(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0063901
(43) 공개일자 2014년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/33 (2006.01) *A61K 47/42* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7012193(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년09월06일
심사청구일자 2014년05월07일
(62) 원출원 특허 10-2013-7009238
원출원일자(국제) 2005년09월06일
심사청구일자 2013년04월11일
(85) 번역문제출일자 2014년05월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2005/009554
(87) 국제공개번호 WO 2006/027207
국제공개일자 2006년03월16일
(30) 우선권주장
10 2004 043 009.8 2004년09월06일 독일(DE)

(71) 출원인
신텍신 리미티드
영국 옥스포드셔 오엑스14 3와이에스 애빙던 바톤 레인 더 쿼드런트 유닛츠 4-10
(72) 발명자
럼멜, 안드레아스
독일, 가르센 30826, 하우프트스트라세 192
(74) 대리인
최덕규

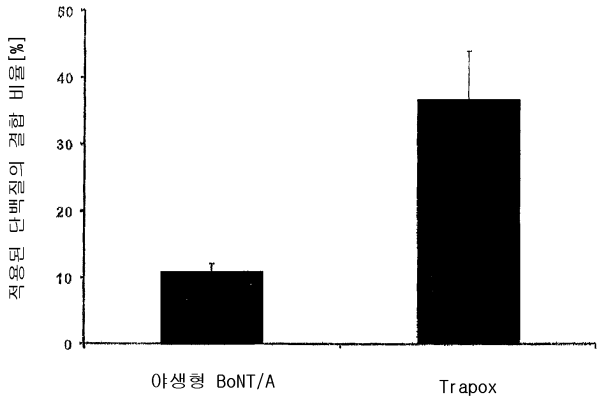
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 **화학 조성물을 신경세포로 도입하기 위해 사용되는 수송단백질**

(57) 요 약

본 발명은 클로스트리듐 보툴리눔에 의해 형성된 신경독의 중쇄 변형으로 얻을 수 있는 수송단백질에 관한 것이다. 상기 단백질은 천연 신경독보다 높은 친화도를 가지면서 신경세포와 특이적으로 결합한다. 또한 본 발명은 수송단백질과 수송단백질을 코딩하는 핵산 또는 그에 따른 약제학적 조성물이나 화장료(cosmetic) 조성물을 포함하는 수송단백질의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

클로스트리듐 보툴리눔(Clostridium Botulinum)에 의하여 형성되는 신경독의 중쇄 변이에 의해서 얻을 수 있고, 천연 신경독보다 높은 친화성을 가지고 신경세포에 결합하는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 특이적으로 신경세포에 결합하고 내포작용에 의하여 세포 내로 유입되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질은 플라즈마막에 편재하는 콜린성 운동뉴런의 복합 갱글리오시드, 바람직하게는 GT1b에 결합하는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 수송단백질의 갱글리오시드 결합영역이 증가된 친화력에 영향을 주면서 아미노산의 치환과 제거를 포함하는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 천연 신경독보다 최소 15% 이상의 친화도를 나타내고, 바람직하게는 최소 50% 이상, 더욱 바람직하게는 최소 80% 이상, 아주 바람직하게는 최소 90% 이상의 친화도를 나타내는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경독은 보툴리눔 신경독 A형(BoNT/A)인 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 보툴리눔 신경독 A형 단백질 염기서열의 아미노산 1092에서 1296 위치 사이에서 적어도 하나의 아미노산이 제거되거나, 자연적으로 발생한 또는 비자연적으로 발생한 다른 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 보툴리눔 신경독 A형 단백질 서열의 1117, 1202 내지 1204, 1252 내지 1254, 1262 내지 1267, 1270, 1278 내지 1279 위치에서 적어도 하나의 아미노산이 제거되거나, 자연적으로 발생한 또는 비자연적으로 발생한 다른 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 보툴리눔 신경독 A형 단백질 서열의 1117 위치의 아미노산이 제거되거나, 자연적으로 발생한 또는 비자연적으로 발생한 다른 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 치환된 아미노산은 알라닌, 시스테인, 글루탐산염, 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 세린, 트레오닌 또는 발린 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 치환된 아미노산은 알라닌, 시스테인 또는 발린인 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 1252 위치의 보툴리눔 신경독 A형 단백질 서열의 아미노산은 티로신으로 치환되거나 또는 1253 위치에서 리신으로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 보툴리눔 신경독 A형 단백질 서열의 1117, 1202 내지 1204, 1252 내지 1254, 1262 내지 1267, 1270 및 1278 내지 1279 위치로부터 선택된 두 개 또는 세 개의 아미노산은 제거되거나 치환되고, 상기 위치는 바람직하게 1117/1252, 1117/1253, 1117/1262, 1117/1278, 1117/1279, 1117/1252/1253, 보다 바람직하게는 Y1117A/F1252Y, Y1117A/H1253K, Y1117A/V1262I, Y1117A/L1278H, Y1117A/G1279N, Y1117C/F1252Y, Y1117C/H1253K, Y1117C/V1262I, Y1117C/L1278H, Y1117C/G1279N, Y1117V/F1252Y, Y1117V/H1253K, Y1117V/V1262I, Y1117V/L1278H, Y1117V/G1279N, Y1117A/F1252Y/H1253K, Y1117C/F1252Y/H1253K, 및 Y1117V/F1252/H1253K 위치로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 14

제4항에 있어서, 상기 클로스트리듐 보툴리눔 신경독 A형의 아미노산 1092 내지 1296 위치는 갱글리오사이드 결합 영역을 포함하고, 다음 서열로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질:

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 B형 단백질, 아미노산 1079 내지 1291 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 C_1형 단백질, 아미노산 1093 내지 1291 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 D형 단백질, 아미노산 1080 내지 1276 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 E형 단백질, 아미노산 1067 내지 1252 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 E형 단백질, 아미노산 1067 내지 1251 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 F형 단백질, 아미노산 1085 내지 1278 위치,

클로스트리듐 바라티 신경독 F형 단백질, 아미노산 1076 내지 1268 위치,

클로스트리듐 보툴리눔 신경독 G형 단백질, 아미노산 1087 내지 1297 위치.

청구항 15

제4항에 있어서, 상기 신경독 A형의 완전한 Hc-절편은 다른 신경독 형태들 중 하나의 완전한 Hc-절편으로 치환되며, 바람직하게는 상기 BoNT/A의 완전한 Hc-절편(아미노산 867 내지 1296)은 BoNT/B의 Hc-절편(아미노산 866 내지 1291)으로 치환되는 것을 특징으로 하는 수송단백질.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 수송단백질을 포함하고, 최소 한 개의 중간분자(intervening molecule)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 중간분자는 하나의 펩티드결합, 에스테르결합, 에테르결합, 황화결합, 이황화결합, 또는 탄소-탄소결합에 의하여 공유결합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 중간분자는 하나의 작은 유기분자, 하나의 펩티드, 또는 하나의 단백질 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 작은 유기분자는 바이러스 증식 저지물질, 세포분열 억제물질, 항생물질 또는 면역글로불린 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 단백질은 프로테아제(protease)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 프로테아제는 클로스트리듐 보툴리눔 A, B, C_1, D, E, F, 및 G형 신경독 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 프로테아제는 서열 His-Glu-Leu-Xaa-His-$(Xaa)_{33-35}$-Glu-$(Xaa)_{84-90}$-Glu-$(Xaa)_{11}$-Arg-Xaa-Xaa-Tyr을 포함하고, 상기 Xaa는 어떠한 아미노산도 될 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 프로테아제는 클로스트리듐 보툴리눔 A, B, C_1, D, E, F, 및 G형 단백질로부터 유도되는 단백질가수분해 활성 절편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 프로테아제는 서열 His-Glu-Leu-Xaa-His-$(Xaa)_{33-35}$-Glu-$(Xaa)_{84-90}$-Glu-$(Xaa)_{11}$-Arg-Xaa-Xaa-Tyr을 포함하고, 상기 Xaa는 어떠한 아미노산도 될 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로테아제는 콜린성 운동뉴런 내에서 특정 기질을 분해시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 기질은 말초신경에서 신경전달물질의 방출에 관여하는 단백질과 신경세포 내에서 촉매반응을 할 수 있는 단백질로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 프로테아제와 수송단백질은 아미노산 서열에 의해 공유결합되고, 엔도펩티다아제에 의하여 인지되고 분해되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 엔도펩티다아제에 의하여 분해된 후에 하나의 이황화결합은 상기 프로테아제와 수송단백질을 연결시키고, 순차적으로 활성 홀로톡신을 형성시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 수송단백질, 또는 제16항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물, 선택적으로 약학적으로 수용가능한 첨가제, 희석액, 및/또는 첨가물을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 30

보툴리누스 신경독을 이용하여 장애 또는 질병을 치료하는 것을 특징으로 하는 제29항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 장애 또는 질병은 편측 안면 경련(hemi-facial apasm), 연축성 사경(spasmodic torticollis), 경직, 근육긴장이상, 편두통, 통증, 목과 허리척추 장애, 사시, 침분비과다증, 우울증 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물의 용도.

청구항 32

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 수송단백질, 또는 제16항 내지 제28항 중 어느 한 항의 조성물, 선택적으로 약학적으로 수용가능한 첨가제, 희석액, 및/또는 첨가물을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 미용성형 조성물.

청구항 33

다한증과 매우 현저한 안면 주름 증상에 이용하는 것을 특징으로 하는 제32항에 따른 미용성형 조성물의 용도.

청구항 34

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 수송단백질 또는 제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 공지된 재조합 방법에 의하여 생산하는 것을 특징으로 하는 상기 수송단백질 또는 상기 조성물의 제조방법.

