



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0102731
(43) 공개일자 2015년09월07일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0028233</p> <p>(22) 출원일자 2015년02월27일
심사청구일자 2015년02월27일</p> <p>(30) 우선권주장
1020140023508 2014년02월27일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)</p> <p>(72) 발명자
이형근
서울특별시 강남구 대치동 617
이준행
서울특별시 강남구 삼성동 AID아파트 31-117</p> <p>(74) 대리인
특허법인 정안</p> |
|--|---|

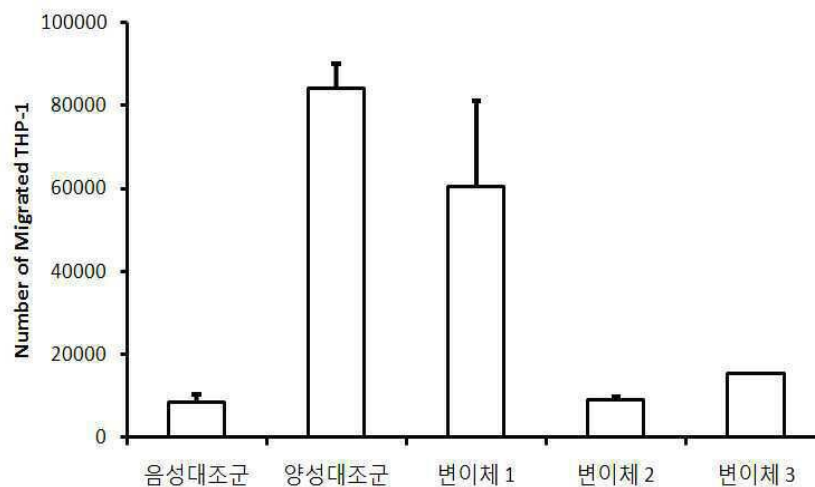
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 타이로신이 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체 및 이의 용도에 관한 것으로, 생산이 용이하며, 다양한 종류의 케모카인에 효과적으로 결합하기 때문에 다양한 케모카인 관련 질환을 치료하는데 폭넓게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0055

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 환경성안질환의 바이오 마커 발굴과 케모카인트랩에 기반한 치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2018.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

D6 디코이 수용체 세포 외 도메인 1에 포함된 타이로신 중 하나 이상이 황산화된, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 D6 디코이 수용체 세포 외 도메인 1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지며, 상기 타이로신은 D6 디코이 수용체 세포 외 도메인 1의 23번째, 24번째, 25번째 또는 27번째 아미노산인, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 23번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 24번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 25번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 27번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 23번째 및 24번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 23번째, 24번째 및 25번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 타이로신은 23번째, 24번째, 25번째 및 27번째 아미노산인 것을 특징으로 하는, 변이체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 하나의 변이체를 포함하는, 케모카인 억제용 약학 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 하나의 변이체를 포함하는, 염증성 또는 자가면역성 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 염증성 또는 자가면역성 질환은 천식, 죽상경화증, 사구체신염, 췌장염, 재협착, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 신병증, 폐섬유증, 염증성 장질환, 크론씨 질환, 및 이식 거부반응으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 14

제 12 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 하나의 변이체를 포함하는, 혈관 형성 억제용 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

림프관의 형성을 억제하는, 약학 조성물.

청구항 18

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 하나의 변이체를 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 19

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 하나의 변이체를 포함하는, 암 전이 억제용 약학 조성물.

명 세 서

기술 분야

[0001]

본 발명은 하나 이상의 타이로신이 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

케모카인(Chemokine)은 크기가 10Kd 미만의 비교적 작은 분비성 단백질로 임파구, 중성구 등의 혈액세포와 혈관 내피세포의 증식, 이동, 활성화를 일으키는 물질들을 통칭한다. 케모카인은 현재 약 30 여종이 발견되어 있으며 이들은 각각의 수용체를 통해 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 케모카인은 여러 자가면역질환(e.g., RA, SLE, Sjogren), 자가 염증성질환(ulcerative colitis, Crohn's Ds)과 같은 많은 질병의 발생과 진행에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이 외에도 당뇨병나 동맥경화의 발생에도 관련된 것으로 알려져 있다. 또한, 장기나 조직의 이식에 있어서 치명적인 거부반응도 케모카인에 의해 매개된다. 이에 따라 케모카인의 활성을 억제할 수 있는 다양한 종류의 억제제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 그러나 아직까지 생산이

용이하며, 동시에 다양한 종류의 케모카인을 효과적으로 억제할 수 있는, 상업화가 가능한 억제제의 개발은 부족한 실정이다.

[0003] 한편, 우리의 몸은 케모카인의 과도한 활성을 조절하는 디코이 수용체(natural decoy receptor)들을 가지고 있으며, D6 역시 이러한 디코이 수용체의 일종으로 주로 면역세포의 활성을 조절하는 케모카인을 조절하는 것으로 알려져 있다. D6 디코이 수용체는 주로 면역과 관계하는 중요 케모카인인 CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL5/RANTES, CCL17/TARC 등을 억제하는 것으로 알려져 있다(*J. Exp. Med.* (2008) 205(9):2075-2084).

[0004] 이에 본 발명자들은 생산이 용이하며, 다양한 종류의 케모카인을 동시에 효과적으로 억제할 수 있는 케모카인 억제제를 개발하고자 노력한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 생산이 용이하며, 다양한 종류의 케모카인을 동시에 효과적으로 억제할 수 있는 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 D6 디코이 수용체 세포 외 도메인 1에 포함된 타이로신 아미노산 중 하나 이상이 황산화된, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체를 제공한다.

[0009] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 23번째, 24번째, 25번째 또는 27번째 아미노산인 타이로신이 하나 이상 황산화된, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체를 제공한다.

[0010] 본 발명에 있어서 상기 타이로신은 23번째, 24번째, 25번째 또는 27번째 아미노산일 수 있고, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0011] 본 발명은 다른 구체예에서, 하나 이상의 타이로신이 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에 있어서 상기 약학 조성물은 포함되어 있는 변이체가 결합하는 케모카인의 종류에 따라서 다양한 종류의 질병을 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 상기 질병은 자가면역질환(e.g., RA, SLE, Sjogren), 자가염증성질환, 혈관형성 관련 질환 등일 수 있으며, 케모카인이 관련된 질병이라면 제한이 없다.

