

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 7월 29일 (29.07.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/085086 A2

- (51) 국제특허분류: C07K 14/505 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000368
- (22) 국제출원일: 2010년 1월 20일 (20.01.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2009-004812 2009년 1월 20일 (20.01.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한올바이오파마 주식회사 (HANALL BIOPHARMA CO., LTD)** [KR/KR]; 대전 대덕구 상서동 400-1, 306-120 Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김성욱 (KIM, Sung Wuk)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 구미동 250 번지 삼환빌라 102 동 304 호, 463-802 Gyeonggi-do (KR). **전성수 (JUN, Sung Soo)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 서현동 현대아파트 426 동 701 호, 463-777 Gyeonggi-do (KR). **박승국 (PARK, Seung Kook)** [KR/KR]; 서울 강남구 일원본동 719 푸른마을아파트 111-302, 135-942 Seoul (KR). **정재갑 (JEONG, Jae Kap)** [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 인계동 975-13 다림해피빌 302 호, 442-833 Gyeonggi-do (KR). **이성률 (LEE, Sung Yul)** [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 곡반정동 516-6, 302 호, 441-400 Gyeonggi-do (KR). **송연정 (SONG, Yeon Jung)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 매탄 1 동 176 번지 현대힐스테이트 113 동 102 호, 443-800 Gyeonggi-do (KR). **심원조 (SHIM, Won Jo)** [KR/KR]; 경기도 수원시 영통구 영통 2 동 살구골 7 단 지 동아아파트 714 동 702 호, 443-736 Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: **안소영 (AHN, So-Young)**; 서울 서초구 서초동 1676-1 신승빌딩 10 층 안소영국제특허법률사무소, 137-881 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))



WO 2010/085086 A2

(54) Title: MODIFIED HUMAN THROMBOPOIETIN POLYPEPTIDE FRAGMENT AND MANUFACTURING METHOD THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편 및 그의 제조방법

(57) Abstract: The present invention provides a modified human thrombopoietin polypeptide fragment that has platelet proliferative activity in vivo and in vitro and enhanced resistance to protease existing in vivo.

(57) 요약서: 본 발명은 생체내외(in vivo, in vitro)에서 혈소판 증식능을 가지면서 생체내에 존재하는 단백질 분해효소(protease)에 대한 저항성이 향상된 변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편(human thrombopoietin polypeptide fragment)을 제공한다.

【명세서】

【발명의 명칭】

변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편 및 그의 제조방법

【기술분야】

본 발명은 생체내외(in vivo, in vitro)에서 혈소판 증식능을 가지면서 생체 내에 존재하는 단백질 분해효소(protease)에 대한 저항성이 향상된 변형된 인간 트롬보포이에틴(human Thrombopoietin) 폴리펩타이드 절편 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

보다 상세하게는 본 발명은 유전자 재조합 방법으로 신호서열이 제거된 아미노산 N 말단부터 1-153번 아미노산, 또는 7-151번 아미노산으로 이루어진 인간 트롬보포이에틴 절편 중 특정 위치를 구조적인 변화를 적게 하는 아미노산으로 치환한 변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편의 변이체, 이를 암호화하는 염기 서열, 상기 서열을 포함하는 벡터 및 이를 이용한 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편 변이체의 제조 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

혈소판은 조혈기관인 골수 내의 거핵구에서 만들어진다. 정상인의 말초혈액 내에는 약 150,000-450,000개/L의 혈소판이 존재하며 생존기간은 7-10일이며 생리적으로 일정한 수가 끊임없이 유지되고 있으며 약 1/3은 비장 내에 저장되어 있으며, 혈소판의 가장 기본적인 기능은 손상된 혈관 벽을 막아주는 지혈작용이다.

혈소판의 수적 감소를 혈소판감소증이라 하며 일반적으로 말초혈액 내에 150,000개/L 이하의 혈소판이 있을 때를 말한다. 혈소판감소증은 단독으로 출현하기도 하지만, 다른 혈액질환의 일부 소견으로 발현될 수도 있다. 혈소판 감소증은 아주 드문 선천성의 경우를 제외하고는 대부분 후천적인 이차적 원인에 의해 발생하게 된다.

혈소판감소증의 원인은

첫째) 어떤 원인에 의해 혈소판생산이 감소되거나,

둘째) 혈소판생산은 정상적이나 말초혈액 순환 중 혈소판이 조기에 파괴되어 발생하게 된다. 정상적으로는 골수천자 검사상 저배율 현미경 시야에서 혈소판 전구세포인 거핵구가 3-7개 관찰되는데 이보다 적은 수가 관찰될 경우에는 전자에 속하며 이보다 많은 경우에는 후자에 의한 혈소판감소를 뒷받침하는 중요한 소견이다.

일반적으로 말초혈액 검사상 혈소판수가 50,000개/L 이상일 경우에는 임상적으로 심각한 출혈성 경향은 적으나 20,000개/L 이하일 경우에는 외상이 없이도 자연적으로 출혈이 일어날 수 있어 각별한 주의를 요한다.

혈소판 생성 감소의 원인에 따른 혈소판 감소증의 모습은 다음과 같다

1) 약제에 의한 혈소판 감소증

혈소판 생산의 감소를 일으킬 수 있는 약제에는 일부 이노제, 에타놀, 에스트로겐, 설파제 및 항암제 등이 있으며, 혈소판 파괴를 증가시킬 수 있는 약제에는 퀴닌, 퀴니딘, 헤파린, 금, 리팜핀, 설파제 등이 있다.

2) 자가면역성 혈소판 감소증

혈소판 항체가 환자의 혈장 내에 생성되어 이 항체와 결합된 혈소판은 조기에 비장에서 파괴된다. 대표적인 질환은 특발성혈소판감소성자반증(ITP)이며 이와 비슷한 증후군으로 전신성홍반성낭창, 만성림프구성백혈병, 악성림프종 등의 질환에서 자가면역성 혈소판감소성자반증이 나타날 수 있다.

급성 특발성혈소판감소성자반증은 주로 소아에서 바이러스 감염 후 1-2주후에 발생하며 특별한 치료없이 6개월 이내에 자연 치유된다. 반면 만성 특발성혈소판감소성자반증은 주로 성인에서 발생하며 특별한 선행 조건이 없이 발생하는 점과 자연치유가 되지 않는 점이 급성의 경우와 다르다.

3) 임신과 관련된 혈소판 감소증

임신 중 약 5-10%의 여성에서 혈소판감소증이 발생할 수 있으나 산모나 태아에 큰 영향을 미치지 않는다.

4) 후천성면역결핍증(AIDS)과 관련된 혈소판 감소증

혈청 내 AIDS 바이러스가 양성인 환자에서 만성 특발성혈소판감소성자반증과 유사한 혈소판감소증이 발생한다.

5) 수혈과 관련된 혈소판 감소증

대량수혈 후 또는 개심술을 위하여 체외순환장치를 사용할 때 혈소판감소증이 발생할 수 있다.

6) 기타원인에 의한 혈소판 감소증

미만성 혈관내 응고증, 엽산 또는 비타민 B12 결핍, 골수 내 암세포 또는 결핵균의 침윤, 골수섬유화증, 골수의 악성 혈액질환(백혈병, 골수이형성증후군, 재생불량성빈혈, 다발성골수종, 발작성야간성혈색소뇨증), 기타 세균, 바이러스, 감염 등에 의해 혈소판감소증이 발생할 수 있다.

혈소판감소증의 임상증세는 쉽게 멍이 들거나, 점막하출혈, 비출혈, 월경기간 연장 등 주로 출혈성 경향이다.

현재까지 혈소판 감소증 치료는 스테로이드 제제, 비장 절제술 및 수혈에 의한 방법이 사용되고 있으나 이런 방법은 스테로이드 제제의 부작용 및 수혈로 인한 바이러스 감염과 외래 혈소판 수혈에 따른 면역 반응 유발등과 같은 부작용을 수반한다. 상기와 같은 부작용이 없는 혈소판 감소증 치료법을 개발하기 위하여 인간 혈소판 생성에 관여하는 직접적인 물질을 찾기 위한 연구가 진행되어 왔으며, 그 중에서도 트롬보포이에틴 관련 연구가 활발히 진행되었다.

인간 트롬보포이에틴은 1994년 최초로 cDNA 형태로 클로닝된 이후 (Lok 등, Nature 369:568-571 (1994); de Sauvage 등, Nature 369:533-538 (1994); Bartley 등, Cell 77: 1117-1124 (1994);) 거핵구세포 생산 (megakaryopoesis)과 혈소판 생성(thrombopoiesis)에 관한 활발한 연구가 진행되었다(Kuter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11104-11108 (1994); Kato 등 J. Biochem. 118:229-236 (1995); Chang 등 J. Biol. Chem. 270:511-514 (1995)).

생체내에서 발견되는 인간 트롬보포이에틴은 60-70 KDa의 분자량으로 주로 간과 신장에서 만들어지며 줄기세포로부터 분화된 거핵구 세포에서 혈소판이 만들어지는 전 과정에 작용하는 당단백질로, 세포내에서 353개의 아미노산으로 구성된 전구체로 발현되어 21개 아미노산의 신호 서열이 잘리면서 332개의 아미노산으로 구성된 활성형 단백질 형태로 세포외로 분비된다(Bartley 등, Cell 77: 1117-1124 (1994); Chang 등 J. Biol. Chem. 270:511-514 (1995)). 트롬보포이에틴은 중간 높은 서열 상동성을 가진다(Gurney 등, Blood 85:981-988 (1995); Bartley 등, Cell 77:1117-1124 (1994)). 인간 트롬보포이에틴은 적혈구 생성을 증가시키는 적혈구 생성인자인 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO)과는 23%의 서열 상동성을 가지고 있으며 인간 트롬보포이에틴의 활성을 나타내는 아미노 말단으로부터 153개의 아미노산 잔기로 이루어진 아미노 말단과 인간 트롬보포이에틴의 세포외 분비와 단백질의 안정성에 중요한 역할을 하는 당화가 많이 되어 있는 카르복실 말단으로 구분된다(Eaton 등, Exp. Hematol., 25:1-7 (1997); Linden 과 Kaushansky, J. Biol. Chem., 277: 35240-35247 (2002)).

인간 트롬보포이에틴의 활성을 개선하고자 하는 연구는 다음과 같은 방법을 통해 시도되었다.

첫째는 인간 트롬보포이에틴에 새로운 당사슬을 도입하여 인간 트롬보포이에틴의 활성을 증가시키는 방법이다. 일반적으로 생체내의 많은 단백질들은 단백질의 특이적인 잔기에 당사슬이 결합된 당단백질 형태로 존재한다. 당사슬화는 당사슬이 세린 또는 트레오닌 아미노산 산소에 부착되는 O-연결형 당사슬화와 아스파라진-X-세린/트레오닌에 결합하는 (X는 프롤린을 제외한 아미노산)의 아스파라진의 질소에 부착되는 N-연결형 당사슬화가 있다.

이러한 당사슬은 단백질의 물리화학적 특성에 영향을 미쳐 단백질의 안정성, 활성과 분비에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Jenkins 등, *Nat. Biotechnol.*, 14: 975-981 (1996), Dwek, *Dev. Biol. Stand.*, 96:43-47 (1998)). 이에 인위적인 당사슬을 도입하여 인간 트롬보포이에틴의 활성을 증가시키려는 시도가 암젠사와 대응제약 등에서 시도되었다(국제특허 공개: 제96-25498호, 국제특허 공개 제00-00612). 그러나 당단백질의 당사슬은 종간의 특이성 및 대량 발현시의 환경적인 특성에 따라 균질성을 확보하기 힘든 문제점이 있다.

두 번째는 인간 트롬보포이에틴의 C-말단 부위를 결실시키거나 C-말단 결실 후 N-말단을 변형시키는 방법이다. 인간 트롬보포이에틴은 시험관내 실험에서 C-말단 부위가 제거되면 천연형보다 활성이 증가한다는 보고가 있다(Kato 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4669-4674 (1997), Muto 등, *J. Biol. Chem.*, 275:12090-12094 (2000)). 이러한 방법으로 암젠(Amgen)사는 인간 트롬보포이에틴 1-151(아미노 말단의 아미노산 1-151), 인간 트롬보포이에틴1-174(아미노산 1-174) 유도체와 인간 트롬보포이에틴1-163의 N-말단에 메티오닌-라이신을 첨가시킨 유도체를 제조하였다(국제 특허공개 W095/26746호, 국제 특허공개 W095/25498호). 제넨텍(Genentech)사의 경우 N-말단에 메티오닌을 첨가한 인간 트롬보포이에틴 절편 유도체를 대장균에서 발현시켜 제조하였고(국제 특허 공개 W095/18858호), 기린(Kirin)사의 경우 C-말단 부위를 결실시킨 여러 유도체와 인간 트롬보포이에틴 아미노 말단 1-163내의 특정 아미노산을 치환시킨 유도체를 제조하였으며(국제 특허 공개 W095/21919호), 그외에 자이모제네틱사(Zymogenetic)(국제 특허공개 W095/21920호, 국제 특허공개 W095/17062호) 및 지디셀사(G. D. Searl)(국제 특허

공개 WO96/23888호)는 인간 트롬보포이에틴 C-말단 아미노산을 결실시킨 유도체를 제조하였다.

그러나 짧아진 인간 트롬보포이에틴은 당사슬이 많이 존재하는 C-말단 부위가 결실됨으로써 동물세포에서 발현시 분비율이 감소하고 단백질 분해효소에 의한 절단 기회가 증가하는 문제점이 발생한다(Linden과 Kaushansky, J. Biol. Chem, 277:35240-35247 (2002)).

세번째는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, 이하 PEG로 약칭함) 부가 방법이다. 암젠사는 인간 트롬보포이에틴 아미노 말단 1-163에 PEG를 부가하여 PEG-인간 트롬보포이에틴1-163 유도체를 만들었는데(국제 특허 공개 WO95/26746호), 이 방법은 인간 트롬보포이에틴1-163에 분자량을 증가시켜 분자량이 20KDa보다 작은 물질이 신장에서 여과되는 신장여과(renal filtration)를 막아 생체 내에서 오래 활성을 가지게 하는 방법이나 PEG 부가가 균일한 비율로 이루어지지 않으므로 품질의 불균질성 문제를 일으킬 수 있다.

생체 내에서 특정 단백질의 원하는 활성을 유지하며, 목적하는 장소로까지 전달하는 데에는 다양한 어려움이 따르는 바, 단백질 치료제의 전달 방법은 제약학에서 임상적으로 중요한 도전 과제이다. 단백질 치료제는 체내 순환에서 대사, 신장에서의 여과작용(glomerular filtration), 및 위장관, 조직, 혈액 등에서의 단백질 분해효소에 의한 분해 등과 같은 정상적인 과정에 의해 제거된다. 그 중 단백질 분해효소에 의한 제거는 경구, 혈관주사, 근육주사 등에 의한 투여시 단백질 치료제의 반감기에 지대한 영향을 미치며, 이러한 분해효소에 의한 공격 가능성은 단백질의 크기가 클수록 더 높아진다.

단백질 치료제 중 하나로 혈소판 증식을 위해서는 인간 트롬보포이에틴이 주사제의 형태로 개발되고 있지만, 주사제 투여는 통증 및 감염 위험 등의 문제를 수반하므로, 주사 투여 횟수를 줄이거나 경구투여 하는 등의 다른 방법이 요구된다. 이를 위해서는 인간 트롬보포이에틴의 안정성을 높이는 것이 필수적이지만, 상기 단백질 분해효소에 의한 분해는 이에 대한 큰 장애로 작용한다.

그러므로, 경구용 단백질 치료제 개발의 중요한 목표 중 하나는 생물학적 활성을 지니면서 단백질 분해효소에 대해서는 저항성을 갖는 적은 수의 아미노산으로 이루어진 단백질 치료제를 개발하는 것이다.

이에 본 발명자들은 인간 트롬보포이에틴 절편이 생체내에서 혈소판 생성능을 지니면서 위장관, 세포질 및 혈액 속에 존재하는 단백질 분해효소에 대해서는 향상된 저항성을 가진 변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편을 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명은 생체내, 외에서(in vivo, in vitro)에서 혈소판 생성능을 가지면서 위장관, 세포 및 혈액 중에 존재하는 단백질 분해효소에 대한 향상된 저항성을 가진 변형된 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편, 이를 암호화 하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질 전환된 동물세포, 나아가, 이들을 포함하는 약제학적 제제, 혈소판 감소증 치료 또는 혈소판 증가나 거핵구(Megakaryocyte) 증가를 위한 조성물, 및 이들을 투여하는 단계를 포함하는 치료하는 방법 등을 제공함에 그 목적이 있다.

【기술적 해결방법】

[정의]

별도로 정의하지 않는 한 하기의 용어는 본 발명의 상세한 설명, 실시예 및 특허 청구 범위에서 이용될 때 하기 정의된 의미를 가진다.

본 발명에서 정의된 "인간 트롬보포이에틴 (이하 TPO)"은 인간 유래로 332개의 아미노산으로 구성되어 cMPL 리셉터에 결합하여 혈소판 형성에 관여하는 폴리펩타이드를 말한다.

본 발명에서 정의된 "인간 트롬보포이에틴 절편, 또는 인간 트롬보포이에틴 폴리펩타이드 절편(이하 TPO절편 또는 TPO 폴리펩타이드 절편)"은 그의 아미노산 서열이 TPO의 서열과 서로 상응하는 아미노산의 서열이 100% 일치하며 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실된 TPO의 한 부분이다. 결실된 아미노산 잔기(들)은 N-말단 또는 C-말단 또는 내부를 포함하여 폴리펩타이드 내에 어느 곳에나 존재할 수 있다. 이 절편은 TPO와 하나 이상의 생물학적 특성을 공유한다. 대표적인 절편의 예는 TPO N 말단 1번 아미노산부터 153번 아미노산까지로 이루어진 TPO1-153이다.

본 발명에서 정의된 "TPO(돌연)변이체, TPO절편 (돌연)변이체" 또는 "변형된 TPO, 변형된 TPO절편"은 하기 정의된 바와 같이 천연 또는 재조합 세포로부터 분리된 TPO 또는 TPO절편과 100% 미만의 서열 동일성을 가지는 TPO 또는 TPO절편을 나

타낸다. 통상 TPO 변이체는 TPO 또는 TPO절편과 약 70% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가진다. 서열 동일성은 바람직하게는 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 한층 더 바람직하게는 약 85% 이상, 더더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상이다.

본 발명에서 정의된 "단일 변이체"는 트롬보포이에틴 변이체 중 한 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.

본 발명에서 정의된 "이중 변이체"는 트롬보포이에틴 변이체 중 두 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.

본 발명에서 정의된 "삼중 변이체"는 트롬보포이에틴 변이체 중 세 위치에 돌연변이가 생성된 변이체를 말한다.

본 발명에서 정의된 "TPO_{m-n}"는 아미노산 서열 중 N-말단의 m번째부터 n번째까지의 아미노산 서열로 이루어진 TPO절편을 말한다. 예로 TPO1-153절편은 TPO N-말단 1번째 아미노산부터 153번째 아미노산까지의 서열을 갖는 TPO절편이다. 다른 예로 TPO7-151은 TPO N-말단 7번째 아미노산부터 TPO151번째 아미노산으로 이루어진 TPO절편이다.

본 발명에서 정의된 "xAz"는 아미노산 서열 중 A번째 아미노산 x가 z로 치환된 것을 의미한다. 예로 A3S는 3번째 아미노산 알라닌(Ala)이 세린(Ser)으로 치환된 것을 의미한다.

본 발명은 천연형 TPO절편 아미노산 서열 중 단백질 분해효소에 의해 인식되어 절단될 것으로 예측되는 하나 또는 하나 이상의 아미노산을 단백질 분해효소에 의해 인식되어 절단되지 않으면서 물리화학적 특성이 크게 변하지 않는 아미노산으로 치환함으로써 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상된 변형된 TPO 폴리펩타이드 절편을 제공한다.

본 발명에서 완전한 길이의 TPO를 사용하지 않고 TPO 폴리펩타이드 절편을 돌연변이체의 주형으로 사용하는 목적은 제약학적으로 생체내 이용률을 높이기 위함이다. 본 발명에 의한 TPO 폴리펩타이드 절편은 거대분자를 포함한다. 따라서 주사제 및 경구투여용 제제를 만들기 위해서는 단백질 분해효소에 의해 공격을 받는 가능성을 최소화하고 장상피세포 투과율을 높이기 위하여 최대한 작은 크기의 물질을 만드는 것이 필요하다. TPO의 생물학적 활성을 나타내는 부위는 아미노 말단 또는 "EPO 유사도메인" 절편이다. 아미노 말단 절편은 첫번째와 네번째 시스테인 잔

기 사이의 실질적으로 모든 인간 TPO 서열을 지나 그 이외의 영역에서는 상당한 첨가, 탈락기 또는 치환기를 포함할 수 있다. 따라서 약리학적 작용을 나타내는 부위는 아미노 말단으로부터 7번 위치에서 151번 위치를 가진 서열이라는 사실은 당분야 숙련자에게는 공지의 사실이다. 또한 151번 위치 이후의 카복시 말단 도메인은 많은 당사슬로 연결되어 있다. 이러한 당사슬은 단백질의 안정성 증가에 기여하는 반면 불균일한 당사슬의 도입으로 약제학적인 불균일성을 부여할 수 있다. 이러한 불균일성을 제거하는 것이 본 발명의 추가의 목적이다.

본 발명은 인간 트롬보포이에틴(이하 'TPO'라 함) 변이체로, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 트롬보포이에틴 절편 1-153(이하 'TP01-153'이라 함)의 아미노산 서열에 있어서 3번, 6번, 8번 내지 12번, 14번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 26번, 31번 내지 34번, 39번 내지 41번, 43번 내지 46번, 48번 내지 52번, 55번 내지 57번, 59번, 60번, 62번, 64번 내지 67번, 69번 내지 79번, 81번, 86번, 89번 내지 91번, 93번, 95번, 97번 내지 104번, 107번 내지 109번, 112번, 116번, 117번, 120번 내지 123번, 126번, 128번, 129번, 131번, 및 133번 내지 147번, 150번, 및 152번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TP01-153 변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한 TP01-153 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 3번, 9번, 14번, 16번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 32번, 40번, 43번 내지 46번, 51번, 52번, 56번, 57번, 59번, 62번, 65번 내지 67번, 69번, 73번 내지 76번, 79번, 81번, 99번, 103번, 104번, 109번, 117번, 122번, 129번, 133번, 135번 내지 139번, 및 141번 내지 144번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TP01-153 변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한, TP01-153 변이체로서, 바람직하게는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 17번, 20번, 21번, 32번, 52번, 59번, 66번, 67번, 138번, 139번, 141번 및 142번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체, 보다 바람직하게는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 21번, 52번, 138번, 및 139번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 인간 트롬보포이에틴 변이체로, 서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 트롬보포이에틴 절편 1-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, 8번 내지 12번, 14번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 26번, 31번 내지 34번, 39번 내지 41번, 43번 내지 46번, 48번 내지 52번, 55번 내지 57번, 59번, 60번, 62번, 64번 내지 67번, 69번 내지 79번, 81번, 86번, 89번 내지 91번, 93번, 95번, 97번 내지 104번, 107번 내지 109번, 112번, 116번, 117번, 120번 내지 123번, 126번, 128번, 129번, 131번, 133번 내지 147번, 및 150번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TPO7-151 변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한 TPO7-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TPO1-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, 9번, 14번, 16번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 32번, 33번, 40번, 43번 내지 46번, 49번, 51번, 52번, 56번, 57번, 59번, 62번, 65번 내지 67번, 69번, 73번 내지 76번, 78번, 79번, 81번, 97번 내지 99번, 103번, 104번, 107번, 109번, 112번, 117번, 122번, 129번, 133번 및 135번 내지 145번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TPO7-151 변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한 TPO7-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TPO1-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, 16번, 21번, 23번, 25번, 32번, 33번, 44번, 45번, 46번, 49번, 52번, 56번, 59번, 67번, 73번, 74번, 78번, 79번, 97번, 98번, 99번, 103번, 107번, 112번, 133번, 136번 내지 141번 및 145번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는, 제16번, 제21번, 제32번, 제33번, 제49번, 제52번, 제67번, 제73번, 제79번, 제99번, 제103번, 제107번, 제112번, 제133번, 제145번 중 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 상기한 TPO 절편 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TPO1-153의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 치환이 A에서 S 또는 T; D에서 N 또는 Q; L에서 I; R에서 Q 또는 N; V에서 T 또는 I; K에서 N, Q 또는 T; H에서 Q 또는 N; E에서 Q, N, 또는 S; P에서 S; F에서 I 또는 S; G에서 S; W에서 I 또는 S; 및 M에서 I 또는 N로의 치환 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 상기한 TP01-153 변이체 또는 TP07-151 변이체로서, 바람직하게는 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 치환이 A에서 S 또는 T; D에서 N 또는 Q; L에서 I; R에서 Q 또는 N; V에서 T 또는 I; K에서 N, Q 또는 T; H에서 Q 또는 N; E에서 N; P에서 S; F에서 I 또는 S; G에서 S; W에서 S; 및 M에서 I 또는 N로의 치환 중 하나 또는 하나 이상인 것인 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를, 보다 바람직하게는 A에서 S; L에서 I; R에서 Q; V에서 T 또는 I; K에서 N 또는 T; H에서 Q; 및 F에서 I 로의 치환 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를, 보다 바람직하게는 V에서 T 또는 I; 및 K에서 N 또는 T로의 치환 중 하나인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를, 더욱 바람직하게는 V에서 T 또는 I인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 TP01-153 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 A3S, A3T, L9I, K14N, K14Q, L16I, R17Q, D18Q, H20Q, V21I, V21T, L22I, H23N, R25Q, R25N, V32I, L40I, A43S, V44I, V44T, D45N, F46I, W51S, K52Q, K52N, E56N, E57N, K59N, D62Q, G65S, A66S, V67T, L69I, G73S, V74I, V74T, M75I, A76S, G79S, L81I, L99I, A103T, L104I, G109S, R117Q, K122Q, L129I, H133Q, L135I, R136Q, G137S, K138N, K138Q, K138S, K138T, V139I, V139T, R140Q, F141I, F141S, L142I, M143I, M143N, L144I, V145T, L150I 및 V152T 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TP01-153변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한 TP01-153 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 바람직하게는 R17Q, H20Q, V21T, V32I, K52N, K59N, A66S, V67T, K138Q, K138S, K138T, V139I, V139T, R140Q, F141I, F141S, 및 L142I 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를, 보다 바람직하게는 V21T, K52N, K138T, 및 V139I 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 TP01-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 V32I/K52N, K52N/K138S 또는 K52N/139I의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

한편, 본 발명은 TP07-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의

아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, L6I, L9I, K14N, K14Q, L16I, R17Q, D18Q, H20Q, V21I, V21T, L22I, H23N, H23Q, R25Q, R25N, V32I, H33N, H33Q, L40I, A43S, V44I, V44T, D45N, F46I, G49S, W51S, K52Q, K52N, E56N, E57N, K59N, K59Q, D62Q, G65S, A66S, V67T, L69I, G73S, V74I, V74T, M75I, A76S, R78Q, G79S, L81I, V97I, R98Q, L99I, A103S, A103T, L104I, L107I, G109S, L112I, R117Q, K122Q, L129I, H133N, H133Q, L135I, R136Q, G137S, K138N, K138Q, K138T, V139I, V139T, R140Q, F141I, F141S, L142I, M143I, M143N, L144I 및 145T 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체(TPO7-151변이체)를 제공한다.

