(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월28일
(11) 등록번호 10-2049987
(24) 등록일자 2019년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 14/47* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 14/4702* (2013.01)
*A61K 38/1709* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0148493
(22) 출원일자 2017년11월09일
심사청구일자 2017년11월09일
(65) 공개번호 10-2018-0052103
(43) 공개일자 2018년05월17일
(30) 우선권주장
1020160149090 2016년11월09일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110087462 A
*(뒷면에 계속)*
전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자
**아이씨엠 주식회사**
서울특별시 서대문구 연세로 50 , 과학원 4층 에스426호 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
**김대원**
서울특별시 서대문구 연희로32길 48, 102동 102호(연희동, 연희동성원아파트)
(74) 대리인
**제일특허법인(유)**

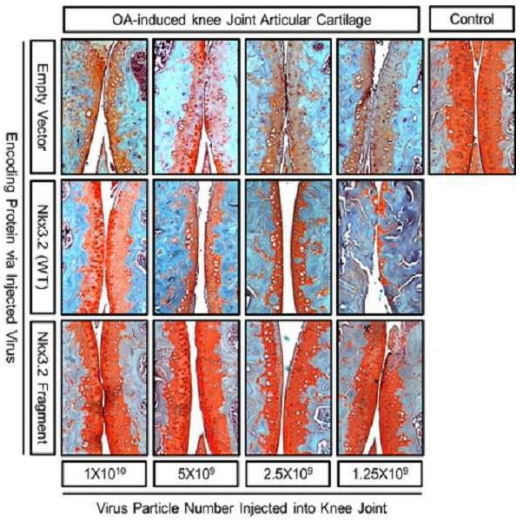
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **Nkx3.2 단편 및 이를 함유하는 약학 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 관절염의 병리조직 환경 하에서 안정성이 향상된 Nkx3.2의 단편 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 Nkx3.2 단편은 전장의 Nkx3.2와 유사한 수준의 NF-κB 활성화 기능을 가지며, Siah1에 의한 단백질 분해에 저항성을 가진다. 또한, 상기 Nkx3.2 단편은 동물모델 기반 *in vivo* 효능 평가에서 Nkx3.2에 비해 최소 10배 이상 향상된 퇴행성 관절염 치료효과를 나타내었다. 따라서, 상기 Nkx3.2 단편은 관절염 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*Y10S 514/825* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020120104517 A
US20140004047 A1
NCBI Reference Sequence: XP_011839517.1 (2015.3.30.)]*
WO2012097057 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9A9055078
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신약 후보물질 발굴 및 최적화 사업 (바이오의료기술사업)
연구과제명 Nkx3.2 과발현 바이러스 최적화를 통한 골관절염 신약후보 물질 개발
기 여 율 1/2
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2012.11.30 ~ 2016.11.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015K000180
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 연구성과실용화진흥원
연구사업명 산학연공동연구법인 지원사업
연구과제명 연골세포 활성조절을 통한 퇴행성관절염 치료기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 아이씨엠 주식회사
연구기간 2012.10.01 ~ 2017.03.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드의 N-말단 부위, C-말단 부위 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 부위의 아미노산이 결실된 폴리펩타이드로서,

상기 폴리펩타이드가 서열번호 21의 아미노산 서열로 이루어진, 폴리펩타이드.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 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**

제1항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 28**

제27항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터.

**청구항 29**

제28항의 발현벡터를 포함하는 숙주세포.

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

제27항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스.

**청구항 33**

제 32항에 있어서,

상기 바이러스가 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 백시니아 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 것인, 재조합 바이러스.

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 관절염의 병리조직 환경 하에서 안정성이 향상된 Nkx3.2의 단편 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 발생율이 가장 높은 관절염 중 하나인 퇴행성 관절염은, 퇴행성 변화로 관절을 보호하는 연골조직이 손상되거나, 관절을 이루는 뼈와 인대 등이 손상되어 염증과 통증이 생기는 질환이다. 기존의 퇴행성 관절염의 치료는 주로 염증 제어를 통해 이루어져 왔으나, 이는 근본적인 치료 기술이 될 수 없음이 입증되고 있다.

[0003] 따라서, 퇴행성 관절염의 근본적인 치료를 위해서는 연골세포의 생성, 분화, 사멸 및 석회화 등의 과정을 조절하는 표적을 확보하고, 상기 표적을 제어하는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 한편, 퇴행성 관절염에 의한 연골조직의 소실이 과발현된 Nkx3.2(NK3 homeobox 2)에 의해 억제됨으로써, 상기 단백질이 퇴행성 관절염의 치료에 사용될 수 있음이 확인된 바 있다. 이와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1150900호는 Nkx3.2 단백질을 이용한 관절염 치료용 조성물, 관절염 진단 키트 또는 관절염 치료제의 스크리닝 방법을 개시하고 있다.

[0005] 또한, 연골세포 비대화/석회화 과정에서 활성화되는 인디안 헤지호그 신호전달로 인해 Nkx3.2 단백질 분해가 촉진되고, 이러한 현상이 단백질 분해 효소 Siah1에 의해 매개됨이 보고된 바 있다. 이와 더불어, 연골세포 석회화를 동반하는 퇴행성 관절염의 발병과 함께 인디안 헤지호그(Indian Hedgehog, Ihh) 신호전달이 증가하며, 이를 제어함으로써 동물모델에서의 퇴행성 관절염 진행이 억제될 수 있음이 알려져 있다.

### *선행기술문헌*

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제1150990호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 Nkx3.2를 기반으로 하는 퇴행성 관절염 치료에 있어, 퇴행성 관절염의 병리 환경 하에서 효과적으로 작용할 수 있는 Nkx3.2 변이체를 개발하기 위해 연구한 결과, Siah1에 의해 유도되는 단백질 분해에 저항성을 가지는 Nkx3.2 단편들을 제조하였다. 또한, 상기 Nkx3.2 단편들이 전장의 Nkx3.2와 유사한 수준의 NF-κB 활성화를 유도할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 Nkx3.2 단편들이 전장의 Nkx3.2에 비해 현저히 향상된 퇴행성 관절염 치료효능을 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 식 (I)로 표시되는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0009] N-말단 확장 도메인-코어 도메인-C-말단 확장 도메인 (I)

[0010] 상기 식 (I)에서,

[0011] 코어 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이고;

[0012] N-말단 확장 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 35의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 53개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있으며;

[0013] C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 5의 24번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개 내지 23개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 하기 식 (II)로 표시되는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0015] N-말단 확장 도메인-코어 도메인-C-말단 확장 도메인 (II)

[0016] 상기 식 (II)에서,

[0017] 코어 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이고;

[0018] N-말단 확장 도메인은 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 39의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 41개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있으며;

[0019] C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 41의 16번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개 내지 15개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있다.

[0020] 나아가, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0022] 나아가, 본 발명은 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 나아가, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 나아가, 본 발명은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는 관절염의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0027] 본 발명의 Nkx3.2 단편은 전장의 Nkx3.2와 유사한 수준의 NF-κB 활성화 기능을 가지며, Siah1에 의한 단백질 분해에 저항성을 가진다. 또한, 상기 Nkx3.2 단편은 동물모델 기반 *in vivo* 효능 평가에서 Nkx3.2에 비해 최소 10배 이상 향상된 퇴행성 관절염 치료효과를 나타내었다. 따라서, 상기 Nkx3.2 단편은 관절염 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 Nkx3.2 단편들의 Siah1에 의한 단백질 분해 저항성을 확인한 도면이다.

도 2는 Nkx3.2 단편과 IκBα의 결합 유무를 확인한 도면이다.

도 3은 Nkx3.2 단편이 IκBα의 분해를 유도하는지 확인한 도면이다.

도 4는 Nkx3.2 단편이 NF-κB의 전사기능을 활성화 시키는지 확인한 그래프이다.

도 5는 Nkx3.2에 의해 유도되는 NF-κB 활성화 과정의 분자적 기전을 보여주는 모식도이다.

도 6은 Nkx3.2 단편의 치료효과를 검증하기 위한 퇴행성 관절염 유발 동물모델을 이용한 동물실험 과정을 도식화한 도면이다.

도 7은 Nkx3.2 또는 Nkx3.2 단편의 환부 내 발현에 의한 퇴행성 관절염 치료 효능을 조직병리학적으로 확인한 사진이다.

도 8은 조직학적인 분석을 통해 얻어진 모든 데이터를 정량적으로 평가하여 퇴행성 관절염 중증도를 최소 0점에서 최대 5점으로 나타낸 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명은 하기 식 (I)로 표시되는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0031] N-말단 확장 도메인-코어 도메인-C-말단 확장 도메인 (I)

[0032] 상기 식 (I)에서,

[0033] 코어 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이고;

[0034] N-말단 확장 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 35의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 53개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있으며;

[0035] C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 5의 24번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개 내지 23개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있다.

[0036] 상기 코어 도메인은 전장의 Nkx3.2 단백질의 166번부터 309번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 전장의 Nkx3.2 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 상기 코어 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0037] 상기 N-말단 확장 도메인은 상술한 코어 도메인의 N-말단에 결합되는 도메인으로서, 전장의 Nkx3.2 단백질의 112번부터 165번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0038] 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개 또는 53개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 11개, 18개, 38개, 41개, 44개, 47개, 50개 또는 53개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0039] 상기 C-말단 확장 도메인은 상술한 코어 도메인의 C-말단에 결합되는 도메인으로서, 전장의 Nkx3.2 단백질의

310번부터 333번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0040] 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 24번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개 또는 23개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0041] 구체적으로, 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 24번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개 또는 23개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 24번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 13개, 15개, 17개, 19개, 21개 또는 23개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0043] 상기 아미노산 잔기의 결실은, N-말단 확장 도메인 및 C-말단 확장 도메인 중 어느 하나 또는 양쪽 도메인 전부에서 발생할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 13, 14, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0044] 본 발명은 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 제공한다. 상기 단편은 서열번호 13의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 53개의 아미노산이 연속적으로 결실된 것일 수 있다. 또한, 상기 단편은 서열번호 13의 333번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개 내지 23개의 아미노산이 연속적으로 결실된 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 13의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 13의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 11개, 18개, 38개, 41개, 44개, 47개, 50개 또는 53개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다. 또한, 서열번호 13의 333번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 13개, 15개, 17개, 19개, 21개 또는 23개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 하기 식 (II)로 표시되는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0047] N-말단 확장 도메인-코어 도메인-C-말단 확장 도메인 (II)

[0048] 상기 식 (II)에서,

[0049] 코어 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이고;

[0050] N-말단 확장 도메인은 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 39의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 41개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있으며;

[0051] C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드로서, 서열번호 41의 16번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개 내지 15개의 아미노산이 연속적으로 결실될 수 있다.

