



(30) 우선권주장

60/306,161 2001년07월19일 미국(US)

60/331,477 2001년11월16일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어지는 NTP(신경 스레드 단백질)-펩티드:

a) 서열 번호 16

(Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly)

b) 서열 번호 23

(Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu) 및

c) 서열 번호 26

(Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met)

### 청구항 2

펩티드의 3' 또는 5' 말단에 플랭킹하는(flanking) 1 내지 25개의 추가 아미노산으로 변형된 제1항에 따른 펩티드로 이루어지는 펩티드.

### 청구항 3

제1항에 따른 펩티드에 상응하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은, 그 개시의 전체가 본원에 인용되어 포함되는, 2001년 7월 19일 자로 출원된 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 단백질 및 펩티드"라는 제목의 미국 가특허 출원 제 60/306,161호, 2001년 7월 19일 자로 출원된 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 제목의 미국 가특허 출원 제 60/306,150, 2001년 11월 16일 자로 출원된 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 제목의 미국 가특허 출원 제 60/331,477에 대해 우선권을 주장한다.

[0002] 기술 분야

[0003] 본 출원은 신경 스레드 단백질(neural thread protein)의 아미노산 서열의 일부에 해당하거나, 유사하거나, 상동성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드에 기초한 화합물을 사용하여 세포 성분의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 질환, 예를 들면 사람의 양성 또는 악성 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 근육내, 경구, 정맥내, 경막내, 종양내, 비내, 국소, 경피 등으로 화합물을 단독으로 또는 담체와 접합하여 투여하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

배경 기술

[0004] 많은 의학적 치료 및 처치의 본질은 해롭거나 원치 않는 조직의 제거 또는 파괴를 포함한다. 이러한 중요한 치료의 예는 암성 증식물의 외과적 제거, 화학요법을 통한 전이성 종양의 파괴, 및 선 (예를 들면 전립선) 증식의 감소를 포함한다. 다른 예는 원하지 않는 얼굴 털, 사마귀, 피하 조직, 림프 세포 또는 지방 조직의 제거를 포함한다.

[0005] 해롭거나 원하지 않는 세포 및 조직을 파괴하여, 이들을 제거하는 것을 용이하게 하거나 이들이 더이상 성장하는 것을 억제하지만, 주로 국소적인 효과를 갖고 독성이 최소이거나 전신적이 아닌 효과적인 약제가 필요하다. 신경 스레드 단백질 및 그와 관련된 분자는, 그 개시의 전체가 본원에 인용됨으로써 삽입되는, 계류중인 2002년 3월 8일 자로 출원된 "신경 스레드 단백질을 사용하여 종양 및 관련 질환을 치료하는 방법"이라는 제목의 미국 특허 출원 제 10/092,934호에 개시된 바와 같은 약제의 일종이다. 신경 스레드 단백질, AD7c-NTP의 아미노산 서열의 일부에 해당하는 아미노산 서열을 함유하는 펩티드도 그러한 약제이다. 이러한 펩티드는 2002년 5월 24일 자로 출원된 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 제목의 미국 특허 출원 제 10/153,334호에 개시되어 있다.

- [0006] 본원에서는 종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 역시 효과적인 신경 스레드 단백질의 특정한 다른 단편을 개시한다.
- [0007] 암은 조절되지 않는 세포의 성장 및 복제를 일으키는 세포의 내부 조절 기전에 있어서의 비정상적 상태이다. 정상 세포는 조직을 구성하고, 이 세포들이 특화, 조절, 조정된 단위로서 활동하는 능력을 상실할 때 (역분화) 결함은 세포 집단 사이에 혼란을 초래한다. 이러한 상태가 발생하면, 종양이 형성된다.
- [0008] 조직의 양성 과다성장은 세포를 유기체로부터 제거하는 것이 바람직한 비정상 상태이다. 양성 종양은 몸 전체에 전이되지 않는 세포 증식이지만, 질환 증상을 일으킨다. 이러한 종양은 뇌와 같은 기관에서 접근할 수 없는 영역에 위치한다면 치명적일 수 있다. 양성 종양은 폐, 뇌, 피부, 뇌하수체, 갑상선, 부신 피질 및 수질, 난소, 자궁, 고환, 연결 조직, 근육, 장, 귀, 코, 인후, 편도, 입, 간, 담낭, 췌장, 전립선, 심장 및 기타 기관을 포함하는 많은 다른 기관에 존재한다.
- [0009] 암의 치료에 있어서는 외과 수술이 첫번째 단계인 경우가 많다. 외과 수술의 목적은 다양하다. 때로는 가능한 한 명백한 종양의 많은 양을 제거하기 위하여, 또는 적어도 종양을 "디벌크(debulk)" (종양의 주요 부피를 제거하여 다른 수단에 의한 치료를 필요로 하는 부분을 줄이는 것) 하기 위하여 사용된다. 암의 유형 및 위치에 따라, 외과 수술은 환자에게 약간의 증상적 완화를 제공할 수도 있다. 예를 들면, 외과의사가 팽창성 뇌 종양의 많은 부분을 제거할 수 있다면, 두개골 내의 압력이 감소하여, 환자의 증상을 개선시킬 수 있다.
- [0010] 모든 종양이 외과 수술될 수 있는 것은 아니다. 어떤 종양은 완전히 제거될 수 없는 신체 부분에 위치할 수도 있다. 이러한 종양의 예는 뇌간 (호흡을 조절하는 뇌의 부분)의 종양 또는 주요 혈관 내부 및 주위에서 성장하는 종양일 것이다. 이러한 경우, 외과수술의 역할은 종양 제거와 관련된 높은 위험으로 인해 제한된다.
- [0011] 어떤 경우에는, 종양을 디벌크하기 위해 외과수술을 사용하지 않는데, 그 이유는 그럴 필요가 없기 때문이다. 호지킨 림프종이 그 예인데, 이는 화학요법 및 방사선 요법의 조합에 매우 잘 반응하는 림프절의 암이다. 호지킨 림프종에서는 치료를 위하여 외과수술이 거의 필요하지 않지만, 진단을 확정하기 위하여 거의 항상 사용된다.
- [0012] 화학요법은 몸 전체에서 급속히 분열하는 세포 (종양에서 발견되는 것과 같은 세포)를 특이적으로 공격하는 의약 (보통 경구 또는 주사로 투여)의 사용과 관련된 암 치료의 또다른 통상적 형태이다. 이는 화학요법이 이미 전이된 암, 및 혈액 및 림프계를 통해 퍼질 가능성이 높지만 일차 종양 이외에는 명확하지 않은 종양을 치료하는데 유용하게 되도록 한다. 화학요법은 또한 국소 종양의 외과수술 및 방사선 요법에 대한 반응성을 증가시키기 위하여 사용될 수도 있다. 예를 들면, 이는 두부 및 경부의 몇몇 암에 대한 경우이다.
- [0013] 불행히도, 정상적으로 급속히 분열하는 인간의 몸의 다른 세포 (예를 들면 위벽 및 머리카락)는 화학요법에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 이유로, 많은 화학요법제는 오심, 구토, 빈혈, 머리카락의 손실 또는 기타 증상을 일으킨다. 이러한 부작용은 일시적이고, 이러한 부작용의 많은 부분을 완화시키는데 도움을 줄 수 있는 의약들이 있다. 우리의 지식이 지속적으로 증가함에 따라, 연구자들은 암세포를 더 잘 죽일 뿐만 아니라 환자에게 부작용이 더 적은 더 새로운 화학요법제를 고안하였다.
- [0014] 화학요법은 여러가지 방법으로 환자에게 투여된다. 어떤 것은 알약이고, 어떤 것은 정맥 또는 기타 주사로 투여된다. 주가사능한 화학요법을 위해서, 환자는 치료를 위해 의사의 사무실 또는 병원을 방문한다. 다른 화학요법제는 혈류 내로 하루에 24 시간 연속 주입을 필요로 한다. 이런 유형의 화학요법제를 위하여, 환자에게 장착되는 작은 펌프를 이식하기 위하여 가벼운 외과적 수술이 수행된다. 그러면 펌프는 천천히 의약을 투여한다. 많은 경우, 환자의 정맥에 영구 포트를 위치시켜서 반복적으로 바늘을 꽂을 필요를 없앤다.
- [0015] 방사선 요법은 암과 싸우는데 있어서 통상적으로 사용되는 또다른 무기이다. 방사선은 종양 세포 내의 DNA를 손상시킴으로써 암세포를 죽인다. 방사선은 두 가지 가능한 방법으로 투여된다. 첫째로는, 가장 흔한 것으로서, 매우 정확한 방법으로 종양에 초점을 맞추어 방사선을 조사하는 것을 포함한다. 이를 위하여, 환자는 테이블 위에 눕고 광선이 환자 주위를 움직인다. 이는 단 몇 분밖에 안 걸리지만, 처방된 특정 총 용량을 달성하기 위하여 (종양의 유형에 따라) 몇 주 동안 매일 시행될 수 있다.
- [0016] 때때로 사용되고, 근접 치료라고 불리는 다른 방사선 방법은 방사활성 펠렛 ("시드") 또는 와이어를 사용하여 체내의 종양의 부위에 이식하는 것을 포함한다. 이식은 일시적 또는 영구적일 수 있다. 영구 이식에 있어서는, 시드 중의 방사선은 수 일 또는 수 주의 기간에 걸쳐 붕괴되어 환자가 방사성을 띠지 않게 된다. 일시적 이식에 있어서는, 방사선의 전체 용량은 보통 며칠 동안 전달되고, 환자는 그 시간 동안 병원에 남아 있어

야 한다. 두 가지 유형의 근접치료 모두에 있어서, 방사선은 일반적으로 매우 표적화된 부위로 전달되어 암에 대해 국소적으로 제어하게 된다 (화학요법에서와 같이 몸 전체에 처치하는 것과는 반대임).

- [0017] 매우 선별적인 환자들은 골수 이식을 받을 수 있다. 이 과정은 보통 환자가 특히 침습적인 암에 걸렸거나 또는 통상적인 치료로 치료된 후 암이 재발한 경우에 수행된다. 골수 이식은 복잡한 과정이다. 여러 종류가 있고, 부작용을 일으키거나 치료될 가능성이 다르다. 대부분의 이식은 특별 기관에서 수행되고 많은 경우 이들의 용도는 연구용으로 생각된다.
- [0018] 다수의 추가적 요법들이 있긴 하지만 이들은 대부분 아직 임상 시험에서 연구 중에 있고 아직 표준 치료법으로 되지 않았다. 그 예는 면역요법, 모노클로날 항체, 항-혈관생성 인자 및 유전자 요법의 사용을 포함한다.
- [0019] 면역요법: 방사선 또는 화학요법과 별도로, 다양한 기술이 환자 자신의 면역계가 암과 싸우는 것을 돕기 위하여 고안되었다. 목적을 달성하기 위하여, 연구자들은 환자에게 특별히 유도된 백신을 주사하는 경우가 많다.
- [0020] 모노클로날 항체: 이들은 항원성 및(또는) 기타 특성에 있어서의 암세포 및 비-암세포 사이의 차이점을 이용하여 암 세포에 부착되도록 (정상 세포에는 부착되지 않음) 고안된 항체이다. 항체는 환자에게 단독으로 투여하거나, 항체가 암세포를 선택적으로 표적화하여 원하는 세포에 독성 약제 또는 방사성을 전달하도록 다양한 세포 독성 화합물에 접합되거나 방사성 형태로 투여될 수 있다.
- [0021] 항-혈관생성 인자: 암세포가 급속하게 분열하고 종양이 성장함에 따라, 이들은 곧 혈관 공급을 능가할 수 있다. 이를 보상하기 위하여, 어떤 종양은 그 근처의 혈관 성장의 유도를 돕는 것으로 나타난 화합물을 분비함으로써 암세포가 혈액 중의 영양분을 계속 공급받을 수 있도록 한다. 실험적 치료는 종양으로 혈관이 성장하는 것을 중단시키도록 고안되었다.
- [0022] 유전자 치료: 암은 종국적으로 암 세포의 생산 및 그의 과다 증식으로 유도하는 일련의 돌연변이의 생성물이다. 암은 암의 증식을 저지하거나 멈추는 작용을 하거나, 세포의 프로그램된 세포 기전을 작동시켜서 세포를 파괴하거나, 세포의 면역 인식을 증강시키거나, 종양 성장을 억제하는 사이토카인 또는 독성 대사물질로 전환하는 프로드럭을 발현할 유전자를 암세포에 도입함으로써 치료될 수 있다.
- [0023] 양성 종양 및 기형은 외과수술, 방사선요법, 약물 요법, 열 또는 전기 제거, 한랭요법 등을 포함하는 다양한 방법에 의해 치료할 수 있다. 양성 종양은 전이되지 않으나, 이들은 크게 성장할 수 있고 재발할 수 있다. 양성 종양의 외과적 적출술에는 일반적 외과수술에서의 모든 어려움 및 부작용이 존재하고, 몇몇 양성 종양, 예를 들면, 뇌하수체 선종, 뇌의 수막종, 전립선 증식 등에 대해서는 반복적으로 수행되어야 하는 경우가 많다.
- [0024] 선택적 세포 제거가 바람직한 원하지 않는 세포 성분을 포함하는 다른 질환도 있다. 예를 들면 심장 질환 및 줄증은 통상적으로 혈관벽을 변형시키고, 관강을 좁히고, 혈류를 제한하고, 국소 혈병이 생기게 하기 쉽고, 궁극적으로 폐색 및 경색에 이르게 하는, 지방섬유 및 변형된 평활근 성분의 증식성 병변인 죽상경화증에 의해 발생한다. 죽상경화증에 대한 다양한 치료는 우회로 이식술; 인공 이식술; 재소통, 소파술, 방사선, 레이저 또는 다른 제거와 함께 혈관성형술; 지질 저하를 통해 죽상경화증을 억제하기 위한 약물요법; 항-응고 요법; 및 음식, 운동 및 생활습관의 일반적 조치를 포함한다. 외과적 수술의 위험 및 부작용이 없는 죽상경화 병변을 제거하기 위한 방법이 필요하다.
- [0025] 선택적 세포 제거가 바람직한 원하지 않는 세포 성분의 다른 예는 사마귀와 같은 바이러스에 의해 유도된 성장을 포함한다. 다른 예는 면역 질환에서 발견되는 비후성 염증성 종괴, 및 비후성 반흔 또는 켈로이드이다. 다른 예는 원하지 않는 털, 예를 들면 얼굴 털의 제거와 같은 미용 분야에서 발견되거나, 또는 예를 들면 얼굴 진피 및 연골 조직에서 또는 사지의 진피 및 연결 조직에서와 같이 미용 목적으로 원하지 않는 조직 영역의 축소를 위한 것이다.
- [0026] 또다른 예는 당업자에게 명백할 것이다. 이 예들의 모두 또는 대부분에서, 원하지 않는 세포 성분을 통상적 요법의 위험 및 부작용 없이 원하지 않는 세포 성분을 제거 또는 파괴할 수 있는 치료가 필요하다. 또한, 더욱 정확하게 원하지 않는 세포 성분을 제거할 필요성이 존재한다.
- [0027] 신경 스레드 단백질 (NPT)은 최근 확인된 뇌 단백질의 일군이다. 이 군에 속하는 한 단백질인 AD7c-NTP는 신경 돌기 발아와 관련된 기능을 갖는 ~41 kD의 막 결합 인단백질이다 (de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100: 3093-3104 (1997); de la Monte et al., Alz. Rep., 2:327-332 (1999); de la Monte SM and Wands JR, Journal of Alzheimer's Disease, 3:345-353 (2001)). AD7c-NTP를 코딩하는 유전자 및 AD7c-NTP에 대해 예측된 단백질 서열은 문헌 [de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100 : 3093-3104 (1997)]에서 확인되고 기재

되어 있다. ~41 kD 중 이외에, 다른 종의 신경 스레드 단백질 (~26 kD, ~21 kD, ~17 kD, 및 ~15 kD)이 확인되었고 신경외배엽 종양, 성상세포종, 및 교모세포종과, 또한 저산소증, 허혈 또는 대뇌 경색으로 인한 손상과 관련된다 (Xu et al., Cancer Research, 53:3823-3829 (1993); de la Monte et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55(10): 1038-50 (1996), de la Monte et al., J. Neurol.Sci., 138(1-2): 26-35 (1996); de la Monte et al., J. Neurol. Sci., 135(2): 118-25 (1996); de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997); and de la Monte et al., Alz.. Rep., 2:327-332 (1999)).

[0028] 신경 스레드 단백질의 종은 미국 특허 5,948,634호, 5,948,888호 및 5,830,670호에 모두 "신경 스레드 단백질 유전자 발현 및 알츠하이머병의 검출"에 대해, 또한 미국 특허 6,071,705호에 "신경 질환 또는 기능장애를 검출하는 방법"에 대해 청구되고 기재되어 있다. 이 특허의 개시는 그 전체가 본원에 인용됨으로써 구체적으로 삽입된다. 거기에 기재되어 있는 바와 같이, NTP는 세포 사멸 동안 상향조절되고 생산된다. 따라서, 죽었거나 죽어가는 신경 세포는 NTP를 과잉생산하는 것으로 기재되고, 따라서, 그의 존재는 신경 세포의 사멸 및 알츠하이머병 (AD)의 발병을 나타낸다.

[0029] 신경 스레드 단백질의 다른 종은 AD7c-NTP 유전자의 다른 산물 (예를 들면, NCBI 엔트레즈 (Entrez)-단백질 데이터베이스 수탁 번호 #XP\_032307 PID g15928971에 기재된 112 개의 아미노산 단백질)로서 또는 신경 스레드 단백질 (예를 들면, NCBI 엔트레즈-단백질 데이터베이스 수탁 번호 #AAH14951 PID g15928971에 기재된 106 개의 아미노산 단백질, NCBI 엔트레즈-단백질 데이터베이스 수탁 번호 #XP\_039102 PID g18599339에 기재된 106 개의 아미노산 단백질 및 NCBI 엔트레즈-단백질 데이터베이스 수탁 번호 #AAH02534 PID g12803421에 기재된 61 개의 아미노산 단백질)과 유사한 것으로서 확인되었다.

[0030] 신경 스레드 단백질은 AD와 관련이 있고, NTP는 AD에서 세포 사멸과 관계되어 상향조절된다. AD7c-NTP mRNA는 AD 뇌에서 대조군에 비하여 상향조절되고; 뇌 및 CSF에서의 AD7c-NTP 단백질 수준은 대조군에서보다 AD에서 더 높고; AD7c-NTP 면역 반응성은 노인성 반점, 신경섬유 농축체 (NFT), AD 및 다운증후군 뇌의 퇴화 뉴론, 신경망 스레드, 및 이영양성 신경돌기 발아에서 발견된다 (Ozturk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:419-423 (1989); de la Monte et al., J. Clin. Invest., 86(3):1004-13 (1990); de la Monte et al., J.Neurol. Sci., 113(2):152-64 (1992); de la Monte et al., Ann. Neurol., 32(6):733-42 (1992); de la Monte et al., J. Neuropathol. Exp. Neuro., 55(10):1038-50 (1996), de la Monte et al., J. Neurol. Sci., 138(1-2):26-35 (1996); de la Monte et al., J. Neurol. Sci., 135(2):118-25 (1996); de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997); and de la Monte et al., Alz.. Rep., 2:327-332 (1999)). NTP는 세포 내에, 신경망 내의 미세 과정에 위치하거나, 또는 AD 및 다운증후군 뇌에서 세포 밖에 위치한다 (de la Monte et al., Ann. Neurol., 32(6):733-42 (1992)).

[0031] AD7c-NTP 단백질의 상승된 수준은 AD 환자의 CSF 및 요에서 발견되었다 (de la Monte and Wands, Front Biosci 7:989-96 (2002); de la Monte and Wands, Journal of Alzheimer's Disease 3:345-353 (2001); Munzar et al, Alzheimer's Reports 4: 61-65 (2001); Kahle et al, Neurology 54:1498-1504 (2000); Munzar et al, Alzheimer Reports 3:155-159 (2000); de la Monte et al, Alzheimer's Reports 2:327-332 (1999); and de la Monte et al, J Clin Invest 100:3093-3104 (1997)).

