

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 특허공보(B1)**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/00  
C12N 15/63  
A61K 37/24

(45) 공고일자 1997년03월 12일  
(11) 공고번호 97-002915

(21) 출원번호	특 1989-0700238	(65) 공개번호	특 1989-0701739
(22) 출원일자	1989년02월 11일	(43) 공개일자	1989년 12월 21일
(86) 국제출원번호	PCT/NL 88/00028	(87) 국제공개번호	WO 88/09813
(86) 국제출원일자	1988년06월 13일	(87) 국제공개일자	1988년 12월 15일
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 네델란드(NL)		

(30) 우선권주장 87201121.8 1987년06월 12일 네델란드(NL)  
이무노 아게 푸라우 독토르 레나테 몰단  
오스트리아 아-1221 비엔나 인두스트리슈트라쎬 67

(73) 특허권자

오스트리아 아-1221 비엔나 인두스트리슈트라쎬 67

(72) 발명자

알베르트 요한네스 요셉 반 우우엔

네델란드 엔엘-2271 에이알 부우어버어그 라안 반 헬덴버어그 23  
한스 판네코예크

네델란드 엔엘-1066 씨엑스 암스텔담 플레즈만라안 125 센트라알 래보레  
이토리움 반데 블로에드트란즈후지에디엔즈트  
마르티누스 필립푸스 베르베에트

네델란드 엔엘-1066 씨케이 암스텔담 플레즈만라안 125 센트라알 래보레  
이토리움 반데 블로에드트란즈후지에디엔즈트

로베르트 빌리엄 반 레엔

(74) 대리인

장용식

**심사관 : 김형준 (책자공보 4862호)**

**(54) 제제인자 활성을 가지는 신규한 단백질 : 유전공학-제조 세포를 사용하는 그의 제조방법 및 그것을 함유하는 의약 조성물**

**요약**

내용없음

## 대표도

```

10      20      30      40      50      60
GTGCACATGCAAAATAGAGACTTCCACCTGCTCTTTCTGTGTCCTTTTGGGATCTGCTGTTT
-19 H D I E L S T C F F L C L L R P C E
70      80      90      100     110     120
AGTCCCAAGAAAGACTACTACCTGGGTSCAGTGGAACTCTCATGGAGCTATATGCAAAAT
S A T R A Y Y L G A V E L S W D Y H M D S 19
130     140     150     160     170     180
GATCTCGGTAGCTGCTGCTGAGCAAGAAATTTCTCTAGAGTGCAGAAATCTTTTCCA
D L G E L P V D A R F P P R V P K S R F
190     200     210     220     230     240
TTCACACCTCAGTCTGTATCAAAAGACTTGTGTGTAGAATTCAGGATCAATTTTCTT
F N T S V V Y K K T L L F V E F T D H L F 55
250     260     270     280     290     300
AACATCGCTAAGCAAGCCACCTGATGCTGTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
N I A K P R P P M H G L L G F T I D A E
310     320     330     340     350     360
GTTTATGATACAGTGTGATACACTAAGAAATGCTTCCCTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTG
V Y D T V V I T L K N M A S H F V S L H 99
370     380     390     400     410     420
ACTGTTGTTGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
A V E V S Y M K A S E G A E Y D D Q T S
430     440     450     460     470     480
CAAGGCGAAGAAAGATGATTAAGTCTTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
D R E Y E D D K V F P G D S H T Y V W G 139
490     500     510     520     530     540
GTCTTGAAGAAAGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
V L K E N G P M A S D P L C L T Y S Y L
550     560     570     580     590     600
TCTCATGTGACCTGGTAAAGACTTGAATTCAGGCTCATTGAGCCCTACTAGTATGT
S H V D L V K D L N S G L I G A L L V C 179
610     620     630     640     650     660
AGAAAGGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
R E G S L A K E K T D T L H R F I L L F
670     680     690     700     710     720
GCTGTATGATGAGAGGAGGAGGAGTGGCACTCAGAAACAGAAAGCTGCTGCTGCTGCTG
A V F D E G K S M H S E T F N S L H M D G 219
730     740     750     760     770     780
AGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
A D A A S A R A M P K M H T V N G V V N
790     800     810     820     830     840
AGGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
R V L P G L I G C H R K S Y Y M H V I G 259
850     860     870     880     890     900
ATGGGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
H G T T P E V H S I F L E G H T F L V R
910     920     930     940     950     960
AACCATCCGAGGCTCTTGGAAATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
N H R D A S L E I S P I T F L T A D T L 299
970     980     990     1000    1010    1020
TTGATGACCTTGGACATTTCTACTGTTTGTATATCTCTCCACCAACATGATGCTG
L H D L S D P L L F C H I S S H G H D S
1030    1040    1050    1060    1070    1080
ATGGGCTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
H E A Y V V D S C P E E P D L R H K N 339
1090    1100    1110    1120    1130    1140
AATCAAGAGCCGAGAGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
N E E A E D Y D D D L T D S E H D V V R
1150    1160    1170    1180    1190    1200
TTGATGATGACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
F D D D N S P S F I Q I R S V A K K H P 379
1210    1220    1230    1240    1250    1260
AAACTTGGATACATTCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
K T M V H Y I A A S E E D W D Y A P L V
1270    1280    1290    1300    1310    1320
CTGCCCGGATGCAAGATTTAAGAGTCAATATTTGAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
L A R D R S Y K S D Y L N G P D S I 419
1330    1340    1350    1360    1370    1380
GATGAGAGTACAAAGATCCGATTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
G R K Y K K V R F H A Y T D E T F K T R

```

## 명세서

### [발명의 명칭]

제 VIII인자 활성을 가지는 신규한 단백질 : 유전공학-제조 세포를 사용하는 그의 제조방법 및 그것을 함유하는 의약 조성물

### [도면의 간단한 설명]

제1도는 제 VIII인자의 Ala-1부터 Tra-2332까지의 아미노산 서열 및 그의 신호 서열 M(-19)부터 S(-1)까지와 그에 해당하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 pCLB89의 제 VIII인자 cDNA의 삽입을 도시한다. F-973은 코돈 TTC에 의해 코드화된다.

제 2 도는 전 길이의 제VIII인자 단백질을 코드화하는 발현 벡터 pCLB201의 구조를 도시한다. 원형 플라스미드 pCLB201은 플라스미드 pSV2(Gorman, 1985 DNA Cloning(Ed. Glover) IRL Press, pp. 143-169; Mulligan and Berg, Prco. Natl. Acad. Sci. USA(1981) 78 : 2072)로부터 유도된 4217bp의 HindIII-BalII 단편내의 EcoR I 위치로 시작하는 것으로 나타난다. 초기 SV40-촉진 유전자 영역이 표시된다 : SVep. 벡터는 또한 Sal I 자리에 삽입된 로우스 사르코마 바이러스-긴 말단 반복(LTR)을 포함하는 플라스미드 pRSV-neo(Gorman, 1985, 상기 동일)로부터 유도된 Nde I-HindIII 단편을 함유한다. 전체 길이의 제VIII인자는 7440bp의 Sal I-Hpa I 단편에 의해 코드화되고 표시된다: 제VIII인자 cDNA(H=Hindm, Sa=Sal I). pCLB201의 제조도중 손실된 제한 효소 절단부위를 괄호안에 표시한다. 플라스미드의 크기는 킬로염기쌍(kb)으로 표시한다.

제3도는 결실 돌연변이체 제VIII인자 단백질의 과도(transient) 발현을 위한 벡터를 도시한다 :

a. pSV2-유도 벡터의 경계표: 직렬 위치의 2개의 촉진 유전자 : SV40 초기 전사 촉진 유전자(SVep)와 로우스 사르코마 바이러스-긴 말단반복(RSV-LTR); 캡핑 부위(Capsite)와 메신저 RNA(mRNA)의 5'끝; 출발 코돈(ATG), 오픈 리딩 프레임 및 중지 코돈(TGA)과 함께 전체 길이의 제VIII인자 코딩영역을 포함하는 cDNA 삽입; 짧은 인트론과 SV40 DNA로부터 유도된 폴리아데닐화 신호(poly A)가 있는 mRAN의 3' 비-코딩영역(제2도와 비교).

b. 전체길이의 제VIII인자를 코드하는 cDNA를 포함하는 7440bp(염기쌍)의 단편 Sal I-Hpa I을 도시한다. 리딩 프레임의 출발 및 중지 코돈이 나타난다. pCLB202와 pCLG203의 제조를 위해 돌연변이생성

에 포함된 전체길이의 cDNA내의 제한효소부위를 도시한다.

c. 제Ⅷ인자 단백질의 지도. 19 아미노산의 긴 신호 펩티드와 혈장 제Ⅷ인자의 도메인 또는 반복 구조를 도시한다. A1, A2 및 A3은 동종 아미노산 서열이다. B는 단일부분인 반면 C1과 C2도 동종성이 다(Veharet al., 1984) A와 C 반복에 접해있는 아미노산 위치를 제시한다. 지도 아래에 제Ⅷ인자를 선택적으로 잘라내는 단백질 분해효소, 즉, 활성화된 단백질 C(APC), 트롬빈(IIa), 활성화된 응고 인자 X(Xa), 및 트립신-계 프로테아제('?'로 표시됨)의 절단 자리를 화살표로 표시한다. 인자 Xa는 또한 나타난 IIa- 및 APC-절단 위치를 절단하는 것으로 여겨진다(Eaton et al., Biochemistry(1986)

25 : 8343-8347; Fay et al., Biochem Biophys. Acta(1986) 871 : 268-278). 그들의 절단자리를 도시한다. B 영역은 다수의 절단자리를 함유한다.

d. 활성화된 제Ⅷ 인자의 하위단위구조 92kDa와 80kDa의 제Ⅷ인자 하위단위는 각각 92k와 80k로서 표시된다. 전체길이 서열내의 그 각각의 아미노 말단 및 카트복시말단 아미노산 위치가 표시된다.

e. b에 표시된 Pst I과 BamH I 자리 사이의 직접 융합을 함유하는 pCLB202의 cDN

A와 단백질 구조, 그 결과의 단백질은 Ala-867과 Asp-1563 사이의 펩티드 결합을 함유하는 것으로 표시된다. 단백질의 총길이는 1637 아미노산이다. (반복 경계위치와 특이적 단백질 분해 절단 자리의 경계선은 표시된 바와 같다 ; 상기 참조 ).

f. b 아래에 표시된 바와 같은 MaeⅧ 자리와 HgiAT 자리를 연결하는 4개의 특별한 아미노산을 코드 하는 Mlu I-링커 서열을 함유하는 pCLB203의 cDNA와 단백질의 구조 단백질의 전체길이는 1411 아미노산이다. (반복 경계위치와 특이적 단백질 분해 절단 자리의 경계선이 표시된다; 상기 참조 )

제4도는 면역침전 및 전기영동을 사용한 여러가지 결실 돌연변이체 제Ⅷ인자 단백질의 분자량(크기) 측정의 결과를 도시한다. 오토라디오그래프는 벡터 pCLB202(라인 2)와 pCLB203(라인 1)으로 만들어진 단백질에 대한 레인을 나타낸다. 분자량 마커는 표시한 바와 같다.

[발명의 상세한 설명]

(서론)

(기술분야)

본 발명은 제Ⅷ인자 활성을 가지는 신규한 단백질 및 유전 공학 제조 셀 라인 및 미생물을 사용한 그의 제조방법에 관한 것이다.

(배경)

A형 혈우병은 혈액 응고 캐스케이드의 필수성분인 제Ⅷ인자의 결핍으로 특징지어지는 성-결합 출혈 장애이다.

이 질병은 남성인구의 약 0.0.1%에서 발생한다.

A형 혈우병은 건강한 수여자로부터 얻어지는 제Ⅷ인자-함유혈장을 투여함으로써 치료될 수 있다.

그러나 이 치료법은 여러가지 단점을 가지고 있다.

제Ⅷ인자의 공급이 한정적이며 매우 비싸다; 혈액중의 제Ⅷ인자의 농도는 단지 약 100ng/ml에 불과하고 현재의 혈장분별법을 사용한 수율도 낮다

제Ⅷ인자의 공급원이 푸울된 수여자의 혈액이기 때문에 수혈자는 수여자의 혈액에 존재할 수 있는 비A비B형 간염, B형 간염 또는 AIDS 바이러스에 의해 유발되는 질병을 포함하여 각종 감염성 질병에 걸릴 많은 위험을 안고 있다.

더불어, 수혈자는 의인성 제Ⅷ인자에 대한 항체를 발생할 수도 있고, 그것은 그의 효력을 대단히 감소시킬 수 있다.

제Ⅷ인자는 세부분, 소위 'A1A2-도메인'으로 불리는 N-말단부분; 'B 도메인'으로 불리는 중심부분; 및 A3, C1 및 C2 도메인을 포함하는 C-말단 부분으로 이루어진다.

A1A2-도메인과 C-말단 부분은 응고활성에 필수적인 것으로 여겨진다. 제Ⅷ인자는 초기 분해에 대하여 민감한 제Ⅷ인자를 보호하는 것으로 믿어지는 단백질인 폰 빌레브란드 인자(vWf)와 결합된 상태로 혈액내에서 순환한다.

제Ⅷ인자는 공지의 재조합 DNA 방법에 의해 제조되는 경우 만족하지 못할 정도의 낮은 수율로 얻어진다.

더우기 단백질이 무상 사슬로 존재하는 것같지 않으므로 생성물을 분리 및 정제하기가 어렵고 따라서 경비도 높다.

그러므로, 제Ⅷ인자 활성을 가지고, 바람직하게는 감소된 면역원 활성을 가지는 화합물을 다량 제조하는 효과적인 방법의 개발이 바람직하다.

(관련 문헌)

사람 mRNA로부터 얻어진 제Ⅷ인자 cDNA의 분자 클로닝 및 제Ⅷ인자 활성을 가지는 단백질의 포유류, 효모 및 박테리아 세포에서의 후속 제조가 보고되어 있다.

WO 85/01961, EP 0160457, EP 0150735, EP 0253455 참조.