[0013] 본 발명에 있어서 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여

를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0015] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0016] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 진분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의학 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 하나 이상의 타이로신이 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체는 기존의 D6 디코이 수용체에 비하여 케모카인과의 결합능이 현저히 증가되었으며, 다양한 종류의 케모카인에 효과적으로 결합하기 때문에 다양한 케모카인 관련 질환을 치료하는데 폭넓게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체 DNA가 pET41a 벡터에 정상적으로 삽입된 것을 전기영동으로 확인한 결과이다(A. Lane 1. 1Kb marker; Lane 2. 변이체 1; Lane 3. 변이체 2; Lane 4-5. 변이체 3; Lane 6-9. 변이체 4; B. Lane 1. 1Kb marker; Lane 2. 변이체 5; Lane 3. 변이체 6; Lane 4-5. 변이체 7).

도 2는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1이 정상적으로 황산화된 것을 SDS-PAGE로 확인한 결과이다(A. Lane 1. size marker; Lane 2. 황산화되지 않은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1; Lane 3. 황산화된 변이체 1; Lane 4. 황산화된 변이체 2; Lane 5. 황산화된 변이체 3; Lane 6. 황산화된 변이체 4; Lane 7. 황산화된 변이체 5; Lane 8. 황산화된 변이체 6; B. Lane 1. size marker; Lane 2. 황산화되지 않은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1; Lane 3. 황산화된 변이체 7).

도 3은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 암세포 이동(migration) 억제능을 확인한 결과이다.

도 4의 (a) 내지 (d)는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 사이토카인(cytokine) 및 케모카인의 억제능을 확인한 결과이다.

도 5의 (a) 내지 (b)는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관신생 사이토카인(angiogenic cytokine)의 억제능을 확인한 결과이다.

도 6은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관신생 사이토카인의 억제능을 확인한 결과이다.

도 7의 (a) 내지 (c)는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 T 세포 증식 억제능을 확인한 결과이다.

도 8의 (a) 내지 (e)는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 각막에서의 면역 세포 침윤 억제능을 확

인한 결과이다.

도 9는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 내피 세포의 이동 억제능을 확인한 결과이다.

도 10은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 내피 세포의 이동 억제능을 확인한 결과이다.

도 11은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 형성 억제능을 확인한 결과이다.

도 12는 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 림프관 형성 억제능을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체 제조

1.1. 프라이머 합성

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1(서열번호 1: MAATASPQPLATEDADSENSSFYYDYLDVAFMLCRKDAVVSFGK)에 존재하는 네 개의 타이로신기를 각각 황산화시키기 위하여, 21개의 프라이머를 합성하였다. 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

명칭	염기서열	서열번호
1.1F	5'-aaaCAT ATG GCC GCC ACT GCC TCT CCG CAG CCA CTC GCC-3'	2
1.2F	5'-ACT GAG GAT GCC GAT TCT GAG AAT AGC AGC TTC TAG TAC-3'	3
1.3F	5'-TAT GAC TAC CTG GAT GAA GTG GCC TTC ATG CTC TGC AGG-3'	4
1.4F	5'-AAG GAT GCA GTG GTG TCC TTT GGC AAA GGA TTCaaaaa-3'	5
1.1R	5'-tttttttttttttttGAA TTC TTT GCC AAA GGA CAC CAC-3'	6
1.2R	5'-TGC ATC CTT CCT GCA GAG CAT GAA GGC CAC TTC ATC CAG-3'	7
1.3R	5'-GTA GTC ATA GTA CTA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	8
1.4R	5'-ATC CTC AGT GGC GAG TGG CTG CGG AGA GGC AGT GGC-3'	9
2.2F	5'-ACT GAG GAT GCC GAT TCT GAG AAT AGC AGC TTC TAT TAG-3'	10
2.3R	5'-GTA GTC ATA CTA ATA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	11
3.2F	5'-ACT GAG GAT GCC GAT TCT GAG AAT AGC AGC TTC TAT TAC-3'	12
3.3F	5'-TAG GAC TAC CTG GAT GAA GTG GCC TTC ATG CTC TGC AGG-3'	13
3.3R	5'-GTA GTC CTA GTA ATA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	14
4.3F	5'-TAT GAC TAG CTG GAT GAA GTG GCC TTC ATG CTC TGC AGG-3'	15
4.3R	5'-CTA GTC ATA GTA ATA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	16
5.2F	5'-ACT GAG GAT GCC GAT TCT GAG AAT AGC AGC TTC TAG TAG-3'	17
5.3R	5'-GTA GTC ATA CTA CTA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	18
6.3F	5'-TAG GAC TAC CTG GAT GAA GTG GCC TTC ATG CTC TGC AGG-3'	19
6.3R	5'-GTA GTC CTA CTA CTA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	20
7.3F	5'-TAG GAC TAC CTG GAT GAA GTG GCC TTC ATG CTC TGC AGG-3'	21
7.3R	5'-CTA GTC CTA CTA CTA GAA GCT GCT ATT CTC AGA ATC GGC-3'	22

1.2. D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체 제조

D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체를 제조하기 위하여 1차적으로 오버래핑 중합효소연쇄반응(overlapping polymerase chain reaction)을 수행하였다. D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 첫번째 위치 타이로신(23번째 아미노산)의 변이체 1을 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 1.2F, 1.2R, 1.3F, 1.3R, 1.4F, 1.4R

