



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0004571

(43) 공개일자 2007년01월09일

(21) 출원번호 10-2006-7013854

(22) 출원일자 2006년07월10일

심사청구일자 없음

변역문 제출일자 2006년07월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/041854

(87) 국제공개번호 WO 2005/059124

국제출원일자 2004년12월13일

국제공개일자 2005년06월30일

(30) 우선권주장 60/529,223 2003년12월11일 미국(US)

(71) 출원인 더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티
미국 94306-1106 캘리포니아 팔로 알토 엘 카미노 리얼 1705

(72) 발명자 모클리-로젠 다리아
미합중국 캘리포니아 94025 멘로 파크 하바드 애비뉴 825

(74) 대리인 정진상
박종혁

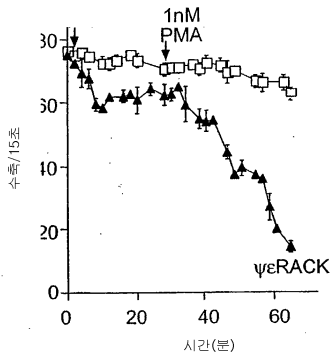
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 단백질 키나제 C의 동종효소-특이적 길항제

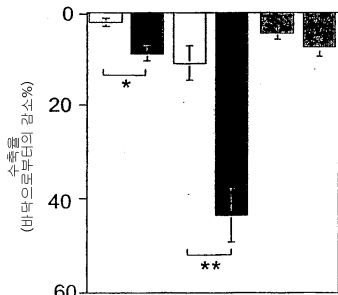
(57) 요약

PKC 펩티드 작용제의 생물학적 활성을 펩티드 길항제로 변화시키거나 그렇지 않으면 전환시키는 방법이 설명되어 있다. 방법은 펩티드 내 전하의 변화에 영향을 미치고 및/또는 그렇지 않으면 각각의 PKC 효소를 위한 RACK 단백질 상 PKC 결합 부위로부터 유도된 서열과 유사한 서열을 만들기 위해 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 또한, PKC 효소, 및 εPKC의 각종 펩티드 길항제의 활성을 억제하는 방법이 개시되어 있다.

대표도



A



PMA	-	-	+	+	+	+
ψεRACK	-	+	-	+	+	+
억제제	-	-	-	-	εV1-	Che 2

B

특허청구의 범위

청구항 1.

단백질 키나제 C(PKC) 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 방법으로서, 상기 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산을 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 아미노산으로 치환하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 하전되지 않은 아미노산으로 치환된 하전된 아미노산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 하전된 아미노산은 아스파르트산이고 상기 하전되지 않은 아미노산은 아스파라긴인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 전통적인 PKC 작용제, 신규한 PKC 작용제 또는 비전형적인 PKC 작용제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 ϵ PKC 작용제 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 ϵ PKC 작용제 펩티드는 SEQ ID NO:3에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 $\Psi\epsilon$ RACK 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 ϵ PKC 작용제 펩티드는 SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:16; 또는 SEQ ID NO:21에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 PKC 길항제 펩티드는 SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID NO:56; 또는 SEQ ID NO:57에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 ϵ PKC 길항제 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 ϵ PKC 작용제 펩티드이며 적어도 하나의 아미노산은 하전되지 않은 아미노산으로 치환된 하전된 아미노산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

단백질 키나제 C(PKC) 효소의 활성을 억제하는 방법으로서, 효소를 PKC 억제제 펩티드 또는 펩티도미메틱과 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 펩티드는 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산이 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키기에 충분한 다른 아미노산으로 치환되는 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 상기 PKC 효소의 Ψ -RACK 서열로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 10 항에 있어서, 상기 Ψ -RACK 서열은 $\Psi\epsilon$ RACK 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 10 항에 있어서, 상기 단백질 키나제 C는 ϵ PKC이며 상기 PKC 작용제 펩티드는 상기 PKC 효소의 Ψ -RACK 서열의 유도체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 SEQ ID NO:3에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 $\Psi\epsilon$ RACK 작용제 펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 13 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:20 또는 SEQ ID NO:21에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 13 항에 있어서, 상기 PKC 작용제 펩티드는 SEQ ID NO:3에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 $\Psi\epsilon$ RACK 펩티드이며 상기 PKC 억제제 펩티드는 SEQ ID NO:3과 상이한 아미노산 서열을 가지며, 상기 적어도 하나의 아미노산 잔기는 상기 적어도 하나의 아미노산과 비교하여 감소된 전하를 갖는 다른 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 음으로 하전되고 상기 다른 아미노산은 하전되지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아스파르트산이고 상기 다른 아미노산은 아스파라긴인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 16 항에 있어서, 상기 PKC 억제제 펩티드는 SEQ ID NO:55에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 10 항에 있어서, 상기 PKC 억제제 펩티드는 SEQ ID NO:50 ; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:53 ; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID NO:56 ; 또는 SEQ ID NO:57에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

PKC 길항 활성을 갖는 펩티드를 포함하는 펩티드로서, 상기 펩티드는 PKC 작용제 펩티드로부터 유도되며, 작용제 펩티드 내 적어도 하나의 아미노산은 작용제 펩티드를 길항제 펩티드로 전환하기에 충분한 다른 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 22.

제 21 항에 있어서, 상기 PKC는 ϵ PKC이며 상기 PKC 작용제 펩티드는 ϵ PKC 작용제 펩티드인 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 23.

제 22 항에 있어서, 상기 펩티드는 SEQ ID NO:55에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 24.

제 21 항에 있어서, 상기 길항제 펩티드는 SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID NO:56; 또는 SEQ ID NO:57에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 25.

