



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년04월27일
(11) 등록번호 10-0954641
(24) 등록일자 2010년04월16일

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7003708

(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년09월12일

심사청구일자 2007년06월05일

(85) 번역문제출일자 2004년03월12일

(65) 공개번호 10-2004-0041611

(43) 공개일자 2004년05월17일

(86) 국제출원번호 PCT/US2002/029015

(87) 국제공개번호 WO 2003/023030

국제공개일자 2003년03월20일

(30) 우선권주장

60/322,350 2001년09월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Science, 1997, vol 277, pp1453-1462.

US04865974 A1

전체 청구항 수 : 총 19 항

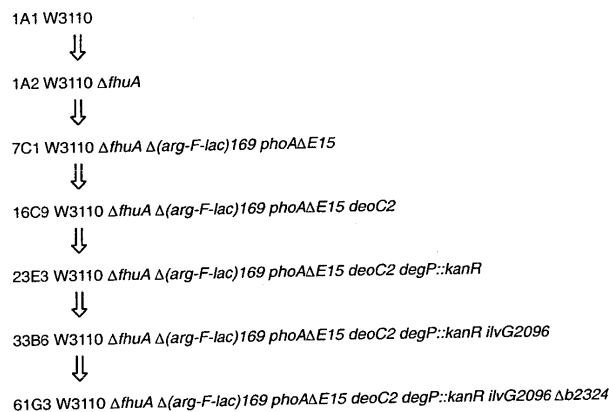
심사관 : 손영희

(54) 아미노펩티다아제

(57) 요약

본 발명은 야생형에 존재하는 염색체 유전자가 결핍되어 *yfcK* 유전자의 천연 서열에 대한 서열 동일성을 80% 이상 공유하고 아미노펩티다아제를 코딩하는 그람-음성 세균 세포에 대해 기재한다. 별법으로, 그람-음성 세균 세포는 야생형에 존재하는 염색체 유전자가 결핍되어, 그의 유전자가 아미노펩티다아제 b2324의 천연 서열에 대한 서열 동일성을 80% 이상 공유하는 아미노펩티다아제를 코딩한다. 이러한 유형의 세포 어느 것이라도, 이중 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 경우에는 N-말단이 절단되지 않은 폴리펩티드를 생성하고, 배양하여 폴리펩티드를 회수할 경우에는 실제로 N-말단이 절단된 폴리펩티드가 불순물로 생성되지 않는다. 또한, 본 발명은 폴리펩티드를 아미노펩티다아제 b2324의 천연 서열에 대한 서열 동일성을 80% 이상 공유하는 아미노펩티다아제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 폴리펩티드에서 N-말단 아미노산을 절단하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자 상보체의 서열을 가지며 아미노펩티다아제를 코딩하는 염색체 유전자가 결핍된 그램-음성 세균 세포.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 살모넬라(*Salmonella*) 또는 엔테로박테리아세아(*Enterobacteriaceae*)인 세포.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 이.콜리(*E.coli*)인 세포.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 프로테아제를 코딩하는 적어도 하나의 유전자가 결핍된 세포.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 천연-서열 *yfcK* 유전자가 결핍된 세포.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 세포에 이중인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 포유류 폴리펩티드인 세포.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 인간 폴리펩티드인 세포.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 인간 성장 호르몬인 세포.

청구항 12

(a) 제 8 항의 세포를 배양하고 (b) 상기 세포로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하는 이중 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 배양이 발효기에서 수행되며, 폴리펩티드가 주변세포질 또는 세포의 배양 배지로부터 회수되는 방법.

청구항 14

제 12 또는 13 항에 있어서, 상기 회수는 세포 파괴에 의해 용균물을 형성함으로써 이루어지며 여기에서 무손상 폴리펩티드가 상기 용균물로부터 정제되는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 용균물이 정제 단계 이전에 항온처리되는 방법.

청구항 16

핵산이 발현되도록 하는 조건 하에 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 제 1 항의 세포를 배양하는 것을 포함하는, 폴리펩티드로부터 아미노산 잔기의 N-말단 절단을 방지하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 세포로부터 회수되는 방법.

청구항 18

(a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) 상기 (a)의 DNA 분자 상보체를 갖는 핵산에 의해 코딩된 아미노펩티다아제와 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 제1항의 세포로부터 단리된 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산을 절단하는 방법.

청구항 19

서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324인 아미노펩티다아제와 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 제1항의 세포로부터 단리된 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산을 절단하는 방법.

청구항 20

제 18 또는 19 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 아미노펩티다아제와 함께 항온처리되는 방법.

청구항 21

제 18 또는 19 항에 있어서, 상기 폴리펩티드를 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324와 접촉시키는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규의 세균성 아미노펩티다아제의 발견에 관한 것이다. 더욱 특별하게는, 본 발명은 세균으로부터 그의 결실 또는 과발현이 재조합 폴리펩티드와 같은 박테리아에서 생성된 미절단 또는 절단된 폴리펩티드의 각각의 회수를 개선하는 중요한 효소 활성화에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 어떤 단백질은 세포 중 아미노펩티다아제의 존재로 인하여 이.콜리(*E.coli*)와 같은 고세균 및 그람-음성 박테리아에서 만들어지는 경우 그 N-말단 아미노산 잔기가 절단된다. 그 결과, 야생형 폴리펩티드에 밀접하게 관계된 불순물이 동시에 또는 연속되는 세포 용균 시에 생성물 정제 과정의 부분으로서 세포 배양물 내로 도입된다. 치료적으로 유용한 단백질이 제조되어야 할 경우 상기 불순물은 야생형 폴리펩티드로부터 제거되어야 한다. 한 예는 인간 성장 호르몬(hGH)이고, 이는 이.콜리에서 제조될 경우 N-말단 페닐알라닌 잔기가 절단되어 있다. 세포 용균 시 생성되어 절단되지 않은 hGH(천연 hGH)를 갖는 혼합물을 형성하는 상기 변형된 형태의 hGH(des-phe hGH)는 상기 혼합물로부터 제거되기 어렵다. 이러한 제거는 혼합물이 소수성 상호작용 크로마토그래피되어야 할 필요가 있다. 이러한 가외의 정제 단계를 피하는 것이 바람직할 것이다.

[0003] 또한 어떤 경우에는 N-말단 아미노산 잔기가 절단된 폴리펩티드를 수득하고 천연-서열 대응물에 대하여 이러한 폴리펩티드의 양을 증강시켜 보다 순수한 절단된 물질을 수득하는 것이 바람직하다.

[0004] 공지의 이.콜리 아미노펩티다아제의 몇 가지는 넓은 특이성을 가지며 N-말단에서 다양한 잔기를 절단할 수 있는데, 예를 들면 *pepA*, *pepB* 및 *pepN*이다[*Escherichia coli* and *Salmonella*, Frederick C. Neidhardt (Ed), ASM Press. Chapter 62 by Charles Miller-Protein Degradation and Proteolytic Modification, pp 938-954 (1996); Gonzales and Robert-Baudouy, *FEMS Microbiology Reviews*, 18 (4): 319-44 (1996)]. 이.콜리의 K12 균주에서 발견된 b2324를 코딩하는 유전자 *yfcK*는 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 중 (수납 번호 AE000321) 이.콜리 게놈 서열 프로젝트(Blattner 등, *Science*, 277: 1453-62 (1997))에 의해 "추정 펩티다아제(putative

peptidase)"로서 열거되었지만, 그 효소 활성화에 대한 더 이상의 정보는 제공되지 않고 있다. 이.콜리 균주 0157:H7 중 상동물은 K12 균주 중 *yfcK* 유전자와 동일하다. 당 분야에서는 보다 순수한 미절단 또는 절단 폴리펩티드를 수득하기 위해 처리될 수 있는 세균성 아미노펩티다아제를 동정할 것이 요구된다.

[0005] 발명의 요약

[0006] *yfcK*에 의해 코딩된 효소 b2324는 이제 아미노펩티다아제로서, 즉 폴리펩티드로부터 N-말단을 절단하는 역할을 하는 효소로서 동정되었다. 그 동정에 입각하여 본 발명이 청구된 바와 같다.

[0007] 한 실시양태에서, 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 *yfcK* 유전자를 포함하는, 상기 효소에 상동인 아미노펩티다아제를 코딩하는 유전자를, 염색체의 유전자 파괴에 의해서와 같이 그램-음성 세균성 균주으로부터 제거하여, 절단된 불순물이 더 이상 임의의 실질적인 정도로 생성되지 않도록 한다. 따라서 절단된 불순물을 제거하기 위한 추가의 정제 단계가 생략된다. 적어도 하나의 수득되는 균주는 모 균주에 동량인 미절단 폴리펩티드를 생성하는 것으로 밝혀졌다.

[0008] 구체적으로, (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자 상보체에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 가지며, 아미노펩티다아제를 코딩하는, 염색체 유전자가 결핍된 그램-음성 세균 세포가 제공된다. 상기 세포에 대한 천연 유래의 동등물은 염색체 유전자를 함유하지만, 본 발명의 세포들은 일반적으로 유전자 수단을 통하여 야생형 세포에 대한 처리를 나타내지만 이러한 유전자가 아미노펩티다아제를 코딩하지 않도록 어떤 식으로든 제거하거나 무력화하도록 이용되지는 않는다.

[0009] 그렇지 않으면, 본 발명은 (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열과 비교할 때 적어도 80% 양성을 기록하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA, 또는 (b) (a)의 DNA 상보체를 포함하는 염색체 유전자가 결핍된 그램-음성 세균 세포를 제공하며, 상기 폴리펩티드는 아미노펩티다아제이다.

[0010] 또다른 선택으로, 본 발명은 서열 1의 1 부터 2067까지의 뉴클레오티드 서열을 갖는 천연-서열 *yfcK* 유전자에 대하여 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 염색체 유전자가 결핍된 그램-음성 세균 세포를 제공한다.

[0011] 또다른 실시양태에서는, 염색체 천연-서열 *yfcK* 유전자가 결핍된 이.콜리가 제공된다.

[0012] 바람직하게는, 전술한 바와 같은 그러한 세포는 예를 들면 *degP* 또는 *fhuA*와 같은 프로테아제를 코딩하는 적어도 하나의 유전자가 결핍된다. 또한, 이러한 세포는 세포, 바람직하게는 진핵세포, 더욱 바람직하게는 포유류, 및 가장 바람직하게는 인간 성장 호르몬과 같은 인간 세포에 대하여 이중인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0013] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 전술한 세포를 배양하고 (b) 상기 세포로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하는 이중 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 배양은 발효기에서 수행한다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 주변세포질(periplasm) 또는 세포의 배양 배지로부터 회수된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 상기 회수는 세포 파괴에 의해 용균물을 형성함으로써 되며, 바람직하게는 무손상 폴리펩티드가 상기 용균물로부터 정제된다. 더욱 바람직한 것은 상기 용균물이 정제 단계 이전에 항온처리되는 경우이다.

[0014] 또다른 국면에서, 본 발명은 핵산이 발현되도록 하는 조건 하에 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 전술한 세포를 배양하는 것을 포함하는, 폴리펩티드로부터 아미노산 잔기의 N-말단 절단을 방지하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드가 상기 세포로부터 회수된다. 또한, 바람직하게는 폴리펩티드는 상기 세포에 이중이며, 더욱 바람직하게는 진핵 세포, 더욱 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간의 것이다. 상기 세포는 바람직하게는 이.콜리 세포이다.

[0015] 또다른 국면에서, 본 발명은 (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자 상보체에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된 아미노펩티다아제와 상기 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포로부터 단리된 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산을 절단하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 아미노펩티다아제와 함께 항온처리된다.

[0016] 그렇지 않으면, 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324에 대하여 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노펩티다아제와 상기 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 세

포로부터 단리된 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산을 절단하는 방법이 제공된다.

- [0017] 구체적국면에서, 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324와 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산의 절단 방법이 제공된다.
- [0018] 또다른 실시양태에서, 절단된 폴리펩티드의 제조 방법은 (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자 상보체에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 가지며 아미노펩티다아제를 코딩하는 핵산을 수용하는 그램-음성 세균 세포를 배양하는 것을 포함하며, 상기 세포는 그 N-말단에 부가된 아미노산을 갖는 상응하는 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하며, 상기 배양은 유전자를 발현 또는 과발현시키고 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현시키기 위한 조건 하에 이루어지며, 상기 미절단 폴리펩티드 및 아미노펩티다아제가 발현 후 접촉하지 않는 경우에는 상기 미절단 폴리펩티드를 아미노펩티다아제와 접촉시켜 절단된 폴리펩티드를 생성한다. 바람직한 국면에서, 상기 폴리펩티드는 세포에 대하여 이중이며, 더욱 바람직하게는 진핵세포, 더더욱 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간의 것이다.
- [0019] 또다른 국면에서, 본 발명은 서열 1의 1 부터 2067까지의 뉴클레오티드 서열을 갖는 천연-서열 *yfcK* 유전자에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 가지며 아미노펩티다아제를 코딩하는 핵산을 수용하는 그램-음성 세균 세포를 배양하는 것을 포함하는 절단된 폴리펩티드의 제조 방법을 제공하며, 상기 세포는 그 N-말단에 부가된 아미노산을 갖는 상응하는 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하고, 여기에서 상기 배양은 상기 유전자를 발현 또는 과발현시키고 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현시키기 위한 조건 하에 이루어지며, 상기 미절단 폴리펩티드 및 아미노펩티다아제가 발현 후 접촉하지 않는 경우에는 상기 미절단 폴리펩티드를 아미노펩티다아제와 접촉시켜 절단된 폴리펩티드를 생성한다.
- [0020] 또다른 국면에서, 본 발명은 천연-서열 *yfcK* 유전자를 수용하며 그 N-말단에 부가된 아미노산을 갖는 상응하는 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 이.콜리 세포를 배양하는 것을 포함하는 절단된 폴리펩티드의 제조 방법을 제공하며, 여기에서 상기 배양은 상기 *yfcK* 유전자를 발현 또는 과발현시키고 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현시키기 위한 조건 하에 이루어지며, 상기 미절단 폴리펩티드 및 상기 *yfcK* 유전자에 의해 코딩되는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324가 발현 후 접촉하지 않는 경우에는, 상기 미절단 폴리펩티드를 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324와 접촉시켜 절단된 폴리펩티드를 생성한다.
- [0021] 절단된 폴리펩티드를 제조하기 위한 상기 방법에서, 바람직한 국면은 세포에 프로테아제를 코딩하는 적어도 하나의 유전자가 결핍되어 있는 것을 포함하고/또는 배양 조건이 *yfcK* 유전자(천연-서열 및 상동물)가 과발현되도록 하는 것이고/또는 상기 접촉이 항온처리에 의한 것을 포함한다. *yfcK* 유전자(천연-서열 및 상동물)은 세균 세포에 대하여 천연의 것이거나 상기 세균 세포에 도입될 수 있다. 배양은 바람직하게는 발효기에서 수행한다. 미절단 폴리펩티드는 바람직하게는 아미노펩티다아제와 접촉하기 전에 세포로부터 회수되며, 여기에서 회수는 세균주위 또는 세포의 배양 배지로부터 또는 세포 파괴에 의하여 그로부터 바람직하게는 절단된 폴리펩티드가 정제되는 용균물을 형성할 수 있다. 또한 상기 용균물은 정제 단계 이전에 항온처리될 수 있다. 바람직하게는 상기 용균물은 적어도 약 1 시간, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 50 시간 동안, 약 20 내지 40℃, 더욱 바람직하게는 약 30 내지 40℃에서 항온처리된다.

