(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/85
C12N 15/00
C12P 21/02

(45) 공고일자 1996년10월09일
(11) 공고번호 특1996-0013574

(21) 출원번호	특1988-0001949	(65) 공개번호	특1988-0010130
(22) 출원일자	1988년02월24일	(43) 공개일자	1988년10월07일

(30) 우선권주장
42218/1987 1987년02월24일 일본(JP)
43444/1987 1987년02월25일 일본(JP)
81977/1987 1987년04월02일 일본(JP)
147511/1987 1987년06월12일 일본(JP)
201510/1987 1987년08월11일 일본(JP)
290283/1987 1987년11월17일 일본(JP)
16260/1988 1988년01월26일 일본(JP)

(73) 특허권자 다께다야꾸힝고오교 가부시끼가이샤 우데모또 요시마사
일본국 오오사까시 히가시꾸 도쇼오마찌 2쪼메 27번지

(72) 발명자 세노오 마사하루
일본국 오오사까 도요나까 니시이즈미가오까 2쪼메 744 1B-212
구로까와 쓰또무
일본국 효오고껭 가와니시 스이데이다이 1쪼메 1-50
이가라시 고이찌
일본국 교오토 사꾜꾸 시모가모미야자끼쪼 66-3
사사다 레이꼬
일본국 교오또 나가오까꼬 다께노다이 2 C1-405

(74) 대리인 박해선, 백락신

심사관 : 김형준 (책자공보 제4670호)

(54) 염기성 섬유 아세포 성장인자의 유데인, 이의 제조방법, 이를 코딩하는 재조합 DNA 및 형질전환체

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

염기성 섬유 아세포 성장인자의 유데인, 이의 제조방법,

이를 코딩하는 재조합 DNA 및 형질전화체

[도면의 간단한 설명]

제1도는 인간 bFGF를 코딩하는 염기서열 및 그로부터 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

제2도는 Cys-코딩 코돈을 Ser-코딩 코돈으로 변이시키는 프라이머로 사용되는 합성 올리고머를 나타낸다.

제3도는 실시예 2에서 수득한 플라스미드 pTB739가 보유하고 있는, 인간bFGF 유데인 CS1을 코딩하는 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 인간bFGF 유데인 CS1의 아미노산을 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아미노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제4도는 실시예 3에서 수득한 플라스미드 pTB742가 보유하고 있는, 인간 bFGF 유데인 CS2를 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 유데인 CS2의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제5도는 실시예 4에서 수득한 플라스미드 pTB743가 보유하고 있는, 인간 bFGF 유데인 CS3을 코딩하는 염

기서열 및 그에 의해 코딩되는 인간 bFGF 뮤테인 CS3의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘렀다.

제6도는 실시예 5에서 수득한 플라스미드 pTB744가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS4를 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 인간 bFGF 뮤테인 CS4의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제7도는 실시예 2(1)에서의 플라스미드 pTB739의 제작도를 나타낸다.

제8도는 실시예 3(1)에서의 플라스미드 pTB742의 제작도를 나타낸다.

제9도는 실시예 4(1)에서의 플라스미드 pTB743의 제작도를 나타낸다.

제10도는 실시예 5(1)에서의 플라스미드 pTB744의 제작도를 나타낸다.

제11도는 실시예 7에서 수득한 플라스미드 pTB762가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS23을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS23의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제12도는 실시예 7(1)에서의 플라스미드 pTB762의 제작도를 나타낸다.

제13도는 실시예 9에서 수득한 플라스미드 pTB762가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS123을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS123의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제14도는 실시예 9(1)에서의 플라스미드 pTB764의 제작도를 나타낸다.

제15도는 실시예 11에서 수득한 플라스미드 pTB765가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS1234을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS1234의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제16도는 실시예 11(1)에서의 플라스미드 pTB765의 제작도를 나타낸다.

제17도는 실시예 15에서 수득한 플라스미드 pTB766가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS12을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS12의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제18도는 실시예 15(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB766의 제작도를 나타낸다.

제19도는 실시예 16에서 수득한 플라스미드 pTB778가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS24을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS24의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제20도는 실시예 16(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB778의 제작도를 나타낸다.

제22도는 실시예 17에서 플라스미드 pTB779가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS13을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS13의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제21도는 실시예 17(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB779의 제작도를 나타낸다.

제23도는 실시예 18에서 수득한 플라스미드 pTB763가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 뮤테인 CS14의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제24도는 실시예 18(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB763의 제작도를 나타낸다.

제25도는 실시예 19에서 수득한 플라스미드 pTB777가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS34을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS34의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제26도는 실시예 19(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB777의 제작도를 나타낸다.

제27도는 실시예 20에서 수득한 플라스미드 pTB782가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS234을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS234의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제28도는 실시예 20(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB782의 제작도를 나타낸다.

제29도는 실시예 21에서 수득한 플라스미드 pTB780가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS124을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS124의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제30도는 실시예 21(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB780의 제작도를 나타낸다.

제31도는 실시예 22에서 수득한 플라스미드 pTB781가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 CS134을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 bFGF 뮤테인 CS134의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤으며, 전환된 아모노산을 포함하는 영역을 사각형으로 둘러쌌다.

제32도는 실시예 22(1)에서의 수득한 플라스미드 pTB781의 제작도를 나타낸다.

제33~35도는 실시예 24에서 수득한 뮤테인의 고수율 액체 크로마토그래피 용출 형태를 나타낸다.

제36도는 실시예 25에서 수득한 뮤테인의 고수율 액체 크로마토그래피 용출 형태를 나타낸다.

제37도는 실시예 26에서 수득한 뮤테인의 고수율 액체 크로마토그래피 용출 형태를 나타낸다.

제38도는 뮤테인-코딩 DNA를 제조하는데 프라이머로 이용되는 합성 올리고머를 나타낸다.

제39도는 실시예 27에서 수득한 파지 M13-PN10의 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 TM910(실시예 32에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제40도는 실시예 27에서 수득한 파지 M13-PN14의 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 N14(실시예 34에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제41도는 실시예 27에서 수득한 파지 M13-PC86의 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 C86(실시예 35에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제42도는 실시예 27에서 수득한 파지 M13-PDN42의 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 DN42(실시예 36에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제43도는 실시예 27에서 수득한 파지 M13-PRQ45의 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 RQ45(실시예 37에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제44도는 실시예 28에서 수득한 파지 M13-PNR42의 염기 서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 NR42(실시예 38에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다.

제45도는 실시예 29에서 수득한, 인간 bFGF 뮤테인 CS2, CS3 및 CS23의 안정성을 나타낸다.

제46도는 실시예 32에서의 수득한 플라스미드 pTB854의 제작도를 나타낸다.

제47도는 실시예 33에서의 수득한 플라스미드 pTB852의 제작도를 나타낸다.

제48도는 실시예 33에서 수득한 플라스미드 pTB852가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 N10을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 N10(실시예 33에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤다.

제49도는 실시예 34에서의 수득한 플라스미드 pTB795의 제작도를 나타낸다.

제50도는 실시예 35에서의 수득한 플라스미드 pTB796의 제작도를 나타낸다.

제51도는 실시예 36에서의 수득한 플라스미드 pTB797의 제작도를 나타낸다.

제52도는 실시예 37에서의 수득한 플라스미드 pTB799의 제작도를 나타낸다.

제53도는 실시예 38에서의 수득한 플라스미드 pTB798의 제작도를 나타낸다.

제54도는 실시예 39에서 수득한 플라스미드 pTB853가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 F1NT를 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 F1NT(실시예 39에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤다.

제55도는 실시예 39에서의 수득한 플라스미드 pTB853의 제작도를 나타낸다.

제56도는 실시예 40에서의 수득한 플라스미드 pTB855의 제작도를 나타낸다.

제57도는 실시예 40에서 수득한 플라스미드 pTB855가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 N41을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 N41(실시예 40에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤다.

제58도는 실시예 41에서의 플라스미드 pTB856의 제작도를 나타낸다.

제59도는 실시예 41에서 수득한 플라스미드 pTB856가 보유하고 있는, 인간 bFGF 뮤테인 C129을 코딩하는 염기서열 및 그에 의해 코딩되는 뮤테인 C129(실시예 41에서 수득)의 아미노산 서열을 나타낸다. 변이된 염기에는 밑줄을 쳤다.

제60도는 실시예 42에서의 수득한 플라스미드 pTB831의 제작도를 나타낸다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 염기성 섬유 아세포 성장 인장 인자(이후에는 간단히 bFGF로 표기한다)의 뮤테인, bFGF의 뮤테인을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA 및 그의 용도에 관한 것이다.

주로 건조 전 뇌하수체 전엽에 의해 분비되는 약 17,000의 분자량을 갖는 염기성 폴리펩티드 호르몬인 bFGF는 맨처음에 BALB/c3T3 같은 섬유 아세포에 대해 강력한 성장 촉진 작용을 나타내는 인자로서 분리되었다.(D. Gospodarowicz ; NATURE, 249, 213(1974)]. 그러나, 그후에, 중배엽에서 유래된 거의 세포에 대해 성장촉진 작용을 나타내는 것이 증명되었다(D. Gospodarowicz et al., National Cancer Institute Monograph, 48, 109(1978)]. 특히, bFGF의 세포 성장 촉진 작용과 함께 그의 맥관 형성작용은 bFGF가 외상의 치료제 및 혈전중, 동맥경화중 등의 예방 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 세시한다.

소의 bFGF는 처음에 문헌[Proceedings of the National Academy of Scinences of the United States of America, 82, 6507(1985)에 기재되었는데, 여기에는 인간 bFGF의 cDNA를 콜로닝하여 생산한 클론에서 추론한 소의 bFGF-구성 아미노산이 기재되어있다.

인간 bFGF로는, 문헌(Biochemical and Biophysical Research Communications, 135, 541(1986)에 인간

bFGF를 사람의 뇌에서 추출한 것이 기재되어 있다.

또 다른 문헌(European Molecular Bioloy Organization(EMBO) Journal, 5, 2523(1986) 및 PCT 국제공고 제WO/D1728호에는, 소 bFGF를 탐침으로 이용하여 인간 bFGF의 cDNA를 클로닝하여 생산한 클론을 기초로 하여 인간 bFGF-구성 아미노산을 추론하여 명시한 것이 나타나 있다.

덧붙여, FEBS 레터[FEBS letters, 213, (1987)]에는 인간 bFGF의 cDNA를 클로닝하여 얻은 형질 전환체를 배양하여 인간 bFGF를 생산하는 것이 기재되어 있다.

인간 bFGF와 소 bFGF를 비교해 보면, 인간 bFGF는 112-위치에 Thr을 갖는 반면 소, bFGF는 Ser을 갖고 ; 인간 bFGF는 128-위치에 Ser을 갖는 반면에 소 bFGF는 Pro를 갖는다(이 경우에, N-말단 Pro은 첫 번째 아미노산으로 결정된다.)

본 발명자들은 아미노산 서열을 변형시킴으로써, bFGF의 세포내에서의 안정성, 생산성 및 한 분자당 세포 증식 작용을 개선할 수 있고, 덧붙여 미확인된 생물활성을 강력화할 수 있다고 가정하고 있다.

덧붙여, DNA 재조합 기술에 의해 미생물학적으로 생산되는 생물활성을 갖는 단백질은 시스테인 잔기를 포함하는데, 이는 그 활성에는 필수적이지 않으며 불필요한 분자간 또는 분자내 결합을 형성할 수 있다.

재조합 DNA 기술에 의한 bFGF의 생산도중에, 고농도의 bFGF를 함유하는 에스케리키아 콜리 추출물에서 불균질한 배위가 관찰되었다. 이 배위는 불규칙한 분자내 또는 분자간 디술피드 결합에 의해 생성된 것으로 생각되며 bFGF 정제상의 어려움 및 회수율의 감소를 유발한다.

이 사실을 기초로 하여, 본 발명자들은 재조합 bFGF 같은 미생물학적으로 생산된 생활성 단백질을 변화시킴으로써, 그 활성의 역효과를 주지않으면서 바람직하지 않은 삼차 구조(예, 단백질 활성을 낮추는 배위)의 형성을 일으키는 분자간 다리결합 및 분자내 결합의 형성 능력을 감소 또는 제거시키고자 하였다.

본 발명자들은 DNA 재조합 및 부위-조작 변이유발에 의해 변형된 bFGF 뮤테인을 제작하고, 그의 안정성을 개선하고, 그의 세포내 생산성 및 활성을 증진시키고 및 그의 생활성의 변화를 설명하고자 연구하였다 ; 그 결과로서 본 발명자들은 이러한 목적에 부합하는 뮤테인을 발견하였다. 본 발명자들은 이 발견을 더 연구하여 본 발명을 완성하였다.

(1) 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인.

(2) 상술한 뮤테인(1)을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA.

(3) 상술한 뮤테인(1)을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 포함하는 벡터를 보유하는 형질전환체 및,

(4) 상기 뮤테인을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 포함하는 벡터를 보유하는 형질전환체를 배지에서 배양하여 배양 브로쓰내에 뮤테인을 생산 및 축적시킴을 특징으로 하는 상기 뮤테인(1)의 제조방법에 관한 것이다. bFGF로는 온혈동물에서 유래된 것이면 bFGF를 열거할 수 있다.

bFGF의 전형적인 예로는 인간, 소및 쥐의 bFGF를 들 수 있다.

특히, 다음 식(Ⅰ)로 나타내지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 바람직하다.

Phe-Phe-Leu-Arg-He-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro

보다 상세히 설명하면, 하기 일반식(Ⅱ)로 나타내지는 폴리펩티드가

Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-
Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr-Cys-Lys-Asn-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-
Arg-Ile-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-
Pro-His-Ile-Lys-Leu-Gln-Leu-Gln-Ala-Glu-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Ser-
Ile-Lys-Gly-Val-Cys-Ala-Asn-Arg-Tyr-Leu-Ala-Met-Lys-Glu-Asp-Gly-
Arg-Leu-Leu-Ala-Ser-Lys-Cys-Val-Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu-
Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Thr-Arg-Ser-Arg-Lys-Yyr-X-
Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Y-
Lys-Thr-Gly-Pro-Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-
Lys-Ser, (II)

바람직하다

(식중, X는 Thr 또는 Ser을 나타내고 ; X가 Thr이면 Y는 Ser을 나타내고, X가 Ser이면 Y는 Pro을 나타낸다).

보다 상세히 설명하면, 하기 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 바람직하다.

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

본 발명의 뮤테인은 필수적으로 원래 팹티드 또는 단백질의 아미노산 서열을 가져야만 한다 ; 이러한 변형으로는, 아미노산(들)의 부가, 구성 아미노산(들)의 결실 및 다른 아미노산(들에 의한 구성 아미노산(들)의 치환을 언급할 수 있다.

이러한 아미노산의 부가는 최소한 하나의 아미노산의 부가를 포함한다.

이러한 구성 아미노산의 결실은 최소한 하나의 bFGF-구성 아미노산의 결실을 포함한다.

이러한 다른 아미노산에 의한 구성 아미노산의 치환은 하나의 bFGF-구성 아미노산이 다른 아미노산에 의해 치환된 것을 포함한다.

bFGF에 부가되는 최소한 하나의 아미노산을 갖는 뮤테인 내의 최소한 하나의 아미노산에서, 팹티드 형질발현 및 시그널 팹티드로 이용하는 개시 코돈에서 유래된 메티오닌을 제외된다.

부가되는 아미노산의 수는 최소한 1이지만, bFGF의 특성을 잃지 않는한 여럿일 수 있다. 바람직한 아미노산은 bFGF와 유사성을 가지면 bFGF와 비슷한 활성을 나타내는 단백질의 아미노산 서열의 일부 또는 전부를 포함한다.

이러한 부가 아미노산의 예로는, 산성 섬유 아세포 성장인자(aFGF), 인터류킨 1-α(IL1-α) 및 IL1-β에는 인간에서 유래된 것이 포함된다.

이러한 소 aFGF의 아미노산 서열은 다음의 서열을 포함한다.

NH_2-Phe-Asn-Leu-Pro-Leu- Gly-Asn-Tyr-Lys-Lys-Pro-Lys-Leu-Leu-
Tyr-Cys-Ser-Asn-Gly-Gly-Tyr-Phe-Leu-Arg-Ile-Leu-Pro-Asp-Gly-Thr-
Val-Asp-Gly-Thr-Lys-Asp-Arg-Ser-Asp-Gln-His-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-
Cys-Ala-Glu-Ser-Ile-Gly-Glu-Val-Tyr-Ile-Lys-Ser-Thr-Glu-The-Gly-
Gln-Phe-Leu-Ala-Met-Asp-Thr-Asp-Gly-Leu-Leu-Tyr-Gly-Ser-Gln-Thr-
Pro-Asn-Glu-Glu-Cys-Leu-Phe-Leu-Glu-Arg-Leu-Glu-Glu-Asn-His-
Tyr-Asn-Thr-Tyr-Ile-Ser-Lys-Lys-His-Ala-Glu-Lys-His-Trp-Phe-Val-

Gly-Leu-Lys-Lys-Asn-Gly-Arg-Ser-Lys-Leu-Gly-Pro-Arg-Thr-His-Phe-
Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Leu-Pro-Val-Ser-Ser-Asp-COOH

인간 IL1-α의 아미노산 서열은 다음의 서열을 포함한다.

