



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월04일
 (11) 등록번호 10-1636086
 (24) 등록일자 2016년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
 C12N 15/52 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-7009925
 (22) 출원일자(국제) 2008년10월23일
 심사청구일자 2013년08월12일
 (85) 번역문제출일자 2010년05월04일
 (65) 공개번호 10-2010-0082003
 (43) 공개일자 2010년07월15일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2008/069184
 (87) 국제공개번호 WO 2009/054433
 국제공개일자 2009년04월30일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2007-276182 2007년10월24일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 Guo-Hui Fu 등. FEBS Letters. Vol. 579, No. 10, 페이지 2105-2110 (2005)*
 GenBank Accession Number M27819 (1993.04.27.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤
 일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5반 1고
 (72) 발명자
 다부치 히사히로
 일본 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5방 1고 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 나이
 다이ना카 사토시
 일본 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5방 1고 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 나이
 스기야마 도모야
 일본 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5방 1고 추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 나이
 (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 11 항

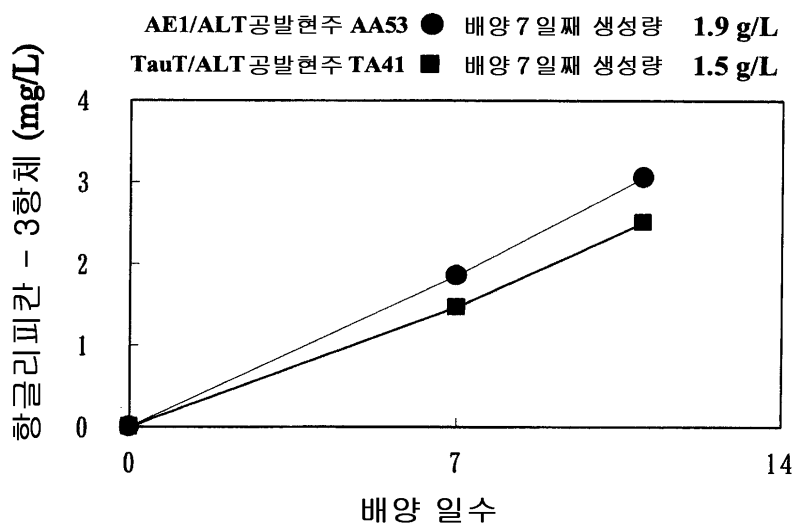
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **이중 단백질 제조를 위한 세포 및 그것을 사용한 제조 방법**

(57) 요약

효율적으로 단백질을 생산할 수 있는 방법을 제공한다. Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키고, 또한 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입한 세포를 배양하여 원하는 폴리펩티드를 생성시키는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.

대표도 - 도8



명세서

청구범위

청구항 1

Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 및 원하는 항체를 코딩하는 DNA 를 도입한 동물세포를 배양하여 원하는 항체를 생성시키는 것을 포함하는 항체의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 및 원하는 항체를 코딩하는 DNA 를 도입한 동물세포가 추가로 시스테인 술폰산 테카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 강하게 발현시키는 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

Bicarbonate 트랜스포터가 SLC4 아ни온 익스체인저 또는 SLC26 아ни온 익스체인저인 제조 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

Bicarbonate 트랜스포터가 SLC4 아ни온 익스체인저인 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

SLC4 아ни온 익스체인저가 AE1 인 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

동물세포가 차이나이즈 햄스터 난소 세포인 제조 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 4 항에 있어서,

SLC4 아ни온 익스체인저를 코딩하는 DNA 가 이하의 (a) ~ (d) 중 어느 것인 제조 방법.

(a) 배열 번호 2 의 아미노산 배열로 이루어진 폴리펩티드를 코딩하는 DNA,

(b) 배열 번호 2 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가, 삽입 또는 이들 중 2 이상을 갖는 아미노산 배열로 이루어지고, 또한 SLC4 아ни온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA,

(c) 배열 번호 1 의 염기 배열로 이루어진 DNA,

(d) 배열 번호 1 의 염기 배열로 이루어진 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이즈하

고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA.

청구항 10

제 1 항 또는 제 3 항에 기재된 방법으로 제조된 항체를 함유하는 의약품 제조하는 방법.

청구항 11

Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 와 원하는 항체를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 동물세포.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

추가로 시스테인술피산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 동물세포.

청구항 13

Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 와 시스테인술피산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 동물세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이중 단백질을 제조하기 위한 세포 및 그것을 사용한 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포 및 그것을 사용하여 폴리펩티드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 재조합 기술을 사용하여 의약으로서 유용한 단백질을 생산할 때, 동물 세포를 사용하면, 원핵 세포가 할 수 없는 복잡한 번역 후 수식이나 폴딩이 가능해지기 때문에, 동물 세포는 재조합 단백질을 생산하기 위한 숙주 세포로서 다루어지고 있다.

[0003] 최근 항체나 생리 활성 단백질 등의 많은 바이오 의약품이 배출되고 있는데, 재조합 단백질을 효율적으로 동물 세포에 생산시키는 기술은, 바이오 의약품의 저비용화로 이어져 환자에 대한 안정된 공급을 약속하는 것이다.

[0004] 따라서, 보다 생산 효율이 높은 단백질의 제조 방법이 요망되고 있다.

[0005] 아니온 익스체인저는 세포막 내외의 아니온을 교환 수송하는 트랜스포터 (막수송 단백질) 이다. SLC4 패밀리는 HCO_3^- 의 트랜스포터의 패밀리인데, 거기에 속하는 AE1, AE2 및 AE3 이라는 3 개의 멤버는, 세포막 밖의 Cl^- 를 세포막 안의 HCO_3^- 와 교환하는 기능을 갖는다.

[0006] 신장에서 AE1 은 측저막의 집합 요세관의 α 간재 세포에서 관찰된다 (비특허문헌 1). 인간에 있어서의 AE1 의 변이는, 원위 요세관성 아시도시스를 일으킨다는 것이 알려져 있다 (비특허문헌 2 및 3).

[0007] 또, 신장에서 AE2 에는 AE2a, AE2b 및 AE2c 라는 3 개의 이소폼이 발견되고 있다. AE2 는 세포 시그널의 전달을 위해 세포 내 pH 호메오스타시스를 제어하는 것으로 생각되는데 (비특허문헌 4), AE2 녹아웃 마우스는 이 유기에 사망하지만, 신장 (腎臟) 성의 표현형 이상은 관찰되지 않는다 (비특허문헌 5).

[0008] SLC26 은 비교적 새로운 아니온 익스체인저 패밀리로서, 그 다수의 멤버 (예를 들어, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6, SLC26A9 등) 가 Bicarbonate 익스체인저인 것이 시사되어 있다 (비특허문헌 6 ~ 11).

[0009] 한편, Bicarbonate 트랜스포터 기능을 갖는 아니온 익스체인저를 강하게 발현시킴으로써, 아니온 익스체인저를 통한 아니온의 배양 세포 내로의 삽입 및 세포 외로의 배출을 인위적으로 촉진시키는 것이, 배양 세포에 있어서의 원하는 재조합 단백질의 생성 향상에 기여한다는 것에 대하여는 전혀 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) van Adelsberg JS.et.al., J Biol Chem 1993 ; 268 : 11283-11289
- (비특허문헌 0002) Shayakui C.et.al., Curr Opin Nephrol Hypertens 2000 ; 9 : 541-546
- (비특허문헌 0003) Alper SL.et.al., Annu Rev Physiol 2002 ; 64 : 899-923
- (비특허문헌 0004) Komlosi P.et.al., Am J Physiol Renal Physiol 2005 ; 288 : F380-F386
- (비특허문헌 0005) Gawenis LR.et.al., J Biol Chem 2004 ; 279 : 30531-30539
- (비특허문헌 0006) Melvin et al, J Biol Chem 1999 ; 274 : 22855-22861
- (비특허문헌 0007) Ko et al., EMBO J. 2002 ; 21 : 5662-5672
- (비특허문헌 0008) Soleimani et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2001 ; 280 : F356-F364
- (비특허문헌 0009) Wang et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2002 ; 282 : G573-G579
- (비특허문헌 0010) Petrovic et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004 ; 286 : F161-F169
- (비특허문헌 0011) Xu et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005 ; 289 : C493-C505

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 효율적으로 폴리펩티드를 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 예의 노력한 결과, Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포를 사용함으로써 원하는 폴리펩티드의 생산량을 증가시킬 수 있다는 것을 알아내어 본 발명을 완성시키기에 이르렀다. 또한, Bicarbonate 트랜스포터와 시스테인술피산 데카르복실라아제 (이하, 「CSAD」라고 기재하는 경우도 있다) 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 (이하, 「ALT」라고 기재하는 경우도 있다) 를 공(共)발현시키는 세포를 사용함으로써, 원하는 폴리펩티드의 생산량을 더욱 증가시킬 수 있었다.
- [0013] 본 발명의 요지는 이하와 같다.
- [0014] (1) Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키고, 또한 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입한 세포를 배양하여 원하는 폴리펩티드를 생성시키는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법.
- [0015] (2) Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포가, Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 를 도입한 세포인 (1) 에 기재된 제조 방법.
- [0016] (3) Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포가, 추가로 시스테인술피산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 강하게 발현시키는 (1) 또는 (2) 에 기재된 제조 방법.
- [0017] (4) Bicarbonate 트랜스포터가, SLC4 아니온 익스체인저 또는 SLC26 아니온 익스체인저인 (1) 내지 (3) 에 기재된 제조 방법.
- [0018] (5) Bicarbonate 트랜스포터가, SLC4 아니온 익스체인저인 (1) 내지 (3) 에 기재된 제조 방법.
- [0019] (6) SLC4 아니온 익스체인저가, AE1 인 (5) 에 기재된 제조 방법.
- [0020] (7) 세포가 차이나이즈 햄스터 난소 세포인 (1) ~ (6) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0021] (8) 원하는 폴리펩티드가 항체인 (1) ~ (7) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0022] (9) SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 가, 이하의 (a) ~ (e) 중 어느 것인 (4) ~ (6) 중 어느 하나에

기재된 제조 방법.

- [0023] (a) 배열 번호 2 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0024] (b) 배열 번호 2 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0025] (c) 배열 번호 2 의 아미노산 배열과 50 % 이상의 상동성을 갖고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0026] (d) 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA
- [0027] (e) 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0028] (10) (1) ~ (9) 중 어느 하나에 기재된 방법으로 제조된 폴리펩티드를 함유하는 의약품을 제조하는 방법.
- [0029] (11) Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 와 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 세포.
- [0030] (12) 추가로 시스테인술폰산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 (11) 에 기재된 세포.
- [0031] (13) Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 와 시스테인술폰산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 세포.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 의해 대량으로 원하는 폴리펩티드를 생산할 수 있게 되었다.
- [0033] 본 명세서는 본원의 우선권의 기초인 일본 특허출원 2007-276182의 명세서 및/또는 도면에 기재되어 있는 내용을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1 은 인간 간세포 유래 AE1 의 아미노산 배열로부터 Tmpred program 에 의해 예측된 막 관통 영역 및 방향에 기초하여, Exo Physiol 91.1 pp153-161, 2006, Seth L.Alper 의 FIG.1. 을 참고로 작성한 AE1 막 토폴로지이다.
- 도 2 는 인간 AE1 (911 아미노산) 을 발현시킨 Hygromycin 선발용 플라스미드이다.
- 도 3 은 인간 AE1 (911 아미노산) 을 발현시킨 Puromycin 선발용 플라스미드이다.
- 도 4 는 50 ml 웨이커 플라스크 유가 (流加) 배양 12 일째에 있어서의 항글리피칸-3 항체 생성량 플롯이다. pHyg-AE1 도입 세포 (n = 4) 의 항글리피칸-3 항체 생성량은, pHyg 도입 세포 (n = 4) 에 대하여 우위였다 (P < 0.05).
- 도 5 는 50 ml 웨이커 플라스크 유가 배양 10 일째에 있어서의 항글리피칸-3 항체 생성량 플롯이다. pHyg-AE1 도입 항체 고생성 세포의 pHyg-AE1-42 주에 pPur-CSAD 를 도입한 공발현 세포 AE1/CSAD 주 (n = 9) 의 항글리피칸-3 항체 생성량은, pHyg-AE1-42 주에 pPur 을 도입한 공발현 세포 AE1/pPur (n = 8) 에 대하여 우위였다 (P < 0.05).
- 도 6 은 50 ml 웨이커 플라스크 유가 배양 10 일째에 있어서의 생존률 플롯이다. pHyg-AE1 도입 항체 고생성 세포의 pHyg-AE1-42 주에 pPur-CSAD 를 도입한 공발현 세포 AE1/CSAD 주 (n = 9) 의 생존률은, pHyg-AE1-42 주에 pPur 을 도입한 공발현 세포 AE1/pPur (n = 8) 에 대하여 우위였다 (P < 0.01). 배양 7 일째에 있어서의 생존률에 있어서도 P < 0.01 이었다 (data not shown).
- 도 7 은 50 ml 웨이커 플라스크 유가 배양 8 일째에 있어서의 항글리피칸-3 항체 생성량 플롯이다. pHyg-AE1 도입 항체 고생성 세포였던 pHyg-AE1-42 주에 pPur-ALT1 을 도입한 공발현 세포 AE1/ALT 주 (n = 10) 의 항글리피칸-3 항체 생성량은 AE1/CSAD 주 (n = 9) 이상으로, pHyg-AE1-42 주에 pPur 을 도입한 공발현 세포 AE1/pPur (n = 8) 에 대하여 우위였다 (P < 0.01).
- 도 8 은 AE1/ALT1 공발현주인 AA53 의 1 l Jar 유가 배양의 항체 생성량을 나타내는 그래프이다. 배양 7

일체에 있어서의 항글리피칸-3 항체 생성량은 1.9 g/l 였다.

도 9 는 신규로 클로닝된 CHO 세포 유래 햄스터 CSAD 유전자의 염기 배열 및 아미노산 배열을 나타낸다.

도 10 은 Hamster CSAD (493 아미노산) 를 발현시킨 Puromycin 선발용 플라스미드이다.

도 11 은 인간 ALT1 (496 아미노산) 을 발현시킨 Puromycin 선발용 플라스미드이다.

도 12 는 AE1 강발현 숙주 유래 항 IL-6R 항체 생성 세포 AE1-S08 의 1 l Jar 유가 배양에 있어서의 항체 생성량을 나타내는 그래프이다. 배양 14 일째에 있어서의 항 IL-6R 항체 생성량은 3.0 g/l 였다.

도 13 은 신규로 클로닝된 CHO 세포 유래 햄스터 타우린 트랜스포터 유전자의 염기 배열 및 아미노산 배열을 나타낸다.

도 14 는 신규로 클로닝한 CHO 세포 유래 Hamster TauT 의 아미노산 배열로부터 TMpred program 에 의해 예측된 막 관통 영역 및 방향에 기초하여, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.89, pp.8230-8234, September 1992, Shinichi Uchida et.al. 의 FIG.5. 를 참고로 작성된 타우린 트랜스포터 막 토폴로지이다. © 는 Hamster TauT 특이적인 아미노산 잔기로서, 제 2 루프 (EX : 세포막의 영역), 12 번째의 막 관통 영역 (TM) 및 C 말단 (IC : 세포내 영역) 에 Human TauT 와 상이한 아미노산이 다수 존재한다.

도 15 는 Hamster TauT (622 아미노산) 를 발현시킨 Hygromycin 선발용 플라스미드이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명의 실시형태에 대하여 보다 상세하게 설명한다.
- [0036] 본 발명은 Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키고, 또한 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입한 세포를 배양하여 원하는 폴리펩티드를 생성시키는 것을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 방법에 있어서, 세포는 원하는 폴리펩티드를 생성할 수 있는 천연 세포여도 되고, 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입한 형질 전환 세포여도 되지만, 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입한 형질 전환 세포가 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 방법에 있어서, 원하는 폴리펩티드는 특별히 한정되지 않으며, 항체 (예를 들어, 항 IL-6 리셉터 항체, 항글리피칸-3 항체, 항 CD3 항체, 항 CD20 항체, 항 GPIIb/IIIa 항체, 항 TNF 항체, 항 CD25 항체, 항 EGFR 항체, 항 Her2/neu 항체, 항 RSV 항체, 항 CD33 항체, 항 CD52 항체, 항 IgE 항체, 항 CD11a 항체, 항 VEGF 항체, 항 VLA4 항체 등) 나 생리 활성 단백질 (과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구 마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 에리스로포이에틴, 인터페론, IL-1 이나 IL-6 등의 인터류킨, t-PA, 우로키나아제, 혈청 알부민, 혈액 응고 인자, PTH 등) 등 어떠한 폴리펩티드여도 되지만, 특히 항체가 바람직하다. 항체는 천연 항체, Fab, scFv, sc(Fv)₂ 등의 저분자화 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 등 어떠한 항체여도 된다.
- [0039] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포를 사용함으로써, 세포에 의한 폴리펩티드의 생성량을 증가시킬 수 있다.
- [0040] Bicarbonate 트랜스포터는 탄산수소 이온 (HCO₃⁻) 또는 탄산 이온 (CO₃²⁻) 을 배출함과 함께 염소 이온이나 황산 이온 등을 삽입하는, 교환 수송 기능을 갖는 막단백이다. Bicarbonate 트랜스포터로는, SLC4 이온 엑스체인저, SLC26 이온 엑스체인저 등을 예시할 수 있다.
- [0041] SLC4 이온 엑스체인저는, 세포 내 pH 호메오스타시스 및 세포 용적을 제어하는 막단백이다. 현재 10 종 (SLC4A1(AE1), SLC4A2(AE2), SLC4A3(AE3), SLC4A4(NBCe1), SLC4A5(NBCe2), SLC4A7(NBCn1), SLC4A8(kNBC3), SLC4A9(NBCn2), SLC4A10(NBCn3), SLC4A11(NaBC1)) 의 SLC4 패밀리가 알려져 있으며, 적어도 1 종 이상의 이소폼이 존재한다. 또, 각각은 Na⁺ 비의존적으로 전하적 중성인 Cl⁻ 와 HCO₃⁻ 의 엑스체인저인 SLC4A1(AE1), SLC4A2(AE2), ALC4A3(AE3), ALC4A9 (NBCn2 또는 AE4), 기전성 (起電性) 의 ALC4A4(NBCe1), ALC4A5(NBCe2), 전하적 중성인 Na⁺ 와 HCO₃⁻ 의 공(共)수송체인 ALC4A7(NBCn1), Na⁺ 의존적으로 전하적 중성인 Cl⁻ 와 HCO₃⁻ 의 엑스체인저인 ALC4A8(kNBC3), ALC4A10(NBCn3), 기전성의 Na⁺ 와 Borate 의 공수송체인 ALC4A11(NaBC1) 등과 상이한 기능을 가지고 있다. 이들은 국소 특이적인 작용을 갖는다. 예를 들어, AE1 의 경우, 극성을 갖는 상피 세포에서는 상피를 통한 분비나 산염기의 재흡수에 기여하고, 송어의 적혈구에서는 osmolyte 수송을 촉진

시킨다. SLC4 아니온 익스체인저로는, SLC4A1(AE1), SLC4A2(AE2), SLC4A3(AE3), SLC4A4(NBCe1), SLC4A5(NBCe2), SLC4A7(NBCn1), SLC4A8(kNBC3), SLC4A9(NBCn2), SLC4A10(NBCn3), SLC4A11(NaBC1) 등을 예시할 수 있는데, AE1 이 바람직하다.