청구항 35

제15항에 따른 수송단백질을 제조하는 방법에 있어서, 상기 갱글리오시드 결합 영역은 프로테아제 측면에 위치한 핵산 사이의 경계면(endonucleic interfaces)을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되고, 상기 제한 엔도뉴클레아제 사이트는 클로스트리듐 보툴리눔 신경독으로부터 갱글리오시드 결합 영역의 다른 물질들과 친화성이 있어서 상기 아미노산 서열의 유사성을 보존하면서 상기 클로스트리듐 보툴리눔 신경독의 단위 치환이 일어나도록 하는 것을 특징으로 하는 제15항에 따른 수송단백질의 제조방법.

청구항 36

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 프로테아제의 제조방법에 있어서, 상기 프로테아제는 프로테아제 측면에 위치한 핵산 사이의 제한 경계면(restricting endonucleic interfaces)을 포함하는 핵산에 의하여 코딩되고, 상기 핵산 사이의 제한 경계면은 상기 아미노산 서열의 유사성을 보존하면서 클로스트리듐 보툴리눔 신경독으로부터 프로테아제 영역으로 단위 치환이 일어날 수 있도록 친화성이 있는 것을 특징으로 하는 제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 프로테아제의 제조방법.

청구항 37

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 수송단백질을 코딩하거나 제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 코딩하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균(Escherichia coli), 맥주효모균(Saccharomyces cerevisiae), 피키아 파스토리스(Pichia pastoris), 또는 거대 아포간균(Bacillus megaterium)인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 39

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 수송단백질 코딩영역 또는 제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물 코딩영역, 및 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

명 세 서

도면의 간단한 설명

[0001] 도 1은 쥐의 뇌로부터의 준비된 시냅토솜 막 조제물에 대한 변형된 BoNT/A의 Hc-절편의 친화력은 야생형 BoNT/A의 Hc-절편보다 3배 높은 수치임을 보여준다.

도 2는 야생형 BoNT/A Hc-절편의 친화도를 100% 기준으로 할 때, 실험용 쥐의 뇌의 시냅토솜에 다른 BoNT/A

Hc-절편 돌연변이의 결합을 보여준다. 첫번째 칸은 BoNT/A 돌연변이체의 친화도를 보여주고 있으며, 아미노산 Y1117의 돌연변이가 증가하고 있는 것을 볼 수 있다. 두번째 칸은 다른 BoNT/A 돌연변이를 보여준다. 세번째 칸은 두 개의 돌연변이를 나타내는 BoNT/A 돌연변이의 친화도를 보여주며, 신경세포막(시냅토솜)에 결합력을 향상시키는 것을 볼 수 있다.

도 3은 분리된 횡격막 신경(실험용 쥐의 횡격막 근육 준비물)에 있어서 돌연변이 BoNT/A Y1117A의 증가된 신경독을 야생형 BoNT/A와 비교해서 보여준다.

도 4는 BoNT/A Hc-절편의 야생형을 100% 표준으로 할 때, 신경세포막 내에 네 가지 BoNT/A Hc-절편 잡종 HcAB, HcAC, HcAE, HcAT(T=테타누스 신경독)의 결합을 보여준다.

도 5는 분리된 횡격막 신경(실험용 쥐의 횡격막 근육 준비물)에 있어서 BoNT/A와 BoNT/B의 Hc-절편 또는 Hcc-영역 중 하나로 구성된 전체 독성 잡종의 증가된 신경독을 야생형 BoNT/A과 비교하여 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0001] 본 발명은 뉴런에 결합하는 수송단백질에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은, 수용체 매개 내포작용(receptor-mediated endocytosis)에 의하여 받아들여지며, 산성의 엔도솜 구획(endosomal compartment)으로부터 뉴런의 사이토졸로 전좌된다. 상기 단백질은 생리학적으로 플라즈마막을 통과하여 신경세포의 사이토졸로 침투할 수 없는 다른 화학물질(예를 들면, 프로테아제)을 전좌시키기 위한 수송수단으로 사용된다. 본 발명은 신경전달물질의 방출을 저해하기 위한 수송단백질의 사용에 관한 것이다.

[0002] 신경세포는 외포작용(exocytosis)에 의해 신경전달물질을 방출한다. 세포내 소낭과 플라즈마막의 융합을 외포작용(exocytosis)이라 한다. 이 과정에서 세포내 함유물은 시냅스 틈(synaptic gap)으로 방출된다. 두 막의 융합은 칼슘에 의해 조절되며, 단백질 시냅토타그민(synaptotagmin)과 반응한다. 다른 보조인자(cofactor)와 함께 시냅토타그민(synaptotagmim)은 이른바 세 개의 융합단백질인 SNAP-25, 시냅토브레빈 2(synaptobrevin 2), 그리고 신택신(syntaxin) 1A의 상태를 조절한다. 신택신 1A와 시냅토브레빈 2는 플라즈마 및/또는 세포내 소낭막으로 합쳐지는 반면에 SNAP-25는 플라즈마막에만 가볍게 결합한다. 세포내 칼슘농도가 증가하는 한도에서, 세 개의 단백질은 서로 결합하고, 양쪽의 막은 서로 접근하여 결국 융합한다. 콜린성(cholinergic) 뉴런의 경우 아세틸콜린이 방출되어, 근육수축, 발한, 그리고 다른 콜린성 유발 반응(cholinergically provoked reaction)을 일으킨다.

[0003] 상기 융합단백질은 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아(bacterium Clostridium Botulinum)에 의해 형성된 클로스트리디아 신경독(clostridial neurotoxins) 경쇄(ligh chain)의 표적분자(기질)이다.

[0004] 혐기성이고 그람양성균(gram-positive)인 클로스트리디움 보툴리눔 박테리아는 7개의 다른 타입의 단백질 신경독을 생산한다. 이들은 보틀리누스 신경독(Botulinus neurotoxins)이라 불린다(BoNT/A에서 BoNT/G까지). 이들 가운데 특히 BoNT/A와 BoNT/B는 인간과 동물에서 신경마비(neuroparalytic disorder)를 일으키며, 이를 보툴리누스 중독(botulism)이라 한다. 클로스트디움 보툴리눔(Clostridium botulinum)의 종자(spore)는 토양에서 발견될 수 있지만, 살균이 제대로 되지 않고, 가정에서 만든 밀봉된 저장식품에서 또한 발생할 수도 있어, 많은 보툴리누스 중독의 원인이 되기도 한다.

[0005] BoNT/A는 알려진 생물학적 물질 중 가장 치명적이다. 순수한 BoNT/A의 5 내지 6 pg의 작은 양은 MLD(Multiple Low Dose)을 나타낸다. 한 단위의 BoNT는 MLD로 정의되며, 이는 복막간 주사에 의하여 18 내지 20 g 무게의 암컷 스위스 웹스터 쥐들의 절반을 치사시킬 수 있는 양이다. 일곱개의 면역학적으로 다른 BoNT는 각각 특징이 있다. 그것들은 BoNT/A, B, C_1, D, E, F, 그리고 G로 명명되며, 항원형으로 특정된 항체(serotype-specific antibodies)와의 중화(neutralisation)에 의해 구별되어질 수 있다. 다른 BoNT의 항원형은 감염된 동물의 종에 따라 야기된 고통(severity)과 마비 기간의 점에서 다르다. 예를 들면 쥐가 마비되는 경우 BoNT/A는 BoNT/B보다 500배 더 강하다. 게다가 BoNT/B는 체중에 대하여 480U/kg(체중의)의 투입량으로도 영장류에는 무해함이 증명되었다. 같은 양의 BoNT/A는 영장류에 있어 이러한 물질의 치사량의 12배에 해당한다. 반면, 쥐에 대한 BoNT/A의 주사 후 마비 기간은 BoNT/E 주사 후의 마비 기간보다 10배 길다.

[0006] BoNTs는 병리학적으로 과도하게 활성된 말초 신경에 의해 야기된 골격근육의 과다활동이 특징인 신경근육장애를 치료하기 위하여 의학적 용도로 사용되어져 왔다. 미국식약품관리청은 BoNT/A를 안면경련, 사시, 편측 안면 경련(hemi-facial spasms)의 치료에 사용하는 것을 승인하였다. BoNT/A에 비하면 다른 BoNT 항원형들은 명백하게 덜 효과적이고 효력 지속면에서도 더 짧다. 말초근육내 투약된 BoNT/A는 보통 일주일 이내 의학적 효과가 감지

된다. BoNT/A를 한 번의 근육 내 주사로 투약하면 정상적으로 약 3달간 병세가 억제된다.

[0007] 클로스트리디아 신경독(clostridial neurotoxins)은 융합기구의 다른 단백질을 특이적으로 가수분해한다. BoNT/A, C_1, 그리고 E는 SNAP-25를 분해하고, 테타누스 신경독(tetanus neurotoxin, TeNT)은 물론 BoNT/B, D, F, G는 또한 시냅토브레빈 2라고 명명된 소낭-연관 막단백질(vesicle-associated membrane protein, VAMP) 2를 공격한다. BoNT/C 은 신택신(syntaxin) 1A를 분해한다.

