

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 15/09 C12N 15/61	(45) 공고일자 1999년02월01일 (11) 등록번호 특0171205 (24) 등록일자 1998년10월19일
(21) 출원번호 특1994-704499 (22) 출원일자 1994년12월09일 번역문제출일자 1994년12월09일 (86) 국제출원번호 PCT/US 93/05318 (86) 국제출원일자 1993년06월02일 (81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 그리스 영국 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 베냉 브르키나파소 카메룬 중앙아프리카공화국 차드 콩 고 가봉 말리 모리타니 니제르 세네갈 토고 코트디부아르 기네 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 핀란드 헝가리 일본 대한민국 카자흐스탄 스리랑카 마다가스카르 몽 골 말라위 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 러시아 수단 슬로바 크 우크라이나 미국	(65) 공개번호 특1995-701975 (43) 공개일자 1995년05월17일 (87) 국제공개번호 WO 93/25676 (87) 국제공개일자 1993년12월23일
(30) 우선권주장	7/901,713 1992년06월12일 미국(US)
(73) 특허권자	머크 앤드 캄파니 인코포레이티드 조셉 에프. 디프리마 미합중국 뉴 저지 07065 라웨이 이스트 링컨 애비뉴 126유니버시티 오브 켄 트 앳 센터베리 이안 알. 스톤
(72) 발명자	영국 켄트 씨티 2 7엔제트 센터베리 더 레지스트리 마이클 에프. 튜트 영국 켄트 씨티4 7엔비 차트햄 헛치 나이팅게일 클로즈 3 로버트 비. 프리드먼 영국 켄트 씨티1 1엑스알 센터베리 세인트 어거스틴즈 로오드 43 로렌 디. 슐츠 미합중국 펜실바니아 19438 할리스빌 오크 드라이브 421 로날드 더블유. 엘리스 미합중국 펜실바니아 19066 메리온 사이카모어 애비뉴 206 헨리 제트. 마르쿠스 미합중국 펜실바니아 19095 와인코트 쏘베리 로오드 1517 도나 엘. 몽고메리 미합중국 펜실바니아 18914 찰폰트 학코리 레인 9
(74) 대리인	이병호, 최달용

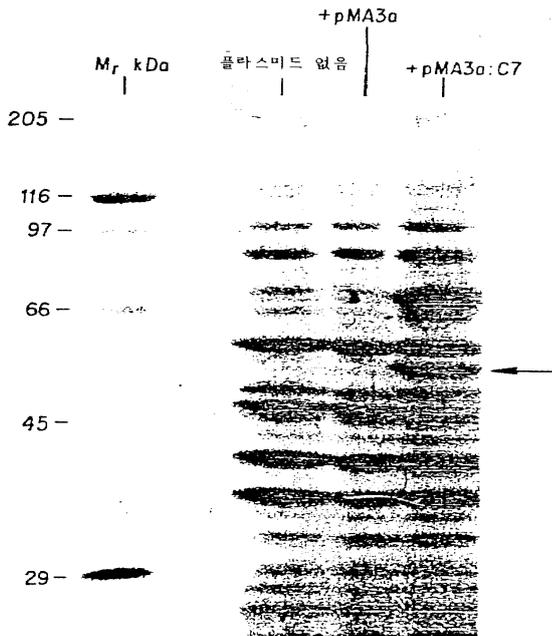
심사관 : 안소영

(54) 사카로마이세스 세레비지애에 의한 디설파이드 결합 재조합 단백질의 생산 증가방법

요약

본 발명은, 효모에 의해 생산되는 디설파이드 결합된 재조합 단백질, 특히 재조합 분부된 단백질의 수율을 증가시키기 위한 방법을 기술하고 있다. 효소 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)는 분비성 및 세포 표면 단백질내 디설파이드 결합의 형성을 촉매화한다. 본 발명자는 조절된 방식으로 사람 PDI 또는 효모 PDI를 과잉생산하는 효모 사카로마이세스 세레비지애 재조합 균주의 작제를 기술하고 있다. 이들 균주는 잠재적인 치료학적 중요성을 갖는 디설파이드 결합된 단백질의 분비를 상당히 증가시키는 것으로 보인다. 이들 균주는 다양한 디설파이드 결합된 단백질의 생산을 증가시키는 효능을 갖는다.

## 대표도



## 명세서

## [발명의 명칭]

사카로마이세스 세레비지에에 의한 디설파이드 결합 재조합 단백질의 생산 증가방법

## [발명의 상세한 설명]

## [발명의 배경]

단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)는 분비성 및 세포-표면 단백질내 디설파이드 결합 형성을 촉매하는데 관련되는 효소이다. 척추동물의 PDI의 보존된 티오레독신-유사 활성 부위(WCGHCK)(서열 확인 번호, 서열 확인 번호: 1)를 검출하도록 고안된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 본 발명자들은 하등 진핵 생물 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)로부터 PDI를 암호화하는 유전자를 분리하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 추론된 개방 판독 프레임은 포유동물 PDI의 특징적인 물리학적 성질, 즉 분자량 59,082 및 pI 4.1을 갖는 530개 아미노산 단백질로 예견된다. 더우기, 아미노산 서열은 포유동물 및 조류 PDI 서열과 30 내지 32% 동일성 및 53 내지 56% 유사성을 나타내며, 매우 유사한 전체적 구성을 갖는다. 즉, 보존된 티오레독신-유사 활성 부위를 함유하는 영역(a,a')내에, 포유동물 및 조류 PDI와 가장 유사한 상동성을 나타내는, 각각이 반복되어 존재하는 2개의 100개 잔기 절편이 존재하다. N-말단 영역은 절단되는 분비성 시그널 서열 특성을 지니고, C-말단의 4개의 아미노산(-HDEL)(서열 확인 번호: 2)은 에스. 세레비지에 소포체(E.R.)의 성분인 단백질과 일치한다. 이러한 유전자(PDI 1로 지칭)의 다중 복제물을 함유하는 형질 전환체는 10배 높은 수준의 PDI 활성을 지니고 예견된 분자량의 단백질을 과발현시킨다. PDI1 유전자는 효모 계층에서만 유일한 것으로, 정지상 세포내에서는 발견되지 않으며 열-유도성도 아닌 단일 1.8kb 전사체를 암호화한다. PDI1 유전자 파괴는 반수성 치사적(haplo-lethal)으로, 이 유전자의 산물이 생존에 필수적임을 나타낸다.

티올 : 디설파이드 상호교환 반응을 촉매하는 효소인 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)는 분비성 세포에서의 E. R. 루멘의 주요 잔류 단백질 성분이다. 효소의 세포상 분포, 이의 아세포적 위치 및 이의 발생학적 특성에 대한 증거의 실체는 이것이 분비성 단백질 생합성에 관여하고 있음을 시사하고[참조: Freedman, 1984, Trends Biochem. Sci. 9, pp. 438-441], 이는 동일계에서의 직접적인 교차 연구에 의해 지지된다[참조: Roth and Pierce, 1987, Biochemistry, 26, pp. 4179-82]. PDI가 결여된 과립막이 동시해독 단백질중 디설파이드 형성에 있어 특이적 결함을 나타낸다는 사실의 발견은[참조: Bulleid and Freedman, 1988, Nature, 335, pp. 649-51], 당해 효소가 분비성 및 세포 표면 단백질 생합성중에 천연 디설파이드 결합 형성의 촉매로서 기능함을 암시한다. 이러한 역할은 시험관내 효소의 촉매특성에 대해 공지된 바와 일치한다; 이는 티올:디설파이드 상호 교환 반응을 촉매하여, 최종적으로 단백질 디설파이드 형성, 분해 또는 이성체화를 초래하며, 광범위하게 환원된, 비폴딩 단백질 기질내에서 천연 디설파이드 결합의 형성 및 단백질 폴딩을 촉매화할 수 있다[참조: Freedman et al., 1989, Biochem. Soc. Symp., 55, pp. 167-192]. 효소의 DNA 및 아미노산 서열은 여러 종에서 공지되어 있고[참조: Scherens, B. et al., 1991, Yeast, 7, pp. 185-193; Farquhar, r., et al., 1991, Gene, 108, pp. 81-89]] 포유동물 간으로부터 균질하게 정제된 효소의 작용 기작에 관한 정보가 증가하고 있다[참조: Creighton et al., 1980, J. Mol. Biol., 142, pp. 43-62; Freedman et al., 1988, Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 96-9; Gilbert, 1989, Biochemistry 28, pp. 7298-7305; Lundstrom and Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Hawkins and Freedman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 335-339]. 세포내에서 단백질 폴딩, 조립(assembly) 및 전좌의 조절체로서 현재 관련된 다수의 단백질 인자중[참조: Rothman, 1989, Cell 59, pp. 591-601], PDI는 우수하게 정의된 촉매적 활성을 지니는 드문 사례이다.

PDI는 포유동물 조직으로부터 용이하게 분리되며, 동형 효소는 특징적인 산성 pI(4.0-4.5)를 갖는 동중이량체(2 x 57kD)이다[참조: Hillson et al., 1984, *Methods Enzymol.*, 107, pp. 2810292]. 효소는 또한 밀 및 조류 클라미도모나스 레인 하르디(*Chlamydomonas reinhardtii*)로부터 정제되기도 한다[참조: kaska et al., 1990 *Biochem. J.* 268, pp. 63-68]. 활성은 다양한 공급원내에서 검출되었고, 예비적 보고에 의하면, PDI 활성은 에스. 세레비지애에서 검출될 수 있는 것으로 주장되었다[참조: Williams et al., 1968. *FEBS Letts.*, 2, pp. 133-135]. 최근, 다수의 PDI의 완전한 아미노산 서열이 주로 클로닝된 cDNA 서열로부터 유도되어 보고되었다; 이들은 래지(Edman et al., 1985, *Nature*, 317, pp. 267-270), 소(Yamauchi et al., 1987, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 146, pp. 1485-1492) 사람(Pihlajaniemi et al., 1987, *EMBO J.*, 6, pp. 643-9), 효모(Scherens, B., et al., supra; Farquhar, R. et al., supra) 및 닭(Parkkonen et al., 1988, *Biochem. J.*, 256, pp. 1005-1011)으로부터의 PDI를 포함하다. 이들 척추동물 중으로 부터의 단백질은 전체적으로 고도의 서열 보존성을 나타내며, 모두 래트 PDI서열 내에서 최초로 주시된 몇몇 전체적 특성을 보인다[참조; Edman et al., 1985 상기]. 가장 중요한 것은 PDI 서열내에 서로간에 매우 상동적이고, 인접 Cys 잔기 사이에 형성된 활성 부위 디설파이드/디티올 커플을 함유하는 소형 간환원 활성-단백질인 티오레독신과 서열상 밀관약 100개 잔기로 이루어진 2개 영역의 존재이다. 티오레독신에서 활성 부위 서열은 WCGPK(서열 확인 번호: 3)인 반면, PDI내에서 2회 발견되는 상응 영역은 서열 WCGHCK(서열 확인 번호: 1)을 갖는다(PDI서열 내에서 확인되는 기타 반복체, 모티프 및 상동성은 하기에서 논의된다).

PDI와 상응하거나 이와 밀관된 서열의 디설파이드 결합 형성 이외의 기능이 분석 목적의 작업중에 확인되었다. 예를 들면, PDI가 4량체  $\alpha_2\beta_2$  효소 프롤린-4-하이드록실라제의  $\beta$  아단위로서 작용하여, E.R. 내에서 발생기 또는 새로이 합성된 프로콜라겐 폴리펩타이드의 주요 해독후 변형을 촉매한다는 명백한 증거가 있다[참조: Pihlajaniemi et al., 1987, supra; Koivu et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262, pp. 6447-49]. 또한 PDI가 해독 동시 N-글리코실화 시스템에 관여한다는 증거가 있고[참조: Geetha-Habib et al., 1988, *Cell*, 54, pp. 63-68], 최근에는 당해 효소가, 트리글리세라이드를 발생기의 분비성 리포단백질로 이전시키는 복합체 내에 관여한다는 제안이 있다[참조: Wetterau et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, pp. 9800-7]. 따라서, PDI는 분비성 단백질의 동시- 및 후-해독 변형에 있어 다기능성일 수 있다[참조: Freedman, 1989, *Cell*, 57, pp. 1062-72].

대다수의 포유동물 분비성 단백질은 다수의 분자내 및/또는 분자간 디설파이드 결합을 함유한다. 이의 예로 뇌하수체 호르몬, 인테루킨, 연역글로불린, 프로테아제 및 이의 억제제 및 기타 혈청 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 단백질은 상업적 유전공학의 주요 표적이 되었으나 세균 및 효모 내에서 이를 발현시키려는 초기의 실험은, 이들을 기능적으로 활성인 재조합 산물로서 수득하는데 있어 많은 문제점이 부각되었다. 이로 인해 일반적인 해독후 변형 및, 특히 단백질 폴딩 및 디설파이드 결합 형성의 보다 나은 이해가 요망되었다.

단일 폴딩된 도메인을 포함하는 디설파이드 결합된 단백질은, 일반적으로 완전히 환원되어 변성되고, 연속적으로 시험관내 재변성되어 합리적인 수율로 정확하게 디설파이드-결합된 상태로 수득될 수 있다. 이 과정은, 서서히 이성체화하면 천연 디설파이드 쌍(pairing)을 형성하는 다수의 상이하게 디설파이드 결합된 형태의 혼합 집단의 신속한 형성과 관련된다. 이 과정은 티올/디설파이드 산화 환원 완충액(예: GSH 및 GSSG) 및 알칼리 pH에 의해 촉매화된다. 침전 및 쇄간 디설파이드 형성을 예방하기 위해 저농도의 단백질이 필요하다. 일반적으로 천연 단백질 형성 속도 및 수득되는 최적 수율 둘다는 분자내 디설파이드 수가 증가함에 따라 감소된다. 각각의 도메인이 폴딩되어 독립적으로 이의 천연 디설파이드 결합을 형성해야 하는 다중 디설파이드 결합된 도메인을 함유하는 단백질(예를 들면 조직 플라스미노겐 활성화제)의 경우 당해 문제가 심각하다.

생체내 디설파이드 결합 형성 과정은 해독과 동시에 또는 매우 초기의 해독후에 발생된다. 포유동물 세포내 E.R. 루멘내의 발생하는 및 새로이 합성되는 분비성 단백질 연구는 천연 디설파이드 결합이 이미 형성되었음을 나타낸다. 생체내 과정은, 분비성 세포내 풍부한 단백질이고, 소포체의 루멘면에 위치하는 효소 단백질 디설파이드 이소머라제에 의해 촉매화되는 것으로 보인다[참조: Freedman, R. B., 1984, *Trends in Biochemical Sciences*, 9, 438-441]. 이 효소는 시험관내에서 광범위한 단백질 기질내 티올:단백질-디설파이드 상호 교환 반응을 촉매화하고 천연 단백질 디설파이드 형성의 세포 촉매에 필요한 특성을 지닌다[참조: Freedman, R. B. et al., 1984, *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 939-942]. 이의 기능에 대한 추가 증거는, (i) 이의 조직 분포가 디설파이드 결합된 분비성 단백질의 합성 분포와 상응하고[참조: Brockway, B. E. et al., 1980, *Biochem. J.*, 191, 873-876], (ii) 다수의 계에 존재하는 효소의 양이 디설파이드 결합된 분비성 단백질 합성 속도의 생리학적 변화와 병행하여 변한다는 점을 포함한다[참조: Brockway, B. E. et al., 1980, *Biochem J.*, 191, 873-876; Freedman R. B. et al., 1983, in *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological Clinical Aspects*, eds. A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren B. Mannervik, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L. et al., 1989, *FEBS Letters*, 242, pp. 357-362].

효소는 다수의 동물 공급원[참조: Lambert, N. and Freedman, R. B., 1983, *Biochem. J.*, 213, pp. 225-234], 및 밀[참조: de Azevedo, G. M. V. et al., 1983, *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 1043]에서 특성이 결정되었고, 분자적 및 동역학 특성의 현저한 보존이 주목받았다[참조: Freedman, R. B. et al., 1984, *Biochem. Soc. Trans.* 12, pp. 939-942; Brockway, B. E. and Freedman, R. B., 1984, *Biochem J.*, 29, 51-59]. 하지만 이 효소는 하등 진핵류 또는 세균내에서는 철저히 연구되지 않았다. 분비와 관련된 가장 밀 분자적 요소에 있어 효모 및 고등 진핵류 사이의 강한 상동성은, 적어도 일부의 효모 분비성 단백질(예: 킬러 독소)이 디설파이드 결합을 함유하기 때문에, 당해 효소 또는 독중체가 효모중에 존재함을 강력히 시사한다.

상업상 중요한 포유동물 단백질의 발현을 위한 다능성 숙주로서 효모 적용은 효모 분비계의 제한된 수행력에 의해, 및 효모와 고등 진핵류 사이의 일부 차이(예: 글리코실화에 있어서의 차이)에 의해 어느 정도 절충된다.

본 발명은 효소 단백질 디설파이드 이소머라제를 과발현하는 재조합 숙주 세포에서 디설파이드 결합된 단

백질을 생산하는 신규 방법을 제공하고, 단백질 디설파이드 이소머라제를 과발현하는 재조합 효모 세포를 제공한다. 본 발명은 또한, 디설파이드 결합되어 분비되는 재조합 단백질의 분비를 예기치 않게 실질적으로 증가시키는 재조합 효모 숙주 세포를 제공한다.

#### [발명의 요약]

사람 및 효모 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)를 암호화하는 DNA를 분리 하여, 프로모터 및 전사 테이네이터를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터내로 클로닝한다. PDI-암호와 DNA를 함유하는 발현 카세트 또는 벡터를 숙주 세포로 이전시킨 결과, PDI 단백질이 과잉생산된다. 이들 PDI과잉생산 세포를 디설파이드 결합된 단백질의 발현을 위한 재조합 숙주로서 사용한다. 디설파이드 결합된 단백질의 분비는, 정상적인 수준의 PDI를 생산하는 숙주 세포에 비해 PDI과잉생산 숙주 세포내에서 실질적으로 증가한다.

#### [도면의 간단한 설명]

제1도는 다중복제 플라스미드 상에 효모 PDI-암호화 유전자를 함유하는 에스. 세레비지에 형질전환체의 무세포 용해물의 SDS-PAGE분석을 나타낸다.

제2도는 'COMPARE' 및 'DOTPLOT' 소프트웨어(UWCGG)를 사용하여 효모 PDI와 래트 PDI사이의 도트 플롯 배열을 나타내는데, 포유동물 PDI의 도메인 구조는 동일 스케일상으로 배열 하단에 나타낸다.

제3도는 효모 PDI1 유전자 절단 결과를 나타내는 전략도이다; 패널(b)는 pdi::HIS3 절단에 대해 이형접합성인 His<sup>+</sup> AS3324 균주의 4회 분석 결과를 나타낸다.

제4도는 플라스미드 pUKC 161의 구조를 나타낸다.

제5도는 플라스미드 pUC-ySP-hPDI의 구조를 나타낸다.

제6도는 플라스미드 p401(pUC18-GAL10p(B)ADH1t로도 공지됨)의 구조를 나타낸다.

제7도는 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADH1t의 구조를 나타낸다.

제8도는 플라스미드 pHK4 α2/ATS(K991로도 공지됨)의 구조를 나타낸다.

제9도는 YEp24-GAL10p-yPDI의 구조를 나타낸다.

제10도는 YEP24-GAL1p-MF α-hPDI의 구조를 나타낸다.

제11도는 pUC-GAL1/10-hPDI/ATS의 구조를 나타낸다.

제12도는 pUC-GAL1/10-yPDI/ATS의 구조를 나타낸다.

