



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0148781
(43) 공개일자 2021년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/85 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 2015/8518 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0066116

(22) 출원일자 2020년06월01일

심사청구일자 2020년07월22일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

박준태

인천광역시 연수구 해송로 143 송도웰카운티1단지
101동 703호

국명옥

인천광역시 계양구 임학서로42번길 3 대동빌라
401호

(74) 대리인

차준용

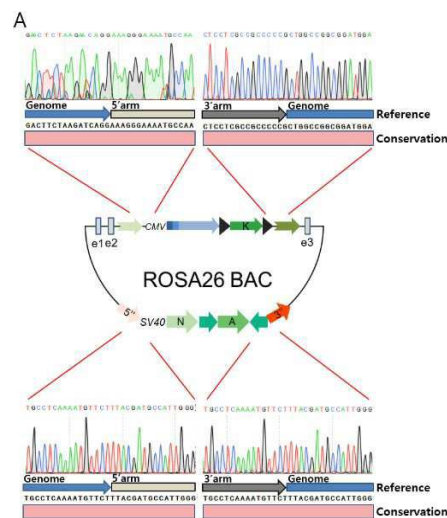
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 Tol2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법

(57) 요약

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

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2800/204 (2013.01)

C12N 2800/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318195
과제번호	2018R1D1A1B07040293
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	자가포식작용 매개 대사과정 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

청구범위유예 : 있음

임시명세서출원 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체.

청구항 2

제1항에 있어서,

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

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함하는 인공 염색체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 인공 염색체의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 포함하는 인공 염색체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 Tol2 좌측 ITR 및 Tol2 우측 ITR은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 인공 염색체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인공 염색체는 BAC, PAC, YAC 및 코스미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 인공 염색체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 인공 염색체를 포함하는 세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포는 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 더 포함하는 세포.

청구항 9

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

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 단계는 상기 인공 염색체와 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터를 공동-형질감염시키는 단계인 단백질 생산 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 인공 염색체로 형질감염된 세포에 Tol2 트랜스포사제 mRNA를 처리하는 단계를 더 포함하는 단백질 생산 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 인공 염색체는 5 ~ 15 μ g의 양으로 형질감염되는 단백질 생산 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 Tol2 트랜스포사제 mRNA의 처리 비율(인공염색체:mRNA)은 9:0.1 ~ 9:0.9 또는 9:2 ~ 9.5인 단백질 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Tol2 트랜스포존 시스템을 포함하는 인공 염색체 및 이를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체, 보다 구체적으로는 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하는 제1카세트와 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 제2카세트를 포함하는 인공 염색체를 제공하고, 상기 인공 염색체를 이용한 단백질 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유동물 세포주는 인간생성 단백질의 경우와 같이 번역 후 수식(당화)과 같은 복잡한 단백질을 생성하는 능력으로 인해 바이오 의약품을 생산하는데 주로 사용되는 발현 시스템이다. 시장에 나와 있는 대부분의 바이오 의약품은 포유류 세포로 만들어지며 CHO 세포가 가장 큰 비율을 차지한다. 재조합 CHO(rCHO) 세포는 현탁 배양, 빠른 세포 성장 속도, 높은 재조합 단백질 생산, 및 물리적 스트레스에 적응하는 능력이 있어서, rCHO는 안정적인 발현 수준을 가질 수 있었다. 따라서, CHO 세포는 단백질을 생산하는 1차 숙주 세포로 선택되는데, 바이오 의약품에서 가장 중요한 것은 적은 시간과 비용으로 많은 단백질을 생산하는 것이다. 이를 해결하기 위해 벡터 수식(vector modification)이 종종 사용된다.

[0003] 통상의 벡터 시스템이 주로 바이오 의약품에 사용된다. 통상의 벡터 시스템은 재조합 단백질을 생성하기 쉽다. 이 시스템은 가장 일반적이고 어렵지 않고 간단하며 대부분의 재조합 단백질은 이제 이러한 시스템을 통해 만들어진다. 그러나 이 시스템은 단백질 생산이 일정하지 않으며 생성이 진행됨에 따라 생산량이 감소한다. 이 약점은 "위치 색채 효과(position chromatic effect)" 때문이다. 대용량(최대 500Kb)으로 인해 BAC은 대부분의 (전부는 아님) 관심 유전자의 발현을 위한 요소들을 포함할 수 있다. 이러한 조건으로 인해 BAC의 경우 BAC은 어디에나 통합되어 있어도 위치 색채 효과를 피할 수 있다. 따라서, 발현량이 일정하게 유지되기 때문에 바이오 의약품에 유리하다. ROSA26 BAC은 마우스 유전자좌에서 잘 발현되는 유전자좌로 만들어진 BAC이다. 바이오 의약품은 BAC가 주로 사용되는 곳이다. 기존의 실험은 이 ROSA26 BAC의 성능을 보여준다. Rosa26 유전자좌를 갖는 BAC은 CHO 세포에서 재조합 단백질 생산에 큰 이점을 가지며, 통상의 벡터 시스템을 사용하는 재조합 CHO 세포와 비교하여 비생산성(specific productivity)을 향상시키는 것으로 보고되었다.

[0004] DNA 트랜스포존은 수년간 포유류 세포에서 재조합 단백질 생산을 촉진하기 위해 사용되어 왔다. DNA 트랜스포존은 세포 내에서 움직이거나 복제되는 유전자 시스템이다(일부 세포는 고유의 기능으로 가지고 있음). 이 시스템은 유전자 치료분야 또는 형질 전환을 위한 비바이러스(non-viral) 전달 도구로 사용되어 왔다. 이 비바이러스 벡터 시스템은 또한 원래의 DNA를 복제하여 여러 유전자좌에 통합할 수 있는 매우 우수한 능력을 가지고 있다. 트랜스포존 시스템은 "잘라서 붙이기" 메커니즘으로 작동한다. 이 시스템에는 두 가지 구성 요소가 필요하다. 트랜스포사제 부위 및 유전자 전이를 일으키는 트랜스포사제를 운반하는 것은 한 쌍의 역위말단반복(ITR)이다. 일반적으로 두 종류의 벡터가 필요하다. 한 유형의 벡터는 선택을 위한 전이유전자 및 유전자와 유전자의 양쪽 끝에 역위말단반복(ITR)이 있어야 한다; 공여자 벡터. 또 다른 유형의 벡터는 트랜스포사제 유전자를 가져야 한다; 헬퍼 벡터. 2개의 벡터가 세포 내로 공동-형질주입된 경우, 공여체 벡터의 ITR로 둘러싸인 서열은 트랜스포사제에 의해 세포의 게놈으로 효과적으로 "잘라서 붙이기"가 된다. 이 시스템은 재조합 세포주의 개발에 효과적으로 사용되고 있다. 주로 사용되는 트랜스포존 시스템은 Sleeping Beauty, PiggyBac, Tol2이다.

[0005] 이들 중 본 발명자는 Tol2 트랜스포존 시스템을 채택했다. 일본 쌀 물고기(Japanese rice fish)(Oryzias latipes) 또는 메다카로 알려진 물고기에서 유래한 hAT 슈퍼 패밀리에 속하는 Tol2 트랜스포존은 자연에서 발견된 유일한 척추동물 트랜스포존이다. 이 도구는 주로 게놈을 수식하는데 사용되는 도구이며 닭, 마우스 및 인간 세포에서 잘 전치되는 것으로 나타났다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) G. Abe, A. Schouw, M. L. Suster, and K. Kawakami, "Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish," Nat. Protoc., vol. 6, no. 12, pp. 1998-2021, 2011.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 새로운 단백질 발현 시스템이 개발되었다. 이 시스템은 BAC를 사용하는 통상의 시스템보다 더 안정적인 발현 수준을 가지고 있다; GOI는 주변 유전자좌의 영향을 받지 않기 때문이다. Tol2 트랜스포존 시스템을 통합함으로써, 발현 수준은 전형적인 BAC 시스템의 발현 수준보다 높다. 본 발명자는 이 시스템이 생산한 세포주가 기존의 시스템보다 더 안정적인 발현 수준을 생성한다는 것을 확인했으며, 이것이 더 많은 단백질을 만든다는 것도 실험으로 확인했다.

과제의 해결 수단

[0008] 기존의 BAC system은 사이즈가 큰 유전자 서열을 담고 있는 BAC을 세포에 형질 주입하여 재조합 단백질을 얻는다. Plasmid와 달리 BAC은 수용력이 크기 때문에 차세대 재조합 단백질을 생산하는 것에 매우 적합하다. Tol2 트랜스포존 시스템은 플라스미드(plasmid)의 수용력을 상승시켜주는 능력이 존재하고 잘라내기 및 붙여 넣기(cut and paste) 기능으로 발현량을 증가시키는 능력 때문에 현 생물 제약 분야에 많이 사용되고 있다.

[0009] Tol2 트랜스포존 시스템은 cut-and-paste 메커니즘으로 매개되는데 이는 표적부위의 재배열 또는 변형을 유발시키지 않고, 표적부위와 관련하여 선호도를 나타내지 않는다. 그래서 Tol2 system을 도입한 벡터는 기존의 발현

벡터보다 단백질 발현량이 우세하고, 안정적으로 발현한다.

