

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/64
C12N 1/21
C12P 21/02

(11) 공개번호 특1999-0044525
(43) 공개일자 1999년06월25일

(21) 출원번호	10-1998-0701773		
(22) 출원일자	1998년03월09일		
번역문제출일자	1998년03월09일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1996/02208	(87) 국제공개번호	WO 1997/09435
(86) 국제출원출원일자	1996년09월06일	(87) 국제공개일자	1997년03월13일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 말라위 수단 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 북한		
(30) 우선권주장	9518395.0 1995년09월08일 영국(GB)		
(71) 출원인	코브라 테라퓨틱스 리미티드 데이비드 알, 대처 영국, 스탠포드셔 에스티5 5에스피, 킬, 더 싸이언스 파크, 슈트 1.8유니버시티 오브 킬		
(72) 발명자	쉐라트. 데이비드, 존 영국, 옥스포드 88 에이이 위트니, 처치 한보로우, 칼리지 팜 윌리엄스. 스티븐, 저레인트 영국, 체셔 씨더블유9 8엘에이치 데이브함, 런던 로드 609 하낙, 줄리안. 알렉시스. 존 영국, 체셔 에스케이 11 7이에프, 맥클레스필드, 블레이크로우 로드138		
(74) 대리인	김동엽, 임석재		

심사청구 : 있음

(54) 플라스미드의 안정화

요약

유전자 치료 및 재조합 단백질의 생산에 유용한 플라스미드의 보존을 위해 신규한 억제인자 적정 시스템을 이용하는 것이 개시되어 있다. 이 시스템은 트랜스 형태로 발현되는 억제인자에 의해서 결합할 수 있는 작동유전자, 억제인자를 암호화하는 제1의 염색체 유전자 및 작동유전자와 기능적으로 결합되며 세포 성장에 필수적인 제2의 염색체 유전자를 포함하는 플라스미드를 갖는 형질전환된 숙주세포를 이용한다. 여기에서 플라스미드는 필수유전자가 발현되므로써 세포성장이 이루어지도록 억제인자를 적정하기에 충분한 수로 세포내에 존재한다.

대표도

도1

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 플라스미드의 안정한 보존방법에 관한 것이며, 특히 유전자 치료에 유용한 유전자를 포함하는 플라스미드에 관한 것이다.

배경기술

특히 고사본수(high copy number)로 플라스미드를 안정되게 보존시키는 것은 유전자 치료용 치료 유전자

를 전달하는 DNA를 제조하는데 중요하다. 그러나, 플라스미드를 포함하는 배양세포들은 플라스미드가 없는 분리된 세포들에 비하여 증대된 대사적 부담을 통상적으로 가지기 때문에 숙주세포들내의 염색체외(extrachromosomal) DNA는 세포배양중에 본질적으로 불안정하게 된다. 플라스미드를 안정하게 보존하고 대사적 부담을 감소시키기 위한 노력으로서, 우세한 선택가능한 마커(marker)들을 포함하도록 설계된 플라스미드가 통상적으로 사용되어 왔다. 박테리아 또는 효모 숙주 균주들의 일정비율이 증가된 발효동안에 존재하는 선택인자가 플라스미드 DNA의 복제 및 보존의 노력으로 부담이 되지 않는 세포들에 의해서 플라스미드가 손실되고 이상증식되는 것을 막게 된다.

예를들면, 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin) 또는 테트라사이클린(tetracycline)과 같은 항생물질에 대한 저항을 암호화하는 항생물질 저항(antibiotic resistance) 유전자들은 재조합 단백질 또는 플라스미드 DNA를 생산하는 분자생물 클로닝과정과 발효과정에서 사용되는 가장 통상적인 우세한 선택가능한 마커들이다. 항생물질 존재하에서의 지속적인 발효동안에, 숙주세포에 의한 배양물의 희석과 감성(degradation)으로 인하여 발효시간 동안에 항생물질은 활성도를 잃기 때문에 선택적인 압력이 손실된다. 따라서, 몇가지의 성공적인 플라스미드의 보존방법은 항생물질의 선택을 이용하지 않고, 아미노산을 합성할 수 있으며, 이러한 합성을 플라스미드내에 제공하는 유전자를 삽입하는 돌연변이 숙주에 다소 의존하게 된다. 플라스미드가 없는 분리된 세포들에 의해 배양물이 정거되는 것을 막는 또다른 해결방법은 염색체내에 독성생산물을 암호화하는 유전자를 배치한 다음 플라스미드내에서 상응하는 억제인자(repressor) 시스템을 포함하는 단계를 수반한다. 플라스미드가 없는 세포들은 분리되자마자 사실상 죽게 된다.

그러나, 선택적인 압력을 가질지라도, 플라스미드를 포함하는 세포들의 선택성 유전자의 보충적인 생산물의 누출로 인하여 플라스미드가 없는 세포들은 지속적으로 성장할 수도 있다. 뿐만 아니라, 유전자 치료 목적을 가지는 벡터들에 대한 항생물질 저항 유전자들 또는 다른 우세한 선택가능한 마커들은 타겟 포유동물 세포 또는 숙주 포유동물 유기체내에서 이들 유전자의 발현과 관련된 잠재적인 문제들을 일으켜 왔다. 타겟 포유동물 세포내에서의 이들 유전자의 발현은 세포의 파괴 및/또는 포유동물의 유전자 생산물에 항원반응을 일으키게 할 수도 있다. 또한, 최종 생산물의 오염에 관해서는 배양중에 플라스미드 선택에 사용되는 항생물질에 대한 관심사, 항생물질에 대한 심한 면역반응, 예를들면 아나필락틱 쇼크(anaphylactic shock)의 잠재적인 유발에 대한 관심사가 있다. 광범위한 용도의 항생물질 저항 박테리아 유전자들도 역시 궁극적으로는 전체로서 박테리아 집단으로 전달된다. 따라서, 플라스미드 태생 유전자들 또는 항생물질의 선택을 필요로 하지 않는 플라스미드의 보존방법이 요구되고 있다.

발명의 요약

본 발명은 플라스미드 태생의 우세한 선택가능한 마커의 사용을 필요로 하지 않으면서, 억제인자 적정(repressor titration) 시스템을 다소 이용하는 플라스미드 보존 시스템의 발견에 근거한 것이다.

본 발명은 트랜스(trans) 형태로 발현된 억제인자에 의해서 결합할 수 있는 작동유전자, 상기 억제인자를 암호화하는 제1의 염색체 및 작동유전자와 기능적으로 결합되고 세포성장에 필수적인 제2의 염색체 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함하는 형질전환된 숙주세포를 포함하며, 여기에서 상기 플라스미드는 필수 유전자가 발현되어 세포성장이 이루어지도록 억제인자를 적정하기에 충분한 수로 세포에 존재하게 된다.

여기에서 사용된 바와 같이, 작동 유전자 서열 및 관련 유전자에 대해서 '기능적으로 결합된(functionally associated)' 또는 '작동가능하게 결합된(operatively associated)'이란, 작동유전자에 억제인자가 결합하자마자 유전자 발현이 억제될 수 있도록 작동유전자가 유전자에 시스템대로 연결되는 것을 의미한다.

당업자들은 작동유전자라는 용어가 관련 프로모터로부터의 전사를 막기 위해 억제인자가 결합하는 핵산 서열을 한정하는데 사용된다는 것을 이해할 것이다. 플라스미드 작동유전자는 염색체 유전자의 전사를 억제하는 억제인자와 결합하는데 필요한 최소의 서열들로만 이루어지는 것을 필요로 하기 때문에, 플라스미드상에 존재하는 작동유전자 서열은 염색체 유전자상의 작동유전자 서열과 동일한 서열일 필요는 없다. 본 발명에 따르면, 돌연변이된 작동유전자 서열들이 예를들면 하나 이상의 뉴클레오티드들이 삽입, 결실 또는 치환되어 상응하는 억제인자에 대한 친화력을 증가 또는 감소시키게 되는 유용한 서열들이라는 것도 이해될 것이다.

여기에서 사용된 바와 같이, '세포성장(cell growth)'은 배양시간 동안에 배지에서 세포들의 수가 증가하는 것을 가리키며, 또한 배양시간 동안에 세포들의 수가 증가하지는 않지만, 배양시간 동안에 살아 있는 세포들의 수가 다소 감소하지 않는 경우인 세포생존을 가리킨다.

바람직하게는, 억제인자 유전자는 *E. coli lac* 억제인자, λ 억제인자, *E. coli trp* 억제인자, *E. coli galR* 억제인자, *E. coli araC* 억제인자, *E. coli Arg RNV* 억제인자(버케 등(1994) 분자생물학, 13, 609-618) 및 *E. coli Tet* 억제인자 중에서 하나를 암호화한다. 전술한 바와 같이, 각각의 억제인자는 염색체내와 플라스미드 상에 존재하는 트랜스형태로 결합된 작동유전자 서열과 트랜스 형태로 작동가능하다. 본 발명은 하나의 염색체 억제인자 유전자가 돌연변이되거나 결실될 경우에 플라스미드의 안정성을 보장하기 위해서 하나 이상의 억제인자 유전자들, 예를들면 한 개, 두 개 또는 세 개의 억제인자 유전자들이 숙주 염색체 상에 존재하는 것을 관찰하였다.

따라서, 바람직한 작동유전자 서열들은 *lac* 작동유전자, λ 작동유전자, *trp* 작동유전자, *gal* 작동유전자, *ara* 작동유전자, *Arg* 작동유전자 및 *Tet* 작동유전자를 포함한다. 바람직하다면, 상응하는 프로모터는 이의 작동유전자와 기능적으로 결합할 수도 있다.

숙주세포는 포유동물 세포 및 곤충세포와 같은 동물세포, 식물세포, 효모세포와 박테리아세포와 같은 곰팡이 균류 세포를 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 숙주 세포는 그램(gram) 네가티브이거나 그램 포지티브일 수 있는 박테리아 세포이며, 예를들면 대장균(*E. coli*), 살모넬라(*salmonella*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*streptomyces*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*) 이다.

숙주 세포가 진행세포인 경우, Lac 억제인자, Tet 억제인자 및 이들의 상응하는 억제인자들이 사용되는 것이 바람직하다. 효모, 디티오스텔름(dictiostelium), 식물세포 및 담배식물을 포함한 진핵세포에서 유전자 발현을 조절하기 위해 Lac 억제인자와 Tet 억제인자가 사용되는 것이 고센 등((1994) Current Opinions in Biotechnology, 5,516-520)에 의해 기술되었다.

작동유전자와 기능적으로 결합하는 하나 이상의 상이한 필수 염색체 유전자가 세포 염색체내에 존재할 수 있으며, 여기에서 필수유전자는 작동유전자에 연결되므로써 억제인자에 의해 억제되어 하나의 염색체 작동유전자에서의 억제인자 민감성이 손실되는 것을 억제하게 된다. 본 발명의 바람직한 하나의 구체예에서, 억제인자 단백질을 암호화하는 유전자는 하나의 염색체 위치에서 억제인자의 발현이 손실되는 것을 억제하기 위해서 염색체내의 상이한 위치에서 두 개 또는 세 개의 사본들로 존재하게 된다.

숙주 염색체상에 위치하는 바람직한 필수 유전자들은, 제한되는 것은 아니지만, 다음의 카테고리에 해당되는 유전자들을 포함한다: 세포벽 전구물질과 같은 세포 대사산물의 생합성과 관련된 생산물을 암호화하는 유전자, 그의 생산물이 탄소대사에 수반되는 유전자, 항생물질 저항을 암호화하는 유전자 및 고분자의 생합성 또는 조절을 암호화하는 유전자, 예를들면 DNA 및/또는 RNA 합성 및 복제기능에 필수적인 유전자.

