



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월19일

(11) 등록번호 10-1930916

(24) 등록일자 2018년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7016766

(22) 출원일자(국제) 2010년11월30일

심사청구일자 2015년11월16일

(85) 번역문제출일자 2012년06월27일

(65) 공개번호 10-2012-0114277

(43) 공개일자 2012년10월16일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2010/001613

(87) 국제공개번호 WO 2011/063477

국제공개일자 2011년06월03일

(30) 우선권주장

12/627,647 2009년11월30일 미국(US)

12/793,386 2010년06월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

KR1020050103288 A*

(뒷면에 계속)

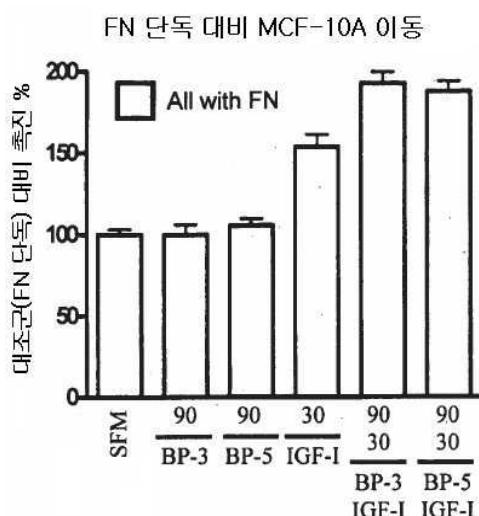
전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 피브로넥틴 : 성장 인자 키메라

(57) 요 약

IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF와 같은 성장 인자 및 피브로넥틴, 또는 성장 인자 수용체 및 피브로넥틴의 인테그린 수용체-결합 도메인 모두로의 결합 및 활성화를 가능하게 하는 그의 도메인을 포함하는 단리된 단백질 복합체가 제공된다. 이 단백질 복합체는 성장 인자 및 피브로넥틴 서열이 링커 서열에 의해 연결된 것인 합성 단백질을 포함한다. 또한, 상피 세포 이동이 요구되는 것인 상처 치유, 조직 공학, 피부 대체(skin replacement), 및 피부 보충(skin replenishment), 및 화상의 치료와 같은 미용 및 치료적 처치에서 세포 이동 및/또는 증식을 촉진 또는 유도하기 위한, 이 단백질 복합체의 용도가 제공된다. 다른 구체예에서, 본 발명은 암 세포 전이, 특히, 유방암과 관련된 암 세포 전이의 억제를 제공한다.

대 표 도 - 도2

(56) 선행기술조사문현

Blood. 1999, Vol.938, No.4, pp.1221-1230

FEBS. 1992, Vol.298, No.2,3, pp.126-128

Biotechnology Letters. 2004, Vol.26,
pp.1837-1840*

WO2000055206 A1

WO1999054359 A1

R. Clark et al., Journal of investigative
dermatology, Vol.121, No.4, pp.695-705
(2003.10.)

Chi-Rosso, G. 등, The Journal of Biological
Chemistry Vol.272, No.50, pp.31447-31452
(1997)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 성장 인자 또는 적어도 동족 성장 인자(cognate growth factor) 수용체를 결합할 수 있는 상기 성장 인자의 도메인; 및

(ii) 서열 번호 1로 표시되는 피브로넥틴(FN) 서열의 1447번 내지 1536번 아미노산으로 이루어진 피브로넥틴의 도메인 10의 아미노산 서열을 포함하는, 합성 키메라 단백질의 형태인 단리된 단백질 복합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자-I(IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자-II(IGF-II), 상피세포 성장 인자(EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 및 각질세포 성장 인자(KGF)로부터 선택되는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, IGFBP 아미노산 서열을 포함하지 않는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 8

청구항 1에 있어서, FN의 추가적인 단편을 더 포함하는 것인 단리된 단백질 복합체로서, 상기 FN의 추가적인 단편은 서열 번호 1로 표시되는 FN 서열의 50번 내지 273번 아미노산을 포함하는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 FN의 추가적인 단편은 상기 서열 번호 1로 표시되는 FN 서열의 184번 내지 273번 아미노산을 포함하는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 하나 이상의 링커 서열을 더 포함하는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 링커 서열은 프로테아제 절단 부위를 포함하는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 링커 서열은:

- (i) Gly₄ Ser (서열 번호 7);
- (ii) Gly₄ Ser₃ (서열 번호 8);
- (iii) (Gly₄ Ser)₃ (서열 번호 9);
- (iv) (Gly₄ Ser)₄ (서열 번호 10);
- (v) Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열 번호 11); 및
- (vi) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열 번호 12)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 단리된 단백질 복합체.

청구항 14

청구항 1의 단리된 단백질 복합체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 15

벡터 중 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 청구항 14의 단리된 핵산을 포함하는, 유전자 구조체(genetic construct).

청구항 16

청구항 15에 있어서, 발현 구조체이고, 상기 단리된 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 유전자 구조체.

청구항 17

청구항 15의 유전자 구조체를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 18

청구항 1의 단리된 단백질 복합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 상처 치유를 촉진시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 19

청구항 1의 단리된 단백질 복합체에 의해 담지되거나(impregnated), 코팅되거나, 또는 상기 단리된 단백질 복합체를 포함하는, 외과용 이식물, 스카폴드 또는 인공기관.

청구항 20

청구항 1의 단리된 단백질 복합체를 포함하는, 상처 또는 화상 드레싱(dressing).

청구항 21

삭제

청구항 22

청구항 18에 있어서, 상기 단리된 단백질 복합체는 인 시투(in situ)로 세포 이동 또는 증식을 촉진하기 위해 동물에게 투여되는 것인 조성물.

청구항 23

청구항 18에 있어서, 상기 단리된 단백질 복합체는 예방 또는 치료적으로 인 시투로 상처 치유를 촉진하는 것인 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

청구항 18에 있어서, 상기 단리된 단백질 복합체는 인 비트로에서 하나 이상의 세포 또는 조직에 투여되는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 성장 인자 수용체 및 피브로넥틴의 인테그린 수용체로의 결합 및 활성화를 가능하게 하는 개별적인 도메인을 갖는 단백질 복합체에 관한 것이다. 특정한 구체예에서, 본 발명은 인슐린-유사 성장 인자(insulin-like growth factor-I, IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자-II (IGF-II), 상피세포 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor, bFGF), 또는 각질세포 성장 인자(keratinocyte growth factor, KGF) 수용체-결합 도메인과 같은 성장 인자 및 피브로넥틴(FN)의 인테그린 수용체-결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질(chimeric protein)에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 세포 이동을 촉진하는 단백질 복합체 및 세포 이동 및/또는 증식을 촉진 또는 유도하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 및 방법은 상피 세포 이동 및/또는 증식이 요구되는 것인 상처 치유, 조직 공학, 피부 대체(skin replacement), 및 피부 보충(skin replenishment)와 같은 미용 및 치료적 처치, 및 화상의 치료에서 용도를 갖는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 암 세포 전이, 특히, 유방암과 관련된 암 세포 전이의 예방 또는 치료와 관련된, 본 발명에 의해 제공된 치료를 제공한다.

배경 기술

[0002]

파형성, DNA 합성, 분화, 세포 주기 진행 및 아폽토시스의 억제를 포함한, 광범위한 세포 과정에 관여하는 다수의 펩티드 성장 인자가 알려져 있고, 인슐린-유사 성장 인자(IGF, 예를 들면, IGF-I 및 IGF-II) (Jones & Clemmons, 1995, Endocrine Rev. 16 3; Wood & Yee, 2000, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia 5 1), EGF (Heldin et al, 1981, Science 4 1122), bFGF (Taraboletti. et al, 1997, Cell Growth. Differ. 8 471), 및 KGF (Marchese et al, 1990, J. Cell Physiol. 144 326)를 포함한다. 이 효과들은 각각 그들의 동족(cognate) 티로신-키나아제 결합 세포 표면 수용체(tyrosine-kinase linked cell surface receptor), 타입-I IGF 수용체(IGF-IR), EGF 수용체, bFGF 수용체, 및 KGF 수용체로의 결합을 통해 매개된다. IGF는 또한 주요 역할이 유리 IGF에 결합하고, 그에 의해 그들의 반감기, 특이성 및 활성을 조절하는 것인 IGFBP로 지칭되는, 특이적 결합 단백질의 패밀리에 의해 엄격하게 조절된다 (Clemmons, 1998, Mol. Cell. Endocrinol. 140 19).

[0003]

피브로넥틴은 모든 척추동물에서 발견되는 고 분자량 부착성 당단백질(adhesive glycoprotein)이다. 피브로넥틴은 세포 부착, 세포 형태 및 표면 아키텍쳐(surface architecture)에서 역할을 수행한다. 그의 주기능은 발생, 조직 복구 및 상처 치유 동안 세포 이동, 세포 증식의 조절, 및 분화에서의 그의 관련인 것으로 보인다(Alitalo & Vahtera, 1982, Adv. Cancer Res. 37 111; Yamada, 1983, Annu. Rev. Biochem. 62 761; Hynes, 1985, Annu. Rev. Cell Biol. 167). 피브로넥틴 다양성(fibronectin polymorphism)은 단일 피브로넥틴 일차 전사물의 3개의 영역(ED-A, ED-B 및 IIICS)에서 대안적인 스플라이싱 패턴 때문이다(Petersen et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 137; Schwarzbauer et al., 1983, Cell 35 421; Kombluh et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12 5853). 피브로넥틴의 정확한 조성은 조직형 및/또는 세포 상태에 의존적이다. 인간에서, 잠재적으로 20개의 상이한 피브로넥틴 형태가 존재하며, 대부분 타입 3 모듈의 대안적인 스플라이싱으로부터 나타난다(Potts and Campbell, 1994, Curr. Opin. Cell Biol. 6 648). 피브로넥틴 스플라이싱 변이체의 발현은 발생적으로 조절되고, 조직-특이적인 것으로 보인다.

[0004]

피브로넥틴은 헤파린, 콜라겐 및 히알루론산을 포함한, 다수의 세포와 단백질에 결합하는 능력을 갖는다. 피브로넥틴은 세포 표면 상에서 세포와 매트릭스의 상이한 성분 및 막-결합 피브로넥틴 수용체(인테그린)로의 결합에 의해 세포-세포 상호작용 및 세포와 매트릭스와의 세포 상호작용을 주도한다.

[0005]

그러나, 세포 이동 및/또는 증식과 같은 생물학적 반응의 촉진 측면에서, 단백질 복합체에 존재하는, 성장 인자와 피브로넥틴, 및 그들의 개별적 도메인의 상대적 기여는 미지로 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF와 같은 성장 인자 및 FN을 포함하는 합성 키메라의 형태인 단백질 복합체가 동족 성장 인자 수용체 및 FN-결합 인테그린 수용체에 결합하고 상승적으로 공동-활성화시키는 것에 의해 세포 이동 및/또는 증식을 촉진한다는 것을 발견했다.
- [0007] 따라서, 본 발명은 전반적으로, 성장 인자의 수용체-결합 도메인 및 적어도, 인테그린 수용체를 결합할 수 있는 피브로넥틴의 도메인을 포함하는 단리된 단백질 복합체로서, 상기 단리된 단백질 복합체는 상기 성장 인자와 인테그린 수용체를 공동-활성화하여, 그에 의해 생물학적 반응을 유발시킬 수 있는 것인 단리된 단백질 복합체에 관한 것이다.
- [0008] 제1 양태에서, 본 발명은
- (i) 성장 인자 또는 적어도, 동족 성장 인자(cognate growth factor)를 결합할 수 있는 상기 성장 인자의 도메인; 및
- (ii) 피브로넥틴, 또는 적어도 피브로넥틴(FN)의 인테그린-결합 도메인을 포함하는 피브로넥틴의 단편의 아미노산 서열을 포함하는, 합성 키메라 단백질의 형태인 단리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0011] 바람직하게는, 전술된 양태에 따라, 상기 성장 인자는 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 GF이다.
- [0012] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_1 또는 α_4 인테그린이다.
- [0013] 본 발명의 이 양태는 또한 상기 합성 키메라 단백질 중 피브로넥틴의 하나 이상의 추가적인 단편의 아미노산 서열을 고려한다.
- [0014] 본 발명의 이 양태는 그의 범위 내에 전술된 (i) 및 (ii)에 상응하는 아미노산 서열, 및 상기 피브로넥틴의 하나 이상의 추가적인 단편에 상응하는 아미노산 서열의 아미노산 결실, 추가, 치환 및/또는 돌연변이를 포함한다.
- [0015] 제2 양태에서, 본 발명은 제1 양태의 단리된 단백질 복합체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0016] 제3 양태에서, 본 발명은 발현 벡터 중 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된, 제2 양태의 단리된 핵산을 포함하는 유전자 구조체(genetic construct)를 제공한다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 유전자 구조체는 발현 구조체이다.
- [0018] 제4 양태에서, 본 발명은 제3 양태의 유전자 구조체를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0019] 제5 양태에서, 본 발명은 제1 양태의 단리된 단백질 복합체 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 이 양태는 또한 합성 단백질을 발현하는, 제4 양태의 숙주 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다.
- [0021] 제6 양태에서, 본 발명은 제1 양태의 합성 단백질에 특이적인 항체를 제공한다.
- [0022] 제7 양태에서, 본 발명은 성장 인자 수용체 및 인테그린 수용체에 결합하는 합성 단백질을 이용하는 단계를 포함하는, 세포 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 성장 인자 수용체는 IGF-IR, EGF 수용체, bFGF 수용체, 또는 KGF 수용체이다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_1 또는 α_4 인테그린이다.
- [0025] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 이 양태는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 상처 치유를 촉진하기 위해 상피세포/각질세포/섬유모세포 이동 및/또는 증식의 촉진 또는 유도에 관한 것이다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 합성 단백질은 본 발명의 제1 양태에 따른 것이다.
- [0027] 제8 양태에서, 본 발명은 성장 인자 및 피브로넥틴을 포함하는 복합체에 의한 성장 인자 수용체 및 인테그린 수용체의 결합을 방지, 억제 또는 감소시키는 단계를 포함하는, 세포 이동 및/또는 증식을 방지하는 방법을 제공