제 21 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 치환된 위치에서 전하의 변화를 제공하는 아미노산으로 치환되는 것을 특징으로 하는 펩티드.

청구항 26.

SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID NO:56; 또는 SEQ ID NO:57에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 PKC 길항 활성을 갖는 펩티드.

청구항 27.

SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:51; SEQ ID NO:52; SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:55; SEQ ID NO:56; 또는 SEQ ID NO:57에서 제시한 아미노산 서열, 또는 그들의 조합을 갖는 치료적으로 유효량의 ϵ PKC 길항제 펩티드를 그것을 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함하는 치료 방법.

청구항 28.

제 27 항에 있어서, 상기 치료는 ϵ PKC에 의해 조절되는 질환 또는 상태를 위한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 28 항에 있어서, 상기 질환 또는 상태는 섬유 형성 질환 또는 염증성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

제 29 항에 있어서, 상기 섬유형성 질환은 경피증, 감 섬유증 또는 폐 섬유증인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.

제 29 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 자가면역 질환 또는 폐 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제 31 항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 다발성 경화증, 길랭바레 증후군, 건선, 그레이브스 병, 류마티스 관절염 및 1형 진성 당뇨병인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제 31 항에 있어서, 상기 폐 질환은 만성 폐쇄 폐질환 또는 천식인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

제 29 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 패혈 속 또는 염증성 장 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 작용제의 생물학적 작용을 길항제로 바꾸는 방법, 및 특히 단백질 키나제 C의 작용제를 단백질 키나제 C의 길항제로 바꾸는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 단백질 키나제 C의 동종효소-특이적 조절을 위한 펩티드 조성물 및 단백질 키나제 C의 특이적 동종효소의 작용을 길항하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

단백질 키나제 C("PKC")는 세포 성장, 유전자 발현의 조절, 및 이온 채널 활성을 포함하는 각종 세포 기능에 관여하는 신호 도입에 있어서의 키 효소이다. PKC 과의 동종효소는 활성인자에 대한 그들의 동종성 및 민감성을 기초로 적어도 3개의 아파로 나뉠 수 있는 적어도 11개의 상이한 단백질 키나제를 포함한다. 각각의 동종효소는 동종효소-특이적("가변" 또는 "V") 도메인으로 산재된 수많은 동종("보존" 또는 "C") 도메인을 포함한다. "분류상의" 또는 "cPKC" 아파의 구성원, α , β_1 , β_2 및 γ PKC는 4개의 동종 도메인(C1, C2, C3 및 C4)을 함유하고 칼슘, 포스파티딜세린, 및 디아실글리세롤 또는 활성화를 위한 포볼 에스테르(phorbol esters)를 필요로 한다. "신규한" 또는 "nPKC" 아파, δ , ϵ , η 및 θ PKC의 구성원 중에서, C2-유사 도메인은 C1 도메인에 선행한다. 그러나, C2 도메인은 칼슘에 결합하지 않으므로 nPKC 아파는 활성화를 위한 칼슘을 필요로 하지 않는다. 최종적으로, "비전형적인" 또는 "aPKC" 아파, ζ 및 λ PKC의 구성원에서, C2 및 C1 동종 도메인의 1/2의 결핍은 디아실글리세롤, 포볼 에스테르 및 칼슘에 반응하지 않는다.

PKC 동질 효소의 세포 아래 분배의 연구는 PKC의 활성화가 세포 내 그것의 재분배를 결과로 하며(또한, 전위라고도 함), 활성화된 PKC 동질 효소는 혈장 막, 세포골격 원소, 핵, 및 기타 세포 아래 구획과 관련한다(Saito, N. et al., Proc. Natl.Acad. Sci. USA 86: 3409-3413 (1989); Papadopoulos, V. and Hall, P. F. J. Cell Biol. 108: 553-567 (1989); Mochly-Rosen, D., et al., Molec. Biol. Cell (formerly Cell Reg.) 1: 693-706, (1990)). 상이한 PKC 동질 효소의 특이적 세포 작용은 그들의 세포 아래 위치에 의해 결정된다. 예를 들어, 활성화 된 β_1 PKC는 핵 내부에서 발견되는 반면, 활성

화된 β_{II} PKC는 심장 근육의 핵주위 및 세포 주위에서 발견된다(Disatnik, M. H., et al., Exp. Cell Res. 210 : 287-297 (1994)). 칼슘으로부터 독립적이지만 활성화를 위해 인지질을 필요로 하는 신규한 PKC 과의 구성원인 ϵ PKC는 척수의 표면층에서 뿐만 아니라 척수 신경절 모두의 1차 구심성 뉴런에서 발견된다.

세포의 상이한 부위로의 상이한 PKC 동질 효소의 국소화는 차례로 활성화 C-키나제에 대한 수용체("RACK")라 칭하여지는 특이적 고정 분자에 대한 활성화 동질 효소의 결합으로 인한 것으로 보인다. RACK는 그들 각각의 세포 아래 위치에 활성화된 PKC 동질 효소를 선택적으로 고정시킴으로써 기능하는 것으로 생각된다. RACK는 오직 완전히 활성화된 PKC에 결합하지만 반드시 효소의 기질은 아니다. 또한, 키나제의 촉매 도메인을 통해 매개되는 RACK에 대한 결합이 아니다 (Mochly-Rosen, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3997-4000 (1991)). PKC의 전위는 활성화 효소의 RACK로의 결합을 반영하며 RACK에 대한 결합은 그것의 세포 반응을 생성하기 위해 PKC를 필요로 한다(Mochly-Rosen, D., et al., Science 268: 247-251 (1995)). 생체 내에서 RACK에 대한 PKC 결합의 억제는 PKC 전위 및 PKC-매개 작용을 억제한다(Johnson, J. A., et al., J. Biol. Chem. 271: 24962-24966 (1996); Ron, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 492-496 (1995); Smith, B. L. and Mochly-Rosen, D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 188: 1235-1240 (1992)).

