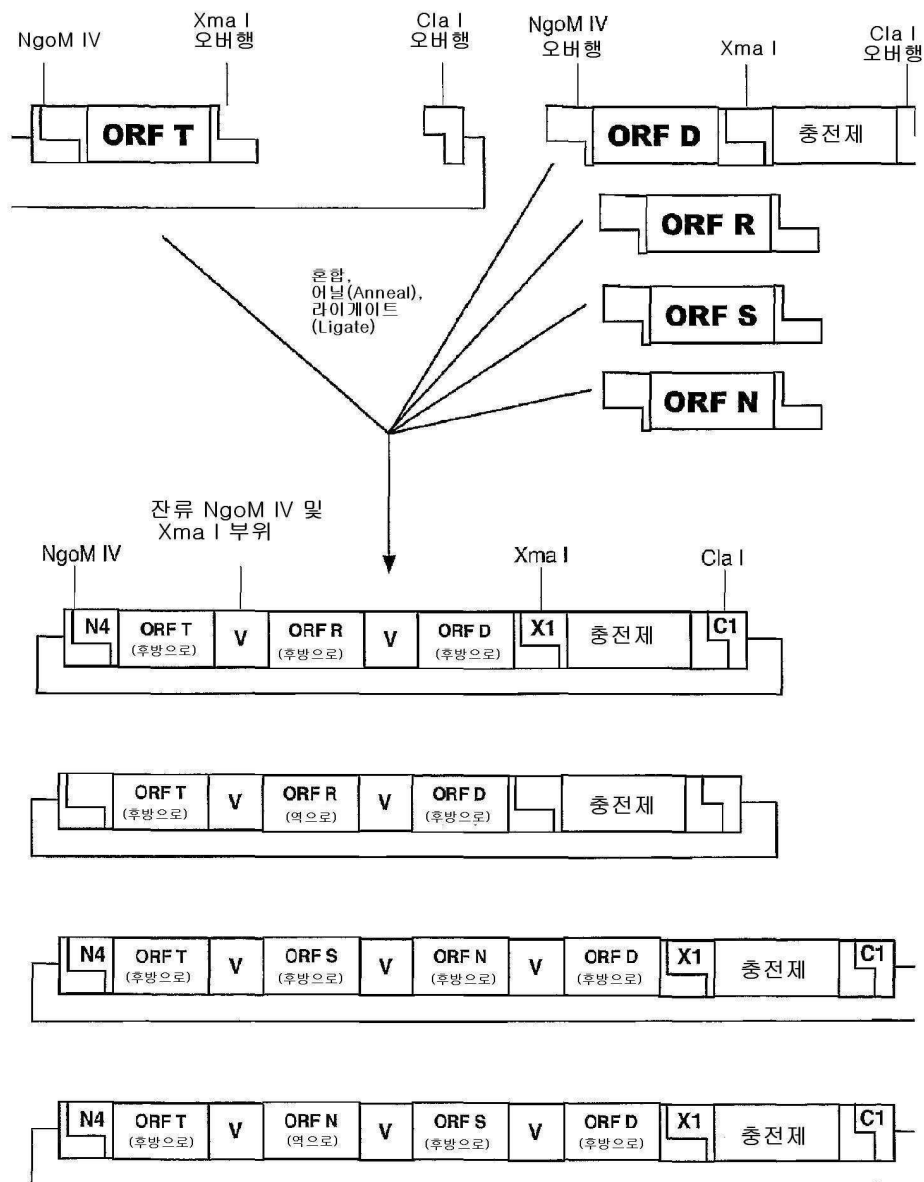
<----- 모듈 개방 판독들 ----->				
NgoM IV	관심 ORF	Xma I	충전제(Stuffer)	Cla I
GCCGGC	AAGAAGAAAAAGAAGAAG	CCCGGG	GGCGGAGGC	ATCGAT
AlaGly	LysLysLysLysLysLys	ProGly	GlyGlyGly	IleAsp

