(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월27일
(11) 등록번호 10-0832733
(24) 등록일자 2008년05월21일

(51) Int. Cl.
C07K 14/81 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7012014(분할)
(22) 출원일자 2007년05월28일
심사청구일자 2007년06월15일
번역문제출일자 2007년05월28일
(65) 공개번호 10-2007-0085485
(43) 공개일자 2007년08월27일
(62) 원출원 특허 10-2001-7016463
원출원일자 2001년12월21일
심사청구일자 2005년06월21일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2000/004101
국제출원일자 2000년06월22일
(87) 국제공개번호 WO 2000/78811
국제공개일자 2000년12월28일
(30) 우선권주장
JP-P-1999-00176967 1999년06월23일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
Biochemistry. vol.37(10):3272-3277.
전체 청구항 수 : 총 2 항

(73) 특허권자
아벤티스 파마 가부시끼가이샤
일본 107-8465 도꾜도 미나또꾸 아까사까 2쪼메 17방 51고
고이데 다케히코
일본 효고켄 이보군 신구마치 고토 2초메 3반 23고
(72) 발명자
고이데 다케히코
일본 효고켄 이보군 신구마치 고토 2초메 3반 23고
(74) 대리인
이병호, 장훈

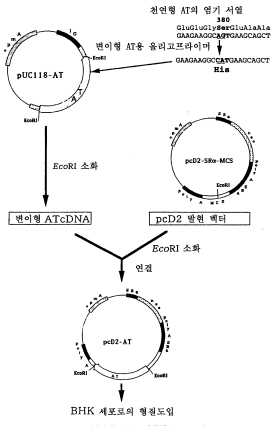
심사관 : 손영희

(54) 사람 안티트롬빈 변이체

(57) 요 약

본 발명은 헤파린 부재하에서도 프로테아제 억제 활성이 높은 사람 안티트롬빈 변이체로서, 천연의 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 78위치, 278위치, 378위치 및 380위치의 아미노산 중의 하나 이상이 다른 아미노산으로 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체를 제공한다. 바람직하게는 78위치가 Phe에 의해; 278위치가 Ala, Arg, Asn, Gly, His, Tyr 또는 Val에 의해; 378위치가 Lys, Asn 또는 Val에 의해; 및/또는 380위치가 Ala, Asp, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Arg, Thr, Tyr 또는 Val에 의해 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체를 제공한다.

대표도 - 도1



(81) 지정국

국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 대한민국, 미국

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

특허청구의 범위

청구항 1

헤파린의 부재 하에서 프로테아제 억제 활성을 나타내는, 천연의 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 78위치가 Phe로 변환된 변이체 (Leu78Phe) 및 천연의 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 380위치가 Gly로 변환된 변이체 (Ser380Gly)로부터 선택되는, 사람 안티트롬빈 변이체.

청구항 2

제1항에 따르는 사람 안티트롬빈 변이체를 암호화하는 DNA.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<2> 본 발명은 헤파린 부재하에도 높은 프로테아제 억제 활성을 갖는 인공의 사람 안티트롬빈 변이체에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 천연의 사람 안티트롬빈 분자의 입체 구조를 유전자 조작에 의해 개질시킨 변이체로서 헤파린 결합후 입체 구조를 갖는 사람 안티트롬빈 변이체에 관한 것이다. 당해 변이체는 예를 들면, DIC, 혈전성 질병이나 임신 중독증 치료에 사용할 수 있다.

<3> 천연의 안티트롬빈은 몇가지 종류의 안티트롬빈 활성이 있는 것으로 나타나며 안티트롬빈 I 내지 VI가 제안되어 있다. 그러나, 오늘날까지 단백질로서 단리된 것은 안티트롬빈 III 뿐이라는 사실로부터 현재에는 안티트롬빈 III은 간단히 안티트롬빈이라고 호칭되고 있다. 따라서 본 발명에서 이하, 안티트롬빈 III을 안티트롬빈이라고 호칭한다.

<4> 천연의 사람 안티트롬빈은 혈액 응고계의 프로테아제 억제 활성을 갖는 분자량 58,000의 일본쇄의 당단백질이다. 천연의 사람 안티트롬빈은 464개의 아미노산 잔기로 이루어진 전구체 단백질로서 생합성되지만, 분비과정에서 32개의 잔기로 이루어진 시그널 펩타이드 부분이 분해되어 제거되므로 혈관내를 순환하는 성숙한 사람 안티트롬빈은 432개의 아미노산 잔기로 이루어진다. 6개의 시스테인 잔기(Cys)는 모두 디설파이드 결합을 형성하고 있으며 Cys8-Cys128, Cys21-Cys95 및 Cys247-Cys430의 3개 위치의 S-S 결합으로 사람 안티트롬빈 분자를 안정화시키고 있다. 천연의 사람 안티트롬빈에는 약 15%의 당이 함유되어 있으며 4개 위치의 아스파라긴 잔기(Asn96, Asn135, Asn155 및 Asn192)에 복합형 당쇄가 결합되어 있다. 천연의 사람 안티트롬빈의 분자중에 프로테아제의 활성 중심과 직접 상호작용하여 결합되는 장소는 반응 부위라고 호칭되며 펩타이드 쇄의 C 말단 근처에 위치한 Arg393-Ser394이다.

