



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월01일
(11) 등록번호 10-1278459
(24) 등록일자 2013년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2006.01) C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7011106(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년12월02일
심사청구일자 2012년05월24일
(85) 번역문제출일자 2012년04월27일
(65) 공개번호 10-2012-0063542
(43) 공개일자 2012년06월15일
(62) 원출원 특허 10-2006-7013411
원출원일자(국제) 2004년12월02일
심사청구일자 2009년11월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/013670
(87) 국제공개번호 WO 2005/054285
국제공개일자 2005년06월16일
(30) 우선권주장
A 1952/2003 2003년12월04일 오스트리아(AT)
(56) 선행기술조사문헌
WO1992007935 A1
FEBS LETTERS Vol.409(2):183-187
WO1996034965 A1

(73) 특허권자
프로타핀 바이오테크놀로지 아게
오스트리아 그라츠 레이닝하우스슈트라쎄 13아 임
펠스젠트룸 그라츠-웨스트 (우:8020)
(72) 발명자
쿤글, 안드레아스, 제이.
오스트리아 아-8045 그라츠 슈트라쎄호프베크 77
아
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 18 항

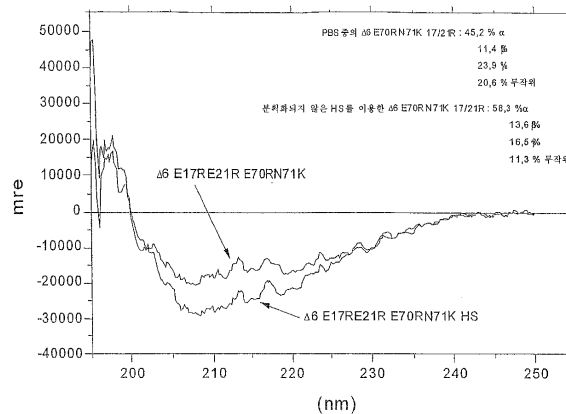
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 GAG 결합 단백질

(57) 요약

본 발명은 구조 유지에 필수적이지 않은 단백질 내의 영역을 확인하는 단계 및 상기 부위로 하나 이상의 염기성 아미노산을 도입시키고/거나 상기 부위 내의 하나 이상의 벌키 및/또는 산성 아미노산을 결실시키는 단계를 포함하는, 단백질 내로 GAG 결합 부위를 도입하는 방법으로서, 여기서 상기 GAG 결합 부위가 $K_d \leq 10 \mu\text{M}$, 바람직하게는 $K_d \leq 1 \mu\text{M}$, 더욱 바람직하게는 $K_d \leq 0.1 \mu\text{M}$ 의 GAG 결합 친화성을 지니는 방법 및 변형된 GAG 결합 단백질에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

GAG 결합 부위가 용매 노출되는 위치인, CC 케모카인의 GAG 결합 부위를 변형하는 방법으로서, 상기 방법은 Arg, Lys 및 His로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 염기성 아미노산을 상기 용매 노출되는 위치로 도입하는 단계,

Trp, Ile, Leu, Phe 및 Tyr으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 벌키(bulky) 아미노산, Glu 및 Asp로 구성된 군에서 선택된 산성 아미노산, 또는 상기 벌키 아미노산 및 상기 산성 아미노산 둘 모두를 상기 용매 노출되는 위치에서 결실시키는 단계,

또는 상기 도입 단계 및 결실 단계 둘 모두를 포함하고,

여기서 상기 변형된 GAG 결합 부위를 지니는 CC 케모카인은 야생형 케모카인의 GAG 결합 친화력(Kd)와 비교하여 5 내지 2600배의 증가된 GAG 결합 친화력을 지니고,

여기서 상기 CC 케모카인은 RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1, MIP-5/HCC-1로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 2

제1항에 따른 방법에 의해 수득가능한 변형된 CC 케모카인으로서,

상기 CC 케모카인 내의 GAG 결합 부위의 용매 노출되는 위치에 Arg, Lys 및 His로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 염기성 아미노산이 삽입되고,

상기 변형된 GAG 결합 부위를 지니는 CC 케모카인은 야생형 케모카인의 GAG 결합 친화력(Kd)와 비교하여 5 내지 2600배의 증가된 GAG 결합 친화력을 지니고,

상기 CC 케모카인은 RANTES, MCP-2, MCP-3, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1, MIP-5/HCC-1로 구성된 군으로부터 선택되고,

상기 CC 케모카인은 하기의 군으로부터 선택되는 것인, 변형된 CC 케모카인:

```

RANTES: 17 RPLPRAH 23 44 RKNR 47
SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFVTRKQRQVCANPEKQWVRE
YINSELEMS
MCP-2: 18 RKIPIQR 24 46 KRGR 49
QPDGVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRQKEVCADPKERWVRDSMKHLDQIFQNLKP
MCP-3: 22 KQR 24 47 KLDK 50 66 KHLDKK 71
QFVGINTSTTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSECPREAVIFKTKLDKEICADPTQKQV
QDFMKHLDKKTQTPKL
MIP-1 $\alpha$ : R17, 44 KRGR 47
SLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEMVQK
YVSDLELSA
MIP-1 $\beta$ : R18, 45 KRGR 48
APMGSDPTACCFSYTARKLPNRFVVDYYETSSLCSPAVVFQTKRGRQVCADPSESWVQEVVDLELN
MIP-1: R18, 45 KRGR 48
MDRFHATSADCCISYTFRSIPCSLLESYFETNSECSPKPGVIFLTKGRGRFCANPSDKQVQ
VCMRMLKLDTRIKTRKN
MIP-5 / HCC-2: 40 KRGR 43
HFAADCTSYISQSI PCSLMKSYFETSSSECSPKPGVIFLTKGRQVCAPSGPGVQDCMKK
LKPYSI
  
```

(상기 CC 케모카인에서 굵게 나타낸 아미노산 영역은 GAG 결합 부위를 나타낸다)

청구항 3

제2항에 있어서,

Arg, Lys 및 His로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기성 아미노산이 상기 GAG 결합 부위 내의 용매 노출되는 위치로 삽입됨을 특징으로 하는, 변형된 CC 케모카인.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 증가된 GAG 결합 친화력은 헤파린 설페이트, 헤파린, 또는 헤파린 설페이트 및 헤파린에 대한 증가된 결합 친화력인 것을 특징으로 하는, 변형된 CC 케모카인.

청구항 5

제2항에 있어서,

수용체 결합 부위인, 추가의 생물학적 활성 영역이 변형되어 상기 CC 케모카인의 생물학적 활성이 억제되거나 하향조절됨을 특징으로 하는, 변형된 CC 케모카인.

청구항 6

제2항에 따른 변형된 CC 케모카인을 코딩함을 특징으로 하는, 분리된 다중핵산 분자.

청구항 7

제6항에 따른 분리된 다중핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 8

제7항에 따른 벡터로 안정하게 트랜스펙션된 재조합 세포로서, 상기 재조합 세포는 인간 기원이 아닌 것을 특징으로 하는 재조합 세포.

청구항 9

염증 질환의 치료를 위한 제2항에 따른 변형된 CC 케모카인 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 제6항에 따른 분리된 다중핵산 분자를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 제7항에 따른 벡터를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 CC 케모카인은 염증 질환의 치료를 위한 약제를 제조하기 위하여 사용되는, 변형된 CC 케모카인.

청구항 13

제6항에 있어서,

상기 분리된 다중핵산 분자는 염증 질환의 치료를 위한 약제를 제조하기 위하여 사용되는, 분리된 다중핵산 분자.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 벡터는 염증 질환의 치료를 위한 약제를 제조하기 위하여 사용되는, 벡터.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 건선, 골관절염, 천식, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 건선, 골관절염, 천식, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 변형된 CC 케모카인.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 건선, 골관절염, 천식, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 분리된 다중핵산 분자.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 건선, 골관절염, 천식, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 벡터.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 케모카인 및 백혈구 상의 이의 고친화성 수용체의 상호작용의 억제를 위한 방법 및 도구, 및 염증 질환의 치료를 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본래, 화학유인물질 사이토카인으로부터 유래된 케모카인은 사실상 50개 이상의 일원을 포함하고, 면역감시 및 염증 과정 동안 결정적인 역할을 하는 저분자량(이의 단량체형에서 6-12 kDa)의 소형의 유도가능한 분비 단백질의 패밀리아. 면역 및 염증에서의 이의 기능에 따라, 이들은 두개의 부류로 구분될 수 있다. 염증성 케모카인은 다수의 상이한 조직 세포에 의해 생성될 뿐만 아니라 세균 독소 및 염증 사이토카인, 예를들어 IL-1, TNF 및 인터페론에 대한 백혈구의 이주에 의해 생성된다. 이들의 주 기능은 숙주 방어 및 염증의 과정에서 백혈구를 보충하는 것이다. 한편, 귀소 케모카인은 림프조직의 규정된 영역에서 조직적으로 발현된다. 이들은 면역계 내에서 림프구 및 수지상 세포의 왕래 및 귀소를 유도한다. BCA-1, SDF-1 또는 SLC에 의해 예시되는 바와 같은 이들 케모카인은 성숙, 분화 및 활성화와 관련하여 림프구의 재배치 및 재순환을 조절하고, 2차 림프기관

내에서 이들의 정확한 귀소를 보장한다.

[0003] 매우 많은 표본(representative)에도 불구하고, 케모카인은 20 내지 70 퍼센트로 서열 상동성이 다양하나 현저하게 유사한 구조적 폴드(fold)를 나타낸다. 케모카인은 네개의 보존된 시스테인 잔기를 지닌 대략 70 내지 130개의 아미노산으로 구성된다. 시스테인은 케모카인의 특색을 이루는 3차 구조를 책임지는 두개의 이황화 결합(Cys 1 → Cys 3, Cys 2 → Cys 4)을 형성한다. 화학주성 사이토카인은 첫번째 시스테인 잔기에 선행하는 짧은 아미노 말단 도메인(3 내지 10개의 아미노산), β-스트랜드(strand) 및 두번째와 네번째 시스테인 잔기 사이에서 발견되는 연결 루프로 구성된 코어, 및 20 내지 60개의 아미노산의 카르복시 말단 α-헬릭스로 구성된다. 단백질 코어는 잘 정돈된 구조를 지니는 반면, N-말단 및 C-말단 부분은 정돈되어 있지 않다. 분비 단백질로서, 이들은 방출 전에 분열되는 20 내지 25개의 아미노산의 선도 서열을 지니도록 합성된다.

[0004] 케모카인은 성숙 단백질에서의 이들의 시스테인 잔기의 상대적인 위치에 기초하여 네개의 패밀리로 세분되어 있다. α-케모카인 서브패밀리에서, 네개의 시스테인중 첫번째 두개는 단일 아미노산에 의해 분리되어 있는 반면(CXC), β-케모카인에서는 상응하는 시스테인 잔기가 서로 인접되어 있다(CC). α-케모카인은 N-말단 내에 ELR 서열을 함유하여 이에 의해 호중구에 대해 화학주성이 되는 패밀리(예를들어, IL-8), 및 ELR 모티프가 결여되어 있고 림프구 상에서 작용하는 패밀리(예를들어, I-TAC)으로 추가로 분류될 수 있다. 구조적으로, β-케모카인은 다섯개의 단핵구 화학유인물질 단백질(MCP) 및 서로 약 65 퍼센트 동일한 이오타신(eotaxin)을 함유하는 단핵구-화학유인물질 단백질 이오타신 패밀리, 및 잔여의 β-케모카인과 같이 두개의 패밀리로 세분될 수 있다. CXC-패밀리와 같이, CC-잔기에 선행하는 N-말단 아미노산은 생물학적 활성 및 케모카인의 백혈구 선택성에 대해 중요한 성분이다. 일반적으로, β-케모카인은 호중구 상에서 작용하지 않으나, 가변적인 선택성으로 단핵구, 호산구, 호염기구 및 림프구를 유인한다.

[0005] 단지 소수의 케모카인이 CC-패밀리 또는 CXC-패밀리에 합치하지 않는다. 림포타틴(lymphotactin)은 이의 일차 구조에서 네개의 특색을 이루는 시스테인 대신 단지 두개를 나타내고, 이에 따라 γ- 또는 C-케모카인으로 분류되는 현재 유일한 케모카인이다. 다른 한편, 이러한 분류의 결론에 의해, 프렉탈카인(fractalkine)은 첫번째 두개의 시스테인을 분리하는 세개의 아미노산을 지니는 δ- 또는 CXXXC-서브패밀리의 유일한 표본으로 언급되어야 한다. 림포타틴 및 프렉탈카인 이들 둘 모두는 T-세포 및 자연살상세포의 화학주성을 유도한다.

[0006] 케모카인은 표적 세포 상의 특이적 세포 표면인 7개의 막횡단-스패닝(transmembrane-spanning)(7TM) G-단백질 결합 수용체에 결합함으로써 세포 이동 및 활성화를 유도한다. 6개의 CXC, 10개의 CC, 1개의 CX3C 및 1개의 XC 수용체를 포함하여 18개의 케모카인 수용체가 최근에 클로닝되었다. 케모카인 수용체는 다양한 유형의 백혈구 상에서 발현되고, 이들중 일부는 특정 세포에 제한되는 반면(예를들어, CXCR1은 호중구에 제한됨), 나머지는 보다 광범위하게 발현된다(예를들어, CCR2는 단핵구, T 세포, 자연살상세포 및 호염기구에서 발현됨). 케모카인과 유사하게, 수용체는 특정 세포상에서 구성적으로 발현될 수 있는 반면, 일부는 유도가능하다. 이들중 일부는 세포가 특정 케모카인에 대해 둔감하도록 하향 조절되는 반면에 다른 케모카인에 대해서는 반응되도록 잔류시킬 수 있다. 대부분의 수용체는 하나 이상의 케모카인을 인지하거나 역으로 하나만을 인지할 수 있으나, 인지는 상응하는 서브패밀리의 케모카인에 제한된다(표 1 참조).

표 1

| 케모카인 | | 수용체 | 화학주성 대상 | 염증 질환 |
|------------------------|--------|----------------|--------------------------------------|---|
| CXC-케모카인 (+ELR 모티프) | IL-8 | CXCR1 CXCR2 | 호중구 | 급성 호흡곤란증후군[71]; 세균성 폐렴[72]; 류마티스 관절염[73]; 염증성 창자병[74]; 건선[75]; 세균성 수막염[76] |
| CC-케모카인 | MCP-1 | CCR2 | 호염기구; 단핵구; 활성화된 T 세포; 수지상 세포; 자연살상세포 | 천식[77]; 사구체신염[78]; 죽상동맥경화증[79]; 염증성 창자병[80]; 건선[81]; 세균성 및 바이러스성 수막염[82,83] |
| | RANTES | CCR1 | 호산구; 단핵구; 활성화된 T 세포; 수지상 세포 | 천식[84]; 사구체신염[85] |
| | | CCR3 | 호산구; 호염기구; 수지상 세포 | |
| | | CCR5 | 단핵구; 활성화된 T 세포; 수지상 세포; 자연살상세포 | |