[0008] 클로스트리디움 박테리아는 각각 1251 내지 1315의 아미노산을 갖는 단일사슬결합의 폴리펩티드인 신경독들을 방출한다. 이후 내생의 프로테아제(endogenous protease)는 정해진 위치에서 이 단백질들을 각각 2개의 사슬로 쪼개나(nicking), 남아 있는 두 사슬은 이황화결합(disulphide-bridge)에 의해 상호 연결된다. 이 두 개의 체인 단백질은 홀로-톡신(holo-toxin)이라 불린다(Shone et al.(1985), Eur J Biochem 151, 75-85 참조). 이 두 사슬은 다른 작용을 갖는다. 더 작은 절편, 경쇄(light chain=LC)는 Zn^{2+}의존 엔도프로테아제를 나타내는 반면, 더 큰 부분(heavy chain=HC)은 경쇄의 운반 수단을 나타낸다. 엔도펩티다아제로 HC를 처리함으로써 두 개의 50 kDa 크기의 절편(fragment)이 발생한다(Gimenez et al. (1993), J Protein Chem12, 351-363 참조). 아미노말단을 가진 절반(amino-terminal half,HC_N-fragment)은 낮은 pH 값에서 막 속으로 모여 들어가서 신경세포의 세포질 속으로 LC가 통과하는 것을 가능하게 해준다. 카르복시말단을 가진 절반(carboxy terminal half, H_C-fragment)은 신경세포막에 배타적으로 발생하는 복합 폴리시알로갱글로시드(complex polysialogangliosides)에 결합하고, 현재까지 확인되지 않은 단백질수용체에 부착된다(Halpern et al. (1993),Curr Top Microbial Immunol 195,221-241 참조). 이는 클로스트리디아 신경독의 높은 신경선택성을 설명해준다. 결정구조는 BoNT/A가 활동기구의 세 단계에 의해 조화되는 세 개의 영역을 처리,결정함을 확인시켜 준다(Lacy et al.(1998), Nat Struct Biol 5,898-902참조). 게다가, 이러한 데이터들은 H_C-절편 내에서 두 개의 자율적인 하위단위(sub-units, sub-domains)가 각 25 kDa 크기로 존재한다는 결론을 준다. 두 개의 기능적인 하위영역이 존재한다는 증거는 TeNT의 H_C절편의 아미노기 말단(amino-terminal, H_{CN})과 카르복시말단(carboxy-terminal half, H_{CC})에 의해 나타나며, TeNT는 재조합된 형태로 표현되고, TeNT의 H_{CN}영역은 뉴런에 부착되지 않지만 H_{CC}-은 부착된다는 것에서 알 수 있다(Herreros et al.(2000), Biochem J 347, 199-204 참조). 시냅토타거민(synaptotagamin)의 단백질수용체 결합부위는 BoNT/B와 G의 H_{CC}- 영역 안에서 발견되었고, 분리되어 기능함을 증명한다(Rummel et al.(2004), J Biol Chem 279, 30865-70 참조).

[0009] 병리학적 상태에서 HC는 뉴런의 갱글리오시드(ganglioside)에 부착되고, 세포 내로 수용기 매개 내포작용에 의해 세포 내로 받아들여지며 엔도좀구획내를 경유하여 자연적인 소낭 순환에 도달한다. 초기의 엔도좀의 산성체(acid medium)에서, H_N(HC의 아미노기말단을 가진 절반)은 소낭체 막을 통과하며 구멍(pore)을 형성한다. 이황화결합에 의해 HC에 연결된 각 물질(X)는 세포내 산화환원시스템에 의해 HC로부터 분리될 것이고, 이황화결합에 접근하면서 그것을 환원시킨다. X는 결국 사이토졸에 나타난다.

[0010] 클로스트리디아 신경독의 경우 HC는 사이토졸 내의 마지막 단계에서 특정 기질을 분해하는 LC의 운반자이다. 융합단백질의 복합체의 형성과 분해의 사이클은 방해받고, 아세틸콜린의 방출도 결국 저해된다. 그 결과로서 가로무늬근은 마비되고, 땀선은 그 분비를 멈춘다. 개별적인 BoNT 항원형의 활동기간은 다르며, 사이토졸 내의 완전한 LC의 존재에 의존한다. 모든 뉴런이 클로스트리디아 신경독에 대한 수용체를 소유함에 따라 아세틸콜린의 방출뿐만이 아니라 잠재적으로 물질 P(노르아드레날린, GABA, 글리신, 엔돌핀 그리고 다른 전달물질과 호르몬)의 방출도 영향을 받을 수 있다.

[0011] 콜린성 전달이 선택적으로 막혀있다는 사실은 주변의 HC(HC in the periphery)가 뉴런에 들어간다는 사실에서 설명되어진다. 중앙 시냅스는 단백질이 통과할 수 없는 혈액-뇌-장벽(blood-brain-barrier)에 의해 보호된다.

[0012] HC는 말초신경세포에 대한 높은 친화성을 가지며, 주로 복합 폴리시알로갱글리오시드와의 반응에 의해 매개된다. 상기 복합 폴리시알로갱글리오시드는 하나 이상의 시알린산(sialic acid)으로 구성되는 글리콜 지방들이다(Halpern et al. (1995), Curr Top Microbiol Immunol 195, 221-41 참조). 결과적으로 HC에 부착된 LC들은 이러한 세포타입에만 이르고, 이러한 세포들에서만 활성화된다. BoNT/A와 B는 각각 하나의 갱글리시드 GT1b의 분자에 부착된다.

[0013] 결합포켓(binding pocket)을 형성하는 아미노산의 역할을 조사하기 위하여, 재조합된 H_C-절편이 본 발명을 통해서 생성되었다. 이 기술은 개별적 아미노산의 교환이 허용된다. 이와 같이 양(+)으로 하전된 아미노산은 음(-

)으로 하전된 혹은 중성 아미노산에 의해 치환될 수 있으며, 역으로도 가능하다. 갱글리오시드의 투과 능력에 관하여 결합포켓 표면상의 약간의 변형은 현저한 효과를 발생시키지 않는다. 만일 예를 들어 1266 위치의 아미노산인 트립토판(SXWY 모티브에서 W로 불려지는)이 지방성 잔기(예를 들면 류신(leucine))에 의해 치환된다면 친화도는 99% 이상 감소됨을 보일 수 있다. 그러나, 그 반대의 현상도 관찰되었다. 아미노산을 치환하여 결합포켓으로 확장하는 아미노산의 치환은 갱글리오시드에 대한 친화력을 증가시키는 결과를 낳는다. 결합포켓의 배열은 HC의 갱글리오시드 수용체에 대한 친화도에 결정적인 영향을 미치며, 연관된 LC의 단백질 가수분해 정도도 동시에 증가하거나 감소한다.

[0014] 리간드 수용체 연구에서, 특정 아미노산 잔기는 BoNT/A의 갱글리오시드의 결합포켓에서 본 발명을 통해서 특징지워졌고, 갱글리오시드 수용체에 대한 친화도를 증가시키기 위하여 치환되었다. 변화된 H_C-절편의 친화도는 갱글리오시드와 시냅토솜 결합분석에 따라 결정된다. 결과적으로 같은 변화의 HC는 짝지어져 LC-A가 되며, 이를 위해 트롬빈에 민감한 아미노산 서열(thrombin-sensitive amino acid sequence)이 사용되었다. 재조합 단백질은 트롬빈에 의해 활성화되고(틈을 가지고), 이중 사슬분자가 되며, 양 사슬은 하나의 이황화결합에 의해 상호결합된다. 그 구조의 활성도는 쥐의 뇌의 시냅토솜(synaptosomes)에서 전달물질 방출실험에 의해 검정되었다. 전달물질 방출 방해의 정도는 그 구조의 활성 정도의 측정으로 생각되어졌다. 게다가, 개별적 구조의 효력은 클로스트리디아 신경독의 생리적 대상을 나타내는 쥐에 대한 고립된 신경 근육 실험(Hemi-Diaphragma-Assay, 편측 횡격막 실험(HDA))에 의해서 분석되었다.

[0015] 트라포X(TrapoX)에 의해 치료되는 장애와 증상에는 활동도가 집중적으로 증가된 운동뉴런과 자율 신경세포(vegetative nerve cells)가 수반된다. 증가된 활동도는 이러한 세포들에 의해 고무된 근육의 고통스런 경련과 분비세포의 과다분비를 초래한다. 더욱이 증가된 활동도로 인하여 다른 부위에서 안면주름이 발생하게 된다. 원인은 말초신경말단으로부터 병리적으로 증가된 아세틸콜린의 방출증가에 기인한다. 영향받은 근육에 트라포X가 주사되고, 그 근육이 완화되면, 1 내지 3일의 잠재기를 거쳐 분비가 마르고, 안면 피부의 매끄러움이 나타난다. 이는 TrapoX에 의해 아세틸콜린 방출이 억제됨에 기인한다. 환자는 사실상 고통이 사라지고, 근육 경련에 의한 고통은 경감되고, 완전히 사라진다.

[0016] 아세틸콜린의 방출은 동물에서는 물론 사람에게서도 억제된다. 따라서 동물 테스트는 BoNT-약제(Botox, Dysport, Xeomin)의 활동도 결정하기위한 것이면서 또한 중독에서 BoNT의 존재의 증거로 사용된다. BoNT의 활동도는 쥐에 있어서 LD_{50} 측정을 함으로써 정량화된다. 본문에서 하나의 테스트 그룹의 동물들의 50%를 죽일수 있는 양을 결정할 수 있다. 어떤 동물도 결코 죽일 수 없는 투입량은 별도로, 한 그룹의 동물 전체를 죽일 수 있는 정량이 투약될 수 있음이 분명하다. 독은 온몸으로 투약될 수 있으므로 많은 동물들이 호흡근육 마비에 의해 야기된 호흡장애로 고통스럽게 죽는다. 동물실험을 피하기 위해 실험용 쥐의 편측횡격막 실험(Mouse Hemi-Diaphragma Assay)을 도입해야 한다. LD_{50}시험에 의해 실험대상 쥐는 호흡근육 마비에 의한 호흡마비로 죽는다. 이것은 횡경 신경(innerving nerve, Nervus phrenicus)을 포함하여 호흡근육이 쥐로부터 제거될 수 있고, 생체 외에서(in vitro) 중독될 수 있음을 의미한다. BoNT는 그의 수용체에 부착되고, 세포로 들어가고, 전좌되며, 결국 기질을 쪼개고, 근육은 마비된다. LD_{50} 값과 호흡근육마비 사이에는 밀접한 관계가 있다. 이러한 생체 외 테스트는 동물실험의 약한 버전이라 할 수 있다(Wohlfarth K, Goeschel H, Frevert J, Dengler R, Bigalke H, Botolinum A toxis: units versus units. Naunyn Schmiederg's Arch Pharmacol. 1997 Mar; 335(3):335-40 참조).