#### [발명의 상세한 설명]

효모내 단백질 폴딩 및 분비 과정은, 유전자 연구를 근거로 하건대, 30개 이상의 유전자 산물이 관여하는 매우 복잡한 과정이다[참조: Franzusoff, A. et al., 1991, Methods Enzymology, 194, pp. 662-674]. 여기에는 펩티딜 프롤릴 시스-트랜스 이소머라제, PDI 및 기타 티오레독신-유사 단백질, BiP, 다양한 분자 샤페론(hsp 70, hsp60 등), 시그널 펩티다제, 시그널 인지 단백질; E.R 내로 전구체 전좌에 관여하는 다양한 단백질; ER, 골지체 및 분비낭의 다양한 구조적 및 기능적 성분 및 아직 특성이 결정되지 않은 각종 단백질이 포함된다[참조: Franzusoff, A., et al., 1991, supra; Rothman, J. E. and Orci L., 1992, Nature, 355, pp. 409-415; Gething, M.G. and Sambrook, G., 1992, Nature, 355, pp. 33-45]. 이러한 복합성의 측면에서 볼때, 하나의 성분(즉, PDI)만의 수준을 증가시켜 특정 이종단백질의 분비를 실질적으로 개선시키리라고 당해 분야의 통상의 전문가가 이해할 수 없을 것 같다. 따라서, 본 발명은, PDI의 수준만을 증가시켜 분비 단백질, 예를 들면 안티스타신 수준의 상당한 실질적 증가를 야기시키는 예상치 못한 결과를 초래했는데, 이는 향상된 단백질 폴딩 및/또는 디설파이드 결합 형성과 관련된 것으로 보이는 현상이다.

본 발명은 재조합 숙주 세포에 의해 DNA 암호화 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)를 과발현시킴으로써 재조합 단백질 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본원중 사용된 PDI는 분자내 및 분자간 디설파이드 결합의 형성을 특이적으로 촉매화하는 효소를 지칭한다.

몇몇 종으로부터의 PDI 유전자의 DNA 서열은 당해 분야에 공지되어 있다. 이들 종은 사람, 소, 래트, 닭 및 효모를 포함하나 이에 제한되지 않는다[참조: Mizunaga et al., 1990, J. Biochem., 108, pp. 846-851; Scherens et al., 1991, Yeast, 7, pp. 185-193].

PDI-암호화 DNA의 분리를 위한 출발 물질은 포유동물 및 기타 척추동물 세포 및 조직과 하등 진핵 세포 및 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는 어떠한 세포 또는 조직 타입일 수 있다. 본 발명은 재조합 효모 숙주 세포내에서 발현되는 사람 및 효모 PDI를 사용하여 입증한다. 당해 분야의 전문가에게 있어, 본 발명이, 포유동물 세포, 식물 세포, 원핵 세포(예: 세균), 곤충 세포 및 하등 진핵 세포(예: 효모 및 사상 진균)를 포함하나 이에 제한되지 않는 기타 발현 숙주에까지 미치어 이를 포괄한다는 것은 용이하게 명백하다. 더욱이, 당해 분야의 전문가에게 있어, 효모 및 사람 세포 이외의 공급원으로부터 유래된 PDI 암호화 DNA의 사용도 본 발명에 포함된다는 것은 용이하게 명백하다. PDI-암호화 DNA의 기타 공급원에는, 래트 및 마우스와 같은 사람 이외의 척추동물, 곤충같은 비척추동물 및 진균과 같은 하등 진핵류가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

문헌[참조: Rothblatt and Meyer(1986, Cell, 44, pp. 619-28)]의 방법에 의해 에스. 세레비지에로부터 제조되는 과일체 막 분획은, 초음파 처리에 의해 8내지 20배 강화되는 낮은 수준의 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI) 활성을 나타낸다. 이것은 척추동물[참조: Mills et al., 1983, Biochem. J., 213, pp. 245-8]; Lambert and Freedman, 1985, Biochem., J. 228, pp. 635-45] 및 밀[참조: Roden et al., 1982, FEBS Lett., 138, pp. 121-4]내 동일 세포 구획내 발견되는 PDI와 비견되는 효소가 효모 소포체 루멘내 존재함을 시사한다. 고등 진핵 효소에 대한 상동성을 가정하며, PDI를 암호화하는 유전자를 클로닝한다.

강력한 보존성을 나타내는 것으로 보이는 영역은 a 및 a' 도메인으로, 척추동물 PDI에서 고도로 보존되어, 특히 2개의 작용성 티오올 활성부위 영역내에서 티오레독신과 매우 큰 상동성을 보이며; 활성 부위에 대한 콘센서스 서열은 FYAPWCGHCK(서열 확인 번호: 4)(Parkonnen et al., 1988 상기)이다. 비-반복성 30량체 올리고뉴클레오타이드는 효모 코돈 바이어스[참조: Sharp et al., 1986, *Nucleic Acids Res.*, 14, pp. 5125-43]를 기초로 디자인되며, 이를 말단 표지하여 다중복제 YEp 플라스미드 pMA3a 내에서 작제되는 효모 게놈 라이브러리를 스크리닝하는데 사용한다[참조: Crouzet and Tuite, 1987, *Mol. Gen. Genet.*, 210, pp. 581-3]. 2개의 강력한 포지티브 클론(C7 및 C10)을 스크리닝으로부터 회수하고 예비 제한 지도화하면 각각 14kb 및 14.5kb 크기의 삽입체가 나타나는데, 이들 두 삽입체의 다수의 제한 부위가 공통적임을 알 수 있다. 클론 C7의 삽입체를 좀더 분석한다.

클론 C7이 PDI를 암호화함을 확인하기 위하여, 효모 에스. 세레비지애 균주 MD40/4C[ $\alpha$  trp1 ura2 his3 leu2; Tuite et al., 1986, *E.M.B.O.J.*, 1, pp. 603-608]를 클론 C7 및 친주 플라스미드 pMA3a로 형질 전환시킨다. SDS-PAGE 분석은 C7 형질 전환체가 주로 58kDa 폴리펩타이드 및 약 77kDa의 제2폴리펩타이드를 과발현시킴을 나타낸다(제1도). 추가로, 2가지 균주의 무세포 용해물의 PDI활성에 대해 검정하는 경우, C7 형질 전환체는 10배 높은 PDI활성 수준을 나타내었다( $38.6 \times 10^{-5}$  U/ $\mu$ g 단백질). 이들 두가지 증거는 C7 클론이 PDI는 암호화하였으나 티오레독신은 암호화하지 않았음을 지지하는 것으로, 이는 활성 부위 서열 WCGPCK(서열 확인 번호: 3)를 갖는 에스. 세레비지애 티오레독신의 분자량이 약 12kDa이기 때문이다[참조: Porque et al., 1970, *J. Biol. Chem.*, 245, pp. 2363-70].

추정적 PDI암호화 서열을 위치화시키기 위하여, C7클론을 다양한 제한 효소로 분해하고, 분해물을 니트로셀룰로스로 옮겨 상기한 30량체 활성 부위 올리고뉴클레오타이드로 탐침화한다. 이 방법으로 5kb BamHI-SalI 단편 및 2개의 명백히 인접한 각각 5.0 및 4.5kb 크기의 HindIII 단편을 확인하였다. 후자의 패턴은 활성부위의 2가지 복제물을 함유하는 PDI에 대해 예견되어 지는 바와 같은 활성 부위 탐침에 대한 2개의 표적의 존재 가능성을 제시한다. 2개의 HindIII 부위로부터의 예비 DNA 서열 분석은 척추동물 PDI와 약간 상동성을 갖는 개방 판독 프레임을 나타내었으나, 또한, 이들이 인접 서열이 아니기 때문에 또다른 HindIII 부위임을 증명하고 있다. DNA서열화와 커플링시킨 세부적 제한 지도화가 이러한 가정을 확인해준다. 천연 발생 제한 부위 및 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여, 2개의 인접 HindIII 부위를 포함하는 2.5kb HindIII-EcoRI 단편을 두 개 쇠 상에서 서열화한다.

DNA서열은 예견된 분자량 59,082의 아미노산 530개의 폴리펩타이드를 암호화하는 잠재능을 갖는 1593bp의 단일 개방 판독 프레임으로 예상된다[참조: Farquhar, R., et al., 상기, 제2도]. 개방 판독 프레임은 비교적 풍부한 단백질을 암호화하는 효모 mRNA에 전형적인 코돈 바이어스를 갖는다[참조: Bennetzen and Hall, 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, pp. 3029-3031]; 계산된 코돈 바이어스 지수는 0.60이다. 결정된 뉴클레오타이드 서열 분석은 다수의 표준 효모 프로모터 및 터미네이터 모티프를 나타낸다[참조: Farquhar, R. et al., 상기 제2도]. 여기에는 개방 판독 프레임에 대해 -100 내지 -128 사이에 위치한 (TA)<sub>14</sub> 서열의 일부와 동일한 TATA 박스 및, -201과 -238 위치 사이의 피리미딘 풍부 영역(37개 뉴클레오타이드 중 34개)을 포함한다. 개방 판독 프레임의 3' 말단에는, TAA 해독 터미네이터 이후에 에스.세레비지애내 전사 종결 및/또는 폴리아데닐화에 대한 시그널인 것으로 추정되는 서열[Zaret and Sherman, 1982, *Cell*, 28, pp. 563-73] 및 진핵류 폴리아데닐화 부위[Proudfoot and Brownlee, 1976, *Nature*, 264, pp. 211-4] 모두와 상동성인 서열이 있다.

이 클로닝된 유전자가 전사되는지의 여부를 결정하기 위하여, 개방 판독 프레임 내부의 800bp HindIII-Stal 단편을 사용하여, 2가지 상이한 탄소원인 글루코스 및 아세테이트 상에서 상이한 성장 단계로 성장시킨 2가지 상이한 에스.세레비지애 균주[MD40/4c 및 SKQ2n( $\alpha/a$  adel/+ade2/=his1/+; Gasion et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, pp. 3965-3969)]로부터 제조한 총 RNA 샘플의 노던 블롯을 탐침화한다. 지수적으로 성장하는 세포의 경우, 단일 1.8kb 전사체가 글루코스 및 아세테이트 상에서 성장한 세포에서는 검출되는 반면, 비-성장기 세포에서는 전사체가 거의 검출되지 않는다. 전사체의 크기는 mRNA의 5' 및 3' 영역내 비해독 서열의 대략 200개 뉴클레오타이드를 허용하는 개방 판독 프레임에 의해 예상되는 바와 같다.

예상된 아미노산 서열은, 하기 이유로 사실상의 PDI임을 강하게 시사하고 있다:

(i) 예상된 분자량이 59kDa이고 포유동물 PDI의 특징적인 pI 값(4.1)을 갖는다;

(ii) 아미노산 서열이, BESTFIT 소프트웨어(UWCGC, University of Wisconsin)에 의해 정의된바, 선행 보고된 포유동물 및 조류 PDI서열과 전체 동일성 30 내지 32% 및 전체 유사성 53 내지 56%를 나타낸다.

(iii) 아미노산 서열내 위치 58-65와 403-410에서 티오레독신-유사 활성 부위의 2개 복제물을 함유한다. 추가로 이들 서열은, 포유동물 PDI내 복제된 a/a' 영역과 명백한 아미노산 동일성을 나타내는 대략 100개 아미노산의 대형 내부 복제물의 일부이다(제2도). 효모 및 포유동물 PDI 서열의 배열은 또한 a 및 a' 영역밖에 존재하며, 상당한 상동성을 보이는 또다른 영역을 나타낸다(제2도).

추가로, 암호화된 폴리펩타이드의 2개의 기타 특징은, 이것이 에스.세레비지애 세포체의 성분이고; 단백질이 추정적 분비성 시그널 특성을 갖는 매우 소수성인 N-말단 서열을 암호화하며[참조: Gierasch, 1989, *Biochemistry*, 28, pp. 923-930], 4개의 C-말단 아미노산의 효모 BiP내 아미노산과 동일함을[참조: Normington et al., 1989, *Cell*, 57, pp. 1223-36] 제시하고 있으며, 에스.세레비지애에 대한 세포체 보유 시그널인 것으로 보고되어 있다[참조: Pelham et al., 1988, *EMBO J.*, 7, pp. 1757-62].

본 발명자들은 클로닝된 에스.세레비지애 PDI 유전자 PD11을 지정하였다. 에스.세레비지애 PD11 유전자는 게놈내 하나의 복제물에만 존재한다. 이것은, 다양한 게놈 분해물에 대한 탐침으로서 상기 기술된 0.8kb HindIII-StuI 단편을 사용하는 고도의 엄중한 하이브리드화에 의해 확인된다.

단일 PD11 유전자가 생존에 필수적인지의 여부를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 HIS3 유전자[참조: Montiel, G. F. et al., 1984, *Nucleic Acids Res.*, 12, pp. 1049-1068]를 함유하는 1.8kb BamHI 단편이 PD11 암호화 서열내 EcoRV 부위내로 삽입되어진 비작용성 대립유전자를 작제하였다(제3도). his3 이배체

효모 에스.세레비지에 균주[AS3324; 참조: Spalding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent]를  $pdi1::HIS3$  절단물을 함유하는 DNA 단편으로 형질전환시켜 PD11 유전자의 2개 염색체 복사물중 하나를 이러한 비-작용성 대립 유전자로 대체한다. 3개의  $HIS^+$ AS3324 형질전환체(Y1, Y2 및 Y3)를 좀더 연구하면, 각각의 경우 이배체의 아포형성은, 4회당 2개의 생존 아포만을 생산하는데, 이들 모두  $his^-$ 이다(제3도). 이 결과는 치사 표현형이  $pdi1::HIS3$  돌연변이와 관련됨을 시사한다. 정확한 유전자 교체가  $HIS^+$  형질전환체 Y1 및 Y2에서 발생한다는 사실은, 탐침으로서 800bp HindIII-StuI 단편을 사용하여 PstI으로 분해된 블롯화된 효모게놈 DNA와 서던 하이브리드화에 의해 확인된다. PD11유전자는 내부 Pst1 부위는 함유하지 않고(제3도)  $HIS3$  유전자는 단일 Pst1 부위를 함유하기 때문에(제3도) 이것이  $pdi1::HIS3$  대립유전자의 단순한 확인을 허용할 수 있어야 한다. 비형질전환된 균주 AS3324에서 예상되는 바와 같이, 단일 9kb PstI 단편이 검출되는 반면, Y1 및 Y2 형질전환체에서는 9kb 및 2.2kb 2개 밴드가, 아마도 상이한 기원의 2개 밴드로 구성되는 9kb 밴드로 검출된다. 이들 데이터는, 2개 염색체중 하나 위의 PD11 유전자가  $HIS3$  대립유전자로 대체되었고, 이러한 사건이 반수성-치사적임을 확인시켜준다.

어떠한 다양한 방법을 사용하여도 효모 PD1-암호화 DNA를 분자적으로 클로닝할 수 있다. 이들 방법에는, 적절한 발현 벡터 시스템내 DNA 라이브러리를 함유하는 PD1의 작제 후 PD1 유전자의 직접적인 작용상 발현을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 방법은, PD1단백질의 아미노산 서열로부터 고안된 표지된 올리고뉴클레오타이드 탐침으로 박테리오파지 또는 플라스미드 셔틀 벡터 내에 작제된 DNA 라이브러리를 함유하는 PD1을 스크리닝하는 것이다. 바람직한 방법은, 플라스미드 셔틀 벡터 내에 작제된 사람 또는 효모 PD1-함유 게놈 DNA 라이브러리를, 효소 활성 부위의 공지된 아미노산 서열을 암호화하는 추론된 DNA 탐침으로 스크리닝하는 것이다.

당해 분야의 전문가에게는, 기타 타입의 라이브러리 및 기타 세포 또는 세포 타입으로부터 작제된 라이브러리가 PD1 암호화 DNA를 분리시키는데 유용할 수 있음이 용이하게 이해될 수 있다. 기타 타입의 라이브러리는 효모 이외에 기타 사람 척추동물, 비척추동물 및 하등 진핵세포 또는 세포주로부터 유래된 cDNA 및 게놈 DNA 라이브러리를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

당해 분야의 전문가에게는, 적합한 cDNA 라이브러리가 PD1 활성을 갖는 세포 또는 세포주로부터 제조될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있다. PD1 cDNA를 분리하기 위해 cDNA 라이브러리를 제조하는데 사용하기 위한 세포 또는 세포주의 선별은, 먼저 전면적으로 기술된 상기 방법을 사용하여 세포 관련된 PD1활성을 측정함으로써 수행될 수 있다.

cDNA 라이브러리의 제조는 당해 분야에 널리 공지된 표준 기술에 의해 수행 될 수 있다. 널리 공지된 cDNA라이브러리 작제 기술은 문헌[참조: Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982]에 나타나 있다.

당해 분야의 전문가에게 있어, PD1-암호화 DNA가 또한 적합한 게놈 DNA라이브러리로부터 분리될 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다.

게놈 DNA라이브러리의 작제는 당해 분야에 널리 공지된 표준 기술로 수행할 수 있다. 널리 공지된 게놈 DNA라이브러리 작제 기술은 문헌[참조: Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982]에 나타나 있다.

상기 방법을 통해 수득되는 클로닝된 PD1은, 적합한 프로모터 및 기타 적절한 전사 조절 요소를 함유하는 발현 벡터내로 분자 클로닝시키고, 진핵 또는 원핵 숙주 세포로 전이시켜 재조합 PD1을 생산함으로써 재조합적으로 발현될 수 있다. 이러한 조작 기술이 문헌[참조: Maniatis, T. et al., 상기]에 모두 기술되어 있고, 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

발현 벡터는 본원중, 적절한 숙주내에서 클로닝된 유전자 복제물의 전사 및 이의 mRNA의 해독에 요구되는 DNA서열로서 정의된다. 이러한 벡터는, 세균, 남조류, 식물세포, 진균, 곤충 세포 및 동물세포 같은 다양한 숙주내에서 진핵성 유전자 발현에 사용될 수 있다.

특이적으로 고안된 벡터는, 세균-효모 또는 세균-동물 세포간과 같은 숙주간의 DNA의 셔틀링(shuttling)을 허용한다. 적절히 작제된 발현 벡터는 숙주 세포내에서 자가 복제를 위한 복제원, 선별성 마커, 제한된 수의 유용한 제한 효소 부위, 고 복제수 잠재능 및 활성 프로모터를 함유해야 한다. 프로모터는 RNA 폴리머라제가 DNA에 결합하여 RNA합성을 개시할 수 있도록 유도하는 DNA서열로서 정의된다. 강력한 프로모터는 mRNA가 고도의 빈도수로 개시되도록 하는 것이다. 발현 벡터에는 클로닝 벡터, 변형된 클로닝 벡터, 특이적인 고안된 플라스미드 또는 바이러스가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

다양한 포유동물 발현 벡터는 포유동물 세포내에서 재조합 PD1을 발현하는데 사용될 수 있다. 재조합 PD1 발현에 적합할 수 있는, 시판되어 입수가 가능한 포유동물 발현 벡터로 pMC1neo(Stratagene), pXT1(Stratagene), pSG5(Stratagene), EB0-pSV2-neo(ATCC 37593), pBPV-1(8-2)(ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12)(ATCC 37224), pRSVgpt(ATCC 37199), pRSVneo(ATCC 37198), pSV2-dhfr(ATCC 37146), pUCTag(ATCC 37460), 및 gZD35(ATCC 37565)가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

PD1을 암호화하는 DNA는 다양한 재조합 숙주 세포내에서 발현을 위해 발현 벡터내로 클로닝될 수 있다. 재조합 숙주 세포는 세균을 포함하나 이에 제한되지 않는 원핵 세포; 및 진핵세포, 즉 효모, 및 사람, 소, 돼지, 원숭이 및 설치류 기원의 세포주를 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물 세포, 재조합 바클로바이러스 발현 시스템과 함께 사용하기 위한 드로소필라(Drosophila)-유도된 세포주, 및 스포둠테라 프러기 퍼다(Spodoptera frugiperda)(SF9) 곤충 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 곤충 세포일 수 있다. 시판되어 입수가 가능한 적합한 포유동물 종으로부터 유래된 세포주에는 CV-1(ATCC CCL 70), COS-1(ATCC CRL 1650), COS-7(ATCC CRL 1651), CHO-K1(ATCC CCL 61), 3T3(ATCC CCL 92), NIH/3T3(ATCC CRL 1658), HeLa(ATCC CCL 2), C1271(ATCC CRL 1616), BS-C-1(ATCC CCL 26) 및 MRC-5(ATCC CCL 171)가 포함되나 이에

제한되지는 않는다.

