(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월29일
(11) 등록번호 10-1963914
(24) 등록일자 2019년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7024789
(22) 출원일자(국제) 2012년02월23일
심사청구일자 2017년02월21일
(85) 번역문제출일자 2013년09월17일
(65) 공개번호 10-2014-0027117
(43) 공개일자 2014년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/026353
(87) 국제공개번호 WO 2012/116203
국제공개일자 2012년08월30일
(30) 우선권주장
61/445,740 2011년02월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2007089899 A2*
Nagarajan Vaidehi 등 PNAS, 99 (20) 12622-12627(2002.10.01.)
Park, S.H., Nature, vol. 491, pp. 779-784 (Nov. 2012).
Khafizov, et al., J. Mol Model 13,pp. 401-409 (2007).
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 매사추세츠주 02142-1493 캠브릿지 룸 엔이 18-501 켄달 스퀘어 원 캠브릿지 센터 엠아이티 테크놀로지 라이센싱 오피스
(72) 발명자
장, 슈구왕
미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 보커 스트리트 25
리치, 알렉산더
미국 매사추세츠주 02140 캠브릿지 월넛 애비뉴 2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **수용성 막 단백질 및 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 수용성 막 단백질, 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

코린, 캐롤리나

미국 매사추세츠주 02139 캠브릿지 웨스턴 애비뉴 101

테글러, 로타, 티.

미국 매사추세츠주 02215 보스턴 아파트먼트 503 비컨 스트리트 534

명 세 서

청구범위

청구항 1

G 단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor: GPCR)의 수용성 변이체로서,

상기 변이체에 있어서, 상기 GPCR의 a, d, e 및 g의 위치가 아니라 b, c 및 f의 소수성 표면 α-나선형 위치에서의 7-막관통 α-나선형 소수성 잔기인 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)이 각각 글루타민(Q), 트레오닌(T), 트레오닌(T) 및 티로신(Y)으로 치환된, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변이체는 상기 GPCR의 생물학적 활성을 갖는, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생물학적 활성은 리간드-결합인, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 변이체는 상기 GPCR의 리간드-결합 활성을 보유하는, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체의 pI가 상기 GPCR의 pI와 동일한, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체의 다른 부분에서 추가의 보존적 치환을 더 포함하는, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GPCR은 포유동물 수용체인, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GPCR은 푸린 수용체(P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6), M1 및 M3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA2), 스핑고신 1-포스페이트(S1P2, S1P3, S1P4 및 S1P5), 리소포스파티드산(LPA1, LPA2, LPA3), 안지오텐신 II(AT1), 세로토닌(5-HT2c 및 5-HT4), 소마토스타틴(sst5), 엔도텔린(ETA 및 ETB), 콜레시스토키닌(CCK1), V1a 바소프레신 수용체, D5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL2 갈라닌 수용체, EP3 프로스타노이드 수용체, A1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB2 봄베신 수용체, B2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 포함하는 군으로부터 선택되는, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 GPCR은 CXCR4인, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 10

제1항에 있어서, 적어도 하나의 막관통 도메인이 서열번호 3, 4, 5, 6 또는 8의 서열을 포함하는, GPCR의 수용성 변이체.

청구항 11

암, 파킨슨병, 심혈관 질환, 고혈압 및 기관지 천식으로 구성되는 군으로부터 선택되는, GPCR의 활성에 의해 매개되는 장애 또는 질환을 앓고 있는 포유동물을 치료하는 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 수용성 변이체의 사용 방법.

청구항 12

유효량의 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 변이체, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는, 암, 파킨슨병, 심혈관 질환, 고혈압 또는 기관지 천식을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 13

G 단백질 결합 수용체(GPCR)의 수용성 변이체를 제조하는 방법으로서,

상기 GPCR의 a, d, e 및 g의 위치가 아니라 b, c 및 f의 소수성 표면 α-나선형 위치에서의 7-막관통 α-나선형 소수성 잔기인 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)을 각각 글루타민(Q), 트레오닌(T), 트레오닌(T) 및 티로신(Y)으로 치환하는 단계를 포함하는, GPCR의 수용성 변이체를 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 리간드 결합을 측정하는 단계를 더 포함하는, GPCR의 수용성 변이체를 제조하는 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 GPCR은 세포-비함유 시스템(cell-free system)을 이용해서 제조되는, GPCR의 수용성 변이체를 제조하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 변이체를 포함하는 세포.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원(들)**

[0002] 본 출원은 2011년 2월 23일에 출원된 미국 가출원 제61/445,740호의 이익을 주장한다. 상기 출원(들)의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 막 단백질은 모든 살아 있는 시스템에서 중요한 역할을 한다. 거의 모든 서열분석된 게놈에서의 모든 유전자의 약 30%가 막 단백질을 코딩한다. 그러나, 이의 구조 및 기능에 대한 본 발명자들의 상세한 이해는 가용성 단백질에 대한 이해보다 훨씬 뒤떨어진다. 2012년 2월 이후로, 단백질 데이터 뱅크(Protein Data Bank)(http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)에 79,500개가 넘는 구조가 있지만, 8개의 G 단백질 결합 수용체를 포함하는 320개의 독특한 구조를 갖는 952개의 막 단백질 구조가 있다. 인간에서 약 400개의 기능성 후각 수용체가 있지만, 단일 후각 수용체는 결정되지 않았다.

[0004] 후각 수용체가 중요하지만, 이 후각 수용체의 구조 및 기능 및 이의 인식 및 취기제(odorant) 결합 특성을 밝히는 데 있어서 여러 애로사항이 있다. 가장 중요하고 도전적인 과제는 수 밀리그램 분량의 가용성 및 안정한 수용체를 생산하는 것이 극도로 어렵다는 점이다. 저렴한 대규모 생산 방법이 절실히 요구되고, 따라서 광범위한 연구의 초점이 되었다. 이러한 사전의 장애물을 극복해야만 상세한 구조 연구를 수행할 수 있다. 따라서, 후각 수용체를 비롯하여 G 단백질 결합 수용체의 개선된 연구 방법에 대한 수요가 당해 분야에서 존재한다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 수용성 막 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 조성물, 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

[0006] 본 발명은 변형된 α-나선형 도메인을 포함하는 수용성 폴리펩타이드로서, 상기 변형된 α-나선형 도메인은 미변형(native) 막 단백질의 α-나선형 도메인 내의 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기가 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기로 대체된 아미노산 서열을 포함하는 것인 수용성 폴리펩타이드를 포함한다. 본 발명은 또한 미변형 막 단백질의 α-나선형 도메인 내의 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기를 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기로 대체하는 것을 포함하는 수용성 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 포함한다. 본 발명은 추가로 미변형 막 단백질의 α-나선형 도메인 내의 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기를 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기로 대체함으로써 제조된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0007] 본 발명은 추가로 막 단백질의 활성에 의해 중재되는 장애 또는 질환의 치료를 필요로 하는 피험체에서 막 단백질의 활성에 의해 중재되는 장애 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에게 변형된 α-나선형 도메인을 포함하는 수용성 폴리펩타이드의 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 변형된 α-나선형 도메인은 상기 미변형 막 단백질의 α-나선형 도메인 내의 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기가 하나 이상의 친수성 아미노산 잔기로 대체된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법을 포함한다. 특정한 양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 막 단백질의 리간드 결합 활성을 보유한다. 본 발명의 수용성 펩타이드를 투여함으로써 치료될 수 있는 장애 및 질환의 예로는 암(예컨대, 소세포 폐암, 흑색종, 삼중 음성 유방암), 파킨슨병, 심혈관 질환, 고혈압 및 기관지 천식을 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0008] 본 발명은 또한 본 발명의 수용성 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

[0009] 몇몇 양태에서, 상기 α-나선형 도메인은 7-막관통 α-나선형 도메인이다. 추가의 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 G 단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor: GPCR)이다. 이 실시양태의 몇몇 양태에서, 상

기 GPCR은 푸린 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$), M_1 및 M_3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA_2), 스핑고신 1-포스페이트($S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ 및 $S1P_5$), 리소포스파티드산(LPA_1, LPA_2, LPA_3), 안지오텐신 II(AT_1), 세로토닌($5\text{-}HT_{2c}$ 및 $5\text{-}HT_4$), 소마토스타틴(sst_5), 엔도텔린(ET_A 및 ET_B), 콜레시스토키닌(CCK_1), V_{1a} 바소프레신 수용체, D_5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL_2 갈라닌 수용체, EP_3 프로스타노이드 수용체, A_1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB_2 봄베신 수용체, B_2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK_1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 포함하는 군으로부터 선택된다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질 또는 막 단백질은 내재 막 단백질(integral membrane protein)이다. 추가의 양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 포유동물 단백질이다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 후각 수용체이다. 추가의 실시양태에서, 상기 후각 수용체는 mOR103-15이다.

[0010] 몇몇 양태에서, (미변형 막 단백질의 α-나선형 도메인에서의 하나 이상의 소수성 잔기를 대체하는) 상기 친수성 잔기는 글루타민(Q), 트레오닌(T), 티로신(Y) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 양태에서, 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)으로부터 선택되는 하나 이상의 소수성 잔기는 대체된다.

