



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월09일
(11) 등록번호 10-1291960
(24) 등록일자 2013년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/19 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7019503

(22) 출원일자(국제) 2006년01월24일

심사청구일자 2011년01월06일

(85) 번역문제출일자 2007년08월25일

(65) 공개번호 10-2007-0108882

(43) 공개일자 2007년11월13일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2006/000222

(87) 국제공개번호 WO 2006/079790

국제공개일자 2006년08월03일

(30) 우선권주장

0501540.9 2005년01월25일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

EP0965641 A

FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, Vol. 66, no. 1-3,
pp.61-66, 1990.

Nature Biotechnology, Vol. 21, no. 7,
pp.785-789, 2003.

Science, Vol. 289, no. 5483, pp.1352-1355,
2000.

전체 청구항 수 : 총 6 항

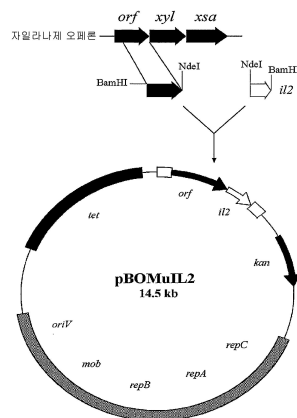
심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 장내세균에 의한 생물학적 활성제의 제어된 생산 및 전달

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질을 발현시키기 위해 변형된 장내 공생 세균을 제공하는데, 상기 세균은 자일라나제 프로모터와 같은 식이에서 자일란의 존재하에서 유도되고, 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 조절할 수 있는 프로모터를 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하여 발현하는 재조합 박테로이데스 오바투스 장내 공생 세균으로서, 상기 세균은 생물학적으로 활성인 이종의 치료용 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 발현을 유도하는 박테로이데스 오바투스 자일라나제 프로모터를 포함하는 자일라나제 오페론을 포함하는 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 자일라나제 오페론은 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 장독소 분비 신호 서열을 더 함유하는 세균.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 사용된 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질은 진핵 또는 원핵 또는 바이러스 소스로부터 유래된 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질은, 인슐린, 성장호르몬, 프로락틴, 칼시토닌, 황체형성호르몬, 부갑상선호르몬, 소마토스타틴, 갑상선자극호르몬, 백신들, 항원들, 혈관활성 장 폴리펩티드, 트레포일인자들(trefoil factors), 세포 및 조직 복구 인자들(cell and tissue repair factors), 형질전환 성장인자 β (transforming growth factor β), 각질세포성장인자(keratinocyte growth factor), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- γ , EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL 또는 IFN α/β 를 포함하는 그룹에서 선택되는 역평행 4 α 헬리컬 번들(antiparallel 4 α helical bundle)을 채용한 구조그룹 1 사이토카인(structural group 1 cytokine), TNF α , TNF β , CD40, CD27 또는 FAS 리간드들, 사이토카인의 IL-1 패밀리, 섬유모세포 성장인자 패밀리, 혈소판 유래 성장인자들, 형질전환 성장인자- β 및 신경성장인자를 포함하는 그룹에서 선택된 구조그룹 2 사이토카인, 사이토카인의 표피성장인자 패밀리, 케모카인들, 또는 인슐린 관련 사이토카인을 포함하는 그룹에서 선택되는 구조그룹 3 사이토카인, 및 EGF, 면역글로불린-유사 및 크링글 도메인들을 포함하는 그룹에서 선택되는 구조그룹 4 사이토카인을 포함하는 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질은 제8항에서 열거된 대로의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들의 수용체 또는 길항제인 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 세균은 다수개의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들을 발현시키기 위해 변형된 것을 특징으로 하는 세균.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 장내 세균군에 의한 생물학적으로 활성인 폴리펩티드(들) 또는 단백질(들)의 생산 및 분비, 그의 전달 방법 및 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드(들) 또는 단백질(들)의 생산 및 분비를 제어하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 특히 새로운 면역치료법 및 특히 염증성 장 질환들(inflammatory gut diseases)의 치료법의 개발에 있어서 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인간 대장에서의 미생물 군집구조는 우세적으로 절대 혐기성균인 세균의 다양한 범위로 구성된다. 이들 세균은 결장에 도착한식이 물질(dietary substrates)(인슐린, 프락토올리고당 및 난소화성 전분을 포함하여)을 분해하기 위해 함께 작용하여, 인간 건강 및 질환에 중요한 일 범위의 생산물들을 생성한다.

- [0003] 점막 면역 반응은 정상 상주 세균군의 조작(manipulation)에 의해 영향을 받을 수 있다. 이 세균군은 점막 면역 시스템의 개발 및 기능에 직접 또는 간접으로 영향을 미칠 수 있는 매우 다양한 생물학적 및 면역조절 속성들을 갖는다. 선진국들에서 상당한 비율의 인구가 장애 크론병 및 궤양성 대장염을 포함하는 예를 들어 염증성 장질환(inflammatory bowel disease (IBD))과 같은 장의 만성장애들에 감염되어 있다. 점막 염증의 동물 모델들이 이들 질환들의 발병에 관련된 면역 메커니즘을 결정하려는 시도를 위해 사용되어 왔다. 만성 대장염은 IBD 모델로서 사용된 인터루킨 (IL) 2^{-/-} 및 IL10^{-/-} 쥐들에서 모두 자발적으로 발생한다. IBD의 많은 다른 쥐들도 또한 기재되어 있고, 대부분이 면역 반응 유전자들의 목표된 결실들(targeted deletions)을 갖는다. IBD의 현재 치료는 종양괴사인자- α (TNF- α)에 대한 재조합 IL 10 및 항체들을 포함하는 항염증 및 면역억제 약물 치료법에 한정되어 있다. 그러나, 이들 치료법은 잘 듣지 않고 독성 및 면역억제와 같은 부작용을 일으킬 수 있다. 따라서 더욱 목표가 확실하고 제어되는 면역치료 형태가 요구되고 있다.
- [0004] 종래기술에 의하면, 인간 장염증 및 IBD 일정 형태들을 치료하기 위해 락토바실러스속(*Lactobacillus spp.*) 및 스트렙토코커스속(*Streptococcus spp.*)과 같은 소화관에서 자연 발생하는 공생동물 또는 세균을 이용하는 것이 알려져 있으나(Shanahan 2001), 이들 결과는 성공한 증거가 한정적이고, 일치하지 않은 효능을 보이고 있다. 또한 종래기술에 의하면, 인터루킨-10 (IL10)을 분비하기 위해 유전자 조작 식품용 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)를 이용하는 것이 알려져 있는데, IBD의 2개의 쥐 모델에 위장 내로 투여된 경우, 보다 전통적인 스테로이드 치료요법만큼 질환을 예방하고 치료하는 데 효과적인 것으로 나타났다(Steidler et al. 2000). 이 락토코커스 시스템은 또한, 생물학적으로 활성인 IL2 및 IL6을 생성하기 위해 사용되고 있다(Steidler et al. 1995; Steidler et al. 1998). 그러나, 이들 종래 기술 시스템과 관련된 주요 단점은, 장상피세포에 결합하기 위한 생물체(organism)의 능력 및/또는 생체내에서 이용할 수 없는 아미노산들 및 펩티드들의 공급에 대한 영양 의존성 때문에 L. 락티스를 장(gut)에 이식시킬 수 없다는 점이다. 따라서 어떠한 생체내 치료 또는 치료요법도 변형된 생물체를 적절한 위치에 반복적으로 투약하는 것을 필요로 한다.
- [0005] 이 특정 호기성 세균의 이용에 있어서 다른 생물안전성 우려 및 단점은 이 세균이 다른 사람들에게 전염될 수 있는 충분한 시간 동안 숙주/환자의 외부에서 생존할 수 있다는 것이다.
- [0006] 종래기술 시스템의 또 다른 단점은 면역학적으로 활성인 인터루킨 분자들의 지속적인 발현을 제어할 수 있는 수단이 없고, 과잉생산되었을 때 이들 활성 분자들 자체가 역효과를 일으킬 수 있다는 점이다. 따라서 종래기술 유전자 조작 프로바이오틱 시스템은 투여(administration)된 후 프로바이오틱 세균의 활성 제어 및 조절이 어렵다. 이것은 인간 치료요법에 대한 심각한 안전성 문제를 나타낸다.
- [0007] 종래기술의 결함을 해결하고 또 생물학적으로 활성인 분자들을 위한 신규한 전달 시스템으로서 공생 세균을 개발하기 위해, 본 발명자들은 본래 위치에서 공생 세균에 의한 면역치료제들의 생산이 식이 인자들에 의해 조절되고 제어될 수 있는 유전자 조작 프로바이오틱 생물체들을 개발하였다.
- [0008] 본 발명의 목적은, 만성 장 장애들을 위한 신규한 면역치료의 기초로서 제어된 방법으로 생물학적으로 활성인 폴리펩티드(들) 및 단백질(들)을 생산 및 분비하기 위한 장내 공생 세균을 조작하는 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0009] 본 발명의 제1측면에 따르면, 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들을 발현하기 위해 변형된 장내 공생 세균이 제공되고, 상기 세균은 식이 인자의 존재에 반응하여 유도되고 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 조절하는 프로모터를 더 포함한다.
- [0010] 본 명세서의 설명 및 청구범위 부분을 통틀어, 단어 "포함한다" 및 "함유한다" 및 이들의 변형어, 예를 들어 "포함하는" 등은 "망라하지만, 한정되지는 않는"을 의미하고, 다른 일부분들, 부가물들, 구성요소들, 완전체들 및 단계들을 배제하려고 의도되지 (그리고 배제하지) 않는다.
- [0011] 본 명세서의 설명 및 청구범위 부분을 통틀어, 맥락이 별다르게 요구하지 않는 한, 단수 개념은 복수 개념을 포함하는 것이다. 특히, 부정 관사가 사용되는 경우, 본 명세서에서는 맥락이 다르게 요구하지 않는 한, 단수는 물론 복수도 해당한다는 것으로 이해되어야 한다.
- [0012] 본 발명의 특정 측면, 구체에 또는 실시예와 관련하여 서술된 특성, 완전체, 특징, 화합물, 화학적 부분체 또는 그룹들은 여기서 서술된 임의의 다른 측면, 구체에 또는 실시예와 양립할 수 없는 것이 아닌 한 적용될 수 있는