효모 활성 프로모터는 효모 숙주내에서 PDI 유전자 전사를 개시한다. 따라서, 당해 분야의 전문가에게 있어 GAL1, GAL10, GAL7, PGK1, ADH1, ADH2, PH05 및 GAP491(TDH3)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 효모-활성 프로모터 서열을 사용할 수 있음은 명백히 인지되어 있다. 또한 당해 분야의 전문가에게 있어, 적합한 검정 시스템, 예를 들면 면역 블롯 또는 RIA 또는 효소-결합된 면역검정(EIA)을 사용하여 재조합 숙주 내 PDI이 발현을 검정할 수 있음도 쉽게 이해될 수 있다.

에스. 세레비지애는, 성장을 위한 탄소원으로서 갈락토스의 이용에 관여하는 효소를 암호화하는 5개 유전자를 갖는다. GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 및 GAL10 유전자는 각각 갈락토키나제, 갈락토스퍼미아제, 포스포글루코유타제,  $\alpha$ -D-갈락토스-1-포스페이트 유리딜트랜스퍼라제 및 유리딘 디포스포갈락토스-4-에피머라제의 주요 이소자임을 각각 암호화한다. 갈락토스 부재하에, 이들 요소는 거의 발현되지 않는다. 세포를 글루코스 상에서 성장시킨 다음 갈락토스를 배양물에 가하는 경우, 이들 세가지 효소가 적어도 1000배까지 RNA전사 수준에서 협동적으로 유도된다(GAL5는 예외, 약 5배까지 유도된다). GAL1, GAL2, GAL5, GAL7 및 GAL10 유전자를 분자적으로 클로닝하고 서열을 결정한다. 각각의 암호화 영역의 5' 부위의 조절 및 프로모터 서열은 lac Z 유전자의 암호화 영역에 인접하여 위치한다. 이들 실험은 이들 프로모터 및 조절 서열이 갈락토스 유도에 필요하고 충분함을 정의하고 있다.

에스. 세레비지애는 또한 3개 유전자를 지니며, 이들 각각은 ADH의 이소자임을 암호화한다. 이들 효소중 하나인 ADH1은 에스. 세레비지애가 산화적 성장 동안 탄소원으로서 에탄올을 사용할 수 있는 능력과 관계가 있다. ADH1 이소자임을 암호화하는 ADH2 유전자의 발현은 글루코스에 의해 이화적으로 억제됨으로써, 0.1%(w/v)수준의 글루코스 존재하에 발효적 성장 동안 ADH2 유전자는 실질적으로 전사되지 않는다. 글루코스 고갈 및 비-억제성 탄소원 존재하에, ADH2 유전자 전사는 100 내지 1000배로 유도된다. 이러한 유전자를 분자적으로 클로닝하고 서열을 결정하며, 상기 조절 및 프로모터 서열이 전사의 탈억제에 필요하고도 충분한 것으로 정의된다.

$\alpha$  교배 인자는 에스. 세레비지애의 성 페로몬으로, MAT $\alpha$ 와 MAT $\alpha$  세포 사이의 교배에 필요하다. 트리데카펩타이드는 프리프로페로몬으로서 발현되고, 이는 조면 소포체로 이동되어, 글리코실화되고, 이의 최종 성숙 형태로 단백질-분해적으로 가공된 후 세포로부터 분비된다. 이러한 생화학적 경로가 외래 폴리펩타이드에 대한 발현 전략으로서 연구되었다.  $\alpha$  교배인자 유전자를 분자학적으로 클로닝하고, 피리-프로타이더 서열과 함께 이의 프로모터를 사용하여 다양한 폴리펩타이드를 발현 및 분비시킨다. 마찬가지로, PH05 유전자 프로모터는 낮은 포스페이트 농도에 의해 유도될 수 있고, 이것 또한 효모내에서 외래 단백질의 생리학적으로 조절된 발현 유용성을 갖는 것으로 나타났다.

$\alpha$  교배 인자 프로모터는 표현형상  $\alpha$  인 세포내에서만 활성적이다. 에스. 세레비지애에는 SIR로서 공지된 4개의 유전자 좌가 있으며, 이들은 a 및  $\alpha$ 정보의 기타 정상적으로 잠재적인 복제물의 억제에 필요한 단백질을 합성한다. 이러한 억제 사례에 개입하는 온도-민감(ts) 병소가 이들 유전자 좌 하나 이상의 유전자 산물내에 존재한다. 이 돌연변이체의 경우, 35°C에서의 성장은 억제를 방지하여  $\alpha$ 교배 인자 프로모터가 비활성인 표현형상 a/ $\alpha$ 인 세포를 생성시킨다. 23°C로 온도를 변화시키면, 세포는 표현형상  $\alpha$ 로 전환되어 프로모터는 활성이 된다. ts SIR 병소를 갖는 균주를 사용하여, 몇몇 외래 폴리펩타이드의 조절된 발현을 입증한다.

당해 분야의 숙련가에게 있어서, PDI의 발현에 적합한 효모 균주를 선별하는데 있어 광범위한 후보가 포함될 수 있음은 명백히 이해될 수 있다. 적합한 효모 균주에는 프로테아제 결핍 및 변경된 글리코실화 수행력과 같은 유전적 및 표현형적 특징을 갖는 것들이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

사카로마이세스 속은 다양한 종으로 이루어져 있다. 에스. 세레비지애가 다양한 외래 폴리펩타이드의 재조합 DNA매개된 발현을 위한 숙주로서 가장 보편적으로 사용된다. 하지만, 사카로마이세스 속의 다른 종과의 차이점이 항상 명확하지는 않다. 다수의 이들 종은 에스. 세레비지애와 교배할 수 있고, 에스. 세레비지애내 프로모터와 유사하거나 동일한 프로모터를 소지하는 것 같다. 따라서, 당해 분야의 전문가에게 있어서, PDI의 발현을 위한, 숙주 균주의 선택은 칼스버겐시스(carlsbergensis), 디아스타티쿠스(diastaticus), 엘롱기스포르루스(elongisporus), 클루이베리(Kluyveri), 몬타누스(montanus), 노르벤시스(norbensis), 오비포르미스(oviformis), 로옥시(rouxii) 및 우바룸(uvarum)을 포함한 이에 제한되지 않는 사카로마이세스 속의 기타 종에까지 미침이 쉽게 이해될 수 있다.

칸디다(Candida), 한세누라(Hansenula), 피치아(Pichia) 및 토룰롭시스(Torulopsis) 같은 몇몇 효모 속은 성장을 위한 단일 탄소원으로서 메탄올을 이용하는 유사한 대사 경로를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 대사 경로에 관여하는 효소인 알콜 옥시다제 유전자가 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)로부터 분리되었다. 피. 파스토리스 알콜 옥시다제 프로모터를 분리하였고, 이는 메탄올 유도된 발현에 감수성인 것으로 나타났다. 이러한 유용성 프로모터는 효모내 폴리펩타이드 발현에 유용하다. 특히, 이러한 프로모터는 피. 파스토리스내 이중 유전자좌의 유도성 발현을 위한 플라스미드 상에서 활성적인 것으로 나타났다. 이러한 관측은 활성형의 폴리펩타이드의 재조합 DNA-매개된 발현을 위한 숙주로서 기능하는 기타 효모 속의 유용성을 부각시킨다. 따라서, 당해 분야의 전문가에게 있어, PDI의 발현을 위한, 숙주 균주의 선택은 칸디다, 한세누라, 클루이베로마이세스, 피치아, 사카로마이세스속 및 토룰롭시스를 포함하나 이에 제한되지 않는 크립토크아세아 및 사카로마이세타세아의 기타 효모 속으로부터의 종에까지 미친다.

발현 벡터는 형질전환, 형질감염, 원형질 융합 및 전기 천공을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 기술중 어느 하나를 통해 숙주 세포내로 도입될 수 있다. 발현 벡터-함유 세포의 클론을 증식시켜 개별적으로 분석하여, 이들이 PDI단백질을 생산하는지의 여부를 결정한다. PDI발현 숙주 세포 클론의 확인은, 항-PDI항체와의 면역반응성 및 숙주세포-관련된 PDI 활성 존재를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 방법에 의해 수행될 수 있다.

PDI DNA 발현은 또한 시험관내 생산된 합성 mRNA를 사용하여 수행할 수 있다. 합성 mRNA는 다양한 무세포 시스템에서 효율적으로 해독될 수 있는데, 이들 시스템은 밀 배아 추출물 및 망상 적혈구 추출물을 포함하나 이에 제한되진 않고, 또한 개구리 난세포내로 미세주입과 같은 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않

는, 세포계 시스템에서도 효율적으로 해독될 수 있다.

숙주 세포 계층내로 세포당 단일 복제 또는 다중 복제물로 통합된 재조합 발현 카세트로부터 재조합 숙주 내에서 PDI가 발현될 수 있음은 당해 분야의 전문가에게 쉽게 이해된다. 또한 당해 분야의 전문가에게 있어 세포당 단일 복제 또는 다중 복제물로 자가 복제 플라스미드 상에 존재하는 재조합 발현 카세트로부터 재조합 숙주내에서 PDI가 발현될 수 있음이 명백히 이해될 수 있다.

재조합 PDI를 발현하는 기타 재조합 숙주 세포는 기타 재조합 유전자의 발현을 위한 숙주로서 다시 사용될 수 있다. 본 발명의 신규한 방법은 실질적으로, 재조합 PDI를 생산하는 숙주 세포내에서 재조합 디설파이드-결합된 단백질을 암호화하는 DNA를 발현함으로써 재조합 디설파이드 결합된 단백질 수율을 향상시킨다. 당해 분야의 전문가에게 있어, 다양한 디설파이드 결합된 단백질이 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있음은 명백히 이해될 수 있다. 디설파이드-결합된 단백질에는 분비되거나, 세포-관련되어 잔류하는 단백질이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 재조합 디설파이드-결합된 단백질의 발현을 위한 재조합 DNA의 작제는 PDI에 대해 전면적으로 기술된 상기 방법에 의해 이루어질 수 있다. 당해 분야의 전문가에게 있어, 재조합 디설파이드-결합된 단백질을 암호화하는 DNA는, 세포당 단일 복제 또는 다중 복제물로 숙주 세포 계층내로 통합된 재조합 발현 카세트로부터 발현될 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다. 또한 당해 분야의 전문가에게 있어, 재조합 디설파이드-결합된 단백질을 암호화하는 DNA는, 세포당 단일 복제 또는 다중 복제물로 자가 복제 플라스미드 상에 존재하는 재조합 발현 카세트로부터 발현될 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다. 또한, 당해 분야의 전문가에게 있어, PDI를 암호화하는 DNA 및 재조합 디설파이드-결합된 단백질을 암호화하는 DNA가 동일 플라스미드 상에, 세포당 단일 복제 또는 다중 복제물로 존재할 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다. 더우기, 당해 분야의 전문가에게 있어, 둘 이상의 디설파이드 결합된 단백질은 통합된 카세트 또는 플라스미드상의 카세트 또는 이의 혼합물로부터 공동 발현될 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다.

재조합 숙주 세포내 PDI 발현후, PDI 단백질을 회수하여, 단백질내 디설파이드 결합의 형성을 촉매할 수 있는 활성 형태로 정제된 PDI를 제공할 수 있다. 몇몇 PDI 정제 방법이 이용가능하고 사용하기에 적합하다. 천연 공급원으로부터의 PDI 정제에 대해 상기 기술한 바와 같이, 재조합 PDI를 각각의 염 분획화, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배척 크로마토그래피, 하이드록실 아파타이트 흡착 크로마토그래피 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이를 혼합하여, 세포 용해물 및 추출물 또는 컨디셔닝되어진 배양 배지로부터 정제할 수 있다.

추가로, 재조합 PDI를 PDI에 대해 특이적인 모노클로날 또는 폴리클로날 항체로 제조된 면역-친화성 컬럼을 사용하여 기타 세포 단백질로부터 분리할 수 있다.

PDI에 단일 특이적 항체를 PDI에 대해 반응성인 항체를 함유하는 포유동물 항 혈청으로부터 정제하거나, 문헌[참조: Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)]의 기술을 사용하여 PDI와 반응성인 모노클로날 항체로서 제조한다. 본원중 사용된 단일특이적 항체는 PDI에 대한 동형 결합 특성을 갖는 단일 항체종 또는 다중 항체종으로서 정의된다. 본원중 사용된 동형 결합이란, 상기한 바와 같이 PDI와 결합될 수 있는 특이적 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있는 항체종의 능력을 의미한다. 효소 특이적 항체는, 마우스, 래트, 기니아 피그, 토끼, 염소, 말 등과 같은 동물, 바람직하게는 토끼를 면역 보조제 존재하 또는 부재하에 적절한 농도의 PDI로 면역화시키면, 발생한다.

예비면역 혈청은 제1면역화 이전에 수거한다. 각각의 동물은 적합한 면역 보조제와 결합된 PDI 약 0.1mg 내지 약 1000mg를 투여 받는다. 이러한 허용가능한 보조제에는 프로인트 완전 보조제, 프로인트 불완전 보조제, 명반-침전물, 코리네박테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*) 및 tRNA를 함유하는 유충수 유액이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 초기 면역화는, 바람직하게는 프로인트 완전 보조제 중의 효소에 의해 피하(SC), 복강내(IP) 또는 둘다로 여러 부위에서 이루어진다. 각각의 동물을 규칙적 간격, 바람직하게는 매주 출혈시켜 항체 역가를 측정한다. 동물은 초기 면역화 이후 부스터 주사를 받거나 받지 않을 수 있다. 부스터 주사를 받는 동물은 일반적으로 동일 경로로 프로인트 불완전 보조제중 효소 동량을 투여 받는다. 부스터 주사는 최대 역가가 수득될 때까지 약 3주 간격을 두고 주어진다. 각각의 부스터 면역 후 약 7일 또는 단일 면역후 약 1주일, 동물을 출혈시켜, 혈청을 회수하고, 분취량을 약 -20°C에서 저장한다.

PDI에 반응성인 모노클로날 항체(mAb)를 동계교배 마우스, 바람직하게는 Balb/c를 PDI로 면역화시켜 제조한다. IP 또는 SC 경로에 의해, 상기한 바와 같이 동량의 허용 가능한 보조제에 혼합된 약 0.5ml의 완충액 또는 식염수중 PDI 약 0.1 내지 약 10mg, 바람직하게는 약 1mg으로 마우스를 면역화한다. 프로인트 온전 보조제가 바람직하다. 마우스를 제0일에 초기 면역화 하고 약 3 내지 약 30주간 방치한다. 면역화된 마우스를, 정맥내(IV) 경로로 인산염 완충된 식염수 및 같은 완충 용액중 PDI 약 0.1 내지 약 10mg으로 1회 이상 부스터 면역화시킨다. 항체 양성 마우스로부터의 임파구, 바람직하게는 비장 임파구를, 당해 분야의 표준 방법에 의해 면역화 마우스로부터 비장을 제거하여 수득한다. 안정한 하이브리도마 형성을 허용하는 조건 하에서 비장 임파구를 적절한 융합 파트너, 바람직하게는 골수종 세포와 함께 혼합하여 하이브리도마 세포를 제조한다. 융합 파트너는 마우스 골수종 P3/NS1/Ag 4-1; MPC-11; S-194 및 Sp 2/0을 포함하나 이에 제한되지는 않고, Sp 2/0이 바람직하다. 항체 생산 세포 및 골수종 세포를 약 1000ml 중량의 폴리에틸렌 글리콜 중에서 약 30 내지 약 50% 농도로 융합한다. 융합된 하이브리도마 세포를, 당해 분야에 공지된 방법에 의해 하이포크산틴, 티미딘 및 아미노테린 보충된 돌베코 변형된 이글 배지(OMEN) 중에서 성장시켜 선별한다. 상등액을 제14, 18 및 21일경에 성장 양성을 나타내는 웰로부터 회수하고 항원으로서 PDI를 사용하여 고품상 면역방사검정(SPIRA) 같은 면역 검정에 의해 항체 생성을 스크리닝한다. 배양액을 또한 오우크테를로니(Ouchterlony) 침전 검정법으로 시험하여 mAb의 이소타입을 측정한다. 항체 양성 웰로부터 하이브리도마 세포를 특정 기술[예: MacPherson의 연 한천 기술, Soft Agar Techniques, in Tissue Culture Methods and Applications, Kruse and Paterson, Eds., Academic Press, 1973]을 사용하여 클로닝한다. 프리스탄 프리이미팅되어진 Balb/c 마우스에 프리이미팅 약 4일 후 약  $2 \times 10^6$  내지 약  $6 \times 10^6$  개 하이브리도마 세포로 마우스 당 약 0.5ml를 주사하면, 모노클로날 항체가 생체내 생성된다. 복수액을 세포 이진 후 약 8 내지 12일 후 회수하고, 모노클로날 항체를 당해 분야에 공지된 기술로 정제한다.

mAb의 시험관내 생산은 약 2% 태송아지 혈청을 함유하는 DMEM중에서 하이브리도마를 성장시켜 충분한 특이적 mAb를 수득함으로써 달성된다. mAb를 당해 분야에 공지된 기술로 정제한다.

복수액 또는 하이브리도마 배양액의 항체 역가를 다양한 혈청학적 또는 면역학적 검정에 의해 측정하는데, 이에는 침전법, 수동 응집법, 효소-결합된 면역흡착항체(ELISA) 기술 및 방사면역 검정(RIA) 기술이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 유사한 검정법을 사용하여, 체액 또는 조직 및 세포 추출물중 PDI의 존재를 검출한다.

당해 분야의 전문가에게 있어, 단일 특이적 항체를 생산하기 위한 상기 방법을 사용하여 PDI 폴리펩타이드 단편, 또는 완전 길이의 PDI 폴리펩타이드의 대해 특이적인 항체를 생산할 수 있음은 쉽게 이해될 수 있다.

PDI 항체 친화 컬럼을, 항체가 아가로스 겔 비이드 지지체와 공유 결합을 형성하도록 N-하이도록시석신이미드 에스테르로 예비-활성화시킨 겔 지지체인 아피겔(Affigel)-10(Biorad)에 항체를 가하여 제조한다. 그런 다음 항체를, 스페이서 암(spacer arm)을 갖는 아미드 결합을 통해 겔로 커플링시킨다. 그후 잔류하는 활성화된 에스테르를 1M 에탄올아민 HCl(pH8)으로 켄칭한다. 컬럼을 물, 이후 0.23M 글리신 HCl(pH2.6)으로 세척하여, 비결합된 항체 또는 필요없는 단백질을 제거한다. 그런 다음 컬럼을 인산염 완충된 식염수(pH 7.3) 중에서 평형화시키고 PDI를 함유하는 세포 배양 상등액 또는 세포 추출물을 컬럼을 통해 서서히 통과시킨다.

그런 다음 컬럼을 광학 밀도(A 280)가 백그라운드로 떨어질 때까지 인산염 완충된 식염수로 세척한 후, 단백질을 0.23M 글리신-HCl(pH2.6)로 용출시킨다. 이후, 정제된 PDI 단백질을 인산염 완충된 식염수에 대해 투석한다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되지만 이를 제한하지는 않는다.

#### [실시예 1]

##### [균주 및 성장 조건]

사카로마이세스 세레비지에 균주 MD40/4C(MAT $\alpha$ , leu2-3-112, ura2, his3-11, -15, trp1) 및 AS3324 (MAT $\alpha$ /MATa his3/his3, leu2/leu2, ura3/ura3, trp1/trp1)를, 필수 염기 및 필수 아미노산이 보충된 YEPD(1% 박토펙톤, 1% 효모추출물, 2% 글루코스) 또는 pH1.8 완충된 최소 배지(0.67% 마이너산 없는 효모 질소 염기, 2% 글루코스, 1% 석신산, 0.6% NaOH, 50 $\mu$ g/ml 메소-이노시톨)내에서 30 $^{\circ}$ C에서 성장시킨다.