형질전환된 미생물을 사용하여 제Ⅷ인자활성을 가지는 단백질을 제조하는 방법은 EP 025455에 개시

되어 있다. 유럽 특허 출원 EP 0150735 및 EP 0123945와 브린코우스 등(1985)은 제Ⅷ인자의 단백질 분해 절단 생성물에서의 제Ⅷ인자 활성을 개시한다.

제Ⅷ인자의 2개의 단백질 분해 절단 생성물, 92kDa와 80kDa 폴리펩티드의 복합체가 증가된 제Ⅷ인자 활성을 나타낸다. (Fay et al., Biochem. Biophys. Acta(1986) 871: 268-278 : Eaton et al Biochemistry(1986) 25 : 505-512).

이튼 등은 바이오케미스트리(1986) 25 : 8343-8347에서 중심 부분의 766 아미노산(797-1562)이 결실되어 있는 폴리펩티드가 제Ⅷ인자 활성을 보유하고 있음을 개시하고 있다.

더우기, 이 결실 폴리펩티드를 코드화하는 DNA를 포함하는 벡터로 형질전환된 포유류 세포가 완전한 길이의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포보다 더 높은 생성수준을 가졌다.

PCT 출원 WO 86/06101은 중심부분에 약 880 아미노산이 결실된 재조합 제Ⅷ인자 단백질이 제Ⅷ인자 활성을 나타냄을 개시하고 있다. 가장 큰 결실은 Thr-760에서 Asn-1639(번호는 제1도에 따른다)까지 연장되어 있다.

재조합 제Ⅷ인자의 제조를 위한 숙주 세포로는 차이니즈 햄스터 난소 세포를 포함하여 포유류 세포가 있다.

(발명의 개요)

제Ⅷ인자의 유도체 및 단편을 포함하는 신규한 조성물이 발현 벡터와 그외 제조방법과 함께 제공된다.

조성물은 숙주 세포, 바람직하게는 포유류 세포를 제Ⅷ인자 콘지너(congener)를 코드화하는 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질전환시켜 형질전환된 숙주 세포를 외인성 DNA 서열을 발현하도록 성장시키고 그 결과 생성된 제Ⅷ인자 유도체 또는 단편을 세포 용해물로부터 또는 적당한 성장 배지로부터 회수함으로써 제조된다.

조성물은 증가된 제Ⅷ인자 활성 및/또는 감소된 면역성을 가질 수 있다. 조성물의 용도에는 A형 혈우병의 치료가 포함된다.

(특이적 구체예의 설명)

본 발명에 따라서, 신규한 DNA 구조와 제Ⅷ인자 활성을 가지는 폴리펩티드를 생산하는 숙주 세포를 포함하는 신규한 조성물이 제공된다. 제Ⅷ인자 활성을 가지는 폴리펩티드는 92킬로-달톤(kDa)부분 뿐만이 아니라 모든 중심부 또는 'B 도메인'이 실질적으로 결실되어 있는 제Ⅷ인자의 결실 돌연변이체 단백질을 포함한다.

제Ⅷ인자 활성을 가지는 결실 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열을 포함하는 플라스미드 구조가 숙주세포를 형질전환하기 위하여 사용된다. 그런 다음 숙주 세포를 성장하여 유전자를 발현한다. 숙주 세포는 진핵 또는 세포중 어느 하나라도 좋다.

사람의 제Ⅷ인자는 제1도에 제시된 서열을 갖는다. 아미노산에 대하여 단일문자의 약어를 사용하며 그 의미는 다음과 같다 : A=알라닌; R=아르기닌; N=아스파라긴; D=아스파르트산 ; C=시스테인; Q=글루타민; E=글루탐산; G=글리신; H=히스티딘 ; I=이소로이신 ; L=로이신 ; K=라이신 ; M :메티오닌 ; F=페닐알라닌; P=프롤린 ; S=세린; T=스레오닌; W=트립토판 ; Y=티로신 ; 및 V=발린.

아미노산 서열의 번호는 19아미노산 신호 서열 다음의 첫번째 아미노산인 A-1으로 시작한다. 제Ⅷ인자의 마지막 아미노산은 Y-2332이다. 이 번호는 명세서 전체에서 사용된다.

혈액 응고 활성을 포함하여 무상의 제Ⅷ인자의 생물학적 활성을 가지는 제Ⅷ인자의 기능 부분을 포함하는 융합 펩티드뿐만 아니라 제Ⅷ인자 단편, 폴리펩티드의 돌연변이체를 포함하여 제Ⅷ인자-계 물질이 또한 제공된다.

본 발명의 폴리펩티드는 제Ⅷ인자의 콘지너, 즉, 제Ⅷ인자의 적어도 하나의 생물학적 활성과 실질적으로 제Ⅷ인자의 아미노산 서열과 같은 제Ⅷ인자 서열을 적어도 하나 가지는 화합물을 포함한다. 콘지너의 아미노산 서열은 제Ⅷ인자의 그것보다 더 많을수도 더 적을수도 있다.

생물학적 활성은 A형 혈우병 환자에게 투여되는 경우, 응고의 결핍 및/또는 자연적으로 발생하는 제Ⅷ인자와의 면역학적 교차반응성을 교정하는 능력을 포함한다. 그로써 교정은 응고 캐스케이드에서의 직접 작용에 의해 또는 제Ⅷ인자에 대한 항체와의 결합에 의해 효과적일 수 있으므로 계속해서 투여되는 제Ⅷ인자의 생물학적 활성은 영향을 덜 미친다. '면역학적 교차반응성'이란 본 발명의 신규한 폴리펩티드에 의해 유도되는 항체가 무상 제Ⅷ인자와 교차 반응하게 되는 것을 의미한다.

폴리펩티드는 적어도 하나의 생물학적 활성 서열, 예를 들면 면역학적 또는 에피토프 서열을 가질 것이며, 하나 이상의 생물학적 활성 서열을 가질 수 있고, 그러한 서열은 생물학적 성질에 대하여 자연적으로 발생하는 산물과 결합할 수 있다.

관심의 신규한 폴리펩티드는 대부분이 N-말단 부분, N<sub>R</sub> · 연결부분, L<sub>R</sub> 과 C-말단 부분, C<sub>R</sub> 을 포함하는 형상을 갖는다.

N<sub>R</sub> 은 전체 길이의 제Ⅷ인자의 A-1에서 R-740에 이르는 아미노산 서열('A1A2 도메인' 도는 92kDa 폴리펩티드)에서 발견되는 연속 서열에 실질적으로 해당하는 아미노산 서열을 가지며 A1A2 도메인중에서 45% 이하, 통상은 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% 이하의 아미노산이 결실되어 있는 것이 특징이다.

실질적으로 A-1에서 D-712까지 또는 A-1에서 R-740까지의 서열에 해당하는 서열이 바람직하다.

$L_R$ 은 통상, 실질적으로 전체 길이의 제VIII인자 단백질의 'B 도메인'의 서열과 유사하지 않은 1 내지 200아미노산, 결합 또는 아미노산의 어느 서열의 짧은 연결군일 수 있다. 그것은 또한 B 도메인의 S-741에서 S-1637까지의 거의 완전한 서열 또는 그의 어떤 부분의 연속 서열에 실질적으로 해당하는 서열을 포함할 수 있다. 특별히 관심있는 것은  $L_R$ 이 S-741에서 A-867까지의 서열 및 D-1563에서 S-1637까지의 서열 중 적어도 하나를 포함하는 조성물이다.

$C_R$ 은 아미노산 Gln-1638에서 Tyr-2332를 포함하는 제VIII인자의 서열에서 발견되는 연속 서열에 실질적으로 유사한 아미노산을 가지며, 25% 이하, 통상본 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하의 아미노산이 Q-1638에서 Y-2332까지에서 결실되어 있는 것이 특징이다.

서열은 제VIII인자 서열 Q-1638에서 Y-2332까지, E-1649에서 Y-2332까지, S-1669에서 Y-2332까지 및 S-1690에서 Y-2332까지, 바람직하게는 Q-1638에서 Y-2332까지에 실질적으로 해당하는 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

관심의 폴리펩티드는 75%까지의 아미노산이 전체 길이의 제VIII인자로부터 결실되어 있는 제VIII인자의 단편, 또는 92kDa 단백질 또는 그의 단편이 80kDa 폴리펩티드 또는 그의 단편에 용합된 융합 단백질일 수 있다.

폴리펩티드에는 통상 약 75%의 아미노산 결실, 대개는 약 45% 이하의 아미노산 결실, 보다 통상은 약 40%의 아미노산 결실이 있을 것이다.

면역원성을 제공하기 위하여, 제VIII인자 콘지너가 큰 면역원성의 폴리펩티드 단위와 공유 결합될 수 있다.

그러한 면역원성의 단위의 실례로는 우혈청 알부민, 키호울 림페트 헤모시아닌(KLH) 등이 있다. 이들 포함된 폴리펩티드는 적합한 숙주 유기체에서 항체 유도에 유용할 것이다.

항체는 체액중의 제VIII인자의 존재유무 및/또는 농도의 측정에 사용될 수 있으며, 제VIII인자의 부재는 A형 혈우병을 의미할 것이다.

(제VIII인자의 콘지너의 제조)

제VIII인자 콘지너는 여러가지 방법으로 얻어질 수 있다.

그것들은 전체 길이의 제VIII인자를 세부분으로 나누는 단백질 분해절단에 의해, 바람직하게는 Arg-740과 Glu-1638앞에서 절단하고 Ala-1에서 Pro-739 서열의 아미노 또는 카르복실 말단을 한번에 적어도 아미노산을 갈라냄으로써 및/또는 서열 Gln-1638에서 Tyr-2332의 아미노 또는 카르복실 말단을 한번에 적어도 한 아미노산을 잘라냄으로써 얻어질 수 있다.

그런 다음 얻어진 폴리펩티드 단편은 직접 또는 중점의 연결군을 경유하여 융합될 수 있고, 또는 제VIII인자 활성화에 대하여 제공하기 위해 단편끼리 조성물중에서 결합할 수 있다.

$N_R$ 과  $C_R$  융합된 융합 단백질을 포함하여, 제VIII인자 콘지너는 또한 재조합 DNA 기법에 의해 제조될 수 있다.

합성, 게놈 DNA로부터의 단리, cDNA로부터의 제조, 또는 그 과정의 조합을 포함하여 제VIII인자 유전자를 단리하는데 사용된 기법이 기술분야에 공지이다.

유전자 조작에 대한 다양한 기법이 널리 공지되어 있으며, 그것은 제한, 소화, 절제, 연결, 시험판 내 돌연변이 생성, 프라이머 수복, 및 폴리링커와 어댑터 등을 포함한다.

마니아티스 등의 분자 클로닝, 콜드 스프링 하버 실험실, 콜드 스프링 하버, 뉴욕, 1982참조.

일반적으로 방법은 제VIII인자를 합성하는 세포로부터 게놈 라이브러리를 제조하는 것을 포함한다.

교정 서열의 확인의 가능성을 증진시키기 위하여 제VIII인자를 생산하지 않는 세포로부터의 cDNA 라이브러리가 교차-혼성화하기 위해 사용될 수 있다. 제VIII인자의 발현에 대하여 pTZ 18 또는 19와 같은 원핵 발현 벡터에 삽입된 제한 단편을 사용하는 측정법 및 교차반응성 펩티드 단편 등을 검출하기 위하여 제VIII인자에 대한 항체를 이용한 스크리닝이 사용될 수 있다.

일단 완전한 유전자가 cDNA 또는 염색체 DNA로서 확인이 되면, 구조 유전자내의 소정 결실이 여러가지 방법으로 이루어질 수 있다. 결실은 전체 길이의 제VIII인자 cDNA를 효소로 절단한 후 정제 단편의 변형 및 연결에 의해서 또는 부위-특이적 돌연변이 생성에 의하여, 특히 크래머 등이 Nucl. Acids Res.(1984)12 : 9441-9456에 기재한 바와 같은 루프-아웃 돌연변이 생성에 의해 만들어질 수 있다. 그로써 얻어지는 유전자는 그후 발현에 대해 제공된 기술분야에 공지의 각종 방법으로 조작될 수 있다.

원핵 및 진핵 숙주 두가지 모두 사용될 수 있으며, 박테리아, 효모, 포유류 세포, 예를 들어 CHO 세포, C127 세포, 사람의 '293' 세포, 골수종 세포, 또는 간 세포 같은 특정 세포, 및 COS 세포가 사용될 수 있다. 그러므로 제VIII인자의 야생형 잔사 및 번역조절영역을 인지하는 숙주에서 유전자가 발현되어야 하는 경우, 그의 야생형 5' 및 3'-조절영역을 가진 완전한 유전자가 적합한 발현 벡터내로 도입될 수 있다.

시미안 바이러스 40, 엡스타인-바르 바이러스, 보바인 파팔로마 바이러스, 백시니아 바이러스 등과 같은 포유류 바이러스의 복제 시스템을 이용하는 여러가지 발현 벡터가 존재한다.

유전자가 자연적으로 발생하는 야생형 전사 및 번역 조절 영역을 인지하지 않는 숙주에서 발현되어

야 하는 경우, 추가의 조작이 필요하게 된다.

편리하게도 각종 3'-전사 조절 영역이 공지이며 중지 코돈으로부터 아래쪽에 삽입될 수 있다. 구조 유전자 위쪽의 비-코딩 5' 영역은 엔도뉴클레아제 제한, Ba1 31절제 등에 의해 제거될 수 있다.

또는, 편리한 제한 부위가 구조 유전자의 5' 말단 가까이에 존재하는 경우에, 구조 유전자가 제한될 수 있고 구조 유전자의 손실된 뉴클레오티드에 대하여 어댑터가 제공되는 경우 구조 유전자의 촉진 유전자 영역과의 연결을 위해 어댑터가 사용될 수 있다.

전사의 5'-3'- 방향으로 전사 조절 영역과 번역 개시 영역을 가지며 또한 조절의 유도를 허용하는 조절서열; 결실 돌연변이체 단백질, 바람직하게는 제시된 숙주 세포에 의해 인지되는 분비 리더 서열을 포함하여 전 길이의 제VIII인자 또는 제VIII인자 콘지너를 코드화 하는 오픈 리딩 프레임 ; 및 전사와 번역의 종결 영역을 포함할 수 있는 외래 발현 카세트의 제공을 위해 각종 스트래티지가 사용될 수 있다.