실시예

- [0116] 실시예 1
- [0117] 물질 및 방법
- [0118] DNA 서열은 게놈 서열 프로젝트에 의해 동정된 b2324를 코딩하는 *yfcK* 유전자의 PCR-증폭된 상류 및 하류였다 (Blattner 등, *supra*로부터 결과된 진뱅크 목록). 다음, 이들 융합된 서열을 P1 형질도입에 의해 W3110 균주의 염색체 상에 재조합하고 결실에 관해 PCR로 스크리닝하여(Mctcalf 등, *Gene*, 138: 1-7 (1994)) 균주 61G3을 생성하였고, 이는 유전자형 W3110 $\Delta fhuA \Delta (arg-F-lac)169 phoA \Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096 \Delta yfcK$ 이다.
- [0119] 구체적으로, 상기 균주는 P1으로부터 유래된 파지 Plkc와의 형질도입을 수반하는 기술 (J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972) 및 트랜스포손 유전학(Kleckner 등, *J. Mol. Biol.*, 116: 125-159 (1977))을 이용하여 몇가지 단계로 구성되었다. 사용된 출발 숙주는 F-람다-인 K-12 균주인 이.콜리 K-12 W3110이었다(Bachmann, *Bact. Rev.*, 36: 525-557 (1972); Bachmann, "Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of Escherichia coli K-12," p. 1190-

1219, in F. C. Neidhardt 등, Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, vol.2, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987). 계놈 내에 *tonA (fhuA)* 돌연변이를 도입하는 것은 1994년 4월 19일자로 부여된 미국 특허 제 5,304,472 호에 상세히 기재되어 있다. *ilv* 유전자에 *Tn10*을 삽입하는 것은 P1 형질도입에 의해 도입되었다. 이소로이신/발린 영양요구성은 *ilvG2096^R* 돌연변이를 담지하는 균주 상에서 성장한 P1 파지를 이용하여 원형으로 형질도입되었고(Lawther 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 922-925 (1981)), 이는 야생형 이.콜리 K-12를 발린에 민감하도록 하는 프레임시프트를 보수한다. *degP41 kan^r* 돌연변이가 미국 특허 제 5,304,472 호에 기재되었다. *ilvG2096R* 유전자좌는 40 µg/mL 발린(0.3 mM)에 대한 33B6 숙주의 내성에 의해 확인될 수 있다. 두 결실 돌연변이, *phoAΔE15* 및 *Δ(argF-lac)169*가 미국 특허 제 5,304,472 호에 기재되어 있다. *deoC2* 돌연변이는 문헌[Mark 등, Mol. Gen. Genet., 155: 145-152 (1977)]에 기재되어 있다. 균주 61G3의 완전한 기원은 도 1에 나타낸다.

[0120] 다음, 상기 균주를 진탕-플라스크 및 10-L 발효에서 hGH(N-말단 페닐알라닌을 갖는)를 발현 및 분리하는 hGH4R로 표시된 발현 플라스미드로 변형시켰다. phGH4R의 구조는 문헌[Chang 등, Gene, 55: 189-196 (1987)]에 상세히 기재되어 있다. 상기 변형은 균주 JJGH1의 결과를 가져왔다. 세포를 문헌[Andersen 등, Biotechnology and Bioengineering, 75(2), 212-218 (2001)]에 기재된 바와 같이 배양하였다. hGH가 생성된 후 세포를 초음파처리하여 조 용균물을 제조하고, 상기 용균물을 37°C에서 0 내지 24 시간 동안 및 실온에서 0 내지 42 시간 동안 항온처리하였다. 보다 높은 온도의 사용은 분석 법에 의해 des-phe 및 des-phe-pro hGH를 검출하는 능력을 향상시키기 위함이지만, hGH의 정제를 위해서는 바람직하지 않다. 일반적으로 hGH 정제는 상기 절단된 형태의 양을 축적하게 하도록 차갑게 수행된다.

[0121] phGH4R로 변형된 모 균주(유전자형 W3110 *Δarg-F-lac)169 phoAΔE15 deoC2 16C9*)를 대조로 사용하여 같은 실험을 수행하였다. 61G3 균주에서 *degP* 및 *ilvG* 돌연변이는 아미노펩티다아제 활성에 영향을 미치지 않으므로 상기 균주는 이 목적에 적합하였다.

[0122] 다음, 대조 및 실험 시료를 원심분리하여 미립자를 제거하고, 용해성 상을 LC-MS)액체 크로마토그래피, 질량 스펙트럼 분석)으로 분석하였다. hGH의 무손상, des-phe, 및 des-phe-pro 형태에 대한 질량을 모니터링하였다.

[0123] **결과**

[0124] 도 2 및 4는 대조 균주(16C9/phGH4R)와 함께 실온 및 37°C의 경우의 결과를 각각 나타내고, 도 3 및 5는 아미노펩티다아제가 녹아웃(knock out)된 JJGH1으로 실온 및 37°C 항온 처리된 경우의 결과를 각각 나타낸다. 네 도면의 실제 숫자는 하기 표 1에 나타낸다(Temp=37°C 및 Temp=RT 열). 37°C에서 15 시간 동안 항온 처리 후 페닐알라닌-절단된 불순물이 실제로 존재하지 않음이 발견될 수 있었고, 항온처리를 하지 않은 경우에도 불순물의 양의 감소가 있었다. 실온 항온처리의 경우에 조차, N-말단 페닐알라닌이 없는 돌연변이 폴리펩티드의 양이 항온처리의 모든 시간에 걸쳐 대조에 비하여 JJGH1 세포의 경우에 감소된다. 무손상 폴리펩티드의 정제는 통상의 또는 공지의 크로마토그래피 방법에 의해 쉽게 수행될 수 있다.

표 1

온도 = 37°C							
시료	시간	면적			면적 %		
		des-phe	천연	des-phe-pro	des-phe	천연	des-phe-pro
대조	0	16159.80	4486460.00	19642.70	0.36	99.21	0.43
JJGH1	0	11927.90	3376380.00	7637.14	0.35	99.42	0.22
대조	15	14372.30	1097210.00	976760.00	46.77	52.53	0.69
JJGH1	15	27163.70	2674010.00	16357.80	1.00	98.40	0.60
대조	24	1058950.00	839418.00	17580.50	55.27	43.81	0.92
JJGH1	24	29409.90	2306690.00	11999.30	1.25	98.23	0.51
온도 = RT							
시료	시간	면적			면적 %		
		des-phe	천연	des-phe-pro	des-phe	천연	des-phe-pro
대조	0	16159.80	4486460.00	19642.70	0.36	99.21	0.43
JJGH1	0	11927.90	3376380.00	7637.14	0.35	99.42	0.22
대조	15	46158.20	364234.00	7950.57	1.24	98.53	0.21
JJGH1	15	183740.00	19431400.00	39130.00	0.94	99.06	0.20
대조	24	100774.00	4561070.00	19501.10	2.15	97.43	0.42
JJGH1	24	160737.00	19711600.00	98221.60	0.80	98.70	0.49
대조	42	122177.00	3933770.00	19246.40	3.00	96.53	0.47
JJGH1	42	213143.00	18242500.00	91090.90	1.15	98.36	0.49

상기 결과는 $\Delta yfcK$ 균주가 폴리펩티드의 N-말단 절단을 방지하기 위해 사용될 수 있음을 보여준다.

도면의 간단한 설명

도 1은 $yfcK(b2324)$ 를 코딩하는)에 대하여 결실된 숙주 균주인 이.콜리 세포 61G3의 기원을 나타내는 도이다.

도 2는 상이한 명암으로 나타낸 양의 천연 hGH, des-페닐알라닌 hGH, 및 des-페닐알라닌-프롤린 hGH를 이용하여 0, 15, 24 및 42 시간 동안 실온에서 항온처리된 rhGH 추출 대조 균주 16C9의 백분율 면적(액체 크로마토그래피/질량 스펙트럼; LC/MS)의 막대 그래프를 나타낸다.

도 3은 상이한 명암으로 나타낸 양의 천연 hGH, des-페닐알라닌 hGH, 및 des-페닐알라닌-프롤린 hGH를 이용하여 0, 15, 24 및 42 시간 동안 실온에서 항온처리된 결실된 유전자를 갖는 rhGH 균주 61G3의 백분율 면적(LC/MS)의 막대 그래프를 나타낸다.

도 4는 상이한 명암으로 나타낸 양의 천연 hGH, des-페닐알라닌 hGH, 및 des-페닐알라닌-프롤린 hGH를 이용하여 0, 15 및 24 시간 동안 37°C에서 항온처리된 rhGH 추출 대조 균주 16C9의 백분율 면적(액체 크로마토그래피/질량 스펙트럼; LC/MS)의 막대 그래프를 나타낸다.

도 5는 상이한 명암으로 나타낸 양의 천연 hGH, des-페닐알라닌 hGH, 및 des-페닐알라닌-프롤린 hGH를 이용하여 0, 15 및 24 시간 동안 37°C에서 항온처리된 결실된 유전자를 갖는 rhGH 균주 16G3의 백분율 면적(LC/MS)의 막대 그래프를 나타낸다.

바람직한 실시양태의 상세한 설명

정의

여기에서 사용된 "세포", "세포주", "균주" 및 "세포 배양물"이라는 표현은 상호교환가능하게 사용되며 이러한 표현 모두는 다음 세대(progeny)를 포함한다. 따라서, "변형물" 및 "변형된 세포"라는 말은 일차적 대상 세포 및 전이의 수에 관계 없이 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 모든 다음 세대는 DNA 함량에 있어서 계획된 또는 우연의 돌연변이로 인하여 정밀하게 동일하지 않아도 됨이 이해된다. 본래의 변형된 세포에 대하여 스크린된 것과 같은 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 다음 세대가 포함된다. 구분되는 표시가 의도 되는 경우, 이는 문맥으로부터 명백할 것이다.

여기에서 목적하는 "세균"은 그람-음성 세균이다. 세균의 하나의 바람직한 종류는 엔테로박테리아세에(Enterobacteriaceae)이다. 엔테로박테리아세에에 속하는 세균의 예로서, 에스케리키아(Escherichia), 엔테로박터(Enterobacter), 에르비니아(Erwinia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 세라티아(Serratia) 및 시겔라(Shigella)를 들 수 있다. 적절한 세균의 다른 종류로서, 아조토박터(Azotobacter), 슈도모나스(Pseudomonas), 리조비아(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 및 파라코커스(Paracoccus)를 들 수 있다. 적절한 이.콜리 숙주로서 이.콜리 W3110 (ATCC 27,325), 이.콜리 294 (ATCC

31,446), 이.콜리 B, 및 이.콜리 X1776 (ATCC 31,537)을 들 수 있다. 상기 예들은 한정하기 보다는 예시적인 것이며, W3110이 바람직하다. 상기-언급된 세균 중 임의의 것의 돌연변이 세포가 사용될 수도 있다. 물론, 세균의 세포 내에서 레플리콘의 복제를 고려하여 적절한 세균을 선택할 필요가 있다. 상기 레플리콘을 지지하기 위해 pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 공지의 플라스미드가 사용되는 경우, 예를 들면 이.콜리, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적절히 사용될 수 있다.

[0031] "염색체 *yfcK* 유전자"란 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 중 (수납 번호 AE000321) 이.콜리 게놈 서열 프로젝트 (Blattner et al., *supra*)에 의해 "추정 펩티다아제(putative peptidase)"로서 열거된 단백질 b2324를 코딩하는 유전자를 의미한다. 상기 단백질은 데이호프(Dayhoff) 수탁 번호 B65005 및 스위스프룻(SwissProt) 수탁 번호 P77182를 가지며, 상기 유전자는 52.59'에서 이.콜리 염색체 상에 위치하며 그 염기쌍 위치 = 좌단: 2439784 bp 우단: 2441790 bp이다. 그 유전자 서열은

```

TTGCGCAGCCTTACACATCGCTAAGATCGAGCCACCGCCTGTAAGACGAGTAACCTTAC
GTGAAACACTACTCCATACAACCTGCCAACCTCGAATTTAATGCTGAGGGTACACCTGTT
TCCCCGAGATTTTGACGATGTCTATTTTCCAACGATAACGGGCTGGAAGAGACGCGTTAT
GTTTTTCTGGGAGGCAACCAATTAGAGGTACGCTTTCCTGAGCATCCACATCCTCTGTTT
GTGGTAGCAGAGAGCGGCTTCGGCACCGGATTAACTTCCTGACGCTATGGCAGGCATT
GATCAGTTTTCGGAAGCGCATCCGCAAGCGCAATTACAACGCTTACATTTCAATTAGTTTT
GAGAAATTTCCCTCACCCGTGCGGATTTAGCCTTAGCGCATCAACACTGGCCGGAACGTG
GCTCCGTGGGCAGAACAACTTCAGGCGCAGTGGCCAATGCCCTTGCCCGGTTGCCATCGT
TTATTGCTCGATGAAGGCCGCGTGACGCTGGATTTATGGTTTGGCGATATTAACGAACTG
ACCAGCCAACTGGACGATTTCGCTAAATCAAAAAGTAGATGCCTGGTTTCTGGACGGCTTT
GCGCCAGCGAAAAACCCGATATGTGGACGCAAAATCTGTTTAAACGCCATGGCAAGGTTG
GCGCGTCCGGCGGCACGCTGGCGACATTTACGCTCGCCGTTTTGTCCGCGCGGTTTTG
CAGGACGCCGGATTACGATGCAAAAACGTAAGGGCTTTGGGCGCAAACGGGAAATGCTT
TGCGGGGTGATGGAACAGACATTACCGCTCCCTGCTCCGCGCGGTGGTTTAAACGCACG
GGCAGCAGCAAAACGGGAAGCGCGGATTATCGGCGGTGGTATTGCCAGCGCGTTGTTGTCG
CTGGCGCTATTACGGCGCGGCTGGCAGGTAAACGCTTTATTGCGCGGATGAGGCCCGCA
CTGGGTGCTTCCGCAATCGCCAGGGGGCGCTGTATCCGTTATTAAGCAAAACACGATGAG
GCGCTAAACCGCTTTTCTCTAATGCGTTTACTTTTGCTCGTCGGTTTTACGACCAATTA
CCCGTTAAATTTGATCATGACTGGTGCGGCGTCACGCAGTTAGGCTGGGATGAGAAAAGC
CAGCATAAAATCGCACAGATGTTGTCAATGGATTTACCCGCAGAACTGGCTGTAGCCGTT
GAGGCAAATGCGGTTGAACAAATTACGGGCGTTGCGCAAAATGCGAGCGGCATTACTTAT
CCGCAAGGTGGTTGGCTGTGCCACGAGAACTGACCCGTAATGTGCTGGAACCTGGCGCAA
CAGCAGGGTTGCGAGATTTATTATCAATATCAGTTACAGAAATTTATCCCGTAAGGATGAC
TGTGTTGTTGTTGAATTTTGACAGGAGATCAGCAAGCAACACACAGCGTAGTGGTACTGGCG
AACGGGCATCAAATCAGCCGATTACGCCAAACGTCGACTCTCCCGGTGTATTCGGTTGCC
GGGCAGGTACGCCATATTCGACAAACGCCGGAATTGGCAGAGCTGAAAGCAGGTGCTGTGC
TATGACGGTTATCTACGCCACAAAATCCGGCGAATCAACATCATTGTATTGGTGCCAGT
TATCATCGCGGCAGCGAAGATACGGCGTACAGTGAGGACGATCAGCAGCAGAAATCGCCAGCGG
TTGATTGATTGTTTCCCGCAGGCACAGTGGGCAAAAGAGGTTGATGTCAGTGATAAGAGGCGC
GCTGCGGTGTGCGTTGTGCCACCCGCGATCATCTGCCAATGGTAGGCAATGTTCCCGATTATGA
GGCAACACTCGTGGAATATGCGTCGTTGGCGGAGCAGAAAGATGAGGCGGTAAGCGCGCCGGT
TTTTGACGATCTCTTATGTTTGGCGCTTTAGGTTCTCGCGGTTTG
TGTTCTGCCCCGCTGTGTGCCGAGATTCTGGCGGCGCAGATGAGCGACGAACCGATTCCG
ATGGATGCCAGTACGCTGGCGGCGTTAAACCCGAATCGGTTATGGGTGCGGAAATGTTG
AAGGGTAAAGCGGTTAAGCGGGGTAA (서열 1);