에스. 세레비지에 균주 JRY188(MAT $\alpha$ , sir3-8, leu2-112, trp1, ura3-52, his4; Brake, A. J. et al., 1984, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, pp. 4642-4646) 및 BJ1995(MAT $\alpha$ , leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, gal2; Jones, E.W., 1991, Methods Enzymol., 194, pp. 428-453)를 PDI 과발현을 평가하는 데 사용하고 적절한 실시예중 기술되는 바와 같이 성장시킨다.

에스케리차 콜라이 균주 DH5 $\alpha$ (supE44  $\Delta$ lacU169( $\phi$ 801 acz  $\Delta$  M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 re1A1)를 플라스미드 스크리닝 조작을 위해 사용한다.

#### [실시예 2]

##### [DNA 조작]

제한 엔도뉴클레아제 분해 및 DNA 결합을 효소 제조업체(BCL, BRL)의 권고된 방식으로 수행한다. 이. 콜라이 형질전환(Cohen et al., 1972, P.N.A.S. USA, 69, pp. 2110-9) 및 에스. 세레비지에 형질전환(Beggs, 1978 Nature, 275, pp. 104-9; Ito et al., 1983, J. Bacteriol., 153, pp.163-8)에 대한 표준 프로토콜을 수행한다. 게놈 DNA를 홀름등[Holm et al., 1986, Gene, 42, pp.169-73]의 방법에 의해 에스. 세레비지애로부터 제조한다.

#### [실시예 3]

##### [PDI1 유전자의 분리]

2 $\mu$ -기본 벡터 pMA3a[Crouzet and Tuite, 1987. 상기]인 고 복제수 LEU2-d의 BamHI 부위내로 클로닝된 에스. 세레비지에 균주 SKQ2n[ $\alpha$ /a ade1/+ ade2/+his1/+; Gasion et al., supra]로부터의 DNA의 Sau3A 단편의 일부를 함유하는 효모 게놈 라이브러리를 사용하여 PDI1 유전자를 스크리닝한다. 30량체 올리고 뉴클레오타이드(5'CTTACAGTGACCACACCATGGAGCGTAGAA 3')(SEQ.ID.NO.: 5)를 고도로 보존된 티오레독신-유사 활성 부위(FYAPWCGHCK)(SEQ.ID.NO.:4)에 대해 효모 코돈 바이어스[Sharp et al., 1986, 상기]를 사용하여 합성한다.

라이브러리를 스크리닝하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드 50ng을 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP[Amersham, 3000Ci/mmol] 및 T4 폴리뉴클레오타이드로 말단 표지화시키고, DE-52 크로마토그래피를 사용하여, 비통합된 뉴클레오타이드로부터 표지된 올리고뉴클레오타이드를 분리시킨다. 약 20,000DH5 $\alpha$  재조합 콜로니를 하기과 같이 콜로니 하이브리드화에 의해 니트로셀룰로스 필터 상에서 스크리닝한다: 각각의 니트로셀룰로스 필터를 35% 포름아미드, 6 $\times$ SSC, 1 $\times$ 덴하르트 용액, 250 $\mu$ g/ml 변성된 연어 정자 DNA, 0.1% SDS중 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 예비하이브리드화시킨다. 표지된 올리고뉴클레오타이드(특히 활성 4.8 $\times$ 10<sup>9</sup> dpm/ $\mu$ g)를 90 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성시킨 후 예비하이브리드화 완충액중 2ng/ml로 희석하고 필터에 가한다. 37 $^{\circ}$ C에서 추가로 16시간 배양후, 필터를 제거하고 4 $\times$ SSC, 0.1% SDS중 2분간 세정한다. 그후 필터를 방사선자기법으로 처리한다.

39개의 잠재적인 양성 콜로니를 동정하여 상기한 바와 같이 2회의 추가의 스크리닝에 의해 취하고, 이후 10개의 양성 클론(표지된 C1 내지 C10)을 수득한다. 이들 클론중 2개(C7 및 C10)을 제한지도화하고, 클론 C7을 후속 연구를 위해 선택한다.

#### [실시예 4]

## [DNA서열 분석]

서열화에 적합한 크기의 단편을 확인하기 위하여, 클론 C7을 다양한 제한 효소로 분해하고, 단편을 1% 아가로스 겔 상에서 분리한 후 진공 블롯팅 장치(Hybrid Ltd.)를 사용하여 진스크린 플러스 막(Genescreen Plus membrane, Dupont)으로 옮긴다. 그런 다음 필터를 문헌[참조: Maniatis et al., 1982, 상기]의 기술된 바대로 예비하이브리드화한 후, 30량체 올리고 뉴클레오타이드 탐침을 부가한 후, 말단-표지화하여, 상기한 바대로 변성시킨다. 하이브리드화는  $6 \times \text{SSC}$ 내에서  $43^\circ\text{C}$ 에서 24시간 수행한 후  $2 \times \text{SSC}$  200mℓ중 실온에서 5분간 2회 세척하고  $2 \times \text{SSC}$ ,  $0.1 \times \text{SSC}$  500mℓ중  $65^\circ\text{C}$ 에서 2회 세척하고  $0.1 \times \text{SSC}$  500mℓ중 실온에서 최종적으로 세척한다. 그런 다음 필터를  $-70^\circ\text{C}$ 에서 48시간 동안 방사자기법으로 처리한다.

클론 C7로부터의 2.4kb HincII-EcoRI 단편을 디데옥시 쇠 테미네이터 방법[참조: Sanger et al., 1977, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., 74 5463-67]을 사용하여 완전히 서열화한다. 서열화에 적합한 제한 단편을 홀름 및 퀴글리[Holmes and Quigley, 1981, Anal. Biochem., pp. 193-7]의 급속 방법을 사용하여 서열화를 위해 제조한 pUC19 및 플라스미드 DNA내로 아클로닝한다. 추가로 일부 단편을 일본쇄 벡터 mp12 또는 mp13[참조: Messing, 1983, Methods Enzymol., 101, pp. 20-78]내로 클로닝한다. 다양한 서열화 프라이머(15-18량체)를 합성하고, 이를 클로닝 벡터의 폴리링커 영역 또는 미리 추론된 내부 C7 DNA 서열로 어닐링한다. 플라스미드 DNA를 0.2M NaOH, 2mM EDTA 내에서 프라이머 어닐링하기 앞서  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 변성시키고, 0.1 용적의 3M 아세트산나트륨(pH5.0)을 부가하여 중화시킨후 95% 에탄올 3배 용적으로  $-70^\circ\text{C}$ 에서 15분간 침전시킨다. T7 DNA 폴리머라제(Seguenase, Us Biochemicals)를 제조업체의 지침에 따라, 표지화를 위해 [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP(3000Ci/mmol; ICN)를 사용하여 시험관내 쇠 연장시킨다. 반응은 이미 기술된 바와 같이 분석한다[참조: Bossier et al., 1989, Gene, 78, pp. 323-30].

## [실시에 5]

## [RNA의 제조 및 분석]

총 RNA를 균주 MD40/4C의 지수적으로 성장하는 세포( $5 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^7$  세포/mℓ) 또는 정지상 세포( $2 \times 10^8$  세포/mℓ)로부터 제조한다. RNA를 또한 30분 가열쇼크(30 내지  $42^\circ\text{C}$ )상태의 MD40/4C의 지수적으로 성장하는 세포로부터 추출한다. 총 RNA를 문헌[참조: Dobson et al., (1983, Nucleic Acids Res., 11, 2287-2302)에 기술된 바대로 추출한다.

노던 블롯 분석을 하기와 같이 수행한다.: 총 RNA 20μg를  $55^\circ\text{C}$ 에서 15분간 20% 포름알데히드 50% 탈이온화 포름아미드 중에서 가열하여 변성시킨 다음, 8% 포름알데히드를 함유하는 1% 아가로스 겔내에서 분리시킨다. RNA를 진공 블롯팅에 의해 니트로셀룰로스 필터(SS, BA85)로 옮기고, 필터를 10mM 트리스-HCl 중에서 5분간 비등시킨다. 하이브리드화를  $10 \times \text{덴하르트}$  용액,  $2 \times \text{SSC}$ , 50mM 인산염 완충액 pH 6.5, 40% 포름아미드, 0.1% SDS, 400μg/mℓ 가열 변성된 연어 정자 DNA 및 1 내지 5ng/mℓ 탐침중  $42^\circ\text{C}$ 에서 밤새 수행한다. 필터를  $-70^\circ\text{C}$ 에서 1 내지 5일간 방사 자기법으로 처리한다. 사용된 탐침은 PD11 유전자로부터의 0.8kb HindIII-SstI 단편[참조: Farguhar, R. et al., 상기, 제2도] 및 pBR322내로 클로닝된 에스. 세레비지애의 18S 및 25S 리보솜 RNA 분획을 함유하는 플라스미드 Scp7[Dr. B. S. Cox, University of Oxford로부터 수득]이다. 탐침을 제조업자의 지시에 따라 랜덤 프라이머 표지화(BCL)에 의해 표지화한다.

## [실시에 6]

## [pdi1::HIS3 대립유전자의 작제]

HIS3 유전자를 함유하는 1.8kb BamHI 단편을 플라스미드 pMA 700[참조: Montiel et al., 1984, 상기]으로부터 유리시켜 1% 저용점 아가로스(Sigma) 상에서 정제한다. BamHI 접착 말단 단편을 문헌[참조: Maniatis et al., 1982, 상기]에 기술된 DNA 폴리머라제의 dNTP 및 클레노우 단편을 사용하여 충진시킨다. 그런다음, PD11 유전자의 1.2kb DraI-BglII 단편을 플라스미드 pUC19의 폴리링커 내부의 SmaI-BamHI 부위내로 아클로닝한다. 최종적으로, HIS3 유전자를 함유하는 충진된 BamHI 단편을 PD11 암호화 영역내 단일 EcoRV 부위로 연결시킨다(제3도). 수득된 pdi1::HIS3 대립유전자를 3.0kb SalI-EcoRI 단편 상에서 방출시키고, 저용점 아가로스 상에서 정제하여 이토등[Ito et al., 1983 상기]의 리튬 아세테이트 형질전환 프로토콜을 사용하여 이배체 균주 AS3324를 His<sup>+</sup> 원형양성으로 형질전환시키는데 사용한다.

## [실시에 7]

## [시험관내 PDI 검정]

전체 단백질 추출물중 PDI 활성에 대한 검정이 문헌[참조: Hillson et al., (1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-92)]에 기술되어 있다.

## [기질의 제조]

혼합된 리보뉴클레아제는 무작위적으로 형성된 디설파이드 결합을 함유하는 완전히 산화된 혼합물이다. 이것은 하기 방법에 의해, 시판되는 소 취장 리보 뉴클레아제A(Sigma)로부터 제조한다.

50mM 트리스-HCl 완충액, pH 8.6, 8.9M 우레아, 130mM 디티오프레이톨(환원성 디설파이드 결합에 비해 약 15배 이상 몰과량의 디티오프레이톨)중의 30mg/mℓ(약 2.2mM) 리보뉴클레아제를 주위 온도에서 18 내지 20시간, 또는  $35^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양한다. 반응 혼합물을 빙초산으로 pH 4까지 산성화시키고 세파덱스 G-25 컬럼으로부터 탈기된 0.1M 아세트산으로 즉각 용출시켜 환원 단백질을 분리한다. 280nm에서 용출된 분획을 모니터하고, 단백질-함유 분획을 모은후, 표준으로서 천연 리보뉴클레아제 A를 사용하여, 분광학적으로 또는 화학적으로 단백질 농도를 측정한다.

0.1M 아세트산으로 약 0.5mg/mℓ까지 환원된 리보뉴클레아제 샘플을 희석한다. 고체 우레아를 가해 10M의 최종 농도가 되게하고, 사르코신 하이드로콜로라이드를 가해 0.1M이 되게한다(사르코신은, 우레아의 농축 용액중에 존재하는 시아네이트 이온과 반응할 수 있도록 포함시켜 카바밀화에 의해 리보뉴클레아제를 비

활성화시킬 수 있다). 1M 트리스로 pH 8.5로 조정하고, 암실에서 주위온도로 2 내지 3일간 배양하는 동안, 단백질은 대기의 O<sub>2</sub>에 의해 무작위적으로 재산화된다. 이러한 배양 이후, 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)을 사용하여 유리 티올 그룹을 측정하여 재산화가 완결되었음을 나타낸다(리보뉴클레아제 분자당 0.1 미만의 유리 티올).

빙초산으로 pH4로 산성화시키고, 0.1M 아세트산중 세파덱스 G-25로부터 용출시켜, 혼합된 생성물을 회수한다. 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 1M 트리스로 pH8로 조정한 후, 4°C에서 저장한다.

이 방법을 통한 혼합된 리보뉴클레아제의 수율은 일반적으로 90 내지 100%이다. 생성물은 용액중 4°C에서 6개월까지 안정적이거나, 다른 방법으로 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(pH 7.8)내로 투석하여 동결건조시켜, -20°C에서 무한정 저장될 수 있는 백색 보풀성 고체를 수득한다.

#### [검정 방법]

기질, 혼합된 리보뉴클레아제는, 고분자량 RNA의 가수 분해적 절단에 필수적으로 불활성이며, 천연 리보뉴클레아제의 활성이 약2%를 나타낸다. 혼합된 리보뉴클레아제내 분자간 및 분자내 디설파이드의 상호교환을 촉매화하는데 있어서의 PDI의 작용은 본래의 디설파이드 쌍 형성(pairing), 본래의 형태 및 RNA에 대한 리보뉴클레아제 활성의 동시적 회복을 재수득하는 것이다. 따라서, PDI의 활성을 시간적으로 배양하여 검정하는 동안, 분취량을 제거하고 RNA에 대한 리보뉴클레아제 활성을 측정한다.

단백질 디설파이드 이소머라제 샘플을 50mM 인산나트륨 완충액(pH7.5)으로 900 $\mu$ l의 최종 용적으로 가하고 10<sup>-5</sup>M 디티오트레이톨(1mM 스탁용액 10 $\mu$ l, 매일 새로 제조)과 함께 30°C에서 2 내지 3분간 예비배양한다. 트리스-HCl 완충액 또한 허용가능 하지만 약 25% 더 낮은 활성이 초래된다. 그런 다음, 혼합된 리보뉴클레아제(10mM 아세트산중 0.5mg/ml 스탁용액, 매일 새로이 제조) 100 $\mu$ l 분취량을 부가해 검정을 개시하고, 배양 혼합물을 30°C에서 유지시킨다. 보다 소형 규모의 연구를 위하여, 상기 용적을 10배 감소시켜 100 $\mu$ l의 최종 검정 용적을 수득한다. 10 $\mu$ l의 분취량을 0.5분, 이후 2 내지 3분 간격으로 18분 동안 제거하여, 혼합된 리보뉴클레아제의 재활성화를 검정한다. 각각의 분취량을 30°C에서 미리 평형화시킨 석영 큐벳 내에서, 고도로 중합화된 효모 RNA(5mg/ml 스탁용액 50 $\mu$ l) 0.25mg을 함유하는 TKM 완충액(50mM 트리스-HCl 완충액, pH7.5, 25mM KCl, 5mM Mg Cl<sub>2</sub>) 3ml의 검정 혼합물로 바로 가한다. 리보뉴클레아제 활성을, 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer) 356 분광 광도계(밴드폭 2.5nm)의 이중-파장 모드를 사용하여 A280에 대한 A260의 변화도( $\Delta A$ )를 측정함으로써 30°C에서 모니터한다. RNA 가수분해율( $\Delta A_{min}^{-1}$ )은 1.5 내지 2분에 걸쳐 일정한다. 배양으로부터 분취량 회수 시간에 대한 이러한 비율의 플롯은 15분까지는 선형이다. 시간 진행에 따른 이러한 선형 부위의 구배( $\Delta A_{min}^{-1} min^{-1}$ )를 3중 검정의 선형 회기분석(상관 계수는 통상  $\geq 0.99$ )으로 계산하여, 단백질 디설파이드-이소머라제 활성의 측정치로서 취한다.

대조 배양은, 디티오트레이톨 단독에 의한 혼합된 리보뉴클레아제의 비효소적 재활성화 속도를 측정하기 위하여 효소 샘플 없이 수행한다. 이들 속도는 통상  $0.2 \times 10^{-3} \Delta A_{min}^{-1} min^{-1}$  미만이고, 효소 샘플의 단백질 디설파이드-이소머라제 활성 계산중 유도된다.

단백질 디설파이드-이소머라제 활성의 1단위는 분당 하나의 리보뉴클레아제 단위의 속도로 혼합된 리보뉴클레아제의 재활성화를 촉매화하는 양으로서 정의된다; 하나의 리보뉴클레아제 단위는 A280에 대한 A260의 분당 1흡광도 변화를 나타내는 양으로서 정의한다.

#### [실시예 8]

[효모 LYS2 또는 URA3 좌에서 PDI 발현 카세트의 통합을 위한 벡터의 작제]

벡터는 하기 방법에 따라 LYS2에서 통합시키기 위해 작제한다. 플라스미드 pUC19를 HindIII로 분해하고 선형 벡터 단편을 겔-정제한다. 그런다음 이 단편을 EcoRI로 분해하고, 수득된 2.7kbp EcoRI-HindIII 벡터 단편을 겔정제한다. 그런다음, 정제된 단편을 EcoRI 접착 말단, NotI 부위, HindIII 부위, NotI 부위 및 HindIII 접착 말단을 순서대로 함유하는 하기 합성 올리고뉴클레오타이드로 연결시킨다:

5'-AATTGCGGCCGCAAGCTTGGCGCCGC-3' (서열확인번호: 6)

3'-CGCCGGCGTTCGAACGCCGGCGTTCGA-5' (서열확인번호: 7)

수득된 플라스미드 pUC-Not는, NotI 부위의 양쪽 측면상에 바로 플랭킹된 단일 HindIII 부위를 함유한다.

URA3 좌에 발현 카세트의 통합을 표적화시키는 플라스미드를 하기와 같이 작제한다. 효모 URA3 유전자의 공급원은 YRp10으로부터의 1.1kbp HindIII 단편이다[참조: Parent, S. A. et al., 1985, Yeast, 1, pp. 83-138]. 플라스미드 pUC-Not를 HindIII로 분해하고, 송아지 장 알칼리 포스파타제로 탈인산화한 후, 1.1kbp HindIII URA3단편으로 연결시켜, 플라스미드 pUC-Not-URA3을 수득한다.

LYS2 좌에 발현 카세트의 통합을 표적화시키는 플라스미드를 하기와 같이 작제한다. 효모 LYS2 유전자를 함유하는 플라스미드 Ylp600[Barnes, D. A. and Thorner, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-2838]를 EcoRI 및 HindIII로 분해하고, LYS2 유전자 함유 4.5kbp EcoRI-HindIII 단편을 이미 EcoRI 및 HindIII로 분해시킨 pUC19내로 크로닝하여 pUKC171을 수득한다. 그런다음, 이 플라스미드를 PvuII 및 BglIII로 분해하고 LYS2 유전자를 함유하는 3.7kbp PvuII-BglIII 단편을 겔 정제하여 평활-말단이 되도록 한다. 플라스미드 pUC-Not를 HindIII로 분해하고, 송아지 장 알칼리 포스파타제로 탈인산화하여 평활-말단으로 제조한 후, 3.7kbp LYS2 단편과 연결시킨다. 예상된 구조의 수득된 플라스미드를 pUC-Not-LYS2(pNL 이라고도 함)로 지정한다.

LYS2에서 통합을 위한 제2벡터 또한 작제한다. 플라스미드 Ylp600을 NcoI로 분해하고, LYS2 단백질 암호화 서열의 주요 부분을 함유하는 3.0kbp NcoI 단편을 겔 정제하여 평활-말단이 되도록 한다. 플라스미드 pUC13를 BamHI로 분해하여, 평활-말단화시키고, 3.0kbp LYS2 단편과 연결시켜, 통합 벡터 pUC13-

LYS2를 수득한다.