본 발명은 또한 TPO7-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TPO1-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, L16I, V21I, H23Q, R25Q, V32I, H33N, H33Q, V44T, D45N, F46I, G49S, K52N, E56N, K59N, K59Q, V67T, G73S, V74I, R78Q, G79S, V97I, R98Q, L99I, A103S, A103T, L107I, L112I, H133N, H133Q, R136Q, G137S, K138T, K138Q, V139I, R140Q, F141S, 및 V145T 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을, 보다 바람직하게는 L16I, V21I, V32I, H33N, H33Q, G49S, K52N, V67T, G73S, G79S, L99I, A103S, A103T, L107I, L112I, H133Q, 및 V145T 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 TPO7-151 변이체로서, 서열번호 1로 기재되는 TPO1-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 결실되고, V32I/K52N, K52N/K138S 또는 K52N/139I의 아미노산 치환을 포함하는, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 또한 서열번호 2 내지 서열번호 227로 나타내어지는 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 제공한다.

본 발명은 나아가, 상기 변형된 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 유전자를 제공한다.

본 발명은 또한 상기 변형된 유전자를 포함하는 벡터, 바람직하게는 도2의 개열지도를 갖는 변형된 TPO 유전자를 포함하는 벡터, 보다 바람직하게는 도2B의 개열지도를 갖는 변형된 TPO 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 발명은 또한 상기 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포를 제공하며, 바람직하게는 상기 벡터로 형질전환된 대장균(E.coli BL21(DE3)), CHO 세포, COS-7

세포, HEK293 세포 등을 제공하며, 보다 바람직하게는 대장균 (E.coli BL21(DE3), 기탁번호: KCTC11453BP)을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 유전자를 적당한 벡터에 도입하고 이 벡터로 숙주세포를 형질전환하고 이로부터 얻어진 형질 전환체를 배지에서 배양하여 TPO 절편 변이체를 얻는 TPO 절편 변이체의 제조 방법을 제공한다.

나아가 본 발명은, 상기 변형된 TPO 절편 변이체를 포함하는 약제학적 제제, 바람직하게는 추가적으로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 본 발명에 있어서 상기 제제는 경구제, 흡입제, 주사제, 점막투여제, 및 외용제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약제학적 제제일 수 있다.

본 발명은 또한 상기 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 포함하는 혈소판 감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 상기 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈소판감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명에 있어서 상기 혈소판 감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환은, 혈소판의 손상, 격리 또는 증가된 파괴로 인한 거핵구 전구 감소증 거핵구 감소증과 관련된 골수 형성 부전증 (예: 화학치료 또는 골수 이식에 수반되는 무형성 빈혈) 파종성 혈관내 응고 (DIC) 면역성 거핵구 전구 감소증 (HIV-유발 ITP 및 비 HIV-유발 ITP) 만성 특발성 거핵구 전구 감소증 선천성 거핵구 전구 감소증 척수이형성 및 혈전성 거핵구 전구 감소증 염증성 질환으로부터 유래하는 거핵구 전구 증가증 척수증식성 거핵구 전구 증가증 철 결핍증 백혈병 또는 충실성 종양 치료를 위한 골수독성 화학 요법, 자기 또는 동종 골수 이식을 위한 척수 절제 화학요법, 척수 이형성, 특발성 무형성 빈혈, 선천성 거핵구 전구 감소증 및 면역성 거핵구 전구 감소증 약물, 독물 또는 인공 표면에 대한 활성화로 인한 혈소판 결함 또는 손상 등을 포함한다.

본 발명의 TPO 절편 변이체는 상기 질환 및 증상 치료시 단독으로 사용하거나 또는 다른 싸이토카인, 조혈소, 인터루킨, 성장 인자 또는 항체와 함께 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 G-CSF, GM-CSF, LIF, M-CSF, IL-1, IL-3, 적혈구 조혈소(EPO), IL-6 및 IL-11을 포함하여 거핵구 전구 생성 활성을 갖는 다른 단백질 또는 펩티드와 함께 사용될 수 있다.

본 발명자들은 TPO절편의 변이체를 만들기 위하여 이미 유전체가 공개되어 있는 인간 TPO 유전체 정보를 이용하였다.

본 발명자들은 TPO절편 유전자를 상업적으로 판매하는 인간의 남자태아 간 유전자 cDNA (Stratagene, Cat. No: 780609-41)로부터 증합효소 연쇄반응(이하 PCR) 방법을 사용하여 증폭하였으며, 이를 동물세포 발현 벡터 pcDNA 3.3-TOPO TA(Invitrogen, Cat. No: K8300-01)에 클로닝하고 인간 성장 호르몬(이하 hGH)의 신호 서열로 TPO신호서열을 치환한 분비능이 증가된 변형된 진핵세포 발현 벡터를 만들었다(도2B). 이를 HEK293세포에 트랜스펙션 방법에 의해 벡터를 주입 TPO절편이 발현되어 배지에 분비되도록 하였다.

단백질 분해효소에 저항성을 가지는 변이체를 제작하기 위해 TPO절편의 단백질 분해효소에 의한 절단 위치를 추정하였는데, 이를 위해 TPO절편의 아미노산 서열을 위장관, 세포내 및 혈액 중에 존재 하는 대표적인 단백질 분해효소 12종에 대한 절단 위치를 ExPASy(Expert Protein Analysis System)에서 제공하는 peptide cutter (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) 프로그램을 이용 추정하였다.

단백질 분해효소에 의해 절단될 것이라고 예측된 아미노산을 구조적 변화가 적으면서 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않는 아미노산으로 치환하기 위해서는 PAM250 매트릭스를 이용 0 이상의 양수 값을 가지는 아미노산 중 단백질 분해효소에 의해 인식되지 않는 아미노산으로 치환하여 TPO 절편 변이체를 제조하였다.

상기 제조된 TPO 절편 변이체를 PCR 방법을 사용하여 증폭하여, 이를 동물세포 발현 벡터 pcDNA 3.3-TOPO TA(Invitrogen, Cat. No: K8300-01)에 클로닝하고 hGH의 신호 서열로 TPO신호서열을 치환한 분비능이 증가된 변형된 진핵세포 발현 벡터를 만들었다. 이를 HEK293세포에 트랜스펙션 방법에 의해 벡터를 주입 TPO절편 변이체가 발현되어 배지에 분비되도록 하였다.

배지로 분비된 TPO절편과 TPO절편 변이체 농도를 측정, 일정 농도의 TPO절편 및 TPO절편 변이체를 거핵구 세포주인 M-07e 세포에 처리하여, TPO에 의하여 특이적으로 인산화 되는 STAT5 단백질의 인산화 정도를 측정하여 TPO절편 및 그 변이체의 생물학적 활성을 확인하였다(kamatu등 Blood 87(11):4552-60 (1996)).

TPO절편과 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성은 발현된 배지의 전체 단백질 농도를 측정하여 10종의 단백질 분해효소를 각각 전체 단백질(배양 세포 배

지에 중 총 단백질을 브래드포드 법에 의해 정량한 값)의 1%가 되게 처리, TPO절편과 그 변이체의 반감기 (half-life)를 조사하여 TPO폴리펩타이드 절편 대비 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 TPO절편 변이체를 확인할 수 있었다.

본 발명은 또한 본 발명에 의한 TPO 절편 변이체와 이를 포함하는 약제조성물의 사용방법을 제공한다. 그러한 약제적인 조성은 주사, 혹은 경구투여, 비강내 투여, 피부를 통한 투여, 혹은 다른방법을 통한 투여가 될 수 있다. 이러한 방법들에는 정맥내(intravenous), 진피내(intradermal), 근육내(intramuscular), 유방내(intramammary), 복강내(intraperitoneal), 포막내(intrathecal), 안내(intraocular), 폐내(intrapulmonary) 혹은 피하주사(subcutaneous injection), 설하(sublingual), 항문(anal), 질(vaginal), 외과적인 주입(surgical implantation) 등이 있을 수 있다. 그 치료는 단회투여나 혹은 일정기간 동안 반복투여일 수도 있다. 일반적으로 본 발명에 의해 설명된 약학적 조성은 약제적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 용해제, 이멸시파이어, 어주번트 또는 운반체등을 포함하는 조성을 포함하는 효과적인 양을 포함한다. 그러한 조성은 다양한 완충용액들(트리스완충액, 아세트산완충액, 인산완충액), 계면활성제(Tween 80), 항산화제(아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트), 보존제(티메로살, 벤질 알코올), 그리고 벌킹 희석제(유당, 만니톨)와 같은 첨가제를 포함하며, 그러한 물질을 폴리락틱산, 폴리글라이콜산 리포솜 등의 폴리머 조성물의 입자성 물질로 만드는 것을 포함한다. 하이알루론산 또한 사용될 수 있으며 이것은 순환계 내에서 지속성을 증가시켜주는 효과를 가지게 할 수도 있다. 그 약제학적 조성물은 선택적으로 또한 약제학적으로 허용 가능한 액체, 반고체, 혹은 고체 희석물들을 포함할 수 있다. 그리고 이러한 물질들은 약제학적 운반체, 부형물, 혹은 배지로서의 역할을 할 수 있다. 이러한 물질들은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 전분류, 설탕, 덱스트로오스, 아카시아검, 칼슘 인산염, 미네랄 오일, 코코아 버터, 그리고 테오브로마 오일 등을 포함할 수 있으며 이것에 한정적이지만은 않다. 그러한 조성물들은 체내 존재하는 단백질들과 그 유도체들의 물리적인 상태, 안정성, 생체 내 용출속도, 생체 내 제거속도 등에 영향을 줄 수 있다. 그 조성물들은 액체형태, 혹은 동결건조된 가루형태로 만들어 질 수 있다. 경피(transdermal) 체제와 같은 이식된 형태의 지속형 방출체제 또한 포함된다.

주된 사용방법으로 고려된 것으로는 고체형태의 경구투여체제이다. 고체투여

형태들은, 타블렛, 캡슐, 환약, 트로키, 펠렛 등의 형태를 포함한다. 또한 리포솜이나 프로티노이드 인캡슐레이션 또한 현재의 조성물로 제제화될 수 있다. 리포솜들은 다양한 폴리머들의 유도체일 수 있다. 일반적으로, 그 제제는 본 발명의 조성물, 위장관 환경, 그리고 장내에서의 생물학적인 활성을 가지는 물질의 분비로부터 보호받을 수 있게 해주는 안정적인 첨가물질들을 포함한다.

또한 상기의 발명 조성물의 경구투여용 형태가 특별히 고안되었다. 필요하다면, 그 조성물은 경구투여가 효과적일 수 있도록 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 일반적으로, 고려된 화학적인 변형은 그 조성물질 자체에 하나 또는 하나 이상의 잔기를 붙이는 것이다. 여기서 잔기라 함은 단백질 분해효소에 저항성을 가지게 하는 물질이거나 위장관으로부터 혈류속으로의 흡수를 도와주는 물질일 수 있다. 또한 바람직하게는 그 조성물의 전체적인 안정성을 증가시켜서 인체내에서 순환되는 시간을 늘리는 것이다. 그러한 잔기들의 예로서, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공동 복합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 덱스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈 그리고 폴리프롤린등이 있을 수 있다. 사용될 수 있는 다른 폴리머들로는 폴리-1,3-다이옥세인과 폴리-1,3,6-티옥소캐인일 수 있다. 상기에 포함된 약제학적 사용에 있어서 선호되는 것은 폴리에틸렌 글리콜 잔기이다.

경구투여용 형태로서, 본 발명품의 치료제의 흡수율을 증가시키기 위한 운반체로서 소듐 N-(8-[2-하이드록시벤조일]아미노) 캐프릴레이트(SNAC)과 같은 변형된 알리파틱 아미노산의 염을 사용할 수도 있다. SNAC을 이용한 헤파린 제제의 임상학적 효능은 에미스피어 사(社)의 임상 2상에서 이미 밝혀진 바 있다.

이 치료제는 과립이나 입자의 크기가 대략 1mm의 펠렛 형태의 고운 멀티파티클레이트의 형태의 제제를 포함한다. 캡슐형 투여의 물질의 제제는 가루, 가볍게 눌러진 충전물이나 혹은 심지어 타블렛 등의 형태일 수 있다. 그 치료제는 압축에 의해서도 만들어질 수 있다.

발색제나 향신료 또한 포함될 수 있다. 예를 들면, 단백질 또는 그 유도체가 리포솜이나 마이크로스피어 인캡슐레이션의 형태로 제제화 될 수 있으며 이것은 먹을 수 있는 제품으로 포장될 수 있다. 예를 들어 발색제와 향신료가 첨가된 냉장유통 음료와 같은 형태이다.

한편으로는 안정한 물질로 이 치료제의 부피를 증가시키거나 희석시킬 수 있다. 이러한 희석제들은 탄수화물, 특히 만니톨, 유당, 무수유당, 셀룰로오스, 수크

로스, 변성 텍스트란 그리고 전분 등일 수 있다. 특정한 무기염들 또한 충전제로서 사용될 수 있다. 이러한 물질들은 칼슘포스페이트, 마그네슘카보네이트 그리고 소듐클로라이드 등을 포함한다. 일부 시장에 나와있는 희석제로서는 패스트-플로, 엠텍스, Starch1500, 엠콤프레스 그리고 아비셀이 있다.

상기 봉해제는 나트륨전분글리콜레이트, 옥수수전분, 감자전분 또는 전젤라틴화전분 등의 전분 또는 변성전분 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 또는 비검 (beegum) 등의 클레이 미세결정성셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류 알긴산나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류 크로스카멜로스(croscarmellose)나트륨 등의 가교 셀룰로오스류 구아검, 잔탄검 등의 검류 가교 폴리비닐피롤리돈(crospovidone) 등의 가교 중합체 중탄산나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

결합제들 또한 고체 투여체로 치료제의 제제화에 사용될 수 있다. 상기 결합제는 전분, 미세결정성 셀룰로오스, 고분산성 실리카, 만니톨, 자당, 락토스, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 천연검, 합성검, 코포비돈, 젤라틴, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.

제제화 과정 중에서 들러붙는 것을 방지하기 위해 마찰을 줄여주는 물질을 사용할 수 있다. 이러한 윤활제에는 스테아린산, 그리고 그것의 마그네슘염, 칼슘염 등을 포함하며 폴리테트라플루오로에틸렌, 액상 파라핀, 식물성 유지와 밀랍 등이 있을 수 있다. 수용성 윤활제인 소듐 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글라이콜, 카보왁스 4000 그리고 6000 등도 사용될 수 있다.

제제화 동안에 잘 흐르는 특성을 개선시켜주며 압축과정 동안에 재배열을 도와줄 수 있는 글라이던트들도 첨가될 수 있다. 그러한 글라이던트들로는 전분, 활석, 발열성 규소 그리고 수화 실리코알루미네이트 등을 포함한다.

물의 환경에서 본 치료제의 용해를 도와주기 위해 계면활성제가 첨가될 수도 있다. 계면활성제로는 소듐 라우릴 설페이트, 다이옥틸 소듐 설포숙신산 그리고 다이옥틸 소듐 설포네이트와 같은 음이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 양이온성 계면활성제도 사용될 수 있으며 그것은 벤잘코니움 클로라이드 혹은 벤제토니움 클로라이드를 포함할 수 있다. 제제화에 포함될 수 있는 비이온성 계면활성제의 목록

은 다음과 같다. 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아르산, 폴리옥세틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일 10, 50, 그리고 60, 글라이세롤 모노스테아르산, 폴리소르빈산 40, 60, 65 그리고 80, 수크로스 지방산 에스터, 메틸 셀룰로오스 그리고 카르복시메틸 셀룰로오스. 이러한 계면활성제들은 각기 다른 비율로 단백질 또는 그 유도체들의 제제에 존재할 수 있다.

본 조성물의 흡수를 증가시킬 수 있는 첨가제들은 예를 들어 지방산들, 올레인산, 리놀레인산 등이다.

조절성 방출제제가 바람직할 수도 있다. 그 약은 비활성의 담체에 담겨서 확산 혹은 용해의 기전으로 방출되도록 할 수 있다. 서서히 분해되는 담체들 또한 제제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 알긴산, 폴리스카라이드 등이다. 본 치료제의 또 다른 형태의 조절성 방출제제는 오로스 치료 시스템(알자 회사)에 기반한 형태일 수 있다. 그 약은 반투과성 막에 담겨져 물이 안으로 들어와서 약을 하나의 작은 구멍을 통해 삼투압 효과로 밀어내도록 한다. 일부 장용성 코팅 또한 지연된 약물 방출 효과를 줄 수도 있다.

다른 코팅들도 본 제제에 사용될 수 있다. 이것들은 다양한 종류의 당잔기들을 포함한다. 그 치료제는 또한 필름으로 코팅된 타블렛의 형태로 들어갈 수도 있으며 이러한 형태에 사용되는 물질로는 2가지 그룹이 있다. 그 첫번째는 비장용성 물질로서 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 하이드로엑세틸 셀룰로오스, 메틸하이드록실-에틸 셀룰로오스, 하이드록실프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필-메틸 셀룰로오스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로오스, 프로비돈 그리고 폴리에틸렌글라이콜 등이다. 그 두번째 그룹은 장용성 물질로서 그것들은 주로 프탈릭산의 에스터들이다. 좀더 자세히 하면 상기 장용성 고분자는 장용성 셀룰로오스 유도체, 장용성 아크릴산계 공중합체, 장용성 말레인산계 공중합체, 장용성 폴리비닐 유도체, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것이며, 상기 장용성 셀룰로오스 유도체는 히프로멜로오스아세테이트숙시네이트, 히프로멜로오스프탈레이트, 히드록시메틸에틸셀룰로오스프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 셀룰로오스아세테이트말레이트, 셀룰로오스벤조에이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 메틸셀룰로오스프탈레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로오스 및 에틸히드록시에틸셀룰로오스프탈레이트 중에서 선택된 하나 또는 하나 이상 상기 장용성 아크릴산계 공중합체는 스티렌-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸-아크릴산 공중합체, 아크릴산부틸-스티렌-

아크릴산 공중합체, 메타크릴산-메타크릴산메틸공중합체(예컨대, 유드라짓 L 100, 유드라짓 S, 데구사), 메타크릴산·아크릴산에틸공중합체(예컨대, 유드라짓 L 100-55, 데구사), 및 아크릴산메틸-메타크릴산-아크릴산옥틸공중합체 중에서 선택된 하나 또는 하나 이상 상기 장용성 말레인산계 공중합체는 아세트산비닐-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산모노에스테르 공중합체, 비닐메틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 비닐부틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 아크릴로니트릴-크릴산메틸·말레인산 무수물 공중합체, 및 아크릴산부틸-스티렌-말레인산 무수물 공중합체 중에서 선택된 하나 또는 하나 이상 또는 상기 장용성 폴리비닐 유도체는 폴리비닐알콜 프탈레이트, 폴리비닐아세탈프탈레이트, 폴리비닐부티레이트프탈레이트, 및 폴리비닐아세탈프탈레이트 중에서 선택된 하나 또는 하나 이상이다.

물질들의 혼합체들이 최적의 필름 코팅을 위해 사용될 수 있다. 필름 코팅은 팬 코터 혹은 유동층 조립기 또는 압축 코팅기에서 수행될 수 있다.

또한 여기에서 고안된 것은 현재의 단백질 또는 그것의 유도체의 폐를 통한 전달방법이다. 단백질 또는 그것의 유도체는 포유동물의 폐를 통해서 숨을 쉬는 동안에 전달될 수 있으며 그것은 폐의 상피세포를 지나면서 혈류 속으로 흡수된다.

본 치료제의 폐를 통한 전달을 위해 고안된 넓은 범위의 기계적 장치들이 본 발명의 실시의 사용에 고안되었다. 이것들은 네블라이저들, 눈금이 붙은 용량 흡입기, 그리고 가루흡입기, 기타 종래의 분야에 익숙히 알려진 여러 기술들을 포함한다.

본 발명의 실시에 적합한 시장에 나와 있는 장치들의 일부 특정한 예로서 맬링크로트사의 울트라벤트 네블라이저, 마르키스트 의료기기에서 생산한 아콘 II 네블라이저, 글락소사가 생산한 벤틀린 예보할러, 피슨스 회사에서 만든 스피날러 가루 흡입기 등이 있을 수 있다.

그러한 모든 장치들은 발명적 조성물의 투여에 적합한 제제의 사용에 필요하다. 일반적으로, 각각의 제제들은 적용된 장치의 형태에 따라 특이적이며 경우에 따라 희석제, 어주번트, 또는 운반체에 추가적으로 추진제 물질들을 적절하게 함께 그 치료법에 사용할 수 있다.

본 발명의 조성물은 입자성 물질로 만들어지는 것이 바람직하며 그것의 평균적인 크기는 대략 10 마이크로미터 이하이다. 가장 이상적이게는 0.5 에서 5 마이크로미터가 되어야 먼 곳의 폐까지 효과적으로 전달된다.

운반체로는 트레할로오스, 만니톨, 자일리톨, 수크로오스, 락토오스 그리고 소르비톨과 같은 탄수화물을 포함한다. 제제에 포함될 수 있는 다른 재료로는 DPPC, DOPE, DSPC 그리고 DOPC 등을 포함한다. 천연의 혹은 합성 계면활성제들도 사용될 수 있다. 폴리에틸렌 글라이콜이 그 단백질 또는 유사체의 유도체를 만드는데 사용되는데 이외에도 사용될 수 있다. 환형덱스트란과 같은 덱스트란도 사용될 수 있다. 담즙산과 다른 연관된 유도체들도 사용될 수 있다. 완충용액의 제제로 사용되는 아미노산도 사용될 수 있다.

또한 리포솜, 마이크로캡슐 또는 마이크로스피어, 인클루전 복합체들 또는 운반체들의 다른 형태들의 사용들 또한 고안되었다.

제트 또는 초음파와 함께 네블라이저의 사용 또한 적합한 제제이다. 이것은 특히 용액의 1 ml 당 대략 0.1에서 25 mg의 생물학적 활성을 지니는 단백질의 농도로 녹아있는 발명된 조성물을 특징적으로 구성한다. 그 제제는 또한 완충용액과 단당류를 포함한다. 그것은 예를 들어 단백질 안정화와 삼투압안정에 기여한다. 그 네블라이저 제제는 또한 에어로졸의 형성에서 용액의 원자화에서 야기되는 단백질의 어그리게이션을 유발하는 표면을 줄여줄 수 있는 계면활성제 또한 포함할 수 있다.

눈금용량의 흡입기기를 위한 제제들은 일반적으로 본 발명의 조성물을 고운 가루로 만들어 계면활성제의 도움으로 추진체에 혼합한 형태이다. 그 추진체는 이러한 목적을 위해 흔히 사용되는 물질로서 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 혹은 디클로로플루오로메탄, 다이클로로다이플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로에탄올, 그리고 1,1,1,2-테트라플루오로에탄과 같은 하이드로카본이나 혹은 이러한 것들의 조합일 수 있다. 적절한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트와 소야 레시틴을 포함한다. 올레익산 또한 계면활성제로 사용될 수 있다.

가루 흡입기로부터 방출되는 제제는 본 발명 조성물을 포함하는 고운 말린 가루로 구성되어 있으며 락토오스, 소르비톨, 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 혹은 자일리톨과 같은 희석제를 포함할 수 있다. 이것들은 기기장치로부터 그 가루를 분산시키는 것을 촉진시킬 수 있다.

비강을 통한 약물전달 또한 발명에 고안되었다. 코를 통한 전달은 단백질 치료제가 코로 들어온 이후 곧장 혈류속으로 들어갈 수 있게 하여 폐에 그 치료제가 쌓일 필요가 없게 해준다. 비강을 통한 전달의 제제로는 덱스트란 혹은 환형 텍스

트란등을 포함한다. 다른 점막 조직들을 통한 전달방법들 또한 고안되었다.

투여용량은 상기 설명된 질병들을 치료하는 방법에 관련된 처방투여용량은 의사에 의해 약물의 효과를 변형시킬만한 요인들, 예를 들어 나이, 상태, 체중, 성별, 식이, 어떤 감염에 의한 중증도, 투여시점 등의 기타 임상학적인 조건에 따른 요인들에 따라서 결정되어야 한다.

