

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12Q 1/68(11) 공개번호 특2000-0069591
(43) 공개일자 2000년 11월 25일

(21) 출원번호 10-1999-7005569
 (22) 출원일자 1999년 06월 18일
 번역문제출일자 1999년 06월 18일
 (86) 국제출원번호 PCT/US1997/24239 (87) 국제공개번호 WO 1998/27230
 (86) 국제출원출원일자 1997년 12월 17일 (87) 국제공개일자 1998년 06월 25일
 (81) 지정국 AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 감비아 짐바브웨
 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스
 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투
 칼 스웨덴 핀란드
 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고
 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이
 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나
 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드
 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북
 한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토
 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽
 고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키
 스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미
 국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스
 웨덴 싱가포르 유고슬라비아 가나 감비아 기네비쓰 인도네시아 시에
 라리온 짐바브웨

(30) 우선권주장 8/769,062 1996년 12월 18일 미국(US)
 (71) 출원인 맥시겐, 인크.
 미국 캘리포니아주 94063 레드우드 시티 갈베스톤 드라이브 515
 (72) 발명자 패튼필립에이
 미국 캘리포니아주 94040 마운틴뷰 페예트드라이브 2680 아파트먼트 506
 스템머월 램피씨
 미국 캘리포니아주 95030 로스가토스 캐씨 코트 108
 (74) 대리인 나영환, 이상섭

심사청구 : 없음**(54) 폴리펩티드 조작 방법 및 그 생성 조성물****요약**

본 발명은 재조합 및 선별을 실시하는 방법을 비롯하여 산업적·약학적으로 유망한 단백질의 개발 방법에 관한 것이다. 또한, 이 방법에 의해 생산되는 조성물도 제공한다.

명세서**기술분야**

본 출원은 1994년 2월 17일자로 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 08/198,431호(1997년 2월 25일자로 미국 특허 제5,605,793호로 특허 하여짐), 일련 번호 PCT/US95/02126(1995.2.17 출원), 일련 번호 08/425,684(1995.4.18 출원), 일련 번호 08/537,874(1995.10.30 출원), 일련 번호 08/564,955(1995.11.30 출원), 일련 번호 08/621,859(1996.3.25 출원), 일련 번호 08/621,430(1996.3.25 출원), 일련 번호 PCT/US96/05480(1996.4.18 출원), 일련 번호 08/650,400(1996.5.20 출원), 일련 번호 08/675,502(1996.7.3 출원), 일련 번호 08/721,824(1996.9.27 출원), 일련 번호 08/722,660(1996.9.27 출원) 및 일련 번호 08/769,062(1996.12.18 출원)의 CIP 출원이고, 이들 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용하였다.

배경기술

반복적 서열 재조합 방법은 재조합과 선별 또는 선택을 반복 사이클로 실시하여 각 유전자, 전체 플라스미드나 바이러스, 다중유전자 클러스터 또는 심지어 전체 게놈을 "개량(evolve)"시키는 것을 포함한다 [Stemmer, Bio/Technology 13:549-553(1995)]. 이 기법은 종래의 폴리펩티드 조작 방법시 필요한 광범위한 분석과 계산을 필요로 하지 않는다. 반복적 서열 재조합 방법은 통상의 쌍을 이룬 재조합 반응과 달리 최소의 선택 단계의 사이클에서 다수 돌연변이의 재조합을 하용한다.

따라서, 반복적 서열 재조합(RSR) 기법은 모든 재조합이나 임의의 재조합중에서 돌연변이간 재조합이 일어난다는 특별한 잇점을 나타내어, 목적 결과에 영향을 미칠 수 있는 여러 조합의 돌연변이 방식을 탐색할 수 있는 가장 신속한 방법을 제공한다.

또한, 몇몇 경우에는 반복적 서열 재조합에 필요한 것은 아니지만 이 기법에 변형의 기회를 제공하는 구조적 및/또는 기능적 정보를 얻을 수도 있다. 또, 어떤 경우에는 다수의 재조합체의 선택 및/또는 선별 과정에 비용이 많이 들거나 많은 시간이 소요되기도 한다. 또 다른 문제는 다수의 핵산 분자를 조작한다는 점이다. 본 발명은 이와 같은 문제 및 기타 다른 문제를 다룬 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 제1 양태는

- (a) 최소한 1개의 뉴클레오티드가 서로 다른 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 제한효소로 분해하는 단계,
- (b) 이 혼합물을 결찰하여 재조합 DNA 분자의 라이브러리를 제조하는 단계,
- (c) 상기 (b)의 생성물을 종에서 목적하는 성질의 생성물을 선별 또는 선택하는 단계,
- (d) 개량된 단백질을 암호하는 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량하는 방법이다.

본 발명의 제2 양태는 1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 재조합하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 각 분절에 대한 프라이머를 1개 이상 포함하고, 이 프라이머 서열이 다른 분절과 최소한 하나의 접합부에 대해 상보적인 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머 군을 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 사슬 반응으로 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자의 분절을 증폭시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 생성하는 단계,
- (d) 목적하는 성질을 가진 단계 (c)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (e) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (d)의 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제3 양태는

- (a) 돌연변이 서열에 대한 일군의 DNA 단편을 변성 및 복원시켜 1개 이상의 2분쇄 단편중 1개 이상의 염기쌍 부정합을 포함하는 하이브리드 2분쇄 단편의 집합을 생성시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물을 약 20 내지 100 bp의 단편으로 단편화하는 단계,
- (c) 부정합을 가진 단편을 친화성 매트릭스에 대해 친화성 정제하여 돌연변이 서열을 증량시킨 DNA 단편의 푸울을 만드는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 생성시키는 단계를 포함하여 돌연변이 서열의 DNA 단편 집합체를 증량시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제4 양태는

- (a) 2개 이상의 소정 분절 사이에 인트론 서열을 삽입시켜 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자 중에 상동성 영역을 제공하는 단계,
- (b) 상기 상동성 영역을 인트론을 통해 제공한 단계 (a)의 DNA 기질 분자를 단편화하고 재조합하는 단계,
- (c) 목적하는 성질을 가진 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (d) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (c)의 생성물로부터 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 약 10개 내지 100개 염기쌍의 서열 상동성 영역을 공유하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합하여 DNA 기질 분자에 의해 암호화된 단백질을 개량시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제5 양태는 1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 각 분절의 각 가닥부에 대해 한쌍의 프라이머를 제공하고, 각 쌍 중 한 성분이 분절의 한 말단에서 결합을 가교하고, 다른 성분이 분절의 다른 말단에서 결합을 가교하며, 상기 DNA 분자의 종지 말단이 프라이머 쌍의 한 성분으로서 일반 프라이머를 보유하고, 프라이머 세트가 최소한 제1 기질 분자 및 제2 기

질 분자 각각에 대해 제공되는 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머 세트를 제공하는 단계,

- (b) 단계 (a)의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 사슬 반응으로 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자의 분절을 증폭시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 분자의 푸을 생성시키는 단계,
- (d) 목적하는 성질을 가진 단계 (c)의 생성물을 선택하거나 선별하는 단계,
- (e) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (d)의 생성물로부터 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제6 양태는 DNA 기질 분자에 의해 암호되는 단백질을 개량시켜 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

- (a) 상기 DNA 분자에 상보적인 2개 이상의 영역과 상기 단백질의 아미노산 서열 중 일정 영역을 암호하는 1개 이상의 축퇴성 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드 세트를 제공하는 단계,
- (b) 올리고뉴클레오티드의 세트를 어셈블리하여 총 길이 유전자의 라이브러리를 제조하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 속주 세포 중에서 발현시키는 단계,
- (d) 단백질의 발현이 개선된 단계 (c)의 생성물을 선별하는 단계,
- (e) 단계 (d)로부터 개량된 단백질을 암호하는 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 단백질 발현의 최적화 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제7 양태는

- (a) 돌연변이유발된 DNA 기질 분자의 라이브러리로 속주 세포를 형질전환시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리에 의해 암호된 단백질의 발현을 유도하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물로부터 추출물을 제조하는 단계,
- (d) 가용성 단백질과 DNA의 복합체로부터 불용성 단백질을 분획화하는 단계,
- (e) 단계 (d) 유래의 개량된 단백질을 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, lac 두상부 이량체를 암호하는 DNA 서열과 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체와 최소한 1개의 lac 작동인자를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시켜 그 단백질의 발현을 최적화하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제8 양태는 융합 단백질을 만들기 위하여 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열과 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 기능적 발현을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 돌연변이유발된 DNA 기질 분자의 라이브러리에 의해 암호된 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 생성하는 속주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)로부터 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 회수하는 단계,
- (c) 상기 단백질에 대한 리간드를 사용하여 돌연변이 단백질을 발현하는 입자를 친화성 정제하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 친화성 정제된 입자로부터 개량된 단백질을 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제9 양태는 제1 플라스미드 벡터 상에 존재하고 lac 두상부 이량체와 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

- (a) 상기 제1 벡터와, 최소한 1개의 채페로닌(chaperonin) 유전자의 돌연변이체의 라이브러리와 1개 이상의 lac 작동인자를 포함하는 제2 벡터로 속주 세포를 형질전환시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물로부터 추출물을 제조하는 단계,
- (c) 가용성 단백질과 DNA의 복합체로부터 불용성 단백질을 분획화하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 채페로닌 유전자를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제10 양태는 채페로닌 유전자 돌연변이체의 라이브러리를 포함하는 파지미드 상에 보유되고, 사상 파지 유전자와 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

- (a) 돌연변이유발된 DNA 기질 분자의 라이브러리에 의해 암호된 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 생성하는 속주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)로부터 상기 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 회수하는 단계,
- (c) 상기 단백질의 리간드를 사용하여 상기 단백질을 발현하는 입자를 친화성 정제하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 친화성 정제된 입자로부터 돌연변이 채페로닌을 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제11 양태는

- (a) 분비 기능을 암호하는 유전자의 클러스터를 제공하는 단계,
- (b) 분비 기능을 암호하는 단계 (a)의 유전자 클러스터에서 1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이한 최소한 제1 서열과 제2 서열을 재조합하여 재조합 서열의 라이브러리를 제조하는 단계,
- (c) 상기 단백질을 암호하는 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포의 배양물을 단계 (b)의 생성물로 형질전환시키는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물을 처리하여 상기 단백질을 분비하는 지에 대해 선별하거나 선택하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 분비 기능을 암호하는 개량된 유전자를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하여, 분비 기능을 암호하는 유전자를 개량시켜 숙주 내에서의 단백질의 분비를 최적화하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제12 양태는

- (a) 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)로 형질감염된 세포의 추출물을 선별하고 야생형 DNA 폴리머라제와 활성을 비교하는 단계,
- (c) 야생형 DNA 폴리머라제보다 개선된 활성을 보유한 돌연변이 DNA 폴리머라제를 발현하는 단계 (b)의 세포로부터 돌연변이 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 개선된 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제13 양태는

- (a) 돌연변이 DNA 폴리머라제에 의해 복제되고 복귀성 돌연변이를 보유한 지표 유전자를 포함하여 숙주 세포에서 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 지표 유전자의 복귀돌연변이체에 대하여 단계 (a)의 생성물을 선별하는 단계,
- (c) 복귀돌연변이체로부터 돌연변이 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 야생형 DNA 폴리머라제의 오차율보다 큰 오차율을 나타내는 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제14 양태는

- (a) 플라스미드 벡터를 포함하고 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물로 형질감염된 숙주 세포의 추출물과 플라스미드 제조물을 제조하는 단계,
- (c) 각 플라스미드 제조물을 PCR 반응으로 그 플라스미드에 의해 암호되고 숙주 세포 추출물 중에 존재하는 돌연변이 폴리머라제를 사용하여 증폭시키는 단계,
- (d) 단계 (c)의 PCR 생성물을 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제15 양태는

- (a) 플라스미드 발현 벡터를 포함하고 DNA 기질 분자의 돌연변이체의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 숙주의 phn 오페론이 결실되어 있는 숙주를 형질감염시키는 단계,
- (c) 기질로서 p-니트로페놀 포스포나타제를 사용하여 단계 (b)의 형질감염체의 성장에 대하여 선별하는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 선택된 형질감염체의 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (e) 개량된 포스포나타제를 암호하는 단계 (d)의 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, DNA 기질 분자에 의해 암호된 포스포나타제로부터 p-니트로페놀 포스포나타제를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제16 양태는

- (a) 분비 리더에 연결된 DNA 기질 분자의 돌연변이체에 대한 플라스미드 발현 벡터를 포함하는 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 숙주를 형질감염시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 형질감염체의 성장을 복합 단백질 배지상에서 선별하는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 얻어지는 개량된 프로테아제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 프로테아제를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제17 양태는 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA에 일정 프로테아제를 암호하는 DNA 기질 분자를 융합시켜 만든 융합 단백질인 개량된 프로테아제를 얻기 위하여 파지 상에 표현되는 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 선별하는 방법으로서,

- (a) 상기 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 제공하는 단계,

- (b) 이 숙주 세포에 상기 파지를 포획하기 위한 단백질 네트를 충총시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 세척하여 단백질 네트의 분해시 방출되는 파지를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 DNA를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)로부터 개량된 프로테아제를 암호하는 DNA 기질을 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제18 양태는

- (a) 형색단 및 형광 반응정지제를 포함하는 펩티드 기질의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 펩티드 기질을 절단하는 활성에 대하여 형광성을 측정하여 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 선별하는 단계,
- (c) 단계 (b)로부터 1종 이상의 프로테아제 돌연변이체를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하여, 개량된 프로테아제를 얻기 위해 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 선별하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제19 양태는

- (a) 사상 파지 백터를 포함하고 돌연변이체 알파 인터페론 유전자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 인터페론 반응성 프로모터의 조절하에 GFP인 리포터 유전자를 포함하는 리포터 작제물을 함유하는 세포를 자극하는 단계,
- (c) GFP를 발현하는 세포를 FACS로 분리하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 파지를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 인터페론 유전자를 회수하는 단계를 포함하여 알파 인터페론 유전자를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제20 양태는

- (a) 돌연변이체의 발현 백터 함유 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리로 포유류 숙주 세포를 형질감염시키고, 이 때 돌연변이 단백질이 세포의 표면상에서 발현되는 단계,
- (c) 이 단백질에 대한 리간드를 사용하여 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 DNA 암호 돌연변이 단백질을 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 DNA 기질을 회수하는 단계를 포함하여, 일정 단백질을 암호하는 DNA 기질의 돌연변이체의 라이브러리를 개량된 DNA 기질에 대하여 선별하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제21 양태는

- (a) 돌연변이 알파 인터페론 유전자가 유도성 프로모터의 조절하에 발현되는 발현 백터를 포함하는, 돌연변이 알파 인터페론 유전자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 바이러스와 접촉시키는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 생존한 숙주 세포로부터 돌연변이 알파 인터페론을 암호하는 DNA를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 인터페론 유전자를 회수하는 단계를 포함하여 인터페론 알파를 암호하는 DNA 기질 분자를 개량하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제22 양태는 융합 단백질을 생성하기 위하여 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열과 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 상기 단백질의 혈청 안정성이나 혈행 반감기를 개량하는 방법으로서,

- (a) 상기 융합 단백질의 돌연변이체의 라이브러리를 발현하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 인간 혈청 단백질, 조직 특이적 단백질 또는 수용체인 상기 단백질에 대한 리간드를 사용하여 돌연변이체를 친화성 정제하는 단계,
- (c) 단계 (b)에서 친화성 선택된 돌연변이체로부터 돌연변이 단백질을 암호하는 DNA를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 상기 단백질을 암호하는 개량된 유전자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제23 양태는 2개 이상

의 서브유니트를 가진 단백질을 개량하는 방법으로서,

- (a) 각 서브유니트에 대하여 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 한 서브유니트의 아미노 말단을 암호하는 핵산 서열에 있는 링커를 사용하여 제2 서브유니트의 카르복시 말단을 암호하는 핵산 서열과 연결시킨 각 서브유니트 서열을 암호하는 DNA 기질 분자를 포함하는 상기 단백질의 1본쇄 작제물의 라이브러리로 상기 라이브러리를 재조합하는 단계,

- (c) 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 재조합 1본쇄 작제물 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물을 돌연변이유발법으로 처리하는 단계,
- (f) 단계 (e)부터 개량된 1본쇄 작제물 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제24 양태는 효모 시그널 형질도입 경로에 대한 포유류의 7-경막 수용체의 커플링을 개량하는 방법으로서,

- (a) 폐로몬 반응성 프로모터의 조절하에 발현되는 수용체 유전자와 포유류의 7-경막 수용체를 발현하는 숙주 세포에서 포유류 G 알파 단백질 돌연변이체 라이브러리를 발현시키는 단계,
- (b) 7-경막 수용체에 대한 리간드의 존재하에 리포터 유전자의 발현에 대해 단계 (a)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (c) 단계 (b)에서 선별되거나 선택된 생성물로부터 개량된 G 알파 단백질 돌연변이체를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제25 양태는

- (a) 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자로 숙주 세포를 형질감염시켜 이 숙주 세포내에서 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물 중 목적 성질을 가진 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 재조합하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제26 양태는 1본쇄 DNA를 포함하는 벡터를 함유하고 목적 단백질을 암호하는 DNA 기질 서열을 개량하는 방법으로서,

- (a) 상기 DNA 기질 서열의 돌연변이체의 라이브러리와 1본쇄 벡터 DNA를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리 유래의 2본쇄 DNA를 단계 (a)의 1본쇄 벡터 DNA에 어닐링하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 사용하여 숙주를 형질전환시키는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물 중 목적 성질을 가진 생성물을 선별하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 DNA 기질 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 소 내장 알칼리성 포스파타제의 개량에 사용하기 위한 올리고 PCR 프라이머를 정렬한 것이다.

도 2는 알파 인터페론 아미노산 서열과 핵산 서열을 정렬한 것이다.

도 3은 키메라성 알파 인터페론 아미노산 서열을 정렬한 것이다.

구체적인 양태의 설명

본 발명은 반복적 재조합 방법을 통해 폴리펩티드를 개량할 수 있는 다양한 전략을 제공한다. 일부 양태로서, 본 발명의 전략은 일반적으로 "조립 셔플링(coarse grain shuffling)" 및 "미립 셔플링(fine grain shuffling)"으로 분류할 수 있다. 이하에 상세하게 설명되듯이, 이 전략들은 특히 목적 폴리펩티드에 대한 일부 구조적 또는 기능적 정보가 유용한 경우, 조작될 핵산이 대형인 경우, 다수의 재조합체의 선별이나 선택이 조작 곤란한 경우 등에 사용된다. "조립 셔플링"은 일반적으로 기능적 도메인, 액손, 제한 효소 단편으로 규정된 것이거나 또는 임의 규정된 분절인 것에 관계 없이 핵산 분절의 재조합이나 교환 단계를 포함한다. "미립 셔플링"은 일반적으로 분절, 예컨대 코돈 내에서 서열 변화가 된 것을 포함한다.

조립 셔플링 및 미립 셔플링을 통해 핵산 서열 내에서 일어나는 변화를 분석할 수 있으며, "서열 간격 조사"라고도 부른다. 두 기법 모두 장점이 있지만, 그 결과는 질적으로 상이하다. 예컨대, 조립 연구는 폴리케티드 오페론과 같은 다중유전자 클러스터를 최적화하는데 매우 적합한 반면, 미립 연구는 코돈 용법 라이브러리를 사용하여 단백질 발현 등의 성질을 최적화하는데 종종 적합하다.

이 전략들은 일반적으로 유전자 또는 이의 단편의 개량을 수반하여 이종 세포에서의 기능의 보유 또는 동종 세포나 이종 세포에서의 기능의 개선을 도모한다. 개량은 일반적으로 반복적 서열 재조합이라는 공정을 통해 실시한다. 반복적 서열 재조합은 다음에 상세하게 설명되듯이 다양한 여러 방식과 이 방식의 과돌연변이를 통해 얻을 수 있다. 이 방식에는 공통된 원리가 일부분 있다. 반복적 서열 재조합은 연속적인 재조합 사이클을 통해 분자 다양성, 즉 서로 실질적인 서열 동일성이 있으나 돌연변이의 존재로 상이한 일군의 핵산 분자를 생성한다. 각 재조합 사이클에 이어 목적 특성을 나타내는 분자를 선별하거나 선택하는 과정을 1회 이상 실시한다. 1차 단계에서 선택된 분자는 다음 사이클에서 분자 다양성을 만들기 위한 출발 물질로서 사용된다. 소정의 사이클에서 재조합은 생체내 또는 시험관내에서 실시할 수 있다. 또한, 재조합을 통해 얻어지는 다양성은 임의의 사이클 단계에서 종래 돌연변이유발법(예컨대, 잘못이 있는(error-prone) PCR 또는 카세트 돌연변이유발법, 박테리아 돌연변이유발 균주에 의한 감염법, 화학적 돌연변이원 처리법, 동종 유전자계로부터 서열 다양성이 있는 "스파이킹")을 재조합 기질이나 재조합 생성물에 대하여 사용하여 보강할 수 있다.

I. 반복적 서열 재조합 방식

때로 DNA 셔플링(shuffling), 개량(evolution) 또는 분자 교배(breeding)라고도 부르는 반복적 서열 재조합의 일부 방식과 예에 대해서는 동시 계류증인 1994년 2월 17일자로 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 08/198,431호, 일련 번호 PCT/US95/02126(1995.2.17 출원), 일련 번호 08/425,684(1995.4.18 출원), 일련 번호 08/537,874(1995.10.30 출원), 일련 번호 08/564,955(1995.11.30 출원), 일련 번호 08/621,859(1996.3.25 출원), 일련 번호 08/621,430(1996.3.25 출원), 일련 번호 PCT/US96/05480(1996.4.18 출원), 일련 번호 08/650,400(1996.5.20 출원), 일련 번호 08/675,502(1996.7.3 출원), 일련 번호 08/721,824(1996.9.27 출원), 일련 번호 08/722,660(1996.9.27 출원); 문헌[Stemmer et al., *Science* 270:1510(1995); Stemmer, *Gene* 164:49-53(1995); Stemmer, *Bio/Technology* 13:549-553(1995); Stemmer, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 91:10747-10751(1994); Stemmer, *Nature* 370:389-391(1994); Crameri et al., *Nature Medicine* 2(1):1-3(1996); Crameri et al., *Nature Biotechnology* 14:315-319(1996)]에 본 발명자들과 동료들에 의해 설명된 바 있으며, 상기 공보 및 문헌은 모두 본 명세서에 참고 문헌으로 인용하였다.

일반적으로, "유전자"란 용어는 광의적으로 생물학적 기능에 연관이 있는 DNA 서열이나 임의의 단편을 의미하는 것이다. 유전자는 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있는데, 예컨대 공지 또는 소정의 서열 정보로부터 합성하거나 당해의 공급원으로부터 클로닝하여 얻을 수 있으며, 바람직한 변수를 갖추도록 디자인된 서열을 포함할 수 있다.

개량된 유전자의 수용체로는 다양한 세포 유형을 사용할 수 있다. 특히 바람직한 세포로는 그람 음성 및 그람 양성의 다양한 박테리아 세포 유형, 예컨대 로도코커스(*Rhodococcus*), 스트렙토마이세테스(*Streptomyces*), 악티노마이세테스(*Actinomycetes*), 코리네박테리아(*Corynebacteria*), 페니실룸(*Penicillium*), 바실러스(*Bacillus*), 에세리치아 콜리(*Escherichia coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 살모넬라(*Salmonella*) 및 에르위니아(*Erwinia*)를 포함한다. 또한, 바람직한 세포로는 진핵 세포, 특히 포유류 세포(예, 마우스, 햄스터, 영장류, 인간)의 세포주 및 1차 배양물을 포함한다. 이와 같은 세포로는 간(stem) 세포, 예컨대 배아 간 세포, 접합자, 성유아세포, 림프구세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 마우스 성유아세포(NIH3T3), 신장, 간, 근육 및 피부 세포를 포함한다. 기타 바람직한 진핵 세포로는 식물 세포, 예컨대, 옥수수, 쌀, 밀, 면, 콩, 사탕수수, 담배 및 아라비듐시스; 어류, 조류, 진균류[페니실룸, 푸사리움(*Fusarium*), 아스퍼길러스(*Aspergillus*), 포도스포라(*Podospora*), 뉴로스포라(*Neurospora*)], 곤충, 효모[피치아(*Pichia*) 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*)]를 포함한다.

숙주의 선택은 유전적 조작된 숙주의 목적 용도, 예컨대 병원성, 기질 범위, 환경적 내성, 주요 중간 물질의 존재, 유전자 조작의 용이성 및 다른 유기체로의 유전자 정보의 우발적인 전이 가능성에 따라 선택한다. 숙주는 벡터 DNA를 복제하는 성질, 목적 단백질을 발현하는 성질 및 목적 단백질을 적당하게 유인하는 성질을 보유하는 것이 바람직하다. 특히, 숙주는 *E. coli*, *Lactobacillus*, 스트렙토마이세테스, 악티노마이세테스, 진균류(예컨대, 사카로마이세스 세레비지에 또는 피치아 파스토리스), 슈나이더 세포, L 세포, COS 세포, CHO 세포 및 SP2/0, J558, NS-1 및 AG8-653과 같은 형질전환된 B 세포주가 바람직하다.

교배 절차는 일반적으로 서로 실질적인 서열 동일성(즉, 약 50%, 70%, 80% 또는 90% 이상의 서열 동일성)을 나타내지만, 특정 위치에서는 서로 상이한 최소한 2개의 기질을 가지고 개시한다. 그 차이는 치환, 삽입 및 결실과 같은 임의의 돌연변이 형태일 수 있다. 때로는 5개 내지 20개 위치에서 서로 상이한 분절일 수 있다. 출발 물질에 상대적으로 다양성을 증가시키기 위한 재조합에 있어서, 출발 물질은 2개 이상의 뉴클레오티드 위치가 서로 상이해야 한다. 즉, 기질이 단지 2개인 경우에는 최소한 2개의 상이한 위치에 있어야 한다. 기질이 3개인 경우에는, 예컨대 제1 기질이 제2 기질과 1개 위치에서 상이하고 제2 기질이 다른 1개 위치에서 제3 기질과 상이할 수 있다. 출발 DNA 분절은 각각 천연 변형체, 예컨대 대립유전자 변형체 또는 종 변형체일 수 있다. 또한, 단편은 구조적 및 보통 기능적 관련도가 약간 있는 비대립유전자(예컨대, 면역글로불린 상과 등의 상과에 속하는 여러 유전자)에서 유래될 수 있다. 또한, 출발 DNA 단편은 각각 유도된 변형체일 수 있다. 예컨대, 하나의 DNA 분절은 다른 분절의 잘못이 있는 PCR 복제, 돌연변이성 카세트의 치환을 통해 생성될 수 있다. 또한, 유도된 돌연변이체는 돌연변이성 균주 중에 존재하는 분절 중 하나(또는 둘 모두)를 전파시켜 재조합할 수 있다. 이와 같은 상황하에, 엄격히 말하면 제2 DNA 분절은 단일 분절이 아니라 다양한 부류의 관련 분절이다. 출발 물질을 형성하는 상이한 분절은 종종 동일 길이이거나 실질적으로 동일한 길이이다. 하지만, 절대적인 조건은 아니다. 예컨대, 한 분절이 다른 분절의 준서열일 수 있다. 분절은 벡터와 같이 장쇄 분자의 일부로서 존재하거나 분리된 형태로서 존재할 수 있다.

출발 DNA 분절은 본 명세서에 제시된 반복적 서열 재조합 방식 중 임의의 방식으로 재조합하여 재조합 DNA 분절의 다양한 라이브러리를 생성한다. 이와 같은 라이브러리는 크기가 10개 이하 내지 10^5 , 10^9 또는 10^{12} 성분 이상으로 다양할 수 있다. 일반적으로, 출발 분절 및 생성된 재조합 라이브러리는 총 길이 암호 서열과 발현시 필요한 프로모터 및 폴리아데닐화 서열 같은 임의의 필수 조절 서열을 포함한다. 그렇지 않다면, 라이브러리 중의 재조합 DNA 분절은 결실 서열이 있는 일반 벡터 중에 삽입한 뒤 선별/선택을 실시할 수 있다.

사용된 반복적 서열 재조합 발현이 생체내 방식인 경우, 생성된 재조합 DNA 분절의 라이브러리는 이미 세포내에 존재하며, 이 세포는 보통 기질 특이성이 개선된 효소의 발현이 필요한 세포 종류이다. 반복적 서열 재조합이 시험관내에서 실시되는 경우에 재조합 라이브러리는 선별/선택 이전에 바람직한 세포 유형으로 도입하는 것이 바람직하다. 재조합 라이브러리의 성분은 유입하기 전에 에피좀이나 바이러스에 결합하거나 직접 유입할 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서 라이브러리는 제1 숙주에서 증폭시키고, 그 다음 이 숙주로부터 회수한 뒤, 다시 발현, 선택 또는 선별이나 기타 다른 바람직한 변수의 조작이 보다 용이한 제2 숙주에 첨가한다. 라이브러리를 숙주 세포 중으로 첨가하는 방식은 세포 유형의 DNA 흡수 특성, 바이러스 수용체를 갖고 있는지, 접합할 수 있는 있는지 또는 천연 수용이 있는지에 따라 달라진다. 세포 유형이 천연 및 화학 유도적 수용능에 영향받지 않지만 전기침투에 민감하다면 전기침투를 사용하는 것이

좋다. 세포 유형이 전기침투에도 영향받지 않는다면 바이오리스틱스(biolistics)를 이용할 수 있다. 바이오리스틱 PDS-1000 Gene Gun(미국 캘리포니아주 헤르큘레스에 소재하는 바이오래드 제품)은 표적 세포를 향해 DNA 피복된 금이나 텅스텐 미소담체를 가속화하기 위하여 헬륨 압력을 이용한다. 이 방법은 다양한 조직, 예컨대 식물, 박테리아, 진균류, 조류, 천연 동물 조직, 조직 배양 세포 및 동물 배아에도 이용가능하다. 동물과 환자의 생 조직에 대한 본질적으로 적당한 전기침투 방식인 전자 빌스 전달법을 이용할 수도 있다[Zhao, Advanced Drug Delivery Reviews 17:257-262(1995)]. 수용능 세포를 제조하는 신규 방법은 동시 계류중인 미국 특허 출원 번호 08/621,430호(1996년 3월 25일)에 기재되어 있다. 재조합 DNA 유전자의 라이브러리를 추가한 후 이 세포는 선택적으로 전파되어 유전자의 발현을 유도할 수 있다.

A. 시험관내 방식

반복적 서열 재조합의 1가지 방식은 관련 서열의 푸울을 이용하는 것이다. 이 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있고 재조합 또는 재어셈블리되는 유전자나 DNA 단편의 크기에 따라 길이가 다양할 수 있다. 이 서열의 길이는 50 bp 내지 100 kb인 것이 좋다.

관련 기질의 푸울은 보통 무작위적으로 약 5 bp 내지 5 kb 또는 그 이상인 단편으로 단편화할 수 있다. 무작위 단편의 크기는 약 10 bp 내지 1000 bp인 것이 바람직하고, 특히 DNA 단편의 크기가 약 20 bp 내지 500 bp인 것이 보다 바람직하다. 기질은 DNase I이나 RNase 분해, 무작위 전단이나 제한 효소 분해와 같은 다양한 방법으로 분해할 수 있다. 특정 길이의 핵산 단편의 농도는 종종 총 핵산의 0.1 총량% 또는 1 총량% 미만이다. 혼합물내 존재하는 여러 특정 핵산 단편의 수는 최소 약 100개, 500개 또는 1000개 이상인 것이 보통이다.

핵산 단편의 혼합물은 약 80 °C 내지 100 °C, 보다 바람직하게는 90 °C 내지 96 °C로 가열 변성하여 1본쇄 핵산 단편을 만든다. 다른 1본쇄 핵산 단편과 서열 동일성이 있는 영역을 가진 1본쇄 핵산 단편은 6 °C 내지 75 °C, 바람직하게는 40 °C 내지 65 °C로 냉각시켜 재어닐링시킬 수 있다. 복원은 폴리에틸렌 글리콜("PEG") 또는 염을 추가하여 가속화할 수 있다. 염의 농도는 0 mM 내지 600 mM인 것이 바람직하고, 특히 10 mM 내지 100 mM인 것이 보다 바람직하다. 염은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl 또는 NaCl과 같은 염일 수 있다. PEG의 농도는 0% 내지 20% 범위, 보다 바람직하게는 5% 내지 10%가 좋다. 재어닐링하는 단편은 여러 기질로부터 유래될 수 있다.

어닐링된 핵산 단편은 핵산 폴리머라제, 예컨대 Taq 또는 클리나우, Mg^{++} (1 mM 내지 20 mM) 및 dNTP(즉, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP)의 존재하에 항온배양한다. 서열 동일성의 영역이 큰 경우에는 45 내지 65 °C의 어닐링 온도에서 Taq 또는 기타 고온 폴리머라제를 사용할 수 있다. 동일성의 영역이 작다면 저온에서 활성적인 클리나우 또는 기타 폴리머라제를 6 내지 30 °C의 어닐링 온도에서 사용할 수 있다. 폴리머라제는 어닐링 이전에, 어닐링과 동시에 또는 어닐링 후에 무작위 핵산 단편에 추가할 수 있다.

변성, 복원 및 폴리머라제 존재하에 무작위 핵산 단편의 항온처리의 사이클은 시험관내 핵산의 "셔플링(shuffling)"이라고 부른다. 이 사이클은 바람직한 횟수만큼 반복한다. 그 횟수는 2 내지 100회 반복하는 것이 바람직하고, 특히 10 내지 40회 반복하는 것이 바람직하다. 최종 핵산은 약 50 bp 내지 약 100 kb, 바람직하게는 500 bp 내지 50 kb인 2본쇄 폴리뉴클레오티드 군이다. 이 핵산 군은 실질적으로 서열이 동일하지만 여러 위치에서 상이한 출발 기질의 변형체로서, 출발 기질보다 더 많은 구성원을 포함한다. 재조합으로 얻어지는 단편의 군은 PCR로 1차 증폭시킨 다음, 적당한 벡터에 클로닝하고, 그 결찰 혼합물을 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킨다.

시험관내 셔플링의 변형예로서, 재조합 기질의 준서열은 불완전하게 신장된 증폭 생성물의 실질적인 분획을 보통 최소 20% 또는 그 이상 생성하는 조건하에서 총 길이 서열을 증폭시켜 생성할 수 있다. 그 결과 불완전하게 신장된 증폭 생성물을 비롯한 증폭 생성물은 변성시키고 재어닐링 및 증폭 사이클을 1회 이상 반복 처리한다. 이와 같이 1회 이상의 재어닐링 및 증폭 사이클을 통해 불완전하게 신장된 생성물의 실질적인 분획을 제공하는 변형에는 "스터터링(stuttering)"이라고 부른다. 불완전하게 신장된 생성물은 후속 증폭 단계를 통해 어닐링하고 다른 서열 관련 주형 종류 상에서 신장 반응을 개시한다.

또 다른 변형예로서, 길이가 다양한 관련 서열의 중첩성 1본쇄 DNA 단편 수집물을 사용하여 1회 이상의 증폭 사이클을 실시할 수 있다. 각 단편은 수집물의 제2 단편에 하이브리드하여 제2 단편의 폴리뉴클레오티드 사슬 신장 반응을 개시시킴으로써 서열 재조합된 폴리뉴클레오티드를 형성할 수 있다. 또 다른 변형으로서, 가변 길이의 1본쇄 DNA 단편은 제1 DNA 주형상에서 Vent DNA 폴리머라제에 의해 단일 프라이머로부터 생성될 수 있다. 이 1본쇄 DNA 단편은 우라실을 함유하는 환상의 1본쇄 DNA로 구성되는 제2의 쿤켈(Kunkel)형 주형에 대한 프라이머로서 사용한다. 결과적으로 제1 주형이 제2 주형으로 복수 치환된다[Levichkin et al., Mol. Biology 29:572-577(1995)].

핵산 서열은 서열 상동성이 부족할지라도 반복적 서열 재조합에 의해 재조합될 수 있다. 상동성은 PCR 프라이머로서 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하면 도입할 수 있다. 1개의 특별한 분절을 증폭시키는데 사용되는 모든 프라이머들은 증폭되는 핵산 분절의 특정 서열 외에도 유전자의 5'쪽에 20 내지 40개 염기의 추가 서열(서열 A)과 분절의 3' 쪽에 다른 20개 내지 40개 염기의 서열(서열 B)을 포함하도록 합성한다. 인접 분절은 서열 B의 상보 가닥(서열 B')을 포함하는 5' 프라이머 및 다른 20개 내지 40개 염기 서열(C)을 함유하는 3' 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 이와 유사하게, 다른 인접 분절에 대한 프라이머는 서열 C'(C에 상보적) 및 D를 포함하게 된다. 이와 같은 방식으로 작은 상동성 영역을 도입하여 분절을 부위 특이적 재조합 카세트로 만든다. 각 분절의 1차 증폭후, 증폭된 분절은 혼합하고 프라이머 없이 PCR로 처리한다.

폴리펩티드내의 도메인이 셔플링된 경우에는 연속 오픈 리딩 프레임을 유지해야 하는 제한때문에 도메인에 추가 인접 서열을 도입하는 것이 불가능할 수도 있다. 그 대신, 셔플링될 유전자 중 한 유전자에 의해 암호된 제1 도메인의 3' 말단 및 함께 셔플링될 기타 다른 모든 유전자에 의해 암호된 제2 도메인의 5' 말단에 상동성인 올리고뉴클레오티드 군을 합성한다. 이것을 모든 도메인에 대하여 반복하므로써 그 순서가 유지되면서 단백질 도메인간 재조합이 일어난 서열을 얻는다.