것으로 이해되어야 한다.

- [0013] 오페론은 프로모터, 작동자 및 다수의 구조유전자들로 구성된 기능성 단위로서 규정될 수 있다. 예를 들어 자일라나제 오페론이 있다. 구조유전자들은 흔히 몇 개의 기능적으로 관련된 효소들을 암호화하고, 그들이 비록 하나(polycistronic) mRNA로 전사되어도 각각은 개별적 전사시작부위를 갖는다. 전형적인 오페론에서, 작동자 부위는 mRNA의 합성의 개시 또는 종료를 스위칭하는 제어요소로서 작동한다. 자일라나제 오페론(xylanase operon)은 자일란(xylan)이 존재하는 경우 활성화된다.
- [0014] 바람직하게, 상기 프로모터는 항시성(constitutive)이고, 더욱 바람직하게는 자일라나제 프로모터이다. 따라서 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들의 발현이 식이에서의 자일란의 존재에 의해 제어된다고 이해될 것이다. 그러므로 상기 세균은 자일란-유도성 조절 인자를 포함한다고 할 수 있다.
- [0015] 자일란은 수용성이고, 식물 세포 벽에서 발견되는 점착성 다당류(gummy polysaccharide)이며, 가수분해로 자일로오스(xylose)를 생산한다. 그러므로 그것은 통상 식이 인자 또는 구성요소이고, 따라서 식이요법에 있어서 자일란의 포함 또는 배제는 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 제어한다. 따라서 본 발명에 의한 변형된 세균은 어떠한 역효과도 최소화하면서 장에 이식할 수도 있기 때문에, 본 발명은 유리하게 개체에 반복적인 침입적 투약을 회피하면서 용이하게 제어할 수 있는 발현시스템을 제공한다.
- [0016] 바람직하게, 세균은 절대 혐기성균이고, 더욱 바람직하게 상기 세균은 박테로이데스 오바투스(*Bacteroides ovatus*) 또는 프레보텔라(*Prevotella*)이다.
- [0017] 바람직하게, 상기 세균은 인간에게 비병원성이다.
- [0018] "생물학적으로 활성인"은 생물학적 기능을 수행할 수 있는 능력을 말한다. 본 발명에서 사용된 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질은 세균과 동종 또는 이종일 수 있고, 진핵 또는 원핵 또는 바이러스 소스로부터 유래된다.
- [0019] 바람직하게 본 발명에 이용된 폴리펩티드들 및 단백질들의 구체적인 예들은 다음을 포함한다: 인슐린, 성장호르몬, 프로락틴, 칼시토닌(calcitonin), 황체형성호르몬, 부갑상선호르몬, 소마토스타틴, 갑상선자극호르몬, 백신들, 항원들, 혈관활성 장 폴리펩티드, 트레포일인자들(trefoil factors), 세포 및 조직 복구 인자들(cell and tissue repair factors), 형질전환성장인자 β (transforming growth factor β), 각질세포성장인자(keratinocyte growth factor), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN- γ , EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL 또는 IFN α/β 와 같은 역평행 4 α 헬릭스 변들 구조(antiparallel 4 α helical bundle structure)를 채용한 구조그룹 1 사이토카인(structural group 1 cytokine), 예를 들어 TNF α , TNF β , CD40, CD27 또는 FAS 리간드들과 같은 사이토카인의 TNF 패밀리를, 사이토카인의 IL-1 패밀리를, 섬유모세포 성장인자 패밀리를, 혈소판 유래 성장인자들, 형질전환 성장인자 β 및 신경성장인자와 같은, 종종 세포-표면 결합되고, 대칭 동형삼형체(symmetric homotrimers)를 형성하고, 서브유니트들이 일정 바이러스 외피단백질을 위해 설명되는 β -젤리 롤(β -jelly roll)의 형성을 시작하는 구조그룹 2 사이토카인, 예를 들어 사이토카인의 표피성장인자 패밀리를, 시스테인 잔기들(C-C 또는 C-X-C 케모카인 서브그룹들)이 주위에 보존된 아미노산 서열의 존재를 특징으로 하는 케모카인들, 또는 인슐린 관련 사이토카인과 같은 적어도 하나의 세포외부에 EGF 도메인을 각각 포함하는 거대 트랜스멤브레인 전구체 분자들(large transmembrane precursor molecules)로서 생산되는 숏체인 α/β 분자들(short chain α/β molecules)을 포함하는 구조그룹 3 사이토카인, 예를 들어 EGF, 면역글로불린-유사 및 크링글 도메인들(kringle domains)과 같은 다른 도메인들로 구성된 헤레굴린들(heregulins) 또는 뉴레굴린들(neuregulins)과 같은 모자이크 구조들을 나타내는 구조그룹 4 사이토카인.
- [0020] 대안적으로, 생물학적으로 활성인 폴리펩티드는 상기에서 규정한 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들의 수용체 또는 길항제일 수 있다.
- [0021] 상기 세균은 내부에 포함된 핵산으로부터 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질을 발현시킨다. 상기 핵산은, 생물학적으로 활성인 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 및 항원을 인코딩하는 핵산이 세균에서의 발현을 위한 적절한 조절 서열들의 제어하에 있는 하나 이상의 핵산 구조물들을 포함할 수 있다.
- [0022] 세균은 또한 백신으로서 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질을 발현시킬 수 있다.
- [0023] 바람직하게는, 본 발명의 세균은 다수개의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들을 발현시키기 위해 변형될 수 있다.