한다.

[0028] 바람직하게는, 상기 성장 인자 수용체는 IGF-IR, EGF 수용체, bFGF 수용체, 또는 KGF 수용체이다.

[0029] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_1 또는 α_4 인테그린이다.

[0030] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 이 양태는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 전이성 암 세포 이동 및/또는 증식의 예방 또는 억제에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 이 양태에 의해 고려되는 특정한 실시예는 유방암 전이의 예방 또는 억제이다.

[0032] 또한, 제7 양태 및 제8 양태의 방법은 처치의 예방 및 치료적 방법을 포함할 수 있다.

[0033] 제9 양태에서, 본 발명은

[0034] (i) 성장 인자 및 피브로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 효능제(agonist)이거나; 또는

[0035] (ii) 성장 인자 및 피브로넥틴을 포함하는 단백질 복합체의 길항제(antagonist)인 분자를 생성하기 위한, 제1 양태의 단리된 단백질 복합체의 용도를 제공한다.

[0036] 일 구체예에서, 본 발명은

[0037] (i) IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-I:IGFBP:FN 단백질 복합체의 효능제이거나; 또는

[0038] (ii) IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-I:IGFBP:FN 단백질 복합체의 길항제인 분자를 생성하기 위한, 제1 양태의 합성 단백질의 용도를 제공한다.

[0039] 본 발명의 이 양태에 따라 생성된 효능제 및/또는 길항제는 상처 치유, 조직 공학, 피부 재생 및/또는 암 세포 전이 또는 피부의 과다증식 질환, 예를 들면, 흉터 및 건선의 예방의 촉진에서 특별한 효능을 가질 수 있다.

[0040] 제10 양태에서, 본 발명은 제1 양태의 단리된 단백질 복합체를 포함하는 생체물질(biomaterial)을 제공한다.

[0041] 특정한 구체예에서, 상기 생체물질은 본 발명의 단리된 단백질 복합체로 적절하게 담지되거나, 코팅되거나, 또는 본 발명의 단리된 단백질 복합체를 포함하는 외과용 이식물(surgical implant), 인공기관, 스카풀드, 상처 또는 화상 드레싱, 등일 수 있다.

과제의 해결 수단

[0042] 본 발명은 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF와 같은 성장 인자 및 FN을 포함하는 합성 키메라가 반응성 세포(responsive cell)에 의해 발현된 그들의 동족 성장 인자 수용체 및 FN-결합 인테그린 수용체에 결합하고 그를 통해 세포 이동에 대한 그들의 생물학적 효과를 발휘한다는 발견으로부터 유래되었다. 보다 구체적으로, 이 듀얼 결합 사건(dual binding event)은 세포 이동 및/또는 증식을 상승적으로 촉진한다. 이 안정한, 생물학적 활성 단쇄 키메라 분자는 적어도, FN의 인테그린-결합 도메인을 포함하는 FN의 하나 이상의 타입-III 도메인과 함께 그의 동족 수용체에 결합할 수 있는 성장 인자의 최소 도메인(minimal domain) 또는 영역을 포함한다.

[0043] 이 발견은 본 발명자들이 FN의 인테그린-결합 도메인과 함께, 적어도 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF의 최소 도메인 또는 영역, 예를 들면, 그들의 동족 수용체에 결합할 수 있는 최소 도메인 또는 영역을 포함하는 단리된 단백질 복합체를 제공하게 했다. 훨씬 더 구체적으로, 이 도메인들을 포함하는, 단일, 인접(contiguous) 단백질이 생성될 수 있다.

[0044] 단일 합성 단백질의 형태인, 그와 같은 단백질 복합체는 그들의 동족 수용체 및 FN-결합 인테그린 수용체에 조화롭게 결합하거나 또는 함께 라이게이션(co-ligate)하고, 따라서, 세포 이동 및/또는 증식 및 상처 치유의 촉진을 위한 유용한 작용제이다. 유사하게, 동족 수용체 및 FN-결합 인테그린 수용체 동시-라이게이션(co-ligation)의 방지가 암세포 전이를 예방하기 위해 이용될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서, 달리 표시되지 않으면, "포함한다(comprise, comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 베타적으로가 아니라, 포함적으로 사용되어, 기재된 정수 또는 정수들의 군은 하나 이상의 다른 기재되지 않은 정수 또는 정수들의 군을 포함할 수 있다.

[0046] 성장 인자 수용체-결합 도메인 및 인테그린-결합 도메인의 구체적 상황에서, 그와 같은 도메인은 필요한 경우,

다른, 추가적인 아미노산과 함께, 그 도메인의 아미노산 서열을 포함할 것이다.

[0047] 또한, 그와 같은 도메인은 10개 이하, 바람직하게는 5개 이하, 또는 훨씬 더 바람직하게는 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 하나의 추가적인 아미노산과 함께, 도메인의 아미노산 서열로 "필수적으로 구성될(consist essentially of)" 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0048] 그와 같은 도메인은 추가적인 아미노산의 부재시, 도메인의 아미노산으로 "구성될(consist of)" 수 있는 것으로 또한 이해될 것이다.

[0049] 본 발명의 목적을 위해, "단리된(isolated)"은 그의 천연 상태로부터 분리되었거나, 인간에 의한 조작을 거친 물질을 의미한다. 단리된 물질은 정상적으로 그의 천연 상태에서 그에 수반되는 성분들을 실질적으로 또는 반드시 포함하지 않을 수 있거나, 또는 그의 천연 상태에서 정상적으로 그에 수반되는 성분들과 함께 인위적 상태로 존재하게 하도록 조작될 수 있다. 단리된 물질은 원형(native)이거나, 화학적 합성 형태 또는 재조합 형태일 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용된, "합성(synthetic)"은 천연이 아니라, 인간의 기술적 개입을 통해 제조된 것을 의미한다. 합성 단백질 및 핵산의 경우, 이는 당해 기술 분야에서 잘 이해되는 재조합 기법, 화학적 합성 기법 또는 조합적 기법(combinational)에 의해 제조된 분자들을 포괄한다.

[0051] "단백질(protein)"은 아미노산 중합체를 의미한다. 아미노산은 당해 분야에서 잘 이해되는 바와 같이, 천연 아미노산 또는 비-천연 아미노산, D-아미노산 또는 L-아미노산일 수 있다. 용어 "단백질"은 또한 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 바와 같이, "당단백질(glycoprotein)", "지방단백질(lipoprotein)" 등과 같은 용어를 포함하고 포괄한다.

[0052] "펩티드(peptide)"는 50개 미만의 아미노산을 갖는 단백질이다.

[0053] "폴리펩티드(polypeptide)"는 50개 이상의 아미노산을 갖는 단백질이다.

[0054] 전술된 바와 같이, 본 발명은 하나의 특정한 양태에서, 하기의 아미노산 서열을 포함하는 합성 키메라 단백질의 형태인 단리된 단백질을 제공한다:

[0055] (i) 성장 인자, 또는 적어도, 동족 성장 인자 수용체에 결합할 수 있는 성장 인자의 도메인의 아미노산 서열; 및

[0056] (ii) 피브로넥틴, 또는 적어도 피브로넥틴의 인테그린-결합 도메인을 포함하는 피브로넥틴의 단편의 아미노산 서열.

[0057] 본 명세서에서 사용된, "키메라 단백질(chimeric protein)"은 아미노산의 연속 서열을 포함하고, 상기 아미노산은 피브로넥틴의 인테그린 수용체-결합 도메인, 선택적으로 피브로넥틴의 추가적 도메인, 및 성장 인자, 또는 적어도 성장 인자의 수용체-결합 도메인으로부터 유래된다.

[0058] 본 명세서에서 사용된, "성장 인자(growth factor)"는 인 비트로 및/또는 인 비보에서 세포 증식, 분화, 생존 및/또는 이동을 조절할 수 있는 생물학적 활성 단백질이다.

[0059] 대표적인 성장 인자는 IGF (Jones & Clemons, 1995, Endocrine Rev. **16** 3; Wood & Yee, 2000, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia **5** 1; Keiss et al., 1994, Hormone Research **41** 66), 예를 들면, IGF-I (UniPrbt B/Swiss-Prot: #P05019, 성숙 단백질(mature protein)은 완전 서열의 49번 내지 118번 아미노산 잔기를 포함함) 및 IGF-II (UniProt B/Swiss-Prot: #P01344, 성숙 단백질은 완전 서열의 25번 내지 91번 아미노산 잔기를 포함함), VEGF (Neufeld et al., 1999, FASEB J. **13** 9-22), PDGF (Heldin, 1992, EMBO J. **11** 4251-4259), EGF (Heldin et al., 1981, Science **4** 1122-1123; UniProtKB/Swiss-Prot: #P01133, 성숙 단백질은 완전 서열의 971번 내지 1023번 아미노산 잔기를 포함함), 섬유모세포 성장 인자 (FGF; Nurcombe et al., 2000, J. Biol. Chem. **275** 30009-30018), bFGF (Taraboletti et al., 1997, Cell Growth. Differ. **8** 471-479; UniProtKB/Swiss-Prot: #P09038, 성숙 단백질은 완전 서열의 143번 내지 288번 아미노산 잔기를 포함함), 오스테오პ틴(osteopontin) (Nam et al., 2000, Endocrinol. **141** 1100), 트롬보스폰딘-1(Nam et al., 2000, supra), 테나신-C (Arai et al., 1996, J. Biol. Chem. **271** 6099), PAI-1(Nam et al., 1997, Endocrinol. **138** 2972), 플라스미노겐 (Campbell et al., 1998, Am. J. Physiol. **275** E321), 피브리노겐 (Campbell et al., 1999, J. Biol. Chem **274** 30215), 피브린 (Campbell et al., 1999, supra), 트랜스페린 (Weinzimer et al., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. **86** 1806), 및 KGF (Marchese et al., 1990, J. Cell Physiol. **144** 326-32;

UniProtKB/Swiss-Prot: #P21781, 성숙 단백질은 32개의 아미노산 잔기를 포함함)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 합성 키메라 단백질의 형태인 단리된 단백질 복합체는 성장 인자, 또는 적어도 동족 성장 인자 수용체에 결합할 수 있는 성장 인자의 도메인을 포함한다.