프라이머 세트를 사용하였고, 두번째 위치 타이로신(24번째 아미노산)의 변이체 2를 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 2.2F, 1.2R, 1.3F, 2.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였고, 세번째 위치 타이로신(25번째 아미노산)의 변이체 3을 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 3.2F, 1.2R, 3.3F, 3.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였고, 네번째 위치 타이로신(27번째 아미노산)의 변이체 4를 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 3.2F, 1.2R, 4.3F, 4.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였다. 또한 첫번째 및 두번째 위치 타이로신(23번째 및 24번째 아미노산)의 변이체 5를 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 5.2F, 1.2R, 1.3F, 5.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였고, 첫번째, 두번째 및 세번째 위치 타이로신(23번째, 24번째 및 25번째 아미노산)의 변이체 6을 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 5.2F, 1.2R, 6.3F, 6.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였고, 첫번째, 두번째, 세번째 및 네번째 위치 타이로신(23번째, 24번째, 25번째 및 27번째 아미노산)의 변이체 7을 제조하기 위해서는 1.1F, 1.1R, 5.2F, 1.2R, 7.3F, 7.3R, 1.4F, 1.4R 프라이머 세트를 사용하였다. 각각의 프라이머를 10pmole의 농도로 혼합하여 준비하고, 혼합된 프라이머 4 μ l에 dNTP 5 μ l, 10X Taq buffer 5 μ l, Ex Taq 0.5 μ l, 3차 증류수 35.5 μ l를 혼합하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응은 1차 DNA 변성 단계(94 $^{\circ}$ C, 5분) 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 변성 단계), 52 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 어닐링 단계), 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 연장)를 55회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시켜 수행하였다. 오버래핑 중합효소연쇄반응에 의하여 증폭된 DNA를 주형(template)으로 사용하여 2차 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 2차 중합효소연쇄반응은 증폭된 DNA 1.25 μ l, 1.1F 프라이머 10pmol 0.5 μ l, 1.1R 프라이머 10pmol 0.5 μ l, dNTP 5 μ l, 5X band 10 μ l, 10X taq buffer 5 μ l, Ex Taq 0.5 μ l, 및 3차 증류수 27.25 μ l를 혼합하고, 1차 DNA 변성 단계(94 $^{\circ}$ C, 5분) 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 변성 단계), 50 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 어닐링 단계), 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초(DNA 연장)를 23회 반복하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시켜 수행하였다.

[0028] 증폭된 DNA는 1.5% 아가로스겔 전기영동(agarosegel electrophoresis)을 이용하여 DNA 크기를 확인하였다. 그리고 DNA 서열을 확인하기 위하여 겔 추출(gel extraction)한 후 pGEM T easy vector에 삽입하고 대장균 DH5a에 형질전환시킨 후, 증폭된 벡터를 추출하여 염기서열 분석(DNA sequencing)을 수행하였다. 염기서열 분석 결과 총 7개의 변이체가 정상적으로 제조되었다는 것을 확인하였다.

[0029] 실시예 2: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 황산화(sulfation)

[0030] 2.1. 단백질 발현용 균주 제작

[0031] 실시예 1.2의 방법으로 제조된 7개의 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체 DNA를 GST-His tag를 포함한 발현벡터(pET41a)에 각각 삽입하여 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 제조된 벡터는 최종적으로 대장균 BL21에 형질전환시켰다.

[0032] 도 1에 나타난 바와 같이, 제조된 7개의 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체 DNA가 pET41a 벡터에 정상적으로 삽입된 것을 확인하였다.

[0033] 그리고 타이로신기를 황산화시키기 위하여 pET41a/DARCex1 mutation1 및 pSUPAR6-3SY-L3를 대장균 BL21에 형질전환시키고, pET41a/DARCex1 mutation1+2 및 pSUPAR6-3SY-L3를 대장균 BL21에 형질전환시켜 각각을 확인하였다.

[0034] pET41a/DARCex1 mutation1, pET41a/DARCex1 mutation1+2, pSUPAR6-3SY-L3 각각의 벡터는 스크립스(Scripps) 연구소에서 분양받아 사용하였다.

[0035] 2.2. 황산화된 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 발현 및 분리

[0036] 형질전환된 대장균은 5mL의 2YT 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 진탕배양기(shaking incubator)에서 18시간 동안 전배양한 후, 10mM의 설포타이로신(sulfo tyrosine)이 첨가되어 있는 YT 액체배지에 1%가 되도록 접종하고 37 $^{\circ}$ C 진탕배양기에서 본배양하였다. 그리고 OD값이 1.0에 도달했을 때 IPTG를 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하고, 다시 30 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리(13,000g, 1분)하여 상층액을 제거하고, 상층액을 제거한 세포는 리서스펜션 버퍼(cell resuspension buffer, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 0.1% Triton X-100) 1mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 그리고 초음파 처리(sonication, 1mL 버퍼 당 30초 켜고 2분 쉬고 2회 실시)하여 세포를 깨고, 원심분리(14,000g, 20분)하여 단백질이 포함된 상층액만 회수하였다. His column을 이용하여 회수한 상층액으로부터 단백질을 분리하였다.

[0037] 분리된 단백질은 정량 후, 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하여 확인하였다. 대조군으로는 황산화가 되지 않은 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 이용하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0038] 도 2에 나타난 바와 같이, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1이 정상적으로 황산화된 것을 확인하였다.

[0039] **실시예 3: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 암세포 이동(migration) 억제능 확인**

