



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월20일  
(11) 등록번호 10-0805269  
(24) 등록일자 2008년02월13일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-0133520

(22) 출원일자 2005년12월29일

심사청구일자 2005년12월29일

(65) 공개번호 10-2007-0070699

(43) 공개일자 2007년07월04일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050012457 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

김두식

서울특별시 서대문구 연희동 84-3

전옥희

서울 동대문구 제기동 한신아파트 112동 1002호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 신성

전체 청구항 수 : 총 4 항

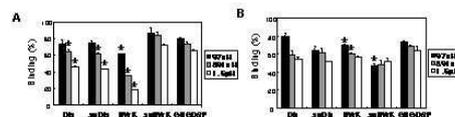
심사관 : 김성길

(54) 디스인테그린 유사 도메인을 포함하는 항혈전제

(57) 요약

본 발명은 항혈소판 활성뿐 아니라 인테그린 결합 특이성을 조사하기 위하여 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체의 클로닝과 발현을 수행하였다. 효모 발현 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인들은 용량 의존적인 형태로 그것의 리간드에  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 결합을 저해할 수 있었다. 특히 디스인테그린 유사 도메인에서 RPTRGD 서열을 NWKRGD로 돌연변이 시킨 것은 인테그린  $\alpha$ IIb $\beta$ 3에 대한 그것의 결합 특이성을 증가시켰다. 또 NWK 돌연변이체는 인테그린  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 활성화를 감소시켜서 원래 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인과 비교하여 개량된 인간 혈소판 응집 저해성을 나타냈다. 따라서 본 발명의 단백질은 심혈관 질환에서 항혈전제로 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**김동범**

서울 종로구 홍지동 68-1

**최용준**

서울 서대문구 연희3동 51-32번지 106호

**김승희**

서울 광진구 구의3동 199-18 삼성쉐르빌아파트  
1812호

**고유석**

서울 강남구 도곡동 463-15차 우성아파트 504동  
703호

**최원석**

인천광역시 남동구 만수4동 주공아파트 206동 120  
2호

(56) 선행기술조사문헌

“재조합 인체 디스인테그린의 혈소판응집 억제효과”, 이상학, 연세대학교 대학원 의학과 박사학위 논문 (2005. 8. 공개)

Novel function of human ADAM15 disintegrin-like domain and its derivatives in platelet aggregation[Thromb Res. 2006 Jun 20]

"유전자 재조합 디스인테그린 saxatilin의 발현 및 혈관 평활근세포에 미치는 영향", 선새아, 연세대학교 석사학위논문(2003 공개)

"유전자 재조합 디스인테그린 saxatilin의 발현 및 혈관 평활근세포에 미치는 영향", 선새아, 연세대학교 석사학위논문 (2003 공개)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 30에서 32번째 RPT 모티프가 NWK 모티프로 치환된 아미노산 서열을 갖는 혈전 치료용 단백질.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 단백질은 효모에서 발현되는 것을 특징으로 하는 단백질.

**청구항 5**

제1항의 단백질을 포함하는 혈전 치료용 조성물.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

제5항에 있어서, 상기 단백질은 효모에서 발현되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- <8> 본 발명은 디스인테그린 유사 도메인을 포함하는 항혈전제에 관한 것이다.
- <9> 혈소판 응집은 항상성의 주된 역할을 하고 혈소판 막 표면에 있는 인테그린 중 하나인 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$  수용체 복합체와 피브리노겐의 상호작용에 의하여 일어나고 피브리노겐의 Arg-Gly-Asp (RGD) 서열이 필수적으로 관여한다(Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF. Rouslathi, E.; *Science* 1986; 231: 1559-1562). 노출된 내피하 구조들에 혈소판 초기 결합 및 차후 혈소판-혈소판 응집은 각각 부착과 응집으로 알려진 혈전 형성의 두 단계로 전형적으로 명명된다.
- <10> 디스인테그린 및 메탈로프로테아제(ADAM; A Disintegrin and Metalloproteinase, 이하 "ADAM"으로 한다)는 디스인테그린 및 메탈로프로테아제 도메인을 포함하는 다기능 단백질이고 세포-세포 및 세포-매트릭스 상호작용에서 부착 및 단백질분해 성질 모두를 수행하는 것으로 알려졌다. 그들 중, ADAM15는 그것의 디스인테그린 유사 도메인내에 Arg-Gly-Asp (RGD) 모티브를 가지는 독특한 단백질이다. ADAM 계열들은 수정, 근형성, 신경발생, 및

사이토카인 분비와 같은 다양한 생물학적 과정에 관여한다(Blobel CP, 외; *Nature* 1992. 356: 248-252.; Aitken, J. *Nature* 1992; 356: 196-197.; Blobel CP, 외 *J. Cell Biol.* 1990; 111: 69-78.; White JM. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003; 15: 598-606). 메탈로프로테이즈 도메인의 카르복실-말단 도메인 부, 특히 ADAM의 디스인테그린 유사 도메인은 세포 부착을 유지하는 것으로 알려졌다. 디스인테그린 유사 도메인은 세포 표면 인테그린들과 상호작용하고 세포-세포 상호작용들을 중재할 수 있는 루프내에 인테그린-결합 서열을 가진다.