<5> 천연의 사람 안티트롬빈은 α_1-안티트립신이나 헤파린 보조인자 II와 동일하게 세르핀(Serpins) 수퍼패밀리 (superfamily)에 속하는 혈장 단백질이며 트롬빈, 활성화 X 인자(Xa 인자), 활성화 IX 인자(IXa 인자) 등의 주요한 응고 효소의 활성을 조절하는 응고계의 주요한 조절인자이다. 이러한 약리활성을 갖는 천연의 사람 안티트롬빈은, 응고의 이상 항진의 보정, 구체적으로는 혈관내 응고 증후군(DIC)이나 임신중의 고혈압, 단백뇨, 부종(浮腫)을 주된 징후로 하는 임신 중독증 및 선천성 사람 안티트롬빈 결핍에 근거하는 혈전 형성 경향의 치료를 목적으로 하여 사용하고 있다.

<6> 천연의 사람 안티트롬빈은 헤파린에 높은 친화성이 있으며, 헤파린 존재하에 트롬빈이나 Xa 인자에 대한 억제속도는 각각 1000배와 300배로 촉진되는 것으로 잘 알려져 있다.

<7> 지금까지의 1차 구조 수준의 해석에 의해, 천연의 사람 안티트롬빈의 N 말단 영역에 헤파린 결합 부위가 있으며 C 말단 근처에 프로테아제와의 반응 부위(Arg393-Sre394)가 있다는 것이 명백하게 밝혀졌다. 또한, 혈중 천연의 사람 안티트롬빈의 5 내지 10%는 Asn135에 당쇄가 결합되어 있지 않은 분자 종(사람 안티트롬빈 β)이며 주요한 분자 종(사람 안티트롬빈 α)보다 높은 헤파린 친화성을 나타낸다.

<8> 천연의 사람 안티트롬빈 분자는 다른 혈중 세르핀과 동일하게 3차원 구조적으로는 A, B 및 C의 3방향으로 대별되는 역평행 β시트로 이루어진 다수의 쇄(s1A 내지 s4C라고 약칭), 9개의 α-나선(hA 내지 hI라고 약칭)과 코

일 구조 부분으로 구성되는 단백질이다(참조: Stein PE, Carrell RW, Nature Struct Biol 2: 96 1995). 최근, 천연형(native form)과 잠재형(latent form)의 안티트롬빈 이량체의 2.6Å 분해능에서의 X선 결정 구조(참조: Skinner R., et al., J. Mol. Biol. 266: 601, 1997)나 고친화성 헤파린의 코어 부분의 펜타삭카라이드와의 복합체의 2.9Å 분해능에서의 결정 구조가 보고되어 있으며(참조: Jin L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94: 14683, 1997), 천연의 사람 안티트롬빈과 헤파린의 3차원 상호작용 부위와 헤파린 결합에 의한 사람 안티트롬빈 분자내의 동적 구조 변화가 기재되어 있다.

<9> 본 발명자는 지금까지 이들 천연의 사람 안티트롬빈 분자내의 동적 구조 변화로부터, 사람 안티트롬빈은 헤파린 부재하에서는 억제인자로서 「불완전」한 세르핀이며 헤파린 존재하에 비로소 「완전」한 억제인자로 된다고 생각했다.