B. 생체내 방식

1. 플라스미드-플라스미드 재조합

재조합의 1차 기질로서 유전자의 변형 형태를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 수집물을 사용한다. 이 변형 형태는 보통 기질 간에 동종 재조합을 일으키기에 충분한 실질적인 서열 동일성을 서로 나타낸다. 폴리뉴클레오티드 간 다양성은 천연적(예, 대립유전자 변형체 또는 종 변형체), 유도적(예, 잘못이 있는 PCR 또는 잘못이 있는 반복적 서열 재조합) 또는 시험관내 재조합의 결과일 수 있다. 또한, 다양성은 천연 단백질을 암호하는 유전자를 대체 코돈을 이용하여 재합성하므로써 얻을 수 있다. 이 때, 기질 간에는 최소한 충분한 다양성이 존재하여 재조합을 통해 출발 물질에서 보다 많은 다양한 생성물을 생성할 수 있어야 한다. 또한, 기질은 최소 2개의 위치가 상이한 2개 이상이어야 한다. 하지만, 보통 구성원이 10^3 내지 10^8 인 기질의 라이브러리를 이용한다. 다양도는 재조합되는 기질의 길이와 개량되는 기능적 변화의 정도에 따라 달라진다. 다양성은 0.1 내지 25% 사이의 위치에 존재하는 것이 일반적이다. 상이한 기질을 플라스미드 중으로 도입시킨다. 이 때 플라스미드로는 박테리아 다중카피 플라스미드와 같은 표준 클로닝 벡터가 보통 사용된다. 하지만, 하기 기재되는 일부 방법에서 플라스미드는 가동화(MOB) 기능을 포함한다. 기질은 동일 플라스미드 또는 다른 플라스미드에 첨가할 수 있다. 2 종류 이상의 벡터를 함유하는 세포를 선택할 수 있도록 상이한 선택성 마커를 가진 2종 이상의 상이한 플라스미드를 사용하기도 한다. 또한, 상이한 유형의 플라스미드가 사용되는 경우 이 상이한 플라스미드는 2개의 다른 불화합성 군에서 선택하면 세포 중에 2개의 상이한 플라스미드를 안정하게 공존시킬 수 있다. 그럼에도 불구하고 동일한 불화합성 군 유래의 플라스미드는 동종 재조합이 일어나기에 충분한 시간동안 동일 세포내에서 공존시킬 수 있다.

먼저, 상이한 기질을 함유하는 플라스미드는 임의의 방법(예컨대, 화학적 형질전환, 천연 경쟁, 전기침투, 바이오리스틱스, 파지나 바이러스 계 종으로의 봉입)으로 세포 종에 도입시킨다. 이 플라스미드는 종종 포화 농도(최대 형질감염능과 관련됨)로 제공되거나 거의 포화 농도로 제공하여 1개 이상의 플라스미드가 동일 세포로 유입될 가능성을 증가시킨다. 다양한 기질을 포함하는 플라스미드는 동시에 또는 다단계로 형질감염시킬 수 있다. 예컨대, 다단계 방법의 경우 세포는 1차 플라스미드 일정량으로 형질감염시키고, 형질감염체를 선택하여 전파시킨 다음, 2차 플라스미드 일정량으로 형질감염시킨다.

세포에 플라스미드가 도입되면, 세포를 단지 전파시키므로써 상이한 복수의 플라스미드를 함유하는 세포 종에서 재조합 유전자를 생성하기 위한 기질간 재조합이 일어난다. 하지만, 단지 1개의 플라스미드를 수용한 세포는 재조합에 관여할 수 없고, 그러한 플라스미드 상에 존재하는 기질에 의한 가능한 개량성은 완전하게 이용되지 않는다(하지만, 이 플라스미드들은 돌연변이 세포 종에서 전파되는 경우 어느 정도로 기여할 수 있다). 개량율은 모든 기질이 재조합에 관여하도록 함으로써 증가시킬 수 있다. 이것은 형질감염된 세포를 전기침투시켜 실시할 수 있다. 전기침투의 조건은 외인성 DNA를 세포 종으로 도입시키는데 종래 사용된 조건과 동일하다(예, 1000 내지 2500 볼트, 400 μ F 및 1 내지 2 mM 캡). 이와 같은 조건 하에서, 플라스미드는 모든 기질이 재조합에 관여하도록 세포 간에 교환된다. 또한, 재조합 생성물은 추가로 서로 재조합되거나 본래의 기질과 재조합될 수 있다. 또한, 개량율은 접합 전이법을 이용하여 증가시킬 수 있다. 접합 전이법을 이용하고자 하는 경우 기질은 MOB 유전자를 가진 플라스미드 중으로 클로닝할 수 있으며, tra 유전자는 MOB 유전자에 대해 시스 또는 트란스로 제공한다. 접합 전이법의 효과는 세포간에 플라스미드를 이동시키고, 상기 재조합 생성물과 임의의 기질간에 재조합이 단지 배양물을 전파시킴으로써 실시될 수 있다는 점에서 전기침투와 매우 유사하다. 또한, 개량율은 세포를 융합시켜 플라스미드 또는 염색체 교환을 유도하므로써 증가시킬 수 있다. 융합은 PEG와 같은 화학제 또는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌, HSV-1 gB 및 gD와 같은 바이러스 단백질을 사용하여 유도할 수 있다. 또한, 개량율은 돌연변이 숙주 세포(예컨대, Mut L, S, D, T, H 박테리아 및 모세 혈관 확장성 운동실조증 인간 세포주)를 사용하여 증가시킬 수 있다.

세포가 전파되고 재조합이 일어나는 시간은 세포 종류에 따라 물론 다르지만, 일반적으로 작은 재조합도를 통해서도 출발 물질에 대한 다양성을 실질적으로 증가시킬 수 있기 때문에 중요한 것은 아니다. 재조합 유전자를 포함하는 플라스미드를 보유한 세포는 목적 기능에 대해 선별하거나 선택한다. 예컨대, 개량되는 기질이 약물 내성 유전자를 포함한다면 선택은 내약성에 대하여 실시할 것이다. 선별이나 선택에서 생존하는 세포는 선별/선택과 후속 재조합을 1회 이상 반복하거나 추가 재조합 과정으로 직접 처리할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "선별"이란 선별의 한 형태로서 "선택"을 포함하는 것으로 기재하였다.

후속 재조합 과정은 이전 과정과 달리 여려가지 상이한 방식으로 실시할 수 있다. 예컨대, 단순히 전술한 바와 같은 플라스미드의 전기침투 또는 접합 매개의 세포내 전이를 재개하여 추가 재조합을 실시할 수 있거나, 또는 이전 기질과 동일하거나 상이한 새 기질을 사용하여 상기 선택/선별에서 생존한 세포를 형질감염시킬 수도 있다. 선택적으로, 새 기질은 본래의 플라스미드와 다른 불화합성 군 유래이고(또는) 상이한 선택성 마커를 보유하는 플라스미드 벡터에 병합시킨다. 다른 양태로서, 선택/선별에서 생존한 세포는 2가지 아집단으로 분류할 수 있고, 1가지 아집단에서 얻은 플라스미드 DNA로 다른 아집단에서 얻은 플라스미드 DNA를 형질감염시키면 두 아집단의 플라스미드 유래의 기질은 추가 재조합이 일어난다. 이 2가지 방법 중 어느 방법에서든지 개량율은 전술한 바와 같이 DNA 추출, 전기침투, 접합 또는 돌연변이 세포를 이용하면 증가될 수 있다. 또 다른 변형예로서, 선별/선택에서 생존한 세포 유래의 DNA를 추출한 뒤 시험관내 반복적 서열 재조합을 실시할 수도 있다.

2차 재조합 후 2차 선별/선택을, 바람직하게는 염증도가 증가된 조건하에서 실시한다. 필요하다면, 추가 재조합과 선별/선택을 2차 시기의 경우와 동일한 전략으로 실시할 수 있다. 재조합 및 선택/선별을 연속 실시함으로써 생존한 재조합 기질은 개량되어 목적하는 표현형을 얻게 된다. 일반적으로, 이와 같은 반복적 재조합 방법과 기타 다른 방법에서 목적하는 표현형을 획득한 최종 재조합 생성물은 출발 기질과 위치

0.1% 내지 25%에서 상이하고 개량율도 선천성 획득 돌연변이율인 세대당 10⁻⁹ 위치당 약 1개의 돌연변이 [Anderson et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 93:906-907(1996)]로 나타나는 개량율보다 훨씬 큰 등급(예컨대, 최소 10배, 100배, 1000배 또는 10000배)으로 개량되었다. "최종 생성물"은 "셔플링된" DNA의 이용에 보다 바람직한 다른 숙주로 전이시킬 수 있다. 이것은 보다 바람직한 숙주가 이.콜리와 같은 다른

미생물이 이용 가능한 분자생물학이나 유전자 기법의 부족으로 인하여 복수의 돌연변이/재조합 과정에 대한 숙주로서 효과적이지 못한 경우에 특히 바람직하다.

2. 바이러스-플라스미드 재조합

또한, 플라스미드-플라스미드 재조합에 사용된 전략은 바이러스-플라스미드 재조합, 보통 파지-플라스미드 재조합에도 사용할 수 있다. 하지만, 바이러스의 이용에 특별한 몇몇 부가 설명도 적당하다. 재조합의 초기 기질은 플라스미드 및 바이러스 벡터 모두에 클로닝된다. 일반적으로, 어떤 기질이 바이러스 벡터에 삽입되어야 하고 플라스미드에 삽입되어야 하는지는 중요하지 않지만 바이러스 벡터는 플라스미드는 다른 기질을 병합시키는 것이 좋다. 전술한 바와 같이 플라스미드(및 바이러스)는 선택성 마커를 포함하는 것이 일반적이다. 플라스미드 및 바이러스 벡터는 전술한 바와 같이 형질감염을 통해 세포 종으로 도입시킬 수 있다. 하지만, 보다 효과적인 절차는 세포를 플라스미드로 형질감염시키고, 형질감염체를 선택하고, 형질감염체를 바이러스로 감염시키는 것이다. 많은 바이러스의 감염 효율은 100% 세포에 가깝기 때문에 이 경로를 통해 형질감염되고 감염된 세포 대부분은 플라스미드 및 다른 기질을 보유한 바이러스를 포함한다.

플라스미드와 바이러스 간에는 동종 재조합이 일어나 재조합된 플라스미드와 재조합된 바이러스를 생성한다. 세포내 DNA가 2본쇄 형태 및 1본쇄 형태로 존재하는 사상 파지와 같은 일부 바이러스의 경우에는, 두 형태 모두 재조합에 참여할 수 있다. 이 바이러스가 세포를 급사시키지 않는다면 전기침투나 접합을 사용하여 세포간 플라스미드를 전이시킴으로써 재조합을 보강할 수 있다. 또한, 재조합은 일부 바이러스 종류에서 한 세포의 후대 바이러스를 사용하여 다른 세포를 재감염시키므로써 보강될 수 있다. 일부 바이러스 종류에 있어서 바이러스 감염된 세포는 중감염에 대해 내성을 나타낸다. 하지만, 이와 같은 내성을 중감염에 대한 내성이 감소된 바이러스의 돌연변이 균주를 사용하고(또는) 높은 다중도로 감염시키면 극복될 수 있다.

플라스미드 함유 세포를 바이러스로 감염시킨 결과는 바이러스의 성질에 따라 다르다. 사상 파지와 같은 일부 바이러스는 세포 중의 플라스미드와 안정적으로 공존하고, 또 후대 파지를 세포로부터 배출하기도 한다. 코스미드 계놈을 가진 랍다와 같은 기타 다른 바이러스는 후대 비리온을 생성함이 없이 플라스미드처럼 세포 중에 안정하게 존재할 수 있다. T 파지 및 용균성 랍다와 같은 기타 다른 바이러스는 플라스미드와 재조합하나, 궁극적으로 숙주 세포를 죽이고 플라스미드 DNA를 파괴시킨다. 숙주를 죽이지 않고 세포를 감염시키는 바이러스의 경우 재조합 플라스미드와 바이러스를 함유하는 세포는 플라스미드-플라스미드 재조합에서와 동일한 방법을 사용하여 선별/선택할 수 있다. 또한, 선택/선별을 통해 생존한 세포에서 압출된 후대 바이러스를 수집하여 후속 재조합 과정의 기질로서 사용할 수 있다. 숙주 세포를 죽이는 바이러스의 경우 재조합으로 생긴 재조합 유전자는 후대 바이러스에만 존재한다. 선별이나 선택 분석법이 세포 중에서의 재조합 유전자 발현을 필요로 하는 경우 재조합 유전자는 후대 바이러스로부터 다른 벡터, 예컨대 플라스미드 벡터로 전이되어야 하고, 선택/선별을 수행하기 전에 세포의 재감염에 이용되어야 한다.

사상 파지의 경우 재조합 생성물은 재조합에서 생존한 세포 및 이 세포로부터 압출된 파지중에 존재한다. 이와 같은 재조합 생성물의 이중 공급처는 플라스미드-플라스미드 재조합에 비해 선택 사항을 제공한다. 예컨대, 시험관내 재조합 단계에 사용하기 위하여 DNA를 파지 입자로부터 분리할 수 있다. 또는, 후대 파지를 사용하여 이전 선별/선택시 생존한 세포를 형질감염 또는 감염시키거나 또는 새 재조합 기질로 형질감염된 새 세포를 형질감염 또는 감염시킬 수 있다.

3. 바이러스-바이러스 재조합

상기 플라스미드-플라스미드 및 플라스미드-바이러스 재조합에 대하여 기재한 원리는 몇몇 변형을 제외하고는 바이러스-바이러스 재조합에도 적용할 수 있다. 이 재조합의 1차 기질은 바이러스 벡터에 클로닝시킨다. 일반적으로, 모든 기질에 대해 동일한 벡터를 사용한다. 바이러스는 천연적으로 또는 돌연변이의 결과로서 세포를 죽이지 않는 것이 바람직하다. 삽입후, 일부 바이러스 계놈은 시험관내에서 또는 포장용 세포주를 사용하여 포장할 수 있다. 포장된 바이러스는 세포 감염에 높은 다중도로 사용하면 세포가 여러 기질을 보유한 복수의 바이러스를 수용할 수 있는 가능성이 증가된다.

1차 감염 후, 후속 단계는 이전 문항에서 논한 바와 같은 감염의 성질에 따라 달라진다. 예컨대, 바이러스가 랍다 코스미드 또는 M13, F1 또는 Fd 파지미드와 같은 파지미드(Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press, 1987) 계놈을 보유하는 경우, 파지미드는 세포 내의 플라스미드처럼 작용하여 세포 내에서 단순히 전파하므로써 재조합될 수 있다. 재조합은 세포내 DNA의 1본쇄 형태간 재조합이 특이 효과적이다. 재조합은 세포의 전기침투를 통해 보강될 수 있다.

선택/선별 이후, 재조합 유전자를 함유하는 코스미드는 예컨대 \cos^- 용원성 숙주 세포의 가열 유도 또는 표준 절차에 의해 DNA 추출을 통해 생존 세포로부터 회수할 수 있고, 그 다음 시험관내에서 코스미드 DNA를 재포장할 수 있다.

바이러스가 사상 파지인 경우, 복제형 DNA의 재조합은 감염 세포의 배양물을 전파시키면 일어난다. 재조합 유전자를 가진 바이러스 벡터를 포함하여 개선된 성질을 보유한 세포의 클로니와, 이 세포로부터 압출된 감염성 입자(즉, 파지 또는 포장된 파지미드)를 동정한다. 후속 단계들은 플라스미드-바이러스 재조합의 경우와 대부분 동일하다.

4. 염색체 재조합

이 방식은 특히 염색체 기질을 개량하는데 사용할 수 있다. 특히, 하나의 표현형에 대하여 많은 염색체 유전자가 관여하거나 개량될 염색체 유전자의 정확한 위치를 알지 못하는 경우에 바람직하다. 1차 재조합 기질은 플라스미드 벡터에 클로닝한다. 개량될 염색체 유전자를 알고 있다면 기질은 고도의 서열 동일성을 나타내지만 염색체 유전자와 약간의 다양성을 보유한 서열 군으로 구성한다. 개량될 염색체 유전자의 위치가 밝혀지지 않은 경우 1차 기질은 소수 분절만이 개량될 유전자와 서열 동일성을 나타내는 DNA 분절의 라이브러리로 구성하는 것이 일반적이다. 플라스미드계 기질과 염색체 유전자 간의 다양성은 돌연변이

유발법으로 유도하거나 염색체를 보유하는 세포와는 다른 종류의 플라스미드계 기질을 얻어서 유도할 수 있다.

재조합에 이용되는 기질을 보유한 플라스미드를 사용하여 개량될 염색체 유전자를 보유한 세포를 형질감염시킬 수 있다. 개량은 이 배양물을 단순히 전파시키므로써 실시할 수 있으며, 접합이나 전기침투에 의해 세포간 플라스미드 전이를 실시하면 가속화될 수 있다. 또한, 돌연변이 숙주 세포를 사용하거나 또는 개량될 비돌연변이 숙주 세포의 배양물을 돌연변이 숙주 세포와 함께 접종한 뒤 전기침투 또는 접합에 의해 플라스미드의 세포내 전이를 유도하여 개량을 더욱 가속화할 수 있다. 접종에 사용된 돌연변이 숙주 세포는 개량되는 비돌연변이 세포의 순수 배양물을 용이하게 분리하기 위한 음성 선택성 마커를 포함하는 것이 바람직하다. 선택/선별을 통해 목적 기능을 획득하여 개량된 플라스미드 및/또는 염색체 보유 세포를 동정한다.

후속되는 재조합과 선택/선별 과정은 플라스미드-플라스미드 재조합에서 기재한 바와 유사한 방식으로 진행한다. 예컨대, 추가 재조합은 플라스미드의 전기침투 또는 접합 전이와 함께 재조합에서 생존한 세포를 전파시켜 실시할 수 있다. 또는, 재조합에 이용가능한 다른 기질을 보유한 플라스미드를 생존 세포 종으로 도입시킨다. 이와 같은 플라스미드는 상이한 불화합성 군 유래이고 원 플라스미드와 다른 선택성 마커를 보유하여 2 이상의 상이한 플라스미드를 포함한 세포의 선택이 가능하도록 한다. 다른 양태로서, 생존 세포의 아침단으로부터 플라스미드 및/또는 염색체 DNA를 분리하여 제2 아침단을 형질감염시킬 수 있다. 염색체 DNA는 형질감염 이전에 플라스미드 백터에 클로닝한다.

5. 바이러스-염색체 재조합

전술한 다른 방법에서와 같이, 바이러스는 일반적으로 세포를 죽이지 않는 것이고, 파지 또는 파지미드인 경우도 있다. 이 절차는 실질적으로 플라스미드-염색체 재조합의 경우와 동일하다. 재조합 기질은 백터에 클로닝한다. 그 다음 기질을 포함하는 백터를 사용하여 세포를 형질감염시키거나 또는 시험관내 포장한 뒤 감염으로 세포 종으로 도입시킨다. 바이러스 계놈은 배양물을 단순히 전파시키면 숙주 염색체와 재조합한다. 개량은 전기침투를 통해 바이러스 계놈을 세포내 전이하거나 후대 비리온으로 세포를 재감염시키면 가속화될 수 있다. 그 다음 선별/선택을 통해 목적 기능의 획득으로 개량된 염색체 및/또는 바이러스 계놈을 가진 세포를 동정한다.

후속 재조합에는 여러가지 방식을 사용할 수 있다. 예컨대, 선별/재조합에서 생존한 세포간에 전기 침투를 통해 바이러스 계놈을 전이시킬 수 있다. 또는, 선택/선별에서 생존한 세포로부터 압출된 바이러스를 모으고 높은 다중도 세포를 중감염시키는데 사용한다. 또는, 재조합의 새 기질을 플라스미드 또는 바이러스 백터 상에서 세포 종으로 도입시킬 수 있다.

II. 반복적 서열 재조합법의 폴리펩티드 개량 용도

전술한 기법외에도, 폴리펩티드를 개량하기 위하여 상기 기법을 유리하게 추가 변형시킨 일부 양태에 대하여 설명하겠다. 이 방법은 "미립" 셔플링 및 "조립" 셔플링이라고도 한다. 조립 방법은 기질 핵산간 유전자 물질의 상당량을 교환하여, 기질을 따라 매우 불규칙하게 다양성을 제공하기 보다는 도메인, 제한단편, 돌연변이의 올리고 암호된 블록 또는 기타 다른 임의의 한정된 분절의 교환이나 치환으로 최종 재조합체 중의 다양성을 제한한다. 조립 셔플링과는 반대로, 미립 셔플링 방법은 코돈과 같은 단 분절 내에서 다중 과돌연변이를 비롯하여 근연성이 매우 큰 소정 돌연변이 군의 모든 가능한 재조합 또는 과돌연변이를 생성한다.

일부 양태에서, 조립 또는 미립 셔플링 기법은 핵산 서열내의 모든 가능한 돌연변이를 소모적으로 조사하는 방식으로 실시되지 않는다. 오히려, 이 기법은 공지 서열이나 구조 정보를 기초로 하여 유전자내에서 가능한 변화의 샘플을 제공하는데 유용하다. 샘플의 크기는 일반적으로 선별 또는 선택 방법의 성질에 따라 결정한다. 예컨대, 96웰 미량역가 평판에서 선별하는 경우에는 선별의 편리성을 위해 상기 미량역가 평판에 사용되는 재조합 라이브러리의 크기는 약 100으로 제한하는 것이 바람직하다.

본 명세서에 기재된 기법은 특히 유전자계에 속하는 유전자의 뉴클레오티드 서열내 천연 발생의 차이를 통해 뉴클레오티드 서열내 다양성이 전부 또는 일부 제공된 유전자계 유래의 유전자 재조합에 유용하다.

본 명세서에 사용된 "유전자계"란 인터페론이나 인터루킨(이것에 국한되는 것은 아님)과 같이 기능이 유사한 유전자, 즉 공통 조상으로부터 계대에 의해 유도된 것으로 생각되는 유전자, 및 4종 나선 다발 단백질과 같이 구조적으로 동종인 단백질을 암호하는 유전자를 포함하는 것이다.

따라서, 예컨대 DNA 또는 단백질 서열은 쟁버그와 레셀[Schomburg and Lessel, Bioinformatics: From Nucleic Acids and Proteins to Cell Metabolism, October 9-11, 1995, Braunschweig, Germany]에 의해 생물정보학의 모노그래프에 기재된 바와 같은 컴퓨터 알고리듬으로 정렬할 수 있다. 이 알고리듬은 두 서열이나 서열의 준도메인이 공통 조상으로부터 계대되어 서로 관련이 있을 수 있는 가능성을 측정할 수 있다. 공통 조상으로부터 계대하여 유래된 것으로 판단되는 서열은 "동종 유전자계"를 포함하고, DNA 셔플링을 사용하면 이 유전자계의 개량을 가속화할 수 있다.

또한, 유사 단백질 폴드에서는 많은 독특한 단백질 서열이 일치하고, 이와 같은 서열계는 "구조적으로 동종"인 유전자계를 포함한다고 할 수 있다. 이와 같은 과의 예는 4종 나선 다발 단백질의 상과이다. 이것은 시토킨에서부터 이 폴드를 가진 DNA 결합 단백질에 대한 효소에 이르기까지 가능적으로 매우 다양한 단백질의 매우 큰 과이지만, 이 단백질이 공통 조상에서 유래될 것 같지 않다. 하지만, 이들은 유사 단백질 폴드를 갖기 위해 "수렴적으로 개량된" 것이라는 가능성이 더 크다. 현재 목적 단백질 폴드를 가진 단백질을 디자인할 수 있는 기능적 알고리듬[Dahiyat et al., Science 278:82-87(1997)]이 알려져 있으며, 이 알고리듬은 예컨대 공지 천연 단백질과 1차 서열에 관련성이 없는 아연 핑거 모티프를 디자인하는데 사용되고 있다.

A. 돌연변이를 재조합하기 위한 제한 효소 부위의 이용

일부 경우에는 당해의 핵산 서열에 존재하는 돌연변이들의 재조합을 유도하기 위하여 핵산 중에 제한 효

소 부위를 사용하는 것이 바람직하다. 이 기법은 특히 반복 DNA 또는 기타 다른 문제시되는 1차 서열 모티프의 존재로 인하여 종래 방법에 의해 용이하게 셔플링될 수 없는 단편의 개량에 매우 바람직하다. 또한, 이 기법은 크기 때문에 쉽게 셔플링 및 "PCR 증폭"될 수 없는 유전자 클러스터와 같은 대형 단편(일반적으로 10 kb 이상)을 셔플링하는데 바람직하다. 50 kb 이하의 단편들은 PCR에 의해 증폭되는 것으로 보고되었지만[Barnes, Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A) 91: 2216-2220(1994)] 10 kb 이상의 단편에서는 문제가 나타나, 10 내지 50 kb 및 그 이상의 범위에 속하는 DNA의 셔플링에 대한 대안적인 방법이 요구되었다. 사용된 제한 효소는 제II형(Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press, 1987)에 속하는 것이 바람직하며, 이 중에서 Alw_nI, Sfi I 또는 BstX1과 같이 비팔린드롬형 점착성 말단의 오버행을 생성하는 것이 특히 바람직하다. 이 효소들은 DNA 리가제에 의해 효과적으로 순차 재조합할 수 있는 비팔린드롬형 말단을 생성한다. 일반적으로, 제한 효소(또는 엔도뉴클레아제) 부위는 종래 제한 효소 지도화 기법(Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press, 1987), 그 유전자에 대한 서열 정보의 분석 또는 합성에 의해 핵산 서열 중으로 바람직한 제한 부위의 도입(즉, 침목 돌연변이 도입)에 의해 확인한다.

분해될 DNA 기질 분자는 플라스미드 제조물과 같이 생체내 복제된 DNA 유래이거나 또는 바람직한 제한 효소 인식 부위를, 바람직하게는 그 단편의 말단 부근에 보유한 PCR 증폭된 핵산 단편에서 유래될 수 있다. 일반적으로, 각각 1개 이상의 돌연변이를 가진 당해 유전자의 2 이상의 변형체를 당해의 핵산 서열내에서 절단이 일어나는 것으로 측정된 1종 이상의 제한 효소를 사용하여 분해한다. 그 다음 제한 단편을 DNA 리가제와 결합하여 셔플링 영역을 가진 총길이 유전자를 생성한다. 셔플링된 영역의 수는 당해의 핵산 서열내의 절단 수에 따라 달라진다. 셔플링된 분자는 전술한 바와 같이 세포 중으로 도입한 후 목적 성질을 가진 것을 선별하거나 선택할 수 있다. 그 후, 목적 성질을 가진 푸울(라이브러리)이나 클론으로부터 핵산을 분리할 수 있으며, 목적하는 개량도가 얻어질 때까지 동일 절차로 처리한다.

일부 양태에서는 1개 이상의 DNA 기질 분자 또는 이의 단편을 분리하여 돌연변이유발법으로 처리한다. 일부 양태에서는 재결합된 제한 단편의 푸울이나 라이브러리를 돌연변이유발법으로 처리한 다음 분해-결합 과정을 반복한다. 본 명세서에 사용된 "돌연변이유발법"이란 용어는 PCR 돌연변이유발법, 올리고뉴클레오티드 지시성 돌연변이유발법, 부위 지시성 돌연변이유발법 등과 본 명세서에 기재된 임의의 기법에 의한 반복적 서열 재조합과 같이 당해 기술 분야에 공지된 기법을 포함한다.

이와 같은 방식이 이용되는 한 예는 폴리케티드 클러스터의 조작에 사용되는 것이다. 폴리케티드 클러스터(Khosla et al., TIBTECH 14, September 1996)는 일반적으로 길이가 10 내지 100 kb이고, 거대 다효소 복합체로 어셈블리하는 복수의 큰 폴리펩티드이다. 이 복합체의 단위 성질과 생합성 경로의 단위 성질로 인해 단백질 단위를 암호하는 핵산은 여러 폴리케티드 클러스터간에 교환되어 신규하고 기능적인 키메라 폴리케티드를 생성할 수 있다. 전술한 기법을 사용하여 핵산 분절의 교환을 조작하기 위하여 폴리펩티드 내에 유전자조작된 인트론이나 폴리펩티드간 비필수 부위에 SfiI(8개 염기 인식, 비팔린드롬형 오버행)과 같은 희귀 제한 효소를 도입하므로써 "핸들"을 제공한다.

B. 재조립 PCR

핵산 서열내 돌연변이를 반복적으로 재조합하기 위한 다른 기법으로 "재조립 PCR"을 이용한다. 이 방법은 유전자와 같은 총 길이 핵산 주형으로 별도로 개량된 복수의 분절을 조립하는데 사용할 수 있다. 이 기법은 종래 연구를 통해 유리한 돌연변이체의 푸울이 알려져 있거나 또는 당해 기술 분야에 공지된 돌연변이 유발법, 예컨대 PCR 돌연변이유발법, 카세트 돌연변이유발법, 침지된 올리고 돌연변이유발법, 화학적 돌연변이유발법 또는 돌연변이 균주에서 생체내 DNA 주형의 전파 등에 의해 작제될 수 있는 돌연변이체를 선별하여 동정되는 경우 실시한다. 당해의 핵산 서열의 분절을 규정짓는 경계는 유전자간 영역, 인트론 또는 당해의 돌연변이를 보유할 것 같지 않은 유전자 영역에 존재하는 것이 바람직하다. 당해의 핵산 서열의 분절을 PCR 증폭하기 위하여 올리고뉴클레오티드 프라이머(올리고)를 합성하고, 이때 올리고뉴클레오티드의 서열은 두 분절의 접합부가 중첩되도록 만든다. 중첩 영역은 일반적으로 약 10 내지 100 뉴클레오티드 길이인 것이 보통이다. 각 분절은 상기 프라이머 세트를 사용하여 증폭시킨다. 그 다음 PCR 생성물을 상기 IA항 내지 IB항에서 사용된 것과 같은 어셈블리 프로토콜에 따라 "재어셈블리"하여 무작위로 단편화된 유전자를 어셈블리한다. 간략히 요약하면, 조립 프로토콜에서 먼저 PCR 생성물을 예컨대 겔 전기영동이나 크기 배제 크로마토그래피를 통해 프라이머로부터 정제한다. 정제된 생성물을 함께 혼합하고, 폴리머라제와 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트(dNTP)와 적당한 완충 염의 존재하에 부가 프라이머 없이("자가 프라이밍") 변성, 재어닐링 및 신장을 약 1 내지 10회 실시한다. 이 유전자에 인접한 프라이머를 이용한 후속 PCR을 실시하여 완전하게 재어셈블리되고 셔플링된 유전자를 증폭시킨다. 이 방법은 "조립"법인 것이 필수적이며, 오페론내에 복수 유전자의 대립유전자 변형체를 재조합할 때와 같이 일부 연구에 유리한 블록식으로 돌연변이를 단지 재조합한다.

일부 양태에서, 최종적으로 재조합된 유전자는 공정을 반복하기 전에 돌연변이유발법으로 처리한다.

일부 양태에서는 프라이머 중에 우라실을 병입시킨 올리고뉴클레오티드를 PCR 증폭에 사용한다. 우라실은 일반적으로 올리고뉴클레오티드 중의 한 부위에 도입된다. 그 생성물을 우라실 글리코실라제로 처리하여, 1분쇄 오버행을 만들고, 라시치안[Rashtchian, Current Biology, 6:30-36(1995)]에 의해 개시된 바와 같은 방법으로 일정 순서의 방식으로 재조립한다.

또 다른 양태로서, 당해의 핵산 서열의 분절을 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 다음과 같이 당해의 유전자에 변형을 도입하는데 사용한다. 핵산 서열내 당해 부위에 형성된 돌연변이는 핵산 서열의 동족체를 선별 또는 선택하고 서열분석하는 등의 방법으로 동정한다. 그 다음, 바람직한 부위에서 야생형 또는 돌연변이 정보를 암호하는 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머를 합성한다. 그 후, 이 프라이머를 PCR 돌연변이유발법에 사용하여 지정 위치에 야생형 및 돌연변이 정보의 과돌연변이를 암호하는 총 길이 유전자의 라이브러리를 생성한다. 이 기법은 일반적으로 선별이나 선택 과정에 있어 당해의 돌연변이 유전자를 서열분석하고 돌연변이원성 올리고뉴클레오티드를 합성하는데 드는 비용에 비하여 높은 비용이 들거나, 조작이 곤란하거나 또는 비현실적인 경우에 유리하다.

이 방법의 일예는 이하 설명된 바와 같은 개선된 Taq 폴리머라제의 개량이다. 이 방법을 사용하여 얻은 돌연변이 단백질은 서열분석 반응으로 동정하고 분석하여 개선된 서열 성질을 가진 돌연변이체를 확인한

다. 이것은 일반적으로 선별 후 소수, 예컨대 약 2 내지 100개의 추가 평가용 후보 재조합체를 얻기 위한 고처리율 방식[예컨대, Broach et al. *Nature* 384(Supp): 14-16(1996)]으로 실시한다. 그 다음 이 돌연변이 유전자를 서열분석하여 돌연변이의 위치에 관한 정보를 제공한다. 이와 같은 정보로부터 해당 돌연변이원성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 합성하고, 전술한 바와 같은 재어셈블리 반응에 사용하여 유전자당 평균적으로 많은 돌연변이를 가진 라이브러리를 효과적으로 생성한다. 이 프로토콜을 1회 이상 실시하면 Taq 폴리머라제의 개선된 변형체에 대하여 효과적으로 연구할 수 있다.

C. 돌연변이 서열 정보의 증량

본 발명의 일부 양태에 있어서, 전술한 바와 같은 재조합 반응은 복수의 돌연변이 스펙트럼, 즉 가능한 돌연변이 조합이 보다 효과적으로 샘플링되도록 돌연변이 서열을 증량시킨다. 개선된 활성이 있으며, 각 클론이 핵산 서열 중의 여러 위치에 단일 점 돌연변이를 보유한 돌연변이 클론의 수(n)가 얻어진다고 가정하자. 이와 같이 핵산 서열마다 당해의 돌연변이를 평균 1개 가진 돌연변이 클론 군을 그 다음 재조합 반응으로 처리하면, 최종적으로 얻어지는 개체는 포이송(Poisson) 분포로 규정되는 바와 같이 핵산 서열 당 목적 돌연변이를 평균 1개 보유하면서 복수의 돌연변이 스펙트럼은 비교적 감소될 것이다.

돌연변이를 2개 이상 가진 재조합체를 동정하는데 요구되는 선별의 양은 다음과 같은 기법으로 급감시킬 수 있다. 돌연변이 클론 푸울로부터 당해의 핵산 서열을 얻고, 일반적으로 제한 효소 분해, 초음파 또는 PCR 증폭을 통해 단편으로 제조한다. 이 단편을 변성시키고, 그 다음 재어닐링하여 돌연변이체의 한 가닥이 다른 돌연변이체 또는 야생형 클론의 상보적 가닥과 하이브리드한 부정합 하이브리드를 만든다. 재어닐링된 생성물을 그 다음 예컨대 DNaseI을 사용하여 약 20 내지 100 bp의 단편으로 단편화한다. 이 단편화 반응은 야생형 서열을 암호하는 영역으로부터 부정합(돌연변이 정보)을 포함하는 주형의 영역을 분리하는 효과를 갖고 있다. 이 부정합 하이브리드는 그 다음 부정합 DNA에 결합하는 암타머(aptamer), 염료 또는 기타 다른 제제를 사용하여 친화성 정제할 수 있다. 바람직한 양태는 어셈블리 반응 이전에 시험관내에서 친화성 정제된 물질을 증폭시키는 바람직한 단계가 있는 mutS 단백질 친화성 매트릭스[Wagner et al., *Nucleic Acids Res.* 23(19):3944-3948(1995); Su et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A)* 83:5057-5061(1986)]를 사용하는 것이다. 이 증폭 물질은 그 다음 전술한 바와 같이 어셈블리 PCR 반응으로 처리한다. 경우에 따라, 이 물질은 본래의 돌연변이 푸울에 대한 역가를 측정하여(예컨대, mutS 증폭 푸울의 약 100% 내지 10%), 다음 재조합 단계 중의 클론 당 평균 돌연변이 수를 조절할 수 있다.

이 방법이 사용되는 또 다른 예는 관련 종의 동종 유전자 간 차이 또는 천연이거나 선택된 대립유전자 변형체로서 발생하는 다형성 염기를 증폭시키는 유전자 작제물의 어셈블리에 관한 것이다. 예컨대, 식물은 당해의 형질(예컨대, 가뭄 내성)에 유전성 변형을 가진 것으로 생각되는 여러 변종이 나타날 수 있다. 그 다음 한 유전자당 많은 돌연변이를 포함하는 이 변형 유전자의 라이브러리를 작제하는 것이 바람직하다. 본 명세서에 기재된 조립 기법과 함께 MutS 선택을 이용하면 다형성("돌연변이") 정보가 고도로 증량된 재조합 푸울을 얻을 수 있다. 일부 양태에서는 재조합 유전자 푸울을 돌연변이 숙주에 제공한다. 재조합체는 개선된 표현형을 가진 것으로 측정된 돌연변이 유기체 유래의 돌연변이 유전자를 PCR 증폭하고, 추가 개량하기 위하여 본 발명에 기재된 방식을 적용하면 더욱 개량될 수 있다.

D. 인트론 지시성 재조합

일부 경우에서 재조합의 기질 분자는 상동성이 균일하게 적고, 산발적으로 분포된 영역을 보유하거나 또는 상동성의 영역이 파지에서 발현되는 패티드 리간드와 같이 비교적 작다(예컨대, 약 10 내지 100 bp). 이 요인은 RSR에서의 재조합의 효율과 무작위도를 감소시킬 수 있다. 이 문제는 본 발명의 일부 양태에서 단백질 동족체를 암호하는 서열 중의 암호 엑손 사이에 인트론을 도입하면 해결된다. 본 발명의 또 다른 양태에도 인트론을 사용할 수 있다[Chong et al., *J.Biol.Chem.*, 271:22159-22168(1996)].