일반적으로, PKC의 전위는 PKC 동질 효소의 적절한 기능을 필요로 한다. PKC 상 RACK-결합 부위를 모방하는 펩티드 [Ron, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 492-496 (1995); Johnson, J. A., et al., J. Biol. Chem. 271: 24962-24966 (1996)]는 생체 내 효소의 기능을 선택적으로 억제하는 PKC의 동종효소-특이적 전위 억제제이다. PKC의 이러한 동종효소-선택적 억제제는 활성화 동질 효소와 그들 각각의 고정 단백질(RACK)과의 상호작용을 선택적으로 억제하는 그들의 능력을 기초로 하여 확인되었다(Souroujon, M. and Mochly-Rosen, D., Nature Biotechnol. 16:919-924, (1998)). 이들 짧은 펩티드 억제제들(7-12 아미노산 길이)은 각각의 동질 효소의 기능을 선택적으로 방해하는 것으로 나타났다 (Mochly-Rosen, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3997-4000, (1991); Ron, D., et al., J. Biol. Chem. 270:24180-24187, (1995); Johnson, J. A., et al., J. Biol. Chem. 271:24962-24966, (1996); Zhang, Z., et al., Biophys. J. 70(2, part 2): A391, (1996); Gray, M.O. et al., J. Biol. Chem. 272:30945-30951, (1997)).

또한, 다른 PKC 동질 효소뿐만 아니라, β 및 ϵ PKC의 전위 작용제 펩티드가 확인되었다[Ron, D. and Mochly-Rosen, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:492-496, (1995); Dorn, G. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12798-12803, (1999)]. RACK 상의 PKC-결합 부위를 모방하는 펩티드[Mochly-Rosen, D., et al., J Biol. Chem. 226: 1466-1468 (1991); Mochly-Rosen, D., et al., Science 268: 247-251 (1995)]는 생체 내 효소의 기능을 선택적으로 억제하는 PKC의 동종효소-특이적 전위 활성제이다(Mochly-Rosen, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 492-496, (1995); Dorn, G. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 12798-12803, (1999)). PKC로부터 유도된 이들 6-8 아미노산 펩티드는 그들의 대응 RACK 내 서열에 일치하므로 그들을 각각 유사- β RACK($\Psi\beta$ RACK) 및 유사- ϵ RACK($\Psi\epsilon$ RACK)라 칭한다. 세포로의 $\Psi\beta$ RACK 또는 $\Psi\epsilon$ RACK의 도입은 대응 동종효소의 선택적 전위를 야기하며 시험관 내 및 생체 내 기질 인산화로서 측정되는 바와 같이 그들의 촉매 활성을 증가시킨다(Ron, D. and Monchly-Rosen, D., proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:492-496, (1995); Dom, G. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12798-12803, (1999)). 또한, RACK가 아직 확인되지 않은(예를 들어, δ 및 θ PKC) 동질 효소 내 Ψ RACK 서열의 C2 또는 C2-유사 도메인의 위치가 전위 작용제 펩티드에 일치하는 것으로 발견되었다[Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1114-1119, (2001)]. 예를 들어, $\Psi\delta$ RACK의 세포로의 도입은 δ PKC의 선택적 전위를 야기하고 그것의 촉매 활성을 증가시킨다[Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:111-1119, (2001)]. 또한, 이들 펩티드들은 세포 내 및 생체 내에서 β PKS, δ PKC 및 ϵ PKC의 역할을 확인하는데 사용되었다[Ron, D. and Monchly-Rosen, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:492-496, (1995); Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1114-1119, (2001); Dorn, G. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12798-12803, (1999)].

치료적 관점에서, PKC의 개개의 동종효소는 다음을 포함하는 각종 질병 상태의 메카니즘에 연루되었다: 암(α 및 β 텔타 PKC); 심장 비대 및 심부전(β_I 및 β_{II} PKC) 통각(γ 및 ϵ PCK); 심근 경색증을 포함하는 허혈(ϵ 및 δ PKC); 면역 반응, 특히 T-세포 매개된 것(θ PKC); 및 섬유아세포 성장 및 기억(δ 및 ζ PKC). 각종 PKC 동종효소- 및 가변 지역-특이적 펩티드가 이미 설명되었다(예를 들어, 미국 특허 제 5,783,405호 참조). 통증 인지에서 있어서 ϵ PKC의 역할은 미국 특허 제 5,783,405호에서 처음 설명된 ϵ PKC의 선택적 억제제인 ϵ V1-2 펩티드의 치료적 사용을 포함하여 최근 보고되었다(WO 00/01415; 미국 특허 제 6,376,467호).

PKC 동종효소가 각종 질병 상태에 관련하며, 사람 질병을 치료하는 치료제를 발전시키기 위해 특이적 PKC 동종효소의 작용을 조절하는 방법에 대한 필요성이 여전한 것은 물론이다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

단백질 키나제 C(PKC) 작용제 펩티드 내 적어도 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 치환된 위치에서 전하를 변화시키는 것과 같이, 펩티드 내 전하 분포를 변경시켜서, 및/또는 상기 펩티드가 활성화 된 C 키나제(RACK) 단백질에 대한 각각의 수용체 상 단백질 키나제 결합 부위 내 서열과 매우 밀접하게 닮도록하는 것은 PKC 효소의 활성을 억제하는데 사용될 수도 있는 PKC 길항제를 생산할 것임을 발견했다. 따라서, 단백질 키나제 C 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱스를 단백질 키나제 C 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환하는 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산을 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 본 발명의 특정 형태에서, 펩티드 길항제는 유도된 동종효소의 선택적 억제제이다.

