(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/00
C12N 15/25
C12P 21/02

(45) 공고일자 1996년12월20일
(11) 공고번호 특1996-0016705

(21) 출원번호	특1989-0001221	(65) 공개번호	특1989-0013177
(22) 출원일자	1989년02월02일	(43) 공개일자	1989년09월21일
(30) 우선권주장	63-24613 1988년02월03일 일본(JP)		

다이닛뽄 세이야꾸 가부시끼가이샤 후지와라 도미오
일본국 오오사까시 히가시꾸 도쇼오마찌 3쪼오메 25반지

(72) 발명자 야마요시 미찌꼬
일본국 오오사까후 도요나까시 니시미도리가오까 3쪼오메 8반 14고오
가와시마 히도시
일본국 오오사까후 스이다시 이즈미쪼오 2쪼오메 47반 27-205고오
야마기시 준이찌
일본국 나라시 스가하라쪼오 309노 10
고다니 히로다다
일본국 오오사까후 사까이시 짜야마다이 2쪼오메 1반 11-403고오
후루다 류우지
일본국 오오쓰시 후지미다이 24반 8고오
후꾸이 도시가즈
일본국 오오사까후 셋쓰시 미시마 3쪼오메 4반 8고오

(74) 대리인 장용식

심사관 : 김형준 (책자공보 제4758호)

(54) 신규폴리펩티드 및 그것을 코우드하는 DNA

요약

요약없음

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

신규폴리펩티드 및 그것을 코우드하는 DNA

[도면의 간단한 설명]

제1도는 형질발현 플라스미드 pHTN 55(141)의 구축공정을 도시한 것으로서, 도면중의 합성 DNA 어댑터 [C], [D], 및 [E]는 실시예 3에 기재된 화학합성올리고 뉴클레오티드 어댑터이다.

제2도는 형질발형 플라스미드 pHIPH 383a의 구축공정을 도시한 것으로서 도면중의 합성 DNA 어댑터 [F]와 [G]는 참고예 1에 기재된 화학합성올리고뉴클레오티드 어댑터이다.

제3도는 형질발현 플라스미드 pHIP 312 EC의 구축공정을 도시한 것으로서, 도면중의 합성 DNA 린커 [H]는 참고예 2에 기재된 화학합성올리고 뉴클레오티드 린커이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 사람 인터로이킨 1폴리펩티드 및 그 N말단부 및 C말단부의 부분결실체의 아미노산 배열중, 특정의 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 변환시킨 아미노산 배열을 갖는 신규폴리펩티드, 그것을 코우드하는 DNA 및 그들의 제조법에 관한 것이다.

인터로이킨 1은 단구/마크로파아지세포를 비롯한 여러가지 세포로 생산되는 생리활성물질이다.

사람인터로이킨 1에는 대별하여 α향과 β형의 2종류의 분자가 존재하는 것이 알려져 있다 (Furutani, Y. 들, Nucleic Acids Res., 14권, 3167면, 1986년 ; Clark, B. D. 들, Nucleic Acids

Res., 14권, 7897면, 1986년).

그 대표적인 작용으로서, T세포 및 B세포에 대한 분화증식 촉진작용, 임파구활성화작용, 마크로파아지의 활성화작용, 발열 야기작용, 프로스터 글랜딘 E2의 생산유도작용 및 선유아(線維芽) 세포의 증식촉진작용 등이 알려져 있고(Oppenheim, J.J. 들, Immunology Today, 7권, 45면, 1986년 ; Dinarello, C.A., Reviews of Infectionus Diseases, 6권, 51면, 1984년), 생체에 있어서의 면역기구등의 조절인자로서 중요한 역활을 담당하고 있고, 의약품으로서 임상응용이 기대되고 있다.

α형의 사람 인터로이킨 1폴리펩티드의 N말단쪽의 1~14개의 아미노산 및/또는 C말단쪽의 1~4개의 아미노산의 결실체(유럽 공개 특허 제0188920호)나 α형의 사람인터로이킨 1폴리펩티드의 N말단으로부터 36번째의 Asn이 탈아미드화되고, Asp로 변화한 폴리펩티드가 알려져 있다 (Cameron, P.M. 들, J. Exp. Med., 164권, 237면, 1986년 ; Wingfield, P. 들, Eur. J. Biochem., 165권, 537면, 1987년).

또, 다른 유전자에 유래하여 상기 α형의 사람 인터로이킨 1폴리펩티드의 N말단으로부터 두번째의 Ser가 Ala로 바뀌어져 있는 폴리펩티드로 알려져 있다. (March, C. J.들, Nature. 315권, 641면, 1985년), β형의 사람 인터로이킨 1 폴리펩티드의 관해서는, 그 N 말단쪽의 1~3개의 아미노산 및/또는 C말단쪽의 1~3개의 아미노산 결실체(缺失體)가 열려져 있다(Mosley, B. 들, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84권, 4572면, 1987년).

본 발명자들은 사람인터로이킨 1의 구조와 생물활성과의 관계에 대하여 예의 연구를 거듭하여, 그 폴리펩티드의 아미노산 배열의 특정부분을 다른 아미노산으로 변환한 폴리펩티드의 특성을 검색하였던 바, 전혀 뜻밖에도 임파구 활성화 작용을 나타내었으나, 프로스터 글랜딘 E2의 생산유도능을 거의 갖지 않는 특이한 활성을 나타내는 것을 발견하고, 본 발명의 완성함에 이르렀다.

본 발명의 폴리펩티드로서는 α형 사람인터로이킨 1의 부분적 아미노산 변환체, 즉 제1표의 식[Ⅰ]로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드 및 그 N말단으로부터 1~14잔기 및/또는 C말단으로부터 1~4잔기의 아미노산 또는 펩티드가 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다.

제1표

Ser	W	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Val
Lys	Tyr	Asn	Phe	Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr
Glu	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln
Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	X	Asp	Gln	Tyr	Leu
Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu
Ala	Val	Lys	Phe	Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys
Ser	Ser	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Val
Ile	Leu	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr
Val	Thr	Ala	Gln	Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val
Leu	Leu	Lys	Glu	Met	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys
Thr	Ile	Thr	Gly	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu
Phe	Phe	Trp	Glu	Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn
Tyr	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	His	Pro	Asn	Leu
Phe	Ile	Ala	Thr	Lys	Gln	Asp	Tyr	Trp	Val
Cys	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr
Y	Phe	Gln	Ile	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	

다만, 상기 식중 W는 Ser 또는 Ala를 의미하고, X는 Asn 또는 Asp를 의미하며, Y는 Asp를 의미하며, Y는 Asp 이외의 아미노산을 의미한다.

또한 본 발명의 다른 폴로펩티드로서는, β형의 사람인터로이킨 1의 특정부위의 아미노산 변화체, 즉 제2표의 식[Ⅱ]로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드 및 그 N말단으로부터 1~3잔기 및/또는 C말단으로부터 1~3잔기의 아미노산 또는 펩티드가 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다.

제2표

Ala	Pro	Val	Arg	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Leu
Arg	Asp	Ser	Gln	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Met
Ser	Gly	Pro	Tyr	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	His
Leu	Gln	Gly	Gln	Asp	Met	Glu	Gln	Gln	Val
Val	Phe	Ser	Met	Ser	Phe	Val	Gln	Gly	Glu
Glu	Ser	Asn	Asp	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu
Gly	Leu	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser
Cys	Val	Leu	Lys	Asp	Asp	Lys	Pro	Thr	Leu
Gln	Leu	Glu	Ser	Val	Asp	Pro	Lys	Asn	Tyr
Pro	Lys	Lys	Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Phe	Val
Phe	Asn	Lys	Ile	Glu	Ile	Asn	Asn	Lys	Leu
Glu	Phe	Glu	Ser	Ala	Gln	Phe	Pro	Asn	Trp
Tyr	Ile	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Glu	Asn	Met
Pro	Val	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Lys	Gly	Gly
Gln	Asp	Ile	Thr	Z	Phe	Thr	Met	Gln	Phe
Val	Ser	Ser							

다만, 상기 식중 Z는 Asp 이외의 아미노산을 의미한다.