[0011] 특정한 실시양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 페닐알라닌 잔기는 티로신으로 대체된다. 추가의 특정한 실시양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 아이소류신 및/또는 발린 잔기는 트레오닌으로 대체된다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 페닐알라닌 잔기는 티로신으로 대체되고, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 아이소류신 및/또는 발린 잔기는 트레오닌으로 대체된다. 추가의 실시양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 류신 잔기는 글루타민으로 대체된다. 또 다른 추가의 실시양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 류신 잔기는 글루타민으로 대체되고, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 아이소류신 및/또는 발린 잔기는 트레오닌으로 대체된다. 추가의 실시양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 류신 잔기는 글루타민으로 대체되고, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 페닐알라닌 잔기는 티로신으로 대체된다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 류신 잔기는 글루타민으로 대체되고, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 페닐알라닌 잔기는 티로신으로 대체되고, 상기 단백질의 α-나선형 도메인의 하나 이상의 아이소류신 및/또는 발린 잔기는 트레오닌으로 대체된다.

[0012] 추가의 실시양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 미변형 막 단백질의 생물학적 활성의 적어도 몇몇을 보유한다. 이 실시양태의 일 양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 미변형 막 단백질에 통상적으로 결합하는 리간드를 결합시키는 능력을 보유한다. 다른 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질의 잠재적 리간드 결합 자리 내의 하나 이상의 아미노산은 대체되지 않는다. 이 실시양태의 일 양태에서, 잠재적 리간드 결합 자리 내에 하나 이상의 아미노산이 대체되지 않는 미변형 막 단백질의 예로는 푸린 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$), M_1 및 M_3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA_2), 스핑고신 1-포스페이트($S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ 및 $S1P_5$), 리소포스파티드산(LPA_1, LPA_2, LPA_3), 안지오텐신 II(AT_1), 세로토닌($5\text{-}HT_{2c}$ 및 $5\text{-}HT_4$), 소마토스타틴(sst_5), 엔도텔린(ET_A 및 ET_B), 콜레시스토키닌(CCK_1), V_{1a} 바소프레신 수용체, D_5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL_2 갈라닌 수용체, EP_3 프로스타노이드 수용체, A_1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB_2 봄베신 수용체, B_2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK_1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 들 수 있다.

[0013] 다른 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질의 잠재적 취기제 결합 자리 내의 하나 이상의 아미노산은 대체되지 않는다.

[0014] 일 실시양태에서, 변형된 α-나선형 도메인을 포함하는 수용성 폴리펩타이드는 MERRNHTGRV SEFVLLGFPA PAPQRALQFF QSLQAYVQTL TENIQTITAI RNHPTLHKPM YYFLANMSFYL ETWYTTVTTP KMQAGYIGSE ENHGQLISFE ACMTQLYFFQ

GLGCTECTLL AVMAYDRYVA TCHPLHYPVI VSSRQCVQMA AGSWAGGFGT SMTVKVYQISR LSYCGPNTIN HFFCDVSPLL NLSCTDMSTA ELTDFILAIF ILLGPLSVTG ASYMAITGAV MRIPSAAGRH KAFSTCASHL TTVITYYAAS IYTYARPKAL SAFDTNKLVS VLYAVIVPLL NPIIYCLRNQ EVKKALRRTL HLAQGDANT KKSSRDGGSS GTETSQVAPA(서열 번호 2)의 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 변형된 7-막관통 α-나선형 도메인을 포함하는 수용성 폴리펩타이드는 하기 아미노산 서열 중 하나 이상을 포함한다:

[0015] a. PQRALQFFQSLQAYVQTLTENIQTITAI R(서열 번호 3)

[0016] b. M YYFLANMSFYLETWYTTVTTPKMQAGYI(서열 번호 4)

[0017] c. CMTQLYFFQGLGCTECTLLAVMAYDRYVA TC(서열 번호 5)

[0018] d. RQCVQMAAGSWAGGFGTSMTVKVYQ(서열 번호 6)

[0019] e. LTDFILAIFILLGPLSVTGASYMAITGAV(서열 번호 7)

[0020] f. HKAFSTCASHLTTVITYYAAS IYTY(서열 번호 8)

[0021] g. TNKLVSVLYAVIVPLLNPIIYCLRN(서열 번호 9).

[0022] 본 발명의 특정한 양태에서, 상기 수용성 펩타이드의 2차 구조를 결정한다. 몇몇 실시양태에서, 2차 구조를 원편광 이색성을 이용하여 결정한다.

[0023] 특정한 실시양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드에 대한 리간드 결합을 측정한다. 몇몇 양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드의 리간드 결합 친화도를 상기 미변형 단백질과 비교한다. 추가의 양태에서, 리간드 결합을 마이크로스케일 열영동, 칼슘 유입 검정 또는 이들의 임의의 조합을 이용하여 측정한다.

[0024] 추가의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 변형된 α-나선형 도메인을 포함하는 수용성 펩타이드로 형질감염된 세포를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 형질감염될 수 있는 포유동물 세포의 일례는 HEK293 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 발명의 상기 및 다른 목적, 특징 및 이점은 도면에 도시된 바대로 하기 본 발명의 바람직한 실시양태의 더 특정한 설명으로부터 명확하고, 도면에서 동일한 참조번호는 다른 도면에 걸쳐 동일한 부분을 의미한다. 도면은 크기 변경될 필요는 없고, 대신 본 발명의 원칙을 설명시 강조된다.

도 1은 미변형 mOR103-15 및 글루타민, 트레오닌 및 티로신(QTY) 대체를 이용하는 돌연변이된 mOR103-15의 아미노산 서열을 나타낸다. QTY 대체의 이용은 7개의 막관통 α-나선 위의 중요한 잔기를 조직적으로 돌연변이시켜 수불용성 후각 수용체를 수용성 수용체로 전환시킨다. 본 발명자들은 더 많은 수용성 잔기 Q, T, Y를 갖는 *b, c, f*의 위치만을 변경하였다. 이 위치는 나선의 친수성 면 위에 있다. 본 발명자들은 소수성 면 위에 있는 *a, d, e, g* 위치를 유지하였다. 이러한 변경은 각각의 α-나선을 유지시킬 것이다. 돌연변이를 수용체 서열 위에 청색 대문자로 표지하였다. *abcdefg*의 소문자는 나선형 휠 위치이다. 밑줄은 7-막관통 α-나선들의 위치이다. 숫자(8, 7, 3, 5, 4, 5, 4)는 각각의 α-나선에서의 돌연변이이다. 전체 340개 잔기 중 약 10.5%인 36개 잔기 변화가 존재한다.

도 2는 QTY 대체 후각 수용체 mOR103-15의 분자 모델을 보여준다. 7개의 막관통 나선형 분절에서 전체 36개의 돌연변이(약 10.5%)가 이루어졌다. 이 돌연변이는 하전된 잔기를 변경하지 않아서, 변이체 수용체 질량 및 pI는 크게 변하지 않았다. 아미노산, Q, T 및 Y의 분자 형상 및 크기는 L, V/I 및 Y와 매우 유사해서, 최소 전체 국소 형상이 변한다. C 말단에서의 20개의 아미노산의 분절을 명확히 모델링하지 않았다.

도 3A 내지 도 3C (A) QTY 대체의 상면도 및 (B) QTY 대체의 측면도. 돌연변이가 나선의 한 측에만 있다는 것에 주목한다. 돌연변이가 없는 미변형 수용체는 α_1 아드레날린 수용체와 유사한 폴딩된 구조를 갖지만, 돌연변이 후, 상기 구조는 β_2 아드레날린 수용체와 유사하다. (C) 중첩된 미변형 mOR103-15(적색) 및 mOR103-15의 설계된 QTY 돌연변이(청색)의 모의 구조. 전체 구조 차이는 평균 약 0.8Å이다.

도 4는 CXCR4 및 CXCR4-QTY의 설계된 QTY 돌연변이의 원편광 이색성 스펙트럼이다.

도 5는 미변형 CXCR4와 QTY 돌연변이를 갖는 CXCR4(서열 번호 10: CXCR4 QTY) 사이의 분자량의 비교를 나타내는

SDS 겔이다.

도 6은 QTY 대체의 이용은 7개의 막관통 알파-나선 위의 중요한 잔기 및 몇몇 다른 소수성 잔기를 조직적으로 돌연변이시켜 수불용성 막 형태 CXCR4를 수용성 형태로 전환시킨다. (a) 본 발명자들은 더 많은 수용성 잔기 Q, T, Y를 갖는 *b, c, f*의 위치를 변경하였다. 본 발명자들은 *a, d, e, g*의 위치를 변경하지 않았다. 이 위치는 각각의 알파-나선의 특정한 클러스터링을 유지시키는 것으로 생각된다. (b). 막 형태 CXCR4(적색) 및 QTY 수용성 CRCR4(청색)의 중첩. (c) 상기 미변형 잔기를 서열에서 적색 철자로 표지하고 (d) 돌연변이를 서열에서 청색 철자로 표지하였다. 7개의 막관통 나선형 분절에서 352개의 잔기 중 전체 29개의 QTY 돌연변이가 이루어졌다(약 8.2%). 이 돌연변이는 하전된 잔기를 변경하지 않아서, 변이체 수용체 질량 및 pI는 크게 변하지 않았다. 아미노산, Q, T 및 Y의 분자 형상 및 크기는 L, V/I 및 Y와 매우 유사해서, 최소 전체 국소 형상이 변한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 바람직한 실시양태의 설명은 하기와 같다.