NH_2-Met-Ala-Lys-Val-Pro-Asp-Met-Phe-Glu-Asp-Leu-Lys-Asn-Cys-
Tyr-Ser-Glu-Asn-Glu-Glu-Asp-Ser-Ser-Ser-Ile-Asp-His-Leu-Ser-Leu-
Asn-Gln-Lys-Ser-Phe-Tyr-His-Val-Ser-Tyr-Gly-Pro-Leu-His-Glu-Gly-
Cys-Met-Asp-Gln-Ser-Val-Ser-Leu-Ser-Ile-Ser-Glu-Thr-Ser-Lys-Thr-
Ser-Lys-Leu-Thr-Phe-Lys-Glu-Ser-Met-Val-Val-Val-Ala-Thr-Asn-Gly-
Lys-Val-Leu-Lys-Lys-Arg-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Ile-Thr-Asp-
Asp-Asp-Leu-Glu-Ala-Ile-Ala-Asn-Asp-Ser-Glu-Glu-Glu-Ile-Ile-Lua-
Asn
PRO-Arg-Ser-Ala-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-Lya-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-Por-Val-Leu-Leu-Lys-Glu-
Met-Rro-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-Gys-Leu-
Ala-Gly-Gly-Pro-Pro-Ser-Ile-Thr-Asp-Phe-Gln-Ile-Leu-Gly-Asn-Gln-
Ala-COOH

IL1-β의 아미노산 서열은 다음의 서열을 포함한다.

NH_2-Met-Ala-Glu-Val-Pro-Glu-Leu-Ala-Ser-Glu-Met-Met-Ala-Tyr-
Tyr-Ser-Gly-Asn-Glu-Asp-Asp-Leu-Phe-Phe-Glu-Ala-Asp-Gly-Pro-Lys-
Gln-Met-Lys-Cys-Ser-Phe-Gln-Asp-Leu-Asp-Leu-Cys-Pro-Leu-Asp-
Gly-Gly-Ile-Gln-Leu-Arg-Ile-Ser-Asp-His-His-Tyr-Ser-Lys-Gly-Phe-
Arg-Gln-Ala-Ala-Ser-Val-Val-Val-Ala-Met-Asp-Lys-Leu-Arg-Lys-Met-
Leu-Val-Pro-Cys-Pro-Gln-Thr-Phe-Gln-Gln-Asp-Asp-Leu-Ser-Thr-Phe-
Phe-Pro-Phe-Ile-Phe-Glu-Glu-Glu-Pro-Ile-Phe-Phe-Asp-Thr-Trp-Asp-
Asn-Glu-Ala-Tyr-Val-His-Asp-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-Rro-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-Asp-Phe-Thr-Met-Gln-Phe-Val-Ser-Ser-
COOH

int-2에 코딩된 서열은 다음의 서열을 포함한다.

NH_2-Met-Gly-Leu-Ile-Trp-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Glu-Pro-Ser-
Trp-Pro-Thr-Thr-Gly-Pro-Gly-Thr-Arg-Leu-Arg-Arg-Asp-Ala-Gly-Gly-
Arg-Gly-Gly-Val-Tyr-Glu-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Pro-Arg-Arg-Arg-Lys-
Ley-Tyr-Cys-Ala-Thr-Lys-Tyr-His-Leu-Gln-Leu-His-Pro-Ser-Gly-Arg-
Val-Asn-Gly-Ser-Leu-Glu-Asn-Ser-Ala-Tys-Ser-Ile-Leu-Glu-Ile-Thr-
Ala-Val-Glu-Val-Gly-Val-Val-Ala-Ile-Lys-Gly-Leu-Phe-Ser-Gly-Arg-
Tyr-Leu-Ala-Met-Asn-Lys-Arg-Gly-Arg-Leu-Tyr-Ala-Ser-Asp-His-Tyr-
Asn-Ala-Glu-Cys-Glu-Phe-Val-Glu-Arg-Ile-His-Glu-Leu-Gly-Tyr-Asn-
Thr-Tyr-Ala-Ser-Arg-Leu-Tyr-Arg-Thr-Gly-Ser-Ser-Gly-Pro-Gly-Ala-
Gln-Arg-Gln-Pro-Gly-Ala-Gln-Arg-Pro-Trp-Tyr-Val-Ser-Val-Aan-Gly-
Lys-Gly-Arg-Pro-Arg-Arg-Gly-Phe-Lys-Thr-Arg-Arg-Thr-Gln-Lys-Ser-
Ser-Leu-Phe-Leu-Pro-Arg-Val-Leu-Gly-His-Lys-Asp-His-Glu-Met-Val-
Arg-Leu-Leu-Gln-Ser-Ser-Gln-Pro-Arg-Ala-Pro-Gly-Glu-Gly-Ser-Gln-
Pro-Arg-Gln-Arg-Arg-Gln-Lys-Lys-Gln-Ser-Pro-Gly-Asp-His-Gly-Lys-
Met-Glu-Thr-Leu-Ser-Thr-Arg-Ala-Thr-Pro-Ser-Thr-Gln-Leu-His-Thr-
Gly-Gly-Leu-Ala-Val-Ala-COOH

최소한 하나의 bFGF-구성 아미노산이 결여되어 있는 본 뮤테인에서 결손된 bFGF-구성 아미노산의 수는 bFGF의 특성이 손실되지 않는한 어느 것이어도 무방하다.

이러한 결손된 구성 아미노산의 예로는, 아미노 말단 또는 카르복실 말단으로부터의 아미노산의 결손 ; 인간 bFGF 아미노산말단에서의 10 잔기 :

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser

인간 bFGF 아미노산말단에서의 14 잔기 :

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro

인간 bFGF 아미노산말단에서의 41 잔기 :

1	2	3	4		41
Met	Pro	Ala	Leu	...	Val

또는 인간 bFGF 카르복실 말단에서의 61 잔기 :

87	88	146	147
Lys	Cys	Lys	Ser

최소한 하나의 bFGF-구성 아미노산이 다른 아미노산에 의해 최환되어 있는 뮤테인에서의 치환전의 최소한 하나의 bFGF-구성 아미노산의 수는 bFGF이 특성이 손실되지 않는한 어느 것이어도 무방하다.

치환전의 구성 아미노산의 예로는 시스테인 및 시스테인 이외의 아미노산을 언급할 수 있다. 시스테인이 바림직하다. 치환전의 시스테인 이외의 구성 아미노산으로는, 아스파르트산, 아르기닌, 글리신, 세린, 발린등을 예시할 수 있다.

치환전의 구성 아미노산이 시스테인이면, 치환된 아미노산은 바람직하게는, 예를 들면, 중성 아미노산이다. 이러한 중성 아미노산의 특별한 예로는 글리신, 발린, 알라닌, 류신, 이소류신, 티로신, 페닐알리닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메티오닌 등을 언급할 수 있다. 특히, 세린 및 트레오닌이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산이 시스테인이외의 것이면, 다른 치환된 아미노산은 친수성, 소수성 또는 전하같은 특성이 치환전의 아미노산이 아스파르트산이면, 치환된 아미노산이 아스파라긴, 트레오닌, 발린, 페닐알라닌 및 아르기닌이 포함되며 ; 아스파라긴 및 아르기닌이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산이 아르기닌이면, 치환된 아미노산에는 글루타민, 트레오닌, 류신, 페닐알리닌 및 아스파르트산이 포함되며 ; 글루타민이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산이 글로신이면, 치환된 아미노산에는 트레오닌, 류신, 페닐알리닌, 세린, 글루탐산 및 아르기닌이 포함되며 ; 트레오닌이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산이 세린이면, 치환된 아미노산에는 메티오닌, 알라닌 류신, 시스테인, 글루타민, 아르기닌 및 아스파르트산이 포함되며 ; 메티오닌이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산이 빌린이면, 치환된 아미노산에는 세린, 류신, 프롤린, 글리신, 리신 및 아스프르트산이 포함되며 ; 세린이 바람직하다.

치환전의 구성 아미노산으로는, 아스파프트산 아스파라긴, 아르기닌, 글리신, 세린 및 발린이 바람직하

다.

치환된 아미노산으로는 아스파라긴, 글루타민, 아르기닌, 트레오닌, 메티오닌, 세린 및 류신이 바람직하다.

뮤테인의 치환에 있어서의 바람직한 구현 예로는, 시스테인에 대한 세린의 치환(즉, 시스테인의 세린에 의해 치환됨)이 가장 바람직하다.

상기 치환에 있어서, 둘 이상의 치환이 발생할 수 있으며, 2 또는 3치환이 바람직하다.

공지의 DNA 재조합 기술이외에, 부위-조작 변이 유발을 이용하여 본 발명의 뮤테인을 생산할 수 있다.

상기 기술은 공지 기술이며, 문헌[(Gentic Engineering, Lather, R. F. and Lecoq, J. P., Academic Press, 31~50(1983)]에 기재되어 있다. 올리고누클레오티드를 조작한 변이유발은 제네틱 엔지니어링(Genetic Engineering : Principes and Methods, Smith, M. and Gillam, S. Plenu, Press, 3, 1~32(1981))에 기재되어 있다.

본 발명의 뮤테인을 코딩하는 구조 유전자의 제조는 예를 들면 다음과 같이 실시할 수 있다.

(a) bFGF의 구조 유전자 한 가닥을 포함하는 단일가닥 DNA를 돌연변이 유발성 올리고누클레오티드 프라이머와 하이브리드화하고,

(b) DNA 폴리머라제를 이용하여 프라이머를 연장시킴으로써 돌연변이성 헤테로 이중 가닥을 형성하고,

(c) 이 돌연변이성 헤테로 이중 가닥을 복제시킨다.

올리고누클레오티드 프라이면의 크기는 돌연변이를 도입시키고자 하는 유전자 영역에 프라이머가 안정하게 하이브리드화되는데 필요한 조건 및 통상적으로 행해지는 올리고누클레오티드 합성 방법에서의 제한에 의해 결정된다. 올리고누클레오티드에 의해 조작되는 돌연변이 유발에 이용하고자하는 올리고누클레오티드를 설계하는데 있어서 고려해야 하는 인자(예, 누클레오티드의 전체 크기 및 돌연변이 부위에서의 잘못 짝지은 부분의 크기)는 스미드 및 길람(Smith, M. and Gillam, S). 이 상술한 문헌에 기술하고 있다. 일반적으로, 올리고누클레오티드의 전체 길이는 돌연변이 부위에서의 안정하고 유일한 하이브리드화가 최적이 되도록 하는 길이로 조정되고, 돌연변이 부위와 5'- 및 3'-말단 사이의 확장은 DNA폴리머라제의 액소 누클레아제 활성에 의한 돌연변이 교정을 방지할 수 있는 충분한 크기에 의해 제공된다.

본 발명에 따라 돌연변이 유발에 이용된 올리고누클레오티드는 통상적으로 12~24 염기, 바람직하게는 14~20 염기, 더욱 바람직하게는 14~18 염기를 함유한다. 이들은 통상적으로 변화시키고자 하는 코돈의 3'- 말단의 최소한 약 3개의 염기를 포함한다.

예를들면, 부가 아미노산을 갖는 뮤테인을 얻기 위해서는, 부가하고자 하는 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 합성하고, 직접 또는 제한효소를 이용하여 소화에 의한 단편화 후에, 상기 유전자를 DNA 리가제를 이용하여 bFGF 유전자의 적절한 부위에 삽입 또는 부가함으로써 돌연변이 유발성 bFGF 유전자를 생산한다. bFGF 유전자내에 적절한 제한효소 인지 부위가 존재하지 않으면, 상술한 부위-조작 돌연변이 유발에 의해 제한효소 인지 부위를 생성시킬 수 있다.

예를 들면, bFGF-구성 아미노산이 결여된 뮤테인을 얻기 위해서는 세가지의 다른 방법으로 돌연변이 유발성 bFGF 유전자를 생산한다. 세가지중 한 경우에서만 bFGF의 아미노산 말단이 결실되어 있고 ; 다른 경우에서는 bFGF의 중앙 영역이 결실되어 있고 ; 나머지 한 경우에서는 카르복실 말단이 결실되어 있다.

아미노 말단이 결실된 경우에는, 결실시키고자 하는 아미노산 서열의 카르복실 말단을 코딩하는 유전자의 코돈이 부위-조작 돌연변이 유발에 의해 Met-코딩 코돈 ATG로 변화되고, 코돈을 프로모터에 연결시킬 수 있도록 하기 위해 5'-말단쪽에 생성된 적절한 제한효소 인지 부위를 갖는다.

아미노산 서열의 중앙 영역이 결실된 경우에는, 결실시키고자 하는 서열을 코딩하는 유전자의 5'-말단 및 3'-말단에서 각각 부위-조작 돌연변이 유발에 의해 유일한 제한 효소 인지 부위를 생성시키고, 효소 소화에 의해 관련 유전자를 유전자로부터 절단시키고, 남아 있는 두 유전자 단편을 재연결함으로써 특정 아미노산이 결여된 bFGF를 코딩하는 목적 유전자를 제작한다. 물론 제한효소에 의한 소화때문에 리딩 프레임을 이동시킬 필요는 없다.

카르복실 말단쪽에 아미노산 서열이 결실된 경우에는, 결실시키고자 하는 서열의 아미노-말단 아미노산을 코딩하는 유전자의 코돈을 부위-작 돌연변이 유발에 의해 정지 코돈으로 변화시킨다.

구성 아미노산 시스테인이 치환된 뮤테인을 얻기 위해서는, 예를 들면 Cys-발현 코돈을 제거하거나 또는 합성 누클레오티드 프라이머를 이용하여 Cys-발현 코돈 TGC 또는 TGT에 부위-조작 돌연변이 유발을 유도하여 다른 아미노산을 코딩하는 코돈으로 변화시킴으로써 돌연변이 유발성 bFGF 유전자를 생산한다. 예를 들면, 프라이머를 FGF 유전자의 센스(sense)사슬과 하이브리드화하여 인간 bFGF의 시스테인(26-위치)를 세린으로 변화시킨다. 적절한 누클레오티드 프라이머는 예를 들면 5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3'(식중, 밑줄친 삼염기 연쇄(triplet)는 변화된 코돈을 나타낸다)를 언급할 수 있다.

시스테인(70-위치)을 세린으로 변화시키는데 적절한 프라이머로는 5'-AACGATTAGC GCTCACTC-3'-(식중, 밑줄친 삼염기 연쇄는 변화된 코돈을 나타낸다)를 언급할 수 있다.

시스테인(88-위치)을 세린으로 변화시키는데 적절한 프라이머로는 5'-GTAACAGA CTTAGAAGCTAGT-3'-(식중, 밑줄친 삼염기 연쇄는 변화된 코돈을 나타낸다)를 언급할 수 있다.

시스테인(93-위치)을 세린으로 변화시키는데 적절한 프라이머로는 5'-TCGAAGAAGAAAGACTCATCC-3'-(식중, 밑줄친 삼염기 연쇄는 변화된 코돈을 나타낸다)를 언급할 수 있다.

Cys(26-위치)의 경우에는 첫번째 염기의 T→A 전위를 통하여 시스테인의 세린으로 변화되고 : Cys(70-위

치)의 경우에는 첫번째 염기의 T→A 전위 및 두번째 염기의 T→C 전위에 의해 시스테인의 세린으로 변화되고 : Cys(88-위치, 93-위치)의 경우에는 두번째 염기의 G→C 전위에 의해 시스테인 세린으로 변화된다.

부위-조작 돌연변이 유발에 의해 bFGF 뮤테인 단백질을 생산하는데 있어서는, 둘 이상의 변형체가 DNA 서열내에 유도될 수 있는 것, 즉 아미노산에 대응하는 DNA 코돈이 중축될 수 있다는 것에 유의해야 한다.

시스테인 이외의 다른 구성 아미노산이 다른 아미노산에 의해 치환되어 있는 뮤테인을 얻기 위해서는, 시스테인의 경우와 동일한 방법으로 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 코돈을 변화시킴으로써 돌연변이성 bFGF 유전자를 생산한다.

올리고누클레오티드 프라이머의 설계는 물론 변화시키고자 하는 아미노산에 따라 다르다.

