

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C07K 14/505

(11) 공개번호 특2000-0052807  
(43) 공개일자 2000년08월25일

(21) 출원번호	10-1999-7003627	(87) 국제공개번호	WO 1998/18926
(22) 출원일자	1999년04월24일	(87) 국제공개일자	1998년05월07일
번역문제출일자	1999년04월24일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/18703		
(86) 국제출원출원일자	1997년10월23일		
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 가나 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨		
	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지아 가나 헝가리 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라 이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카 르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르 투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크 라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남		
(30) 우선권주장	60/034,044 1996년10월25일 미국(US)		
(71) 출원인	지.디. 썸 앤드 컴파니 윌리엄스 로저 에이		
	미국 일리노이주 60680-5110 시카고 피.오.박스 5110 코퍼레이트 페이턴트 디파트먼트		
(72) 발명자	맥웨어터찰즈에이.		
	미국미주리63011엘리스빌턴더헤드캐년코트16564		
	핑이칭		
	미국미주리63130세인트루이스미션코트423		
	섬머즈니나		
	미국미주리63304세인트찰즈새들메이커1203		
(74) 대리인	장용식		

**심사청구 : 없음**

**(54) 순환 교환된 에리트로포이에틴 수용체 아고니스트**

**요약**

신규 에리트로포이에틴 수용체 아고니스트 단백질, 에리트로포이에틴 수용체 아고니스트 단백질을 암호화하는 DNA, 에리트로포이에틴 수용체 아고니스트 단백질을 생성하는 방법 및 에리트로포이에틴 수용체 아고니스트 단백질을 사용하는 방법을 개시한다.

**색인어**

에리트로포이에틴, 수용체 아고니스트, 콜로니 자극인자, 에리트로이드 선구체.

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 사람 에리트로포이에틴(EP0) 수용체 아고니스트에 관한 것이다. 이러한 EP0 수용체 아고니스트

는 천연 EP0의 활성의 한가지 또는 그 이상을 지니고 또한 개선된 조혈세포자극활성 및/또는 천연 EP0와 관련된 바람직하지 않은 생물학적 활성의 감소를 포함하는 개선된 활성 프로파일을 나타낼 수 있고, 증가된 용해도, 안정성 및 재폴딩 효율성을 포함하는 개선된 물리적 성질을 가질 수 있다.

## 배경기술

골수세포의 분화 및/또는 증식을 자극하는 콜로니자극인자는 조혈 간세포-유도세포들의 저하된 레벨을 회복시키는 치료적 잠재능 때문에 많은 관심을 불러일으켜 왔다.

에리트로포이에틴은 처음 보고에 따르면 약 39,000달톤에 달하는 분자량을 갖는 천연에서 발생된 당단백질 호르몬이다(T. Miyaki et al., J. Biol. Chem. 252:5558-5564(1977)). 성숙한 호르몬은 166개의 아미노산 길이고, 'prepro' 형태의 호르몬은 선도펩티드를 포함하여 193개의 아미노산 길이다(F. Lin, U.S. 특허번호 4,703,008). 성숙한 호르몬의 분자량은 아미노산 배열로부터 계산하여 18,399달톤에 이른다(K. Jacobs et al., Nature 313:806-810(1985); J. K. Browne et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 5:1693-702 (1986)).

아미노산의 치환과 결실로 제조된 첫번째 돌연변이체 에리트로포이에틴(i.e., 에리트로포이에틴 유사체)은 감소된 또는 개선되지 못한 활성을 보인다. 미국특허번호 4,703,008에 기재된 바와 같이, 15, 40 및 145 위치에서 티로신 잔기를 페닐알라닌 잔기로 치환, 7 위치에서 시스테인 잔기를 히스티딘으로 치환, 2 위치에서 프롤린을 아스파라긴으로 치환, 잔기 2-6 의 결실, 잔기 163-166의 결실, 그리고 잔기 27-55 의 결실은 생물학적 활성에서 뚜렷한 증가를 가져오지 않는다. 시스테인<sup>7</sup> - 히스티딘<sup>7</sup> 돌연변이체는 생물학적 활성을 제거시킨다. 아스파라긴 잔기 24, 38, 또는 83에서 단일 아미노산 치환을 갖는 일련의 돌연변이체 에리트로포이에틴은 심하게 감소된 활성(잔기 24에서 치환)을 보이고, 또는 빠른 세포내 퇴화와 분비의 뚜렷한 부족(잔기 38 또는 183에서 치환)을 보인다. 세인 126에서 0-결합된 글리코실화 위치의 제거는 빠른 퇴화현상 또는 에리트로포이에틴 유사체의 분비의 부족을 가져온다. (S. Dube et al., J. Biol. Chem. 33:17516 - 17521(1988)). 이들 저자는 잔기 38,83 및 126 에서 글리코실화 위치는 적당한 분비를 위해 요구되며, 잔기 24 및 38에 위치한 글리코실화 위치는 성숙한 에리트로포이에틴의 생물학적 활성에 관여될 수 있다고 결론짓는다.

탈글리코실화된 에리트로포이에틴은 시험관내 생물정량법에서 완전한 활성을 갖는다 (M. S. Dorsdal et al., Endocrinology 116:2293-2299 (1985); U.S. Patent No. 4,703,008; E. Tsuda et al., Eur. J. Biochem. 266:20434-20439 (1991)). 그러나, 에리트로포이에틴 글리코실화는 호르몬의 생체내 활동에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 폭넓게 받아들여진다. (P.H. Lowy et al., Nature 185:102-105(1960); E. Goldwasser 및 C.K.H. Kung, Ann. N.Y. Acad. Science 149:49-53 (1968); W.A. Lukowsky 및 R.H. Painter, Can. J. Biochem. :909-917 (1972); D.W. Briggs et al., Amer. J. Phys. 201:1385-1388 (1974); J.C. Schooley, Exp. Hematol. 13:994-998; N. Imai et al., Eur. J. Biochem. 194:457-462(1990); M.S. Dorsdal et al., Endocrinology 116: 2293-2299 (1985); E. Tsuda et al., Eur. J. Biochem. 188:405-411 (1990); U.S. 특허 No. 4,703,008; J.K. Brown et al., Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. 51:693-702(1986); 및 K. Yamaguchi et al., J. Biol. Chem. 266:20434-20439 (1991)). 에리트로포이에틴의 탈글리코실화된 유사체의 생체내 생물학적 활성이 부족하면 처리된 동물내 순환계에서 탈글리코실화된 호르몬의 즉각적인 클리어언스를 가져온다. 이러한 관점은 글리코실화 및 탈글리코실화된 에리트로포이에틴의 혈장 반감기를 직접적으로 비교함으로써 지지된다(J.C. Spivak and B.B. Hoyans, Blood 73:90-99(1989), and M.N. Fukuda, et al., Blood 73: 84-89(1989)).

에리트로포이에틴 글리코실화 위치의 올리고핵산-특이적 돌연변이유발은 글리코실화의 기능을 효과적으로 탐침하였으나, 아직까지는 치료학적 응용용 호르몬의 특성을 현저하게 개선시키는 전략에 관한 식견을 제공하지 못하였다.

일련의 단일 아미노산의 치환 또는 결실 돌연변이체를 구성하였고, 이는 아미노산 잔기 15, 24, 49, 76, 78, 83, 143, 145, 160, 162, 163, 164, 165 및 166 을 포함한다. 이러한 돌연변이체에서, 카르복시 말단, 글리코실화위치, 및 에리트로포이에틴의 티로신 잔기를 변화시켜 그 돌연변이체를 헤모글로빈, 헤마토크리트 및 망상적혈구(EP No. 0409 113)를 모니터링하고 있는 동물에 투여하였다. 이러한 돌연변이체들 중 다수가 생체내에서 생물학적 활성을 갖는 반면, 어떤 돌연변이체도 천연 에리트로포이에틴과 비교하여 헤모글로빈, 헤마토크리트 또는 망상적혈구(적혈구의 바로 전 전구물질)레벨을 상승시키는 작용에서 현저한 증가를 보이지는 않는다.

또 다른 돌연변이체 집합은 잔기 99-119(도메인 1) 및 111-129(도메인 2)의 기능을 탐침하기 위해 구성하였다(Y. Chern et al., Eur. J. Biochem. 202:225-230(1991)). 도메인1 돌연변이체는 시험관내 생물정량법에서 급속하게 퇴화하고 비활성되는 반면, 도메인2 돌연변이체는 적지만 시험관내 활성을 보유한다. 또한, 이들 돌연변이체는 와일드형, 사람 에리트로포이에틴과 비교하여 어떤 향상된 생체내 생물학적 활성도 보이지 않으며, 이 저자들은 잔기 99-119가 에리트로포이에틴 구조에서 중요한 역할을 한다고 결론짓는다.

사람 에리트로포이에틴 분자는 두 개의 이황화다리를 갖는데, 한가지는 위치 7 및 161에서 시스테인 잔기를 잇고, 두번째는 위치 29 및 33에서 시스테인 잔기를 연결하는 것이다(P.H. Lai et al., J. Biol. Chem. 261:3116-3121(1986)). 올리고핵산-특이적 돌연변이유발은 사람 에리트로포이에틴에서 시스테인 29 및 33 을 연결하는 이황화다리의 기능을 탐침하기 위해 사용하였다. 위치 33에서 시스테인은 프롤린 잔기로 전환되었으며, 이것은 이 잔기에서 유린 에리트로포이에틴의 구조를 의사한다. 얻어진 돌연변이체는 시험관내 활성을 상당히 감소시켰다. 저자들은 활성의 손실이 매우 크기때문에 잔기 29와 33사이의 이황화다리는 에리트로포이에틴 기능에 필수적인 것으로 결론짓는다(F.K. Lin, Molecular and Cellular Aspects of Erythropoietin and Erythropoiesis, pp. 23-36, ed. I.N. Rich, Springer-Verlag, Berlin(1987)).

Lin, F-K 의 미국 특허 4,703,008(이하 '008특허'로 참조한다)는 EP0의 첨가, 결실 및 치환된 유사체를 포함한 EP0 변형의 넓은 다양성에 대하여 가정한다. '008특허는 글리코실화위치의 결실이 효모에서 제조된 EP0의 활성을 증가시킨다고 언급되었지만(컬럼 37에서 '008특허, 25-28줄 참조) 어떠한 제안된 변형도

그 자체로 생물학적 활성을 증가시킨다는 것을 가리키진 않는다. 또한, '008특허는 페닐알라닌으로 치환한 한가지 또는 그 이상의 티로신 잔기를 갖는 EP0유사체가 증가된 또는 감소된 수용체 결합 친화력을 보일수 있다고 가정한다.

Fibi, M et al.의 호주 특허 출원 AU-A-59145/90은 또한 변형된 EP0 단백질(EP0 돌연변이체)의 수에 관해 논한다. 통상 EP0의 아미노산 10-55, 70-85, 및 130-166의 변화가 가정되며, 특히 카르복실 말단 영역에서 양전하된 기초아미노산의 첨가는 EP0의 생물학적 활성을 증가시키는 것을 의미한다.

Shoemaker, C.B.의 미국 특허 4,835,260은 위치 54의 메티오닌과 위치 38의 아스파라긴의 아미노산 치환을 갖는 변형 EP0단백질에 관해 논의한다. 그러한 EP0 돌연변이는 개선된 안정성을 갖지만 와일드형-EP0에 비해 생물학적 활성에서는 어떠한 증가도 보이지 않는다.

WO 91/05867에는 EP0(Asn<sup>69</sup>), EP0(Asn<sup>125</sup>, Ser<sup>127</sup>), EP0(Thr<sup>125</sup>), 및 EP0(Pro<sup>124</sup>, Thr<sup>125</sup>)과 같은, 사람 에리트로포이에틴보다 많은 수의 탄수화물부착위치를 갖는 사람 에리트로포이에틴 유사체를 개시되어 있다.

WO 94/24160에는 향상된 활성을 갖는, 구체적으로 위치 20, 49, 73, 140, 143, 146, 147, 및 154에서 아미노산 치환을 갖는 에리트로포이에틴 유데인이 개시되어 있다.

WO 94/25055에는 EP0(X<sup>33</sup>, Cys<sup>139</sup>, des-Arg<sup>166</sup>) 및 EP0(Cys<sup>139</sup>, des-Arg<sup>166</sup>)를 포함하는 에리트로포이에틴 유사체가 개시되어 있다.