발현 카세트는 추가로 적어도 하나의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 개시 및 종결 영역은 숙주 세포에서 기능적이며 동종성(원래의 숙주로부터 유도됨) 또는 이종성(외래 공급원으로부터 유도됨)의 어느 하나 또는 합성 DNA 서열일 수 있다.

그러므로 발현 카세트는 전연 공급원으로부터 전체 또는 부분적으로 유도될 수 있으며 숙주 세포에 대하여 동종성 또는 이종성 공급원의 어느 하나로부터 전체 또는 부분적으로 유도될 수 있다. 발현의 각종 DNA구조(DNA 서열, 벡터, 플라스미드, 발현 카세트)는 단리 및/또는 정제되고, 또는 합성되며, 그러므로 '자연 발생'이 아니다.

최적의 유전자 발현을 위해서, 번역 개시 코돈 ATG 주위의 뉴클레오티드 서열이 동물 세포에서 중요한 것으로 발견되었다.

예를 들면, 코작크는 Microbool. Reviews(1983) 47: 1-45에서, 이들 영역이 COS 세포에서 인슐린 같은 폴리펩티드의 발현에 미치는 효과를 광범위하게 연구하였다.

그러므로 개시 코돈 주위의 뉴클레오티드 서열을 변형하는 것이 필요하게 되었다.

이것은 부위-특이적 돌연변이 생성에 의해 또는 외인성 유전자를 고도발현 유전자의 개시 영역에 융합시킴으로써 행해질 수 있다.

예시적인 전사 조절 영역 또는 촉진 유전자로는, 박테리아에 대해서는 베타-gal 촉진 유전자, 아밀라제, 촉진 유전자, 람다 좌측 및 우측 촉진 유전자, trp과 lac 촉진 유전자, trp-lac 융합 촉진 유전자 등이 있으며; 효모에 대해서는 ADH-1 및 -2 촉진 유전자, PGK 촉진 유전자, 및 락타제 촉진 유전자와 같은 당분해효소 촉진 유전자 등이 있고 ; 포유류 세포에 대해서는 SV40 초기 및 후기 촉진 유전자, 사이토메갈로바이러스(CMV) 촉진 유전자, 베타-악틴 촉진 유전자, 아데노 바이러스의 큰 후기 촉진 유전자 등이 있다.

진핵 세포에서의 조절 서열로는, 예를 들어 SV40 촉진 유전자 같은 촉진 유전자 서열에 융합되어 키메라촉진 유전자를 형성하거나 발현 카세트의 다른 곳, 바람직하게는 촉진 유전자 서열에 근접한 곳에 삽입될 수 있는 사이토메갈로바이러스 인핸서 서열이 있을 수 있다. 구조 유전자의 발현은 또한, 예를 들어 우세한 증폭가능 유전자 마커에 대한 유전자를 구조 유전자에 대해 5' 또는 3' 직렬로 연결하여 선택 조건하에서 숙주 세포를 성장시킴으로써 증폭될 수 있다. 증폭가능 유전자의 실례로는 디하이드로폴산 산화환원효소(dhfr)에 대한 유전자가 있으며 그의 발현은 폴산염 길항제인 메토타렉세이트(mtx)에 대해 내성의 경향을 가지는 세포에서 증가될 수 있다. COS 세포와 같은 포유류 세포에서의 발현에 대하여 관심있는 것은 메탈로티오네인 촉진 유전자, 또는 SV40 초기 전사 촉진 유전자(SVep), 특히 SVep 촉진 유전자와 직렬로 있는 로우스 사르코마 바이러스-긴 말단 반복(RSV-LTR) 촉진 유전자를 사용하는, 제VIII인자 또는 그의 콘지너를 발현할 수 있는 발현 카세트이다.

촉진 유전자와 실시예 7에 따르는 발현 벡터와 조합하여 C127 세포에서 사용될 수 있는 촉진 유전자/인핸서 조합의 실례는 후르비츠 등에 의해 Nucl. Acids Res(1987)

15 : 7137-7153에 기재되어 있다. 최적의 발현을 위해서, 발현 카세트로의 인트론의 도입이 유익할 것이다. mRNA의 5' -부분에 있는 인트론이 바람직하다.

더불어, 분비 리더 및 프로세싱 신호를 코드화하는 구조 유전자에 5'-서열을 제공함으로써 융합된 유전자가 제조될 수 있다.

제VIII인자 폴리펩티드의 분비를 위해 자연 발생하는 제VIII인자 리더 서열이 사용되는 것이 바람직하지만, 페니실리나제, 알파-인자, 면역글로불린, T-세포수용체, 외막 단백질, 혈청 알부민, 조직 플라즈미노겐 활성화제, 인슐린, 소화트렉의 효소 등의 분비 리더를 포함하여 다른 신호 서열도 또한 사용될 수 있다.

적당한 리딩 프레임중의 분비리더를 제VIII인자 또는 그의 콘지너에 대한 구조 유전자와 융합시킴으로써 성숙한 제VIII인자가 배양 배지로 분비될 수 있다.

종결 영역은 개시 영역이 얻어지는 유전자의 3' 영역으로부터 또는 상이한 유전자로부터 유도될 수 있다.

많은 수의 종결 영역이 공지이고 동일 및 상이한 종과 속으로부터의 다양한 숙주에서 만족할 만하게 발견되어 있다.

종결 영역은 포유류 세포의 mRNA의 적절한 프로세싱에 대한 서열, 즉, 작은 인트론 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

발현 카세트의 제조 도중에, 각종 DNA 단편이 통상적으로 적합한 클로닝 벡터에 클론될 수 있으며

그것은 서열, 링커 등을 결합 또는 제거함으로써 DNA의 팽창, DNA의 변형 또는 조작을 허용한다.

정상적으로, 벡터는 대장균에서 적어도 상대적으로 높은 복사수로 복제할 수 있을 것이다. pBR322, pML2, pUC7-pUC19, pSP64, pSP65, pSP18, pSP19, pTZ18 및 pTZ18R, pTZ19 및 pTZ19R 등과 같은 벡터를 포함하여 많은 수의 벡터가 쉽게 클로닝에 활용될 수 있다.

클로닝 벡터는 최소한 대장균에서 기능적인 효과적인 복제 기원을 가지는 것이 특징이다.

또한 클로닝 벡터는 적어도 하나의 단일한 제한 부위, 통상은 복수의 단일 제한 부위를 가질 것이며 또한 다중 제한 부위, 특히 치환에 대하여 2개의 동일 제한 부위를 포함할 수 있다.

더불어, 클로닝 벡터는 형질전환에 대하여 선택을 제공하는 하나 또는 그 이상의 마커를 가질 것이다. 마커는 정상적으로 항생물질, 중금속, 독소 등과 같은 세포장해제에 대한 내성, 영양요구성 숙주의 상보성, 또는 파지에 대한 면역성을 제공할 것이다.

벡터와 카세트의 적절한 제한과, 필요에 따라 말단의 변형에 의해, 블런트 끝을 제공하기 위한 돌출부의 충전 또는 되돌이 절단에 의해, 링커의 첨가에 의해, 꼬리달기에 의해 발현 카세트 또는 그의 성분에 벡터를 연결 및 결합시키기 위한 상보성 말단이 제공될 수 있다.

어떤 경우에는, 벡터가 상이한 복제 시스템을 필요로 한, 상이한 숙주에서 복제될 수 있는 서플 벡터가 사용될 것이다.

플라스미드가 COS-1에서 증식하는 것을 허용하는 시미만 바이러스 40(SV40) 복제 기원을 사용하는 것이 바람직한 한편, C127 세포에서의 발현 벡터의 에피솜성 유지에 대해서는 보바인 파필로마 바이러스(BPV-1) 게놈이 사용된다.(예컨대 Howley et al., Meth. Enzymol. 101 : 387-402, 1983 참조).

발현 카세트는 적합한 세포 숙주에서의 에피솜성 유지를 위하여 복제 시스템내에 포함될 수 있거나 또는 복제 시스템 없이 제공될 수 있으며, 그때에는 숙주 게놈안으로 통합될 것이다. 숙주 유기체의 각종 DNA 구조로의 형질전환의 방식은 본 발명에 중요하지 않다. 형질전환 같은 공지 기술에 따라 인산칼슘 침전된 DNA, 전기영동, 세포를 바이러스로 접촉시킴에 의한 형질전환, 세포로의 DNA의 마이크로주사 등을 사용하여 DNA가 숙주만에 도입될 수 있다.

숙주 유기체로서, 미생물 세포뿐만 아니라, 정상 일차 세포 또는 배양된 일차 조직으로부터 유도된 셀 라인이 사용될 수 있다. 숙주 세포로는 포유류 셀 라인, 바람직하게는 햄스터 CHO 세포, 마우스 C127 세포 또는 사람 '293' 세포가 바람직하지만 미생물 세포, 예컨대 효모, 바람직하게는 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 종, 박테리아, 바람직하게는 바실러스(*Bacillus*) 종도 또한 사용될 수 있다.

제VIII자 콘지너 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터로 포유류 셀 라인을 안정하게 형질전환하고 계속해서 숙주 염색체로 삽입된 벡터의 증폭을 위해서는, 특히 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)가 적당하다.

형질전환은 발현 벡터와 함께 dhfr 또는 G418(neo-) 내성 유전자 등과 같은 선택용 마커 유전자로 숙주 세포를 형질전환하는 것과 계속해서 염색체 안으로의 통합 및 안정한 형질전환에 대한 선택을 포함한다.

숙주 셀 라인에 대한 안정한 형질전환에 대한 다른 방법은 BPV-1 서열을 함유하는 발현 벡터를 사용한다.

C127 세포가 이 목적에 아주 적당하다.

형질전환은 BPV-1 서열을 함유하는 발현 벡터로 숙주 세포의 형질전환을 포함한다.

형질전환체는 중점(foci)의 형성에 의해 인지된다.

적당한 형질전환체가 제조되고 실시예 6 및 7에 따라 가비 코아테스트(Kabi Coatst

)를 사용하여 제VIII자 환성에 대하여 스크린된다. 대조적으로, 발현이 pSV2-유도 발현 벡터로 COS-1 세포같은 과도 형질 전환 시스템에서 수행되는 경우 선택 단계는 없다.

일단 구조 유전자가 적합한 숙주만에 도입되면, 숙주는 성장되어 구조 유전자를 발현할 수 있다.

숙주 세포는 적합한 배지에서 고밀도까지 성장할 수 있다.

촉진 유전자가 원핵 시스템에서와 같이 유도가능한 경우, 허용 조건, 예컨대 온도 변화, 대사 생성물 또는 영양분의 소모 또는 과잉분 등이 활용될 것이다.

포유류 시스템에서는, 증폭가능 유전자가 구조 유전자와 협력하여 사용되는 경우, 적합한 증폭 수단이 사용될 것이다.

융합 또는 비융합 발현 생성물이 분비되는 경우, 생성물은 종래 방법에 의하여 성장 배지로부터 단리될 수 있다.

분비되지 않는 경우, 숙주 세포가 종래 방법에 의해 수확되고 용해될 것이다.

그런 다음 소정 생성물이 종래 기법, 예를 들어 고정 항체를 이용한 친화성 크로마토그래피, 아미노핵심-세파로스 상에서의 크로마토그래피 또는 혼합 고분자 전해질 방법에 의하여 단리 및 정제된다.

재조합 생성물은 클리코실화 또는 비-클리코실화 될 수 있어서 야생형 또는 다른 클리코실화 형을 갖는다.

클리코실화 양은 부분적으로는 특정 펩티드의 서열, 뿐만 아니라 그것이 생성되는 유기체에 좌우될

것이다.

그러서, 대장균 세포에서의 생성물의 발현은 비클리코실화 생성물을 유발할 것이고, 포유류 세포에서의 생성물의 발현은 아생형 펩티드와 유사한 글리코실화 생성물을 유발할 것이다.

(제Ⅷ인자 콘지너의 사용)

본 화합물은 체내 및 시험관내에서 다양한 각종 방법으로 사용될 수 있다. 본 화합물은 A형 혈우병 증상을 나타내는 환자를 치료하기 위한 의약 제제의 활성 성분으로서 사용될 수 있다.

의약 조성물이란 포유류에 투여될 어느 제제를 의미한다.

그러서, 제Ⅷ인자 활성을 가지는 의약 제제는 적절하게 혈액을 응고하지 못하는 A형 혈우병 관련 증상을 경감시키기 위하여 포유류에 투여될 수 있는 제제이다.

의약 조성물 제조시에, 일반적으로 본 폴리펩티드는 기술분야에 공지된 과정에 따라 비경구적으로 허용가능한 비이클 및 다른 적당한 부형제와 함께 혼합된다.

의약 제제는 편리하게도 용액 제조용으로 적당한 멸균 용액, 바람직하게는 수혈자의 혈액과 등장인 용액의 첨가에 의하여 재구성될 수 있는 본 폴리펩티드의 멸균 동결건조 제제일 수 있다.

의약 제제는 단일 단위 또는 다중-투약 용기에, 예를 들어 밀폐된 앰플 또는 바이알에 보관될 수 있다.

그 사용은 잠재성에 대하여 적당히 조정된, 공지의 사람 제Ⅷ인자 폴리펩티드의 그것과 유사할 것이다.

본 폴리펩티드는 체내에 예컨대, 정맥내, 복강, 피하 등의 주사에 의해 투여될 수 있다.

본 화합물은 체내 또는 시험관내에서 용도를 발견할 수 있는 본 화합물에 대한 항체 제조에도 또한 사용될 수 있다.

항체는 종래 방법으로, 면역원으로서 본 폴리펩티드를 사용하여 폴리펩티드를 포유류 숙주, 예컨대 마우스, 황소, 염소, 양, 토끼 등의, 특히 보조액, 예컨대 완전 프로인트 보조액, 수산화 알루미늄 겔 등과 함께 주사함으로써 제조될 수 있다.

그런 다음 숙주는 출혈되고 출혈된 혈액이 다중클론성 항체의 단일체 사용되고, 또는 마우스의 경우에는 말초혈액 임파구 또는 비장 임파구(B 세포)가 염색체를 본 화합물에 특이적인 항체의 단일 클론성 발현을 위해 고정시키기 위한 적합한 골수종 세포와의 융합에 사용된다.