- [0042] SLC26 아니온 익스체인저는 거의 모든 장기계에서 작용하는 다기능의 막단백으로서, 황산 아니온, 요오드 아니온, 포름산 아니온, 옥살산 아니온, 염소 아니온, 하이드록실 아니온, 탄산수소 아니온 등의 교환 수송을 행하는 것이나, 염소 이온 채널, 혹은 아니온 의존성 분자 모터가 존재한다. 여러 가지 아니온의 호메오스타시스에 관여하고 있는 것으로 생각되며, 10 종 (SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11) 의 아니온 익스체인저 패밀리가 알려져 있다. 예를 들어, 하이드록실 아니온, 탄산수소 아니온의 트랜스포터인 SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6, SLC26A9 는, SLC4 아니온 익스체인저와 마찬가지로 막 내외의 pH 를 제어하고 있다. 신장에서 발견되고 있는 것은, SLC26A1, SLC26A2, SLC26A4, SLC26A6, SLC26A9, SLC26A11 이다. SLC26A1 은 황산 아니온과 옥살산 아니온을 수송하고, SLC26A6 은 염화나트륨을 삼입하기 위해 여러 가지의 아니온을 교환 수송한다. SLC26A1 은 신석증, SLC26A4 와 SLC26A6 은 고혈압증, SLC26A5 는 난청의 병인이 된다. SLC26A7 은 SLC26A4 와 마찬가지로 산업기의 호메오스타시스나 혈압 제어에 관여한다. SLC26 아니온 익스체인저로는, SLC26A1, SLC26A2, SLC26A3, SLC26A4, SLC26A5, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11 등을 예시할 수 있다.
- [0043] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포는, 천연 세포와 비교하여 Bicarbonate 트랜스포터의 발현량이 증가되고 있는 세포라면 특별히 한정되지 않는다. 천연 세포는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어 CHO 세포 등 재조합 단백질을 제조할 때에 숙주로서 사용되고 있는 세포를 들 수 있다.
- [0044] 세포에 강하게 발현시키는 Bicarbonate 트랜스포터는, 어떠한 생물 유래 Bicarbonate 트랜스포터여도 되며, 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는, 인간, 또는 마우스, 래트, 햄스터 등의 설치류, 침팬지, 소, 말, 개, 늑대 등의 포유류, 닭 등의 조류, 제브라 피쉬, 뱀장어 등의 어류, 초파리 등의 곤충류 등의 생물 유래 Bicarbonate 트랜스포터를 들 수 있으며, 인간, 설치류 혹은 숙주 세포와 동일한 종 유래의 Bicarbonate 트랜스포터인 것이 바람직하고, 예를 들어 Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포가 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO 세포) 인 경우에는, 인간 혹은 햄스터 유래 Bicarbonate 트랜스포터인 것이 바람직하다.
- [0045] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포는, 동물 세포, 식물 세포, 효모 등의 진핵 세포 ; 대장균, 고초균 등의 원핵 세포 등 어떠한 세포여도 되고, CHO 세포, COS 세포 등의 동물 세포가 바람직하며, 특히 CHO 세포가 바람직하다. 또, 원하는 폴리펩티드를 제조하기 위해서는, CHO dhfr-세포 등 원하는 유전자를 도입하는 데에 적합한 세포인 것이 바람직하다.
- [0046] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포로는, 예를 들어 Bicarbonate 트랜스포터 유전자 (예를 들어, SLC4 아니온 익스체인저 유전자, SLC26 아니온 익스체인저 유전자 등) 가 인위적으로 도입된 세포를 들 수 있다. Bicarbonate 트랜스포터 유전자가 인위적으로 도입된 세포는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있으며, 예를 들어 Bicarbonate 트랜스포터 유전자를 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 세포로 형질 전환함으로써 제작할 수 있다. 또한, 본 명세서에서는 유전자 활성화 기술 (예를 들어, 국제 공개 제W094/12650호 팜플렛 참조) 에 의해 내인성 Bicarbonate 트랜스포터 유전자가 활성화되고, 그 결과, Bicarbonate 트랜스포터가 강하게 발현된 세포도 Bicarbonate 트랜스포터 유전자가 인위적으로 도입된 세포에 포함된다.
- [0047] 세포에 도입하는 SLC4 아니온 익스체인저 유전자로는, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 이하의 (a) ~ (e) 중 어느 것의 DNA 를 들 수도 있다.
- [0048] (a) 배열 번호 2 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0049] (b) 배열 번호 2 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수 (예를 들어, 수 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0050] (c) 배열 번호 2 의 아미노산 배열과 50 % 이상의 상동성을 갖고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0051] (d) 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA
- [0052] (e) 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이즈하고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA

- [0053] SLC4 아ни온 익스체인저 활성이란, 세포 내 pH 의 항상성이나 세포 용적을 유지시키기 위해, 배지 중의 Cl^- 나 SO_4^{2-} 삽입하고, 세포 내의 HCO_3^- 나 Borate 를 배출하는 활성을 포함하는 개념이다.
- [0054] SLC4 아ни온 익스체인저 활성은, 이하와 같이 하여 측정할 수 있다.
- [0055] SLC4 를 기능적으로 발현시킨 세포를 pH 감수성 색소인 BCECF-AM 으로 처리하고, Cl^- 나 Na^+ 를 포함하는 배지와 포함하지 않는 배지를 관류시켰을 때의 형광 강도 비교에 의해, 세포 내 pH (pHi) 의 변화를 측정할 수 있다 (Dahl NK.et.al., J Biol Chem 2003 ; 278 : 44949-44958 ; Fujinaga J.et.al., J Biol Chem 1999 ; 274 : 6626-6633).
- [0056] 본 발명에 있어서, SLC4 아ни온 익스체인저를 코딩하는 DNA 로서, 배열 번호 2 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용하면 된다. 그 밖에도, 배열 번호 2 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수 (예를 들어, 수 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 SLC4 아ни온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다. 배열 번호 2 의 아미노산 배열은, 인간 AE1 의 아미노산 배열이다. AE1 에 대해서는, 인간 이외에도 마우스, 래트, 침팬지, 소, 말, 개, 늑대, 닭, 제브러 피쉬 등의 배열 정보가, 마우스 GenBank NM_011403, 래트 GeneBank NM_012651, 침팬지 GenBank XM_001151353, 소 GeneBank NM_181036, 말 GeneBank NM_001081788, 개 GenBank AB242566, 늑대 GeneBank NM_001048031, 닭 GenBank NM_205522, 제브러 피쉬 GenBank NM_198338 등에 등록되어 있으므로, 그것을 이용할 수도 있다. 다른 SLC4 아ни온 익스체인저에 대해서도 각종 데이터베이스에 배열 정보가 등록되어 있어, 그것들을 이용해도 된다.
- [0057] 배열 번호 2 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수 (예를 들어, 수 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 SLC4 아ни온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드는, 인간, 마우스, 래트, 닭, 침팬지, 소, 말, 개, 늑대, 닭, 제브러 피쉬 SLC4 아ни온 익스체인저 (이하, 「인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저」라고 기재하는 경우도 있다) 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드이다. 이와 같은 폴리펩티드에는, 예를 들어 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저의 변이체 등이 포함된다. 후술하는 실시예에서는, 공개되어 있는 인간 SLC4 아ни온 익스체인저 유전자 (AE1 유전자) 가 코딩하고 있는 아미노산 911 개 중, 4 아미노산 (L88R, E693G, V712A, H834Y) 이 치환되어 있는 변이체가 사용되었다.
- [0058] 어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하기 위한 당업자에게 잘 알려진 방법으로는, 폴리펩티드에 변이를 도입하는 방법이 알려져 있다. 예를 들어, 당업자라면 부위 특이적 변이 유발법 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) 등을 사용하여, 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저의 아미노산에 적절히 변이를 도입함으로써, 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제할 수 있다. 또, 아미노산의 변이는 자연계에서도 발생될 수 있다.
- [0059] 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드로는, 구체적으로는 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저의 아미노산 배열 (예를 들어, 배열 번호 2 의 아미노산 배열) 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 결실된 것, 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저의 아미노산 배열에 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 부가된 것, 인간 등의 SLC4 아ни온 익스체인저의 아미노산 배열 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것 등을 들 수 있다.
- [0060] 변이하는 아미노산 잔기는 특별히 한정되지 않지만, 아미노산 측사슬의 성질이 보존되어 있는 다른 아미노산으로 변이되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 아미노산 측사슬의 성질로는, 소수성 아미노산 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 지방족 측사슬을 갖는 아미노산 (G, A, V, L, I, P), 수산기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (S, T, Y), 황 원자 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (C, M), 카르복실산 및 아미드 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (D, N, E, Q), 염기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (R, K, H), 방향족 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (H, F, Y, W) 을 들 수 있다 (괄호 안은 모두 아미노산의 1 문자 표기를 나타낸다).

- [0061] 또한, 어느 아미노산 배열에 대한 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기의 결실, 부가 및/또는 다른 아미노산에 의한 치환에 의해 수식된 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드가 그 생물학적 활성을 유지한다는 것은 이미 알려져 있다 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500, Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433, Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).
- [0062] 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저에 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기가 부가된 폴리펩티드로는, 예를 들어 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저를 포함하는 융합 폴리펩티드를 들 수 있다. 융합 폴리펩티드는, 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 다른 폴리펩티드가 융합된 것이다. 융합 폴리펩티드를 제작하는 방법은, 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저를 코딩하는 유전자와 다른 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 프레임이 일치하도록 연결하고, 이것을 발현 벡터에 도입하여 숙주에서 발현시키면 되고, 당업자에게 공지된 수법을 사용할 수 있다. 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와의 융합에 제공되는 다른 폴리펩티드로는 특별히 한정되지 않는다.
- [0063] 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와의 융합에 제공되는 다른 펩티드로는, 예를 들어 FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6 개의 His (히스티딘) 잔기로 이루어지는 $6 \times \text{His}$, $10 \times \text{His}$, 인플루엔자 응집소 (HA), 인간 c-myc 의 단편, VSV-GP 의 단편, p18HIV 의 단편, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40T 항원의 단편, lck tag, α -tubulin 의 단편, B-tag, Protein C 의 단편, GST (글루타티온-S-트랜스퍼라아제), HA (인플루엔자 응집소), 임퓨노글로불린 정상 영역, β -갈락토시다아제, MBP (말토오스 결합 폴리펩티드) 등을 들 수 있다.
- [0064] 시판되는 이들 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저를 코딩하는 유전자와 융합시키고, 이로써 조제된 융합 유전자를 발현시킴으로써 융합 폴리펩티드를 조제할 수 있다.
- [0065] 또, 어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하는 당업자에게 잘 알려진 다른 방법으로는, 하이브리다이제이션 기술 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) 을 이용하는 방법을 들 수 있다. 즉, 당업자라면 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저를 코딩하는 DNA 배열 (예를 들어, 배열 번호 1 의 DNA 배열) 혹은 그 일부를 기초로, 이것과 상동성이 높은 DNA 를 단리시키고, 그 DNA 로부터 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 단리시키는 것도 통상적으로 행할 수 있는 것이다.
- [0066] 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 단리시키기 위한 하이브리다이제이션 조건으로는, 당업자라면 적절히 선택할 수 있다. 하이브리다이제이션 조건은, 예를 들어 저(低)스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42°C , $2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50°C , $2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고(高)스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65°C , $2 \times \text{SSC}$ 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 낮출수록 높은 상동성을 갖는 DNA 뿐만 아니라, 낮은 상동성밖에 갖지 않는 DNA 까지도 포괄적으로 얻을 수 있다. 반대로, 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 만이 얻어질 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠스에 영향을 미치는 요소로는, 온도 이외에도 염 농도 등의 복수의 요소를 생각할 수 있으며, 당업자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠스를 실현시킬 수 있다.
- [0067] 이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 가 코딩하는 폴리펩티드는, 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 아미노산 배열에서 70 % 이상의 동일성을 갖는 것이면 되는데, 통상적으로 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 아미노산 배열에서 높은 상동성을 갖는다. 높은 상동성이란, 통상적으로 97 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 폴리펩티드의 동일성을 결정하려면, 문헌 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) 에 기재된 알고리즘에 따르면 된다.
- [0068] 폴리펩티드는 후술하는 그것을 생성하는 세포나 숙주 혹은 정제 방법에 따라 아미노산 배열, 분자량, 등전점 또는 당사슬의 유무나 형태 등이 상이할 수 있다. 그러나, 얻어진 폴리펩티드가 인간 등의 SLC4 아미온 익스체인저와 동등한 기능을 가지고 있는 한, 그것을 코딩하는 DNA 를 본 발명에서 이용할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드를 원핵 세포, 예를 들어 대장균에 의해 발현시킨 경우, 본래의 폴리펩티드의 아미노산 배열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 부가된다. 또, 진핵 세포, 예를 들어 포유 동물 세포에 의해 발현시킨 경우, N 말단의

시그널 배열은 제거된다. 이와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 도 본 발명에서 이용할 수 있다.

- [0069] 본 발명에서 SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 로서, 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA 를 사용해도 된다. 그 밖에도, 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다. 배열 번호 1 의 염기 배열은, 인간 AE1 의 염기 배열이다. AE1 에 대해서는, 인간 이외에도 마우스, 래트, 침팬지, 소, 말, 개, 늑대, 닭, 제브러 피쉬 등의 배열 정보가, 마우스 GenBank NM_011403, 래트 GeneBank NM_012651, 침팬지 GenBank XM_001151353, 소 GeneBank NM_181036, 말 GeneBank NM_001081788, 개 GenBank AB242566, 늑대 GeneBank NM_001048031, 닭 GenBank NM_205522, 제브러 피쉬 GenBank NM_198338 등에 등록되어 있으므로, 그것을 이용할 수도 있다. 다른 SLC4 아니온 익스체인저에 대해서도 각종 데이터베이스에 배열 정보가 등록되어 있어, 그것들을 이용해도 된다.
- [0070] SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 는, 상기 서술한 바와 같은 원하는 폴리펩티드의 in vivo 나 in vitro 에 있어서의 생산에 이용되는 것 외에, SLC4 아니온 익스체인저를 강하게 발현시키는 세포의 제작에 사용할 수 있다. SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 는, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩할 수 있는 것이라면 어떠한 형태여도 된다. 즉, mRNA 로부터 합성된 cDNA 인지, 게놈 DNA 인지, 화학 합성 DNA 인지 등을 문제삼지 않는다. 또, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 를 코딩할 수 있는 한, 유전 암호의 축중 (縮重) 에 기초하는 임의의 염기 배열을 갖는 DNA 가 포함된다.
- [0071] SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들어, SLC4 아니온 익스체인저를 발현시키고 있는 세포로부터 cDNA 라이브러리를 제작하고, SLC4 아니온 익스체인저의 DNA 의 배열 (예를 들어, 배열 번호 1) 의 일부를 프로브로 하여 하이브리다이제이션을 실시함으로써 조제할 수 있다. cDNA 라이브러리는, 예를 들어 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 에 기재된 방법에 의해 조제해도 되고, 시판되는 유전자 라이브러리를 사용해도 된다. 또, SLC4 아니온 익스체인저를 발현시키고 있는 세포로부터 RNA 를 조제하고, SLC4 아니온 익스체인저의 DNA 의 배열 (예를 들어, 배열 번호 1) 에 기초하여 올리고 DNA 를 합성하고, 이것을 프라이머로서 사용하여 PCR 반응을 실시하여, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 cDNA 를 증폭시킴으로써 조제할 수도 있다.
- [0072] 또, 얻어진 cDNA 의 염기 배열을 결정함으로써, 그것이 코딩하는 번역 영역을 결정할 수 있어, SLC4 아니온 익스체인저의 아미노산 배열을 얻을 수 있다. 또, 얻어진 cDNA 를 프로브로 하여 게놈 DNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 게놈 DNA 를 단리시킬 수 있다.
- [0073] 구체적으로는, 다음과 같이 하면 된다. 먼저, SLC4 아니온 익스체인저를 발현시키는 세포, 조직 등으로부터 mRNA 를 단리시킨다. mRNA 의 단리는 공지된 방법, 예를 들어 구아니딘 초원심법 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), AGPC 법 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 등에 의해 전체 RNA 를 조제하고, mRNA Purification Kit (Pharmacia) 등을 사용하여 전체 RNA 로부터 mRNA 를 정제한다. 또, QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) 를 사용함으로써 mRNA 를 직접 조제할 수도 있다.
- [0074] 얻어진 mRNA 로부터 역전사 효소를 사용하여 cDNA 를 합성한다. cDNA 의 합성은, AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (생화학 공업) 등을 사용하여 실시할 수도 있다. 또, 프라이머 등을 사용하여 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 제조) 및 폴리머라아제 연쇄 반응 (polymerase chain reaction ; PCR) 을 이용한 5'-RACE 법 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 에 따라 cDNA 를 합성 및 증폭시킬 수 있다.
- [0075] 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 DNA 단편을 조제하여 벡터 DNA 와 연결한다. 또한, 이것으로부터 재조합 벡터를 제작하고, 대장균 등에 도입하고 콜로니를 선택하여 원하는 재조합 벡터를 조제한다. 목적으로 하는 DNA 의 염기 배열은 공지된 방법, 예를 들어 디데옥시뉴클레오티드 체인 터미네이션법에 의해 확인할 수 있다.
- [0076] 또, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 에서는, 발현에 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도를 고려하여, 보다 발현 효율이 높은 염기 배열을 설계할 수 있다 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74). 또, SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 는, 시판되는 키트나 공지된 방법에 의해 개변시킬 수 있다. 개변으로는, 예를 들어 제한 효소에 의한 소화, 합성 올리고 뉴클레오티드나 적당한 DNA 프래그먼트의

삽입, 링커의 부가, 개시 코돈 (ATG) 및/또는 종지 코돈 (TAA, TGA 또는 TAG) 의 삽입 등을 들 수 있다.

- [0077] SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 는 또한, 배열 번호 1 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA 이고, 또한 SLC4 아니온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 포함한다.
- [0078] 스트린젠트한 조건으로는, 당업자라면 적절히 선택할 수 있는데, 예를 들어 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 2 × SSC 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 를 얻을 수 있다. 상기 하이브리다이징하는 DNA 는, 바람직하게는 천연 유래 DNA, 예를 들어 cDNA 또는 염색체 DNA 이면 된다.
- [0079] 이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 는, 통상적으로 인간 등의 SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 와 염기 배열에서 높은 동일성을 갖는다. SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 에는, 인간 등의 SLC4 아니온 익스체인저와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하고, 인간 등의 SLC4 아니온 익스체인저를 코딩하는 DNA 와 높은 동일성을 갖는 DNA 도 포함된다. 높은 동일성이란, 통상적으로 96 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 염기 배열의 동일성은, Karlin and Altschul 에 의한 알고리즘 BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5877, 1993) 에 의해 결정할 수 있다. 이 알고리즘에 기초하여 BLASTN 이나 BLASTX 라고 하는 프로그램이 개발되어 있다 (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215 : 403-410, 1990). BLAST 에 기초하여 BLASTN 에 의해 염기 배열을 해석하는 경우에는, 파라미터는, 예를 들어 score = 100, wordlength = 12 로 한다. 이들 해석 방법의 구체적인 수법은 공지되어 있다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [0080] 세포에 도입하는 Bicarbonate 트랜스포터 유전자로는, SLC26 아니온 익스체인저 유전자여도 된다. SLC26 아니온 익스체인저 유전자의 염기 배열 및 그것이 코딩하는 아미노산 배열 정보는, GenBank AF331525 (인간 putative SLC26A9), GenBank NM_052934 (인간 SLC26A9 variant 1), GenBank NM_134325 (인간 SLC26A9 variant 2), GenBank NM_134420 (마우스 SLC26A6), GenBank NM_177243 (마우스 SLC26A9), GenBank AY240025 (초파리 Slc26d9702), GenBank AY240023 (초파리 Slc26d6928), GenBank AY240022 (초파리 Slc26d6125), GenBank AY240021 (초파리 Slc26d5002), GenBank AB084425 (뱀장어 Slc26A6) 등에 등록되어 있으므로, 그것을 이용할 수 있다.
- [0081] Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 는 벡터에 삽입되면 된다.
- [0082] 벡터로는, 예를 들어 대장균을 숙주로 하는 경우에는, 벡터를 대장균 (예를 들어, JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue) 등으로 대량으로 증폭시켜 대량 조제하기 위해, 대장균에 의해 증폭되기 위한 「ori」를 갖고, 또한 형질 전환된 대장균의 선발 유전자 (예를 들어, 어떠한 약제 (암피실린이나 테트라사이클린, 카나마이신, 클로람페니콜) 에 의해 판별할 수 있는 약제 내성 유전자) 를 갖는 것이 바람직하다. 벡터의 예로는, M13 계 벡터, pUC 계 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script 등을 들 수 있다. 또, cDNA 의 서브클로닝, 절단을 목적으로 한 경우, 상기 벡터 외에, 예를 들어 pGEM-T, pDIRECT, pT7 등을 들 수 있다. 원하는 폴리펩티드를 생산하는 목적에서 벡터를 사용하는 경우에는, 특히 발현 벡터가 유용하다. 발현 벡터로는, 예를 들어 대장균에 의한 발현을 목적으로 한 경우에는, 벡터가 대장균에 의해 증폭되는 상기 특징을 갖는 것 외에, 숙주를 JM109, DH5 α , HB101, XL1-Blue 등의 대장균으로 한 경우에 있어서는, 대장균에 의해 효율적으로 발현할 수 있는 프로모터, 예를 들어 lacZ 프로모터 (Ward 등, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), araB 프로모터 (Better 등, Science (1988) 240, 1041-1043), 또는 T7 프로모터 등을 갖고 있는 것이 바람직하다. 이와 같은 벡터로는, 상기 벡터 외에 pGEX-5X-1 (Pharmacia 사 제조), 「QIAexpress system」 (Qiagen 사 제조), pEGFP 또는 pET (이 경우, 숙주는 T7 RNA 폴리머라아제를 발현시키고 있는 BL21 이 바람직하다) 등을 들 수 있다.
- [0083] 또, 벡터에는 폴리펩티드 분비를 위한 시그널 배열이 포함되어 있어도 된다. 폴리펩티드 분비를 위한 시그널 배열로는, 대장균의 페리플라즘에 생성시키는 경우, pelB 시그널 배열 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) 을 사용하면 된다. 숙주 세포로의 벡터의 도입은, 예를 들어 염화칼슘법, 일렉트로포레이션법을 사용하여 실시할 수 있다.
- [0084] 대장균을 숙주로 하는 경우 이외에도, 예를 들어 원하는 폴리펩티드를 제조하기 위해 사용되는 벡터로는, 포유

동물 유래 발현 벡터 (예를 들어, pcDNA3 (Invitrogen 사 제조) 나, pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322), pEF, pCDM8), 곤충 세포 유래 발현 벡터 (예를 들어, 「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL 사 제조), pBacPAK8), 식물 유래 발현 벡터 (예를 들어, pMH1, pMH2), 동물 바이러스 유래 발현 벡터 (예를 들어, pHSV, pMV, pAdexLcw), 레토로 바이러스 유래 발현 벡터 (예를 들어, pZIpeo), 효모 유래 발현 벡터 (예를 들어, 「Pichia Expression Kit」(Invitrogen 사 제조), pNV11, SP-Q01), 고초균 유래 발현 벡터 (예를 들어, pPL608, pKTH50) 등을 들 수 있다.