본 발명의 바람직한 폴리펩티드로서는 제1표의 식[Ⅰ]에 표시한 아미노산 배열에 있어서, W가 Ser이고, X가 Asn이며, 또한 Y가 Tyr인 폴리펩티드 및 제3표의 식[Ⅲ]에 표시한 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 들 수 있다.

제3표

Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Phe	Ile	Leu
Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	Ser	Ile	Ile	Arg
Ala	X	Asp	Gln	Tyr	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala
Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Phe
Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys	Ser	Ser	Lys	Asp
Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Val	Ile	Leu	Arg	Ile
Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	Gln
Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val	Leu	Leu	Lys	Glu
Met	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Gly
Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Glu
Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn	Tyr	Phe	Thr	Ser
Val	Ala	His	Pro	Asn	Leu	Phe	Ile	Ala	Thr
Lys	Gln	Asp	Tyr	Trp	Val	Cys	Leu	Ala	Gly
Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Y	Phe	Gln	Ile
Leu									

다만, 상기 식중 X는 Asn 또는 Asp를 의미하고, Y는 Tyr를 의미한다.

본 발명은 상기이 폴리펩티드의 유도체에도 관한 것이다. 그 폴리펩티드의 유도체란, 그 폴리펩티드

의 쇄상의 측쇄관능기, N말단의 아미노기 또는 C말단의 카르복실기를 이용하여 형성되는 유도체를 의미한다.

예컨대, 카르복실기와 지방족 알코올과의 에스테르류, 제1 또는 제2아민과의 산아미드류, 아미노기의 N-아실유도체, 히드록실기의 O-아실유도체, 카르바모일기의 수해체 또는 폴리에틸렌글리콜등에 의한 수식체, 또한 그 폴리펩티드의 카르복실기 또는 아미노기 등으로 형성되는 염, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 알기닌, 카페인, 프로카인, 염산, 글루콘산 등의 염으로 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 분자간 S-S결합에 의하여, 다시 고분자를 형성하는 경우도 있고, 이러한 고분자체도 본 발명의 폴리펩티드에 포함한다.

또, 본 발명의 폴리펩티드는 생산세포 또는 생산조건에 의하여 N말단에 Met가 부가된 폴리펩티드가 얻어지는 경우가 있고, 이러한 폴리펩티드도 본 발명의 폴로펩티드에 포함된다.

본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코우드하는 DNA에도 관한 것이다. 그 DNA의 예로서는 제4표에 기재한 식[IV]으로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드(이하, TN-55 폴리펩티드라고 한다)를 코우드하는 DNA로서, 제5표에 기재한 식[A] 로 표시되는 염기 배열을 갖는 DNA 및 그 축중(縮重)을 들 수 있다.

제4표

Ser	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Val
Lys	Tyr	Asn	Phe	Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr
Glu	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln
Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	Asn	Asp	Gln	Tyr	Leu
Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu
Ala	Val	Lys	Phe	Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys
Ser	Ser	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Val
Ile	Leu	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr
Val	Thr	Ala	Gln	Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val
Leu	Leu	Lys	Glu	Met	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys
Thr	Ile	Thr	Gly	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu
Phe	Phe	Trp	Glu	Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn
Tyr	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	His	Pro	Asn	Leu
Phe	Ile	Ala	Thr	Lys	Gln	Asp	Tyr	Trp	Val
Cys	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr
Tyr	Phe	Gln	Ile	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	

제5표

5′-T C A T C A C C T T T A G C T T C C T G A G C A A T G T G

A A A T A C A A C T T T A T G A G G A T C A T C A A A T A C

G A A T T C A T C C T G A A T G A C G C C C T C A A T C A A

A G T A T A A T T C G A G C C A A T G A T C A G T A C C T C

A C G G C T G C T G C A T T A C A T A A T C T G G A T G A A

G C A G T G A A A T T T G A C A T G G G T G C T T A T A A G

T C A T C A A A G G A T G A T G C T A A A A T T A C C G T G

A T T C T A A G A A T C T C A A A A A C T C A A T T G T A T

G T G A C T G C C C A A G A T G A A G A C C A A C C A G T G

C T G C T G A A G G A G A T G C C T G A G A T A C C C A A A

A C C A T C A C A G G T A G T G A G A C C A A C C T C C T C

T T C T T C T G G G A A A C T C A C G G C A C T A A G A A C

T A T T T C A C A T C A G T T G C C C A T C C A A A C T T G

T T T A T T G C C A C A A A G C A A G A C T A C T G G G T G

T G C T T G G C A G G G G G G C C A C C C T C T A T C A C T

T A C T T T C A G A T A C T G G A A A A C C A G G C G - 3′

식[A] 본 발명의 폴리펩티드를 코우드하는 DNA는 공지의 사람 인터로이킨 1 또는 그 N말단 및/또는 C말단의 아미노산 또는 펩티드 결실체를 코우드하는 DNA를 공지의 방법, 예컨대 상기 유럽공개특허 제0188920호에 기재된 방법을 사용하여 만들고, 이것을 예컨대 왕들의 방법(Wang A.M. 들, Sceince, 224권, 131면 1984년)이나 쿤켈등의 방법(Methods in Enzymol., 154권, 367면, 1987년)에 준하여 점변이시켜 목적으로 하는 본 발명의 DNA를 만들거나, 혹은 적당한 제한효소에 의하여 DNA 단편을 단리(單離)하여, 목적하는 개소의 염기배열을 인위적으로 바꾼 합성올리고 디옥시 뉴클레오티드 어댑터와 결합시킴으로써, 본 발명의 DNA를 제조할 수 있다.

이들의 DNA를 그 기술분야에서 공지의 기술에 의하여 적당한 형질발현벡터에 적절한 배열을 갖도록 삽입하여, 이것을 숙주에 도입한 형질 전환체를 배양함으로써 본 발명의 폴리펩티드를 제조할 수 있다.

예컨대, 본 발명의 폴리펩티드 그 자체를 코우드하는 염기 배열을 갖는 DNA의 5'말단에 번역개시 코돈 ATG를, 그리고 3'말단에는 종지코돈을 갖는 DNA 단편을 만들어, 이것을 적당한 프로모우터 및 SD 배열에 이어서 결합시키고, 또한 이것을 벡터에 조합해 넣음으로써 본 발명의 폴리펩티드 생산용의 형질 발현 벡터를 만들 수 있다.

프로모우터로서는 예컨대 lac, trp, tac, phoS, phoA, PL, SV40 초기 프로모우터 등을 들 수 있다.

벡터로서는 예컨대 플라스미드(pBR 322등), 파아지(λ파아지 유도체등), 윌스(SV 40등), 런너웨이 플라스미드 등을 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 생산용의 형질발현벡터를 적당한 숙주, 예컨대 대장균에 코헨들의 방법(Cohen, S. N. 들, Proc. Natl, Acad. Sci., USA, 69권, 2110면, 1972년)에 준하여 도입함으로써 형질 전환체를 얻을 수 있다. 이어서 이 형질 전환체를 그에 따른 적당한 배양조건하에서 배양함으로써, 목적하는 폴리펩티드 또는 그 N 말단에 Met가 결합된 폴리펩티드를 만들 수 있다.