[0017] 따라서, 생체 외에서 횡격막을 마비시키는 BoNT는 또한 투약된 양에 따라서 살아있는 쥐를 죽일 수 있다. 이러한 동물 실험 대체방법은 상당히 설득력이 있어 마우스 반횡경막 분석(Mouse Hemi-Diaphragma-Assay)은 EU회원국을 위해 EU 약전(pharmacopoeia)으로 BoNT를 위한 공식 시험방법으로 채택될 것이다. 쥐의 횡격막 실험에서 트라포X의 증가된 효과는 인간에 있어서도 마찬가지임을 암시한다.

[0018] 가장 최근에 BoNT/A 복합체는 고통과 편두통을 완화하고(Sycha et al.(2004) J Neurol 251,19-30 참조), 과도한 정서적 활동을 완화시키고, 활동 긴장 이상을 치료하는데(Bnecke et al.(1995), Akt Neurol 22,209ff 참조) 사용되었다. 이 복합체는 신경독, 여러 가지 해모글루티닌(haemagglutines) 그리고 비독성, 비응집(non-haemagglutininating) 단백질로 구성된다. 이 복합물은 생리학적 pH에서 빠르게 분해된다. 결과적인 신경독은 치료적으로 관련이 있고, 증상의 완화를 가져오는 복합체의 유일한 성분이다. 잠재적인 신경병은 치료가 되지 않기 때문에 3 내지 4개월의 간격으로 복합물이 다시 주사되어야 한다. 주사된 외부 단백질의 양에 의존하여, 어떤 환자들은 BoNT/A 항체를 발생한다. 이 환자들은 신경독에 대해 저항력을 가진다. 일단 항원 민감 세포가 신경독을 감지하고 항체가 형성되고 나면 관련 뇌세포는 수년간에 걸쳐 보존된다. 이러한 이유 때문에 가능한

가장 낮은 투입량으로 가능한 최상의 활동도를 갖도록 조제하여 환자를 치료하는 것이 중요하다. 박테리아 기원의 단백질은 면역보조제로 작용하기 때문에 더 이상 이를 포함하지 않도록 조제하는 것이 중요하다. 그러한 물질들은 대식세포(신경독뿐만 아니라 면역보강제를 인식하고 그들을 면역 글로불린을 형성하게 하는 림프구로 보낸다)를 끌어당긴다. 결국 외부 단백질을 포함하지 않는 극히 순수한 생산물만이 치료에 사용되어질 수 있다.

[0019] 본 발명은 지금까지 알려진 방법에 대한 상기 문제를 극복할 수 있는 수송단백질(Trapo)을 제공하는 데 있다.

[0020] 바람직하게는 복합 갱글리오시드에 대한 친화도가 최소 3배 증가한 수송 단백질(Trapo)이 제공된다.

[0021] "천연(native) 신경독보다 높은 친화도를 가지고 신경세포에 부착". 여기서 천연 신경독은 바람직하게는 C. 보툴리눔의 천연 신경독을 말한다. 바람직하게는 문맥상의 천연 신경독은 보틀리누스 신경독 A 및/또는 보툴리누스 신경독 B 및/또는 보툴리누스 신경독 C 내지 G를 의미한다. 대장균에서 재조합되고 준비된 보툴리누스 신경독 중 천연 보툴리누스 신경독의 아미노산 배열이 동일한 것은 약리학적으로 천연의 것과 동일하게 행동하고 재조합된 보툴리누스 신경독 와일드 타입(recombinant Botulinus neurotoxin wild type)이라 불린다. 이 경우 언급된 신경세포는 콜린성 운동뉴런이다. 바람직하게는 수송 단백질은 신경세포막 표면의 폴리시알로갱글로시드(예를 들어 GD1a, GD1b, 또는 GT1b와 같은)에 특이적으로 잘 부착한다. 결합은 바람직하게는 생체 외에서 측정된다. 특히 바람직하게, 측정은 실시예에서 상세하게 설명된 분석을 이용하여 수행된다.

[0022] "C. 보툴리눔에 의해 형성된 신경독의 중쇄 변이"라는 용어를 설명한다. C. 보툴리눔에 의해 형성된 신경독의 중쇄가 아미노산 및/또는 핵산 배열은 일반적으로 공개된 데이터베이스로부터 이용가능하다(표 1 참조). 변형은 적어도 하나의 아미노산이 결핍되거나, 추가되거나, 아미노산 배열에 삽입된 것을 포함하거나, 자연신경독의 적어도 하나의 아미노산이 또 다른 자연발생적 또는 비자연발생적 아미노산으로 치환된다. 그리고/또는 상기 아미노산 서열에서 하나의 아미노산이 번역 후 변이된 것을 포함한다.

[0023] 전사 후 변형은 포도당화, 아세틸레이션, 아실레이션, 디아미네이션, 포스포릴리제이션, 이소프레닐리제이션, 글리코실 포스패티딜 이노시틸리제이션 그리고 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 변형을 의미한다.

[0024] C. 보툴리눔에 의해 형성된 신경독의 HC는 세 개의 하위 영역을 포함한다. 즉, 아미노말단을 가진 50 kDa 크기의 전좌 영역 H_N, 다음의 25 kDa H_{CN}-영역, 그리고 카르복시단이 위치한 25 kDa H_{CC}-영역으로 된다. H_{CN}-과 H_{CC}-은 함께 H_C-절편으로 명명된다. 개별적인 항원형과 그들의 변형의 하위영역에 대한 각 개별적으로 대응하는 아미노산부분은 표 1에 나타나 있다.

[0025] 혼성 단백질을 다른 BoNT 항원형의 영역으로 상세하게 표현하기 위해 다음에 명명법이 도입된다. 용어 scAtAAB는 각각의 영역이 각자의 항원형의 대문자로 표시된 LC, H_N, H_{CN}, H_{CC}로 구성된 네 영역을 갖는 단일 사슬신경독(sc)을 나타낸다. scAtAAB는 LC, H_N, H_{CN},와 BoNT/A의 Hcc-영역이 BoNT/B로 치환된 것을 의미한다. 소문자 t는 LC와 H_N 사이에 삽입된 트롬빈 마커(marker) 서열을 나타낸다.

표 1

일곱개의 보툴리누스 뉴로탁신들의 하위영역의 아미노산 서열과 분포의 데이터베이스 수

BoNT	단백질 서열의 데이터베이스 수	아미노산의 수	HC		
			H_N	H_C	
				H_{CN}	H_{CC}
BoNT/A	AAA23262 AAM75961 AAQ06331 BTCLAB	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	P10845	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA36289	1296	449-866	867-1091	1092-1296
	CAA51824 I40645 Q45894	1296	449-866	867-1091	1092-1296
BoNT/B	AAL11499 AAL11498	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA73968	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	AAK97132	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	A48940 AAA23211 P10844	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	BAC22064	1291	442-855	866-1078	1079-1291
	CAA50482 I40631	1291	442-855	866-1078	1079-1291
BoNT/C1	A49777 BAA14235 BAB71749 CAA51313 S46431	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	P18640	1291	450-863	864-1092	1093-1291
	BAA08418	1280	450-863	864-1083	1084-1280
	BAA89713	1280	450-863	864-1083	1084-1280
BoNT/D	CAA38175 P19321 S11455	1276	446-859	860-1079	1080-1276
	AAB24244	1276	446-859	860-1079	1080-1276
	BAA07477 S70582	1285	446-859	860-1088	1089-1285
	BAA90661	1285	446-859	860-1088	1089-1285
BoNT/E	BAB86845 CAA44558 S21178	1252	423-842	843-1066	1067-1252
	CAA43999 Q00496	1251	423-842	843-1066	1067-1251
	CAA43998 JH0256 P30995	1251	423-842	843-1066	1067-1251
BoNT/F	1904210A AAA23263 I40813 P30996	1274	440-860	861-1086	1087-1274
	CAA73972	1280	440-861	862-1087	1088-1280
	AAA23210 CAA57358	1278	440-861	862-1084	1085-1278
	CAA48329 S33411	1268	432-853	854-1075	1076-1268
BoNT/G	CAA52275 Q60393 S39791	1297	447-860	861-1086	1087-1297

[0026]

[0027] 본 발명은 특히 수송단백질에 관한 것으로, 클로스트리디움 보툴리눔에 의해 형성된 신경독의 HC를 변형함으로써 얻어지며, 상기 단백질은 자연신경독보다 높은 친화도에 의해 신경세포에 부착되며, 이 세포 내로 내포작용에 의해 받아들여진다.

[0028] 수송단백질은 복합 폴리시알로갱글리오시드에 대한 갱글리오시드 결합영역의 특정한 친화도를 향상시킴을 보여준다. 친화도의 향상은 아미노산의 치환이나 제거에 의해 달성된다.

[0029] 바람직한 실시예에 따르면, 수송단백질은 천연 신경독보다 최소 15% 향상된 친화도를 보인다. 바람직하게는 천연 신경독보다 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 80%, 가장 바람직하게는 적어도 90% 향상된 높은 친화도를 보인다.

[0030] 바람직한 실시예에 따르면, HC의 변형은 주어진 신경독의 H_C-절편의 영역에서 일어난다. 만일 변형이 치환, 삭제, 삽입, 첨가를 포함한다면, 후자는 당 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에게 알려진 기술인 돌연변이생성에 의해 수행될 수 있다. 본문 내용상 천연 신경독에 존재하는 아미노산은 자연 발생적이거나 비자연적으로 발생한 아미노산으로 변형된다. 원칙적으로 아미노산은 다른 물리화학적 그룹으로 분할된다. 아스파라테이트와 글

루타메이트는 음하전 아미노산에 속한다. 히스타딘, 아르기닌, 그리고 라이신은 양하전 아미노산에 해당한다. 아스파라긴 글루타민, 세린, 트레오닌, 시스테인, 그리고 티로신은 극성아미노산에 해당한다. 글리신, 알라닌, 발린 ,류신, 이소류신, 메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌 그리고 트립토판은 비극성 아미노산에 해당한다. 방향족 사이드그룹은 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 그리고 트립토판중에서 발견된다. 일반적으로 또 다른 물리화학 그룹에 속하는 다른 아미노산에 의해 아미노산을 치환하는 것이 바람직하다.

