



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월07일
(11) 등록번호 10-1624345
(24) 등록일자 2016년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/70 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7026047(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년02월01일
심사청구일자 2014년09월26일
(85) 번역문제출일자 2014년09월18일
(65) 공개번호 10-2014-0119202
(43) 공개일자 2014년10월08일
(62) 원출원 특허 10-2014-7017744
원출원일자(국제) 2007년02월01일
심사청구일자 2014년07월03일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/000351
(87) 국제공개번호 WO 2007/088371
국제공개일자 2007년08월09일
(30) 우선권주장
0602173.7 2006년02월03일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
W01999005297 A1
W02005071089 A3

(73) 특허권자
후지필름 다이오신쓰 바이오테크놀로지스 유케 리미티드
영국 티에스23 1엘에이치 빌링햄 벨라시스 애비뉴
(72) 발명자
호지슨 이안 존
영국 클리브랜드 티에스23 1와이엔 빌링엄 벨라시스 애비뉴 피오 박스 2
레논 크리스토퍼 데이비드 존
영국 클리브랜드 티에스23 1와이엔 빌링엄 벨라시스 애비뉴 피오 박스 2
카라 버펜드라 벨러브
영국 클리브랜드 티에스23 1와이엔 빌링엄 벨라시스 애비뉴 피오 박스 2
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

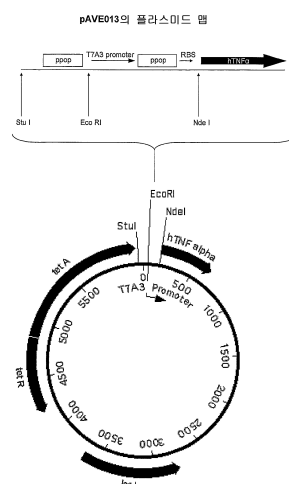
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 발현 시스템

(57) 요약

완전한 팔린드롬 작동자 서열-기반 단백질 발현 시스템이 제공된다. 상기 발현 시스템은 프로모터 및 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 포함하고, 상기 프로모터는 T7이 아니다. 상기 발현 시스템은 발효에 의한 재조합 단백질의 생산에서 바람직하게 이용된다.

대표도 - 도18



명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 완전한 팔린드롬 작동자 서열에 작동 가능하게 연결된, 프로모터를 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 대장균 숙주 세포를 포함하는 단백질 발현 시스템으로서,

상기 프로모터는 대장균 RNA 폴리머라아제 프로모터이고, 완전한 팔린드롬 작동자 서열은 전사 개시 지점과 중첩되는 것을 특징으로 하는 단백질 발현 시스템.

청구항 2

하나 이상의 완전한 팔린드롬 작동자 서열에 작동 가능하게 연결된, 프로모터를 포함하는 대장균 벡터로서,

상기 프로모터는 대장균 RNA 폴리머라아제 프로모터이고, 완전한 팔린드롬 작동자 서열은 전사 개시 지점과 중첩되는 것을 특징으로 하는 대장균 벡터.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 단백질의 발현을 위한 발현 카세트를 더 포함하는 것인 벡터.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것인 벡터.

청구항 5

청구항 2에서 청구된 벡터에 의해 형질전환된 대장균 숙주 세포.

청구항 6

하나 이상의 완전한 팔린드롬 작동자 서열에 작동 가능하게 연결되고, 재조합 단백질의 발현을 위한 발현 카세트에 작동 가능하게 연결된, 프로모터를 포함하는 벡터에 의해 형질전환된 대장균 숙주 세포를 포함하는 발현 시스템을 발현시키는 단계를 포함하는, 재조합 단백질을 생산하는 방법으로서,

상기 프로모터는 대장균 RNA 폴리머라아제 프로모터이고, 완전한 팔린드롬 작동자 서열은 전사 개시 지점과 중첩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 작동자 서열은 lac, gal, deo 또는 gln인 것인 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 프로모터의 하류에 위치한 하나의 완전한 팔린드롬 작동자 서열이 이용되는 것인 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 프로모터는 T7A1, T7A2, T7A3, λ pL, λ pR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA 및 rrnB로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 프로모터는 T7A3, λ pL 또는 tac이고, 상기 전사 개시 지점과 중첩된 작동자 서열은 서열 GGAATTGTGAGCGCTCACAATTC (서열번호 3의 51번 내지 74번 염기)를 갖는 것인 방법.

청구항 11

- a) 청구항 3에 따른 박테에 의해 형질전환된 대장균 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- b) 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 단백질 생산 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 숙주 세포는 대장균 B (*E. coli* B) 또는 K12 (*E. coli* K12) 균주인 것인 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 박테는 청구항 4에서 청구된 박테인 것인 방법.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 프로모터는 λ pL, tac 또는 T7A3인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 폴리펩티드의 미생물 발현에 적합한 발현 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] T7-기반 완전한 팔린드롬(palindrome) 작동자 서열-기반 단백질 발현 시스템이 미국특허 제6,537,779호로부터 공지되었다. T7 기반 시스템은 T7 시스템의 작동이 용원성(lysogenic) 숙주 균주를 생성하기 위해 대장균 숙주 균주에 필요한 파아지 폴리머라아제를 발현하는 λ DE3 프로파아지(prophage)를 삽입하는 것에 의해 통상적으로 제공되는 파아지 폴리머라아제를 필요로 한다는 점에서 단점을 갖는다. 상기 파아지 폴리머라아제는 또한 파아지 폴리머라아제(예를 들면, T7 RNA 폴리머라아제)에 대한 유전자를 갖는 특화된 λ 형질도입 파아지(transducing phage)에 의한 감염에 의해 상기 세포로 전달될 수 있다. λ DE3 프로파아지는 용원성(lytic) 파아지 입자를 형성하기 위해 상기 프로파아지의 절단에 요구되는 유전적 인자들을 갖지 않는다. 그러나, λ DE3 용원성 숙주 균주는 파아지 입자들을 방출시키고 따라서, 발효 플랜트에서 원치않는 감염을 유발하는 것으로 확인되었다. 실제로, λ DE3 균주의 이용은 일부 발효 플랜트 운영자에 의해 허용되지 않는다.

[0003] 유도 전에 이종(heterologous) 단백질의 발현은 일부 이종 단백질이 숙주 세포의 성장 및 플라스미드 안정성에 대해 유해한 효과를 가져서 전체 생산성을 감소시키기 때문에 바람직하지 않다. 이를 피하기 위해, T7-기반 발현 시스템은 일반적으로 두 수준에서 이종 단백질의 발현을 조절한다. 먼저, T7 RNA 폴리머라아제를 생산하기 위한 T7 RNA 폴리머라아제 유전자의 발현의 유도가 T7 프로모터로부터 발현을 추진하기 위해 요구된다. 둘째, T7 프로모터 자체도 유도되어야 한다. 이는 T7-기반 발현 시스템 작동의 복잡성을 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 상이한 조절 및 유도 모드를 갖는 다수의 이종 단백질 발현 시스템이 있어서, 목적 단백질(protein of interest)의 발현 시스템/발효 공정의 선택 및 최적화를 실험적 과정(empirical process)으로 만든다. 이는 시간을 소요하며 바람직하지 않다. 따라서, 파아지 폴리머라아제 및 용원성 숙주 균주의 이용 없이 발현의 개선된 제어 및 단백질 발현의 개선된 수준을 제공할 수 있는 시스템에 대한 요구가 있다. 또한, 포유동물 세포 및 효모 세포와 같은 진핵 세포 및, 원핵 세포에서 유도성 이종 발현(inducible heterologous expression)을 제공할 수 있는 시스템에 대한 요구가 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명에 따르면,

[0006] a) 프로모터 및

[0007] b) 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 포함하고,

[0008] 상기 프로모터는 T7이 아닌 것을 특징으로 하는 완전한 팔린드롬 작동자 서열(perfect palindrome operator

sequence)-기반 단백질 발현 시스템이 제공된다.

- [0009] 본 발명의 발현 시스템에서 이용될 수 있는 프로모터는 통상적으로 숙주 RNA 폴리머라아제-기반 프로모터 시스템이고, 바람직하게는 대장균 RNA 폴리머라아제-기반 프로모터 시스템이다. 이용될 수 있는 프로모터의 예는 T7A1, T7A2, T7A3, λ pL, λ pR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA 및 rrnB를 포함한다.
- [0010] 본 발명에 따른 발현 시스템에서 이용될 수 있는 작동자 서열은 lac, gal, deo 및 gln을 포함한다. 하나 이상의 완전한 팔린드롬 작동자 서열이 이용될 수 있다. 다수의 바람직한 구체예에서, 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열이 이용되고, 가장 유리하게는 하나의 작동자 서열은 프로모터의 하류(downstream)에 위치하고 하나의 작동자 서열은 프로모터의 상류(upstream)에 위치한다. 두 개의 작동자 시스템(operator system)이 이용되는 경우, 바람직하게는 상기 작동자 서열들은 프로모터의 제어를 최대화하도록 간격을 두고 배치된다(space). 다수의 구체예에서, 간격(spacing)은 85 내지 105 bp 떨어지며, 바람직하게는 90 내지 126 bp 떨어지고, 가장 바람직하게는 91 또는 92 bp 떨어진단. 일부 구체예에서, 작동자 서열은 전사 개시 지점(transcriptional start point)과 중첩된다.
- [0011] 작동자 시스템은 통상적으로 적합한 억제자(repressor) 서열과 함께 이용되는 것으로 인식될 것이다. 억제자 서열은 억제자 단백질을 생성하고, 예를 들면, lac 작동자를 사용하는 경우 lacI 유전자 서열이 이용된다. 다른 lac 억제자 서열도 사용될 수 있으며, 예를 들면, lacI^q 서열이 lac 억제자 단백질의 수준을 증가시키기 위해 이용될 수 있다. 억제자 서열은 또한 숙주 세포 계놈에 의해 제공되거나 또는 추가적인 친화성 플라스미드(compatible plasmid)를 이용하는 것에 의해 제공될 수 있다.
- [0012] 발현 시스템은 숙주 세포 계놈으로 통합될 수 있으나, 바람직하게는 플라스미드와 같은 염색체의 요소(extrachromosomal element) 내에 포함된다. 대안적으로, 발현 시스템은 파아지(phage) 또는 바이러스 벡터 내로 내포되고, 이들이 숙주 세포 시스템으로 상기 발현 시스템을 전달하기 위해 이용될 수 있다. 플라스미드 또는 발현 벡터는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 방법에 의해 조립될 수 있다. 플라스미드는 통상적으로 하나 이상의 하기 요소를 포함한다: 선택 마커, 예를 들면, 항생제 내성을 부여하는 서열, cer 안정성 서열 및 발현 카세트. 발현 시스템은 또한 원하는 단백질의 분비가 필요한 경우, 신호 서열(signal sequence)를 내포할 수 있다.
- [0013] 발현은 이소프로필- β -D-1-티오갈락토포라노시드(IPTG), 이소부틸-C-갈락토시드(IBC)와 같은 IPTG의 유사체, 락토오스 또는 멜리비오스와 같은 유도 인자(inducer)의 첨가에 의해 유도될 수 있다. 다른 유도 인자들이 이용될 수 있고 다른 문헌에 보다 상세하게 기재되어 있다(예를 들면, The Operon, eds Miller and Renznikoff (1978) 참조). 유도 인자들은 개별적으로 또는 조합으로 이용될 수 있다. 적합한 플라스미드 또는 발현 벡터의 작제는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 명백할 것이다.
- [0014] 본 발명의 발현 시스템은 숙주 세포에서, 특히, 미생물에서 단백질을 발현시키기 위해 이용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된, "단백질(protein)"은 일반적으로 약 10개 이상의 아미노산을 갖는 펩티드 및 단백질을 의미한다. 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 원핵세포의 예는 세균 세포, 예를 들면, 대장균(*E. coli*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marsescens*) 및 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)를 포함한 그람-음성 세균 세포, 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 포함한 그람-양성 세균 세포를 포함한다. 진핵세포의 예는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 한세룰라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)와 같은 효모를 포함한다. 이용될 수 있는 포유동물 숙주 세포는 인간 배아 신장 세포 및 PERC.6 세포와 같은 인간 세포주; NSO 세포와 같은 마우스 세포주; 및 특히, 베이비 햄스터 신장 세포 및 특히 중국 햄스터 난소 세포(chinese hamster ovary cell)와 같은 햄스터 세포주를 포함한다. 사상 진균(filamentous fungi), 식물 세포, 곤충 세포, 양서류 세포 또는 난소 종(ovarian species)과 같은 다른 진핵 숙주 세포도 이용될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는 세균, 특히, 엔테로박테리아카에(enterobacteriaceae), 바람직하게는 대장균, 및 특히, 대장균 B 또는 K12 균주이다.
- [0015] 본 발명의 발현 시스템은 통상적으로 플라스미드의 형태로 이용되고, 프로모터 및 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 포함하고, 상기 플라스미드는 T7이 아닌 것인 플라스미드는 본 발명의 또 다른 양태를 형성한다. 상기 플라스미드는 자가 복제(autonomously replicating) 플라스미드 또는 통합형(integrative) 플라스미드이다.
- [0016] 본 발명의 발현 시스템은 재조합 세포를 배양하는 것에 의한 단백질, 특히, 재조합 단백질의 제조를 위해 유리

하게 이용된다. 단백질의 발현을 위해, 프로모터 및 작동자 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결되는 것으로 인식될 것이다.