- [0010] 이와 같은 Tol2 트랜스포존 시스템의 특징을 인공 염색체 시스템에 적용하고자, 본 발명의 일 실시예에서는, 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함하는 인공 염색체를 제공한다.
- [0011] 구체적으로 상기 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)은 Tol2 좌측 ITR 및 Tol2 우측 ITR을 포함하며, 각각의 염기서열은 아래와 같다;
- [0012] [서열번호 1] Tol2 좌측 ITR
- [0013] TGCGAAGATACGGCCACGGGTGCTCTTGATCCTGTGGCTGATTTTGGACTGTGCTGCTCGCAGCTGCTGATGAATCACATACTTCTCCATTTTCTTCCACTGATTGACTGTTATAATTTCCCTAATTTCCAGGTCAAGGTGCTGTGCATTGTGGTAATAGATGTGACATGACGTCACTTCCAAAGGACCAATGAACATGTCTGACCAATTTTCATATAATGTGAAAAACGATTTTCATAGGCAGAATAAATAACATTTAAATTTAACTGGGCATCAGCGCAATTCATTTGGTTTGGTAATAGCAAGGAAAAAGATAAGTGAATCTCCAAAAATAAGTACTTTTTGACTGTAAATAAAATTTGTAAGGAGTAAAAAGTACTTTTTTTTCTAAAAAATGTAATTAAGTAAAGTAAAGTATTGATTTTAATTTGACTCAAGTAAAGTAAAAATCCCCAAAAATAATACTTAAGTACAGTAATCAAGTAAATTTACTCAAGTACTTTACACCTCTGGTTCTTGACCCCTACCTTCA
- [0014] [서열번호 2] Tol2 우측 ITR
- [0015] ACCCATATCCACTCTGTTCCACACAGGTGAGGTTTGTCCAGGAGTTCTTGACAGAGGTGTAAAAAGTACTCAAAAAATTTACTCAAGTGAAAGTACAAGTACTTAGGGAAAAATTTACTCAATTAAGTAAAAAGTATCTGGCTAGAACTTACTTGAGTAAAAAGTAAAAAGTACTCCATTAATAATTTGACTTGAGTATTAAGGAAGTAAAAAGTAAAAAGCAAGAAAGAAAACTAGAGATTCTTGTTTAAGCTTTTAATCTCAAAAAACATTAATGAAATGCATACAAGGTTTTATCCTGCTTTAGAACTGTTTGTATTTAATTATCAAACTATAAGACAGACAATCTAATGCCAGTACACGCTACTCAAAGTTGTAAAACCTCAGATTTAACTTCAGTAGAAGCTGATTCTCAAAATTTGTTAGTGCAAGCCTAGCTCTTTTGGGGCTGAAAAGCAATCTGCAGTGCTGAAAAGCCTCTCACAGGCAGCCGATGCGGGAAGAGGTGTATTAGTCTTGATAGAGAGGCTGCAAAATAGCAGGAACGTGAGCAGAGACTCCCTGGTGTCTGAAACACAGGCCAGATGGG
- [0016] 구체적으로 상기 인공 염색체는 제1카세트 및 제2카세트를 포함하고, 상기 제1카세트는 관심 유전자(GOI) 및 프로모터를 포함하고, 제2카세트는 한 쌍의 Tol2 ITR(inverted terminal repeat)을 포함할 수 있다.
- [0017] 구체적인 실시예에서 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진다.
- [0018] 구체적인 실시예에서, 상기 제1카세트는 인공 염색체의 엑손 사이에서 상동 재조합을 위한 5' 상동성 암(homologous arm); CMV 프로모터; 관심 유전자; 항생제 내성 유전자; 상동 재조합을 위한 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 포함할 수 있다.
- [0019] 구체적인 실시예에서, 상기 제2카세트는 인공 염색체의 내성 유전자와의 상동 재조합을 위한 5' 상동성 암(homologous arm); Tol2 좌측 암(arm); 양 측면에 플립파아제 인식 타겟(flippase recognition target, FRT)을 포함하는 항생제 내성 유전자; Tol2 우측 암(arm); SV40 프로모터; 항생제 내성 유전자; 인공 염색체의 내성 유전자와의 상동 재조합을 위한 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 카세트는 구체적으로 DNA 카세트(DNA cassette)로, 세포 내로 도입되어 발현되도록 만들어진 유용유전자를 포함한 일련의 유전자들을 포함하는 구조체(construct)를 지칭한다.
- [0021] 상기 관심 유전자(GOI)는 전이 유전자 또는 목적 유전자로 지칭될 수 있고, 관심유전자 단백질을 암호화하는 DNA와 관련하여 RNA 전사 개시 신호, 프로모터 또는 인핸서와 같은 전사되지 않는 플랭킹 영역을 포함하지 않는다. 관심 유전자는 세포 내에서 목적 단백질을 생산하기 위하여 도입될 수 있으며 상기 관심 단백질을 인코딩하는 유전자를 의미하고, 기능성 RNA를 암호화하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 관심 유전자는 형질감염(이는 본 발명과 관련하여 또한 형질도입)을 통한 포유동물 숙주 세포와 같은 세포로 도입되고 목적하는 생성물(관심 유전자 발현 생성물, 예를 들어 이중성 단백질을) 암호화하는 DNA 서열을 언급하는 경우 본원에 사용된다. 관심 유전자는 소포체 및/또는 세포질 막에 걸친 전좌 및/또는 분비를 매개하고/하거나 촉진시키는 신호 펩타이드를 암호화하고 분비 전 또는 분비 동안에 제거되는 신호 펩타이드 암호화 서열에 기능적으로 부착될 수 있다.
- [0022] 프로모터는 하나 이상의 핵산 서열의 발현을 위해 숙주 세포에 의해 인지되는 핵산 서열이다. 프로모터 서열은 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하는 전사 제어 서열을 함유한다. 프로모터는 돌연변이체, 절단되고 하이브리드 프로모터를 포함하는 선택된 숙주 세포에서 전사 활성을 보여주는 임의의 핵산 서열일 수 있고 숙주 세포에 상동성 또는 이중성의 세포의 또는 세포내 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자로부터 수득될 수 있다. 본 발명에 따른 프로모터는 유도성 및 비-유도성 프로모터를 포함한다. 핵산 서열은 프로모터의 제어하에 있고 프로모터는

상기 핵산에 대해 이의 기능을 발휘한다. 본 발명의 세포/백터는 흔히 상기 프로모터를 함유한다.

- [0023] 상기 프로모터는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터이고, 보다 바람직하게는 제2프로모터는 U6 프로모터, H1 프로모터, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노 바이러스 후기 프로모터, 벡시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, 인간 연장인자 1 α (hEF1 α) 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, E2F 프로모터 AFP 프로모터 또는 알부민 프로모터이고, 가장 바람직하게는 CMV(cytomegalo virus) 프로모터이다.
- [0024] 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 항생제 내성 유전자는 마커 유전자로 사용되고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 제네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그러나 인공 염색체 제조시 상동 재조합이 성공적으로 완료되었는지 여부를 확인하기 위하여 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 항생제 내성 유전자를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 제1카세트 및 제2카세트는 각각 상이한 인공 염색체의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)을 포함할 수 있다. 구체적인 실시예에 따르면 상기 제1카세트는 인공 염색체의 엑손 사이에서 상동 재조합을 위한 상동성 암(homologous arm)을 포함하고, 상기 제2카세트는 상기 인공 염색체가 포함하고 있는 항생제 내성 유전자와 상동 재조합을 위한 상동성 암(homologous arm)을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0026] 상기 인공 염색체가 포함하고 있는 항생제 내성 유전자는 상기 제1카세트 및 제2카세트에 포함되어 있는 내성 유전자와 상이한 제3의 항생제 내성 유전자인 것이 바람직하다. 이와 같이 제1카세트, 제2카세트 및 인공 염색체에 포함된 항생제 내성 유전자가 각각 상이하기 때문에 인공 염색체 제조시 상동 재조합이 성공적으로 완료되었는지 여부를 용이하게 확인할 수 있다.
- [0027] 구체적인 실시예에서, 상기 제1카세트의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)은 Rosa26의 엑손 2와 엑손 3 사이의 상동 재조합을 위해 설계되었으며, Rosa26 좌측 암 및 Rosa26 우측 암은 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기서열을 갖는다.
- [0028] 또한 상기 제2카세트의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm)은 Rosa26의 클로람페니콜(Cam) 내성 유전자의 상동 재조합을 위해 설계되었으며, 클로람페니콜 좌측 암 및 클로람페니콜 우측 암은 각각 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열을 갖는다.
- [0029] 상기 인공 염색체는 BAC(bacterial artificial chromosome), PAC(P1-derived artificial chromosome), YAC(Yeast atificial chromosome) 및 코스미드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 BAC(bacterial artificial chromosome)이다.
- [0030] 이들 인공 염색체는 DNA 증폭을 위해 사용되는 개개의 세포에서 세포 분화 동안 복제 및 보존을 위해 필요한 복제 개시 서열(replication origin sequence)을 포함한다는 점에서 공통점을 갖는다. 코스미드, BAC 및 PAC는 박테리아 유래 복제 개시점을 가지며, YAC는 효모 유래 복제 개시점을 가지며, MAC는 포유동물 세포의 복제 개시점을 가지며, HAC는 인간 세포의 복제 개시점을 갖는다. 또한 본 발명에 따라 사용된 인공 염색체는, 인공 염색체를 갖고 있는 세포의 선별을 가능케 하는, 일반적으로 항생제 내성을 갖는 선택 표지인자를 가질 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 인공 염색체를 포함하는 세포를 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 포유동물 세포이며, 상기 포유동물 세포는 COS 세포, CHO 세포, VERO 세포, MDCK 세포, WI38 세포, V79 세포, B14AF28-G3 세포, BHK 세포, HaK 세포, NSO 세포, SP2/0-Ag14 세포, HeLa 세포, HEK293 세포 및 PER.C6 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 세포는 To12 트랜스포사제를 발현하는 To12 트랜스포사제 백터를 더 포함할 수 있다. 즉 상기 세포는 상기 인공 염색체와 상기 To12 트랜스포사제 백터로 공동-형질감염될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 실시예는, 상기 인공 염색체를 이용한 단백질 생산 방법을 제공하며, 상기 단백질 생산 방법은 상기 인공 염색체를 세포에 형질감염시키는 단계를 포함한다.
- [0034] 구체적으로 상기 단계는 상기 인공 염색체와 To12 트랜스포사제를 발현하는 To12 트랜스포사제 백터를 공동-형

질감염시키는 단계일 수 있다.