이 배양물을 예컨대 리조팀 소화와 동결융해, 초음파 파쇄, 프렌치 프레스등에 의하여 파괴한 후, 원심분리 또는 여과함으로써 본 발명의 폴리펩티드 함유 추출액을 얻을 수 있다. 이 추출액을 단백질 정제의 일반적인 정제법, 예컨대 한회여과, 투석, 전기영동, 영석분획, 겔여과분획, 이온교환 크로마토그래피, 항체컬럼을 사용하는 아피니티 크로마토그래피 등에 따라 정제함으로써 본 발명의 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 또, 이와 같이 하여 얻은 폴리펩티드를 화학적으로 수식함으로써 본 발명의 폴리펩티드의 유도체를 얻을 수 있다.

이하에, 본 발명의 폴리펩티드의 전형적인 예로서 제4표에 표시한 아미노산 배열을 갖는 TN-55 폴리펩티드의 제성질에 대하여 설명한다.

시험예 1

TN-55 폴리펩티드의 물리화학적 성상

TN-55 폴리펩티드의 분자량, 등전점 및 부분아미노산 배열의 분석결과는 다음과 같았다. 분자량은

SDS를 사용하는 폴리아크릴아미드겔 전기영동법에 의하여 측정하고, 18±1KD라고 구하여졌다. 등전점은 등전점은 전기영동법에 의하여 분석한 결과, 5.7±0.2였다. 본 폴리펩티드를 미리 4-비닐피리딘으로 처리하여, 요소(尿素) 존재하에서 리질엔드펩티타아제(和光純藥)를 사용하여 35℃로 하룻밤 효소분해한 후, 신크로백 RP-P300 컬럼(Synchrom사. 미국)을 사용한 고속액체 크로마토그래피에 의하여 분취한 펩티드 단편 및 단백분해효소 미처리의 본 폴리펩티드에 대하여, 자동 아미노산 배열결정장치(470A Protein Sequencer, Applied Biosystems사, 미국)에 으하여 그들의 아미노산 배열을 결정하였다.

단백분해효소 미처리의 TN-55 폴리펩티드를 사용하여 결정한 본 폴리펩티드의 N말단으로부터 제40째번까지의 아미노산 배열은 다음과 같고, 제4표에 표시한 아미노산 배열과 완전히 일치하였다.

Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe

Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu

Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu

한편, 단백분해효소분해에 의하여 조제한 2종류의 펩티드 단편(LP-10 단편과 LP-12 단편이라고 한다)의 아미노산 배열은 다음과 같았다.

LP-10 단편의 아미노산 배열 :

Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu

Thr His Gly Thr Lys

LP-12 단편의 아미노산 배열 :

Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile

Thr Tyr Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala

이들 LP-10 단편과 LP-12 단편의 아미노산 배열은 각각 제4표에 표시한 아미노산 배열의 N단말으로부터 제101～119번째의 영역 및 제136～159번째의 영역의 아미노산 배열과 일치하였다.

시험예 2

TN-55 폴리펩티드의 생물활성

(1) 임파구 활성화 작용

임파구 활성화 작용을 하기의 방법에 의하여 측저하였다. 즉, TN-55 폴리펩티드 용액을 5% 소태아 혈청을 함유한 조직 배양용 배지 RPMI-1640(Flow Labs., 미국)으로 희석하였다. 각 희석액의 50㎕을 96구멍 평저형(平底型) 플레이트의 각 웰에 주입하여, 그 각 웰에 20㎍/㎖농도의 피트헤마글루티닌-P(Difco Labs., 미국)의 50㎕을 첨가하고, 또한 C3H/He 마우스의 흉선 세포현탁액(200만개/㎖)의 100㎕을 첨가하여 5% 탄산가스 함유 공기중 37℃에서 3일간 배양하였다.

배양종료 약 18시간전에 [^{3}H]-티미진의 1μCi를 첨가하여, 세포 내에 스며든 [^{3}H]-티미진량을 계측하였다.

음성대조에는 공시시료의 대신에 5% 소태아 혈청을 함유한 RPMI-1640배지를 첨가한 계에 있어서의 마우스의 흉선 세포배양시의 [^{3}H]-티미진 주입량을 표시하였다.

제6표에 표시한 바와같이 강한 임파구 활성화 작용이 인정되었다.

제6표

TN-55 폴리펩티드의 최종희석배수	(^{3}H)-티미진 주입량
5,000	94,171 cpm
20,000	95,283
50,000	83,579
200,000	69,471
500,000	65,143
2,000,000	39,050
5,000,000	16,630
20,000,000	9,952
50,000,000	6,311
음성대조	6,740

(2) 프로스터글랜딘 E2 생산유도능

TN-55 폴리펩티드의 사람 골육종세포 MG-63세포(American Type Cell Collection CRL 1427)를 표적세포로 하는 프로스터글랜딘 생산유도능을 상기의 임파구 활성화 작용의 측정에 사용한 같은 시료원액을 사용하여, 이하의 방법에 따라 측정하였다.

즉, TN-55 폴리펩티드 용액을 10% 소태아혈청, 비필수아미노산 및 필빈산나트륨을 함유한 조직배양용배지 MEM 아르액(Flow Labs.)으로 희석하였다.

각 희석액의 100㎕을 24구멍 평저형 플레이트의 각 웰에 주입하고, 다시 각 웰당 약 2만개의 MG-63세포를 함유한 세포 현탁액의 400㎕를 첨가하여 5% 탄산가스함유공기중 37℃에서 48시간 배양하였다.

배양종료후, 배양상청(上淸)을 채취하여 그 상청중의 프로스터 글랜딘 E2 함유량을 RIA킷(E.I. duPont de Nemours & Co., 미국)을 사용하여 측정하였다.

음성대조에는 공시시료의 대신에 상기의 배양액을 첨가한계에 있어서의 MG-63세포의 배양상청중의 프로스터 글랜딘 E2량을 표시하였다.

제7표에 표시한 바와 같이, 프로스터글랜딘 E2 생산유도능은 거의 인정되지 않았다.

제7표

TN-55 폴리펩티드의 최종희석배수	프로스터글랜딘 E2 생산유리량(ng/㎖)
500	0.36
5,000	0.30
50,000	0.18

500,000	0.18
5,000,000	0.21
50,000,000	0.18
음성대조	0.18

이상의 결과에서, TN-55 폴리펩티드는 강한 임파구 활성화 작용을 발휘하는 양에 있어서도, 유효한 프로스터글랜딘 E2 생산유도능은 인정되지 않고, 극히 특징적인 특성을 갖는 폴리펩티드인 것이 증명되었다.

그리고, 본 명세서에서는 기재의 간략화를 위하여 이하의 약호를 사용한다.

A아데닌

C시토신

G구아닌

T티민

DNA디옥시 리보헥산

cDNA상보 DNA

RNA리보핵산

mRNA전령 RNA

ATP아데노신 3인산

dATP디옥시 아데노신 3인산

dCTP디옥시 시티딘 3인산

dGTP디옥시 구아노신 3인산

dTTP디옥시 티미딘 3인산

bp염기대

kbp킬로 염기대

kD킬로 달톤

SDS라우릴 황산 나트륨

이하에 실시예를 들어 본 발명을 다시 구체적으로 설명한다.

실시예 1

TN-55 폴리펩티드의 제조

상기 제4표의 식[IV]로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 TN-55 폴리펩티드를 이하의 방법으로 제조하였다.