바람직하게는, 플라스미드는 숙주세포당 약 20개의 플라스미드 사본 또는 약 200개의 플라스미드 사본을 복제하는 복제기점(origin of replication)을 포함한다. 이러한 플라스미드의 예는, 제한되는 것은 아니지만, 비에라와 메싱(1982, Gene, 19(3), 259-268) 및 야니취-페론 등(1985, Gene, 33(1), 103-119)에 의해서 기술된 바와 같이 플라스미드의 pBR322 시리즈 및 pUC 시리즈를 포함하며, 여기에서는 pUC로서 인용된다.

플라스미드는 목적하는 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하는 것이 바람직하다.

본 발명의 특히 바람직한 하나의 구체예에서, 플라스미드는 목적하는 유전자를 더 포함한다. 바람직하게는, 목적하는 유전자는 포유동물, 바람직하게는 인간 세포에서 발현가능하다. 이러한 유전자들의 예는 당업계에서 공지되어 있으며, 여기에 개시되어 있다. 바람직하다면, 목적하는 유전자는 숙주 균주내에서 발현되지 않는다. 이는 숙주 균주가 박테리아인 경우 목적하는 유전자를 갖는 박테리아 프로모터를 포함하지 않으므로써 달성될 수 있다. 뿐만 아니라, 바람직하다면, 유전자의 발현이 플라스미드-형질전환 숙주세포의 성장을 억제하도록 목적하는 유전자가 플라스미드 작동유전자 서열과 결합할 수도 있다. 이는 암호화된 목적하는 단백질을 생산하는 숙주세포의 대사적 부담을 덜어 주게 된다. 선택적으로는, 목적하는 유전자의 발현을 원한다면, 예를들면, 암호화된 단백질을 생산하고 분리해내는 것이 바람직한 경우, 세포가 성장하자마자 목적하는 유전자의 발현이 억제되도록 작동유전자가 위치할 필요는 없으며, 목적하는 유전자의 발현은 숙주세포내에서 활성을 갖는 프로모터에 의해서 유도될 수 있다.

또한 본 발명은 전술한 숙주세포를 포함하며, 여기에서 플라스미드는 숙주세포에서의 복제 및 보존에 필요한 서열들만을 포함한다. 즉, 여기에서 플라스미드는 트랜스 형태로 발현되는 억제인자에 의해서 결합할 수 있는 작동유전자, 복제기점 및 목적하는 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위로 필수적으로 이루어져 있다.

또한 본 발명은 전술한 최소의 플라스미드, 즉 트랜스형태로 발현되는 억제인자에 의해서 결합할 수 있는 작동유전자, 복제기점 및 목적하는 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위로 필수적으로 이루어진 플라스미드를 포함한다. 여기에서 사용된 바와 같이, '필수적으로 이루어진'이란 플라스미드가 숙주균주내에서 플라스미드를 보존하는데 필요한 서열들과 치료용 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위만을 포함한다는 것을 의미한다. 즉, 상기 플라스미드는 숙주세포내에서의 생존에 불필요한 서열들은 포함하지 않는다. 여기에서 사용된 바와 같이, '복제기점(origin of replication)'은 세포당 주어진 사본수로 플라스미드를 보존하는데 필요한 플라스미드상의 서열들을 가리킨다.

바람직하게는, 이 최소의 플라스미드는 약 1000bp의 길이를 갖는다. 더욱 바람직하게는, 최소의 플라스미드는 약 2Kb의 길이를 가지며, 여기에서 작동유전자 서열, 복제기점 및 클로닝 부위와는 다른 플라스미드에 포함되는 DNA는 비-암호화(non-coding) DNA 이다.

이 최소의 플라스미드는 타겟 세포내에서의 발현을 위해 조절 서열과 작동가능하게 결합된 목적하는 유전자를 더 포함하는 것이 특히 바람직하다. 바람직하게는 타겟 세포는 포유동물의 세포이며, 더욱 바람직하게는 인간의 세포이다.

최소의 플라스미드는 박테리아 서열과 같은 최소의 외래(foreign) DNA 서열들만을 포함하므로써, 포유동물의 세포라인에 외래 DNA 서열들을 도입하는 경우, 예를들면 플라스미드가 유전자 치료용 벡터로서의 목적을 가지는 경우에 관련되는 문제점들을 상당히 해소하게 된다. 따라서, 본 발명에 의해서 회피할 수 있는 문제점들은, 포유동물의 타겟 세포내에서 박테리아 유전자 또는 효모 유전자와 같은 플라스미드 태생 유전자들의 발현이 타겟 세포 또는 포유동물의 숙주 자체를 파괴시키게 되거나 또는 외래 DNA 또는 그러한 서열들에 의해서 암호화되는 생산물에 대한 면역반응을 발전시키게 되는 점을 포함한다.

또한 본 발명은 세포가 성장하기에 충분한 조건 및 시간동안에 전술한 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 숙주세포내에서 플라스미드를 보존하는 방법을 포함한다.

또한 본 발명은 세포가 성장하기에 충분한 조건 및 시간 동안에 전술한 형질전환된 세포를 배양하는 단계와 배양된 세포로부터 플라스미드 DNA를 분리해 내는 단계를 포함하는 플라스미드 DNA의 생산방법을 포함한다.

또한 본 발명은 재조합 단백질을 생산하기에 충분한 조건 및 시간동안에 전술한 형질전환된 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 생산방법을 포함한다. 바람직하게는, 상기 생산방법은 재조합 단백질을 분리해 내는 단계를 더 포함한다. 바람직하게는, 재조합 단백질은 인간에게는 치료적 잇점을 가지는 단백질이다.

여기에서 기술된 억제인자 적정 시스템을 사용하는 재조합 단백질의 생산방법은, 플라스미드상의 유일한

암호영역이 재조합 단백질을 암호화하는 유전자라는 이유 때문에 숙주세포에게는 경감된 대사적 부담을 주게 된다. 따라서, 숙주세포는 재조합 단백질과는 다른 플라스미드-암호화된 단백질의 생산을 지원할 필요가 없다. 뿐만 아니라, 여기에서 기술된 억제인자 적정 시스템은 항생물질의 부재하에서 재조합 단백질의 생산을 허용하므로, 배양물에서의 항생물질의 활성 손실로 인한 플라스미드 선택의 손실을 피할 수 있게 된다. 더욱이, 분리된 재조합 단백질은 항생물질로 오염되지 않는다.

여기에서 기술된 억제인자 적정시스템은, 항생물질 저항과 같은 플라스미드-암호화된 우세한 선택가능한 마커를 사용하지 않으면서 플라스미드를 적당한 사본수 또는 고사본수로 안정하게 보존할 수 있으며, 트랜스-작용(trans-acting) 억제인자/작동유전자 시스템을 지원할 수 있는 어떠한 숙주에도 사용될 수 있다. 본 발명의 하나의 장점은 플라스미드-함유 세포들의 항생물질 선택에 의한 것과는 다른 플라스미드 보존에 대한 확신에 있다. 즉, 항생물질의 활성도 손실에 기인하는 발효동안의 선택적인 압력의 손실이 전혀 없게 된다. 여기에서 기술된 바와 같이, 플라스미드상에서의 항생물질 저항 유전자와 같은 우세한 선택가능한 마커들의 부재도 역시 포유동물의 타겟 세포내 유전자들의 발현과 관련된 잠재적인 심각한 문제점들을 피할 수 있다는 점에서 유리하다. 따라서 본 발명은 유전자 치료를 위해 의도된 생산물이 유전자 치료 벡터의 선택을 위해 사용되는 항생물질로 오염되는 것도 역시 피할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명은 이러한 항생물질들에 대한 심한 면역반응, 예를들면, 아나필락틱 쇼크의 잠재적인 유도를 피할 수 있다.

여기에서 기술된 플라스미드 안정화 시스템의 하나의 큰 장점은 전체로서 박테리아 집단에서의 유전자들의 전달을 촉진하는 경향이 있는, 항생물질 저항을 암호화하는 박테리아 유전자들의 광범위한 용도를 피할 수 있다는 점이다.

본 발명의 다른 특징 및 장점들은 후술되는 본 발명의 바람직한 구체예와 청구범위에서 명백해지게 된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 플라스미드-형질전환된 숙주세포의 계통도이다 ;

도 2는 본 발명에 따른 최소의 플라스미드의 계통도이다 ;

도 3은 유일한 탄소원으로서 락토오스 또는 글루코스를 함유하는 최소의 배지상에서 pUC18로 비형질전환 및 형질전환된 *E. coli* 균주 Hfr 3000 YA 694의 성장을 도시한 도면이다, A) Hfr 3000 YA694(Min/Gluc/B1), B) Hfr 3000 YA694 (Min/Lac/B1), C) Hfr 3000 YA694-pUC18(Min/Gluc/B1/Ap), D) Hfr 3000 YA694-pUC18 (Min/Lac/B1/Ap) ;

도 4는 글루코스와 엠피실린을 함유하는 최소의 배지상에서 성장한 다음 a) 락토오스 및 엠피실린, b) 락토오스, c) 글루코스를 함유하는 최소의 배지내에 접종된 세포들의 플라스미드 DNA를 도시한 도면이다 ; 여기에서 트랙 1 HindIII 스탠다드, 트랙 2 EcoRI 제한된 접종물 플라스미드 DNA, 트랙 3~6 대략적으로 15, 36, 55 및 72 세포세대 동안 성장한 후에 분리된 EcoRI 제한 플라스미드 DNA ;

도 5는 카나마이신의 존재하에서 JC7623 lacZ-kan의 활성화된(derepressible) 성장을 도시한 도면이다 ;

도 6은 카나마이신의 존재하에서 DH1 lacZ-kan의 활성화된 성장을 도시한 도면이다 ;

도 7은 디아미노피멜레이트의 부재하에서 JC7623 dapD-kan lacZ-dapD의 활성화된 성장을 도시한 도면이다.

설명

본 발명은 다음의 물질들과 방법들이 사용된 비한정적인 실시예들에 의해서 예시된다. 이후에 인용된 각 참고문헌들은 여기에서 참고문헌으로 통합된다.

본 발명은 형질전환된 숙주세포, 플라스미드 및 신규한 억제인자 적정시스템을 사용하는 숙주세포내에서의 개선된 플라스미드의 생산방법과 보존방법에 근거한 것이다(도 1). 본 발명에 따라 생산된 플라스미드 DNA는 유전자 치료에 유용하다. 플라스미드 자체는, 도 2에 도시된 바와 같이, 일정한 최소의 서열들로 이루어질 수 있으며, 목적하는 치료 유전자를 전달할 수 있다. 신규한 억제인자 적정시스템은 다음과 같이 작동된다.

도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 억제인자 적정시스템은 플라스미드 태생 억제인자 단백질 결합 서열 16, 즉 작동유전자와 억제인자 단백질을 암호화하는 유전자의 숙주 염색체 사본 12으로 형질전환된 숙주세포 10를 이용한다. 숙주세포의 성장 또는 생존에 필수적인 생산물인 또 다른 염색체 유전자 14는 억제인자 단백질을 결합하는 작동유전자 16와 작동가능하게 결합된다(즉, 작동유전자 16의 통제하에 둔다). 플라스미드 15의 부재하에서, 억제인자가 염색체 작동유전자에 결합하여 필수유전자의 발현을 저지하게 되며, 유발자(inducer)의 존재하에서만 세포가 성장하게 된다. 억제인자 단백질의 결합부위를 포함하는 플라스미드의 후속 도입으로 염색체 작동유전자와 떨어져 있는 억제인자 단백질이 적정되어 필수유전자가 발현된다. 따라서, 유발자의 부재하에서는 플라스미드를 포함하는 세포들만이 성장하게 된다. 이는 플라스미드상에 존재하는 작동유전자 서열이 플라스미드가 억제인자를 적정하게 하므로써 염색체 작동유전자에 결합하는데 이용할 수 있는 억제인자 분자들을 제거하기 때문이다. 플라스미드 작동유전자 서열들에 의한 억제인자의 적정은 필수 염색체 유전자의 발현 및 플라스미드를 함유하는 세포들만의 성장을 고려해 둔 것이다. 억제인자가 고사본수로 합성되도록 숙주 균주가 설계된다면, 플라스미드는 더욱 큰 사본수로 보존될 것이다.