[실시예 9]

[효모  $\alpha$  인자 분비 리더에 융합된 사람 PDI를 과잉 생산하는 효모 균주의 작제]

사람 PDI 암호화 서열의 공급원은 문헌[참조: Pihlajaniemi et al., 1987, 상기]에 기술된 중첩 부분 cDNA 클론 p210 및 p1이다. 사람 PDI cDNA의 5'말단을 함유하는 p210으로부터의 0.45kbp EcoRI-PstI 단편을 pUC18내로 아클로닝하여, 플라스미드 pUKC150을 수득한다. 그런 다음, 플라스미드 pUKC 150을 EcoRI 및 Aval 으로 분해한다(Aval는 성숙한 사람 PDI에 대한 암호화 서열내 세 번째 아미노산에 상응하는 위치에서 절단한다). 수득된 3.1kbp 벡터 기본 골격 단편을 겔-정제시키고 하기 구조를 갖는 올리고뉴클레오타이드 어댑터로 연결한다:

5'-AATTCGTTGACGCC-3' (서열확인번호 :8)

3'-GCAACTGCGGGGGT-5' (서열확인번호: 9)

이 어댑터는 성숙한 PDI 암호화 서열의 5' 말단을 재구성하고, 목적하는 분비성 리더 서열로 성숙한 사람 PDI 서열의 정확한 융합을 허용하는 위치로 HindI 부위를 함유한다.

그런 다음, 수득된 플라스미드 pUCK159를 PstI으로 분해하고, 송아지 장 알칼리 포스파타제로 처리한 후, 사람 PDI 암호화 서열의 나머지를 함유하는 플라스미드 p1[참조: Pihlajaniemi et al., 1987, 상기]로부터의 1.5kbp PstI-PstI 단편과 연결시켜, 플라스미드 pUK160을 수득한다. 그런 다음, 플라스미드 pUKC160을 HindII(상기 올리고어댑터내에서 절단)에 이어, HindIII로 분해한다. 성숙한 사람 PDI 암호화 서열을 함유하는 수득된 1.9kbp HindII-HindIII 단편을 겔 정제하고, 미리 StuI 및 HindIII로 분해한 플라스미드 pGS4내로 아클로닝한다[pGS4는  $\alpha$  교배인자(MF  $\alpha$  1) 프리-프로 분비 리더 서열에 융합된 효모 GAL1 프로모터를 함유한다; Shaw, K. J. et al., 1988, DNA, 7, 117-126]. 형질 전환된 StuI 및 HindIII 말단 사이에 형성된 접합은 MF  $\alpha$  1 프리-프로 리더 서열과 사람 PDI의 성숙한 부위 사이의 정확한 프레임-유지(in-frame) 융합을 재구축한다(수득된 플라스미드를 pUKC161로 지정; 제4도).

LYS2 통합 벡터 pNL(pUC-NotI-LYS2)을 StuI 및 XhoI으로 분해하고, T4 DNA 폴리머라제로 처리하여 평활-말단으로 만든다. 플라스미드 pUKC161을 EcoRI 및 HindIII로 분해하고, 생성된 GAL10 프로모터- $\alpha$  인자 프리-프로 리더-사람 PDI 발현 카세트를 함유하는 2.8kbp EcoRI-HindIII 단편을 겔-정제하고, T4 DNA 폴리머라제 처리하여 평활-말단으로 만든다. 상기 평활-말단화 pNL-벡터 단편 및 이러한 발현 카세트 단편을 함께 연결시키고, 연결 혼합물을 이.콜라이 균주 ATCC 35691을 형질 전환하는데 사용한다. 기대되는 구조를 갖는 플라스미드를 함유하는 형질전환체를 스크리닝하여, 수득된 플라스미드 pNL-MF  $\alpha$  1-hPDI를 다량으로 제조한다. NotI으로 분해하는 경우, pNL-MF  $\alpha$  1-hPDI는 한쪽 말단이 LYS2 DNA 서열에 의해 플렌킹된 6.2kbp 발현 카세트를 생성시킨다. 분해된 DNA를 사용하여, 스페로플라스트 방법으로 에스.세레비지에 균주 BJ1995 및 JRY 188을 형질전환시킨다[참조: Hinnen A. et al., 1978, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75, pp. 1929-1993]. NotI 말단을 표적화 장치로서 작용하여, 발현 카세트를 염색체 LYS2 좌로 유도하면, 이곳에서 상동재조합을 통해 카세트가 통합되어진다.  $\alpha$ -아미노 아디프산을 함유하는 고체 배지상에서 성장하는 형질전환체를 스크리닝하는데, 이는 균주가 1ys<sup>-</sup>임을 지시한다[참조: Chattoo, B. B. et al., 1979, Genetics, 93, pp. 51; Barnes and Thorner, 1986, supra]. LYS2 탐침을 사용하여 클로날 분리물을 서던 블롯 분석함으로써 발현 카세트가 LYS2 부위에서 통합되었음을 확인한다. BglIII로 분해된 염색체 DNA 제제는 LYS2 탐침과 하이브리드화하는 밴드에 대해 5.0 내지 7.8kbp의 기대된 크기 변화를 보인다. 통합된 발현 카세트를 함유하는 수득된 관련 균주 BJ1995 및 JRY188은 각각 BJ1995/ $\alpha$ -hPDI 및 JRY188/ $\alpha$ -hPDI(균주 #1072A)로 지정된다.

[실시예 10]

[효모 PDI 또는 사람 PDI시그널 서열을 사용하여 사람 PDI를 과잉생산하는 효모 균주의 작제]

PDI cDNA 클론 p1(Pihlajaniemi et al., 1987, 상기)을 PstI으로 분해하고, 사람 PDI cDNA의 3'-영역을 함유하는 1.5kbp PstI-PstI 단편을 겔 정제한다. 그런 다음, 이 단편을 pUKC150(상기 실시예 9에 기술)의 PstI 부위내로 삽입하여 플라스미드 pUKC151을 수득하는데, 이는 완전한, 총 길이의 사람 PDI cDNA를 함유하게 된다. pUKC151을 HindIII로 분해하고, 적절한 올리고 뉴클레오타이드 어댑터(EcoRI 인지 서열 함유)와 연결시켜 PDI cDNA의 3'말단에 위치한 HindIII 부위를 EcoRI 부위로 전환시킨다. 수득된 플라스미드 pUKC153은 2.1kbp EcoRI 단편 상에 완전한 사람 PDI 암호화 서열을 포함한다. 플라스미드 pUCK153을 EcoRI 및 PstI으로 분해한다. 각각 사람 PDI 서열의 5'- 및 3'-부위를 함유하는 수득된 0.47kbp EcoRI-PstI 및 1.7kbp PstI-EcoRI 단편을 겔 정제한다. pUC19를 EcoRI 및 PstI으로 분해하고 2.7kbp 벡터 단편을 겔 정제후 상기 0.47kbp EcoRI-PstI 단편과 연결시킨다. 연결 혼합물을 상요하여 이.콜라이 ATCC 35691을 형질전환시킨다. 플라스미드 DNA를 예상된 구조를 갖는 플라스미드를 함유하는 형질전환체로부터 제조한다. 이 DNA를 Aval 및 PstI으로 분해하여 사람 PDI 서열의 5' 부위를 함유하는 0.38kbp 단편을 겔 정제한다.

pUC19를 EcoRI 및 BamHI으로 분해하고, 2.7kbp 벡터 단편을 겔정제한다. 하기 올리고뉴클레오타이드를 합성한다.

1. 5'-GATCCACAAAACAAAATGCTGCGCCGCGCTCTGCTGTGCCTGCCGTGG

TCCGCCCTGGTGC GCGCCGACGCC-3'

(올리고 # 15165-220)

(서열확인번호: 10)

2. 5'-TCGGGGGCGTCGGCGGCACCAGGGCGGACCACGGCAGGCACAGCAG

AGCGGGCGCAGCATTTTGT TTTGTG-3'

(올리고 # 15165-221)

(서열확인번호: 11)

3. 5'-GATCCACAAAACAAAATGAAGTTTTCTGCTGGTGCCGTCCTGTCATGG

TCCTCCCTGCTGCTCGCCTCCTCTGTTTTCGCCGACGCC-3'

(올리고 # 15165-249)

(서열확인번호: 12)

4. 5'-TCGGGGGCGTCGGCGAAAACAGAGGAGGCGAGCAGCAGGGAGGACCAT

GACAGGACGGCACCAGCAGAAAAC TTTTGT TTTGTG-3'

(올리고 # 15165-250)

(서열확인번호: 13)

올리고뉴클레오타이드 #15165-220 및 151650249를 키나제화한후 올리고뉴클레오타이드 #15165-221 및 15165-250으로 각각 어닐링한다. 사람 PDI 시그널 펩타이드 서열을 갖는 사람 PDI를 재조합하기 위하여, 하기 연결물을 제조한다. pUC19 2.7kbp BamHI-EcoRI 단편을 1.7kbp PstI-EcoRI hPDI 3'-단편, 0.38kbp PstI-AvaI 5'-hPDI 단편 및 어닐링된 링커 15165-220 및 15165-221 과 연결시킨다.

효모 PDI 시그널 서열을 갖는 사람 PDI를 재조합하기 위하여, 하기 연결 혼합물을 제조한다. pUC19 2.7kbp BamHI-EcoRI 단편을 1.7kbp PstI-EcoRI hPDI 3'-단편, 0.38kbp PstI-AvaI 5'-hPDI 단편 및 어닐링된 링커 15165-249 및 15165-250(당해 어닐링된 링커는 BamHI 및 AvaI 접착 말단을 함유하고 지시된 시그널 펩타이드 서열과 효모 5'-배해독 리더 서열을 암호화한다)과 연결시킨다.

연결 혼합물을 이.콜라이 ATCC 35691로 형질전환시키고, 형질전환체는 예상된 구조의 플라스미드를 함유하는 것을 스크리닝한다. 올리고뉴클레오타이드 링커와 측면 DNA를 포함하는 영역에 걸친 DNA 서열은 디

데옥시 서열화 방법에 의해 확인된다. 효모 PDI 시그널 펩타이드 또는 사람 PDI 시그널 펩타이드 암호화 서열을 갖는 사람 PDI 암호화 서열을 각각 ySP-hPDI 및 hSP-hPDI로 지정한다. 이들 카세트를 함유하는 2개의 수득된 플라스미드(각각 pUC-ySP-hPDI(제5도) 및 pUC-hSP-hPDI)를 SmaI 및 BamHI으로 분해하고, hDI 카세트를 함유하는 수득된 1.5kbp 단편을 절정제하여 평활-말단으로 만든다.

플라스미드 p401(단일 BamHI 부위에 분리된 GAL10 프로모터 및 ADH1 전사 터미네이터 함유; 제6도)을 BamHI으로 분해하고, 평활-말단화한 후, 상기 카세트로 연결시켜, 각각 플라스미드 pGAL-ySP-hPDI 및 pGAL-hSP-hPDI를 수득한다. 이들 2개의 플라스미드를 SmaI, SphI 및 ScaI으로 분해하고, GAL10p-ySP-hPDI 및 GAL10p-hSP-hPDI 발현 카세트를 함유하는 수득된 3.2kbp SmaI-SphI 단편을 절정제한 후, 평활-말단화하여 LYS2 통합 벡터 pUC13-LYS2의 XhoI 부위(평활-말단화됨)내로 삽입한다. 생성된 플라스미드를 각각 pLYS2-hSP-hPDI 및 pLYS2-ySP-hPDI로 지정한다.

통합적 형질전환을 위하여, 상기 2개의 플라스미드를 XbaI 및 SacI으로 분해하여, LYS2 측면 말단을 갖는 선형 단편을 생성시키고, 선형 단편을 효모 균주 BJ1995 및 JRY188을 형질전환시키는데 사용한다. LYS2에 목적하는 발현 카세트를 통합시킨 형질전환체를 BglII로 분해시킨 게놈 DNA의 서던 블롯에 의해 확인한 후, LYS2 탐침과 하이브리드화한다. 수득된 균주는 BJ1995/hSP-hPDI, BJ1995/ySP-hPDI, JRY188/hSP-hPDI(균주 #1148), 및 JRY188/ySP-hPDI(균주 #1157)이다.

[실시에 11]

[사람 PDI 또는 효모 PDI 시그널 펩타이드를 사용하여, 사람 PDI의 C-말단 HDEL 돌연변이체를 과잉생산하는 효모 균주의 작제]

소포체내에 잔류하는 효모 단백질은 보통, ER내 체류에 대한 시그널인 C-말단 HDEL 아미노산 서열을 함유한다[참조: Pelham, et al., 1988 상기]. 반대로, 사람 PDI는, 이전부터 효모내 ER체류에 대해 불량하게 작용하는 것으로 알려진 C-말단 KDEL 서열(Pihlajaniemi, et al., 1987, 상기)을 갖는다[참조: Lewis, M. J., et al., 1990, Cell, 61, pp. 1359-1363]. 따라서, C-말단 KDEL이 HDEL로 변화된, 변형된 사람 PDI를 작제하는 것이 바람직하다. 이것은 하기와 같이 수행된다.

2개의 플라스미드 pUC-ySP-hPDI 및 pUC-hSP-hPDI(실시에 9)를 EcoRI 및 XhoI 으로 분해하고, hPDI 서열의 5' 부위를 갖는 벡터 서열을 함유하는 수득된 4.0kbp EcoRI-XhoI 단편 및 hPDI 암호화 서열의 중간 부위를 함유하는 0.5kbp XhoI-XhoI 단편을 절 정제한다. 그런다음, 하리 올리고뉴클레오타이드 어댑터를 합성한다.

5'-GACGACCTCGAGGACCTCGAAGAAGCAGAGGAGCCAGACATGGAGGAA-

3'-CTGCTGGAGCTCCTGGAGCTTCTTCGTCTCCTCGGTCTATGCCTCCTT-

GACGATGACCAGAAAGCTGTGCACGATGAAGTGAAGGATCCG-3'

(서열 확인번호: 14)

CTGCTACTGGTCTTTTCGACACGTGCTACTTGACATTCCTAGGCTTAA-5'

(서열 확인번호: 15)

2개 올리고의 어닐링 이후, 이 어댑터를 XhoI으로 분해하고 (EcoRI 및 XhoI 접착 말단이 수득됨), 2개의 분리된 반응에서 5'-ySP-hPDI 또는 5'-hSP-hPDI 서열을 각각 함유하는 4.0kbp EcoRI-XhoI 벡터 단편과 연결시킨다. 그런다음, 생성된 2개의 플라스미드를 XhoI으로 분해하고 hPDI 암호화 서열의 중간 부분을 함유하는 상기 0.5kbp XhoI-XhoI 단편과 연결시켜, XhoI 단편이 사람 PDI 암호화 서열을 재작제하기 위해 정확한 배향으로 삽입된 플라스미드 pUC-ySP-hPDI(HDEL) 및 pUC-hSP-hPDI(HDEL)를 각각 수득한다. 그런다음 이들 2개의 플라스미드를 BamHI으로 분해하고, 발현 카세트를 함유하는 2개의 상이한 1.5kbp BamHI 단편을 절정제한 후, p401의 BamHI 부위내로 삽입하여, pUC-GAL10p-ySP-hPDI(HDEL) 및 pUC-GAL10p-hSP-hPDI(HDEL)를 각각 수득한다. 그런다음, 이들 2개의 플라스미드를 SmaI, SphI 및 PvuII으로 분해한다. 수득된 2개의 2.5kbp SmaI-SphI 단편을 절정제하여, 평활 말단화한 후, 이미 XhoI으로 분해되어 평활-말단화되어진 pUC13-LYS2로 연결시킨다. 수득된 2개의 플라스미드 pLYS2-ySP-hPDI(HDEL) 및 pLYS2-hSP-hPDI(HDEL)을 HpaI 및 EcoRV로 분해하여 선형화시킨 후, 균주 BJ1995 및 JRY188의 형질전환을 위한 각각의 반응중에 사용한다. Lys 형질전환체를,  $\alpha$ -아미노 아디프산 함유 고체 배지상에서 선별한다. LYS2부위에 목적하는 통합된 발현 카세트를 함유하는 분리물을, 게놈 DNA의 서던 블롯 분석에 의해 확인한다. 수득된 균주는 BJ1995/ySP-hPDI(HDEL), BJ1995/hSP-hPDI(HDEL), JRY188/ySP-hPDI(HDEL)(균주 #1268), 및 JRY188/hSP-hPDI(HDEL)(균주 #1267)로 지정한다.

[실시에 12]

[효모  $\alpha$  인자 분비성 리더를 사용하여, 사람 PDI의 C-말단 HDEL 돌연변이체를 과잉생산하는 효모 균주의

작제]

플라스미드 pUKC161(제4도)를 BamHI 및 ClaI으로 분해하고,  $\alpha$ 인자 프리-프로 리더 서열 및 hPDI 의 5' 절편을 함유하는 0.7kbp BamHI ClaI 단편을 결정제한다. 플라스미드 pUC-ySP-hPDI (HDEL)(실시에 11에 기술)을 ClaI 및 EcoRI로 분해하고, C- 말단 HDEL 변형부와 함께 hPDI 의 3'-절편을 함유하는 1.0kbp ClaI-EcoRI 단편을 결정제한다. pUC19를 BamHI 및 EcoRI로 분해하고, 수득된 벡터 단편을 0.7kbp BamHI-ClaI 단편 및 1.0kbp ClaI-EcoRI 단편과 연결시켜 플라스미드 pUC-MF  $\alpha$ 1-hPDI (HDEL)을 수득한다. 이 플라스미드를 BamHI으로 분해하고, PDI 카세트를 함유하는 1.7kbp BamHI-BamHI 단편을 결정제한 후, 플라스미드 p401의 BamHI 부위로 삽입시켜(제6도), 플라스미드 pGAL-MF  $\alpha$ 1-hPDI (HDEL)을 수득한다. 그런 다음, 이 플라스미드를 효소 SmaI, SphI 및 PvuII 으로 분해하고, 발현 카세트를 함유하는 수득된 2.6kbp SmaI-SphI 단편을 결정제한 후 평활 말단화한다. pUC13-LYS2 벡터를 XhoI로 분해하고, 평활-말단화한 후, 상기 2.6kbp 평활-말단 단편과 연결시킨다. 생성된 플라스미드 pLYS2-MF  $\alpha$ 1-hPDI (HDEL)을 HpaI 및 EcoRV로 분해한 후, 균주 JRY188 및 BH1995를 형질전환시키는데 사용한다. 수득된 형질전환체를 게놈 DNA의 서던 블롯에 의해(실시에 9와 같이) 평가하여, 목적하는 발현 카세트가 LYS2 좌에 통합되었음을 확인한다. JRY188 형질전환체를 균주 #1279로 지정한다.

[실시에 13]

[LYS2 좌에 통합된 발현 카세트로부터 효모 PDI 단백질을 과발현하는 효모 균주의 작제]

완전한 효모 PDI1 유전자를 함유하는 플라스미드 C7(실시에 4에 기술)을 EcoRV로 분해하고, 효모 hPDI 개방 판독 프레임(ORF)의 C-말단부위(ORF의 아미노산 223 내지 말단) 및 3'-비해독 서열을 함유하는 1.3kbp EcoRV-EcoRV 단편을 결정제한 후 플라스미드 pAT153[참조: Twigg, A. G. and Sherratt. D., 1980, Nature, 283, pp. 216-218]의 EcoRV 부위내로 삽입하여, pUKC169를 수득한다. 그후, 플라스미드 C7을 BamI 및 EcoRV로 분해하고, 효모 PDI ORF의 아미노산 6-222를 암호화하는 0.67kbp BamI-EcoRV 단편을 결정제한 후 BamHI 및 BamI 접착 말단을 각각 함유하고, 효모 PDI ORF의 아미노산 1-5와 효모 5' 비해독리더 서열의 12bp를 암호화하는 하기 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(ATG 개시 코돈은 밑줄)와 연결시킨다.