- [0017] 따라서, 본 발명은 단백질을 제조하는 방법으로서,
- [0018] a) 프로모터,
- [0019] b) 완전한 팔린드롬 작동자 서열, 및
- [0020] c) 단백질을 위한 발현 카세트를 포함하고, 상기 프로모터는 T7이 아닌 것을 특징으로 하는 발현 시스템을 발현시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0021] 동일하거나 또는 상이할 수 있는, 하나 이상의 프로모터, 작동자 서열 및 발현 카세트가 바람직한 경우, 존재할 수 있다.
- [0022] 상기 발현 시스템은 이용된 세포에서 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 방법에 의해 발현된다. 바람직한 발현 방법은 재조합 세포들을 성장 배지에서, 특히, 발효에 의해 배양하는 단계, 및 발현된 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 용어 "성장 배지(growth medium)"는 재조합 세포들을 성장시키기 위해 이용된 영양분 배지(nutrient medium)를 의미한다. 다수의 구체예에서, 영양분 용액이 이용된다. 주어진 재조합 세포를 위한 적합한 성장 배지는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려져 있다.
- [0023] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 한정되지 않으면서 예시된다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1: D1.3 Fab 발현 카세트
- 도 2: hTNF α 의 축적된 수준
- 도 3: CLD038 균주의 웨스턴 블롯 분석
- 도 4: CLD030 균주에 대한 hTNF α 생산성 프로파일
- 도 5: bsctDb 서열
- 도 6: 삼입물의 서열 (서열번호 23)
- 도 7: 삼입물의 서열 (서열번호 24)
- 도 8: 삼입물의 서열 (서열번호 25)
- 도 9: hadL 유전자 서열 (서열번호 26)
- 도 10: HadL 단백질의 발현 및 추적
- 도 11: 유도 후 CLD075의 성장 및 HadL 단백질의 발현/추적
- 도 12: hCMV 프로모터 및 두 개의 완전한 팔린드롬 lac 작동자의 DNA 서열 (서열번호 33)
- 도 13: IgG Fc 단백질의 DNA 서열 (서열번호 34)
- 도 14: IgG Fc 발현
- 도 15: 클론 서열 1 (서열번호 35)
- 도 16: 클론 서열 2 (서열번호 36)
- 도 17: hTNF α 의 추적
- 도 18: pAVE013의 플라스미드 맵

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 실시예 1. pAVE 시리즈 벡터의 생성

- [0026] 벡터 pAVE011, pAVE012 및 pAVE013
- [0027] pAVE011의 생성을 위한 출발 벡터(startign vector)는 미국특허 제6,537,779호에 기재된 바와 같이 제조된 pZT7#2.0이었다. pZT7#2.0은 pAT153 벡터 백본, cer 안정성 서열, tet A/R, 목적 유전자(gene of interest)의 상류에 있는 하나의 원형(native) lac 작동자 서열 및 상류 T4 전사 종결자를 갖는다. T7A3 프로모터 및 두 개의(dual) 완전한 팔린드롬 lac 작동자를 NcoI I, EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식 부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 이 플라스미드 내로 클로닝시켰다. 올리고뉴클레오타이드 1 및 2.1을 어닐링시켜서 링커 12.1을 제조하였다:
- [0028] 올리고뉴클레오타이드 1 (서열번호 1)
- [0029] 5' CATGTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCAAGAACAATCCTGCACG
- [0030] 올리고뉴클레오타이드 2.1 (서열번호 2)
- [0031] 5' AATTCGTGCAGGATTGTTCTTGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCA
- [0032] 그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고, Nco I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 형질전환체의 1차 스크리닝은 NcoI을 이용한 제한효소 처리(restriction digesion)에 의해 수행하였다. 서열분석(sequencing)에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE012로 명명하였다.
- [0033] 그 후, 올리고뉴클레오타이드 3과 4를 어닐링시키는 것에 의해 T7A3 프로모터 카세트를 pAVE012에 클로닝시켰다:
- [0034] 올리고뉴클레오타이드 3 (서열번호 3)
- [0035] 5' AATTCAAACAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAATT
- [0036] GTGAGCGCTCACAATCCCA
- [0037] 올리고뉴클레오타이드 4 (서열번호 4)
- [0038] 5' CTGGTGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCCTCGTGCCGT
- [0039] GTTTGCTCGTGTGTGCGCCGTTTGTGTTG
- [0040] 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 XbaI/EcoRI 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝(initial screening)을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE0.11로 명명하였다.
- [0041] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE013을 생성하였다. pAVE013의 플라스미드 맵이 도 18에 제시된다. 이 도면은 작제에서 사용된 작동자 및 프로모터와 제한효소 인식 부위의 배열을 보여준다. 상기 작동자는 두 개의 완전한 팔린드롬 lac 작동자이다. RBS는 리보솜 결합 부위(ribosomal binding site)이다. 상기 벡터는 pAT153 벡터 백본, cer 안정성 서열, 유도성 테트라사이클린 내성 유전자(inducible tetracycline resistance gene)(tet A/R), 및 상류 T4 전사 종결자를 포함한다.
- [0042] 벡터 pAVE038 및 pAVE041
- [0043] pAVE038의 생성을 위한 출발 벡터는 미국특허 제6,537,779호에 기재된 바와 같이 제조된 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식 부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 tac 프로모터 및 하나의 원형 lac 작동자를 이 플라스미드로 클로닝시켰다.
- [0044] 올리고뉴클레오타이드 11 및 12를 어닐링하여 링커 1112를 제조하였다.
- [0045] 올리고뉴클레오타이드 11 (서열번호 5)
- [0046] 5' AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGGATACTGTGTGGAATT
- [0047] GTGAGCGGATAACAATCCCA
- [0048] 올리고뉴클레오타이드 12 (서열번호 6)

- [0049] 5'CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAGTATCCGAGCC
- [0050] GATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTAGAA
- [0051] 그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. Nco I을 이용한 제한효소 처리에 의해 형질전환체의 1차 스크리닝을 수행하였다. 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE038로 명명하였다.
- [0052] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE041을 생성하였다.
- [0053] 벡터 pAVE037 및 pAVE040
- [0054] pAVE037의 생성을 위한 출발 벡터는 미국특허 제6,537,779호에 기재된 바와 같이 제조된 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식 부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 tac 프로모터 및 하나의 원형 lac 작동자를 이 플라스미드로 클로닝시켰다.
- [0055] 올리고뉴클레오타이드 13 및 14를 어닐링하여 링커 1314를 제조하였다.
- [0056] 올리고뉴클레오타이드 13 (서열번호 7)
- [0057] 5'AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGGATACTGT
- [0058] GTGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCTCA
- [0059] 올리고뉴클레오타이드 14 (서열번호 8)
- [0060] 5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCACACAGTATCCGAGCCG
- [0061] ATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTAGAA
- [0062] 그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. Nco I을 이용한 제한효소 처리에 의해 형질전환체의 1차 스크리닝을 수행하였다. 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE037로 명명하였다.
- [0063] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE040을 생성하였다.
- [0064] 벡터 pAVE028 및 pAVE030
- [0065] pAVE028의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE012였다. 올리고뉴클레오타이드 5와 6을 어닐링시키는 것에 의해 T7A3 프로모터 카세트를 pAVE012로 클로닝시켰다.
- [0066] 올리고뉴클레오타이드 5 (서열번호 9)
- [0067] 5'AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT
- [0068] TGTGAGCGCTCACAATTCCTCA
- [0069] 올리고뉴클레오타이드 6 (서열번호 10)
- [0070] 5'CTGGTGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGTTCCGGTGGTCTGTCGGT
- [0071] GTTTGCTTCGTGTTGTGCGCCGTTTGTTCG
- [0072] 상기 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE028로 명명하였다.
- [0073] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE030을 생성하였다.
- [0074] 벡터 pAVE007 및 pAVE031

- [0075] pAVE007의 생성을 위한 출발 벡터는 미국특허 제6,537,779호에 기재된 바와 같이 제조된 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식 부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 T7A3 프로모터 및 하나의 완전한 팔린드롬 lac 작동자를 이 플라스미드로 클로닝시켰다.
- [0076] 상기 T7A3 프로모터를 포함하는 링커는 올리고뉴클레오타이드 3 및 4로 제조하였다.
- [0077] 올리고뉴클레오타이드 3 (서열번호 3)
- [0078] 5' AATTCAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAATT
- [0079] * GTGAGCGCTCACAATCCCCA
- [0080] 올리고뉴클레오타이드 4 (서열번호 4)
- [0081] 5' CTGGTGGGGGGTTGTGGGCGCTCGCGGTTCCGGTGCCTCGTGCCGT
- [0082] GTTTGCTTCGTGTGTGCGCCGTTTTGTTTG
- [0083] 올리고뉴클레오타이드 3과 4를 어닐링하고, 형성된 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)로 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 PAVE007로 명명하였다.
- [0084] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE031을 생성하였다.
- [0085] 벡터 pAVE029 및 pAVE027
- [0086] pAVE029의 생성을 위한 출발 벡터는 미국특허 제6,537,779호에 기재된 바와 같이 제조된 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식 부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 λ pL 프로모터 및 하나의 완전한 팔린드롬 lac 작동자를 이 플라스미드로 클로닝시켰다.
- [0087] 링커 78은 올리고뉴클레오타이드 7과 8을 어닐링하는 것에 의해 제조하였다.
- [0088] 올리고뉴클레오타이드 7 (서열번호 11)
- [0089] 5' AATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGAGCGGAATT
- [0090] GTGAGCGCTCACAATCCCCA
- [0091] 올리고뉴클레오타이드 8 (서열번호 12)
- [0092] 5' CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCGCTCAGTATCACCGCCA
- [0093] GTGGTATTATGTCAACACCGCCAGAGAT
- [0094] 그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)로 형질전환시켰다. Nco I을 이용한 제한효소 처리에 의해 형질전환체의 1차 스크리닝을 수행하였다. 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 PAVE029로 명명하였다.
- [0095] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE027을 생성하였다.
- [0096] 벡터 pAVE043 및 pAVE044
- [0097] pAVE043의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE012였다. 올리고뉴클레오타이드 17과 18을 어닐링시키는 것에 의해 tac 프로모터 카세트를 pAVE012로 클로닝시켰다:
- [0098] 올리고뉴클레오타이드 17 (서열번호 37)
- [0099] 5' AATTTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTG
- [0100] TGGAATTGTGAGCGCTCACAATCCCCA

- [0101] 올리고뉴클레오타이드 18 (서열번호 38)
- [0102] 5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCACACATTATACGAGCCG
- [0103] ATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTAGAA
- [0104] 상기 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE043으로 명명하였다.
- [0105] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE044를 생성하였다.
- [0106] 벡터 pAVE034 및 pAVE035
- [0107] pAVE034의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE012였다. 올리고뉴클레오타이드 9와 10을 어닐링시키는 것에 의해 λ pL 프로모터 카세트를 pAVE012로 클로닝시켰다:
- [0108] 올리고뉴클레오타이드 9 (서열번호 39)
- [0109] 5'AATTCATCTCTGGCGGTGTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACT
- [0110] GAGCGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCTCA
- [0111] 올리고뉴클레오타이드 10 (서열번호 40)
- [0112] 5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCGCTCAGTATCACCGCCAGTGGTATT
- [0113] TATGTCAACACCGCCAGAGATG
- [0114] 상기 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE034로 명명하였다.
- [0115] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE035를 생성하였다.
- [0116] 벡터 pAVE020 및 pAVE021
- [0117] pAVE020의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE012였다. 올리고뉴클레오타이드 7과 8을 어닐링시키는 것에 의해 λ pL 프로모터 카세트를 pAVE012로 클로닝시켰다:
- [0118] 올리고뉴클레오타이드 7 (서열번호 11)
- [0119] 5'AATTATCTCTGGCGGTGTGACATAAATACCACTGGCGGTGATACTGAGCGGAATT
- [0120] GTGAGCGCTCACAATTCCTCA
- [0121] 올리고뉴클레오타이드 8 (서열번호 12)
- [0122] *5'CTAGTGGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCGCTCAGTATCACCGCCA
- [0123] GTGGTATTTATGTCAACACCGCCAGAGAT
- [0124] 상기 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE020으로 명명하였다.
- [0125] 인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE021을 생성하였다.

- [0126] 벡터 pAVE016 및 pAVE017
- [0127] pAVE016의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE012였다. 올리고뉴클레오타이드 15와 16을 어닐링시키는 것에 의해 tac 프로모터 카세트를 pAVE012로 클로닝시켰다:
- [0128] 올리고뉴클레오타이드 15 (서열번호 13)
- [0129] 5' AATTCCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTG
- [0130] TGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCTCA
- [0131] 올리고뉴클레오타이드 16 (서열번호 14)
- [0132] 5' CTAGTGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCACACATTATACGAGCCG
- [0133] ATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTCAGG
- [0134] 상기 어닐링된 올리고뉴클레오타이드를 플라스미드 pAVE012에 라이게이션시키고 XbaI/EcoRI 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE016으로 명명하였다.
- [0135] *인간 TNF α 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켜 pAVE017을 생성하였다.
- [0136] 벡터 pAVE049
- [0137] pAVE049의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE0.17이었다. tac 프로모터 카세트는 변형시키지 않았다. 두 개의 작동자 간의 간격을 91 bp에서 124 bp로 증가시키기 위해, EcoR I 링커를 클로닝에 의해 삽입시켰다(clone in). 이 링커는 올리고뉴클레오타이드 19와 20으로 제조하였다.
- [0138] 올리고뉴클레오타이드 19 (서열번호 15)
- [0139] 5' AATTCACCGGTGTACAGTCATGTACAACCGGTG
- [0140] 올리고뉴클레오타이드 20 (서열번호 16)
- [0141] 5' AATTCACCGGTTGTACATGACTGTACACCGGTG
- [0142] 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE049로 명명하였다.
- [0143] 벡터 pAVE046
- [0144] 분비 벡터(secretion vector) pAVE046의 생성을 위한 출발 벡터는 pAVE027이었다. D1.3 Fab 발현 카세트(도 1, 서열번호 17)를 Nde I-BamH I 단편으로 클로닝하였다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE046으로 명명하였다.

표 1

[0145] pAVE 벡터의 요약

플라스미드	프로모터	작동자 시스템	비고
pAVE041	tac	하나의 원형의 lac 서열	
pAVE017	tac	두 개의 완전한 팔린드롬 서열(DPPS)	작동자 간격 91 bp(DPPS91)
pAVE040	tac	하나의 완전한 팔린드롬 서열(SPPS)	
pAVE049	tac	두 개의 완전한 팔린드롬 서열	작동자 간격 124 bp(DPPS124)
pAVE013	T7A3	두 개의 완전한 팔린드롬 서열	작동자 간격 91 bp(DPPS91)
pAVE030	T7A3	두 개의 완전한 팔린드롬 서열	작동자 간격 92 bp(DPPS92)
pAVE031	T7A3	하나의 완전한 팔린드롬 서열	
pAVE021	λ pL	두 개의 완전한 팔린드롬 서열	작동자 간격 91 bp(DPPS91)
pAVE035	λ pL	두 개의 완전한 팔린드롬 서열	작동자 간격 92 bp(DPPS92)

pAVE027	λ pL	하나의 완전한 팔린드롬 서열	
pAVE046	λ pL	하나의 완전한 팔린드롬 서열	분비 벡터

[0146] 실시예 2. 재조합 균주의 생성

[0147] 대장균 균주 W3110 (균주 ATCC27325로서 American Type Culture Collection로부터 입수가가능함) 및 BL21 (EMD Biosciences Inc, San Diego, USA로부터 입수가가능함)을 하기의 표2에 기재된 바와 같은 플라스미드로 전기천공에 의해 형질전환시켰다. 결과물인 재조합 균주를 정제하고 글리세롤 스톡(glycerol stock)으로 -80℃에서 유지시켰다.

[0148] 표 2: 작제된 재조합 균주

표 2

숙주	플라스미드	설명 (단백질:프로모터:작동자 시스템)	재조합체 지정 번호
ATCC27325	pAVE013	TNF α :T7A3:DPPS91	CLD018
ATCC27325	pAVE030	TNF α :T7A3:DPPS92	CLD026
ATCC27325	pAVE031	TNF α :T7A3:SPPS	CLD032
ATCC27325	pAVE041	TNF α :tac:single native lacO	CLD043
ATCC27325	pAVE017	TNF α :tac:DPPS91	CLD019
ATCC27325	pAVE040	TNF α :tac:SPPS	CLD042
ATCC27325	pAVE049	TNF α :tac:DPPS124	CLD050
ATCC27325	pAVE021	TNF α : λ pL:DPPS91	CLD021
ATCC27325	pAVE035	TNF α : λ pL:DPPS92	CLD038
ATCC27325	pAVE027	TNF α : λ pL:SPPS	CLD030
BL21	pAVE013	TNF α :T7A3:DPPS91	CLD035
BL21	pAVE030	TNF α :T7A3:DPPS92	CLD028
ATCC27325	pAVE046	D1.3 Fab: λ pL:SPPS	CLD048

[0149]

[0150] *비교예 1

[0151] 작동자 없이 T7A3 프로모터를 갖는 플라스미드의 생성을 위한 출발 벡터는 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I 제한효소 인식부위에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드 링커를 이용하여 T7A3 프로모터를 이 플라스미드에 클로닝시켰다.

