

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 1/21  
C12N 15/63

(11) 공개번호 특2000-0068934  
(43) 공개일자 2000년11월25일

|   |   |                            |                              |
|---|---|----------------------------|------------------------------|
| (21) 출원번호<br>(22) 출원일자<br>번역문제출일자<br>(86) 국제출원번호<br>(86) 국제출원출원일자<br>(81) 지정국   | 10-1999-7004107<br>1999년05월08일<br>1999년05월08일<br>PCT/US1997/20528<br>1997년11월07일<br>AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 짐바브웨  | (87) 국제공개번호<br>(87) 국제공개일자 | WO 1998/20111<br>1998년05월14일 |
| <p>EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄</p> <p>EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드</p> <p>OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고</p> <p>국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 가나 인도네시아 시에라리온 짐바브웨 유고슬라비아</p> |   |                            |                              |
| (30) 우선권 주장<br>(71) 출원인<br><br>(72) 발명자<br><br>(74) 대리인   | 60/029,545 1996년11월08일 미국(US)<br>네오스 테크놀로지스, 인크. 스티븐 로스<br><br>미국 19044 펜실바니아주 홀삼 위트머 로드 102<br>솔츠조디<br><br>미국워싱턴주98112시애틀리스트알로하스트리트2610<br>허만슨게리<br><br>미국캘리포니아주92024엔시니타스비아데카달로3159<br>김창세, 장성구 |                            |                              |

**심사청구 : 없음**

**(54) 개선된 발현 벡터**

**요약**

본 발명은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 단리된 재조합 핵산 구축물에 관한 것이다. 본 재조합 핵산 구축물은 박테리아 세포에서 원하는 폴리펩타이드를 다량으로 발현시키는데 유용하다.

**대표도**

**도1**

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 박테리아 세포내에서 재조합 단백질을 발현시키기 위한 개선된 벡터 및 발효 프로토콜(protocol)에 관한 것이다. 본 발명은 올리고사카라이드의 효소적 합성에 유용한 효소를 비롯한 임의의 원하는 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다.

## 배경기술

생물학적으로 활성인 폴리펩타이드 및 단백질의 생산은 인간 및 동물용 약학 제제, 효소 및 기타 특정 화학물질의 제조를 위해 경제적으로 중요하다. 발현 숙주로서 박테리아 세포, 진균류 세포, 포유류 세포 또는 곤충류 세포를 사용하는 재조합 DNA 기법은 다량의 폴리펩타이드 생산을 위해 특히 유용한 수단이다.

일반적으로, 원하는 단백질의 재조합 생산은 단백질을 코딩하는 유전자에 조작될 수 있게 연결된 경우 유전자의 발현을 조절하는 신호를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질감염시킴을 포함한다. 세포는 재조합 단백질의 발현에 적합한 조건하에 성장된다. 발현 조절 신호는 전형적으로 프로모터의 다운스트림에 위치한 유전자가 RNA로 전사되는 속도에 영향을 주고, 전사 출발 부위를 결정하는 프로모터를 포함한다. 발현 조절 신호는 원하는 단백질을 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포내에서 기능적이라도 선택된다. 예컨대, 박테리아인 이. 콜라이(E. coli)가 통상 높은 수율로 재조합 단백질을 생산하는데 이용된다. 다수의 문헌에 재조합적으로 단백질을 생산하는 이. 콜라이 및 그 외의 박테리아를 사용하는 방법이 개시되어 있다. (예컨대, 미국 특허 제 4,565,785호, 미국 특허 제 4,673,641호, 미국 특허 제 4,738,921호, 미국 특허 제 4,795,706호 및 미국 특허 제 4,710,473호 참조).

상업적으로 사용하도록 의도된 재조합적으로 생산된 단백질의 경우, 숙주 세포로부터 원하는 단백질을 높은 수준으로 발현시키는 것이 특히 요망된다. 세포당 생산되는 원하는 단백질의 양이 증가되면 정해진 양의 생성물을 수득하기 위해 성장되어야만 하는 세포의 부피가 감소되므로 생산 비용이 줄어들 수 있고, 또한 원하는 생성물이 숙주 세포에 의해 생산된 총 단백질중 보다 많은 부분을 차지하므로 용이하게 정제할 수 있다. 따라서, 원하는 단백질을 높은 수준으로 발현시킬 수 있는 발현 조절 신호가 필요하다. 본 발명은 이러한 요구사항 및 그 외의 요구사항을 충족시킨다.

### 발명의 요약

본 발명은 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 단리된 재조합 핵산 구축물을 제공한다. 이 구축물은 박테리아 숙주 세포내에서 원하는 폴리펩타이드를 높은 수준으로 발현시키는데 유용하다. 이중 프로모터는 tac-관련 프로모터로부터 유도된 제 1 성분 및 갈락토즈 대사에 연관된 효소 또는 효소들을 코딩하는 오페론 또는 박테리아 유전자로부터 수득된 제 2 프로모터 성분을 포함한다. 다수의 갈락토즈 프로모터는 제 2 성분으로서 사용될 수 있고; 이러한 프로모터의 한 예는 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus Thermophilus*)로부터 유도된 것과 같은 UDP 갈락토즈-4-에피머레이즈(또한 UDP 글루코즈-4-에피머레이즈로서 공지됨) 프로모터이다.

또한 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 발현 벡터가 본 발명에 의해 제공된다. 이 발현 벡터는 선택적 표지 등의 다른 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 이 구축물은 또한 이. 콜라이 또는 기타 숙주 세포에서 작용하는 복제 서열의 기능을 포함할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 구축물인 플라스미드 pTGK(하기에 상세히 설명됨)는 1996년 5월 22일자로 수탁번호 제 98059호로서 미국 종균 보존소(American Type Culture Collection)에 의해 기탁되었다.

또한, 본 발명은 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 박테리아 프로모터 유닛을 포함하는 재조합 발현 카세트(cassette)를 함유하는 박테리아 세포를 제공한다. 발현 카세트는 숙주 세포의 게놈으로 통합되거나, 또는 독립적으로 복제되는 플라스미드상에 존재할 수 있다. 바람직한 박테리아 세포는 이. 콜라이이다.

추가로, 본 발명은 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 이중 핵산의 발현을 허용하는 조건하에서 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이중 박테리아 프로모터 유닛을 갖는 재조합 발현 카세트를 함유하는 박테리아 세포를 적절한 배지내에서 배양함을 포함한다. 전형적으로 이. 콜라이가 숙주 세포로서 사용된다. 이러한 방법 및 구축물은 박테리아 세포내에서 매우 다양한 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 폴리펩타이드의 예로는 호르몬, 성장 인자 등, 뿐만 아니라 탄수화물의 합성에 유용한 효소가 포함된다. 이러한 효소로는 CMP-시알산 신테테이즈, UDP-글루코즈 피로포스포릴레이즈, 아데닐레이트 카이네이즈, 피루베이트 카이네이즈, 시알산 알돌레이즈, UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이즈 및 미오카이네이즈, 갈락토실트랜스퍼레이즈 및 N-아세틸 글루코즈아미닐트랜스퍼레이즈가 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 플라스미드 pPHOX2의 맵(map)이다.

도 2는 본 발명의 벡터에서 리보솜 결합 부위[샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열]와 재조합 유전자의 개시 코돈 사이의 간격을 도시한다(서열번호: 2).

도 3은 플라스미드 pPHOX2/galE/Kan의 맵이다.

도 4는 플라스미드 pTGK의 맵이다. 이 플라스미드는 프로모터 영역의 5'XbaI 부위 및 카나마이신 내성 유전자(kan<sup>r</sup>)의 HindIII 부위가 결실됨을 제외하고는 pPHOX2/galE/Kan과 본질적으로 동일하다.

도 5A 및 5B는 ATG 개시 코돈으로 시작하는 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 발현되는 DNA를 증폭시킴으로써 본 발명의 벡터에서 발현되는 유전자의 개시 코돈 및 리보솜 결합 부위 사이의 최적 간격을 유지할 수 있음을 도시한다. 도 5A는 플라스미드 pTGKS에서 SrfI 제한 부위와 리보솜 결합 부위(RBS) 사이의 관계를 나타낸다(서열번호: 3). SrfI으로 분해하면 블런트-말단이 남고, 여기에 도 5B에 도시된 바와 같이 ATG 개시 코돈으로 시작하는 블런트-말단의 재조합 유전자가 연결될 수 있다(서열번호: 4).

도 6은 지시된 바와 같이 pPHOX2 서열이 양쪽에 있는 본 발명의 이중 tac-gal 프로모터의 한 실시태양의 뉴클레오타이드 서열을 도시한다(서열번호: 1). tac 및 galE 프로모터 둘다의 -35 및 -10 컨센서스 서열

이 도시되어 있고, 이는 발현을 위한 재조합 유전자의 삽입에 유용한 XbaI 및 HindIII 부위의 위치이다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명은 원하는 폴리펩타이드의 재조합 발현을 위한 개선된 프로모터 및 벡터를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 벡터는 박테리아 숙주, 예컨대 이. 콜라이내에서 재조합 단백질을 발현시키기에 특히 적합하다. 또한, 본 발명의 프로모터 및 벡터를 사용하여 재조합 단백질을 높은 수준으로 발현시키기 위한 발효 프로토콜도 제공된다.

정의

본원에서 요구되는 많은 명명법 및 일반적인 실험 절차는 삼브룩(Sambrook) 등의 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual(제 2 판), 제 1 내지 제 3 권, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에서 찾아볼 수 있다. 이후, 매뉴얼은 "삼브룩 등"으로서 지칭된다.

다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련가에 의해 통상 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 싱글레톤(Singleton) 등의 문헌[Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 제 2 판, John Wiley and Sons(New York)]에는 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적인 사전적 의미가 제공되어 있다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기술되어 있다. 본 발명을 위해, 하기 용어들을 다음과 같이 정의한다.

"핵산"이란 용어는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭하고, 별도의 제한이 없는한 천연적으로 발생하는 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 핵산에 하이브리드 형성되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함한다. 별도의 지시가 없는한, 특정 핵산 서열은 그의 상보적 서열을 포함한다.

"조작될 수 있게 연결된"이란 용어는 핵산 발현 조절 서열(예컨대, 프로모터, 신호 서열 또는 일련의 전사 인자 결합 부위)과 제 2 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 이 때 발현 조절 서열은 제 2 서열에 상응하는 핵산의 전사 및/또는 번역에 영향을 준다.

세포에 대해 사용될 경우 "재조합"이란 용어는 세포가 이중 핵산을 복제하거나, 이중 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현함을 의미한다. 재조합 세포는 세포의 천연(재조합되지 않은) 형태내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현시킬 수 있다. 재조합 세포는 또한 세포의 천연 형태에서 발현되는 유전자를 발현할 수도 있으나, 이때 유전자는 인공적인 수단에 의해 개질되고 세포내로 재도입된다.

본원에서 "이중 서열" 또는 "이중 핵산"이란 외래 공급원(또는 종)으로부터 기원되거나, 또는 동일한 공급원으로부터 기원될 경우 그의 고유 형태로부터 개질된 것이다. 따라서, 프로모터에 조작될 수 있게 연결된 이중 핵산은 프로모터가 유도되는 공급원과는 상이한 공급원으로부터 유도되거나, 또는 동일한 공급원일 경우 그의 고유의 형태로부터 개질된다. 예를 들면, UDP 글루코즈 4-에피머레이즈 유전자 프로모터는 천연 UDP 글루코즈 4-에피머레이즈와는 다른 폴리펩타이드를 코딩하는 구조 유전자에 연결될 수 있다. 이중 서열은, 예컨대 DNA를 제한 효소로 처리하여 프로모터에 조작될 수 있게 연결될 수 있는 DNA 단편을 생성함으로써 개질될 수 있다. 부위-지향된 돌연변이유발 등의 기법 또한 이중 서열을 개질하기 위해 유용하다.