<11> ADAM15는 평활근 세포, 혈관간세포 및 내피 세포들에서 발현된다. 그것의 기능에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 최근, 그것의 메탈로프로테이즈 도메인의 젤라티네이즈 활성과 관련된 혈관간세포 이동에서 ADAM15가 관련된다는 보고가 있다. ADAM15는 또한 내피 세포 접합 형성을 중재하는 세포 부착 분자인 혈관 내피 카드헤린과 동시위치(colocalize)하는 것을 나타낸다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

<12> 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 혈전 치료용 단백질을 제공하는 것이다.

<13> 본 발명의 또 다른 목적은 혈전 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

<14> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 디스인테그린 유사 도메인을 포함하는 혈전 치료용 단백질을 제공한다.

<15> 본 발명에서 디스인테그린 유사 도메인 단백질은 서열번호 1에 기재된 것이 바람직하고, 서열번호 2에 기재된 것이 더욱 바람직하다.

<16> 또 본 발명의 단백질은 효모에서 발현되는 것이 바람직하다.

<17> 또한 본 발명은 디스인테그린 유사 도메인 단백질을 포함하는 혈전 치료용 조성물을 제공한다.

<18> 본 발명의 조성물에 포함되는 단백질은 서열번호 1에 기재된 것이 바람직하고, 서열번호 2에 기재된 것이 더욱 바람직하다.

<19> 또한 본 발명의 조성물에 포함된 단백질은 효모에서 발현되는 것이 바람직하다.

<20> 이하 본 발명을 간단하게 설명한다.

<21> 본 발명은 효모 *pichia pastoris* 에서 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인의 클로닝과 발현을 수행하였고 그것의 인테그린 결합 특이성 및 혈소판 응집에서의 기능을 조사하였다. 또 혈소판 응집 시스템에서 본 발명의 단백질의 저해 작용을 개량하기 위하여 돌연변이 연구를 수행하였다. 본 발명은 본 발명의 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인을 항혈전제로 사용할 수 있다는 것을 보여준다.

<22> 본 발명에서 "A15Dis"는 ADAM 15 디스인테그린 유사 도메인; "ADP"는 adenosine diphosphate; "BSA"는 소 혈청 알부민; "ELISA"는 효소면역 측정법; "FITC"는 fluorescein isothiocyanate; "GRGDSP"는 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro; "KGD"는 Lys-Gly-Asp; "NWK"는 Asn-Trp-Lys; "PBS"는 인산 버퍼 식염수; "PPP"는 혈소판 부족 플라즈마 (platelet-poor-plasma); "PRP"는 혈소판 풍부 플라즈마(platelet-rich plasma); "RGD"는 Arg-Gly-Asp; "RPT"는 Arg-Pro-Thr; "SDS-PAGE"는 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동; "TACTS"는 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.02% Sodium Azide, 2 mM Calcium Chloride, 0.05% Tween-20, 150 mM Sodium Chloride; "TRITC"는 테트라메틸로다민 B 이소싸이오시아나이트를 나타낸다.

<23> 본 발명에 사용된 *Pichia* 발현 키트, 효모 질소 베이스(Yeast nitrogen base;YNB) 및 SDS-PAGE 젤은 Invitrogen (Carlsbad, USA)으로부터 구입하였다. 페닐-셀파로스, 모노-Q HR 5/50, 및 슈퍼텍스 G-75 젤 여과 크로마토그래피는 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. 소 혈청 알부민(BSA)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 및 피브리노겐은 Calbiochem (La Jolla, USA)으로부터 구입하였다. 항- $\alpha$  IIb $\beta$ 3 및 항-avb3 단일클론 항체들 및 인테그린 avb3은 Chemicon(Temecula, USA)으로부터 구입하였다. Taq-폴리머레이즈 및 인간 비트로넥틴은 TaKaRa (Shiga, Japan)로부터 구입하였다. 혈소판 응집 분석을 위한 ADP는 Chrono-Log (Sweden)로부터 구입하였다. PAC-1-FITC 항체는 Becton Dickinson(San Jose, USA)으로부터 구입하였다. GRGDSP 펩타이드는 Anygen (Korea)로부터 합성하였다.