본 발명의 조성물은 초회 투여 후 일정한 순환계 농도를 유지시키기 위해 계속적인 투여를 해야 한다. 또 다른 예로서, 본 발명의 조성물은 단회로 투여될 수도 있다. 종래 연구분야의 일반적인 기술들이 효과적인 투여용량과 방법을 최적화시킬 것이다. 반복투여 횟수는 각 환자의 약동학적인 인자들과 투여경로에 따라 달라질 것이다. 그러한 제제화는 투여된 약물의 물리적인 상태, 안정성, 생체내 방출 속도, 생체내 제거율 등에 영향을 줄 것이다. 투여경로에 따라서 적절한 투여용량이 체중, 체표면적, 장기의 크기에 따라서 계산되어야 할 것이다. 상기 설명된 제제의 보다 더 정교한 계산은 적절한 치료를 위해서 필요하다. 적절한 용량은 적절한 용량-반응 자료와 함께 혈중농도의 자료와 함께 판단하여 확정되어야 한다. 최종의 투여법은 의사에 의해 결정될 것이며, 의사는 약물의 비활성, 환자의 중증도, 약물에 대한 환자의 반응정도, 나이, 컨디션, 체중, 성별, 그리고 식이와 기타 다른 임상학적인 요인들을 고려하여 처방해야 한다. 연구가 진행됨에 따라, 다양한 종류의 질병들과 조건들에 대응하는 적절한 투여 용량과 처방기간들에 관한 보다 많은 정보들이 나올 것이다.

본 발명을 이용한 치료 방법들, 조성과 그 조성물들 또한 단독으로 또는 다른 싸이토카인, 솔루블 mpl 수용체, 헤마토포이에틱 팩터, 인터루킨, 성장인자 또는 항체를 함께 투여하여 혈소판 감소증 뿐만 아니라 다른 증상에도 사용할 수 있다. 본 발명품은 트롬보싸이토펜시아의 일부 형태들에 유용하게 사용될 뿐 아니라 혈구세포 생성을 촉진하는 일반적인 인자들, 예를 들어 IL-3, GM-CSF 등과 함께 처방될 수 있다.

본 발명의 조성물이 혈소판이나 거대핵세포와 그에 연관된 세포들에 첨가될 때에는 첨가하는 용량이 종래 기술분야에 알려진 실험법으로 실험을 통하여 확정될 수 있다. 용량의 한 예로서 백만개의 세포당 0.1 마이크로그램에서 1 밀리그램 정도의 본 발명의 조성물을 처리하는 것이 있다.

본 발명의 조성물은 경구 및 흡입 투여 외 정맥 및 피하로 투여할 수 있다. 전신 투여할 경우, 본 발명의 치료 조성물은 발열질이 없어야 하고, pH, 등장성 및

안정성이 적당한 비경구적으로 허용가능한 용액 상태이어야 한다. 이 조건들은 당 업계에 공지되어 있다. 간단히 말하자면, 본 발명의 화합물의 제제는 목적하는 순도를 갖는 화합물을 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장 또는 투여용으로 제조한다. 이러한 물질은 사용되는 투여량 및 농도에서 복용자에게 무독성이며, 인산염, 시트르산염, 아세트산염 및 다른 유기산염과 같은 완충제 아스코르브산과 같은 산화방지제 폴리아르기닌, 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 저분자량 (약 10개 미만의 잔기를 갖는) 펩티드 폴리비닐피롤리디논과 같은 친수성 중합체 글리신, 글루탐산, 아스파르트산 또는 아르기닌과 같은 아미노산 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 셀룰로오스 또는 그의 유도체를 포함하는 다른탄수화물, 글루코스, 만노스 또는 덱스트린 EDTA와 같은 킬레이트제 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜 나트륨과 같은 카운터 이온 및(또는) 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronic) 또는 폴리에틸렌글리콜과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

유리 산 또는 염기 형태 또는 제약학적으로 허용되는 염 형태의 거핵구 생성 단백질 화합물 또는 혼합물 약 0.5 내지 500mg을 허용된 제약 관행상 요구되는 생리학적으로 허용되는 비히클, 담체, 부형제, 결합제, 방부제, 안정화제, 향미제 등과 혼합한다. 이들 조성물 중의 활성 성분의 양은 지시되는 범위의 적당한 투여량을 얻을 수 있는 양이다.

주사용 멸균 조성물은 통상의 제약 관행에 따라 제조될 수 있다. 예를 들면, 비히클, 예를 들면, 물 또는 참깨유, 땅콩유 또는 면실유와 같은 천연 식물성 오일 또는 에틸 올레이트와 같은 합성 지방 비히클 중의 활성 화합물의 용액 또는 현탁액이 바람직할 수 있다. 완충제, 방부제, 산화 방지제 등을 허용된 제약 관행에 따라 혼합시킬 수 있다.

지속 방출형 제제의 적당한 예는 성형품, 예를 들면 필름 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 고상 소수성 중합체 매트릭스 내에 본 발명의 폴리펩티드를 함유하는 것이다. 지속 방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 [예: Langer 등, J.Biomed. Mater. Res., 15:167-277, 1981 및 Langer, Chem. Tech., 12:98-105, 1982에 기재된 폴리(2-히드록시에틸메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)], 폴리락티드(미합중국 특허 제3773919호, 유럽 특허 제58,481호), L-글루타민산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman 등, Biopolymers, 22:547-556, 1983), 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트(상기 Langer 등의 문헌), 분해성 락트산-글리콜산 공

중합체(예: 루프론 데포트 TM(Lupron DepotTM; 락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산(유럽특허 제133988호)을 포함한다.

에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하지만, 일부 히드로겔은 이보다 더 짧은 기간 동안 단백질 방출한다. 캡슐화된 단백질이 장기간 동안 체내에 존재할 때, 이들은 37°C에서 습기에 노출된 결과 변성되거나 또는 응집될 수 있고, 이 결과, 생물학적 활성이 손실되고 면역원성에 변화가 일어난다. 관련 메커니즘에 따라 단백질 안정화를 위한 적당한 방법을 고안할 수 있다. 예를 들면, 응집 메커니즘이 디설피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합을 형성하는 것으로 발견된 경우, 안정화는 술프히드릴 잔기를 변성하고, 산성 용액으로부터 동결 건조시키고, 수분 함량을 조절하고, 적당한 첨가제를 사용하고, 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성될 수 있다.

또한, 지속 방출형 거핵구 생성 단백질 조성물은 리포솜으로 트래핑된(entrapped) 거핵구 생성 단백질을 포함한다. 거핵구 생성 단백질을 함유하는 리포솜은 공지 방법에 의해 제조된다(독일 연방 공화국 특허 제3218121호 Epstein 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692, 1985; Hwang 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034, 1980; 유럽 특허 제52322호 유럽 특허 제36676호 유럽 특허 제88046호 유럽 특허 제143,949호 유럽 특허 제142641호 일본특허 출원 제83-118008호 미합중국 특허 제4485045호 및 동 제4544545호 및 유럽 특허 제102324호). 통상적으로, 리포솜은 지질이 약 30몰% 이상의 콜레스테롤인 작은 (약 200 내지 800 Å) 단층형이며, 이 비율은 최적의 거핵구 생성 단백질 치료를 위해 조정된다.

투여량은 상기의 경구용 투여량 결정 방법과 같은 방법으로 투여량을 결정한다.

【유리한 효과】

본 발명에 의한 위치 특이적 돌연변이 방법에 의해 만들어진 변형된 TPO절편 변이체로 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 안정한 TPO절편 변이체는 주사제 및 경구제로 투여시 단백질 분해효소에 의해 분해가 덜 되어 생체 이용률과 흡수율이 개선되어 지속형 주사제 및 경구용 단백질 제제로서의 투여 가능성을 제공한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 태아 간세포 cDNA로부터 TP01-153 유전자의 증폭 산물의 1% 아

가로즈 전기영동 결과이다.

도2 A는 인간의 간 조직으로부터 추출한 cDNA를 주형으로 하여 PCR 방법으로 TP0153 유전자를 증폭한 뒤 동물세포 발현벡터에 삽입하여 클로닝하였다. PCR에 사용된 프라이머 세트는 실시예1 기재와 동일하며 PCR 산물은 천연형 TPO 유전자의 -21 위치의 신호서열(S.S.)부터 153번 아미노산을 포함한다.

도2 B는 인간의 간 조직으로부터 증폭된 TP0153 유전자에서 -21번 아미노산을 암호화하는 염기위치까지의 신호서열을 hGH의 신호서열로 대체하기 위해 실시예 3의 프라이머를 사용하여 5' 쪽으로 hGH 신호서열 유전자를 순차적으로 연장하였다.

도 2 C는 인간의 간 조직으로부터 증폭된 TP0153 유전자에서 -21번 아미노산을 암호화하는 염기위치까지의 신호서열을 BM40의 신호서열로 대체하기 위해 실시예 3의 프라이머를 사용하여 5' 쪽으로 BM40 신호서열 유전자를 순차적으로 연장하였다.

도 3은 TP01-153 발현 벡터를 세포주에 트랜스펙션하여 발현시킨 뒤 배지 상층액을 회수하여 분비된 TPO 양을 ELISA로 정량하여 수율을 비교한 결과이다.

도 4는 TP01-153 아미노산 서열 전반부에 자체신호 서열과 BM40, hGH 신호서열을 도입하여 벡터를 제작 후 HEK293 세포주에 트랜스펙션하여 발현시킨 뒤 배지 상층액을 회수하여 분비된 TPO 양을 ELISA로 정량하여 수율을 비교한 결과이다.

도 5는 STAT5의 인산화에 의한 TP01-153의 생물학적 활성을 확인한 웨스턴 블로팅 결과이다. 각 lane별 약어와 처리 용량은 다음과 같다. Vh: Vehicle, RPMI1640; GM: GM-CSF, 10 ng/ml; 332: TP0332, 10 ng/ml (R&D Systems, Cat. No.288-TPN); 158: TP0158 (Antigenix, Cat. No. HC88882B, 10 ng/ml); Mo: Mock transfected CM

도 6은 돌연변이에 의한 TP01-153의 단백질 분해효소 혼합액에 대한 저항성 증가하는 대표적인 사례를 보여 주는 그래프이다. 각 그래프에서 파란선은 천연형을 나타내고 붉은색은 (A) 변이체 132번, (B) 변이체 67번, (C) 변이체 87번을 각각 나타낸다.

도 7은 pcDNA3.3-TP01-153을 주형으로 하여 PCR 방법으로 실시예 14에 나온 프라이머를 이용하여 TP07-151을 증폭하였다. 증폭된 산물은 서열1의 7번 아미노산부터 암호화하며 151번 아미노산위치 뒤에 종결코돈을 암호화한다. 증폭된 산물은 동물세포발현벡터로 삽입하여 클로닝하였다

【발명의 실시를 위한 형태】

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[실시예 1] TP01-153 유전자 증폭

TP01-153을 암호화하고 있는 유전자를 클로닝하기 위하여 인간의 간조직에서 추출한 RNA로부터 합성한 cDNA(Stratagene, Cat#780622)를 주형으로 하여 PCR 방법으로 유전자를 증폭하였다(도1). PCR 증폭에 사용된 프라이머의 염기서열은 TP01-153-SN (accatggagctgactgaattgctcctcgtg)과 TP01-153-C(ccgctcgagttacctgacgcagagggtggaccctcc)이었다.

보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

인간 간 cDNA를 주형으로 하고 상기의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머를 10 pmol이 되도록 H₂O에 녹인 다음 그 용액 3ul에 Pfu (Pyrococcus furiosus) 중합효소(Bioneer, Cat. No. K-2018)를 첨가하여 최종 부피가 100ul가 되도록 하여 PCR 반응을 진행시켰다. 증폭 반응에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다. 50 ng cDNA, 3 ul 10mM N-프라이머, 3 ul 10mM C-프라이머, 50 ul Accupower PCR premix, 39 ul의 H₂O를 넣어 100 ul의 반응 용액을 만들었다.

PCR은 1차변성 95℃ 10분, 2차 변성 95℃ 1분, 프라이머 접합 55℃ 1분, 신장반응 72℃ 1분 중 2차변성에서 신장반응 과정을 25회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 72℃ 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

[실시예 2] TP01-153 발현 벡터 제작

실시예 1에서 증폭된 PCR 산물은 1% 아가로오스 젤 전기영동을 수행하여 해당 크기의 DNA 밴드를 면도칼로 잘라내어 DNA 추출 키트(GeneAll, Cat. No: 102-102)를 이용하여 추출하였다. 상기의 PCR 산물(삽입체)과 pcDNA3.3-TOPO TA 벡터(Invitrogen, Cat. No: K8300-01)를 각각을 3:1의 몰비율로 혼합하고 T4 DNA 라이

게이즈(Takara, Cat. No: 2011A)에 의해 14°C에서 16시간 동안 반응시켜 붙게 한 뒤에 대장균 XL1-blue(RBC, Cat.No: RH119)에 형질 전환하였다. 형질 전환체로부터 플라스미드 추출 kit(Geneall, Cat. No: 101-102)를 이용 플라스미드를 추출하고, Solgent(대전, 대한민국)에 의뢰하여 염기서열 분석을 통해 클로닝 여부를 확인 하였다. 상기의 pcDNA3.3-TOPO TA에 클로닝된 TP01-153은 pcDNA3.3-TP01-153이라 명명하였다(도2A). 상기 pcDNA3.3-TP01-153은 hGH 및 BM40 신호서열 부가를 위한, 또는 표3에 나타낸 프라이머를 이용한 부위 특이적 변이체를 만들기 위한 주형으로 사용되었다.

[실시예 3] 인간 성장 호르몬 신호 서열을 가진 TP01-153 발현 벡터 제작

아미노 말단 부분에 분비능을 증가 시키기 위하여 pcDNA3.3-TP01-153 벡터에 도입된 TPO 자체 신호 서열 대신 hGH 신호 서열을 PCR 방법에 의하여 부가하였다. hGH 신호서열 부가에 사용된 프라이머의 염기 서열은 TP01-153hGH-N1 (ttcaagagggcagtgccagcccggtcctcctgcttgt), TP01-153hGH-N2 (tctgcctgccctggcttcaagagggcagtgccagcc), TP01-153hGH-N3 (tggttttggcctgctctgcctgccctggcttcaag), TP01-153hGH-N4 (ggagtcctgctcctggcttttggcctgctctgcc), TP01-153hGH-N5 (accatggctacaggctcccgacgtccctgctcctggct) 및 TP01-153-C(ccgctcgagttacctgacgcagagggtggaccctcc)이었다. PCR 방법은 상기 pcDNA3.3-TP01-153 제작 방법과 같은 방법으로 수행하였다. 간단히, 반응액에 TP01-153hGH-N1과 TP01-153-C 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 유전자를 증폭시킨 후 PCR 산물을 Expin PCR SV(Geneall, Cat. No: 103-102)를 사용 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 주형으로 TP01-153hGH-N2와 TP01-153-C 프라이머를 이용 이차 PCR 반응을 수행한다. 이와 같이 153hGH-N1에서 153hGH-N5까지 연속적인 PCR 수행으로 hGH 신호 서열이 부과된 증폭된 PCR 산물을 pcDNA3.3 TOPO TA 벡터에 클로닝하여 pcDNA3.3-GH_TP01-153 벡터를 완성하였다(도 2B). 정확한 hGH 신호 서열 부과 확인은 염기서열 해독을 통해 이루어졌다.

[실시예 4] BM40 신호 서열을 가진 TP01-153 발현 벡터 제작

아미노 말단 부분에 분비능을 증가 시키기 위하여 pcDNA3.3-TP01-153 벡터에 도입된 TPO 신호 서열 대신 또다른 신호서열 BM40를 PCR 방법에 의하여 부가하였

다. BM40 신호서열 부가에 사용된 염기 서열은 TPO절편BM40-N1
 (gccttggcagcccctagcccggctcctcctgcttgtg), TPO절편BM40-N2
 (tgcttggccgggagggccttggcagcccctagccc), TPO절편BM40-N3
 (atcttctttctcctttgcctggccgggagggcctt), TPO절편BM-N4
 (accatgagggcctggatcttctttctcctttgcct), 및 TPO절편-C
 (ccgctcgagttacctgacgcagagggtggaccctcc)로 연속적인 PCR 반응에 의해 완전한 BM40
 의 신호 서열을 도입하고 이를 pcDNA3.3-TOPO TA 벡터에 상기의 실시예 3의 hGH 서
 열 삽입 방법으로 pcDNA3.3-TOPO TA 클로닝하여 분비능이 증가된 pcDNA3.3-
 BM40_TPO1-153 벡터를 제작하고(도2 C), 정확한 클로닝 여부를 염기서열 해독으로
 확인하였다.

[실시예 5] TPO1-153 발현 동물 세포주 선정

TPO1-153의 발현 및 분비율을 높이기 위해 분비율이 좋은 발현 동물 세포주
 를 선정할 필요가 있다. 이를 위해 pcDNA3.3-TPO1-153 벡터를 단백질 발현에 사용
 되는 대표적인 동물 세포주 CHO-K1, COS7 및 HEK293 (모두 한국 세포주 은행
 (KCLB), 한국) 세포에 일시 발현시켜 발현량을 확인하였다.

구체적으로 실시예 2에서 만들어진 pcDNA3.3-TPO1-153 플라스미드를 추출한
 뒤 정량하여 각각 500ng/ul가 되도록 농도를 맞추었다. COS7, HEK293 세포는
 10%FBS(Gibco Cat. No. 26140-079)가 함유된 DMEM 배지(Gibco, Cat. No.: 11995-
 065)에서 유지하였으며 CHO-K1 세포는 RPMI1640(Gibco, Cat.No: 42401)에서 유지
 하였다. 트랜스펙션 하루 전에 6웰 플레이트(well plate)에 200,000개/웰의 세포를
 깔아 놓았다. 다음날 웰 당 OPTI-MEM(Invitrogen, Cat. No. 31985) 50ul에 DNA
 4ug, Enhancer-Q(Welgene, Cat. No. TR-003) 2.5ul를 넣고 15분간 상온에서 반응시
 킨 뒤 WelFect-Ex(Welgene, Cat. No. TR-003-01) 2ul를 넣은 뒤 상온에서 다시 10
 분간 방치하였다. 그 사이에 HEK293, CHO-K1, COS7 세포의 배지를 제거한 뒤 OPTI-
 MEM을 웰 당 1ml씩 넣어 주었다. DNA와 리포솜이 섞인 후 이 혼합체를 세포에 주입
 하고 4시간 동안 세포배양기에서 반응시켰다. 시간이 경과 후 10%FBS가 함유된
 DMEM 또는 RPMI1640 배지로 다시 교체하였다. 72시간이 지난 후 배양한 상층액을
 회수하였다. 상층액을 하기의 실시예 10 방법에 의하여 정량한 결과 HEK293 세포에
 서의 발현율이 가장 높아 HEK293 세포를 TPO1-153 발현 세포주로 확정하였다(도3).

[실시예 6] 사용된 신호서열에 따른 분비율 비교

TP01-153의 발현율을 높이기 위해 실시예 2, 3, 또는 4에서 제작된 TPO 신호서열, hGH 신호서열, 또는 BM40신호서열을 각각 도입한 벡터를 HEK293 세포에 트랜스펙션하여 상기 실시예 5의 방법으로 일시 발현시켜 발현율을 확인하였다.

간단히, 10%FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 HEK293 세포를 트랜스펙션 하루 전에 6웰 플레이트(well plate)에 200,000개/웰의 세포를 깔아 놓았다. 다음 날 웰 당 OPTI-MEM 50ul에 각각의 벡터 플라스미드를 4ug, Enhancer-Q 2.5ul를 넣고 15분간 상온에서 반응시킨 뒤 WelFect-Ex 2ul를 넣은 뒤 상온에서 다시 10분간 방치하였다. 그 사이에 HEK293 세포의 배지를 제거한 뒤 OPTI-MEM을 웰 당 1ml씩 넣어 주었다. DNA와 리포솜이 섞인 후 이 혼합체를 세포에 주입하고 4시간 동안 세포배양기에서 반응시켰다. 시간이 경과 후 10%FBS 가 함유된 DMEM 배지로 다시 교체하였다. 72시간이 지난 후 배양한 상층액을 회수하 TP01-153을 정량하였다.

pcDNA3.3-GH_TP01-153 플라스미드로 트랜스펙션 한 HEK293세포는 천연형 pcDNA3.3-TP01-153, pcDNA3.3-BM40_TP01-153 벡터를 이용한 것보다 약 3배 높은 발현 분비능을 나타내는 것을 확인하였다(도4).

[실시예 7] TP01-153 변이체 설계

변이체 제작을 위하여 먼저 단백질 분해효소에 저항성을 가지는 변이체를 설계하였다. 돌연변이 위치 결정은 TP01-153 아미노산 서열에 대해 표 1에 표시된 위장관, 세포 및 혈액 속에 존재하는 대표적인 단백질 분해효소 12종에 대한 절단 위치를 ExPasy(Expert Protein Analysis System)에서 제공하는 peptide cutter (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) 프로그램을 이용 추정하고, 추정된 절단 부위의 아미노산을 구조적 변화가 적으면서 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않는 아미노산으로 치환하고자 하였다. 치환될 아미노산의 결정은 PAM250 매트릭스(matrix)를 이용하였다. PAM250 매트릭스(W. A Pearson, *Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA*, in *Methods in Enzymology*, ed. R. Doolittle (ISBN 0-12-182084-X, Academic Press, San Diego) 183: 63-98 (1990))에는 각각의 아미노산에 대해 양수, 0, 음수의 값을 가지는 19가지의 대응 아미노산이 있는데 본 발명자들은 단백질 분해효소에 의한 절단이 되지 않으면서 양수 또는 0의 값을 가지는 아미노산을 치환 아미노산으로 결정하였다.

[표 1] 단백질 분해효소 특이적 아미노산 및 저항성 유도 치환 아미노산

| 단백질 분해효소 | 인식 절단 아미노산 | 저항성 유도 치환 아미노산 |
|------------------------|-----------------------|----------------|
| Arg-C proteinase | R | N 또는 Q |
| Asp-N endopeptidase | -D | N 또는 Q |
| Chymotrypsin | [FYWML], not before P | I |
| | [H], not before P | N 또는 Q |
| Enterokinase | K | N 또는 Q |
| Factor Xa | R | N 또는 Q |
| Glutamyl endopeptidase | E | Q |
| LysC | K | N 또는 Q |
| LysN | K | N 또는 Q |
| Proline-endopeptidase | H,K or R-P | S 또는 T |
| Thrombin | R | N 또는 Q |
| Trypsin | K | N 또는 Q |
| Elastase | A | S 또는 T |
| | G | S |
| | V | I 또는 T |

상기의 방법에 의하여 설계된 TP01-153 변이체의 목록은 표 2에 나타내었다.

[표 2] 설계된 TPO1-153 단일 변이체 목록

| 변이체번호 | 변이내용 | 변이체번호 | 변이내용 |
|-------------|------|--------------|-------|
| TPO1-153-1 | A3S | TPO1-153-75 | E72N |
| TPO1-153-2 | A3T | TPO1-153-76 | E72S |
| TPO1-153-3 | A6S | TPO1-153-77 | G73S |
| TPO1-153-4 | A6T | TPO1-153-78 | V74I |
| TPO1-153-5 | D8Q | TPO1-153-79 | V74T |
| TPO1-153-6 | D8N | TPO1-153-80 | M75I |
| TPO1-153-7 | L9I | TPO1-153-81 | A76S |
| TPO1-153-8 | R10Q | TPO1-153-82 | A76T |
| TPO1-153-9 | V11I | TPO1-153-83 | A77S |
| TPO1-153-10 | V11T | TPO1-153-84 | A77T |
| TPO1-153-11 | L12I | TPO1-153-85 | R78Q |
| TPO1-153-12 | K14N | TPO1-153-86 | G79S |
| TPO1-153-13 | K14Q | TPO1-153-87 | L81I |
| TPO1-153-14 | L15I | TPO1-153-88 | L86I |
| TPO1-153-15 | L16I | TPO1-153-89 | L89I |
| TPO1-153-16 | R17Q | TPO1-153-90 | L90I |
| TPO1-153-17 | D18N | TPO1-153-91 | G91S |
| TPO1-153-18 | D18Q | TPO1-153-92 | L93I |
| TPO1-153-19 | H20N | TPO1-153-93 | G95S |
| TPO1-153-20 | H20Q | TPO1-153-94 | V97I |
| TPO1-153-21 | V21I | TPO1-153-95 | V97T |
| TPO1-153-22 | V21T | TPO1-153-96 | R98Q |
| TPO1-153-23 | L22I | TPO1-153-97 | L99I |
| TPO1-153-24 | H23N | TPO1-153-98 | L100I |
| TPO1-153-25 | H23Q | TPO1-153-99 | L101I |
| TPO1-153-26 | R25Q | TPO1-153-100 | G102S |
| TPO1-153-27 | R25N | TPO1-153-101 | A103S |
| TPO1-153-28 | L26I | TPO1-153-102 | A103T |
| TPO1-153-29 | E31Q | TPO1-153-103 | L104I |
| TPO1-153-30 | V32I | TPO1-153-104 | L107I |
| TPO1-153-31 | V32T | TPO1-153-105 | L108I |
| TPO1-153-32 | H33N | TPO1-153-106 | G109S |
| TPO1-153-33 | H33Q | TPO1-153-107 | L112I |
| TPO1-153-34 | P34S | TPO1-153-108 | G116S |
| TPO1-153-35 | V39I | TPO1-153-109 | R117Q |
| TPO1-153-36 | V39T | TPO1-153-110 | A120S |
| TPO1-153-37 | L40I | TPO1-153-111 | A120T |
| TPO1-153-38 | L41I | TPO1-153-112 | H121N |
| TPO1-153-39 | A43S | TPO1-153-113 | H121Q |

| 변이체번호 | 변이내용 | 변이체번호 | 변이내용 |
|-------------|------|--------------|-------|
| TPO1-153-40 | A43T | TPO1-153-114 | K122N |
| TPO1-153-41 | V44I | TPO1-153-115 | K122Q |
| TPO1-153-42 | V44T | TPO1-153-116 | D123Q |
| TPO1-153-43 | D45Q | TPO1-153-117 | D123N |
| TPO1-153-44 | D45N | TPO1-153-118 | A126S |
| TPO1-153-45 | F46I | TPO1-153-119 | A126T |
| TPO1-153-46 | L48I | TPO1-153-120 | F128I |
| TPO1-153-47 | G49S | TPO1-153-121 | L129I |
| TPO1-153-48 | E50Q | TPO1-153-122 | L129V |
| TPO1-153-49 | E50N | TPO1-153-123 | F131I |
| TPO1-153-50 | W51I | TPO1-153-124 | H133N |
| TPO1-153-51 | W51S | TPO1-153-125 | H133Q |
| TPO1-153-52 | K52Q | TPO1-153-126 | L134I |
| TPO1-153-53 | K52N | TPO1-153-127 | L135I |
| TPO1-153-54 | M55I | TPO1-153-128 | R136Q |
| TPO1-153-55 | E56Q | TPO1-153-129 | G137S |
| TPO1-153-56 | E56N | TPO1-153-130 | K138N |
| TPO1-153-57 | E57Q | TPO1-153-131 | K138Q |
| TPO1-153-58 | E57N | TPO1-153-132 | K138T |
| TPO1-153-59 | K59Q | TPO1-153-133 | V139I |
| TPO1-153-60 | K59N | TPO1-153-134 | V139T |
| TPO1-153-61 | A60S | TPO1-153-135 | R140Q |
| TPO1-153-62 | A60T | TPO1-153-136 | F141I |
| TPO1-153-63 | D62Q | TPO1-153-137 | F141S |
| TPO1-153-64 | D62N | TPO1-153-138 | L142I |
| TPO1-153-65 | L64I | TPO1-153-139 | M143I |
| TPO1-153-66 | G65S | TPO1-153-140 | M143N |
| TPO1-153-67 | A66S | TPO1-153-141 | L144I |
| TPO1-153-68 | A66T | TPO1-153-142 | V145I |
| TPO1-153-69 | V67I | TPO1-153-143 | V145T |
| TPO1-153-70 | V67T | TPO1-153-144 | G146S |
| TPO1-153-71 | L69I | TPO1-153-145 | G147S |
| TPO1-153-72 | L70I | TPO1-153-146 | L150I |
| TPO1-153-73 | L71I | TPO1-153-147 | V152I |
| TPO1-153-74 | E72Q | TPO1-153-148 | V152T |
| | | TPO1-153-149 | K138S |

[실시에 8] TPO1-153 단일 변이체 제작

위치 특이적 TPO1-153 단일 변이체를 제작하기 위해 위치 지정 변이체 제작 (site-directed mutagenesis) 방법에 의해 각 변이체의 변이내용에 상응하는 표 3 기재 프라이머를 이용하여 변이체를 제작하였다.

