(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/12
C07K 14/47
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2004년04월03일
(11) 등록번호 10-0404011
(24) 등록일자 2003년10월21일

(21) 출원번호 10-1996-0705807
(22) 출원일자 1996년10월14일
번역문제출일자 1996년10월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US1995/004636
(86) 국제출원일자 1995년04월14일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

(65) 공개번호 10-1997-0702366
(43) 공개일자 1997년05월13일
(87) 국제공개번호 WO 1995/28483
(87) 국제공개일자 1995년10월26일

(30) 우선권주장 08/227,371 1994년04월14일 미국(US)
08/248,812 1994년05월25일 미국(US)
08/306,511 1994년09월14일 미국(US)
08/346,147 1994년11월29일 미국(US)

(73) 특허권자 콜드 스프링 하버 래보레이토리
미국 11724 뉴욕 콜드 스프링 하버 피.오. 박스 100
(72) 발명자 데이비드 에이치. 비이취
미합중국 11743 뉴욕 헌팅턴 배이 우드랜드 드라이브 19
더글라스 제이. 디메트릭
미합중국 11731 뉴욕 이스트 노오쓰포트 몬마우쓰 드라이브 17
마뉴엘 세라노
미합중국 11765 뉴욕 밀 넥 밀 힐 로우드 297
그레고리 제이. 해넌
미합중국 11743 뉴욕 헌팅턴 새미스 스트리스 92
(74) 대리인 남상선

심사관 : 임혜준

(54) 세포-주기조절단백질및그것의사용방법

명세서

배경기술

<1> 이상증식(neoplasia)은 비조절되는 세포 성장 및 분열을 특징으로 한다. 필연적으로, 세포 성장을 조절하는 분자적 경로는 세포 분열을 조절하는 경로와 상호작용해야 한다. 그러나, 최근에 비로소 상기 관계를 밝히는 실험 증거가 입수되었다. 사이클린 A는 아데노바이러스의 종양단백질 (E1A)과 관련하여, 바이러스적으로 형질전환된 세포내에서 발견된다 [Giordona 등, Cell 58:981 (1989); 및 Pines 등, Nature 346:760 (1990)]. 초기 간세포종에서, 사람의 사이클린 A 유전자는, 사이클린 A의 전사를 활성화시켜 시험관내에서 분해될 수 없는 키메라 바이러스 사이클린 A 단백질을 생성시키는, B형 간염 바이러스 단편의 통합 부위로 발견된다[Wang 등, Nature 343:555 (1990)]. 현재까지 종양발생과 가장 깊이 관련된 세포-주기 유전자는 사람 사이클린 D1이다. 본래 상기 사이클린 D1은 효모 G_1 사이클린-결핍 균주의 유전적 컴플리멘테이션 [Xiong 등, Cell 65:691 (1991); 및 Lew 등, Cell 66:1197 (1991)]을 통해, 유린의 대식세포 [Matsushine 등. Cell 65:701 (1991)] 및 부갑상선 종양내에 재배열되는 추정 종양유전자 (Montokura 등, Nature 350:512 (1991))내에서 CSF-1에 의해 전사가 자극되는 세포 유전자로서 단리된다. 뒤이어, 2개의 추가 사람 D-타입 사이클린, 즉 사이클린 D2 및 D3가 PCR 및 저도의 -엄격한 혼성화 기술 (Inaba 등, Genomics 13:565 (1992); 및 Xiong 등, Genomics 13:575 (1992))을 이용하여 확인된다. 사이클린 D1은, 일부 B-세포 임파종 및 백혈병에서 면역글로불린 유전자 인핸서에 대한 전좌에 의해 활성화되는 유전자좌인 bcl-1 종양유전자에 유전적으로 연결되어 있고, 이것은 사람 유방암의 15-20% 및 머리와 목이 기원인 편평상피세포암의 25-48%에서의 유전자 증폭 부위에 위치하고 있다.

<2> 그러나, 돌연변이 종양유전자의 생성은 종양 형성에 요구되는 유일한 조건이다; 또한, 종양 발생에는 중요한 제 2 클래스 유전자인, "항-종양유전자" 또는 "종양-억제 유전자"의 추가적인 불활성화가 요구되는 것처럼 보인다. 자연 상태에서, 상기 유전자는 세포 증식을 억제하는 역할을 한다. 상기 유전자가 손상되면, 억제력이 떨어지게 되어, 종양발생이 초래된다. 상기와 같이, 세포 성장의 비조절은 종양유전자의 불활성화 또는 종양 억제 유전자의 불활성화중 하나에 의해 매개될 수 있다 (Weinberg, R.A., (Sept

1988) Scientific Amer. pp 44-51).

<3> 종양유전자 및 종양-억제 유전자는 구별되는 기본 특성을 가진다. 현재까지 확인된 종양유전자는 단지 체세포내에서만 생기기 때문에, 상기 유전자의 효과는 숙주 동물의 생식계열에 전달될 수 없었다.

<4> 전형적인 유전성 암에는 소아의 망막아종이 있다. 상기 망막아종의 발병은 종양 억제 유전자인 망막아종 (RB) 유전자에 의해 결정된다 (Weinberg, R.A., (Sept 1988) Scientific Amer. pp 44-51; Hansen 등, (1988) Trends Genet 4:125-128). RB 대립유전자중 하나가 손상된채로 태어난 개체는 초기 어린시절에 망막아종에 걸리기 쉽게 된다. 상기 감수성이 강한 개체의 체세포중 한 세포내의 제 2 RB 대립유전자의 불활성화 또는 돌연변이는 종양을 형성시키는 분자적 사건으로 보인다 (Cavenee 등, (1983) Nature 305:799-784; Friend 등, (1987) PNAS 84:9059-9063).

<5> RB 종양-억제 유전자는 사람의 13번 염색체상에 편재되어 있다. 상기 돌연변이는 환자의 생식계열을 통해 쉽게 유전될 수 있다 (Cavenee 등, (1986) New Engl. J. Med 314:1201-1207). 상기 종양-억제 유전자의 자연적으로 존재하는 2개의 대립유전자중 단지 하나의 유전자가 돌연변이된 사람은 망막아종에 걸리기 쉽다. 그러나, 종양발생을 위해서는, 2개의 대립유전자중 제 2 유전자가 불활성화되어야 한다 [Knudson (1971) PNAS 68:820-823].

<6> 제 2 종양-억제 유전자는 p53 유전자이다 (Green (1989) Cell 56:1-3; Mowat 등 (1985 Nature 314:633-636). 상기 p53에 의해 엔코딩된 단백질은, SV40 거대 T항원 및 아데노바이러스의 E1B 55kd 단백질과 모두 안정한 복합체를 형성하는 핵단백질이다. 상기 p53 유전자 산물은 상기 단백질과의 결합에 의해 불활성화될 수 있다.

<7> 상기 p53 돌연변이의 원인 및 결과 분석을 기초로 하여, "세포-주기 체크포인트"로서의, 특히 G1 기에서 S 기으로의 세포의 진행을 조절하는 것에 대한 p53의 기능적인 역할에는 세포-주기 기관에 직접 또는 간접적으로 영향을 미칠수 있는 p53이 관련된다. p53 및 세포-주기 간의 특정한 생화학적 연관성에 관한 첫 번째 강력한 증거는, p53에 의해, 예를 들면 G1에서 S 상으로의 세포-주기를 통해 세포를 자극하는데 필요한 사이클린-의존성 키나아제 (CDK)를 저해하는 제 2 단백질, p21의 발현이 분명히 조절된다는 발견이다. 예를 들면, p53 종양 억제물질의 결실에 의한 돌연변이로부터 부분 이상이 초래되는 바와 같이, 비-바이러스성 형질전환은 사이클린/CDK 복합체로부터 p21을 감소시킬 수 있다. [Xiong 등 (1993) Nature 366:701-704]에 기술된 바와 같이, p53에 대한 p21의 유도는 DNA 손상에 대해 세포-주기를 정지시키는 기작을 나타내며, p53의 감소로 인해 p21 세포-주기 저해물질이 감소되어 성장이 비조절될 수 있다.

<8> 세포-주기 조절에서 종양-억제물질로서 RB의 역할은 p53과 유사한 것으로 간주된다. 그러나, 일반적으로 p53이 DNA 손상과 같은 자생적 주위 신호에 반응하는 것으로 간주되므로, RB 단백질은 정상적으로 세포의 증식을 정지시키는 외부 자극, 예를 들면 증식될 수 있는 성장 저해물질에 대해 세포 성장을 조정하는 것에 명백히 관련되어 있다. 정상 세포에 있어서, RB는 세포 주기를 통해 발현되지만, 상기 사이클의 특정한 상에 특이적인 다-인산화된 형태로 존재한다. 보다 고-인산화된 형태는 S 및 G_2/M 동안에 발견되고, 저-인산화된 형태는 G_1 및 성장 정지 상태에서 나타나는 발달 초기 종류이다. 상기 관찰을 기초로 하여, RB가 세포-주기내에 조절 (억제) 활성을 가지는 경우, 상기 활성은 번역후 수준에서 조절되어야 한다는 것이 논의되어 왔다. 따라서, 저-인산화된 RB는 성장-억제 활성을 갖는 형태일 수 있는데, 이는 상기 형태가 G1 및 성장 정지된 세포에서 우세하기 나타나기 때문이다.

<9> 결과적으로, TGF-β 류에 속하는 다양한 파라크린 (paracrine) 성장 저해물질은 RB의 인산화를 방해하고, 늦은 G1 기의 세포를 정지시키는 것으로 인지된다. 현재의 모형은 G1 기 동안에 사이클린-의존성 키나아제 및 특히 사이클린 D-관련 키나아제, 즉 CDK4 및 CDK6가 망막아종 감수성 유전자의 생성물, RB를 인산화시킴으로서, 세포의 성장 저해 효과가 제거된다는 것을 제안한다. TGF-β로 처리하는 경우 저-인산화 상태인 RB가 축적되고, RB-불활성화 바이러스 종양단백질이 발현되는 경우 TGF-β로 유도되는 세포 주기 정지를 방해한다. 유사한 방법으로, 악티빈과 같은 다른 분화 관련 인자는 G1 기의 정지와 관련있는 비인산화된 RB를 축적시킨다.

<10> 최근에, RB 단백질이 CDK4 및 CDK6 모두에 대한 인산화 기질인 것으로 설명되어 왔다 (Serano 등 (1993) Nature 366:704-707; Kato 등 (1993) Genes Dev 7:331-342; 및 Meyerson 등 (1994) Mol Cell Biol 14:2077-2086). 그러나, 현재의 발견 이전에는, RB의 CDK 인산화가 음성적으로 조절되는 방법에 관한 정보가 거의 없었다.

발명의 상세한 설명

<11> 본 발명은 진핵 세포, 특히 포유동물 세포내의 신종의 세포-주기 조절 단백질 ("CCR-단백질")의 발견에 관한 것이다. 본원에 기술된 바와 같이, 상기 종류의 단백질에는 겉보기 분자량이 16kDa인 폴리펩티드 및 겉보기 분자량이 15kDa인 폴리펩티드가 포함되며, 상기 두 폴리펩티드는 각각 세포-주기 진행의 억제물질로 작용하여, 결과적으로 세포 성장을 저해하는 작용을 한다. 상기와 같이, p53 체크포인트에 대한 p21의 역할과 유사하게, 상기 CCR-단백질은 망막아종 (RB)과 공동으로 작용할 수 있다. 또한, 본 발명의 CCR-단백질 종류에는 겉보기 분자량이 13.5 kDa(이하 "p13.5")인 단백질이 포함된다. p16 및 p15와 같이, p13.5는 세포-주기를 조절하는 작용을 하는 것으로 추정된다.

<12> 본 발명의 한 관점에서, 실질적으로 본 발명은 세포 주기 조절 (CCR) 단백질 또는 그것의 단편의 순수한 제조를 특징으로 하며, 완전한 길이의 CCR-단백질의 분자량은 대략 12 내지 20kD, 바람직하게는 13 내지 18ID 이다. 바람직한 구체예에 있어서, 완전한 길이의 CCR-단백질의 겉보기 분자량은 대략 13.5kD, 15kD, 15.5kD 또는 16kD 이다. 바람직한 구체예 있어서, 폴리펩티드의 아미노산은 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 어느 한 서열에 나타난 아미노산 서열과 60% 이상 상동이고; 상기 폴리펩티드의 아미노산은 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 어느 한 서열에 나타난 아미노산 서열과 80% 이상 상동이고; 상기 폴리펩티드의 아미노산은 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 어느 한 서열에 나타난 아미노산 서열과 90% 이상 상동이고; 상기 폴리펩티드의 아미노산은 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 어느 한 서열과 동일하다. 바람직한 구체예에 있어서, 단편은 서열번호 2, 4, 6 또는 8의 연속 아미노산을 5개 이상 포함하고; 상기 단편은 서열

번호 2, 4, 6 또는 8의 연속 아미노산을 20개 이상 포함하고; 상기 단편은 서열번호 2, 4, 6 또는 8의 연속 아미노산을 50개 이상 포함한다. 예를 들면, CCR-단백질은 하기식에 의해 표현되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

Met-Met-Met-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Val-Ala-Xaa-Leu-Leu-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Xaa-Xaa-Asn-Cys-Xaa-Asp-Pro-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Pro-Val-His-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Arg-Leu-Asp-Val-Arg-Asp-Ala-Trp-Gly-Arg-Leu-Pro-Xaa-Asp-Leu-Ala-Xaa-Glu-Xaa-Gly-His-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Leu-Arg-Xaa-Ala-Xaa-Gly

<14> 예를 들어, CCR-단백질을 하기식으로 제시된다:

Met-Asp-Pro-Ala-Ala-Gly-Ser-Ser-Met-Glu-Pro-Ser-Ala-Asp-Trp-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Ala-Arg-Gly-Arg-Val-Glu-Glu-Val-Arg-Ala-Leu-Leu-Glu-Ala-Val-Ala-Leu-Pro-Asn-Ala-Pro-Asn-Ser-Tyr-Gly-Arg-Arg-Pro-Ile-Gln-Val-Met-Met-Met-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Val-Ala-Xaa-Leu-Leu-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Xaa-Xaa-Asn-Cys-Xaa-Asp-Pro-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Pro-Val-His-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Arg-Leu-Asp-Val-Arg-Asp-Ala-Trp-Gly-Arg-Leu-Pro-Xaa-Asp-Leu-Ala-Xaa-Glu-Xaa-Gly-His-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Leu-Arg-Xaa-Ala-Xaa-Gly-Gly-Thr-Arg-Gly-Ser-Asn-His-Ala-Arg-Ile-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Pro-Ser-Asp-Ile-Pro-Asp;

<16> 또는, 대안적으로 하기식으로 제시된다:

Met-Arg-Glu-Glu-Asn-Lys-Gly-Met-Pro-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Asp-Glu-Gly-Leu-Ala-Thr-Pro-Ala-Arg-Gly-Leu-Val-Glu-Lys-Val-Arg-His-Ser-Trp-Glu-Ala-Gly-Ala-Asp-Pro-Asn-Gly-Val-Asn-Arg-Phe-Gly-Arg-Arg-Ala-Ile-Gln-Val-Met-Met-Met-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Val-Ala-Xaa-Leu-Leu-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Xaa-Xaa-Asn-Cys-Xaa-Asp-Pro-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Pro-Val-His-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Arg-Leu-Asp-Val-Arg-Asp-Ala-Trp-Gly-Arg-Leu-Pro-Xaa-Asp-Leu-Ala-Xaa-Glu-Xaa-Gly-His-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Leu-Arg-Xaa-Ala-Xaa-Gly-Asp,

<18> 또는, 다른 구체예에서 하기식으로 제시된다:

Met-Met-Met-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Val-Ala-Xaa-Leu-Leu-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Xaa-Xaa-Asn-Cys-Xaa-Asp-Pro-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Pro-Val-His-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Xaa-Xaa-Gly-Ala-Arg-Leu-Asp-Val-Arg-Asp-Ala-Trp-Gly-Arg-Leu-Pro-Xaa-Asp-Leu-Ala-Xaa-Glu-Xaa-Gly-His-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Leu-Arg-Xaa-Ala-Xaa-Gly-Cys-Ser-Leu-Cys-Ser-Ala-Gly-Trp-Ser-Leu-Cys-Thr-Ala-Gly-Asn-Val-Ala-Gln-Thr-Asp-Gly-His-Ser-Phe-Ser-Ser-Ser-Thr-Pro-Arg-Ala-Leu-Glu-Leu-Arg-Gly-Gln-Ser-Gln-Glu-Gln-Ser.

<20> 바람직한 구체예에 있어서, CCR-단백질은 G_1 기의 CDK, 예를 들면 CDK4 및/또는 CDK6와 특이적으로 결합한다. 상기 CCR-단백질은 포유동물 세포, 예를 들면 사람 세포 및 마우스 세포로부터 클로닝될 수 있다.

<21> 본 발명의 또다른 관점에서, 본 발명은 세포-주기 조절의 작용제 또는 길항제중의 하나로 기능하는 CCR-단백질 종류의 폴리펩티드를 특징으로 한다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 CCR-단백질은 사이클린-의존성 키나아제 (CDK), 예를 들면 CDK4 및 CDK6와 특이적으로 결합하고; CDK4 및 CDK6의 키나아제 활성을 저해하고; CDK4에 의한 RB의 인산화를 저해한다. 더욱 바람직한 구체예에 있어서, CCR-단백질은 진핵세포-주기, 예를 들면 사람세포-주기와 같은 포유동물세포-주기를 조절하고; 상기 CCR-단백질은 진핵세포, 예를 들면 사람 세포의 증식/세포성장을 저해하고; 상기 CCR-단백질은 진핵 세포, 예를 들면 사람 세포와 같은 포유동물 세포가 G1 기에서 S 기으로 진행되는 것을 저해하고; 상기 CCR-단백질은 사이클린-의존성 키나아제 (CDK), 예를 들면 G1 기에서 활성인 CDK4의 키나아제 활성을 저해하고; 상기 CCR-단백질은, 예를 들면 무손상된 RB 또는 RB류 단백질의 체크포인트를 갖는 종양 세포내에서, 종양 성장을 억제한다. 더욱이, 또한 본 발명의 CCR-단백질은, 외래 인자 및 시토킨에 반응하여 세포-주기의 진행을 조절하는 능력이 있으며, 즉 세포 성장 및/또는 분화의 파라크린 또는 오토크린 조절에서 작용하여, 형질전환 성장 인자-β (TGF-β) 또는 그와 관련된 성장, 분화 또는 형태발생 인자에 반응하는 CDK의 활성화를 저해한다.

<22> 본 발명의 또다른 관점에서, 본 발명은 서열번호중 한 서열에 의해 표현된 아미노산 서열에 상동인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 관한 것이다.

<23> 본 발명의 또다른 관점에서, 본 발명은 면역원성 제조물내에서 본 발명의 CCR-단백질 또는 그것의 단편을 포함하여, CCR-단백질에 대해 특이적인 면역 반응, 예를 들면 항체 반응과 같은 체액성 반응 및 세포성 반응을 유도시킬 수 있는 면역원에 관한 것이다.

<24> 본 발명의 또다른 관점에서, 본 발명은 재조합형 CCR-단백질, 또는 그것의 단편을 특징으로

하며, 바람직하게 상기 CCR-단백질 또는 그것의 단편은 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열에 제시된 아미노산 서열과 60% 이상, 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상, 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상 상동이거나, 또는 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 어느 하나의 서열에 제시된 아미노산 서열과 동일하다. 바람직한 구체예에 있어서, 단편은 서열번호 2, 4, 6 또는 8의 연속 아미노산 잔기를 5개 이상; 20개 이상; 또는 50개 이상을 포함한다. 바람직한 구체예에 있어서, 재조합형 CCR-단백질은 세포-주기 조절의 작용제 또는 길항제중의 하나로 기능한다. 더욱 바람직한 구체예에 있어서, CCR-단백질은 사이클린-의존성 키나아제 (CDK), 예를 들면 CDK4 및 CDK6와 특이적으로 결합하고; CDK4 및 CDK6의 키나아제 활성을 저해하고; CDK4에 의한 RB 단백질의 인산화를 저해한다. 더욱 바람직한 구체예에 있어서, CCR-단백질은 진핵세포-주기, 예를 들면 사람세포-주기와 같은 포유동물세포-주기를 조절하고; 상기 CCR-단백질은 진핵 세포, 예를 들면 사람 세포의 증식/세포성장을 저해하고; 상기 CCR-단백질은 진핵 세포, 예를 들면 사람 세포와 같은 포유동물 세포가 G1 기에서 S 기로 진행되는 것을 저해하고; 상기 CCR-단백질은 사이클린-의존성 키나아제 (CDK), 예를 들면 G1 기에서 활성인 CDK4의 키나아제 활성을 저해하고; 상기 CCR-단백질은, 예를 들면 무손상된 RB 또는 RB류 단백질의 체크포인트를 갖는 종양 세포내에서, 종양 성장을 억제한다.

<25> 다른 바람직한 구체예에 있어서, 재조합형 CCR-단백질은 서열번호 2, 4, 6 또는 8의 단백질과 무관한 단백질로부터의 아미노산 서열을 갖는 제 2 폴리펩티드 부분을 추가로 포함하는 융합 단백질이다. 상기 융합 단백질은 2-혼성체 검정에서 작용할 수 있다.

<26> 본 발명의 다른 관점에서, 실질적으로 본 발명은 CCR-단백질 또는 그것의 단편을 엔코딩시키고, 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열의 아미노산 서열과 60% 이상 상동인 누클레오티드 서열을 갖는 순수 핵산을 제공한다. 더욱 바람직한 구체예에 있어서, 상기 핵산은 서열번호 2의 아미노산 서열과 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 상동이고; 상기 핵산은 서열번호 6의 아미노산 서열과 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 상동인 단백질을 엔코딩시킨다. 상기 핵산은 사이클린-의존성 키나아제(CDK), 예를 들면 CDK4 및 CDK6와 특이적으로 결합하고; CDK4의 키나아제 활성을 저해하고; CDK4에 의한 RB 단백질의 인산화를 저해하는 CCR-단백질을 엔코딩시키는 것이 바람직하다.

<27> 다른 구체예에 있어서, 상기 핵산은 엄격한 조건하에서 서열번호 1의 12개 이상; 바람직하게는 20개 이상; 보다 더 바람직하게는 40개 이상의 연속하는 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로우브와 혼성화된다.

<28> 다른 추가의 구체예에서, 핵산이 엄격한 조건하에서 서열번호 5중 12개 이상; 바람직하게는 20개 이상; 보다 더 바람직하게는 40개 이상의 연속하는 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로우브와 혼성화된다.

<29> 다른 추가의 구체예에 있어서, 상기 핵산은 엄격한 조건하에서 서열번호 3의 12개 이상; 바람직하게는 20개 이상; 보다 더 바람직하게는 40개 이상의 연속하는 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로우브와 혼성화된다.

<30> 다른 추가의 구체예에 있어서, 상기 핵산은 엄격한 조건하에서 서열번호 7의 12개 이상; 바람직하게는 20개 이상; 더욱 바람직하게는 40개 이상의 연속하는 누클레오티드에 상응하는 핵산 프로우브와 혼성화된다.

<31> 또한, 특정한 구체예에 있어서, CCR 핵산은 전사 조절 서열, 예를 들면 CCR-유전자 서열과 작동가능하게 결합된 전사 프로모터 또는 전사 인핸서 서열을 포함하여, 재조합형 CCR-유전자 서열이 발현 벡터로 사용되게 한다.

<32> 또한, 본 발명은 이식유전자를 가진 사람 이외의 동물, 예를 들면 사람으로부터 유래된 이종 CCR-유전자를 발현시키거나, 또는 그자신의 CCR-유전자를 오-발현시키는, 즉 p16, p15 또는 p13.5의 발현이 중단되는 마우스를 특징으로 한다. 상기 유전자이식 동물은 돌연변이되거나 또는 오-발현된 CCR 대립유전자를 포함하는 세포성 질환을 연구하는 동물 모형으로 이용될 수 있다.

<33> 또한, 본 발명은 실질적으로 정제된 올리고누클레오티드를 포함하는 프로우브/프라이머를 제공하며, 상기 올리고누클레오티드는 엄격한 조건하에서 서열번호 1, 3, 5 또는 7중 한 서열의 센스 또는 앤티센스인 10개 이상의 연속 누클레오티드 또는 그것의 자연-발생적인 돌연변이체와 혼성화되는 누클레오티드 서열의 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에 있어서, 상기 프로우브/프라이머는, 이것에 부착되어 검출될 수 있는 표지 군을 더 포함하며, 상기 표지는 방사성 동위 원소, 형광화합물, 효소 및 효소 조-인자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 프로우브는 형질전환된 세포를 확인하기 위한, 즉 환자로부터 단리된 세포 시료내에서 핵산을 엔코딩시키는 p16, p15 또는 p13.5의 수준을 측정하고; 세포내의 mRNA 수준을 측정하고, 게놈성 CCR 유전자가 돌연변이되거나 또는 결실되는지의 여부를 결정하기 위한, 진단용 시험 키트의 부분으로서 사용될 수 있다.

<34> 또한, 본 발명은, CDK, 예를 들면 CDK4의 키나아제 활성을 저해할 수 있는 제제의 치료적 유효량을 투여시키는 것을 포함하는, 야생형 CCR-단백질 기능의 상실을 특징으로 하는 바람직하지 못한 세포 성장을 갖는 동물의 치료 방법을 제공한다. 한 가지 구체예에 있어서, 상기 방법은 CCR 단백질, 예를 들면 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열로 표현되는 폴리펩티드와 같은 p16, p15 또는 p13.5를 엔코딩시키는 핵산 구조물을, 상기 구조물이 CCR-결핍 세포에 의해 혼입되고, 상기 폴리펩티드가, 예를 들면 유전자 치료 기술에 의해 발현되는 조건하에서, 투여시키는 것을 포함한다. 또다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 CDK와 결합하여, 상기 CDK를 저해하는 의태적, 예를 들면 펩티드-의태적 CCR을 투여하는 것을 포함한다.

<35> 본 발명의 또다른 관점에서, 본 발명은, 피검자의 조직에서, (i) 서열번호 2, 4, 6 또는 8중 한 서열에 의해 표현되는 단백질 및 그것의 동종물을 엔코딩시키는 유전자의 돌연변이; 또는 (ii) p16, p15 또는 p13.5 유전자와 같은 CCR-유전자의 오-발현중 하나 이상을 특징으로 하는 유전적 병변의 존재 유무를 검출하는 것을 포함하는, 사람 환자인 피검자가 바람직하지 못한 세포 증식을 특징으로 하는 질환의 위험이 있는 지의 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에 있어서, 유전적 병변을 검출하는

단계는, 상기 유전자로부터 하나 이상의 누클레오티드의 결실, 상기 유전자로의 하나 이상의 누클레오티드의 첨가, 상기 유전자의 하나 이상의 누클레오티드의 치환, 상기 유전자의 총 염색체 재배열, 상기 유전자의 mRNA 전사체의 수준의 총 변화, 상기 유전자의 mRNA 전사체의 비-야생형 스플라이싱 패턴의 존재 또는 상기 단백질의 비-야생형 수준 중 하나 이상이 존재한다는 것을 확인하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 유전적 병변을 검출하는 단계는, (i) 서열번호 1, 3, 5 또는 7중 한 서열의 센스 또는 안티센스 서열 또는 그것의 자연-발생적인 돌연변이와 혼성화되는 누클레오티드의 서열 영역을 함유하는 올리고누클레오티드를 포함하는 프로우브/프라이머를 제공하는 단계; (ii) 상기 프로우브/프라이머를 조직의 핵산에 노출시키는 단계; 및 (iii) 상기 프로우브/프라이머를 상기 핵산과 혼성화시킴에 의해 유전적 병변의 존재 유무를 검출하는 단계를 포함하며; 예를 들면, 상기 병변을 검출하는 단계는, 프로우브/프라이머를 사용하여 CCR-유전자 및, 선택적으로, 플랭킹 핵산 서열의 누클레오티드 서열을 결정하는 것을 포함하거나; 중합효소 사슬 반응 (PCR)에서 상기 프로우브/프라이머를 사용하는 것을 포함하거나; 연결 사슬 반응 (LCR)에서 상기 프로우브/프라이머를 사용하는 것을 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 상기 단백질의 수준은 면역검정에서 검출된다.

<36> 본 발명의 또다른 관점에 있어서, 본 발명은 CCR-단백질, 즉 p15 또는 p16과 결합하여, CDK, 즉 CDK4 또는 CDK6와의 결합을 저해하는 펩티드 의태성 CCR-단백질에 관한 것이다. 예를 들면, 의사 펩티드는 VAEIG(V/E)GAYG(T/K)-V(F/Y)KARD 서열을 갖는 펩티드의 유사물이 바람직하고, 헥사-펩티드 V(F/Y)KARD 유사물이 더욱 바람직하고, 테트라펩티드 KARD가 보다 더욱 바람직하다. 이와 같이, CDK4/CDK6의 또다른 펩티드 유사물은 SRTDRE(I/T)K(V/L)TLVFEHVDQDL(R/T)-TYLDK(A/V)PPPG(L/V) 서열에 상응하는 펩티드 또는 의사 펩티드를 포함하는 것이 바람직하고, 헥사-펩티드 FEHVDQ 또는 EHVDQD의 유사물이 더욱 바람직하고, 테트라펩티드 HVDQ 또는 EHVD의 유사물이 보다 더욱 바람직하다. 상기 잔기의 가수분해될 수 없는 펩티드 유사물은, 예를 들면 벤조디아제핀, 아제핀, 치환된 감마 락탐 고리, 케토-메틸렌 의사 펩티드, β-터언(turn) 디펩티드 코아 또는 β-아미노알코올을 사용하여 발생시킬 수 있다.

<37> 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기의 상세한 설명 및 특허청구의 범위로부터 명확해질 것이다. 다른 지시가 없는 경우, 본 발명의 실시에는 본 발명의 기술분야에 있는 통상의 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 유전자이식 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학적 기술이 이용될 것이다. 상기 기술은 하기 문헌에서 충분히 설명된다.

***Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989); *DNA Cloning*, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No. 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).**

<39> 세포-주기를 통한 진행은 신뢰할 만한 세포 복제에 필요한 불연속적 작업을 분리시키는 일련의 비가역적 전이에 의해 마아킹된다. 상기 전이는, 특정 조건이 달성될때 까지 세포-주기를 억제하는 신호에 의해 네거티브적으로 조절된다. 예를 들면, 유사분열의 개시는 불완전-복제된 DNA 또는 DNA 손상에 의해 저해된다. 세포-주기 진행에 대한 상기 제한은, 세포 분열 동안에 유전 정보를 원형으로 보존하는데 필수적이다. 다른 한편, G_1 에서 S상으로의 전이는, 환경신호와 세포 증식을 조화시키고, 상기 전이 후에 세포-주기 진행에 대한 체크는 세포-자율적이 되는 경향이 있다. G_1 동안에 세포-주기 진행을 제한하는 신호 중에서, 세포외 단백질은 세포 증식, 성장 인자 또는 아미노산 고갈, 및 세포-세포 접촉을 제한한다. 상기 시그널링 경로가 파괴되는 경우, 환경 조절로부터 세포 반응을 커플링시키지 못하고, 비제한되는 세포 증식을 초래시킬 수 있다.

<40> 일반적으로, 진핵 세포는 G_1을 통해 S 상으로 전이되는 진행을 위해 사이클린-의존성 키나아제(CDK)가 요구한다. 예를 들면, 포유동물 세포중에서, D- 및 E-타입 사이클린은 모두 G_1 에서 S로의 전이 속도를 제한하고, 미토겐성 성장 인자에 대한 세포 요구를 제거하지 않고 감소시킨다. 그러나, 본 발견 이전에는, 상기 사이클린 및 CDK가 세포 증식을 저해하는 세포내 신호 또는 세포외 신호에 의해 네거티브적으로 조절되는 방법에 관한 정보가 거의 없었다.

<41> 본 발명은, 전형적으로 유사 분열을 통한 세포 진행을 제한하는 기능을 하고, 감수 분열을 통한 세포 진행의 조절과 관련되는, 세포-주기 조절 단백질 (이하 "CCR-단백질"이라 칭함)류의 발견에 관한 것이다. 상기 류에 속하는 것들은 "p16"(또는 "$p16^{INK4a}$")으로 서열번호 2에 제시된 대략 16kd 단백질과 진화적으로 관련되어 있다. 상기 종류에는, 예를 들면 분자량이 대략 15Kd인 폴리펩티드 ("p15") 및 13.5 Kd 폴리펩티드 ("p13.5")가 포함된다. 사람 p16, 사람 p15, 마우스 p13.5 및 마우스 p15 코우딩 서열에 대한 누클레오티드 서열은 각각 서열번호 1, 3, 5 및 7에 제공되어 있다. 대응하는 아미노산 서열은 서열번호

2, 4, 6 및 8에 표현되어 있다. 더욱이, 혼성화 및 면역침전 실험으로부터의 데이터는 CCR-단백질류에 속하는 다른 단백질이 존재한다는 것을 나타내고, 상기 단백질은 특이적으로 스플라이싱된 변형체 뿐만 아니라 진화적으로 분기된 서열을 모두 표현하는 단백질을 포함한다.

<42> 세포-주기 조절에서, 특히 G_1 기에서 활성인 CDK, 즉 CDK4 또는 CDK6를 포함하는, 상기 단백질류에 속하는 단백질의 한 가지 기능은 세포-주기의 다양한 단계동안에 사이클린/CDK 복합체의 활성을 조절하는 것이다. 사이클린/CDK 복합체, 특히 CDK4 또는 CDK6를 포함하는 것들의 활성에 대해 저해 효과를 미치는 p16 및 p15는 모두 하기에 설명된다. 예를 들면, 각 단백질은 생체내에서 사이클린 D1/CDK 복합체의 활성을 저해할 수 있다. 일반적으로 공지된 바와 같이, 사이클린 D1은 증식성 질병과 광범위하게 관련되어 왔다. 결과적으로, 본 발명은 사이클린 D1의 종양유전자 발현으로부터 초래된 세포 증식의 잠재적 저해물질을 확인하는 것이다. 더욱이, CDK의 다양성과 같이, CCR-단백질류에 속하는 단백질의 다양성은, 세포-타입 특이적인 조직-타입일 수 있는 각 단백질의 개별적인 역할을 암시하는데, 상기 단백질의 역할은 세포-주기의 다른 포인트에서 발생하고, 다른 세포외 또는 세포내 시그널링 경로의 일부 또는 그것의 조합으로 발생한다.

<43> 하기 실시예에서 설명되는 바와 같이, 특정한 CCR-단백질은, 폐, 유방, 뇌, 뼈, 피부, 방광, 신장, 난소 또는 림프구로부터 유래하는 종양내에서, 고빈도로 결실되거나 또는 돌연변이되는 것으로 보인다. 결과적으로, 본원에서 설명되는 바와 같이, 유전자 치료 또는 의사 CCR, 또는 CDK4 또는 CDK6 활성의 직접 저해에 의한 CCR 단백질 기능의 변화는 상기 증식성 질환을 치료하는 잠재적 치료법이다. 더욱이, 현재의 데이터는 p15의 발현이 형질전환시키는 성장 인자-베타 (TGF-β)를 이용한 치료에 의해 조절되며, 이는 p15가 CDK4 또는 CDK6 키나아제의 저해를 통해 TGF-β 매개성 세포 주기 정지의 작동체로 작용할 수 있다는 것을 설명한다. TGF-β에 대해 감소된 반응성이 많은 증식성 질환에서의 성장 조절의 손실에서 중요한 사건일 수 있다는 최근의 연구결과를 고려하는 경우, 의사 CCR 또는 CCR-유전자 치료, 또는 키나아제의 메카니즘-기초 저해물질에 의해 CDK4/6 활성을 조절하는 연구는 상기 증식성 질환의 치료에 더욱 주목을 끈다.

<44> 따라서, 본 발명은, 예를 들면 조직의 퇴화, 즉 신경 퇴행과 같은 특이적인 질환 뿐만 아니라 종양발생적 세포의 형질전환, 또는 다른 증생 또는 종양 형질전환 작용으로부터 발생하는 증식성 질환을 검출 및 치료에 유용한 진단적 및 치료적 검정, 및 시약을 제조한다. 예를 들면, 본 발명은 변화된 복합체 구성, 및/또는 변화된 수준의 CCR-단백질 발현, 및/또는 CCR-유전자 결실 또는 돌연변이를 검출하여, 형질전환된 세포를 확인하기 위한, 항체 및 핵산 프로우브 같은 유용한 시약을 제조한다. 더욱이, 본 발명은, 예를 들면 상기 CCR-단백질을 엔코딩하는 재조합형 유전자 구조물을 사용하는 유전자 치료법에 의하거나 또는 일반적인 방법으로 이상적으로 증식하는 세포를 저해하는 의사 CCR-단백질을 제공하여, 광범위한 병리적 세포 증식 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

<45> 또한, 상기 단백질을 검정 시스템에서 사용하여, CDK (예를 들면, CDK4 또는 CDK6)와 결합하는 CCR-단백질의 작용력을 감소시켜 사이클린/CDK 복합체의 저해를 제거하거나, 또는 다른 방법으로 CDK 활성화의 CCR-매개성 저해를 방해하거나 의태하는 제제를 확인할 수 있다. 예를 들면 의태 CCR 단백질에 있어서, 사이클린/CDK 복합체 예를 들어, 사이클린 D/CDK4의 활성화를 저해시킴으로서, 세포가 세포-주기를 통해 진행하지 못하게 하여, 최종적으로 세포를 사멸시킬 수 있다. 다른 한편, CDK/사이클린 복합체가 재활성화되는 경우, 이것은 형질전환된 세포에서 발생하는 세포성 사건을 파괴하거나 또는 불균형화시킬 수 있다. 상기 제제는, 예를 들면 종양 바이러스에 의해 형질전환된 세포내의 CDK 복합체를 활성화시키도록 치료적으로 사용될 수 있다. 상기 세포의 치료로 인해, 체크포인트, 예를 들면 망막아종(RB) 체크포인트를 통해 조기 진행이 초래될 수 있고, 유사 분열 변재(세포 사멸) 또는 아포프토시스(apoptosis)를 유도시킬 수 있다.

<46> 본원에서 사용되는 용어인 "핵산"은 데옥시리보핵산 (DNA), 및 적절한 경우, 리보핵산 (RNA)과 같은 폴리누클레오티드를 의미한다. 또한, 상기 용어는 누클레오티드 유사물로부터 제조된 RNA 또는 DNA의 유사물도 균등물로 포함하고, 설명된 구체예에 응용될 수 있는 단일 (센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리누클레오티드도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

<47> 본원에서 사용되는 용어인 "유전자", "재조합형 유전자" 및 "유전자 구조물"은 본 발명의 세포-주기 조절 단백질을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임을 포함하고, 엑손 및 (선택적으로) 인트론 서열을 포함하는 핵산을 의미한다. 바람직한 구체예에 있어서, 핵산은 DNA 또는 RNA이다. 전형적인 재조합 유전자는 서열번호 2에 제시된 p16 단백질, 서열번호 4 및 8에 제시된 p15 단백질, 또는 서열번호 6에 제시된 p13.5 단백질의 전부 또는 CDK-결합 부분을 엔코딩하는 핵산을 포함한다. "인트론"이란 용어는 단백질로 번역되지 않고 일반적으로 엑손 사이에서 발견되는 주어진 CCR-유전자에 존재하는 DNA 서열을 의미한다.

<48> "상동"이란 용어는 두 펩티드 간 또는 두 핵산 분자 간의 서열 유사성을 의미한다. 상동은 비교를 목적으로 정렬될 수 있는 각 서열내의 위치를 비교하여 결정될 수 있다. 비교되는 서열내의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산에 의해 점유되는 경우, 상기 분자는 상기 위치에서 상동이다. 서열 간의 상동의 정도는 상기 서열에 의해 공유되는 정합 또는 상동 위치의 갯수의 함수이다.

<49> "트랜스펙션"이란 용어는 핵산-매개성 유전자 전달 방법으로 예를 들면, 발현 벡터를 사용하여 핵산을 수용성 세포에 도입시키는 것을 의미한다.

<50> 본원에서 사용되는 "형질전환"이란 용어는 세포의 유전형이 외래 DNA 또는 RNA에 세포성 흡수의 결과로 변화되는 방법을 의미하며 예를 들어, 형질전환된 세포는, p16, p15 또는 p13.5와 같은 상기 세포-주기 조절 단백질중 한 단백질의 재조합형을 발현시킨다.

<51> "세포" 또는 "세포 배양물" 또는 "재조합형 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는, 문맥상 명확할 경우에 종종 교환적으로 사용된다. 상기 용어는 본 발명의 세포-주기 조절 단백질을 발현시키는 해당 세포 및 그것의 자손을 포함한다. 예기치 못한 돌연변이 및 환경의 차이로 인해, 세포의 모든 자손이 모세포와 정확하게 일치하지 않는 것으로 이해되어 진다. 그러나, 상기 변화된 자손은, 그것이 본래 형질전환된 세포에 부여된 특성과 관련된 특성을 유지하기만 하면, 상기 용어에 포함된다. 본원에서 그러한 특성은 재조

합된 CCR-단백질을 생산할 수 있는 능력일 수 있다.