도 2에 도시된 바와같이, 플라스미드 15는 작동유전자 결합을 위한 서열 16, 복제기점 18 및 클로닝 부위 20만을 필요로 한다.

본 발명에 따른 유용한 억제인자/작동 유전자 시스템

본 발명은 어떤 트랜스-작용을 하는(trans-acting) 억제인자/작동 유전자 시스템으로 사용될 수 있다.

예를 들어, 여기에서 기술된 억제인자 적정 시스템은 DNA 결합 서열에 대하여 충분한 친화성을 지닌 어떠한 억제인자를 포함할 수도 있어서 억제인자 적정 시스템은 필수 염색체 유전자의 발현을 방해할 수 있지만 또한 플라스미드-태생 DNA 결합 서열에 의해서 적정될 수 있다.

억제인자에 의하여 억제되기 쉬운 필수 염색체 유전자는 억제인자와 결합하는 작동 유전자/프로모터의 조절하에 놓여진다는 점에 있어서 억제되기가 쉽다. 또한 억제인자 결합 서열(즉, 작동 유전자)은 삽입되거나 그러한 방법으로 필수 유전자의 원래의 프로모터와 결합하기 때문에 억제되기가 쉬워서 억제인자에 의해서 결합이 될 때 전사를 방해할 수 있다. 그러나 억제인자의 결합이 없을 때 필수 유전자의 전사를 시작하기 위한 원래의 프로모터의 능력은 분열되지 않는다.

예를들면 돌 또는 세계 유전자와 같이 하나 이상의 다른 필수 유전자가 염색체에 존재할 수 있는데, 각각의 유전자가 작동유전자 서열에 기능적으로 연결되어 있어서 억제인자에 의해서 쉽게 억제 될 수 있다. 염색체에 존재하는 필수 유전자에 민감한 다른 억제인자의 존재는 염색체에서 다른 부위에 존재하는 것이 바람직하는데, 이는 필수 염색체 유전자의 억제를 감소시키는 돌연변이 또는 결실을 통하여 플라스미드 안정성을 감소시키는 가능성을 줄여준다.

억제인자는 염색체 유전자에 의해서 암호화된다. 본 발명에 따르면, 하나 또는 그 이상, 바람직하게는 하나, 돌 또는 세계의 염색체 억제인자 유전자의 사본은 숙주 세포내에 존재한다. 염색체 억제인자 유전자는 변형되지 않는 유전자를 자연적으로 발생시키거나, 상응하는 작동유전자에 결합하는 강도에 대하여 더 높거나 더 낮은 친화성을 지닌 억제인자 분자를 제공하는 유전학적 돌연변이를 포함하지도 모른다. 그러한 돌연변이는 선행기술에 공지되어 있는데 예를 들어, 작동유전자에 대한 lac 억제인자의 친화성은 단일 아미노산 변화에 의해 강화될 수 있다(베트츠, (1986) 진, 42, 283-392 그리고 쿠리 등., (1991) J. 몰. 비올., 219, 623-634를 참조). 또한, 작동유전자 결합부위의 다소의 사본은 플라스미드에 도입될 수 있고 또한 억제인자 유전자의 다소의 사본은 염색체 또는 플라스미드에 운반된 또다른 임바디먼트(embodiment) 내로 도입될 수 있다.

또한, 프로모터, 증폭제 등과 같은 억제인자 유전자의 발현을 개시하는 서열은 돌연변이 되거나 유전학적으로 설계될 수 있어서 고분자수 또는 저분자수의 억제인자 분자가 세포내에서 만들어질 수 있다. 예를 들어, LacI 억제인자의 사본의 수는 LacIq 돌연변이의 도입에 의해서 증가할 수 있다(칼로스(1978) 네이처 274, 762-765 참조). 세포에 존재하는 억제인자 분자의 수는 상응하는 작동유전자 서열을 지닌 플라스미드 사본수와 관련될 것이다. 본 발명의 억제인자 적정 시스템에 따르면 숙주 세포에 존재하는 억제인자의 농도는 플라스미드가 없을 경우에, 관심이 있는 필수 유전자는 발현되지 않지만, 플라스미드가 존재하는 경우, 억제인자는 필수 유전자로부터 적정된다. 염색체에 억제인자 유전자의 하나 이상의 사본, 예를들면 돌 또는 세계의 사본들이 존재하는 곳에, 세포 내에서 만들어진 억제인자 단백질의 양은 하나의 유전자의 존재에 비례해서 증가할 것이다; 이러한 증가는 복제에 있어서 상응하는 플라스미드 기점을 선택하거나 세포내에 존재하는 염색체 작동유전자/필수 유전자의 수를 선택하는데 고려되어질 것이다.

작동유전자의 강도와 억제인자의 친화성은 사본수가 다른 플라스미드로 사용할 수 있는 시스템에 맞게 하기 위하여 변경될 수 있다. 예를 들어, lac 오페론의 억제정도는 최적으로 놓여진 보조적이고 이상적인 Lac 작동유전자(예를들어, 강화된 억제인자 친화력을 지닌 lac 작동유전자) 또는 프로모터 사이로 이상적인 작동유전자의 도입(몰러 등., (1996) 몰. 비올., 257, 21-29 그리고 루이스 등., (1996) 싸이언스 271, 1247-1254)에 의해서 강화될 수 있다. 또한, 작동유전자의 강도는 비-이상적인 작동유전자의 도입, 최적이 아닌 작동유전자의 위치선정 또는 보조 작동유전자의 제거에 의해서 감소될 수도 있었다(몰러 등., (1996) 몰. 비올., 257, 21-29 그리고 오에를러 등., (1990) EMBO J. 219, 973-979). 예를들면, 작동유전자에 대한 lac 억제인자의 친화성은 단일 아미노산 변화에 의해 강화될 수 있다(베르쯔, (1986) 진, 42, 283-292).

본 발명에 따른 유용한 억제인자 시스템은 다음을 포함하지만 제한되지는 않는다. 대장균 lac 억제인자는 Eds., J.L. 잉그라함 등., 1987 Amer. Soc. Micro., pp. 1444-1452, 그리고 덕슨 등., 1975, Science 187 : 27-35의 에케리키아 대장균과 살모넬라 티피리움에서 J. 베르퀴트의 '락토스 오페론'에 기술되어 있다. lac 오페론은 다음과 같이 조절된다. 비-도입 조건하에서(글루코스에서의 성장과 같은) LacI는 Lac 오페론의 작동유전자에 결합하고 β -갈락토시다제(LacZ), 락토스 페르미아제(LacY) 그리고 트랜스아세틸라제(LacA)의 전사를 방해한다. 도입 조건하에서(락토스에서의 성장, IPTG, 비-대사 유사체의 첨가와 같은) 억제인자는 더 이상 작동 유전자와 결합하지 않고 전사는 발생하지 않는다. 오페론의 발현은 β -갈락토시다제의 분석에 의해 쉽게 발견된다. 본 발명에 따른 유용한 억제인자 시스템은 상기 기술된 lac 억제인자 시스템과 진핵성 세포에서의 유전자 활성을 조절하는데 사용되는 테트 억제인자 시스템을 포함한다(고센 등., (1994) 생물공학에서의 현재의 의견, 5, 516-520.). 테트 억제인자 시스템은 효모, 딕티오스텔리움(dictyostelium), 식물세포 및 담배식물에 사용된다. 본 발명에 따른 유용한 다른 억제 시스템은 ArgRNV 억제 시스템이다(부르케 등., (1994) 몰, 마이크로바이올, 13, 609-618). ArgR 억제인자는 정상적으로는 아르기닌의 존재하에서 다만 작동유전자와 결합한다. 그러나 돌연변이체 ArgRN 억제인자는 아르기닌의 부재하에서 작동유전자와 결합하고 아르기닌의 존재하에서 결합상태로 남아 있으며 트랜스도미넌트 효과(transdominant effect)를 지닌다. 두개의 대칭적인 Arg 박스(boxes)를 가진 이상화된 ArgR 결합부위(작동유전자)는 필수 유전자로부터 ArgRNV를 적정하기 위해서 목적하는 플라스미드 내로 설계될 수 있고 이것의 발현은 ArgR 결합 부위에 의하여 조절된다.

당업자는 어떤 변형이 여기에 기술된 억제인자-적정 시스템으로 이루어질 수 있고, 이는 주어진 프로토콜(protocol)에 시스템을 적용하기 위해 주어질 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 예를들면, 성장 배지가 작동유전자의 발현을 허락하기 보다는 유도 성분을 지니고 있으며 유도조건이 성장하는 동안 바람직하지 않은 곳에서 작동유전자 돌연변이체 또는 억제인자 돌연변이체가 유도를 극복하기 위해서 그리고 억제를 위하여 사용될 수 있다.

돌연변이체 억제인자의 하나의 예는 lac 억제인자의 Lac I 돌연변이체이다. Lac I 돌연변이체는 더 이상 유도인자에 결합할 수 있는 능력을 지니고 있지 않다. Lac I 돌연변이체의 예들은 예를들어 Lac I⁵ 돌연변이체(베이루프, 1978, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY) 그리고 Asp 276~Asn274와 같은 다른

돌연변이체(창등., 1994, Biochem, 22:3607-3616)를 포함한다. 유도인자에 민감하지 않은 돌연변이체 억제인자를 지닌 다양한 타입의 억제인자를 차환함으로써 억제인자는 성장하는 동안 작동유전자에 결합할 수 있고 플라스미드는 정상적으로 억제인자를 유도하는 조건하에서도 숙주 세포에서 지속된다.

대장균 *trp* 억제인자 또한 본 발명에 따라서 유용하다(Eds., J.L. 잉그라함 등., 1987, Amer. Soc. Micro., pp. 1453-1472의 에스케리키아 대장균 및 살모넬라 티피유리움에서 Yanofsky and Crawford, '트립토판 오페론' 참고). *trp* 억제인자는 약 50개의 사본/세포에 존재하고, 억제인자 결합의 유도인자로 발효배지에 트립토판의 존재를 필요로 한다. 대장균 *galR* 억제인자 또한 본 발명에 따르면 유용하다('갈락토스오페론', S. Adhya, 에스케리키아 대장균 및 살모넬라 티피유리움. Eds., J.L. 잉그라함 등., 1987, Amer. Soc. Micro. pp. 1503-1512 참고). 대장균 *araC* 억제인자 또한 본 발명에 유용하다('L-아라미노스 오페론', R. Schlieff, 에스케리키아 대장균 및 살모넬라 티피유리움. Eds., J.L. 잉그라함 등., 1987, Amer. Soc. Micro., pp. 1473-1481 ; 둔 등., 1984, Proc. Nat. Aca. Sci, 81 ; 5017-5020 참고). *ara* 억제인자는 아라비노스 존재하에서 결합 친화력을 증가시킨다. 마지막으로, λ 억제인자는 본 발명에 따라 유용하다(분자 생물학에서 현재의 프로토콜에서 람다 파지로의 유도, 에드스, 아우수벨 등., 1994, Section III. Unit 1.9 ; 호츠스킬드., 1986, cell 47(5) ; 807-816).