"재조합 발현 카세트" 또는 단순히 "발현 카세트"라 함은 서열과 상용성인 숙주에서 구조 유전자의 발현에 영향을 줄 수 있는 핵산 요소가 있는, 재조합적으로 또는 합성적으로 만들어진 핵산 구축물이다. 발현 카세트는 적어도 프로모터 및 선택적으로 전사 종결 신호를 포함한다. 전형적으로, 재조합 발현 카세트는 전사될 핵산(예컨대, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산) 및 프로모터(예컨대, tac 프로모터 성분 및 gal 프로모터 성분을 함유하는 이중 프로모터)를 포함한다. 발현을 수행하는데 요구되거나 이에 도움을 주는 추가의 인자는 또한 본원에 설명된 바와 같이 사용될 수 있다. 예컨대, 발현 카세트는 숙주 세포로부터 발현된 단백질의 분비를 유도하는 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수도 있다.

"단리된"이란 용어는 어떤 물질이 그의 천연 상태로 발견될 때 그 물질에 통상 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 지칭하기 위한 것이다. 따라서, 단리된 단백질은 예를 들면 동일반응계 환경에서 함께 존재하는 물질들을 포함하지 않는다. 전형적으로, 본 발명의 단리된 단백질은 은 염색된 겔상의 밴드 강도, 또는 순도를 결정하기 위한 다른 방법에 의해 측정하였을 때 약 80% 이상, 통상 약 90% 이상, 바람직하게는 약 95% 이상 순수하다. 본 발명에서, 폴리펩타이드는 돌연변이 세포로부터 정제된다.

UDP 글루코즈-4-에피머레이즈(E.C.5.1.3.2)는 또한 UDP 갈락토즈-4-에피머레이즈 및 포스포리볼로즈 에피머레이즈로 공지되어 있다. 이러한 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

두개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는, 최대로 상응하도록 배열하였을 때 두개의 서열내의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 서열이 동일한 경우 "동일하다"고 한다. 비교를 위한 최적의 서열 배열은 스미스(Smith) 및 워터만(Waterman)의 문헌[Adv. Appl. Math 2: 482(1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 니들맨(Needleman) 및 운쉬(Wunsch)의 문헌[J. Mol. Biol. 48:443(1970)]의 상동성 배열 알고리즘, 퍼슨(pearson) 및 립만(Lipman)의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 85:2444(1988)]의 유사성 방법에 대한 연구, 이러한 알고리즘의 컴퓨터화 임플러멘테이션(위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지의 유전자 컴퓨터 그룹의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA) 또는 조사에 의해서 수행될 수도 있다.

폴리펩타이드에 대해 적용되는 "실질적으로 동일한"이라는 용어는 폴리펩타이드가 약 20 잔기 내지 약 600 잔기, 전형적으로 약 50 내지 약 500 잔기, 보통은 약 250 내지 약 300 잔기의 비교 원도우에 걸쳐서 참고 서열과 비교시, 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상이 동일한 서열을 포

함하는 폴리펩타이드를 의미한다.

핵산 서열에서 적용되고 본원에서 사용되는 바와 같은 "실질적으로 동일한" 또는 "실질적인 서열의 동질성"이라는 용어는, 폴리뉴클레오타이드가 20개 이상의 뉴클레오타이드 위치의 비교 윈도우, 종종 25 내지 50개의 뉴클레오타이드의 비교 윈도우에 걸쳐서, 85% 이상, 바람직하게는 90 내지 95%, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열이 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 서열 동질성의 비율(%)이 참고 서열 비교 윈도우에 걸쳐서 총 20% 이하가 삭제 또는 첨가될 수도 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 기준 서열과 비교함으로써 계산되는 폴리뉴클레오타이드의 특성을 의미한다.

뉴클레오타이드 서열이 실질적으로 동일하다는 다른 지표는 두개의 분자가 까다로운 조건하에서 서로 하이브리드되는 경우이다. 까다로운 조건은 서열에 좌우되지만, 상이한 환경에서는 상이할 것이다. 일반적으로, 까다로운 조건이란, 정해진 이온 세기 및 pH에서 약 5°C 내지 약 20°C, 일반적으로 약 10°C 내지 약 15°C, 특정 서열에 대하여 열적 용융점(T<sub>m</sub>) 미만에서 선택된다. T<sub>m</sub>은 목적 서열의 50%가 완전히 일치되는 프로브에 하이브리드되는 온도(정해진 이온 세기 및 pH 7에서)이다. 전형적으로, 까다로운 조건은 염 농도가 pH에서 약 0.02 몰이고 온도가 약 60°C 이상인 조건이다. 예를 들어, 표준 써던 하이브리드 방법에서, 까다로운 조건은 42°C에서 6X SSC로 초기 세척 및 약 55°C 이상, 전형적으로 약 60°C 및 종종 약 65°C에서 0.2X SSC로 1회 이상의 추가적인 세척을 포함한다.

또한, 뉴클레오타이드 서열은, 이들이 코딩하는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일한 경우 본 발명의 목적을 위해 실질적으로 동일하다. 따라서, 한개의 핵산 서열이 실질적으로 동일한 폴리펩타이드를 제 2 핵산 서열로서 코딩하는 경우, 유전자 코드에 의해 허용되는 묵음(silence) 치환에 때문에 까다로운 조건하에서 하이브리드되지 않는 경우에도, 두개의 핵산 서열은 실질적으로 동일하다(코돈 디제너러시(degeneracy) 및 유전자 코드의 설명에 대해서는 다넬(Darnell) 등의 문헌[Molecular Cell Biology, Second Edition Scientific American Books W. H. Freeman and Company New York 참고]).

단백질의 순도 또는 균질성은 당 분야에 공지되어 있는 다수의 방법, 예를 들어 단백질 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시키고, 착색시킴으로써 가시화함으로써 발휘할 수 있다. 특정 목적을 위해서는 높은 해상도가 필요하고 정제를 위해서는 HPLC 또는 유사한 수단이 사용된다.

본 발명의 수행은 재조합 핵산의 구축 및 형질감염된 박테리아 세포내의 유전자 발현을 포함한다. 이러한 목적을 달성시킬 수 있는 분자의 클로닝 기법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝, 및 재조합 핵산, 예를 들어 발현 벡터의 구축을 위해 적당한 시험관내 증폭 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 다수의 클로닝 시험을 통해 당 분야의 직접적인 숙련자들을 지도하기에 충분한 이러한 기법 및 기구의 예는 버거(Berger) 및 킴멜(Kimmel)의 문헌[Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA(버거)] 및 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement)(Ausubel)]에서 발견할 수 있다.

폴리머레이즈 연쇄 반응(PCR), 리게이즈 연쇄 반응(LCR), Q $\beta$ -리플리케이즈 증폭 및 그밖의 RNA 폴리머레이즈 매개 기법을 포함하는 시험관내 증폭 방법을 통해서 당 분야의 숙련자들을 지도할 수 있는 충분한 프로토콜의 예는 버거, 삼브룩(Sambrook) 및 아슈벨(Ausubel) 및 물리스(Mullis) 등의 미국 특허 제 4,683,202 호(1987); 문헌[PCR Protocols A Guide to Methods and Applications(Innis et al, eds) Academic Press Inc. San Diego, CA(1990)(Innis)]; 문헌[Arnheim & Levinson(October 1, 1990) C&EN 36-47]; 문헌[The Journal of NIH Research (1991) 3, 81-94]; 쿠우(Kwoh) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)]; 구텔리(Guattelli) 등의 문헌[Pro. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)]; 로멜(Lomell) 등의 문헌[J. Clin. Chem 35, 1826(1989)]; 란더그렌(Landegren) 등의 문헌[Science 241, 1077-1080 (1988)]; 반 브런트의 문헌[Biotechnology 8, 291-294(1990)]; 우(Wu) 및 발락크(Wallacc)의 문헌[Gene 4, 560(1989)]; 및 배링거(Barringer) 등의 문헌[Gene 89, 117(1990)]에서 발견된다. 시험관내에서 증폭된 핵산을 클로닝하는 개선된 방법은 발락크 등의 미국 특허 제 5,426,039 호에 기술되어 있다.

본 발명은 박테리아 세포, 예를 들어 이. 콜라이(E. Coli)에서 고도로 발현 되는 재조합 유전자를 위해 유용한 발현 카세트를 제공한다. 또한, 발현 카세트를 포함하는 벡터 뿐만 아니라 목적하는 이종 단백질의 발현을 수득할 수 있는 발현 카세트를 사용하기 위한 발효 프로토콜을 제공한다. 본 발명의 발현 카세트는 목적하는 유전자 생성물, 전형적으로 폴리펩타이드를 코딩하는 이종 핵산에 조작될 수 있게 연결된 이종 프로모터를 함유한다. 이종 프로모터는 갈락토즈 대사에 포함되는 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자들로부터 수득된 프로모터 성분에 연결된 tac 프로모터 성분(예: UDP 갈락토즈 4-에피머레이즈 유전자(galE)를 위한 프로모터)을 포함한다. 이종 tac-gal 프로모터는 어느 한 프로모터가 단독으로 제공하는 것보다 더 많이 발현시킨다. 이종 프로모터는 발현 단계에서 첨가 효과보다 더 큰 상승 효과를 나타낸다.

클로닝된 유전자의 다량의 발현을 수득하기 위해서, 발현 카세트는 그밖의 서열, 예를 들어 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위 및 전사/번역 종결 서열을 포함한다. 구축물을 포함하는 세포의 선택성을 위해서, 1종 이상의 선택적 표지 유전자(예: 항생제-내성 유전자)가 발현 벡터에 편의상 포함된다. 벡터는, 벡터를 원핵세포 숙주, 예를 들어 폭넓은 숙주 범위의 원핵세포의 복제 기원에 클로닝시킬 수 있는 그밖의 서열을 포함할 수도 있다. 당 분야의 숙련자라면 이러한 벡터 성분의 각각이 실질적으로 이들의 작용에 영향을 미치지 않고 개질될 수 있음을 인지할 것이다.

본 발명의 이종 프로모터의 한가지 성분은 tac 프로모터로서, 이것은 lac 및 trp 프로모터의 조합체이다. tac 프로모터를 함유하는 발현 벡터의 예는 pKK223-3(문헌[Brosius and Holy, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81: 6929(1984)] 참고)이고, 이 벡터는 시판중이다(미국 뉴저지 피스카타웨이 소재의 파마시아 바이오택크 인코포레이티드). tac 프로모터의 변종, 예를 들어 trc(문헌[Amann et al., Gene 69: 301(1988)] 참고)은 또한 청구된 이종 프로모터의 제 1 성분으로도 유용하다.