이 방법에서, 유전자 또는 유전자계와 같은 핵산 서열은 분절을 보유하도록 임의로 한정한다. 이 분절은 엑손이 바람직하다. 인트론은 분절 사이에 조작된다. 제1 분절과 제2 분절 사이에 삽입된 인트론은 제2 분절과 제3 분절 사이에 삽입된 인트론과 최소 약 10%의 다양성이 있고, 제2 분절과 제3 분절 사이에 삽입된 인트론은 이전 분절상 사이에 삽입된 인트론과 최소 약 10%의 다양성이 있으며, 기타 분절 n과 n+1의 경우에도 마찬가지이다. 따라서, 소정 엑손 세트 사이에 존재하는 인트론은 처음에는 라이브러리 중의 모든 클론간에 동일할 수 있는 반면, 엑손은 서열에 임의의 다양성이 있을 수 있다. 따라서, 인트론으로는 본 명세서에 기재된 임의의 RSR 방법에 적용할 수 있는 상동성 DNA 서열을 제공하고, 이에 반해 엑손은 서열이 임의적으로 작거나 상이하여 재조합 효율의 유의적인 손실 없이도 개량되어 임의의 서열 다양성을 상당량 제공할 수 있다. 또한, 당해의 인트론계 핵산 서열에 제한 부위를 유전자 조작하여 제한 단편을 일정 방향으로 재어셈블리할 수 있다. 출발 엑손 DNA는 서열 정보로부터 새로 합성하거나 또는 임의의 핵산 재조물(예컨대, 게놈, cDNA, 라이브러리 등)로부터 얻을 수 있다. 예컨대, 1 내지 10개의 비상동성 인트론을 디자인하여 이 인트론을 엑손 사이에 배치하여 당해의 핵산 서열의 재조합을 유도할 수 있다. 인트론 서열은 그 전 서열이나 일부 서열이 공지 인트론 서열로부터 얻어질 수 있다. 인트론은 자가 접목성인 것이 바람직하다. 일정 순서의 인트론 세트와 엑손 라이브러리는 표준 방법을 통해 기능적 유전자로 어셈블리한다[Sambrook et al., *Molecular Cloning*, CSH Press(1987)].

본 명세서에 기재된 시험관내 또는 생체내 재조합 방식들은 반복적 엑손 셔플링에 사용할 수 있다. 바람직한 방식은 셔플링을 촉진하기 위하여 인트론 서열에 배치된 SfiI과 같은 비필린드롬형 제한 부위를 사용하는 것이다. 선택된 클론의 푸울은 SfiI로 절단하고 재결합한다. 비필린드롬형 오버행은 셔플링된 엑손이 일정 순서로 재조립되도록 촉진한다. 이 유전자의 라이브러리를 발현시켜 목적 성질의 유전자를 선별한 다음, 상기 공정을 이용하여 재조합을 더 반복한다. 일부 양태에서는 공정을 반복하기 전 라이브러리를 돌연변이 유발법으로 처리하기도 한다.

포유류 라이브러리 방식으로 인트론을 도입하는 방식이 유리하게 사용된 예는 다음과 같다. Iox[(Sauer et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A)*, 85:5166-5170(1988))] 부위를 함유하는 인트론은 각 알파 인터페론 양친 기질 종의 아미노산 92와 93 사이에 임의 도입시킨다. 두 엑손(잔기 1 내지 92 및 93 내지 167) 각각에 대해 10^4 키메라 인터페론 유전자 라이브러리를 제조하고, 이를 복제성 플라스미드 백터에 클로닝한

위 표적 세포 종으로 도입한다. 10⁴의 수는 선별시 편리한 것으로 임의 선택한 것이다. 포유류 세포종에서 발현되는 백터의 예는 SV40 오리진을 포함하여 숙주 세포가 SV40 대형 T 항원을 발현함으로써 인터페론 작제물을 일시 발현시키는 것이다. 이 세포에 인터페론 예방 분석법[예, Meister et al., J.Gen.Viro. 67: 1633-1643(1986)]에 사용되는 수포성 구내염 바이러스(VSV)와 같은 세포변성 바이러스를 항원투여한다. 인터페론의 발현으로 생존하는 세포를 회수하고, 인터페론 유전자의 2가지 라이브러리를 PCR 증폭시킨 다음 이 콜리 종에서 증폭될 수 있는 백터에 재클로닝한다. 그 다음 증폭된 플라스미드를 고다중도(예, 10⁶ 세포당 플라스미드 10 µg)로 사용하여 이 백터의 복제를 지지할 수 있는 cre 발현 숙주를 형질감염시킨다. 숙주 세포 중에 cre의 존재는 인터페론 인트론 내 lox 부위에 대한 효과적인 재조합을 촉진하고, 그 결과 소정의 액손 세트를 셔플링한다. 그 다음 이 세포 개체군을 바이러스 투여에 의한 2차 선별에 사용하고, 이 공정은 반복적으로 실시한다. 이 방식에서, cre 재조합효소는 숙주내에서 복제할 수 없는 동시형질감염된 분자에서 일시적으로 발현되는 것이 바람직하다. 따라서, cre 발현 플라스미드와 재조합체를 분리한 후에는 추가 재조합이 일어나지 않을 것이며, 따라서, 유전자적으로 안정한 액손과 돌연변이에 대한 선택을 실시할 수 있다. 이 방법은 인트론이 1개 이상인 경우, cre/lox 이외에 다른 재조합 향상 서열(예, int/xis 등)을 사용한 경우 및 레트로바이러스, 아데노바이러스, 또는 아데노 관련 바이러스(이것에 국한되는 것은 아님)와 같은 기타 다른 백터 시스템을 사용하는 경우 이용할 수 있다.

5. 합성 올리고뉴클레오티드 매개 재조합

1. 서열 간격 사이의 올리고 가교

본 발명의 일부 양태에서는 상동성이 약 80% 미만, 보다 일반적으로 약 50% 미만인 유전자 계의 성분과 같이 일군의 기질에 의해 제공된 서열 간격의 영역에 대한 연구가 요구된다. 유전자의 일부 또는 전체일 수 있는 이 영역은 임의로 분절로 표시한다. 이 분절의 경계는 대응하는 천연 액손에 따라, 구조적 고찰요인(루프, 알파 헬리스, 준도메인, 전체 도메인, 소수성 코어, 표면, 동적 모의부)에 근거하여, 유전자지도 데이터간의 상관관계에 근거하여 무작위로 선택할 수 있다.

일반적으로, 분절은 각 결합부에 "가교" 올리고뉴클레오티드의 푸울을 사용하여 PCR로 증폭시킨다. 따라서, 5개 유전자 세트가 3개의 분절 A, B 및 C로 나뉘고, 각 분절에 대해 5개의 변형체(A1, A2, ..., C4, C5)가 있다면 A-B 결합부 각 가닥에 대하여 각 가교 올리고가 A 분절 하나와 B 분절 하나에 대해 상동성이 있는 20개 염기를 가진 25개의 올리고뉴클레오티드가 만들어진다. 일부 경우에, 필요한 올리고뉴클레오티드의 수는 유전자계 구성원 중 일부 또는 전체 중에서 동일한 분절 경계를 선택하여 감소시킬 수 있다. B-C 결합부에 대해서도 올리고뉴클레오티드를 유사하게 합성한다. A 도메인 계열은 외측의 일반 A 프라이머와 A-B 접합부 올리고뉴클레오티드의 푸울을 이용하여 PCR로 증폭시키고, B 도메인은 A-B와 B-C 가교 올리고뉴클레오티드를 사용하고, C 도메인은 B-C 가교 올리고뉴클레오티드와 일반 외측 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 그 다음 PCR을 어셈블리하거나 전술한 dUTP/우라실 글리코실라제 방법을 사용하여 총 길이 유전자를 제조한다. 이 단계의 생성물은 선별 및 재조합 과정을 반복하기 전에 목적 성질에 대한 개량이나 개선이 바람직한 정도로 얻어질 때까지 돌연변이유발법으로 처리하는 것이 바람직하다. 이 바람직한 정도는 목적 성질과 단백질에 적당한 선별 또는 선택 방법을 사용하여 측정하는 것이 보통이다.

이 방법의 일예에 대해서는 이하 7가지 상동성 인간 알파 인터페론 유전자의 재조합에 대한 설명 부분에 예시한다.

2. 동족 돌연변이를 암호하는 올리고뉴클레오티드에 의한 부위 지시성 돌연변이(SDM) 및 후속적인 셔플링

본 발명의 일부 양태에서는, 당해의 소정 "양친" 서열에 1개 이상의 기질 서열의 서열 정보를 첨가하고, 그 후 선별 또는 선택 과정사이에 재조합을 실시한다. 일반적으로, 이 방법은 주형으로 하나의 기질을 사용하고 다른 기질 서열, 예컨대 동종 유전자에서 유래되고 1개 또는 복수의 돌연변이를 암호하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 당해 기술 분야에 공지된 기법[Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press(1987)]에 의해 수행되는 부위 지시성 돌연변이유발법으로 실시한다. 당해의 개선된 표현형에 대하여 선별 또는 선택한 후, 선택된 재조합체는 본 명세서에 기재된 RSR 기법으로 더 개량할 수 있다. 선별 또는 선택 후, 부위 지시성 돌연변이유발법은 동족 돌연변이를 암호하는 다른 올리고뉴클레오티드 수집물을 사용하여 다시 실시할 수 있으며, 이 방법은 목적 성질이 얻어질 때까지 반복한다.

두 동족체간의 차이가 코돈내 1개 이상의 단일 점 돌연변이인 경우에는 두 동족체의 서열을 암호하는 축퇴성 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 하나의 올리고는 이와 같은 많은 축퇴성 코돈을 포함할 수 있고, 따라서 이 서열 를록 상의 모든 과돌연변이를 철저하게 연구할 수 있다. 이 방법의 한 예로, 알파 인터페론 유전자의 개량에 대하여 이하에 제시한다.

동족체 서열 간격이 매우 큰 경우, 그 연구는 특정 변형체로 제한하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 예컨대 컴퓨터 모델링 기법[Lathrop et al., J.Mol.Biol., 255:641-665(1996)]을 사용하여 표적 단백질 상의 각 동족체 돌연변이를 모형으로 만들고 구조와 기능을 총괄적으로 통과시키는 것으로 예상되는 임의의 돌연변이를 분류한다.

F. 숙주 기작에 의해 유도되는 재조합

본 발명의 일부 양태에서는 세포 기작이 재조합을 유도하는 세포 종으로 DNA 기질 분자를 도입시킨다. 예컨대, 돌연변이체의 라이브러리를 작제하고, 본 명세서에 기재된 임의의 기법을 사용하여 개선된 표현형을 가진 돌연변이체에 대하여 선별하거나 선택한다. 최선의 시험군을 암호하는 DNA 기질 분자를 본 명세서에 기재된 임의의 방법으로 회수하고, 단편화한 뒤 포유류 숙주를 형질감염시키는데 사용한 다음 개선된 기능을 가진 것을 선별하거나 선택한다. DNA 기질 분자를 PCR과 같은 포유류 숙주로부터 회수하고, 이 방법을 목적하는 개선도가 얻어질 때까지 반복한다. 일부 양태에서, 이 단편은 형질감염에 사용하기 전에 변성한 뒤 재어닐링하고, recA와 같은 재조합 자극 단백질로 코팅하거나, 또는 Neo^R과 같은 선택성 마커와 함께 동시형질감염시킴으로써 목적 유전자의 재조합 변형체를 수용한 세포를 양성군으로 선택할 수 있게

된다.

예컨대, 이 방식은 RSR에 의한 항체의 생체내 친화성 성숙 조사시 바람직하다. 간략히 설명하면, 48G7 친화성 성숙에 대해 본 명세서에 기재된 바와 같이 돌연변이 항체의 라이브러리를 생성한다. 이 라이브러리를 최고 0.1 내지 10% 친화도를 가진 항체를 증량시킬 수 있는 리간드를 사용하여 FACS 정제한다. PCR로 V 영역의 유전자를 회수하고, 단편화한 뒤, 재조립된 V 영역의 유전자가 재조합할 수 있는 벡터로 동시형 질감염시키거나 전기침투시킨다. 동시형질감염된 세포로부터 DNA 기질 분자를 회수하고, 이 공정을 목적하는 개선도가 얻어질 때까지 반복한다. 다른 양태로는 전기침투 이전에 V 영역을 재어셈블리하여 본래의 V 영역 액손을 항체 발현 카세트에 재조합하는 것을 포함한다. 또 다른 양태로는 이 방식을 총 바이러스의 개량이나 기타 다른 진핵 유전자에 대하여 사용하는 것을 포함한다.

G. 파지미드에 의한 조립

본 발명의 일부 양태에서는 목적 유전자를 파지미드와 같은 1본쇄 DNA를 생성하는 벡터에 클로닝한다. 그 결과 생성되는 DNA 기질을 당해 기술 분야에 공지된 RSR로 돌연변이유발시키고, 숙주 세포를 형질감염시킨 뒤, 목적 성질이나 개선된 표현형을 가진 것을 선별 또는 선택한다. 선택 또는 선별된 파지미드 유래의 DNA를 예컨대 PCR 또는 플라스미드 제조물로 증폭시킨다. 이 DNA 제조물은 과돌연변이하고자 하는 각종 돌연변이 서열을 포함한다. 이 DNA를 단편화하고 변성한 뒤, 1본쇄 DNA(ssDNA) 파지미드 주형(야생형 유전자 및 벡터 서열을 암호하는 ssDNA)에 어닐링한다. 바람직한 양태는 ssDNA를 제조하기 위하여 CJ236[Sambrook et al., Molecular Cloning CSH Press(1987)]과 같은 dut(-)ung(-) 숙주 균주를 사용하는 것이다.

어닐링된 주형 중의 캡은 DNA 폴리머라제로 충전하고 결찰시켜 풀린 폐환 고리를 만든다. 복수의 단편은 파지미드에 어닐링할 수 있기 때문에 새로 합성된 가닥은 서플링된 서열로 구성된다. 이 생성물을 사용하여 dut+ung+인 이.콜리의 mutS 균주를 형질전환시킨다. 형질감염된 숙주로부터 파지미드 DNA를 회수하고 목적하는 개선도가 얻어질 때까지 이 프로토콜을 다시 실시한다. 회수한 파지미드 DNA의 라이브러리에서 목적 단백질을 암호하는 유전자는 이 공정을 반복하기 전 RSR을 비롯한 임의의 기법으로 돌연변이유발시킬 수 있다.

III. 개선된 단백질 발현

재조합 DNA 기법은 당해의 거의 모든 핵산 서열을 순수 분리하고 동종으로 다량 얻기에 가장 보편적인 방법으로 입증되어 왔지만 순수한 동종 단백질을 재조합 형태로 다량 생성하는데에는 유사한 보편성이 얻어지지 않았다. 그 이유는 단백질 발현, 풀딩, 국재화 및 안정성이 DNA 보다 본래 더 복잡하고 예측불가능하기 때문에 설명될 수 있다. 발현된 단백질의 수율은 전사율, 해독율, 리보솜과의 상호작용, 세포내 차폐로닌 및 기타 다른 단백질과 발생 폴리펩티드와의 상호작용, 올리고머율, 분비 및 기타 다른 단백질 유인 경로 중의 성분과의 상호작용, 프로테아제 민감성 및 최종 풀딩된 상태의 고유 안정성의 복합 기능이다. 이와 같은 복합 공정의 최적화는 RSR을 사용하는데 있어 매우 적합하다. 이하, RSR을 적용하여 단백질 발현을 최적화하는 전략에 대하여 상세히 설명하겠다.

A. 코돈 용법 라이브러리에 대한 RSR 후 개선된 발현율을 나타내는 돌연변이 유전자의 개량

이.콜리 숙주에서 재조합 단백질이 발현될 때 희귀 이.콜리 코돈에 의한 부정적인 효과에 대해서는 명백하게 입증되어 있다[Rosenberg et al., J.Bact. 175:716-722(1993)]. 하지만, 기능적 단백질을 최적 발현하기 위한 코돈 용법 패턴의 선택에 대한 일반 규칙은 아직 해명되지 않았다. 본 발명의 일부 양태에서는 유전자 코드의 축퇴에 근거하여 당해의 유전자에 사용된 코돈을 변화시키므로써 단백질 발현을 최적화하였다. 일반적으로, 이것은 축퇴성 올리고뉴클레오티드를 사용한 유전자 합성으로 실시한다. 일부 양태에서, 축퇴성 올리고뉴클레오티드는 당해의 단백질을 암호하는 DNA 기질 분자와 동일한 약 20개 뉴클레오티드, 그 다음 상기 단백질의 일정 영역을 암호하는 약 20개 축퇴성 뉴클레오티드 영역, 및 이어서 다른 동일한 약 20개의 뉴클레오티드 영역을 보유하는 것이 일반 구조이다. 바람직한 양태에서, 동일성 영역에는 숙주의 바람직한 코돈을 이용한다. 다른 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 최소한 하나의 5'뉴클레오티드 및 하나의 3' 뉴클레오티드가 DNA 기질과 동일하고, 축퇴성 코돈에 의한 차이를 보유하면서 DNA 기질 분자와 85% 이상의 서열 상동성을 갖기도 한다. 일부 양태에서는, 각 올리고뉴클레오티드가 다른 올리고뉴클레오티드와 일반식 n-10(여기에서 n은 올리고뉴크레오티드의 길이임) 만큼 중복되는 상기 축퇴성 올리고뉴클레오티드 세트가 사용된다. 이와 같은 올리고뉴클레오티드는 길이가 약 20 내지 1000개의 뉴클레오티드인 것이 일반적이다. 조립된 유전자를 그 다음 클로닝, 발현하고 발현이 개선된 유전자를 선별하거나 선택한다. 이와 같이 어셈블리된 유전자를 전술한 바와 같이 목적하는 개선도가 얻어질 때까지 반복적 재조합 방법으로 처리할 수 있다.

예컨대, 이 기법은 이.콜리내에서 능동 발현되는 소의 장 알칼리 포스파타제(BIAP)를 개량하는데 사용될 수 있다. 이 효소는 일반적으로 ELISA와 같은 분석 방식에서 리포터 유전자로서 사용된다. 이 클로닝된 유전자는 이.콜리와 같은 원핵 숙주에서 양호한 수율로 활성 형태로 발현될 수 없다. 이와 같은 발현계 개발을 통해 BIAP에 대한 저령한 발현 기법을 얻을 수 있고, 특히 개선된 활성이나 화학적 커플링 성질(예컨대 항체에 대한 화학적 커플링)을 가진 유전자조작된 변형체에 대한 저령한 발현 기법을 얻을 수 있다. 상세한 실시예는 이하 실시예에 부문에 기재하였다.

B. 풀딩 개선

본 발명의 일부 양태에서 이종 숙주에서 과잉발현 또는 발현될 때 당해의 단백질은 봉입체를 형성하며, 발현된 단백질의 대부분은 불용성 응집물을 발견된다. 반복적 서열 재조합 기법은 상기 표적 단백질의 풀딩을 최적화하는데 사용될 수 있다. 풀딩을 개선시키는 방법에는 당해의 표적 단백질을 변이 개량하고 차폐로닌 단백질을 개량하는 것을 비롯하여 여러가지 방법이 있다.

1. 표적 단백질의 개량

a. lac 두상부 이량체 융합 단백질을 이용한 봉입체 분획 선별

Iac 억제인자 "두상부 이량체"는 2개의 두상부 도메인을 포함하는 소단백질로서, 이 도메인들은 친화성 정제 방법[Gates et al., J.Mol.Biol. 255:373-386(1995)]을 통해 상기 단백질을 암호하는 플라스미드에 상기 두상부에 대한 폴리펩티드 융합체가 결합된 상태를 유지하기에 충분한 친화성으로 Iac 오퍼레이터에 결합하는 짧은 펩티드 링커에 의해 결합되어 있다. 이 성질을 다음과 같이 이용하여 폴딩성이 개선된 당해의 돌연변이 단백질을 개량할 수 있다. 당해의 단백질은 포유류, 효모, 박테리아성 등일 수 있다.

Iac 두상부 이량체와 표적 단백질 서열간의 융합 단백질은 예컨대 전술한 게이츠 문헌에 개시된 바와 같이 작제한다. 최소한 1개의 Iac 오퍼레이터를 포함하는 이 작제물을 당해 기술 분야에 통상적인 기법, 예컨대 PCR 돌연변이유발법, 화학적 돌연변이유발법, 올리고 자시성 돌연변이유발법[Sambrook et al., Molecular Cloning CSH Press(1987)]으로 돌연변이유발시킨다. 결과적으로 얻어지는 라이브러리를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시키고, 융합 단백질의 발현을 바람직하게는 아라비노스를 사용하여 유도한다. 이 작제물을 발현하는 라이브러리의 배양물로부터 추출물이나 용균물을 제조한다. 가용성 단백질/DNA 복합체로부터 원심분리 또는 친화성 크로마토그래피를 통해 불용성 단백질을 분획화하고, 가용성 단백질/DNA 복합체의 수율을 플라스미드의 정량적 PCR[Sambrook et al., Molecular Cloning CSH Press(1987)]로 정량한다. 모노클로널 항체 또는 천연 리간드와 같이 적당하게 폴딩된 단백질에 특이적인 시약을 사용하여 가용성 단백질/DNA 복합체를 정제하는 것이 바람직하다. 이 단계에서 플라스미드 DNA를 분리하고 RSR 처리한 뒤 다시 발현시킨다. 그 다음 가용성 단백질/DNA 복합체의 수율이 바람직한 개선도를 나타낼 때까지 상기 과정을 반복한다. 그 다음 각 클론에 대하여 효소 활성 등과 같은 당해의 단백질의 기능적 성질을 보유하는지 선별한다.

이 기법은 일반적으로 가용성 및 당해의 숙주 세포내에서 이종 발현되는 단백질의 세포 유인과 같은 기타 다른 성질을 개량하는데 일반적으로 유용하다. 예컨대, Iac 억제인자 두상부 이량체에 융합된 단백질의 효과적인 폴딩과 핵 국재화에 대한 선택은 SV40 복제 오리진과 Iac 오퍼레이터를 암호하는 플라스미드 상에서 상기 단백질을 암호화하고 T 항원을 발현하는 포유류 숙주 종에서 상기 융합 단백질을 순간 발현시켜서 실시할 수 있다. 핵 HIRT 추출물[Seed and Aruffo, Proc.Natl.Acad.Sci (U.S.A.), 84:3365-3369(1987)]로부터 단백질/DNA 복합체의 정제를 통해 효과적으로 폴딩되고 핵 국재화된 단백질을 선택할 수 있다.

b. 파지 표현에 의한 단백질의 기능적 발현

오늘 등[O'Neill et al., Current Biology, 5:443-449(1995)]에 의해 개시된 것과 같은 파지 표현 방법에서 종종 나타나는 문제는 파지에서 당해의 단백질이 기능적으로 발현하지 못하는 것에 관한 것이다. 어떤 이론에 한정하지 않아도 이 문제점의 원인은 당해의 단백질의 폴딩이 부적절하게 이루어지는데 있다. RSR은 당해의 단백질을 파지 상에서 기능적으로 발현하도록 개량하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 융합 단백질은 유전자 III 또는 유전자 VII와 표적 단백질 사이에 작제한 다음, 예컨대 PCR 돌연변이유발법으로 돌연변이유발시킨다. 이 돌연변이유발된 라이브러리를 그 다음 파지 표현 방식으로 발현시키고, 파지 스톡을 제조한 다음, 이 파지 중에서 표적 단백질에 대한 공자의 리간드를 함유하는 친화성 매트릭스를 사용하여 기능적으로 발현되는 융합 단백질을 보유한 파지를 선택한다. 기능적으로 선택된 파지 유래의 DNA를 절제하고, 당해의 표현된 유전자를 셔플링한 다음 파지 표현 방식으로 재클로닝한다. 선택, 셔플링 및 재클로닝 단계는 기능적으로 표현된 단백질을 가진 파지의 수율이 예컨대 리간드 친화성 매트릭스에 보유된 파지의 분획이나 표현된 파지와 관련된 생물 활성으로 나타나듯이 바람직한 정도에 도달할 때까지 반복한다. 각 클론을 그 다음 선별하여 발현성이 개선되고 바람직한 발현율을 나타내며, 당해의 기능적 성질(예, 리간드 또는 수용체에 결합하는 성질, 림포카인 활성, 효소 활성 등)을 보유한 후보 돌연변이체를 동정한다.

본 발명의 일부 양태에서는 기능적 선별이나 선택을 사용하여 파지 상에서 발현되지 않는 개량된 단백질을 동정한다. 당해의 숙주에서는 초기에 효과적으로 발현될 수 없는 표적 단백질을 돌연변이유발시ки고 기능적 선별이나 선택을 사용하여 기능적 단백질을 발현하는 세포를 동정한다. 예컨대, 당해의 단백질은 숙주 세포종의 기능을 보충하고, 비색 기질의 절단 등의 역할을 할 수 있다. 그 다음 반복적 서열 재조합을 사용하여 개선된 돌연변이체의 푸율로부터 개선된 기능적 발현을 조속하게 개량시킬 수 있다.

예컨대, AMV 역전사효소는 특히 상업적으로 중요한데, 그 이유는 고온(42 °C)에서 활성적이고 많은 기타 다른 역전사효소보다 강하기 때문이다. 하지만, 이.콜리와 같은 원핵 숙주에서 발현시키기가 어렵고, 결과적으로 병아리 세포로부터 정제해야 하기 때문에 비용이 많이 든다. 따라서, 이.콜리 중에서 효과적으로 발현될 수 있는 개량된 AMV 역전사효소가 절실히 요구된다.

간략히 설명하면, AMV 역전사효소 유전자[Papas et al., J.Cellular Biochem 20:95-103(1982)]를 당해 기술 분야에 일반적인 임의의 방법으로 돌연변이유발시킨다. 이 돌연변이 유전자의 라이브러리를 polA12(Ts) recA718[Sweasy et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 90:4626-4630(1993)] 이.콜리 숙주에서 Iac 프로모터의 조절하에 colE1 플라스미드(Amp 내성)중으로 클로닝한다. 이 라이브러리를 IPTG로 유도하고, 비허용 운도로 전환시킨다. 이와 같이 하여, 킴 등[Kim et al., Proc.Natl.Acad.Sci(U.S.A.), 92:684-688(1995)]에 의해 보고된 활성 HIV 역전사효소 돌연변이체 선택에 있어 보고된 선택 조건하에 기능적으로 발현된 역전사효소 유전자를 선택한다. 선택된 AMV RTX 유전자를 클로닝된 유전자에 인접한 올리고뉴클레오티드를 사용하여 PCR로 회수한다. 얻어지는 PCR 생성물을 전술한 바와 같이 선택된 시험관내 RSR로 처리하고, 기능적 발현도가 허용되는 수준이 될 때까지 이 공정을 반복한다. 각 클론을 그 다음 RNA 의존적 DNA 중합 및 당해의 다른 성질(예, 실온에서의 반감기, 오차율)에 대해 선별한다. 후보 클론은 돌연변이유발법으로 처리하고 다시 시험하여 이.콜리에서 고농도로 발현될 수 있는 AMV RT를 얻는다.

2. 차페로닌의 개량

본 발명의 일부 양태에서는 단백질의 과잉발현을 통해 응집하는 경향이 있는 폴딩 중간물을 축적할 수 있다. 특정 이론에 따른 것은 아니지만, 차페로닌의 역할은 응집에 대하여 상기 폴딩 중간물을 안정화하는 것으로 생각되며, 따라서 당해의 단백질의 과잉발현은 차페로닌의 능력을 능가할 수 있다. 이 문제를 극복하기 위하여 차페로닌 유전자는 단독으로 또는 당해의 단백질을 암호하는 유전자와 함께 본 발명의 기법을 사용하여 개량할 수 있다.

이 시도에 특히 적합한 당해 단백질의 예로는 사이토킨, 말라리아 외피 단백질, T 세포 수용체, 항체, 산업용 효소(예, 세정용 프로테아제 및 세정용 리파제), 백신용 바이러스 단백질 및 식물 종자 저장 단백질을 포함하며, 이것에 국한되는 것은 아니다.

챠페로닌 유전자 재료로는 티오례독신, Gro ES/Gro EL, PapD, CIPB, DsbA, DsbB, DnaJ, DnaK 및 GrpE와 같은 단백질을 암호하는 이.콜리 쳐페로닌 유전자; Hsp70, Hsp72, Hsp73, Hsp40, Hsp60, Hsp10, Hdj1, TCP-1, Cpn60, BiP와 같은 포유류 쳐페로닌; 및 효모와 같은 기타 다른 종에 존재하는 상기 쳐페로닌 유전자의 동족체를 포함하며, 이것에 국한되는 것은 아니다[J.G.Wall and A.Pluckthun, *Current Biology*, 6:507-516(1995); Hartl, *Nature*, 381:571-580(1996)]. 또한, 이종 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 신규 쳐페로닌의 선택 또는 선별용 라이브러리로서 사용할 수 있다.

일반적으로, 쳐페로닌의 개량은 먼저 쳐페로닌 유전자를 돌연변이유발시키고, 당해의 표적 단백질의 발현이 개선된 유전자를 선별 또는 선택한 뒤, 돌연변이된 쳐페로닌 유전자를 RSR로 처리하고, 선택 또는 선별을 반복한다. 모든 RSR 기법에서와 같이, 이 공정은 당해 단백질의 목적하는 발현 개량이 얻어질 때까지 반복한다. 2가지 예시적인 시도는 다음과 같다.

a. 개선된 기능에 대한 선별이나 선택에 의한 당해 단백질에 대해 트란스형인 쳐페로닌 개량

일부 양태에서 쳐페로닌 유전자는 당해 단백질의 유전자와 무관하게 개량된다. 개량된 쳐페로닌의 개선도는 예컨대 표적 단백질 자체의 활성 향상을 선별하거나 또는 표적 단백질을 포함하는 융합 단백질과 선택성 또는 선별성 단백질(예, GFP, 알칼리성 포스파타제 또는 베타갈락토시다제)의 활성 향상을 선별하여 분석할 수 있다.

b. 시스형 쳐페로닌 오페론

일부 양태에서는 쳐페로닌 유전자와 표적 단백질 유전자를 동일 플라스미드 상에서 암호화시키지만, 반드시 함께 개량되는 것은 아니다. 예컨대, lac 두상부 이량체는 단백질 표적에 융합하여 가용성 단백질을 암호하는 플라스미드를 선택할 수 있다. 이 동일 플라스미드 상에 쳐페로닌 유전자를 제공하고("cis") 셔플링하여 표적 단백질 보다는 쳐페로닌 단백질을 개량한다. 이와 유사하게, 쳐페로닌 유전자는 당해의 단백질과 함께 유전자 III 또는 유전자 VIII 융합체를 암호하는 파지미드 플라스미드 상에 클로닝할 수 있다. 이와 같이 클로닝된 쳐페로닌을 돌연변이유발시키고, 전술한 선택 과정에서와 같이 기능적으로 표현되는 융합 단백질을 발현하는 파지를 친화성 매트릭스를 이용하여 분리한다. 이 파지 유래의 쳐페로닌 유전자를 셔플링하고, 선택, 돌연변이 및 재조합 사이클을 융합 단백질의 기능적 형태가 효과적으로 발현될 때까지 반복적으로 적용한다.

3. 세포내 국재화의 개선

생명공학적으로 관심 있는 과잉발현시킨 다수의 단백질은 정제 분석이나 활성 분석에 유리하도록 주변세포질이나 배지로 분비시킨다. 다량 분비는 이 공정이 다수의 유전자에 의해 조절되기 때문에 최적화하기가 어렵고, 따라서 최적화에는 이들 성분 중 여러 성분의 발현율과 구조에 영향을 미치는 복수의 돌연변이를 필요로 할 수 있다. 이.콜리에서의 단백질 분비는 예컨대 분비성 ATPase(SecA), 전위효소 복합체(SecB, SecD, SecE, SecF 및 SecY), 쳐페로닌(DnaK, DnaJ, GroES, GroEL), 시그널 펩티다제(LepB, LspA, Ppp), 특정 폴딩 촉매(DsbA) 및 공지율이 적은 기능(예, Ffh, FtsY)을 가진 기타 다른 단백질[(Sandkvist et al., *Curr.Op.Biotechnol.* 7:505-511(1996)]을 비롯한 많은 단백질에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이 단백질에 대한 상기 유전자의 야생형 또는 돌연변이 복사체의 과잉생성은 성숙 분비형 단백질의 수율을 유의적으로 증가시킬 수 있다. 예컨대, secY 또는 secY4의 과잉발현은 hIL6-pre-OmpA 융합체로부터 성숙 인간 IL6의 주변세포질내 수율을 유의적으로 증가시켰다[Perez-Perez et al., *Bio-Technology* 12:178-180(1994)]. 이와 유사하게, 이.콜리에서 DnaK/DnaJ의 과잉발현은 분비형 인간 과립구 콜로니 자극 인자의 수율을 증가시켰다(Perez-Perez et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 210:254-259(1995)].

RSR은 분비 경로 중에 관여하는 전술한 성분 중의 1가지 이상을 개량하는 경로를 제공한다. 다음 전략을 이용하여 이.콜리내 단백질 분비를 최적화한다. 이 방법의 변형으로, 바실러스 서브틸리스, 슈도모나스, 사카로마이세스 세레비지에, 피치아 파스토리스, 포유류 세포 및 기타 숙주에 적용하기에 적합한 방법도 설명한다. 일반 프로토콜은 다음과 같다.

전술한 유전자 중 1가지 이상을 이.콜리 게놈 DNA로부터 공지 인접 서열을 사용하여 PCR 증폭으로 얻고, 플라스미드 또는 코스미드 벡터에 일정 순서의 배열로 클로닝한다. 이 유전자들은 일반적으로 천연에서 클러스터로 발생하지 않으며, 따라서 인위적인 유전자 클러스터를 포함할 것이다. 이 유전자를 이들의 천연 프로모터 또는 lac, tac, 아라비노스 또는 trp 프로모터와 같은 다른 프로모터의 조절하에 클로닝한다. 일반적으로, 이들 유전자 사이에 SfiI와 같은 희귀 제한 부위를 배치하여 본 발명의 방법에 기재된 바와 같이 셔플링된 유전자를 일정 순서로 용이하게 재어셈블리한다.

유전자 클러스터는 돌연변이유발시키고 당해의 유전자가 유도적으로 발현될 수 있는 숙주 세포로 도입한다. 분비될 표적 유전자와 클로닝된 유전자의 발현은 당해 프로모터에 대한 표준 방법(예컨대, lac 프로모터에 대하여 1 mM IPTG를 첨가하여)으로 유도한다. 돌연변이 라이브러리에 의한 단백질 분비 효율은 예컨대 콜로니 블롯팅 방법[Skerra et al., *Anal.Biochem.* 196:151-155(1991)]으로 측정한다. 분비 단백질을 최고 농도로 발현하는 콜로니(최고 0.1 내지 10%, 바람직하게는 최고 1%)를 취한다. 이를 콜로니로부터 플라스미드 DNA를 제조하고 본 발명에 기재된 임의의 방법에 따라 셔플링한다.

바람직하게는, 각 유전자를 개체군으로부터 증폭시키고 RSR로 처리한다. 단편을 SfiI로 분해하고(DNA 리가제에 의한 일정 순서의 재어셈블리를 촉진하도록 디자인된 비팔린드룸형 오버행을 각 유전자 사이에 도입시킴), 바람직하게는 낮은 희석율에서 함께 결찰시켜 풀린 공유 폐환상 고리(<1 ng/μl)의 형성을 촉진한다. PCR 증폭된 유전자 개체군 각각을 최종 유전자 클러스터로 재어셈블리하기 전에 셔플링할 수 있다. 결찰 생성물을 사용하여 당해의 숙주를 다시 형질전환시키고 분비 및 RSR 과정을 반복 순환시킨다.

이와 유사한 전략을 슈도모나스, 바실러스 서브틸리스, 효모 및 포유류 세포와 같은 기타 다른 숙주에 사용할 수 있다. 전술한 이.콜리 유전자의 동족체는 최적화의 표적으로, 이 동족체들은 다른 종에서도 다수

동정되었다[Pugsley, Micro. Rev. 57:50-108(1993)]. 이 동족체외에도 시그널 인식 입자, 전위성 사슬 결합된 막 단백질(TRAM), BiP, Ssa 단백질, 기타 hsp70 동족체 및 prsA(비.서브틸리스)의 6개 폴리펩티드와 같은 기타 다른 성분[Simonen and Pulva, Micro. Rev. 57:109-137(1993)] 역시 RSR에 의한 최적화 대상이다. 일반적으로, 포유류 세포의 SV40-neo[Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press(1987), Norhrup et al., J. Biol. Chem. 268(4):2917-2923(1993)]와 같은 복제성 에피좀 벡터 또는 효모의 2 마이크론 플라스미드나 ars 플라스미드[Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, CSH Press(1982)]를 사용한다. 비.서브틸리스에는 pJM103, pJM113 또는 pSGMU2와 같은 통합성 벡터가 바람직하다[Perego, Chap.42, pp. 615-624 in: *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*, A. Sonenshein, J. Hoch and R. Losick, eds., 1993].