#### 단백질 서열의 재배열

진화에 있어서, DNA서열의 재배열은 단백질 구조와 기능의 다양성을 초래하는 데 있어서 중요한 역할을 한다. 유전자 복제 및 엑손서플링은 특히 기본돌연변이율이 낮기 때문에 다양성을 신속히 초래하는 중요한 메카니즘을 제공함으로써 유기체에 경합적 이점을 제공한다(Doolittle, Protein Science 1:191-200, 1992)

재조합 DNA법의 발전은 단백질 폴딩, 구조 및 기능에 관한 서열 전위의 영향을 연구하는 것이 가능하게 되었다. 새로운 서열을 생성하는데 사용되는 접근법은 아미노산 서열 선형재구성에 의해 관련된 자연 발생 단백질 쌍을 생성하는데 사용되는 것과 유사하다(Cunningham, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3218-3222, 1979; Teather & Erfle, J. Bacteriol. 172:3837-3841, 1990; Schimming et al., Eur. J. Biochem. 204: 13-19, 1992; Yamiuchi 및 Minamikawa, FEBS Lett. 260: 127-130, 1991; MacGregor et al., FEBS Lett. 378: 263-266, 1996). 단백질의 이러한 유형의 단백질 재배열을 시험관내에서 최초로 적용한 것이 골든버그와 크레이튼에 의해 기재되었다(J. Mol. Biol. 165: 407-413, 1983). 새로운 N-말단은 원래의 서열의 내부부위(절단점)에서 선택하고, 새로운 서열은 원래의 C-말단에 있거나 또는 그 부근의 아미노산에 도달할 때까지 절단점으로부터 원래의 것과 동일한 순서의 아미노산을 갖는다. 이 때 새로운 서열은 원래의 N-말단에 있거나 또는 그 부근에 있는 아미노산에 직접 또는 서열의 추가부분(링커)을 통해 결합되고, 새로운 서열은 원래 서열의 절단점 부위에 N-말단이었던 아미노산에 있거나 또는 그 부근에 있는 원지점에 도달할 때까지 원래의 것과 동일한 서열이 계속되며 이 잔기는 사슬의 C-말단을 형성한다.

이 접근법은 크기가 58 ~ 462 아미노산 범위의 단백질에 적용되어 왔다 (Goldenberg & Creighton, J. Mol. Biol. 165: 407-413, 1983; Li & Coffino, Mol. Cell. Biol. 13:2377-2383, 1993). 실험된 단백질은 주로  $\alpha$ -헬릭스(인터루킨-4; Kreitman et al., Cytokine 7:311-318, 1995),  $\beta$ -시트(인터루킨-1; Horlick et al., Protein Eng. 5:427-431, 1992), 또는 이 두가지의 혼합물(효모 포스포리보실 안트라닐레이트 이소머라제; Luger et al., Science 243:206-210, 1989)을 함유하는 단백질을 포함하여 광범위한 구조등급을 나타내었다. 단백질 기능의 광범위한 범주는 이러한 서열 재구성 연구에서 나타난다.

#### 호소

T4 리소짐	Zhang et al., Biochemistry 32: 12311-12318 (1993); Zhang et al., Nature Struct. Biol. 1:434-438(1995)
디히드로플레이트리덕타제	Buchwalder et al., Biochemistry 31: 1621-1630 (1994); Protasova et al., Prot. Eng. 7: 1373-1377 (1995)
리보뉴클레아제 T1	Mullins et al., J. Am. Chem. Soc. 116: 5529-5533 (1994); Garrett et al., Protein Science 5: 204-211 (1996)
바실러스 $\beta$ -글루카나제	Hahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 10417 - 10421 (1994)
아스파르테이트 트랜스 카르바모일라제	Yang & Schachman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11980-11984 (1993)
포스포리보실 안트라닐 레이트 이소머라제	Luger et al., Science 243: 206-210(1989); Luger et al. Prot. Eng. 3: 249-258 (1990)
펩신/ 펩시노겐	Lin et al., Protein Science 4: 159-166 (1995)

글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제	Vignais et al., Protein Science 4: 994-1000 (1995)
오르니틴	Li & Coffino, Mol. Cell. Biol. 13: 2377-2383 (1993)
데카르복실라아제	Ritco- Vonsovic et al., Biochemistry 34: 16543-16551 (1995)
효모	
포스포글리세레이트	
디히드로게나제	
효소 저해제	
염기성 채널	Goldenberg & Creighton, J. Mol. Biol. 165: 407-413 (1983)
트립신 저해제	
시토킨	
인터루킨-1 $\beta$	Horlick et al., Protein Eng. 5: 427-431 (1992)
인터루킨-4	Kreitman et al., Cytokine 7: 311-318 (1995)
티로신 키나아제 인식 도메인	
$\alpha$ -스펙트린 SH3	Viguera, et al., J. Mol. Biol. 247: 670-681 (1995)
도메인	
트랜스멤브레인 단백질	
omp A	Koebnik & Kramer, J. Mol. Biol. 250:617-626 (1995)
키메라 단백질	
인터루킨-4-수도모나스	Kreitman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 6889-6893 (1994)
엑소톡신 용출 분자	

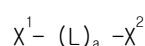
이러한 연구의 결과는 매우 가변적이었다. 많은 경우 현저하게 낮은 활성, 용해도 또는 열역학적 안정성이 관찰되었다(E.coli 디히드로폴레이트 리덕타제, 아스파르테이트 트랜스카르바모일라제, 포스포리보실 안트라닐레이트 이소머라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 오르니틴 데카르복실라제, omp A, 효모 포스포글리세레이트 디히드로게나제). 다른 경우에는, 서열 재배열된 단백질이 그들의 천연 대응물과 거의 동일한 많은 성질을 갖는 것으로 나타났다(염기성 채널 트립신 저해제, T4 리소짐, 리보뉴클레아제 T1, 바실러스  $\beta$ -글루카나제, 인터루킨-1 $\beta$ ,  $\alpha$ -스펙트린 SH3 도메인, 펩시노겐, 인터루킨-4). 예외적인 경우에는, 천연 서열의 일부 성질을 능가하는 예기치 못한 개선, 예를 들어, 재배열된  $\alpha$ -스펙트린 SH3 도메인 서열의 용해도 및 리폴딩율, 전위된 인터루킨-4-수도모나스 엑소톡신 용출분자에 대해서는 수용체 친화성 및 항종양 활성등이 관찰되었다. (Kreitman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:6889-6893, 1994; Kreitman et al., Cancer Res. 55: 3357-3363, 1995).

이러한 유형의 연구를 하게된 일차적 동기는 단백질 폴딩과 안정성에 있어 단기적 및 장기적 상호작용의 역할을 연구하는 것이었다. 이러한 유형의 서열재배열은 원래의 서열에서 장기적인 상호작용 집합을 새로운 서열에서 단기적인 상호작용으로 전환시키고, 또 그 반대로도 전환시킨다. 이들 서열 재배열의 다수가 몇가지 이상의 활성을 가진 구조를 달성할 수 있다는 사실은 단백질 폴딩이 복합폴딩경로에 의해 일어난다는 설득력 있는 증거가 된다(Viguera, et al., J. Mol. Biol. 247: 670-681, 1995).  $\alpha$ -스펙트린의 SH3 도메인의 경우,  $\beta$ -헤어핀 턴에 대응되는 위치에서 새로운 말단을 선택하면 약간 낮은 안정성을 갖는 단백질이 생성되었으나 그럼에도 불구하고 이 단백질은 폴딩할 수 있었다.

여기에서 인용된 연구에서 사용되는 내부 절단점 위치는 전적으로 단백질 표면에서만 발견되며, 명백히 말단 또는 중간부로 치우치지 않고 선형서열 전체에 걸쳐 분포되어 있다(원래의 N-말단에서 절단점까지 상대적 거리의 변화량은 총 서열 길이의 약 10 ~ 80%이다). 이들 연구에서 원래의 N-말단과 C-말단을 연결하는 링커는 잔기 0 ~ 9의 범위이었다. 한 경우로(Yang & Schachman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 11980-11984, 1993), 서열의 일부를 원래의 C-말단 세그먼트로부터 결실시키고 절단된 C-말단에서 원래의 N-말단까지 연결하였다. Gly 및 Ser과 같은 가동성의 친수성 잔기들은 링커에 자주 이용되고 있다. Viguera 등(J. Mol. Biol. 247: 670-681, 1995)은 원래의 N-및 C-말단이 3- 또는 4-잔기 링커와 결합하는 것을 비교하였다. 3-잔기 링커가 열역학적으로 덜 안정하였다. Protasova 등(Protein Eng. 7:1373-1377, 1994)은 E.coli 디히드로폴레이트 리덕타제의 원래의 N-말단을 연결하는데 3-또는 5-잔기 링커를 이용하였다. 3-잔기 링커만이 양호한 수율로 단백질을 생성하였다.

#### 발명의 요약

본 발명의 변형된 사람 EP0 수용체 아고니스트는 다음과 같은 식으로 나타내어질 수 있다.



식중;

a는 0 또는 1;

$X^1$ 은 잔기 n+1부터 J까지의 서열에 대응하는 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드;

$X^2$ 는 잔기 1부터 n까지의 서열에 대응하는 아미노산 서열로 구성된 펩티드;

n은 1~J-1의 범위의 정수; 및

L은 링커

위의 식에서 사람 EP0의 아미노산 잔기 구성원들은 아미노에서 카르복실 말단까지 연속적으로 1~J까지 번호매겨지고, 이러한 단백질 내의 근접한 아미노산 한 쌍은 각각 n 및 n+1로 번호매겨지고, 여기서 n은 1~J-1 범위의 정수이다. 잔기 n+1은 새로운 EP0 수용체 아고니스트의 새로운 N-말단이 되며, 잔기 n은 새로운 EP0 수용체 아고니스트의 새로운 C-말단이 된다.

본 발명은 다음과 같은 변형된 EP0 아미노산 서열로 이루어지는 신규 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드에 관한 것이다. :

```

AlaProProArgLeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLys
              10                      20

GluAlaGluAsnIleThrThrGlyCysAlaGluHisCysSerLeuAsnGluAsnIleThr
              30                      40

ValProAspThrLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgMetGluValGlyGlnGlnAla
              50                      60

ValGluValTrpGlnGlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeu
              70                      80

LeuValAsnSerSerGlnProTrpGluProLeuGlnLeuHisValAspLysAlaValSer
              90                      100

GlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGlnLysGluAlaIleSer
              110                     120

ProProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLys
              130                     140

LeuPheArgValTyrSerAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAla
              150                     160

CysArgThrGlyAspArg
              166
  
```

여기서, 임의로 N-말단으로부터 1~6 아미노산 및 C-말단으로부터 1~5 아미노산은 상기 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드로부터 결실될 수 있다;

여기서, N-말단은 C-말단에 직접 또는 N-말단이 C-말단에 결합할 수 있고 다음 아미노산들 각각에서 새로운 C- 및 N-말단을 갖을 수 있는 링커를 통하여 결합된다.

23-24	48-49	111-112
24-25	50-51	112-113
25-26	51-52	113-114
26-27	52-53	114-115
27-28	53-54	115-116
28-29	54-55	116-117
29-30	55-56	117-118
30-31	56-57	118-119
31-32	57-58	119-120
32-33	77-78	120-121
33-34	78-79	121-122
34-35	79-80	122-123
35-36	80-81	123-124
36-37	81-82	124-125
37-38	82-83	125-126
38-39	84-85	126-127
40-41	85-86	127-128
41-42	86-87	128-129
43-44	87-88	129-130
44-45	88-89	131-132
45-46	108-109	
46-47	109-110	
47-48	110-111	

상기 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드는 임의로 (메티오닌<sup>-1</sup>), (알라닌<sup>-1</sup>), 또는 (메티오닌<sup>-2</sup>, 알라닌<sup>-1</sup>) 다음으로 즉각적으로 올 수 있다.

C-말단 및 N-말단이 생성될 수 있는 보다 선호되는 절단점은; 23-24, 24-25, 25-26, 27-28, 28-29, 29-30, 30-31, 31-32, 32-33, 33-34, 34-35, 35-36, 36-37, 37-38, 38-39, 40-41, 41-42, 42-43, 52-53, 53-54, 54-55, 55-56, 77-78, 78-79, 79-80, 80-81, 81-82, 82-83, 83-84, 84-85, 85-86, 86-87, 87-88, 88-89, 109-110, 110-111, 111-112, 112-113, 113-114, 114-115, 115-116, 116-117, 117-118, 118-119, 119-120, 120-121, 121-122, 122-123, 123-124, 124-125, 125-126, 126-127, 127-128, 128-129, 129-130, 130-131 및 131-132.

C-말단 및 N-말단이 생성될 수 있는 가장 선호되는 절단점은 ; 23-24, 24-25, 31-32, 32-33, 37-38, 38-39, 82-83, 83-84, 85-86, 86-87, 87-88, 125-126, 126-127, 및 131-132.

가장 선호되는 절단점은 글리코실화 부위, 비중화 항체, 단백질 분해 절단 부위를 포함한다.

본 발명의 EP0 수용체 아고니스트는 WO 94/24160에서 개시된 것 또는 Asn<sup>24</sup>, Asn<sup>83</sup> 및 Asn<sup>126</sup> 에서 글리코실화 부위의 한가지 또는 그 이상이 제한되진 않지만 Asp 또는 Glu 와 같은 다른 아미노산으로 변화되는 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함한다. 또한 본 발명의 EP0 수용체 아고니스트는 원래 단백질의 N- 및 C-말단 중 한가지/또는 모두에서 아미노산 결실을 갖거나 상기 나타난 식에서 서열 재배열된 단백질의 N- 및/또는 C-말단으로부터 결실을 갖을 수 있도록 의도되었다.

N-말단을 C-말단으로 결합하는 링커의 본 발명의 선호되는 구체에는 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 폴리펩티드이다.