본 발명의 이종 프로모터의 제 2 성분은 갈락토즈의 대사에 포함되어 있는 효소를 코딩하는 유전자로부터 수득된 프로모터이다. 박테리아에서, 이러한 유전자는 종종 서로 매우 인접하게 존재하는 1종 이상의

gal 유전자와 함께 덩어리를 형성한다. 예를 들어, 스트렙토코커스 써모필루스에서, UDP 갈락토즈-4-에피머레이즈(gal E: UDP갈락토즈-4-에피머레이즈로 공지되어 있음) 및 알도즈 1-에피머레이즈(무타로테이즈)(galM)를 코딩하는 유전자는 밀접하게 연결되어 있다(문헌[Poolman et al., J. Bacteriol 172:4037-4047 (1990)] 참고). 이. 콜라이에서, 4개의 gal 유전자(gal E, gal T(UDP 글루코즈-헥소스-1-포스페이트 우리딜 트랜스퍼레이즈), galK(갈락토카이네이즈) 및 galM)가 연결되어 있다(문헌[Bouffard et al., J. Mol. Biol., 244: 269-278(1994)] 참고). 유사하게, 크립시엘라 뉴모니아에의 gal 오페론은 또한 7개의 유전자(순서대로 galE, galT 및 galK)(문헌[Peng et al., J. Biochem. 112: 604-608(1992)] 참고)를 포함하고, 헤모필루스 인플루엔자의 것은 단일 오페론에 순서대로 galT, galK 및 galM을 포함하고(문헌[Maskell et al., Mol. Microbiol. 6: 3051-3063(1992)] 참고), 스트렙토마이세스 리비단스의 gal 오페론은 순서대로 galT, galE, galK를 포함하고(문헌[Adams et al., Bacteriol. 170 203-212(1988)] 참고)을 포함한다. 갈락토즈 오페론은 1종 이상의 프로모터의 제어하에서 발현된다. 예를 들어, 에스. 리비단스 gal 오페론은 두개의 프로모터, 즉 갈락토즈-유도가능하고 galT, galE 및 galK 유전자의 전사를 지시하는 제 1 프로모터(galP1) 및 galE 유전자의 오페론의 바로 상부스트림에만 존재하여 구성적으로 발현되는(문헌[Fornwald et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:2130-2134 (1987)] 참고) 제 2 프로모터를 포함한다. 이. 콜라이 gal 오페론은 또한 유도가능한 프로모터와 더불어 galE 유전자(id)의 업스트림에 위치하는 구성 프로모터를 포함한다.

바람직한 양태에서, 이중 프로모터는 박테리아의 UDP 갈락토즈-4-에피머레이즈(gal E) 유전자를 포함한다. 스트렙토코커스 써모필루스 UDP 갈락토즈-4-에피머레이즈 유전자(폴맨의 문헌[J. Bacteriol 172: 4037-4047 (1990)]에 기술됨)는 본 발명에서 유용한 프로모터를 수득할 수 있는 것으로부터의 유전자의 특정 예이다. 그밖의 미생물의 UDP 글루코즈-4-에피머레이즈 유전자로부터의 프로모터도, 이. 콜라이 또는 전술한 그밖의 박테리아 숙주 세포에서 작용할 수 있다면 사용할 수 있다. UDP 글루코즈 4-에피머레이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 예시적인 미생물로는, 이. 콜라이, 케이 뉴모니아에, 에스. 리비단스 및 이 스테워티 및 살모넬라 및 스트렙토코커스 종을 들 수 있다.

gal 유전자 및 이들의 프로모터의 단리는 당 분야의 숙련자들에게 공지되어 있는 다수의 기법에 의해 수행될 수도 있다. 예를 들어, 예시된 UDP 글루코즈 4-에피머레이즈 유전자 또는 하기에서 기술되어 있는 프로모터로 선택적으로 하이브리드될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브는 그밖의 미생물로부터 분리된 DNA내 목적하는 유전자를 확인하는데 사용될 수 있다. 상동한 유전자를 확인하기 위한 이러한 하이브리드화 기법을 사용하는 것은 당 분야에 공지되어 있기 때문에 추가로 기술할 필요가 없다. 수득된 프로모터는 하기에서 기술되어 있는 예시적인 글루코즈 에피머레이즈 프로모터와 전형적으로 동일하거나 또는 실질적으로 서열상 동일성을 나타낸다.

선택적으로, 목적하는 프로모터 분절의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 문헌에서 기술되어 있는 공지된 기법에 의해 합성할 수 있다(문헌[Carruthers et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 411-418(1982)] 및 문헌[Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 105: 661(1983)] 참고). 그 다음, 상보적인 가닥을 합성하고 적당한 조건하에서 가닥을 함께 어닐링하거나 적당한 프라이머 서열과 함께 DNA 폴리머레이즈를 사용하여 상보적인 가닥을 첨가함으로써 이중 가닥 DNA 분절을 수득할 수 있다.

본 발명의 이중 프로모터를 포함하는 tac 및 gal 프로모터는 야생형 박테리아 세포내의 상응하는 프로모터와 동일하거나, 또는 요구되는 바와 같이, 예를 들어 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환과 같이 개질될 수 있다. 이러한 개질은 프로모터 작용을 위해서 필요한 프로모터 서열의 부분을 유지시킬 것이다. 예를 들어 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 프로모터를 위한 -10 및 -35 컨센서스 서열(문헌[Graves et al., J. Biol. Chem. 261:11409-11415(1986); Singer and Berg, Genes & Genoms, University Science Books, Mill Valley, CA, 1991, pp. 140-143] 참고)는 발현하는데 요구되는 정도는 유지될 것이다. 이. 콜라이내 프로모터의 적당한 작용을 위해서 중요한 뉴클레오타이드는 예를 들어 문헌[Singer and Berg, Genes & Genoms, University Science Books, Mill Valley, CA, 1991, pp. 143]에 제시되어 있다. 프로모터 작용에 필수적이지는 않는 프로모터 서열의 부분은 목적하는 바와 같이, 예를 들어 프로모터 부분 내부 또는 인접 부위에 제한 부위를 삽입시킴으로써 클로닝이 용이하도록 개질할 수 있다.

tac 및 gal 프로모터 성분은 둘다 일반적으로 cAMP 수용체 단백질(crp 유전자의 생성물인 CRP)에 대한 결합 부위를 갖는다. cAMP는 탄소 공급원의 이용가능성에 대한 신호로서 널리 알려져 있으며, 그 수준은 우수한 탄소 공급원(예컨대, 글루코즈)상에서의 성장보다 높은 cAMP 수준을 유도해내는 열악한 탄소 공급원(예컨대, 프럭토즈, 글리세롤, 아세테이트)상에서의 세포 성장에 의해 증명되는 바와 같이 세포의 에너지 상태와 반비례 관계에 있다. cAMP는 CRP로의 결합에 의해 유전자 발현을 조절한다. 이러한 높은 친화성 결합은 이량체 착물에서 형태 변화를 발생시키며, 이량체 착물은 RNA 폴리머레이즈의 결합 부위의 특정한 DNA 부위 업스트림에 결합될 수 있다. 적어도 gal 오페론의 경우에는 RNA 폴리머레이즈의 E $\sigma$ <sup>70</sup> 형태의 개시 결합을 촉진시키므로써(K $\sigma$ 을 증가시킴으로써) 전사가 활성화된다.

본 발명의 이중 프로모터의 tac 프로모터 성분은 일반적으로 gal 프로모터의 업스트림에 위치한다. 일반적으로 2개의 프로모터 성분은 약 0.1 내지 2kb의 DNA에 의해 분리된다. 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 1.5kb가 2개의 프로모터 성분을 분리시킨다. 가장 바람직한 양태에서, tac 프로모터 성분은 gal 프로모터 성분의 약 1kb 업스트림에 위치한다. DNA가 유전자 발현을 방해하는 서열, 예컨대 전사 종결체를 함유하지 않는 한 2개의 프로모터 성분을 분리시키는 DNA의 공급원은 그다지 중요하지 않다. 예컨대, 한 양태에서 gal 프로모터 성분의 본래 5' 인접 영역으로부터 얻은 DNA에 의해 tac 프로모터 성분이 gal 프로모터 성분으로부터 분리된다. 바람직한 양태에서, 에스. 써모필루스(S. thermophilus) galE 유전자의 5' 인접 영역으로부터 약 1kb의 DNA가 gal 프로모터 성분으로부터 tac 프로모터 성분을 분리시킨다.

바람직한 이중 프로모터의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 1로 나타낸다. 도시된 바와 같이, 이중 프로모터는 pPHOX2 발현 벡터의 XbaI 부위내로 삽입되어 업스트림의 XbaI 부위를 파괴시킨다. 서열의 뉴클레오타이드 1-146 및 1490-1561은 pPHOX2로부터 비롯된다. tac 프로모터의 -35 및 -10 컨센서스 서열은 각각 뉴클레오타이드 362-367 및 384-389에 있다. galE 프로모터 컨센서스 서열은 뉴클레오타이드 1438-1443(-35) 및 1462-1467(-10)에 있다. 리보솜 결합 부위(RBS)는 뉴클레오타이드 1483-1488에서 발견된다. 이중 프로모터의 다운스트림에 발현된 유전자를 용이하게 삽입시키기 위하여, RBS는 XbaI 제

한 부위 이후에 오고 HindIII 부위는 XbaI 부위의 3'으로 pPHOX2 서열에서 존재한다.

또한, 본 발명의 벡터는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 독립적으로 복제되도록 할 수 있는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 일반적으로, 이 서열은 숙주 크로모솜 DNA에 상관없이 벡터가 복제되도록 할 수 있으며 복제의 기원 또는 자동적으로 복제되는 서열을 포함한다. 이러한 서열은 각종 박테리아에 대해 널리 공지되어 있다. 예컨대, 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기원은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하다.

또한, 원하는 구축물을 함유한 박테리아 세포의 선별을 가능케하는 선택적 표지 유전자를 포함한다. 이러한 유전자는 선택적 배양 배지에서 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 생장에 필요한 단백질을 코딩한다. 선택 유전자를 함유한 벡터에 의해 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존하지 않는다. 전형적인 선택 유전자는 암피실린, 네오마이신, 카나마이신, 클로르암페니콜 또는 테트라사이클린과 같은 항생물질 또는 기타 독소에 대한 내성을 제공하는 단백질을 코딩한다. 또는, 선택성 표지는 보조적 영양 결핍을 보충하거나 또는 복합 배지로부터 입수할 수 없는 중요한 영양물을 공급하는 단백질, 예컨대 바실러스의 경우 D-알라닌 라세미아제를 코딩할 수 있다. 다수의 선택성 표지가 당해 분야의 숙련자들에게 공지되어 있으며, 예컨대 전술한 삼브룩 등의 문헌에 기재되어 있다. 원하는 폴리펩타이드를 발현시키는 이중 tac-lac 프로모터에 사용되기 위한 바람직한 선택적 표지는 카나마이신 내성 표지이다(바이어라(Viera)와 메싱(Messing)의 문헌[Gene 19:259(1982)]). 암피실린은 배양 배지에서  $\beta$ -락타메이즈에 의해 신속하게 분해되어서 선택 압력을 제거하고 벡터를 함유하지 않는 세포와 함께 배양물이 과성장되도록 하므로, 카나마이신을 선택하는 것이 암피실린을 선택하는 것보다 유리하다.

전술한 성분중 하나 이상을 사용한 적합한 벡터의 구축은 전술한 문헌에 기술된 바와 같은 표준 연결법을 사용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 절단하고 재단하고 원하는 형태로 재연결하여서 필요한 플라스미드를 발생시킨다. 구축된 플라스미드중 정확한 서열을 확인하기 위하여 제한 엔도뉴클레아제 분해 및/또는 공지된 방법에 따른 서열화와 같은 표준 기법에 의해 플라스미드를 분석한다.