프라이머를 M13(Yanish-Perror, C. Vieira, and J. Messing, Gene, 33, 103～119(1985) ; Messing, J., Methods in Enzymology, 101, 20～78(1983)], Fd[R. Herrman et al., Molecular and General Genetics, 177, 231(1980)] 또는 ø×174[M. Smith and S. Gillam, Genetic Engineering, Plenum Press, 3, 1～32(1980)] 같은 bFGF 유전자의 단일가닥을 클로닝하여 얻은 단일-가닥 파지에 하이브리드화시킨다. 파지가 유전자의 센스 사슬 또는 안티센스 사슬을 보유할 수 있어야 하는 것에 유의해야 한다. 파지가 안티센스 사슬을 보유하는 경우에는, 다른 아미노산을 코딩하는 삼염기 인쇄를 결정하는 관련 코돈과의 상이성 이외에도, 프라이머는 코돈중축에 의한, 돌연변이가 유발되는 코돈을 함유하는 센스사슬 영역과의 상이성을 가질 수 있다. 비슷하게, 파지가 센스 사슬을 보유하는 경우에, 프라이머는 돌연변이를 유발시키고자 하는 코돈을 함유하는 센스사슬 영역에 상보적이지 않을 수 있을 뿐만 아니라 결실시키고자 하는 코돈과 짝을 맺는 삼염기 연쇄와의 적절한 상이성을 가질 수 있다. 하이브리드화에 이용되는 조건을 스미드 및 길람(M. Smith and S. Gillam)에 의해 상술한 문헌에 기술되어 있다. 온도는 통상적으로 약 0～70℃이고, 보다 일반적으로는 약 10～50℃이다. 하이브리드화 후에, 에스케리키아 콜리 DNA 폴리머라 제 Ⅰ, T4 DNA폴리머라제, 역전사 효소 또는 다른 적절한 DNA 리가제를 이용하는 처리에 의해, 생성된 dsDNA를 폐환상 dsDNA로 전환시킨다. 단일 가닥 영역을 함유하는 DNA 분자는 S1 엔도누클레아제 처리에 의해 분해시킬 수 있다.

생성된 돌연변이 헤테로 이중 가닥은 가염성 숙주 생물 또는 세포를 형질전환시키는데 이용된다. 숙주에 의한 헤테로 이중가닥의 복제에 있어서, 두 사슬로부터 후손이 생산된다. 복제 후에, 변이 유전자를 변이 주 사슬의 후손으로부터 분리하고, 적절한 벡테에 삽입하고, 이를 적절한 숙주생물 또는 세포를 형질전환시키는데 이용한다.

그후에 돌연변이 유전자를 보유하는 파지 DNA를 분리하고 플라스미드에 통합시킨다.

DNA를 통합시키는 플라스미드의 예로는, pBR322[(Gene, 2, 95(1977)], pBR325[(Gene, 4, 121(1978)], pUC12[Gene, 19, 259(1982)] 및 pUC13[Gene, 19, 259(1982)] 같은 에스케리키아 콜리-유래 플라스미드 ; 및 pUB110[Biochemical and Biophusical Research Communication, 112, 678(1983)] 같은 바실루스 서브틸리스-유래 플라스미드를 언급할 수 있지만, 숙주내에서 복제되고 계속 유지되기만 하면 다른 어떠한 플라스미드도 이용할 수 있다.

플라스미드내로의 통합방법으로는, 예를 들면 문헌[Molecular Cloning, T. Maniatis et al., Cole Spring Harbor Laboratory, 239(1982)]에 기재된 방법을 들 수 있다.

클로닝된 유전자를 형질 발현용의 적절한 운반체(벡터)내의 프로모터 하류에 연결시켜 형질발현 벡터를 얻는다.

벡터는 상술한, 에스케리키아 콜리에서 유래된 폴라스미드(예, pBR322, pBR325, pUC12 및 pUC13), 바실루스 서브틸리스에서 유래된 플라스미드(예, pUB110, pTP5 및 pC194), 효모에서 유래된 플라스미드(예, pSH19 및 pSH15), λ 파지 같은 박테리오파지 및 레트로비루스 및 종두비루스 같은 동물 비루스를 포함한다.

상술한 유전자는 5'-말단에 번역 개시 코돈으로서 ATG를 가질 수 있으며, 3'-말단에 번역 종료 코돈으로서 TAA, TGA 또는 TAG를 가질 수 있다. 상기 유전자를 형질 발현시키기 위해서 프로모터를 그의 상류에 연결시킬 수 있다. 유전자 형질발현에 이용되는 숙주에 적절하게 대응하기만 하면 어느 프로모터든지 본 발명에서 사용할 수 있다.

형질 전환용 숙주가 에스케리키아 속에 속하는 세균인 경우에는, trp프로모터, lac 프로모터, rea A프로모터, λPL프로모터, lpp프로모터, 등이 바람직하고 ; 숙주가 바실루스 속의 세균이면, SP01 프로모터, SP02 프로모터, penP 프로모터 등이 바람직하고 ; 숙주가 효모이면 PH05 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터 등이 바람직하다. 특히, 숙주가 에스케리키아 속의 세균이고 프로모터가 trp프로모터 또는 λPL프로모터인 것이 바람직하다.

숙주가 동물 세포인 경우에, 적절한 프로모터는 SV40에서 유래된 프로모터 및 레트로비루스 프로모터를 포함한다 ; 특히 SV40에서 유래된 프로모터가 바람직하다.

이렇게 제작한, 뮤테인-코딩 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 함유하는 벡터를 이용하여 형질전환체를 생산한다.

숙주로는, 예를 들면 에스케리키아 속의 세균, 바실루스 속의 세균, 효모, 동물세포 등을 언급할 수 있다.

에스케리키아 속의 세균 예로는, 에스케리키아 콜리 K12DH1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60, 160(1968)], HB101[Jorunal of Molecular Biology, 41, 459(1969)], C600[(Genetics, 39, 440(1954)] 및

MM294[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4174(1976)]을 언급할 수 있다.

바실루스 속의 세균의 예로는, 바실루스 서브틸리스 MU114[(Gene, 24, 255(1983)] 207-21[Journal of Biochemistry, 95, 87(1984)]을 언급할 수 있다.

상기 효모의 예로는, 사카로미세스 세레비시아에 AH22R-, NA87-11A 및 DKD-5D를 언급할 수 있다.

동물세포의 예로는 원숭이 세포 COS-7, 베로, 차이니스 햄스터 난소세포 CHO, 생쥐 L-세포 및 인간 FL-세포를 언급할 수 있다.

상술한 에스케리키아속의 세균이 형질전환은 예를 들면, 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972) ; Gene, 17, 107(1972)]에 기재된 방법에 따라 실시한다.

바실루스 속의 세균이 형질전환은 예를 들면 문헌[Molecular and General Genetics, 168, 111(1979)]에 기재된 방법에 따라 실시한다.

효모의 형질전환은, 예를 들면 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 1929(1978)]에 기재된 방법에 따라 실시한다

동물세포의 형질전환은 예를 들면, 문헌[Virology, 52, 456(1973)]에 기재된 방법법에 따라 실시한다.

이렇게 해서, 뮤테인-코딩 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 포함하는 벡터를 보유하는 형질전환체가 얻어진다.

상술한 형진전환체를 배지에서 배양하여 뮤테인을 생산하도록 한다.

그 숙주가 에스케리키아 또는 바실루스 속의 세균인 형질 전환체의 배양에서는, 탄소원, 질소원, 미네랄 및 상기 형질전환체의 성장에 필수적인 다른 물질이 포함되어 있는 액체 배자가 배양에 적합하다. 탄소원으로는, 예를들면, 글루코스, 덱스트린, 가용성 전분, 수크로스 등을 언급할 수 있으며 ; 질소원으로는 예를 들면 암모늄염, 질산염, 옥수수 침지액, 펩톤, 카제인, 육즙, 두부 및 감자 추출액 같은 무기 또는 유기물질을 언급할 수 있으며 ; 미네랄로는 예를드면, 염화칼슘, 인산이수소나트륨 및 염화마그네슘을 언급할 수 있다. 효모추출액, 비타민, 성장 촉진제 등을 첨가할 수도 있다.

배지의 pH는 약 6~8인 것이 바람직하다.

에스케리키아 속의 세균이 배양에 적절한 배지의 예로는, 글루코스 및 카사미노산을 함유하는 M9 배지[Miller, Journal of Experiments in Molectular Genetics, 431~433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1972)]를 언급할 수 있다. 프로모터 효율을 증가시키는 것이 필요한 경우에는, 3β-인돌릴 아크릴산 같은 화학약품을 첨가할 수 있다.

숙주가 에스케리키아 속의 세균인 경우에는, 배양은 통상적으로 약15~43℃ 에서 약3~24시간 동안 실시되며, 필요한 경우에는, 통기 및/또는 휘저음을 덧붙일 수 있다.

숙주가 바실루스 속의 세균인 경우에는, 배양은 통상적으로 약30~40℃ 약 6~24시간 동안 실시되며, 필요한 경우에는, 통기 및/또는 휘저음을 덧붙일 수 있다.

숙주가 효모인 형실전환체의 배양 배지로는, 예를들면 버크홀더 최소 배지[Burkholder's minimum medium ; bostian, K. L. et al., Proc. Natl, Acad. Sci, UAS, 77, 4505(1980)]를 언급할 수 있다. 배지의 pH는 약 5~8로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상적으로 약20~35℃ 약 24~72시간 동안 실시되며, 필요한 경우에는, 통기 및/또는 휘저음을 덧붙일 수 있다.

숙주가 동물세포인 형실전환체의 배양 배지로는, 예를들면 약 5~20% 태내송아지 혈청을 함유하는 MEM배지 [Science, 122, 501(1952)], DMEM 배지[Virology, 8, 396(1959), RPMI 1640 배지 [Journal of the American Medical Association, 199. 519(1967)] 및 199배지 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73. 1(1950)를 언급할 수 있다. pH는 약 6~8로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상적으로 약30~40℃ 약 15~60시간 동안 실시되며, 필요한 경우에는, 통기 및/또는 휘저음을 덧붙일 수 있다.

상술한 배양물에서 뮤테인을 분리 및 정제하는 것은, 예를들면 하기 방법에 따라 실시할 수 있다.

배양된 세균, 진균 또는 동물세포에서 뮤테인을 추출하는 데에는, 예를들면, 배양후에 세균, 진균 또는 동물세포를 공지방법에 의해 수집하고, 구아니딘 히드로클로라이드 같은 단백질 변성제를 함유하는 완충액에 현탁시켜 목적 단백질을 세포로부터 용출시키는 방법 및 프렌치 프레스, 초음파처리, 리소자임 처리 및/ 또는 동결-해동법에 의해 붕괴시킨 후에 세균, 진균 또는 동물세포를 원심분리하여 뮤테인을 얻는 방법을 적절하게 이용할 수 있다. 특히 리소자임 처리와 초음파 처리를 배합하여 이용하는 방법이 바람직하다.

이렇게 얻은 상층액에서 뮤테인을 정제하는 것은 주지된 분리 및 정제방법을 적절하게 배합하여 행할 수 있다. 이러한 주지된 분리 및 정제방법의 예로는, 염석 및 용매 침전 같이 용해도에 기초를 둔 방법 ; 투석, 한외여과, 겔여과 및 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동 같이 주로 분자량의 차이에 기초를 둔 방법 ; 이온-교환 크로마토그래피 같은 전하차이에 기초를 둔 방법 ; 친화력 크로마토그래픽같이 특이적 친화력에 기초를 둔 방법 ; 역상 고수율 액체 크로마토그래피 같이 소수성의 차이에 기초를 둔 방법 ; 및 등전점 전기영동같이 등전점의 차이에 기초를 둔 방법을 언급할 수 있다.

보다 상세히 설명하면, 상술한 상층액을 DEAE셀룰로스를 담체로 이용하여 이온-교환 크로마토그래피 시키면 헥산 및 산성 단백질 같은 불순물을 제거할 수 있다. 예를들면, 트리스 같은 거의 중성인 완충액으로 평형화한 DEAE 셀룰로스 컬럼에 상층액을 통과시키고, 컬럼에 흡착되지 않은 분획을 수집하는 것이 효과적이다. 수집한 분획을 더, CM 셀룰로스 등을 담체로 이용하는 이온교환 크로마토그래피시킴으로써

뮤테인을 담체에 흡착시킬 수 있고, 염용액으로 뮤테인을 용출시키면 된다. 이 용출액은 투석후에 동결건조 시킬 수 있다.

추출액내의 bFGF 뮤테인을 정제하기 위하여 헤파린-세파로스를 이용하는 친화력 크로마토그래피를 적절히 이용할 수 있다. 따라서, 예를들면, 거의 중성인 완충액(예, 트리스 또는 인산염 완충액)으로 평형화한 헤파린-세파로스 컬럼에 상기 용출액을 공급하고, 컬럼을 완전히 세척하고 NaCl등으로 직선 구배 용출시킴으로써 bFGF 뮤테인 단백질을 정제할 수 있다.

고수율 액체 크로마토그래피용으로 개발된 헤파린 컬럼(예, 쇼덱스 AF-pak HR-894, 쇼와 덴꼬(일본국 제품)이 특히 효율적이다.

이 경우에는, 상술한 헤파린-세파로스 컬럼의 경우와 동일한 방법으로 bFGF를 균질 생성물로 수득할 수 있다. 즉, 약간 중성 완충액으로 채운 헤파린 컬럼에 시료를 공급하고, 컬럼을 완전히 세척하고, 예를들면 NaCl등으로 직선 구배 용출시킨다.

이렇게 얻은 생성물은 투석 및 동결건조에 의해 건식 분말로 만들 수 있다. 용기의 벽에 생성물이 흡착되는 것을 방지할 수 있기 때문에, 생성물에 담체(예, 혈청 알부민)를 가하여 보존하는 것이 바람직하다.

덧붙여, 생성물의 산화를 방지하기 위하여 정제 또는 보존중에 소량의 환원제를 첨가하는 것이 바람직하다.

환원제의 예로는, β-메르캅토 에탄올, 디티오트레이톨, 글루타티온 등이 언급된다.

이러한 방법으로, 실질적으로 순수한 bFGF 뮤테인 단백질을 얻을 수 있다. 본 발명에 따른 실질적으로 순수한 bFGF 뮤테인은 그 bFGF 뮤테인 단백질 함량이 95%(w/w)이상인 생성물, 및 보다 바람직하게는 그 bFGF 뮤테인 단백질 함량이 98%(w/w)이상인 생성물을 포함한다.

이렇게 얻은 뮤테인은 섬유아세포 성장 촉진활성, 모세관 내피 세포의 성장 자극 활성 및 맥관형성 활성을 가지며, 높은 안전성을 갖고 독성이 낮다 ; 따라서, 이것은 화상, 상처, 수술후 조직의 치료 촉진제로 사용되거나, 또는 맥관형성 활성을 기초로 하여 혈전증, 동맥경화증 등의 치료제로 사용될 수 있다. 또한, 이것은 세포배양의 촉진제로서도 사용될 수 있다.

특히, 최소한 하나의 구성 시스테인이 세린에 의해 치환된 뮤테인이 현저히 안정하기 때문에 바람직하다. 본 발명에 따른 뮤테인은, 의약용으로 사용될 때, 분말로 직접 또는 다른 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제와 함께 약한 조성물(예, 주사제, 정제, 캡슐, 용액 및 연고)로 제조한 후에 비경구 또는 경구적으로 온혈동물(예, 인간, 생쥐, 쥐, 햄스터, 토끼, 개 및 고양이)에게 안전하게 투여할 수 있다.

주사제의 제조는 예를들면 생리 식염수 또는 글루코스 및 다른 보조제를 함유하는 수용액을 이용하여 통상법에 따라 실시할 수 있다. 정제 및 캡슐 같은 약학 조성물도 상법에 따라 제조할 수 있다.

본 발명에 따른 뮤테인은, 상술한 약제로 사용될 때, 예를들면 투여경로, 증세 등을 고려하여 약 1ng/㎏ ~ 100㎍/㎏ · 1일의 범위에서 선택된 적절한 양으로 상술한 온혈동문에게 투여된다.

본 발명에 따른 뮤테인은, 세포 배양 촉진제로 사용될때, 바람직하게는 1ℓ의 배지당 약 0.01~10㎍, 보다 바람직하게는 1ℓ의 배지당 0.1~10㎍의 양으로 배지에 포함되도록 배지에 첨가된다.

본 명세서 및 도면에서 사용된 염기, 아미노산 등의 약어는 생화학 명명법에 대한 IUPAC-IUB Commission이 지정한 약어 또는 관련 분야에서 통용되는 약어에 기초를 둔 것으로서 그 예는 다음과 같다. 아미노산에 광학 이성체가 존재할 가능성이 있는 경우에, 그 이성체는 다른 언급이 없는 한 L-체이다.

DNA : 데옥시리보헥산

cDNA : 상보적 데옥시리보헥산

A : 아데닌

T : 티민

G : 구아닌

C : 시토신

RNA : 리보핵산

dATP : 데옥시아데노신 트리포스페이트

dTTP : 데옥시티민 트리포스페이트

dGTP : 데옥시구아노신 트리포스페이트

dCTP : 데옥시시티딘 트리포스페이트

ATP : 아데노신 트리포스페이트

Tdr : 티미딘

EDTA : 에틸렌디아민테트라아세트산

SDS : 소듐도데실 설페이트

Gly : 글리신

Ala : 알라닌

Val : 발린

Leu : 류신

Ile : 이소류신

Ser : 세린

Thr : 트레오닌

Cys : 시스테인

Met : 메티오닌

Glu : 글루탐산

Asp : 아스파르트산

Lys : 리신

Arg : 아르기닌

His : 히스티딘

Phe : 페니알라닌

Tyr : 티로신

Trp : 트립토판

Pro : 프롤린

Asn : 아스파라긴

Gln : 글루타민

본 명세서 및 도면에서, 인간 bFGF-구성 아미노산에 번호를 매기는 것에 있어서는 다른 언급이 없는한 번역 개시 코돈에서 유래된 Met을 첫번째 아미노산으로 하였다.