(1) 형질발현플라스미드의 구축

참고예 2에 기재된 조환체(組煥體) 플라스미드 pHIP 312 EC를 출발재료로 사용하여, 이 플라스미드 DNA중의 사람인터로이킨 1 폴리펩티드의 C말단으로부터 제9번째의 아미노산(Asp)을 코우드 하는 코돈(GAC)을, 쿤겔들의 방법(Kunkel, T.A. 들, Methods in Enzymol., 154권, 367면, 1987년)에 준한 부위특이적 변이 유도면에 의하여 티로신에 대응하는 코돈 TAC로 변환함으로써, TN-55 폴리펩티드 생산용의 형질 발현 플라스미드(pHTN 55)를 구축하였다.

그 구축방법은 이하와 같으며, 부위특이적 변이유도에는 MUTA-CENE 인비트로 무타제네시스 키트(Bio-Rad Labs., 미국)를 사용하였다.

즉, 플라스미드 pHIP 312 EC를 제한효소는 Pvu II와 Hind III으로 소화하여, 사람 인터로이킨 1폴리펩티드를 코우드하는 영역 및 대장균 트립트판 프로모우터 영역을 포함한 DNA 단편을 단리 하였다.

이 DNA 단편을 M13mp19 벡터의 제한효소 Hind III 과 Hinc II 인식부위간에 삽입하였다.

이 조환체 DNA를 대장균 JM 105주에 감염시키고, 이것을 배양하여 그 파아지를 채취하였다.

이어서, 그 파아지를 대장균 CJ 236주에 감염시킴과 동시에 우리딘(1㎍/㎖) 및 클로람페니콜(20㎍/㎖)을 함유하는 2xTY배지 [조성 : 1.6% 트립톤, 1% 효모에키스, 0.5% 염화나트륨]중, 37℃로 5시간 배양하고, 그 배양상청으로부터 파아지 DNA를 정제분리하였다.

배양용량 10㎖당, 약 2㎍의 파아지 DNA가 얻어졌다.

별도 하기식 [B]로 표시되는 염기 배열의 올리고 디옥실보 뉴클레오티드를 상법에 따라 화학합성하였다.

5'-CTATCACTTACTTTCA-3'[B]

이 염기배열은 제8표의 염기배열에 있어서 제787째번의 염기를 제외하고, 제779~794째번의 배열과 일치한다.

이 화학합성 DNA를 변이유도 프라이머라고 한다.

이 변이유도 프라이머의 5'말단에 인산기를 부가하여, 이 프라이머를 먼저 조제한 파아지 DNA와 아닐완충액 [조성 : 2mM 염화 마스네슘 및 50mM 염화나트륨을 함유한 200mM 트리스 염산 완충액(pH 7.4)] 중, 70℃로 10분간 반응시킨후, 1분간에 1℃의 비율로 30℃까지 서서히 냉각시켜, 프라이머를 파아지 DNA에 결합시켰다.

이어서, T4DNA 폴리메라아제 및 T4DNA 리가아제를 사용하여 dGTP, dATP, dCTP, dTTP 및 ATP 등의 존재하에서 파아지 DNA에 대하여 상보적인 DNA를 합성하여 환상 2본쇄 DNA로 하였다.

이것을 대장균 JM 105주에 감염시켜 각 클로우(clone)에 대하여 각각 배양하고, 그 배양세균으로부터 복제형 2본쇄 DNA를 단리하였다.

그 염기 배열은 배양상청으로부터 단리한 단쇄 DNA를 사용하여 단백번역영역을 중심으로 염기배열을 결정하고, TN-55 폴리펩티드를 코우드하는 염기배열을 가지고 있는 것을 확인하였다.

이어서, 복제형 2본쇄 DNA로부터 제한효소 Hpa Ⅰ과 Xho Ⅰ에 의한 소화로 그 단백번역영역을 포함한 DNA 단편을 잘라내었다.

이 DNA 단편을 TN-55DNA 단편이라고 한다.

별도 참고예 1에 기재된 조환체 플라스미드 pHIPH 383a로부터 제한효소 Hpa Ⅰ과 Xho Ⅰ을 사용하여 안피실린 내성 유전자 및 복제개시점을 포함한 큰 DNA 단편을 잘라내어, 이것을 상기의 TN-55 DNA 단편과 T4DNA 리가아제를 사용하여 결합시킴으로써 형질발현 플라스미드 pHTN55를 구축하였다.

이 형질발현 플라스미드 pHTN55를 다음의 방법에 따라 대장균 HB 101주에 도입하여 형질 전환체를 만들었다.

즉, 대장균 HB 101주를 LB배지 [조성 : 1% 트립톤, 0.5% 효모에키스, 1% 염화나트륨(pH 7.5)]에 접종하여, 30℃로 하룻밤 배양하였다. 그 균체 현탁액의 1㎖을 100㎖의 LB 배지에 접종하고, 탁도(파장 600nm의 흡광도)가 약 0.6에 달할 때까지 30℃로 배양하였다.

이 배양액을 빙수중에서 30분간 조용히 놓아둔 후, 원심분리로 균체를 채취하였다.

이 균체를 50㎖의 50mM 염화칼슘액중에 다시 현탁시켜, 빙수중에서 60분간 조용히 놓아둔 후, 원심분리로 균체를 채취하여, 20% 글리세린을 함유한 50mM 염화칼슘액의 10㎖에 현탁시켰다.

이 현탁액에 상기의 형질발현 플라스미드 pHTN55를 첨가하여, 빙수중에서 20분간, 실온으로 10분간 반응시킨 후, LB 배지를 첨가하여 37℃로 60분간 진탕배양하였다.

그 균체현탁액의 일정량을 25㎍/㎖ 농도의 안피실린을 함유한 LB 한천평판(한천농도 1.5%)에 뿌리고, 37℃로 하룻밤 배양하여, 안피실린 내성 클로운을 얻었다.

이 안피실린 내성 클로우, 즉 형질전환체를 HB 101/pHTN55라고 명명하고, TN-55 폴리펩티드의 생산균으로 하였다.

(2) TN-55 폴리펩티드의 제조

제1항에서 얻은 TN-55 폴리펩티드 생산균 HB 101/pHTN55를 LB 배지로 37℃로 하룻밤 배양한 후, 그 균체 현탁액을 약 100배량의 영양배지 [조성 : 1.5% 인산 2나트륨, 12수염, 0.3% 인산 1칼륨, 0.1% 염화암모늄, 2㎎/1 비타민 B1, 0.5% 카자미노산, 2mM 황산마그네슘, 0.1mM 염화칼슘 1% 트립톤, 0.5% 효모에키스, 1% 염화나트륨, 0.4% 글리세린]에 접종하고, 다시 인돌-3-아크릴산을 최종농도 20㎍/㎖이 되도록 첨가한 후, 28시간 배양하였다.

균체를 원심분리에 의하여 채취하여, 0.1% 리조팀 및 30mM 염화나트륨을 함유한 50mM 트리스 염산완충액(pH 8.0)에 현탁시켰다. 빙수중에서 30분간 조용히 놓아둔 후, 드라이아이스/에탄올 욕에서의 동결과 37℃에서의 융해를 반복하여 균체를 파괴하였다. 여기에 1/50 용량의 10% 폴리에틸렌이민을 가하여 조용히 놓아둔후, 원심분리로 균체잔사등을 제외한 추출액을 얻었다.

이 추출액에 황산암모늄을 최종 70% 포화가 되도록 첨가하여, 조용히 놓아둔 후 원심분리에 의하여 침전을 채취하였다. 이 침전을 증류수에 융해시켜, 5mM 인산염 완충화 생리식염액(pH 6.5)[이하, PBS라고 한다]에 대하여 투석한 후, 세파크릴 S-200 컬럼(Pharmacia, 스웨덴)을 사용한 겔여과에 붙였다.