[0027] 단수의 단어는, 달리 특정되지 않는 한, 하나 이상을 포함하도록 의도된다.

[0028] 몇몇 양태에서, 본 발명은 미변형 단백질의 7개의 막관통 α-나선 소수성 잔기인 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)을 친수성 잔기 글루타민(Q), 트레오닌(T) 및 티로신(Y)으로 조직적으로 변경하는 QTY(글루타민, 트레오닌 및 티로신) 대체 방법의 이용에 관한 것이다. 본 발명은 미변형 막 단백질을 수불용성 부분으로부터 수용성 대응부분으로 전환시킨다.

[0029] 본 발명의 새로운 혁신은 수불용성 후각 수용체 mOR103-15를 약 10.5%의 특이적 잔기 변경(36aa/340aa)을 갖는 수용성 수용체로 전환하는 것이다. 이를 α-나선 위치 *a, d, e, g*에서의 소수성 잔기를 유지시키면서 친수성 표면을 일반적으로 마주보는 α-나선 위치 *b, c, f*에서의 중요한 잔기를 조직적으로 그리고 선택적으로 변경함으로써 수행한다. 합성 생물학 설계 방법은 일반적이고 다른 후각 수용체 및 G 단백질 결합 수용체의 연구에 광범위하게 적용 가능하다. 이러한 전략은 후각 수용체, 및 추가의 GPCR 및 다른 막 단백질을 결정화하는 것의 장애물을 극복할 가능성을 갖는다.

[0030] 본 발명자들은 합성 생물학 방법을 이용하여 수불용성 후각 수용체를 약 10.5%의 잔기 변경(36aa/340aa)을 갖는 수용성 수용체로 전환하였다(도 1 및 도 2). 본 발명자들은 (일반적으로 친수성 표면을 형성하는) α-나선 위치 *b, c, f*에서의 중요한 잔기를 전신적으로 및 선택적으로 변경하였지만, α-나선 위치 *a, d, e, g*에서의 소수성 잔기를 유지시켰다(도 1). 본 발명자들의 합성 생물학 설계 방법은 사실상 일반적이고, 따라서 다른 후각 수용체, 케모카인 CXCR4 및 다른 G 단백질 결합 수용체(GPCR) 및 다른 막 단백질을 연구하는 데 광범위하게 적용 가능하다. 이러한 단순한 전략은 전환된 수용성 막 단백질이 생물학적으로 기능적으로 있는 경우 후각 수용체, GPCR 및 다른 막 단백질의 구조 연구의 장애를 부분적으로 극복할 수 있다.

[0031] 후각 수용체 및 이의 결합 특성의 구조 양태의 연구를 수월하게 하기 위해, 본 발명자들은 수용성의 7-번들 나선형 후각 수용체 mOR103-15를 설계하기 위한 QTY 대체 방법을 이용하였다(도 1 내지 도 3). 류신(L)(1.30), 글루타민(Q)(1.27), 페닐알라닌(F)(1.07), 티로신(Y)(0.72), 아이소류신(I)(0.97), 발린(V)(0.91) 및 트레오닌(T)(0.82)의 7개의 아미노산이 α-나선형 형성 경향(32)을 갖는 것으로 공지되어 있다. 본 발명자들은 또한 Q, Y 및 T의 측쇄가 모두 물과 수소 결합을 형성할 수 있고: Q가 4개의 H 결합($-NH_2$로부터의 2개의 H 도너, C=O로부터의 2개의 H 억셉터)을 형성할 수 있고, T 및 Y가 각각 3개의 H 결합(-OH, -H로부터의 1개의 H 도너 및 -O로부터의 2개의 억셉터)를 형성할 수 있다는 것을 알고 있다. Q, T, Y 잔기는 이의 측쇄와 임의의 수소 결합을 형성할 수 없는 L, F, I 또는 V보다 더 수용성이다. 제안된 치환은 임의의 양전하 또는 음전하 변화를 갖지 않을 것이다. 더욱이, 분자 형상 및 크기는 류신/글루타민, 페닐알라닌/티로신, 발린/트레오닌 및 아이소류신/트레오닌(33-34)의 쌍에서 매우 유사하다. 제안된 변화는 따라서 전체 나선형 구조를 유지시키면서 7개의 막관통 α-나선의 수용성을 증가시켜야 한다(도 3C).

[0032] 이러한 가용성 후각 수용체 설계에서, 본 발명자들은 티로신으로의 페닐알라닌의 치환(F→Y), 트레오닌으로의 아이소류신/발린의 치환(I/V→T) 및 글루타민으로의 류신의 치환(L→Q)을 수행하였다. 상기 수용성 후각 수용체의 2차 구조 및 이의 취기제 결합 능력을 검사할 수 있다. 취기제 결합이 QTY 대체로 검출되는 경우, 본 발명자들은 본래 구조의 중요한 성분을 보존할 수 있을 것이다. 상기 미변형 후각 수용체에 의한 설계된 수용성 후각 수용체의 2차 구조 및 결합을 준비할 수 있다. 밀리그램 분량의 수용성 수용체를 제조하고 결정 스크린을 취기제와 함께 그리고 취기제와 없이 설정할 수 있다.

[0033] 일 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 G 단백질 결합 수용체(GPCR)이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 후각 수용체이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 후각 수용체는 포유동물 수용체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 후각 수용체는 mOR103-15이다. 특정한 양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 미변형 막 단백질의 생물학적 활성의 적어도 몇몇을 보유한다. 또 다른 양태에서, 상기 막 단백질은 질환 또는 병증을 매개하는 막 수용체이다.

[0034] 추가의 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질은 푸린 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$), M_1 및 M_3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA_2), 스핑고신 1-포스페이트($S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ 및 $S1P_5$), 리소포스파티드산(LPA_1, LPA_2, LPA_3), 안지오텐신 II(AT_1), 세로토닌($5\text{-}HT_{2c}$ 및 $5\text{-}HT_4$), 소마토스타틴(sst_5), 엔도텔린(ET_A 및 ET_B), 콜레시스토키닌(CCK_1), V_{1a} 바소프레신 수용체, D_5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL_2 갈라닌 수용체, EP_3 프로스타노이드 수용체, A_1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB_2 봄베신 수용체, B_2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK_1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 포함하는 군으로 선택되는 GPCR이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 상기 미변형 막 단백질이 푸린 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$), M_1 및 M_3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA_2), 스핑고신 1-포스페이트($S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ 및 $S1P_5$), 리소포스파티드산(LPA_1, LPA_2, LPA_3), 안지오텐신 II(AT_1), 세로토닌($5\text{-}HT_{2c}$ 및 $5\text{-}HT_4$), 소마토스타틴(sst_5), 엔도텔린(ET_A 및 ET_B), 콜레시스토키닌(CCK_1), V_{1a} 바소프레신 수용체, D_5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL_2 갈라닌 수용체, EP_3 프로스타노이드 수용체, A_1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB_2 봄베신 수용체, B_2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK_1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 포함하는 군으로 선택되는 GPCR인 본원에 기재된 약제학적 조성물 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0035] 다른 실시양태에서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 막 단백질의 리간드 결합 활성의 적어도 몇몇을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 GPCR은 포유동물 수용체이다.

[0036] 추가의 실시양태에서, 상기 미변형 막 단백질의 잠재적 리간드 결합 자리 내의 하나 이상의 아미노산은 대체되지 않는다. 이 실시양태의 일 양태에서, 하나 이상의 아미노산이 대체되지 않은 잠재적 리간드 결합 자리를 갖는 미변형 막 단백질의 예로는 푸린 수용체($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$), M_1 및 M_3 무스카린 아세틸콜린 수용체, 트롬빈에 대한 수용체[프로테아제 활성화 수용체(PAR)-1, PAR-2], 트롬복산(TXA_2), 스핑고신 1-포스페이트($S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ 및 $S1P_5$), 리소포스파티드산(LPA_1, LPA_2, LPA_3), 안지오텐신 II(AT_1), 세로토닌($5\text{-}HT_{2c}$ 및 $5\text{-}HT_4$), 소마토스타틴(sst_5), 엔도텔린(ET_A 및 ET_B), 콜레시스토키닌(CCK_1), V_{1a} 바소프레신 수용체, D_5 도파민 수용체, fMLP 포르밀 펩타이드 수용체, GAL_2 갈라닌 수용체, EP_3 프로스타노이드 수용체, A_1 아데노신 수용체, α1 아드레날린 수용체, BB_2 봄베신 수용체, B_2 브라디키닌 수용체, 칼슘 인지 수용체, 케모카인 수용체, KSHV-ORF74 케모카인 수용체, NK_1 타키키닌 수용체, 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체, 프로테아제 활성화 수용체, 뉴로펩타이드 수용체, 아데노신 A2B 수용체, P2Y 퓨리노셉터, 대사성 글루타메이트 수용체, GRK5, GPCR-30 및 CXCR4를 들 수 있다.