[0052] 상기 코어 도메인은 전장의 Nkx3.2 단백질의 154번부터 317번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 전장의 Nkx3.2 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 상기 코어 도메인은 서열번호 37의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0053] 상기 N-말단 확장 도메인은 상술한 코어 도메인의 N-말단에 결합되는 도메인으로서, 전장의 Nkx3.2 단백질의 112번부터 153번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 39의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0054] 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개 또는 41개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 N-말단 확장 도메인은 서열번호 39의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단

방향으로 11개, 18개, 38개 또는 41개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0055] 상기 C-말단 확장 도메인은 상술한 코어 도메인의 C-말단에 결합되는 도메인으로서, 전장의 Nkx3.2 단백질의 318번부터 333번까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0056] 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 16번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0057] 구체적으로, C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 16번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 13개 또는 15개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일실시예에서, 상기 C-말단 확장 도메인은 서열번호 41의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드거나, 상기 폴리펩타이드의 16번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 3개, 6개, 9개, 13개 또는 15개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0059] 상기 화학식 (I) 또는 (II)로 표시되는 폴리펩타이드는 Nkx3.2 단백질의 단편으로서, 생체 내에서는 존재하지 않는다. 그러나, 상기 폴리펩타이드는 전장의 Nkx3.2 단백질과 동일한 활성을 가지면서도, 생체 내에서 쉽게 분해되지 않아 전장의 Nkx3.2 단백질에 비해 체내에서 오랫동안 존재함으로써, 더 우수한 활성을 나타낼 수 있다.

[0060] 본 발명은 상기 화학식 (I) 또는 (II)로 표시되는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0061] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드는 상기 코어 도메인, N-말단 확장 도메인 및 C-말단 확장 도메인을 코딩하는 것으로서, 각각은 서열번호 2 또는 38, 서열번호 36 또는 40 및 서열번호 6 또는 42의 염기서열을 가질 수 있다.

[0062] 상기 폴리뉴클레오타이드는 상술한 바와 같은 N-말단 확장 도메인 및 C-말단 확장 도메인에서 아미노산 잔기가 결실된 단편을 코딩하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1, 서열번호 35 또는 서열번호 5의 폴리펩타이드를 발현시키는 다른 염기서열로 치환된 것을 포함할 수 있다.

[0063] 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 상술한 바와 같은 N-말단 확장 도메인 및 C-말단 확장 도메인에서 아미노산 잔기가 결실된 단편을 코딩하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 37, 서열번호 39 또는 서열번호 41의 폴리펩타이드를 발현시키는 다른 염기서열로 치환된 것을 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0065] 상기 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코스미드(cosmid) 벡터, 박테리오파지 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 발현벡터는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드가 발현 및 분비될 수 있도록 통상의 기술자에 의해 제작될 수 있다.

[0066] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0067] 상기 숙주세포는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드가 포함된 발현벡터가 형질전환된 세포로서, 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 구체적으로, 포유동물세포일 수 있다. 상기 형질전환은 통상의 기술분야에 공지된 방법으로 수행될 수 있다. 한편, 상기 원핵세포의 일 예는 *E. coli*일 수 있으며, 진핵세포의 일 예는 효모(Yeast)일 수 있다. 또한, 상기 포유동물세포는 NS/0 골수종 세포(NS/0 myeloma cell), 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO cell), HeLa 세포, CapT 세포(인간 양수 유래 세포) 또는 COS 세포일 수 있다.

[0068] 본 발명은 상술된 Nkx 3.2 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스를 제공한다.

[0069] 상기 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 백시니아 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이러스는 아데노-부속 바이러스(AAV)일 수 있다. 상기 아데노 부속 바이러스는 특정 혈청형 (serotype)에 한정되지 않으며, 바람직하게는 AAV1 내지 AAV9 중 어느 하나일 수 있다.

[0070] 상기 아데노-부속 바이러스(AAV)는 비분열 세포를 감염시킬 수 있고, 다양한 종류의 세포에 감염할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 본 발명의 유전자 전달 시스템으로 적합하다. AAV 벡터의 제조 및 용도에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,139,941호 및 제 4,797,368호에 상세하게 개시되어 있다.

[0071] 전형적으로, AAV 바이러스는 두 개의 AAV 말단 리피트가 옆에 위치되어 있는 목적의 유전자 서열을 포함하는 플

라스미드 및 말단 리피트가 없는 야생형 AAV 코딩 서열을 포함하는 발현 플라스미를 동시 형질전환시켜 제조될 수 있다.

[0072] 본 발명의 일실시예에서, 본 발명자들은 Nkx3.2의 단편을 제작하여, 상기 단편이 Siah1에 의해 분해되지 않으면서도(도 1) IκBα와의 결합을 통해 IκBα의 분해를 유도하고(도 2 및 3), NF-κB에 의한 전사 활성화를 유도함을 확인하였다(도 4). 또한, Nkx3.2의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 아데노 부속 바이러스를 퇴행성 관절염 유발 마우스에 관절강 투여하여 손상된 연골조직이 회복되는 것을 확인하였다(도 7 및 8). 따라서, 본 발명의 Nkx3.2의 단편은 관절염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 함유하는 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0074] 상기 관절염은 골 관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 통풍 관절염, 소아 관절염, 노인성 관절염, 반응성 관절염 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0075] 상기 약학 조성물은 약학 조성물 전체 중량에 대하여 유효성분인 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 0.1 내지 99 중량%, 1 내지 90 중량%, 10 내지 80 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 약학 조성물은 투여를 위해 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.

[0077] 본 발명은 상기 재조합 바이러스를 유효성분으로 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0078] 상기 관절염은 골 관절염, 류마티스 관절염, 퇴행성 관절염, 통풍 관절염, 소아 관절염, 노인성 관절염, 반응성 관절염 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 약학 조성물은 투여를 위해 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 재조합 바이러스의 성인 기준 1일 $1.0x10^{5}$ 내지 $1.0x10^{15}$ 바이러스 유전체(viral genome)의 양으로 투여할 수 있다. 구체적으로, 본 발며의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준 1일 $1.0x10^{5}$ 내지 $1.0x10^{15}$, $1.0x10^{7}$ 내지 $1.0x10^{13}$, $1.0x10^{8}$ 내지 $1.0x10^{12}$ 또는 $1.0x10^{9}$ 내지 $1.0x10^{10}$의 양으로 투여할 수 있다.

[0081] 본 발명은 상기 약학 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 관절염의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0082] 상기 약학 조성물은 관절강 내 투여할 수 있다. 본 발명에서 사용하는 "관절강"이란, 관절에서 뼈와 뼈의 틈새로서, 관절포에 의하여 싸여있는 내강을 의미한다. 관절강 내에 투여하는 방법은 다양하다. 예를 들면, 환자가 천장을 쳐다보는 자세로 누운 상태에서 한쪽 무릎을 90도로 굽히도록 하고 관절강 내에 주삿바늘을 찌르는 방법이 있다. 상기 자세에서 안쪽과 바깥쪽의 관절 경계선을 비교적 쉽게 손으로 구분할 수 있다. 안쪽과 바깥쪽, 양쪽 모두에 주사할 수 있으나, 주로 안쪽 방향으로 주사한다. 또한, 무릎을 편 상태에서 주사하는 방법도 있다. 상기 두 자세 모두 예정된 주사 위치에 정확하게 주삿바늘을 꽂았다면, 별다른 저항감 없이 주사액을 주입할 수 있다. 그러나, 주사기를 누를 때 약물이 잘 들어가지 않고 저항감이 느껴지거나 환자가 심한 통증을 호소한다면 바늘의 위치를 조정해야 한다.

[0083] 본 발명은 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 N-말단 부위, C-말단 부위 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 부위를 결실시키는 단계를 포함하는, 체내 안정성이 증가된 Nkx3.2 단편을 제조하는 방법을 제공한다.

[0084] 상기 N-말단 부위의 결실은, 서열번호 7의 1번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 165개의 아미노산이 연속적으로 결실된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 결실은 서열번호 7의 112번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 1개 내지 53개의 아미노산이 연속적으로 결실된 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 N-말단 부위의 결실은 서열번호 7의 112번 위치의 아미노산부터 시작하여 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 11개, 18개, 38개, 41개, 44개, 47개, 50개 또는 53개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0085] 상기 C-말단 부위의 결실은, 서열번호 7의 333번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으

로 1개 내지 23개의 아미노산이 연속적으로 결실된 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 C-말단 부위의 결실은 서열번호 7의 333번 위치의 아미노산부터 시작하여 C-말단으로부터 N-말단 방향으로 13개, 15개, 17개, 19개, 21개 또는 23개의 아미노산 잔기가 결실된 것일 수 있다.

[0086] 상기 아미노산 잔기의 결실은 N-말단 부위 및 C-말단 부위 중 어느 하나 또는 양쪽에서 발생할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 상기 Nkx3.2 단편은 서열번호 13, 14, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0087] 상기 아미노산 잔기의 결실은 통상의 기술자에 의해 적절한 방법으로 수행될 수 있다. 상기 방법으로 제조된, 체내 안정성이 증가된 Nkx3.2 단편은 생체 내에서 Siah1에 의해 쉽게 분해되지 않아 천연형의 Nkx3.2 단백질에 비해 체내에서 오랫동안 존재할 수 있다.

[0088] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0089] **실시예 1. Nkx3.2의 단편을 발현하는 벡터의 제작**

[0090] Siah1에 의한 단백질 분해에 저항성을 가지는 변이체를 확보하기 위하여 다음과 같은 방법으로 Nkx3.2의 단편을 발현하는 벡터를 제작하였다.

[0091] 구체적으로, 서열번호 8로 표시되는 염기서열을 가지는 Nkx3.2 유전자를 주형으로 Lamp Pfu DNA 중합효소(Cat.# LP116-250, BioFACT, 한국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물을 제한효소인 EcoRI(Cat.# FD0274, ThermoFisher, 미국)과 XhoI(Cat.# FD0694, ThermoFisher, 미국) 또는 XbaI(Cat.# FD0684, ThermoFisher, 미국)으로 절단하고, T4 리가아제(Cat.# EL0011, ThermoFisher, 미국)를 사용하여 pCS 발현벡터(Addgene Cat # 17095)에 각각 삽입하였다.

[0092] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 20종의 Nkx3.2의 단편을 발현하는 발현벡터를 제작하였다.