5'-GATCCACAAAACAAAATGAAGTTTTCTGCTG-3'

(서열확인번호: 16)

3'-GTGTTTTGTTTTACTTCAAAAAGACGACCACG-5'

(서열확인번호: 17)

수득된 0.7kbp BamHI-EcoRV 단편을 결정제한 후, 미리 EcoRV 및 BamHI로 분해한 pAT153내로 아클로닝하고, 플라스미드 pUKC170을 수득한다.

플라스미드 pUKC169를 EcoRV로 분해하고, 효모 PDI의 상기한 C-말단 부위를 갖는 수득된 1.3kbp EcoRV-EcoRV 단편을 결정제한 후 pUKC170의 단일 EcoRV 부위내로 삽입시켜 완전한 효모 PDI(yPDI) 유전자를 재 생성시킨다. 이러한 수득된 플라스미드를 pUKC175로 지정한다.

pUKC175를 EcoNI로 분해하고, yPDI 유전자를 함유하는 수득된 2.1kbp 단편을 평활-말단화하고 결정제한다. pUC19를 SacI 및 SmaI으로 분해하고, 평활-말단화하며, 상기 평활-말단화 EcoNI yPDI 단편과 연결시킨다. 연결 혼합물을 사용하여, 이.콜라이 DH5 세포를 형질전환시키고, 수득된 형질전환체를, pUC19 폴리 링커내 BamHI 부위가 yPDI 암호화 서열의 3' 말단에 인접하여 위치하는 적절한 배향으로 yPDI 삽입체를 갖는 플라스미드를 함유하는 것에 대해 스크리닝한다. BamHI 부위가 EcoNI 단편상의 yPDI ORF의 5' 말단에 이미 존재하기 때문에, 이 작제물(pUC19-yPDI)은 1.9kbp BamHI 단편상에 yPDI ORF를 함유하게 된다. pUC19-yPDI를 BamHI으로 분해하고, yPDI 유전자를 함유하는 1.9 BamHI kbp 단편을 결정제한 후 벡터 pUC18-GAL10p(B) ADHit(스톡 #401)(제6도)의 BamHI 부위내로 아클로닝한다. 수득된 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADHit(제7도)는 스톡 #1015이다. 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADHit를 SmaI, SphI 및 SacI으로 분해하고, 발현 카세트를 함유하는 2.7kbp SmaI-SphI 단편을 결정제하고, 평활-말단화한 후, pUKC171의 단일 StuI 부위내로 클로닝한다[pUKC171은, EcoRI 및 HindIII로 이미 분해된 pUC19내로 아클로닝된 Ylp600(참조: Barnes and Thorner, 1986, 상기)의 4.5kbp EcoRI-HindIII LYS2 단편을 함유한다] 그후, 수득된 pUKC171-GAL10p-yPDI 벡터를 EcoRI 및 PvuII로 분해하여, LYS2-GAL10p-yPDI-ADHit-LYS2 카세트를 절단시킨 후, 이를 에스. 세레비지에 균주 HJRY188 및 BJ1995를 형질전환하는데 사용한다. 수득된 lys 형질전환체를 실시에 9에 기술된 바와 같이 게놈 DNA 제제의 서던 블롯에 의해 평가한다. 각각의 균주의 분리물은 LYS2 좌에 통합된 GAL10p-yPDI 카세트를 갖는 것으로 발견되었다. 수득된 균주를 BJ1995/yPDI 및 JRY188/yPDI (균주 #1152)로 지정한다.

[실시에 14]

[URA3 좌에 통합된 발현 카세트로부터 효모 PDI를 과잉 생산하는 효모 균주의 작제]

플라스미드 pUC-Not-URA3(실시에 8)를 ApaI 및 NcoI(URA3 유전자의 부위를 결실시키기 위해)으로 분해하여 평활-말단으로 만든다. 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADHit를 EcoRI, ScaI, 및 SphI으로 분해하고, GAL10p-yPDI-ADHit 발현 카세트를 함유하는 2.8kbp EcoRI-SphI 단편을 결정제하고, 평활-말단화하여, 상기 벡터 단편과 연결시켜, 플라스미드 pNU-GAL10p-yPDI를 수득한다. URA3-GAL10p-yPDI-ADHit-URA3 통합

카세트를 pNU-GAL10p-yPDI 로부터 NotI로 분해하여 절단시킨다. 수득된 선형 단편을 효모 균주 KHY107을 형질전환하는데 사용한다. Ura<sup>-</sup>형질전환체를 5-플루오로-오로틴산을 함유하는 고체 배지상에서 선별한다[참조: Boeke et al., 1984, Mol. Gen. Genet., 197, pp345]. 수득된 ura<sup>-</sup>형질전환체로부터 게놈 DNA를 BglII로 분해하고, 탐침으로서 GAL10p-yPDI-ADH1 카세트로부터의 방사 표지된 EcoRI-PvuII 단편을 사용하여 서던 블롯에 의해 평가한다. URA3에서 목적하는 GAL10p-yPDI-ADH1 발현 카세트가 통합된 분리물을 동정한다. 분리물 K-Y1은 URA3에 통합된 다중 복제물을 갖는다(균주 #1136). 분리물 K-Y3은 URA3에서 통합된 하나의 복제물을 갖는다(균주 #1137).

#### [실시에 15]

##### [재조합 숙주내 PDI 단백질 수준의 평가]

효모 균주를 3x YEPD액체 배지내에서, 23°C에서 24시간 성장시킨다. 이후, 배양물에 갈락토스를 보충하여 최종 농도 4.8%를 수득한다. 그런 다음 배양물을 23°C에서 추가로 24시간 재배양한다. 다른 방법으로, 효모 균주를 3x YEPD에서 30°C로 24시간 동안 배양한다. 세포를 수거하고 냉 멸균수로 세척후, 동일 용적의 3x YEPD-갈락토스 배지중에 재현탁한다. 효모 균주를 추가로 16 내지 25시간동안 배양한 후, 이를 수거하여 추출 방법 2(하기)에 의해 단백질을 추출한다.

##### [단백질 추출]

문헌[참조: Mellor et al., (1983, Gene, 24, pp. 1-14)]에 기술된 바와 같이, 유리 비이드를 사용하여 단백질을 지수적으로 성장하는 세포 또는 정지상 세포로부터 추출한다.

##### [방법 1]

단백질을 25mM 인산염 완충액(pH 7.0) 중 PMSF(0.5mM)의 존재하에, 세포벽을 유리 비이드 분해로 추출한 후, 동결-해동 사이클을 반복하여 가용성 단백질을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한다. PEG(고체), 황산암모늄(0-80%) 또는 한외여과막(100kDa)으로 농축하기 이전 또는 이후에, 소모된 배양액을 분석하여 분비를 초기에 평가한다. 단백질 농도를 문헌[참조: Bradford(1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248-254)]의 방법으로 측정한다.

##### [방법 2]

세포내 샘플을 방법 1과 같이 제조하는데, 단 배양 배지에 NaOH 및 β-머캅도에탄올(각각, 최종 농도 0.2M 및 1%)을 보충하고, 얼음상에서 약 10분간 정치시킨 후, TCA를 최종 농도 6%로 부가한다. 얼음상에서 30분간 정치시킨후, 단백질을 원심분리에 의해 회수하고, 냉아세톤으로 세척한 후, SDS-PAGE 로딩 완충액중 재현탁시킨다.

총 가용성 단백질 50μg을 일차원 SDS-PAGE(12% 폴리아크릴아미드) 및 쿠마시 블루 염색으로 분석한다[참조: Schultz et al., (1987, Gene, 54, pp. 113-23)].

하기 조건하에 전기영동한다.: 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 및 10μg단백질을 레인당 로딩시킨다(단백질 추출법 1). 시그마 예비염색된 분자량 표준을 모든 겔에서 전개시킨다. 겔을 바이오래드 미니-단백질 II 겔 시스템내에서 전개시킨다. 세포외 추출물을 단백질 농도를 평가하지 않고, 레인당 15 내지 20μl로 로딩한다. 전기영동중의 전압은 200볼트 이하로 유지한다.

단백질은 바이오메트라(Biometra) 세미-무수 웨스턴 블롯 시스템을 사용하여 니트로셀룰로스로 옮긴다. 니트로셀룰로스 막을 5%(w/v) 밀크 분말로 1시간 차단하고 세척후, 1:500 내지 1:750 범위의 희석비로 항 사람-PDI 폴리클로날 항체와 3시간 내지 밤새 배양한다. 막을 세척하고, 페옥시다제-결합된 항-토끼 IgG를 1:1000의 최종 희석비로 가한후, 1시간 동안 배양을 지속한다. 세척후, 블롯을 제조업체의 지시대로 애머샴(Amersham) ECL 키트를 사용하여 발생시킨다.

초기 검정은 균주 1072A가 웨스턴 블롯에 의해 검출가능한 수준에서 분비된 hPDI를 생성시킴을 나타낸다. 검출 수준은 사용된 ECL 프로토콜에 의하면 정제된 소 PDI 0.05μg이다. 이러한 분비된 PDI는 100kDa 절단 한외여과 막에 의해 보유되므로 이량체인 것으로 보인다. 균주 1072A 및 이의 상응하는 HDEL 변이체(1279)를 비교하는 경우, 사람 PDI가 양자에 의해 분비되어짐을 발견하였다. 이러한 실험에서 최종 배양/유도 조건을 성장 온도 및 유도 기간의 측면에서 최적화한다. 2개의 균주는 23°C에서 배양한 후 30°C에서 16시간 동안 유도하거나, 30°C에서 16시간 동안 배양하고 유도하는 경우 보다 높은 수준의 PDI를 합성한다.

#### [실시에 16]

##### [효모내 안티스타신 발현을 위한 벡터 제조]

안티스타신은 혈액 응고 인자 Xa의 강력한 단백질 억제제이다. 안티스타신(ATS)을 멕시코나 거머리 헤멘테리아 오피시 날리스(Haementeria officinalis)[참조: Nutt, E. et al., 1988, J. Biol. Chem., 263, pp. 10162-10167]의 침샘으로부터 분리한다. ATS를 암호화하는 cDNA를 연속적으로 분리하고 문헌[참조: Han, J. H. et al., (1989, Gene, 75, pp. 47-57)]에 의해 특성을 결정한다. ATS는 단백질이 생물학적 활성을 갖도록 정확하게 짝지어야 하는 10개 디설파이드 결합을 갖기 때문에, 재조합 효모에 의해 분비되는 이종 단백질내 적절한 디설파이드 결합의 형성 및 폴딩에 대한 증가된 수준의 PDI 활성 효과를 평가하기 위한 이상적인 리포터 단백질이다.

ATS는 갈락토스-유도성 GAL10 프로모터, 및 이종 단백질의 분비를 유도하기 위한 효모 MF α 1 프리-프로 분비성 리더 서열을 함유하는 발현 벡터 pKH4 α 2[참조: Jacobson, M.A. et al., 1989, Gene, 85, pp. 511-516]를 사용하여 효모내에서 발현된다. ATS에 대한 암호화 서열은 기질로서 클론 5C-4[참조: Han, J. H. et al; 상기]로부터의 아클로닝된 ATS cDNA 및 하기 올리고 뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 폴리머라제 쇄반응(PCR) 방법에 의해 분리한다:

1. 5'-ATATGGATCCTGTCCTTTGGATAAAAAGACAAGGAC

CATTTGGACCCCGGGTGT-3'

(서열확인번호: 18)

2. 5'-TATAGGATCCTTATGATAAGCGTGGGATAAGCTT-3'

(서열확인번호: 19)

2개의 프라이머는 BamHI 부위를 함유하여 PCR 생성물의 아클로닝을 용이하게 한다. 제1프라이머는 성숙한 ATS의 첫 번째 아미노산 잔기에 효모 KEX2 yscF엔도프로테아제 절단 부위(Lys-Arg) N-말단을 삽입한다(효모 yscF 엔도프로테아제는 이 서열에서 Lys-Arg 부위의 C-말단부를 상에서 절단한다). PCR 생성물을 BamHI로 절단하고, 겔 정제한 후, BamHI-분해된 pH4 $\alpha$ 2로 연결시켜, pH4 $\alpha$ 2/ATS(K991)을 수득한다(제 8도). 그런 다음, 이 발현 벡터를 사용하여, 스페로플라스트 방법을 사용하여, 표 1의 효모 숙주 균주를 형질전환시킨다[참조: Hinnen. et al., 1978, 상기].

형질전환체를 류신 결여된 합성 고체 배지상에서 선별하고[참조: Schultz, L. et al., 1987; Gene, 61. pp. 123-133], 후속 분석에 사용되는 클론 분해물을 위해 스트리킹한다. 균주를 17% 글리세롤 함유 합성 배지내 -70°C에서 저장하여 보존한다.

[표 1]

형질전환 균주*	숙주 균주	공급원	PDI <sup>†</sup> 카세트
960	239	JRY188	없음
1105	1072A	JRY188	$\alpha$ -hPDI
1176	1157	JRY188	ySP-hPDI
1175	1148	JRY188	hSP-hPDI
1293	1279	JRY188	$\alpha$ -hPDI (HDEL)
1294	1267	JRY188	hSP-hPDI (HDEL)
1295	1268	JRY188	ySP-hPDI (HDEL)
1177	1152	JRY188	yPDI
1156	548	KHY107	없음
1154	1136	KHY107	yPDI-A1
1155	1137	KHY107	yPDI-A3

PDI카세트 및 균주는 하기와 같이 실시예에 기술됨:

$\alpha$ -yPDI, 실시예 9; ySP-yPDI 및 hSP-yPDI, 실시예 10; hSP-hPDI(HDEL) 및 ySP-yPDI(HDEL), 실시예 11;  $\alpha$ -hPDI(HDEL), 실시예 12; yPDI, 실시예 13; yPDI-A1 및 yPDI-A3, 실시예. \*형질전환 균주는 K911 안티스타시 발현 벡터를 함유한다.

[실시예 17]

[안티스타신 분비를 위한 친주 및 PDI 과잉생산 균주의 성장 및 평가]

K991-형질전환 JRY188 친주 및 효모 또는 사람 PDI를 과잉생산하는 다양한 형질전환 변이체를 하기 방법에 따라 안티스타신 분비에 대해 평가한다. 지시된 균주를 -70℃ 냉동 글리세롤 스톱으로부터 휴식-결핍된 합성 아가 평판상으로 스트리킹하여, 30℃에서 3일간 성장시킨다. 3xYEH[ $\ell$  당, Difco 효모 추출물 60g, HySoy 펩톤 30g, 글루코스 48g] 5m $\ell$ 를 함유하는 배양 튜브(18x150mm) 배지를 적은 루프 분량의 세포로 접종하고 조직 배양 롤러 드럼상에서 23℃로 약 18시간 동안 배양한다. 이 단계에서, 최종농도 4.8%(w/v)로 갈락토스를 부가하여 세포를 유도하고 배양물을 23℃에서 추가로 5일간 배양한다. 그 후 원심분리기에 의해 세포를 수거하고, 정화된 배지 상등액을 안티스타신 활성의 검정을 위해 보존시킨 후, 인자 Xa 활성 억제에 의해 안티스타신 활성을 측정한다[참조: Nutt, E. et al., 1988, 상기]. 실험을 3회 수행하며, 결과가 표 2에 요약되어 있다.

[표 2]

균주	ng ATS/1.00D	상대 수준
JRY188	25.6	1.0
JRY188/hSP-hPDI	24.4	0.95
JRY188/ySP-hPDI	28.4	1.11
JRY188/ $\alpha$ -hPDI	77.2	3.0
JRY188/yPDI	65.1	2.54

[실시에 18]

[JRY188 및 사람 PDI의 HDEL 돌연변이체를 과잉생산하는 관련 균주에 의한 안티스타신 분비의 평가]

K991-형질전환된 JRY188 및 3개의 상이한 분비성 리더를 갖는 사람 PDI의 HDEL 돌연변이부를 과잉생산하는 형질전환된 유도체 균주를 실시에 17에 기술된 바대로 성장시키고, 정화된 배지 상등액을 실시에 17에 기술된 바와 같이 인자 Xa 억제 검정에 의해 분비된 ATS의 수준을 평가한다. 결과는 표 3에 나타나 있다.

[표 3]

균주	ng ATS/1.00D	상대 수준
JRY188	18.0	1.0
JRY188/hSP-hPDI(HDEL)	27.5	1.53
JRY188/ySP-hPDI(HDEL)	29.3	1.63
JRY188/ $\alpha$ -hPDI(HDEL)	31.3	1.74

[실시에 19]

[효모균주 KHY107 및 효모 PDI를 과잉생산하는 유도체에 의한 안티스타신의 분비]

K991-형질전환된 KHY107 및 효모 PDI를 과잉생산하는 이의 형질전환된 유도체를 성장시키고, 정화된 배지 상등액을 실시예 17에 기술된 바와 같이 인자 Xa 억제 검정에 의해 분비된 ATS의 수준을 평가한다. 결과는 표 4에 요약되어 있다.

[표 4]

균주	ATS(mg/L)	A600	ATS/A600
KEY107 A1	0.314	23.9	0.013
KEY107 A2	0.244	24.5	0.010
KEY107 A3	0.334	25.5	0.013
K-Y1 A1	1.168	24.8	0.047
K-Y1 A2	1.469	21.8	0.067
K-Y1 A3	1.483	25.3	0.059
K-Y3 A1	2.856	39.0	0.099
K-Y3 A2	2.144	51.2	0.042
K-Y3 A3	1.920	48.0	0.040

K-Y1은 URA3에서 GAL-yPDI 다중 복제물을 갖는 KHY107이다.

K-Y3은 URA3에서 GAL-yPDI 단일 복제물을 갖는 KHY107이다.

A1, A2 및 A3은 동시에 평가한 지시된 균주의 상이한 클론 분리물이다.

효모 PDI의 과발현으로, 분리물 K-Y3-A1에 있어, 세포 기준으로 ATS 분비 활성이 4배 증가했고, 용적 기준으로 약 9배 증가되었다.

[실시예 20]

[다중복제 플라스미드로부터 효모 PDI 또는 사람 PDI를 과잉생산하는 효모 숙주 균주의 작제]

다중복제 효모 셔틀 벡터 YEp24[참조: Botstein, D. et al., 1979, 8, pp. 17-24]는 효모 2 $\mu$  DNA 복제원 및 우라실 결핍 합성 배지상 선별을 위한 효모 URA3유전자를 함유한다. YEp24를 BamHI로 분해하고, 수득된 7.8kbp BamHI 벡터 단편을 겔 정제한다(단편 a). 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADH1t(#1015)를 EcoRI, SphI 및 ScaI로 분해하고, GAL10p-yPDI-ADH1t 발현 카세트를 함유하는 수득된 2.8kbp EcoRI-SphI 단편을 겔 정제한다(단편 b). 플라스미드 pUK161을 EcoRI 및 HindIII로 분해하고, GAL1p-MF $\alpha$ 1 프리-프로-사람 PDI 발현 카세트를 함유하는 2.8kbp EcoRI-HindIII 단편을 겔 정제한다(단편 c). 상기 3개의 단편을 평활-말단화한 후 하기와 같이 함께 연결시킨다: (1) 벡터 단편 a 및 단편 b를 함께 연결하여 플라스미드 YEp24-GAL10p-yPDI를 수득한다(제9도); (2) 벡터 단편 a 및 단편 c를 함께 연결하여 플라스미드 YEp24-GAL1p-MF $\alpha$ -hPDI를 수득한다(제10도). 2개 수득된 플라스미드 DNA의 대규모 CsCl 제제를 제조한다. 2개의 별개의 형질전환 반응에서, 효모 균주 JRY188을 ATS 발현 벡터 K991(실시예 16) 및 YEp24-GAL10p-yPDI 또는 Yep24-GAL1p-MF $\alpha$ -yPDI로 동시형질전환시킨다.