- <24> 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- <25> 실시예 1:
- <26> ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 단백질에 대한 발현 프라즈미드의 설계
- <27> ADAM15의 디스인테그린 유사 도메인(A15Dis)을 N-말단 프라이머 5'CTCGAGAAAAGAGAGCCGGGCGAGCAGT-3'(서열번호:3) 및 C-말단 프라이머 5'GCGGCCGCTCACCCCTAGGCTGACATC-3'(서열번호:4)를 사용하여 인간 태아 간 cDNA로부터 PCR에 의하여 클로닝하였고, ADAM15의 디스인테그린 유사 도메인 내의 RPTRGD 서열을 돌연변이유발을 통하여 NWKRGD로 바꾸고 NWK로 명명하였다(도 1A). ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 NWK 돌연변이체의 확장형인 spacer-Dis (spDis) 및 spacer-NWK (spNWK)(도 1A)에 대하여는, 프라이머 5'CTCGAGAAAAGAATGGCTGCTTTCTGCGAAATATG -3'(서열번호:5)를 N-말단용으로 사용하였다. 또한 NWK에서 5' 말단의 22개 아미노산을 제거한 Truncated-NWK의 경우 N-말단 프라이머 5' CCTCGAGAAAAGAACCTGCCAGCTGAGCCAGGTG -3'(서열번호:6)를 사용하였다.
- <28> 상기 PCR 산물들을 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison, USA)로 클로닝하고, 시퀀싱하고, *Pichia pastoris* 발현 벡터 pPIC9(Invitrogen, Carlsbad, USA)로 트랜스퍼하였다. 전체 4 컨스트럭트들을 제조하여 각각 Dis, spDis, NWK, spNWK 및 truncated NWK로 명명하였다(도 1A). N-말단 프라이머들은 *Xho* I 제한 효소 자리를 포함하고 C-말단 프라이머는 정지 코돈과 *Not* I 자리를 포함한다. 클로닝된 프라즈미드의 발현을 간단하게 설명하면, pPIC9-A15Dis 프라즈미드들을 *Sal* I 제한 효소로 처리하고 선형화된 프라즈미드들을 전기충격법(electroporation)(Gene Pulser, Bio-Rad, Hercules, USA)에 의하여 컴페턴트 GS115 세포로 트랜스포메이션하였다. His<sup>+</sup> pPIC9-A15Dis 형질전환체들의 메탄올 이용 능력을 최소 텍스트로스와 최소 메탄올 플레이트에서 리프리카 선택에 의하여 분석하였다. 최종적으로 His<sup>+</sup> 및 Mut<sup>+</sup> 세포들을 단백질 발현을 위하여 수집하였다.
- <29> 실시예 2:
- <30> ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체의 발현 및 정제
- <31> 형질전환된 세포들을 글리세롤 최종 배지(암모늄 설페이트를 가지는 1.34% 효모 질소 베이스, 4 x 10<sup>-5</sup> M 바이오틴 및 1% 글리세롤 및 아미노산이 없는)에서 30℃에서 성장시켰다. 48 시간 후, 세포들을 원심분리에 의하여 수집하고 100 mM 인산 칼륨(pH 6.0)내의 메탄올 최소 배지(암모늄 설페이트를 가지는 1.34% 효모 질소 베이스, 4 x 10<sup>-5</sup> M 바이오틴 및 0.5% 메탄올 및 아미노산이 없는)로 트랜스퍼하고 30℃에서 성장시켰다. A15Dis 단백질 발현을 유도하기 위하여 전체 0.5% (v/v) 메탄올을 매 12시간 마다 3일간 첨가하였다. 유도된 단백질을 포함하는 배양 배지를 원심분리한 후 수집하였다. 암모늄 설페이트를 수집된 상등액에 1.5M까지 첨가한 후 페닐-세파로스 킬럼에 로딩한 후 1.5 M - 0 M 암모늄 설페이트 그라디언트로 단백질을 이추선하였다. *P. pastoris*에 의하여 발현된 A15Dis 단백질을 Superdex G-75 젤 여과 크로마토그래피로 더 정제하였다. 새롭게 유도된 A15DIS 단백질을 정제 과정을 거쳐서 SDS-PAGE 분석으로 모니터하였다. 재조합 A15Dis의 N-말단 서열 분석을 정제된 단백질의 동정을 보증하기 위하여 자동 에드만 분해 과정에 의하여 수행하였다.
- <32> 실시예 3: 인테그린 결합 분석
- <33> 피브리노젠/αIIbβ3 ELISA 및 비트로넥틴/avb3 ELISA는 Nachman 및 Leung[Nachman RL, Leung LLK. *J. Clin. Invest.* 1982; 69: 263-26924]의 변형된 방법에 의하여 수행하였다. 마이크로타이터 플레이트들을 정제된 인간 피브리노젠(100 μg/ml) 또는 인간 비트로넥틴(10 μg/ml)로 오버나잇 코팅하고 TACTS 버퍼(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.02% Sodium Azide, 2 mM Calcium Chloride, 0.05% Tween-20, 150 mM Sodium Chloride) 내 1% 소혈청 알부민(BSA)으로 1시간 블럭킹하였다. 각 단백질 샘플 또는 GRGDSP 펩타이드를 TACTS 버퍼 내 αIIbβ3 (100 μg/ml) 또는 avb3 (40 μg/ml)로 5분간 배양하고 분석 플레이트에 첨가하였다. 2시간 배양 후, 마우스 항-인간 αIIbβ3 항체 또는 항-인간 avb3 항체를 첨가하였다. 추가적으로 1시간 배양 및 2회 세척을 수행하였다. 양고추냉이 피옥시테이즈 부착된 염소 항-마우스 IgG(Cell signaling, USA)를 첨가한 후 또 한시간 배양하였다. 최종 세척 후 발색 기질(1-스텝 ABTS, PIERCE, Rockford, USA) 용액을 첨가하였다. 그 후 그 플레이트를 발색까지 10여분간 배양하였다. 그 반응은 1% SDS (w/v) 용액을 첨가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <34> 실시예 4: 혈소판 부착 분석
- <35> 고정된 피브리노젠에 혈소판 부착은 Faul1 등[*J. Cell Biol.* 1993; 121: 155-162]에 기재된 것과 같이 수행하