- [0035] 상기 트랜스포사제는 예를 들어 플라스미드(벡터)에서 DNA에 의해 암호화되거나, 또는 한편으로 상기 트랜스포사제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA이다.
- [0036] 따라서, 상기 인공 염색체를 세포에 형질감염시키는 단계 이후에 상기 인공 염색체로 형질감염된 세포에 To12 트랜스포사제 mRNA를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 인공 염색체는 5 ~ 15 μ g 또는 33 ~ 70 μ g의 양으로 상기 세포에 형질감염될 수 있으며, 바람직하게는 6 ~ 10 μ g의 양으로 형질감염되는 것이 바람직하다.
- [0038] 또한 상기 To12 트랜스포사제 mRNA의 처리 중량 비율(인공염색체:mRNA)은 9:0.1 ~ 9:0.9 또는 9:2 ~ 9.5인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명은 기존의 BAC 시스템에 To12 시스템을 적용시킨 새로운 형태의 항체 발현 시스템을 제공한다. 항체 의약품 생산에 있어 벡터의 유전자 수용력이 중요하다. 그래서 수용력이 적은 플라스미드 시스템보다 수용력이 큰 BAC 시스템이 주목받고 있다. 기존의 BAC 시스템은 사이즈가 큰 탓에 세포에 형질 주입되는 양이 적다는 단점이 존재한다. 이에 본 발명은 BAC의 발현량을 강화하고자 To12 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템에 추가하였으며 BAC 시스템에 To12 트랜스포존 시스템을 추가함으로 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 BAC 기반 벡터 디자인을 나타내는 도면이다; (A) BAC 구조의 개략도. 루시퍼라제 구조물을 엑손 2와 엑손 3 사이의 인트론 영역에 삽입하였다. CMV; CMV 프로모터, KanR; 카나마이신 내성, AmpR: 암피실린 내성, To12; To12 arm 서열, NeoR: 네오마이신 내성 (B) To12 트랜스포존 벡터(Tv)의 개략도. SA; 스플라이스 수용체, SP; 신호 펩티드, SV40; SV40 프로모터 (C) 플라스미드 대조군의 개략도.
- 도 2는 재조합 ROSA26 유전자좌의 PCR 스크리닝 결과를 나타내는 도면이다; (A) 엑손2와 엑손3 사이를 표적으로 하는 ROSA26 BAC에서 루시퍼라제 카세트의 재조합은 PCR 스크리닝으로 확인되었다. (B) 엑손2와 엑손3 사이에 표적화된 ROSA26 BAC에서의 To12 카세트 재조합은 PCR 스크리닝에 의해 확인되었다. 5'/3' 교차 PCR 앰프리콘 시퀀싱. 안정된 세포풀 앰프리콘을 정제하고 PCR 증폭한 다음 직접 시퀀싱하였다. 접합된 PCR 증폭된 생성물의 크로마토그램 서열을 게놈-공여체 경계에서의 기준 서열과 비교하였다.
- 도 3은 재조합 세포주의 루시퍼라제 발현 측정 결과를 나타내는 도면이다; 루시퍼라제는 동일한 세포 수를 가진 세포 용해로 측정하였다. (A) 각 재조합 세포주의 발현 수준을 2주 선택 후 안정된 세포주로서 측정하였다. (B) 각 재조합 세포주의 발현 수준을 각 세포주의 단일 클론으로 측정하였다(*P < 0.05, **P < 0.01, Unpaired t test, Means $\pm$ S.D., N = 3)
- 도 4는 세포주를 실시간 PCR로 분석한 결과를 나타내는 도면이다; 각 세포주의 대표적인 단일클론을 사용하여 실시간 PCR 분석을 수행하였다. (A) 통합량은 각 세포의 gDNA를 사용하여 측정하였다. (B) 전사량은 각 세포의 cDNA를 사용하여 측정하였다. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, 쌍이 아닌 t 테스트, 평균 $\pm$ SD, N = 3
- 도 5는 BAC 및 To12 시스템의 최적화 결과를 나타내는 도면이다; BAC 및 To12 시스템이 최적의 성능을 달성할 수 있도록 다양한 실험을 수행했다. (A) To12 트랜스포사제 형태에 따른 BAC 및 To12 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험. -; 음성, +; 양성 (B) BAC의 투여량에 따른 BAC & To12 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험 -; 음성, +; 양성 (C) BAC와 To12 트랜스포사제 mRNA의 비율에 따른 BAC와 To12 시스템의 최적화를 위한 형질주입 실험 -; 음성, +; 양성

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [0043] <실시예>

[0044] 1. 세균 균주 및 BAC 클론

[0045] SW105 박테리아: 유전자형 F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80d*lacZ* M15 Δ *lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*) 7649 *galU galK rspl nupG* [λ *CI857(cro-bioA)* ϕ *tet*] [(*cro-bioA*) ϕ *araC-PBADflpe*]. SW105 박테리아는 국립암연구소(National Cancer Institute)의 Copeland 연구소에서 제공해 주었다. BAC 클론(RP24-85L15)은 BACPAC 리소스 센터(미국 캘리포니아주 오클랜드 소재 CHORI)에서 구입하였다.*

[0047] 2. BAC 표적화 카세트(BTC) 및 클로람페니콜(Cam) 표적화 카세트(CTC)의 준비

[0048] BAC 표적화 벡터(BTV) 및 Cam 표적화 카세트(CTV)는 본 발명자가 제작하였다(대한민국 특허출원번호 제10-2020-0061812호) BTV를 *XmaI* 및 *XhoI*와 함께 그리고 CTV를 *BamHI* 및 *XhoI*와 함께 37°C에서 4시간 동안 배양한다. 소화된 DNA를 0.2% 아가로스 겔에 넣는다. DNA 전기영동 장치(Bioand, cat. no. Mini-ES)에서 그 겔을 100 V에서 30분 동안 작동시킨다. 전기영동 후, LED 트랜스 일루미네이터 아래에서 BTC 및 CTC를 함유하는 DNA 밴드를 절단해 낸다(Maestrogen, cat. No. SLB-01W). 겔 추출 키트(Qiagen, cat. no. 28704)를 사용하여 DNA를 정제한다. Nanodrop 분광광도계(Denovix, cat. no. DS-11)를 사용하여 DNA 농도를 측정하고 DW를 사용하여 DNA를 8-10 ng/ μ l로 희석한다.

[0050] 3. 통상적 및 BAC 기반 발현 벡터 생성

[0051] 제한효소 및 리가제는 New England Biolabs(NEB)에서 구입하였다. 모든 플라스미드는 그것들을 사용하여 제조하였다. 두 차례의 BAC 재조합을 위해 2개의 카세트를 만들었다. 제1카세트; BTV는 CMV 프로모터에 의해 발현된 루시퍼라제 유전자를 함유하고 및 제2카세트; CTC는 Tol2 트랜스포존 시스템에 대한 Tol2 암(*arm*) 서열 및 선별에 대한 네오마이신 내성을 포함한다. DH10B 대장균 박테리아에서 클로닝을 수행하였다.

[0053] 4. BAC 재조합

[0054] BAC 재조합은 이득 & 손실 시스템으로 수행하였다. 상동성 재조합에 필요한 재조합 효소 단백질을 보유하는 SW105 대장균을 Rosa26 BAC로 전기 천공시켰다. 적절한 BAC를 포함하는 SW105의 단일 콜로니를 분리한다. 12.5 μ g/ml Cam으로 5 ml LB의 종균 배양액에 접종하고 분당 250회전으로 진탕하면서 32°C에서 밤새 인큐베이션 한다. 다음날, 종균 배양액 5ml를 12.5 μ g/ml Cam으로 500ml의 LB로 희석한다. UV-Vis 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 OD를 측정하여 시간이 지남에 따라 세포 집단의 성장을 검사한다. OD₆₀₀이 0.4에 도달할 때까지(약 2.5 ~ 3 시간) 32°C에서 진탕(250rpm)하여 배양한다. 열충격 유도성 재조합 효소의 발현을 유도하기 위해, 배양액 플라스크를 42°C 진탕 수조로 옮긴다. 셀 다운 후, 상층액을 제거하고 적격세포를 만들기 위해 총부피를 1 ml로 조정한다.

[0056] 5. 1차 재조합

[0057] 200 μ l 피펫을 사용하여 상층액을 따라낸다. 세포에 800-900 ng의 FC(8-9 ng/ μ l 농도에서 총 100 μ l FC)를 추가하고 1 ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 세포를 2mm 간격 큐벳으로 옮긴다. 큐벳을 전기천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50 μ F 및 100 Ω 저항을 가한다. 1 ml SOC 배지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15 ml 원추형 튜브로 옮긴다. 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 더한다. 250rpm로 진탕하면서 32°C에서 90분 동안 세포를 배양한다. Cam과 다른 농도의 Kan을 함유한 LB 플레이트 당 배양된 세포 500 μ l을 시딩한다. 32°C에서 36시간 동안 그 판들을 배양한다. 양성 콜로니는 이득 & 손실 시스템을 사용하여 식별하였다.(도 1A)

[0059] 6. 2차 재조합

[0060] 200 μ l 피펫을 사용하여 상층액을 따라낸다. 세포에 800-900 ng의 SC(8-9 ng/ μ l 농도에서 총 100 μ l SC)를 첨가하고 1 ml 피펫을 사용하여 세포를 부드럽게 재현탁한다. 세포를 2mm 간격 큐벳으로 옮긴다. 큐벳을 전기천공 홀더로 빠르게 옮기고 전기 천공기의 펄스 버튼을 눌러 2.5kV, 50 μ F 및 100 Ω 저항을 가한다. 1 ml SOC 배

지를 큐벳에 넣고 세포를 재현탁시키고 15 ml 원추형 튜브로 옮긴다. 15ml 원추형 튜브에 추가 4ml SOC 배지를 더한다. 250rpm로 진탕하면서 32℃에서 90분 동안 세포를 배양한다. 상이한 농도의 Aan을 함유하는 LB 플레이트 당 배양 세포 500 μ l를 입힌다. 32에서 36시간 동안 그 판들을 배양한다. 양성 콜로니는 증감 선택 시스템을 사용하여 식별하였다(도 1A). BAC DNA는 삽입될 구성 및 BAC의 프라이머 쌍을 사용하여 중합 효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 정확한 재조합에 대해 분석되었다.