[0152] 올리고뉴클레오타이드 21와 22를 어닐링시켜 링커 2122를 제조하였다.

[0153] 올리고뉴클레오타이드 21 (서열번호 18)

[0154] 5' AATTGCAAAACAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCACATG

[0155] AAACGACAGTGAGTCA

[0156] 올리고뉴클레오타이드 22 (서열번호 19)

[0157] 5' CTAGTGACTCACTGTCGTTTCATGTGGTACCTCGTACCGTGTCTTACTTCATGTTGTC

[0158] AACCGTTTGTGTTTCG

[0159] *그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 제한효소 처리 및 서열분석에 의해 82개의 클론을 스크리닝하였다.

[0160] 올바른 T7A3 프로모터 서열을 갖는 클론은 확인되지 않았다(모두 상기 서열에 돌연변이를 포함함). 이는 이 강력한 구조성(constitutive) 프로모터를 포함하는 플라스미드의 작제에 문제가 있다는 것을 시사한다.

[0161] 비교예 2

[0162] 하나의 원형 Lac 작동자 서열의 제어 하에 있는 T7A3 프로모터를 갖는 플라스미드의 생성을 위한 출발 벡터는 pZT7#2.0이었다. EcoR I 및 Xba I에 의해 합성 올리고뉴클레오티드 링커를 이용하여 T7A3 프로모터 및 원형의 Lac 작동자(LacO) 서열을 이 플라스미드 내에 클로닝시켰다.

[0163] 올리고뉴클레오티드 23과 24를 어닐링시켜 링커 2324를 제조하였다.

[0164] 올리고뉴클레오티드 23 (서열번호 20)

[0165] 5' AATTCGAAACAAAACGGTTGACAACATGAAGTAAACACGGTACGATGTACCGGAAT

[0166] TGTGAGCGGATAACAATTCCCCA

[0167] 올리고뉴클레오티드 24 (서열번호 21)

[0168] 5' CTAGTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCGGTACATCGTACCGTGTTTACTTCA

[0169] TGTGTCAACCGTTTTGTTTCG

[0170] 그 후, 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 Xba I/EcoR I 단편으로 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)에 형질전환시켰다. 플라스미드 DNA의 제한효소 처리에 의해 1차 스크리닝을 수행하였다. 그 후, 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. 제한효소 처리 및 서열분석에 의해 94개의 클론을 스크리닝하였다. 이 경우에도, 올바른 서열을 갖는 클론은 확인되지 않았다. 그러나, 거의 온전한 서열(near intact sequence)를 갖는 하나의 클론을 확인하였다. 이 클론은 상기 서열의 위치 -37 부근에 추가적인 'G'를 포함했다. 예상된 서열이 이 영역에 -GG-를 포함하기 때문에 돌연변이의 정확한 위치를 지정하는 것이 어렵다. 인간 TNF α 유전자를 거의 온전한 서열을 갖는 상기 플라스미드에 Nde I/Xho I 단편으로 클로닝시켰다. 클로닝 숙주 균주 XL-Blue MR (Stratagene)로부터의 20개의 콜로니를 스크리닝하였다. 하나는 돌연변이(전술된 추가적인 'G'이 아닌 돌연변이)를 갖지 않는 양성 클론이었다. 이 플라스미드를 생산 숙주(ATCC27325)에 형질전환시키고 상기 플라스미드를 재-서열분석하였다.

[0171] 이는 상기 플라스미드가 T7A3 프로모터 및 인간 TNF α 서열에 심각한(gross) 돌연변이를 포함하고, 원형의 lac 작동자 서열의 제어 하에서도, T7A3 프로모터의 이용이 플라스미드 불안정성을 초래한다는 것을 나타냈다.

[0172] 실시예 3

[0173] -80°C 냉동고로부터 CLD032의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기(orbital shaker)에서 16시간 동안 37°C에서 인큐베이션 하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크 2개에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 하나의 플라스크를 최종 농도 0.05 mM의 IPTG(이소프로필- β .-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고 기초 발현(basal expression)을 모니터링하기 위해 제2의 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두었다. 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물(whole cell lysate)의 콜로이드 블루(Colloidal Blue)로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도 계(densitometry) 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 3에 요약하였다.

표 3

시간(시)	hTNF α 의 축적 수준(%TCP [*])
3	2
4	18
6	25

8	33
24	42
24(기초 수준, IPTG 불포함)	13

[0175] (*): TCP = 총 세포 단백질(Total Cell Protein)

[0176] 비교예 1과 2 및 실시예 3에서 제시된 데이터는 강력한 T7A3 프로모터의 효과적인 제어가 놀랍게도 하나의 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 이용하여 달성되었다는 것을 보여 준다. 하나의 원형 작동자의 이용(비교예 2)이 안정한 재조합 생산 균주가 수립될 수 있게 하는 충분한 기초 조절(basal control)을 제공하지 않았다는 것을 고려할 때 이는 완전히 예기치 못한 것이었다. 유도를 위한 유도 인자의 비교적 낮은 농도를 이용하여 하나의 완전한 팔린드롬 제어 시스템으로 높은 생성물 축적 수준을 달성하였다. 기초 발현(유도 인자의 부재 시)을 관찰하였으나, 기초 발현은 유의성 있게 연장된 인큐베이션(24시간) 후에야 명확했다.

[0177] 실시예 4

[0178] -80℃ 냉동고로부터 CLD018의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10μl를 테트라사이클린(10μg/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 종 배양(seed culture)을 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 종 배양물의 500μl를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.05 mM 및 1 mM의 IPTG(이소프로필-β-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시켰다. 또한, 하나의 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 상기 플라스크의 배양을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNFα의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이드ال 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNFα의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 4에 요약하였다.

표 4

0.05mM IPTG 시간(시)	hTNFα 축적 수준 (%TCP)	1mM IPTG 시간(시)	hTNFα 축적 수준 (%TCP)
3	2	5	7
4	5	6	12
6	8	8	19
8	13	24	26
24	19		
24(기초, IPTG 불포함)	검출되지 않음		

[0179]

[0180] 이 데이터는 91 bp 간격으로 떨어져 배치된 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 이용하여 강력한 T7A3 프로모터의 추가적인 제어가 실현될 수 있다는 것을 보여주었다. (유도 인자의 부재 하에) 기초 발현은 억제를 제어하기 위한 하나의 완전한 팔린드롬 작동자를 이용하여 달성되었던 수준으로부터 유의성 있게 감소되었다. 상기 두 개의 완전한 팔린드롬 서열을 이용하여 달성된 기초 발현의 제어는 기초 발현의 제어가 두 개의 상이한 조절 요소를 요구하는 미국 특허 제6,537,779호의 T7 시스템에 비교할 때 예기치 못한 것이었다. 본 실시예에서, 기초 발현의 제어는 대장균 RNA 폴리머라아제의 높은 배경 수준에서 달성되었다.

[0181] 실시예 5

[0182] -80℃ 냉동고로부터 CLD026의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.05 mM 및 0.005 mM의 IPTG(이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시켰다. 또한, 하나의 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 상기 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 5에 요약하였다.

표 5

0.005mM IPTG 유도 시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)	0.05mM IPTG 유도 시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)
8	15	8	17
24(기초, IPTG 불포함)	검출되지 않음		

[0183]

[0184] *결과는 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열 간 간격을 1 bp (91 bp에서 92 bp까지) 변화시키는 것은 달성된 기초 발현 및 최종 축적 수준의 측면에서 성능에 부정적으로 영향을 미치지 않았다는 것을 보여주었다. 예기치 않게, IPTG 농도를 10배 감소시키는 것은(0.05mM로부터 0.005mM로 감소) 유도된 생산성을 유의성 있게 감소시키지 않았다.

[0185] 실시예 6

[0186] -80℃ 냉동고로부터 CLD042 및 CLD043의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 각각의 글리세롤 스톱 10 μ l를 각각 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨) 2개에 접종하였다. 이들을 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 각각 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.5 mM의 IPTG(이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시켰다. 또한, 각 균주의 배양물을 포함하는 플라스크를 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 상기 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 20시간의 인큐베이션 후에 CLD042 및 CLD043의 유도되지 않은 배양물에서 hTNF α 의 기초 축적 수준은 상기 시료로 채취된 세균의 SDS-PAGE 후 웨스턴 블롯 분석(항-hTNF α 항체 이용)에 의해 비교하였다. 상기 블롯을 스캐닝하고 비교를 가능하게 하기 위해 데이터를 정규화시켰다. 결과는 하기의 표 6에 요약된다.

표 6

CLD043: tac 프로모터, 하나의 원형 lac 작동자- 0.5 mM IPTG 유도		CLD042: tac 프로모터, 하나의 완전한 팔린드롬 작동자 - 0.5 mM IPTG 유도	
시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)	시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)
3	6	3	2
12	23	12	18
20	25	20	21
웨스턴 블롯: 스캔 강도 *		웨스턴 블롯: 스캔 강도 *	
20(기초, IPTG 불포함)	1	20(기초, IPTG 불포함)	0.25

[0187]

[0188]

(*) = 웨스턴 블롯 상의 hTNF α 밴드의 스캔. CLD043의 강도 스캔 데이터에 대해 정규화된 CLD042의 강도 스캔 데이터.

[0189]

상기 결과는 하나의 완전한 팔린드롬 작동자 서열이 tac 프로모터 시스템의 유도된 생산성에 부정적으로 영향을 미치지 않으면서 (유도 인자의 부재 시) 기초 발현을 4배 감소시키기 위해 이용될 수 있다는 것을 보여주었다.

[0190]

실시예 7

[0191]

-80°C 냉동고로부터 CLD019의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM 및 0.005 mM의 IPTG(이소프로필-. β .-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시켰다. 또한, 하나의 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이드 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 도 2에 도시된다.

[0192]

도 2에 표시된 데이터는 tac 프로모터와 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열의 조합은 발현율이 유도를 위해 사용된 IPTG의 농도에 의해 직접적으로 조절될 수 있는 시스템을 유도한다는 것을 보여주었다. 그와 같은 시스템은 이종 (heterologous) 단백질의 발현을 조절하기 위해, 예를 들면, 가용성 형태의 단백질의 축적을 최대화하거나 또는 이종 단백질 분비가 재조합 세포의 성장과 생산성에 대해 가질 수 있는 유해한 효과의 문제를 회피하기 위해, 이용될 수 있다.

[0193]

실시예 8

[0194]

-80°C 냉동고로부터 CLD030의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 하나의 플라스크를 최종 농도 0.05 mM의 IPTG(이소프로필-. β .-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고 다른 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 지속하면서, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취

하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 7에 요약된다.

표 7

[0195]

시간(시)	hTNF α 의 축적 수준(%TCP [*])
4	2
6	5
8	9
24	12
24(기초 수준, IPTG 불포함)	검출되지 않음

[0196]

표 7에 제시된 데이터는 하나의 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 이용하여 놀랍게도 매우 강력한 λ pL 프로모터의 제어가 달성될 수 있다는 것을 보여준다. 하나의 완전한 팔린드롬 제어 시스템을 이용하여 높은 생성물 축적 수준이 달성될 수 있다.

[0197]

실시예 9

[0198]

-80°C 냉동고로부터 CLD021 및 CLD038의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 각각의 글리세롤 스톱 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 각각 접종하였다. 이들을 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 각각 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 하나의 플라스크를 최종 농도 1 mM의 IPTG(이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고, 제2의 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 상기 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔 및 SDS-PAGE 후 웨스턴 블롯 분석(항-hTNF α 항체 이용)을 이용하여 hTNF α 의 축적을 결정하였다. 데이터는 하기의 표 8에 요약된다. CLD038 균주의 웨스턴 블롯 분석은 도 3에 도시된다.

표 8

[0199]

분석	hTNF α 축적-CLD021(λ pL:DPPS91)	hTNF α 축적-CLD038(λ pL:DPPS92)
콜로이달 블루 SDS-PAGE (IPTG 유도 후)	검출되지 않음	검출되지 않음
웨스턴 블롯 (IPTG 유도 후)	양성	양성(도 2 참조)
콜로이달 블루 SDS-PAGE (IPTG 유도 없는 기초 수준, 24시간 후)	검출되지 않음	검출되지 않음
웨스턴 블롯 (IPTG 유도 없는 기초 수준, 24시간 후)	검출되지 않음	검출되지 않음

[0200]

이 결과들은 91 bp 또는 92 bp 간격인 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열과 λ pL 프로모터의 조합은 매우 철저한(tight) 억제를 초래했다는 것을 입증했다. 웨스턴 블롯은 표적 단백질의 기초 발현이 검출되지 않았다는 것을 나타냈다. 유도 시, 낮은 발현 수준이 달성되었다. λ pL 프로모터가 매우 강력한 프로모터라는 것을 고려할 때 이 결과들은 전혀 예상되지 않았다. 그와 같은 시스템은 예를 들면, 숙주 세포에 대한 높은 독성의 단백질의 발현을 주도하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 막 단백질의 발현 및 삽입을 위해, 제어된 발현이 유리한 경우 이용될 수 있다.

[0201] 실시예 10

[0202] -80℃ 냉동고로부터 CLD028 및 CLD035의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 각각의 글리세롤 스톱 10 μ l를 각각 테트라사이클린(10 μ g/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨) 2개에 접종하였다. 이들을 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 각각 상기 배양물의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 1 mM의 IPTG(이소프로필- β -D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고, 전술된 조건 하에서 상기 인큐베이션을 지속하며, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 9에 요약된다.

표 9

CLD035: T7A3 프로모터, 91bp 간격의 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자		CLD028: T7A3 프로모터, 92 bp 간격의 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자	
IPTG 유도 후 시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)	IPTG 유도 후 시간(시)	hTNF α 축적 수준 (%TCP)
2	7	2	10
4	14	4	15
20	27	20	23

[0203]

[0204] 실시예 4 및 5에 제시된 데이터와 함께 이 데이터는 대장균 K-12 및 B 균주가 이용될 수 있다는 것을 보여주었다.

[0205] 실시예 11

[0206] 하기에 기재된 각각의 균주의 글리세롤 스톱 200 μ l를 15 μ g/ml의 테트라사이클린으로 보충된 200 mL의 Luria Broth (LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)를 담은 2.0L 배플 진탕 플라스크(baffled shake flask)에 첨가하여 발효 접종원을 배양했다. 접종원을 진탕기-인큐베이터에서 250 rpm의 교반 하에 37℃에서 12시간 동안 성장시켰다. 200ml 진탕 플라스크 접종원을 이용하여 10L의 회분 배양 배지를 담은 15L 용량의 발효기에 접종했다. 하기에 기재된 운전 조건 하에서 발효를 수행하였다.