였다. 요약하면 96-웰 마이크로타이터 플레이트(NUNC, Sweden)를 4℃에서 웰 당 10 μg 피브리노겐으로 16시간 코팅하였다. PBS로 세척 후, 웰들을 상온에서 90분간 1% BSA (Sigma)를 포함하는 PBS로 블럭킹하였다. 변형된 Tyrode's 버퍼(140mM NaCl, 4mM KCl, 5.5mM 포도당, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM HEPES, pH 7.4)내 2 x 10<sup>6</sup> 인간 세척 혈소판들을 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 유도체들 또는 GRGDSP 펩타이드로 37℃에서 15분간 배양한 후, 반응 혼합물을 각 웰에 위치한 후 90분 더 배양하였다. 부착되지 아니한 혈소판을 제거하기 위하여 PBS로 3회 세척 후 부착된 혈소판들을 0.1M 구연산 나트륨, 0.1% Triton X-1000, 및 5mM 발색 기질 p-nitrophenyl phosphate (Sigma)를 함유한 0.1ml 라이시스 버퍼로 37℃ 30분간 세포내 에시드 포스포테이즈 활성을 측정하여 정량하였다. 2N NaOH (0.1ml)를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 상기 부착된 혈소판들을 405nm에서 흡광도 측정 에 의하여 측정하였다.

<36> 부착된 혈소판들의 형태학적 연구는 Leng 등[. *Blood* 1998; 91: 4206-4215]에 기재된 것과 같이 수행하였다. 유리 커버슬립에 100 μg/ml 피브리노겐으로 4℃에서 16시간 동안 코팅한 후 PBS로 세척하였다. ADAM15 디스인테그린 단백질들로 배양 후, Tyrode's 버퍼 내 2 x 10<sup>6</sup> 혈소판들을 37℃에서 60분 동안 피브리노겐-코팅 또는 코팅되지 아니한 커버슬립에 플레이트하였다. 비 부착된 혈소판들을 세척한 후 부착된 세포들을 100% 메탄올 내에서 고정하고 tetramethylrhodamine B isothiocyanate(TRITC)-부착된 팔로이딘으로 염색하였다. 혈소판 스프리딩은 형광 현미경(Zeiss Axioskop) 하에서 관찰하였다.

<37> 실시예 5: 혈소판 응집 분석

<38> 혈소판 응집 분석은 김 등(*Thromb. Res.* 2002; 105: 79-86)에 의하여 인간 PRP에서 수행하였다. 건강한 지원자로부터 구연산을 포함한 주사기로 혈액을 수집하였다. PRP를 얻기 위하여 전혈을 상온에서 15분간 120 x g에서 원심분리하였다. 혈소판 빈약 플라즈마(PPP)를 2,000 x g에서 더 원심분리하여 PRP로부터 얻었다. 50 μl의 PBS (pH 7.4)내 A15Dis 샘플 또는 PBS 단독을 450 μl PRP에 첨가한 후 37℃에서 Chrono-log Aggregometer에서 3분간 배양하였다. 혈소판 응집은 10 μM ADP를 첨가하여 시작한 후 광 투과량을 기록하였다. 혈소판 응집의 저해는 최대 응집 반응에서 측정되었다.

<39> 실시예 6: 유동 세포 분석법

<40> 휴지 및 활성화된 혈소판 상의 PAC-1의 막 표면 발현을 유동세포 분석법에 의하여 분석하였다. 전혈을 상온에서 15분간 120 x g에서 원심분리하고 PRP를 제거하였다. 1 μM 프로스타그란딘 E<sub>1</sub>로 5분간 배양 후, PRP를 1,200 x g에서 5분간 원심분리하고 변형 Tyrode's 버퍼 내에서 재부유하였다. 세척된 혈소판들(3x 10<sup>8</sup>/mL)을 10분간 다른 양의 NWK 단백질로 전처리한 후 ADP (10 μM)로 활성화를 수행하였다. 10분 활성화 후, 혈소판들을 fluorescein isothiocyanate (FITC) 부착된 PAC-1 항체로 상온에서 15분간 염색하였다. PAC1를 활성화 의존 형태로 혈소판들에 결합하는 α IIbβ3-특이적 단일클론 항체들이다. 그 반응은 0.5% 파라포름알데히드를 첨가하여 즉시 정지시켰다. 염색된 혈소판들은 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA)를 사용하여 정량화하였다.

<41> 본 발명의 데이터는 n 회 실험의 평균 ± SE로 표시하였다. 통계 유의성은 원-테일드 스튜던트 '스 t-테스트를 사용하여 결정하였다. 차이는 0.01 이하의 p 값에 대한 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 유의성은 개별 실험들에 대해 기재하였다(그림들의 별표). 데이터들은 삼중의 적어도 2 독자 실험들로부터 얻었다.

<42> 실시예 7: 일부가 절단된 디스인테그린 유사 도메인 단백질(Truncated NWK)의 혈소판 응집 분석

<43> 혈소판 응집 분석에 사용되는 단백질이 상기 실시예 5에서 사용된 단백질에 비하여 N-말단의 일부가 결손된 서열번호 2의 단백질을 사용한 것과 인두서로 콜라젠을 사용한 것을 제외하곤 실시예 5의 과정과 동일한 과정에서 서열번호 2의 단백질에 대한 혈소판 응집 능력을 분석하였다.