*표 1*

[0093]

| 명칭 | 특징 | 서열번호 |
|---|---|---|
| Nkx3.2 (1-333) | 전장의 Nkx3.2 | 서열번호 7 |
| Nkx3.2 (1-320) | 1 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 9 |
| Nkx3.2 (1-307) | 1 내지 307번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 10 |
| Nkx3.2 (42-333) | 42 내지 333번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 11 |
| Nkx3.2 (99-333) | 99 내지 333번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 12 |
| Nkx3.2 (112-333) | 112 내지 333번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 13 |
| Nkx3.2 (123-333) | 123 내지 333번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 14 |
| Nkx3.2 (99-330) | 99 내지 330번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 15 |
| Nkx3.2 (99-327) | 99 내지 327번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 16 |
| Nkx3.2 (99-320) | 99 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 17 |
| Nkx3.2 (105-327) | 105 내지 327번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 18 |
| Nkx3.2 (110-324) | 110 내지 324번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 19 |
| Nkx3.2 (112-320) | 112 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 20 |
| Nkx3.2 (123-320) | 123 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 21 |

| | | |
|---|---|---|
| Nkx3.2 (130-320) | 130 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 22 |
| Nkx3.2 (150-320) | 150 내지 320번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 23 |
| Nkx3.2 (153-318) | 153 내지 318번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 24 |
| Nkx3.2 (156-316) | 156 내지 316번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 25 |
| Nkx3.2 (159-314) | 159 내지 314번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 26 |
| Nkx3.2 (162-312) | 162 내지 312번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 27 |
| Nkx3.2 (165-310) | 165 내지 310번째 아미노산을 포함하는 Nkx3.2 단편 | 서열번호 28 |

[0094] **실시예 2. Siah1에 의한 단백질 분해에 저항성을 가지는 Nkx3.2 단편 선별**

[0095] 실시예 1.에서 제작된 Nkx3.2 단편을 발현하는 발현벡터를 이용하여, Siah1에 의해 분해되지 않는 Nkx3.2의 단편을 다음과 같은 방법으로 선별하였다.

[0096] 먼저, Siah1(서열번호 29; GenBank Accession No. AAH35562.1)을 실시예 1과 동일한 조건 및 방법으로 PCR을 통해 증폭시키고, 증폭된 PCR 산물을 EcoRI 및 NcoI을 사용하여 절단하였다. 이를 동일한 제한효소로 절단된, 인간 인플루엔자 헤마글루티닌(HA)의 아미노산 서열(서열번호 33; YPYDVPDYA)이 3번 반복된 표지를 포함하는 pCS 3HA 발현벡터(Addgene plasmid #17095 pCS2P+의 EcoRI과 ClaI site 사이에 3 HA epitope tag을 삽입한 형태의 벡터)에 삽입하여, Siah1을 발현하는 발현벡터를 제작하였다.

[0097] 한편, 293T 신장세포주(Cat.# CRL-3216, ATCC, 미국)는 10%(v/v) 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여, 37℃, 5% $CO_2$ 조건에서 배양하였다. 상기 준비된 세포를 60x15 ㎜ 세포 배양 플레이트에 세포수가 $5x10^5$개가 되도록 분주하고, Nkx3.2를 발현하는 발현벡터 2 ㎍, 및 Nkx3.2 단편을 발현하는 발현벡터들을 4 ㎍씩 사용하여, 이들 각각을 2 ㎍의 Siah1를 발현하는 발현벡터와 함께 일시적 형질전환(transient transfection)시켰다. 형질전환은 VivaMagic(Cat.# VM001, 비바젠, 한국)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0098] 형질전환된 세포들로부터 전체 단백질을 분리하고, 이를 Bio-Rad Laboratories protein kit(Cat.# 500-0116, Bio-Rad, 미국)를 이용하여 정량한 뒤, Nkx3.2, Siah1 및 β-actin 각각에 대한 웨스턴 블롯팅을 통상적인 방법으로 수행하였다. 이때, 항-Nkx3.2 항체(Cat.# Ab83288, Abcam, 영국)는 1:1000, 항-HA 항체(Cat.# 11583816001, Roche, 스위스)는 1:5000, 항-Myc 항체(Cat.# 11667149001, Roche, 스위스)는 1:5000 및 항-β-actin 항체(Cat.# LF-PA0207, AbFrontier, 한국)는 1:5,000으로 3%(v/v)의 소혈청알부민(BSA)을 포함하는 TBST 완충액에 희석하여 사용하였다. 그 결과, 웨스턴 블롯팅 밴드를 촬영한 사진을 도 1에 나타내었고, 이를 하기 표 2에 정리하였다.

*표 2*

[0099]

| 명칭 | 서열번호 | Siah1에 의한 분해 여부 | |
|---|---|---|---|
| Nkx3.2(1-333) | 서열번호 7 | +++ | ○ |
| Nkx3.2(1-320) | 서열번호 9 | + | X |
| Nkx3.2(1-307) | 서열번호 10 | - | X |
| Nkx3.2(42-333) | 서열번호 11 | +++ | ○ |
| Nkx3.2(99-333) | 서열번호 12 | ++ | X |
| Nkx3.2(112-333) | 서열번호 13 | ++ | X |
| Nkx3.2(123-333) | 서열번호 14 | - | X |
| Nkx3.2(99-330) | 서열번호 15 | +++ | ○ |
| Nkx3.2(99-327) | 서열번호 16 | +++ | ○ |
| Nkx3.2(99-320) | 서열번호 17 | + | X |
| Nkx3.2(105-327) | 서열번호 18 | ++ | ○ |
| Nkx3.2(110-324) | 서열번호 19 | +++ | ○ |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nkx3.2(112-320) | 서열번호 20 | - | X |
| Nkx3.2(123-320) | 서열번호 21 | - | X |
| Nkx3.2(130-320) | 서열번호 22 | - | X |
| Nkx3.2(150-320) | 서열번호 23 | - | X |
| Nkx3.2(153-318) | 서열번호 24 | - | X |
| Nkx3.2(156-316) | 서열번호 25 | ++ | X |
| Nkx3.2(159-314) | 서열번호 26 | ++ | X |
| Nkx3.2(162-312) | 서열번호 27 | ++ | X |
| Nkx3.2(165-310) | 서열번호 28 | ++ | X |

[0100] 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, Siah1에 의한 Nkx3.2 단백질의 분해 현상이 전장의 Nkx3.2(1-333)와는 달리, Nkx3.2(1-320), Nkx3.2(1-307), Nkx3.2(123-333), Nkx3.2(99-320), Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들에서는 일어나지 않았다.

[0101] **실시예 3. Nkx3.2 단편과 IκBα의 결합 유무 확인**

[0102] Nkx3.2는 IκBα와의 결합을 통해 NF-κB의 활성화를 유도한다. 따라서, Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들이 IκBα와의 결합 유무를 면역침강법을 이용하여 확인하였다.

[0103] 먼저, IκBα(서열번호 31; GenBank Accession No. CAB65556)를 실시예 1.과 동일한 조건 및 방법으로 PCR을 통해 증폭시키고, 증폭된 PCR 산물을 EcoRI 및 XbaI을 사용하여 절단하였다. 이를 동일한 제한효소로 절단된, Myc 아미노산 서열(서열번호 34: EQKLISEEDL)이 6번 반복된 표지를 포함하는 pCS 6Myc 발현벡터(Addgene plasmid #17095 pCS2P+의 EcoRI과 ClaI site 사이에 6 Myc epitope tag을 삽입한 형태의 벡터)에 삽입하여 IκBα를 발현하는 발현벡터를 제작하였다.

[0104] 그 후, 실시예 1.에서 제조된 Nkx3.2(1-333)과 상기 단편들을 각각 발현하는 발현벡터들을 8 ㎍씩 사용하여, 이들 각각을 동량의 IκBα를 발현하는 발현벡터와 함께 실시예 2.와 동일한 조건 및 방법으로 293T 신장 세포주에 형질전환하였다. 이때, Nkx3.2 단백질에 의해 IκBα 단백질이 분해되는 것을 억제하기 위해 프로테오좀 분해 억제제인 MG132(Cat.# 474790, Merck Millipore, 독일) 20 μM의 농도로 첨가하였다. 6시간 후, 세포로부터 전체 단백질을 분리하고, IκBα에 표지된 Myc을 인식하는 항-Myc 항체를 이용하여 통상적인 방법으로 면역침강을 수행한 뒤, 상기 기재된 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅한 결과 사진을 도 2에 나타내었다.

[0105] 도 2에 나타난 바와 같이, Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들에서 전장의 Nkx3.2(1-333)와 유사하게 밴드가 형성되었다. 따라서, 상기 Nkx3.2 단편들이 NF-κB의 활성화를 위해 필수적으로 요구되는 IκBα와의 결합체 형성 기능을 보유하고 있음을 확인하였다.

[0106] **실시예 4. Nkx3.2 단편에 의한 IκBα단백질 분해 여부 확인**

[0107] Nkx3.2는 IκBα와의 결합을 통해 IκBα의 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 촉진시킨다. 이에, Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들이 이와 같은 활성을 유지하는지 확인하기 위해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0108] 한편, ATDC5 연골 세포주(Cat.# RCB0565, Riken, 일본)는 10%(v/v) 우태아혈청이 포함된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 사용하여, 37℃, 5% $CO_2$ 조건에서 배양하였다. 상기 준비된 세포를 90x20 ㎜ 세포 배양 플레이트에 세포수가 $5x10^5$개가 되도록 분주하고, 여기에 Nkx3.2(1-333)를 발현하는 발현벡터 4 ㎍, 및 Nkx3.2 단편을 발현하는 발현벡터들을 8 ㎍씩 사용하여, 이들 각각을 1 ㎍의 IκBα를 발현하는 발현벡터와 함께 일시적 형질전환을 수행하였다. 형질전환은 VivaMagic(Cat.# VM001, 비바젠, 한국)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0109] 이후의 과정은 실시예 2.와 동일한 조건 및 방법으로 웨스턴 블롯팅을 수행하였으며, 그 결과를 확인한 사진을 도 3에 나타내었다.

[0110] 도 3에 나타난 바와 같이, Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들에서 전장의 Nkx3.2(1-333)와 유사한 강도의 밴드가 형성되었다. 이로부터, 상기

Nkx3.2 단편들이 전장의 Nkx3.2와 동일한 수준으로 IκBα의 단백질 분해를 유도할 수 있음을 검증하였다.