두 플라스미드를 모두 함유하는 형질전환체를 루이신과 우라실이 모두 결여된 합성 배지상에서 선별해내고 분리시킨 단일 클로니들을 클론성 분리물의 선별을 위한 동일한 배지상에 재스트리킹한다. 각각의 두 가지 최초 동시형질전환에 대한 다섯가지 상기 클론성 분리물을 배양 튜브중의 5ml의 3xYEHD 배지 중에 접종시키고 조직 배양 롤러 배지중의 23°C에서 24시간 동안 배양시킨다. 배양 말기에, 최종농도 4.8%로 갈락토스를 가하고, 배양물을 23°C에서 추가로 5일간 배양시킨다. 원심분리시켜 세포를 제거하고 투명화시킨 배지상등액을 인자 Xa 억제검정에 의해 ATS 활성 수준에 대해 검정한다. YEp24-GAL10p-yPDI 플라스미드+ATS발현 벡터를 함유하는 동시형질전환체들은, ATS 발현 벡터만을 함유하는 JRY188 친주와 비교하여, 분리물에 따라 3- 내지 26-배 높은 수준의 분비된 ATS 활성을 나타내었다. Yep24-GAL1p-MF $\alpha$ -hPDI 플라스미드 + ATS발현 벡터를 함유하는 동시형질전환체는 ATS 발현벡터만을 함유하는 JRY188 친주와 비교하여 2- 내지 3-배 높은 수준의 분비된 ATS 활성을 나타내었다.

[실시예 21]

[목적하는 이중 단백질의 발현에 사용한 것과 동일한 발현 벡터로부터 효모 또는 사람 PDI를 과잉생산하는 효모 숙주 균주의 작제 및 평가]

에스. 세레비치에 GAL1 및 GAL10 유전자는 두가지 프로모터에 대한 TATA박스사이에 위치해있는 분기성(divergent) GAL1 및 GAL10 프로모터와 통상의 GAL4 결합 도메인을 함유하는 두가지 구조 유전자간의 영역으로부터 분기적으로 전사시킨다. 플라스미드 pBM272[참조: Johnston, M. and Davis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440]는 이 분기성 효모 GAL1-GAL10 프로모터를 0.85kbp 길이의 EcoRI-HindIII 단편 상에 함유한다(HindIII 부위에 인접한 내부 BamHI 부위와 함께). 이 프로모터 단편은 다음의 특성을 갖고

있는 분기성 프로모터 카세트 벡터 pUC-GAL1/10을 작제하는데 사용된다: 효모 GAL10 프로모터는 단일 EcoRI 및 SmaI 부위(이순서로)에 의해 효모 ADH1 전사 터미네이터(0.35kbp 길이의 HindIII-SphI 단편)로부터 분리된다. 효모 GAL1 프로모터는 단일 BamHI 및 HindIII 부위에 의해 ADH1 전사 터미네이터의 제2복제물로부터 분리된다. 두 ADH1 터미네이터 요소의 3'-말단은, 전체 발산성 프로모터 발현 카세트를 SphI 단편으로 분리할 수 있도록 허용하기 위해, SphI 부위에 의해 플랭킹되어 있다. 이 플라스미드에서의 벡터 기본 골격은 폴리링커 대신에 상기 발현 카세트를 갖고 있는 pUC18이다.

플라스미드 pUC-GAL1/10을 BamHI으로 분해시키고 겔-정제하여 단편 a를 생성시킨다. 플라스미드 pUKC161을 BamHI으로 분해시키고 완전한 사람 PDI 암호화서열에 프레임-유지 융합된  $\alpha$  인자 프리-프로 리더를 함유하는 1.9kbp의 BamHI 단편을 겔-정제시키고 벡터 단편 a에 연결시켜 플라스미드 pUC-GAL1/10-yPDI를 수득하는데, 여기에서  $\alpha$  인자 프리-프로-yPDI 융합물의 발현이 GAL1 프로모터의 조절하에 있게된다. 플라스미드 pUC18-GAL10p-yPDI-ADH1t(실시예 13)를 BamHI으로 분해시키고 효모 PDI를 암호화하는 서열을 갖는 생성된 1.7kbp BamHI 단편을 겔-정제시킨 후 벡터 단편 a와 연결시켜 GAL1 프로모터가 효모 PDI의 발현을 지시하게되는 플라스미드 pUC-GAL1/10-yPDI를 수득한다. 그후 생성된 이들 두 플라스미드를 EcoRI으로 분해시키고 평활-말단을 만들어 각각 hPDI 및 yPDI 카세트를 지니는 벡터 단편 b와 c를 수득한다.

ATS 발현 벡터(K991)를 SalI 및 BclII로 분해시키고, 성숙한 ATS dp 대한 암호화 서열에 대해 프레임-유지 융합된  $\alpha$  인자 프리-프로 리더를 지니는 SalIII-BglIII단편을 겔-정제시켜 평활 말단을 만들어 별도의 반응에서 두 개의 평활-말단 벡터 단편 b와 c에서 결합시킨다. 제한지도 분석에 의해 밝혀진 바와 같은 정확한 구조를 갖는 생성된 플라스미드를 각각 pUC-GAL1/10-hPDI/ATS(제11도) 및 pUC-GAL1/10-yPDI/ATS(제12도)로 나타낸다. 그후 이들 두 플라스미드를 SphI으로 분해시키고 발현카세트를 방출시키며 hPDI- 또는 yPDI- 관련 발현 카세트를 지니는 단편을 앞서 SphI으로 분해시킨 효모 셔틀 벡터 pCI/1과 결합시킨다(참조: Rosenberg, S. et al., 1984, Nature, 312, pp. 77-80). 이로써 생성되는 두 플라스미드 pCI/1-Gal1/10-hPDI/ATS 와 pCI/1-Gal1/10-yPDI/ATS를 수득하며, 여기에서 ATS와 PDI-관련 발현 카세트는 각각 GAL10 및 GAL1 프로모터의 조절하에 있는 동일한 높은 복제수의 벡터상에 존재한다.

그후 이들 두 발현 벡터를 효모 균주 JRY188, BJ1995 및 기타 적절한 효모속주 균주를 형질전환시키는데 사용한다. 형질전환체는 루이신-결핍 배지상에서 선별하고, 선별된 형질전환체를 선행실시에에서 기술한 바와 같이 ATS와 PDI의 발현/분비에 대해 평가한다.

표 5(하기)에 나타낸 결과는 hPDI를 과잉생산하는 분리물이 단지 pH4  $\alpha$ 2/ATS 만을 함유하는 대조군 균주에 비해 수배 높은 수준의 안티스타신을 분비함을 분명히 보여주고 있다. 게다가, 효모 PDI를 과잉생산하는 분리물은 대조군 균주보다 3 내지 17배 높은 수준의 안티스타신을 분비한다.

[표 5]

작제물	안티스타신(mg/L)*
pCI/1-GAL1/10-hPDI/ATS	
분리물 1	4.7
분리물 2	5.3
분리물 3	3.9
분리물 4	4.6
분리물 5	5.1
pCI/1-GAL1/10-hPDI/ATS	
분리물 1	3.9
분리물 2	11.7
분리물 3	5.8
분리물 4	26.0
분리물 5	8.2
JRY188 대조군	1.5

\*23°C에서 5일의 후-유도후의 수율

## [실시에 22]

[PDI 과잉생산 효모숙주 균주에 의한 증가된 안티스타신 분비에 대한 온도의 영향]

안티스타신 발현벡터 pKH4  $\alpha$ 2/ATS 및 YEp24-GAL1p-MF  $\alpha$ -hPDI 또는 YEp24-GAL10p-yPDI로 동시형질전환시킨 균주 JRY188의 선별된 분리물을 23°C 또는 30°C에서 성장시킨 후 안티스타신 분비에 대해 평가한다. 안티스타신 발현 벡터만으로 형질전환시킨 친주 JRY188을 병행시켜 성장시킨다. 23°C 또는 30°C에서 3xYEDH 배지중에서 밤새 성장시킨 후, 세포 배양물을 최종 농도 4.8%로 갈락토스를 가하여 유도하고 필요에 따라 23°C 또는 30°C에서 추가로 5일간 증식시킨다. 3 내지 5일후 유도기에 수거한 배지 샘플을 인자 Xa 억제 분석에 의해 분비된 안티스타신 수준에 대해 평가한다. 표 6에 나타난 결과는 3일 및 5일의 후-유도 모두에서 PDI를 과잉생산하는 모든 분리물에 대해 안티스타신 발현이 30°C보다 23°C에서 현저하게 높음을 뚜렷이 보여주고 있다.

[표 6]

분리물*	온도(°C)	안티스타신(mg/L)	
		3일	5일
hPDI-1	23	0.83	2.11
hPDI-2	23	1.14	2.68
yPDI-1	23	5.93	10.25
yPDI-3	23	3.00	15.92
JRY188 대조군	23	0.38	0.65
hPDI-1	30	0.49	0.47
hPDI-2	30	0.42	0.47
yPDI-1	30	2.29	4.65
yPDI-3	30	2.71	2.56
JRY188 대조군	30	0.34	0.30

여러가지 hPDI 분리물은 안티스타신 발현벡터 K991 및 YEp24-GAL1p-MF  $\alpha$ -hPDI 모두를 함유한다. yPDI 분리물은 벡터 K991과 YEp-24-GAL10p-yPDI 모두를 함유한다.

## [실시에 23]

[PDI를 과잉생산하는 재조합 효모 균주에 의한 진드기 항응고 펩타이드(TAP)의 분비]

진드기 항응고 펩타이드(TAP)는 강력한 고도로 선택적인 혈액응고인자 Xa 억제제이다[참조: Waxman, L. et al., 1990, Science, 248, pp. 593-596]. TAP는 진드기 오르니티도로스 모우바타(Ornithodoros moubata)로부터 분리된 신규한 세린프로테아제 억제제이다. TAP는 6개의 시스테인 잔기를 포함하는 60개 아미노산으로 구성되어 있다[참조: Waxman, et al., 1990, 상기 참조]. TAP는 갈락토스-유도성 GAL10 프로모터와 TAP를 암호화하는 합성 유전자에 프레임-유지 융합된 효모 MF  $\alpha$ 1 프리-프로 분비성 리더 서열을 함유하는 발현벡터 pKH4-TAP로 효모 중에서 발현시킨다[참조: Neeper, M. et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, pp. 17746-17752]. 이 벡터는 프리-프로리더의 아미노산 79의 위치에 위치한 BamHI 클로닝 부위의 존재로 인해 약간 변형된 MF  $\alpha$ 1 프리-프로 리더 서열을 함유한다[Neeper et al., 1990, 상기 참조].

두 번째 TAP 발현 벡터 pKH4-3B/TAP를 작제하며 이는 TAP를 암호화하는 합성 유전자로 프레임-유지 융합된 고유한 MF  $\alpha$ 1 프리-프로 리더 서열을 함유한다. 합성 TAP 유전자를 함유하는 플라스미드 pKH4-TAP(Neeper et al., 1990, 상기 참조)를 각각 5'- 및 3'-말단의 합성 TAP 유전자를 변경시키기 위해, 다음의 두가지 올리고-뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 폴리머라제 체 반응(PCR)에서 DNA 주형으로서 사용한다:

5'-TACAACCGTC TGTGCATCAA-3' (서열확인번호: 20) 및

5'-ACTGGATCCG AATCAAGCT TAGATGCAAG CGT-3' (서열확인번호: 21)

PCR 반응을 당해 분야에 숙련자에게 공지된 방법으로 수행한다[참조: Innis, M.A., et al., editors, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego CA]. 생성된 PCR 생성물을 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제로 인산화시키고 BamHI으로 분해시키며 겔-정제하여 TAP 암호화 서열의 정확한 5' 말단에 평활 말단을 지니며 해당 종결 코돈의 3'-측 말단에 접착성 BamHI 말단을 갖는 0.2kbp의 평활-BamHI 단편을 수득한다.

벡터 pKH4-3B[참조: Hofmann, K. and Schultz, L.D., 1991, Gene, 101, pp. 105-111]는 MF $\alpha$ 1 프리-프로 리더 암호화 서열의 3'-말단에 단일 SphI 부위를 함유한다. pKH4-3B를 SphI으로 분해하고, T4 DNA 폴리머라제 처리하여 평활-말단화한 후, BglII로 분해한다. 생성된 평활-BglII 벡터 단편을 겔-정제하고 전술한 0.2kbp 평활-BamHI TAP 단편에 결합시켜 벡터 pKH4-3B/TAP를 수득한다.

다른 별도의 형질전환 반응에서, 효모균주 BJ1995, JRY188 및 U9를 벡터 YEp24-GAL10p-yPDI 와 pKH4-TAP 또는 pKH4-3B/TAP로 동시형질전환시킨다. 두 플라스미드를 함유하는 동시형질 전환체를 루이신과 우라실 모두가 결여된 합성 배지상에서 선별하고 분리된 단일 콜로니를 클론성 분리물의 선별을 위해 동일한 배지상에 재스트리킹 한다. 각각의 상이한 벡터/숙주 동시 형질전환체에 대한 3개의 이 같은 클론 분리물을 우라실이 없으며 (5xLeuUra) 배양 튜브중 4%의 글루코스를 함유하는 5ml의 변형시킨 5xLeu배지에 접종한다. 이 배양물을 조직 배양용 롤러 드럼중에서 30°C에서 24시간 배양한다. 배양말기에 원심 분리시켜 세포를 수거하고 4% 갈락토스를 함유하는 5ml의 5xLeuUra 배지중에 재현탁시킨다. 생성된 배양물을 30°C에서 추가로 48시간 동안 배양한다. 그후, 세포를 원심분리시켜 정제하고 정화시킨 배지 샘플을 SCX-HPLC 또는 인자 Xa 억제 검정에 의해 분비된 수준에 대해 평가한다[참조: Waxman et al., 1990 상기 참조]. 다른 방법으로서, 재조합 효모세포를 23°C에서 24시간 성장시키고 최종농도 4%로 갈락토스를 가하여 유도한 후 23°C에서 추가로 5일간 배양한다. 그후 정화시킨 배지 샘플을 상기한 바와 같이 분비된 TAP의 수준에 대해 평가한다.

서열리스트

(1) 일반 정보:

(i) 출원인: 로날드 더블류 엘리스

로렌 디. 솔츠

헨리 제트. 마르쿠스

마이클 에이치. 튜트

로버트 프리드먼

도나 엘. 몽고메리

(ii) 발명의 명칭: 사카로마이세스 세레비지애에 의한 디설파이드 결합 재조합 단백질의 분비를 증가시키는 방법.

(iii) 서열 수: 21

(iv) 통신 주소:

(A) 수신자: 머크 앤드 캄파니, 인코포레이티드

(B) 거리: 피. 오. 박스2000

(C) 도시: 라웨이

(D) 주: 뉴 저지

(E) 국가: 미합중국

(F) 우편번호: 07065

(v) 컴퓨터 판독형

(A) 매체형: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환

(C) 운영체제: PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어: 파텐틴 릴리즈 #1.0, 비전 #1.25

(vi) 현출원 데이터:

(a) 출원번호:

(b) 출원일:

(c) 분류번호:

(viii) 변리사/대리인 정보:

(A) 명칭: 존 더블유. 왈렌

(B) 등록번호: 35,403

(D) 참조/도켓 번호: 18469

(ix) 전신전보 정보:

(A) 전화: (908)594-3905

(B) 팩시밀리: (908)594-4720

(2) 서열확인번호: 1의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 6아미노산

(B) 타입: 아미노산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: 펩타이드

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 1:

Trp Cys Gly His Cys Lys

1

5

(2) 서열확인번호: 2의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 4아미노산

(B) 타입: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: 펩타이드

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 2:

His Asp Glu Leu

1

(2) 서열확인번호: 3의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 10아미노산

(B) 타입: 아미노산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: 펩타이드

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 3:

Trp Cys Gly Pro Cys Lys

1

5

(2) 서열확인번호: 4의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 10아미노산

- (B) 타입: 아미노산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: 펩타이드  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 4:

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys

1

5

10

- (2) 서열확인번호: 5의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 30 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 5:

CTTACAGTGA CCACACCATG GAGCGTAGAA 30

- (2) 서열확인번호: 6의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 26 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 6:

AATTGCGGCC GCAAGCTTGC GGCCGC 26

- (2) 서열확인번호: 7의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 26 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 7:

AGCTGCGGCC GCAAGCTTGC GGCCGC 26

- (2) 서열확인번호: 8의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 15 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산

- (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 8:

AATTCGTTGA CGCCC

15

- (2) 서열확인번호: 9의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 15 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 9:

TCGGGGGCGT CAACG

15

- (2) 서열확인번호: 10의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 73 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 10:

GATCCACAAA ACAAAATGCT GGGCCCGGCT CTGCTGTGCC TGCCGTGGTC CGCCCTGGTG 60

CGGGCCGACG CCC

73

- (2) 서열확인번호: 11의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 73 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산  
 (C) 본쇄성: 일본쇄  
 (D) 형태: 선형  
 (ii) 분자 타입: cDNA  
 (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 11:

TCGGGGGCGT CGGGCCGAC CAGGGCCGAC CACGGCAGGC ACAGCAGAGC GCGGGCAGC 60

ATTTTGTTTT GTG

73

- (2) 서열확인번호: 12의 정보:  
 (i) 서열 특성:  
 (A) 길이: 88 염기쌍  
 (B) 타입: 핵산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 12:

GATCCACAAA ACAAAATGAA GTTTTCTGCT GGTGCCGTCC TGTCATGGTC CTCCTGCTG 60

CTCGCCTCCT CTGTTTTTCGC CGACGCC

88

(2) 서열확인번호: 13의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 88 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 13:

TCGGGGGCGT CGGCGAAAAC AGAGGAGGCG AGCAGCAGGG AGGACCATGA CAGGACGGCA 60

CCAGCAGAAA ACTTCATTTT GTTTTGTG

88

(2) 서열확인번호: 14의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 91 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 14:

GACGACCTCG AGGACCTCGA AGAAGCAGAG GAGCCAGACA TGGAGGAAGA CGATGACCAG 60

AAAGCTGTGC ACGATGAACT GTAAGGATCC G

91

(2) 서열확인번호: 15의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 95 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 본쇄성: 일본쇄

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 15:

AATTCGGATC CTTACAGTTC ATCGTGCACA GCTTCTGGT CATCGTCTTC 50

CTCCGTATCT GGCTCCTCTG CTTCTTCGAG GTCCTCGAGG TCGTC

95

(2) 서열확인번호: 16의 정보:

(i) 서열 특성:

- (A) 길이: 31 염기쌍
- (B) 타입: 핵산
- (C) 본쇄성: 일본쇄
- (D) 형태: 선형
- (ii) 분자 타입: cDNA
- (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 16:

GATCCACAAA ACAAATGAA GTTTTCTGCT G 31

- (2) 서열확인번호: 17의 정보:
- (i) 서열 특성:
- (A) 길이: 31 염기쌍
- (B) 타입: 핵산
- (C) 본쇄성: 일본쇄
- (D) 형태: 선형
- (ii) 분자 타입: cDNA
- (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 17:

GCACCAGCAG AAAACTTCAT TTTGTTTTGT G 31

- (2) 서열확인번호: 18의 정보:
- (i) 서열 특성:
- (A) 길이: 51 염기쌍
- (B) 타입: 핵산
- (C) 본쇄성: 일본쇄
- (D) 형태: 선형
- (ii) 분자 타입: cDNA
- (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 18:

ATATGGATCC TGTCTTTGGA TAAAAGACAA GGACCATTG GACCCGGGTG T 51

- (2) 서열확인번호: 19의 정보:
- (i) 서열 특성:
- (A) 길이: 34 염기쌍
- (B) 타입: 핵산
- (C) 본쇄성: 일본쇄
- (D) 형태: 선형
- (ii) 분자 타입: cDNA
- (xi) 서열 기재: 서열확인번호: 19:

TATAGGATCC TTATGATAAG CGTGGGATAA GCTT 34

- (2) 서열확인번호: 20의 정보:
- (i) 서열 특성:
- (A) 길이: 20 염기쌍
- (B) 타입: 핵산
- (C) 본쇄성: 일본쇄
- (D) 형태: 선형
- (ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 20:

TACAACCGTC TGTGCATCAA

20

(2) 서열확인번호: 21의 정보:

(i) 서열 특성:

(A) 길이: 33 염기쌍

(B) 타입: 핵산

(C) 본체성: 일본체

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 타입: cDNA

(xi) 서열 기재: 서열확인번호: 21:

ACTGGATCCG AATTCAAGCT TAGATGCAAG CGT

33

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

재조합 단백질 디설파이드 이소머라제를, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제와 다른 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 재조합 유전자와 함께 재조합 사카로마이세스 세레비지에 효모 숙주내에서 공동-발현시킴을 특징으로 하는, 디설파이드 결합된 재조합 단백질의 생체내 생산방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제 효소를 생산하는 재조합 사카로마이세스 세레비지에 효모 숙주가 단백질 디설파이드 이소머라제 효소를 암호화하는 재조합 발현 카세트의 복제물을 하나 이상 함유하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트를 사카로마이세스 세레비지에 효모 숙주 세포의 게놈내로 통합시키는 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트를 자가 복제 플라스미드상에 포함시키는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제는 하나 이상의 플라스미드상에 포함된 하나 이상의 발현 카세트에 의해 암호화되고, 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자는 하나 이상의 플라스미드상에 포함시키는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제는 하나 이상의 플라스미드상에 포함된 하나 이상의 발현 카세트에 의해 암호화되고, 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자는 사카로마이세스 세레비지에 효모 숙주 세포 게놈내로 통합시키는 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자를 사카로마이세스 세레비지에 효모 숙주 세포 게놈내로 통합시키는 방법.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트, 및 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자를 동일 플라스미드 상에 포함시키는 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자가 안티스타신인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자가 진드기 항응고 단백질인 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 효모 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 재조합 디설파이드 이소머라제가 포유동물 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 사람 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 14**

재조합 단백질 디설파이드 이소머라제를, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제와 다른 하나 이상의 분비성 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 재조합 유전자와 함께 재조합 사카로마이세스 세레비지애 효모 숙주내에서 공동-발현시킴을 특징으로 하는, 분비성 디설파이드 결합된 재조합 단백질의 생체내 생산방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 효모 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 포유동물 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 사람 단백질 디설파이드 이소머라제인 방법.