- [0060] 이 상황에서, "도메인(domain)"은 적어도 동족 성장 인자 수용체에 결합할 수 있는 성장 인자의 부분 또는 영역을 의미한다. 베타적인 것은 아니나, 통상적으로, 동족 성장 인자 수용체는 세포에 의해 발현되고, 상기 성장 인자의 도메인에 의한 상기 동족 성장 인자 수용체의 결합 또는 라이케이션은 세포 증식, 분화, 생존 및/또는 이동과 같은 세포 반응을 유발한다.
- [0061] 구체적으로 IGF-I에 대하여, 상기 도메인은 적합하게, 24번 아미노산 잔기를 포함하고, 이 잔기는 루이신 잔기가 아니다.
- [0062] 전형적으로, 상기 잔기는 티로신이다.
- [0063] 구체적으로 IGF-II에 대하여, 상기 도메인은 적합하게, 27번 아미노산 잔기를 포함하고, 이 잔기는 루이신 잔기가 아니다.
- [0064] T전형적으로, 상기 잔기는 티로신이다.
- [0065] 구체적으로 IGF-I에 대하여, 일 구체예에서, 상기 도메인은 IGF-I의 1번 내지 70번 잔기로 구성된다.
- [0066] 또 다른 구체예에서, 상기 도메인은 IGF-I의 4번 내지 70번 잔기로 구성된다. 또한, 본 발명의 단리된 단백질 복합체의 또 다른 성분은 적어도 피브로넥틴의 인테그린-결합 도메인인 것으로 이해될 것이다.
- [0067] 바람직하게는, 인테그린 수용체는 α_1 또는 α_4 인테그린이다.
- [0068] 특정한 이론에 의해 한정되기를 원치 않으나, 합성 키메라 단백질은 상기 성장인자의 동족 수용체와 피브로넥틴의 인테그린 수용체를 동시에 라이케이션시키고 동시에 활성화시킬 수 있어서, 그에 의해 세포 이동을 자극, 유도, 강화, 또는 촉진하는 것으로 제안된다.
- [0069] 본 발명에 따른 키메라 단백질의 장점은 이들이 화학적 합성 또는 재조합 수단에 의해 용이하게 제조되고, 비-공유결합에 의해 결합된 올리고-단백질 복합체에서 요구되는 단백질-단백질 상호작용의 유지에 의존적이지 않기 때문에, 인 비보에서 더 안정할 것으로 예상된다.
- [0070] 이와 관련하여, IGF-I의 수용체-결합 도메인을 포함하는 단리된 단백질 복합체는 또한 IGFBP를 포함하나, 전술된 작용 방식에 따라, IGFBP는 바람직하게는 IGF-I/FN 합성 키메라에 존재하지 않는 것으로 제안된다.
- [0071] 다른 구체예에서, 본 발명은 단리된 단백질 복합체, 예를 들면, IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 및 FN, 또는 적어도 FN의 인테그린-결합 도메인을 포함하는 FN의 단편을 포함하는, 합성 키메라 단백질의 형태인 단리된 단백질 복합체를 제공한다.
- [0072] 바람직하게는, 상기 인테그린 수용체는 α_1 또는 α_4 인테그린 수용체이다.
- [0073] 이 경우, "단편(fragment)"은 피브로넥틴의 도메인, 서브-서열(sub-sequence) 또는 부분을 의미한다. 단편은 바람직하게는 성숙(mature) 피브로넥틴 서열의 500개 미만, 400개 미만, 300개 미만, 또는 보다 바람직하게는 약 80개 내지 280개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 피브로넥틴의 복수개의 단편도 또한 고려된다.
- [0074] 피브로넥틴의 인테그린-결합 도메인은 적합하게 RGD 서열을 포함한다. RGD 서열은 피브로넥틴 타입 III에서 도메인 8 내지 10(피브로넥틴 서열의 1266번 내지 1536번 아미노산)에 위치한다. 보다 구체적으로, RGD 서열은 피브로넥틴 서열의 1447번 내지 1536번 아미노산에 의해 한정된, 피브로넥틴 타입 III 도메인 10에 존재하나, 이 차 인테그린-결합 부위는 보다 큰 8번 내지 10번 도메인 영역에 걸쳐 존재할 수 있다.
- [0075] 따라서, 하나의 특정한 구체예에서, 합성 키메라는 RGD 서열을 포함하는, 피브로넥틴 단편을 포함하고, 상기 단편은 피브로넥틴 아미노산 서열의 1447번 내지 1536번 아미노산 중 6개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 또는 1447번 내지 1536번 아미노산 모두를 포함하거나, 또는 이들로 구성된다.
- [0076] 또 다른 특정한 구체예에서, 상기 합성 키메라는 RGD 단편을 포함하는 피브로넥틴 단편을 포함하고, 상기 단편은 피브로넥틴 아미노산 서열의 1266번 내지 1536번의 아미노산 중 6개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 100개 이상, 150개 이상, 200개 이상, 250개 이상, 260개 이상, 또는 모든 아미노산을 포함하거나 이들로

구성된다.

[0077] 또 다른 특정한 구체예에서, 상기 합성 키메라는 전술된 구체예에 따른 RGD 서열을 포함하는 피브로넥틴 단편을 포함하고, 상기 합성 키메라는 피브로넥틴 아미노산 서열의 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 300개 이상, 500개 이상, 800개 이상, 또는 1000개 이상의 아미노산, 예를 들면, N-말단의 1266번 잔기 및/또는 C-말단의 1536번 잔기를 더 포함한다. 따라서, 상기 합성 키메라는 피브로넥틴 타입 I 및/또는 타입 II 도메인, 예를 들면, 피브로넥틴 아미노산 서열의 50번 내지 273번 아미노산 중 6개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 100개 이상, 150개 이상, 200개 이상, 또는 피브로넥틴 아미노산 서열의 50번 내지 273번 아미노산 모두를 포함하거나 또는 이들로 구성된 피브로넥틴 단편을 포함할 수 있다.

[0078] 또 다른 특정한 구체예에서, 상기 합성 키메라는 피브로넥틴 아미노산 서열의 1173번 내지 1536번 아미노산 중 6개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 100개 이상, 150개 이상, 200개 이상, 250개 이상, 300개 이상, 350개 이상, 또는 피브로넥틴 아미노산 서열의 1173번 내지 1536번 아미노산 모두를 포함하거나 또는 이들로 구성된 피브로넥틴 단편을 포함할 수 있다.

[0079] 전술된 피브로넥틴 서열의 번호지정(numbering)은 도 1에 표시된 피브로넥틴 서열을 참조하여 이루어진 것으로 이해될 것이다. 이 피브로넥틴 서열은 UniProtKB Protein Database, 단백질 수탁 번호 P02751로부터 유래된다. 피브로넥틴 도메인 및 영역은 표 1에 표시된다.

[0080] 바람직하게는, 피브로넥틴 또는 인테그린-결합 도메인을 포함하는 단편을 포함하는 합성 키메라는 IGFBP 아미노산 서열을 포함하지 않는다.

[0081] 바람직하게는, 전술된 합성 키메라 단백질은 성장 인자 서열과 피브로넥틴 아미노산 서열 사이에 위치하고 인접한 "링커 서열(linker sequence)"을 더 포함한다.

[0082] 일 구체예에서, 상기 링커 서열은 하나 이상의 글리신 잔기 및 하나 이상의 세린 잔기를 포함한다.

[0083] 링커 서열의 특정한 예는 Gly₄ Ser (서열 번호 7); Gly₄ Ser₃ (서열 번호 8); (Gly₄ Ser)₃ (서열 번호 9); 및 (Gly₄ Ser)₄ (서열 번호 10)로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 또 다른 구체예에서, 상기 링커 서열은 서열 Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열 번호 11)에 따른 것과 같은 Plasmin Cleavage Recognition Site (Sakiyama-Elbert et al, 2001, FASEB **15** 1300)을 포함한다.

[0085] 또 다른 구체예에서, 상기 링커 서열은 서열 Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열 번호 12)에 따른 것과 같은 Collagenase-3 Cleavage Recognition Site (Kim & Healy, 2003, Biomacromolecules **4** 1214)를 포함한다.

[0086] 본 발명은 또한 본 발명의 합성 키메라 단백질의 생물학적 활성 단편의 용도 및/또는 본 명세서에 예시된 특정한 성장 인자 수용체-결합 도메인 및 인테그린-결합 도메인의 생물학적 활성 단편의 용도까지 확장된다.

[0087] 일 구체예에서, 상기 "생물학적-활성 단편(biologically-active fragment)"은 자신이 기원한 단백질의 생물학적 활성의 10% 이상, 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상 및 훨씬 더 바람직하게는 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상을 갖는다.

[0088] 또 다른 구체예에서, 상기 "생물학적 활성 단편(biologically-active fragment)"은 자신이 기원한 단백질의 연속된 아미노산 서열의 10% 이상, 바람직하게는 25% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상 및 훨씬 더 바람직하게는 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상을 갖는다.

[0089] 또한, 본 발명의 변이체 단백질 변이체를 고려한다.

[0090] 통상적으로, 및 단백질과 관련하여, "변이체(variant)" 단백질은 다른 아미노산에 의해 치환된 하나 이상의 아미노산을 갖는다. 일부 아미노산은 단백질의 활성의 속성을 변화시키지 않으면서, 광범위하게 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 변화될 수 있다는 것이 당해 기술 분야에서 잘 이해된다(보존적 치환).

[0091] 기준 서열(reference sequence), 예를 들면, 성장 인자, 성장 인자의 수용체-결합 도메인, 피브로넥틴의 인테그린-결합 도메인, IGFBP의 하나 이상의 아미노산 잔기, 또는 합성 키메라 단백질에 존재하는 하나 이상의 상응하는 잔기는 본 발명의 단리된 단백질 복합체의 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않으면서, 변형되거나, 결실되거나, 또는 추가적인 서열이 첨가될 수 있다.

[0092] 일 구체예에서, 단백질 변이체는 기준 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 또는 85% 이상 및 보다 바람직하게는 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성(sequence identity)을

공유한다.

- [0093] 바람직하게는, 서열 동일성은 기준 서열의 전장과 60% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상 또는 보다 바람직하게는 95% 이상, 98% 이상 또는 실질적으로 기준 서열의 전장에 대해 측정된다.
- [0094] 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위해서, 아미노산 서열 및/또는 뉴클레오티드 서열의 최적 정렬(alignment)은 알고리즘 (Geneworks program by Intelligentech; GAP, BESTFIT, FAST A, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, WI, USA)의 전산화된 실행 또는 검사 및 선택된 다양한 방법 중 하나에 의해 생성된 최적 정렬 (즉, 비교 범위(comparison window)에 걸쳐 가장 높은 상동성 백분율을 보임)에 의해 수행된다. 기준은 또한 Altschul et al, 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389에 의해 개시된 것과 같은 BLAST 패밀리의 프로그램에 대해 수립될 수 있다.
- [0095] 또 다른 예에서, "서열 동일성(sequence identity)"은 DNASIS 컴퓨터 프로그램 (윈도우의 경우 Version 2.5; Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, USA로부터 구입가능)에 의해 계산된 "일치 백분율(match percentage)"을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0096] 서열 분석의 상세한 검토는 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999)의 Unit 19.3에서 볼 수 있다.
- [0097] 본 발명은 또한 성장 인자의 수용체-결합 도메인, 피브로넥틴의 인테그린-결합 도메인, 또는 이들을 포함하는 단리된 단백질 복합체의 유도체를 고려한다.
- [0098] 본 명세서에서 사용된, 본 발명의 단백질의 "유도체(derivative)" 단백질은 변형될 수 있고, 예를 들면, 다른 화학적 모이어티의 첨가, 접합(conjugation) 또는 복합체화 또는 당해 기술 분야에서 잘 이해되는 번역-후 변형(post-translational technique) 기법에 의해 변형될 수 있다.
- [0099] 아미노산의 "첨가(addition)"는 폴리펩티드 또는 그의 변이체의 다른 폴리펩티드 또는 단백질과의 융합을 포함한다. 상기 다른 단백질은 예로서, 단백질의 정제를 보조할 수 있다. 예를 들면, 이들은 폴리히스티딘 텍(polyhistidine tag), 말토오스 결합 단백질, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 단백질 A, 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(glutathione S-transferase, GST)를 포함한다.
- [0100] 본 발명에 의해 고려되는 다른 유도체는 웹티드, 폴리웹티드 또는 단백질 합성 동안 결사슬의 변형, 비천연(unnatural) 아미노산 및/또는 유도체의 결합(incorporation), 및 본 발명의 폴리펩티드, 단편 및 변이체에 대한 구조적 제한(conformational constraint)을 부여하는 가교제(crosslinker) 및 기타 방법의 이용을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 의해 고려되는 결사슬 변형의 예는 아세트산 무수물에 의한 아실화, 숙신산 무수물 및 테트라하이드로프탈산 무수물에 의한 아미노기의 아실화, 메틸아세트아미데이트에 의한 아미딘화(amidination), 시아네이트에 의한 아미노기의 카바모일화(carbamoylation), 피리독살-5-포스페이트에 의한 라이신의 피리독실화 및 뒤이은 NaBH₄에 의한 환원, 알데히드와의 반응에 의한 환원성 알킬화 및 뒤이은 NaBH₄에 의한 환원, 및 2,4,6-트리니트로벤젠 술폰산(TNBS)에 의한 아미노기의 트리니트로벤질화와 같은 아미노기의 변형을 포함한다.
- [0101] 카르복시기는 0-아실이소우레이 형성을 통한 카르보디이미드 활성화 및 뒤이은 유도체화, 예를 들면, 상응하는 아미드로의 유도체화에 의해 변형될 수 있다.
- [0102] 아르기닌 잔기의 구아니딘기는 2,3-부탄디온, 페닐글리옥살 및 글리옥살과 같은 시약에 의한 헤테로시클릭 응축 산물의 형성에 의해 변형될 수 있다.
- [0103] 설프히드릴기는 시스테산으로의 과포름산의 산화, 4-클로로머큐리페닐술폰산, 4-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 페닐머큐리 클로라이드 및 기타 머큐리 화합물(mercurial)을 이용한 머큐리 화합물 유도체의 형성, 기타 티올 화합물에 의한 혼합 디솔피드(mixed disulphide)의 형성, 말레이미드, 말레산 무수물 또는 기타 치환된 말레이미드와의 반응, 요오도아세트산 또는 요오드아세트아미드에 의한 카르복시메틸화, 및 알칼리 pH에서 시아네이트에 의한 카바모일화와 같은 방법에 의해 변형될 수 있다.
- [0104] 트립토판 잔기는 예를 들면, 2-히드록시-5-니트로벤질 브로미드 또는 설포닐 할로겐화물에 의한 인돌 고리의 알킬화, 또는 N-브로모숙신이미드에 의한 산화에 의해 변형될 수 있다.
- [0105] 티로신 잔기는 테트라니트로메탄에 의한 니트로화에 의해 변형되어 3-니트로티로신 유도체를 형성할 수 있다.