```

[0032]

[0033] 이고, 그에 의해 코딩된 단백질은 다음과 같은 서열을 갖는다:

```
MRSLTTHIAKIEPPPPVRRVTYVKHYSIQPANLEFNAEGTPVSRDFFDVYFSNDNGLEETRYVFLGGNQ
LEVRFPPEHPHPLFVVAESGFGTGLNFLTQAFDQFREAHPQAQLQRLHFISFEKFLPLTRADLALAH
QHWPELAPWAEQLQAQWPMPLPGCHRLLLDEGRVTLDLWFGDINELTSQLDDSLNQKVDWFLD
GFAPAKNPDMWTQNLFNAMARLARPGGTATFTSAGFVRRLQDAGFTMQKRKGFGRKREMLCG
VMEQTLPLPCSAWPNRTGSSKREAAIIGGGIASALLSLALLRRGWQVTLYCADEAPALGASGNRQG
ALYPLLSKHDEALNRFFSNAFTFARRFYDQLPVKFDHWDWCGVTQLGWDEKSQHKIAQMLSMDLPA
ELAVAVEANAVEQITGVATNCSGITYPQGGWLCPAELTRNVLELAQQQGLQIYYQYQLQNLRSKDD
CWLLNFAGDQQATHSVVVLANGHQISRFSQTSTLPVYSVAGQVSHIPTTPELAELKQVLCYDGYLTP
QNPNQHHHCIGASYHRGSEDTAYSEDDQQNRQLIDCFPQAQWAKEVDVSDKEARCGVRCATRD
HLPVMGVNPDYEATLVEYASLAEQKDEAVSAPVFDLDMFAALGSRGLCSAPLCAEILAAQMSDEP
IPMDASTLAALNPRLWVRKLLKGA VKAG (서열 2).
```

[0034]

[0035] 유전자 또는 핵산이 "결핍"되었다는 것은 그 세포에서 문제의 유전자가 결실되거나 비활성화되거나 무력화되어 그것이 코딩하는 단백질을 생성할 수 없는 것을 의미한다. 예를 들면, b2324를 코딩하는 염색체 *yfcK* 유전자가 결핍된 세포는 배양 시 그 유전자의 산물을 생성하지 않는다. 유사하게, 프로테아제를 코딩하는 유전자가 결핍된 세포는 배양 시 그 특정 프로테아제를 생성하지 않는다.

[0036]

여기에서 사용된 "폴리펩티드"는 약 10 개가 넘는 아미노산을 갖는 임의의 세포 근원으로부터의 펩티드 및 단백질을 일반적으로 의미한다. "이중" 폴리펩티드는, 이.콜리에 의해 생성된 인간 단백질과 같이, 사용되는 숙주 세포에 이중인 폴리펩티드이다. 이중 폴리펩티드는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있지만 바람직하게는 진핵세포, 더욱 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 인간의 것이다.

[0037]

포유류 폴리펩티드의 예로서 예를 들면 레닌, 인간 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬과 같은 분자; 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 1-안티트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 트롬보포이에틴; 난포 자극 호르몬; 칼시토닌; 루테인화 호르몬; 글루카곤; 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트(von Willebrands) 인자와 같은 응혈 인자; 단백질 C와 같은 항-응혈 인자; 심방 나트리에틱(natrietic) 인자; 폐 계면활성제; 유로키나아제 또는 인간 소변 또는 조직-형 플라스미노겐 활성화제(t-PA)와 같은 플라스미노겐 활성화제; 봄베신(bombesin); 트롬빈; 해포포이에틴 성장 인자; 중앙 피사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나아제; 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민; 물레리안-저해 물질; 틸렉신 A-사슬; 틸렉신 B-사슬; 프로틸렉신; 생쥐 고나도트로핀-관련 펩티드; 베타-락타마아제와 같은 미생물 단백질; DNase; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자를 위한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류머티즘성 인자; 뇌-유래 뉴로트로픽 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 NGF와 같은 신경 성장 인자 등의 뉴로트로픽 인자; 카디오트로핀-1(CT-1)과 같은 카디오트로핀 (심장 비대 인자); 혈소관 유래 성장 인자(PDGF); aFGF 및 bFGF와 같은 섬유아세포 성장 인자; 상피 성장 인자(EGF); TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 또는 TGF-5를 포함하는 TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 변형 성장 인자(TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); 테스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19와 같은 CD 단백질; 에리트로포이에틴; 골격-유도 인자; 면역독소; 골격 형태형성 단백질(BMP); 인터페론-알파, -베타 및 -감마와 같은 인터페론; 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 소 혈청 알부민(BSA)와 같은 혈청 알부민; 예를 들면 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF와 같은 콜로니 자극 인자 (CSFs); 예를 들면 IL-1 내지 IL-10과 같은 인터류킨(ILs); 항-HER-2 항체; 과산화물 디스무타아제(superoxide dismutase); T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 부식 가속화 인자; 예를 들면 AIDS 외피의 부분과 같은 바이러스성 항원; 이송 단백질; 회귀(homing) 수용체; 에드레신; 조절 단백질; 항체; 및 상기-나열된 폴리펩티드 중 임의의 것의 단편을 들 수 있다. 관심있는 하나의 바람직한 폴리펩티드 군은 hGH와 같이 N-말단 페닐알라닌을 갖는 것들이다. 관심있는 또다른 바람직한 폴리펩티드 군은 hGH와 같이 세균의 주변세포질 또는 세포 배양 배지에서 생성된 것들이다.

[0038]

"대조 서열"이라는 표현은 특정 숙주 미생물 중 작동적으로 결합된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 세균에 적합한 대조 서열은 촉진제, 선택적으로 작동 유전자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다.

[0039]

핵산은 그것이 다른 핵산 서열과의 기능적 관계로 위치될 경우 "작동적으로 결합"된다. 예를 들면, 예비서열 또는 분비성 선구체는 그것이 폴리펩티드의 분비에 관여하는 예비단백질로서 발현되는 경우 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동적으로 결합되거나; 촉진제는 상기 서열의 전사에 영향을 주는 경우에 코딩 서열에 작동적으로 결합되거나; 리보솜 결합 부위는 그것이 번역을 촉진하기 위해 위치할 경우 코딩 서열에 작동적으로 결합된다. 일반적으로, "작동적으로 결합된"이라는 것은 결합되는 DNA 서열이 인접하고, 분비성 선구체의 경우 인접하고 판

독 상(reading phase)에 있음을 의미한다. 결합은 예를 들면 편리한 제한 부위에서의 결합에 의해 이루어진다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 통상의 실시예 준하여 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 결합제(linker)가 사용된다.

[0040] 유전자 또는 핵산에 관련하여 "과발현"이라는 용어는 예를 들면 촉진제에 의한 합성의 인공적인 유도가 없는 경우 세포에 의해 통상적으로 생성되는 것보다 많은 양으로 특정 단백질을 합성하는 것을 의미한다.

[0041] 폴리펩티드의 "회수"라는 용어는 그것이 생성되는 세포로부터 유리된 폴리펩티드를 수득하는 것을 일반적으로 의미한다.

[0042] 여기에서 사용된 "아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드", "아미노펩티다아제 b2324 단백질" 및 "아미노펩티다아제 b2324"라는 용어는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324 및 아미노펩티다아제 b2324 상동물(이는 추후 정의됨)을 포함한다. 문맥에 따라서, 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티다아제는, 세균 세포와 같은 다양한 원천으로부터 단리되거나 재조합 및/또는 합성법에 의해 제조될 수 있다.

[0043] "천연-서열 아미노펩티다아제 b2324"는 천연에서 유래된 아미노펩티다아제 b2324와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 그러한 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324는 자연으로부터 단리될 수도 있고 또는 재조합 및/또는 합성 방법에 의해 생성될 수 있다. "천연-서열 아미노펩티다아제 b2324"라는 용어는 천연에서 나타나는 절단되거나 분비된 형태(예, 세포의 영역 서열), 천연에서 나타나는 변형된 형태(예, 그렇지 않으면 접합된 형태) 및 천연에서 나타나는 아미노펩티다아제 b2324의 대립 유전자 변형을 특이적으로 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324는 서열 2의 1부터 688까지의 아미노산을 포함하는 성숙된 또는 완전한-길이의 천연 서열 아미노펩티다아제 b2324이다.

[0044] "아미노펩티다아제 b2324 상동물"은 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드의 잔기 1부터 688의 아미노산 서열과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노펩티다아제를 의미한다. 이러한 아미노펩티다아제 b2324 상동물은 예를 들면 N- 또는 C-말단에서, 및 서열 2의 서열의 하나 이상의 내부 영역에서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 부가 또는 결실된 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 아미노펩티다아제 2324 상동물은 서열 2의 잔기 1부터 688의 아미노산 서열과 적어도 약 85%의 아미노산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 상동물은 천연 서열을 포함하지 않는다.

[0045] *yfcK* 유전자는 (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자 상보체에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 가지며, 아미노펩티다아제를 코딩하는 유전자를 나타내며, 또한 서열 1의 핵산 잔기의 완전한 서열을 갖는 염색체 *yfcK* 유전자에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 가지며 아미노펩티다아제를 코딩하는 유전자를 나타낸다. 그러한 *yfcK* 유전자는 예를 들면 서열 1의 서열의 내부 부분에 뿐만 아니라 5'- 또는 3'-말단에서 하나 이상의 핵산 잔기가 부가 또는 결실된 염색체 *yfcK* 유전자를 포함한다. 바람직하게는, *yfcK* 유전자는 서열 1의 뉴클레오타이드 1 내지 2067의 핵산 서열과 적어도 약 85% 핵산 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 핵산 서열 동일성 및 더더욱 바람직하게는 적어도 약 95%의 핵산 서열 동일성을 가질 것이다. 상기 용어는 천연-서열 *yfcK* 유전자(즉, 염색체 *yfcK* 유전자)를 포함한다.

[0046] 여기에서 동정된 아미노펩티다아제 b2324 서열과 관련한 "백분율(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열 및 도입하는 간격(gap)을 정렬시켜, 필요하다면 최대의 백분율 서열 동일성을 획득한 후, 임의의 보존적인 치환을 서열 동일성의 부분으로서 고려하지 않고, 아미노펩티다아제 b2324 서열 중 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 여기에서 사용된 % 동일성 값은 문헌[Altschul 등, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>]에서 수득된 WU-BLAST-2에 의해 산출될 수 있다. WU-BLAST-2는 몇가지 검색 변수를 사용하며, 그 대부분은 디폴트 값으로 고정된다. 조절될 수 있는 변수는 다음 값으로 고정된다: 중첩 스캔 = 1, 중첩 분획 = 0.125, 단어 문턱 (T) = 11. HSP S 및 HSP S2 변수는 동적인 값이고 특정 서열의 조성 및 관심있는 서열이 검색되는 특정 데이터베이스의 조성에 따라 프로그램 자체에 의해 수립되지만; 그 값은 감도를 증가시키기 위해 조절될 수 있다. % 아미노산 서열 동일성 값은 짝이 맞는 동일 잔기의 수를 정렬된 영역에서 "보다 긴" 서열의 총 잔기 수로 나누어 결정된다. "보다 긴" 서열은 상기 정렬된 영역(정렬 점수를 극대화하기 위해 WU-Blast-2에 의해 도입된 간격은 무시한다)에서 가장 활동적인 잔기를 갖는 것이다.

[0047] 전술한 바와 같이 수행되는 서열 비교의 문맥에서 "양성"이라는 용어는 비교된 서열 중 동일하지는 않지만 유사

한 성질을 갖는 잔기(예, 보존적인 치환의 결과로서)를 포함한다. 양의 % 값은 BLOSUM 62 매트릭스 중 양성 값의 점수를 얻은 잔기의 분획을 상기 정의된 바와 같은 보다 긴 서열 중 잔기의 총수로 나누어 결정된다.

[0048] 유사한 방식으로, 여기에서 동정되는 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드의 코딩 서열에 관하여 "백분율(%) 핵산 서열 동일성"은 아미노펩티다아제 b2324 코딩 서열 중 뉴클레오티드 잔기와 동일한 후보 서열 중 뉴클레오티드 잔기의 백분율로 정의된다. 여기에서 사용된 동일성 값은 중첩 스캔 및 중첩 분획이 1과 0.125로 각각 고정된, 디폴트 변수로 고정된 WU-BLAST-2의 BLASTN 모듈에 의해 산출될 수 있다.

[0049] 여기에 개시된 각종 폴리펩티드를 기술하는 데 사용될 경우 "단리된"이란 그 천연 환경의 성분으로부터 동정되고 분리되고/또는 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 그 천연 환경의 오염 성분은 폴리펩티드용 진단적 또는 치료적 사용을 전형적으로 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 회전 컵 서열화기를 이용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 개 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (2) Coomassie 블루 또는 바람직하게는 실버 스테인을 이용하는 비-환원 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의한 균질성에 이르도록 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 재조합 세포 내에 그 자리에 있는 폴리펩티드를 포함하는데, 그 이유는 아미노펩티다아제 b2324 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나 통상 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0050] 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 통상 아미노펩티다아제 b2324-코딩 핵산의 천연 원천과 관련된 적어도 하나의 오염성 핵산 분자로부터 동정 및 분리되는 핵산 분자이다. 단리된 아미노펩티다아제 b2324-코딩 핵산 분자는 천연에서 발견되는 형태 또는 고정이 아닌 것이다. 따라서 단리된 핵산 분자는 천연의 세포에 존재하는 것과 같은 아미노펩티다아제 b2324-코딩 핵산 분자와는 구별된다. 그러나, 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는, 예를 들면 핵산 분자가 천연 셀의 그것과는 다른 염색체 위치에 있는, 아미노펩티다아제 b2324를 통상적으로 발현하는 세포에 함유된 아미노펩티다아제 b2324-코딩 핵산 분자를 포함한다.