본 발명의 벡터를 갖는 다수의 박테리아 숙주 세포를 사용할 수 있다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리치아(Escherichia), 엔테로박터(Enterobacter), 아조토박터(Azotobacter), 에르위니아(Erwinia), 바실러스(Bacillus), 슈도모나스(Pseudomonas), 클렙실리아(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 세라티아(Serratia), 시겔라(Shigella), 리조비아(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 및 파라코커스(Paracoccus)를 포함한다. 적합한 이.콜라이 숙주는 JM101, RP1, DH5 $\alpha$  및 기타의 균주를 포함한다. 이들 예는 제한이 아니라 예시이다. 사용된 숙주 세포에 따라, 이러한 세포에 적절한 표준 기법을 이용하여 형질전환이 실시된다. 적합한 기법은 염화칼슘을 비롯한 칼슘 처리, 폴리에틸렌 글리콜 또는 전기천공을 포함한다.

본 발명은 또한 원하는 폴리펩타이드의 고도의 발현을 얻기 위하여 이중 tac-gal 프로모터를 사용하는 방법을 제공한다. 숙주 세포는 이중 프로모터 발현 카세트를 함유하는 벡터에 의해 형질전환되며 원하는 폴리펩타이드의 발현에 적절한 조건하의 배양 배지에서 배양된다. 세포는 교반 플라스크 또는 그 밖의 용기에서 성장할 수 있으나, 폴리펩타이드를 대규모로 제조하는 경우에는 발효기에서의 성장이 바람직하다. 최대 발현을 얻기 위하여, 원하는 폴리펩타이드의 발현을 증가시키기 위하여 성장 사이클중 적절한 시간에 갈락토즈를 영양 배지에 첨가한다. 예컨대, 숙주 세포의 성장은 탄소 공급원으로서 프럭토즈(0.25%의 최종 농도)를 함유한 영양 배지에서 개시될 수 있으며, 세포내 cAMP(아데노신 3',5'-사이클릭 모노포스페이트) 농도를 증가시키는 그 밖의 당(예컨대, 글리세롤, 아세테이트)이 또한 탄소 공급원으로서 사용될 수 있다. 배양을 개시한 지 약 5 내지 6시간 후에 또는 세포가 적절한 농도(약 3 내지 6 A<sub>600</sub>)에 도달한 후에, 프럭토즈 및 갈락토즈의 용액(최종 농도는 프럭토즈의 경우 3%, 갈락토즈의 경우 0.6%)을 배지(발효기의 경우에는 페드-배치 모드)에 첨가한다. 갈락토즈는 본 발명의 이중 tac-gal 프로모터 발현 카세트로부터 발현의 정도를 증가시킨다. 세포 성장에 의해 배양물의 밀도가 커짐에 따라, 프럭토즈/갈락토즈 용액의 공급 속도는 성장 사이클동안 (단계적으로 또는 신속하게) 증가할 수 있다. 바람직하게는, 프럭토즈/갈락토즈 용액을 성장 사이클의 마지막 내내 공급한다.

본 발명의 이중 프로모터는 매우 높은 수율의 원하는 폴리펩타이드 또는 단백질 발현에 유용하다. 폴리펩타이드는 박테리아 숙주 세포와 동종일 수 있거나, 바람직하게는 숙주 세포와 이종이다. 예컨대, 이중 프로모터를 사용하여 매우 높은 정도로 효모, 진균, 포유동물 및 식물의 단백질을 발현시킬 수 있다. 청구된 이중 프로모터를 사용하여 생성된 다수의 폴리펩타이드는 효소적 활성을 갖는다. 활성에 대해 글리코실화 또는 그 밖의 진핵세포-특이적 가공을 필요로 하는 일부 폴리펩타이드는 박테리아 숙주 세포에서 활성 형태로 생성되지 않을 수 있으나, 이러한 경우에도 불활성 폴리펩타이드는 예컨대, 항체 유도 면역원, 분자량 표지 등으로서의 용도를 갖는다. 이중 프로모터를 사용하여 발현시킬 수 있는 예시적인 박테리아 폴리펩타이드는  $\beta$ -락타메이즈, 탄수화물 물질 대사 효소, 알칼리 포스파테이즈, 제한 효소, DNA 및 RNA 폴리머레이즈, 라이게이즈, 카이네이즈, 엔도- 및 엑소뉴클레이즈 등을 포함한다. 예시적인 진균성 폴리펩타이드는 리그니네이즈, 프로티에이즈, 글리코실트랜스퍼레이즈 등을 포함한다. 청구된 이중 프로모터를 사용하여 박테리아 숙주 세포에서 발현시킬 수 있는 포유동물 폴리펩타이드의 예는 인슐린, 성장 호르몬(인간 성장 호르몬 및 소의 성장 호르몬을 포함), 조직형 플라스미노겐 활성화제(t-PA), 레닌, 응혈 인자(예컨대, VII 인자 및 IX 인자), 보체인자, 트롬빈, 소혈 성장 인자, 혈청 알부민, 호르몬 또는 성장 인자의 수용체, 인터루킨, 콜로니 자극 인자, T-세포 수용체, MHC-폴리펩타이드, 바이러스 항원, 글리코실트랜스퍼레이즈 등을 포함한다. 본 발명의 이중 프로모터는 이중 프로모터에 조작될 수 있게 연결된 임의의 핵산 발현 단위를 전사시키는데 유용하므로, 이러한 효소 리스트는 배타적인 것이 아니며 예시를 위한 것이다. 이러한 발현 단위는 폴리펩타이드를 코딩시키는 것 뿐만 아니라 원하는 생성물이 핵산인 것, 예컨대 안티센스 RNA를 포함한다.

벡터는 탄수화물의 효소적 합성에 유용한 효소를 발현시키는데 특히 유용하다. 탄수화물의 효소적 합성의 사용은 효소에 의해 제공되는 실제로 완전한 입체선택성 및 연결 선택성으로 인해 화학적 방법보다 유리하다(이토(Ito) 등의 문헌[Pure Appl. Chem., 65:753(1993); 미국 특허 제 5,352,670호 및 미국 특허 제 5,374,541호]). 다수의 글리코실트랜스퍼레이즈 사이클(예컨대, 시알릴트랜스퍼레이즈 사이클, 갈락토실트랜스퍼레이즈 사이클 및 푸코실트랜스퍼레이즈 사이클)가 미국 특허 제 5,374,541호 및 제 WO

9425615 A호에 기재되어 있다. 그 밖의 글리코실트랜스퍼레이스 사이클이 이치가와(Ichigawa) 등의 문헌 [J. Am. Chem. Soc. 114:9283 (1992)], 왕(Wong) 등의 문헌[J. Org. Chem. 57:4343 (1992)], 드루카(DeLuca) 등의 문헌[J. Am. Chem. Soc. 117:5869-5870 (1995)] 및 이치가와 등의 문헌[Carbohydrates and Carbohydrate Polymers. Yaltami ed., ATL Press, 1993]에 기재되어 있다. 또한, 청구된 이중 프로모터를 사용하여 발현시킬 수 있는 탄수화물의 합성에 유용한 효소의 예는 또한 CMP-시알산 신테타이스, UDP-글루코즈 피로포스포릴레이스, 아데닐레이트 카이네이스, 피루베이트 카이네이스, 시알산 알돌레이스, UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이스, 미오카이네이스, 갈락토실트랜스퍼레이스, 네이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*)의 *los* 위치(예컨대, 국제 특허 제 WO 96/10086호를 참조한다)에 의해 코딩되는 글리코실트랜스퍼레이스, 및 N-아세틸 글루코사미닐트랜스퍼레이스를 포함한다. 이들 문헌에 기재되고 이러한 사이클에 사용된 임의의 효소가 본 발명의 벡터를 사용하여 재조합 발현될 수 있다.

청구된 이중 *tac-gal* 프로모터를 사용하여 필요한 효소를 생성시킬 수 있는 글리코실트랜스퍼레이스 사이클의 전형적인 예는 갈락토실트랜스퍼레이스 사이클이다. 갈락토실트랜스퍼레이스 사이클의 반응 배지는 바람직하게는 갈락토실트랜스퍼레이스, 공여체 기질, 수용체 당 및 이가 금속 양이온 이외에, 수용체 당 1몰당 1몰이상의 글루코즈-1-포스포릴레이스, 포스페이트 공여체, 포스페이트 공여체로부터 뉴클레오사이드 디포스페이트로 포스페이트를 이동시킬 수 있는 카이네이스, 및 UTP와 글루코즈-1-포스페이트 및 촉매량의 UDP 및 UDP-글루코즈를 형성할 수 있는 피로포스포릴레이스 및 UDP-갈락토즈-4-에피머레이스를 포함하는 공여체 기질 재순환 시스템을 함유한다. 갈락토실트랜스퍼레이스가 이 사이클에서 주요한 효소이다. 예시적인 갈락토실트랜스퍼레이스는  $\beta(1,3)$  갈락토실트랜스퍼레이스,  $\beta(1,4)$  갈락토실트랜스퍼레이스(E.C.No.2.4.1.90, 예컨대, 나리마츠(Narimatsu) 등의 문헌[Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83:4720-4724(1986)]을 참고한다),  $\alpha(1,3)$  갈락토실트랜스퍼레이스(E.C.No.2.4.1.151, 다코브스키(Dabkowski) 등의 문헌[Transplant Proc. 25:2921 (1993)]과 야마모토(Yamamoto) 등의 문헌[Nature 345:229-233(1990)]) 및  $\alpha(1,4)$  갈락토실트랜스퍼레이스(E.C.No.2.4.1.38)를 포함한다. 갈락토실트랜스퍼레이스 사이클에 사용되는 다른 효소는 카이네이스(예컨대, 피루베이트 카이네이스), 에피머레이스(예컨대, UDP-갈락토즈-4-에피머레이스) 및 피로포스포릴레이스(예컨대, 글루코즈 피로포스포릴레이스)를 포함한다. 이들 효소 모두를 코딩하는 DNA는 본 발명의 벡터를 이용하여 발현될 수 있다.

몇몇 양태에서, 관심이 있는 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA는 다른 폴리펩타이드, 바람직하게는 성숙된 폴리펩타이드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드 또는 신호 서열과 함께 융합체로서 발현될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분이거나 또는 벡터에 삽입되는 폴리펩타이드 DNA의 일부일 수 있다. 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되어 처리된(즉, 신호 펩티다이스에 의해 절단된) 것이어야 한다. 천연 폴리펩타이드 신호 서열을 인식 및 처리하지 않은 박테리아 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 박테리아 신호 서열로 치환된다. 신호 서열은 원하는 단백질을 세포로부터 세포외 배지로 분비시키므로써 원하는 폴리펩타이드의 정제를 촉진시킬 수 있다.

원핵 세포에 의해 생성되는 폴리펩타이드는 적절히 절첩될 필요는 없다. 이.콜라이로부터의 정제 동안, 발현된 폴리펩타이드는 처음에 변성된 후에 재변성될 수 있다. 이는 구아니딘 HCl과 같은 차오토픽(chaotropic)제 중에서 박테리아에 의해 생성된 단백질을 용해시킨 후 모든 시스템 잔기를  $\beta$ -머캅타에 탄올과 같은 환원제로 환원시키므로써 이루어질 수 있다. 이어서, 느린 투석 또는 겔 여과에 의해 폴리펩타이드를 재변성시킨다. 미국 특허 제 4,511,503호를 참조한다.

발현된 폴리펩타이드의 검출은 방사 면역 분석 시험, 웨스턴 블롯팅 기법, 면역 침전 또는 활성 분석과 같은 당해 분야에서 공지된 방법에 의해 이루어진다. 이.콜라이로부터의 정제는 미국 특허 제 4,511,503호에 기재된 하기의 절차에 의해 실시될 수 있다.

## 실시예

하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해서 제공된 것으로, 본 발명을 제한하고자함이 아니다.