[0031] 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 수송단백질이 보툴리누스 신경독 항원형 A 내지 G까지이다.

[0032] 발명의 바람직한 실시예에서, 수송단백질은 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 A 형태 단백질 서열에서 유도된 수송단백질이다(database no. AAA23262와 CAA51824).

[0033] 본 발명의 구체적 실시예는 수송단백질에 관한 것으로, 적어도 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 A 형태(database no. AAA23263 및 CAA51824)의 위치 1117, 1252 내지 1253에 있는 하나의 아미노산이 치환되는 것이다.

[0034] 본 발명의 구체적 실시예는 수송단백질에 관한 것으로, 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 A 형태 단백질 서열의 위치 1092에서 1296까지의 아미노산-갱글리오시드의 결합영역을 포함하는 부위-이 다음 서열로 치환되는 것이다.

[0035] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 B형태 단백질(database no. AAA23211), 아미노산 1079부터 1291까지,

[0036] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 C_1형태 단백질(database no. CAA51313), 아미노산 1093부터 1291까지,

[0037] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 D형태 단백질(database no. CAA38175), 아미노산 1080부터 1276까지,

[0038] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 E형태 단백질 (database no. CAA44558), 아미노산 1067부터 1252까지,

[0039] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 E형태단백질 (database no. CAA43998), 아미노산 1067부터 1251까지,

[0040] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 F형태 단백질 (database no. CAA57358), 아미노산 1085부터 1278까지,

[0041] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 F형태 단백질 (database no. CAA48329), 아미노산 1076부터 1268까지,

[0042] 클로스트리디움 보툴리눔 신경독 G형태 단백질 (database no. CAA52275), 아미노산 1087부터 1297까지.

[0043] 상세하게는 아미노산 위치간 교환가능성에 적합한 H_{CC}-영역은 표 1에 나타나 있다.

[0044] 본 발명의 구체적 실시예는 발명에 따른 수송단백질을 포함하는 화합물에 관한 것으로 적어도 하나의 중간분자(X)를 가진 것을 말한다. 중간 분자는 작은 유기분자, 펩티드, 혹은 단백질일 수도 있다; 바람직하게는 공유결합된 것이다(펩티드, 에스테르, 에테르, 설피드, 디설피드, 탄소-탄소결합).

[0045] 게다가 중간분자는 모든 알려진 치료에 효력이 있는 물질을 포함한다. 세포분열억제제, 바이러스분열 억제제, 항생제, 면역글로불린이 바람직하다.

[0046] 트라포(Trapo)의 증가된 친화도를 잘 사용하기 위해서는, 트라포가 아미노산 서열을 통하여 BoNT/A, B, C_1, D, E, F 또는 G의 LC에 아미노말단쪽에 부착되어야 하며, 아미노산 서열은 프로테아제 트롬빈에 의해 인식되고 분열되며, 특정 트라포X를 발생시킨다. 천연 BoNT/A와 비교하여 상기 트라포X의 활성강도는 증가되었고, 특히 적어도 3 인자(factor)로 바람직하다. 외부 단백질이 없는 이 새로운 산물은 작은 복용량과 더 커진 순수도에 기인하여 면역체계의 자극을 현저하게 감소시킬 것이다.

[0047] 본 발명의 구체적인 실시예는 수송단백질에 관한 것으로, 상기 단백질은 단백질 분해효소로서 신경전달 방출기구의 하나 또는 그 이상의 단백질을 분해하며, 단백질 분해 효소는 클로스트리디움 보툴리움의 신경독, 특히 항원형 A, B, C, D, E ,F ,G형의 LC로 구성되는 신경독들의 그룹에서 선택된 것이거나, 특히 항원형 A, B, C, D, E ,F ,G의 클리스트리디움 보틀리움의 LC의 단백질 활성절편에서 선택된 것으로, 그 절편은 적어도 자연 프로테아제의 단백질 분해 활성도의 0.01%를 나타내며, 바람직하게는 적어도 5%, 좀더 바람직하게는 적어도 50%, 특별히 적어도 90%를 나타낸다. 바람직하게 수송단백질과 프로테아제는 같은 C. 보틀리눔 신경독 항원형 A에서 유도된다. 프로테아제의 서열은 데이터베이스에서 얻을 수 있고, 그 데이터 베이스의 수는 표 1에 나타나 있다. 프로테아제의 단백질 분해정도는 기질분리 동역학(substrate separation kinetics)에 따라 결정된다(Bina et al. (2002), Biochemistry41(6), 1717-23 참조).

[0048] 상기 LCs는 His-Glu-Leu-Xaa-His-$(Xaa)_{33-35}$-Glu-$(Xaa)_{11}$-Arg-Xaa-Xaa-Tyr을 포함하는 것을 특징으로 한다. 여기서 상기 Xaa는 임의의 아미노산이다. 본 발명의 수송단백질은, 단백질과 단백질분해효소가 이전 그룹의 단백질과/또는 단백질분해효소로부터 유래한다는 점에 특징이 있다.

[0049] 본 발명의 구체적 실시예에는 수송단백질의 생산방법이 나타나 있다. 이 경우 첫 단계에서 수송단백질에 대한 핵산 코딩이 제공된다. 여기서 코딩핵산은 RNA, DNA, 또는 그들의 혼합물을 의미한다. 그 핵산들은, 예를 들어 포스포르티오에이트(phosphorthioate) 결합같은 뉴클레아제 저항의 관점에서 좀 더 변형될 수 있다. 핵산은 출발 핵산(a starting nucleic acid)으로부터 생산될 수 있으며, 출발 핵산은 예를 들면 게놈 또는 cDNA-데이터베이스로부터 복제하여 얻어질 수 있다. 게다가 핵산은 고체상합성(solid phase synthesis)으로부터 생산될 수 있다. 적당한 방법은 당업자에게 알려져 있다. 하나의 출발 핵산을 가정한다면, 예를 들어 국부성 돌연변이유발(locality-specific mutagenesis)과 같은 특정 변형이 일어나 아미노산 수준에서 적어도 하나의 첨가, 결실, 삽입 및/또는 치환이 초래된다. 핵산은 적당한 프로모터에 연결되어 작동한다. 알려진 발현체계에서 발현을 위한 적당한 프로모터는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이 경우에 있어서 프로모터의 선택은 발현을 위해 사용된 발현체계에 따른다. 일반적으로 지속성 프로모터(constitutive promoter)가 바람직하며, 그러나 유도 프로모터(inducible promoter)도 마찬가지로 사용될 수 있다. 이러한 방식으로 생산된 구성물(construct)은 적어도 특히 조절요소로서 하나의 벡터를 포함하며, 벡터는 예를 들어 λ-유도체, 아데노바이러스, 바큘로바이러스(baculoviruses), 백시니아바이러스(vacciniavirus), SV40-바이러스 그리고 레트로바이러스로부터 선택된다. 이 벡터는 주어진 숙주세포에서 핵산을 바람직하게 발현할 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한 숙주세포를 포함하는데, 이는 벡터를 포함하며 벡터를 발현하는 데 적합하다. 많은 원핵과 진핵세포의 발현체계가 당해 기술분야에서 알려져 있고, 숙주 세포는 예를 들어 대장균이나 B. 메가테리움과 같은 원핵세포나, S. 효모균(S.cerevisiae)과 P. 파스토리스(P.pastoris)와 같은 진핵세포로부터 선택된다. 곤충이나 포유류와 같은 고등진핵세포 또한 이용될 수 있으나, 그럼에도 불구하고 숙주세포는 당화(glycosylation) 기작을 포함하지 않는, 예를 들어 C. 보툴리눔같은 것이 바람직하다.

[0051] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 핵산은 C. 보툴리눔 신경독의 H_{CC}-영역을 코딩한다. 이 핵산은 H_C-절편을 코딩하는 핵산 측면에 위치하는 핵산 사이의 경계면(endonuclease-interfaces)과 C. 보틀리눔 신경독의 다른 H_C-절편의 것들과 친화성이 있는 엔도누클레아제 사이트를 포함하고 있어서 아미노산 서열의 유사성을 유지하면서 상기 수송단백질을 코딩하는 유전자에서 C. 보틀리눔 신경독이 쉽게 단위 치환(modular substitution)이 일어나도록 한다.

[0052] 상기 본 발명의 수송 시스템과는 별개로, 본 발명은 최소 하나의 중간분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 중간분자가 카르복시단을 가지는 시스테인 또는 메르캅토기 그룹 중 어느 하나를 가져서 기능하게 된다면, 상기 한 바와 같은 유사한 방식으로 펩티드 및/또는 단백질은 예를 들면 이원세포 또는 다양한 숙주세포를 사용하는 것에 의하여 재조합으로 생산될 수 있다. 동일한 숙주세포가 수송단백질과 펩티드 또는 단백질 양자에 대한 발현을 위하여 사용된다면, 분자 상호간 이황화결합은 바람직하게는 원래 위치에 형성하게 된다. 또한, 동일한 숙주 세포에서 더 효율적인 생산을 위하여 펩티드 또는 단백질에 대한 핵산 코딩은 동일한 리딩프레임에 수송단백질의 코딩과 함께 번역될 수 있으므로, 단사슬 폴리펩티드가 제공되는 것이다. 이러한 경우 바람직하게는 분자내 이황화결합이 원래 위치에서 형성되도록 한다. 수송단백질과 펩티드 및/또는 단백질 사이에서 마찬가지로 존재하는 펩티드의 교차결합을 단순하게 가수분해하기 위해서 아미노산 서열은 수송단백질의 아미노기 말단부에서 삽입된다. 수송단백질은 특히 프로테아제 트롬빈 또는 숙주세포의 특정 엔도프로테아제에 의하여 인식되거나 분리된다.