7. 접합 PCR 및 시퀀싱

완성된 BAC이 템플릿으로 사용되었다. 제조자의 지시에 따라 QIAfilter 플라스미드 미디 키트(12243; Qiagen)를 사용하여 템플릿을 분리 및 정제하였다. 랜딩 패드 밖으로 향한 프라이머는 벡터 백본에서 프라이머와 짝을 이루었다. 카세트 외부의 서열, 즉 BAC의 서열을 표적으로 하는 프라이머는 카세트 내부의 서열을 표적으로 하는 프라이머와 쌍을 이룬다. 카세트의 5' 및 3' 부분을 표적으로 하는 두 쌍의 프라이머가 있다. 이 영역을 SolgTM 2x Taq PCR Smart mix(STD02-M50h; Solgent)를 사용하여 3회 PCR로 증폭시키고 1% 아가로스 겔에서 시각화하였다. PCR 단편을 SolgTM 겔 및 PCR 정제 시스템(SGP04-C200; 용매)을 사용하여 정제하고 접합 PCR에 사용된 프라이머로 마크로젠으로 서열분석하였다.

8. 세포 배양

CHO-DG44(A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 세포는 4 mM L-글루타민(PAA), 4500 mg/L 포도당, 소듐피루브산염, 태아 소 혈청(FBS), Pen/Strep(Gibco) 및 HT-보충(Gibco); CHO 세포 배지를 보충한 DMEM/고포도당 배지(Hyclone)에서 유지되었다. 세포는 150 rpm에서 진탕시키며 37℃ 5% CO₂, 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

9. 형질주입

리포펙션: BAC 및 대조군 플라스미드를 LipofectamineTM 2000 형질주입 시약으로 형질주입시키기 위해 잠깐 사용하였다. 6 μ g DNA 및 12 μ L LipofectamineTM 2000 형질주입 시약(제어 DNA 0.3 μ g 첨가)을 Opti-MEM(Gibco) 무혈청 배지에서 함께 인큐베이션 하였고 20분 동안 6 웰 배양 플레이트(SPL)에서 3ml의 CHO 세포 배지에 플레이트된 3×10^6 CHO-DG44 세포에 첨가하였다. BAC DNA는 원형으로 형질주입에 사용된다. BAC 및 To12 트랜스포사제 벡터의 양의 비율은 9:1이다. 500g/ml 지네티신 디설페이트 G418(Invitrogen)을 사용하여 형질주입 2주 후 세포주 선택을 시작하였다. 형질주입 2주 후 안정된 세포주를 분석하였다. 이어서 세포를 HiRes(Roche)로 계수하였다.

11. 클론 선택 및 안정성

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

12. 제어 플라스미드 그룹, BAC 및 BAC w/To12 세포주의 생성.

생산 클론 대조군 플라스미드 그룹, Tv가 없는 BAC 그룹 및 Rosa26 BAC 그룹 w/Tv는 CHO-DG44(A1100001; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 나온 무혈청 적응 숙주 세포주에서 생성되었다. 리포펙타민TM 2000(11668030; Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 형질주입을 수행하였다. 간단히 말하면, 12 μ L 리포

펙타민™ 2000 및 원형 BAC DNA(또는 플라스미드)를 총부피 300 μL Opti-MEM 배지 무혈청에서 복합체화시켰다. 형질주입 실험 전날, CHO 세포 배지에서 성장한 3×10^5 세포/mL 숙주 세포를 6개의 웰 플레이트에 시딩하여 실험 당일에 사용하였다. DNA 및 리포펙타민의 혼합물을 세포를 함유하는 각각의 웰에 적가하고 가습 CO₂ 인큐베이터(Forma™ Series 3 Water Jacketed CO₂ 인큐베이터; Thermo Fisher Science)에서 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 후, 3X 혈청 배지로 교체한다(세포 성장에 사용되는 30mL의 배지에 6mL의 FBS를 첨가함). C418 세포 배지에 G418을 첨가하여 2주 동안 세포를 선택하였다. G418의 농도는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 선택된 형질주입 세포를 96웰(SPL)에서 웰당 0.8 세포로 인큐베이션하였다. 각 웰의 배지 부피는 150 μL 이었다. 세포가 배양된 96개의 웰-플레이트는 37°C 및 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 2주 동안 인큐베이션되었다. 각 세포주에 대해 30 개의 단일클론이 무작위로 선택되었다. 세포는 6개의 웰 플레이트로 옮기고 인큐베이션하였다.

[0077] 13. 비생산성(Specific productivity) 결정

[0078] 재조합 CHO 세포주의 발현 수준을 결정하기 위해, 루시페라제를 동일한 수의 세포에서 측정하였다. 세포 수는 Cedex HiRes(Roche)를 사용하여 계수하였고, 루시페라제는 다중 모드 판 계기(PerkinElmer)로 측정하였다. 15mL 튜브와 cfg(2000rpm, 2분)에 1×10^6 세포를 넣는다. 상층액을 제거한 후, PBS 및 cfg(2000 rpm, 2분)를 첨가하였다. 상층액을 제거한 후, PBS 50 μL 및 1 X 용해 완충액 50 μL 를 첨가하고 소용돌이 치게(vortexing)하여 펠렛을 방출한다. 준비된 각 샘플을 흰색 96개의 웰에 넣고 각 웰에 50 μL 의 LARII를 추가한다 (용해된 세포:LARII = 1:1)

[0080] 14. gDNA 및 cDNA의 준비

[0081] 게놈 DNA(gDNA)는 안정된 재조합 CHO 세포주로부터 제조되었다; 2×10^6 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 제작자의 지시에 따라 Solg™ 게놈 DNA 준비 키트(SGD41-C100; SPL)를 사용하여 gDNA를 분리하고 정제하였다. 매뉴얼에 따라 Rnasy Mini Kit(74104; QIAGEN)를 사용하여 2×10^6 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 정제된 RNA를 RNase가 없는 물에 -80°C에서 저장하였다. Phusion RT-PCR 키트(F-546S; Thermo Fisher Scientific, MA, USA, MA, USA)를 사용하여 총 RNA를 제작자의 지시에 따라 역전사시켰다. gDNA 및 cDNA의 순도 및 농도는 DS-11 분광광도계(DeNovix)로 측정하여 결정했다.

[0083] 15. mRNA

[0084] Tol2 트랜스포사제 mRNA를 Rosa26 BAC로 형질주입시켰다. MEGAscript™ T7 전사 키트(AM1333; Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 트랜스포사제 벡터(Tv)로부터 Tol2 트랜스포사제 mRNA를 증폭시켰다. 템플릿 플라스미드를 Tol2 트랜스포사제의 하류의 SalI 부위로 선형화시켜 전사시켰다. 그렇지 않으면, 원형 플라스미드 템플릿은 RNA 폴리머라제가 매우 연작용적이기 때문에 매우 길고 이질적인 RNA 전사체를 생성한다.

[0086] 16. 실시간 PCR(qPCR) 분석

[0087] qPCR은 SYBR 방법을 이용하여 CFX Connect™ 실시간 PCR 검출 시스템(Bio-Rad)으로 수행되었다. 모든 프라이머는 Snap Gene(GSL Biotech LLC, IL, USA)을 사용하여 설계되었고 MacroGen으로 합성되었다. 프라이머는 루시페라제 유전자에서 200 bp 단편 및 내부 대조군으로서 작용하는 200 bp 살림 유전자 GAPDH를 증폭시키고 데이터를 정규화하도록 설계되었다. qPCR은 비템플릿(non-template) 대조군 및 음성 대조군을 포함하여 20ng의 gDNA 또는 1 μL cDNA로 95°C에서 5분 동안 변성시킨 후 94°C에서 30초 동안, 57°C에서 30초 동안 그리고 70°C에서 10초 동안 40회 수행하였다.

[0089] 17. 클론 안정성.