### 실시예 1

#### pTGK의 구축

#### pPHOX2/galE의 구축

플라스미드 pPHOX2(도 1)는 알칼리 포스파테이스 유전자(*phoA*)의 포스페이트-결합 유도성 프로모터(promoter)를 포함하는 것으로, 이 플라스미드는 포스페이트 농도가 극히 낮을 때 상기 프로모터의 조절 하에 유전자의 전사가 증가되는 것이다. 이 플라스미드는 국제 특허 공개공보 제 W094/12636 호에 기술된 바와 같은 *phoA* 프로모터 및 *rrnB* 리보솜 터미네이터(terminator, 파마시아 바이오텍(Pharmacia Biotech)의 pKK223-3으로부터 입수된 것)를 포함한다. 스트렙토코코스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*, 풀만(Poolman) 등의 문헌[J. Bacteriol., 172, 4037-4047, 1990] 참조)의 UDP-갈락토즈-4-에피머레이스(*epimerase*) 유전자(*galE*)에서의 갈락토즈-유도성 프로모터 및 *tac* 프로모터를 pPHOX2에 삽입시켰다.

발현 플라스미드 pTGK를 다음과 같이 구축하였다. 우선, 플라스미드 pHP1/*tac*(풀만 등의 문헌[J. Bacteriol., 172, 4037-4047, 1990]에 기술된 것)의 단편을 5' 말단 및 3' 말단에서 Pfu 폴리머레이스 및 XbaI 프라이머(primer)를 사용하여 폴리머레이스 연쇄 반응(PCR)으로 증폭시켰다. 증폭된 단편은 스트렙토코코스 써모필러스(풀만 등의 상기 문헌 참조)의 UDP-갈락토즈-4-에피머레이스 유전자(*galE*)로부터 갈락토즈-유도성 프로모터의 업스트림(upstream) 방향으로 약 1kb의 *tac* 프로모터를 포함하였다. 5' 프라이머(5'-GCTCTAGACGATCCGTCGCGTA-3'; 서열번호: 5)를 pHP1/*tac*의 프로모터에서의 pBR322 벡터 영역 업스트림에 하이브리드를 형성하도록 고안하였고, 3' 프라이머(5'-ATTCTAGACCTCCTTTCTCAGAAAAACAATT-3'; 서열번호: 6)를 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 리보솜 결합 부위를 포함하는 *galE* 프로모터의 연속된 영역에 하이브리드를 형성하도록 고안하였다. *galE* 리보솜 결합 부위와 재조합 유전자의 개시 코돈(codon) 사이의 간격으로 최적으로 유지되었다(도 2). *tac* 프로모터 및 *galE* 프로모터를 둘다 포함하는 상기 증폭된 1.3kb의 DNA 단편을 XbaI로 분해하고, 알칼리 포스파테이스 유전자(*phoA*, 국제 특허 공개공보 제 WO

94/12636 호에 기술된 것)의 포스페이트-결핍 유도성 프로모터 및 *rrnB* 리보솜 터미네이터(파마샤 바이오 테크의 pK223-3으로부터 입수된 것)을 포함하는 *Xba*I-분해된 pPHOX2(도 1)에 삽입시켰다. 이 중 *tac-galE* 프로모터의 위치를 *Bam*HI로 분해하여 확인하였다. 생성된 플라스미드를 pPHOX2/*galE*로 명명하였다.

#### 카나마이신 내성 유전자의 첨가

pPHOX2는  $\beta$ -락타메이즈를 코딩하는 암피실린-내성 유전자를 가진다. 암피실린은 플라스미드를 유지시키기 위해서 배양액에 첨가되지만,  $\beta$ -락타메이즈에 의해 즉시 분해되어 그 효력이 상실된다. 재조합 단백질의 제조에 대한 강력한 선택적 압력하에 존재하는 세포(예를 들어, CMP-시알산 신세테이즈와 함께 존재하는 세포)에서는, 플라스미드가 없는 세포가 대량 증식할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 플라스미드를 카나마이신 내성 유전자( $Kan^r$ )를 포함하도록 재조합하는데, 이것은 카나마이신 내성 유전자가 코딩하는 단백질은 멤브레인(membrane) 전송 시스템에서 작용하기 때문에 더 강력한 선별성을 제공하기 때문이다.

플라스미드 pUC4K(비에이라(Vieira)와 메싱(Messing)의 문헌[Gene, 19, 259, 1982] 참조)으로부터 1.3kb의  $Kan^r$  유전자를 *Eco*RI로 분해하여, pPHOX2/*galE* 플라스미드의 단일 *Eco*RI 부위에 삽입시켰다. 카나마이신에 대한 내성으로 콜로니(colony)를 선별하였다. 생성된 플라스미드를 pPHOX2/*galE*/ $Kan^r$ (도 3)으로 명명하였다.

#### 클로닝(cloning)의 편의를 위한 벡터 개발

재조합 유전자는 *Xba*I 및 *Hind*III의 두 가지 제한효소 부위를 사용하여 삽입되기 때문에, 클로닝할 때 pPHOX2/*galE*/ $Kan^r$  플라스미드에 존재하는 *Xba*I 및 *Hind*III의 다중 제한효소 부위가 다소 문제가 되었다.

따라서, *galE* 프로모터 단편의 5' 말단에 존재하는 *Xba*I 부위와  $Kan^r$  유전자에 존재하는 *Hind*III 부위를 제거하였다. *Xba*I 부위를 제거하기 위해, pPHOX2/*galE* 플라스미드를 *Xba*I로 부분 분해시킨 후, 선형화된 플라스미드를 분리하였다. 절단된 *Xba*I 부위를 클레뉴(Klenow) 폴리머레이즈로 채워넣어 블런트(blunt) 단편을 제조하고 다시 연결시켰다. 제한효소 맵핑(mapping)에 의해 콜로니를 탐색하여 5' *Xba*I 부위가 제거된 플라스미드(플라스미드 pPHOX2/*galE* $\Delta$ *Xba*)를 갖는 콜로니를 확인하였다.

제한효소 부위를 제거하기 위해, *Hind*III의 AAG 코돈(AAGCTT)은 변형되지만 동일한 아미노산 코돈(라이신, AAA)은 유지하도록 올리고뉴클레오타이드(ATGCATAAACTTTTGGCATTCTCAC;  $\Delta$ H3(서열번호: 7))를 설계하였다.

첫번째 PCR 반응은  $\Delta$ H3 올리고뉴클레오타이드와 M13 진행방향 프라이머(뉴 잉글랜드 바이오랩)를 사용하여 플라스미드 pUC4K로부터 DNA를 증폭시켜 620bp 분절을 생성시켰다. 두번째 PCR 반응은 M13 역방향 프라이머(뉴 잉글랜드 바이오랩)와 첫번째 PCR에서의 분절을 사용하여 pUC4K로부터 DNA를 증폭시켜 1.3kb 분절을 생성시켰다. 진행방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 PCR에 의해서 두번째 분절을 추가로 증폭시켰다. 이러한 분절을 *Eco*RI(및 비재조합체를 절단하기 위한 *Hind*III)으로 분해하고 플라스미드 pPHOX2/*galE* $\Delta$ *Xba*의 부분적인 *Eco*RI 분해물의 단리된 선형 분절에 연결하였다. *Nhe*I/*Hind*III 분해를 *Eco*RI 분절의 정확한 삽입 위치를 결정하기 위해 사용하였다. pTGK(도 4)라고 하는 이러한 벡터는 1996년 5월 22일 미국 종균 보존소(American Type Culture Collection)에 기탁되었고 수탁 번호 제 98059로 명명되었다.

#### pTGK 벡터의 개질

pTGK 벡터에 대한 수많은 개질이 수행될 수 있다. 예를 들면 블런트 PCR 분절의 클로닝 및 발현을 촉진하도록 벡터를 개질시킬 수 있다. 이를 위하여, pTGK를 *Xba*I로 분해하고 말단을 클레뉴(Klenow) 폴리머레이즈로 채운다. CCCGGG 올리고뉴클레오타이드를 블런트-말단에 연결하여 플라스미드를 재환상화시키고, 이후에 비재조합체를 제거하기 위해 *Xba*I로 분해한다. CCC와 GGG 사이에서 블런트-말단 절단을 수행하는 *Srf*I 또는 *Sma*I를 이용하여 분해하면, PCR 또는 다른 방법으로 수득된 블런트-말단 분절에 연결될 수 있는 블런트-말단을 생성하게 된다. ATG의 개시 코돈으로 시작하는 PCG 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용함으로써, 개시 코돈과 리보솜 결합 부위 사이의 적정 간격이 유지될 수 있다(도 5). 이러한 벡터를 pTGKS라고 한다.

#### 실시예 2

##### 이중 *tac-gal* 프로모터에서의 발현 분석

본 실험은 *tac* 프로모터 뿐만 아니라 유전자의 천연 프로모터를 함유하는 pHP1을 사용한 이. 콜라이에서, 에스. 써모필러스(*S. thermophilus*) UDP-*gal*-4-에피머레이즈 유전자(*galE*)의 발현을 유도하는 갈락토즈의 능력을 시험하였다. pHP1을 함유하는 이. 콜라이 균주 JM101을 하기에 나타낸 바와 같이 보충되는 LB 또는 M9 매질에서 방배 성장시켰다. 모든 배양물을 진탕하면서 37°C에서 방배 배양하여 약 2 내지 3의  $A_{600}$ 과 같은 세포 밀도를 수득하였다. 고정상에 이르렀을 때 세포를 수확하여 프랜치(French) 가압 세포 처리법으로 분쇄하였다. UDP-갈락토즈-4-에피머레이즈 활성도를 칼커(Kalckar) 등의 문헌[Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 45: 1776(1959)]에 개시된 바와 같이 분석시험하였다. 단위를 분당 사용된 기질의  $\mu$ 몰로서 정의한다.

표 1에 나타낸 본 실험의 결과는 이. 콜라이에서의 갈락토즈가 에피머레이즈의 발현을 유도함을 증명하였다.

[표 1]

| 배양 매질                    | U/L, 에피머레이즈 |
|--------------------------|-------------|
| LB                       | 850         |
| LB, 10mM 갈락토즈            | 2000        |
| M9, 0.5% 프럭토즈, 1mM 갈락토즈  | 2200        |
| M9, 0.5% 프럭토즈, 10mM 갈락토즈 | 3120        |
| M9, 1% 프럭토즈, 10mM 갈락토즈   | 3340        |
| M9, 1.2% 글리세롤, 10mM 갈락토즈 | 2860        |

천연 galE 유전자 이외의 유전자의 발현이 이중 프로모터의 조절하에서 갈락토스에 의해 유도될 수 있는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 GlcNAc 트랜스퍼레이즈를 코딩한 유전자를 pTGK로 삽입하였다. 이러한 벡터를 이. 콜라이 JM101로 형질전환시키고, 프럭토즈, 프럭토즈와 갈락토즈, 또는 글루코스를 탄소원으로 하여 함유하는 M9 매질에서 성장시켰다. 표 2에 나타난 바와 같이, 발현 수준은 GlcNAc에 대하여 매우 낮았고, 나타난 높은 실험적 오차는 갈락토즈 유도성에 대하여 자료를 결론 지을 수 없게 하였다.