- [0106] 히스티딘 잔기의 이미다졸 고리는 디에틸피로카르보네이트에 의한 N-카브에톡실화 또는 요오도아세트산 유도체에 의한 알킬화에 의해 변형될 수 있다.
- [0107] 웨티드 합성 동안 결합되는 비-천연 아미노산 및 유도체의 예는 4-아미노부티르산, 6-아미노헥산산, 4-아미노-3-히드록시-5-페닐펜탄산, 4-아미노-3-히드록시-6-메틸헵탄산, t-부틸글리신, 노르루이신, 노르발린, 페닐글리신, 오르니틴, 사르코신, 2-티에닐 알라닌 및/또는 아미노산의 D-이성질체의 이용을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0108] 단백질의 화학적 유도체화(chemical derivatization)를 위해 적합한 방법의 예는 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et. al., John Wiley & Sons NY (1995-2001)의 챕터 15에 제공된다.
- [0109] 단리된 단백질 복합체, 및 그의 개별적인 단백질 성분(단편, 변이체, 유도체, 및 동족체(homolog)를 포함함)은 당업자에게 공지된 적절한 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0110] 일 구체예에서, 본 발명의 단백질은 화학적 합성에 의해 제조된다. 화학적 합성 기법은 당업계에서 잘 알려져 있고, 당업자는 적절한 방법의 예를 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et. al., John Wiley & Sons NY (1995-2001)의 챕터 18을 참조할 수 있다.
- [0111] 또 다른 구체예에서, 단백질은 재조합 단백질로 제조될 수 있다. 재조합 단백질의 제조는 당업계에 잘 알려져 있고, 당업자는 예를 들면, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), 특히, 섹션 16 및 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), 특히, 챕터 10 및 16; 및 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), 특히, 챕터 1, 5, 및 6에 기재된 것과 같은, 표준 프로토콜을 참조할 수 있다.
- [0112] 일 구체예에서, 재조합 단백질은:
- [0113] (i) 발현 벡터 중 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된, 상기 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 구조체(expression construct)를 제조하는 단계;
- [0114] (ii) 상기 발현 구조체로 숙주 세포를 형질감염 또는 형질변환시키는 단계; 및
- [0115] (iii) 상기 숙주 세포에서 재조합 단백질을 발현하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0116] "발현 벡터(expression vector)"는 플라스미드와 같은 자가복제하는 잉여-염색체 벡터(self-replicating extra-chromosomal vector), 또는 숙주 세포로 통합되는 벡터를 의미한다.
- [0117] "작동가능하게 연결된(operably linked)" 또는 "작동가능하게 결합된(operably connected)"은 상기 조절 뉴클레오티드 서열이 핵산의 전사, 또는 핵산에 의해 코딩된 단백질의 번역을 개시, 조절 또는 제어하도록 본 발명의 재조합 핵산에 대해 위치하는 것을 의미한다.
- [0118] 조절 뉴클레오티드 서열(regulatory nucleotide sequence)은 일반적으로 발현을 위해 사용되는 숙주 세포를 위해 적합할 것이다. 다양한 종류의 적합한 발현 벡터 및 적절한 조절 서열이 다양한 숙주 세포에 대해 당업계에 알려져 있다.
- [0119] 통상적으로, 상기 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열(leader or signal sequence), 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 번역 개시 및 종료 서열, 스플라이스 공여체/수용체 서열(splice donor/acceptor sequence), 및 인핸서 또는 활성자 서열(enhancer or activator sequence)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0120] 구성적 프로모터(constitutive promoter) (예를 들면, CMV, RSV, 아데노바이러스, SV40, 및 인간 신장 인자(elongation factor) 프로모터) 및 유도성/억제성(inducible/repressible) 프로모터 (예를 들면, tet-억제성 프로모터 및 억제성 프로모터 및 IPTG-, 메탈로티오닌(metallothioneine)- 또는 액디손(ecdysone)-유도성 프로모터)가 당업계에 잘 알려져 있고, 본 발명에 의해 고려된다. 또한, 프로모터는 둘 이상의 프로모터의 요소를 조합한 하이브리드 프로모터일 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0121] 발현 구조체는 또한 융합 파트너(통상적으로 발현 벡터에 의해 제공됨)를 포함할 수 있고, 따라서, 본 발명의 재조합 단백질은 상기 융합 파트너와의 융합 폴리펩ти드로서 발현된다. 융합 단백질의 주된 장점은 그들이 상기 융합 단백질의 식별 및/또는 정체를 보조한다는 것이다.

- [0122] 융합 파트너의 잘 알려진 예는 친화도 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리를 위해 특히 유용한, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST), 인간 IgG의 Fc 부분, 말토오스 결합 단백질 (MBP), 및 헥사히스티딘 (HIS₆)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 친화도 크로마토그래피에 의한 융합 단백질 정제를 위해, 친화도 크로마토그래피를 위한 적절한 매트릭스는 각각 글루타티온-, 아밀로오스-, 및 니켈- 또는 코발트-접합 수지이다. 다수의 그와 같은 매트릭스는 "키트(kit)" 형태, 예를 들면, (HIS₆) 융합 파트너와의 사용에 유용한, QIAexpress™ 시스템 (Qiagen) 및 Pharmacia GST 정제 시스템으로 이용가능하다.
- [0123] 일부 경우에, 융합 파트너는 또한, Factor X_a 또는 트롬빈의 경우와 같이, 프로테아제 절단 부위를 갖고, 이들은 본 발명의 융합 단백질을 부분적으로 분해(digest)하고 그에 의해 그로부터 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 방출시킬 수 있게 한다. 그 후, 후속 크로마토그래피 분리에 의해, 방출된 단백질을 융합 파트너로부터 단리시킬 수 있다.
- [0124] 본 발명에 따른 융합 파트너는 또한 그들의 범위 내에, 특정 항체를 위해 이용가능한 짧은 펩티드 서열인, "에피토프 택(epitope tag)"을 포함한다. 특정한 단일클론 항체를 위해 용이하게 이용가능한 에피토프 택의 잘 알려진 예는 c-myc, 헤마글루티닌 및 FLAG 택을 포함한다.
- [0125] 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있고, 예를 들면, 대장균 (예를 들면, DH5 α), 효모 세포, 바클로바이러스(baculovirus) 발현 시스템과 함께 이용가능한 Sf9 세포, CHO 세포, COS, CV-1, NIH 3T3, 및 293 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0126] 발현 구조체는 또한 형질전환된 세포에 선택제(selection agent)에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 선택 마커 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 형질전환된 박테리아의 선택을 위해 유용한 선택 마커는 bla, kanR 및 tetR을 포함하나, 이에 한정되지 않고, 형질전환된 진핵 세포는 히그로마이신(hygromycin), G418, 및 퓨로마이신(puromycin)과 같은, 그러나, 이에 한정되지 않는 마커에 의해 선택될 수 있다.
- [0127] 유전자 물질(genetic material)의 숙주 세포로의 도입과 관련하여, 용어 "형질전환(transforming)" 및 "형질감염(transfecting)"은 유전자 물질의 숙주 세포로의 도입을 기술하기 위해 일반적으로 이용된다. 외래 유전자 물질을 숙주 세포로 도입하는 다수의 공지된 방법이 있고, 이들은 칼슘 포스페이트 침전, 전기천공, 리포택타민, 리포펙틴 및 기타 친지성 물질에 의한 전달, 칼슘 포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 형질감염, 미세입자 충돌(microparticle bombardment), 미세주입(microinjection), 및 원형질 융합(protoplast fusion)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0128] 본 발명은 그의 변이체 및 동족체를 포함한, 본 발명의 합성 키메라 단백질을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0129] 본 명세서에서 사용된 용어 "핵산(nucleic acid)"은 단일-가닥 또는 이중-가닥 mRNA, RNA, cRNA, RNAi, 및 cDNA 및 게놈 DNA 및 DNA-RNA 하이브리드를 포함한 DNA를 의미한다.
- [0130] "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 80개 이상의 연속 뉴클레오티드를 갖는 핵산이고, "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)"는 80개 미만의 연속 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0131] "프로브(probe)"는 예를 들면, 노던 블롯팅 또는 서던 블롯팅에서 상보적 서열을 검출하기 위해 적절하게 표지된, 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0132] "프라이머(primer)"는 통상적으로 상보적 핵산 "주형(template)"에 어닐링하고, Taq 폴리미라아제, RNA-의존적 DNA 폴리미라아제 또는 Sequenase™와 같은 DNA 폴리미라아제의 작용에 의해 주형-의존적 방식으로 신장될 수 있는, 단일-가닥 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 15개 내지 50개의 연속된 뉴클레오티드를 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드이다.
- [0133] 본 발명의 합성 핵산은 당해 기술 분야에서 잘 알려진, 화학적 합성 방법 또는 핵산 서열 증폭 기법을 이용한 재조합 방법, 또는 이들의 조합에 의해 제조될 수 있다.
- [0134] 본 발명에 따라 유용한 화학적으로 합성된 프라이머 및 올리고뉴클레오티드, 합성기(synthesizer) 및 관련 기술은 통상적으로 대부분의 연구실에서 이용가능하거나, 상업적 출처로부터 구매될 수 있다.
- [0135] 적절한 핵산 증폭 기법은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들면, Ausubel et al. supra의 챕터 15에 기재된 것과 같은 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 리가아제 연쇄 반응(LCR); 예를 들면, 미국특허 제5,422,252호에 기재된

것과 같은 SDA(strand displacement amplification); Liu et al., 1996, J. Am. Chem. Soc. 118 1587, 국제 출원 WO 92/01813 및 국제출원 WO 97/19193에 기재된 것과 같은 RCR(rolling circle replication); Sooknanan et al., 1994, Biotechniques 17 1077에 기재된 바와 같은 NASBA (nucleic acid sequence-based amplification); 및 예를 들면, Tyagi et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 5395에 기재된 바와 같은 Q-β 레플리카아제 증폭을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0136] 바람직한 핵산 증폭 기법은 PCR이다.