후술한 참고예 또는 실시예에서 생성된 하기 형질전환체는 하기 표 1에 나타낸 수탁번호로(기탁일은 괄호안에 표기하였음) 일본국 재단법인 발효연구소(IFO) 및 일본국 통상산업성 공업기술원 미생물 공업기술연구소(FRI) 및 재단법인 종균협회(KFCC)에 기탁되어 있다. FRI의 기탁번호에 있어서, FERM BP 번호는 부다페스트 조약하의 기탁번호를 의미하여 ; FERM P 번호 및 FERM BP번호가 모두 기재된 경우에 이것은 FERM P 번호하의 기탁이 부다페스트 조약하의 기탁으로 전환되어 형질전환체가 FERM BP의 번호로 FRI에 보관되어 있는 것을 나타낸다.

[표 1]

형 질 전 환 체	IFO	FRI		KFCC
E.coli K12 DH1/pTB627 [참고예 1]	IFO 14494 (1986. 3.13)	FERM P-8726 (1986. 4. 2)	FERM BP-1280	KFCC-10316 (1987. 2.19)
E.coli K12 MM294/pTB669 [참고예 2]	IFO 14532 (1986. 8.11)	FERM P-8918 (1986. 8.21)	FERM BP-1281	KFCC-10317 (1987. 2.19)
E.coli DH1/pTB739 [실시예 2]	IFO 14575 (1987. 2.18)	FERM P-9216 (1987. 2.25)	FERM BP-1641	KFCC-10522 (1988. 2. 4)
E.coli DH1/pTB742 [실시예 3]	IFO 14584 (1987. 3.24)	FERM P-9307 (1987. 3.30)	FERM BP-1642	KFCC-10523 (1988. 2. 4)
E.coli DH1/pTB743 [실시예 4]	IFO 14585 (1987. 3.24)	FERM P-9308 (1987. 3.30)	FERM BP-1643	KFCC-10524 (1988. 2. 4)
E.coli DH1/pTB744 [실시예 5]	IFO 14586 (1987. 3.24)	FERM P-9309 (1987. 3.30)	FERM BP-1644	KFCC-10525 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB627 [실시예 7]	IFO 14613 (1987. 5.27)	FERM P-9409 (1987. 6.11)	FERM BP-1645	KFCC-10526 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB764 [실시예 9]	IFO 14614 (1987. 5.27)	FERM P-9410 (1987. 6.11)	FERM BP-1646	KFCC-10527 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB765 [실시예 11]	IFO 14615 (1987. 5.27)	FERM P-9411 (1987. 6.11)	FERM BP-1647	KFCC-10528 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB795 [실시예 34]	IFO 14700 (1988. 1.14)		FERM BP-1660 (1988. 1. 20)	KFCC-10529 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB796 [실시예 35]	IFO 14701 (1988. 1.14)		FERM BP-1661 (1988. 1.20)	KFCC-10530 (1988. 2. 4)
E.coli MM294/pTB797 [실시예 36]	IFO 14702 (1988. 1.14)		FERM BP-1662 (1988. 1.20)	KFCC-10531 (1988. 2. 4)

후술한 실시예 35(3)(d)에서 생산된 하기 하이브리도마는 후술한 수탁번호로 1987년 8월 17일부터 IFO에 기탁되어 있다.

생쥐 HbF 52 세포 : IFO 50143

생쥐 HbF 78 세포 : IFO 50144

참고예 1

(인간 bFGF를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드의 제조)

(1) cDNA- 포함 플라스미드의 분리 :

그 숙주가 에스케리키아 콜리×1776이고 인간표피에서 유래된 일차 배양 세포 mRNA를 pCD 벡터[Okayama et al. 참조, Molecular Cell Biology, 3, 280(1983)]에 통합시켜 제조한 cDNA를 미합중국의 내셔날 인스티튜트 오브 차일드 헬쓰 앤드 휴맨 디벨롭먼트[National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda]의 오까야마 박사에게서 공급받는다. 알칼리법[Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucleic Acids Research, 1, 1513(1979)]에 의해 상기 DNA로부터 플라스미드 DNA를 추출하고, 이 DNA를 에스케리키아 콜리 DH1 에 감염시켜 그 숙주가 에스케리키아 콜리 DH1인 cDNA 라이브러리를 약 2×10 클론으로 생산한다.

에스케리키아 콜리 DH1을 이용한 상기 cDNA 라이브러리를 약 5×10 클론/필터의 양으로 10 니티로 셀룰로스 필터(Millipore Inc., USA, HATE 필터)에 펴바르고, 상기 10필터를 마스터 필터로 사용하여 총 20 복제 필터쌍을 제조한다.

복제 필터상의 에스케리키아 콜리 세포를 0.5N NaOH 용액으로 분해시키고, 노출된 변성 플라스미드 DNA를 필터에 고정시킨다[(Grunstein, M. and Hogness, D. S., Proc, Natl, Acad, Sci, USA, 72, 2961(1975)].

한편, 에슈 등[F. Esch et al., Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6507(1985)]이 보고한 소 염기성 섬유아세포 성장 인자의 아미노산 서열중에서 아미노산 번호 13~20(Pro-Pro-Gly-His-His-Phe-Lys-Asp-Pro) 및 아미노산 번호 89~96(Thr-Asp-Glu-Cys-Phe-Phe-Phe-Glu)을 기초로 하여, 아미노산 서열에 대응하는 염기서열을 화학적으로 합성한다(어떤 코돈의 경우에는, 세번째 글자를 임의로 고정시켰다. 각각5'GG A/G TC T/C TT A/G AA A/G TGGCCAGGAGG 및 5'TC A/G AA A/G AA A/G AA A/G CA T/C TCGTCGGT. 밑줄친 글자는 고정된 염기를 나타낸다.). 이들 올리고누클레오티드 각각에 있어서, T4 폴리누클레오티드 키나제(일본국, 다까라슈조사 제품)[올리고누클레오티드 0.1㎍, 50mM 트리스-HC1 pH 8.0, 0.10mM MgCl, 10mM 메르캅토에탄올, 50μCi γ-P ATP(5000Ci/mmole), 3단위의 T4 폴리누클레오티드 키나제]를 이용하여 50μl의 반응액내에서, 37℃에서 1시간 동안 반응을 실시하여 올리고누클레오티드의 5'-말단을 32P을 표지화한다.

상술한 방법에서 표지화한 올리고누클레오티드를 탐침으로 이용하여, 이들을 DNA를 고정시킨 복제 필터에 각각 결합시킨다. 결합 반응은 10μ Ci의 탐침을 함유하는, 5×SSPE[180mM NaCl, 10mM NaH PO, lmM EDTA(pH 7.4)], 5×덴하르트 용액, 0.1% SDS 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA의 용액내에서 35℃에서 16시간 동안 실시한다. 반응후에, 필터를 5×SSC[0.5M NaCl, 0.15M 소듐 시트레이트]의 0.1% SDS 용액으로 실온에서 30분간 3회, 그리고 45℃에서 30분간 2회 세척한다[T. Manistis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratroy, p. 309(1982)].

세척한 필터로부터 라디오 오토그램을 만들고, 각 복제 필터쌍의 2라디오 오토그램을 겹쳐봄으로써 두 탐침에 대응하는 균주를 찾는다. 이 방법에 의해, 두 탐침에 대응하는 한 균주[에스케리키아 콜리 K12 DH1/pTB627(IFO 14494, FERM BP-1280, KFCC-10316]를 5×10 클론으로부터 얻는다.

(2) 상기 (1)에서 얻은 균주[에스케리키아 콜리 K12 DH1/pTB627 (IF014494, FERM BP-1280, KFCC-10316]로부터 알칼리법[Nucleic Acids Research, 1, 1513(1979)]에 의해 플라스미드 DNA(pTB627)를 추출 및 정제한다.

참고예 2

(인간 bFGF를 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF형질 발현용 플라스미드 pTB669의 제작 :

상기 참고예 1(2)에서 얻은 인간 bFGF cDNA를 함유하는 플라스미드 pTB627을 제한효소 Ava I 및 Bal I을 이용하여 절단함으로써 인간 bFGF를 코딩하는 영역을 함유하는 0.44kb DNA 단편을 수득한다. T4 DNA 리가제를 이용하여 이 DNA 단편의 Bal I 절단부위(블런트 말단)에 Bg1II 링커 pCAGATCTG를 연결시키고 0.44kb Ava I-Ba1II DNA 단편을 분리한다. 이 0.44kb Ava I-Ba1II DNA 단편에 T4 DNA리가제를 반응시켜 Ba1II절단부위에서 연결되도록 하고, dXTP의 존재하에 DNA 폴리머라제(클레노우 단편) 반응시켜 Ava I 절단부위를 블러트 말단으로 만든다. 포스포릴화 후에 T4 DNA 리가제를 이용하여, 상기 DNA 단편에 합성 올리고누클레오티드 5'AATTCTATGCCAGCTTGC 3' 및 5'GCAATGCTGGCATAG 3' 를 연결하고, Ecor I-Bg1II를 이용하여 절단함으로써, 0.46kb DNA단편을 제조한다. 한편, trp프로모터를 갖는 플라스미드 ptrp 781[Kurokawa, T. et al., Nucleic Acids Research, 11, 3077~3085(1983)]의 DNA를 Pat I으로 절단하고, T4 DNA플리머라제 반응에 의해블런트 말단을 만든다. T4 DNA 리가제 반응에 의해 블런트 말단에 Bg1II링커 pCAGATCTG를 연결시킨 후에, Ecor I-Bg1II를 이용하여 절단함으로써 trp 프로모터, 테트라사이클린 내성 유전자 및 플라스미드 복제 개시 부위를 포함하는 약 3.2kb DNA 단편을 분리한다. 인간 bFGF를 코딩하는 유전자 영역을 함유하는 상기 0.46kb Ecor I-Bg1II DNA 단편과 이 3.2kb DNA 단편을 T4 DNA 리가제 반응에 의해 서로 연결시켜 인간 bFGF 형질발현용 플라스미드 pTB669를 제작한다.

이 플라스미드 pTB669를 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시킴으로써 플라스미드 pTB669를 보

유하는 에스케리키아 콜리 DH1/pTB669를 수득한다.

덧붙여, pTB669를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 에스케리키아 콜리 K12 MM294 또는C600을 형질 전환시켜 각각 에스케리키아 콜리 K12 MM294/pTB669(IFO 14532, FERM BP-1281, KFCC-10317) 및이. 콜리 C600/pTB699를 얻는다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 각각의 형질전환체를, 1% 글루코스, 0.4% 카사미노산 및 8㎍/ml 테트라사이클린을 함유하는 M9 배지에서 배양하고, 클레트 값이 약 200이 되면 3β-인돌릴 아크릴산을 25㎍/ml의 농도로 가하고 4시간 동안 더 배양한다. 배양 후에 세균 세포를 수집하고, 20mM 트리스 -HCl(pH 7.6)을 1/20양으로 함유하는 10% 수크로스 용액에 현탁시킨다. 이 현탁액에 페닐메틸설포닐 플루오라이드 (PMSF)를 1mM, EDTA를 10mM, NaCl을 0.1M, 스페르미딘 히드로클로라이드를 10mM 및 리소자임을 100㎍/ml(모든 수치는 최종 농도를 나타낸다)의 농도로 가하고, 혼합물을 0℃에서 45분간 방치한 후에 30초간 초음파 처리한다. 이 용액을 18000rpm(Sorval 원심분리기, SS34로터)에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이를 세균 세포 추출액으로 이용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

인간 bFGF활성은, BALB/c3T3 세포에 대한 성정 촉진 작용의 활성에 있어서 세균 세포 추출액의 활성과 등가인 양의 정제된 소 뇌FGF(다까라슈조사 제품)의 표준 시료의 중량으로 나타낸다.

각 웰당 2×10 세포의 양의 생쥐 BALB/c3T3 세포를 5% 송아지 혈청을 함유하는 DMEM 배지를 0.2ml씩 포함하는 눈크(Nunc) 96-웰 마이크로타이머 플래이트(평편한 바닥)에 접종시키고 배양한다. 다음 날, 배지를 0.5% 송아지 혈청-함유 DMEM 배지를 바꾼다. 3일간 배양한 후에, 미리 0.5% BSA-함유 DME배지로 5배씩 연속적으로 희석시킨 세균 세포 추출액 10μl를 각 웰에 가하고 배양한다. 20시간 후에, 20μl의 H-Tdr(5Ci/mmol, 0.5mCi/ml RCC Amersham, 영국)을 각 웰에 가한다. 6시간 후에, 0.2% 트립신-0.02% EDTA를 함유하는 인산염 완충액(PBS)으로 처리하여 세포를 박리하고, 타이터텍크 세포 수확기를 이용하여 세포를 유리 필터상에 수확함으로써, 신틸레이션 계수기를 이용하여 세포가 취한 H-Tdr의 양을 측정한다. 동일한 방법을 이용하여, 알려진 중량의 뇌FGF(다까라슈조사 제품)의 활성을 측정한다. 이렇게 얻은 작업 곡선으로부터, 세균 세포 추출액 시료내의 인간 bFGG의 양을 계산한다.

결과를 표 2에 나타냈다.

대조용으로 플라스미드 ptrp 781을 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시켜 얻은 형질전환체이. 콜리 DH1/ptrp781의 인간 bFGF 생산성을 측정하였다.

[표 2]

형 질 전 환 체	인간 bFGF 생산성(배양 배지 1ℓ당)
E. coli DH1/pTB669	2.95mg
E. coli MM294/pTB669	23.15
E. coli C600/pTB669	8.15
E. coli DH1/pTB781	<0.0005

실시예 1

(뮤테인-코딩 염기서열을 포함하는 재조합 DNA의 제조)

(1) 인간 bFGF 유전자의 M13 벡터의 클로닝

참고예 2에서 수득한 플라스미드 pTB669를 제한효소 Ecor I 및 BamH I으로 소화시킨다. 파지 벡터 M13mp8[J. Messing, Methods, in Enzymology, 101, 20~78(1983)] 복제형(RF) DNA를 제한효소 Ecor I 및 BamH I으로 소화시키고, 소화된 pTB669에서 유래된 인간 bFGF DNA 단편과 혼합시킨다.

T4 DNA 리가제를 이용하여 혼합물을 연결시키고 : 연결된 DNA를 균주 에스 케리키아 콜리 JM105의 감염성 세포내에 형질 전환시키고 ; Xgal을 지시제로 이용하여 생성된 형질전환체를 플래이트에 접종시키고 [J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309~321(1981)] ; 재조합 파지를 함유하는 플라크(백색 플라크)를 취하고 ; 재조합 영역의 염기서열을 디데옥시누클레티드 합성 사슬 종결법[J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309~321(1981)]에 의해 결정함으로써 인간 bFGF DNA가 정확하게 삽입된 것을 확인한다.

이 M13-F0 클론으로부터 단일가닥 파지 DNA를 정제한 후에 이것을 합성 올리고누클레오티드를 이용하는 부위-조작 돌연변이유발의 주형으로 이용한다.

(2) 부위-특이적 돌연변이 유발 :

0.1mM 아데노신 트리포스페이트(ATP), 50mM 트리스(히드록시메틸) 아미노메탄 히드로클로라이드(트리스-HC1 pH 8.0) 10mM MgCl, 5mM 다티오트레이톨(DTT) 및 9단위의 T4키나제의 존재하에 (총 50μl의 양) 40피코몰의 다음의 합성 오릴고누클레오티드 :

5'CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT3'

[Cys26을 Ser으로 변화시키는 프라이머)제한 효소 RsaⅠ의 인지 서열이 사라진다)(제2도 참고)]를 37℃에서 1시간 동안 T4키나제로 처리한다. 이 키나제-처리 프라이머(12피코몰)를 67℃에서 5분간. 그리고 42℃에서 25분간, 50mM NaCl, 1.0mM 트리스- HC1(pH 8.0), 10mM MgCl, 및 10mM β-메르캅토 에탄올을 함유하는 혼합물 50μl내에서 가열함으로써 프라이머를 5㎍의 단일가닥(ss)M13-P0 DNA에 하이 브리드화시킨다. 어닐링된 혼합물을 얼음위에 냉각시키고, 0.5mM 데옥시누클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 80mM 트리스- HC1(pH 7.4), 8mM MgCl, 100mM NaCl, 9 단위의 DNA 폴리머라제Ⅰ 클레노우 단편, 0.5mM ATP 및 2단위의 T4 DNA 리가제를 함유하는 반응 혼합물 50μl에 가하고, 37℃에서 3시간 동안, 그리고 25℃에서 2시간 동안 반응시키고, 2μl의 0.2mM EDTA를 가하여 반응을 중지시킨다.

반응 생성물은 감염성 JM105 세포를 형질전환하는데 이용하고 ; 이렇게 얻은 형질전환 세포를 밤새 생장시키고, 배지 상층액으로부터 ssDNA를 분리한다. 이ssDNA를 두번째 프라이머 연장 사이클의 주형으로 이용하여, 겔-정제 RF형 DNA를 감염성 JM105세포로 형질전환시키고 ; 생성된 형질전환 세포를 한천 플래이트에 펴바르고, 밤새 배양하여 파지 플라크를 수득한다.