[0032] NTP의 과다 발현은 알츠하이머 병에서 세포 사멸의 과정과 연관되었다 (de la Monte and Wands, J. Neuropathol. Exp. Neuro. 60:195-207 (2001); de la Monte and Wands, Cell Mol Life Sci 58:844-49 (2001)). AD7c-NTP는 다운증후군 뇌 조직에서도 확인되었다 (Wands et al., 국제 특허 공개 WO 90/06993; de la Monte et al, J Neurol Sci 135:118-25 (1996); de la Monte et al., Alz.. Rep., 2:327-332 (1999)). 어떤 증거는 NTP의 과다 발현이 정상 안압 녹내장과도 관련될 수 있다는 것을 제시한다 (Golubnitschaja-Labudova et al, Curr Eye Res 21:867-76 (2000)).

[0033] NTP는 시험관내에서는 교종 및 신경모세포종 세포 배양에서 그리고 생체내에서는 정상 설치류 근육 조직, 피하 연결 조직, 및 진피에서, 및 유방암, 피부암 및 유두종, 결장암, 뇌의 교종을 포함하는 다양하고 상이한 인간 및 비-인간 기원 종양에서, 및 다른 설치류 모델에서 모두 세포 사멸을 유발하기 위하여 효과적인 물질임이 입증되었다. 2002년 3월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 제10/092,934 호, "신경 스레드 단백질을 사용하는 종양 및 관련 질환의 치료 방법"을 참조하시오.

[0034] AD7c-NTP의 특정 펩티드("AD7c-NTP 펩티드")도 시험관내에서는 신경아교종 및 심경모세포종 세포 배양물에서 및 (또는) 생체내에서는 정상 설치류 근육 조직, 피하 연결 조직, 진피 및 기타 조직에서 모두 세포 사멸을 유발하기 위하여 효과적인 물질임이 입증되었다. 그 개시의 전체가 본원에 인용됨으로써 삽입되는 2002년 5월 24일

자로 출원된 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 제목의 미국 특허 출원 제10/153,334호를 참조하시오.

[0035] 관련 기술의 상기 기재를 포함하여 이 기재 전체에서, 모든 미국 특허를 포함하여 본원에 기재된 모든 공개적으로 입수가 가능한 문헌은 본원에 인용됨으로써 그 전체가 삽입된다. 상기 관련 기술은 어떠한 방식으로든 계류 중인 미국 특허 출원을 포함하여 거기에 기재된 문헌의 모두가 본 발명의 선행 기술임을 인정하는 의도로 기재된 것은 아니다.

[0036] 원치않는 세포 성분을 치료하기 위한 새롭고, 독성이 적은 치료법이 필요하다. 본 발명은 이러한 필요성을 충족시킬 수 있다.

## 발명의 상세한 설명

[0037] **발명의 요약**

[0038] 본 발명은 펩티드, 조성물, 및 원치않는 세포 증식, 예를 들면 양성 및 악성 종양, 선 (예를 들면, 전립선) 증식, 원치않는 얼굴 털, 사마귀, 및 원치않는 지방 조직을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 세포 사멸을 일으키는데 효과적인 약제로 알려진 NTP 펩티드의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 포유류에게 투여하는 것을 포함한다.

[0039] 본 발명의 펩티드는 신경 스레드 단백질(neural thread protein)의 종의 아미노산 서열의 일부에 해당하는 아미노산 서열을 하나 이상 함유한다. 본 발명의 조성물은 상기 펩티드 및 제약학적으로 허용가능한 담체, 또는 담체에 접합된 펩티드 등, 또는 중합체 매트릭스 내에 봉입된 펩티드를 포함한다.

[0040] 본 발명은 부분적으로는 본 발명자들이 해롭거나 원치않는 세포의 파괴 또는 제거에 유용한 약제라는 것을 발견한 AD7c-NTP에 포함된 펩티드 서열, 이들의 변형체 및 상동체가 인간 및 기타 포유류를 비롯한 다른 유기체에서도 발견된다는 것을 밝힌 것에 관한 것이다. 일단 펩티드 서열이 밝혀지면, 광범위하게 입수가 가능한 공개적이고 상업적인 단백질 데이터베이스, 예를 들어, 국립 센터 생명공학 정보의 단백질 데이터베이스 및 검색 프로그램, 예를 들면, 블라스트(등록상표) (베이직 로컬 얼라인먼트 검색 도구)를 통하여 당분야의 통상의 지식을 가진 자는 상기 단백질을 찾을 수 있다. 문헌[Altschul, Stephen F. , Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of 단백질 database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402] 참조.

[0041] 이어서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원에 기술된 분석시험법을 사용함으로써 원치않는 또는 해로운 세포의 파괴 또는 제거를 위한 약제로서의 효능을 결정함으로써 상기 단백질을 선별할 수 있다. 하나 이상의 효과적인 약제를 찾아낸 당분야의 통상의 지식을 가진 자는, 이어서, 상기 약제의 어느 부분이 본원에 기술된, 또는 2002년 5월 24일 자로 출원되어 계류 중인 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 명칭의 미국 특허 출원 제10/153,334호에 기술된 AD7c-NTP 펩티드 서열과 상동성이 있거나 유사한 서열을 포함하는지를 결정하고, 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 합성된 상기 약제의 상기 부분을 얻고, 원치않는 또는 해로운 세포의 파괴 또는 제거를 위한 약제로서의 효능에 대하여 합성된 약제를 시험할 수 있다. 또한, 당분야의 통상의 지식을 가진 자는 찾아낸 임의의 상기 단백질을, 본원에 기술된 또는 2002년 5월 24일 자로 출원되어 계류 중인 "종양 및 세포의 제거 또는 파괴를 필요로 하는 다른 질환의 치료에 효과적인 펩티드"라는 명칭의 미국 특허 출원 제10/153,334호에 기술된 AD7c-NTP 펩티드 서열과 비유사하거나, 또는 상동성이 있거나 유사한 다른 펩티드 서열을 결정하는데 사용할 수 있다. 이어서, 이러한 신규 합성된 서열은 원치않는 또는 해로운 세포의 파괴 또는 제거를 위하여 약제로서의 효능에 대하여 시험될 수 있다.

[0042] 본 발명의 펩티드 또는 단백질 ("세포 사멸 펩티드")은 단독으로 또는 담체 또는 항체에 접합되어 투여될 수 있다. 세포 사멸 단백질은 근육내, 경구, 정맥내, 복강내, 뇌내 (실질내), 뇌실내, 종양내, 병변내, 진피내, 경막내, 비내, 안내, 동맥내, 국소, 경피로, 에어로졸, 주입, 일시 주사, 이식 장치, 지연 방출 시스템 등을 통해 투여될 수 있다. 별법으로, NTP 펩티드는 유전자 변형 또는 다른 방법으로 인해, 펩티드를 발현하는 유전자를 투여하거나, 이러한 생산을 유도하는 백신을 투여하거나 또는 생체내에서 펩티드를 발현하는 세포, 박테리아 또는 바이러스를 도입함으로써 생체내에서 발현될 수 있다.

[0043] 또한, 세포 사멸 펩티드는 양성 및 악성 종양 및 다른 원하지 않거나 해로운 세포 성장을 치료하기 위한 다른 요법과 결합하여 사용될 수 있다. 상기 일반적 기재 및 하기 상세한 설명 모두는 예시적 및 설명적이고, 청구된 발명을 더 설명하기 위한 것이다. 다른 목적, 이점, 및 신규한 특징은 하기 발명의 상세한 설명으로부터 당

업자에게 명백할 것이다.

[0044] **도면의 간단한 설명**

- [0045] 도 1: AD7c-NTP 유전자 및 그 유전자의 AD7c-NTP 단백질 생성물의 완전한 아미노산 서열 및 핵산서열을 나타낸다 (미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호 및 제5,948,888호의 서열 120 및 121; NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAC08737; PID g3002527) [서열 번호 1].
- [0046] 도 2: 122 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 40; NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25447 PID g10048540) [서열 번호 2].
- [0047] 도 3: 112 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #XP\_032307 PID g15928971) [서열 번호 3].
- [0048] 도 4: 106 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질-유사 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAH14951 PID g15928971) [서열 번호 4].
- [0049] 도 5: 106 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 유사 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #XP\_039102 PID g18599339) [서열 번호 5].
- [0050] 도 6: 98 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 30; NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25445, PID g10048538) [서열 번호 6].
- [0051] 도 7: 75 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 48; NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25448, PID g10048541) [서열 번호 7].
- [0052] 도 8: 68 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 36; NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25446, PID g10048539) [서열 번호 8].
- [0053] 도 9: 61 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 유사 단백질의 완전한 아미노산 서열을 나타낸다 (NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAH02534, PID g12803421) [서열 번호 9].

[0054] **바람직한 실시태양의 상세한 설명**

- [0055] 본원에 사용된 용어 및 문구들은 달리 지시하지 않는 한 하기 나타낸 바와 같이 정의된다.
- [0056] "AD7c-NTP"라는 용어는 문헌 [de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100:3093-104 (1997)], 미국 특허 제5,948,634호, 제5,948,888호, 및 제5,830,670호의 서열 120 및 121, 및 진뱅크(GenBank) #AF010144에 기재된 ~41kD의 단백질 및 그를 코딩하는 유전자 및 핵산 서열을 지칭하고, 그에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 도 1에 기재된다. "AD7c-NTP"라는 용어는 또한 AD7c-NTP의 생물학적 활성 단편, 변이체, 유도체, 상동체 및 모방체를 포함한다.
- [0057] "NTP" 또는 "신경 스레드 단백질"이라는 용어는 신경 스레드 단백질 및 관련 분자 (척장 스레드 단백질을 포함) 및 상기 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 지칭하고, 하기 단백질 및 이 단백질에 대한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다 (그러나, 이에 한정되지는 않는다):
- [0058] (a) AD7c-NTP;
- [0059] (b) 미국 특허 제5,948,634호, 제5,948,888호, 제5,830,670호, 및 제6,071,705호 및 문헌 [de la Monte et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 55(10):1038-50 (1996), de la Monte et al., J. Neurol. Sci., 138(1-2):26-35 (1996); de la Monte et al., J. Neurol.Sci., 135(2):118-25 (1996), de la Monte et al., J. Clin. Invest., 100:3093-3104 (1997) and de la Monte et al., Alz.. Rep., 2:327-332 (1999)]에 기재된 ~42, ~26, ~21, ~17, ~14, 및 ~8 kD 종의 신경 스레드 단백질;
- [0060] (c) 아메리칸 타입 컬처 콜렉션, 마나사스(Manassas), Va.에 수탁 번호 HB-12546으로 기탁된 모노클로날 항체

#2 또는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션, 마나사스, Va.에 수탁 번호 HB-12545로 기탁되어 있는 모노클로날 항체 #5에 의해 특이적으로 인식되는 단백질;

- [0061] (d) AD7c-NTP 유전자에 의해 코딩되는 단백질;
- [0062] (e) 미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 40 및 NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25447, PID g10048540에 기재된 122 개의 아미노산 신경 스레드 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 2에 기재되어 있다);
- [0063] (f) NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #XP\_032307, PID g14725132에 기재되어 있는 112 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 3에 기재되어 있다);
- [0064] (g) NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAH14951 PID g15928971에 기재된 106 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질-유사 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 4에 기재되어 있다);
- [0065] (h) NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #XP\_039102, PID g18599339에 기재되어 있는 106 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 유사 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 5에 기재되어 있다);
- [0066] (i) 미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 30 및 NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25445, PID g10048538에 기재되어 있는 98 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 6에 기재되어 있다);
- [0067] (j) 미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 48 및 NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25448, PID g10048541에 기재되어 있는 75 개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 7에 기재되어 있다);
- [0068] (k) 미국 특허 제5,830,670호, 제5,948,634호, 및 제5,948,888호의 서열 36 및 NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAE25446, PID g10048539에 기재되어 있는 68개의 아미노산의 신경 스레드 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 8에 기재되어 있다);
- [0069] (l) NCBI 엔트레즈-단백질 수탁 번호 #AAH02534, PID g12803421에 기재되어 있는 61개의 아미노산의 신경 스레드 단백질-유사 단백질 (그에 대한 아미노산 서열은 도 9에 기재되어 있다);
- [0070] (m) 채장 스레드 단백질;
- [0071] (n) 미국 특허 제6,071,705호에 기재되어 있는 신경 채장 스레드 단백질 (nPTP); 및
- [0072] (o) 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁된 HB 9934, HB 9935, 및 HB 9936으로 이루어진 군으로부터의 하이브리도마에 의해 생산된 항체에 의해 특이적으로 인식되는 단백질.
- [0073] "NTP 펩티드"라는 용어는 NTP 또는 NTP의 단편의 아미노산 서열의 적어도 일부에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 지칭하고, 본원에서 달리 지시하지 않는 한 이러한 펩티드의 상동체, 유도체, 변이체, 융합 단백질 및 펩티드 모방체를 포함한다. "NTP 펩티드"라는 용어는 미국 특허 출원 제10/092,934호 및 제10/15334호에 구체적으로 열거된 펩티드를 포함한다 (그러나, 이에 한정되지 않는다). "NTP 펩티드"라는 용어는 또한 하기 NTP의 아미노산 서열을 포함하고 (그러나, 이에 한정되지는 않는다), 이들 구체적으로 열거된 NTP 펩티드의 상동체, 유도체, 변이체, 단편, 융합 단백질 및 펩티드 모방체 및 이의 해당 핵산 서열을 포함한다.
- [0074] a) NTP 펩티드 #1 [서열 번호 10], p228 이후 추가 페닐알라닌 잔기의 삽입을 갖는 AD7c-NTP p227-245와 유사함.
- PGFFKLFSCPSLLSSWDYRR  
Pro-Gly-Phe-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-  
Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0075]
- [0076] 핵산 서열 [서열 번호 10A]에 해당함
- CCCGGGTTCTTCAAGTTATTCTCCTGCCCCAGCCTCCTGAG  
TAGCTGGGACTACAGGCGC
- [0077]

- [0078] b) NTP 펩티드 #2 [서열 번호 11], AD7c-NTP p114-132  
 PELKQSTCLSLPKCWDYRR  
 Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-  
 Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0079]
- [0080] 핵산 서열 [서열 번호 11A]에 해당함  
 CCTGAGCTCAAGCAGTCCACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGT  
 GCTGGGATTACAGGCGT
- [0081]
- [0082] c) NTP 펩티드 #3 [서열 번호 12], AD7c-NTP p326-344  
 PPGLKRFSLSLPSSWDYDG  
 Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-  
 Trp-Asp-Tyr-Gly
- [0083]
- [0084] 핵산 서열 [서열 번호 12A]에 해당함  
 CCTCCCGGGCTCAAGCGATTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAA  
 GCAGCTGGGATTACGGG
- [0085]
- [0086] d) NTP 펩티드 #4 [서열 번호 13], AD7c-NTP p332-345  
 FSCLSLPSSWDYGH  
 Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His
- [0087]
- [0088] 핵산 서열 [서열 번호 13A]에 해당함  
 TTCTCCTGTCTCAGCCTCCCAAGCAGCTGGGATTACGGGC  
 AC
- [0089]
- [0090] e) NTP 펩티드 #5 [서열 번호 14], AD7c-NTP p119-132  
 STCLSLPKCWDYRR  
 Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0091]
- [0092] 핵산 서열 [서열 번호 14A]에 해당함  
 TCCACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC  
 GT
- [0093]
- [0094] f) NTP 펩티드 #6 [서열 번호 15], AD7c-NTP p232-245  
 FSCPSLLSSWDYRR  
 Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0095]
- [0096] 핵산 서열 [서열 번호 15A]에 해당함  
 TTCTCCTGCCCCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGC  
 GC
- [0097]
- [0098] g) NTP 펩티드 #7 [서열 번호 16], AD7c-NTP p335-343  
 LSLPSSWDY  
 Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly
- [0099]
- [0100] 핵산 서열 [서열 번호 16A]에 해당함  
 CTCAGCCTCCCAAGCAGCTGGGATTAC
- [0101]

- [0102] h) NTP 펩티드 #8 [서열 번호 17], AD7c-NTP p122-132  
LSLPKCWDYRR  
Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0103]
- [0104] 핵산 서열 [서열 번호 17A]에 해당함
- [0105] CTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGT
- [0106] i) NTP 펩티드 #9 [서열 번호 18], AD7c-NTP p236-245  
SLLSSWDYRR  
Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0107]
- [0108] 핵산 서열 [서열 번호 18A]에 해당함
- [0109] AGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCGC
- [0110] j) NTP 펩티드 #10 [서열 번호 19], N-말단에 류신 및 프롤린 잔기의 첨가를 갖는 AD7c-NTP p239-245  
LPSSWDYRR  
Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0111]
- [0112] 핵산 서열 [서열 번호 19A]에 해당함
- [0113] CTCCCAGAGTAGCTGGGACTACAGGCGC
- [0114] k) NTP 펩티드 #11 [서열 번호 20], AD7c-NTP p239-245  
SSWDYRR  
Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg
- [0115]
- [0116]
- [0117] 핵산 서열 [서열 번호 20A]에 해당함
- [0118] GAGTAGCTGGGACTACAGGCGC
- [0119] l) NTP 펩티드 #12 [서열 번호 21], AD7c-NTP p239-243, p339-343  
SSWDY  
Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr
- [0120]
- [0121]
- [0122] 핵산 서열 [서열 번호 21A]에 해당함
- [0123] AGCAGCTGGGATTAC
- [0124] m) NTP 펩티드 #13 [서열 번호 22], AD7c-NTP p239-245 + AD7c-NTP p139, 144  
SSWDYRRFILFPL  
Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu
- [0125]
- [0126] 핵산 서열 [서열 번호 22A]에 해당함
- [0127] GAGTAGCTGGGACTACAGGCGCTTTATTTTATTTTATTTT
- [0128] n) NTP 펩티드 #14 [서열 번호 23], AD7c-NTP p241-245 + AD7c-NTP p197-202  
WDYRRFIFNFL  
Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu
- [0129]
- [0130] 핵산 서열 [서열 번호 23A]에 해당함
- [0131] TGGGACTACAGGCGCTTTATTTTAAATTTTGTG

- [0132] o) NTP 펩티드 #15 [서열 번호 24], AD7c-NTP p279-302
- FNFCLF
- [0133] Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe
- [0134] 핵산 서열 [서열 번호 24A]에 해당함
- [0135] TTTAATTTTGTGTTT
- [0136] p) NTP 펩티드 #16 [서열 번호 25], AD7c-NTP p197-202
- FIFNFL
- [0137] Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu
- [0138] 핵산 서열 [서열 번호 25A]에 해당함
- [0139] TTTATTTTAAATTTTGTG
- [0140] q) NTP 펩티드 #17 [핵산 서열 26], AD7c-NTP p31-43
- [0141] PASASPVAGITGM
- [0142] Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Met
- [0143] 핵산 서열 [서열 번호 26A]에 해당함
- [0144] CCTGCCTCAGCCTCCCCAGTAGCTGGGATTACAGGCATG
- [0145] r) NTP 펩티드 #18 [서열 번호 27], AD7c-NTP p175-187
- [0146] PASASQVAGTKDM
- [0147] Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met
- [0148] 핵산 서열 [서열 번호 27A]에 해당함
- [0149] CCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACCAAAGACATG
- [0150] s) NTP 펩티드 #19 [서열 번호 28], AD7c-NTP p277-289
- [0151] PASASQSAGITGV
- [0152] Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val
- [0153] 핵산 서열 [서열 번호 28A]에 해당함
- [0154] CCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTG
- [0155] "단편"이라는 용어는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 아미노산 서열의 연속 부분서열로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭하고, 자연적으로 발생하는 생체내 프로테아제 활성화에 의해 생기는 단편 및 스플라이스 변이체와 같은 자연적으로 발생하는 단편을 포함한다. 이러한 단편은 아미노 말단, 카르복시 말단, 및(또는) 내부에서 (예를 들면 자연 스플라이싱에 의해) 절단될 수 있다. 이러한 단편은 아미노 말단 메티오닌을 포함하여 또는 포함하지 않고 제조될 수 있다. "단편"이라는 용어는 직접 또는 링커를 통해 함께 결합되고, 공통의 근접 아미노산 서열을 포함하거나 포함하지 않는, 같은 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드로부터의 동일하거나 상이한 단편을 포함한다.
- [0156] "변이체"라는 용어는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및(또는) 삽입이 존재하는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭하고, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 자연적으로 발생한 대립 변이체 또는 대체 스플라이스 변이체를 포함한다. "변이체"라는 용어는 펩티드 서열에서 유사하거나 상동성의 아미노산 또는 유사하지 않은 아미노산으로 하나 이상의 아미노산이 교체된 것을 포함한다. 아미노산을 유사하거나 상동성인 것으로 분류할 수 있는 많은 척도가 있다 ((Gunnar von Heijne, Sequence Analysis in Molecular Biology, p.123-39 (Academic Press, New York, NY 1987.)) 바람직한 변이체는 1 이상

의 아미노산 위치에서의 알라닌 치환을 포함한다. 다른 바람직한 치환은 단백질의 전체 순 전하, 극성 또는 소수성에 영향을 미치지 않거나 거의 미치지 않는 보존적 치환을 포함한다. 보존적 치환은 하기 표 2에 기재되어 있다.