분자량 약 15~20kD의 용출위치에 상당한 획분으로부터 TN-55 폴리펩티드를 함유한 용출액을 모아서, 이것을 미리 5mM 인산염 완충액(pH6.5)[이하, PB라고 한다)으로 평형화한 DEAE-세파로우스 CL-6B 컬럼(Pharmacia)에 부하하고, PB로 컬럼을 세정하였다.

동컬럼에 흡착한 TN-55 폴리펩티드를 PB 중 0~0.5M의 염화나트륨 농도 경사로 용출하였던 바, TN-55 폴리펩티드의 계산 분자량과 일치하는 분자량을 갖는 폴리펩티드가 2분획으로 분리되어 용출 되었다.

저농도의 염화나트륨으로 용출된 획분을 TN-55(a) 폴리펩티드 획분이라고 이름붙이고, 보다 높은 염화나트륨 농도로 용출된 획분을 TN-55(b) 폴리펩티드 획분이라고 이름붙였다.

TN-55(a) 폴리펩티드 획분을 5mM 인산염 완충액(pH5.7)[이하, PB5라고 한다]에 대하여 투석한 후, 미리 PB5로 평형화한 S-세파로우스 파아스트 플로우 컬럼(Pharmacia)에 부하하고, PB5로 컬럼을 세정하며, 이어서 PB5중 0~0.25M의 염화나트륨 농도 경사로 용출하였다. TN-55(a) 폴리펩티드 획분을 모아 한외여과로 농축한후, 토요팔 HW-55 컬럼(도오소오)을 사용하는 겔여과에 의하여 정제하고, 최종적으로 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기 영동분석으로 불순물을 인정하지 않는 고도정제품을 얻었다.

여시서 얻은 TN-55(a) 폴리펩티드 획분으로부터 정제분리한 폴리펩티드를 상기 시험예(1) 및 (2)에 제공하였다.

상기 시험예의 결과등에 의하여 이 폴리펩티드가 목적으로 하는 TN-55 폴리펩티드라고 결론되었다.

실시예 2

TN-55 폴리펩티드의 탈아미드체의 제조

TN-55 폴리펩티드의 아미노산 배열중, N 말단으로부터 제36째번의 아미노산이 Asp로 변화한 폴리펩티드(TN-55 Asp 폴리펩티드라고 한다)를 이하의 방법에 의하여 분리정제하였다.

실시예 1 제2항에 기재한 DEAE-세파로우스 CL-6B 컬럼 크로마토 그래피에 있어서, 보다 높은 염화나트륨 농도로 용출된 TN-55(b) 폴리펩티드 획분에 포함되는 폴리펩티드를 실시예 1 제2항 기재의 방법에 준하여 정제하였다.

즉, S-세파로우스 파아스트 플로우 컬럼 크로마토그래피 및 토요팔 HW-55 컬럼을 사용한 겔여과에 의하여 정제하여, 고도 정제품을 얻었다.

이 TN-55(a) 폴리펩티드 획분으로부터 단리정제한 폴리펩티드의 아미노산 배열을 N말단으로부터 차례로 에드먼 분해법에 의하여 분석하였던 바, 본 폴리펩티드의 N말단으로부터 40번째까지의 아미노산 배열은 다음과 같았다.

Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe

Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu

Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu

즉, N말단으로부터 제36번째의 아미노산은 Asp라고 정해졌다. 그 결과, 이 폴리펩티드 정제품은 TN-55 Asp 폴리펩티드라고 결론되었다. 그리고, 이 TN-55 Asp 폴리펩티드의 등전점은 등전점 전기영동법에 의하여 5.4±0.2라고 구해졌다.

실시예 3

TN-55(141) 폴리펩티드의 제조

상기 제3표의 식[III]에 표시한 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드(다만, 제3표중의 X는 Asn이고, Y는 Tyr이다). 즉 TN-55 폴리펩티드의 아미노산 배열중, N 말단으로부터 14잔기의 펩티드 및 C말단으로부터 4잔기이 펩티드를 결실시킨 아미노산 배열에 대응한 폴리펩티드[TN-55(141) 폴리펩티드라고 한다]를 이하의 방법에 의하여 분리정제하였다.

(1) 형질 발현 플라스미드의 구축

유럽공개특허 제0188920호에 기재된 방법으로 얻은 사람 인터로이킨1 전구체 폴리펩티드를 코우드하는 클로운화 cDNA가 조합해 넣어진 조환체 플라스미드 pHL4로부터 제한효소 Pst I 에 의한 소화로 cDNA 영역을 잘라내었다.

이 cDNA가 코우드 하는 사람 인터로이킨1 전구체 폴리펩티드의 아미노산 배열 및 그 염기배열을 제8표에 표시한다.

이 클로운화 cDNA로부터, 제한효소 Eco RI과 Sau 96I에 의한 소화로 제8표에 표시한 염기배열의 제398~769째번에 상당하는 DNA 단편을 단리하였다.

이 DNA 단편에 하기의 식[C] 및 [D]로 표시되는 두 종류의 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터를 T4 DNA 리가아제를 사용하여 결하시켰다.

식 [C] 및 [D]의 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터의 염기 배열은 다음과 같다.

5'-AAATTATGAGGATCATCAAATACG

3'-TAATACTCCTAGTAGTTTATGCTTAA[C]

및

5'-GGCCACCCTCTATCACTTACTTTCAGATACTGTGATGACTCGA

3'-GTGGGAGATAGTGAATGAAAGTCTATGACACTACTGAGCTCTAG [D]

여기서 얻어진 DNA 단편을 IL1(141) 단편이라고 한다.

형질발현벡터 pEP302를 요시다니(古谷)들의 방법(Furutani, Y. 들 Nucleic Acids Res., 13권, 5869면, 1985년)에 따라 만들고, 이것을 제한효소 Hpa I 과 Bam HI로 소화하여, 대장균 트립트판 프로모우터 영역부분 및 안피실린 내성 유전자를 함유한 큰 DNA단편을 단리하였다.

이 단편에 하기식 [E]로 표시되는 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터를 T4 DNA 리가아제를 사용하여 결합시켰다.

5'-AACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAGGAGGTTT

3'-TTGATCATGCGTTCAAGTGCATTTTCCTCCAAATT[E]

또한, 이 얻어진 DNA 단편을 상기의 IL1(141) 단편과, T4 DNA 리가아제를 사용하여 결합시킴으로써 TN-55(141) 단편과, T4 DNA리가아제를 사용하여 결합시킴으로써 TN-55(141) 폴리펩티드 생산용의 형질 발현 플라스미드를 구축하였다(도1 참조).

이 형질 발현 플라스미드를 pHTH55(141)라고 이름붙였다.

(2) TN-55(141) 폴리펩티드의 제조

제1항에서 만든 형질 발현 플라스미드를 pHTH55(141)를 사용하여 실시예 1에 기재한 방법에 준하여 형성 전환체를 만들어, 그 배양균체로부터 TN-55(141) 폴리펩티드를 분리정제 하였다.

얻어진 TN-55(141) 폴리펩티드 정제품에 대하여, 그 N말단부분의 아미노산 배열을 에드먼 분해법에 의하여 분석한 결과, 그 N말단으로부터 제40째번까지의 아미노산 배열은 다음과 같고, 상기 제3표의 식[III]에 표시한 아미노산 배열과 일치하였다(다만, 제3표중의 X는 Asn이다).

Mer Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu

Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala

Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe

또, 카르복시 펩티다아제 효소분해 및 아미노산 분석의 결과에서는, 로이신이 검출되었다.