[0207] 온도를 37℃로 조절하고 35%(w/v) 수산화암모늄의 자동 첨가에 의해 pH를 6.8로 조절하였다. 용존 산소 분압(dissolved oxygen tension: dOT) 설정은 30%의 공기 포화였고 발효기 교반기(stirrer) 속도를 최저 250 rpm 내지 최대 1500 rpm의 자동 조절 및 주입 기체 흐름(inlet gas stream)으로의 산소의 자동 첨가에 의해 조절하였다. 발효기 용기로의 기류(airflow)는 발효 내내 10L/분이었다. 발효기 내의 압력은 50 내지 200 mbar로 유지되었다.

[0208] 접종 후 약 10 시간 후에 일어난 탄소원(즉, 글리세롤)의 고갈 때까지 회분식으로 발효를 수행하였고 상기 발효는 dOT의 급격한 증가를 특징으로 했다. 탄소원의 고갈 시점에 11g의 글리세롤/L 배지/시의 공급 속도로 글리세롤/염화마그네슘 공급물의 첨가에 의해 유가식(fed-batch) 발효를 개시하였다. 발효액의 바이오매스(biomass) 수준이 OD₆₀₀ = 50-60에 도달하면 0.5 mM의 최종 농도까지 IPTG를 첨가하여 유도를 수행하였다. 유도 후 12시간 동안 유가식 배양기(fed-batch phase)를 지속하였다. 회수(harvet) 시 바이오매스 수준(OD₆₀₀) 및 hTNF α 축적 (%TCP)/hTNF α 역가(g/L)를 결정하기 위해 시료를 채취하였다(콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔).

[0209] 회분 성장 배지(batch growth medium)의 조성이 표 10에 제공된다.

표 10

성분	최종 농도 정제수 기준 [g/L], mg/L] 및 [ml/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	14.0
글리세롤	35.0
효모 추출물 (Becton Dickinson)	20.0
KH ₂ PO ₄	2.0
K ₂ HPO ₄	16.5
시트르산	7.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.47
H ₃ PO ₄	1.5 ml/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294
Antifoam AF204	0.2 ml/L
테트라사이클린	15 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	114 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	29 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	17 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	9 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4 mg/L
H ₃ BO ₃	12 mg/L

[0210]

[0211] 글리세롤/염화마그네슘 공급물(feed)의 조성이 표 11에 제공된다.

표 11

공급물의 성분	정제수 기준, 필요한 양[g/L]
글리세롤	714
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4

[0212]

[0213] 결과는 표 12에 요약된다. CLD030 균주에 대한 hTNF α 생산성 프로파일이 도 4에 표시된다.

표 12

균주	발현 벡터 설명	회수(harvest)시 OD600	회수시 hTNF α 축적(%TCP)	회수시 hTNF α 역가(mg/L)
CLD018	T7A3 프로모터, 91 bp 간격의 두 개의 완전한 팔린드롬	147	29	8400
CLD026	T7A3 프로모터, 92 bp 간격의 두 개의 완전한 팔린드롬	204	34	11400
CLD032	T7A3 프로모터, 하나의 완전한 팔린드롬 서열	194	41	12500
CLD019	tac 프로모터, 91 bp 간격의 두 개의 완전한 팔린드롬	196	22	8300
CLD030	하나의 완전한 팔린드롬 서열을 갖는 λpL 프로모터	167	7	2600

[0214]

[0215] 데이터는 이중 단백질의 제조를 위한 상기 시스템의 유용성을 명확하게 보여준다. 단순한 일반적인 최적화되지 않은 발효 및 유도 과정을 이용하여 높은 생성물 역가를 달성하였다. 도 4에 도시된 생산성 프로파일에 의해 입증된 바와 같이, 플라스미드 pAVE027의 제어 특성은 이중 단백질, 특히, 분비를 최대화하기 위해 발현의 제어

를 필요로 하는 단백질의 생산을 최대화하기 위해 이용될 수 있다.

[0216] *실시에 12

[0217] * -80°C 냉동고로부터 CLD050의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μl 를 테트라사이클린(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μl 를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C , 200rpm에서 인큐베이션시켰다. $\text{OD}_{600}=0.5-0.7$ 까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 하나의 플라스크를 최종 농도 0.05 mM의 IPTG(이소프로필-. β .-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고 또 다른 플라스크는 유도되지 않은 상태로 두고, 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장 및 세균 세포 내의 hTNF α 의 축적의 측정을 위해 시료를 채취 하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해물의 콜로이달 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 hTNF α 의 축적된 수준을 결정하였다. 결과는 하기의 표 13에 요약된다.

표 13

유도 후 시간(시)	hTNF α DML 축적 수준(%TCP)
4	16
24(기초, IPTG 불포함)	검출되지 않음

[0219] 놀랍게도, 두 개의 완전한 팔린드롬 작동자 서열은 간격이 증가된 경우에 작용했다. 두 개의 완전한 팔린드롬의 간격은 예를 들면, 다른 프로모터의 효과적인 제어를 위해 변경될 수 있다.

[0220] 실시예 13

[0221] -80°C 냉동고로부터 CLD048의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10 μl 를 테트라사이클린(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500 μl 를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37°C , 200rpm에서 인큐베이션시켰다. $\text{OD}_{600}=0.5-0.7$ 까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.1 mM의 IPTG(이소프로필-. β .-D-1-티오갈락토피라노시드)로 유도시키고 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 2시간 더 지속하였다. 그 후, 세포 및 잔여 세포 불포함 성장 배지(residual cell free growth medium)를 회수하였다. 회수된 세포들을 대상으로 가용성 대장균 주변세포질(periplasmic) 분획에 분배된 단백질을 함유한 세포 분획을 분리하기 위해 삼투압 충격 세포 분획화(osmotic shock cell fractionation)를 더 수행하였다. 가용성 주변세포질 추출물 및 잔여 성장 배지 내의 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적을 정제된 활성 D1.3 Fab로 작성된 표준 곡선을 참조하여 ELISA 분석법에서 D1.3 Fab의 리소자임(항원)으로의 결합을 결정하는 것에 의해 추정하였다. 대장균의 주변세포질 및 잔여 성장 배지(주변세포질로부터 성장 배지로의 유출에 의함) 내의 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적이 표 14에 표시된다. 대장균의 주변세포질 및 잔여 성장 배지에서 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적을 "단위 바이오매스(OD_{600}) 당 배양액(culture) 리터 당 활성 물질 μg (μg active material per litre of culture per unit of biomass (OD_{600}))"으로 정규화시켰다.

표 14

분획	생물학적 활성 D1.3 Fab($\mu\text{g}/\text{L}$ 배양액/OD)
잔여 성장 배지(residual growth medium)	460
주변세포질(periplasm)	4020
전체(잔여 성장 배지 + 주변세포질)	4480

[0223] 이종 단백질, 특히 복잡한 디설피드(disulphide) 결합 형성을 필요로 하는 단백질의 고 수준 분비를 가능하게 하기 위해 이 시스템에 의해 제공되는 제어의 유용성은 대장균의 주변세포질에서 생물학적 활성 D1.3 Fab의 높은 수준의 분비 및 축적에 의해 명확하게 예시된다. 추가적으로, 유가식 발효(예를 들면, 실시예 11 또는 하기의 실시예 14에 기재된 바와 같은 발효)가 그와 같은 단백질을 고 수율로 제조하기 위해 이용될 수 있는 방법은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 명백할 것이다.

[0224] 실시예 14

[0225] 실시예 11에 기재된 발효 공정을 CLD048을 이용하여 반복하였다. 배양에서 바이오폐스가 OD₆₀₀ = 약 50에 도달되면, 최종 농도 0.15 mM의 IPTG(이소프로필-β-D-1-티오갈락토포라노시드)의 첨가에 의해 유도를 수행하였다. 유도 후 35-45 시간 동안 유가식 배양기를 지속하였다. 그 후, 세포 및 잔여 세포 불포함 성장 배지를 회수하였다. 회수된 세포들을 대상으로 가용성 대장균 주변세포질 분획에 분배된 단백질을 함유한 세포 분획을 분리하기 위해 삼투압 충격 세포 분획화를 더 수행하였다. 가용성 주변세포질 추출물 및 잔여 성장 배지 내의 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적을 정제된 활성 D1.3 Fab로 작성된 표준 곡선을 참조하여 ELISA 분석법에서 D1.3 Fab의 리소자임(항원)으로의 결합을 결정하는 것에 의해 추정하였다. 대장균의 주변세포질 및 잔여 성장 배지에서 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적을 "배양액 리터 당 활성 물질 mg"으로 정규화시켰다.

[0226] 대장균의 주변세포질 및 잔여 성장 배지(주변세포질로부터 성장 배지로의 유출에 의한) 내의 생물학적 활성 D1.3 Fab의 축적이 표 15에 표시된다.

표 15

[0227]

분획	생물학적 활성 D1.3 Fab(mg/L 배양액/OD)
잔여 성장 배지	525
주변세포질	57
전체(잔여 성장 배지 + 주변세포질)	582

[0228] 상기 발현 시스템을 이용하여 생물학적 활성 D1.3 Fab의 고 수준 발현을 입증하였다.

[0229] 실시예 15

[0230] D1.3 (항-리소자임) 및 A5B7 (항-CEA(carcinoembryonic antigen:암종 배아 항원))으로부터의 가변 경쇄 영역(variable light region)와 가변 중쇄 영역이 하나의 폴리펩티드 사슬 상에서 연결된 것인, 합성 양특이성 단쇄 4가의 디아바디(synthetic bispecific single chain tetravalent diabody)(bsctDb)를 설계하였다. 상기 분자에 대한 DNA 서열이 도 5(서열번호 22)에 도시된다. 이를 Nde I 및 Not I으로 처리한 pAVE046에 Nde I/Not I 단편으로 클로닝하였다. 재조합 효소 처리에 의해 재조합 플라스미드를 스크리닝하고 서열분석에 의해 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE078로 명명하였다. pAVE078을 대장균 W3110에 형질전환시켜 CLD073을 제조하고, 이를 정제하여 글리세롤 스톱으로 -80℃에서 유지시켰다..

[0231] -80℃ 냉동고로부터 CLD073의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 해동된 글리세롤 스톱 10μl를 테트라사이클린(10μg/ml) 및 글루코오스(1g/L)가 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 상기 배양물의 500μl를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크 2개에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm에서 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에서, 상기 플라스크를 최종 농도 0.5 mM 또는 0.1 mM의 IPTG(이소프로필-β-D-1-티오갈락토포라노시드)로 유도시키고 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 20시간 더 지속하였다. 그 후, 세포 및 잔여 세포 불포함 성장 배지를 회수하였다. 회수된 세포들을 대상으로 가용성 대장균 주변세포질 분획에 분배된 단백질을 함유한 세포 분획을 분리하기 위해 삼투압 충격 세포 분획화를 더 수행하였다. 주변세포질 추출물 및 잔여 성장 배지에서 생물학적 활성 D1.3-A5B7 bsctDb의 발현, 분비, 폴딩(folding) 및 축적을 경쟁적 ELISA 분석에서 항-CEA 단일클론 항체의 CEA(항원)로의 결합의 억제 및 경쟁적 ELISA 분석에서 항-리

소자임 Fab 항체 단편의 리소자임(항원)으로의 결합을 결정하는 것에 의해 추정하였다.

[0232] 수득된 데이터는 유도의 종료 시에 대부분의 D1.3-A5B7 bsctDb가 잔여 성장 배지(주변세포질로부터의 유출)로 분배되었다는 것을 나타냈다. 이 데이터(경쟁적 ELISA에서 bsctDb의 결합)가 표 16에 표시된다. 수득된 데이터는 0.5 mM IPTG로 유도된 배양물로부터의 잔여 성장 배지 시료가 경쟁적 ELISA 분석에서 항-CEA 및 항-리소자임 항체의 결합을 완전하게 억제한다는 것을 보여준다. 0.1 mM IPTG로 유도된 배양물로부터의 잔여 성장 배지 시료는 감소된 억제 수준을 보여주었으며, 이는 이 시료에서 생물학적 활성 D1.3-A5B7 bsctDb의 보다 낮은 축적 수준을 나타낸다.

표 16

[0233]

시료	CEA 경쟁 ELISA에서 % 억제	D1.3 경쟁 ELISA에서 % 억제
대조구 (D1.3-A5B7 bsctDb 불포함)	없음	없음
0.5 mM IPTG로 유도된 배양액의 상층액	100	100
0.1 mM IPTG로 유도된 배양액의 상층액	부분적	부분적

[0234]

상기 새로운 발현 시스템을 이용하여, 대장균을 이용하여 생산하기 어려웠던 복잡한 복수-사슬 이중 단백질을 제조할 수 있다. 이는 새로운 발현 시스템을 이용하여 대장균에서 생물학적 활성 형태의 양특이성 단백질 4가의 디아바다가 생산될 수 있다는 것을 보여주는 것에 의해 예시되었다. 이는 상기 발현 시스템의 유용성을 더 예시한다.

[0235]

실시예 16

[0236]

글루타치온-S-트랜스퍼라아제-3C 프로테이나아제 융합(glutathione-S-transferase-3C proteinase fusion)(GST-3C) 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로서 Nde I 및 Xho I으로 처리된 pAVE011로 클로닝시켰다. 삽입물의 서열은 도 6에 도시된다(서열번호 23). 제한 효소 처리에 의해 재조합 플라스미드를 스크리닝하고 서열분석에 의해 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE052로 명명하였다. pAVE052를 대장균 BL21에 형질전환시켜 CLD054를 제조하고, 이를 정제하여 -80℃에서 글리세롤 스톱으로 유지시켰다.

[0237]

인간 인터페론 α2 (IFN α2) 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로서 Nde I 및 Xho I으로 처리된 pAVE011로 클로닝시켰다. 삽입물의 DNA 서열은 도 7에 도시된다(서열번호 24). 제한 효소 처리에 의해 재조합 플라스미드를 스크리닝하고 서열분석에 의해 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE058로 명명하였다. pAVE058을 대장균 W3110에 형질전환시켜 CLD059를 제조하고, 이를 정제하여 -80℃에서 글리세롤 스톱으로 유지시켰다.

[0238]

대장균에서의 발현을 위해 코돈 최적화된, 인간 에리트로포이에틴(EPO) 유전자를 Nde I/Xho I 단편으로서 Nde I 및 Xho I으로 처리된 pAVE011로 클로닝시켰다. 삽입물의 DNA 서열이 도 8에 도시된다(서열번호 25). 제한 효소 처리에 의해 재조합 플라스미드를 스크리닝하고 서열분석에 의해 확인하였다. 결과물인 플라스미드를 pAVE061로 명명하였다. pAVE061을 대장균 W3110에 형질전환시켜 CLD060을 제조하고, 이를 정제하여 -80℃에서 글리세롤 스톱으로 유지시켰다.