보다 자세히 설명하면 부위 특이적 변이체를 만들기 위해서 상기 pcDNA3.3-GH_TPO1-153 플라스미드를 주형으로 표 3의 프라이머 각 쌍을 10 pmole이 되도록 H₂O에 녹인 후 그 용액에 Pfu polymerase를 첨가하여 최종 부피가 50 ul가 되도록 하여 PCR 반응을 진행시켰다. 증폭 반응에 사용된 용액의 구성은 다음과 같다. 1 ul 50 ng pcDNA3.3-GH_TPO1-153 DNA, 0.25 ul 10pmole N-프라이머, 0.25 ul

10pmole C-프라이머, 25 ul 2X PrimeSTAR PCR premix, 2 ul 200uM dNTP, 0.5 ul PrimeSTAR HS DNA polymerase(Takara, Cat. No: R044A)와 19 ul의 H₂O를 넣어 50 ul의 반응 용액을 만들었다.

PCR은 1차 변성 98℃ 10초, 2차 변성 98℃ 10초, 프라이머 접합 68℃ 30초, 신장반응 74℃ 5분 30초 과정 중 2차 변성에서 신장반응 22회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 74℃ 7분으로 수행하여 반응을 종료하였다.

PCR 산물은 *DpnI* 효소로 5분간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보한 후 대장균 XL1-blue 세포에 형질 전환하여 클론을 얻고 이로부터 플라스미드를 추출하여 염기서열 분석을 하여 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

[표3] 위치 특이 돌연변이 유도를 위한 프라이머

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|---------|-------|---------|---|
| 1 | A3S | 전 | 5'-gcagtgccagcccAGCctcctgcttg-3' |
| | | 후 | 5'-cacaagcaggaggGCTcgggctggcactgc-3' |
| 2 | A3T | 전 | 5'-gcagtgccagcccACCcctcctgcttg-3' |
| | | 후 | 5'-cacaagcaggaggGGTcgggctggcactgc-3' |
| 3 | A6S | 전 | 5'-gcccggctcctcctAGCtgtgacctccag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcggaggtcacaGCTaggaggagccggc-3' |
| 4 | A6T | 전 | 5'-cccggctcctcctACCtgtgacctccg-3' |
| | | 후 | 5'-cggaggtcacaGGTaggaggagccggg-3' |
| 5 | D8Q | 전 | 5'-ctcctcctgctgtCAGctccgagtctcag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgaggactcggagCTGacaagcaggaggag-3' |
| 6 | D8N | 전 | 5'-cggctcctcctgctgtAATctccgag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcggagATTacaagcaggaggagccg-3' |
| 7 | L9I | 전 | 5'-cctcctgctgtgacATTcgagtcctcagta-3' |
| | | 후 | 5'-tactgaggactcgAATgtcacaagcaggagg-3' |
| 8 | R10Q | 전 | 5'-cctgcttgacctcCAGgtcctcagtaaactg-3' |
| | | 후 | 5'-cagtttactgaggacCTGgaggtcacaagcagg-3' |
| 9 | V11I | 전 | 5'-tctgcttgacctccgaATTctcagtaaactg-3' |
| | | 후 | 5'-cagtttactgagAATcggaggtcacaagcagga-3' |
| 10 | V11T | 전 | 5'-ctgcttgacctccgaACCctcagtaaactgct-3' |
| | | 후 | 5'-agcagtttactgagGGTcggaggtcacaagcag-3' |
| 11 | L12I | 전 | 5'-cttgacctccgagtcATCagtaaactgcttcg-3' |
| | | 후 | 5'-cgaagcagtttactGATgactcggaggtcacaag-3' |
| 12 | K14N | 전 | 5'-ctccgagtcctcagtAATctgcttcgtgactcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggagtcacgaagcagATTactgaggactcggag-3' |
| 13 | K14Q | 전 | 5'-ctccgagtcctcagtCAGctgcttcgtgactccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggagtcacgaagcagCTGactgaggactcggag-3' |
| 14 | L15I | 전 | 5'-cgagtcctcagtaaaATCcttcgtgactcccattg-3' |
| | | 후 | 5'-catgggagtcacgaagGATtttactgaggactcg-3' |
| 15 | L16I | 전 | 5'-agtccctcagtaaactgATCcgtagtcccattg-3' |
| | | 후 | 5'-gacatgggagtcacgGATcagtttactgaggact-3' |
| 16 | R17Q | 전 | 5'-ctcagtaaactgcttCAGgactcccattgcttc-3' |
| | | 후 | 5'-gaaggacatgggagtcCTGaagcagtttactgag-3' |
| 17 | D18N | 전 | 5'-gtcctcagtaaactgcttctgAATcccattgcttc-3' |
| | | 후 | 5'-ggacatgggaATTacgaagcagtttactgaggac-3' |
| 18 | D18Q | 전 | 5'-ctcagtaaactgcttctgCAGtcccattgcttc-3' |
| | | 후 | 5'-gaaggacatgggaCTGacgaagcagtttactgag-3' |
| 19 | H20N | 전 | 5'-actgcttcgtgactccAATgtccttcacagcag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgctggaaggacATTggagtcacgaagcag-3' |
| 20 | H20Q | 전 | 5'-gcttcgtgactccCAGgtccttcacagcaga-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|------------|----------|------------|---|
| | | 후 | 5'-tctgctgtgaaggacCTGggagtcacgaagc-3' |
| 21 | V21I | 전 | 5'-ctgcttcgtgactcccatATCcttcacagcaga-3' |
| | | 후 | 5'-tctgctgtgaagGATatgggagtcacgaagcag-3' |
| 22 | V21T | 전 | 5'-tgcttcgtgactcccatACCcttcacagcagac-3' |
| | | 후 | 5'-gtctgctgtgaagGGTatgggagtcacgaagca-3' |
| 23 | L22I | 전 | 5'-tcgtgactcccattgctATTcacagcagactgag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcagctgctgtgAATgacatgggagtcacga-3' |
| 24 | H23N | 전 | 5'-cttcgtgactcccattgctcctAATagcagactga-3' |
| | | 후 | 5'-tcagctgctATTAaggacatgggagtcacgaag-3' |
| 25 | H23Q | 전 | 5'-cgtgactcccattgctcctCAGagcagactgag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcagctgctCTGaaggacatgggagtcacg-3' |
| 26 | R25Q | 전 | 5'-catgcttcacagcCAGctgagccagtgcccag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgggcactggctcagCTGgctgtgaaggacatg-3' |
| 27 | R25N | 전 | 5'-catgcttcacagcAATctgagccagtgcccag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgggcactggctcagATTgctgtgaaggacatg-3' |
| 28 | L26I | 전 | 5'-cccatgcttcacagcagaATCagccagtgccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggcactggctGATctgctgtgaaggacatggg-3' |
| 29 | E31Q | 전 | 5'-ctgagccagtgcccaCAGgttacacct-3' |
| | | 후 | 5'-aggggtaacCTGtgggcactggctcag-3' |
| 30 | V32I | 전 | 5'-gccagtgcccagagATTcaccctttgacct-3' |
| | | 후 | 5'-aggcaaaaggtgAATctctgggcactggc-3' |
| 31 | V32T | 전 | 5'-gagccagtgcccagagACCcaccctttgacctaca-3' |
| | | 후 | 5'-ttaggcaaaaggtgGGTctctgggcactggctc-3' |
| 32 | H33N | 전 | 5'-agccagtgcccagaggttAATcctttgcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggcaaaaggATTAacctctgggcactggct-3' |
| 33 | H33Q | 전 | 5'-ccagtgcccagaggttCAGcctttgccta-3' |
| | | 후 | 5'-taggcaaaaggCTGaacctctgggcactgg-3' |
| 34 | P34S | 전 | 5'-gtgcccagaggttcacAGCttgcctacacctgtc-3' |
| | | 후 | 5'-gacaggtgtaggcaaGCTgtgaacctctgggcac-3' |
| 35 | V39I | 전 | 5'-accctttgcctacacctATCctgctgcctg-3' |
| | | 후 | 5'-caggcagcagGATaggtgtaggcaaaaggt-3' |
| 36 | V39T | 전 | 5'-ccctttgcctacacctACCctgctgcctgctg-3' |
| | | 후 | 5'-cagcaggcagcagGGTtaggtgtaggcaaaagg-3' |
| 37 | L40I | 전 | 5'-tgctacacctgtcATCctgctgctgtggactt-3' |
| | | 후 | 5'-aagtccacagcaggcagGATgacaggtgtaggca-3' |
| 38 | L41I | 전 | 5'-cctacacctgtcctgATCctgctgtggacttta-3' |
| | | 후 | 5'-taaagtccacagcaggGATcaggacaggttagg-3' |
| 39 | A43S | 전 | 5'-cacctgtcctgctgctAGCgtggacttagctt-3' |
| | | 후 | 5'-aagctaaagtccacGCTaggcagcaggacaggtg-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|---------|-------|---------|---|
| 40 | A43T | 전 | 5'-cctgtcctgctgctACCgtggactttagct-3' |
| | | 후 | 5'-agctaaagtccacGGTaggcagcaggacagg-3' |
| 41 | V44I | 전 | 5'-gtcctgctgctgctATCgactttagcttggga-3' |
| | | 후 | 5'-tccaagctaaagtcGATagcaggcagcaggac-3' |
| 42 | V44T | 전 | 5'-ctgtcctgctgctgctACCgactttagcttggg-3' |
| | | 후 | 5'-ccaagctaaagtcGGTagcaggcagcaggacag-3' |
| 43 | D45Q | 전 | 5'-ctgctgctgctgtgCAGtttagcttgggagaat-3' |
| | | 후 | 5'-attctccaagctaaaCTGcaccagcaggcagcag-3' |
| 44 | D45N | 전 | 5'-ctgctgctgctgtgAATtttagcttgggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccaagctaaaATTcacagcaggcagcag-3' |
| 45 | F46I | 전 | 5'-gtgcctgctgtggacATTgcttgggagaatg-3' |
| | | 후 | 5'-cattctccaagctAATgtccacagcaggcagc-3' |
| 46 | L48I | 전 | 5'-gtggactttagcATTggagaatggaaaaccag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgggtttccattctccAATgctaaagtccac-3' |
| 47 | G49S | 전 | 5'-ctgtggactttagcttAGCGaatggaaaacca-3' |
| | | 후 | 5'-tgggtttccattcGCTcaagctaaagtccacag-3' |
| 48 | E50Q | 전 | 5'-gtggactttagcttgggaCAGtggaaccagag-3' |
| | | 후 | 5'-tctgggtttccaCTGtccaagctaaagtccac-3' |
| 49 | E50N | 전 | 5'-ggactttagcttgggaAATggaaaaccagatg-3' |
| | | 후 | 5'-catctgggtttccaATTtccaagctaaagtcc-3' |
| 50 | W51I | 전 | 5'-ctttagcttgggagaaATTaaaaccagatggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccatctgggtttAATtctccaagctaaag-3' |
| 51 | W51S | 전 | 5'-ctttagcttgggagaaAGCaaaaccagatggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccatctgggtttGCTtctccaagctaaag-3' |
| 52 | K52Q | 전 | 5'-gctgggagaatggCAGaccagatggaggagac-3' |
| | | 후 | 5'-ggtctcctcatctgggtCTGccattctccaagc-3' |
| 53 | K52N | 전 | 5'-gactttagcttgggagaatggAATaccagatggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccatctgggtATTccattctccaagctaaagtc-3' |
| 54 | M55I | 전 | 5'-gggagaatggaaaaccagATTgaggagaccaag-3' |
| | | 후 | 5'-cttggctcctcAATctgggtttccattctccc-3' |
| 55 | E56Q | 전 | 5'-tggaaccagatgCAGgagaccaaggcac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgccttgggtctcCTGcatctgggtttcca-3' |
| 56 | E56N | 전 | 5'-gaatggaaaaccagatgAATgagaccaaggcac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgccttgggtctcATTcatctgggtttccattc-3' |
| 57 | E57Q | 전 | 5'-aaaaccagatggagCAGaccaaggcacagg-3' |
| | | 후 | 5'-cctgtgccttgggtCTGctccatctgggtttt-3' |
| 58 | E57N | 전 | 5'-gaaaaccagatggagAATaccaaggcacaggac-3' |
| | | 후 | 5'-gtcctgtgccttgggtATTctccatctgggtttc-3' |
| 59 | K59Q | 전 | 5'-cagatggaggagaccCAGgcacaggacattc-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|---------|-------|---------|---|
| | | 후 | 5'-gaatgtcctgtgcCTGggtctcctccatctg-3' |
| 60 | K59N | 전 | 5'-cagatggaggagaccAATgcacaggacattctg-3' |
| | | 후 | 5'-cagaatgtcctgtgcATTggtctcctccatctg-3' |
| 61 | A60S | 전 | 5'-gatggaggagaccaagAGCcaggacattctggg-3' |
| | | 후 | 5'-cccagaatgtcctgGCTcttggctcctccatc-3' |
| 62 | A60T | 전 | 5'-tggaggagaccaagACCcaggacattctgggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcccagaatgtcctgGGTcttggctcctcca-3' |
| 63 | D62Q | 전 | 5'-gagaccaaggcacagCAGattctgggagcagt-3' |
| | | 후 | 5'-cactgctcccagaatCTGctgtgccttggctc-3' |
| 64 | D62N | 전 | 5'-gagaccaaggcacagAATattctgggagcag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgctcccagaatATTctgtgccttggctc-3' |
| 65 | L64I | 전 | 5'-gaccaaggcacaggacattATTggagcagtgacc-3' |
| | | 후 | 5'-ggtcactgctccAATaatgtcctgtgccttggtc-3' |
| 66 | G65S | 전 | 5'-gcacaggacattctgAGCgcagtgacccttctgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcagaagggtcactgcGCTcagaatgtcctgtgc-3' |
| 67 | A66S | 전 | 5'-caggacattctgggaAGCgtgacccttctgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcagaagggtcacGCTtcccagaatgtcctg-3' |
| 68 | A66T | 전 | 5'-acaggacattctgggaACCgtgacccttctgctgg-3' |
| | | 후 | 5'-ccagcagaagggtcacGGTtcccagaatgtcctgt-3' |
| 69 | V67I | 전 | 5'-ggacattctgggagcaATTacccttctgctggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccagcagaagggtAATgtctcccagaatgtcc-3' |
| 70 | V67T | 전 | 5'-ggacattctgggagcaACCacccttctgctggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccagcagaagggtGGTgtctcccagaatgtcc-3' |
| 71 | L69I | 전 | 5'-gggagcagtgaccATTctgctggaggg-3' |
| | | 후 | 5'-ccctccagcagTTAggtcactgctccc-3' |
| 72 | L70I | 전 | 5'-tctgggagcagtgacccttATTctggagggagtg-3' |
| | | 후 | 5'-cactccctccagAATaagggtcactgctcccaga-3' |
| 73 | L71I | 전 | 5'-gcagtgacccttctgATTgagggagtgatggcag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgccatcactccctcAATcagaagggtcactgc-3' |
| 74 | E72Q | 전 | 5'-gacccttctgctgCAGggagtgatggc-3' |
| | | 후 | 5'-gccatcactccCTGcagcagaagggtc-3' |
| 75 | E72N | 전 | 5'-gtgacccttctgctgAATggagtgatggcagcac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgctgccatcactccATTcagcagaagggtcac-3' |
| 76 | E72S | 전 | 5'-gtgacccttctgctgAGCggagtgatggcagc-3' |
| | | 후 | 5'-gctgccatcactccGCTcagcagaagggtcac-3' |
| 77 | G73S | 전 | 5'-cccttctgctggagAGCgtgatggcagcacg-3' |
| | | 후 | 5'-cgtgctgccatcacGCTtccagcagaagg-3' |
| 78 | V74I | 전 | 5'-cttctgctggaggaATTatggcagcacgggga-3' |
| | | 후 | 5'-tcccgtgctgccatAATtccctccagcagaag-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|---------|-------|---------|--|
| 79 | V74T | 전 | 5'-cttctgctggaggaACCatggcagcacgggg-3' |
| | | 후 | 5'-cccgtgctgcatGGTcccctccagcagaag-3' |
| 80 | M75I | 전 | 5'-ctggagggagtGATTgcagcacgggga-3' |
| | | 후 | 5'-tccccgtgctgcAATcactccctccag-3' |
| 81 | A76S | 전 | 5'-ggagggagtgatgAGCgcacggggaca-3' |
| | | 후 | 5'-gtccccgtgcGCTcatcactccctcc-3' |
| 82 | A76T | 전 | 5'-ctggagggagtgatgACCgcacggggacaactg-3' |
| | | 후 | 5'-cagtggtccccgtgcGGTcatcactccctccag-3' |
| 83 | A77S | 전 | 5'-agggagtgatggcaAGCcggggacaactg-3' |
| | | 후 | 5'-cagtggtccccgGCTgccatcactccct-3' |
| 84 | A77T | 전 | 5'-ctggagggagtgatggcaACCcggggacaac-3' |
| | | 후 | 5'-gttggtccccgGGTgccatcactccctccag-3' |
| 85 | R78Q | 전 | 5'-agtgatggcagcaCAGggacaactgggac-3' |
| | | 후 | 5'-gtcccagttgtccCTGtgctgcatcact-3' |
| 86 | G79S | 전 | 5'-tgatggcagcacggAGCcaactgggaccac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgggtcccagttgGCTccgtgctgcatca-3' |
| 87 | L81I | 전 | 5'-gcagcacggggacaaATTggaccacttgcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggcaagtgggtccAATttgtccccgtgctgc-3' |
| 88 | L86I | 전 | 5'-tgggaccacttgcATTtcatccctcctg-3' |
| | | 후 | 5'-caggagggatgaAATgcaagtgggtccca-3' |
| 89 | L89I | 전 | 5'-cttgctctcatccATTctggggcagctt-3' |
| | | 후 | 5'-aagctgccccagAATggatgagaggcaag-3' |
| 90 | L90I | 전 | 5'-gcctctcatccctcATTgggcagctttctggac-3' |
| | | 후 | 5'-gtccagaaagctgcccAATgagggatgagaggc-3' |
| 91 | G91S | 전 | 5'-ctctcatccctcctgAGCagctttctggacag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgtccagaaagctgGCTcaggagggatgagag-3' |
| 92 | L93I | 전 | 5'-ccctcctggggcagATTctggacaggtc-3' |
| | | 후 | 5'-gacctgtccagaAATctgcccaggaggg-3' |
| 93 | G95S | 전 | 5'-ctggggcagctttcAGCaggtcctctcctc-3' |
| | | 후 | 5'-gaggagacggacctgGCTagaaagctgcccag-3' |
| 94 | V97I | 전 | 5'-cagctttctggacagATTcgtctcctcctg-3' |
| | | 후 | 5'-caaggaggagacgAATctgtccagaaagctg-3' |
| 95 | V97T | 전 | 5'-gcagctttctggacagACCcgtctcctccttggg-3' |
| | | 후 | 5'-ccaaggaggagacgGGTctgtccagaaagctgc-3' |
| 96 | R98Q | 전 | 5'-tttctggacaggtcCAGctcctccttggggcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggccccaaggaggagCTGgacctgtccagaaa-3' |
| 97 | L99I | 전 | 5'-ctttctggacaggtccgtATTctccttggg-3' |
| | | 후 | 5'-ccaaggagAATacggacctgtccagaaag-3' |
| 98 | L100I | 전 | 5'-caggtccgtctcATTcttggggccc-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|---------|-------|---------|---|
| | | 후 | 5'-gggcccccaagAATgagacggacctg-3' |
| 99 | L101I | 전 | 5'-gtccgtctcctcATTggggccctgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcagggccccAATgaggagacggac-3' |
| 100 | G102S | 전 | 5'-ggtcctctcctccttAGCgccctgcag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgcagggcGCTaaggaggagacggacc-3' |
| 101 | A103S | 전 | 5'-gtctcctcctgggAGCctgcagacctcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaggctctgcagGCTccaaggaggagac-3' |
| 102 | A103T | 전 | 5'-ctctccttgggACCctgcagagcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggctctgcagGAcccaaggaggag-3' |
| 103 | L104I | 전 | 5'-tcctcctggggccATTcagagcctctgg-3' |
| | | 후 | 5'-ccaaggaggctctgAATggccccaggagga-3' |
| 104 | L107I | 전 | 5'-ggccctgcagagcATCcttgaacca-3' |
| | | 후 | 5'-tgggtccaagGATgctctgcagggcc-3' |
| 105 | L108I | 전 | 5'-ccctgcagagcctcATTgaaccagctt-3' |
| | | 후 | 5'-aagctgggtccaAATgaggctctgcaggg-3' |
| 106 | G109S | 전 | 5'-ggccctgcagagcctccttAGCaccagcttc-3' |
| | | 후 | 5'-gaagctgggtGCTaaggaggctctgcagggcc-3' |
| 107 | L112I | 전 | 5'-tccttgaaccagATTcctccacagggc-3' |
| | | 후 | 5'-gccctgtggaggAATctgggtccaagga-3' |
| 108 | G116S | 전 | 5'-gcttctccacagAGCaggaccacagc-3' |
| | | 후 | 5'-gctgtgtcctGCTctgtggaggaagc-3' |
| 109 | R117Q | 전 | 5'-gcttctccacagggcCAGaccacagctcacaag-3' |
| | | 후 | 5'-ctgtgagctgtgtCTGgccctgtggaggaagc-3' |
| 110 | A120S | 전 | 5'-ccacagggcaggaccacaAGCcacaggatccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggatcctgtgGCTgtgtcctgccctgtgg-3' |
| 111 | A120T | 전 | 5'-agggcaggaccacaACCacaaggatccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggatcctgtgGGTgtgtcctgccct-3' |
| 112 | H121N | 전 | 5'-gggcaggaccacagctAATaaggatcccaa-3' |
| | | 후 | 5'-tgggatcctATTgctgtgtcctgccc-3' |
| 113 | H121Q | 전 | 5'-caggaccacagctCAGaaggatcccaatgcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggcattgggatccttCTGagctgtgtcctg-3' |
| 114 | K122N | 전 | 5'-ggaccacagctcacAATgatcccaatgccatct-3' |
| | | 후 | 5'-agatggcattgggatcATTgtgagctgtgtcc-3' |
| 115 | K122Q | 전 | 5'-ggaccacagctcacCAGgatcccaatgcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggcattgggatcCTGgtgagctgtgtcc-3' |
| 116 | D123Q | 전 | 5'-gaccacagctcacaagCAGcccaatgccatctc-3' |
| | | 후 | 5'-gaagatggcattgggCTGctgtgagctgtgtcc-3' |
| 117 | D123N | 전 | 5'-gaccacagctcacaagAATcccaatgccatctc-3' |
| | | 후 | 5'-gaagatggcattgggATTctgtgagctgtgtcc-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|------------|----------|------------|--|
| 118 | A126S | 전 | 5'-ctcacaaggatccaatAGCattctcctgagctt-3' |
| | | 후 | 5'-aagctcaggaagatGCTattgggatcctgtgag-3' |
| 119 | A126T | 전 | 5'-acagctcacaaggatccaatACCatcttctga-3' |
| | | 후 | 5'-tcaggaagatGGTattgggatcctgtgagctgt-3' |
| 120 | F128I | 전 | 5'-ggatccaatgccatcATCctgagcttcaaca-3' |
| | | 후 | 5'-tgttgaagctcagGATgatggcattgggatcc-3' |
| 121 | L129I | 전 | 5'-cccaatgccatcttcATCagcttccaacacctgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcaggtgttgaagctGATgaagatggcattggg-3' |
| 122 | L129V | 전 | 5'-cccaatgccatcttcGTGagcttccaacacctgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcaggtgttgaagctCACgaagatggcattggg-3' |
| 123 | F131I | 전 | 5'-gccatctcctgagcATCcaacacctgtcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggagcaggtgttgGATgctcaggaagatggc-3' |
| 124 | H133N | 전 | 5'-gccatctcctgagcttccaaAATctgtccga-3' |
| | | 후 | 5'-tcggagcagATTtgaagctcaggaagatggc-3' |
| 125 | H133Q | 전 | 5'-cctgagcttccaaCAGctgtcaggaaag-3' |
| | | 후 | 5'-cttctcggagcagCTGttgaagctcagg-3' |
| 126 | L134I | 전 | 5'-ctgagctccaacacATTctccgaggaaaggtgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcaccttctcggagAATgtgttgaagctcag-3' |
| 127 | L135I | 전 | 5'-agcttccaacacctgATCcgaggaaaggtgc-3' |
| | | 후 | 5'-gcaccttctcctcgGATcaggtgttgaagct-3' |
| 128 | R136Q | 전 | 5'-ttccaacacctgctcCAGggaaggtgcgttc-3' |
| | | 후 | 5'-gaaacgcacctttccCTGgagcaggtgttggaa-3' |
| 129 | G137S | 전 | 5'-caacacctgctccgaAGCaaggtgcgttctga-3' |
| | | 후 | 5'-tcaggaaacgcaccttGCTcggagcaggtgtg-3' |
| 130 | K138N | 전 | 5'-acacctgctccgaggaAATgtgcgttctg-3' |
| | | 후 | 5'-caggaacgcacATTtctcggagcaggtgt-3' |
| 131 | K138Q | 전 | 5'-cacctgctccgaggaCAGgtgcgttcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaaacgcacCTGtctcggagcaggtg-3' |
| 132 | K138T | 전 | 5'-cacctgctccgaggaACCgtgcgttcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaaacgcacGGTtctcggagcaggtg-3' |
| 133 | V139I | 전 | 5'-ctgctccgaggaaagATCcgttcctgatgcttg-3' |
| | | 후 | 5'-caagcatcaggaacgGATcttctcggagcag-3' |
| 134 | V139T | 전 | 5'-ctgctccgaggaaagACCcgttcctgatgcttg-3' |
| | | 후 | 5'-caagcatcaggaacgGGTcttctcggagcag-3' |
| 135 | R140Q | 전 | 5'-ctccgaggaaaggtgCAGttcctgatgcttag-3' |
| | | 후 | 5'-ctacaagcatcaggaaCTGcaccttctcggag-3' |
| 136 | F141I | 전 | 5'-gctccgaggaaaggtgcgtATCctgatgct-3' |
| | | 후 | 5'-agcatcagGATacgcaccttctcggagc-3' |
| 137 | F141S | 전 | 5'-gctccgaggaaaggtgcgtAGCctgatgct-3' |