GlyGlyGlySer SEQ ID NO:123;  
 GlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID NO:124;  
 GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID NO:  
 125;  
 SerGlyGlySerGlyGlySer SEQ ID NO:126;  
 GluPheGlyAsnMet SEQ ID NO:127;  
 GluPheGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:128;  
 GluPheGlyGlyAsnGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:129; 및  
 GlyGlySerAspMetAlaGly SEQ ID NO:130.

본 발명은 재조합 사람 EP0 수용체 아고니스트를 시토킨, 림포킨, 인터루킨, GM-CSF, G-CSF, c-mpl 리간드(TPO 또는 MGF로 알려짐), M-CSF, IL-1, IL-4, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, LIF, 사람 성장 호르몬, B-세포 성장 인자, B-세포 분화 인자, 호에오신 분화 인자 및 철 인자 또는 c-kit 리간드(여기선 모두 '인자'로 참조한다)로 또한 알려진 간세포 인자(SCF)등을 제한하진 않지만 이를 포함하는 조혈 성장 인자들을 포함하는 부가 콜로니 자극인자(CSF)의 한가지 또는 그 이상과 연속적으로, 또는 병용투여하는 것을 또한 포함한다. 이들 병용투여된 혼합물은 펩티드 모두의 통상 활성을 갖는 것을 특징으로 하고, EP0 수용체 아고니스트 또는 2차 콜로니 자극인자 단

독 존재의 단순한 부가기능보다 더 큰 생물학적 또는 생리적 활성을 갖는 것을 더욱 특징으로 한다. 병용 투여는 또한 EPO 또는 2차 골조 자극인자의 존재에 의한 활성 또는 예상된 것과 다른 활성에 대한 향상된 효과를 제공할 수 있으며, 천연사람 EPO와 관련된 바람직하지 못한 생물학적 활성을 감소시키는 것을 포함하는 개선된 활성 프로파일을 갖을 수 있다. 상기 목록에 덧붙여, WO 94/12639 에 교시된 IL-3 변이체와 WO 95/21197에 개시된 WO 94/12638 용출 단백질, WO 97/12977에서 개시된 WO 95/21254 G-CSF 수용체 아고니스트, WO 97/12978에서 개시된 c-mpl 수용체 아고니스트, WO 97/12979 에서 개시된 IL-3 수용체 아고니스트 및 WO 97/12985 에 교시된 다기능 수용체 아고니스트는 본 발명의 폴리펩티드와 병용투여될 수 있다. 여기서 'IL-3 변형체'란 WO 94/12639 및 WO 94/12638 에서 교시된 IL-3 변형체를, '용출 단백질'은 WO 95/21197 및 WO 95/21254 에서 교시된 용출 단백질을, 'G-CSF 수용체 아고니스트'는 WO 97/12978에서 개시된 G-CSF 수용체 아고니스트를, 'c-mpl 수용체 아고니스트'는 WO 97/12978에서 개시된 c-mpl 수용체 아고니스트를, 'IL-3 수용체 아고니스트'는 WO 97/12979 에서 개시된 IL-3 수용체 아고니스트를, '다기능 수용체 아고니스트'는 WO 97/12985에서 개시된 다기능 수용체 아고니스트를 참조한다.

더욱이, 시험관내 사용은 팽창된 세포가 환자속으로 주입되기 전에 골수와 혈액세포 활성 및 성장을 자극하는 능력을 포함할 것으로 예상된다.

본 발명의 EPO 수용체 아고니스트의 사용은 혈액은행응용을 포함할 것으로 예상되고, 이는 EPO 수용체 아고니스트가 몇가지 의학적 과정전에 적혈구와 환자에게 부족한 혈액생산물 및 의학적 과정후 환자속으로 다시 주입된 또는 저장된 혈액생산물의 수를 증가시키는 특허에 주어진다. 부가적으로, EPO 수용체 아고니스트의 사용은 혈액기증 전에 EPO 수용체 아고니스트를 혈액 공여자에게 제공하여 적혈구의 수를 증가시킴으로써 공여자가 보다 많은 혈액을 안전하게 제공할 수 있도록 하는 것을 포함할 것으로 예상된다.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 단백질의 서열재배열을 계략적으로 예시한 것이다. 천연단백질의 N-말단(N)과 C-말단(C)을 링커를 통해, 또는 직접 결합시킨다. 이 단백질은 N-말단(새로운 N) 및 C-말단(새로운 C)을 생성하는 절단점에서 개방하여 새로운 선형 아미노산 서열을 갖는 단백질을 얻는다. 원래의 N-말단과 C-말단을 연결하는 단계 및 단백질을 절단점에서 개방하는 단계없이 처음부터 재배열 분자를 선형분자로서 새로이 합성할 수도 있다.

도 2는 천연단백질의 원래의 N-말단과 C-말단이 링커로 결합되고 단백질의 상이한 N-말단 및 C-말단이 생성된 새로운 단백질을 생성하는 방법I의 개략도를 나타낸다. 도시된 예에서 서열 재배열은 원래 단백질의 아미노산97에서 생성된 N-말단, 링커영역을 통해 아미노산 11(a.a.1-10은 결실됨)에 결합된 원래의 C-말단(a.a.174) 및 원래서열의 아미노산 96에 생성된 C-말단을 갖는 단백질을 암호화하는 새로운 유전자를 가져온다.

도 3은 천연단백질의 원래의 N-말단 및 C-말단이 링커없이 결합하고 단백질의 상이한 N-말단과 C-말단이 생성된 새로운 단백질을 생성하는 방법II의 개략도를 나타낸다. 도시된 예에서 서열 재배열은 원래 단백질의 아미노산97에서 생성된 N-말단, 원래의 N-말단과 결합된 원래의 C-말단(a.a. 174) 및 원래 서열의 아미노산96에서 생성된 C-말단을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 가져온다.

도 4는 천연단백질의 원래의 N-말단 및 C-말단이 링커로에 결합되고 단백질의 상이한 N-말단 및 C-말단이 생성된 새로운 단백질을 생성하는 방법III의 개략도를 나타낸다. 도시된 예에서 서열 재배열은 원래 단백질의 아미노산 97에서 생성된 N-말단, 링커 영역을 통해 아미노산1에 결합된 원래의 C-말단(a.a. 174) 및 원래 서열의 아미노산96에서 생성된 C-말단을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 가져온다.

도 5는 Lin 등(PNAS 82:7580-7584, 1985)의 서열에 기초한 사람의 성숙한 EPO를 암호화하는 DNA서열을 나타낸다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 수용체 아고니스트는 조혈시스템중 적혈구의 감소된 레벨을 특징으로 하는 질병의 치료에 있어 유용할 수 있다.

EPO 수용체 아고니스트는 빈혈의 억제와 치료에 유용할 수 있다. 많은 약품이 골수억제 또는 조혈결핍을 일으킬 수 있다. 그 약품의 예로는 화학요법에서 이용되는 AZT, DDI, 알킬화제 및 대사길항물질, 클로람페니콜, 페니실린, 강시클로버, 다우노마이신 및 설파제와 같은 항생제, 페니티아존, 메프로바이트와 같은 신경안정제, 아미노피린 및 디피론과 같은 진통제, 페니토인 또는 카바마제핀과 같은 항경련제, 프로필티오우라실 및 메티마졸같은 항갑상선제, 이노제이다. EPO 수용체 아고니스트는 이러한 약품으로 치료한 환자들에게서 종종 발생하는 골수억제 또는 조혈결핍을 예방하거나 치료하는데 유용할 수 있다.

조혈 결핍은 바이러스, 미생물 또는 기생충 감염의 결과로서 발생할 수 있고, 투석과 같은 신질환 및 신부전 치료의 결과로서 발생할 수 있다. 본 펩티드는 그러한 조혈 결핍을 치료하는 데 유용할 수 있다.

본 발명의 또 다른 일면은 이 신규 EPO 수용체 아고니스트의 발현법에서 사용되는 플라스미드 DNA 벡터를 제공하는 것이다. 이들 벡터들은 본 발명의 신규 폴리펩티드를 코드하는 상기 기재된 신규 DNA 서열을 포함한다. EPO 수용체 아고니스트를 발현가능한 숙주를 형질전환할 수 있는 적합한 벡터는 핵산서열로 이루어지는 발현 벡터를 포함하고 이 핵산은 사용된 숙주에 따라 선택되는 전사 및 번역 조절서열에 결합된 EPO 수용체 아고니스트를 코드한다. 상기 기재된 것과 같이 변형된 서열을 포함하는 벡터는 본 발명에 포함되고 변형된 EPO 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 생성하는 데 유용하다. 이 방법에서 사용된 벡터는 본 발명의 DNA 코드서열과 작동적으로 관련되고 선택된 숙주에서 그들의 복제와 발현을 지시할수 있는 선택된 조절서열을 또한 포함한다.

본 발명의 또 다른 일면으로는, EPO 수용체 아고니스트의 신규종을 생성하는 방법을 제공하는 데 있다. 본 발명의 방법은 적당한 세포 또는 세포계를 배양하는 것을 포함하며, 이들 세포는 신규 EPO 수용체 아고니스트 폴리펩티드의 발현을 코드하는 DNA서열을 갖는 벡터로 형질전환되었다. 적당한 세포 또는 세포

게는 E. coli, 효모, 포유동물세포와 같은 박테리아의 여러균주를 포함하고, 또는 곤충세포가 본 발명의 방법에서 숙주로서 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 일면은 방법 및 상기 참조된 조건을 실행하는 치료학적 조성물이다. 그러한 조성물들은 약학적으로 인정될 수 있는 담체와의 혼합물속에 EP0 수용체 아고니스트의 한가지 또는 그 이상의 치료학적으로 효과적인 양 만큼으로 이루어진다. 이 조성물은 비경구적으로, 정맥주사로, 또는 피하주사로 투여될 수 있다. 투여되었을 때 본 발명에서 사용되는 치료조성물은 발열성 없이 비경구적으로 인정될 수 있는 수용액 형태가 보다 바람직하며, pH, 등장도, 안정성등에서 적합성을 갖는 그러한 비경구적으로 이용가능한 그러한 단백질용액 제조는 당업자 기술내에 있다.

투여는 사람 에리트로포이에틴과 비교하여 유사체의 생체내 특이 활성을 기초로 하고, 신부전을 앓고있는 환자의 빈혈을 포함한 사람내부의 빈혈과 같이, 다양한 조건을 처리하고 에리트로포이시스를 유도하는 사람 에리트로포이에틴 투여에 대해 당업자에게 현재 공지된 것을 기초로 하여 전문가에 의해 정확히 확인될 복용량법과 관련되어야 할 것이다. 본 발명 유사체의 복용량은 특이 유사체와 그것의 생체내 특이 활성, 투여경로, 의학적 조건, 나이, 몸무게 또는 환자의 성별, 유사체 또는 매개물의 성분에 대한 환자의 민감정도 및 참가한 의사들이 고려할 수 있는 기타 인자에 의존하여 다소 개인마다 차이가 존재할 수 있다. 본 발명 유사물의 치료학적 용도와 관련하여, 미국 특허 Nos. 4,703,008 및 4,835,260 를 참고문헌으로 한다; Physicians's Desk의 페이지 591-595 에 (재조합) [des-Arg<sup>166</sup>] 사람 에리트로포이에틴에 관한 장을 또한 참조한다. 재조합 [des-Arg<sup>166</sup>] 사람 에리트로포이에틴의 상업적으로 이용가능한 제조법은 사람 혈청알부민 2.5 mg/mL, 시트르산 나트륨 5.8 mg/mL, 염화나트륨 5.8 mg/mL, 및 시트르산 0.06 mg/mL을 갖는 pH 6.9(+/-0.3)의 무방부제 수용액 mL당 2,000, 3,000, 4,000 또는 10,000 단위의 당호르몬을 갖는다.

재조합적으로 생성된 EP0는 손상된 적혈구 생산성을 앓고 있는 환자들을 치료하는데 특히 유용한것으로 증명되었다(Physicians Desk Reference(PDR), 1993 판, 페이지 602-605). 재조합 EP0는 고질적 신부전과 관련된 빈혈을 치료하고 지도부딘(AZT)치료와 관련된 낮은 내인성 EP0 레벨을 갖는 HIV 감염 환자들을 치료하는데 효과적인 것으로 증명되었다(PDR, 1993 판 페이지 6002 참조).

혈액장애를 진단 또는 치료하는 수단으로서 그 유용성을 개선시킬 EP0 단백질의 변형은 확실히 이상적이다. 특히, 향상된 생물학적 활성을 나타내는 EP0의 변형된 형태는 환자에게 EP0를 투여해야 할때, 치료적 환경면에서 천연 EP0 보다 효과적이고 효율적이며 적은 빈도로 및/또는 낮은 복용량으로 투여가능하다. 감량된 EP0를 투여하면 고혈압, 경련, 두통등과 같은 EP0 투여관련성 부작용의 위험을 가정적으로 또한 줄일 수 있을 것이다. (PDR, 1993판, 페이지 603-604 참조). 본 발명의 EP0 수용체 아고니스트는 또한 개선된 안정성을 갖을 것이며 그러므로 세균성 발현계에서 훨씬 낮은 가격으로 비글리코실화 EP0형 생성을 허용하는 반주기를 갖을 수 있다. 이러한 증가로 인하여 비글리코실화 EP0형은 탈글리코실화 EP0와 비교하여 증가된 생체내 활성을 갖을 수 있을 것이다.