[0053] 만약 이것이 불가능하다면 적합한 분자 상호간의 이황화결합은 수송단백질과 단백질을 개별적으로 정제한 후 당업자에게 알려진 산화공정에 의하여 수행될 수 있다. 또한, 펩티드와 단백질은 합성 또는 응축에 의해서 직접 얻을 수도 있다. 적합한 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0054] 그 후에 수송단백질과 펩티드 또는 단백질은 각각 정제된다. 이러한 목적을 위해서 당업자에게 알려진 크로마토그래피법 또는 전기영동장치와 같은 방식이 사용된다.

[0055] 본 발명의 다른 구체예는 수송단백질과 선택적으로 약제학적으로 수용가능한 첨가제, 희석액, 및/또는 첨가물을 포함한 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 상기 조성물은 반안면 경련, 연축성 사경, 경직, 근긴장이상, 편두통, 통증, 목과 허리척추 장애, 사시, 과다침분비증, 우울증 등과 같은 장애나 질병을 치료하는데 적합하다.

[0056] 상기 약제학적 조성물은 경구 복용, 정맥 주사, 피하 투여, 근육 내 투여, 국부 투여에 적합하며, 근육 내 투여가 바람직하다. 상기 약제학적 조성물의 투여량 단위는 수송단백질 및/또는 본 발명을 통한 조성물 1 mg당 약 0.1 pg이다.

[0057] 본 발명의 또 다른 구체예는 수송단백질과 약제학적 첨가제, 희석액, 및/또는 첨가액으로 구성된 미용(화장료) 조성물을 포함하며, 다한증과 매우 현저한 안면주름을 치료하는데 적합하다. 화장료 조성물은 경구 복용, 정맥 주사, 피하 투여, 근육 내 투여, 국부 투여에 적합하며, 근육 내 투여가 바람직하다. 화장료 조성물의 투여량 단위는 수송단백질 및/또는 발명을 통한 조성물 1 mg당 약 0.1 pg이다. 화장료 조성물은 다한증과 안면 주름을 치료하는데 적합하다.

[0058] 본 발명에 기술된 수송단백질은 적합한 숙주세포, 예를 들면 대장균, 맥주 효모, 피키아 파스토리스, 또는 거대 아포간균 등에 의해서 생산될 수 있고, 상기 숙주세포는 재조합 발현벡터를 증가시키며, 상기 벡터는 수송단백질을 코딩한다.

[0059] 본 발명은 다음 도면에 의하여 명확해진다.

[0060] 도 1은 쥐의 뇌로부터의 준비된 시냅토솜 막 조제물에 대한 변형된 BoNT/A의 Hc-절편의 친화력은 야생형 BoNT/A의 Hc-절편보다 3배 높은 수치임을 보여준다.

[0061] 도 2는 야생형 BoNT/A Hc-절편의 친화도를 100% 기준으로 할 때, 실험용 쥐의 뇌의 시냅토솜에 다른 BoNT/A Hc-절편 돌연변이의 결합을 보여준다. 첫번째 칸은 BoNT/A 돌연변이체의 친화도를 보여주고 있으며, 아미노산 Y1117의 돌연변이가 증가하고 있는 것을 볼 수 있다. 두번째 칸은 다른 BoNT/A 돌연변이를 보여준다. 세번째 칸은 두 개의 돌연변이를 나타내는 BoNT/A 돌연변이의 친화도를 보여주며, 신경세포막(시냅토솜)에 결합력을 향상시키는 것을 볼 수 있다.

[0062] 도 3은 분리된 횡격막 신경(실험용 쥐의 횡격막 근육 준비물)에 있어서 돌연변이 BoNT/A Y1117A의 증가된 신경독을 야생형 BoNT/A와 비교해서 보여준다.

[0063] 도 4는 BoNT/A Hc-절편의 야생형을 100% 표준으로 할 때, 신경세포막 내에 네 가지 BoNT/A Hc-절편 잡종 HcAB, HcAC, HcAE, HcAT(T=테타누스 신경독)의 결합을 보여준다.

[0064] 도 5는 분리된 횡격막 신경(실험용 쥐의 횡격막 근육 준비물)에 있어서 BoNT/A와 BoNT/B의 Hc-절편 또는 Hcc-영역 중 하나로 구성된 전체 독성 잡종의 증가된 신경독을 야생형 BoNT/A과 비교하여 보여준다.

[0065] 세부적으로, 본 발명은 클로스트리디움 보툴리눔에 의해서 생산되는 신경독의 HC의 변형에 의해서 형성된 수송단백질(Trapo)를 포함한다. 바람직하게는 특히 수용체 매개 내포작용에 의하여 세포 상호간에 수용되고 산 내포낭의 구획에서 신경의 사이토졸로 전이되면서 신경에 결합하게 된다. 이러한 단백질은 생리학적으로 원형질 세포막을 투과하거나 신경세포의 사이토졸에 도달할 수 없는 프로테아제와 상술한 수송 방법으로 결합된 다른 물질들을 세포 속으로 안내하기 위해서 수용체로서 사용된다. 프로테아제의 기질은 신경전달물질 방출에 관여하는 세포내부에 편재된 단백질과 펩티드이다. 기질을 분리한 후 신경의 특정 기능은 제한된다; 세포 자체는 손상받지 않는다. 이러한 기능 중 하나는 신경전달물질 방출에 관계하는 외포작용이다. 만약 신경전달물질의 방출이 저지되는 경우 세포간 신호전달은 막히게 된다. 예를 들면, 아세틸콜린이 신경근육 접촉점에서 막히게 되면 가로무늬근 마비가 발생하게 된다. TrapoX가 경련성 또는 근긴장이상성 근육의 신경말단에 적용된다면 이러한 효과는 치료적 용도로 사용될 수도 있다. 예를 들면 다른 활동성 물질은 항바이러스 활동을 저지하는 물질이다. Trapo와 결합한 물질들은 신경계의 바이러스성 감염을 치료하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 신경전달물질의 방출을 막기 위하여 수송단백질의 용도에 관련된 것이다.

[0066] 환자가 천연 형태의 BoNT/A와 BoNT/B로 치료받는다면, 이러한 비인체 단백질의 주입은, 낮은 복용량에도 불구하고, 항체의 형성을 유발하게 되므로 과민성 경련의 방지를 위하여 치료는 중단되어야만 한다. 효소 활동의 더 높은 수송율을 가지고 동일한 활성 메커니즘을 가진 물질을 적용하는 것에 의하여 복용량은 점진적으로 낮추어질 수 있고, 항체의 형성은 발생하지 않게 될 것이다. 이러한 특성들은 상술한 수송단백질 때문에 나타나는 현상이다.

[0067] 본 발명의 실시예가 처방에 대하여 기술되어 있다고 할지라도 일상적으로 처방과 복용의 적합한 방식은 개인적으로 의사에 의하여 결정될 사안이다. 그러한 결정은 일반적으로 관련 특정 분야에 정통한 각각의 의사에 의해서 처방된다. 그러므로, 신경독의 적용과 복용 방식은, 예를 들면 선택된 신경독의 용해성 또는 치료될 때의 고

통의 강도 등과 같은 판단기준에 기초하여 본 발명과 조화되어 선택되어야 할 것이다. 천연 BoNT/A와 BoNT/B에 대한 치료 간격은 현재 평균 3-4 개월이다. 이러한 치료 간격을 연장하는 것은 항체 형성의 위험을 감소시키고, BoNT를 가진 더 장기의 치료 기간을 가능하게 할 것이다. 사이토졸 내의 LC의 증가는 분해시간을 연장시키고 또한, 활동의 지속성을 연장하게 할 것이다. 상술한 수송단백질은 본래의 HC-A보다 더 높은 친화도와 수용율을 나타낸다.

[0068] 다음 실시예는 설명을 위해서만 제공되는 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0069] **실시예**

[0070] 대장균 내 유전학적으로 처리된 트라포X의 유전자 재조합 발현

[0071] BoNT/A의 HC의 DNA 서열은 PCR법에 의해서 클로스트리듐 보툴리눔(데이터베이스 넘버 AAA23262)의 염색체 DNA에서 증폭되었다. 이러한 목적을 위하여 특정 올리고뉴클리오티드에 의해서 아미노산 티로신 1117의 코돈은 알라닌의 아미노산 잔기에 대한 염기 트리플렛 코딩에 의하여 치환되었다. 더욱이, 유전자의 5' 말단은 트롬빈의 인식 염기서열의 아미노산을 코딩을 하면서 유전자 염기서열에 의하여 보충되었다. 이러한 DNA 서열은 박테리아 발현 벡터로 삽입되었다. 트라포에 대한 삽입 유전자는 이러한 경우 카르복시기 친화성 펩티드 예를 들면, Strep-day, 6xHN-day, His_6-day 를 코딩하면서 3' 말단에서 올리고뉴클리오티드와 융합되었다. 이러한 방식으로 생산된 발현벡터 pAR-Trapo는 BoNT의 LC와 같은 운반분자를 부가하기 위한 출발 기초물질이다.

[0072] BoNT/A의 LC의 DNA염기서열은 클로스트리디움 보툴리눔(데이터베이스 넘버 AAA23262)의 염색체 상 DNA 염기서열에서 PCR법에 의하여 증폭되고, 코딩된 트롬빈 인식 서열의 발현벡터 pAR-Trapo 위쪽으로 삽입되었다. 생산된 발현 벡터 pAR-TrapoX는 대장균 K12 균주로 변형되었고, 단백질 TrapoX의 발현은 생물학적 안전레벨 2의 상태하에서 유도되었다. 이것은 계획사업을 위하여 하노버 주정부에 의해 발의된 법과 규정(file reference 501g.40654/3/57/3)에 따른 것이다. 과다 발현된 TrapoX는 친화성 크로마토그래피 방식으로 제조업자의 지시에 따라 150kDa의 분자무게로 단사슬 단백질로써 분리되었다. 그 후에 단백질은 세파로오스에 결합된 트롬빈으로 가수분해되었고, 상기 단백질은 이황화결합에 의하여 상호 결합된 채 남아 있는 두 개의 사슬인 정제된 단백질로 남게 된다.