이 TN-55(141) 폴리펩티드의 정제과정중, 실시예 2에 도시한 것과 똑같이 산성측의 등전점을 갖는 탈아미드체의 존재를 확인하였다. 그 탈아미드체 폴리펩티드의 아미노산 배열분석의 결과에서, N 말단으로부터 제22째번의 아미노산이 Asp로 변화하고 있는 것을 확인하였다.

TN-55(141) 폴리펩티드의 등전점은 5.4±0.2이고, 그 탈아미드체 폴리펩티드의 등전점은 5.4±0.2라고 구해졌다.

참고예 1

형질발현 플라스미드 pHIPH 383a의 구축

사람 인터로이킨1 전구체 폴리펩티드를 코우드하는 클로운화 cDNA(제8표 참조)가 조합되어 넣어진 조환체 플라스미드 pHL4로부터 제한효소 Pst I에 의한 소화로 cDNA 영역을 잘라 내었다.

이 클로운화 cDNA로부터 제한효소 Eco RI와 Bst NI으로 소화하여, 제8표에 표시한 염기배열의 제398~808째번 까지에 상당하는 DNA 단편을 단리하였다.

이 DNA 단편에 하기식 [F] 및 [G]로 표시되는 2종류의 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터를 T4DNA 리가아제를 사용하여 결합시켰다.

여기서 얻어진 DNA 단편을 SD-IL1 단편이라고 한다.

다만, 식[F]의 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터란, 하기 식[a]~[e]로 표시되는 5종류의 DNA 단편을 차례로 결합시켜서 만든 DNA 어댑터이다(이하 화학합성 DNA [F]라고 한다).

5'-AACTAGTACGCAAGTTCAC

3'-TTGATCATGCGTTCAAGTGCATT[a]

5'-GTAAAAGGAGGTTTAAA

3'-TTCCTCCAAATTTAATAC[b]

5'-TTATGTCATCACCTTTTAG

3'-AGTAGTGGAAAATCGAAGG[c]

5'-CTTCCTGAGCAATGTGAAATACAACTTTA

3'-ACTCGTTACACTTTATGTTGAAATACTC[d]

5'-TGAGGATCATCAAATACG

3'-CTAGTAGTTTATGCTTAA[e]

식 [G]의 화학합성 올리고 뉴클레오티드 어댑터의 염기배열은 다음과 같다.

5'-AGGCGTGATGACTCGA

3'-CCGCACTACTGAGCTCTAG[G]

별도로, 형질 발현 벡터 pEP 302를 제한효소 Hpa I 과 Bam HI로 소화하여, 대장균 트립트팬 프로모우터 영역부분 및 안피실린내성 유전자를 함유한 큰 DNA 단편(이하, 벡터단편이라고 한다)을 단리하였다.

이 벡터단편과 상기의 SD-IL1 단편을 T4 DNA 리가아제를 사용하여 결합시킴으로써 사람 인터로이킨1

폴리펩티드 생산용의 형질발현 플라스미드를 구축하였다(제2도 참조).

이 형질발현 플라스미드를 pHIPH 383a라고 이름붙였다.

참고예 2

형질발현 플라스미드 pHIP 312EC의 구축

플라스미드 pBR 322를 제한효소 Ava I 과 Pvu II 로 소화하여, 얻어진 큰 DNA 단편(약 3.7kbp)을 단락하였다.

이 DNA 단편의 양단을 DNA 폴리메라아제 I (클레노플러그멘트) 및 dGTP, dATP, dCTP, dTTP를 사용하여 평활말단으로 한 후, T4DNA 리가아제로 결합시켜서, pBR 322의 복제개시점 근방의 커피수제어영역을 결실시킨 플라스미드벡터 (pBRS6이라고 한다)를 만들었다.

이 플라스미드벡터 pBRS6을 제한효소 Eco RI으로 소화하여, 직쇄상 DNA로 한 후, 그 양단을 DNA 폴리메라아제 I (클레노플러그멘트) 및 dGTP, dATP, dCTP, dTTP를 사용하여 평활말단으로 하였다.

이 DNA 단편의 양단에 하기식 [H]로 표시되는 올리고 뉴클레오티드 린커를 T4DNA 리가아제를 사용하여 결합시켰다.

화학합성 링커의 염기배열은 다음과 같다.

5'-CCTCGAGG-3'[H]

이어서, 얻어진 DNA 단편을 제한효소 Pst I 과 Xho I 에 의하여 소화하여, 테트라사이클린 내성 유전자를 함유한 큰 DNA 단편을 단리하였다.

이 DNA 단편을 pBRS6-단편이라고 한다.

별도 참고예 1에 기재한 조환체 플라스미드 pHIPH 383a를 제한효소 Pst I 과 Xho I 에 의하여 소화하여, 사람 인터로이킨 1폴리펩티드를 코우드하는 영역을 포함한 DNA 단편을 단리하였다. 이 DNA 단편을 상기의 pBRS6-단편과 결합시킴으로써 테트라사이클린 내성 유전자를 갖는 사람 인터로이킨1 폴리펩티드 생산용 형질발현 플라스미드를 구축하였다(제3도 참조).

이 형질발현 플라스미드를 pHIP 312EC라고 이름붙였다.

제8표

사람인터로이킨 1(α형) 전구체 폴리펩티드를 코우드하는 cDNA의 염기 배열 및 아미노산 배열

1									10
Met	Ala	Lys	Val	Pro	Asp	Met	Phe	Glu	Asp
ATGGCCAAAGTTCCAGACATGTTTGAAGAC (30)									

20
Leu Lys Asn Cys Tyr Ser Glu Asn Glu Glu
CTGAAGAACTGTTACAGTGAAAATGAAGAA (60)
30
Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu
GACAGTTCCTCCATTGATCATCTGTCTCTG (90)
40
Asn Gln Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr
AATCAGAAATCCTTCTATCATGTAAGCTAT (120)
50
Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met Asp Gln
GGCCCACTCCATGAAGGCTGCATGGATCAA (150)
60
Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser
TCTGTGTCTCTGAGTATCTCTGAAACCTCT (180)
70
Lys Thr Ser Lys Leu Thr Phe Lys Glu Ser
AAAACATCCAAGCTTACCTTCAAGGAGAGC (210)
80
Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val
ATGGTGGTAGTAGCAACCAACGGGAAGGTT (240)
90
Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln
CTGAAGAAGAGACGGTTGAGTTTAAGCCAA (270)
100
Ser Ile Thr Asp Asp Asp Leu Glu Ala Ile
TCCATCACTGATGATGACCTGGAGGCCATC (300)
110
Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys
GCCAATGACTCAGAGGAAGAAATCATCAAG (330)
120
Pro Arg Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser
CCTAGGTCATCACCTTTTAGCTTCCTGAGC (360)
130
Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile Ile
AATGTGAAATACAACTTTATGAGGATCATC (390)
140
Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu

```
AAATACGAATTCATCCTGAATGACGCCCTC (420)
                                        150
Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln
AATCAAAGTATAATTCGAGCCAATGATCAG (450)
                                        160
Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu
TACCTCACGGCTGCTGCATTACATAATCTG (480)
                                        170
Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala
GATGAAGCAGTGAAATTTGACATGGGTGCT (510)
                                        180
Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile
TATAAGTCATCAAAGGATGATGCTAAAATT (540)
      }                                 190
Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln
ACCGTGATTCTAAGAATCTCAAAAACTCAA (570)
                                        200
Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln
TTGTATGTGACTGCCCAAGATGAAGACCAA (600)
                                        210
Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile
CCAGTGCTGCTGAAGGAGATGCCTGAGATA (630)
                                        220
Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn
CCCAAAACCATCACAGGTAGTGAGACCAAC (660)
                                        230
Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His Gly Thr
CTCCTCTTCTTCTGGGAAACTCACGGCACT (690)
                                        240
Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
AAGAACTATTTCACATCAGTTGCCCATCCA (720)
                                        250
Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr
AACTTGTTTATTGCCACAAAGCAAGACTAC (750)
                                        260
Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser
TGGGTGTGCTTGGCAGGGGGGCCACCCTCT (780)
                                        270
```

271

Ala * * *

GCGTAG

숫자는 아미노산 번호를 표시한다.