[0157] <표 2>

[0158] 보존적 아미노산 치환

[0159]

|         |        |
|---------|--------|
| 염기성:    | 아르기닌   |
|         | 리신     |
|         | 히스티딘   |
| 산성:     | 글루탐산   |
|         | 아스파르트산 |
| 비하전 극성: | 글루타민   |
|         | 아스파라긴  |
|         | 세린     |
|         | 트레오닌   |
| 비극성:    | 티로신    |
|         | 페닐알라닌  |
|         | 트립토판   |
|         | 시스테인   |
|         | 글리신    |
|         | 알라닌    |
|         | 발린     |
|         | 프롤린    |
|         | 메티오닌   |
|         | 류신     |
|         | 이소류신   |

[0160] 표 3은 아미노산 치환의 다른 방법에 대해 기재한다.

[0161] <표 3>

| 본래의 잔기 | 치환            |
|--------|---------------|
| Ala    | gly; ser      |
| Arg    | lys           |
| Asn    | gln; his      |
| Asp    | glu           |
| Cys    | ser           |
| Gln    | asn           |
| Glu    | asp           |
| Gly    | ala; pro      |
| His    | asn; gln      |
| Ile    | leu; val      |
| Leu    | ile; val      |
| Lys    | arg; gln; glu |
| Met    | leu; tyr; ile |
| Phe    | met; leu; tyr |
| Ser    | thr           |
| Thr    | ser           |
| Trp    | tyr           |
| Tyr    | trp; phe      |
| Val    | ile; leu      |

[0162]

[0163] 다른 변이체는 덜 보존적인 아미노산 치환, 예를 들면 (a) 치환의 영역에서 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면, 시트 또는 나선형 입체 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지 하는데 미치는 효과가 더 현저히 다른 잔기를 선택하는 것과 같은 치환을 포함한다. 일반적으로 기능에 더 현저한 효과를 가질 것으로 기대되는 치환은 (a) 글리신 및(또는) 프롤린이 다른 아미노산으로 치환되거나 결실 또는 삽입된 경우; (b) 친수성 잔기, 예를 들면 세린, 트레오닐이 소수성 잔기, 예를 들면 류실, 이소류실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐 대신 (또는 이러한 잔기로) 치환되는 경우; (c) 시스테인 잔기가 다른 잔기 대신

(또는 다른 잔기로) 치환되는 경우; (d) 전기양성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면, 리실, 아르기닐 또는 히스티딜이 전기음성 전하를 갖는 잔기, 예를 들면 글루타미드 또는 아스파르틸 대신 (또는 이러한 잔기로) 치환되는 경우; 또는 (e) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들면 페닐알라닌이 그러한 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들면 글리신 대신 (또는 이러한 잔기로) 치환되는 경우이다. 다른 변이체는 신규 글리코실화 및(또는) 인산화 부위를 발생시키도록 디자인된 것, 또는 존재하는 글리코실화 및(또는) 인산화 부위가 결실되도록 디자인된 것을 포함한다. 변이체는 글리코실화 부위, 단백질해 절단 부위 및(또는) 시스테인 잔기에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 변이체는 또한 링커 펩티드 상의 NTP 또는 NTP 펩티드 아미노산 서열 전 또는 후에 추가적 아미노산 잔기를 갖는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 포함한다. 예를 들면, 시스테인 잔기를 아미노 및 카르복시 말단 모두에 첨가하여 디-설파이드 결합의 형성에 의해 NTP 펩티드가 고리화되게 할 수 있다. "변이체"라는 용어는 또한 NTP 펩티드의 3' 또는 5' 말단을 플랭킹하는 1 내지 25 개의 추가적 아미노산과 함께 NTP 펩티드의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0164] "유도체"라는 용어는 가공 및 다른 번역 후 변형과 같은 자연적 과정, 또한 예를 들면 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자, 슈가, 포스페이트 및(또는) 다른 이러한 분자의 첨가에 의한 것과 같은 화학적 변형 기술 (여기서, 분자 또는 분자들은 야생형 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드에 자연적으로 부착되지 않음)에 의해 화학적으로 변형된 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 유도체는 염을 포함한다. 이러한 화학적 변형은 기본 도서 및 좀더 상세한 모노그래프 뿐만 아니라 많은 연구 문헌에 잘 기재되어 있고, 당업자에게 공지되어 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 단백질 또는 폴리펩타이드의 몇몇 부위에 동일한 또는 다른 정도로 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 또한, 주어진 단백질 또는 폴리펩티드는 많은 유형의 변형을 포함할 수 있다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄, 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여 단백질 또는 폴리펩티드의 어디에서나 발생할 수 있다. 변형은 예를 들면 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 부분의 공유 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질해 과정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 히드록실화 및 ADP-리보실화, 셀레노일화, 황산화, 아미노산의 단백질에의 t-RNA 매개 부착, 예를 들면 아르기닐화 및 유비퀴틴화를 포함한다. 예를 들면, 문헌 [Proteins--Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects," pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) and Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging," Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)]을 참조하라. "유도체"라는 용어는 단백질 또는 폴리펩티드가 분지화되거나 분지화를 포함하거나 포함하지 않고 고리화되는 결과를 가져오는 화학적 변형을 포함한다. 고리화, 분지화 및 분지화된 원형 단백질 또는 폴리펩티드는 번역후 자연 과정으로부터 생길 수 있고 전체가 합성 방법에 의해 제조될 수도 있다.

[0165] "상동체"라는 용어는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 아미노산 서열이 60 퍼센트 이상 동일한 단백질을 의미하고, 2 개의 폴리펩티드의 아미노산의 위치의 유사성을 비교하기 위하여 통상적으로 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 두 개의 단백질 사이의 유사성 또는 동일성의 정도는 문헌 [Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo H. and Lipman, D., SIAM, J. Applied Math., 48:1073 (1988)]에 기재된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 공지된 방법에 의해 쉽게 계산할 수 있다. 동일성을 결정하기 위한 바람직한 방법은 시험된 서열 간의 가장 큰 매치를 제공하기 위하여 디자인된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 프로그램에서 조직화된다.

[0166] 두 서열 사이의 동일성 및 유사성을 결정하는데 유용한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA, (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990))을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. BLAST X 프로그램은 NCBI 및 다른 공급처로부터 공개적으로 입수할 수 있다 (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM

NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). 예를 들면, GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)과 같은 컴퓨터 알고리즘을 사용하여, 퍼센트 서열 동일성을 결정하려는 두 개의 단백질 또는 폴리펩티드가 각각의 아미노산의 최적의 매칭을 위하여 배열된다 (알고리즘에 의해 결정된 "매치된 스패 (matched span)").

[0167] 갭 오픈링 페널티 (평균 대각선의 3 배로서 계산됨; "평균 대각선"은 사용된 비교 행렬의 대각선의 평균이고, "대각선"은 특정 비교 행렬에 의해 각 완전 아미노산에 할당된 점수 또는 번호임) 및 갭 익스텐션 페널티 (보통 갭 오픈링 페널티의 1/10 배), 뿐만 아니라 PAM 250 또는 BLOSUM 62와 같은 비교 행렬이 알고리즘과 함께 사용된다. 표준 비교 행렬 (PAM250 비교 행렬에 대해서는 문헌 [Dayhoff et al. in: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 [1978] 참조; BLOSUM 62 비교 행렬에 대해서는 문헌 [Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 10915-10919 [1992]] 참조)이 또한 알고리즘에 의해 사용될 수 있다. 그 후 퍼센트 동일성이 알고리즘에 의해 계산된다. 상동체는 통상적으로 NTP 단백질 NTP 펩티드와 비교할 때 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 및(또는) 삽입을 가질 수 있다

[0168] "펩티드 모방체" 또는 "모방체"라는 용어는 펩티드 또는 단백질의 생물학적 활성을 모방하지만 화학적 성질상 펩티드가 아닌, 즉 펩티드 결합 (즉, 아미노산 사이의 아미드 결합)을 함유하지 않는 생물학적 활성 화합물을 지칭한다. 본원에서, 펩티드 모방체라는 용어는 유사-펩티드, 세미-펩티드 및 펩토이드와 같이 성질상 완전히 펩티드성은 아닌 분자를 포함하는 광의로 사용된다. 이 광의의 펩티드 모방체의 예 (펩티드의 일부가 펩티드 결합이 없는 구조에 의해 교체됨)는 하기에 기재한다. 완전한 또는 부분적 비-펩티드이던지 간에, 본 발명에 따른 펩티드 모방체는 펩티드 모방체가 기초로 하는 NTP 펩티드에서의 활성 기의 3차원적 배열과 매우 유사한 반응성 화학적 부분의 공간적 배열을 제공한다. 이 유사한 활성-부위의 기하학적 배열의 결과 펩티드 모방체는 NTP 펩티드의 생물학적 활성과 유사한 영향을 생물학적 시스템에 준다.

[0169] 본 발명의 펩티드 모방체는 바람직하게는 본원에 기재된 NTP 펩티드와 3차원적 형상 및 생물학적 활성 면 모두에서 실질적으로 유사하다. 펩티드 모방체를 만들기 위한 펩티드를 구조적으로 변형시키는 공지의 방법의 예는 특히 N-말단에서, 활성에 미치는 부정적 영향 없이 단백분해적 분해에 대한 안정성을 상승시킬 수 있는 D-아미노산 잔기 구조로 유도하는 골격 키랄 중심의 반전을 포함한다. 그 예는 문헌 ["Tritiated D-ala<sup>1</sup>-Peptide T Binding", Smith C. S. et al., Drug Development Res., 15, pp. 371-379 (1988)]에 기재되어 있다. 두번째 방법은 N에서 C로의 사슬간 이미드 및 락탐과 같이 안정성을 위해 고리 구조를 변경시키는 것이다 (Ede et al. in Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). 그 예는, 예를 들면 본원에 인용됨으로써 그 개시의 전체가 삽입되는 골드스타인, 지. (Goldstein, G.) 등의 미국 특허 제4,457,489호 (1985)에 개시되어 있는 것과 같은 입체구조적으로 제한된 티모펜틴-유사 화합물이다. 세번째 방법은 NTP 펩티드에서 펩티드 결합을 단백분해에 저항성을 부여하는 유사펩티드 결합에 의해 치환하는 것을 포함한다.

[0170] 다수의 유사펩티드 결합은 일반적으로 펩티드 구조 및 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 기재되었다. 이러한 접근의 한 예는 레트로-인버소 (retro-inverso) 유사펩티드 결합을 치환하는 것이다 (본원에 인용됨으로써 삽입되는 문헌 ["Biologically active retroinverso analogues of thymopentin", Sisto A. et al in Rivier, J. E. and Marshall, G. R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp.722-773 및 Dalpozzo, et al. (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41:561-566]). 이러한 변형에 따라, 펩티드의 아미노산 서열은 하나 이상의 펩티드 결합이 레트로-인버소 유사펩티드 결합에 의해 교체된다는 것을 제외하고 상기 NTP 펩티드의 서열과 동일할 수 있다. 바람직하게는, 대부분의 N-말단 펩티드 결합이 치환되는데, 이는 이러한 치환이 N-말단에 작용하는 엑소펩티다제에 의한 단백분해에 대한 저항성을 부여할 것이기 때문이다. 추가적 변형은 또한 유사한 구조의 다른 화합기와 아미노산의 화학기를 교체함으로써 만들어질 수 있다. 생물학적 활성의 손실은 없거나 거의 없으면서 효소적 절단에 대한 안정성을 상승시킨다고 알려진 다른 적절한 유사펩티드 결합은 환원된 등입체성 유사펩티드 결합이다 (Couder, et al. (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41:181-184, 그 전체가 본원에 인용됨으로써 삽입됨).

[0171] 따라서, 이 펩티드들의 아미노산 서열은 하나 이상의 펩티드 결합이 등입체성 유사펩티드 결합에 의해 교체되는 것을 제외하고 NTP 펩티드의 서열과 동일할 수 있다. 본 명세서에서 "아미노산 서열(들)"이라는 표현은 2개 이상, 바람직하게는 4개 이상, 더 바람직하게는 5개 이상의 아미노산 서열을 지칭하기 위해 사용된다. 바람직하게는 대부분의 N-말단 펩티드 결합이 치환되는데, 이는 이러한 치환이 N-말단에서 작용하는 엑소펩티다제에 의한 단백분해에 대한 저항성을 부여할 것이기 때문이다. 하나 이상의 환원된 등입체성 유사펩티드 결합을 갖는

펩티드의 합성은 공지되어 있다 (상기 인용된 문헌 [Couder, et al. (1993)]). 다른 예는 펩티드 결합을 교체하기 위한 케토메틸렌 또는 메틸설파이드 결합의 도입을 포함한다.

[0172] NTP 펩티드의 펩티드 유도체는 생물학적 활성에 중요한 구조적 결정자를 보유하지만, 펩티드 결합을 제거함으로써 단백질에 대한 저항성을 부여하는 다른 종류의 펩티드 모방체를 나타낸다 (Simon, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367-9371, 그 전체가 본원에 인용함으로써 삽입됨). 펩티드는 N-치환된 글리신의 올리고머이다. 각각 천연 아미노산의 측쇄에 해당하는 다수의 N-알킬기가 기재되었다 (상기 인용된 문헌 [Simon, et al. (1992)]). NTP 펩티드의 아미노산의 일부 또는 전부가, 교체된 아미노산에 해당하는 N-치환된 글리신으로 교체될 수 있다.

[0173] "펩티드 모방체" 또는 "모방체"라는 용어는 또한 하기하는 역-D 펩티드 및 에난티오머를 포함한다. "역-D 펩티드"라는 용어는 NTP 펩티드의 L-아미노산 서열과 비교하여 역순으로 배열된 D-아미노산으로 이루어진 생물학적 활성 단백질 또는 펩티드를 지칭한다. 따라서, L-아미노산 NTP 펩티드의 카르복시 말단 잔기는 D-아미노산 펩티드에 대한 아미노 말단이 되는 등이다. 예를 들면, NTP 펩티드, SSWDY는  $Y_d D_d W_d S_d$ 가 되고, 여기서  $D_d$ ,  $S_d$ ,  $W_d$ , 및  $Y_d$ 는 각각 L-아미노산인 D, S, W 및 Y에 상응하는 D-아미노산이다.

[0174] "에난티오머"라는 용어는 NTP 펩티드의 아미노산 서열에서 하나 이상의 L-아미노산 잔기가 상응하는 D-아미노산 잔기로 교체된 생물학적 활성 단백질 또는 펩티드를 지칭한다.

[0175] 본원에 기재된 아미노산 및 아미노산 잔기는 하기 표에 제공되는 인정된 1 또는 3-문자 코드에 따라 언급될 수 있다.

[0176] <표 1>

| 아미노산   | 1-문자 심볼 | 3-문자 심볼 |
|--------|---------|---------|
| 알라닌    | A       | Ala     |
| 아르기닌   | R       | Arg     |
| 아스파라긴  | N       | Asn     |
| 아스파르트산 | D       | Asp     |
| 시스테인   | C       | Cys     |
| 글루타민   | Q       | Gln     |
| 글루탐산   | E       | Glu     |
| 글리신    | G       | Gly     |
| 히스티딘   | H       | His     |
| 이소류신   | I       | Ile     |
| 류신     | L       | Leu     |
| 리신     | K       | Lys     |
| 메티오닌   | M       | Met     |
| 페닐알라닌  | F       | Phe     |
| 프롤린    | P       | Pro     |
| 세린     | S       | Ser     |
| 트레오닌   | T       | Thr     |
| 트립토판   | W       | Trp     |
| 티로신    | Y       | Tyr     |
| 발린     | V       | Val     |

[0178] 본 발명은 앞에서 정의한 NTP 펩티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 바람직한 NTP 펩티드는 AD7c-NTP에서 유래한 NTP 펩티드와 유사하거나 상동성이 있는 것이다. 그러나 다른 종류의 NTP 단백질 일부나 단편에 바탕을 두고 있는 NTP 펩티드를 사용하는 것도 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들면, AD7c-NTP 펩티드 서열 및 이와 유사한 변이체 및 상동체는 광범위한 인간 및 비인간 단백질("동종 단백질")에서도 발견된다. 특히 AD7c-NTP 유전자는 Alu 타입 서열을 포함하고 있는데, 이것은 인간 및 다른 영장류의 게놈에 있는 다른 유전자에서 발견되는 것들과 매우 유사하다.

[0179] 따라서 동종 단백질의 전부는 아니라 하더라도 그 일부는 AD7c-NTP 펩티드("동종 펩티드")와 상동성이 있거나 매우 유사한 펩티드 서열을 포함하고 있기 때문에 세포를 파괴할 수 있는 매우 효과적인 제제일 것이라고 예상할 수 있다. 마찬가지로 당업자라면 세포를 파괴할 수 있는 유용한 제제라 판명된 임의의 동종 단백질의 아미

노산 서열에 기초하여 특정 동종 펩티드를 합성할 수 있고, 이것들이 세포 파괴에 효과가 있는 지 시험해 볼 수 있다.