[0037] 본 발명은 추가로 막 단백질의 활성에 의해 매개되는 장애 및 질환을 치료하기 위한 수용성 폴리펩타이드의 사용을 포함하는 상기 장애 또는 질환의 치료 방법으로서, 상기 수용성 폴리펩타이드는 변형된 α-나선형 도메인을 포함하고, 상기 수용성 폴리펩타이드는 상기 미변형 막 단백질의 리간드 결합 활성을 보유하는 것인 방법을 포함한다. 이러한 장애 및 질환의 예로는 암, 소세포 폐암, 흑색종, 유방암, 파킨슨병, 심혈관 질환, 고혈압 및 천식을 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0038] 본원에 기재된 바대로, 본원에 기재된 수용성 펩타이드를 막 단백질의 활성에 의해 매개되는 병증 또는 질환의 치료에 사용할 수 있다. 특정한 양태에서, 상기 수용성 펩타이드는 막 수용체에 대한 "유인자(decoy)"로서 작용

하고 막 수용체를 활성화하는 리간드에 결합할 수 있다. 그러므로, 막 단백질의 활성을 감소시키기 위해 본원에 기재된 수용성 펩타이드를 사용할 수 있다. 이 수용성 펩타이드는 순환시 잔류하고 특이적 리간드에 결합하여, 막 결합 수용체의 활성을 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 GPCR CXCR4는 소세포 폐암에서 과발현되고 종양 세포의 전이를 수월하게 한다. 본원에 기재된 것과 같은 수용성 펩타이드에 의한 이러한 리간드의 결합은 전이를 상당히 감소시킬 수 있다.

[0039] 케모카인 수용체인 CXCR4는 바이러스 연구에서 전체 T 세포주 트로픽 HIV의 진입에 대한 주요한 보조수용체로서 공지되어 있다(Feng, et al. (1996) Science 272: 872-877; Davis, et al. (1997) *J Exp Med 186:* 1793-1798; Zaitseva, et al. (1997) Nat Med 3: 1369-1375; Sanchez, et al. (1997) *J Biol Chem 272:* 27529-27531). T 기질 세포 유도 인자 1(SDF-1; stromal cell derived factor 1)은 CXCR4와 특이적으로 상호작용하는 케모카인이다. SDF-1이 CXCR4에 결합할 때, CXCR4는 림프구, 거핵세포 및 조혈 줄기 세포에서 Ras/MAP 키나제 및 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K)/Akt와 같은 다운스트림 키나아제 경로를 포함하는 Gαi 단백질 매개 신호전달(페르투시스 독소 민감)(Chen, et al. (1998) *Mol Pharmacol 53:* 177-181)을 활성화시킨다(Bleul, et al. (1996) *Nature 382:* 829-833; Deng, et al. (1997) *Nature 388:* 296-300; Kijowski, et al. (2001) *Stem Cells 19:* 453-466; Majka, et al. (2001) *Folia. Histochem. Cytobiol. 39:* 235-244; Sotsios, et al. (1999) *J. Immunol. 163:* 5954-5963; Vlahakis, et al. (2002) *J. Immunol. 169:* 5546-5554). 인간 림프절이 이식된 마우스에서, SDF-1은 이식된 림프절로의 CXCR4 양성 세포 이동을 유도한다(Blades, et al. (2002) *J. Immunol. 168*: 4308-4317).

[0040] 최근에, 연구는 CXCR4 상호작용이 전이 세포의 이동을 조절할 수 있다는 것을 보여준다. 산소 분압의 감소인 저산소증은 대부분의 고형 종양에서 발생하는 미소 환경 변경이고 종양 혈관신생 및 치료학적 내성의 주요한 유도인자이다. 저산소증은 CXCR4 수준을 증가시킨다(Staller, et al. (2003) *Nature 425*: 307-311). 전이 활성이 증가된 골 전이 모델로부터의 세포 소집단에서의 마이크로어레이 분석은 전이 표현형에서 증가한 유전자 중 하나가 CXCR4라는 것을 보여준다. 더욱이, 단리된 세포에서의 과발현 CXCR4는 전이 활성을 상당히 증가시킨다(Kang, et al. (2003) *Cancer Cell 3*: 537-549). 다양한 유방암 환자로부터 수집된 샘플에서, 물러(Muller) 등(Muller, et al. (2001) *Nature 410*: 50-56)은 정상 유선 또는 상피 세포에 비해 원발성 종양에서 CXCR4 발현 수준이 더 높다는 것을 발견하였다. 더욱이, CXCR4 항체 치료가, 림프절 및 폐로 모두 전이된 대조군 아이소타입과 비교할 때, 국부 림프절로의 전이를 억제하는 것으로 나타났다(Muller, et al. (2001)). 그러므로, 유인자 치료 모델은 CXCR4 매개 질환 및 장애를 치료하는 데 적합하다.

[0041] 다른 실시양태에서 본 발명은 비정상 백혈구 동원 또는 활성화와 관련되고 CXCR4 의존성 주화성을 포함하는 질환 또는 장애의 치료에 관한 것이다. 상기 질환은 관절염, 건선, 다발성 경화증, 궤양성 대장염, 크론씨병, 알레르기, 천식, AIDS 관련 뇌염, AIDS 관련 반상 구진(maculopapular skin eruption), AIDS 관련 간질성 폐렴, AIDS 관련 장질환, AIDS 관련 간 문맥 염증 및 AIDS 관련 사구체 신염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 다른 양태에서, 본 발명은 관절염, 림프종, 비소 폐암, 폐암, 유방암, 전립선암, 다발성 경화증, 중추 신경계 발달 장애, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 종양, 섬유종, 성상세포종, 골수종, 교모세포종, 염증 질환, 장기 이식 거부, AIDS, HIV 감염 또는 혈관신생으로부터 선택되는 질환 또는 장애의 치료에 관한 것이다.

[0043] 본 발명은 또한 상기 수용성 폴리펩타이드 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다.

[0044] 상기 조성물은 또한 원하는 제제에 따라, 동물 또는 인간 투여에 대한 약제학적 조성물을 제제화하기 위해 통상 사용되는 비히클로서 정의되는, 약제학적으로 허용가능한, 비독성 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 희석제는 약학 제제 또는 조성물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예로는 증류수, 생리학적 인산염 완충 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액 및 행크액을 들 수 있다. 또한, 약제학적 조성물 또는 제제는 또한 다른 담체, 부형제 또는 비독성, 비치료학적, 비면역원성 안정제 등을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 또한 크고 천천히 대사되는 마크로분자, 예컨대 단백질, 폴리사카라이드, 예컨대 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 공중합체(예컨대, 라텍스 작용기화된 세파로스(SEPHAROSE)상표명, 아가로스, 셀룰로스 등), 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체 및 지질 응집체(예컨대, 오일 액적 또는 리포솜)을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 조성물을 예를 들면 정맥내, 근육내, 지주막하 또는 피하 주사 등에 의해 비경구로 투여할 수 있다. 용액 또는 현탁액으로 조성물을 도입함으로써 비경구 투여를 성취할 수 있다. 이러한 용액 또는 현탁액은 또한 무균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글라이콜, 글라이세린, 프로필렌 글라이콜 또는 다른 합성 용매를 포함할 수 있다. 비경구 제제는 또한 항박테리아제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤 등, 항산

화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨 등 및 킬레이트화제, 예컨대 EDTA를 포함할 수 있다. 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장성 조절을 위한 물질, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스를 또한 첨가할 수 있다. 비경구 제제를 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 주사기 또는 다용량 바이알에 밀폐할 수 있다.

[0046] 추가로, 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 상기 조성물에 존재할 수 있다. 약제학적 조성물의 다른 성분은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 성분, 예를 들면, 땅콩유, 대두유 및 광유이다. 일반적으로, 글라이콜, 예컨대 프로필렌 글라이콜 또는 폴리에틸렌 글라이콜이 특히 주사용 용액에 바람직한 액체 담체이다.

[0047] 주사용 제제를 액체 용액 또는 현탁액 중 어느 하나로 제조할 수 있고; 주사 전의 액체 비히클 내의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태를 또한 제조할 수 있다. 상기 제제를 또한 상기 기재된 바대로 증대된 아쥬반트 효과(adjuvant effect)를 위해 리포솜 또는 마이크로 입자, 예컨대 폴리락타이드, 폴리글라이콜라이드 또는 공중합체 중에 유화하거나 캡슐화할 수도 있다. 문헌[Langer, *Science* 249: 1527, 1990 and Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews 28*: 97-119, 1997]. 활성 성분의 지속성 또는 박동성(pulsatile) 방출을 허용하는 방식으로 제제화될 수 있는 임플란트 제제 또는 데포 주사(depot injection)의 형태로 본원에 기재된 조성물 및 약학 제제를 투여할 수 있다.

[0048] 경피 투여는 피부를 통한 조성물의 경피 흡수를 포함한다. 경피 제제는 패치, 연고, 크림, 겔, 고약(salve) 등을 포함한다. 스킨 패치를 사용하거나 트랜스퍼로솜(transferosome)을 사용하여 경피 전달을 성취할 수 있다. 문헌[Paul et al., *Eur. J. Immunol. 25*: 3521-24, 1995; Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368: 201-15, 1998].