예컨대, 효과적으로 분비된 열안정성 DNA 폴리머라제는 개량될 수 있어 발현된 DNA 폴리머라제를 거의 정제하지 않고도 DNA 종합 분석을 실시할 수 있게 된다. 이와 같은 절차는 고 처리율 분석법으로 시험하고자 하는 모든 단백질, 예컨대 표 1에 기재된 임의의 약학 단백질 또는 임의의 산업용 효소의 돌연변이체의 라이브러리를 발현시키는데 바람직하다. 1차 작제물은 분비될 단백질 STII 또는 OmpA 유래의 시그널 펩티드와 같은 시그널 펩티드를, 분비될 단백질의 아미노 말단에 융합시켜 제조한다. 당해의 분비 경로에 작용하는 것으로 사료되는 글로닝된 유전자의 유전자 클러스터를 돌연변이유발시키고 표적 작제물과 함께 동시형질발현시킨다. 각 클론을 유전자 생성물의 발현에 대하여 선별한다. 개선된 클론 유래의 분비성 유전자 클러스터를 회수하고 재클로닝하여 본래의 숙주로 다시 도입시킨다. 이 공정을 반복하기 전에 먼저 돌연변이유발법으로 처리하는 것이 바람직하다. 이 사이클을 분비된 단백질의 발현이 목적하는 정도까지 향상될 때까지 반복한다.

IV. 개량된 폴리펩티드 성질

A. 개량된 전이 상태 유사체 및 기질 결합

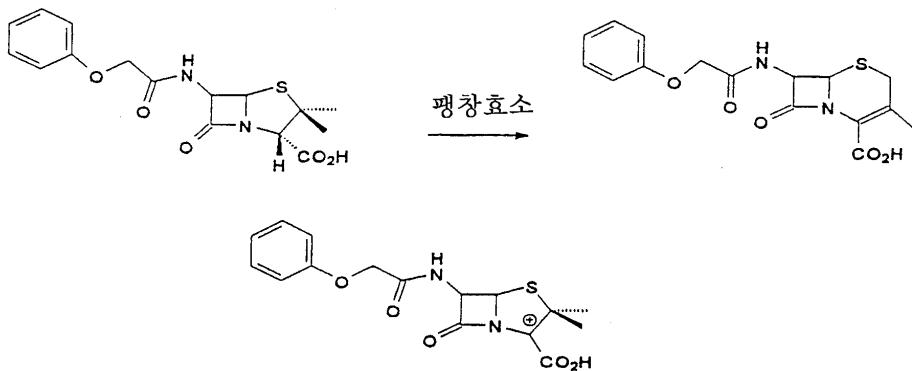
당해의 기질에 대해 실질적으로 최적이하의 활성을 보유한 산업적으로 바람직한 많은 효소가 있다. 이 경우 대부분에서 천연에서 얻은 효소는 이것이 개량되는 조건과 매우 다른 조건 또는 천연 기질과 다른 기질에 대하여 활성을 보유하는 조건하에서 작업할 필요가 있다.

산업용 효소에 대한 개량적 기법의 적용은 사용될 수 있는 선택 방법의 유형 및 선별시 조사될 수 있는 돌연변이체의 적당한 수에 따라 유의적으로 제한되기도 한다. 촉매 효능이 개선된 돌연변이체를 선별하는데 일반적으로 사용되는 전략으로는 표현 방식으로 발현되어 전이 상태 유사체[McCafferty et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:157-171(1994)] 또는 기질 유사체[Janda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 91:2532-2536(1994)]에 결합하는 효소 또는 촉매 항체 선택 방법이 대표적이다.

파지 발현[O'Neill et al., Current Biology 5:443-449(1995)] 및 본 명세서에 기재된 기타 다른 표현 방식[Gates et al., J. Mol. Biol. 255: 373-386(1995); Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 91:9022-9026(1994)]은 당해의 단백질에 친화성을 기본으로 한 선택 과정을 적용하는 일반 방법을 나타낸다. 예컨대, 매튜스와 웰스[Matthews and Wells, Science 260:1113-1117(1993)]는 개선된 기질을 선택하기 위하여 프로테아제 기질의 파지 표현법을 사용하였다. 한편, 파지 표면 상에 활성 효소의 표현을 통해 전이 상태 유사체 결합이 개선된 돌연변이 단백질을 선택하였다. 전이상태 유사체에 대한 친화성의 개선은 촉매 효능의 개선과 상호 관련이 있다. 예컨대, 패튼 등[Patten et al., Science 271:1086-1091(1996)]은 합텐에 대하여 촉매 항체의 친화성을 개선시키면 촉매 효능을 에스테르분해성 항체에 대한 k_{cat}/K_m 이 80배 증가할 정도로 개선시킨다는 것을 규명하였다.

예컨대, 항생제 생합성에 사용된 효소는 파지 표현 선택 과정을 사용하여 바람직한 조건하에서 새로운 기질 특이성과 활성을 갖도록 개량시킬 수 있다. 현재 일부 항생제는 생물학적으로 생성된 출발 화합물을 화학적 변형시켜 만든다. 목적 분자의 완전한 생합성 방법은 필요한 효소 활성과 기질 특이성을 가진 효소가 부족하기 때문에 현재는 불가능하다[Skatrud, TIBTECH 10:324-329, September 1992]. 예컨대, 7-아미노데아세토옥시세팔로스포란산(7-ADCA)은 반합성적으로 제조된 세팔로스포린의 전구물질이다. 7-ADCA는 페니실린 G를 화학적 고리 팽창 반응시킨 다음, 페녹시아세탈 기를 효소적으로 탈아실화하여 제조한다. 7-ADCA는 적합하게 변형된 페니실린 팽창효소(expandase)가 개량될 수 있다면 효소적 고리 팽창 반응에 의해 페니실린 V로부터 유도될 수 있는 디아세틸세팔로스포린 C(DAOC V)로부터 효소적으로 제조할 수 있다[Cantwell et al., Curr. Genet. 18:213-221(1990)]. 따라서, 7-ADCA는 본래 에스.클라불리제루스 (S. Clavuligerus) cefE 유전자[Skatrud, TIBTECH 10:324-329, September 1992]의 돌연변이체 형태와 같은 변형된 페니실린 N 팽창효소를 사용하여 페니실린 V로부터 효소적으로 생성될 수 있다. 하지만, 페니실린 V는 상업적으로 유용할 정도로 충분한 효능을 가진 공자의 모든 팽창효소의 기질로서 전혀 사용되지 않고 있다. 하기 개략되는 바와 같이, 본 발명의 RSR 기법은 기질로서 페니실린 V를 사용할 수 있도록 cefE에 의해 암호된 페니실린 팽창효소 또는 기타 다른 팽창효소를 개량하는데 사용할 수 있다.

표현 방식으로 cefE 페니실린 팽창효소 돌연변이체의 라이브러리를 발현시키고, 기질 또는 전이 상태 유사체에 대한 결합성에 대하여 선택한 뒤, RSR을 적용하여 고친화성 결합제를 신속하게 개량시키므로써 상기 문제점에 파지 발현 또는 기타 다른 발현 방식의 선택을 적용한다. 시험 후보를 더 선별하여 바람직한 반응 조건, 예컨대 pH, 온도, 용매 농도 등의 조건하에서 페니실린 V에 대해 개선된 효소적 활성이 있는 돌연변이체를 동정한다. RSR은 바람직한 팽창효소 활성이 있는 돌연변이체를 더 개량하는데 적용한다. 이 반응에는 다수의 전이 상태 유사체(TSA)가 적합하다. 다음 화학식은 cefE 돌연변이체의 발현 라이브러리를 선택하는데 사용되는 초기 TSA이다.



공지 페니실린 팽창효소[Skatrud, TIBETH 10:324-329(1992); Cantwell et al., Curr.Genet. 17:13-221(1990)]의 라이브러리를 본 명세서에 기재된 바와 같이 제조한다. 이 표현 라이브러리를 사용하여, 페니실린 V를 DAOC V로 전환시키는 상기 제시된 바와 같은 페니실린 V 및/또는 전이 상태 유사체에 대한 결합성에 대하여 선택한다. 이 결합성 선택 과정은 새로운 조건하에서 활성적인 돌연변이체를 얻기 위하여 고온과 같은 비생리적 반응 조건하에서 실시할 수 있다. RSR은 선택성 리간드에 대한 결합 친화성이 2- 10^5 배 개선된 돌연변이체를 개량하는데 사용한다. 목적하는 정도의 결합성이 개선되면, 시험 후보 돌연변이체를 고 처리율 방식으로 발현시키고, 페니실린 V를 DAOC V로 팽창시키는 비활성을 정량적으로 측정한다. 개선된 효소 활성을 보유하는 재조합체를 돌연변이유발시키고 이 공정을 반복하여 더욱 개량시킨다.

표현된 효소(예, 표지 표현, lac 두상부 이량체, 폴리솜 발현 등)에 의한 TSA 결합의 보유를 통해 활성 부위가 종괄적으로 통합되어 보유되는지를 양호하게 선택할 수 있고, 따라서 당해의 조건하에서 활성을 보유하는 돌연변이체의 선택에 이용할 수 있다. 이와 같은 조건으로는 여러 최적 pH, 보다 광범위한 최적 pH, DMSO[Seto et al., DNA Sequence 5:131-140(1995)] 또는 포름아미드[Chen et al., Proc.Natl.Acad.Sci(U.S.A) 90:5618-5622(1993)]와 같은 변화된 용매 중에서의 활성, 변화된 온도, 개선된 보존 수명, 변화 또는 광범위해진 기질 특이성, 또는 프로테아제 내성을 포함하며, 이것에 국한되는 것은 아니다. 또 다른 예로서, 포유류 표현 방식을 사용한 p-나트로페닐 에스테라제의 개량에 대해서 이하에 설명한다.

B. DNA 및 RNA 폴리머라제의 개선

핵산 서열분석과 폴리머라제 사슬 반응에 사용되는 개선된 폴리머라제는 특히 상업적으로 중요하다. DNA 서열분석 폴리머라제의 개선에 바람직한 시험 후보는 다음과 같은 성질이 있는 것으로, (1) 표지 프라이머 방식에서의 이노신에 의한 종결 억제[H.Dierick et al., Nucleic Acids Res. 21:4427-4428(1993)], (2) 특히 형광성 표지된 디데옥시 터미네이터에 의한 보다 규정화된 피크 높이[Parker et al., BioTechniques 19:116-121(1995)], (3) 예컨대 > 10% DMSO에 대한 관용성에 의한 고 GC 함량 DNA(> 60% GC)의 우수한 서열 분석[D.Seto et al., DNA Sequences 5:131-140(1995); Scheidl et al., BioTechniques 19(5):691-694(1995)], 또는 (4) 이노신, 7-데아자 dGTP와 같은 신규 염기 유사체[Dierick et al., Nucleic Acids Res. 21:4427-4428(1993)] 또는 상기 성질을 개선시키는 기타 다른 신규 염기 유사체에 대한 개선된 허용성이 있다.

비행 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 시간(MALDI-TOF; matrix assisted laser desorption ionization time of flight)을 이용하여 디데옥시 래더를 해석하는 신규 서열 분석 방식이 논의되었다[Smith, Nature Biotechnology 14:1084-1085(1996)]. 스미드는 최근 논문에서 DNA의 단편이 DNA 서열 분석의 표준 방법인 젤 전기영동에 실제적인 대체 방법으로서 상기 방법을 개발함에 있어 그 개발을 제한하는 유일한 특징이라는 것을 지적하였다. 퓨린 염기를 7-데아자 유사체[Kirpekar et al., Rapid Comm. in Mass Spec. 9:525-531(1995)] 또는 2' 히드록실(2'-H 또는 2'-F)로 변형하여 N-글리코시드 결합을 안정화하는 염기 유사체는 상기 기법의 "질량 범위 제한을 상당히 경감시킨다"[Smith, 1996]. 따라서, MALDI-TOF 조건하에서 단편화에 대한 내성을 부여하는 상기 염기 유사체 및 기타 다른 염기 유사체를 효과적으로 병입시킬 수 있는 개량된 폴리머라제가 귀중한 새기틀을 마련할 것이다.

기타 RSR에 의한 개선에 바람직한 폴리머라제 성질은 전술한 용도의 염기 유사체를 허용하는 유용한 상호 관련체로서 또는 보다 효과적인 돌연변이유발을 위한 저 정확도의 열안정성 DNA 폴리머라제; PCR의 고 정확도 폴리머라제[Lundberg et al., Gene 108:1-6(1991)]; 치료용 작제물 및 레트로바이러스의 돌연변이를 감소시키는 레트로바이러스 유전자 치료법 운반체로서 사용하기 위한 고 정확도의 역전사효소; GC 풍부한 DNA의 개선된 PCR 및 변형 염기를 이용한 PCR[S.Turner and F.J.Jenkins, BioTechniques 19(1): 48-52(1995)]이다.

따라서, 본 발명의 일부 양태에서는 돌연변이 폴리머라제 유전자의 라이브러리를 개선된 서열분석 성질에 대한 직접 고 생산량 선별법으로 선별한다. 그 다음 최상의 시험 후보를 RSR로 처리한다. 간략히 요약하면, Taq 폴리머라제와 같은 시험 폴리머라제의 돌연변이 라이브러리를 PCR 돌연변이유발법[Caldwell et al., PCR Meth.App. 2: 28-33(1992)] 및/또는 카세트 돌연변이유발법[Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press(1987)]과 같은 표준 방법을 사용하여 작제한다. 이 라이브러리에 T7 폴리머라제 유래의 활성 부위 잔기와 같은 Taq DNA 폴리머라제로 디데옥시 뉴클레오티드에 대한 허용성을 개선시키는 돌연변이[Tabor and Richardson, J.Biol.Chem. 265:8322-8328(1990)] 및 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성을 불활성화시키는 돌연변이[R.S.Rano, BioTechniques 18:390-396(1995)]를 도입시킨다. 이 문제를 해결하는데 있어, 예컨대 전술한 바와 같은 재어셈블리 PCR 기법이 특히 적합하다. 이와 유사하게, 키메라 폴리머라제 라이브러리는 기존의 고온성 폴리머라제, 시퀴나제 및 이.콜리 polI를 전술한 가교 올리고뉴클레오티드 방법을 사용하여 서로 교배시켜 제조한다. 이 라이브러리는 인간 또는 로보트에 의한 콜로니 채취를

사용하여 96월 평판에 각 콜로니를 레플리카 접종하고 여기에서 소량의 배양물을 증식시키고 폴리머라제 발현을 유도한다.

각 웰에서 발현된 폴리머라제를 고 처리율의 소규모 단순 정제 방법을 실시한다. 예컨대, His 표지된 Taq 를 이.콜리에서 발현시켜 간단하게 1단계 정제하는 방법에 대하여 개시된 바 있고[Smirnov et al., Russian J. Bioorganic Chem. 21(5): 341-342(1995)], 96월 발현 및 정제 방식으로 간단하게 조정할 수 있다.

고 처리율 서열분석법은 정제 시료에 대하여 서열분석 반응을 실시하여 사용한다. 이 데이터를 분석하여 개선된 서열분석 성질을 가진 돌연변이체를 다음과 같은 기준, 즉 야생형 효소에 의해 제공되는 것 보다 강한 시그널과 보다 적은 수의 인공 종결 생성물과 같은 점을 비롯한 GC 풍부한 주형, 특히 60% GC 함유 주형에 대한 향상된 질의 래더; 프라이머 표지 반응, 예컨대 형광 표지 프라이머에서 이노신에 의한 반응 종결 빈도의 감소; 소정 위치에 존재하는 형광 디데옥시 뉴클레오티드와의 반응시 시그널 병입의 변화 감소; 야생형 효소에 의해 얻어지는 것 보다 긴 장쇄화, 예컨대 약 20 내지 100 뉴클레오티드인 서열분석 래더; 7-데아자 퓨린과 같은 기타 다른 공지의 염기 유사체에 대한 허용성 향상; 조합적 화학 라이브러리 유래의 신규 염기 유사체에 대한 허용성 개선[예컨대, Hogan, Nature 384(Supp):17 1996]에 따라 동정한다.

그 다음 최상의 시험 후보를 돌연변이유발법으로 처리하고, 전술한 개선된 서열 분석 성질을 가진 것을 선택하거나 선별한다.

또 다른 양태로서, 선별 또는 선택은 다음과 같이 실시한다. 플라스미드의 복제를 이.콜리 또는 다른 미생물 종에서 발현되는 폴리머라제의 절대적 조절하에 실시할 수 있다. 이 시스템의 효과는 플라스미드 복제를 포유류 폴리머라제 베타[Sweasy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:4626-4630(1993)], Taq 폴리머라제[Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 93: 9670-9675(1996)] 또는 HIV 역전사효소[Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:684-688(1995)]에 의존적인 방식으로 조성하여 입증된 바 있다. 이 돌연변이 폴리머라제 유전자를 coIE1 오리진을 함유하는 플라스미드에 배치하고 아리비노스 프로모터의 조절하에 발현시킨다. 이 라이브러리를 실질적으로 전술한 스크린 등의 문현을 통해 기재된 바와 같이 활성 폴리머라제를 증량시키고, 배양물 중에 아라비노스를 첨가하여 폴리머라제의 발현을 유도한다.

또 다른 정량적 선별 방법에서는 동일 플라스미드 상에 제공된 GFP(녹색 형광성 단백질)를 이용하고, 선택용 항생제의 부재하에 비허용 온도에서 아라비노스 상에 레플리카 평판화하며, 형광계를 이용하여 각 배양물의 형광성을 정량적으로 측정한다. GFP 활성을 결국 활성 폴리머라제의 발현에 의존적인 플라스미드 안정성과 복제수와 상호관련있다.

오차율이 매우 높은 폴리머라제는 특이성 및 선택성의 감소로 인하여 현재 사용되는 형광 표지 디데옥시와 같이 염기 유사체의 병입에 대해 보다 일정한 시그널을 나타내기 때문에 서열분석 효소로서 우수하다.

현재 사용되는 폴리머라제의 오차율은 10^{-5} 내지 10^{-6} 정도로, 겔 시스템의 해상력 하에 검출될 수 있는 것 보다 낮은 등급이다. 오차율 1%, 아마도 10% 정도는 현재의 겔 시스템으로는 검출될 수 없으며, 따라서 효소의 "비정확성(slippiness)"을 증가시킬 수 있는 기회를 제공한다. 잘못이 있는 순환 폴리머라제는 PCR에 의한 유전자의 과돌연변이유발과 같은 기타 다른 용도에도 사용될 수 있다.

일부 양태에서는 스크린[Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 93:9670-9675(1996)]에 의해 개시된 시스템을 사용하여 발현된 폴리머라제에 의존적인 리포터 플라스미드의 복제를 조성할 수 있다. 이 시스템은 발현된 폴리머라제의 조절하에 CoIE1 오리진 다음의 최초 200 내지 300개의 염기를 직접 복제시킨다 [Sweasy and Loeb, J. Bact. 177:2923-2925(1995); Sweasy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:4626-4630(1993)]. 종지 코돈을 포함하는 선별성 또는 선택성 리포터 유전자를 이 영역, 예컨대 1개, 2개 또는 3개의 종지 코돈을 포함하는 LacZ 알파를 배치한다. 이 작제물을 비허용 온도에서 아라비노스 상에서 증식시키고, 회수한 뒤, 리포터 카세트중의 종지 코돈의 복귀를 요구하는 선택성 락토스 최소 배지 상에 평판배양한다. 돌연변이 폴리머라제는 생존물로부터 PCR로 회수한다. 생존물은 돌연변이체의 표현형이 리포터 lacZ 알파 단편에서 종지 코돈의 복귀율을 증가시키기 때문에 돌연변이체를 증량시킨다.

생존물의 폴리머라제 유전자는 RSR로 처리하고, 그 다음 폴리머라제 돌연변이체를 지표 균주로 재형질전환시킨다. 돌연변이체는 비허용 온도에서 아라비노스/Xgal 평판 상에 평판 배양하여 육안으로 선별할 수 있다. 돌연변이 폴리머라제는 종지 코돈의 복귀로 인한 청색 돌기 수가 증가된 콜로니를 생성시킬 것이다. 시험 돌기는 가장 유두상 소돌기가 많은 콜로니(즉, "최상의" 콜로니) 중의 비소돌기 영역을 채취하고 아라비노스/Xgal 지표 배지 상에 재평판배양하여 재선별하므로써 돌기율이 증가된 콜로니를 추가 선별할 수 있다. 이 단계를 목적하는 복귀율이 얻어질 때까지(예, 복제당 염기쌍당 10^{-2} 내지 10^{-3} 돌연변이) 반복한다.

돌기율이 높은 콜로니는 잘못이 있는 폴리머라제를 암호하는 시험 후보이다. 이 시험 후보를 실질적으로 전술한 고처리율 선별에서와 같이 개선된 서열분석 성질에 대하여 선별한다. 간략히 설명하면, 돌연변이 Taq 단백질을 96월 방식으로 발현시키고 정제한다. 이와 같이 정제된 단백질을 서열분석 반응에 사용하고 그 서열 데이터를 분석하여 본 명세서에 개략된 개선을 나타내는 돌연변이체를 동정한다. 개선된 성질을 나타내는 돌연변이를 RSR로 처리하고 추가 개선된 기능을 보유한 것을 재선별한다.

일부 양태에서는 종지 코돈을 가진 lacZ 알파 대신에 종지 코돈을 함유하는 GFP를 작제에 사용한다. GFP에 복귀 종지 코돈을 가진 세포를 형광성 활성화된 세포 분류기(FACS)로 선택한다. 일반적으로, FACS 선택은 최고 명도를 약 0.1 내지 10%, 바람직하게는 최고 0.1 내지 1%로 정하여 실시하고 문현[Dangl et al., Cytometry 2(6):395-401(1982)]에 기재된 방법과 유사한 방법에 따라 수집한다. 다른 양태에서는 lox 부위 또는 부위 특이적 재조합효소의 다른 표적에 polA 유전자를 인접시킨다. 재조합효소는 유도된 후 polA 유전자를 유도적으로 결실시킨다[Mulbery et al., Nucleic Acid Res. 23:485-490(1995)]. 따라서, 어떤 온도와 어떤 숙주에서든지 "로에브형(Loeb-type)" 선택을 수행할 수 있다. 예컨대, 유도적으로 결실 가능한 방식으로 polA 동족체를 배치하여 recA 결손형 종온균 또는 고온균에서 상기 선택 방식

을 적용할 수 있고, 그 결과 보다 일반 조건하에서 활성 폴리머라제 선택에 사용할 수 있다.

또 다른 양태로서, 이와 같은 일반 시스템은 유전자의 생체내 돌연변이유발법에 사용되는 것이 바람직하다. 표적 유전자를 잘못이 있는 폴리머라제의 조절하에 복제가 절대적으로 제어되는 플라스미드의 복제 오리진 부근 영역에 클로닝한다. 이 작제물을 *polA(ts)* *recA* 균주를 통해 계대시키고 비하용 온도에서 증식시켜, 높은 정확도로 플라스미드의 나머지를 복제하면서 표적 유전자를 특이적으로 돌연변이유발시킨다.

다른 양태에서는, 염기 유사체를 사용하거나 변화된 조건하에서 DNA를 PCR 증폭시키는 돌연변이 DNA 폴리머라제의 활성에 근거하여 선택을 실시한다. 돌연변이 폴리머라제는 PCR 증폭에서 그 폴리머라제를 암호하는 주형에 작용하여 그 폴리머라제를 차별적으로 복제한다.

간략히 요약하면, 돌연변이체의 초기 라이브러리는 레플리카 평판배양한다. 폴리머라제 제조물은 96웰 방식으로 제조한다. 이와 동일한 세트로 미정제 플라스미드 제조물을 만든다. 각 플라스미드 제조물을 그 플라스미드 유래의 폴리머라제 제조물을 사용하여 상기 폴리머라제를 최적화하고자 하는 조건(예, DMSO 또는 포름아미드 첨가, 변성 또는 신장 온도의 변화, 완충액 염 변화, 질량 분광분석학 서열 분석에 사용하기 위한 티올 dTP와 같은 염기 유사체를 이용한 PCR, GC 풍부한 DNA(> 60% GC)의 PCR, 7-데아자 퓨린, 2' 플루오로 dNTP, rNTP와 같은 신규 염기 유사체를 이용한 PCR, 이노신을 이용한 PCR 등)하에 PCR 증폭시킨다. 이와 같이 증폭된 유전자를 모아서, 클로닝하고 돌연변이유발시킨 다음 원하는 개선이 얻어질 때까지 공정을 반복한다.

C. 포스포나타제 개량

알칼리성 포스파타제는 포유류 세포에 대한 리포터 유전자로서 분비형태이며 ELISA 분석, 단백질 융합 분석에 널리 사용되는 리포터 효소이다. p-니트로페닐 포스페이트(dNPP) 기질의 화학적 불안정성과 dNPP와 교차반응하는 세포 포스파타제의 존재는 이 리포터 유전자를 사용한 분석의 감도에 영향을 미치는 중요한 제한 요인이다. 노이즈(noise)성에 우수한 시그널을 나타내는 리포터 유전자는 대응 포스페이트보다 염기 촉매성 가수분해에 대해 더욱 안정한 p-니트로페닐 포스포네이트의 가수분해에 근거하여 발현될 수 있다. 또한, 천연 발생의 세포 포스포나타제는 알칼리 포스파타제보다 그 수가 훨씬 적다. 따라서, p-니트로페닐 포스포나타제는 화학적 및 효소적 가수분해에 의한 배경이 매우 적기 때문에 알칼리 포스파타제의 바람직한 대체물이다. 따라서, ELISA를 극소량의 항원 농도를 검출하는데 더욱 민감하게 만들 수 있다.

챈 등[J.Mol.Biol. 234:165-178(1993)]은 스타필로코커스 아우레우스 베타 락타마제가 p-니트로페닐 포스포네이트 에스테르를 단일 대사회전 속도론하에 가수분해할 수 있다는 것을 밝혔다. 활성 부위 Ser70(베타 락탐 가수분해에 대한 활성 부위 친핵체)은 기질과 공유 중간체를 형성한다. 이것은 베타 락탐 가수분해에 있어서의 제1 단계와 유사하고, 이 효소는 RSR에 의해 개량되어 베타 락탐 가수분해와 유사한 기작에 의해 포스포네이트를 가수분해할 수 있다. 멧카프와 워너(Metcalf and Wanner)는 이.콜리 중의 잠복 포스포네이트 이용 오페론(phn)에 대하여 개시하고 phn 오페론의 결실부를 함유하는 균주를 작제하였다 [J.Bact. 175:3430-3442(1993)]. 이 문헌은 phn 오페론 중의 유전자에 의한 알킬 포스포네이트의 가수분해로부터 인이 유래되어 인산염 제거된 최소 배지에서 이.콜리의 성장을 통한 선택 반응을 개시한다. 따라서, 소정의 최소 배지에서 생화학적 선택 반응을 이용했을 때 활성인 개량된 p-니트로페닐 포스포나타제를 선택할 수 있다. 구체적으로, 포스포나타제는 다음과 같이 개량되는 것이 효과적이다. 이.콜리 phn 효소 중 하나 또는 *Staph.* 아우레우스의 돌연변이체의 라이브러리를 작제한다. 이 라이브러리를 사용하여 phn 오페론이 결실되어 있는 이.콜리 돌연변이체를 형질전환시키고, p-니트로페닐 포스포네이트를 포함하는 인산염 제거된 MOPS 최소 배지상에서 증식하는 것을 선택한다. 선택된 돌연변이체에 대해 RSR을 실시하여 p-니트로페닐 포스포네이트의 가수분해를 향상시키기 위한 효소를 더 개량시킨다.

D. 세정제 프로테아제 개량

프로테아제 및 리파제는 의복에 있는 단백질 및 지질 오염을 효소적으로 분해하기 위하여 세정제에 다양으로 첨가되는 것이다. 이 효소를 세정제에 첨가한 결과 세정제에 필요한 계면활성제를 유의적으로 감소시켰고, 그 결과 오염 제거 성질을 향상시키고 세정제 조성비를 감소시킨다. 또한, 비활성, 단백질 기질 특이성 범위, 보존 기간, 승온에서의 안정성에 대한 향상과 계면활성제 필요성의 감소를 나타내는 프로테아제는 상기 제품의 가치를 증가시킬 것이다.

일 예로서, 서브틸리신은 다음과 같이 개량할 수 있다. 클로닝된 서브틸리신 유전자[von der Osten et al., J.Biotechnol. 28:55-68(1993)]는 복합 단백질 혼합물을 분해하는 분비형 서브틸리신에 의해 복합 단백질 배지상에서 성장하는 것을 선택하는 과정을 사용하여 RSR로 처리할 수 있다. 보다 구체적으로, 서브틸리신 돌연변이체의 라이브러리는 바실러스 서브틸리스에 의해 돌연변이 단백질이 분비되도록 유도하는 발현 벡터에 작제한다. 이 라이브러리에 의해 형질전환된 바실러스 숙주를 탄소원 및/또는 질소원으로서 복합 단백질 제제를 첨가한 최소 배지에서 증식시킨다. 급속 성장체로부터 서브틸리신 유전자를 회수하고 RSR로 처리한 다음, 목적 성질의 개선에 대하여 선별한다.

E. "단백질 네트"로부터 파지의 이탈

일부 양태에서 개선된 프로테아제에 대한 선택은 다음과 같이 실시한다. 돌연변이 프로테아제 유전자의 라이브러리를 표현 파지 상에서 작제하고, 다중웰판 또는 평판에서 증식시킨다. 이 파지는 파지를 잡는 "단백질 네트"와 중총시킨다. 이 네트는 표면 이황화물을 갖도록 조작된 단백질로 구성한 다음, 펩티드 링커의 라이브러리로 가교시킨다. 또 다른 양태는 보조 매트릭스를 이용하여 파지를 더 잡는다. 이 파지를 추가로 항온처리한 후, 세척하여 단백질 네트로부터 파지를 해리시키는 프로테아제의 발현으로 해리된 파지를 수집한다. 이 프로테아제 유전자를 RSR로 처리하여 더욱 개량시킨다. 또 다른 양태는 펩티드 링커에 의해 스트렙트아비딘이 pIII에 융합된 파지미드에 의해 암호되나 파지미드상에 표현되지는 않는 프로테아제의 라이브러리를 이용하는 것이다. 이 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리는 증폭 순환 중에 비오틴 커리지로 파지미드를 선택하여 링커를 절단하므로써 개량한다.

또 다른 양태로서, 프로테아제는 반드시 표현 방식으로 제공될 필요는 없다. 숙주 세포는 파지미드에 의

해 암호되지만 파지미드에 의해 표면에 표현되지 않는 프로테아제를 분비하는 반면, 예컨대 미량역가 평판에서는 웰에 한정되어 있다. 파지 표현 방식은 고역가의 전용균물이 단백질 네트 매트릭스에 싸여있는 것이 바람직하고, 파지는 그 매트릭스를 분해하여 다음 증폭, 돌연변이유발 및 선택 과정에서 해리시키는 활성적이고 특이성이 광범위한 프로테아제를 발현한다.

또 다른 양태에서는 파지가 웰에 한정되어 존재하는 것이 아니라 단백질 결합 필터를 사용하여 플라크 용기 콜로니를 제조한 뒤, 발색단성 기질이나 형광단성 기질을 사용하여 활성에 대해 선별한다. 필터 상의 양성 점에 상응하는 콜로니 또는 플라크를 채취하고, 예컨대 PCR로 암호된 프로테아제 유전자를 회수한다. 이 프로테아제 유전자를 RSR로 처리하여 더 개량시킨다.

F. 개량된 프로테아제 활성에 대한 선별

카르복시 말단에 부착된 형광단과 아미노 말단 상의 형광성 반응정지 부를 함유하는 펩티드 기질, 예컨대 홀스킨 등[Holskin et al., Anal.Biochem. 227:148-155(1995)]에 의해 개시된 것[예, (4,4'-디메틸아미노펜아조)벤조일-arg-gly-val-val-asn-ala-ser-ser-arg-leu-ala-5-(2'-아미노에틸)-아미노-나프탈렌-1-설폰산]을 사용하여 특이성이 확대되거나 변화된 프로테아제 돌연변이체를 선별한다. 간략히 요약하면, 펩티드 기질의 라이브러리를 아미노 말단에 형광단을 배치하고 카르복시 말단에 강력한 형광성 반응정지제를 배치하여 디자인하거나 그 반대로 디자인한다. 분비된 프로테아제를 함유하는 상정액을 상기 라이브러리의 각 성분과 별도로 또는 복합 혼합물로서 항온처리한다. 고도로 활성적이고 특이성이 광범위한 프로테아제는 펩티드 대부분을 절단하여 반응정지제로부터 형광단을 해리하고, 따라서 형광계에서 양성 시그널을 나타낼 것이다. 이 기법은 고 일도 다중웰 방식에 적용하기 쉽다.

G. RSR을 이용한 약학 단백질의 개선

표 I은 약학 산업에서 특히 상업적으로 중요한 단백질을 기재한 것이다. 이 단백질들은 RSR 개량법으로, 예컨대 비활성, 리간드 결합, 보존 기간, 향상된 특이성을 통한 부작용 감소 등의 기능을 향상시킬 수 있는 모든 시험 후보들이다. 모두 본 발명의 기법으로 조작하기에 매우 적합하다. 이 목록의 단백질에 특히 적용할 수 있는 또 다른 양태는 다음과 같다.

첫째, Taq 폴리머라제에 대하여 전술한 방법과 유사한 돌연변이 단백질을 발현하고 정제하는 고처리율 방법은 표 I에 기재한 단백질에 적용한다. 이 돌연변이체들을 기능 분석시의 활성으로 선별한다. 예컨대, IL2 돌연변이체는 혈장이나 조직의 프로테아제에 의한 분해 내성으로, 또는 저친화성 IL2 수용체에 대해서는 활성을 보유하지만 고친화성 IL2 수용체에 대해서는 활성을 상실하는 성질에 대해 선별한다. 야생형에 비하여 개선된 활성을 나타내는 돌연변이체 유래의 유전자를 회수하고 RSR로 처리하여 표현형을 더욱 개선시킨다.

라이브러리는 표현 방식으로 생성시켜 성숙한 풀딩된 단백질을 이를 암호하는 유전자 정보와 물리적으로 연결시키는 것이 바람직하다. 그 예로는 사상 파지를 이용한 파지 표현[O'Neil et al., Current Biology 5:443-449(1995)] 또는 박테리오파지 람다 유전자 V 표현[Dunn, J. Mol. Biol. 248:497-506(1995)], 플라스미드 상의 펩티드[Gates et al., J.Mol.Biol. 255:373-386(1995)](여기에서 당해의 폴리펩티드는 lac 두상부 이량체에 융합되어 있고 신생 해독 생성물은 플라스미드 또는 PCR 생성물 상에 암호된 lac 작동인자 부위에 결합되어 있음), 및 폴리리즘 표현[Matteakis et al., Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A) 91:9022-9026(1994)](여기에서 리보솜은 mRNA 분자 상에 배치되어, 고정된 리보솜/mRNA 복합체를 파괴함이 없이 동족 리간드와 상호작용할 수 있게 신생 폴리펩티드가 노출됨)을 포함한다. 선택된 복합체를 RT-PCR로 처리하여 유전자를 회수한다.

이와 같이 표현되면, 재조합 파지의 친화성 결합은 당해의 단백질에 대한 수용체를 사용하여 종종 실시한다. 일부 경우에 모든 바람직한 생물학적 특성을 보유하는 정제된 수용체[예컨대, 7-경막(7-TM) 수용체]를 얻는 것은 비현실적이다. 이와 같은 경우에는 선별 기질로서 수용체를 발현하는 세포를 사용할 수 있다. 예컨대, 배리 등[Barry et al., Nat.Med. 2:299-305(1996)]은 당해의 수용체를 발현하는 세포에 결합하는 파지를 얻기 위하여 전 세포에 대하여 M13 라이브러리를 성공적으로 선별하는 방법에 대하여 개시하였다. 이 방식은 일반적으로 표 I에 기재된 모든 단백질에 일반적으로 적용될 수 있다.

일부 양태에서는 다음과 같은 방법을 사용하여 선택을 실시할 수 있다. IFN 알파 돌연변이체를 암호하는 파지미드 저장액은 예컨대 적합한 희석율로 세포를 자극하는데 직접 사용할 수 있다. 이 세포에 대한 생물학적 효과는 IFN 응답성 프로모터, 예컨대 MHC 제I군 프로모터의 조절하에 GFP와 같은 리포터 유전자의 활성화를 통해 간접적으로 판독하거나[Crameri et al., Nat.Med. 14:315-319(1996)] 또는 표준 분석법[예, 증식 또는 바이러스 내성]으로 판독할 수 있다. 일부 양태에서, 응답성 세포의 자극, 발현 및 FACS 정제 후 부착된 상태를 유지하는 파지미드는 FACS로 정제할 수 있다. 명도가 가장 높은 세포를 수집하는 것이 바람직하다. 파지미드를 수집하고, 이들의 DNA를 목적하는 개선율이 얻어질 때까지 RSR로 처리한다.

따라서, 예컨대 IL-3은 상기 표현 방식 중 한가지 방식으로 제조하고 RSR 처리하여 목적하는 정도의 활성을 가진 작동물질을 개량시킨다. 사상 파지 벡터 상의 IL3 돌연변이체 라이브러리를 제조하고, 정제된 IL3 수용체에 대하여 친화성 선택("선별")하여 수용체에 대해 개선된 친화성 또는 파지 표현된 IL-3의 개선된 효능을 나타내는 돌연변이체를 얻는다. 이 돌연변이 IL-3 유전자를 PCR로 회수한 다음, RSR로 처리하여 표현 벡터에 재클로닝한다. 원하는 친화성 또는 작동물질 활성이 얻어질 때까지 상기 사이클을 반복한다.

당해의 많은 단백질은 이량체 또는 이보다 고차원의 다량체 형태로 발현된다. 일부 양태에서, 전술한 표현 방식은 주로 단백질의 단쇄 형태에 적용한다. RSR과 같은 돌연변이유발법을 이 표현 방식에 사용하면 적지만 검출할 수 있는 활성을 처음 나타내는 다량체 인자의 개선된 단쇄 유도체를 개량할 수 있다. 이 전략에 대해서는 다음에 상세히 설명하겠다.