본 발명에 따른 유용한 플라스미드

본 발명은 숙주 세포당 최소한 10개, 바람직하기로는 최소한 20~100개, 그리고 가장 바람직하게는 최소한 200~500개의 플라스미드의 사본의 복제를 허용하는 복제의 플라스미드 기점을 가지고 유리하게 이용될 수 있다. 많은 플라스미드(예, 200~500개) 사본 수에 대한 적정수(예 20~50개)의 복제를 허용하는 복제의 기점들은 많은 플라스미드 사본 수에 대한 적정수가 억제인자 분자를 쉽게 적정할 수 있다는 점에서 특히 유용하다. 물론, 만약에 원한다면, 세포당 1000~2000개의 사본 만큼 많은 사본수를 지닌 플라스미드가 또한 사용될 수 있다.

적은 사본수(예, 10개 또는 그 이하의 사본)를 지닌 플라스미드는 사본수를 증가시키는 돌연변이 이후에 본 발명에 따라 가장 유리하게 이용될 수 있다(J. 스코트, 1984, Microbial Reviews 48:1~23). 이따금 사용된 복제의 기점 중에서, pBR322(20개 사본/세포)는 본 발명에 유용하고, pUC(200개 사본/세포)는 더 바람직하다. 바람직하지는 않지만 본 발명에 유용한 다른 플라스미드는, 예를 들어 복제의 pT181, F II, 그리고 F I 기점과 같은 복제를 위해 단백질을 암호화한 플라스미드의 존재를 필요로 한다.

대장균과 S. 티피유리움에서 본 발명에 따른 유용한 복제의 기점의 예는 pMB1(세포당 25개 또는 그 이상의 사본, 볼리바르 등., 1977, 진 2:95-113), ColE1(세포당 15개 또는 그 이상의 사본, 칸 등., 1979, Methods Enzymol. 68:268-280), p15A(세포당 약 15개의 사본, 창 등., 1978, J. 박테리올, 134:1141-1156) ; pSC101(세포당 약 6개의 사본, 스토커 등., 1982, 진 18:335-341) ; R6K(세포당 15개 이하의 사본, 칸 등., 1979, 상기와 동일한 문헌) ; R1 (복제의 기점에 의존하는 온도, 우홀린 등., 1983, 진 22:255-265) ; 람다 dv(잭슨 등., 1972, Proc. Nat. Aca. Sci. 69:2904-2909)를 포함하지만 이것으로 제한되지는 않는다. 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)에서 유용한 복제의 기점의 예는 pT181(세포당 약 20개의 사본, J. 스코트, 1984, Microbial Reviews 48:1-23) 이다. 상기한 복제의 기점중에서, pMB1, p15A 그리고 ColE1가 더 바람직한데 그것은 이들 기점들이 복제를 위한 단백질이 암호화된 플라스미드를 필요로 하지 않기 때문이다.

본 발명에 따른 유용한 숙주 세포

포유류와 같은 동물세포, 곤충세포, 식물세포, 효소와 같은 균류, 예를 들어 그람 양성균 및 그람 음성균 계통과 같은 박테리아의 대부분 계통을 포함하는 모든 세포 타입에 적용되는 본 발명은 배지내의 숙주세포에서 유지될 수 있게 존재하는 플라스미드에 많은 사본 수를 제공하였다.

본 발명에 따른 유용한 그람 음성균은 예를 들어 S. 티피유리움과 같은 대장균과 살모넬라를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 유용한 그람 양성균은 많은 사본수 플라스미드가 이미 존재하는 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 락토바실러스(*Lactobacillus*) 및 락토코쿠스(*Lactococcus*)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 락토코쿠스에서 본 발명에 따른 유용한 플라스미드의 예는 pNZ2123과 PIL253 이다(시몬등., 비오키미에 70:559, 1988). 락토코칼 락토스 오페론(*lactococcal lactose operon*)은 이중 구조의 단백질의 발현을 조절하기 위해 사용된다(웰스 등., 1993, 몰, 마이크로바이올, 8(6) : 1155-1162). 이 오페론은 *lacR* 억제인자(반 루이젠 등., J. 비올. 켐. 265:18499-18503, 1990)를 T7 폴리머라제의 발현을 조절하기 위해서 사용하고 나서 이중구조 단백질의 발현을 조절한다. 바실러스(*Bacillus*)에서 본 발명에 따른 유용한 플라스미드의 예는 pC194, pUB110 및 pT181 이다.

예를 들어서 B. 서브틸리스(*B. Subtilis*)와 같은 바실러스(*Bacillus*)에서 λ 억제인자는 이중구조 단백질의 발현을 조절하기 위해서 사용된다. λ 억제인자는 *sak42D* 프로모터의 조절하에 놓여졌고 이는 B. 서브틸리스(*B. Subtilis*)에서 효율적으로 전사될 수 있다(브레이틀링 등., 1990, 진 93(1) : 35-40).

많은 사본수의 플라스미드는 효모내에서 유지되기 때문에 효모는 본 발명에 따라서 유용하다. 그러한 플라스미드의 예는 세포당 약 100개의 사본까지의 사본수를 지닌 YRp 플라스미드(자율적인 복제서열(ARS)에 기초한)와 세포당 50-100의 사본수를 지닌 YeP 플라스미드(2 마이크로 써클(*micron circle*)에 기초한)를 포함한다(시코르스키, 'Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*' 플라스미드에서, A Practical Approach, Ed. K.G. Hardy, IRL Press, 1993 ; 및 효모 클로닝 벡터와 유전자, Section II, Unlit 13.4, 분자생물학에서 현재의 프로토콜, 에드스. 아우수벨 등., 1994). 효모는 대장균 *lacZ* 유전자를 발현할 수 있으므로 본 발명에 따라서 *ura3* 또는 *leu2*와 같은 필수 효모 유전자, 효모내의 플라스미드를 유지하기 위해 사용되는 유전자의 발현을 조절하기 위한 *lac* 억제인자 적정 시스템을 사용하기 위해 고려되어진다(Gunge, 1983, Ann, Rev, Micro, 37:253-276).

본 발명에 따른 유용한 필수 유전자

본 발명은 플라스미드의 안정한 유지를 위한 많은 다른 필수 염색체 숙주 유전자와의 결합에 사용될 수

있다. 이들 필수 유전자들은 다음의 카테고리를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어 세포 대사 산물의 생합성에 관련된 산물을 암호화 하는 유전자, 그들의 산물이 탄소 대사에서 관련된 유전자, 항생 저항을 암호화하는 유전자, 예를들어 DNA 및/또는 RNA 합성 그리고 복제 기능에 필수적인 유전자와 같이 생합성 또는 거대분자의 조절을 암호화하는 유전자가 있다.

1. 세포 구조의 성분의 합성에 관련된 산물을 암호화하는 필수 유전자.

세포 성분의 공급, 특히 세포벽 전구물질의 공급과 관련된 효소를 암호화하는 어떤 유전자들은 또한 숙주 세포 성장에 필수적이고 본 발명에 따르면 유용하다. 예를들어, 박테리아 세포벽은 메조-디아미노피멜리산(DAP)을 지니고 있으며 세포용해의 결과를 가져오는 이 성분을 합성시킬 수 없다. *asd* 유전자(아스파르테이트 β-세미알데히드 디하이드로지나제) 또는 *dapD* 유전자(숙시닐 디아미노피멜레이트 아미노전이효소)가 결실된 돌연변이체는 플라스미드에 유전자의 완벽한 사본을 운반하는 플라스미드의 유지를 위해 사용될 수 있다(나카야마 등., *Bio/technology* 6:693-697, 1988 ; 디그리세, 미국특허 제5,198,343호). DAP 생합성 경로에서 많은 다른 유전자들, 즉 *dapA*, *dapB*, *dapC* 및 *dapE* 유전자들 또한 사용될 수 있다. *dapA* 그리고 *dapB*는 클론화되고 서열화되며, *dapB*는 단일 시스템으로서 유용하다(리샤우드 등., *J. 박테리올.* 166:297-300, 1986;부비에 등., *J. 비올. 켈.* 259:14829-14834, 1984). D-알라닌 생합성과 같은, 다른 세포벽 성분의 생합성에 관련된 유전자들은 본 발명에 또한 유용하다(왈쉬, 1989, *J. 비올. 켈.* 264(5):2393-2396). D-알라닌의 성분을 암호화하는 DNA 서열은 항생제를 사용하지 않고 플라스미드의 안정화에 사용된다(EP 85/309020 참조).

본 발명은 그러한 유전자와의 결합에서 억제인자 적정의 사용을 생각한다. 목적하는 유전자는 우선 숙주 계통으로부터 제거되고 숙주는 현재 유전자의 생성물을 위한 필요조건을 지니고 있다(위난스 등., 1985, *J. 바크트.* 161(3) : 1219 - 1221 ; 자신 등., 1984, *J. 바크트.* 159(2) : 783-786). 그후에 유전자의 사본은 종래의 클로닝 기술을 사용하여 구조화 되어서 그것의 발현은 선택된 억제인자 단백질을 결합하는 프로모터/작동 유전자에 의해서 행해진다. 이 구조는 억제인자 단백질을 합성하는 숙주 계통의 염색체 내로 도입된다(위난스 등., 1985, *J. 바크트.* 161(3) : 1219~1221 ; 자신 등., 1984, *J. 바크트.* 159(2):783-786). 서열과 결합한 억제인자를 포함하는 플라스미드의 계통의 형질전환을 생합성 유전자로부터 억제인자의 적정의 결과를 가져오고 필수 유전자를 발현할 수 있다.

2. 세포 성장에 필수적인 유전자들

본 발명의 억제인자-적정 방법은 탄소원(carbon source)의 이용과 관련된 유전자를 가지고 사용될 수 있다. 특히, 본 방법은 락토스 오페론, 여기에 기술된 바와 같이 단독의 탄소원으로서 락토스의 이용으로 사용될 수 있다. 다른 변형은 당업자들에게 명백할 것이다. 존재하는 *lac* 억제인자의 돌연변이체는 더 이상 유도인자(알로락토스)와 결합할 수 없고 정상적인 유도조건하에서 *lac* 작동유전자와 결합한 상태로 남아있다. 이들은 *lac I*⁵ 돌연변이체에 의하여 예시된다 ; 그러나 존재하는 다른 돌연변이체는 유도인자와 결합할 수 있는 능력은 없지만 다른 모든 기능들에서는 정상이다(창 등., *바이오텍.* 33:3607-3616(1994)). 이들 돌연변이체를 운반하는 계통들은 *lac* 오페론의 유전자를 발현할 수 없으므로 단독의 탄소원으로서 락토스와 함께 성장할 수 없다. 다양한 타입의 *Lac* 작동 유전자 서열을 지닌 많은 사본수 플라스미드의 그러한 계통의 형질전환은 *Lac* 오페론으로부터 억제인자를 적정하고 락토스에서의 성장을 허락할 것이다.

글루타민 신테타제(synthetas)는 NS0 미엘로마 세포라인(NS0 myeloma cell line)과 같은 진핵 세포에 필수적인 유전자이고(베빙톤 등., (1992) *바이오/테크놀로지* 10, 169-175) 숙주세포가 진핵 세포일 때 사용되는 것이 더 바람직하다.

3. 핵산의 합성을 암호화하는 유전자

본 발명은 또한 DNA 및/또는 RNA 합성 또는 숙주세포의 복제 단백질을 암호화하는 필수 유전자와의 결합에 사용될 수 있다. 대장균과 살모넬라와 같은 박테리아에서의 필수적인 기능들과 관련된 그러한 유전자들의 예는 McMacker 등에서 제공되고(에스케리키아 콜라이 및 살모넬라 티피유리움에서, *Cellular and Molecular Biology*, 에드. 네이드하르트 등., *Amer. Soc. Micro.*, Wash, D.C., 1987, pp. 564-612). 다음의 유전자들을 포함하지만 한정되지는 않는다 : *dnaA*, *dnaB*, *dnaC*, *ssb*, *dnaG*, *polC(dnaE)*, *dnaQ(mutD)*, *dnaN*, *dnaZX*, *gyrA*, *gyrB*, *polA*, *lig*, *dnaT*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, 그리고 *rpoD*.