<52> 본원에서 사용되는 용어인 "벡터"란, 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. "발현 벡터"란 용어는, 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 엔코딘되는 상기 CCR-단백질을 합성시킬 수 있는, 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는, 그것에 결합된 핵산을 자기 복제 및/발현시킬 수 있는 벡터이다. 본원에 있어서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 벡터의 가장 일반적인 형태로 사용되는 경우, 교환적으로 사용된다. 더욱이, 본 발명은, 동등한 기능을 수행하며, 후속하여 본 발명의 기술 분야에 공지되는 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.

<53> "전사 조절 서열"은, 본원을 통하여, 상기 서열에 작동가능하게 결합되어 있는 단백질 코딩 서열의 전사를 유도하거나 또는 조절하는, 폴리아데닐화 부위 뿐만 아니라 개시 신호, 인핸서 및 프로모터와 같은 DNA 서열을 의미하는 일반적 용어로 사용된다. 바람직한 구체예에 있어서, 재조합형 CCR-유전자의 전사는, 발현이 의도되는 세포-타입내의 재조합형 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 서열 (또는 다른 전사 조절 서열)의 조절하에 있다. 또한, 상기 재조합형 유전자가, 자연-발생적인 형태의 조절 단백질의 전사를 조절하는 서열과 동일하거나 또는 다른 전사 조절 서열의 조절하에 있을 수 있는 것으로 이해되어질 것이다.

<54> "조직-특이적인 프로모터"라는 용어는, 프로모터로 작용하여, 예를 들면 상기 프로모터에 작동가능하게 결합된 선별된 DNA 서열의 발현을 조절하고, 신경 계통의 세포, 즉 교질 세포 또는 다른 방법으로는 멜라닌 세포와 같은 상피 세포와 같이 조직의 특이적인 세포내에서 선별된 DNA 서열을 발현시키는, DNA 서열을 의미한다. 한 가지 구체예에 있어서, 교질-특이적인 프로모터를 사용하는 유전자 구조물은, 유전자 치료법의 부분으로 사용되어, 단지 교질 조직내에서 상기 단백질을 발현시키는 조직-특이적인 프로모터인 유전자 구조물의 특징을 갖는 교종 세포내에서 상기 CCR-단백질중 한 단백질의 재조합형을 발현시킬 수 있다. 또한, 상기 용어는 주로 한 조직내에서 선별된 DNA의 발현을 조절하고, 다른 조직내의 DNA도 발현시키는 소위 "리키(leaky)" 프로모터를 포함한다.

<55> 본원에서 사용되는 용어인 "유전자이식 동물"이란, 동물의 하나 이상의 세포가, 본 발명의 기술분야에 널리 공지된 이종 핵산을 함유하는, 바람직하게는 사람이외의 포유동물인 모든 동물을 의미한다. 상기 핵산은, 세포 전구체내로의 도입에 의해, 마이크로인젝션과 같은 계획적인 유전자 조작에 의해, 또는 재조합형 바이러스로의 감염에 의해, 직접 또는 간접적으로 세포내로 도입된다. 유전자 조작이란 용어는, 고전적인 교잡-육종, 또는 체외 수정을 포함하기 보다는, 재조합형 DNA 분자의 도입을 의미한다. 상기 분자는 염색체내에 통합되거나, 염색체외적으로 DNA를 복제할 수 있다. 본원에 기재된 전형적인 유전자이식 동물에 있어서, 상기 이식유전자로 인해 세포는 상기 CCR 단백질의 재조합형을, 예를 들면 작용성 또는 길항성 형태로 발현시키거나, 내생 CCR-유전자는 파괴된다. 그러나, 또한 재조합형 CCR-유전자가 사일런트한, 유전자이식 동물이, 예를 들면 하기에 기술된 FLP 또는 CRE 재조합효소-의존성 구조물로서 숙고된다. 본 발명의 "사람 이외의 동물"에는 설치동물, 사람 이외의 영장류, 양, 개, 소, 양서류, 파충류 같은 포유동물이 포함된다. 상기 사람 이외의 동물은 쥐 및 마우스를 포함하는 설치동물로부터 선택되는 것이 바람직하고, 이중 마우스가 가장 바람직하다. 본원에서 사용되는 용어인 "키메라 동물"이란, 재조합형 유전자가 발견되거나, 또는 상기 재조합형 유전자가 동물의 전체 세포 또는 일부 세포에서 발현되는 동물을 의미한다. "조직-특이적인 키메라 동물"이란, 재조합형 CCR-유전자가 일부 조직에서 존재 및/또는 발현되거나, 파괴되는 동물을 의미한다.

<56> 본원에서 사용되는 용어인 "이식유전자"란, 이식유전자가 도입되는 동물 또는 세포에 부분적으로 또는 전체적으로 이종이거나 또는 이식유전자가 도입되는 유전자이식 동물 또는 세포의 내생 유전자와 상동인, 예를 들면 외래인 핵산 서열(예를 들면 CCR-폴리펩티드를 엔코딩하는)을 의미하며, 상기 핵산 서열은 그것이 삽입되는 세포의 게놈을 변화시키도록 동물의 게놈내로 삽입되도록 설계된다 (예를 들면 상기 핵산 서열은 본래 유전자의 위치와는 다른 위치에 삽입되거나 또는 상기 삽입으로 인해 녹아웃(knockout)이 야기된다). 이식유전자는 선택된 핵산의 최적 발현을 위해 필요한, 하나 이상의 전사 조절 서열 및 인트론 같은 다른 핵산을 포함한다.

<57> 본원에서 사용되는 용어인 "형질전환시키는 성장 인자-β" 및 "TGF-β"란, 포유동물에 편재되어 발견되는 구조적으로 관련된 파라크린 폴리펩티드의 종류 및 후생동물의 성장, 분화 및 형태형성 인자의 광범위한 종류의 원형을 의미한다 (참조: 재조사를 위한, Massaque 등 (1990) Ann Rev Cell Biol 6:597-641; 및 Sporn 등(1992) J Cell Biol 119:1017-1021).

<58> CCR-단백질을 엔코딩하는 핵산 서열에 대해, "진화적으로 관련된"이란, 자연-발생적 돌연변이를 포함하는 유기체내에서 자연-발생된 핵산 서열을 의미한다. 일반적으로, p16 단백질과 진화적으로 관련된 단백질을 엔코딩하는 유전자는 안키린류 복제물의 일반적 특징 및 사이클린-의존성 키나아제와의 결합력에 의해 인식될 수 있다. 더욱이, "진화적으로 관련된"이란, 자연-발생적인 CCR-단백질로부터 유래되고, 예를 들면 하기에 기술된 조합적 돌연변이 유발 기술과 같은 돌연변이 유발에 의해 변화되며, 여전히 하나 이상의 CCR-단백질 활성을 갖는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 의미한다. 예를 들면, p16 서열은, p15 및/또는 p13.5 서열과의 정렬로부터 유래된 아미노산 치환을 기초로 한 돌연변이 유발에 의해 변화될 수 있다.

<59> 본 발명의 한 관점에 있어서, 본 발명은 CCR-단백질, 그것의 단편 및 하나 이상의 CCR-단백질의 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 핵산 및/또는 상기 핵산의 균등물에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 용어인 핵산이란, 상기 단편 및 균등물을 포함하는 것을 의미한다. 균등물이란, 기능적으로 동등한 CCR-단백질 또는 본원에 기재된 바와 같은 CCR-단백질의 활성을 갖는 기능적으로 동등한 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 동등한 누클레오티드 서열에는, 하나 이상의 누클레오티드 치환, 부가 또는 결실에 의해 구별되는 서열이 포함되고; 또한 유전 암호의 변질로 인해, 서열번호 2에 의해 나타나는 p16 단백질, 서열번호 4 및 8에 의해 나타나는 p15 단백질, 또는 서열번호 6에 의해 나타나는 p13.5 단백질을 엔코딩하는 누클레오티드 서열이 포함된다. 또한, 균등물에는 엄격한 (stringent) 조건 (예를 들면 약 1M의 염농도에서 형성된 DNA 이중체의 융점 (Tm) 이하인 약 20 - 27℃에 상응하게)하에서, 서열번호 1, 3, 5 또는 7에 나타난 CCR-유전자의

누클레오티드 서열과 혼성화되는 누클레오티드 서열이 포함된다. 한 가지 구체예에 있어서, 상기 균등물에는 서열번호 1, 3, 5 또는 7 중 한 서열에 나타나는 누클레오티드 서열로부터 유래되거나, 또는 진화적으로 관련된 핵산 서열이 포함된다.

<60> 또한, 본원에서 DNA 또는 RNA와 같은 핵산에 관해 사용되는 바와 같은, "단리된" 분자란 천연 거대분자원에 존재하는 다른 DNA 또는 RNA로부터 각각 분리되는 분자를 의미한다. 예를 들어, 상기 CCR-단백질 중 한 단백질을 엔코딩하는 단리된 핵산은, 바람직하게는 본래 게놈 DNA내 CCR-유전자에 직접 플랭킹되는 10 킬로염기(kb) 이하의 핵산을 포함하고, 더욱 바람직하게는 5kb 이하의 상기 자연-발생적 플랭킹 서열을 포함하며, 가장 바람직하게는 1.5kb 이하의 상기 자연-발생적 플랭킹 서열을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 단리된 이란 용어는, 재조합형 DNA 기술에 의해 제조되는 경우에 세포성 물질 또는 배양 보존물질이 없는 핵산 또는 펩티드에 관해 사용되고, 화학적으로 합성되는 경우에 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 없는 핵산 또는 펩티드에 관해 사용된다. 더욱이, "단리된 핵산"이란, 단편으로 자연-발생되지 않고, 자연 상태로 발견되지 않는 핵산 단편을 포함하는 것을 의미한다.

<61> 본원에서 세포-주기 조절 단백질의 활성을 갖는 것으로 언급되는 폴리펩티드는 서열번호 2에 나타나는 p16 단백질의 아미노산 서열의 전부 또는 일부와 상동인 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다. 전형적인 폴리펩티드에는 서열번호 4 또는 8중 어느 하나의 서열에 나타나는 p15 단백질, 서열번호 6에 나타나는 p13.5 단백질, 또는 상기 단백질 중 하나의 이소폼(특이한 스플라이싱 변형체를 포함하는)가 포함된다. 바람직한 구체예에서, CCR-단백질의 생물학적 활성에는 하기 중 하나 이상이 포함된다: (i) 진핵 세포-주기, 즉 사람 세포-주기와 같은 포유동물 세포-주기를 조절하는 능력; (ii) 진핵 세포, 즉 사람 세포와 같은 포유동물 세포의 증식/성장을 저해하는 능력; (iii) G1상에서 S상으로의 진핵 세포, 즉 사람 세포와 같은 포유동물 세포의 진행을 저해하는 능력; 및/또는 (iv) 예를 들면 사이클린-의존성 키나아제에 의해 망막아종 (RB) 또는 망막아종-류 단백질의 인산화를 저해하는 능력과 같이, 사이클린-의존성 키나아제 (CDK), 즉 CDK4 및 CDK6와 같은 G1 상에서 활성인 CDK의 키나아제 활성을 저해하는 능력. 더욱이, 또한, 본 발명의 CCR-단백질은 하기와 같은 생물학적 활성을 포함한다: 종양, 즉 무손상된 RB 단백질을 갖는 종양의 성장을 억제하는 능력; 세포 성장 및/또는 분화의 파라크린 또는 오토크린 조절에서 기능적이고, 형질전환 성장 인자-β (TGF-β) 또는 그것과 관련된 성장, 분화 또는 형태형성 인자에 대한 CDK 활성화를 저해하는, 세포외 인자 및 시토카인에 대해 세포-주기 진행을 조절하는 능력. 상기 관점에서, 또한 본 발명의 CCR-단백질은 세포/조직의 탈-분화를 억제하는 기능도 할 수 있다. 상기 CCR-단백질의 다른 생물학적 활성은 본원에 기재되어 있거나, 본원에 의해 본 발명의 당업자에게는 명백해 질 것이다.

<62> 더욱이, 일반적으로, 특정 환경하에서는, CCR-단백질의 생물학적 활성의 부분만이 작용제 또는 길항제로 기능하는 특정 CCR-단백질의 자연-발생적 형태의 동족체를 제공하는 것이 유리한 것으로 생각된다. 상기와 같이, 제한된 기능을 가지며, 상기 단백질의 모든 생물학적 활성에 대해 유도된 작용제 또는 길항제를 이용한 처리에 대해 부작용이 거의 없는 동족체로 처리하여, 특이적인 생물학적 효과를 유도시킬 수 있다. 예를 들면, 실질적으로 CDK6의 활성화를 간섭하지 않고 CDK4와 결합하여 CDK4의 활성화를 저해하는 p16 동족체가 생성될 수 있다.

<63> 한 가지 구체예에서, 본 발명은 p16 단백질의 작용제 또는 길항제이며 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 엔코딩한다. 바람직한 핵산은 p16 단백질 활성을 가지며 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상 상동인 펩티드를 엔코딩한다.

<64> 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산은 p15 단백질의 작용제 또는 길항제인 펩티드를 엔코딩하며, 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. p15 단백질 활성을 가지며 서열번호 4 및 8에 제시된 아미노산 서열과 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상 상동인 펩티드를 엔코딩하는 핵산이 본 발명의 범위에 속한다. p15 단백질 활성을 가지며 서열번호 4 및 8에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98-99% 이상 상동인 펩티드를 엔코딩하는 핵산이 본 발명의 범위에 속한다. 대표적인 구체예에 있어서, 상기 핵산은 서열번호 3 또는 7에 제시된 p15 단백질을 엔코딩하는 누클레오티드 서열의 일부 이상을 포함하는 cDNA 분자이다. 서열번호 3 또는 7에 제시된 cDNA 분자의 바람직한 부분은 상기 분자의 코딩 영역을 포함한다.

<65> 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 핵산은 p13.5 단백질 활성을 가지며, 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 엔코딩한다. 바람직한 핵산은 p13.5 단백질 활성을 가지며, 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 60% 이상, 더욱 바람직하게는 70% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상 상동인 펩티드를 엔코딩한다. CDK와 결합하는 능력과 같은, p13.5 단백질 활성을 가지며, 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98-99% 이상 상동인 펩티드를 엔코딩하는 핵산이 본 발명의 범위에 속한다. 바람직하게는, 상기 핵산이 서열번호 5에 제시된 p13.5 단백질을 엔코딩하는 누클레오티드 서열의 부분 이상을 포함하는 cDNA 분자이다. 서열번호 5에 제시된 cDNA 분자의 바람직한 부분은 분자의 코딩 영역을 포함한다.

<66> 본 발명의 또다른 관점에 있어서, 본 발명은, 매우 엄격한 또는 약간 엄격한 조건하에서, 서열번호 2, 4, 6 또는 8 중 한 서열에 제시된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 갖는 CCR 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산과 혼성화되는 핵산을 제공한다. DNA 혼성화를 촉진시키는 적당히 엄격한 조건, 예를 들면 약 45℃에서 6.0 x 염화나트륨/시트르산 나트륨 (SSC)을 처리한 후에, 50℃에서 2.0 x SSC로 세척 조건은, 본 발명의 당업자에게 공지되어 있거나, [Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 발견될 수 있다. 예를 들면, 세척 단계에서의 염농도는 50℃, 약 2.0 x SSC인 약간 엄격한 조건 내지 50℃, 약 0.2 x SSC인 매우 엄격한 조건에서 선택될 수 있다. 부가하여, 세척 단계에서의 온도는 실온, 약 22℃인 약간 엄격한 조건 내지 약 65℃인 매우 엄격한 조건으로 상승될 수 있다.

<67> 또한, 유전 암호의 축중으로 인한, 서열번호 1, 3, 5 또는 7 중 한 서열에 제시된 누클레오티드 서열과 구별되는 단리된 핵산은 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들면, 다수의 아미노산은 한 개 이상의 삼중체에 의해 표시된다. 동일한 아미노산 또는 유사물 (예를 들면, CAU 및 CAC는 히스티딘에 대한 유사

물이다)을 특정화하는 코돈은 단백질의 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 "사일런트" 돌연변이를 초래시킬 수 있다. 그러나, 상기 CCR-단백질의 아미노산 서열을 변화시키는 DNA 서열 다형성은 진핵세포 중에 존재할 수 있는 것으로 예측된다. 본 발명의 당업자는, CCR-단백질 종류에 속하는 특정한 단백질을 엔코딩하는 핵산의 하나 이상의 누클레오티드 (약 3-4%의 누클레오티드 이하)의 상기 변이가 자연적 대립유전자변이로 인해, 주어진 종의 개체 중에 존재할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기의 모든 누클레오티드 변이 및 최종 아미노산 다형성은 본 발명의 범위에 속하게 된다.

<68> 또한, 표적 CCR-단백질의 생물학적 활성 부분을 엔코딩하는 핵산의 단편이, 본 발명의 범위내에 있다. 본원의, CCR-단백질의 활성 부분을 엔코딩하는 핵산의 단편은, 본원에서 정의된 것과 같이, 완전한-길이의 단백질의 생물학적 활성의 길항제로서 기능하거나, 또는 완전한-길이의 단백질의 생물학적 활성의 최소 일부를 보유하는 펩티드를 엔코딩하고, 예를 들어 서열번호 2, 4, 6 또는 8에 제시된 CCR-단백질의 완전한 길이의 아미노산 서열을 엔코딩하는 누클레오티드 보다 더 적은 누클레오티드를 가지는 누클레오티드 서열을 의미하는 것이다. 본 발명의 범위내의 핵산 단편은, 예를 들어, 표적 CCR-단백질의 동족체를 검출하기 위한 스크리닝 프로토콜에서의 사용을 위하여, 다른 종류로부터의 핵산과 높거나 낮은 엄격한 조건 하에 혼성화할 수 있는 것을 포함한다. 또한 본 발명의 범위내의 핵산은, 링커(linker) 서열, 변형된 제한 엔도누클레아제 부위 및 재조합 펩티드의 분자 클로닝, 발현 또는 정제에 유용한 그밖의 서열을 함유할 수 있다.

<69> 하기 실시예에서 지적되는 바와 같이, CCR-단백질의 활성을 가지는 펩티드를 엔코딩하는 핵산은, 일반적으로 공지되어 있는 것 뿐만아니라, 본원에서 제시되는 프로토콜에 따라, 많은 진핵 세포에 존재하는 mRNA 또는 게놈 DNA로부터 수득될 수 있다. CCR-단백질을 엔코딩하는 cDNA는 예를 들어, 세포 예를 들어, 포유 동물의 세포 예를 들어, 사람 세포로부터 전체 mRNA를 분리함으로써 수득될 수 있다. 그후 이중가닥 cDNA는, 정체 mRNA로부터 제조되고, 그후, 여러 가지 공지된 방법을 사용하여 적합한 플라스미드 또는 박테리오파아지 벡터로 삽입될 수 있다. 또한, CCR-단백질을 엔코딩하는 유전자는, 본 발명에서 제공되는 누클레오티드 서열 정보에 따라 달성되는 중합효소 사슬 반응 방법을 사용하여 클로닝될 수 있다. 다른 방법으로, 첨부된 실시예에서 기술되는 2 개의 혼성체 검정은 예를 들어, 안키린(ankyrin)-류 반복체를 가지고, CDK6과 같은, 사이클린 의존 카나아제와 결합하는 다른 p16 동족체의 확인에 사용될 수 있다.

<70> 바람직한 핵산은, 서열번호 1에 제시된 서열에 cDNA 상동성을 가진다. 그밖의 바람직한 핵산은, 서열번호 3에 제시된 서열을 포함하는 cDNA이고, 또다른 바람직한 핵산은, 서열번호5에 제시된 서열을 포함하는 cDNA이다.

<71> 본 발명의 다른 측면은, "안티센스" 치료법에서의 분리된 핵산의 사용에 관한 것이다. 본원의 "안티센스" 치료법은 예를 들어, 전사 및/또는 번역을 저해함으로써 단백질의 발현을 저해하기 위해, CCR-단백질을 엔코딩하는 세포 mRNA 및/또는 게놈 DNA과 세포 조건 하에 특이적으로 혼성화(예를 들어, 결합)하는 올리고누클레오티드 프로우브 또는 이들의 유도체의 원 발생 또는 투여를 의미한다. 상기 결합은, 통상의 염기쌍 상보성에 의해, 또는 예를 들어, DNA 이중체에 결합하는 경우, 이중 헬릭스의 주요 그루브 (groove)에서의 특이적 상호 작용을 통하여 일 수 있다. 일반적으로, "안티센스" 치료법은 당업에서 일반적으로 사용되는 범위의 방법을 의미하고 올리고누클레오티드 서열로의 특이적 결합에 의존적인 모든 치료법을 포함한다.

<72> 본 발명의 안티센스 구성체는 예를 들어, 세포내에서 전사될 경우에 CCR-단백질을 엔코딩하는 세포 mRNA의 단일 부분 이상에 상보적인 RNA를 생성시키는 발현 플라스미드로서 전달될 수 있다. 다른 방법으로 안티센스 구성체는 생체외에서 발생되고 세포내로 도입될 경우에, 표적 CCR 단백질 중 하나를 엔코딩하는 mRNA 및/또는 게놈 서열과 혼성화함으로써 발현의 저해를 야기하는 올리고누클레오티드 프로우브이다. 상기 올리고누클레오티드는, 내인성 누클레아제, 예를 들어 엑소누클레아제 및/또는 엔도누클레아제에 내성이고, 그리하여 생체내에서 안정한 바람직하게 변형된 올리고누클레오티드이다. 안티센스 올리고누클레오티드로서의 사용을 위한 핵산의 예는, DNA의 포스포라미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 동족체이다 (미국 특허 제 5,176,996; 5,264,564; 및 5,256,775). 추가적으로, 안티센스 치료법에 유용한 올리고머를 구성하기 위한 일반적 접근은, 예를 들어 하기 문헌에 제시되어 있다 [참고 문헌: Van der krol et al. (1988) *Biotechnizques* 6:968-976; and Stein et al. (1988) *Cancer Res* 48:2659-2668].

<73> 따라서, 본 발명의 변형된 올리고머는 치료, 진단 및 연구에 유용하다. 치료학적 적용에서, 상기 올리고머는 일반적 안티센스 치료법에 적당한 방법으로 사용된다. 이러한 치료에서, 본 발명의 올리고머는 조직 및 경피 또는 국부 투여를 포함하여, 다양한 투여 방식을 위해 제형화될 수 있다. 방법 및 제형물은 일반적으로 하기 문헌에서 발견할 수 있다 [참고 문헌: Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA.]. 조직 투여에서, 근육내, 정맥내, 복강내 및 피하를 포함한 주입이 바람직하고, 본 발명의 올리고머는 액상 용액, 바람직하게는, 행크 용액 (Hank's solution) 또는 링게르 용액 (Ringer's solution)과 같은 생리학적으로 허용될 수 있는 완충액 중에서 제형화될 수 있다. 추가적으로, 상기 올리고머는 고형으로 제형되고 사용 직전에 용해되거나 또는 현탁될 수 있다. 또한 친핵성 형태가 또한 포함된다.

<74> 또한, 조직 투여는 경점막 또는 경피 수단에 의해서 일 수 있거나 또는 화합물이 경구적으로 투여될 수 있다. 경점막 또는 경피 투여에서, 투과를 용이하게 하기 위해 투과 장애물에 적당한 침투제가 사용할 수 있다. 상기 침투제는 이미 공지되어 있고 예를 들어, 경점막 투여를 위해 빌 (bile) 염 및 푸시드산 유도체에 포함한다. 그외에 투과를 용이하게 하기 위해 청정제가 사용할 수 있다. 경점막 투여는 경비 스프레이를 통하여 또는 좌약을 사용하여 수행될 수 있다. 경구적 투여를 위해, 올리고머는 캡슐, 정제 및 강장약과 같은 통상의 경구적 투여 형태로 제형화된다. 경피 투여를 위해, 본 발명의 올리고머는 일반적으로 공지되어 있는 것과 같이 연고, 고약 겔 또는 크림으로 제형화된다.

<75> 바람직한 안티센스 올리고누클레오티드는 CCR 유전자의 모든 또는 단일 단편을 함유한다. 상기 단편의 길이는 예를 들어 10, 20, 50, 75 또는 100 누클레오티드일 수 있다. 선택되는 서열의 단일성은 모든 그밖의 비-CCR 유전자에 관련될 수 있고 예를 들어, 상기와 같은 안티센스 핵산이 생리학적 조건 하

에 수개의 CCR 유전자/메신저에 혼성화하거나, 상기 구성체가 예를 들어, 수개의 CCR 유전자 중에 단일한 서열을 선택함으로써 CCR 유전자 하나 또는 이것의 특이적 하위 세트에 단일하게 혼성화하는 것으로 선택될 수 있다.

<76> 치료법에서의 사용 이외에, 본 발명의 올리고머는 이들이 특이적으로 결합하는 표적 DNA 또는 RNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하는 진단학적 시약으로서 사용할 수 있다. 이러한 진단학적 시험은 하기에서 상세하게 기술된다.

<77> 또한, 본 발명은 표적 세포-주기 조절 단백질을 엔코딩하고, 하나 이상의 조절 서열에 실시 가능하게 결합되는 누클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 실시 가능한 결합은 누클레오티드 서열이 누클레오티드 서열의 발현을 가능하게하는 방식으로 조절 서열에 결합되는 것을 의미하는 것이다. 조절 서열은 CCR-단백질의 활성을 가지는 펩티드의 직접적 발현에 대하여 인지되고 선택된다. 따라서, 조절 서열은, 프로모오터, 인핸서 및 그밖의 발현 조절 요소이다. 조절서열의 예는 하기 문헌에 기술되어 있다[참고 문헌: Goeddel, *Gene Expression Technology*: Methods in *Enzymology* 185. Academic Press, San Diego, CA (1990)]. 예를 들어, 기능적으로 결합될 경우에 DNA 서열의 발현을 조절하는 광범위한 발현 조절 서열-서열은 이러한 벡터에서 본 발명의 CCR-단백질을 엔코딩하는 DNA 서열을 발현시키는 데에 사용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열은 예를 들어, SV40의 전기(early) 및 후기(late) 프로모터, 아데노바이러스 또는 시토메갈로바이러스 매개 전기 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T7 RNA 중합효소에 의해 직접 발현되는 T7 프로모터, 파아지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 피복 단백질을 위한 조절 영역, 3-포스포글리서레이트 키나아제 또는 그밖의 당분해 효소를 위한 프로모터, (Pho5) 산 포스파타아제의 프로모터, 효모 α -메이팅(mating) 인자의 프로모터, 바쿨로바이러스 시스템의 폴리헤드론 프로모터 및, 진핵 또는 원핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 공지된 그밖의 서열 및 이들의 다양한 조합물을 포함한다. 발현 벡터의 디자인이 형질전환되는 숙주 세포의 선택 또는 발현되기에 바람직한 단백질의 유형과 같은 요소에 의존적일 수 있음이 이해되어야 한다. 더욱이, 상기 벡터의 카피 수, 카피 수를 조절하는 능력 및 항체성 마아커와 같은, 상기 벡터에 의해 엔코딩되는 그밖의 단백질의 발현이 고려되어야 한다.

<78> 표적 유전자 구성체는 예를 들어, 정제를 위한, 융합 단백질 또는 펩티드를 포함하는 단백질 또는 펩티드를 생성시키기 위해, 배양으로 증식된 세포내의 표적 CCR-단백질의 발현을 야기시키는 데에 사용될 수 있다. 그외에, 배양된 세포내의 표적 CCR-단백질 또는 이들의 작용 형태의 재조합 발현은, 시험관내에서, 세포의 탈-분화(de-differentiation)를 억제하는 데에 유용할 수 있다. 설명을 위해, 시험관내 뉴우론 배양 시스템은, 신경 영양 (neurotrophic) 인자의 확인 뿐만아니라, 신경 발달의 연구를 위한 기본적이고, 필수적인 수단임이 입증되었다. 뉴우론 세포가 최종적으로-분화되었기 때문에, 이것은 최종적으로 분화된 다른 세포-유형으로 변화되지 않을 것이다. 그러나, 그럼에도 불구하고, 뉴우론 세포는 그들의 분화된 상태를 쉽게 잃어버릴 수 있다. 이러한 사실은, 이들이 성숙 조직으로부터 배양될 경우, 및 재발생 동안 아체를 형성할 경우 일반적으로 관찰된다.

<79> p16 또는 p15의 발현(또는 과발현)을 유지시키는 것과 같이, 대상 CCR-단백질의 기능을 작용화(agonizing)하는 것은, 분화의 여러 단계에서 뉴우론 세포를 유지시키기 위한 적당한 제한 환경을 보장하기 위한 수단을 제공하고 예로서, 영양(trophic) 인자의 특이적 활성을 시험하기 위해 디자인된 세포 배양에서 사용될 수 있다. 분화 유지를 요구하는 그밖의 조직 배양 시스템은 당업자에게 분명할 것이다. 이러한 면에서, CDK4 및 CDK6의 CCR 저해의 작용제 및 길항제는 예를 들어, 이식을 위한 보철 연골 장치의 발생을 강화시키기 위해, 생체외 조직 발생을 위해 사용될 수 있다.

<80> 반대로, CCR-단백질의 CDK와의 결합을 분리시킬 수 있는 제제로의 처리, 안티센스 구성체, 길항 유사체의 발현에 의한 것과 같은, 야생형 CCR-단백질의 활성에 길항 작용을 함으로써, 배양된 세포는 차후의 특정 분화 경로로부터 방지될 수 있고, 중요하게 배양에서 세포의 형질전환을 야기할 수 있다. 유사하게, 하기 기술되는, 우세한 네거티브 CDK4 및 CDK6 돌연변이체는 이러한 CDK 돌연변이체가 p16 저해에 영향을 받지 않고 p16의 효과적인 길항제이기 때문에 세포성 형질전환을 야기하는 데에 사용될 수 있다. 세포 성장을 촉진시키는 CCR 길항제의 능력은 사람 세포의 시험관내 성장이 매우 어렵다는 관찰에서 특히 중요하다. 따라서, 이러한 제제는 일차 세포 배양으로부터 세포를 형질전환시키고 특정 예에서, 불멸화시키는데에 유용하다.

<81> 더욱이, 또는 대상 유전자 구성체는, CCR-단백질의 조절 기능의 더 이상 의존적이지 않은지를 측정하기 위한 진단학적 검정에서 예를 들어, 형질전환된 세포의 표현형을 측정하는 데에 사용될 수 있다. 예시 하면, 환자의 조직으로부터의 세포의 샘플을 수득하고 적당한 세포 배양 배지에 분산시킬 수 있으며, 샘플내의 세포의 일부는 예를 들어, p16, p15 또는 p13.5 발현 벡터의 트랜스펙션 및 평가된 차후의 세포 성장에 의해 재조합 CCR-단백질의 발현을 야기시킬 수 있다. CCR-단백질의 발현에도 불구한 세포의 증식 능력은 RB-매개 검사점과 같은 CCR-단백질을 포함하는 세포 조절 경로 상의 의존성의 결여를 지시한다. 표적 조직의 특성에 의존적으로 샘플은 예를 들어, 혈액 샘플, 박리된 세포 샘플, 미세한 바늘 흡입물 샘플 또는 생검 조직 샘플로부터 분리된 세포 형태일 수 있다. 초기 샘플이 고체 덩어리일 경우에, 조직 샘플은 공지된 것과 같이 세포가 배양될 수 있도록 세분화되거나 또는 다른 방법으로 분산될 수 있다. 이러한 지식은 진단 및 치료학적 잇점을 가질 수 있다.

<82> 또한, 본 발명은 CCR-단백질의 활성을 가지는 폴리펩티드를 발현시키기 위한 재조합 CCR-유전자로 트랜스펙션된 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 진핵 또는 원핵 세포일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CCR-단백질은 *E. coli*, 곤충 세포(바쿨로바이러스), 효모 또는 포유동물 세포와 같은 박테리아성 세포에서 발현될 수 있다. 그밖의 적합한 숙주 세포는 당업자에게 공지되어 있다.

<83> 본 발명의 그밖의 면은, 진핵 세포 유기체 예를 들어, 포유동물 예를 들어, 사람으로부터 유도된 유전자에 의해 엔코딩되고, CCR-단백질의 하나 이상의 생물학적 활성을 가지거나 자연적으로 돌연변이를 유발시키는 재조합 CCR-단백질에 관한 것이다. "재조합 단백질"은, 일반적으로 CCR-단백질을 엔코딩하는 DNA가 이종성 단백질을 생성시기기 위해 숙주 세포를 형질전환시키는 데에 차례로 사용되는 적합한 발현 벡터에 삽입되는 재조합 DNA 방법에 의해 생성되는 본 발명의 단백질을 의미한다. 더욱이, "~로부터의 유도"는 재조합 CCR-단백질을 엔코딩하는 재조합 유전자에 관하여 "재조합 단백질"의 의미내에서 고유의

CCR-단백질의 아미노산 서열 또는 유기체의 자연 발생 CCR-단백질의 결실 및 치환을 포함하여 돌연변이에 의해 발생되는 유사한 아미노산 서열을 가지는 단백질을 포함하는 의미이다. 예시 하면, 본 발명에 의해 바람직한 재조합 단백질은 고유의 p15 또는 p13.5 단백질 이외에 서열번호 2, 4, 6 또는 8에 제시된 아미노산 서열과 60 % 이상, 더욱 바람직하게는 70 % 이상 및 가장 바람직하게는 80 % 이상의 상동성을 가지는 재조합적으로 생성된 단백질이다. 또한, CDK-결합과 같은, CCR-단백질의 활성을 가지고, 서열번호 2, 4, 6 또는 8과 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 98 내지 99 % 이상의 상동성을 가지는 폴리펩티드가 본 발명의 범위내에 있다. 그밖의 바람직한 구체예에서, 재조합 CCR-단백질은, CDK4 또는 CDK6과 같은 사이클린 의존적 키나아제에 결합하는 능력 및 안키린(ankyrin)-류 반복단위체를 특징으로 할 수 있다. 따라서, 본 발명은 유기체로부터 유도된 유전자에 의해 엔코딩되고, 서열번호 2, 4, 6 또는 8에 의해 제시되는 CCR-단백질에 진화적으로 관련된 아미노산 서열을 가지는 재조합 CCR-단백질에 관한 것이고, 여기에서 "진화적 관련"은 예를 들어, 조합 돌연변이 유발에 의해 유도되는 CCR-단백질의 돌연변이체 뿐만아니라, (예를 들어, 대립 형질 변화 또는 구별 접합에 의해) 자연적으로 발생되는 아미노산 서열을 가지는 CCR-단백질을 의미한다.

<84> 본 발명은, 그밖에 대상 CCR-단백질을 생성시키는 방법에 관련된다. 대상 CCR-단백질의 하나를 엔코딩하는 발현 벡터로 트랜스펙션된 숙주 세포는, 펩티드의 발현을 가능하게하는 적당한 조건 하에 배양될 수 있다. 상기 펩티드는 이들을 함유하는 배지 및 세포의 혼합물로부터 분비되고 분리될 수 있다. 다른 방법으로, 상기 펩티드는 세포질에 의해 보유되고, 세포 수집, 용해 및 단백질 분리될 수 있다. 세포 배양액은 숙주 세포, 배지 및 그밖의 부산물을 포함한다. 세포 배양을 위해 적합한 배지는 당업자에게 공지되어 있다. 펩티드는 표적 CCR-단백질의 특정 에피토프에 특이적인 항체로의 면역친화성 정제, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 울트라필트레이션 및 전기 영동을 포함하는, 공지의 단백질 정제 방법을 사용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 양자 모두로부터 분리될 수 있다. 바람직한 구체예에서, CCR-단백질은 p16-GST, p15-GST 또는 p13.5-GST 융합 단백질과 같은 정제를 용이하게 하는 도메인을 함유하는 융합 단백질이다.

<85> 따라서, 단백질의 선택적 일부 또는 모두를 엔코딩하는 본 발명의 CCR-단백질의 클로닝으로부터 유도된 누클레오티드 서열은 미생물 또는 진핵 세포 과정을 통하여 단백질의 재조합 형태를 생성시키는데에 사용될 수 있다. 발현 벡터와 같은, 유전자 구성체로의 폴리누클레오티드 서열의 연결, 진핵 세포(효모, 조류, 곤충 또는 포유 동물) 또는 원핵 세포 (박테리아 세포)의 숙주로의 형질전환 또는 트랜스펙션은, 그밖의 공지된 단백질, 예를 들어, 인슐린, 인터페론, 사람 성장 호르몬, IL-1, IL-2 등을 생성시키는 데에 사용되는 표준 공정이다. 유사한 공정 또는 이들의 변형은, 본 발명에 따른 미생물학적 수단 또는 조직-배양 방법에 의해, 재조합 CCR-단백질 또는 이들의 일부를 제조하는 데에 사용될 수 있다.

<86> 재조합 CCR-단백질은 클로닝된 유전자 또는 이들의 일부를, 원핵 세포 또는 진핵 세포에서의 발현에 적합한 벡터로 연결시킴으로써 생성될 수 있다. 재조합 CCR-단백질의 생성을 위한 발현 운반체는 플라스미드 및 그밖의 벡터를 포함한다. 예를 들어, 표적 폴리펩티드의 발현에 적합한 벡터는: *E. coli*와 같은 원핵 세포에서의 발현을 위한, pBR322-유도 플라스미드, pEMBL-유도 플라스미드, pEX-유도 플라스미드, pBTac-유도 플라스미드 및 pUC-유도 플라스미드 유형의 플라스미드를 포함한다.

<87> 효모에서의 재조합 단백질의 발현을 위한 많은 벡터가 존재한다. 예를 들어, YEP24, YIP5, YEP52, pYES2 및 YRP17은, 유전적 구성체의, S. *cerevisiae* (참조: Broach et al. (1983) in Experimental Manipulation of *Gene Expression*, ed. *M. Inouye Academic Press*, p. 83, 본원에서 참고로 통합)로의 도입에 유용한 크로닝 및 발현 운반체이다. 이러한 벡터는, 효모 2 미크론 플라스미드의 복제 결정 인자로 인해, S. cerevisiae에서 및 pBR322 ori의 존재로 인해, *E. coli*에서 복제될 수 있다. 추가적으로, 앰피실린과 같은 약제 내성 마아커가 사용될 수 있다.

<88> 바람직한 포유 동물 발현 벡터는 진핵 세포에서 발현되는 하나 이상의 진핵 세포성 전사 단위 및, 박테리아에서 벡터의 증식을 용이하게 하기 위한 진핵 세포성 서열을 함유한다. pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 및 pHyg 유도 벡터는, 진핵 세포의 트랜스펙션에 적합한 포유 동물 발현 벡터의 예이다. 상기 벡터의 일부는 원핵 및 진핵 세포 모두에서 복제 및 약제 내성 선택을 용이하게 하기 위해, pBR322와 같은 박테리아 플라스미드로부터의 서열로 변형한다. 다른 방법으로, 진핵 세포에서의 단백질 일시 발현을 위해 보빈 파필로마 바이러스 (bovine papilloma virus)(BPV-1) 또는 에프스테인-바르 바이러스 (Epstein-Barr virus) (pHEBo, pREP-유도 및 p205)와 같은 바이러스의 유도체를 사용할 수 있다. 그밖의 바이러스성(리트로바이러스 포함) 발현 시스템은, 하기 유전자 치료 전달 시스템의 설명에서 발견될 수 있다. 숙주 유기체의 형질전환 및 플라스미드의 제조에서 사용되는 다양한 방법이 공지되어 있다. 일반적 재조합 공정 뿐만아니라, 진핵 및 원핵 세포에 적합한 그밖의 발현 시스템을 위한 참고 문헌은 하기와 같다 [참고 문헌: Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) Chapters 16 and 17]. 일부 예에서, 바쿨로바이러스 (baculovirus) 발현 시스템의 사용에 의해 재조합 CCR-단백질을 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 상기 바쿨로바이러스 발현 시스템의 예는 pVL-유도 벡터 (예를 들어, pVL1392, pVL1393 및 pVL941), pAcUW-유도 벡터 (예를 들어, pAcUW1), 및 pBlueBac-유도 벡터 (예를 들어, β -gal 함유 pBlueBac III)를 포함한다.