- [0180] 세포 파괴에 유효한 제제라 밝혀진 동종 단백질에서 유래한 다른 펩티드 서열들도 또한 세포 파괴에 유용한 제제가 될 수 있다. 당업자라면 다른 유효 펩티드 서열을 동정하기 위해 과도한 실험을 하지 않고도 동종 단백질의 전체 아미노산 서열을 연결하는 유효 동종 단백질 단편을 합성할 수 있다.
- [0181] 본 발명의 바람직한 NTP 펩티드는 NTP 펩티드 서열과 동일하거나, 매우 유사하거나, 또는 상동성이 있는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 알려진 단백질 및 펩티드를 포함한다.
- [0182] NTP 펩티드 및 그 단편, 변이체, 유도체, 상동체 및 모방체는 본 발명에 포함되는 것들이고, 당업자에게 공지된 방법, 예를 들면, 재조합 DNA 기술, 단백질 합성 및 자연 발생 NTP 펩티드 및 그 단편, 변이체, 유도체 및 상동체의 분리를 사용하여 제조할 수 있다.
- [0183] NTP 펩티드는 공지의 재조합 DNA 기술 방법, 예를 들면 문헌 [Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.[1989]) 및(또는) Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, N. Y. [1994])에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0184] NTP 펩티드를 코딩하는 유전자 또는 cDNA는 예를 들면 게놈 또는 cDNA 라이브러리를 스크리닝 함으로써, 또는 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 라이브러리를 스크리닝하는데 유용한 탐침 또는 프라이머는 동일하거나 관련된 군의 유전자로부터의 다른 공지의 유전자 또는 유전자 단편, 예를 들면 다른 NTP 펩티드 또는 NTP 단백질에서 발견되는 보존된 모티프에 대한 서열 정보에 기초하여 생성시킬 수 있다. 또한, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자가 한 종으로부터 확인된 경우, 그 유전자의 전부 또는 일부는 다른 종으로부터 상동성 유전자를 확인하기 위한 탐침으로서 사용될 수 있다. 탐침 또는 프라이머는 NTP 유전자를 발현한다고 생각되는 다양한 조직 공급원으로부터의 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위하여 사용할 수 있다. 통상적으로, 스크리닝으로부터 얻는 거짓 양성 수를 최소화하기 위하여 고도의 엄격성 (stringency) 조건을 사용할 것이다.
- [0185] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자를 제조하기 위한 다른 방법은 당업자에게 공지된 방법, 예를 들면 문헌 [Engels et al. (Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 [1989])]에 기재된 방법을 사용하는 화학 합성을 사용하는 것이다. 이 방법은 특히, 핵산 합성을 위한 포스포트리에스테르, 포스포라미디트, 및 H-포스포네이트 방법을 포함한다. 이러한 화학 합성을 위한 바람직한 방법은 표준 포스포라미디트 화학을 사용하는 중합체-지지 (polymer-supported) 합성이다. 통상적으로, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 DNA는 그 길이가 수백 뉴클레오타이드일 것이다. 약 100개의 뉴클레오타이드보다 큰 핵산은 이 방법을 사용하여 수 개의 단편으로서 합성될 수 있다. 그 후 단편을 함께 라이게이션하여 전장 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 형성할 수 있다. 보통, 단백질의 아미노 말단을 코딩하는 DNA 단편은 메티오닌을 코딩하는 ATG를 가질 것이다. 이 메티오닌은 숙주 세포에서 생산된 펩티드가 그 세포에서 분비되도록 디자인되는지의 여부에 따라, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 성숙된 형태에 존재하거나 존재하지 않을 수 있다.
- [0186] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자, cDNA 또는 그의 단편을 통상적인 표준 라이게이션 기술을 사용하여 적절한 발현 또는 증폭 벡터로 삽입할 수 있다. 벡터는 통상적으로 사용된 특정 숙주 세포에서 기능을 갖도록 선택된다 (즉, 벡터는 유전자의 증폭 및(또는) 유전자의 발현이 일어날 수 있도록 숙주 세포 기구에 적합하다). NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자, cDNA 또는 그의 단편은 원핵, 효모, 곤충 (바큘로바이러스 시스템) 및(또는) 진핵 숙주 세포에서 증폭/발현될 수 있다. 숙주 세포의 선택은 NTP 단백질 또는 펩티드가 글리코실화 및(또는) 인산화될 것인지에 부분적으로 의존할 것이다. 그렇다면, 효모, 곤충, 또는 포유류 숙주 세포가 바람직하다.
- [0187] 통상적으로, 모든 숙주 세포에서 사용되는 벡터는 적어도 5' 플랭킹 서열 (또한 "프로모터"로 지칭됨) 및 다른 조절 요소 뿐만 아니라 인핸서(들), 복제 기원 요소, 전사 종결 요소, 공여체 및 수용체 절단 부위를 포함하는 완전 인트론 서열, 신호 펩티드 서열, 리보솜 결합 부위 요소, 폴리아데닐화 서열, 발현되는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역 및 선택가능한 마커 요소를 포함할 수 있다. 이들 각각의 요소는 하기 논의되는 바와 같다. 임의로, 벡터는 "태그(tag)" 서열(즉, NTP 단백질 코딩 서열의 5' 또는 3'에 위치하는 올리고뉴클레오타이드 분자, 여기서 올리고뉴클레오타이드 분자는 polyHis (예: hexaHis)를 코딩함) 또는 FLAG, HA (헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스) 또는 상업적으로 입수가 가능한 항체가 존재하는 myc와 같은 다른 "태그"를 포함할 수 있다. 상기 태그는 통상적으로 폴리펩티드의 발현에 따라서 폴리펩티드에 융합되고, 숙주 세포로부터

터 NTP 단백질 또는 NTP펩티드의 친화도 정제에 대한 수단으로 사용될 수 있다. 친화도 정제는 예를 들면, 친화도 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용한 칼럼 크로마토그래피에 의해서 수행될 수 있다. 임의로, 태그는 후속적으로 특정 펩티다제를 사용하는 등의 다양한 수단에 의해 정제된 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드로부터 제거될 수 있다.

[0188] 인간 면역글로불린 힌지(hinge) 및 Fc 영역은 당업자에 의해 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 이후의 Fc-융합 단백질은 단백질 A 친화도 칼럼을 사용하여 정제될 수 있다. Fc는 생체 내에서 긴 약동학적 반감기를 나타내는 것으로 알려져 있으며, Fc에 융합된 단백질은 융합되지 않은 대응부 보다 생체내에서 실질적으로 더 큰 반감기를 나타내는 것이 발견되었다. 또한, Fc 영역에의 융합은 일부 분자의 생활성에 유용할 수 있는 분자의 이합체화/다중합체화를 가능하게 한다.

[0189] 5' 플랭킹 서열은 상동성(즉, 숙주 세포와 동일한 종 및(또는) 균주로부터 유래), 이종성(즉, 숙주 세포 종 또는 균주와 다른 종으로부터 유래), 하이브리드(즉, 1 보다 많은 기원으로부터의 5' 플랭킹 서열의 조합), 합성적일 수 있거나, 천연 NTP 단백질 또는 펩티드 유전자 5' 플랭킹 서열일 수 있다. 이와 같이, 5' 플랭킹 서열의 기원은 단일세포성 원핵 또는 진핵 유기체, 임의의 척추동물 또는 비척추동물 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있으며, 여기서 단 5' 플랭킹 서열이 그 중에서 기능성이고, 숙주 세포 기관에 의해 활성화될 수 있는 것을 조건으로 한다.

[0190] 본 발명의 벡터에서 유용한 5' 플랭킹 서열은 당업계에 공지된 여러 방법 중 임의의 것에 의해서 얻을 수 있다. 통상적으로, NTP 유전자 플랭킹 서열 이외의 본원에서 유용한 5' 플랭킹 서열은 매핑에 의해서 및(또는) 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 이미 동정되었을 수 있으며, 따라서 적합한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적합한 조직 기원으로부터 단리될 수 있다. 일부 경우, 5' 플랭킹 서열의 전체 뉴클레오티드 서열을 알 수 있다. 여기서, 5' 플랭킹 서열은 핵산 합성 또는 클로닝에 대하여 상기 기술된 방법을 사용하여 합성될 수 있다.

[0191] 5' 플랭킹 서열 전부 또는 부분만이 알려진 경우, 이는 PCR을 사용하여 및(또는) 적합한 올리고뉴클레오티드 및(또는) 동일 또는 다른 종의 5' 플랭킹 서열 단편으로 게놈 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해서 얻을 수 있다.

[0192] 5' 플랭킹 서열이 알려지지 않은 경우, 5' 플랭킹 서열을 포함하는 DNA의 단편은 예를 들면, 코딩 서열 또는 나아가 다른 유전자 또는 유전자를 함유할 수 있는 더 큰 조각의 DNA로부터 단리될 수 있다. 단리는 적합한 DNA 단편을 단리하기 위하여 1 이상의 조심스럽게 선택된 효소를 사용하여 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해서 수행될 수 있다. 소화 후, 요망되는 단편은 아가로스 겔 정제, 퀴아젠(Qiagen(등록상표)) 칼럼 또는 다른 당업자들에게 공지된 방법에 의해서 단리될 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위해 적당한 효소의 선택은 당업자들이 용이하게 이해할 수 있을 것이다.

[0193] 복제 기원 요소는 통상적으로 상업적으로 입수한 원핵 발현 벡터의 일부이고, 숙주 세포에서 벡터의 증폭을 보조한다. 특정 카피 수로의 벡터의 증폭은 일부 경우 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 최적 발현에 중요할 수 있다. 선택한 벡터가 복제 기원 부위를 포함하지 않는 경우, 공지된 서열에 기초하여 화학적으로 합성하고 벡터로 리게이션할 수 있다. 전사 종결 요소는 통상적으로 NTP 단백질 또는 NTP펩티드 코딩 서열의 말단의 3'에 위치하고, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 전사를 종결하도록 작용한다. 통상적으로, 원핵 세포의 전사 종결 요소는 G-C가 풍부한 단편 및 이에 이어지는 폴리 T 서열이다. 상기 요소는 라이브러리로부터 용이하게 클로닝하거나 또는 나아가 벡터의 일부로서 상업적으로 구입되지만, 이는 또한 상기 기술된 바와 같은 핵산 합성에 대한 방법을 사용하여 용이하게 합성될 수 있다.

[0194] 선택가능한 마커 유전자 요소는 선택적 배양 배지 중에서 성장하는 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 통상적인 선택 마커 유전자는 (a) 원핵 숙주 세포에 대한 항생제 또는 다른 독소(예: 암피실린, 테트라시클린 또는 카나마이신)에 내성을 부여하거나, (b)세포의 보충 자가영양 결핍, 또는 (c) 완전 배지에서 이용가능하지 않은 결정적 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다. 바람직한 선택가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라시클린 내성 유전자이다.

[0195] 통상적으로 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열 (원핵) 또는 코작(Kozak) 서열 (진핵)으로 지칭되는 리보솜 결합 요소는 통상적으로 mRNA의 해독 개시에 필요하다. 상기 요소는 통상적으로 합성되는 NTP 단백질의 프로모터에 대한 3' 및 코딩 서열에 대한 5'에 위치한다. 샤인-달가노 서열은 다양하나, 통상적으로 폴리퓨린(즉, 높은 A-G 함량을 가짐)이다. 많은 샤인-달가노 서열이 동정되었고, 이들 각각은 상기 기술되고 원핵 벡터에 사용되는 방법을 사용하여 용이하게 합성될 수 있다.

- [0196] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 숙주 세포로부터 분리되는 것이 요망되는 경우에, 신호 서열을 사용하여 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 합성되는 숙주 세포 외부로 향하게 할 수 있고, 막 고정화를 예방하기 위하여 단백질의 카르복시 말단 부부를 결손시킬 수 있다. 통상적으로, 신호 서열은 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 또는 cDNA의 코딩 영역 중, 또는 직접적으로 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 코딩 영역의 5' 말단에 위치한다. 많은 신호 서열이 동정되었고, 이들 중 선택된 숙주 세포에서 기능성인 것 모두가 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 또는 cDNA와 함께 사용될 수 있다. 따라서, 신호 서열은 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 또는 cDNA에 상동성 또는 이종성일 수 있고, NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 또는 cDNA에 대하여 상동성 또는 이종성일 수 있다. 또한, 신호 서열은 상기 기술된 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 대부분의 경우, 신호 펩티드의 존재를 통한 숙주 세포로부터의 폴리펩티드의 분비는 폴리펩티드로부터 아미노 말단 메티오닌의 제거를 초래할 수 있다.
- [0197] 많은 경우, NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 또는 cDNA의 전사는 벡터 중 1 이상의 인트론의 존재에 의해 증가될 수 있고, 특히 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 진핵 숙주 세포, 특히 포유동물 숙주 세포에서 생산되는 경우 그러하다. 사용되는 인트론은, 특히 사용되는 유전자가 전장(full length) 게놈 서열 또는 이의 단편인 경우 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자 내에서 천연적으로 발생될 수 있다. 인트론이 유전자 내에서 천연 발생되지 않는 경우 (대부분의 cDNA에 대한 경우), 인트론은 다른 원천으로부터 얻을 수 있다. 인트론은 전사되어 효과를 나타내어야 하므로 플랭킹 서열 및 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자에 대한 인트론의 위치는 상대적으로 중요하다. 이와 같이, 발현 벡터 내로 삽입된 NTP 단백질/NTP 펩티드 유전자가 cDNA 분자인 경우, 인트론에 대한 바람직한 위치는 전사 개시 부위에 대한 3' 및 폴리A 전사 종결 서열에 대한 5'이다. 바람직하게는, NTP 단백질/NTP 펩티드 cDNA에 대하여, 인트론 또는 인드론들은 cDNA의 한 쪽 또는 다른 쪽 (즉, 5' 또는 3')에 위치하여 상기 코딩 서열을 방해하지 않게할 수 있다. 모든 바이러스성, 원핵 및 진핵 (식물 또는 동물) 유기체를 비롯한 모든 원천으로부터의 모든 인트론을 사용하여 본 발명을 실시할 수 있으나, 단 이는 삽입되는 숙주 세포와 상용성일 것을 조건으로 한다. 또한 합성 인트론을 포함한다. 임의로, 1 보다 많은 인트론이 벡터에서 사용될 수 있다.
- [0198] 상기 기술된 1 이상의 요소가 사용되는 벡터 중에 존재하지 않는 경우, 이들을 개별적으로 획득하고 벡터 내로 리게이션할 수 있다. 각각의 요소를 얻기 위해 사용되는 방법은 당업자들에게 공지이고, 상기 기술된 방법(즉, DNA의 합성, 라이브러리 스크리닝 등)과 동등하다.
- [0199] 본 발명을 실시하기 위하여 사용되는 최종 벡터는 상업적으로 입수가 가능한 벡터와 같은 출발 벡터로부터 구성될 수 있다. 상기 벡터는 완전한 벡터 중에 포함되는 요소의 일부를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 요망되는 요소 모두가 출발 벡터에 존재하지 않는 경우, 리게이션되는 요소의 말단 및 벡터의 말단이 리게이션에 적합하도록 벡터를 적합한 제한 엔도뉴클레아제로 절단하는 것에 의하여 각 요소를 개별적으로 벡터로 리게이션할 수 있다. 일부 경우, 만족한 리게이션을 얻기 위하여 함께 리게이션되는 말단을 "무디게 하는 것(blunt)"이 필요할 수 있다. 무디게 하는 것은 모든 4개의 뉴클레오타이드의 존재하에서 클레노우(Klenow) DNA 폴리머라제 또는 T4 DNA 폴리머라제를 사용하여 "점착성 말단(sticky end)"을 먼저 충전하는 것에 의해 달성된다. 상기 방법은 당업계에 공지이고, 예를 들면 삼브룩 등의 상기 문헌에 기술되어 있다. 별법으로, 벡터내로 삽입되는 2 이상의 요소는 먼저 함께 리게이션되고 (이들이 서로 인접하여 위치하는 경우), 이어서 벡터로 리게이션될 수 있다.
- [0200] 벡터를 구성하기 위한 한가지 다른 방법은 한 반응 혼합물 중에서 동시에 다양한 요소의 모든 리게이션을 수행하는 것이다. 여기서, 요소의 부적당한 리게이션 또는 삽입으로 인하여 많은 넌센스(nonsense) 또는 비기능성 벡터가 생성될 수 있으나, 기능성 벡터는 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 확인 및 선택될 수 있다.
- [0201] 본 발명을 실시하기 위한 바람직한 벡터는 세균, 곤충 및 포유동물 숙주 세포와 상용성인 것들이다. 상기 벡터는 특히 pCRII, pCR3 및 pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET15b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen) 및 pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.)을 포함한다.
- [0202] 벡터를 구성하고 전장 또는 절단된(truncated) NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 벡터의 적합한 위치로 삽입한 후, 완성된 벡터는 증폭 및(또는) 폴리펩티드 발현을 위한 적당한 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 숙주 세포는 원핵 숙주 세포(예: 대장균(E. coli)) 또는 진핵 숙주 세포(예: 효모 세포, 곤충 세포 또는 식물 세포)일 수 있다. 적합한 조건하에서 배양하는 경우 숙주 세포는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 합성할 수 있고, 이는 후속적으로 배양 배지로부터(숙주 세포가 이를 배지로 분리하는 경우) 또는 이를 생산하는 숙주 세포로부터 직접(분리되지 않는 경우) 수집될 수 있다.

- [0203] 수집 후, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 분자체 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등과 같은 방법을 사용하여 정제될 수 있다. NTP 단백질 또는 NTP 펩티드 생산을 위한 숙주 세포의 선택은 부분적으로 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 글리코실화 또는 포스포릴화 (이러한 경우 진핵 숙주 세포가 바람직함)되는지 여부 및 숙주 세포가 단백질을 이의 천연 3차 구조(예를 들면, 디설피드 가교의 적합한 배향 등)로 "주름형성(fold)"하여 생물학적으로 활성인 단백질이 생물학적 활성을 갖는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드에 의해 제조될 수 있고, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 하기 논의하는 바와 같은 적합한 화학적 조건을 사용하여 합성 후 "주름형성"될 수 있는 방식에 의존할 수 있다. 적당한 세포 또는 세포주는 포유동물 세포, 예를 들면, 차이니스 햄스터 난소 세포 (Chinese hamster ovary cells; CHO), 인간 배아 신장(human embryonic kidney: HEK) 293 또는 293T 세포 또는 3T3 세포이다. 적당한 포유동물 숙주 세포의 선택 및 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 생성물 생산 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있다. 다른 적당한 포유동물 세포는 원숭이 COS-1 및 COS-7 세포주 및 CV-1 세포주이다. 나아가, 포유동물 숙주 세포의 예로는 영양류 세포주 및 설치류 세포주(형질변화된 세포주를 포함함)을 들 수 있다. 정상 이배체 세포, 일차 조직의 생체내 배양으로부터 유도된 세포주 뿐만 아니라 일차 이식편 또한 적당하다. 후보 세포는 선택 유전자에서 유전자형 결정될 수 있거나, 또는 우세하게 작용하는 선택 유전자를 포함할 수 있다. 다른 적당한 포유동물 세포주는 생쥐 신경모세포종 N2A 세포, HeLa, 생쥐 L-929 세포, 스위스(Swiss), Balb-c 또는 NIH 생쥐, BHK 또는 HaK 햄스터 세포주로부터 유도된 3T3 주를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0204] 본 발명에 대하여 숙주 세포로 유사하게 유용한 것은 세균 세포이다. 예를 들면, 대장균(*E. coli*)의 다양한 주 (strain) (예를 들면, HB101, DH5.alpha., DH10 및 MC1061)은 바이오테크놀로지 분야에서 숙주 세포로서 잘 알려져 있다. 비. 서브틸리스(*B. subtilis*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* spp.), 다른 바실러스 종(*Bacillus* spp.), 스테프토마이세스 종(*Streptomyces* spp.) 등의 다양한 균주 또한 본 방법에서 이용될 수 있다. 당업자들에게 공지된 많은 균주의 효모 세포 또한 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위한 숙주 세포로 이용가능하다.
- [0205] 또한, 요망되는 경우, 곤충 세포 시스템을 본 발명의 방법에서 이용할 수 있다. 상기 시스템은 키츠(Kitts) 등의 문헌[Biotechniques, 14:810-817 (1993)], 루크로우(Lucklow)의 문헌[Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572 (1993)] 및 루크로우 등의 문헌[J. Virol., 67:4566-4579 (1993)]에 기술되어 있다. 바람직한 곤충 세포는 Sf-9 및 Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)이다.
- [0206] 선택된 숙주 세포로의 벡터의 삽입(또한 "형질전환" 또는 "트랜스펙션"으로 지칭됨)은 칼슘 클로라이드, 일렉트로포레이션, 미세주사, 리포펙션 또는 DEAE-텍스트란 방법과 같은 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로 사용되는 숙주 세포 유형의 작용일 수 있다. 이들 방법 및 다른 적당한 방법은 당업자들에게 공지이고, 예를 들면 삼브룩 등의 상기 문헌에 나타나 있다.
- [0207] 벡터를 포함하는 숙주 세포(즉, 형질전환 또는 트랜스펙션된 숙주 세포)는 당업자들에게 잘 알려진 표준 배지를 사용하여 배양될 수 있다. 배지는 통상적으로 세포의 성장 및 생존에 필요한 모든 영양소를 포함할 수 있다. 대장균(*E. coli*) 세포를 배양하기 적당한 배지는 예를 들면, 루리아 브로쓰(Luria Broth; LB) 및(또는) 테리픽 브로쓰(Terrific Broth; TB)이다. 진핵 세포를 배양하기 적당한 배지는 RPMI 1640, MEM, DMEM이고, 이들은 배양되는 특정 세포주에 의해 요구되는 바와 같이 혈청 및(또는) 성장 인자로 보충될 수 있다. 곤충 배양에 적당한 배지는 필요에 따라 이스틀레이트(yeastolate), 락트알부민 가수분해물 및(또는) 우테아 혈청으로 보충된 그레이스 배지(Grace's medium)이다. 통상적으로, 형질전환된 세포만의 선택적 성장에 유용한 항생제 또는 다른 화합물이 배지에 보충물로 첨가된다. 사용되는 화합물은 숙주 세포를 형질전환시킨 플라스미드 상에 존재하는 선택가능한 마커 요소에 의해 지정될 수 있다. 예를 들면, 선택가능한 마커 요소가 카나마이신 내성인 경우, 배양 배지에 첨가되는 화합물은 카나마이신일 수 있다.
- [0208] 숙주 세포에서 생산되는 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 양은 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 상기 방법은 웨스턴 블롯 분석, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 비변성 겔 전기영동, HPLC 분리, 질량 분광분석, 면역침전 및(또는) DNA 결합 겔 쉬프트 검정과 같은 활성 검정을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0209] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 숙주 세포로부터 분리되도록 고안된다면, 대부분의 NTP 단백질 또는 펩티드는 세포 배양 배지 중에서 발견될 수 있다. 이 방법으로 제조된 단백질은 통상적으로 아미노산 말단 메티오닌을 갖지 않는데, 이는 세포로부터 분리 도중에 제거되기 때문이다. 그러나, NTP 단백질 또는 펩티드가 숙주 세포로부터 분리되지 않는다면, (진핵 숙주 세포에 대해서는) 세포질 및(또는) 핵 중에 또는 (그람 음성 세균 숙주 세포에 대해서는) 시토플 중에 존재하고, 아미노 말단 메티오닌을 가질 수 있다.
- [0210] 숙주 세포 세포질 및(또는) 핵에 위치한 NTP 단백질 또는 펩티드의 경우, 숙주 세포를 통상적으로 먼저 기계적

으로 또는 세제를 사용하여 분쇄하여 세포내 내용물을 완충 용액으로 방출한다. 이어서, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 상기 용액으로부터 분리될 수 있다.