괄호내의 숫자는 염기번호를 표시한다.

* * *는 번역종지 코돈을 의미한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 식[Ⅰ]로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드 또는 그 N말단쪽의 1~14개의 아미노산 및/또는 C말단쪽의 1~4개의 아미노산이 결실된 폴리펩티드.

Ser	W	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Val
Lys	Tyr	Asn	Phe	Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr
Glu	Phe	Ile	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln
Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	X	Asp	Gln	Tyr	Leu
Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu
Ala	Val	Lys	Phe	Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys
Ser	Ser	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Val
Ile	Leu	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr
Val	Thr	Ala	Gln	Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val
Leu	Leu	Lys	Glu	Met	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys
Thr	Ile	Thr	Gly	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu
Phe	Phe	Trp	Glu	Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn
Tyr	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	His	Pro	Asn	Leu
Phe	Ile	Ala	Thr	Lys	Gln	Asp	Tyr	Trp	Val
Cys	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr
Y	Phe	Gln	Ile	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala	

식[I]

식중 W는 Ser 또는 Ala를 의미하고, X는 Asn 또는 Asp를 의미하며, Y는 Asp 이외의 아미노산을 의미한다.

청구항 2

하기식 [III]으로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드.

Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Phe	Ile	Leu
Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	Ser	Ile	Ile	Arg
Ala	X	Asp	Gln	Tyr	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala
Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Phe
Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys	Ser	Ser	Lys	Asp
Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Val	Ile	Leu	Arg	Ile
Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	Gln
Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val	Leu	Leu	Lys	Glu

Met	Pro	Glu	Ile	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Gly
Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Glu
Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn	Tyr	Phe	Thr	Ser
Val	Ala	His	Pro	Asn	Leu	Phe	Ile	Ala	Thr
Lys	Gln	Asp	Tyr	Typ	Val	Cys	Leu	Ala	Gly
Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Y	Phe	Gln	Ile
Leu									

식(Ⅲ)

식중 X는 Asp를 의미하고, Y는 Asp 이외의 아미노산을 의미한다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 식[Ⅰ] 또는 [Ⅲ]으로 표시되는 아미노산 배열중, Y가 Tyr인 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드.

청구항 4

하기식[Ⅱ]으로 표시되는 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드 또는 그 N말단쪽의 1~3개의 아미노산 및/또는 C말단쪽의 1~3개의 아미노산이 결실된 폴리펩티드.

Ala	Pro	Val	Arg	Ser	Leu	Asn	Cys	Thr	Leu
Arg	Asp	Ser	Gln	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Met
Ser	Gly	Pro	Tyr	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	IIis
Leu	Gln	Gly	Gln	Asp	Met	Glu	Gln	Gln	Val
Val	Phe	Ser	Met	Ser	Phe	Val	Gln	Gly	Glu
Glu	Ser	Asn	Asp	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu
Gly	Leu	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser
Cys	Val	Leu	Lys	Asp	Asp	Lys	Pro	Thr	Leu
Gln	Leu	Glu	Ser	Val	Asp	Pro	Lys	Asn	Tyr
Pro	Lys	Lys	Lys	Met	Glu	Lys	Arg	Phe	Val
Phe	Asn	Lys	Ile	Glu	Ile	Asn	Asn	Lys	Leu
Glu	Phe	Glu	Ser	Ala	Gln	Phe	Pro	Asn	Trp
Tyr	Ile	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Glu	Asn	Met
Pro	Val	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Lys	Gly	Gly
Gln	Asp	Ile	Thr	Z	Phe	Thr	Met	Gln	Phe
Val	Ser	Ser							

식(Ⅱ)

식중, Z는 Asp 이외의 아미노산을 의미한다.

청구항 5

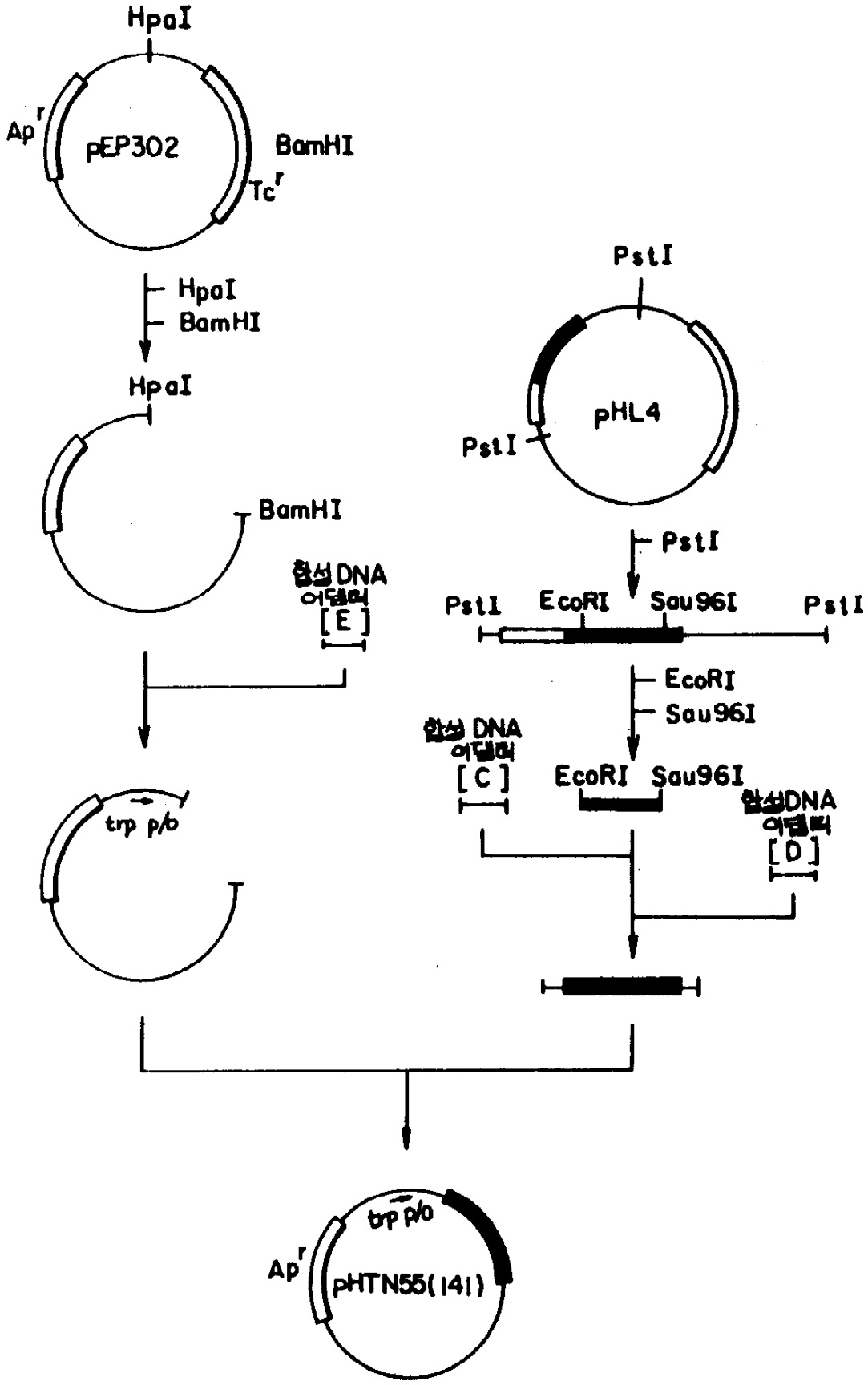
제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 폴리펩티드를 코우드하는 DNA.