- [0090] 선택 압력이 없는 CHO 세포 배지(상기 참조) 해동 후 20 세대(71-73 일)에 걸쳐 진탕 플라스크에서 CHO-DG44/Ctrl, CHO-DG44/e2e3 및 CHO-DG44/e2e3 + Tol2 rCHO 세포주의 클론 안정성을 모니터링하였다. 세포를 3 일마다 1×10^5 세포/mL로 신선한 배지에 통과시켰다. 각각의 분리 전에 세포 농도, 생존력 및 생성물 농도를 모니터링하였다.
- [0092] <실험예>
- [0093] 1. BAC 기반 벡터 설계의 최적화
- [0094] 재조합 단백질 생산에 적합한 BAC에 기초한 강력한 발현 벡터를 설계하기 위해 2가지 전략이 사용되었다. 첫째, 다양한 BAC에서 높은 수준의 발현을 갖는 것으로 알려진 Rosa26 BAC가 사용되었다. 둘째, 상당한 양의 DNA를 트랜스포존시킬 수 있는 것으로 알려진 Tol2 트랜스포존 시스템이 BAC 시스템에 추가되었다.
- [0095] 2가지 이전의 전략에 의해 생성된 새로운 벡터 시스템(BAC 및 Tol2 시스템)은 2개의 BAC 재결합을 통해 구성되었다(도 1A).
- [0096] 첫 번째 전략을 위해 murine Rosa26과 함께 BAC를 사용하기로 결정했다. Rosa26 유전자 자리는 허용되는 염색질을 함유하는 것으로 잘 알려져 있으며, 표적 전이유전자 통합을 위한 마우스 유전자 변형 분야에서 널리 사용된다. 본 발명자는 루시퍼라제 유전자를 발현하는 CMV 프로모터에 통합되고 이를 Rosa26과 재조합하는 일련의 카세트 구성하였다(도 1B).
- [0097] 이 카세트는 Rosa26의 엑손 2와 엑손 3 사이의 상동 재조합을 위해 설계되었다. 이 카세트 생산을 위해, 원하는 구조물을 복제하여 벡터(BTV)를 생성하고, 완성된 벡터를 XmaI 및 XhoI을 사용하여 분해하여 선형 카세트(BTC)를 형성하였다(도 1B).
- [0098] 두 번째 전략적 접근과 관련하여 Tol2 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템에 도입했다. 트랜스포존 시스템이 작동하려면 두 가지 조건이 충족되어야 한다. 트랜스포사제가 DNA 구조를 인식하기 위해서는 한 쌍의 ITR(역위 말단 반복: inverted terminal repeats)이 있어야 한다. ITR은 Tol2 트랜스포존 시스템에서 Tol2 암(arm)이라고 한다. 또 하나의 조건은 DNA 구조를 지닌 단백질인 트랜스포사제의 존재이다. 첫 번째 조건을 만족시키기 위해, Rosa26의 Cam26의 위치에서 또 다른 유형의 카세트 재조합은 Tol2 암 서열 및 네오마이신 내성 유전자로 설계되었다(도 1D). 포유류 선택을 위해 네오마이신 내성이 추가되었다. 이 카세트 생산을 위해, 원하는 구조물을 복제하여 벡터(CTV)를 생성하고, 완성된 벡터를 BamHI 및 XhoI를 사용하여 분해하여 선형 카세트(CTC)를 형성하였다(도 1C).
- [0099] 그리고 두 번째 조건을 위해 Tol2 트랜스포사제를 발현하는 Tol2 트랜스포사제 벡터(Tv)를 발명했다(도 1D). 제조된 BAC-기반 항체 발현 시스템을 비교하기 위해 대조군 벡터를 제조하였다(도 1E). 각각의 카세트의 5' 및 3' 접합의 하류 프라이머를 설계하여 PCR을 수행하였으며, 2개의 카세트가 Rosa26 BAC에 대한 상동 재조합을 성공적으로 완료했는지 여부를 결정하였다. 실제 서열과 비교하기 위해 PCR 생성물을 확인하고 서열 분석하였다. 정확한 서열이 일치함을 확인했다(도 2).
- [0101] 2. 기존 시스템보다 우수한 발현 수준
- [0102] 본 발명자는 정상적인 플라스미드와 강력한 벡터 시스템을 개발했다. 이들은 다른 BAC-기반 발현 벡터의 성능을 확인하기 위해 CHO-DG44 세포로 형질주입되었다. 대조군 플라스미드 그룹, Tv가 없는 Rosa26 BAC 그룹 및 Tv가 없는 Rosa26 BAC 그룹이 3 개의 세포주 그룹으로 구성되었다. 리포펙타민을 사용하여 형질주입을 수행하고, G418을 사용하여 스크리닝을 통해 안정된 세포주를 수집하였다. 이 안정된 세포주는 일시적인 발현 수준을 확인했다. 세포 내 루시퍼라제는 각 세포주에서 동일한 세포 수를 사용하여 측정하였다.
- [0103] 실험 결과, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv는 대조군 플라스미드 그룹보다 2배 더 높았고, Tv가 없는 BAC 그룹보다 1.8배 더 높았다(도 3A).
- [0104] 그 후 단일클론 수준에서 발현 수준을 확인하기 위해 후속 실험을 수행하였다. 각 세포주는 2주 동안 96웰을 사용하여 단일클론 수준에서 배양되었다. 각 세포주에서 30개의 세포를 무작위로 선택하여 배양을 위해 6웰로 옮기고, 각 세포주에서 일정한 30개 세포에서 루시퍼라제를 측정하였다.

[0105] 단일클론을 각 그룹에서 가장 높은 발현 수준과 비교할 때, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv의 클론은 대조군 플라스미드 그룹보다 3.4배 높았고, Tv 클론이 없는 BAC 그룹보다 2.3배 더 높았다(도 3B).

[0106] 세포의 배가 시간(doubling time)은 성장 속도를 알려준다. To12를 사용한 BAC 기반 시스템의 안정성을 확인하기 위해, 각 그룹에서 가장 높은 발현 수준을 갖는 세포를 선택하고 30일 동안 배치로 배양하였다. 3일마다 성장률을 측정하였다.

[0107] 결과는 Rosa26 BAC 그룹 w/Tv의 성장률이 가장 안정적임을 보여주었다(도 3C). 결과적으로, Rosa26 BAC은 플라스미드보다 더 높은 발현 능력을 가지며 To12 트랜스포존 시스템이 첨가될 때 증가하였다.

[0109] 3. 유전자 카피 수와 mRNA 전사의 차이점

[0110] 3개의 세포주의 발현 수준을 안정된 세포주 수준 및 단일클론 수준에서 확인하였다. 발현 수준의 원인을 결정하기 위해, 유전자 카피 수(gene copy number, gcn) 및 mRNA를 각 세포주에서 단일 세포 중에서 가장 높은 루시페라제를 발현하는 개체를 사용하여 확인하였다. 루시페라제를 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 형질주입된 세포의 gDNA를 사용하여 실시간 PCR(qPCR)을 수행하여 각 세포주에서 gDNA에 통합된 DNA 수의 차이를 결정하였다.

[0111] 측정된 결과는 대조군 플라스미드 그룹 클론의 gcn이 1 일 때, Tv 클론이 없는 BAC 그룹의 gcn은 0.66이고 Rosa26 BAC 그룹 w/Tv 클론의 gcn은 0.76임을 나타낸다(도 4A).

[0112] 트랜스포존을 사용할 때 본 발명자는 gcn에서 현저한 차이를 찾지 못했다. 전사될 mRNA의 차이를 결정하기 위해 cDNA를 사용하여 qPCR 실험을 수행하였다. cDNA는 이전 실험에서 사용된 동일한 클론에서 얻은 동일한 양의 RNA를 사용하여 합성되었다. 이어서 전사될 루시페라제 mRNA를 루시페라제를 표적으로 하는 프라이머를 사용하여 측정하였다. 결과적으로, Tv 클론이 없는 BAC 그룹의 mRNA 양은 대조군 플라스미드 그룹 클론의 것보다 70% 낮았고, Rosa26 BAC 그룹 w/Tv 클론의 경우 2.5배였다(도 4B).

[0113] 분석에 따르면, BAC의 사용은 플라스미드 전사의 양보다 더 많이 발생한다. 트랜스포존 시스템과 함께 사용하면 전사량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 4. BAC 최적화

[0116] To12를 갖춘 BAC 시스템은 종래의 시스템 또는 BAC 시스템보다 훨씬 더 강한 발현 수준을 갖는 것으로 밝혀졌다. 또한 To12를 사용하여 BAC 기반 시스템을 향상시키기 위해 최고의 효율성을 위한 최적의 조건을 찾았다.

[0117] 본 발명자는 세 가지 유형의 To12 트랜스포사제 유전자, BAC DNA 및 트랜스포사제를 최적화했다. 먼저, 최적의 트랜스포사제 유전자 유형이 To12를 갖춘 BAC 기반 시스템을 보다 효율적으로 작동시키는 것으로 확인되었다. BAC, 트랜스포사제 플라스미드 및 트랜스포사제 mRNA의 조건은 이전 실험에서와 동일한 조건하에서 수행되었다. 형질주입된 루시페라제 발현 플라스미드(대조군), 형질주입된 BAC 및 트랜스포사제 플라스미드, 형질주입된 BAC 및 트랜스포사제 mRNA의 세 그룹으로 실험을 수행하였다.

[0118] 결론적으로, mRNA를 가진 그룹이 가장 높은 발현 수준을 나타냈다. mRNA 그룹은 대조군보다 6배 더 높았고, 플라스미드 그룹은 3배 더 높았다.

[0119] 요약하면, To12를 갖춘 BAC 시스템을 가장 효율적으로 사용하려면 트랜스포사제를 플라스미드 형태가 아닌 mRNA 형태로 사용해야 한다(도 5A).

[0120] BAC의 양을 최적화하기 위해, 총 6가지 조건을(예컨대 2, 4, 8, 16, 32 및 64 μ g) 비교하였다. 64 μ g가 가장 높은 발현 수준을 보였지만, 너무 많은 BAC가 세포를 손상시킬 수 있기 때문에 두 번째로 높은 발현 수준을 갖는 8 μ g가 최적의 양으로 선택되었다(도 5B).

[0121] To12를 갖춘 BAC 기반 시스템은 BAC DNA의 두 조건과 To12 mRNA 사이의 비율이 최적일 때 최상의 발현을 생성한다. BAC DNA와 같은 총 5개의 조건(예를 들어 9:0.5, 9:1, 9:3, 9:6 및 9:9)에서 To12 mRNA 조건을 비교하였다. 결과적으로 9:3의 비율일 때 표현 수준이 가장 높았다(도 5C). 요약하면, To12를 갖춘 BAC 기반 시스템은 To12의 유전자가 mRNA의 형태이고, BAC의 양이 8 μ g이고, BAC 및 To12 트랜스포사제 mRNA의 비율이 9:3 인 조건 하에서 가장 높은 발현 수준을 가졌다.