**청구항 18**

제14항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제 효소를 생산하는 재조합 사카로마이세스 세레비지애 효모 숙주가 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 재조합 발현 카세트의 복제물을 하나 이상 포함하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트를 사카로마이세스 세레비지애 효모 숙주 세포의 게놈내로 통합시키는 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트를 자가 복제 플라스미드상에 포함시키는 방법.

**청구항 21**

제14항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제는 하나 이상의 플라스미드상에 포함된 하나 이상의 발현 카세트에 의해 암호화되고, 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자는 하나 이상의 플라스미드상에 포함시키는 방법.

**청구항 22**

제14항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제를 암호화하는 발현 카세트, 및 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 암호화하는 재조합 유전자를 동일 플라스미드상에 포함시키는 방법.

**청구항 23**

제14항에 있어서, 재조합 사카로마이세스 세레비지애 효모 숙주를 30℃ 미만의 온도에서 성장시켜 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 발현시키는 방법.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 재조합 사카로마이세스 세레비지애 효모 숙주를 약 20 내지 26℃의 온도에서 성장시켜 하나 이상의 디설파이드 결합된 단백질을 발현시키는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 디설파이드 결합된 단백질이 안티스타신인 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 디설파이드 결합된 단백질이 진드기 항응고 단백질인 방법.

**청구항 27**

재조합 단백질 디설파이드 이소머라제 및 이러한 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제와 다른 하나 이상의 디설파이드 결합된 재조합 단백질을 공동-발현하는 사카로마이세스 세레비지애 효모 균주.

**청구항 28**

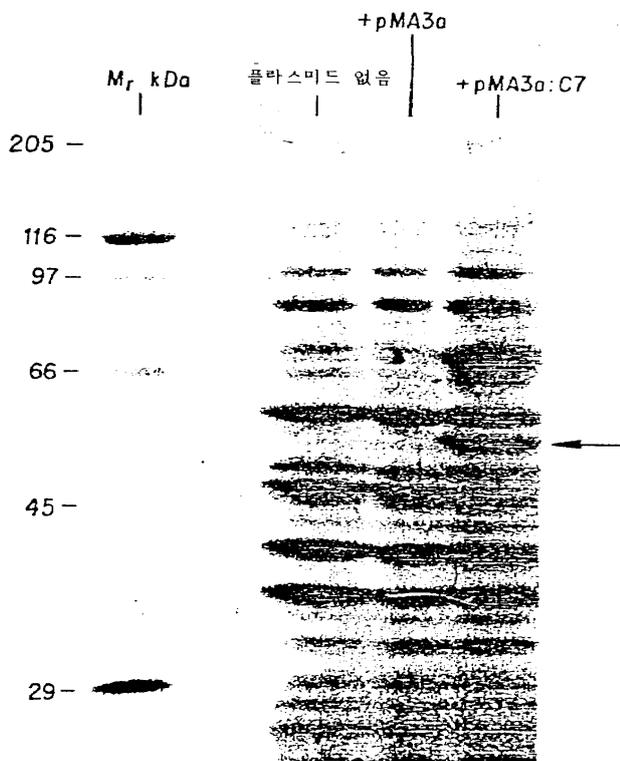
제27항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 사람 단백질 디설파이드 이소머라제인 균주.

**청구항 29**

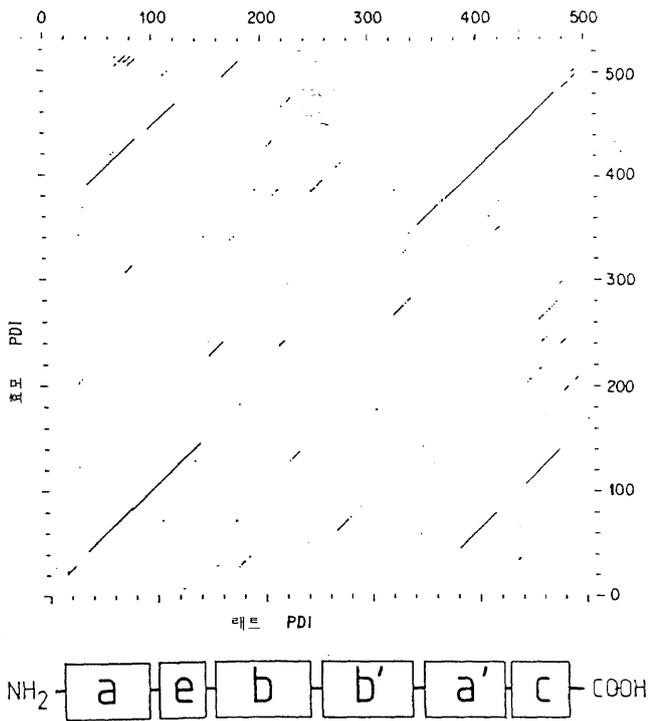
제27항에 있어서, 재조합 단백질 디설파이드 이소머라제가 효모 단백질 디설파이드 이소머라제인 균주.

**도면**

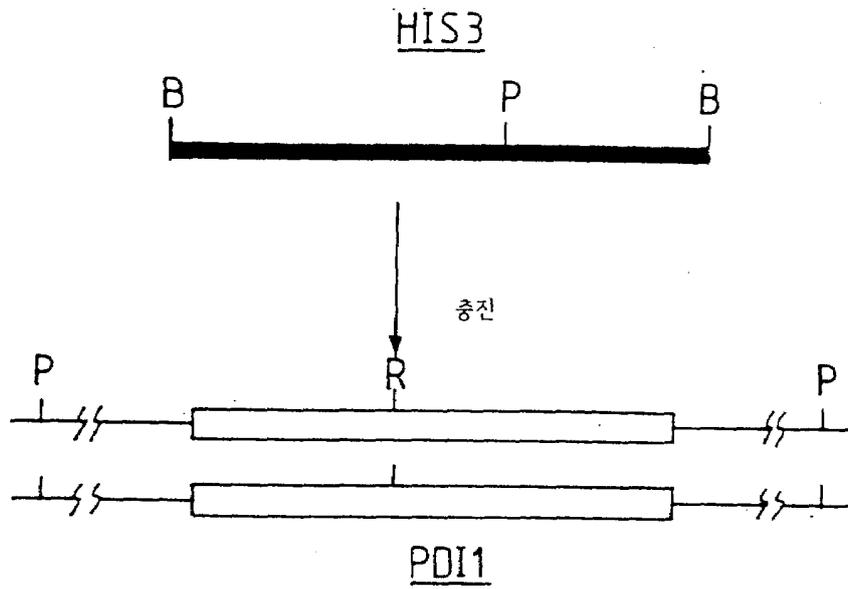
**도면1**



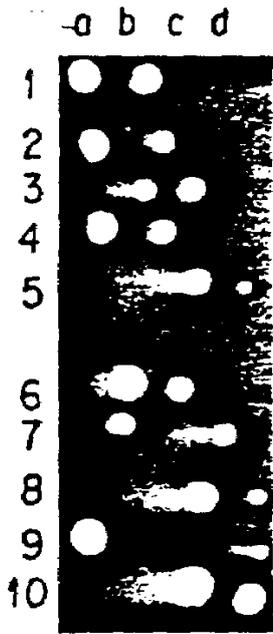
도면2



도면3a

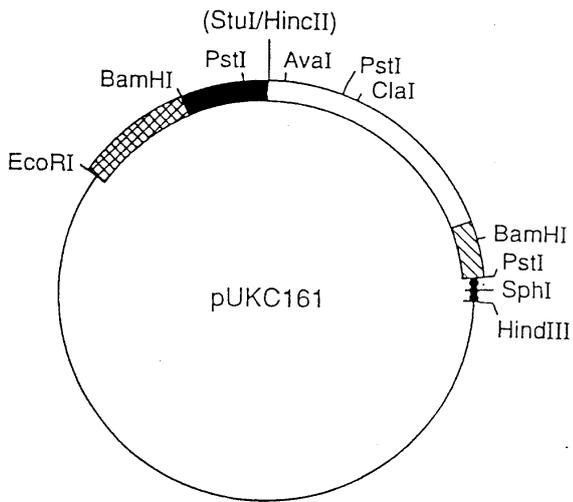


도면3b



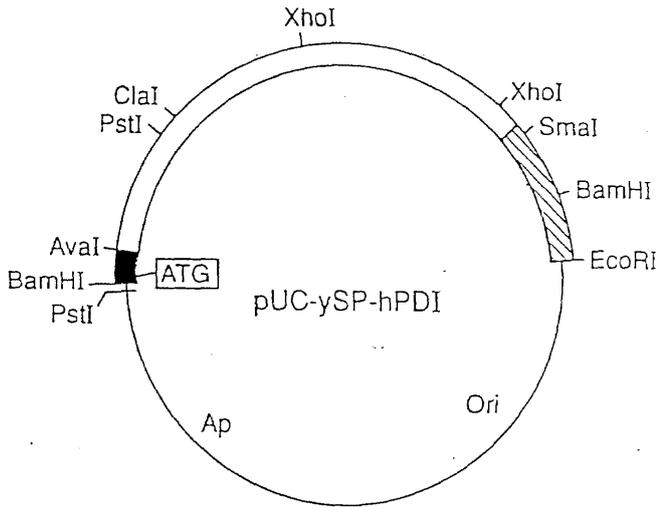
2 His<sup>r</sup>:2 사멸

도면4



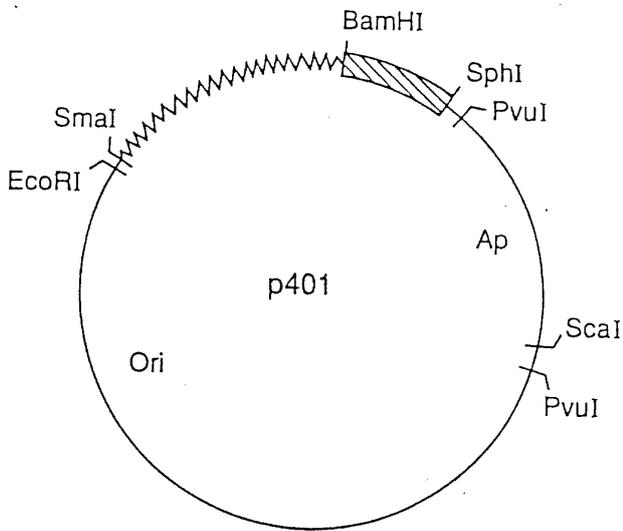
- pGS4
- ▨ 효모 GAL1 프로모터
- α- 인자 프리-프로 리더
- 상속한 hPDI 유전자
- ▤ hPDI 3'- 측면 DNA
- pUC18

도면5



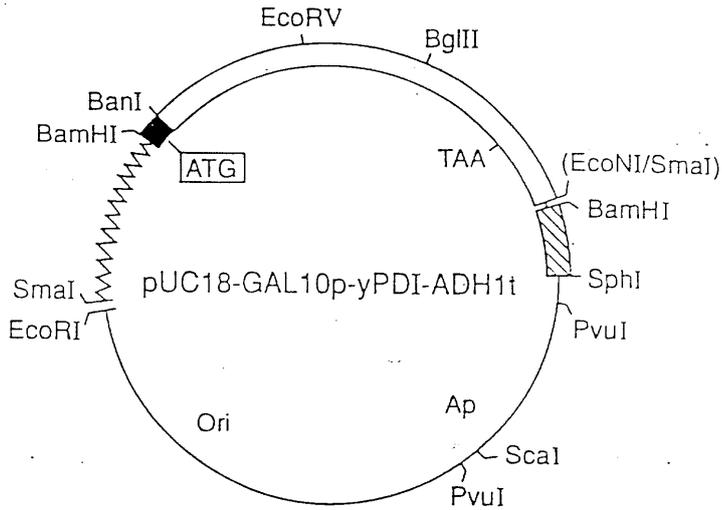
- pUC19
- 올리고 암호화 시그널 펩타이드
- 성숙한 사람 PDI 유전자
- ▨ hPDI 3'-측면 DNA

도면6



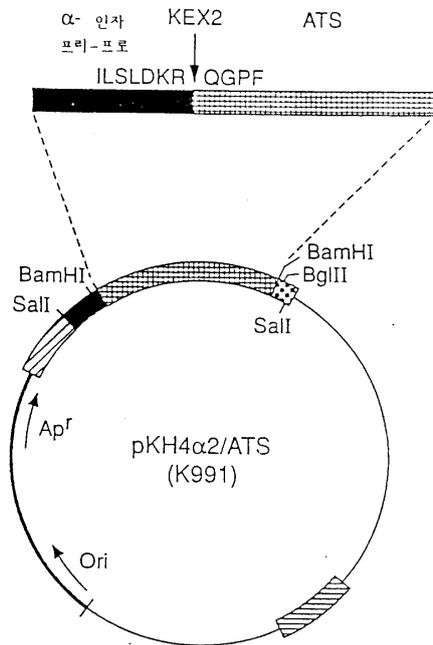
- ~~~~~ 효모 GAL10 프로모터
- ▨ 효모 ADH1 전사 터미네이터
- pUC18

도면7



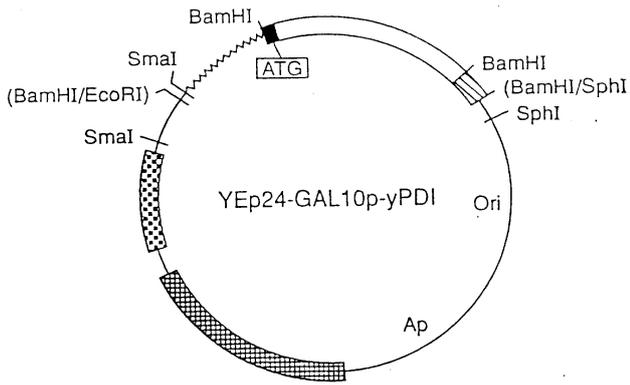
- ~~~~~ 효모 GAL10 프로모터
- yPDI 유전자 5'-말단의 재작제를 위한 올리고
- 효모 PDI 유전자
- ▨ 효모 ADH1 전사 터미네이터
- pUC18

도면8



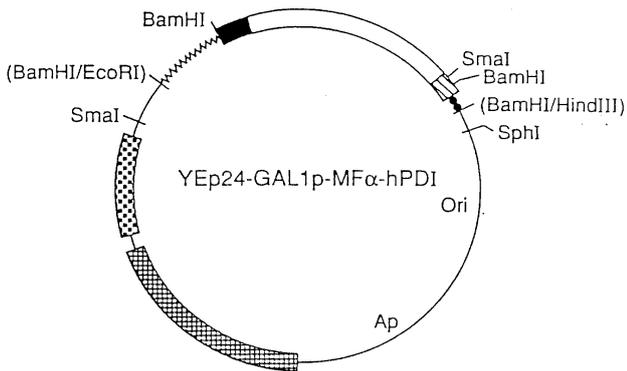
- ▨ 효모 GAL10 프로모터
- α-인자 프리-프로 리더
- ▤ 안티스타신 암호화 서열
- ▩ α-인자 전사 터미네이터
- 효모 2-μDNA
- ▨ 효모 LEU2-d 유전자
- pBR322

도면9



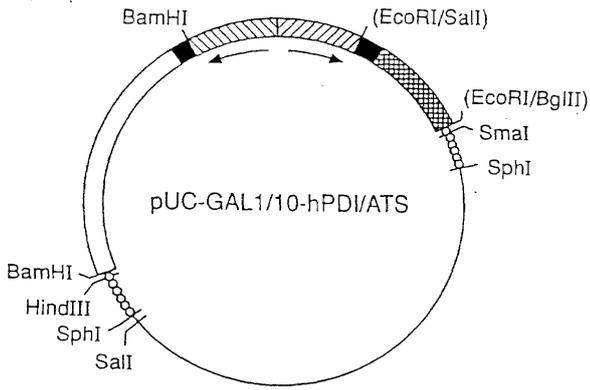
- ~~~~~ 효모 GAL10 프로모터
- 올리고
- 효모 PDI 유전자
- ▨ 효모 ADH1 전사 터미네이터
- pBR 322
- ▧ 효모 2- $\mu$  DNA
- ▣ 효모 URA3 유전자

도면10



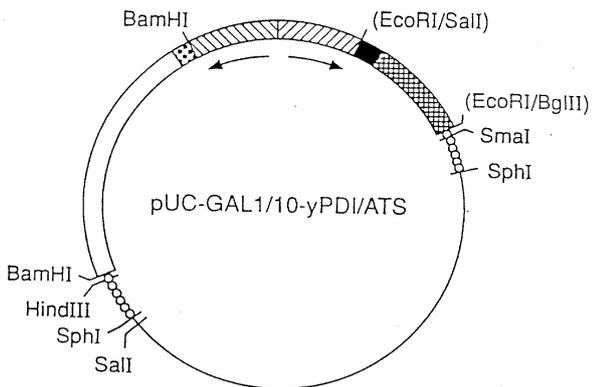
- ~~~~~ 효모 GAL1 프로모터
- $\alpha$ -인자 프리-프로 리더
- 성숙한 hPDI 유전자
- ▨ hPDI 3' 측면 DNA
- pUC18
- pBR322
- ▧ 효모 2- $\mu$  DNA
- ▣ 효모 URA3 유전자

도면11



- α- 인자 프리-프로 리더
- 성숙한 hPDI 유전자
- 안티스트레스 인자 유도 서열
- 효모 ADH1 전사 터미네이터
- GAL1 - GAL10 발산성 프로모터
- pUC18

도면12



- 폴리-U
- 효모 PDI 인자 유도 서열
- α-인자 프리-프로 리더
- 안티스트레스 인자 유도 서열
- GAL1 - GAL10 발산성 프로모터
- 효모 ADH1 전사 터미네이터
- pUC18