[0049] "치료하는" 또는 "치료"는 질환의 증상, 합병증 또는 생화학적 징후의 개시를 예방하거나 지연시키는 것, 증상을 완화하거나 경감시키는 것 또는 상기 질환, 병증 또는 장애의 추가의 진행을 저지시키거나 억제하는 것을 포함한다. "환자"는 치료를 필요로 하는 인간 피험체이다.

[0050] "유효량"은 장애의 하나 이상의 증상을 경감시키고/시키거나, 장애의 진행을 예방하고, 장애의 퇴행을 야기하고/하거나, 원하는 효과를 성취하기 위한 치료 물질의 양을 의미한다.

[0051] 본 발명은 본 발명을 오직 예시하도록 의도되고 이를 제한하지 않는 하기 실시예와 관련하여 더 잘 이해될 것이다. 개시된 실시양태에 대한 다양한 변화 및 변경이 당업자에게 명확하고, 본 발명의 정신 및 특허청구범위를 벗어나는 일 없이 이러한 변화가 이루어질 수 있다.

[0052] 실시예

[0053] 실시예 1: 후각 수용체의 리간드 결합 특성의 조직적인 분석

[0054] 생화학적, 생물물리학적 및 구조학적 분석을 위해 수불용성 후각 수용체를 수용성 수용체로 전환하기 위해 Q(글루타민) T(트레오닌) Y(티로신) QTY 대체를 이용하였다. 본 발명자들의 특정한 목적은 하기와 같다:

[0055] 1) 7개의 막관통 α-나선 소수성 잔기인 류신(L), 아이소류신(I), 발린(V) 및 페닐알라닌(F)을 친수성 잔기 글루타민(Q), 트레오닌(T) 및 티로신(Y)으로 조직적으로 변경하는 QTY(글루타민, 트레오닌 및 티로신) 대체 방법의 사용. 이 방법은 상기 단백질을 수불용성 후각 수용체로부터 수용성 수용체로 전환시킨다.

[0056] 2) 상업용 세포 비함유 *실험실내* 번역 시스템(인비트로겐(Invitrogen) 및 퀴아젠(Qiagen))을 사용하여 밀리그램 분량의 미변형 및 바이오조작 후각 수용체를 생성하고 정제하는 것.

[0057] 3) 원편광 이색성(CD)을 이용하여 정제된 후각 수용체의 2차 구조를 결정하는 것.

[0058] 4) 마이크로스케일 열영동을 이용하여 상기 미변형 및 바이오조작 후각 수용체 변이체의 결합 친화도를 결정하는 것.

[0059] 5) 상기 미변형 및 변이체 OR 유전자를 HEK293 세포로 형질감염하고, 칼슘 유입 검정을 이용하여 상기 미변형 및 돌연변이체 후각 수용체의 취기제 활성화를 측정하는 것. 이러한 측정값은 세포 내에서 마이크로스케일 열영동 결합 데이터를 기능성 반응과 연관시킨다.

[0060] 6) 취기제의 존재 및 부재 및 세제의 존재 및 부재 하에 결정화 조건에 대해 상기 미변형 및 바이오조작 후각 수용체를 조직적으로 스크리닝하는 것.

[0061] 연구 전략

[0062] 가용성의 7-나선형 번들의 후각 수용체 mOR103-15를 설계하기 위해 QTY 대체를 이용하였다. 본 발명자들의 연구의 혁신은 수불용성 후각 수용체 mORI03-15를 약 10.5%의 특이적 잔기 변경(36aa/340aa)을 갖는 수용성 수용체로 전환하는 것이다. 본 발명자들은 α-나선 위치 *a, d, e, g*에서의 소수성 잔기를 유지시키면서 친수성 표면을 일반적으로 마주보는 α-나선 위치 *b, c, f*에서의 중요한 잔기를 전신적으로 및 선택적으로 변경하였다. 본 발명자들의 합성 생물학 설계 방법은 일반적이고 다른 후각 수용체 및 G 단백질 결합 수용체의 연구에 광범위하게 적용 가능하다. 이러한 전략은 후각 수용체, 및 추가의 GPCR 및 다른 막 단백질을 결정화하는 것의 장애물을 극복할 가능성을 갖는다. 상기 서열의 수용성을 변경하기 위한 본 발명자들의 설계가 나선형 휠의 *b,c,f* 위치에 초점을 두지만, 서열의 다른 부분에 대한 몇몇 추가의 변경이 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질의 기능 또는 구조에 상당히 영향을 미치는 일 없이 이루어질 수 있다. 예를 들면 보존적 돌연변이가 이루어질 수 있다.

[0063] 실험적 접근법

[0064] 1) 7-수용성 나선형 번들의 후각 수용체 mOR103-15를 설계하기 위해 QTY 대체를 이용하였다. 본 발명자들은 합성 생물학 방법을 이용하여 수불용성 후각 수용체를 약 10.5%의 특이적 잔기 변경(36aa/340aa)을 갖는 수용성 수용체로 전환하였다(도 1 내지 도 3). 본 발명자들은 (일반적으로 친수성 표면을 형성하는) α-나선 위치 *b, c, f*에서의 중요한 잔기를 전신적으로 및 선택적으로 변경하였지만, α-나선 위치 *a, d, e, g*에서의 상기 소수성 잔기를 유지시켰다(도 1). 본 발명자들의 합성 생물학 설계 방법은 사실상 일반적이고, 따라서 다른 후각 수용체 및 G 단백질 결합 수용체(GPCR)의 연구에 광범위하게 적용 가능하다. 이러한 단순한 전략은 전환된 수용성 막 단백질이 생물학적으로 기능적으로 있는 경우 후각 수용체, GPCR 및 다른 막 단백질의 구조 연구의 장애를 부분적으로 극복할 수 있다.

[0065] 후각 수용체 및 이의 결합 특성의 구조 양태의 연구를 수월하게 하기 위해, 본 발명자들은 QTY 대체 방법을 이용하여 수용성 7-나선형 번들의 후각 수용체 mORI03-15를 설계할 수 있다(도 1 내지 도 3). 류신(L)(1.30), 글루타민(Q)(1.27), 페닐알라닌(F)(1.07), 티로신(Y)(0.72), 아이소류신(I)(0.97), 발린(V)(0.91) 및 트레오닌(T)(0.82)의 7개의 아미노산이 α-나선형 형성 경향(32)을 갖는 것으로 공지되어 있다. 본 발명자들은 또한 Q, Y 및 T의 측쇄가 모두 물과 수소 결합을 형성할 수 있고: Q가 4개의 H 결합(-NH_2로부터의 2개의 H 도너, C=O로부터의 2개의 H 억셉터)을 형성할 수 있고, T 및 Y가 각각 3개의 H 결합(-OH, -H로부터의 I-H 도너 및 -O로부터의 2개의 억셉터)를 형성할 수 있다는 것을 알고 있다. Q, T, Y 잔기는 이의 측쇄와 임의의 수소 결합을 형성할 수 없는 L, F, I 또는 V보다 더 수용성이다. 치환은 임의의 양전하 또는 음전하 변화를 갖지 않을 것이다. 더욱이, 분자 형상 및 크기는 류신/글루타민, 페닐알라닌/티로신, 발린/트레오닌 및 아이소류신/트레오닌의 쌍에서 매우 유사하다. 변화는 전체 나선형 구조를 유지시키면서 7개의 막관통 α-나선의 수용성을 증가시킨다.

[0066] 이러한 가용성 후각 수용체 설계에서, 본 발명자들은 글루타민으로의 페닐류신의 치환(L→Q), 트레오닌으로의 아이소류신/발린의 치환(IN→T) 및 티로신으로의 페닐알라닌의 치환(F→Y)을 수행하였다. 이 연구에서, 본 발명자들은 상기 수용성 후각 수용체의 2차 구조 및 이의 취기제 결합 능력을 검사할 수 있다. 취기제 결합이 QTY 대체로 측정되는 경우, 본 발명자들은 본래 구조의 중요한 성분을 보존할 수 있을 것이다. 본 발명자들은 미변형 후각 수용체의 2차 구조 및 결합을 설계된 수용성 후각 수용체와 비교할 수 있다. 본 발명자들은 또한 밀리그램 분량의 수용성 수용체를 제조하고 결정 스크린을 취기제와 함께 그리고 취기제와 없이 설정할 수 있다.

```
MERRNHTGRV SEFVLLGFPA PAPQRALQFF QSLQAYVQTL TENIQTITAI RNHPTLHKPM YYFLANMSYL ETWYTTVTTP
                        abcdefga bcdefgabcd efgabcdefg a        a bcdefgabcd efgabcdefg
KMQAGYIGSE ENHGQLISFE ACMTQLYFFQ GLGCTECTLL AVMAYDRYVA TCHPLHYPVI VSSRQCVQMA AGSWAGGFGT
abcdefg               abcdefgab cdefgabcde fgabcdefga bc            abcdefg abcdefgabc
SMTKVYQISR LSYCGPNTIN HFFCDVSPLL NLSCTDMSTA ELTDFIQAIY TLLGPLSTTG ASYMAITGAV MRIPSAAGRH
defgabcd                                  abcdefgab cdefgabcde fgabcdefga          a
KAFSTCASHL TTVITYYAAS IYTYARPKAL SAFDTNKLVS VLYAVITPLQ NPITYCQRNQ EVKKALRRTL HLAQGQDANT
bcdefgabcd efgabcdefg abcd           abcdef gabcdefgab cdefgabc
KKSSRDGGSS GTETSQVAPA. (36aa 돌연변이 /340aa, ~10.5% 돌연변이)
```

[0067]

[0068] 2) 밀리그램 분량의 미변형 및 바이오조작 후각 수용체를 생성하고 정제한다. 본 발명자들은 밀리그램의 미변형 및 수용성 mORI03-15를 제조하기 위해 상업용 세포 비함유 시스템을 사용할 수 있다. 본 발명자들은 본 발명자들이 실험실에서 개발한 최적화된 프로토콜을 사용할 수 있다: 이는 본 발명자들이 지난 수년동안 달성한 중요한 진전 및 개혁이다. 본 발명자들은 면역친화도 정제를 이용하여 1일에 상기 미변형 및 변이체 후각 수용체를 제조하고 정제할 수 있다. 이후, 단량체 및 이합체 수용체 형태를 분리하기 위해 겔 여과를 이용할 수 있다.