| 프라이머 번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | 서열 |
|------------|----------|------------|--|
| | | 후 | 5'-agcatcagGCTacgcacctttcctcggagc-3' |
| 138 | L142I | 전 | 5'-aaaggtgcgtttcATCatgcttgtaggagggtcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaccctcctacaagcatGATgaaacgcaccttt-3' |
| 139 | M143I | 전 | 5'-ggtgcgtttcctgATCcttgtaggagggtcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaccctcctacaagGATcaggaacgcacc-3' |
| 140 | M143N | 전 | 5'-ggtgcgtttcctgAATcttgtaggagggtccacc-3' |
| | | 후 | 5'-ggiggaccctcctacaagATTcaggaacgcacc-3' |
| 141 | L144I | 전 | 5'-ggtgcgtttcctgatgATTgtaggagggtccac-3' |
| | | 후 | 5'-gtggaccctcctacAATcatcaggaacgcacc-3' |
| 142 | V145I | 전 | 5'-aggtgcgtttcctgatgcttATCggagggtcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaccctccGATaagcatcaggaacgcacct-3' |
| 143 | V145T | 전 | 5'-gtgcgtttcctgatgcttACCggagggtccaccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggtggaccctccGGTaagcatcaggaacgcac-3' |
| 144 | G146S | 전 | 5'-gtgcgtttcctgatgcttgaAGCgggtccaccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggtggaccctcctacaagcatcaggaacgcac-3' |
| 145 | G147S | 전 | 5'-gttctgatgctttaggaAGCtccaccctctg-3' |
| | | 후 | 5'-cagagggtggaGCTtctacaagcatcaggaaac-3' |
| 146 | L150I | 전 | 5'-ggtccaccATCtgcgtgaggttaactcgagcgg-3' |
| | | 후 | 5'-ccgctcgagttacctcagcaGATggtggacc-3' |
| 147 | V152I | 전 | 5'-ggtccaccctctgcATCaggttaactcgagcgg-3' |
| | | 후 | 5'-ccgctcgagttacctGATgcagagggtggacc-3' |
| 148 | V152T | 전 | 5'-gggtccaccctctgcACCaggttaactcgagcgg-3' |
| | | 후 | 5'-ccgctcgagttacctGGTgcagagggtggacc-3' |
| 149 | K138S | 전 | 5'-cacctgctccgaggaAGCgtgcgttcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaacgcacGCTtctcggagcaggtg-3' |

[실시예 9] HEK293 세포에서의 TP01-153 및 TP01-153 변이체 발현

실시예 3에서 클로닝한 동물세포 발현용 벡터인 pcDNA3.3-GH_TP01-153과 실시예 8에서 완성한 그에 대한 변이체들을 HEK293 세포에서 발현하였다. 간단히, 각각의 변이체 플라스미드를 추출한 뒤 정량하여 각각 500ng/ul가 되도록 농도를 맞추었다. HEK293 세포는 10%FBS가 함유된 DMEM 배지에서 유지하였으며 트랜스펙션 하루 전에 6웰 플레이트(well plate)에 200,000개/웰의 세포를 깔아 놓았다. 다음 날 웰 당 OPTI-MEM 50ul에 DNA 4ug, Enhancer-Q 2.5ul를 넣고 15분간 상온에서 반응시킨 뒤 WelFect-Ex 2ul를 넣은 뒤 상온에서 다시 10분간 방치하였다. 그 사이에 HEK293 세포의 배지를 제거한 뒤 OPTI-MEM을 웰 당 1ml씩 넣어 주었다. DNA와 리포좀이 섞인 후 이 혼합체를 세포에 주입하고 4시간 동안 세포배양기에서 반응시켰다. 시간이 경과 후 10%FBS 가 함유된 DMEM 배지로 다시 교체하였다. 72시간이 지난 후 배양한 상층액을 회수하였다.

[실시예 10] HEK293 세포에서 발현된 TP01-153 및 TP01-153 변이체 단백질 정량

TP01-153 및 각 변이체의 발현 수율은 ELISA kit(Peprrotech, Cat. No: 900-K44)를 이용하여 측정하였다.

구체적으로 Assay 희석액인 RD1-1(Cat. No: 900-K44)을 TPO에 대한 단일클론 항체가 코팅된 96 웰 플레이트에 각각 50ul씩 주입한 후 스탠다드 단백질 TP0174 (Peprrotech, Cat. No: 900-K44)를 포함한 시료를 200 ul씩 주입하고 플레이트를 비닐테이프로 밀봉하고 3시간 동안 상온에서 반응시켰다. 세척 완충액(40mM Tris (pH7.5) 0.3M NaCl, 2.7mM KCl, 0.05% Tween20)을 이용해 3번씩 플레이트를 씻어준 후 각각의 웰에 TPO Conjugate(염소에서 길러진 TPO 복합항체와 HRP의 conjugate, (Cat. No: 900-K44))를 주입했다. 비닐테이프로 밀봉한 뒤 한 시간 동안 상온에서 반응시킨다. 다시 세척 완충액을 이용해 3번씩 플레이트를 씻어준 후 기질용액을 200 ul씩 주입했다. 30분이 경과한 후 마이크로 플레이트 리더기에서 450 nm에서의 흡광도를 측정했다. 스탠다드 커브를 참고하여 시료내의 TP01-153 및 TP01-153 변이체 절편 농도를 계산했다. 측정 후 나머지 시료는 -80℃에서 보관하였다.

ELISA 방법에 의하여 정량된 TP01-153 및 TP01-153 변이체의 발현량은 표 4에 나타내었다.

[표4] TP01-153 및 TP01-153 변이체 단백질 발현량

| 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) | 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) |
|-------------|----------------|--------------|----------------|
| TP01-153 | 500 | TP01-153-75 | 174 |
| TP01-153-1 | 418 | TP01-153-76 | 54 |
| TP01-153-2 | 649 | TP01-153-77 | 415 |
| TP01-153-3 | 218 | TP01-153-78 | 737 |
| TP01-153-4 | 389 | TP01-153-79 | 140 |
| TP01-153-5 | 278 | TP01-153-80 | 221 |
| TP01-153-6 | 217 | TP01-153-81 | 246 |
| TP01-153-7 | 181 | TP01-153-82 | 113 |
| TP01-153-8 | 260 | TP01-153-83 | ND |
| TP01-153-9 | 377 | TP01-153-84 | ND |
| TP01-153-10 | 226 | TP01-153-85 | 455 |
| TP01-153-11 | 333 | TP01-153-86 | 494 |
| TP01-153-12 | 285 | TP01-153-87 | 121 |
| TP01-153-13 | 262 | TP01-153-88 | 160 |
| TP01-153-14 | 277 | TP01-153-89 | 176 |
| TP01-153-15 | 404 | TP01-153-90 | 5 |
| TP01-153-16 | 138 | TP01-153-91 | 105 |
| TP01-153-17 | 147 | TP01-153-92 | 14 |
| TP01-153-18 | 121 | TP01-153-93 | 314 |
| TP01-153-19 | 250 | TP01-153-94 | 383 |
| TP01-153-20 | 412 | TP01-153-95 | 37 |
| TP01-153-21 | 442 | TP01-153-96 | 535 |
| TP01-153-22 | 88 | TP01-153-97 | 509 |
| TP01-153-23 | 334 | TP01-153-98 | 68 |
| TP01-153-24 | 88 | TP01-153-99 | 162 |
| TP01-153-25 | 315 | TP01-153-100 | 95 |
| TP01-153-26 | 539 | TP01-153-101 | 522 |

| 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) | 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) |
|-------------|----------------|--------------|----------------|
| TPO1-153-27 | 205 | TPO1-153-102 | 436 |
| TPO1-153-28 | 198 | TPO1-153-103 | 154 |
| TPO1-153-29 | 148 | TPO1-153-104 | 594 |
| TPO1-153-30 | 417 | TPO1-153-105 | 17 |
| TPO1-153-31 | 24 | TPO1-153-106 | 145 |
| TPO1-153-32 | 361 | TPO1-153-107 | 324 |
| TPO1-153-33 | 407 | TPO1-153-108 | 199 |
| TPO1-153-34 | 115 | TPO1-153-109 | 286 |
| TPO1-153-35 | 229 | TPO1-153-110 | 232 |
| TPO1-153-36 | 12 | TPO1-153-111 | 197 |
| TPO1-153-37 | 224 | TPO1-153-112 | 214 |
| TPO1-153-38 | 44 | TPO1-153-113 | 218 |
| TPO1-153-39 | 226 | TPO1-153-114 | 383 |
| TPO1-153-40 | 180 | TPO1-153-115 | 297 |
| TPO1-153-41 | 202 | TPO1-153-116 | 11 |
| TPO1-153-42 | 560 | TPO1-153-117 | 35 |
| TPO1-153-43 | 66 | TPO1-153-118 | 140 |
| TPO1-153-44 | 547 | TPO1-153-119 | 63 |
| TPO1-153-45 | 328 | TPO1-153-120 | 22 |
| TPO1-153-46 | 282 | TPO1-153-121 | 190 |
| TPO1-153-47 | 584 | TPO1-153-122 | 225 |
| TPO1-153-48 | 191 | TPO1-153-123 | ND |
| TPO1-153-49 | 49 | TPO1-153-124 | 13 |
| TPO1-153-50 | 95 | TPO1-153-125 | 515 |
| TPO1-153-51 | 169 | TPO1-153-126 | 489 |
| TPO1-153-52 | 276 | TPO1-153-127 | 232 |
| TPO1-153-53 | 635 | TPO1-153-128 | 58 |

| 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) | 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) |
|-------------|----------------|--------------|----------------|
| TPO1-153-54 | 271 | TPO1-153-129 | 421 |
| TPO1-153-55 | 276 | TPO1-153-130 | 754 |
| TPO1-153-56 | 1295 | TPO1-153-131 | 273 |
| TPO1-153-57 | 203 | TPO1-153-132 | 1096 |
| TPO1-153-58 | 150 | TPO1-153-133 | 1118 |
| TPO1-153-59 | 395 | TPO1-153-134 | 588 |
| TPO1-153-60 | 432 | TPO1-153-135 | 105 |
| TPO1-153-61 | 217 | TPO1-153-136 | 326 |
| TPO1-153-62 | 186 | TPO1-153-137 | 208 |
| TPO1-153-63 | 108 | TPO1-153-138 | 587 |
| TPO1-153-64 | 107 | TPO1-153-139 | 87 |
| TPO1-153-65 | 214 | TPO1-153-140 | 163 |
| TPO1-153-66 | 170 | TPO1-153-141 | 471 |
| TPO1-153-67 | 304 | TPO1-153-142 | 83 |
| TPO1-153-68 | 107 | TPO1-153-143 | 311 |
| TPO1-153-69 | 154 | TPO1-153-144 | 975 |
| TPO1-153-70 | 392 | TPO1-153-145 | 331 |
| TPO1-153-71 | 301 | TPO1-153-146 | 294 |
| TPO1-153-72 | 256 | TPO1-153-147 | 146 |
| TPO1-153-73 | 17 | TPO1-153-148 | 233 |
| TPO1-153-74 | 309 | TPO1-153-149 | 523 |

*ND: Not Detected

[실시예 11] STAT5 인산화 측정을 통한 TPO1-153 및 TPO1-153 변이체의 시험 관내 생물학적 활성 측정

M-o7e 세포내에 존재하는 STAT5 인산화는 천연형 TPO 존재 하에서 이루어진다. 따라서, STAT5의 인산화 여부를 관찰함으로써 본 발명에 의한 TPO1-153 변이체의 TPO로서의 생물학적 활성을 확인하였다(도5).

STAT5 인산화에 의한 TPO1-153 및 TPO1-153 변이체의 활성 측정은 다음의 방법에 의해 이루어졌다. 10% FBS와 10 ng/ml GM-CSF를 함유한 RPMI1640 배지에서 배양한 M-o7e 세포(세포수 0.5-2 x10⁶/ml)를 6 웰 플레이트에 0.5 x10⁶/ml 세포 수가 되게 1 ml씩 분주하였다. 분주 후 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지로 GM-CSF를 씻어내고 50시간 배양하였다. HEK293 세포에 트랜스펙션하여 일시적으로 발현시킨 농도가 확인된 TPO1-153, TPO1-153 변이체가 발현된 배지 및 TPO1-153이 발현되지 않은

조건 배지를 RPMI1640 배지로 희석하여 최종 농도가 100 pg/ml이 되게 세포가 배양된 배지에 100 ul 첨가하여 부드럽게 앞뒤로 흔들어 퍼지게 하였다. 30분간 반응 후 1.5ml 원심분리 튜브에서 원심분리 방법(15000 rpm, 5분)으로 침전시켰다. 수집된 세포는 섭씨 4도에 보관된 인산 완충용액(PBS)으로 세척 후 다시 원심 분리 방법으로 침전시켰다. 침전된 세포에서 잔존 완충용액을 완전히 제거 후 세포용해 완충용액(lysis buffer (Pierce, 89900))을 각 튜브당 100 ul 첨가하여 각각 20초씩 강하게 와동(vortex)시켰다. 얼음에서 20분간 반응 후 원심분리하여 세포 파쇄 침전물과 상등액으로 분리하였다. 분리된 상등액은 브래드포드(Bradford) 방법에 의해 단백질을 정량하고 정량된 단백질은 ELISA kit(USbiological, Cat. No: S7969-95)에 의하여 SATAT5의 인산화를 확인하였다.

STAT5 인산화 정도에 의한 TPO1-153 변이체의 생물학적 활성은 표 5에 나타내었다.

[표 5] TPO1-153 및 TPO1-153 변이체 생물학적 활성도

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 |
|-------------|-------------------|--------------|-------------------|
| TPO1-153-1 | 132% | TPO1-153-76 | 87% |
| TPO1-153-2 | 81% | TPO1-153-77 | 164% |
| TPO1-153-3 | 85% | TPO1-153-78 | 131% |
| TPO1-153-4 | 103% | TPO1-153-79 | 189% |
| TPO1-153-5 | 60% | TPO1-153-80 | 151% |
| TPO1-153-6 | 60% | TPO1-153-81 | 156% |
| TPO1-153-7 | 189% | TPO1-153-82 | 96% |
| TPO1-153-8 | 84% | TPO1-153-83 | N/A |
| TPO1-153-9 | 100% | TPO1-153-84 | N/A |
| TPO1-153-10 | 77% | TPO1-153-85 | 59% |
| TPO1-153-11 | 182% | TPO1-153-86 | 155% |
| TPO1-153-12 | 33% | TPO1-153-87 | 219% |
| TPO1-153-13 | 29% | TPO1-153-88 | 112% |
| TPO1-153-14 | 112% | TPO1-153-89 | ND |
| TPO1-153-15 | 122% | TPO1-153-90 | ND |
| TPO1-153-16 | 123% | TPO1-153-91 | 104% |
| TPO1-153-17 | 169% | TPO1-153-92 | 44% |
| TPO1-153-18 | 163% | TPO1-153-93 | 142% |
| TPO1-153-19 | 122% | TPO1-153-94 | 136% |
| TPO1-153-20 | ND | TPO1-153-95 | 61% |
| TPO1-153-21 | 104% | TPO1-153-96 | 58% |
| TPO1-153-22 | 3% | TPO1-153-97 | 180% |
| TPO1-153-23 | 157% | TPO1-153-98 | 2% |
| TPO1-153-24 | 151% | TPO1-153-99 | 107% |
| TPO1-153-25 | 123% | TPO1-153-100 | 34% |
| TPO1-153-26 | 76% | TPO1-153-101 | 123% |
| TPO1-153-27 | 31% | TPO1-153-102 | 87% |

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 |
|-------------|----------------------|--------------|----------------------|
| TPO1-153-28 | 85% | TPO1-153-103 | 157% |
| TPO1-153-29 | 76% | TPO1-153-104 | 117% |
| TPO1-153-30 | 106% | TPO1-153-105 | 94% |
| TPO1-153-31 | 55% | TPO1-153-106 | 133% |
| TPO1-153-32 | 152% | TPO1-153-107 | 93% |
| TPO1-153-33 | 122% | TPO1-153-108 | 103% |
| TPO1-153-34 | 122% | TPO1-153-109 | 85% |
| TPO1-153-35 | 147% | TPO1-153-110 | 87% |
| TPO1-153-36 | 34% | TPO1-153-111 | 113% |
| TPO1-153-37 | 193% | TPO1-153-112 | 199% |
| TPO1-153-38 | 124% | TPO1-153-113 | 100% |
| TPO1-153-39 | 186% | TPO1-153-114 | 170% |
| TPO1-153-40 | 110% | TPO1-153-115 | 175% |
| TPO1-153-41 | 86% | TPO1-153-116 | 28% |
| TPO1-153-42 | 101% | TPO1-153-117 | 105% |
| TPO1-153-43 | -1% | TPO1-153-118 | 88% |
| TPO1-153-44 | 6% | TPO1-153-119 | 107% |
| TPO1-153-45 | 94% | TPO1-153-120 | 67% |
| TPO1-153-46 | 126% | TPO1-153-121 | 131% |
| TPO1-153-47 | 79% | TPO1-153-122 | 125% |
| TPO1-153-48 | 94% | TPO1-153-123 | N/A |
| TPO1-153-49 | 111% | TPO1-153-124 | 130% |
| TPO1-153-50 | 83% | TPO1-153-125 | 152% |
| TPO1-153-51 | 19% | TPO1-153-126 | 111% |
| TPO1-153-52 | 95% | TPO1-153-127 | 139% |
| TPO1-153-53 | 94% | TPO1-153-128 | 76% |
| TPO1-153-54 | 139% | TPO1-153-129 | 2% |

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 활성 |
|-------------|----------------|--------------|----------------|
| TPO1-153-55 | 133% | TPO1-153-130 | 1% |
| TPO1-153-56 | 138% | TPO1-153-131 | 18% |
| TPO1-153-57 | 207% | TPO1-153-132 | -1% |
| TPO1-153-58 | 180% | TPO1-153-133 | 119% |
| TPO1-153-59 | 118% | TPO1-153-134 | 90% |
| TPO1-153-60 | 90% | TPO1-153-135 | 5% |
| TPO1-153-61 | 109% | TPO1-153-136 | 74% |
| TPO1-153-62 | 211% | TPO1-153-137 | -1% |
| TPO1-153-63 | 170% | TPO1-153-138 | 128% |
| TPO1-153-64 | 108% | TPO1-153-139 | 183% |
| TPO1-153-65 | 100% | TPO1-153-140 | 6% |
| TPO1-153-66 | 189% | TPO1-153-141 | 8% |
| TPO1-153-67 | 161% | TPO1-153-142 | 127% |
| TPO1-153-68 | 116% | TPO1-153-143 | 147% |
| TPO1-153-69 | 103% | TPO1-153-144 | 131% |
| TPO1-153-70 | 142% | TPO1-153-145 | 106% |
| TPO1-153-71 | 147% | TPO1-153-146 | 124% |
| TPO1-153-72 | 122% | TPO1-153-147 | 149% |
| TPO1-153-73 | 72% | TPO1-153-148 | 102% |
| TPO1-153-74 | 104% | TPO1-153-149 | 36% |
| TPO1-153-75 | 97% | | |

*ND: Not Detected, N/A: Not Available

[실시예 12] TPO1-153 및 TPO1-153 변이체의 단백질 분해효소 저항성 실험
 단백질 분해효소에 대해 저항성을 가지는 TPO1-153 변이체를 선별하기 위하여 10종의 단백질 분해효소 혼합액을 처리 반감기가 증가한 변이체를 얻었다. 대표적인 변이체로서 TPO1-153-132, TPO1-153-67, TPO1-153-87 변이체의 단백질 분해효소 혼합액에 대한 저항성 증가 결과는 도 6에 나타내었다.

구체적인 확인방법은 다음과 같았다.

정량된 TPO1-153 발현 배지의 총 단백질이 20 ug이 되게 취하고 500 mM Tris-HCl(pH7.4) 30 ul, H₂O를 넣어 총 300 ul의 반응물을 만든다. 이중 30 ul를 0 분대의 시료로 취하여 2 ul의 단백질 분해효소 저해제(Roche, Cat. No:11836170001)와 혼합하여 -80도에 보관하였다. 남은 시료에 상기 총 단백질량 대비 각각 1%가 되게 시그마사에서 판매되는 10종류의 단백질 분해효소인 트립신

(Trypsin), 키모트립신(chymotrypsin), 트롬빈(thrombin), 엘라스테아제(Elastase), 아르기닌 C 말단 엔도펩티다아제(Arg-C endopeptidase), 아스파라긴 N 엔도펩티다아제), 글루타민산 C 말단 엔도펩티다아제(Glu-C endopeptidase), 프롤린 C 말단 엔도펩티다아제(Pro-C endopeptidase) 리신 C 말단 엔도펩티다아제(Lys-C endopeptidase), 카르보시펩티다아제 Y(carboxypeptidase Y)를 1.8 ul 첨가하여 25도 또는 30도에서 반응시켰다. 반응 후 5분, 10분, 20분, 40분, 60분, 80분, 100분 마다 32 ul의 시료를 취하여 2 ul의 단백질 분해효소 저해제와 혼합하여 -80도에 보관하였다. 실험이 끝난 시료는 ELISA를 통해 절단되지 않은 양을 분석하여 TPO 변이체의 반감기를 2회 구하고 TP01-153의 반감기 100으로 했을 때의 상대적인 반감기 평균 변화량을 %로 표 6, 7에 기재하였다.