- [0024] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질을 발현시키기 위해 변형된 장내 공생 세균을 포함하는 제제(pharmaceutical)를 제공하고, 상기 세균은 식이 인자의 존재에 반응하여 유도될 수 있고 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 조절하는 프로모터를 더 포함한다.
- [0025] 바람직하게, 상기 제제는 생리학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 첨가제내의 조성물로서 제공된다.
- [0026] 바람직하게, 상기 제제는 이전에 열거된 하나 이상의 특징들을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 만성 염증성 장질환의 치료 약제를 제조함에 있어서, 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질을 발현시키기 위해 변형된 장내 공생 세균의 용도를 제공하고, 상기 세균은 식이 인자의 존재에 반응하여 유도될 수 있고 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 조절하는 프로모터를 더 포함한다.
- [0028] 바람직하게, 상기 용도는 이전에 열거된 하나 이상의 특징들을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하나의 식이 인자의 존재하에서 활성화되는 프로모터에 의해 제어되는 하나 이상의 생물학적 활성제들 발현을 발현시키는 장내 공생 세균을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들 또는 항원들 또는 효소들 또는 백신들을 전달하는 방법이 제공된다.
- [0030] 바람직하게, 상기 세균은 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질 또는 항원 또는 효소 또는 백신 또는 이들의 조합을 발현시킨다.
- [0031] 바람직하게, 상기 방법은 다양한 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질들 또는 항원들 또는 효소들 또는 백신들 또는 이들의 조합을 발현시키는 세균 혼합물의 투여를 포함한다.
- [0032] 따라서 본 발명의 이 실시예에서 이에 한정되지 않고, IL2를 발현시킬 수 있는 세균, IL12 및/또는 IL9을 발현시킬 수 있는 세균 및 선택적으로 세포 및 조직 복구 인자를 발현시킬 수 있는 세균이 예로서 제공될 수 있다고 이해될 것이다.
- [0033] 바람직하게, 상기 방법은 이전에 설명된 어느 하나 이상의 특징을 포함한다.
- [0034] 박테로이데스 오바투스(*Bacteroides ovatus*)는, 외래 DNA를 생물체로 도입하고 게놈에 통합할 수 있는 클로닝 시스템들을 위한 인간들 및 설치동물 안에 있는 주요 공생 만성 그램-음성 세균이다(Tancula et al. 1992). 이 생물체는 또한 다당류 자일란을 분해할 수 있는 소수 생물체 중 하나이다. 본 발명자들은 자일란 존재하에서 활성화되는 자일라나제 프로모터의 제어하에서 세포내로 무린 IL2 (MuIL2)을 생산하기 위해 B. 오바투스를 성공적으로 조작한 증거를 제공한다. 본 발명자들의 결과는 B. 오바투스가 자일란에 반응하여 생물학적으로 활성인 MuIL2를 생산하기 위해 유도될 수 있다는 것을 증명한다. 본 발명자들은 또한 상기 단백질에 B. 프라질리스(*B. fragilis*) 장독소 분비 신호 서열을 추가하여 MuIL2을 분비하기 위한 제2의 계통을 조작하였다. 상기 재조합 계통들은 세포 용해물 및 배양 상층액의 효소결합 면역흡수 분석법에 의해 측정된 결과 자일란 존재하에서만 MuIL2를 생산하였다. IL2-의존 세포계 CTLL-2가 양 B. 오바투스 계통들에 의해 생산된 MuIL2가 생물학적으로 활성이었다는 것을 보여주기 위해 사용되었다. 나아가 이 활성은 항-IL2 중화항체(anti-IL2 neutralising antibody)에 의해 차단될 수 있었다.
- [0035] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하나 이상의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드들 또는 단백질을 발현시키기 위해 변형된 장내 공생 세균을 약학적으로 유효한 양으로 장의 만성 염증 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 장의 만성 염증을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 상기 세균은 식이 인자의 존재에 반응하여 유도될 수 있고, 상기 생물학적으로 활성인 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 조절하는 프로모터를 더 포함한다.
- [0036] 약물 전달 운반체로서의 본 발명에 의한 세균의 용도는 장의 만성 염증을 치료하기 위한 작용점에 사이토카인들과 같은 면역조절 인자들 및 다른 생물학적으로 활성인 분자들을 직접적으로 전달하는 수단을 제공한다.
- [0037] 치료 전달의 이 독특한 형태의 장점들은, 비경구적 요법과 결합된 불편함 및 시스템적 노출(systemic exposure)을 피할 수 있으면서, 작용점에 생물학적으로 활성인 단백질을 직접적으로 전달하는 편리하고, 간단한 수단이라는 점이다.
- [0038] 본 발명은 이하 도면과 관련된 간단한 참조로서만 실시예의 방식으로 설명될 것이다.

실시예

- [0045] 세균 계통들, 플라스미드들 및 일반적인 DNA 조작들(Bacterial strains, plasmids and general DNA manipulations)
- [0046] 대장균(*E. coli*) DH5 α 및 J53/R751가 LB 배지에서 배양되었다. 대장균 J53/R751의 배양액에 200 μ g 트리메소프림(trimethoprim) ml⁻¹이 보충되었다. *B. ovatus* V975은 10 μ g 해민(haemin) ml⁻¹이 보충된 BHI 배양액(brain heart infusion broth, BHI broth) 또는 Hespell et al. (1987)에 의해 기술된 대로 조제되고 0.1% (w/v) 글루코오스가 보충된 통상의 배지(routine growth medium, RGM)에서 혐기적으로 37°C에서 배양되었다. 자일란이 필요한 경우, 오토스펠트 자일란(oatspelt xylan)의 열수-용해성 단편이 Hespell 와 O'Bryan (1992)의 방법에 의해 조제되고 0.2% (w/v) 농도로 배지에 보충된다. 대장균 J53/R751에서 *B. ovatus*로 플라스미드 전달은 Valentine 등 (1992)에 의해 기술된 대로 접합에 의해 수행되었다. pBT2 (Tancula et al. 1992)은 50 μ g 카나마이신 ml⁻¹을 이용하여 대장균에서 선별되었다. *B. ovatus* 트랜스컨쥬전트들(transconjugants)은 200 μ g 겐타마이신(gentamicin) ml⁻¹ 및 5 μ g 테트라사이클린(tetracycline) ml⁻¹을 함유하는 BHI-해민 아가에서 선별되었다. 트랜스컨쥬전트들은 연속적으로 1 μ g 테트라사이클린(tetracycline) ml⁻¹을 함유하는 배지에서 배양되었다. 대장균은 Hanahan (1983)의 방법에 의해서 형질전환되었다. 일반적 DNA 조작들이 Sambrook et al. (1990)에 의해 기술된 대로 수행되었다.
- [0047] MuIL2-생산 및 제어 *B. ovatus* 계통의 구축(Construction of MuIL2-producing and control *B. ovatus* strains)
- [0048] MuIL2-생산 계통 BOMuIL2. MuIL2 유전자는 MuIL2F1 (GCGCATATGCGACCCACTTC AAGCTCCAC; SEQ ID NO:1 짧은 글씨는 *NdeI* 사이트) 및 MuIL2R1 (GCGGGATCCTT ATTGAGGGCTTGTTGAGATGATG; SEQ ID NO:2 짧은 글씨는 *BamHI* 사이트)의 프라이머들을 이용하여 pUC13에서 클론된 cDNA로부터 PCR-증폭되었다. *orf* 유전자의 3' 하프(half) 및 이 유전자와 *xyI* 유전자 사이의 부위(region)를 포함하는 *B. ovatus* 자일라나제 오페론 부분은 프라이머 ORFF1 (GCGGGATCCATGGAGCA TGAATGCGTCA; SEQ ID NO:3 짧은 글씨는 *BamHI* 사이트) 및 ORFR1 (CATATGTTATTTTTGAGTAATAACATTCTAC; SEQ ID NO:4 짧은 글씨는 *NdeI* 사이트)을 이용하여 플라스미드 pOX1 (Whitehead and Hespell 1990)으로부터 증폭되었다. MuIL2 및 ORF PCR 산물은 pGEM-T (Promega)로 클론되어, 각각 플라스미드 pGEM-MuIL2 및 pGEM-ORF을 생성하였다. MuIL2는 *NdeI*로 pGEM-MuIL2로부터 제거되어 *NdeI*-절단된(*NdeI*-digested) pGEM-ORF에 붙여 pORF-MuIL2을 생성하였다. 상기 삽입은 구조물을 확인하기 위해 시퀀싱되었다. ORF-MuIL2 구조물은 *BamHI* 절단에 의해 pORF-MuIL2로부터 제거되었고, pBT2의 *BamHI* 사이트로 클론되어 pBOMuIL2을 생성하였다. 이 플라스미드는 접합에 의해 *B. ovatus* 로 전달되었고, 트랜스컨쥬전트들의 계놈에 상기 플라스미드가 통합되었다는 것은 PCR에 의해 확인되었다.
- [0049] MuIL2-분비 계통 BOMuIL2-S. *B. ovatus* 계통 BOMuIL2은, MuIL2 유전자가 프라이머 BFTSIGIL2F (GACATATGAAGAATGTAAAGTTACTTTTAA TGCTAGGAACCGCGGCATTATTAGCTGCAGCACCCACTTCAAGCTCCAC; SEQ ID NO:5 신호 서열 코딩 부위는 밑줄이 쳐져 있음. 짧은 글씨는 *NdeI* 사이트) 및 MuIL2R1을 이용하여 PCR-증폭되는 것을 제외하고 계통 BOMuIL2와 동일한 방법으로 구축되었다. 이것으로 플라스미드 pGEM-MuIL2-S, pORF-MuIL2-S 및 pBOMuIL2-S가 생성되었다.
- [0050] 대조군 계통 BT2. MuIL2가 없는 pBT2를 포함하는 대조군 계통이 다음과 같이 구축되었다. 상기에서 사용된 대로 *orf* 유전자의 동일 부분이 프라이머 ORFF1 및 ORFR2 (GGATCCTTATTTTTGAGTAAT AACATTCTAC; SEQ ID NO:6 짧은 글씨는 *BamHI* 사이트)로 PCR 증폭되었고 pGEM-T로 클론되어 pGEM-ORFB을 생성하였다. 상기 삽입은 *BamHI*로 제거되었고 pBT2의 *BamHI* 사이트로 클론되어 pBT-ORF를 생성하였다. 이 플라스미드는 상술한 대로 *B. ovatus*에 전달되었다.
- [0051] MuIL2을 생산하는 *B. ovatus* 샘플의 제조(Preparation of samples of *B. ovatus* producing MuIL2).
- [0052] *B. ovatus* 계통들 V975, BT2, BOMuIL2 및 BOMuIL2-S는 24시간 동안 자일란이 있는 또는 없는 10 ml RGM에 배양되었다. 계통 BOMuIL2 및 BOMuIL2-S는 또한 자일란 없이 16시간 동안 배양되었고 그런 다음 자일란과 함께 8시간 동안 더 배양되었다. 후에 인큐베이션을 하고, 세포들은 수거되었다(5000 g, 30 min, 40C). 상층액들은 제