[표 2]

| pTGK/GlcNAcT  | U/L, GlcNAcT |
|---------------|--------------|
| M9, 프럭토즈      | 15           |
| M9, 프럭토즈+갈락토즈 | 16           |
| M9, 글루코즈      | 12           |

tac 프로모터가 발현 수준에 큰 영향을 미친다

이중 tac-gal 프로모터의 조절하에 tac 프로모터가 유전자 발현에 기여하는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 GlcNAc 트랜스퍼레이즈 또는 Gal 트랜스퍼레이즈[고스클리치(Gotschlich, E. C.), J. Exp. Med. 180: 2181-2190(1994)]를 발현하는 구축물로부터 tac 프로모터를 제거하였다. galE 프로모터는 모든 구축물에 존재하였다. 균주를 M9+프럭토즈+갈락토즈에서 성장시키고 GlcNAc 또는 Gal 트랜스퍼레이즈 활성을 분석시험하였다. 표 3에 나타난 결과는 tac 프로모터가 발현 수준에 크게 기여함을 증명하였다.

[표 3]

|  | U/L |
|--|-----|
| A. GlcNAcT 구축물                                   |     |
| pTGK(P <sub>tac</sub> , P <sub>galE</sub> , Kan) | 16  |
| pGK(P <sub>galE</sub> , Kan)                     | 0.5 |
| B. GalT 구축물                                      |     |
| pTGK(P <sub>tac</sub> , P <sub>galE</sub> , Kan) | 7   |
| pGK(P <sub>galE</sub> , Kan)                     | 3   |

피루베이트 카이네이즈 발현 수준에 대한 galE 및 tac 프로모터의 영향

상기 표 2에서의 상대적으로 낮은 발현 수준 때문에 이중 프로모터의 조절하에서 이중 유전자 발현에 대한 갈락토즈 유도성으로서 통계적으로 의미있는 결론을 짓지 못하므로, 더욱 고도로 발현된 효소(피루베이트 카이네이즈)를 하기 실험을 위해 선택하였다. 피루베이트 카이네이즈 구축물을 함유하는 pTGK 플라스미드로부터 galE 프로모터를 제거하여, 플라스미드에 오직 tac 프로모터만 남겼다. 대조군으로서, 동일하지만 프로모터를 둘 모두 포함하는 구축물을 사용하였다. 리보솜 결합 부위 및 간격은 양쪽 구축물에서 동일하였다. 표 4에 나타난 이러한 시험의 결과는 galE 프로모터 영역의 존재가 피루베이트 카이네이즈의 발현에 큰 영향을 미침을 증명하였다. 흥미롭게도, 갈락토즈 유도가 galE 프로모터가 없는 것을 포함하여 양쪽 구축물 모두에서 관찰되었다.

[표 4]

|                           | U/L, 피루베이트 카이네이즈 |                       |
|---------------------------|------------------|-----------------------|
|                           | P <sub>tac</sub> | P <sub>tac,galE</sub> |
| M9, 0.5% 프럭토즈             | 1202             | 3167                  |
| M9, 0.5% 프럭토즈 + 10mM 갈락토즈 | 1902             | 4377                  |
| M9, 0.5% 글루코즈             | 1208             | 2625                  |

다른 실험에서, tac 프로모터를 피루베이트 카이네이즈 구축물로부터 제거하였다. 이러한 구축물을 이. 콜라이로 형질전환시키고 프로모터 둘모두 또는 tac 프로모터만을 함유하는 균주와 비교하였다. 표 5로 나타내는 이러한 실험의 결과는 tac 및 galE 프로모터의 조합에 의한 기여가 그들의 개별적인 활성의 합보다 크다는 것을 증명한다. 갈락토즈의 첨가는 발현 수준을 증가시킨다.

[표 5]

|                           | U/L, 피루베이트 카이네이즈  |                  |                       |
|---------------------------|-------------------|------------------|-----------------------|
|                           | P <sub>galE</sub> | P <sub>tac</sub> | P <sub>tac,galE</sub> |
| M9, 0.5% 프럭토즈             | 403               | 1420             | 3181                  |
| M9, 0.5% 프럭토즈 + 10mM 갈락토즈 | 429               | 1839             | 3635                  |

### 실시예 3

#### 재조합 유전자의 발현

이. 콜라이 발현 벡터 pTGK는, 이. 콜라이로부터의 CMP-시알산 신세테이즈, 바실러스 섭탈리스(*Bacillus subtilis*)로부터의 UDP-글루코즈 피로포스포릴레이즈, 이. 콜라이로부터의 아데닐레이트 카이네이즈, 바실러스 스테아로써모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*)로부터의 피루베이트 카이네이즈, 이. 콜라이로부터의 시알산 알돌레이즈, 이. 콜라이로부터의 UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이즈, 토끼의 근육 미오카이네이즈, 네이세리아(*Neisseria*)의  $\beta$ 1,4-갈락토실트랜스퍼레이즈, 및 네이세리아의 N-아세틸 글루코사미닐트랜스퍼레이즈를 포함하는 다양한 재조합 단백질을 제조하기 위해 사용되었다. 이러한 모든 단백질에 대하여 고수율을 수득하였다. 예를 들면, 세포 kg당 10,000,000U의 토끼의 근육 미오카이네이즈가 제조되었고, pTGK로부터 세포 kg당 3,500,000U의 피루베이트 카이네이즈가 발현되었다.

### 실시예 4

#### pTGK를 사용한 박테리아의 발효 프로토콜

#### 배지의 제조

- 2리터들이 비이커에 하기 성분을 칭량하여 넣는다:

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 60g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 시그마(Sigma) S0876              |
| 30g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 시그마 P5379                     |
| 5g NaCl   | 제이 티 베이커(J. T. Baker) 3628-05 |
| 50g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 제이 티 베이커 0792R                |

- 2리터의 증류수를 첨가하고 혼합하여 용해시킨다.
- 2리터들이 비이커에 하기 성분을 칭량하여 넣는다:

|              |                              |
|--------------|------------------------------|
| 120g NZ아민 A  | 퀘스트 인터내셔널(Quest Intl.)       |
| 50g 효모 추출물   | 딕코(Difco)                    |
| 2ml 마주(Mazu) | 피피지 케미칼(PPG Chemical) DF 204 |

- 1리터의 증류수를 첨가하고 혼합하여 용해시킨다.
- 단계 2 내지 4의 용액을 발효기(예를 들면, 뉴 브런스윅 바이오플로우(New Brunswick BioFlow) IV)에 첨가한다. 증류수로 10리터가 되게한다.
- 증기 멸균을 사용하여 60분동안 발효기를 오토클레이브한다. 15분동안 포트를 멸균한다.

7. 50% 용액이 되도록 프럭토스를 칭량한다:

|           |           |
|-----------|-----------|
| 400g 프럭토스 | 시그마 F0127 |
|-----------|-----------|

8. 증류수로 800ml가 되게하고 혼합한다. 1리터들이 병으로 옮긴다.

9. 20% 용액이 되도록 갈락토스를 칭량한다:

|           |           |
|-----------|-----------|
| 100g 갈락토스 | 시그마 G0625 |
|-----------|-----------|

10. 증류수로 500ml가 되게하고 혼합한다. 1리터들이 병으로 옮긴다.

11. 0.5M 용액이 되도록  $MgSO_4$ 를 칭량한다:

|             |           |
|-------------|-----------|
| 6g $MgSO_4$ | 시그마 M7506 |
|-------------|-----------|

12. 증류수로 100ml가 되게하고 혼합한다. 200밀리리터들이 병으로 옮긴다.

13. 1M 용액이 되도록  $CaCl_2$ 를 칭량한다:

|              |                  |
|--------------|------------------|
| 11g $CaCl_2$ | 제이 티 베이커 1311-01 |
|--------------|------------------|

14. 증류수로 100ml가 되게하고 혼합한다. 200밀리리터들이 병으로 옮긴다.

15. 45분동안 하기를 오토클레이브한다:

|                           |
|---------------------------|
| 50% 프럭토스(단계 8)            |
| 20% 갈락토스(단계 10)           |
| 0.5M $MgCl_2$ (단계 12)     |
| 1M $CaCl_2$ (단계 14)       |
| 공급 펌프 #1에 대한 관이 장치된 1리터 병 |

16. 25mg/ml 용액이 되도록 카나마이신을 칭량한다:

|            |           |
|------------|-----------|
| 0.5g 카나마이신 | 시그마 K4000 |
|------------|-----------|

17. 증류수로 20ml가 되게하고 혼합한다. 0.2마이크론 멸균 필터로 멸균 여과한다.

18. 발효기에 접종물을 넣기 직전에  $FeSO_4$ 를 칭량한다:

|               |           |
|---------------|-----------|
| 1.0g $FeSO_4$ | 시그마 F7002 |
|---------------|-----------|

19. 증류수로 10ml가 되게하고 혼합한다. 0.2마이크론 멸균 필터로 멸균 여과한다.

20. 50%  $NH_4OH$  용액을 공급 펌프 #2에 접속시킨다.

뉴 브룬스윅 바이오플로우 IV 발효기에서의 발효기 변수

1. 용존 산소(D.O.) 프로브를 조정한다. 초기 D.O.는 100%이어야 한다.
2. D.O.를 비례 적분 유도체(P.I.D.)에 대하여 20%의 설정값으로 설정한다.
3. 진탕을 P.I.D.에 대해 300rpm의 설정값으로 설정한다. P.I.D.을 D.O. 설정에 대해 변환시키고 800rpm으로 고정한다. 800값은 수초 내에 300으로 다시 되돌아갈 것이다. 이것은 진탕이 300rpm에서 시작함을 나타내지만 D.O.를 20%로 유지하기 위해 rpm을 800까지 증가시킬 것이다.
4. pH를 P.I.D.에 대하여 6.8의 설정값으로 설정한다.
5. 기저선 세팅(공급 펌프 #2는  $NH_4OH$  첨가를 조절한다)에 대하여 공급 #2를 설정한다.
6. P.I.D.에 대하여 온도를 37°C의 설정값으로 설정한다.
7. 분당 4.3 내지 4.7리터의 범위내로 공기를 설정한다.

발효기에의 접종

다음과 같이 공급물 병을 준비한다:

1. 고압멸균한 공급물 병에 프럭토스 용액 600ml 및 갈락토스 용액 300ml를 첨가한다. 이 병을 발효기의 공급구 #1에 설치한다.
2. 성장시킨 접종물의 흡광도를 600nm에서 측정한다. 0.5ml 유리 큐벳(cuvette)에서 배양물을 물로 1/10

로 희석한다. 물을 블랭크로 사용한다.

3. 멸균된 1ℓ 들이 플라스크에 프럭토즈 50ml, MgSO<sub>4</sub> 100ml, CaCl<sub>2</sub> 1ml, 카나마이신 20ml 및 FeSO<sub>4</sub> 2.5ml를 첨가한다. 냉각되면 발효기에 첨가한다.

4. 접종물을 발효기에 첨가한다.

목적하는 단백질의 발현

발효기를 사용하여 본 발명의 이중 프로모터를 사용하여 목적하는 단백질을 얻기 위하여, 초기에는 탄소원으로서 소량의 프럭토즈를 함유하는 배지에서 세포를 생육시킨다. 통상적으로 접종한지 약 5 내지 6시간이면 세포가 증식하는데, 이때 배지에 페드-배치식(fed-batch mode)으로 갈락토즈 및 프럭토즈의 용액을 공급한다. 발효하는 동안 공급속도를 증가시킬 수 있으며(단계적으로 또는 서서히), 세포가 생육하면서 배양물이 농후해진다. 탄소원은 발효가 끝날 때까지 계속 공급한다. 경우에 따라, 목적하는 폴리펩타이드를 배지로부터(분비성 단백질의 경우) 또는 수확된 세포로부터 정제한다.

상기 실시예는 본 발명을 예시하고자 제공한 것이지만 본 발명의 범주를 제한하려는 것은 아니다. 당업자라면 본 발명의 그밖의 변형이 가능하고 첨부된 청구의 범위에 포함됨을 쉽게 알 것이다. 본원에 인용된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 본원에 참조로 인용된다.