<10> 지금까지의 발견을 근거로 하여 천연의 사람 안티트롬빈 중의 특정한 아미노산을 변환시켜 헤파린 부재하에도 프로테아제 억제 활성이 높은 사람 안티트롬빈 변이체의 제조가 시도되고 있다. 예를 들면, 천연의 사람 안티트롬빈의 49위치, 96위치, 135위치, 155위치, 192위치, 393위치 및 394위치의 아미노산 1개 또는 2개 이상이 다른 아미노산으로 변환된 사람 안티트롬빈 변이체가 기재되어 있다[참조: 일본 공개특허공보 제(평)2-262598호]. 또한, 11 내지 14위치, 41 내지 47위치, 125 내지 133위치 및 384 내지 398위치의 4개 영역의 아미노산이 각각의 영역에서 단독으로 또는 조합되어 하나 이상의 다른 아미노산으로 변환된 사람 안티트롬빈 변이체가 기재되어 있다[참조: 일본 공개특허공보 제(평)5-339292호]. 그러나, 이들 변이체의 효력은 반드시 충분하지는 않으며 헤파린 부재하에 프로테아제 억제 활성이 보다 강한 사람 안티트롬빈 변이체의 제조가 요망되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 지금까지의 발견을 근거로 하여 천연의 사람 안티트롬빈 중의 특정한 아미노산을 변환시켜 헤파린 부재하에도 프로테아제 억제 활성이 높은 사람 안티트롬빈 변이체의 제조가 시도되고 있다. 예를 들면, 천연의 사람 안티트롬빈의 49위치, 96위치, 135위치, 155위치, 192위치, 393위치 및 394위치의 아미노산 1개 또는 2개 이상이 다른 아미노산으로 변환된 사람 안티트롬빈 변이체가 기재되어 있다[참조: 일본 공개특허공보 제(평)2-262598호]. 또한, 11 내지 14위치, 41 내지 47위치, 125 내지 133위치 및 384 내지 398위치의 4개 영역의 아미노산이 각각의 영역에서 단독으로 또는 조합되어 하나 이상의 다른 아미노산으로 변환된 사람 안티트롬빈 변이체가 기재되어 있다[참조: 일본 공개특허공보 제(평)5-339292호]. 그러나, 이들 변이체의 효력은 반드시 충분하지는 않으며 헤파린 부재하에 프로테아제 억제 활성이 보다 강한 사람 안티트롬빈 변이체의 제조가 요망되고 있다.

발명의 구성 및 작용

<12> 본 발명의 목적은 헤파린 부재하에 완전한 억제인자로서 작용하여 프로테아제 억제 활성이 높은 신규한 사람 안티트롬빈 변이체를 제공하는 것이다.

<13> 천연의 사람 안티트롬빈이 프로테아제 억제인자로서 기능할 때, 사람 안티트롬빈 중의 반응 루프(loop)에 큰 구조 변화가 일어난다. 요컨대, 천연의 사람 안티트롬빈의 분자 표면에 돌출되어 있는 반응 루프가 표적 프로테아제의 「기질」로서 인식되며 반응 부위[P1(Arg393)-P1'(Ser394)]의 펩타이드 결합이 프로테아제에 의해 절단된다. 이때에 P1 위치 Arg393의 카보닐 탄소와 프로테아제의 활성 중심 Ser195의 수산기의 산소 사이에 아실 결합이 형성되어 아실 효소 복합체가 형성되는 동시에, 절단된 반응 루프의 N 말단측 15잔기(P1 내지 P15)가 s3A와 s5A 사이에 삽입되며 새로운 쇄(s4A)를 형성한다. 이때에 Arg393는 프로테아제를 따라 사람 안티트롬빈 분자의 말단으로부터 말단까지 약 70Å 이동한다. 이러한 동적 변화가 프로테아제와의 안정적인 복합체 형성에 중요하다고 생각되고 있다. 천연의 사람 안티트롬빈이나 플라스미노겐 활성인자 억제인자 1에서 반응부위가 절단되어 있지 않음에도 불구하고 s4A로서 분자내에 삽입된 잠재형(latent form)의 존재가 공지되어 있으며, 세르핀의 안정한 구조는 s4A의 형성에 있다고 생각되고 있다.

<14> 천연형 α-안티트립신의 반응 루프는 분자 표면에 완전히 노출되어 있으며 P1 위치 Met358의 측쇄가 분자의 외측에 배향되어 있으며 세린 프로테아제의 활성부위와 상보적인 입체 배좌(conformation)를 형성하고 있으므로 프로테아제와의 반응성이 높으며 절단후의 반응 루프의 분자내 삽입이 일어나기 쉽다. 그러나, 천연의 사람 안티트롬빈의 P1 위치 Arg393의 측쇄는 분자의 내측에 배향되어 있으므로 프로테아제와의 반응성이 대단히 낮다(참조: Jin L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997). 본 발명자는 보다 중요한 점으로서 천연의 사람 안티트롬빈의 반응 루프가 P14위치(Ser380)와 P15위치(Gly379)에서 쇄 내에 삽입되므로 쇄에 변형을 부여하고 절단된 반응 루프의 삽입도 일어나기 어려운 점에 주목하였다. 헤파린이 천연의 사람 안티트롬빈에 결합되면 사람 안티트롬빈 분자중의 다양한 부위에서 입체 구조상의 변화가 일어나지만, 이러한 P14위치

(Ser380)와 P15위치(Gly379)의 아미노산은 헤파린 결합의 알로스테릭적(allosteric) 영향(입체장애적 영향)을 받아 쇄로부터 압출되며 α-안티트립신과 동일한 위치로 이동한다(참조: Jin L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997).