<44> 상기 실시예에 의한 결과는 다음과 같다.

<45> ADAM15의 디스인테그린 유사 도메인(A15Dis)을 N-말단 프라이머 5'CTCGAGAAAAGAGAGCCGGGCGAGCAGT-3'(서열번호 3) 및 C-말단 프라이머 5'GCGGCCGCTCACCTAGGCTGACATC-3'(서열번호 4)를 사용하여 인간 태아 간 cDNA로부터 PCR에 의하여 클로닝하였고, ADAM15의 디스인테그린 유사 도메인 내의 RPTRGD 서열을 돌연변이유발을 통하여 NWKRGD로 바꾸고 NWK로 명명하였다(도 1A). ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 NWK 돌연변이체의 확장형인 spacer-Dis (spDis) 및 spacer-NWK (spNWK)(도 1A)에 대하여는, 프라이머 5'CTCGAGAAAAGAATGGCTGCTTTCTGCGAAATATG -3'(서열번호 5)를 N-말단용으로 사용하였다. 또한 NWK에서 5'의 22개

아미노에시드를 제거한 Truncated-NWK의 경우 N-말단 프라이머 5' CCTCGAGAAAAGAACCTGCCAGCTGAGGCCAGGTG -3' (서열번호 6)를 사용하였다.

- <46> 상기 PCR 산물들을 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison, USA)로 클로닝하고, 시퀀싱하고, *Pichia pastoris* 발현 벡터 pPIC9(Invitrogen, Carlsbad, USA)로 트랜스퍼하였다. 전체 4 컨스트럭트들을 제조하여 각각 Dis, spDis, NWK, spNWK로 명명하였다(도 1A). N-말단 프라이머들은 *Xho* I 제한 효소 자리를 포함하고 C-말단 프라이머는 정지 코돈과 *Not* I 자리를 포함한다. 클로닝된 플라즈미드의 발현을 간단하게 설명하면, pPIC9-A15Dis 플라즈미드들을 *Sal* I 제한 효소로 처리하고 선형화된 플라즈미드들을 전기충격법(electroporation)(Gene Pulser, Bio-Rad, Hercules, USA)에 의하여 컴페턴트 GS115 세포로 트랜스포메이션하였다. His<sup>+</sup> pPIC9-A15Dis 형질전환체들의 메탄올 이용 능력을 최소 텍스트로스 및 최소 메탄올 플레이트에서 리프리카 선택에 의하여 분석하였다. 최종적으로 His<sup>+</sup> 및 Mut<sup>+</sup> 세포들을 단백질 발현을 위하여 수집하였다.
- <47> ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그것의 유도체들을 pPIC9 벡터에 클로닝하고 메탄올 유도에 의하여 *Pichia pastoris*에서 발현하였다. 재조합 단백질들을 크로마토그래피 분획을 통하여 배양 배지로부터 정제하였다. 상세하게 설명하면 *Pichia pastoris* 배양 배지를 페닐-세파로스 크로마토그래피에 로딩하고 그 단백질을 암모늄 설페이트 선형 그래디언트로 용출하였다. ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 단백질을 포함하는 크로마토그래피 분획들을 PBS에 대하여 투석하고 균질한 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그것의 유도체들을 세파텍스 G-75 젤 여과 크로마토그래피로 더 정제하여 얻었다(도 1B).
- <48> 정제된 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인들, Dis 및 NWK를 환원 조건에서 분자량 12 kDa의 단일 밴드로 전개하였다. 효모-발현된 Dis 및 NWK 단백질들은 디스인테그린 유사 도메인을 포함하고 78 아미노산으로 구성된다. 반면에 spDis 및 spNWK 단백질들은 디스인테그린 유사 도메인외에 10 아미노산의 스페이서를 포함하고(도 1A), 분자량 13 kDa로 전개된다(도 1B).
- <49> 뱀독에서 유래한 RGD-포함 디스인테그린들은 혈소판 표면의 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 에 결합하여 혈소판 응집을 저해한다. 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인에 RGD 세펩타이드 서열이 존재하므로 Dis로 명명된 ADAM15의 디스인테그린 유사 도메인(도 1)이 고상 저해 분석에 의하여 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3와 상호작용하는지를 조사하였다. Dis의 인테그린 저해 활성을 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 에 결합하는 것으로 알려진 GRGDSP 펩타이드와 비교할 때 Dis는 GRGDSP 펩타이드와 유사하게 용량 의존적인 형태로 피브리노겐에  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 결합을 저해하나 GRGDSP 펩타이드보다 더 강하게 블럭하였다(도 2A). 피브리노겐을 고정화하는 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 결합을 저해하는 Dis 및 GRGDSP 펩타이드의 IC<sub>50</sub> 값들은 각각 1.3  $\mu$ M 및 6.9  $\mu$ M로 결정되었다.
- <50> 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3를 길항하는 NWK 단백질의 활성을 야생형 Dis 단백질 및 다른 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 돌연변이체들과 비교할 때 NWK 돌연변이체는 0.2  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3에 대하여 증가된 결합 친화도를 보였다. 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3/피브리노겐 ELISA에서 spDis 및 spNWK의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.1  $\mu$ M 및 8.1  $\mu$ M를 나타냈다.
- <51> NWK 단백질의 저해 작용이  $\alpha$  IIb $\beta$ 3에 제한되는지를 결정하기 위하여, avb3로 인테그린 결합 ELISA를 수행하였다. 도 2B에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명자들이 실험한 모든 돌연변이체는 avb3/비트로넥틴 ELISA에서 Dis 단백질과 비교하여 변경된 결합 친화도를 나타내지 않았다. 이 결과는 NWK 돌연변이체가 피브리노겐에 대한 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3의 결합을 특이적으로 저해할 수 있다는 것을 의미한다. 이와 대조적으로 NWK보다 10 아미노산을 더 가진 spNWK는 원래 Dis 단백질보다 개량된 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3의 결합 친화도를 나타내지 않았다(도 2A).
- <52> ADAM15 디스인테그린 유사 도메인이 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3를 블럭킹하여 혈소판의 기능을 저해하는지를 확인하기 위하여, 고정화된 인간 피브리노겐에 혈소판 부착을 조사하였다. 부착된 혈소판들의 정량은 혈소판 에시드 포스포테이즈 활성을 측정하여 수행하였다. A15Dis로 혈소판의 전(pre)배양은 고정화된 피브리노겐에 혈소판 부착을 용량 의존적으로 감소시켰다(도 3). 인테그린  $\alpha$  IIb $\beta$ 3/피브리노겐 ELISA와 유사하게, NWK 돌연변이체는 피브리노겐 코팅된 플레이트에 혈소판 부착을 현저하게 저해하는 것을 나타냈다.
- <53> 또 고정화된 피브리노겐에 부착된 혈소판들을 F-액틴에 특이적으로 결합하는 TRITC-판로이딘과 세포들을 염색하여 현미경적으로 조사하였고, 80% 이상의 혈소판들이 저해제없이 60분 후 세포들을 배양한 피브리노겐 코팅된 커버슬립 상에 완전하게 스프리딩된 것을 보였다(도 4A, C, 화살표). 이와 대조적으로, 1  $\mu$ M의 NWK 단백질로 배양된 혈소판들의 스프리딩은 크게 감소하였다(도 4D). NWK에 의한 혈소판 스프리딩의 저해는 코팅되지 아니한