[0123]

<검토>

[0124]

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

[0125]

BAC 시스템은 매우 강력한 단백질 발현 시스템이다. 안정된 세포주 수준에서 BAC 시스템 단독은 플라스미드 시스템보다 1.8배 높았으며 BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템은 2.1배 더 높게 사용되었다. 결과적으로, 단일 세포 수준에서, BAC 시스템은 플라스미드 시스템보다 2.42배 높았으며, BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템은 3.43배로 가장 높았다. 새로 만든 벡터 시스템이 통상 시스템보다 훨씬 강력하다는 것을 알 수 있다. 형질주입된 세포주의 gDNA 및 cDNA를 분석하였다. 플라스미드 시스템의 gcn이 1 인 경우, BAC 시스템의 gcn은 0.66이고 BAC 및 Tol2 트랜스포존 시스템의 gcn은 0.76이다. 각 시스템과 비교하여, BAC 시스템 단독은 플라스미드 시스템보다 28배 높았고, Tol2 트랜스포존 시스템은 239배로 가장 높았다. gcn의 수의 차이는 눈에 띄지 않았지만, 발현량은 상당히 다른 것으로 관찰되었다. 결론적으로, Tol2 트랜스포존 시스템은 BAC 통합보다는 BAC 전사를 증가시켰다. 새로운 벡터 플랫폼을 최적화하기 위해 실험을 수행하였다. Tol2 플랫폼을 갖춘 BAC에서 최고의 성능을 얻기 위해 최적 유형의 트랜스포사제로 실험했다. 결론적으로, 벡터 유형은 대조군보다 약 3배 더 많았으며, mRNA 유형은 약 6배 더 높았는데, mRNA 유형이 가장 적합하였다.

[0126]

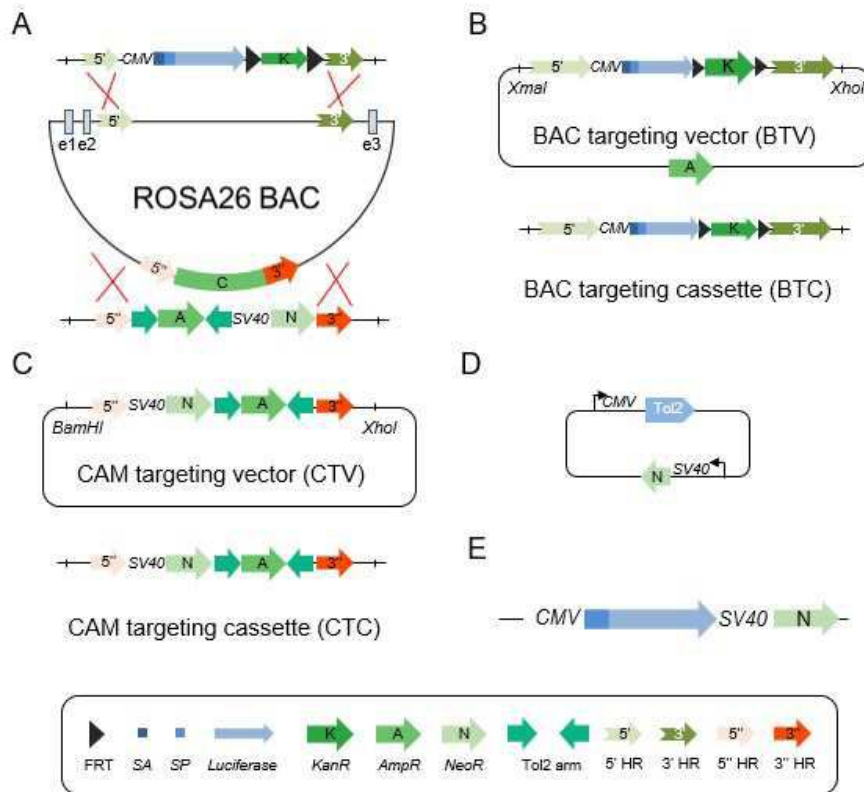
요약하면, 본 발명자는 재조합 단백질을 생산하기 위한 매우 강력한 벡터 시스템을 개발했다. BAC 시스템을 사용하는 경우, 재조합 단백질의 발현 수준이 종래의 벡터 시스템의 발현 수준보다 높다는 것이 확인되었다. 다음으로, Tol2 트랜스포존 시스템을 BAC 시스템과 함께 사용해보니, BAC 시스템만 사용했을 때 발현이 더 강한 것으로 확인되었다. 트랜스포존 시스템이 BAC와 함께 사용될 때, 세포 내로 형질도입된 통합량은 유의하게 변하지 않지만 전사량은 유의하게 증가한다. 종합하면, 이 증거들은 새로 개발된 벡터 시스템이 기존의 벡터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

[0128]

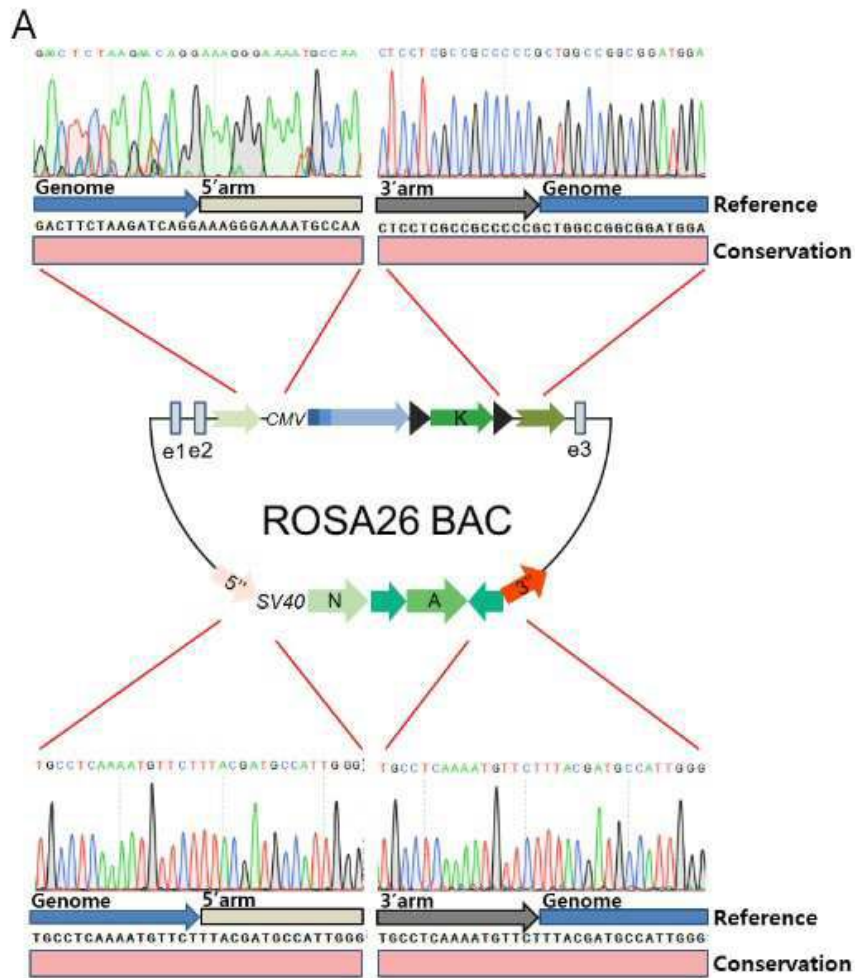
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