4. 항생 저항을 암호화하는 유전자

본 발명은 또한 항생 저항과의 결합에서 사용될 수 있다. 저항 유전자는 구조화되어서 그것의 발현은 원하는 억제인자 단백질과 결합하는 프로모터/작동유전자로 조절된다. 이 구조체는 그후에 숙주계통의 염색체내로 삽입된다. 억제인자 결합 서열을 포함하는 플라스미드 계통의 형질전환은 항생 저항 유전자로부터 억제인자를 적정할 것이고 발현을 일으키며 따라서 항생제 존재하에서의 성장을 일으킨다. 항생 저항 유전자는 유용한 선택성 마커이므로 일정비율이 증가된(scale-up) 효모 방법에서 사용된 항생제로부터 플라스미드 생성물을 정제하려는 의도였다 하더라도 본 발명의 실시자들은 숙주의 필수 유전자로서 항생 저항을 선택할지도 모른다.

실시에 1에서, 본 발명은 염색체 유전자로부터 억제인자를 적정하기 위한 플라스미드 태생 서열의 능력을 증명하는 실험에서 사용하는 *Lac* 억제인자/작동유전자 시스템에 적용된다.

실시에 1

대장균 계통 DH1(하나한(Hanahan), *J. Molec. Biol.* 166:577~580, 1983)은 락토스 억제인자 단백질(*Lac I*)에 의해 조절되기 쉬운 손상되지 않은 락토스 오페론을 소유한다. *Lac I*는 세포당 10~20개의 사본에 존재하고 높은 친화성(kd 1×10⁻¹⁴)과 결합한다.

대장균 DH1은 pUC18tet로 형질전환 되었다(세포당 약 100~200개의 사본에 존재하는 암피실린(ampicillin) 및 테트라실린(tetracycline) 저항 유전자를 함유하는 플라스미드에 근거한 pU18). pUC18tet는 *lac* 작동유전자/프로모터를 함유하지만 억제인자 단백질을 암호화하는 *Lac I* 유전자를 함유하

지는 않는다. 플라스미드는 또한 치료학 유전자의 삽입을 위한 폴리링커(또는 다중 클로닝 부위)와 복제의 pUC 기점을 지닌다. 암피실린과 테트라사이클린 저항이 암호화된 플라스미드는 억제인자 적정에 불필요하고 항생저항이 없는 플라스미드는 본 발명에 따라 바람직하며, pUC18tet로 쉽게 치환될 수 있다.

DH1 그리고 DH1:pUC18tet는 필요한 암피실린($50\mu\text{g}/\text{ml}$)이 추가된 탄소원으로서는 락토스(10mM) 또는 글루코스(10mM)가 있는 M9 최소 염 배지에서 성숙했다. 세포들은 로그 성장(log growth) 동안 회수되었고 β -갈락토시다제 활성으로 분석되었다(밀러, 1972, 분자 유전학에서의 실험, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY). 표 1에 나타난 것과 같이, 비교되는 β -갈락토시다제 활성이 글루코스 및 락토스에서 성장된 DH1 : pUC18tet로 관찰되었다. 반면에 상당히 더 낮은 활성이 락토스와 비교되는 글루코스에서 성장된 DH1로 관찰되었다. 그러므로 플라스미드의 존재는 β -갈락토시다제의 발현을 허락하면서 lac 오페론으로부터 lac 억제인자를 적정한다.

표 1

유도 및 비-유도 조건에서 성장했을 때 pUC18tet의 존재 또는 부재하에서 대장균 DH1에서 β -갈락토시다제의 발현.

실험 1.

	DH1		DH1:pUC18tet	
	활성(유닛)	%	활성(유닛)	%
락토스	1391	100	4162	300
글루코스	27	2	3120	224

실험 2.

	DH1		DH1:pUC18tet	
	활성(유닛)	%	활성(유닛)	%
락토스	2571	100	7140	277
글루코스	9	0	6466	255

실험 3.

	DH1		DH1:pUC18tet	
	활성(유닛)	%	활성(유닛)	%
락토스	1123	100	1400	125
글루코스	29	2.5	1157	103

결과는 세개의 독립된 실험이고 각 실험을 위한 DH1이 성장된 락토스가 얻어진 값의 유닛과 퍼센트로서 나타내었다.

실시예 2

억제인자 적정의 증명

대장균 계통 Hfr 3000 YA 694(CGSC 6378) lacI 694, relA1, spoT1, thi-1, λ 는 EMB 한천에 플레이트되어 밤새도록 성장되어서 예를 들어서 민감하지 않은 유도인자인 억제인자를 암호화하는 lacI⁶ 지노타입(genotype)을 지니고 락토스를 발효시킬 수 없는 계통을 나타내는 핑크 콜로니가 나타났다(위슨 등., (1964) J. 몰. 비올, 8:582). 단일 콜로니가 성숙되었고 형질전환을 위한 컴피턴트(competent)를 만들었다. 그리고 나서 이 계통은 pUC18(lac 작동유전자를 지니고 상기한)로 형질전환되었고 암피실린을 지닌 EMB 한천에 플레이트 되었다. 결과물인 콜로니는 β -갈락토시다제 유전자를 발현시키는 lac 오페론으로부터 적정되는 lacI⁸ 억제인자의 결과로서 락토스가 발효되었다는 것을 지적하는 블랙이었다. 단일 콜로니를 5ml의 LB 암피실린에 넣고 미드로그(mid log)로 성장시켰더니 β -갈락토시다제 활성이 나타났다.

pUC18로 형질전환되지 않고 형질전환된 대장균 계통 Hfr 3000 YA694는 적용되는 암피실린으로 보충된 단독 탄소원으로서는 락토스 또는 글루코스를 함유한 최소 배지로 플레이트 되었다. pUC18의 유도는 락토스에서 성장시키기 위한 능력의 결과를 도 3에 나타낼 수 있다.

실시예 3

억제인자 적정에 의한 플라스미드 유지의 증명.

pUC18을 지닌 대장균 계통 YA694를 글루코스($0.1\text{g}/\text{l}$), 암피실린($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 티아민($0.5\text{m}/\text{g}$)이 보충된 5ml의 M9 최소배지에 넣고, 14시간동안 37°C에서 성숙시켰다. 이 배양물의 0.5ml는 그후에 분리되어 다음에 넣어졌다.

- (1) 글루코스가 보충된 M9배지 100ml
- (2) 락토스가 보충된 M9 배지 100ml
- (3) 락토스와 암피실린이 보충된 M9배지 100ml

그후 배양물은 37°C에서 약 8시간동안 성숙되었다. OD600 측량은 성장기간을 통하여 얻어졌다. 2 OD 유니트가 성장기간의 후반에 제거되어 회수되었고 동결되었다. 각 배양물의 0.5ml를 100ml의 신선한 각각의 배지에 넣었고 14시간 더 성장시켰다. 그런 다음 적당한 지점에서 얻어진 샘플로 약 72세대의 성장을 이루기 위해 공정이 반복되었다.

플라스미드 DNA는 그후에 EcoR I로 분해된 회수된 세포로부터 분리되었고 겔 전기영동에 의하여 분석되었다. 결과는 72세대의 성장이 발생한 후에 플라스미드가 글루코스 단독에서 성장한 세포보다 락토스 단독에서 성장한 세포에서 더 높은 특별한 수율에서 존재했다는 것을 나타낸다(도 4). 이는 락토스를 신진대사시키기 위해서 β 갈락토시다제의 생성에 성장이 의존하게 만듦으로써, β 갈락토시다제 유전자를 발현시키는 플라스미드를 선택적으로 유지되게 한다는 것을 증명한다.

실시에 4

다른 억제 인자의 증명

억제인자 적정 시스템에서 사용될 수 있는 억제인자로서 작용을 하는 돌연변이체 억제인자 ArgRNV의 능력이 연구되었다. ArgRNV, 유전학적으로 설계된 ArgR의 돌연변이체(부르케 등., 1994, 몰. 마이크로비올. 13(4), 609-618)는 아르기닌이 없을때조차도 아르기닌 생합성 유전자의 프로모터 사이에서 DNA 결합부위에 결합한 채로 남아 있다. 다중 사본 플라스미드에 ArgRNV 유전자를 지닌 대장균 계통 DS997과 DS998의 형질전환은 최소배지에서 성장을 방해하기 위한 것으로 나타났다(부르케 등., 1994, 몰. 마이크로비올. 13(4), 609-618). 그러므로 억제인자는 트랜스도미넌스(transdominance)를 나타낸다. 실험은 높은 사본 수 플라스미드에서 암호화된 ArgRNV로 형질전환된 대장균 DH1으로 반복되었고(pSelect, 프로메가(Promega)) 최소배지에서의 연속적인 성장은 억제인자 적정 시스템에서 사용된 억제인자의 능력을 증명하는 아르기닌의 존재하에서만 발생했다.

ArgRNV 유전자는 DH1의 염색체내로 놓여질 수 있었고 최소배지에서 성장을 방해하는 능력이 관찰되었다. 아르기닌 생합성 유전자 또는 필수적인 유전자로부터 ArgRNV를 적정하기 위한 ArgR 결합부위를 지니는 플라스미드의 능력이 기능적으로 Arg 작동유전자에 결합되었다는 것이 관찰 될 수 있다.

실시에 5

lacZ 가나마이신 융합의 발생

lac 작동유전자/프로모터의 콘트롤하에서 필수 유전자의 모델로서 사용될 lacZ 유전자와 가나마이신 유전자의 N-터미널 영역의 인프레임(inframe) 융합은 다음의 방법에 따라서 구성되었다(가나마이신 유전자는 어떤 필수 유전자에 의해서 대치가 가능하다). 가나마이신 카세트는 Xho I와 Pst I로 소화분해작용에 의하여 pUC4K(파마시아 바이오테크 회사제)로부터 제거되었으며, 이는 Sal I과 pst I로 소화분해된 pUC18내로 연결되었다. 이는 가나마이신 유전자와 함께 lacZ 유전자의 기능성이 있는 인프레임 융합물을 만들었으며, 따라서 가나마이신 내성의 발현은 lac 작동유전자 프로모터의 콘트롤하에서 이루어졌다. lac/가나마이신 구조물은 Hae II로 소화분해되어 분리되고, 블런트 되며, sty I로 소화분해되고, 블런트 된 PN1내로 연결되었다. PN1은 dif 로커스를 둘러싸고 있는 5.5kb의 E. coli 염색체 DNA의 포함하는 pUC18을 바탕으로 하는 플라스미드이다(Leslie 등, 1995, EMBO J., 14, 1561-1570). lac/가나마이신을 PN1의 dif 로커스로의 삽입은 원하는 E. coli 숙주의 염색체내로의 구조물의 재조합을 가능케 한다. 여기서 얻은 플라스미드는 Sal I로 선형화되고 E. coli JC7623의 형질전환에 사용되며(Winans 등, 1985, J. Bact., 161(3) 1219-1221), 가나마이신 + IPTG 플레이트상에서 선택되었다.