[0239]

실시예 11에 기재된 배지 및 공정 조건을 이용하여, CLD054, CLD059 및 CLD060의 유가식 발효를 수행하였다. 표 19에 기재된 바와 같이, 발효를 30℃ 또는 37℃에서 유지시켰다. 탄소원(즉, 글리세롤)이 고갈될 때까지, 발효를 회분식으로 수행하였다. 이 시점에 글리세롤(714g/L) 및 황산 마그네슘 (30g/L)을 함유한 공급물의 첨가에 의해 유가식 발효를 개시하였다. 발효액 내의 바이오매스 수준이 OD₆₀₀ = 50-60에 도달하면, IPTG의 첨가에 의해 유도를 수행하였다. 이용된 IPTG 농도는 표 17에 기재된다. 유도 후 12-15시간 동안 유가식 배양기를 지속하였다. 바이오매스 수준(OD₆₀₀) 및 단백질 생성물을 결정하기 위해 발효 동안 시료를 채취하였다(시료로 채취된 세균의 전세포 용해액의 콜로이드 블로로 염색된 SDS-PAGE 겔을 이용하여 (GST-3C, IFN α2 및 EPO) 역가(g/L) 측정).

표 17

균주	<i>E.coli</i> 숙주	단백질 및 발현 벡터 기술	발효 온도 °C	유도 IPTG 농도 (mM)	OD600	생성물 역가 (g/L)
CLD 054	BL21	GST-3C T7A3:DPPS91	37	0.50	100	8
CLD 059	W3110	IFN α 2 T7A3:DPPS91	37	0.10	120	9
			37	0.25	150	14
			37	0.50	160	14
CLD 060	W3110	EPO T7A3:DPPS91	37	0.10	100	>13
			30	0.50	90	>13

[0240]

[0241]

표 17에 제시된 데이터는 또한 광범위한 이중 단백질의 제조를 위한 상기 시스템의 유용성을 보여준다. 유도를 위해 이용된 IPTG의 농도만의 조절과 결합된 단순한 일반적인 발효 공정을 이용하여 높은 생성물 역가를 달성하였다. 이는 치료적으로 유용한 이중 단백질의 공정 개발 일정을 단축하기 위해 특히 유용하다.

[0242]

실시예 17

[0243]

슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)로부터의 L-2-할로알카노에이트 데할로게나아제(L-2-haloalkanoate dehalogenase)(hadL) 유전자를 PCR을 이용하여 도입시킨(engineered) Nde I 및 Spe I 부위를 이용하여 클로닝하였다. 상기 유전자 서열이 도 9에 도시된다(서열번호 26). 플라스미드 pAVE011를 Nde I 및 Spe I으로 처리하고 밴드를 겔로부터 추출하였다. hadL 유전자를 Nde I 및 Spe I으로 처리하고 상기 hadL 유전자를 겔로부터 추출하고 pAVE011에 라이게이션시켜서 pAVE075를 제조하였다. 슈도모나스 사바스타노이(*Pseudomonas savastanoi*)의 복제 원점을 PCR을 이용하여 플라스미드 pCN60 (ATCC 77101; Nieto C, et al. (1990) Gene 87: 145-149)로부터 카피하였다.

[0244]

사용된 프라이머는 하기와 같았다:

[0245]

F37A: 서열: 5' AGATCTACGCTTATGGGTGCCTTTCC (서열번호 27), 및

[0246]

B29a: 서열: 5' AGATCTAATACGCAAAACCGCCTCTCC (서열번호 28).

[0247]

PCR 생성물을 먼저 TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen)에 클로닝시키고 그 후, Bgl II 처리에 의해 pAVE075로 클로닝시켰다. 결과물인 플라스미드, pAVE086을 전기천공을 통해 슈도모나스 푸티다 NCIMB 12018에 형질전환시켜 CLD075를 제조하고, 이를 정제하고 -80°C에서 글리세롤 스톱으로 유지시켰다. -80°C 냉동고로부터 CLD075의 배양액을 꺼내어 해동시켰다. 상기 해동된 글리세롤 스톱의 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml)으로 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 30°C에서 인큐베이션시켰다. 그 후, 상기 배양액의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 2개의 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 각각 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 30°C, 200rpm으로 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에 하나의 플라스크를 IPTG로 최종 농도 0.5 mM까지 유도시키고, 제2의 플라스크는 기초 발현을 모니터링하기 위해 유도되지 않은 상태로 유지하였다. 전술된 조건 하에 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안, 성장 및 상기 세균 세포 내에서의 HadL 단백질의 축적을 측정하기 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 전세포 용해액의 콜로이드 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔의 밀도계 스캐닝을 이용하여 HadL 단백질의 축적 수준을 결정하였다.

[0248]

HadL 단백질의 발현 및 축적이 도 10에 제시된다. 데이터는 T7A3:DPPS91 발현 시스템이 다른 원핵세포 숙주 시스템에서 기능했다는 것을 보여준다. 놀랍게도, 상기 발현 시스템은 슈도모나스 푸티다에서 대장균을 숙주 시스템으로 이용한 경우 관찰된 것과 동일한 효율성으로 기능했다. 유도 인자의 부재 하에 23시간의 인큐베이션 후

에도 기초 발현은 검출되지 않았다. IPTG를 이용한 유도 후에 슈도모나스 푸티다에서 높은 수준의 발현 및 축적이 달성되었다.

- [0249] 실시예 18
- [0250] 슈도모나스 푸티다 CLD075를 이용한 유가식 발효를 실시예 11에 기재된 일반적인 대장균 배지 및 공정 조건을 이용하여 수행하였다. 발효를 30℃ 및 pH 7.0 (25% 수산화암모늄 및 10% 인산으로 조절함)에서 유지시켰다. 탄소원(즉, 글리세롤)의 고갈 때까지 발효를 회분식으로 수행하였다. 이 시점에 글리세롤(714g/L) 및 황산마그네슘(30g/L)을 포함하는 공급물의 첨가에 의해 유가식 발효를 개시하였다. 발효액의 바이오매스 수준이 $OD_{600} = 50$ 에 도달하면, 1 mM(최종 농도) IPTG의 첨가에 의해 발효를 수행하였다. 유도 후 12-15시간 동안 유가식 배양기를 지속하였다. 바이오매스 수준(OD_{600}) 및 HadL 단백질 축적(%TCP), 시료로 채취된 세균의 전세포 용해액의 콜로이드ال 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔)을 결정하기 위해 발효 동안 시료를 채취하였다. 유도 후 CLD075의 성장 및 HadL 단백질의 발현/축적이 도 11에 제시된다.
- [0251] 단지 대장균과의 이용을 위해 고안된 일반적인 성장 배지를 이용하는 것에 의해서도 슈도모나스 푸티다의 발현 시스템을 이용하여 높은 수준의 단백질 발현 및 축적(>40% TCP)을 달성하였다.
- [0252] 실시예 19
- [0253] 합성 Gal 억제자 유전자(대장균)를 PstI 부위에 PstI 단편으로서 벡터 pZen042 (EP 0 502 637에 기재됨)에 클로닝시켰다. 시계방향 및 반시계 방향 배향인 Gal 억제자 유전자를 갖는 클론을 식별하였다. 반시계 방향 배향을 갖는 클론을 선택하여 pAVE071을 생성하였다.
- [0254] 미국특허 제6,537,779호에 개시된 바와 같이 제조된 플라스미드 pZT7#2.0에서 Gal 프로모터 및 작동자 서열의 작제를 개시하였다. pZT7#2.0은 pAT153 벡터 백본, cer 안정성 서열, tet A/R, 목적 유전자의 상류에 있는 하나의 원형의 lac 작동자 서열 및 상류의 T4 전사 종결자를 갖는다. 원형의 Gal 작동자 서열을 변형하여 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 생성하였다. 이를 EcoRI 및 XbaI 제한효소 인식부위에 의해 합성 링커를 이용하여 전술된 플라스미드에 클로닝시켰다. 올리고뉴클레오티드 GalB1 및 GalB2를 어닐링시켜 링커 GalB를 제조하였다:
- [0255] GalB1 (서열번호 29)
- [0256] 5' AATTCATACCATAAGCCTAATTCTACGAATTATCAGAGTTCTGGTTACCGGT
- [0257] GTAAGCGCTTACACTGT
- [0258] GalB2 (서열번호 30)
- [0259] 5' CTAGACAGTGTAAGCGCTTACACCGTAACCGAAGTCTGATAATTCGTAGA
- [0260] ATTAGGCTTATGGTATG
- [0261] 상기 링커를 플라스미드 pZT7#2.0에 라이게이션시키고 EcoR I/Xba I 단편으로서 클로닝 숙주 균주 XL-1 Blue MR (Stratagene)로 형질전환시켰다. AgeI을 이용한 제한효소 처리에 의해 형질전환체의 1차 스크리닝을 수행하였다. 서열분석에 의해 서열을 확인하였다. hTNF α 유전자를 NdeI/XhoI 단편으로 이 플라스미드에 클로닝시켰다.
- [0262] XmaI 및 MscI으로 처리하고 XmnI 및 XmaI으로 처리된 pAVE071에 라이게이션시켜 hTNF α 유전자 및 부분적인 Gal 완전한 팔린드롬 작동자 서열을 클로닝하였다. 제한효소 처리에 의해 hTNF α 유전자의 존재에 대해 클론을 스크리닝하였다.
- [0263] 상류의 완전한 팔린드롬 Gal 작동자 및 Gal 프로모터를 StuI 및 EcoRI 부위에 의해 합성 링커를 이용하여 각각 이 플라스미드에 클로닝시켰다. 올리고뉴클레오티드 GalA1과 GalA2를 어닐링시켜 링커 GalA를 제조하였다:
- [0264] GalA1 (서열번호 31):
- [0265] 5' CAATTGTGTAAGCGCTTACACAACCTTTATTCATGTCACACTTTTCGCATCTT TGTTATGCTATGGTG
- [0266] GalA2 (서열번호 32)

- [0267] 5' AATTCACCATCGCATAACAAGGATGCGAAAAGTGTGACATGGAATAAAGTTG
- [0268] TGTAAGCGCTTACACAATTG
- [0269] MfeI에 의한 처리로 링커의 존재를 검출하고 서열분석에 의해 확인하였다. 이 플라스미드를 대장균 W3110에 형질전환시켜 CLD085를 생성하고, 이를 정제하고 -80℃에서 글리세롤 스톱으로 유지시켰다.
- [0270] -80℃ 냉동고로부터 CLD085의 바이알을 꺼내어 해동시켰다. 상기 해동된 글리세롤 스톱의 10 μ l를 테트라사이클린(10 μ g/ml)으로 보충된 5 ml Luria Broth(LB, 5g/L 효모 추출물(Oxoid), 10g/L 트립톤(Oxoid), 및 5g/L 염화나트륨)에 접종하였다. 이를 오비탈 진탕기에서 16시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 그 후, 상기 배양액의 500 μ l를 이용하여 50 ml의 Luria Broth(조성은 전술된 바와 같음)를 담은 250 ml 엘렌마이어 플라스크에 접종하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 37℃, 200rpm으로 인큐베이션시켰다. OD₆₀₀=0.5-0.7까지 성장을 모니터링하였다. 이 시점에 상기 플라스크를 갈락토오스로 최종 농도 10.0 mM까지 유도시켰다. 전술된 조건 하에 인큐베이션을 지속하고, 상기 인큐베이션 동안, 성장 및 상기 세균 세포 내에서의 hTNF α 단백질의 축적을 측정하기 위해 시료를 채취하였다. 시료로 채취된 세균의 SDS-PAGE 후 (항-hTNF α 항체를 이용한) 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 hTNF α 의 축적을 결정하였다. 데이터는 도 17에 제시된다. 이는 gal 억제자 유전자와 조합된 완전한 팔린드롬 gal 작동자 서열을 이용하여 유도 인자의 부재 하에 gal 프로모터의 매우 철저한 억제를 가져 오고, 반면에 놀랍게도 유도 인자 갈락토오스가 첨가되면 유도 능력을 여전히 유지한다는 것을 보여준다.
- [0271] 실시예 20
- [0272] 비-통합성(non-integrating) 효모 벡터를 하기와 같이 작제하였다:
- [0273] 1) 서열 1 (사카로마이세스 세레비시에 CYC1 프로모터의 하류에 있는 대장균 Lac I)을 Xho I으로 처리된 pCR2.1 (Invitrogen)에 Xho I 단편으로 클로닝시킨다. 클론 서열 1이 도 15에 도시된다(서열번호 35).
- [0274] 2) 서열 2(사카로마이세스 세레비시에 MF- α 1 유전자 프로모터, MF- α 1 프로모터 영역의 양쪽에 완전한 팔린드롬 lac 작동자 서열 및 하류에 위치한 C-말단 c-myc tag(elafin-cmyc)을 갖는 단백질 elafin에 대한 유전자 서열로 구성됨)를 상기 단계 1에서 작제된 Hind III 처리된 플라스미드에 Hind III 단편(PCR에 의해 제조됨)으로서 클로닝하여 플라스미드 2를 생성한다. 클론 서열 2가 도 16에 도시된다(서열번호 36).
- [0275] 3) LEU2 (선택 마커 유전자) 및 효모 2 μ 복제 원점을 포함하는 YEpl3 (ATCC37115)으로부터의 Spe I 단편을 SpeI 처리된 플라스미드 2에 클로닝시켜 pAVE091을 생성한다.
- [0276] pAVE091 플라스미드 DNA를 전기 천공에 의해 사카로마이세스 세레비시에 XS95-6C (ATCC 204688)에 형질전환시키고 루이신을 포함하지 않는 효모 드롭-아웃(drop-out) 배지에서 양성 콜로니를 선택하였다(Kaiser C, Michaelis S and Mitchel A (Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Manual, 1994)). 동일한 배지를 이용하여 elafin-cmyc 단백질 발현을 결정하기 위한 진탕 플라스크 성장 연구를 수행하였다. 상기 플라스크를 오비탈 진탕기에서 30℃, 200rpm으로 인큐베이션시켰다. 클론을 ~3의 OD까지 성장시키고 0.5 mM IPTG (최종 농도)로 유도시켰다. 전술된 조건 하에서 인큐베이션을 16시간 더 지속하고, 상기 인큐베이션 동안 성장과 elafin-cmyc 단백질의 성장 배지로의 분비를 측정하기 위해 시료를 채취하였다. Wiedow O, et al, J Biol Chem. (1990) 265(25): 14791-5에 개시된 바와 같이, 엘라스타아제 억제 효소 분석법(elastase inhibiton enzyme assay)을 이용하여 elafin-cmyc의 잔여 성장 배지로의 분비를 연구하였다. IPTG 유도의 4시간 후에, 성장 배지에 30 mg/L의 활성 elafin 단백질이 있었다. 이는 본 발명의 발현 시스템이 효모에서 유효하다는 것을 입증한다.
- [0277] 실시예 21
- [0278] 두 개의(dual) 완전한 팔린드롬 lac 작동자 서열에 의해 플랭킹된 구성적 인간 시토메칼로바이러스 프로모터(constitutive hCMV promoter)를 포함하는 DNA 단편을 합성하였다. 이를 발현 벡터로 클로닝하였고, 상기 벡터는 IgG Fc 단백질을 발현했다. 결과물인 플라스미드는 pAVE081로 명명되었고, pCMV-Script(Stratagene)로부터 유래되며 Nde I/Nhe I 단편 상에 두 개의 완전한 팔린드롬 lac 작동자 서열에 의해 플랭킹된 hCMV 프로모터를 포함하고, 상기 벡터의 다중 클로닝 부위(multiple cloning site)에 IgG Fc DNA 서열을 가졌다. 상기 hCMV 프로모터 및 두 개의 완전한 팔린드롬 lac 작동자의 DNA 서열이 도 12에 도시된다(서열번호 33). IgG Fc 단백질을

의 DNA 서열이 도 13에 도시된다(서열번호 34). 본 발명이 속하는 기술 분야에서 공지된 바와 같이, IPTG 유도성 hCMV 프로모터-이중의(dual) 완전한 팔린드롬 lac 작동자 발현 시스템의 제어 하에 IgG Fc 단백질이 발현될 수 있는지 여부를 결정하기 위해 IgG Fc 단백질을 발현하는 pAVE081 및 lac 억제자(repressor)를 발현하는 pCMVlacI (Stratagene)의 일시적 공-형질감염(transient co-transfection)을 수행하였다.