H. 전세포 선택

일부 양태에서 진핵 세포는 생물학적 선택의 기본 단위이다. 이 선택 단위로서 진핵 세포를 사용하여 단

백질을 개선시키기 위해 RSR을 적용시 다음과 같은 프로토콜을 사용할 수 있다. (1) 적합한 숙주 세포를 돌연변이체의 라이브러리로 형질감염시키거나 형질도입시키는 단계, (2) 암호된 유전자 생성물을 일시적으로 또는 안정적으로 발현시키는 단계, (3) 개선된 표현형(표적 리간드에 대해 개선된 친화성을 가진 수용체의 발현; 바이러스 내성 등), (4) 예컨대, PCR과 후속적으로 이.콜리의 형질전환과 함께 HIRT 상청액의 제조에 의한 돌연변이 유전자의 회수, (5) RSR 및 (6) 목적하는 개선도가 얻어질 때까지 단계 (1) 내지 (5)의 반복.

예컨대, 발현된 표면 단백질에 대한 유전자를 클로닝하기 위해 항체를 사용하듯이 클로닝된 유전자를 발현하는 세포를 기능적으로 선택하기 위하여 포유류 표면 표현을 사용할 수 있음은 종래 연구를 통해 밝혀졌다[Reviewd by Seed, *Curr.Opin.Biotechnol.* 6:567-573(1995)]. 간략히 설명하면, 세포는 복제성 에피좀 벡터 상에 존재하는 클로닝된 유전자의 라이브러리로 일시적으로 형질감염시킨다. 당해의 단백질(이의 유전자가 클로닝하고자 하는 것)에 대하여 유발되는 항체를 플라스틱 접시와 같은 고체 표면에 고정화시키고 당해의 단백질을 발현하는 형질감염된 세포를 친화성 선택한다.

예컨대, 리간드에 대한 항체의 친화성을 포유류 표면 표현 및 RSR을 사용하여 개선시킬 수 있다. 그 다음 동족 리간드에 대해 높은 친화성을 나타내는 항체를 다음과 같은 성질 중 1가지 이상의 성질이 개선되었는지 여부에 대하여 선별한다. (1) 개선된 치료적 성질(세포 사멸 증가, 리간드 종화, 가교 수용체에 의한 시그널 형질도입 경로의 활성화), (2) 개선된 생체내 영상화 용도(방사능핵종이나 NMR과 같은 비침입 성 수단에 의한 체외에서 검출할 수 있는 모든 제제의 공유/비공유 결합에 의한 항체의 검출), (3) 개선된 분석 용도(단백질이나 소분자의 ELISA 검출) 및 (4) 개선된 촉매(촉매성 항체). 개시된 방법은 일반적 방법으로 당해의 모든 수용체-리간드 쌍에 적용할 수 있다. 구체적인 예는 하기 실험예에서 논하겠다.

1가지 돌연변이 서열과 1가지 형질감염된 세포 프로토콜의 이용은 RSR을 기본으로 한 프로토콜의 바람직한 디자인 특징인데, 그 이유는 개선된 표현형을 가진 돌연변이체를 동정하기 위하여 기능적 선택을 이용해야 하고, 형질감염이 "클로날" 방식으로 이루어지지 않는다면 임의의 소정 세포의 기능적 표현형은 복수의 형질감염된 서열의 종합적 결과이기 때문이다. 이와 같은 목적을 달성할 수 있는 1가지 방법은 원형질 융합인데, 이때 각 원형질은 일반적으로 단일 플라스미드 변형체 각각을 50 복사체 이상 포함한다. 하지만, 이 방법은 효율이 비교적 낮은 방법(약 10^3 내지 10^4 형질감염체)으로, B 세포주와 같은 일부 비부착 세포주에는 바람직하지 않다. 제2의 대안으로 레트로바이러스 벡터가 있지만, 이것은 허용되는 삽입 체의 크기에 한계가 있고(< 10 kb), 일정하고 높은 발현율을 얻기가 때로 어렵다. 무작위 통합법은 가변적인 발현율을 초래하여 노이즈를 만들고 돌연변이 단백질의 친화성 대 발현율 증가의 개선간에 구별하는 성질이 제한된다. 따라서, RSR의 일정한 발현율과 "1 유전자 - 1 세포" DNA 전이를 실행하는데 효과적으로 사용할 수 있는 관련 전략은 lox 부위를 포함하는 바이러스 벡터를 사용하고 cre 재조합효소를 바람직하게는 일시적으로 발현하고 계놈 중에 1개 이상의 lox 부위가 통합되어 있는 숙주로 도입시켜, 통합 부위의 가변성을 제한한다[Rohlman et al., *Nature Biotech.* 14: 1562-1565(1996)].

대안 전략은 SV40 오리진을 보유하는 플라스미드로 COS 세포를 형질감염시키는 경우와 같이 표적 세포 중에서 복제할 수 있는 벡터를 사용하여 제한 농도의 플라스미드(즉, 세포당 약 1 복제수)로 형질감염시키는 것이다. 이 전략에는 숙주 세포나 벡터가 SV40 대형 T 항원과 같은 복제 인자를 공급해야 하는 조건이 있다. 노스럽 등[Northrup et al., *J.Biol.Chem.* 268:2917-2923(1993)]은 SV40 오리진을 보유하는 벡터를 사용하여 SV40 대형 T 항원을 발현하는 안정한 형질감염체를 형질감염시키는 전략에 대하여 개시한다. 이 방식은 DpnI에 의한 분해 감수성으로 분석되듯이 일정하게 높은 일시 발현과 증명될 정도의 플라스미드 복제를 제공하였다. 일시 발현(즉, 비통합성 플라스미드)은 세포 표현 선택시 바람직한 방식인데, 그 이유는 순환 시간을 감소시키고 선별될 수 있는 돌연변이체의 수를 증가시키기 때문이다.

SV40 대형 T 항원 또는 기타 다른 복제 인자의 발현은 일부 세포에 대해 유해 영향을 미치거나 일부 세포에서 효과적으로 작용할 수 없다. 이와 같은 경우, RSR을 복제 인자 자체에 적용하여 당해의 세포 종류에서 개선된 활성을 나타내는 돌연변이체를 개량할 수 있다. 이와 같은 인자를 개량하는 유전자 프로토콜은 다음과 같다.

표적 세포를 SV40 대형 T 항원, SV40 오리진 및 GFP 같은 리포터 유전자를 포함하는 벡터에 클로닝된 GFP로 형질감염시킨다. 이와 관련된 방식으로 SV40 오리진을 포함하는 플라스미드상에 클로닝된 GFP 같은 과정의 리포터와 제한된 양의 SV40 대형 T 항원 발현 벡터로 동시형질감염시키는 것이 있다. 일반적으로, 1 내지 10일간의 일시 발현 후에는 최고 명도의 세포를 FACS로 정제한다. SV40 대형 T 항원 돌연변이체는 PCR로 회수하고 돌연변이유발시킨다. 이 사이클을 원하는 개선도가 얻어질 때까지 반복한다.

I. 오토크린(autocrine) 선택

일부 양태에서 돌연변이 단백질은 이것을 발현하는 세포에서 오토크린 방식으로 생물학적 효과를 발휘하는 활성에 근거하여 선택하거나 선별한다. 예컨대, 알파 인터페론 유전자의 라이브러리는 다음과 같이 보다 효능이 크거나 보다 특이적인 항바이러스 활성을 유도하는 것을 선택할 수 있다. 인터페론 알파 돌연변이체의 라이브러리는 웨일 1개 또는 몇개의 독립 클론을 첨가한 다중웨일 방식(예컨대, 96웨일)에서 발현(즉, 메탈로티오네인 프로모터의 제어하에) 및 효과적인 분비를 유도하는 벡터에서 생성한다. 일부 양태에서, 프로모터는 유도성이 아니고 구성형일 수 있다.

클로닝된 인터페론 유전자의 발현은 유도성이다. 세포는 개량하고자 하는 최적화된 인터페론에 대한 세포 독성 바이러스(예컨대, 수포성 구내염 바이러스 또는 HIV)를 항원투여한다. 생존하는 세포를 회수한다. 클로닝된 인터페론 유전자를 PCR 증폭시켜 회수하고, RSR 처리한 뒤, 형질감염 벡터에 다시 클로닝한 후 숙주 세포를 재형질감염시킨다. 이 단계는 원하는 항바이러스 활성도를 개량될 때까지 반복한다.

일부 양태에서 당해의 바이러스는 강한 세포독성이 아니다. 이 경우, 조건 치사 유전자, 예컨대 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제를 바이러스에 클로닝하고, 바이러스를 항원투여하여 회수한 후 조건 치사 선택성 조건하에 바이러스로 감염된 세포를 사멸시킨다. 조건 치사 유전자의 예는 헤르페스 TK로서, 이 유전자를 발현하는 세포를 티미딘 유사체 아사이클로비르로 처리하면 치사적이 된다. 일부 양태에서 클로닝된 인터페론의 증식 억제 활성은 분열 세포를 죽이는 제제(예컨대, DNA 알킬화 제제)로 세포를 처리하

여 선택한다.

일부 양태에서, 효능적인 시토킨은 알파 인터페론의 개량된 변형체에 의해 유도되는 MHC 제I군 프로모터와 같이 시토킨에 의해 유도되는 프로모터의 제어하에 GFP 또는 다른 리포터를 보유하는 세포에서 시토킨의 라이브러리를 발현시켜 분비시키므로써 선택한다. 시그널 형질도입 경로는 개량될 야생형 시토킨이 약하지만 검출가능한 시그널을 제공하도록 배치한다.

K. 혈청 안정성 및 혈행 반감기의 개선

본 발명의 일부 양태에서 단백질은 RSR로 개량시켜 혈청내 안정성이나 혈행 반감기를 개선시킨다. 반감기를 개선시키는 바람직한 방법은 장기 지속적인 혈청 단백질, 예컨대 항체니 기타 다른 풍부한 혈청 단백질에 대한 당해 단백질의 친화성을 개량시키는 것이다. 항체에 대한 친화성이 혈청의 반감기를 향상시키는 방식에 대한 예로는 인간 재조합 IL2의 항종양 활성과 혈청 반감기를 증가시키는 항IL2 항체와 IL2를 동시투여하는 것을 포함한다[Courtney et al., Immunopharmacology 28:223-232(1994)].

8가지 가장 풍부한 인간 혈청 단백질은 혈청 알부민, 면역글로불린, 지단백질, 헵토글로빈, 피브리노겐, 트란스페린, 알파-1 항트립신 및 알파-2 마크로글로빈이다[Doolittle, Chapter 6, The Plasma Proteins, F. Putnam, ed.: Academic Press, 1984]. 이와 같은 혈청 단백질 및 세룰로플라스민 및 피브로넥틴과 같은 기타 다른 풍부한 혈청 단백질은 반감기를 연장시키기 위한 목적으로 표 1에 기재한 바와 같은 치료용 단백질 상의 개량시키고자 하는 결합 부위에 대한 1차 표적이다. 항체의 경우에, 바람직한 전략은 가변 영역보다는 불변 영역에 대한 친화성을 개량시켜 관련 표적 애피토프 농도의 각각의 변화를 최소화하는 것이 좋다(여러 개체간 항체 V 영역의 코돈은 유의적으로 가변적이다).

원하는 친화성의 결합 부위는 당해의 단백질에 대해 파지 표현, 플라스미드 표현상의 펩티드 또는 폴리솜 표현 선택 과정을 적용하여 개량시킨다. 다양성원으로서, 기존의 결합 부위 또는 기타 표적 단백질의 소정 영역을 무작위로 돌연변이유발시키거나, 펩티드 라이브러리를 N 말단, C 말단 또는 기능적으로 비파괴적인 루프로서 내재적으로 부착하거나 또는 동종 유전자의 "유전자계 내 셔플링"을 이용할 수 있다. DNA 셔플링은 생물학적 활성을 보유하면서 HSA에 대한 친화성 개선과 같이 2 이상의 "무관련" 성질을 동시에 최적화하고자 하는 경우에 특히 바람직하다.

본 발명의 다른 양태로서, 반감기는 PEG, 기타 다른 중합체 접합체 또는 반감기 연장용 화학부로 유도체화하여 개선시킨다. 이 방법은 치료용 단백질의 반감기를 연장시키는 기존 방법[R.Duncan, Clin.Pharmacokinet 27:290-306(1994); Smith et al., TIBTECH 11 397-403(1993)]으로, 면역원성을 감소시키는 추가 잇점이 있다[R.Duncan, Clin.Pharmacokinet 27:290-306(1994)]. 하지만, 유도체화는 수용체 또는 리간드에 대한 치료용 단백질의 친화성을 감소시킬 수 있다. RSR를 사용하여 반감기 연장성 화학부에 화학적 또는 효소적 접합되는 리신 또는 기타 다른 적합한 잔기로 치환될 수 있는 1차 서열 중의 대안적 부위를 찾을 수 있으며, 그 결과 생물학적 활성을 최대로 보유하는 단백질을 얻을 수 있다.

바람직한 전략은 표현 형식으로 단백질 돌연변이체의 라이브러리를 발현하고 이 라이브러리를 표현계를 생물학적으로 불활성화시키지 않는 화학 방식을 사용하는 당해의 제제(즉, PEG)로 유도체화한 뒤, 동족 수용체에 대한 친화성에 근거하여 선택하고, 선택된 돌연변이체를 암호하는 유전자를 PCR 증폭한 뒤, 표현 방식으로 셔플링, 재어셈블리, 재글로닝한 다음, 변형후 원하는 활성을 나타내는 돌연변이체가 얻어질 때까지 반복한다. 대안 방식은 고처리율 방식으로 돌연변이체를 발현, 정제 및 유도체화하고, 최적 활성을 나타내는 돌연변이체를 선별한 뒤, 해당 유전자를 회수하고, 이 유전자를 RSR로 처리하고 반복하는 것이다.

본 발명의 다른 양태로서, 당해의 특정 조직에 위치된 표적 인간 단백질에 대한 결합 부위는 RSR로 개량시킨다. 예컨대, 인터페론은 간 세포 상에 선택적으로 분배되어 간세포에서 보다 높은 특이적 항바이러스 활성을 나타내도록 간세포 성장 인자 수용체와 같은 간 표면 단백질에 대한 결합 부위를 포함하도록 개량시킬 수 있다. 이와 같이 개량된 인터페론은 간염 치료에 유용할 것이다. 이와 유사하게, ABO 혈액 항원과 같은 적혈구 상의 풍부한 애피토프에 대한 친화성을 개량하여 소정의 단백질을 혈류에 국제화시킬 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태로서, 당해의 단백질은 프로테아제에 대한 안정성을 증가시키기 위해 개량시키는 것이다. 예컨대, IL2의 임상적 용도는 고 투여량 투여의 필요성과 관련하여 나타나는 심각한 부작용 때문에 제한을 받는다. 고 투여량은 반감기가 짧고(3 내지 5 분, Lotze et al., JAMA 256(22):3177-3124(1986), IL2의 치료적 농도를 유지하기 위해서는 고 투여량이 계속 필요하다. 치료용 단백질의 반감기를 줄이는데 역할을 하는 요인 중의 1가지는 혈청 프로테아제에 의한 단백분해작용이다. 주요 신장 산 프로테아제인 카텝신 D는 Balb/c 마우스에서 IL2의 분해에 큰 역할을 한다[Ohnishi et al., Cancer Res. 50:1107-1112(1990)]. 또한, 오니시는 이 프로테아제의 강력한 억제제인 펩스스타틴으로 Balb/c 마우스를 처리하면 재조합 인간 IL2의 반감기를 연장시키고 이 마우스 모델에서 림포킨 활성화된 치사 세포 활성이 강화된다는 것을 밝혔다.

따라서, 혈청이나 신장의 프로테아제에 내성적인 표 1에 기재된 단백질이나 IL2의 프로테아제 내성 변형체의 개량은 혈청 반감기가 연장된 변형체를 얻기에 바람직한 전략이다.

바람직한 프로토콜은 다음과 같다. 당해의 돌연변이유발된 단백질의 라이브러리를 유전자-원거리 애피토프 태그(즉, 파지 표현 작제물의 N 말단에 존재하여 프로테아제로 절단시 애피토프 태그는 제거됨)를 보유한 표현 계에서 발현시킨다. 발현된 단백질을 소정의 프로테아제 또는 전체 인간 혈청과 같은 혼합 칵테일로 처리한다. 유전자 원거리 태그에 대한 항체를 이용하여 친화성 선택을 실시한다. 생물학적 기능(예, 동족 수용체에 대한 결합)을 요구하는 제2의 선별이나 선택을 실시한다. 애피토프 태그(그 결과 프로테아제 내성)를 보유한 파지를 회수하고 RSR로 처리한다. 이 공정을 원하는 내성도가 얻어질 때까지 반복한다.

다른 양태로서, 이 절차를 돌연변이 단백질이 고처리율 방식으로 발현 및 정제되고 생물학적 활성의 보유를 통해 프로테아제 내성에 대해 선별되는 선별 방식으로 실시한다.

본 발명의 다른 양태에서 당해의 단백질은 보존 기간을 증가시키기 위해 개량된다. 당해의 단백질을 암호하는 돌연변이유발된 핵산 서열의 라이브러리를 표현 방식 또는 고처리율 발현 방식으로 발현시키고, 개량된 안정성이 요구되는 조건(열, 금속 이온, 비생리적 pH, 예컨대 <6 또는 >8, 동결건조, 동결-해동)에 다양한 시간 동안 노출시킨다. 기능적 생존자로부터 예컨대 PCR로 유전자를 회수한다. DNA를 돌연변이 유발법, 예컨대 RCR로 처리하고, 이 공정을 원하는 개선도가 얻어질 때까지 반복한다.

IFN은 개선된 반감기를 가진 재조합체를 개량할 수 있는 기회를 제공한다. 이 유전자과에서는 아미노산 다양성의 가능한 재조합체가 $>10^{26}$ 존재한다. 이 재조합체는 야생형 IFN 유전자의 분절로 만들어지므로, 이 공정에서 임의의 신규 T 세포 에피토프가 형성된다면 그 수는 비교적 적어진다. 고도로 활성적인 분자는 천연 인터페론과 구조적으로 매우 유사할 가능성이 많고, 따라서 임의의 신규 B 세포 에피토프라면 그 수는 적다. 이 경우 인간 혈청 알부민과 같이 풍부한 혈청 단백질에 대한 친화성을 가진 재조합체를 선택하기 위하여 파지 분별법과 함께 재조합체의 대형 라이브러리를 조합할 수 있게 된다. 장기간 풍부한 혈청 단백질에 대해 친화성을 가진 단백질은 혈청 반감기도 향상된 것으로 밝혀졌다. 따라서, HSA와 같은 단백질에 대해 친화성을 보유한 재조합체에 대하여 파지 분별법을 사용하여 혈청 반감기가 연장된 IFN 재조합체를 선별할 수 있다. HSA에 대한 결합이나 HSA에 대한 친화성을 생성시키는 돌연변이는 IFN 활성을 실질적으로 감소시키거나 제거할 수 있기 때문에 효능적인 IFN 활성을 보유하는지 역설별을 실시해야 한다. 파지 분별법, 활성 분별법 및 셔플링을 반복적으로 실시하면 표적 혈청 단백질에 대해 원하는 친화도와 높은 활성을 보유한 재조합체를 얻을 수 있다. 시험 IFN의 반감기는 신생 자가 단백질로서 인간 혈청 단백질을 발현하는 돌연변이 마우스에서 시험할 수 있다.

이와 같은 시도는 복수의 동종 인간 대립유전자 또는 비대립 유전자 형식으로 존재하는 기타 다른 단백질에도 일반적으로 사용될 수 있다. 또한, 이 시도는 IL2와 같이 비대립유전자 인간 동족체가 없는 단백질에도 적용될 수 있다. IL2에 대한 유전자는 다른 포유류 유래의 IL2 유전자로 셔플링될 수 있으며, 바람직한 유전자는 영장류와 같은 근연성이 큰 포유류의 유전자이다. 이를 동족체에 의해 제공되는 "천연 다양성"의 재조합은 인간 및 마우스 세포에서의 셔플링된 인터페론의 활성으로 관찰되는 바와 같이 활성적이고 우수한 많은 분자를 보유한 매우 고품질의 라이브러리를 생성하는 것으로 예상된다.

K. 다중서브유니트 인자 중 단쇄 변형체의 개량

전술한 바와 같이, 본 발명의 일부 양태에서 RSR로 개량하고자 하는 기질은 단쇄 구조물인 것이 바람직하다. 동종다량체 단백질의 구조물에 대한 비대칭 돌연변이유발의 실시 가능성은 천연 동종다량체 상태에서 그 단백질에 가능하지 않은 상기 구조물의 추가 개량에 중요한 새로운 경로를 제공한다. 특히, 동종다량체 중의 소정의 돌연변이는 그 변화가 각각 동일 서브유니트 중에 존재하게 만들 것이다. 하지만, 단쇄 구조물의 경우 도메인은 서로 각각 돌연변이할 수 있다.

다중서브유니트 단백질은 새롭고 유용한 성질을 가진 단쇄 작제물로 전환될 수 있다는 것이 많은 단백질에서 입증된 바 있다. 특히, 항체 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 단쇄 Fv에 연결되어[Bird et al., *Science* 242:423-426(1988)], 개선된 열안정성[Young et al., *FEBS Lett* 377:135-139(1995)] 또는 단백분해작용에 대한 감수성[Solar et al., *Prot. Eng.* 8:717-723(1995)]을 가진 항체를 생성한 경우가 있다. 또한, 동종이량체인 IL5의 기능적 단쇄 변형체도 작제되었고, 야생형 단백질과 유사하게 IL5 수용체에 대한 친화성을 보유한 것으로 밝혀졌으며, 이 작제물을 사용하여 이량체의 비대칭 돌연변이유발법을 실시하기도 하였다[Li et al., *J. Biol. Chem.* 271:1817-1820(1996)]. 우로키나제형 플라스미노겐 활성인자의 단쇄 변형체도 만들어졌고, 이 단쇄 작제물은 천연 동종이량체보다 플라스미노겐 활성인자 억제제 제1형에 대해 보다 내성적인 것으로 밝혀졌다[Higazi et al., *Blood* 87:3545-3549(1996)]. 마지막으로, 단쇄 인슐린형 성장인자 I/인슐린 하이브리드가 만들어졌고, 천연 리간드보다 키메라 인슐린/IGF-1 수용체에 대해 보다 큰 친화성을 보유하는 것으로 밝혀졌다[Kristensen et al., *Biochem. J.* 305:981-986(1995)].

일반적으로, 링커는 당해의 단백질 중 1 서브유니트의 아미노 말단을 복합체 중의 다른 서브유니트의 카르복실 말단에 결합시키는 것으로 제조한다. 이 융합 단백질은 동종이량체, 동종다량체, 이종이량체 및 보다 고차원의 이종다량체의 결합 변형체로 구성될 수 있다. 가장 단순한 경우는 결합될 천연 말단 사이에 폴리펩티드 링커를 첨가하는 것이다. 그러면 2가지 유의적인 변형이 이루어질 수 있다. 첫째, 결합 내외 결합 주위의 야생형 서열 및 링커내 변화의 상이한 라이브러리를 작제하여 활성 융합 단백질의 작제를 용이하게 할 수 있다. 둘째, 장 등[Zhang et al., *Biochemistry* 32:12311-12318(1993)]은 천연 아미노 말단 및 카르복실 말단을 결합시켜 신규 아미노 및 카르복시 말단을 단백질로 조작된 T4 리소자임의 환형과 돌연변이에 대하여 개시하였다. 이 환형 과돌연변이, 링커의 라이브러리 및 링커에 인접한 결합 서열의 라이브러리 방법은 지형학적 결합 전략과 1차 서열이 상이한 라이브러리를 작제할 수 있게 한다. 이 라이브러리를 발현시키고 활성에 대하여 선택한다. 선택이나 선택에는 전술한 전략 중 어떤 방법도 사용할 수 있고, 대부분의 경우에는 파지 표현이 바람직하다. 활성 융합 단백질을 암호하는 유전자를 회수, 돌연변이유발, 재선택 및 표준 RSR 방법으로 처리하여 기능을 최적화시킨다. 선택된 돌연변이 단쇄 작제물의 개체군은 2가지 별도 PCR 반응으로 PCR 증폭시켜 두 도메인 각각을 별도로 증폭시키는 것이 바람직하다. 이와 같이 별도로 증폭된 도메인은 별도 반응으로 셔플링시키고, 그 다음 2 개체군을 PCR 재어셈블리로 재조합시켜 추가 선택과 개량에 사용할 수 있는 완전한 단쇄 작제물을 만든다.

V. 약학적 단백질의 특성 개량

A. 당해의 세포 유형이나 수용체에 대한 특이성 개량

표 I에 기재된 단백질 대부분은 당해 약제의 수용체 또는 리간드이다. 케모킨 또는 인터루킨과 같은 많은 작동물질은 1가지 이상의 수용체 대하여 작동작용을 한다. 개선된 특이성을 보유한 개량된 돌연변이체는 특정 부작용 프로파일에 연루된 수용체에 대한 활성의 상실로 인하여 부작용이 감소될 수 있다. 이와 같은 리간드/수용체 대부분에서 개선된 친화성을 보유한 돌연변이체 형태는 개선된 약학적 성질을 나타낼 것이다. 예컨대, CCR5 또는 CXCR4 또는 이 둘 모두에 대해 개선된 친화성을 보유한 RANTES의 길항성 형태는 소정 투여량의 약물에 대한 수용체 점유 면적을 증가시켜 HIV 감염의 개선된 억제제로서 사용될 수 있다. RSR과 함께 전술한 선택 및 선별을 사용하여 표 I에 기재된 임의의 단백질의 친화성과 특이성을 개선시킬 수 있다. 예컨대, 포유류 표형 방식은 TNF에 대해 개선된 친화성을 보유한 TNF 수용체를 개량하는데

사용될 수 있다.

또 다른 예로는 종양 세포 증식은 억제시키지만 NK 세포는 자극하지 않는 개량된 인터페론 알파 변형체, 저친화성의 IL2 수용체 복합체는 자극하나 고친화성 수용체는 자극하지 않는(그 반대일 수도 있음) IL2 변형체, 야생형 단백질에 의해 인식되는 V 베타 단백질(바람직하게는 단독 V 베타)의 서브세트만을 자극하는 초항원, 당해의 수용체에만 특이적으로 길항작용하는 케모킨의 길항작용성 형태, 교차반응성이 감소된 항체 및 특정 수용체 복합체를 특이적으로 활성화시키는 키메라 인자를 포함한다. 이 후자의 경우의 일례로서, IL2 수용체 알파, 베타 및 감마 쇄[Theze et al., Imm. Today 17:481-486(1996)]에 결합할 수 있는 IL2 및 IL4, 7, 9 또는 15간의 키메라를 제조하고, 단핵구 상의 중간 친화성 IL2 수용체 복합체에 대한 결합은 보유하지만 활성화된 T 세포상의 고친화성 IL2 알파, 베타, 감마 수용체 복합체에 대해서는 친화성이 감소된 키메라를 선택할 수 있다.

B. 효능이 증가된 작동물질 개량

본 발명의 일부 양태에서, 바람직한 전략은 RSR과 함께 전술한 전세포 방식을 사용하여 작동물질 활성이 증가된 돌연변이체를 선택 또는 선별하는 것이다. 예컨대, IL3 돌연변이체의 라이브러리는 그램 등 [J. Immun. Meth. 161:169-176(1993)]에 기재된 바와 같이 파지 또는 파지미드상에서 활성 형태로 발현된다. 플라크 정제 파지로 감염시켜 얻는 클론 용균물은 96웰 미량역가 방식과 같이 고처리율 방식으로 제조한다. GFP와 같은 리포터 유전자를 발현하는 IL3 의존적 세포주를 고처리율 96웰에서 파지 스트으로 자극한다. 파지 상청액의 최대 희석율에서 양성 시그널을 나타내는 파지를 회수하고, 대안으로 돌연변이체 IL3를 암호하는 DNA를 PCR로 회수할 수 있다. 일부 양태에서, IL3 반응성 프로모터의 제어하에 GFP를 발현하는 단세포를 IL3 파지미드 라이브러리로 자극하고, 양성 세포를 FACS로 분류한다. 그 다음 회수된 핵산을 PCR로 처리하고, 원하는 개선도가 얻어질 때까지 상기 공정을 반복한다.

[표 1]

폴리펩티드 개량 후보

명칭	명칭
알파-1 항트립신안지오스타틴항용혈 인자아포지단백아포단백심방성 나트륨배설증가 인자심방성 나트륨배설증가 폴리펩티드심방성 펩티드바실러스 쿠린젠시스 독소(Bt 독소)C 케모킨(즉, 림포택틴)C-X-C 케모킨(예, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG)칼시토닌CC 케모킨(예, 단핵구 화학주성 단백질-1, 단핵구 화학주성 단백질-2, 단핵구 화학주성 단백질-3, 단핵구 염증 단백질-1 알파, 단핵구 염증 단백질-1 베타, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262)CD40 리간드섬모성 신경영양성 인자(CNTF)콜라겐결장 자극 인자(CSF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF)보체 인자 5a보체 억제제보체 수용체 1상피 성장 인자(EGF)에리트로포이에틴제IX인자제VII인자제VIII인자제X인자피브리노겐피브로넥틴FLT-3 수용체 길항물질글루코세레브로시다제고나도트로핀성장 호르몬소마토메din소마토스타틴소마토트로핀간(幹)세포 인자스트렙토키나제초항원, 즉 스타필로코커스 내독소(SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), 독소 쇼크 증후군 독소(TSST-1), 박탈 독소 A 및 B, 발열성 외독소 A, B 및 C 및 엠.아스리티디스 분열촉진인자	고슴도치 단백질, (예, 소닉, 인도, 사막)해모글로빈(혈액 대체용, 방사선감작용)하루딘인간 혈청 일부민인슐린 인터페론 감마인터루킨 20(흑색종 분화 관련 유전자 7)인터루킨(1 내지 18)락토페린 렙틴백혈병 억제 인자(LIF)루시퍼라제뉴트리호중구 억제 인자(INF)온코스타틴-M골형성 단백질부갑상선 호르몬단백질 A단백질 GRANK(NK-κβ의 수용체 활성인자)RNAK 리간드자궁이완인자레닌연어 칼시토닌연어 성장 호르몬가용성 CD4가용성 CD28 가용성 CD40가용성 CD40 리간드가용성 CD80(B7-1)가용성 CD150(SLAM)가용성 CD152(CTLA-4)가용성 보체 수용체 1가용성 1-CAM 1가용성 INF 감마 수용체가용성 인터루킨 수용체(IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20)가용성 렙틴 수용체 가용성 RANK가용성 TNF 수용체초과산화물 디스뮤타제트롬보포이에틴티모신 알파 1조직 플라스미노겐 활성인자형질전환 성장 인자 베타종양 괴사 인자 베타(TNF 베타)종양 괴사 인자 수용체(TNFR)종양 괴사 인자-알파(TNF 알파)우로카니제바이러스 IL10 동족체

C. 진핵 시그널 형질도입이나 전사 경로에 관여하는 성분의 개량

전술한 선별과 선택 반응을 사용하고, 여러 가지 방식으로 RSR을 사용하여 진핵 시그널 형질도입 또는 전사 경로를 변형시킬 수 있다. 당해 시그널 형질도입 경로에 관여하는 성분이나 조절 영역과 이 영역과 상호작용할 수 있고 전사를 유도하는 화학제와 상호작용할 수 있는 전사 활성인자의 모든 성분을 개량할 수 있다. 이와 같이 하면 천연 유도인자나 이 정상 유도인자의 유사체에 의해 전사가 보다 강력하게 활성화되는 조절 시스템이 만들어진다. 이 기법은 생명공학 대상물의 다양한 분석법을 개발하고 최적화하는데 바람직하다. 예컨대, 수십가지 7 경막 수용체(7-TM)는 약물 발견의 유효한 표적이다[예컨대, Siderovski et al., Curr Biol. 6(2) 211-212(1996); An et al., FEBS Lett. 375(1-2) 121-124(1995); Raport et al., Gene, 163(2) 295-299(1995); Song et al., Genomics, 28(2) 347-349(1995); Strader et al. FASEB J., 9(9) 745-754(1995); Benka et al., FEBS Lett., 363(1-2) 49-52(1995); Spiegel, J.Clin Endocrinol.Metab., 81(7) 2434-2442(1996); Post et al., FASEB J., 10(7) 741-749(1996); Reisine et al., Ann NY Acad.Sci., 780:168-175(1996); Spiegel, Annu.Rev.Physiol., 58:143-170(1996); Barak et al., Biochemistry, 34(47):15407-15414(1995); 및 Shenker, Baillieres Clin. Endocrinol. Metab., 9(3):427-451(1995)]. 이 수용체의 작동물질 및 길항물질에 대한 민감한 고처리율 분석법의 개발은 상기 리간드의 발견에 있어 조합 화학의 완전한 가능성을 이용하는데 필수적이다. 또한, 당해의 신규 화합물이나 단백질에 대해 작동적으로 응답반응하는 7-TM을 개량하면 여러 화합물에 대한 생물검출기 및 바이오센서도 개발할 수 있다. 이 경우, 선택은 검출되는 신규 화합물이나 폴리펩티드에 의해 활성화되는 구조물에 대해 이루어질 것이다. 선별은 원하는 개선이 광 생산과 연결되므로 간단히 형광 또는 광 활성화 세포

분류법으로 실시할 수 있다.

바이오 센서는 약물과 환경 오염물과 같은 소분자의 검출 외에도, 수용체가 있거나, 수용체가 반복적 서열 재조합에 의해 개량될 수 있는 임의의 화합물, 예컨대 호르몬, 성장 인자, 금속 및 약물에 대해 응답 반응하는 것도 개발될 수 있다. 이 수용체는 세포내 존재하는 전사의 직접적인 활성인자이거나, 인산화 캐스캐이드와 같이 시그널 전사를 간접적으로 활성화시키는 막결합된 수용체일 수 있다. 또한, 전사에 전혀 영향을 미치지 않고 시그널 생성 경로의 성분을 전사후 일부 변형시켜 시그널을 생성할 수도 있다. 이 수용체는 여러 리간드를 커플링시키는데 역할을 하는 도메인과 여러 시그널링 도메인을 융합시켜 만들 수도 있다. 또한, 반복적 서열 재조합을 사용하여 생성된 시그널의 진폭을 증가시켜 키메라 수용체의 발현과 기능을 최적화하고 수용체에 의해 검출된 화합물의 특이성을 변화시킬 수 있다.

예컨대, G 단백질은 효모 시그널 형질도입 경로에 포유류 7-TM 수용체가 효과적으로 커플링되도록 개량시킬 수 있다. 현재 공지된 포유류 종의 G 알파 단백질 좌에는 23가지가 있고, 이를 서열과 기능적 유사성에 따라 그룹화하면 4군, 즉 Gs(Gna, Gna1), Gi(Gnai-2, Gnai-3, Gnai-1, Gnao, Gnat-1, Gnat-2, Gnaz), Gq, (Gnaq, Gna-11, Gna-14, Gna-15) 및 G12(Gna-12, Gna-13)[B.Nurnberg et al., J.Mol.Med., 73:123-132(1995)]로 나누어진다. 이들은 내인성 GTPase 활성을 보유하여 효소와 이온 채널과 같은 하류 작동인자와 리간드 결합된 수용체 간에 복구성 기능적 커플링을 가능케 한다. G 알파 단백질은 G 베타 및 G 감마 단백질 뿐만 아니라 이들의 동족 7-TM 수용체에 비공유적으로 커플링한다. 수용체와 시그널 특이성은 G 알파, G 베타(5개 유전자좌 공지) 및 G 감마(7개 유전자좌 공지) 서브유니트의 특정 조합에 의해 조절된다. 리간드 결합된 수용체에 의한 이종상상체 복합체의 활성화는 복합체를 G 알파 단량체와 G 베타, 감마 이량체로 해리시킨 다음, 하류 작동인자 단백질과 회합하여 시그널을 전송한다. 이중 G 알파 서브유니트가 7-TM과 접촉하는 서브유니트인 것으로 추정되며, 따라서 포유류 7-TM 유래의 시그널을 효모 하류 유전자로 전송할 수 있는 키메라 또는 개량된 G 알파 서브유니트를 개량하기 위한 문제의 초점이다.

포유류 수용체에 대한 효모계 생물검정법은 신규 리간드 개발을 매우 용이하게 할 것이다. 강 등[Kang et al., Mol.Cell Biol. 10:2582-2590(1990)]은 포유류 및 하이브리드 효모/포유류 G 알파 단백질을 이용하여 포유류 세포내 시그널 형질도입에 관련된 G 단백질의 알파 서브유니트의 동족체인 돌연변이 SCG1(GPA1)을 보유하는 효모 균주의 부분 보완에 대하여 논하고 있다. 이 하이브리드는 일부 기능, 예컨대 scg1 균주의 성장 결손을 보완하지만 교배를 유도하지 않고, 따라서 폐로몬 시그널 형질도입 경로에서 완전하게 보완 기능을 발휘하지 못한다. 프라이스 등[Price et al., Mol.Cell Biol. 15:6188-6195(1995)]은 효모내에서 래트의 소마토스탄틴 수용체 아형 2(SSTR2)를 발현시켰고, 다른 HIS3(-) 세포가 히스티딘이 결실된 최소 배지에서 증식하도록 폐로몬 응답성 프로모터 FUS-1의 제어하에 HIS3 리포터 유전자에 대한("커플링") 효모 및 키메라 포유류/효모 G 알파 서브유니트를 통해 상기 7-TM 수용체가 리간드 커플링 시그널을 전송하는 것을 입증하였다.