다중클론성 또는 단일클론성 항체가 제조된 다음에, 시험 혈액에 대하여 세포 또는 생리적 체액과 같은 샘플중의 본 폴리펩티드의 존재의 진단 또는 검출에 사용될 수 있다.

본 폴리펩티드의 검출의 실패는 A형 혈우병의 상태를 의미할 것이다.

제Ⅷ인자 mRNA에 상보하는 서열을 포함하는 프로브 또한 제조될 수 있으며 예컨대 환자가 제Ⅷ인자를 만들고 있지만, 그의 활성을 방해하는 항체를 발생하고 있는지를 측정하기 위하여 사용될 수 있는 제Ⅷ인자의 세포중의 존재 및/또는 양의 진단보조제로서 사용될 수 있다.

혼성용 서열을 함유하는 것으로 여겨지는 세포, 조직 샘플 또는 체액을 포함하는 시험 샘플은 어떠한 세포라도 용해하도록 처리될 수 있고, 그런 다음 구아니딘 염산염 같은 변성체로 처리되어 단일 스트랜드의 mRNA를 방출한다.

그런 다음 예컨대 <sup>32</sup>p 또는 비오틴화 뉴클레오티드로 표지된 프로브가 세포 mRNA와 혼성되어 이중 스트랜드의 복합체를 형성하고, 그것은 표지에 의해 검출될 수 있다.

몇 가지 목적을 위하여 제Ⅷ인자 mRNA의 양을 정하는 것이 바람직할 것이다.

이것은 공지양의 단일 스트랜드 제Ⅷ인자 mRNA를 함유하고 있는 대조 샘플중에서 검출된 표지의 양과 시험 샘플중에서 검출된 표지의 양을 비교함으로써 행해진다

다음의 실시예를 제한하는 것이 아닌 예시에 의하여 제공한다.

(실형)

일반적인 클로닝 기법을 마니아티스 등의 분자 클로닝 : 실험실 편람, 콜드 스프링 하버 실험실, CSH, NY, 1982에 기재된 바와 같이 사용하였다. 모든 DNA-변형효소를 상업적 판매자로부터 구하였다. 그것들은 제조업자의 지시에 따라 사용하였다.

DNA 정제 및 분리를 위한 재료 및 장치를 판매자의 지시에 따라 사용하였다.

(실시예 1)

(발현 벡터 pCLB 201의 제조)

pCLB 201은 전사 개시에 대하여 정확한 방향의 RSV-LTR 촉진 유전자와 전체 길이의 제Ⅷ인자 cDNA를 포함하는 발현 벡터이다(제2도 참조). 그것은 물리간과 베르그의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1981)78 : 2072 기재의 pSV2-벡터로부터 유도한다.

플라스미드 pSV2.tPA(Van Zonneveld et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1986) 83 : 4670-4674)의 단일한 HindIII 부위를 HindIII 스틱커 끝을 블런트로 만든 후 블런트 끝에 Sal I -링커(5'-CGTCGACG-3')를 연결함으로써 Sal I 부위로 변형시켰다.



Sal I 부위를 함유하는 플라스미드를 선택하여 pCLB91로 표시하였다. 이 플라스미드는 HindIII 부위에 삽입된 Sal I 링커를 함유한 것을 제외하고는 pSV2.tPA와 동일하다.

사람간으로부터의 제VIII인자 mRNA의 단리 및 제조, 그의 cDNA의 정제 및 확인과 플라스미드 pCLB89를 유발하는 플라스미드 pEP121로의 조합은 참고로 본원에 삽입된 특허 출원 EP 0253455에 기재되어 있다.

제VIII인자 cDNA(제1도 참조)를 함유하고 있는 pCLB89로부터 7440bp의 긴 Sal I-Hpa I 단편을 정제하여 Sal I 과 Bal II로 잘라놓은 pCLB91에 삽입시켰다.

그 결과 형성되는 발현 벡터 pCLB200은 충전되어 있는 Bgl II 부위에 연결된 Hpa I 부위와 함께 무상 Sal I 부위를 함유하였다.

플라스미드 pRSVneo (Gorman, DNA Cloning, 1985, ed., D. Glover, IRL Press, Washington, Oxford, pp 143-149)를 Nde I과 HindIII로 소화시킨 후 DNA 중합효소의 클레노우 단편과 함께 항온반응시켜서 블런트 끝을 만들고 로우스 사로코마 바이러스-긴 밀단 반복(RSV-LTR) 서열을 함유하는 0.6kb 단편을 단리하여 유사하게 블런트-끝으로 만들어 놓은 pCLB200의 Sal I 부위에 삽입시켜 발현 벡터 pCLB201을 형성하였다(제2도- 참조).

(실시예 2)

pCLB202의 제조

뉴클레오티드 서열 위치 2660의 Pst I 부위(제3b도 참조)부터 위치 4749의 BamH I 부위(제3b도 참조)까지 결실된 제VIII인자의 결실 돌연변이체를 특허출원 EP 0253455에 기재된 바와 같이 플라스미드 pGB860안에 제조하였다.

pGB860의 제VIII인자 DNA는 중심부의 695 아미노산을 코드하는 DNA가 결실되어 있다.

발현 벡터 pCLB202를 pGB860과 pCLB201로부터 유도하였다.

두 플라스미드를 Kpn I과 Xba I 제한효소로 소화시켰다

pGB860의 3.1kb Kpn I-Xba I 단편을 pCLB201의 7kb Kpn-Xba I 단편을 연결하였다. 그 결과 형성된 플라스미드 pCLB202는 무상 Kpn I 과 Xba I 부위를 갖는다.

그 구조를 제3e도에 도시한다.

(실시예 3)

(pCLB203의 제조)

(A) pCLB100 :

pCLB89의 Sal I-Hpa I 7440bp 단편(제2도 참조)을 Sal I과 Sma I으로 잘라놓은 플라스미드 pSP64(Meton et al., Nucleic Acids Res.(1984) 12:7035-7056)에 삽입시켰다

그 결과 형성된 플라스미드 pCLB100은 무상 Sal I 부위와 Sma I-끝에 연결된 Hpa I-끝을 함유하였다.

(B) pCLB101 : (괄호안의 번호는 제1도를 따른다)

(1) 플라스미드 pCLB100을 Kpn I과 TthIII I로 소화시켜서 631bp 단편 : Kpn I(1817)에서 TthIII I(2447)까지를 생성하였다.

631bp 단편을 정제한 후 MaeIII(2199)로 잘랐다 MaeIII 스티키 끝을 채워서 383bp 단편을 만들었다.

(2) 플라스미드 pCLB100을 Apa I과 Ban I으로 소화시켰다. 669bp의 Apa I(6200)

-Ban I(5532) 단편을 단리하였다.

(3) 플라스미드 pCLB100을 HgiA I으로 소화하여 634bp의 HgiA I-단편을 생성하였다. 단편을 T4DNA 중합효소와 함께 항온반응시켜 블런트 끝을 만든 후, Ban I으로 소화시켜 565bp의 단편을 제조하였다.

(4) 플라스미드 pCLB100을 Apa I과 Kpn I으로 소화시켜서 대장균에서 유지 및 증식하기 위한 벡터 서열을 함유하는 5.9kb의 긴 단편(Apa I (6200)에서 Kpn I(1817)까지)을 제조하였다.

(5) 단계(1)에서 (4)까지에서 얻어진 단편들을 정제하여 등몰량의 단편과 10배몰의 Mlu I-링커 (CCACGCGTGG)를 연결하여 플라스미드 pCLB101을 만들었다. 플라스미드 pCLB101은 Kpn I, Ban I 및 Apa I 부위에 더불어 Mae III과 HgiA I 부위사이에 Mlu I-링커를 함유하였다(제3b도 참조). 아미노산 D-712와 Q-1638(제1도) 사이의 4개의 특정 아미노산(P-R-V-A)을 제3f도에 도시한다.

(C) pCLB203 :

pCLB101과 pCLB201을 호소 Kpn I과 Xba I으로 소화시켰다. pCLB101로부터의 2.4kb Kpn I-Xba I 단편을 pCLB200으로부터 유도한 7.0kb Kpn I-Xba I 단편에 연결하였다. 그 결과 생성된 플라스미드 pCLB203은 무상 Kpn I 과 Xba I 부위를 소유하였다. 그의 구조를 제3f도에 도시한다.

(실시예 4)

(pCLB212의 제조)

pCLB212를 크래머 등이 *Nucleic Acids Res.* 12 : 9441-9456(1984)에 기재한 바와 같이 루프-아웃 돌연변이생성 기법을 사용하여 제조하였다. 제Ⅷ인자 cDNA의 중심 부분의 결실돌연변이생성을 다음의 올리고 뉴클레오티드 :

(프라이머 IV)

3' TTC. CAA. AGA. TCA. ACA. CTG. GTT. TTG. GGT. GGT. CAG. AAC 5'를 사용하여 수행하여 아미노산 Lys 713에서 Ser-1637까지를 코드하는 서열이 내부결실된 제Ⅷ인자 cDNA를 제조하였다.

해당하는 단백질은 전체길이의 제Ⅷ인자 단백질과 비교하여 925 아미노산 잔기의 내부 결실을 함유한다.

루프-아웃 돌연변이생성에 대한 표적 단편을 얻기 위하여 pCLB203(실시에 3)으로부터 유도된 1.4kb의 HindIII-Pst I 단편을 선택하였다. HindIII-부위의 뉴클레오티드 위치(제1도)는 변형될 영역의 위쪽의 전체 길이의 제Ⅷ인자 서열의 1025에 있고, Pst I 부위는 영역의 아래쪽 위치 5165에 있다. 이들 부위는 제2도에 표시한다. 1.4kb 단편을 M13mp9에 하위클론하고 루프-아웃 돌연변이생성을 후속시켰다.

정확히 결실된 단편을 선택한 후, 소정 결실을 함유하는 HindIII-Pst I 단편의 Kpn I-Pst I 부분을 단편을 스티키의 단일한 제한효소소 끝으로 제조함으로써 다음 단계에 따라 적합한 발현 벡터에 삽입시켰다.

(번호는 제 1도를 따른다) :

단계 1. 돌연변이체 제Ⅷ인자 분자의 발현을 위해 새로운 플라스미드 pCLB211을 제조하였다. pCLB89로부터 유도된 7440bp의 Sal I-Hpa I 단편(제1도)을 포유류 세포에서 후기 SV40 촉진유전자로부터의 전사를 가능하게 하는 발현 벡터 pSVL(Pharma

cia, No. 27-4509-01, Uppsala, Sweden)에 삽입시켰다. 플라스미드 pSVL을 Xho I 과 Sma I 으로 절단하였다. 그결과 형성된 pCLB211은 두 효소의 두개의 5'돌출 끝이 동일하므로 Sal I 끝에 연결된 Xho I 끝과, Hpa I 끝에 연결된 Sma I 끝을 함유한다.

단계 2. 플라스미드 pCLB211을 Apa I 과 Sal I 으로 소화시켰다. 1.4kb의 Apa I (6200) -Sal I (pCLB211의 pSVL-부분에서 단일하다)단편을 단리하였다.

단계 3. 플라스미드 pCLB100을 Nde I, Pst I 및 Apa I으로 소화시켰다. 두개의 단편을 단리하였다. 363bp의 Pst I(5165)-Nde I(5527) 단편과 674bp의 두번째 단편인 Nde I 5527)-Apa I(6200).

단계 4. 플라스미드 pCLB100을 Kpn I과 Sac I으로 소화시켰다. 1799bp의 Kpn I(1817)-Sac I(19)을 단리하였다.

단계 5. 플라스미드 pCLB211을 Sal I과 Sac I으로 소화시켰다. 4.5kb의 Sal I(pSVL 벡터에서 단일하다)-Sac I(19) 단편을 얻었다.

단계 6. 서열 분석으로 증명된바 소정 결실이 포함된 Hind III(1025)-Pst I (5165)단편을 함유하는 M13-박테리오파지를 Kpn I과 Pst I으로 소화시켰다. 584bp의 Pst I(5165)-Kpn I(1819)단편을 단리하였다.

단계 7. 단계 2에서 6으로부터 단리한 6단편을 등몰량으로 혼합하여 연결시켰다. 모든 6단편을 함유하는 플라스미드를 선택하였다. 플라스미드 pCLB212는 예시 화합물 3b(표 11)를 발현하였다. 그 화합물 3b는 네개의 아미노산에 해당하는 Mlu I 링커를 잃어버림으로써 화합물 3(제3f도에 도시됨)과는 다르다.

(실시에 5)

(pCLB208, pCLB209 및 pCLB210의 제조)

pCLB208, pCLB209 및 pCLB210을 크래머 등이 *Nucleic Acids Res.*(1984) 12 : 9441-9456에 기재한 바와 같은 루프-아웃 돌연변이생성기법을 사용하여 제조하였다.

(a) 루프-아웃 돌연변이생성

제Ⅷ인자 cDNA의 중심부의 결실돌연변이생성을 다음의 올리고뉴클레오티드 :

프라이머 I :

3' TTA. CGG. TAA. CTT. GGT. TCT. CTT. TAT. TGA. GCA. TGA. TGA 5'

프라이머 II :

3' TTA. CGG. TAA. CTT. GGT. TCT. AGT. CAA. CTT. TAC. TTC. TTC 5'

프라이머 III :

3. TTA. CGG. TAA. CTT. GGT. TCT. TCG. AAA. GTT. TTC. TTT. TGT 5'

를 사용하여 수행하여 아미노산 S-741부터 R-1648까지(프라이머 I), S-741부터 I-1668까지(프라이머 II) 및 S-741부터 R-1689까지(프라이머 III)를 코드하는 서열이 내부 결실된 제Ⅷ인자 cDNA를 얻었다. 해당하는 단백질은 각각 908(I), 928(II) 및 949(III) 아미노산 잔기가 내부 결실된다.

(B. 표적 단편의 제조)

루프-아웃 돌연변이생성에 대한 표적 단편을 얻기 위하여 pCLB101로부터 유도되는 0.8kb의 단편을

다음과 같이 제조하였다.