<89> 완전한-길이의 CCR-단백질의 카르복시 말단 단편의 발현이 바람직할 경우, 즉, 불완전 돌연변이체일 경우, 발현에 바람직한 서열을 함유하는 올리고누클레오티드 단편에 개시 코돈 (ATG)를 첨가하는 것이 요구될 수 있다. N-말단 위치의 메티오닌이, 효소 메티오닌 아미노펩티다아제 (MAP)의 사용에 의해 효소적으로 분해될 수 있음이 공지되어 있다. MAP는 *E. coli* (Ben-Bassat et al. (1987) J. Bacteriol. 169:751-757) 및 *Salmonella typhimurium*으로부터 클로닝되고, 시험관내 활성은 재조합 단백질에서 증명되었다 (Miller et al. (1987) PNAS 84:2718-1722). 그러므로, N-말단 메티오닌의 제거는, 요구되는 경우, MAP를 생성시키는 숙주 (예를 들어, E. coli or CM89 or S. cerevisiae)에서 상기 재조합 폴리펩티드를 발현시킴으로써 생체내에서 달성시키거나 또는 정제된 MAP의 사용 (예를 들어, Miller 등의 공정)에 의해 시험관내에서 달성시킬 수 있다.

<90> 다른 방법으로, 폴리펩티드의 코딩 서열은, 다른 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을

포함하는 융합 유전자의 일부로서 혼입시킬 수 있다. 상기 유형의 발현 시스템은, 표적 CCR-단백질 중 하나의 면역원 단편을 생성시키는 것이 바람직한 조건 하에서 유용할 수 있다. 예를 들어, 로타바이러스의 VP6 캡시드 단백질은, 바이러스 입자의 형태 또는 단량체 형태로, 폴리펩티드의 일부를 위한 면역학적 담체 단백질로서 사용될 수 있다. 항체가 발생하는 CCR 단백질의 일부에 해당하는 핵산 서열은, 비리온의 일부로서 단백질의 일부를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 재조합 바이러스의 한 세트를 생성시키기 위해, 후기 (late) 우두 바이러스 구조 단백질의 코딩 서열을 포함하는 융합 유전자 구성체로 혼입될 수 있다. 유사한 방법으로, 면역원성을 증진시키기 위해, 폴리오바이러스 캡시드 단백질 및 CCR-단백질의 일부를 함유하는 융합 단백질을 코딩하는 키메라 구성체를 제조할 수 있다 (예를 들어, EP Publication No. 0259149; and Evans et al. (1989) Nature 339:385; Huang et al. (1988) J. Virol. 62:3855; and Schlienger et al. (1992) J. Virol. 66:2).

<91> 펩티드-기제 면역화을 위한 복합 항원 펩티드 시스템이 사용될 수 있고, 상기에서 CCR-단백질의 바람직한 부분은 올리고머성 측쇄 리신 코어 상에 펩티드의 유기-화학 합성으로부터 직접 수득된다(예를 들어, Posnett et al. (1988) JBC 263:1719 and Nardelli et al. (1992) J. Immunol. 148:914). 또한, CCR-단백질의 항원결정기는 박테리아 세포에 의해 발현되고 제공될 수 있다.

<92> 면역원성을 증진시키기 위해 융합 단백질을 사용하는 것 이외에, 또한, 융합 단백질이 단백질의 발현을 용이하게 할수 있음이 광범위하게 이해되고 있다. 예를 들어, 본 발명의 CCR-단백질은 글루타티온-S-트랜페라아제 (GST) 융합 단백질로서 생성될 수 있다. 상기 GST 융합 단백질은, 글루타티온-유도 매트릭스의 사용과 같이, CCR-단백질의 정제를 간편하게 하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds Ausabel et al. (N.Y.: John Wiley & Sons, 1991)).

<93> 다른 구체예에서, 재조합 단백질의 바람직한 부분의 N-말단에서 폴리-(히스)/엔테로키나아제 분해 위치 서열과 같은 정제 리더 (leader) 서열을 코딩하는 융합 유전자는, Ni^{2+} 금속 수지를 사용하는 친화 크로마토그래피에 의한 발현된 융합 단백질의 정제를 가능하게 한다. 그후 상기 정제 리더 서열은, 엔테로키나아제 처리에 의해 연속적으로 제거되어, 정제된 CCR-단백질을 제공할 수 있다 (예를 들어, Hochuli et al. (1987) J. *Chromatography* 411:177; and Jankencht et al. PNAS 88:8972).

<94> 융합 유전자의 제조 방법은 이미 공지되어 있다. 기본적으로, 다른 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 결합은, 연결을 위한 평활-말단 또는 스태거 (stagger)-말단, 적당한 말단을 위해 제공되는 제한 효소 분해, 적당한 점착 말단의 충전, 바람직하지 않은 결합을 피하기 위한 알칼리 포스파타아제 처리, 및 효소 연결을 사용하는, 통상의 방법에 따라 수행시킨다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는, 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상의 방법에 의해 합성할 수 있다. 다른 방법으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 키메라 유전자 서열을 생성시키기 위해 그후 어닐링될 수 있는 2 개의 연속 유전자 단편 사이에 상보적 돌출을 발생시키는 앵커(anchor) 프라이머를 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992).

<95> 또한, 본 발명은 CCR-단백질과 정상적으로 관련되는 그밖의 세포외 단백질, 특히 세포-주기 단백질 예를 들어, CDK, 사이클린, p21, p19 또는 PCNA의 실질적 부재인 또는 분리된, 표적 CCR-단백질의 가능한 분리 및/또는 정제 형태를 제조할 수 있다. "그밖의 세포 단백질의 실질적 부재"(또한, 본원에서 "오염 단백질"으로서 언급됨)는, 예를 들어, 20 % (건조 중량에 대하여) 미만의 오염 단백질, 바람직하게는 5 % 미만의 오염 단백질을 포함하는, p16, p15 또는 p13.5 제조를 포함하는 것이다. CCR-단백질의 작용형은 본원에 기술된 바와 같이 클로닝된 유전자를 사용하여 정제된 제제로서 처음으로 제조될 수 있다. "정제된" 이란, 폴리펩티드와 관련하는 경우에, 지시된 분자가 그외의 단백질(특히, CDK4 또는 CDK6 과 같은 그외 세포-주기 단백질 뿐만 아니라 그외 불순 단백질)과 같은 그외의 생물학적 고분자의 실질적인 부재하에 존재하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "정제된" 은 바람직하게는 존재하는 동일한 형태(그러나 물, 완충액 및 이외 저분자, 특히 5000 미만의 분자량을 갖는 분자가 존재할 수 있다)의 생물학적 고분자의 80 건조 중량% 이상, 더욱 바람직하게는 95 내지 99 중량 %, 가장 바람직하게는 99.8 중량 % 이상을 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "순수한"은 바람직하게는 상기의 "정제된"과 동일한 중량의 범위를 갖는다. "분리된" 및 "정제된" 은 원상태의 천연물질이나, 성분으로(예를 들어, 아크릴아미드 겔로) 분리되나 순수한(예를 들어, 결여 오염 단백질, 또는 예를 들어, 아크릴아미드 또는 아가로오스의 변성제 및 중합체와 같은 크로마토그래피 시약) 물질이나 용액으로 수득될 수 없는 성분(예를 들어, 아크릴아미드 겔)으로 분리된 천연물질을 포함하지 않는다.

<96> 그러나, 대상 폴리펩티드는 또한 전신 및 경피 또는 국부 투여를 포함하는 여러 투여 형태로 제제되기 위해 약제학적으로 허용되는 담체에 제공될 수 있다. 이 기술 및 제제는 문헌[참조:Remmington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA]에서 알 수 있을 것이다. 예시적인 구체예에서, CCR-폴리펩티드는 경점막 또는 경피 전달에 제공된다. 이러한 투여를 위해, 침투시키려는 막에 적합한 침투제가 CCR 폴리펩티드를 함유한 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 이 기술분야에서 공지되어 있는 예를 들어, 경점막 투여를 위한 담즙염 및 푸지드산 유도체를 포함한다. 또한, 디터전트(detergent)가 용이하게 침투시키기 위해 사용된다. 경점막 투여는 경비 스프레이 또는 좌약을 사용할 수 있다. 경피 투여를 위해 본 발명의 올리고머를 이 기술분야에서 일반적으로 공지된 바와 같은 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제형된다.

<97> 본 발명의 다른 관점은 완전-길이의 CCR 단백질로부터 유도된 펩티드와 관련된다. 대상 CCR-단백질의 분리된 펩티딜 부분은 펩티드와 같은 핵산 엔코딩의 대응하는 단편으로부터 재조합하여 생성된 펩티드를 스크리닝하므로써 수득될 수 있다. 또한, 단편은 종래의 메리필드(Merrifield) 고체상 f-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 기술 분야에서 공지된 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CCR-단백질은 단편의 중복 없이 바람직한 길이의 단편으로 임의로 분할될 수 있거나, 바람직하게는 바람직한 길이의 중복 단편으로 분할될 수 있다. 단편이 재조합으로 또는 화학적 합성으로 생성되고 예를 들어, 마이크로인젝션 검정과 같은 CDK4 활성화의 작용제 또는 길항제로서 작용할 수 있는 펩티딜 단편을 확인하기 위해 시험할 수 있다. 예시의 구체예에서, 목적 CCR 단백질의 펩티딜 부분은 예를 들어, CCR-단백질의 불연속 단편을 함유하는 각각의 티오레독신(thioredoxin) 융합 단백질과 같은 발현에 의해 CDK-결합 활성도 뿐만 아니라 억제능력에 대한 시험을 할 수 있다[참조: 예를 들어, 미국 특허 제 5,270,181 및

5,292,646; 및 PCT 공개 제 WO94/02502].

<98> 또한, 이러한 목적을 위해 치료 또는 예방 효능 또는 안정성(예를 들어, 생체외 저장 기간 및 생체내 단백질분해성 분해에 대한 저항성) 을 개선시키므로써 목적 CCR-단백질의 구성체를 변경할 수 있다. 자연-발생 형태의 단백질의 하나 이상의 활성도를 보유하도록 고안되는 경우, 이러한 변경된 폴리펩티드는 본원에서 더욱 상세하게 기술된 세포-주기 조절 단백질의 기능적 동등물로 간주된다. 이러한 변경된 폴리펩티드는 예를 들어, 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가에 의해 생성될 수 있다.

<99> 또한, 예를 들어 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파르트산염을 글루탐산염으로, 트레오닌을 세린으로 분리 치환하는 것 또는 아미노산을 구성체적으로 관련된 아미노산으로의 유사한 치환하는 것은 (즉, 보존 돌연변이) 생성되는 분자의 생물학적 활성도에 주요한 영향을 미치지 않을 것이다. 보존 치환은 이들의 측쇄와 관련된 아미노산류내에 발생되는 것이다. 일반적으로 엔코딩되는 아미노산은 4류로 분리할 수 있다: (1) 산성 = 아스파르트산염, 글루탐산염, (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘, (3) 비극성 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판, 및 (4) 비하전 극성 = 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신은 종종 방향성 아미노산으로서 함께 분류된다. 유사한 형태로, 아미노산 레퍼토리는 (1)산성 = 아스파르트산염, 글루탐산염, (2)염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘, (3)지방족 = 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, (여기서, 세린 및 트레오닌이 임의로 지방족-하이드록실로서 개별적으로 그룹화될 수 있다) (4)방향족 = 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, (5) 아미드 = 아스파라긴, 글루타민, 및 (6) 황-함유 = 시스테인 및 메티오닌과 같이 그룹화될 수 있다[참조: 예를 들어, Biochemistry, 2nd ed. Ed by L. Stryer, WH Freeman and Co. : 1981]. 펩티드의 아미노산 서열에서의 변화가 기능적 동족체를 유도하는지는 변형체 펩티드의 야생형 단백질과 유사한 형태의 세포에서 반응을 일으키는 능력을 검정하므로써 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 이러한 p16의 변형체형은 이들의 능력으로 p16-결여 세포를 보충하는 것으로 평가된다. 하나 이상의 치환이 일어난 펩티드는 동일한 방법으로 용이하게 시험할 수 있다.

<100> 본 발명은 또한 본원의 CCR-단백질의 재조합 돌연변이체 뿐만 아니라 불완전 돌연변이체의 세트를 발생시키는 방법에 관한 것이며, 특히 CDK, 특히 CDK4 또는 CDK6 에 결합에 작용하는 잠재적인 변형체 서열(예를 들어, 동족체)를 확인하는데 유용하다. 이러한 재조합 라이브러리를 스크리닝하는 목적은 예를 들어 작용제 또는 길항제로서 작용하거나, 대안적으로 모두 함께 신규한 활성도를 가질 수 있는 예를 들어, 신규한 p16, p15 또는 p13.5 동족체를 발생시키는 것이다. 예증하기 위해, p16 및/또는 p15 동족체는 CDK4와 보다 더 효율적으로 결합시키기 위해 본 발명에 의해 처리될 수 있으나, 단백질의 자연-발생 형태와 관련된 CDK6에 대해 현저히 감소된 결합 친화성을 갖는다. 따라서, 자연적으로 발생하는 CCR-단백질과 관련하여 선택 잠재성을 갖는 조합-유도 동족체가 생성될 수 있다. 이러한 단백질은 재조합 DNA 구성체에서 발현되는 경우에 유전자 치료 프로토콜에 사용될 수 있다.

<101> 이와 유사하게, 돌연변이 유발은 상응하는 야생형 단백질과는 매우 상이하게 세포내 수명이 1/2인 CCR 동족체를 유발시킨다. 예를 들어, 변형된 단백질은 단백가수분해적 분해, 또는 CCR-단백질의 파괴 또는 그렇지 않을 경우에 비활성을 유도하는 이외의 세포 진행에 대해 더욱 안정적이거나 또는 더욱 비안정적이 될 수 있다. 이러한 동족체, 및 이들을 엔코딩하는 유전자를 사용하여 단백질의 반감기를 조절하므로써 p16, p15 또는 p13.5 발현체의 외피를 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 짧은 반감기는 생물학적 효과를 더욱 일시적으로 발생시키며, 일부 유도가능한 발현 시스템일 경우에는 세포내 재조합 CCR-단백질의 양을 더욱 철저하게 조절할 수 있게 한다. 상기와 같이, 이러한 단백질 및 특히 이들의 재조합 핵산 구성체는 유전자 치료 프로토콜에 사용될 수 있다.

<102> 이와 유사한 형태로, CCR 동족체는 상응하는 야생형 단백질의 능력의 방해하여 세포 증식을 조절할 수 있다는 점에서 길항제로서 작용하기 위해 본원의 조합적 접근법에 의해 생성될 수 있다.

<103> 본 방법의 대표적인 구체예에서, CCR-단백질 동족체의 집락에 대한 아미노산 서열이 배열되어 바람직하게는 가능한 가장 가까운 동족관계를 조장한다. 이러한 변형체의 집락은 예를 들어, 하나 이상의 종으로 부터의 p16 및/또는 p15 동족체, 또는 동일하나 돌연변이로 인해 달라진 종으로부터의 동족체를 포함할 수 있다. 배열된 서열의 각 위치에 제시된 아미노산은 선택되어 조합 서열의 축중 세트를 생성시킨다. 특정 변형체의 배열된 서열에서의 아미노산의 존재 또는 부재는 실제 또는 인위적일 수 있는 기준 서열의 선택된 동일 길이와 관련한다. 서열의 배열에서 가장 가까운 동족관계를 유지시키기 위해서, 기준 서열에 관련한 변형체의 서열에서의 결실이 아미노산 공간(*)으로 나타날 수 있으나, 기준 서열에 대한 변형체의 삽입 돌연변이는 무시될 수 있으며 배열되는 경우에는 변형체 서열에서 제외될 수 있다.

<104> 예시 하면, p16, p15 및 p13.5 서열의 조사로(도 6 참조) 세개의 CCR-단백질의 내부 단편이 매우 잘 보존되었음을 알게 된다. 이들 배열을 기본으로 하여, 조합 라이브러리가 이 부분에서 발생될 수 있으며, 이 부분의 요소는 CCR-단백질의 다른 부분의 부재하에서 발현될 수 있거나, 이 단백질의 다른 부분이 정적인 CCR-단백질의 일부로서 발현될 수 있다(예를 들어, p16 또는 p15 단백질에서 단지 잔기 Met-52 내지 Gly-135 또는 Met-54 내지 Gly-137 각각은 조합 돌연변이 유발에 의해 변화된다). 예를 들어, CCR 동족체의 라이브러리는 변형 공식에 의해 제시된 아미노산 서열을 갖도록 p16 및 p15 단백질의 서열을 기본으로 하여 생성될 수 있다:

Met-Met-Met-Gly-Xaa(1)-Xaa(2)-Xaa(3)-Val-Ala-Xaa(4)-Leu-Leu-Leu-Xaa(5)-Xaa(6)

-Gly-Ala-Xaa(7)-Xaa(8)-Asn-Cys-Xaa(9)-Asp-Pro-Xaa(10)-Thr-Xaa(

11)-Xaa(12)-Xaa(13)-Arg-Pro-Val-His-Asp-Ala-Ala-Arg-Glu-Gly-Phe-Leu-

Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Xaa(14)-Xaa(15)-Gly-Ala-Arg-Leu-Asp-Val-

Arg-Asp-Ala-Trp-Gly-Arg-Leu-Pro-Xaa(16)-Asp-Leu-Ala-Xaa(17)-Glu-Xaa(18)-Gly-H

is-Xaa(19)-Asp-Xaa(20)-Xaa(21)-Xaa(22)-Tyr-Leu-Arg-Xaa(23)-Ala-Xaa(24)-Gly

<106> 여기서, 각각의 Xaa(1)-Xaa(24)는 서열번호 2, 4, 6 또는 8에서 동일한 위치의 아미노산 잔기 중 하나로부터 선택된다.

<107> 조합 라이브러리의 추가 확장은 예를 들어, 하나 이상의 축중 위치에서 보전 돌연변이를 나타내는 아미노산을 포함하므로써 이루어 질 수 있다. 이러한 돌연변이의 포함은 상기 공식에 제시된 잠재적 세포-주기 조절 서열의 라이브러리를 야기시킬 수 있으나 단, 이 식에서 Xaa(1)은 Ser, Thr, Asn 또는 Gln을 나타내고; Xaa(2)는 Gly, Ala, Val, Leu 또는 Ile을 나타내며; Xaa(3)은 Arg, Lys 또는 His를 나타내고; Xaa(4)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Asp 또는 Glu를 나타내며; Xaa(5)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Asn 또는 Gln을 나타내고; Xaa(6)는 Arg, Lys, His, Tyr 또는 Phe를 나타내며; Xaa(7)는 Asp 또는 Glu를 나타내고; Xaa(8)은 Pro, Gly, Ser 또는 Thr을 나타내며; Xaa(9)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Asp 또는 Glu를 나타내고; Xaa(10)은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile 또는 아미노산 갭을 나타내며; Xaa(11)은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser 또는 Thr을 나타내고; Xaa(12)는 Phe, tyr, Trp 또는 아미노산 갭을 나타내고; Xaa(13)은 Ser 또는 Thr을 나타내며; Xaa(14)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Arg, Lys 또는 His를 나타내고; Xaa(15)는 Gly, Ala, Val, Leu, ILe, Ser 또는 Thr을 나타내며; Xaa(16)은 Gly, Ala, Val, Leu 또는 Ile를 나타내고; Xaa(17)은 Glx를 나타내며; Xaa(18)은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, His 또는 Arg를 나타내고; Xaa(19)는 Arg 또는 Gln를 나타내며; Xaa(20)은 Gly, Ala, Val, Leu 또는 Ile를 나타내고; Xaa(21)는 Gly, Ala, Val, Leu 또는 Ile을 나타내며; Xaa(22)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Lys, His 또는 Arg를 나타내고; Xaa(23)은 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Thr 또는 Ser을 나타내며; Xaa(24)는 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr 또는 아미노산 갭을 나타내고 여기서, 아미노산 갭은 폴리펩티드로부터 아미노산 위치가 삭제된 것을 의미하는 것으로 이해된다. 대안적으로, 축중 위치에서의 아미노산 치환은 아미노산 측쇄의 극성 또는 전하에 관계없이 예를 들어, 등배열 치환과 같은 입체 특징을 기본으로 할 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 변형체 위치(Xaa) 의 완전한 임의의 돌연 변이 유발을 수행시킬 수 있다.

<108> 바람직한 구체예에서, 조합 CCR 라이브러리는 잠재 CCR-단백질 서열의 한 부분 이상을 포함하는 각각의 폴리펩티드 라이브러리를 엔코딩하는 유전자의 축중 라이브러리에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 합성 올리고누클레오티드의 혼합물은 잠재 CCR 누클레오티드 서열의 축중 세트가 개별적인 폴리펩티드로서, 또는 선택적으로 그안에 CCR 단백질 서열의 세트를 포함하는 더 큰 융합 단백질의 세트(예를 들어, 파아지 디스플레이)로서 발현가능하도록 유전자 서열에 효소적으로 연결될 수 있다.

<109> 잠재 CCR 동족체의 라이브러리를 축중 올리고누클레오티드 서열로 부터 생성시킬 수 있는 방법은 많다. 축중 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 수행될 수 있으며, 이후 합성 유전자는 발현에 적합한 유전자에 연결된다. 축중 유전자 세트의 목적은 하나의 혼합물에 목적하는 잠재 CCR 서열을 엔코딩하는 모든 서열을 제공하는 것이다. 축중 올리고누클레오티드의 합성은 이 기술분야에서 널리 공지되어 있다[참조 : 예를 들어, Narang, SA(1983) Tetrahedron 39:3; ItaKura et al. (1981) Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477]. 이러한 기술은 다른 단백질의 직접적인 진화에 사용되어 왔었다[참조: 예를 들어, Scott et al. (1990) Science 249:386-390; Roberts et al.(1992) PNAS 89:2429-2433; Devlin et al.(1990) Science 249:404-406; Cwirla et al. (1990) PNAS 87:6378-6382); 뿐만 아니라 미국 특허 제 5,223,409, 5,198,346 및 5,096,815호].

<110> 점(point) 돌연변이에 의해 이루어진 조합 라이브러리의 유전자 생성물을 스크리닝하기 위해 그리고, 이를 위해 특정한 특성을 갖는 유전자 생성물에 대한 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 광범위한 기술은 본 기술 분야에서는 공지되어 있다. 이러한 기술은 일반적으로 CCR 동족체의 조합 돌연변이 유발에 의해 생성된 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 적용할 수 있을 것이다. 대형 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 광범위하게 사용될 수 있는 기술은 유전자 라이브러리를 복제가능 발현벡터로 클로닝하고, 적합한 세포를 상기 생성된 벡터의 라이브러리로 형질전환시키고, 목적하는 활성도 조사가 그 생성물이 검출된 유전자를 엔코딩하는 벡터를 비교적 용이하게 분리시키게 하는 조건하에서 조합 유전자를 발현시키는 것을 포함한다. 하기에서 기술되는 각각의 예시적 검정은 조합 돌연변이 유발 기술에 의해 제시된 다수의 축중 서열을 스크리닝하는데 필요한 고산출 분석으로 보정할 수 있다.

<111> 스크리닝 검정의 예시 구체예에서, 후보 조합 유전자 생성물이 세포의 표면상에 나타내어지고, 이 유전자 생성물을 통해 특정 세포 또는 바이러스 입자가 CDK4 또는 CDK6와 같은 CDK와 결합 능력이 "팬닝(panning) 검정"으로 검출된다. 예를 들어, 유전자 라이브러리는 박테리아 세포의 표면 막 단백질에 대한 유전자로 클로닝될 수 있으며[참조 : Lander et al., WO 88/06630; Fuchs et al.(1991)

Bio/Technology 9:1370-1371; 및 Goward et al. (1992) TIBS 18:136-140], 생성되는 융합 단백질은 예를 들어, 잠재적 작용성 CCR 동족체를 기입하기 위해 예를 들어, FITC-CDK4와 같은 CCR-단백질을 결합시키는 형광 표지된 분자를 사용하여 패닝(panning)시켜 검출될 수 있다. 세포는 형광 현미경하에서 가시적으로 관찰하고, 분리시킬 수 있거나 세포의 형태학에서는 형광-활성 세포 분류기에 의해 분리시킬 수 있다.

<112> 이와 유사한 방법으로, 유전자 라이브러리는 바이러스입자 표면상에서 융합 단백질로 발현될 수 있다. 예를 들어, 실모양 파아지 시스템에서 외래 펩티드 서열은 감염성 파아지 표면상에서 발현되어 두 가지 주요한 장점을 부여할 수 있다. 첫째로 상기 파아지를 매우 고농도로 친화성 매트릭스에 적용할 수 있으므로 다수의 파아지를 동시에 스크리닝할 수 있다. 둘째로 감염성 파아지는 각각 그것의 표면상에서 결합형 유전자 산물을 나타내므로 특정한 파아지가 저수율로 친화성 매트릭스로부터 회수되는 경우 상기 파아지는 또 다른 감염단계에 의해 증폭될 수 있다. 거의 이상적인 E. coli 실모양파아지인 M13, fd 및 f1군은 파아지 디스플레이 라이브러리에서 가장 빈번하게 사용되며, 파아지 gIII나 gVIII 피복단백질 모두 바이러스 입자의 최종 패키징의 분해 없이 융합 단백질을 생성시키기 위해 사용될 수 있다.

<113> 하나의 구체예에서, 재조합 파아지 항체 시스템(RPAS, Pharmacia Catalog number27-9400-01)은 본 발명의 CCR 조합 유전자 라이브러리의 발현 및 스크리닝에 이용하기 위해 쉽게 변형될 수 있다. 예를 들어 RPAS 키트의 pCANTAB 5 파아지미드는 파아지 gIII 피복 단백질을 엔코딩시키는 유전자를 함유한다. CCR 조합 유전자 라이브러리는 gIII 융합 단백질로 발현되는 gIII 신호 서열에 인접한 파아지미드에 클로닝시킬 수 있다. 연결된 후에 파아지미드를 이용하여 수용능력을 갖는 *E. coli* TGI 세포를 형질전환시킨다. 후속하여 형질전환된 세포는 파아지미드 및 후보 CCR-유전자 삽입물을 복구하는 M13K07 헬퍼 파아지로 감염시킨다. 최종적인 재결합 파아지는 특이적 후보 CCR-단백질을 엔코딩하는 파아지미드 DNA를 포함하고 상응하는 융합 피복 단백질의 1이상의 복제를 디스플레이한다. CDK와 결합할 수 있는 파아지-디스플레이드 후보 단백질은 패닝(panning)에 의해 선택되거나 부화된다. 예를 들어, 파아지 라이브러리를 글루타티온으로 고정된 CDK-GST융합 단백질상에서 패닝하고 결합되지 않은 파아지는 세포로부터 세척한다. 그 다음에는 결합된 파아지를 단리시키고, 재조합 파아지가 야생형 gIII 피복 단백질의 1개 이상의 복사체를 발현시킨다면 이 파아지는 *E.coli*를 감염시킬 능력을 가지는 것이다. 따라서 *E.coli*의 계속되는 재감염 및 패닝단계는 작용제와 길항제를 구별하기 위한 추가적인 생물학적 활동을 스크리닝할 수 있다. p16, p15 또는 p13.5 동일 구조체와 같은 CCR 동족체를 상당히 증식할 수 있으며, 다음 라이브러리로부터 감소된 돌연변이체 세트 등을 후속 선별하는 단계는 단순한 CDK-결합 능력보다 더욱 의미있는 현상을 기초로 한다. 예를 들어 저해 잠재성이나 세포내 반감기는 2차 스크리닝의 선별기준이 된다.

<114> 본 명세서의 견지에서 일반적으로 적용할 수 있는 돌연변이 유발의 다른 형태는 전술한 조합성 돌연변이유발에 더하여, 본 발명의 당업자에게 명백하다. 예를 들어 p16, p15, 또는 p13.5 동족체(작용제와 길항제의 형태와 단편을 포함한)를 발생시키고, 예컨대 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발방법 등(Ruf 등 (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang 등 (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint 등 (1993) Gene 137:109-118; Grodberg 등 (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima 등 (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman 등 (1991) Biochemistry 30:10382-10838; 및 Cunningham 등 (1989) Science 244:1081-1085) ; 링커 스캐닝 돌연변이 유발방법 (Gustin 등 (1993) Virology 193:653-660; Brown 등 (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight 등 (1982) Science 232:316) ; 포화 돌연변이 유발 방법 (Meyers 등 (1986) Science 232:613) ; PCR 돌연변이 유발 방법 (Leung 등 (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) ; 또는 임의 돌연변이 유발 방법 (Miller 등 (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; 및 Greener 등 (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)을 이용하여 스크리닝할 수 있다.

<115> 결과적으로, 본 발명은 또한 CCR-단백질을 감소시켜 예컨대 CDK4 및/또는 CDK6와 같은 사이클린-의존성 키나아제에 CCR-단백질을 의태-결합시킬 수 있는, 예컨대 펩티드나 비-펩티드 작용제와 같은 유사체를 발생시킬 수 있다. 티오레독신 체계와 상기 언급한 돌연변이 발생 기술은, 예컨대 CDK와 CCR-단백질을 결합시키는데 수반되는 단백질-단백질 상호작용에 참여하는 CCR-단백질의 결정인자를 맵핑하는데에도 특히 유용하다. 다시 설명하면, CDK4의 분자인식에 관여하는 CCR-단백질의 잔유물을 엄밀하게 측정하여, CDK4 또는 CDK6와 결합하고, 예컨대 CCR-단백질과 같이 키나아제의 활성화를 억제하는 CCR-유래의 펩티드 유사체를 생성하는데 사용할 수 있다. 사이클린-의존성 돌연변이 유발을 스캐닝하여 키나아제의 결합에 수반되는 특별한 CCR-단백질의 아미노산 잔유물을 맵핑하는 방법을 사용함으로써, 키나아제에 대한 결합에 있어서 상기 잔유물을 의태하는, 예컨대 디아제핀 또는 이소퀴놀린 유도체와 같은 펩티드 유사 화합물을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 이같은 잔유물의 비가수분해성 펩티드 유사체는 벤조디아제핀(e.g., see Freidinger et al. in Peptides : Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher : Leiden, Netherlands, 1988), 아제핀(e.g., see Huffman et al. in Peptides : Chemistry and Biology, G.R> Marshall ed., ESCOM Publisher : Lieden, Netherlands, 1988), 치환된 감마 락탐 고리(Garvey et al. in Peptides : Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher : Lieden, Netherlands, 1988), 케토-메틸렌 슈도펩티드(Ewenson et al.(1986) J. Med Chem 29:295; and Ewenson et al. in Peptides : Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), 베타-턴 디펩티드 코아 (β-turn dipeptide core) (Nagai 등 (1985) Tetrahedron Lett 26:647; 및 Sato 등 (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231), 및 β-아미노알콜 (Gordon 등 (1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; and Dann et al.(1986) Biochem Biophys Res Commun 134: 71) 등을 사용하여 생성시킬 수 있다.

<116> 이와 유사한 방법으로, CCR-단백질의 결합에 영향을 미치는 CDK4 및/또는 CDK6의 돌연변이에 대한 확인 방법을 이용하여, CDK의 억제하는 자체의 능력을 방해하고 CCR-단백질에 경합적으로 결합할 수 있는 CDK4/CDK6의 잠재적 펩티딜 단편을 확인할 수 있다. 후술하는 바와 같이, 본 발명자들은 p15, p16에 의해 결합을 끝내고, 결과적으로 CDK4의 돌연변이 특징이 있고 CCR-단백질 억제 비감수성인 키나아제를 제공한다. 실제적으로 이들 돌연변이는 CDK4와 CDK6 사이에서 보존된 아미노산 잔기의 스트레치(stretch)에서 나타난다. 따라서 이들 CDK4/CDK6의 부분에 기초한 펩티도미네틱은 CCR-단백질의 결합에 대해 CDK4 또는 CDK6와 경쟁할 것이 예상된다는 점에서 CCR-단백질의 길항제로 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, CCR 길항제는 아미노산 서열 VAEIG(V/E)GAYG(T/K)-V(F/Y)KARDE에서 펩티드 또는 비펩티드 유사체

이고, 보다 바람직하게는 아미노산 서열의 V(F/Y)KARD의 펩티도메틱이며, 훨씬 더 바람직하게는 테트라펩티드 KARD이다. 이와같이 다른 우수한 CDK4/CDK6의 펩티드 유사체는 서열 STRDRE(I/T)K(V/L)TLVFEHVDQDL(R/T)TYLDK(A/V)PPPG(L/V)에 상응하는 펩티드나 펩티도메틱을 포함하고, 바람직하게는 펩티도미메틱이 헥사-펩티드인 FEHVDQ나 EHVDQD의 유사체이거나, 훨씬 더욱 바람직하게는 테트라펩티드인 HVDQ나 EHVD이다. 이러한 잔기의 비가수분해성 펩티드 유사체의 잔유물은, 벤조디아제판, 아제핀, 치환된 감마 락탐 고리, 케토 메틸렌 슈도펩티드, β-턴 (β-turn) 디펩티드 코아 또는 베타-아미노알코올 등을 사용하여 생산한다. CDK의 이들 및 다른 펩티딜 부분은 예를 들어, 상기한 티오리디독신 융합 단백질 구조로 사용하는 p15 또는 p16과 같은 CCR-단백질과의 결합에 대해 시험될 수 있다.

<117> 본 발명의 다른 관점은 대상 CCR-단백질중 하나와 특이적으로 반응하는 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 대상 p16 단백질의 cDNA 서열에 기초한 펩티드를 사용하여, 항-p16 안티세라, 항-p15 모노클로날 항체가 표준 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 유사하게, 항-p13.5와 항 p15 항체가 생성된다. 마우스나 햄스터나 토끼와 같은 포유류가(항체 반응을 일으킬 수 있는 항원 단편과 같은) 펩티드의 면역원 형태를 사용하여 면역화 될 수 있다. 단백질이나 펩티드의 면역원성을 부여하는 기술은 이 분야에서 잘 알려진 서적에 알려진 담체나 다른 기술과 콘쥬게이션된다. 예를 들어, 서열번호 2, 4, 6 또는 8중의 하나에 의해 제시되는 단백질의 펩티딜 부분은 애쥬번트로 도입될 수 있다. 면역화 진행과정은 혈장이나 혈청의 항체 역가의 검출에서 관찰할 수 있다. 표준 ELISA 또는 다른 면역검정이 항체수준의 평가를 위해 항원으로서의 면역원과 함께 사용될 수 있다.

<118> 면역화 후에, 항-CCR 안티세라가 수득될 수 있고, 필요하다면 폴리클로날 항-CCR 항체를 혈청으로부터 단리할 수 있다. 모노클로날 항체의 생산을 위해, 항체 생산 세포(림프구)가 면역화된 동물로부터 채취되고, 히브리도마 세포를 산출하기 위해 마이엘로마 세포와 같은 불멸화시킨 세포와 함께 표준 잠재성 표준 체세포 융합 과정을 통해 융해시킨다. 이와 같은 기술은 예를들어 히브리도마(본래 Kohler and Milstein,(1975) Nature, 256:495-497), 인체 B 세포 히브리도마 기술(Kozbar et al.,(1983) Immunology Today, 4:72), 와 인체 모노클로날 항체(Cole et al.,(1985) Monoclonal 항체와 암 치료, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96)을 포함하는 EBV-히브리도마 기술로서 이 분야에 알려져 있다. 단리한 모노클로날 항체와 목적하는 CCR-단백질과의 특이적으로 반응하는 항체의 생성에 대해 면역화학적으로 스크리닝한다.

<119> 여기에 사용되는 항체라는 용어는 예를 들어, 항-p16, 항-p15 또는 항-p13.5 항체와 같은 CCR-단백질과 특이적으로 반응하는 상기의 단편을 포함한다. 항체는 공지 기술을 사용하여 단편화 시킬 수 있고, 그 단편은 전체 항체에 대해 상기한 것과 동일한 방법으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어 $F(ab')_2$ 단편은 항체를 펩신으로 처리하여 반응시켜 얻을 수 있다. 결과의 $F(ab')_2$ 단편은 Fab' 단편을 생성하는 디설파이드 다리를 감소시킴으로 얻을 수 있다. 본 발명의 항체는 이중 특이성이며 키메릭 분자를 포함하고 있다.

<120> 모노클로날 및 폴리클로날 항체(Ab)가 대상 CCR-단백질에 대해 유도되고, Fab과 $F(ab')_2$와 같은 항체 단편은 특별한 CCR의 활동 억제 및 세포-주기 또는 세포 증식의 연구에 이용될 수 있다.

<121> 항-CCR 항체의 적용은 λ gt11, λ gt18-23, λ ZAP 및 λ ORF8과 같은 발현 벡터에서 구성된 cDNA 라이브러리의 면역학적 스크리닝내에 적용된다. 올바른 리딩 프레임 및 배향으로 삽입된 코딩 서열을 가지는 이러한 형태의 메신저 라이브러리가 융합 단백질을 생산할 수 있다. 예를 들어, λ gt11는 아미노 말단이 β -갈락토시다제 아미노산 서열을 구성되고, 카르복시 말단이 외래 폴리펩티드로 구성된 융합 단백질을 생산할 수 없다. p16, p15 또는 p13.5와 항원적으로 관련된 단백질과 같은 CCR-단백질의 항원 에피토프는 예를 들어, 항-CCR 항체로 감염시킨 평판배지로부터 수득된 니트로셀룰로스 필터와 반응시키는 것에 의해 항체를 검출할 수 있다. 상기 검정에 의해 기록된 파아지가 감염된 평판으로부터 단리될 수 있다. 따라서, p15, p16 또는 p13.5 동족체와 같은 CCR 상동의 존재가 검출될 수 있으며, 다른 기원으로부터 클로닝될 수 있다.

<122> 본 발명의 하나 이상의 CCR-단백질과 특이적으로 면역반응하는 항체가 CCR-단백질 계열 또는 그의 특정 일원의 형태 및 발현 양을 평가하기 위해, 조직 샘플의 면역조직화학 염색법에 사용될 수 있다. 항-CCR 항체는 임상 실험 과정의 부분으로 체액으로부터 단리한 세포나 조직에서 하나 이상의 CCR-단백질의 단계를 평가하고 검출하는 면역침전법과 면역-블롯팅(blotting) 진단에 이용한다. 예를 들어 그와 같은 측정은 종양의 시작이나 진행에 예측적 평가로 사용된다. 이와같이 어느 개체의 어떤 CCR-단백질 수준을 관찰하는 능력은 이러한 질환에 감염된 개체에 대한 치료 효능을 결정하는데 사용될 수 있다. 항-p16 또는 항-p15 항체와 같은 항-CCR 항체를 사용하는 진단검정은 예를 들어, CCR-유전자의 병변이 나타난 세포를 검출하기 위한 것과 같이 예를 들어, 샘플의 암세포 존재와 같은 종양성 질환이나 증식성 질환의 초기 진단에 도움을 주도록 고안된 면역학적 검정법을 포함한다.

<123> 부가하여 누클레오티드 프로우브가 mRNA를 엔코딩하는 대상 CCR-단백질의 존재에 대해 손상되지 않은 조직과 샘플 조직의 조직학적 스크리닝을 허용하는 대상 CCR-단백질의 클로닝된 서열로부터 생산된다. 항-CCR-단백질 항체에 사용되는 진단과 유사하게 CCR-단백질 엔코딩 mRNA 또는 게놈 CCR-유전자 서열에 대한 프로우브의 사용이 예를 들어, 종양 또는 증식 질환(원치 않는 세포 증식)에 흔히 나타나는 대립형 돌연변이의 예측적 또는 진단적 평가에 이용될 수 있다. 항-CCR 단백질 항체 면역검정법과 함께 사용되는 누클레오티드 프로우브가 CCR-단백질의 형질발현과 관련된 임의의 비정상성을 수반할 수 있는, 발육 질환에 대한 분자 기초의 결정을 촉진하는데 도움을 준다. 예를 들어, CCR-단백질 합성의 변화가 코딩 서열의 돌연변이로부터 분화될 수 있다.

<124> 따라서, 본 방법은 피험자에 원하지 않는 세포 증식을 특징으로 하는 질환이 있지 여부를 결정하는 방법이다. 바람직한 구체에서, 본 방법은 통상 상기 피험자의 조직내에서 하기중 하나 이상을 특징으로 하는 유전적 병변의 검출을 포함하는 것을 특징으로 한다: (i) p16, p15, 또는 p13.5와 같은 CCR-단백질을 엔코딩하는 유전자의 돌연변이, 또는 CCR-유전자의 과오 발현. 예시 하면, 이러한 유전적 병변은 하기 하나 이상의 존재를 확인함에 의해 측정될 수 있다: (i) CCR-유전자로부터 하나 이상의 유전자의 결실, (ii) CCR-유전자의 하나 이상의 누클레오티드의 부가, (iii) CCR-유전자의 하나 이상의 누클레오티드의 치환, (iv) CCR-유전자의 총 염색체의 재배열, (v) CCR-유전자의 mRNA 전사체 단계에서 총 변화,

(vi) CCR-유전자의 mRNA 전사체의 비야생형 접합형태의 존재, (vii) CCR-단백질의 비야생형의 수준. 본 발명의 하나의 관점에서, 서열번호 1, 3, 5 또는 7 또는 이의 자연적 돌연변이, 또는 대상 CCR-유전자와 자연적으로 관련된 인트론 서열 또는 5' 또는 3' 플랭킹 서열 또는 그의 자연 돌연변이의 센스나 엔티센스 서열과 혼성화될 수 있는 누클레오티드 서열의 영역을 함유하는 올리고누클레오티드를 포함하는 프로우브/프라이머가 제공된다. 프로우브가 조직 샘플의 핵산에 제공되어, 샘플의 핵산과 프로우브의 혼성화가 검출된다. 하나의 구체예에서, 병변의 검출은 중합효소 사슬 반응(PCR)(see, e.g. U.S, Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202) 에서 프로우브/프라이머 이용을 포하거나, 대안적으로 또한 연결 사슬 반응(LCR)(see, e.g., Landegran et al.(1988) science 241:1077-1080 과 Nakazawa et al.(1944) PNAS 91:360-364)을 포함하며, 후자는 특히 CCR-유전자의 점(point) 돌연변이의 검출에 사용될 수 있다.