<15> 본 발명자는 상기한 사람 안티트롬빈, 플라스미노겐 활성인자 억제인자 1 및 α_1-안티트립신 중의 각각의 반응 루프에 관한 입체 구조 변화를 해석, 검토함으로써 천연의 사람 안티트롬빈 중의 P14위치(Ser380)가 헤파린 부재하에 완전한 억제인자로서 기능하고 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 제조하기 위한 중요한 부위라고 판단된다. 또한, 본 발명자는 천연의 사람 안티트롬빈의 반응 루프에서 P15 내지 P10 위치는 근위(近位) 힌지(proximal hinge) 영역이라고 호칭된다는 점으로부터 이러한 사람 안티트롬빈 중에서 입체 구조적인 특징을 검토한다. 그 결과, 이러한 근위 힌지 영역은 반응 루프가 s4A로서 들어갈 때의 힌지(경첩)의 역할을 담당하고 있으므로 이의 기부(base)에 해당하는 P16 위치(Glu378)도 P14 위치와 동일하게 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 사람 안티트롬빈 변이체를 제조하기 위해 적절한 아미노산으로 변환해야 할 부위라고 판단한다.

<16> 한편, 천연의 사람 안티트롬빈의 반응 루프는 프로테아제에 의해 절단되면 s3A와 s5A 사이에 s4A로서 분자내에 삽입되지만, 이들 쇄 사이가 개방될 때에 관여하는 영역이 hB(Ser79 내지 Thr90)를 중심으로 하는 셔터(shutter) 영역인 것으로 공지되어 있다(참조: Stein PE, Carrel RW, Nature Struct Biol 2: 96, 1995). 본 발명자는 s3A와 s5A 사이가 개방될 때에는 우선 양쪽 쇄 간의 수소결합이 절단된 후, 이들 쇄가 hB의 홈 위를 슬라이드하여 당해 영역의 「개방 용이성」이 반응 루프의「삽입 용이성」과 관련된다는 발견을 했다. 요컨대, 천연의 사람 안티트롬빈의 셔터 영역은 s3A와 s5A 사이의 개폐에 영향을 주며, 다시 헤파린과의 결합이나 안티트롬빈의 활성에도 영향을 주는 중요한 영역이며, 이러한 셔터 영역의 기부에 해당하는 78위치(Leu78)를 다른 아미노산으로 변환함으로써 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 사람 안티트롬빈 변이체를 제조할 수 있다고 판단된다.