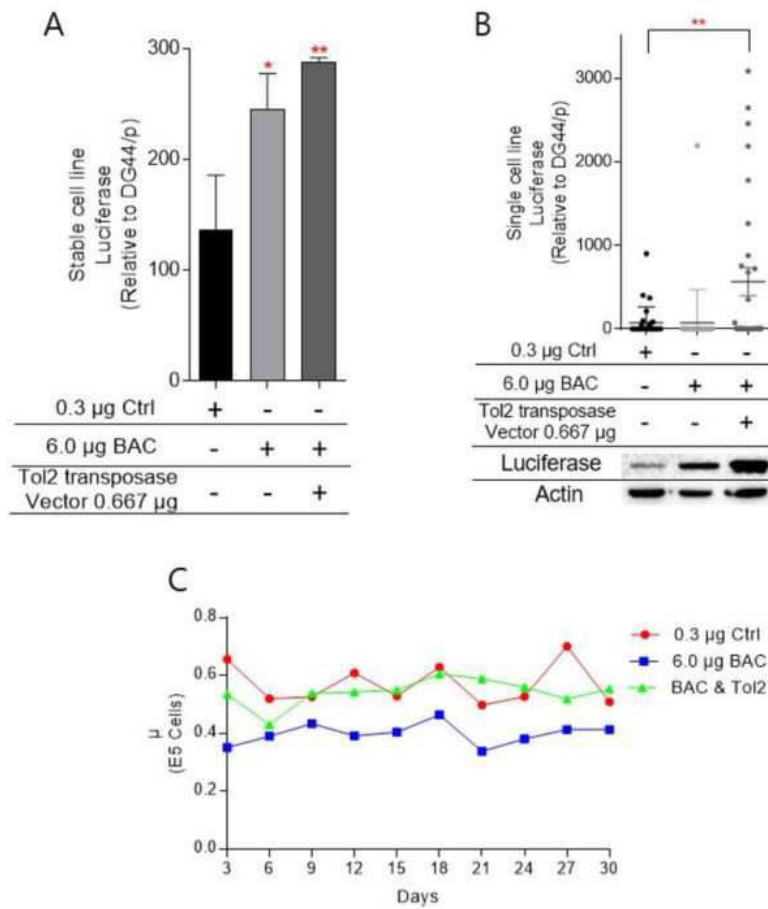
도면1



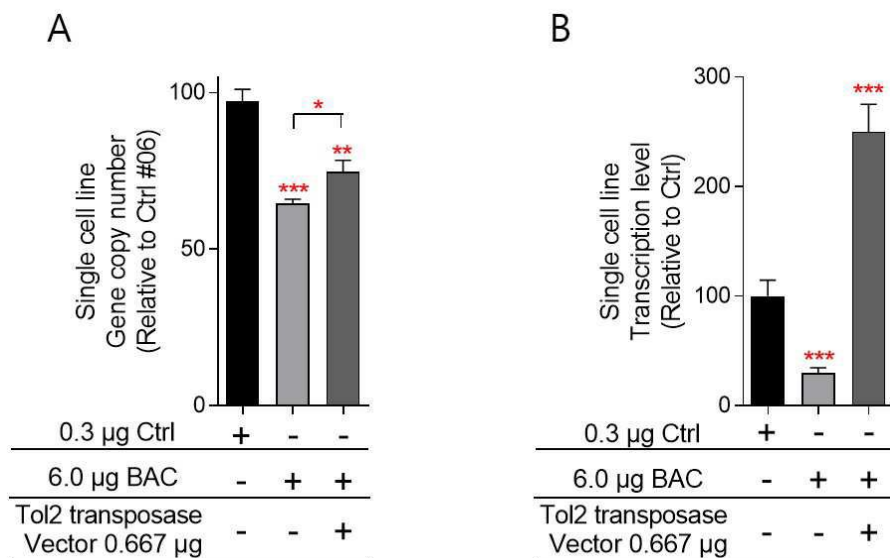
도면2



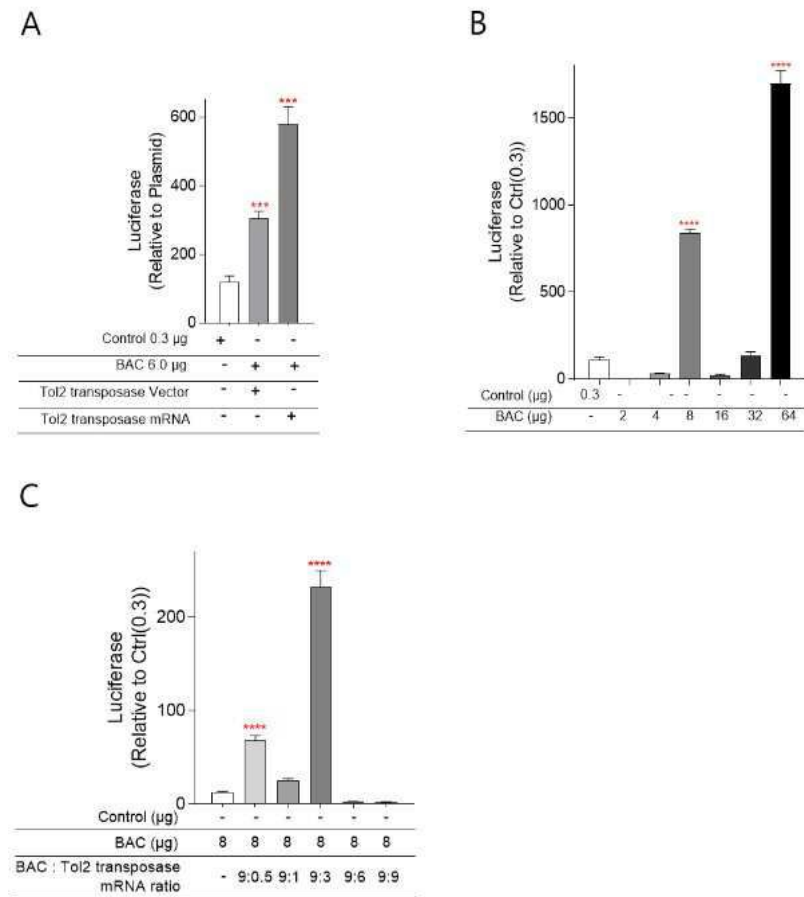
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> ARTIFICIAL CHROMOSOME CONTAINING TOL2 TRANSPOSON SYSTEM AND PRODUCTION METHOD OF PROTEIN USING THE SAME
- <130> P20-0000
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 539
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Tol2 left ITR
- <400> 1

tgccaagata cggccacggg tgctcttgat cctgtggctg attttgact gtgctgctcg 60

cagctgctga tgaatcacat acttctcca ttttctcca ctgattgact gttataattt 120

ccctaatttc caggtaagg tgctgtgcat tgggtaata gatgtgacat gacgtcactt 180
 ccaaaggacc aatgaacatg tctgaccaat ttcataataat gtgaaaacga tttcatagg 240
 cagaataaat aacattttaa ttaactggg catcagcgca attcaattgg ttggtaata 300
 gcaagggaaa atagaatgaa gtgatctcca aaaaataagt actttttgac tgtaataaaa 360
 attgtaagga gtaaaaagta ctttttttc taaaaaatg taattaagta aaagtaaaag 420
 tattgatttt taattgtact caagtaaagt aaaaatcccc aaaaataata cttaagtaca 480
 gtaatcaagt aaaattactc aagtacttia cacctctggg tcttgacccc ctaccttca 539

<210> 2

<211> 592

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tol2 right ITR

<400> 2

accatatacc actctgttcc acacaggtca gaggtttgtc caggagttct tgacagaggt 60
 gtaaaaagta ctcaaaaatt ttactcaagt gaaagtacaa gtacttaggg aaaattttac 120
 tcaattaaaa gtaaaagtat ctggctagaa tcttacttga gtaaaagtaa aaaagtactc 180
 cattaaaatt gtacttgagt attaaggaag taaaagtaaa agcaagaaag aaaactagag 240
 attcttgttt aagcttttaa tctcaaaaaa cattaaatga aatgcataca aggttttacc 300

ctgctttaga actgtttgta tttaattatc aaactataag acagacaatc taatgccagt 360
 acacgtact caaagttgta aaacctcaga ttaacttca gtagaagctg attctcaaaa 420
 ttgttagtgt caagcctagc tcttttgggg ctgaaaagca atcctgcagt gctgaaaagc 480
 ctctcacagg cagccgatgc gggaagaggt gtattagtct tgatagagag gctgcaaata 540
 gcaggaaacg tgagcagaga ctccctgggt tctgaaacac aggccagatg gg 592

<210> 3

<211> 5245

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> the first cassette

<400> 3

aaagggaaaa tgccaatgct ctgtctaggg gttggataag ccagtataat aaatgaaaat 60
 ggggctaaaa tgagtgttct aaaatactt ttgataagc tgcagaagga gcgggagaaa 120
 tggatatgaa gtactgggct ctttaaaaat gattaaaatt ctgcttacat agtctaactc 180

gcgacactgt aatttcatac ttagtaagg atctcaagca ggagagtata aaactcgggt	240
gagcatgtct ttaatctacc tcgatgaaa atactccgag gcggatcaca agcaataata	300
acctgtagtt ttgctgcata aaaccccaga tgactaccta tctctccatt ttccttattt	360
gcccctatta aaaaacttcc cgacaaaacc gaaaatctgt gggaagtctt gtccctccaa	420
ttttacacct gttcaattcc cctgcaggac aacgccaca caccaggta gcctttaagc	480
ctgggatcgg atccgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc	540
attagttcat agcccatata tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc	600
tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcctatagt	660
aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacgtt aaactgcccc	720
cttggcagta catcaagtg atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg	780
taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga	840
gtacatctac gtattagta tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa	900
tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa	960
tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc	1020
cccatgacg caaatggcg gttagcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctga	1080
tcctagggcg cagtagtcca gggtttctt gatgatgtca tacttatect gtcccttttt	1140
tttccacagc tcgcggttga ggacaaactc ttccgggtct ttcagtgcc accatggagt	1200
ttgggctgag ctgggttttc ctcggtgctc ttttagagg tgtccagtgt atggaagacg	1260
ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgt ggaagatgga accgctggag	1320
agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccttgggtcc tggaacaatt gcttttacag	1380
atgcacatat cgaggtggac atcacttacg ctgagtactt cgaaatgtcc gttcggttgg	1440
cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta tgcagtgaaa	1500
actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt gcagttgcgc	1560
ccggaacga catttataat gaacgtgaat tgcacaacag tatgggcatt tcgcagccta	1620
ccgtggtgtt cgtttccaaa aagggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa aaaaagctcc	1680
caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccaggga tttcagtcga	1740
tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacga tttgtgccag	1800
agtccttcga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctctctgga tctactggc	1860
tgctaaagg tgcgctctg cctcatagaa ctgcctgcgt gagattctcg catgccagag	1920
atcctatttt tggcaatcaa atattccgg atactgcga ttttaagtgt gtccattcc	1980
atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatattgat atgtggattt cgagtcgtct	2040

taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac aagattcaaa	2100
gtgcgtgct ggtgccaaacc ctattctcct tcttcgcaa aagcactctg attgacaaat	2160
acgatttate taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct aaggaagtcg	2220
gggaagcggg tgccaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat gggctcactg	2280
agactacatc agctattctg attacaccg agggggatga taaaccgggc gcggtcggtg	2340
aagttgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa acgctgggcg	2400
ttaatcaaag aggcgaaactg tgtgtgagag gtccatgat tatgtccggt tatgtaaca	2460
atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct ggagacatag	2520
cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct ctgattaaagt	2580
acaaaggcta tcaggtggct cccgctgaat tggaatccat cttgctcaa cacccaaca	2640
tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt cccgccgccg	2700
ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat tacgtcgcca	2760
gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt gtttgtggac gaagtaccga	2820
aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata aaggccaaga	2880
agggcggaaa gatcgccgtg taattctagg agctctatac gcgtctcaag cttactgcta	2940
gcgttctaga gtcggggcgg ccggccgctt cgagcagaca tgataagata cattgatgag	3000
tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat	3060
gctattgctt tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaaca caacaattgc	3120
attcatttta gtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac	3180
ctctacaaat gtggtatggc tgattatgat cctctagatc aactagtcca tggaaattcag	3240
caacattgcc ttacatggtc catatgaata tctccttag ttcctattcc gaagttccta	3300
ttctctagaa agtataggaa cttcagagcg cttttgaagc tggggtgggc gaagaactcc	3360
agcatgagat ccccgcgctg gaggatcatc cagccggcgt cccggaaaac gattccgaag	3420
cccaaccttt catagaagcg ggcggtggaa tcgaaatctc gtgatggcag gttgggcgtc	3480
gcttggctcg tcatttcgaa cccagagtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat	3540
agaaggcgat gcgctgcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag	3600
cccattgcc gccaaagctt tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tctgatagc	3660
ggtccgccac acccagccgg ccacagtcca tgaatccaga aaagcggcca tttccacca	3720
tgatattcgg caagcaggca tcgcatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc	3780