[0111] **실시예 5. Nkx3.2 단편에 의한 NF-κB 전사기능 활성화 여부 확인**

[0112] Nkx3.2는 NF-κB의 활성화를 유도함으로써, 연골세포의 세포사멸을 억제한다. 따라서, Nkx3.2 단편에 의한 NF-κB의 활성화를 측정하기 위하여, NF-κB에 특이적인 DNA 결합 사이트(서열번호 35: GGGAATTTCC)가 4번 반복된 폴리뉴클레오티드 서열을 MluI 및 XhoI을 이용하여 pGL3-Basic 벡터(Cat.# E1751, Promega, 미국)에 삽입하여 4x-κB-Luc 발현벡터를 제작하였다. 또한, 상기 발현벡터를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정함으로써 Nkx3.2에 의한 NF-κB의 전사기능 활성화를 확인하였다.

[0113] 먼저, 전장의 Nkx3.2(1-333) 및 Nkx3.2 단편을 발현하는 발현벡터 200 ng, 4x-κB-Luc 발현벡터 100 ng, pRL-TK 발현벡터 (Cat.# E2241, Promega, 미국) 20 ng을 각각 사용하여 293T 신장 세포주로 일시적 형질전환시켰다.

[0114] 형질전환은 VivaMagic을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 24시간 후, Dual-Luciferase Reporter Assay System (Cat.# E1910, Promega, 미국)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.

[0115] 구체적으로, 형질전환된 293T 신장 세포주의 배양액을 제거하고, 1xPBS로 세척하였다. 여기에 150 ㎕의 1x Passive Lysis Buffer(PLB)를 첨가하여 15분 동안 상온에서 세포를 용해시키고, 10 ㎕의 세포 용해물에 50 ㎕의 LAR II를 첨가하여 반응시킨 뒤, 파이어플라이 루시퍼라제(FireFly luciferase) 활성을 측정하였다. 여기에 50 ㎕의 Stop&Glo를 첨가하여 레닐라 루시퍼라제(Renilla luciferase) 활성을 측정하였다. 실험 결과는 각각의 샘플에 대한 레닐라 루시퍼라제 활성을 파이어플라이 루시퍼라제 활성으로 정규화시키고(normalized), 이에 대한 백분율의 평균을 도 4에 나타내었다.

[0116] 도 4에 나타난 바와 같이, 음성 대조군으로서 pCS2 벡터만을 형질전환한 세포에서의 루시퍼라제 활성을 1로 하였을 때, 전장의 Nkx3.2(1-333)뿐만 아니라, Nkx3.2(112-320), Nkx3.2(123-320), Nkx3.2(130-320), Nkx3.2(150-320) 및 Nkx3.2(153-318) 단편들에서 모두 유의하게 증가된 루시퍼라제 활성을 나타내었다. 따라서, 상기 Nkx3.2 단편들이 전장의 Nkx3.2와 유사한 수준의 NF-κB 전사기능 활성화 기능을 보유하고 있음을 확인하였다.

[0117] **실시예 6. Nkx3.2 단편의 향상된 퇴행성 관절염 치료 효능 확인**

[0118] 상기의 *in vitro* 실험들을 통해 전장의 Nkx3.2에 비하여 Nkx3.2 단편들이 나타내는 기능적 우수성을 확인할 수 있었다. 이에, Nkx3.2 단편에 대한 *in vivo* 측면에서의 향상된 기능을 검증하기 위하여 Nkx3.2 단편(123-320)과 전장의 Nkx3.2(1-333)의 퇴행성 관절염 치료 효능을 비교 분석하였다. 이를 위해 DMM(Destabilization of Medial Meniscus)이라 명명되는 외과적 시술을 통해 퇴행성 관절염을 유도하는 마우스 모델을 선택하였다. 해당 실험과정을 도 6에 도식화하였다.

[0119] 구체적으로, 무릎조직 내 내측반월상연골 인대를 절단하여, 내측반월상연골의 구조적인 불안정화를 유도하고 이를 통해 대퇴골연골과 경골연골이 서로 마주 부딪히게 하여 연골손상을 유도함으로써 퇴행성 관절염을 유도하였다. 대조군(Control)은 모의수술을 통하여 무릎 외피와 내피를 절개하였다가 봉합한 동물군을 사용하였다. 퇴행성 관절염을 유도한 동물군과 모의수술 대조군을 8주간 사육하고, 이 시점에서 Nkx3.2 단편(123-320) 또는 전장의 Nkx3.2(1-333)를 발현하는 AAV(Adeno-Associated Virus) 또는 공벡터 AAV를 해당 무릎 관절강에 주사하여, 4 주간 사육한 뒤 퇴행성 관절염의 진행 정도를 조직 병리 분석을 통해 분석하였다.

[0120] 조직병리학적 분석은 양이온 화합물로써 연골의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfateproteoglycan)이 띄는 음이온기에 효과적으로 부착되어 붉은색의 색깔을 띄는 염색 시료인 Safranin-O 염색 방법을 채택하였다. 붉은색으로 진하게 염색된 부위는 건강성이 유지된 연골 조직으로 평가되며, 반대로 Safranin-O 염색이 약하거나 없으며 조직이 손상된 부분은 퇴행성 관절염 병증이 진행된 병변으로 해석된다.

[0121] 도 7에 나타난 바와 같이, 공벡터 AAV가 관절강으로 주사된 대조군의 경우, 투여된 바이러스 입자의 양에 상관없이 매우 심한 연골 손상 및 퇴행 현상이 관찰되었다.

[0122] 전장의 Nkx3.2(1-333)를 발현하는 AAV가 관절강으로 주사된 비교군의 경우, $1x10^{10}$ AAV 투여군에서만 유의한 퇴행성 관절염 치료 효능이 관찰되었다.

[0123] 반면, Nkx3.2 단편(123-320)을 발현하는 AAV가 관절강으로 주사된 실험군의 경우, 가장 낮은 용량인 $1.25x10^{9}$

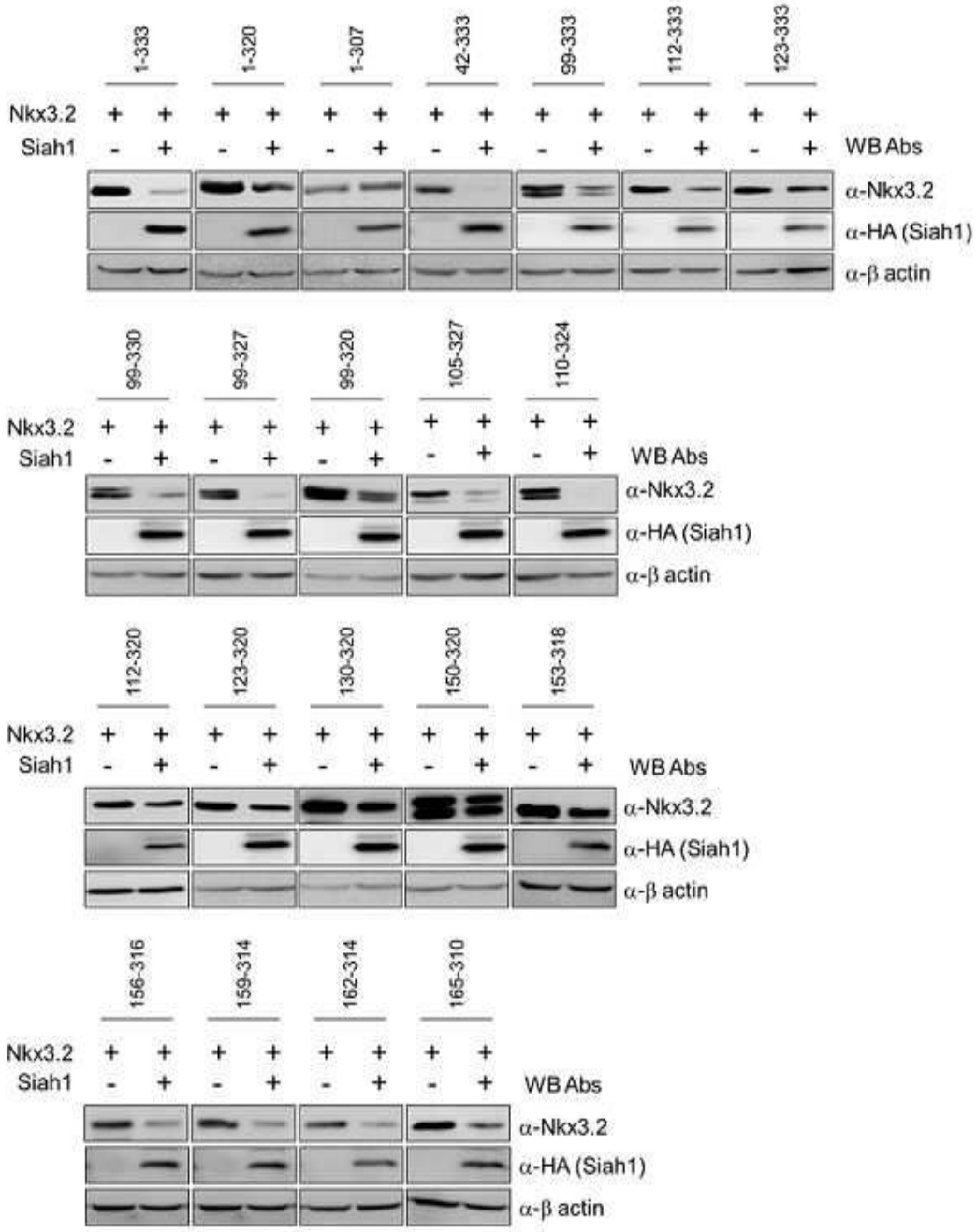
AAV 투여군에서부터 월등한 퇴행성 관절염 치료효과를 나타내었다. 즉, Nkx3.2 단편(123-320) 단편의 경우, 퇴행성 관절염 치료 효능이 전장의 Nkx3.2(1-333) 대비 최소 10배 이상 향상되었음을 확인할 수 있었다.

[0124] 상기 조직병리학적 분석을 통해 얻어진 모든 데이터를 정량적으로 평가하고, 그 결과를 그래프화하여 도 8에 나타내었다. 각 실험군 별로 분석된 동물의 수는 3마리이며, 퇴행성 관절염 중증도를 최소 0점에서 최대 5점으로 평가하여 막대 그래프를 작성하였다. 평균의 표준오차(mean with SEM)가 오차막대로 표기되었으며, 바이러스 입자의 투여 용량 A, B, C, D는 각각 $1.25x10^{9}$, $2.5x10^{9}$, $5x10^{9}$, $1x10^{10}$ 순서로 증가 되었다.