<17> 다음에 본 발명자는 헤파린 결합에 따른 천연의 사람 안티트롬빈의 동적 구조 변화와 프로테아제 억제 활성의 촉진에 관해서 특히 헤파린 결합 영역의 각 아미노산의 입체 구조를 해석, 검토하였다. 지금까지 천연의 사람 안티트롬빈 중의 헤파린 결합 영역은 47위치의 Arg가 Cys로 변환된 안티트롬빈 도야마(TOYAMA)(참조: Koide T., Takahashi K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 289, 1984) 등의 이상(異常) 증례(症例)의 해석이나 화학적 변형 실험, 또한 부위 특이적 변이체의 해석에 의해 hA와 hD에 존재하는 염기성 아미노산 잔기 그룹인 것이 명백하였으나, 상기한 X선 결정 구조 해석(참조: Jin L,, et al., Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 94: 14683, 1997)에 의해 천연의 사람 안티트롬빈의 헤파린 유래 펜타삭카라이드 결합 부위는 hD(Lys125나 Arg129의 측쇄), hA(Arg46이나 Arg47의 측쇄 및 Asn45의 주쇄 아미드), N 말단 영역(Lys11, Arg13의 측쇄와 주쇄 아미드)과 hC-hD 사이에 펜타사카로이드 결합에 의해 신생하는 「P-나선체(helix)」(P는 펜타사카로이드로 부터 유래한다) 중의 Glu113의 주쇄 아미드와 Lys114의 측쇄 및 주쇄 아미드인 것이 명백해졌다. 펜타삭카라이드가 접촉되면 Arg46과 Arg47은 각각 17Å과 8Å 이동하여 당쇄의 황산기와 수소결합을 형성한다. 또한, hD는 s2A와 s3A를 압박하는 방향으로 약 10도 경사, 이의 N 말단측의 Glu113 내지 Gln118의 코일 구조가 2회전의 hP로 되며 hD에 대하여 직각 방향으로 형성된다. 또한, hD의 C말단측도 1.5회전분의 나선체가 형성되어 Arg132, Lys133, Lys136의 측쇄가 펜타삭카라이드 결합 부위의 방향을 향하게 된다. 이들 잔기는 펜타삭카라이드와 떨어져 있으므로 양쪽 사이에 수소결합은 형성되지 않지만, 장쇄 헤파린과는 상호작용할 가능성이 높다고 생각된다. 또한, hD가 신장함에 따른 알로스테릭 효과에서 상기한 사람 안티트롬빈의 천연형에서는 쇄 내에 삽입되어 있는 반응 루프내의 P14, P15 위치의 아미노산 잔기가 압출되며 쇄의 변형이 없어지는 동시에, P1 위치 Arg393의 측쇄가 분자의 외측을 향하게 되며 억제인자로서 반응하기 쉬운 형으로 변환된다(참조: Pike RN, et al., J. Biol. Chem. 272: 19652, 1997). 또한, 사람 안티트롬빈의 N 말단 부분(Ile22 내지 Arg46)은 펜타삭카라이드가 결합되면 많이 이동하여 안티트롬빈-펜타삭카로이드 복합체를 안정화하는 입체적인 게이트로서 역할을 담당하고 있다(참조: Fitton, HL, et al., Protein science 7: 782, 1998). 천연의 사람 안티트롬빈의 천연형과 잠재형의 입체 구조를 비교하면, 천연형의 hD는 약간 비틀려 있으며 헤파린 결합 부위인 Arg47, Lys125 및 Arg129는 펜타삭카라이드 결합 영역의 방향으로 향하며 Arg129의 Nε기는 Asp278의 측쇄와 수소결합을 형성하여 측쇄를 안정화시킴으로써 펜타삭카라이드의 황산기와 이온적인 상호작용을 하기 쉽게 하고 있다. 그러나, 잠재형에서는 hD는 곧바르게 신장되어 Arg47은 Ser112, Lys125는 Ile7과 수소결합되어 있으며 헤파린 결합에 중요한 아미노산 잔기의 영역은 모두 헤파린 결합 영역의 방향으로 향하고 있지 않다(참조: Skinner R., et al., J. Mol. Biol. 266: 601, 1997). 그래서 본 발명자는 Arg129와 Asp278의 수소결합을 미리 절단하는 것으로 헤파린 부재하에서도 헤파린 존재하와 유사한 입체 구조로 변화시킬 수 있다고 판단했다. 그래서 Arg129와 수소결합되어 있는

278위치(Asp278)의 아미노산을 다른 아미노산으로 변환시킴으로써 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 안티트롬빈 변이체를 제조할 수 있다고 생각했다.

<18> 이와 같이 본 발명자는 지금까지 해석된 천연의 사람 안티트롬빈의 헤파린 결합에 따른 안티트롬빈의 동적 구조 변화에 관한 정보를 검토한 뒤에 천연의 사람 안티트롬빈의 프로테아제 억제 활성 촉진에 바람직한 입체 구조상의 변환 부위를 찾아냈다. 즉, 천연의 사람 안티트롬빈의 반응 루프의 힌지 영역, s4A 형성시의 힌지 영역, 또한 헤파린 결합에 관련되는 부위를 하나 이상의 다른 아미노산으로 변환시켜 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 사람 안티트롬빈 변이체를 제조할 수 있다는 결론을 얻었다. 이러한 결론에 근거하여 본 발명자는 사람 안티트롬빈 변이체의 개량을 예의 연구한 결과, 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 신규한 사람 안티트롬빈 변이체 제조에 성공하여 본 발명을 완성했다.

<19> 즉, 본 발명은 천연의 사람 안티트롬빈의 변이체로서, 천연의 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 78위치, 278위치, 378위치 및 380위치의 아미노산 중의 하나 이상이 다른 아미노산으로 변환되어 있음을 특징으로 하는, 사람 안티트롬빈 변이체에 관한 것이다. 이들 사람 안티트롬빈 변이체 중에 다음의 것이 특히 바람직하다:

<20> 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 78위치가 Phe로 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체,

<21> 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 278위치가 Ala, Arg, Asn, Gly, His, Tyr 및 Val로부터 선택된 아미노산으로 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체,

<22> 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 378위치가 Lys, Asn 및 Val로부터 선택된 아미노산으로 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체 및

<23> 사람 안티트롬빈의 아미노산 서열의 380위치가 Ala, Asp, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Arg, Thr, Tyr 및 Val로부터 선택된 아미노산으로 변환되어 있는 사람 안티트롬빈 변이체.

<24> 또한 본 발명은 사람 안티트롬빈 변이체를 암호화하는 DNA에 관한 것이다.