[표 6] TPO1-153 변이체의 단백질 분해효소 저항성 (30℃ 반응)

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 |
|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| TPO1-153-1 | 110% | TPO1-153-76 | 74% |
| TPO1-153-2 | 136% | TPO1-153-77 | 103% |
| TPO1-153-3 | 75% | TPO1-153-78 | 117% |
| TPO1-153-4 | 88% | TPO1-153-79 | 111% |
| TPO1-153-5 | 72% | TPO1-153-80 | 104% |
| TPO1-153-6 | 80% | TPO1-153-81 | 118% |
| TPO1-153-7 | 125% | TPO1-153-82 | 96% |
| TPO1-153-8 | 99% | TPO1-153-83 | N/A |
| TPO1-153-9 | 103% | TPO1-153-84 | N/A |
| TPO1-153-10 | 77% | TPO1-153-85 | 71% |
| TPO1-153-11 | 87% | TPO1-153-86 | 131% |
| TPO1-153-12 | 135% | TPO1-153-87 | 161% |
| TPO1-153-13 | 108% | TPO1-153-88 | 91% |
| TPO1-153-14 | 75% | TPO1-153-89 | ND |
| TPO1-153-15 | 117% | TPO1-153-90 | ND |
| TPO1-153-16 | 142% | TPO1-153-91 | 76% |
| TPO1-153-17 | 90% | TPO1-153-92 | ND |
| TPO1-153-18 | 106% | TPO1-153-93 | 90% |
| TPO1-153-19 | 93% | TPO1-153-94 | 93% |
| TPO1-153-20 | 205% | TPO1-153-95 | ND |
| TPO1-153-21 | 136% | TPO1-153-96 | 76% |
| TPO1-153-22 | 192% | TPO1-153-97 | 133% |
| TPO1-153-23 | 109% | TPO1-153-98 | 45% |
| TPO1-153-24 | 116% | TPO1-153-99 | 79% |
| TPO1-153-25 | 82% | TPO1-153-100 | 104% |
| TPO1-153-26 | 124% | TPO1-153-101 | 83% |
| TPO1-153-27 | 107% | TPO1-153-102 | 110% |
| TPO1-153-28 | 92% | TPO1-153-103 | 123% |
| TPO1-153-29 | 79% | TPO1-153-104 | 104% |
| TPO1-153-30 | 157% | TPO1-153-105 | 91% |
| TPO1-153-31 | ND | TPO1-153-106 | 108% |
| TPO1-153-32 | 80% | TPO1-153-107 | 67% |
| TPO1-153-33 | 73% | TPO1-153-108 | 76% |
| TPO1-153-34 | 82% | TPO1-153-109 | 97% |
| TPO1-153-35 | 86% | TPO1-153-110 | 64% |
| TPO1-153-36 | ND | TPO1-153-111 | 56% |
| TPO1-153-37 | 108% | TPO1-153-112 | 89% |
| TPO1-153-38 | 70% | TPO1-153-113 | 81% |
| TPO1-153-39 | 127% | TPO1-153-114 | 93% |

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 |
|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| TPO1-153-40 | 96% | TPO1-153-115 | 132% |
| TPO1-153-41 | 97% | TPO1-153-116 | ND |
| TPO1-153-42 | 117% | TPO1-153-117 | 41% |
| TPO1-153-43 | 78% | TPO1-153-118 | 80% |
| TPO1-153-44 | 201% | TPO1-153-119 | 50% |
| TPO1-153-45 | 157% | TPO1-153-120 | 68% |
| TPO1-153-46 | 98% | TPO1-153-121 | 112% |
| TPO1-153-47 | 52% | TPO1-153-122 | 57% |
| TPO1-153-48 | 112% | TPO1-153-123 | N/A |
| TPO1-153-49 | 99% | TPO1-153-124 | 109% |
| TPO1-153-50 | 81% | TPO1-153-125 | 105% |
| TPO1-153-51 | 102% | TPO1-153-126 | 97% |
| TPO1-153-52 | 130% | TPO1-153-127 | 113% |
| TPO1-153-53 | 173% | TPO1-153-128 | 127% |
| TPO1-153-54 | 73% | TPO1-153-129 | 106% |
| TPO1-153-55 | 73% | TPO1-153-130 | 109% |
| TPO1-153-56 | 95% | TPO1-153-131 | 290% |
| TPO1-153-57 | 102% | TPO1-153-132 | 700% |
| TPO1-153-58 | 117% | TPO1-153-133 | 218% |
| TPO1-153-59 | 84% | TPO1-153-134 | 68% |
| TPO1-153-60 | 125% | TPO1-153-135 | 172% |
| TPO1-153-61 | 76% | TPO1-153-136 | 94% |
| TPO1-153-62 | 102% | TPO1-153-137 | 157% |
| TPO1-153-63 | 106% | TPO1-153-138 | 97% |
| TPO1-153-64 | 78% | TPO1-153-139 | 128% |
| TPO1-153-65 | 72% | TPO1-153-140 | 111% |
| TPO1-153-66 | 104% | TPO1-153-141 | 80% |
| TPO1-153-67 | 126% | TPO1-153-142 | 85% |
| TPO1-153-68 | 68% | TPO1-153-143 | 87% |
| TPO1-153-69 | 78% | TPO1-153-144 | 85% |
| TPO1-153-70 | 163% | TPO1-153-145 | 87% |
| TPO1-153-71 | 104% | TPO1-153-146 | 133% |
| TPO1-153-72 | 84% | TPO1-153-147 | 91% |
| TPO1-153-73 | 51% | TPO1-153-148 | 111% |
| TPO1-153-74 | 99% | TPO1-153-149 | 505% |
| TPO1-153-75 | 90% | | |

*ND: Not Detected.

[표 7] TPO1-153 변이체의 단백질 분해효소 저항성 (25℃ 반응)

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 |
|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| TPO1-153-1 | 95% | TPO1-153-76 | 95% |
| TPO1-153-2 | 149% | TPO1-153-77 | 116% |
| TPO1-153-3 | 84% | TPO1-153-78 | 135% |
| TPO1-153-4 | 104% | TPO1-153-79 | 106% |
| TPO1-153-5 | 72% | TPO1-153-80 | 121% |
| TPO1-153-6 | 85% | TPO1-153-81 | 181% |
| TPO1-153-7 | 123% | TPO1-153-82 | 94% |
| TPO1-153-8 | 90% | TPO1-153-83 | N/A |
| TPO1-153-9 | 82% | TPO1-153-84 | N/A |
| TPO1-153-10 | 58% | TPO1-153-85 | 69% |
| TPO1-153-11 | 112% | TPO1-153-86 | 118% |
| TPO1-153-12 | 77% | TPO1-153-87 | 111% |
| TPO1-153-13 | 97% | TPO1-153-88 | 78% |
| TPO1-153-14 | 75% | TPO1-153-89 | ND |
| TPO1-153-15 | 113% | TPO1-153-90 | ND |
| TPO1-153-16 | 172% | TPO1-153-91 | 69% |
| TPO1-153-17 | 106% | TPO1-153-92 | ND |
| TPO1-153-18 | 102% | TPO1-153-93 | 89% |
| TPO1-153-19 | 75% | TPO1-153-94 | 85% |
| TPO1-153-20 | 156% | TPO1-153-95 | ND |
| TPO1-153-21 | 78% | TPO1-153-96 | 72% |
| TPO1-153-22 | 225% | TPO1-153-97 | 92% |
| TPO1-153-23 | 122% | TPO1-153-98 | 41% |
| TPO1-153-24 | 141% | TPO1-153-99 | 94% |
| TPO1-153-25 | 90% | TPO1-153-100 | 94% |
| TPO1-153-26 | 86% | TPO1-153-101 | 95% |
| TPO1-153-27 | 105% | TPO1-153-102 | 101% |
| TPO1-153-28 | 78% | TPO1-153-103 | 83% |
| TPO1-153-29 | 91% | TPO1-153-104 | 74% |
| TPO1-153-30 | 159% | TPO1-153-105 | 97% |
| TPO1-153-31 | ND | TPO1-153-106 | 113% |
| TPO1-153-32 | 78% | TPO1-153-107 | 85% |
| TPO1-153-33 | 92% | TPO1-153-108 | 79% |
| TPO1-153-34 | 110% | TPO1-153-109 | 110% |
| TPO1-153-35 | 101% | TPO1-153-110 | 84% |
| TPO1-153-36 | ND | TPO1-153-111 | 67% |
| TPO1-153-37 | 138% | TPO1-153-112 | 108% |
| TPO1-153-38 | 62% | TPO1-153-113 | 70% |
| TPO1-153-39 | 103% | TPO1-153-114 | 100% |

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 |
|-------------|--------------------|--------------|--------------------|
| TPO1-153-40 | 83% | TPO1-153-115 | 131% |
| TPO1-153-41 | 110% | TPO1-153-116 | ND |
| TPO1-153-42 | 95% | TPO1-153-117 | 40% |
| TPO1-153-43 | 89% | TPO1-153-118 | 87% |
| TPO1-153-44 | 103% | TPO1-153-119 | 58% |
| TPO1-153-45 | 123% | TPO1-153-120 | 73% |
| TPO1-153-46 | 74% | TPO1-153-121 | 119% |
| TPO1-153-47 | 50% | TPO1-153-122 | 76% |
| TPO1-153-48 | 82% | TPO1-153-123 | N/A |
| TPO1-153-49 | 66% | TPO1-153-124 | 74% |
| TPO1-153-50 | 82% | TPO1-153-125 | 99% |
| TPO1-153-51 | 106% | TPO1-153-126 | 100% |
| TPO1-153-52 | 94% | TPO1-153-127 | 104% |
| TPO1-153-53 | 302% | TPO1-153-128 | 131% |
| TPO1-153-54 | 88% | TPO1-153-129 | 158% |
| TPO1-153-55 | 101% | TPO1-153-130 | 112% |
| TPO1-153-56 | 147% | TPO1-153-131 | 197% |
| TPO1-153-57 | 92% | TPO1-153-132 | 1087% |
| TPO1-153-58 | 113% | TPO1-153-133 | 146% |
| TPO1-153-59 | 68% | TPO1-153-134 | 75% |
| TPO1-153-60 | 183% | TPO1-153-135 | 195% |
| TPO1-153-61 | 92% | TPO1-153-136 | 109% |
| TPO1-153-62 | 83% | TPO1-153-137 | 225% |
| TPO1-153-63 | 106% | TPO1-153-138 | 117% |
| TPO1-153-64 | 93% | TPO1-153-139 | 118% |
| TPO1-153-65 | 79% | TPO1-153-140 | 101% |
| TPO1-153-66 | 106% | TPO1-153-141 | 75% |
| TPO1-153-67 | 245% | TPO1-153-142 | 88% |
| TPO1-153-68 | 64% | TPO1-153-143 | 117% |
| TPO1-153-69 | 73% | TPO1-153-144 | 57% |
| TPO1-153-70 | 142% | TPO1-153-145 | 73% |
| TPO1-153-71 | 113% | TPO1-153-146 | 73% |
| TPO1-153-72 | 77% | TPO1-153-147 | 92% |
| TPO1-153-73 | 67% | TPO1-153-148 | 124% |
| TPO1-153-74 | 85% | TPO1-153-149 | 554% |
| TPO1-153-75 | 72% | | |

*ND: Not Detected, N/A: Not Available

본 발명에 의한 TPO1-153 변이체 폴리펩타이드는 TPO1-153에 비해 위장관, 세포 및 혈액 중에 존재하는 다양한 단백질 분해효소에 대해 각각 적게는 50% 이상에서, 100%, 150%, 200%, 나아가 1000% 이상의 현저한 저항성을 보임을 확인하였다.

[실시예 13] 이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체 설계

본 발명자들은 나아가 단일 변이체 제조시 사용된 동일한 프라이머를 이용하여 2 이상의 아미노산이 치환된 이중 또는 삼중 변이체를 설계 하였다. 이중 변이

체는 단백질 분해 효소에 대한 저항성이 증가한 위치끼리 또는 저항성이 증가한 위치와 감소한 위치 등을 조합하여 제작하였고 삼중 변이체는 저항성이 증가한 이중 변이체에 저항성이 증가한 위치를 추가로 치환하여 만들었다. 이중 또는 삼중 변이체의 설계 목록은 표 8에 나타내었다.

[표 8] 이중 및 삼중 변이체 설계 목록

| 변이체번호 | 변이내용 | 변이체번호 | 변이내용 |
|---------------------------|------------|-----------------------------|-----------------|
| TPO1-153-201 (53/133)* | K52N/V139I | TPO1-153-215 (73/132) | L71I/K138T |
| TPO1-153-202 (11/132) | L12I/K138T | TPO1-153-216 (79/132) | V74T/K138T |
| TPO1-153-203 (16/132) | R17Q/K138T | TPO1-153-217 (81/132) | A76S/K138T |
| TPO1-153-204 (20/132) | H20Q/K138T | TPO1-153-218 (87/132) | L81I/K138T |
| TPO1-153-205 (22/132) | V21T/K138T | TPO1-153-219 (97/132) | L99I/K138T |
| TPO1-153-206 (37/132) | L40I/K138T | TPO1-153-220 (112/132) | H121N/K138T |
| TPO1-153-207 (39/132) | A43S/K138T | TPO1-153-221 (115/132) | K122Q/K138T |
| TPO1-153-208 (42/132) | V44T/K138T | TPO1-153-222 (117/132) | D123N/K138T |
| TPO1-153-209 (53/132) | K52N/K138T | TPO1-153-223 (122/132) | H133N/K138T |
| TPO1-153-210 (57/132) | E57Q/K138T | TPO1-153-301 (7/57/132) | L9I/E57Q/K138T |
| TPO1-153-211 (60/132) | K59N/K138T | TPO1-153-302 (22/57/132) | V21T/E57Q/K138T |
| TPO1-153-212 (66/132) | G65S/K138T | TPO1-153-224 (16/53) | R17Q/K52N |
| TPO1-153-213 (67/132) | A66S/K138T | TPO1-153-225 (30/53) | V32I/K52N |
| TPO1-153-214 (70/132) | V67T/K138T | | |

*("X/Y"는 TPO1-153-X, TPO1-153-Y 이중변이를 "X/Y/Z"는 TPO1-153-X, TPO1-153-Y, TPO1-153-Z 삼중변이를 나타냄 (X, Y, Z는 상수))

[실시예 14] 이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체 제작

표 8에 기술된 이중 또는 삼중 변이체는 단일 변이체에 표 3에 표시된 프라이머를 이용하여 TPO1-153 단일 변이체 이외의 추가로 원하는 부분에 돌연변이를 일으켜 완성하고 삼중 변이체는 이중 변이체의 변이 부분 이외의 부분에 추가적인 돌연 변이를 일으켜 완성하였다.

TPO1-153 이중 변이체는 실시예 8의 방법 중 pcDNA3.3-GH_TPO1-153 플라스미

드 대신 단일 변이체 pcDNA3.3-GH_TPO1-153-132 플라스미드를 주형으로 표 3의 프라이머 중 상기 표 8 기재 선별된 각 쌍을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 8과 동일한 방법으로 제작되었다.

반응결과 PCR 산물은 DpnI 효소로 5분간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보한 후 대장균 XL1-blue 세포에 형질전환하여 클론을 얻고 이로부터 플라스미드를 추출하여 염기서열 분석을 하여 위치 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

삼중 변이체 제작은 상기 서열이 확인된 이중 변이체 플라스미드를 주형으로 사용하여 상기와 동일한 방법으로 제작하였으며, 그 완성을 염기서열 확인으로 이루었다.

[실시예 15] TPO1-153 이중 또는 삼중 변이체 발현 및 정량

실시예 14에서 제작한 변이체 플라스미드들을 추출한 후 상기 실시예 9 및 10과 동일한 방법을 통하여 HEK293 세포에서 발현시켜 정량하였다.

ELISA 방법에 의하여 정량된 이중 및 삼중 TPO1-153 변이체의 발현량은 표 9에 나타내었다.

[표 9] 이중 및 삼중 TPO1-153 변이체 발현량

| 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) | 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) |
|--------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| TPO1-153-201 (53/133) | 1045 | TPO1-153-215 (73/132) | 357 |
| TPO1-153-202 (11/132) | 1142 | TPO1-153-216 (79/132) | 1649 |
| TPO1-153-203 (16/132) | 732 | TPO1-153-217 (81/132) | 2250 |
| TPO1-153-204 (20/132) | 1537 | TPO1-153-218 (87/132) | 308 |
| TPO1-153-205 (22/132) | 1567 | TPO1-153-219 (97/132) | 1114 |
| TPO1-153-206 (37/132) | 881 | TPO1-153-220 (112/132) | 890 |
| TPO1-153-207 (39/132) | 1761 | TPO1-153-221 (115/132) | 565 |
| TPO1-153-208 (42/132) | 1096 | TPO1-153-222 (117/132) | 254 |
| TPO1-153-209 (53/132) | 1658 | TPO1-153-223 (122/132) | 916 |
| TPO1-153-210 (57/132) | 967 | TPO1-153-301 (7/57/132) | 525 |
| TPO1-153-211 (60/132) | 65 | TPO1-153-302 (22/57/132) | 968 |
| TPO1-153-212 (66/132) | 880 | TPO1-153-224 (16/53) | 131 |
| TPO1-153-213 (67/132) | 1379 | TPO1-153-225 (30/53) | 294 |
| TPO1-153-214 (70/132) | ~2392 | | |

[실시에 16] STAT5 인산화 측정을 통한 이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체의 시험관내 생물학적 활성 측정

TPO1-153 변이체 대신 이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 상기 실시예 11의 방법을 따라 그 시험관내 생물학적 활성 측정하였다.

TPO1-153 이중 또는 삼중 변이체에 의한 생물학적 활성은 표 10에 나타내었다.

[표10] TPO1-153 이중 또는 삼중 변이체에 의한 생물학적 활성

| 변이체번호 | 상대적 활성 | 변이체번호 | 상대적 활성 |
|--------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| TPO1-153-201 (53/133) | 36% | TPO1-153-215 (73/132) | -4% |
| TPO1-153-202 (11/132) | 2% | TPO1-153-216 (79/132) | -6% |
| TPO1-153-203 (16/132) | -1% | TPO1-153-217 (81/132) | -3% |
| TPO1-153-204 (20/132) | -1% | TPO1-153-218 (87/132) | 0% |
| TPO1-153-205 (22/132) | 1% | TPO1-153-219 (97/132) | 3% |
| TPO1-153-206 (37/132) | -1% | TPO1-153-220 (112/132) | 2% |
| TPO1-153-207 (39/132) | -2% | TPO1-153-221 (115/132) | 0% |
| TPO1-153-208 (42/132) | -7% | TPO1-153-222 (117/132) | 2% |
| TPO1-153-209 (53/132) | -6% | TPO1-153-223 (122/132) | -2% |
| TPO1-153-210 (57/132) | -3% | TPO1-153-301 (7/57/132) | -5% |
| TPO1-153-211 (60/132) | 5% | TPO1-153-302 (22/57/132) | -1% |
| TPO1-153-212 (66/132) | -1% | TPO1-153-224 (16/53) | 34% |
| TPO1-153-213 (67/132) | -2% | TPO1-153-225 (30/53) | 105% |
| TPO1-153-214 (70/132) | -1% | | |

[실시예 17] 이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체의 단백질 분해효소 저항성 실험

실시예 12에서 TPO1-153 단일 변이체 대신 TPO1-153 이중 또는 삼중 변이체를 사용한 것을 제외하고는 25도에서 동일한 방법으로 상기 실시예 12에서 사용한 10종의 단백질 분해효소 혼합액을 이용한 반감기 평가를 통해 저항성을 확인시험을 시행하였다.

이중 또는 삼중 TPO1-153 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 확인하여 표 11에 나타내었다.

[표 11] TPO1-153 이중 또는 삼중 변이체의 단백질 분해효소 저항성

| 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO1-153 대비 저항성 |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| TPO1-153-201 (53/133) | 489% | TPO1-153-215 (73/132) | 380% |
| TPO1-153-202 (11/132) | 217% | TPO1-153-216 (79/132) | 317% |
| TPO1-153-203 (16/132) | 531% | TPO1-153-217 (81/132) | 400% |
| TPO1-153-204 (20/132) | 811% | TPO1-153-218 (87/132) | 506% |
| TPO1-153-205 (22/132) | 342% | TPO1-153-219 (97/132) | 248% |
| TPO1-153-206 (37/132) | 335% | TPO1-153-220 (112/132) | 621% |
| TPO1-153-207 (39/132) | 347% | TPO1-153-221 (115/132) | n/a |
| TPO1-153-208 (42/132) | 1006% | TPO1-153-222 (117/132) | 232% |
| TPO1-153-209 (53/132) | 856% | TPO1-153-223 (122/132) | 4175% |
| TPO1-153-210 (57/132) | 616% | TPO1-153-301 (7/57/132) | 315% |
| TPO1-153-211 (60/132) | 733% | TPO1-153-302 (22/57/132) | 1005% |
| TPO1-153-212 (66/132) | 306% | TPO1-153-224 (16/53) | 171% |
| TPO1-153-213 (67/132) | 982% | TPO1-153-225 (30/53) | 154% |
| TPO1-153-214 (70/132) | 220% | | |

*n/a: not applicable

[실시예 18] TPO7-151 유전자 증폭 및 발현백터 제작

TPO7-151를 암호화하고 있는 유전자를 클로닝하기 위하여 실시예 2에서 제조된 pcDNA3.3-TPO1-153를 주형으로 하여 PCR 방법으로 유전자를 증폭하였다. GH-TPO7-151 제작에 사용된 프라이머의 염기 서열은 TPO1-153-N7-hGH-N1 (ttcaagagggcagtgacctgacccgagtcctcagtaaacctgcttc), TPO1-153hGH-N2 (tctgacctgccctggcttcaagagggcagtgccagcc), TPO1-153hGH-N3 (tggttttggcctgctctgacctgccctggcttcaag), TPO1-153hGH-N4 (ggacgtccctgctcctggcttttggcctgctctgcc), TPO1-153hGH-N5 (accatggctacaggctcccggacgtccctgctcctggct)와 TPO151-C (ttagcagagggtggaccctc)이며, 연속적인 PCR반응에 의해 152, 153번 위치의 아미노산에 대한 서열을 제거하고 1번부터 6번까지의 위치에 대한 아미노산 서열도 제거하여 이를 pcDNA3.3-TOPO TA 벡터에 상기의 방법으로 클로닝 하여 분비능이 증가된 pcDNA3.3-GH_TPO7-151 백

터를 제작하고, 정확한 클로닝 여부를 염기서열 해독으로 확인하였다.

간단히, pcDNA3.3-TP01-153을 주형으로 하고 상기의 프라이머를 TPO-N7-hGH-N1부터 순차적으로 사용하여 인간 성장 호르몬 신호서열을 부과하기 위해 PCR을 수행하였다. 주형과 프라이머 핵산 및 증합효소를 첨가하여 PCR 반응물(5 ul 50 ng cDNA, 3 ul 10mM N-프라이머, 3 10mM ul C-primer, 50 ul Accupower PCR premix, 39 ul의 H₂O)을 만든 후 PCR을 수행했다. PCR은 1차 변성 95°C 10분, 2차 변성 95°C 1분, 프라이머 접합 55°C 1분, 신장반응 72°C 1분 중 2차 변성에서 신장반응 과정을 25회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소반응을 72°C 5분으로 수행하여 반응을 종료하였다. 증폭된 유전자는 pcDNA3.3-TOPO TA 벡터에 라이게이즈를 사용 클로닝하여 XL1-blue 세포에 형질 전환시켰다.

벡터 제작의 완성은 염기 서열 해독을 통한 TPO7-151 염기 서열 확인을 통해 결정되었다.

[실시예 19] TPO7-151 발현 및 정량

pcDNA3.3-GH_TP01-153 벡터 대신 실시예 18에서 제작한 pcDNA3.3-GH_TP07-151 벡터를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 9 및 10과 동일한 방법을 통하여 HEK293 세포에서 발현하여 정량하였다.

ELISA 방법에 의해 정량된 TPO7-151의 발현량은 60 ng/ml로 확인되었다.

[실시예 20] STAT5 인산화 측정을 통한 TPO7-151의 시험관내 생물학적 활성 측정

TP01-153과 TPO7-151을 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 11과 동일한 방법을 따라 TPO7-151의 STAT5 인산화 정도에 의한 시험관내 생물학적 활성 측정하였다.

그 결과, TPO7-151의 생물학적 활성은 TP01-153 대비 20% 수준의 활성을 가짐을 확인하였다.

[실시예 21] TPO7-151 단일 변이체 설계 및 제작

변형된 TPO7-151에 대한 변이체 설계 및 제작은 실시예 7, 8 방법과 같은 방법으로 이루어졌으며 설계된 TPO7-151 단일 변이체의 목록은 하기 표 12와 같다. 돌연변이 위치 결정과 치환될 아미노산의 결정은 상기 표 2와 동일하며 실시예 8의

pcDNA3.3-GH_TPO1-153 플라스미드 대신 상기 pcDNA3.3-GH_TPO7-151 플라스미드를 주형으로 하고 각 변이체의 변이내용에 상응하는 표 3 기재 프라이머를 이용하여 변이체를 제작하였다.