<110> Cytel Corporation

<120> Improved expression vectors

<130> 1

<150> PCT/US 60/029,545

<151> 1996-11-08

<160> 7

<170> KOPATIN 1.0

<210> 1

<211> 1561

<212> DNA

<213> promoter

<220>

<221> promoter

<222> (362)..(389)

<223> tac promoter

<220>

<221> promoter

<222> (1438)..(1467)

<223> galE promoter

<400> 1

```

gtaaagaagt tatggagcnc ttngtcagt aaaagttat tttttcaac agcgttcata      60
aagtgtcacg gccggagaat tatagtcgct tggttttat ttttaagta ttgtaacta      120
gtacgcaagt tcacgtaaaa agggtaacta gatagacgan ggtccgngt agaggatccg      180
ggcttatcga ctgcacggtg caccaatgct tctgggtcag gcagccatcg gaagctgtgg      240
tatggctgtg caggctgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt      300
ctggataatg ttttttgcgc cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct      360
gttgacaatt aatcatcggc tcgtataatg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac      420
acaggaaca gaattcccgg ggatccgtcg acctgcagct aaaaatgagg tagcttctga      480
ttatccaaaa tgccaacttt gtatggaaaa tgaaggttat ttgggtcgc ttaatcacc      540
agcccgcagc aatcaccgtg ttgttcgttt ccaaatggaa gacaaggagt ggggttcca      600
atactgcctt tatgcctact ttaacgaaca ttctatcttc ttttatggta agcacgaacc      660
aatgcacatc agtccattga cgtttgccg tctcctaaca attgttgaag cattcccctg      720
gttacttcgc aggttcaaat gccgatcttc caattgtagg tggttcaatt cttacacatg      780
aacactatca aggtggctgc cataccttcc caatggaagt agcaggcatt aaagaaaaag      840

```

|   |      |
|---|------|
| ttagctttga tggttactct gatgttgagg ctggcatcgt taattggcct atgtctgttc | 900  |
| ttcgtctaag aagtgaagac aaggaagac ttatcgctct tgcaactaaa atcctaaatt  | 960  |
| gctggcgtgg ttattcagac gaaaagctg gggctttggc tgagtctgat ggacaacctc  | 1020 |
| accacacat tactccaatt gctcgtagaa aagacggcaa attgaattg gatttggttc   | 1080 |
| ttcgtgacaa tcaaacttct gaagaatac cagacggtat ctatcaccca cataaagatg  | 1140 |
| ttcaacatat taagaaagaa aatattggtt tgattgaagt tatgggattg gccattcttc | 1200 |
| cacctcgttt gaaaacagaa cttaaatag ttgaagatta tctattaggt caagtaacc   | 1260 |
| aagttgtcc aattcaccaa gaatggcag atgaactcaa agctcaaac cgaatattac    | 1320 |
| ggctgaggaa gtgacagaag ttgttcgaca atctgttgca gatatctttg ctcgtgtact | 1380 |
| agaagatgca ggtgtttata agactaatag tgaaggcttg gatcagtta aagcatttgt  | 1440 |
| agattttgta aatttagctg attaatgtt ttttctgaag aaaggagtc tagagtcgac   | 1500 |
| ctgcaggcat gcaagcttct gttttggcgg atgagagaag atttcagcc tgatacagat  | 1560 |
| t   | 1561 |
| <210> 2   |      |
| <211> 27  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> primer  |      |
| <400> 2   |      |
| gaaaagaagt ctagannnat gnnnnnn                                     | 27   |
| <210> 3   |      |
| <211> 25  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> primer  |      |
| <400> 3   |      |
| gaaaagaagt ctagcccggg ctaga                                       | 25   |
| <210> 4   |      |
| <211> 27  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> primer  |      |
| <400> 4   |      |
| gaaaagaagt ctagcccatg nnnnnnn                                     | 27   |
| <210> 5   |      |
| <211> 24  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> primer  |      |
| <400> 5   |      |
| gctctagacg atccgtccgg cgta  | 24   |
| <210> 6   |      |
| <211> 32  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> primer  |      |
| <400> 6   |      |
| attctagacc tcctttctca gaaaaacaa tt                                | 32   |
| <210> 7   |      |
| <211> 25  |      |

<212> DNA  
 <213> primer  
 <400> 7

atgcataaac ttttgccatt ctac

25

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된, tac 프로모터 성분 및 gal 프로모터 성분을 포함하는 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
 tac 프로모터 성분이 trc 프로모터인 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  
 gal 프로모터 성분이 박테리아의 UDP갈락토즈-4-에피머레이즈 프로모터인 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서,  
 gal 프로모터 성분이 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*)로부터 얻어지는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 5

이중 프로모터가 tac 프로모터 성분 또는 gal 프로모터 성분을 개별적으로 사용하였을 때보다 원하는 폴리펩타이드를 더 다량으로 발현시키는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 박테리아의 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서,  
 이중 핵산이 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*)의 los 좌위로부터 얻어지는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 포유동물의 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 진균의 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 10

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 식물의 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 11

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 CMP-시알산 신테테이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 12

제 1 항에 있어서,  
 이중 핵산이 UDP-글루코즈 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 13

제 1 항에 있어서,

이중 핵산이 아데닐레이트 카이네이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 14

제 1 항에 있어서,

이중 핵산이 피루베이트 카이네이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 15

제 1 항에 있어서,

이중 핵산이 시알산 알돌레이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 16

제 1 항에 있어서,

이중 핵산이 UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 17

제 1 항에 있어서,

이중 핵산이 토끼의 근육 미오카이네이즈를 코딩하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 18

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된, tac 프로모터 성분 및 gal 프로모터 성분을 포함하는 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물 및 선택적 표지 유전자를 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 19

제 18 항에 있어서,

선택적 표지 유전자가 카나마이신 내성 유전자인 발현 벡터.

#### 청구항 20

제 18 항에 있어서,

이. 콜라이(E. coli)에서 작용하는 복제 서열의 기원을 추가로 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 21

미국 증권 보존소에 수탁번호 제 98059 번으로 기탁된 플라스미드와 실질적으로 동일한 플라스미드.

#### 청구항 22

제 21 항에 있어서,

플라스미드가 미국 증권 보존소에 수탁번호 제 98059 번으로 기탁된 플라스미드와 동일한 플라스미드.

#### 청구항 23

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된 스트렙토코커스 써모필루스 UDP글루코즈-4-에피머레이즈 프로모터를 포함하는 재조합 핵산 구축물.

#### 청구항 24

원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된, tac 프로모터 성분 및 gal 프로모터 성분을 포함하는 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 재조합 발현 카세트를 포함하는 박테리아 세포.

#### 청구항 25

제 24 항에 있어서,

gal 프로모터 성분이 스트렙토코커스 써모필루스로부터 얻어지는 박테리아 세포.

#### 청구항 26

제 24 항에 있어서,

이. 콜라이인 박테리아 세포.

#### 청구항 27

제 24 항에 있어서,

재조합 발현 카세트가 독립 복제성 플라스미드에 위치하는 박테리아 세포.

#### 청구항 28

제 27 항에 있어서,  
플라스미드가 카나마이신 내성 유전자를 추가로 포함하는 박테리아 세포.

#### 청구항 29

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 CMP-시알산 신테테이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 30

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 UDP-글루코즈 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 31

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 아데닐레이트 카이네이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 32

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 피루베이트 카이네이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 33

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 시알산 알돌레이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 34

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 35

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 토끼의 근육 미오카이네이즈를 코딩하는 박테리아 세포.

#### 청구항 36

제 24 항에 있어서,  
이중 핵산이 네이세리아 고노르호에아에의 *los* 좌위로부터 얻어지는 박테리아 세포.

#### 청구항 37

원하는 폴리펩타이드가 발현될 수 있는 조건하에, 원하는 폴리펩타이드를 코딩하는 이중 핵산에 조작될 수 있게 연결된, *tac* 프로모터 성분 및 *gal* 프로모터 성분을 포함하는 이중 박테리아 프로모터를 포함하는 재조합 발현 카세트를 포함하는 박테리아 세포를 적당한 배지에서 배양함을 포함하는, 원하는 폴리펩타이드를 제조하는 방법.

#### 청구항 38

제 37 항에 있어서,  
*gal* 프로모터 성분이 스트렙토코커스 써모필루스로부터 얻어지는 방법.

#### 청구항 39

제 37 항에 있어서,  
박테리아 세포가 이. 콜라이인 방법.

#### 청구항 40

제 37 항에 있어서,  
박테리아 세포를 카나마이신을 포함하는 배지에서 배양하는 방법.

#### 청구항 41

제 37 항에 있어서,  
원하는 폴리펩타이드의 발현이 배지중의 갈락토즈의 존재에 의해 유도되는 방법.

#### 청구항 42

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 UDP-글루코즈 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 43**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 아데닐레이트 카이네이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 44**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 피루베이트 카이네이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 45**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 시알산 알돌레이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 46**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 UDP-GlcNAc 피로포스포릴레이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 47**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 토끼의 근육 미오카이네이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 48**

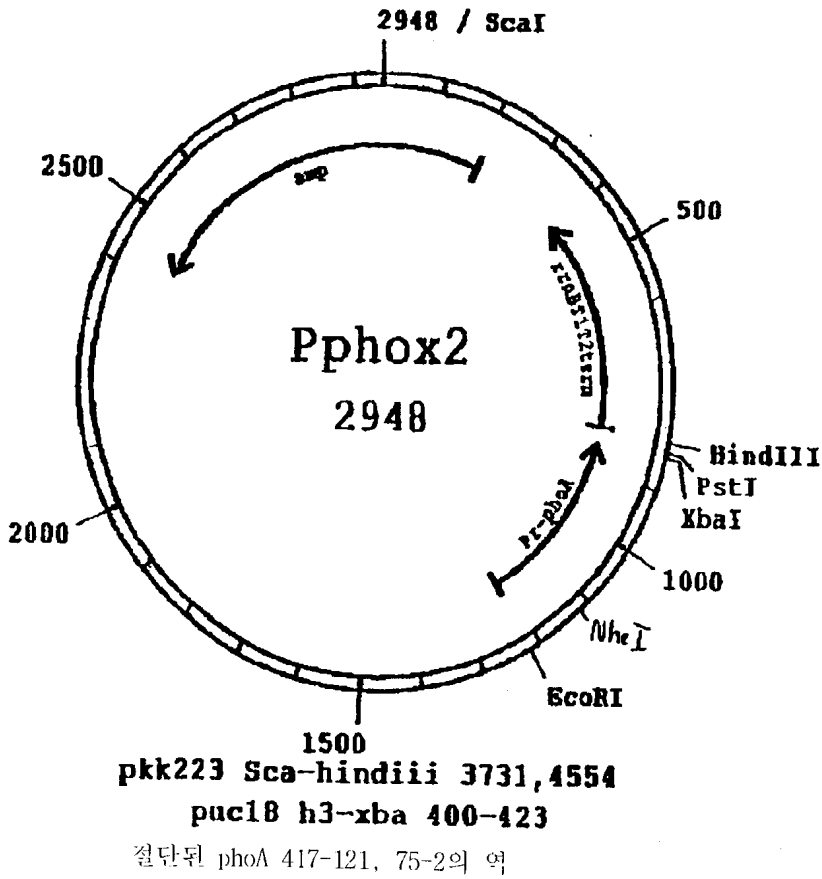
제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 CMP-시알산 신테테이즈를 코딩하는 방법.