[0040] 실시예 1의 방법으로 제조된 7개의 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 항암효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 암세포 이동 억제능을 확인하였다. THP-1 세포주를 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 RPMI1640 배지에서 2~3 세대 계대 배양 후, 배양된 세포를 24시간 동안 혈청 기아(serum starvation)시켰다. 그리고 상기 세포를 배양 접시로부터 분리하여 0.5% BSA(bovine serum albumin)가 첨가된 RPMI1640 배지로 세척한 후에 1% 트리판 블루 염색시약(trypan blue dye)으로 세포를 염색하고, 0.5% BSA가 첨가된 RPMI1640 배지에 2×10^6 cells/mL 농도가 되도록 희석하였다. 상기 희석된 세포 배양액 250 μ l를 보이덴 챔버(boyden chamber)의 상위 챔버에 첨가하고, 하위 챔버에는 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 첨가하였다. 그리고 상위 챔버에 음성 대조군으로는 RPMI1640 배지 250 μ l를 첨가하였고, 양성 대조군으로는 20ng/mL 농도의 MCP-1이 첨가된 RPMI1640 배지 250 μ l를 첨가하였고, 각각의 실험군에는 20ng/mL 농도의 MCP-1이 첨가된 RPMI1640 배지에 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체를 각각 0.1 내지 1 μ M이 되도록 첨가한 용액 250 μ l를 첨가하여 준비하였다. 준비된 보이덴 챔버의 뚜껑을 덮고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 후에, 상위 챔버를 제거하고 하위 챔버로 이동한 세포를 분리하여 세포의 수를 측정하였다. 각 군별로 계산된 값은 t-검증(t-test) 또는 일원배치 분산분석(One way ANOVA)를 이용하여 통계학적으로 의의가 있음을 확인하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0041] 도 3에 나타난 바와 같이, 세포 외 도메인 1의 첫번째 위치의 타이로신이 황산화된 변이체 1의 경우에는 세포의 이동을 거의 억제하지 못하는 반면, 두번째 위치의 타이로신이 황산화된 변이체 2는 양성 대조군에 비하여 89.3% 억제능 효과를 나타내었으며, 세번째 위치의 타이로신이 황산화된 변이체 3의 경우에는 81.6% 억제능 효과를 나타내었다. 상기 결과를 통하여 변이체 2 및 3의 경우에는 암세포의 이동을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 변이체 2 및 3의 경우 항암효과가 뛰어나다는 것을 확인하였다.

[0042] **실시예 4: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 사이토카인(cytokine) 및 케모카인의 억제능 확인**

[0043] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 사이토카인 및 케모카인에 대한 억제능을 나타내는지 확인하였다. 발브시 마우스 (Bal/c mice)의 말초 혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 피콜파큐(Ficoll-Paque) 버퍼를 통해 분리한 후, RPMI1640 배지에 2.5×10^5 cells의 농도가 되도록 배양시켰다. 이 후, 배양액 내에 LPS(lipopolysaccharide) 1.0 μ g/ml를 첨가하여 면역 자극을 가한 뒤, 각각에 실시예 1에서 제조된 변이체 1 및 변이체 7을 배양액 내에 1.0 μ g/ml의 농도로 첨가하고 24시간이 경과한 시점에서 사이토카인 IL-1 β 및 IL-6와 케모카인 CCL-2 및 CCL5의 농도를 마이크로어세이(micro assay) 방법으로 측정하여 그 결과를 도 4의 (a) 내지 (d)에 그래프로 나타내었다. 대조군으로는 RPMI1640 배지에 말초 혈액 단핵구를 배양시킨 것과, 이에 LPS로 자극을 가한 것을 이용하였다.

[0044] 도 4의 (a) 내지 (d)에 나타난 바와 같이, 세포 외 도메인 1의 타이로신 중 하나가 황산화된 변이체 1과, 네 개의 타이로신이 모두 황산화된 변이체 7을 처리한 경우 모두 LPS로 자극이 가해진 경우와 비교하여 IL-1 β , IL-6, CCL-2 및 CCL5의 생성 농도가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 본 발명의 변이체의 경우 사이토카인 및 케모카인 억제능이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0045] **실시예 5: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관신생 사이토카인(cytokine)의 억제능 확인**

[0046] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 혈관 신생과 관련된 사이토카인에 대한 억제능을 나타내는지 확인하였다. 마우스의 MS1 혈관 내피 세포를 RPMI + 5% 소태아혈청의 혼합 배양액에 혼합하고 6 well plate에 5×10^5 cells로 접종한 뒤, TNF- α 10ng/ml, TNF- α 10ng/ml + 1 μ g/ml의 실시예 1에서 제조된 변이체 1, TNF- α 10ng/ml + 1 μ g/ml의 실시예 1에서 제조된 변이체 7, 1 μ g/ml의 변이체 1 및 1 μ g/ml의 변이체 7을 배양액 내에 각각 첨가한 후 24시간이 경과한 시점에서 사이토카인 VEGF A 및

VEGF C의 농도를 마이크로어세이 (micro assay) 방법으로 측정하여 그 결과를 도 5의 (a) 내지 (b)에 그래프로 나타내었다.

[0047] 도 5의 (a) 내지 (b)에 나타난 바와 같이, TNF-alpha와 함께 세포 외 도메인 1의 타이로신 중 하나가 황산화된 변이체 1과, 네 개의 타이로신이 모두 황산화된 변이체 7을 처리한 경우, TNF-alpha에 의해 자극된 혈관 내피 세포로부터의 혈관 생성과 관련된 사이토카인 VEGF A와 VEGF C의 형성이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 본 발명의 변이체의 경우 혈관 신생과 관련한 사이토카인의 억제능이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0048] **실시예 6: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관신생 사이토카인(cytokine)의 억제능 확인**

[0049] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 혈관 신생과 관련된 사이토카인에 대한 억제능을 나타내는지 확인하였다. 마우스의 MS1 혈관 내피 세포를 RPMI + 5% 소태아혈청의 혼합 배양액에 혼합하고 6 well plate에 5×10^5 cells로 접종한 뒤, TNF 10ng/ml, TNF 10ng/ml에 실시예 1에서 제조된 변이체 1 내지 7 각각을 $1 \mu\text{g/ml}$ 으로 혼합한 혼합물을 배양액 내에 각각 첨가한 후 24시간이 경과한 시점에서 사이토카인 VEGF A2의 농도를 마이크로어세이 (micro assay) 방법으로 측정하여 그 결과를 도 6에 그래프로 나타내었다.