[0051] 본 발명을 수행하는 방식

[0052] 한 국면에서, 본 발명은 아미노펩티다아제(즉, N-말단 페닐알라닌과 그에 인접한 또하나의 아미노산 사이를 절단하는 것과 같은, 폴리펩티드의 N-말단에 위치한 아미노산 잔기를 절단하는 효소)가 결핍된 특정 세균 속주 세포 군주에 관한 것이며, 따라서 상기 폴리펩티드의 개선된 정제를 허용한다.

[0053] 구체적으로, 이 국면에서 본 발명은 (a) 서열 2의 1 부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자 상보체에 대하여 적어도 80% 서열 동일성을 가지며, 아미노펩티다아제를 코딩하는, 염색체 유전자(상기 유전자는 상기 세포의 야생형이 결핍됨)가 결핍된 그램-음성 세균 세포를 제공한다. 즉, 이러한 유전자는 *yfcK* 유전자의 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 공유한다. 바람직하게는, 상기 유전자는 *yfcK* 유전자(천연-서열 아미노펩티다아제 b2324를 코딩하는)의 서열과 적어도 약 85% 서열 동일성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 동일성, 더더욱 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 동일성, 가장 바람직하게는 100% 서열 동일성을 공유한다.

[0054] 또다른 국면에서, 상기 그램-음성 세균 세포는 서열 2의 1부터 688까지의 아미노산 잔기 서열을 갖는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324와 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노펩티다아제를 코딩하는 염색체 유전자(상기 유전자는 그러한 세포의 야생형에는 결핍되지 않는다)가 결핍된다. 바람직하게는, 상기 아미노펩티다아제는 적어도 약 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는다. 이는 염색체성 천연-서열 *yfcK* 유전자가 결핍된 세포를 포함한다.

[0055] 세번째 국면에서, 상기 그램-음성 세균 세포는 (a) 서열 2의 1 부터 688까지 스페닝하는 천연-서열 아미노펩티다아제 b2324의 아미노산 잔기 서열과 비교할 때 적어도 80% 양성을 기록하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA, 또는 (b) (a)의 DNA 상보체를 포함하며, 상기 폴리펩티드는 아미노펩티다아제인 염색체 유전자(이 유전자는 그러한 세포의 야생형에는 결핍되어 있지 않다)가 결핍되어 있다. 이는 아미노펩티다아제 b2324의 천연 서열과 비교할 때 100% 양성을 기록하는 세포를 포함한다.

[0056] 본 발명의 상기 국면의 대상인 세포는 그램-음성 세균, 예를 들면, *yfcK* 상동물이 예견되는 살모넬라, 해모필루스(*Haemophilus*), 카울로박터(*Caulobacter*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 비브리오 등과 같은 서열을 가진 계통을 갖는 세균이다. 더욱 바람직하게는, 상기 세포는 살모넬라 또는 엔테로박테리아세에, 더더욱 바람직하게는 이.콜리, 가장 바람직하게는 W3110이다.

- [0057] 상기 세포는 세균 프로테아제를 코딩하는 유전자와 같은, 그러한 세포의 야생형에 존재하는 하나 이상의 기타 염색체 유전자가 선택적으로 더 결핍된다. 프로테아제 또는 프로테아제의 조절을 제어하는 유전자가 결핍된 이.콜리 균주가 알려져 있다[Beckwith and Strauch, WO 88/05821, 1988년 8월 11일 발행; Chaudhury and Smith, *J. Bacteriol.*, 160: 788-791 (1984); Elish 등, *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1355-1364 (1988); Baneyx and Georgiou, "Expression of proteolytically sensitive polypeptides in *Escherichia coli*," in: *Stability of Protein Pharmaceuticals*, Vol.3: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation, Ahern and Manning, eds. (Plenum Press, New York, 1992), p. 69-108)].
- [0058] 상기 프로테아제-결핍 균주의 몇가지는, 특히 잠재적인 의학적 또는 상업적 관심을 받는 단백질분해적으로 민감한 펩티드를 효율적으로 생성하기 위한 시도에서 사용되어 왔다. 미국 특허 제 5,508,192 호(Georgiou 등)는 다수의 프로테아제-결핍 및/또는 열-충격 단백질-결핍 세균 숙주의 구성을 기재하고 있다. 이러한 숙주는 단일, 이중, 삼중 또는 4중 프로테아제-결핍 세균 및 *rpoH* 유전자에 돌연변이를 담지하는 단일-프로테아제 박테리아를 포함한다. 개시된 프로테아제 유전자의 예로서, 이.콜리에서 재조합 단백질의 큰 역가(titer)를 생성하는 것으로 보고되고[Park 등, *Biotechnol. Prog.*, 15: 164-167 (1999)], 또한 두 세포 외피 프로테아제(*degP* *prc*)가 결핍된 균주(HM 114)가 약간 더 빨리 성장하여 더 많은 프로테아제가 결핍된 다른 균주보다 더 많은 용해 단백질을 생성하는 것으로 보고된, *degP ompT ptr3₂ prc (tsp)* 및 *degP rpoH* 균주를 들 수 있다. 여기에서 세포는 그러한 프로테아제 중 임의의 하나 이상이 결핍될 수 있고, 바람직하게는 그러한 프로테아제는 프로테아제 III을 코딩하는 염색체 *ptr3*, 프로테아제 OmpT를 코딩하는 염색체 *ompT*, 및/또는 프로테아제 DegP를 코딩하는 염색체 *degP*이다. 상기 균주는 *tonA (fhuA)*, *phoA* 및/또는 *deoC*가 또한 결핍될 수 있다. 바람직하게는 상기 세포는 *degA* 및/또는 *fhuA*가 결핍된 것이다. 가장 바람직하게는, 상기 세포는 유전자형 W3110 $\Delta fhuA \Delta (arg-F-lac)169 phoA \Delta E15 deoC2 degP::kanR ilvG2096 \Delta yfcK$ 이다.
- [0059] 또다른 실시양태에서, 상기 세포는 상기 세포에 이중인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함한다. 상기 핵산은 임의의 방법으로 세포 내로 도입될 수 있으나 바람직하게는, 재조합 발현 벡터를 사용하거나 상동의 재조합에 의해, 가장 바람직하게는 벡터에 의해, 핵산을 변형시키는 데 사용된다.
- [0060] 적절한 이중 폴리펩티드의 예는 상기 정의된 것들이고, 메티오닌 잔기로 시작되고 두번째 잔기로 페닐알라닌을 갖는 단백질 및 폴리펩티드, 뿐만 아니라 페닐알라닌으로 시작되는 단백질(즉, 성숙된 형태에서 페닐알라닌으로 시작되거나 단백질분해적으로 더 가공되어 초기 메티오닌을 제거한 것들 및 인간 성장 호르몬과 같이 성숙된 단백질의 N-말단으로 Phe를 남기도록 절단된 신호 펩티드를 갖는 프리프로단백질을 포함한다. 따라서 성숙된 또는 최종 생성물의 아미노 말단이 Phe인, 그것이 제조되는 세균 세포에 대하여 이중인 임의의 폴리펩티드가 상기 목적을 위해 여기에 포함된다.
- [0061] 페닐알라닌 치환의 상기 요건에 부합하는 인간 폴리펩티드의 예로서 콜라겐 알파 2 사슬 전구체, T-세포 표면 당단백질 cd3 델타 사슬 전구체, 인슐린 전구체, 인테그린 알파-3 전구체, 인테그린 알파-5 전구체, 인테그린 알파-6 전구체, 인테그린 알파-7 전구체, 인테그린 알파-e 전구체, 인테그린 알파-m 전구체, 인테그린 알파-v 전구체, 인테그린 알파-x 전구체, 포스포티구콜린-스테롤 아실트랜스퍼라아제 전구체, 임파구 기능-관련 항원 3 전구체, 세포간 콜라게나아제 전구체, 뉴트로필 콜라게나아제 전구체, 모틸린(motilin) 전구체, 뉴트로필린-1 전구체, 혈소판-활성화 인자 아세틸히드롤라아제 전구체, 골격 시알로프로테인 ii 전구체, 성장 호르몬 변형 전구체 (Seeburg, *DNA*: 239-249 (1982)), 소마토트로핀 전구체, 소형 유도성 사이토킨 a13 전구체, 소형 유도성 사이토킨 a27 전구체, 소형 유도성 사이토킨 b11 전구체, 종양 괴사 인자 수용체 상과(superfamily) 멤버 8 전구체, 갑상선 자극호르몬 베타 사슬 전구체, 혈관 내피 성장 인자 c 전구체, 프리프로인슐린(BE885196-A), 인간 성장 호르몬 변형 HGH-V (EP89666-A), 인간 프로인슐린 (US4431740), pAP-1에 의해 코딩된 인간 성장 호르몬(hGH) 및 AP 시그널 펩티드 (EP177343-A), 인간 성장 호르몬(hGF) 전구체 (EP245138-A), 인간 BMP (EP409472-A) 인간 LFA-3 (CD58) 단백질 (DE4008354-A), 인간 유형 II 인터류킨-1 수용체 (EP460846-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #6 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #7 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #8 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #10 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #9 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #11 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #12 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #13 (WO9206111-A), 신장독성이 감소된 아프로티닌 상동물 #14 (WO9206111-A), 알파 6A 인테그린 아단위 (WO9219647-A), 알파 6B 인테그린 아단위 (WO9219647-A), 인간 LFA-3 단백질 (EP517174-A), 인간 혈장 카르복시펩티다아제 B (US5206161-A), 림포블라스토이드 유도된 IL-1R (WO9319777-A), 인간 LFA-3 (JP06157334-A), 임파구 활성화에 의해 유도된 (ILA) 인간 수용체 (CA2108401-A), 내피 세포 단백질 수용체 (WO9605303-A1), 인

간 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라아제 (LCAT) (WO9717434-A2), 인간 용해성 CD30 항원 (DE9219038-U1), 인간 소형 CCN-형 성장 인자 (WO9639486-A1), 인간 혈장 카르복시펩티다아제 B (US5593674-A), 인간 성장 호르몬 (WO9820035-A1), 플라스미드 pKFN-864 단편에 의해 코딩된 인슐린 상동물 (EP861851-A1), 영장류 CXC 케모킨 "IBICK" 폴리펩티드 (WO9832858-A2), 인간 소형 CCN-형 성장 인자 (US5780263-A), 인간 혈장 히알루로니다아제 (hphAse)의 아미노산 서열 (WO9816655-A1), 인간 유형 II IL-1R 단백질 (US5767064-A), 호호 사피언스 클론 CC365_40 단백질 (WO9807859-A2), 인간 성장 호르몬 (US5955346-A), 인간 용해성 성장 호르몬 수용체 (US5955346-A), 인간 CD30 항원 단백질 (WO9940187-A1), 인간 뉴로필린-1 (WO9929858-A1), 인간 두뇌 조직-유래된 폴리펩티드 (클론 OMB096)(WO9933873-A1), 인간 톨(Toll) 단백질 PRO285 (WO9920756-A2), 인간 분비된 펩티드의 아미노산 서열 (WO9911293-A1), 인간 분비된 펩티드의 아미노산 서열 (WO9911293-A1), 인간 분비된 펩티드의 아미노산 서열 (WO9911293-A1), 인간 분비된 단백질의 아미노산 서열 (WO9907891-A1), 인간 분비된 단백질의 아미노산 서열 (WO9907891-A1), 인간 분비된 단백질의 아미노산 서열 (WO9907891-A1), 인간 혈장 카르복시펩티다아제 B (PCPB) thr147 (WO9855645-A1), 인간 케모킨 MIG-베타 단백질 (EP887409-A1), 인간 분비성 단백질의 아미노산 서열 (WO200052151-A2), 플라스미드 pWRG1630에 의해 코딩된 인간 hGH/EGF 융합 단백질 (US6090790-A), cDNA 클론 3470865에 의해 코딩된 인간 분비된 단백질 (WO200037634-A2), 인간 단핵세포-유래된 단백질 FDF03델타TM (WO200040721-A1), 인간 단핵세포-유래된 단백질 FDF03-S1 (WO200040721-A1), 인간 단핵세포-유래된 단백질 FDF03-M14 (WO200040721-A1), 인간 단핵세포-유래된 단백질 FDF03-S2 (WO200040721-A1), 인간 분비된 단백질 #2 (EP 1033401-A2), 인간 프리프로-혈관 내피 성장 인자 C (WO200021560-A1), 인간 막 이송 단백질, MTRP-15 (WO200026245-A2), 인간 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)-C 단백질 (WO200024412-A2), 인간 TANGO 191 (WO200018800-A1), 인터페론 수용체-HKAEF92 (WO9962934-A1), 인간 인테그린 아단위 알파-10 (WO9951639-A1), 인간 인테그린 아단위 알파-10 접합 변형물 (WO9951639-A1), 인간 델타 1-피롤린-5-카르복실레이트 환원효소 상동물 (P5CRH) (US6268192-B1), 인간 성장/분화 인자-6-형 단백질 AMF10 (WO200174897-A2), 인간 수송자 및 이온 채널-6 (TRICH-6) 단백질 (WO200162923-A2), 인간 수송자 및 이온 채널-7 (TRICH-7) 단백질 (WO200162923-A2), 인간 매트릭스 메탈로프로티나아제-1 (MMP-1) 단백질 (WO200166766-A2), 인간 매트릭스 메탈로프로티나아제-8 (MMP-8) 단백질 (WO200166766-A2), 인간 매트릭스 메탈로프로티나아제-18P (MMP-18P) 단백질 (WO200166766-A2), 인간 G-단백질 커플된 수용체 6 (GPCR6) 단백질 (WO200181378-A2), 인간 Zlec1 단백질 (WO200166749-A2), 인간 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP)-형 단백질 (WO200157255-A1), 인간 유전자 15 코딩된 분비된 단백질 HFCDI56 (WO200154708-A1), 인간 유전자 9 코딩된 분비된 단백질 HTEGF16, (WO200154708-A1), 인간 분비된 단백질 (SECP) #4 (WO200151636-A2), 인간 유전자 20 코딩된 분비된 단백질 HUSIB 13 (WO200151504-A1), 인간 유전자 28 코딩된 분비된 단백질 HISAQ04 (WO200151504-A1), 인간 유전자 35 코딩된 분비된 단백질 HCNH57 (WO200151504-A1), 인간 유전자 17 코딩된 분비된 단백질 HBMC37 (WO200151504-A1), 인간 종양 괴사 인자 (TNF) 자극된 유전자-6 (TSG-6) 단백질 (US6210905-B1), FCTR 10 (WO200146231-A2), 인간 유전자 18 코딩된 분비된 단백질 HFKH50 (WO200136440-A1), 인간 유전자 18 코딩된 분비된 단백질 HFKH50 (WO200136440-A1), 인간 유전자 13 코딩된 분비된 단백질 HE8FC45 (WO200077022-A1), 인간 유전자 32 코딩된 분비된 단백질 HTLIF12 (WO200077022-A1), 인간 유전자 4 코딩된 분비된 단백질 HCRPV17 (WO200134643-A1), 인간 유전자 23 코딩된 분비된 단백질 HE8OK73 (WO200134643-A1), 인간 유전자 4 코딩된 분비된 단백질 HCRPV17 (WO200134643-A1), 인간 유전자 22 코딩된 분비된 단백질 HMSFK67 (WO200132676-A1), 인간 유전자 22 코딩된 분비된 단백질 HMSFK67 (WO200132676-A1), 인간 유전자 22 코딩된 분비된 단백질 HMSFK67 (WO200132676-A1), 인간 유전자 19 코딩된 분비된 단백질 HCRNF14 (WO200134800-A1), 인간 유전자 6 코딩된 분비된 단백질 HNEEB45 (WO200132687-A1), 인간 유전자 6 코딩된 분비된 단백질 HNEEB45 (WO200132687-A1), 인간 유전자 9 코딩된 분비된 단백질 HHPDV90 (WO200132675-A1), 인간 유전자 1 코딩된 분비된 단백질 B7-H6 (WO200134768-A2), 인간 유전자 3 코딩된 분비된 단백질 HDPMS12 (WO200134768-A2), 인간 유전자 13 코딩된 분비된 단백질 클론 HRABS65 (WO200134768-A2), 인간 유전자 1 코딩된 분비된 단백질 HDPAP35 (WO200134768-A2), 인간 유전자 3 코딩된 분비된 단백질 HDPMS12 (WO200134768-A2), 인간 유전자 17 코딩된 분비된 단백질 HACCL63 (WO200134769-A2), 인간 유전자 17 코딩된 분비된 단백질 HACCL63 (WO200134769-A2), 인간 유전자 10 코딩된 분비된 단백질 HHEPJ23 (WO200134629-A1), 인간 유전자 10 코딩된 분비된 단백질 HHEPJ23 (WO200134629-A1), 인간 유전자 5 코딩된 분비된 단백질 HE9QN39 (WO200134626-A1), 인간 유전자 14 코딩된 분비된 단백질 HCRN087 (SEQ 104)(WO200134626-A1), 인간 유전자 5 코딩된 분비된 단백질 HE9QN39 (WO200134626-A1), 인간 유전자 14 코딩된 분비된 단백질 HCRN087 (SEQ 145)(WO200134626-A1), 인간 유전자 4 코딩된 분비된 단백질 HSODE04 (WO200134623-A1), 인간 유전자 6 코딩된 분비된 단백질 HMZMF54 (WO200134623-A1), 인간 유전자 18 코딩된 분비된 단백질 HPJAP43 (WO200134623-A1), 인간 유전자 27 코딩된 분비된 단백질 HNTSL47 (WO200134623-A1), 인간 유전자 4 코딩된 분비된 단백질 HSODE04 (WO200134623-A1), 인