이를 통해 얻어진 클론으로부터 플라스미드를 추출하여 염기서열 분석을 하여 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

[표 12] 설계된 TPO7-151 단일 변이체 목록

| 변이체번호 | 변이내용 | 변이체번호 | 변이내용 |
|---------------|-------|---------------|-------|
| TPO7-151-1001 | E56N | TPO7-151-1021 | M143N |
| TPO7-151-1002 | K138T | TPO7-151-1022 | R78Q |
| TPO7-151-1003 | K138Q | TPO7-151-1023 | V21I |
| TPO7-151-1004 | V145T | TPO7-151-1024 | A103T |
| TPO7-151-1005 | G137S | TPO7-151-1025 | K59N |
| TPO7-151-1006 | V74I | TPO7-151-1026 | R136Q |
| TPO7-151-1007 | K52N | TPO7-151-1027 | V32I |
| TPO7-151-1008 | L107I | TPO7-151-1028 | G73S |
| TPO7-151-1009 | V139I | TPO7-151-1029 | H33Q |
| TPO7-151-1010 | F141S | TPO7-151-1030 | L16I |
| TPO7-151-1011 | G49S | TPO7-151-1031 | K59Q |
| TPO7-151-1012 | V44T | TPO7-151-1032 | V67T |
| TPO7-151-1013 | D45N | TPO7-151-1033 | V97I |
| TPO7-151-1014 | R25Q | TPO7-151-1034 | K122N |
| TPO7-151-1015 | R98Q | TPO7-151-1035 | H33N |
| TPO7-151-1016 | A103S | TPO7-151-1036 | L22I |
| TPO7-151-1017 | H133N | TPO7-151-1037 | F46I |
| TPO7-151-1018 | L99I | TPO7-151-1038 | R140Q |
| TPO7-151-1019 | G79S | TPO7-151-1039 | L112I |
| TPO7-151-1020 | H133Q | TPO7-151-1040 | H23Q |

[표 13] TPO7-151 위치 특이 돌연변이 유도를 위한 프라이머

| 변이체번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | Primer sequence |
|---------------|-------|---------|--|
| TPO7-151-1001 | E56N | 전 | 5'-gaatggaaaaccagatgAATgagaccaaggcac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgccttggctctcATTcatctgggtttccattc-3' |
| TPO7-151-1002 | K138T | 전 | 5'-cacctgctccgaggaACCgtgcgtttcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaaacgcacGGTtctcggagcaggtg-3' |
| TPO7-151-1003 | K138Q | 전 | 5'-cacctgctccgaggaCAGgtgcgtttcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaaacgcacCTGtctcggagcaggtg-3' |
| TPO7-151-1004 | V145T | 전 | 5'-gtgcgtttcctgatgcttACCggagggtccaccc-3' |
| | | 후 | 5'-gggtggaccctccGGTaagcatcaggaaacgcac-3' |
| TPO7-151-1005 | G137S | 전 | 5'-caacacctgctccgaAGCaaggtgcgtttcctga-3' |
| | | 후 | 5'-tcaggaaacgcaccttGCTcggagcaggtgtg-3' |
| TPO7-151-1006 | V74I | 전 | 5'-cttctgctggaggaATTatggcagcacgggga-3' |
| | | 후 | 5'-tcccctgctgcatAATtccctcagcagaag-3' |
| TPO7-151-1007 | K52N | 전 | 5'-gacttagctgggagaatggAATaccagatggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccatctgggtATTccatttcccagctaaagtc-3' |
| TPO7-151-1008 | L107I | 전 | 5'-ggccctgcagagcATCcttgaaccca-3' |
| | | 후 | 5'-tgggtccaagGATgctctgcagggcc-3' |
| TPO7-151-1009 | V139I | 전 | 5'-ctgctccgaggaagATCcgtttctgatgcttg-3' |
| | | 후 | 5'-caagcatcaggaaacgGATctttcctcggagcag-3' |
| TPO7-151-1010 | F141S | 전 | 5'-gctccgaggaaggtgcgtAGCctgatgct-3' |
| | | 후 | 5'-agcatcagGCTacgcaccttctcggagc-3' |
| TPO7-151-1011 | G49S | 전 | 5'-ctgtggactttagctgAGCgaatggaaaaccca-3' |
| | | 후 | 5'-tgggtttccattcGCTcaagctaaagtcacag-3' |
| TPO7-151-1012 | V44T | 전 | 5'-ctgtcctgctgctgctACCgactttagcttggg-3' |
| | | 후 | 5'-cccagctaaagtcGGTagcaggcagcaggacag-3' |
| TPO7-151-1013 | D45N | 전 | 5'-ctgtgcctgctgtgAATtttagcttgggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccaagctaaaATTcacagcaggcagcag-3' |
| TPO7-151-1014 | R25Q | 전 | 5'-catgtccttcacagcCAGctgagccagtgcccag-3' |
| | | 후 | 5'-ctggcactggctcagCTGgctgtgaaggacatg-3' |
| TPO7-151-1015 | R98Q | 전 | 5'-tttctggacaggtcCAGctcctccttggggcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggccccaaggaggagCTGgacctgtccagaaa-3' |
| TPO7-151-1016 | A103S | 전 | 5'-gtctcctcctgggAGCctgcagagcctcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggaggctctgcagGCTcccaaggaggagac-3' |
| TPO7-151-1017 | H133N | 전 | 5'-gccatctcctgagcttccaaAATctgctccga-3' |
| | | 후 | 5'-tcggagcagATTtgaagctcaggaagatggc-3' |

| 변이체번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | Primer sequence |
|---------------|-------|---------|--|
| TPO7-151-1018 | L99I | 전 | 5'-ctttctggacaggtccgtATTctccttggg-3' |
| | | 후 | 5'-ccaaggagAATacggacctgtccagaaag-3' |
| TPO7-151-1019 | G79S | 전 | 5'-tgatggcagcacggAGCcaactgggaccac-3' |
| | | 후 | 5'-gtgggtcccagttgGCTccgtgctgccatca-3' |
| TPO7-151-1020 | H133Q | 전 | 5'-cctgagcttccaaCAGctgctccgaggaaag-3' |
| | | 후 | 5'-ctttctcggagcagCTGttggaagctcagg-3' |
| TPO7-151-1021 | M143N | 전 | 5'-ggtgcgtttctcgtAATctgtaggagggtccacc-3' |
| | | 후 | 5'-ggtggaccctcctacaagATTcaggaacgcacc-3' |
| TPO7-151-1022 | R78Q | 전 | 5'-agtgatggcagcaCAGggacaactgggac-3' |
| | | 후 | 5'-gtcccagttgtccCTGtgctgccalcact-3' |
| TPO7-151-1023 | V21I | 전 | 5'-ctgcttctgactcccatATCcttcacagcaga-3' |
| | | 후 | 5'-tctgctgtgaagGATatgggagtcacgaagcag-3' |
| TPO7-151-1024 | A103T | 전 | 5'-ctcctccttgggACCctgcagagcc-3' |
| | | 후 | 5'-ggctctgcagGGAccaaggaggag-3' |
| TPO7-151-1025 | K59N | 전 | 5'-cagatggaggagaccAATgcacaggacattctg-3' |
| | | 후 | 5'-cagaatgtcctgtgcATTggtctcctcatctg-3' |
| TPO7-151-1026 | R136Q | 전 | 5'-ttcaacacctgctcCAGgaaagggtgcgttc-3' |
| | | 후 | 5'-gaaacgcacctttccCTGgagcaggtgtggaa-3' |
| TPO7-151-1027 | V32I | 전 | 5'-gccagtgccagagATTcacccttgcct-3' |
| | | 후 | 5'-aggcaaagggtgAATctctgggcactggc-3' |
| TPO7-151-1028 | G73S | 전 | 5'-cccttctgctggagAGCgtgatggcagcacg-3' |
| | | 후 | 5'-cgtgctgccatcacGCTctccagcagaagg-3' |
| TPO7-151-1029 | H33Q | 전 | 5'-ccagtgccagaggtCAGccttgccta-3' |
| | | 후 | 5'-taggcaaaggCTGaacctctgggcactgg-3' |
| TPO7-151-1030 | L16I | 전 | 5'-agtcctcagtaactgATCcgtagctccatgtc-3' |
| | | 후 | 5'-gacatgggagtcacgGATcagttactgaggact-3' |
| TPO7-151-1031 | K59Q | 전 | 5'-cagatggaggagaccCAGgcacaggacattc-3' |
| | | 후 | 5'-gaatgtcctgtgcCTGggtctcctcatctg-3' |
| TPO7-151-1032 | V67T | 전 | 5'-ggacattctgggagcaACCaccctctgctggag-3' |
| | | 후 | 5'-ctccagcagaagggtGGTgctccagaatgtcc-3' |
| TPO7-151-1033 | V97I | 전 | 5'-cagcttctggacagATTcgtctcctcttg-3' |
| | | 후 | 5'-caaggaggagacgAATctgtccagaagctg-3' |
| TPO7-151-1034 | K122N | 전 | 5'-ggaccacagctcacAATgatccaatgcatct-3' |
| | | 후 | 5'-agatggcattgggatATTgtgagctgtgtcc-3' |
| TPO7-151-1035 | H33N | 전 | 5'-agccagtgccagaggtAATccttggc-3' |
| | | 후 | 5'-ggcaaaggATTaacctctgggcactggct-3' |

| 변이체번호 | 변이 내용 | 프라이머 방향 | Primer sequence |
|---------------|-------|---------|---|
| TPO7-151-1036 | L22I | 전 | 5'-tcgtgactcccatgtcATTcacagcagactgag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcagtctgctgtgAATgacatgggagtcacga-3' |
| TPO7-151-1037 | F46I | 전 | 5'-gctgcctgctgtggacATTtagctgggagaatg-3' |
| | | 후 | 5'-cattctccaagctAATgtccacagcaggcagc-3' |
| TPO7-151-1038 | R140Q | 전 | 5'-ctccgaggaagggtCAGttcctgatgctttag-3' |
| | | 후 | 5'-ctacaagcatcaggaaCTGcaccttctcggag-3' |
| TPO7-151-1039 | L112I | 전 | 5'-tccttgaaccagATTcctccacagggc-3' |
| | | 후 | 5'-gccctgtggaggAATctgggtccaagga-3' |
| TPO7-151-1040 | H23Q | 전 | 5'-cgtgactcccatgtcctCAGagcagactgag-3' |
| | | 후 | 5'-ctcagtctgctCTGaaggacatgggagtcacg-3' |

[실시예 22] TP07-151 단일 변이체 발현 및 정량

실시예 21에서 제작한 각각의 TP07-151 단일 변이체 벡터를 상기 실시예 9, 10과 동일한 방법을 통하여 HEK293 세포에서 발현하여 정량하였다.

측정된 TP07-151 단일 변이체 발현량은 표 14에 나타내었다.

[표 14] TP07-151 변이체 발현량

| 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) | 변이체번호 | 발현량 (ng/ml) |
|---------------|-------------|---------------|-------------|
| TP07-151-1001 | 137 | TP07-151-1021 | 61 |
| TP07-151-1002 | 256 | TP07-151-1022 | 26 |
| TP07-151-1003 | 28 | TP07-151-1023 | 22 |
| TP07-151-1004 | 206 | TP07-151-1024 | 51 |
| TP07-151-1005 | 44 | TP07-151-1025 | 32 |
| TP07-151-1006 | 71 | TP07-151-1026 | 32 |
| TP07-151-1007 | 38 | TP07-151-1027 | 17 |
| TP07-151-1008 | 43 | TP07-151-1028 | 37 |
| TP07-151-1009 | 39 | TP07-151-1029 | 23 |
| TP07-151-1010 | 203 | TP07-151-1030 | 37 |
| TP07-151-1011 | 28 | TP07-151-1031 | 28 |
| TP07-151-1012 | 39 | TP07-151-1032 | 43 |
| TP07-151-1013 | 72 | TP07-151-1033 | 34 |
| TP07-151-1014 | 29 | TP07-151-1034 | 22 |
| TP07-151-1015 | 19 | TP07-151-1035 | 25 |
| TP07-151-1016 | 22 | TP07-151-1036 | 6 |
| TP07-151-1017 | 22 | TP07-151-1037 | 23 |
| TP07-151-1018 | 41 | TP07-151-1038 | 11 |
| TP07-151-1019 | 74 | TP07-151-1039 | 38 |
| TP07-151-1020 | 20 | TP07-151-1040 | 17 |

[실시예 23] STAT5 인산화 측정을 통한 TP07-151 단일 변이체의 시험관내 생물학적 활성 측정

TP01-153 단일 변이체 대신 TP07-151 단일 변이체를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 11와 동일한 방법을 따라 TP07-151 단일 변이체의 STAT5 인산화 정도에 의한 시험관내 생물학적 활성 측정하였다.

그 결과, TP07-151 단일 변이체에 의한 M-07e 세포의 인산화률을 통해 TP07-151과 비교한 생물학적 활성을 확인하였다. 결과는 표 15에 나타내었다.

[표 15] TP07-151 변이체의 생물학적 활성

| 변이체번호 | TP07-151 대비 활성 | 변이체번호 | TP07-151 대비 활성 |
|---------------|----------------|---------------|----------------|
| TP07-151-1001 | 46% | TP07-151-1021 | -4% |
| TP07-151-1002 | -5% | TP07-151-1022 | 38% |
| TP07-151-1003 | 1% | TP07-151-1023 | 185% |
| TP07-151-1004 | 170% | TP07-151-1024 | 119% |
| TP07-151-1005 | -5% | TP07-151-1025 | -7% |
| TP07-151-1006 | 54% | TP07-151-1026 | 15% |
| TP07-151-1007 | 153% | TP07-151-1027 | 141% |
| TP07-151-1008 | 146% | TP07-151-1028 | 121% |
| TP07-151-1009 | 21% | TP07-151-1029 | 132% |
| TP07-151-1010 | -11% | TP07-151-1030 | 115% |
| TP07-151-1011 | 202% | TP07-151-1031 | 1% |
| TP07-151-1012 | 33% | TP07-151-1032 | 143% |
| TP07-151-1013 | -5% | TP07-151-1033 | 89% |
| TP07-151-1014 | 47% | TP07-151-1034 | 145% |
| TP07-151-1015 | -13% | TP07-151-1035 | 144% |
| TP07-151-1016 | 134% | TP07-151-1036 | 124% |
| TP07-151-1017 | 75% | TP07-151-1037 | -19% |
| TP07-151-1018 | 156% | TP07-151-1038 | -24% |
| TP07-151-1019 | 156% | TP07-151-1039 | 138% |
| TP07-151-1020 | 105% | TP07-151-1040 | 144% |

[실시예 24] TP07-151 단일 변이체의 단백질 분해효소 저항성 실험

TP07-151 단일 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 확인하기 위하여 TP01-153 단일 변이체 대신 TP07-151 단일 변이체를 이용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 상기 실시예 12에서 사용한 10종의 단백질 분해효소 혼합액을 이용 반감기 평가를 통해 저항성을 확인하였다. 결과는 표 16에 나타내었다.

[표 16] TPO7-151 변이체의 단백질분해효소 저항성

| 변이체번호 | TPO7-151 대비 저항성 | 변이체번호 | TPO7-151 대비 저항성 |
|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| TPO7-151-1001 | 364% | TPO7-151-1021 | 88% |
| TPO7-151-1002 | 13475% | TPO7-151-1022 | 321% |
| TPO7-151-1003 | 280% | TPO7-151-1023 | 572% |
| TPO7-151-1004 | 442% | TPO7-151-1024 | 168% |
| TPO7-151-1005 | 136% | TPO7-151-1025 | 567% |
| TPO7-151-1006 | 212% | TPO7-151-1026 | 712% |
| TPO7-151-1007 | 175% | TPO7-151-1027 | 131% |
| TPO7-151-1008 | 196% | TPO7-151-1028 | 439% |
| TPO7-151-1009 | 432% | TPO7-151-1029 | 368% |
| TPO7-151-1010 | 393% | TPO7-151-1030 | 199% |
| TPO7-151-1011 | 329% | TPO7-151-1031 | 313% |
| TPO7-151-1012 | 127% | TPO7-151-1032 | 364% |
| TPO7-151-1013 | 291% | TPO7-151-1033 | 222% |
| TPO7-151-1014 | 456% | TPO7-151-1034 | 907% |
| TPO7-151-1015 | 134% | TPO7-151-1035 | 230% |
| TPO7-151-1016 | 396% | TPO7-151-1036 | 95% |
| TPO7-151-1017 | 539% | TPO7-151-1037 | 358% |
| TPO7-151-1018 | 141% | TPO7-151-1038 | 161% |
| TPO7-151-1019 | 382% | TPO7-151-1039 | 216% |
| TPO7-151-1020 | 120% | TPO7-151-1040 | 83% |

[실시에 25] TPO7-151의 이중, 삼중 변이체 제작

실시에 13에서와 마찬가지로 TPO7-151 이중 변이체는 표 8에 기술된 이중 TPO1-153 변이체와 상응하는 위치에 제작되었으며 그 변이체 목록은 표 17에 나타내었다. TPO7-151 단일 변이체에 표 17에 표시된 각 변이내용에 상응하는 프라이머를 이용하여 단일 변이체 이외의 원하는 부분에 돌연변이를 일으켜 완성하였다. 삼중 변이체는 이중 변이체의 변이 부분 이외의 부분에 돌연 변이를 일으켜 제조할 수 있다.

[표 17] 이중 및 삼중 변이체 설계 목록

| 변이체번호 | 변이내용 |
|---------------|-------------|
| TPO7-151-1201 | A76S/ K138T |
| TPO7-151-1202 | K52N/ K138T |
| TPO7-151-1203 | V21T/ K138T |
| TPO7-151-1204 | H20Q / K38T |
| TPO7-151-1205 | A66S/ K38T |
| TPO7-151-1206 | L12I/ K38T |
| TPO7-151-1207 | L99I/ K138T |
| TPO7-151-1208 | K52N/V139I |
| TPO7-151-1209 | V32I/ K52N |
| TPO7-151-1210 | R17Q/K52N |

TPO7-151 이중 변이체는 실시예 14의 방법 중 pcDNA3.3-GH_TPO1-153-132 플라스미드 대신 상기 방법으로 만들어진 단일 변이체 pcDNA3.3-GH_TPO7-151-132 플라스미드를 주형으로 표 3의 프라이머 중 상기 표 17의 선별된 각 쌍을 사용하는 것을 제외하고는 동일한 방법으로 제작되었다

반응결과 PCR 산물은 *DpnI* 효소로 5분간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보한 후 대장균 XL1-blue 세포에 형질전환하여 클론을 얻고 이로부터 플라스미드를 추출하여 염기서열 분석을 하여 부위 특이적인 돌연변이의 완성을 확인하였다.

삼중 변이체는 서열이 확인된 이중 변이체를 주형으로 사용하여 상기 방법으로 제작할 수 있다.

[실시예 26] 이중 또는 삼중 TPO7-151 변이체 발현 및 정량

실시예 25에서 제작한 변이체 플라스미드들을 추출한 뒤 상기 실시예 9, 10의 방법을 통하여 HEK293 세포에서 발현하여 정량하였다.

ELISA 방법에 의하여 정량된 이중 TPO7-151 변이체의 발현량은 200-700 ng/ml 농도 범위로 확인되었다.

[실시예 27] STAT5 인산화 측정을 통한 이중 또는 삼중 TPO7-151 변이체의

시험관내 생물학적 활성 측정

TP01-153 변이체 대신 이중 또는 삼중 TP07-151 변이체를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 상기 실시예 11의 방법을 따라 그 시험관내 생물학적 활성 측정하였다.

그 결과, 이중 TP07-151 변이체의 생물학적 활성을 TP07-151과 비교 확인하여 표 18에 나타내었다.

[표 18] TP07-151 이중, 삼중 변이체의 상대적 활성도

| 변이체번호 | TP07-151 대비 활성 |
|---------------|----------------|
| TP07-151-1201 | -2% |
| TP07-151-1202 | -5% |
| TP07-151-1203 | 2% |
| TP07-151-1204 | -1% |
| TP07-151-1205 | 1% |
| TP07-151-1206 | 0% |
| TP07-151-1207 | -3% |
| TP07-151-1208 | 40% |
| TP07-151-1209 | 95% |
| TP07-151-1210 | 25% |

[실시예 28] 이중 또는 삼중 TP07-151 변이체의 단백질 분해효소 저항성 실험

이중 또는 삼중 TP07-151 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 확인하기 위하여 상기 실시예 12에서 사용한 10종의 단백질 분해효소 혼합액을 이용 반감기 평가를 통해 저항성을 확인하였다. 실시예 12에서의 TP01-153 단일 변이체 대신 TP07-151 이중 또는 삼중 변이체를 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수행하였다.

그 결과 TP07-151 단일 변이체에 비교한 이중 TP07-151 변이체의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 확인하여 표 19에 나타내었다.

[표 19] TPO7-151 이종, 삼중 변이체의 단백질분해효소 저항성

| 변이체번호 | TPO7-151 대비 저항성 |
|---------------|--------------------|
| TPO7-151-1201 | 48111% |
| TPO7-151-1202 | 144333% |
| TPO7-151-1203 | n/a |
| TPO7-151-1204 | 5413% |
| TPO7-151-1205 | 1968% |
| TPO7-151-1206 | 1493% |
| TPO7-151-1207 | 2547% |
| TPO7-151-1208 | n/a |
| TPO7-151-1209 | 401% |
| TPO7-151-1210 | 1102% |

* n/a: not applicable

[미생물 수탁증]

특허절차상의 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제적 형식
원 기탁에 있어서의 수탁증
규칙 7.1에 따라 발행되었다.

기탁자 이름: 정재갑
한을제약주식회사
주소: 대한민국 경기도 수원시 영통구 이익동 864-1
경기바이오센터 12층 (우편번호: 443-270)

| | |
|--|---|
| I. 미생물의 표시 | |
| 기탁자가 붙인 식별용 표시: <i>Escherichia coli</i> XL1-blue/pcDNA3.3-GH_TPO153_#70 | 국제기탁기관에서 부여한 수탁번호: KCTC 11453BP |
| II. 과학적 성질 및 분류학상의 위치 | |
| I란의 미생물에는 다음사항을 기재한 문헌이 첨부되어 있다: [x] 과학적성질 [] 분류학상의 위치 | |
| III. 수령 및 수탁 | |
| 본 국제 기탁당국은 2009년 1월 12일에 수령한 I란의 미생물을 수탁한다. | |
| IV. 이관청구의 수령 | |
| 본 국제 기탁당국은 에 I란의 미생물을 수령하였다. 그래서 에 원기탁에서 부다페스트에 기초한 기탁으로의 이관청구를 수령하였다. | |
| V. 국제기탁당국 | |
| 명칭: 유전자은행 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로 111 한국생명공학연구원 (우편번호: 305-806) | 국제기탁당국을 대표하는 권한 있는 관리의 서명 이사, 이 정 속 2009년 1월 20일 |

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서열번호 1로 기재되는 천연형 인간 트롬보포이에틴 절편 1-153(이하 'TP01-153'이라 함)의 아미노산 서열에 있어서 3번, 6번, 8번 내지 12번, 14번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 26번, 31번 내지 34번, 39번 내지 41번, 43번 내지 46번, 48번 내지 52번, 55번 내지 57번, 59번, 60번, 62번, 64번 내지 67번, 69번 내지 79번, 81번, 86번, 89번 내지 91번, 93번, 95번, 97번 내지 104번, 107번 내지 109번, 112번, 116번, 117번, 120번 내지 123번, 126번, 128번, 129번, 131번, 및 133번 내지 147번, 150번, 및 152번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 3번, 9번, 14번, 16번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 32번, 40번, 43번 내지 46번, 51번, 52번, 56번, 57번, 59번, 62번, 65번 내지 67번, 69번, 73번 내지 76번, 79번, 81번, 99번, 103번, 104번, 109번, 117번, 122번, 129번, 133번, 135번 내지 139번, 140번 내지 145번, 150번 및 152번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 17번, 20번, 21번, 32번, 52번, 59번, 66번, 67번, 138번, 139번, 140번, 141번, 142번, 145번, 150번 및 152번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 1번 내지 6번, 152번 및 153번 아미노산이 삭제된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 인간 트롬보포이에틴(이하 'TPO'라 함) 절편 변이체.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 9번, 14번, 16번 내지 18번, 20번 내지 23번, 25번, 32번, 33번, 40번, 43번 내지 46번, 49번, 51번, 52번, 56번, 57번, 59번, 62번, 65번 내지 67번, 69번, 73번 내지 76번, 78번, 79번, 81번, 97번, 99번, 103번, 104번, 107번, 109번, 112번,

117번, 122번, 129번, 133번 및 135번 내지 145번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 TP01-153의 아미노산 서열에 있어서 16번, 21번, 23번, 25번, 32번, 33번, 44번 내지 46번, 49번, 52번, 56번, 59번, 67번, 73번, 74번, 78번, 79번, 97번, 98번, 99번, 103번, 107번, 112번, 133번, 136번 내지 141번 및 145번 중 하나 또는 하나 이상의 아미노산이 치환된, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 7】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 치환은 A에서 S 또는 T; D에서 N 또는 Q; L에서 I; R에서 Q 또는 N; V에서 T 또는 I; K에서 N, Q 또는 T; H에서 Q 또는 N; E에서 Q, N 또는 S; P에서 S; F에서 I 또는 S; G에서 S; W에서 I 또는 S; 및 M에서 I 또는 N으로의 치환 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 아미노산 치환이 A3S, A3T, L9I, K14N, K14Q, L16I, R17Q, D18Q, H20Q, V21I, V21T, L22I, H23N, R25Q, R25N, V32I, L40I, A43S, V44I, V44T, D45N, F46I, W51S, K52Q, K52N, E56N, E57N, K59N, D62Q, G65S, A66S, V67T, L69I, G73S, V74I, V74T, M75I, A76S, G79S, L81I, L99I, A103T, L104I, G109S, R117Q, K122Q, L129I, H133Q, L135I, R136Q, G137S, K138N, K138Q, K138S, K138T, V139I, V139T, R140Q, F141I, F141S, L142I, M143I, M143N, L144I, V145T, L150I 및 V152T 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 아미노산 치환이 R17Q, H20Q, V21T, V32I, K52N, K59N, A66S, V67T, K138Q, K138S, K138T, V139I, V139T, F141I, F141S 및 L142I 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 10】

제4항에 있어서, 아미노산 치환이 L6I, L9I, K14N, K14Q, L16I, R17Q, D18Q, H20Q, V21I, V21T, L22I, H23N, H23Q, R25Q, R25N, V32I, H33N, H33Q, L40I, A43S, V44I, V44T, D45N, F46I, G49S, W51S, K52Q, K52N, E56N, E57N, K59N, K59Q, D62Q,

G65S, A66S, V67T, L69I, G73S, V74I, V74T, M75I, A76S, R78Q, G79S, L81I, V97I, R98Q, L99I, A103S, A103T, L104I, L107I, G109S, L112I, R117Q, K122Q, L129I, H133N, H133Q, L135I, R136Q, G137S, K138N, K138Q, K138T, V139I, V139T, R140Q, F141I, F141S, L142I, M143I, M143N, L144I 및 V145T 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 11】

제4항에 있어서, 아미노산 치환이 L16I, V21I, V32I, H33N, H33Q, G49S, K52N, V67T, G73S, G79S, L99I, A103S, A103T, L107I, L112I, H133Q, 및 V145T 중 하나 또는 하나 이상인 것인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 12】

제1항에 있어서, 아미노산 치환이 V32I/K52N, K52N/K138S, 또는 K52N/V139I 인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 13】

제4항에 있어서, 아미노산 치환이 V32I/K52N, K52N/K138S, 또는 K52N/V139I 인, 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체.