<25> **발명을 실시하기 위한 최상의 양태**

<26> 본 발명의 신규한 사람 안티트롬빈 변이체는 부위 특이적 변이도입법에 의해 헤파린 결합후의 입체 구조와 유사한 변이체를 제조한다. 즉, 목적하는 사람 안티트롬빈 변이체 cDNA를 (1) 일본쇄 pUC118-AT의 제조, (2) 스컬프터법(Sculptor method)에 의한 변이 도입 (서열 1 내지 서열 3), (3) 변이 도입의 확인 및 (4) EcoRI 소화에 의한 절단의 순서에 의해 제조한다. 당해 변이체 cDNA를 동일하게 EcoRI로 소화시킨 pcD2 발현 벡터에 삽입시켜 제조한 플라스미드로 BHK 세포를 형질전환시킨다. 형질전환시킨 BHK 세포를 선택 배양하여 목적하는 사람 안티트롬빈 변이체를 제조한다(도 1).

<27> 이하에 구체적인 변이체 제조방법을 기재하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

<28> 천연형 안티트롬빈 cDNA(일본쇄) 2.5㎍(10㎕)에 아미노산 치환용의 변이 프라이머(0.475 OD/ml) 30㎕를 어닐링시켜 DNA 폴리머라제로 전체 길이를 합성시킨다. 다음에 염기 서열을 결정하여 변이 도입을 확인한다. 각 안티트롬빈 변이체 cDNA(1.4kb)를 pcD2 벡터의 EcoRI 부위에 편입시키고 EdoRI와 PstI로 절단하여 삽입 서열의 방향을 확인한다. 정방향으로 편입된 것에 관해서 대량 제조를 위해 인산칼슘법으로 BHK 세포에 형질감염시킨다(도 1). G418로 네오마이신 내성의 안정 발현세포를 선택하고 이들을 풀링(pool)한다. 안정 발현 BHK(새끼 햄스터 신장) 세포의 풀을 사용하여 펄스 추적 실험(pulse-chase experiment)을 실시한다. 직경 35mm의 디쉬에 5×10^5개의 세포를 뿌리고 밤새 배양한다. EXPRE35S35S(100㎕Ci/ml)를 6.8㎕ 첨가하여 30분 동안 표지시킨 다음, 배양액을 DME/10% FCS, Met, Cys로 교환하여 8시간 동안 추적을 실시하고 0, 0.5, 1, 2, 4, 8시간 후의 배양 상청액(CM)과 세포 추출액(CE)을 수득한다. 각 시간마다 CM과 CE를 항체와 Staphylosorb™로 면역 침강시킨 다음, 8% SDS-PAGE(+SH)를 실시하고 수득된 당해 RI 밴드의 RI량을 정량함으로써 재조합 변이체의 분비량을 정량한다.

<29> 분비량이 높은 변이체에 관해서는 8시간 동안 추적한 후 CM을 회수한다. 회수액 500㎕에 대하여 트롬빈 또는 Xa 인자를 가하여 헤파린 부재하에서는 37℃, 5분과 60분, 헤파린 존재하에서는 5분 동안 반응시킨 다음, 면역 침강시켜 10% SDS-PAGE(+SH)로 복합체량을 정량한다.

<30> 1)분비성

<31> 각 안티트롬빈 재조합 변이체의 BHK 세포로부터의 분비성에 관해서 표 1에 정리하여 기재한다. 펄스 표지시의

방사선량을 100%로 할 때 추적 8시간 후의 세포내 양과 분비량을 기재한 것인데, 천연형 재조합체의 분비량이 89%인데 대하여 78위치의 Leu가 Phe로 변환되어 있는 Leu78Phe 변이체는 분비량이 90%이다. 또한, 278위치의 Asp가 Ala, Gly, His 또는 Tyr로 변환되어 있는 변이체(Asp278Ala, Asp278Gly, Asp278His 또는 Asp278Tyr)에서는 각각 104%, 104%, 165% 또는 160%로서 천연형 재조합체 이상의 분비성이 얻어진다.

<32> 한편 278위치의 Asp가 Arg, Asn 또는 Val로 변환되어 있는 변이체(Asp278Arg, Asp278Asn 또는 Asp278Val)에서는 분비량이 각각 57%, 48% 또는 51%이다. 380위치의 Ser이 Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, His, Pro, Thr, Tyr 또는 Val로 변환되어 있는 변이체(Ser380Ala, Ser380Arg, Ser380Asn, Ser380Asp, Ser380Gly, Ser380His, Ser380Pro, Ser380Thr, Ser380Tyr 또는 Ser380Val)에서는 모두 분비성이 양호하지만, 이중에서도 Asn과 Val로 변환된 변이체에서는 각각 154%와 144%로서 분비성이 높다.