이와 같은 균주는 포유류 수용체에 대한 수용체 균주로서 유용하지만, 강 등의 연구에서 예시된 바와 같이 중요한 단점도 갖고 있다. 즉 효모 폐로몬 수용체 유래의 시그널이 포유류 G 단백질로 전송되는 것이 차단되는 것으로 나타난다. 일반적으로, 포유류 7-TM 수용체를 효모 시그널 형질도입 경로에 커플링시키기 위해 포유류 수용체를 효모, 포유류 또는 키메라 G 알파 단백질에 커플링시키면, 이들은 그 경로 중의 하류 성분과 생산적으로 상호작용하여 FUS-1과 같은 폐로몬 응답성 프로모터의 발현을 유도할 것이다. 이와 같은 기능적 재구성은 일반적으로 "커플링"이라고 부른다.

본 명세서에 기재된 방법들을 사용하면 효모 시그널 형질도입 경로에 대한 포유류 7-TM 수용체의 커플링을 개량할 수 있다. 일반적인 시도는 다음과 같다. (1) 프라이스에 의해 개시된 것과 유사한 변형된 폐로몬 응답 반응 경로를 가진 효모 균주[예, FAR1(G₁ 시클린의 음성 조절인자) 결손 균주, 및 폐로몬 존재하에 세포가 과민성이 되게 하는 SST2 결손형 균주]에 당해의 7-TM을 클로닝한다. (2) GPA1이나 동종 효모 G 알파 단백질과 상호작용하는 것으로 알려지거나 추정되는 포유류 G 알파 단백질 간 키메라의 라이브러리를 제작한다. (3) 폐로몬 응답성 프로모터 FUS1의 제어하에 HIS3과 같은 선택성 리포터 유전자를 배치한다[Price et al., Mol. Cell Biol. 15:6188-6195(1995)]. 대안적으로, 루시퍼라제와 같은 선별성 유전자는 FUS1 프로모터의 제어하에 배치할 수도 있다. (4) 라이브러리(2)를 사용하여 균주(3)[HIS(-)]을 형질전환시킨다. (5) 예컨대 HIS3 발현을 요구하는 리간드의 존재하에 최소 평판상에서 형질전환체의 라이브러리를 증식시켜 당해 리간드에 대한 응답반응으로 리포터를 발현하는 것을 선별하거나 선택한다. (6) 선택한 세포를 회수하고, RSR을 적용하여 폐로몬 응답성 프로모터 FUS1의 제어하에 리포터의 개선된 발현을 개량한다.

당해의 시그널 형질도입 경로에 대한 최적화된 리포터 작제물로 균주를 개량하는데 있어 고려해야 할 2번째 중요한 문제는 시그널 대 노이즈 비(유도 조건 대 비유도 조건하에 유전자 발현의 비)를 최적화하는 것이다. 많은 7-TM 경로는 일반 리포터 유전자의 최대 유도가 기준치에 비해 5 내지 10배 정도로 누설적이다. 이와 같은 범위의 시그널 대 노이즈는 여러 고처리율 분석법에서 얻어지는 작은 효과를 검출하기에는 불충분할 수 있다. 따라서, 비유도 상태에는 활성화가 한계치 바로 아래가 되도록 조정된 제2의 비선형 증폭계와 7-TM 경로를 커플링하는 것이 바람직하다. 비선형 증폭 계의 예는 람다 P_L 프로모터에 의해 유도되는 유전자의 발현이다. cl 프로모터내 3개의 인접 부위에 결합된 람다 억제인자간 복합 공조 상호작용은 억제인자의 특정 농도 이상에서 매우 효과적인 억제작용을 나타낸다. 특정 임계치 이하의 농도에서는 급격한 감소가 나타나고, 억제인자 농도가 작게 감소하여도 유전자 발현은 크게 증가되는 참이 있다 [Ptashne, A Genetic Switch: Phage Lambda and Higher Organisms, Blackwell Scientific Publ. Cambridge, MA, 1992]. 이와 유사한 효과는 예컨대 GAL4에 의해 조절되는 일부 진행 프로모터에서 관찰된다. 이와 같은 프로모터(GAL4)에 대한 전사인자의 제한 성분을 GAL4 향상성 7-TM 응답 프로모터의 제어하에 배치하여 발현시키면 7-TM 경로 시그널이 증폭되도록 약간 유도하여 역시 GAL4 의존적 프로모터의 제어하에 있는 리포터 작제물의 발현을 더욱 크게 변화시킨다.

이와 같은 커플링계의 한 예는 FUS-1 폐로몬 응답성 프로모터의 제어하에 GAL4를 배치하고, FUS-1 프로모터의 상류에 GAL4 결합 부위를 배치하여 세포내 GAL4(그 자체가 전사 증강인자임) 농도가 그 자신을 양성적으로 피드백하는 것이다. 또한, 리포터 유전자를 GAL4 활성화 프로모터의 조절하에 두는 것이다. 이 시스템은 GAL 발현이 비선형적으로 자가 증폭하고 세포내 특정 한계치에 도달하면 루시퍼라제와 같은 리포

터 유전자의 발현을 동시 증폭하도록 디자인한다. 이 때, RSR을 사용하면 다음과 같이 원하는 시그널링 성질을 가진 리포터 작제물을 개량하는데 큰 도움이 된다. (1) GAL4/페로몬 경로 조절된 GAL4 유전자와 GLA4 조절된 리포터 유전자를 모두 포함하는 단일 플라스미드 작제물을 만든다. (2) 이 작제물을 돌연변이시키고, 이를 이용하여 7-TM 및 키메라 효모/당해의 포유류 단백질을 발현하는 적당하게 유전자 조작된 효모 균주를 형질전환시킨다. (3) 세포를 작동물질로 자극하고 리포터 유전자의 활성에 근거하여 선별(또는 선택)한다. 바람직한 방식은, 루시퍼라제가 리포터 유전자이고 작동물질로 자극하기 전과 자극 후에 활성을 정량하여 각 콜로니의 시그널 대 노이즈 비를 정량적으로 측정한다. (4) 개선된 리포터 성질을 가진 세포를 회수하고, 작제물을 셔플링한 뒤, RSR을 적용하여 최적의 시그널 대 노이즈 특성을 제공하도록 플라스미드를 더욱 개량한다.

이와 같은 방법은 일반적인 것으로, 시그널 도입 경로 또는 전사 인자의 임의 성분을 전술한 RSR 및 선별과 선택 과정을 사용하여 개량시킬 수 있는 방법을 예시한 것이다. 예컨대, 구체적인 방법을 사용하면 신규 리간드에 대한 특이성, 신규 리간드에 대한 핵 수용체의 특이성(예컨대, 소정 유전자 세트가 소정의 화학제로 처리시 유도될 수 있도록 돌연변이식물에서 당해 유전자의 제조제 또는 기타 다른 소분자 유도성 발현을 얻기 위한 목적), 바이러스 인자에 대해 응답성이 된 전사 인자의 특이성(그 결과 이 전사 인자를 발현하는 세포(유전자 요법 작제물로 처리된 세포 또는 돌연변이체)내에서 항바이러스 유전자 또는 치사 유전자를 유도함), 또는 암 세포의 활성에 대한 전사 인자의 특이성(예컨대, 종양 특이적 방식으로 조건 치사 유전자를 발현하는 유전자 치료 작제물로 감염시킬 수 있는 p53 결손형 세포)을 가진 7-TM 수용체를 개량할 수 있다.

다음 실시예는 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니라 단지 예시하기 위한 것이다.

실시예

실험 실시예

1. BIAP의 개량

BIAP를 개량하기 위한 바람직한 전략은 다음과 같다. 각 올리고의 중심 20개 염기가 야생형 단백질을 특정하지만 축퇴성 코돈을 가진 야생형 단백질 서열을 암호하도록 60mer 올리고뉴클레오티드로부터 코돈 용법 라이브러리를 작제한다. 이.콜리와 같이 선택한 원핵 숙주에서 매우 희귀한 코돈은 사용하지 않는 것이 바람직하다. 올리고의 각 말단의 20개 염기는 이.콜리 중에 존재하는 비축퇴성이지만 바람직한 코돈을 사용하는 것이 좋다. 이 올리고뉴클레오티드를 전술한 바와 같이 전길이 유전자로 어셈블리한다. 어셈블리된 생성물을 당해 기술 분야에 공지된 기법으로 발현 벡터에 클로닝한다. 일부 양태에서, 코돈 용법 라이브러리는 분비 리더 서열의 라이브러리와 함께 발현하고, 그 각각은 암호된 BIAP 단백질을 이.콜리 주변세포질로 유도한다. 리더 서열의 라이브러리는 리더 서열과 돌연변이체의 조합을 최적화하는데 사용한다. 리더 서열의 예는 샤쓰 등[Schatz et al. Ann Rev. Genet. 24:215-248(1990)]에 의해 검토되어 있다. 클로닝된 BIAP 유전자는 아라비노스 프로모터와 같은 유도성 프로모터의 조절하에 발현시킨다. 아라비노스 유도된 콜로니는 BIAP의 기질인 브로모-클로로-인돌릴 포스페이트(BICP)을 분무하여 선별한다. 청색이 가장 짙은 콜로니를 육안 관찰로 채취하여 본 명세서에 기재된 바와 같이 RSR 절차로 처리한다.

코돈 용법 라이브러리 작제용 올리고뉴클레오티드는 표 11에 기재한다. 이 프로모터의 대응 위치는 도 1에 도시하였다.

표 11

1. AACCCCTCCAG TTCCGAACCC CATATGATGA TCACCCTGCG TAAACTGCCG
2. AACCCCTCCAG TTCCGAACCC CATATGAAAA AAACCGCT
3. AACCCCTCCAG TTCCGAACCC ATATACATAT GCGTGCTAAA
4. AACCCCTCCAG TTCCGAACCC CATATGAAAT ACCTGCTGCC GACC
5. AACCCCTCCAG TTCCGAACCC GATATACATA TGAAACAGTC
6. TGGTGTATG TCTGCTCAGG CDATGGCDGT DGAYTTYCAY CTGGTTCCGG
TTGAAGAGGA
7. GGCTGGTTTC GCTACCGTTG CDCARGCDGC DCCDAARGAY CTGGTTCCGG
TTGAAGAGGA
8. CACCCCGATC GCTATCTCTT CYTTYGCDTC YACYGGYTCY CTGGTTCCGG
TTGAAGAGGA
9. GCTGCTGGCT GCTCAGCCGG CDATGGCDAT GGAYATYGGY CTGGTTCCGG
TTGAAGAGGA

10. TGCCGCTGCT GTTCACCCCG GTDACYAARG CDGCDCARGT DCTGGTTCCG
GTTGAAGAGGA A
11. CCCGGCTTC TGGAACCGTC ARGCDGCDCA RGCDCTGGAC GTTGCTAAAA
AACTGCAGCC
12. ACGTTATCCT GTTCCTGGGT GAYGGYATGG GYGTDCCDAC CGTTACCGCT
ACCCGTATCC
13. AAACTGGTC CGGAAACCCC DCTGGCDATG GAYCARTTYC CGTACGTTGC
TCTGTCTAAA
14. GGTCGGGAC TCTGCTGGTA CYGCDACYGC DTAYCTGTGC GGTGTTAAAG
GTAACTACCG
15. CTGCTCGTTA CAACCAGTGC AARACYACYC GYGGYAAYGA AGTTACCTCT
GTTATGAACC
16. TCTGTTGGTG TTGTTACAC YACYCGYTD CARCAYGCDT CTCCGGCTGG
TGCTTACGCT
17. GTACTCTGAC GCTGACCTGC CDGCDGAYGC DCARATGAAC GGTTGCCAGG
ACATCGCTGC
18. ACATCGACGT TATCCTGGGT GGYGGYCGYA ARTAYATGTT CCCGGTTGGT
ACCCCGGACC
19. TCTGTTAACG GTGTTCGTAA RCGYAARCAR AAYCTGGTDC AGGCTTGGCA
GGCTAAACAC
20. GAACCGTACC GCTCTGCTGC ARGCDGCDGA YGAYTCYTCT GTTACCCACC
TGATGGGTCT
21. AATACAACGT TCAGCAGGAC CAYACYAARG AYCCDACYCT GCAGGAAATG
ACCGAAGTTG
22. AACCCCGCTG GTTCTACCT GTTYGTDGAR GGYGGYCGYA TCGACCACGG
TCACCAACGAC
23. GACCGAAGCT GGTATGTTCG AYAAYGCDAT YGCDAARGCT AACGAACTGA
CCTCTGAACT
24. CCGCTGACCA CTCTCACGTT TTYTCYTTYG GYGGYTAYAC CCTGGCTGGT
ACCTCTATCT
25. GCTCTGGACT CTAAATCTTA YACYTCYATY CTGTAYGGYA ACGGTCCGGG
TTACGCTCTG
26. CGTTAACGAC TCTACCTCTG ARGAYCCDTC YTAYCARCAG CAGGCTGCTG
TTCCGCAGGC
27. AAGACGTTGC TGTTTCGCT CGYGGYCCDC ARGCDCACT GGTTCACGGT
GTTGAAGAAG

28. ATGGCTTCG CTGGTTGCGT DGARCCDTAY ACYGAYTGYA ACCTGCCGGC
TCCGACCACC
29. TGCTCACCTG GCTGCTT MAC CDCCDCCDCT GGCDCTGCTG GCTGGTGCTA
TGCTGCTCCT C
30. TTCCGCCTCT AGAGAATTCT TARTACAGRG THGGHGCCAG GAGGAGCAGC
ATAGCACCAG CC
31. AAGCAGCCAG GTGAGCAGCG TCHGGRATRG ARGTHGCGGT GGTCGGAGCC
GGCAGGTT
32. CGCAACCAGC GAAAGCCATG ATRTGHGCHA CRAARGTYTC TTCTTAAACA
CCGTGAACCA
33. GCGAAAACAG CAACGTCTTC RCCRCCRTGR GTYTCRGAHG CCTGCGAAC
AGCAGCCTGC
34. AGAGGTAGAG TCGTTAACGT CHGGRCGRGA RCCRCCRCCC AGAGCGTAAC
CCGGACCGTT
35. AAGATTAGA GTCCAGAGCT TTRGAHGGHG CCAGRCCRAA GATAGAGGTA
CCACCGCAGGG
36. ACGTGAGAGT GGTCAGCGGT HACCAGRATC AGRGTRTCCA GTTCAGAGGT
CAGTCGTTA
37. GAACATACCA GCTTCGGTCA GHGCCATRTA HGCYTRTCG TCGTGGTGAC
CGTGGTCGAT
38. GGTAGAAACC ACGCGGGTTA CGRGAHACHA CRCGCAGHGC AACTTCGGTC
ATTTCCTGCA
39. TCCTGCTGAA CGTTGTATT CATRTCHGCH GGYTCRAACA GACCCATCAG
GTGGGTAACA
40. CAGCAGAGCG GTACGGTTCC AHACRTAYTG HGCRCCTGG TGTTTAGCCT
GCCAAGCCTG
41. TACGAACACC GTTAACAGAA GCRTCRTCHG GRTAYTCHGG GTCCGGGGTA
CCAACCGGGA
42. CCCAGGATAA CGTCGATGTC CATRTTRTH ACCAGYTGHG CAGCGATGTC
CTGGCAACCG
43. CAGGTCAGCG TCAGAGTACC ARTTRCGRTT HACRGTRTGA GCGTAAGCAC
CAGCCGGAGA
44. TGGTAACAAC ACCAACAGAT TTRCCCHGCYT TYTTHGCRCG GTTCATAACA
GAGGTAACCTT
45. CACTGGTTGT AACGAGCAGC HGCRGAHACR CCRATRGTRC GGTAGTTACC
TTAACACCG

46. ACCAGCAGAG TCCGGAACCT GRCGRTCHAC RTTRTARGTT TTAGACAGAG
CAACGTACGG
47. GGGTTTCCGG ACCCAGTTA CCRTTCATYT GRCCYTTCA GATACGGGTA
GCGGTAACGG
48. CCCAGGAACA GGATAACGTT YTTHGCHGCR GTYTGRATHG GCTGCAGTTT
TTTAGCAACG
49. ACGGTTCCAG AAAGCCGGGT CTTCCTCTTC AACCGGAACC AG
50. CCTGAGCAGA CATAACACCA GCHGCHACHG CHACHGCCAG CGGCAGTTA
CGCAGGGTGA
51. ACCGGGGTGA ACAGCAGCGG CAGCAGHGCC AGHGCRATRG TRGACTGTTT
CATATGTATA TC
52. GCCGGCTGAG CAGCCAGCAG CAGCAGRCCH GCHGCHGCGG TCGGCAGCAG
GTAGTTCA
53. AAGAGATAGC GATCGGGGTG GTCAGHACRA TRCCCAGCAG TTTAGCACGC
ATATGTATAT
54. CAACGGTAGC GAAACCAGCC AGHGCHACHG CRATHGCRAT AGCGGTTTTT
TTCATATG
55. AGAATTCTCT AGAGGCGGAA ACTCTCCAAC TCCCAGGTT
56. TGAGAGGTTG AGGGTCCAAT TGGGAGGTCA AGGCTTGGG

모든 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3'로 기재하였다. 축퇴성 위치의 코드는 R: A 또는 G, Y: C 또는 T, H: A 또는 C 또는 T, D: A 또는 G 또는 T이다.

II. 포유류 표면 표현

면역 반응 동안 항체는 천연적으로 친화성 성숙 과정으로 처리되어 동족 항원에 대해 개선된 친화성을 보유한 돌연변이 항체를 만든다. 이 과정은 클론 선택과 커플링된 항체 유전자의 체세포 초과돌연변이에 의해 유도된다[Berek and Milstein, Immun. Rev. 96:23-41(1987)]. 패튼 등[Patten et al., Science 271: 1086-1091(1996)]은 135 마이크로몰의 친화도로 p-니트로페닐포스포네이트 헵тен에 결합하는 생식세포계 서열로부터, 9개의 체세포 돌연변이를 획득하고 10 nm의 친화도로 결합하는 친화성 성숙된 서열로 촉매 항체의 진행을 재구축하였다. 이 항체의 친화성 성숙은 CDR의 카세트 돌연변이유발법(또는 PCR 등에 의한 무작위 돌연변이유발법), 포유류 표현, 개선된 결합성에 대한 FACS 선택 및 개선된 결합을 암호하는 돌연변이의 재조합을 통해 개선된 친화성을 신속하게 개량시키는 RSR을 사용하여 반복적으로 개량할 수 있다.

가스코인 등의 문헌[Gascoigne et al. Proc.Natl.Acad.Sci(U.S.A) 84: 2936-2940(1987)]에 기재된 것과 유사한 계놈 항체 발현 셔틀 백터를 돌연변이 V 영역 엑손의 라이브러리가 셔틀 백터에 쉽게 클로닝될 수 있도록 작제한다. 카파 작제물은 퓨로마이신 내성을 암호하는 플라스미드에 클로닝하고 중쇄는 네오마이신 내성 암호 백터에 클로닝한다. 성숙 및 생식세포계 중쇄 및 경쇄의 V 영역을 암호하는 cDNA 유래의 가변 영역의 서열은 PCR 돌연변이유발법을 사용하여 계놈 셔틀 백터내 적당한 위치에 배치된 상보성 SfiI 부위와 함께 SfiI 부위가 인접된 계놈 엑손으로 재구성한다. VDJ 엑손에 인접한 인트론 SfiI 부위를 만드는데 사용된 올리고뉴클레오티드는 다음과 같다. 5' SfiI : 5'-TTCCATTCA TACATGGCCG AAGGGGCCGT
GCCATGAGGA TTTT-3'; 3'SfiI : 5'-TTCTAAATG CATGTTGGCC TCCTTGGCCG GATTCTGAGC CTTCAGGACC A-3'. 표준 PCR 돌연변이유발 방법을 사용하여 다음과 같은 잔기들(카베트[Sequence of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept of Health and Human Services, 1991]에 따라 번호매김)이 NNK 코돈(GATC, GATC, GC)으로 불규칙하게 만든 돌연변이체의 라이브러리를 만든다.

사슬	CDR	돌연변이된 잔기
V-L	1	30, 31, 34
V-L	2	52, 53, 55
V-H	2	55, 56, 65
V-H	"4"	74, 76, 78

안정한 형질감염체 세포주는 숙주로서 B 세포 미엘로마 AG8-653(K.Kearney의 증여물)을 사용하고 표준 전기침투 기법을 사용하여 2개의 경쇄 및 중쇄 작제물(성숙 및 생식세포계) 각각에 대하여 제조한다. 지정된 V-L 돌연변이체 라이브러리를 아호하는 돌연변이 플라스미드의 라이브러리를 사용하여 생식세포계 V-H를 발현하는 안정한 형질감염 세포주를 형질감염시키고, V-H 돌연변이체를 사용하여 생식세포계 V-L 안정한 형질감염체계를 형질감염시킨다. 이 2가지 경우 모두, 라이브러리는 원형질 융합[Sambrook et al., Molecular Cloning, CSH Press(1987)]으로 도입시켜 형질감염된 세포 대부분이 1개 및 단지 1개의 돌연변이체 플라스미드 서열을 수용하도록 한다(형질감염된 세포 대부분이 많은 플라스미드를 수용하여 각 세포가 여러 돌연변이체 서열을 발현하는 전기침투는 사용하지 않음).

이 항체에 의해 인식되는 p-니트로페닐포스포네이트 헵텐(JWJ-1)은 패튼 등[Science 271: 1086-1091(1996)]에 기재된 바와 같이 합성한다. JWJ-1은 EDAC(March, Advanced Organic Chemistry, Third edition, John Wiley and Sons, 1985)와 같은 표준 커플링 화합물을 사용하여 아미드 결합을 형성시키므로써 5-((2-아미노에틸)티오)아세틸(Pluroxolesein, Molecular Probes, Inc.)에 직접 결합시켜 단량체 JWJ-1-FITC 프로브를 제공한다. 화합력이 보다 높은 프로브를 얻기 위하여 "이량체" 접합체(FACS 마커에 커플링된 JWJ-1 2분자)를 만들어, 저친화성 상호작용(예컨대, 생식세포계 항체)이 FACS에 의해 보다 용이하게 검출되게 한다. 이것은 JWJ-1-FITC 2 당량 존재하에 항플로오레세인 항체에 결합된 텍사스 레드(Texas Red)로 염색하여 실시한다. 그 다음, IgG의 2가 구조는 동종의 2가 시약을 제공한다. 스픬 컬럼을 사용하여 항FITC 시약에 결합되지 않은 과량의 JWJ-1-FITC 분자를 제거한다. 4가 시약은 다음과 같이 제조한다. 바이오틴 1당량을 EDAC를 사용하여 에틸렌디아민 2 당량에 커플링시킨 다음, JWJ-1상의 자유 카르복실레이트에 커플링시킨다. 비오틴화된 JWJ-1 생성물을 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 질량 분광계로 특성규명하였다. FITC 표지된 아비딘을 비오틴화된 JWJ-1과 항온처리하여 4가 프로브를 생성하였다.

FACS 선택은 판카 등[Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 85:3080-3084(1988)]에 기재된 방법과 유사한 방법에 따라 다음과 같이 실시한다. 원형질 융합 방법(36 시간 내지 72 시간 동안 회수함)으로 돌연변이 항체 유전자의 라이브러리를 형자리감염시킨 후, 세포를 얼음 상에서 형광성 표지된 헵텐과 항온처리하였다. 항온처리는 얼음 상에서 실시하여 비특이적 배경값에 기여할 수 있는 FITC 접합체의 세포흡수를 최소화한다. 그 다음 세포를 세척 단계와 함께 또는 세척 단계 없이 FACS로 분류한다. FACS 세척 단계를 제외시키는 것이 바람직한데, 그 이유는 친화성 성숙 이전 생식세포계 항체의 오프율이 매우 급속하고[> 0.1 초 내지 1초; Patten et al., Science 271:1086-1091(1996)], 세척 단계가 복잡한 변수를 추가하기 때문인 것으로 추정된다. 세포 중 명도가 최고인 세포 0.1 내지 10%를 수거한다.

4가지 변수를 조작하여 증가된 결합성의 선택에 대해 최적화한다. 즉, 단량체 대 이량체 대 사량체 헵텐, 염색 반응에 사용된 헵텐의 농도(고친화도 Kd인 경우는 저농도를 선택함), 세척 및 FACS 간의 시간(저온 오프율인 경우는 장시간 처리함) 및 게이팅 선택성(즉, 최고 0.1 내지 10%, 보다 바람직하게는 최고 0.1%). 생식세포계, 성숙형 및 반생식세포계의 양 조합물을 발현하는 작제물은 상기 선택성을 최적화하는데 있어 대조군으로 사용한다.

플라스미드는 Hirt 상청액을 사용하여 이.콜리 숙주를 형질전환하여 FACS 선택된 세포로부터 회수한다. 또는, FACS 선택된 세포로부터 돌연변이 V 유전자 엑손을 PCR 증폭시킨다. 회수한 V 유전자 엑손은 RSR로 처리하고, 대응하는 게놈 서틀 벡터로 재클로닝하고, 이 절차를 평균 형광성 강도가 증가할 때까지 반복적으로 적용한다. 개선된 결합성에 대한 관련 양성 대조군을 친화도 성숙된 48G7 엑손(상기 Patten et al. 문헌 참조)으로 형질감염시킨다.

또 다른 실험에서는, 동수의 생식세포계와 2가지 반생식세포계 형질감염체 각각의 동수를 혼합한다. 명도가 가장 높은 세포를 전술한 조건하에서 선택한다. V 유전자를 PCR로 회수하고, 발현 벡터에 재클로닝한 뒤, 이.콜리 당 2개의 플라스미드를 사용한 뒤 원형질 융합시켜 동시형질감염시키거나, 또는 대량 전기침투를 사용하여 동시형질감염시킨다. 형질감염체의 평균 형광성 강도는 생식세포계 V 영역에 비하여 성숙형의 증량으로 증가할 것이다.

이 방법은 모든 수용체-리간드 또는 결합 파트너 상호작용을 개량하는데 적용할 수 있다. 천연 발현 방식을 사용하면 천연 리간드 또는 신규 리간드에 대한 친화성을 증진시키고자 하는 임의의 수용체의 돌연변이제 라이브러리를 발현시킬 수 있다. 그 대표적 예는 당해 리간드(즉, MHC/종양 펩티드 항원 복합체) 또는 TNF에 대한 TNF 수용체(TNF 활성을 중화시키기 위해 치료적으로 사용하는 TNF 수용체의 가용성 형태)의 친화성을 개선시키는 것이다.

이 방식은 또한 웨스타인 등[J.Exp.Med. 174:219-28(1991)]의 방법과 유사한 방법으로 유전자조작된 막 앵커와 함께 막결합형 리간드를 발현시켜 만든 리간드의 돌연변이체 형태를 선택하는데 사용할 수 있다. FACS 선택은 형광 표지된 수용체로 실시한다. 이 방식에서 예컨대, 개선된 수용체 길항물질은 천연 발생의 수용체 길항물질(예컨대, IL1 수용체 길항물질)로부터 개량시킬 수 있다. 또한, 동족 수용체에 대해서도 개선된 친화도를 가진 작동물질의 돌연변이 형태도 이 방식으로 개량시킬 수 있다. 이 돌연변이체는 보고된 IL3의 길항작용성 돌연변이체 형태와 유사하게 개선된 작동물질 또는 강력한 수용체 길항물질에 대한 시험 후보이다.

III. 알파 인터페론의 개량

관련성이 큰 1차 구조(78 내지 95% 동일성)와 광범위한 생물학적 활성을 보유한 18가지 공지 비대립유전자 인간 인터페론 알파(IFN- α) 유전자에는 18가지가 있다. 양친 분자와는 다른 목적 생물학적 활성이 있는 하이브리드 인터페론에 대해서는 다수가 개시되어 있다[Horisberger and Di Marco, Pharm. Ther. 66:507-534(1995)]. 콘센서스 인간 알파 인터페론, IFN-Con1을 14가지 공지 IFN- α 중에서 가장 공통된 잔기를 각 위치에 배치하여 합성적으로 작제하고, 천연 발생의 인터페론과 비교하는 것이 바람직하다[Ozes et al., J.Interferon Res. 12:55-59(1992)]. 이 IFN은 가장 근연성이 큰 IFN- α 인 IFN- α 2a에 비해 20개 아미노산 변화를 포함한다. IFN-Con1은 임의의 공지된 천연 IFN 아형보다 10배 높은 특이적 항바이러스 활성을 나타낸다. IFN- α Con1은 항바이러스, 항종식 및 NK 세포 활성화에 있어 재조합 IFN- α -2a(임상적으로 사용된 주 IFN) 보다 시험관내 활성이 10 내지 20배 더 높다. 따라서, 2가지 이상의 인터페론 중에서 가장 바람직한 종류를 결합시킨 인터페론 하이브리드를 생성하는 것이 상당히 바람직하다. 하지만, IFN- α 또는 IFN- α 수용체의 결정 구조가 없고 강력한 하이브리드가 다수 제공된다면 신규 하이브리드를 개발함에 있어 상당한 어려움이 있다[Horisberger and Di Marco, Pharm. Ther. 66:507-534(1995)].

IFN- α 의 생물학적 효과는 다양하고, 항바이러스 상태의 유도(해독을 정지시키고 mRNA를 분해하는 인자의 유도); 세포 성장의 억제; 제I군 및 제II군 MHC의 유도; 단핵구 및 대식세포의 활성화; 천연 킬러 세포의 활성화; 세포독성 T 세포의 활성화; B 세포에서 Ig 합성의 조절; 및 발열성 활성과 같은 성질을 포함한다.

다양한 IFN- α 아형은 여러 표적 세포에 대해 독특한 스펙트럼의 활성과 고유 부작용 프로파일을 갖고 있다[Ortaldo et al., Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 81:4926-4929(1984); Overall et al., J.Interferon Res. 12:281-288(1992); Fish and Stebbing, Biochem.Biophys.Res.Comm. 112:537-546(1983); Weck et al., J.Gen.Virol. 57:233-237(1981)]. 예컨대, 인간 IFN α 는 극히 중간 정도의 부작용이 있지만 항바이러스 활성은 낮다. 인간 IFN α 8은 매우 높은 항바이러스 활성이 있지만, 비교적 심각한 부작용을 나타낸다. 인간 IFN α 7은 NK 활성이 없고 다른 INF α 에 의한 NK 자극을 차단한다. 인간 IFN- α J는 NK 세포를 자극하는 성질이 부족하지만 IFN- α A의 자극 활성을 차단하고 NK 세포상의 IFN- α 수용체에 결합할 수 있다[Langer et al., J.Interferon Res. 6:97-105(1986)].

인터페론의 치료적 용도는 독감 유사 증상, 피로, 신경 질환(예, 환각), 발열, 간장 효소 상승 및 백혈구 감소증을 포함하는 다양하고 심각한 부작용 프로파일 때문에 제한된다. IFN- α 효과의 다중성은 IFN- α 계에 대한 수용체가 1개 이상이거나 또는 다성분 수용체라는 가설을 고무시켰다[R.Hu et al., J.Biol.Chem. 268:12591-12595(1993)]. 따라서, 인간 알파 IFN 중 풍부한 천연 발생의 다양성의 존재(및 재조합체의 큰 서열 간격)와 함께 IFN- α 수용체와 활성의 복잡성은 우수한 하이브리드를 작제할 수 있는 기회를 제공한다.

A. 서열 간격의 복잡성

도 2는 11가지 인간 IFN- α 의 단백질 서열을 도시한 것이다. 콘센서스와의 차이도 표시하였다. 모든 다양성 부위에 존재하는 축퇴성 코돈의 위치는 별표로 표시하였다. 서열을 정렬하여 조사한 결과 이 군의 알파 인터페론 유전자에 의해 암호된 아미노산으로 57번 위치에는 2개, 15번 위치에는 3개, 4번 위치에는 4개가 가능한 것으로 나타났다. 따라서, 이와 같은 천연 발생의 모든 다양성에서 나타나는 과돌연변이에 의해 암호된 가능한 다양성은 $2^{57} \times 3^{15} \times 4^4 = 5.3 \times 10^{26}$ 이다. 이 하이브리드 종에서 11개 인터페론 유전자 종의 총 175 부위에 분포된 76개 다행태제 중에 175개 변화 중 171개를, 상응하는 위치에 단일 축퇴성 코돈을 사용하는 동족 라이브러리에 병입시킬 수 있다. 예컨대, Arg, Trp 및 Gly은 모두 축퇴성 코돈(A,T,G)GG에 의해 암호될 수 있다. 이와 같은 전략을 사용하면, 축퇴성 올리고뉴클레오티드 1세트로 1.3×10^{25} 하이브리드를 포획할 수 있다. 표 III 내지 VI으로부터 명백히 알 수 있듯이, 총 7개의 인간 알파 인터페론을 셔플링하는데에는 올리고뉴클레오티드 27개이면 충분하다. 사실상 천연 다양성은 모두 이 올리고뉴클레오티드에 의해 암호되며, 표 V에 기재된 9개의 "블록" 올리고뉴클레오티드 중의 축퇴성에 의해 충분히 과돌연변이된 것이다.

B. 동족 서열 간격의 "조립" 연구의 성질

IFN 알파[Kontsek, Acta Vir. 38:345-360(1994)]의 모델 구조는 2차 구조 인자를 단일 유니트로서 유지시키고 동일성이 높은 영역내 분절 경계의 위치를 정위/선택하는 조합된 기준에 근거하여 9개 분절로 분류하였다. 따라서, 중간 축퇴성의 올리고뉴클레오티드 1세트를 사용하여 전 유전자계를 찾을 수 있다. 표 III 및 도 2는 각각 단백질과 DNA 수준에서 상기 경계의 정확한 위치를 제공한 것이다. 이와 같은 특정 분절화 도식은 임의적인 것으로 다른 분절화 도식도 사용될 수 있음을 자명한 것이다. 일반 전략은 유전자계 성분간 높은 동일성의 영역에 있어서의 재조합 경계의 위치 또는 상기 구조를 분절로 분해하는 특정 알고리듬에 따라 달라지지 않는다.

[표 III]

알파 인터페론의 분절화 계획

분절	아미노산	대립유전자수#	모든 변화 서열의 과돌연변이 수#
1	1-21	5	1024
2	22-51	10	6.2×10^4
3	52-67	6	96
4	68-80	7	1024
5	81-92	7	192
6	93-115	10	2.5×10^5
7	116-131	4	8
8	132-138	4	8
9	139-167	9	9126

많은 IFN은 분절 일부 상에서 동일하고, 따라서 각 분절은 7개 미만의 상이한 "대립유전자"가 존재한다. 따라서, 분절 "대립유전자"의 과돌연변이를 포함하는 라이브러리는 가능한 복잡성이 2.1×10^7 (5 분절 #1 $\times 10$ 분절 #2 $\times \dots \times 9$ 분절 #9)이다. 이것은 기재된 대부분의 선별 절차에서 조사될 수 있는 것보다 매우 큰 수로서, RSR을 사용하여 서열 간격을 연구하는 경우의 큰 문제이다.

C. IFN 알파 동족체 서열 간격 연구에 RSR을 사용하기 위한 상세한 전략

올리고 유도성 셔플링(즉, 가교 올리고뉴클레오티드)에 대해 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 인터페론 알파 하이브리드의 라이브러리를 작제하고, 전술한 일반 방법을 이용하여 개선된 기능을 가진 돌연변이체를 선별하거나 선택한다. 개선된 인터페론 활성에 대해 선별하거나 선택하는 방법에는 다양한 방식이 있고, 그 대부분은 인터페론의 고유 성질에 따라 달라지며, 이하 IFN을 기본으로 한 분석법에 대하여 상세히 설명하겠다.

D. 하이브리드 IFN 알파 서열 간격의 조립 연구 프로토콜

간략히 설명하면, 9개 분절의 11개 동족 형태를 과돌연변이시킨 라이브러리를 삭제한다(대부분의 경우 2개의 동족체는 소정 분절 상에서 동일함). 표 IV에 기재된 18개의 올리고뉴클레오티드를 가지고 모두 7개의 IFN 알파 유전자로부터 총 9개의 분절을 PCR 증폭하고, 올리고 유도성 재조합 방법을 이용하여 총길이 유전자로 재어셈블리하였다. 라이브러리로부터 임의의 수, 예컨대 1000개의 클론을 96월 발현/정제 방식으로 제조하였다. 가장 강력한 항바이러스 활성을 보유한 하이브리드를 선별하였다. 핵산은 PCR 증폭으로 회수하고 가교 올리고뉴클레오티드를 사용하여 재조합시켰다. 이 단계를 반복하여 원하는 성질을 가진 시험 후보를 얻었다.

E. $> 10^{26}$ 미립 하이브리드의 간격을 조사하기 위한 전략

간략히 설명하면, 분절당 1개의 축퇴성 올리고를 사용하여 각각 9개 분절을 합성하였다. 임의의 비천연 서열을 첨가하지 않고 단일 축퇴성 코돈을 사용하여 조사될 수 있는 IFN 알파 다양성을 모두 획득하기 위하여 축퇴성을 선택한다. 그 다음, 천연 다양성이 모두 획득되지만, 유전자 코드의 제한으로 필요 위치에 비천연 돌연변이를 추가한 9개 분절을 암호하는 축퇴성 올리고뉴클레오티드의 제2 군을 만든다. 대부분의 경우 모든 다양성은 단일 축퇴성 코돈에 의해 획득될 수 있고, 일부 경우 축퇴성 코돈은 모든 천연 다양성을 획득하지만 1개의 비천연 돌연변이를 추가할 것이다. 또한, 몇몇 위치에는 비천연 돌연변이를 1개 이상 생성하는 고도 축퇴성 코돈을 첨가하지 않으면 천연 다양성의 획득이 불가능한 경우도 있다. 이 위치는 제2 올리고뉴클레오티드 군이 보다 광범위하여 제1 군과 상이한 위치이다. 그 다음 9개의 합성 분절 각각을 PCR을 사용하여 18개의 PCR 올리고뉴클레오티드로 증폭시킨다. 올리고 지시성 재조합 방법을 이용한 총길이 유전자를 만들어, 숙주를 형질감염시킨 뒤, 원하는 성질을 가진 하이브리드에 대하여 분석한다. 최상의 하이브리드(예, 최고 10%, 1% 또는 0.1%, 바람직하게는 최고 1%)를 RSR로 처리하고 이 공정을 원하는 성질의 시험후보가 얻어질 때까지 반복한다.