[0211] 용액으로부터의 NTP 단백질 또는 펩티드의 정제는 다양한 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 단백질이 헥사히스티딘 (NTP 단백질/hexaHis)와 같은 태그(tag) 또는 FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) 칼모듈린 결합 펩티드 (Stratagene, La Jolla, CA)와 같은 다른 작은 펩티드를 카르복시 또는 아미노 말단에 함유하도록 합성된다면, 이는 칼럼 매트릭스가 태그 또는 단백질에 직접적으로 높은 친화도를 갖는(즉, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 특이적으로 인식하는 모노클로날 항체) 친화도 칼럼을 통하여 용액을 통과시키는 것에 의해 일 단계 방법으로 분배 정제될 수 있다. 예를 들면, 폴리히스티딘은 니켈, 아연 및 코발트에 높은 친화도 및 특이성으로 결합하고, 따라서 니켈 기재 친화도 수지('Qiagen's QIAexpress system' 또는 'Invitrogen's Xpress System'에서 사용된 것과 같은) 또는 코발트 기재 친화도 수지('BD Biosciences-CLONTECH's Talon system'에서 사용된 것과 같은)를 이용하는 고정화 금속 이온 친화도 크로마토그래피를 NTP 단백질/polyHIs의 정제에 사용할 수 있다 (예를 들면, 아우수벨(Ausubel) 등의 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)]을 참조).

[0212] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 부착된 태그 없이 제조되고 항체가 이용가능하지 않은 경우, 다른 공지된 정제 방법이 사용될 수 있다. 상기 방법은 제한됨이 없이 이온 교환 크로마토그래피, 히드록시에퍼타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, HPLC, 겔 용리를 병행한 천연 겔 전기영동 및 예비 등전 집속 ("이소프라임(Isoprime)" 기계/기술, 호에퍼 사이언티픽(Hoefer Scientific))을 포함한다. 일부 경우, 상기 기술 2 이상을 병용하여 증가된 순도를 달성할 수 있다.

[0213] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 주로 세포내에서 발견될 것으로 예상된다면, 세포내 물질 (그람 음성 세균에 대한 봉입체를 포함함)은 당업자들에게 공지된 임의의 표준 기술을 사용하여 숙주 세포로부터 추출될 수 있다. 예를 들면, 프렌치 프레스(French press), 균질화 및(또는) 초음파분해 이어서 원심분리에 의해서 숙주 세포를 용해하여 원형질막 주위공간/세포질의 내용물을 방출할 수 있다. NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 시토졸 중 봉입체를 형성한다면, 봉입체는 종종 내부 및(또는) 외부 세포막에 결합될 수 있고, 따라서 원심분리 후 펠렛 물질 중에서 주로 발견될 수 있다. 이어서, 펠렛 물질은 pH 극단치에서, 또는 세제, 구아니딘, 구아니딘 유도체, 우레아 또는 우레아 유도체와 같은 카오트로픽제(chaotropic agent)로 알칼리성 pH에서의 디티오프레이톨 또는 산성 pH에서 트리스 카르복시에틸 포스핀과 같은 환원제의 존재하에서 처리되어 봉합체를 방출하고, 부수고 용해할 수 있다. 이제 용해 형인 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 이어서 겔 전기영동, 면역침전 등을 사용하여 분석될 수 있다. NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 분리하는 것이 요망된다면, 분리는 하기 및 마르스톤(Marston) 등의 문헌[Meth. Enz., 182:264-275 (1990)]에 나타난 바와 같은 표준 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0214] 일부 경우, NTP 단백질 또는 펩티드는 단리시 생물학적으로 활성이 아닐 수 있다. 폴리펩티드를 그의 3차 구조로 다시접거나(refolding)" 또는 전환시키고 디설피드 결합을 형성하는 다양한 방법을 사용하여 생물학적 활성을 회복시킬 수 있다. 상기 방법은 가용화된 폴리펩티드를 통상적으로 7보다 높은 pH에 특정 농도의 카오트로프(chaotrope)의 존재하에서 노출시키는 것을 포함한다. 카오트로프의 선택은 봉합체 가용화에 사용되는 선정되는 것들과 매우 유사하나 통상적으로 더 낮은 농도에서이고, 가용화에 사용되는 것과 반드시 동일한 카오트로프인 것은 아니다. 대부분의 경우, 재접힘/산화 용액은 또한 환원제 또는 특정비의 환원제 및 그의 산화된 형태를 포함함으로써 디설피드 서플링이 단백질의 시스테인 가교의 형성시 일어날 수 있도록 하는 특정 산화환원 전위를 발생시킬 수 있다. 통상적으로 사용되는 산화환원 쌍의 일부는 시스테인/시스테인, 글루타티온(GSH)/디티오비스 GSH, 염화제2구리, 디티오프레이톨(DTT)/디티안 DTT, 2-메르캅토에탄올(bME)/디티오-b(ME)를 포함한다. 많은 예에서, 재접힘의 효율을 증가시키기 위하여 공용매가 필요할 수 있고, 상기 목적으로 보다 통상적으로 사용되는 시약으로는 글리세롤, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜 및 아르기닌을 들 수 있다.

[0215] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드 봉합체가 숙주 세포에서 상당한 정도로 형성되지 않는 경우, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 세포 균질물의 원심분리 후 상층액 중에서 주로 발견될 수 있으며, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 하기 기술하는 바와 같은 방법을 사용하여 상층액으로부터 분리될 수 있다.

[0216] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드를 부분적으로 또는 완전히 분리하는 것이 바람직한 경우에는, 정제는 당업자들에게 공지된 표준 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법에는 전기영동 후 전기용리에 의한 분리, 다양한 유형의 크로마토그래피 (면역친화, 분자체 및(또는) 이온 교환), 및(또는) 고압 액체 크로마토그래피가 포함된다(단, 이들로 제한되는 것은 아님). 일부 경우, 완전한 정제를 위하여 상기 방법 1 이상을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0217] 재조합 DNA 기술을 사용한 NTP 단백질 및 NTP 펩티드의 제조 및 정제외에도, NTP 단백질, NTP 펩티드 및 이들의 단편, 변이체, 상동체(homologue) 및 유도체가 메리필드(Merrifield) 등의 문헌[J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)], 호그텐(Houghten) 등의 문헌[Proc Natl Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985)] 및 스투어트(Stewart) 및 영(Young)의 문헌[Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill, (1984)]에 나타난 바와 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 화학적 합성 방법(예: 고체상 펩티드 합성법)에 의해 제조될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 아미노 말단 상에 메티온을 갖거나 메티온 없이 합성될 수 있다. 화학적으로 합성된 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드는 상기 문헌들의 방법을 사용하여 산화되어 디설피드 가교를 형성할 수 있다. NTP 단백질 및 NTP 펩티드는 재조합적으로 제조되거나 천연 출처원으로부터 정제된 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드에 필적하는 생물학적 활성을 갖는 것으로 예상되고, 따라서 재조합 또는 천연 NTP 단백질 또는 펩티드와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0218] NTP 단백질 또는 NTP 펩티드가 폴리머에 연결된 화학적으로 변형된 NTP 단백질 및 펩티드 조성물은 본 발명의 범위에 포함된다. 선택되는 폴리머는 통상적으로 수 가용성이어서 이것이 부착된 단백질은 생리학적 환경과 같은 수성 환경에서 침전되지 않는다. 선택된 폴리머는 아실화에 대한 활성 에스테르 또는 알킬화에 대한 알데히드와 같은 단일 반응성기를 갖도록 변형되어, 중합도는 본 방법에서 제공되는 바와 같이 제어될 수 있다. 폴리머는 임의의 분자량을 가질 수 있으며, 분지 또는 비분지될 수 있다. NTP 단백질/NTP 펩티드 폴리머의 범위에는 폴리머의 혼합물이 포함된다.
- [0219] 일부 경우, 천연 발생 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 핵산 및(또는) 아미노산 변이체를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 핵산 변이체는 프라이머(들)가 원하는 점 돌연변이를 갖는 위치 지향성 돌연변이발생, PCR 증폭 또는 다른 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (돌연변이발생 기술의 설명에 대해서는 삼브룩 등의 상기 문헌, 아수벨 등의 상기 문헌 참조). 엔겔스 등의 상기 문헌에 기술된 방법을 사용한 화학적 합성법은 또한 사용하여 상기 변이체를 제조할 수 있다. 당업자들에게 공지된 다른 방법 또한 사용될 수 있다.
- [0220] 바람직한 핵산 변이체는 NTP 단백질 또는 펩티드를 제조하기 위하여 사용되는 것인 숙주 세포 중의 코돈 선호물의 원인인 뉴클레오티드 치환을 포함하는 것이다. 그러한 "코돈 최적화"는 유니버시티 오픈 위스콘신 패키지 버전 9.0, 제네틱스 컴퓨터 그룹(미국 위스콘신주 매디슨)에 의해 제공되는 것과 같은 고도로 발전된 세균 유전자 코돈 선호물에 대한 "에코하이 코드(Ecohigh. Cod)"와 같은 코돈 빈도 표를 삽입한 컴퓨터 알고리즘을 통해 측정될 수 있다. 다른 유용한 코돈 빈도 표는 "Celegans\_high.cod", "Celegans\_low.cod", "Drosophila\_high.cod", "Human\_high.cod", "Maize\_high.cod", 및 "Yeast\_high.cod"를 포함한다. 다른 바람직한 변이체는 야생형, 및(또는) 신규 글리코실화 및(또는) 포스포릴화 부위를 생성하도록 고안된 것, 또는 기존 글리코실화 및(또는) 포스포릴화 부위를 결실하도록 고안된 것과 비교하여 상기 기술된 바와 같은 보존성 아미노산 변화를 코딩하는 것이다(예를 들면, 여기서 천연 발생 아미노산 측쇄의 전하 또는 극성은 상이한 아미노산으로의 치환에 의해 실질적으로 변화되지 않는다).
- [0221] NTP 단백질, NTP 펩티드, 및 이들의 단편, 상동체, 변이체, 유도체 및 염은 당업자들에게 공지된 통상적인 펩티드 합성 기술을 사용하여 만들 수 있다. 이들 기술은 화학적 커플링 방법 (예를 들면, Wunsch, E: "Methoden der organischen Chemie", Volume 15, Band 1+2, Synthese von Peptiden, Thime Verlag, Stuttgart (1974), 및 Barrany, G.: Merrifield, R.B.: "The peptides", eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Chapter 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)), 효소적 커플링 방법 (예를 들면, Widmer, F. Johansen, J.T., Carlsberg Res. Commun., Vol. 44, pp. 37-46 (1979), 및 Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. (1987), and Widmer, F., Johansen, J.T. in "Synthetic Peptides in Biology and Medicines:", eds. Alitalo, K., Partanen, P., Väterli, A., pp. 79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)), 또는 방법 고안 및 경제성에서 유리하다면 화학적 및 효소적 방법의 조합을 포함한다. 상기 개시내용에 제시된 교시 사항을 사용하여, 당업자들은 NTP 펩티드의 펩티드 서열을 변경하여 본래의 또는 천연의 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드와 동일 또는 유사한 생물학적 활성(생활성)을 갖는 상동체를 만들 수 있다.
- [0222] 단백질 자체보다는 소정의 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 모방체(mimetic)를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 일반적으로, 펩티드 모방체는 생체이용가능하고, 더 장기간의 작용 지속시간을 갖고, 단백질 및 펩티드 보다 생산 비용이 저렴할 수 있다.
- [0223] 따라서, 상기 기술된 NTP 단백질 및 NTP 펩티드는 유사한 생물학적 활성을 갖고 그에 따라 유사한 치료적 효용을 갖는 작은 화합물의 개발에 유용하다. NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 펩티드 모방체는 조합적 화학 기술 및 당업계에 공지된 다른 기술을 사용하여 개발될 수 있다 (예를 들면, 문헌[Proceedings of the 20th European

Peptide Symposium, ed. G. Jung, E. Bayer, pp. 289-336] 및 이의 참고문헌들 참조).

- [0224] 당업계에서 공지된 펩티드를 구조적으로 변형하여 펩티드 모방체를 만드는 방법의 예로는 특히 N-말단에서 활성에 부정적으로 영향을 미치지 없이 단백분해성 분해작용에 대한 안정성을 증가시킬 수 있는 D-아미노산 말단 구조에 이르는 골격 키랄 중심의 역위(inversion)를 들 수 있다. 그 한 예는 문헌["Tritiated D-ala<sup>1</sup>-Peptide T Binding", Smith C.S. 등, Drug Development Res. 15, pp. 371-379 (1988)]에 기재되어 있다.
- [0225] 두번째 방법은 안정성을 위해 시클릭 구조를 변화시키는 것, 예를 들면, N에서 C로의 사슬간 이미드 및 락탐이다 (Ede et al. in Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991), pp. 268-270). 이의 한 예는 형태적으로 제한된 티모펜틴 유사 화합물, 예를 들면, 골드스타인(Goldstein, G.) 등의 미국 특허 제4,457,489 (1985)에 제시되어 있고, 이의 개시사항은 본원에 전체로서 참고문헌으로 혼입된다.
- [0226] 세번째 방법은 단백분해에 대하여 저항성을 부여하는 유사펩티드 결합으로 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드 중의 펩티드 결합을 치환하는 것이다. 펩티드 구조 및 생물학적 활성에 일반적으로 영향을 미치지 않는 다수의 유사펩티드 결합이 기술되어 왔다. 이 방법의 한 예는 레트로-인버소(retro-inverso) 유사펩티드 결합을 치환시키는 것이다 ("Biologically active retroinverso analogues of thymopentin", Sisto A. et al in Rivier J.E. and Marshall, G.R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp. 722-773) 및 Dalpozzo, et al. (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41:561-566, 본원에 참고문헌으로 삽입됨). 상기 변형에 따라서, 펩티드의 아미노산 서열은 1 이상의 펩티드 결합이 레트로-인버소 유사펩티드 결합으로 대체된 것을 제외하고는 상기 기술된 NTP 펩티드의 서열과 동일할 수 있다. 대부분의 N-말단 펩티드 결합이 치환되는 것이 바람직한데, 그것은 그러한 치환이 N-말단에 작용하는 엑소펩티다제(exopeptidase)에 의한 단백분해에 대하여 저항성을 제공할 것이기 때문이다.
- [0227] 1 이상의 환원된 레트로-인버소 유사펩티드 결합을 갖는 펩티드의 합성은 당업계에 공지되어 있다 (상기 인용된 시스토 (1990) 및 달포조 등 (1993)). 따라서, 펩티드 결합은 펩티드 모방체로 하여금 원래의 펩티드와 유사한 구조 그에 따라 생물학적 활성을 채택할 수 있게 하는 비-펩티드 결합에 의해 대체될 수 있다. 나아가, 아미노산의 화학적 기를 다른 유사한 구조의 화학적 기로 대체함으로써 변형시킬 수 있다. 생물학적 활성의 손실이 전혀 또는 거의 없이 효소적 분해에 대한 안정성을 증가시키는 것으로 알려진 다른 적당한 유사펩티드 결합은 환원된 이소스테어(isostere) 유사펩티드 결합이다 (Couder, et al. (1993), Int. J. Peptide Protein Res., 41:181-184, 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입됨). 따라서, 이들 펩티드의 아미노산 서열은 1 이상의 펩티드 결합이 이소스테어 유사펩티드 결합으로 대체된 것을 제외하고는, NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 서열과 동일할 수 있다. 대부분의 N-말단 펩티드 결합이 치환되는 것이 바람직한데, 그것은 그러한 치환이 N-말단에 작용하는 엑소펩티다제에 의한 단백분해에 대하여 저항성을 제공할 수 있기 때문이다. 1 이상의 환원된 이소스테어 유사펩티드 결합을 갖는 펩티드의 합성은 당업계에 공지되어 있다 (상기 인용한 코우더 등 (1993)). 다른 예로는 케토메틸렌 또는 메틸술피드 결합을 도입하여 펩티드 결합을 대체하는 것을 들 수 있다.
- [0228] NTP 단백질 및 NTP 펩티드의 펩토이드(peptoid) 유도체는 생물학적 활성에 대한 중요한 구조적 결정요소를 유지하나 펩티드 결합을 제거하여 단백분해에 대한 저항성을 부여하는 다른 부류의 펩티드 모방체이다 (Simon, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371, 본원에 온전히 참고문헌으로 삽입됨). 펩토이드는 N-치환된 글리신의 올리고머이다. 각각이 천연 아미노산의 측쇄에 상응하는 다수의 N-알킬기가 기술되어 있다 (Simon, et al. (1992), 상기 인용되고 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입됨). NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 아미노산의 일부 또는 전부는 대체된 아미노산에 상응하는 N-치환된 글리신으로 대체된다.
- [0229] 펩티드 모방체의 개발은 NMR 분광분석, 결정분석 및(또는) 컴퓨터에 의한 분자 모델링에 의해 본래의 NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 3차 구조를 결정하는 것에 의해 촉진될 수 있다. 이들 기술은 본래의 펩티드 보다 더 높은 효능 및(또는) 더 큰 생체이용률 및(또는) 더 큰 안정성의 신규 조성물의 개발을 촉진한다 (Dean (1994), BioEssays, 16:683-687; Cohen and Shatzmiller (1993), J. Mol. Graph., 11:166-173; Wiley and Rich (1993), Med. Res. Rev., 13:327-384; Moore (1994), Trends Pharmacol. Sci., 15:124-129; Hruby (1993), Biopolymers, 33:1073-1082; Bugg et al. (1993), Sci. Am., 269:92-98, 이들 모두는 그 전체 내용이 본원에 참고문헌으로 삽입됨).
- [0230] 일단 잠재적 펩티드 모방체 화합물이 확인되면, 하기 실시예에 약속한 방법을 사용해 합성하고 조사하여 그 활성을 평가할 수 있다. NTP 단백질 또는 NTP 펩티드의 생물학적 활성 및 유사한 3차원 구조를 갖는 상기 방법에 의해 얻어진 펩티드 모방체 화합물은 본 발명에 포함된다. 펩티드 모방체는 1 이상의 상기 기술된 변화를 수반하는 모든 NTP 단백질 또는 펩티드로부터 형성될 수 있음이 당업자에게 용이하게 이해될 것이다. 나아가, 본

발명의 펩티드 모방체는 치료 화합물로서의 그의 용도 외에도, 나아가 더욱 강력한 비펩티드성 화합물의 개발에 사용될 수 있음이 명백할 것이다.