[0137] 본 명세서에서 사용된, "증폭 산물(amplification product)"은 핵산 증폭 기법에 의해 생성된 핵산 산물을 의미한다.

[0138] 본 발명의 핵산의 제조 및 발현에서, 코돈 서열 중복(codon sequence redundancy)을 이용하여, 본 명세서에 예시된 핵산이 그에 의해 코딩된 아미노산 서열을 변화시키지 않으면서 용이하게 변형될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0139] 특정한 구체예에서, 핵산은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 재조합 발현을 위해 이용될 숙주 세포의 바람직한 "코돈 사용(codon usage)"에 따라 최적화될 수 있다. 이는 선호되는 코돈 사용이 단백질 발현에 영향을 미치는 것인 특정한 개체 또는 그의 세포에서 최적 발현을 위해 핵산을 효과적으로 "맞춤화(tailor)"할 수 있다.

[0140] 따라서, 본 발명은 본 명세서에서 예시된 핵산에 상동성인 합성 핵산을 포함한다.

[0141] 일 구체예에서, 핵산 동족체는 본 명세서에 기재된 합성 키메라 단백질 구조체 중 하나를 코딩하는 핵산과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0142] 바람직하게는, 서열 동일성은 본 발명의 코딩 핵산의 전장의 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상, 95% 이상, 유리하게는 실질적으로 그 전장에 대해 측정된다.

[0143] 또 다른 구체예에서, 핵산 동족체는 높은 염격성(high stringency) 조건 하에, 본 명세서에 기재된 합성 키메라 단백질 구조체 중 하나를 코딩하는 핵산에 혼성화된다.

[0144] "혼성화되다(hybridize)" 및 "혼성화(hybridization)"는 본 명세서에서 DNA-DNA, RNA-RNA 또는 DNA-RNA 듀플렉스를 생성하기 위한 적어도 부분적으로 상보적인 핵산 서열의 쌍 형성(pairing)을 표시하기 위해 사용된다. 혼성화된 서열은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 상보적인 퓨린과 퍼리미딘 간의 염기쌍 형성을 통해 일어난다.

[0145] 이와 관련하여, 변형된 퓨린(예를 들면, 이노신, 메틸이노신 및 메틸아데노신) 및 변형된 퍼리미딘(티오우리딘 및 메틸시토신)도 염기쌍 형성에 참여할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0146] 본 명세서에서 사용된 "엄격성(stringency)"은 혼성화 동안의 온도 및 이온 강도 조건, 및 특정 유기 용매 및/ 또는 디터전트의 존재 또는 부재를 의미한다. 염격성이 더 높을수록, 혼성화되는 뉴클레오티드 서열 간의 상보성의 요구되는 수준이 더 높을 것이다.

[0147] "엄격한 조건(stringent condition)"은 상동성 염기의 높은 빈도를 갖는 핵산만이 혼성화하는 조건을 의미한다.

[0148] 본 명세서에 기재된 높은 염격성 조건은:

[0149] (i) 42°C에서 혼성화를 위한, 약 31% v/v 이상 내지 약 50% v/v 이상의 포름아미드 및 약 0.01M 이상 내지 약 0.15M 이상의 염 및 42°C에서의 세척을 위한 약 0.01M 이상 내지 약 0.15M 이상의 염;

[0150] (ii) 65°C에서 혼성화를 위한, 1% BSA, 1mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2), 7% SDS, 및 (a) 65°C보다 높은 온도에서 약 1시간 동안의 세척을 위한 0.1x SSC, 0.1% SDS; 또는 (b) 0.5% BSA, 1mM EDTA, 40 mM NaHPO₄ (pH 7.2), 1% SDS; 및

[0151] (iii) 약 68°C 또는 그 이상에서 약 20분 동안의 세척을 위한 0.2 x SSC, 0.1% SDS를 포함하고, 포괄한다.

[0152] 일반적으로, 세척은 $T_m = 69.3 + 0.41(G + C) \% - 12^\circ\text{C}$ 에서 수행된다. 일반적으로, 듀플렉스 DNA의 T_m 은 불일치 염기(mismatched base)의 갯수의 1% 증가당 약 1°C 만큼 저하된다.

[0153] 전술된 기재에도 불구하고, 염격한 조건은 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들면, 전술된 Ausubel 등

의 챕터 2.9 및 2.10, 및 특히, 페이지 2.9.1부터 2.9.20에 기재된다.

[0154] 본 발명은 또한 키메라 단백질, 또는 그의 단편, 변이체, 및/또는 유도체를 포함한, 본 발명의 합성 키메라 단백질에 대한 항체를 고려한다. 본 발명의 항체는 다중클론 항체이거나 또는 단일클론 항체일 수 있다. 항체 제조, 정제 및 사용에 적용될 수 있는 잘 알려진 프로토콜은 예를 들면, Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994)의 챕터 2 및 Harlow, E. & Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988에서 찾을 수 있다.

[0155] 일반적으로, 본 발명의 항체는 본 발명의 폴리펩티드, 그의 단편, 변이체, 또는 유도체에 결합하거나 또는 접합된다. 예를 들면, 상기 항체는 다중클론 항체를 포함할 수 있다. 그와 같은 항체는 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드, 그의 단편, 변이체 또는 유도체를 다중클론 항혈청을 수득하기 위해, 마우스 또는 토끼를 포함할 수 있는, 제조 종(produciton species)에 주사하는 것에 의해 제조될 수 있다. 다중클론 항체를 제조하는 방법이 당업자에게 잘 알려져 있다. 이용될 수 있는 예시적인 프로토콜이 예를 들면, Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, supra, 및 Harlow & Lane, 1988, supra에 기재된다.

[0156] 제조 종에서 수득되는 다중클론 항혈청 대신에, 표준 방법, 예를 들면, Kohler & Milstein (1975, Nature 256, 495)에 기재된 방법, 또는 예를 들면, Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, supra에 기재된 것과 같은 보다 최근의 그의 변형을 이용하여, 하나 이상의 본 발명의 폴리펩티드, 그의 단편, 변이체 또는 유도체에 의해 접종된 제조 종으로부터 유래된 비장 또는 기타 항체 생성 세포를 불멸화시키는 것에 의해 단일클론 항체가 제조될 수 있다.

[0157] 본 발명은 또한 전술된 다중클론 항체 또는 단일클론 항체의 Fc 또는 Fab 단편을 포함하는 항체를 그의 범위 내에 포함한다. 대안적으로, 항체는 본 발명의 단백질에 대한 단쇄 Fv 항체(scFv)를 포함할 수 있다. 그와 같은 scFv는 예를 들면, 미국특허 제5,091,513호, 유럽 특허 제239,400호, 또는 Winter & Milstein에 의한 논문 (1991, Nature 349 293)에 각각 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0158] 표지는 항체 또는 항체 단편과 결합될 수 있다.

[0159] 표지는 발색체(chromogen), 촉매, 효소, 형광단(fluorophore), 화학발광 분자, 유로퓸(Eu^{34})과 같은 란탄족 원소, 방사성 동위원소, 및 직접 시각 표지(direct visual label)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 직접 시각 표지의 경우, 금속 콜로이드 입자 또는 비-금속 입자, 염료 입자, 효소 또는 기질, 유기 중합체, 라텍스 입자, 리포좀, 또는 신호 생성 물질을 포함하는 기타 소포(vesicle), 등을 이용할 수 있다

[0160] 표지로서 유용한 다수의 효소가 미국특허 제4,366,241호, 미국특허 제4,843,000호 및 미국특허 제4,849,338호에 개시된다. 본 발명에서 유용한 효소 표지는 알칼리 포스파타아제, 호스래디쉬 페옥시다아제(horseradish peroxidase), 루시피라아제, b-갈락토시다아제, 글루코오스 옥시다아제, 리소자임, 말레이트 테하드로게나아제, 등을 포함한다. 효소 표지는 단독으로 또는 용액 중 제2 효소와 조합되어 이용될 수 있다.

[0161] 예로서, 형광단은 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon green), 테트라에틸로다민 이소티오시아네이트(TRITL), 알로피코시아닌(APC), 및 R-피코에리트린(RPE)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0162] 본 발명은 또한 그의 변이체 및 유도체를 포함한 본 발명의 단리된 단백질 복합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0163] 이와 같은 단리된 단백질 복합체는 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 임의의 형태일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0164] 본 발명의 약제학적 조성물은 세포 이동, 조직 재생 및 상처 치유를 증진시키거나 또는 촉진시키기 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 약제학적 조성물은 종양 세포가 이차 부위로 이동하는 것을 예방 또는 억제하는 것에 의해 종양 전이를 예방하기 위해 투여될 수 있다.

[0165] 본 발명의 조성물은 필요에 따라, 치료적 또는 예방적 처치에서 이용될 수 있다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 피부 복구, 상처 치유, 화상의 치유 및 기타 피부학적 처치를 위한 치료 또는 미용 제제(preparation)의 형태로 적용될 수 있다.

[0166] 이와 관련하여, 약제학적 조성물은 본 발명의 약제학적 조성물이 적절하게 담지(impregnate)되거나, 코팅되거나, 또는 포함된, 생체물질(biomaterial), 생중합체(biopolymer), 하드록시아파타이트(hydroxyapatite) 또는 그의 유도체와 같은 무기 물질, 외과수술 이식물(surgical implant), 인공기관

(prosthesis), 상처 또는 화상 드레싱, 압박물(compress), 붕대 등과 결합되어, 또는 이들의 성분으로 투여될 수 있다.

[0167] 적절하게, 상기 약제학적 조성물은 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0168] 바람직하게는, 상기 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에게 투여하기에 적합하다.

[0169] "약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제(pharmaceutically-acceptable carrier, diluent or excipient)"는 전신 투여에서 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제, 또는 캡슐화 물질(encapsulating substance)을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라, 당업계에서 잘 알려진 다양한 담체가 이용될 수 있다. 이 담체들은 당, 전분, 세룰로오스 및 그의 유도체, 맥아(malt), 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충용액(PBS), 유화제, 등장성 염수 및 염산염, 브롬화물 및 황산염을 포함한 무기산염(mineral acid salt), 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산, 발열물질-불포함(pyrogen-free) 물을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0170] 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및 부형제를 기술하는 유용한 참조문헌은 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)이다.

[0171] 임의의 안전한 투여 경로가 본 발명의 조성물을 환자에게 제공하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장, 비경구, 설하(sublingual), 구강(buccal), 정맥내, 관절내, 근육내, 피내(intra-dermal), 피하, 흡입, 안내(intraocular), 복강내, 뇌실내(intracerebroventricular), 경피 경로 등이 이용될 수 있다.

[0172] 투여 제형은 정제, 분산액, 혼탁액, 주사, 용액, 시럽, 트로키제(troches), 캡슐, 좌제, 에어로졸, 경피 패치 등을 포함한다. 이 투여 제형은 또한 이 목적을 위해 특이적으로 설계된 제어 방출 장치, 또는 이 방식으로 추가적으로 작용하도록 변형된 이식물의 기타 형태를 주사 또는 이식하는 것을 포함한다. 치료제의 제어 방출은 예를 들면, 치료제를 아크릴 수지(acrylic resin), 왁스, 고급 지방족 알코올(higher aliphatic alcohol), 폴리락트산 및 폴리글리콜산, 및 히드록시프로필메틸 세룰로오스와 같은 세룰로오스 유도체로 코팅하는 것에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 제어 방출은 기타 중합체 매트릭스, 리포좀 및/또는 미세소포를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0173] 전술된 조성물은 투여 제제에 적합한 방식으로, 및 약제학적 유효량으로 투여될 수 있다. 본 발명에서, 환자에게 투여되는 투여량은 적절한 기간 동안 환자에서 유용한 반응을 달성하기에 충분해야 한다. 투여되는 작용제의 양은 연령, 성별, 체중 및 전반적 건강 상태, 의사의 판단에 의존적일 인자들을 포함하여, 치료 대상 개체에 의존적일 수 있다.

[0174] 상처 치유용 약제학적 조성물의 경우, 구체적으로 미국특허 제5,936,064호 및 국제특허공개 WO 99/62536을 참조한다.