(3) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)향의 방법을 반복 실시하되, 사용된 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'AAC GT TAG CGC TCA CTC C3'

이것은 시스테인-7--코딩 코돈을 세린-코딩 코돈으로 변화시킨다(제한효소 HaeⅡ의 인지서열이 생성됨)(제2도 참고).

(4) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)향의 방법을 반복 실시하되, 사용된 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'GTA ACA GAC TTA GAA GCT AGT3'

이것은 시스테인-88--코딩 코돈을 세린-코딩 코돈으로 변화시킨다(제한효소 AluⅠ의 인지서열이 생성됨)(제2도 참고).

(5) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)향의 방법을 반복 실시하되, 이용 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음과 같으며 :

5'TCG AAG AAG AAA GAC TCA TCC3'

이는 시스테인-93--코딩 코돈을 세린-코딩 코돈으로 변화시킨다(제한효소 HinfⅠ의 인지서열이 생성됨)(제2도 참고).

(6) 돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화

상기 (1)항에서 얻은 돌연변이된 M13-P0플라크를 포함하는 플래이트 및 돌연변이되지 않은 M13-P0 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 105 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P0 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P0 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P0 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P0 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-26)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGT(Cy s-70) 코돈이 AGC(Ser)코돈으로 변화되고 ; TGT(Cys-88)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGT(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화된 것이 확인된다.

M13-P0 파지중에서, 코돈 Cys-26이 Ser -코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P1으로 명명하고, 코돈 Cys-70이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P2으로 명명하고 ; 코돈 Cys-83이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P3으로 명명하고 ; 코돈 Cys-93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P4으로 명명한다.

실시예 2

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB739의 제조 :

상기 실시예 1에서 얻은 M13-P1 복제형(RF) 제한효소 EcorR Ⅰ 및 Pst Ⅰ으로 절단하여 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 0.56kb DNA단편을 얻는다.

한편, trp프로모터를 갖는 플라스미드 ptrp 781[Kurokawa, T. et al., Nucleic Acids Research, 11, 3077~3085(1983)]의 DNA를 EcorR Ⅰ- Pat Ⅰ으로 절단하여, trp 프로모터, 테트라사이클린 내성 유전자 및 플라스미드 복제 개시 부위를 포함하는 약 3.2kb DNA 단편을 분리한다. 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자 영역을 함유하는 상기 0.46kb EcorR Ⅰ- Pat Ⅰ DNA 단편 및 이 3.2kb DNA 단편을 T4 DNA 리가제 반응에 의해 서로 연결시킴으로써 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB739를 제작한다.(제 7 도).

이 플라스미드 pTB739를 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시켜 군주 에스케리키아 콜리 DH1/pTB739(IFO 14575, FERM BP-1641, KFCC-10522)를 수득하는데, 이것은 제 3 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB739를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 각각의 형질전환체를, 1% 글루코스, 0.4% 카사미노산 및 8㎍/ml 테트라사이클린을 함유하는 M9 배지에서 배양하고, 클레트 값이 약 200이 되면 3β-인돌릴 아크릴산을 25㎍/ml의 농도로 가하고 4시간 동안 더 배양한다. 배양 후에 세균 세포를 수집하고, 20mM 트리스 -HCl(pH 7.6)을 1/20양으로 함유하는 10% 수크로스 용액에 현탁시킨다. 이 현탁액에 페닐메틸설포닐 플루오라이드 (PMSF)를 1mM, EDTA를 10mM, NaCl을 0.1M, 스페르미딘 히드로클로라이드를 10mM 및 리소자임을 100㎍/ml(모든 수치는 최종 농도를 나타낸다)의 농도로 가하고, 혼합물을 0℃에서 45분간 방치한 후에 30초간 초음파 처리한다. 이 용액을 18000rpm(Sorval 원심분리기, SS34로터)에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이를 세균 세포 추출액으로 이용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

각 웰당 2×10 세포의 양의 생쥐 BALB/c3T3 세포를 5% 송아지 혈청을 함유하는 DMEM 배지를 0.2ml씩 포함하는 눈크(Nunc) 96-웰 마이크로타이터 플래이트(평편한 바닥)에 접종시키고 배양한다. 다음 날, 배지를 0.5% 송아지 혈청-함유 DMEM 배지를 바꾼다. 3일간 배양한 후에, 미리 0.5% BSA-함유 DME배지로 5배씩 연속적으로 희석시킨 세균 세포 추출액 10μl를 각 웰에 가하고 배양한다. 20시간 후에, 20μl의 H-Tdr(5Ci/mmol, 0.5mCi/ml RCC Amersham)을 각 웰에 가한다. 6시간 후에, 0.2% 트립신-0.02% EDTA를 함유하는 인산염 완충액(PBS)으로 처리하여 세포를 박리하고, 타이터텍크 세포 수확기를 이용하여 세포를 유리 필터상에 수확함으로써, 신틸레이션 계수기를 이용하여 세포가 취한 H-Tdr의 양을 측정한다. 결과로서, 이 콜리 DH1/pTB739에서 유래한 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF 뮤테인의 26-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS1이 얻어진다.

실시예 3

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB742의 제조 :

상기 실시예 1에서 얻은 M13-P2 복제형(RF)을 제한효소 EcorR Ⅰ 및 Pst Ⅰ으로 절단하여 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 0.56kb DNA단편을 얻는다.

한편, trp프로모터를 갖는 플라스미드 ptrp 781 DNA를 EcorR Ⅰ- Pat Ⅰ으로 절단하여, trp 프로모터, 테트라사이클린 내성 유전자 및 플라스미드 복제 개시 부위를 함유하는 약 3.2kb DNA 단편을 분리한다. 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자 영역을 함유하는 상술한 0.56kb EcorR Ⅰ- Pat Ⅰ DNA 단편 및 이 3.2kb DNA 단편을 T4 DNA 리가제 반응에 의해 서로 연결시킴으로써 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB742를 제작한다.(제 8 도).

이 플라스미드 pTB742를 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시켜 군주 에스케리키아 콜리 DH1/pTB742(IFO 14584, FERM BP-1642, KFCC-10523)를 수득하는데, 이것은 제 4 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB742를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 DH1/pTB742에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 70-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS2가 얻어진다.

실시예 4

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB743의 제조 :

상기 실시예 1에서 얻은 M13-P3 복제형(RF)을 제한효소 EcorR I 및 Pst I으로 절단하여 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 0.56kb DNA단편을 얻는다.

한편, trp프로모터를 갖는 플라스미드 ptrp 781 DNA를 EcorR I - Pat I으로 절단하여, trp 프로모터, 테트라사이클린 내성 유전자 및 플라스미드 복제 개시 부위를 함유하는 약 3.2kb DNA 단편을 분리한다. 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자 영역을 함유하는 상술한 0.5kb EcorR I - Pat I DNA 단편 및 이 3.2kb DNA 단편을 T4 DNA 리가제 반응에 의해 서로 연결시킴으로써 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB743를 제작한다.(제 9 도).

이 플라스미드 pTB743를 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 DH1/pTB743(IFO 14585, FERM BP-1643, KFCC-10524)를 수득하는데, 이것은 제 5 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB743를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이. 콜리 DH1/pTB743에서의 세균 세포 추출액은 FGF 활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 88-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS3가 얻어진다.

실시예 5

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB744의 제조 :

상기 실시예 1에서 얻은 M13-P4 복제형(RF)을 제한효소 EcorR I 및 Pst I으로 절단하여 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 0.56kb DNA단편을 얻는다.

한편, trp프로모터를 갖는 플라스미드 ptrp 781 DNA를 EcorR I - Pat I으로 절단하여, trp 프로모터, 테트라사이클린 내성 유전자 및 플라스미드 복제 개시 부위를 포함하는 약 3.2kb DNA 단편을 분리한다. 인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자 영역을 함유하는 상술한 0.56kb EcorR I - Pat I DNA 단편 및 이 3.2kb DNA 단편을 T4 DNA 리가제 반응에 의해 서로 연결시킴으로써 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB744를 제작한다.(제 10 도).

이 플라스미드 pTB744를 이용하여 에스케리키아 콜리 DH1을 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 DH1/pTB744(IFO 14586, FERM BP-1644, KFCC-10525)를 수득하는데, 이것은 제 6 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB744를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 DH1/pTB744에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS4가 얻어진다.

실시예 6

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

실시예 1에서 얻은 돌연변이된 M13-P2 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 1에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-P2 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P2 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P2 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P2 플라크 3~10개가 탐

침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P2 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-26) 코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGT(Cys-88) 코돈이 TCT(Ser)코돈으로 변화되고 ; TGC(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화된 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P2 파지중에서, 코돈 Cys-26 및 -70이 Ser 코돈으로 변환된 파지를 M13-P12으로 명명하고 ; Cys-70 및 -88이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P23으로 명명하고 ; Cys-70 및 -93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P24으로 명명한다.

실시예 7

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB762의 제조 :

상기 실시예 6에서 얻은 M13-P23 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB762를 제작한다.(제 12 도).

이 플라스미드 pTB62를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB762(IFO 14613, FERM BP-1645, KFCC-10526)를 수득하는데, 이것은 제 11 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB762를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB762에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 70- 및 88-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS23가 얻어진다.

실시예 8

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

실시예 7에서 얻은 돌연변이된 M13-P23 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 7에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-P23 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한 천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P23 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P23 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P23 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P23 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-26)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGT(Cys-93) 코돈이 TCTC(Ser)코돈으로 변화 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P23 파지중에서, 코돈 Cys-26, -70 및 -88이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P123으로 명명하고 ; Cys-70, -88 및 -93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P234으로 명명한다.

실시예 9

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB764의 제조 :

상기 실시예 8에서 얻은 M13-P123 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤

테인 형질발현용 플라스미드 pTB764를 제작한다.(제 14도).

이 플라스미드 pTB64를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB764(IFO 14614, FERM BP-1646 KFCC-10527)를 수득하는데, 이것은 제13도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB764를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB764에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26-, 70- 및 88-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS123가 얻어진다.

실시예 10

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

실시예 8에서 얻은 돌연변이된 M13-P123 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 8에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-P123 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한 천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 105 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P123 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P123 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P23 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P123 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P123 파지중에서, 코돈 Cys-26, -70 및 -88이 Ser 코돈으로 변환된 파지를 M13-P1234로 명명한다.

실시예 11

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB765의 제조 :

상기 실시예 10에서 얻은 M13-P1234 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB765를 제작한다.(제 16 도).

이 플라스미드 pTB65를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB765(IFO 14615, FERM BP-1647 KFCC-10528)를 수득하는데, 이것은 제 15 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB765를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB765에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26-, 70-, 88- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS1234가 얻어진다.

실시예 12

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

합성 올리고머[제2(3) 또는(4)도]를 이용하여 실시예 1의 방법에 의해 돌연변이된 M13-P1 파지 플라크를 함유하는 플래이트 및 실시예 1에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-P1 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P23 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. γ-P ATP의 존재하에 키나제-처리한 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P1 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P1 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P1 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-88)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGC(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P1 파지중에서, 코돈 Cys-26 및-88이 Ser 코돈으로 변환된 파지를 M13-P13으로 명명하고 ; Cys-26 및-93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P14으로 명명한다.

실시예 13

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

합성 올리고머[제2(2) 또는(3)도]를 이용하여 실시예 1의 방법에 의해 돌연변이된 M13-P14 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 돌연변이되지 않은 M13-P14 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P14 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. γ-32P- ATP의 존재하에 키나제-처리한 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P14 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P14 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P14 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-70)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화되고 ; TGC(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P14 파지중에서, 코돈 Cys-26, -70 및-93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P124으로 명명하고 ; Cys-26, -88 및 -93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P134으로 명명한다.

실시예 14

(돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화)

합성 올리고머[제2(4)도]를 이용하여 실시예 1의 방법에 의해 돌연변이된 M13-P3 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 1에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-P3 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이

들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCI에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다. 동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P3 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 0.1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. γ-32P ATP의 존재하에 키나제-처리한 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P3 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P1 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P3 플라크중 하나를 취하여 JM105 배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, TGC(Cys-93)코돈이 TCT(Ser) 코돈으로 변화 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-P3 파지중에서, 코돈 Cys-88 및 -93이 Ser-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-P34으로 명명하였다.

실시예 15

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB776의 제조 :

상기 실시예 6에서 얻은 M13-P12 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB776를 제작한다.(제 18 도).

이 플라스미드 pTB776를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB776을 수득하는데, 이것은 제 17 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB776를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB776에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26 및, 70- 위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS12가 얻어진다.

실시예 16

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB778의 제조 :

상기 실시예 6에서 얻은 M13-P24 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB778를 제작한다.(제 20 도).

이 플라스미드 pTB778를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB778을 수득하는데, 이것은 제 19 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB778를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB778에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 70- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS24가 얻어진다.

실시예 17

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB779의 제조 :

상기 실시예 12에서 얻은 M13-P13 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB779를 제작한다.(제 22 도).

이 플라스미드 pTB779를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB779을 수득하는데, 이것은 제 21 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB779를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB778에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26- 및 88-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS13가 얻어진다.

실시예 18

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB763의 제조 :

상기 실시예 12에서 얻은 M13-P14 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB763를 제작한다.(제 24 도).

이 플라스미드 pTB763를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB763을 수득하는데, 이것은 제 23 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB763을 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB763의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS14가 얻어진다.

실시예 19

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB777의 제조 :

상기 실시예 14에서 얻은 M13-P34 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB777를 제작한다.(제 26 도).

이 플라스미드 pTB777를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB777을 수득하는데, 이것은 제 25 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB777를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB777에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 88- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS34가 얻어진다.

실시예 20

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB782의 제조 :

상기 실시예 8에서 얻은 M13-P234 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB782를 제작한다.(제 28 도).

이 플라스미드 pTB782를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB782을 수득하는데, 이것은 제 27 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드

pTB782를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB782에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 70-, 88- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS34가 얻어진다.

실시예 21

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB780의 제조 :

상기 실시예 13에서 얻은 M13-P124 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB780를 제작한다.(제 30 도).

이 플라스미드 pTB780를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB780을 수득하는데, 이것은 제 19 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB780를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB780에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26-, 70- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS124가 얻어진다.

실시예 22

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB781의 제조 :

상기 실시예 13에서 얻은 M13-P134 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB781를 제작한다.(제 31 도).

이 플라스미드 pTB781를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB781을 수득하는데, 이것은 제 19 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB781를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB781에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 26-, 88- 및 93-위치 Cys 이 Ser으로 대치된 뮤테인 CS134가 얻어진다.

실시예 23

(뮤테인 생산성)

참고예 2(2)에 방법에 따라, 각 뮤테인을 함유하는 세균 세포 추출액의 FGF 활성을 측정함으로써 각 형질전환체의 뮤테인 생산성을 계산한다. 이렇게 얻은 값을 표 3에 나타냈다.

[표 3]

플라스미드	뮤테인	생산성(mg-ptFGF/1 배양)
pTB739	CS1	0.3
pTB742	CS2	10.6
pTB743	CS3	13.3
pTB744	CS4	0.8
pTB776	CS12	0.2
pTB779	CS13	0.1
pTB763	CS14	0.5
pTB762	CS23	25.8
pTB778	CS24	0.3
pTB777	CS34	0.5
pTB764	CS123	0.3
pTB780	CS124	0.4
pTB781	CS134	0.2
pTB782	CS234	1.4
pTB765	CS1234	0.1
pTB669	rhbFGF	6.0
pTB781	-	0.0

실시예 24

(bFGF 뮤테인 생산)

각각의 뮤테인 생산하는 형질전환체를 참고예 2에 기재된 방법에 따라 배양하여, 세균 세포 추출액을 제조한다. 20mM 트리스-HCl(pH 7.4)및 0.2M NaCl을 함유하는 용액으로 평형화한 DEAE 셀룰로스(DE52, 와트만사 제품, 영국) 컬럼(ø2×10㎝)에 500ml의 배지에서 제조한 각 추출액 25ml를 통과시켜 추출액내의 핵산 성분을 제거한다. 컬럼의 용출액 및 20mm 트리스-HCl(pH 7.4)및 0.2M NaCl을 함유하는 용액으로 컬럼을 세척하여 생긴 세척액을 합하고 수집한다(DEAE 용출분획, 60ml).

이 분획을 쇼댓스 AF-pak HR-894 헤파린 컬럼(8mmId×5㎝, 쇼아 덴꼬사 제품, 일본)을 건 고수율 액체 크로마토그래피(길송사, 프랑스공화국)를 이용한 고수율 액체 크로마토그래피한다. 컬럼을 20mM 트리스-HCl(pH 7.4)및 트리스-HCl(pH 7.4)및 0.2M NaCl을 함유하는 용액으로 컬럼을 세척한 후에 20mM 트리스-HC 함유 완충액I(pH 7.4)에 용해시킨 0.5M~2M(60ml 부피, 용출속도 1.0ml/분)의 NaCl 구배로 직전 구배 용출시킨다.