[0050] 도 6에 나타난 바와 같이, TNF와 함께 세포 외 도메인 1의 타이로신 중 하나 이상이 황산화된 변이체 1 내지 7을 처리한 경우, TNF에 의해 자극된 혈관 내피 세포로부터의 혈관 생성과 관련된 사이토카인 VEGF A2의 형성이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 본 발명의 변이체의 경우 혈관 신생과 관련한 사이토카인의 억제능이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0051] **실시예 7: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 T 세포 증식 억제능 확인**

[0052] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 T 세포의 증식에 대한 억제능을 나타내는지 확인하였다. 블랙 6 마우스 (B6 mice)의 비장으로부터 CD4 T 세포를 FACS ARIA(BD Bioscience)를 이용하여 분리하였고, 이를 RPMI1640 배지에서 2×10^6 cells의 농도가 되도록 배양시킨 뒤, IL-2 5ng/ml과, IL-2 5ng/ml + $1 \mu\text{g/ml}$ 의 실시예 1에서 제조된 변이체 7을 배양액 내에 각각 첨가하고 12시간 경과한 뒤, T 세포 증식의 변화를 Ki67 발현의 변화로 확인하여 그 결과를 도 7의 (a) 내지 (c)에 그래프로 나타내었다.

[0053] 도 7의 (a) 내지 (c)에 나타난 바와 같이, 아무 처리를 하지 않은 대조군, IL-2만 처리한 경우, IL-2와 변이체 7을 처리한 경우 Ki67+ 세포의 비율이 각각 0.11%, 8.4%, 1.9%인 것을 확인할 수 있는바, 본 발명에 따른 세포 외 도메인 1의 변이체를 처리한 경우, CD4 T 세포의 증식이 감소한 것을 알 수 있고, 나아가서는 상기한 변이체가 염증성 또는 자가면역질환의 예방 또는 치료 효과가 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] **실시예 8: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 각막에서 면역 세포 침윤 억제능 확인**

[0055] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 면역 세포의 침윤을 억제하는지 확인하였다. 발브시 마우스 (Bal/c mice)의 각막에 10-0 나일론 (10-0 nylon) 으로 봉합을 한 후, 실시예 1에서 제조된 변이체 1과 변이체 7 각각을 각막에 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하되, 24시간 간격으로 2번 처리하였다. 봉합 후 변이체를 처리한 뒤 48시간이 경과된 시점에서 각막으로부터 Gr1+ 세포의 침윤을 관찰하여 그 결과를 도 8의 (d) 및 (e)에 그래프로 나타내었다. 이때 대조군으로는 봉합을 수행하지 않은 경우와, 봉합 후 아무 처리를 하지 않은 후 24시간 및 48시간이 경과한 경우 각막으로부터 Gr1+ 세포의 침윤을 관찰하여 그 결과를 도 8에 (a) 내지 (c)로 함께 나타내었다.

[0056] 도 8의 (a) 내지 (e)에 나타난 바와 같이, 봉합 수술 후 세포의 침윤이 증가한 것을 볼 수 있는데, 아무 처리를 하지 않은 대조군과 비교할 때 본 발명에 따른 변이체를 처리한 경우 세포 침윤이 현저히 억제된 것을 볼 수 있었다. 특히, 세포 외 도메인 1의 타이로신 중 네 개 모두가 황산화된 변이체 7의 침윤 억제능이 더욱 우수한 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 본 발명에 따른 세포 외 도메인 1 변이체는 항암효과가 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] **실시예 9: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 내피 세포의 이동 억제능 확인**

[0058] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 혈관 내피 세포에 대한 이동 억제능을 갖는지 확인하였다. 마우스의 MS1 혈관 내피 세포를 RPMI + 5% 소태아혈청의 혼합 배양액에 혼합하고 6 well plate에 5×10^5 cells로 접종한 뒤, 95% 치밀도 (confluent) 로 배양된 상태에서 유리관을 이용하여 2mm 사이즈의 상처를 형성한 뒤, VEGF-A 5ng/ml, VEGF-A 5ng/ml + 1 μ g/ml의 실시예 1에서 제조된 변이체 1 및 VEGF-A 5ng/ml + 1 μ g/ml의 실시예 1에서 제조된 변이체 7, 1 μ g/ml의 변이체 1, 1 μ g/ml의 변이체 7을 배양액 내에 각각 첨가한 뒤 24시간이 경과한 시점에서 상처의 면적을 처리 전과 비교하여 그 결과를 도 9에 그래프로 나타내었다. 단, 상처의 면적은 '이미지 J 소프트웨어(image J software)'를 이용하여 측정하였다.

[0059] 도 9에 나타난 바와 같이, VEGF-A만을 처리한 경우와 비교할 때, 본 발명에 따른 변이체를 함께 처리한 경우, VEGF-A에 의한 혈관 내피 세포의 이동을 50% 이상 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 특히 세포 외 도메인 1에 포함된 네 개의 타이로신이 황산화된 변이체 7의 침윤 억제능이 더욱 우수한 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 본 발명에 따른 세포 외 도메인 1 변이체의 경우 항암효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0060] **실시예 10: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 내피 세포의 이동 억제능 확인**

[0061] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 혈관 내피 세포에 대한 이동 억제능을 갖는지 확인하였다. 마우스의 MS1 혈관 내피 세포를 RPMI + 5% 소태아혈청의 혼합 배양액에 혼합하고 6 well plate에 5×10^5 cells로 접종한 뒤, 95% 치밀도 (confluent) 로 배양된 상태에서 유리관을 이용하여 2mm 사이즈의 상처를 형성한 뒤, VEGF-A 5ng/ml, VEGF-A 5ng/ml에 실시예 1에서 제조된 변이체 1 내지 7 각각을 1 μ g/ml로 혼합한 혼합물을 배양액 내에 각각 첨가한 뒤 24시간이 경과한 시점에서 상처의 면적을 처리 전과 비교하여 그 결과를 도 10에 그래프로 나타내었다. 단, 상처의 면적은 '이미지 J 소프트웨어(image J software)'를 이용하여 측정하였다.