- [0008] 케모카인은 이들의 수용체와의 상호작용의 두개의 주요 부위, 즉 아미노 말단 도메인의 부위, 및 두번째 및 세번째 시스테인 잔기 사이에 연장된 백본의 노출된 루프 내에 다른 부위를 지닌다. 두 부위는 이황화 결합에 의해 근접되어 있다. 수용체는 도킹 도메인으로 작용하는 것으로 보이는 루프 영역 내의 결합 부위를 먼저 인지한다. 이러한 상호작용은 케모카인의 이동성을 제한하여, 아미노-말단 도메인의 올바른 배향을 촉진시킨다. 케모카인의 수용체에 여전히 효과적으로 결합하나 신호를 나타내지 않는 돌연변이체 케모카인으로 연구를 수행하였다. 이들 돌연변이체는, 예를들어 IL-8, RNATES 및 MCP-1의 N-말단 내의 아미노산 결실 또는 변형에 의해 수득되었다.
- [0009] 다중의 세포내 신호전달 경로는 케모카인 결합의 결과로서 수용체 활성화 후에 발생한다. 케모카인은 또한 두 유형의 비신호전달 분자와 상호작용한다. 하나는 적혈구 및 내피세포 상에서 발견되고, CC-케모카인 및 CXCL-케모카인과 결합하여 이들의 순환을 방지하는 DARC 수용체이다. 두번째 유형은 프로테오글리칸의 일부이고, 케모카인의 공동-수용체로 작용하는 헤파란 설페이트 글리코사미노글리칸(GAG)이다. 이들은 국소 농도 구배를 확립하기 위해 귀소 조직(예를들어, 내피세포)의 표면 상에서 케모카인을 획득하고 제시한다. 염증 반응, 예를들어 류마티스 관절염에서, 선택된-매개 과정에서 내피 상에서 회전하는 백혈구는 세포 표면 상의 프로테오글리칸에 의해 제시된 케모카인과 접촉하게 된다. 이에 의해, 백혈구 인테그린이 활성화되어 부착 및 이출을 확고하게 한다. 보충된 백혈구는 국소 염증 사이토카인에 의해 활성화되고, 케모카인의 고도의 국소 농도로 인해 추가의 케모카인 신호전달에 대해 둔감해질 수 있다. 조직 혈류 케모카인 구배를 유지시키기 위해, DARC 수용체는 과잉 케모카인에 대한 싱크(sink)로서 작용한다.
- [0010] 공유적으로 부착된 글리코사미노글리칸 측쇄(GAG)를 지닌 코어 단백질로 구성된 헤파란 설페이트(HS) 프로테오글리칸은 대부분의 포유동물 세포 및 조직에서 발견된다. 단백질 부분이 세포막 또는 세포의 기질에서 프로테오글리칸의 위치를 결정하는 동안, 글리코사미노글리칸 성분은 다양한 세포외 리간드, 예를들어 성장 인자, 케모카인 및 부착 분자와의 상호작용을 매개한다. 프로테오글리칸의 생합성은 기존에 광범위하게 연구되었다. 세포 표면 프로테오글리칸의 주요 그룹은 막횡단 단백질의 신데칸(syndecan) 패밀리를(포유동물중 4개의 일원) 및 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 테일에 의해 세포막에 부착된 단백질의 글리피칸(glypican) 패밀리를(포유동물중 6개의 일원)이다. 글리피칸은 신경계, 신장에서 광범위하게 발현되고, 보다 적은 범위에서 골격근 및 평활근에서 발현되지만, 신데칸-1은 내피 세포의 주요 HSPG이고, 신데칸-2는 섬유모세포 및 내피세포에서 우세하고, 신데칸-3는 신경 세포에 풍부하고, 신데칸-4는 광범위하게 발현된다. 특정 세린 상의 사당류 결합 영역을 통해 신데칸 코어 단백질로 첨가되는 GAG 사슬의 대부분은 HS 사슬이다. 막횡단 및 세포질 도메인과는 대조적으로 특이적 신데칸 유형의 세포외 도메인의 아미노산 서열은 상이한 종 사이에서 보존되어 있지 않지만, GAG 사슬의 수 및 위치는 고도로 보존되어 있다. 그러나, GAG의 구조는 종 특이적이고, 더욱이 HSPG 발현 조직의 특성에 좌우된다.
- [0011] 헤파란 설페이트(HS)는 헤파린, 콘드로이틴 설페이트, 더마탄 설페이트 및 케라탄 설페이트를 포함하는 선형 다당류의 글리코사미노글리칸(GAG) 패밀리의 가장 풍부한 일원이다. 자연 발생의 HS는 N-설페이션 및 O-설페이션(글루코사민의 6-O 및 3-O 설페이션 및 유론산의 2-O 설페이션) 뿐만 아니라 α -L-이두론산(IdoA)에 대한 β -D-글루루로닉산의 에피머화를 포함하도록 변형될 수 있는 N-아세틸-D-글루코사민(GlcAc) 및 D-글루루론산(GlcA)으로 구성된 20 내지 100개의 이당류 유닛의 선형 사슬로 특징된다.
- [0012] 적은 설페이션의 영역에 의해 분리된 N- 및 O-설페이트화 당 잔기의 클러스터는 HS의 다수의 단백질 결합 및 조절 특성을 주로 책임지는 것으로 추정된다. HS 설페이트기와 염기성 아미노산의 정전기 상호작용 이외에, 반데르 발스 및 소수 상호작용이 또한 단백질 결합과 관련되는 것으로 생각된다. 더욱이, 형태적으로 유연한 이두로네이트 잔기의 존재는 단백질에 대한 GAG 결합을 촉진하는 듯하다. 기타 요인, 예를들어 단백질 결합 부위 사이의 간격이 또한 단백질-GAG 결합 상호작용에서 중요한 역할을 한다: 예를들어, HS에 의해 유도된 γ -인터페론 이합체화는 적은 설페이션을 지닌 7kDa 영역에 의해 분리된 두개의 단백질 결합 서열을 지닌 GAG 사슬을 필요로 한다. 추가 서열은 FGF-2 신호 전달을 지지하기 위해 때때로 몇몇 리간드의 완전한 생물학적 활성이 요구되고, HS는 최소 결합 서열 뿐만 아니라 FGF 수용체와 상호작용하는 것으로 추정되는 추가의 잔기 둘 모두를 지녀야 한다.
- [0013] 헤파린 결합 단백질은 종종 염기성 아미노산 잔기의 클러스터로 구성된 공통서열을 함유한다. 리신, 아르기닌, 아스파라긴, 히스티딘 및 글루타민은 종종 GAG 상의 설페이트 및 카르복실기와와 정전기적 접촉과 관련된다. 때때로 단백질 3-D 구조에 의해 결정된 염기성 아미노산의 간격은 GAG 결합 특이성 및 친화성을 조절하는 것으로 추정된다. 리간드의 생물학적 활성은 또한 HS-단백질 상호작용의 동역학에 의해 영향을 받을 수 있다. 성장 인자 확산의 범위를 감소시키는 것은 GAG 사슬의 긴 반복 특성 뿐만 아니라 이의 단백질 결합의 비교적 신속

한 작용 및 중단 속도에 이상적으로 적합한 것으로 제시된 HSPG 기능중 하나이다. 몇몇 경우에서, 열역학보다는 약동학이 HS-단백질 결합의 생리학적 기능을 추진시킨다. 대부분의 HS 리간드는 널리 규명된 길이 및 구조의 GAG 서열을 필요로 한다. 비만 세포에 의해 생성된 헤파린은 헤파란 설페이트와 구조적으로 매우 유사하나, 비교적 적은 정도의 구조적 다양성으로 균일한 고도의 설페이션을 야기시키는 보다 높은 수준의 중합후 변형을 특징으로 한다. 따라서, 헤파란 설페이트 내의 고도로 변형된 블록은 때때로 "헤파린-유사"로 언급된다. 이러한 이유에 대해, 헤파린은 또한 많은 양이 이용가능함에 따라 HS보다 저렴하므로 단백질 생물물리학 연구에 대한 완벽한 HS 유사체로 사용될 수 있다. 다양한 세포 유형이 발병기전 동안, 발달과정 동안 또는 세포의 신호, 예를들어 성장 인자에 대한 반응으로 변화하는 다양한 글리코사미노글리칸 구조를 지닌 프로테오글리칸을 합성하는 것으로 밝혀졌다. HSPG의 이러한 구조적 다양성이 프로테오글리칸의 매우 큰 중요성을 강조하는 고도의 결합 가능성을 발생시킨다.

[0014] 헤파란 설페이트 프로테오글리칸이 FGF 신호 전달에 중요하다는 것이 입증된 이래로, 케모카인 활성을 촉진시키기 위한 케모카인-GAG 결합의 중요성을 나타내는 여러 연구가 수행되었다. 첫째로, 지금까지 거의 대부분의 케모카인이 시험관내에서 HS에 결합하는 것으로 연구되었고, 이는 이들 단백질의 기초적인 특성을 나타내는 것을 암시한다. 두번째로, 생체내에서 T 림프구가 글리코사미노글리칸과의 복합체로서 CC-케모카인을 분비한다는 발견은 이러한 형태의 상호작용이 생리학적으로 적절하다는 것을 나타낸다. 더욱이, 케모카인과 HS와의 결합이 내피 표면을 교차하는 농도 구배를 안정시켜, 이에 의해 백혈구 이동에 대한 방향 정보를 제공하는데 도움이 되는 것으로 공지되어 있다. HS는 또한 단백질 분해성 분해로부터 케모카인을 보호하고, 이의 올리고머화를 유도하여, G-결합된 신호전달 수용체 부근에 국소적인 고농도를 촉진시키는 것으로 사료된다. 그러나, 올리고머화의 기능적 관련은 모든 케모카인이 다량체화(multimerisation)를 위한 명백한 구조적 기초를 지님에도 불구하고 논의의 여지가 있다. N-말단 스트랜드를 통해 이합체화되는 CC-케모카인 패밀리(예를들어, RANTES)의 대부분의 일원에 반하여, β -시트의 결합을 통한 이합체화는 CXCL-패밀리(예를들어, IL-8)의 모든 케모카인에서 관찰된다.

[0015] 저분자량 화합물에 의한 케모카인과 백혈구 상에서의 이의 고-친화성 수용체의 상호작용의 억제에 대한 풍부한 데이터가 축적되어 있다. 그러나, 이러한 방법에 의한 염증 질환의 치료에서의 획기적인 약진은 없었다.

[0016] 인터루킨-8(IL-8)은 만성 및 급성 염증 동안의 호중구 유인과 관련된 중요한 분자이다. 예를들어, 글루코코르티코이드, 비타민 D3, 시클로스포린 A, 전환 성장 인자 β , 인터페론 등, IL-8 mRNA의 생성의 수준에서 IL-8 활성을 억제하는 상기 물질 모두에 의한 IL-8 생성의 억제로부터 출발하여 이제까지 여러 방법이 IL-8의 작용을 억제하기 위해 수행되었다. 기존에 사용된 추가의 방법은 특이적 길항제로서 작용하도록 백혈구 상의 수용체 또는 IL-8 그 자체에 대한 특이적 항체를 사용함으로써 수용체에 대한 IL-8의 결합을 억제하여, IL-8 활성을 억제시키는 것이다.

발명의 내용

[0017] 따라서, 본 발명의 목적은 백혈구 상에서의 케모카인/수용체의 상호작용을 억제하거나 방해하기 위한 대안적 방법을 제공하는 것이다. 이러한 방법에 의해 특히 IL-8, RANTES 또는 MCP-1의 활성이 표적이 된다.

[0018] 따라서, 본 발명의 주제는 신규의 GAG 결합 단백질 뿐만 아니라 GAG 공동-수용체에 대해 (야생형 보다) 높은 친화성을 나타내는 대안적 GAG 결합 단백질을 생산하는 방법이다. 이러한 변형된 GAG 결합 단백질은 당 분야에서 사용되는 공지된 재조합 단백질에서 발생하는 부작용 없이 야생형 GAG 결합 단백질에 대한 경쟁자로서 작용할 수 있고, 야생형 GAG 결합 단백질의 활성을 억제하거나 하향조절할 수 있다. 본 발명에 따른 분자는 상기 언급된 불이익을 나타내지 않는다. 본 발명의 변형된 GAG 결합 단백질은 다양한 치료적 용도, 특히 케모카인의 경우 당 분야에 공지된 재조합 케모카인에서 발생하는 공지된 불이익 없이 염증 질환의 치료를 위한 약제에서 사용될 수 있다. 본 발명의 따른 GAG 결합 부위의 변형은 활성이 상기 부위, 특히 GAG 부위를 지니는 케모카인에 대한 결합 작용을 기초로 하는 모든 단백질에 대해 광범위하게 적용가능한 방법인 것으로 판명되었다. 보다 높은 GAG 결합 친화성을 지니는 본 발명에 따른 바람직한 분자는 GAG 부위에 대한 야생형 분자와의 경쟁에 의해 이의 생물학적 효과, 특히 이의 항염증 활성에 대해 특히 유리한 것으로 입증되었다.

[0019] 따라서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 내로 GAG 결합 부위를 도입하는 방법을 제공한다:

[0020] · 구조 유지에 필수적이지 않은 단백질 내의 영역을 확인하는 단계

[0021] · 상기 부위로 하나 이상의 염기성 아미노산을 도입시키고/거나 상기 부위 내의 하나 이상의 벌키 및/또는 산성

아미노산을 결실시키는 단계,

[0022] 여기서, GAG 결합 부위는 $K_d \leq 10 \mu M$, 바람직하게는 $K_d \leq 1 \mu M$, 더욱 바람직하게는 $K_d \leq 0.1 \mu M$ 의 GAG 결합 친화성을 가진다. 상기 영역에 하나 이상의 염기성 아미노산을 도입시키고/거나 하나 이상의 벌키 및/또는 산성 아미노산을 결실시킴으로써, 신규의 개선된 "인공" GAG 결합 부위가 상기 단백질에 도입된다. 이는 상기 변형 전에 GAG 결합 활성을 나타내지 않는 단백질로의 GAG 결합 부위의 신규하고 완전한 도입을 포함한다. 이는 이미 GAG 결합 활성을 나타낸 단백질로의 GAG 결합 부위의 도입도 포함한다. 신규의 GAG 결합 부위는 GAG 결합 친화성을 나타내지 않는 단백질의 영역 뿐만 아니라 GAG 결합 친화성을 나타내는 영역으로 도입될 수 있다. 그러나, 본 발명의 가장 바람직한 구체예에서, 주어진 GAG 결합 단백질의 GAG 결합 친화성의 변형이 제공되고, 상기 변형된 단백질의 GAG 결합 능력은 야생형 단백질에 비해 증가된다. 본 발명은 단백질내로 GAG 결합 부위를 도입하는 방법, 변형된 GAG 결합 단백질 뿐만 아니라 분리된 DNA 분자, 벡터, 재조합 세포, 상기 변형된 단백질의 약학적 조성물 및 용도에 관한 것이다.

[0023] 용어 "하나 이상의 염기성 아미노산의 도입"은 추가의 아미노산의 도입 뿐만 아니라 아미노산의 치환을 의미한다. 주 목적은 상기 부위 내의 아미노산의 전체량에 비교하여 염기성 아미노산, 바람직하게는 Arg, Lys, His, Asn 및/또는 Gln의 상대량을 증가시키는 것이고, 이에 의해 생성된 GAG 결합 부위는 바람직하게는 3개 이상의 염기성 아미노산, 더욱 바람직하게는 4개, 가장 바람직하게는 5개의 아미노산을 포함하여야 한다.

[0024] GAG 결합 부위는 바람직하게는 용매 노출되는 위치, 예를들어 루프이다. 이는 효과적인 변형을 보장할 것이다.

[0025] 단백질의 영역이 구조 유지에 필수적인지의 여부는, 예를들어 당업자에게 공지된 특정 프로그램을 이용한 전산 방법에 의해 시험될 수 있다. 단백질의 변형 후, 형태적 안정성은 바람직하게는 인-실리코(in silico) 시험된다.

[0026] 용어 "벌키 아미노산"은 길거나 입체적으로 방해되는 측쇄를 지닌 아미노산을 의미하고, 이는 특히 Trp, Ile, Leu, Phe 및 Tyr이다. 산성 아미노산은 특히 Glu 및 Asp이다. 바람직하게는, 생성된 GAG 결합 부위는 벌키 및 산성 아미노산이 결여되어 있고, 이는 모든 벌키 및 산성 아미노산이 제거되었음을 의미한다.

[0027] GAG 결합 친화성은 본원의 보호의 범위에서는 해리상수 K_d 상에서 결정된다. 하나의 가능성은 리간드 결합에서의 구조 변화에 의한 임의의 제공된 단백질의 해리상수(K_d) 값을 결정하는 것이다. 다양한 기술, 예를들어 등온 형광 적정, 등온 적정 열량측정법, 표면 플라즈몬 공명, 겔 이동성 분석, 및 간접적으로는 방사능 표지된 GAG 리간드를 이용한 경쟁 실험이 당업자에게 널리 공지되어 있다. 추가의 가능성은 당업자에게 또한 공지된 전산 방법을 이용한 계산에 의해 결합 영역을 예측하는 것으로, 여러 프로그램이 사용될 수 있다.

[0028] GAG 결합 부위를 단백질로 도입시키는 프로토콜은 예를들어 하기와 같다:

[0029] · 전체 구조 유지에 필수적이지 않고 GAG 결합에 적절할 수 있는 단백질의 영역 확인

[0030] · 염기성 Arg, Lys, His, Asp 및 Gln 잔기를 임의의 위치에 도입(대체 또는 삽입)시키거나 GAG 결합을 방해하는 아미노산을 결실시킴으로써 신규의 GAG 결합 부위를 고안

[0031] · 생성된 돌연변이체 단백질을 인-실리코에서 이의 형태적 안정성을 체크

[0032] · 야생형 단백질 cDNA를 클로닝(대안적으로, 상기 cDNA를 구입)

[0033] · 아미노산 서열내로 상기 언급된 변화를 도입시키기 위해 상기 cDNA를 PCR-보조 돌연변이체 유발을 위한 주형으로 이용

[0034] · 적절한 발현 시스템(생물학적으로 번역후 변형에 필요한 원핵생물 또는 진핵생물 의존성 시스템)으로 돌연변이체 유전자를 서브클로닝

[0035] · 시험관내에서 돌연변이체 단백질의 발현, 정제 및 특성 규명

[0036] · 도입된 GAG 결합 친화성에 대한 표준: K_d^{GAG} (돌연변이체) $< 10 \mu M$.