가나마이신 내성 클론은 가나마이신 존재하에서 성장의 IPTG 유도가능성에 대해서 테스트했으며(도 5), 플라스미드의 손실과 염색체로의 구조물의 삽입을 서던(southern) 분석에 의해 테스트했다. 그후에 구조물을 P1 형질도입 방법에 의하여 JC7623의 염색체로부터 DH1의 염색체내로 전이했다. 최종적으로 얻은 DH1 lac/kan 균주는 dif 로커스내의 구조물 존재와 가나마이신 내성의 유도가능성에 대하여 서던 분석에 의해 분석했다(도 6). pUC18Tet로 DH1 lacZ-kan의 형질감염은 가나마이신 내성 유전자를 위한 억제인자의 적정(titration)을 예시하는 IPTG 없이 가나마이신내에서의 성장을 초래한다. 따라서 이는 가나마이신 존재하에서 플라스미드의 유지를 위한 숙주세포의 적합성을 예시한다.

DH1 lac/kan 균주는 lac 작동유전자(pUC18, pUC18Tet와 이들로부터 유도된 더 큰 플라스미드)를 소유하는 다수의 플라스미드들로 변형되며, 다음에 대하여 테스트 했다 :

1. 비-유도조건 하에서 가나마이신(60 μ g/ml)을 포함하는 배지상에서 성장 ;
2. 억제인자 적정시스템에 의하여 배지 성장동안에 플라스미드의 유지.

lac/가나마이신 구조물로부터 멀리 lac 억제인자의 적정이 증명되었고, 배지성장 동안의 플라스미드의 유지 또한 증명되었다.

실시에 6

lacZ dapD 융합구조물의 구조와 E. coli DH1 dapD-균주의 dif 로커스로의 삽입은 lac 작동유전자/프로모터의 콘트롤하에서 필수 유전자를 제공하기 위하여 이루어졌다.

lacZ dapD 융합의 구조

dapD 유전자는 EcoR I 부위가 설계된(5'GTGCCCGAATTCCAATTGGCG-3', 5'-CGGCGTGAATTCATCGCTCATCCC-3') 프라이머를 사용하는 pCR에 의해 DH1로부터 클론되었다. PCR 생성물은 EcoR I로 소화분해되고, EcoR I로 소화분해된 pUC18로 연결되었다. 여기서 얻은 플라스미드(pUC18dapD)는 E. coli 균주 AT982(dapD4, thil, relA1, λ -, spoT1)을 형질변환시키는데 사용되었으며, dapD 유전자가 클론되었음을 예시하는 dapD 돌연변이에 상보적임을 보여주었다. pUC18의 lacZ 유전자와 함께 dapD 유전자의 융합은 pUC18dapD와 올리고뉴클레오티드를 이용하는 PCR에 의하여 생성되었다 ;

5'-CAATGCAGAATTCACAGAACATTA-3'와 5'-CGGCGTGAATTCATCGCTCATCCC-3'. EcoR I에 의한 소화 분해와 E. coli

로 소화분해된 pUC18내로의 연결은 lacZ와 dapD 유전자 사이에서 인프레임 융합으로 생성되었다. 이 구조물(pUC18dapD2)는 형질전환 후 AT982의 성장회복에 의하여 다시 기능성이 있는 것으로 나타났다. lac/dapD 융합은 HaeII 단편으로 분리되고, 블런드되고, *styI*로 소화분해된 PN1으로 연결된 후에 블런드되었다. 이 플라스미드(pN1 dap D2)는 균주 AT982에서 dapD 돌연변이에 상보적이었다. 당업자들에게는 분명하듯이, 예를들면, 여러 가지의 콘트를 서열에 변형을 포함하는 구조물에 변형이 이루어질 수가 있다.

WT DH1 *dapD* 유전자의 비활성화

DH1의 염색체에 *lacZdapD* 융합을 삽입하기전에 WT 유전자의 발현은 처음에는 비활성화 되었다. *dapD* 유전자는 더 효율적인 재조합이 가능하도록 다음의 올리고 뉴클레오티드를 사용하여 *dapD* 유전자에 DNA5'와 3'의 더 큰 단편으로 PCR에 의하여 재 클론되었다 ;

5' TCATCGGAATTCCTGGAGTATCGG-3'와 5' -TGAGCTGAATTCATCGCCGCGTG-3'.

여기서 얻은 PCR 생성물은 EcoRI로 소화분해되고 *PstI* 부위가 삭제된 pUC18로 연결되었다. 최종적으로 생성된 플라스미드(pUC18dapD3)는 AT982에서의 *dapD* 돌연변이체에 상보적이다. *dapD* 유전자는 pUC4K로부터 *dapD* 유전자내에 위치한 *PstI* 부위내로 가나마이신 카세트의 도입에 의하여 삽입에 따라 비활성화되었다. 이 플라스미드(pUC18dapDkan)는 AT982에서의 *dapD* 돌연변이체에 이미 상보적이지 아니다. 구조물을 *BamHI*에 의한 소화분해에 의하여 선형화된 pUC18dapkan으로 변형된 *E. coli* JC7623의 염색체내로 도입했다. 클론을 가나마이신의 존재하에서는 성장능력이 있지만, 영양보충된 디아미노피멜레이트의 부재하에서는 성장이 무능한 것에 대하여 스크리닝했다. *dapD* 유전자내에 가나마이신 유전자의 존재는 서던 분석에 의하여 확인 되었다. 비활성화 *dapD* 유전자는 P1 형질도입에 의하여 DH1의 염색체로 전이되어 DH1 *dapDkan*을 만든다. *lacZdapD* 구조는 *ScaI*로 선형화된 pN1dapD2를 이용한 형질변환에 의한 JC7623 *dapDkan*의 염색체내로 도입되었다. 클론은 분리되고 디아미노피멜레이트의 부재하에서 IPTG 성장의 유발이 설명되었다(도 7).

그후에, lac/dapD 융합은 P1 형질도입에 의하여 DH1dapDkan내로 도입되고, 서던 분석에 의하여 확인된 *dif* 로커스내에서 이의 위치와 IPTG 성장유발에 대하여 스크리닝했다. DH1 *dapDkan-lacdapD* 균주는 lac 작동유전자(pUC18Tet)를 소유하는 플라스미드로 형질전환되었으며 다음의 특성을 예시했다 :

1. lac/dapD 구조로부터 멀리 lac 억제인자의 적정을 예시하는 비-유도 조건하에서 디아미노피멜레이트가 결핍된 배지상에서 DH1 *dapDkan-lacdapD-pUC18Tet*의 성장 ;
2. 플라스미드의 유지는 बै치 성장 동안에 테스트 했으며, 플라스미드 수율은 테트라사이클린의 존재하에서 성장된 세포들과(즉, 항생물질내성 유전자에 의하여 플라스미드를 위한 선택을 하도록) 유도인자(IPTG) 존재하에서 성장된 세포들(즉, 플라스미드의 유지가 필요치 않은 조건)과 비교했다.

테트라사이클린의 부재하에서 플라스미드의 특별한 수율은 테트라사이클린의 존재하에서 관찰된 것들과 비교가 될 수 있으므로, 이는 항생물질의 부재하에서 플라스미드의 선택적 유지를 예시한다. 상기 양쪽 경우에 있어서, 수율은 유도인자의 존재하에서 성장된 세포들에서 보다 상당히 더 컸다.

실시예 7

본 발명에 따라서 숙주세포내에 안정하게 유지된 플라스미드 DNA는 다음에 따라서 분리된다. 세포들은 분해되고 플라스미드 DNA는 당분야에 잘 알려진 방법들에 따라서 정제되었다(Brinboim 등, 1979, NAR 7 : 1513-1523 및 Birnboim, 1983, Methods Enzymol, 150 : 243-255, 또는 쿼아겐 플라스미드, 미니, 맥시 또는 메가 키트 사용(쿼아겐, Chatsworth, CA) 100mg 또는 이 보다 더 큰, 플라스미드 DNA의 대규모 정제를 위해서는, Horn 등, 1995, 인간유전자 치료 6 : 565-573 참고.

실시예 8

재조합 단백질을 암호화하는데 목적하는 유전자가 플라스미드상에서 운송되는 경우에는, 이는 숙주세포 조절서열의 콘트롤하에 있게 되므로(즉, 최소한 숙주세포내에서 기능을 하는 프로모터), 재조합 단백질은 세포성장 동안에 생성될 수 있으며, 그후에 다음과 같은 기술분야에 공지된 방법에 따라서 분리된다.

E. coli 내에서 재조합 단백질의 생산과 정제는 Das, 1990, 'Overproduction of proteins in *E. coli* : Vectors, host and Strategies', Methods in Enzymol, 182 ; 93-112 ; Marston 등 1990, 'Solubilization of protein aggregates', Methods in Enzymol 182 : 264-276 ; 과 Thatcher 등, 1994, 'Protein folding in biotechnology', in Mechanisms of protein folding, Ed. R.H. Pain, Frontiers in Molecular Biology Series, IRL Press, oxford University, U.K.에 설명된 내용에 따라서 이루어진다.

E. coli 내에서 가용성과/또는 주변세포질 재조합 단백질의 생산과 정제는, Hart 등, 1994, Bio/Technology 11 : 1113-1117 ; Schein, 1989, Bio/Technology 7 : 1141-1149 ; 와 Lavallie 등, 1993, Bio/Technology 11 : 187-193에 설명된 내용에 따라서 실행될 수 있다. *S. cerevisiae*(*cerevisiae*)내에서 재조합 단백질의 생산과 정제는, Romanos 등, 1992, 'Foreign gene expression in yeast ; 리뷰', yeast 8 : 423-488에 설명된 바에 따라서 실행될 수 있다. 효모 피치아(*phichia*) 패스토리스(*pastoris*) 내에서 재조합 단백질의 생산과 정제는, streekrishna 등, 1989, Biochemistry 28 : 4117 - 4125에 설명된 바에 따라서 실행가능하다. 포유동물세포내에서 재조합 단백질의 생산과 정제는, Reff, 1993, Curr. Opin. Biotech., 4, 573-576, 또는 Cartwright, 1994, Animal cells as Bioreactors, Cambridge studies in Biotechnology, 11, 캠브리지 대학교 출판부에 설명된 내용에 따라서 실행될 수 있다.

용도와 투여

본 발명에 따라서 생산된 플라스미드 DNA는 플라스미드가 치료용 유전자를 포함할 때에는 유전자 치료에 유용하다. 치료용 유전자는 포유류, 바람직하게는 인간 세포내에서 발현가능한 것이며, 포유동물, 바람직하게는 인간에 치료적 잇점이 있는 RNA 또는 폴리펩티드를 암호화하는 것이다.

이러한 유전자들의 예는 당분야에 잘 알려져 있으며, 제한을 하지는 않지만, β -글루코세레브로시다제 유

전자, 불루톤스 티미딘 키나제 유전자, TNF와 같은 시토킨을 암호화하는 유전자, 인터로이킨 1-12, 인터페론(α , β , γ), Fc 수용체와, T-세포 수용체를 포함한다.

다른 예는 천연단백질의 경쟁적 억제인자로서 역할을 하는 TAT 또는 REV 돌연변이체와 같이, HIV의 억제인자를 암호화하는 유전자들을 포함한다. 또한 플라스미드 DNA는 약품 내성 유전자와 같은 마커유전자, β -갈락토시다제 유전자, 디하이드로퀴레이트 리덕타제 유전자 및 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 유전자 등을 포함한다. 치료용 유전자가 불량 유전자의 대체 또는 잠재적으로 유리한 부가적인 유전자 기능 같은 생리적 중요성이 있는 생성물을 암호화하기 위한, 생체내 또는 생체외에서의 이러한 DNA의 사용은, 세포들의 장기간 유전자 변형을 부여하리라고 기대되며, 질병의 치료에 효과적일 것으로 기대가 된다. 치료용 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA는 생체내 또는 생체외 치료에 있어서 비루스성 또는 비-비루스성 방법을 사용하여 투여된다.

투여방법은 본 발명에서는 중요치 않으며, 네이키드(naked) DNA의 투여를 위한 유전자총의 사용, 예를 들어 리포좀/항체 콤플렉스와 비루스성 벡터를 사용하는 수용체 중개 유전자 치료법을 포함할 수 있다.