<33> 2)트롬빈과의 복합체(TAT) 형성능

<34> 각 안티트롬빈 재조합 변이체의 트롬빈과의 복합체(TAT) 형성능을 조사한 결과를 표 2에 정리하여 기재한다. 본 발명의 최대 효과인 헤파린 부재하의 즉각적인 TAT 형성능은 천연형 재조합체의 TAT 형성능을 100%로 할 때의 상대값이 78위치의 Leu가 Phe로 변환되어 있는 Leu78Phe 변이체에서는 131%, 278위치의 Asp가 His로 변환되어 있는 Asp278His 변이체에서는 163%, 또한 380위치의 Ser이 Gly 또는 Tyr로 변환되어 있는 Ser380Gly와 Ser380Tyr 변이체에서는 각각 171%와 172%이며, 모두 천연형 재조합체보다도 고성능인 변이체가 수득되고 있다. 또한, 표 2에 기재된 변이체는 모두 장시간(120분)의 트롬빈과의 상호작용에서도 천연형 재조합체와 동일한 정도(Leu78Phe, Asp278His 및 Ser380Ala 변이체) 또는 천연형 재조합체 이상(Asp278Ala, Asp278Val, Asp278Tyr, Ser380Gly 및 Ser380Tyr 변이체)의 안정적인 TAT 형성능을 갖고 있다.

<35> 또한, 헤파린 존재하의 즉각적인 TAT 형성능에 관해서는 모든 변이체에서 보존되어 있으며 헤파린과 병용되는 항혈전증 약제로서의 유효성도 나타낸다.

<36> 3)Xa 인자와의 복합체(Xa-AT) 형성능

<37> 각 안티트롬빈 재조합 변이체의 Xa 인자와의 복합체(Xa-AT) 형성능을 조사한 결과를 표 3에 정리하여 기재한다. 본 발명의 최대 효과인 헤파린 부재하에서의 즉각적인 Xa-AT 형성능은 천연형 재조합체의 Xa-AT 형성능을 100%로 할 때의 상대값이 78위치의 Leu가 Phe로 변환되어 있는 Leu78Phe 변이체에서는 106%이다. 또한, 278위치의 Asp가 Gly, His 또는 Tyr로 변환되어 있는 Asp278Gly, Asp278His 또는 Asp278Tyr 변이체에서는 각각 144%, 171% 또는 131%이며, 모두 천연형 재조합체보다도 고성능인 변이체가 수득되고 있다. 또한, 장시간(60분)의 Xa 인자와의 상호작용에서도 천연형 재조합체와 동일한 정도(Leu78Phe, Asp278Gly, Asp278His 및 Ser380Tyr 변이체) 또는 천연형 재조합체 이상(Asp278Val, Asp278Tyr 및 Ser380Gly 변이체)의 안정적인 TAT 형성능을 갖고 있다.

<38> 또한, 헤파린 존재하의 즉각적인 Xa-AT 형성능은 Leu78Phe, Asp278Ala 및 Asp278Gly 변이체에서는 천연형 재조합체와 비교하여 거의 반감하고 있으며 헤파린 비의존성의 고성능 Xa인자 억제제로서 효과적인 것으로 나타난다. 한편, Asp278Val, Asp278Tyr, Ser380Gly, Ser380Thr 및 Ser380Tyr의 각 변이체에 관해서는 천연형 재조합체 이상의 헤파린 존재하의 즉각적인 Xa-AT 형성능이 보존되어 있으며 헤파린과 병용되는 항혈전증 약제로서의 유효성도 나타낸다.

표 1

<39> AT 재조합 변이체의 분비성, 펄스 표지시의 방사선량을 100%로 할 때의 추적 8시간 후의 세포내 양과 분비량

재조합체	세포내 양(%)	분비량(%)	합계
천연형	1.4	89	90.4
Leu 78 Phe	10	90	100
Asp 278 Ala	16	104	120
Asp 278 Arg	4.6	57	61.6
Asp 278 Asn	4.9	48	52.9
Asp 278 Gly	22	104	126
Asp 278 His	9.2	165	174.2
Asp 278 Tyr	16	160	176
Asp 278 Val	4.6	51	55.6
Glu 378 Lys	15	62	77
Ser 380 Ala	4.9	79	83.9
Ser 380 Arg	10	73	83
Ser 380 Asn	38	154	192
Ser 380 Asp	10	83	93
Ser 380 Gly	6.1	128	134.1
Ser 380 His	8.3	120	128.3
Ser 380 Pro	30	63	93
Ser 380 Thr	13	122	135
Ser 380 Tyr	11	78	89
Ser 380 Val	17	144	161