- [0231] 현재, 관련 단백질, 관련 펩티드 및 본원에 기술된 NTP 펩티드를 합성할 수 있는 다수의 조직이 존재한다. 예를 들어, NTP 펩티드의 서열을 고려할 때, 위 조직은 펩티드를 합성하고 그 펩티드의 확인 서류 및 증거를 수반하여 합성된 펩티드를 송부할 수 있다.
- [0232] 본 발명은 또한 포유동물 조직 또는 체액 샘플 중의 NTP 펩티드, NTP 펩티드 DNA 또는 상응하는 RNA의 존재에 대하여 정성적으로 또는 정량적으로 시험하기 위한 분석을 위한 NTP 펩티드 및 이의 상응하는 핵산 분자의 용도를 포함한다. NTP 펩티드 또는 그의 코딩된 NTP 펩티드가 생물학적 활성을 보이던지 아닌지 간에, NTP 펩티드 및 이들의 상응하는 핵산 분자는 그러한 평가에서의 준비에 유용할 수 있다. NTP 펩티드 핵산 서열은 포유동물 조직 또는 체액 샘플 중에서 NTP 펩티드 DNA 또는 상응하는 RNA의 존재에 대하여 정성적으로 또는 정량적으로 시험하기 위한 혼성화 프로브의 유용한 공급원일 수 있다.
- [0233] 그 자체가 생물학적으로 활성이 아닌 NTP 펩티드는 NTP 펩티드를 인식하고(하거나) 그에 결합하는 항체의 제조에 유용할 수 있다. 그러한 항체는 표준적인 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 따라서, 단쇄 항체 단편 및 상기 항체의 다른 반응성 단편외에도 NTP 펩티드와 반응하는 항체 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 재조합, 키메릭, 단일-쇄 및(또는) 이중특이적일 수 있다. 통상적으로, 항체 또는 이의 단편은 인간으로부터 유래된 것일 수 있거나, "인간화"된 것일 수 있다(즉, 환자에게 투여된 경우 항체에 대한 면역 반응을 예방 또는 최소화하도록 제조됨). 바람직한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날인 인간 항체이다. 항체 단편은  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  등과 같은 본 발명의 NTP 펩티드와 반응성인 임의의 단편일 수 있다. 본 발명은 또한 선택된 포유동물에 대한 항원으로서 임의의 NTP 펩티드를 제시하고 이어서 공지 기술에 의하여 포유동물의 세포(예: 비장 세포)를 특정 암 세포와 융합하여 무한증식 세포주(immortalized cell line)을 생성하는 것에 의해 형성된 하이브리도마를 제공한다. 상기 세포주 및 NTP 펩티드의 전부 또는 일부에 대한 항체를 형성하기 위해 이용된 방법 또한 본 발명에 포함된다.
- [0234] 항체는 나아가 예를 들면, 라벨링된 형태로서 생체내 및 시험관내 진단 또는 연구 목적으로 사용되어 체액 또는 세포 샘플 중의 NTP 펩티드의 존재를 검출할 수 있다.
- [0235] 본 발명은 또한 포유동물 조직 또는 체액 샘플 중의 NTP 펩티드, NTP 펩티드 DNA 또는 상응하는 RNA의 존재를 정성적으로 또는 정량적으로 시험하는 분석에서의 검정 표준으로서의 1 이상의 NTP 펩티드의 용도를 포함한다.
- [0236] 본 발명은 양성 및 악성 종양, 선(glandular, 예: 전립선) 과증식, 원치않는 안면모(facial hair), 사마귀 및 원치않는 지방 조직과 같은 세포의 제거가 요구되는 질환의 신규한 치료 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 필요로 하는 포유동물에게 치료적으로 유효한 양의 NTP 펩티드를 투여하는 것을 포함한다.
- [0237] 질환은 예를 들면, 폐, 유방, 위, 췌장, 전립선, 방광, 뼈, 난소, 피부, 신장, 공동(sinus), 결장, 장, 위, 직장, 식도, 혈액, 뇌 및 이의 외피, 척수 및 이의 외피, 근육, 결합 조직, 부신, 부갑상선, 갑상선, 자궁, 고환, 뇌하수체, 생식 기관, 간, 담낭, 눈, 귀, 코, 목, 편도, 입, 림프절 및 림프계(예, 림프 조직) 및 다른 기관의 종양일 수 있다.
- [0238] 본원에서 사용된 용어 "악성 종양"은 불충분하게 분화된, 적당히 분화된 그리고 잘 분화된 형태로 발생하는 모든 형태의 인간 암종, 육종 및 흑색종을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0239] 본 발명은 적은 위험 및 더 적은 원치않는 수술의 부작용으로 양성 종양을 제거할 수 있는 치료법에 대한 당업계의 요구를 충족시킨다. 신체의 심부에서와 같은 외과적으로 위험한 영역(예: 뇌, 심장, 폐 및 기타)에서의 양성 종양의 제거 방법이 특히 요구된다.
- [0240] 세포가 제거되어야 하는 질환의 치료 방법은 외과적 절개, 화학요법 및 방사선과 같은 상기 질환의 통상적인 치료방법과 병용해 사용될 수 있다. NTP 펩티드는 상기 통상적인 치료 전, 도중 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0241] 치료되는 질환은 폐, 유방, 위, 췌장, 전립선, 방광, 뼈, 난소, 피부, 신장, 공동, 결장, 장, 위, 직장, 식도, 혈액, 뇌 및 이의 외피, 척수 및 이의 외피, 근육, 결합 조직, 부신, 부갑상선, 갑상선, 자궁, 고환, 뇌하수체, 생식 기관, 간, 담낭, 눈, 귀, 코, 목, 편도, 입, 림프절 및 림프계로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조직의 증식, 비대 또는 과다성장일 수 있다.
- [0242] 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 또 다른 질환으로는 폐, 유방, 위, 췌장, 전립선, 방광, 뼈, 난소,

피부, 신장, 공동, 결장, 장, 위, 직장, 식도, 혈액, 뇌 및 이의 외피, 척수 및 이의 외피, 근육, 결합 조직, 부신, 부갑상선, 갑상선, 자궁, 고환, 뇌하수체, 생식 기관, 간, 담낭, 눈, 귀, 코, 목, 편도, 입, 림프절 및 림프계로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이러스, 세균 또는 기생충에 의해 변형된 조직을 들 수 있다(단, 이들로 제한되는 것은 아님).

[0243] 치료되는 질환은 또한 폐, 유방, 위, 췌장, 전립선, 방광, 뼈, 난소, 피부, 신장, 공동, 결장, 장, 위, 직장, 식도, 혈액, 뇌 및 이의 외피, 척수 및 이의 외피, 근육, 결합 조직, 부신, 부갑상선, 갑상선, 자궁, 고환, 뇌하수체, 생식 기관, 간, 담낭, 눈, 귀, 코, 목, 편도, 입 및 림프절 및 림프계로 이루어지는 군으로부터 선택되는 조직의 기형 또는 이상일 수 있다.

[0244] 특히, 치료되는 질환은 편도 비대, 전립선 비대증, 건선, 습진, 피부질환 또는 또는 치질일 수 있다. 치료되는 질환은 죽상경화증 또는 동맥경화증과 같은 혈관 질환 또는 하지 정맥류와 같은 혈관계 질환일 수 있다. 치료되는 질환은 또한 피부, 눈, 귀, 코, 목, 입, 근육, 결합 조직, 모발 또는 유방 조직과 같은 조직의 성형 변화(cosmetic modification)일 수 있다.

[0245] NTP 펩티드의 치료 조성물은 본 발명의 범위 내에 있다. 상기 조성물은 제약적으로 허용가능한 담체와 혼합물로서 치료적으로 유효한 양의 NTP 펩티드를 포함할 수 있다. 담체 물질은 바람직하게는 포유동물에 투여하기 위한 용액에 통상적인 다른 물질이 보충된, 주사용수(water for injection)일 수 있다. 통상적으로, 치료용 NTP 펩티드는 1 이상의 생리적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제 및 정제된 NTP 펩티드를 포함하는 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 전형적인 적합한 담체의 예이다. 생성물은 적합한 부형제 (예: 수크로스)를 사용하여 동결건조물(lyophilizate)로서 제제화된다. 다른 표준 담체, 희석제 및 부형제가 필요에 따라 포함될 수 있다. 조성물은 약 pH 7.0-8.5의 트리스 완충액 또는 약 pH 4.0-5.5의 아세트이트 완충액 (소르비톨 또는 이에 대한 적당한 대체물을 더 포함할 수 있음)을 비롯하여 적합한 pH 값 범위를 갖는 당업자들에게 공지된 완충액을 포함한다.

[0246] 원치않는 세포 요소로의 타게팅을 위하여 항체, 항체 단편, 항체 유사 분자, 또는 특이적 종양 마커(예: 세포 수용체, 시그널 펩티드 또는 과발현된 효소)에 대하여 높은 친화도를 갖는 분자에 컨쥬게이션 또는 연결 또는 결합된 NTP 펩티드의 용도가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 항체, 항체 단편, 항체 유사 분자, 또는 특이적 종양 마커에 대한 높은 친화도를 갖는 분자는 NTP 펩티드 컨쥬게이트를 특이적 세포 또는 조직 표적으로 타게팅 하는데 사용된다. 예를 들면, 특이한 표면 항원 또는 발현된 항원을 갖는 종양은 항체, 항체 단편 또는 항체 유사 결합 분자에 의해 타게팅될 수 있으며, 종양 세포는 NTP 펩티드에 의해서 제거될 수 있다. 항체 타게팅을 사용한 상기 접근법은 투여량을 감소시키고, 표적 세포에 대한 결합 또는 표적 세포에 의한 섭취(uptake)의 가능성을 증가시킬 것으로 예상되는 잇점을 가지며, 전이성 종양 및 극미세 크기의 종양을 타게팅 및 치료함에 있어 유용성이 증가된다.

[0247] 본 발명은 또한 종양 또는 다른 원치않는 세포를 타게팅하는 항체 컨쥬게이트에 의해서, 또는 종양- 또는 위치-특이적 효소 또는 프로테아제에 의해서 종양 또는 다른 원치않는 세포 부위(들)에서 또는 그 근처에서 분할(cleavage)시에 종양 또는 다른 원치않는 세포 부위(들)에서 또는 그 근처에서 NTP 펩티드를 방출하는 조성물을 형성하기 위한 단백질 또는 다른 분자에 컨쥬게이션 또는 연결 또는 결합된 NTP 펩티드의 용도를 포함한다.

[0248] 본 발명은 또한 빛(레이저 치료 또는 다른 광-역학 또는 광-활성 요법에서와 같이), 다른 형태의 전자기 방사선 (예: 적외 방사선, 자외 방사선, x-선 또는 감마선 방사선, 국소 가열, 알파 또는 베타 방사선, 초음파 방출 또는 다른 원천의 국소 에너지)에 치료하고자 하는 조직을 노출할 때, NTP 펩티드 또는 NTP 펩티드의 일부 생물학적 활성 단편을 방출하는 조성물을 형성하기 위한 단백질 또는 다른 분자에 컨쥬게이션 또는 연결 또는 결합되는 NTP 펩티드의 용도를 포함한다.

[0249] NTP 펩티드는 치료되는 적응증에 적합한 사이토카인, 성장 인자, 항생물제, 자멸사 유도제, 소염제 및(또는) 화학요법제와 같은 다른 제약 조성물과 병용하여, 함께 또는 단독으로 이용될 수 있다.

[0250] 본 발명은 또한 덴드리머(dendrimer), 풀러렌(fullerene) 및 다른 합성 분자, 폴리머 및 거대분자를 이용한 NTP 펩티드의 치료 조성물을 포함하고, 여기서 NTP 펩티드 및(또는) 이의 상응하는 DNA 분자는 그 자체로 또는 종양 특이적 마커와 같은 다른 종의 분자와 함께 분자, 폴리머 또는 거대분자와 컨쥬게이션, 이에 연결 또는 이에 봉입되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,714,166호(Bioactive and/or Targeted Dendrimer Conjugates)는 특히 표적 디렉터(들)를 갖는 덴드리머 1종 이상 및 이에 컨쥬게이션된 생활성제 1종 이상으로 구성된 수지상 폴리머 컨쥬게이트를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다.

- [0251] 본 발명은 또한 NTP 펩티드 및(또는) 유전자 및 약물 전달 비히클(예: 지질 에멀전, 미셀 폴리머, 폴리머 마이크로스피어, 전기활성 폴리머, 히드로겔 및 리포솜)의 치료 조성물을 포함한다.
- [0252] 원치않는 세포로 전달되는 NTP 펩티드 또는 관련 유전자 또는 유전자 등가물의 용도 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 종양 내의 NTP 펩티드의 과발현을 사용하여 종양에서의 세포의 사멸을 유도하고 그에 따라 종양 세포 군을 감소시킬 수 있다. 원치않는 세포 요소를 치료하기 위한 NTP 펩티드의 유전자 또는 유전자 등가물 전달은 더 적은 투여량을 요하고, 표적 세포 요소의 세포 자손 상에 전해짐으로 인해 적은 빈도의 치료 및 적은 총 치료를 필요로 한다는 잇점을 갖는 것으로 예상된다. 본 발명은 원치않는 세포 또는 인접 세포에 대한 NTP 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 유전자의 전달을 포함하고, 여기서 유전자의 발현 및 융합 단백질의 생성 및(또는) 분비에 이어서 융합 단백질은 천연 효소 또는 프로테아제에 의해서 또는 프로드럭에 의해 분열되어 원치않는 세포중, 세포에서 또는 세포 근처에서 NTP 펩티드를 방출한다.
- [0253] 클로닝된 재조합 NTP 펩티드-항체 컨주게이트, 클로닝된 재조합 NTP 펩티드-항체 단편 컨주게이트, 및 클로닝된 재조합 NTP 펩티드-항체 유사 단백질 컨주게이트의 용도 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 타게팅 컨주게이트(예: 항체, 항체 단편, 항체 유사 분자 또는 암 특이적 수용체 또는 다른 종양 마커에 높은 친화도를 갖는 분자)와 결합된 클로닝된 NTP 펩티드의 잇점은 그러한 분자가 클로닝된 컨주게이션된 분자의 제조 및 표준화된 생산에 대한 잇점외에도 상기한 타게팅 잇점을 겸한다는 것이다.
- [0254] 경구 투여용 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제, 산제 및 과립제를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 다음 중 1종이상과 혼합되는 것이 바람직하다: (a) 1종 이상의 불활성 부형제 (또는 담체), 예를 들면 시트르산나트륨 또는 이인산칼슘; (b) 충전제 또는 증량제, 예를 들면 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산; (c) 결합제, 예를 들면 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아카시아, (d) 습윤제(humectant), 예를 들어 글리세롤 (e) 봉해제, 예를 들어 아가-아가, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정한 복합 실리케이트 및 탄산나트륨; (f) 용액 지연제, 예를 들면 파라핀; (g) 흡수 촉진제, 예를 들면 4차 암모늄 화합물; (h) 습윤제, 예를 들면 아세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트; (i) 흡착제, 예를 들면 카올린 및 벤토나이트; 및 (j) 윤활제, 예를 들면 탈크, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트 또는 이들의 혼합물. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투여 형태는 완충제를 또한 포함할 수 있다.
- [0255] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약적으로 허용가능한 에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 활성 화합물 외에도, 액체 투여 형태는 당업계에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들면 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제를 포함할 수 있다. 유화제로는 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(예: 목화씨유, 땅콩유, 옥수수씨유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로푸르푸릴 알콜, 폴리에틸렌글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 또는 이들 성분의 혼합물 등을 들 수 있다.
- [0256] 상기 불활성 희석제 외에도, 조성물은 또한 아주반트(adjutant), 예를 들면 습윤제, 유화 및 현탁화제, 감미제, 풍미제 및 방향제를 포함할 수 있다.
- [0257] 본 발명의 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 특정 조성물 및 투여 방법에 대하여 요망되는 치료반응을 얻기에 효과적인 치료적 유효량의 NTP 펩티드를 얻도록 변화될 수 있다. 따라서, 선택된 투여 수준은 요망되는 치료 효과, 투여 경로, 요망되는 치료 지속기간, 치료되는 개체 또는 동물의 크기 및 다른 인자에 의존한다.
- [0258] 인간을 비롯한 포유동물에 관해서, 유효량은 체표면적을 기준으로 투여될 수 있다. 다양한 크기, 종의 동물 및 인간에 대한 투여량의 상호관계 (체표  $M^2$  당 mg에 기초함)은 문헌[E.J. Freireich et al., Cancer Chemother. Rep., 50(4):219 (1966)]에 기술되어 있다. 체표면적은 개체의 키 및 중량으로부터 대략적으로 측정될 수 있다 (예를 들면, 문헌[Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.T. pp. 537-538 (1970)] 참조). 당업자들에게 공지된 기술을 사용하고, 본원에 제공된 기준 및 교시사항을 사용하여, 당업자들은 본 발명에 사용되기 위한 치료적 유효량의 NTP 펩티드를 결정할 수 있다.
- [0259] 숙주에 투여되는 NTP 펩티드의 총 일일 용량은 단일 또는 분할 용량일 수 있다. 투여 단위 조성물은 일일 용량을 구성하도록 사용될 수 있도록 상기 량의 약수를 포함할 수 있다. 그러나, 임의의 특정 환자에 대한 특정 투여 수준은 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간 및 경로, 투여되는 약물의 효능, 흡수 및 배설의 속도, 다른 약물과의 병용 및 치료되는 특정 질환의 심각도를 비롯한 여러 인자에 따라 결정될 수 있음을 이해할 수 있다.