**청구항 49**

제 37 항에 있어서,  
이종 핵산이 네이세리아 고노르호에아에의 Ios 좌위로부터 얻어지는 방법.

**도면**

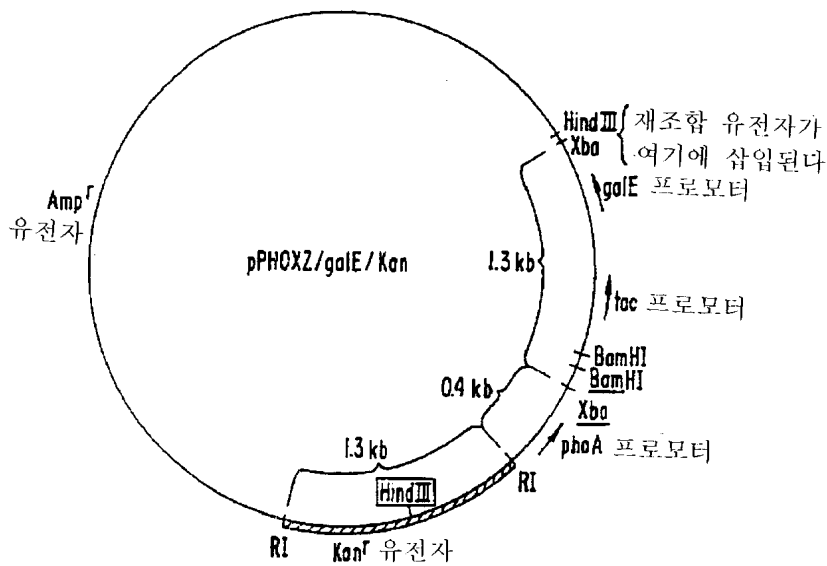
도면1



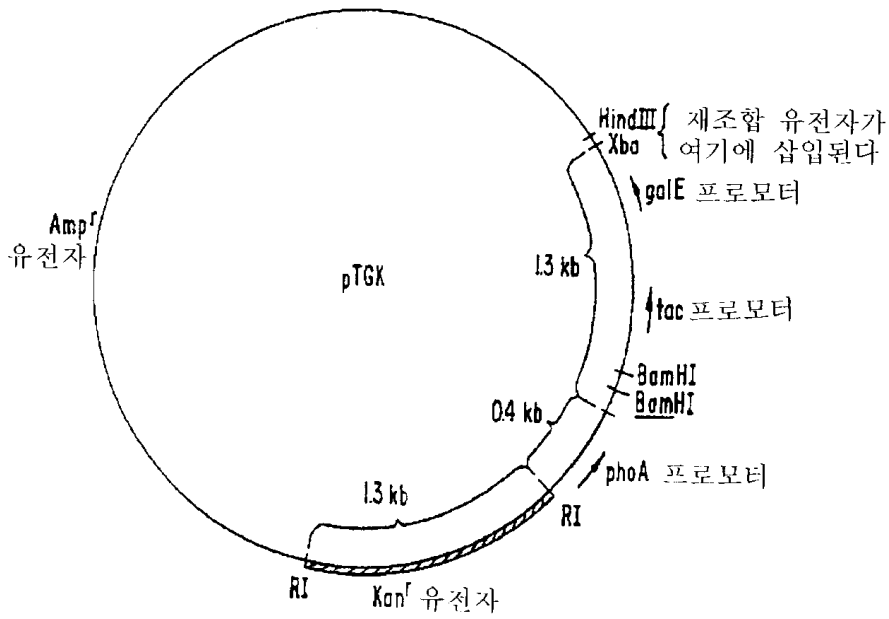
도면2

XbaI  
GAAAAGAAGTCTAGANNNATGNNNNNN...  
RBS      재조합 유전자의 Met

도면3



## 도면4



## 도면5a

플라스미드 TGKS(블린트)

GAAAAGAAAGTCTAGCCCGGGCTAGA  
RBS

## 도면5b

재조합 삽입물이 있는 플라스미드 pTGKS

GAAAAGAAAGTCTAGCCCATGNNNNNNN  
RBS      재조합 유전자의 Met .

## 도면6a

1 58  
\* \*  
GTAAAGAAGTTATGGAGCNTCTTNGTCAGTAAAAAGTTATTTTTTTCAACAGCGTTCA  
CATTCTTCAATACCTCGNAGAANCAGTCATTTTTCAATAAAAAAGTTGTCGCAAGT

59 116  
\* \*  
p<sup>PHO</sup> 서열  
TAAAGTGTACGGCCGGAGAATTATAGTCGCTTGGTTTTTATTTTTTAAGTATTGGTA  
ATTTACAGTGCCGGCCTCTTAATATCAGCGAACCAAAAATAAAAAATTCATAACCAT

117 174  
\* \*  
—pPHOX2 플라스미드 서열/ (XbaI)  
ACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTA[ACTAGATAGACGAT]GGTCCGC[GTAGAG  
TGATCATGCGTTCAACTGCATTTTTCCCAT][GATCT]ATCTGCTNCCAGGCCNCATCTC

175 232  
\* \*  
GATCCGGGCTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGGTCAGGCAGCCATCGGA  
CTAGGCCCGAATAGCTGACGTGCCACGTGGTTACGAAGACCCAGTCCGTCGGTAGCCT

233 290  
\* \*  
AGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTGCTCAAGGCG  
TCGACACCATACCGACACGTCCAGCATTTAGTGACGTATTAAGCACAGCGAGTTCGCG

291 348  
\* \*  
CACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATT  
GTGAGGGCAAGACCTATTACAAAAACGCGGCTGTAGTATTGCCAAGACCGTTTATAA

349 406  
\* \*  
-35 tac 프로모터 -10  
CTGAAATGAGCTGTTGACAAATTAATCATCGGCTCCATATAATGTGTGGAATTGTGACCG  
GACTTTACTCGACA[ACTGTTAATTAGTAGCCGAGCATATTA]CACACCTTAACACTCGC

407 464  
\* \*  
GATAACAATTTACACACAGGAAACAGAATTTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGCTAAAA  
CTATTGTTAAAGTGTGTCTTTGTCTTAAGGGCCCCTAGGCAGCTGGACGTCGATTTT

465 522  
\* \*  
ATGCGGTAGCTTCTGATTATCCAAAATGCCAACTTTGTATGGAAAATGAAGGTTATTT  
TACGCCATCGAAGACTAATAGGTTTTACGGTTGAAACATACCTTTTACTTCCAATAAA

## 도면6b

523 580  
\* \*  
GGGTGCGATTAATCACCCAGCCCGCAGCAATCACCGTGTGTTTCGTTTCCAAATGGAA  
CCCAGCGTAATTAGTGGGTGGGGCGTCGTTAGTGGCACAACAAGCAAAGGTTTACCTT

581 638  
\* \*  
GACAAGGAGTGGGGCTTCCAATACTCGCCTTATGCCTACTTTAACGAACATTCTATCT  
CTGTTCCCTCACCCCGAAGGTTATGAGCGGAATACGGATGAAATTGCTTGTAAGATAGA

639 696  
\* \*  
TCTTTTATGGTAAGCACGAACCAATGCACATCAGTCCATTGACGTTTGGCCGTCTCCT  
AGAAAATACCATTCTGTGCTTGGTTACGTGTAGTCAGGTAAGTCAAACCGGCAGAGGA

697 754  
\* \*  
AACAATTGTTGAAGCATTCCCCTGGTTACTTCGCAGGTTCAAATGCCGATCTTCCAAT  
TTGTTAACAACCTTCGTAAGGGGACCAATGAAGCGTCCAAGTTTACGGCTAGAAGTTA

755 812  
\* \*  
TG TAGGTGGTTCAATTCTTACACATGAACACTATCAAGGTGGTCGCCATACCTTCCCA  
ACATCCACCAAGTTAAGAATGTGTACTTGTGATAGTTCCACCAGCGGTATGGAAGGGT

813 870  
\* \*  
ATGGAAGTAGCAGGCATTAAAGAAAAAGTTAGCTTTGATGGTACTCTGATGTTGAGG  
TACCTTCATCGTCCGTAATTTCTTTTTCAATCGAAACTACCAATGAGACTACAACCTCC

871 928  
\* \*  
CTGGCATCGTTAATTGGCCTATGTCTGTTCTTCGTCTAAGAAGTGAAGACAAGGGAAG  
GACCGTAGCAATTAACCGGATACAGACAAGAAGCAGATTCTTCACTTCTGTTCCCTTC

929 986  
\* \*  
ACTTATCGCTCTTGCAACTAAAATCCTAAATTGCTGGCGTGGTTATTCAGACGAAAAA  
TGAATAGCGAGAACGTTGATTTTAGGATTTAACGACCCACCAATAAGTCTGCTTTTT

987 1044  
\* \*  
GCTGGGGTCTTGGCTGAGTCTGATGGACAACCTCACCACTTACTCCAATTGCTC  
CGACCCCGAACC GACTCAGACTACCTGTTGGAGTGGTGTGGTAATGAGGTTAACGAG

## 도면6c

1045 1102  
\* \*  
GTAGAAAAGACGGCAAATTTGAATTGGATTTGGTTCTTCGTGACAATCAAACCTTCTGA  
CATCTTTTCTGCCGTTTAAACTTAACCTAAACCAAGAAGCACTGTTAGTTTGAAGACT

1103 1160  
\* \*  
AGAATATCCAGACGGTATCTATCACCCACATAAAGATGTTCAACATATTAAGAAAGAA  
TCTTATAGGICTGCCATAGATAGTGGGTGTATTTCTACAAGTTGTATAATTCTTTCTT

1161 1218  
\* \*  
AATATTGGTTTGGATTGAAGTTATGGGATTGGCCATTCTTCCACCTCGTTTGA AACAG  
TTATAACCAAACCTAACTTCAATACCCTAACCGGTAAGAAGGTGGAGCAAACCTTTGTG

1219 1276  
\* \*  
AACTTAAAGATGTTGAAGATTATCTATTAGGTCAAGGTAACCAAGTTGCTCCAATTCA  
TTGAATTTCTACAACCTTCAATAGATAATCCAGTTCATTGGTTCAACGAGGTTAAGT

1277 1334  
\* \*  
CCAAGAATGGGCAGATGAACTCAAAGCTCAAATCCGAATATTACGGCTGAGGAAGTGA  
GGTCTTACCCGCTACTTGGAGTTTCGAGTTTAGGCTTATAATGCCGACTCCTTCACT

1335 1392  
\* \*  
CAGAAGTTGTTGACAATCTGTTGCAGATATCTTTGCTCGTGTACTAGAAGATGCAGG  
GTCTTCAACAAGCTGTTAGACAACGTCTATAGAAACGAGCACATGATCTTCTACGTCC

1393 1450  
\* \*  
TGTTTATAAGACTAATAGTGAAGGCTTGGATCAGTTTAAAGCATTGTAGATTTTGTA  
ACAAATATTCTGATTATCACTTCCGAACCTAGTCAAATTTGTAACATCTAAACAT

1451 1508  
\* \*  
AATTTAGCTGATTAATTGTTTTTCTGAAGAAAGGAGGCTAGAGTTCGACCTGCAGGC  
TTAAATCGACTAATTAACAAAAAAGACTTCTTTCCTCCAGATCTCAGCTGGACGTCCG

gale 프로모터  
-35

-10 RBS XbaI

## 도면6d

1509 1560  
\* \*  
HDIII  
ATGCAAGCTTCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATT  
TACGTTTCGAAACACAAAACCGCCTACTCTCTTCTAAAAGTCGGACTATGTCTAA  
pPHOX2 서열