【청구항 14】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 암호화하는 염기서열을 포함하는 유전자.

【청구항 15】

제14항의 변형된 유전자를 포함하는 벡터.

【청구항 16】

제15항에 있어서, 도2B의 개열지도를 갖는 변형된 TPO 유전자를 포함하는 벡터.

【청구항 17】

제15항 또는 제16항의 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포.

【청구항 18】

제17항에 있어서, 상기 세포는 대장균(기탁번호:KCTC11453BP), CHO 세포, COS-7 세포, 또는 HEK293세포인 세포.

【청구항 19】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 포함하는 억제학적 제제.

【청구항 20】

제19항에 있어서, 추가적으로 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 제제.

【청구항 21】

제19항에 있어서, 상기 제제는 경구제, 흡입제, 주사제, 점막투여제제, 및 외용제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약제학적 제제.

【청구항 22】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 포함하는 혈소판 감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

【청구항 23】

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체의 치료학적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈소판감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환을 치료하는 방법.

【청구항 24】

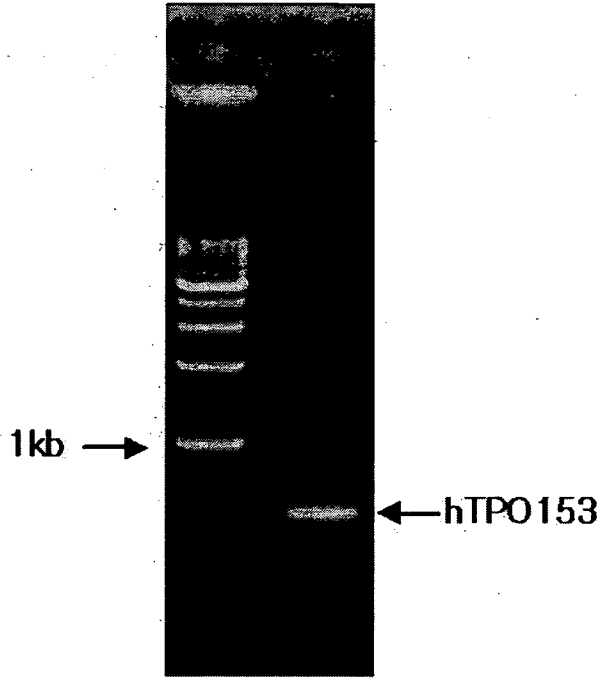
제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체를 혈소판 감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환의 치료에 사용하는 방법.

【청구항 25】

혈소판 감소증 또는 혈소판 감소에 의한 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 변형된 아미노산 서열을 포함하는 TPO 절편 변이체의 용도.

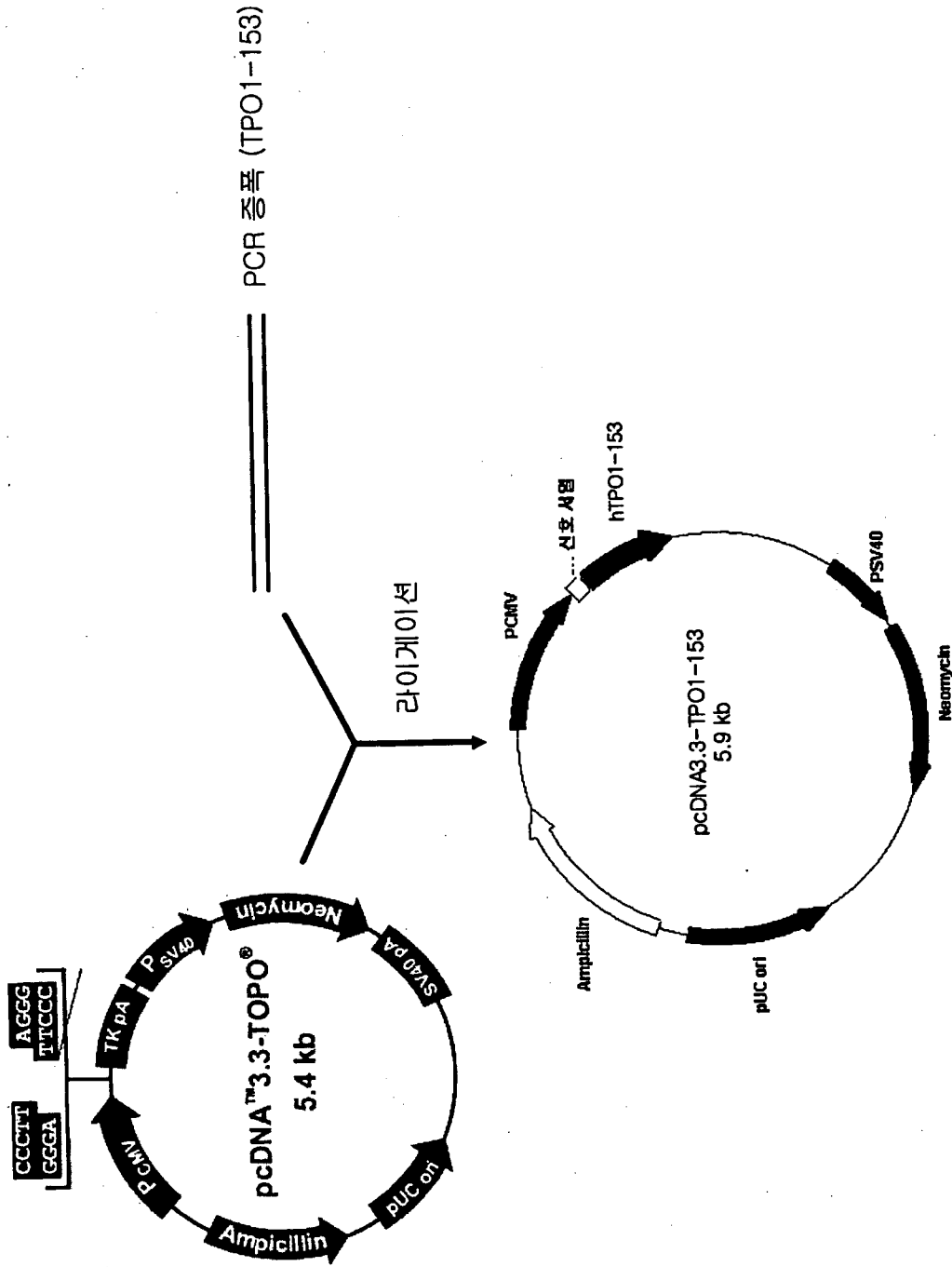
【도면】

【도 1】

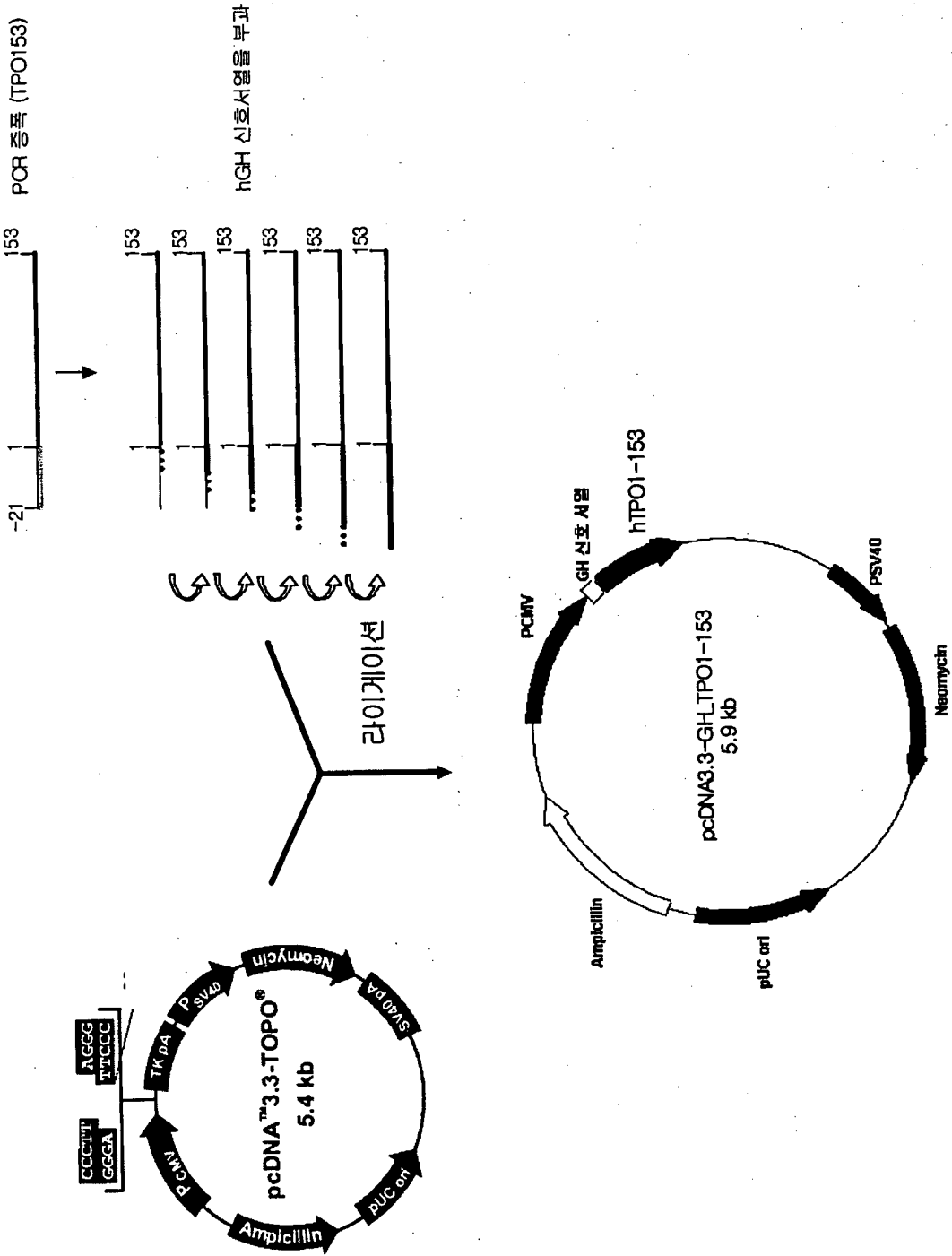


【도 2】

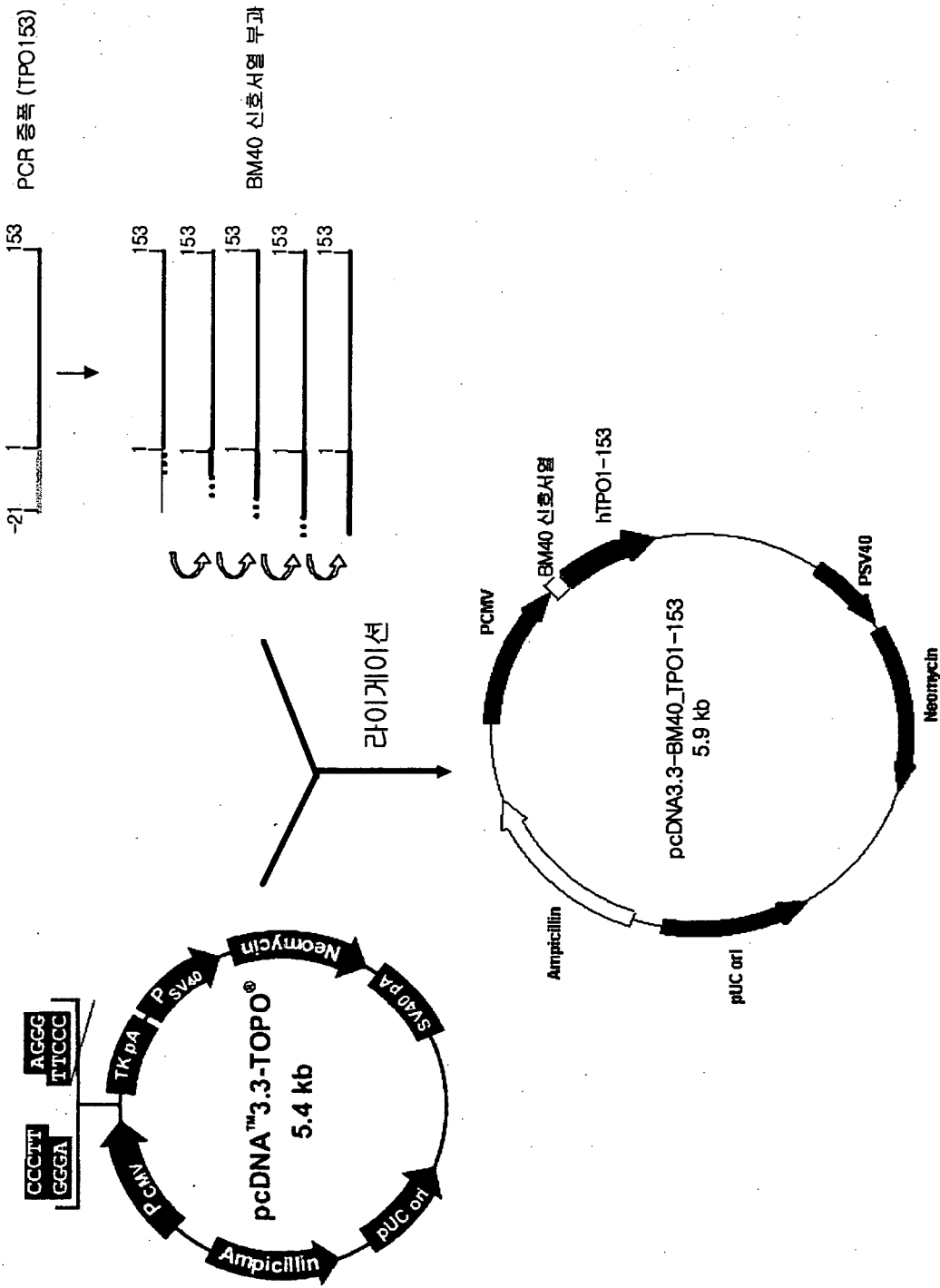
a.



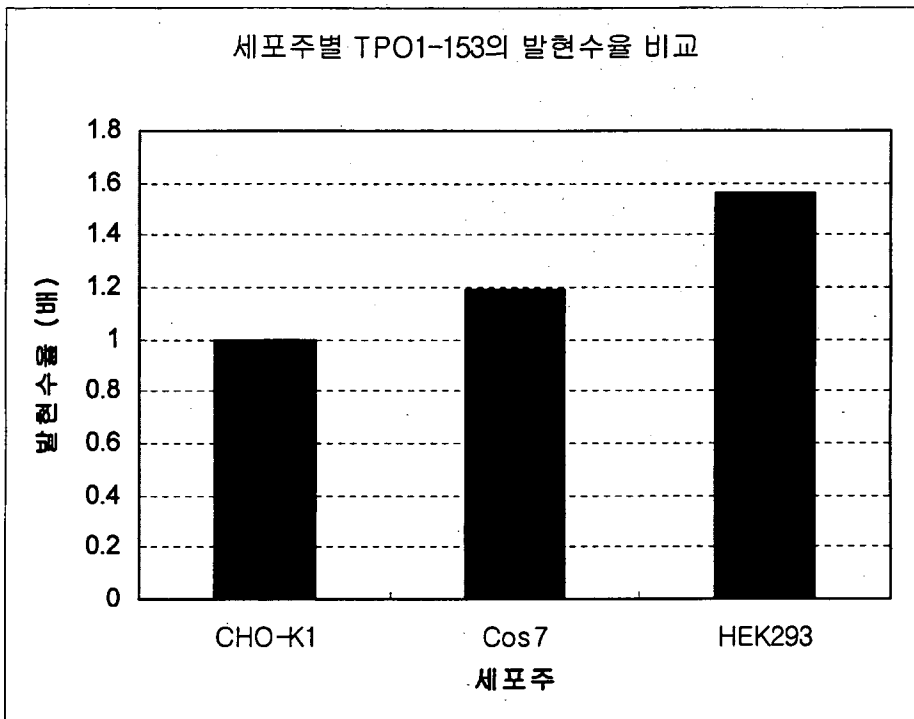
b.



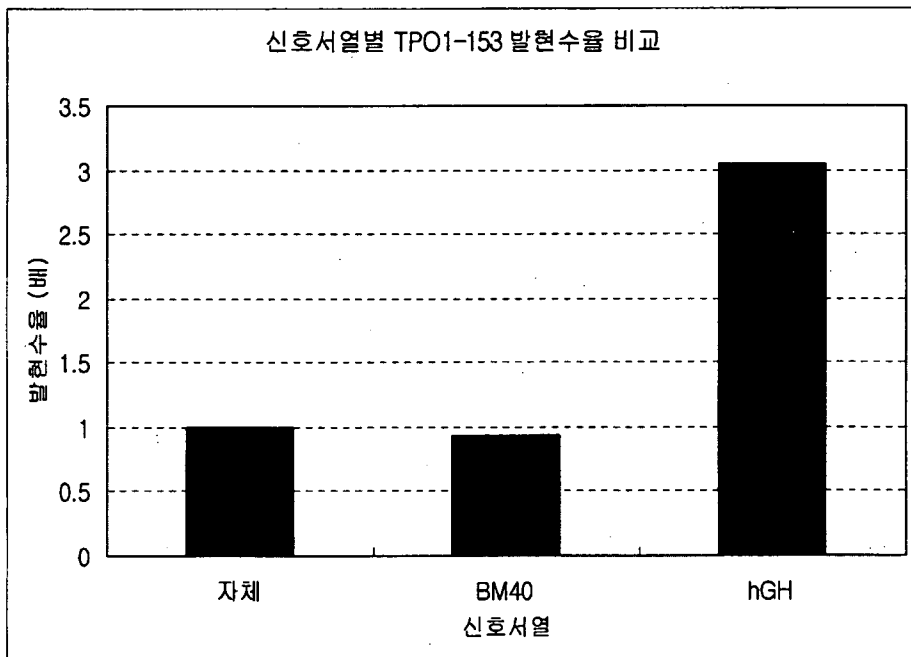
C.



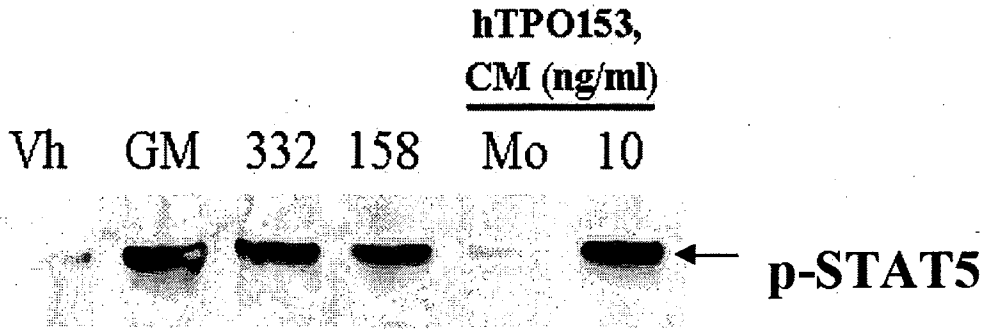
【도 3】



【도 4】

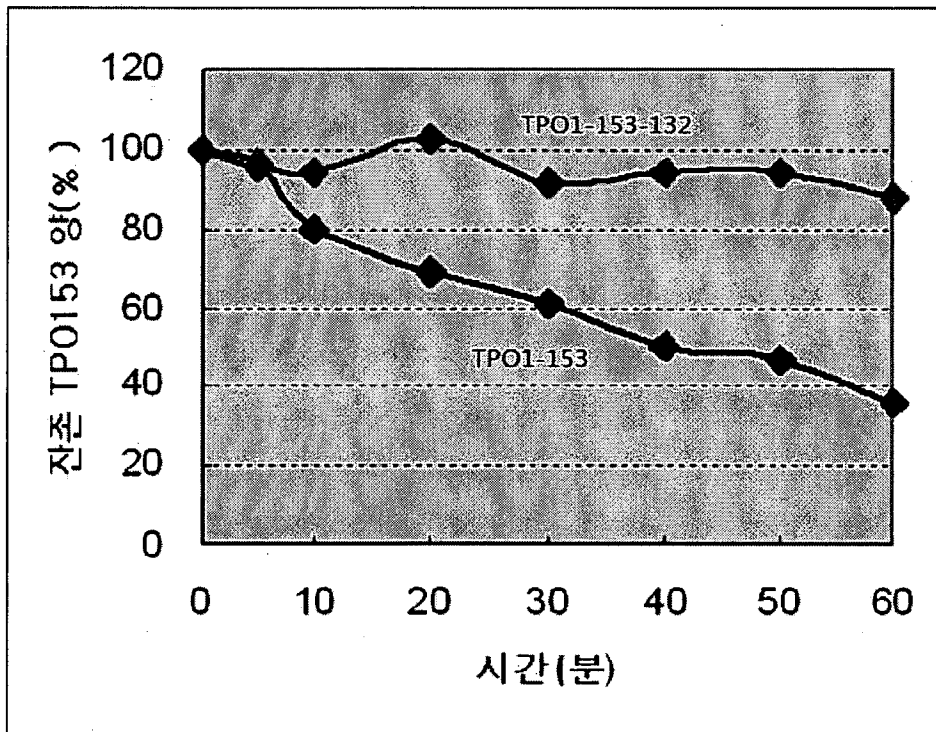


【도 5】

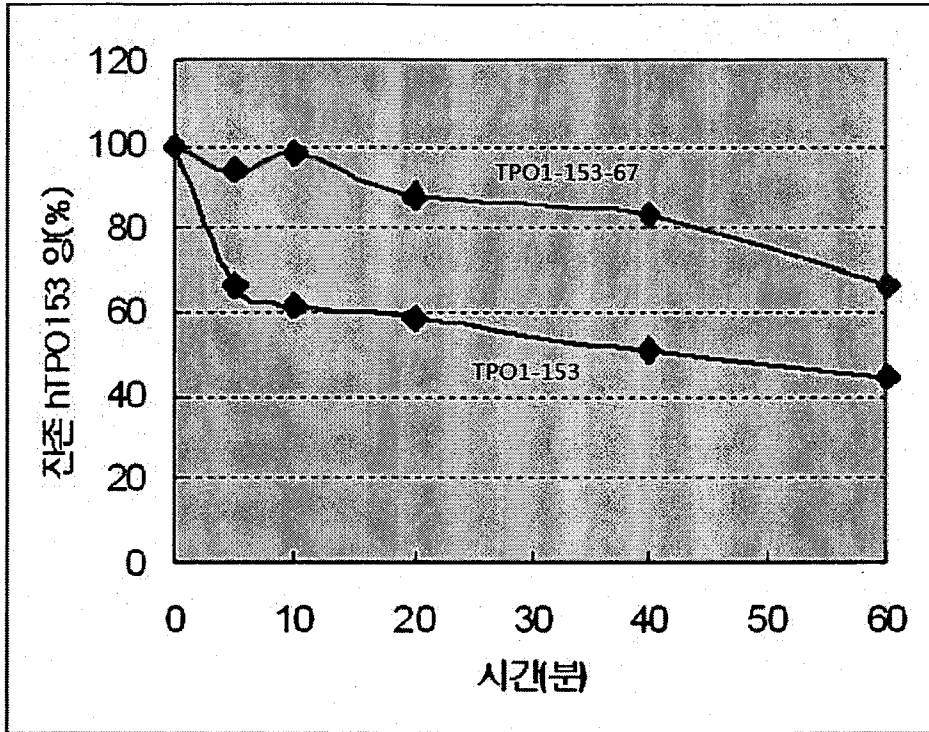


【도 6】

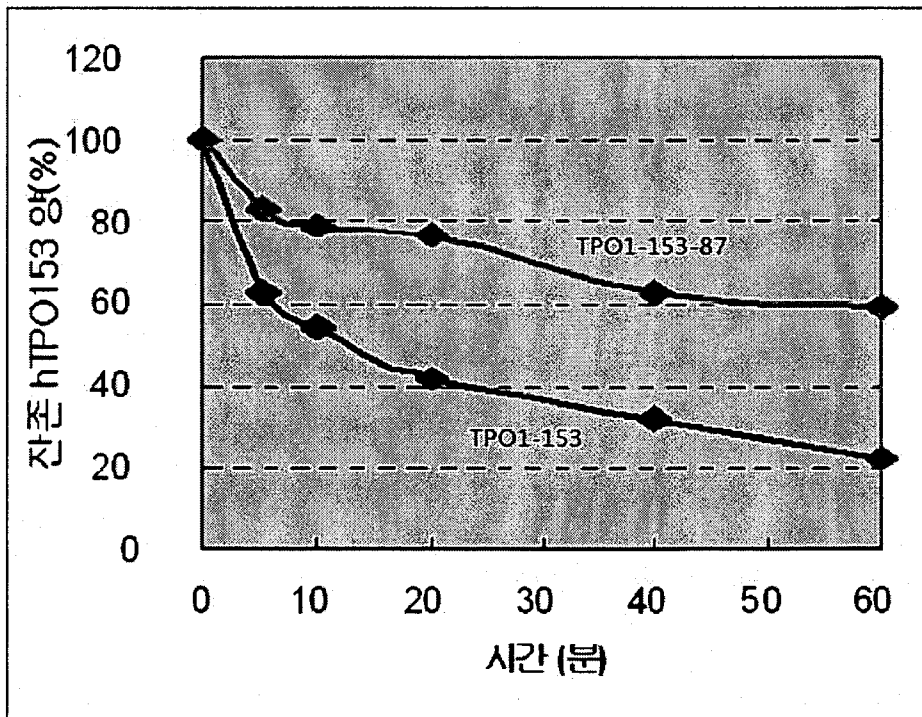
a.



b.



c.



【도 7】