<125> 또한, 안티센스 기술의 사용(예를 들어, 안티센스 분자의 마이크로인젝션 또는 어떤 CCR mRNA에 대한 안티센스를 전사하는 플라스미드의 트랜스펙션)은 단백질의 내생적 생산을 억제하여, 통제된 환경에서의 세포-주기 및 세포 번식에서 p16, p15 또는 p13.5 같은 특별한 CCR-단백질의 역할을 조사할 수 있다. 이같은 기술은 세포 배양 및 유전자이식 동물의 생성에도 이용할 수 있다.

<126> 본 발명의 다른 관점에서, 이종성 CCR-유전자를 나타내는 유전자이식된 사람을 제외한 동물을 나타내거나, 동물의 세포 형태나 조직 중의 하나 이상이 파괴된 하나 이상의 게놈 CCR-유전자를 가지고 있다. 예를 들어, 그의 p13.5 유전자좌가 파괴된 유전자이식 마우스가 실시예 5에 제시된다.

<127> 다른 관점에서, 본 발명은 과오 발현된 CCR-대립형질(allele)을 가지는 진행적 질환에 대한 포유동물 모델을 특징으로 한다. 예를 들어, p16이나 p15 형질이 결실되거나, 1개 이상의 p16 엑손의 전부 또는 일부가 결실된 마우스가 배양될 수 있다. 다음, 상기 마우스 모델을 이용하여 과오 발현된 p16 유전자로부터 발생되는 질환을 연구할 수 있다.

<128> 따라서, 본 발명은 본 발명의 이식유전자를 함유하고, 바람직하게는 (선택적으로) 상기 동물의 1개 이상의 세포내에서 외래 CCR-단백질을 발현시키는 (동물의)세포들을 포함하는 유전자이식 동물에 관한 것이다. CCR-이식유전자는 단백질의 야생형을 엔코딩할 수 있고 이것의 작용제 및 길항제, 및 안티센스 구성체를 모두 포함하는 동족체를 엔코딩할 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 이식유전자의 발현은 세포, 조직 또는 예컨대 발현을 바람직한 패턴으로 조절하는 시스-작용 서열을 이용하는 발육단계 이용의 특이적 서브세트로 제한할 수 있다. 본 발명에서, 단백질의 위와 같은 모자이크 발현은 많은 형태의 일련적 분석에 필수적이고, 예컨대, 그렇지 않은 경우에 정상적인 배(embryo)내의 작은 조직 패취에서 발현을 총체적으로 변화시킬 수 있는 CDK의 p16 및 p15 저해의 결여 효과의 평가 수단을 추가로 제공한다. 이에 대해, 조직-특이적 조절 서열 및 조건부 조절 서열이 임의의 공간 패턴에서 이식유전자의 발현의 조절에 사용될 수 있다. 또한, 일시적인 발현 패턴이 예를 들어, 조건부 재조합 시스템 또는 원핵 전사 조절 서열에 의해 제공될 수 있다.

<129> 이식유전자의 발현을 체내에서 부위-특이적 유전자 조작을 통해 조절하는 유전자 기술은 본 발명의 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 표적 서열에 대한 유전자 재조합을 촉매화하는 재조합효소의 발현을 조절하는 유전자 시스템을 이용할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "표적 서열"이란, 재조합효소에 의해 유전적으로 재조합된 누클레오티드 서열을 의미한다. 상기 표적 서열은 재조합효소 인식 서열에 의해 플랭킹되고, 일반적으로 상기 서열은 재조합효소 활성을 발현시키는 세포내에서 절제 또는 역위된다. 재조합효소-촉매 재조합은, 표적 서열의 재조합이 대상 CCR 폴리펩티드의 발현을 활성화 또는 억제시키도록 의도될 수 있다. 예를 들면, 재조합형 CCR-유전자의 발현을 간섭하는 표적 서열의 절단으로 인해, 상기 유전자의 발현이 활성화될 수 있다. 상기 단백질 발현의 간섭은, 예컨대 프로모우터 성분으로부터의 CCR-유전자의 공간 분리 또는 내부 정지 코돈과 같은 다양한 기작으로부터 생성될 수 있다. 또한, 이식유전자가 제조될 수 있으며, 여기서 유전자의 코딩 서열이 플랭킹된 재조합효소 인식 서열일 수 있고, 상기 이식 유전자는 초기에 프로모우터 성분에 대해 3'에서 5'방향으로 세포내로 트랜스펙션된다. 이러한 예시에서, 표적 서열의 역위가 프로모터 구동 전사 활성화를 허용하는 프로모우터 성분에 대한 방향으로 코딩 서열의 5' 말단을 배열시켜 대상 유전자를 재배향시킨다.

<130> 한 가지 구체예에서, 박테리오파아지 P1의 cre/loxP 재조합효소 시스템(Lakso 등. (1992) PNAS 89:6232-6236; Orban 등 (1992) PNAS 89:6861-6845) 또는 *Saccharomyces cerevisiae*의 FLP 재조합효소 시스템(O'Gorman 등 (1991) Science 251:1351-1355; PCT publication WO 92/15694)을 이용하여 체내에서 부위-특이적 재조합 시스템을 생성시킬 수 있다. Cre 재조합효소는 *loxP* 서열 사에에 위치한 개재 표적 서열의 재조합을 촉매화한다. *loxP* 서열은 Cre 재조합효소가 결합하는 34개의 염기쌍인 누클레오티드 반복 서열이며, 상기 서열은 Cre 재조합효소-매개성 유전자 재조합에 필요하다. *loxP* 서열의 배향이 Cre 재조합효소가 존재하는 경우에, 간섭성 표적 서열이 절제 또는 역위되는 지의 여부를 결정한다(Abremski 등 (1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514); *loxP* 서열이 정반복단위체에 대해 배향된 경우 표적 서열의 절단을 촉매하고, *loxP* 서열이 반복단위체에 대해 반대로 배향된 경우 표적 서열의 역위를 촉매한다.

<131> 따라서, 상기 표적 서열의 유전자 재조합은 Cre 재조합효소의 발현에 의존한다. 재조합효소의 발현은 예컨대 조직-특이적, 발생단계-특이적인 조절을 수행하거나, 외부적으로 첨가된 제제에 의해 유도 또는 억제될 수 있는 프로모우터 성분에 의해 조절될 수 있다. 상기의 억제되는 조절로 인해, 표적 서열의 유전적 재조합은 재조합효소의 발현이 프로모우터 성분에 의해 매개되는 세포내에서만 표적 서열의 유전자 재조합이 초래된다. 상기와 같이, CCR 단백질의 활성화 발현은 재조합효소의 발현을 조절하여 조절할 수 있다.

<132> p15 또는 p16과 같은, 재조합형 CCR 단백질의 발현을 조절하는 cre/loxP 재조합효소 시스템을 사용하기 위해서는, Cre 재조합효소 및 대상 단백질을 모두 엔코딩하는 이식유전자를 함유하는 유전자이식 동물을 구성해야 한다. Cre 재조합효소 및 재조합 CCR 유전자를 함유하는 동물은 "이중(double)" 유전자이식 동물을 구성하여 제공할 수 있다. 이러한 동물을 제공하는 편리한 방법은 예컨대, CCR-유전자 및 재조합효소 유전자와 같은 이식유전자를 각각 함유하는 동물을 교배시키는 것이다.

<133> 재조합효소-매개 발현될 수 있는 포맷(format)으로 CCR-이식유전자를 함유하는 유전자이식 동물을 초기에 구성하는 경우에, 대상 단백질이 이식유전자를 가진 동물내에서 발현중에 유해할 수 있다는 가

능성으로부터 하나의 장점을 가진다. 상기의 예에서, 이식유전자가 모든 조직내에서 사일런트(silent)한 조상(founder) 집단은 증식되고 유지될 수 있다. 상기 조상 집단의 개체는 예컨대 하나 이상의 조직내의 재조합효소를 발현시키는 동물과 교배될 수 있다. 이와 같이, 길항적 p15 이식 유전자가 사일런트한 조상 집단을 생성시킴에 의해, 특정 조직내의 p15에 의한 또는 발생 단계에서의 세포-주기 조절이 파괴된 결과로서 예를 들어, 치명적 표현형을 초래하는 자손에 대한 연구가 가능하다.

<134> 유사한 조건부 이식유전자가 이식유전자의 발현을 촉진시키도록 동시에 발현되는 원핵 단백질을 요구하는 원핵 프로모터 서열을 사용하여 제공될 수 있다. 전형적인 프로모우터 및 대응하는 트랜스-활성화 원핵 단백질은 USP 4,833,080에 기술되어 있다. 또한, 조건부 이식유전자의 발현은 트랜스-활성화 단백질, 예컨대 재조합효소 또는 원핵 단백질을 엔코딩하는 유전자가 세포-유형 특이적 방법으로 조직에 전달되어 발현이 유도되는 유전자 치료와 같은 방법에 의해 유도될 수 있다. 상기 방법에 의해, CCR-이식유전자는 트랜스-활성화제가 도입되어 "turned on"될 때까지, 성인기에서 사일런트한 상태로 있을 수 있다.

<135> 전형적인 구체예에 있어서, 본 발명의 "유전자이식된 사람 이외의 동물"은, 사람 이외의 동물의 생식계열에 이식유전자를 도입시켜 생성시킬 수 있다. 다양한 발육 단계의 배아상태의 표적 세포가 이식유전자를 도입시키는데 사용될 수 있다. 상기 배아상태의 표적 세포의 발생 단계에 의존하여 다른 방법에 이용된다. 접합체는 마이크로-인젝션을 위한 최상의 표적이다. 마우스에서, 수컷의 생식핵의 직경은 약 20 ㎛에 달하며, 이는 DNA 용액 1-2pl인 재현가능한 주입을 가능하게 한다. 접합체를 유전자 이식의 표적으로서 사용하면, 대부분의 경우 인젝션된 DNA가 제 1 난할 전에 숙주 유전자내로 통합되는 장점을 가진다 (Brinster 등 (1985) PNAS 82:4438-4442). 결과적으로, 유전자이식된 사람 이외의 동물의 모든 세포는 통합된 이식유전자를 함유한다. 일반적으로, 또한 상기는 생식세포의 50%가 이식유전자를 함유하므로, 조상의 자손으로 이식유전자가 효율적인 전달되는 것으로 반영된다. 접합체의 마이크로인젝션은 본 발명의 실시에서 이식유전자를 통합시키는 바람직한 방법이다.

<136> 또한, 레트로바이러스적 감염을 이용하여 이식유전자를 사람 이외의 동물로 도입시킬 수 있다. 발육중인 사람 이외의 배는 체외에서 낭포까지 배양될 수 있다. 상기 기간중에, 할구가 레트로바이러스 감염에 대한 표적일 수 있다(Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264). 투명대를 이동시키는 효소적 처리에 의해 할구를 효율적으로 감염시킨다 (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986). 전형적으로, 이식유전자를 도입하기 위한 바이러스 벡터 시스템은 이식유전자를 함유하는 복제-결함 레트로바이러스이다(Jahner 등 (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten 등(1985) PNAS 82:6148-6152). 할구를 바이러스-생성 세포의 단일층상에서 배양하여, 용이하고, 효율적으로 트랜스펙션시킨다 (Van der Putten, supra; Stewart 등(1987) EMBO J. 6:383-388). 대안적으로, 보다 더 후기 단계에서 감염시킬 수 있다. 바이러스 또는 바이러스-생성 세포는 할구내로 인젝션될 수 있다(Jahner 등(1982) Nature 298:623-628). 통합은 유전자이식된 사람 이외의 동물을 형성시키는 세포의 단지 일부에서만 발생하므로, 대부분의 조상은 모자이크적이 된다. 또한, 상기 조상은 일반적으로 자손에서 분열되는 게놈내의 다른 위치에 이식유전자의 다양한 레트로바이러스 삽입을 함유할 수 있다. 부가하여, 미지스테이션(midgestation) 배의 자궁내 레트로바이러스 감염에 의해 생식계열로 이식유전자를 도입시킬 수 있다(Jahner 등 (1982) supra).

<137> 이식유전자 도입을 위한 표적 세포의 제 3의 유형은 배 간세포(ES)이다. ES 세포는 시험관에서 배양되고, 배와 융합된 이식-전 배로부터 수득된다(Evans 등(1981) Nature 292:154-156; Bradley 등 (1984) Nature 309:255-258; Gossler 등(1986) PNAS 83:9065-9069; 및 Robertson 등 (1986) Nature 322:445-448). 이식유전자는 DNA 트랜스펙션 또는 레트로바이러스-매개 형질도입에 의해 효율적으로 ES 세포내로 도입될 수 있다. 다음, 상기 형질전환된 ES 세포가 사람 이외의 동물로부터의 낭포와 결합될 수 있다. 다음, 상기 ES 세포는 배를 콜로니화시키고, 최종적인 키메라 동물의 생식계열에 기여한다[재검토를 위해, Jaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474를 참조하라).

<138> 또한, 녹-아웃(knock-out) 또는 붕괴 유전자이식 동물을 생성시키는 방법은 공지되어 있다(참조: 예를 들면, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). 또한, 재조합효소-의존성 녹아웃은 예를 들어, CCR-유전자의 불활성화의 조직 특이적 및/또는 임시적 조절이 상기와 같이 조절되도록, 표적 서열을 삽입시키는 상동 재조합에 의해 생성될 수 있다.

<139> 본 발명의 다른 관점에서, 본 발명은 비정상적 성장 조절에도 불구하고 세포 성장에 여전히 CDK4 또는 CDK6가 요구되는 세포로부터 발생하는 증식 및/또는 분화질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 CCR-유전자 구성 및 CCR-유사체가 비정상적인 세포의 증식을 저해시키는 통상의 수단과 함께, 치료적 효과를 제공할 수 있는 광범위한 병적 증식 상태가 있다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 구성체는 단백질이 과오 발현된 세포 또는 CCR 단백질의 신호 형질도입 경로 상류가 기능하지 못하는 세포내에서 예를 들어, p16, p15, 및 p13.5와 같은 CCR 단백질의 기능을 재구성하는 것과 같이 유전자 치료 프로토콜의 일부로서 사용될 수 있다. 예시 하면, CCR 단백질의 일부 이상의 기능에 의존하는 병적 또는 비정상적 증식을 보이는 세포형은 다양한 암, 및 백혈병, 건선, 골질환, 섬유증식 질환, 및 만성 감염을 포함한다. 증식 질환외에 예를 들어, 유사분열로의 부전형의 재도입을 (임의로) 수반할 수 있는 조직의 탈분화로부터 기인하는 분화 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 퇴행성 질환으로는 예컨대 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 헌팅톤 무도병, 아밀로트로픽 측면(amylitrophic lateral) 경화증 등을 포함하는 신경계의 만성적 퇴행성 신경질환 및 중추신경계 퇴행성 신경질환이 있다. 다른 분화된 질환으로서는, 예컨대 내피조직과 평활근 세포의 분화-배제를 포함하는 관상혈관계 질환, 선세포의 퇴행성 변화로 특징지워지는 위궤양, 및 예컨대 윌름 종양(Wilm's tumor)과 같이 분화에 실패하는 신장 조건뿐만 아니라, 연골세포나 골세포의 분화-결여에 기인하여 발생하게 되는 것과 같은 연결조직과 관련된 질환이 있다. 예컨대 기관의 발달과 유지에 있어서는, 대상 CCR 단백질의 유전자 치료용 구성체를 일시적으로 사용(작용제 또는 길항제의 형태로)하여 체내에서 조직을 재구성하는 것을 달성할 수도 있음이 명백하다. 상이한 세포들에 대한 증식 및 분화 잠재력을 조절함으로써, 대상이 되는 유전자 구성체를 사용하여 손상 조직을 재구성하거나 이식 조직의 그라프팅 및 형태를 개선할 수도 있다. 예를 들어, CCR 작용제 및 길항제를 치료적으로 사용하여 물리적, 화학적, 또는 병리학적 피해를 조절할 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자 치료법은 간의 부분절단후에 간의 회복을 위해, 그리고 기종(emphysema)의 치료에 있어서 허파 조직의 재생을 위해 사용할 수 있다.

<140> 예를 들어, 하기 실시예에 설명한 바와 같이 세포의 형질전환은 부분적으로 특정 CCR-유전자에 대한, 예를 들면 점(point)-돌연변이로부터 유전자의 총 결실에 이르기까지의 기능상실 돌연변이에 기인할 수 있다. 또한, 하기 실시예에 제공된 기타의 데이터들은 CCR-작용제를 사용한 치료에 민감한 질환으로서는 CCR-단백질의 발현을 유도하는 능력을 상실한 세포로부터 발생되는 질환들이 포함된다. 예를 들어, 정상적인 세포의 증식은 예컨대 TGF-베타 족의 구성원인 TGF-베타1, TGF-베타2, 또는 TGF-베타3, 그리고 이와 관련된 폴리펩티드 성장 저해제, 예를 들어 액티빈, 인히빈, 뮐러리안 저해제, 데카펜타플레직(decapentaplegic), 골 형상화 인자, 및 vg1(예를 들어, 말단 분화 인듀서)와 같은 음성의 오토크린 또는 파라크린 성장 조절제에 대한 반응에 의해 마아킹되는 것이 일반적이다. 특히 상피세포와 혈액세포에 있어서의 상기 성장 조절제에 의한 세포 증식의 조절이 성장억제의 상태에 있는 것이 보통이다. 이는, 세포를 세포분열후 표현형으로 분화시킴으로써 달성되는 것이 일반적이다. 그러나, 상기 세포형으로부터 유래되는 사람 암의 높은 백분율이 예컨대 TGF-베타와 같은 성장 조절제에 대한 반응성이 현저히 낮아졌다는 것이 밝혀졌다. 예를 들어, 직장, 간 상피 및 진피 원세포의 어떤 종양은 자체의 정상 대조군에 비해 TGF-베타의 성장 저해 효과에 대한 감수성 및 내성이 현저히 저하되었다. 이러한 맥락에서, 몇가지 망막아세포종 세포주의 가치있는 특성은 검출가능한 TGF-베타 수용체의 부재이다. CCR-작용제를 사용하여 상기 종양을 치료하면(유전자 치료법에 의해 전달된 CCR-단백질, 또는 CCR-의태물질), RB-매개의 체크 포인트를 위한 지점의 기능을 확보할 수 있는 기회를 제공할 수 있다.

<141> 그러나, 본 발명의 방법이 일반적으로 RB 또는 RB-류 단백질의 수반과 무관하게 G_1 중에서 활성인 시클린 의존성 키나아제, 예를 들어 CDK4 또는 CDK6에 대해 여전히 신뢰성이 있는 세포의 증식을 억제하기 위해 사용될 수 있음이 인지될 것이다.

<142> 본 발명의 방법에 따라, 본 발명의 CCR-단백질의 발현 구성물은 모든 생물학적으로 효과적인 담체, 예를 들어 재조합 CCR-유전자에 의해 생체내에서 세포를 효과적으로 형질전환시킬 수 있는 모든 제형 또는 조성물 중에 투여될 수 있다. 이러한 시도는 재조합 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 및 헤르페스 심플렉스 바이러스-1, 또는 재조합 박테리아 또는 진핵 세포 혈장을 포함하는 바이러스 벡터 중의 유전자의 삽입을 포함한다. 바이러스 벡터는 세포를 직접 형질전환시키기 위해 사용될 수 있고; 플라스미드 DNA는 예를 들어 양이온성 리포조옴 (리포펙틴) 또는 유도체화된 (예를 들어 항체 콘쥬게이트된) 폴리리신 콘쥬게이트, 그라마시딘 S, 인공 바이러스 엔빌로우프 또는 다른 이러한 세포간 담체의 도움에 의해, 뿐만 아니라 생체내에서 수행되는 유전자 구성물의 직접 주입 또는 $CaPO_4$ 침전에 의해 전달될 수 있다. 적합한 목표 세포의 형질 도입이 유전자 치료에서의 중요한 첫 번째 단계를 나타내기 때문에, 특별한 유전자 전달계의 선택이 예정된 목표의 페노타입 및 투여 경로, 예를 들어 국소 투여 또는 전신 투여와 같은 인자에 의존할 것임이 인지될 것이다.

<143> 세포내로의 본 발명의 단백질 중 하나를 엔코딩시키는 핵산의 생체내 도입을 위한 바람직한 방법은 유전자 생성물을 엔코딩시키는 핵산, 예를 들어 cDNA를 함유하는 바이러스 벡터를 사용하는 것이다. 바이러스 벡터에 의한 세포의 감염은 목표 세포의 대부분이 핵산을 수용할 수 있다는 장점을 갖는다. 부가적으로, 예를 들어 바이러스 벡터에 함유된 cDNA에 의해 바이러스 벡터 내에 엔코딩된 분자는 바이러스 벡터 핵산을 수용한 세포 내에서 효율적으로 발현된다.

<144> 레트로바이러스 벡터 및 아데노-관련 바이러스 벡터는 일반적으로 생체내에서, 특히 인체 내로의 외인성 유전자의 전달을 위해 선택된 재조합 유전자 전달계인 것으로 이해된다. 상기 벡터는 세포 내로 유전자의 효율적인 전달을 제공하고, 전달된 핵산은 숙주의 염색체 DNA 내로 안정적으로 통합된다. 레트로바이러스의 사용을 위한 주요 요건은 특히 세포군 중에서의 야생형 바이러스의 확산 가능성에 대해, 레트로바이러스의 사용 안전성을 보장하는 것이다. 단지 복제-결함 레트로바이러스를 생성시키는 특수화된 세포계 ("패키징 세포")는 유전자 치료를 위한 레트로바이러스의 이용성을 증가시키고, 결함 레트로바이러스는 유전자 치료를 위해 유전자 전달에 사용하기 위해 더욱 특징화된다. [참조 : Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271]. 이와 같이, 레트로바이러스 엔코딩 서열 (*gag, pol, env*)의 일부가 대상 CCR-단백질 중 하나를 엔코딩시키는 핵산에 의해 교체되어 레트로바이러스가 복제 결함이 되게 한 재조합 레트로바이러스가 구성될 수 있다. 복제 결함 레트로바이러스는 표준 기술에 의해 헬퍼 바이러스의 사용을 통해 목표 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있는 비리온 내로 패키징된다. 재조합 레트로바이러스를 생성시키고, 이러한 바이러스로 생체외 또는 생체내에서 세포를 감염시키는 방법은 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al (eds.) Green Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14] 및 다른 표준 실험실 소책자에 공지되어 있다. 적합한 레트로바이러스의 예로는 당분야에 널리 공지된 pLJ, pZIP, pWE 및 pEM이 포함된다. 에코트로픽 및 암포트로픽 레트로바이러스계 둘 모두를 제조하기 위한 적합한 패키징 바이러스 라인의 예로는 ψ Crip, ψ Cre, ψ 2 및 ψ Am이 포함된다. 레트로바이러스는 생체외 및/또는 생체내에서 다양한 유전자를 신경 세포, 상피 세포, 내피 세포, 림프구, 미오블라스트, 간세포 및 골수 세포를 포함하는 많은 서로 다른 종류의 세포 내로 도입시키기 위해 사용되어 왔다. [참조예 : Eglitis, et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; 미합중국 특허 제 4,868,116호; 미합중국 특허 제 4,980,286호; PCT 출원 WO 89/07136호; PCT 출원 WO 89/02468호; 및 PCT 출원 WO 92/07573호).

<145> 대상 CCR-유전자에 대한 유전자 전달계로서 레트로바이러스 벡터를 선택하는데에 있어서, 대부분의 레트로바이러스에 의한 표적 세포의 성공적 감염을 위한 예비 요건, 및 그에 따르는 재조합 CCR-유전자의 안정한 도입을 위한 요건은 표적 세포가 분열되어야 한다는 것임을 주목하는 것이 중요하다. 일반적으로, 상기 요건은 CCR-유전자 구성물을 전달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 사용에 대한 장해가 아닐 것이다. 사실상, 이러한 감염에 대한 제한은 목표 세포를 둘러싸는 조직(예를 들어, 형질전환되지 않은 세포)가 연장된 세포 분열을 일으키지 않고 따라서, 레트로바이러스 벡터에 의한 감염이 잘 되지 않는 경

우에 유익할 수 있다.

<146> 또한, 바이러스 입자의 표면 상의 바이러스 패키징 단백질을 변형시킴으로써, 레트로바이러스의 감염 범위, 및 결과적으로 레트로바이러스-기본 벡터의 감염 범위를 제한시킬 수 있음이 입증되었다. (참조예 : PCT 출원 WO93/25234호, WO94/06920호, 및 WO94/11524호). 예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 감염 범위를 변동시키기 위한 방법은, 세포 표면 항원에 대해 특이적인 항체를 바이러스 *env* 단백질에 커플링시키는 단계 (Roux et al. (1989) *PNAS* 86:9079-9083, Julan et al. (1992) *J. Gen Virol* 73:3251-3255; 및 Goud et al. (1983) *Virology* 163:251-254), 및 바이러스 *env* 단백질에 세포 표면 리간드를 커플링시키는 단계(Neda et al. (1991) *J Biol Chem* 266:14143-14146)를 포함한다. 커플링은 단백질 또는 다른 돌연변이체(예를 들어, *env* 단백질을 아시알로글리코 단백질로 전환시키기 위한 락토오스)과의 화학적 교차결합, 및 융합 단백질(예를 들어, 단쇄 항체/*env* 융합 단백질의 발생에 의한 화학적 교차 결합의 형태를 가질 수 있다. 상기 기술은 일정한 조직 형태에 대한 감염을 제한하거나 다른 식으로 감염시키는 데에 유용하지만 또한, 에코트로픽 인자를 암포트로픽 인자로 전환시키기 위해 사용될 수 있다.

<147> 또한, 레트로바이러스 유전자 전달의 사용은 레트로바이러스 벡터의 CCR-유전자의 발현을 조절하는 조직- 또는 세포-특이성 전사 조절 서열의 사용에 의해 더욱더 향상될 수 있다.

<148> 본 발명에 유용한 다른 바이러스 전달계는 아데노바이러스-유도 벡터를 이용한다. 아데노바이러스의 게놈은 이것이 관심있는 유전자 생성물을 엔코딩시킬 수 있도록 조작될 수 있지만, 정상의 리틱(lytic) 바이러스 사이클에서의 복제 능력에 대한 관점에서는 비활성이다. [참조예 ; Berkner et al. (1988) *Bio Techiques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; 및 Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155]. 아데노바이러스 돌연변이체 Ad 타입 5 dl324 또는 아데노바이러스의 다른 돌연변이체 (예를 들어, Ad2, Ad3, Ad7 등)으로부터 유도된 적합한 아데노바이러스 벡터가 당업자들에게 널리 공지되어 있다. 재조합 아데노 바이러스는 특정 경우에, 이것이 비분열 세포를 감염시킬 수 없고, 통풍 상피(Rosenfeld et al. (1992)), 내피 세포 (Lemarchand et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6482-6486), 간세포 (Herz and Gerard (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816) 및 근세포 (Quantin et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584)를 포함하는 다양한 세포 타입을 감염시키는 데에 사용될 수 있다는 점에서 특정 환경에 유익하다. 또한, 바이러스 입자는 비교적 안정적이고, 정제 및 농축이 잘되고, 상기와 같이, 감염성의 범위에 영향을 미치도록 변형될 수 있다. 부가적으로, 도입된 아데노바이러스 DNA (및 그안에 함유된 외래 DNA)는 숙주 세포의 게놈 내로 통합되지 않지만, 에피소멀을 유지하여 도입된 DNA가 숙주 게놈(예를 들어 레트로바이러스 DNA) 내로 통합되는 경우에 삽입 돌연변이의 결과로서 일어날 수 있는 가능한 문제점을 피한다. 더욱이, 외래 DNA에 대한 아데노바이러스 게놈의 운반 능력은 다른 유전자 운반 인자에 비해 크다 (8 킬로베이스 이하) (Beckner et al., supra; Haj-Ahmand and Graham (1986) *J Virol.* 57:267). 현재 사용중이며, 따라서 본 발명에 의해 바람직한 대부분의 복제-결함 아데노바이러스 벡터는 바이러스 E1 및 E3 유전자의 일부 또는 전부에 대해 결실되지만, 아데노 바이러스 유전성 물질의 80% 만큼을 유지한다. [참조예 : Jones et al. (1979) *Cell* 16:683; Berkner et al. *supra*; and Graham et al. in Methods in Molecular Biology, E.J.Murry, Ed. (Humana, Clifton, NJ, 1991) vol. 7. pp. 109-127]. 삽입된 CCR-유전자의 발현은 예를 들어 E1A 프로모터, 주요 후발(later) 프로모우터 (MLP) 및 관련된 리더(leader) 서열, E3 프로모우터, 또는 외인적으로 첨가된 프로모우터 서열의 조절하에 있을 수 있다.

<149> 대상 CCR-유전자의 전달을 위해 유용한 다른 바이러스 벡터 시스템은 아데노-관련 바이러스(AAV)이다. 아데노-관련 바이러스는 효율적인 복제 및 생산 수명 주기를 위한 헬퍼 바이러스로서 아데노바이러스 또는 간염 바이러스와 같은 다른 바이러스를 필요로 하는 자연발생의 결함 바이러스이다. [참조예 ; Muzyczka et al., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129]. 이것은 또한, 그의 DNA를 비분열 세포 내로 통합시키고, 안정적인 통합의 높은 빈도수를 나타낼 수 있는 수가지 바이러스 중 하나이다. [참조예 ; Flotte et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; and McLaughlin et al. (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973]. 300개 만큼 적은 염기쌍의 AAV를 함유하는 벡터가 패키징되고 통합될 수 있다. 외인성 DNA를 위한 공간은 약 4.5 kb로 제한된다. 세포 내에 DNA를 도입시키기 위해 문헌 [Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260]에 기술된 바와 같은 AAV 벡터가 사용될 수 있다. 다양한 핵산이 AAV 벡터를 사용하여 서로 다른 세포 내에 도입된다. [참조예 : Hermonat et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin et al. (1984) *Virol.* 5:611-619; 및 Flotte et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790].

<150> 유전자 치료에 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터 시스템은 간염 바이러스, 백시니아 바이러스 및 수개의 RNA 바이러스로부터 유도된다. 특히, 간염 바이러스 벡터는 중추 신경계 및 안구 조직의 세포에서 재조합 CCR-유전자의 지속성에 대한 독특한 방법을 제공할 수 있다. [참조 : Pepose et al. (1994) Invest Ophtalmol Vis Sci 35:2662-2666].

<151> 상기 예시된 바와 같은 바이러스 전달 방법 이외에, 또한, 동물의 조직에서 CCR-유전자의 발현을 유발시키기 위해 비-바이러스 방법이 사용될 수 있다. 유전자 전달의 대부분의 비바이러스 방법은 거대분자의 흡수 및 세포내 전달을 위해 포유 동물 세포에 의해 사용되는 정상적 메카니즘에 의존한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 비바이러스 유전자 전달계는 표적 세포에 의한 대상 CCR-유전자의 흡수를 위한 세포내 경로에 의존한다. 상기 타입의 대표적인 유전자 전달계는 리포소옴 유도 계, 폴리-리신 콘쥬게이트, 및 인공 바이러스 엔빌로우프를 포함한다.

<152> 대표적인 구체예에서, 대상 CCR-단백질 중 하나를 엔코딩시키는 유전자는 표면에 양전하를 갖고 (예를 들어, 리포펙틴), 표적 조직의 세포 표면 항원에 대한 항체로 태깅된 리포오솜 중에 엔트래핑될 수 있다. [참조 : Mizuno et al. (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; PCT 공보 WO91/06309; 일본 특허 출원 제 1047381호, 및 유럽 특허 공보 EP-A-43075호]. 예를 들어, 뉴로글리오마 세포의 리포펙션은 글리오마-관련 항원에 대한 모노클로날 항체로 태깅된 리포소옴을 사용하여 수행될 수 있다. [참조 : Mizuno et al. (1992) *Neurol. Med. Chir.* 32:873-876].

<153> 다른 예시적 구체예에서, 유전자 전달계는 폴리리신과 같은 유전자 결합제와 교차결합되는 항체 또는 세포 표면으로 이루어진다. [참조예 : PCT 공보 WO93/04701호, WO92/22635호, WO92/20316호, WO92/19749호, 및 WO92/06180호]. 예를 들어, 대상 CCR-유전자 구성물은 다중 양이온, 예를 들어 폴리리신에 콘쥬게이트된 아시알로글리코 단백질로 이루어진 가용성 폴리누클레오티드 담체를 사용하여 생체내에서 간세포를 형질전환시키기 위해 사용될 수 있다. [참조 : 미합중국 특허 제 5,166,320호]. 또한, 중개된 세포내 취입을 통해 대상 핵산 구성체의 효과적인 전달이 세포내 구성물로부터의 유전자의 방출을 향상시키는 제제를 사용하여 개선될 수 있음이 인지될 것이다. 예를 들어, 인플루엔자 HA 유전자 생성물의 전체 아데노바이러스 또는 푸조게닉 펩티드가 DNA-함유 엔도소옴의 효과적인 파괴를 유도하기 위해 전달계의 일부로서 사용될 수 있다. [참조 : Mulligan et al. (1993) *Science* 260-926; Wagner et al. (1992) *PNAS* 89:7934; and Christiano et al. (1993) PNAS 90:2122].

<154> 임상적 환경에서, 유전자 전달계는 각각 당분야에 공지된 많은 방법 중 어느 하나에 의해 환자에게 도입될 수 있다. 예를 들어, 유전자 전달계의 약제학적 제조물은 예를 들어, 정맥내 주입에 의해 전신으로 도입될 수 있고, 유전자의 전사성 조절 서열 제어 발현으로 인한 유전자 전달 비히클, 세포형 또는 조직형 발현 또는 이들의 조합에 의해 제공되는 형질전환의 특이성으로부터 목표 세포의 특이성 전환이 우세하게 일어난다. 다른 구체예에서, 재조합 유전자의 초기 전달은 매우 국소적인 동물 내로의 도입에 의해 더욱 제한된다. 예를 들어, 유전자 전달 비히클은 카테테르 (미합중국 특허 제 5,328,470호) 또는 입체적 주입 [Chen et al. (1994) *PNAS* 91:3054-3057]에 의해 도입될 수 있다.

<155> 또한, 약제학적 제조물은 허용되는 희석제 중의 유전자 전달계를 필수적으로 구성하거나, 유전자 전달 비히클이 삽입되는 서방성 매트릭스로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달계가 재조합 세포, 예를 들어 레트로바이러스 패키지로부터의 온전히 생성될 수 있는 경우, 약제학적 제조물은 유전자 전달계를 생성시키는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다. 후자의 경우에, 바이러스 패키징 세포를 도입시키는 방법은 예를 들어 재충전 가능하거나 생분해성인 장치에 의해 제공될 수 있다. 최근에 여러 서방성 중합체 장치가 개발되었고, 단백질 함유 생약제를 포함하는 약제의 조절된 전달에 대해 시험되었으며, 중합체 조성 및 형태의 조절을 통해 바이러스 입자의 방출을 위해 적합하게 될 수 있다. 생분해성 및 비생분해성 중합체 양자 모두를 포함하는 다양한 생체 적합성 중합체 (하이드로겔 포함)가 특정 표적 부위에서 이식된 세포에 의한 바이러스 입자의 지속적 방출을 위한 이식체를 형성시키기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이러한 구체예는 중합체 장치 중에 통합된 외인성 정제 바이러스의 전달을 위해, 또는 중합체 장치에서 캡슐화된 세포에 의해 생성되는 바이러스 입자의 전달을 위해 사용될 수 있다.

<156> 단량체 조성물 또는 중합 기술의 선택에 의해, 수분의 양, 다공성 및 결과적인 투과성이 조절될 수 있다. 형상, 크기, 중합체 및 삽입 방법의 선택은 시험하려는 질환 및 환자의 반응에 따라 환자 개인별로 결정될 수 있다. 이러한 이식체의 생성은 일반적으로 당분야에 공지되어 있다. [참조예 : *Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*, ed. by David Williams (MT Press: Cambridge, MA, 1990), 및 사벨 (Sabel) 등의 미합중국 특허 제 4,883,666호]. 삽입체의 또다른 구체예에서, 재조합 바이러스를 생성시키는 세포의 공급원은 이식 가능한 중공 섬유 내에 캡슐화된다. 이러한 섬유는 사전 방사되고 후속적으로 바이러스 공급원으로 로딩될 수 있거나 [참조 : 애비셔(Aebischer) 등의 미합중국 특허 제 4,892,538호; 애비셔 등의 미합중국 특허 제 5,106,627호, Hoffman et al. (1990) *Expt. Neurobiol.* 110:39-44; Jaeger et al. (1990) *Prog. Brain Res.* 82:41-46; and Aebischer et al. (1991) *J. Biomch. Eng.* 113:178-183], 바이러스 패키징 세포에 대한 중합체 코우팅을 형성하는 작용을 하는 중합체와 동시 압출될 수 있다 [참조 : 림 (Lim)의 미합중국 특허 제 4,391,909호; 세프톤 (Sefton) 등의 미합중국 특허 제 4,353,888호, SUgamori et al. (1989) *Trans. Am. Artif. Intern. Organs* 35:791-799; Sefton et al. (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 29:1135-1143; and Aebischer et al. (1991) *Biomaterials* 12:50-55]. 다시, 중합체의 조절이 수행되어 바이러스 입자의 최적 방출을 제공할 수 있다.

<157> 본 발명의 방법의 사용을 추가로 예시하기 위해, 예를 들어 유전자 치료에 의한 CCR-유전자의 치료적 응용이 신경교종의 치료에 사용될 수 있다. 신경교종은 전체 수명에서 두개골간 종양의 40 내지 50%이다. 유해 신경교종에 대한 수술 후에, 방사선 치료, 화학 치료, 및 종종 면역 치료의 사용의 증가에도 불구하고, 사망률 및 질병률은 실제로 개선되지 않았다. 그러나, 상당한 양의 신경교종에 대해, TGF-β 반응성이 성장 조절의 손실에서 중요한 현상이라는 실험적 및 임상적 증거가 증가하고 있다. 감소된 반응성의 원인, 예를 들어 p15의 기능의 손실 또는 다른 TGF-β 시그날 전환 단백질의 손실과 무관하게, 세포 중의 p15 (또는 다른 CCR-단백질)의 외인성 발현이 세포 증식을 억제하는 데에 효과적으로 사용될 수 있다.

<158> 재조합 단백질의 발현을 위한 신경교종 세포의 표적화를 위해 유전자 치료가 사용될 수 있음이 입증되었다 [참조 : Miyao et al. (1993) *J. Neurosci. Res.* 36:472-479; Chen et al. (1994) PNAS 91:3054-3057; and Takamiya et al. (1993) *Neurosurg.* 79:104-110]. 이와 같이, CCR-단백질을 발현시키기 위한 유전자 구성물이 바람직하게는, 입체 방식-의존 수단에 의해 종양에 전달될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 유전자 전달계는 레트로바이러스 벡터이다. 어른 CNS에는 빠르게 성장하는 정상 세포가 부족하기 때문에, 신경교종 세포는 재조합 레트로바이러스에 의해 특이적으로 형질도입된다. 예를 들어, 레트로바이러스 입자는 수술 후에 옴마야 관을 통해 종양 공동 내로 전달되거나 대안적으로, 회복성 면역 단리 비히클에 캡슐화된 패키징 섬유 아세포가 종양 공동 내로 도입될 수 있다. 레트로바이러스-매개 유전자 치료의 효과를 증가시키고 부작용을 감소시키기 위해, 신경교종-특이성 프로모우터가 사용되어 CCR-유전자의 발현을 조절할 수 있다. 예를 들어, 신경교 섬유성 산성 단백질 (GFAP) 및 미엘린 기본 단백질 (MBP)의 프로모터 영역이 재조합 유전자에 실시 가능하게 결합되어, 재조합 유전자 구성물의 신경교 세포-특이성 발현을 가능하게 한다.