[0085] CHO 세포, COS 세포, NIH3T3 세포 등의 동물 세포에서의 발현을 목적으로 한 경우에는, 세포 내에서 발현시키기 위해 필요한 프로모터, 예를 들어 SV40 프로모터 (Mulligan 등, Nature (1979) 277, 108), MMLV-LTR 프로모터, EF1 α 프로모터 (Mizushima 등, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), CMV 프로모터 등을 가지고 있는 것이 바람직하고, 세포로의 형질 전환을 선발하기 위한 유전자 (예를 들어, 약제 (네오마이신, G418 등) 에 의해 판별할 수 있는 약제 내성 유전자) 를 가지면 더욱 바람직하다. 이와 같은 특성을 갖는 벡터로는, 예를 들어 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13 등을 들 수 있다.

[0086] 또한, 유전자를 안정적으로 발현시키고 또한 세포 내에서의 유전자의 카피수의 증폭을 목적으로 하는 경우에는, 핵산 합성 경로를 결손시킨 CHO 세포에 그것을 상보하는 DHFR 유전자를 갖는 벡터 (예를 들어, pCHOI 등) 를 도입하고, 메토티렉사트 (MTX) 에 의해 증폭시키는 방법을 들 수 있으며, 또 유전자의 일과성 발현을 목적으로 하는 경우에는, SV40T 항원을 발현시키는 유전자를 염색체 상에 갖는 COS 세포를 사용하여 SV40 의 복제 기점을 갖는 벡터 (pcD 등) 에 의해 형질 전환하는 방법을 들 수 있다. 복제 개시점으로는 또한, 폴리오마 바이러스, 아데노 바이러스, 소 유두종 바이러스 (BPV) 등의 유래의 것을 사용할 수도 있다. 또한, 숙주 세포계에서 유전자 카피수의 증폭을 위해, 발현 벡터는 선택 마커로서, 아미노글리코시드 트랜스퍼라아제 (APH) 유전자, 티미딘키나아제 (TK) 유전자, 대장균 크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제 (Ecogpt) 유전자, 디히드로엽산 환원 효소 (dhfr) 유전자 등을 포함할 수 있다.

[0087] Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA (벡터에 삽입되어 있어도 된다) 가 도입되는 숙주 세포로는 특별히 제한은 없으며, 예를 들어 대장균이나 여러 가지 동물 세포 등을 사용할 수 있다. Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 가 도입된 숙주 세포에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 도입하면, 이 숙주 세포는, Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시킬 수 있어, 원하는 폴리펩티드의 생산을 증가시킬 수 있다. Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 가 도입된 숙주 세포에는, CSAD 또는 ALT 를 코딩하는 DNA (벡터에 삽입되어 있어도 된다) 가 추가로 도입되어도 된다. Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 가 도입된 숙주 세포에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 와 CSAD 또는 ALT 를 코딩하는 DNA 를 도입함으로써 원하는 폴리펩티드의 생성량을 향상시킬 수 있다. 폴리펩티드를 제조하기 위한 생성계는, in vitro 및 in vivo 의 생성계가 있다. in vitro 의 생성계로는, 진핵 세포를 사용하는 생성계나 원핵 세포를 사용하는 생성계를 들 수 있다.

[0088] Bicarbonate 트랜스포터 유전자가 인위적으로 도입된 세포를 사용하여 원하는 폴리펩티드를 제조하는 경우, Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 도입 순서는 특별히 제한되지 않으며, Bicarbonate 트랜스포터 유전자를 도입한 후에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입해도 되고, 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입한 후에 Bicarbonate 트랜스포터 유전자를 도입해도 된다. 또, Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 동시에 도입해도 된다.

[0089] Bicarbonate 트랜스포터 유전자 및 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 도입은 단일 벡터에 의해 동시에 도입해도 되고, 복수의 벡터를 사용하여 따로따로 도입해도 된다.

[0090] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포는, 원하는 폴리펩티드를 제조하기 위해, 추가로 시스템인슐린산 테카르복실라아제 (CSAD) 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 (ALT) 를 강하게 발현시키고 있는 것이 바람직하다. Bicarbonate 트랜스포터 외에 CSAD 또는 ALT 를 강하게 발현시키는 세포에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입하고, 그 세포를 배지 중에서 배양함으로써 보다 대량으로 원하는 폴리펩티드를 제조할 수 있다.

[0091] CSAD 는 본래 3-술폰산알라닌을 하이포타우린으로 변환하는 효소로서 알려져 있으나, CHO 세포 내에서 강하게 발현시킴으로써 β -알라닌을 과잉량 합성하게 된다.

[0092] CSAD 를 강하게 발현시키는 세포는, 천연 세포와 비교하여 CSAD 의 발현량이 증가되고 있는 세포라면 특별히 한정되지 않는다. 천연 세포는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어 CHO 세포 등 재조합 단백질을 제조할 때에

숙주로서 사용되고 있는 세포를 들 수 있다.

- [0093] 세포에 강하게 발현시키는 CSAD 로는, 어떠한 생물 유래 CSAD 여도 되며, 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는 인간, 마우스, 래트, 햄스터 등의 설치류, 복(puffer)류의 자지복, 명게류의 유령명게 등의 생물 유래 CSAD 를 들 수 있으며, 인간, 설치류 혹은 숙주 세포와 동일한 종 유래의 CSAD 인 것이 바람직하고, 예를 들어 CSAD 를 강하게 발현시키는 세포가 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO 세포) 인 경우에는, 인간 혹은 햄스터 유래 CSAD 인 것이 바람직하다.
- [0094] CSAD 를 강하게 발현시키는 세포로는, 예를 들어 CSAD 유전자가 인위적으로 도입된 세포를 들 수 있다. CSAD 유전자가 인위적으로 도입된 세포는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있으며, 예를 들어 CSAD 유전자를 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 세포로 형질 전환함으로써 제작할 수 있다. 또한, 본 명세서에서는 유전자 활성화 기술 (예를 들어, 국제 공개 제WO94/12650호 팜플렛 참조) 에 의해 내인성 CSAD 유전자가 활성화되고, 그 결과, CSAD 가 강하게 발현된 세포도 CSAD 유전자가 인위적으로 도입된 세포에 포함된다.
- [0095] 세포에 도입하는 CSAD 유전자로는, CSAD 를 코딩하는 이하의 (a1) ~ (e1) 중 어느 DNA 를 들 수 있다.
- [0096] (a1) 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0097] (b1) 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수 (예를 들어, 수 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0098] (c1) 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열과 70 % 이상의 상동성을 갖고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0099] (d1) 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열을 갖는 DNA
- [0100] (e1) 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이즈하고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA
- [0101] CSAD 활성이란 3-sulfino-L-alanine = hypotaurine + CO₂ 를 촉매하고, 탈탄산시키는 활성을 포함하는 개념이다. L-cysteic acid 를 탈탄산시키는 활성이기도 하다 (EC-Number 4.1.1.29).
- [0102] CSAD 활성은, 이하와 같이 하여 측정할 수 있다.
- [0103] Davis K.et.al., J Biomed Sci 2001 ; 8 : 359-364 에서 나타나 있는 바와 같이, L-[1-¹⁴C]cysteic acid 로부터 CSAD 의 탈탄산 효소 활성에 의해 생성되는 ¹⁴CO₂ 를 정량한다.
- [0104] 본 발명에서 CSAD 를 코딩하는 DNA 로서, 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용하면 된다. 그 밖에도, 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다.
- [0105] 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드는, 햄스터, 래트, 마우스, 인간 (이하, 「햄스터 등의 CSAD」라고 기재하는 경우도 있다) 과 기능적으로 동등한 폴리펩티드이다. 이와 같은 폴리펩티드에는, 예를 들어 햄스터 등의 CSAD 의 변이체 등이 포함된다.
- [0106] 어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하기 위한 당업자에게 잘 알려진 방법으로는, 폴리펩티

드에 변이를 도입하는 방법이 알려져 있다. 예를 들어, 당업자라면 부위 특이적 변이 유발법 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) 등을 사용하여 햄스터 등의 CSAD 의 아미노산에 적절히 변이를 도입함으로써, 햄스터 등의 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제할 수 있다. 또, 아미노산의 변이는 자연계에서도 발생될 수 있다.

[0107] 햄스터 등의 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드로는, 구체적으로는 햄스터 등의 CSAD 의 아미노산 배열 (예를 들어, 배열 번호 4 의 아미노산 배열 또는 UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL) 래트 CSAD (Q64611), 마우스 CSAD_(Q9DBE0) 혹은 인간 CSAD_(Q9Y600) 의 아미노산 배열) 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 결실된 것, 햄스터 등의 CSAD 의 아미노산 배열에 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 부가된 것, 햄스터 등의 CSAD 의 아미노산 배열 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것 등을 들 수 있다.

[0108] 변이하는 아미노산 잔기는 특별히 한정되지 않지만, 아미노산 측사슬의 성질이 보존되어 있는 다른 아미노산으로 변이되는 것이 바람직하다. 예를 들어 아미노산 측사슬의 성질로는, 소수성 아미노산 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 지방족 측사슬을 갖는 아미노산 (G, A, V, L, I, P), 수산기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (S, T, Y), 황 원자 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (C, M), 카르복실산 및 아미드 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (D, N, E, Q), 염기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (R, K, H), 방향족 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (H, F, Y, W) 을 들 수 있다 (괄호 안은 모두 아미노산의 1 문자 표기를 나타낸다).

[0109] 또한, 어느 아미노산 배열에 대한 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기의 결실, 부가 및/또는 다른 아미노산에 의한 치환에 의해 수식된 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드가 그 생물학적 활성을 유지한다는 것은 이미 알려져 있다 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500, Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433, Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).

[0110] 햄스터 등의 CSAD 에 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기가 부가된 폴리펩티드로는, 예를 들어 햄스터 등의 CSAD 를 포함하는 융합 폴리펩티드를 들 수 있다. 융합 폴리펩티드는, 햄스터 등의 CSAD 와 다른 폴리펩티드가 융합된 것이다. 융합 폴리펩티드를 제작하는 방법은, 햄스터 등의 CSAD 를 코딩하는 유전자와 다른 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 프레임이 일치하도록 연결하고, 이것을 발현 벡터에 도입하여 숙주에서 발현시키면 되고, 당업자에게 공지된 수법을 사용할 수 있다. 햄스터 등의 CSAD 와의 융합에 제공되는 다른 폴리펩티드로는 특별히 한정되지 않는다.

[0111] 햄스터 등의 CSAD 와의 융합에 제공되는 다른 펩티드로는, 예를 들어 FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6 개의 His (히스티딘) 잔기로 이루어지는 6 × His, 10 × His, 인플루엔자 응집소 (HA), 인간 c-myc 의 단편, VSV-GP 의 단편, p18HIV 의 단편, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40T 항원의 단편, lck tag, α-tubulin 의 단편, B-tag, Protein C 의 단편, GST (글루타티온-S-트랜스퍼라아제), HA (인플루엔자 응집소), 임뮤노글로불린 정상 영역, β-갈락토시다아제, MBP (말토오스 결합 폴리펩티드) 등을 들 수 있다.

[0112] 시판되는 이들 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 햄스터 등의 CSAD 를 코딩하는 유전자와 융합시키고, 이로써 조제된 융합 유전자를 발현시킴으로써 융합 폴리펩티드를 조제할 수 있다.

[0113] 또, 어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하는 당업자에게 잘 알려진 다른 방법으로는, 하이브리다이제이션 기술 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2 nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) 을 이용하는 방법을 들 수 있다. 즉, 당업자라면 햄스터 등의 CSAD 를 코딩하는 DNA 배열 (예를 들어, 배열 번호 3 의 DNA 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 DNA 산 배열) 혹은 그 일부를 기초로, 이것과 상동성이 높은 DNA 를 단리시키고, 그 DNA 로부터 햄스터 등의 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 단리시키는 것도 통상적으로 행할 수 있는

것이다.

- [0114] 햄스터 등의 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 단리시키기 위한 하이브리다이제이션 조건으로는, 당업자라면 적절히 선택할 수 있다. 하이브리다이제이션 조건은, 예를 들어 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 2 × SSC 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 낮출수록 높은 상동성을 갖는 DNA 뿐만 아니라, 낮은 상동성밖에 갖지 않는 DNA 까지도 포괄적으로 얻을 수 있다. 반대로, 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 만이 얻어질 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠시에 영향을 미치는 요소로는, 온도 이외에도 염 농도 등의 복수의 요소를 생각할 수 있으며, 당업자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠시를 실현시킬 수 있다.
- [0115] 이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 가 코딩하는 폴리펩티드는, 햄스터 등의 CSAD 와 아미노산 배열에서 70 % 이상의 동일성을 갖는 것이면 되는데, 통상적으로 햄스터 등의 CSAD 와 아미노산 배열에서 높은 상동성을 갖는다. 높은 상동성이란, 통상적으로 97 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 폴리펩티드의 동일성을 결정하려면, 문헌 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) 에 기재된 알고리즘에 따르면 된다.
- [0116] 폴리펩티드는, 후술하는 그것을 생성하는 세포나 숙주 혹은 정제 방법에 따라 아미노산 배열, 분자량, 등전점 또는 당사슬의 유무나 형태 등이 상이할 수 있다. 그러나, 얻어진 폴리펩티드가 햄스터 등의 CSAD 와 동등한 기능을 가지고 있는 한, 그것을 코딩하는 DNA 를 본 발명에서 이용할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드를 원핵 세포, 예를 들어 대장균에 의해 발현시킨 경우, 본래의 폴리펩티드의 아미노산 배열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 부가된다. 또, 진핵 세포, 예를 들어 포유 동물 세포에 의해 발현시킨 경우, N 말단의 시그널 배열은 제거된다. 이와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 도 본 발명에서 이용할 수 있다.
- [0117] 본 발명에서 CSAD 를 코딩하는 DNA 로서, 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열을 갖는 DNA 를 사용해도 된다. 그 밖에도, 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이제이션하고, 또한 CSAD 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다.
- [0118] CSAD 를 코딩하는 DNA 는, 상기 서술한 바와 같은 원하는 폴리펩티드의 in vivo 나 in vitro 에 있어서의 생산에 이용되는 것 외에, CSAD 를 강하게 발현시키는 세포의 제작에 사용할 수 있다. CSAD 를 코딩하는 DNA 는, CSAD 를 코딩할 수 있는 것이라면 어떠한 형태여도 된다. 즉, mRNA 로부터 합성된 cDNA 인지, 게놈 DNA 인지, 화학 합성 DNA 인지 등을 문제삼지 않는다. 또, CSAD 를 코딩하는 DNA 를 코딩할 수 있는 한, 유전 암호의 축중 (縮重) 에 기초하는 임의의 뉴클레오티드 배열을 갖는 DNA 가 포함된다.
- [0119] CSAD 를 코딩하는 DNA 는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들어, CSAD 를 발현시키고 있는 세포로부터 cDNA 라이브러리를 제작하고, CSAD 의 DNA 의 배열 (예를 들어, 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열) 의 일부를 프로브로 하여 하이브리다이제이션을 실시함으로써 조제할 수 있다. cDNA 라이브러리는, 예를 들어 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 에 기재된 방법에 의해 조제해도 되고, 시판되는 유전자 라이브러리를 사용해도 된다. 또, CSAD 를 발현시키고 있는 세포로부터 RNA 를 조제하고, CSAD 의 DNA 의 배열 (예를 들어, 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열) 에 기초하여 올리고 DNA 를 합성하고, 이것을 프라이머로서 사용하여 PCR 반응을 실시하여, CSAD 를 코딩하는 cDNA 를 증폭시킴으로써 조제할 수도 있다.
- [0120] 또, 얻어진 cDNA 의 염기 배열을 결정함으로써, 그것이 코딩하는 번역 영역을 결정할 수 있어, CSAD 의 아미노산 배열을 얻을 수 있다. 또, 얻어진 cDNA 를 프로브로 하여 게놈 DNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 게놈 DNA 를 단리시킬 수 있다.
- [0121] 구체적으로는, 다음과 같이 하면 된다. 먼저, CSAD 를 발현시키는 세포, 조직 등으로부터 mRNA 를 단리시킨다. mRNA 의 단리는 공지된 방법, 예를 들어, 구아니딘 초원심법 (Chirgwin, J. M. et. al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), AGPC 법 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 등

에 의해 전체 RNA 를 조제하고, mRNA Purification Kit (Pharmacia) 등을 사용하여 전체 RNA 로부터 mRNA 를 정제한다. 또, QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) 를 사용함으로써 mRNA 를 직접 조제할 수도 있다.

- [0122] 얻어진 mRNA 로부터 역전사 효소를 사용하여 cDNA 를 합성한다. cDNA 의 합성은, AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (생화학 공업) 등을 사용하여 실시할 수도 있다. 또, 프라이머 등을 사용하여 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 제조) 및 폴리머라아제 연쇄 반응 (polymerase chain reaction ; PCR) 을 이용한 5'-RACE 법 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 에 따라 cDNA 를 합성 및 증폭시킬 수 있다.
- [0123] 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 DNA 단편을 조제하여, 벡터 DNA 와 연결한다. 또한, 이것으로부터 재조합 벡터를 제작하고, 대장균 등에 도입하고 콜로니를 선택하여 원하는 재조합 벡터를 조제한다. 목적으로 하는 DNA 의 염기 배열은 공지된 방법, 예를 들어, 디데옥시뉴클레오티드 체인 터미네이션법에 의해 확인할 수 있다.
- [0124] 또, CSAD 를 코딩하는 DNA 에서는, 발현에 사용하는 숙주의 코돈 사용 빈도를 고려하여, 보다 발현 효율이 높은 염기 배열을 설계할 수 있다 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74). 또, CSAD 를 코딩하는 DNA 는, 시판되는 키트나 공지된 방법에 의해 개변시킬 수 있다. 개변으로는, 예를 들어 제한 효소에 의한 소화, 합성 올리고 뉴클레오티드나 적당한 DNA 프래그먼트의 삽입, 링커의 부가, 개시 코돈 (ATG) 및/또는 종지 코돈 (TAA, TGA 또는 TAG) 의 삽입 등을 들 수 있다.
- [0125] CSAD 를 코딩하는 DNA 는 또한, 배열 번호 3 의 염기 배열 또는 GenBank 래트 CSAD NM_021750, 마우스 CSAD NM_144942 혹은 인간 CSAD NM_015989 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA 이고, 또한 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 포함한다.
- [0126] 스트린젠트한 조건으로는 당업자라면 적절히 선택할 수 있으나, 예를 들어 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 2 × SSC 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 를 얻을 수 있다. 상기 하이브리다이징하는 DNA 는, 바람직하게는 천연 유래 DNA, 예를 들어 cDNA 또는 염색체 DNA 이면 된다.
- [0127] 이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 는, 통상적으로 햄스터 등의 CSAD 를 코딩하는 DNA 와 염기 배열에서 높은 동일성을 갖는다. ALT 를 코딩하는 DNA 에는, 햄스터 등의 CSAD 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하고, 햄스터 등의 CSAD 를 코딩하는 DNA 와 높은 동일성을 갖는 DNA 도 포함된다. 높은 동일성이란 통상적으로 96 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 염기 배열의 동일성은, Karlin and Altschul 에 의한 알고리즘 BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5877, 1993) 에 의해 결정할 수 있다. 이 알고리즘에 기초하여 BLASTN 이나 BLASTX 라고 하는 프로그램이 개발되어 있다 (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215 : 403-410, 1990). BLAST 에 기초하여 BLASTN 에 의해 염기 배열을 해석하는 경우에는, 파라미터는, 예를 들어 score = 100, wordlength = 12 로 한다. 이들 해석 방법의 구체적인 수법은 공지되어 있다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [0128] 또, ALT 는 본래 알라닌의 아미노기를 2-옥소글루타르산에 전이시켜 글루타민산을 생성시키는 효소로서 알려져 있는데, CHO 세포 등의 숙주 세포 내에서 강하게 발현시킴으로써, 알라닌으로부터 피루브산이나 글루타민산을 생합성하는 반응을 촉진시킬 수 있으면, TCA 회로에서의 대사나 당 신생에 의한 글루코오스 생성에 이용되어, 세포의 배양 거동이 개선되어 원하는 폴리펩티드의 고생성이 기대된다.
- [0129] ALT 를 강하게 발현시키는 세포는, 천연 세포와 비교하여 ALT 의 발현량이 증가되고 있는 세포라면 특별히 한정되지 않는다. 천연 세포는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어 CHO 세포 등 재조합 단백질을 제조할 때에 숙주로서 사용되고 있는 세포를 들 수 있다.
- [0130] ALT 를 강하게 발현시키는 세포로는, 예를 들어 ALT 유전자가 인위적으로 도입된 세포를 들 수 있다. ALT 유전자가 인위적으로 도입된 세포는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있으며, 예를 들어 ALT 유전자를 벡터에 삽입하고, 그 벡터를 세포로 형질 전환함으로써 제작할 수 있다. 또한, 본 명세서에서는 유전자

활성화 기술 (예를 들어, 국제 공개 제W094/12650호 팜플렛 참조) 에 의해 내인성 ALT 유전자가 활성화되고, 그 결과, ALT 가 강하게 발현된 세포도 ALT 유전자가 인위적으로 도입된 세포에 포함된다.