본 발명의 또 다른 양태에서, PKC 효소의 활성을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 한 형태에서, 방법은 효소를 PKC 억제제 펩티드 또는 펩티도미메틱과 접촉하는 것을 포함하며, 펩티드는 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도되며 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환하기에 충분한 다른 아미노산으로 치환된다. 본 발명의 특정 형태에서, 치환은 치환된 잔여 위치에서 전하의 변화를 결과로 한다.

또한, 처리 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 치료적으로 유효한 양의 ϵ PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 그것을 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함한다. 방법은 ϵ PKC 효소의 활성을 조절함으로써 각종 질환 또는 상태를 치료하는데 사용될 수도 있다.

또한, PKC 길항 작용을 갖는 펩티드 또는 펩티도미메틱이 제공된다. 본 발명의 한 형태에서, 펩티드 또는 펩티도미메틱은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도되며, 여기서 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환하기에 충분한 다른 아미노산으로 치환된다. 본 발명의 또 다른 형태에서, 펩티드는 본원에서 나타낸 바와 같은 서열을 갖는다.

본 발명의 목적은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 단백질 키나제 C 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 PKC 효소의 활성을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 본원에서 설명된 PKC 길항제를 사용하는 처리 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 추가적 목적은 ϵ PKC 길항 작용을 갖는 펩티드 또는 펩티도미메틱을 제공하는 것이다.

이들 및 본 발명의 다른 목적 및 특징들은 하기 본 발명의 설명이 수반하는 도면과 함께 읽는 경우 더 완전히 이해될 것이다.

실시예

실시예 1

심장 근육세포 상 N- Ψ eRACK의 효과

A. 펩티드 제조 및 세포로의 송달

다음 펩티드가 전통적 기술에 의해 합성되고 정제되었다(>95%):

Ψ eRACK (SEQ ID NO:3, HDAPIGYD, ϵ PKC 아미노산 잔기 85-92);

N-ΨεRACK (SEQ ID NO:55, HNAPIGYD);

A-ΨεRACK (SEQ ID NO:79, HAAPIGYD);

εV1-2 (SEQ ID NO:86, EAVSLKPT; εPKC 아미노산 잔기 14-21 및 미국 특허 제 6,165,977호에서 설명됨);

ΨεRACK (SEQ ID NO:7, SVEIWD, βPKC 아미노산 241-246).

펩티드를 비변형시키거나 또는 초파리 안테나페디아 호메오도메인-유도된 담체 펩티드(SEQ ID NO:6, C-RQIKIWFQNRRMKWKK)로의 N-말단 Cys-Cys 결합을 통하여 가교 결합시켰다(Derossi, D., et al., J. Biol. Chem. 269: 10444- 10450, (1994); Derossi, D., et al., J. Biol. Chem. 271: 18188-18193, (1996); Theodora, L., et al., J. Neurosci. 15: 7158-7167, (1995)). 이 담체 펩티드(SEQ ID NO:6)는 대조군 펩티드로서 사용되었다.

1차 심장 근육세포 배양(90-95% 순도)을 앞서 설명한 바와 같이 갓 태어난 래트로부터 제조하였다(Gray, M. O., et al., J. Biol. Chem. 272: 30945-30951, (1997); Disatnik, M. -H., et al., Exp. Cell Res. 210: 287-297, (1994)).

펩티드(100 nM-1μM 적용된 농도)를 대조군으로서 담체-담체 이량체를 포함하여 대조군, 또는 담체-펩티드 콘주게이트로서 허위 삼투화(30 nM-1μM) (Derossi, D. et al., surpa (1994); Derossi, D. et al., surpa (1996); Theodora, L., et al., surpa(1995))를 갖는 일시적 삼투화(Johnson, J. A., et al., Circ. Res. 79: 1086-1099, (1996))에 의해 세포로 도입시켰다.

세포를 펩티드의 부재 또는 존재하에 10-20분간 처리한 후 10 또는 20분 동안 1nM 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)로 추가적 배양하였다. 택일적으로, 세포를 100 nM PMA(양성 대조군)를 포함하거나 PMA의 부재하에서 10분 동안 배양시켰다.

B. 심장 근육세포 수축율 측정

심장 근육세포 수축율의 측정을 앞서 설명한 바와 같이 필수적으로 수행하였다(Johnson, J. A., et al., J. Biol. Chem. 271: 24962- 24966, (1996)). 요약하면, 35 mm 플레이트 상에서 배양된 심근아세포를 37℃에서 온도 조절 기구(Medical Systems Corp.)에 두고 역광 현미경(Carl Zeiss Inc.)의 단계에 위치시켰다. 하나의 현미경 시야에서 4개의 세포의 수축율을 각각 15초 동안 2분 마다 결정하였다. 바닥 수축Ψε율(~300 비트/분)은 많은 시간에 걸쳐서 안정적이었다.

결과

상기 설명된 바와 같이, SEQ ID NO:1-5에서 나타난 펩티드를 합성하고 정제하였다. 구체적으로, ΨεRACK (SEQ ID NO:3, HDAPIGYD), N-ΨεRACK (SEQ ID NO:55, HNAPIGYD), A-ΨεRACK (SEQ ID NO:79, HAAPIGYD); εV1-2 (SEQ ID NO:86, EAVSLKPT); 및 ΨβRACK (SEQ ID NO:7, SVEIWD)를 제조하였다. 펩티드를 변형시키지 않거나 또는 초파리 안테나페디아 호메오도메인-유도 담체 펩티드(SEQ ID NO:81, C-RQIKIWFQNRRMKWKK)에 대한 N-말단 Cys-Cys 결합을 통해 가교 결합하였다.