[0175] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 백시니아와 같은 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터, 및 유전자 치료에서 유용한 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 후자는 Braun-Falco 등(1999, Gene Ther. 6 432)에 기재된 것과 같은 아데노바이러스 및 아데노바이러스-연관 바이러스(adenovirus-associated virus, AAV), Buchshacher 등(2000, Blood 95 2499)에 기재된 것과 같은 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus) 및 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)로부터 유래된 벡터를 포함한다. 내분비성 유전자 치료(endocrine gene therapy)에서 유용한 바이러스 벡터의 개요가 Stone 등 (2000, J. Endocrinol. 164 103)에 제공된다.

[0176] 본 발명은 또한 미국특허 제5,958,764호에 기재된 것과 같은 상피 세포로 유전자 발현을 표적화하는 특이적 발현 벡터 및 미국특허 제5,962,427호에 기재된 것과 같은 인 비보 상처 치유 응용을 위한 벡터를 이용할 수 있다.

[0177] 본 발명은 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 단리된 단백질 복합체를 이용한 치료 방법을 제공한다. 이 방법은 특히, 포유동물, 보다 구체적으로 인간의 치유적 및/또는 예방적 치료를 목적으로 한다.

[0178] 그러나, 본 발명에 따른 치료 용도는 또한 가축 및 반려동물, 말, 낙타 및 그레이하운드와 같은 공연 동물(performance animal), 가축류, 실험 동물 및 이종이식을 위한 세포, 기관 및 조직의 공급원(source)으로 이용되는 동물과 같은 포유동물에 적용될 수 있다.

- [0179] 본 발명은 또한 피부의 질 또는 피부 외양을 개선 또는 증진시키기 위해 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 단리된 단백질 복합체가 투여되는 것인 미용 치료(treatment) 방법을 고려한다.
- [0180] 그와 같은 치료는 비정상적인 피부 세포 증식으로부터 초래되는 건선 및 비후성 반흔과 같은 피부 질환의 예방 또는 개선을 포함할 수 있다.
- [0181] 대안적으로, 종양 세포가 이차 부위로 이동하는 것을 차단하여 종양 전이가 예방 또는 억제되는 것인 치료 방법이 고려된다. 또한, 세포 증식을 차단하여 암을 치료하는 방법도 고려된다.
- [0182] 특정한 구체예에서, 치유적 및/또는 예방적 처치가 본 발명의 단리된 단백질 복합체가 적절히 담지되거나 코팅되거나 또는 포함된, 생체물질, 생중합체, 플루오로히드록시아파타이트와 같은 무기 물질, 외과수술 이식물, 인공기관, 상처 또는 화상 드레싱, 압박물, 붕대와 결합되어, 또는 그들의 성분으로서, 단리된 단백질 복합체를 이용할 수 있다.
- [0183] 이와 같은 방법은 앞서 정의된 것과 같은 약제학적 조성물의 투여를 포함하고, 예로서, 미국특허 제6,090,790호에 기재된 것과 같은, 특정한 조직 부위로의 미세침 주사(microneedle injection), 국소 크림, 로션, 또는 미국특허 제6,054,122호에 기재된 것과 같은, 상처, 화상, 또는 궤양에 적용되는 밀폐 드레싱(sealant dressing), 또는 국제특허공개 WO 99/47070에 기재된 것과 같은 조성물을 방출하는 이식물일 수 있다.
- [0184] 이와 관련하여, 예를 들면, 미국특허 제5,929,040호 및 미국특허 제5,962,427호에 기재된 방법에 따라, 유전자 치료가 또한 적용될 수 있다.
- [0185] 피부 대체물(skin substitute)을 생성할 목적으로 피부 세포가 유전적으로 변형될 수 있고, 예를 들면, 원하는 성장 인자 발현을 유전적으로 조작하는 것인 방법이 존재한다 (Supp et al., 2000, J. Invest. Dermatol. 114 5). 이 분야의 검토의 예가 Bevan 등 (Biotechnol. Gent. Eng. Rev. 16 231)에 제공된다.
- [0186] 또한, 국제특허공개 WO 99/11789에 기재된 것과 같은, 형질감염 또는 형질전환된 세포를 수용자(recipient)에게 "접종(seeding)"하는 것이 고려된다.
- [0187] 이 방법은 세포 이동을 촉진하고, 그에 의해 상처 및 화상 치유, 궤양과 같은 피부 병변의 회복, 자가 피부의 인 비트로 배양에 의한 것과 같은 조직 대체 및 이식, 신장 및 폐와 같은 내부 기관의 재-상피화(re-epithelialization) 및 손상된 신경 조직의 회복을 촉진하거나 진전시키기 위해 이용될 수 있다.
- [0188] 피부 대체 요법(skin replacement therapy)이 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있고, 예를 들면, Kehe 등(1999, Arch. Dermatol. Res. 291600)에 기재된 것과 같은 공-배양된 상피/각질세포주, 또는 일차(통상적으로 자기-유래) 상피, 진피 및/또는 각질세포의 인 비트로 배양물의 이용을 채택할 수 있다. 이와 같은 기법은 생체공학 물질(engineered biomaterial) 및 합성 중합체 "스카폴드(scaffold)"를 이용할 수 있다.
- [0189] 이 분야의 전반적 검토의 예가 Terskikh & Vasiliev (1999, Int. Rev. Cytol. 188 41) 및 Eaglestein & Falanga (1998, Cutis 62 1)에 제공된다.
- [0190] 보다 구체적으로, 두개안면골 수술에서 유용한 대체용 경구 접막의 생성이 Izumi 등(2000, J. Dent. Res. 79 798)에 기재된다. 태아 각질세포 및 진피 섬유모세포가 인 비트로에서 Fauza 등 (J. Pediatr. Surg. 33 357)에 기재된 것과 같은, 피부 병변을 치료하기 위한 이식용 피부를 생성하기 위해 인 비트로에서 확장될 수 있고, 헥알루론산-유래 생체물질로 인 비트로에서 배양된 진피 및 상피 피부 요소로부터의 피부 대체물(skin substitute)이 화상의 치료에서 잠재적으로 유용한 것으로 확인되었다 (Zacchi et al., 1998, J. Biomed. Mater. Res. 40 187).
- [0191] 종합체 스카폴드가 또한 예를 들면, Sheridan 등 (2000, J. Control Release 14 91) 및 Fauza 등(1998, supra)에 기재된 것과 같이, 대체 피부 공학을 촉진할 목적으로 고려되며, 상처 및 화상으로의 피부 세포의 전달을 위한 매개체로서 미세소포(microsphere)가 고려된다(LaFrance & Armstrong, 1999, Tissue Eng. 5 153).
- [0192] 본 발명은 IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-I:IGFBP:FN 복합체와 같은, 성장인자와 피브로넥틴을 포함하는 복합체의 효능제 또는 길항제를 식별, 스크리닝, 설계 또는 생성하기 위한, 본 발명의 합성 키메라 단백질을 포함한, 단리된 단백질 복합체의 용도를 고려한다. 그와 같은 작용제는 "모방체(mimetic)"일 수 있다. 용어 "모방체"는 단백질 또는 웹티드의 특정한 기능성 영역을 닮도록 설계된 분자를 지칭하기 위해 사용되고, 그 범위 내에 당해 기술 분야에서 잘 이해되는, 용어 "효능제(agonist)", "유사체(analogue)" 및 "길항제(antagonist)"를 포함한다.

- [0193] 일 구체예에서, IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-I:IGFBP:FN 복합체에 의한 동족 성장인자 수용체 및 FN 수용체의 결합을 모사하는 효능제가 생성된다. 그와 같은 분자들은 상처 치유, 피부 재생 등을 위해 요구되는 것과 같은 피부 이동의 촉진제로서의 유용성을 가질 수 있다.
- [0194] 또 다른 구체예에서, 동족 성장 인자 수용체 및 인테그린 수용체의 IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-II:IGFBP:FN 복합체에 의한 결합을 예방 또는 억제하는 길항제가 생성된다. 이와 같은 분자들은 세포 이동 및/또는 세포 증식의 억제제로서의 유용성을 가지며, 그에 의해 유용한 항-종양제를 구성하고, 또한 비정상적인 세포 증식으로부터 초래된 전선 및 비후성 상흔과 같은 피부 질환의 치료에서 유용성을 가질 수 있다.
- [0195] 전술된 모방체, 효능제, 길항제 및 유사체는 원하는 생물학적 활성 및 반감기를 갖는, 펩티드, 폴리펩티드 또는 기타 유기 분자, 바람직하게는 소형 유기 분자일 수 있다.
- [0196] 컴퓨터-보조 구조 데이터베이스 검색(computer-assisted structural database searching)이 점차 모방체를 식별하는 절차로서 이용되고 있다. 원칙적으로 모방체의 식별을 위해 적합할 수 있는, 데이터베이스 검색 방법을 국제특허공개 WO 94/18232 (HIV 항원 모방체의 제조에 관한 것임), 미국특허 제5,752,019호 및 국제특허공개 WO 97/41526 (EPO 모방체의 식별에 관한 것임)에서 찾을 수 있다.
- [0197] 다른 방법은 분자 상호작용을 식별하는 다양한 생물물리적 기법을 포함한다. 이들은 후보 분자가 예를 들면, IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, 또는 IGF-IGFBP-FN 복합체의 형성에 영향을 미치는지 여부에 따라 후보 분자의 스크리닝을 가능하게 한다. 잠재적으로 유용한 기법, 예를 들면, 경쟁적 방사성리간드 결합 분석법 (관련 방법과 관련하여, Upton et al, 1999, supra 참조), 분석용 한외여파, 미세열량측정법 (microcalorimetry), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 및 광학 바이오센서-기반 방법에 적용 가능한 방법이 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan 등, (John Wiley & Sons, 1997)의 챕터 20에 제공된다.
- [0198] 본 발명의 방법을 보다 용이하게 이해하고 실시하기 위해, 당업자는 하기의 비-한정적 실시예를 참조한다.

도면의 간단한 설명

- [0199] 도 1. (A) 인간 피브로네틴 (서열 번호 1), (B) 성숙(mature) IGF-I (서열 번호 2), (C) 성숙 IGF-II (서열 번호 3), (D) 성숙 EGF (서열 번호 4), (E) 성숙 bFGF (서열 번호 5), (F) 성숙 GF (서열 번호 6)의 아미노산 서열, 및 (G) 바람직한 링커 서열 (서열 번호 7 내지 12).
- 도 2. IGF-I, IGFBP 및 FN 단백질 복합체는 유방암 세포 이동을 촉진한다. MCF-10A 세포를 IGFBP-3 또는 -5의 존재 하에 미리 결합된 증가되는 농도의 IGF-I 및 FN ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 코팅된 Transwell에 접종했다. 세포를 5시간 동안 이동될 수 있게 했다. 각 처리에 대응하여 막을 관통한 세포의 갯수를 FN 단독(SFM)에서 이동한 세포의 갯수 대비 퍼센트로 표현했다. 각각의 재현 실험에서 4개의 웰에서 처리를 테스트한, 3회의 실험으로부터의 데이터를 폴링(pool)한다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. SFM=무혈청 배지(Serum-free media).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0200] 실시예 1
- [0201] IGF-I, IGFBP 및 FN은 세포 이동을 촉진한다.
- [0202] MCF-10A 세포를 IGFBP-3 또는 -5의 존재 하에 미리 결합된 증가되는 농도의 IGF-I 및 FN ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 코팅된 Transwell에 접종했다. 세포를 5시간 동안 이동될 수 있게 했다. 각 처리에 대응하여 막을 관통한 세포의 갯수를 FN 단독(SFM)에서 이동한 세포의 갯수 대비 퍼센트로 표현했다. 각각의 재현 실험에서 4개의 웰에서 처리를 테스트한, 3회의 실험으로부터의 MCF-10 데이터를 폴링(pool)하고 도 2에 도시한다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. SFM=무혈청 배지(Serum-free media). IGF-I:FN, IGF-I:IGFBP-3:FN 및 IGF-I:IGFBP-5:FN은 FN 단독 대조군 웰 대비 유의성 있게 증가된 이동을 촉진할 수 있었다(각각 FN 대조군 웰의 $153.7 +/−7.3\%$, $192.5 +/−6.8\%$ 및 $187.5 +/−6.5\%$ 반응) ($p<0.05$). MCF7-10A 세포의 IGF-I:IGFBP-3:FN 및 IGF-I:IGFBP-5:FN 처리에 대한 반응도 FN 단독과 함께 IGFBP 또는 IGF-I 단독에 의해 수득된 것보다 유의성 있게 더 높았다 ($p<0.05$). 이 데이터는 삼량체 IGF-I:IGFBP-3:FN 복합체가 존재하는 경우 최대 반응이 일어난다는 것을 나타낸다. 이는 FN에 연결된 IGF-I를 포함하는 키메라가 FN 결합 인테그린 및 동족 성장 인자 수용체를 활성화시킨다는 것을 시사한다.