[0131] 세포에 강하게 발현시키는 ALT 는 어떠한 생물 유래의 ALT 여도 되며, 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는 인간, 마우스, 래트, 개, 아프리카밭뜯개구리, 초파리, 선충, 일본쌀, 원자 효모, 빵 효모, 사상균 *Ashbya gossypii*, 진균 *Candida albicans*, 분열 효모, 진균 *Aspergillus nidulans*, 진균 *Aspergillus fumigatus*, 청주 누룩곰팡이 *Aspergillus oryzae*, 진균 *Cryptococcus neoformans*, 세포성 점균 *Dictyostelium discoideum*, *Trypanosoma brucei*, 세포 내 기생성 원충 *Leishmania major*, 적리 아메바 *Entamoeba histolytica* 또는 세포 내 기생성 원충 *Trypanosoma cruzi* 등의 ALT 가 공지되어 있으며, 이들을 이용할 수 있으나, 인간, 설치류 혹은 숙주 세포와 동일한 종 유래의 ALT 인 것이 바람직하고, 예를 들어 ALT 를 강하게 발현시키는 세포가 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO 세포) 인 경우에는, 인간 혹은 햄스터 유래 ALT 인 것이 바람직하다. 인간, 마우스, 효모 등의 ALT 는, Variant (ALT1 와 ALT2) 가 존재한다. ALT2 는, ALT1 에 대하여 아미노산 레벨에서 80 % 이상의 상동성이 있다. 후술하는 실시예 및 참고예에서는, ALT1 을 강제 발현시켰다.

[0132] 세포에 도입하는 ALT 유전자로는, ALT 를 코딩하는 이하의 (a2) ~ (e2) 중 어느 DNA 를 들 수 있다.

(a2) KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140

[0133]

[0134] 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA

(b2) KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0135]

[0136] 의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수 (예를 들어, 수 개) 의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA

(c2) KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0137]

[0138] 의 아미노산 배열과 70 % 이상의 동일성을 갖고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA

(d2) KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0139]

- [0140] 의 염기 배열을 갖는 DNA
- (e2) KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0141]

- [0142] 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA

[0143] ALT 활성이란 아미노산과 α -케토산 사이의 아미노기 전이를 촉매하는 효소 활성을 포함하는 개념이다.

[0144] ALT 활성은, 이하와 같이 하여 측정할 수 있다.

[0145] 자동 분석용 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 측정 시약 (란피아 리키드 S-ALT 승인 번호 20900AMZ00597000) 이나, Rajamohan F.et.al. Protein Expression and Purification (2006) 48, 81-89 에서 나타난 방법을 사용하여 ALT 활성값을 구한다.

[0146] 본 발명에 있어서, ALT 를 코딩하는 유전자로서

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO09003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.

140

[0147]

[0148] 의 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용하면 된다. 그 밖에도, 상기 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다.

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0149]

[0150]

의 아미노산 배열에 있어서, 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는/및 삽입된 아미노산 배열을 갖고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드는, 인간, 마우스, 래트, 개, 아프리카밭뜯개구리, 초파리, 선충, 일본 쌀, 원자 홍조, 빵 효모, 사상균 *Ashbya gossypii*, 진균 *Candida albicans*, 분열 효모, 진균 *Aspergillus nidulans*, 진균 *Aspergillus fumigatus*, 청주 누룩곰팡이 *Aspergillus oryzae*, 진균 *Cryptococcus neoformans*, 세포성 점균 *Dictyostelium discoideum*, *Trypanosoma brucei*, 세포 내 기생성 원충 *Leishmania major*, 적리 아메바 *Entamoeba histolytica* 또는 세포 내 기생성 원충 *Trypanosoma cruzi* ALT (이하, 「인간 등의 ALT」라고 기재하는 경우도 있다) 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드이다. 이와 같은 폴리펩티드에는, 예를 들어 인간 등의 ALT 의 변이체 등이 포함된다. 후술하는 실시예 및 참고예에서는, 공개되어 있는 인간 ALT1 유전자가 코딩하고 있는 아미노산 496 개 중, 4 아미노산 (R53S, Q72R, F286S, M332K) 이 치환되어 있는 변이체가 사용되었다.

[0151]

어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하기 위한 당업자에게 잘 알려진 방법으로는, 폴리펩티드에 변이를 도입하는 방법이 알려져 있다. 예를 들어, 당업자라면 부위 특이적 변이 유발법 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) *Methods. Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492, Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) 등을 사용하여, 인간 등의 ALT 의 아미노산에 적절히 변이를 도입함으로써, 인간 등의 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제할 수 있다. 또, 아미노산의 변이는 자연계에서도 발생할 수

있다.

[0152] 인간 등의 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드로는, 구체적으로는, 인간 등의 ALT 의 아미노산 배열 (예를 들어,

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF1.2.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0153]

[0154] 의 아미노산 배열) 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 결실된 것, 인간 등의 ALT 의 아미노산 배열에 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 추가된 것, 인간 등의 ALT 의 아미노산 배열 중의 1 또는 2 개 이상, 바람직하게는 1 개 이상 30 개 이하, 보다 바람직하게는 1 개 이상 10 개 이하의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것 등을 들 수 있다.

[0155] 변이하는 아미노산 잔기는 특별히 한정되지 않지만, 아미노산 측사슬의 성질이 보존되어 있는 다른 아미노산으로 변이되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 아미노산 측사슬의 성질로는, 소수성 아미노산 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), 친수성 아미노산 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), 지방족 측사슬을 갖는 아미노산 (G, A, V, L, I, P), 수산기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (S, T, Y), 황 원자 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (C, M), 카복실산 및 아마이드 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (D, N, E, Q), 염기 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (R, K, H), 방향족 함유 측사슬을 갖는 아미노산 (H, F, Y, W) 을 들 수 있다 (괄호 안은 모두 아미노산의 1 문자 표기를 나타낸다).

[0156] 또한, 어느 아미노산 배열에 대한 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기의 결실, 부가 및/또는 다른 아미노산에 의한

치환에 의해 수식된 아미노산 배열을 갖는 폴리펩티드가 그 생물학적 활성을 유지한다는 것은 이미 알려져 있다 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500, Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433, Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413).

[0157] 인간 등의 ALT 에 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기가 부가된 폴리펩티드로는, 예를 들어 인간 등의 ALT 를 포함하는 융합 폴리펩티드를 들 수 있다. 융합 폴리펩티드는, 인간 등의 ALT 와 다른 폴리펩티드가 융합된 것이다. 융합 폴리펩티드를 제작하는 방법은, 인간 등의 ALT 를 코딩하는 유전자와 다른 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 프레임이 일치하도록 연결하고, 이것을 발현 벡터에 도입하여 숙주에서 발현시키면 되고, 당업자에게 공지된 수법을 사용할 수 있다. 인간 등의 ALT 와의 융합에 제공되는 다른 폴리펩티드로는 특별히 한정되지 않는다.

[0158] 인간 등의 ALT 와의 융합에 제공되는 다른 펩티드로는, 예를 들어 FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6 개의 His (히스티딘) 잔기로 이루어지는 6 × His, 10 × His, 인플루엔자 응집소 (HA), 인간 c-myc 의 단편, VSV-GP 의 단편, p18HIV 의 단편, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40T 항원의 단편, lck tag, α -tubulin 의 단편, B-tag, Protein C 의 단편, GST (글루타티온-S-트랜스퍼라아제), HA (인플루엔자 응집소), 임뮤노글로불린 정상 영역, β -갈락토시다아제, MBP (말토오스 결합 폴리펩티드) 등을 들 수 있다.

[0159] 시판되는 이들 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 인간 등의 ALT 를 코딩하는 유전자와 융합시키고, 이로써 조제된 융합 유전자를 발현시킴으로써 융합 폴리펩티드를 조제할 수 있다.

[0160] 또, 어느 폴리펩티드와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 조제하는 당업자에게 잘 알려진 다른 방법으로는, 하이브리다이제이션 기술 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) 을 이용하는 방법을 들 수 있다. 즉, 당업자라면 인간 등의 ALT 를 코딩하는 DNA 배열 (예를 들어,

KE

GG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Homo sapiens* (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Mus musculus* (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Rattus norvegicus* (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Canis familiaris* (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Xenopus laevis* (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Drosophila melanogaster* (fruit fly) : Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Caenorhabditis elegans* (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Oryza sativa japonica* (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Cyanidioschyzon merolae*: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Saccharomyces cerevisiae*: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Ashbya gossypii* (*Eremothecium gossypii*): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Candida albicans*: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Schizosaccharomyces pombe*: SPB C582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus nidulans*: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus fumigatus*: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Aspergillus oryzae*: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Cryptococcus neoformans* JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Dictyostelium discoideum*: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma brucei*: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Leishmania major*: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Entamoeba histolytica*: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / *Trypanosoma cruzi*: 510889.140

[0161]

[0162]

의 DNA 배열) 혹은 그 일부를 기초로, 이것과 상동성이 높은 DNA 를 단리시키고, 그 DNA 로부터 인간 등의 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 단리시키는 것도 통상적으로 행할 수 있는 것이다.

[0163]

인간 등의 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 단리시키기 위한 하이브리다이제이션 조건으로는, 당업자라면 적절히 선택할 수 있다. 하이브리다이제이션 조건은, 예를 들어 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 2 × SSC 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 낮출수록 높은 상동성을 갖는 DNA 뿐만 아니라, 낮은 상동성밖에 갖지 않는 DNA 까지도 포괄적으로 얻을 수 있다. 반대로, 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 만이 얻어질 것을 기대할 수 있다. 단, 하이브리다이제이션의 스트린젠시에 영향을 미치는 요소로는, 온도 이외에도 염 농도 등의 복수의 요소를 생각할 수 있으며, 당업자라면 이들 요소를 적절히 선택함으로써 동일한 스트린젠시를 실현시킬 수 있다.

[0164]

이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 가 코딩하는 폴리펩티드는, 인간 등의 ALT 와 아미노산 배열에서 70 % 이상의 동일성을 갖는 것이면 되는데, 통상적으로 인간 등의 ALT 와 아미노산 배열에 있어서 높은 상동성을 갖는다. 높은 상동성이란, 통상적으로 97 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 폴리펩티드의 동일성을 결정하려면, 문헌 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) 에 기재된 알고리즘에 따르면 된다.

[0165] 폴리펩티드는, 후술하는 그것을 생성하는 세포나 숙주 혹은 정제 방법에 따라 아미노산 배열, 분자량, 등전점 또는 당사슬의 유무나 형태 등이 상이할 수 있다. 그러나, 얻어진 폴리펩티드가, 인간 등의 ALT 와 동등한 기능을 가지고 있는 한, 그것을 코딩하는 DNA 를 본 발명에서 이용할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드를 원핵 세포, 예를 들어 대장균에 의해 발현시킨 경우, 본래의 폴리펩티드의 아미노산 배열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 추가된다. 또, 진핵 세포, 예를 들어 포유 동물 세포에 의해 발현시킨 경우, N 말단의 시그널 배열은 제거된다. 이와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 도 본 발명에서 이용할 수 있다.

[0166] 본 발명에 있어서, ALT 를 코딩하는 DNA 로서,

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Hom

o sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 8470
 6, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME:
 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norv
 egicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KE
 GG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / E
 NZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZ
 YME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME:
 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.
 2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / C
 yanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces c
 erevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR1
 11C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS
 _AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / E
 NZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2
 .6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fu
 migatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO0900
 03000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG014
 90, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG
 / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.
 1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba hist
 olytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016
 , KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME:
 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanoso
 ma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.

140

[0167]

[0168] 의 염기 배열을 갖는 DNA 를 사용해도 된다. 그 밖에도, 상기 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하고, 또한 ALT 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 사용해도 된다.

[0169]

ALT 를 코딩하는 DNA 는, 상기 서술한 바와 같은 원하는 폴리펩티드의 in vivo 나 in vitro 에 있어서의 생산에 이용되는 것 외에, ALT 를 강하게 발현시키는 세포의 제작에 사용할 수 있다. ALT 를 코딩하는 DNA 는, ALT 를 코딩할 수 있는 것이라면 어떠한 형태여도 된다. 즉, mRNA 로부터 합성된 cDNA 인지, 게놈 DNA 인지, 화학 합성 DNA 인지 등을 문제삼지 않는다. 또, ALT 를 코딩하는 DNA 를 코딩할 수 있는 한, 유전 암호의 축

중에 기초하는 임의의 염기 배열을 갖는 DNA 가 포함된다.

[0170]

ALT 를 코딩하는 DNA 는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 조제할 수 있다. 예를 들어, ALT 를 발현시키고 있는 세포로부터 cDNA 라이브러리를 제작하고, ALT 의 DNA 의 배열 (예를 들어,

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0171]

[0172]

의 DNA 배열) 의 일부를 프로브로 하여 하이브리다이제이션을 실시함으로써 조제할 수 있다. cDNA 라이브러리는, 예를 들어 Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 에 기재된 방법에 의해 조제해도 되고, 시판되는 유전자 라이브러리를 사용해도 된다. 또, ALT 를 발현시키고 있는 세포로부터 RNA 를 조제하고, ALT 의 DNA 의 배열 (예를 들어,

KEGG / EN

ZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 7628 2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFUA_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t00009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0173]

[0174]

의 DNA 배열)에 기초하여 올리고 DNA를 합성하고, 이것을 프라이머로서 사용하여 PCR 반응을 실시하여, ALT를 코딩하는 cDNA를 증폭시킴으로써 조제할 수도 있다.

[0175]

또, 얻어진 cDNA의 염기 배열을 결정함으로써 그것이 코딩하는 번역 영역을 결정할 수 있어, ALT의 아미노산 배열을 얻을 수 있다. 또, 얻어진 cDNA를 프로브로 하여 게놈 DNA 라이브러리를 스크리닝함으로써 게놈 DNA를 단리시킬 수 있다.

[0176]

구체적으로는, 다음과 같이 하면 된다. 먼저, ALT를 발현시키는 세포, 조직 등으로부터 mRNA를 단리시킨다. mRNA의 단리는 공지된 방법, 예를 들어, 구아니딘 초원심법(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), AGPC법(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 등에 의해 전체 RNA를 조제하고, mRNA Purification Kit(Pharmacia) 등을 사용하여 전체 RNA로부터 mRNA를 정제한다. 또, QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia)를 사용함으로써 mRNA를 직접 조제할 수도 있다.

[0177]

얻어진 mRNA로부터 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 합성한다. cDNA의 합성은, AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(생화학 공업) 등을 사용하여 실시할 수도 있다. 또, 프라이머 등을 사용하여 5'-Ampli FINDER RACE Kit(Clontech 제조) 및 폴리머라아제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 이용한 5'-RACE법(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

(1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 에 따라 cDNA 를 합성 및 증폭시킬 수 있다.

[0178] 얻어진 PCR 산물로부터 목적으로 하는 DNA 단편을 조제하여, 벡터 DNA 와 연결한다. 또한, 이것으로부터 재조합 벡터를 제작하고, 대장균 등에 도입하고, 콜로니를 선택하여 원하는 재조합 벡터를 조제한다. 목적으로 하는 DNA 의 염기 배열은 공지된 방법, 예를 들어, 디데옥시뉴클레오티드 체인 터미네이션법에 의해 확인할 수 있다.

[0179] 또, ALT 를 코딩하는 DNA 에서는, 발현에 사용되는 숙주의 코돈 사용 빈도를 고려하여, 보다 발현 효율이 높은 염기 배열을 설계할 수 있다 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-74). 또, ALT 를 코딩하는 DNA 는, 시판되는 키트나 공지된 방법에 의해 개변시킬 수 있다. 개변으로는, 예를 들어 제한 효소에 의한 소화, 합성 올리고 뉴클레오티드나 적당한 DNA 프래그먼트의 삽입, 링커의 부가, 개시 코돈 (ATG) 및/또는 종지 코돈 (TAA, TGA 또는 TAG) 의 삽입 등을 들 수 있다.

[0180] ALT 를 코딩하는 DNA 는 또한,

KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 2875, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Homo sapiens (human): 84706, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 76282, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Mus musculus (mouse): 108682, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Rattus norvegicus (rat): 81670, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Canis familiaris (dog): 609510, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Xenopus laevis (African clawed frog): 444533, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Drosophila melanogaster (fruit fly): Dmel_CG1640, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Caenorhabditis elegans (nematode): C32F10.8, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4342210, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Oryza sativa japonica (Japanese rice): 4348524, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cyanidioschyzon merolae: CMM066C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YLR089C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Saccharomyces cerevisiae: YDR111C, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii): AGOS_AGR085W, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Candida albicans: CaO19_346, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Schizosaccharomyces pombe: SPBC582.08, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus nidulans: AN1923.2, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus fumigatus: AFU A_6G07770, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Aspergillus oryzae: AO090003000164, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Cryptococcus neoformans JEC21: CNG01490, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Dictyostelium discoideum: DDB_0232139, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma brucei: Tb927.1.3950, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Leishmania major: LmjF12.0630, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 233.t0009, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Entamoeba histolytica: 24.t00016, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.420, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 506529.430, KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.120 또는 KEGG / ENZYME: 2.6.1.2 / Trypanosoma cruzi: 510889.140

[0181]

[0182] 의 염기 배열을 갖는 DNA 에 상보적인 DNA 와 스트린젠트한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA 이고, 또한 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 를 포함한다.

[0183] 스트린젠트한 조건으로는, 당업자라면 적절히 선택할 수 있으나, 예를 들어 저스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 저스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 42 °C, 2 × SSC, 0.1 % SDS 를 들 수 있으며, 바람직하게는 50 °C, 2

× SSC, 0.1 % SDS 이다. 또, 보다 바람직하게는 고스트린젠트한 조건을 들 수 있다. 고스트린젠트한 조건이란, 예를 들어 65 °C, 2 × SSC 및 0.1 % SDS 를 들 수 있다. 이들 조건에서 온도를 높일수록 높은 상동성을 갖는 DNA 를 얻을 수 있다. 상기 하이브리다이징하는 DNA 는, 바람직하게는 천연 유래 DNA, 예를 들어 cDNA 또는 염색체 DNA 이면 된다.