플라스미드 pCLB101을 EcoR I으로 소화시키고 EcoR I 부위를 채운다음 이어서 Kpn I으로 추가로 소화시켰다. 479bp의 Kpn I(1819)-EcoR I(2297) 단편(뉴클레오티드 위치의 숫자는 제1도에 기재된 바와 같다)을 단리하였다. 플라스미드 pCLB10.1을 BamH I으로 소화시키고; 스티키 끝을 채운 후 추가로 Pst I으로 소화시켰다. 416bp의 BamH I(4749)-Pst I(5165) 단편을 단리하였다. 이들 단편을 등몰량으로 연결시켜서 M13mp19 앰버에 하위클론하였다. 제VIII인자 코딩 서열에서 변형될 영역 위쪽의 1819로부터 그 영역의 아래쪽 5165까지에 해당하고 큰 부분이 결실된 895bp의 Kpn I-Pst I 단편을 함유하는 M13 박테리오파지를 루프 아웃 돌연변이생성을 위해 선택하였다. 박테리오파지 M13에서 프라이머 I, II 또는 III으로 얻어진 정확히 결실된 단편을 선택한 후 소정결실을 함유하는 Kpn I-Pst I 단편을 다음의 단계를 사용하고 스티키의 단일한 제한 효소끝으로 단편을 제조함으로써 pCLB211(실시에 4참조)로부터 유도된 적합한 발현 벡터안에 삽입하였다(숫자는 제1도를 따른다).

(1) 플라스미드 pCLB211을 Apa I과 Sal I으로 소화시켰다. 1.4kb Apa I(6200)-Sal I(pCLB211의 pSVL-부분에서 단일하다) 단편을 단리하였다.

(2) Nde I, Pst I 및 Apa I으로 소화시킨 플라스미드 pCLB100으로부터 363bp의 P

st I(5165)-Nde I(5527) 단편과 674bp의 Nde I(5527)-Apa I (6200) 단편을 단리하였다.

(3) 플라스미드 pCLB100을 Kpn I과 Sac I으로 소화시키고 1799bp의 Kpn I(1817

)-Sac I(19) 단편을 단리하였다.

(4) 플라스미드 pCLB211을 Sal I과 Sac I으로 소화시켰다. 4.5kb의 Sal I(pSVL 벡터에서 단일함)-Sac I (19) 단편을 단리하였다.

(5) 소정의 돌연변이를 일으킨 단편을 함유하는 M13-박테리오파지를 Kpn I과 Pst I으로 소화시켰다. 소정의 돌연변이를 함유하는 Kpn I -Pst I 단편을 모든 세가지 돌연변이생성에 대하여 단리하였다.

(6) 상기 (1)에서 (5)로부터 6단편을 단리하여 등몰량으로 혼합 및 연결시켰다. 모든 소정의 단편을 함유하고 있는 플라스미드를 혼성체 형성 및 제한 효소 소화에 의하여 선택하였다. 상기 제시한 프라이머 I, II 또는 III을 사용하여 표 I 에 기재한 예시 화합물의 발현을 위해 새로운 3개의 발현 벡터를 제조하였다:

1. 화합물 7에 대해 프라이머 I 로 pCLB208 ;

2. 화합물 8에 대해 프라이머 II로 pCLB209 ; 및

3. 화합물 9에 대해 프라이머 III으로 pCLB210.

(실시에 6)

재조합 제VIII인자 DNA의 과도발현과 생산되는 단백질의 측정

#### A. COS-1 세포의 형질전환과 대사적 표지화

앞의 실시에에 따라서 얻어진 발현 벡터를 DEAE 형질전환기법을 사용하여 COS-1 세포에 도입시켰다. 벡터 DNA를 2시간동안 DEAE-덱스트란과 함께 반응시킴으로써 침전시킨후, 로파타등이 Nucleic Acids Res. 12, 5707, (1984)에 및 루드만과 마그누손이 Nucleic Acids Res. (1983) 11 : 1295에 기재한 바와 같이 2시간동안 클로로퀸 충격처리를 하였다.

COS-1 세포의 성장을 위해 및 또한 조건 배지를 의해 사용된 배지는 10%(부피/부피) 가열 비활성된 우태아 혈청(Flow)이 첨가된 이스코브스 DMEM(Flow)이었다. 배지를 형질전환 48시간 후에 교환하였다. 조건배지를 48시간후에 수집하였다.

형질전환된 세포에서의 단백질의 대사적 표지화는 혈청 유리 RPMI-배지(Gibco)를 사용하여 수행하였다. 형질전환 2일후에 형질전환체를 4시간동안 50  $\mu$ Ci/ml의 L<sup>-35</sup>S-메티오닌(Amersham, 1985; 370MBeq/330  $\mu$ l; 특이적 활성: 100Ci/mMole 이상)과 함께 배양한 후 조건 배지를 수득하기 전에 1mM L-메티오닌과 함께 방제 배양하였다. 단백질 분해를 억제하기 위하여, 페닐메탄 술폰닐 플루오라이드(PMSF) 같은 프로테아제 저해제를 수득후의 조건 배지에 첨가하였다. 단백질 글리코실화를 저해하기 위하여 조건배지에 투니카마이신을 첨가할 수 있다(최종 농도 0.001mg/ml). 조건 배지를 형질전환 4일후에 수득하였다; 생산된 단백질을 측정하였다.

#### B. 재조합 제VIII인자의 생물학적 활성

조건 배지를 (1) 표준 응집 또는 응고 측정법과 (2) 색원체의 활성 측정법(Kabi Coatest)을 사용하여 제VIII인자 활성에 대하여 측정하였다.

표준 응집 또는 응고 측정(소위 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간)을 벨드캄프등이 Thromb.

Diath. Haemorrh. (1968) 19 : 279에 기재한 바와 같이 혈우병 혈장을 사용하며 수행하였다. 조건 배지를 시험전에 시트르산 처리하였다.

색원체 활성 또는 카비 코아테스트 측정을 제조업자인 카비-비트롬의 지시에 의한 과정에 따라 수행하였다. 단, 규정된 모든 부피를 4로 나누고 조건 배지 25  $\mu$ l를 시험하였다. 제VIII인자-계 단백질을 15분동안 활성화시키고 그때에 색원체 기질(S222)을 첨가하였다.

제VIII인자 활성의 저해를 표준 베데스다 프로토콜(Kasper et al., Thromb. Diath Ha

emorrh. (1975)34 : 869-871)에 따라 측정하였다. 사용한 면역글로불린은 사용에 앞서 이온 교환 및 단백질 A 세파로스 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

제Ⅷ인자에 대한 생물학적 활성 측정의 기준은 ml당 1U의 제Ⅷ인자 활성 또는 항원을 함유하는 것으로 추정된 시트르산 처리된(0.5mM 최종농도) 혈장의 푸올이었다.

각종 결실 단백질에 대한 생물학적 활성을 표 11에 제시한다. 결실된 돌연변이체 단백질은 제Ⅷ인자 응고 활성을 나타냈다.

더불어, 재조합 단백질 용액의 정립된 활성은 저해제; 즉, 제Ⅷ인자에 대한 항체를 혈액내에 가지고 있는 환자로부터 얻어진 혈장-유도 제Ⅷ인자 활성의 저해제 및/또는 소위 저해제-혈청으로 알려진 항체의 첨가후에 저해되는 것으로 나타났다.

### C. 제Ⅷ인자와의 면역학적 교차-반응성

#### (1) 단일클론성 항체의 제조

Balb/c 마우스를 치료 목적으로 사용된 제Ⅷ인자 농축물(Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam, The Netherlands

ds)의 한냉침전물의 아가로스 겔여과에 의해 얻어진 정제된 사람 제Ⅷ인자-폰 빌레브란드 인자 복합체로 면역시켰다. 반 모우릭과 모히타르, Biochem Biophys. Acta 221 : 677-679(1970). 임파구 혼성체 형성을 갈프레 등이 Nature(1977) 266 : 550-552에 기재한 바와 같이 수행하였다. 제Ⅷ인자에 대한 단일클론성 항체를 생성하는 클론의 선택을 위해 사용된 기법의 설명은 다른 곳에 기재되어 있다(Stel, 1984, Ph.D. thesis, University of Amsterdam, The Netherlands). 제Ⅷ인자에 대한 단일클론성 항체를 유럽 특허출원 EP 0253455에 기재된 바와 같이 제Ⅷ인자 폴리펩티드와의 반응성에 따라 확인하였다.

#### (2) 제Ⅷ인자 폴리펩티드에 대한 다중클론성 항체

토끼를 크로마토그래피에 의해 정제된 제Ⅷ인자 제제로 표준 방법에 의해 면역시켰다(Stel, 상기 동일). 그로써 얻어진 항체를 유럽 특허출원 EP 0253455에 기재된 바와 같이, 정제된 제Ⅷ인자-폰 빌레브란드 인자 또는 정제된 폴리펩티드를 사용하여 면역블롯팅에 의해 확인하였다. 항체를 폴리아크릴아이드 겔 전기영동에 의해 분리한 후 표적 단백질로서 니트로셀룰로스 시트에 옮겼다. 세개의 다른 다중클론성 항혈청을 얻었다 : RH63271, RH63272 및 RH63275. 항혈청은 80kDa 더블렛(doublet), 92kDa 폴리펩티드 및 보다 큰 폴리펩티드와 반응하였다. 이들 항혈청은 또한 제Ⅷ인자의 보다 작은 단편과 반응하였다.

#### (3) ELISA

새로 개발된 ELISA(효소 결합 면역흡착 측정법)를 조건 배지에서 제Ⅷ인자 항원을 검출하기 위하여 사용하였다. 방법은 다음과 같다.

ELISA 플레이트를 0.05M 탄산염완충액, pH 9.8중의 제Ⅷ이나 특이적 단일클론성 항체 CLB CAgA(5mg/1)의 적당한 희석액을 웰당 200 $\mu$ l씩 첨가하여 피복하였다. 플레이트를 봉하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 모든 배양 사이에 플레이트를 0.05% 트윈-20을 함유하고 있는 PBS로 적어도 1분동안 플레이트위에 놓아 두면서 3회 세척하였다.

시험 샘플 또는 정상 혈장의 일련의 희석액을 이중으로 웰에 피펫으로 넣었다(200 $\mu$ l/웰). 플레이트를 봉하여 교반없이 2시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 상기와 같이 세척하였다. 항원의 희석에 대해서는 50mM Tris-HCl 완충제, 2% 우혈청 알부민 및 1.0M 염화나트륨 pH 7.4를 함유한 완충액을 사용하였다.

CLB-CAg17-양고추냉이 과산화수소 포함체를 50mM Tris-HCl 완충제, 0.2% 트윈-20 및 1.0M 염화나트륨, pH 7.4를 함유한 완충액으로 대략 10,000배(필요한 민감성에 따라) 희석하였다. 이 희석액중 200 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 봉하여 어두운 곳에서 2시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

상술한 바와 같이 플레이트를 세척한 후, 0.1M 아세트산염/시트르산 완충액, pH 5.5중의 테트라메틸벤지딘(TMB)(0.1g/1)과 과산화수소(0.006%)의 새로 제조한 용액 150 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 어두운 곳에서 30분동안 실온에서 배양하였다. 호소반응을 150 $\mu$ l의 2N 황산을 첨가함으로써 중지시켰다. 흡광도를 ELISA 마이크로리더를 사용하여 450nm에서 측정하였다. 표 11에 제시된 바와 같이 배지중의 제Ⅷ인자 단백질의 양의 증가에 대략 비례하여 연속조건배지중의 제Ⅷ인자 활성이 증가하였다.

### D. 크기 측정

생성된 제Ⅷ인자 단백질의 크기를 다음과 같이 겔 전기영동을 사용하여 측정하였다.

혈장-유도 제Ⅷ인자에 대하여 일어난 단일클론성 및 다중클론성 혈청을 면역침전에 대하여 사용하였다. 항체를 단백질 A-세파로스상에 고정시키고(단백질 A-세파로스 10mg당 혈청 15 $\mu$ l), 그런 다음 대사적으로 표지된 재조합 제Ⅷ인자-계 화합물과 함께 배양하였다. 고정된 재조합 단백질을 10% 베타-메르캅토에탄올을 사용하여 환원시킨 후, 5% 폴리아크릴아미드 SDS 겔 전기영동 시스템(Laemmli, Nature (1972) 2

27 : 680-685)상에서 분리하였다. 제4도 및 표 11에 도시된 바, 재조합 제Ⅷ인자-계 단백질은 글리코실화된 단백질로 보이는 크기를 갖는다. 더 작은 밴드는 또한 대조 라인에도 나타났다.

표 11에 나타난 결과를 토대로 하여 아스파라긴-연결 글리코실화의 공지 저해제인 투니카마이신의 배지내의 존재유무에 따라 형성된 단백질의 크기의 차이가 상당하므로, 본 발명의 재조합 제Ⅷ인자-계 단백질은 글리코실화된다고 결론지을 수 있다.

## (실시예 7)

제VIII인자 활성을 가지는 단백질을 생성하는 안정한 셀라인의 제조

## A. CHO 세포의 발현

플라스미드 pCLB203(10 µg)과 pAdD26SV(A)-3(1 µg, Kaufman and Sharp, M

oi : Cell Bio (1982)2 : 1304-1319)을 인산칼슘 침전 기법(Graham and Van der Eb, Virology (1973) 52 : 456-467)을 사용하여 dhfr-결핍 CHO 세포(Chasin and Urlaub, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77 : 4216-4220)에 도입하였다. 제VIII인자와 dhfr 코딩 서열의 증폭은 카우프만파 샤프에 의해 J. Mol. Biol. (1982) 159 : 601-621에 기재된 바와 같이 메도트렉세이드의 농도를 증가시키면서 단계별 투여함으로써 이루어졌다. 200nMtx에 내성인 독립 형질전환체를 취하여 안정한 셀 라인으로 정하였다. 여러개의 이들 셀 라인은 배양 배지 ml당 75mU의 제VIII인자 활성을 생성하였다. 배양 배지로 분비되는 제VIII인자 활성의 양은 증가하는 농도의 mtx를 사용하여 제VIII인자 코딩 서열을 추가로 증폭시킴으로써 추가로 증가될 수 있다.