각 뮤테인의 용출 패턴을 제 33~35도에 나타내었다. 도면에서 세롸좌표는 OD280의 흡광도 및 구배에서의 NaCl 농도를 나타낸다. 가로좌표는 시간을 나타내는데, 구배 용출은 시간 -0점에서 시작된다. 피크 분획을 수집하고, 그 FGF 활성을 검사한다. 그의 후정제 비활성을 표 4에서 나타내었다.

[표 4]

뮤테인	비활성(mg-ptFGF/mg 단백질)
CS1	0.4
CS2	0.9
CS3	1.0
CS4	1.0
CS12	0.5
CS13	0.5
CS14	0.3
CS23	1.1
CS24	0.8
CS34	0.5
CS123	0.4
CS124	0.1
CS134	0.5
CS234	0.9
CS1234	0.1
rhbFGF	1.0

표 4에서는, 다까라 슈조사에서 생산된 소 뇌-유래 FGF(순도, 95% 이하)의 FGF 활성을 기초로 한 비활성을 나타내었다.

모든 뮤테인에 있어서, bFGF의 피크 Ⅰ에 해당하는 피크는 15~25분 사이의 용출시간에 용출시킨다. 이것은 또한 17.25% SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 약 17,000분자량의 위치에 단일 밴드로서 검출된다.

실시예 25

(FGF 뮤테인의 산화)

헤파린 HPLC 컬럼에서 용출시킨 각 뮤테인 및 bFGF를 개별적으로 1000배량의 증류수에 대해 3시간 동안 4℃에서 2회 투석하고, 동결건조한다. 각각의 건조된 표준시료 200㎍(단백질 기준)을 200㎕의 산화반응액[50mM 트리스-HCl(pH 8.5)/ 0.2M NaCl/1mg/ml BSA/20mM H202]에 용해시키고, 37℃에서 30분간 산화시킨다.

용액을 헤파린 HPLC 컬럼에서 통과시키고, 0.6M~2M 염구배에서의 용출에서 나타난 패턴을 검사한다. 얻어진 용출 패턴을 제36도에 나타내었다. bFGF에서 피크는 일반적으로 낮고; 한편 CS2, CS3 및 CS23는 피크 I에 해당하는 피크가 높고 ; CS3 및 CS23에서는 피크 상승이 눈에 띄게 나타난다.

이것이 CS3 및 CS23이 산화에 안정하다는 것을 시사한다. 덧붙여, CS2, CS3 및 CS23의 모든 경우에 있어서, 피크로 용출된 단백질은 FGF 활성을 나타낸다.

실시예 26

(FGF 뮤테인의 환원)

실시예 25와 동일한 방법으로 숟그한 각 동결건조된 표준시료 200㎍(단백질)씩을 200㎕의 환원반응액[50mM 트리스-HCl(pH 8.5)/ 0.2M NaCl/1mg/ml BSA/20mM 디티오트레이톨(DTT)]에 용해시키고, 37℃에서 30분간 환원반응시킨다.

용액을 헤파린 HPLC 컬럼에서 통과시키고, 0.6M~2M 염구배의 용출에서 나타난 패턴을 검사한다. 얻어진 용출 패턴을 제37도에 나타내었다. bFGF 및 CS2에서, 피크 I에 대응하는 피크가 눈에 띄며, 다른 피크(피크 Ⅱ~Ⅳ)는 산화되었으리라 생각된다. 또한 CS3 및 CS23에서는 피크가 산화에 의해 영향을 받지 않는다. 즉, 이것은 실시예 25에서 언급한 바 있는 안전성을 뒷받침한다. pTB77및 이들 피코로 용출된 뮤테인 단백질은 FGF 활성을 나타낸다.

실시예 27

(뮤테인-코딩 염기서열을 포함하는 재조합 DNA의 제조)

(1) 인간 bFGF 유전자의 M13 벡터의 클로닝

참고예 2에서 수득한 플라스미드 pTB669를 제한효소 EcorⅠ 및 BamHⅠ으로 소화시킨다. 파지 벡터 M13mp8[J. Messing, Methods, in Enzymology, 101, 20~78(1983)] 복제형(RF) DNA를 제한효소 EcorⅠ 및 BamHⅠ으로 소화시키고, 소화된 pTB669에서 유래된 인간 bFGF DNA 단편과 혼합시킨다.

T4 DNA 리가제를 이용하여 혼합물을 연결시키고 : 연결된 DNA를 균주 에스 케리키아 콜리 JM105의 감염성 세포내에 형질 전환시키고 ; Xgal을 지시제로 이용하여 생성된 형질전환체를 플래이트에 접종시키고[J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309~321(1981)] ; 재조합 파지를 함유하는 플라크(백색 플라크)를 취하고 ; 재조합 영역의 염기서열을 디데옥시누클레티드 합성 사슬 종결법[J. Messing et al., Nucleic Acids Research, 9, 309~321(1981)]에 의해 결정함으로써 인간 bFGF DNA가 정확하게 삽입된 것을 확인한다.

이 M13-F0 클론으로부터 단일가닥 파지 DNA를 정제한 후에 이것을 합성 올리고누클레오티드를 이용하는 부위-조작 돌연변이유발의 주형으로 이용한다.

(2) 부위-특이적 돌연변이 유발 :

0.1mM 아데노신 트리포스페이트(ATP), 50mM 트리스(히드록시메틸) 아미노메탄 히드로클로라이드(트리스-HC1 pH 8.0) 10mM MgCl2, 5mM 다티오트레이톨(DTT) 및 9단위의 T4키나제의 존재하에 (총 50㎕의 양) 40피코몰의 다음의 합성 오릴고누클레오티드 :

5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3'

[제한효소 EcorⅠ의 인지부위를 염기서열내에 생성시키고, Pro-14를 Met으로 변화시키는 프라이머(제38(2)도 참고)]를 37℃에서 1시간 동안 T4키나제로 처리한다. 이 키나제-처리 프라이머(12피코몰)를 67℃에서 5분간. 그리고 42℃에서 25분간, 50mM NaCl, 1.0mM 트리스- HC1(pH 8.0), 10mM MgCl, 및 10mM β-메르캅토 에탄올을 함유하는 혼합물 50㎕내에서 가열함으로써 프라이머를 5㎍의 단일가닥(ss)M13-P0 DNA에 하이브리드화시킨다. 어닐링된 혼합물을 얼음위에 냉각시키고, 0.5mM 데옥시누클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 80mM 트리스- HC1(pH 7.4), 8mM MgCl2, 100mM NaCl, 9 단위의 DNA 폴리머라제 I 클레노우 단편, 0.5mM ATP 및 2단위의 T4 DNA 리가제를 함유하는 반응 혼합물 50㎕에 가하고, 37℃에서 3시간 동안, 그리고 25℃에서 2시간 동안 반응시키고, 2㎕의 0.2mM EDTA를 가하여 반응을 중지시킨다.

반응 생성물은 감염성 JM105 세포를 형질전환하는데 이용하고 ; 이렇게 얻은 형질전환 세포를 밤새 생장시키고, 배지 상층액으로부터 ssDNA를 분리한다. 이ssDNA를 두번째 프라이머 연장 사이클의 주형으로 이

용하여, 겔-정제 RF형 DNA를 감염성 JM105세포로 형질전환시키고 ; 생성된 형질전환 세포를 한천 플래이트에 펴바르고, 밤새 배양하여 파지 플라크를 수득한다.

(3) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)항의 방법을 반복 실시하되, 사용된 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'-CGCCCATGGTGCCATCCTC-3'

이것은 염기서열내에 제한효소 Nco Ⅰ의 인지부위를 생성시키고, Gly-9을 Thr으로, Ser-10을 Met으로, 동시에 변화시킨다[제38(1)도 참고].

(4) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)항의 방법을 반복 실시하되, 사용된 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'-TAACACCTTAAGAAGCCAG-3'

이는 염기서열내에 제한효소 HpaⅡ의 인지부위를 생성시키고, 동시에 Lys-7 코딩 코돈을 종결 코돈으로 변화시킨다[제38(3)도 참고].

(5) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)항의 방법을 반복 실시하되, 이용 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'-CCGGACTCCGTTAACTCGG-3'

이는 염기서열내에 제한효소 Hpa Ⅰ의 인지부위를 생성시키고, 동시에 Asp-42를 Asn으로 변화시킨다[제38(4)도 참고].

(6) 부위-조작 돌연변이유발 :

상기 (2)항의 방법을 반복 실시하되, 이용된 합성 올리고누클레오티드프라이머는 다음고 같으며 :

5'-CTTCTCCTGGACTCCGTCAAC-3'

이는 염기서열내에 제한효소 HpaⅡ의의 인지부위를 결실시키고, 동시에 Arg-45를 Gln으로 변화시킨다[제38(5)도 참고].

(7) 돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화

상기 (1)항에서 얻은 돌연변이된 M13-P0플라크를 포함하는 플래이트 및 돌연변이되지 않은 M13-P0 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방치하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다.

동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-P0 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 32P-γ- ATP의 존재하에 키나제로 처리한 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-P0 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-P0 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-P0 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, GGC(Gly-9) 코돈이 ACC(Thr)코돈으로, AGC(Ser-10)코돈이 ATG(Met)코돈으로 변화되고 : CCG(Pro-14) 코돈이 ATG(Met) 코돈이 변화되고 : AAA(Lys-87) 코돈이 TAA(종결) 코돈으로 변화되고 : GAC(Asp-42) 코돈이 AAC(Asn-42) 코돈으로 변화되고 : CGG(Arg-45) 코돈이 CAG(Gln-45) 코돈으로 변화된 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-PN0 파지중에서, Gly-9코돈이 Thr- 코딩 코돈으로 Ser-10 코돈이 Met-코딩 코돈으로 된 파지를 M13-PN10[염기서열 및 그에 의해 코딩된 아미노산 서열은 제39도에 나타나 있다]으로 명명하고, Pro-14 코돈이 Met-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-PN14[염기서열 및 그에 의해 코딩된 아미노산 서열은 제40도에 나타나 있다]으로 명명하고 : Lys-87 코돈이 종결 코돈으로 변화된 파지를 M13-PC86[염기서열 및 그에 의해 코딩된 아미노산 서열은 제40도에 나타나 있다]으로 명명하고 ; Asp-42 코돈이 Asn-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-PDN42[염기서열 및 그에 의해 코딩된 아미노산 서열은 제42도에 나타나 있다]으로 명명하고 : Arg-45 코돈이 Gln-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-PRQ45[염기서열 및 그에

의해 코딩된 아미노산 서열은 제43도에 나타나 있다]으로 명명한다.

실시예 28

(뮤테인-코딩 염기서열을 포함하는 재조합 DNA의 생산)

(1) 부위-특이적 돌연변이 유발 :

0.1mM 아데노신 트리포스페이트(ATP), 50mM 트리스(히드록시메틸) 아미노메탄 히드로클로라이드(트리스-HC1 pH 8.0) 10mM MgCl2, 5mM 다티오트레이톨(DTT) 및 9단위의 T4키나제의 존재하에 (총 50μl의 양) 40피코몰의 다음의 합성 오릴고누클레오티드 :

5'-CGGACTCCTCTAACTCGGC-3'

[제한효소 Hpa Ⅰ의 인지부위를 염기서열내에 결실시키고, Asn-42를 Arg으로 변화시키는 프라이머(제38(6)도 참고)]를 37℃에서 1시간 동안 T4키나제로 처리한다. 이 키나제-처리 프라이머(12피코몰)를 67℃에서 5분간. 그리고 42℃에서 25분간, 50mM NaCl, 1.0mM 트리스- HC1(pH 8.0), 10mM MgCl2, 및 10mM β-메르캅토 에탄올을 함유하는 혼합물 50μl내에서 가열함으로써 프라이머를 5㎍의 단일가닥(ss)M13-PDN42 DNA에 하이브리드화시킨다. 어닐링된 혼합물을 얼음위에 냉각시키고, 0.5mM 데옥시누클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 80mM 트리스- HC1(pH 7.4), 8mM MgCl2, 100mM NaCl, 9 단위의 DNA 폴리머라제 Ⅰ 클레노우 단편, 0.5mM ATP 및 2단위의 T4 DNA 리가제를 함유하는 반응 혼합물 50μl에 가하고, 37℃에서 3시간 동안, 그리고 25℃에서 2시간 동안 반응시키고, 2μl의 0.2mM EDTA를 가하여 반응을 중지시킨다. 반응 생성물은 감염성 JM105 세포를 형질전환하는데 이용하고 ; 이렇게 얻은 형질전환 세포를 밤새 생장시키고, 배지 상층액으로부터 ssDNA를 분리한다. 이ssDNA를 두번째 프라이머 연장 사이클의 주형으로 이용하여, 겔-정제 RF형 DNA를 감염성 JM105세포로 형질전환시키고 ; 생성된 형질전환 세포를 한천 플래이트에 펴바르고, 밤새 배양하여 파지 플라크를 수득한다.

(2) 돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화

합성 올리고머[제39(6)도를 이용하여 실시예 26의 방법으로 돌연변이된 M13-PDN42 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 26에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-PDN42 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다.

동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-PDN42 플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 1×SSC이다. 필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 32P-γ- ATP의 존재하에 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-PDN42 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-PDN42 플라크 3~10개가 탐침에 하이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-PDN42 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, AAC(Asn-42) 코돈이 ACA(Arg)코돈으로 변화된 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-PDN42 파지중에서, Asp-42 코돈이 Asn-코딩 코돈으로 변환된 파지를 M13-PDN42으로 명명한다. 그의 염기서열 및 그에 의해 코딩된 아미노산 서열은 제44도에 나타나 있다.

실시예 29

(뮤테인 CS2, CS3 및 CS23의 안정성)

헤파린 HPLC로 전제한 인간 bFGF 뮤테인 CS2, CS3 및 CS23(실시예 24에서 수득)의 안정성을 다음과 같이 산성 조건하에서 검사한다 : 1㎍/ml 농도로 조정하여 50mM Na-아세테이프(pH 4.0) 용액에 용해시킨 뮤테인 및 인간 bFGF를 각각 37℃에서 보온한다. 10분 간격으로 0~1시간 범위내이며, 생쥐 BALB/c3T3 세포계(상술한 바 있음)을 이용하여 각 보온시간에서 활성을 측정한다. 각 보온시간에서의 활성을, 보온시키지 않은 표준시료의 활성을 100%으로 하여 백분율로 계산하고 제45도에 나타낸 그래프를 얻는다. 제45도에 있어서, -●-, -▲-, -■- 및 -○-는 각각 인간 bFGF, 뮤테인 CS2, 뮤테인CS3 및 뮤테인CS23에서 얻은 결과를 나타낸다. 인간 bFGF는 10분 이내에 거의 완전히 불활성화되지만, 뮤테인 CS2, CS3 및 CS23의 순서로 (CS23이 가장 장기간 보유) 더 장기간 동안 활성을 유지한다.

뮤테인 CS23은 20분 후에도 약 50% 활성을 유지한다. 결과로서, 뮤테인이 인간 bFGF보다 큰 안정성을 갖는다는 것이 증명된다.

실시예 30

(뮤테인의 인간 탯줄 혈관 내피 세포 증식 촉진 활성)

헤파린 HPLC로 전제한 인간 bFGF 뮤테인 CS2, CS3 및 CS23(실시예 24에서 수득)의 혈관 내피 세포 증식 촉진 활성을 측정한다. 측정방법은 다음과 같다 : 트립신 용액을 이용한 관류에 의해 인간 탯줄 정맥으로부터 인간 혈관 내피세포를 수득하고, 2.5% 태내 소 혈정 및 2.0ng/ml 인간 bFG를 GIT배지(일본국, 다이고 에이요 가가꾸고요교 가부시끼가이샤 제품)에 가하여 제조한 액체 베지를 이용한 게대배양에 의해 유지된다. 96-웰 배양판(Nunc, 1-67008)에 2×103 인간 혈관 내피세포 현탁액 100μl를 가하고, 이산화탄소로 채운 항온실에서 배양한다. 다음날에 최종 농고가 2ng/ml가 되는 양의 FGF 및 각종 농도의 시료를 함유하는 배지 100μl를 가한다. 3일간 배양후에 시료를 포함하는 배지에 공기를 공급하고, 1mg/ml MTT용액(배지에 3-(4, 5 -디메틸-2-티아졸릴)-2, 5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드를 용해시켜 제조) 100μl를 가하고, 4시간 동안 배양한다. 10% SDS용액(소듐 도데실 설페이트 수용액) 100μl를 가하고, 5~6시간 동안 보온하여 세포 및 MTT색조를 용해시키고, 분광계를 이용하여 OD590값을 측정한다. 8ng/ml 인간 bFGF에서 얻어진 최대 증식율을 100%로 하여, 각각의 시료 농도에 대한 세포 증식율을 백분율로 계산하고, 50%증식율을 나타내는 농도와 표준 FGF 시료의 농도를 비교함으로써 비활성을 측정한다. 이렇게 얻은 비활성을 제 5 도에 나타내었다.

[표 5]

FGF	비활성
CS2	1.6
CS3	3.0
CS23	2.5
인간 bFGF	1.0

이 결과를 기초로 하여, 뮤테인이 비활성에서 인간 bFGF 보다 높다는 것을 알 수 있다.