[0073] 야생형 BoNT/A와 비교할 때, 상기 단백질은 미세적정판(micro titre plates)에 부동화시킨 분리된 갱글리오시드 GT1b와 실험용 쥐의 뇌로부터의 시냅토솜 막 준비물에 대하여 300%까지 증가된 친화력을 보여주었다(제1도). LC-A의 촉매 활동성은 재조합 SNAP-25의 생체 외 분리에서 보여지는 바와 같이 변화하지 않았다. 쥐의 뇌로부터의 기능성 시냅토솜에서의 신경전달자 방출의 억제와 관련된 TrapoX의 효능은, 클로스트리듐 보툴리눔으로부터 회복된 천연 BoNT/A와 비교할 때 300%까지 증가하였다. 실험용 쥐의 신경 근육 조제물물(HDA)에서, TrapoX의 효능도 마찬가지로 천연 BoNT/A와 비교하여 300%까지 증가하였다(제2도).

[0074] 쥐 뇌의 시냅토솜에서의 결합력과 다른 BoNT/A 변형체의 HDA에서의 신경독의 측정

[0075] 쥐의 시냅토솜에 방사선으로 표지된 Hc-절편의 결합은 Rummel et al., J. Mol. Biol. 326 (2003), 835-847에서 기술된 바와 같이 측정되었다. BoNT/A 변형물의 신경독은 Habermann et al., Naunyn Schmiedeberg's Arch에 의하여 기술된 바와 같이 결정되었다.

[0076] 야생형과 다른 BoNT/A 돌연변이체의 결합력의 비교는 다음 표에 나타나 있다.

[0077] 표 2는 도 2에 관한 표이다.

표 2

[0078]

돌연변이체	% vs. 야생형	표준 편차
야생형	100,0	15,00

Y1117A	332,3	29,00
Y1117C	324,2	44,75
Y1117D	124,4	26,94
Y1117E	183,3	27,95
Y1117F	235,9	38,41
Y1117G	112,8	21,34
Y1117H	120,0	22,29
Y1117I	248,1	21,95
Y1117L	253,6	25,65
Y1117M	182,8	18,41
Y1117N	250,3	20,13
Y1117P	150,3	14,98
Y1117Q	187,3	28,19
Y1117R	115,4	16,80
Y1117S	199,2	32,65
Y1117T	264,1	28,55
Y1117V	346,9	37,61
F1252Y	208,0	38,36
H1253K	153,0	9,24
V1262I	97,8	9,38
Q1270N	122,3	37,81
L1278H	170,0	61,59
G1279N	153,6	44,54
Y1117C/H1253K	324,8	22,72
Y1117V/H1253K	332,9	33,48

[0079] BoNT/A의 갱글리오시드 결합포켓 내에 개별적으로 결정된 아미노산의 돌연변이는 신경세포에 결합력의 증가를 초래하였다. 바람직하게는 1117 위치에서 티로신은 알라닌, 시스테인, 또는 발린으로 치환된다. 부분적으로 알라닌에 의하여 1117 위치에서 티로신 잔기의 대체는 약 330%까지 친화력의 증가가 일어났다.

[0080] 갱글리오시드 결합포켓으로부터 1252와 1253 위치에서의 개별적 아미노산의 나머지 돌연변이들 역시 결합력의 증가가 발생하였다. 특히 티로신에서 F1252와 리신에서 H1253의 돌연변이는 각각 110%와 50%까지 친화력의 상승을 초래하였다.

[0081] 더욱이, 신경세포에 결합력의 증가는 1202, 1262, 1270, 1278, 1279 위치에서의 돌연변이체들로 예상될 수 있다.

[0082] 또한, BoNT/A의 돌연변이체는 두 개의 돌연변이로 실험하였고, 특히 돌연변이체 Y1117C/H1253K와 Y1117V/H1253K는 시냅토솜에 결합력의 증가를 초래하였다(제2도 참조).

[0083] BoNT/A의 돌연변이체 Y1117A의 결합력의 증가는 특히 횡격막신경-신경독 분석(HDA-Assay)에서 신경독의 증가를 초래한다는 것이 측정되었다(제3도).

[0084] BoNT/A H_{CC}-혼성물의 결합력과 신경독의 결정

[0085] 결합력과 신경독의 결정은 상술한 바와 같이 수행되었다.

[0086] 그 결과는 다음 표에 반영되어 있으며, 더 상세한 내용은 제4도와 제5도에 나타내었다.

[0087] 표 3은 도 4에 관한 표이다.

표 3

[0088]

돌연변이	% vs. 야생형	표준 편차
HcA wt	100,0	10,4
HcAB	249,2	19,1
HcAC	393,4	57,9
HcAE	22,0	5,3
HcAT	210,2	22,5

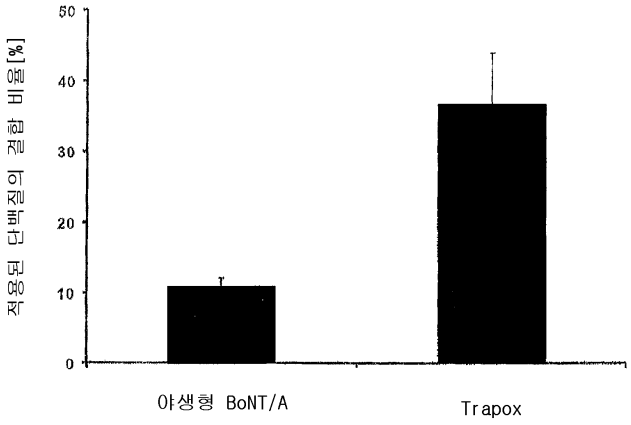
[0089] 다른 항원형, 특히 클로스트리듐 보툴리눔 독소 B와 C에 의하여 BoNT/A의 Hcc-영역의 치환은 신경세포에 결합력의 증가를 초래하였다. 더욱이 파상풍 신경독의 상응하는 영역에 의하여 BoNT/A의 Hc-절편의 Hcc-영역의 치환은 신경세포에서 친화력의 증가를 초래한다는 결과가 측정되었다. 친화력 변화 또한 전체 BoNT/A에서의 Hcc-영역의 치환에 적용된다. 이러한 관계에 있어서 제5도는 잡종 scAtAAB에서 친화력의 증가는 신경독의 증가와 유사한 효과를 가진다는 것을 보여준다. Hcc-영역 대신에 전체 Hc-절편 scAtAAB가 치환된다면, 이에 상응하는 결과는 관찰된다. 특히 BoNT/B의 Hcc-영역 또는 Hc-절편에 의하여 BoNT/A의 Hcc-영역 또는 Hc-절편이 대체될 때 약 350%까지 신경독의 증가는 주목할 만하다는 것이 관찰되었다.

[0090] BoNT 돌연변이체의 갱글리오시드 GT1b에 대한 결합력의 결정

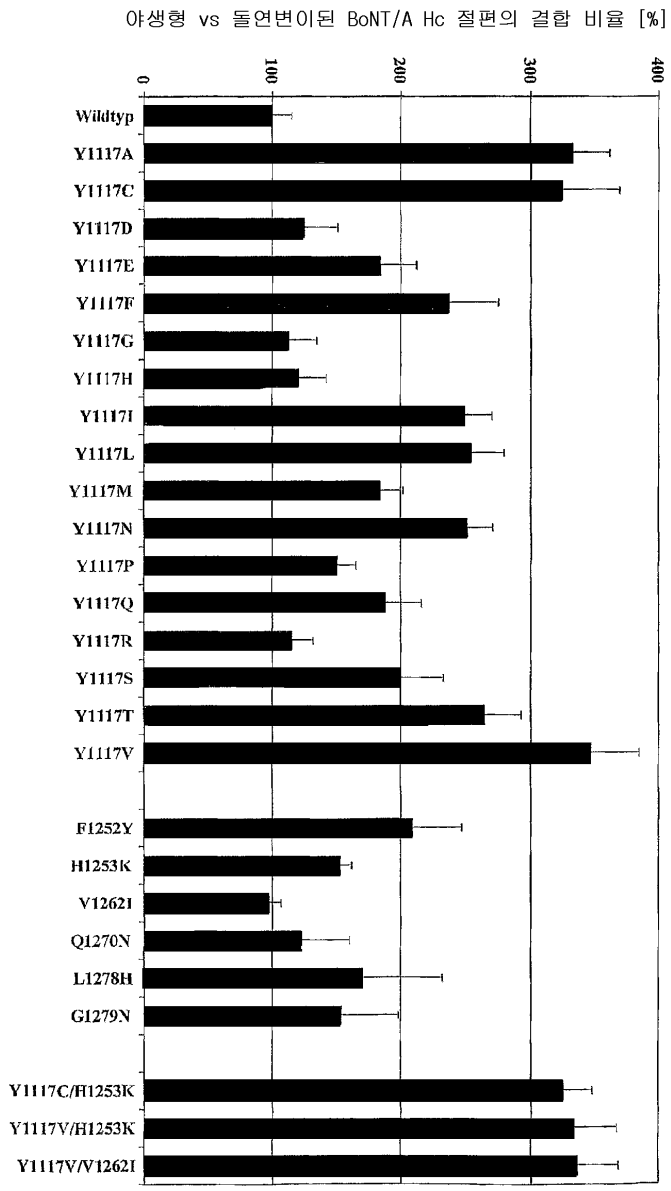
[0091] 갱글리오시드 GT1b [NAcNeuα3Galβ3NAcGalβ4(NAcNeuα8NAcNeuα3)Galβ4Glcβ] (Sigma-Aldrich)는 메탄올에서 용해되고, 고친화성 96-컵 폴리스티렌-미세적정판(Corning; 1㎍ GT1b in 100㎕/cup)에 넣거나, 경쟁분석의 경우 125I-BoNTs를 가진 고친화도 CS 싱글 프랙쳐 스트립 플레이트(Greiner Bio-ohne; 0.1㎍ GT1b in 100㎕/cup)에 놓는다. 용액은 상온에서 증발되고, 컵은 결합완충액(10mM Tris-HCl, 10mM $Na2HPO_4$, 0.5% BSA, pH 7.2)으로 세 번 헹군다. 비특정 결합위치는 3%(V/V) BSA에 의하여 보강되는 PBS/Tween(140 mM NaCl, 7mM KCl, 10mM $Na2HPO_4$, 1.8mM KH_2PO_4, 0.05%(V/V) Tween 20, pH 7.2)에서 두 시간 동안의 배양에 의하여 차단된다. 결합력 분석은 2시간 동안 상온에서 야생형의 양을 증가시키거나 돌연변이체의 특정량을 가하여 결합 완충액(100㎕/cup)으로 수행된다. 비결합된 단백질은 3회의 세척단계, 각각 250㎕ PBS/Tween 완충액으로 제거된다. 결합된 Hc-절편은 제조자의 지시에 따라 상온에서 2시간을 지속시키기 위하여 결합 완충액에서 알칼린 인산염과 결합된 스트랩 탁신(ST-AP IBA GmcH)을 가진 배양에 의하여 확인된다. 인산-p-니트로페닐(1mg/㎖ in 100mM glycine, 1mM $MgCl_2$, 1mM $ZnCl_2$, pH 10.4)은 결국 알칼린 포스페타아제에 대한 기질로서 작용한다. 데스포포릴레이션 반응은 3M NaOH 용액을 가하는 것에 의하여 중단되고, 그 중단상태는 Spectra Count micro plate reading device(Packard)를 사용하여 405㎚으로 측정된다. 경쟁 분석은 700000cpm/cup(125I)-BoNT를 가진 100㎕ 결합 완충액에서 본래의 BoNT 또는 재결합 Hc-절편과는 다른 양으로 2시간에 걸쳐서 상온에서 실시한다. 배양과 상등액 제거 후 컵은 PBS/Tween 완충액으로 세 번 헹구고, 건조 후 분리한다. 그 후, 방사능 표지된 BoNT의 양은 자동 γ-카운터(Wallac 1480 Wizzard 3)로 측정된다.