거되어 냉동되었다. 세포들은 10 ml RGM에서 한번 세척되었고, 5 ml 증류수에서 재부유 되었다. 세포들은 12 μ m에 4 x 20 sec 동안 얼음에서 초음파 처리에 의해 분쇄되었다(Soniprep 150, MSE). 분쇄되지 않은 세포들 및 세포 파편들은 원심분리(13,000 g, 20 min, 40C)에 의해 제거되었다. 용해물들 및 상층액들은 감압하에서 동결 건조하여 0.5 ml 증류수에서 재부유되었다.

[0053] **MuIL2 검출을 위한 분석(Assays for detection of MuIL2)**

[0054] 각각 캡처(capture) 및 항체로서 네이티브 쥐(native rat) 안티-마우스 IL2 (clone JES6-1A12) 및 비오틴화 쥐 안티-마우스 IL2 (clone JES65H4)와 결합된 ELISA가 *B. ovatus*의 재조합 계통에 의해 생산된 MuIL2 레벨을 정량하기 위해 사용되었고 제조자 지시(BD Pharmingen)에 따라 수행되었다. 재조합 MuIL2 (rMuIL2; Sigma)은 표준 곡선을 얻기 위해 대조군으로서 사용되었다. 샘플에서 생물학적으로 활성인 MuIL2의 존재를 검출하기 위해 지시(indicator) 세포계 CTLL-2 (Gillis et al. 1978)를 이용하는 IL2 바이오에세이가 이용되었다(Wadhwa et al. 2000). 간략하게, 세포들은 18시간 동안 중복된 96-웰 플레이트들 내에서 테스트 샘플들 또는 대조군 rMuIL2의 희석액과 함께 인큐베이트 되었다. 그런 다음 세포들은 0.5 μ Ci [3 H]티미딘(thymidine)이 추가되고, 4 시간 후에 수거되었고, DNA와 관련된 방사능이 섬광계측에 의해 측정되었다. 또한 상기 분석은 IL2 중화항체(clone JES6-1A12)의 존재하에서 수행되었다. 이것은 세포들의 추가 1시간 전에 5 μ g ml $^{-1}$ 의 농도로 샘플들에 추가되었다.

[0055] **RT-PCR에 의한 MuIL2 전사 검출(Detection of MuIL2 transcription by RT-PCR)**

[0056] *B. ovatus* V975, BT2, BOMuIL2 및 BOMuIL2-S는 16시간 동안 자일란 없이 RGM에서 배양되었다. 자일란이 추가 되어 자일라나제 오페론의 전사를 유도하기 전에, 유도전 샘플(preinduction sample)이 BOMuIL2 및 BOMuIL2-S의 배양액에서 취해졌다. 샘플들은 1시간 후에 모든 4개의 배양액에서 취해졌다. 총 RNA는 RNeasy kit (Qiagen)를 이용하여 모든 세포 샘플들에서 추출된 후, 잔기 오염 DNA를 제거하기 위해 TURBO DNA-freeTM (Ambion)로 처리되었다. RT-PCR은 AccessQuickTM RT-PCR System (Promega) 및 *orf-MuIL2* 퓨전 (CCGATGGTACCTGCCATTA (SEQ ID NO:7) 및 CTGTGCTTCCGCTGAGG (SEQ ID NO:8)) 또는 양성 대조군으로 *gyrA* 유전자(CTCCATGTTCGGTCATCGTTTC (SEQ ID NO:9) 및 CAAAGGATAACGCATTGCCCA (SEQ ID NO: 10))를 위한 프라이머들을 이용하여 수행되었다. 음성 대조군으로 반응은 역전사 효소의 부가 없이 수행되었다.

[0057] ***B. ovatus* 계통의 구축(Construction of *B. ovatus* strains)**

[0058] 자일란-유도 방식으로 MuIL2을 발현시킬 수 있는 *B. ovatus* 계통을 구축하기 위해, MuIL2 유전자 (minus native signal sequence) 및 자일라나제 오페론의 *orf* 유전자의 3' 부분(portion)은 PCR-증폭되었고 pGEM-T에 결합되어 플라스미드 pORF-MuIL2를 제공한다. ATG 개시 코돈은 *NdeI* 사이트의 부분으로서 성숙 MuIL2을 인코딩 하는 서열 앞에 위치하였다. 이것은 단백질의 번역을 확실하게 하였다. 클로닝에 이 *NdeI* 사이트를 이용하면 *orf*와 *xyl* 사이의 야생형 부위와 비교해서 *orf*와 MuIL2 유전자 사이의 비암호(non-coding) 부위에서 단일 염기 변경(G에서 A로)만을 초래하게 되었다. 그러나, 이것은 MuIL2 발현에 영향을 미치는 것으로 기대되지는 않았다. 도 1의 플라스미드 pBOMuIL2의 구축은 pBOMuIL2을 형성하기 위해 PCR에 의해 증폭되고, pBluescript 내에서 함께 결합된 후 pBT2 안으로 서브클론되는 *B. ovatus orf* 유전자의 3' 부분 및 전체 MuIL2 유전자를 포함한다. 클론을 위해 사용된 제한사이트만이 상기 도면에 나타나 있다. Tet, *B. ovatus*에서 선별을 위한 테트라사이클린 저항성; kan, 대장균에서 선별을 위한 카나마이신 저항성; oriV, 복제기점(origin of replication); repA, repB, repC, 복제 기능들(replication functions)을 인코딩 및 mob이 대장균에서 *B. ovatus*로의 동원(mobilization)을 위해 필요하다. 다음 상기 pBOMuIL2 플라스미드(도 1)는 *B. ovatus* V975로 성공적으로 전달되었다. 상기 MuIL2-분비 계통, *B. ovatus* BOMuIL2-S는 MuIL2 유전자를 PCR-증폭하기 위해 사용된 포워드 프라이머, *B. fragilis* 장독소 분비 신호서열을 위한 코딩 서열을 포함하는 것을 제외하고 동일한 방법으로 구축되었다. 대조군 계통, *B. ovatus* BT2도 또한 pBT2 내로 *orf* 유전자만 클로닝하여 구축되었다. MuIL2 및 MuIL2-S 발현계통 및 BT2 대조군 계통의 성공적 구축은 PCR 및 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 확인되었다(데이터 미도시).

[0059] 실시예 1

[0060] 자일란의 존재하에서 쥐 성장인자 인터루킨-2 (IL-2)을 생산하기 위해 설계된 유전조작된 계통 *B. ovatus*, *B. ovatus*-MuIL2가 쥐의 장에 이식될 수 있는 능력을 측정하기 위한 연구가 착수되었다.