도면12

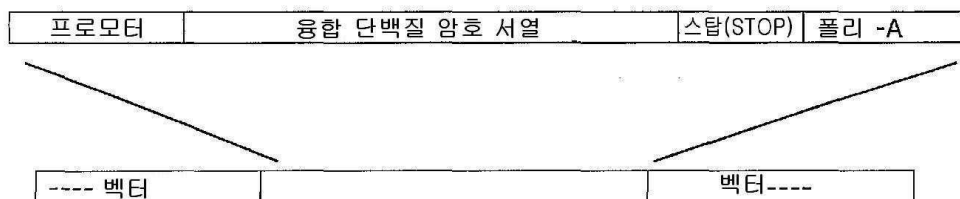
부위 I	인산화 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	징크 핑거 영역	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	펩티드 억제제	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	호르몬 결합 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	에피토프(Epitope)	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	이합체화 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	액체 결합 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	글리코실화 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	펩티드 호르몬	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	이온 기공 영역	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	리포터 펩티드	부위 II	충전제	부위 III

부위 I	촉매 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	DNA 결합 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	류신 지퍼(leucine zipper) 영역	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	막통과 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	활성화 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	억제 도메인	부위 II	충전제	부위 III
부위 충전제	G 단백질 결합 영역	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	고산화 영역	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	리간드	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	단백질 소단위체	부위 II	충전제	부위 III
부위 I	위치 신호	부위 II	충전제	부위 III

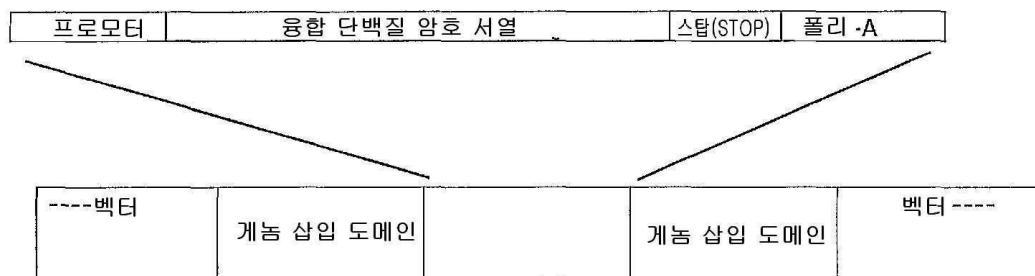
도면13



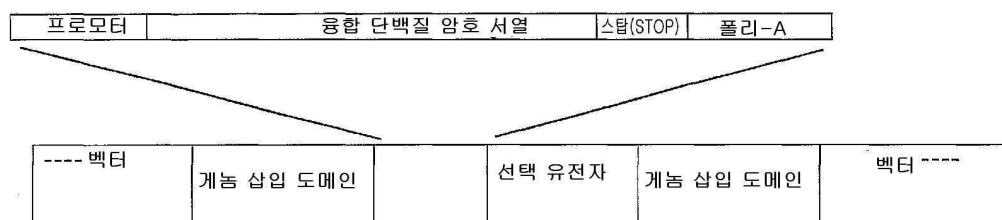
도면14A



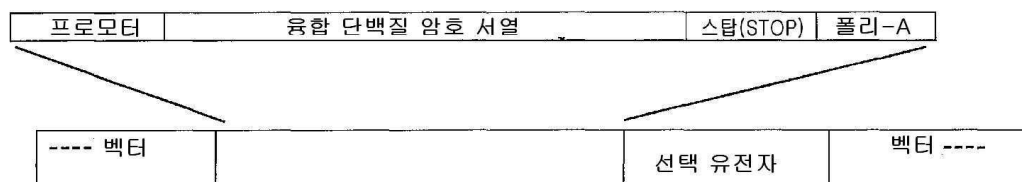
도면14B



도면14C



도면14D



서열 목록

<110> Intrexon Corporation
REED, Thomas D.

<120> METHODS OF MAKING MODULAR FUSION PROTEIN EXPRESSION PRODUCTS

<130> INX

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chimeric

<400> 1

gccggcaaga agaaaaagaa gaagcccgga gccggaggca tcgat

45

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chimeric

<400> 2

Ala Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Pro Gly Gly Gly Gly Ile Asp

1

5

10

15