<159> 다른 구체예에서, 유전자 치료는 여러 암종의 치료에서 대상 CCR-단백질과 함께 사용될 수 있다. 암종 중에서, TGF-β 반응성과 유해 종양 등급의 증가 및 증식 세포 핵 항원 지수의 증가 둘 모두 사이에서 강한 상호 관계가 관찰되었다 [참조 : Coffery et al. (1988) *Cancer* 48:1596-1602; Masui et al. (1986) *PNAS* 83:2438-2442; and Knabble et al. (1987) *Cell* 48:417-428]. 대표적 구체예에서, 레트로바이러스 벡터 중의 대상 CCR-유전자로 이루어진 유전자 치료계가 특정 유방암을 치료하기 위해 사용된다. 바람직한 구체예에서, 대상 CCR-단백질 유전자의 발현은 포유 동물-특이성 프로모터에 의해 최소한 부분

적으로 조절될 수 있으며, 이 중 대부분이 이용될 수 있다. [참조 : Hennighausen (1990) *Protain Expression and Purification* 1:3-8; and Guenberg et al. (1992) *BIOCHEM J* 283:625-632].

<160> 유사한 방식으로, 대상 CCR-유전자의 전달을 수반하는 유전자 치료 프로토콜은, 형질전환에서 점진적 TGF-β 저항성에 대한 모델로서 또한 역할을 하는 유해 흑색종의 치료에 사용될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 흑색종의 치료를 위한 유전자 치료 프로토콜은, 레트로바이러스 전달에 의한 CCR-유전자 구성물의 전달 이외에, 직접 주입에 의한 유전자의 약제 제조물의 전달을 포함한다. 예를 들어, 미합중국 특허 제 5,318,514호에는 본 발명에 따라 사용될 수 있는, 상피 세포 내로의 유전자의 전기 영동을 위한 도포기가 기술되어 있다.

<161> 대상 CCR-유전자 구성물은 과증식성 맥관 질환, 예를 들어 평활근 과형성(예를 들어 아테롬성 동맥 경화증) 또는 레스티노시스, 뿐만 아니라 섬유 형성을 특징으로 하는 다른 질환, 예를 들어 류머티스성 관절염, 인슬린 의존성 진성 당뇨병, 사구체 신염, 경화증 및 경피증, 특히 TGF-β 오토크린 또는 파라크린 시그널화의 손실이 관련된 증식성 질환의 치료에 사용될 수 있다.

<162> 예를 들어, 레스티노시스는 사용된 여러 기계적 및 약제학적 개재에도 불구하고, 심장 혈관 형성의 효율을 계속적으로 제한한다. 평활근 세포의 친밀한 증식의 정상 조절에 수반되는 중요한 메카니즘은 평활근 세포에서의 오토크린 및 파라크린 TGF-β 저해 루프의 유도인 것으로 보인다. [참조 : Scott-Burden et al. (1994) *Tex Heart Inst J* 21:91-97; Graiger et al. (1993) *Cardiovasc Res* 27:2238-2247; and Grainger et al. (1993) *Biochem J* 294:109-112]. TGF-β 에 대한 민감성의 손실, 또는 대안적으로, PDGF 자동 자극에 의한 바와 같은 저해 자극의 무시는 레스티노시스에서의 비정상 평활근 증식에 대한 기여 인자일 수 있다. CCR-유전자 구성물은 예를 들어 바이러스 리포소옴 전달 조성물을 사용하는 피부 관통 트랜스루미날 유전자 전달 (Mazur et al. (1994) *Tex Heart Inst J* 21:104-111)에 의해 전달될 수 있다. 심장 또는 맥관 평활근의 치료를 위한 대표적 아데노바이러스-매개 유전자 전달 기술 및 조성물은 PCT 공보 WO94/11506호에 기술되어 있다.

<163> 형질전환 성장 인자-β 는 또한 사람 신장 발달 및 질환에서 국소적 사구체 및 간질 자리에서 현저한 역할을 하는 것으로 이해된다. 결과적으로, 대상 방법은 신장 조직에서 대상 CCR-단백질의 생체내 전달 및 재조합 발현을 포함하는 사구체 글로머룰로패티 및 다른 직장 증식성 질환의 치료 또는 저해 방법을 제공한다.

<164> 본 발명의 방법은 또한 망막아세포종를 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 여기에서 망막아세포종 유전자(RB)는 그 자체로 손상받을 수 없고 예를 들어, RB 체크포인트의 효과적인 손상은 RB의 CDK4 인산화를 조절하는데 대한 실패의 결과이다. 이와 같이, 외래 CCR-유전자는 망막아세포종 세포 중에서 발현되어, CDK4 활성화 및 다운-조절 RB 인산화의 저해를 야기시킨다. 예시 하면, 재조합 레트로바이러스는 p16 또는 p15의 발현, 및 망막아세포종 세포에 특이성인 항체, 예를 들어 망막 S-항원에 대한 항체에 의해 *env* 단백질을 유도함으로써 향상되는 망막아세포종 세포의 감염성을 촉진시키기 위해 구성될 수 있다 [참조 : Doroso et al. (1985) *Invest Opthalmol Vis Sci* 26:560-572; Liao et al. (1981) *Eur J Immunol* 11:450-454; 및 미합중국 특허 제 4,444,744호].

<165> 다른 구체예에서, 대상 CCR-유전자는 육종(sarcoma) 예를 들어, 골육종 또는 카포시 육종에 전달된다. 대표적 구체예에서, 유전자는 바이러스 벡터 중에서 제공되고 골육종에 대해 면역 선택성인 항체로 유도된 바이러스 입자에 의해 전달된다. [참조예 : 미합중국 특허 제 4,564,517호 및 제 4,444,744호; 및 Singh et al. (1976) *Cancer Res* 36:4130-4136].

<166> 다른 구체예에서, 대상 CCR-유전자가 원하지 않는 탈분화를 특징으로 하고, 또한 원하지 않는 아포토시스가 일어날 수 있는 조직 중에서 재조합적으로 발현된다. 예를 들어, 많은 신경학적 질환은 신경성분의 불연속 집단화의 퇴화와 관련된다. 예를 들어, 알쯔하이머 병은 수개의 신경 전달계에서의 결핍과 관련되며, 신경 전달계는 신피질에 대해 돌출한 것 및 피질과 함께 존재하는 것 양자 모두를 포함한다. 예를 들어, 알쯔하이머병에 걸린 환자의 핵 바살리스는 나이에 부합되는 대조군과 비교하여 뉴우런의 현저한 (75%) 손실을 갖는 것으로 관찰되었다. 알쯔하이머병이 치매의 가장 공통적인 형태이지만 수가지 다른 질환이 치매를 발생시킬 수 있다. 대부분은 연령과 관련되어 젊은이 보다는 노인에게서 더 큰 발병률로 일어난다. 치매 중 수 가지는 중추신경계의 여러 부분, 특히 대뇌 피질에서 뉴우런의 치사를 특징으로 하는 퇴행성 질환이다. 그러나, 치매의 일부 형태는 대뇌 피질 아래에 있는 시상 또는 백질의 퇴화와 관련된다. 여기에서, 인식 기능 장애는 원심성 및 구심성 신경의 퇴화에 의해 피질 영역의 단리로부터 유발된다. 헌팅톤병은 인트라스트레이탈 및 피질 콜린성 뉴우런 및 GABA 유발성 뉴우런의 퇴화를 수반한다. 픽의 병은 종종 선조체 중의 뉴우런의 치사에 의해 달성되는 전방 및 후방 측두골 돌출부의 신피질의 심한 뉴우런 퇴화이다. 따라서, 대상 CCR-유전자는 유전자 치료 기술에 의해 영향받은 조직으로 전달된다. 발현 인자, 세포 및 바이러스 유전자이식 담체의 구성 및 뉴우런 유전자 치료에 대한 표적 세포의 특성화에 있어서 많은 진보가 이루어졌으며, 이는 대상 CCR-유전자의 전달을 위해 쉽게 부합될 수 있음이 자명하다. [참조예 : Suhr et al. (1993) *Arch Neurol* 50:1252-1268; Jiao et al. (1993) *Nature* 362:450-453; Friedmann (1992) *Ann Med* 24:411-417; and Freese et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:7219-7223].

<167> 퇴행성 유도 치매이외에, 대상 유전자 치료 시스템은 경우에 따라 진전 및 비자발 운동의 징후를 갖는 신경 퇴행성 질환의 치료에 응용될 수 있다. 파킨슨병은 예를 들어 주로 피질 아래 구조에 영향을 주고, 흑질 경로, 종구 핵, 청반, 및 미주신경의 운동 핵의 퇴화를 특징으로 한다. 발리즘은 대표적으로 종종 실제 맥관 고장으로 인한 시상 아래 핵에 대한 손상과 관련된다. 또한, 궁극적으로 말초 신경계의 체강 분할에 영향을 주고 신경근 질환으로서 나타날 수 있는 뉴로겐성 및 근병성 질환이 포함된다. 그 예로는, 근위축성 측색 경화증, 길라인-바레 증후군 및 만성 말초신경병과 같은 만성 위축증, 뿐만 아니라, 진행성 연수 마비 또는 척수 근위축증으로서 나타날 수 있는 다른 질환이 포함된다. 더욱이, CCR-유전자 치료 구성물의 사용은 병변에 대해 동축에 있는 사지의 질환을 발생시키는 소뇌의 질환과 같은, 저긴장증 또는 운동 실조증을 유발시키는 송뇌의 질환의 치료에 적용될 수 있다. 예를 들어, p16 또는 p15 유전자 구성물은 알코올성 환자에게서 공통적인 바와 같은 전염 (충부 및 다리 부분)을 수반하는 소뇌 피질 퇴화의 제한된 형태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

<168> 또한, 대상 CCR-유전자는 또한, 평활근 및 내분비 조직 (예를 들어 선 조직)의 신경 분포에 영향을 주는 질환을 포함하는, 말초 신경계의 자발적 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 유전자 치료에 의한 재조합 p16 또는 p15 발현은 심장의 횡문근에 분포하는 신경의 퇴행성 질환으로부터 발생할 수 있는 심박 급속증 또는 심실 부정맥을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

<169> 본 발명의 다른 관점은 하나 이상의 대상 CCR-단백질의 저해 조절에 민감하지 않은 CDK4 및 CDK6 돌연변이체에 관한 것이다. 세포 주기 조절에 대해, 상기 돌연변이체는 CCR-단백질의 작용을 상쇄하고, 바람직한 구체예에서, 이것이 RB 또는 RB-형 단백질에 의해 중개된 체크포인트와 같은 유사 분열 특정 세포-주기 체크 포인트의 조절로부터 제거된다는 점에서 우세한 네가티브 돌연변이체이다. 대표적인 CDK4 및 CDK6 돌연변이체는 서열번호 9 (CDK4) 및 서열번호 10 (CDK6)로 표현되며, 여기에서, 각각 위치 24 및 31에서, 야생형 효소 중의 Arg인 Xaa가 효소를 CCR-단백질에 의한 저해에 민감하지 않게 하도록 돌연변이된다. 바람직한 구체예에서, Xaa는 더욱 바람직하게는 염기성 측쇄를 갖지 않는 아미노산 (예를 들어, Arg, Lys 또는 His가 아닌)일 지라도, 아르기닌을 제외한 다른 아미노산이다. 바람직한 구체예에서, 아르기닌은 시스테인으로 변한다.

<170> p16과 결합하는 능력이 손상된 다른 CDK4 돌연변이체가 하기의 실시예 10에 기술되어 있다. 따라서, CDK4의 위치 22에서의 Xaa (CDK6의 잔기 29)는 리신을 제외한 다른 아미노산, 바람직하게는 염기성 측쇄 또는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산일 수 있고; CDK4의 위치 95에서 Xaa (CDK6의 잔기 100)은 히스티딘을 제외한 다른 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 산성 또는 비극성 또는 소수성 측쇄를 갖는 아미노산이고; 위치 97에서 Xaa(CDK6의 잔기 102)는 아스파르트산을 제외한 다른 아미노산일 수 있으며, 바람직하게는 염기성 측쇄 또는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산이다. 이러한 CDK4/CDK6 돌연변이체가 하나 이상의 상기 돌연변이체를 포함할 수 있음이 자명할 것이다.

<171> 돌연변이체 CDK4 및 CDK6 단백질, 이러한 단백질을 엔코딩시키는 유전자, 및 이러한 단백질에 대해 특이적인 항체는 각각의 CCR-단백질에 대해 상기 기술한 구체예 중 어느 하나와 유사한 방식으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체 키나아제를 엔코딩시키는 핵산이 많은 형태 중 어느 하나, 예를 들어 재조합 발현 벡터 및 프로우브로서 제공될 수 있다. 효소의 단리된 형태 및 재조합 형태 양자 모두, 및 각각의 키나아제의 돌연변이 형태와 특이적으로 결합하는 항체가 특히 고려된다. 더욱이, 본 출원이 CCR 길항 물질에 대한 유용성을 언급하는 경우에는 언제나 대상 CDK 돌연변이체가 이용될 수 있다고 이해된다.

<172> 더욱이, CDK4의 Arg→Cys 돌연변이체는 첫번째로 흑색종 환자로부터의 세포에서 발견되었고, 후속 CDK4/CDK6 돌연변이체는 상기 돌연변이체에 근거한 CDK4의 분자 모델의 분석으로부터 단리되며 (실시예 10), 상기 기술된 것과 같은 돌연변이체 기술은 CCR-단백질 저해에 대해 내성인 다른 CDK4 및 CDK6를 단리시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, CDK4 및 CDK6 저해에 민감한 검정을 사용하는 우세한 네가티브 돌연변이체에 대해 스크리닝될 수 있는 CDK 돌연변이체의 라이브러리를 발생시키기 위해 스캐닝 돌연변이 또는 랜덤 돌연변이가 사용될 수 있다. 예를 들어, CDK4의 라이브러리는 p16을 과발현시키고 결과적으로 정지되는 세포로 형질전환시킨다. p16/p15로부터 CDK4 돌연변이체를 커플링시키지 않는 돌연변이체의 부재하에, 세포는 정지한 상태로 유지될 것이다. 대조적으로, p16으로부터 활성을 커플링시키지 않는 키나아제에 대한 돌연변이체는 CDK4의 돌연변이체를 발현시키는 세포를 증식시킬 것이다. 유사한 구체예에서, 포스포릴화된 RB의 수준은 포스포릴화된 RB의 면역 검출, 또는 RB의 포스포릴화된 상태에 의존하여 발현되는 RB-민감성 리포터 구성물의 사용에 의한 바와 같이, CDK4의 우세한 네가티브 돌연변이체를 검출하기 위해 사용될 수 있다. [참조예 : Park et al. (1994) *J Biol Chem* 269:6083-6088; Ouellette et al. (1992) *Oncogen* 7:1075-1081; and Slack et al. (1993) *Oncogen* 8:1585-1591]. CDK4의 p16/p15 저해를 커플링시키지 않는 돌연변이가 보다 더 많은 양의 인산화된 RB 단백질을 세포 중에 축적시킬 것이다.

<173> 본 발명의 다른 관점은 CDK4/CDK6의 CCR-결합 포켓의 발견에 관한 것이다. 하기의 실시예 10에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 포인트 돌연변이체 및 분자 모델로부터, CDK4의 잔기 K22, R24, H95 및 D97 (CDK6의 잔기 K29, R31, H100 및 D102)의 일부분 이상에 의해 최소한 부분적으로 결정된 표면이 p16과 같은 CCR-단백질에 대한 결합 포켓을 규정함을 확인하였다. CDK4의 작은 돌출부 내에 있는 상기 결합 포켓은 키나아제에 대한 ATP 결합 자리에 매우 근접하며, p16과의 결합은 또한 CDK4/CDK6의 ATP 결합 자리를 차단 또는 변형시킨다. 따라서, 본 발명은 CDK 단백질의 3차원 분자 모델, 및 키나아제의 적어도 하나의 생물학적 활성을 저해할 수 있는 제제의 디자인에 대한 주형으로서의 이것의 사용에 관한 것이다. CDK4 또는 CDK6의 CCR-형 저해제를 디자인하기 위한 시도에 대한 일체화된 단계는 p16-결합 자리에 대한 CCR-단백질의 결합을 최소화시키는 데에 근거하여 일정한 약제 디자인에 의해 약제를 디자인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 저해제를 키나아제와 최적으로 상호 작용시키기 위해 일반적으로, 저해제가 효소의 p16-결합 자리의 형태와 최소한 부분적으로 유사한 형태를 갖는 것이 바람직할 것이다. 부가적으로, 정전기 상호작용, 수소 결합, 소수성 상호작용, 황무 작용, 및 효소와 리간드의 협력 운동을 포함하는, 다른 인자들이 모두 결합 작용에 영향을 주며, 이들은 생체 활성 저해제를 디자인하기 위한 시도에서 고려되어야 한다.

<174> 대상 효소의 컴퓨터-산출 분자 모델이 생성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 최소한 CDK4 또는 CDK6의 Cα -탄소 위치는 상동 모델링에 의해 CDK2의 협력과 같은 특별한 협력 패턴으로 맵핑되고 [DeBondt et al. (1993) *Nature* 363:595-602; Endicott et al. (1994) *Prot Eng* 27:243-253; and Morgan et al. (1994) *Curr Opin Cell Biol* 6:239-246], 키나아제의 구조 및 각각의 원자의 속도는 도킹 시뮬레이션이 결정되는 시뮬레이션 온도 (T_0)에서 계산된다. 필연적으로, 이러한 프로토콜은 주로 모델링된 키나아제중의 측쇄 구조의 예측을 수반하면서, CDK2 구조에 의해 제공되는 것과 같은 3차 구조로부터 취한 주쇄 트레이스를 가정한다. 에너지 최소화 경로를 수행하기 위한 컴퓨터 프로그램이 분자 모델을 산출시키기 위해 통상적으로 사용된다. 예를 들어, CHARMM(Brooks et al. (1983) *J Computer Chem* 4:187-217) 및 AMBER(Weiner et al. (1981) *J Computer Chem* 106:765) 연산은 양자 모두 분자 시스템 셋업, 힘의 장 계산 및 분석을 취급한다. [참조예 : Eisenfield et al (1991) *Am J Physiol* 261:C376-386; Lybrand (1991) *J Pharm Belg* 46:49-54; Froimowitz (1990) *Biotechniques* 8:640-644; Burbam et al. (1990) *Proteins* 7:99-111; Pederson (1985) *Environ Health Perspect* 61:185-190; and Kini et al. (1991) *J Biomol*

Struct Dyn 9:475-488]. 상기 프로그램의 중심은 모델에서 매 분자의 위치가 주어지면, 시스템의 전체 잠재 에너지 및 각각의 원자상의 힘을 계산하는 일련의 서브루틴이다. 상기 프로그램은 CDK2에 대한 모델 코오디네이트, 잠재 에너지 작용의 여러 조건에 대한 파라미터 및 분자 형태 (공유 결합 구조)의 묘사와 같은 원자 코오디네이트의 출발 세트를 이용할 수 있다. 이러한 분자 모델링법의 공통적 특징은, 수소 결합 및 다른 강제력을 핸들링하기 위한 조건; 주기적 경계 조건의 사용; 및 경우에 따라 위치, 속도, 또는 온도, 압력, 부피, 강제력 또는 외부적으로 조절되는 조건을 조절하기 위한 조건을 포함한다.

<175> 가장 통상적인 에너지 최소화 방법은 상기 기술된 입력 데이터를 사용하고, 원자 위치의 어떠한 세트에 대해서도 잠재 에너지 및 이것의 기울기 (이것은 각각의 원자 상에 힘을 제공함)을 계산하기 위해, 잠재 에너지 작용이 카테시안 코오디네이트의 명백한 미분 작용이라는 사실을 이용한다. 상기 정보는 전체 잠재 에너지를 감소시키기 위한 노력에서 그리고 상기 공정을 반복하여 주어진 세트의 외부 조건하에 분자 구조를 최적화시킴으로서, 새로운 코오디네이트의 세트를 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 에너지 최소화 방법은 일상적으로 CDK4 및 CDK6, 및 핵산, 중합체 및 제올라이트와 유사한 분자에 적용된다.

<176> 일반적으로, 에너지 최소화 방법은 도킹 시뮬레이션 온도 T_0와는 다를 수 있는 주어진 온도 Ti에 대해 수행될 수 있다. Ti에서 분자의 에너지 최소화 하에, 모든 원자의 코오디네이트 및 속도가 컴퓨터 계산된다. 부가적으로, 시스템의 정상 모우드가 계산된다. 당업자들은 각각의 정상 모우드가 시스템의 모든 부분이 서로에 대해 단계적으로 움직이는 수집성 주기 운동이며, 분자의 운동이 모든 정상 모우드에 포개짐을 인지할 것이다. 주어진 온도에 대해, 특별한 모우드에서 운동의 평균 스퀘어 증폭은 상기 모우드에 애해 일정한 효과적인 힘에 반비례하여, 분자의 운동이 종종 낮은 주파수 변동에 의해 제공될 것이다.

<177> 분자 모델이 Ti에서 에너지가 최소화된 후에, 시스템은 바람직한 온도 T_0에 도달할 때 까지 단계적 방식으로 원자의 속도가 척도화되는 경우, 평형화 공정을 수행함으로써 시뮬레이션 온도 T_0로 "가열되거나" "냉각된다". 시스템은 평균 운동에너지와 같은 시스템의 특정 성질이 일정하게 유지될 때 까지 특정 기간 동안 추가로 평형화된다. 각각의 원자의 코오디네이트 및 속도가 평형화된 시스템으로부터 얻어질 수 있다.

<178> 추가의 에너지 평형화 경로가 또한 수행될 수 있다. 예를 들어, 제 2 부류의 방법은 단백질에 대한 강제 EOM에 대해 대략적 솔루션을 계산하는 것을 포함한다. 상기 방법은 라그랑에 승수를 풀기 위한 반복적 시도를 이용하고, 일반적으로, 필요한 보정이 작은 경우에 단지 수회의 반복을 필요로 한다. 상기 유형의 가장 선호되는 방법 [SHAKE (Ryckaert et al. (1977) *J Comput Phys* 23:327; and Van Gunsteren et al. (1977) *Mol Phys* 34:1311)]은 강제 횟수가 증가함에 따라 O(N)으로서 실행되고 척도화되기 쉽다. 따라서, 상기 방법은 관심있는 CDK 단백질과 같은 매크로분자에 적용될 수 있다. 대안적인 방법 [RATTLE (Anderson (1983) *J Comput Phys* 52:24]는 베를렛 연산의 속도 버젼에 근거한 것이다. SHAKE와 같이, RATTLE는 반복 연산이고, 대상 단백질의 모델을 에너지 최소화시키기 위해 사용될 수 있다.

<179> 결정학적으로 해결된 잠재 약물학적 분자의 생물학적 매크로 분자의 증가되는 이용성은 분자 디자인에 대한 다양한 직접적 컴퓨터 계산 방법의 개발을 촉진시키며, 여기에서 기질 결합 자리의 입체 및 전자적 성질은 CDK4 및/또는 CDK6의 잠재적 저해제의 디자인을 가이드하기 위해 사용된다. [참조 : Cohen et al. (1990) *J Med. Cam*. 33:883-894; Kuntz et al. (1982) *J. Mol. Biol* 161:269-288; DesJariais (1988) *J. Med. Cam.* 31:722-729; Bartlett et al. (1989) (*Spec. Publ., Roy. Soc. Chem.*) 78:182-196; Goodford et al. (1985) *J. Med. Cam*. 28:849-857; DesJariais (1988) *J. Med. Cam*. 29:2149-2153]. 일반적으로 관련된 방법은 2가지 범주에 속한다: (1) 공지된 분자의 3-D 구조 (결정학적 데이터베이스로부터 얻음)가 효소 구조와 도킹되고 양호하게 적합한 것으로 스코어링된 유추에 의한 디자인; 및 (2) 리간드 모델이 효소 중에 조각적으로 구성된 *de novo* 디자인. 상기 (2)의 디자인은 특히, 키나아제 CCR-결합 자리와 결합시키도록 독특하게 디자인된 새로운 분자의 개발을 촉진시킬 수 있다.

<180> 예시적 구체예에서, 잠재적 CDK4/CDK6 억제제의 디자인은 P16-결합 자리에 대해 바람직한 형태의 일반적 투시법으로부터 시작되고, 표적 결합 자리 내로 기하학적으로 고정시키는 후보에 대한 공지된 3차원 구조의 작은 분자의 데이터베이스를 스캐닝할 수 있는 서치 연산이 사용된다. 형태 서치에서 발견된 분자는 초기 서치 동안 화학적 상호작용의 평가가 반드시 이루어지지는 않기 때문에, 그 자체로 반드시 유도될 것으로는 기대되지 않는다. 오히려, 이러한 후보는 추가의 디자인에 대한 프레임워크로서 작용하여 적합한 원자 치환이 이루어질 수 있는 분자 골격을 제공하는 것으로 예상된다. 물론, 상기 분자의 화학적 선호도가 평가될 수 있지만, 원자 유형이 정전기, 수소 결합, 및 효소와의 소수성 상호작용을 최대화시키도록 변동될 것으로 기대된다. 상기 유형의 대부분의 연산은 대상 키나아제의 p16-결합 자리의 형태에 대해 상보성인 화학적 구조의 폭넓은 혼합을 발견하기 위한 방법을 제공한다. 캠브리지 크리스탈로그래픽 데이터 뱅크 (CCDB) [Allen et al. (1973) *J. Chem. Doc*. 13:119]와 같은 특정 데이터베이스로부터 수득한 일련의 작은 분자는 각각, 도킹 연산의 사용으로 많은 기하학적으로 허용될 수 있는 배향에서 키나아제의 p16-결합 자리에 개별적으로 도킹된다. 바람직한 구체예에서, DOCK로 불리우는 일련의 컴퓨터 연산이 CDK 단백질의 p16 인식 표면을 형성하는 함입부 및 홈의 형태를 특징화시키기 위해 사용될 수 있다. [Kuntz et al. (1982) *J. Mol. Biol* 161:161-288]. 프로그램은 또한, 효소의 p16-결합 자리에 대해 상보적인 형태의 주형에 대해 작은 분자의 데이터베이스를 검색할 수 있다. [DesJariais (1989) *J.Med. Chem* 31:722-729]. 상기 주형은 통상적으로, 우수한 화학적 및 정전기적 상호 작용을 달성하기 위한 변형을 필요로 한다. [DesJariais (1988) *ACS Symp Ser* 413:60-69]. 그러나, 프로그램은 단지 강제적인 형태에 근거한 저해제에 대한 공지된 보조 인자를 정확하게 위치시키는 것으로 입증되었다.

<181> 배향은 양호하게 적합한 것으로 평가되고, 최선의 상태가 AMBER 또는 CHARMM과 같은 분자 메카닉스 프로그램을 사용하는 추가의 시험을 위해 유지된다. 이러한 연산은 이미, 수용체-효소의 주어진 결합 자리에 대해 형태상 바람직한 다양한 분자를 발견하는 데에 성공적인 것으로 입증되었으며, 수개의 바람직한 특징을 갖는 것으로 입증되었다. 첫째로, 이러한 연산은 분자 구조의 현저한 다양성을 회복시킬 수 있다. 둘째로, 가장 양호한 구조는 다른 단백질에 대한 이전의 적용에서 확장된 표면 영역에 걸쳐 현저한 형태적 상보성을 나타내었다. 세째로, 전반적인 접근은 후보 원자의 위치선정에서의 작은 불확실성에 대

해 매우 확실한 것으로 보인다.

<182> 굿포드(Goodford)(1985, *J Med Chem* 28:849-857) 및 부바이어(Boobbyer) 등(1989, *J. Med. Chem.* 32:1083-1094)은 결합 자리의 분자 표면 상의 서로 다른 화학적 그룹 (프로우브)에 대한 높은 친화성의 영역을 결정하는 컴퓨터 프로그램(GRID)를 계발했다. GRID는 결합을 향상시키는 p16 등과 같은 공지된 리간드에 대한 변형을 제공하기 위한 수단을 제공한다. 높은 친화성의 영역으로서 GRID에 의해 식별된 자리의 일부가 일련의 공지된 리간드로부터 추론적으로 결정되는 "약물 패턴"에 상응하는 것으로 예측될 수 있다. 본원에서, 용어 "약물 패턴"은 결합을 위해 중요한 것으로 믿어지는 예측된 리간드의 특징인 기하학적 배열이다. 따라서, 대상 CCR-단백질의 짧은 중첩 펩티딜 부분은 CDK4 또는 CDK6에 대해 규정된 p16-결합 자리를 결합시키는 능력에 대해 스캐닝될 수 있다.

<183> 본 발명의 다른 구체예는 CLIX와 같은 컴퓨터 연산을 이용한다. 상기 CLIX는 입체적으로 허용될 수 있고 후보 분자와 주변 아미노산 잔기 사이의 바람직한 화학적 상호작용을 달성시킬 수 있다. 고도의 가능성을 갖는 방식으로 수용체 결합 자리에서 배향될 수 있는 작은 분자 대한 CCDB와 같은 데이터베이스를 검색한다. 상기 방법은 서로 다른 화학적 그룹에 대한 바람직한 결합 위치의 조화라는 관점에서 키나아제의 p16-결합자리를 특징화시키고, 조화되는 일원을 가지는 개개의 후보 화학적 그룹의 최대 공간적 조화를 야기하는 후보 분자의 배향을 검색하는 것에 근거한다. 컴퓨터 파워의 현재 이용성은 신규의 리간드에 대한 컴퓨터 베이스 서치 다음에 폭-제 1 방법이 수행됨을 나타낸다. 폭-제 1 방법은 하나의 후보에 대한 최대의 상세한 분석이 다음 단계로 진행되기 전에 수행되는 깊이-제 1 방법과 상반되게, 점증되는 엄격한 기준의 적용에 의해 잠재적 후보 검색 공간의 크기를 점차적으로 줄이는 것을 목적으로 한다. CLIX는 결합의 분석이 기본적인 상기 방법에 따르며, 이것은 바람직한 결합 상호작용이 실제로 일어나는 충분한 조건을 제공하지 않으면서, 결합에 대한 "정확한" 위치에서 개별적 그룹을 갖고 입체적으로 적합한 필수 조건을 충족시키는 것으로 보인다. 바람직한 배향에서, 컴퓨터 그래픽 및 복잡한 분자 모델 기술을 사용하여, 분자-분자 기준으로 시험될 수 있는 분자의 분류된 "쇼트리스트"가 생성된다. CLIX가 또한, 키나아제의 p16-결합 포켓과의 결합을 증진시키는 후보 분자의 치환성 화학 그룹에 대한 변동을 제시할 수 있다.

<184> CLIX의 연산의 상세한 설명은 문헌 [Lawrence et al. (1992) *Proteins* 12:31-41]에 기술되어 있으며, CLIX 연산은 하기와 같이 요약될 수 있다. GRID 프로그램은 다양한 대표적인 화학적 그룹에 대한 키나아제의 p16-결합 자리에서 불연속한 바람직한 상호 작용 위치 (목표 자리)를 결정하기 위해 사용된다. CCDB 중의 각각의 후보 리간드에 대해, 단백질의 결합 자리 중의 공간적 의미에서, 한쌍의 후보 치환 화학적 그룹을 GRID에 의해 제안된 한쌍의 상응하는 바람직한 상호 작용자리와 일치시키기 위한 철저한 시도가 이루어졌다. 리간드 그룹의 쌍과 GRID 자리의 쌍의 모든 가능한 조합이 이러한 과정 동안 고려된다. 결합 자리에서 기하학적으로 매우 적합하고 원자단과 GRID 자리의 상당한 일치성을 나타내는 특별한 후보/배향 조합이 유지된다.

<185> 폭-제 1 방법과 일치하여, 상기 방법은 가설을 간편화시키는 것을 수반한다. 경질 단백질 및 작은 분자의 기하학적 형태가 전체에 걸쳐 유지된다. 제 1 접근법으로서, 경질의 기하학적 형태는 CDK4 또는 CDK6 유도 구조의 에너지 최소화 코오디네이트가 국소적이기는 하지만, 분자에 대한 에너지 최소값은 나타냄에 따라 허용될 수 있다. CLIX에 내재하는 추가의 가설은, 잠재적 리간드가 키나아제의 p16-결합 자리 내로 도입되는 경우에, 환자의 입체화학적 또는 부분적 전하 분포의 변동을 유도하여 GRID 상호 작용 에너지 맵을 컴퓨터로 제작하는 기준을 변경시키지 않는다는 것이다. 또한, GRID에 의해 예측되는 상호작용 자리가 단지 위치 및 유형의 의미로 사용된다는 것, 즉 후보 원자단이 GRID에 의해 바람직한 것으로 예측되는 자리에 위치하는 경우에, 결합의 기하학적 형태, 양자화의 상태, 또는 부분적 전하 분포가 단백질과 상기 원자단 사이의 강한 상호작용에 바람직하다는 것을 보장하는 어떠한 체크도 이루어지지 않는다는 것이 강조되어야 한다. 이러한 상세한 분석은 CLIX 쇼트리스트에서 확인된 후보의 더욱 진전된 모델링의 일부를 형성한다.

<186> CDK4 또는 CDK6의 특이적 저해제를 확인하기 위한 컴퓨터-보조 분자 디자인 방법의 또다른 구체예는 효소의 p16-결합 자리와의 바람직한 구조적 및 정전기적 상보성을 나타낼 작은 분자 단편의 연산적 관련에 의한 잠재적 저해제의 새로운 합성을 포함한다. 일련의 방법은 CDK4/CDK6 p16-결합 자리의 모델에서 함께 반복적으로 단편화된 작은 분자의 큰 주형 세트를 사용한다. 리간드 성장의 각각의 단계는 분자 메카닉스-기본 에너지 작용에 따라 평가되며, 이것은 반데어 발스 및 쿨롱 상호작용, 길이 연장 리간드의 내부 변형 에너지, 및 리간드 및 효소 양자 모두의 탈용매화를 고려한 것이다. 검색 공간은 결합 기준에 따르는 절단에 의한 조절 하에 유지되는 데이터 트리의 사용에 의해 조절될 수 있다.

<187> 예시적 구체예에서, 검색 공간은 단지 분자 빌딩 블록으로서 아미노산 및 아미노산 유사체를 고려하는 것으로 제한된다. 이러한 방법은 일반적으로, 아미노산이 의료 화학자에게 관심있는 다른 관련된 단편, 예를 들어 아미노산 유사체를 포함하도록 쉽게 연장될 수 있음에 따라, 바로 20개의 천연 아미노산으로 제한될 필요는 없지만, 아미노산 배열의 큰 주형 세트를 사용한다. 상기 구성 방법으로부터 유발되는 추론되는 리간드는, 대표적으로 약제 디자인 연구의 일반적인 목적인 작은 유기 분자이기 보다는 펩티드 및 펩티드-유사 화합물이다. 펩티드 빌딩 방법의 목적은 펩티드가 잠재적 약제로서 유기 물질에 바람직하다는 것이 아니라, 오히려, (1) 펩티드가 비교적 빠르게 *de novo* 생성될 수 있고; (2) 이것의 에너지론이 널리 제한된 힘의 장 방법에 의해 연구될 수 있고; (3) 이것이 대부분의 유기 물질보다 합성하기가 훨씬 더 쉽고; (4) 이것이 펩티드 유사 저해제 디자인, 단백질-단백질 결합 연구, 및 심지어 보다 더 일반적으로 사용되는 상기한 3D 유기 데이타 베이스에서 형태 주형으로서, 다양한 방식으로 사용될 수 있다는 점이다. 더욱이, 사실상 본원에 기술된 CCR-단백질 서열로부터 유도될 수 있는 바와 같은 펩티드 단편이 사용될 수 있다.

<188> 이러한 *de novo* 펩티드 디자인 방법이 GROW로 불리우는 소프트웨어 패키지중에 통합된다. [Moon et al. (1991) *Proteins* 11:314-328]. 대표적 디자인 세션에서, 표준 상호 작용 그래픽 모델링 방법이 GRPW를 조작하는 구조적 환경을 정의하는 데에 사용된다. 예를 들어, 이러한 환경은 CDK4의 p16-결합 자리이거나, 펩티드-류 분자, 예를 들어 CDK4의 잔기 K22, R24, H95 및 D97을 결합시키려고 하는 단백질의 표면상의 일련의 특징일 수 있다. GROW 프로그램은 일련의 잠재적 리간드 분자를 생성시키기 위해 조작된

다. 상호 작용 모델링 방법은 합성 분자의 시험을 위한 역할 및 추가의 정제를 위한 이들 중 하나 이상의 선택을 위한 역할을 하게 된다.

<189> 예시 하면, GROW는 CDK4의 상동 모델링에 의해 제공되는 코오디네이트, 또는 p16-결합 자리의 코오디네이트, 및 펩티드 성장을 위한 출발점을 제공하기 위해 p16-결합 자리에 위치한 작은 단편(예를 들어, 아세틸기)과 같은 상호작용 모델링 세션에서 사용자에 의해 생성되는 원자 코오디네이트 파일에 대해 조작된다. 이것은 각각 "자리" 원자 및 "시드" 원자로서 언급된다. 사용자에 의해 제공되는 제 2 파일은 펩티드 성장을 유도하기 위한 많은 조절 변수를 함유한다. [Moon et al. (1991) *Proteins* 11:314-328].

<190> GROW 연산의 조작은 개념적으로 매우 간단하다. GROW는 반복 방식으로 진행되어, 아미노산 배열의 큰 사전 구성 라이브러리 중의 각각의 주형을 시드 단편에 계통적으로 결합시킨다. 주형이 결합되는 경우, 이것은 수용체 자리에 대한 양호한 적합성에 대해 스코어링된 후, 라이브러리 중의 다음 주형이 시드에 결합된다. 모든 주형이 시험된 후에, 단지 가장 높은 스코어가 다음 수준의 성장을 위해 유지된다. 이러한 공정은 제 2 성장 수준을 위해 반복되고, 각각의 라이브러리 주형은 또한 제 1 단계로부터 유지되는 각각의 결합된 시드/아미노산 분자에 결합되고 스코어링된다. 결과의 가장 양호한 결합된 시드/디펩티드 분자만이 제 3 수준의 성장을 위해 유지된다. 펩티드의 성장은 사용자에 의해 제공되는 초기 조절 특수화에 의존하여, N으로부터 C의 방향으로만 단지 가역적 방향으로 또는 교호적 방향으로 진행될 수 있다. 따라서, 연속적인 성장 수준은 하나의 잔기에 의해 길이가 연장된 펩티드를 생성시킨다. 사용자가 규정한 펩티드 길이에 도달하면 공정이 종결되며, 이 시점에서 사용자는 구성된 펩티드로부터 추가로 연구하려는 펩티등를 선택할 수 있다. GROW 공정에 의해 제공되는 결과된 데이터는 수용체 자리 원자의 코오디네이트 시스템에 직접 관련하여, 잔기 서열 및 스코어, 및 펩티드의 원자 코오디네이트를 포함한다.

<191> 다른 구체예에서, 잠재적 약물 화합물은 CDK의 p16-결합 자리에서 작용기의 에너지론적으로 바람직한 위치를 결정하기 위한 에너지 최소화-켄칭 분자 역학 연산에 근거한 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 방법은 공지된 리간드의 변형 또는 *de novo* 구성에 의해 이러한 작용기를 통합시키는 분자의 디자인에 도움을 줄 수 있다.

<192> 예를 들어, 문헌 [Miranker et al. (1991) *Proteins* 11:29-34]에 기술된 다중 복제 시뮬레이션 검색 방법(MCSS)이 사용될 수 있다. 단백질의 힘의 장에서 작용기의 국소적 최소화를 결정하고 특징화하기 위해, 선택된 작용기의 다중 복제물이 먼저 관심있는 CDK 단백질의 p16-결합 자리에 분포한다. 분자 역학 또는 켄칭 역학에 의한 상기 복제물의 에너지 최소화는 독특한 국소적 최소화를 제공한다. 상기 최소화의 근처는 그리드 검색에 의해 또는 강제 최소화에 의해 연구될 수 있다. 하나의 구체예에서, MCSS 방법은 단백질의 힘의 장에서 많은 동일한 그룹을 동시에 최소화시키고 켄칭시키기 위한 고전적 시간 의존성 하아티 (Hartee) (TDH) 접근법을 사용한다.

<193> MCSS 연산의 실행은 작용기의 선택 및 작용기 각각에 대한 분자 역학적 모델의 선택을 필요로 한다. 이러한 그룹은 쉽게 특징화되고 조절되도록 충분히 간단해야 하고(3-6 원자, 2면각 자유도는 거의 없음), 키나아제의 p16-결합 자리와의 결합에서 작용기가 갖는 입체 및 정전기적 상호 작용에 접근하도록 충분히 컴플렉스해야 한다. 바람직한 세트는 예를 들어, 대부분의 유기 분자가 이러한 그룹의 집단으로서 기술될 수 있는 것이다. [참조: *Patai's Guide to the Chemistry of Functional Groups*, ed. S. Patai (New York: John Wiley, and Sons, (1989)]. 이것은 아세토니트릴, 메탄올, 아세테이트, 메틸 암모늄, 디메틸 에테르, 메탄 및 아세트알데히드와 같은 단편을 포함한다.