[0037] 상기 신규의 GAG 결합 부위를 이용하여 설계된 단백질의 예는, 예를들어 IgG의 Fc 부분 뿐만 아니라 하기와 같이 변형된 보충 인자 C3 및 C4이다:

[0038] Fc: (439) KSLSLS (444) -> KSKKLS

- [0039] C3: (1297) WIASHT (1302)-> WKAKHK
- [0040] C4: (1) MLDAERLK (8) -> MKKAKRLK
- [0041] 본 발명의 추가의 양태는 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 단백질이다. 따라서, 본 발명의 단백질은 야생형 단백질에 비해 상기 규정된 바와 같은 신규의 GAG 결합 부위를 포함하고, 특히 본 발명의 단백질의 GAG 결합 친화성이, 예를들어 $K_d \leq 10 \mu\text{M}$ 로 매우 높으므로 천연 GAG 결합 단백질에 대한 경쟁자로 작용할 것이다.
- [0042] 본 발명의 추가의 양태는 변형된 GAG 결합 단백질에 관한 것으로, 바람직하게는 용매 노출되는 위치에서 상기 GAG 결합 영역내의 염기성 아미노산의 상대량을 증가시키고/거나 상기 GAG 결합 영역내의 벌키 및/또는 산성 아미노산의 양을 감소시키기 위해 상기 단백질 내의 GAG 결합 영역이 하나 이상의 아미노산의 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 변형되고, 상기 단백질의 상기 GAG 결합 친화성은 각각의 야생형 단백질의 GAG 결합 친화성에 비해 증가된다.
- [0043] 놀랍게도, GAG 결합 영역 내의 염기성 아미노산, 특히 Arg, Lys, His, Asn 및 Gln의 상대량을 증가시킴으로써, 특히 염기성 아미노산의 상대량이 용매 노출되는 부위에서 증가되는 경우에, 변형된 GAG 결합 단백질은 야생형 단백질에 비해 증가된 GAG 결합 친화성을 나타내는데, 이는 상기 단백질 표면 상의 양성으로 하전된 영역이 결합 친화성을 향상시키는 것을 나타내기 때문이다. 바람직하게는, 3개 이상, 더욱 바람직하게는 4개, 가장 바람직하게는 5개의 염기성 아미노산이 GAG 결합 영역내에 존재한다.
- [0044] 용어 "GAG 결합 단백질"은 GAG 공동-수용체에 결합하는 임의의 단백질을 의미한다. 단백질이 GAG 공동-수용체에 결합하는지의 여부는 상기 언급된 바와 같은 공지된 프로토콜의 도움으로 시험될 수 있다. 문헌[Hileman et al. (BioEssays 20 (1998), 156-167)]에는 글리코사미노글리칸 결합 단백질 내의 공통 서열이 기재되어 있다. 상기 문헌에 기재된 정보는 또한 본 발명의 출발 정보로서 유용하다. 용어 "단백질"은 본 발명에 의해 제공된 분자가 80개 이상의 아미노산 길이임을 명백하게 한다. 이는 본 발명의 분자를 본 발명의 항염증 방법에 대한 적절한 후보자로 만드는데 필요하다. GAG 결합 부위와 상호작용하고 상기 상호작용으로 인해 생리학적으로 또는 병리학적으로 적절한 보다 작은 분자는 공지되어 있지 않아 본 발명에 적절하지 않다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 분자는 90개 이상, 100개 이상, 120개 이상, 150개 이상, 200개 이상, 300개 이상, 400개 이상 또는 500개 이상의 아미노산 잔기로 구성된다.
- [0045] 본 출원의 범위에서, 용어 "GAG 결합 영역"은 등은 형광 적정(하기 실시예 참조)에 의해 결정되어 $100 \mu\text{M}$ 이하, 바람직하게는 $50 \mu\text{M}$ 이하, 더욱 바람직하게는 $20 \mu\text{M}$ 이하의 해리 상수(K_d -값)로 GAG에 결합하는 영역으로 정의된다.
- [0046] 본 출원에 언급된 임의의 변형은 공지된 생화학 방법, 예를들어 부위-특이적 돌연변이체 유발을 이용하여 수행될 수 있다. GAG 결합 부위의 분자 클로닝은 물론 종래 기술[참조: WO 96/34965 A, WO 92/07935 A, Jayaraman et al. (FEBS Letters 482 (2000), 154-158), WO 02/20715 A, Yang et al. (J.Cell.Biochem. 56 (1994), 455-468)]이고, GAG 영역의 분자 셔플링(shuffling) 또는 데 노보(de novo) 합성이 문헌[Butcher et al., (FEBS Letters 4009 (1997), 183-187) (단백질이 아니라 인공 펩티드에 관한 것임); Jinno-Oue et al., (J. Virol. 75 (2001), 12439-12445) de novo synthesis]]에 기재되어 있음이 또한 인지되어야 한다.
- [0047] GAG 결합 영역은 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 변형될 수 있다. 이는 비-염기성 아미노산이 염기성 아미노산에 의해 치환될 수 있고, 염기성 아미노산이 GAG 결합 영역으로 삽입될 수 있거나 비-염기성 아미노산이 결실될 수 있음을 의미한다. 더욱이, GAG 결합, 바람직하게는 모든 아미노산 결합을 방해하는 아미노산은 결실된다. 이러한 아미노산은 특히 상기 기재된 바와 같은 벌키 아미노산 및 산성 아미노산, 예를들어 Glu 및 Asp이다. 아미노산이 GAG 결합을 방해하는지의 여부는, 예를들어 수학적 또는 전산 방법으로 시험될 수 있다. 임의의 상기 변형의 결과는 상기 GAG 결합 영역 내의 염기성 아미노산의 상대량이 증가하는 것으로, 여기서 "상대"는 상기 GAG 결합 영역 내의 모든 아미노산의 수에 대한 상기 GAG 결합 영역 내의 염기성 아미노산의 양을 의미한다. 더욱이, 입체적으로 또는 정전기적으로 GAG 결합을 방해하는 아미노산은 결실된다.
- [0048] 아미노산이 용매 노출되는 위치에 존재하는지의 여부는, 예를들어 단백질의 공지된 3차구조 또는 상기 언급된 전산 방법의 도움으로 결정될 수 있다.
- [0049] 상기 변형된 단백질의 GAG 결합 친화성이 각각의 야생형 단백질의 GAG 결합 친화성에 비해 증가되었는지의 여부는, 예를들어 해리 상수를 결정하는 형광 적정 실험의 도움으로 상기 언급된 바와 같이 결정될 수 있다. 개선

된 GAG 결합 친화성에 대한 표준은 $K_d(\text{돌연변이체}) < K_d(\text{야생형})$, 바람직하게는 100% 이상일 것이다. 특히 개선된 변형된 단백질은 야생형 K_d 에 비해 5 이상, 바람직하게는 10 이상, 더욱 바람직하게는 100 이상 더 높은 GAG 결합 친화성을 가진다. 따라서, 바람직하게는 증가된 GAG 결합 친화성은 10 μM 이하, 바람직하게는 1 μM 이하, 더욱 바람직하게는 0.1 μM 이하의 K_d 를 나타낼 것이다.

[0050] GAG 결합 친화성이 증가함으로써, 변형된 단백질은 특이적 길항제로 작용할 것이고, GAG 결합에 대해 야생형 GAG 결합 단백질과 경쟁할 것이다.

[0051] 바람직하게는, Arg, Lys 및 His로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기성 아미노산은 상기 GAG 결합 영역으로 삽입된다. 이들 아미노산은 상기 GAG 결합 영역으로 용이하게 삽입되고, 여기서 용어 "삽입된"은 삽입뿐만 아니라 임의의 비-염기성 아미노산의 아르기닌, 리신 또는 히스티딘으로의 치환을 의미한다. 물론, 하나 이상의 염기성 아미노산을 삽입하는 것이 가능하고, 동일한 염기성 아미노산이 삽입되거나 상기 언급된 아미노산 중 두개 또는 세개의 조합으로 삽입된다.

[0052] 더욱 바람직하게는, 단백질은 케모카인, 바람직하게는 IL-8, RANTES 또는 MCP-1이다. 케모카인은 공동-수용체 GAG와의 상호작용 부위를 지니는 것으로 공지되어 있고, 이러한 케모카인 결합은 종종 상기 언급된 바와 같은 추가의 수용체 활성화를 위한 조건이 된다. 케모카인은 종종 염증 질환에서 발견되므로, 케모카인 수용체 활성화를 방해하는 것이 주요 관심사항이다. 이러한 케모카인은 바람직하게는 IL-8, RANTES 또는 MCP-1으로, 이는 널리 특성이 규명된 분자이고, GAG 결합 영역은 널리 공지되어 있다(참조: Lortat-Jacob et al., PNAS 99 (3) (2002), 1229-1234). 상기 케모카인의 GAG 결합 영역에서 염기성 아미노산의 양을 증가시킴으로써, 이의 결합 친화성이 증가되고, 이에 따라 야생형 단백질의 농도에 대한 변형된 단백질의 농도에 따라 야생형 케모카인은 보다 적게 결합하거나 전혀 결합하지 않을 것이다.

[0053] 이로인 양태에 따라, 상기 GAG 결합 영역은 C-말단 α -헬릭스이다. 통상적인 화학 단량체는 C-말단 α -헬릭스에 의해 오버레이(overlay)된 3중 가닥의 역평행 β -시트로 구성되어 있다. 케모카인 내의 상기 C-말단 α -헬릭스는 GAG 결합과 관련된 주요 부분이고, 염기성 아미노산의 양을 증가시키기 위한 상기 C-말단 α -헬릭스 내의 변형은 증가된 GAG 결합 친화성을 지닌 변형된 케모카인을 생성시키는 것으로 나타났다.

[0054] 유리하게는, IL-8 내의 위치 17, 21, 70 및/또는 71은 Arg, Lys, His, Asn 및/또는 Gln에 의해 치환된다. 여기서, 상기 전술한 부위의 단지 하나가 변형되는 것이 가능하다. 그러나, 하나 이상의 상기 부위 뿐만 아니라 모든 부위가 변형될 수 있고, 모든 변형은 Arg 또는 Lys 또는 His 또는 Asn 또는 Gln 또는 이들의 혼합물일 수 있다. IL-8에서, 이들 위치는 IL-8의 GAG 결합 친화성을 고도로 증가시켜, 이들 위치가 변형에 특히 적합한 것으로 나타났다.

[0055] 바람직하게는, 증가된 결합 친화성은 헤파란 설페이트 및/또는 헤파린에 대한 증가된 결합 친화성이다. 헤파란 설페이트는 헤파린도 포함하는 선형 다당류의 GAG 패밀리 of the 가장 풍부한 일원이다. 헤파린은 비교적 작은 정도의 구조적 다양성을 지니는 균일하게 높은 정도의 설페이션을 야기시키는 보다 높은 수준의 중합반응 후 변형으로 특징되는 헤파란 설페이트와 구조적으로 매우 유사하다. 따라서, 헤파란 설페이트의 고도로 변형된 블록은 때때로 헤파란-유사로 언급되고, 헤파린은 단백질 생물물리학 연구에서 헤파란 설페이트 유사체로 사용될 수 있다. 임의의 경우, 헤파란 설페이트 및 헤파린 둘 모두가 특히 적절하다.

[0056] 보다 바람직하게는, 추가의 생물학적 활성 영역이 변형되어 이에 의해 상기 단백질의 추가의 생물학적 활성이 억제되거나 하향조절된다. 이러한 추가의 생물학적 활성은 대부분의 GAG 결합 단백질, 예를 들어 케모카인에 대해 공지되어 있다. 이는 수용체, 예를 들어 7TM 수용체에 대한 결합 영역일 것이다. 용어 "추가"는 GAG 결합 영역이 아니지만 기타 분자, 세포 또는 수용체에 결합하고/거나 이들을 활성화시키는 생물학적으로 활성 영역을 의미한다. 이러한 추가의 생물학적 활성 영역을 변형시킴으로써, 상기 단백질의 추가의 생물학적 활성은 억제되거나 하향 조절되고, 이에 의해 변형된 단백질은 야생형 단백질에 대한 강력한 길항제로 제공될 것이다. 이는 한편으로 GAG 결합 친화성이 야생형 GAG 결합 단백질보다 높고, 변형된 단백질이 야생형 단백질 대신에 GAG에 광범위하게 결합할 것이라는 것을 의미한다. 다른 한편, 단백질이 GAG에 결합되는 경우에 주로 발생하는 야생형 단백질의 추가의 활성은 억제되거나 하향조절되는데, 이는 변형된 단백질이 상기 특이적 활성을 수행하지 않거나 보다 적은 범위로 상기 활성을 수행할 것이기 때문이다. 상기 변형된 단백질은 당 분야에 기재된 바와 같은 기타 재조합 단백질로부터 공지된 부작용을 나타내지 않는 야생형 GAG 결합 단백질에 대한 효과적인 길항제로 제공된다. 이러한 추가의 생물학적 활성 영역은, 예를 들어 수용체 경쟁 분석(형광 표지된 야생형 케모카인을 이용함), 칼슘 유입, 및 세포 이동(천연 백혈구 또는 7TM으로 안정되게 트랜스펙션된 세포주 상에서 수행

됨)에 의해 시험관내에서 결정될 수 있다. 이러한 추가의 생물학적 활성 영역의 예는 추가의 수용체 결합 부위(성장 인자 패밀리) 이외에, 효소 부위(가수분해효소, 분해효소, 설포트랜스페라아제, N-테아세틸라아제 및 코폴리머라아제), 단백질 상호작용 부위(안티트롬빈 III), 및 막 결합 도메인(단순헤르페스 바이러스 gD 단백질)이다. 따라서, 이러한 이중 변형된 단백질의 바람직한 구체예가 본 발명의 목적에 특히 이로운 우세한(GAG 결합 관련) 네거티브(수용체 관련) 돌연변이체로 제공된다.

[0057] 보다 바람직하게는, 상기 추가의 생물학적 활성 영역은 결실, 삽입, 및/또는 바람직하게는 알려진, 입체적 및/또는 정전기적으로 유사한 잔기를 이용한 치환에 의해 변형된다. 물론, 상기 추가의 생물학적 활성 영역에 하나 이상의 아미노산을 결실시키거나 삽입하거나 치환시키는 것이 가능하다. 그러나, 상기 변형중 두개 이상의 조합 또는 이들 세가지 모두를 제공하는 것도 가능하다. 주어진 아미노산을 알려진 또는 입체적/정전기적으로 유사한 잔기로 치환시킴으로써, 변형된 단백질은 입체적/정전기적으로 변형되지 않거나 보다 적은 범위로 변형된다(용어 "유사한"은 치환되는 아미노산과 유사함을 의미한다). 이는 변형된 단백질의 기타 활성, 특히 GAG 결합 영역에 대한 친화성이 변형되지 않았으므로 특히 이롭다.

[0058] 유리하게는, 상기 단백질은 케모카인이고, 상기 추가의 생물학적 활성은 백혈구 활성화이다. 상기 언급된 바와 같이, 케모카인은 만성 또는 급성 염증 동안 백혈구 유인과 관련된다. 따라서, 백혈구 활성화를 억제하거나 하향조절시킴으로써 염증이 감소되거나 억제되고, 이는 상기 특정한 변형된 단백질을 염증 질환의 연구, 진단 및 치료를 위한 중요한 도구로 만든다.

[0059] 이로운 양태에 따라, 상기 단백질은 IL-8이고, 상기 추가의 생물학적 활성 영역은 처음 10개의 N-말단 아미노산 내에 존재한다. 처음 N-말단 아미노산은 백혈구 활성화와 관련되고, 특히 Glu-4, Leu-5 및 Arg-6은 수용체 결합 및 활성화에 필수적인 것으로 확인되었다. 따라서, 수용체 결합 및 활성화를 억제하거나 하향-조절시키기 위해 상기 세개 또는 모든 처음 10개의 N-말단 아미노산이 치환되거나 결실될 수 있다.

[0060] 추가의 이로운 단백질은 처음 6개의 N-말단 아미노산이 결실된 IL-8 돌연변이체이다. 상기 언급된 바와 같이, 이러한 돌연변이체는 백혈구에 결합하지 않거나 보다 적은 범위로 결합하여 활성화시키는데, 이는 염증 질환의 연구, 진단 및 치료에 특히 적합하다.

[0061] 바람직하게는, 상기 단백질은 de16F17RE70KN71R, de16F17RE70RN71K 및 de16E70KN71K로 구성된 군으로부터 선택된 IL-8 돌연변이체이다. 이러한 돌연변이체는 처음 6개의 N-말단 아미노산의 결실이 수용체 결합 및 활성화를 억제하거나 하향-조절시킴으로 특히 이로운 것으로 나타난다. 더욱이, 위치 17 및 21의 두개의 페닐알라닌은 수용체의 이후의 활성화를 촉진하기 위한 이의 N-말단 세포외 도메인 상의 수용체와 첫번째 접촉을 이루는 것으로 발견되었다. 임의의 호중구 접촉을 방지하기 위해, 이들 두 아미노산 17 및 21이 교환되고, 이들은 염기성 아미노산으로 교환되는데, 이는 이들이 단백질의 3차원 모델 상에서 관찰될 수 있는 바와 같이 C-말단 α-헬릭스의 GAG 결합 모티프에 근접하여 있기 때문이다. 위치 17 및/또는 21을 아르기닌 또는 리신으로 교환함으로써, GAG 결합 친화성은 증가된다.

[0062] 본 발명의 추가의 양태는 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 단백질을 코딩하는 분리된 다중핵산 분자이다. 다중핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 이에 의해, 본 발명의 변형된 단백질을 발생시키는 변형이 DNA 또는 RNA 수준에서 수행된다. 이러한 본 발명의 분리된 다중핵산 분자는 진단 방법 뿐만 아니라 유전자 요법 및 본 발명의 단백질의 대규모의 생산에 적합하다.

[0063] 보다 바람직하게는, 분리된 다중핵산 분자는 엄격한 조건하에서 상기 정의된 본 발명의 다중핵산 분자와 하이브리드화된다. 하이브리드화 조건에 따라, 완전하게 매치되거나 미스매치된 염기를 포함함으로써 상보성 겹나선(complementary duplexe)이 두개의 DNA 또는 RNA 분자 사이에 형성된다(참조: Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). 약 50개의 뉴클레오티드 이상의 길이의 프로브는 25 내지 30% 까지의 미스매치된 염기를 수용할 수 있다. 보다 작은 프로브는 보다 적은 미스매치를 수용할 것이다. 미스매치된 염기쌍을 함유하는 겹나선을 형성하기 위한 표적 및 프로브의 경향은 그 자체가 인자로 작용되는 하이브리드화 조건, 예를들어 하이브리드화 완충용액 내의 염 또는 포름아미드의 농도, 하이브리드화의 온도 및 하이브리드화후 세척 조건의 엄격함에 의해 조절된다. 하이브리드 겹나선의 형성에서 발생하는 널리 공지된 법칙을 적용시킴으로써, 요망되는 엄격함을 지니는 조건이 다양한 하이브리드화 완충용액, 온도 및 세척 조건으로부터 선택됨으로써 당업자에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 조건은 완전하게 매치되거나 부분적으로 미스매치된 하이브리드 겹나선의 검출을 허용하도록 선택될 수 있다. 겹나선의 용융점(Tm)은 적절한 하이브리드화 조건의 선택에 유용하다. 200개 이상의 뉴클레오티드 길이의 폴리뉴클레오티드 분자를 위한 엄격한 하이브리드화 조건은 예상되는 겹나선의 용융점보다 15 내지 25℃ 낮은 온도에서의 하이브리

드화를 통상적으로 포함한다. 보다 긴 프로브보다 덜 안정한 겹나선을 형성하는 30개 이상의 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대해서는, 엄격한 하이브리드화는 보통 T_m 보다 5 내지 10℃ 낮은 온도에서의 하이브리드화에 의해 달성된다. 핵산 겹나선의 T_m 은 핵산에 함유된 G+C 퍼센트에 기초하고 사슬 길이를 고려한 공식, 예를들어 공식 $T_m = 81.5 - 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\% G+C) - (600/N)$ 을 이용하여 계산될 수 있다(여기서, N은 사슬 길이임).