- [0184] 이들 하이브리다이제이션 기술에 의해 단리되는 DNA 는, 통상적으로 인간 등의 ALT 를 코딩하는 DNA 와 염기 배열에서 높은 동일성을 갖는다. ALT 를 코딩하는 DNA 에는, 인간 등의 ALT 와 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 코딩하고, 인간 등의 ALT 를 코딩하는 DNA 와 높은 동일성을 갖는 DNA 도 포함된다. 높은 동일성이란, 통상적으로 96 % 이상의 동일성, 바람직하게는 98 % 이상의 동일성, 더욱 바람직하게는 99 % 이상의 동일성을 가리킨다. 염기 배열의 동일성은, Karlin and Altschul 에 의한 알고리즘 BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5877, 1993) 에 의해 결정할 수 있다. 이 알고리즘에 기초하여 BLASTN 이나 BLASTX 라고 하는 프로그램이 개발되어 있다 (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215 : 403-410, 1990). BLAST 에 기초하여 BLASTN 에 의해 염기 배열을 해석하는 경우에는, 파라미터는, 예를 들어 score = 100, wordlength = 12 로 한다. 이들 해석 방법의 구체적인 수법은 공지되어 있다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [0185] 원하는 폴리펩티드를 제조하려면, Bicarbonate 트랜스포터와 CSAD 또는 ALT 를 강하게 발현시키는 세포에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입하고, 그 세포를 배지 중에서 배양함으로써 제조할 수 있다.
- [0186] Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 CSAD 또는 ALT 유전자가 인위적으로 도입된 세포를 사용하여 원하는 폴리펩티드를 제조하는 경우, Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 CSAD 또는 ALT 유전자와 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 도입 순서는 특별히 제한되지 않으며, Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 CSAD 또는 ALT 유전자를 도입한 후에 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입해도 되고, 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 도입한 후에 Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 CSAD 또는 ALT 유전자를 도입해도 된다. 또, Bicarbonate 트랜스포터 유전자와 CSAD 또는 ALT 유전자와 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 동시에 도입해도 된다.
- [0187] Bicarbonate 트랜스포터 유전자, CSAD 또는 ALT 유전자 및 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 도입은, 단일 벡터에 의해 동시에 도입해도 되고, 복수의 벡터를 사용하여 따로따로 도입해도 된다.
- [0188] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포 (CSAD 또는 ALT 를 강하게 발현시켜도 된다) 의 배양에는, 통상의 세포 (바람직하게는 동물 세포) 배양에서 사용되고 있는 배지를 사용할 수 있다. 이들에는 통상적으로 아미노산, 비타민류, 지질 인자, 에너지원, 삼투압 조절제, 철원, pH 완충제를 포함한다. 이들 성분의 함량은, 통상적으로 아미노산은 0.05 - 1500 mg/l, 비타민류는 0.001 - 10 mg/l, 지질 인자는 0 - 200 mg/l, 에너지원은 1 - 20 g/l, 삼투압 조절제는 0.1 - 10000 mg/l, 철원은 0.1 - 500 mg/l, pH 완충제는 1 - 10000 mg/l, 미량 금속 원소는 0.00001 - 200 mg/l, 계면 활성제는 0 - 5000 mg/l, 증식 보조 인자는 0.05 - 10000 μg/l 및 뉴클레오시드는 0.001 - 50 mg/l 의 범위가 적당한데, 이들에 한정되지 않고, 배양하는 세포의 종류, 원하는 폴리펩티드의 종류 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0189] 상기 성분 외에, 예를 들어 미량 금속 원소, 계면 활성제, 증식 보조 인자, 뉴클레오시드 등을 첨가해도 된다.
- [0190] 구체적으로는, 예를 들어 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-시스틴, L-글루타민, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-오르니틴, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린 등, 바람직하게는 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스틴, L-글루타민, L-글루타민산, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린 등의 아미노산류 ; i-이노시톨, 비오틴, 엽산, 리포산, 니코틴아미드, 니코틴산, p-아미노벤조산, 판토텐산칼슘, 염산피리독살, 염산피리독신, 리보플라빈, 엽산티아민, 비타민 B12, 아스코르브산 등, 바람직하게는 비오틴, 엽산, 리포산, 니코틴산아미드, 판토텐산칼슘, 염산피리독살, 리보플라빈, 엽산티아민, 비타민 B12, 아스코르브산 등의 비타민류 ; 염화콜린, 타르타르산콜린, 리놀레산, 올레산, 콜레스테롤 등, 바람직하게는 염화콜린 등의 지질 인자 ; 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 프룩토오스 등, 바람직하게는 글루코오스 등의 에너지원 ; 염화나트륨, 염화칼륨, 질산칼륨 등, 바람직하게는 염화나트륨 등의 삼투압 조절제 ; EDTA 철, 시트르산철, 염화제1철, 염화제2철, 황산제1철, 황산제2철, 질산제2철 등, 바람직하게는 염화제2철, EDTA 철, 시트르산철 등의 철원류 ; 탄산수소나트륨, 염화칼슘, 인산수소나트륨, HEPES, MOPS 등, 바람직하게는 탄산수소나트륨 등의 pH 완충제를 함유하는 배지를 예시할 수 있다.
- [0191] 상기 성분 외에, 예를 들어 황산구리, 황산망간, 황산아연, 황산마그네슘, 염화니켈, 염화주석, 염화마그네슘,

아구산나트륨 등, 바람직하게는 황산구리, 황산아연, 황산마그네슘 등의 미량 금속 원소 ; Tween 80, 플루로닉 F68 등의 계면 활성제 ; 및 재조합형 인슐린, 재조합형 IGF-1, 재조합형 EGF, 재조합형 FGF, 재조합형 PDGF, 재조합형 TGF- α , 염산에탄올아민, 아셀렌산나트륨, 레티노인산, 염산 푸트레신 등, 바람직하게는 아셀렌산나트륨, 염산에탄올아민, 재조합형 IGF-1, 염산 푸트레신 등의 증식 보조 인자 ; 테옥시아데노신, 테옥시시티딘, 테옥시구아노신, 아데노신, 시티딘, 구아노신, 우리딘 등의 뉴클레오타이드 등을 첨가해도 된다. 또한, 상기 배지의 바람직한 예에서는, 스트렙토마이신, 페니실린 G 칼륨 및 겐타마이신 등의 항생 물질이나, 페놀 레드 등의 pH 지시약을 함유하고 있어도 된다.

[0192] 배지의 pH 는 배양하는 세포에 따라 상이한데, 일반적으로는 pH 6.8 ~ 7.6, 대부분의 경우에는 pH 7.0 ~ 7.4 가 적당하다.

[0193] 배지는 시판되는 동물 세포 배양용 배지, 예를 들어 D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), D-MEM/F-12 1 : 1 Mixture (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12), RPMI1640, CHO-S-SFM II (Invitrogen 사), CHO-SF (Sigma-Aldrich 사), EX-CELL 301 (JRH biosciences 사), CD-CHO (Invitrogen 사), IS CHO-V (Irvine Scientific 사), PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich 사) 등의 배지를 사용할 수도 있다.

[0194] 또, 배지는 무혈청 배지여도 된다.

[0195] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포 (CSAD 또는 ALT 를 강하게 발현시켜도 된다) 가 CHO 세포인 경우, CHO 세포의 배양은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 통상적으로 기상의 CO₂ 농도가 0 - 40 %, 바람직하게는 2 - 10 % 의 분위기 하, 30 - 39 °C, 바람직하게는 37 °C 정도에서 배양할 수 있다.

[0196] Bicarbonate 트랜스포터를 강하게 발현시키는 세포 (CSAD 또는 ALT 를 강하게 발현시켜도 된다) 를 사용하여 원하는 폴리펩티드를 생성시키기 위해 적당한 배양 기간은, 통상적으로 1 일 ~ 3 개월이고, 바람직하게는 1 일 ~ 2 개월, 더욱 바람직하게는 1 일 ~ 1 개월이다.

[0197] 또, 동물 세포 배양용의 각종 배양 장치로는, 예를 들어 발효조형 탱크 배양 장치, 에어 리프트형 배양 장치, 켈처 플라스크형 배양 장치, 스피너 플라스크형 배양 장치, 마이크로 캐리어형 배양 장치, 유동층형 배양 장치, 할로우 파이버형 배양 장치, 롤러 보틀형 배양 장치, 충전조형 배양 장치 등을 사용하여 배양할 수 있다.

[0198] 배양은 배치 배양 (batch culture), 유가 배양 (fed-batch culture), 연속 배양 (continuous culture) 등 중 어느 방법을 사용해도 되지만, 유가 배양 또는 연속 배양이 바람직하고, 유가 배양이 보다 바람직하다.

[0199] 본 발명의 방법에 의해 제조된 폴리펩티드가 의약으로서 이용할 수 있는 생물학적 활성을 갖는 경우에는, 이 폴리펩티드를 의약적으로 허용되는 담체 또는 첨가제와 혼합하여 제제화함으로써 의약품을 제조할 수 있다.

[0200] 의약적으로 허용되는 담체 및 첨가제의 예로서, 물, 의약적으로 허용되는 유기 용제, 콜라겐, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시비닐 폴리머, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리아크릴산나트륨, 알긴산나트륨, 수용성 텍스트란, 카르복시메틸스타치나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 잔탄검, 아라비아 고무, 카세인, 한천, 폴리에틸렌글리콜, 디글리세린, 글리세린, 프로필렌글리콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴알코올, 스테아르산, 인간 혈청 알부민 (HSA), 만니톨, 소르비톨, 락토오스, 의약 첨가물로서 허용되는 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0201] 실제 첨가물은 본 발명 치료제의 제형에 따라 상기 중에서 단독으로 또는 적절히 조합하여 선택되는데, 물론 이들에 한정하지 않는다. 예를 들어, 주사용 제제로서 사용하는 경우, 정제된 폴리펩티드를 용제, 예를 들어 생리 식염수, 완충액, 포도당 용액 등에 용해시키고, 이것에 흡착 방지제, 예를 들어 Tween 80, Tween 20, 젤라틴, 인간 혈청 알부민 등을 첨가한 것을 사용할 수 있다. 혹은 사용 전에 용해 재구성하는 제형으로 하기 위해 동결 건조시킨 것이어도 되고, 동결 건조를 위한 부형제로는, 예를 들어 만니톨, 포도당 등의 당알코올이나 당류를 사용할 수 있다.

[0202] 폴리펩티드의 유효 투여량은 폴리펩티드의 종류, 치료나 예방의 대상으로 하는 질환의 종류, 환자의 연령, 질환의 위독한 정도 등에 따라 적절히 선택된다. 예를 들어, 폴리펩티드가 항글리피칸 항체인 경우, 항글리피칸 항체의 유효 투여량은, 1 회에 대하여 체중 1 kg 당 0.001 mg 내지 1000 mg 의 범위에서 선택된다. 혹은 환자당 0.01 ~ 100000 mg/body 의 투여량을 선택할 수 있다. 그러나, 이들 투여량에 제한되지 않는다.

[0203] 폴리펩티드의 투여 방법은 경구, 비경구 투여 중 어느 것으로도 가능한데, 바람직하게는 비경구 투여이고, 구체

적으로는 주사 (예를 들어, 정맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하 주사 등에 의한 전신 또는 국소 투여), 경피 투여, 경피 투여, 경피 투여 등을 들 수 있다.

- [0204] 본 발명은 Bicarbonate 트랜스포터를 코딩하는 DNA 와 시스테인술폰산 데카르복실라아제 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제를 코딩하는 DNA 가 도입되어 있는 세포 (어느 쪽의 DNA 가 벡터에 삽입되어 있어도 된다) 도 제공한다.
- [0205] 진핵 세포를 사용하는 경우, 예를 들어 동물 세포, 식물 세포, 진균 세포를 숙주에 사용할 수 있다. 동물 세포로는 포유류 세포, 예를 들어 CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), COS, 3T3, 미엘로마, BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, 양생(兩生)류 세포, 예를 들어 아프리카밭뜯개구리 난모세포 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340), 혹은 곤충 세포, 예를 들어 Sf9, Sf21, Tn5 가 알려져 있다. CHO 세포로는, 특히 DHFR 유전자를 결손시킨 CHO 세포인 dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) 나 CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) 을 바람직하게 사용할 수 있다. 동물 세포에서 대량 발현을 목적으로 하는 경우에는, 특히 CHO 세포가 바람직하다. 숙주 세포로의 DNA (벡터에 삽입되어 있어도 된다) 의 도입은, 예를 들어 인산칼슘법, DEAE 텍스트란법, 카티온 리보솜 DOTAP (베링거 만하임사 제조) 를 사용한 방법, 일렉트로포레이션법, 리포펙션 등의 방법으로 실시할 수 있다.
- [0206] 식물 세포로는, 예를 들어 니코티아나·타바쿰 (Nicotiana tabacum) 유래 세포가 폴리펩티드 생산계로서 알려져 있으며, 이것을 캘러스 배양하면 된다. 진균 세포로는 효모, 예를 들어, 사카로마이세스 (Saccharomyces) 속, 예를 들어 사카로마이세스·세레비시에 (Saccharomyces cerevisiae), 사상균, 예를 들어 아스페르길루스 (Aspergillus) 속, 예를 들어 아스페르길루스·니거 (Aspergillus niger) 가 알려져 있다.
- [0207] 원핵 세포를 사용하는 경우, 세균 세포를 사용하는 생성계가 있다. 세균 세포로는, 대장균 (E. coli), 예를 들어 JM109, DH5 α , HB101 등을 들 수 있으며, 그 밖에 고초균이 알려져 있다.
- [0208] 이들 세포를 목적으로 하는 유전자에 의해 형질 전환하고, 형질 전환된 세포를 in vitro 에서 배양함으로써, 목적으로 하는 유전자가 코딩하는 폴리펩티드가 얻어진다. 배양은 공지된 방법에 따라 실시할 수 있다. 예를 들어, 동물 세포의 배양액으로서, 예를 들어 DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM 을 사용할 수 있다. 그 때, 소 태아 혈청 (FCS) 등의 혈청 보액을 병용할 수도 있으며, 무혈청 배양해도 된다. 배양시의 pH 는 약 6 ~ 8 인 것이 바람직하다. 배양은 통상적으로 약 30 ~ 40 °C 에서 약 15 ~ 200 시간 동안 실시하고, 필요에 따라 배지의 교환, 통기, 교반을 추가한다.
- [0209] 한편, in vivo 에서 폴리펩티드를 생성시키는 계로는, 예를 들어 동물을 사용하는 생성계나 식물을 사용하는 생성계를 들 수 있다. 이들 동물 또는 식물에 목적으로 하는 유전자를 도입하고, 동물 또는 식물의 체내에서 폴리펩티드를 생성시키고, 회수한다. 본 발명에 있어서의 「숙주」란, 이들 동물, 식물을 포함한다.
- [0210] 동물을 사용하는 경우, 포유류 동물, 곤충을 사용하는 생성계가 있다. 포유류 동물로는 염소, 돼지, 양, 마우스, 소를 사용할 수 있다 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). 또, 포유류 동물을 사용하는 경우, 트랜스제닉 동물을 사용할 수 있다.
- [0211] 예를 들어, 목적으로 하는 유전자를 염소 β 카세인과 같은 유즙 중에 고유하게 생성되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자와의 융합 유전자로서 조제한다. 이어서, 이 융합 유전자를 포함하는 유전자 단편을 염소의 배 (胚) 에 주입하고, 이 배를 암컷 염소에 이식한다. 배를 수용한 염소로부터 태어나는 트랜스제닉 염소 또는 그 자손이 생성하는 유즙으로부터 목적하는 폴리펩티드를 얻을 수 있다. 트랜스제닉 염소로부터 생성되는 폴리펩티드를 함유하는 유즙량을 증가시키기 위해, 적절히 호르몬을 트랜스제닉 염소에 사용해도 된다 (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).
- [0212] 또, 곤충으로는, 예를 들어 누에를 사용할 수 있다. 누에를 사용하는 경우, 목적하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 삽입한 바콜로 바이러스를 누에에 감염시킴으로써, 이 누에의 체액으로부터 목적하는 폴리펩티드를 얻을 수 있다 (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594).
- [0213] 또한, 식물을 사용하는 경우, 예를 들어 담배를 사용할 수 있다. 담배를 사용하는 경우, 목적으로 하는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 식물 발현용 벡터, 예를 들어 pMON 530 에 삽입하고, 이 벡터를 아그로박테리움·투메파시엔스 (Agrobacterium tumefaciens) 와 같은 박테리아에 도입한다. 이 박테리아를 담배, 예를 들어 니코티아나·타바쿰 (Nicotiana tabacum) 에 감염시켜, 본 담배의 잎으로부터 원하는 폴리펩티드를 얻을 수 있다 (Julian K.-C. Ma et. al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

- [0214] 이로써 얻어진 폴리펩티드는, 숙주 세포 내 또는 세포 외 (배지 등) 로부터 단리하여, 실질적으로 순수하고 균 일한 폴리펩티드로서 정제할 수 있다. 폴리펩티드의 분리, 정제는, 통상의 폴리펩티드의 정제에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법을 사용하면 되며, 전혀 한정되지 않는다. 예를 들어, 크로마토그래피 칼럼, 필터, 한 외 여과, 염석, 용매 침전, 용매 추출, 증류, 번역 침강, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동, 등전점 전기 영 동법, 투석, 재결정 등을 적절히 선택, 조합하면 폴리펩티드를 분리, 정제할 수 있다.
- [0215] 크로마토그래피로는, 예를 들어 어피니티 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 등을 들 수 있다 (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). 이들 크로마토그래피는 액상 크로마토그래피, 예를 들어 HPLC, FPLC 등의 액상 크로마토그래피를 사용하여 실시할 수 있다. 본 발명은 이들 정제 방법을 사용하며, 고도로 정제된 폴리펩 티드도 포함한다.
- [0216] 또한, 폴리펩티드를 정제 전 또는 정제 후에 적당한 폴리펩티드 수식 효소를 작용시킴으로써, 임의로 수식을 가 하여 부분적으로 펩티드를 제거할 수도 있다. 폴리펩티드 수식 효소로는, 예를 들어 트립신, 키모트립신, 리 실엔도펩티다아제, 프로테inkin아아제, 글루코시다아제 등이 사용된다.
- [0217] 또한, 본 발명에서 「DNA 가 도입된 세포」 혹은 「DNA 를 도입한 세포」란, 유전자 재조합 기술에 의해 외래성 DNA 가 삽입된 세포 외에, 유전자 활성화 기술 (예를 들어, 국제 공개 제W094/12650호 팜플렛 참조) 에 의해 내 인성 DNA 가 활성화되고, 그 결과, 당해 DNA 에 대응하는 단백질의 발현 혹은 당해 DNA 의 전사가 개시 혹은 증 가된 세포도 포함하는 개념이다.
- [0218] 실시예
- [0219] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 또한, 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것으 로서, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.
- [0220] [실시예 1] 인간 간세포 아ни온 익스체인저 (Anion Exchanger 1, band 3) 유전자 클로닝
- [0221] 시판되는 Human Liver QUICK-Clone cDNA (Clontech 사) 를 주형으로 하여, 인간 간 유래 Anion Exchanger (AE1) 유전자를 PCR 법에 의해 얻었다. 클로닝된 유전자는 염기 배열을 결정하고, 공개되어 있는 인간 AE1 과의 상동성으로부터 AE1 을 코딩하고 있다는 것을 확인하였다. 얻어진 AE1 유전자는, 2733 염기 중 8 지점 (t263g, t357c, a645t, a672c, c951t, a2078g, t2195c, c2500t) 에 변이가 관찰되며, 코딩하는 아미노산은 911 개 중 4 아미노산 (L88R, E693G, V712A, H834Y) 이 상이했다. 그러나, 13 의 막 관통 영역을 갖는 트랜스 포터인 것으로 예측되기 때문에 (도 1), 인간 간 유래 AE1 유전자로서 세포 개변에 사용하였다.
- [0222] [실시예 2] 인간 아ни온 익스체인저 유전자 도입에 의한 항체 생성량 증가
- [0223] 실시예 1 의 PCR 클로닝에 의해 취득한 인간 AE1 (이하 AE1) 유전자에 Kozak 배열을 추가하여, CMV 프로모터 발 현 플라스미드 pHyg-AE1 (도 2), pPur-AE1 (도 3) 을 구축하였다. pHyg-AE1 혹은 AE1 유전자를 함유하지 않는 pHyg 발현 플라스미드 (Clontech 사의 pTK5 유래 Hygromycin 내성 유전자 발현 유닛을 pSV2-dhfr 플라스 미드 (ATCC No.37146) 에 도입한 플라스미드를 구축 후, dhfr 발현 유닛을 제거한 것이다.) 를 친주인 항글리피 칸-3 항체 생성 CHO 세포 (국제 공개 제WO 2006/006693호 팜플렛을 참조) 에 일렉트로포레이션법에 의해 도입하 고, Hygromycin (200 $\mu\text{g/ml}$) 의 존재 하, 정치 (靜置) 배양 하에서 고증식이었던 세포주를 확대한 후, pHyg-AE1 세포주로부터 Total RNA 를 조제하고, TaqMan 법에 의해 인간 AE1 을 고발현한 5 주를 선발하였다. 또한, 진탕 배양 하에서, 컨트롤인 pHyg 도입 세포 (4 주) 와 동일한 정도로 증식시킨 4 주를 인간 AE1 도입 세포로 하여 항체 생성량을 비교하였다. 초발 (初發) 밀도 2×10^5 cells/ml 의 50 ml 웨이커 플라스크에 의한 유 가 배양에 있어서, 웨이커 배양 후기 12 일째의 pHyg-AE1 도입 세포 (4 주) 의 항글리피칸-3 항체 생성량은, pHyg 도입 세포 (4 주) 에 대하여 우위였다 (t 검정 $P < 0.05$, 도 4).
- [0224] 다음으로, pHyg-AE1 도입 세포 4 주 중에서 가장 항체 고생성이었던 AE1 발현주를 친주로 하여, Puromycin 내성 유전자를 포함하는 시스템인슐린산 테카르복실라아제 (CSAD) 발현 플라스미드 pPur-CSAD (도 10, 후술하는 참고 예 2), Puromycin 내성 유전자를 포함하는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 (ALT1) 발현 플라스미드 pPur-ALT1 (도 11, 후술하는 참고예 4), 컨트롤 플라스미드 pPur (Clontech 사의 pPUR (a puromycin resistance expression vector)) 을 일렉트로포레이션법에 의해 도입하였다. Puromycin (6 $\mu\text{g/ml}$) 의 존재 하, 정치 배양 하에서 고증식이었던 세포주를 확대한 후, Total RNA 를 조제하고, 새로 도입된 유전자를 고발현한 AE1/CSAD 공발현주

(9 주), AE1/ALT1 공발현주 (10 주), AE1/pPur 공발현주 (8 주) 를 선발하여 항체 생성량 및 생존률을 비교하였다. 초발 밀도 2×10^5 cells/ml 의 50 ml 셰이커 플라스크에 의한 유가 배양에 있어서, AE1/CSAD 공발현주 (9 주) 는, 컨트롤의 AE1/pPur 공발현주 (8 주) 에 대하여 셰이커 배양 후기 10 일째의 항글리피칸-3 항체 생성량 (t 검정 $P < 0.05$, 도 5), 생존률 (t 검정 $P < 0.01$, 도 6) 모두 우위였다. 3 종류의 공발현주 중, 항글리피칸-3 항체 생성량이 가장 높았던 세포주는 AE1/ALT1 공발현주 (10 주) 이고, 셰이커 유가 배양 8 일째에 컨트롤의 AE1/pPur 공발현주 (8 주) 에 대하여 우위였다 (t 검정 $P < 0.01$, 도 7). 그래서, AE1/ALT1 공발현주 (10 주) 중, 셰이커 유가 배양 검토에서 가장 항체 고생산 그리고 ALT1 mRNA 를 고발현한 AA53 (1497 mg/l/8 days) 을 초발 10×10^5 cells/ml 에서 1 l Jar 유가 배양을 실시하면, 배양 7 일째에 1.9 g/l/7 day 로 단기 배양에서 항체 고생산이었다 (도 8). 배양 21 일째에 5.3 g/l 이었던 TauT/ALT1 발현주 TA41 (후술하는 참고예 4) 은, 배양 7 일째에 1.5 g/l 이기 때문에, AA53 은 TA41 이상으로 단기간에 항체를 고생산할 수 있는 포텐셜을 가지고 있어, 실생산에 적합한 것으로 생각된다.