F. "엄격한(non-gentle)" 미립 조사

한편, 동족체 다양성의 무작위 과돌연변이를 암호하는 축퇴성 합성 올리고뉴클레오티드로부터 각 분절을 유도한 라이브러리를 제조할 수 있다. 이 경우, 초기 라이브리러는 이 유전자계에 의해 가능한 $> 10^{25}$ 의 가능한 미립 하이브리드간 간격을 대충 조사할 것이다. 이 조사와 함께 양성 교배를 진행시킬 수 있다. 하지만, 이 라이브리러의 각 구성원간에는 다양한 차이가 있을 수 있고, 결과적으로 교배 과정은 비교적 다양한 유전자 푸울이 각 단계에서 재조합될 것이기 때문에 그다지 "관용적"이지 않다.

G. "관용적(gentle)" 미립 조사

이 방법을 보다 "관용적"이도록 하는 1가지 방법은 시험후보 출발점을 얻어서, 이로부터 관용적으로 조사하는 것이다. 이 출발점은 천연 IFN- α (예컨대, 치료적으로 가장 널리 사용되는 것인 IFN α -2a), 특징적인 IFN-Con1 콘센서스 인터페론, 또는 전술한 셔플링된 IFN- α 선별시의 최적률 중 어느 하나일 수 있다. 출발점이 정해지면, 축퇴성 분절 라이브리러를 1번에 1개씩 기초 서열에 교배하여 별도의 라이브리러를 만든다. 각 라이브리러로부터 개선된 최적률은 그 다음 함께 교배하여 그 분자 중의 모든 돌연변이를 관용적으로 형성시킨다.

H. 기능적 세포 분석법

당해 기술 분야에 공지된 다음 분석법을 사용하여 IFN 알파 돌연변이체를 선별한다. 즉 바이러스 사멸 억제, 표준 오차율 30 내지 50%, 플라크 형성 단위 억제, 매우 낮은 표준 오차(작은 효과를 측정할 수 있음), 바이러스 수율의 감소(치명적이지 않고 비플라크 형성 단위에 유용함), 세포 성장 억제(3H-티미딘 흡수 분석법), 종양 세포를 죽이는 NK 세포의 활성화, 인간 종양(예컨대, 피부 종양)이 이식된 누드 마우스에 투여된 인간 INF의 종양 형성의 억제.

이 분석법들은 대부분은 고처리를 선별법에 적용하기 쉽다. 재조합 IFN 알파 돌연변이체의 라이브리러는 항IFN 항체 또는 애피토프 태그와 친화성 수지를 사용하는 96월 방식에서 발현, 용해 및 정제하는 것과 같이 고처리율 방식으로 발현시키고 정제한다. 이와 같이 정제된 IFN 제제를 고처리율 방식으로 선별하고, 평가한 뒤, 최고의 목적 활성을 암호하는 돌연변이체를 RSR과 같은 돌연변이유발법으로 추가 처리하고, 원하는 활성도가 얻어질 때까지 상기 과정을 반복한다.

I. 파지 표현

표준 파지 표현 방식을 사용하여 생물학적 활성 IFN을 표현시킨다. 이 방식으로 키메라 IFN 유전자의 라이브리리를 발현시키고 1가지 이상의 정제된 IFN 수용체 제제 또는 1가지 이상의 IFN 수용체 발현 세포 유형에 결합(또는 감소 결합)하는 것을 선별(양성 또는 음성)한다.

J. IFN-알파 의존적 프로모터 제어하의 GFP 또는 루시퍼라제

돌연변이체에 의해 발현된 단백질은 IFN 알파 응답성 프로모터, 예컨대 GFP 발현을 유도하는 MHC 제I군 프로모터의 제어하에 GFP 또는 루시퍼라제를 발현하는 리포터 세포주에서 고처리율 방식으로 선별할 수 있다.

K. 천연 감염 입자에 의한 표적 세포의 자극

활성 IFN의 정제는 전술한 분석법의 처리율을 제한할 것이다. 사상 파지 M13에서의 활성 IFN 알파 발현은 수천 또는 수만 돌연변이체를 쉽게 다룰 수 있는 방식으로 IFN 돌연변이체의 동종 제조물을 얻을 수 있을 것이다. 그램 등[J. Imm. Meth. 161:169-176(1993)]은 IFN 알파와 유사한 지형의 단백질 풀드를 가진 시토킨인 인간의 IL3은 M13의 표면에서 발현될 수 있고 그 결과 얻어지는 파지는 IL3 의존적 세포주에게 활성 IL3을 제공할 수 있다는 것을 증명하고 있다. 이와 유사하게, 사지오 등[Saggio et al., Gene 152:35-39(1995)]은 4중나선 다발 시토킨인 인간 섬모 신경영양성 인자가 가용성 시토킨의 농도와 유사한 농도로 파지에서 발현될 때 생물학적으로 활성임을 밝히고 있다. 이와 유사하게, M13상의 IFN 알파 돌연변이체의 라이브리리를 발현시키고, 소정 역가의 파지 스톡을 사용하여 본 명세서에 기재된 고처리율 분석법과 선

택법을 통해 생물학적 활성 IFN을 제공할 수 있다.

다음 계산식은 이 기법을 IFN 알파에 적용할 수 있음을 가능성을 지지하는 것이다. (1) 파지당 표현된 인터페론의 활성 복제수가 5인 파지 역가가 1×10^{10} 파지/mℓ이고, (2) 표현된 인터페론이 가용성 재조합 인터페론과 등가의 활성을 나타낸다(물론 다가인 경우 더욱 강력할 수도 있음)고 가정한 경우, 현안 문제는 생물학적 활성을 나타낼 것으로 적당하게 추정할 수 있는지이다.

$$(1 \times 10^{10} \text{ 파지}/\text{mℓ}) \times (5 \text{ IFN 분자}/\text{파지}) \times (1 \text{ 몰}/6 \times 10^{23} \text{ 분자}) \times (26,000 \text{ gm}/\text{몰}) \times (10^9 \text{ ng/gm}) = 2.2 \text{ ng}/\text{mℓ}$$

생물 검정에 사용된 농도의 범위는 NK 활성의 경우 1 ng/mℓ이고, 에스콜(Eskol) 세포에서의 항증식 활성의 경우 0.1 내지 10 ng/mℓ이며, 다우디(Daudi) 세포인 경우 0.1 내지 1 ng/mℓ이다[Ozes et al., J. Interferon Res. 12:55-59(1992)]. 일부 아형이 글리코실화된 것이라도 인터페론 알파2a 및 콘센서스 인터페론은 이 콜리에서 활성 재조합체로 발현되고, 따라서 최소한 이들 두 형태는 활성에 글리코실화를 필요로 하지 않는다. 따라서, 사상 파지에서 발현되는 IFN 알파는 추가 농축 없이 파지 스톡 만큼 생물학적으로 활성인 것으로 추정된다. IFN 키메라의 라이브러리는 파지 표현 방식으로 발현되고, 추가 RSR 처리하기 위해 개선된 성질을 가진 돌연변이체를 동정하기 전과 후에 전술한 분석법으로 평가한다.

표현된 단백질의 높은 활성가 상태로 인해 1개의 파지를 사용하여 1개의 세포를 활성화시키기에 충분한 경우(제III유전자 방식에서 파지당 5개; 제VIII유전자 방식에서는 파지당 수백개; 람다 제V유전자 방식에서는 10개). 파지 스톡은 적합한 희석율로 직접 사용하여 IFN 응답성 프로모터의 조절하에 GFP 리포터 작제물로 세포를 자극할 수 있다. 파지가 자극, 발현 및 응답성 세포의 FACS 정제 후에도 부착된 상태를 유지한다고 가정하면, 상당히 큰 라이브러리(FACS 처리당 10^7 파지 이하 내지 아마도 그 이상)로부터 활성이 개선된 하이브리드를 직접 FACS 정제할 수 있을 것이다.

이러한 방식으로 FACS가 유리하게 사용되는 제2 방법은 다음과 같다. 세포를 월당 1개의 파지 스톡과 GFP 형 리포터 작제물을 첨가한 다중웰 방식에서 자극한다. 이와 같이 자극된 모든 세포를 FACS 정제하여 최고 명도의 세포를 수집하고, IFN 유전자를 회수한 뒤 RSR로 처리하며, 이 공정을 원하는 개선도가 얻어질 때까지 반복한다. 이 공정에서 자극은 각각 농축된 용균물로 실시하며, 따라서 단일 파지가 세포를 자극하기에 충분해야 한다는 필요 조건이 해소된다. 또한, 최고 명도의 세포, 즉 가장 강력한 파지가 부착된 세포를 수집하는 관문이다.

L. IFN 알파 돌연변이체에 대한 세포 표면 표현 프로토콜

샘플 프로토콜은 IFN 알파 돌연변이체의 세포 표면 표현에 관한 것이다. 이 표현 형태는 파지 표현에 비해 최소 2가지 잇점이 있다. 첫째, 단백질이 진핵 세포에 의해 표현되어, 일부 IFN 알파(및 기타 다른 성장 인자)에 필요한 형태인 적당하게 글리코실화된 형태로 발현될 수 있다는 점이다. 둘째, 매우 높은 활성가의 표현 방식으로 활성이 매우 약한 돌연변이체로부터 활성을 검출하는데 바람직하다는 것이다.

간략히 설명하면, 돌연변이체 IFN의 라이브러리는 포스포이노시톨 테일을 첨가하기 위해 폴리펩티드 시그널을 카르복실 말단에 융합시켜, 표면 발현시키기 위한 단백질이 표적화되게 작제한다[Wettstein et al., J. Exp. Med. 174:219-28(1991)]. 이 라이브러리를 사용하여 전술한 리포터 세포(루시퍼라제 리포터 유전자)를 미량역가 방식으로 형질감염시킨다. 양성군을 전하 커플링 장치(CCD) 카메라로 검출한다. 핵산은 HIRT 및 숙주의 재형질전환법이나 PCR로 회수하고, RSR 처리하여 추가 개량시킨다.

M. 바이러스 내성에 대한 오토크린 표현 프로토콜

샘플 프로토콜은 IFN 알파 돌연변이체의 오토크린 표현에 대한 것이다. 간략히 설명하면, IFN 돌연변이체의 라이브러리를 발현 유도(즉, 메탈로티오네인 프로모터) 및 효과적인 분비를 허용하는 백터에서 생성시킨다. 돌연변이 IFN 작제물로 형질감염시켜 IFN 응답성 리포터 카세트(GFP 또는 루시퍼라제)를 운반하는 수용체 세포주를 유도한다. IFN 응답성 프로모터를 자극하는 돌연변이체를 FACS 또는 CCD 카메라로 검출한다.

이 방식의 변형은 형질감염체를 바이러스로 공격하고 생존체를 선택하는 것이다. 유전자를 회수하기 전에 형질감염체 각 세트에 대하여 바이러스 공격과 증식을 수회 반복한다. 수회 사멸 및 증식을 통해 약간의 잇점을 지수적으로 증폭시킬 수 있고, 따라서 바이러스 사멸에 있어 약간의 개선을 검출하는데 잇점을 제공한다.

표 IV

블록당 재조합에 필요한 올리고뉴클레오티드 : 18

알파 인터페론 셔플링에 대한 올리고뉴클레오티드

1. 5'-TGT[G/A]ATCTG[C/T]CT[C/G]AGACC
2. 5'-GGCACAAATG[G/A/C]G[A/C]AGAATCTCTC
3. 5'-AGAGATTCT[G/T]C[C/T/G]CATTGTGCC
4. 5'-CAGTTCCAGAAG[A/G]CT[G/C][C/A]AGCCATC
5. 5'-GATGGCT[T/G][G/C]AG[T/C]CTTCTGGAAGT
6. 5'-CTTCAATCTCTCA[G/C]CACA
7. 5'-TGTG[G/C]TGAAGAGATTGAAG
8. 5'-GGA[T/A][G/C]AGA[C/G][C/G]CTCCTAGA
9. 5'-TCTAGGAG[G/C][G/C]TCT[G/C][T/A]TCC
10. 5'-GAACTT[T/G/A][T/A]CCAGCAA[A/C]TGAAT
11. 5'-ATTCA[T/G]TTGCTGG[A/T][A/T/C]AAGTTC
12. 5'-GGACT[T/C]CATCCTGGCTGTG
13. 5'-CACAGCCAGGATG[G/A]AGTCC
14. 5'-AAGAATCACTCTTATCT
15. 5'-AGATAAAAGAGTGATTCTT
16. 5'-TGGGAGGTTGTCAGAGCAG
17. 5'-CTGCTCTGACAAACCTCCC
18. 5'-TCA[A/T]TCCTT[C/A]CTC[T/C]TTAA

대괄호는 그 위치에 특정 염기의 동일 혼합물이 있는 축퇴를 나타낸다. 이 축퇴의 목적은 1세트의 프라이머를 사용하여도 IFN계의 모든 성분을 유사한 효율로 개시시킬 수 있다는 것이다. 올리고 유도성 재조합 지점의 선택은 각 교배 사이클에서 "중복사용"되기 때문이며, 따라서 다수의 선택 사이클을 통해 나머지 서열과 함께 개량될 수 있다.

[표 V]

9개 블록 각각에 대한 천연 다양성의 "미립" 재조합에 필요한 올리고뉴클레오티드

블록	필요한 올리고 길이#
123456789	769565565193506280

[표 VI]

바람직한 코돈에서 1단계 돌연변이에 의해 얻어질 수 있는 아미노산

야생형 아미노산	1개 돌연변이에 의해 얻을 수 있는 아미노산
WYFLVIAGMSTPCNQHDERK	C,R,G,LF,S,C,H,N,DL,I,V,S,Y,CS,W,F,I,M,V,PF,L,I,M,A,D,E,GF,L,M,V,T,N,K,S,RS,P,T,V,D,E,GV,A,D,E,R,S,C,VL,I,V,T,K,RF,L,Y,C,W,P,T,A,R,G,N,T,IS,P,A,I,M,N,K,S,RS,T,A,L,H,Q,RF,S,Y,R,G,WY,H,K,D,S,T,IY,H,K,E,L,P,RY,Q,N,D,L,P,RY,H,N,E,V,A,GQ,K,D,V,A,GL,P,H,Q,C,W,S,G,K,T,I,MQ,N,E,R,T,I,M

이 표를 근거로 하여, 모든 다양성이 축퇴성 코돈에 의해 획득될 수 있는 IFN 알파의 다양성 위치를 확인하였다. 표 VI에서 추론된 축퇴성을 이용하여 상기 표 V에 기재된 길이의 올리고뉴클레오티드를 합성하였다.

N. 개선된 IFN- α 의 개량

1. 클로닝

IFN 유전자는 전술한 일반 방법에 따라 12개 축퇴성 프라이머 세트를 사용하여 게놈 DNA로부터 PCR 증폭으로 클로닝하였다. PCR 생성물은 fd 박테리오파지 유전자 III에 대한 융합체로서 표준 파지미드 표현 벡터에 클로닝하였다. 30개의 클론을 서열분석하고 문헌에 기재된 인간 알파 IFN 유전자와 비교하였다. 그 서열 대부분이 공지 서열과 정확하거나 거의 정확하게(> 98% DNA 동일성) 정합하였다. 몇몇 클론은 공지 IFN과 잘 정합하지 않았고(즉, 약 93% 동일성), 신규 IFN 유전자로 간주하였다. 1개의 유전자는 PCR 동안 만들어진 것으로 추정되는 명백한 재조합체이었다. 10개 클론 중 8개를 모아 셔플링시켰다. 이들 8개의 서열은 이 유전자계의 공지 아미노산에 대해 약 66%의 변화를 포함하였다.

2. 셔플링

이 유전자는 다음과 같이 셔플링하였다. 20개 내지 50개 bp 및 50개 내지 100개 bp 단편의 수집물은 전술한 바와 같이 부분 DNaseI 분해물로부터 제조하였다. 또한, 20개 내지 100개 bp 단편은 동일한 12개 프라이머 세트를 사용하여 인간 게놈 DNA의 정제용 PCR 생성물로부터 제조하였다. 이 단편들은 모두 인간 알파 인터페론 좌에 서열 다양성을 포함해야 한다. 키메라는 ($94^{\circ}\text{C} \times 60", 6^{\circ}\text{C} \times 60", 25^{\circ}\text{C} \times 120"$) 20회, 그 다음 PCR 완충액으로 희석한 1:10의 희석물로서 2회 교차 PCR하여 어셈블리하고, ($94^{\circ}\text{C} \times 30", 40^{\circ}\text{C} \times 30", 72^{\circ}\text{C} \times (30+2n)"$)[n은 사이클 수] 20회 실시하여 재어셈블리한다. 총 길이 유전자는 외측 프라이머를 사용하여 PCR로 얻고, 이 물질을 파지미드 표현 벡터에 표준 방법으로 클로닝하였다. 20 내지 50 bp, 50 내지 100 bp 및 게놈 PCR 단편 각각으로부터 2.5×10^4 , 3.0×10^5 및 2×10^8 복합성의 라이브러리를 얻었다. 무작위 키메라의 서열분석을 통해 셔플링이 효과적으로 실시되었음을 입증하였다.

3. 파지미드의 생물학적 활성의 입증

파지미드 입자의 대량 제조물은 표준 방법, 헬퍼 파지로서 M13 VCS를 사용하여 제조하였다. IFN-geneIII 융합 유전자는 대수기 중기에 0.02% 아라비노스를 첨가하여 유도하였다. PEG 침전된 파지미드 입자를 CsCl 밴드화하고 투석하였다. 이 파지미드 입자는 인간 다우디 세포 항증식 분석법(인간 세포)에서 IFN-Con1, IFN2a 또는 8개의 클로닝된 야생형 IFN을 발현한느 파지미드 제조물의 생물학적 활성으로 입증되는 바와 같이 활성 IFN을 표현하였다[Tymms et al., Genet. Anal. Techn. Appl. 7:53-63(1990)].

4. 다우디 분석에서 개선된 활성에 대한 선별

2가지 선별 전략을 사용하여 활성이 개선된 클론을 동정하였다. 즉 무작위로 선택된 클론에 대해 활성 분석하고 CsCl 밴드 수집물에 대해 활성 분석한 뒤, 최고 활성의 수집물로부터 최상의 클론을 동정하였다.

일례로서, 무작위로 선택된 8개 키메라 중에서 3개는 Con1보다 활성이 더 컸고, 1개는 Con1과 IFN2a 중간이었으며, 4개는 음성이었다. 도 3은 IFN-Con1과 4가지 키메라 인터페론의 아미노산 서열을 정렬한 것이다.

수집된 클론의 일례는 다음과 같다. 96개의 클론을 12개 중 8개의 상이한 수집물과 혼합하였다. 활성이 가장 큰 수집물(P12.7 또는 수집물 "F")에 있는 12개의 클론으로부터 CsCl 제조물을 제조하였다. 이 클론 중 하나인 F4는 Con1 보다 약 60x, IFN2a 보다 약 1000x 높은 활성을 나타내었다. Con1보다 활성이 큰 양의 IFN는 없었고, 따라서, 최상의 양의 클론에 비해 약 60배의 활성 증가를 나타내는 것이다. 이 클론을 인간 바이러스 차단 분석법(WISH 세포)으로 분석하였고[Jilbert et al., Microbial. Path. 1:159-168(1986)], 이 분석법에서도 역시 Con1 보다 활성적인 것으로 밝혀졌으며, 따라서 일반 독성보다 진정한 인터페론 활성을 입증한다.

5. 마우스 세포에서 활성의 개량

8개의 야생형 마우스 IFN 유전자를 표준 방법으로 PCR 증폭하고 파지미드 벡터에 클로닝하였다. 이 클론 중 1개는 이 벡터에서 표현되는 경우 마우스 항바이러스 분석법(마우스 세포)에서 매우 활성적이었다[Beilharz et al., J. Interferon Res. 9:305-314(1988)]. 8개의 인간 양의 IFN 클론 및 IFN2a는 모두 불활성이었고, Con1은 마우스 항바이러스 분석에서 약한 활성이었다. 무작위로 선별된 인간 키메라 중 1개는 Con1 보다 활성적이었다. 12 클론의 8개 수집물 중 하나(수집물 "G")는 마우스 분석법에서 활성적이었다. 수집물 "G"는 1개의 고도 활성 클론인 G8을 생성하였다. 96개 클론의 16개 수집물 중 1개는 활성적이었다. 96개 클론의 이 수집물은 12 클론의 8개 수집물로 나누고, 이 수집물 중 2개는 매우 활성적이었다.

6. 해석

종합해보면, 상기 데이터들은 본 명세서에 기재된 선별 방법과 본 명세서에 기재된 재조합 기법을 조합하여 사용하면 인간 세포에 대해 이미 효능적인 인터페론의 활성을 개선시킬 수 있다. 또한, 이 방법은 출발 유전자 개체에서 검출가능한 농도로 존재하지 않았던 "관련" 활성(마우스 세포에 대한 활성)을 생성시키는데에도 사용할 수 있다. 상기 데이터는 또한, 본 발명이 우수한 재조합체로부터 쉽게 얻을 수 있는 활성의 가우시안(Gaussian) 유사 분포를 가진 재조합체 유전자의 개체를 생성하는데 적용할 수 있음을 증명하고 있다.

IV. 개선된 루시퍼라제의 개량

포티누스 피랄리스(*Photinus pyralis*)의 루시퍼라제는 pGL2_베이직(미국 위스콘신주 매디슨에 소재하는 프로메가 코포레이션 제품)로부터 PCR 증폭시켰다. 루시올라 링그레리카(*Luciola mingrelica*)의 루시퍼라제는 pJGR로부터 PCR 증폭시켰다[Devine et al., Biochim. Biophys. Acta 1173:121-132(1993)]. 이 둘은 NcoI에 의해 암호되는 개시 코돈에 의해 pBAD24에 클로닝되었다[Guzman et al., J. Bacter. 177:4121-4130(1995)]. DNaseI 분해시, 일부 인접 영역을 비롯한 루시퍼라제 유전자는 프라이머 BADup(TGCACGGCGTACACTTGTCA) 및 BADdown(TACTGCCGCCAGGCAAATTCT)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 이 PCR 생성물을 동물량으로 혼합하고, DNaseI로 부분 분해하였다. 70 내지 280 bp의 PCR 생성물을 걸 정제하였다. 5 μg 의 단편을 Taq 폴리머라제를 사용하여 10 μl 의 부피 중에서 어셈블리하고 그 다음 로보사이클러에서 94°C 하에 30초, 6°C 하에 60초, 25°C 하에 180초간 15회 순환처리하였다. 이 시료를 1:6으로 희석하고 DNA 엔진(94°C , 30초; 40°C , 30초; 72°C , 30초)에서 Taq 폴리머라제 및 Pwo 폴리머라제의 1:1 혼합물을 사용하여 추가 20회 순환시켰다. 이 시료를 1:4로 희석하고 DNA 엔진(94°C , 30초; 40°C , 30초; 72°C , 30초)에서 Taq 폴리머라제 및 Pwo 폴리머라제의 1:1 혼합물을 사용하여 추가 20회 순환시켰다. 어셈블리된 DNA 단편을 증폭시키기 위하여, 어셈블리 반응물을 1:10 내지 1:100으로 희석하고 프라이머 #773(TAGCGGATCCTACCTGACGC) 및 #297(TGAAATCTCTCATCCG)을 첨가하여 DNA 엔진(94°C , 30초; 45°C , 30초; 72°C , 110초)에서 Taq 폴리머라제 및 Pwo 폴리머라제의 1:1 혼합물을 사용하여 25회 순환시켰다. 이 PCR 생성물을 NcoI/HindIII로 분해하고, pCKX-GFP에 결합시켰다. pCKX-GFP는 C1aI, NcoI 아라비노스 조절 단위 카세트가 pJGR[Devine et al., Biochim. Biophys. Acta 1173:121-132(1993)]로부터 비브리오 피谢리(*Vibrio fischeri*)의 lux 자가유도인자 시스템 변형체로 치환된 pBAD24이다. 이 결합물을 XL1-Blue를 형질전환시켰다. 이 라이브러리를 LB-Amp200 상에 평판배양하고 37°C 에서 증식시켰다. 이 콜로니를 6개

384 월 평판에 채취하고 하룻밤 동안(ON) 증식시켰다. 이 배양물을 니트로셀룰로스 상에 배치하고 이 콜로니를 30°C에서 하룻밤동안(ON) 증식시켰다. 이 평판을 60 °C에서 45분 동안 항온처리하였다. 그 다음 니트로셀룰로스 여지를 0.2% 트리톤 X-100과 1 mM D-루시페린을 함유하는 100 mM Na-구연산염 pH5을 함유하는 블록팅지 위에 배치하였다. 이것을 니트로셀룰로스와 콜로니를 아래를 향하게 하여 플라스틱 랩위에 배치하였다. 이 어셈블리를 필름 카세트 중의 BIOMAX MR 상에 30 분 동안 방치하였다. 현상 후, 필름을 육안으로 관찰하여 평가하고, 최상의 명도를 가진 콜론을 384 월 평판에서 항온배양하고 이 클론을 96웰판에 75 μ l LB-Amp 중에서 30 °C 하에 하룻밤동안 증식시켰다. 이 배양물로부터 루시페라제를 다음과 같이 추출하였다. 배양물 20 μ l를 용해 완충액 I(100 mM Tris-CL pH 7.8, 5% Triton X-100, 10mM DTT, 10mM EDTA, 2mg/ml Polymyxin B 활산염) 20 μ l와 혼합하였다. 진탕한 후, 반응 혼합물을 -70 °C에서 1 시간 동안 동결시키고 그 후 실온에서 해동시켰다. 용해 완충액 II(100 mM Tris-CL pH 7.8, 0.25U/ μ l DNase, 1.5 mg/ml 달걀 리소자임, 40 mM MgSO4) 60 μ l를 첨가하고, 용해 혼합물을 실온에서 30 분 동안 항온처리하였다. 용해물 일정량을 30 °C 내지 42 °C 사이의 다양한 온도에서 30 분동안 항온처리하였다. 또한, 일정량은 RT에서 수일 동안 방치하였다. 표준 용해물 및 열처리된 용해물 5 μ l의 루시페라제 활성을, 완전 분석 완충액(20 mM Tris-CL pH 7.8, 5 mM MgSO4, 0.5 mM ATP, 0.5 mM 조효소 A, 0.5 mM D-루시페린, 5 mM DTT) 50 μ l를 사용하여 탑카운트(Topcount) 발광계로 측정하였다. 여러 클론이 열처리하고 수일 동안 RT에서 방치한 후에도 잔류 활성의 증가를 나타내었다. 1개의 클론은 39 °C에서 30 분 동안 처리했을 때 이 콜리 추출물에서 루시콜라 링글리카 야생형 클론 보다 5배 증가된 루시페라제 활성을 나타내었다. RT에서 4일 동안 항온처리한 후, 동일 클론은 동일하게 처리된 야생형 L. 링글렐리카 루시페라제 보다 10 배 이상의 활성을 나타내었다. 또한, 이 클론은 37 °C에서 증식시켰을 때 야생형 보다 활성의 유의적인 증가(2배)를 나타내었다.

이와 결과를 통해 양친 공급 분자 기질에 비해 루시페라제가 안정성이 개선되어 개량되었음을 알 수 있었다.

이상, 본 발명을 이해의 석명을 위해 일부 예시적으로 설명하였지만, 첨부되는 청구의 범위의 영역내에서 임의의 변형 및 수정이 가능함을 자명한 것이다.

본 명세서에 기재된 모든 참고문헌은 그 전체를 참고 인용하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

- (a) 최소한 1개의 뉴클레오티드가 서로 다른 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 제한 효소로 분해하는 단계,
- (b) 이 혼합물을 결찰하여 재조합 DNA 분자의 라이브러리를 제조하는 단계,
- (c) 상기 (b)의 생성물 중에서 목적하는 성질의 생성물을 선별 또는 선택하는 단계,
- (d) 개량된(evolved) 단백질을 암호하는 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제한 효소가 절단 부위에 비팔린드롬형 말단을 생성하는 것이 특징인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 절단 부위에 비팔린드롬형 말단을 생성하는 제한 효소에 대한 제한 부위를 1개 이상 포함하도록 기질 분자가 유전자 조작된 것이 특징인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, DNA 기질 분자가 유전자 클러스터를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제한 효소에 의해 DNA 기질 분자로부터 생성되는 1개 이상의 단편을 분리하고, 이것을 돌연변이 유발법으로 처리하여 돌연변이 단편의 라이브러리를 만드는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 돌연변이 단편의 라이브러리가 단계 (b)의 결찰에 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택된 전체 단백질 또는 일부 단백질을 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 돌연변이 유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 단계 (b)의 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 제10항의 생성물이 단계 (d)에 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 단계 (d)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 15

제1항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 단백질.

청구항 16

1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 재조합하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 각 분절의 각 가닥에 대한 프라이머를 1개 이상 포함하고, 이 프라이머 서열이 최소한 하나의 결합부에서 다른 분절과 상보적인 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머 군을 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 사슬 반응으로 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자의 분절을 증폭시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 생성하는 단계,
- (d) 목적하는 성질을 가진 단계 (c)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (e) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (d)의 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 단계 (a) 이전에 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 유전자의 대립유전자를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 돌연변이체의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 분절이 유전자간 영역 내의 부위에 한정된 것임이 특징인 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 분절이 인트론 내의 부위에 한정된 것임이 특징인 방법.

청구항 22

제16항에 있어서, 프라이머가 1개 이상의 티미딘 잔기에 우라실 치환을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 단계 (b)의 생성물이 우라실 글리코실라제로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 24

제16항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 25

제16항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 유전자 클러스터를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 26

제16항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 DNA 폴리머라제 전체 또는 일부를

암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 27

제16항에 있어서, 1개 이상의 PCR 프라이머가 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자와 최소한 1개의 뉴클레오티드가 서로 상이한 것이 특징인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, PCR 프라이머가 최소한 제1 DNA 기질 분자 또는 제2 DNA 기질 분자의 공지 돌연변이체 또는 다형체의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, PCR 프라이머가 최소한 제1 DNA 기질 분자 또는 제2 DNA 기질 분자의 1개 이상의 공지 돌연변이체 또는 다형체의 뉴클레오티드 서열을 암호하는 축퇴성 프라이머 군을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 표 1에서 선택된 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 31

제17항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 32

제16항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 제32항의 생성물이 단계 (b)에 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 35

제16항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 단계 (b)의 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 36

제16항에 있어서, 단계 (e)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 37

제16항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 단백질.

청구항 38

(a) 돌연변이 서열에 대한 일군의 DNA 단편을 변성 및 복원시켜 1개 이상의 2분쇄 단편이 1개 이상의 염기쌍 부정합을 포함하는 하이브리드 2분쇄 단편 군을 생성시키는 단계,

(b) 단계 (a)의 생성물을 약 20 내지 100 bp의 단편으로 단편화하는 단계,

(c) 부정합을 가진 단편을 친화성 매트릭스에 대해 친화성 정제하여 돌연변이 서열을 증량시킨 DNA 단편의 푸울을 만드는 단계,

(d) 단계 (c)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 생성시키는 단계를 포함하여 돌연변이 서열의 DNA 단편 군을 증량시키는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, DNA 단편 군이 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자에서 유래되고, 상기 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 서로 상이한 1개 이상의 뉴클레오티드를 보유하는 것이 특징인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 돌연변이유발법에 의해 얻어지는 것이 특징인 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 유전자의 대립유전자를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 42

제39항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 유전자의 다형성 변이체를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 43

제38항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 44

제38항에 있어서, 단계 (c)의 생성물이 단계 (d) 이전에 단계 (a)의 생성물과 혼합되는 것이 특징인 방법.

청구항 45

(a) 2개 이상의 소정 분절 사이에 인트론 서열을 삽입시켜 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자 중에 상동성 영역을 제공하는 단계,

(b) 상기 상동성 영역을 인트론을 통해 제공한 단계 (a)의 DNA 기질 분자를 단편화하고 재조합하는 단계,

(c) 목적하는 성질을 가진 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,

(d) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (c)의 생성물로부터 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 약 10개 내지 100개 염기쌍의 서열 상동성 영역을 공유하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합하는 것을 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호화된 단백질을 개량시키는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 인트론이 자가 접목성인 것이 특징인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 삽입된 인트론이 약 1개 내지 약 10개의 비상동성 인트론을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 인트론이 절단 부위에 비팔린드롬형 말단을 가진 제한 효소의 인식 부위를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 단계 (b) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 50

제45항에 있어서, DNA 기질 분자가 유전자 클러스터를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 51

제45항에 있어서, DNA 기질 분자로부터 1개 이상의 분절을 분리하고 돌연변이유발법으로 처리하여 돌연변이 단편의 라이브러리를 만드는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 돌연변이 분절의 라이브러리가 단계 (b)의 재조합에 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 53

제45항에 있어서, 분절이 엑손에 한정된 것임이 특징인 방법.

청구항 54

제45항에 있어서, 분절이 유전자간 영역에 한정된 것임이 특징인 방법.

청구항 55

제45항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 단백질 동족체를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 56

제45항에 있어서, 인트론이 lox 부위를 포함하고 단계 (b)의 생성물을 사용하여 Cre^+ 숙주를 형질감염시키는 것이 특징인 방법.

청구항 57

제45항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 58

제45항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자가 단계 (a) 이전에 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 60

제45항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 61

제58항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 62

제45항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 단계 (b)에서 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 63

제45항에 있어서, 단계 (d)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 64

제45항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 단백질.

청구항 65

1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이하고 소정의 분절을 포함하는 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합하여 DNA 기질 분자에 암호된 단백질을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 분절의 각 결합을 위해 한쌍의 프라이머를 제공하고, 각 쌍 중 한 성분은 분절의 한쪽 말단에서의 결합을 가교하고, 다른 성분은 분절의 다른쪽 말단에서의 결합을 가교하며, 이 DNA 분자의 종지 말단이 프라이머 쌍의 한 성분으로서 일반 프라이머를 보유하고, 프라이머 세트가 최소한 제1 기질 분자 및 제2 기질 분자 각각에 대해 제공되는 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머 세트를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 프라이머를 사용하여 폴리머라제 사슬 반응에서 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자의 분절을 증폭시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 어셈블리하여 재조합 DNA 분자의 푸울을 생성시키는 단계,
- (d) 목적하는 성질을 가진 단계 (c)의 생성물을 선택하거나 선별하는 단계,
- (e) 개량된 단백질을 암호하는 단계 (d)의 생성물로부터 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 단계 (a) 내지 단계 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 단계 (a) 이전에 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 단백질 동족체를 암호하는 서열을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 69

제65항에 있어서, 프라이머가 1개 이상의 티미딘 잔기 대신 우라실 치환을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 단계 (b)의 생성물이 우라실 글리코실라제 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 71

제65항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 72

제65항에 있어서, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자가 유전자 클러스터를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 73

제65항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 단백질.

청구항 74

제65항에 있어서, 1개 이상의 PCR 프라이머가 최소한 제1 기질 분자 및 제2 기질 분자와 1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이한 것이 특징인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, PCR 프라이머가 최소한 제1 기질 분자 또는 제2 기질 분자의 공지 돌연변이체 또는 다형체의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, PCR 프라이머가 최소한 제1 기질 분자 또는 제2 기질 분자의 1개 이상의 공지 돌연변이체 또는 다형체의 뉴클레오티드 서열을 암호하고 축퇴성인 것이 특징인 방법.

청구항 77

제67항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 78

제65항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 80

제65항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 단계 (b)의 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 81

제65항에 있어서, 단계 (e)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 82

DNA 기질 분자에 의해 암호되는 단백질을 개량시켜 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

(a) 상기 DNA 분자에 상보적인 2개 이상의 영역과 상기 단백질의 아미노산 서열 중 일정 영역을 암호하는 1개 이상의 축퇴성 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드 세트를 제공하는 단계,

(b) 올리고뉴클레오티드의 세트를 어셈블리하여 총 길이 유전자의 라이브러리를 제조하는 단계,

(c) 단계 (b)의 생성물을 숙주 세포 중에서 발현시키는 단계,

(d) 단백질의 발현이 개선된 단계 (c)의 생성물을 선별하는 단계,

(e) 단계 (d)로부터 개량된 단백질을 암호하는 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 프라이머가 DNA 기질 분자에 상보적인 약 20개의 뉴클레오티드와, 이어서 이 DNA 기질 분자와 상동성인 약 20개의 축퇴성 뉴클레오티드의 제2 영역과 그 다음 이 DNA 기질에 상보적인 약 20개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 84

제82항에 있어서, 단백질이 소내장 알칼리성 포스파타제인 것이 특징인 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 표 11에 기재된 1개 이상의 프라이머를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 86

제82항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택된 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 87

제82항에 있어서, DNA 분자가 유전자 클러스터를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 88

제82항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 89

제82항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 DNA 기질 분자에 상보적인 최소한 5' 및 3' 뉴클레오티드와, DNA 기질 분자의 일정 영역과 최대 약 85% 서열 상동성을 보유한 약 20개 내지 300개의 뉴클레오티드를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 제2 올리고뉴클레오티드와 중복되는 각각의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 세트를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 91

제82항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 93

제82항에 있어서, 단계 (e)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 94

제82항에 기재된 방법에 의해 생성된 개량된 단백질.

청구항 95

- (a) 돌연변이유발된 DNA 기질 분자의 라이브러리로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리에 의해 암호된 단백질의 발현을 유도하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물로부터 추출물을 제조하는 단계,
- (d) 가용성 단백질과 DNA의 복합체로부터 불용성 단백질을 분획화하는 단계,
- (e) 단계 (d) 유래의 개량된 단백질을 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, lac 두상부 이량체를 암호하는 DNA 서열과 상기 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체와 최소한 1개의 lac 작동인자를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질을 개량시켜 그 단백질의 발현을 최적화하는 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 97

제95항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택된 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 98

제95항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 단백질.