- [0064] 본 발명의 추가의 양태는 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 분리된 DNA 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 벡터는 효과적인 트랜스펙션 뿐만 아니라 단백질의 효과적인 발현에 필요한 모든 조절 성분을 포함한다. 이러한 벡터는 당 분야에 널리 공지되어 있고, 본 목적을 위해 임의의 적절한 벡터가 선택될 수 있다.
- [0065] 본원의 추가의 양태는 상기 기재된 바와 같은 본 발명의 벡터로 안전하게 트랜스펙션되는 재조합 세포에 관한 것이다. 이러한 재조합 세포 뿐만 아니라 이로부터의 임의의 자손 세포는 상기 벡터를 포함한다. 이에 의해, 세포주는 벡터에 따라 지속적으로 또는 활성화 직후 변형된 단백질의 발현을 제공한다.
- [0066] 본 발명의 추가의 양태는 상기 기재된 바와 같이 본 발명에 따른 단백질, 다중핵산 또는 벡터, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 물론, 약학적 조성물은 약학적 조성물에 보통 존재하는 추가 물질, 예를들어 염, 완충용액, 에멀션화제, 착색제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 추가의 양태는 각각의 야생형 단백질의 생물학적 활성을 억제하거나 서프레스하는 방법에서 상기 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 변형된 단백질, 다중핵산 또는 벡터의 용도에 관한 것이다. 상기 언급된 바와 같이, 변형된 단백질은 길항제로 작용할 것이고, 공지된 재조합 단백질에서 발생하는 부작용은 본 발명의 변형된 단백질에서는 발생하지 않을 것이다. 케모카인의 경우, 이는 염증 반응과 관련된 생물학적 활성에 특히 존재할 것이다.
- [0068] 따라서, 본 발명에 따른 변형된 단백질, 다중핵산 또는 벡터의 추가의 용도는 염증 질환의 치료를 위한 약제를 생성하기 위한 방법이다. 특히, 변형된 단백질이 케모카인인 경우, 이는 부작용 없이 길항제로 작용할 것이고, 염증 질환의 치료에 특히 적합할 것이다. 따라서, 본원의 추가의 양태는 또한 염증 질환의 치료를 위한 방법이고, 여기서 본 발명에 따른 변형된 단백질, 본 발명에 따른 분리된 다중핵산 분자 또는 벡터 또는 본 발명에 따른 약학적 조성물이 환자에게 투여된다.
- [0069] 바람직하게는, 염증 질환은 류마티스 관절염, 건선, 골관절염, 천식, 알츠하이머병 및 다발성 경화증을 포함하는 군으로부터 선택된다. 케모카인을 통한 활성화는 본 발명에 따른 변형된 단백질로 억제될 수 있기 때문에, 염증 반응이 억제되거나 하향-조절될 수 있고, 이에 의해 상기 언급된 염증 질환이 예방되거나 치료될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 본 발명은 하기의 실시예 및 도의 도움으로 보다 상세하게 기재되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- 도 1은 CD 스펙트럼이고, 도 2는 다양한 돌연변이체의 이차 구조 목록을 도시하고, 도 3 및 도 4는 다양한 돌연변이체의 형광 비등방성 시험의 결과의 그래프를 도시하고, 도 5는 등온 형광 적정의 결과의 그래프를 도시하고, 도 6은 다양한 돌연변이체의 언폴딩(unfolding) 실험의 결과의 그래프를 도시하고, 도 7은 IL-8 돌연변이체의 화학주성 지표를 도시하고, 도 8은 RANTES 화학주성 분석의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1 : 재조합 IL-8 유전자의 생성 및 돌연변이체의 클로닝

[0072] 센스 및 안티센스 돌연변이체 유발 프라이머를 이용하여 돌연변이체를 도입시킴으로써 돌연변이체용 요망 cDNA를 생성시키기 위해 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술을 사용하였다. 야생형 IL-8용 cDNA를 함유하는 합성 플라스미드를 주형으로 사용하였고, 클론테크 어드밴티지®2 중합효소 믹스(Clontech Advantage®2 Polymerase Mix)를 DNA 중합효소로 사용하고, PCR 반응을 에펜도르프(Eppendorf)의 마스터그래디언트 사이클러(Mastergradient Cycler)를 이용하여 수행하였다. 사용된 돌연변이체 유발 프라이머는 전방향 서열을 이용하여 출발하는 하기 표에 요약되어 있다(5'에서 3'):

[0073] · CACC ATG TGT CAG TGT ATA AAG ACA TAC TCC (돌연변이체 Δ6용 프라이머)

[0074] · CACC ATG TGT CAG TGT ATA AAG ACA TAC TCC AAA CCT AGG CAC CCC AAA AGG ATA (돌연변이체 Δ6 F17R F21R용 프라이머)

- [0075] 역방향 서열(5' 에서 3'):
- [0076] · TTA TGA ATT CCT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70R용 프라이머)
- [0077] · TTA TGA ATT CTT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70K용 프라이머)
- [0078] · TTA TGA CTT CTC AGC CCT CTT (돌연변이체 N71K용 프라이머)
- [0079] * · TTA TGA CTT CTT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70K N71K용 프라이머)
- [0080] · TTA TGA CTT CCT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70R N71K용 프라이머)
- [0081] · TTA TGA CCT CTT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70K N71R용 프라이머)
- [0082] · TTA TGA CCT CCT AGC CCT CTT (돌연변이체 E70R N71R용 프라이머)
- [0083] PCR 생성물을 정제하고, pCR[®] T7/NT-TOPO[®]TA(Invitrogen) 벡터로 클로닝시키고, TOP10F 적격 대장균(*E.coli*)(Invitrogen)에 형질전환시켰다. 다음 단계로서, ABI PRISM CE1 서열분석기를 이용하여 이중 가닥 DNA 서열분석에 의해 서열 확인을 수행하였다.
- [0084] **실시예 2: 재조합 단백질의 발현 및 정제**
- [0085] 서열을 확인한 후, 발현을 위해 작제물을 칼슘-적격 BL21(DE3) 대장균에 형질전환시켰다. 세포를 약 0.8의 OD₆₀₀에 도달할 때까지 37℃에서 100 µg/ml의 앰피실린을 함유하는 11 레녹스 브로스(Lennox Broth, Sigma)에서 진탕하여 성장시켰다. 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 1 mM의 최종 농도로 첨가함으로써 단백질 발현의 유도를 달성시켰다. 4시간 후, 20분 동안 6000 g에서 원심분리하여 세포를 수거하였다. 이후, 세포 펠릿을 20 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl(pH 8)을 함유하는 완충용액에 재현탁시키고, 20초 동안 5회 100 와트로 초음파파쇄시키고, 최종적으로 10,000 g에서 20분 동안 다시 원심분리하였다. 재조합 IL-8 단백질의 주요 분획이 봉입체에서 발견되었기 때문에, 추가의 정제를 위해 변성 조건을 선택하였다. 세포 펠릿을 6M Gua/HCl 및 50 mM MES(pH 6.5)의 완충용액에 재현탁시켰다. 이후, 현탁액을 4시간 동안 4℃에서 교반한 후, 50 mM MES(pH 6.5)에 대한 투석 단계를 수행하였다. 이후, 생성된 현탁액을 원심분리시키고, 강한 양이온 교환 컬럼(Pharmacia Biotech사의 SP Sepharose[®])상에 로딩하여 여과시켰다. 60분에 걸쳐 50 mM MES 완충용액(pH 6.5)에서 0M 내지 1M NaCl으로부터의 선형 구배에 의해 용리를 수행하였다. 요망 단백질을 함유하는 분획을 동결건조시킨 후, C18 컬럼을 사용하는 역상 HPLC에 의해 2차 정제 단계를 수행하였다. 이 경우, 요망 단백질을 용리시키기 위해 10% 내지 90% 아세토니트릴로부터의 비선형 구배를 선택하였다. 상기 기재된 바와 동일한 조건하에서 동일한 양이온 교환 컬럼에 의해 변성된 단백질의 재-폴딩(re-folding)을 최종적으로 수행하였다.
- [0086] 이후, 첫번째로 은 염색 분석 및 두번째로 야생형 IL-8에 대한 특이적 모노클로날 항체를 이용하는 웨스턴 블롯 분석에 의해 단백질의 순도 및 동일성을 체크하였다. 단백질의 재-폴딩을 또한 원형 광이색성(Circular Dichroism ,CD) 측정으로 확증하였다.
- [0087] **실시예 3: 돌연변이체의 생물물리적 특성분석**
- [0088] 3.1 원형 광이색성 측정 및 분석
- [0089] 헤파란 설페이트(HS)의 존재 및 부재하에서 돌연변이체 단백질의 이차 구조 변화를 연구하기 위해, CD 분광법을 수행하였다. 측정치를 195 내지 250 nm의 범위에 걸쳐 Jasco J-710 분광편광계 상에서 기록하고, 0.1 cm 패치 길이의 세포를 사용하였다. 5 µM의 농도를 지닌 단백질 용액의 스펙트럼을 1초의 반응 시간, 0.2 nm의 단계 분해능, 50 nm/분의 속도, 1 nm의 대역폭 및 20 mdeg의 민감도로 기록하였다. 원활한 스펙트럼을 생성하기 위해 세개의 스캔의 평균을 내었다. 이후, 단백질 스펙트럼을 완충용액 그 자체 또는 완충용액/HS의 CD-신호에 관하여 백그라운드-정정(background-correct)하였다. HS의 존재 및 부재하에서 프로그램 SELCON을 이용하여 단백질의 이차 구조 분석을 최종적으로 수행하였다.
- [0090] 매우 많은 수의 아미노산이 다수의 신규 조합물로 변화되었기 때문에, 원형 광이색성 방법에 의해 생성된 이차 구조 변형의 치수를 규명하려 하였다.
- [0091] 유도된 돌연변이체에 따라 다양한 구조가 수득되었다. 임의의 구조를 나타내지 않도록 하나의 발현된 돌연변이

체($\Delta 6$ F17R F21R E70K N71R)를 제외하고, 모든 돌연변이체가 측정가능한 α -헬릭스, β -시트 및 루프를 나타내었다. IL-8 야생형과 비교하여, 단지 하나의 돌연변이체($\Delta 6$ E70R)가 거의 유사한 구조를 나타낸 반면, 나머지는 전체 구조의 17.2% 내지 45.2% 범위로 이들의 α -헬릭스가 주로 달랐다. 그럼에도 불구하고, 이러한 사실은 단백질 서열 내에 많은 변화에도 불구하고 IL-8 야생형의 전체 구조가 유지되었음을 나타낸다. 이는 기존에는 예측될 수 없었다. 헤파린이 아닌 헤파란 설페이트 올리고당류만이 IL-8 야생형 이차 구조에 영향을 줄 수 있음이 이미 밝혀졌으므로, 분획화되지 않은 헤파란 설페이트에 의해 유도된 효과에 주의를 집중하였다. 모든 시험된 돌연변이체는 복합체 형성의 증거로서 관찰될 수 있는 HS 결합에서의 구조적 변화를 나타내었다.

[0092] 도입된 돌연변이체 및 헤파란 설페이트 첨가에 의한 구조적 변화를 입증하기 위해, 수득된 데이터중 일부를 상기와 같이 그래프에 요약하였다.

[0093] 3.2 형광 측정

[0094] 농도 및 리간드 의존성 사차 구조 변화를 연구하기 위해, 형광 분광법을 수행하였다. 높은 민감성으로 인해 단지 나노그램 양의 단백질이 요구되는 형광 기법은 요망되는 연구를 수행하기 위한 선택 방법이다. 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer, Beaconsfield, England) LS50B 형광측정기를 이용하여 측정을 수행하였다.

[0095] 3.3 형광 비등방성

[0096] 외인성 발색단 bisANS로부터 생성된 케모카인의 농도 의존성 형광 비등방성을 기록함으로써, 돌연변이체의 이합체화 상수를 규명하고자 하였다. 고농도($4 \mu\text{M}$ 이하의 단백질)로 출발한 후 단계적으로 희석한 PBS에서 측정을 수행하였다. 각각의 데이터 포인트에 대해, 507 nm에서 기록된 비등방성 신호(r)를 60초에 걸쳐 평균을 내었다.

[0097] IL-8 소중합반응이 단백질 GAG 결합 특성에 적절하게 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 단량체 농도로 고정시키는 경우, IL-8 결합 크기는 올리고당류가 이량체 농도에서 보다 1000배 단단한 것으로 규명되었다. 따라서, IL-8 돌연변이체의 소중합반응 특성을 형광 비등방성으로 연구하였다. IL-8 내인성 형광단(Trp57)은 모든 돌연변이체에 대해 충분히 민감하지 않으므로, 외인성 형광단 bisANS를 상기 측정에 사용하였다. 또한, 이차 구조에 대해 이미 공지된 바와 같이, 돌연변이체 $\Delta 6$ E70R은 IL-8 야생형($k_{\text{올리고}}=379 \text{ nM}$)에 대한 소중합반응 상수($k_{\text{올리고}}=350 \text{ nM}$)와 매우 유사한 것으로 나타났다. 가장 높은 $k_{\text{올리고}}$ ($k_{\text{올리고}}=460 \text{ nM}$)를 지니고, 이에 따라 가장 이합체화되지 않는 돌연변이체는 $\Delta 6$ F17RF21R E70RN71K이었다. 기존의 연구는 β -시트가 이합체화 과정에 주로 관련되고, 이는 상기 돌연변이체의 이차 구조에 대한 결과와 서로 관련되고, 단지 11.4%의 β -시트의 매우 낮은 점유율을 나타내는 사실이 확인되었다. 가장 낮은 $k_{\text{올리고}}$ ($k_{\text{올리고}}=147 \text{ nM}$)를 지닌 돌연변이체는 $\Delta 6$ F17RF21R E70K인 것으로 밝혀졌고, 이는 또한 연구된 모든 돌연변이체중 가장 높은 점유율(29.8%)의 β -시트 구조를 나타내었다. 또한, 헤파란 설페이트 첨가의 영향이 관찰되었다. IL-8 야생형에 대해서는 헤파란 설페이트가 보다 높은 수준($k_{\text{올리고}}=1.075 \mu\text{M}$)으로 소중합반응 상수의 전환을 야기시켰고, 이는 또한 연구된 IL-8 돌연변이체에 대해서도 발견되었다. 헤파란 설페이트의 존재하에서 $\Delta 6$ F17RF21R E70K는 $0.147 \mu\text{M}$ 으로부터 $1.162 \mu\text{M}$ 로 전환시켰고, 돌연변이체 $\Delta 6$ E70R은 $0.350 \mu\text{M}$ 로부터 $1.505 \mu\text{M}$ 로 전환시켰다. 수득된 결과의 일부는 도 3 및 4에 입증되어 있고, HS($\text{pc} = 10 \text{ xy}$ 과량) 단백질 농도의 존재(10배 과량) 및 부재하에서 도 3은 케모카인 농도에 대한 PBS 중의 IL-8 돌연변이체의 형광 비등방성의 의존성을 나타내고, 도 4는 케모카인 농도에 대한 PBS 중의 $\Delta 6$ F17RF21R E70K의 형광 비등방성의 의존성을 나타낸다.

[0098] 3.4 등온 형광 적정 (IFT) 실험

[0099] 해리 상수(K_d 값)은 단백질에 대한 리간드의 결합 친화성에 대한 척도이고, 이에 따라 리간드 결합시 단백질의 형광 발광 특성에서의 농도-의존성 변화(형광 켄칭(quenching))가 K_d 의 결정에 사용된다. 상기 돌연변이체들은 제안된 GAG 결합 부위 또는 GAG 결합 부위 근처에 위치한 내인성 트립토판 발색단을 함유하여 리간드 결합시의 구조적 변화에 민감하게 되므로, IFT 실험이 이러한 종류의 연구에 적합한 듯 하다. 형광 강도 적정을 700 nm의 단백질 농도를 이용하여 PBS중에서 수행하였다. 각각의 GAG 리간드의 분취량의 첨가 및 60초의 평형 기간 후에 282 nm에서의 여기시에 단백질 용액의 발광을 300 내지 400 nm의 범위에 걸쳐 기록하였다.