[0061] IL2^{-/-} 쥐들을 처치하기 위한 *B. ovatus*-MuIL2 이용의 효용은 그것이 쥐의 결장에 이식될 수 있다는 것을 증명하는 것에 의존하므로, 본 발명자들은 *B. ovatus*-MuIL2가 야생형 쥐의 결장에 이식될 수 있는지로 측정하였다. 통상의 식이(자일란을 포함한)로 유지된 야생형, 특정 병원균이 없는(SPF), C57BL/6 쥐에 구강공급(oral gavage)에 의해 $\sim 10^{10}$ cfu의 *B. ovatus*-MuIL2를 단일 접종원으로 감염시켰다. 이식(colonisation)은 모든 박테로이데스 속의 성장 또는 *B. ovatus*-MuIL2만의 성장을 위해 허용된 항생제의 존재, 혐기성 조건하에서 분변펠릿(faecal pellet) 배양하여 7, 14, 21 및 28일 후에 평가되었다. 앞으로의 실험들에서 분변 배양에서 *B. ovatus*-MuIL2의 동일성(identity)은 프로브로서 전체 길이의 쥐 IL2 cDNA 클론을 이용하여 콜로니 필터 하이브리다이제이션(colony filter hybridisation)에 의해 더욱 엄격하게 확인될 것이다. 표 1에 나타난 바와 같이, *B. ovatus*-MuIL2은 접종 후 28일까지 동물들 3/5의 분변펠릿에서 존재하였고, 적어도 일시적으로 쥐 결장에 이식할 수 있는 능력이 있음을 일관되게 보여주었다. 접종 후 28일에 해부된 동물 2, 3 및 5의 결장은 다수의 *B. ovatus*-MuIL2을 포함하고 있었고(이론적으로 20-80pg MuIL2을 생산할 수 있는 $2-8 \times 10^7$ cfu/g), 분변 세균 측정결과와 일치하였다. 대조적으로, 쥐 번호 1 및 4의 결장은 이식실패와 일치되게 *B. ovatus*-MuIL2가 포함되어 있지 않았다. 이식의 효율성 및 지속은 감염접종에서의 세균의 수를 증가시키거나 세균을 반복하여 투여하여 증가시킬 수 있었다. 표 1은 *B. ovatus*-MuIL2로 "감염"된 쥐들의 분변 혐기성 세균 총수를 나타낸다.

표 1

쥐	총 박테로이데스($\times 10^8$ cfu/g)					<i>B. ovatus</i> -MuIL2($\times 10^4$ cfu/g)				
	T0	T7	T14	T21	T28	T0	T7	T14	T21	T28
1	12	1.6	7.5	5.4	5.8	-	nd	nd	nd	nd
2	17	3.6	4.8	2.9	8.3	-	0.67	2.74	5.4	10.1
3	15	4.1	3.7	3.5	3.7	-	0.53	3.2	4.9	9.3
4	18	7.8	1.1	6.0	1.3	-	nd	nd	nd	nd
5	13	5.1	2.5	7.0	3.4	-	0.21	4.61	7.9	12.2

[0063] nd, 미검출(Not Detectable)

[0064] 실시예 2

[0065] 자일란의 존재하에서 쥐 성장인자 인터루킨-2 (IL-2)을 생산하기 위해 설계된 유전조작 계통 *B. ovatus*, *B. ovatus*-MuIL2가, 유전적으로 IL-2가 결핍된 쥐들(IL-2^{-/-} 쥐들)에서 자연발생하는 장염증의 발병 또는 격렬함에 대해 역으로 영향을 미칠 수 있는 능력을 측정하기 위한 연구가 착수되었다.

[0066] IBD에 대한 면역치료학 프로토콜에서 공생 세균을 이용하는 데 관심사는 면역저하된 동물들 및 환자들에서 선택된 세균이 "병원성"이고, 장 염증을 촉진, 확대, 또는 유지할 수 있다는 점이다. 박테로이데스 및 특히 *B. fragilis* 및 *B. vulgatis*는 IBD의 실험동물 모델들 및 IBD 환자들에서 장 염증의 발전과 관련이 있었다. 또한 한 연구에서 IBD 환자들의 장액(sera)에서 *B. ovatus*의 항원과 반응하는 IgA 및 IgG 항체의 역가(titres)가 증가한 것이 확인되었다. 그러나, 이것이 장염증의 원인이었는지 또는 표피막 손상의 결과로서 체계 순환(systemic circulation)에 진입하거나 면역 반응을 유발하는 박테로이데스 및 다른 공생 세균에게 부차적이었는지는 명백하지 않다. 이들 발견의 관점에서, 본 발명자들은 *B. ovatus*가 IL2^{-/-} 쥐들에서 대장염의 발전에 역효과를 갖는지, 어느 것이 *B. ovatus*-MuIL2에 의한 치료가 이들 동물들에서 가질 수 있는 어떠한 잠재적 이익을 무산시키거나 상쇄시키는 지를 결정할 필요가 있다고 생각하였다.

[0067] 통상의 식이요법으로 유지된 대장염이 없는 3주 된 SPF IL2^{-/-} 쥐들이 연령 및 성비를 맞추어 2개의 그룹(각 n =6)으로 구분되고, 그룹들은 미처리 IL2^{-/-} 쥐들이 심각한 질환으로 발전하는 6주 동안 매 7일마다 200ul PBS 안의 $\sim 10^{10}$ cfu *B. ovatus* (V975) 또는 PBS만으로 감염처리되었다. 접종 후 3주 및 6주에 동물들은 안락사되었고,

조직들(비장, 임파절 및 결장)은 질병 병상(disease pathology)를 위해 전체적으로 그리고 조직구조적으로 해부되었다. 확인된 조직구조적 염증 스코어가 장 염증의 블라인드 평가(blinded evaluation)를 위해 사용되었다.

[0068] 본 발명자들의 발견에 의하면 *B. ovatus*는 IL2^{-/-} 쥐들에서 정상적으로 발전하는 대장염의 발병을 촉진하지도 격렬함을 증가시키지도 않는 것으로 나타났다. 그러나, 이 전체적이고 조직구조적인 평가는 예를 들어 *B. ovatus*로 처리된 동물의 조직들 및 결장에서 면역세포들의 수, 분포 및/또는 활성의 다른, 보다 미묘한 변화들의 가능성을 배제하지 않는다. 따라서, 더욱 상세한 면역학적 분석이 수행될 것이다.

[0069] 실시예 3

[0070] 계통 BOMuIL2 및 BOMuIL2-S에 의한 MuIL2의 생산을 측정하기 위해, 재조합 계통(BOMuIL2, BOMuIL2-S 및 BT2) 및 야생형 계통(V975)이 자일란이 있는 또는 없는 배지에서 배양되었다. 생산의 유도적 성질을 증명하기 위해, 추가로 BOMuIL2 및 BOMuIL2-S는 자일란이 없이(글루코오스가 첨가된 RGM) 16시간 동안 배양된 후, 자일란과 함께 추가로 8시간 동안 배양되었다. 세포 용해물들 및 세포 상층액들은 ELISA 및 바이오에세이에 의해 MuIL2에 대해 분석되었다. 3개의 독립적 실험들로부터의 대표적인 결과들이 도 2에 나타나 있고, 도 2에 24시간 동안 자일란과 함께(+X) 또는 자일란 없이 배양된 *B. ovatus* BOMuIL2, *B. ovatus* BOMuIL2-S 및 대조군 계통들(V975 및 BT2)의 세포 용해물들(CL) 및 배양 상층액들(SN)에서의 MuIL2 레벨이 나타나 있다. BOMuIL2-S는 또한 16시간 동안 자일란 없이 배양된 후 8시간 동안 자일란과 함께(+X8) 배양되었다. 테스트 및 *B. ovatus*의 대조군 계통들은 자일란과 함께 또는 자일란 없이 RGM에서 배양되었다. 세포들은 수거되어 용해되었고, 용해물들 및 배양 상층액들 내의 MuIL2 양은 ELISA에 의해 측정되었다. MuIL2은 조제합 MuIL2의 일련의 희석액들(dilution series)과 비교해서 정량되었다. 데이터 포인트들은 평균 \pm 표준 오차이다. MuIL2는 자일란과 함께 배양된 *B. ovatus* BOMuIL2의 세포 용해물들에서(539.5 pg ml^{-1}), 더 낮은 농도로(44.2 pg ml^{-1}) 배양 상층액에서 검출되었다. 계통 BOMuIL2-S의 경우, BOMuIL2와 비교해서 19.3배의 MuIL2(849.9 pg ml^{-1})가 자일란의 존재하에서 배양된 배양 상층액에서 검출되었다. BOMuIL2-S의 세포 용해물에서 더 낮은 농도의 MuIL2(184.3 pg ml^{-1})가 검출되었다. 자일란의 결핍하에서 배양된 두개의 대조군 계통들 또는 *B. ovatus* BOMuIL2 또는 BOMuIL2-S의 세포 용해물들 또는 배양 상층액들에서는 MuIL2가 검출되지 않았다.