## B. C127 세포에서의 발현

상술한 바와 같이, 발현 벡터는 진핵세포만으로 도입될 수 있고, 그 안에서 숙주 세포의 게놈에 통합된다. 연속적으로 발현 카세트는 증폭될 수 있다. 발현 벡터의 통합의 또다른 점은 에피솜으로서의 그의 안정한 유지이다. 후자의 실례로는 에피솜성 BPV-시스템(Howley et al., Meth. Enzymol. (1983) 101 : 387-402)을 사용한 '돌연변이체' 제VIII인자 단백질 중 하나의 발현이다.

BPV-1 게놈(BamH I 절단된)을 먼저 BamH I 부위의 양쪽에 Xho I 부위를 함유하는 pTZ18R(Pharmacia)의 BamH I 절단 유도체에 도입하였다. 계속해서 그 결과 형성된 pTZX-BPV 플라스미드를 Xho I을 사용하여 절단하여 Xho I 돌출끝을 가지는 2.9kb pTZ 단편과 8kb BPV-단편을 만들었다. 후자의 단편을 자신의 단일한 Sal I 부위에서(원래의 pSVL 벡터의 위치 2040에서) 절단되어 있는 플라스미드 pCLB212에 연결하였다. 그결과 형성되는 발현 벡터 pGB881은 SV40 후기 촉진유전자, 2775bp가 없는(주로B-도메인의) 제VIII인자 cDNA 코딩 서열 및 SV40 후기 폴리아데닐화 신호를 함유한다.

BPV-게놈의 존재에 기인하여 이 벡터는 마우스 C127 세포와 같은 적절한 숙주세포에서 에피솜으로서 유지될 수 있다. 플라스미드 pGB881(10 µg)을 인산칼슘 침전 기법(Graham and Van der Eb, 상기 동일)을 사용하여 C127 세포에 형질전환시켰다. 형질전환 14일후 중점을 단리하고 계속해서 안정한 셀 라인을 정립하였다. 여러가지 셀 라인은 배양 배지 ml당 40mU의 제VIII인자 활성을 생성하였다.

## (실시예 8)

## pCLB204의 제조

pCLB204를 크래머등(1984)에 의해 기재된 바와 같은(일반적 방법, 2참조) 루프-아웃 돌연변이 생성 기법을 사용하여 제조하였다. 제VIII인자 cDNA의 중점 부분의 결실 돌연변이를 다음의 올리고뉴클레오티드 :

프라이머 V :

3' TAG. GTT. TAA. GCG. AGT. CAA. GTT. TTG. GGT. GGT. CAG. AAC. 5'를 사용하여 수행함으로써 아미노산 Ala-375에서 Ser-163가 (프라이머 V)을 코드하는 서열이 내부 결실된 제VIII인자 cDNA를 얻었다.

해당하는 단백질은 1263 아미노산이 내부 결실된다.

루프-아웃 돌연변이 생성에 대한 표적 단편을 얻기 위하여 pCLB203(실시예 3)으로부터 유도되는 1.4kb의 HindIII-Pst I 단편을 선택하였다. HindIII-부위의 뉴클레오티드 위치(제1도)는 전체길이의 제VIII인자 서열에서 변형될 영역 위쪽의 1025에 있고; Pst I 부위는 그 영역 아래쪽의 위치 5165에 있다. 이들 부위를 제2도에 표시한다. 1.4kb 단편을 M13mp9에 하위클론한 후 루프-아웃 돌연변이를 유발시켰다. 박테리오파지 M13에서 프라이머 V로 얻어진 정확한 결실 단편을 선택한 후, 소정의 결실을 함유하는 HindIII-Pst I 단편을 다음의 단계를 사용하고 단편을 스티키한 단일의 제한 효소끝으로 제조함으로써, pCLB201로부터 유도된 적합한 발현 벡터에 삽입하였다(숫자는 제1도를 따른다):

단계 1. 플라스미드 pCLB201을 Ava I과 Xba I으로 소화시켜 약 6kb의 벡터 단편-Ava I(737)에서 Xba I (6951)까지-을 제조하였다.

단계 2. 플라스미드 pCLB201을 Ava I과 HindIII로 소화시켜서 289bp의 긴 단편 : Ava I(737)에서 HindIII(1025)까지를 얻었다.

단계 3. 플라스미드 pCLB201을 Pst I과 Nde I으로 소화시켜서 363bp의 단편-Pst I(5165)에서 Nde I(5527)까지-을 얻었다.

단계 4. 플라스미드 pCLB201을 Nde I과 Xba I으로 소화시켜서 1425bp의 단편-Nde I(5527)에서 Xba I (6951)까지-을 얻었다.

단계 5. 소정의 돌연변이를 가지는 단편을 함유하는 M13 박테리오파지를 HindIII과 Pst I으로 소화시켰다.

단계 6. 다섯개의 단편을 단리하여 등몰량으로 혼합 및 연결시켰다. 모든 단편을 함유하는 플라스미드를 선택하였다. 상기 제시한 프라이머 V를 사용하여, 표 I에 기재된 예시 화합물의 발현을 위하여 새로운 발현 벡터를 제조하였다 : 화합물 4에 대하여 프라이머 V로 pCLB204.

본 발명의 DNA 구조 및 방법은 제VIII인자 콘지너를 코드화하는 결실 돌연변이 유전자를 숙주 세포에

도입시킴으로서 제Ⅷ인자 활성을 가지는 폴리펩티드의 제조방법을 제공한다. 본 조성물은 A형 혈우병의 증상의 치료에도 사용된다.

본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 기술분야에 속련된 사람들의 숙면도에 준한 것이다. 모든 공보 및 특허 출원은 각 별도의 공보 또는 특허출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 삽입되어야 할 것임을 의미하는 것과 같은 의미로 본원에 참고로 삽입된다.

발명을 이제 완전히 기재하였고, 첨부된 특허청구의 범위의 사상 또는 범주로부터 벗어나지 않고서도 많은 수정 및 변형이 이루어질 수 있음이 기술분야에 통상의 지식을 가진 사람에게 명백할 것이다.

#### 참고문헌

- Brinkhous, K.M. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8752-8756
- Burke, R.L. et al., (1986) J. Biol. Chem. 261, 12574-12578
- Carter, P. et al., (1985) Nucleic Acids Res. 13, 4431
- Chasin, L.A. and Urlaub, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220
- Eaton, D.L. et al., (1986a) Biochemistry 25, 505-512
- Eaton, D.L. et al., (1986b) Biochemistry 25, 8343-8347
- Fay, J.F. et al., (1986) Biochim. Biophys. Acta 871, 268-278
- Galfré, G. et al., (1977) Nature 266, 550-552
- Gluzman, Y., (1981) Cell 23, 175-182
- Gorman, C., (1985) DNA cloning (Ed.: D.Glover), IRL-press, Washington, Oxford, pp. 143-169
- Graham, F. and Van der Eb, A. (1973) Virology 52, 456-467
- Hanahan, D., (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580
- Howley, P.M., Sarver, N. and Law, M.F. (1983) Meth. Enzymol. 101, 387-402
- Hurwitz, D.R., Hodges, R., Drohan, W. and Sarver, H. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 7137-7153
- Kasper, C.K. et al., (1975) Thrombs. Diath. Haemorrh. 34, 869-871
- Kaufman, R.J. and Sharp, P.A. (1982) Mol. Cell. Biol. 2, 1304-1319
- Kaufman, R.J. and Sharp, P.A. (1982a) J. Mol. Biol. 159, 601-621
- Kozak, M. (1983) Microbiol. Rev. 47, 1-45
- Kramer, W. et al., (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456
- Laemmli, U.K., (1970) Nature 227, 680-685
- Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295
- Maniatis, T. et al., (1982) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Methods Enzymol. 65, 499-560
- Melton, D.A. et al., (1984) Nucleic Acids Res. 12, 7035-7056
- Mulligan, R. and Berg, P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2072
- Sanger, F. et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Stel, H.V., (1984) Ph.D. thesis, University of Amsterdam, The Netherlands
- Toole, J.T., et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5939-5942
- Van Mourik, J.A. and Mochtar, J.A., (1970) Biochim. Biophys. Acta 221, 677-679
- Van Zonneveld, A.J., et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4670-4674
- Vehar, G.A., et al., (1984) Nature 312, 337-342

#### [ 표 1 ]

#### 결실 돌연변이체 제Ⅷ인자 단백질

투입물	N <sub>R</sub>	N <sub>R</sub> *Del.	L <sub>R</sub>	L <sub>R</sub> *Del.	C <sub>R</sub>	L <sub>R</sub> *Del.	발한 배터
1.	A-1→R-740	0	S-741→S-1637	0	Q-1638→Y-2332	0	pCLB201
2.	A-1→R-740	0	S-741→A-867+ D-1563→S1637	695	Q-1638→Y-2332	0	pCLB202
3.	A-1→D-712	28	F-R-V-A	897	Q-1638→Y-2332	0	pCLB203
3b.	A-1→D-712	28	펩티드결함	897	Q-1638→Y-2332	0	pCLB212
4.	A-1→V-374	28	펩티드결함	897	Q-1638→Y-2332	0	pCLB204
7.	A-1→R-740	0	펩티드결함	897	E-1649→Y-2332	11	pCLB208
8.	A-1→R-740	0	펩티드결함	897	S-1669→Y-2332	31	pCLB209
9.	A-1→R-740	0	펩티드결함	897	S-1690→Y-2332	52	pCLB210

→는 제Ⅷ인자 아미노산의 연속 서열을 의미한다.

\* 전체 길이의 제Ⅷ인자와 비교한 각 영역의 결실 아미노산의 수를 머릿글자 Del의 해당 컬럼에 나열한다. 아미노산의 번호는 제I도에 사용된 바와 같다.

## [ 표 II ]

## 제VIII인자 활성과 단백질 양

화합물 <sup>1)</sup>	아미노산의 길이(결실)	제VIII인자 활성(mU/ml) <sup>7)</sup>		항체 첨가후의 잔여 활성 <sup>2)</sup>		항원 측정 <sup>3)</sup>
		색원체 측정 <sup>4)</sup>	표준 측정 <sup>5)</sup>	CLB.CagA <sup>6)</sup>	pat.J <sup>6)</sup>	
1	2332(0)	1.0	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	<5mU
2	1637(695)	6.7	2	<1%	<1%	7mU
3	1411(925)	17.3	5	<2%	<1%	20mU
3b	1407(925)	15.0	ND <sup>9)</sup>	ND <sup>9)</sup>	ND <sup>9)</sup>	20mU
4	1069(1263)	0	0	0	0	20mU
7	1424(908)	15.0	ND	ND	ND	ND
8	1404(928)	15.0	ND	ND	ND	ND
9	1383(949)	0	ND	ND	ND	ND
허위(pSV2)		0	0			0

- 1) 표 I 참조 ;
- 2) 색원체 측정(Kabi Coatest)에 따름
- 3) 표준 응고 측정
- 4) CLB. CAgA, 제VIII인자에 대한 단일클론성 항체(Stel, Ph. D. Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands, 1984)
- 5) 환자 J의 혈청으로부터 단리된 저해제
- 6) 초기환성이 가능한 비환성화를 구별하기에는 너무 낮음
- 7) 48시간 배양후의 조건 배지 1유니트의 제VIII인자는 100ng의 제VIII인자 단백질에 해당한다.
- 8) 효소-결합 면역흡착 측정(ELISA)
- 9) ND=측정할 수 없음

## [ 표 III ]

## 분비된 제VIII인자 단백질 크기

화합물 <sup>1)</sup>	발현 벡터	길이 <sup>2)</sup>	결실 <sup>3)</sup>	계산된 크기 <sup>4)</sup>	실제의 크기 <sup>5)</sup>	글리코실화 저해 <sup>6)</sup>
1	pCLB201	2332	0	256kDa		
2	pCLB202	1637	695	188kDa	192kDa	185kDa
3	pCLB203	1411	925	162kDa	168kDa	158kDa
3b	pCLB212	1407	925	162kDa	168kDa	
4	pCLB204	1069	1263	123kDa	135kDa	

- 1) 표 I 참조 ;
- 2) 길이는 발현 벡터의 제VIII인자 코딩 서열의 아미노산의 총 수이다.
- 3) 결실은 해당하는 발현 벡터의 전체 길이의 제VIII인자의 코딩 서열로부터 결실된 아미노산의 수를 의미한다.
- 4) 공지 아미노산 조성물을 토대로 결정된 킬로달톤의 크기.
- 5) 표지된 단백질의 면역침전과 전기영동에 의해 측정된 킬로달톤의 크기.
- 6) 투니카마이신 함유 배지(0.001mg/ml)에서 성장한 세포로부터의 단백질의 킬로달톤의 크기.

**(57) 청구의 범위****청구항 1**

제VIII인자의 생물학적 활성을 가지며 아미노산 서열 Ser-741에서 Ile-1668까지가 결실된 것을 제외하고 제VIII인자의 아미노산 서열에 해당되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 단백질.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 아미노산 서열 Lys-713에서 Arg-740까지의 적어도 일부가 결실되고 상기 결실 부위에 링커서열로서 아미노산 서열 Pro-Arg-Val-Ala가 삽입되는 것을 특징으로 하는 단백질.

**청구항 3**

제1항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 DNA 분자.

**청구항 4**

전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사조절영역 및 번역개시영역, 제1항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며, 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

**청구항 5**

형질 전환된 세포 및 그의 자손에 있어서, 상기 세포는 전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사조절영역 및 번역개시영역, 제1항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 6**

제 5 항에 있어서, 상기 세포가 포유류 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 세포가 COS 세포, CHO 세포 또는 C127 세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 8**

제5항에 있어서, 상기 세포가 원핵세포 또는 효모세포인 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 세포가 바실러스 또는 클루이베로마이세스종에 속하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 10**

제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질의 제조방법에 있어서, 전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사조절영역과 번역개시영역, 제1항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 영양배지에서 성장시키는 단계 및 상기 단백질을 단리시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질의 제조방법.

**청구항 11**

제VIII인자 결핍증후-경감용 조성물에 있어서, 증후를 경감시킬 수 있는 양의 제1항에서 규정된 제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질 및 생리적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제VIII인자 결핍증후-경감용 조성물.