[0100] 분획화되지 않은 헤파린 및 헤파란 설페이트에 대한 결합을 연구하였다. 돌연변이체를 충분한 민감성을 보장하기 위해 이량체 농도로 고정시켰다. GAG 결합시의 Trp57 형광 강도의 켄칭을 25 내지 35%의 범위 내로 기록하였다. 특히 헤파린 결합에 대해서 리간드 결합의 현저한 개선이 관찰되었다. IL-8 야생형 ($K_d=37 \mu\text{M}$)에 비해

$\Delta 6$ F17RN71R E70K ($K_d=14$ nM) 및 $\Delta 6$ F17RF21R N71K ($K_d=14.6$ nM)은 2600 배의 보다 낮은 결합을 나타내었고, $\Delta 6$ E70K N71K ($K_d=74$ nM)은 1760배의 보다 낮은 결합을 나타내었다. 헤파란 설페이트 결합에 대해 우수한 결과가 또한 획득되었다. $\Delta 6$ F17RN71R E70K에 대해 107 nM의 K_d 가 발견되었고, $\Delta 6$ F17RF21R N71K에 대해 95 nM의 K_d 가 발견되었고, 돌연변이체 $\Delta 6$ E70K N71K는 34 nM의 K_d 를 나타내었다. IL-8 야생형이 4.2 μ M의 K_d 로 결합함에 따라, 돌연변이체에 대해 발견된 K_d 는 결합에서의 매우 큰 개선을 나타낸다(참조: 도 5)

[0101] 3.5 언폴딩(Unfolding) 실험

[0102] 단백질 안정성 및 이러한 안정성이 GAG 리간드 결합시에 변화하는지의 여부에 관한 정보를 획득하기 위해, 언폴딩 실험을 수행하였다. 상기 언급된 바와 같이 형광 기술은 사차 구조 변화를 관찰하기에 매우 민감하므로, 단백질의 열적 구조 변화를 연구하기 위한 선택 방법이 된다. 리간드 농도는 변화하지 않았으나 온도는 변화한 IFT에 대해 기술된 바와 같이 측정을 수행하였다. 10배 과량의 헤파란 설페이트 또는 헤파린의 존재 및 부재하에서 15 내지 85℃의 온도로부터 0.7 μ M의 농도에서 단백질 구조를 관찰하였다.

[0103] 단백질의 발광 최대치는 용매 노출되는 트립토판 잔기에 대해 전형적인 값인 340 nm 내지 357 nm이었다. 15℃에서 언폴딩 실험을 시작하여, 돌연변이체의 발광 최대치는 340 nm 내지 351 nm로 다양하였다. IL-8 야생형과 비교하여, 발광 최대치는 340 nm에서 관찰되었고, 이는 약간 더 높은 값을 의미한다. 온도를 증가시키는 경우, 발광 최대치의 강도는 감소하였고, 보다 높거나 보다 낮은 파장에 대한 최대치의 변화를 수반하였다. $\Delta 6$ E70R 및 $\Delta 6$ E70K N71K의 발광 최대치는 352.5 nm 로부터 357 nm 및 343 nm 로부터 345 nm로 변화하였고, 이는 온도 증가를 통하여 용매에 대한 Trp57 잔기의 추가의 노출에 대해서 전형적이나, 흥미롭게도 돌연변이체 $\Delta 6$ F17RN71R E70K 및 $\Delta 6$ F17RF21R E70R N71K는 350 nm로부터 343 nm 및, 덜 명백하지만 350 nm로부터 348 nm의 범위의 청색 이동을 나타내었다(도 6 참조). 온도를 천천히 감소시킴으로써, 언폴딩의 과정을 파장 변화 및 강도의 변화에 관하여 부분적으로 가역시켰다. 5배 과량의 헤파란 설페이트의 첨가는 복합체 형성을 통해 단백질의 안정성의 증가를 야기시켰다. 이는 한편으로 보다 높은 온도로의 용융점의 변화에 의해 관찰될 수 있고, 다른 한편으로 온도 증가시 발광 최대치의 현저하게 덜 명백한 변화에 의해 관찰될 수 있다.

[0104] 실시예 4: 우세-네거티브(dominant-negative) IL-8 돌연변이체의 수용체-"네거티브" 기능의 세포 기재 분석

[0105] 호중구 유인에 관한 IL-8 돌연변이체의 손상된 수용체 기능을 특성 규명하기 위해, IL-8 돌연변이체에 대한 호중구의 트랜스필터 기재 화학주성을 5 μ m PVP 제거 폴리카르보네이트 막이 설치된 미세화학주성 챔버에서 분석하였다.

[0106] 세포 제조:

[0107] 요컨대, 호중구 분획을 새로 수집된 인간 혈액으로부터 제조하였다. 이는 6% 텍스트란 용액 대 헤파린 처리된 혈액(1:2)을 첨가한 후, 45분 동안 침전되도록 방치함으로써 수행되었다. 상층의 투명한 세포 용액을 수거하고, HBSS w/o Ca 및 Mg로 2회 세척하였다. 세포를 계수하고, 최종적으로 계수된 세포의 60%만이 호중구 임을 고려하여 2Mio/ml 세포 현탁액에서 HBSS로 희석시켰다.

[0108] 화학주성 분석:

[0109] IL-8 돌연변이체를 10 μ g/ml, 1 μ g/ml 및 0.1 μ g/ml의 농도에서 희석시키고, 챔버의 보다 하부의 구획내에 삼중으로(triplicate) 두었다(웰 당 26 μ l). 새로이 제조된 호중구를 상부 챔버에 시딩(웰 당 50 μ l)하고, 5% CO₂ 습도조절된 인큐베이터 내에서 37℃에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 챔버를 해체하고, 필터의 상부측을 세척하고, 닦아내고, 하부측에 부착된 세포를 메탄올로 고정시키고, 헤마컬러(Hemacolor) 용액(Merck)으로 염색하였다. 이후, 세포를 웰 당 4개의 무작위적으로 선택된 현미경 시야에서 400 x 배율에서 계수하였다. 최종적으로, 세개의 독립적 실험의 평균을 케모카인 농도에 대해 작도하였다. 도 7에, 다양한 IL-8 돌연변이체에 대한 화학주성 목록이 나타나 있다. 예측된 바와 같이, 모든 돌연변이체는 현저하게 감소된 수용체 결합 활성을 나타내었다.

[0110] 실시예 5: 재조합 RANTES 유전자의 생성, 발현, 돌연변이체의 생물물리학적 활성 특성 규명

[0111] 우세-네거티브 "GAG-마스킹" 케모카인 돌연변이체의 개념을 또한 이식 거부, 아토피성 피부염 및 기타 염증성 질환, 예를들어 관절염, 진행성 사구체신염 및 염증성 폐 질환과 같은 타입 IV 과민 반응과 관련된 케모카인인 RANTES에 대해 사용하였다.

[0112] 수용체 결합 능력을 야생형 단백질로 개시 메티오닌 잔기를 도입시킴으로써 손상시켰다. 대장균에서의 야생형 RANTES의 발현은 상기 메티오닌 잔기의 유지를 야기시켰고, 이는 야생형 RANTES를 단백질 이동의 효율있는 억제제, 소위 Met-RANTES로 만든다. GAG 결합 친화성을 향상시키는 다양한 돌연변이체를 PCR 기재 부위 특이적 돌연변이체 유발 방법으로 도입시켰다.

[0113] 이러한 방법에 의해, 이제까지 하기와 같이 9개의 RANTES 돌연변이체를 클로닝하고, 발현시키고 정제하였다: Met-RANTES A22K, Met-RANTES H23K, Met-RANTES T43K, Met-RANTES N46R, Met-RANTES N46K, Met-RANTES Q48K, Met-RANTES A22K/N46R, Met-RANTES V49R/E66S 및 Met-RANTES ¹⁵LSLA¹⁸ V49R/E66S.

[0114] 크기가 규명된 헤파린에 대한 RANTES 돌연변이체의 상대 친화성 상수(K_d 값)를 측정하기 위해 등은 형광 적정 실험을 수행하였다. 표에서 관찰할 수 있는 바와 같이, 모든 RANTES 돌연변이체 단백질은 상기 헤파린에 대해 보다 높은 친화성을 나타내었고, Met-RANTES A22K, Met-RANTES H23K, Met-RANTES T43K 및 Met-RANTES A22K/N46R는 가장 신뢰성 있는 결과를 나타내었다.

| [0115] | | K_d (nM) |
|--------|--------------------------|--------------|
| [0116] | 야생형 Rantes | 456.2 ± 8.5 |
| [0117] | Met-Rantes V49R/E66S | 345.5 ± 21.7 |
| [0118] | Rantes 15LSLA18 V49R/66S | 297.3 ± 14.1 |
| [0119] | Rantes N46R | 367.7 ± 11.7 |
| [0120] | Rantes N46K | 257.4 ± 10.2 |
| [0121] | Rantes H23K | 202.5 ± 12.8 |
| [0122] | Rantes Q48K | 383.4 ± 39.6 |
| [0123] | Rantes T43K | 139.2 ± 30.1 |
| [0124] | Rantes A22K | 202.1 ± 9.8 |
| [0125] | Rantes A22K/N46R | 164.0 ± 16.6 |

[0126] RRANTES 화학구성 분석

[0127] RANTES 돌연변이체 유도 세포 이동을 5 μ m PVP 코팅된 폴리카르보네이트막이 설치된 48-웰 보이덴 챔버 시스템 (Boyden chamber system)을 이용하여 연구하였다. 20 mM HEPES(pH 7.3) 및 1mg/ml BSA를 함유하는 RPMI 1640 중의 RANTES 및 RANTES 돌연변이체 희석액을 챔버의 하부 웰에 삼중으로 두었다. 2×10^6 세포/ml에서의 동일한 배지 내의 50 μ l의 THP-1 세포 현탁액(세포 배양물의 유럽 수집물(European collection)로부터의 전단구 세포주)을 상부 웰에 두었다. 5% CO₂ 내에서 37℃에서 2시간의 인큐베이션 후, 필터의 상부 표면을 HBSS 용액으로 세척하였다. 이동된 세포를 메탄올로 고정시키고, 헤마컬러 용액(Merck)로 염색하였다. 웰 당 다섯개의 400 x 배율로 계수하고, 도 8에 세개의 독립적으로 수행된 시험된 실험의 평균을 케모카인 농도에 대해 작도하였다. 오차 막대는 세개의 실험의 평균의 표준 오차를 나타낸다. 또한, IL-8 돌연변이체의 경우에서와 같이, 모든 RANTES 돌연변이체는 현저하게 감소된 수용체 결합 활성을 나타내었다.

[0128] 실시예 6: GAG 결합 영역을 지닌 단백질

[0129] 생물정보학적 및 단백질학적 방법에 의해, GAG 결합 단백질을 이의 GAG 결합 영역과 함께 특성분석하였다. 하기의 표 2 및 3에서, 케모카인을 이의 GAG 결합 영역과 함께 나타내었고(표 2), 기타 단백질의 예를 이의 GAG 결합 영역과 함께 또한 나타내었다(표 3).

[0130] 표 2:

케모카인 및 이의 GAG 결합 도메인

CXC-케모카인

IL-8: ¹⁸HPK²⁰, (R47) ⁶⁰RVVEKFLKR⁶⁸
 SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTETIIVKLSDGRELCLDPKENWVQR
 VVEKFLKRAENS
MGSA/GRO α : ¹⁹HPK²¹, ⁴⁵KNGR⁴⁸, ⁶⁰KKIEK⁶⁶
 ASVATELRQCQLQTLOGIHFKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNGRKACLNPA SPIVK
 KIEKMLNSDKSN
MIP-2 α /GRO β : ¹⁹HLK²¹, ⁴⁵K45, ⁶⁰KKIEKMLK⁶⁸
 APLATELRQCQLQTLOGIHFKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLNPA SPMVK
 KIEKMLKNGKSN
NAP-2: ¹⁵HPK¹⁸, ⁴²KDGR⁴⁵, ⁵⁷KKIVQK⁶²
 AELRCLCIKTTSGIHFKNIQSLVIGKGTNCQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQ
 KKLAGEDESAD
PF-4: ²⁰RPRH²³, ⁴⁶KNGR⁴⁹, ⁶¹KKIIKK⁶⁶
 EAEEDGDLQCLCVKTTQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLQAPLY
 KKIKKLLES
SDF-1 α :K1, ²⁴KHLK²⁷, ⁴¹RLK⁴³
 KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQE
 YLEKALN

CC-케모카인

RANTES: (¹⁷RPLPRAH²³) ⁴⁴RKNR⁴⁷
 SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFVTRKNRQVCANPEKKWVRE
 YINSLEMS
MCP-2: ¹⁸RKPIQR²⁴, ⁴⁶KRGK⁴⁹
 QPDSVSIPITCCFNVINRKIPQRLSYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKERWVRDSMKHLDQIFQNLKP
MCP-3: ²²KQR²⁴, ⁴⁷KLDK⁵⁰, ⁶⁶KHLDK⁷¹

[0131]

QPVGINSTTCCYRFINKKIPKQRLSYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWV
 QDFMKHLDKKTQTPKL
MIP-1 α : R17, ⁴⁴KRSR⁴⁷
 SLAADTPTACCFYSYTSRQIPQNFADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQK
 YVSDLELSA
MIP-1 β : R18, ⁴⁵KRSK⁴⁸
 APMGSDPPTACCFYSYTARKLPRNFVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWEYVYDLELN
MPIF-1: R18, ⁴⁵KKGR⁴⁸
 MDRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQ
 VCMRMLKLDTRIKTRKN
MIP-5 / HCC-2: ⁴⁰KKGR⁴³
 HFAADCCTSYISQSIPLSMKSYFETSSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKK
 LKPYSI

[0132]

[0133] 표 3:

| | |
|---------------|------------------|
| 퍼옥시좀 생합성 인자 1 | 181 TRRAKE 186 |
| | 367 QKKIRS 372 |
| | 1263 PKRRKN 1268 |
| | 181 TRRAKE 186 |
| | 367 QKKIRS 372 |
| | 1263 PKRRKN 1268 |
| MLTK-베타 | 415 SKRRGKKV 422 |
| | 312 ERRLKM 317 |
| | 416 KRRGKK 421 |
| | 312 ERRLKM 317 |
| | 416 KRRGKK 421 |
| BHLH 인자 Hes4 | 43 EKRRRARI 50 |
| | 43 EKRRRA 48 |
| | 43 EKRRRA 48 |
| 프로토키데린 11 | 867 MKKKKKKK 874 |
| | 867 MKKKKK 872 |
| | 867 MKKKKK 872 |
| | 899 MKKKKKKK 906 |
| | 899 MKKKKK 904 |
| | 899 MKKKKK 904 |

[0134]

카테닌(카데린-관련 단백질), 델타 1

315 RRRLRS 320
404 VRKLKG 409
460 LRKARD 465
545 RRKLRE 550
621 AKKGKG 626
787 AKKLRE 792

무스카리닉(muscarinic) 아세틸콜린 수용체 M5

315 RRRLRS 320
404 VRKLKG 409
460 LRKARD 465
545 RRKLRE 550
621 AKKGKG 626
787 AKKLRE 792

알파 -2A 아드레날린 수용체

221 EKRTKD 226
427 TKRKRV 432
514 WKKKKV 519
221 EKRTKD 226
427 TKRKRV 432
514 WKKKKV 519

IL-5 프로모터 REII-영역-결합 단백질

147 PRRIKA 152
224 KRRTRV 229
147 PRRIKA 152
224 KRRTRV 229
440 TKKKTRRR 447
569 GKRRRRRG 576

미토헤신 1

38 ARKGKR 43
437 GKTKK 442
444 TRRRRA 449
569 GKRRRR 574
38 ARKGKR 43
437 GKTKK 442
444 TRRRRA 449
569 GKRRRR 574

N-cym 단백질

291 ARKQKA 296
395 KKKIKE 400
291 ARKQKA 296
395 KKKIKE 400

Smad 유비퀴틴화 조절 인자 1

71 VRRCKI 76
71 VRRCKI 76
672 ERRARL 677
672 ERRARL 677

[0135]

CUG-BP 및 ETR-3 유사 인자 5

유잉 육종 EWS-Fli1

NUF2R

크루펠 유사 (Kruppel-like) 아연 손가락 단백질 GLIS2

FKSG32

BARH- 유사 1 단백질

핵소체 GTP- 결합 단백질 1

468 MKRLKV 473
475 LKRPKD 480
468 MKRLKV 473
475 LKRPKD 480
347 QRKSKP 352
347 QRKSKP 352
455 LKRKMFKM 462
331 LKKLKT 336
347 VKKEKL 352
331 LKKLKT 336
347 VKKEKL 352
22 EKRERT 27
22 EKRERT 27
15 LKRVRE 20
431 VRRGRI 436
15 LKRVRE 20
431 VRRGRI 436
175 LKKPRK 180
228 NRRTKW 233
175 LKKPRK 180
228 NRRTKW 233
393 SRKKRERD 400
624 GKRKAGKK 631
48 MRKVKF 53
141 IKRQKQ 146
383 ARRKRK 388
393 SRKKRE 398
490 KKKLKI 495
543 ARRSRS 548
550 TRKRKR 555
586 VKKAKT 591
629 GKKDRR 634
48 MRKVKF 53
141 IKRQKQ 146
383 ARRKRK 388
393 SRKKRE 398
490 KKKLKI 495
543 ARRSRS 548
550 TRKRKR 555
586 VKKAKT 591

| | |
|-----------------------------|------------------|
| EVG1 | 629 GKDDRR 634 |
| | 17 RRRPKT 22 |
| | 138 ERKRKA 143 |
| | 17 RRRPKT 22 |
| ASPL | 138 ERKRKA 143 |
| | 282 PKKSKS 287 |
| | 282 PKKSKS 287 |
| 아연 전달체 1 | 477 EKKPRR 482 |
| | 477 EKKPRR 482 |
| 포도막 자가항원 | 603 EKKGRK 608 |
| | 995 ERKFKA 1000 |
| | 1023 VKKNKQ 1028 |
| | 603 EKKGRK 608 |
| | 995 ERKFKA 1000 |
| | 1023 VKKNKQ 1028 |
| RAB39 | 7 VRRDRV 12 |
| | 7 VRRDRV 12 |
| 다운증후군 세포 유착 분자 | 320 PRKVKs 325 |
| | 387 VRKDKL 392 |
| | 320 PRKVKs 325 |
| | 387 VRKDKL 392 |
| 단백질-티로신 인산분해효소, 비-수용체 타입 12 | 139 GRKKCERY 146 |
| | 59 VKKNRY 64 |
| | 59 VKKNRY 64 |
| WD- 반복 단백질 11 | 752 VRKIRF 757 |
| | 752 VRKIRF 757 |
| 위암-관련 단백질 VRG107 | 20 SRKRQTRR 27 |
| | 25 TRRRRN 30 |
| | 25 TRRRRN 30 |
| 조기 성장 반응 단백질 4 | 356 ARRKGRRG 363 |
| | 452 EKKRHSKV 459 |
| | 357 RRKGRR 362 |
| | 357 RRKGRR 362 |
| 비히클 수송-관련 단백질 | 309 PKRKNKKS 316 |
| | 226 DKKLRE 231 |
| | 310 KRKNKK 315 |
| | 355 VKRLKS 360 |
| | 226 DKKLRE 231 |
| | 310 KRKNKK 315 |
| | 355 VKRLKS 360 |