실시예 30

(CAM법에 의해 측정한 뮤테인의 맥관형성력)

헤파린 HPLC로 정제한 인간 bFGF 및 CS2, CS3 및 CS23(실시예 24에서 수득)의 생체내 맥관형성력을 검사한다. 방법은 CAM(융모 요낭막) 분석법이다. CAM 분석을 위해, 약간 변형된 아우에르바흐법[Auerbach's method, Developmental Biology, 41, 391(1974)] 을 이용한다. 정온기내에서, 37℃로 33일간 보안한 후, 그 껍질을 제거한 가금 수정란을 나프코(Napco) 이산화탄소 정온기 6300(CO : 0%, HO : 포화)을 이용하여 37℃에서1주일간 더 보온시킨다. 각 단백질 수용액을 6㎜직경의 폴리프로필렌 디스크에 각 단백질 6.25, 12.5, 25.0, 및 50.0ng의 양으로 존재할 수 있도록 스포팅한다. 클린 벤취위에서 공기 건조시킨 후에, 가금 융모 요낭막위에 보존하면서 디스크를 37℃에서 3일간 더 보온시키고, 입체 현미경을 이용하여 맥관형성 상태를 관찰한다. 얻어진 결과를 표 6에 나타내었다.

주 : 각 시료당 총 18란(egg)을 사용하고, 표의 숫자는 맥관 형성이 나타나는 란의 수를 백분율로 표시하는 것이다.

[표 6]

FGF	맥관형성력(%)			
	50.0	25.0	12.5	6.25ng
CS2	77.8	44.4	22.2	0.0
CS3	72.2	61.1	16.7	0.0
CS23	72.2	55.6	22.2	0.0
인간 bFGF	94.4	50.0	33.3	0.0
담체	11.1	5.6	11.1	0.0

표 6에서, bFGF 뮤테인은 대조 인간 bFGF와 거의 등가인 맥관형성력을 갖는다는 것이 확실해진다.

실시예 32

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB854의 제조 :

상기 실시예 27에서 얻은 M13-PN10 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB854를 제작한다.(제 46 도).

이 플라스미드 pTB854를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB854을 수득하는데, 이것은 제 39 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB854를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB854의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 9- 위치 Gly 및 10-위치 Ser이 각각 Thr 및 Met에 의해 대치된 뮤테인 TM910가 얻어진다.

실시예 33

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB852의 제조 :

상기 실시예 32에서 수득한 플라스미드 pTB854의 DNA를 제한효소 EcorR Ⅰ 및 Pst Ⅰ으로 절단하여 인간 bFGF N말단의 10 아미노산을 코딩하는 DNA단편이 제거되도록 한다. 남아 있는 DNA 단편의 단일가닥 부분을 dATP, dCTP, dGTP, dTTP의 존재하에 에스케리키아 콜리 DNA 폴리머라제 Ⅰ으로 블럭트 말단으로 만들고, T4 DNA 연결 반응에 의해 연결시켜 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB852 를 제작한다.(제 47 도).

이 플라스미드 pTB852를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB852을 수득하는데, 이것은 제 48 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB852를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB852의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 2- 위치 Pro으로부터 10-위치 Ser까지의 아미노산 서열이 결실된 뮤테인 N10가 얻어진다.

실시예 34

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB795의 제조 :

상기 실시예 27에서 얻은 M13-PN14 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB795를 제작한다.(제 49 도).

이 플라스미드 pTB795를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB795(IFO 14700, FERM BP-1660 KFCC-10529)를 수득하는데, 이것은 제 40 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB795를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB795에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 2- 위치 Pro으로부터 14-위치 Pro까지의 아미노산 서열이 결실된 뮤테인 N14가 얻어진다.

실시예 35

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB796의 제조 :

상기 실시예 27에서 얻은 M13-P≠86 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB796를 제작한다.(제 50 도).

이 플라스미드 pTB796를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB796(IFO 14701, FERM BP-1661 KFCC-10530)를 수득하는데, 이것은 제 41 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB796를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 (2)에서 얻은 세포 추출액을 하기(a)~(j)에 나타낸대로 단클론성 항체를 이용하여 효소 면역 분석법(EIA), 샌드위치법으로 평가한다.

결과로서, bFGF 뮤테인 C86이 세포 추출액내에 존재하는 것을 확인한다. 87-위치의 Lys 에서부터 147-위치의 Ser까지의 아미노산 서열이 결실된 뮤테인 C86을 얻는다.

(a) 면역화 :

0.4ml의 프로인트 완전 보조제(Difco Lab., USA)에 용해시킨 항원 인간 bFGF(참고예 2에서 수득)을 BALB/c 생쥐(숫컷, 생후 4주)에게 복강내 투여한다. 3주 후에, 0.4ml의 프로인트 불완전 보조제에 용해시킨 항원 hbFGF 용액을 10㎍을 복강내 투여한다. 3주 후에, 동일한 부가 면역화를 실시하고, 2주 후에 생리식염주에 용해시킨 인간 bFGF 용액 10㎍을 복강내 접종시킨다.

(b) 세포융합 :

상기 (a)에서 언급한 면역화 생쥐로부터, 최종 항원 접종 후 4일 후에 비장을 절단해내어 세포융합에 쓰일 세포를 얻는다. 이들 세포를 이소코브 배지 및 Ham F012 배지를 1 : 1 비율로 혼합한 배지(이후에는 IH 배지로 표기)내에 현탁시킨다.

생쥐 골수종 세포 P3-X63-Ag 8UI를 10% 태내 송아지 혈청-함유 RPMI 1640배지에서 5% 이산화탄소-95% 공기 대기하에 계대배양한다.

컬러 및 밀스타인[Kohler, G. and Milstein, C. : Nature, 256, 495(1975)]에 의해 확립된 방법에 따라 세포융항을 실시한다. 상기 골수 종 세포계 2.9×107 세포 및 상기 방법에 의해 얻은 1.5×108 면역화 임파구를 함께 혼합 및 원심분리하고, 0.3ml의 IH 배지에 용해시킨45% 폴리에틸렌 글리콜 6000(이후에는 PEG 6000으로 표기함)용액을 적가한다.

PEG 6000 용액을 37℃로 예비가열하고 천천히 가한다. 5분후에, 37℃- 예비강려된 IH 배지를 1분당 0.5ml의 속도로 가열하여 10ml로 만든다.

용액을 600rpm으로 15분간 실온에서 원심분리하고 상층액을 제거한다.

이 세포 침전물을 20% 송아지 혈청-함유 IH 배지 200ml에 현탁시키고, 현탁액을 각 웰당 2ml의 양으로 24-웰 마이크로플레이트(Linbro)에 옮긴다. 1일 후에, HAT(1×10 하포크산탄, 4×10M 아미노프테린, 1.6×10 티미딘) (이후에는 HAT 배지로 표기함)을 보충한 IH배지(20% 송아지 혈청 함유)를 각 웰당 1ml의 양으로 마이크로플레이트에 가하고, 3일 후에 배지의 반을 HAT 배지로 바꾼다. 이렇게 해서 성장한 세포는 하이브리드 세포이다.

(c) 항체-생산 세포의 탐색

인간 bFGF를 고정시킨 폴리스티렌 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 각 웰당 100μl의 양으로 하이브리드 세포 배양 상층액을 가하고, 실온에 2시간 동안 보온한다. 배양 상층액을 제거하고, 세척후에, 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-표지화 항-생쥐 IgG 염소 항체(Miles Laboratories)를 이차항체로 가하고, 실온에서 2시간 동안 보온시킨다. 이차 항체를 제거하고, 웰을 완전히 섹척한 후에, 첨가된 반응 물질의 존재하에 발생 반응을 실시한다(EIA 법). 이 방법에 의해 3웰에서 강력한 역가가 관찰된다.

(d) 하이브리드 세포의 클로닝 :

10세포/웰 생쥐 티모사이트를 영양세포로서 접종시킨 96-웰 마이크로타이터 플래이트에 각 웰당 0.5 세포의 비율로 상기 웰 내의 세포를 접종시키고, 클로닝을 행한다. 결과로서, 세 클론, 즉 생쥐 하이브리도마 HbF52(IFO 50143) 및 생쥐 하이브리도마 HbF78(IFO 50144)이 얻어진다.

(e) 하이브리드 세포의 복수중화 :

미리 광유를 복강내 투여한 생쥐에게 생쥐 하이브리도마 HbF52 또는 생쥐 하이브리도마 HbF78 2×10 세포씩을 접종한다. 10일 후에, 각 생쥐로 부터 약 2ml양의 복수중 세포를 수집함을써 단클론성 항체 MoAb52 및 단클론성 항체 MoAb78을 수득한다.

(f) 이렇게 복수증액으로 부터 얻은 단클론성 항체 MoAb78 스타켈린 등(Stachelin et al)의 방법[Journal of Biological Chemistry. 256, 9750(1981)]으로 정제한다. 얻어진 항체를 2㎎/ml 이상으로 농축하고, 0.2M 포스페이 완충액(pH 7.0)에서 투석한다. 이렇게 얻어진 MoAb78(2.8㎎/ml)의 용액 1.4ml에 N, N'-디메틸포름아미드에 용해시킨 S-아세틸메르캅토숙신산 무수물(Aidrich Co., USA) 50μl를 11.5㎎/ml 농도로 가한다. 반응 용기내의 공기를 질소기체로 바꾼다. 용기를 밀봉하고, 교반하여 SH기를 도입시키는 반응을 시킨다. 미반응 S-아세틸메르캅토숙신산 무수물을 10분간 130μl의 0.2M 트리스

HCl(pH 7.0), 13㎕의 0.2M EDTA 및 130㎕의 2M 히드록시아민 (pH 7.0)으로 처리하여 불활성화 한다. 세파댁스 G-25로 패킹한 컬럼 (직경 1㎝×80㎝ , Farmacia, 스웨덴)을 이용한 겔 여과(용출속도 : (20ml/시간)에 의해 MoAb78을 회수한다.

(g) 10㎎의 고추냉이 퍼옥시다제(HRP, Behringer Manheim, I등급, 서독)를 1.4ml의 0.1M 포스페이트 완충액(pH 6.8)에 용해시킨다. 한편, N-(4-카르복시시클로헥실메틸)말레이미드의 N-히드록시숙신이 미드 에스테르 14㎎을 335㎕의 DMF에 용해시키고, 이렇게 얻은 용액 10㎕를 상기 HRP 용액에 가한다. 반응 용기내의 공기를 질소기체로 바꾸고, 용기를 밀봉한다. 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후에, SH기를 도입시킨 단클론성 MoAb78부분의 단백질을 상기 (f)와 같이 세파댁스 G-25-패킹 컬럼을 이용한 겔 여과에 의해 회수한다.

(h) 상기 (f)에서 수득한, SH기를 도입시킨 단클론성 항체 MoAb78 6ml 및 상기 (g)에서 수득한 말레이미드기를 도입한 HRP 2ml를 혼합하고 4℃에서 20시간 도안 감압하에 콜로디온 백(Sartorius, 서독)을 이용하여 혼합물을 1ml로 농축시킨다. 반응후에, SH기를 도입시킨 미반응 HRP을 올트로겔 AcA44(LKB Co., 직경 1㎝×80㎝, 스웨덴) 컬럼(용출속도 : 10ml/시간)을 이용하여 제거한다. 용출액에서, 2.4HRP/항체-함유 분획이 항체 분자당 가장 높은 HRP수를 갖는다. 이렇게 얻은 것을 하기(i)의 EIA에 이용한다.

(i) 상기 (e)에서 얻은 단클론성 항체 MoAb52를 상기 (f)에서 기재된 방법대로 정제한다. 단클론성 항체 MoAb52를 PBS로 희석하여 10㎍/ml 또는 20㎍/ml로 되도록 하고, 희석액을 100㎕/웰이 되도록 면역플레이트(Nunc. 덴마크)에 쏟아붓는다. 플래이트를 4℃에서 밤새 방치하여 단클론성 항체 MoAb52가 플래이트에 흡착되도록 한다. 흡착되지 않은 항체를 제거하고, 플래이트를 PBS로 삼회세척하고, 0.01% 메르티올레이트 및 1% 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 PBS를 200㎕/웰로 플래이트에 가하고, 플래이트를 4℃에서 밤새 방치한다.

(j) 상기(2)에서 숟그한 bFGF 뮤테인 C86-함유 세포 추출액을 0.1% BSA-함유 PBS로 희석한다. 상기 (i)에서 얻은 플래이트로 부터 BSA 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS로 4회 세척하고, 희석된 bFGF 뮤테인 C86을 플레이트에 100㎍/웰이 되도록 가하고, 4×에서 밤새 플레이트에 흡착되도록 한다. 미반응 뮤테인 C86을 제거하고, 플레이트를 PBS로 4회 세척한다. 상기 (h)에서 얻은 HRP의 접합시킨 단클론성 항체를 0.1% BSA-함유 PBS로 1/300로 희석하고, 희석액을 100㎕/웰이 되게끔 플래이트에 가한다. 실온에서 4시간동안 반응시킨다. 항체를 제거한후에, 플래이트를 PBS로 6회 세척하고, 옥시다제용 기질(Bio. RadCo. USA) 을 100㎕웰이 되게끔 플래이트에 가한다. 415㎜에서의 흡광도를 측정하여 정량하고, 소량의 뮤테인 C86이 생산된 것을 확인한다.

실시예 36

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB797의 제조 :

상기 실시예 27에서 얻은 M13-PDN42 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB797를 제작한다.(제 51 도).

이 플라스미드 pTB797를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB797를 수득하는데, 이것은 제 42 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB797를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB797에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 4- 위치 Asp가 Asn에 의해 대치된 뮤테인 DN42가 얻어진다.

실시예 37

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB799의 제조 :

상기 실시예 27에서 얻은 M13-PRQ45복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB799를 제작한다.(제 52 도).

이 플라스미드 pTB799를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB799(IFO 14701, FERM BP-1661 KFCC-10530)를 수득하는데, 이것은 제 43 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB799를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB799에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 45- 위치 Arg가 Gln에 의해 대치된 뮤테인 RQ45가 얻어진다.

실시예 38

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB798의 제조 :

상기 실시예 28에서 얻은 M13-PNR42복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB798를 제작한다.(제 53 도).

이 플라스미드 pTB798를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB798을 수득하는데, 이것은 제 44 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB798를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB798에서의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 42- 위치 Asp가 Arg에 의해 대치된 뮤테인 NR42가 얻어진다.

실시예 39

(뮤테인-코딩 염기서열을 포함하는 재조합 DNA의 제조)

(2) 부위-특이적 돌연변이 유발 :

0.1mM 아데노신 트리포스페이트(ATP), 50mM 트리스(히드록시메틸) 아미노메탄 히드로클로라이드(트리스-HC1 pH 8.0) 10mM MgCl2, 5mM 다티오트레이톨(DTT) 및 9단위의 T4키나제의 존재하에 (총 50μl의 양) 40피코몰의 다음의 합성 오릴고누클레오티드 :

5'-TCTTCTCCAGGGATCCGTT-3'

[제한효소 BamHⅠ의 인지부위를 염기서열내에 부가시키고, Val-44를 Ser으로, Arg-45를 Leu으로 변화시키는 프라이머(제38(7)도 참고)]를 37℃에서 1시간 동안 T4키나제로 처리한다. 이 키나제-처리 프라이머(12피코몰)를 67℃에서 5분간. 그리고 42℃에서 25분간, 50mM NaCl, 1.0mM 트리스- HC1(pH 8.0), 10mM MgCl, 및 10mM β-메르캅토 에탄올을 함유하는 혼합물 50μl내에서 가열함으로써 프라이머를 5㎍의 단일가닥(ss)M13-PDN42 DNA에 하이브리드화시킨다. 어닐링된 혼합물을 얼음위에 냉각시키고, 0.5mM 데옥시누클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 80mM 트리스- HC1(pH 7.4), 8mM MgCl, 100mM NaCl, 9단위의 DNA 폴리머라제Ⅰ 클레노우 단편, 0.5mM ATP 및 2단위의 T4 DNA 리가제를 함유하는 반응 혼합물 50μl에 가하고, 37℃에서 3시간 동안, 그리고 25℃에서 2시간 동안 반응시키고, 2μl의 0.2mM EDTA를 가하여 반응을 중지시킨다. 반응 생성물은 감염성 JM105 세포를 형질전환하는데 이용하고 ; 이렇게 얻은 형질전환 세포를 밤새 생장시키고, 배지 상층액으로부터 ssDNA를 분리한다. 이ssDNA를 두번째 프라이머 연장 사이클의 주형으로 이용하여, 겔-정제 RF형 DNA를 감염성 JM105세포로 형질전환시키고 ; 생성된 형질전환 세포를 한천 플래이트에 펴바르고, 밤새 배양하여 파지 플라크를 수득한다.