[0071] 실시예 4

[0072] IL2 바이오에세이는 BOMuIL2-S에 의해 생산된 MuIL2가 생물학적으로 활성이었다는 것을 보여주었다(도 3). 도 3은 자일란과 함께 배양된 *B. ovatus* BOMuIL2-S의 배양 상층액들 내의 MuIL2의 바이오에세이 결과를 나타낸다. CTLL-2 세포들의 증식은 [³H]티미딘(thymidine)의 빨아올림(uptake) 후 2배 희석 인큐베이션 다음 측정되었다: ■, *B. ovatus* BOMuIL2-S 상층액만; □, 항-MuIL2 항체와 함께 *B. ovatus* BOMuIL2-S 상층액. MuIL2는 재조합 MuIL2의 일련 희석액들과 비교해서 정량되었다. 데이터 포인트들은 평균 \pm 표준 오차이다. 생물학적 활성은 대조군 계통들 또는 배양배지만의 상층액들에서는 검출되지 않았다(데이터 미도시). 항-MuIL2 항체의 추가에 의한 지시세포계(indicator cell line)의 증식 차단은 *B. ovatus* pBOMuIL2-S의 배양 상층액들에서 성장 촉진 활성이 MuIL2에 기인하였다는 것을 보여주었다. 계통 BOMuIL2-S에서, 번역을 용이하게 하기 위해 ATG 코돈이 MuIL2의 5' 말단에 추가되었다. 그 결과로, 메티오닌 잔기가 성숙 단백질의 N-터미널에 존재하였다. 바이오에세이 결과들은 이것이 단백질의 생물학적 활성을 제거하지 않았다는 것을 보여주었다. 유사하게, *B. fragilis* 장독소 분비 신호 서열에 의한 MuIL2의 분비가 MuIL2의 생물학적 활성을 제거하지 않았다. 세포 용해물들 및 상층액들의 더 높은 농도는 지시세포계에 대한 저해를 증명하였고, 따라서 더 낮은 MuIL2의 농도가 BOMuIL2-S 상층액의 1/40 희석액에서 측정되었다.

[0073] 실시예 5

[0074] *orf*-MuIL2 유전자 플렌의 전사를 확인하기 위해, RT-PCR이 수행되었다. *B. ovatus* BOMuIL2 및 BOMuIL2-S는 16시간 동안 글루코오스가 첨가된 RGM에서 배양되었고 세포샘플이 채취되었다. 다음, 자일란이 추가되었고 샘플들이 1시간 후에 채취되었다. 대조군 계통들의 배양으로부터 샘플들이 또한 자일란 유도 후에 채취되었다. 총 RNA가 세포들로부터 추출되었고, RT-PCR이 *orf*-MuIL2 구조물 및 *gyrA*, 통상 사용되는 본질적으로 발현된 대조

유전자를 위한 특이한 프라이머들을 이용하여 수행되었다. 전사의 기초 레벨이 자일란의 추가 전에 BOMuIL2 및 BOMuIL2-S 모두에서 검출될 수 있었고, 자일란 추가 1시간 후에 증가되었다(도 4). 도 4는 RT-PCR에 의해 측정된 대로 자일란에 반응하여 MuIL2 mRNA의 발현이 증가된 것을 나타낸다. 테스트(BOMuIL2 및 BOMuIL2-S) 또는 *B. ovatus*의 대조군 계통들(V975 및 BT2)은 자일란 없이 RGM에서 24시간 동안 배양되었다. 다음, 자일란이 추가되고 1시간 동안 인큐베이션 계속되었다. 세포들이 수거되었고, 총 RNA가 추출되었고, MuIL2 및 MuIL2-S 전사를 검출하기 위해 RT-PCT이 수행되었다. *gyrA*은 양성 대조군으로 사용되었다. 레인들: 1, 1시간 동안 자일란과 함께 배양된 V975; 2, 1시간 동안 자일란과 함께 배양된 BT2; 3, 자일란 없이 배양된 BOMuIL2; 4, 1시간 동안 자일란과 함께 배양된 BOMuIL2-S ; 5, 자일란 없이 배양된 BOMuIL2-S; 6, 1시간 동안 자일란과 함께 배양된 BOMuIL2-S.

[0075] MuIL2 유전자 전사가 2개의 대조군 계통들에서 검출되지 않았다. 비록 전사가 자일란 추가 전에 MuIL2-생산 계통들에서 검출되었지만, 세포 용해물들 또는 배양 상층액들에서 MuIL2 단백질을 검출하는 것이 가능하지 않았다(도 2).

[0076] 여기서 제시된 데이터는, 생물학적으로 활성인 MuIL2가 상주 장 세균군의 하나인 *B. ovatus* 내의 자일라나제 오페론의 엄격한 조절하에서 생산될 수 있다는 것을 보여준다. 나아가, 생물학적으로 활성인 MuIL2는 또한 *B. fragilis* 장독소 분비 신호 서열과 결합된 *B. ovatus*에 의해 분비될 수 있었다. 계통 BOMuIL2의 배양 상층액에서 MuIL2의 레벨은 상대적으로 낮지만, 분비 신호 서열의 추가에 의해 19.3 배 증가하였다(계통 BOMuIL2-S). 자일라나제 오페론은 자일란의 존재하에서 이 오페론의 유도성 성질에 의해 조절된 유전자 발현에 유리하게 이용될 수 있다. 비록 이 오페론의 프로모터는 클론 또는 특성화되지 않았지만, 상기 오페론 내의 유전자들에 의해 인코딩된 효소들의 활성은 자일란에 반응하여 상향조절된다는 것이 보여졌다. 본 발명의 시스템은 또한 자일란의 식이 섭취(dietary intake)에 의해 생체 내에서의 제어 또는 조절을 위해 제공될 수도 있다. 본 발명의 이러한 특징은 자일란이 장을 통해 결장까지 통과할 때 소화되지 않은 상태로 남아 있고, 미생물 효소들의 작용에 의해서 결장에서만 분해된다는 점에서 다른 유도성 시스템들에 비해 장점을 갖는다.

[0077] 비록 자일란 없이 배양된 세포들에서 전사의 기초 레벨이 검출되었지만, MuIL2의 생산은 세포 용해물들 또는 배양 상층액들에서 ELISA에 의해 검출되기에 너무 낮은 레벨 ($< 20 \text{ pg ml}^{-1}$)이었다. *B. ovatus* pBOMuIL2의 자일란-유도 배양 후 자일란을 제거하면 MuIL2을 검출할 수 없는 것은 자일라나제 오페론의 정밀성(stringency) 및 MuIL2 생산을 위해 자일란이 계속적으로 필요하다는 것을 증명한다(데이터 미도시). *B. ovatus*에 의해 생산되고 분비된 MuIL2의 레벨은 낮지만, 생리학적 범위 내에 있다. MuIL2가 생물학적 효과를 가질 수 있도록 충분히 생산되어야 하나 해로운 효과를 가질 정도로 레벨이 높아서는 안 되기 때문에, 이것은 이 시스템이 치료학적으로 사용될 수 있는지 여부에 결정적이다. 본 발명자들은 질병을 치료하고 예방할 수 있는 능력을 측정하기 위해, IBD의 쥐 모델에서 *B. ovatus*의 MuIL2-생산 및 분비 계통들을 시험하려고 한다.

[0078] 실시예 6

[0079] 성체 C57BL/6 쥐들에 구강 공급(oral gavage)에 의해 쥐 IL2 유전자를 발현하는 *B. ovatus*의 재조합 계통이 단일 투여량(PBS 내에 10^8 cfu)으로 투여되었고 선택적 배양 조건들 및 항체들의 용도를 이용하여 3 및 7일(T) 후에 스톨(stools)이 모든 네이티브 박테로이데스 속 및 재조합 *B. ovatus*의 존재를 위하여 배양되었다. 세균 콜로니(cfu)는 24시간 후에 정량되었다.

[0080] 그 결과는 재조합 *B. ovatus* 계통이 세균의 단일 투여 후 1주일까지 동안 대부분 쥐(4/5)의 결장에 이식한 것을 보여준다. 재조합 *B. ovatus*의 존재는 박테로이데스의 내생 개체군의 크기에 인지될 수 있는 효과를 미치지 않는다. 표 2는 *B. ovatus*의 재조합 계통들에 의한 쥐로의 이식을 나타낸다.