[0225] 이상의 결과는, 아니온 익스체인저 (AE1) 를 인위적으로 강하게 발현시킴으로써, 또 AE1 과 CSAD 또는 ALT1 을 동시에 강하게 발현시킴으로써, 항체를 고생산시키는 세포가 얻어진다는 것을 나타낸다.

[0226] AE1 강발현 효과는 또한, AE1 강발현 숙주 세포를 사용한 항 IL-6R 항체 생성주 구축에 의해 나타났다. 통상의 숙주 세포 DXB11 에 pHyg-AE1 (도 2) 을 일렉트로포레이션법에 의해 도입하고, Hygromycin (200 μ g/ml) 의 존재 하, 정지 배양 하에서 고증식이었던 세포주를 선발, 확대한 후, TaqMan 법에 의해 인간 AE1 을 고발현한 세포를 AE1/DXB11 숙주 세포로서 수립하였다. AE1/DXB11 숙주 세포에 항 IL-6R 항체 발현 플라스미드를 도입하여, 싱글 클론화된 AE1-S08 세포는 항 IL-6R 항체 고생산이며, 도 12 에 나타낸 바와 같이, 초발 7×10^5 cells/ml 의 1 l Jar 유가 배양 14 일째의 생성량은 3.0 g/l 였다. 항체 고생산 세포 AE1-S08 및 숙주 세포 AE1/DXB11 은 모두 계대 배양에 의한 안정성 시험에서 안정되고, AE1 고발현이 유지된다는 것은 확인이 끝난 상태이다.

[0227] 이상의 결과는, AE1 유전자 도입 효과가 항체 유전자 도입 전후 어느 쪽에서나 포지티브하게 작용한다는 것을 나타내고 있다.

[0228] 본 발명은 모든 폴리펩티드 (바람직하게는 항체) 생성 세포에 응용할 수 있다.

[0229] [참고예 1] CHO 세포 유래 햄스터 Cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSAD) 유전자 클로닝

[0230] CHO DXB11 세포에 항 IL-6 리셉터 항체 유전자를 도입한 항 IL-6 리셉터 항체 생성 세포 (일본 공개특허공보 평 8-99902호) 로부터 total RNA 를 추출한 후, 폴리 A 에 의존하는 cDNA 를 합성하였다. SalI, XhoI, EcoRI 의 3 종류의 제한 효소에 의해 단편화한 cDNA 를 주형으로 함으로써, Hamster CSAD 유전자를 PCR 에 의해 얻었다. PCR 프라이머는 이미 알려진 Rat 와 Mouse 사이에서 유전자 배열이 보존되어 있는 5', 3' 을 포함하는 것을 설계하여 사용하였다. 클로닝된 유전자는 염기 배열을 결정하고, 이미 알려진 생물종의 CSAD 와의 상동성으로부터 Hamster CSAD (도 9) 를 코딩하고 있다는 것을 확인하였다. Hamster CSAD 는 Mouse (96 % Identity), Rat (96 % Identity), Human (91 % Identity) 과 이미 알려진 아미노산 배열에 대하여 높은 상동성을 가지고 있어, 동일한 활성을 갖는 효소인 것으로 예상되었다. 햄스터의 CSAD 의 염기 배열을 배열 번호 3 에 나타낸다. 햄스터의 CSAD 의 아미노산 배열을 배열 번호 4 에 나타낸다.

[0231] [참고예 2] 햄스터 CSAD 를 발현시키는 Puromycin 선발용 플라스미드의 구축

[0232] 참고예 1 의 클로닝에 의해 취득한 Hamster CSAD (이하 CSAD) 유전자에 Kozak 배열을 추가하여, CMV 프로모터 발현 플라스미드 pPur/CSAD (도 10) 를 구축하였다.

[0233] [참고예 3] 인간 간세포 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 (Alanine aminotransferase) 유전자 클로닝

[0234] 시판되는 Human Liver QUICK-Clone cDNA (Clontech 사) 를 주형으로 하여, 인간 간 유래 Alanine aminotransferase (ALT1) 유전자를 PCR 법에 의해 얻었다. 클로닝된 유전자는 염기 배열을 결정하고, 공개되어 있는 인간 ALT1 과의 상동성으로부터 ALT1 을 코딩하고 있다는 것을 확인하였다. 얻어진 ALT1 유전자는, 1488 염기 중 5 지점 (c157a, a215g, c765t, t857c, t995a) 에 변이가 관찰되며, 코딩하는 아미노산은 496 개 중 4 아미노산 (R53S, Q72R, F286S, M332K) 이 상이했지만, 인간 간 유래 ALT1 PCR 클론으로서 세포 개변에 사용하였다.

[0235] [참고예 4] 인간 알라닌 아미노트랜스퍼라아제 도입에 의한 항체 생성량 증가

- [0236] 참고예 3 의 클로닝에 의해 취득한 인간 ALT1 (이하 ALT1) 유전자에 Kozak 배열을 추가하여, CMV 프로모터 발현 플라스미드 pPur-ALT1 (도 11) 을 구축하였다. pPur-ALT1 혹은 ALT1 유전자를 함유하지 않는 pPur 발현 플라스미드를, 친주인 항글리피칸-3 항체 생성 CHO 세포 (국제 공개 제WO 2006/006693호 팜플렛을 참조) 에 일렉트로포레이션법에 의해 도입하고, Puromycin (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 의 존재 하, 정치 배양에서 고증식이었던 세포주 (pPur-ALT1 : 7 주, pPur : 3 주) 를 선발하였다. 확대 후, pPur-ALT1 세포주로부터 Total RNA 를 조제하고, TaqMan 법에 의해 인간 ALT1 을 고발현한 6 주를 선발하고, 추가로 진탕 배양 하에서 컨트롤인 pPur 도입 세포 (3 주) 와 동일한 정도로 증식하는 4 주를 인간 ALT1 도입 세포로 하여 항체 생성량을 비교하였다. 초발 밀도 2×10^5 cells/ml 의 50 ml 셰이커 플라스크에 의한 유가 배양에서, 셰이커 배양 후기 17 일째의 pPur-ALT1 도입 세포 (4 주) 의 항글리피칸-3 항체 생성량 ($1236 \pm 149 \text{ mg}/\ell$) 은, pPur 도입 세포 (3 주) 의 항글리피칸-3 항체 생성량 ($871 \pm 119 \text{ mg}/\ell$) 에 대하여 우위였다 (t 검정 $P < 0.01$). 셰이커 유가 배양 검토에 있어서, 각각 가장 항체 고생성이었던 pPur-ALT1 발현주 A72 및 Pur 발현주 P41 을 초발 10×10^5 cells/ml 로 1 l Jar 유가 배양을 실시하면, A72 의 항체 생성량은, 배양 19 일째에 $2.9 \text{ g}/\ell$ 로, P41 의 항체 생성량 ($2.2 \text{ g}/\ell$) 이상으로 고생성이었다. 배양 14 일째 이후에 P41 의 생성량 증가가 관찰되지 않기 때문에, A72 의 항체 고생성은 생존률 유지 효과에 의한 것으로 생각되었다 (배양 14 일째 생존률은, pPur-ALT1 발현 A72 에서 60 %, pPur 발현주 P41 에서 23 % 였다).
- [0237] 다음으로, pHyg-TauT 도입 세포 T10 (후술하는 참고예 6 을 참조) 을 친주로 하여, pPur-ALT1 혹은 pPur 을 공동 도입하고, 고증식이고 또한 인간 ALT1 을 고발현한 TauT/ALT1 공발현 세포 (6 주), 및 고증식인 TauT/pPur 공발현 세포 (8 주) 를 선발하여, 초발 밀도 10×10^5 cells/ml 로 50 ml 셰이커 플라스크에 의한 유가 배양을 실시하였다. ALT 발현 세포인 TauT/ALT1 공발현주의 셰이커 배양 4 일째의 항글리피칸-3 항체 생성량 ($745 \pm 87 \text{ mg}/\ell$) 은, TauT/pPur 발현주의 셰이커 배양 4 일째의 항글리피칸-3 항체 생성량 ($616 \pm 29 \text{ mg}/\ell$) 에 대하여 우위였다 (t 검정 $P < 0.01$).
- [0238] 셰이커 유가 배양 검토에 있어서 가장 항체 고생적이고, 또한 ALT1 mRNA 를 가장 발현한 TauT/ALT1 공발현주 TA41 ($881 \text{ mg}/\ell/4 \text{ days}$) 을 초발 10×10^5 cells/ml 에서 1 l Jar 유가 배양을 실시하면, 그 항체 생성량은 배양 7 일째에 $1.3 \text{ g}/\ell$, 배양 10 일째에 $3.0 \text{ g}/\ell$, 배양 12 일째에 $3.5 \text{ g}/\ell$, 배양 17 일째에 $4.6 \text{ g}/\ell$, 배양 21 일째에 $5.3 \text{ g}/\ell$ 로 높아, TauT/pPur 공발현주 중에서 가장 생성량이 높았던 컨트롤주 TP08 ($656 \text{ mg}/\ell/4 \text{ days}$) 에 대해서도 명백하게 높았다 (배양 10 일째에 $2.4 \text{ g}/\ell$).
- [0239] [참고예 5] CHO 세포 유래 햄스터 타우린 트랜스포터 유전자 클로닝
- [0240] CHO DXB11 세포에 항 IL-6 리셉터 항체 유전자를 도입한 항 IL-6 리셉터 항체 생성 세포 (일본 공개특허공보 평 8-99902호) 로부터 total RNA 를 추출한 후, 폴리 A 에 의존하는 cDNA 를 합성하였다. SalI, XhoI, EcoRI 의 3 종류의 제한 효소에 의해 단편화한 cDNA 를 주형함으로써, Hamster 타우린 트랜스포터 (TauT) 유전자를 PCR 에 의해 얻었다. PCR 프라이머는 이미 알려진 Rat/Mouse TauT 사이에서 유전자 배열이 보존되어 있는 5', 3' 을 포함하는 것을 설계하여 사용하였다. 클로닝된 유전자는 염기 배열을 결정하고, 이미 알려진 생물종의 TauT 와의 상동성으로부터 Hamster TauT 를 코딩하고 있다는 것을 확인하였다 (도 13). Hamster TauT 아미노산 배열은 Mouse (96 % Identity), Rat (96 % Identity), Human (93 % Identity) TauT 에 대하여 높은 상동성을 가지고 있어, 12 개의 막 관통 영역을 갖는 트랜스포터인 것으로 예상되었다 (도 14).
- [0241] [참고예 6] 햄스터 타우린 트랜스포터 도입에 의한 생세포 밀도 증가, 락트산 생성량 억제, 및 항체 생성량 증가
- [0242] 참고예 5 의 클로닝에 의해 취득한 Hamster TauT (이하 TauT) 유전자에 Kozak 배열을 추가하여, CMV 프로모터 발현 플라스미드 pHyg/TauT (도 15) 를 구축하였다. pHyg/TauT 혹은 TauT 유전자를 제거한 컨트롤 플라스미드 pHyg 를, 친주인 항글리피칸-3 항체 생성 CHO 세포 (국제 공개 제WO 2006/006693호 팜플렛을 참조) 에 일렉트로포레이션법에 의해 도입하였다. 발현 플라스미드 도입 세포를 Hygromycin ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$) 의 존재 하에서 선발한 후, 안정되게 증식하는 세포주 전부를 확대하였다 (pHyg/TauT : 8 주, pHyg : 7 주). TauT mRNA 를 조제 후, TaqMan 법에 의해 친주에 대하여 우위인 발현을 확인할 수 있는 7 주를 pHyg/TauT 도입 세포로 하였다. 도입 세포 (7 주) 의 mRNA 평균 발현량은 컨트롤 (7 주) 의 약 40 배였다. 함께 14 주의 세포는 2×10^5 cells/ml 의 초발 밀도로 50 ml 셰이커 플라스크에 의한 배치 (batch) 배양 및 유가 (Fed-batch) 배양을 실시하여, 배양 후기 7 일째에 있어서의 생세포 밀도, 락트산 생성량, 항글리피칸-3 항체 생성량을 비교

하였다. 배양 배양에서는 세포 증식에 따라 배양액 중에 락트산 등의 생육 저해 물질이 축적되어 증식이 억제되지만, pHyg/TauT 도입 세포의 생세포 밀도 ($9.28 \pm 3.27 \times 10^5$ cells/ml) 및 락트산 생성량 (1.54 ± 0.20 g/l) 은, pHyg 도입 세포 (생세포 밀도 : $5.69 \pm 2.09 \times 10^5$ cells/ml, 락트산 생성량 : 1.75 ± 0.15 g/l) 에 대하여 우위였다 (t 검정 $P < 0.05$). 항글리피칸-3 항체 생성량에 관해서는, pHyg/TauT 도입 세포의 7 주 중 4 주 (평균 항체 생성량 : 440.6 mg/l) 가 pHyg 도입 세포의 최고값 (389.6 mg/l) 이상이었다.

또한, pHyg/TauT 도입 세포의 항글리피칸-3 항체 생성량의 우위성 (t 검정 $P < 0.01$) 이 유가 배양에 의해 명백해졌기 때문에, 상기 4 주 중에서 가장 증식능이 높았던 pHyg/TauT 도입 세포 (T10) 와 친주의 1 l Jar 에 의한 유가 배양을 실시한 결과, T10 은 배양 32 일째에도 생존률이 80 % 이상으로 유지되어 있어, 락트산 생성이 억제되어 있었다. 그 결과, 항글리피칸-3 항체 생성량은, 배양 35 일째에 2.9 g/l 를 달성하였다. TauT 도입 T10 세포가 세포막 상에 TauT 분자를 발현하고 있는 것은, 플로우사이토메트리 분석에 의해 확인하였다. 이상의 결과는, Hamster TauT 를 인위적으로 발현시킴으로써 항체 생성 세포의 포텐셜이 높아져, 항체 고생산주가 얻어지는 것을 시사하고 있다.

[0243] 본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허출원을 그대로 참고로서 본 명세서에 도입한다.

산업상 이용가능성

[0244] 본 발명은 폴리펩티드의 생산에 이용할 수 있다.

서열목록 자유텍스트

[0246] <배열 번호 1>

배열 번호 1 은 인간 AE1 을 코딩하는 유전자의 염기 배열 (GenBank M27819) 을 나타낸다.

<배열 번호 2>

배열 번호 2 는 인간 AE1 의 아미노산 배열 (UniProtKB/Swiss-Prot P02730) 을 나타낸다.

<배열 번호 3>

배열 번호 3 은 햄스터 CSAD 를 코딩하는 유전자의 염기 배열을 나타낸다.

<배열 번호 4>

배열 번호 4 는 햄스터 CSAD 의 아미노산 배열을 나타낸다.

<배열 번호 5>

배열 번호 5 는 인간 ALT1 을 코딩하는 유전자의 염기 배열 (KEGG/ENZYME : 2.6.1.2/Homo sapiens (human) : 2875) 을 나타낸다.

<배열 번호 6>

배열 번호 6 은 인간 ALT1 의 아미노산 배열 (KEGG/ENZYME : 2.6.1.2/Homo sapiens (human) : 2875) 을 나타낸다.

<배열 번호 7>

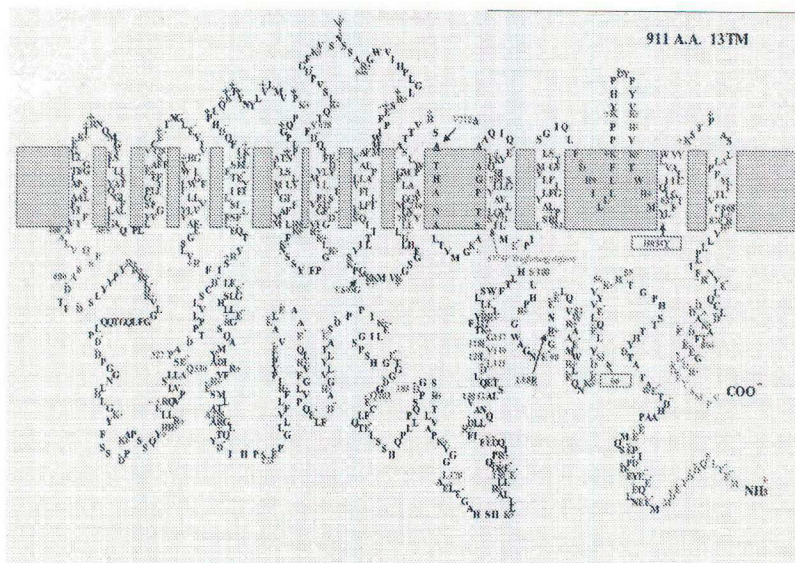
배열 번호 7 은 햄스터 타우린 트랜스포터를 코딩하는 유전자의 염기 배열을 나타낸다.

<배열 번호 8>

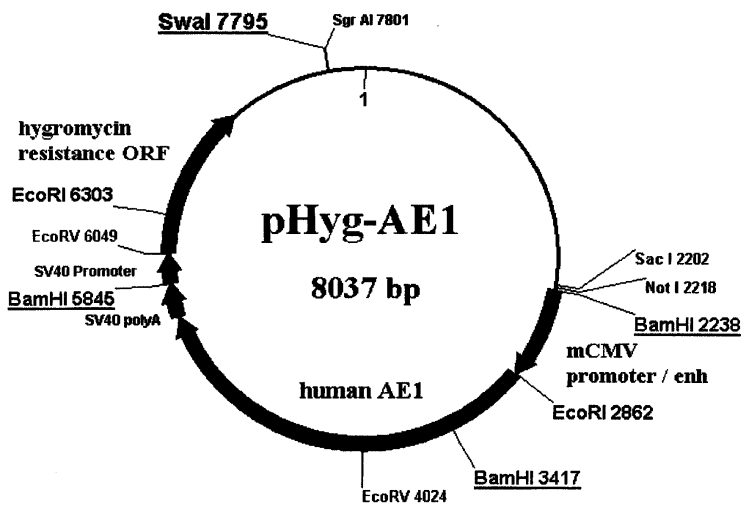
배열 번호 8 은 햄스터 타우린 트랜스포터의 아미노산 배열을 나타낸다.