<194> 결합 자리에서 국소적 에너지 최소화의 결정은 많은 출발점이 샘플링되는 것을 필요로 한다. 이것은 예를 들어, 결합 자리 상의 중심 구체 내측에 불규칙하게 1,000 내지 5,000개의 그룹을 분포시킴으로써 달성될 수 있으며; 단지 단백질에 의해 점유되지 않은 공간을 고려하는 것이 필요하다. 일정 위치에서 특별한 그룹과 단백질의 상호작용 에너지가 주어진 컷-오프 보다 더욱 포지티브한 경우 (예를 들어 5.0 kcal/몰), 그룹은 상기 자리로부터 방출된다. 출발점의 세트가 주어지면, 모든 단편은 TDH 접근법에 의해 동시에 최소화된다. [참조 : Elber et al. (1990) *J Am Chem Soc* 112:9161-9175]. 본 방법에서, 각각의 단편상의 힘은 이것의 내력 및 단백질로 기인된 힘으로 구성된다. 본 방법의 본질적인 요소는 단편들 사이의 상호작용이 상실되고 단백질 상의 힘이 단일 단편으로 인한 힘으로 정규화되는 것이다. 이러한 방식에서 단일 단백질 분야에서 모든 작용기의 자발적인 최소화 또는 동력화가 수행될 수 있다.

<195> 연속적으로 예컨대 100의 불규칙하게 놓여진 그룹의 하위 세트상에서 최소화가 수행된다. 1,000 인터벌과 같은 일정수의 단계 인터벌 후에, 결과들이 조사되어 동일한 최소치로 전환되는 군을 제거할 수 있다. 최소화가 완성(예컨대 0.01 kcal/mole/Å 의 RMS 성분)될 때까지 상기 방법이 반복된다. 이와 같이 얻어진 에너지가 최소화된 분자 세트는 잠재적인 약물작용발생단을 나타내는 3차원내의 한세트의 단절된 단편이 되는 량인 것을 포함한다.

<196> 다음 단계는 약물작용발생단의 일부와 소화학 물질(원자, 사슬, 또는 고리 성분)로 채워지는 스페이서를 연결시키는 것이다. 바람직한 구체예에서, 각각의 비연결부는 공간적으로 링크되어, 예컨대 NEWLEAD(Tschinke et al. (1993) J Med Chem 36: 3863, 3870)와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 단일 분자를 발생시킬 수 있다. NEWLEAD에 의해 채택된 방법은 (1) 2가지 분리 부분을 연결시키는 단계, (2) 추가 처리를 위해 중간체 용액을 유지시키는 단계, (3) 단절 유니트가 전혀 발견되지 않을 때까지 각각의 중간체 용액에 대해 상기 단계들을 반복하는 단계, 및 (4) 각각 단일 분자인 최종 용액을 산출하는 단계로 수행된다. 상기 프로그램은 예컨대, 하기 3가지 유형의 스페이서를 사용할 수 있다: 라이브러리 스페이서, 단일-원자 스페이서, 및 융합-고리 스페이서. 라이브러리 스페이서는 에틸렌, 벤젠 및 메틸아미드와 같은 소분자의 최적화된 구조이다. NEWLEAD와 같은 프로그램에 의해 생성된 산출량은 스페이서에 의해 지금 연결된 본래의 단편을 함유하는 한 세트의 분자로 이루어진다. 유입된 단편에 속하는 원자는 공간적으로 이것들의 본래의 방향을 유지시킨다. 분자는 스페이서 및 작용기의 간단한 제조때문에 화학적으로 가소성이고, 반데르 발쓰 반지름이 적용되지 않는 용액이 쓰이지 않기 때문에 에너지적으로 수용될 수 있다.

<197> 본 발명의 다른 일면은 p16 또는 p15와 같은 CCR 단백질에 민감한 CDK 돌연변이체에 관한 것이다. 예를 들어, CDK2 또는 CDC2로서, 이것은 정상적으로 p16과 결합하지 않고, 키나아제의 일부 잔기

를 p16 결합에 참여하는 CDk4로부터의 상응하는 잔기로 대체함으로써 p16 저해에 민감하게된다. 예를 들어, 도 7에서 예시되는 바와 같이, β 1, β 2, β 3, β 4, β 5, 또는 L7에 상응하는 CDK4의 단백질이 CDK2 또는 CDC2로 상호교환되어 p16 민감 CDK를 수득한다. 예를 들어, 상기 돌연변이체가 사용되어 CCR-단백질의 발현에 의해 다른 지점의 세포-주기에서 저해될 수 있는 생체외 또는 생체내에서의 재조합 세포를 발생시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

<198> 도 1A-1B는 엑손 경계 및 PCR 프라이머의 위치가 표시된, p16 cDNA의 개략도이다.

<199> 도 2A 및 2B는 엑손 1에 대한 게놈성 핵산 서열 및 엑손 1을 직접 플랭킹하는 비-코딩 서열이다. 상기 서열은 수 개의 프라이머로부터의 복합서열이다. 도 2C는 엑손 2에 대한 게놈성 서열이다.

<200> 도 3A-3D는 엑손 3에 대한 게놈성 핵산 서열 및 엑손 3를 직접 플랭킹하는 비-코딩 서열이다. 상기 서열은 수 개의 프라이머로부터의 복합 서열이다.

<201> 도 4는 정상 사람 대조군 및 다른 사람 종양과 비교하여, p16 서열이 수 개의 사람 종양 세포의 게놈으로부터 손실된 것을 도시한다.

<202> 도 5는 마우스 p16 유전자에 대한 제한-부위 지도를 도시한다.

<203> 도 6은 CCR-단백질인 p16, p15 및 p13.5의 고도로 보존된 부분의 서열 정렬이다.

<204> 도 7은 사이클린-의존성 키나아제의 일부의 서열 정렬이다.

실시예

<205> 이제 일반적으로 설명된 본 발명은 본 발명의 일면 및 구체예를, 단지 예시의 목적으로만 포함되고, 본 발명을 제한하지 않는 하기 실시예에 의해 보다 더 쉽게 이해될 것이다.

<206> 이전에 언급된 바와 같이(미국 특허 출원 우선 번호 08/154,915호, 07/963,308호, 이외에도 Xiong et al. (1993) Nature 366:701; Xiong et al. (1993) Genes Dev 7:1572; Xiong et al. (1992) Cell 71:505; 및 Zhang et al. (1993) Mol Cell Biol 4:897 참조), 진핵 세포에서 사이클린이 다양한 잠재적 촉매 서브유니트(예컨대, CDK2, CDK4 및 CDK5와 같은 CDK)와 조합시키는데 면역학적 방법을 사용한다. 예시 하면, 사람 사이클린 D1은 많은 증식성 질환과 관련된다. 사람 이배체 세포, 특히 사람 이배체 섬유아세포에서, 사이클린 D1을 다른 많은 세포형 단백질과 복합시켰다. 이들 중에는 촉매성 서브유니트 CDK2, CDK4(상기에서 PSK-J3이라고 함), CDK5(또한 PSSALRE라고 함), 및 CDK6(PLASTIRE)가 있었다. 부가적으로, 21kDa 및 36kDa의 폴리펩티드를 사이클린 D1과 조합하여 확인했다. 36kDa 단백질이 증식성 CeN 핵 항원, PCNA임을 관찰했다. PCNA는 리딩-가닥 DNA 복제 및 DNA 복구에 요구되는 델타 중합제에 대한 본질적인 보조 인자로서 기술했다. 또한 사이클린 D3는 다수 단백질 키나아제, p21 및 PCNA와 조합되는 것으로 발견했다. 그러므로, D형 사이클린 CDK, PCNA 및 p21의 4차 복합체가 존재하고, 많은 조합 변수(CDK2, 4, 5 및 6을 갖는 사이클린 D1, D3)가 생체내에서 조합될 수 있음을 제안했다.

<207> 4차 복합체의 중요성은 DNA 종양 바이러스에 의한 세포 형질전환이 사이클린 D 복합체, 및 사이클린 A, CDC2, CDK2, CDK4 및 CDK5 복합체를 포함하는 다른 세포-주기 복합체의 선택적 서브유니트 재배열과 관련되는 발견에 의해 강조되었다. 특히, 정상 사람 이배체 섬유아세포(HDF)내로 SV40 DNA 종양 바이러스 또는 이것의 종양 형성 유전자 생성물 거대 T 항원의 도입은 사이클린 D 및 PCNA, CDK(예컨대 CDK2, CDK4, CDK5 및 CDK6) 및 p21 사이의 조합의 분리를 일으켰다. 예를 들어, 사이클린 D 및 p21로부터 해리된 후에, CDK4 키나아제는 16kDa 폴리펩티드(p16)와 관련되었다. 유사하게, SV40 형질 전환은 HDF에서 p21과 사이클린 A의 관련을 감소시키고; 아데노바이러스-(293 세포주) 또는 사람 유두종 바이러스-(HeLa 세포주) 형질 전환 세포, p21은 사이클린 A로부터 완전하게 해리됐다. 그리고 나서 19kDa 펩티드, p19가 사이클린 A를 갖는 복합체에 나타났다.

<208> 이와 같이, 많은 형질 전환된 세포에서, 시클린 및 CDK를 세포-주기 조절 장치의 코어(core)를 형성하는 2차 복합체에 조합시켰다. 정상 세포에서, 사이클린 키나아제의 주요 부분이 2개의 부가 사브유니트(p21 및 PCNA)를 얻고 4차 복합체를 형성했다. 곤충 세포에서 4차 복합체의 재구성은 p21이 사이클린 키나아제의 보편적인 저해제인 것을 나타냈다. 상기와 같이, p21은 포유류 세포에서 과발현시에 세포-주기 진행 및 세포 증식을 저해했다. p53가 결핍된 세포에서 세포-주기 키나아제 복합체내의 상기한 p21 단백질 부재를 함께 고려하면, 상기 결과들은 p21이 종양 억제 단백질, p53의 전사 표적임을 제시했다. p53의 1가지 작용은 DNA 손상에 후속되는 세포-주기 정지를 일으키는 세포 신호 경로에서 이루어진다(예를 들어, Kastan et al. Cell 71:587-597 (1993) 참조). 그러므로 p21은 p53과 세포-주기 조절 장치에서 중요한 링크를 형성하는 것을 제안했다.

<209> 사이클린 D/CDK4 키나아제는 기질로서 히스톤 H1를 이용할 수 있는 능력이 없는 점에서 다른 것과 상이하다. 지금까지, 사이클린 D/CDK4 키나아제에 대한 유일한 기재는 "포켓" 단백질의 RB족의 일원이었다(Matsushime et al., Cell 71:323-334 (1992)). 그러므로, p21의 효과를 인산화된 RB에 대한 사이클린 D/CDK4의 능력으로 시험했다. 사이클린 D 또는 CDK4 만을 함유하는 곤충 세포 용해질은 GST-RB에 대한 작은 활성을 거의 보이지 않았다. 그러나, 사이클린 D/CDK4 2차 복합체는 상당한 RB 인산화를 촉매화시켰다. p21의 첨가의 증가는 RB 인산화의 저해에 대응하는 사이클린 D/CDK4/p21 3차 복합체의 축적을 가져왔다. PCNA의 포함은 본질적으로 효과가 없었다. 그러나, 작용기 p53이 부족한 세포는 내인성 p21의 부족에도 불구하고 구별되는 인산화를 수행하는 기능성 RB 체크포인트를 역시 유지할 수 있었다.

<210> 2-혼성체 스크리닝 시스템(Fielda et al. Nature 340:254 (1989))을 사람 CDK4와 상호 작용할 수 있는 단백질을 찾고, 더욱 상세하게는 p16을 엔코딩시키는 cDNA를 단리시키는데 사용했다. 2-혼성체 스크리닝은 하기 2가지의 분리된 융합 단백질로부터 기능성 GAL4 활성기를 재구성하는 것이다: CDK4, GAL4db-CDK4와 융합된 GAL4 DNA-결합 도메인; 및 HeLa cDNAs, GAL4ad-cDNA에 의해 엔코딩되는 단백질에 융합된

GAL4 활성 영역. YPB2를 수여 효모로서 사용하였으며, 이는 이것이 하기 2개의 GAL4- 의존성 프로모우터의 조절하에서 두개의 염색체 유전자를 함유하기 때문이었다. YPB2는 각각 GAL4db-CDK4 및 GAL4ad-cDNA 융합을 엔코딩하는 2가지의 플라스미드의 혼합물로 형질 전환시키고; 히스티딘 부재하에서 성장되고 β -갈락토시다제의 존재하에서 푸른색으로 변색하는 수개의 클론을 수득했다. DNA 서열 데이터로부터의 1군이 보다 더 짧은 3' 말단을 갖는 mRNA로 표현될지라도, 각각의 양성 클론이 같은 유전자로부터 유도됨을 확인하였다. GAL4ad를 갖는 상에서, 상기 cDNA 서열은 예상되는 분자량이 15,845 달톤인 148 아미노산의 단백질을 엔코딩하는 오픈 리딩 프레임을 함유했다(서열번호 1 및 2). 최근에 유용되는 데이터 뱅크에 존재하는 서열과 p16의 서열을 표준방법으로 비교하였으나, 주목할 만한 상동을 발견할 수 없었다.

<211> p16이 CDK4와 특이적으로 결합하는지의 여부를 시험하기 위해, YPB2를 GAL4ad-p16 융합 이외에도 각각, cdc2, CDK2, CDK4, CDK5, PCNA 및 Smf1(분열 이스트 키나아제)를 함유하는 수개의 표적 GAL4db 융합 구성물과 함께 형질 전환시켰다. 형질 전환시킨 세포를 히스티딘과 존재 및 부재하에 도말하였다. 단지 GAL4db-CDK4 융합만이 히스티딘 부재에서 성장할 수 있을 정도로 GAL4ad-p16와 상호작용했다. 이는 상기 융합 단백질의 쌍이 HIS3 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는, 작용기 GAL4 활성기를 특이적으로 재구성시킴을 나타냈다. β -갈락토시다제 유전자의 발현을 전이활성화시키는 능력을 검정하여 동일한 결과를 수득했다.

<212> 추가로 시험관내에서 번역된 (^{35}S)-라벨화 CDK와 p16에 링크된 글루타티온-S 전이효소(GST)로 이루어진 정제된 박테리아를 이용하여 생성된 융합 단백질을 혼합시킴으로써, 상기 상호 작용의 특이성은 세포-프리 시스템에서 증명된다. GST-p16 융합을 글루타티온-세파로오스 비드에 결합시켜 복구시키고, 각각의 CDK의 조합을 겔 전기영동법으로 분석했다. 기존의 관찰과 일치하여, GST-p16은 cdc2, CDK2 또는 CDK5 보다 CDK4와 보다 효과적으로 결합했다.

<213> 예상한 p16의 분자량이 16Kd에 근접하였으며, 형질전환시킨 세포주(상기 참조)에서 발견한 CDK4-조합 p16 단백질로서 p16의 동일성을 결정했다. 15KD 및 17KD인 시험관내 2가지 번역 생성물을 p16 cDNA로부터 수득했다. HeLa 세포로부터의 CDK4-관련 p16 단백질 및 상기 생성물을 N-클로로숙신이미드로 처리했다. 17KD cDNA-유도 생성물의 부분 NCS-단백질 가수분해 패턴은 HeLa 세포로부터 CDK4-조합 p16 단백질로 얻은 패턴과 매우 유사하고, 실질적으로 p16 cDNA가 p16에 상응하는 것을 강하게 제시한다. 또한 17KD cDNA-유도 생성물 및 p16의 V8 프로테아제로의 부분 소화가 유사한 패턴을 만들었다. 곤충 세포에서 과발현된 p16 단백질이 15KD의 전기영동 유동성을 갖고, 이것의 NCS 단백질 가수분해 지도는 15KD cDNA-유도 생성물로 얻은 것과 동일한 것이 흥미롭게 주목된다. 이것은 사람 세포에서 발견된 실제 p16 및 시험관내 17KD 번역 생성물이 번역후에 변형된 단백질에 상응하는 것을 제시한다. 곤충 세포내에서 과발현된 p16 단백질이 CDK4와 상호작용하는 사실은 상기 변형이 상호 작용에 대해서 본질적이지 않는다는 것을 제시한다(하기 참조).

<214> p16 및 CDK4-조합 단백질 p16 사이의 동일성을 정제된 GST-p16 융합 단백질에 대해 증가된 항체를 사용하여 추가로 확인했다. 수개의 사람 세포주를 본 실험을 위해 사용했다: 정상 허파 섬유아세포로부터 유도한 정상 세포주: W138; SV40 T-항원으로의 형질전환시켜 W138로부터 유도한 VA13 세포주; 및 HeLa 세포. 상기에서 제시한 바와 같이, W138의 항-CDK4 면역침전물은 CDK4와 사이클린 D1, PCNA, p21 및 p16과의 관련을 나타냈다. 대조적으로, CDK4는 VA13 및 HeLa 세포에서 단지 p16과 관련됐다. 항-p16 면역침전물은 2개의 형질전환주인, VA13 및 HeLa에서 용이하게 감지될 수 있지만 정상 세포주 W138에서 보다 더 적은 범위로 감지될 수 있는 겉보기 분자량이 16kD인 단백질을 함유했다. 상기 단백질은 항-CDK4 혈청과 동시 면역침전된 p16 단백질과 같은 전기영동 유동성을 가질 뿐만 아니라, 동일한 NCS 부분 단백질 가수 분해 패턴을 갖는다. p16 에 부가하여 33Kd의 단백질이 V8-단백질 가수 분해 맵핑에 의해 CDK4와 동일한 것으로 나타난 항-p16 동시 면역 침전물에서 관찰됐다.

<215> W138 및 VA13 세포에 존재하는 전사물의 노던 분석은 p16 mRNA가 VA13 세포와 비교하여 W138 세포에 보다 덜 풍부함을 제시했다. 이러한 차이는 2개의 세포주 사이에서 관찰된 p16 단백질의 양의 차이와 대체로 대응하였고, 이는 p16 발현이 전사 또는 전사 후 수준으로 조절될 수 있음을 제시했다. 실제로, 비바이러스적으로 형질전환시킨 3개의 세포주에서, p16의 발현은 겔에 과노출된 후에도 감지할 수 없었다.

<216> p16과 CDK4의 상호 작용의 생화학적 결과를 연구하기 위해서, 활성 CDK4-사이클린 D 복합체를 표준 프로토콜에 따라 시험관내에서 재구성했다(Kato et al. Genes Der 7:331 (1993); 및 Ewen et al. Cell 73:487 (1993)). 3개의 관련 성분, CDK4, p16 및 사이클린 D1을 바쿨로바이러스-감염시킨 곤충 세포에서 발현시켰다. p16, CDK4 또는 사이클린 D1을 분리적으로 과발현시키는 대사적으로 (^{35}S)-표지화한 곤충 세포, 및 CDK4 와 사이클린 D1 양자 모두를 과발현시키는 세포로부터 추출물을 제조했다. p16의 양이 증가함에 따라, 이에 대응하여 RB를 인산화시키기는 CDK4의 능력의 감소를 관찰했다. 이러한 저해는 면역 침전에 의해 감지되는 바와 같이 p16과 CDK4의 관련과 상호 관련되었다. CDK2-사이클린 D2 복합체를 유사한 분석에서 사용하는 경우에 저해를 관찰하지 못했다. CDK4의 저해가 p16에 기인하는 것을 확인하기 위해, His-태깅된 p16 융합 단백질(His-p16)이 6 히스티딘 잔기를 함유하는 20 아미노산의 아미노 말단 연장을 가지도록 제조했다. 상기 융합 단백질을 바쿨로바이러스-감염 곤충 세포내에서 과발현시키고, 니켈 아가로스 비드에 대한 히스티딘 트랙의 고친화성 관계에 따라 정제했다. His-p16 단백질 제조물이는 90% 이상 정제되었으며, 이는 전체 용해질에 의한 억제를 위해 사용된 것과 유사한 조건하에서 CDK4-사이클린 D1의 활성을 억제했다.

<217> 망막아세포종 유전자 생성물(RB)의 역할은 상의 단백질에 대해 전사 성분을 격리시키는 최소한의 활성이 나타내는 세포-주기 체크 포인트였다. 많은 암종에서, p53 융합이 돌연변이 또는 결실에 의해 손실됐다. 반면에, RB는 그렇게 종종 변경되지 않았다. 그러나, p16이 CDK4/사이클린 D 복합체를 하향-조절시키고, RB를 인산화시키도록 작용하기 때문에, 어떤 암종에서 p16 손실이 RB 체크포인트의 효과를 감소시킬 수 있고, 말하자면, p53 손실과 유사한 체크포인트 결핍을 나타나는 것이 본 명세서에 기재되어 있다. p16의 손실이 보다 더 효과적으로 RB를 인산화시키고 세포-주기의 RB-매개 저해를 제거할 것이다. 상기 언급과 일치하여, D-형 사이클린, 예컨대 사이클린 D1 또는 D2를 과-발현시키는 세포와 같은 다양한

사람의 종양 세포에서, p16 유전자가 세포로부터 손실, 예컨대 상동 결실됨을 하기에 기술했다.

<218> 또한, 하기 실시예에 설명하는 바와 같이, p16 유전자는 사람 영역 9p21-22, 공지된 멜라노마 좌에 맵핑하는 것을 밝혔다(Walker et al. (1994) Oncogene 9:819; Coleman et al. (1994) Cancer Res 54:344, Cheng et al. (1993) Cancer Res 53:4761; 및 Cannon-Albright et al. (1992) Science 258:1148). 염색체 맵핑을 PCR 증폭을 통한 체세포 혼성의 검정으로 추가로 확인했다(도 2A의 프라이머 ex1A 및 ex13을 사용). 사람 염색체(9)를 함유하는 체세포 혼성은 증폭된 양성 PCR 생성물을 생성했다.

<219> 도 1에 도시된 사람 p16의 cDNA 서열(서열번호1)로부터 발생된 프라이머를 사용하여, 게놈 p16 유전자를 부분적으로 서열화시켜 인트론/엑손 경계를 결정했다. 엑손 1 및 엑손 2(도 1 참조)를 플랭킹시키는 적절한 핵산 서열을 도 2A 및 2B 및 3A-D 각각에 도시했다.

<220> 게놈 DNA를 다양한 사람의 종양주로부터 단리하고(Sambrook et al. Molecular Cloning; A Laboratory Manual, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY(1989)), PCR 반응으로 p16 서열의 존재 또는 부재를 프로우빙했다. 특히, 프라이머 ex1A 및 ex13(도 2A)를 사용하여 p16의 엑손 1에 대해 스크리닝했으며, 유사하게 프라이머 ex14 및 ex15를 사용하여 p16의 엑손 2를 탐지했다. 도 4에서 제시한 바와 같이, p16 유전자는 수개의 종양 세포주에서 파괴되었고, 이는 실제로 p16이 일정 암 세포에서의 세포 형질 전환에서 결정인자임을 확인시켰다. 더욱이, 총 길이 p16 cDNA(서열번호 1)를 사용한 프로우빙으로, 상기 세포주의 p16 유전자의 일부를 명백하게 결실하는 3개 이상의 세포에서, 전체 유전자가 사실상 부재임을 입증했다.

<221> 항-P16 항체로 실시한 면역 침전 실험, 및 올리고누클레오티드 혼성화 분석에 기초할 때, 서열번호 2로 표현되는 p16 단백질이 관련 세포-주기 조절 단백질의 거대 족의 한 성분인 것이 명백해졌다. 예를 들어, 매우 엄격한 조건하에서도, 상이한 조직형으로부터 mRNA의 서던 혼성화 실험은 약 4가지의 가깝게 관련된 전사물이 생성됨을 예시했다. CCR-단백질족의 성분인, 상기의 p16 동족체는 유전자 복제(예컨대, 각각의 CCR-단백질은 분명한 유전자로부터 발생한다)에 의하거나 mRNA 수준에서 임의적인 엑손 스플라이싱 또는 이것의 조합으로부터 발생했다.

<222> 사람 p16 유전자의 코딩 영역을 구성하는 프로우브를 이용하여, 발명자들은 마우스 태아 간세포 라이브러리를 스크리닝시키고, 상기에 설명된 사람 p16 유전자의 마우스 동족체에 대한 코딩 영역을 함유하는 게놈 클론을 단리시켰다. 상기 클론은 하한 내지 중간의 엄격한 조건(50℃에서 1× SSC)하에서 단리시켰다. 상기 DNA(14kB)는 2개의 독립 부분에서 클로닝되고 9개의 제한 효소에 대한 제한 지도가 실행된다(도 5 참조). 마우스 CCR-유전자를 완전하게 시퀀싱시키고, 코딩 영역을 서던 혼성화에 의해 제한 지도 내에 위치된 단지 2개의 엑손으로 형성시켰다. 마우스 CCR-단백질의 겉보기 분자량은 13.5kDa이었고, 본 명세서에 "p13.5"으로 정의된 마우스 CCR-단백질의 핵산 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 5 및 6에 제시했다.

<223> 또한, 사람 p16 클론 및 마우스 p13.5 클론 사이(예컨대 사람 p16의 Gly-135를 통하는 잔기 Met-52 및 마우스 p13.5의 Gly-83을 통하는 Met-1 사이)에 가장 많이 보존된 서열에 기초한 축중 프로우브를 이용하여, 발명자들은 마우스 p15 동족체(서열번호 7 및 8)와 같은 다수의 사람 및 마우스 p16 동족체를 단리했다.

<224> 부가적으로, TGF-β 처리가 인산화된 상태하에서 RB의 축적을 유발하고 RB-불활성 바이러스성 종양단백질의 발현이 TGF-β 유도 세포 주기 정지를 방지하는 것이 주목했다(Laiho et al.(1990) Cell 62:175-185; 및 Pietenpol et al.(1990) Cell 61:777-785). TGF-β 처리가 CDK4 발현의 하향-조절을 초래하는(Ewen et al.(1993) Cell 74:1009-1020) 것을 종래 기술이 제시하는 반면, 상기 데이타는 발명자들에게 TGF-β 가 RB 인산화의 억제를 통해 작용할 수 있는 것을 제시하고 TGF-β 처리의 결과가 사이클린 종속 키나아제의 저해를 일으킬 수 있는 가능성을 제시했다.

<225> 따라서, TGF-β 가 세포 증식을 저해함에 의한 메카니즘을 조사하기 위해, 발명자들은 TGF-β 에 노출시킴에 의해 G1에서 정지시킨 사람 케라티노시트로부터 항-CDK 면역 침전물을 조사했다. 특히, 2가지 G1-특정 사이클린 키나아제, CDK4 및 CDK6의 면역 침전물이 수개의 저분자량, 관련 단백질을 함유했다. 상기 면역 침전물은 p16 및 약 15 및 15.5kDa의 2개 부가 단백질을 포함했다. 상기 단백질은 평행하는 CDC2 또는 CDK2 면역 침전물에서는 회수되지 않지만 항-p16 면역 침전물에서 회수되었으며, 이는 p15, p15.5 및 p16이 관련될 수 있음을 제시했다. 이를 p15 및 p15.5가 p16 항혈청과 약한 교차-반응성임을 증명하는 CDK4 및 CDK6 면역 침전물의 웨스턴 블롯팅으로 확인했다.

<226> 추정의 p16 관련물을 엔코딩하는 클론을 단리시키기 위해, 발명자들은 TGF-β 정지 HaCaT 세포로부터 cDNA 라이브러리를 구성하고(Boukamp et al. (1988) J Cell Biol 106:761-771) 및 p16 코딩 서열(서열번호1)로 저-엄격(low-stringency)조건에서 상기 라이브러리를 프로우빙시켰다. 상기 스크리닝에서 얻은 1개의 클론이 p16에 상동을 지닌 137 아미노산 단백질(예상 분자량 14.7 kDa)을 동족체로 엔코딩시켰다. 상기 동족체 및 하기에 설명된 생화학적 성질을 기초로, 발명자들은 상기 단백질을 p15로 명명하였다. p15 및 p16의 첫번째 50개의 아미노산은 약 44% 동일성을 공유했다. 다음, 약 97%의 동일(도 6 참조)한 81개의 아미노산 영역이 있으며, 다음으로 p15 및 p16 서열이 분리됐다. p15의 서열은 상기 구조 모티프가 CCR-단백질 족에서 보존되는 것을 제시하는 4개의 안키린 반복 단위로 분리될 수 있었다. 시험관내에서 p15 cDNA의 번역은 TGF-β 정지 HaCaT 세포로부터 CDK4, CDK6 및 p16 면역 침전에 존재하는 p15 밴드와 정확하게 동시 이동된 단백질을 생성했다. 상기 단백질의 동일성을 프로테아제 및 화학적 분할 지도에 의해 확인했다.

<227> p15 및 p16의 기능 유사성을 조사하기 위해, 발명자들은 박테리아내의 융합 단백질로서 p15를 발현시키고 사이클린 종속 키나아제를 결합시키고 억제시키는 능력을 시험했다. 특히 p15는 CDK4 및 CDK6를 결합시키지만 CDC2, CDK2 또는 CDK5를 분명하게 결합시키지 않았다. 결합의 결과를 평가하기 위해, p15를 곤충 세포에 발현된 활성 사이클린/CDK 복합체에 첨가했다. 특히 p15를 사이클린 D/CDK4 및 사이클린 D/CDK6 효소를 저해시키지만 CDK2/사이클린 A 키나아제에는 전혀 효과가 없다. 이와 같이 p15는 CCR-단핵질족의 기능 성분이다. 더욱이, p15 유전자의 FISH 맵핑은 상기 유전자가 9p21에서 p16 유전자에 인접하

게 위치하는 것을 증명했다.

<228> 발명자들은 TGF-β 의 존재하에서 혈청 부족 및 재-자극에 의해 G1에서 정지된 HaCaT 세포로부터의 면역 침전물내에 p15를 먼저 주목한 반면, 비교에 의해, 발명자들은 비동시성의, 빠르게 증식하는 HaCaT 세포가 CDK4 및 CDK6 면역 침전물내에 상당히 소량의 p15를 함유하는 것을 밝혀내었다. G1 정지의 효과로부터 TGF-β 처리의 효과를 분리시키기 위해, 비동시성 배양물을 CDK4 및 CDK6 관련 단백질 패턴에 대한 조사 후에, 다양한 기간 동안 TGF-β 로 처리시켰다. 4시간 동안 TGF-β 첨가한 후, p15의 값은 CDK4 및 CDK6에서 증가하고, 6 내지 8 시간 후에 최고에 달했다. 반대로, CDK-관련 P16 값은 TGG-β 에 의해 영향받지 않았다. 대등하게 처리한 배양물로부터 RNA를 노던 블롯팅하여 증가된 CDK4-관련 P15가 증가된 p15 mRNA를 초래함을 밝혔다. TGF-β 처리한 후, 2시간 내에 p15 mRNA가 증가되기 시작 했으며, 6 내지 8 시간 후에 약 30배인 최고점의 유도에 도달했다. 반대로, p16 mRNA 수준은 변하지 않았다.

<229> TGF-β 매개된 세포 주기 정지에 대한 2개의 다른 메카니즘은 이미 상기에 제시하였다. Mv1Lu 세포에서, TGF-β 처리는 CDK4 합성을 저해했다. 이것은 세포가 CDK4의 구조적 과발현에 의해 TGF-β 에 대한 내성을 가질 수 있기 때문에 우연한 것으로 간주하였다. HaCaT 세포에서, TGF-β 처리는 CDK4 단백질 또는 mRNA 수준에 대한 영향을 전혀 끼치지 않았다. p15의 성질에 기초하여, 발명자들은 p15 CDK4/CDK6 억제기를 적정함에 의해 CDK4 과발현이 HaCaT 세포가 TGF-β 저항성이게 할 수 있는 것을 예견하였다. 또한 TGF-β 정지 세포로부터 정제되는 p27, CDK 억제기는 TGF-β 및 세포 주기 조절 사이의 링크로서 제한된다. 그러나, HaCaT 세포에서, TGF-β 처리는 p27 mRNA 값에 전혀 영향을 주지 않는다. 이와 같이 p27이 상기 세포에서 TGF-β 매개 세포 주기 정지를 일으킬 수 있는 요인이 후-번역 값에서 조절에 의해 발생되어야 한다.

<230> 동시에 고려되는 경우, 본 발명의 자료는 p15가 CDK4 및 CDK6 키나아제의 저해를 통해 TGF-β 매개 세포 주기 정지의 영향 요소로서 작용할 수 있다. p15는 일부 세포에서 TGF-β 유도 정지의 단일 매개체가 될 수 있거나, 또는 다른 TGF-β 반응 경로와 상호 작용할 수 있다. TGF-β 는 일부 세포형에서의 분화를 조절할 수 있고, 또한 p15를 통한 세포 주기 진행에 영향을 끼치는 TGF-β 의 능력은 상기 방법에 기여할 수 있다.

<231> 더욱이, 9p21에서 세포 유전학 비정상도는 상기 위치에서 종양 억제 유전자의 존재를 제시하는 사람 유형의 많은 종양에서 공통이다. 또한 멜라노마에 소질(predisposition)을 유발하는 유전된 암 증후군은 9p21에 맵핑했다. 본 명세서에 기재된 자료 이외에도 U.S.S.N 08/248,812 및 08/227,371에서, p16은 세포주에서 p16 제거 및 점 돌연변이의 분석에 기초한 2가지 활성 모두에 대한 후보 인자로서 초기에 제안되었다. 그러나, 9p21에서 p16족의 제 2 기능 성분의 존재는 2가지 유전자 중 하나 또는 2가지 모두의 불활성화를 포함할 수 있는 종양 억제의 손실을 증가시켰다. 본 명세서에 기재된 결과들이 p15가 세포외 성장 저해 신호를 형질도입시킬 수 있음을 제시하는 반면, 바이러스 종양 단백질에 대한 p16의 반응은 이것이 세포내 성장 조절 경로에서 작용할 수 있음을 예시했다. 이와 같이 2가지 유전자(또는 모두 비활성인 다른 돌연변이체)를 제거하는 9p21의 결실은 동시에 2가지 주요 증식 조절 경로를 무효로 할 수 있었다. 이러한 점에서, 성장 정지를 유도하기 위한 TGF-β 의 능력은 많은 종양 형질 전환된 세포주에서 감소되거나 또는 손실되었다. 특히, 멜라노사이트는 TGF-β 에 의한 성장 저해에 민감하지만, 많은 신진전이성 멜라노마는 TGF-β 내성이 있었다.

<232> [실시예 1]

<233> DNA 종양 바이러스 또는 이것의 종양 유전자성 생성물에 의한 세포 형질전환과 관련된 세포-주기 복합체의 선택적 서브유니트 재배열의 증명

<234> (i) DNA 종양 바이러스 SV40으로의 세포 형질 전환은 세포-주기 복합체의 서브유니트 재배열과 관련된다.

<235> [^{35}S] 메티오닌-표지한 세포 용해질의 제조 및 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법을 상기하였고, 이는 PCT 공보 No. WO 92/20796에도 기재되어 있다. 사람 정상 이배체 섬유아세포 W138 또는 DNA 종양 바이러스 SV40 형질 전환 W138 세포, VA13으로부터 세포 용해질을 제조했다. 세포 용해질을 각각의 세포-주기 유전자 생성물에 대해 항체로 면역 침전시켰다.

<236> (ii) 2가지 상이한 쌍의 세포주에서 세포-주기 복합체의 서브유니트 재배열

<237> 세포 용해질을 제조하는 방법은 상기한 바와 같았다. 2가지 상이한 쌍 세포주를 본 실험에서 사용했다. HSF43은 정상 사람 이배체 섬유아세포 세포주이고 CT10(완전명 CT10-2C-T1)은 SV40 거대 종양 항원에 의해 형질전환된 HSF43의 유도체였다. CV-1은 아프리카산 녹색 원숭이 신장 세포주이고 COS-1은 SV40로 형질전환시킨 CV-1의 유도체였다.

<238> (iii) DNA 종양 바이러스 SV40 에 의한 세포 형절 전환은 세포-주기 복합체의 PCNA 하위 유닛의 재배열과 관련된다.

<239> 세포 용해질의 제조 방법, 전기 영동, 및 웨스턴 블롯팅 조건은 상기에 언급된 바와 같았다. 정상의 사람 이배체 섬유아세포주 및 이것의 SV40 형질전환 세포주는 상기에 설명되어 있다. 각각의 항체로부터 유도시킨 면역 침전물을 폴리아크릴아미드 겔상에서 분리시키고 항-PCNA 항체로 블롯팅시켰다.

<240> (iv) DNA 종양 바이러스 SV40 에 의한 세포 형절 전환은 세포-주기 복합체의 CDK4 서브유니트의 재배열과 관련된다.

<241> 세포 용해질의 제조 방법, 전기 영동, 및 웨스턴 블롯팅 조건은 상기에 언급된 바와 같았다. 정상의 사람 이배체 섬유아세포주 및 이것의 SV40 형질전환 세포주는 상기에 설명되어 있다. 각각의 항체로부터 유도시킨 면역 침전물을 폴리아크릴아미드 겔상에서 분리시키고 항-CDK4 항체로 블롯팅시켰다.

<242> [실시예 2]

<243> CDK4 활성의 억제물질인 p16의 클로닝

<244> (i) 2 혼성체 분석을 사용한 p16의 클로닝

<245> 사카로마이세스 세레비지애 YPB2 세포를 GAL4db-p16 융합을 함유하는 플라스미드 및 cdc2(CDK1), CDK2, CDK4, CDK5, PCNA(증식 세포 핵 항원), 및 분열 이스트키나아제 Snf1으로 융합된 GAL4ad를 함유하는 플라스미드로 동시에 형질전환시켰다. 2개의 플라스미드(마이너스 트립토판 및 마이너스 류신)에 대해 선택적인 배지에서 세포를 배양한 후, 2개의 콜로니를 임의로 채취하여 히스티딘 함유 또는 결핍의 플레이트에 스트리킹시켰다. 히스티딘 부재하에서의 성장 능력은 GAL4-반응성 프로모터하에 있는 HIS3의 발현에 따라 다르고, 그러므로 기능성 GAL4 활성기를 p16의 대응하는 표적 단백질과의 상호 작용을 통해 재구성시켰다.

<246> (ii) p16 CDKs의 상호작용

<247> 정제한 박테리아로 생성시킨 GSTp16 융합 단백질을 (^{35}S)-표지한 시험관내에서 번역시킨 cdc2, CDK2, CDK4 및 CDK5과 혼합시킨다. 혼합물은 50mM 트리스-HCl pH 8, 120mM NaCl 및 0.5% Nonidet P-40을 함유시킨 최종 부피가 200㎕인 완충액내에 0.5㎍의 정제 GST-p16 및 같은 양의 시험관내에서의 번역 단백질(0.5 내지 5㎕; TNT 프로메가)을 함유시켰다. 4℃에서 1시간 후에, 15㎕의 글루타티온-아가로오스 비드를 첨가하고 추가 시간동안 인큐베이션을 재개했다. 비드를 원심 분리하여 회수하고, 인큐베이션 완충액으로 4회 세척한 다음, 표준 단백질-겔 로딩 완충액과 혼합시켰다. 샘플을 15% 폴리아크릴아미드 겔에 적재시키고 (^{35}S)-표지한 단백질을 형광그래피로 검출했다. GSTp16 융합 단백질을 pGEX-KG 벡터에서 과발현시키고 표준 방법으로 정제했다. 시험관내 번역 주형을 pBluescript 벡터(스트라타진)로부터 유도시켰다.

<248> (iii) p16의 단백질 가수 분해 맵핑

<249> 시험관내 번역 (^{35}S)-표지 p16(TNT 프로메가)를, 주형으로서 pBluescript 벡터(스트라타진)로 클로닝한 p16 cDNA를 사용하여 수득하고, CDK4-관련 p16 단백질을 대사적 (^{35}S)-표지 HeLa 세포 용해질로부터의 항-CDK4 혈청으로 동시-면역 침전시켰다. 완충액내의 광범위한 평형 및 분해를 상이한 농도로 NCS를 첨가하여 수행한 후에 부분 단백질 가수 분해를 상응하는 겔 슬라이스에서 실시했다. 생성물을 17.5% 폴리아크릴아미드 겔에서 러닝시키고 포스포이미저 Fujix 2000로 검출했다.

<250> (iv) CDK4-사이클린 D 복합체 상에 p16의 효과의 검출 방법

<251> p16, CDK4, 사이클린 D1, 또는 CDK4 및 사이클린 D1 모두를 과발현하는 바쿨로바이러스 감염시킨 곤충 세포를 대사적으로 (^{35}S)-표지화시켰다. 상이한 인큐베이션 혼합물을 p16, CDK4, 사이클린 D1, 및 CDK4와 사이클린 D1 양자 모두를 함유하는 추출물로 구성하고, 항-p16 혈청, 모든 사전 예비 인큐베이션을 시키지 않은 항-CDK4 혈청, 및 항혈청 및 항-사이클린 D1 혈청을 증가시키기 위해 원시적으로 사용되는 펩티드로 예비 인큐베이션 시킨 항-CDK 혈청으로 면역 침전시켰다. 다음, 면역 침전물을 SDS-PAGE로 분석했다.