펩티드 SEQ ID NO:3, 55 및 79를 대조군으로서 담체-담체 이량체를 포함하여 대조군으로서, 또는 담체-펩티드 콘주게이트로서 허위 삼투압으로, 일시적 삼투압에 의해 갓 태어난 래트로부터 제조된 심장 근육세포 배양액으로 도입시켰다. 세포를 펩티드의 부재 또는 존재하에서 10-20분 동안 처리한 다음 10 또는 20분 동안 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)를 포함하거나 포함하지 않는 추가적 배양을 하였다. 택일적으로, 세포를 100 nM PMA(양성 대조군)와 함께 또는 PMA의 존재하에서 10분 동안 배양하였다. 펩티드 및/또는 PMA의 효과는 실시예 1B에서 설명된 바와 같이, 근육세포의 수축율을 측정함으로써 결정하였다.

도 1A는 ΨεRACK(삼각형)로 처리된 세포 및 대조군 펩티드(사각형)로 처리된 세포로서, 이후에 실험의 개시 후 30분 동안 배양액에 첨가된 PMA를 포함한 배양에 대한 결과를 보여준다(PMA의 첨가는 도 1A의 그래프 상 화살표로 나타냄). 세포로의 ΨεRACK 펩티드 적용 약 10분 후, 대조군 세포와 비교하여 심근아세포의 수축율의 감소가 유도되었다. ΨεRACK의 존재하에 관찰된 감소는 PMA의 첨가에 의해 대단히 증가하였으며, 이것은 심장 근육세포의 수축율의 감소를 유도하는 것으로 알려져 있다(Johnson, J. A. et al., J. Biol. Chem., 271: 24962 (1996)).

도 1B는 신생아 래트 심장 근육세포의 수축율의 감소%를 나타내며, 감소%는 분당 약 100 비트에서 자발적으로 및 안정적으로 두드리는 세포의 바닥 수축율에 상대적이다. Ψ eRACK 펩티드로 처리된 세포는 펩티드 첨가 20분 후, 대조군 펩티드로 처리된 세포에 대한 $2 \pm 1\%$ 와 비교하여, Ψ eRACK에 대한 바닥 비율로부터 수축율에 있어서 $9 \pm 2\%$ 감소를 갖는다. PMA와 함께 Ψ eRACK로 처리된 세포는 바닥 수축율로부터 $44 \pm 6\%$ 의 감소를 겪은 반면, PMA 단독으로의 처리는 단지 $11 \pm 4\%$ 의 감소를 야기하였다.

도 1B에 대한 참고와 함께, 세포를 또한 ϵ PKC-특이적 억제제 펩티드인 ϵ V1-2로 처리하여 수축율에 있어서 Ψ eRACK 효과를 ϵ PKC 전위를 유도하는 능력으로 기인한 것인지를 여부를 결정하게 되며, 왜냐하면, 이 경우라면, 거기서 ϵ PKC-선택적 전위 억제제가 전위를 억제해야만 하기 때문이다. 게다가, 심장 근육세포의 농도에 있어서 Ψ eRACK 효과는 도 1B에서 나타난 바와 같이, ϵ PKC-특이적 억제제 펩티드 ϵ V1-2의 적용 전에 없어졌다. 또한, Ψ eRACK 효과가 ϵ PKC의 촉매적 활성의 증가로 기인한다면, 이 효과는 촉매 활성의 억제제에 의해 사라질 것이다. 보여지는 바와 같이, 비선택적 PKC 억제제 체렐리트린(Che)은 Ψ eRACK-유도된 음성 크로노트로피를 억제하였다. 이들 데이터는 ϵ PKC 활성화가 필요하며 신생아 심장 근육세포에서 음성 크로노트로피를 유도하기에 충분함을 보여준다.

도 1A-1B의 결과는 Ψ eRACK가 심장 근육세포에서 수축율의 억제를 자극한다. 방법론은 ϵ PKC의 전위에 있어서 다른 펩티드 및 펩티도미메틱의 효과를 결정하는 수단을 제공한다. 따라서, 서열 HNAPIGYD (SEQ ID NO:55)를 갖는 펩티드를 설계하였으며, 이것은 서열이 아스파라긴(N), 극성, 비하전된 아미노산에 대하여 아스파르테이트(D), 음으로 하전된 아미노산의 치환을 제외하고 Ψ eRACK(HDAPIGYD, SEQ ID NO:3)과 동일한 바와 같은 N- Ψ eRACK로서 본원에서 언급된다. 심장 근육세포의 수축율에 있어서 N- Ψ eRACK의 효과를 연구하였으며 결과는 도 2A-2C에서 보여준다.