[0137]

| | |
|---|------------------|
| UPF3X | 140 AKKTKKR 147 |
| | 141 KKKTKK 146 |
| | 217 ERRRRE 222 |
| | 225 RKRQRE 230 |
| | 233 RRKWKE 238 |
| | 240 EKRRRK 245 |
| | 296 DKREKA 301 |
| | 373 RRRQKE 378 |
| | 393 MKKEKD 398 |
| | 426 VKRDRI 431 |
| | 140 AKKTKKRD 148 |
| | 141 KKKTKK 146 |
| | 217 ERRRRE 222 |
| | 225 RKRQRE 230 |
| | 233 RRKWKE 238 |
| | 240 EKRRRK 245 |
| | 296 DKREKA 301 |
| | 373 RRRQKE 378 |
| | 393 MKKEKD 398 |
| | 426 VKRDRI 431 |
| CGI-201 단백질, 타입 IV | 49 ARRTS 54 |
| 약지(RING finger) 단백질 23 | 49 ARRTS 54 |
| | 98 KRKIRD 103 |
| FKSG17 | 98 KRKIRD 103 |
| | 72 EKKARK 77 |
| | 95 IRKSKN 100 |
| | 72 EKKARK 77 |
| | 95 IRKSKN 100 |
| P83 | 681 ARKERE 686 |
| | 681 ARKERE 686 |
| 난소암-관련 단백질 1 | 62 LKDRDF 67 |
| | 62 LKDRDF 67 |
| MHC 클래스 II 트랜스액티베이터(transactivator) CIITA | 407 HRRPRE 412 |
| | 741 PRKKRP 746 |
| | 783 DRKQKV 788 |
| | 407 HRRPRE 412 |
| | 741 PRKKRP 746 |
| | 783 DRKQKV 788 |
| 혈소판 당단백질 VI-2 | 275 SRRKRLRH 282 |
| | 275 SRRKRL 280 |

[0138]

| | |
|---------------------------------------|-------------------|
| 유비퀴틴-유사 5 단백질 | 275 SRRKRL 280 |
| | 11 GKQVRV 16 |
| | 11 GKQVRV 16 |
| 단백질 키나아제 D2 | 191 ARKRRL 196 |
| | 191 ARKRRL 196 |
| 호메오박스 단백질 GSH-2 | 202 GKRMRT 207 |
| | 252 NRRVKH 257 |
| | 202 GKRMRT 207 |
| | 252 NRRVKH 257 |
| ULBP3 단백질 | 166 ARRMKE 171 |
| | 201 HRKKRL 206 |
| | 166 ARRMKE 171 |
| | 201 HRKKRL 206 |
| 타입 II 요오도티로닌 탈이온효소 | 87 SKKEKV 92 |
| | 87 SKKEKV 92 |
| | 299 SKRCKK 304 |
| | 299 SKRCKK 304 |
| 정자 항원 | 160 LKKYKE 165 |
| | 478 IKRLKE 483 |
| | 160 LKKYKEKRT 168 |
| | 160 LKKYKE 165 |
| | 478 IKRLKE 483 |
| UDP-GalNAc: 폴리펩티드 N-아세틸갈락토사아미널트랜스페라아제 | 4 ARKIRT 9 |
| | 44 DRRVRS 49 |
| | 138 PRKCRQ 143 |
| | 4 ARKIRT 9 |
| | 44 DRRVRS 49 |
| | 138 PRKCRQ 143 |
| NCBE | 62 HRRHRH 67 |
| | 73 RKRDRE 78 |
| | 1012 SKKKKL 1017 |
| | 62 HRRHRH 67 |
| | 73 RKRDRE 78 |
| | 1012 SKKKKL 1017 |
| WD 반복 단백질 | 372 LKKKEERL 379 |
| | 384 EKKQRR 389 |
| | 400 AKKMRP 405 |
| | 384 EKKQRR 389 |
| | 400 AKKMRP 405 |
| 포스포디에스테라아제 11A | 27 MRKGKQ 32 |

[0139]

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| 프로버블(Probable) 양이온-수송 ATPase 2 | 27 MRKGKQ 32 |
| | 891 ERRRRPRD 898 |
| | 306 SRKWRP 311 |
| | 891 ERRRRP 896 |
| | 306 SRKWRP 311 |
| | 891 ERRRRP 896 |
| HMG-박스 전사 인자 TCF-3 | 420 GKKKKRKR 427 |
| | 399 ARKERQ 404 |
| | 420 GKKKKR 425 |
| | 420 GKKKKRKRE 428 |
| | 399 ARKERQ 404 |
| | 420 GKKKKR 425 |
| HVPS11 | 793 VRRYRE 798 |
| | 793 VRRYRE 798 |
| PIST | 165 NKKEKM 170 |
| | 165 NKKEKM 170 |
| FYN-결합 단백질 | 473 KKREKE 478 |
| | 501 KKKFKL 506 |
| | 682 LKKLKK 687 |
| | 696 RKKFKY 701 |
| | 473 KKREKE 478 |
| | 501 KKKFKL 506 |
| | 682 LKKLKK 687 |
| | 696 RKKFKY 701 |
| C1orf25 | 620 GKKQKT 625 |
| | 620 GKKQKT 625 |
| C1orf14 | 441 LRRRK GKR 448 |
| | 70 LRRWRR 75 |
| | 441 LRRRK 446 |
| | 70 LRRWRR 75 |
| | 441 LRRRK 446 |
| T-박스 전사 인자 TBX3 | 144 DKKAKY 149 |
| | 309 GRREKR 314 |
| | 144 DKKAKY 149 |
| | 309 GRREKR 314 |
| 미토콘드리아 39S 리보솜 단백질 L47 | 121 AKRQRL 126 |
| | 216 EKRARI 221 |
| | 230 RKKAKI 235 |
| | 121 AKRQRL 126 |
| | 216 EKRARI 221 |

[0140]

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| CGI-203 | 230 RKKAKI 235 |
| Jagged1 | 33 VRRIRD 38 |
| 분비성 담체-관련 막 단백질 1 | 33 VRRIRD 38 |
| 비타민 D 수용체-상호작용 단백질 복합체 성분 DRIP205 | 1093 LRKRRK 1098 |
| | 1093 LRKRRK 1098 |
| | 102 DRRERE 107 |
| | 102 DRRERE 107 |
| | 673 KKKKSSRL 680 |
| | 672 TKKKKS 677 |
| | 954 QKRVKE 959 |
| | 978 GKRSRT 983 |
| | 995 PKRKKA 1000 |
| | 1338 GKREKS 1343 |
| | 1482 HKKHKK 1487 |
| | 1489 KKKVKD 1494 |
| | 672 TKKKKS 677 |
| | 954 QKRVKE 959 |
| | 978 GKRSRT 983 |
| | 995 PKRKKA 1000 |
| | 1338 GKREKS 1343 |
| | 1482 HKKHKK 1487 |
| | 1489 KKKVKD 1494 |
| 분비성 담체-관련 막 단백질 2 | 100 ERKERE 105 |
| Nogo 수용체 | 100 ERKERE 105 |
| FLAMINGO 1 | 420 SRKNRT 425 |
| | 420 SRKNRT 425 |
| | 169 GRRKRN 174 |
| | 2231 ARRQRR 2236 |
| | 169 GRRKRN 174 |
| | 2231 ARRQRR 2236 |
| CC-케모카인 수용체 | 58 CKRLKS 63 |
| | 58 CKRLKS 63 |
| 프롤락틴 조절 성분-결합 단백질 | 271 HKRLRQ 276 |
| | 271 HKRLRQ 276 |
| 카파 B 및 V(D)J 재조합 신호 서열 결합 단백질 | 17 PRKRLTKG 24 |
| | 713 RKRRKEKS 720 |
| | 903 PKKKRLRL 910 |
| | 180 HKKERK 185 |
| | 629 TKKTKK 634 |
| | 712 LRKRRK 717 |

[0141]

| | |
|--------------------------|------------------|
| | 903 PKKKRL 908 |
| | 1447 QKRVKE 1452 |
| | 1680 SRKPRM 1685 |
| | 180 HKKERK 185 |
| | 629 TKKTKK 634 |
| | 712 LRKRRK 717 |
| | 903 PKKKRL 908 |
| | 1447 QKRVKE 1452 |
| | 1680 SRKPRM 1685 |
| 유방암 전이-억제인자 1 | 200 SKRKKA 205 |
| | 229 IKKARA 234 |
| | 200 SKRKKA 205 |
| | 229 IKKARA 234 |
| 포크헤드(Forkhead) 박스 단백질 P3 | 414 RKKRSQRP 421 |
| | 413 FRKKRS 418 |
| | 413 FRKKRS 418 |
| FAS 결합 단백질 | 228 LKRKLIRL 235 |
| | 391 RKKRRARL 398 |
| | 358 ARRLRE 363 |
| | 390 ERKKRR 395 |
| | 629 CKKSRK 634 |
| | 358 ARRLRE 363 |
| | 390 ERKKRR 395 |
| | 629 CKKSRK 634 |
| 유비퀴틴 카르복실-말단 가수분해효소 12 | 228 HKRMKV 233 |
| | 244 LKRFKY 249 |
| | 228 HKRMKV 233 |
| | 244 LKRFKY 249 |
| KIAA0472 단백질 | 110 HRKPKL 115 |
| | 110 HRKPKL 115 |
| PNAS-101 | 68 LKRSRP 73 |
| | 106 PRKSRR 111 |
| | 68 LKRSRP 73 |
| | 106 PRKSRR 111 |
| PNAS-26 | 118 DRRTRL 123 |
| | 118 DRRTRL 123 |
| 말이집 전사 인자 2 | 176 GRRKSERQ 183 |
| 나트륨/칼륨-수송 ATPase 감마 사슬 | 47 SRRFRC 52 |
| | 55 NKKRRQ 60 |
| | 47 SRRFRC 52 |

[0142]

| | |
|--------------------|--|
| Mdm4 단백질 | 55 NKKRRQ 60 441 EKRPRD 446 464 ARRLKK 469 441 EKRPRD 446 464 ARRLKK 469 |
| G 항원 패밀리 D 2 단백질 | 87 QKKIRI 92 87 QKKIRI 92 |
| NipSnap2 단백질 | 153 FRKARS 158 153 FRKARS 158 |
| 스타닌(Stannin) | 73 ERKAKL 78 73 ERKAKL 78 |
| 중탄산나트륨 공동수송자 | 973 EKKKKKKK 980 165 LRKHRH 170 666 LKKFKT 671 966 DKKKKE 971 973 EKKKKK 978 165 LRKHRH 170 666 LKKFKT 671 966 DKKKKE 971 973 EKKKKK 978 |
| 미오신 X | 683 YKRYKV 688 828 EKKKRE 833 1653 LKRIRE 1658 1676 LKKTCK 1681 683 YKRYKV 688 828 EKKKRE 833 1653 LKRIRE 1658 1676 LKKTCK 1681 |
| PNAS-20 | 21 RKRSVRG 28 20 ERKRKS 25 20 ERKRKS 25 |
| 펠리노(Pellino) | 36 RRKSRF 41 44 FKRPKA 49 36 RRKSRF 41 44 FKRPKA 49 |
| 히알루로난 매개 운동 수용체 | 66 ARKVKs 71 66 ARKVKs 71 |
| 짧은 일시적 수용체 전위 채널 7 | 753 FKKTRY 758 753 FKKTRY 758 |
| 리프린-알파 2 | 825 PKKKGIKS 832 |

[0143]

| | |
|----------------------------|--------------------|
| | 575 IRRPRR 580 |
| | 748 LRKHRR 753 |
| | 839 GKKEKA 844 |
| | 875 DRRLKK 880 |
| | 575 IRRPRR 580 |
| | 748 LRKHRR 753 |
| | 839 GKKEKA 844 |
| | 875 DRRLKK 880 |
| 전사 중간 인자 1-알파 | 904 DKRKCERL 911 |
| | 1035 PRKKRLKS 1042 |
| | 321 NKKGKA 326 |
| | 1035 PRKKRL 1040 |
| | 321 NKKGKA 326 |
| | 1035 PRKKRL 1040 |
| 연골 중간층 단백질 | 719 QRRNKR 724 |
| | 719 QRRNKR 724 |
| UBX 도메인-함유 단백질 1 | 194 YRKIKL 199 |
| | 194 YRKIKL 199 |
| 아라키도네이트 12-리폭시게나아제, 12R 타입 | 166 VRRHRN 171 |
| | 233 WKRLKD 238 |
| | 166 VRRHRN 171 |
| | 233 WKRLKD 238 |
| 조혈 PBX-상호작용 단백질 | 159 LRRRRGRE 166 |
| | 698 LKKRSGKK 705 |
| | 159 LRRRRG 164 |
| | 703 GKDKKH 708 |
| | 159 LRRRRG 164 |
| | 703 GKDKKH 708 |
| NAG18 | 28 LKKKKK 33 |
| | 28 LKKKKK 33 |
| POU 5 도메인 단백질 | 222 ARKRKR 227 |
| | 222 ARKRKR 227 |
| NRCAM 단백질 | 2 PKKKRL 7 |
| | 887 SKRNRR 892 |
| | 1185 IRRNKG 1190 |
| | 1273 GKKEKE 1278 |
| | 2 PKKKRL 7 |
| | 887 SKRNRR 892 |
| | 1185 IRRNKG 1190 |
| | 1273 GKKEKE 1278 |

[0144]

| | |
|-------------------------------|------------------|
| 프로토키테린 감마 클러스터 | 11 TRRSRA 16 |
| SKD1 단백질 | 11 TRRSRA 16 |
| | 288 IRRRFETR 295 |
| | 251 ARRIKT 256 |
| | 362 FKKVRG 367 |
| | 251 ARRIKT 256 |
| | 362 FKKVRG 367 |
| 항-DEATH 단백질 | 58 HRKRSRRV 65 |
| | 59 RKRSRR 64 |
| | 59 RKRSRR 64 |
| 센트린 3 | 14 TKRKKRRE 21 |
| | 14 TKRKKR 19 |
| | 14 TKRKKR 19 |
| 엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포히드롤라아제 3 | 512 TRRKRH 517 |
| | 512 TRRKRH 517 |
| PIT-1의 호메오박스 단백질 프로벳(prophet) | 12 PKKGRV 17 |
| | 69 RRRHRT 74 |
| | 119 NRRAKQ 124 |
| | 12 PKKGRV 17 |
| | 69 RRRHRT 74 |
| | 119 NRRAKQ 124 |
| 프로스타글란딘 EP3 수용체 | 77 YRRRESKR 84 |
| | 389 MRKRRLRE 396 |
| | 82 SKRKKS 87 |
| | 389 MRKRRL 394 |
| | 82 SKRKKS 87 |
| | 389 MRKRRL 394 |
| 뇌하수체 호메오박스 3 | 58 LKKKQRRQ 65 |
| | 59 KKKQRR 64 |
| | 112 NRRAKW 117 |
| | 118 RKREERS 123 |
| | 59 KKKQRR 64 |
| | 112 NRRAKW 117 |
| | 118 RKREERS 123 |
| HPRL-3 | 136 KRRGRI 141 |
| | 136 KRRGRI 141 |
| 아드빌린(advillin) | 812 MKKEKG 817 |
| | 812 MKKEKG 817 |
| 핵 LIM 상호작용자-상호작용 인자1 | 32 GRRARP 37 |
| | 109 LKKQRS 114 |

[0145]

| | |
|------------------------|------------------|
| 코어 히스톤 마크로-H2A.1 | 32 GRRARP 37 |
| | 109 LKKQRS 114 |
| | 5 GKKKSTKT 12 |
| | 114 AKKRGSKG 121 |
| | 70 NKKGRV 75 |
| | 132 AKKAKS 137 |
| | 154 ARKSKK 159 |
| | 302 DKKLKS 307 |
| | 70 NKKGRV 75 |
| | 132 AKKAKS 137 |
| 빌린-유사 단백질 | 154 ARKSKK 159 |
| | 302 DKKLKS 307 |
| | 180 KRRRNQKL 187 |
| | 179 EKRRRN 184 |
| 베타-필라민 | 179 EKRRRN 184 |
| | 254 PKKARA 259 |
| | 2002 ARRAKV 2007 |
| | 254 PKKARA 259 |
| 3개조의 모티프 단백질 TRIM31 알파 | 2002 ARRAKV 2007 |
| | 290 LKKFKD 295 |
| | 290 LKKFKD 295 |
| | 106 SKRPRL 111 |
| 핵 수용체 공동-억제자 1 | 299 ARKQRE 304 |
| | 330 RRKAKE 335 |
| | 349 IRKQRE 354 |
| | 412 QRRVKF 417 |
| | 497 KRRGRN 502 |
| | 580 RRKGRI 585 |
| | 687 SRKPRE 692 |
| | 2332 SRKSKS 2337 |
| | 106 SKRPRL 111 |
| | 299 ARKQRE 304 |
| | 330 RRKAKE 335 |
| | 349 IRKQRE 354 |
| | 412 QRRVKF 417 |
| | 497 KRRGRN 502 |
| | 580 RRKGRI 585 |
| | 687 SRKPRE 692 |
| 뇌 발현된 약지 단백질 | 2332 SRKSKS 2337 |
| | 432 KRRVKS 437 |