gcgccttgag cctggcgaac agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat	3840
catcctgata gacaagaccg gcttccatcc gactacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg	3900
cttgggtggc gaatgggcag gtagccgat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag	3960
ccatgatgga tactttctcg gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca	4020
cttcgcccga tagcagccag tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc	4080
aaggaacgcc cgtcgtggcc agccacgata gccgcgtgc ctcgtcctgc agttcattca	4140
gggcaccgga caggtcggtc ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga	4200
acacggcggc atcagagcag ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct	4260
ccaccaagc ggccggagaa cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcatg cgaaacgata	4320
ctcatcctgt ctcttgatca gatcttgatc ccttcgcca tcagatcctt ggccggcaaga	4380
aagccatcca gtttactttg cagggttcc caaccttacc agaggcgccc ccagctggca	4440
attccggttc gcttgcgtgc cataaaaccg cccagtctag ctatcgccat gtaagcccac	4500
tgcaagctac ctgctttctc tttagcgttg cgttttccct tgtccagata gccagtagc	4560
tgacattcat ccggggtcag caccgtttct gcggactggc tttctactg ttccgcttcc	4620
tttagcagcc cttagccct gagtgcttg gcgcagctgg gggatcttga agttcctatt	4680
ccgaagtcc tattctctag aaagtatagg aacttcgaag cagctccagc ctacacaatc	4740
gtgaattct ttctaaggc tagaaagact ggagttgcag atcacgaggg aagaggggga	4800
agggattctc ccaggcccag ggcggtctc agaagccagg aggcagcaga gaactcccag	4860
aaaggtattg caaacctccc ctccccctc cggagaaggg tgcggccttc tccccgcta	4920
ctccactgca gtcctttac tgataacaac tcagagcgac tttagggagag caagtgttc	4980
ctgcctcaa aacagcccaa ctgagccctc gtccttccc tccactccc ggagtgcgcg	5040
atggaggctt ggtcagcac gccctcttg aggcaactca agtcggaaac gtgcttgac	5100
ccgccccga gccgtcagc cctactgcc gtccccgcc ccagcgcgcg cttcctgcca	5160
cgttgcgcag ggcgcgcgg ccagactctg cggcgcgggg ccgaggggag ggccggaacc	5220
tgggagcgc tctcgcgc cccc	5245
<210> 4	
<211> 3890	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> the second cassette	
<400> 4	

gatccactag agaacatttt gaggcatttc agtcagttgc tcaatgtacc tataaccaga	60
ccgttcagct ggatattacg gcctttttta agaccgtaaa gaaaaataag actagggtgtg	120
tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggttc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca	180
tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat	240
gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc	300
gcccctaact cgcgccagtt ccgccatttc tccgccccat ggctgactaa tttttttat	360
ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt	420
ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca ttttcggatc	480
tgatcaagag acaggatgag gatcgttttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg	540
ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cgctatgac tgggcacaac agacaatcgg	600
ctgctctgat gccgcctgtt tccgctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa	660
gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct	720
ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgactt gtcactgaag cgggaaggga	780
ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcttg tcatctcacc ttgctcctgc	840
cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggttg catacgcttg atccgctac	900
ctgccatttc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc	960
cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact	1020
gttcgccagg ctcaaggcgc gcatccccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga	1080
tgctgcttg ccgaataca tgggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg	1140
ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga	1200
agagcttggc ggcaatggg ctgaccgtt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga	1260
ttcgcagcgc atcgcttct atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg	1320
ttcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc	1380
gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggtg gatgacctc	1440
cagcgcgggg atctcatgct ggagtcttc gccacccca acttgtttat tgcagcttat	1500
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt ttttctactg	1560
cattctagtt gtggtttgtc caaactcacc aatgtatctt actagtaacg gccgccagt	1620
tgctggaatt cgcccttgcg aagatcggc cacgggtgct cttagtcctg tggctgattt	1680
tggactgtgc tgctgcagc tgctgatgaa tcacatactt cctccatttt ctccactga	1740

ttgactgtta taatttcctt aatttccagg tcaaggtgct gtgcattgtg gtaatagatg	1800
tgacatgacg tcacttccaa aggaccaatg aacatgtctg accaatttca tataatgtga	1860
aaacgatttt cataggcaga ataaataaca tttaaattaa actgggcacg agcgcaattc	1920
aattggtttg gtaatagcaa gggaaaatag aatgaagtga tctccaaaaa ataagtactt	1980
tttgactgta aataaaattg taaggagtaa aaagtacttt tttttctaaa aaaatgtaat	2040
taagtaaaag taaaagtatt gatttttaat tgtactcaag taaagtaaaa atccccaaaa	2100
ataaacttta agtacagtaa tcaagtaaaa ttactcaagt actttacacc tctggttctt	2160
gacccctac cttcattgcg gaaccctat ttgtttatit ttctaaatac attcaaatat	2220
gtatcgctc atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag	2280
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt ttgcggcac tttgccttcc	2340
tgtttttgc caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagac agttgggtgc	2400
acgagtgggt tacatcgaa tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc	2460
cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagtcttg ctatgtggcg cggattatc	2520
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt	2580
ggttgagtac tcaccagta cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt	2640
atgcagtgt gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat	2700
cggaggaccg aaggagctaa ccgttttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt	2760
tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat	2820
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc	2880
ttcccgcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg	2940
ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc	3000
tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tgtaagccc tcccgtatcg tagttatcta	3060
cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc	3120
ctcactgatt aagcatttgt aactgtcaga ccaaccata tccactctgt tccacacagg	3180
tcagaggttt gtccaggagt tcttgacaga ggtgtaaaaa gtactcaaaa attttactca	3240
agtgaagta caagtactta gggaaaattt tactcaatta aaagtaaaag tatctggcta	3300
gaatcttact tgagtaaaag taaaaaagta ctccattaaa attgtacttg agtattaagg	3360
aagtaaaagt aaaagcaaga aagaaaacta gagattcttg ttttaagcttt taatctcaaa	3420
aaacattaaa tgaatgcat acaaggtttt atcctgcttt agaactgttt gtatttaatt	3480
atcaaaactat aagacagaca atctaatagcc agtacacgt actcaaagtt gtaaaacctc	3540
agatttaact tcagtagaag ctgattctca aaattgttag tgtcaagcct agctcttttg	3600

gggctgaaaa gcaatcctgc agtgctgaaa agcctctcac aggcagccga tgcgggaaga 3660
 ggtgtattag tcttgataga gaggtgcaa atagcaggaa acgtgagcag agactccctg 3720
 gtgtctgaaa cacaggccag atgggaaggg cgaattctgc agatatcaaa tattatacgc 3780
 aaggcgacaa ggigctgatg ccgctggcga ttcaggttca tcatgccgtt tgtgatggct 3840

tccatgtcgg cagaatgctt aatgaatata tccatcacac tggcggccgc 3890

<210> 5

<211> 473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rosa26 left homologous arm

<400> 5

aaagggaaaa tgccaatgct ctgtctaggg gttggataag ccagtataat aaatgaaaat 60
 ggggctaaaa tgagtgttct aaaatacctt ttgataaggc tgcagaagga gcgggagaaaa 120
 tggatatgaa gtactgggct ctttaaaaat gattaaaatt ctgcttacat agtctaactc 180
 gcgacactgt aatttcatac tgtagtaagg atctcaagca ggagagtata aaactcgggt 240

gagcatgtct ttaatctacc tcgatggaaa atactccgag gcggatcaca agcaataata 300
 acctgtagtt ttgtgcata aaaccccaga tgactaccta tcttccatt ttccttattt 360
 gcccctatta aaaaacttcc cgacaaaacc gaaaatctgt gggaagtctt gtccctccaa 420
 ttttacacct gttcaattcc cctgcaggac aacgccaca caccaggtta gcc 473

<210> 6

<211> 486

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rosa26 right homologous arm

<400> 6

ctagaaagac tggagttgca gatcacgagg gaagaggggg aagggtattct cccaggccca 60

gggcggctct cagaagccag gaggcagcag agaactccca gaaaggtatt gcaaacctcc 120
 cctccccctt ccggagaagg gtgcggcctt cccccgcct actccactgc agctccctta 180
 ctgataaaa ctcagagcga ctttgggaga gcaagtgtt cctgcctcca aaacagccca 240
 actgagccct cgtctcttcc ctccactccc cggagtgcgc gatggaggtc tggtcagca 300
 cgccctctt gaggcgaactc aagtcggaaa cgtgcttgca cccgccccgc agccgctcag 360
 ccctactgcc cgtccccgcc cccagcgcgc gcttctgcc acgttgcgca ggggcgcgcg 420

gccagactct gcggcgcggg gccgagggga gggccggaac ctgggagcgc ctcctcgccg 480

cccccg 486

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cam left homologous arm

<400> 7

agaacatttt gaggcatttc agtcagttgc tcaatgtacc tataaccaga cgttcagct 60

ggatattacg gcctttttaa agaccgtaaa 90

<210> 8

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cam right homologous arm

<400> 8

aaatattata cgcaaggcga caagtgctg atgccgtgg cgattcaggt tcatcatgcc 60

gtttgtgatg gcttccatgt cggcagaatg cttaatgaat 100

임시명세서(첨부)



아이콘을 더블 클릭하시면 임시명세서 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.