[0279] ml 당 1.5×10^5 개의 살아있는 세포 농도의 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포 현탁액(무혈청 배지에서의 현탁 성장에 적응된 CHO 세포주 ECACC 85050302) 2 ml를 6-웰 배양 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 웰 당 2 μ g의 pAVE081 DNA와 동량의 pCMVlacI(Stratagene) DNA, 및 6 μ l의 형질감염 시약과 94 μ l의 성장 배지를 포함하는 형질감염 믹스를 준비하기 전에, 상기 6-웰 조직 배양 플레이트를 5% CO₂의 가습화된(humidified) 37°C 인큐베이터에서 밤새(16시간) 인큐베이션하였다. 100 μ l의 형질감염 믹스를 상기 CHO 세포를 함유한 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 상기 6-웰 조직 배양 플레이트를 5% CO₂의 가습화된 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 성장 배지로의 IgG Fc 단백질의 발현/분비 수준을 결정하기 위해, 일련의 웰(2일차)을 5mM IPTG(최종 농도)로 유도하고, 일련의 웰들은 유도되지 않은 상태로 유지시켰다. 3일차에, IPTG로 유도된 웰들과 유도되지 않고 유지된 웰들로부터 시료를 채취하였다(IPTG 유도 후 및 유도되지 않은 시료). CHO 세포에 의한 IgG Fc 단백질의 발현 및 성장 배지로의 분비를 본 발명이 속하는 기술 분야에서 정립된 바와 같이 ELISA에 의해 결정하였다. 수득된 데이터가 도 14에 도시된다.

[0280] 데이터는 상기 발현 시스템의 광범위한 유용성을 명확하게 보여준다. 상기 발현 시스템은 일반적으로 포유동물 세포에서 제어가능하고 유도가능한 방식으로 단백질을 발현하기 위해, hCMV 프로모터와 같은 포유동물 세포 시스템과 이용되는 강력한 구성적(constitutive) 프로모터를 제어하기 위해 이용될 수 있다는 것을 명확하게 보여준다.

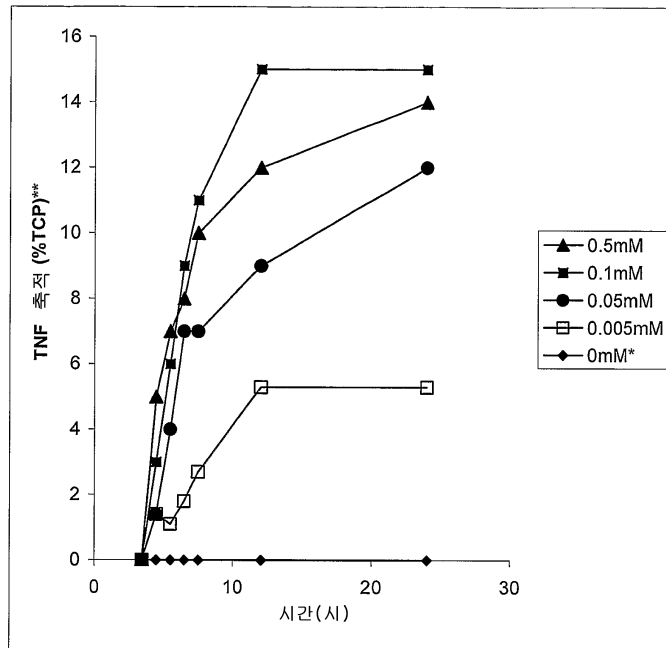
도면

도면1

D1.3 서열

```
CATATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAA
CCAGCGATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT
CACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGGCTATGGTG
TAAACTGGGTTGCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTTGG
GGTGATGGAAACACAGACTATAATTAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAG
GACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCACACTGATGACACAG
CCAGGTACTACTGTGCCAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGTCTTCCCCCTGGC
ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACTGTGCCCTCCAGTAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAACCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTCAACTAAGAC
GCACACATCAGGAGGTGAACAGAAGCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATTAATAAGG
GAGCTTGATGCAAAATCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTA
CGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGCCGACATCGAG
CTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCGTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACA
TGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGA
AAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAACAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAA
GGTTCAGTGGCAGTGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAAC
CTGAAGCTTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCCG
TGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAA
TAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAGCCCTCCAATC
GGGTAATCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
TCAGCAGCACCTGTACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGG
AGAGTCATAGTAAGGATCC
```

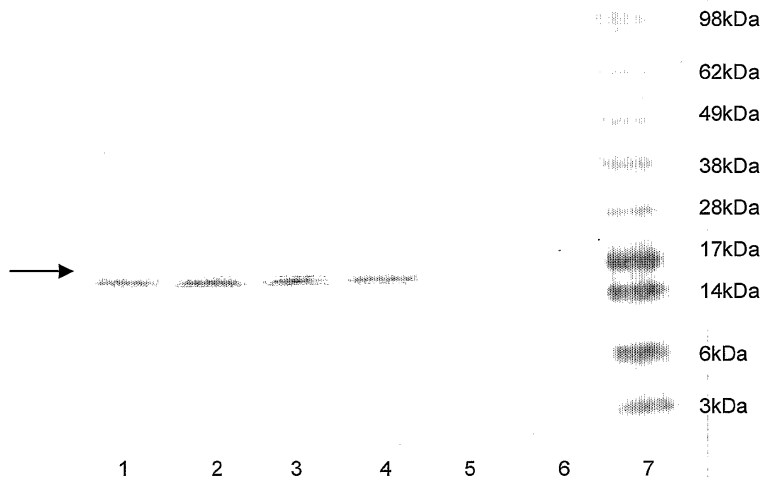
도면2



(*) = 기준 발현, 유도 인자 (IPTG) 무첨가

(**) = % TCP, % Total Cell Protein

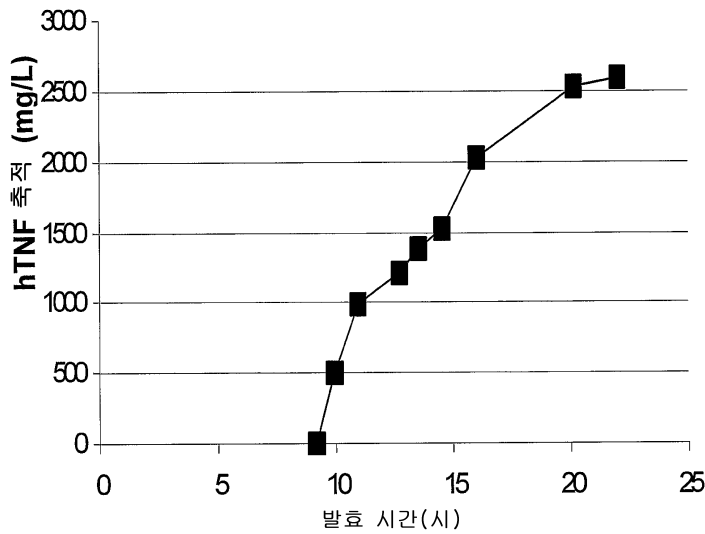
도면3



화살표는 hTNFα 밴드를 나타냄

라인 6: CLD038: 2시간 유도 (예비-유도)
 라인 5: CLD038: 4시간 유도 (예비-유도)
 라인 4: CLD038: IPTG 유도 1시간 후
 라인 3: CLD038: IPTG 유도 2시간 후
 라인 2: CLD038: IPTG 유도 3시간 후
 라인 1: CLD038: IPTG 유도 4시간 후
 라인 7: 분자량 마커

도면4



도면5

D1.3-A5B7 양특이성 단일 사슬 4가 디아바디(bsctDb) 서열(서열번호 22)

CATATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTA
GCTCAAGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCAC
AGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTGTA
ACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATTGGGGT
GATGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGAC
AACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCACACTGATGACACAGCCA
GGTACTACTGTGCCAGAGAGAGAGATTATAGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGAGCGCCAAAACCAACCC
GGACATCGAGCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG
TCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAACCTTACATTCACTGGTACCAGCAGA
AGCCAGGATCCTCCCCAAATCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAG
TCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAACATTGGAGTAGTAAACAC
CGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGCGCGCCGATGC
CGCCCCGACCGTGCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGTGGTGGCTTAGTTCAACCTG
GTGGTTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTACCTTCACTGATTACTACAT
GAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTGGAA
ACAAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCCGTTACCA
TCTCCAGAGATAAATCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGA
GGACAGTGCCACTTATTACTGTACAAGAGATAGGGGGCTACGGTTCTACTTTGACTA
CTGGGGCCAAGGCACCGGTCAACGCTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGA
GCGCCAAAACCAACCCCGGACATCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTGCG
TCTGTGGGAGAACTGTCAACATCACATGTCGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATT
TAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTATACAAC
AACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATA
TTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAACCTGAAGCTTTTGGGAGTTATTACTGTCAACAT
TTTTGGAGTACTCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGAC
TGTGGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCATGATAAGCGGC
CGC

도면6

GST-3C 융합 서열 (서열번호 23)

CATATGTCCCCATACTAGGTTATTGGAAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGAC
TTCTTTTGGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGG
TGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTAT
TATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGA
CAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGA
AGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT
GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAATGTTTGAAG
ATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATG
TTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCC
CAAAATTAGTTTGTTTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCAAAATTGATAAGTACTTG
AAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGT
GGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCCGGACCAACACAGA
ATTTGCACTATCCCTGTTAAGGAAAAACATAATGACTATAACAACCTCAAAGGGAGAG
TTCACAGGGTTAGGCATACATGATCGTGTCTGTGTGATACCCACACACGACAGCCT
GGTGATGATGTACTAGTGAATGGTCAGAAAATTAGAGTTAAGGATAAGTACAAATTAG
TAGATCCAGAGAACATTAATCTAGAGCTTACAGTGTTGACTTTAGATAGAAATGAAAA
ATTCAGAGATATCAGGGGATTATATCAGAAGATCTAGAAGGTGTGGATGCCACTTTG
GTAGTACATTCAAATAACTTTACCAACTATCTTAGAAGTTGGCCCTGTAACAATGG
CAGGACTTATTAATTTGAGTAGCACCCCACTAACAGAAATGATTCGTTATGATTATGC
AACAAAACTGGGCAGTGTGGAGGTGTGCTGTGTGCTACTGGTAAGATCTTTGGTAT
TCATGTTGGCGGTAATGGAAGACAAGGATTTTCAGCTCAACTTAAAAACAAATTTT
GTAGAGAAACAATAAGAATTCC

도면7

인터페론 $\alpha 2$ 서열 (서열번호 24)

CATATGATGTGTGATCTGCCGAAACTCATAGCCTGGGTAGCCGTCGCACCCCTGATG
CTGCTGGCCCAAATGCGCCGTATCTCCCTGTTCTCCTGTCTGAAAGACCGCCATGAC
TTTGGCTTCCCGCAGGAAGAGTTCCGTAACCAGTTCCAAAAGGCAGAAACTATCCCG
GTAAGTGCACGAAATGATTCAACAGATTTTAACTGTTTACGCACTAAAGACTCCTCT
GCTGCATGGGACGAAACTCTCCTGGACAAATTCTACACCGAACTGTACCAGCAACTG
AACGACCTGGAAGCCTGCGTCATCCAGGGTGTGGCGTAACCGAAACTCCGCTGAT
GAAAGAAGACTCCATCCTGGCTGTTCCGAAATACTTCCAGCGTATCACCTGTACCT
GAAAGAGAAGAAATACAGCCCGTGGGAAAGTTGTACGCGCTGAAATCATGC
GTTCTTCAGCCTGTCCACTAACCTGCAAGAATCTCTGCGTAGCAAGAATAACTCG
AG

도면8

에리트로포이에틴 (EP0) 서열 (서열번호 25)

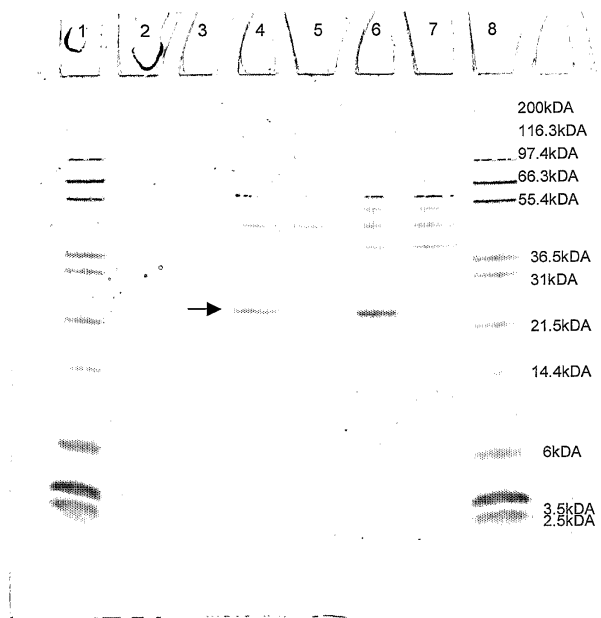
CATATGGCTCCGCCACGTCTGATTTGTGACTCTCGCGTTCTGGAGCGTTACCTGCTG
GAGGCCAAGGAAGCCGAAAACATCACGACCGGTTGTGCGGAACATTGCTCTCTGAA
TGAGAACATCACTGTTCCGGATACGAAGGTTAACTTCTACGCTTGAAACGTATGGA
AGTAGGCCAGCAGGCAGTAGAAGTGTGGCAGGGTCTGGCGCTGCTGTCCGAAGCG
GTTCTGCGTGGCCAGGCGCTGCTGGTCAACTCCAGCCAGCCGTGGGAGCCGCTGC
AGCTGCACGTAGATAAAGCGGTTAGCGGTCTGCGTTCCCTGACTACCCTGCTGCGC
GCGCTGGGTGCGCAAAAAGAAGCTATCTCCCGCCAGATGCGGCATCTGCAGCCCC
GCTGCGTACCATCACTGCAGATACTTCCGCAAGCTGTTTCGTGTTTATTCCAACCTC
CTGCGTGGTAAACTGAAGCTGTACACCGGTGAAGCGTGCCGTACCGGCGATCGTTA
ATAAACTCGAG