치료법과 조성물은 다른 조혈인자와 병용투여를 또한 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드와 동시의 또는 연속적인 병용투여용 조혈세포, 콜로니 자극인자(CSFs) 및 인터루킨의 비제한적 목록은 GM-CSF, G-CSF, c-mpl 리간드(또한 TP0 또는 MGDF로 알려짐), M-CSF, IL-1, IL-4, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, LIF, 사람성장호르몬, B-세포성장인자, B-세포분화인자, 호에오신 분화인자 및 철인자 또는 c-kit 리간드(여기선 모두 '인자'로써 참조)로 또한 알려진 간세포인자(SCF) 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기 목록외에도, WO 94/12639 에서 교시된 IL-3 변이체와 WO 95/21197 에서 교시된 WO 94/12638 용출 단백질, WO 97/12977에서 개시된 WO 95/21254 G-CSF 수용체 아고니스트, WO 97/12978에서 개시된 c-mpl 수용체 아고니스트, WO 97/12979 에서 개시된 IL-3 수용체 아고니스트 및 WO 97/12985 에서 교시된 다기능 수용체 아고니스트는 본 발명의 폴리펩티드와 병용투여할 수 있다.

본 발명의 EP0 수용체 아고니스트는 말초혈에서 조혈선구체 및 간세포의 가동화에 유용할 수 있다. 선구체로부터 유도된 말초혈은 자가골수이식을 셋팅하는 데 있어 환자를 회복시키는데 효과적인 것으로 나타났다.

본 발명의 EP0 수용체 아고니스트는 생체외 조혈선구체의 확장에 또한 유용할 수 있다. G-CSF와 같은 콜로니 자극인자는 단독 투여되어왔고, 다른 CSFs와 병용투여되어 왔고, 자주 그러한 치료 결과가 되는 빈혈, 호중구 감소, 혈소판감소증을 치료하기 위한 다량복용 화학요법이후 골수이식과 함께 투여되어 왔다.

본 발명의 또 다른 면은 본 발명의 EP0 수용체 아고니스트를 보충했던 HS-5(WO 96/02662, Roecklein 및 Torok-Strob, Blood 85:997-1105, 1995)와 같은 간질세포계에 노출되는 조건의 배지를 포함하는 배양용기속으로 조혈전구물질세포를 접종하는 것을 포함하는 지속법 및/또는 팽창법을 제공한다.

#### 링커의 결정

링커의 아미노산 서열 길이는 실험적으로 또는 구조정보를 지침으로, 또는 두가지 접근법을 조합하여 선택할 수 있다. 어떤 구조정보도 이용가능하지 않을때는, 작은 일련의 링커를 그 길이가 0 ~ 50 Å 범위에 걸쳐 변화하며, 그 서열을 표면노출부분과 일치하도록 선택하고(친수성, Hopp & Woods, Mol. Immunol. 20:483-489, 1983; Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132, 1982; 표면에 노출된 용매, Lee & Richard, J. Mol. Biol. 55:379-400, 1971) EP0 수용체 아고니스트의 배치의 교란없이 필요한 콘포메이션을 채택할 수 있는 능력을 갖춘 디자인을 이용하여 시험용으로 제조할 수 있다. 잔기당 해독평균 2.0 ~ 3.8 Å를 가정하면, 이것은 시험길이가 0 ~ 30 사이의 잔기를 의미할 것이며, 보다 바람직한 범위는 0 ~ 15이다. 이러한 일련의 실험적 예는 n번(단, n은 1,2,3 또는 4이다)반복되는 Gly-Gly-Gly-Ser와 같은 카세트 서열을 이용하여 링커를 구성하게 될 것이다. 당업자는 길이 및 조성면에서 다양하고 지나치게 길지도 짧지도 않는 것을 일차적 고려사항을 갖는 링커로서 제공될 수 있는 그러한 서열이 다수 존재한다는 것을 인식할 것이다. (cf., Sandhu, Critical Rev. Biotech. 12:437-462, 1992) 만약, 길이가 너무 길 경우, 엔트로피 영향이 3차원 폴드를 불안정화할 것이며, 너무 짧을 경우, 엔트로피 영향이 비틀림 또는 입체장력때문에 분자를 불안정화할 것이다.



단백질 구조정보를 분석하는 업자들은  $\alpha$ -알파 탄소사이의 거리로 정의된 사슬말단 사이 거리를 사용하는 것은 사용되는 서열의 길이를 정의하는 데, 또는 적어도 링커의 실험적 선택에 있어 반드시 테스트되어야 할 가능성의 수를 제한하는데 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 그들은 또한 폴리펩티드 체인의 말단의 위치가 x-선회절 또는 핵자기공명 스펙트로스코피 자료로부터 유래된 구조모델에서 불명확한 경우가 가끔 있음을 인정할 것이며, 이것이 사실일때는 요구되는 링커의 길이를 정확히 측정하기위해 이러한 상황을 고려할 필요가 있을 것이다. 위치가 명확한 잔기들로부터 서열상 사슬말단에 가까운 두 가지 잔기를 선택하고,  $\alpha$ -알파 탄소사이의 거리를 그들 사이의 링커의 대략길이를 계산하는데 이용한다. 계산된 길이를 지침으로서 사용하여, 잔기 수(잔기당 2 ~ 3.8Å를 이용해 계산된)의 범위를 갖는 링커를 그 후 선택한다. 이러한 링커들은 필요에 의해 축소되거나 확장된 원래의 서열로 구성될 수 있고, 확장된 것의 경우, 추가 잔기는 상기 기재된 것과 같이 가동성의 친수성인 것으로 선택될 수 있다; 또는 임의로 원래의 서열은 상기 언급된 'Gly-Gly-Gly-Ser' 카세트 접근을 하나의 예로서 일련의 링커를 사용하여 치환될 수 있다; 또는 임의로 적당한 총길이를 갖고 있는 원래의 서열과 새로운 서열의 조합을 사용할 수 있다.

#### EP0 수용체 아고니스트의 아미노 및 카르복실 말단의 결정

생물학적 활성상태로 폴딩할 수 있는 EP0 수용체 아고니스트의 서열은 상기 언급된 링커서열을 이용하는 동안 원래의 폴리펩티드 사슬내부로부터 시작(아미노 말단)과 말단(카르복실 말단)을 적절히 선택함으로써 제조할 수 있다. 아미노 및 카르복실 말단은 서열의 통상 스트레치 내부로부터 선택하고, 하기 기재된 지침을 이용하여 절단점 영역으로서 참고한다. 신규 아미노산 서열은 그러므로 동일한 절단점 영역 내부로부터 아미노 및 카르복실 말단을 선택함으로써 초래된다. 많은 경우에 있어 새로운 말단의 선택은 원래의 카르복실 말단의 위치가 아미노 말단의 위치보다 바로 앞선것과 같이 되어야 할 것이다. 그러나 담당자는 그 영역 내 어느 곳의 말단 선택도 가능할 수 있고 이것은 새로운 서열의 아미노 또는 카르복실의 부분에 부가 또는 결실을 효과적으로 가져올 것을 인식할 것이다.

단백질의 1차 아미노산 구조가 생물학적 기능 발현에 필요한 3차구조의 폴딩을 규정한다는 것이 분자생물학의 중심되는 개념이다. 단일단백질 결정의 x-선 회절 또는 단백질 용액의 핵자기공명 스펙트로스코피를 이용하여 3차구조정보를 얻고 해석하는 방법이 당업자에게 알려진다. 절단점 영역의 동일성에 부합되는 구조정보의 예는 위치, 단백질 2차구조형태(알파 및 3-10 헬릭스, 평행 및 반평행 베타 시트, 사슬역전 및 턴, 루프; Kabsch & Sander, Biopolymers 22: 2577-2637, 1983; 아미노산 잔기의 용매 노출정도, 서로간의 잔기 상호작용의 정도 및 형태 (Chothia, Ann.Rev. Biochem. 53: 537-572; 1984) 그리고 폴리펩티드 사슬을 따라 콘포메이션의 정적 및 동적 분배(Alber & Mathews, Methods Enzymol. 154:511-533, 1987)등을 포함한다. 몇 가지 경우에 있어 잔기의 용매노출에 대한 부가적 정보가 알려진다; 한 예로 단백질 표면에 필수적으로 존재하는 탄수화물의 후 해독 부착위치이다. 실험적 구조정보가 이용 가능하지 않을 때, 또는 얻을 수 없을 때, 1차 아미노산 서열을 단백질 3차 및 2차 구조, 용매접촉성, 턴 및 루프의 발생을 예측하기 위해 분석하는 방법 또한 이용가능하다. 생화학적 방법은 직접적 구조방법을 이용할 수 없을 때 표면 노출을 실험적으로 결정하기 위해 가끔 또한 적용할 수 있다; 예를 들어, 표면 노출 정도를 추정하기 위해 제한된 단백질 가수분해 이후 사슬절단자리의 동일성을 이용하는 것이다(Gentile & Salvatore, Eur. J. Biochem. 218:603-621, 1993)

그러므로 실험적으로 유래된 구조정보를 이용하거나 또는 예측방법 (e.g., Srinivisan & Rose protein: Struct., Funct. & Genetics, 22: 81-99, 1995)을 이용하여 부모 아미노산 서열을 영역이 2차 및 3차 구조의 지명에 필수적인지 아닌지에 따라 영역을 분류하기 위해 조사한다. 주기적 2차구조(알파 및 3-10 헬릭스, 평행 및 반평행 베타 시트)와 관련된 것으로 알려진 영역 내 서열의 발생은 피해야 할 영역이다. 유사하게, 낮은 용매 노출정도를 갖는것으로 관찰되었거나 예측된 아미노산 서열의 영역은 단백질의 일명 소수성 핵의 일부일 것 같고 아미노 및 카르복실 말단을 선택할 경우 또한 피해야만 한다. 반대로, 표면 또는 루프에 있다고 알려진 또는 예상되는 영역, 특히 생물학적 활성을 위해 요구되지 않는 것으로 알려진 영역은 폴리펩티드 사슬의 극한위치로서 보다 선호되는 자리이다. 상기 기준을 기준하여 선호되는 아미노산 서열의 계속적인 스트레치는 절단점 영역으로서 적용한다.

#### 재료 및 방법

##### 제조할 DNA 방법

모든 전문 화학제품은 다르게 명시되지 않으면 Sigma Co., (St. Louis, MO)

로부터 얻었다. 제한핵산내부분해효소 및 T4 DNA 리가아제는 New England Biolabs(Beverly, MA) 또는 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)로부터 얻었다.

#### E.coli 균주의 형질전환

DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 및 TG1(Amersham Corp., Arlington Heights, IL)과 같은 E.coli 균주를 라이게이션반응의 형질전환용으로 이용하고, 포유동물세포의 형질감염용 플라스미드 DNA의 근원이 된다.

MON105 및 JM101 과 같은 E.coli 균주는 세포질 또는 주변세포질에서 본 발명의 EP0 수용체 아고니스트로서 사용할 수 있다.

MON105 ATCC#55204 : F<sup>-</sup>, lamda<sup>-</sup>, IN(rrnD, rrE)1, rpoD<sup>+</sup>, rpoH358

DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> : F<sup>-</sup>, phi80dlacZdeltaM15, delta(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), phoA, supE44lamda-thi-1, gyrA96, relA1

TG1: delta(lac-pro), supE, thi-1, hsdD5/F<sup>-</sup>(traD36, proA+B<sup>+</sup>, lacIq, lacZdeltaM15)

DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> 서브클로닝 효율세포를 콤피턴트세포로 구입하고 제조자의 프로토콜을 사용해 형질전환용으로 준비하는 반면, E.coli 균주 TG1 및 MON105는 염화칼슘 방법을 이용하여 DNA를 흡수하는데 적합하다. 전형

적으로 세포 20~50mL를 LB배지(1% 박토-트립톤, 0.5% 박토-효모 추출물, 150 mM 염화나트륨)에서 Baugh & Lomb 스펙트로닉 스펙트로포토미터 (Rochester, NY)로 측정된 것과 같이 600나노미터(OD 600)에서 약 1.0 옵티컬 밀도단위의 밀도까지 성장시킨다. 이러한 세포를 원심분리로 회수하고, 염화칼슘 용액(50mM  $\text{CaCl}_2$ , 10mM Tris-Cl, pH7.4) 1/5 배양부피에서 재현탁시키고 30분간 4°C에서 정치한다. 다시 세포를 원심분리로 회수하여  $\text{CaCl}_2$ 용액 1/10 배양부피에서 재현탁시킨다. 접합된 DNA를 이러한 세포 0.2mL에 넣고, 그 샘플을 4°C온도에서 1시간동안 정치시킨 후, 42°C온도로 옮겨 2분간 가열하고, 한시간 동안 37°C에서 교반하기 전에 LB 1mL를 넣어준다. 이러한 샘플로부터 세포를, 암피실린 내성 형질전환체를 선택할 경우 암피실린(100 마이크로그램/mL, ug/mL), 또는 스펙티노마이신 내성 형질전환체를 선택할 경우 스펙티노마이신(75ug/mL)을 함유한 플레이트(LB 배지 + 1.5% 박토-아가)위에 깔고, 그 플레이트를 37°C온도에서 하룻밤 인큐베이션 시킨다. 단일 콜로니를 골라내어 적합한 항생물질을 첨가한 LB에서 37°C온도로 6-16시간 동안 교반하면서 성장시킨다. 균락을 골라내어 LB + 적합한 항생물질(100ug/mL 암피실린 또는 75ug/mL 스펙티노마이신)을 주입하고 37°C온도로 교반동안 성장시킨다. 배양물을 수확하기 전에, 세포 1uL를 EPO 수용체 아고니스트 유전자의 존재성을 위해 PCR로 분석한다. PCR을 EPO 수용체 아고니스트 및/또는 벡터에 어닐링한 프라이머의 조합을 이용하여 수행한다. PCR이 끝난 후에, 부하염색약을 샘플에 넣고 앞서 기재한대로 전기영동시킨다. 예상되는 크기의 PCR 생산물이 관찰되면 유전자는 벡터에 접합된 것이다.