[0062] 도 10에 나타난 바와 같이, VEGF-A만을 처리한 경우와 비교할 때, 세포 외 도메인 1의 타이로신 중 하나 이상이 황산화된 변이체 1 내지 7을 함께 처리한 경우, VEGF-A에 의한 혈관 내피 세포의 이동을 50% 이상 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0063] **실시예 11: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 혈관 형성 억제능 확인**

[0064] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 혈관 형성 억제능을 갖는지 확인하였다. 마우스의 MS1 혈관 내피 세포를 RPMI + 5% 소태아혈청의 혼합 배양액에 혼합하고 48 well plate에 2×10^4 cells로 접종한 뒤, 실시예 1에서 제조된 변이체 1과 변이체 7 각각을 배양액 내에 1 μ g/ml의 농도로 첨가한 후 8시간이 경과한 시점에서 혈관 분포망(vascular network)의 형성을 관찰하고 그 길이를 측정하여 결과를 도 11에 그래프로 나타내었다. 단, 혈관 분포망의 길이는 '뉴로 J 소프트웨어(Neuro J software)'를 이용하여 측정하였으며, 도 11의 그래프에 있어서 세로축의 '길이'는 '총 혈관의 길이(Total vascular length)'를 의미하고 'HPF'는 고배율시야(High Power Field)를 의미한다.

[0065] 도 11에 나타난 바와 같이, 아무 처리를 하지 않은 경우와 비교할 때, 본 발명에 따른 변이체를 처리한 경우, 혈관 분포망이 형성된 길이가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 특히나 세포 외 도메인 1에 포함된 네 개의 타이로신이 황산화된 변이체 7의 혈관 분포망 형성 억제능이 더 우수한 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 상기한 세포 외 도메인 1 변이체는 항암효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 12: D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1 변이체의 림프관 형성 억제능 확인**

[0067] 본 발명에 따른 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1의 변이체가 림프관 형성 억제능을 갖는지 확인하였다. 마우스의 가슴관을 분리하여 1mm 사이즈로 잘라내어 액체 콜라겐 겔에 심은 뒤, 이를 경화시키고 RPMI 배지에 배양시켰다. 이 후 VEGF 10ng/ml, 1 μ g/ml의 D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1, 1 μ g/ml의 실시예 1에서 제조된 변이체 1, 1 μ g/ml의 변이체 7을 각각의 콜라겐 겔에 배양되는 배양액 내에 48시간 마다 3번 처리하고, 새로이 자라난 림프관 줄기의 길이를 측정하여 그 결과를 도 12에 그래프로 나타내었다. 단, 림프

관의 길이는 ‘뉴로 J 소프트웨어(Neuro J software)’를 이용하여 측정하였다.

[0068]

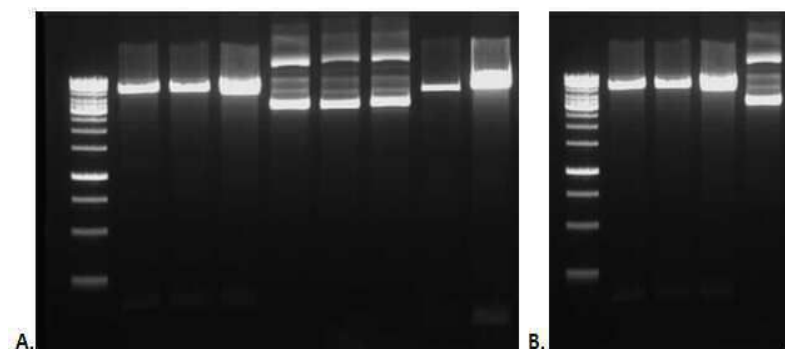
도 12에 나타난 바와 같이, 아무 처리를 하지 않은 경우와 비교할 때, 본 발명에 따른 변이체를 처리한 경우, 림프관 형성 길이가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었고, D6 디코이 수용체의 세포 외 도메인 1을 처리한 경우보다도 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히나 첫번째 타이로신이 황산화된 변이체 1을 처리한 경우는 아무 처리를 하지 않은 수준까지 림프관 형성이 억제된 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 본 발명에 따른 세포 외 도메인 1 변이체는 항암효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

[0069]

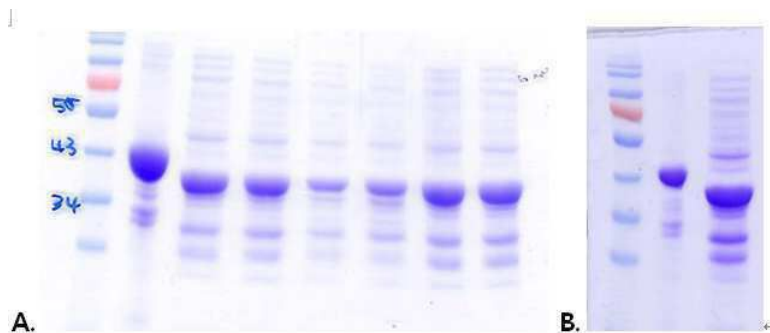
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