[0203] 실시예 2

[0204] 합성 키메라 피브로넥틴: 성장 인자 단백질

[0205] FN: 성장인자(예를 들면, IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 및 KGF) 키메라의 형태인 본 발명의 합성 키메라 단백질의 예가 제공된다.

[0206] 합성 키메라 단백질은 아미노산 잔기 변형의 존재 또는 부재 하에, 성장 인자와 융합된 전장 또는 절단된 형태의 FN을 포함한다. 또한, FN 및 성장 인자는 다양한 펩티드 링커와 함께 또는 링커 없이 융합될 수 있다.

[0207] 다양한 길이의 FN 단백질이 전장의 성숙 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 단백질, 또는 동족 성장 인자 수용체를 결합할 수 있는 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 단백질의 하나 이상의 도메인에 연결된 것인 일련의 키메라 발현 구조체가 설계된다. 각 경우에, FN 세그먼트가 바람직하게는 링커, 예를 들면, Gly₄ Ser (서열 번호 7) 링커, Gly₄ Ser₃ (서열 번호 8) 링커, (Gly₄ Ser)₃ (서열 번호 9) 링커, 또는 (Gly₄ Ser)₄ (서열 번호 10) 링커를 통해 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 서열에 연결된다.

[0208] 대표적인 합성 키메라 단백질은 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:

A) FN 타입-III 도메인 8 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

B) FN 타입-III 도메인 8-9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

C) FN 타입-III 도메인 8-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

D) FN 타입-III 도메인 9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

E) FN 타입-III 도메인 9-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

F) FN 타입-III 도메인 10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

G) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

H) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8-9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

I) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

J) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

K) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 9-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

L) FN 타입-I 도메인 1-5 [링커] FN 타입-III 도메인 10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

M) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

N) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8-9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

O) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 8-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

P) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 9 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

Q) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 9-10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF);

KGF);

[0226] R) FN 타입-I 도메인 4-5 [링커] FN 타입-III 도메인 10 [링커] 성장 인자 (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF).

[0227] 인간 FN, IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 및 KGF 유전자 DNA 서열 (각각, 서열 번호 1 내지 6)은 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)에서의 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있다. 이때, 코딩 서열은 키메라의 정제를 보조하기 위해 폴리-히스티딘 친화도 텍(poly-histidine affinity tag)을 포함하는 발현 벡터 내로 클로닝 될 수 있다(예를 들면, pIB/V5-His 발현 벡터 (Invitrogen)). 앞서 검토된 아미노산 링커를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 부위-지향적 돌연변이생성(site-directed mutagenesis) PCR을 통해 삽입될 수 있다. 링커 서열의 C 말단으로의 Asn의 첨가가 Asn-Gly 모티프를 생성하기 위해 이용될 수 있고, Gly이 성장 인자 단백질의 첫번째 아미노산이다. 이 모티프는 키메라로부터 성장 인자 단백질의 히드록실아민 유도 절단을 가능하게 한다.

[0228] 결과적으로 수득된 구조체는 전장의 성숙 IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 단백질, 또는 동족 성장 인자 수용체에 결합할 수 있는, IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF, 또는 KGF 단백질의 하나 이상의 도메인에 링커에 의해 연결된 다양한 길이의 FN 단백질을 코딩할 것이다. 모든 구조체의 DNA 서열은 원하는 DNA 서열의 정확도(fidelity)가 유지되도록 하기 위해 검증될 수 있다.

[0229] pIB V5-His 벡터에서의 클론이 Sf9 곤충 세포를 형질감염시키기 위해 이용될 수 있고, 면역블롯팅 (immunoblotting)에 의해 평가되는 바와 같이, 일시적으로 발현된 분비 단백질은 조건화 배지(conditioned medium)에서 검출된다. 요약하면, 시료를 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 상에서 분리하고, 단백질은 준-전조 이동 방법(semi-dry transfer method)을 이용하여 니트로셀룰로오스막 상으로 옮긴다. 수득된 막을 다중클론 항-FN 항체로 처리하고(interrogate), 표적 단백질 종을 강화된 화학발광을 이용하여 시각화한다.

[0230] 키메라 단백질의 정제는 제조사의 설명서에 따라 수행되는 Ni-NTA Superflow Agarose (QIAGEN, Australia) 친화도 크로마토그래피에 기반한다. 키메라 단백질을 SDS-PAGE 및 다중클론 항-FN 항체(Calbiochem)를 이용한 웨스턴 블로트 분석에 의해 정제 과정 전체 동안 모니터링한다.

[0231] 세포 이동 및/또는 증식에 대한 합성 키메라 단백질의 효과를 조사하기 위해, MCF-IOA 세포, MCF-7 세포, 및 단리된 인간 상피 세포, 각질세포 및 섬유모세포와 같은 세포를 이용할 수 있다. 예를 들면, Transwell™ 이동 분석을 이용하여 세포 이동을 평가할 수 있고, 당해 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 세포 증식 분석을 이용하여 세포 증식을 결정할 수 있다.

[0232] 본 명세서 전체에서, 목적은 본 발명을 구체예 또는 특정한 특성의 조합에 한정하지 않으면서, 본 발명의 바람직한 구체예를 설명하는 것이다. 따라서, 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서, 본 개시로부터 예시된 특정한 구체예에서 다양한 변형 및 수정이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0233] 본 명세서에 기재된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특히 및 과학 문헌은 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

표 1

표 1. 피브로넥틴 도메인 및 영역

위치	길이	설명
50-90	41	피브로넥틴 타입-I 1
95-138	44	피브로넥틴 타입-I 2
139-182	44	피브로넥틴 타입-I 3
184-228	45	피브로넥틴 타입-I 4
229-273	45	피브로넥틴 타입-I 5
306-345	40	피브로넥틴 타입-I 6
355-403	49	피브로넥틴 타입-II 1
415-463	49	피브로넥틴 타입-II 2
468-511	44	피브로넥틴 타입-I 7
516-558	43	피브로넥틴 타입-I 8
559-602	44	피브로넥틴 타입-I 9
607-699	93	피브로넥틴 타입-III 1
720-809	90	피브로넥틴 타입-III 2
811-898	88	피브로넥틴 타입-III 3
908-995	88	피브로넥틴 타입-III 4
996-1084	89	피브로넥틴 타입-III 5
1087-1172	86	피브로넥틴 타입-III 6
1173-1265	93	피브로넥틴 타입-III 7
1266-1356	91	피브로넥틴 타입-III 8
1357-1446	90	피브로넥틴 타입-III 9
1447-1536	90	피브로넥틴 타입-III 10
1541-1630	90	피브로넥틴 타입-III 11
1631-1720	90	피브로넥틴 타입-III 12
1723-1810	88	피브로넥틴 타입-III 13
1813-1901	89	피브로넥틴 타입-III 14
1902-1991	90	피브로넥틴 타입-III 15
2100-2190	91	피브로넥틴 타입-III 16
2204-2248	45	피브로넥틴 타입-I 10
2249-2291	43	피브로넥틴 타입-I 11
2293-2336	44	피브로넥틴 타입-I 12
907-1172	266	DNA-결합
52-272	221	피브린- 및 혼파린-결합
308-608	301	콜라겐-결합
464-477	14	콜라겐 결합을 위해 중요(critical)
1267-1540	274	세포-부착
1721-1991	271	혼파린-결합 2
1813-1991	179	FBLN1 결합
1992-2102	111	연결 가닥 3(CS-3)(V-영역)
2206-2337	132	피브린-결합 2

도면**도면1a****A) FN AA 서열**

```

1      mlrgpgpgll llavqclgta vpstgasksk rqaqqmvqpq spvavsqskp gcydnkhyq
61     inqwertyl gnalvctcyg gsrgfncesk peaeetcfdk ytgntryrvd tyerpkdsml
121    wdctcigagr gristicianr cheggqsyki gdtwrrphet ggymlecavl gngkgewtck
181    piaekcfdfa agtsyyvget wekpycgwmvdctclgegs gritctsrrn cndqdrttsy
241    rigdtskkd nrgnllqcic tgngrgewkc erhtsvqfts sgsgpftdvr aavyqpqphp
301    qpppyghcvt dsgvyyvgm qwlktqgnq mlctclgnvg scqetavtqt yggnnsnepc
361    vlpftnygrt fyscttegrg dghlwcssts nyeqdqkysf ctdhtvlvgt gggnsgalc
421    hfpflynnhn ytdctsegr dhmkwcgftq nydadqkfgf cpmaahheeic ttnegvmyri
481    gdqwdkgdgm ghnmrctcvn nrgewtcia ysqrldqgciv dditynvndt fhrkrheeghm
541    lnctcfqgr grwkcdpvq cqdssetgtfy qidgswekyv hgryqcy cy grgigewhcq
601    plqtypsssg pvevfifetp sqpnshpiw napqphish yilwrpkns vgrkeatip
661    ghlnsytkg lkpgrvyyeqq lisiqqyghq evtrfdftt ststpvtnt vtgettpfsp
721    lvatsesvte itassfvvsw vsasdtvsgf rveyelseeg depqyldlps tatsvnipdl
781    lpgrkyivnv yqisdedqgs lilstsqfta pdapdpvtv qvddtsivvr wrspqapitg
841    yrivyspsve gsstelnpe tansvtlsdl qpgvqyniti yaveenqest pviqgettq
901    prsrdtvpasp rdqfvevtv kvktimwtpp esavtgyrvd vlpvnlpgeh ggrplisrnt
961    faevtqlspg vtyyfkfvfav shgreskpl aqktklad tnlqfvnetd stvlvrwtpp
1021   raqitygrl vgltrrgpr qynvqpsvsk yplrlnlpas eytvslvaik gnqespkatg
1081   vfttlqpgss ippyneteve ttivitwtpa prigfklgvr psqggeapre vtsdsgsivv
1141   sgltpgveyv ytiqvrlrdqg erdapivnkv vtplspptnl hleapnadtgv ltvswerstt
1201   pditygrlitt tptngqgns leevvhadgs stctfdnlspg leynvsvytv kddkesvpis
1261   dtiipavppp tdlrlftnigp dtmrvtwapp psidltnflv ryspvkneed vaelsispsd
1321   navrltllp gteyvvsvs vyeqhestpl rgrqktglde ptqidfsdit ansftvhwia
1381   pratityri rhhpefsgr predrvphsr nsitltltp gteyvvsiva lngreespli
1441   igqqstvsdv prdlevvaat ptslliswda pavtvryri tygetggns vqeitvpgsk
1501   statisglkp qvdytityva vtgrgdspas skpisinyt eidkpsqmqv tduqdnsisv
1561   kwlpsppvt gyvrttppkn gpgptktka qpdqtemtiglqptveyvv svyaqnpse
1621   sqplvqavt nidrpkglaf tdrvdsiki awespqggvs ryrvtysspe dgihelpap
1681   dgeedtaelq glrpgeytv svvalhddme sqpligtqst aipaptdlkf tqvpttslsa
1741   qwtppnvqlt gyrvrtpke ktgpmeinl apdsssvvvs glmvatkvev svyalkdtil
1801   srpaqgvtt lenvssppra rvtdatetti tiswrtktet itgfqvdavp angqtpiqrt
1861   ikpdvrsyti tglqpgtdyk iylytlndna rsspvvidas taidapsnl flattpnsl
1921   vswpprari tgyiikyekp gspprevprp rprgvtteati tglepgteyt iyyialknnq
1981   ksepligrkk tdeplqlvlt phpnlhgpei ldvpstvqkt pfvthpgydt gngiqlpgts
2041   qqqpsvgqmq ifeehgfrt tppttatpir hrprpyppn geeeiqighip redvdyhlyp
2101   hpgqlpnas tgealsqtt iswapfqdts eyiischpvq tdeeplqfrv pgtstsatlt
2161   gltrgatyni iavealdqgk hkvreevvtv gnsyneqlng ptddscfdpy tvshayavde
2221   wermssgfk llcqclqfjgs ghfrcdssrw chdnqnyki gekwdrqgen gqmmstclg
2281   ngkgefkdcp heatcyddgk tyhvgeqwqk eylgaicsct cfgggrgwrc dnccrrpggep
2341   spegttgqsy nqysqryhqr tntnvncpie cfmpldvqad redsre (서열번호 1)