도면

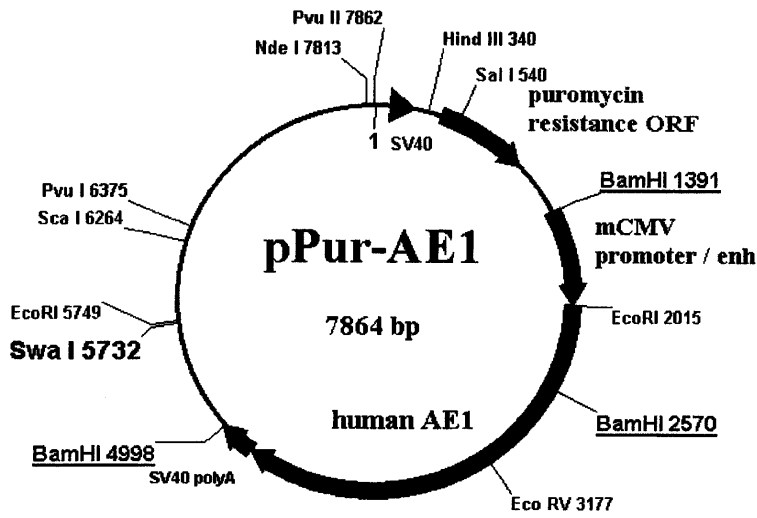
도면1



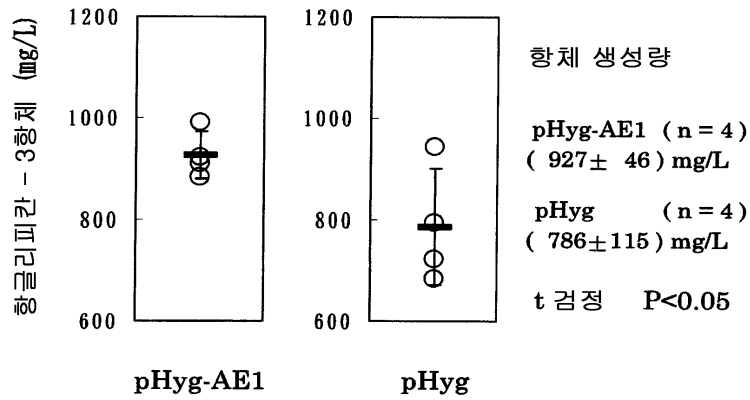
도면2



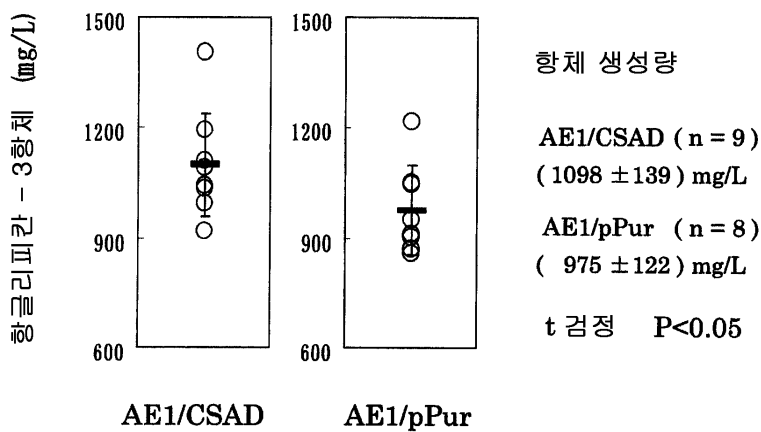
도면3



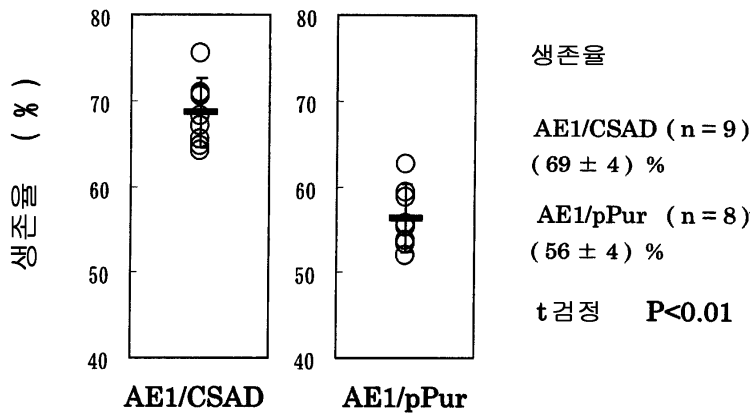
도면4



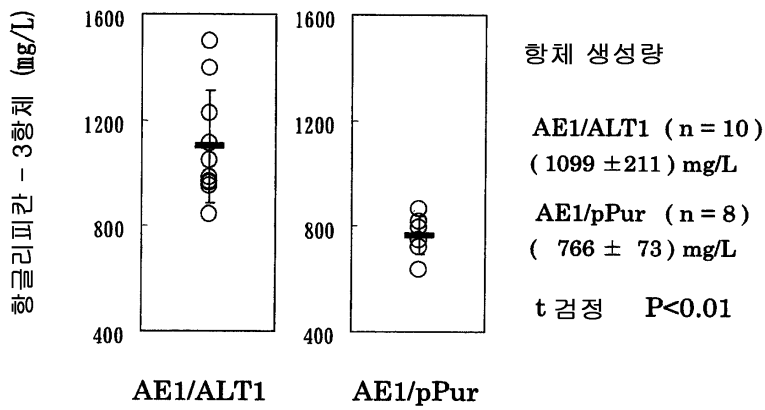
도면5



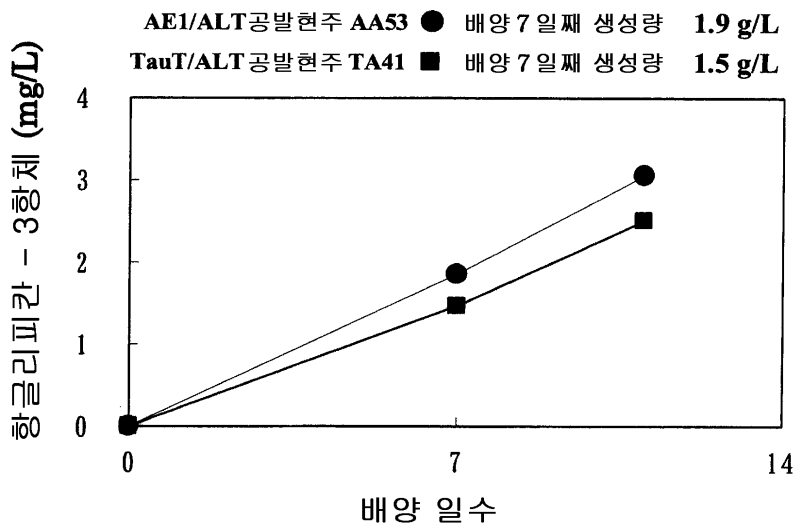
도면6



도면7



도면8

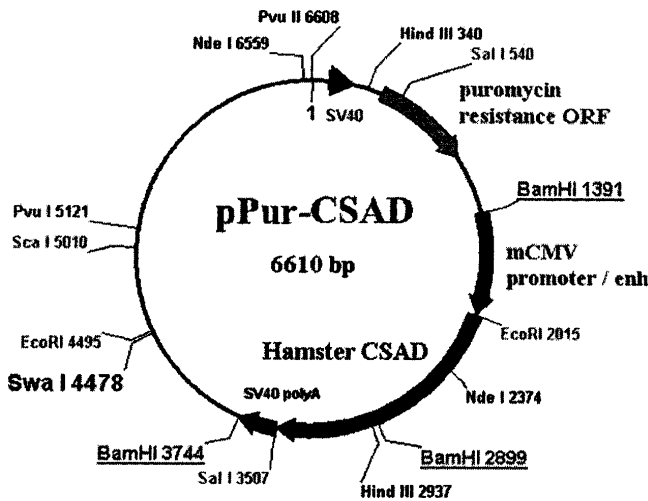


도면9

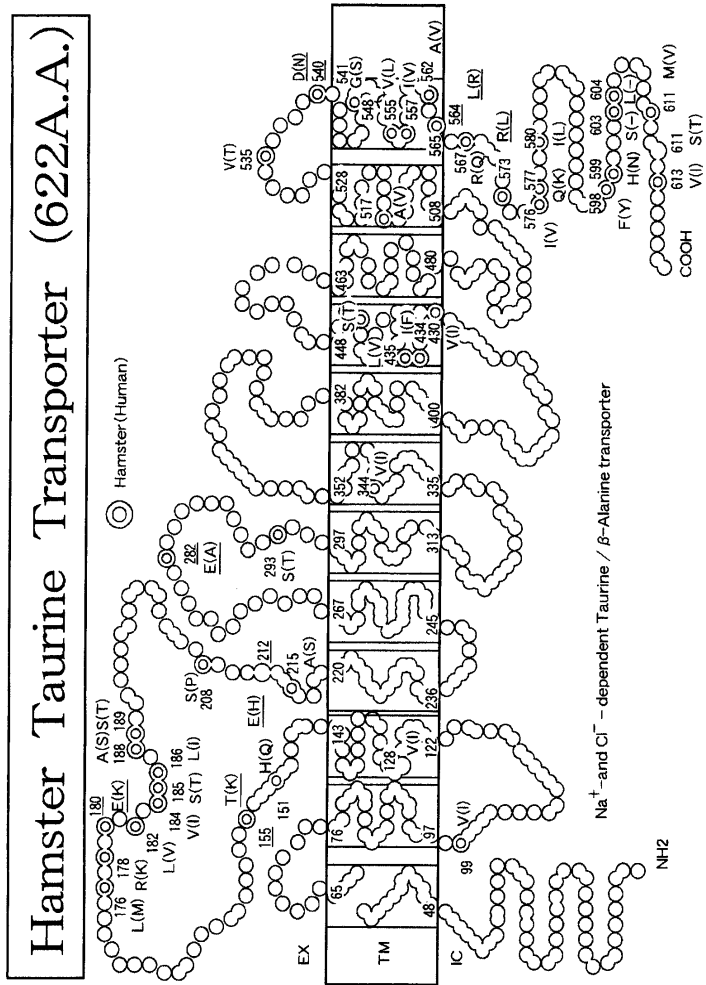
```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
atggctgactcaaaaccactcaatgccctggatggggaccctgtggctcttactccggatgtgttgggatgtgtagatgaggccattcggaaaggaccagctgcctcg
M A D S K P L N A L D G D P V A V E S L L R D V F G I V V D E A I R K G T S A S
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
gagaaggtttgtgaatggaggagctcaagagctcaagctatctggattggagctgcagagccaggcgagctcaagagccagatcttagagcgctgccggctgtgattcaactac
E K V C E W K E P E E L K H L L D L E L Q S Q G E S Q E Q I L E R C R A V I H Y
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
agtgtcaagactggtcaccgccgtttcttcaaccagctctctccagggttagacccecatgtctgtgctggcgcaatcaccagaagcctcaaccaccagccagtacaacatagatt
S V K T G H P R F F N Q L F S G L D P H A L A G R I I T E S L N T S Q Y T Y E I
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
gccctgtgtttgtctcatggaagagggtgctgcaagaactcgtgccctgtggctggaaactctgggatgggtctctgtctcctgggtccatctcgaacctgatgccatg
A P V F V L M E E E V L K K L R A L V G W N S G D G V F C P G G S I S N H Y A W
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
aacctggccctatcagcgtaccaccagctcaagcaagggcctccggccctcgcgccttgccctcttcaactcaagagagtgactactccatcagtaaggagctgtttt
N L A R Y Q R Y P D C K Q R G L R A L P P L A L F T S K E C H Y S I S K G A A F
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
ctggagctggcactgacagctcccgctgtcaaggtgatgagagggaaatgatccctgagatctggagggccagatcagctgtgctgagcaggggctctgtgccattctg
L G L G T D S V R V V K A D E R G K M I P E D L E R Q I S L A E A E G S V P F L
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
gtcagtcaccactctgtaccacgtgtgagggcttgacccttgcaatgtctgtgtttgcccagctcaagattatggttacagtggtgagcggcctggggtggagcgtc
V S T T S G T T V L G A P D P L D A I A D V C Q R H G L W L H V D A A W G G S V
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
ctgtgtccggacacacaggtatcctctgatggatccagggctgactctgtgctggaccctcaagctctcctgctcagggctgagctgtctctctctccggac
L L S R T H R H L L D G I Q R A D S V A W N P H K L L G A G L Q C S A L L L R D
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
acctcgaacctgtcagcgtgccaatggctccagggcagctaccctgtccagcaggaatctatgagctggtcttgacatggagacaaggtggtgcaagtgggcccgtgtg
T S N L L K R C H G S Q A S Y L F Q Q D K F Y D V A L D T G D K V V Q C G R R V
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
gactgtcgaagtgtgctcatgtggaagcacaaggtggcaggaactggagcggcctcgaaccagccttgcctcaccggtaacctggctggaggagataaaaagcgggaagga
D C L K L W L H L L D G I Q R A D S V A W N P H K L L G A F A L T R Y L V E E I K K R E G
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
ttttagtggctcagcagctgagctttgtcaatgtgtctctgtgtttgtctccagcctcgggggaaagaagagctcagattacagcaaaaggctgtctcaggtggccctgta
F E L V M E P E F V N V C F W P V P P S L R G K K E S P D Y S K R L S O V A P V
1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
ctcaaggagcagctggaagaaggtcctgatgattgctaccagccatgggaccggccaactctcggatggtggtggccaaccacactgaccagctgatagac
L K E R M V K K G S M M I G Y O P H G T R A N F P R M V V A N P T L T Q A D I D
1450    1460    1470    1480
tctctctggggagctggagcgtctggccaggaccctgtga
F L L G E L E R L G Q D L *
    
```

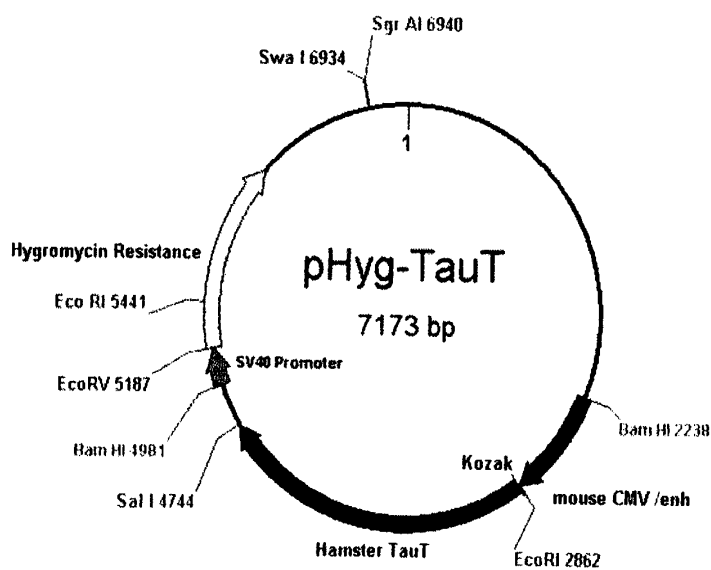
도면10



도면14



도면15



서열 목록

<110> CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Cells for producing heterogeneous proteins and a method using the same
 <130> FP-118PCT
 <150> JP P2007-276182
 <151> 2008-10-24
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2736
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

atggaggagc tgcaggatga ttatgaagac atgatggagg agaatctgga gcaggaggaa      60
tatgaagacc cagacatccc cgagtcccag atggaggagc cggcagctca cgacaccgag      120
gcaacagcca cagactacca caccacatca cacccgggta cccacaaggt ctatgtggag      180

ctgcaggagc tggatgatga cgaaaagaac caggagctga gatggatgga ggcggcgcgc      240
tgggtgcaac tggaggagaa cctgggggag aatggggcct ggggccgccc gcacctctct      300
cacctcacct tctggagcct cctagagctg cgtagagtct tcaccaaggg tactgttctc      360
ctagacctgc aagagacctc cctggctgga gtggccaacc aactgctaga caggtttatc      420
tttgaagacc agatccggcc tcaggaccga gaggagctgc tccgggcctt gctgcttaaa      480
cacagccacg ctggagagct ggaggccctg gggggtgtga agcctgcagt cctgacacgc      540
tctggggatc cttcacagcc tctgtcctcc caacactcct cactggagac acagctcttc      600

tgtgagcagg gagatggggg cacagaaggg cactcacat ctggaattct ggaaaagatt      660
ccccggatt cagaggccac gttggtgcta gtggcccgcg ccgacttctt ggagcagccg      720
gtgctgggct tcgtgaggct gcaggaggca ggggagctgg aggcggtgga gctgccggtg      780
cctatacgtt tcctctttgt gttgctggga cctgaggccc cccacatcga ttacaccag      840
cttggccggg ctgctgccac cctcatgtca gagagggtgt tccgcataga tgctacatg      900
gctcagagcc gaggggagct gctgcactcc ctgagggtt tctggactg cagcctagtg      960
ctgcctccca ccgatgcccc ctccgagcag gcaactgtca gtctggtgcc tgtgcagagg     1020

gagctacttc gaagcgctca tcagtccagc cctgccaagc cagactccag cttctacaag     1080
ggcctagact taaatggggg cccagatgac cctctgcagc agacaggcca gctcttcggg     1140
ggcctggtgc gtgatatccg gcgccgctac ccctattacc tgagtgacat cacagatgca     1200
    