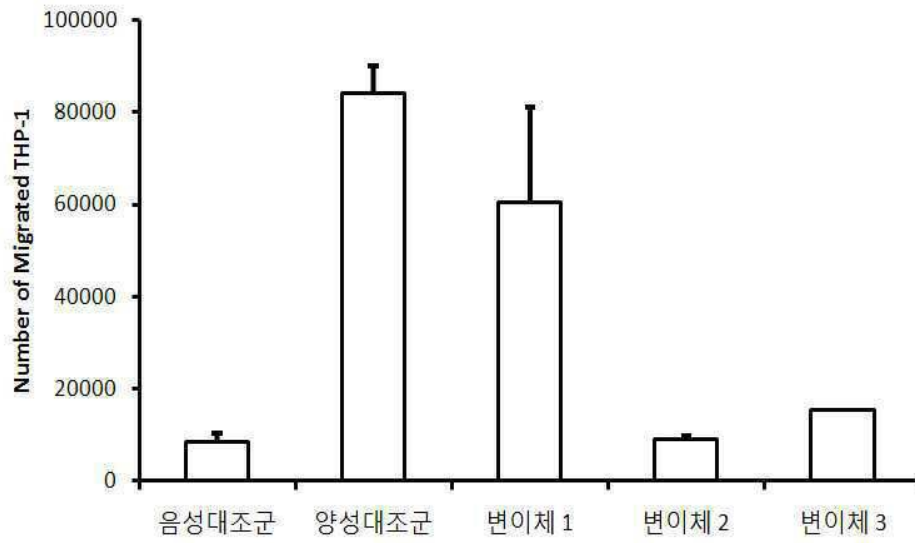
도면1



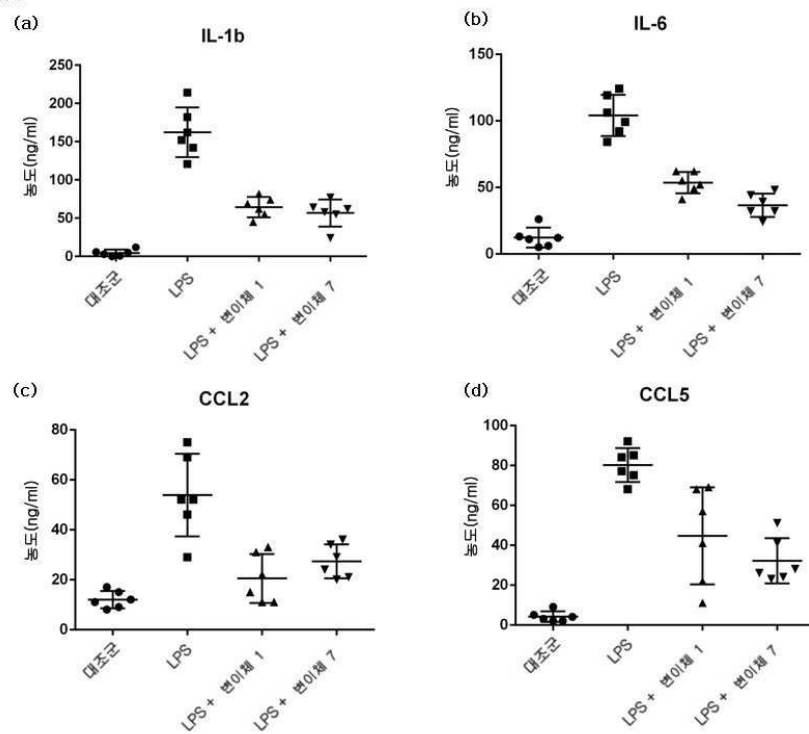
도면2



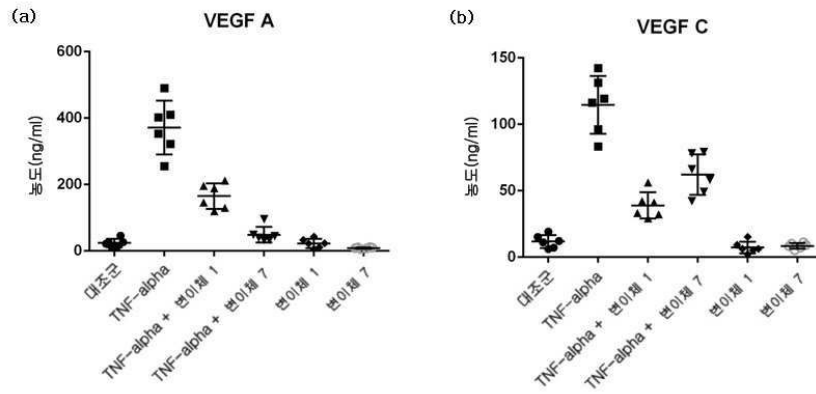
도면3



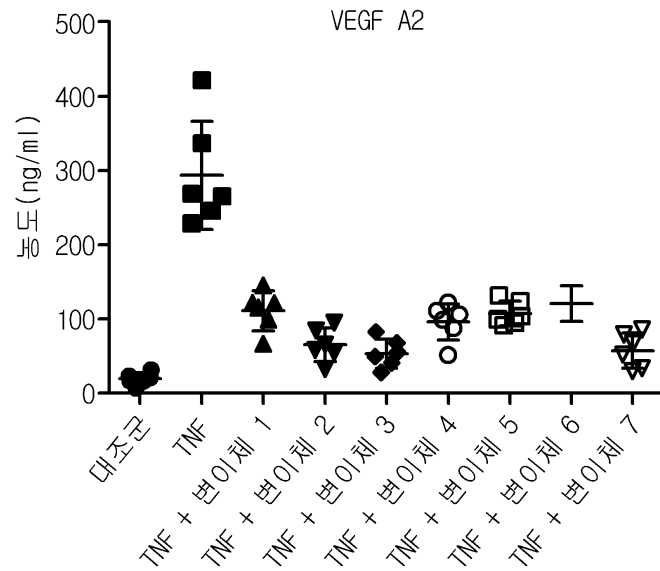
도면4



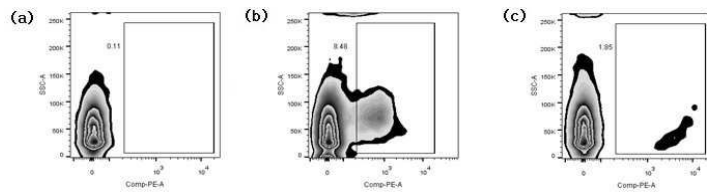
도면5



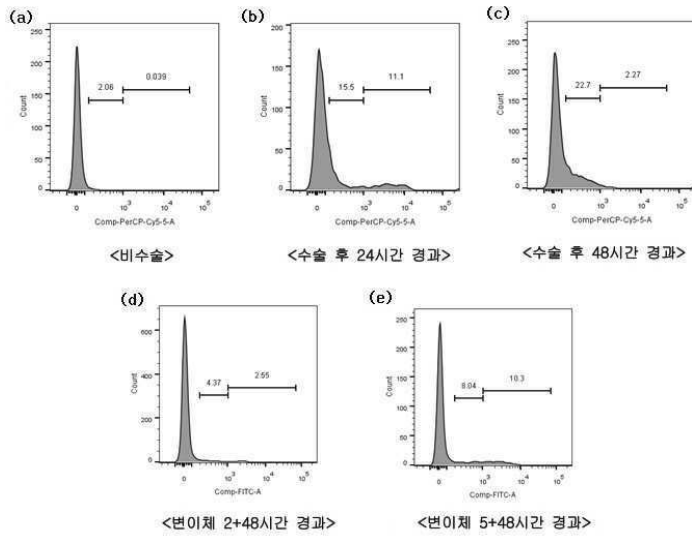
도면6



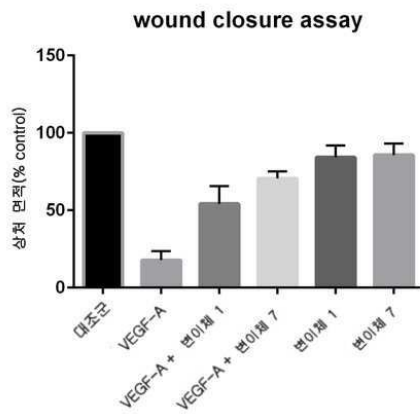
도면7



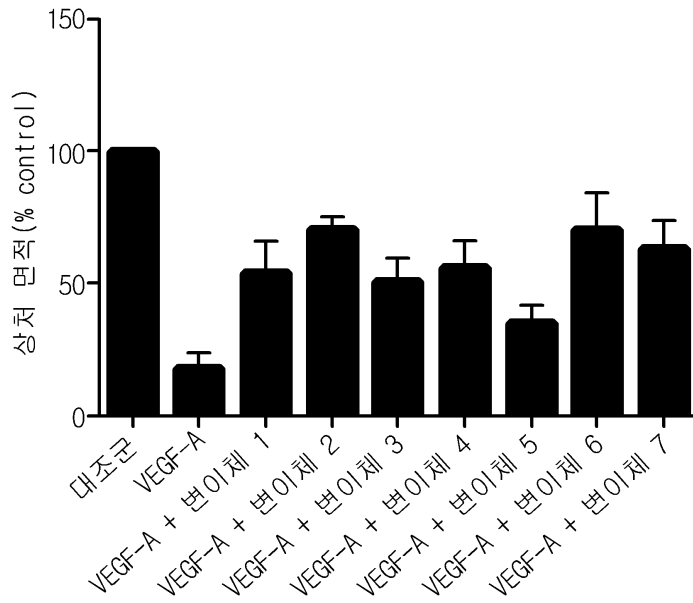
도면8



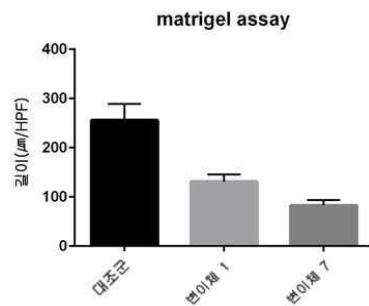
도면9



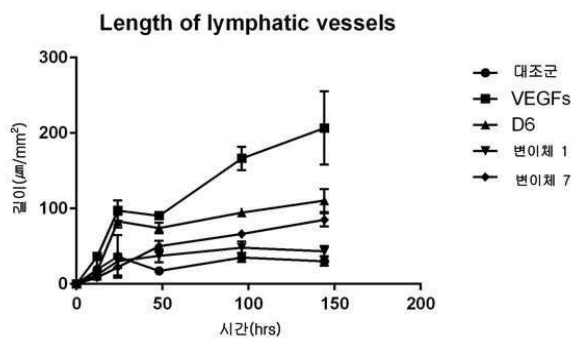
도면10



도면11



도면12



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Sulfated extracellular domain 1 of D6 decoy receptor and thereof

<130> DPB150021
 <150> 14/0023508
 <151> 2014-02-27
 <160> 22
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens sapiens
 <400> 1
 Met Ala Ala Thr Ala Ser Pro Gln Pro Leu Ala Thr Glu Asp Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Glu Asn Ser Ser Phe Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Glu Val Ala

20 25 30
 Phe Met Leu Cys Arg Lys Asp Ala Val Val Ser Phe Gly Lys
 35 40 45

<210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 1.1F

<400> 2

aaacatatgg ccgccactgc ctctccgcag ccaactcgcc

39

<210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 1.2F

<400> 3

actgaggatg ccgattctga gaatagcagc ttctagtac

39

<210> 4
 <211> 39
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.3F

<400> 4

tatgactacc tggatgaagt ggccttcatg ctctgcagg

39

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.4F

<400> 5

aaggatgcag tgggtgcctt tggcaaagga ttcaaaaaa

39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.1R

<400> 6

tttttttttt tttttgaatt ctttgccaaa ggacaccac

39

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.2R

<400> 7

tgcatacttc ctgcagagca tgaaggccac ttcattccag

39

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 1.3R