도 2A는 대조군 펩티드(사각형) 또는 N- Ψ eRACK(다이아몬드)로 처리 후 시간의 함수로서 신생아 래트 심장 근육세포의 수축율을 보여준다. 수축율은 상기 논의되며 실시예 1에서의 바닥 수축율과 비교하여 수축율의 감소%로서 표현된다. Ψ eRACK와 반대로, N- Ψ eRACK는 N- Ψ eRACK로 처리된 세포의 수축율이 PMA 처리 전에, 도 2A-2B에서 나타난 데이터의 처음 20분 동안, 대조군 펩티드로 처리된 세포와 거의 동일하였다는 사실에 의해 나타난 바와 같은 심장 근육세포의 수축율에 있어서 길항적 효과를 갖지 않았다. 세포를 펩티드 처리 약 20분 후 PMA로 처리하고, 약 20분 이상의 시간에 도 2A-2B에서 나타난 바와 같이, N- Ψ eRACK는 ϵ PKC의 길항제로서 작용하였다. 즉, N- Ψ eRACK는 PMA에 의해 유도된 수축율의 감소를 유도할 수 있었다. 도 2B에서 나타난 바와 같이, Ψ eRACK는 5 nM PMA에 의해 유도된 수축율의 감소를 유도하였다. 본원에서 나타내지 않은 연구에서, N- Ψ eRACK는 PMA 첨가 40분 후($n=4$; $p<0.05$) $47 \pm 3\%$ 내지 $24 \pm 5\%$ 에 이르는 10 nM PMA에 의해 유도된 수축율의 감소를 유도하였다.

도 2C는 N- Ψ eRACK(다이아몬드)로 처리된 심장 근육세포에 대한 수축율의 감소%를 보여준다. N- Ψ eRACK의 처리 약 15분 후, 세포를 15 분 시간 지점에서 화살표에 의해 나타난 바와 같이, Ψ eRACK로 추가로 처리하였다. 15분 시간 지점(삼각형)에서 Ψ eRACK로 처리된 대조군 세포는 수축율의 즉시 감소를 보였으나; N- Ψ eRACK 및 Ψ eRACK 모두로 처리된 세포는 수축율에서 거의 변화하지 않았다. 30분 시간 지점에서 PMA로의 세포 처리는 N- Ψ eRACK로 처리되지 않은 대조군 세포의 수축율에 있어서 추가적 감소를 이끌었다. 그러나, N- Ψ eRACK로 처리된 세포는 수축율에서 10% 미만 감소를 가졌으며, 이것은 N- Ψ eRACK가 수축율의 감소에 있어서 Ψ eRACK 및 PMA의 조합된 효과를 거의 완전히 제거할 수 있음을 나타낸다. 따라서, N- Ψ eRACK는 심장 근육세포에서 ϵ PKC의 길항제로서 작용한다.

이론으로써 제한되지는 않지만, Ψ eRACK 및 N- Ψ eRACK 모두가 ϵ PKC의 RACK-결합 부위에 결합하는 것이 고려된다. Ψ eRACK는 RACK 결합 부위와 Ψ eRACK 서열 간의 분자내 상호작용과 함께 역으로 방해함으로써 작용하는 반면, N- Ψ eRACK는 RACK 결합 자리 및 ϵ RACK간의 분자내 상호작용과 함께 방해함으로써 작용한다. 또한, 펩티드는 그것의 기질로의 효소의 접근 또는 인산화와 같은 ϵ PKC의 전사후 변형에 영향을 미치며; 인산화는 전통적인 PKC 효소의 활성화 및 전위를 조절한다. 본원에서 설명된 실시예에서, 하전된 아미노산은 하전되지 않은 아미노산으로 치환되어 내인성 고정 단백질에 매우 근접하게 닮은 펩티드에 도달하였다. 어떤 서열에 대한 인접 수용체의 서열은 치환을 확정함에 있어서 안내를 제공한다.

실시예 2

ϵ PKC의 전위에 있어서 N- Ψ eRACK의 효과

래트 신생아 및 어른 심장 근육세포 내 특이적 PKC 동질 효소의 전위를 앞서 설명한 바와 같이, 처리된 세포의 시토졸 및 특정 부분의 웨스턴 블롯 분석(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)에서 PKC 동종효소-특이적 항체를 사용하여 펩티드 처리 후 평가하였다(Johnson, J. A. and Mochly-Rosen, D., Circ. Res. 76: 654-663, (1995)). 요약하면, 펩티드 처리 후

세포를 균질화, 분획화하고, 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 블롯을 항-εPKC(도 3A)으로 우선 검사한 다음, 제거하고 항-αPKC(도 3B)에 대하여 재검사하였다. 전위%(세포 내 PKC의 총량에 걸쳐서 특정 분획에서의 PKC의 양)를 도 3A-3B의 막대 그래프에서 나타낸다.

결과

웨스턴 블롯 분석을 PKC 활성화의 증명인 세포질로부터 특정 세포 아래 분획에 이르는 εPKC의 전위를 평가하는데 사용되었다. N-ΨεRACK 또는 ΨεRACK 펩티드를 하나의 투여량의 PMC(1 nM)의 존재하에 일시적인 삼투압에 의해 세포로 도입시켰다. 실시예 2에서 설명되는 바와 같이, 후속하여 세포를 균질화, 분획화시키고, 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 블롯을 항-εPKC로 우선 검사하였고, 도 3A에 나타낸다. 후속하여 블롯을 제거시키고 도 3B에서 나타낸 바와 같이, 항-αPKC로 재검사하였다. 전위%는 세포 내 PKC의 총량에 걸쳐서 특정 분획 내 PKC의 양으로서 취하여, 도 3A-3B의 막대 그래프에 나타낸다. 웨스턴 블롯은 N-ΨεRACK가 PMA-유도된 전위를 억제하고, 그 결과, PMA 및 ΨεRACK-유도된 εPKC 전위, 및 εPKC 기능의 길항제이다(도 2).