간 유전자 6 코딩된 분비된 단백질 HMZMF54 (WO200134623-A1), 인간 유전자 18 코딩된 분비된 단백질 HPJAP43 (WO200134623-A1), 인간 유전자 27 코딩된 분비된 단백질 HNTSL47 (WO200134623-A1), 인간 유전자 21 코딩된 분비된 단백질 HLJEA01 (WO200134767-A2), 인간 유전자 25 코딩된 분비된 단백질 HTJNX29 (SEQ 115)(WO200134627-A1), 인간 유전자 25 코딩된 분비된 단백질 HTJNX29 (SEQ 165) (WO200134627-A1), 인간 TANGO 509 아미노산 서열 (WO200121631-A2), 인간 TANGO 210 단백질 (WO200118016-A1), 인간 암 관련 단백질 12 (WO200118014-A1), 인간 암 관련 단백질 18 (WO200118014-A1), 인간 B7-4 분비된 (B7-4S) 단백질 (WO200114557-A1), 인간 B7-4 막 (B7-4M) 단백질 (WO200114557-A1), 인간 B7-4 분비된 (B7-4S) 단백질 (WO200114556-A1), 인간 B7-4 막 (B7-4M) 단백질 (WO200114556-A1), 인간 인터류킨 DNAX 80 변형물 (WO200109176-A2), 인간 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라아제 (LCAT) (WO200105943-A2), 인간 폴리펩티드 PR01419의 아미노산 서열 (WO200077037-A2), 인간 알파 11 인테그린 사슬의 아미노산 서열 (WO200075187-A1), 인간 A259 (WO200073339-A1), 인간 골수 유래된 펩티드 (WO200166558-A1), 인간 종양-관련된 항원 목표물-169 (TAT169) 단백질 (WO200216602-A2), 인간 유전자 3 코딩된 분비된 단백질 HKZA035ID (WO200218411-A1), 인간 유전자 3 코딩된 분비된 단백질 HKZA035 (WO200218411-A1), 인간 유전자 11 코딩된 분비된 단백질 HLYCK27 (WO200218435-A1), 인간 INTG-1 단백질 (WO200212339-A2), 인간 유전자 15 코딩된 분비된 단백질 HFPHA80, SEQ 70 (WO200216390-A1), 인간 유전자 15 코딩된 분비된 단백질 HFPHA80, SEQ 94 (WO200216390-A1), 인간 유전자 2 코딩된 분비된 단백질 HDQFU73, SEQ 69 (WO200224719-A1), 인간 유전자 8 코딩된 분비된 단백질 HDPTC31, SEQ 75 (WO200224719-A1), 인간 유전자 2 코딩된 분비된 단백질 HDQFU73, SEQ 90 (WO200224719-A1), 인간 유전자 6 코딩된 분비된 단백질 HDPRJ60, SEQ 95 (WO200224719-A1), 인간 유전자 8 코딩된 분비된 단백질 HDPTC31, SEQ 99 (WO200224719-A1), 인간 유전자 8 코딩된 분비된 단백질 HDPTC31, SEQ 100 (WO200224719-A1), 인간 프로인슐린 상동물 (WO200204481-A2), 종양-관련된 항원 목표물 단백질, TAT136 (WO200216429-A2), 종양 관련된 항원 목표물 폴리펩티드 (TAT) 136 (WO200216581-A2), 인간 CD30 단백질 서열 (WO200211767-A2), 인간 인터류킨 1R2 (IL-1R2) 단백질 서열 (WO200211767-A2), 인간 G-단백질 커플된 수용체-7 (GPCR-7) 단백질 (WO200206342-A2), 인간 G-단백질 커플된-수용체 (GPCR6a)(WO200208289-A2), 인간 G-프로테인 커플된-수용체 (GPCR6b) (WO200208289-A2), 인간 유형 II 인터류킨-1 수용체 (WO200187328-A2), 인간 A259 폴리펩티드 (WO200181414-A2), 인간 혈관 세포 부착 분자, VCAM1 (US6307025-B1), 인간 혈관 세포 부착 분자, VCAM1b (US6307025-B1), 인간 수술자 및 이온 채널 (TRICH)-6 (WO200177174-A2), 및 인간 단백질 개질 및 유지 분자-8 (PMMM-8) (WO200202603-A2)를 들 수 있다.

[0062] 또다른 국면에서, 본 발명은 (a) 이중 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 수용하는 세포를 배양하고 (b) 상기 세포로부터 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함하는 이중 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 회수는 세포질, 주변 세포질 또는 세포의 배양 배지로부터 이루어질 수 있지만, 바람직하게는 상기 폴리펩티드는 주변세포질 또는 세포의 배양 배지로부터 회수된다. 바람직하게는 상기 배양은 발효기에서 수행한다. 배양 변수가 사용되고 폴리펩티드 생성은 후술하는 방법과 같은 통상의 방법으로 수행된다.

[0063] 바람직한 폴리펩티드가 세포질에서 생성될 경우, 세포의 전-용균 또는 후-용균 시의 항온처리가 필요하지 않지만, 그것이 절단된 물질의 형성 효율을 증가시킬 수 있다. 바람직한 폴리펩티드가 주변세포질 또는 세포 배양 배지 내로 분배될 경우에는, 항온처리 단계가 바람직하며 적어도 약 0.5 시간 동안의 항온처리가 권장된다. 주변세포질에서 생성된 폴리펩티드를 회수하기 위한 바람직한 방법은 예를 들면 호모지나이저, 프렌치 압력 세포 및 큰 부피용 미세 유체화기 및 작은 부피를 위한 초음파발생기를 이용하여 세포를 파괴 또는 파쇄시키는 것이다. 용균물은 파괴된 세포로부터 형성되고, 이로부터 무손상 폴리펩티드가 정제될 수 있다. 바람직하게는 상기 용균물을 정제 단계 이전에 항온처리한다. 이러한 항온처리는 임의의 적절한 온도에서 수행될 수 있지만, 바람직하게는 실온 또는 그 이하에서 적어도 1 시간 동안, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 50 시간 동안 수행된다. 폴리펩티드 및 세포 종류는 바람직하게는 전술한 바와 같다.

[0064] 또한, 본 발명은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 핵산이 발현되도록 하는 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는, 폴리펩티드로부터 아미노산 잔기의 N-말단 절단을 방지하는 방법을 제공한다. 이러한 배양 조건은 통상적이며 당업자에게 공지되어 있다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 세포로부터 회수된다. 바람직한 폴리펩티드 및 세포 종류는 전술한 바와 같다.

[0065] 그렇지 않으면, 불순물인 미절단 폴리펩티드로부터 절단된 폴리펩티드가 정제되는 경우에는 반대 상황이 적용된다. 이러한 국면에서, 본 발명은 전술한 아미노펩티다아제 b2324 단백질과 폴리펩티드를 접촉시키는 것을 포함하며, 바람직하게는 상기 접촉이 아미노펩티다아제 b2324 단백질과 함께 항온처리하는 것에 의한, 폴리펩티드로부터 N-말단 아미노산을 절단하는 방법을 제공한다. 절단된 폴리펩티드를 제조하는 또다른 방법은, yfcK 유전

자(유전자가 세포에 대하여 내생의 것이건 이종기원의 것이건)를 수용하며 그 N-말단에 부가된 아미노산을 갖는 상응하는 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세균 세포를 배양하는 것을 수반하며, 여기에서 배양은 yfcK 유전자를 발현 또는 과발현하고 상기 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현하기 위한 조건 하에 이루어지며, 상기 미절단 폴리펩티드 및 아미노펩티다아제 b2324 단백질이 발현 후 접촉하지 않는 경우에는 상기 미절단 폴리펩티드를 상기 아미노펩티다아제 b2324와 접촉시켜 절단된 폴리펩티드를 생성한다.

[0066] 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 세포에 대하여 이종이고, 더욱 바람직하게는 상기 폴리펩티드의 하나는 전술한 카테고리에 있다. 바람직하게는, 세포의 종류는 yfcK 유전자가 결실되지 않은 것 외에는 전술한 것들로부터 선택된다. yfcK 유전자는 박테에 의해서 도입되거나 숙주 세포에 대하여 내생의 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현에 비하여 과발현되어 효소 절단 반응을 촉진한다.

[0067] 또다른 바람직한 국면에서, 상기 미절단 폴리펩티드는 상기 아미노펩티다아제 b2324 단백질과 접촉하기 전에 세포로부터 회수된다. 회수 시에, 바람직하게는, 상기 세포는 파괴(전술한 기술을 사용)되고 이어서 용균된다. 용균 후, 상기 미절단 폴리펩티드는 바람직하게는 아미노펩티다아제 b2324 단백질과 함께 항온처리되어 아미노말단을 절단시키고, 상기 절단된 폴리펩티드는 상기 항온처리된 용균물로부터 정제된다. 바람직하게는 상기 용균물은 약 20 내지 40℃에서 적어도 약 1 시간 동안, 더욱 바람직하게는 약 30 내지 40℃에서 약 2 내지 50 시간 동안 항온처리된다.

[0068] I. 미절단 폴리펩티드의 제조 및 회수

[0069] A. 복제가능한 박테로에 핵산의 삽입

[0070] 관심있는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은, 그것이 관심있는 폴리펩티드(들)를 코딩한다면, 임의의 원천으로부터의 cDNA 또는 게놈성 DNA이 적합하다.

[0071] 이종기원의 핵산(예, cDNA 또는 게놈성 DNA)은 적절한 촉진제의 제어 하에 세균 내 발현을 위한 복제 가능한 박터 내로 적합하게 삽입된다. 상기 목적을 위해 다수의 박터가 사용가능하며, 적절한 박터의 선택은 상기 박터 내에 삽입될 핵산의 크기 및 상기 박터를 이용하여 변형될 특정 숙주 세포에 주로 의존할 것이다. 각각의 박터는 함께 조화될 수 있는 특정 숙주 세포에 따라 여러가지 성분을 함유한다. 특정한 숙주 종류에 따라, 상기 박터 성분은 일반적으로 다음의 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다: 신호 서열, 복제의 근원, 하나 이상의 표지 유전자, 촉진제 및 전사 종결 서열.

[0072] 일반적으로, 레플리콘을 함유하는 플라스미드 박터 및 상기 숙주 세포와 조화되는 종으로부터 유래된 대조 서열이 이.콜리 숙주와 관련하여 사용된다. 상기 박터는 일반적으로 복제 부위 뿐만 아니라 변형된 세포 중에서 표현형의 선택을 제공할 수 있는 표지 서열을 담지한다. 예를 들면, 이.콜리는 이.콜리 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 전형적으로 변형된다[예를 들면, Bolivar 등, Gene, 2: 95 (1977)]. pBR322는 암피실린 및 테트라사이클린 내성을 위한 유전자를 함유하며 따라서 변형된 세포를 동정하기 위한 쉬운 방법을 제공한다. 상기 pBR322 플라스미드 또는 다른 세균성 플라스미드 또는 파지(phage) 또한, 선택가능한 표지 유전자의 발현을 위한 이.콜리 숙주에 의해 사용될 수 있는 촉진제를 일반적으로 함유하거나 함유하도록 개질된다.

[0073] (i) 신호 서열 성분

[0074] 여기에서 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 직접 발현될 수 있을 뿐만 아니라, 또다른 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열 또는 성숙된 폴리펩티드의 N-말단에서 특정 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드와의 융합으로서 발현될 수도 있다. 일반적으로, 신호 서열은 박터의 성분일 수 있거나, 그 박터에 삽입되는 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 선택된 이종기원의 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 진행되는(즉, 신호 펩티다아제에 의해 절단되는) 것이어야 한다.

[0075] 천연의 또는 진핵세포의 폴리펩티드 신호 서열을 인식 및 진행하지 않는 세균 숙주 세포의 경우, 신호 서열은, 예를 들면 알팔린 포스포타아제, 페니실리나아제, lpp 또는 열-안정한 엔테로톡신 II 선구체로 구성된 군에서 선택된 적절한 원핵세포의 신호 서열로 치환된다.

[0076] (ii) 복제 성분의 근원

[0077] 발현 박터는 그 박터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 중에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 그러한 서열은 다양한 세균의 경우 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 근원이 이.콜리 같은 대부분의 그램-음성 세균의 경우 적절하다.