**청구항 12**

제 2 항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 DNA 분자.

**청구항 13**

전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사조절영역 및 번역개시영역, 제2항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며, 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

**청구항 14**

형질 전환된 세포 및 그의 자손에 있어서, 상기 세포는 전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사 조절영역 및 번역개시영역, 제2항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 세포 및 그의 자손.

**청구항 15**

제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질의 제조방법에 있어서, 전사의 방향으로, 숙주세포에서 기능하는 전사조절영역 및 번역개시영역, 제2항에서 규정된 단백질을 코드화하는 DNA 서열 및 상기 숙주세포에서 기능하는 번역 및 전사종결영역을 포함하며 상기 DNA 서열의 발현이 장기 개시 및 종결영역에 의해 조절되는 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 영양배지에서 성장시키는 단계 및 상기 단백질을 단리시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질의 제조방법.

**청구항 16**

제VIII인자 결핍증후-경감용 조성물에 있어서, 증후를 경감시킬 수 있는 양의 제2항에서 규정된 제VIII인자의 생물학적 활성을 가지는 제VIII인자의 결실 돌연변이체인 단백질 및 생리적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제VIII인자 결핍증후-경감용 조성물.



도면

도면1

18 28 38 48 58 68  
 GTCACATGCAAAATAGAGCTCCACCTGCTCTTTCTGTGCTTTTGGCAATCTGCTTT  
 -19M D I E L S T C F F L C L L R F C F -2  
 70 80 90 100 110 120  
 AGTCCACCCAGAAATACCTACCTGGTGCATGGAACTGCATGGAACTATATGCAAGT  
 S A T R R Y Y L B A V E L S W D Y H O S 19  
 130 140 150 160 170 180  
 GATCTCGGTGAGCTGCCCTGGACCCAGATTCTCTCTAGAGTCCAAAATCTTTTCCA  
 D L G E L P V D A R F P P R V P K S F F  
 190 200 210 220 230 240  
 TTCACACCTCAGTGTGTACAAAAGACTGTGTGTAGAAATTCAGGATCAATTTTTC  
 F N T S V V Y K K T L F V E F T D H L F 56  
 250 260 270 280 290 300  
 AACATCCTAAGCCAAAGCCACCTGGATGGTCTGCTAGTCCCTACCTCAGGCTTGA  
 H I A K P R P P W M B L L G P T I Q A E  
 310 320 330 340 350 360  
 GTTTATGATCAGTGGTCAATTACACTTAAAGACATGGCTTCCCATCCTGATGCTGAT  
 V Y D T V V I T L K N H A S H P V S L H 99  
 370 380 390 400 410 420  
 GCTGTGTGTATCTCCTACTGAAAGCTCTGAGGAGCTGAATATGATGATCAGACAGT  
 A V S V S Y M K A S E G A E V D D G T S  
 430 440 450 460 470 480  
 CAAGGGAGAAAGAGATGATAAGTCTCCCTGGTGGAGCCATACATATGTCTGBCAG  
 O R E K E D D K V F P G S S H T Y V W Q 139  
 490 500 510 520 530 540  
 GTCCGAAAGAGAAATGGTCAATGGCTCTGACCACCTGCTCTACTACTCATATCTT  
 V L K E N O P H A S D P L C L T Y S Y L  
 550 560 570 580 590 600  
 TCTCATGTGACCTGGTAAAGACTGAAATTCAGCCCTATTGGAGCCCTACTATGT  
 S H V D L V K D L N S G L I G A L L V C 179  
 610 620 630 640 650 660  
 AGAGAAAGAGTCTGCCAAGBAAGACACAGACTGACACAATTTACTACTTTTT  
 R E G S L S K E K T G T L H K F I L L F  
 670 680 690 700 710 720  
 GCTGTATTGATGAGGGAAGTGGACTCAGAAACAGAACTCTTGTATGACAGGAT  
 A V F D E G K S W H S E T K N S L H Q D 210  
 730 740 750 760 770 780  
 AAGGATGCTGCATCTGCTGGCCCTGGCTAAGATGCACACAGTCAATGTTATGTAAC  
 R D A A S R A W P K M H T V N G Y V N  
 790 800 810 820 830 840  
 AAGTCTTGGCAGTGTGATGGATGCCACAGAAATCAGTCTATTGACATGATGGA  
 R S L P G L I G C H E K S V V Y W H V I G 250  
 850 860 870 880 890 900  
 ATGGCACCCTCTAAGTGCACCTAATCTCTGAAAGTCCACACTTCTTGTGAGG  
 H G T T P E V H S I F L E G H T F L V R  
 910 920 930 940 950 960  
 AACCATCCAGCCCTCTTGGAAATCTGSCCAATACTTTCTTACTGCTCAAGACTC  
 N H R G Q A S L E I S P P I T F L T A Q T 299  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 TTGATGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTGTCTATCTCTTCCACCAACATGATGC  
 L H D L G G F L L F C H I S S H Q H D G  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 ATGAACTTATGTCAAGTAGACAGCTGTCCAGAGAAACCCCACTACAAATGAAAAAT  
 R E A Y V K V D S C P E E P G L R M K N 339  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 AATGAGAAAGCAGACTATGATGATGATCTTACTGATCTGAAATGATGATGATGATG  
 N E E A E D Y D D D L T D S E M D V U V R  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 TTTGATGACAACTCTCTCTTTCCTTATCCAAATGCTCAGTGGCAAGAGCATCCT  
 F D D D N S P S F I D I R S V A K K H P 379  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 AAACTTGGTACATTTCAATGCTGCTAAGAGAGACTGGACTATGCTCTTCTAGTC  
 K T M V H Y I A A E E E D W D Y A P L V  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
 CTCGCCCCGATGACAGAGTTTAAAGTCAATATTGAAATGCTCAGCCCTCAGCGAAT  
 L A R D D R S Y K S O Y L N N G P Q R I 419  
 1330 1340 1350 1360 1370 1380  
 GGTAGAGTACAAAAGTCCBATTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTGT  
 G R K Y K K V R P F H R A Y T D E T F K T R

도면1-계속

1398 1488 1418 1428 1438 1448  
BAAGCTATTACAGTCAATCAGAACTTBBACCTTACTTTATBBBAAAGTTBAGAAC  
E A I Q H E S B I L B P L L Y B E V G D 459

1458 1468 1478 1488 1498 1508  
ACACTGTTGATTATTAAGAAATCAACCAACACACATATACACTTACCCCTACGGA  
T L L I I F K N G A S R P Y N I Y P H S

1518 1528 1538 1548 1558 1568  
ATCACTGATTCCTCCTTTGTATTCAGBAAATCCAGAAAGBTGAAACACTTTGAG  
I T D U R J L V B R R L P K B U K H L K 459

1578 1588 1598 1608 1618 1628  
GATTTTCCAAATCTCCAGBAGAAATTTCAAATATAAATBACAGTACTGTAGASAT  
D F P I L P G E I F K Y K K W T V T V E D

1638 1648 1658 1668 1678 1688  
GGCCCACTAAATCAGATCCTCGTCCCTBACCCCTATTACTAGTTTCGTAAATATB  
S P T K S D P R C L T R Y Y S S E V H H 539

1698 1708 1718 1728 1738 1748  
GAGAGATCTACCTCAGBACCTCATGBCCTCTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
E R D L A S G L I B P L L I C Y K E S V

1758 1768 1778 1788 1798 1808  
GATCAAGBAGAAACAGATATGTCCACAGAGBAAATGTCCCTGTTTCTGTATT  
D D R G N D I H S D K R N V I L F S V F 579

1818 1828 1838 1848 1858 1868  
GATGAGACCCBAGCTGTTACCTCAGAGAAATACAAACCTTTCCCAATCCACCT  
D E N R S W Y L T E N I D R P L P N P S

1878 1888 1898 1908 1918 1928  
GGATGCACTTGGAGATCCAGATTTCCAGCCTCCAGATCATCAGACATCAATGAC  
G V D L E D P E F G A S N I H H S I N G 619

1938 1948 1958 1968 1978 1988  
TATGTTTTGATGTTTCCAGTTGTCAATTTTGTTCATBAGTGGCATACTGGTACA  
Y V F D S L D L S V C L H E V A Y W Y I

1998 2008 2018 2028 2038 2048  
CTAAGCATTGGACACAGACTGACTTCTTTCTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
L S I G A D T D F L S V F F S Y T F K 659

2058 2068 2078 2088 2098 2108  
CACAAATGCTATGAAACACACTCACCCTATTCCATTCTCAGBAAAGCTGTCTTC  
H K M V Y E D T L T L F P F S S E T V F

2118 2128 2138 2148 2158 2168  
ATGTCGATGAAACCCAGTCTATGATCTGAGGTCACACACTCAGACTTTCBAGAC  
H S H E N P G L W I L D C H N S D F R H 699

2178 2188 2198 2208 2218 2228  
AGAGCATTGACCCCTTACTGAAAGTTTCTAGTTTGGAGAAACACTGGTATTATTAC  
R G H T A L L K V B S C D K N T G D Y Y

2238 2248 2258 2268 2278 2288  
GAGCAGTATGAAATTTTCAGCATCTTCTGAGTAAACAACTBCCATTGACCA  
E D S Y E D I S A Y L L S K N N A I E P 739

2298 2308 2318 2328 2338 2348  
AGAAGCTTCCAGAAATTCAGACACCTTACACTAGCAGAAACCAATTTATBCCACC  
R S F S D N S R H P S T R G K G E N A I I

2358 2368 2378 2388 2398 2408  
ACAATTCAGAAATGACATAGAGAACTGACCCCTGTTTTCACACAGAACACTATB  
T I P E N D I E K T D P M F A H R T P H 779

2418 2428 2438 2448 2458 2468  
CCTAAATACAAATGCTCCTCAGTATTTGTTGATCTCTTCCACAGATCTCTACT  
P K I G N V S S S D L L H L L R G S P T

2478 2488 2498 2508 2518 2528  
CCACATGGCTATCTTATCTCAGAAACCAATATGAGACTTTTCTGATGAT  
P H S L S L S D L S E A K Y E T F S D D 819

2538 2548 2558 2568 2578 2588  
CCATCAGTGGACCAATAGACATATACACCTGCTGAAATGACACACTTCCAGCCA  
P S P G A I D S N N S L S E M T H F R P

2598 2608 2618 2628 2638 2648  
CAGCTCCATCAGTGGACATGATTTACCCCTBAGTCCACCTCCCAATTAAGATTA  
D L H H S B D H V F T P E S B L G L R L 859

2658 2668 2678 2688 2698 2708  
AATGAGAACTGGGACACTCCACACAGAGTTGAGAACTTGAATTCAGATTTCT  
N E L L G T T A R T E L K K L D P K V S

도면1-계속(1)

2710 2720 2730 2740 2750 2760  
AGTACATCAAAATCTGATTTCAACAAATCCATCAGACAAATTTGACACAGATCTGAT  
S T S N N L I S T I P S D N L A A G T D 899

2770 2780 2790 2800 2810 2820  
AATACAAATCTCTAGACCCCAAGTATCCAGTCTTATATGATGATCAATTTAGATACC  
N T S S L G P S H P V H Y D S G L D T

2830 2840 2850 2860 2870 2880  
ACTCTATTGBCAAAAGTTCATCTCCCTTACTGAGTCTGTTGACCTCTGACCTTGAAT  
T L F G K K S B P L T E G G G P L B L S 899

2890 2900 2910 2920 2930 2940  
GAAGAAATATGATTCAGATTTGTTAGATCAGGTTTAAATGATGACCAAGAAATGCA  
E E N N D S K L L E S G L M N S G E S S

2950 2960 2970 2980 2990 3000  
TGGGAAAAGATGTATCTGACACAGAGAGTGGTAGGTTATTCAAGGAAAAGAGCTCAT  
W S K N V S S T E S G R L F K S K R A H 899

3010 3020 3030 3040 3050 3060  
GGACCTCTTTGTTGACTAAGATAATGCTTATCAAGATGACATCTCTTTGTTAAGG  
G P A L L T K D N A L F K V S I B L L K

3070 3080 3090 3100 3110 3120  
ACAAACAAAATCTCAATAATTCAGCAACTAATGAAAGACTACATTGATGACCCATCA  
T N K T S N N S A T T N R K T H I D G P S 1019

3130 3140 3150 3160 3170 3180  
TTATTATTGAAATATGCTCATCTGTCGCAAAATATTTAGAAATGACACTGATTT  
L L I E N S P S V W Q N I L E B D T E F

3190 3200 3210 3220 3230 3240  
AAAAAGTACACCTTTBATTCCATCAGCAAAATGCTTATGCAAAATGCTACACCTTTG  
K K V T P L I H D R M L M D K N A T A L 1099

3250 3260 3270 3280 3290 3300  
AGCTAAATCATATGTCAAATAAAGTCTTTCATCAAAAACATGAAATGTTCCAAACG  
R L N H H S N K K T T S G K N H E H V G S

3310 3320 3330 3340 3350 3360  
AAAAAGTACACCTTTCCACCAATGTCGCAAAATATTTAGAAATGACACTGATTT  
K K E G P I P P D A Q N P D N S F F K H 1099

3370 3380 3390 3400 3410 3420  
CTATTCTTGCAGAAATCAGCAAGTGGATCAAAAGACTCATGAAAGAAATCTCTGAAAC  
L F L P E S A R W I O R T H G K N S L N

3430 3440 3450 3460 3470 3480  
TCTGGCAAGCCCAATCCAAAGCAATTAGTATCTTACAGCCAGAAAATCTGTGAA  
S G S P S P K D L V S L G P E K S V E 1139

3490 3500 3510 3520 3530 3540  
GGTCAGAAATTTCTGTGGAAAAACAGTGGTATGAAAGAAAGTGAATTTACAAAG  
G D N F L R E K N K V V V G K G E F T K

3550 3560 3570 3580 3590 3600  
GACGTAGACTCAAGAGATGTTTTTCCAAAGCAGAAAGCTTATTTCTACTACTTG  
D V G L K E R V F P S S R N L F L T N L 1179

3610 3620 3630 3640 3650 3660  
GATATTTACATGAAATATACACACATCAAGAAAAAAATTCAGSAGAAATAGAA  
D N L H E N N T H N Q E K K I D E E I E