새로운 N-말단/C-말단을 갖는 유전자 생성방법

방법 I. 링커 영역을 포함하는 N-말단/C-말단을 갖는 유전자의 생성

원래 C-말단과 N-말단을 분리하는 링커영역을 포함하는 새로운 N-말단/C-말단을 갖는 유전자는 필수적으로 L.S.Mullins, et al J. Am. Chem. Soc. 116, 5529-5533(1994)에 기술된 다음의 방법에 의해 합성할 수 있다. 중합체연속반응(PCR) 증폭의 다양한 단계들은 단백질의 1차 아미노산 서열을 암호화하는 DNA서열을 재배열하는데 사용된다. 그러한 단계는 도2에 도식된다.

1차 단계에서, 프라이머 세트('새로운 스타트' 및 '링커스타트')는 새로운 단백질의 새로운 N-말단부분을 암호화하는 서열 다음에 원래 단백질의 C-말단 및 N-말단 끝을 연결하는 링커를 포함하는 DNA 단편('단편스타트')을 원래의 유전자 서열로부터 생성하고 증폭시키는데 이용한다. 2차 단계에서, 프라이머 세트('새로운 스톱' 및 '링커스톱')는 상기 사용된 것과 동일한 링커를 암호화하는 DNA 단편을 원래의 유전자 서열로부터 합성하고 증폭시키는데 사용되고 그 다음에 새로운 단백질의 새로운 C-말단부분이 온다. '새로운 스타트' 과 '새로운 스톱' 프라이머는 새로운 유전자를 발현 플라스미드속으로 클로닝하도록 허용하는 적당한 제한효소인식부위를 포함하도록 설계한다. 전형적인 PCR조건은 2분간 95°C용융 1주기, 1분간 94°C변성, 1분간 50°C 어닐링, 1분간 72°C 연장 25주기, 덧붙여 7분간 72°C 연장 1주기이다. Perkin Elmer GeneAmp PCR Core Reagents 키트를 사용한다. 100uL의 반응물은 각 프라이머 100피코몰과 주형 DNA 1ug; 1x PCR 완충액, 200uM dGTP, 200uM dATP, 200uM dTTP, 200uM dCTP, 2.5단위의 AmpliTaq DNA 폴리머라제 및 2mM  $\text{MgCl}_2$ 를 포함한다. PCR 반응은 Model 480 DNA 열사이클러(Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT)에서 실시한다.

링커영역에 상보적 서열을 갖고 링커 양끝에 두개의 아미노산 코딩 서열을 갖는 '단편스타트' 과 '단편스톱'는 새로운 단백질을 암호화하는 완전한 길이의 유전자 생성을 위한 세번째 PCR 단계에서 함께 결합한다. DNA 단편 '단편스타트' 및 '단편스톱'는 1% TAE 겔 위에서 분해되고, 에티디움 브로마이드로 염색되며 Qiaex 겔 추출 키트(Qiagen)를 사용해 분리된다. 이들 단편은 동일한 몰량으로 결합하고, 70°C 온도로 10분간 가열되고 '링커스타트' 및 '링커스톱'에 공통의 서열을 통해 어닐링되도록 서서히 냉각된다. 세번째 PCR 단계에서, 프라이머 '새로운 스타트' 및 '새로운 스톱'는 완전한 길이의 새 N-말단/C-말단을 생성 및 증폭시키기 위해 어닐링된 단편에 첨가한다. 전형적인 PCR조건은 2분간 95°C용융 1주기, 1분간 94°C변성, 1분간 60°C 어닐링, 1분간 72°C 연장의 25주기, 덧붙여 7분간 72°C 연장 1주기이다. Perkin Elmer GeneAmp PCR Core Reagents 키트를 사용한다. 100uL의 반응물은 각 프라이머 100몰과 주형 DNA 1ug; 1x PCR 완충액, 200uM dGTP, 200uM dATP, 200uM dTTP, 200uM dCTP, 2.5단위의 AmpliTaq DNA 폴리머라제 및 2mM  $\text{MgCl}_2$ 를 포함한다. PCR 반응물은 Wizard PCR Preps 키트(Promega)를 사용하여 정제한다.

방법 II. 링커영역없이 새 N-말단/C-말단을 갖는 유전자의 생성

링커 없이 원래의 N-말단 및 C-말단에 결합하는 새로운 N-말단/C-말단 유전자는 PCR증폭 및 불란트말단 라이게이션의 두 단계를 이용하여 생성할 수 있다. 이 단계는 도3에 도시된다. 1차 단계에서, 프라이머 세트('새로운 스타트' 및 'P-bi 스타트')는 새로운 단백질의 N-말단부분을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 단편('단편스타트')을 원래 유전자 서열로부터 생성 및 증폭하는 데 사용된다. 2차 단계에서, 프라이머 세트('새로운 스톱' 및 'P-bi 스톱')는 새로운 단백질의 C-말단부분을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 단편('단편스톱')을 원래 유전자 서열로부터 생성 및 증폭하는 데 사용된다. '새로운 스타트' 및 '새로운 스톱' 프라이머는 새로운 유전자를 발현 벡터속으로 클로닝하도록 허용하는 적당한 제한부위를 포함하도록 설계한다. 전형적인 PCR조건은 2분간 95°C용융 1주기, 1분간 94°C 변성, 45초간 50°C 어닐링, 45초간 72°C 연장의 25주기이다. Deep Vent 폴리머라제(New England Biolabs)는 제조자에 의해 추천된 조건에서 오버행 발생을 감소시키는데 사용된다. 'P-bi 스타트' 및 'P-bi 스톱' 프라이머는 '단편스타트' 및 '단편스톱'의 연속적인 불란트말단 라이게이션을 서로 보조하기 위해 5'말단에서 인산화된다. 100uL의 반응물은 각 프라이머 150피코몰과 주형 DNA 1ug; 1x Vent 완충액(New England Biolabs), 300 uM dGTP, 300 uM dATP, 300 uM dTTP, 300 uM dCTP, 및 1 단위 Deep Vent 폴리머라제를 포함하였다. PCR 반응은 Model 480 DNA 열 사이클러 (Perkin Elmer Corporation Norwalk, CT.)에서 실행한다. PCR 반응생산물들은 Wizard PCR Preps kit (Promega)를 사용하여 정제된다.

프라이머는 새로운 유전자를 발현 벡터속으로 클로닝하도록 허용하는 적당한 제한효소인식부위를 포함하도록 설계한다. 전형적으로 '단편스타트'은 NcoI 제한부위를 생성하도록, '단편스톱'는 HindIII 제한부위를 생성하도록 설계한다. 제한분해반응은 Magic DNA Clean-up System 키트(Promega)를 이용하여 정제한다. 단편스타트와 스톱을 1% TAE 겔 위에서 분해하고, 에티디움 브로마이드로 염색하고 Qiaex 겔 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 분리한다. 이들 단편은 결합하여 10분간 50°C 온도로 가열함으로써 pMON3934의 ~3800염기쌍 NcoI/HindIII 벡터 단편 말단 끝에 어닐링되고 서서히 냉각되도록 한다. 세 단편들을 T4 DNA

리가아제(Boehringer Mannheim)를 이용하여 함께 라이게이션시킨다. 그 결과는 완전한 길이의 새로운 N-말단/C-말단 유전자를 갖는 플라스미드이다. 라이게이션반응의 일부는 E.coli 균주 DH5 $\alpha$  세포를 형질전환 하는데 이용된다(Life Technology, Gaithersburg, MD). 하기와 같이 플라스미드 DNA를 정제하고 서열을 아래와 같이 확인한다.

### 방법 III. 탠덤식중복법에 의한 새로운 N-말단/C-말단 유전자의 생성

새 N-말단/C-말단 유전자는 R. A. Horlick, et al Protein Eng. 5:427-431(1992)에 기재된 방법을 기초로 합성할 수 있다. 새 N-말단/C-말단 유전자의 중합체연속반응(PCR) 증폭은 탠덤식중복된 주형 DNA를 이용하여 실행한다. 그 공정은 도4에 도시된다.

탠덤식중복된 주형 DNA는 클로닝에 의해 생성되고 두 유전자 복제물의 원래 C-및 N-말단 끝을 연결하는 링커를 암호화하는 DNA서열에 의해 분리된 두 유전자 복제물을 포함한다. 특별한 프라이머 세트는 탠덤식중복된 주형 DNA로부터 완전한 길이의 새로운 N-말단/C-말단을 생성 및 증폭시키는데 이용된다. 이들 프라이머는 새로운 유전자를 발현 벡터속으로 클로닝하도록 하는 적당한 제한부위를 포함하도록 설계한다. 전형적인 PCR 조건은 2분간 95 $^{\circ}$ C 용융 1주기, 1분간 94 $^{\circ}$ C 변성, 1분간 50 $^{\circ}$ C 어닐링, 1분간 72 $^{\circ}$ C 연장의 25 주기, 덧붙여 7분간 72 $^{\circ}$ C 연장 1주기이다. Perkin Elmer GeneAmp PCR Core Reagents 키트(Perkin Elmer 사제, Norwalk, CT)를 사용한다. 100 $\mu$ l 반응물은 각 프라이머 100피코몰 및 주형 DNA 1 $\mu$ g; 1x PCR 완충액, 200 $\mu$ M dGTP, 200 $\mu$ M dATP, 200 $\mu$ M dTTP, 200 $\mu$ M dCTP, 2.5단위 AmpliTaq DNA 폴리머라제 및 2mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한다. PCR 반응은 Model 480 DNA 열 사이클러(Perkin Elmer 사제, Norwalk, CT)에서 실행한다. PCR 반응물은 Wizard PCR Preps 키트(Promega)를 사용하여 정제한다.

### DNA 분리 및 특성화

플라스미드 DNA는 수많은 다른 방법 및 당업자에게 알려진 상업적 이용가능한 키트를 사용하여 분리될 수 있다. 그러한 방법 몇 가지가 여기에 나타난다. 플라스미드 DNA를 Promega Wizard<sup>TM</sup> Miniprep 키트(Madison, WI), Qiagen QIAwell Plasmid 분리 키트(Chatsworth, CA) 또는 Qiagen Plasmid Midi 키트를 사용하여 분리한다. 이들 키트는 플라스미드 DNA 분리를 위해 동일한 일반적 과정을 따른다. 요약해서, 세포를 원심분리(5000  $\times$  g)에 의해 펠렛화 하고, 플라스미드 DNA를 연속적 NaOH/acid 처리로 배출하고, 세포 찌꺼기는 원심분리(10000  $\times$  g)에 의해 제거한다. 상청액(플라스미드 DNA를 포함하는)을 DNA 결합수지를 포함하는 컬럼에 부하하고, 컬럼을 씻은 후, 플라스미드 DNA는 TE로 추출한다. 콜로니를 관심의 플라스미드로 스크린한 후, E.coli 세포를 교반동안 공기 인큐베이터에 37 $^{\circ}$ C 온도에서 하룻밤 성장을 위해 적당한 항생물질을 더한 LB 50-100mL 속으로 접종시킨다. 정제된 플라스미드 DNA는 DNA 시퀀싱, 제한효소분해, DNA 단편의 부가적 서브클로닝 및 포유동물, E.coli, 또는 다른 세포속으로 형질감염 용도로 사용한다.

### 서열 확인

정제된 플라스미드 DNA를 dH<sub>2</sub>O에서 재현탁하고 Bausch 및 Lomb Spectronic 601 UV 스펙트로미터의 흡광도 260/280nm에서 측정함으로써 정량한다. DNA 샘플은 화학 (Biosystems Division of Perkin Elmer사, Lincoln, CA 에서 제조된)키트(Part Number 401388 또는 402078)를 서열결정하는 ABI PRISM<sup>TM</sup> DyeDeoxy<sup>TM</sup> 터미네이터를 사용하여 시퀀싱 혼합물에 5% DMSO를 첨가함으로써 통상 변경된 제조자가 제안하는 프로토콜에 따라 서열결정된다. 서열결정반응은 추천된 증폭조건에 따라 Model 480 DNA 열사이클러(Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT)에서 실행한다. 샘플을 과잉염료터미네이터를 제거하기 위해 Centri-Sep<sup>TM</sup> 스펀컬럼에서 정제하고 동결건조시킨다. 형광성 염료로 표시된 서열결정반응물을 탈이온화 포름아미드에서 재현탁하고, ABI Model 373A 자동화 DNA 시퀀서를 사용해 변성 4.75% 폴리아크릴아미드-8M 요소겔에서 서열결정한다. 오버랩 DNA 서열단편은 Sequencer v2.1 DNA 분석 소프트웨어(Gene Codes 사, Ann Arbor, MI)를 사용해 분석하고 마스터 DNA 컨티그로 조립한다.