[0078] (ii) 선택 유전자 성분

[0079] 발현 벡터는 일반적으로 선택가능한 표지라고도 하는 선택 유전자를 함유한다. 상기 유전자는 선택적인 배양 배지에서 성장하는 변형된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터로 변형되지 않은 숙주 세포는 그 배양 배지에서 생존하지 못할 것이다. 이러한 선택가능한 표지는 본 발명에 의해 사용 및 정의된 바와 같이 유전적 표지로부터 분리된다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 예를 들면 암피실린, 네오마이신, 메토타렉세이트 또는 테트라사이클린과 같은 항생제 또는 기타 독소에 대한 내성을 부여하거나, (b) 유전적 표지(들)의 존재에 의해 발생된 것들 외의 영양요구성 결핍을 보충하거나 또는 (c) 예를 들면 바실리(*Bacilli*)의 경우 D-알라닌 라세마아제를 코딩하는 유전자와 같은 복합적 배지로부터 입수되지 않는 결정적인 영양분을 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0080] 선택 도식의 한 예는 숙주 세포의 성장을 저지시키는 약품을 사용한다. 이러한 경우, 관심있는 핵산으로 성공적으로 변형되는 세포는 의약 내성을 부여하는 폴리펩티드를 생성하므로 선택된 투약계획에서 생존한다. 그러한 우세한 선택의 예는 의약품 네오마이신(Southern 등, *J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327 (1982)), 미코페놀산(Mulligan 등, *Science*, 209: 1422 (1980)) 또는 하이그로마이신(Sugden 등, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 410-413 (1985))을 사용한다. 위에 주어진 세 가지 예는 적절한 의약 G418 또는 네오마이신(제네티신), xgpt(미코페놀산) 또는 하이그로마이신 각각에 대한 내성을 부여하기 위해 진핵세포적 제어 하에 세균 유전자를 사용한다.

[0081] (iv) 촉진제 성분

[0082] 관심있는 폴리펩티드를 제조하기 위한 발현 벡터는 숙주 미생물에 의해 인식되고 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 작동적으로 결합되어 있는 적절한 촉진제를 함유한다. 원핵세포 숙주에 사용하기 적절한 촉진제는 베타-락타마아제 및 락토오스 촉진제 계(Chang 등, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel 등, *Nature*, 281: 544 (1979)), 아라비노오스 촉진제 계(Guzman 등, *J. Bacteriol.*, 174: 7716-7728 (1992)), 알칼린 포스파타아제, 트립토판(*trp*) 촉진제 계(deBoer 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)) 및 *tac* 촉진제와 같은 혼성 촉진제를 포함한다. 그러나, 다른 공지의 세균성 촉진제도 적합하다. 그들의 핵산 서열은 발행되었으며, 당업자들은 임의의 필요한 제한 부위를 공급하기 위한 결합제 또는 어댑터를 이용하여 이들을 관심있는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA에 작동적으로 결합시킬 수 있다(Siebenlist 등, *Cell*, 20: 269 (1980)).

[0083] 세균 계에서 사용하기 위한 촉진제는 또한 일반적으로 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동적으로 결합된 Shine-Dalgarno (S.D.) 서열을 함유한다. 이 촉진제는 제한 효소 소화에 의해 세균성 원천 DNA로부터 제거될 수 있고 원하는 DNA를 함유하는 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0084] (v) 벡터의 구성 및 분석

[0085] 상기 나열된 성분의 하나 이상을 함유하는 적절한 벡터의 구성은 표준 결찰 기술을 이용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을 원하는 형태로 절단, 재단 및 재-결찰하여 요구되는 플라스미드를 생성한다.

[0086] 구성된 플라스미드 중 정확한 서열을 확인하기 위한 분석의 경우, 상기 결찰 혼합물은 이.콜리 K12 균주 294(ATCC 31,446) 또는 다른 균주를 변형시키도록 사용되고, 성공적인 변형물질은 적절한 경우 암피실린 또는 테트라사이클린 내성에 의해 선택된다. 상기 변형물질로부터의 플라스미드가 제조되고 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 분석되고/또는 문헌의 방법(Sanger 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467 (1977) 또는 Messing 등, *Nucleic Acids Res.*, 9:309 (1981) 또는 Maxam 등, *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980)]에 의해 서열화된다.

[0087] B. 숙주 세포의 선택 및 변형

[0088] 상기 정의된 바와 같이, 그램-음성 세균 세포의 많은 종류가 *yfcK* 유전자 결핍의 목적으로 사용될 수 있고, 전술한 것들은 그 예이다. 이.콜리 균주 W3110은 그것이 재조합 DNA 생성 발효를 위한 일반적인 숙주 균주이므로 바람직한 모 균주이다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 극소량의 단백질분해 효소 만을 분비해야 한다. 예를 들면, 균주 W3110은 단백질의 코딩하는 유전자에 유전적 돌연변이를 수행하기 위해 개질될 수 있으며, 그러한 이.콜리 숙주의 예를 유전자형과 함께 하기 표에 나타낸다:

균주	유전자형
W3110	K-12 F 람다 <i>IN(rrnD-rrnE)I</i>
1A2	W3110 Δ <i>fhuA</i>
7C1	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15
9E4	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> 또는 W3110 <i>tonA</i> Δ
16C9	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15 <i>deoC2</i>
23E3	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15 <i>deoC2</i> <i>degP::kanR</i>
27A7	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>phi</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169
27C6	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 Δ <i>ompT</i>
27C7	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 Δ <i>ompT</i> <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^R</i>)
33B6	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>arg-F-lac</i>)169 <i>phoA</i> Δ E15 <i>deoC2</i> <i>degP::kanR</i> <i>ilvG2096</i>
33D3	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>lacIq</i> <i>lacL8</i> Δ <i>ompT</i> <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^R</i>)
36F8	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>ptr3</i> <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^R</i>) <i>ilvG2096^R</i>
37D6	W3110 <i>tonA</i> Δ <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>ompT</i> Δ <i>degP41kan^R</i> <i>rbs7</i> Δ <i>ilvG</i>
40B4	Strain 37D6 with a non-kanamycin resistant <i>degP</i> deletion mutation
40G3	W3110 <i>tonA</i> Δ <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>deoC</i> Δ <i>ompT</i> <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^R</i>) <i>ilvG2096^R</i> <i>phn(EcoB)</i>
43D3	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 Δ (<i>argF-lac</i>)169 Δ <i>ompT</i> <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^R</i>) <i>ilvG2096^R</i>
43E7	W3110 Δ <i>fhuA</i> Δ (<i>argF-lac</i>)169 Δ <i>ompT</i> <i>ptr3</i> <i>phoA</i> Δ E15 <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^S</i>) <i>ilvG2096^R</i>
44D6	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^S</i>) Δ <i>ompT</i> <i>ilvG2096^R</i>
45F8	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^S</i>) Δ <i>ompT</i> <i>phoS*</i> (T10Y) <i>ilvG2096^R</i>
45F9	W3110 Δ <i>fhuA</i> <i>ptr3</i> Δ (<i>argF-lac</i>)169 <i>degP41</i> (Δ <i>pstI</i> - <i>kan^S</i>) Δ <i>ompT</i> <i>ilvG2096^R</i> <i>phoS*</i> (T10Y) Δ <i>cyo::kan^R</i>

[0089]

[0090]

균주 36F8을 제조하기 위한 중간체도 적절하다: 즉, 27B4(미국 특허 제 5,304,472 호) 및 35E7(27B4보다 잘 성장하는 자발적 온도-내성 콜로니 단리물). 추가의 적절한 균주는 0990년 8월 7일 발행된 미국 특허 제 4,946,783 호에 개시된 돌연변이 주변세포질 프로테아제를 갖는 이.콜리 균주이다.

[0091]

본 발명의 돌연변이 세포는 yfcK 유전자를 모 세포의 염색체 융합시킴으로써 또는 후술하는 실시예에 기재한 것을 포함하는 다른 기술에 의해 생성될 수 있다.

[0092]

폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 상기 숙주 세포 내에 삽입한다. 폴리펩티드를 코딩하는 벡터에 의한 변형을 포함하는 임의의 적절한 방법을 이용하여 핵산을 적절한 세균 세포 내에 도입시킨다. 변형은 DNA를 미생물 내로 도입하여 그 DNA가 염색체외적 요소 또는 염색체 구성요소로서 복제가능하게 하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 변형은 그러한 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)의 섹션 1.82에 기재된 바와 같은 염화 칼슘을 사용하는 칼슘 처리가 원핵 세포 또는 실질적인 세포-벽 장벽을 함유하는 여타 세포에 대하여 일반적으로 사용된다. 또다른 변형 방법은 문헌[Chung and Miller, Nucleic Acids Res., 16: 3580 (1988)]에 기재된 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 또다른 방법은 일렉트로포레이션이라는 기술을 사용하는 것이다.

[0093]

폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 이.콜리 숙주 계통 내에 삽입함에 의한 변형의 한 예는 변형을 위한 벡터에 이.콜리 계통 DNA에서 발견되는 서열에 상보적인 DNA 서열을 포함시키는 것을 수반한다. 상기 벡터를 이용한 이.콜리의 트랜스펙션은 계통과의 상동의 재조합 및 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 삽입의 결과를 가져온다. 바람직하게는, 상기 핵산은 전술한 발현 벡터로 숙주 세포를 변형시키고 다양한 촉진제를 유도하기 적절하게 개질된 통상의 영양 배지에서 배양함으로써 삽입된다.

[0094]

C. 숙주 세포의 배양

[0095]

본 발명의 관심있는 폴리펩티드를 생성하는 데 사용되는 세균 세포는 일반적으로 예를 들면 [Sambrook 등, *supra*]에 기재된 적정 배지에서 배양된다.

[0096]

발현되거나 과발현된 유전자 생성물의 분비를 위해, 숙주 세포는 상기 유전 생성물의 분비에 충분한 조건 하에 배양된다. 그러한 조건은 예를 들면 온도, 영양분, 및 세포에 의한 분비를 허용하는 세포 밀도 조건을 포함한

다. 더욱이, 이러한 조건은 당업자에게 알려진 바와 같이 세포가 전사, 번역 및 한 세포구획에서 다른 세포구획으로의 단백질 운반의 기본적 세포 기능을 수행할 수 있는 조건 하에 있다.

[0097] 알칼린 포스포타아제 촉진제가 사용되는 경우, 본 발명의 관심있는 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용되는 이.콜리는 알칼린 포스포타아제 촉진제가, 예를 들면 [Sambrook 등, *supra*]에 기재된 바와 같이 부분적으로 또는 완전히 유도될 수 있는 적정 배지에서 배양된다. 배양 요건은 무기 인산염의 부재 하에 또는 인산염 결핍 수준에서 결고 일어나지 않는다. 먼저, 배지는 단백질 합성의 유도 수준을 초과하며 세균의 성장에 충분한 양의 무기 인산염을 함유한다. 세포가 성장하여 인산염을 사용하게 되면, 그들은 배지 중 인산염의 수준을 감소시키므로, 폴리펩티드의 합성의 유도를 초래한다.

[0098] 탄소, 질소 및 무기 인산염 원천 외의 임의의 다른 필요한 매질 성분이 또한 단독으로 또는 다른 성분 또는 복합 질소원과 같은 매질과의 혼합물로서 적절한 농도로 포함될 수도 있다. 배지의 pH는 주로 숙주 미생물에 의존하여 약 5 내지 9의 임의의 pH일 수 있다.

[0099] 촉진제가 유도성 촉진제일 경우에는, 유도가 일어나기 위해, 전형적으로 세포는 일정 광학적 밀도, 예를 들면 높은 세포 밀도 공정을 이용할 경우, 약 200의 A₅₅₀에 도달할 때까지 배양되며, 그 지점에서 유도가 개시되어 (예, 유도제의 첨가에 의하거나 배지 성분 등의 소모에 의해) 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현을 유도한다.

[0100] D. 발현의 검출

[0101] 핵산 발현은 예를 들면 통상의 서던(Southern) 블로팅, 너던(northern) 블로팅에 의해 mRNA의 전사를 정량하거나(Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)), 도트 블로팅(DNA 분석), 또는 그자리에서의 교배에 의해, 적절히 표지된 프로브를 사용하여 폴리펩티드의 서열을 기준으로 직접적으로 시료 내에서 측정될 수 있다. 다양한 표지가 사용될 수 있으나, 가장 흔한 방사선 표지는 특히 ³²P이다. 그러나, 폴리뉴클레오티드 내에 도입하기 위한 바이오틴-개질된 뉴클레오티드를 사용하는 등의 다른 기술들도 사용될 수 있다. 다음 바이오틴은 아비딘 또는 항체에 결합하기 위한 부위로서 작용하며, 이는 방사선헤중, 형광물질, 효소 등과 같은 광범위한 표지로 표지될 수 있다. 그렇지 않으면, 단백질의 검출을 위해 분석 또는 겔이 사용될 수 있다.

[0102] 발현 또는 과발현된 유전 생성물이 분비되었는지를 관찰하기 위한 과정은 숙련된 당업자에게는 쉽게 입수가능하다. 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 일단 배양 배지가 숙주 세포로부터 분리되면, 유전 생성물의 공지된 성질 특성을 이용하여 유전 생성물을 세포가 없는 배양 배지에서 검출할 수 있다. 그러한 성질은 유전 생성물의 구별되는 면역학적, 효소적 또는 물리적 성질을 포함할 수 있다.

[0103] 예를 들면, 과발현된 유전자 생성물이 독특한 효소 활성을 가질 경우, 그 활성에 대한 분석이 숙주 세포에 의해 사용된 배양 배지 상에서 수행될 수 있다. 또한, 주어진 유전 생성물에 대해 반응성인 항체가 입수가능한 경우, 그러한 항체가 임의의 공지된 면역학적 분석에서 유전자 생성물을 검출하는 데 사용될 수 있다(예, Harlowe 등, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988).

[0104] 분비된 유전자 생성물은 분자량과 같은 특정 물리적 성질을 근거로 폴리펩티드를 구별하는 시험을 이용하여 검출될 수 있다. 유전자 생성물의 물성을 검출하기 위해, 숙주 세포에 의해 새로이 합성된 모든 폴리펩티드는 예를 들면 방사성 동위원소로 표지될 수 있다. 숙주 세포 내에 합성된 폴리펩티드를 표지하는 데 사용될 수 있는 통상의 방사성 동위원소로서 트리튬(³H), 탄소-14(¹⁴C), 황-35(³⁵S) 등을 들 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포는 ³⁵S-메티오닌 또는 ³⁵S-시스테인 매질에서 성장될 수 있고, ³⁵S 표지의 실질적인 양이, 과발현된 이종기원의 폴리펩티드를 포함하는 임의의 새로이 합성된 폴리펩티드 내에 우위적으로 도입될 것이다. 다음, ³⁵S-함유 배양 배지를 제거하고, 세포를 세척하여 새로운 방사선-비활성의 배양 배지에 놓는다. 세포를 새로운 배지에 일정 시간 동안 및 ³⁵S-방사선표지 발현된 이종기원의 폴리펩티드의 분비를 허용하기 충분한 조건 하에 유지시킨 후, 상기 배양 배지를 수거하고 숙주 세포로부터 분리한다. 그 후, 배양 배지 중 분비되고 표지된 폴리펩티드의 분자량을 엘르 들면 폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 공지 방법에 의해 결정할 수 있다. 이러한 방법 및/또는 분비된 유전자 생성물을 검출하기 위한 여타 방법은 문헌[Goeddel, D.V. (ed.) 1990, *Gene Expression Technology, Methods in Enzymology*, Vol. 185 (Academic Press), and Sambrook 등, *supra*]에 제공되어 있다.