도면9

L-2-할로알카노에이트 데할로게나아제(hadL) 서열(서열번호 26)

```
CATATGAAGGAAATAACCAATGAAAAACATCCAAGGTATCGTTTTCGATTTGTATGGC
ACGCTCTACGACGTGCATTCCGTGGTGCAAGCCTGTGAAGAGGTCTATCCGGGCCA
AGGCGACGCTATTTCTCGCCTCTGGCGGCAAAAGCAATTGGAATACACCTGGCTCAG
GAGCCTCATGGGCCGTTACGTGAACCTTGAGAAAGCAACAGAGGATGCCTTGCGCTT
TACCTGCACGCATCTGGGCTTGTGCTCGATGATGAAACCCACCAGCGCCTCAGTG
ATGCTTATTTGCACCTCACCCCTTATGCCGATACAGCTGACGCCGTTGCGCGTTTGA
AAGCTGCGGGCCTACCGCTAGGCATCATTCAAATGGTTCTCATTGCTCGATCGAGC
AAGTCGTGACTAACTCTGAAATGAATTGGGCGTTCGATCAGCTGATCAGCGTCGAGG
ATGTGCAAGTGTTCAAACCTGATAGTCGCGTCTATAGCCTTGCCGAGAAGCGCATGG
GTTTTCAAAGGAAAACATCCTCTTCGTTTCGTCAAACGCGTGGGATGCGAGTGCAG
CCAGTAACCTTTGGTTTCCCGGTTTGCTGGATCAATCGGCAGAACGGCGCGTTTGATG
AGCTGGATGCAAAGCCGACACAGCTGTCGTAATCTCGCCGAAATGTGCGAATGG
CTGGTTAATTCGCTCGATTAATGAAGGATCC
```

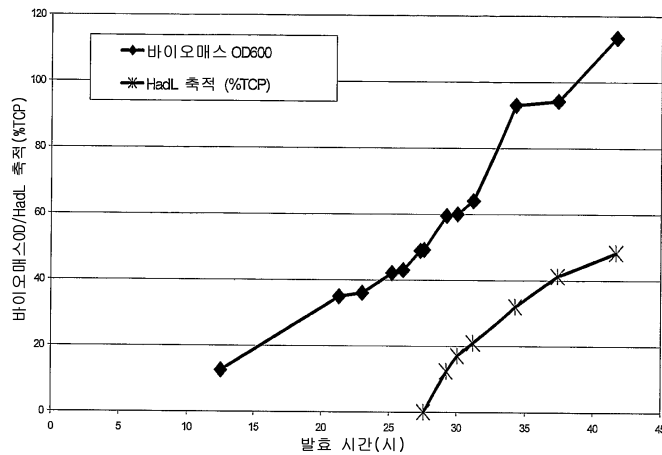
도면10



화살표는 HadL 단백질을 표시함

라인 1: 분자량 마커
 라인 2: 플라스크 1- CLD075 예비-유도
 라인 3: 플라스크 2- CLD075 예비-유도
 라인 4: 플라스크 1- CLD075, 6시간 배양, 0.5 mM IPTG 유도 3시간 후
 라인 5: 플라스크 2- CLD075, 6시간 배양, 유도되지 않음
 라인 6: 플라스크 1- CLD075, 23시간 배양, 0.5 mM IPTG 유도 20시간 후
 라인 7: 플라스크 2- CLD075, 23시간 배양, 유도되지 않음
 라인 8: 분자량 마커

도면11



도면12

hCMV 프로모터 및 Lac 작동자 서열 (서열번호 33)

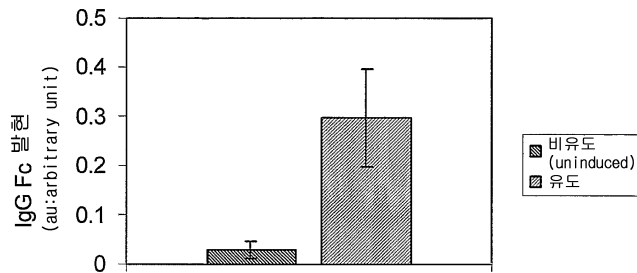
CATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT
TATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG
TCATCGCTATTATACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATA
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
GTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGTT
GACGCAATGGGGAATTGTGAGCGCTACAATTCCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTGAACCGTCAGATCACTAGATGCGTACAGTCCGATGACTTGCATGGAATTGTGAG
CGCTCACAATTCCAAGCTTTATTGCGGTATAGGCTAGC

도면13

IgG Fc 서열 (서열번호 34)

ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACT
GGTGACGCGGCCAGCGGCCAGGCGCGCGCGCTACGTACAAGCTTGGATCCG
CAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

도면14



(유도 및 비유도 모두에 대해, n=4임.
제시된 데이터는 평균 및 1 표준편차를 나타내는 오차 막대임.)

도면15

실시에 20에서 사용된 클론 서열 1 (서열번호 35)

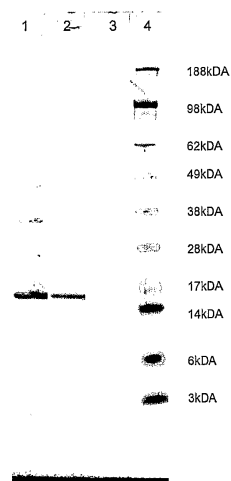
CTCGAGGCATGTGCTCTGTATGTATATAAACTCTTGTCTTTCTCTTTCTCTAAATATT
CTTTCTTATACATTAGGACCTTTGCAGCATAAATTACTATACTTCTATAGACACGCAA
ACACAAATACACACACTAAATGGCGGAGCTGAATTACATCCCAACCGCGTGGCACA
ACAACTGGCGGGCAACAGCTGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCC
TGCACGCGCGCTCGCAAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCGGATCAACTGGGT
GCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGG
CGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGG
ATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTT
TTGATGTCTCTGACCAGACCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTAC
GCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTCGATTGGGTCACCAGCAAATCGCGCTGTTAG
CGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATC
TCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATG
TCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATG
CTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGG
GCTGCGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCT
CATGTTATATCCCGCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAA
CCAGCGTGGAACCGCTTGTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAG
CTTTTGGCGTCTCACTGGTGAAAAAGAAAAACCCCTGGCGCCCAATACGCAAAAC
GCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTCGCACGACAGGTTTCCCG
ACTGGAAGCGGGCAGTGACTCGAG

도면16

실시에 20에서 사용된 클론 서열 2 (서열번호 36)

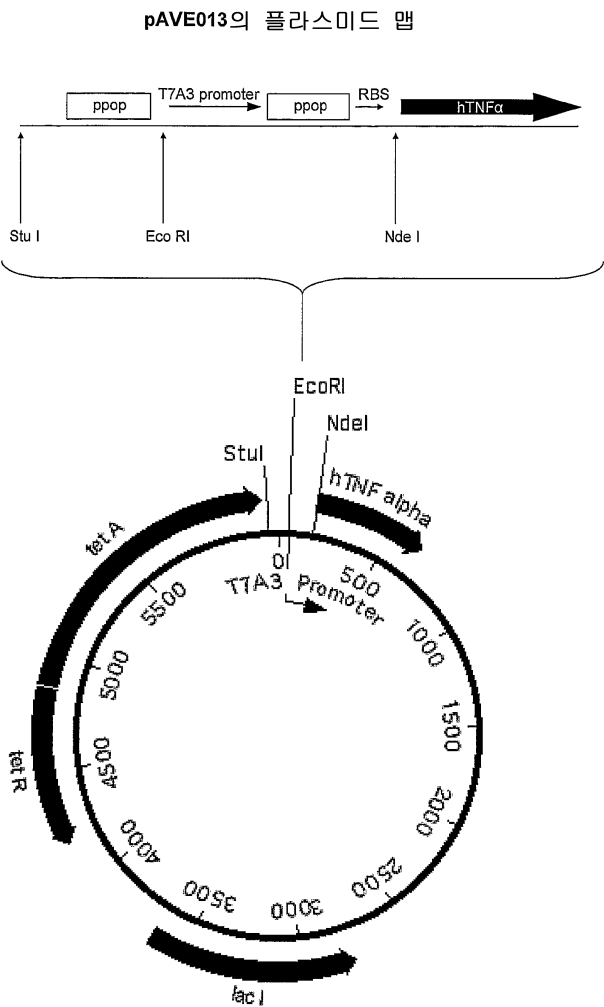
GGATCCTAGGCAATAATTATGAGATAAATGGTGCAGCACTATTAAGTAGTGATTT
CAATAATTTCCGAATTAGGAATAAATGCGCTAAATAGACATCCCGTTCTCTTTGGTAAT
CTGCATAATTCTGATGCAATATCCAACAACTATTTGTGCAATTATTTAACAAATCCAA
TTAACTTTCCCTAATTAGTCCTTCAATAGAACATCTGTATTCTTTTTTTTATGAACACCT
TCCTAATTAGGCCATCAACGACAGTAAATTTTGCCGAATTTAATAGCTTCTACTGAAAA
ACAGTGGACCATGTGAAAAGATGCATCTCATTTATCAAACACATAATATTCAAGTGAG
CCTTACTTCAATTGTATTGAAGTGCAAGAAAACCAAAAGCAACAACAGGTTTTGGAT
AAGTACATATATAAGGGAATTGTGAGCGCTCACAATTCCTGTTACTGTTCTTACGATT
CATTTACGATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAACTATCAATGGAATTGTGA
GCGCTCACAATTCCAAGAATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGC
ATCTCCGCTATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGGCACAAAT
TCCGGCTGAAGCTGTCTCGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGT
TTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCA
GCATTGCTGCTAAAGAAGAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCT
CAAGAACCAGTTAAAGGTCTGTGTCTACTAAGCCAGGTTCTTGTCTATTATCTTGA
TTCGTTGCGCTATGTTAAACCCACCTAACCCTGTTTGAAGGACACTGATTGTCCAGG
TATCAAAAAGTGCTGTGAAGTTCTGCGGTATGGCTGTTTCGTTCCACAAGAACAA
AAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAATAGCAGCTG

도면17



레인 1: 유도 20시간 후 CLD077
레인 2: 유도 3시간 후 CLD077
레인 3: 유도 전 CLD077
레인 4: 분자량 마커

도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Avecia Biologics Limited

<120> Expression System

<130> SMC 60733/W0

<140> PCT/GB2007/000351

<141> 2007-02-01

<150> GB 0602173.7

<151> 2006-02-03

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 1 used in preparation of Linker 12.1

<400> 1

catgtgggaa ttgtgagcgc tcacaattcc aagaacaatc ctgcacg 47

<210> 2

<211> 47

<212> DNA

<213>

> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 2.1 used in preparation of Linker 12.1

<400> 2

aattcgtgca ggattgttct tggaattgtg agcgctcaca attccca 47

<210> 3

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 3 used in cloning of T7A3 promoter

<400> 3

aattcaaaca aaacggttga caacatgaag taaacacggt acgatgtacc ggaattgtga 60

gcgctcaciaa ttcccca 77

<210> 4

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220

><223> Oligonucleotide 4 used in cloning of T7A3 promoter

<400> 4

ctggtggggg gttgtgggcg ctgcgggttc cggcgctcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60

gtcggccgtt ttgtttg 77

<210> 5

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 11 used in preparation of Linker 1112

<400> 5

aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcacggctc ggatactgtg tggattgtg 60

agcggataac aattcccca 79

<210> 6

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 12 used in preparation of Linker 1112

<400> 6

ctagtgggga attgttatcc gtcacaatt ccacacagta tccgagccga tgattaattg 60

tcaacagctc atttcagaa 79

<210> 7

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 13 used in preparation of Linker 1314

<400> 7

aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcacggctc ggatactgtg tggattgtg 60

agcgctcaca attcccca 78

<210> 8

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 14 used in preparation of Linker 1314

<400> 8

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacagtat ccgagccgat gattaattgt 60

caacagctca tttcagaa 78

<210> 9

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 5 used in cloning of T7A3 promoter

<400> 9

aattcgaaac aaaacgggtg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60

agcgctcaca attcccca 78

<210> 10

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 6 used in cloning of T7A3 Promoter

<400> 10

ctgggtggggg gttgtgggcg ctgcggttc cgggtgcgtcg tgccgtgttt gcttcgtgtt 60

gtcggccgtt ttgtttcg 78

<210> 11

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 7 used in preparation of Linker 78

<400> 11

aattatctct ggcgggtgtg acataaatac cactggcgggt gatactgagc ggaattgtga 60

gcgctcaciaa ttcccca	77
<210> 12	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 8 used in preparation of Linker 78	
<400> 12	
ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg	60
tcaacaccgc cagagat	77
<210> 13	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 15 used in cloning of tac Promoter	
<400> 13	
aattcctgaa atgagctgtt gacaattaat catcggtcgc tataatgtgt ggaattgtga	60
gcgctcaciaa ttcccca	77
<210> 14	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 16 used in cloning of tac Promoter	
<400> 14	
ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt	60
caacagctca tttcagg	77
<210> 15	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 19 used in preparation of EcoR I Linker	
<400> 15	
aattcaccgg tgtacagtca tgtacaaccg gtg	33
<210> 16	

<211

> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 20 used in preparation of EcoR I Linker

<400> 16

aattcacccg ttgtacatga ctgtacaccg gtg 33

<210> 17

<211> 1550

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<400> 17

catatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt tattactcgc tgcccaacca 60

gcatggccc aggtgcagct gcaggagtca ggacctggcc tggcggccc ctcacagagc 120

ctgtccatca catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatggtgt aaactgggtt 180

cgccagcctc caggaaaggg tctggagtgg ctgggaatga tttggggtga tggaaacaca 240

gactataatt cagctctcaa atccagactg agcatcagca aggacaactc caagagccaa 300

gttttcttaa aaatgaacag tctgcacact gatgacacag ccaggtacta ctgtgccaga 360

gagagagatt ataggcttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcagcc 420

tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgactgtg ccctccagta gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcaca cccagcaac accaaggctg acaagaaagt tgagcccaaa 720

tcttcaacta agacgcacac atcaggaggt gaacagaagc tcctctcaga agaggatctg 780

aattaataag ggagcttgca tgcaaattct atttcaagga gacagtcata atgaaatacc 840

tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgtgc ccaaccagcg atggccgaca 900

tcgagctcac ccagtctcca gcctccctt ctgcgtctgt gggagaaaact gtcacatca 960

catgtcgagc aagtgggaat attcacaatt atttagcatg gtatcagcag aaacagggaa 1020

aatctcctca gctcctggtc tattatacaa caaccttagc agatgggtgtg ccatcaaggt 1080

tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg caacctgaag 1140

cttttgggag ttattactgt caacattttt ggagtactcc tcggacgttc ggtggaggga 1200

ccaagctcga gatcaaacgg actgtggctg caccatctgt cttcatcttc cgcctatctg 1260
atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca 1320
gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 1380
gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga 1440
gcaaagcaga ctacagagaaa cacaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga 1500

gttcgccgt cacaagagc ttcaaccgcg gagagtcata gtaaggatcc 1550

<210> 18
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Oligonucleotide 21 used in preparation of Linker 2122
<400> 18
aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cacatgaaac 60
gacagtgagt ca 72
<210> 19
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Oligonucleotide 22 used in preparation of Linker 2122
<400> 19
ctagtgactc actgtcgttt catgtggtac ctctgtaccgt gtttacttca tgttgtcaac 60

cgttttgttt cg 72
<210> 20
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Oligonucleotide 23 used in preparation of Linker 2324
<400> 20
aattcgaaac aaaacggttg acaacatgaa gtaaacacgg tacgatgtac cggaattgtg 60
agcggataac aattcccca 79
<210> 21
<211> 79
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide 24 used in preparation of Linker 2324