예를들면, 비루스성 또는 유전자 질병이 있는 환자는 생체내 또는 생체외 방법을 통하여 본 발명법에 따라서 치료처릴 수 있다. 예를들면, 생체내 치료에 있어서 본 발명의 플라스미드 DNA는, 바람직하게는 생물학적 친화성 용액 또는 약학적으로 허용될 수 있는 운반 부형제로서, 섭취, 주사, 흡입 또는 어떤 다른 방법들에 의하여 환자에 투여할 수 있다.

투여되는 투약량은 환자에 따라 달라질 수 있으며 '치료상 효과가 있는 투약량'은 어떤 위험 또는 해로운 부수 효과들에 대하여 균형이 잡힌 전이된 유전자 물질의 기능 향상 수준에 의해 결정될 수 있다. 유전자 도입수준의 모니터링, 유전자 발현과/또는 암호화된 생성물의 존재 또는 수준은 투약량의 선택 및 조절시에 도움을 줄 수 있다.

일반적으로, 운반 부형제를 포함하는 조성물은 체중 kg당 10ng~100 μ g, 바람직하게는 체중 kg당 100ng~10 μ g 사이의 범위내로 단일량으로 투여 가능하다. 따라서 치료용 유전자의 최소한 한 사본(copy)은 각각의 목표 세포에 인도된다.

생체외 치료 또한 본 발명의 범위내에서 예기된다. 세포 집단은 환자로부터 제거될 수 있거나 또는 그렇지 않으면, 본 발명에 따르는 치료용 유전자를 포함하는 플라스미드로서 형질도입된 후 환자에 다시 도입될 수도 있다.

본 발명에 따라서 전이하여 생체외 유전자를 목표로 하는 세포들은 치료용 유전자의 운반이 요구되는 어떠한 세포들, 예를들면, T-세포, B-세포와 같은 면역시스템의 세포들, 마크로파아지, 조혈세포, 수지상 세포들을 포함한다. 확립된 기술을 사용하여, 간세포(stem)들은 영양강화 공정후에 유전자 전이를 위해 사용될 수 있다. 또는 비분리 조혈세포와 간세포 집단은 여기에 설명된 바와 같이 DNA를 흡수하게(uptake) 될 수도 있다.

두 개의 대표적인 플라스미드는 인간의 유전자 질병의 치료를 위하여 아래에서 설명된다. 본 발명에 따르는 플라스미드는 X-연결된 β -글로불린 혈증을 치료하는데 사용될 수 있다. 이 플라스미드는 여기에 설명된 최소 서열, 즉 박테리아 또는 효모 숙주세포에서 복제를 위한 복제의 기점, 작동인자 서열과 치료용 유전자의 삽입을 위한 부위를 포함할 수 있다. 예를들면, pUC18tet 플라스미드는 최소 플라스미드, 바람직하게는 결실된 tet 유전자와 함께 사용될 수 있다. 치료용 유전자는 부르톤'스 키나제 유전자(vetrie 등, 1993, Nature 361 : 226-233)일 수 있으며, 다음의 DNA 단편상에서 운송되며, 당분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 함께 클론된다. 부르톤'스 티로신 키나제 인간 유전자는 PvuI 부위 위치(+33)와 HindIII 부위 위치(+2126)에 의하여 묘사된(delineated) 2.1Kb 단편상에서 운송된다. 만일 원한다면, 플라스미드는 PCT/GB88/00655에서 알 수 있듯이, 위치 독립적이고 조직특이적인 유전자 발현을 일으키는 서열을 포함할 수도 있다.

치료용 유전자는 인간 β 글로빈 로커스 스플라이스(splice)와 폴리 A 시그널, 즉, BamHI-XbaI 2.8Kb 3' 스플라이스/폴리 A 후랜킹(flanking) 서열, 엑손 2-IVSII-엑손 3-폴리 A 서열을 포함하는 부분을 포함할 수 있는 스플라이스부위와 폴리 A 꼬리를 암호화할 수도 있다.

플라스미드 DNA는 여기에서 설명한 바에 따라 제조될 수 있고, Martensson 등, Eur. Jour. Immunol. 1987, 17: 1499 ; Okabe 등, Eur. Jour. Immunol. 1912, 22 : 37 ; 과 Banerji 등, cell 33 : 729, 1983에 설명된 바와 같은 생체외치료를 위한 프레-B 세포내에 또는 생체내 유전자치료를 위하여 환자에 직접 구조물을 도입시키므로써 X-연결된 β -글로불린 혈증을 치료하는데 사용될 수 있으며, X-연결된 β -글로불린 혈증으로 고생을 하고 있는 환자에게 형질감염된 프레-B 세포를 투여할 수 있다.

본 발명에 따라서 제조된 플라스미드 DNA는 고오시에씨병을 치료하는데도 사용할 수 있다. 고오시에씨병은 두 개의 다른 유전자 돌연변이종의 하나로부터 유래한다. 고오시에씨병의 유형 1은 CGG ... > CAG 돌연변이이며, 이는 β -글루코세레브로시다제 폴리펩티드의 119 위치에서 Arg ... > Gln 치환을 초래한다(Graves, DNA 7:521, 1988). 고오시에씨병의 유형 2는 CTG ... > CCG 돌연변이이며, 이는 β -글루코세레브로시다제 폴리펩티드의 444 위치에서 Leu ... > Pro 치환을 초래한다(Tsuji, NEJM 316 : 570, 1987).

야생유형의 폴리펩티드를 암호화하는 β -글루코세레브로시다제 유전자의 존재는 고오시에씨병에 상당히 정확한 것으로 믿어진다. 따라서 본 발명에 따르는 유용한 다른 플라스미드는 여기에서 설명된 최소 요소를 포함하는 것(즉, 복제의 기점, 작동인자 서열과 클로닝 부위)과 라이소자임 유전자 프로모터와 Horowitz 등, 1989, Genomics, 4 : 87-96에 설명된 β -글루코세레브로시다제 트랜스유전자 이다. 이 플라스미드는 다음에 따라서 구성된다.

인간의 β -글루코세레브로시다제 유전자는 Horowitz 등이 개시한 바에 따라서, 엑손 1내의 BamHI 부위로부터 폴리아데닐화부위의 EcoRV 부위 3'로 연장된 9722 염기쌍 단편상에서 운송된다.

이 단편은 엑손 2내에서 해독스타트와 함께 11개 엑손과 모든 간섭서열들을 포함한다. 위치-독립적이고 조직-특이성 유전자 발현을 부여하는 서열은 이 구조물내에 포함될 수 있으며, Bonifer 등, 1990, Euro.

Mol. Biol. Org. Jour, 9 ; 2843에 설명된 바의 PIII.lyx 구조물로부터의 11.8Kb Xho I-Sac I 단편상에서 운송된다.

플라스미드 DNA는 여기에 설명된 바에 따라서 제조되며, 그후에 면역학과 세포 생물학, 1993, Vol. 71, 75~78 페이지에 설명된 바와 같이, 생체내 치료를 위하여 숙주에 직접 도입시키거나, 또는 생체외 치료를 위하여 마크로파아지에 도입하고, 고오시에씨병으로 고생을 하고 있는 환자에 형질감염된 마크로파아지를 도입시키므로써 이 병을 치료하는데 사용된다. 고오시에씨병으로 고생을 하고 있는 환자에서 야생 유형의 트랜스유전자의 발현은 질병 상태를 고치게 될 것이다.

다른 실시예

다른 실시예들은 당업자들에게는 분명할 수 있다. 전술한 상세 설명이 명쾌함을 위하여 제공되고 단지 예시적임을 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 실시예에 제한되는 것이 아니고, 다음의 청구범위에 의하여 분명히 된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

억제인자에 의해서 결합할 수 있는 작동유전자,

상기 억제인자를 암호화하는 제1의 염색체 유전자 및

상기 억제인자와 기능적으로 결합되고 세포성장에 필수적인 제2의 염색체 유전자를 함유하는 플라스미드를 포함하며,

여기에서 상기 플라스미드는 상기 필수 유전자가 발현되어 세포성장이 이루어질 수 있도록 상기 억제인자를 적정하기에 충분한 수로 상기 세포내에 존재하는 것임을 특징으로 하는 형질전환된 숙주세포.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 억제인자는 *E. coli lac* 억제인자, γ 억제인자, *E. coli trp* 억제인자, *E. coli galR* 억제인자, *E. coli araC* 억제인자, *E. coli tet* 억제인자 및 *E. coli ArgRNW* 억제인자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 숙주세포는 포유동물 세포 또는 곤충세포와 같은 동물세포, 식물세포, 효모세포 또는 박테리아세포와 같은 곰팡이류 세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 세포는 그램 네가티브 박테리아 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 세포는 *E. coli* 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 세포는 살모넬라 세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 세포는 그램 포지티브 박테리아 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 세포는 바실러스 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 세포는 효모세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플라스미드는 숙주세포 당 약 10~50개의 상기 플라스미드 사본을 복제할 수 있는 복제 기점을 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 13

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플라스미드는 숙주 세포 당 약 100~200개의 상기 플라스미드 사본을 복제할 수 있는 복제 기점을 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 플라스미드는 pBR322인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 플라스미드는 pUC인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플라스미드는 목적하는 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 플라스미드는 포유동물세포내에서의 발현을 위해 조절 서열들과 작동가능하게 결합되는 목적하는 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플라스미드는 억제인자에 의해 결합할 수 있는 작동 유전자, 복제 기점 및 목적하는 유전자의 삽입을 위한 클로닝 부위로 필수적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 플라스미드는 약 1000bp의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 20

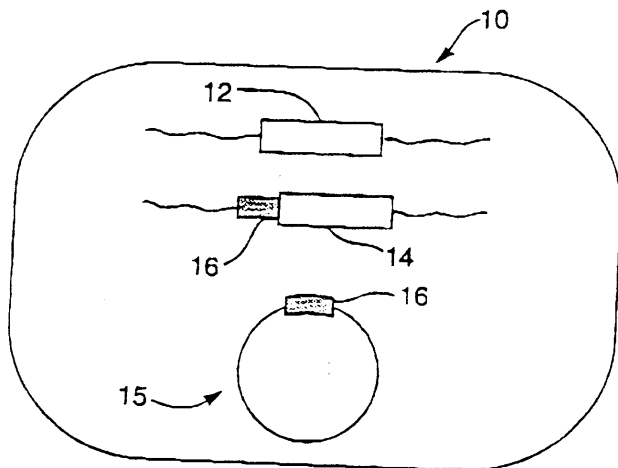
세포가 성장하기에 충분한 조건 및 시간 동안에 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주세포내에서의 플라스미드의 보존방법.

청구항 21

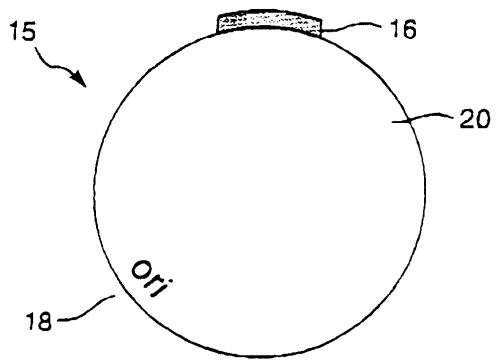
세포가 성장하기에 충분한 조건 및 시간동안에 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양된 세포로부터 플라스미드 DNA를 분리해내는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드 DNA의 생산방법.