### 포유동물 세포에서 EPO 수용체 아고니스트의 발현

#### 조건된 배지에서 포유동물 세포 형질감염/제조

BHK-21 세포계는 ATCC(Rockville, MD)로부터 얻을 수 있다. 세포를 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM/고-글루코스)에서 배양하고, 2mM (mM) L-글루타민 및 10% 우태아혈청(FBS)으로 보충한다. 이러한 설정을 BHK 성장배지라고 명명한다. 선택적 배지는 453 단위/mL 히그로마이신 B(Calbiochem, San Diego, CA)로 보충된 BHK성장배지이다. BHK-21 세포계는 앞서 HSV 전환활성시키는 단백질 VP16로 안전하게 형질감염되었고, 이 단백질은 플라스미드 pMON3359 (Hippe-nmeyer et al., Bio/Technology, pp.1037-1041, 1993 참조)에서 발견되는 IE10프로모터를 전환활성화시킨다. 단백질 VP16은 IE110 프로모터 뒤에 삽입된 유전자를 발현시키고, 단백질 VP16 을 전환활성을 발현하는 BHK-21세포는 BHK-WP16으로 명명한다. 플라스미드 pMON1118(Highkin et al., Poultry Sci., 70: 970-981, 1991 참조)는 SV40 프로모터로부터 히그로마이신 저항유전자를 발현한다. 유사한 플라스미드로는 ATCC, pSV2-hph 가 이용가능하다.

BHK-WP16 세포를 형질감염 24시간 전에 접시당  $3 \times 10^5$  세포에서 60밀리미터 (mm)조직배양접시에 파종한다. 세포는 접시당 관심의 유전자,히그로마이신 저항 플라스미드 3 $\mu$ g, pMON1118, 및 Gibco-BRL

'LIPOFECTAMINE'<sup>TM</sup> 80 $\mu$ g을 포함하는 플라스미드 DNA 10 $\mu$ g 를 포함하는 'OPTIMEM'<sup>TM</sup> (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) 3mL에 16시간동안 형질감염시킨다. 배지는 연속적으로 흡인되고 성장배지 3mL로 대체된다. 형질감염 48시간 이후, 각 접시로부터 배지를 회수하고 활성을 검정한다(일시적 조건의 배지). 트립신-EDTA로 세포를 접시로부터 제거하고, 1:10으로 희석하고 선택배지 10mL를 포함하는 100mm 조직배양 접시로 이동시킨다. 선택배지에서 약 7일 후, 저항세포들은 지름상 여러 밀리미터의 콜로니로 성장한다. 콜로니를 필터 페이퍼(콜로니와 대략 동일한 크기로 자른 후 트립신/EDTA에 담근)로 접시로부터 제거하고 선택배지 1mL를 함유하는 24 웰 플레이트의 각 웰로 이동시킨다. 클론들이 자라서 합류된 후, 조건배지를 재검정하고, 양성클론들을 성장배지로 확장시킨다.

## E.coli에서 EPO 수용체 아고니스트의 발현

관심의 플라스미드를 보호하는 E.coli균주 MON105 또는 JM101을 New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey)사제의 Model G25 공기 인큐베이터에 교반하면서 M9 + 카사미노산 배지에서 37°C로 성장시킨다. 성장은 0.1N NaOH에 나리딕스산(10밀리그램/mL)을 첨가하여 최종농도 50ug/mL가 되는 시간에, 성장수치 1이 될때까지 OD600에서 모니터링한다. 배양을 37°C 온도로 3~4 추가시간동안 교반시킨다. 높은 정도의 통기가 목적하는 유전자 생산물의 최대량을 얻기위해 배양기간 내내 유지되며, 세포들을 봉입체(IB)의 존재성 여부를 위해 라이트 마이크로스코프아래 조사한다. 배양의 분취량1mL를 단백질함량 분석을 위해 펠릿화된 세포를 끓이고, SDS-PAGE(Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982 참조)를 통해 환원용 완충액 및 전기영동으로 처리함으로써 제거하고, 배양을 원심분리(5000×g)하여 세포를 펠릿화 한다.

E.coli유전자의 하이-레벨 발현을 달성하기 위한 부가적 전략은 Savvas, C.M. (Microbiological Reviews 60: 512-538, 1996)에서 찾을 수 있다.

봉입체 제조, 추출, 재폴딩, 투석, DEAE 크로마토그래피 및 E.coli에서 봉입체로 축적되는 EPO 수용체 아고니스트의 특성

### 봉입체의 분리:

330mL E. coli 배양로부터 얻은 세포펠릿을 pH 8.0의 음파처리완충액(10mM 2-아미노-2-(히드록시메틸)1,3-프로판디올 히드로클로라이드(Tris-염산) + 1mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA))15mL에서 재현탁한다. 이들 재현탁된 세포를 Sonicator Cell Disruptor (Model W-375, Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Farmingdale, New York) 마이크로팁 프로브를 사용하여 음파처리한다. 원심분리 후 음파처리완충액에서 음파처리 3회 후 원심분리는 세포를 파열시키고 봉입체(IB)를 세척하는 데 이용한다. 음파처리 첫회는 1분 파괴 후 3분 파괴이고, 음파처리 마지막 2회는 각각 1분이다.

### 봉입체 펠릿으로부터 단백질의 추출 및 재폴딩:

마지막 원심분리 단계 후, IB펠릿은 pH 9.5의 50mM Tris-염산 10mL, 8M 요소 및 5mM 다이티오테이올(DDT)에서 재현탁되고, 발현된 단백질의 변성이 가능하도록 실온에서 약 45분간 저어준다.

추출용액을 pH 9.5의 5mM Tris-염산 70mL 및 2.3M 요소를 포함한 비커에 옮겨 단백질 재폴딩이 가능하도록 4°C온도에서 18~48시간동안 공기에 노출시키는동안 부드럽게 저어준다. 재폴딩은 Vydac(Hesperia, Ca.) C18 역상 고압 액체크로마토그래피(RP-HPLC)컬럼(0.46×25 cm)상의 분석으로 모니터링한다. 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유한 40~60% 아세토니트릴의 선형구배를 재폴딩을 모니터 하기위해 이용한다. 이 선형구배는 분당 1.5mL 유출속도로 30분이상 나타난다. 변성된 단백질은 통상 재폴딩 단백질보다 구배에서 나중에 추출된다.

### 정제:

재폴딩 후에 오염된 E.coli 단백질을 산침전에 의해 제거한다. 재폴딩 용액의 pH는 아세트산(HOAc) 15%(v/v)를 사용해 5.0~5.2 사이로 적정하고, 이 용액을 4°C온도로 2시간동안 저어준 후 어떤 불용성 단백질도 펠릿화하기 위해 12000×g으로 20분간 원심분리한다.

산침전 단계에서 얻어진 상청액을 3500달톤의 분자량 컷 오프(MWCO)를 갖는 Spectra/Por 3 멤브레인을 이용해 투석한다. 투석은 총 18시간동안 pH 8.0, 10mM Tris-염산 4리터를 2번 바꾼 것에 대한 것이며, 샘플의 전도성을 낮추고 DEAE 크로마토그래피 전에 요소를 제거한다. 샘플은 어떤 불용성 단백질도 펠릿화하기 위해 투석다음 원심분리한다(12,000×g에서 20분).

Bio-Rad Bio-Scale DEAE2 컬럼(7×52mm)을 이온 교환 크로마토그래피용으로 사용한다. 컬럼은 pH 8.0의 10mM Tris-염산을 포함한 완충액에서 평형되고, 단백질을 평형완충액에서 0~500mM 염화나트륨(NaCl)구배를 사용해 컬럼부피 45이상으로 추출한다. 실행 내내 분당 1mL의 유출속도를 사용한다. 컬럼 프랙션(프랙션당 2mL)을 구배 가로질러 회수하고, Vydac(Hesperia, Ca.) C18컬럼(0.46×25 cm)상의 RP HPLC에 의해 분석한다. 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함한 40~65% 아세토니트릴의 선형구배를 이용한다. 이 구배는 분당 유출속도 1.5mL로 30분 넘게 나타난다. 모아진 프랙션을 그 후, 총 18시간동안 pH 4.0의 10mM 암모늄 아세테이트(NH<sub>4</sub>Ac) 4리터를 2번 바꾼 것에 대해 투석하고, 3,500달톤의 분자량 컷 오프를 갖는 Spectra/Por 3 멤브레인을 이용하여 실행한다. 마지막으로, 샘플을 시린지 필터(μStar LB 시린지 필터, Costar, Cambridge, Ma.)를 사용해 무균여과하고, 4°C로 보존한다.

몇몇 경우에 있어 폴드 단백질은 적합한 매트릭스에 부착된 mAbs 또는 수용체 서브단위와 같은 친화제를 사용해 정제된 친화성이 될 수 있다. 양자택일로(또는 부가적으로) 정제를 이온교환, 겔 여과 또는 소수성 크로마토그래피 또는 역상 HPLC와 같은 다양한 크로마토그래피 방법 중 어느 것을 사용해 실행할 수 있다.

이들 및 다른 단백질 정제법은 캘리포니아 산디에고, 아카데미 출판, Murray Deutscher에 의해 편집된 효소학 182권 '단백질 정제에 대한 지침'의 Method에 상세히 설명되었다.

### 단백질 특성화:

정제된 단백질을 RP-HPLC, 전자스프레이 질량분석법 및 SDS-PAGE에 의해 분석한다. 단백질 정량을 아미노산 조성물, RP-HPLC 및 브래드포드 단백질 결정에 의해 행한다. 몇몇 경우에 있어 트립틱 펩티드 맵핑은 단백질 동일성을 확인을 위한 전자스프레이 질량분석법과 함께 실행한다.

### 메탈셀룰로오스 검정

이 검정은 정상 골수세포를 자극하여 시험관내 조혈콜로니의 다른 형태를 생성하는 콜로니자극인자의 능력을 반영한다(Bradley et al., Aust. Exp Biol. Sci. 44:287-300, 1966), Pluznik et al., J. Cell

Comp. Physio 66:319-324, 1965).

#### 방법

신선하고 정상의 건강한 골수흡인물 약 30mL를 다음 알려지는 개체로부터 얻는다. 샘플을 무균의 조건하의 50mL 삼각튜브(#25339-50 코닝, 코닝 MD)내에 1X PBS(#14040.059 생명공학, Gainthersburg, MD)용액으로 1:5 희석한다. 피콜(Histopaque 1077 시그마 H-8889)은 희석된 샘플아래 층을 이루고, 300×g에서 30분 원심분리한다. 단핵세포 밴드를 제거하고 1X PBS로 2회, 1% BSA PBS(CellPro Co., Bothell, WA)로 1회 세척한다. 단핵세포 수를 세고 CD34+ 세포를 세프라트 LC(CD34)키트(CellPro Co., Bothell, WA)컬럼을 이용하여 선택한다. 이러한 분획은 골수내의 모든 간 및 선구체세포들이 CD34 표면 항원을 나타내기 때문에 실행된다.

배양물은 1.0mL의 최종부피가 되도록 35×10mm 페트리 접시(Nunc#174926)에 세 벌 만든다. 배지를 테리 폭스 실험실(HCC-4230 배지(테리 폭스 실험실, 벅쿠버, B.C., 캐나다)로부터 구입한다. 에리트로포이에틴(Amgen, Thousand, CA.)을 배지에 넣고, 접시당 3,000-10,000개 CD34+ 세포를 넣는다. 형질감염된 포유동물 세포로부터 얻어진 조건배지에서 또는 형질감염된 포유동물 세포 또는 E.coli로부터의 조건배지에서 정제된 EP0 수용체 아고니스트를 0.001~10nM 범위의 최종농도를 얻도록 첨가한다. 배양물은 3cc시린지를 이용하여 재현탁되고 1.0mL는 접시당 분배된다. 제어(바세린 반응)배양은 어떠한 콜로니 자극인자도 갖지 않는다. 양성 제어 배양은 조건배지를 받았다(PHA로 자극한 사람 세포: 테리 폭스 시험실, H2400). 배양은 가슴 공기에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C로 인큐베이션시킨다.

50세포 이상의 크기로 나타난 조혈콜로니를 40× 오브젝티브 콤비네이션을 갖는 니콘 도치상 현미경을 이용하여 피크반응일(10-11일)에 세어본다. 50세포 이하를 갖는 세포군은 클러스터로 적용한다. 양자택일로 콜로니를 슬라이드위에 깔고염색으로 가려내거나, 또는 골라내어 재현탁시킨 후 염색용 시토스핀 슬라이드 위에서 회전시킬 수 있다.