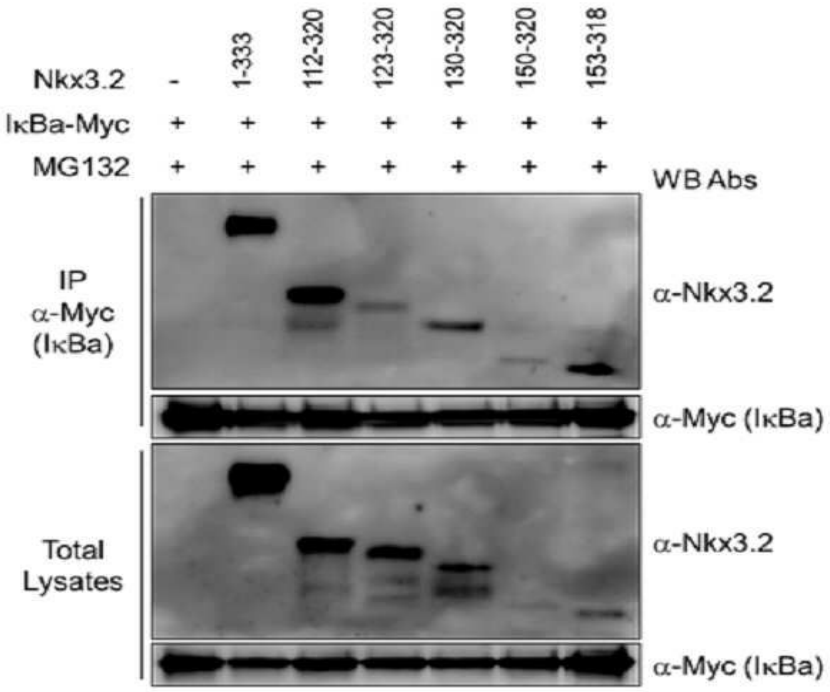
[0125] 도 8에 나타난 바와 같이, 공벡터 AAV가 관절강으로 주사된 대조군의 경우, 투여된 바이러스 입자의 양에 상관없이 4.5 내지 5점의 높은 점수가 평가되었다. 또한, 전장의 Nkx3.2(1-333)을 발현하는 AAV가 관절강으로 주사된 비교군의 경우, $1x10^{10}$ AAV 투여군에서만 1.5점의 낮은 점수가 평가되었다. 반면, Nkx3.2 단편(123-320)의 을 발현하는 AAV가 관절강으로 주사된 실험군의 경우, 가장 낮은 용량인 $1.25x10^{9}$ AAV 투여군에서부터 1점 이하의 매우 낮은 점수가 평가되었다. 즉, Nkx3.2 단편(123-320) 단편이 전장의 Nkx3.2(1-333)보다 퇴행성 관절염 치료 효능이 우수하다는 것을 확인하였다.

도면

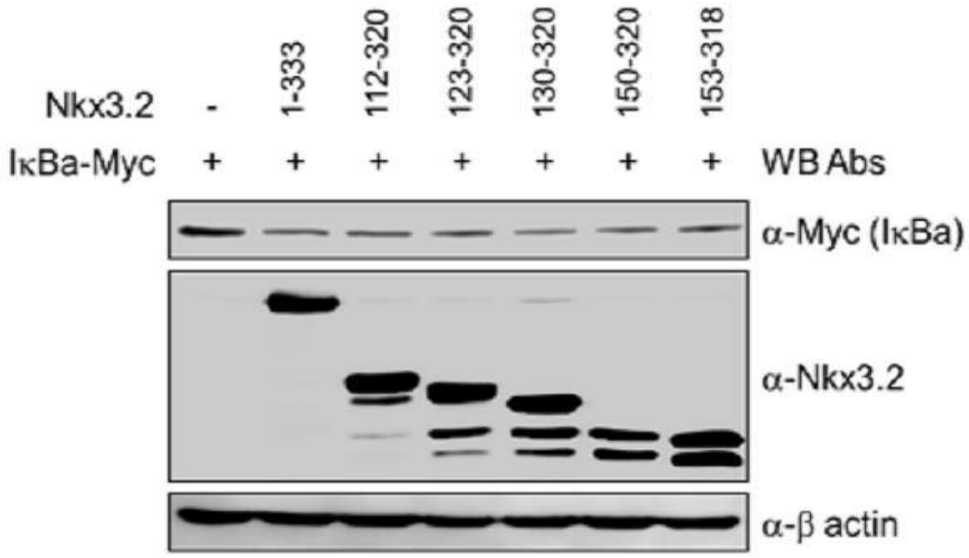
도면1


1-333
1-320
1-307
42-333
99-333
112-333
123-333
Nkx3.2
Siah1
WB Abs
α-Nkx3.2
α-HA (Siah1)
α-β actin
99-330
99-327
99-320
105-327
110-324
112-320
123-320
130-320
150-320
153-318
156-316
159-314
162-314
165-310

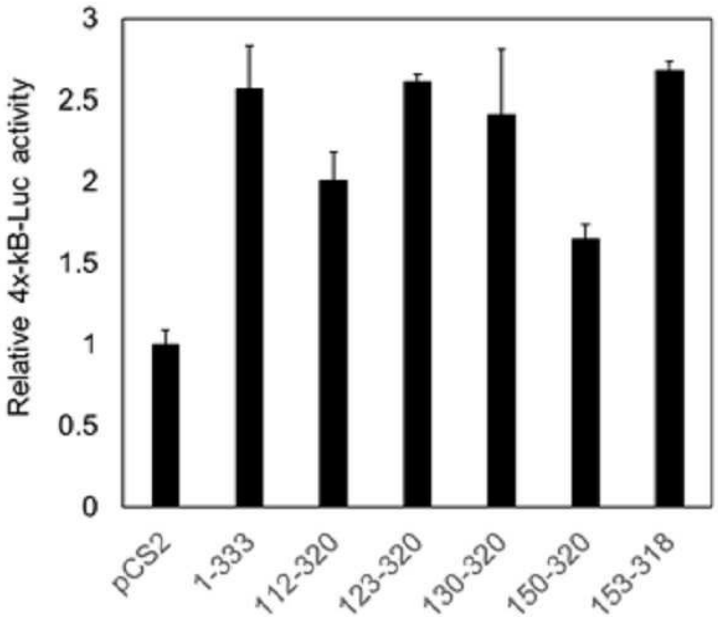
도면2


Nkx3.2
IκBa-Myc
MG132
-
1-333
112-320
123-320
130-320
150-320
153-318
+
WB Abs
IP
α-Myc
(IκBa)
α-Nkx3.2
α-Myc (IκBa)
Total
Lysates
α-Nkx3.2
α-Myc (IκBa)

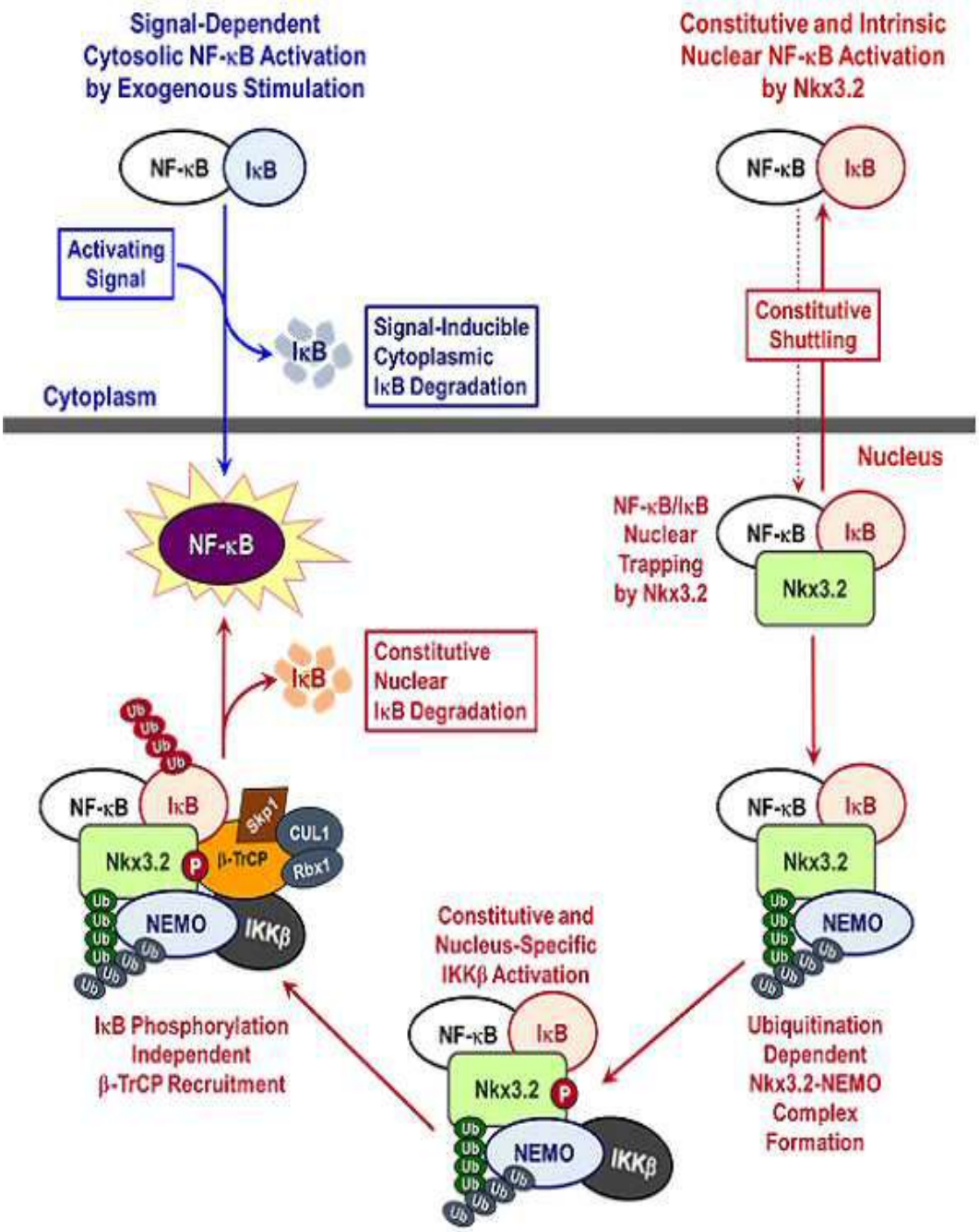
도면3


Nkx3.2
IκBa-Myc
-
1-333
112-320
123-320
130-320
150-320
153-318
+
WB Abs
α-Myc (IκBa)
α-Nkx3.2
α-β actin