```

ttcagccccc aggtcctggc tgccgtcatc ttcattact ttgctgact gtcacccgcc 1260
 atcaccttcg gggcctcct gggagaaaag acccggaaacc agatgggagt gtcggagctg 1320
 ctgatctcca ctgcagtga gggcattctc ttgcacctgc tgggggctca gccctgctt 1380
 gtggtcggct ttcaggacc cctgctggig tttaggaag ctttctctc gttctgcgag 1440

 accaacggtc tagagtacat cgtgggccgc gtgtggatcg gcttctggct catcctgctg 1500
 gtggtgttgg tggtagcctt cgagggtagc ttctgtgccc gttcatctc ccgctatacc 1560
 caggagatct tctccttct catttccctc atcttcatct atgagacttt ctccaagctg 1620
 atcaagatct tccaggacca cccactacag aagacttata actacaacgt gttgatggtg 1680
 cccaaacctc agggccccct gcccaacaca gccctcctct ccttgtgct catggccggt 1740
 accttctct ttgcatgat gctgcgcaag ttcaagaaca gctcctattt cctggcaag 1800
 ctgctcggg tcatcgggga cttcggggtc cccatctcca tctgatcat ggtcctggtg 1860

 gatttcttca ttcaggatac ctacaccag aaactctcgg tgcctgatgg cttcaaggtg 1920
 tccaactcct cagccccggg ctgggtcatc caccactgg gcttgcgttc cgagtttccc 1980
 atctggatga tgtttgctc cgccctgect gctctgctgg tcttcatct catattctg 2040
 gagtctcaga tcaccacgt gattgtcagc aaacctgagc gcaagatggt caaggctcc 2100
 ggcttccacc tggacctgct gctgtagta ggcatgggtg gggtagccgc cctcttggg 2160
 atgccctggc teagtccac caccgtgct tccgtaccc atgccaacgc cctcactgtc 2220
 atgggcaaag ccagcacc cagggctgca gccagatcc aggaggtcaa agagcagcgg 2280

 atcagtgga cctggctgc tgtgcttgg ggcctgtcca tctcatgga gccatcctg 2340
 tcccgatcc cctggctgt actgtttggc atcttctct acatgggggt cacgtcgtc 2400
 agcggcatcc agctcttga ccgcatctt ctctgttca agccaccaa gtatcacca 2460
 gatgtgccct acgtcaagcg ggtgaagacc tggcgcagc acttattcac gggcatccag 2520
 atcatctgcc tggcagtgt gtgggtggg aagtccacgc cggcctcct gccctgccc 2580
 ttctctca tctcactgt gccgtcggc cgcgtctgc tgcctcat cttcaggaac 2640
 gtggagcttc agtgtctga tgcctgatg gccaaaggca ccttctgga ggaggaaggt 2700

 cgggatgaat acgacgaagt ggccatgct gtgtga 2736

 <210> 2
 <211> 911
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Glu Glu Leu Gln Asp Asp Tyr Glu Asp Met Met Glu Glu Asn Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Glu Glu Tyr Glu Asp Pro Asp Ile Pro Glu Ser Gln Met Glu
 20 25 30
 Glu Pro Ala Ala His Asp Thr Glu Ala Thr Ala Thr Asp Tyr His Thr
 35 40 45

 Thr Ser His Pro Gly Thr His Lys Val Tyr Val Glu Leu Gln Glu Leu
 50 55 60
 Val Met Asp Glu Lys Asn Gln Glu Leu Arg Trp Met Glu Ala Ala Arg
 65 70 75 80
 Trp Val Gln Leu Glu Glu Asn Leu Gly Glu Asn Gly Ala Trp Gly Arg
 85 90 95
 Pro His Leu Ser His Leu Thr Phe Trp Ser Leu Leu Glu Leu Arg Arg
 100 105 110
 Val Phe Thr Lys Gly Thr Val Leu Leu Asp Leu Gln Glu Thr Ser Leu

 115 120 125
 Ala Gly Val Ala Asn Gln Leu Leu Asp Arg Phe Ile Phe Glu Asp Gln
 130 135 140
 Ile Arg Pro Gln Asp Arg Glu Glu Leu Leu Arg Ala Leu Leu Leu Lys
 145 150 155 160
 His Ser His Ala Gly Glu Leu Glu Ala Leu Gly Gly Val Lys Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Thr Arg Ser Gly Asp Pro Ser Gln Pro Leu Leu Pro Gln His
 180 185 190

 Ser Ser Leu Glu Thr Gln Leu Phe Cys Glu Gln Gly Asp Gly Gly Thr
 195 200 205
 Glu Gly His Ser Pro Ser Gly Ile Leu Glu Lys Ile Pro Pro Asp Ser
 210 215 220
 Glu Ala Thr Leu Val Leu Val Gly Arg Ala Asp Phe Leu Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Val Leu Gly Phe Val Arg Leu Gln Glu Ala Ala Glu Leu Glu Ala Val
 245 250 255

Glu Leu Pro Val Pro Ile Arg Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Pro Glu
 260 265 270
 Ala Pro His Ile Asp Tyr Thr Gln Leu Gly Arg Ala Ala Ala Thr Leu
 275 280 285
 Met Ser Glu Arg Val Phe Arg Ile Asp Ala Tyr Met Ala Gln Ser Arg
 290 295 300
 Gly Glu Leu Leu His Ser Leu Glu Gly Phe Leu Asp Cys Ser Leu Val
 305 310 315 320
 Leu Pro Pro Thr Asp Ala Pro Ser Glu Gln Ala Leu Leu Ser Leu Val
 325 330 335

 Pro Val Gln Arg Glu Leu Leu Arg Arg Arg Tyr Gln Ser Ser Pro Ala
 340 345 350
 Lys Pro Asp Ser Ser Phe Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Asn Gly Gly Pro
 355 360 365
 Asp Asp Pro Leu Gln Gln Thr Gly Gln Leu Phe Gly Gly Leu Val Arg
 370 375 380
 Asp Ile Arg Arg Arg Tyr Pro Tyr Tyr Leu Ser Asp Ile Thr Asp Ala
 385 390 395 400
 Phe Ser Pro Gln Val Leu Ala Ala Val Ile Phe Ile Tyr Phe Ala Ala
 405 410 415
 Leu Ser Pro Ala Ile Thr Phe Gly Gly Leu Leu Gly Glu Lys Thr Arg
 420 425 430
 Asn Gln Met Gly Val Ser Glu Leu Leu Ile Ser Thr Ala Val Gln Gly
 435 440 445
 Ile Leu Phe Ala Leu Leu Gly Ala Gln Pro Leu Leu Val Val Gly Phe
 450 455 460
 Ser Gly Pro Leu Leu Val Phe Glu Glu Ala Phe Phe Ser Phe Cys Glu
 465 470 475 480

 Thr Asn Gly Leu Glu Tyr Ile Val Gly Arg Val Trp Ile Gly Phe Trp
 485 490 495
 Leu Ile Leu Leu Val Val Leu Val Val Ala Phe Glu Gly Ser Phe Leu

755	760	765	
Leu Val Gly Leu Ser Ile Leu Met Glu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Pro			
770	775	780	
Leu Ala Val Leu Phe Gly Ile Phe Leu Tyr Met Gly Val Thr Ser Leu			
785	790	795	800
Ser Gly Ile Gln Leu Phe Asp Arg Ile Leu Leu Leu Phe Lys Pro Pro			
805	810	815	
Lys Tyr His Pro Asp Val Pro Tyr Val Lys Arg Val Lys Thr Trp Arg			
820	825	830	
Met His Leu Phe Thr Gly Ile Gln Ile Ile Cys Leu Ala Val Leu Trp			
835	840	845	
Val Val Lys Ser Thr Pro Ala Ser Leu Ala Leu Pro Phe Val Leu Ile			
850	855	860	
Leu Thr Val Pro Leu Arg Arg Val Leu Leu Pro Leu Ile Phe Arg Asn			
865	870	875	880
Val Glu Leu Gln Cys Leu Asp Ala Asp Asp Ala Lys Ala Thr Phe Asp			
885	890	895	
Glu Glu Glu Gly Arg Asp Glu Tyr Asp Glu Val Ala Met Pro Val			
900	905	910	
<210>	3		
<211>	1482		
<212>	DNA		
<213>	Cricetulus griseus		
<400>	3		
atggctgact caaaaccact caatgccctg gatggggacc ctgtggctgt ggagtcctta			60
ctccgggatg tgtttgggat tgtttagat gaggccattc ggaaaggac cagtgcctcg			120
gagaaggttt gtgaatgaa ggagcctgaa gagctcaagc atctgctgga ttggagctg			180
cagagccagg gcgagtctca agagcagatt ctagagcgt gccgggctgt gattcactac			240
agtgtcaaga ctggcacc cgggttcttc aaccagctct tctcagggtt agaccccat			300
gctctggctg ggcgcacat cacagaaagc ctcaacacca gccagtacac atatgagatt			360
gcccctgtgt ttgtcctcat ggaagaggag gtgctgaaga aactccgtgc cctggtgggc			420

tggaaactctg gggatggggt cttctgtcct ggtggctcca tctcgaacat gtatgccatg 480
 aacctggccc gctatcagcg ctaccacagac tgcaagcaaa gaggcctccg ggcctgccg 540
 cccttggctc tcttcacttc aaaggagtgt cactactcca tcagtaaggg agctgctttt 600
 ctgggacttg gcaactgacag tgtccgagtg gtcaaggctg atgagagagg gaaaatgatc 660
 cctgaggatc tggagaggca gatcagttctg gctgaggcag agggctctgt gccatttctg 720
 gtcagtacca cctctggfac caccgtgcta ggggcctttg acccctgga tgcaattgct 780

 gatgtttgcc agcgtcacgg attatggtta cacgtggatg ccgcctgggg tgggagcgtc 840
 ctgctgtccc ggacacacag gcatctcctg gatgggatcc agagggtga ctctgtggcc 900
 tggaaacctc acaagcttct cgggtcaggg ctgcagtgtc ctgctcttct tctccgggac 960
 acctcgaacc tgctcaagcg ctgccatggg tcccaggcca gctacctgtt ccagcaggac 1020
 aaattctatg acgtggctct tgacactgga gacaaggagg tgcaagtgtg ccgccgtgtg 1080
 gactgtctga agttgtggct catgtggaag gcacagggtg ggcaaggact ggagcggcgc 1140
 atcgaccagg cctttgctct caccgggtac ctggtggagg agataaaaaa gcgggaagga 1200

 tttgagttgg tcatggagcc tgagtttgc aatgtgtgct tctggtttgt gecteccagc 1260
 ctgcggggga agaaagagag tccagattac agcaaaaaggc tgtctcaggt ggcgcctgta 1320
 ctcaaggagc gcatggtgaa gaagggtcc atgatgattg gctaccagcc ccatgggacc 1380
 cgggccaact tcttccgat ggtggtggcc aacccacac tgaccaggc tgatatagac 1440
 ttcttctgg gcgagctgga gcgtctgggc caggacctgt ga 1482

- <210> 4
- <211> 493
- <212> PRT
- <213> *Cricetulus griseus*
- <400> 4

Met Ala Asp Ser Lys Pro Leu Asn Ala Leu Asp Gly Asp Pro Val Ala

1	5	10	15
Val	Glu	Ser	Leu
Leu	Arg	Asp	Val
Phe	Gly	Ile	Val
Val	Val	Asp	Glu
Ala			
20	25	30	
Ile	Arg	Lys	Gly
Thr	Ser	Ala	Ser
Glu	Lys	Val	Cys
Glu	Trp	Lys	Glu
35	40	45	
Pro	Glu	Glu	Leu
Lys	His	Leu	Leu
Asp	Leu	Glu	Leu
Gln	Ser	Gln	Gly
50	55	60	
Glu	Ser	Gln	Glu
Gln	Ile	Leu	Glu
Arg	Cys	Arg	Ala
Val	Ile	His	Tyr

Thr Ser Asn Leu Leu Lys Arg Cys His Gly Ser Gln Ala Ser Tyr Leu
 325 330 335
 Phe Gln Gln Asp Lys Phe Tyr Asp Val Ala Leu Asp Thr Gly Asp Lys
 340 345 350
 Val Val Gln Cys Gly Arg Arg Val Asp Cys Leu Lys Leu Trp Leu Met
 355 360 365

Trp Lys Ala Gln Gly Gly Gln Gly Leu Glu Arg Arg Ile Asp Gln Ala
 370 375 380
 Phe Ala Leu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Glu Ile Lys Lys Arg Glu Gly
 385 390 395 400
 Phe Glu Leu Val Met Glu Pro Glu Phe Val Asn Val Cys Phe Trp Phe
 405 410 415
 Val Pro Pro Ser Leu Arg Gly Lys Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Val Leu Lys Glu Arg Met Val Lys Lys

435 440 445
 Gly Ser Met Met Ile Gly Tyr Gln Pro His Gly Thr Arg Ala Asn Phe
 450 455 460
 Phe Arg Met Val Val Ala Asn Pro Thr Leu Thr Gln Ala Asp Ile Asp
 465 470 475 480
 Phe Leu Leu Gly Glu Leu Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu
 485 490

- <210> 5
- <211> 1491
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 5

atggcctcga gcacaggtga ccggagccag gcggtgagge atggactgag ggcgaaggtg 60

ctgacgctgg acggcatgaa cccgcgtgtg cggagagtgg agtacgcagt gcgtggcccc 120

atagtgcagc gagccttggg gctggagcag gagctgcgcc aggggtgtgaa gaagcctttc 180

accgaggtca tccgtgccaa catcggggac gcacaggcta tggggcagag gcccatcacc 240

ttcctgcgcc aggtcttggc cctctgtgtt aacctgatc ttctgagcag cccaacttc 300

cctgacgatg ccaagaaaag ggcggagcgc atcttgagg cgtgtggggg ccacagtctg 360
 ggggcctaca gcgtcagctc cggcatccag ctgatccggg aggacgtggc gcggtacatt 420
 gagaggcgtg acggaggcat ccctgcggac cccaacaacg tcttcctgtc cacaggggcc 480

agcgatgcca tcgtgacggt gctgaagctg ctggtggccg gcgagggcca cacacgcacg 540
 ggtgtgctca tccccatccc ccagtacca ctctactcgg ccacgctggc agagctgggc 600
 gcagtgcagg tggattacta cctggacgag gagcgtgcct gggcgtgga cgtggccgag 660
 cttaccgtg cactgggcca ggcgcgtgac cactgccgcc ctctgtcgct ctgtgtcatc 720
 aacctggca accccaccgg gcaggtgcag acccgcgagt gcatcgaggc cgtgatccgc 780
 ttgccttcg aagagcggct ctttctgtg gcggacgagg tgtaccagga caacgtgtac 840
 gccgcgggtt cgcagttcca ctattcaag aaggtgtca tggagatggg gccgcctac 900

gccgggcage aggagcttgc ctcttccac tccacctca agggctacat gggcgagtgc 960
 gggttccgcg gcggctatgt ggaggtggtg aacatggacg ctgcagtgca gcagcagatg 1020
 ctgaagctga tgagtgtcg gctgtgcccg ccggtgccag gacaggccct gctggacctg 1080
 gtggtcagcc cgcgccgcc caccgacccc tctttgcgc agttccaggc tgagaagcag 1140
 gcagtgctgg cagagctggc ggccaaggcc aagctcaccg agcaggtctt caatgaggct 1200
 cctggcatca gctgcaacc agtgcaggc gccatgtact cttcccgcg cgtgcagctg 1260
 cccccggg cggtggagcg cgctcaggag ctgggcctgg ccccgatat gttcttctgc 1320

ctgcgcctcc tggaggagac cggcatctgc gtggtgccag ggagcggctt tgggcagcgg 1380
 gaaggcacct accacttccg gatgaccatt ctccccct tggagaaact gcggtgctg 1440
 ctggagaagc tgagcaggtt ccatgccaag ttaccctcg agtactctg a 1491

<210> 6
 <211> 992
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Ala Ser Ser Thr Gly Asp Arg Ser Gln Ala Val Arg His Gly Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Lys Val Leu Thr Leu Asp Gly Met Asn Pro Arg Val Arg Arg
 20 25 30
 Val Glu Tyr Ala Val Arg Gly Pro Ile Val Gln Arg Ala Leu Glu Leu
 35 40 45

Glu Gln Glu Leu Arg Gln Gly Val Lys Lys Pro Phe Thr Glu Val Ile
 50 55 60
 Arg Ala Asn Ile Gly Asp Ala Gln Ala Met Gly Gln Arg Pro Ile Thr
 65 70 75 80
 Phe Leu Arg Gln Val Leu Ala Leu Cys Val Asn Pro Asp Leu Leu Ser
 85 90 95
 Ser Pro Asn Phe Pro Asp Asp Ala Lys Lys Arg Ala Glu Arg Ile Leu
 100 105 110
 Gln Ala Cys Gly Gly His Ser Leu Gly Ala Tyr Ser Val Ser Ser Gly
 115 120 125
 Ile Gln Leu Ile Arg Glu Asp Val Ala Arg Tyr Ile Glu Arg Arg Asp
 130 135 140
 Gly Gly Ile Pro Ala Asp Pro Asn Asn Val Phe Leu Ser Thr Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Asp Ala Ile Val Thr Val Leu Lys Leu Leu Val Ala Gly Glu Gly
 165 170 175
 His Thr Arg Thr Gly Val Leu Ile Pro Ile Pro Gln Tyr Pro Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Ala Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ala Val Gln Val Asp Tyr Tyr Leu
 195 200 205
 Asp Glu Glu Arg Ala Trp Ala Leu Asp Val Ala Glu Leu His Arg Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gln Ala Arg Asp His Cys Arg Pro Arg Ala Leu Cys Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Pro Gly Asn Pro Thr Gly Gln Val Gln Thr Arg Glu Cys Ile Glu
 245 250 255
 Ala Val Ile Arg Phe Ala Phe Glu Glu Arg Leu Phe Leu Leu Ala Asp
 260 265 270
 Glu Val Tyr Gln Asp Asn Val Tyr Ala Ala Gly Ser Gln Phe His Ser
 275 280 285
 Phe Lys Lys Val Leu Met Glu Met Gly Pro Pro Tyr Ala Gly Gln Gln
 290 295 300

545 550 555 560
 Arg Ala Asn Ile Gly Asp Ala Gln Ala Met Gly Gln Arg Pro Ile Thr
 565 570 575
 Phe Leu Arg Gln Val Leu Ala Leu Cys Val Asn Pro Asp Leu Leu Ser
 580 585 590
 Ser Pro Asn Phe Pro Asp Asp Ala Lys Lys Arg Ala Glu Arg Ile Leu
 595 600 605

 Gln Ala Cys Gly Gly His Ser Leu Gly Ala Tyr Ser Val Ser Ser Gly
 610 615 620
 Ile Gln Leu Ile Arg Glu Asp Val Ala Arg Tyr Ile Glu Arg Arg Asp
 625 630 635 640
 Gly Gly Ile Pro Ala Asp Pro Asn Asn Val Phe Leu Ser Thr Gly Ala
 645 650 655
 Ser Asp Ala Ile Val Thr Val Leu Lys Leu Leu Val Ala Gly Glu Gly
 660 665 670
 His Thr Arg Thr Gly Val Leu Ile Pro Ile Pro Gln Tyr Pro Leu Tyr

 675 680 685
 Ser Ala Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ala Val Gln Val Asp Tyr Tyr Leu
 690 695 700
 Asp Glu Glu Arg Ala Trp Ala Leu Asp Val Ala Glu Leu His Arg Ala
 705 710 715 720
 Leu Gly Gln Ala Arg Asp His Cys Arg Pro Arg Ala Leu Cys Val Ile
 725 730 735
 Asn Pro Gly Asn Pro Thr Gly Gln Val Gln Thr Arg Glu Cys Ile Glu
 740 745 750

 Ala Val Ile Arg Phe Ala Phe Glu Glu Arg Leu Phe Leu Leu Ala Asp
 755 760 765
 Glu Val Tyr Gln Asp Asn Val Tyr Ala Ala Gly Ser Gln Phe His Ser
 770 775 780
 Phe Lys Lys Val Leu Met Glu Met Gly Pro Pro Tyr Ala Gly Gln Gln
 785 790 795 800
 Glu Leu Ala Ser Phe His Ser Thr Ser Lys Gly Tyr Met Gly Glu Cys

805 810 815
 Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Val Glu Val Val Asn Met Asp Ala Ala Val

820 825 830
 Gln Gln Gln Met Leu Lys Leu Met Ser Val Arg Leu Cys Pro Pro Val

835 840 845
 Pro Gly Gln Ala Leu Leu Asp Leu Val Val Ser Pro Pro Ala Pro Thr

850 855 860
 Asp Pro Ser Phe Ala Gln Phe Gln Ala Glu Lys Gln Ala Val Leu Ala

865 870 875 880
 Glu Leu Ala Ala Lys Ala Lys Leu Thr Glu Gln Val Phe Asn Glu Ala

885 890 895
 Pro Gly Ile Ser Cys Asn Pro Val Gln Gly Ala Met Tyr Ser Phe Pro

900 905 910
 Arg Val Gln Leu Pro Pro Arg Ala Val Glu Arg Ala Gln Glu Leu Gly

915 920 925
 Leu Ala Pro Asp Met Phe Phe Cys Leu Arg Leu Leu Glu Glu Thr Gly

930 935 940
 Ile Cys Val Val Pro Gly Ser Gly Phe Gly Gln Arg Glu Gly Thr Tyr

945 950 955 960
 His Phe Arg Met Thr Ile Leu Pro Pro Leu Glu Lys Leu Arg Leu Leu

965 970 975
 Leu Glu Lys Leu Ser Arg Phe His Ala Lys Phe Thr Leu Glu Tyr Ser

980 985 990
 <210> 7

<211> 1869
 <212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*
 <400> 7

atggccacca aggagaagct gcagtgtctg aaagacttcc acaaagacat cctgaagcct 60

tctccagggg agagcccagg cacacggcct gaggatgagg ctgaggggaa gccccctcag 120

agggagaagt ggtccagcaa gattgacttt gtgctgtctg tggccggagg cttcgtgggt 180

ttgggcaacg tttggcgttt cccgtaccic tgctacaaaa atggtggagg tgctttcctc 240

ataccgtatt ttattttctt gtttgggagt ggctgcctg tgttttctt ggaggtcata 300

ataggccagt acacctcaga agggggaatc acctgctggg agaagatctg ccccttgttc 360

tctggcattg gctacgcac cactgctcct gtgtccctcc tgaatgtgta ctacattgtc 420

atcctggcct gggccacata ctacctattt cactccttcc agacagagct tccttgggcc 480

cactgcaacc acagctggaa cacaccacat tgcattggagg acacctgctg taggaatgag 540

agtctctggg tctcccttag cgcctccaac ttacctcgc ctgtcatcga gttctgggag 600

cgcaatgtac tcagcctgtc ttccggaatc gacgaaccag gcgctctgaa atgggacctt 660

gcgctctgcc tcctcttagt ctggcttgtc tgttttttct gcatatggaa ggggtgttca 720

tccacaggca aggttgtcta cttcaccgcc actttcccgt ttgccatgct tctgggtctg 780

ctggtccgtg gactgacctt gccgggtgct ggcgaaggca tcaaattcta cctgtacctt 840

gacatcagcc gccttgagga cccacagggt tggatcgacg ccggaacca gatattcttt 900

tcctatgcca tctgcctggg ggccatgacc tctctgggaa gctacaacaa gtacaagtat 960

aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct 1020

ggcttcgcag tttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct 1080

gatgtggctg agtcaggctc tggcttggcc ttcatctcct atccaaaagc tgtgactatg 1140

atgccctgct ccaccttttg gtccattctg ttttttatta tgctcctctt gcttggactg 1200

gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tgggtgatct ttaccgtcc 1260

ttcctaagga agggttatcg tccggaagtc ttcatcgcca tctgtgttag catcagctac 1320

ctgctggggc tgcgatggg gacggagggt ggcatgtatg tgtttcaact ctttgactac 1380

tatgcagcta gtggtgatg ctttttgtgg gttgcattct ttgaatgttt tgttattgcc 1440

tggatatatg gtggtgataa cttatatgac ggtattgagg acatgattgg ctatcggcct 1500

gggccctgga tgaagtacag ctgggctgtc atcactccag ttctctgtgc tggatgtttc 1560

atcttctctc ttgtcaagta tgtaccctg acctacaaca aagtctacgt gtatcctgat 1620

tgggcaattg ggctgggctg gggcctggcc ctatcctcca tgggtgtgat ccccttggtc 1680

attgccatcc tcctctgccg gacggaggga ccgttccgct tgagaatcca atacctgata 1740

acccccaggg agcccaaccg ctgggctgtg gacgctgagg gggccacacc ctccactcc 1800

cgcaaacgcc tcgtcatgaa cggcgcactc atgaaacca gtcacgtcat tgtggagacc 1860

atgatgtga 1869

<210> 8
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*
 <400> 8
 Met Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Leu Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu Asp
 20 25 30
 Glu Ala Glu Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser Lys Ile
 35 40 45
 Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu Gly Asn Val
 50 55 60
 Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly Leu Pro Val Phe Phe
 85 90 95
 Leu Glu Val Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser Glu Gly Gly Ile Thr Cys
 100 105 110
 Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Ile
 115 120 125
 Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp
 130 135 140
 Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe His Ser Phe Gln Thr Glu Leu Pro Trp Ala
 145 150 155 160
 His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Leu
 165 170 175
 Arg Arg Asn Glu Ser Leu Trp Val Ser Leu Ser Ala Ser Asn Phe Thr
 180 185 190
 Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Gly Ile Asp Glu Pro Gly Ala Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu

465 470 475 480
 Trp Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile

 485 490 495
 Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Ala Val Ile Thr
 500 505 510
 Pro Val Leu Cys Ala Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val
 515 520 525
 Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Val Tyr Val Tyr Pro Asp Trp Ala Ile Gly
 530 535 540
 Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys Ile Pro Leu Val
 545 550 555 560

 Ile Ala Ile Leu Leu Cys Arg Thr Glu Gly Pro Phe Arg Val Arg Ile
 565 570 575
 Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg
 580 585 590
 Glu Gly Ala Thr Pro Phe His Ser Arg Thr Ser Leu Val Met Asn Gly
 595 600 605
 Ala Leu Met Lys Pro Ser His Val Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615 620