<400> 8

gtagtcatag tactagaagc tgctattctc agaatcggc

39

<210> 9

<211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1.4R
 <400> 9
 atcctcagtgc gcgagtggct gcggagaggc agtggc 36

<210> 10
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2.2F
 <400> 10
 actgaggatg ccgattctga gaatagcagc ttctattag 39

<210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 2.3R
 <400> 11
 gtagtcatac taatagaagc tgctattctc agaatcggc 39

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3.2F
 <400> 12
 actgaggatg ccgattctga gaatagcagc ttctattac 39

<210> 13
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3.3F
 <400> 13
 taggactacc tggatgaagt ggccttcacg ctctgcagg 39

<210>	14	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3.3R	
<400>	14	
	gtagtcctag taatagaagc tgctattctc agaatcggc	39
<210>	15	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	4.3F	
<400>	15	
	tatgactagc tggatgaagt ggccttcacg ctctgcagg	39
<210>	16	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	4.3R	
<400>	16	
	ctagtcacag taatagaagc tgctattctc agaatcggc	39
<210>	17	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5.2F	
<400>	17	
	actgaggatg ccgattctga gaatagcagc ttctagtag	39
<210>	18	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5.3R	
<400>	18	

gtagtcatac tactagaagc tgctattctc agaatcggc

39

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6.3F

<400> 19

taggactacc tggatgaagt ggccttcatg ctctgcagg

39

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6.3R

<400> 20

gtagtcctac tactagaagc tgctattctc agaatcggc

39

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7.3F

<400> 21

taggactagc tggatgaagt ggccttcatg ctctgcagg

39

<210> 22

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7.3R

<400> 22

ctagtcctac tactagaagc tgctattctc agaatcggc

39