[0105] E. 회수/정제

[0106] 상기 폴리펩티드가 생성된 후, 이는 예를 들면 세포가 어느 부분으로부터 회수되는지에 따라 임의의 적절한 방

법에 의해 세포로부터 회수될 수 있다. 폴리펩티드는 세포질, 주변세포질 또는 세포 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 관심있는 폴리펩티드는 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 정제되어 관심있는 폴리펩티드에 대해서와 같이 실질적으로 균질한 제제를 수득한다. 첫번째 단계로서, 배양 배지 또는 용균물을 원심분리하여 미립자 세포 잔해를 제거한다. 다음, 필요하다면 막과 용해성 단백질 분획을 분리시킬 수 있다. 그 후, 폴리펩티드가 막에 결합되었는지, 용해성인지, 혹은 응집된 형태로 존재하는지에 따라, 폴리펩티드를 용해성 단백질 분획으로부터 및 배양 용균물의 막 분획으로부터 정제할 수 있다. 그후, 폴리펩티드를 필요하다면 가용화 및 재혼합(refold)하고, 오염된 용해성 단백질과 폴리펩티드로부터 정제한다. 아미노펩티다아제가 더 이상 존재하지 않으므로, 혼합물로부터 절단된 폴리펩티드 불순물을 제거하는 임의의 전형적인 단계가 정제 계획으로부터 생략될 수 있다. 하나의 바람직한 실시양태에서는, 미국 특허 제 5,288,931 호에 개시된 바와 같이 응집된 폴리펩티드를 단리한 다음 동시에 가용화 및 재혼합 단계를 수행한다.

[0107] 특히 바람직한 실시양태에서, 세포 파괴(전술한 기술에 의해)에 의해 주변세포질로부터 회수하여 용균물을 형성한 다음, 무손상 미절단 폴리펩티드를 상기 용균물로부터 정제한다. 더욱 바람직하게는, 상기 용균물을 약 20 내지 25℃에서 적어도 약 1 시간 동안, 더욱 바람직하게는 실온 부근에서 약 2 내지 50 시간 동안, 더더욱 바람직하게는 실온 부근에서 약 5 내지 45 시간 동안, 가장 바람직하게는 실온 부근에서 약 20 내지 30 시간 동안 항온처리한다.

[0108] 다음 과정이 적절한 정제 과정의 예이다: 면역친화성 또는 이온-교환 컬럼 상에서 분획; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상에서의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산 암모늄 침전; 및 예를 들면 SEPHADEX G-75TM 컬럼을 이용하는 겔 여과.

[0109] II. 절단된 폴리펩티드의 제조 및 회수

[0110] 상기 선택적인 방법에서, 폴리펩티드를 아미노펩티다아제 b2324 폴리펩티드와 직접 접촉시켜 그를 절단시킨다. 이는 약 20 내지 40℃에서, 바람직하게는 약 30 내지 40℃에서, 약 50 시간에 이르는 시간 동안, 바람직하게는 적어도 약 1 시간 내지 45 시간 동안 항온처리하는 것을 포함하는 몇가지 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 접촉 방법의 바람직한 국면에서, 본 발명은 *yfcK* 유전자를 수용하고 그 N-말단에 부가된 아미노산을 갖는 상응하는 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세균 세포를 배양하는 것을 포함하는 절단된 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 배양은 *yfcK* 유전자를 발현 또는 과발현시키고 미절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현시키는 조건 하에 이루어지며, 상기 미절단 폴리펩티드와 아미노펩티다아제 b2324 단백질이 발현 후 접촉하지 않는 경우에는, 상기 미절단 폴리펩티드와 아미노펩티다아제 b2324 단백질을 접촉시켜 절단된 폴리펩티드를 생성한다. 바람직하게는 상기 접촉은 전술하거나 후술하는 조건 하에 항온처리함으로써 이루어지며 배양은 발효기에서 수행한다.

[0111] 바람직한 국면에서, 상기 폴리펩티드는 세포에 대하여 이종기원의 것이며, 더욱 바람직하게는 진핵세포의 폴리펩티드, 더더욱 바람직하게는 포유류의 폴리펩티드, 특히 인간 폴리펩티드이다. 바람직한 세포는 살모넬라 또는 엔테로박테리아세이 세포, 더욱 더 바람직하게는 이.콜리 세포, 가장 특별히는 W3110이다. 또한 바람직한 것은 *degP* 또는 *fhuA* 또는 그 둘다와 같이 프로테아제를 코딩하는 적어도 하나의 유전자가 결핍된 세포이다.

[0112] 바람직한 국면에서, 배양 조건은 *yfcK* 유전자가 과발현되는 조건이다. *yfcK* 유전자는 상기 세균 세포에 대하여 천연이거나 그러한 유전자를 수용하는 벡터로 변형되는 등에 의해 그에 도입된 것일 수 있다.

[0113] 또다른 바람직한 국면에서, 상기 미절단 폴리펩티드는 아미노펩티다아제 b2324 단백질과 접촉하기 전에 세포로부터 회수되고, 상기 미절단 폴리펩티드는 주변세포질 또는 세포의 배양 배지로부터 회수된다. 한 실시양태에서, 회수는 세포 파괴(전술한 바와 같음)에 의해 용균물을 형성하고, 아미노펩티다아제를 첨가한 다음, 상기 절단된 폴리펩티드를 상기 용균물로부터 정제함으로써 이루어진다. 바람직하게는, 이러한 경우, 상기 용균물을 정제 단계 이전에 아미노펩티다아제와 함께 항온처리한다. 더욱 바람직하게는 정제 단계 이전에 용균물을 약 20 내지 40℃에서 적어도 약 1 시간 동안, 더욱 바람직하게는 30 내지 40℃에서 약 2 내지 50 시간 동안, 더더욱 바람직하게는 30 내지 40℃에서 약 5 내지 45 시간 동안, 가장 바람직하게는 35 내지 38℃에서 약 20 내지 30 시간 동안 항온처리한다.

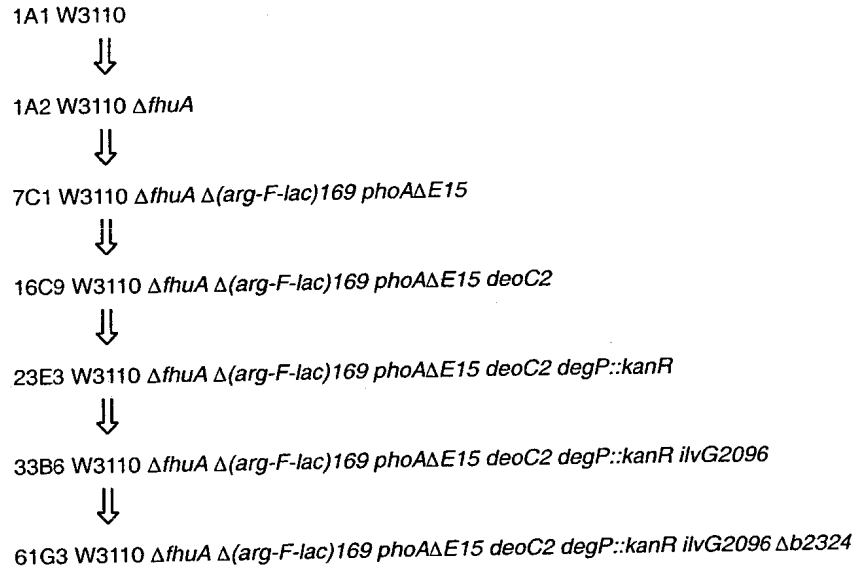
[0114] 절단된 폴리펩티드가 재조합적으로 제조되는 경우, 모 균주, 배양 조건, 발현의 검출, 회수/정제, 및 기본 기술은 일반적으로 전술한 바와 같다. 그러나, 배양된 균주 내의 과발현을 위해, 전형적으로 *yfcK* 유전자는, 숙주 세포에 대하여 내생이건(염색체 중) 외인성이건 간에, 유도가능한 촉진제에 작동적으로 결합되어 그 촉진제가 유도될 때 그 유전자가 발현되도록 한다. 배양은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 발현을 유도하기에 앞서 *yfcK*

유전자의 발현이 유도되는 조건 하에 바람직하게 일어난다. 여기에서 유용한 유전자의 과발현을 위한 적절한 기술은 문헌[Joly 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2773-2777 (1998); 미국 특허 제 5,789,199 호 및 5,639,635 호; Knappik 등, *Bio/Technology*, 11(1): 77-83 (1993); 및 Wulfig and Pluckthun, *Journal of Molecular Biology*, 242(5): 655-69 (1994)]에 기재된 것들을 포함한다.

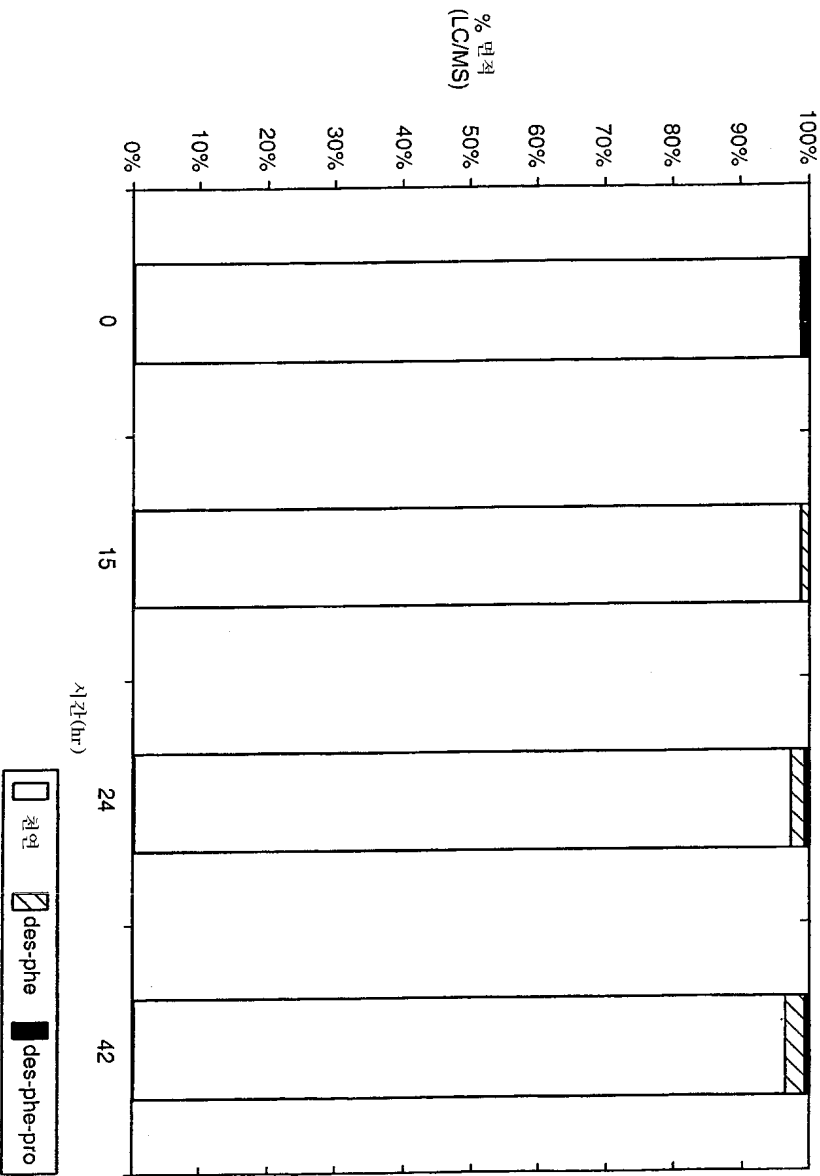
[0115] 본 발명은 이하의 실시예를 참고하면 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이는 본 발명의 범위를 한정하고자 함이 아니다. 여기에서 모든 문헌 및 특허 인용은 참고문헌으로 도입된다.