[0146]

| | |
|--------------------------------|------------------|
| PB39 | 432 KRRVKS 437 |
| | 231 TKKIKL 236 |
| 정자 침단체 단백질 | 231 TKKIKL 236 |
| | 48 FRKRMEKE 55 |
| | 24 RRKARE 29 |
| | 135 KRKLKE 140 |
| | 213 KKRLRQ 218 |
| | 24 RRKARE 29 |
| | 135 KRKLKE 140 |
| 비히클 소통 단백질 SEC22B | 213 KKRLRQ 218 |
| | 177 SKKYRQ 182 |
| | 177 SKKYRQ 182 |
| 핵소체 전사 인자 1 | 79 VRKFRT 84 |
| | 102 GKCLKK 107 |
| | 125 EKRAKY 130 |
| | 147 SKKYKE 152 |
| | 156 KKKMKY 161 |
| | 240 KKRLKW 245 |
| | 451 KKKAKY 456 |
| | 523 EKKEKL 528 |
| | 558 SKKMKF 563 |
| | 79 VRKFRT 84 |
| | 102 GKCLKK 107 |
| | 125 EKRAKY 130 |
| | 147 SKKYKE 152 |
| | 156 KKKMKY 161 |
| | 240 KKRLKW 245 |
| | 451 KKKAKY 456 |
| | 523 EKKEKL 528 |
| | 558 SKKMKF 563 |
| 플렉신-B3 | 248 FRRRGARA 255 |
| 정크토폰린(junctophilin) 타입3 | 626 QKRRYSKG 633 |
| 플라우시블(Plaucible) 혼합-계 키나아제 단백질 | 773 YRKKPHRP 780 |
| | 312 ERRLKM 317 |
| | 312 ERRLKM 317 |
| 지방산 결합 단백질 4, 지방세포 | 78 DRKVKS 83 |
| | 105 IKRKRE 110 |
| | 78 DRKVKS 83 |
| | 105 IKRKRE 110 |
| 외골증(다발성) 1 | 78 SKKGRK 83 |

[0147]

| | |
|-------------------------|------------------|
| DHHC-도메인-함유 시스테인-풍부 단백질 | 78 SKKGRK 83 |
| | 64 HRRPRG 69 |
| Myb 프로토-종양유전자 단백질 | 64 HRRPRG 69 |
| | 2 ARRPRH 7 |
| | 292 EKRIKE 297 |
| | 523 LKKIKQ 528 |
| | 2 ARRPRH 7 |
| | 292 EKRIKE 297 |
| | 523 LKKIKQ 528 |
| 장쇄 지방산-CoA 리가아제 2 | 259 RRKPKP 264 |
| | 259 RRKPKP 264 |
| 신타신 1B2 | 260 ARKKI 265 |
| | 260 ARKKI 265 |
| 닥스훈트(Dachshund) 2 | 162 ARKRQ 167 |
| | 516 QKRLKK 521 |
| | 522 EKTKR 527 |
| | 162 ARKRQ 167 |
| | 516 QKRLKK 521 |
| | 522 EKTKR 527 |
| DEAD/DEXH 헬리카아제 DDX31 | 344 EKRSEKA 351 |
| | 760 TRKKRK 765 |
| | 760 TRKKRK 765 |
| 안드로겐 수용체 | 628 ARKLKK 633 |
| | 628 ARKLKK 633 |
| 레티노산 수용체 알파 | 364 RKRRPSRP 371 |
| | 163 NKKKKE 168 |
| | 363 VRKRRP 368 |
| | 163 NKKKKE 168 |
| | 363 VRKRRP 368 |
| 키네신 중쇄 | 340 WKKKYEKE 347 |
| | 605 VKRCKQ 610 |
| | 864 EKRLRA 869 |
| | 605 VKRCKQ 610 |
| | 864 EKRLRA 869 |
| 디유비퀴틴 | 30 VKKIKE 35 |
| | 30 VKKIKE 35 |
| BING1 단백질 | 519 NKKFKM 524 |
| | 564 ERRHRL 569 |
| | 519 NKKFKM 524 |
| | 564 ERRHRL 569 |

[0148]

| | |
|---|----------------|
| 국소 부착 키나아제 1 | 664 SRRPRF 669 |
| EBN2 단백질 | 664 SRRPRF 669 |
| | 20 TKRKKPRR 27 |
| | 13 PKKDKL 18 |
| | 20 TKRKKP 25 |
| | 47 NKKNRE 52 |
| | 64 LKKSRI 69 |
| | 76 PKKPRE 81 |
| | 493 SRKQRQ 498 |
| | 566 VKRKRK 571 |
| | 13 PKKDKL 18 |
| | 20 TKRKKP 25 |
| | 47 NKKNRE 52 |
| | 64 LKKSRI 69 |
| | 76 PKKPRE 81 |
| | 493 SRKQRQ 498 |
| | 566 VKRKRK 571 |
| CO16 단백질 | 33 ARRLRR 38 |
| | 115 PRRCKW 120 |
| | 33 ARRLRR 38 |
| | 115 PRRCKW 120 |
| 키누레닌 3- 모노옥시케나아제 | 178 MKKPRF 183 |
| | 178 MKKPRF 183 |
| MLN 51 단백질 | 4 RRRQRA 9 |
| | 255 PRRIRK 260 |
| | 407 ARTRTR 412 |
| | 4 RRRQRA 9 |
| | 255 PRRIRK 260 |
| | 407 ARTRTR 412 |
| MHC 클래스II 항원 | 99 QKRGRV 104 |
| MHC 클래스II 항원 | 99 QKRGRV 104 |
| 트랜스포밍 산성 나선-코일(transforming acidic coiled-coil)함유 단백질 1 | 225 SRRSKL 230 |
| | 455 PKKAKS 460 |
| | 225 SRRSKL 230 |
| | 455 PKKAKS 460 |
| 신경-내분비샘 특이적 단백질 VGF | 479 EKRNrk 484 |
| | 479 EKRNrk 484 |
| 유기 양이온 수송체 | 230 GRRYRR 235 |
| | 535 PRKNKE 540 |
| | 230 GRRYRR 235 |

[0149]

| | |
|--------------------|------------------|
| DNA 중합효소 세타 | 535 PRKNKE 540 |
| | 215 KRRKHLKR 222 |
| | 214 WKRRKH 219 |
| | 220 LKRSRD 225 |
| | 1340 GRKLRL 1345 |
| | 1689 SRKRKL 1694 |
| | 214 WKRRKH 219 |
| | 220 LKRSRD 225 |
| | 1340 GRKLRL 1345 |
| | 1689 SRKRKL 1694 |
| CDC45-관련 단백질 | 169 MRRRQRRE 176 |
| | 155 EKRTTL 160 |
| | 170 RRRQRR 175 |
| | 483 NRRCKL 488 |
| | 155 EKRTTL 160 |
| | 170 RRRQRR 175 |
| | 483 NRRCKL 488 |
| 클로라이드 세포내 채널 단백질 2 | 197 AKKYRD 202 |
| | 197 AKKYRD 202 |
| 메틸-CpG 결합 단백질 | 85 KRKPSRP 92 |
| | 83 SKKRKK 88 |
| | 318 QKRQKC 323 |
| | 354 YRRRKR 359 |
| | 83 SKKRKK 88 |
| | 318 QKRQKC 323 |
| | 354 YRRRKR 359 |
| 단백질 키나아제 C, eta 타입 | 155 RKQRA 160 |
| | 155 RKQRA 160 |
| 이중성 핵 리보핵산단백질 H | 71 LKKDRE 76 |
| | 169 LKKHKE 174 |
| | 71 LKKDRE 76 |
| | 169 LKKHKE 174 |
| ORF2 | 11 SRTRW 16 |
| | 155 ERRRK 160 |
| | 185 LRRCRA 190 |
| | 530 SRRSRS 535 |
| | 537 GRRRKS 542 |
| | 742 ERRAKQ 747 |
| | 11 SRTRW 16 |
| | 155 ERRRK 160 |

[0150]

F-박스 유일 단백질 24

류신 풍부 신경세포성 단백질

RER1 단백질

네프로시스틴(nephrocystin)

아데닐레이트 키나아제 동종효소 2, 미토콘드리아

클로르테콘 환원효소

메탁신 2

쌍 중배엽 호메오박스 단백질 1

약지 단백질

185 LRRCRA 190
530 SRRSRS 535
537 GRRRKS 542
742 ERRAKQ 747
9 LRRRRVKR 16
9 LRRRRV 14
29 EKRKGK 34
9 LRRRRV 14
29 EKRKGK 34
51 NRRLKH 56
51 NRRLKH 56
181 KRRYRG 186
181 KRRYRG 186
3 ARRQRD 8
430 PKKPKT 435
557 NRRSRN 562
641 EKRDKE 646
3 ARRQRD 8
430 PKKPKT 435
557 NRRSRN 562
641 EKRDKE 646
60 GKCLKA 65
116 KRKEKL 121
60 GKCLKA 65
116 KRKEKL 121
245 AKKHKR 250
245 AKKHKR 250
166 KRKMKA 171
166 KRKMKA 171
89 KKKRKQRR 96
88 EKKKRK 93
94 QRRNRT 99
144 NRRAKF 149
88 EKKKRK 93
94 QRRNRT 99
144 NRRAKF 149
174 LKRKWIRC 181
8 TRKIKL 13
95 MRKQRE 100
8 TRKIKL 13

[0151]

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| 아탁신 7(ataxin) | 95 MRKQRE 100 |
| | 55 PRRTRP 60 |
| | 377 GRRKRF 382 |
| | 704 GKKRKN 709 |
| | 834 GKKRKC 839 |
| | 55 PRRTRP 60 |
| | 377 GRRKRF 382 |
| | 704 GKKRKN 709 |
| | 834 GKKRKC 839 |
| 성장 지연 특이적 단백질 1 SKAP55 단백질 | 169 ARRCDRD 176 |
| | 115 EKSKD 120 |
| | 115 EKSKD 120 |
| 세린 팔미토일트랜스페라아제 1 | 232 PRKARV 237 |
| | 232 PRKARV 237 |
| 세린 팔미토일트랜스페라아제 2 | 334 KKKYKA 339 |
| | 450 RRLKE 455 |
| | 334 KKKYKA 339 |
| | 450 RRLKE 455 |
| 시냅토포딘 (synaptopodin) | 405 KRRQRD 410 |
| | 405 KRRQRD 410 |
| 알파-텍토린 (tectorin) | 1446 TRRCRC 1451 |
| | 2080 IRRKRL 2085 |
| | 1446 TRRCRC 1451 |
| | 2080 IRRKRL 2085 |
| 긴 형태 전사 인자 C-MAF | 291 QKRRTLKN 298 |
| 아서 증후군 타입 IIa 단백질 | 1285 MRRLRS 1290 |
| | 1285 MRRLRS 1290 |
| MSin3A 관련 폴리펩티드 p30 | 95 QKKVKI 100 |
| | 124 NRRKRK 129 |
| | 158 LRRYKR 163 |
| | 95 QKKVKI 100 |
| | 124 NRRKRK 129 |
| | 158 LRRYKR 163 |
| Ig 델타쇄 C 영역 | 142 KKKEKE 147 |
| | 142 KKKEKE 147 |
| 갑상샘 호르몬 수용체-관련 단백질 복합체 성분 TRAP100 | 383 AKRKADRE 390 |
| | 833 KKRHRE 838 |
| | 833 KKRHRE 838 |
| P60 카타닌 | 369 LRRRLEKR 376 |

[0152]

| | |
|--------------------------|------------------|
| 전사 인자 jun-D | 326 SRRVKA 331 |
| | 326 SRRVKA 331 |
| | 286 RKRKLERI 293 |
| | 273 RKRLRN 278 |
| | 285 CRKRKL 290 |
| | 273 RKRLRN 278 |
| | 285 CRKRKL 290 |
| 스테롤/레티놀 탈수소효소 | 152 VRKARG 157 |
| | 152 VRKARG 157 |
| 글리코겐 [당] 합성효소, 간 | 554 DRRFRS 559 |
| | 578 SRRQRI 583 |
| | 554 DRRFRS 559 |
| | 578 SRRQRI 583 |
| 에스트로겐-관련 수용체 감마 | 173 TKRRRK 178 |
| | 353 VKKYKS 358 |
| | 173 TKRRRK 178 |
| | 353 VKKYKS 358 |
| 신경세포 망막-특이적 류신 지퍼 단백질 | 162 QRRRTLKN 169 |
| 세포질 포스포리파아제 A2-감마 | 514 NKKILRE 521 |
| | 31 LKKLRI 36 |
| | 218 FKKGRL 223 |
| | 428 CRRHKI 433 |
| | 31 LKKLRI 36 |
| 세포질 포스포리파아제 A2-감마 | 218 FKKGRL 223 |
| | 428 CRRHKI 433 |
| GLE1 | 415 AKKIKM 420 |
| | 415 AKKIKM 420 |
| 다발성 외골종 타입 II 단백질 EXT2.I | 296 VRKRCHKH 303 |
| | 659 RKKFKC 664 |
| | 659 RKKFKC 664 |
| 사이클릭-AMP-의존 전사 인자 ATF-7 | 86 EKKARS 91 |
| | 332 GRRRRT 337 |
| | 344 ERRQRF 349 |
| | 86 EKKARS 91 |
| | 332 GRRRRT 337 |
| | 344 ERRQRF 349 |
| 단백질 키나아제/엔도리보누클레아제 | 886 LRKFRT 891 |
| | 886 LRKFRT 891 |
| 전사 인자 E2F6 | 23 RRRCRD 28 |
| | 59 VKRPRF 64 |

[0153]

MAP 키나아제-활성화 데스(death) 도메인 단백질

회귀 핵 수용체 PXR

수정체 상피 유래 성장 인자

LIM 호메오박스 단백질 보조인자

다중 막 스페닝 수용체 TRC8

98 VRKRRV 103
 117 EKSKN 122
 23 RRRCRD 28
 59 VKRPRF 64
 98 VRKRRV 103
 117 EKSKN 122
 1333 IRKKVRRL 1340
 160 KRRAKA 165
 943 MKKVRR 948
 1034 DKRKRS 1039
 1334 RKKVRR 1339
 1453 TKKCRE 1458
 160 KRRAKA 165
 943 MKKVRR 948
 1034 DKRKRS 1039
 1334 RKKVRR 1339
 1453 TKKCRE 1458
 126 KRKKSERT 133
 87 TRKTRR 92
 125 IKRKKS 130
 87 TRKTRR 92
 125 IKRKKS 130
 149 RKRKAQEQ 156
 286 KKRKGGRN 293
 145 ARRGRK 150
 178 PKRGRP 183
 285 EKKRKG 290
 313 DRKRKQ 318
 400 LKKIRR 405
 337 VKKVEKKRE 345
 145 ARRGRK 150
 178 PKRGRP 183
 285 EKKRKG 290
 313 DRKRKQ 318
 400 LKKIRR 405
 255 TKRRKRKN 262
 255 TKRRKR 260
 255 TKRRKR 260
 229 WKIRF 234
 229 WKIRF 234

[0154]

| | |
|------------------------------|------------------|
| 전사 인자 SUPT3H | 172 DKKKLRL 179 |
| | 169 MRKDKK 174 |
| | 213 NKRQKI 218 |
| | 169 MRKDKK 174 |
| | 213 NKRQKI 218 |
| 제미닌(GEMININ) | 50 KRKHRN 55 |
| | 104 EKRRKA 109 |
| | 50 KRKHRN 55 |
| | 104 EKRRKA 109 |
| 세포 주기-조절 인자 p78 | 165 EKKKVSKA 172 |
| | 124 IKRKKF 129 |
| | 188 TKRVKK 193 |
| | 381 DRRQKR 386 |
| | 124 IKRKKF 129 |
| | 188 TKRVKK 193 |
| | 381 DRRQKR 386 |
| 림프구 항원 6 복합체, 좌위 D | 61 QRKGRK 66 |
| | 85 ARRLA 90 |
| | 61 QRKGRK 66 |
| | 85 ARRLA 90 |
| 델타 1-피롤린-5-카르복실레이트 합성효소 | 455 LRRTRJ 460 |
| | 455 LRRTRJ 460 |
| B 세포 링커 단백질 BLNK | 36 IKKLV 41 |
| | 36 IKKLV 41 |
| B 세포 링커 단백질 BLNK-S | 36 IKKLV 41 |
| | 36 IKKLV 41 |
| 태아 알츠하이머 항원 | 5 ARRRRKRR 12 |
| | 16 PRRRRRRT 23 |
| | 93 WKKTSRP 100 |
| | 5 ARRRRK 10 |
| | 16 PRRRRR 21 |
| | 26 PRRPRI 31 |
| | 35 TRMRW 40 |
| | 5 ARRRRK 10 |
| | 16 PRRRRR 21 |
| | 26 PRRPRI 31 |
| | 35 TRMRW 40 |
| 일시적 수용체 전위 채널 4 제타 스플라이스 변형체 | 505 CKKMRK 512 |
| | 506 KKKMR 511 |
| | 676 HRRSKQ 681 |