<252> [실시예 3]

<253> p16의 염색체 맵핑

<254> 사람 p16의 게놈 클론을 cDNA 프로우브를 사용하여 λ FIXII 사람 게놈 라이브로리(스트레이트진)의 엄격한 스크리닝(68℃, 0.1× SSC 워시)으로 분리시켰다. 분리시킨 파지 클론을 고도의 엄격한 서던 혼성화 및/또는 부분 서열 분석으로 확인했다. 정제시킨 전체 파지 DNA를 형광 혼성화(FISH) 분석을 위해 표지했다.

<255> FISH 분석을 동시에 일어나는 메토트랙사이트 또는 티미딘, 자극된 피토헤마글루티닌, 정상적인 말초 혈액 림포사이트상에 확정된 방법(Demetrick et al. (1994) Cytogenet Cell Genet 66:72-74; Demetrick et al. (1993) Genomics 18:144-147; 및 Demarini et al. (1991) Environ Mol Mutagen 18:222-223)을 사용하여 수행했다. 초음파 처리한 사람 DNA 및 cot1 DNA의 혼합물을 사용한 억제는 배경을 감소시키는 것이 필요했다. 염색시킨 슬라이드를 요오드화 프로피디엄(R밴드화 패턴용) 또는 DAPI 및 악티노미신 D(DA-DAPI 밴드화 패턴용)로 카운터염색시키고, 페이드방지 매질내에 고정시키고 자이스 악시포트 마이크로스코프를 사용하여 가시화시켰다. 30 내지 100 유사분열을 각각의 유전자좌에 대해 조사했다. 포토그래프를 냉각시킨 CCD 카메라를 사용하여 완성했다. 삼중 밴드패스 필터(FITC/Texas Red/DAPI)를 통한 직접적인 가시화에서 3색의 형광을 조절했다. p16 유전자를 가시화하여 9p21-22에 맵핑시켰다.

<256> [실시예 4]

<257> 마우스 CCR-단백질의 클로닝

<258> 사람 p16 유전자의 코딩 영역으로 이루어진 프로우브를 이용하여, 발명자들은 마우스 태아 간세포 라이브러리를 스크리닝시키고 상기한 사람 p16 유전자의 마우스 동족체에 대한 코딩 영역을 함유하는 게놈 클론을 분리시켰다. 상기 클론을 하한 내지 중간의 엄격한 조건(50℃에서 1× SSC)하에서 분리시켰다. 상기 DNA(14kB)는 2개의 독립 부분에서 클론되고 9개의 제한 효소에 대한 제한 지도가 실행된다(도 5 참조). 마우스 CCR-유전자는 완전하게 서열화되고 코딩 영역은 서던 혼성화에 의해 제한 지도내에 위치된 단지 2개의 엑손으로 형성되었다. 마우스 CCR-단백질의 겉보기 분자량은 13.5kDa이고, 본 명세서에 "p13.5"으로 정의된 마우스 CCR-단백질의 핵산 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 5 및 6에 제시하였다.

<259> 마우스 p13.5 클론의 Met1-Arg80(도 6 참조)의 보존 영역의 누클레오티드 서열상에 기초한 프로우브를 이용하여, p19 태아 카르시노마 라이브러리(스트라타진)을 높은 엄격 조건하에서 프로우빙시켰다. 수개의 클론을 p13.5 클론에 현저하게 상동인 라이브러리로부터 분리시켰다. 1가지 쥐 클론의 서열 비교, 서열번호 7 및 8에서 제공된 서열이 p15의 쥐 상동임을 보였다(하기 실시예 5에서 상세하게 설명됨).

<260> [실시예 5]

<261> 사람 세포로부터 p15의 클로닝

<262> p15 cDNA의 서열을 서열번호 3 및 4 각각의 단백질의 유도 아미노산 서열에 따라 제시하였다. p15의 유도된 아미노산 서열을 p16의 서열과 비교하고(예컨대 도 6 참조), 상동 영역을 BLAST 프로그램을 사용하여 확인했다.

<263> (i) 세포 배양

<264> HaCaT 세포를 우태아 혈청(FBS)(Boukamp et al.(1988) J Cell Biol. 106:761-771)을 함유하는 DMEM내에 루틴하게 유지시켰다. TGF-β 정지를 위해서, HaCaT 세포를 10% FBS를 함유하는 DMEM에 함류되도록 성장시키고, 혈청을 0.1% FBS를 함유하는 DMEM에서 3일 동안 소비시켰다. 세포에 10% FBS 및 2ng/ml의 TGF-β (사람 플레이트릿, 칼바이오켐으로부터 정제됨)를 함유하는 새로운 배지를 첨가시켜 재자극시켰다. 라이브러리 구성을 위해서, RNA를 재자극 후에 22시간 동안 제조했다. 면역 침전물 실험을 위해, 재자극 후 19시간이 경과후에 시작하여 4시간 동안 세포를 TGF-β 의 존재하에서 ^{35}S-메티오닌으로 표지했다.

<265> (ii) 라이브러리 구성화 및 스크리닝

<266> RNA를 TGF-β 처리 세포 및 소비된 혈청이 있는 세포로부터 제조한 다음, RNAZOL B를 제조자의 지시에 따라 사용하여 TGF-β의 존재하에서 재자극시켰다. p15 클론을 분리시키기 위해 사용된 cDNA 라이브러리를 처리 및 처리되지 않은 세포로부터의 RNA의 혼합물로부터 구성했다. mRNA 제조 및 cDNA 합성은 상기에 설명되어 있는 바와 같았다(Hannon et al. (1993) Genes Dev. 7:2378-2391). 제조자의 지시에 따라 이중-가닥 cDNA를 λ -ZapII 팔과 결합시켰다. 낮은 엄격 혼성화를 50℃에서 500mM $NaPO_4$, pH 7.0, 1mM EDTA, 15% 포름아미드, 7% SDS, 0.1% 우혈청 알루민(워시: 1× SSC, 50℃)으로 실시했다. 또한 p15 cDNA를 사람 유방 상피 세포 라이브러리로부터 분리시켰다. 세포 용해, 면역 침전 및 프로테아제 지도화를 상기에 설명된 바와 같이 수행한다(Xiong et al. (1993) Nature 366:701-704). 키모트립신 분해를 위해, 7㎍ 또는 1.5㎍의 효소를 사용했다. 키모트립신 맵핑용 겔은 0.1% SDS를 함유했다.

<267> [실시예 6]

<268> CDK4 및 CDK6의 특이적 억제물인 p15

<269> 박테리아로부터 GST-p16 융합 단백질의 제조 방법은 상기에 설명되어 있다. GST-p15를 동일하게 제조했다.

<270> (i) p15는 CDK4 및 CDK6을 결합시킨다

<271> 제조자의 지시에 따라 시험관내 번역 CDK를 TNT-용해질 시험관내 번역 키트(프로메가)를 사용하여 제조했다. 결합 분석을 위해, 30분 동안 20mM 트리스, pH 8.0, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA를 함유하는 30μl의 용액에서 GST-p15 또는 GST-p16(250ng)을 시험관내 번역 CDK, 예컨대 ^{35}S-라벨화 CDC2, CDK2, CDK4, CDK5 또는 CDK6으로 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 혼합물을 250μl IP 완충액(50mM 트리스, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% NP-40)으로 희석시키고, 1시간 동안 12.5μl의 글루타티온 세파로오스로 인큐베이션시켰다. 결합된 단백질을 글루타티온 세파로오스상에서 재생시키고, 1ml이 IP 완충액으로 4번 세척 후에, SDS 겔 샘플 완충액에서 끓여서 방출시켰다. 결합된 단백질을 17.5% PAGE 겔에서 전기 영동으로 분석했다. 비교를 위해서, 유사한 실험을 GST-p16을 수행했다.

<272> (ii) p15는 사이클린 D/CDK4 키나아제를 억제한다

<273> 30℃에서 30분 동안 바쿨로바이러스 감염시킨 곤충 세포의 용해질에 존재하는 활성 사이클린 D/CDK4를 증가된 양의 GST-p15로 인큐베이션시켰다. 활성 사이클린 D/CDK4 키나아제를 함유하는 바쿨로바이러스 용해질을 제조하는 방법은 상기에 설명되어 있다. 활성 사이클린 D/CDK4를 함유하는 용해질을 동일하게 제조했다. 키나아제 분석을 위해서 10μl의 바쿨로바이러스 용해질을 약 0,10ng, 20ng, 50ng, 또는 100ng의 GST-p15 또는 GST-p16과 혼합시키고 30℃에서 30분 동안 20mM 트리스, pH 8.0, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA를 함유하는 30μl의 전체 부피에서 인큐베이트시켰다. 인큐베이션 후에, 0.5㎍ GST-RB 및 0.5μl의 γ -^{32}P-ATP(5μlCi, 3000 Ci/mMol)을 30℃에서 10분 동안 기질로서 첨가했다. 250μl의 IP 완충액 및 15μl의 글루타티온 세파로스를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 추가로 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션시킨 후에, 결합 단백질의 방출 및 연속 전기영동 전에 비드를 IP 완충액으로 4회 세척했다. p16과 같이 p15-GST 융합 단백질은 CDK4의 키나아제 활성을 억제시킬 수 있었다.

<274> (iii) p15는 사이클린 D/CDK6 키나아제를 억제시켰다

<275> 상기에 설명된 바와 같이 사이클린 D/CDK6 복합체를 바쿨로바이러스 감염시킨 곤충 세포에서 생성시키고, 증가량의 GST-p15 또는 GST-p16으로 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, GST-RB 인산화를 촉매화시키기 위한 상기 복합체의 능력을 결정했다. p15 및 p16 모두 CDK6 키나아제 활성을 억제시키는 능력을 증명했다.

<276> [실시예 7]

<277> TGF-β 처리는 p15와 CDK4 및 CDK6의 결합을 증가시켰다

<278> 상기한 바와 같이 HaCaT를 배양했다. TGF-β 처리는 준비한 배지에 2ng/ml의 TGF-β 를 첨가하여 시작했다. TGF-β 처리중 최종 2시간 동안, 세포를 ^{35}S-메티오닌으로 표지화시켰다. 세포 표지화를 위해, 배지를 2ng/ml의 TGF-β, 10% 투석된 FBS 및 0.5mCi/ml의 ^{35}S-메티오닌/시스테인(트랜스-라벨, NEN)을 함유하는 DMEM 마이너스 메티오닌(Gibco-BRL)로 전환시켰다. 세포를 용해시키고 단백질을 항-CDK4 또는 항-

CDK6 항체를 사용하여 면역 침전시켰다. 세포 용해 및 면역 침전은 상기한 바와 같았다. 대등하게 TGF-β로 처리한 HaCaT 배양물을 DAPI로 염색시키고 FACS로 분석했다. TGF-β 첨가 후 8시간 동안, G1 세포의 % 에 관찰되는 변화가 전혀 없었다. 14시간 후에, G1 군이 증가하기 시작했다. G1(약 85% G1 세포)에서 HaCaT 세포의 정지는 비동시 배양의 처리 후에 24시간 이상을 필요로 했다.

<279> [실시예 8]

<280> TGF-β 처리는 p15 mRNA를 유도했다

<281> 비동시성 HaCaT 배양물을 제시된 시간 동안 TGF-β 로 처리했다. 전체 RNA를 처리시킨 세포로부터 제조하고 p15에 대해 특이한 프로우브(예컨대, 프로우브는 상기 유전자의 제 1 코딩 엑손으로 구성하고 PCR에 의해 제조한다)으로 노던 블롯팅에 대해 사용했다. 200mM $NaPO_4$, pH 7.0, 1mM EDTA, 15% 포름아미드, 7% SDS, 0.1% 우혈청 알부민으로 구성되는 노던 블로트에 대해 65℃에서 혼성화시키고; 세척하였다: 0.2× SSC, 65℃. p15 프로우브는 약 0.8, 2.2 및 3.2Kb의 3개의 p15 mRNA를 인식했다. 노던 신호를 후지 BAS2000 포스포르이미저상에서 정량화시키고 도시하여 결과의 그래프적 표현을 제공했다. RNA 양은 중량에 의해 정상화시키고, 사람 악틴 탐침을 갖는 블로트의 과-프로우빙은 레인(lane) 사이의 RNA 양에 10% 변화가 있는 것을 제시한다.

<282> 또한 p15 프로우브 패널에서 사용된 것과 동일한 RNA를 p16에 대해 특이한 단편으로 프로우빙시켰다. 추가로, TGF-β 처리 HaCaT 세포로부터의 RNA를 사람 CDK4 코딩 서열의 단편 또는 P27 cDNA의 단편으로부터 유도시킨 올리고누클레오티드에 프로우빙시켰다.

<283> [실시예 9]

<284> 유전자이식 마우스 p13.5 녹아웃(Knockout)을 발생시키는 방법

<285> p13.5 유전자를 플랭킹하는 약 3-4Kb의 2개의 DNA 영역으로 분열구조를 형성시켰다. 이러한 DNA 단편을 트랜스팩션 후에 상기 DNA를 통합시키는 마우스 태아간(ES) 세포의 선택에 사용할 유전자 마아커의 양측에 클로닝시켰다. p16 좌와 상동인 영역을 비상동성 재조합(예컨대, 마우스 p13.5 유전자의 위치와 다른 위치에서의 재조합)에 의해 분열 벡터를 통합시킨 세포에 대해 선택할 수 있도록 하는 다른 마아커로 플랭킹시켰다. 적당한 위치에서 삽입을 발생시킨 세포를 마우스 낭포로 주입시키고, 표준 프로토콜에 따라 적당한 자성 마우스에 주입시켰다(Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986; 및 Jaenisch (1988) Science 240:1468-1474).

<286> 조작한 낭포로부터 수득한 키메릭 퍼프를 트랜스팩션시킨 ES 세포(아고우티)에 특이적인 피복 색상 마아커로 확인할 수 있었다. 고도의 키메리즘을 갖는 마우스를 교배시켜 키메라 배 주를 갖는 것을 확인하고, 비키메릭 이형접합성 붕괴물을 발생시켰다. 비키메릭 이형접합체를 배양하여 동형접합성 파괴물을 유도했다.

<287> [실시예 10]

<288> CCR-비감수성 CDK4 돌연변이체의 특성화

<289> CDK4의 돌연변이체를 멜라노마 환자의 세포에서 발견하였고, 돌연변이 효소의 서열을 결정하였다. 상기 서열로부터, 유전자가 위치 24에서 Arg→Cys를 함유함을 결정했다(서열번호 9 참조).

<290> 발명자들은 CDK4를 클로닝시켜 돌연변이를 재분리시키고(Matsushime et al. (1992) Cell 71:323-334 참조) 올리고누클레오티드 프라이머 돌연변이 유전에 의해 시스테인 돌연변이체를 발생시켰다. 돌연변이의 효과를 특징짓기 위해, 발명자들을 기본 활성도(예컨대, 돌연변이는 CDK4를 구조적으로 활성시킨다), 이외에도 CDK4 활성을 조절하기 위한 다른 조절 단백질의 활성도를 포함하여, 많은 상이한 특징을 기본으로한 돌연변이 및 야생형 효소를 비교했다. 간단하게, 발명자들은 다양한 단백질을 과발현시키기 위한 일련의 바쿨로바이러스 발현 시스템을 발생시켰다. 특히, Sf9 세포 용해질(Desai et al.(1992) Mol Cell Biol 3:571-582, 및 상기 실시예 6)이 돌연변이체 및 야생형 CDK4, 사이클린 D1, p16, P15, p21 및 p27에 대해서 얻어진다(Polyak et al. (1994) Genes Dev 8:9-22; 및 Toyoshima et al.(1994) Cell 78:67-74). CDK4 키나아제 활성도를 검출하기 위한 물질로서 GST-RB 융합 단백질(실시예 6)을 사용하여, 용해질의 다양한 조합을 분리시키고 CDK4 활성화/억제에 대해 시험했다.

<291> 돌연변이체 CDK4를 Sf9 세포에서 단독으로 발현시키는 경우, RB 물질의 적당한 인산화가 전혀 발견되지 않았고, 또한 야생형 효소를 갖는 경우에, 돌연변이체가 CDK4의 구조적 활성을 일으키는 것을 예시했다. 또한, 각각이 사이클린 D1의 존재하에서 활성화되는 것으로 보여짐에 따라, Sf9 용해질에서 CDK4 및 사이클린 D1의 과발현은 돌연변이체 및 야생형 키나아제 모두에 대해서 동일했다. 그러나, 증가량의 p16- 또는 p15-함유 용해질을 CDK4/사이클린 D 혼합물에 혼합시킴에 따라, 야생형 CDK4는 저해되지만 돌연변이체 CDK4는 상대적으로 영향받지 않고, 이것은 돌연변이체가 p15 또는 p16에 무감한 키나아제의 활성을 일으키는 것을 예시했다. 추가로, 면역 침전은 p15 또는 p16 어느 것도 야생형 CDK4에서 일반적으로 보여지는 복합제로부터 명백하게 손실되기 때문에, p15 또는 p16 어느 것도 돌연변이와 결합할 수 없는 것을 증명했다. 최종적으로, 유사한 실험을 특정 돌연변이를 나타내는 p21 및 p27로 수행하고, Arg24-Cys는 상기 단백질 중 하나의 결합 또는 억제 능력에 영향을 주지 않았다. CDK6의 Arg31(야생형 유전자에 대해서 서열번호 10; 및 Bates et al.(1994) Oncogene 9:71-79)에 대한 동류 돌연변이와 같은 효과를 갖는 것을 예상했다.

<292> 참고 점으로서 Arg-24 잔기를 사용하여, 추가로 발명자들은 p16/p15의 재인식에 또한 포함될 수 있는 다른 잔기를 분자 모델링에 의해 확인하였다. CDK2에 대한 배위체(DeBondt et al.(1993) Nature 363:595-602; Endicott et al.(1994) Prot Eng 7:243-253; 및 Morgan et al.(1994) Curr Opin Cell Biol 6:239-246))를 이용하여, 발명자들은 CDK4에 대한 모델을 구성하였다. Arg-24 및 CDK4 및 CDK6(그러나 CDK2 또는 CDC2와는 상이하다) 사이에서 보존되는 것의 공간적 주변에서의 잔기상에 발명자들이 관심을 갖고, 발명자들은 p16을 결합시키는 능력에 대한 많은 새로운 CDK4 돌연변이를 재조합적으로 발생시키고 분석했다. 이러한 돌연변이체 및 이것들의 p16-결합도를 하기 표(1)에 요약하였다(또한 도 7 참조).

<293> 3가지 변화가 p16과의 상호 작용을 없앴다. 상기 변화가 3 차원 구조상에서 가시화되는 경우에, 상기 잔기가 용매에 영향받는 4개의 아미노산의 클러스터를 형성하는 것이 명백했다. 상기 잔기, K22, R24, H95 및 D97는 CDK4의 작은 로브에서, ATP 결합 자리에 아주 근접하지만, 사이클린 결합 위치 또는 물질 결합 위치로부터 떨어져 있는 표면을 결정했다. 이러한 표면은 CDK4(및 CDK6에 동족체형으로 존재)에 존재하는 일부 이상의 p16/P15-재인식 표면을 나타냈다. 따라서, CDK4/CDK6의 p16/p15 억제에 대한 관심 모델은 CCR 단백질의 결합시에 ATP-결합 자리에 교합 또는 뒤틀림 효과를 제공하여 ATP는 CDK4에 결합하지 않거나 또는 인산염 공여체로서 사용되도록 적당하게 위치되지 않았다.

[표 1]

CDK4 돌연변이체에 결합한 p16

잔기 번호	보존	변종	p16 결합
7	CDK4/CDK6 특이적	E→Q	영향 없음
10	CDK4/CDK6 특이적	A→E	영향 없음
11	CDK4/CDK6 특이적	E→K	영향 없음
22	CDK에 보존	K→A	p16과 결합하지 않음
24	CDK에 보존	R→S	p16과 결합하지 않음
25	CDK4/CDK6 특이적	D→N	영향 없음
31	CDK4/CDK6 특이적	F→V	영향 없음
78	CDK4/CDK6 특이적	C→I	영향 없음
81	CDK4/CDK6 특이적	S→E	영향 없음
82 내지 86	CDK4/CDK6 특이적	RTDRE→N	영향 없음
95 내지 97	CDK4/CDK6 특이적	HVD→FLH	p16과 결합하지 않음

<295> 상기에 인용된 참고 문헌 및 공보 모두는 참고적으로 본 명세서에서 이용된다.

<296> 당업자들은 정해진 실험을 통해 본 명세서에 설명된 본 발명의 특정 구체예에 대한 상당 어구를 인식할 수 있거나, 또는 확인할 수 있다. 상기 상당 어구는 하기에 첨부된 특허청구의 범위에 포함된다.

【서열표】

(1) 일반적 사항

(1) 출원인

(A)성명 : 콜드 스프링 하버 래보레이토리

(B)스트리트 : 원 벙타운 로우드

(C)도시 : 콜드 스프링 하버

(D)주 : 뉴욕

(E)국가: 미합중국

(F)우편번호 : 11724

(ii) 발명의 명칭 : 세포-주기 조절 단백질 및 그것의 사용방법

(iii) 서열의 수 · 12개

(iv) 컴퓨터 판독형태

(A)매체 유형 : 플로피디스크

(B)컴퓨터 : IBM PC 호환기종

(C)작업 시스템 : PC-DOS / MS-DOS

(D)소프트웨어 : AscII (text)

(vi) 우선출원 상황 :

(A) 출원번호 : US 08/346,147

(B) 출원일 : 1994년 11월 29일

(vi) 우선출원 상황:

(A) 출원번호 · US 08/306,511

(B) 출원일 : 1994년 9월 14일

(vi) 우선출원 상황 :

(A) 출원번호 : US 08/248,812

(B) 출원일 : 1994년 5월 25일

(vi) 우선출원 상황 :

(A) 출원번호 : US 08/227,371

(B) 출원일 : 1994년 4월 14일

(2) 서열번호 1에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 · 994 염기쌍

(B)서열의 형 : 핵산

(C)쇄의 수 : 2 본쇄

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 · cDNA

(ix) 서열의 특징 :

(A) 특징을 나타내는 기호 : CDS

(B) 존재 위치 : 41..508

(xi) 서열 : 서열번호 1 :

```
CGGAGAGGGG GAGAACAGAC AACGGGCGGC GGGGAGCAGC ATG GAT CCG GCG GCG        55
                                            Met Asp Pro Ala Ala
                                              1               5

GGG AGC AGC ATG GAG CCT TCG GCT GAC TGG CTG GCC ACG GCC GCG GCC       103
Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu Ala Thr Ala Ala Ala
                 10                  15                  20

CGG GGT CGG GTA GAG GAG GTG CGG GCG CTG CTG GAG GCG GTG GCG CTG       151
Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu Glu Ala Val Ala Leu
             25                  30                  35

CCC AAC GCA CCG AAT AGT TAC GGT CGG AGG CCG ATC CAG GTC ATG ATG       199
Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro Ile Gln Val Met Met
         40                  45                  50

ATG GGC AGC GCC CGA GTG GCG GAG CTG CTG CTG CTC CAC GGC GCG GAG       247
Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu
     55                  60                  65

CCC AAC TGC GCC GAC CCC GCC ACT CTC ACC CGA CCC GTG CAC GAC GCT       295
Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His Asp Ala
 70                  75                  80                  85

GCC CGG GAG GGC TTC CTG GAC ACG CTG GTG GTG CTG CAC CGG GCC GGG       343
Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly
                 90                  95                 100

GCG CGG CTG GAC GTG CGC GAT GCC TGG GGC CGT CTG CCC GTG GAC CTG       391
Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu
             105                 110                 115

GCT GAG GAG CTG GGC CAT CGC GAT GTC GCA CGG TAC CTG CGC GCG GCT       439
Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Ala
         120                 125                 130

GCG GGG GGC ACC AGA GGC AGT AAC CAT GCC CGC ATA GAT GCC GCG GAA       487
Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile Asp Ala Ala Glu
     135                 140                 145

GGT CCC TCA GAC ATC CCC GAT TGAAAGAACC AGAGAGGCTC TGAGAAACCT          538
Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
150                 155

CGGGAAACTT AGATCATCAG TCACCGAAGG TCCTACAGGG CCACAACTGC CCCCGCCACA     598

ACCCACCCCG CTTTCGTAGT TTTCATTTAG AAAATAGAGC TTTTAAAAAT GTCCTGCCTT     658

TTAACGTAGA TATAAGCCTT CCCCCACTAC CGTAAATGTC CATTTATATC ATTTTTTATA     718

TATTCTTATA AAAATGTAAA AAAGAAAAAC ACCGCTTCTG CCTTTTCACT GTGTTGGAGT     778

TTTCTGGAGT GAGCACTCAC GCCCTAAGCG CACATTCATG TGGGCATTTC TTGCGAGCCT     838

CGCAGCCTCC GGAAGCTGTC GACTTCATGA CAAGCATTTT GTGAACTAGG GAAGCTCAGG     898

GGGGTTACTG GCTTCTCTTG AGTCACACTG CTAGCAAATG GCAGAACCAA AGCTCAAATA     958


AAAATAAAAT TATTTTCATT CATTCACTCA AAAAAA                               994
```

(2) 서열번호 2에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 156 아미노산

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 : 서열번호 2 :

```
Met Asp Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
 1               5                  10                  15

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
            20                  25                  30

Glu Ala Val Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
        35                  40                  45

Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu
    50                  55                  60

Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg
65                  70                  75                  80

Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val
                85                  90                  95

Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg
            100                 105                 110

Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg
        115                 120                 125

Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg
    130                 135                 140

Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
145                 150                 155
```

(2) 서열번호 3에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 850 염기쌍

(B)서열의 형 . 핵산

(C)쇄의 수 : 2 본쇄

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특징 :

(A) 특징을 나타내는 기호 : CDS

(B) 존재 위치 : 338..751

(xi) 서열 : 서열번호 3 :

```
GCGGGGCAGT GAGGACTCCG CGACGGTCCG CACCCTGCGG CCAGAGCGGC TTTGAGCTCG      60

GCTGCTTCCG CGCTAGGCGC TTTTTCCCAG AAGCAATCCA GGCGCGCCCG CTGGTTCTTG     120

AGCGCCAGGA AAAGCCCGGA GCTAACGACC GGCCGCTCGG CACTGCACGG GGCCCCAAGC     180

CGCAGAAGAA GGACGACGGG AGGGTAATGA AGCTGAGCCC AGGTCTCCTA GGAAGGAGAG     240

AGTGCGCCGG AGCAGCGTGG GAAAGAAGGG AAGAGTGTCG TTAAGTTTAC GGCCAACGGT     300

GGATTATCCG GGCCGCTGCG CGTCTGGGGG CTGCGGA ATG CGC GAG GAG AAC AAG       355
                                          Met Arg Glu Glu Asn Lys
                                            1               5

GGC ATG CCC AGT GGG GGC GGC AGC GAT GAG GGT CTG GCC AGC GCC GCG        403
Gly Met Pro Ser Gly Gly Gly Ser Asp Glu Gly Leu Ala Ser Ala Ala
            10                  15                  20

GCG CGG GGA CTA GTG GAG AAG GTG CGA CAG CTC CTG GAA GCC GGC GCG        451
Ala Arg Gly Leu Val Glu Lys Val Arg Gln Leu Leu Glu Ala Gly Ala
        25                  30                  35

GAT CCC AAC GGA GTC AAC CGT TTC GGG AGG CGC GCG ATC CAG GTC ATG        499
Asp Pro Asn Gly Val Asn Arg Phe Gly Arg Arg Ala Ile Gln Val Met
    40                  45                  50

ATG ATG GGC AGC GCC CGC GTG GCG GAG CTG CTG CTG CTC CAC GGC GCG        547
Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala
55                  60                  65                  70

GAG CCC AAC TGC GCA GAC CCT GCC ACT CTC ACC CGA CCG GTG CAT GAT        595
Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His Asp
                75                  80                  85

GCT GCC CGG GAG GGC TTC CTG GAC ACG CTG GTG GTG CTG CAC CGG GCC        643
Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala
            90                  95                  100

GGG GCG CGG CTG GAC GTG CGC GAT GCC TGG GGT CGT CTG CCC GTG GAC        691
Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp
        105                 110                 115

TTG GCC GAG GAG CGG GGC CAC CGC GAC GTT GCA GGG TAC CTG CGC ACA        739
Leu Ala Glu Glu Arg Gly His Arg Asp Val Ala Gly Tyr Leu Arg Thr
    120                 125                 130

GCC ACG GGG GAC TGACGCCAGG TTCCCCAGCC GCCCACAACG ACTTTATTTT            791
Ala Thr Gly Asp
135

CTTACCCAAT TTCCCACCCC CACCCACCTA ATTCGATGAA GGCTGCCAAC GGGGAGCGG       850
```

(2) 서열번호 4에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 138 염기쌍

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 : 서열번호 4 :

```
Met Arg Glu Glu Asn Lys Gly Met Pro Ser Gly Gly Gly Ser Asp Glu
  1               5                  10                  15

Gly Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Leu Val Glu Lys Val Arg Gln
             20                  25                  30

Leu Leu Glu Ala Gly Ala Asp Pro Asn Gly Val Asn Arg Phe Gly Arg
         35                  40                  45

Arg Ala Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu
     50                  55                  60

Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu
 65                  70                  75                  80

Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu
                 85                  90                  95

Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Arg Gly His Arg Asp Val
        115                 120                 125

Ala Gly Tyr Leu Arg Thr Ala Thr Gly Asp
    130                 135
```

(2) 서열번호 5에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 853 염기쌍

(B)서열의 형 : 핵산

(C)쇄의 수 : 2 본쇄

(D)형태 . 선형

(ii) 분자형 · cDNA

(ix) 서열의 특징 :

(A) 특징을 나타내는 기호 : CDS

(B) 존재 위치 : 213..587

(xi) 서열 . 서열번호 5 :

```
GGAGTACAGC AGCGGGAGCA TGGGTCGCAG GTTCTTGGTC ACTGTAAGGA TTCAGCGCGC      60

GGGCCGCCCA CTCCAAGAGA GGGTTTTCTT GGTGAAGTTC GTGCGATCCC GGAGACCCAG     120

GACAGCGAGC TGCGCTCTGG CTTTCGTGAA CATGTTGTTG AGGCTAGAGA GGATCTTGAG     180

AAGAGGGCCG CACCGGAATC CTGGACCAGG TG ATG ATG ATG GGC AAC GTT CAC       233
                                      Met Met Met Gly Asn Val His
                                        1               5

GTA GCA GCT CTT CTG CTC AAC TAC GGT GCA GAT TCG AAC TGC GAG GAC       281
Val Ala Ala Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Ala Asp Ser Asn Cys Glu Asp
         10                  15                  20

CCC ACT ACC TTC TCC CGC CCG GTG CAC GAC GCA GCG CGG GAA GGC TTC       329
Pro Thr Thr Phe Ser Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe
     25                  30                  35

CTG GAC ACG CTG GTG GTG CTG CAC GGG TCA GGG GCT CGG CTG GAT GTG       377
Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Gly Ser Gly Ala Arg Leu Asp Val
 40                  45                  50                  55

CGC GAT GCC TGG GGT CGC CTG CCG CTC GAC TTG GCC CAA GAG CGG GGA       425
Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Leu Asp Leu Ala Gln Glu Arg Gly
                 60                  65                  70

CAT CAA GAC ATC GTG CGA TAT TTG CGT TCC GCT GGG TGC TCT TTG TGT       473
His Gln Asp Ile Val Arg Tyr Leu Arg Ser Ala Gly Cys Ser Leu Cys
             75                  80                  85

TCC GCT GGG TGG TCT TTG TGT ACC GCT GGG AAC GTC GCC CAG ACC GAC       521
Ser Ala Gly Trp Ser Leu Cys Thr Ala Gly Asn Val Ala Gln Thr Asp
         90                  95                 100

GGG CAT AGC TTC AGC TCA AGC ACG CCC AGG GCC CTG GAA CTT CGC GGC       569
Gly His Ser Phe Ser Ser Ser Thr Pro Arg Ala Leu Glu Leu Arg Gly
    105                 110                 115

CAA TCC CAA GAG CAG AGC TAAATCCGCC TCAGCCCGCC TTTTTCTTCT              617
Gln Ser Gln Glu Gln Ser
120                 125

TAGCTTCACT TCTAGCGATG CTAGCGTGTC TAGCATGTGG CTTTAAAAAA TACATAATAA     677

TGCTTTTTTT GCAATCACGG GAGGGAGCAG AGGGAGGGAG CAGAAGGAGG GAGGGAGGGA     737

GGGAGGGACC TGGACAGGAA AGGAATGGCA TGAGAAACTG AGCGAAGGCG GCCGCGAAGG     797

GAATAATGGC TGGATTGTTT AAAAAAATAA AATAAAGATA CTTTTTAAAA TGTCAA         853
```

(2) 서열번호 6에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 125 아미노산

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 : 서열번호 6 :

```
Met Met Met Gly Asn Val His Val Ala Ala Leu Leu Leu Asn Tyr Gly
 1               5                  10                  15

Ala Asp Ser Asn Cys Glu Asp Pro Thr Thr Phe Ser Arg Pro Val His
            20                  25                  30

Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Gly
        35                  40                  45

Ser Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Leu
    50                  55                  60

Asp Leu Ala Gln Glu Arg Gly His Gln Asp Ile Val Arg Tyr Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Ala Gly Cys Ser Leu Cys Ser Ala Gly Trp Ser Leu Cys Thr Ala
                85                  90                  95

Gly Asn Val Ala Gln Thr Asp Gly His Ser Phe Ser Ser Ser Thr Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Leu Glu Leu Arg Gly Gln Ser Gln Glu Gln Ser
        115                 120                 125
```

(2) 서열번호 7에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 580 염기쌍

(B)서열의 형 : 핵산

(C)쇄의 수 : 2 본쇄

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : cDNA

(ix) 서열의 특징 :

(A) 특징을 나타내는 기호 : CDS

(B) 존재 위치 . 91..480

(xi) 서열 : 서열번호 7 :

```
CTCCAGAGGG GAGGAGCCGC TCAGAGACCA GGCTGTAGCA ATCTCACGGC CGGCGAAGGA      60

CCATTTCTGC CACAGACCGG GGACAAGGGC ATG TTG GGC GGC AGC AGT GAC GCG      114
                                 Met Leu Gly Gly Ser Ser Asp Ala
                                   1               5

GGC CTG GCC ACC GCC GCG GCG CGG GGG CAA GTG GAG ACG GTG CGG CAG      162
Gly Leu Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Gln Val Glu Thr Val Arg Gln
     10                  15                  20


CTC CTG GAA GCC GGC GCA GAT CCC AAC GCC CTG AAC CGC TTC GGG AGG      210
Leu Leu Glu Ala Gly Ala Asp Pro Asn Ala Leu Asn Arg Phe Gly Arg
 25                  30                  35                  40

CGC CCA ATC CAG GTC ATG ATG ATG GGC AGC GCC AGG GTG GCA GAG CTG      258
Arg Pro Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu
                 45                  50                  55

CTG CTG CTC CAC GGA GCA GAA CCC AAC TGC GCC GAC CCT GCC ACC CTT      306
Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu
             60                  65                  70

ACC AGA CCT GTG CAC GAC GCA GCT CGG GAA GGC TTC CTG GAC ACG CTT      354
Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu
         75                  80                  85

GTC GTG CTG CAC CGG GCA GGG GCG CGG TTG GAT GTG TGT GAC GCC TGG      402
Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Cys Asp Ala Trp
     90                  95                  100

GGC CGC CTG CCG GTA GAC TTG GCT GAA GAG CAG GGC CAC CGT GAC ATT      450
Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Gln Gly His Arg Asp Ile
105                 110                 115                 120

GCG AGG TAT CTG CAC GCT GCC ACT GGA GAT TGACTGCGGG TTCCCTCCGC        500
Ala Arg Tyr Leu His Ala Ala Thr Gly Asp
                125                 130

CTTCCGCAAG GACTTCTTTC TCCCCAGCCC CATCTAGGAA GACTGTAAGC ACGAAGAGGC    560

CACCAGCGCC CAGCCTGCAG                                               580
```

(2) 서열번호 8에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 .

(A)서열의 길이 : 130 아미노산

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(xi) 서열 : 서열번호 8 :

```
Met Leu Gly Gly Ser Ser Asp Ala Gly Leu Ala Thr Ala Ala Ala Arg
 1               5                  10                  15

Gly Gln Val Glu Thr Val Arg Gln Leu Leu Glu Ala Gly Ala Asp Pro
            20                  25                  30

Asn Ala Leu Asn Arg Phe Gly Arg Arg Pro Ile Gln Val Met Met Met
        35                  40                  45

Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro
    50                  55                  60

Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala
65                  70                  75                  80


Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala
                85                  90                  95

Arg Leu Asp Val Cys Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu Ala
            100                 105                 110

Glu Glu Gln Gly His Arg Asp Ile Ala Arg Tyr Leu His Ala Ala Thr
        115                 120                 125

Gly Asp
    130
```

(2) 서열번호 9에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 303 아미노산

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(v) 단편형 · N 말단 단편

(xi) 서열 : 서열번호 9 :

```
Met Ala Thr Ser Arg Tyr Glu Pro Val Ala Glu Ile Gly Val Gly Ala
1               5                  10                  15

Tyr Gly Thr Val Tyr Xaa Ala Xaa Asp Pro His Ser Gly His Phe Val
            20                  25                  30

Ala Leu Lys Ser Val Arg Val Pro Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Leu Pro Ile Ser Thr Val Arg Glu Val Ala Leu Leu Arg Arg Leu Glu
    50                  55                  60

Ala Phe Glu His Pro Asn Val Val Arg Leu Met Asp Val Cys Ala Thr
65                  70                  75                  80

Ser Arg Thr Asp Arg Glu Ile Lys Val Thr Leu Val Phe Glu Xaa Val
                85                  90                  95

Xaa Gln Asp Leu Arg Thr Tyr Leu Asp Lys Ala Pro Pro Pro Gly Leu
            100                 105                 110

Pro Ala Glu Thr Ile Lys Asp Leu Met Arg Gln Phe Leu Arg Gly Leu
        115                 120                 125

Asp Phe Leu His Ala Asn Cys Ile Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu
    130                 135                 140

Asn Ile Leu Val Thr Ser Gly Gly Thr Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly
145                 150                 155                 160

Leu Ala Arg Ile Tyr Ser Tyr Gln Met Ala Leu Thr Pro Val Val Val
                165                 170                 175

Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val Leu Leu Gln Ser Thr Tyr Ala
            180                 185                 190

Thr Pro Val Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Ile Phe Ala Glu Met Phe
        195                 200                 205

Arg Arg Lys Pro Leu Phe Cys Gly Asn Ser Glu Ala Asp Gln Leu Gly
    210                 215                 220

Lys Ile Phe Asp Leu Ile Gly Leu Pro Pro Glu Asp Asp Trp Pro Arg
225                 230                 235                 240

Asp Val Ser Leu Pro Arg Gly Ala Phe Pro Pro Arg Gly Pro Arg Pro
                245                 250                 255

Val Gln Ser Val Val Pro Glu Met Glu Glu Ser Gly Ala Gln Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Glu Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Ser Ala Phe Arg
        275                 280                 285

Ala Leu Gln His Ser Tyr Leu His Lys Asp Glu Gly Asn Pro Glu
    290                 295                 300
```

(2) 서열번호 10에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 . 326 아미노산

(B)서열의 형 . 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 단백질

(v) 단편형 . N 말단 단편

(xi) 서열 : 서열번호 10 :

```
Met Glu Lys Asp Gly Leu Cys Arg Ala Asp Gln Gln Tyr Glu Cys Val
1               5                  10                  15

Ala Glu Ile Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Lys Val Phe Xaa Ala Xaa Asp
            20                  25                  30

Leu Lys Asn Gly Gly Arg Phe Val Ala Leu Lys Arg Val Arg Val Gln
        35                  40                  45

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

Leu Arg His Leu Glu Thr Phe Glu His Pro Asn Val Val Arg Leu Phe
65                  70                  75                  80
```

```
Asp Val Cys Thr Val Ser Arg Thr Asp Arg Glu Thr Lys Leu Thr Leu
                85                  90                  95

Val Phe Glu Xaa Val Xaa Gln Asp Leu Thr Thr Tyr Leu Asp Lys Val
            100                 105                 110

Pro Glu Pro Gly Val Pro Thr Glu Thr Ile Lys Asp Met Met Phe Gln
        115                 120                 125

Leu Leu Arg Gly Leu Asp Phe Leu His Ser His Arg Val Val His Arg
    130                 135                 140

Asp Leu Lys Pro Gln Asn Ile Leu Val Thr Ser Ser Gly Gln Ile Lys
145                 150                 155                 160

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Tyr Ser Phe Gln Met Ala Leu
                165                 170                 175

Thr Ser Val Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val Leu Leu
            180                 185                 190

Gln Ser Ser Tyr Ala Thr Pro Val Asp Leu Trp Ser Val Gly Cys Ile
        195                 200                 205

Phe Ala Glu Met Phe Arg Arg Lys Pro Leu Phe Arg Gly Ser Ser Asp
    210                 215                 220

Val Asp Gln Leu Gly Lys Ile Leu Asp Val Ile Gly Leu Pro Gly Glu
225                 230                 235                 240

Glu Asp Trp Pro Arg Asp Val Ala Leu Pro Arg Gln Ala Phe His Ser
                245                 250                 255

Lys Ser Ala Gln Pro Ile Glu Lys Phe Val Thr Asp Ile Asp Glu Leu
            260                 265                 270

Gly Lys Asp Leu Leu Leu Lys Cys Leu Thr Phe Asn Pro Ala Lys Arg
        275                 280                 285

Ile Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Ser His Pro Tyr Phe Gln Asp Leu Glu
    290                 295                 300

Arg Cys Lys Glu Asn Leu Asp Ser His Leu Pro Pro Ser Gln Asn Thr
305                 310                 315                 320

Ser Glu Leu Asn Thr Ala
                325
```

(2) 서열번호 11에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 157 아미노산

(B)서열의 형 · 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 펩티드

(v) 단편형 : 중간부 단편

(xi) 서열 : 서열번호 11 :

```
Met Asp Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
1               5                  10                  15

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
            20                  25                  30

Glu Ala Val Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
        35                  40                  45

Ile Gln Val Met Met Met Gly Xaa Xaa Xaa Val Ala Xaa Leu Leu Leu
    50                  55                  60

Xaa Xaa Gly Ala Xaa Xaa Asn Cys Xaa Asp Pro Xaa Thr Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val
                85                  90                  95

Val Leu His Xaa Xaa Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly
            100                 105                 110

Arg Leu Pro Xaa Asp Leu Ala Xaa Glu Xaa Gly His Xaa Asp Xaa Xaa
        115                 120                 125

Xaa Tyr Leu Arg Xaa Ala Xaa Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala
    130                 135                 140

Arg Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
145                 150                 155
```

(2) 서열번호 12에 대한 사항 :

(i) 서열의 특성 :

(A)서열의 길이 : 138 아미노산

(B)서열의 형 : 아미노산

(D)형태 : 선형

(ii) 분자형 : 펩티드

(v) 단편형 : 중간부 단편

(xi) 서열 . 서열번호 12 :

```
Met Arg Glu Glu Asn Lys Gly Met Pro Ser Gly Gly Gly Ser Asp Glu
1               5                  10                  15

Gly Leu Ala Thr Pro Ala Arg Gly Leu Val Glu Lys Val Arg His Ser
            20                  25                  30

Trp Glu Ala Gly Ala Asp Pro Asn Gly Val Asn Arg Phe Gly Arg Arg
        35                  40                  45


Ala Ile Gln Val Met Met Met Gly Xaa Xaa Xaa Val Ala Xaa Leu Leu
    50                  55                  60

Leu Xaa Xaa Gly Ala Xaa Xaa Asn Cys Xaa Asp Pro Xaa Thr Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Xaa Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu
                85                  90                  95

Val Val Leu His Xaa Xaa Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Arg Leu Pro Xaa Asp Leu Ala Xaa Glu Xaa Gly His Xaa Asp Xaa
        115                 120                 125

Xaa Xaa Tyr Leu Arg Xaa Ala Xaa Gly Asp
    130                 135
```

(57) 청구의 범위

청구항 1

안키린(ankyrin) 류의 반복단위체를 특징으로 하는 아미노산 서열을 포함하고 사이클린 의존성 키나아제(CDK)와 결합하는 단리된 또는 재조합된 세포 주기 조절 폴리펩티드로서, 서열번호 4 또는 8을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 2

제 1항에 있어서, CDK가 G1 기(phase)의 CDK임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 3

제 1항에 있어서, CDK가 CDK4 또는 CDK6임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 폴리펩티드의 SDS-PAGE에 의한 겉보기 분자량이 12kD 내지 20kD임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호 2로 표시된 단백질과 경쟁적으로 CDK에 결합함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 6

사이클린 의존성 키나아제 (CDK)와 특이적으로 결합하는 세포 주기 조절(CCR) 단백질의 실질적으로 순수한 제조물로서, 상기 CCR-단백질의 전장 형태의 근사 분자량이 12kD 내지 20kD이며, 상기 CCR-단백질이 서열번호 4 또는 8에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 제조물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 단백질이 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상상동인 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 세포 주기 조절 단백질의 제조물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 단백질이 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 세포 주기 조절 단백질의 제조물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 단백질이 세포 주기 조절의 작용제 또는 길항제로서 기능함을 특징으로 하는 세포 주기 조절 단백질의 제조물.