(2) 돌연변이 유발성으로 만든 플라크의 선별 및 동정화

합성 올리고머 올리고 누클레오티드 [제38(7)도를 이용하여 실시예 27의 방법으로 돌연변이된 M13-PDN42 파지 플라크를 포함하는 플래이트 및 실시예 27에서 얻은 돌연변이되지 않은 M13-PDN42 파지 플라크를 함유하는 2플래이트를 4℃로 냉각하고, 첫번째 필터의 경우에는 한천 플래이트상에 놓여진 건조 필터를 5분간, 그리고 두번째 필터의 경우에는 15분간 보존함으로써 각 플래이트의 플라크를 2개의 둥근 니트로셀룰로스 필터에 옮긴다. 0.2N NaOH, 1.5M NaCl 및 0.2% 트리톤 X-100에 침지시킨 두꺼운 여과지위에 필터를 5분간 방지하고, 이들을 0.5M 트리스- HC1(pH 7.5) 및 1.5M NaCl에 침지시킨 여과지 위에서 5분간 더 방치하여 이들을 중화시킨다.

동일한 방법으로 2×SSC(표준 소듐 시트레이트)에 침지시킨 필터상에서 필터를 2회 세척하고, 건조시키고, 진공 오븐내에서 80℃에서 2시간 동안 건조시킨다. 4×덴하르트 용액(폴리비닐피롤리돈, Ficoll 및 소혈청 알부민, 1×=0.02%)을 함유하는 DNA 하이브리드화 완충액(5×SSC, pH 7.0) 10ml/필터, 0.1% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 50mM 소듐 포스페이트-완충용액(pH 7.0) 및 100㎍/ml 연어 정자 변성 DNA를 이용하여, 겹쳐진 필터를 55℃에서 4시간 동안 예비 하이브리드화 한다. 10 cpm/ml 올리고누클레오티드 프라이머를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 하이브리드화를 행한다. 0.1% SDS 및 감소된 양의 SSC 를 함유하는 세정용 완충액내에서, 50℃에서 30분간 각 필터를 세척한다. 필터를 우선 2×SSC-함유 완충액으로 세척하고, 돌연변이되지 않은 M13-PDN42플라크를 함유하는 대조 필터를 게어거 계수기를 이용하여 방사능 측정한다. SSC 농도를 단계적으로 감소시키면서, 필터상에 검출 가능한 방사능이 남게되지 않을때까지 대조 필터를 세척한다. 사용된 SSC 농도의 최소값은 1×SSC이다.

필터를 공기중에서 건조시키고, -70℃에서2~3일간 노출시켜 라디오오토그래프를 작성한다. 32P-γ-ATP의 존재하에 키나제-처리 올리고누클레오티드 탐침을 이용하여 돌연변이된 10,000 M13-PDN42 플라크 및 돌연변이 되지 않은 100 대조 플라크를 선별한다. 돌연변이된 M13-PDN42 플라크 3~10개가 탐침에 하

이브리드되는 반면에 대조 플라크는 전혀 탐침에 하이브리드되지 않는다.

돌연변이된 M13-PDN42 플라크중 하나를 취하여 JM105배지에서 접종시킨다. 생성된 상층액에서 ssDNA를 제조하고, 세균 세포 펠릿으로부터 이중가닥 (dS)DNS를 제조한다. 적절한 올리고누클레오티드 프라이머 및 ssDNA를 이용하여 염기서열을 분석한다.

결과로서, GTC(Val-44) 코돈이 및 CGG(Arg-45)코돈이 각각 TCC(Ser) 코돈 및 CTG(Leu)코돈으로 변화된 것이 확인된다.

돌연변이된 M13-PDN42 파지중에서,코돈 Vsl-44 Arg-45 코돈이 각각 Ser-코딩 코돈 및 Leu- 코딩 코돈으로 변화된 파지를 M13-PINT로 명명한다. 그의 염기서열 및 그에 의해 코딩 아미노산 서열은 제 54 도에 나타나 있다.

(3) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB853의 제조 :

상기 (2)항에서 얻은 M13-PINT 복제형(RF)을 실시예 2(1)과 동일한 방법으로 처리하여 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB853를 제작한다.(제 55 도).

이 플라스미드 pTB853를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB853을 수득하는데, 이것은 제 54 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB853를 보유한다.

(4) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(5) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(4)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB853의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 42- 위치Asp, 44-위치 Val 및 45-위치 Arg이 각각 AsN, Ser 및 Leu에 의해 대치된 뮤테인 FINT가 얻어진다.

실시예 40

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB855의 제조 :

상기 참고예 2에서 얻은 플라스미드 pTB669의 DNA를 제한효소 HincⅡ로 절단하고, T4 DNA 라가제 반응하에 EcoR Ⅰ으로 절단하여 p(5'CATGAATTCATG3')와 연결시킨다. 이렇게 얻어진 DNA를 제한효소 EcoR Ⅰ 및 Pst Ⅰ으로 절단하여 약 0.35kb의 DNA단편을 회수한다. 이 DNA단편을 실시예 2(1)에서 얻는 약 3.2kb DNA단편(플라스미드 pTB781을 EcoR Ⅰ 및 Pst Ⅰ으로 절단하여 수득)과 연결시켜 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB855를 제작한다.(제 56 도).

이 플라스미드 pTB855를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB855을 수득하는데, 이것은 제 57 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드 pTB855를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라, 상기(2)에서 얻은 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성을 측정한다.

결과로서, 이 콜리 MM294/pTB855의 세균 세포 추출액은 FGF활성을 나타낸다.

이렇게 해서, 인간 bFGF의 2- 위치 Pro에서부터 41-위치 Val까지의 아미노산 서열이 결산된 뮤테인 N41이 얻어진다.

실시예 41

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 에스케리키아 콜리내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB856의 제조 :

상기 참고예 2에서 수득한 플라스미드 pTB669의 DNA를 제한효소 BamH Ⅰ으로부터 절단하여 bFGF 유전자내에 BamH Ⅰ 인지 부위를 생성시킨다.

부위를 dATP, dCTP, dGTP, dTTP의 존재하에 에스케리키아 콜리 DNA 폴리머라제 Ⅰ으로 블럭트 말단으로 만든다. 이 DNA를 T4 DNA 리가제 반응하에 Nhe Ⅰ링커 P(5'CTAGCTAGCTAG3')와 연결시킨다. 제한효소 Nhe Ⅰ로 처리한 후에 T4DNA리가제 반응하에 절단 부위를 연결시킴으로써 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB856의 제작한다(제 58 도).

이 플라스미드 pTB856를 이용하여 에스케리키아 콜리 MM294를 형질전환시켜 균주 에스케리키아 콜리 MM294/pTB856을 수득하는데, 이것은 제 59 도에 나타낸 뮤테인-코딩 유전자를 함유하는 플라스미드

pTB856를 보유한다.

(2) 세균 세포 추출액의 제조 :

상술한 형질전환체를 실시예 2(2)에 기재된 방법에 따라 배양하여 상층액을 수득하고, 이를 세균 세포 추출액으로 사용한다.

(3) 세균 세포 추출액의 인간 bFGF 활성 :

(3) 상기 (2)에서 얻은 세포 추출액을 실시예 35(3)에 기재된 방법대로 효소 면역 분석법(EIZ), 샌드위치법으로 평가한다.

결과로서, bFGF 뮤테인 세포 추출액내에 존재하는 것을 확인한다.

130- 위치의 Lys에서부터 147-위치의 Ser까지의 아미노산 서열이 결실된 뮤테인 C129를 얻는다.

실시예 42

(인간 bFGF 뮤테인을 코딩하는 유전자의 동물 세포내에서의 형질발현)

(1) 인간 bFGF 뮤테인 형질발현용 플라스미드 pTB831, pTB833 및 pTB835의 제작 :

상기 실시예 7에서 수득한 플라스미드 pTB762를 제한효소 EcorR Ⅰ-BamH Ⅰ으로 절단하여, 70-위치 및 88-위치의 Cys이 Ser으로 치환되어 있는 인간 bFGF 뮤테인 CS23을 코딩하는 코딩 영역을 함유하는 0.38㎏ DNA 단편을 수득한다.

한편, 플라스미드 pTB504[일본국 특허 공개 제 62-175182호의 실시예 1(ii), 대응 유럽 특허 공고 제 225, 701호]를 제한 효소 CIA Ⅰ- EcorR Ⅰ으로 절단함으로써 생쥐 백혈병 비루스(MuLV) LTR영역, SV40 얼리(early) 프로모터, 스플라이스 부위 및 인간 인터류킨- 2(il-2) 리더 서열을 포함하는 1.7kb DNA 단편을 수득한다.

덧붙여, 참고예 1에서 수득한 플라스미드 pTB627를 제한효소 EcorR Ⅰ-BamH Ⅰ으로 절단하여, 2kb DNA 단편을 수득하고, 플라스미드 pTB389를 제한효소 EcorR Ⅰ-BamH Ⅰ으로 절단하여, 2kb DNA 단편을 수득한다. 이렇게 얻어진 2kb DNA 단편과 연결시켜, 인간 bFGF 코딩하는 플라스미드 pTB675를 수득한다. 플라스미드 pTB106(일본국 특허 공개 제 61-63282호에 기재, 대응 유럽 특허 공고 제 172,619호)의 인터류킨-2 유전자 영역의 5'-말단영역의 Past Ⅰ -BamH Ⅰ으로 절단부위를 모두 EcorR Ⅰ으로 전환시켜 인터류킨-2유전자 영역을 제거함으로써 상기 플라스미드 pTB389를 수득한다. 플라스미드 pTB675를효소 CIA Ⅰ- EcorR Ⅰ으로 절단함으로써 인간 bFGF의 C-말단의 아미노산을 코딩하는 영역, 비코딩 영역, 플라스미드 pTB322에서 유래한 암피실린 내성 유전자 및 에스케리키아 콜리 내에서 복제 오리진을 포함하는 3.4kb DNA 단편을 수득한다.

T4 DNA 리가제를 이용하여 상기 세 DNA 단편(즉, 0.38kb DNA 단편, 1.76kb DNA 단편 및 3.4kb DNA 단편)을 연결시켜 플라스미드 pTB381의 수득한다(제 60 도).

비슷하게, 상기 방법에서 플라스미드 pTB762 대신에, 인간 bFGF 뮤테인 CS14(인간 bFGF의 26- 및 93- 위치의 Cys이 Ser에 의해 치환됨)을 코딩하는 실시예 18에서 수득한 플라스미드 pTB763 및 인간 bFGF 뮤테인 CS123(인간 bFGF의 26-, 70-, 88- 및 93- 위치의 Cys이 Ser에 의해 치환됨)을 코딩하는 실시예 11에서 수득한 플라스미드 pTB765를 이용함으로써 각각 플라스미드 pTB833 및 플라스미드 pTB835를 수득한다.

(2) 동물세포내에서의 형질발현 :

10% 태내 송아지 혈정을 함유하는 DMEM 배지가 들어 있는 직경 6㎝의 조직 배양 다시에 원숭이 COS7 세포를 접종하고, 24시간 후에 배지를 새것으로 바꾼다. 4시간후에, 인산칼슘법 [Graham et al. Virology, 52, 456(1973)]에 의해 플라스미드 pTB831, pTB833 또는 pTB835의 DNA 10㎍씩을 COS7 세포에 트랜스팩션시킨다. 다음날에 배지를 1% 태내 송아지 혈청-함유 DMEM 배지로 바꾼다. 48시간 동안 배양한 후에, 세포를 함유하는 배양 브로쓰를 수집하고 세포를 회수한다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 PBS에 현탁시킨다. 현탁액을 짧은 시간동안 초음파 처리한 후에, 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상 총액을 수득한다.

플라스미드로 감염시킨 COS7세포의 배양 브로쓰 및 세포추출액에 대하여, 실시예 2(3)에 기재된 방법에 따라 인간 bFGF 활성을 측정한다.

얻어진 결과를 표 7에 나타내었다.

[표 7]

플라스미드	뮤테인	FGF 활성(ng/디시)	
		배양 브로쓰	세포추출액
pTB831	CS23	115	420
pTB833	CS14	0.2	35
pTB835	CS1234	1.1	20
-		<0.02	1

(57) 청구의 범위

청구항 1

치환형 뮤테인 천연형 bFGF의 구성 아미노산 서열내 4개의 시스테인 잔기 중 하나 이상이 시스테인 이외의 다른 아미노산으로 치환되고, 그리고 결실형 뮤테인 bFGF의구성 아미노산 서열이 아미노말단으로 부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실되거나, bFGF의 구성 아미노산 서열의 카르복실 말단으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실되거나, 또는 bFGF의 구성 아미노산 서열의 아미노말단으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실 및 bFGF의 구성 아미노산 서열의 카르복실 말단으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실되는 것을 특징으로 하는 치환형 또는 치환 및 결실이 조합형인 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 천연형 bFGF가 그 분자내에 다음의 아미노산 서열을 포함을 특징으로 하는 뮤테인. Phe-Leu-Arg-He-His-Pro-Asp-Gly-Arg-Val-Asp-Gly-Val-Arg-Glu-Lys-Ser-Asp-Pro.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 새로이 도입되는 아미노산이 중성 아미노산임을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 4

제1항에 있어서, bFGF의 구성 아미노산 서열의 아미노 말단으로부터 1 내지 41개의 아미노산이 결실되는 것을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 5

제1항에 있어서, bFGF의 구성 아미노산 서열의 카르복실 말단으로부터 1 내지 61개의 아미노산이 결실되는 것을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 6

제3항에 있어서, 중성 아미노산의 특별한 예로는 글리신, 발린, 알라닌, 루이신, 이소루이신, 티로신, 페닐알리닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 7

제6항에 있어서, 중성 아미노산이 세린 또는 트레오닌인 을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 8

제7항에 있어서, 중성 아미노산이 세린인 것을 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 9

제8항에 있어서, 인간 bFGF의 70위치의 시트테인 잔기가 세린으로 치환되는 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 10

제8항에 있어서, 인간 bFGF의 88위치의 시트테인 잔기가 세린으로 치환되는 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 11

제8항에 있어서, 인간 bFGF의 70위치 및 88위치의 시트테인 잔기가 세린으로 치환되는 특징으로 하는 뮤테인.

청구항 12

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항 및 제6항 내지 제11항중 어느 한 항에 정의된 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA.

청구항 13

제12항에 있어서, 새로이 도입되는 아미노산이 글리신, 발린, 알라닌, 루이신, 이소루이신, 티로신, 페닐알리닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 중성 아미노산ㅇ니 재조합 DNA.

청구항 14

제13항에 있어서, 새로이 도입되는 아미노산이 세린인 것을 특징으로 하는 재조합 DNA.

청구항 15

제12항에 있어서, bFGF의 구성 아미노산 서열의 아미노말단으로부터 1 내지 41개의 아미노산이 결실되거나, 또는 카르복실 말단으로부터 1 내지 61개의 아미노산이 결실되는 것을 특징으로 하는 DNA.

청구항 16

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항 및 제6항 내지 제11항중 어느 한 항에 정의된 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 포함하는 벡터를 보유하는 형질전환체.

청구항 17

제16항에 있어서, 새로이 도입되는 아미노산이 글리신, 발린, 알라닌, 루이신, 이소루이신, 티로신, 페닐알리닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 중성 아미노산인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 18

제17항에 있어서, 새로이 도입되는 아미노산이 세린인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 19

제16항에 있어서, bFGF의 구성 아미노산 서열의 아미노말단으로부터 1 내지 41개의 아미노산이 결실되거나, 또는 카르복실 말단으로부터 1 내지 61개의 아미노산이 결실되는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 20

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항 및 제6항 내지 제11항중 어느 한 항에 정의된 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인을 코딩하는 염기서열을 갖는 재조합 DNA를 포함하는 벡터를 보유하는 형질전환체를 배지에서 배양 브로쓰내에 뮤테인을 생산 및 축적시킴을 특징으로 하는 염기성 섬유 아세포 성장 인자(bFGF)의 뮤테인의 제조방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 로이 도입되는 아미노산이 글리신, 발린, 알라닌, 루이신, 이소루이신, 티로신, 페닐알리닌, 히스티딘, 트립토판, 세린, 트레오닌 및 메티오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 중성 아미노산인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 새로이 도입되는 아미노산이 세린인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 23

제20항에 있어서, bFGF의 구성 아미노산 서열의 아미노말단으로부터 1 내지 41개의 아미노산이 결실되거나, 또는 카르복실 말단으로부터 1 내지 61개의 아미노산이 결실되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

도면

도면1

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp    20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC   60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg    40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA   120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu    60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG   180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp    80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT   240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu    100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA   300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys    120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA   360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe    140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT   420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                        147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                        444
```

도면2

```
                    Ser
(1)  5'-CGTTCTTGCTGTAGAGCCGCT-3'
                      (RsaI)

                       Ser
(2)  5'-AACGATTAGCGCTCACTCC-3'
                    HaeII

                  Ser
(3)  5'-GTAACAGACTTAGAAGCTAGT-3'
                         AluI

                      Ser
(4)  5'-TCGAAGAAGAAAGACTCATCC-3'
                     HinfI
```

도면3

```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp    20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC   60

ProLysArgLeuTyrSerLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg    40
CCCAAGCGGCTCTAGAGCAAGAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA   120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu    60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG   180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp    80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT   240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu    100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA   300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys    120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA   360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe    140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT   420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                        147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                        444
```