#### 사람 제대혈액 조혈성장인자 검정

골수세포는 종래 시험관내 조혈 콜로니 자극인자(CSF) 활성을 검정하기 위해 이용된다. 그러나 사람의 골수는 항상 이용가능하지 않고 공여자 사이에 상당한 다양성이 존재한다. 탯줄제대혈액은 조혈간세포 및 선구체의 근원으로서 골수와 비교할 수 있다(Browmeyer et al., PNAS USA 89:4109-113 1992; Mayani et al., Blood 81:3252-3258, 1993). 골수와 대조적으로, 제대혈액은 통상의 기준상 보다 쉽게 이용가능하다. 여러 공여자로부터 얻은 신선한 세포를 모음으로써 검정다양성을 감소시키고, 또는 이러한 목적으로 냉동보존한 세포들의 은행을 만드는 데 잠재적이다. 배양조건을 변경함으로써, 및/또는 계통특이마커를 분석함으로써 콜로니(BFU-E)활성을 나타내는 파괴를 특이적으로 검정하는 것이 가능하다.

#### 방법

단핵세포(MNC)를 표준밀도구배(1.077g/mL 히스토파크)를 사용하여 회수된 제대혈액으로부터 24시간내 분리한다. 제대혈액 MNC를 CD14-, CD34+ 세포를 면역자기 분리; 응용 면역과학(Santa Clara, CA)의 코팅된 플라스크를 이용해 SBA-, CD34+ 일부를 패닝; CellPro (Bothell, WA) 아비딘 컬럼을 이용한 CD34+ 분리등의 여러과정을 통해 간세포 및 선구체로 보다 강화시킨다. 신선하게 분리된 또는 냉동보존된 CD34+ 세포의 강화된 일부 중 하나를 검정용으로 사용한다. 샘플을 각각 연속희석하기위한 중복배양물(1pM~1204pM 범위의 농도)은 부가성장인자(Methocult H4230 from Stem Cell Technologies, Vancouver, B.C.) 없이 0.9% 메틸셀룰로오스 1mL를 함유하는 배지에서 1×10<sup>4</sup> 세포로 생성시킨다. 7-9일 배양 후, 30세포이상을 함유하는 콜로니를 센다.

#### 형질감염된 세포계:

BHK 또는 유린 프로B 세포계 Baf/3와 같은 세포계는 그 세포계가 가지고 있지 않은 사람 EP0 수용체와 같은 콜로니 자극인자 수용체로 형질감염될 수 있다. 이들 형질감염된 세포계를 세포번성활성 및/또는 수용체결합력을 결정하는데 사용할 수 있다.

### 실시에

#### 실시에 1

EP0리간드를 재배열한 서열을 암호화하는 유전자는 여기 기재된 방법중 어느하나 또는 당업자에게 알려진 기타 재조합 방법에 의해 구성될 수 있다. 이 예의 목적을 위해 교환위치는 EP0의 말단 131(Arg)과 132(Thr)사이이다. 이곳은 단백질 가수분해분열되기 쉬운 위치고, 이로서 상대적으로 높은 정도의 가동성을 갖는 표면노출을 지시한다. 이 예에서 새로운 N-말단 및 C-말단을 원래 말단에 결합하는 링커없이 생성한다. 방법II에서 기재한대로, PCR 및 블란트 엔드 라이게이션 두 단계로 행한다.

1차 PCR 단계에서 주형으로 SEQ ID NO:120 DNA서열을 포함하는 벡터를 이용해 '새로운 스타트' 및 '블란트 스타트' 프라이머는 새로운 N-말단을 암호화하는 DNA단편을 생성한다. 이 단편을 '단편 스타트'로 명명한다. 새로운 스타트 프라이머에서 밀줄 친 서열은 NcoI 제한 위치이다.

새로운 스타트 프라이머 = gcgcgcCCATGGACAATCACTGCTGAC SEQ ID

NO:131

블란트 스타트 프라이머 = TCTGTCCCCTGTCCT SEQ ID NO:132

두번째 PCR 단계에서 주형으로 SEQ ID NO:120 DNA서열을 포함하는 벡터를 이용하여, '새로운 스톱' 및 '블란트 스톱' 프라이머는 새로운 C-말단을 코드하는 DNA 단편을 생성한다. 이 단편을 '단편 스톱'로 명명한다. 새로운 스톱 프라이머에서 밀줄 친 서열은 HindIII 제한 위치이다.

새로운 스톱 프라이머 =

gcgcgcAAGCTTATTATCGGAGTGGAGCAGCTGAGGCCGCATC SEQ ID

NO:133

블란트 말단 프라이머 = GCCCCACCACGCCTCATCTGT SEQ ID NO:134

라이게이션 단계에서는, 두 PCR 반응에서 합성된 두 개의 단편을 함께 라이게이션하고, NcoI 및 HindIII로 절단하여 발현벡터속으로 클론시킨다. 클론을 제한 분석에 의해 스크린하고 적합한 서열을 확인하기 위해 DNA를 서열결정한다. 프라이머를 다른 발현벡터속으로 클론시키는 NcoI 및 HindIII 외의 제한 부위를 생성하도록 설계할 수 있다.

## 실시예 2

본 발명의 EP0 수용체 아고니스트를 재배열한 서열을 여기에 기재된 방법 또는 당업자에게 알려진 기타 검정법에 의해 생활성으로 검정할 수 있다.

변이체 유전자, 재조합 단백질 발현, 단백질 정제, 단백질 특성화, 생물학적 활성결정을 구성하기 위한 부가 기술은 전적으로 참고문헌으로서 포함되는 WO 94/12639, WO 94/12638, WO 95/20976, WO 95/21197, WO 95/20977, WO 95/21254 에서 찾을 수 있다.

모든 참고문헌, 특허 및 이하 인용된 응용은 여기 기재된 것과 같이 전적으로 참고문헌으로서 포함된다.

기타 여러가지 예들은 본 발명의 목적 및 범위를 벗어나지 않고 본 개시를 읽은 후 당업자에게 명확해질 것이다. 그러한 모든 기타 예들은 부록 청구항의 범위내에 포함되도록 한다.

## (57) 청구의 범위

### 청구항 1

다음의 변형된 EP0 아미노산 서열로 이루어지는 사람 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드로서,

```

AlaProProArgLeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLys
              10                      20

GluAlaGluAsnIleThrThrGlyCysAlaGluHisCysSerLeuAsnGluAsnIleThr
              30                      40

ValProAspThrLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgMetGluValGlyGlnGlnAla
              50                      60

ValGluValTrpGlnGlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeu
              70                      80

LeuValAsnSerSerGlnProTrpGluProLeuGlnLeuHisValAspLysAlaValSer
              90                      100

GlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGlnLysGluAlaIleSer
              110                     120

ProProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLys
              130                     140

LeuPheArgValTyrSerAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAla
              150                     160

CysArgThrGlyAspArg SEQ ID NO:121
              166
  
```

여기서 임의로 N-말단으로부터 1~6개의 아미노산 및 C-말단으로부터 1~5개의 아미노산은 상기 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드로부터 결실될 수 있고;

여기서 N-말단은 C-말단에 직접 또는 N-말단을 C-말단에 결합할 수 있고 다음 아미노산들 각각에서 새로운 C- 및 N-말단을 갖는 링커를 통해 결합되어있고:

23-24	48-49	111-112
24-25	50-51	112-113
25-26	51-52	113-114
26-27	52-53	114-115
27-28	53-54	115-116
28-29	54-55	116-117
29-30	55-56	117-118
30-31	56-57	118-119
31-32	57-58	119-120
32-33	77-78	120-121
33-34	78-79	121-122
34-35	79-80	122-123
35-36	80-81	123-124
36-37	81-82	124-125
37-38	82-83	125-126
38-39	84-85	126-127
40-41	85-86	127-128
41-42	86-87	128-129
43-44	87-88	129-130
44-45	88-89	130-131
45-46	108-109	131-132
46-47	109-110	
47-48	110-111	

상기 EPO 수용체 아고니스트 폴리펩티드는 임의로 (메티오닌<sup>-1</sup>), (알라닌<sup>-1</sup>) 또는 (메티오닌<sup>-2</sup>, 알라닌<sup>-1</sup>) 바로 다음에 있을 수 있는 것을 특징으로 하는 EOP 수용체 아고니스트 폴리펩티드.

## 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 링커는 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 EPO 수용체 아고니스트 폴리펩티드:

GlyGlyGlySer SEQ ID NO:123;  
 GlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID NO:124;  
 GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID  
 NO:125;  
 SerGlyGlySerGlyGlySer SEQ ID NO:126;  
 GluPheGlyAsnMet SEQ ID NO:127;  
 GluPheGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:128;  
 GluPheGlyGlyAsnGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:129; 및  
 GlyGlySerAspMetAlaGly SEQ ID NO:130.

## 청구항 3

제 1 항에 있어서, 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 EPO 수용체 아고니스트 폴리펩티드:

SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID  
 NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7;  
 SEQ ID NO:8; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; SEQ ID  
 NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13; SEQ ID  
 NO:14; SEQ ID NO:15; SEQ ID NO:16; SEQ ID  
 NO:17; SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:19; SEQ ID  
 NO:20; SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID  
 NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID  
 NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID  
 NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID  
 NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; SEQ ID  
 NO:35; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:37; SEQ ID  
 NO:38; SEQ ID NO:39; SEQ ID NO:40; SEQ ID  
 NO:41; SEQ ID NO:42; SEQ ID NO:43; SEQ ID  
 NO:44; SEQ ID NO:45; SEQ ID NO:46; SEQ ID  
 NO:47; SEQ ID NO:48; SEQ ID NO:49; SEQ ID  
 NO:50; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID  
 NO:53; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID  
 NO:56; SEQ ID NO:57; SEQ ID NO:58; SEQ ID  
 NO:59 및 SEQ ID NO:122.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서, 링커서열(GlyGlyGlyGlySer SEQ ID NO:123)이 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 링커  
 서열에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드:

GlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID NO:124;  
 GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer SEQ ID  
 NO:125;  
 SerGlyGlySerGlyGlySer SEQ ID NO:126;  
 GluPheGlyAsnMet SEQ ID NO:127;  
 GluPheGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:128;  
 GluPheGlyGlyAsnGlyGlyAsnMet SEQ ID NO:129; 및  
 GlyGlySerAspMetAlaGly SEQ ID NO:130.

#### 청구항 5

제 1 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열로 이루어지는 핵산 분자.

#### 청구항 6

제 2 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열로 이루어지는 핵산 분자.

#### 청구항 7

제 3 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열로 이루어지는 핵산 분자.

#### 청구항 8

다음으로 구성된 군으로부터 선택된 제 3 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열  
 로 이루어진 핵산 분자:



SEQ ID NO:60; SEQ ID NO:61; SEQ ID NO:62; SEQ ID NO:63; SEQ ID NO:64; SEQ ID NO:65; SEQ ID NO:66; SEQ ID NO:67; SEQ ID NO:68; SEQ ID NO:69; SEQ ID NO:70; SEQ ID NO:71; SEQ ID NO:72; SEQ ID NO:73; SEQ ID NO:74; SEQ ID NO:75; SEQ ID NO:76; SEQ ID NO:77; SEQ ID NO:78; SEQ ID NO:79; SEQ ID NO:80; SEQ ID NO:81; SEQ ID NO:82; SEQ ID NO:83; SEQ ID NO:84; SEQ ID NO:85; SEQ ID NO:86; SEQ ID NO:87; SEQ ID NO:88; SEQ ID NO:89; SEQ ID NO:90; SEQ ID NO:91; SEQ ID NO:92; SEQ ID NO:93; SEQ ID NO:94; SEQ ID NO:95; SEQ ID NO:96; SEQ ID NO:97; SEQ ID NO:98; SEQ ID NO:99; SEQ ID NO:100; SEQ ID NO:101; SEQ ID NO:102; SEQ ID NO:103; SEQ ID NO:104; SEQ ID NO:105; SEQ ID NO:106; SEQ ID NO:107; SEQ ID NO:108; SEQ ID NO:109; SEQ ID NO:110; SEQ ID NO:111; SEQ ID NO:112; SEQ ID NO:113; SEQ ID NO:114; SEQ ID NO:115; SEQ ID NO:116; SEQ ID NO:117; SEQ ID NO:118 및 SEQ ID NO:119.

#### 청구항 9

제 4 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 암호화하는 DNA서열로 이루어진 핵산 분자.

#### 청구항 10

제 5 항, 제 6 항, 제 7 항, 제 8 항 또는 제 9 항의 상기 핵산분자로 이루어지는 복제가능한 벡터로 형질전환 및 형질주입된 숙주세포를 적당한 영양조건하에서 상기 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드 발현을 허용하는 방식으로 성장시키는 단계와, 상기 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 회수하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 EP0 리셉터 아고니스트 폴리펩티드의 제조방법.