커버스립에서 혈소판의 스프리딩이 단백질에 의하여 영향을 받지 아니하므로 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$  특이적이다(도 4B).

<54> 재조합 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인들이 인 비트로에서 혈소판 응집을 저해할 수 있는지를 확인하기 위하여 인간 PRP를 이용하여 ADP-유도된 혈소판 응집 분석을 수행하였다. 도 5A에 나타난 실험 결과는 재조합 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인이 ADP-유도된 혈소판 응집에서 50  $\mu M$  농도까지는 저해 활성이 없다는 것을 나타내었다. ADP-유도된 혈소판 응집 분석에서 Dis 단백질의  $IC_{50}$  값은 110  $\mu M$ 이었다. 기대한 바와 같이 본 발명의 NWK 돌연변이체는 혈소판 응집 저해제로 현저한 작용을 하였다. 이러한 결과는 여러 돌연변이체 중 NWK가 ADP-유도된 시스템에서 인간 혈소판 응집의 최고의 저해제라는 것을 나타낸다( $IC_{50}$  값은 5  $\mu M$ )(도 5B). 이와 대조적으로 ADP-유도된 혈소판 응집에서 GRGDSP 펩타이드의  $IC_{50}$  값은 270  $\mu M$ 이었다. 이러한 결과는 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 중 NWK 돌연변이체가 혈전 관련 질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

<55> 혈소판 응집을 저해하는 NWK 단백질의 작용기작을 더 분석하기 위하여 휴지 또는 활성화된 혈소판들 상의 PAC-1의 막 표면 발현을 유동 세포분석법에 의하여 분석하였다. PAC1는 RGD-저해 형태로 활성화된 혈소판들 상 피브리노겐 수용체 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$ 에 특이적인 단일클론 항체이다. ADP로 활성화하기 전에 NWK를 혈소판들에 전처리한 경우에, 혈소판들에 대한 PAC-1 결합은 ADP-활성화된 혈소판들과 비교하여 크게 감소하였다(도 6B, C). PAC-1 결합에 대한 NWK 및 GRGDSP 펩타이드의  $IC_{50}$  값은 각각 10  $\mu M$  및 100  $\mu M$ 이었다(도 6E). 이것은 혈소판 응집 저해에 대한 NWK의 기능은 혈소판들의 표면상의 활성화된 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$ 의 감소에 기초한다는 것을 나타낸다.

<56> 상기 실시예 7의 혈소판 응집분석 실험의 결과는 도 7에 표시하였다.

<57> 도 7에서 알 수 있는 바와 같이 Truncated NWK의 경우  $IC_{50}$ 이 700nM을 나타내었다. NWK의 경우 인간 혈소판 응집 억제제의  $IC_{50}$  값이 5  $\mu M$ 인 것과 비교하면(실시예 5, 도5) 7배 정도의 억제 활성증가의 효과를 보았다. 또 Dis 단백질의  $IC_{50}$  값 (110  $\mu M$ )에 비하면 무려 150배의 억제 활성이 증가되었음을 알 수 있다. 이 결과로 22개의 아미노산의 제거가 단백질의 구조의 안정화에 큰 역할을 하였으며, 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$ 에의 결합을 증가시켰음을 알 수 있다.