[0069] 3) 원편광 이색성을 이용하여 2차 구조를 결정한다. 본 발명자들은 원편광 이색성(CD) 스펙트럼 분석을 이용하여 정제된 수용체의 2차 구조를 측정할 수 있다. CD는 미변형 수용체와 돌연변이체 수용체 사이의 어떠한 작은 구조 변화도 검출할 수 있는 매우 민감한 기술이다. 구체적으로, CD 분석을 이용하여 단백질에서의 α-나선 및 β-시트의 백분율을 계산할 수 있다. 단백질의 구조가 변경되는 경우, CD 분석에서 이것이 밝혀질 수 있다. 특이적 돌연변이가 수용체 구조를 변경하는지를 결정하는 것 이외에, CD를 또한 이용하여 임의의 취기제 유도 구조 변화를 측정할 수 있다. 도 4 참조

[0070] 4) 후각 수용체의 리간드 결합을 검정한다. 마이크로스케일 열영동을 이용하여 미변형 및 바이오조작 단백질 및 이의 취기제 리간드의 결합 친화도를 측정할 수 있다. SPR 또는 다른 리간드 결합 기술에 비해 이러한 기술의 중요한 이점은 이 기술이 전체적으로 표면 자유 및 라벨 자유라는 것이다. 따라서, 수용체는 변형될 필요가 없다. 신호원으로서 미변형 트립토판을 사용하여 용액 중에서 측정을 수행할 수 있다. 추가로, 작은 리간드(MW 약 200 달톤)를 신뢰성있게 측정할 수 있다. 더욱이, 각각의 측정은 0.5J.t1(1J1g/J.t1)의 샘플을 필요로 하여, 귀중한 수용체 샘플을 절약한다. 이 결과는 돌연변이체 후각 수용체가 미변형 단백질만큼 효과적으로 취기제를 결합시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0071] 5) 칼슘 유입 활성화 검정을 이용하여 후각 수용체 활성화를 측정한다. 본 발명자들은 칼슘 유입 검정을 이용하여 HEK293 세포에서의 미변형 및 변이체 후각 수용체의 취기제 유도 활성화를 조사할 수 있다. 이 데이터는 마이크로스케일 열영동 측정과 상관된다. 마이크로스케일 열영동은 리간드 결합을 직접 측정하는 반면, 칼슘 유입 검정은 활성화를 측정한다. 조합되어, 이러한 검정은 특이적 돌연변이가 결합, 활성화 또는 둘 다에 영향을 미치는지를 검정할 수 있다. 추가로, 본 발명자들은 효현제 리간드와 길항제 리간드를 구별할 수 있다.

[0072] 6) 결정화 조건에 대해 조직적으로 스크리닝한다. 본 발명자들은 취기제의 부재 및 존재 하에 결정화 조건에 대해 미변형 및 바이오조작 변이체 후각 수용체를 조직적으로 스크리닝할 수 있다. 수용성 단백질을 결정화 스크리닝하는 기술이 쾌 개발되었다. 다양한 침전물, 염, pH 구배가 미세하게 조정되는 완충제 및 일정 범위의 양이온 물질 및 음이온 물질을 공급하는 상업용 스크린이 이용 가능하다. 이러한 변수 모두 널리 공지되어 있고 막 단백질을 결정화할 때 사용될 수 있다. 막 단백질 스크린의 추가의 독특한 성분은 하나 이상의 세제 분자의 존재이다. 그러나, 현적(hanging drop)으로부터 저속 물 제거를 포함하는 침전 기술이 여전히 효과적일 수 있다. 이것이 큰 결정을 형성하는 데 유용하지만, 결정 스크린의 결과는 더 작은 결정을 생성시킬 수 있다.

[0073] CXCR4 QTY의 표면 플라스몬 공명 분석

[0074] 세포 비함유 생성으로부터 얻고 친화도 비드로 정제된 본 발명자들의 CXCR4 QTY 단백질 및 인간 CXCR4 단백질을 바이아코어(Biacore) 2000 장치에서 고정화된 1D4 항체(Ab)를 갖는 바이아코어 CM5 칩에서 상이한 유세포 중에 포획하였다. 상이한 농도의 hCXCR4 수용체에 대한 미변형 리간드인 SDF1α를 표면에 주입하여 수용체와 상호작용시켰다.

[0075] **인간 CXCR4 QTY(서열 번호 10)**

[0076] MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANYNKTFLPTIYSIIYQTGTVGNGLVI

[0077] LVMGYQKKLRSMTDKYRLHLSTADLQFVTTLPYWATDATANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKVVYVGVWT
PAQLLTTPDYTFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIIISKLSHSKGHQKRKALKTTTTLIQAFFACWQPYYTGISIDSY
ILLEIIKQGCEFENTVHKWISTTEAQAFYHCCTNPTQYAYLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSSFHS

[0078] **1D4 항체의 고정**

[0079] 바이아코어 CM5 칩을 제조업자의 프로토콜에 따라 1-에틸-3-[3-다이메틸아미노프로필]카르보다이이미드 하이드로클로라이드로 활성화하고, 70㎍/㎖에서 2개 내지 4개의 유세포에 1D4 Ab를 5㎕/분으로 7분간 주사하고, 이후 짧은 에탄올아민 펄스로 모든 4개의 유세포에서 표면을 탈활성화하였다. 1D4 Ab의 고정 수준은 8000~25000 반응 단위(Response unit: RU) 범위이다.

[0080] **GPCR의 포획**

[0081] 샘플 및 0.2% 포스(Fos)-콜린-14 세제를 포함하는 영동 완충제 둘 다로 15분 동안 5㎍/분에서 단일 유세포에 단백질 샘플을 0.1mg/㎖로 주입함으로써 CM5 칩에서 1D4 Ab에 의해 CXCR4 및 CXCR4 QTY 돌연변이체를 포획하였다. 수용체를 800-3000 RU의 수준으로 포획하였다.

[0082] **상호작용 분석**

[0083] SDF1α를 모든 유세포에 주입하여 수용체 둘 다를 상호작용시키고 유세포를 어떠한 고정화 단백질도 없는 기준 세포로서 사용하였다. 2분 동안 15분 대기 시간으로 20㎕/분에서 0, 7.8nM, 15.6nM, 31.25nM, 62.5nM, 125nM, 250nM, 500nM, 1μM에서 3회 주사하여 해리시켰다. 0.2% BSA 및 0.2% 포스-콜린-14가 첨가된 HBST(50mM 허페스(Hepes), pH 7.4, 150mM NaCl, 0.005% 트윈(Tween)-20)를 영동 완충제 둘 다로서 SDF1α 샘플의 희석에 사용하였다.

[0084] 결론: 상기 기재된 연구는 CXCR4 QTY에 의한 리간드 결합를 보여준다.

[0085] 참고문헌

1. Choma C, Gratkowski H, Lear JD & DeGrado WF. (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol* **7,** 161-6.

2. Slovic AM, Kono H, Lear JD, Saven JG & DeGrado WF. (2004) Computational design of water-soluble analogues of the potassium channel KcsA. *Proc Natl Acad Sci U SA* **101,** 1828-33.

3. Walters RF & DeGrado WF. (2006) Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103,** 13658-63.

4. Zhang Y, Kulp DW, Lear JD & DeGrado WF. (2009) Experimental and computational evaluation of forces directing the association of transmembrane helices. *J Am Chem Soc* **131,** 11341-11343.