<400> 21

ctagtgggga attgttatcc gctcacaatt ccggtacatc gtaccgtgtt tacttcatgt 60

tgtcaaccgt tttgtttcg 79

<210> 22

<211> 1592

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequence encoding bispecific single chain tetravalent diabody
produced in Example 15

<400> 22

catatgaaaa agacagctat cgcgattgca gtggcactgg ctggtttcgc taccgtagct 60

caagcccagg tgcagctgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 120

tccatcacat gcaccgtctc agggttctca ttaaccggct atggtgtaaa ctgggttcgc 180

cagcctccag gaaagggctc ggagtggctg ggaatgattt ggggtgatgg aaacacagac 240

tataattcag ctctcaaac cagactgagc atcagcaagg acaactccaa gagccaagtt 300

ttcttaaaaa tgaacagtct gcacactgat gacacagcca ggtactactg tgccagagag 360

agagattata ggcttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcgagcgc caaaaccacc ccggacatcg agctctccca gtctccagca 480

atcctgtctg catctccagg ggagaaggtc acaatgactt gcagggccag ctcaagtgt 540

acttacattc actggtacca gcagaagcca ggatcctccc ccaaatectg gatattatgcc 600

acatccaacc tggcttctgg agtccctgct cgtttcagtg gcagtgggtc tgggacctct 660

tactctctca caatcagcag agtggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccaacat 720

tggagtagta aaccaccgac gttcgggtga ggcaccaagc tcgagatcaa acggactgtg 780

cgcgccgatg ccgccccgac cgtgcagggt cagctgcagg aatctggtgg tggcttagtt 840

caacctgggt gtccctgag actctcctgt gcaacttctg ggttcacctt cactgattac 900

tacatgaact gggctccgca gcctccagga aaggcacttg agtggttggg ttttattgga 960

aacaaagcta atggttacac aacagagtac agtgcactct tgaagggctc gttcaccatc 1020

tccagagata aatcccaaag catcctctat cttcaaatga acaccctgag agctgaggac 1080

agtgccactt attactgtac aagagatagg gggctacggg tctactttga ctactggggc 1140

caaggcacca cggtcacgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcgag cgccaaaacc 1200
 accccggaca tcgagctcac ccagctcca gcctcccttt ctgcgtctgt gggagaaact 1260
 gtcaccatca catgtcgagc aagtgggaat attcacaatt atttagcatg gtatcagcag 1320
 aaacagggaa aatctcctca gctcctggtc tattatacaa caaccttagc agatgggtgtg 1380
 ccatcaaggt tcagtggcag tggatcagga acacaatatt ctctcaagat caacagcctg 1440
 caacctgaag cttttgggag ttattactgt caacattttt ggagtactcc tcggacgttc 1500

ggtggaggga ccaagctcga gatcaaacgg actgtgggat ccgaacaaaa gctgatctca 1560
 gaagaagacc taaactcatg ataagcggcc gc 1592

<210> 23
 <211> 1237
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Sequence encoding GST fusion protein produced in Example 16
 <400> 23

catatgtccc ctatactagg ttattggaaa attaagggcc ttgtgcaacc cactcgactt 60
 cttttggaat atcttgaaga aaaatatgaa gagcatttgt atgagcgcga tgaaggatgat 120
 aaatggcgaa acaaaaagtt tgaattgggt ttggagtttc ccaatcttcc ttattatatt 180

gatggatgatg ttaaattaac acagtctatg gccatcatac gttatatagc tgacaagcac 240
 aacatgttgg gtggttgcc aaaagagcgt gcagagattt caatgcttga aggagcggtt 300
 ttggatatta gatacgggtg ttcgagaatt gcatatagta aagactttga aactctcaaa 360
 gttgattttc ttagcaagct acctgaaatg ctgaaaatgt tcgaagatcg tttatgtcat 420
 aaaacatatt taaatggatg tcatgtaacc catcctgact tcatgttgta tgacgtcttt 480
 gatgttgttt tatacatgga cccaatgtgc ctggatgcgt tcccaaaatt agtttgtttt 540
 aaaaaacgta ttgaagctat ccacaaaatt gataagtact tgaaatccag caagtatata 600

gcatggcctt tgcagggctg gcaagccacg tttggtgggtg gcgacccatcc tccaaaatcg 660
 gatctggttc cgcgtggatc cggaccaaac acagaatttg cactatccct gtttaaggaaa 720
 aacataatga ctataacaac ctcaaaggga gagttcacag ggttaggcat acatgatcgt 780
 gtctgtgtga taccacaca cgcacagcct ggtgatgatg tactagttaa tggtcagaaa 840
 attagagtta aggataagta caaattagta gatccagaga acattaatct agagcttaca 900
 gtgttgactt tagatagaaa tgaaaaattc agagatatca ggggatttat atcagaagat 960
 ctagaagggtg tggatgccac tttggttagta cattcaaata actttaccaa cactatctta 1020

gaagttggcc ctgtaacaat ggcaggactt attaatttga gtagcacccc cactaacaga 1080
atgattcggt atgattatgc aacaaaaact gggcagtgtg gaggtgtgct gtgtgctact 1140
ggtaagatct ttggtattca tgttggcggg aatggaagac aaggattttc agctcaactt 1200
aaaaaacaat atttttaga gaaacaataa gaattcc 1237

<210> 24

<211> 513

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

catatgatgt gtgatctgcc gcaaaactcat agcctgggta gccgtcgac cctgatgctg 60
ctggcccaaa tgcgccgtat ctccctgttc tctgtctga aagaccgcca tgactttggc 120

ttcccgagg aagagttcgg taaccagttc caaaaggcag aaactatccc ggtactgcac 180
gaaatgattc aacagatttt taacctgttc agcactaaag actcctctgc tgcattggac 240
gaaactctcc tggacaaatt ctacaccgaa ctgtaccagc aactgaacga cctggaagcc 300
tgcgtcatcc aggtgttgg cgtaaccgaa actccgtga tgaaagaaga ctccatcctg 360
gctgttcgca aatacttcca gcgtatcacc ctgtacctga aagagaagaa atacagcccg 420
tgcgcttggg aagtgttacg cgctgaaatc atgcgttctc tcagcctgtc cactaacctg 480
caagaatctc tgcgtagcaa agaataaactc gag 513

<210> 25

<211> 517

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

catatggctc cgccacgtct gattttgac tctcgcgttc tggagcgta cctgctggag 60
gccaaggaag ccgaaaacat caccaccggt tgtgcggaac attgtctctt gaatgagaac 120
atcactgttc cggtacgaa gggttaacttc tacgcttggg aacgtatgga agtaggccag 180
caggcagtag aagtgtggca gggctcggcg ctgctgtccg aagcggttct gcgtggccag 240
gcgtgctgg tcaactccag ccagccgtgg gagccgtgc agctgcacgt agataaagcg 300
gttagcggtc tgcgttcctt gactaccctg ctgcgcgcgc tgggtgcgca aaaagaagct 360

atctccccgc cagatgcggc atctgcagcc ccgtgcgta ccatcactgc agatactttc 420
cgcaagctgt ttcgtgttta ttccaacttc ctgcgtggta aactgaagct gtacaccggt 480
gaagcgtgcc gtaccggcga tcgttaataa actcgag 517

<210> 26
 <211> 713
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida
 <400> 26
 catatgaagg aaataaccaa tgaaaaacat ccaaggtatc gttttcgatt tgtatggcac 60
 gctctacgac gtgcattccg tgggtcaagc ctgtgaagag gtctatccgg gccaaaggcga 120
 cgctatttct cgcctctggc ggcaaaagca attggaatac acctggctca ggagcctcat 180

 gggccgttac gtgaactttg agaaagcaac agaggatgcc ttgcgcttta cctgcacgca 240
 tctgggcttg tcgctcgatg atgaaaccca ccagcgctc agtgatgctt atttgcacct 300
 cacccttat gccgatacag ctgacgccgt tcgccgtttg aaagctgcgg gcctaccgct 360
 aggcacatt tcaaattggtt ctcatgtctc gatcgagcaa gtcgtgacta actctgaaat 420
 gaattggcg ttcgatcagc tgatcagcgt cgaggatgtg caagtgttca aacctgatag 480
 tcgctctat agccttgccg agaagcgcgt gggttttcca aaggaaaaca tcctcttcgt 540
 ttcgtcaaac gcgtgggatg cgagtcagc cagtaacttt ggtttcccg tttgctggat 600

 caatcggcag aacggcgct ttgatgagct ggatgcaaag ccgacacacg tcgtgcgtaa 660
 tctcgccgaa atgtcgaact ggctgggttaa ttcgctcgat taatgaagga tcc 713
 <210> 27
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> F37A Primer used in Example 17
 <400> 27
 agatctacgc ttatgggtgc ctttcc 26
 <210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> B29a Primer used in Example 17
 <400> 28
 agatctaata cgcaaaccgc ctctcc 26
 <210> 29

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide GalB1 used in preparation of GalB Linker

<400> 29

aattcataacc ataagcctaa ttctacgaat tatkagagtt ctggttacg gtgtaagcgc 60

ttacactgt 69

<210> 30

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide GalB2 used in preparation of GalB Linker

<400> 30

ctagacagtg taagcgctta caccggtaac cagaactctg ataattcgta gaattaggct 60

tatggtatg 69

<210> 31

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide GalA1 used in preparation of GalA Linker

<400> 31

caattgtgta agcgcttaca caactttatt ccatgtcaca cttttcgcat ctttgttatg 60

ctatggtg 68

<210> 32

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Oligonucleotide GalA2 used in preparation of GalA Linker

<400> 32

aattcacat cgcataacaa ggatgcgaaa agtgtgacat ggaataaagt tgtgtaagcg 60

cttacacaat tg 72

<210> 33

<211> 438

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequence encoding hCMV Promoter and Lac Operators used in Example

21

<400> 33

catatgccaa gtccgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc ctggcattat	60
gccagtaga tgaccttac ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac	120
gctattatac catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga tagcggtttg	180
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	240
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta ataacccgc cccgttgacg caaatgggga	300
attgtgagcg ctcaaatc ctctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatca	360
ctagatgcgt acagtccgat gacttgcatt gaattgtgag cgctcacaat tccaagcttt	420
attgcggtat aggctagc	438

<210> 34

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Sequence encoding IgG Fc protein used in Example 21

<400> 34

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgtaca agcttggatc cgcagagccc	120
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca cctgcccag cacctgaact cctgggggga	180
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	240
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	300
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	360
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	420
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	480
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag	540
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	600
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	660
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	720
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	780

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 813

<210> 35

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Clone Sequence 1 used in Example 20

<400> 35

ctcgaggcat gtgctctgta tgtatataaa actcttgttt tcttcttttc tctaaatatt 60

ctttctttat acattaggac ctttcagca taaattacta tacttctata gacacgcaaa 120

cacaaatata cactactaaat ggcggagctg aattacattc ccaaccgcgt ggcacaacaa 180

ctggcgggca aacagtcgtt gctgattggc gttgccacct ccagctctggc cctgcacgcg 240

ccgtcgcataa ttgtcgcggc gattaaatct cgcgccgac aactgggtgc cagcgtggtg 300

gtgtcgtatg tagaacgaag cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcgggtgca caatcttctc 360

gcgcaacgcg tcagtgggtc gatcattaac tatccgtctg atgaccagga tgccattgct 420

gtggaagctg cctgcactaa tgttccggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc 480

atcaacagta ttatttctc ccatgaagac ggtacgcgac tgggcgtgga gcatctggtc 540

gcattgggtc accagcaaat cgcgtctgta gggggcccat taagtctgt ctcggcgcgt 600

ctgcgtctgg ctggctggca taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa 660

cgggaaggcg actggagtgc catgtccggt tttaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag 720

ggcatcgttc cactgcgat gctggttgcc aacgatcaga tggcgtggg cgcaatgcgc 780

gccattaccg agtccgggtc gcgcgttggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat 840

accgaagaca gctcatgtta tatccgcgcg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgcctg 900

ctggggcaaa ccagcgtgga ccgcttgcgt caactctctc agggccaggc ggtgaagggc 960

aatcagcttt tgccgtctc actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacga 1020

accgctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tcgcacgaca ggtttcccga 1080

ctggaaagcg ggcagtgact cgag 1104

<210> 36

<211> 1026

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Clone sequence 2 used in Example 20

<400> 36

ggatcctagg caataattat gagataaatg gtgcagcact attaatgagt gtggatttca 60
ataatttccg aattaggaat aaatgcgcta aatagacatc ccgttctctt tggtaatctg 120
cataattctg atgcaatatc caacaactat ttgtgcaatt atttaacaaa atccaattaa 180

ctttcctaat tagtccttca atagaacatc tgtattcctt tttttatga acaccttct 240
aattaggcca tcaacgacag taaattttgc cgaatttaat agcttctact gaaaaacagt 300
ggaccatgtg aaaagatgca tctcatttat caaacacata atattcaagt gagccttact 360
tcaattgtat tgaagtgcga gaaaacaaa aagcaacaac aggttttgga taagtacata 420
tataaggga tttgtgagcg tcacaattcc tgttactgtt cttacgattc atttacgatt 480
caagaatagt tcaacaaga agattacaaa ctatcaatgg aattgtgagc gctcacaatt 540
ccaagaatga gatttccttc aatttttact gctgttttat tcgcagcatc ctccgcatta 600

gctgctccag tcaacactac aacagaagat gaaacggcac aaattccggc tgaagctgtc 660
atcggttact cagattttaga aggggatttc gatgttgctg ttttgccatt ttccaacagc 720
acaaataacg ggttattgtt tataaatact actattgccca gcattgctgc taaagaagaa 780
ggggtatctc tcgagaaaag agaggctgaa gctgctcaag aaccagttaa aggtcctgtg 840
tctactaagc caggttcttg tctattatc ttgattcggt gcgctatgtt aaaccacct 900
aaccgttggt tgaaggacac tgattgtcca ggtatcaaaa agtgctgtga aggttcctgc 960
ggtatggctt gtttcgttcc acaagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgtaatat 1020

cagctg 1026

<210> 37
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Oligonucleotide 17 used in cloning of tac Promoter
<400> 37
aattttctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcggtc gtataatgtg tgggaattgtg 60
agcgctcaca attcccca 78
<210> 38
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Oligonucleotide 18 used in cloning of tac Promoter
<400> 38

ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cacacattat acgagccgat gattaattgt	60
caacagctca tttcagaa	78
<210> 39	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 9 used in cloning of lambda pL Promoter	
<400> 39	
aattcatctc tggcgggtgtt gacataaata ccactggcgg tgatactgag cggaattgtg	60
agcgctcaca attcccca	78
<210> 40	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Oligonucleotide 10 used in cloning of lambda pL Promoter	
<400> 40	
ctagtgggga attgtgagcg ctcacaattc cgctcagtat caccgccagt ggtatttatg	60
tcaacaccgc cagagatg	78

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

핵염기

【변경후】

염기