### 발명의 효과

<58> 상기의 구성에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 NWK 돌연변이체는 인간 순환계에서 항혈소판 치료제 또는 항혈전 치료제로 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체 정제를 나타낸 그림. pPIC9 벡터에 클론된 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체의 분자 구조를 패널 A에 나타내었다. 인간 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체들은 실시예에 기재된 방법에 따라서 *Pichia pastoris* 에서 발현하였고 정제된 단백질들은 환원 조건하에서 4-20% SDS-PAGE에서 분리하였다(B).

<2> 도 2는 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 및 그 유도체들의 인테그린 결합 특이성을 나타낸 그림. 인테그린 결합은 고상 ELISA에 의해서 측정하였다. 마이크로타이터 플레이트(96-웰)을 인간 피브리노겐(A) 및 비트로넥틴(B)로 각각 코팅하였다. 블로킹 및 세척 후, 그 플레이트를 그것의 각 수용체들인 인테그린  $\alpha IIb\beta 3$ (A) 및 avb3(B)로 디스인테그린 존재 또는 부존재하에서 배양하였다. 배양 후, 마우스  $\alpha$ -인간  $\alpha IIb\beta 3$ (A) 및 avb3(B) 항체를 첨가하였다. 추가 배양 후 염소 항-마우스 IgG HRP를 첨가하고 실시예에 기재된 바와 같이 수행하였다. 데이터는 유사한 정성결과를 가지는 세 독립적인 실험 중 대표적인 하나이다. 실험은 삼중으로 수행하였다. \*,  $p < 0.01$  versus GRGDSP 펩타이드.

<3> 도 3은 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 돌연변이체에 의한 혈소판 응집저해를 나타낸 그림. 세척된 혈소판들은 여러 농도들의 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 돌연변이체 또는 GRGDSP 펩타이드로 배양한 후 60분 동안 고정된 피브리노겐 상에 위치하였다. 비 응집 혈소판을 제거하기 위하여 PBS로 세척 후, 응집된 혈소판들을 에시드 포스파테이즈 방법들로 정량화하였다. 결과는 두 독자적 실험은 삼중으로 수행하여 얻은 것이다. \*,  $p < 0.01$  versus 비 처리 대조군.

<4> 도 4는 NWK 돌연변이체에 의한 혈소판 스프리딩의 저해를 나타내는 그림. NWK 돌연변이체로 처리된 혈소판들을

비 코팅된(A, B) 또는 피브리노겐-코팅된(C, D) 유리 커버슬립에 위치하였다. 부착된 혈소판들을 실시예에서 기재한 바와 같이 TRITC-팔로이딘으로 염색하였다. 원래 배율은 x 1000이다.

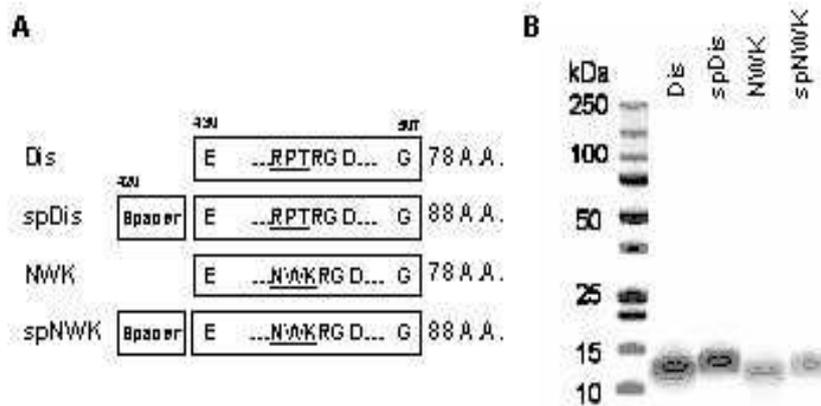
<5> 도 5는 재조합 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 돌연변이체에 의한 혈소판 응집의 저해를 나타내는 그림. 혈소판 처리는 실시예에 기재된 바와 같이 수행하였다. PRP 를 여러 농도의 ADAM15 디스인테그린 유사 도메인 돌연변이체(A) 또는 NWK(B)로 배양하고 ADP 첨가에 의하여 혈소판 응집을 시작한 후 광투과를 크로노-로그 어그레고미터로 기록하였다. 혈소판 응집의 저해는 최대 응집 반응에서 측정하였다. 단백질 농도는 로그 스케일로 작도하였다. 데이터는 적어도 3회 독자적인 실험의 평균 ± SE를 나타낸다. 실험은 3중으로 수행하였다(B). \*,  $p < 0.01$  versus 비처리 대조군.