- [0260] 본 발명에 따른 NTP 펩티드 조성물의 투여 방법은 근육내, 경구, 정맥내, 복강내, 뇌내 (실질조직내), 뇌실내, 종양내, 피사내, 피내, 경막내, 비강내, 안구내, 동맥내, 국소, 경피, 에어로솔, 주입, 볼러스 주사, 이식 장치, 지속 방출 시스템 등을 통하여 화합물을 투여하는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0261] 본 발명의 NTP 펩티드를 투여하는 다른 방법은 경피 또는 피부통과 경로에 의한 것이다. 상기 실시태양의 일례는 패치를 사용하는 것이다. 특히, 패치는 예를 들면, 디메틸설폭시드(DMSO) 또는 DMSO와 면화씨유의 혼합물 중의 NTP 펩티드의 미세한 현탁액으로 제조될 수 있고, 피부 파우치 내의 종양 존재 위치로부터 떨어진 종양을 수반하는 포유동물의 피부와 접촉될 수 있다. 다른 매질 또는 다른 용매 또는 고체 지지체와의 이의 혼합물이 마찬가지로 잘 작용할 수 있다. 패치는 용액 또는 현탁액 형태로 NTP 펩티드 화합물을 함유할 수 있다. 패치는 예를 들면, 주름형성에 의해 형성된 환자의 피부 파우치 내로 이를 삽입하고, 스티치, 클립 또는 다른 유지 장치에 의하여 피부를 함께 유지하는 수단에 의하여 환자의 피부에 적용될 수 있다. 상기 파우치는 포유동물의 간섭 없이 피부와의 연속적 접촉이 보장되는 방식으로 이용되어야 한다. 피부 파우치를 사용하는 이외에, 패치의 피부와 접촉된 견고한 배치를 보장하는 모든 장치가 사용될 수 있다. 예를 들면, 접착성 봉대를 사용하여 패치를 피부 상 위치에 유지시킬 수 있다.
- [0262] NTP 펩티드는 지속 방출 제제 또는 조제품으로 투여될 수 있다. 지속 방출 조제품의 적당한 예는 성형품 형태의 반투과성 폴리머 매트릭스, 예를 들면 필름 또는 마이크로캡슐이다. 지속 방출 매트릭스는 폴리에스테르, 히드로겔, 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호, 유럽 특허 제58,481호), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머 (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 [1983]), 폴리 (2-히드록시에틸-메타크릴레이트) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 [1981] 및 Langer, Chem. Tech., 12:98-105 [1982]), 에틸렌 비닐 아세테이트 (상기 Langer 등의 문헌) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산 (유럽 특허 제133,988호)를 포함한다. 지속 방출 조성물은 또한 당업계에 공지된 여러 방법 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다 (예를 들면, 엡스타인(Eppstein) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); 유럽 특허 제36,676; 유럽 특허 제88,046호; 및 유럽 특허 제143,949호를 참조).
- [0263] 본 발명의 NTP 펩티드를 투여하는 다른 방법은 치료되는 종양 또는 다른 조직으로의 NTP 펩티드의 직접 또는 간접 주입에 의한 것이다. 상기 실시태양의 일례는 치료되는 종양 또는 다른 조직으로의 NTP 펩티드의 직접 주사이다. 치료는 시간, 일 또는 달의 기간에 걸쳐서 어느 때 또는 일련의 주사시 치료되는 종양 또는 다른 조직의 퇴보 또는 파괴를 생검, 영상화 또는 다른 조직성장의 모니터링 방법에 의해 모니터링하면서 단일 주사, 복수 주사로 이루어질 수 있다. 치료되는 종양 또는 다른 조직으로의 주사는 생체내 종양 또는 조직에 도달하기 위하여 코, 입, 귀, 질, 직장 또는 유도와 같은 구멍으로 또는 절개를 통하여 삽입된 장치에 의할 수 있고, 주사를 위한 적합한 부위를 확인하기 위하여 초음파 또는 광섬유 스코프와 같은 영상화 또는광학 시스템과 함께 수행될 수 있다. 상기 실시태양의 다른 예는 시간에 걸쳐 조직으로 NTP 펩티드의 연속적 주입을 제공할 수 있는 장치를 사용하는 것이다.
- [0264] 본 발명의 NTP 펩티드의 다른 투여 방법은 제거 또는 파괴되는 것이 필요 또는 요망되는 종양 또는 다른 조직 또는 세포 요소를 물리적으로 절개, 제거 또는 달리 사멸 또는 파괴하기 위해 이용되는 외과적 또는 유사한 방법에 관한 것이고, 여기서 본 발명의 NTP 펩티드가 상기 방법에 의해 제거 또는 파괴되지 않은 임의의 종양 세포 또는 다른 세포 요소의 성장을 파괴 또는 저해하기 위하여 종양 또는 다른 조직이 제거된 부분을 둘러싼 인접 부위에 투여된다.
- [0265] 본 발명의 NTP 펩티드를 투여하는 다른 방법은 치료되는 종양 또는 다른 조직 내에 장치를 이식하는 것에 의한 것이다. 상기 실시태양의 일례는 치료되는 종양 또는 다른 조직 중에 NTP 펩티드를 함유하는 웨이퍼(wafer)를 이식하는 것이다. 웨이퍼는 치료 용량의 NTP 펩티드를 조직 내로 시간에 걸쳐 방출한다. 별법으로 또는 부가적으로, 조성물은 NTP 펩티드가 흡수되는 침범된 부분의 막, 스폰지 또는 다른 적합한 물질 내로의 이식을 통하여 국소적으로 투여될 수 있다. 이식 장치가 사용되는 경우, 장치는 임의의 적당한 조직 또는 기관으로 이식될 수 있고, NTP 펩티드의 송달은 볼러스에 의해 또는 연속 투여에 의해 또는 연속 주입을 이용한 카테터에 의한 장치를 통한 직접적인 것일 수 있다.
- [0266] 별도 투여 방법은 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자 카피 1 이상을 치료되는 세포내로 도입하고, 필요한 경우 유전자 카피를 유도하여 NTP 펩티드 제조를 세포내적으로 개시하는 것이다. 유전자 요법이 이용될 수 있는 한 방법은 구조성 또는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되어 "유전자 요법 DNA 구조물"을 형성할 수 있는 NTP 펩티드를 코딩하는 유전자 (NTP 펩티드 또는 이의 단편, 변이체, 상동체 또는 유도체를 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및(또는) 합성 DNA)를 사용하는 것이다. 구조물이 삽입되는 세포 또는 조직 유형 중에서 활성인 한, 프로모터

는 내재성 NTP 펩티드 코딩 유전자와 상동성 또는 이종일 수 있다. 유전자 요법 DNA 구조물의 다른 성분은 임의로 필요한 경우 위치-특이적 통합을 예정하는 DNA 분자 (예: 상동성 재조합에 유용한 내재성 플랭킹 (flanking) 서열), 위치 특이적 프로모터, 인핸서 또는 사일렌서, 모 세포 이상의 선택적 잇점을 제공할 수 있는 DNA 분자, 변형된 세포를 확인하기 위한 라벨로 유용한 DNA 분자, 음성 선택 시스템, 세포 특이적 결합제 (예: 세포 타게팅을 위한 것), 세포 특이적 내재화 인자 및 벡터에 의한 발현을 증강시키는 전사 인자, 및 벡터 제조를 가능하게 하는 인자를 포함할 수 있다.

[0267] 생체내(*in vivo*) 또는 생체외(*ex vivo*) 세포 또는 조직으로의 유전자 송달의 수단은 노출 DNA의 직접 주사, 탄도법, 리포솜 매개 전달, 수용체 매개 전달 (리간드-DNA 복합체), 일렉트로포레이션 및 칼슘 포스페이트 침전법을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 그 각각의 개시내용이 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입된 미국 특허 제 4,970,154호, WO 96/40958호, 미국 특허 제5,679,559호, 미국 특허 제5,676,954호 및 미국 특허 제5,593,875호를 참고. 이들은 또한 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 폭스(pox) 바이러스, 렌티바이러스, 유두종 바이러스 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스와 같은 바이러스 벡터의 사용, DNA-단백질 컨쥬게이트의 사용 및 리포솜의 사용을 포함한다. 유전자 요법 벡터의 사용은 예를 들면, 그 각각의 개시내용이 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입된 미국 특허 제5,672,344호, 미국 특허 제5,399,346호, 미국 특허 제5,631,236호 및 미국 특허 제5,635,399호에 기술되어 있다.

[0268] NTP 펩티드 코딩 유전자는 본원에 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 NTP 펩티드 또는 이의 단편, 변이체, 상동체 또는 유사체를 발현 및 분비하도록 생체외에서 유전적으로 조작된 특정 세포를 환자 내로 이식하는 것을 통하여 송달될 수 있다. 상기 세포는 동물 또는 인간 세포일 수 있고, 환자 자식의 조직 또는 인간 또는 비인간인 다른 원천으로부터 유래할 수 있다. 임의로, 세포는 영속화된 것이거나 또는 줄기 세포일 수 있다. 그러나, 면역 반응의 기회를 감소시키기 위하여, 세포를 캡슐화하여 주위 조직의 침윤을 회피하는 것이 바람직하다. 캡슐화 물질은 통상적으로 단백질 생성물의 방출을 가능하게 하나 환자의 면역계에 의해서 또는 주위 조직으로부터의 다른 해로운 인자에 의한 세포의 파괴를 막는 생체적합성, 반투과성 폴리머성 봉합체 또는 막이다. 세포의 막 캡슐화에 사용되는 방법은 당업자들에게 익숙하고, 캡슐화된 세포의 제조 및 이들의 환자에서의 이식은 과도한 실험없이 달성될 수 있다. 예를 들면, 그 각각의 개시내용이 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입된 미국 특허 제4,892,538호, 동 제5,011,472호 및 동 제5,106,627호를 참고. 생존 세포를 캡슐화하기 위한 시스템은 PCT WO 91/10425에 기술되어 있다. 여러 다른 지속 또는 제어 송달 수단(예; 리포솜 담체, 생체 침식성 입자 또는 비드)를 제제화하는 기술은 당업자들에게 공지되고, 예를 들면 그 개시내용이 본원에 전체로서 참고문헌으로 삽입된 미국 특허 제5,653,975호에 기술되어 있다. 캡슐화된 또는 캡슐화되지 않은 세포는 환자의 적당한 인체 조직 또는 기관 내로 이식될 수 있다.

## 실시예

[0269] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 제공되는 것이다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 기술된 특정 상태 또는 세부사항에 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 명세서 전반에 걸친 미국 특허를 비롯한 공중이 이용가능한 문헌들에 대한 임의의 또는 모든 참조가 참고로서 구체적으로 삽입된다.

[0270] 특히, 본 발명은 계류중인 미국 특허 출원 번호: 10/092,934 (신경 스레드 단백질을 사용하는 종양 및 관련 질환의 치료 방법)에 포함되어 있는 실시예들을 인용에 의하여 명시적으로 포함하며, 상기 출원은 AD7c-NTP 단백질 전체가 교종 및 신경모세포종 세포 배양에서 시험관내에서 및 정상 설치류 근육 조직, 피하 연결 조직, 및 진피에서, 및 유방암, 피부암 및 유두종, 결장암, 뇌의 교종을 포함하는 다양하고 상이한 인간 및 비-인간 기원 종양, 및 다른 설치류 모델에서 생체내에서 모두 세포 사멸을 유발하기 위하여 효과적인 물질임을 보인다. 본 발명은 또한 미국 특허 출원 번호: 10/153334에 포함되어 있는 실시예들을 인용에 의하여 명시적으로 포함하며, 상기 출원은 NTP 펩티드가 정상 설치류 근육 조직, 피하 연결 조직, 진피 및 기타 조직에서 생체내에서 세포 사멸을 유발하기 위하여 효과적인 물질임을 보인다.

### [0271] 실시예 1

[0272] 본 실시예의 목적은 주사 부위의 조직에 대한 NTP 펩티드 #7의 효과를 측정하기 위한 것이었다.

[0273] 4 마리의 정상 랫트에 피부 및 경피하에(각 4개의 상이한 부위에) 및 사지 골격근에(각 2개의 상이한 부위에) 스테인레스 스틸 26 게이지 바늘을 통하여 플라스틱 시린지로부터 송달되는 0.1-1 mg/mL 농도의 100 내지 400 mL 양의 식염수 중 NTP 펩티드 #7을 주사하였다.

[0274] 동물을 24시간 동안 관찰하여, 24시간에 고통없이 희생시켰다. 개별 부위의 침윤을 절개하고, 10% 포르말린 중

에 고정시키고, 파라핀 중에 봉하였으며, 표준적인 조직병리학적 방법에 의해 염색 및 검사하였다.

[0275] 대조군은 식염수만 투여했다.

[0276] **결과**

[0277] NTP 펩티드 #7의 주사는 주사 부위에서 조직의 괴사를 일으켰다. 괴사는 NTP 펩티드 #7을 주사한 부위에서 근육 조직, 피하 결합 조직 및 진피에서 명백하였다. 괴사는 주사 부위와 관련이 있었으며, 주사 부위를 넘어 멀리 확산되지는 않았다.

[0278] 가벼운 염증 부위 이외에, 대조군은 괴사 또는 세포 손실의 증거가 나타나지 않았다. 대조군은 근육 변화가 최소 또는 없었다. 대조군 주사는 주사 부위에서의 경증 내지 최소 급성 염증 및 바늘로부터의 국소 미세출혈이 있었다.

[0279] **실시예 2**

[0280] 본 실시예의 목적은 주사 부위에서의 조직에 대한 NTP 펩티드 #7의 효과를 측정하기 위한 것이었다.

[0281] 4 마리의 랫트를 에테르로 마취시키고, 전립선내 주입(intraprostatic infusion)에 의해 NTP 펩티드 #7을 투여하였다. 상기 주사는 PBS pH 7.4 중의 1 mg/mL의 NTP 펩티드 #7 300  $\mu$ l로 구성되었다 (1.0 mg/kg). 대조군은 주사를 투여받지 않거나 PBS만의 주사를 투여받았다. 랫트들을 72 시간 후에 고통없이 희생시켰다. 전립선들을 절개하고, 10% 완충된 포르말린 중에 24 시간 동안 고정시키고, 파라핀 중에 봉하고, 단편화하고, H&E로 염색하였다. 각 동물들에 대하여 전체 전립선을 봉하고, 단편화하였다. 모든 염색된 단편들을 조직학적으로 검사하였다.

[0282] **결과**

[0283] NTP 펩티드 #7로 처리된 랫트 전립선은 샘 상피의 손실, 평평화(flattening) 및 위축과 함께 주사 부위에서 조직의 괴사를 나타냈다. PBS 주사만 투여한 대조군 및 주사를 투여 받지 않은 대조군 사이에 식별할 수 있는 차이가 존재하지 않았다.

[0284] **실시예 3**

[0285] 본 실시예의 목적은 주사 부위의 조직에 대한 NTP 펩티드 #14의 효과를 측정하기 위한 것이었다.

[0286] NTP 펩티드 #14를 주사하는 것 이외에는 상기 실시예 1에서와 같이, 랫트들에게 피부 및 경피하에 주사하였다.

[0287] 동물을 24시간 동안 관찰하여, 24시간에 고통없이 희생시켰다. 조직들을 절개하고, 10% 포르말린 중에 고정시키고, 파라핀 중에 봉하였으며, 표준적인 조직병리학적 방법에 의해 염색 및 검사하였다.

[0288] 대조군은 실시예 1과 동일하였다.

[0289] **결과**

[0290] NTP 펩티드 #14의 주사는 주사 부위에서 세포 사멸 및 조직의 괴사를 일으켰다. 실시예 1과 유사하게, 세포 사멸은 NTP 펩티드 #14를 주사한 부위에서 근육 조직, 피하 결합 조직 및 진피에 존재하였다.

[0291] 가벼운 염증 부위 이외에, 대조군은 괴사 또는 세포 손실의 최소한의 증거를 나타냈다. 대조군 주사는 주사 부위에서의 경증 내지 최소 급성 염증 및 바늘로부터의 국소 미세출혈이 있었다.

[0292] **실시예 4**

[0293] 본 실시예의 목적은 주사 부위의 조직에 대한 NTP 펩티드 #17의 효과를 측정하기 위한 것이었다.

[0294] NTP 펩티드 #17을 주사하는 것 이외에는 상기 실시예 2에서와 같이, 정상 랫트들의 전립선에 주사하였다. 랫트들을 72시간 후에 고통없이 희생시키고, 그들의 전립선들을 실시예 2에서와 같이 검사하였다.

[0295] **결과**

[0296] 실시예 2에서와 같이, NTP 펩티드 #17의 주사는 72 시간에 전립선에서 상당한 세포 손실 및 위축을 일으켰다. 대조군들은 바늘로부터의 경증의 국소 염증으로 구성되는 변화가 없거나 최소한이었다.

[0297] 본 발명은 특히 선호되는 실시양태 및 실시예들에 대해서 기술되었다. 그러나, 당업자들은 본 발명의 정신 또

는 범위를 벗어나지 않으면서 본 발명에 여러가지 변화가 일어날 수 있음을 인식할 것이다.

## 도면

### 도면1

#### AD7C-NTP [ 서열 번호 1]

|      |                                                                                   |                                                                 |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1    | tttttttttttgag                                                                    | ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC | 62 |
| 1    |                                                                                   | M E F S L L L P R L E C N G A I                                 | 16 |
| 63   | TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA   | 122                                                             |    |
| 17   | S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P                                           | 36                                                              |    |
| 123  | GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA   | 182                                                             |    |
| 37   | V A G I T G M C T H A R L I L Y F F L V                                           | 56                                                              |    |
| 183  | GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC   | 242                                                             |    |
| 57   | E M E F L H V G Q A G L E L F T S D D P                                           | 76                                                              |    |
| 243  | TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG   | 302                                                             |    |
| 77   | S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L                                           | 96                                                              |    |
| 303  | GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGS GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC   | 362                                                             |    |
| 97   | A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L                                           | 116                                                             |    |
| 363  | AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT   | 422                                                             |    |
| 117  | K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P                                           | 136                                                             |    |
| 423  | GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG   | 482                                                             |    |
| 137  | G L F I L F F L R H R C P T L T Q D E V                                           | 156                                                             |    |
| 483  | CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CPT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC   | 542                                                             |    |
| 157  | Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A                                           | 176                                                             |    |
| 543  | TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT   | 602                                                             |    |
| 177  | S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I F I                                           | 196                                                             |    |
| 603  | TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG   | 662                                                             |    |
| 197  | F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W                                           | 216                                                             |    |
| 663  | CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC   | 722                                                             |    |
| 217  | R N L G S L Q P L P F G F K L F S C P S                                           | 236                                                             |    |
| 723  | CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA   | 782                                                             |    |
| 237  | L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L                                           | 256                                                             |    |
| 783  | GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG   | 842                                                             |    |
| 257  | V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L                                           | 276                                                             |    |
| 843  | CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT   | 902                                                             |    |
| 277  | P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I                                           | 296                                                             |    |
| 903  | TTT AAT TTT TGT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG   | 962                                                             |    |
| 297  | F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W                                           | 316                                                             |    |
| 963  | CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC   | 1022                                                            |    |
| 317  | P N L G S L Q P L P F G L K R F S C L S                                           | 336                                                             |    |
| 1023 | CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC   | 1082                                                            |    |
| 337  | L P S S W D Y G H L F F H P A N F C I F                                           | 356                                                             |    |
| 1083 | ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CPT GAC CTC AGG       | 1143                                                            |    |
| 357  | I R G G V S F Y L S G W S Q T P D L R                                             | 375                                                             |    |
| 1144 | ccacctgcctcagccttccaaagtgtgggattacaggcgtgagccacctcaccagccgctaatttagataaaaaaat     | 1223                                                            |    |
| 1224 | atgtagcaatgggggtcttgctatgttgcacagctggtctcaaaactctggttcatgcaatccttccaatgagcca      | 1303                                                            |    |
| 1304 | caacacccagccagtcacattttttaaacagttacatctttatttttagtatactagaaagtaatacaataaacatgtcaa | 1383                                                            |    |
| 1384 | acctgcaaatcagtagtaacagagttcttttataacttttaaacaaagcttttagagca                       | 1442                                                            |    |

도면2

NTP[122] [ 서열 번호 2]

```

1   Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
    M  M  V  C  W  N  R  F  G  K

11  Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
    W  V  Y  F  I  S  A  I  F  N

21  Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
    F  G  P  R  Y  L  Y  H  G  V

31  Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
    P  F  Y  F  L  I  L  V  R  I

41  Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
    I  S  F  L  I  G  D  M  E  D

51  Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
    V  L  L  N  C  T  L  L  K  R

61  Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
    S  S  R  F  R  F  W  G  A  L

71  Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
    V  C  S  M  D  S  C  R  F  S

81  Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
    R  V  A  V  T  Y  R  F  I  T

91  Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
    L  L  N  I  P  S  P  A  V  W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
    M  A  R  N  T  I  D  Q  Q  V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
    L  S  R  I  K  L  E  I  K  R

121 Cys-Leu
    C  L
  
```

도면3

NTP[112] [서열 번호 3]

```

1   Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-
    M  A  Q  S  R  L  T  A  T  S

11  Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
    A  S  R  V  Q  A  I  L  L  S

21  Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
    Q  P  P  K  Q  L  G  L  R  A

31  Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
    P  A  N  T  P  L  I  F  V  F

41  Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
    S  L  E  A  G  F  H  H  I  C

51  Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
    Q  A  G  L  K  L  L  T  S  G

61  Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
    D  P  P  A  S  A  F  Q  S  A

71  Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
    G  I  T  G  V  S  H  L  T  Q

81  Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
    P  A  N  L  D  K  K  I  C  S

91  Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
    N  G  G  S  C  Y  V  A  Q  A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
    G  L  K  L  L  A  S  C  N  P

111 Ser-Lys
    S  K
  
```

도면4

NTP[106] [서열 번호 4]

```

1   Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
    M   W   T   L   K   S   S   L   V   L

11  Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
    L   L   C   L   T   C   S   Y   A   F

21  Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
    M   F   S   S   L   R   Q   K   T   S

31  Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
    E   P   Q   G   K   V   P   C   G   E

41  His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
    H   F   R   I   R   Q   N   L   P   E

51  His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
    H   T   Q   G   W   L   G   S   K   W

61  Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
    L   W   L   L   F   A   V   V   P   F

71  Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
    V   I   L   K   C   Q   R   D   S   E

81  Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
    K   N   K   V   R   M   A   P   F   F

91  Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
    L   H   H   I   D   S   I   S   G   V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
    S   G   K   R   M   F
  