청구항 22

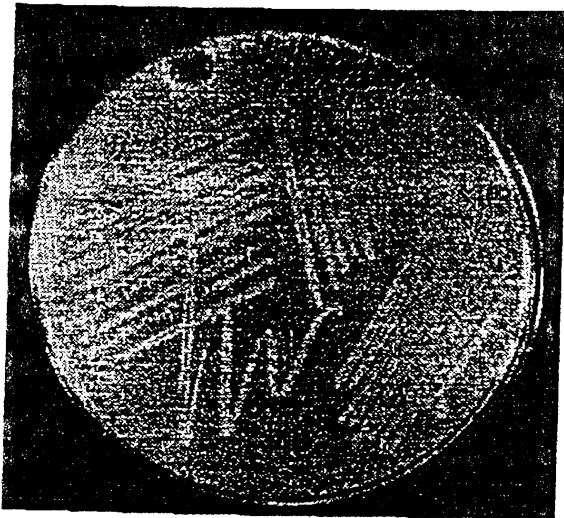
세포가 성장하기에 충분한 조건 및 시간 동안에 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하는 단계 및 상기 배양된 세포로부터 재조합 단백질을 분리해내는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산 방법.

도면**도면1**

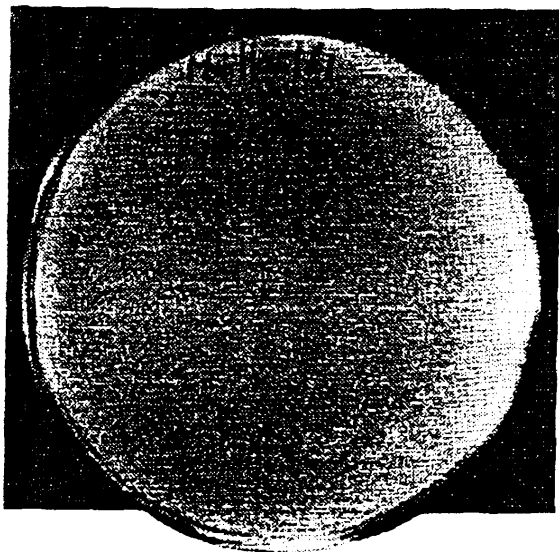
도면2



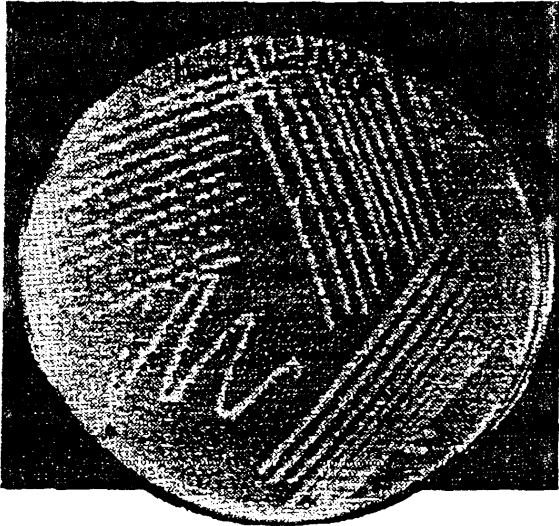
도면3a



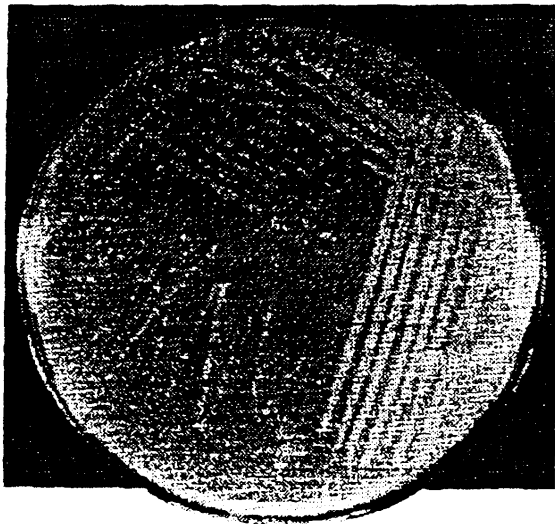
도면3b



도면3c

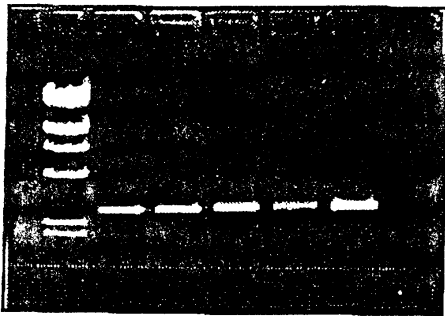


도면3d

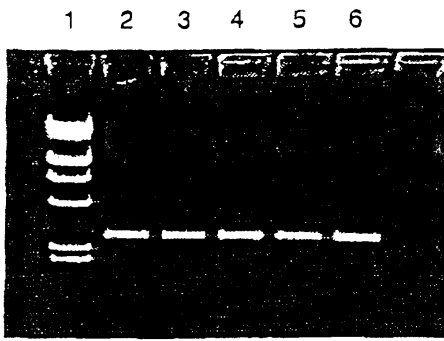


도면4a

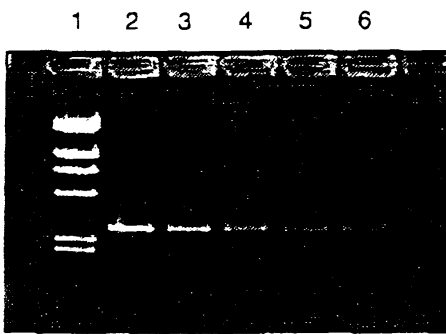
1 2 3 4 5 6



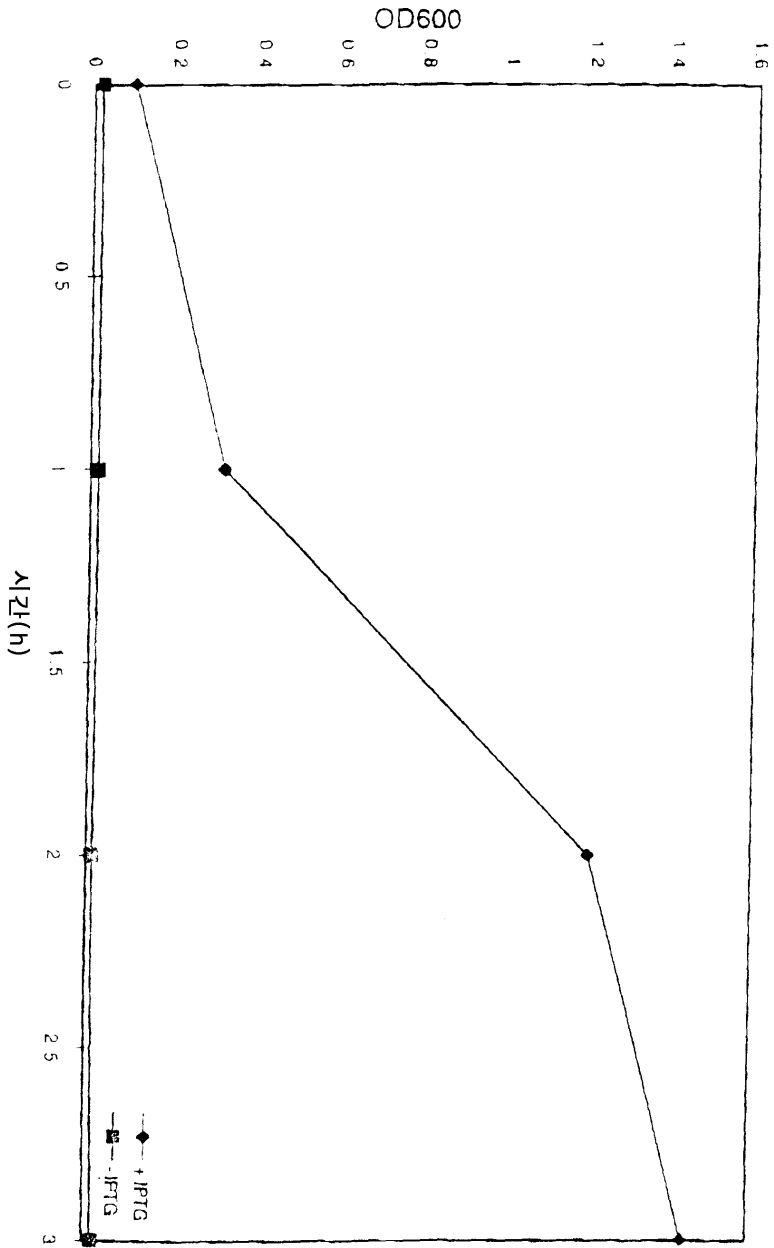
도면4b



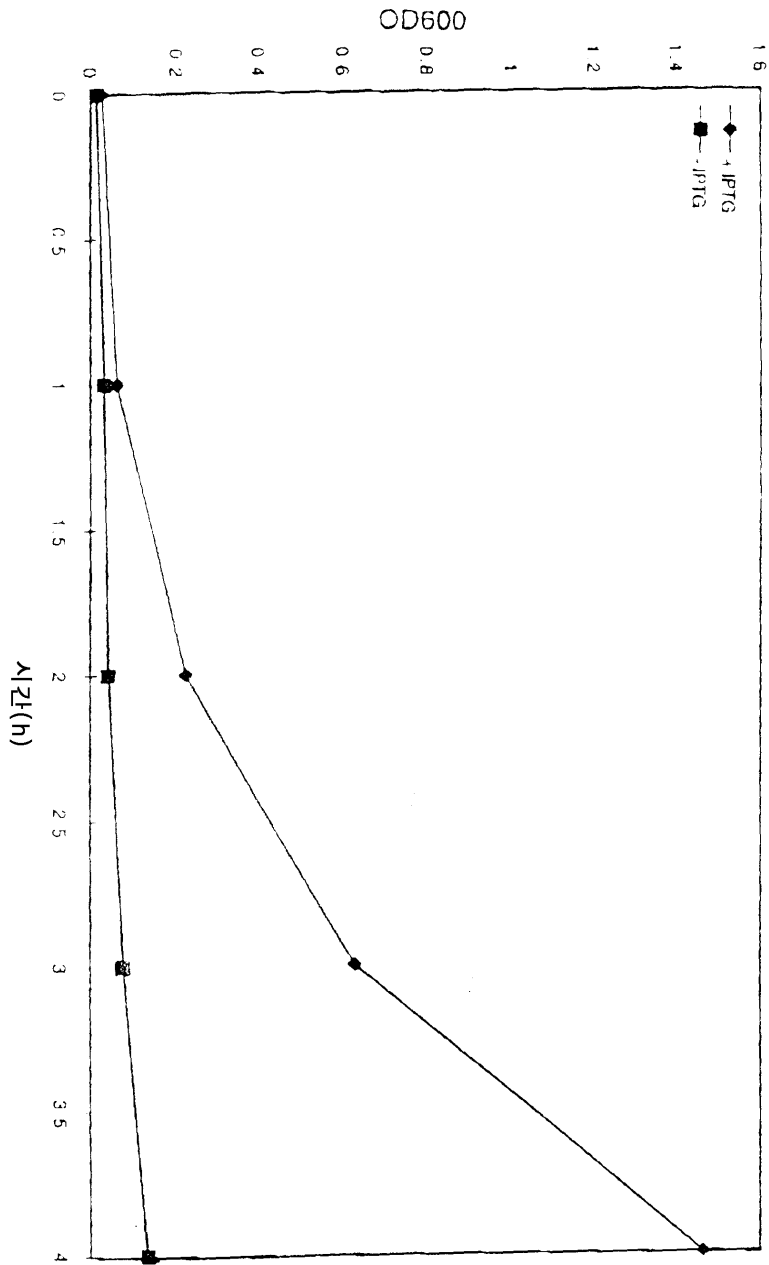
도면4c



도면5



도면6



도면7