청구항 10

서열번호 4 또는 8과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는, p15 폴리펩티드의 실질적으로 순수한 제조물.

청구항 11

제 15항에 있어서, 서열번호 4 또는 8의 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 폴리펩티드의 제조물.

청구항 12

제 10항에 있어서, 폴리펩티드가 세포 주기 조절의 작용제로서 또는 길항제로서 기능함을 특징으로 하는 폴리펩티드의 제조물.

청구항 13

사이클린 의존성 키나아제 4 (CDK4)와 특이적으로 상호작용하고, 상기 특이적 상호작용이 CDK4의 K22, R24, H95 및 D97 잔기에 의해 영향을 받는, 서열번호 4 또는 8 중 하나 이상의 서열에 제시된 아미노산과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 또는 재조합된 폴리펩티드.

청구항 14

제 13항에 있어서, 폴리펩티드가 CDK4에 의해 매개되는 인산 전이(transfer)반응을 저해함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 15

제 6항의 CCR-단백질의 에피토프와 특이적으로 반응하는 항체 제조물.

청구항 16

서열번호 4의 폴리펩티드의 에피토프와 특이적으로 반응하는 항체 제조물.

청구항 17

서열번호 8의 폴리펩티드의 에피토프와 특이적으로 반응하는 항체 제조물.

청구항 18

서열번호 4 또는 8중 하나 이상의 서열에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 가지는 재조합된 폴리펩티드.

청구항 19

제 18항에 있어서, 폴리펩티드가 세포 주기 조절의 작용제 또는 길항제로서 기능을 함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 20

제 18항에 있어서, 폴리펩티드가 사이클린 의존성 키나아제와 결합함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 21

제 20항에 있어서, 사이클린 의존성 키나아제가 CDK4이고, 폴리펩티드와 CDK4의 결합이 CDK4의 잔기 K22, R24, H95 및 D97의 영향을 받음을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 22

제 21항에 있어서, 폴리펩티드가 CDK4에 의해 매개되는 인산 전이 반응을 저해함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 23

제 18항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호 4 또는 8의 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 24

제 18항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호 4 또는 8의 단백질과 무관한 단백질로부터 유래된 아미노산 서열을 가지는 제 2의 폴리펩티드 부분을 추가로 포함하는 융합 단백질임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 25

제 24항에 있어서, 융합 단백질이 2 혼성체 검정법에서 기능적임을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 26

안키린 류의 반복단위체를 특징으로 하는 아미노산 서열을 포함하고 사이클린 의존성 키나아제(CDK)와 결합하는 세포 주기 조절 폴리펩티드를 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 가지는 실질적으로 순수

한 핵산으로서, 상기 폴리펩티드가 서열번호 4 또는 8인 핵산.

청구항 27

제 26항에 있어서, CDK가 G1 기의 CDK임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 28

제 26항에 있어서, CDK가 CDK4 또는 CDK6임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 29

제 26항에 있어서, 폴리펩티드의 SDS-PAGE에 의한 겉보기 분자량이 12kD 내지 20kD임을 특징으로 하는 핵산.

청구항 30

사이클린 의존성 키나아제 (CDK)와 특이적으로 결합하는 세포 주기 조절(CCR) 단백질을 엔코딩하는 누클레오티드 서열을 가지는 실질적으로 순수한 핵산으로서, 상기 CCR-단백질의 전장 형태의 근사 분자량이 12kD 내지 20kD 이고, 상기 CCR-단백질이 서열번호 4 또는 8에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 포함하는 핵산.

청구항 31

제 30항에 있어서, 누클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 CCR-단백질이 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 지님을 특징으로 하는 핵산.

청구항 32

제 30항에 있어서, 누클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 CCR-단백질이 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 상동인 아미노산 서열을 지님을 특징으로 하는 핵산.

청구항 33

제 30항에 있어서, 누클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 CCR-단백질이 세포 주기 조절의 작용제 또는 길항제로서 기능함을 특징으로 하는 핵산.

청구항 34

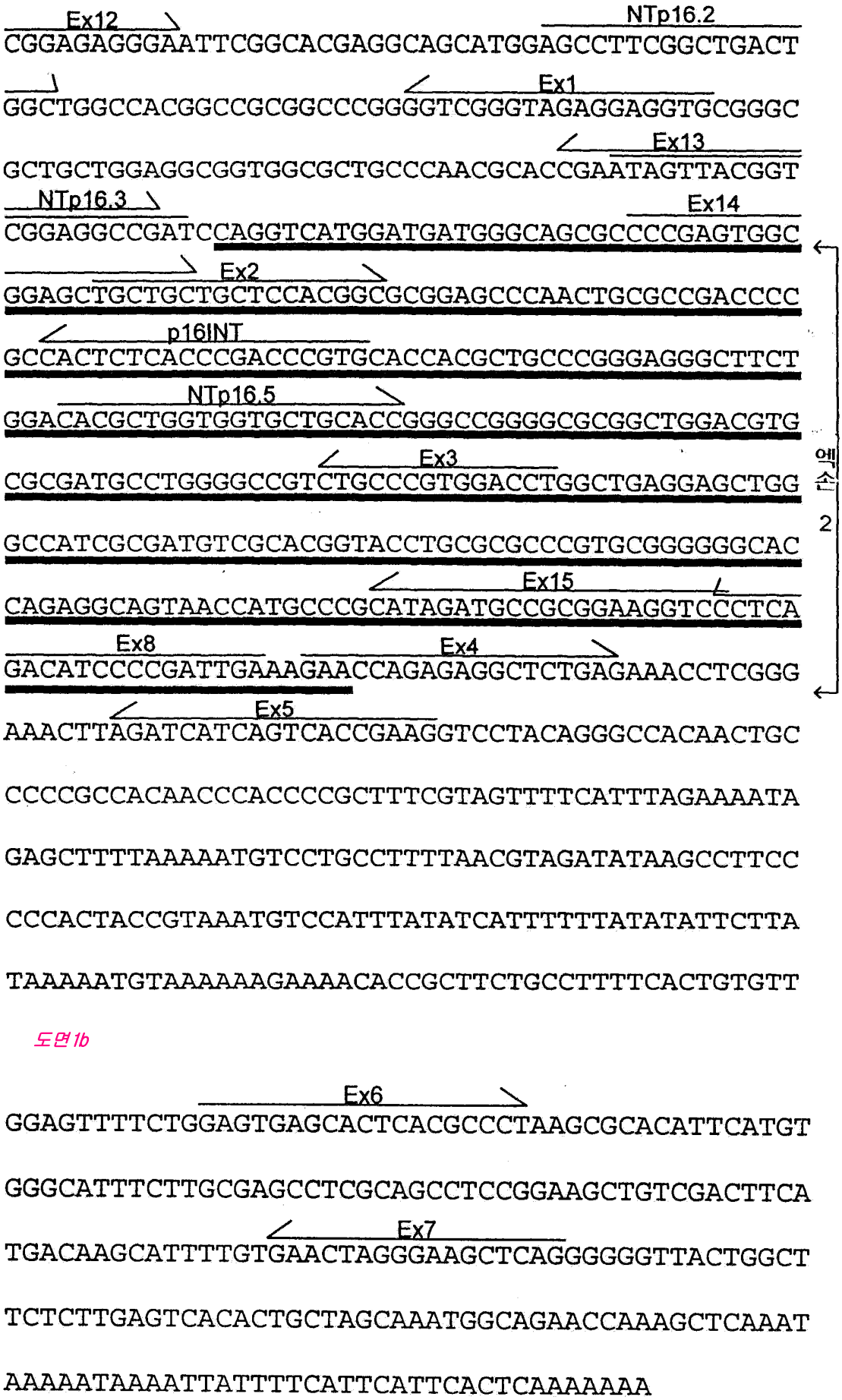
제 30에 있어서, 누클레오티드 서열이 50℃에서의 2xSSC의 조건하에서 서열번호 3 또는 7에 혼성화됨을 특징으로 하는 핵산.

요약

본 발명은 진핵 세포, 특히 포유동물 세포내의 신종의 세포-주기 조절 단백질 ("CCR-단백질")의 발견에 관한 것이다. 본 원에 기술된 바와 같이, 상기 종류의 단백질에는 겉보기 분자량이 16kDa인 폴리펩티드 및 겉보기 분자량이 15kDa인 폴리펩티드가 포함되며, 상기 두 폴리펩티드는 각각 세포-주기 진행의 억제물질로 작용하여, 결과적으로 세포 성장을 저해하는 작용을 한다. 상기와 같이, p53 체크 포인트에 대한 p21의 역할과 유사하게, 상기 CCR-단백질은 망막아종 (RB) -----. 또한, 본 발명의 CCR-단백질 종류에는 겉보기 분자량이 13.5 kDa (이하 "p13.5")인 단백질이 포함된다. p16 및 p15와 같이, p13.5는 세포-주기를 조절하는 작용을 하는 것으로 추정된다.

도면

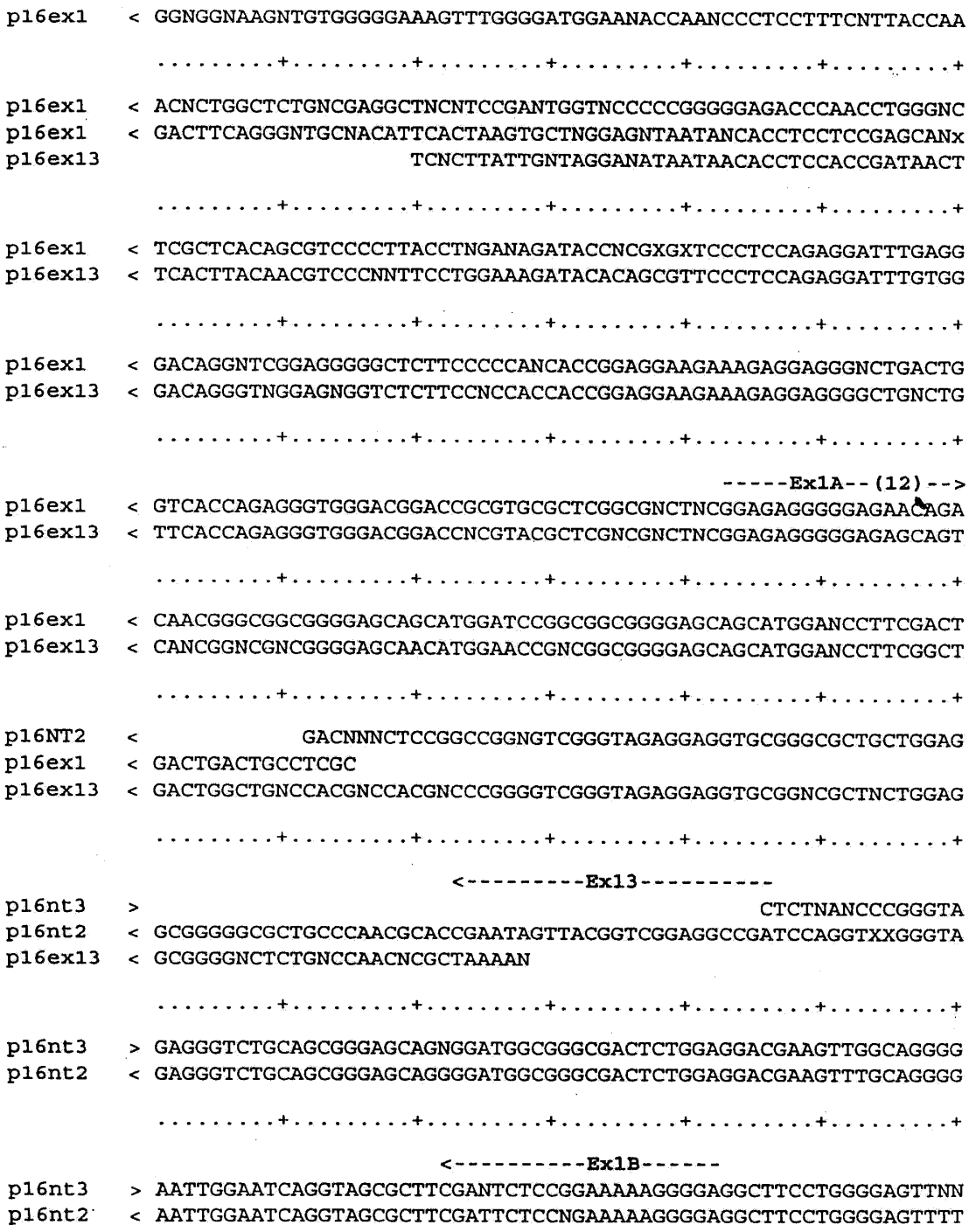
도면1a


Ex12
NTp16.2
CGGAGAGGGAATTCGGCACGAGGCAGCATGGAGCCTTCGGCTGACT
Ex1
GGCTGGCCACGGCCGCGGCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGC
Ex13
GCTGCTGGAGGCGGTGGCGCTGCCCAACGCACCGAATAGTTACGGT
NTp16.3
Ex14
CGGAGGCCGATCCAGGTCATGGATGATGGGCAGCGCCCCGAGTGGC
Ex2
GGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGACCCC
p16INT
GCCACTCTCACCCGACCCGTGCACCACGCTGCCCGGGAGGGCTTCT
NTp16.5
GGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTG
Ex3
CGCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGG
엑손 2
GCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCCCGTGCGGGGGGCAC
Ex15
CAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGGTCCCTCA
Ex8
Ex4
GACATCCCCGATTGAAAGAACCAGAGAGGCTCTGAGAAACCTCGGG
Ex5
AAACTTAGATCATCAGTCACCGAAGGTCCTACAGGGCCACAACTGC
CCCCGCCACAACCCACCCCGCTTTCGTAGTTTTCATTTAGAAAATA
GAGCTTTTAAAAATGTCCTGCCTTTTAACGTAGATATAAGCCTTCC
CCCACTACCGTAAATGTCCATTTATATCATTTTTTATATATTCTTA
TAAAAATGTAAAAAAGAAAACACCGCTTCTGCCTTTTCACTGTGTT

도면1b

Ex6
GGAGTTTTCTGGAGTGAGCACTCACGCCCTAAGCGCACATTCATGT
GGGCATTTCTTGCGAGCCTCGCAGCCTCCGGAAGCTGTCGACTTCA
Ex7
TGACAAGCATTTTGTGAACTAGGGAAGCTCAGGGGGGTTACTGGCT
TCTCTTGAGTCACACTGCTAGCAAATGGCAGAACCAAAGCTCAAAT
AAAAATAAAATTATTTTCATTCATTCACTCAAAAAAA

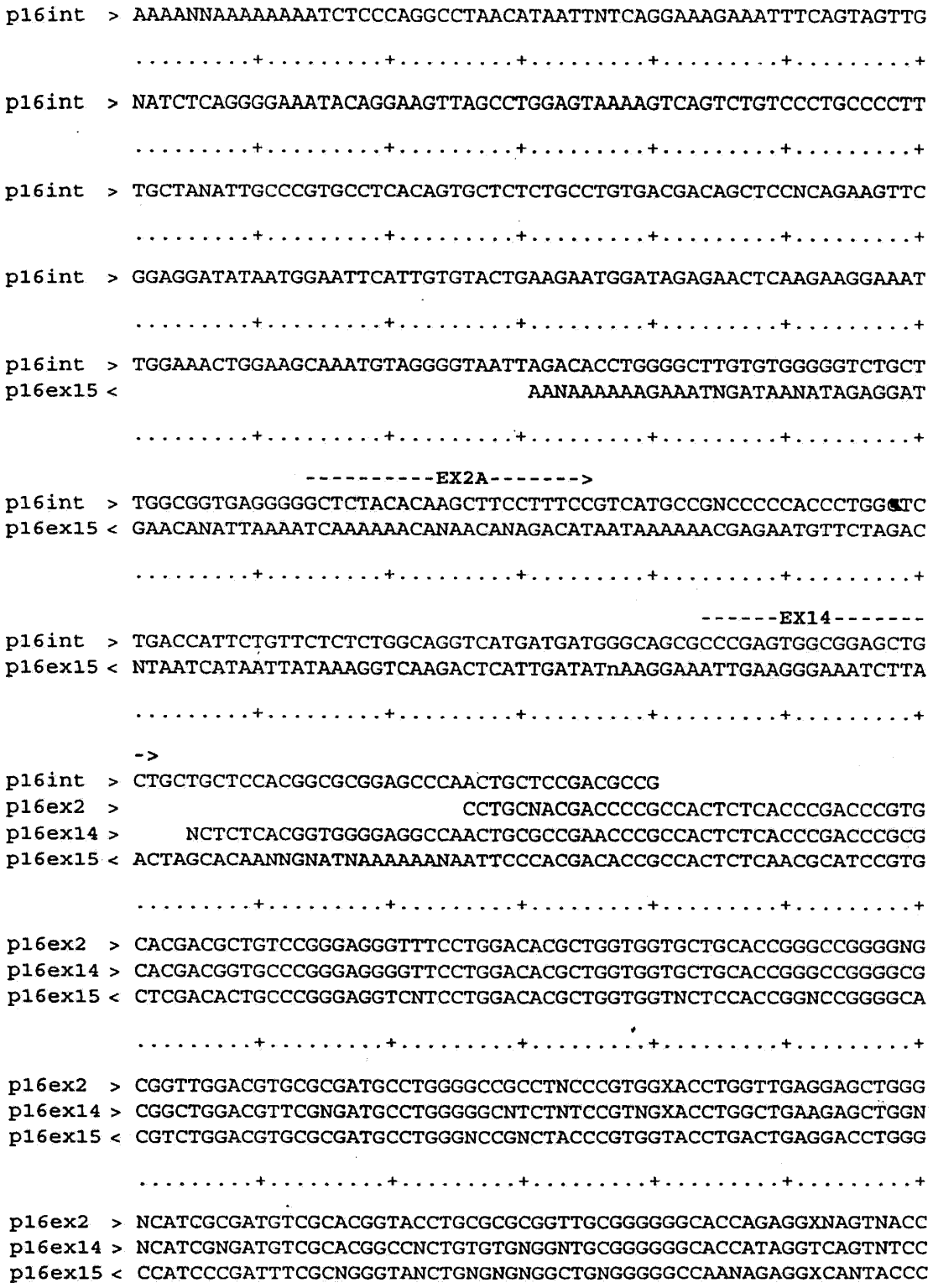
도면2a


p16ex1 < GGNGGNAAGNTGTGGGGGAAAGTTTGGGGATGGAANACCAANCCCTCCTTTCNTTACCAA
p16ex1 < ACNCTGGCTCTGNCGAGGCTNCNTCCGANTGGTNCCCCCGGGGGAGACCCAACCTGGGNC
p16ex1 < GACTTCAGGGNTGCNACATTCACTAAGTGCTNGGAGNTAATANCACCTCCTCCGAGCANx
p16ex13 TCNCTTATTGNTAGGANATAATAACACCTCCACCGATAACT
p16ex1 < TCGCTCACAGCGTCCCCTTACCTNGANAGATACCNCGXGXTCCCTCCAGAGGATTTGAGG
p16ex13 < TCACTTACAACGTCCCNNTTCCTGGAAAGATACACAGCGTTCCCTCCAGAGGATTTGTGG
Ex1A--(12)-->
p16ex1 < GTCACCAGAGGGTGGGACGGACCGCGTGCGCTCGGCGNCTNCGGAGAGGGGGAGAACAGA
p16ex13 < TTCACCAGAGGGTGGGACGGACCNCGTACGCTCGNCGNCTNCGGAGAGGGGGAGAGCAGT
p16ex1 < CAACGGGCGGCGGGGAGCAGCATGGATCCGGCGGCGGGGAGCAGCATGGANCCTTCGACT
p16ex13 < CANCGGNCGNCGGGGAGCAACATGGAACCGNCGGCGGGGAGCAGCATGGANCCTTCGGCT
p16NT2 < GACNNNCTCCGGCCGGNGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAG
p16ex1 < GACTGACTGCCTCGC
p16ex13 < GACTGGCTGNCCACGNCCACGNCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGNCGCTNCTGGAG
<---------Ex13----------
p16nt3 > CTCTNANCCCGGGTA
p16nt2 < GCGGGGGCGCTGCCCAACGCACCGAATAGTTACGGTCGGAGGCCGATCCAGGTXXGGGTA
p16ex13 < GCGGGGNCTCTGNCCAACNCGCTAAAAN
p16nt3 > GAGGGTCTGCAGCGGGAGCAGNGGATGGCGGGCGACTCTGGAGGACGAAGTTGGCAGGGG
p16nt2 < GAGGGTCTGCAGCGGGAGCAGGGGATGGCGGGCGACTCTGGAGGACGAAGTTTGCAGGGG
<----------Ex1B------
p16nt3 > AATTGGAATCAGGTAGCGCTTCGANTCTCCGGAAAAAGGGGAGGCTTCCTGGGGAGTTNN
p16nt2 < AATTGGAATCAGGTAGCGCTTCGATTCTCCNGAAAAAGGGGAGGCTTCCTGGGGAGTTTT

도면2b

```
          .........+.........+.........+.........+.........+.........+

p16nt3   > CAGAAGGGGTTTGTAATCACAGNCCTCCNCCTGGCGACGCCCTGGGGGGTTGGGAAGCCA
p16nt2   < CAGAAGGGGTTTGTAATCACAGACCTCCTCCTGGCGACGTCCTGGGGGCTTGGGAAGCCA

          .........+.........+.........+.........+.........+.........+

p16nt3   > AGGAAGAGGAATGAGGAGNCACGCGCNTACAGNTCTCTCGAATNCTGANAAGATCTGAAG
p16nt2   < AGGAAGAGGAATNAGGAGCCACGCGCGTACAGATCTCTCGAATGCTGAGAAGATCTNAAG

          .........+.........+.........+.........+.........+.........+

p16nt3   > GGGGGAACATATTTGTATTAGxATNNAAGTATGCTCTTTATCAGATACAAAATTCACGAA
p16nt2   < GGGGGAACATATTTGTATTAGCNTCCAAGTNTNCTCTNTATCANATACAAANTxC

          .........+.........+.........+.........+.........+.........+

p16nt3   > CGTGTGGNATAAAAAGGGAGTCTTAAAGAAATNTAAGATGTGCTGGGACTACTTAGCCTC
p16nt3   > CAANACACAGATNCCTGGATGGAGCT
```

도면2c


p16int > AAAANNAAAAAAAATCTCCCAGGCCTAACATAATTNTCAGGAAAGAAATTTCAGTAGTTG
p16int > NATCTCAGGGGAAATACAGGAAGTTAGCCTGGAGTAAAAGTCAGTCTGTCCCTGCCCCTT
p16int > TGCTANATTGCCCGTGCCTCACAGTGCTCTCTGCCTGTGACGACAGCTCCNCAGAAGTTC
p16int > GGAGGATATAATGGAATTCATTGTGTACTGAAGAATGGATAGAGAACTCAAGAAGGAAAT
p16int > TGGAAACTGGAAGCAAATGTAGGGGTAATTAGACACCTGGGGCTTGTGTGGGGGTCTGCT
p16ex15 < AANAAAAAAGAAATNGATAANATAGAGGAT
----------EX2A-------->
p16int > TGGCGGTGAGGGGGCTCTACACAAGCTTCCTTTCCGTCATGCCGNCCCCCACCCTGGCTC
p16ex15 < GAACANATTAAAATCAAAAAACANAACANAGACATAATAAAAAACGAGAATGTTCTAGAC
------EX14-------
p16int > TGACCATTCTGTTCTCTCTGGCAGGTCATGATGATGGGCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTG
p16ex15 < NTAATCATAATTATAAAGGTCAAGACTCATTGATATnAAGGAAATTGAAGGGAAATCTTA
->
p16int > CTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCTCCGACGCCG
p16ex2 > CCTGCNACGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTG
p16ex14 > NCTCTCACGGTGGGGAGGCCAACTGCGCCGAACCCGCCACTCTCACCCGACCCGCG
p16ex15 < ACTAGCACAANNGNATNAAAAAANAATTCCCACGACACCGCCACTCTCAACGCATCCGTG
p16ex2 > CACGACGCTGTCCGGGAGGGTTTCCTGGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGNG
p16ex14 > CACGACGGTGCCCGGGAGGGGTTCCTGGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCG
p16ex15 < CTCGACACTGCCCGGGAGGTCNTCCTGGACACGCTGGTGGTNCTCCACCGGNCCGGGGCA
p16ex2 > CGGTTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGCCTNCCCGTGGXACCTGGTTGAGGAGCTGGG
p16ex14 > CGGCTGGACGTTCGNGATGCCTGGGGGCNTCTNTCCGTNGXACCTGGCTGAAGAGCTGGN
p16ex15 < CGTCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGNCCGNCTACCCGTGGTACCTGACTGAGGACCTGGG
p16ex2 > NCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCGGTTGCGGGGGGCACCAGAGGXNAGTNACC
p16ex14 > NCATCGNGATGTCGCACGGCCNCTGTGTGNGGNTGCGGGGGGCACCATAGGTCAGTNTCC
p16ex15 < CCATCCCGATTTCGCNGGGTANCTGNGNGNGGCTGNGGGGGCCAANAGAGGXCANTACCC

도면3a

```
P16EX5  <  XAAGTATGAGCGAAACNAATTGTGGTTTGAGAANAGGNAATCGTAGGGAACTTCGGGATC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  CCNCNGGGANCNCCAGAACCTGAGNCGCCNATTGGAAATNACAAACTGNCTGNATCACTC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  CGNACCAGGTNCAAAAGATACCTGGGGANGCGGGAAGGGAAAGACNACATCNAGACCGCC
P16EX9  <                                                          CCCC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  TTCGCNCCTXGGNATTGTGAGCAGCCTCTGAGACTCATTXATATNACACTCGTXTTTCTT
P16EX9  <  ATCGCGCCTTGGGANTGTGAGCNACCATTGAGACTCATNAATATAGCACTCGTTTTTCTT

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  CTTACAACCCTGCGGNCCGCGCGGTCGCGCTTTCTCTGCCCTCCGCCGGGTGGACCTGGA
P16EX9  <  CTTGCAACCCTGCGGNCCGCGCGGTCGCGCTNTCTCTGCCCTCCGCNGGGTGGACCTGGA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  GCGCTTGAGCGGTCGGCGCGCCTGGAGCAGCCAGGCGGNCAGTGGACTAGCTGCTGGACC
P16EX9  <  GCGCTTGAGCGGTCGGCGCNCCTGGANCAGCCAGGCGGGCAGTGGACTACCTNCTGGACC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  AGGGAGGTGTGGGAGAGCGGTGGCGGCGGGTACATGCACGTGAAGCCATTGCGAGAACTT
P16EX9  <  AGGGAGGTGTGGGAGAGCGGTGNCGGCGGGTACATGCACGTGAAGCCATTGCGAGAACTT

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  TATCCATAAGTATTTCAATACCGGTAGGGACGGCAAGAGAGGAGGGCGGGATGTGCCACA
P16EX5  <  TATCCATAAGTATTTCAATGCCGGTAGGGACGGCAAGAGAGGAGGGCGGGATGTNCCACA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX5  <  CATCTTTGACCTCAGGTTTCTAACGCCTGTTTTCTTTCTGCCCTCTGCAGACAACCCCGA
P16EX9  <  CATCTTTGACCTCAGGTTTCTAACGCCTGTTTTCTTTCTGCCCTCTGCAGACATCCCCGA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX4  >                                        AGAAATTAGATCATCAGTCACCGATG
P16EX5  <  TTGAAAGAACCAGAGAGGCTCTGAGAAACC
P16EX9  <  TTGAAAGAACCAGAGAGGCTCTGAGAAACCTCCGGAAACTTAGXTCATCAXTCGCCGNAA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX4  >  GTCCTACAGGGNCACAACTGNCCCCGCCACAACCCACCCCGNTTTCGTAGTTTTCATTTA
P16EX9  <  AA
```

도면3b

```
P16EX4   > GAAAATAGAGCTTTTAAAAATGTCCTGCCTTTTAACGTAGATATATGCCTTCCCCCACTA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX4   > CCGNAAATGTCCATTTATATCATNTTTTATATATTCTTATAAAAATGTAAAAAAGAAAAA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX4   > CACCGCTTCTGCCTTTTCACTGTGTTGGAGTTTTCTGGAGTGAGCACTCACGCCCTAAGC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   >   CANCNATNTNCGGCATTTCTNGNGAGCCTCGTAGTCTCCGGATGNTGTCGACCTCGAG
P16EX6A  >   CANCNATNTNCGGCATTTCTNGNGAGCCTCGTAGTCTCCGGATGNTGTCGACCTCGAG
P16EX4   > GCACATTCATGTGGGCATTTCTTGCGAGCCTCGCAGNCTCCGGAAGCTGTCGACCTCGAG

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > GGGGGGNCCNGTACCCAATTCGNCCTATNGTGAGTCGTNTTACAATTCACTGGCCGCCGT
P16EX6A  > GGGGGGNCCNGTACCCAATTCGNCCTATNGTGAGTCGTNTTACAATTCACTGGCCGCCGT
P16EX4   > GGGGGGNCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGNCGNCGN

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > TTTXACAACGTCGXTGXACTGGGAAAACCCTGGTGTTACCCAACTTXAATCGCCTTGNAG
P16EX6A  > TTTXACAACGTCGXTGXACTGGGAAAACCCTGGTGTTACCCAACTTXAATCGCCTTGNAG
P16EX4   > TTTTACAACGTCGGTGGACTGGGAAAACCCCGGNGTTACCCAACTTTAATCGNCTTGGAG

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > NACATCCCCCTTTXCGCCAGCTGGTGTAATAGCGANGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
P16EX6A  > NACATCCCCCTTTXCGCCAGCTGGTGTAATAGCGANGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCC
P16EX4   > GACATCCCCCTTTTCGCCAGNTGGGGTTATAGNGAAGAGGGCCNCACCNNTCGCCC

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > CAACAGTTGNGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAAT
P16EX6A  > CAACAGTTGNGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAAT

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > TCGCGTTANATCNTCGGTTAANTCAGCTCATNTTTTATCCAATAGGCCGANATCGGCANA
P16EX6A  > TCGCGTTANATCNTCGGTTAANTCAGCTCATNTTTTATCCAATAGGCCGANATCGGCANA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > ATCCCCAATAAATCAANAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTCGTTCCAGTTNGGGAA
P16EX6A  > ATCCCCAATAAATCAANAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTCGTTCCAGTTNGGGAA

           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > CANGAGTCCACTATTAAAGANCGTAGNCTCNAACGTCANAGGGCGAAAAACCNTNTTTCA
P16EX6A  > CANGAGTCCACTATTAAAGANCGTAGNCTCNAACGTCANAGGGCGAAAAACCNTNTTTCA
```

도면3c

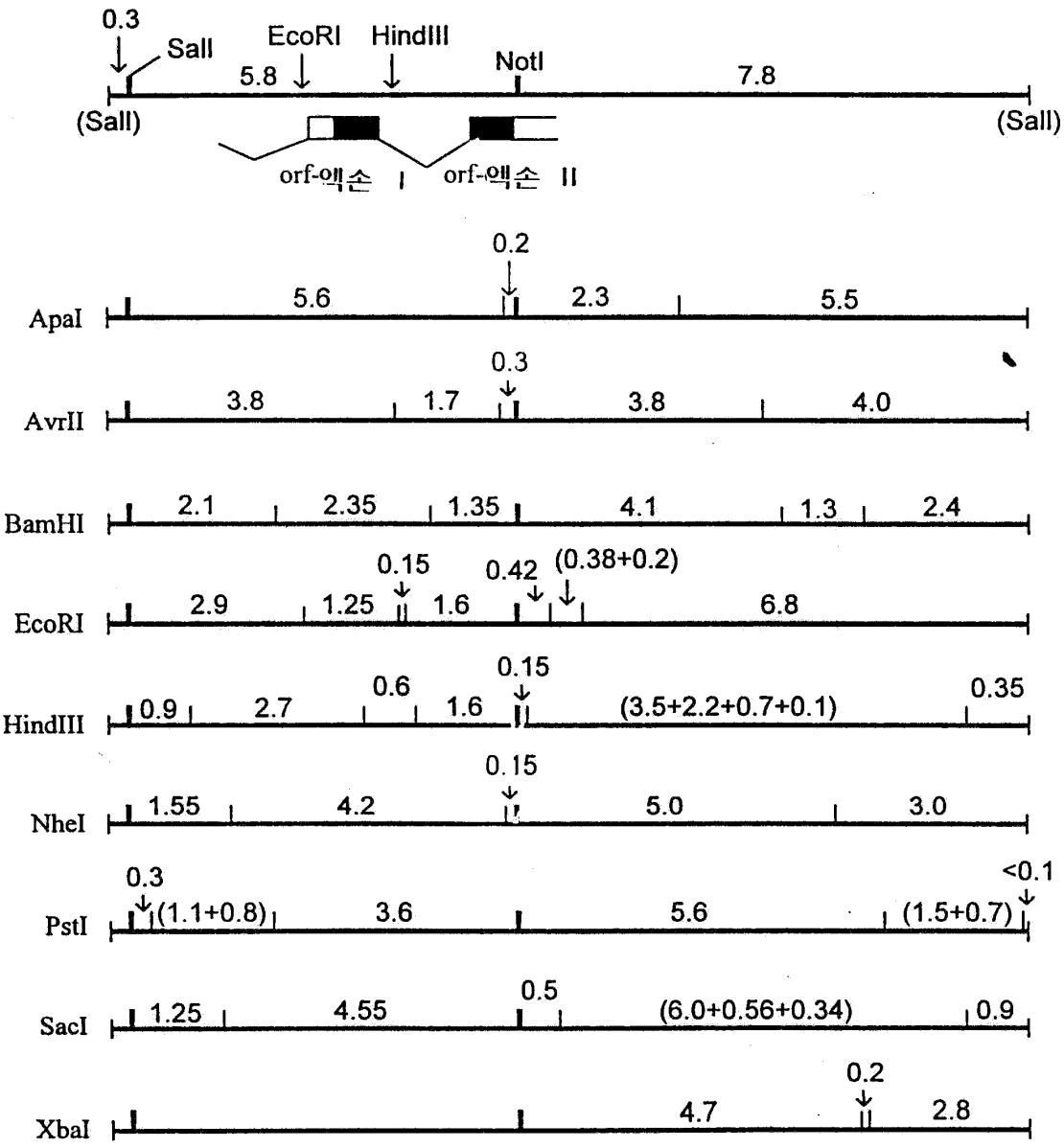
```
           .........+.........+.........+.........+.........+.........+

P16EX6   > GNGGATTGGNCCACTACGCNTANCC
P16EX6A  > GNGGATTGGNCCACTACGCNTANCCATCACCCTATTC
```

도면4

세포	정상 #2	정상 #1	A431	SaOs2	HTB 125	MCF-7	CCL119	U18	H9
엑손 1	정상	정상	변화	변화	결여	결여	결여	결여	결여
엑손 2	정상	정상	결여	변화	결여	결여	결여	결여	결여

세포	HTB173	HTB172	Tera2	GM130	ZRB75	HTB100	HeLa	CCL120	WI38
엑손 1	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상
엑손 2	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상	정상

도면5


0.3
SalI
EcoRI
HindIII
NotI
5.8
7.8
(SalI)
(SalI)
orf-액손 I
orf-액손 II
ApaI
0.2
5.6
2.3
5.5
AvrII
0.3
3.8
1.7
3.8
4.0
BamHI
2.1
2.35
1.35
4.1
1.3
2.4
EcoRI
0.15
0.42
(0.38+0.2)
2.9
1.25
1.6
6.8
HindIII
0.15
0.6
0.9
2.7
1.6
(3.5+2.2+0.7+0.1)
0.35
NheI
0.15
1.55
4.2
5.0
3.0
PstI
0.3
<0.1
(1.1+0.8)
3.6
5.6
(1.5+0.7)
SacI
0.5
1.25
4.55
(6.0+0.56+0.34)
0.9
XbaI
0.2
4.7
2.8

도면6

```
p16: Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn
p15: Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn
p13:        Met Met Met Gly Asn Val His Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Ala Asp Ser Asn

     Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu   *  Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr
     Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu   *  Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr
     Cys Glu Asp Pro   *  Thr Thr Phe Ser Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr

     Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp
     Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp
     Leu Val Val Leu His Gly Ser Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Leu Asp

     Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Thr ....
     Leu Ala Glu Glu Arg Gly His Arg Asp Val Ala Gly Tyr Leu Arg Thr Ala Thr Gly Asp
     Leu Ala Gln Glu Arg Gly His Gln Asp Ile Val Arg Tyr Leu Arg Ser Ala   *  Gly Cys Ser ....
```