```

도면5

NTP [106] [서열 번호 5]

```

1   Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
    M   F   F   V   L   Y   R   F   C   F

11  Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
    C   F   F   E   T   E   S   H   S   L

21  Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
    T   Q   A   G   V   Q   W   C   E   L

31  Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
    G   S   P   Q   P   L   P   S   G   F

41  Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
    K   R   F   S   C   L   S   L   L   S

51  Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
    S   W   D   Y   S   H   E   P   P   H

61  Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
    P   V   I   C   S   F   L   M   E   K

71  Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
    C   L   I   L   Y   K   P   N   G   D

81  Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
    T   I   G   P   I   L   V   Q   Q   G

91  Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
    K   R   Q   K   L   Y   I   S   A   D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
     L   V   H   L   I   A
  
```

도면6

NTP[98] [서열 번호 6]

```

1   Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
    E   A   Y   Y   T   M   L   H   L   P

11  Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
    T   T   N   R   P   K   I   A   H   C

21  Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
    I   L   F   N   Q   P   H   S   P   R

31  Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
    S   N   S   H   S   H   P   N   P   L

41  Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
    K   L   H   R   R   S   H   S   H   N

51  Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
    R   P   R   A   Y   I   L   I   T   I

61  Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
    L   P   S   K   L   K   L   R   T   H

71  Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
    S   Q   S   H   H   N   P   L   S   R

81  Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
    T   S   N   S   T   P   T   N   S   F

91  Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
     L   M   T   S   S   K   P   R
  
```

도면7

NTP[75] [서열 번호 7]

```

1   Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
    S  S  S  L  G  L  P  K  C  W

11  Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
    D  Y  R  H  E  L  L  S  L  A

21  Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
    L  M  I  N  F  R  V  M  A  C

31  Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
    T  F  K  Q  H  I  E  L  R  Q

41  Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
    K  I  S  I  V  P  R  K  L  C

51  Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
    C  M  G  P  V  C  P  V  K  I

61  Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
    A  L  L  T  I  N  G  H  C  T

71  Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
    W  L  P  A  S
  
```

도면8

NTP[68] [서열 번호 8]

```

1   Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
    M  F  V  F  C  L  I  L  N  R

11  Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
    E  K  I  K  G  G  N  S  S  F

21  Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
    F  L  L  S  F  F  F  S  F  Q

31  Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
    N  C  C  Q  C  F  Q  C  R  T

41  Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
    T  E  G  Y  A  V  E  C  F  Y

51  Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
    C  L  V  D  K  A  A  F  E  C

61  Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
    W  W  F  Y  S  F  D  T
  
```

도면9

NTP[61] [ 서열 번호 9]

```

1   Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
    M   E   P   H   T   V   A   Q   A   G

11  Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
    V   P   Q   H   D   L   G   S   L   Q

21  Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
    S   L   L   P   R   F   K   R   F   S

31  Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
    C   L   I   L   P   K   I   W   D   Y

41  Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
    R   N   M   N   T   A   L   I   K   R

51  Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
    N   R   Y   T   P   E   T   G   R   K

61  Ser
    S
    
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NYMOX CORPORATION  
AVERBACK, PAUL

<120> PEPTIDES EFFECTIVE IN THE TREATMENT OF TUMORS AND OTHER  
CONDITIONS REQUIRING THE REMOVAL OR DESTRUCTION OF  
CELLS

<130> 10107-45

<140> PCT/CA02/01105

<141> 2002-07-19

<150> US 60/306,161

<151> 2001-07-19

<150> US 60/306,150

<151> 2001-07-19

<150> US 60/331,477

<151> 2001-11-16

<160> 48

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys Asn Gly Ala Ile  
1 5 10 15

Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser Asp Ser Pro Ala  
20 25 30

Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys Thr His Ala Arg  
35 40 45

Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe Leu His Val Gly  
50 55 60

Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro Ser Val Ser Ala  
65 70 75 80

Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala Arg Leu Cys Leu  
85 90 95

Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met Cys Pro Ser Trp  
100 105 110

Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp  
115 120 125

Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile Leu Phe Phe Leu  
130 135 140

Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val Gln Trp Cys Asp  
145 150 155 160

His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys His Pro Pro Ala  
165 170 175

Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His His Tyr Thr Trp  
180 185 190

Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln Ser Leu Asn Ser  
195 200 205

Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro  
210 215 220

Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser  
225 230 235 240

Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe Phe Val Phe Leu  
245 250 255

Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile Leu Ile Ser Gly  
260 265 270

Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly  
275 280 285

Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys Leu Phe Glu Met  
290 295 300

Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Pro Asn Leu Gly  
305 310 315 320

Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser  
325 330 335

Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro His Pro Ala Asn  
340 345 350

Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Trp  
355 360 365

Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg  
370 375

<210> 2  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Unknown Organism

<220>  
 <223> Description of Unknown Organism: Unknown NTP  
 peptide

<400> 2  
 Met Met Val Cys Trp Asn Arg Phe Gly Lys Trp Val Tyr Phe Ile Ser  
 1 5 10 15

Ala Ile Phe Asn Phe Gly Pro Arg Tyr Leu Tyr His Gly Val Pro Phe  
 20 25 30

Tyr Phe Leu Ile Leu Val Arg Ile Ile Ser Phe Leu Ile Gly Asp Met  
 35 40 45

Glu Asp Val Leu Leu Asn Cys Thr Leu Leu Lys Arg Ser Ser Arg Phe  
 50 55 60

Arg Phe Trp Gly Ala Leu Val Cys Ser Met Asp Ser Cys Arg Phe Ser  
 65 70 75 80

Arg Val Ala Val Thr Tyr Arg Phe Ile Thr Leu Leu Asn Ile Pro Ser  
 85 90 95

Pro Ala Val Trp Met Ala Arg Asn Thr Ile Asp Gln Gln Val Leu Ser  
 100 105 110

Arg Ile Lys Leu Glu Ile Lys Arg Cys Leu  
 115 120

<210> 3  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Met Ala Gln Ser Arg Leu Thr Ala Thr Ser Ala Ser Arg Val Gln Ala  
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Ser Gln Pro Pro Lys Gln Leu Gly Leu Arg Ala Pro Ala  
20 25 30

Asn Thr Pro Leu Ile Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Gly Phe His His  
35 40 45

Ile Cys Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Thr Ser Gly Asp Pro Pro Ala  
50 55 60

Ser Ala Phe Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val Ser His Leu Thr Gln  
65 70 75 80

Pro Ala Asn Leu Asp Lys Lys Ile Cys Ser Asn Gly Gly Ser Cys Tyr  
85 90 95

Val Ala Gln Ala Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Cys Asn Pro Ser Lys  
100 105 110

<210> 4  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Met Trp Thr Leu Lys Ser Ser Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Thr Cys  
1 5 10 15

Ser Tyr Ala Phe Met Phe Ser Ser Leu Arg Gln Lys Thr Ser Glu Pro  
20 25 30

Gln Gly Lys Val Pro Cys Gly Glu His Phe Arg Ile Arg Gln Asn Leu  
35 40 45

Pro Glu His Thr Gln Gly Trp Leu Gly Ser Lys Trp Leu Trp Leu Leu  
50 55 60

Phe Ala Val Val Pro Phe Val Ile Leu Lys Cys Gln Arg Asp Ser Glu  
65 70 75 80

Lys Asn Lys Val Arg Met Ala Pro Phe Phe Leu His His Ile Asp Ser

85

90

95

Ile Ser Gly Val Ser Gly Lys Arg Met Phe  
100 105

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Phe Phe Val Leu Tyr Arg Phe Cys Phe Cys Phe Phe Glu Thr Glu  
1 5 10 15

Ser His Ser Leu Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Cys Glu Leu Gly Ser  
20 25 30

Pro Gln Pro Leu Pro Ser Gly Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu  
35 40 45

Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Ser His Glu Pro Pro His Pro Val Ile Cys  
50 55 60

Ser Phe Leu Met Glu Lys Cys Leu Ile Leu Tyr Lys Pro Asn Gly Asp  
65 70 75 80

Thr Ile Gly Pro Ile Leu Val Gln Gln Gly Lys Arg Gln Lys Leu Tyr  
85 90 95

Ile Ser Ala Asp Leu Val His Leu Ile Ala  
100 105

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Unknown NTP  
peptide

<400> 6

Glu Ala Tyr Tyr Thr Met Leu His Leu Pro Thr Thr Asn Arg Pro Lys  
1 5 10 15

Ile Ala His Cys Ile Leu Phe Asn Gln Pro His Ser Pro Arg Ser Asn  
20 25 30

Ser His Ser His Pro Asn Pro Leu Lys Leu His Arg Arg Ser His Ser  
35 40 45

His Asn Arg Pro Arg Ala Tyr Ile Leu Ile Thr Ile Leu Pro Ser Lys  
50 55 60

Leu Lys Leu Arg Thr His Ser Gln Ser His His Asn Pro Leu Ser Arg  
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Leu Met Thr Ser Ser Lys  
85 90 95

Pro Arg

<210> 7

<211> 75

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Unknown NTP  
peptide

<400> 7

Ser Ser Ser Leu Gly Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg His Glu Leu  
1 5 10 15

Leu Ser Leu Ala Leu Met Ile Asn Phe Arg Val Met Ala Cys Thr Phe  
20 25 30

Lys Gln His Ile Glu Leu Arg Gln Lys Ile Ser Ile Val Pro Arg Lys  
35 40 45

Leu Cys Cys Met Gly Pro Val Cys Pro Val Lys Ile Ala Leu Leu Thr

50

55

60

Ile Asn Gly His Cys Thr Trp Leu Pro Ala Ser  
65 70 75

<210> 8

<211> 68

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Unknown NTP  
peptide

<400> 8

Met Phe Val Phe Cys Leu Ile Leu Asn Arg Glu Lys Ile Lys Gly Gly  
1 5 10 15

Asn Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ser Phe Gln Asn Cys  
20 25 30

Cys Gln Cys Phe Gln Cys Arg Thr Thr Glu Gly Tyr Ala Val Glu Cys  
35 40 45

Phe Tyr Cys Leu Val Asp Lys Ala Ala Phe Glu Cys Trp Trp Phe Tyr  
50 55 60

Ser Phe Asp Thr  
65

<210> 9

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Pro His Thr Val Ala Gln Ala Gly Val Pro Gln His Asp Leu  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gln Ser Leu Leu Pro Arg Phe Lys Arg Phe Ser Cys Leu  
20 25 30

Ile Leu Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Arg Asn Met Asn Thr Ala Leu Ile  
35 40 45

Lys Arg Asn Arg Tyr Thr Pro Glu Thr Gly Arg Lys Ser  
50 55 60

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 10

Pro Gly Phe Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp  
1 5 10 15

Asp Tyr Arg Arg  
20

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 11

Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp  
1 5 10 15

Tyr Arg Arg

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp  
1 5 10 15

Asp Tyr Gly

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Phe Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His  
1 5 10

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14

Ser Thr Cys Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

Phe Ser Cys Pro Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16

Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr  
1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Leu Ser Leu Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 18

Ser Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 19

Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 20

Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg  
1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 21

Ser Ser Trp Asp Tyr

1 5

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22  
 Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Phe Ile Leu Phe Phe Leu  
 1 5 10

<210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 23  
 Trp Asp Tyr Arg Arg Phe Ile Phe Asn Phe Leu  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 24  
 Phe Asn Phe Cys Leu Phe  
 1 5

<210> 25

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<400> 25  
 Phe Ile Phe Asn Phe Leu  
 1 5

<210> 26  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<400> 26  
 Pro Ala Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<400> 27  
 Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 28

Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala Gly Ile Thr Gly Val  
1 5 10

<210> 29

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 29

cccgggttct tcaagttatt ctctgcccc agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc 60

<210> 30

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 30

cctgagctca agcagtcac ctgcctcagc ctcccaaagt gctgggatta caggcgt 57

<210> 31

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 31

cctcccgggc tcaagcgatt ctctgtctc agcctccaa gcagctggga ttacggg 57

<210> 32  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 32  
 ttctctgtc tcagcctccc aagcagctgg gattacgggc ac 42

<210> 33  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 33  
 tccacctgcc tcagcctccc aaagtgtgg gattacaggc gt 42

<210> 34  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 34  
 ttctctgcc ccagcctcct gagtagctgg gactacaggc gc 42

<210> 35  
 <211> 27  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 35

ctcagcctcc caagcagctg ggattac

27

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 36

ctcagcctcc caaagtgcctg ggattacagg cgt

33

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 37

agcctcctga gtagctggga ctacaggcgc

30

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 38  
ctcccagagt agctgggact acaggcgc 28

<210> 39  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 39  
gagtagctgg gactacaggc gc 22

<210> 40  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 40  
agcagctggg attac 15

<210> 41  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 41  
gagtagctgg gactacaggc gctttatttt atttttttta 40

<210> 42  
<211> 33  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 42

tgggactaca ggcgctttat tttaatttt ttg

33

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 43

tttaattttt gttgttt

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 44

tttattttta atttttg

18

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 45  
cctgcctcag cctccccagt agctgggatt acaggcatg 39

<210> 46  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 46  
cctgcctcag cctcccaagt agctgggacc aaagacatg 39

<210> 47  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 47  
cctgcctcgg cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtg 39

<210> 48  
<211> 1442  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (15)..(1139)

<400> 48  
tttttttttt tgag atg gag ttt tgc ctc ttg ttg ccc agg ctg gag tgc 50  
Met Glu Phe Ser Leu Leu Leu Pro Arg Leu Glu Cys  
1 5 10

aat ggc gca atc tca gct cac cgc aac ctc cgc ctc ccg ggt tca agc 98  
Asn Gly Ala Ile Ser Ala His Arg Asn Leu Arg Leu Pro Gly Ser Ser

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 15                                                              | 20  | 25  |     |
| gat tct cct gcc tca gcc tcc cca gta gct ggg att aca ggc atg tgc |     |     | 146 |
| Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ser Pro Val Ala Gly Ile Thr Gly Met Cys |     |     |     |
| 30                                                              | 35  | 40  |     |
| acc cac gct cgg cta att ttg tat ttt ttt tta gta gag atg gag ttt |     |     | 194 |
| Thr His Ala Arg Leu Ile Leu Tyr Phe Phe Leu Val Glu Met Glu Phe |     |     |     |
| 45                                                              | 50  | 55  | 60  |
| ctc cat gtt ggt cag gct ggt ctc gaa ctc ccg acc tca gat gat ccc |     |     | 242 |
| Leu His Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Pro Thr Ser Asp Asp Pro |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |     |
| tcc gtc tcg gcc tcc caa agt gct aga tac agg act ggc cac cat gcc |     |     | 290 |
| Ser Val Ser Ala Ser Gln Ser Ala Arg Tyr Arg Thr Gly His His Ala |     |     |     |
| 80                                                              | 85  | 90  |     |
| cgg ctc tgc ctg gct aat ttt tgt ggt aga aac agg gtt tca ctg atg |     |     | 338 |
| Arg Leu Cys Leu Ala Asn Phe Cys Gly Arg Asn Arg Val Ser Leu Met |     |     |     |
| 95                                                              | 100 | 105 |     |
| tgc cca agc tgg tct cct gag ctc aag cag tcc acc tgc ctc agc ctc |     |     | 386 |
| Cys Pro Ser Trp Ser Pro Glu Leu Lys Gln Ser Thr Cys Leu Ser Leu |     |     |     |
| 110                                                             | 115 | 120 |     |
| cca aag tgc tgg gat tac agg cgt gca gcc gtg cct ggc ctt ttt att |     |     | 434 |
| Pro Lys Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Gly Leu Phe Ile |     |     |     |
| 125                                                             | 130 | 135 | 140 |
| tta ttt ttt tta aga cac agg tgt ccc act ctt acc cag gat gaa gtg |     |     | 482 |
| Leu Phe Phe Leu Arg His Arg Cys Pro Thr Leu Thr Gln Asp Glu Val |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |     |
| cag tgg tgt gat cac agc tca ctg cag cct tca act cct gag atc aag |     |     | 530 |
| Gln Trp Cys Asp His Ser Ser Leu Gln Pro Ser Thr Pro Glu Ile Lys |     |     |     |
| 160                                                             | 165 | 170 |     |
| cat cct cct gcc tca gcc tcc caa gta gct ggg acc aaa gac atg cac |     |     | 578 |
| His Pro Pro Ala Ser Ala Ser Gln Val Ala Gly Thr Lys Asp Met His |     |     |     |
| 175                                                             | 180 | 185 |     |
| cac tac acc tgg cta att ttt att ttt att ttt aat ttt ttg aga cag |     |     | 626 |
| His Tyr Thr Trp Leu Ile Phe Ile Phe Ile Phe Asn Phe Leu Arg Gln |     |     |     |

|                                                                                                                                                                      |     |     |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|--|
| 190                                                                                                                                                                  | 195 | 200 |  |
| <p>agt ctc aac tct gtc acc cag gct gga gtg cag tgg cgc aat ctt ggc 674<br/> Ser Leu Asn Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp Arg Asn Leu Gly<br/> 205 210 215 220</p> |     |     |  |
| <p>tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ttc aag tta ttc tcc tgc ccc agc 722<br/> Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Phe Lys Leu Phe Ser Cys Pro Ser<br/> 225 230 235</p>     |     |     |  |
| <p>ctc ctg agt agc tgg gac tac agg cgc cca cca cgc cta gct aat ttt 770<br/> Leu Leu Ser Ser Trp Asp Tyr Arg Arg Pro Pro Arg Leu Ala Asn Phe<br/> 240 245 250</p>     |     |     |  |
| <p>ttt gta ttt tta gta gag atg ggg ttc acc atg ttc gcc agg ttg atc 818<br/> Phe Val Phe Leu Val Glu Met Gly Phe Thr Met Phe Ala Arg Leu Ile<br/> 255 260 265</p>     |     |     |  |
| <p>ttg atc tct gga cct tgt gat ctg cct gcc tcg gcc tcc caa agt gct 866<br/> Leu Ile Ser Gly Pro Cys Asp Leu Pro Ala Ser Ala Ser Gln Ser Ala<br/> 270 275 280</p>     |     |     |  |
| <p>ggg att aca ggc gtg agc cac cac gcc cgg ctt att ttt aat ttt tgt 914<br/> Gly Ile Thr Gly Val Ser His His Ala Arg Leu Ile Phe Asn Phe Cys<br/> 285 290 295 300</p> |     |     |  |
| <p>ttg ttt gaa atg gaa tct cac tct gtt acc cag gct gga gtg caa tgg 962<br/> Leu Phe Glu Met Glu Ser His Ser Val Thr Gln Ala Gly Val Gln Trp<br/> 305 310 315</p>     |     |     |  |
| <p>cca aat ctc ggc tca ctg caa cct ctg cct ccc ggg ctc aag cga ttc 1010<br/> Pro Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro Leu Pro Pro Gly Leu Lys Arg Phe<br/> 320 325 330</p>    |     |     |  |
| <p>tcc tgt ctc agc ctc cca agc agc tgg gat tac ggg cac ctg cca cca 1058<br/> Ser Cys Leu Ser Leu Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Gly His Leu Pro Pro<br/> 335 340 345</p>    |     |     |  |
| <p>cac ccc gct aat ttt tgt att ttc att aga ggc ggg gtt tca cca tat 1106<br/> His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe Ile Arg Gly Gly Val Ser Pro Tyr<br/> 350 355 360</p>    |     |     |  |
| <p>ttg tca ggc tgg tct caa act cct gac ctc agg tgaccacct gcctcagcct 1159<br/> Leu Ser Gly Trp Ser Gln Thr Pro Asp Leu Arg</p>                                        |     |     |  |

365

370

375

tccaaagtgc tgggattaca ggcgtgagcc acctcaccca gccggctaatt ttagataaaa 1219

aaatatgtag caatgggggg tcttgctatg ttgccaggc tggctcctaaa cttctggctt 1279

catgcaatcc ttccaaatga gccacaacac ccagccagtc acatttttta aacagttaca 1339

tctttatitt agtataactag aaagtaatac aataaacatg tcaaacctgc aaattcagta 1399

gtaacagagt tcttttataa cttttaaaca aagctttaga gca 1442