실시예 3

허혈로부터 ΨεRACK-유도된 보호에 있어서 N-ΨεRACK의 효과

심장 근육세포를 앞서 설명한 바와 같이 어린 수컷 래트로부터 분리시켰다(Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96 (22): 12784 (1999)). 배양 완충제 내 근육세포를 15분 동안, 실시예 1에서 설명한 바와 같이 제조한 펩티드 또는 펩티드의 조합으로 처리하였다. 후속하여 근육세포를 질소를 포함하는 가스 제거된 배양 포화 완충액에서 1분 동안 100 rpm에서 펠릿화하고 3시간 동안 37°C에서 배양하여 허혈을 자극하였다. 세포 손상을 트리판 블루 배제법에 의해 3시간 후 평가하고 손상을 갖는 세포%를 앞서 설명한 바와 같이 결정하였다(Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96 (22): 12784 (1999)).

결과

세포에 투여되는 경우 ΨεRACK(SEQ ID NO:1)은 허혈에 대한 보호를 제공한다(Dornet al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96 (22): 12798 (1999)). 이 예에서, 허혈 에피소드에 노출된 세포 상 N-ΨεRACK의 효과를 평가하였다. 추가적으로, A-ΨεRACK로 부르는 서열 HΔAPIGYD(SEQ ID NO:3)을 갖는 펩티드는 ΨεRACK(HΔAPIGYD; SEQ ID NO:3)의 아스파르트레이트(D) 잔기를 변화시키는 효과를 결정하기 위해 제조되는데, 만일 이 잔기가 작용제로서 펩티드의 작용에 중요한 경우, 알라닌(A), 하전되지 않은, 비극성 아미노산으로의 그것의 치환은 비활성인 펩티드를 제공할 것이기 때문이다. 또한, 심장 보호에 있어서 이 펩티드의 효과를 평가하였다. 이 실시예에서 설명한 바와 같이, 심장 근육 세포를 자극된 허혈 전에 ΨεRACK, N-ΨεRACK, A-ΨεRACK, εV1-2 펩티드 및 이들 펩티드의 각종 조합으로 처리하였다. 자극된 허혈 에피소드 이후에, 세포 손상을 트리판 블루 염색 배타법에 의해 평가하였다. 결과를 도 4에 나타낸다.

도 4는 허혈 에피소드의 결과인 래트 심장 근육세포에 대한 세포 손상%를 나타내는 그래프이며, 여기서 허혈을 겪지 않은 근육세포는 각 막대에서 투명한 영역으로 나타내며, 허혈 손상%는 채워진 영역으로 나타낸다. PKC 활성화의 대조군으로서, 근육세포를 체렐리트린(Che) 및 ΨεRACK 펩티드의 조합으로 처리하였다. ΨεRACK 펩티드로의 처리는 60%까지 허혈-유도된 세포 손상을 감소시켰다. 그러나, N-ΨεRACK 및 A-ΨεRACK는 허혈에 대한 반응에 영향을 미치지 않았으며, 이는 아스파라긴 또는 알라닌에 대한 아스파르트레이트의 변화는 ΨεRACK의 작용제 활성화의 손실을 결과로 한다. 더욱이, N-ΨεRACK 및 ΨεRACK의 조합은 허혈 손상으로부터의 보호를 제거하였다. εPKC와 그것의 선택적 억제제 εV1-2 또는 PKC 촉매 활성화의 억제제, Che와의 억제는 ΨεRACK-유도된 보호 효과를 바꿨다. N-ΨεRACK는 ΨεRACK-유도된 보호를 제거한 반면, 비활성 펩티드, A-ΨεRACK는 그렇지 않았으며, 이것은 N-ΨεRACK가 εPKC 억제제임을 나타낸다.

이들 발견은 ΨεRACK의 εRACK 서열로의 유사성을 증가시키는 단일 아미노산 치환은 작용제 활성화의 손실 및 길항제 활성화의 획득을 결과로 하였다. ΨεRACK 펩티드 작용제는 PKC의 분자내 상호작용을 그것의 RACK 또는 지질로 변경시키지 않으면서, PKC에서 분자내 상호작용을 방해한다. 또한, 이 펩티드는 εPKC 상에서 적어도 일부의 RACK-결합 부위를 노출시키고, 후속하여 εRACK에 의해 대체시켜서 완전한 활성화를 획득한다. 반대로, N-ΨεRACK 펩티드는 RACK-결합 부위 및 ΨεRACK 간의 분자내 상호작용 뿐만 아니라, εPKC 및 εRACK 간의 분자내 상호작용을 간섭한다. εPKC 및 εRACK 간 상호작용이 억제되기 때문에, 전위 및 εPKC 기능도 또한 결과적으로 억제된다.

실시예 4

상이한 ΨεRACK εPKC 돌연변이의 프로테아제 분해에 대한 민감성

Ψ eRACK 부위의 D86이 RACK-결합 부위와 분자내 상호작용하여 관여되는 경우, D(86)N 돌연변이는 폐쇄 상태에서 더 존재할 수도 있으며, 그 결과 단백질 가수분해에 대하여 더 저항성일 것이다. 반대로, D(86)A 돌연변이는 개방형 형태를 선호하므로, 그 결과 단백질 가수분해에 더 민감할 것이다. 이 가정을 테스트하기 위해, 곤충 세포에서 발현된 ϵ PKC Wt 및 돌연변이는 ϵ PKC에 대하여 앞서 나타난 바와 같이, 엔도캡티다제, Arg C에 의한 단백질 가수분해를 겪었다 [Orr, J. W. et al., J. Biol. Chem. 267: 15263-15266 (1992)]. Arg C에 의한 분해를 총-길이 ϵ PKC의 감소에 의해 모니터링하였다.

재료

제한 효소는 New England Biolabs로부터 얻었다. 항- ϵ PKC V5 항체는 Santa Cruz biotechnologt로부터 얻었다.