[0086]

[0087] 본 발명은 특히 이의 바람직한 실시양태를 참조하여 도시되고 기재되어 있지만, 당업자라면 특허청구범위에 포함되는 본 발명의 범위로부터 벗어나는 일 없이 형태 및 상세사항의 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

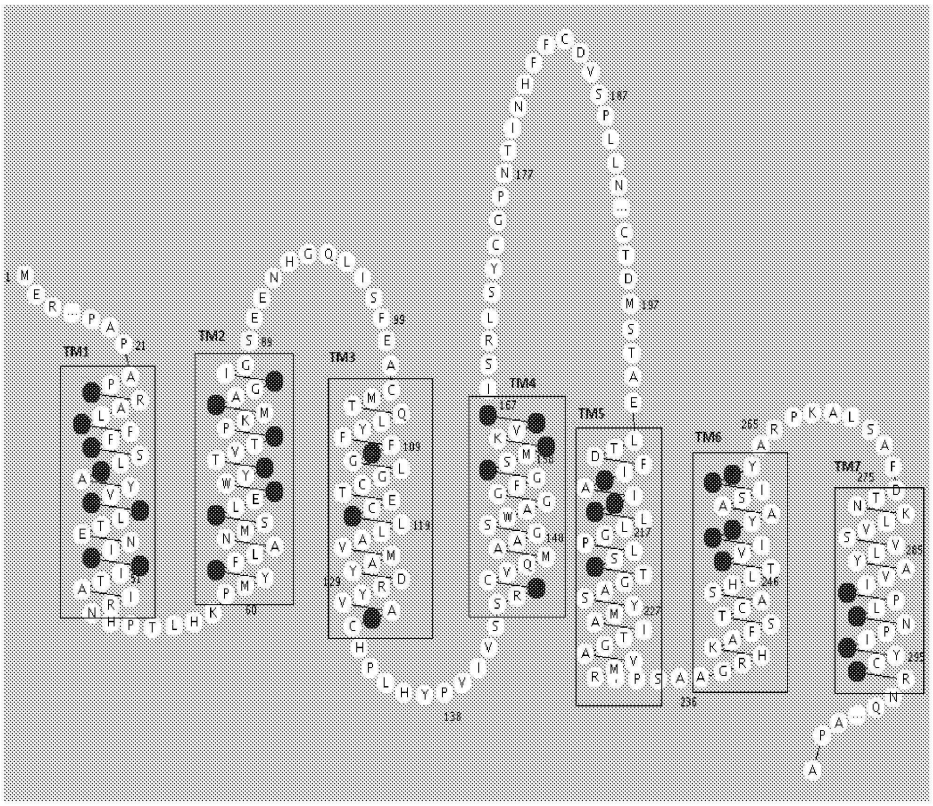
도면

도면1

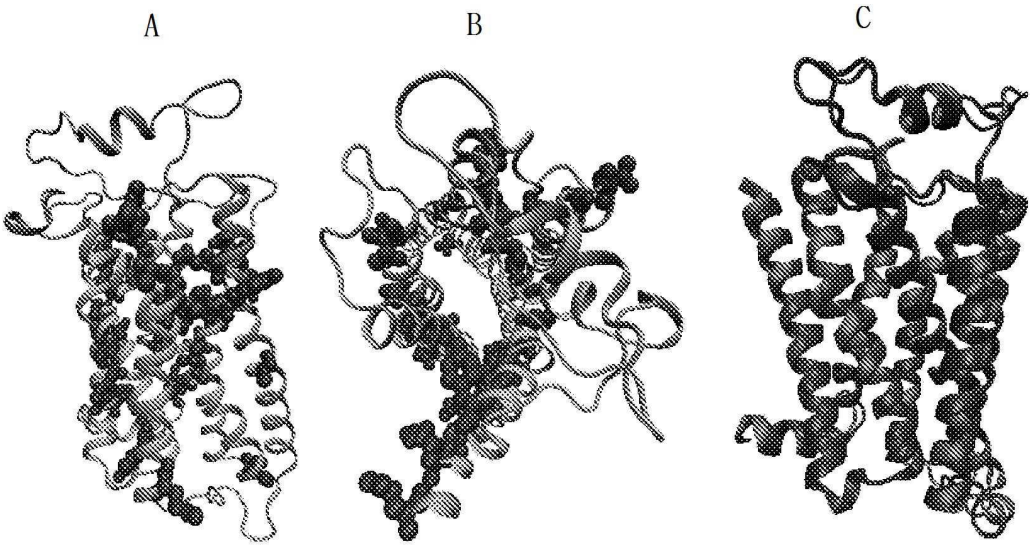
mOR103-15의 가용성 7-나선형 번들의 설계

```
                          Q   Q   Q  Q   QT      QT (8)     서열 번호 2
MERRNHTGRV SEFVLLGFPA PAPLRALLFF LSLLAYVLVL TENILIITAI     서열 번호 1
                         abcdefga bcdefgabcd efgabcdefg

            Y      Y   T  T   T    Q  Y (7)
RNHPTLHKPM YFFLANMSFL EIWYVTVTIP KMLAGFIGSE ENHGQLISFE
a         a bcdefgabcd efgabcdefg abcdefg

          Q        T              T (3)          Q
ACMTQLYFFL GLGCTECVLL AVMAYDRYVA ICHPLHYPVI VSSRLCVQMA
 abcdefgab cdefgabcde fgabcdefga bc             abcdefg

          T   T  YQ (5)
AGSWAGGFGI SMVKVFLISR LSYCGPNTIN HFFCDVSPLL NLSCTDMSTA
abcdefgabc defgabcd
      Q  Y T      T (4)

ELTDFILAIF ILLGPLSVTG ASYMAITGAV MRIPSAAGRH KAFSTCASHL
 abcdefgab cdefgabcde fgabcdefga          a bcdefgabcd

 T  TY      YT (5)                    T  Q    T  Q (4)
TVVIIFYAAS IFIYARPKAL SAFDTNKLVS VLYAVIVPLL NPIIYCLRNQ
efgabcdefg abcd           abcdef gabcdefgab cdefgabc

EVKKALRRTL HLAQGQDANT KKSSRDGGSS GTETSQVAPA (36aa/340aa)
```

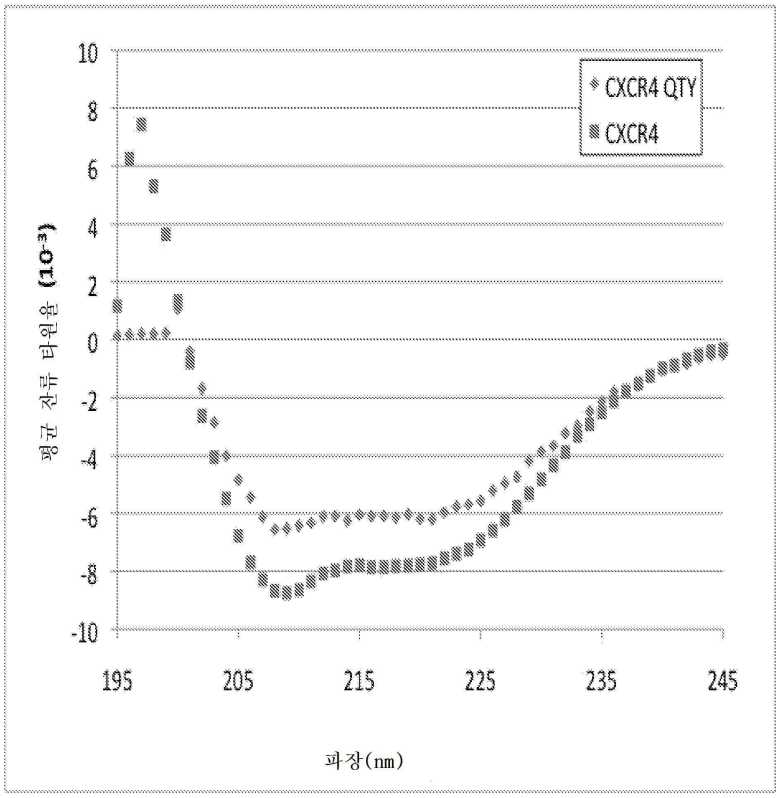
도면2



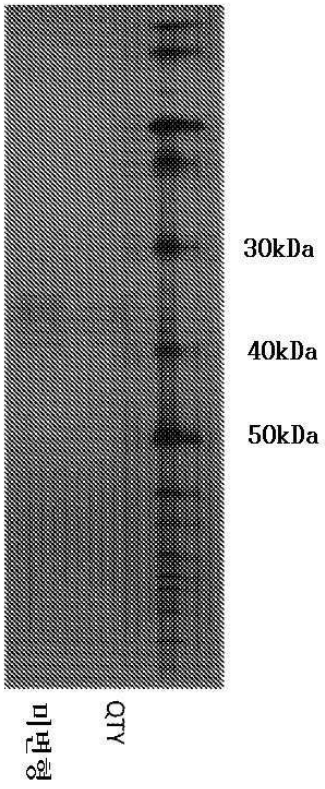
도면3



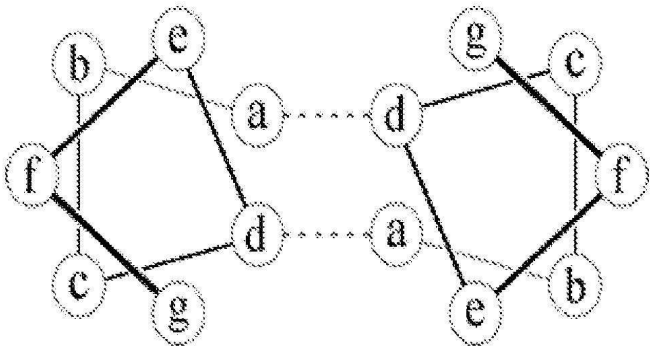
도면4


CXCR4 QTY
CXCR4
평균 잔류 타원율 (10-3)
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
195
205
215
225
235
245
파장(nm)