청구항 99

제95항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 101

제95항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 단계 (a)에 기재된 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 102

제95항에 있어서, 단계 (e)의 재조합 DNA 기질 분자가 재조합 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 103

융합 단백질을 만들기 위하여 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열과 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 기능적 발현을 개량시키는 방법으로서,

- (a) 돌연변이유발된 DNA 기질 분자의 라이브러리에 의해 암호된 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 생성하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)로부터 융합 단백질을 표현하는 감염성 입자를 회수하는 단계,

- (c) 상기 단백질에 대한 리간드를 사용하여 돌연변이 단백질을 표현하는 입자를 친화성 정제하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 친화성 정제된 입자로부터 개량된 단백질을 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 105

제103항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 106

제103항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 단백질.

청구항 107

제103항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 109

제107항에 있어서, 제107항의 생성물이 단계 (a)에서 DNA 기질 분자로서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 110

제103항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 111

제103항에 있어서, 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열이 파지미드를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 112

제103항에 있어서, 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열이 파지를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 113

제1 플라스미드 벡터 상에 존재하고 lac 두상부 이량체를 암호하는 DNA 기질과 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

- (a) 상기 제1 벡터와, 최소한 1개의 채페로닌(chaperonin) 유전자와 돌연변이체의 라이브러리와 1개 이상의 lac 작동인자를 포함하는 제2 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물로부터 추출물을 제조하는 단계,
- (c) 가용성 단백질과 DNA의 복합체로부터 불용성 단백질을 분획화하는 단계,
- (d) 단계 (c)로부터 채페로닌 유전자를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 115

제113항에 있어서, DNA 기질이 단계 (a) 이전에 채페로닌 유전자와 무관하게 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 116

제113항에 있어서, 단계 (d)의 DNA가 돌연변이체의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 117

제113항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 동일 벡터인 것이 특징인 방법.

청구항 118

제113항에 있어서, 단계 (d)가 단계 (c)의 생성물로부터 개량된 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 더 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 119

제113항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 채페로닌.

청구항 120

제113항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 단백질.

청구항 121

제113항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 122

제113항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 124

제122항에 있어서, 제122항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 125

챠페로닌 유전자 돌연변이체의 라이브러리를 포함하는 파지미드 상에 보유되는, 사상 파지 유전자와 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 발현을 최적화하는 방법으로서,

- (a) 돌연변이된 DNA 기질 분자의 라이브러리에 의해 암호된 융합 단백질을 발현하는 감염성 입자를 생성하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)로부터 상기 융합 단백질을 표현하는 감염성 입자를 회수하는 단계,
- (c) 상기 단백질의 리간드를 사용하여 상기 단백질을 표현하는 입자를 친화성 정제하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 친화성 정제된 입자로부터 돌연변이 쳐페로닌을 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 127

제125항에 있어서, DNA 기질 분자가 표 1에서 선택된 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 128

제125항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 쳐페로닌.

청구항 129

제125항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 단백질.

청구항 130

제125항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 132

제130항에 있어서, 제130항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 133

제125항에 있어서, 단계 (d)의 DNA가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 134

제125항에 있어서, DNA 기질 분자가 목적 단백질을 암호하는 돌연변이유발된 DNA 서열의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 135

제125항에 있어서, 단계 (d)가 단계 (c)의 친화성 정제된 입자로부터 단백질을 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 더 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 136

(a) 분비 기능을 암호하는 유전자의 클러스터를 제공하는 단계,

(b) 분비 기능을 암호하는 단계 (a)의 유전자 클러스터에서 1개 이상의 뉴클레오티드가 서로 상이한 최소

한 제1 서열과 제2 서열을 재조합하여 재조합 서열의 라이브러리를 제조하는 단계,

(c) 상기 단백질을 암호하는 DNA 서열을 포함하는 숙주 세포의 배양물을 단계 (b)의 생성물로 형질전환시키는 단계,

(d) 단계 (c)의 생성물을 처리하여 상기 단백질을 분비하는지에 대해 선별하거나 선택하는 단계,

(e) 단계 (d)의 생성물로부터 분비 기능을 암호하는 개량된 유전자를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하여, 분비 기능을 암호하는 유전자를 개량시켜 숙주 내에서의 단백질의 분비를 최적화하는 방법.

청구항 137

제136항에 있어서, 유전자 클러스터가 절단 부위에 비팔린드롬형 말단을 가진 제한 효소의 1개 이상의 인식 부위를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 138

제136항에 있어서, 숙주가 이.콜리, 효모, 바실러스, 슈도모나스 또는 포유동물의 세포인 것이 특징인 방법.

청구항 139

제136항에 있어서, 단백질이 열안정성 DNA 폴리머라제인 것이 특징인 방법.

청구항 140

제136항에 있어서, 단백질이 유도적으로 발현되는 것이 특징인 방법.

청구항 141

제136항에 있어서, 단백질이 분비성 리더 서열에 연결되어 있는 것이 특징인 방법.

청구항 142

제136항에 기재된 방법에 의해 개량된 분비성 유전자.

청구항 143

제136항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 144

제136항에 있어서, 단계 (c)의 DNA 서열이 표 1에서 분비되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 145

제136항에 있어서, 단계 (c)의 DNA 서열이 돌연변이체 서열의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 146

제136항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 147

제146항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 148

제146항에 있어서, 제146항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 149

제136항에 있어서, 단계 (e)의 DNA가 개량된 유전자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 150

(a) 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,

(b) 단계 (a)로 형질감염된 세포의 추출물을 선별하고 야생형 DNA 폴리머라제와 활성을 비교하는 단계,

(c) 야생형 DNA 폴리머라제보다 개선된 활성을 보유한 돌연변이 DNA 폴리머라제를 발현하는 단계 (b)의 세포로부터 돌연변이 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,

(d) 단계 (c)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 개선된 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법.

청구항 151

제150항에 있어서, 개선된 활성이 보다 우수한 질의 서열 결정 래더, 이노신에 의한 반응 종결의 감소, 염기 유사체 허용성의 증가, 디데옥시 뉴클레오티드의 허용성 증가 및 서열결정 래더의 길이 증가로 구성된 군 중에서 선택되는 1가지 이상의 활성인 것이 특징인 방법.

청구항 152

제150항에 있어서, 단계 (a)의 생성물이 돌연변이 숙주 DNA 폴리머라제를 가진 이.콜리 숙주에서 아라비노스 프로모터의 조절하에 발현되는 것이 특징인 방법.

청구항 153

제150항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 154

제150항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 DNA 폴리머라제.

청구항 155

제150항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 157

제155항에 있어서, 제155항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 158

제150항에 있어서, 단계 (d)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 159

- (a) 돌연변이 DNA 폴리머라제에 의해 복제되고 복귀성 돌연변이를 보유한 지표 유전자를 포함하는 숙주 세포에서 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 지표 유전자의 복귀돌연변이체에 대하여 단계 (a)의 생성물을 선별하는 단계,
- (c) 복귀돌연변이체로부터 돌연변이 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 야생형 DNA 폴리머라제의 오차율보다 큰 오차율을 나타내는 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법.

청구항 160

제150항에 있어서, 지표 유전자가 LacZ알파 또는 GFP인 것이 특징인 방법.

청구항 161

제150항에 있어서, 복귀성 돌연변이가 종결 코돈인 것이 특징인 방법.

청구항 162

제150항에 있어서, 숙주 세포가 돌연변이 숙주 DNA 폴리머라제를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 163

- (a) 플라스미드 벡터를 포함하고 돌연변이 DNA 폴리머라제를 암호하는 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 생성물로 형질감염된 숙주 세포의 추출물과 플라스미드 제조물을 제조하는 단계,
- (c) 각 플라스미드 제조물을 그 플라스미드에 의해 암호되고 숙주 세포 추출물 중에 존재하는 돌연변이 폴리머라제를 사용하여 PCR 반응으로 증폭시키는 단계,
- (d) 단계 (c)의 PCR 생성물을 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 폴리머라제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 폴리머라제를 개량하는 방법.

청구항 164

제163항에 있어서, 단계 (c)의 반응이 유기 용매, 염기 유사체 또는 이노신의 존재하에서 실시되는 것이 특징인 방법.

청구항 165

제163항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 166

제163항의 방법으로 생성되는 개량된 폴리머라제.

청구항 167

제163항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 169

제167항에 있어서, 제167항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 170

제163항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 171

- (a) 플라스미드 발현 백터를 포함하고 DNA 기질 분자의 돌연변이체의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 숙주의 phn 오페론이 결실되어 있는 숙주를 형질감염시키는 단계,
- (c) 기질로서 p-니트로페놀 포스포나타제를 사용하여 단계 (b)의 형질염체의 성장에 대하여 선별하는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 선택된 형질감염체의 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,
- (e) 개량된 포스포나타제를 암호하는 단계 (d)의 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, DNA 기질 분자에 의해 암호된 포스포나타제로부터 p-니트로페놀 포스포나타제를 개량하는 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 173

제171항에 있어서, 포스포나타제가 베타 락타마제 및 알킬 포스포나타제로 구성된 군 중에서 선택되는 것이 특징인 방법.

청구항 174

제173항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 p-니트로페놀 포스포나타제.

청구항 175

제171항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 176

제175항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 177

제175항에 있어서, 제175항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 178

제171항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 179

- (a) 분비 리더에 연결된 DNA 기질 분자의 돌연변이체에 대한 플라스미드 발현 백터를 포함하는 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 숙주를 형질감염시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 형질감염체의 성장을 복합 단백질 배지상에서 선별하는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 얻어지는 개량된 프로테아제를 암호하는 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여 DNA 기질 분자에 의해 암호된 프로테아제를 개량하는 방법.

청구항 180

제179항에 있어서, 단계 (a) 내지 (d)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 181

제179항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 서브틸리신.

청구항 182

제179항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 184

제182항에 있어서, 제182항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 185

제179항에 있어서, 단계 (d)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 186

제179항에 있어서, 프로테아제가 서브틸리신인 것이 특징인 방법.

청구항 187

사상 파지 단백질을 암호하는 DNA에 일정 프로테아제를 암호하는 DNA 기질 분자를 융합시켜 융합 단백질을 만들어서 개량된 프로테아제를 얻기 위하여 파지 상에 표현되는 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 선별하는 방법으로서,

- (a) 상기 융합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 이 숙주 세포 위에 상기 파지를 포획하기 위한 단백질 네트를 중층시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 세척하여 단백질 네트의 분해시 방출되는 파지를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 DNA를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)로부터 개량된 프로테아제를 암호하는 DNA 기질을 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 188

제187항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 189

제187항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 프로테아제.

청구항 190

제187항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 192

제190항에 있어서, 제190항의 생성물이 단계 (a)에 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 193

제187항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 194

- (a) 형광단 및 형광 반응정지제를 포함하는 펩티드 기질의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 펩티드 기질을 절단하는 활성에 대한 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 형광성을 측정하여 선별하는 단계,
- (c) 단계 (b)로부터 1종 이상의 프로테아제 돌연변이체를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하여, 개량된 프로테아제를 얻기 위해 프로테아제 돌연변이체의 라이브러리를 선별하는 방법.

청구항 195

- (a) 사상 파지 백터를 포함하고 돌연변이체 알파 인터페론 유전자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 인터페론 응답성 프로모터의 조절하에 GFP인 리포터 유전자를 포함하는 리포터 작제물을 함유하는 세포를 자극하는 단계,
- (c) GFP를 발현하는 세포를 FACS로 분리하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 파지를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 인터페론 유전자를 회수하는 단계를 포함하여 알파 인터페론 유전자를 개량하는 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 인터페론 응답성 프로모터가 MHC I형 프로모터인 것이 특징인 방법.

청구항 197

제195항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 198

제195항에 기재된 방법으로 생성되는 개량된 인터페론.

청구항 199

제195항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 201

제199항에 있어서, 제199항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 202

제195항에 있어서, 단계 (e)의 개량된 인터페론 유전자가 유전자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 203

- (a) 돌연변이체의 발현 벡터 함유 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리로 포유류 숙주 세포를 형질감염시키고, 이 때 돌연변이 단백질이 세포의 표면상에서 발현되는 단계,
- (c) 이 단백질에 대한 리간드를 사용하여 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 돌연변이 단백질을 암호하는 DNA를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 DNA 기질을 회수하는 단계를 포함하여, 일정 단백질을 암호하는 DNA 기질의 돌연변이체의 라이브러리를 개량된 DNA 기질에 대하여 선별하는 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 리간드가 항체인 것이 특징인 방법.

청구항 205

제203항에 있어서, 리간드가 기질이고 단백질이 효소인 것이 특징인 방법.

청구항 206

제203항에 있어서, 발현 벡터가 SV40 오리진을 포함하고 숙주 세포가 Cos 세포인 것이 특징인 방법.

청구항 207

제203항에 있어서, 돌연변이 단백질이 일시적으로 발현되는 것이 특징인 방법.

청구항 208

제203항에 있어서, 숙주 세포가 SV40의 큰 T 항원을 더 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 209

제203항에 있어서, 단백질이 항체인 것이 특징인 방법.

청구항 210

제203항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 211

제203항에 있어서, DNA 기질 문자가 표 1에서 선택되는 단백질의 전체 또는 일부를 암호하는 것이 특징인 방법.

청구항 212

제203항의 방법으로 생성되는 개량된 단백질.

청구항 213

제203항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 214

제213항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 215

제213항에 있어서, 제213항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 216

제203항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 217

- (a) 돌연변이 알파 인터페론 유전자가 유도성 프로모터의 조절하에 발현되는 발현 벡터를 포함하는, 돌연변이 알파 인터페론 유전자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 라이브러리로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 바이러스와 접촉시키는 단계,
- (d) 단계 (c)에서 생존한 숙주 세포로부터 돌연변이 알파 인터페론을 암호하는 DNA를 회수하는 단계,
- (e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 인터페론 유전자를 회수하는 단계를 포함하여 인터페론 알파를 암호하는 DNA 기질 분자를 개량하는 방법.

청구항 218

제217항에 있어서, 프로모터가 메탈로티오네인 프로모터인 것이 특징인 방법.

청구항 219

제217항에 있어서, 바이러스가 HIV인 것이 특징인 방법.

청구항 220

제217항에 있어서, 바이러스가 조건 치사 유전자가 티미딘 키나제인 것이 특징인 방법.

청구항 221

제217항에 있어서, 조건 치사 유전자가 티미딘 키나제인 것이 특징인 방법.

청구항 222

제217항에 있어서, 형질감염된 세포가 조건 치사 선택성 조건에 노출되는 것이 특징인 방법.

청구항 223

제217항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 224

제217항의 방법에 의해 생성되는 개량된 인터페론 알파.

청구항 225

제217항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 226

제225항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 227

제225항에 있어서, 제218항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 228

제217항에 있어서, 단계 (e)의 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 229

융합 단백질을 생성하기 위하여 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열과 일정 단백질을 암호하는 DNA 서열의 융합체를 포함하는 DNA 기질 분자에 의해 암호된 단백질의 헐첨 안정성이나 헐행중 반감기를 개량하는 방법으로서,

- (a) 상기 융합 단백질의 돌연변이체의 라이브러리를 발현하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- (b) 인간 헐첨 단백질, 조직 특이적 단백질 또는 수용체인 상기 단백질에 대한 리간드를 사용하여 돌연변이체를 친화성 정제하는 단계,
- (c) 단계 (b)에서 친화성 선택된 돌연변이체로부터 돌연변이 단백질을 암호하는 DNA를 회수하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 상기 단백질을 암호하는 개량된 유전자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 헐청 단백질이 헐청 알부민, 면역글로불린, 지단백질, 헵토글로빈, 피브리노겐, 트란스페린, 알파-1 항트립신, 알파-2 마크로글로불린 또는 인터페론인 것이 특징인 방법.

청구항 231

제229항에 있어서, 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열이 파지를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 232

제229항에 있어서, 사상 파지 단백질을 암호하는 DNA 서열이 파지미드를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 233

제229항에 있어서, 단계 (a)의 생성물이 반감기 연장 부로 유도체화되어 있는 것이 특징인 방법.

청구항 234

제229항에 있어서, 상기 반감기 연장 부가 폴리에틸렌 글리콜인 것이 특징인 방법.

청구항 235

제229항에 있어서, DNA 기질 분자가 에피토프 태그를 암호하는 핵산과 단백질을 암호하는 핵산의 융합체를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 236

제235항에 있어서, 단계 (a)의 생성물이 단계 (b) 이전에 프로테아제와 접촉시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 237

제235항에 있어서, 리간드가 에피토프 태그에 대해 특이적인 항체인 것이 특징인 방법.

청구항 238

제229항에 있어서, 단백질이 표 1에서 선택되는 것이 특징인 방법.

청구항 239

제229항에 있어서, 단계 (a)의 생성물이 단계 (b) 이전에 열, 금속 이온, 비생리학적 pH, 동결건조 또는 동결 해동으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 240

제229항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 241

제229항의 방법으로 생성되는 개량된 알파 인터페론.

청구항 242

제229항에 있어서, 단계 (d)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 243

제242항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복적 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 244

제242항에 있어서, 제242항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 245

제229항에 있어서, 단계 (d)의 개량된 유전자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 246

2개 이상의 서브유니트를 가진 단백질을 개량하는 방법으로서,

- (a) 각 서브유니트에 대하여 돌연변이 DNA 기질 분자의 라이브러리를 제공하는 단계,
- (b) 제1 서브유니트의 아미노 말단을 암호하는 핵산 서열에 있는 링커를 사용하여 제2 서브유니트의 카르복시 말단을 암호하는 핵산 서열을 연결시킨 각 서브유니트 서열을 암호하는 DNA 기질 분자를 포함하는 상기 단백질의 1분쇄 작제물의 라이브러리와 상기 단계 (a)의 라이브러리를 재조합하는 단계,
- (c) 단계 (b)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (d) 단계 (c)의 생성물로부터 재조합 1분쇄 작제물 DNA 기질 분자를 회수하는 단계,

- (e) 단계 (d)의 생성물을 돌연변이유발법으로 처리하는 단계,
- (f) 단계 (e)로부터 개량된 1본쇄 작제물 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 247

제246항에 있어서, 단계 (b)의 생성물이 파지상에서 표현되는 것이 특징인 방법.

청구항 248

제246항에 있어서, 단백질이 표 1에서 선택되는 것이 특징인 방법.

청구항 249

제246항에 있어서, 단계 (a) 내지 (f)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 250

제246항에 기재된 방법에 의해 생성되는 개량된 단백질.

청구항 251

제246항에 있어서, 단계 (f)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 252

제246항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 253

제246항에 있어서, 제246항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 254

제246항에 있어서, 단계 (f)의 개량된 DNA 기질 분자가 DNA 기질 분자의 라이브러리를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 255

효모 시그널 형질도입 경로에 대한 포유류 7-경막 수용체의 커플링을 개량하는 방법으로서,

- (a) 효모 폐로몬 응답성 프로모터의 조절하에 발현되는 수용체 유전자에 의해 포유류 7-경막 수용체를 발현하고 리포터 유전자를 발현하는 효모 숙주 세포에서 포유류 G 알파 단백질 돌연변이체 라이브러리를 발현시키는 단계,
- (b) 7-경막 수용체에 대한 리간드의 존재하에 리포터 유전자의 발현에 대해 단계 (a)의 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,
- (c) 단계 (b)에서 선별되거나 선택된 생성물로부터 개량된 G 알파 단백질 돌연변이체를 암호하는 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 256

제255항에 있어서, 단계 (c)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 257

제256항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 258

제255항에 있어서, 제255항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 259

제255항에 있어서, 단계 (a) 내지 (c)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 260

제255항의 방법에 의해 생성되는 개량된 G 알파 단백질.

청구항 261

제255항에 있어서, 리포터 유전자가 루시퍼라제인 것이 특징인 방법.

청구항 262

제255항에 있어서, 폐로몬 응답성 프로모터가 GAL4에 의해 양성적으로 조절되고 GAL4가 폐로몬 감수성 GAL4 증강성 프로모터의 조절하에 발현되는 것이 특징인 방법.

청구항 263

- (a) 최소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자로 숙주 세포를 형질감염시켜 이 숙주 세포내에서 최

소한 제1 DNA 기질 분자와 제2 DNA 기질 분자를 재조합시키는 단계,

(b) 단계 (a)의 생성물 중 목적 성질을 가진 생성물을 선별하거나 선택하는 단계,

(c) 단계 (b)의 재조합 DNA 기질 분자를 회수하는 단계를 포함하여, 최소한 제1 DNA 기질 분자 및 제2 DNA 기질 분자를 재조합하는 방법.

청구항 264

제263항에 있어서, 단계 (c)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 265

제264항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 266

제263항에 있어서, 단계 (a) 내지 (c)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

청구항 267

제263항에 있어서, 제263항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 268

1본쇄 DNA를 포함하는 백터를 함유하고 목적 단백질을 암호하는 DNA 기질 서열을 개량하는 방법으로서,

(a) 상기 DNA 기질 서열의 돌연변이체의 라이브러리와 1본쇄 백터 DNA를 제공하는 단계,

(b) 단계 (a)의 라이브러리 유래의 변성된 2본쇄 DNA를 단계 (a)의 1본쇄 백터 DNA에 어닐링하는 단계,

(c) 단계 (b)의 생성물을 사용하여 숙주를 형질전환시키는 단계,

(d) 단계 (c)의 생성물 중 목적 성질을 가진 생성물을 선별하는 단계,

(e) 단계 (d)의 생성물로부터 개량된 DNA 기질 DNA를 회수하는 단계를 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 269

제268항에 있어서, 단계 (e)의 생성물이 돌연변이유발법으로 처리되는 것이 특징인 방법.

청구항 270

제269항에 있어서, 돌연변이유발법이 반복성 서열 재조합을 포함하는 것이 특징인 방법.

청구항 271

제269항에 있어서, 제269항의 생성물이 단계 (a)에서 사용되는 것이 특징인 방법.

청구항 272

제268항에 있어서, 숙주가 mutS 숙주인 것이 특징인 방법.

청구항 273

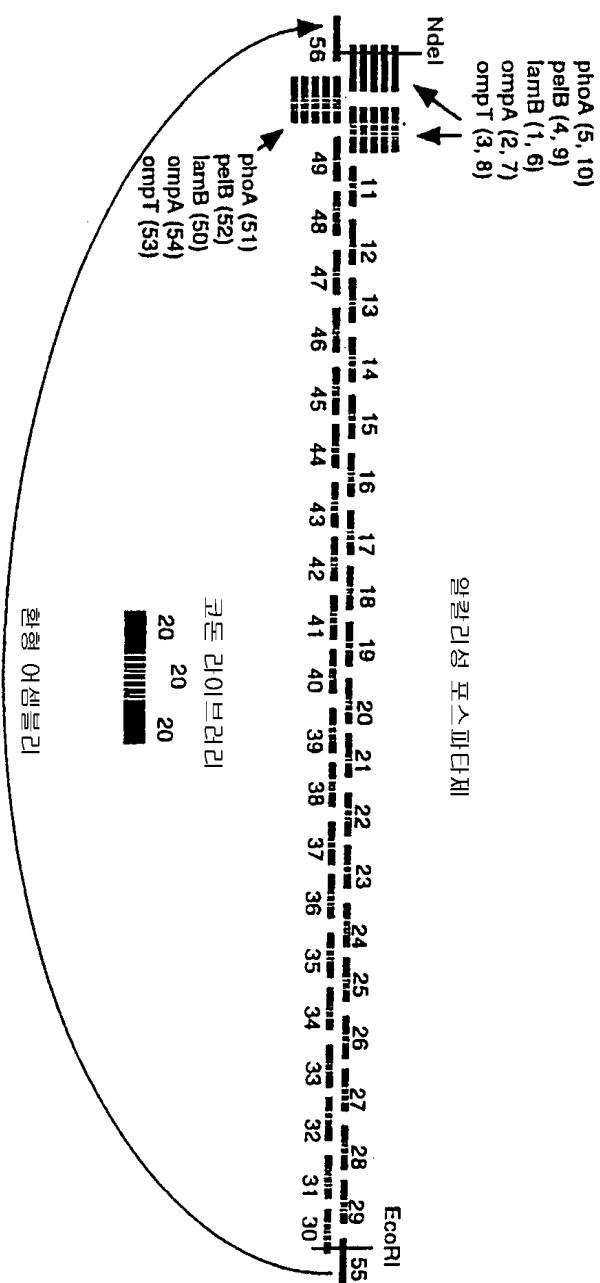
제268항에 있어서, 백터가 파지미드인 것이 특징인 방법.

청구항 274

제268항에 있어서, 단계 (a) 내지 (e)가 1회 이상 반복되는 것이 특징인 방법.

도면

도면1



도면2a

인터페론 도

뒤섞인 인터페론의 단백질 서열

1. 콘센서스	K	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	Q	A	I	S	V	L	H	E	M
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
													40		50		60												
2. 알파 I	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	P	-	-	-	-	-	-	
3. 알파 C	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	L	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4. 알파 H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5. 알파 4B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	H	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
6. 알파 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	V	-
7. 알파 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	R	-	E	-	-	-	H	-	-	T	-	-	-	-	-	-	
8. 알파 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	D	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9. 알파 D	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	L	-
10. 알파 F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11. 알파 I	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
12. 알파 WA	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	F	-	-	-	-	-	

도면2b

1. 콘센서스	S	L	S	F	S	T	N	L	Q	K	R	L	R	R	K	D
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
160																
2. 알파 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. 알파 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-
4. 알파 H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. 알파 4B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. 알파 6	-	F	-	S	-	R	-	-	-	E	-	-	-	-	-	E
7. 알파 7	-	F	-	-	-	-	-	-	K	-	G	-	-	-	-	-
8. 알파 8	-	F	-	L	-	I	-	-	-	-	-	K	S	-	E	-
9. 알파 D	-	-	L	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	E
10. 알파 F	-	F	-	L	-	K	I	F	-	E	-	-	-	-	-	E
11. 알파 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-
12. 알파 WA	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-

도면2c

뒤섞인 인터페론의 DNA 서열

1. 콘센서스 T G T G A T C T G C C T C A G A C C C A C A G G C C T G G G T

		10	20	30	
2.	알파	I	-	-	
3.	알파	C	-	-	
4.	알파	H	-	A	
5.	알파	4B	-	T	-
6.	알파	6	-	-	A
7.	알파	7	-	-	
8.	알파	8	-	-	C
9.	알파	D	-	C	-
10.	알파	F	-	G	-
11.	알파	I	-	-	
12.	알파	WA	-	-	A

1.콘센서스 A A T A G G A G G G G C C T T G A T A C T C C T G G C A C A A

			40	50	60		
2.	일파	I	-	-	-	-	-
3.	일파	C	-	-	-	-	-
4.	일파	H	-	C	-	A	T
5.	일파	4B	-	-	-	-	-
6.	일파	6	C	C	-	A	A
7.	일파	7	-	-	-	-	-
8.	일파	8	-	C	-	-	-
9.	일파	D	-	C	-	A	-
10.	일파	F	-	-	-	-	-
11.	일파	I	-	-	-	-	-
12.	일파	WA	-	-	-	-	-

1. 콘센서스 ATGGGAAGAACCTCTCTCCCTTTCTCCCTGCCTG

		70	80	90	
2.	얼파	I	-	-	-
3.	얼파	C	-	-	-
4.	얼파	H	-	A - G	-
5.	얼파	4B	-	-	A -
6.	얼파	5	-	A - G	T -
7.	얼파	7	-	-	T -
8.	얼얼파	8	-	C -	-
9.	얼파	D	-	A - C	-
10.	얼파	F	-	-	C -
11.	얼파	I	-	-	T -
12.	얼파	WA	-	-	A -

1. 콘센서스 A A G G A C A G A C A T G A C T T T G G A T T T C C C C A G

		100	110	120	
2.	알파	I	-	-	-
3.	알파	C	-	-	-
4.	알파	H	-	-	-
5.	알파	4B	-	T	C
6.	알파	6	-	-	C
7.	알파	7	-	A	CA
8.	알파	8	-	C A	-
9.	알파	D	T	-	C
10.	알파	F	-	-	C
11.	알파	I	-	-	-
12.	알파	WA	-	T	C
			-	T	C
			-	C	-

도면2d

1. 콘센서스 G A G G A G T T T G A T G G C A A C C A G T T C C A G A A G

2.	알파	I	- - - - -	130	- - - - -	140	- - - - -	150	- - - - -
3.	알파	C	- - - - -		- - - - -		- - - - -		- - - - -
4.	알파	H	- - - - -		A - - - -		- - - - -		A - - - -
5.	알파	4B	- - - - -		- - - - -	C - - - -	- - - - -		- - - - -
6.	알파	6	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -		- - - - -
7.	알파	7	- - - - -		- - - - -	C - - - -	- - - - -		- - - - -
8.	알파	8	- - - - -		- - - - -	- A T - -	A - - - -	- - - - -	- - - - -
9.	알파	D	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
10.	알파	F	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
11.	알파	I	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
12.	알파	WA	- - - - -		T - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

1. 콘센서스 G C T C A A G C C A T C T C T G T C C T C C A T G A G A T G

2.	알파	I	A - - - -	160	- - - - -	C - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
3.	알파	C	A - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
4.	알파	H	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
5.	알파	4B	A - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
6.	알파	6	- - - - -		G - - - -	- - - - -	- - - - -	G - - - -	- - - - -
7.	알파	7	A - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
8.	알파	8	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
9.	알파	D	- - - - -		C - - - -	- - - - -	- - - - -	C - - - -	- - - - -
10.	알파	F	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
11.	알파	I	A - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
12.	알파	WA	- - - - -		- - - - -	C - T - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

1. 콘센서스 A T C C A G C A G A C C T T C A A T C T C T T C A G C A C A

2.	알파	I	- - - - -	190	- - - - -	200	- - - - -	210	- - - - -
3.	알파	C	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
4.	알파	H	- - - - -		G - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
5.	알파	4B	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
6.	알파	6	- - - - -		T - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
7.	알파	7	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
8.	알파	8	- - - - -		- - - - -	C - - - -	- - - - -	T C - - -	- - - - -
9.	알파	D	- - - - -		- - - - -	T - - - -	C - - - -	T C - - -	- - - - -
10.	알파	F	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
11.	알파	I	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
12.	알파	WA	- - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

1. 콘센서스 A A G G A C T C A T C T G C T T G C T T G G G A T G A G A G C

2.	알파	I	G - - - -	220	- - - - -	230	- - - - -	240	- - - - -
3.	알파	C	G - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	A C - - -	- - - - -
4.	알파	H	- - - - -		A - - - -	- - - - -	- - - - -	A C - - -	- - - - -
5.	알파	4B	G - - - -		- - - - -	- - - - -	- - - - -	A C - - -	- - - - -
6.	알파	6	- - - - -		- - - - -	T - - - -	- - - - -	- - - - -	G - - - -
7.	알파	7	G - - - -		- - - - -	- - - - -	A C - - -	- - - - -	- - - - -
8.	알파	8	- - - - -		- - - - -	T - - - -	- - - - -	C - - - -	- - - - -
9.	알파	D	- - - - -		A - T - -	- - - - -	- - - - -	G A - - -	- - - - -
10.	알파	F	- - - - -		- - - - -	A - - - -	A C - - -	- - - - -	- - - - -
11.	알파	I	G - - - -		- - - - -	- - - - -	A C - - -	- - - - -	- - - - -
12.	알파	WA	- - - - -		T - - - -	- - - - -	C - - - -	- - - - -	- - - - -

도면2e

1. 콘센서스 C T C C T A G A A A A A T T T T C C A C T G A A C T T T A C

		250	260	270	
2. 알파	I	- - -	- - -	- - -	- - -
3. 알파	C	- - -	- - -	- - -	- - -
4. 알파	H	- - -	- - -	C - A - - T	- - - - - T
5. 알파	4B	- - -	- - -	- - -	- - -
6. 알파	6	- - T	- - -	C - C - A T	- - -
7. 알파	7	- - -	- - -	- - -	- - -
8. 알파	8	- - T	- - -	T G - - - C - A - - T C	- - - G
9. 알파	D	- - -	- - -	C - - - C G - - C	- - - C
10. 알파	F	- - -	- - -	- - -	- - - A - -
11. 알파	I	- - -	- - -	- - -	- - -
12. 알파	WA	- - -	- - -	C - A - - T	- - - T

1. 콘센서스 C A G C A A C T G A A T G A C C T G G A A G C C T G T G T G

		280	290	300	
2. 알파	I	- - -	- - -	A - - -	- - - A - -
3. 알파	C	- - -	- - -	A - - -	- - - A - -
4. 알파	H	- - -	- - -	A - - -	- - - - -
5. 알파	4B	- - -	- - -	- - -	- - - A - -
6. 알파	6	- - -	- - -	G - - -	- - - - -
7. 알파	7	- - -	- - -	- - -	- - - A - -
8. 알파	8	- - -	- - -	G - - -	- - - G T - -
9. 알파	D	- - -	- - -	G - - -	- - - T - -
10. 알파	F	- - -	- - -	G - - -	- - - A - -
11. 알파	I	- - -	- - -	A - - -	- - - C - -
12. 알파	WA	- - -	- - -	A - - -	- - - - -

1. 콘센서스 A T A C A G G A G G T T G G G G T G G A A G A G A C T C C C

		310	320	330	
2. 알파	I	- - -	G - - -	- - - A - - -	- - - - -
3. 알파	C	- - -	- - -	A - - -	- - - - -
4. 알파	H	- - -	- - -	- - -	- - - - -
5. 알파	4B	- - -	- - -	- - -	- - - - -
6. 알파	6	- - -	G - -	G T - - -	G - - G - -
7. 알파	7	- - -	- - -	- - -	- - - - -
8. 알파	8	- - G	- - A - G - -	- - A T - - - T	- - - T - -
9. 알파	D	- - G	- - A G A - -	- G - - A - -	- - - - -
10. 알파	F	- - -	- - -	- - -	- - - - -
11. 알파	I	- - -	- - -	A - - -	- - - - -
12. 알파	WA	- C - - -	- - -	- - - T - G -	- - - - -

1. 콘센서스 C T G A T G A A T G A G G A C T C C A T C C T G G C T G T G

		340	350	360	
2. 알파	I	- - -	- - -	- - -	- - - - -
3. 알파	C	- - -	- - -	- - -	- - - - -
4. 알파	H	- - -	- - -	- - -	- - - - -
5. 알파	4B	- - -	- - -	T - - -	- - - - -
6. 알파	6	- - -	- - -	- - -	- - - - -
7. 알파	7	- - -	- - -	- - -	- - - - -
8. 알파	8	- - -	- - -	T - - -	- - - - -
9. 알파	D	- - -	T - C - C - -	- - -	- - - - -
10. 알파	F	- - -	- - -	T - - -	- - - - -
11. 알파	I	- - -	- - -	T - - -	- - - - -
12. 알파	WA	- - -	- - -	- - -	- - - - -

도면2f

1. 콘센서스	A G G A A A T A C T T C C A A A G A A T C A C T C T T T A T
	370 380 390
2. 알파 I	- - -
3. 알파 C	- - -
4. 알파 H	- A -
5. 알파 4B	- - -
6. 알파 6	- - A - -
7. 알파 7	- - -
8. 알파 8	- - -
9. 알파 D	- A - - -
10. 알파 F	- A -
11. 알파 I	- - -
12. 알파 WA	- - - - T - - - - -

1. 콘센서스	C T G A C A G A G A A G A A A T A C A G G C C C T T G T G C C
	400 410 420
2. 알파 I	- - A - -
3. 알파 C	- - A - -
4. 알파 H	- - - T G -
5. 알파 4B	- - A - -
6. 알파 6	- - - - - A - G -
7. 알파 7	- - A - T G -
8. 알파 8	- - - - - T -
9. 알파 D	- - - - -
10. 알파 F	- - - - -
11. 알파 I	- - A - -
12. 알파 WA	- - - - T G - - - - -

1. 콘센서스	T G G G A G G T T G T C A G A G C A G A A A T C A T G A G A
	430 440 450
2. 알파 I	- - - - -
3. 알파 C	- - - - -
4. 알파 H	- - - - -
5. 알파 4B	- - - - -
6. 알파 6	- - - - -
7. 알파 7	- - - - -
8. 알파 8	- - - - -
9. 알파 D	- - - - -
10. 알파 F	- - - - -
11. 알파 I	- - - - -
12. 알파 WA	- - - - -

1. 콘센서스	T C C T T C T C T T T T C A A C A A A C T T G C A A A A A
	460 470 480
2. 알파 I	- - - C - - -
3. 알파 C	- - T C - - -
4. 알파 H	- - - C - - -
5. 알파 4B	- - - C - - - G -
6. 알파 6	- - - - - C A - G -
7. 알파 7	- - - - - A - - - A -
8. 알파 8	- - - - - A - - - T C -
9. 알파 D	- - - C - - - A -
10. 알파 F	- - - - - A - - - A - T T - - T - - G -
11. 알파 I	- - T C - - - - - - - - - - - - -
12. 알파 WA	- - - - - - - - - - - - - - - - -

도면2g

1. 콘센서스	A G A T T A A G G A G G G A A G G A T T G A
	490 500
2. 알파 I	- - -
3. 알파 C	- T - - -
4. 알파 H	- - -
5. 알파 4B	- - -
6. 알파 6	- - G - - - - - A - A -
7. 알파 7	G -
8. 알파 8	- - - - G - A - - - T - - - A - -
9. 알파 D	- - - - - - - A - A -
10. 알파 F	- - - - - - - A - - -
11. 알파 I	- - - - - - - - - - - - -
12. 알파 WA	G - - - - - A - - - - -

도면3