표 2

쥐	총 박테로이데스 cfu g^{-1}			재조합 <i>B. ovatus</i> cfu g^{-1}		
	T0	T3	T7	T0	T3	T7
1	1.16×10^9	1.61×10^9	7.54×10^9	-	1208	1555
2	1.66×10^9	3.61×10^8	4.75×10^8	-	997	1054

3	1.50×10^9	4.06×10^8	3.73×10^8	-	5263	5409
4	3.81×10^9	7.77×10^8	1.08×10^9	-	0	0
5	1.32×10^9	5.05×10^8	2.50×10^8	-	2105	1636

[0082] 실시예 7

[0083] 도 5는 인간 TGF β 또는 KGF를 발현하는 *B. ovatus*의 구조물 맵을 나타낸다. 인간 KGF (BoHuKGF) 또는 TGF β (BoHuTGF)을 인코딩하는 *B. ovatus*의 재조합 계통들 또는 이중 유전자를 포함하지 않는 대조군 계통들(BoBTS)이, ELISA에 의해 TGF β 및 KGF에 대해 배양 상층액들을 분석되기 전에 8 또는 24시간 동안 단독적으로 완전 배지(Media) 또는 자일란을 포함하는 배지에서 배양되었다. 재조합 *B. ovatus*의 일부 배양은 배지를 제거하고 단독 완전배지에서(BoHuKGF/TGF β ± 자일란) 추가로 24시간 동안 배양되기 전에 8시간 동안 자일란과 함께 배양되었다. 도 6a는 인간 KGF TGF β (BoHuTGF)을 인코딩하는 유전자를 발현하는 *B. ovatus*로 행한 3개의 독립적인 실험들에서 검출된 배양 상층액들에 존재하는 사이토카인의 평균량을 나타내는 그래프이다. 도 6b는 인간 KGF (BoHuKGF)을 인코딩하는 유전자를 발현하는 *B. ovatus*로부터의 동일한 실험 데이터를 나타낸다.

[0084] 요약하면, 상술한 바와 같이 식이 인자들의 제어하에서 면역조절용 분자들을 생산하기 위해 공생 세균을 조작하는 능력은, IBD와 같은 만성 장 장애들에 대한 더욱 정확하고, 특이하고 제어된 치료요법을 제공할 가능성을 제시한다. 이러한 접근은 다양한 장애들의 치료 및 예방적 응용으로 사이토카인들, 효소들 및 백신들을 포함하는 다양한 생물학적 관련 분자들을 전달하기 위해 이용될 수 있다.

[0085] 참고문헌들

- [0086] Gillis, S., Ferm, M.M.와 Smith, K.A. (1978) T Cell 성장 인자: 생산 파라미터들과 활성화에 관한 정량적 마이크로에세이. *Journal of Immunology* 120,2027-2032.
- [0087] Hanahan, D. (1983) 플라스미드를 가진 대장균의 형질전환에 관한 연구, *Journal of Molecular Biology* 166,557-580.
- [0088] Hespell, R.B.와 O'Bryan, P.J. (1992) 부티리비브리오 피브리솔벤스(*Butyrivibrio Fibrisolvens*) GS113으로부터 α -L-아라비노푸라노시다제(α -L-arabinofuranosidase)의 정제 및 특성. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1082-1088.
- [0089] Hespell, R.B., Wolf, R.와 Bohast, R.J. (1987) 부티로비브리오 피브리솔벤스(*Butyrovibrio fibrisolvens*)와 다른 루미날 박테리아(ruminal bacteria)에 의한 자일란의 발효. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2849-2853.
- [0090] Saitoh, S., Noda, S., Aiba, Y., Takagi, A., Sakamoto, M., Benno, Y.와 Koga, Y (2002) 염증성 장질환에 체계적인 항체 반응을 일으키는 지배적 공생 장내 병원균으로서 박테로이데스 오바투스(*Bacteroides ovatus*). *Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.*, 9, 54.
- [0091] Sambrook, J., Fritsch, E. F.와 Maniatis, T. (1990) 분자 클로닝: 실험실 메뉴얼, 콜드 스프링 하버, NY: 콜드 스프링 하버 래버러토리(Cold Spring Harbor Laboratory).
- [0092] Shanahan, F. (2001) 염증성 장질환: 면역진단학, 면역요법학, 및 환경치료학. *Gastroenterology* 120, 622-635.
- [0093] Steidler, L. (2001) 염증성 장질환의 치료를 위한 미생물학적 그리고 면역학적 전략들. *Microbes and Infection* 3, 1157-1166.
- [0094] Steidler, L., Wells, J. M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W.와 Remaut, E. (1995) 락토코커스 락티스 subsp. 락티스(*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*)에 의해서 생물학적으로 활성인 쥐 인터루킨-2의 분비. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1627-1629.
- [0095] Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R. W. F. 와 Wells,

J. M. (1998) 항원 및 사이토카인을 공동 발현하는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)의 재조합 계통에 의한 쥐 인터루킨-2(IL-2) 및 IL-6의 점막 전달. *Infection and Immunity* 66, 3183-3189.

[0096] Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. 와 Remaut, E. (2000) 인터루킨 10 을 분비하는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)에 의한 쥐 대장염의 치료. *Science* 289, 1352-1355.

[0097] Tancula, E., Feldhaus, M.J., Bedzyk, L.A. 와 Salyers, A.A. (1992) 박테로이데스 테타이오타오마이كرون(*Bacteroides thetaiotaomicron*)의 표면에 전분을 결합하는 것과 관련된 유전자의 위치와 특성. *Journal of Bacteriology* 174, 5609-5616.

[0098] Valentine, P.J., Arnold, P. 와 Salyers, A.A. (1992) 구아 검(guar gum)에 성장에 필수적인 유전자들을 포함하는 박테로이데스 오바투스(*Bacteroides ovatus*)로부터 두 개의 염색체 유전자 좌(loci)의 클로닝 및 부분적 특성. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1541-1548.

[0099] Wadhwa, M., Bird, C., Dilger, P., Mire-Sluis, T. 와 Thorpe, R. (2000) 개별적 사이토카인을 위한 정량적 생물학적 분석들. In *Cytokine Cell Biology*, 3판, ed. Balkwill, F. pp. 207-212. 옥스포드: 옥스포드 대학 출판부.

[0100] Whitehead, T.R. 와 Hespell, R.B. (1990) The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. *Journal of Bacteriology* 172, 2408-2412.

[0101] Whitehead, T.R. 와 Hespell, R.B. (1990) 3.8-킬로베이스 지역에서 군집되어져 있는 박테로이데스 오바투스(*Bacteroides ovatus*) 유래의 세 개의 자일란-분해 활성을 갖는 유전자들. *Journal of Bacteriology* 172, 2408-2412.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 플라스미드 pBOMuIL2의 개략적 구성을 보인 도면이다.

[0040] 도 2는 24시간 동안 자일란과 함께 배양된(+X) 또는 자일란 없이 배양된 *B. ovatus* BOMuIL2, *B. ovatus* BOMuIL2-S 및 대조 계통들(V975 및 BT2)의 세포 용해물들(CL) 및 배양 상층액(SN)에서의 MuIL2 레벨들을 나타내는 바차트이다.

[0041] 도 3은 자일란과 함께 배양된 *B. ovatus* BOMuIL2-S의 배양 상층액들에서의 MuIL2 의 바이오에세이 결과를 나타내는 도면이다.

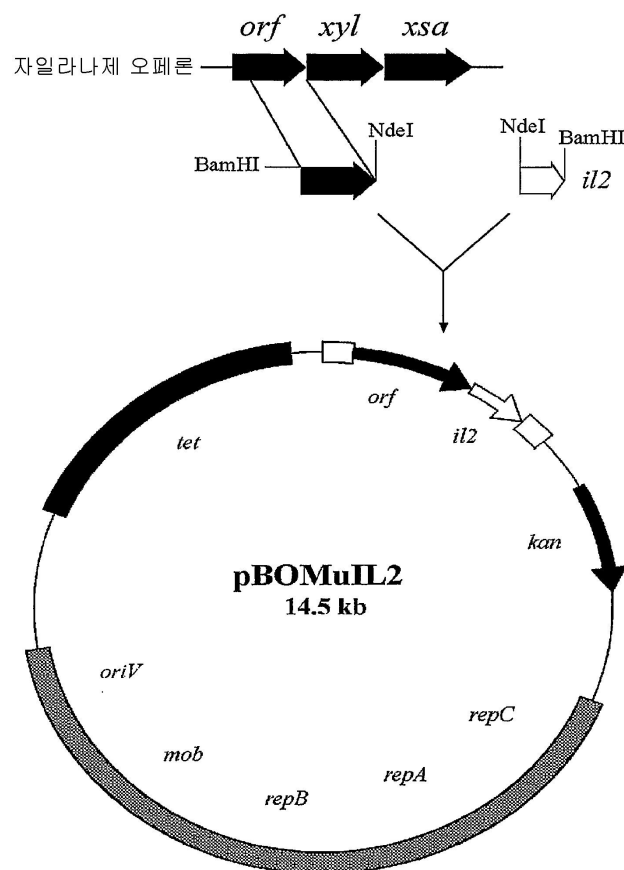
[0042] 도 4는 자일란 없이 RGM에서 24시간 동안 배양된 후 자일란과 함께 1시간 동안 배양된 *B. ovatus*의 테스트(BOMuIL2 and BOMuIL2-S) 또는 대조구 계통들(V975 및 BT2) RT-PCR로 측정된 자일란에 반응하여 MuIL2 mRNA의 증가된 발현 겔을 나타내는 도면이다.