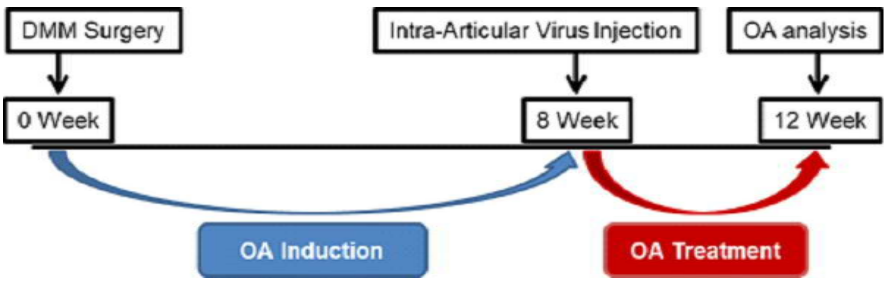
도면4


Relative 4x-kB-Luc activity
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
pCS2
1-333
112-320
123-320
130-320
150-320
153-318

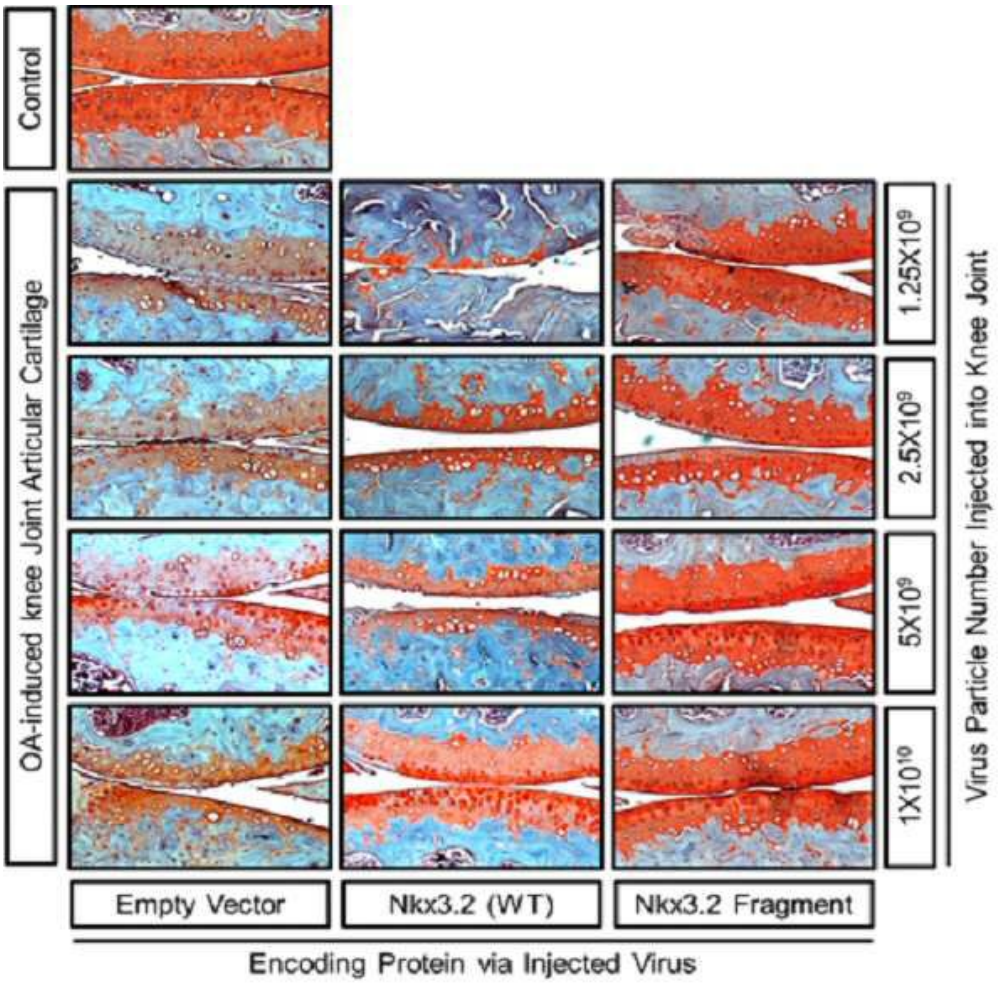
도면5


Signal-Dependent
Cytosolic NF-κB Activation
by Exogenous Stimulation
Constitutive and Intrinsic
Nuclear NF-κB Activation
by Nkx3.2
NF-κB
IκB
Activating
Signal
Signal-Inducible
Cytoplasmic
IκB Degradation
Constitutive
Shuttling
Cytoplasm
Nucleus
NF-κB/IκB
Nuclear
Trapping
by Nkx3.2
Nkx3.2
Constitutive
Nuclear
IκB Degradation
Skp1
CUL1
β-TrCP
Rbx1
NEMO
IKKβ
Ub
P
Constitutive and
Nucleus-Specific
IKKβ Activation
IκB Phosphorylation
Independent
β-TrCP Recruitment
Ubiquitination
Dependent
Nkx3.2-NEMO
Complex
Formation

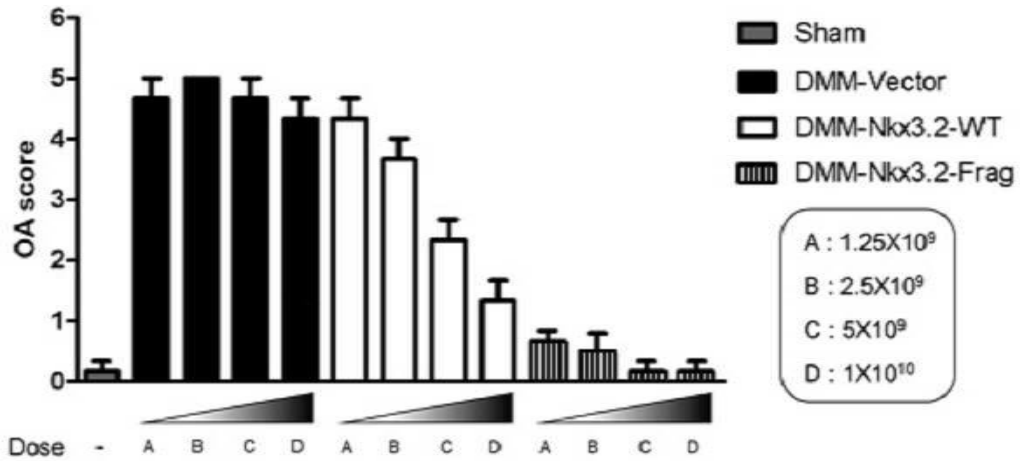
도면6


DMM Surgery
Intra-Articular Virus Injection
OA analysis
0 Week
8 Week
12 Week
OA Induction
OA Treatment

도면7




도면8




서 열 목 록

<110> ICM Co., Ltd

<120> Nkx3.2 FRAGMENT AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

<130> FPD/201710-0019

<150> KR 2016/0149090

<151> 2016-11-09

<160> 42

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 166-309 aa fragment of Nkx3.2

<400> 1

Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu

20 25 30

Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe
35 40 45

Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg
50 55 60

Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu
65 70 75 80

Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr
85 90 95

Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala
100 105 110

Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr
115 120 125

Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro
130 135 140

<210> 2

<211> 432

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 166-309 aa fragment of Nkx3.2

<400

> 2

ggtgttggcc ccagaggtgc acacgtgtcc gcgctgtgca gcggggccgg cggcgggggc 60

ggcagcgggc cggcaggcgt cgcggaggag gaggaggagc cggcggcgcc caagccacgc 120

aagaagcgct cgcgggccgc tttctcccac gcgcaggtct tcgagctgga gcgccgcttt 180

aaccaccagc gctacctgtc cgggcccgag cgcgcagacc tggccgcgtc gctgaagctc 240

accgagacgc aggtgaaaat ctggttccag aaccgtcgct acaagacaaa gcgccggcag 300

atggcagccg acctgctggc ctcggcgccc gccgccaaga aggtggccgt aaaggtgctg 360

gtgcgcgacg accagagaca atacctgccc ggcgaagtgc tgcggccacc ctcgcttctg 420

ccactgcagc cc 432

<210> 3

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 123-165 aa fragment of Nkx3.2

<400> 3

Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val

20 25 30

Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp

35 40

<210> 4

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 123-165 aa fragment of Nkx3.2

<400> 4

ttgagcctcg gccagccggt ctgtgagctg gccgcttcca aagacctaga ggaggaagcc 60

gcgggccgga gcgacagcga gatgtccgcc agcgtctcag gcgaccgcag cccaaggacc 120

gaggacgac 129

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 310-333 aa fragment encoding Nkx3.2

<400> 5

Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser Thr
1 5 10 15

Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gln
20

<210> 6

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 310-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 6

tcctactatt acccgtacta ctgcctccca ggctgggcgc tctccacctg cgcagctgcc 60

gcaggcaccc ag 72

<210> 7

<211> 333

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Ala Val Arg Gly Ala Asn Thr Leu Thr Ser Phe Ser Ile Gln Ala
1 5 10 15

Ile Leu Asn Lys Lys Glu Glu Arg Gly Gly Leu Ala Ala Pro Glu Gly
20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gly Gly Thr Ala Ala Ser Val Ala Ala Ala Pro Ala
35 40 45