표 2

<40> AT 재조합 변이체의 TAT 복합체 형성

재조합체 AT	TAT(%) (-)헤파린, 5분	TAT(%) (-)헤파린, 120분	TAT(%) (+)헤파린, 5분
천연형	100	100	100
Leu 78 Phe	131	93	81
Asp 278 Ala	102	108	99
Asp 278 His	163	95	89
Asp 278 Val	90	108	104
Asp 278 Tyr	105	106	104
Ser 380 Ala	56	86	118
Ser 380 Gly	171	112	98
Ser 380 Tyr	172	122	111
값은 천연형 재조합체 AT의 TAT 형성능을 100%로 할 때의 상대값이다.			

표 3

<41> AT 재조합 변이체의 Xa-AT 복합체 형성

재조합체 AT	Xa-AT(%) (-)헤파린, 5분	Xa-AT(%) (-)헤파린, 60분	Xa-AT(%) (+)헤파린, 5분
천연형	100	100	100
Leu 78 Phe	106	88	53
Asp 278 Ala	80	56	44
Asp 278 Gly	144	87	54
Asp 278 His	171	80	89
Asp 278 Val	89	116	136
Asp 278 Tyr	131	156	161
Ser 380 Gly	56	114	168
Ser 380 Thr	8.8	52	128
Ser 380 Tyr	86	90	105
값은 천연형 재조합체 AT의 Xa-AT 형성능을 100%로 할 때의 상대값이다.			

발명의 효과

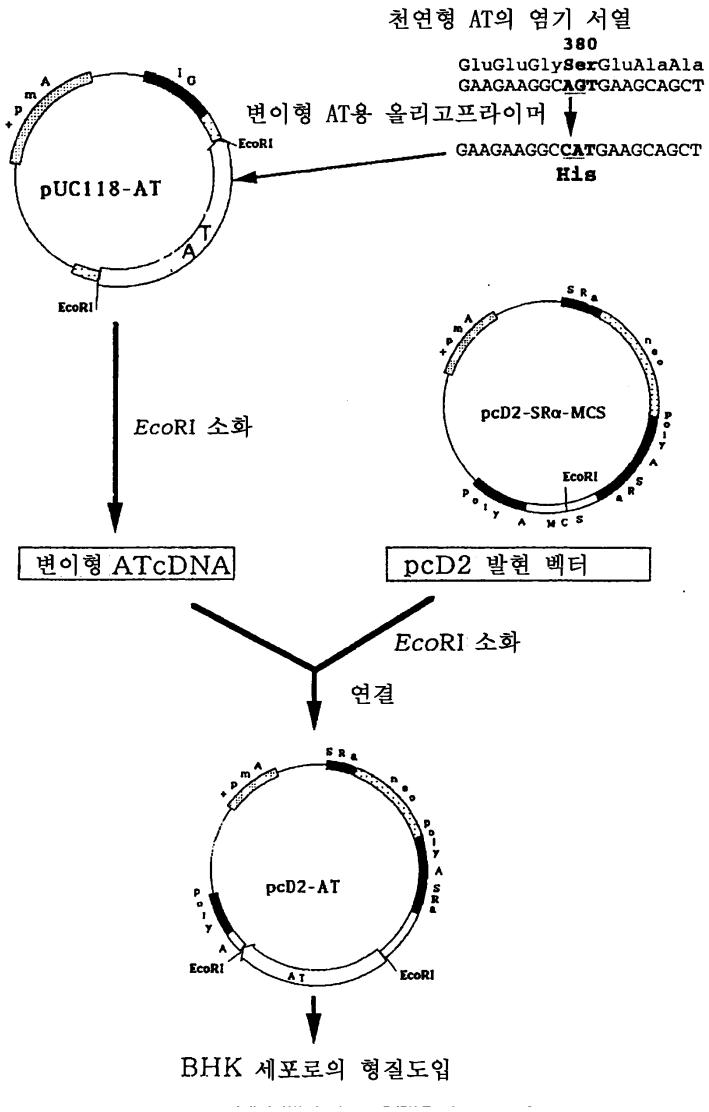
<42> 본 발명에 따라 헤파린 부재하에서도 프로테아제 억제 활성이 높은 적절한 입체 구조를 갖는 신규한 사람 안티트롬빈 변이체를 제공할 수 있다. 본 발명의 재조합 사람 안티트롬빈 변이체는, 예를 들면, 혈전성 질병이나 임신 중독증의 치료약으로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 안티트롬빈(AT) 재조합 변이체 발현 벡터의 작제(Ser380His의 예)를 나타낸다.

도면

도면1



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부