<6> 도 6은 NWK에 의한 ADP-유도된 PAC-1 결합의 감소를 나타낸 그림이다. 혈소판 처리는 실시예에 기재된 바와 같이 수행하였다. 25  $\mu$ M NWK (C) 또는 100  $\mu$ M GRGDSP 펩타이드(D)로 전처리된 세척된 혈소판들( $3 \times 10^8$ /mL)을 ADP(B)로 활성화하였다. 혈소판들을 FITC-PAC-1 항체로 염색하였고 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA)를 사용하여 정량화하였다. 세척된 혈소판들을 여러 양의 NWK 또는 GRGDSP 펩타이드로 사전배양하였다고, 비처리된 대조군과 비교하여 PAC-1 결합 퍼센트를 계산하였다(E). 단백질 농도는 로그 스케일로 작도하였다. 데이터는 유사한 정성 결과를 가지는 3회 독자적인 실험의 대표적인 하나이다. 실험은 3중으로 수행하였다. \*,  $p < 0.005$  versus ADP-활성화된 혈소판들.

<7> 도 7은 Truncated NWK의 혈소판 응집의 저해를 나타내는 그림. 자세한 내용은 도 5를 참고하기 바람.

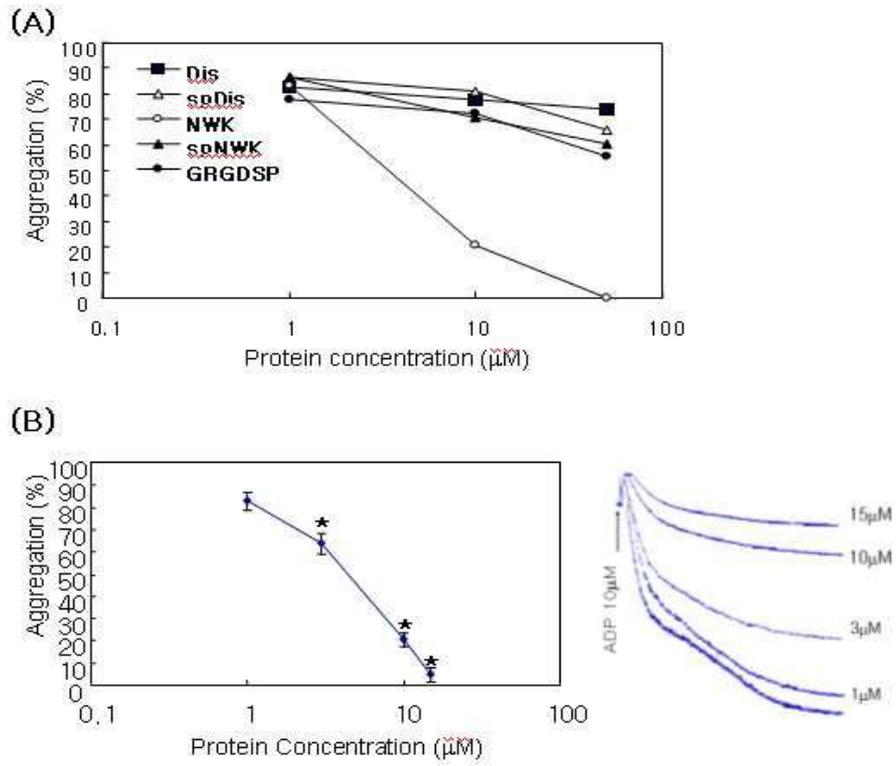
## 도면

### 도면1

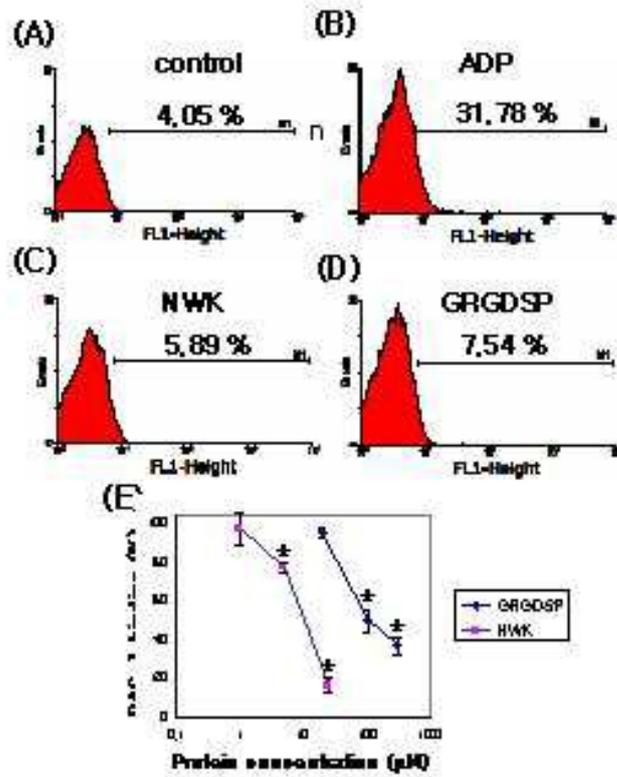




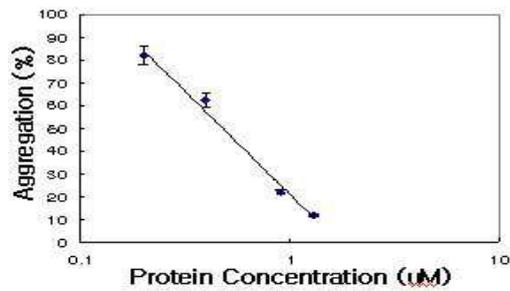
도면5



도면6



도면7



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)