Val Cys Cys Trp Arg Leu Phe Gly Glu Arg Asp Ala Gly Ala Leu Gly

50 55 60

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

Ala Gly Arg Thr Ala Glu Ser Pro Glu Gly Trp Asp Ser Asp Ser Ala

85 90 95

Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly

100 105 110

Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro

115 120 125

Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly

130 135 140

Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro

145 150 155 160

Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala

165 170 175

Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val

180 185 190

Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg

195 200 205

Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg

210 215 220

Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala

225 230 235 240

Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn

245 250 255

Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala

260 265 270

Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp

275 280 285

Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu

290 295 300

Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly

305 310 315 320

Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gln

325 330

<210> 8

<211> 1002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggctgtgc gcggcgccaa caccttgacg tccttctcca tccaggcgat cctcaacaag 60

aaagaggagc gcggcgggct ggccgcgcca gaggggcgcc cggcgcccgg gggcacagcg 120

gcatcggtgg ccgcggctcc cgctgtctgc tgttggcggc tctttgggga gagggacgcg 180

ggcgcgttgg ggggcgccga ggactctctg ctggcgtctc ctgccggtac cagaacagct 240

gcggggcgga ctgcggagag cccggaaggc tgggactcgg actccgcgct cagcgaggag 300

aacgagagca ggcggcgctg cgcggacgcg cgggggggcca gcggggccgg ccttgcgggg 360

ggatccttga gcctcggcca gccggtctgt gagctggccg cttccaaaga cctagaggag 420

gaagccgcgg gccggagcga cagcgagatg tccgccagcg tctcaggcga ccgcagccca 480

aggaccgagg acgacggtgt tggccccaga ggtgcacacg tgtccgcgct gtgcagcggg 540

gccggcggcg ggggcggcag cgggccggca ggcgtcgcgg aggaggagga ggagccggcg 600

gcgcccaagc cacgcaagaa gcgctcgcgg gccgctttct cccacgcgca ggtcttcgag 660

ctggagcgcc gctttaacca ccagcgctac ctgtccgggc ccgagcgcgc agacctggcc 720

gcgtcgctga agctcaccga gacgcaggtg aaaatctggt tccagaaccg tcgctacaag 780

acaaagcgcc ggcagatggc agccgacctg ctggcctcgg cgcccgccgc caagaaggtg 840

gccgtaaagg tgctggtgcg cgacgaccag agacaatacc tgcccggcga agtgctgcgg 900

ccaccctcgc ttctgccact gcagccctcc tactattacc cgtactactg cctcccaggc 960

tgggcgctct ccacctgcgc agctgccgca ggcacccagt ga 1002

<210> 9

<211> 320

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-320 aa fragment of Nkx3.2

<400> 9

Met Ala Val Arg Gly Ala Asn Thr Leu Thr Ser Phe Ser Ile Gln Ala

1 5 10 15

Ile Leu Asn Lys Lys Glu Glu Arg Gly Gly Leu Ala Ala Pro Glu Gly

20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gly Gly Thr Ala Ala Ser Val Ala Ala Ala Pro Ala
35 40 45
Val Cys Cys Trp Arg Leu Phe Gly Glu Arg Asp Ala Gly Ala Leu Gly
50 55 60
Gly Ala Glu Asp Ser Leu Leu Ala Ser Pro Ala Gly Thr Arg Thr Ala
65 70 75 80
Ala Gly Arg Thr Ala Glu Ser Pro Glu Gly Trp Asp Ser Asp Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly
100 105 110
Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro
115 120 125
Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly
130 135 140
Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro
145 150 155 160
Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala

165 170 175
Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val
180 185 190
Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg
195 200 205
Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg
210 215 220
Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala
225 230 235 240

Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn
245 250 255
Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala
260 265 270
Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp
275 280 285

Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu

290 295 300

Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly

305 310 315 320

<210> 10

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1-307 aa fragment of Nkx3.2

<400> 10

Met Ala Val Arg Gly Ala Asn Thr Leu Thr Ser Phe Ser Ile Gln Ala

1 5 10 15

Ile Leu Asn Lys Lys Glu Glu Arg Gly Gly Leu Ala Ala Pro Glu Gly

20 25 30

Arg Pro Ala Pro Gly Gly Thr Ala Ala Ser Val Ala Ala Ala Pro Ala

35 40 45

Val Cys Cys Trp Arg Leu Phe Gly Glu Arg Asp Ala Gly Ala Leu Gly

50 55 60

Gly Ala Glu Asp Ser Leu Leu Ala Ser Pro Ala Gly Thr Arg Thr Ala

65 70 75 80

Ala Gly Arg Thr Ala Glu Ser Pro Glu Gly Trp Asp Ser Asp Ser Ala

85 90 95

Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly

100 105 110

Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro

115 120 125

Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly

130 135 140

Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro

145 150 155 160

Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala

165 170 175

Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val

180 185 190

Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg

195 200 205

Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg

210 215 220

Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala

225 230 235 240

Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn

245 250 255

Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala

260 265 270

Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp

275 280 285

Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu

290 295 300

Leu Pro Leu

305

<210> 11

<211> 292

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 42-333 aa fragment of Nkx3.2

<400>

11

Ser Val Ala Ala Ala Pro Ala Val Cys Cys Trp Arg Leu Phe Gly Glu

1 5 10 15

Arg Asp Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Glu Asp Ser Leu Leu Ala Ser

20 25 30

Pro Ala Gly Thr Arg Thr Ala Ala Gly Arg Thr Ala Glu Ser Pro Glu

35 40 45

Gly Trp Asp Ser Asp Ser Ala Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg

50 55 60

Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly

65 70 75 80

Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp

85 90 95

Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser

100 105 110

Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro

115 120 125

Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala

145 150 155 160

Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln

165 170 175

Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly

180 185 190

Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln

195 200 205

Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln

210 215 220

Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala

225 230 235 240

Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu

245 250 255

Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr

260 265 270

Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala

275 280 285

Ala Gly Thr Gln

290

<210> 12

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 99-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 12

Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser
1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys
20 25 30

Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser
35 40 45

Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr
50 55 60

Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys
65 70 75 80

Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg
100 105 110

Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn
115 120 125

His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser
130 135 140

Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala
165 170 175

Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln
180 185 190

Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro
195 200 205

Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala

210 215 220

Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gln

225 230 235

<210> 13

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 112-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 13

Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala

20 25 30

Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser

35 40 45

Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser

50 55 60

Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly

65 70 75 80

Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys

85 90 95

Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg

100 105 110

Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu

115 120 125

Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln

130 135 140

Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu

145 150 155 160

Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg

165 170 175

Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser

180 185 190

Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro

195 200 205

Gly Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gln

210 215 220

<210> 14

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 123-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 14

Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu

1 5 10 15

Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val

20 25 30

Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg

35 40 45

Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly

50 55 60

Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro

65 70 75 80

Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val

85 90 95

Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro

100 105 110

Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val

115 120 125

Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met

130 135 140

Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val

145 150 155 160

Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val

165 170 175

Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro

180 185 190

Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala

195 200 205

Gly Thr Gln

210

<210> 15

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 99-330 aa fragment of Nkx3.2

<400> 15

Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys

20 25 30

Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser

35 40 45

Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr

50 55 60

Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys

65 70 75 80

Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg

100 105 110

Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn

115 120 125

His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser

130 135 140

Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala

165 170 175

Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln

180 185 190

Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro

195 200 205

Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala

210 215 220

Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala

225 230

<210> 16

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 99-327 aa fragment of Nkx3.2

<400> 16

Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys

20 25 30

Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser

35 40 45

Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr

50 55 60

Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys

65 70 75 80

Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg

100 105 110

Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn

115 120 125

His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser

130 135 140

Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala

165 170 175

Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln

180 185 190

Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro

195 200 205

Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala

210 215 220

Leu Ser Thr Cys Ala

225

<210> 17

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 99-320 aa fragment of Nkx3.2

<400> 17

Glu Glu Asn Glu Ser Arg Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys

20 25 30

Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser

35 40 45

Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr

50 55 60

Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys

65 70 75 80

Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu

85 90 95

Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg

100 105 110

Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn

115 120 125

His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser

130 135 140

Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala

165 170 175

Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln

180 185 190

Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro

195 200 205

Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly

210 215 220

<210> 18

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 105-327 aa fragment of Nkx3.2

<400> 18

Arg Arg Cys Ala Asp Ala Arg Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys

20 25 30

Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala

35 40 45

Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly

50 55 60

Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly

65 70 75 80

Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala

85 90 95

Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala

100 105 110

Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser

115 120 125

Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr

130 135 140

Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg

145 150 155 160

Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val

165 170 175

Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly

180 185 190

Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr

195 200 205

Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala

210 215 220

<210> 19

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 110-324 aa fragment of Nkx3.2

<400> 19

Ala Arg Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu

1 5 10 15

Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu

20 25 30

Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp

35 40 45

Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His

50 55 60

Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro

65 70 75 80

Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg

85 90 95

Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu

100 105 110

Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala

115 120 125

Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp

130 135 140

Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp

145 150 155 160

Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu

165 170 175

Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro

180 185 190

Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys

195 200 205

Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser

210 215

<210> 20

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 112-320 aa fragment of Nkx3.2

<400> 20

Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala

20 25 30

Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser

35 40 45

Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser
50 55 60
Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly
65 70 75 80
Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys
85 90 95
Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg
100 105 110
Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu

115 120 125
Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln
130 135 140
Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu
145 150 155 160
Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg
165 170 175
Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser
180 185 190

Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro
195 200 205
Gly

<210> 21
<211> 198
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 123-320 aa fragment of Nkx3.2
<400> 21
Leu Ser Leu Gly Gln Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu
1 5 10 15
Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val

20 25 30

Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg
35 40 45
Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80
Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val
85 90 95
Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro

100 105 110
Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val
115 120 125
Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met
130 135 140
Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val
145 150 155 160
Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val
165 170 175

Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro
180 185 190
Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly
195

<210> 22
<211> 191
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 130-320 aa fragment of Nkx3.2
<400> 22
Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Gly Arg
1 5 10 15
Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg

20 25 30

Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu
35 40 45
Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala
50 55 60
Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser
65 70 75 80
Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe
85 90 95
Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala

100 105 110
Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg
115 120 125
Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser
130 135 140
Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp
145 150 155 160
Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu
165 170 175

Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly
180 185 190

<210> 23
<211> 171
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 150-320 aa fragment of Nkx3.2
<400> 23
Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp
1 5 10 15
Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu

35 40 45

Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe

50 55 60

Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg

65 70 75 80

Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu

85 90 95

Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr

100 105 110

Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala

115 120 125

Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr

130 135 140

Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro

145 150 155 160

Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu Pro Gly

165 170

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 153-318 aa fragment of Nkx3.2

<400> 24

Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly

1 5 10 15

Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala

35 40 45

Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala

50 55 60

Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser
65 70 75 80
Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr
85 90 95
Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg
100 105 110
Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val
115 120 125
Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly

130 135 140
Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr
145 150 155 160
Tyr Pro Tyr Tyr Cys Leu
165

<210> 25
<211> 161
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 156-316 aa fragment of Nkx3.2
<400> 25
Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly
1 5 10 15
Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30
Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys
35 40 45
Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe
50 55 60
Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu
65 70 75 80
Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys

85 90 95

Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala
100 105 110
Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys
115 120 125
Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu
130 135 140
Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro Tyr
145 150 155 160
Tyr

<210> 26

<211> 156
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 159-314 aa fragment of Nkx3.2
<400> 26
Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val
1 5 10 15
Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala
20 25 30
Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys
35 40 45
Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu

50 55 60
Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp
65 70 75 80
Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe
85 90 95
Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu
100 105 110
Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val

115 120 125

Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro
130 135 140
Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr Pro
145 150 155

<210> 27
<211> 151
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 162-312 polypeptide fragment of Nkx3.2
<400> 27

Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu
1 5 10 15
Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala

20 25 30
Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser
35 40 45
Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe
50 55 60
Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg
85 90 95

Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser
100 105 110
Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp
115 120 125
Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu
130 135 140
Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr
145 150

<210> 28

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 165-310 polypeptide fragment of Nkx3.2

<400> 28

Asp Gly Val Gly Pro Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu
20 25 30

Glu Glu Pro Ala Ala Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala
35 40 45

Phe Ser His Ala Gln Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln
50 55 60

Arg Tyr Leu Ser Gly Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys

65 70 75 80

Leu Thr Glu Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys
85 90 95

Thr Lys Arg Arg Gln Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala
100 105 110

Ala Lys Lys Val Ala Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln
115 120 125

Tyr Leu Pro Gly Glu Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln
130 135 140

Pro Ser

145

<210> 29

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Ser Arg Gln Thr Ala Thr Ala Leu Pro Thr Gly Thr Ser Lys Cys
1 5 10 15

Pro Pro Ser Gln Arg Val Pro Ala Leu Thr Gly Thr Thr Ala Ser Asn
20 25 30
Asn Asp Leu Ala Ser Leu Phe Glu Cys Pro Val Cys Phe Asp Tyr Val
35 40 45
Leu Pro Pro Ile Leu Gln Cys Gln Ser Gly His Leu Val Cys Ser Asn

50 55 60
Cys Arg Pro Lys Leu Thr Cys Cys Pro Thr Cys Arg Gly Pro Leu Gly
65 70 75 80
Ser Ile Arg Asn Leu Ala Met Glu Lys Val Ala Asn Ser Val Leu Phe
85 90 95
Pro Cys Lys Tyr Ala Ser Ser Gly Cys Glu Ile Thr Leu Pro His Thr
100 105 110
Glu Lys Ala Asp His Glu Glu Leu Cys Glu Phe Arg Pro Tyr Ser Cys
115 120 125

Pro Cys Pro Gly Ala Ser Cys Lys Trp Gln Gly Ser Leu Asp Ala Val
130 135 140
Met Pro His Leu Met His Gln His Lys Ser Ile Thr Thr Leu Gln Gly
145 150 155 160
Glu Asp Ile Val Phe Leu Ala Thr Asp Ile Asn Leu Pro Gly Ala Val
165 170 175
Asp Trp Val Met Met Gln Ser Cys Phe Gly Phe His Phe Met Leu Val
180 185 190
Leu Glu Lys Gln Glu Lys Tyr Asp Gly His Gln Gln Phe Phe Ala Ile

195 200 205
Val Gln Leu Ile Gly Thr Arg Lys Gln Ala Glu Asn Phe Ala Tyr Arg
210 215 220
Leu Glu Leu Asn Gly His Arg Arg Arg Leu Thr Trp Glu Ala Thr Pro
225 230 235 240
Arg Ser Ile His Glu Gly Ile Ala Thr Ala Ile Met Asn Ser Asp Cys
245 250 255
Leu Val Phe Asp Thr Ser Ile Ala Gln Leu Phe Ala Glu Asn Gly Asn

260 265 270

Leu Gly Ile Asn Val Thr Ile Ser Met Cys

275 280

<210> 30

<211> 1540

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gtcccgtcgg tctcggcgcc gggaagaggc ggtggcgctg cccgcggtgg cgggggttgg 60

cgacggagcg cgttggtgcc aggaccgggg tccgaggcgc gctctccgcc cacagaaatg 120

agccgtcaga ctgctacagc attacctacc ggtacctcga agtgtccacc atcccagagg 180

gtgcctgccc tgactggcac aactgcatcc aacaatgact tggcgagtct ttttgagtgt 240

ccagtctgct ttgactatgt gttaccgccc attcttcaat gtcagagtgg ccatcttgtt 300

tgtagcaact gtcgcccaaa gctcacatgt tgtccaactt gccggggccc tttgggatcc 360

attcgcaact tggctatgga gaaagtggct aattcagtac ttttcccctg taaatatgcg 420

tcttctggat gtgaaataac tctgccacac acagaaaaag cagaccatga agagctctgt 480

gagtttaggc cttattcctg tccgtgccct ggtgcttcct gtaaatggca aggctctctg 540

gatgctgtaa tgccccatct gatgcatcag cataagtcca ttacaaccct acagggagag 600

gatatagttt ttcttgctac agacattaat cttcctggtg ctgttgactg ggtgatgatg 660

cagtcctgtt ttggctttca cttcatgtta gtcttagaga aacaggaaaa atacgatggt 720

caccagcagt tcttcgcaat cgtacagctg ataggaacac gcaagcaagc tgaaaatttt 780

gcttaccgac ttgagctaaa tggtcatagg cgacgattga cttgggaagc gactcctcga 840

tctattcatg aaggaattgc aacagccatt atgaatagcg actgtctagt ctttgacacc 900

agcattgcac agctttttgc agaaaatggc aatttaggca tcaatgtaac tatttccatg 960

tgttgaaatg gcaatcaaac attttctggc cagtgtttaa aacttcagtt tcacagaaaa 1020

taaggcaccc atctgtctgc caacctaaaa ctctttcggt aggtggaagc tagacacatg 1080

aaggtaaata aaaagaaagg ctgttaaata caggaaacag ttgcatgtag taacactaat 1140

atatttaaaa ataagtcaac agtaaaccac tgaaaaaata tatgtatata cacccaagat 1200

gggcatcttt tgtattaaga aaggaagcat tgtaaaataa ttctgagttt tgtgtttgtt 1260

gtagattgat tgtattgttg aaaaagtttg tttttgcgtg ggagtgtgtg cctgcgtggg 1320

tgtgtgcgtg tttgggtttt tttcctttaa ctgacaagcc atcttgagtg gtcatgggcc 1380

actgcttttc cctttgtgag tcaatacata gtgctgctgt gtgctttttt tgtgtgtatt 1440

tgctaatttt tattaatttt agtttttcat taaataaatt tgacttttct gtaaaaaaaa 1500

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1540

<210> 31

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Phe Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro

1 5 10 15

Arg Asp Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser

20 25 30

Gly Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu

35 40 45

Leu Gln Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu

50 55 60

Pro Trp Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu

65 70 75 80

Ala Ile Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln

85 90 95

Val Lys Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln

100 105 110

Thr Pro Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu

115 120 125

Ala Leu Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly

130 135 140

Asn Thr Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val

145 150 155 160

Gly Val Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu

165 170 175

Lys Ala Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile

180 185 190

His Gly Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp

195 200 205

Val Asn Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala

210 215 220

Val Asp Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly

225 230 235 240

Ala Asp Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu

245 250 255

Thr Trp Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu

260 265 270

Thr Leu Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser

275 280 285

Tyr Asp Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro

290 295 300

Tyr Asp Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu

305 310 315

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of Human influenza hemagglutinin

<400> 32

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of Myc

<400> 33

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of NF-kappaB specific DNA binding site

<400> 34

gggaatttcc 10

<210> 35

<211

> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 112-165 aa fragment of Nkx3.2

<400> 35

Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala
20 25 30

Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Asp Arg Ser
35 40 45

Pro Arg Thr Glu Asp Asp

50

<210> 36

<211> 162

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 112-165 aa fragment of Nkx3.2

<400> 36

ggggccagcg gggccggcct tgcgggggga tccttgagcc tcggccagcc ggtctgtgag 60

ctggccgctt ccaaagacct agaggaggaa gccgcgggcc ggagcgacag cgagatgtcc 120

gccagcgtct caggcgaccg cagcccaagg accgaggacg ac 162

<210> 37

<211> 164

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 154-317 aa fragment of Nkx3.2

<400> 37

Val Ser Gly Asp Arg Ser Pro Arg Thr Glu Asp Asp Gly Val Gly Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ala His Val Ser Ala Leu Cys Ser Gly Ala Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Gly Pro Ala Gly Val Ala Glu Glu Glu Glu Glu Pro Ala Ala
35 40 45

Pro Lys Pro Arg Lys Lys Arg Ser Arg Ala Ala Phe Ser His Ala Gln
50 55 60

Val Phe Glu Leu Glu Arg Arg Phe Asn His Gln Arg Tyr Leu Ser Gly

65 70 75 80

Pro Glu Arg Ala Asp Leu Ala Ala Ser Leu Lys Leu Thr Glu Thr Gln
85 90 95

Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Thr Lys Arg Arg Gln
100 105 110

Met Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ala Lys Lys Val Ala
115 120 125

Val Lys Val Leu Val Arg Asp Asp Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Gly Glu
130 135 140

Val Leu Arg Pro Pro Ser Leu Leu Pro Leu Gln Pro Ser Tyr Tyr Tyr
145 150 155 160

Pro Tyr Tyr Cys

<210> 38

<211> 492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 154-317 aa fragment of Nkx3.2

<400> 38

gtctcaggcg accgcagccc aaggaccgag gacgacggtg ttggccccag aggtgcacac 65

gtgtccgcgc tgtgcagcgg ggccggcggc gggggcggca gcgggccggc aggcgtcgcg 125

gaggaggagg aggagccggc ggcgcccaag ccacgcaaga agcgctcgcg ggccgctttc 185

tcccacgcgc aggtcttcga gctggagcgc cgctttaacc accagcgcta cctgtccggg 245

cccgagcgcg cagacctggc cgcgtcgctg aagctcaccg agacgcaggt gaaaatctgg 305

ttccagaacc gtcgctacaa gacaaagcgc cggcagatgg cagccgacct gctggcctcg 365

gcgcccgccg ccaagaaggt ggccgtaaag gtgctggtgc gcgacgacca gagacaatac 425

ctgcccggcg aagtgctgcg gccaccctcg cttctgccac tgcagccctc ctactattac 485

ccgtactact gc 497

<210> 39

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 112-153 aa fragment of Nkx3.2

<400> 39

Gly Ala Ser Gly Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ser Leu Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Pro Val Cys Glu Leu Ala Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala
20 25 30

Gly Arg Ser Asp Ser Glu Met Ser Ala Ser
35 40

<210> 40

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 112-153 aa fragment of Nkx3.2

<400> 40

ggggccagcg gggccggcct tgcgggggga tccttgagcc tcggccagcc ggtctgtgag 60

ctggccgctt ccaaagacct agaggaggaa gccgcgggcc ggagcgacag cgagatgtcc 120

gccagc 126

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 318-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 41

Leu Pro Gly Trp Ala Leu Ser Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gln

1 5 10 15

<210> 42

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence encoding 318-333 aa fragment of Nkx3.2

<400> 42

ctcccaggct gggcgctctc cacctgcgca gctgccgcag gcacccag 48