[0155]

| | |
|------------------------------|------------------|
| 근육원섬유형성 조절자 MR-2 | 506 KKKMRR 511 |
| SH2 도메인 함유 포스파타아제 앵커 단백질 2c | 676 HRRSKQ 681 |
| 면역글로불린 슈퍼패밀리, 일원 3 | 65 RKRGN 70 |
| Meis (마우스) 동족 3 | 65 RKRGN 70 |
| Deleted in azoospermia(DAZ)2 | 269 IKRSLRS 276 |
| 센타우린 감마3 | 394 SKRPKN 399 |
| 프레-B-세포 백혈병 전사 인자-1 | 394 SKRPKN 399 |
| 60S 리보솜 단백질 L13a | 112 PRRSRR 117 |
| WD40-및 FYVE-도메인 함유 단백질 3 | 120 WRRTRG 125 |
| LENG1 단백질 | 112 PRRSRR 117 |
| MRIP2 | 120 WRRTRG 125 |
| G 단백질 결합 수용체 | 105 GKKLKL 110 |
| | 114 IRKQKL 119 |
| | 105 GKKLKL 110 |
| | 114 IRKQKL 119 |
| | 543 NRKHHRRK 550 |
| | 544 RKKHRR 549 |
| | 544 RKKHRR 549 |
| | 233 ARRKRR 238 |
| | 286 NKRIKY 291 |
| | 233 ARRKRR 238 |
| | 286 NKRIKY 291 |
| | 112 DKKKRM 117 |
| | 158 KRKEKA 163 |
| | 167 YRKKKQ 172 |
| | 112 DKKKRM 117 |
| | 158 KRKEKA 163 |
| | 167 YRKKKQ 172 |
| | 388 IKRLKI 393 |
| | 388 IKRLKI 393 |
| | 34 RKRGLRS 41 |
| | 84 SRKTRRM 91 |
| | 1 MRRSRA 6 |
| | 33 ERKRRG 38 |
| | 85 RKKTRR 90 |
| | 1 MRRSRA 6 |
| | 33 ERKRRG 38 |
| | 85 RKKTRR 90 |
| | 375 NKKHLKK 382 |
| | 430 EKKLKRH 437 |

정자 이온 채널

A-키나아제 고정 단백질

림프구 특이적 단백질 LSP1

신호전달 림프구 활성화 유사 분자(H. 사피엔스)

더마탄-4-설포트랜스페라아제-1

모에신(moesin)

290 WKKKRA 295
395 RKKAKF 400
431 KKKLKR 436
290 WKKKRA 295
395 RKKAKF 400
431 KKKLKR 436
143 LKKFRQ 148
228 LRKIRT 233
143 LKKFRQ 148
228 LRKIRT 233
232 QKRRRHRA 239
232 QKRRRH 237
232 QKRRRH 237
402 QKRKTGRL 409
2232 KRKKLVLD 2239
2601 EKRRRERE 2608
2788 EKKKKNKT 2795
370 RKKNKG 375
1763 SKKSKE 1768
2200 EKKVRL 2205
2231 LKRKKL 2236
2601 EKRRRE 2606
2785 EKKEKK 2790
1992 QKKDVVKRQ 2000
370 RKKNKG 375
1763 SKKSKE 1768
2200 EKKVRL 2205
2231 LKRKKL 2236
2601 EKRRRE 2606
2785 EKKEKK 2790
315 GKRYKF 320
315 GKRYKF 320
261 RRRGKT 266
261 RRRGKT 266
242 VRRYRA 247
242 VRRYRA 247
291 MRRRKP 296
325 EKKKRE 330
291 MRRRKP 296
325 EKKKRE 330

| | |
|---------------------------------------|------------------|
| A-Raf 프로토-종양유전자 세린/트레오닌-단백질 키나아제 | 288 KKKVKN 293 |
| | 358 LRKTRH 363 |
| | 288 KKKVKN 293 |
| | 358 LRKTRH 363 |
| 시토크롬 P450 2C18 | 117 GKRWKE 122 |
| | 117 GKRWKE 122 |
| | 117 GKRWKE 122 |
| | 156 LRKTKA 161 |
| | 117 GKRWKE 122 |
| 단백질 티로신 포스파타아제, 비-수용체 타입 3 | 156 LRKTKA 161 |
| | 594 IRRRAVRS 601 |
| | 263 FKRRKF 268 |
| | 388 IRKPRH 393 |
| | 874 VRKMRD 879 |
| | 263 FKRRKF 268 |
| | 388 IRKPRH 393 |
| | 874 VRKMRD 879 |
| 칼리크레인(kallikrein) 유사 7 (키모트립신분해, 각질층) | 15 VKKVRL 20 |
| | 15 VKKVRL 20 |
| 호르몬 민감 리파아제 | 703 ARRLRN 708 |
| | 703 ARRLRN 708 |
| 4GS 리보솜 단백질 S30 | 25 KKKKTGRA 32 |
| | 23 EKKKKK 28 |
| | 23 EKKKKK 28 |
| 아연 손가락 단백질 91 | 617 LRRHKR 622 |
| | 617 LRRHKR 622 |
| NNP-1 단백질 | 320 NRRLYKV 327 |
| | 387 ERKRSRRR 394 |
| | 432 QRRRTPRP 439 |
| | 454 EKKKKRRE 461 |
| | 29 VRKLRL 34 |
| | 355 GRRQKK 360 |
| | 361 TKKQKR 366 |
| | 388 RKRSRR 393 |
| | 454 EKKKKR 459 |
| | 29 VRKLRL 34 |
| | 355 GRRQKK 360 |
| | 361 TKKQKR 366 |
| | 388 RKRSRR 393 |
| | 454 EKKKKR 459 |

[0158]

| | |
|-------------------------------|--------------------|
| 메티오닐-tRNA 합성효소 | 725 WKRIKG 730 |
| ELMO2 | 725 WKRIKG 730 |
| 수막중-발현 항원 6/11 | 560 NRRRQERF 567 |
| | 432 RKRAKD 437 |
| | 432 RKRAKD 437 |
| 이노시톨 폴리포스페이트 4-포스파타아제 타입 I-베타 | 375 LRKKLHKF 382 |
| | 829 ARKNKN 834 |
| | 829 ARKNKN 834 |
| | 815 SKKRKN 820 |
| | 815 SKKRKN 820 |
| C7ORF12 | 40 SRRYRG 45 |
| | 338 HRKNKP 343 |
| | 40 SRRYRG 45 |
| | 338 HRKNKP 343 |
| Rap 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 | 138 SRRFRKI 145 |
| | 1071 QRKKRWS 1078 |
| | 1099 HKKRARRS 1106 |
| | 139 RRRFRK 144 |
| | 661 SKKVKA 666 |
| | 930 LKRMIK 935 |
| | 1071 QRKKRW 1076 |
| | 1100 KKRARR 1105 |
| | 1121 ARKVQ 1126 |
| | 139 RRRFRK 144 |
| | 661 SKKVKA 666 |
| | 930 LKRMIK 935 |
| | 1071 QRKKRW 1076 |
| | 1100 KKRARR 1105 |
| | 1121 ARKVQ 1126 |
| 시그마 1C 아댑틴(adaptin) | 27 ERKKITRE 34 |
| 알신(alsin) | 883 GRKRKE 888 |
| | 883 GRKRKE 888 |
| NOPAR2 | 14 LKRPR 19 |
| | 720 VKREKP 725 |
| | 14 LKRPR 19 |
| | 720 VKREKP 725 |
| AT-결합 전사 인자 1 | 294 SKRPKT 299 |
| | 961 EKKKNL 966 |
| | 1231 NKRPRT 1236 |
| | 1727 DKRLRT 1732 |

[0159]

서프레신(suppresin)

중심선 1 단백질

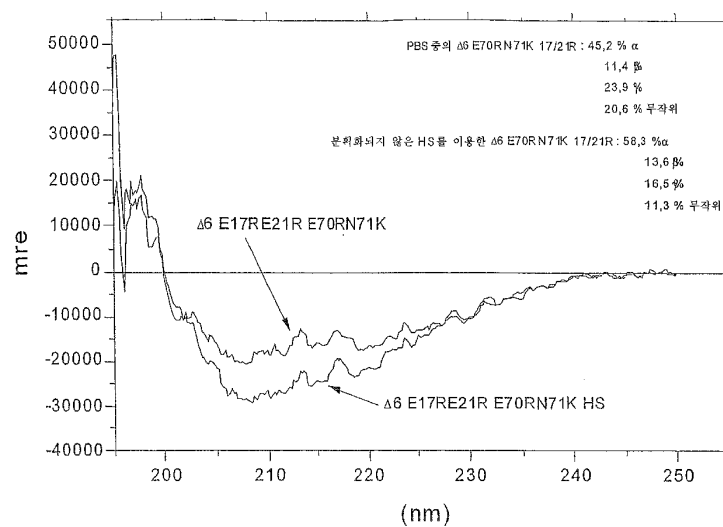
고속 이동 단백질 2a

2032 QKRFRT 2037
2087 EKSKSL 2092
2317 QRKDKD 2322
2343 PKKEKG 2348
294 SKRPKT 299
961 EKKNKL 966
1231 NKRPRT 1236
1727 DKRLRT 1732
2032 QKRFRT 2037
2087 EKSKSL 2092
2317 QRKDKD 2322
2343 PKKEKG 2348
232 YKRRKK 237
232 YKRRKK 237
100 TRRERA 105
494 HRKLV 499
100 TRRERA 105
494 HRKLV 499
6 PKKPKG 11
84 GKKKKD 89
6 PKKPKG 11
84 GKKKKD 89

[0160]

도면

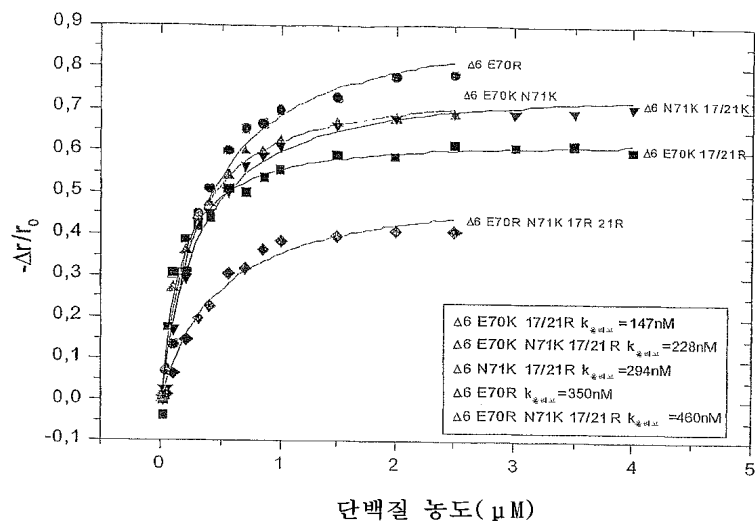
도면1



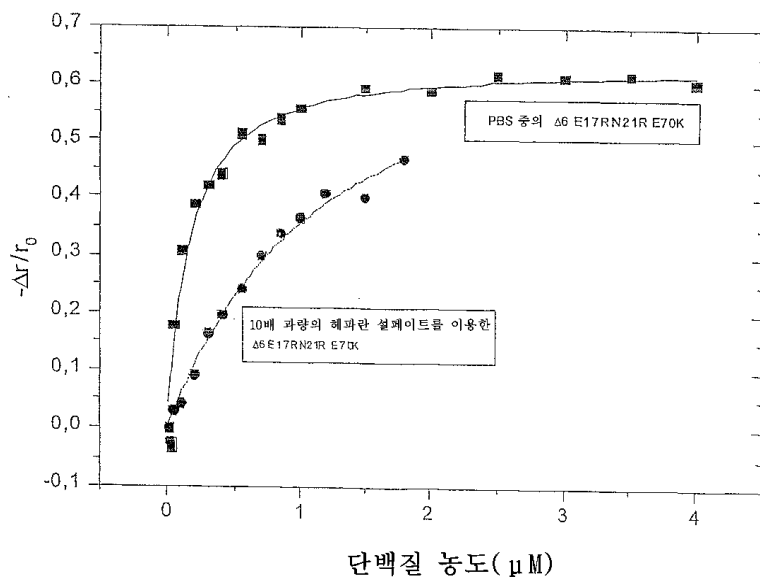
도면2

| 이차 구조 | IL-8Δ6 E70R | IL-8Δ6 E70R HS | IL-8Δ6 F17RF21R E70K | IL-8Δ6 F17RF21R E70K HS |
|-----------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------------|
| α-헬릭스 [%] | 24,9 | 37 | 17,4 | 28,7 |
| β-시트 [%] | 23,6 | 23 | 29,8 | 22 |
| 회전 [%] | 20,9 | 27,3 | 25,9 | 29,7 |
| 기타 [%] | 40,7 | 12,7 | 26,9 | 19,6 |

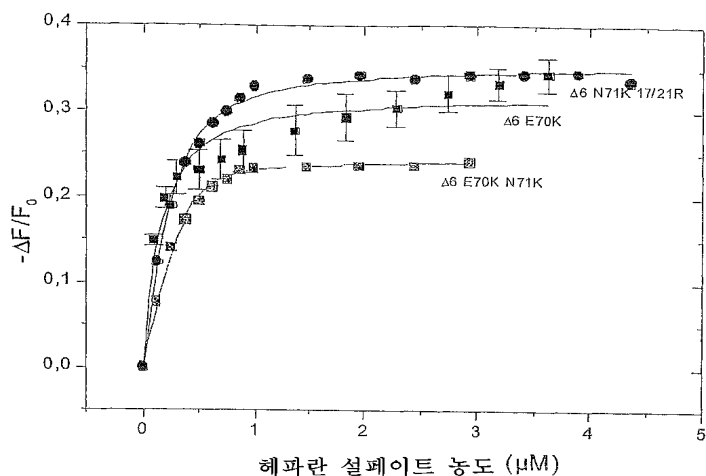
도면3



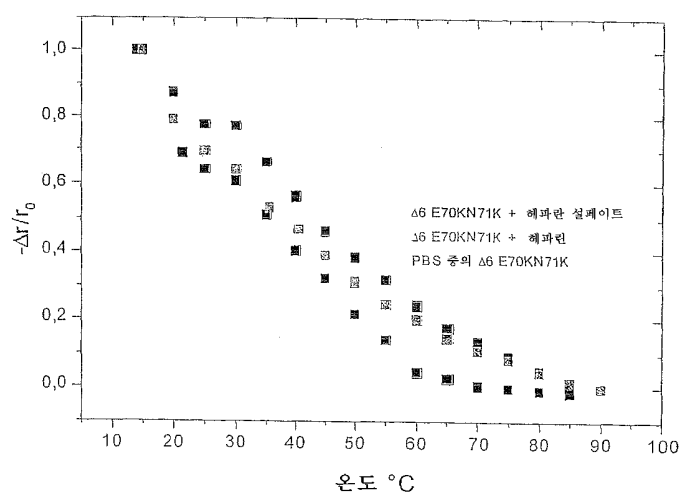
도면4



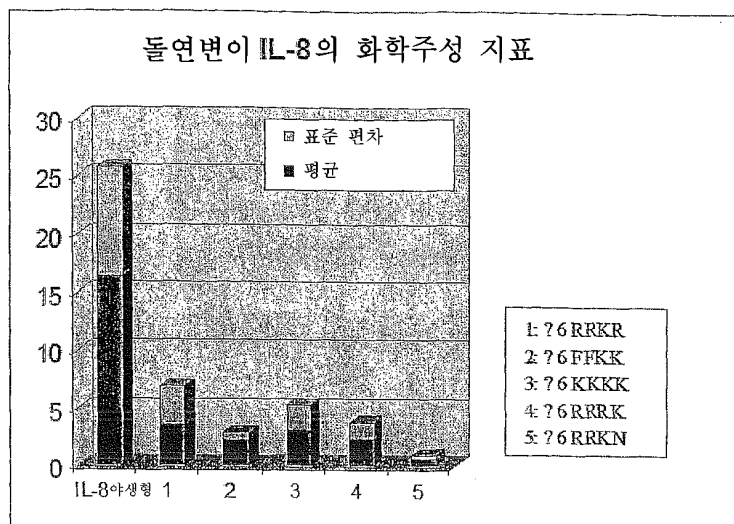
도면5



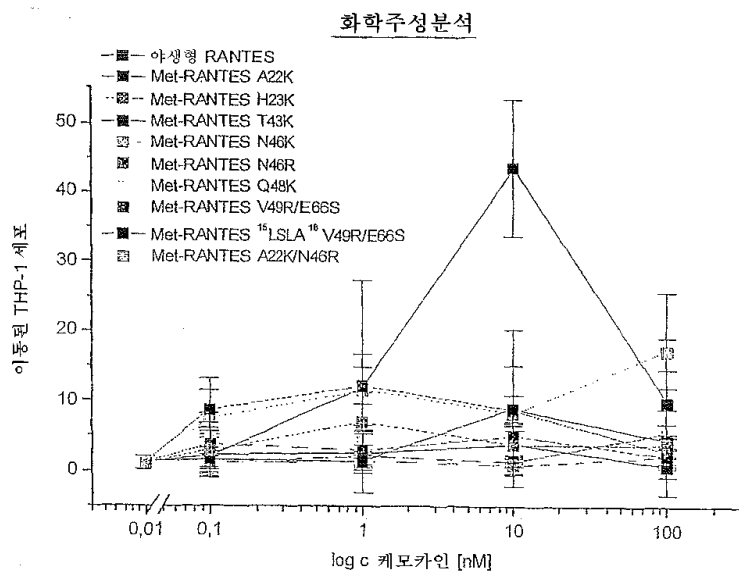
도면6



도면7



도면8



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)