```

B) IGF-I AA 서열

GPETLCGAEV VDALQFVCGD RGFYFNKPTG YGSSSRRAPQ TGIVDECCFR SCDLRRLEMY
CAPLKAOKSA (서열번호 2)

C) IGF-II AA 서열

AYRPSETLCG GELVDTLQFV CGDRGFYFSR PASRVSRRSR GIVEECCFRS CDLALLETYC
ATPAKSE (서열번호 3)

도면1b**D) EGF AA** 서열

NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVGYIGE RCQYRDLKWW ELR (서열번호 4)

E) bFGF AA 서열

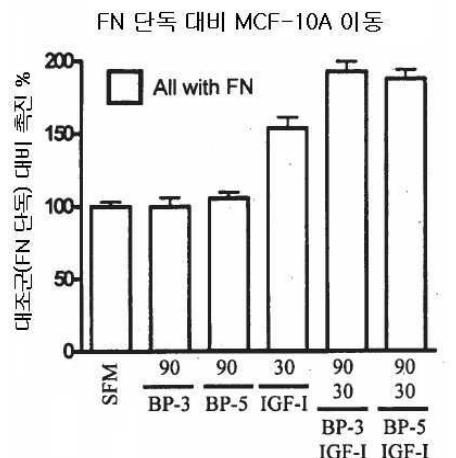
PALPEDGGSS AFPPGHFKDP KRLYCKNGGF FLRIHPDGRV DGVREKSDPH IKLQLQAEER
GVVSIKGVCA NRYLAMKEDG RLLASKCVTD ECFFFERLES NNYNTYRSRK YTSWYVALKR
TGQYKLGSKT GPGQKAILFL PMSAKS (서열번호 5)

F) KGF AA 서열

CNDMTPEQMA TNVNCCSSPER HTRSYDYMEG GDIRVRRFLC RTQWYLRIDK RGKVKGQTQEM
KNYYNIMEIR TVAVGIVAIK GVESEFYLMN KKEGKLYAKK ECNEDCNFKE LILEHYNTY
ASAKWTHNGG EMFVALNQKG IPVRGKTKKK EQKTAHFLPM AIT (서열번호 6)

G) 링카 서열

- 1) Gly₄ Ser (서열번호 7)
- 2) Gly₄ Ser₃ (서열번호 8)
- 3) (Gly₄ Ser)₃ (서열번호 9)
- 4) (Gly₄ Ser)₄ (서열번호 10)
- 5) Leu Ile Lys Met Lys Pro (서열번호 11)
- 6) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (서열번호 12)

도면2**서 열 목 록**

SEQUENCE LISTING

<110> Queensland University of Technology

Van Lonkhuyzen, Derek

Upton, Zee

<120> FIBRONECTIN:GROWTH FACTOR CHIMERAS

<130> 23142

<140> XXXXX

<141> 2012-05-30

<150> US12/627647

<151> 2009-11-30

<150> US12/793386

<151> 2010-06-03

<150> PCT/AU2010/001613

<151> 2010-11-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2386

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys

1 5 10 15

Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln

20 25 30

Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser

35 40 45

Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln

50 55 60

Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly

65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr

85 90 95

Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr

100 105 110

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala

115 120 125

Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly

130	135	140
Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr		
145	150	155
Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu		
165	170	175
Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly		
180	185	190
Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp		
195	200	205
Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr		
210	215	220
Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr		
225	230	235
Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu		
245	250	255
Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg		
260	265	270
His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp		
275	280	285
Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro		
290	295	300
Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met		
305	310	315
Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu		
325	330	335
Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly		
340	345	350
Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly		
355	360	365
Arg Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His Leu		
370	375	380

Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser Phe
 385 390 395 400
 Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Gln Gly Gly Asn Ser Asn
 405 410 415
 Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr Thr
 420 425 430
 Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly Thr
 435 440 445
 Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met Ala
 450 455 460
 Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg Ile
 465 470 475 480
 Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg Cys
 485 490 495
 Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr Ser
 500 505 510
 Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val Asn
 515 520 525
 Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys Thr
 530 535 540
 Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp Gln
 545 550 555 560
 Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp
 565 570 575
 Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg
 580 585 590
 Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser Ser
 595 600 605
 Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro Asn
 610 615 620
 Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser Lys

625	630	635	640
Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn Ser Val Gly Arg Trp Lys Glu			
645	650	655	
Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys			
660	665	670	
Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Ile Gln Gln Tyr Gly			
675	680	685	
His Gln Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Ser Thr Ser Thr			
690	695	700	
Pro Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Phe Ser Pro			
705	710	715	720
Leu Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Phe			
725	730	735	
Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg Val			
740	745	750	
Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp Leu			
755	760	765	
Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly Arg			
770	775	780	
Lys Tyr Ile Val Asn Val Tyr Gln Ile Ser Glu Asp Gly Glu Gln Ser			
785	790	795	800
Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro Asp			
805	810	815	
Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp Ser			
820	825	830	
Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro Ser			
835	840	845	
Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn Ser			
850	855	860	
Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr Ile			
865	870	875	880

Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Val Ile Gln Gln
 885 890 895
 Glu Thr Thr Gly Thr Pro Arg Ser Asp Thr Val Pro Ser Pro Arg Asp
 900 905 910
 Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Val Thr Ile Met Trp Thr
 915 920 925
 Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro Val
 930 935 940
 Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Ile Ser Arg Asn Thr
 945 950 955 960
 Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Tyr Phe Lys
 965 970 975
 Val Phe Ala Val Ser His Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala Gln
 980 985 990
 Gln Thr Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Val Asn Glu
 995 1000 1005
 Thr Asp Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln
 1010 1015 1020
 Ile Thr Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Arg Gly Gln
 1025 1030 1035
 Pro Arg Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ser Val Ser Lys Tyr Pro Leu
 1040 1045 1050
 Arg Asn Leu Gln Pro Ala Ser Glu Tyr Thr Val Ser Leu Val Ala
 1055 1060 1065
 Ile Lys Gly Asn Gln Glu Ser Pro Lys Ala Thr Gly Val Phe Thr
 1070 1075 1080
 Thr Leu Gln Pro Gly Ser Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Thr Glu Val
 1085 1090 1095
 Thr Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile
 1100 1105 1110
 Gly Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro

1115	1120	1125
Arg Glu Val Thr Ser Asp Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu		
1130	1135	1140
Thr Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Gln Val Leu Arg Asp		
1145	1150	1155
Gly Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Asn Lys Val Val Thr Pro		
1160	1165	1170
Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr		
1175	1180	1185
Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile		
1190	1195	1200
Thr Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly		
1205	1210	1215
Asn Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr		
1220	1225	1230
Phe Asp Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr		
1235	1240	1245
Thr Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile		
1250	1255	1260
Ile Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile		
1265	1270	1275
Gly Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile		
1280	1285	1290
Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu		
1295	1300	1305
Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val		
1310	1315	1320
Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val		
1325	1330	1335
Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg		
1340	1345	1350

Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp
 1355 1360 1365
 Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala
 1370 1375 1380
 Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser

 1385 1390 1395
 Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
 1400 1405 1410
 Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile
 1415 1420 1425
 Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln
 1430 1435 1440
 Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala

 1445 1450 1455
 Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val
 1460 1465 1470
 Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn
 1475 1480 1485
 Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala
 1490 1495 1500
 Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val

 1505 1510 1515
 Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro
 1520 1525 1530
 Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met
 1535 1540 1545
 Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu
 1550 1555 1560
 Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro

 1565 1570 1575
 Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp

1580	1585	1590
Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr		
1595	1600	1605
Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro		
1610	1615	1620
Leu Val Gln Thr Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu		
1625	1630	1635
Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu		
1640	1645	1650
Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser		
1655	1660	1665
Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu		
1670	1675	1680
Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr		
1685	1690	1695
Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser Gln Pro		
1700	1705	1710
Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu		
1715	1720	1725
Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr		
1730	1735	1740
Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro		
1745	1750	1755
Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp		
1760	1765	1770
Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr		
1775	1780	1785
Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro		
1790	1795	1800
Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg		
1805	1810	1815

Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser
 1820 1825 1830
 Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
 1835 1840 1845
 Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro
 1850 1855 1860
 Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp

 1865 1870 1875
 Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser
 1880 1885 1890
 Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
 1895 1900 1905
 Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp
 1910 1915 1920
 Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu

 1925 1930 1935
 Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro
 1940 1945 1950
 Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu
 1955 1960 1965
 Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
 1970 1975 1980
 Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val

 1985 1990 1995
 Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val
 2000 2005 2010
 Pro Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Val Thr His Pro Gly Tyr
 2015 2020 2025
 Asp Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln
 2030 2035 2040
 Pro Ser Val Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe Arg

2045	2050	2055
Arg Thr	Thr Pro Pro Thr Thr	Ala Thr Pro Ile Arg His Arg Pro
2060	2065	2070
Arg Pro	Tyr Pro Pro Asn Val	Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly His
2075	2080	2085
Ile Pro	Arg Glu Asp Val Asp	Tyr His Leu Tyr Pro His Gly Pro
2090	2095	2100
Gly Leu	Asn Pro Asn Ala Ser	Thr Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln
2105	2110	2115
Thr Thr	Ile Ser Trp Ala Pro	Phe Gln Asp Thr Ser Glu Tyr Ile
2120	2125	2130
Ile Ser	Cys His Pro Val Gly	Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gln Phe
2135	2140	2145
Arg Val	Pro Gly Thr Ser Thr	Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu Thr
2150	2155	2160
Arg Gly	Ala Thr Tyr Asn Ile	Ile Val Glu Ala Leu Lys Asp Gln
2165	2170	2175
Gln Arg	His Lys Val Arg Glu	Glu Val Val Thr Val Gly Asn Ser
2180	2185	2190
Val Asn	Glu Gly Leu Asn Gln	Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp
2195	2200	2205
Pro Tyr	Thr Val Ser His Tyr	Ala Val Gly Asp Glu Trp Glu Arg
2210	2215	2220
Met Ser	Glu Ser Gly Phe Lys	Leu Leu Cys Gln Cys Leu Gly Phe
2225	2230	2235
Gly Ser	Gly His Phe Arg Cys	Asp Ser Ser Arg Trp Cys His Asp
2240	2245	2250
Asn Gly	Val Asn Tyr Lys Ile	Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly
2255	2260	2265
Glu Asn	Gly Gln Met Met Ser	Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys
2270	2275	2280

Gly Glu Phe Lys Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp

2285	2290	2295
Gly Lys Thr Tyr His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu		
2300	2305	2310
Gly Ala Ile Cys Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp		
2315	2320	2325
Arg Cys Asp Asn Cys Arg Arg Pro Gly Gly Glu Pro Ser Pro Glu		
2330	2335	2340
Gly Thr Thr Gly Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His		

2345	2350	2355
Gln Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe Met		
2360	2365	2370
Pro Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu		
2375	2380	2385

<210> 2

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20	25	30
----	----	----

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35	40	45
----	----	----

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50	55	60
----	----	----

Lys Pro Ala Lys Ser Ala

65	70
----	----

<210> 3

<211> 67

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 3

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr

1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala

20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe

35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Glu

65

<210> 4

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn

20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys

35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 5

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His

1 5 10 15

Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
 20 25 30
 Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
 35 40 45
 Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
 50 55 60
 Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Glu
 85 90 95
 Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
 100 105 110
 Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
 115 120 125
 Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
 130 135 140
 Lys Ser
 145
 <210> 6
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Cys Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser
 1 5 10 15
 Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp
 20 25 30
 Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile
 35 40 45
 Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu

85	90	95
----	----	----

Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn

115	120	125
-----	-----	-----

Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg

130	135	140
-----	-----	-----

Gly Lys Lys Thr Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Ile Thr

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 7

Gly Gly Gly Ser

1	5
---	---

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 8

Gly Gly Gly Ser Ser Ser

1	5
---	---

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 11

Leu Ile Lys Met Lys Pro

1	5		
---	---	--	--

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 12

Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys

1	5		
---	---	--	--