도면

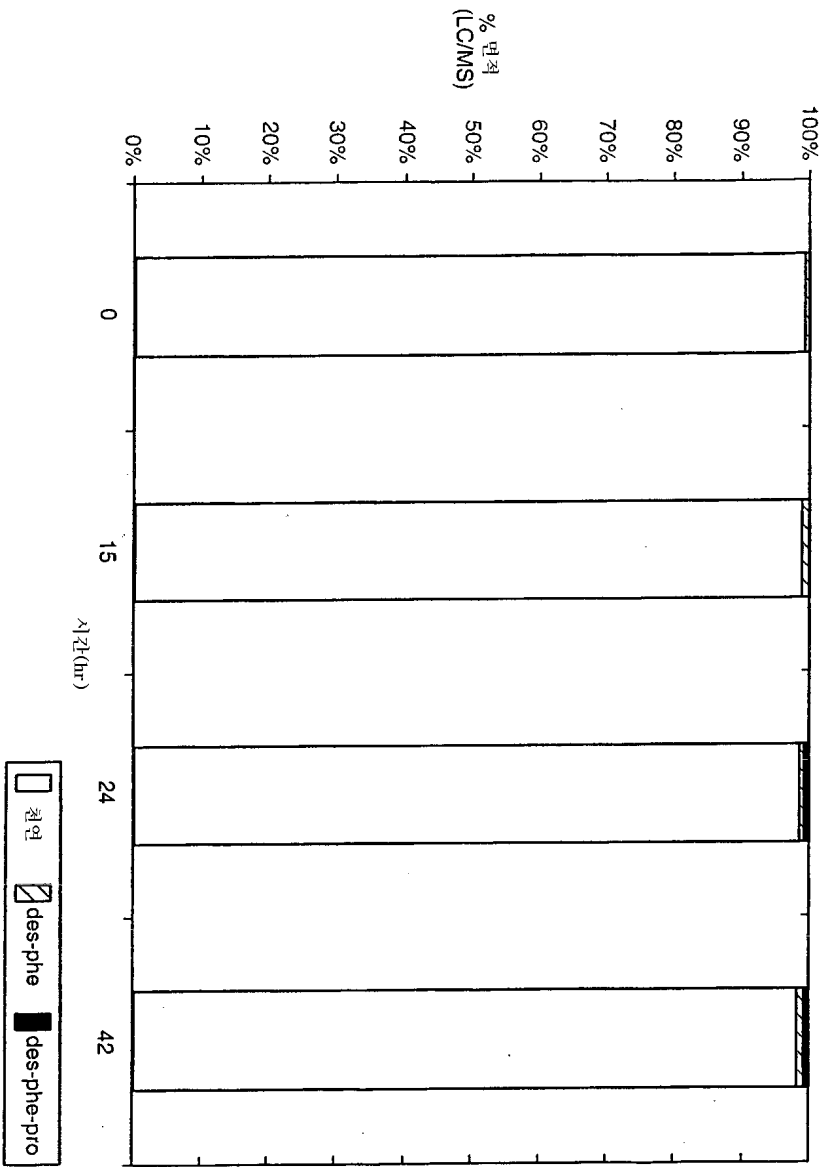
도면1



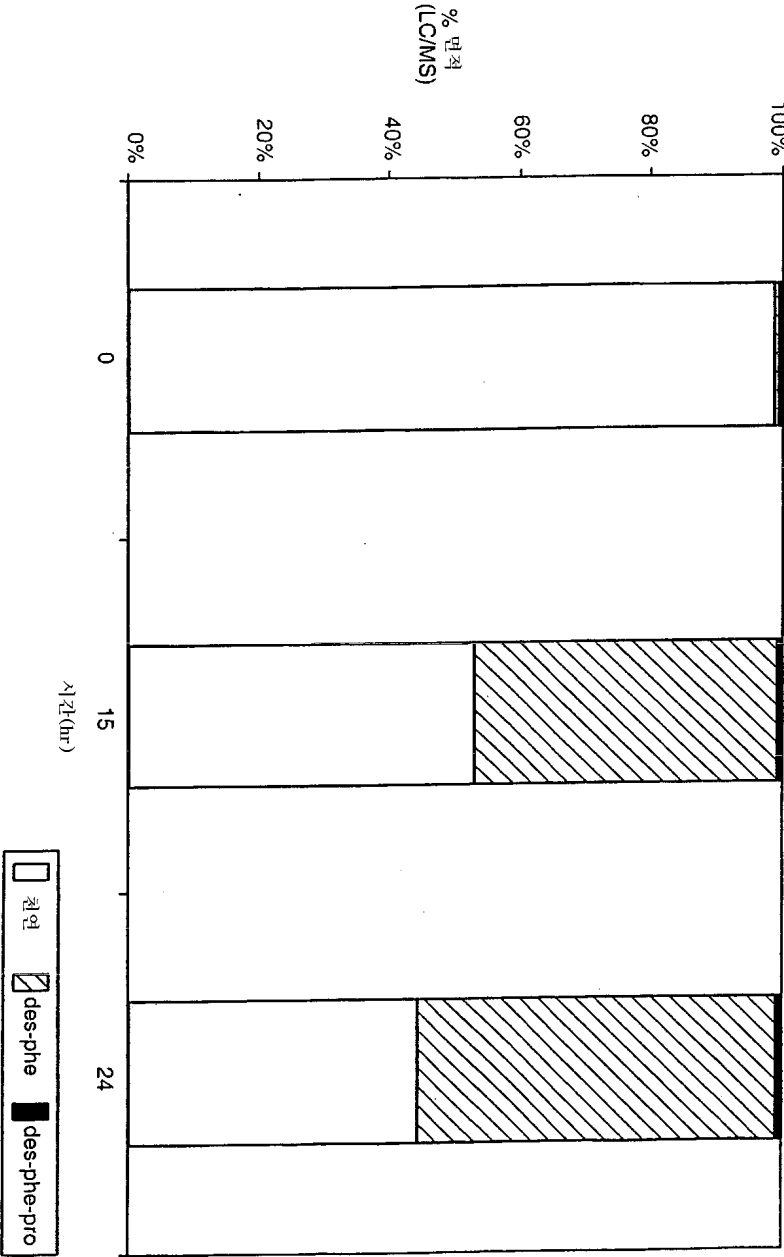
도면2



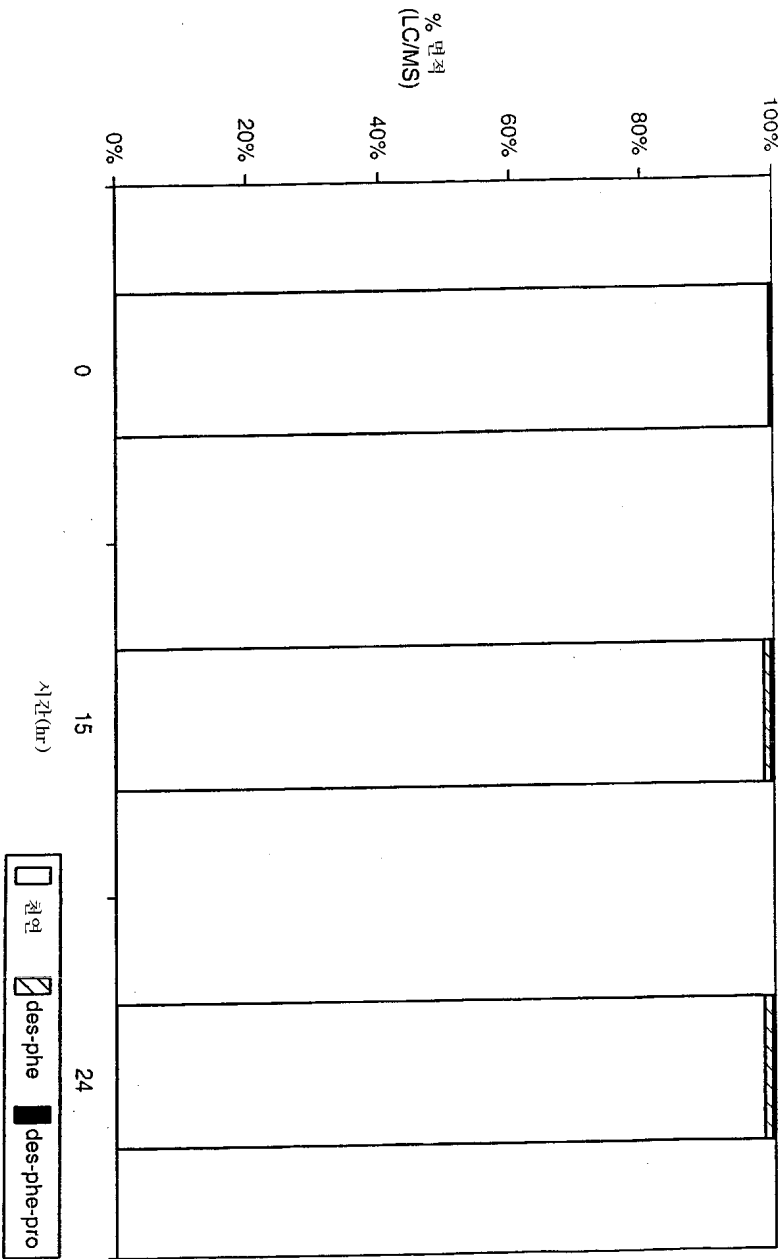
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> Joly, John C.

<120> AMINOPEPTIDASE

<130> P1920R1

<141> 2002-09-12

<150> US 60/322,350

<151> 2001-09-13

<160> 2

<210> 1

<211> 2067

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

```

ttgcgcagcc ttacacacat cgctaagatc gagccaccgc ctgtaagacg 50

agtaacttac gtgaaacact actccataca acctgccaac ctcgaattta 100

atgctgaggg tacacctgtt tcccgagatt ttgacgatgt ctatttttcc 150

aacgataacg ggctggaaga gacgcgttat gtttttctgg gaggcaacca 200

attagaggta cgctttcctg agcatccaca tcctctgttt gtggtagcag 250

agagcggctt cggcaccgga ttaaacttcc tgacgctatg gcaggcattt 300

gatcagtttc gcgaagcgca tccgaagcg caattacaac gcttacattt 350

cattagtttt gagaaatttc ccctcaccg tgcggattta gccttagcgc 400

atcaacactg gccggaactg gctccgtggg cagaacaact tcaggcgagc 450

tggccaatgc ccttgcccgg ttgccatcgt ttattgctcg atgaaggccg 500

cgtgacgctg gatttatggt ttggcgatat taacgaactg accagccaac 550

tggacgattc gctaaatcaa aaagtagatg cctggtttct ggacggcttt 600

gcgccagcga aaaaccgga tatgtggacg caaaatctgt ttaacgcat 650

ggcaaggttg gcgcgtccgg gcggcacgct ggcgacattt acgtctgccg 700

```


gttttgtccg ccgcggtttg caggacgccg gattcacgat gcaaaaacgt 750

aagggtttg ggcgcaaacg ggaaatgctt tgcgggtga tggaacagac 800

attaccgtc cctgtccg cgccgtggtt taaccgcacg ggcagcagca 850

aacgggaagc ggcgattatc ggcggtggtt ttgccagcgc gtgtgtgtcg 900

ctggcgctat tacggcgccg ctggcaggta acgctttatt gcgcggatga 950

ggcccccga ctgggtgctt ccgcaatcg ccagggggcg ctgtatccgt 1000

tattaagcaa acacgatgag gcgctaaacc gctttttctc taatgcgttt 1050

acttttgctc gtcggtttta cgaccaatta cccgttaaatt ttgatcatga 1100

ctggtgcggc gtcacgcagt taggctggga tgagaaaagc cagcataaaa 1150

tcgcacagat gttgtcaatg gattaccgc cagaactggc tgtagccgtt 1200

gaggcaaatg cggttgaaca aattacgggc gttgcgacaa attgcagcgg 1250

cattacttat ccgcaagggtg gttggctgtg cccagcagaa ctgacccgta 1300

atgtgctgga actggcgcaa cagcagggtt tgcagattta ttatcaatat 1350

cagttacaga atttatcccg taaggatgac tgttggttgt tgaattttgc 1400

aggagatcag caagcaacac acagcgtagt ggtactggcg aacgggcac 1450

aatcagccg attcagccaa acgtcgactc tcccgtgta ttcggttgcc 1500

gggcaggta gccatattcc gacaacgccg gaattggcag agctgaagca 1550

ggtgctgtgc tatgacggtt atctcacgcc acaaaatccg gcgaatcaac 1600

atcattgtat tggtgccagt tatcatcgcg gcagcgaaga tacggcgta 1650

agtggaggacg atcagcagca gaatcgccag cggttgattg attgtttccc 1700
 gcaggcacag tgggcaaaag aggttgatgt cagtgataaa gaggcgcgct 1750
 gcggtgtgcg ttgtgccacc cgcgatcatc tgccaatggt aggcaatgtt 1800
 cccgattatg aggcaacact cgtggaatat gcgtcgttgg cggagcagaa 1850
 agatgaggcg gtaagcgcgc cggtttttga cgatctcttt atgtttgcgg 1900
 ctttaggttc tcgcggtttg tgttctgccc cgctgtgtgc cgagattctg 1950
 gcggcgcaga tgagcgacga accgattccg atggatgcca gtacgctggc 2000
 ggcgtaaac ccgaatcggg tatgggtgcg gaaattgtt aagggtaaag 2050
 cggttaaggc ggggttaa 2067

<210> 2
 <211> 688
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 2
 Met Arg Ser Leu Thr His Ile Ala Lys Ile Glu Pro Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Arg Arg Val Thr Tyr Val Lys His Tyr Ser Ile Gln Pro Ala Asn
 20 25 30
 Leu Glu Phe Asn Ala Glu Gly Thr Pro Val Ser Arg Asp Phe Asp
 35 40 45
 Asp Val Tyr Phe Ser Asn Asp Asn Gly Leu Glu Glu Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Val Phe Leu Gly Gly Asn Gln Leu Glu Val Arg Phe Pro Glu His
 65 70 75
 Pro His Pro Leu Phe Val Val Ala Glu Ser Gly Phe Gly Thr Gly
 80 85 90

Leu Asn Phe Leu Thr Leu Trp Gln Ala Phe Asp Gln Phe Arg Glu
95 100 105

Ala His Pro Gln Ala Gln Leu Gln Arg Leu His Phe Ile Ser Phe
110 115 120

Glu Lys Phe Pro Leu Thr Arg Ala Asp Leu Ala Leu Ala His Gln
125 130 135

His Trp Pro Glu Leu Ala Pro Trp Ala Glu Gln Leu Gln Ala Gln
140 145 150

Trp Pro Met Pro Leu Pro Gly Cys His Arg Leu Leu Leu Asp Glu
155 160 165

Gly Arg Val Thr Leu Asp Leu Trp Phe Gly Asp Ile Asn Glu Leu
170 175 180

Thr Ser Gln Leu Asp Asp Ser Leu Asn Gln Lys Val Asp Ala Trp
185 190 195

Phe Leu Asp Gly Phe Ala Pro Ala Lys Asn Pro Asp Met Trp Thr
200 205 210

Gln Asn Leu Phe Asn Ala Met Ala Arg Leu Ala Arg Pro Gly Gly
215 220 225

Thr Leu Ala Thr Phe Thr Ser Ala Gly Phe Val Arg Arg Gly Leu
230 235 240

Gln Asp Ala Gly Phe Thr Met Gln Lys Arg Lys Gly Phe Gly Arg
245 250 255

Lys Arg Glu Met Leu Cys Gly Val Met Glu Gln Thr Leu Pro Leu
260 265 270

Pro Cys Ser Ala Pro Trp Phe Asn Arg Thr Gly Ser Ser Lys Arg
275 280 285

Glu Ala Ala Ile Ile Gly Gly Gly Ile Ala Ser Ala Leu Leu Ser

290	295	300
Leu Ala Leu Leu Arg Arg Gly Trp Gln Val Thr Leu Tyr Cys Ala		
305	310	315
Asp Glu Ala Pro Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asn Arg Gln Gly Ala		
320	325	330
Leu Tyr Pro Leu Leu Ser Lys His Asp Glu Ala Leu Asn Arg Phe		
335	340	345
Phe Ser Asn Ala Phe Thr Phe Ala Arg Arg Phe Tyr Asp Gln Leu		
350	355	360
Pro Val Lys Phe Asp His Asp Trp Cys Gly Val Thr Gln Leu Gly		
365	370	375
Trp Asp Glu Lys Ser Gln His Lys Ile Ala Gln Met Leu Ser Met		
380	385	390
Asp Leu Pro Ala Glu Leu Ala Val Ala Val Glu Ala Asn Ala Val		
395	400	405
Glu Gln Ile Thr Gly Val Ala Thr Asn Cys Ser Gly Ile Thr Tyr		
410	415	420
Pro Gln Gly Gly Trp Leu Cys Pro Ala Glu Leu Thr Arg Asn Val		
425	430	435
Leu Glu Leu Ala Gln Gln Gln Gly Leu Gln Ile Tyr Tyr Gln Tyr		
440	445	450
Gln Leu Gln Asn Leu Ser Arg Lys Asp Asp Cys Trp Leu Leu Asn		
455	460	465
Phe Ala Gly Asp Gln Gln Ala Thr His Ser Val Val Val Leu Ala		
470	475	480
Asn Gly His Gln Ile Ser Arg Phe Ser Gln Thr Ser Thr Leu Pro		
485	490	495

Val Tyr Ser Val Ala Gly Gln Val Ser His Ile Pro Thr Thr Pro
500 505 510

Glu Leu Ala Glu Leu Lys Gln Val Leu Cys Tyr Asp Gly Tyr Leu
515 520 525

Thr Pro Gln Asn Pro Ala Asn Gln His His Cys Ile Gly Ala Ser
530 535 540

Tyr His Arg Gly Ser Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Asp Asp Gln
545 550 555

Gln Gln Asn Arg Gln Arg Leu Ile Asp Cys Phe Pro Gln Ala Gln
560 565 570

Trp Ala Lys Glu Val Asp Val Ser Asp Lys Glu Ala Arg Cys Gly
575 580 585

Val Arg Cys Ala Thr Arg Asp His Leu Pro Met Val Gly Asn Val
590 595 600

Pro Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Val Glu Tyr Ala Ser Leu Ala Glu
605 610 615

Gln Lys Asp Glu Ala Val Ser Ala Pro Val Phe Asp Asp Leu Phe
620 625 630

Met Phe Ala Ala Leu Gly Ser Arg Gly Leu Cys Ser Ala Pro Leu
635 640 645

Cys Ala Glu Ile Leu Ala Ala Gln Met Ser Asp Glu Pro Ile Pro
650 655 660

Met Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ala Leu Asn Pro Asn Arg Leu Trp
665 670 675

Val Arg Lys Leu Leu Lys Gly Lys Ala Val Lys Ala Gly
680 685