도면

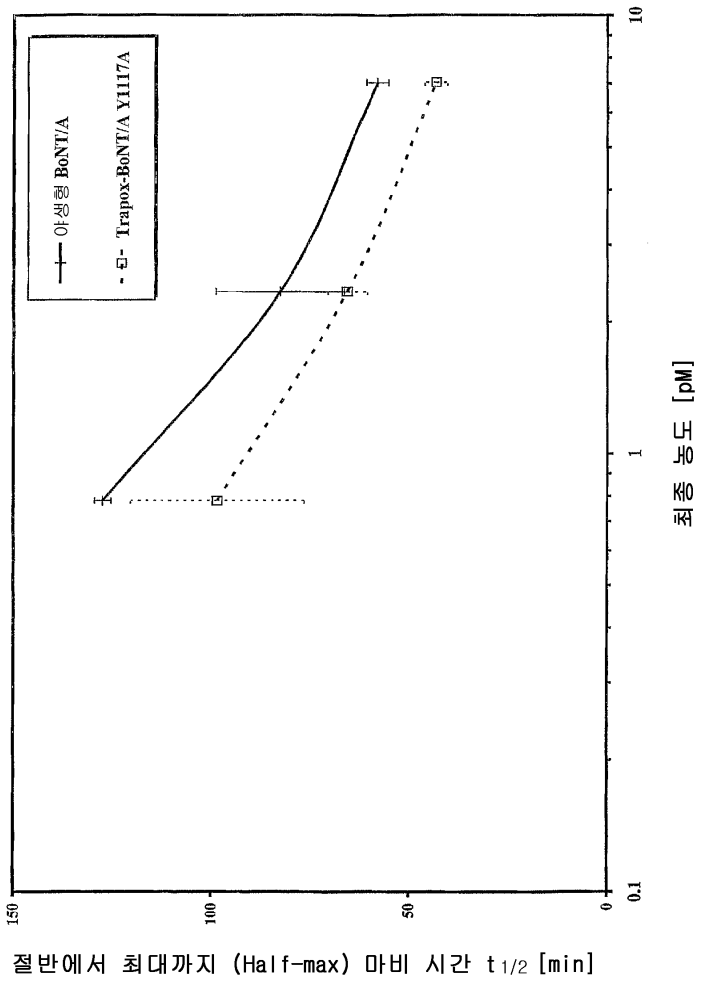
도면1



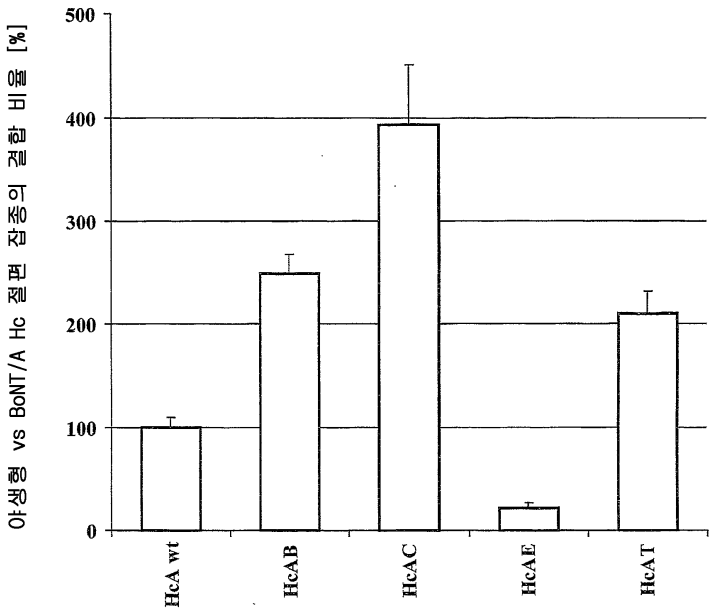
도면2


야생형 vs 돌연변이된 BoNT/A Hc 절편의 결합 비율 [%]
0
100
200
300
400
Wildtyp
Y1117A
Y1117C
Y1117D
Y1117E
Y1117F
Y1117G
Y1117H
Y1117I
Y1117L
Y1117M
Y1117N
Y1117P
Y1117Q
Y1117R
Y1117S
Y1117T
Y1117V
F1252Y
H1253K
V1262I
Q1270N
L1278H
G1279N
Y1117C/H1253K
Y1117V/H1253K
Y1117V/V1262I

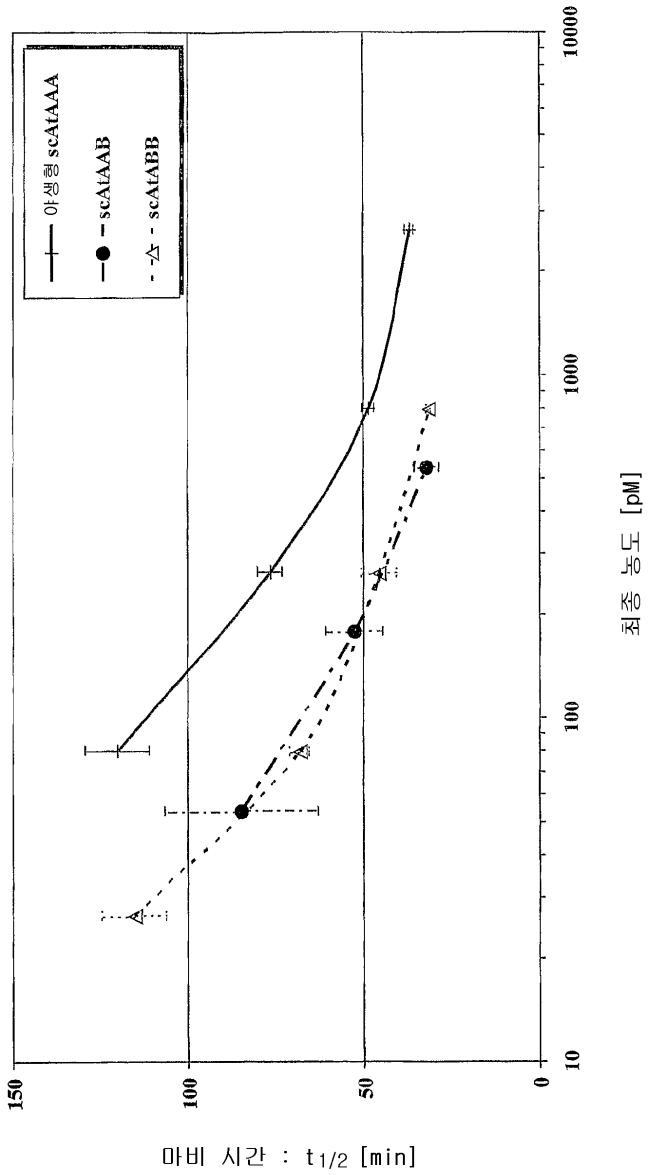
도면3


야생형 BoNT/A
Trapox-BoNT/A Y1117/A
최종 농도 [pM]
10
1
0.1
150
100
50
0
절반에서 최대까지 (Half-max) 마비 시간 t1/2 [min]

도면4


야생형 vs BoNT/A Hc 절편 잡종의 결합 비율 [%]
500
400
300
200
100
0
HcA wt
HcAB
HcAC
HcAE
HcAT

도면5


아생형 scAtAAA
scAtAAB
scAtABB
10000
1000
100
10
최종 농도 [pM]
150
100
50
0
마비 시간 : t1/2 [min]