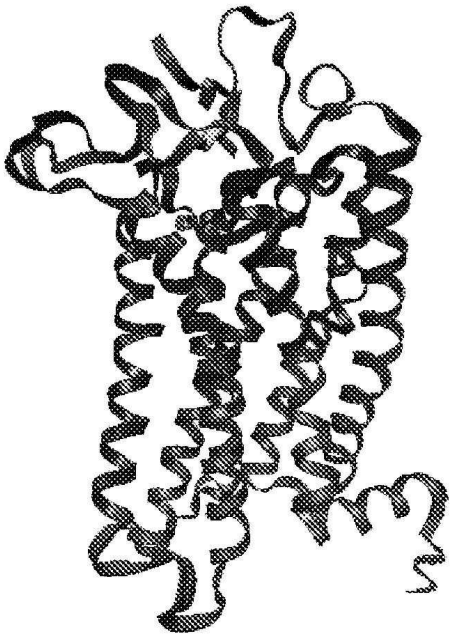
도면5


30kDa
40kDa
50kDa
QTY
미부착

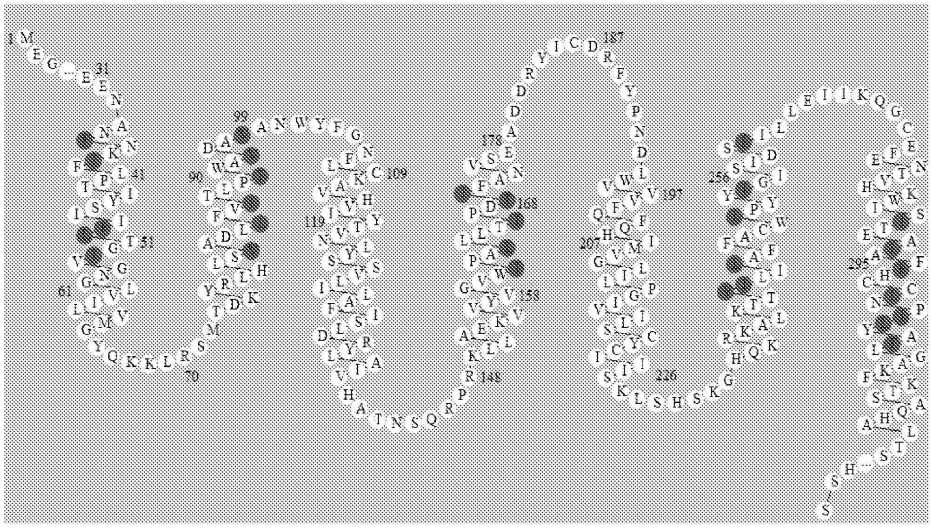
도면6a



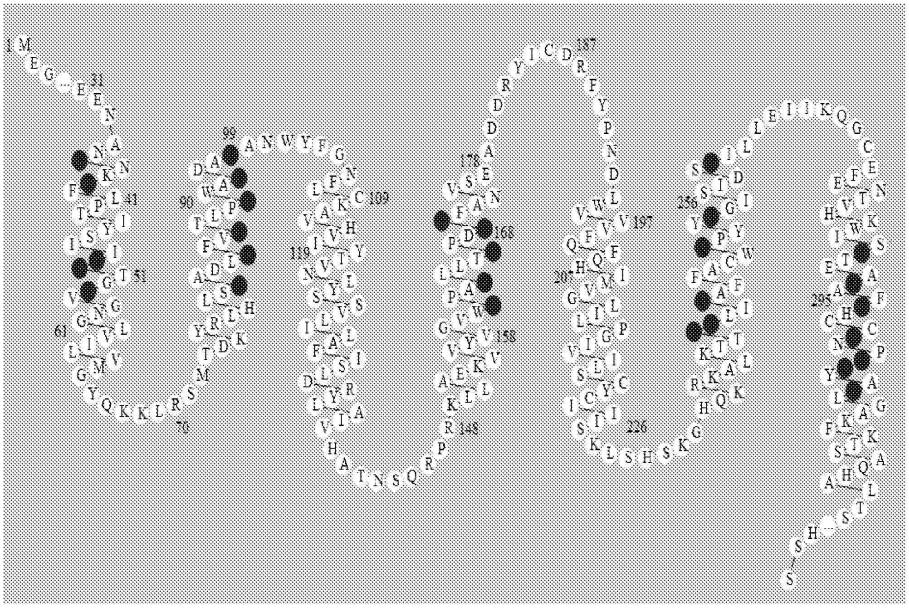
도면6b



도면6c



도면6d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Massachusetts Institute of Technology

<120> Water Soluble Membrane Proteins and

Methods for the Preparation and uses Thereof

<130> WO2012/116203

<140> PCT/US2012/26353

<141> 2012-02-23

<150> US 61/445,740

<151> 2011-02-23

<160> 10

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 340

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu

1 5 10 15

Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Ala Leu Leu Phe Phe Leu Ser

20 25 30

Leu Leu Ala Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Ile Leu Ile Thr Ala

35 40 45

Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ala

50 55 60

Asn Met Ser Glu Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Thr Val Thr Ile Pro

65 70 75 80

Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln Leu

85 90 95

Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Leu

100 105 110

Gly Cys Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr

115 120 125

Val Ala Ile Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser Arg

130 135 140

Leu Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly Ile

145 150 155 160

Ser Met Val Lys Val Phe Leu Ile Ser Arg Leu Tyr Thr Cys Gly Pro
165 170 175
Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu Asn Leu
180 185 190
Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala

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

260 265 270
Phe Asp Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile Val Pro
275 280 285
Leu Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Lys
290 295 300
Ala Leu Arg Arg Thr Leu His Leu Ala Gln Gly Gln Asp Ala Asn Thr
305 310 315 320
Lys Lys Ser Ser Arg Asp Gly Gly Ser Ser Gly Thr Glu Thr Ser Gln

325 330 335
Val Ala Pro Ala
340

<210> 2
<211> 341
<212> PRT
<213> Synthetic
<400> 2
Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu
1 5 10 15
Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Gln Arg Ala Leu Gln Phe Phe Gln Ser

20 25 30

Leu Gln Ala Tyr Val Gln Thr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Thr Ile Thr

35 40 45

Ala Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Tyr Phe Leu

50 55 60

Ala Asn Met Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Trp Tyr Thr Thr Val Thr Thr

65 70 75 80

Pro Lys Met Gln Ala Gly Tyr Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln

85 90 95

Leu Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Gln Gly

100 105 110

Leu Gly Cys Thr Glu Cys Thr Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg

115 120 125

Tyr Val Ala Thr Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser

130 135 140

Arg Gln Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly

145 150 155 160

Thr Ser Met Thr Val Lys Val Tyr Gln Ile Ser Arg Leu Ser Tyr Cys

165 170 175

Gly Pro Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu

180 185 190

Asn Leu Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile

195 200 205

Leu Ala Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser Val Thr Gly Ala Ser

210 215 220

Tyr Met Ala Ile Thr Gly Ala Val Met Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly

225 230 235 240

Arg His Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ala Ser His Leu Thr Thr Val Ile

245 250 255

Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Ile Tyr Thr Tyr Ala Arg Pro Lys Ala Leu

260 265 270

Ser Ala Phe Asp Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile
275 280 285

Val Pro Leu Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn Gln Glu Val
290 295 300

Lys Lys Ala Leu Arg Arg Thr Leu His Leu Ala Gln Gly Asp Ala Asn
305 310 315 320

Thr Lys Lys Ser Ser Arg Asp Gly Gly Ser Ser Gly Thr Glu Thr Ser
325 330 335

Gln Val Ala Pro Ala
340

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

Pro Gln Arg Ala Leu Gln Phe Phe Gln Ser Leu Gln Ala Tyr Val Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Thr Ile Thr Ala Ile Arg
20 25

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

Met Tyr Tyr Phe Leu Ala Asn Met Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Trp Tyr
1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Thr Pro Lys Met Gln Ala Gly Tyr Ile
20 25

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> Synthetic

<400> 5

Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Gln Gly Leu Gly Cys Thr Glu Cys
 1   5   10   15

Thr Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Thr Cys
            20   25   30

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 6

Arg Gln Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly
 1   5   10   15

Thr Ser Met Thr Val Lys Val Tyr Gln
            20   25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 7

Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser
 1   5   10   15

Val Thr Gly Ala Ser Tyr Met Ala Ile Thr Gly Ala Val
            20   25

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

His Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ala Ser His Leu Thr Thr Val Ile Thr
 1 5 10 15

Tyr Tyr Ala Ala Ser Ile Tyr Thr Tyr
 20 25

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile Val Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn
 20 25

<210> 10

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx
 1 5 10 15

Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Ala Asx Cys
 20 25 30

Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu

35 40 45

Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly

50 55 60

Ala Asx Cys Glu Asp Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx

65 70 75 80

Cys Asp Glu Gly Gly Ala Asx Cys Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala

85 90 95

Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys

100 105 110

Asp Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala

115 120 125

Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Ala Asx

130 135 140

Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp

145 150 155 160

Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx

165 170 175

Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly Ala Asx Cys

180 185 190