3670 3680 3690 3700 3710 3720  
AAGAAAGAAATCAATCCAGAGAAATGATTTTCCCTCAGATACATACAGTACTGAC  
K K E T L I G E N V V L P Q I H T V T S 1219

3730 3740 3750 3760 3770 3780  
ACTAAGAAATTCATGAAAGAAATTTCTTACTGAGCAATGAGCAAAATGATGAAATTT  
T K N F R K N L F L L S T K Q N V E E S

3790 3800 3810 3820 3830 3840  
TATGAGGAGATATGCTCCAGTACTCAAGATTTAGTCAATTAATGATTCACAAAT  
Y D G A Y A P V L Q D F R S L N D S T N 1259

3850 3860 3870 3880 3890 3900  
AGAACAAAGAACACAGCTCATTCTCAAAAAGGAGGAGAAAGAACTTGGAAAGC  
R T K H T A H F S K K G E E N L E S

3910 3920 3930 3940 3950 3960  
TTGAAATCAACCAAGCAATTTAGAAATATGATGACCAACAGAGATATCTCTCT  
L G N Q T K Q I V E K Y A C T T R I S P 1299

3970 3980 3990 4000 4010 4020  
AATACAGCCAGCAGAAATTTGTACCCACACATGATGAAAGAACTTTGAAACAAATCAGA  
N Y S D Q N F V T G R S K R A L K Q D F R

4030 4040 4050 4060 4070 4080  
CTCCACTGAAAGAAAGAAATTTGAAAGAAATTTGATGACACTCAACCCAG  
L P L E E T E L E K R I I V D D T S T G 1339

도면1-계속(2)

4098 4100 4110 4120 4130 4140  
TGGTCCAAAACATGAAACATTTGACCCCBACACCTCCACACATAGACATCAATGAG  
M S K N M K H L T P S T L T Q I D Y N E

4150 4160 4170 4180 4190 4200  
AAGGAGAAAGGGCCACTACTCAGTCCCTTATCAGATTCCTTACBAGBAGTCAATAC  
K E K G A I T Q S P L S D C L T R S H S 1379

4210 4220 4230 4240 4250 4260  
ATCCCTGAGCAATAGATTCCTTACCTTCCATTCAGAGATATCATCTTCCATCTATT  
I P Q R N A S P L F I A K V S S F P S I

4270 4280 4290 4300 4310 4320  
AGACCTATATCTGACAGGCTTATTCAGAGCACTCTCTCATCTTCCAGCAGCA  
R F I Y L T R V L F Q D N S S H L P A A 1419

4330 4340 4350 4360 4370 4380  
TCTTATAGAAAGAAATTCCTGAGTCCAGAAAGCAGTCTTCTTACAGAGCCAAA  
S Y R K K D S S V Q E S S H F L Q G A K

4390 4400 4410 4420 4430 4440  
AAAAATGACTTCTTACCTTACCTTGGAGATGACTGGATGATCAAGAGAGATTT  
K N N L S L A I L T L E H T B D Q R E V 1459

4450 4460 4470 4480 4490 4500  
GGCTCCCTGGGACAGTCCACAAATTCAGTACATCAAGAAATGAGAACTGTT  
G S L G T S A T N S V T Y K V E N T V

4510 4520 4530 4540 4550 4560  
CTCCGAAACAGACTTCCCAAAATCTGCAAAATGAAATTCCTTCCAAAATTCAC  
L F F P D L P K T S B K V E L L P K V H 1499

4570 4580 4590 4600 4610 4620  
ATTATCAGAAAGACTTATCCCTACGAAACTAGCAATGGTCTCTGSCCATCTGAT  
I Y O K D L F P T E T S N G S P S H L D

4630 4640 4650 4660 4670 4680  
CTCGTGAAGGAGCTTCTTCAAGGAGCAGAGGAGGAGATTAATGAAATGAGCAAC  
L V E G S L L Q G F E S A T K H N E A N 1539

4690 4700 4710 4720 4730 4740  
AGACCTGAAAGTCCCTTCTGAGATGACAGAGAAAGCTTCCAGAACTCCCTCC  
R P B K V P F L R V A T E S S A K T P S

4750 4760 4770 4780 4790 4800  
AAGCTATTGATCTTCTTGGATACCACTATGACTACATACCAAAAGAAAG  
K L L D P L A M D N H Y G T G I P K E E 1579

4810 4820 4830 4840 4850 4860  
TGGAAATCCAGAGAGTCCACAGAAAGCACTTTAGAGAAAGGATACCATTTG  
H K S Q E K S P E K T A F K K K D T I L

4870 4880 4890 4900 4910 4920  
TCCCTGAACCTTGTGAAGCAATCAATGACAGCAATAAATGAGGACAAATAA  
S L N A C E S N H A I A A I N E B Q N K 1619

4930 4940 4950 4960 4970 4980  
CCCAATAGAAAGTCACTTGGGCAAGAGGTAGGACTGAAAGGCTGTCTCTCAAAAC  
F E I E V T W A K D S R T E R L C S D H 37 38

4990 5000 5010 5020 5030 5040  
CCACCACTTGAACCCATCAACGAGAAATACCTCTACTACTCTTCAAGATCA  
P P V L K R H Q R S I T R T T L Q S D Q 1659

5050 5060 5070 5080 5090 5100  
GAGGAAATGACTATGATACCATATCAATGAAATGAAAGAAAGATTTGACAT  
E E I D V D D T I S V E H K K E D F D I

5110 5120 5130 5140 5150 5160  
TATGATGAGGATGAAATCAGAGCCCCGCACTTCAAAAGAAACAGCACTATTT  
Y D E G E N G S P S F D K K T R H Y F 1699

5170 5180 5190 5200 5210 5220  
ATTGCTCAGTGGAGAGCTCTGGATATGGATGATAGCTCCCACTGTCTGAA  
I A A U E R L W D V G H S S S P H V L R

5230 5240 5250 5260 5270 5280  
AACAGGCTCAGAGTGGAGTGTCCCTCAGTTCAGAAAGTGTTCACAGAAATTA  
N R A Q S B S V P Q F K K V V F Q E F T 1739

5290 5300 5310 5320 5330 5340  
GATGCTCTTACTGAGCTTATACCTGAGAACTAAATGAAATTTGGAGCTCTG  
D G S F T O P L Y R G E L N E H L G L L

5350 5360 5370 5380 5390 5400  
GGCCATATAGAGCAGAGTGAAGATAATATCATGTAACTTCCAGAAATCAGCC  
G F Y I R A E V E D N I N V T F R N Q A 1779

도면1-계속(3)

5410 5420 5430 5440 5450 5460  
TCTCCCTATTCTCTCTATTCTAGCCTTATTTCTATGAGGAGATCAGAGGCCAAGGA  
S R P Y S F Y S S L I S Y E E D Q R Q S

5470 5480 5490 5500 5510 5520  
GCAGACCTGAGAAAGTTCATAGCCTTAATGAAACCAACCTACTTTTGGAAAGTG  
A E P R K N F V K P N E T K T Y F W K V 1819

5530 5540 5550 5560 5570 5580  
CAACATCATATGACCCACATAAGATGAGTTGACTGCAAAACCTGGCTTATTCTCT  
O H H H A P T K D E F D C K A M A Y F S

5590 5600 5610 5620 5630 5640  
BATGTTGACCTGAGAAAGATGTCACCTGAGCCTGATTGACCCCTCTGCTCTGCTG  
D V L E K D V H S G L I G F L L W C H 1859

5650 5660 5670 5680 5690 5700  
ACTAACACACTGACCCCTGCTCATGGAGACAAGTGACAGTACAGGATTTGCTCTCT  
T N T L N P A H G R Q V T V D E F A L F

5710 5720 5730 5740 5750 5760  
TTCACCTCTTTGATGAGACCAAGCTGACTTCTACTGAAAATGGAAGAACTGC  
F T I F D E T K S W Y F T E N H E R N C 1899

5770 5780 5790 5800 5810 5820  
AGGCTCCCTGCAATATCAGATGAGATCCCACTTTTAAAGAGATTTCTCCCTCCAT  
R A P C N I Q M E D P T T F K E N Y R F H

5830 5840 5850 5860 5870 5880  
GCAATCAATGCTACATAATGATACACTACTGCTTAGTAATGGCTCAGGATCAAGG  
A I N G Y I M D T L P G L V M A G D Q R 1939

5890 5900 5910 5920 5930 5940  
ATTCATGATGATCTCTCAGCATGGCAGCAATGAACATCATTCTATTCTTCAAT  
I R H Y L L S H G S H E N I H S I H F S

5950 5960 5970 5980 5990 6000  
GGACATGTTCTCACTGACBAAAAGAGAGATTAATGATGCACTGTACAACTCTAT  
G H V P T V R K K E E Y K H A L Y N L Y 1979

6010 6020 6030 6040 6050 6060  
CCAGBTBTITTTGAGACATGGAATGTTACCATCAAACTGGAAATTTGCCGGTGGAA  
P S V F E T V E H L P S K A G I W R V E

6070 6080 6090 6100 6110 6120  
TGCCITATTGGCAGATCTACATGCTGGATGAACTACTTTCTGGTGTACAGCAAT  
C L I G E H L H A G M S T L F L V Y S N 2019

6130 6140 6150 6160 6170 6180  
AAGTCTCAGACTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCT  
K C O T P L G H A S G H I R D F G I T A

6190 6200 6210 6220 6230 6240  
TCAGBACAATGAGACATGAGCCCAAGCTGGCCAGACTTCAATTTCCGGATCAATC  
S B Q Y G Q H A P K L A R L H Y S S S I 2059

6250 6260 6270 6280 6290 6300  
AATGCTTGGACCAAGAGCCCTTTCTTGGATCAAGTGGATCTGTGGCAGCAATG  
N A M S T K E F F S W I K V D L L A P H

6310 6320 6330 6340 6350 6360  
ATTATTCCAGCATTCAAGCCAGGCTGCCCTCAGAGTCTCCACTCTACATCTCT  
I I H G I R K T Q G A R Q K F S S L Y I S 2099

6370 6380 6390 6400 6410 6420  
CAGTTTATCATCATATAGTCTTATGAGAAAGTGGCAGACTTATCBAAGAAATTC  
D F I I H Y S L D G K K W Q T Y R G N S

6430 6440 6450 6460 6470 6480  
ACTGAACTTAATGCTCTCTTTGGCAATGATGATCTATGGAATGAAACCAATATTT  
T B T L N V F F G N V D S S B I K H N I 2139

6490 6500 6510 6520 6530 6540  
TTAACCTCCAATTTGCTGATACATCCCTTGCACCACTCATTATAGCATTCCB  
F N F P I I A R Y I R L H P T H Y B I R

6550 6560 6570 6580 6590 6600  
AGCACTTCCCATGAGTGGATGGCTGATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
S T L R H E W H G C D L N S C S H P L S 2179

6610 6620 6630 6640 6650 6660  
ATGGAGATGAAAGCAATATCAGATGACAGATGATGATGATGATGATGATGATGATG  
H E S K A I S D A D I T A S S Y F T N H

6670 6680 6690 6700 6710 6720  
TTTCCACCTGCTCTCTCAAAAGCTGACTTCACTTCAAGAGAGAGATTAATGCTGG  
F A T W S P S K A R L H L O G R S N A H 2219

6730 6740 6750 6760 6770 6780  
ABACCTCAGTGAATATCCAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAGACAAATGAA  
R P D V N N P K E W L G V D F D G K T H K

도면1-계속(4)

```

6798 6888 6918 6928 6938 6948
GTCAAGAGTAACACTCTCAGBAGATGAAATCTCTCTACACAGATGTATBTGAAGAG
V T G V U T T O G V K S L L T S H Y V U K E 225v

6858 6868 6878 6888 6898 6908
TTCCATCTCCACAGTCAAGATGCCATCAGTGAAGTCTCTTTTTCAGAAATGCCAA
F L I S S S O D O H Q M T L F F Q N S K

6918 6928 6938 6948 6958 6968
GTAAGGT11TTAGBAAATCAAGACTCTTACACAGTGTGTAACTCTAGACCCA
V X V F O S N G D S F T P V V N S L D P 2299

6978 6988 6998 7008 7018 7028
CCGTACTGACTCCTACTCTGAAATCACCACCCAGAGTTGGTGCACAGATGCCCTG
P L L T R Y L R I H P G S W V H Q I A L

7038 7048 7058 7068 7078 7088
AGBATAAGGTTCTGGCTCAGAGCACAGACTCTACTAGGGTGGCCACTGCAGCAC
R H E V L B C E A Q D L Y
2332 stop

7098 7108 7118 7128 7138 7148
CTGCACATCCCTCCTCTCCCTCAGCTCCAGCCAGTGTCCCTCCCTGGCTGCC

```

도면1-계속(5)

```

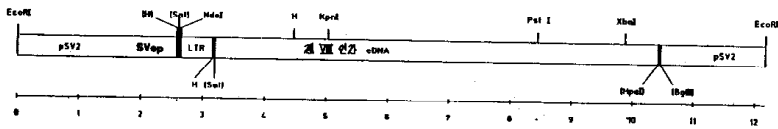
8118 8128 8138 8148 8158 8168
GTACAGGGGAAATATATACCGTACTGAAACTAGAGTCCCTACTTACATAGTTGAAT

8178 8188 8198 8208 8218 8228
ATCAAGGAGTCCAGAGAAATTTGACTGGTGAACACBAAACACTCCAGTCTCCA

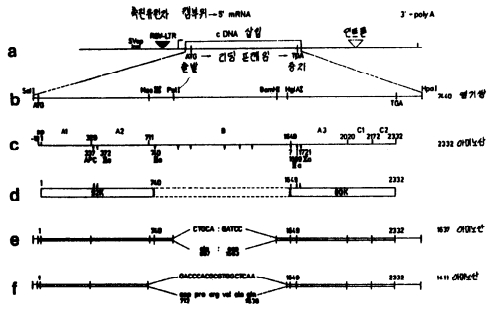
8238 8248
TATCACCACAAATAGGATCC

```

도면2



도면3



도면4

1 2

$M_r$   
- X  
 $10^{-3}$