청구항 6

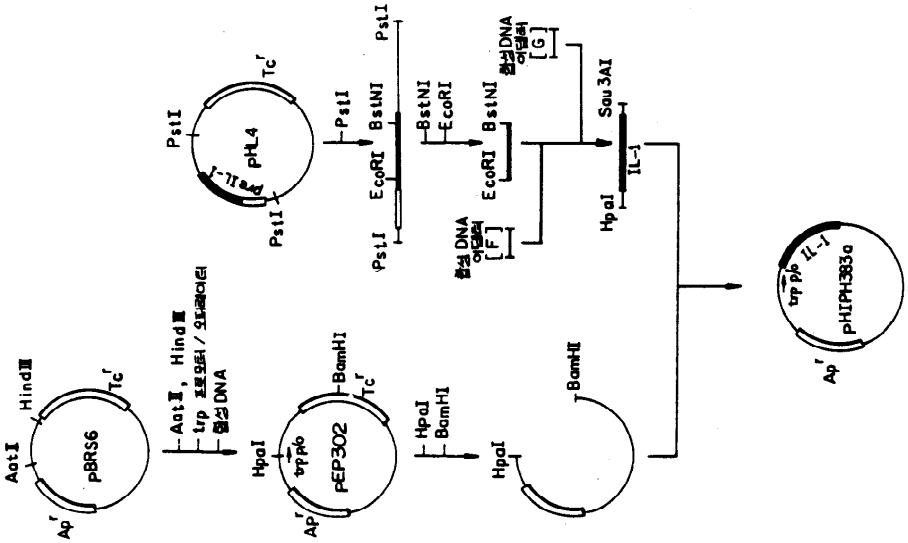
제5항에 기재된 DNA를 조립해넣은 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 폴리펩티드의 제조법.

도면

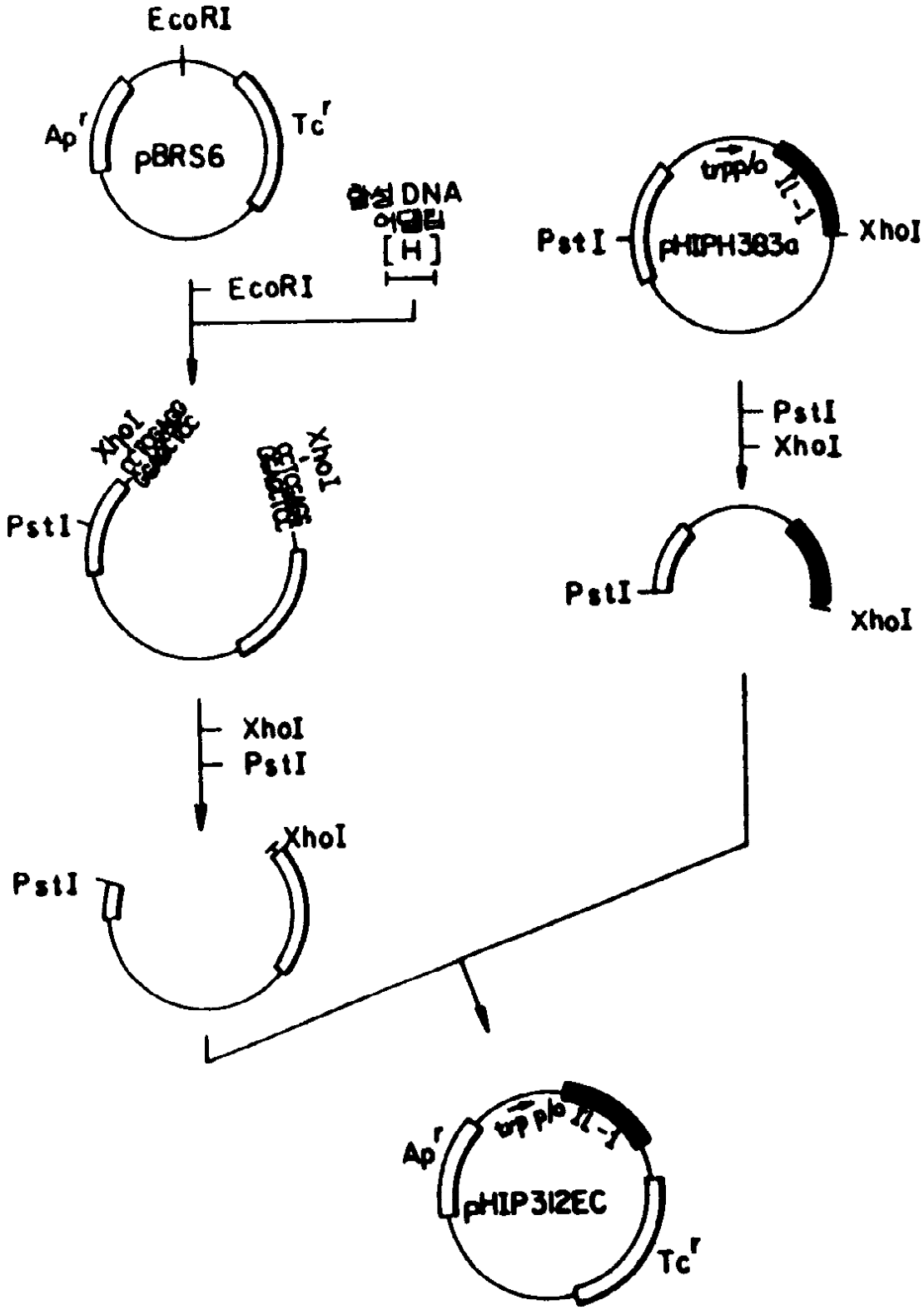
도면1


HpaI
Ap^r
pEP302
BamHI
Tc^r
HpaI
BamHI
HpaI
BamHI
합성 DNA 어댑터 [E]
trp p/o
PstI
pHL4
PstI
PstI
PstI
EcoRI
Sau96I
PstI
EcoRI
Sau96I
합성 DNA 어댑터 [C]
EcoRI
Sau96I
합성DNA 어댑터 [D]
trp p/o
Ap^r
pHTN55(141)

도면2


AatII
HindIII
Tc^r
pBRS6
Ap^r
AatII, HindIII
trp 프로모터 / 오퍼레이터
합성 DNA
HpaI
BamHI
Tc^r
trp p/o
pEP302
Ap^r
PstI
pHL4
Tc^r
IL-1
PstI
PstI
BstNI
EcoRI
PstI
BstNI
EcoRI
합성 DNA 어댑터 [F]
BstNI
EcoRI
합성 DNA 어댑터 [G]
Sau3AI
HpaI
IL-1
HpaI
BamHI
trp p/o
IL-1
pHIPH383a
Ap^r

도면3


EcoRI
Ap^r
pBRS6
Tc^r
합성 DNA
어댑터
[H]
EcoRI
PstI
XhoI
PstI
XhoI
PstI
XhoI
PstI
XhoI
PstI
XhoI
trpp/o
pHIPH383a
PstI
XhoI
PstI
XhoI
Ap^r
trp p/o
pHIP312EC
Tc^r