#### 청구항 11

제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항에 따른 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드와 약학적으로 허용되는 담체로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 12

제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항에 따른 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드; 인자; 및 약학적으로 허용되는 담체로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 인자가 GM-CSF, G-CSF, c-mpl 리간드, M-CSF, IL-1, IL-4, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, LIF, flt3/flk2 리간드, 사람성장호르몬, B-세포성장인자, B-세포분화인자, 호에오신 분화인자 및 간세포인자, IL-3 변이체, 용융단백질, G-CSF 수용체 아고니스트, c-mpl 수용체 아고니스트, IL-3 수용체 아고니스트, 다기능 수용체 아고니스트로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 14

제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항의 EP0 수용체 아고니스트 폴리펩티드를 환자에게 투여하는 단계로 이루어지는 환자에서 조혈세포의 생산을 자극하는 방법.

#### 청구항 15

(a) 제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항의 폴리펩티드로 이루어지는 에리트로이드 선구체 세포를 배지에서 배양하는 단계와,

(b) 상기 배양된 세포를 회수하는 단계로 이루어지는 에리트로이드 선구체의 선택적인 생체외 팽창방법.

#### 청구항 16

- (a) 다른 세포로부터 에리트로이드 선구체를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 에리트로이드 선구체를 제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항의 폴리펩티드로 이루어진 선택배지와 함께 배양하는 단계; 그리고
- (c) 상기 배양된 세포를 회수하는 단계로 이루어지는 에리트로이드 선구체의 선택적 생체외 팽창방법.

#### 청구항 17

조혈 장애를 갖는 환자의 치료방법에 있어서,

- (a) 에리트로이드 선구체 세포를 제거하는 단계;
- (b) 제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항의 폴리펩티드로 이루어지는 상기 에리트로이드 선구체 세포를 배양하는 단계;
- (c) 상기 배양된 세포를 회수하는 단계; 및
- (d) 상기 환자에 상기 배양된 세포를 이식하는 단계로 이루어지는 치료방법.

#### 청구항 18

조혈 장애를 갖는 환자의 치료방법에 있어서,

- (a) 에리트로이드 선구체 세포를 제거하는 단계;
- (b) 다른 세포로부터 에리트로이드 선구체 세포를 분리하는 단계;
- (c) 제 1 항, 제 2 항, 제 3 항 또는 제 4 항의 폴리펩티드로 이루어진 선택배지로 상기 분리된 에리트로이드 선구체 세포를 배양하는 단계;
- (d) 상기 배양된 세포의 회수하는 단계; 및
- (e) 상기 배양된 세포를 상기 환자에게 이식하는 단계로 이루어지는 치료방법.

#### 청구항 19

제 15 항에 있어서, 상기 에리트로이드 선구체세포는 말초혈로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 20

제 16 항에 있어서, 상기 에리트로이드 선구체세포는 말초혈로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 21

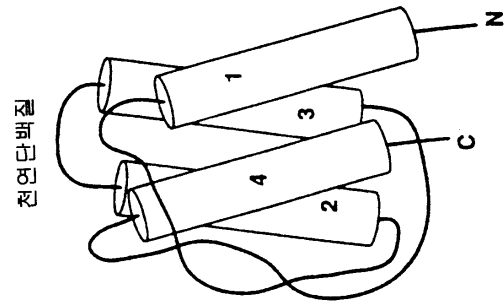
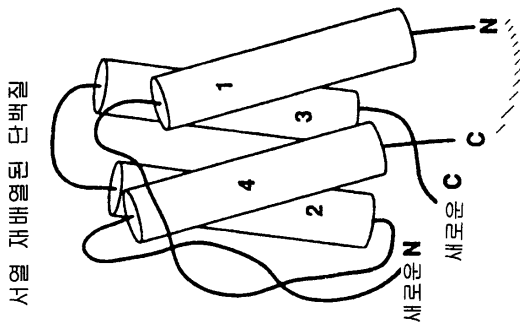
제 17 항에 있어서, 상기 에리트로이드 선구체 세포는 말초혈로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 22

제 18 항에 있어서, 상기 에리트로이드 선구체세포는 말초혈로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

**도면**

도면1

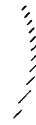


키



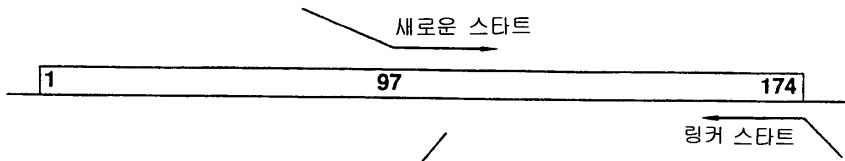
주기적 2차 구조

링크

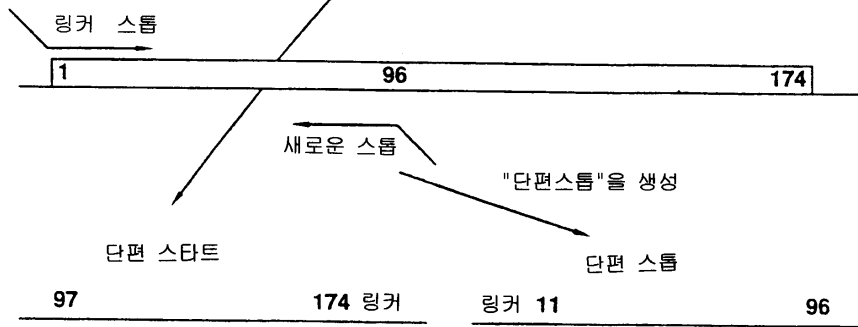


## 도면2

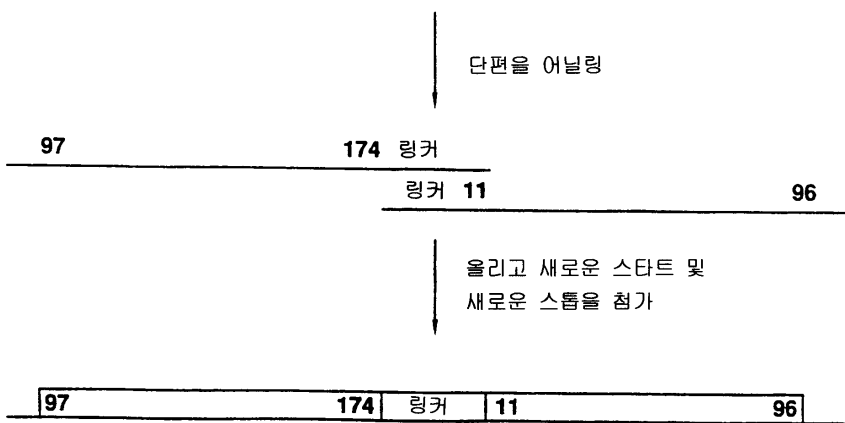
제 1 단계 PCR 증폭



제 2 단계 PCR 증폭

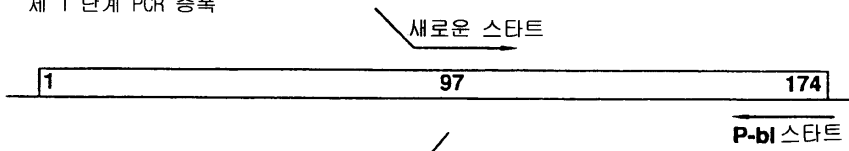


제 3 단계 PCR 증폭

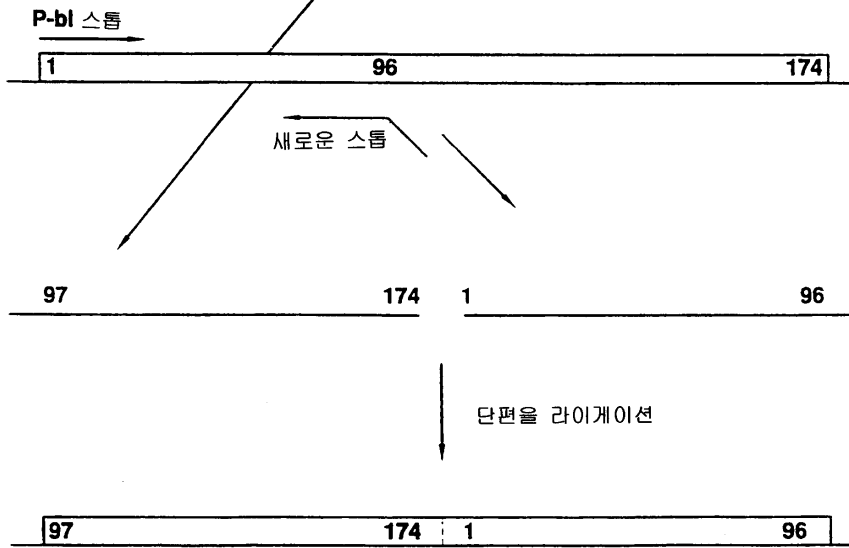


## 도면3

제 1 단계 PCR 증폭

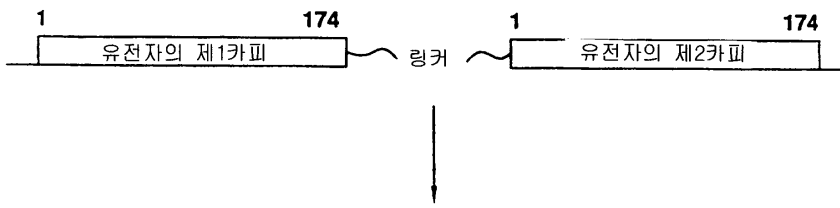


제 2 단계 PCR 증폭

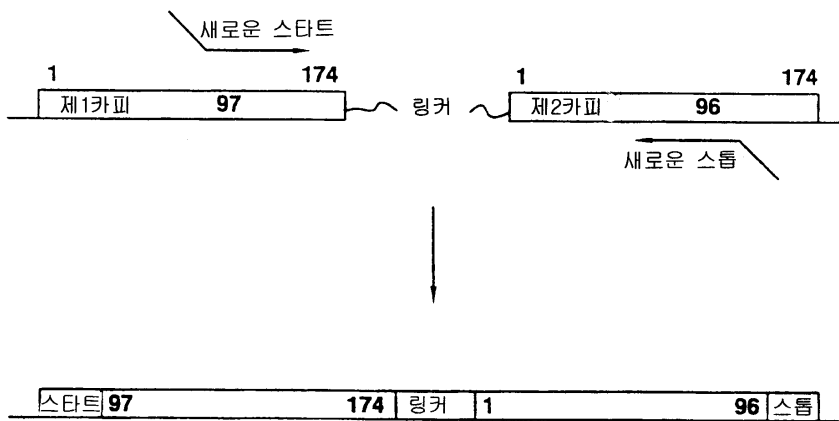


## 도면4

## I. 탠덤식으로 중복된 주형의 구성



## II. 탠덤식으로 중복된 주형의 PCR 증폭



## 도면5

```

1  GCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAG 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGGGGTGGTGC GGAGTAGACACTGTCCGCTCAGGACCTCTCCATGGAGAACCTCCGGTTC
   AlaProProArgLeuIleCysAspSerArgValLeuGluArgTyrLeuLeuGluAlaLys

61  GAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCCGGCTCTTATAGTGCTGCCCCACGACACTTGTGACGTGCGAAGTTACTCTTATAGTGA
   GluAlaGluAsnIleThrThrGlyCysAlaGluHisCysSerLeuAsnGluAsnIleThr

121  GTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAGCAGGCC 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CAGGGTCTGTGGTTTCAATTAAAGATACGGACCTTCTCCTACCTCCAGCCCGTCGTCCGG
   ValProAspThrLysValAsnPheTyrAlaTrpLysArgMetGluValGlyGlnGlnAla

181  GTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTG 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CATCTTCAGACCGTCCCGGACCGGGACGACAGCCTTCGACAGGACGCCCCGGTCCGGGAC
   ValGluValTrpGlnGlyLeuAlaLeuLeuSerGluAlaValLeuArgGlyGlnAlaLeu

241  TTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGT 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AACCAGTTGAGAAGGGTCGGCACCCCTCGGGGACGTCGACGTACACCTATTTCCGGCAGTCA
   LeuValAsnSerSerGlnProTrpGluProLeuGlnLeuHisValAspLysAlaValSer
   GGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCC

301  CCGGAAGCGTCGGAGTGGTGAGACGAAGCCCGAGACCCTCGGGTCTTCCTTCGGTAGAGG 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GlyLeuArgSerLeuThrThrLeuLeuArgAlaLeuGlyAlaGlnLysGluAlaIleSer

361  CCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCCGCAAA 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GGAGGTCTACGCCGGAGTCGACGAGGTGAGGCTTGTTAGTGACGACTGTGAAAGGCGTTT
   ProProAspAlaAlaSerAlaAlaProLeuArgThrIleThrAlaAspThrPheArgLys

421  CTCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCC 480
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GAGAAGGCTCAGATGAGGTTAAAGGAGGCCCTTTTCGACTTCGACATGTGTCCCCTCCGG
   LeuPheArgValTyrSerAsnPheLeuArgGlyLysLeuLysLeuTyrThrGlyGluAla

481  TGCAGGACAGGGGACAGATGA 501
   -----+-----+-----
   ACGTCCTGTCCCCTGTCTACT
   CysArgThrGlyAspArg

```