[0043] 도 5는 인간 TGF β 또는 KGF를 발현하는 *B. ovatus*의 구조물 맵(construct map)을 나타내는 도면이다.

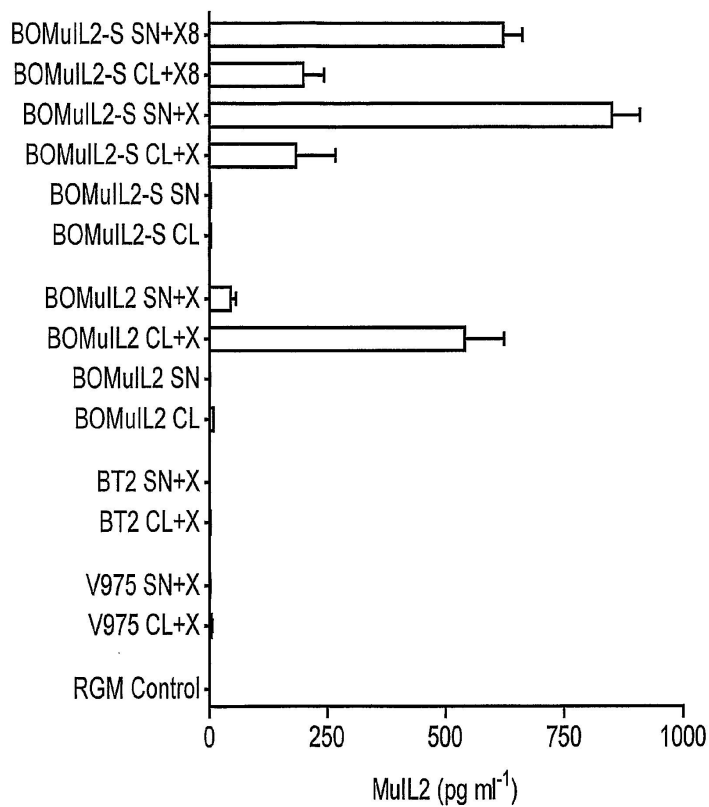
[0044] 도 6a는 자일란에 반응하여 인간 TGF β 를 발현하는 *B. ovatus*에 의한 인간 사이토카인의 생산을 나타내는 도면이고, 도 6b는 자일란에 반응하여 인간 KGF를 발현하는 *B. ovatus*에 의한 인간 사이토카인의 생산을 나타내는 도면이다.

도면

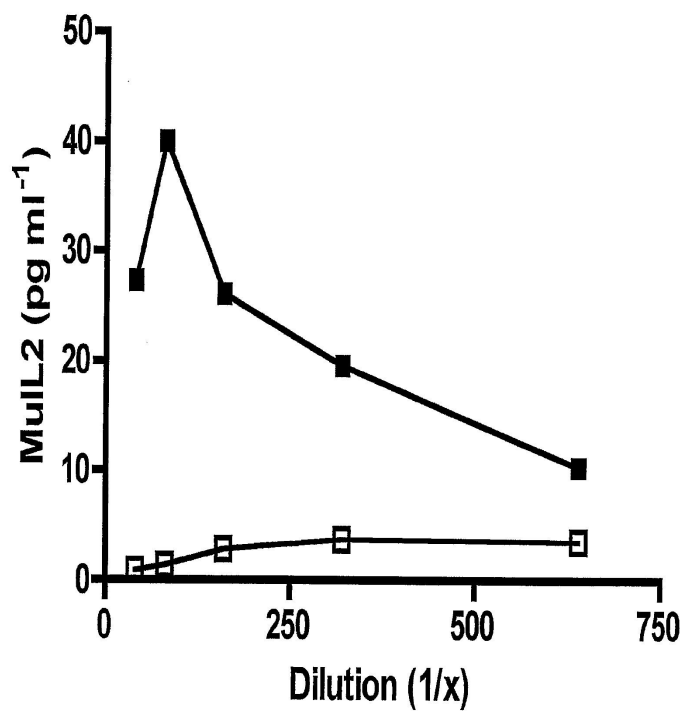
도면1



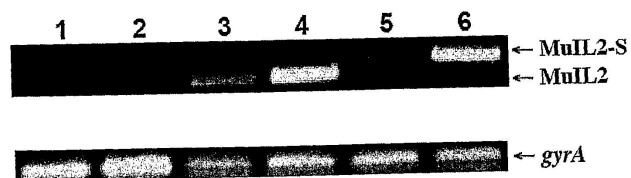
도면2



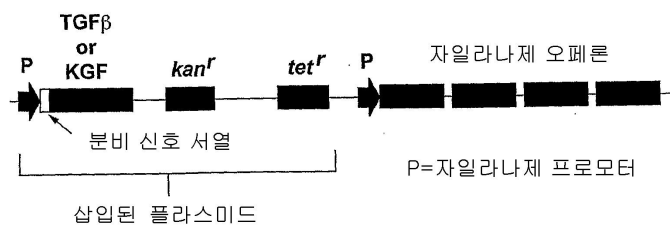
도면3



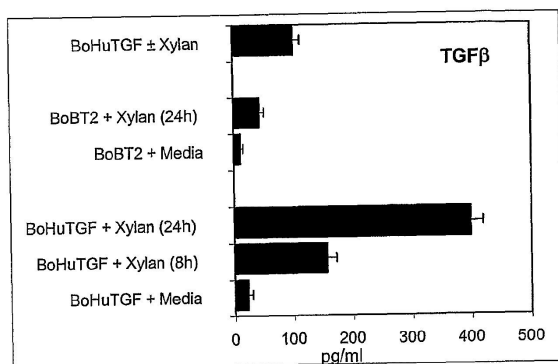
도면4



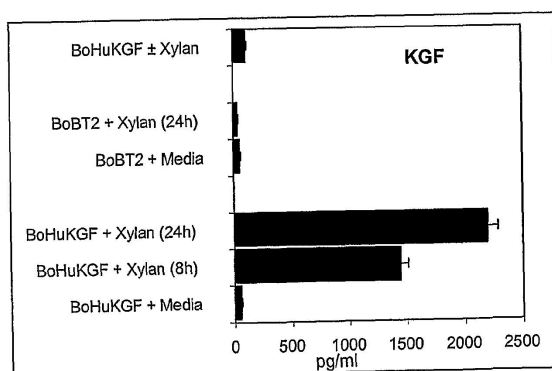
도면5



도면6a



도면6b



서열목록

<110>	UNIVERSITY OF LEEDS	
<120>	Controlled Production and Delivery of Biologically Active Agents by Gut Bacteria	
<130>	P31-070803-01	
<150>	GB0501540.9	
<151>	2005-01-25	
<160>	10	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR PRIMER	
<400>	1	
	gcgcataatgg caccacttc aagctccac	29
<210>	2	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR PRIMER	
<400>	2	
	gcgggatacct tattgagggc ttgttgagat gatg	34
<210>	3	
<211>	28	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 3

gcgggatcca tggagcatga atgcgtca

28

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 4

catatgttat attttgagt aataaacatt ctac

34

<210> 5

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 5

gacatatgaa gaatgtaaag ttacttttaa tgctaggaac cgcgcatia ttagctgcag

60

caccacttc aagctccac

79

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 6
ggatccttat atttttgagt aataaacatt ctac 34

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 7
ccgatggtac ctgccattaa a 21

<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 8
ctgtgcttcc gctgagg 17

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 9
ctccatgtcg gtcacgttt c 21

<210> 10

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR PRIMER

<400> 10
 caaaggataa cgcattgccc a

21