세포 배양

CHO-Hir 세포(덴마크 소에보르그 BioImage A/S에 의해 기꺼이 제공됨)를 글루타맥스(Gibco-Brl), 10% 태아 소 혈청 (미합중국의 검정을 받은 Gibco-Brl) 및 항생제(100 유닛/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신 황산염, Gibco-Brl) 으로 보충된 F-12(HAM) 영양 혼합물 중 배양액에 유지시켰다. MCF7 세포(스탠포드 대학 제임스 포드의 기프트)를 5% FBS 및 항생제로 보충된 RPMI1640(Gibco-Brl)에 유지시켰다. 세포를 37°C 5% CO₂에서 배양시켰다. 곤충 세포를 26°C 에서 성장시키고, Sf9 세포를 10% 태아 소 혈청(Gibco-Brl), 및 항생제로 보충된 SF900II SFM 배지(Gibco-Brl)에서 배양시켰다. Hi5 곤충 세포를 항생제를 함유하는 곤충 Xpress(Bio Whittaker)에서 배양시켰다.

구조체

이들 연구에서 사용된 EGFP- ϵ PKC 구조체는 덴마크 소에보르그 바이오이미지 에이/에스에 의해 기꺼이 제공되었다. 유전자 은행, 승인 번호 X65293로 기탁된 사람 ϵ PKC 서열과 비교하였을 때, 이 구조체는 2개의 아미노산 치환[Q(34)A 및 S(336)G]을 함유하였다. 이 클론의 부위-지정된 돌연변이 유발은 제조 설명서에 따라서 퀵 체인지 부위 지정된 돌연변이 유발 키트(Stratagene)를 사용하여 수행하였다. 부위 지정된 돌연변이 유발을 위해 사용된 프라이머는 프라이머 (5'-GTAGCCTATGGGGGCATTGTGAAAGACAGCCAG-3') (SEQ ID NO:87) 및 역 프라이머 (5'-CTGGCTGTCTTTTACAAATGCCCCCATAGGC TAC-3') (SEQ ID NO:88)에 향하는 D(86)N이었다. D(86)A에 대하여 프라이머 (5'-CTGGCTGTCTTTTACACGTGCCCCCATAGGCTAC) (SEQ ID NO:89) 및 역 프라이머를 향하게 하였다. (5'-GTAGCCTATGGGGGCAGCGTGAAA GACAGCCAG-3') (SEQ ID NO:90). ϵ PKC 돌연변이를 XhoI 및 BamHI(뉴 잉글랜드 바이오랩스) 부위로 절단 및 재-리게이션함으로써 pEYFPC1 및 pECFP C1(클론테크)으로 완전히 서열화 및 하위 클로닝하였다. 바큐로바이러스 발현 시스템 내 발현을 위해, GFP- ϵ PKC를 XhoI 및 BamHI로 절단하여 Klenow(뉴 잉글랜드 바이오랩스)로 채워지고 SmaI(뉴 잉글랜드 바이오랩스)와 함께 소화된 pv: 1392(BD 바이오사이언스)로 클로닝된 삽입물을 방출하였다. 이 연구에서 사용된 PZeoSV로 클로닝된 사람 ϵ RACK 구조체는 덴마크 소에보르그 바이오이미지 에이/에스에 의해 기꺼이 제공되었다. ϵ RACK 삽입물을 Scal(뉴 잉글랜드 바이오랩스) 및 Klenow를 갖는 무딘 말단의 XhoI로 절단함으로써 방출시키고 PacG3X (BD Bioscience)의 SmaI 부위로 재리게이션 시켰다. ϵ RACK를 GST 융합 단백질로서 표현하였다.

일시적인 트랜스펙션:

CHO-Hir, MCF-7 및 Hi5 세포의 트랜스펙션을 제조업자 설명에 따라서 FUGENE 6(Roche)을 사용하여 수행하였다.

곤충 세포 단백질 발현

바큐로바이러스를 Sf9 세포에서 생산하였으며 모든 단백질을 Hi5 세포에서 발현하였다. 모든 구조체의 발현은 72 시간 트랜스펙션 후에 최적이었다. 감염된 Hi5 세포를 균질화 버퍼에서 용해하였다[20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0.25M 수크로스, 12 mM β ME, 및 프로테아제 억제제: 류페틴 (25 μ g/ml), 아프로티닌(25 μ g/ml), PMSF (17 μ g/ml), SBTI(20 μ g/ml), E64(25 μ g/ml)(시그마)]. 가용성 부분을 49000g에서 30-분 회전 후 단리시키고 상청액을 추가적 사용시까지 -20°C에서 50% 글리세롤에 저장하였다.

Arg C 단백질 가수분해 분석

Arg C 소화를 설명한 바와 같이 [Orr, J. W. et al., J. Biol. Chem. 267:15263-15266(1992)] 수행하였다. 약 70 ng의 PKC를 함유하는 미정제 곤충 세포 용해물 [표준화된 웨스턴 블롯 비교에 의해 결정된 PKC(PanVera)]을 실온에서 20 μ l의 엔도프로테아제 ArgC(베링거 인겔하임 25 유닛/ml)를 포함하는 520 μ l의 20 mM Tris pH 7.4에서 소화시켰다. 분취량을 8% SDS-PAGE 겔 상에서 나타낸 시간 지점 실행에서 제거한 후, 항- ϵ PKC 항체를 사용하여 웨스턴 블롯시켰다.

통계적 분석

정량적 분석을 위해 방사선 자동 사진을 NIH 영상 소프트웨어를 사용하여 스캐닝하고 정량화하였다. 형광성 데이터의 분석은 MetaMorph®(Universal Imaging Corporation)를 사용하여 수행하였다. 통계적 의미를 결정하기 위해 a1 꼬리 유형 2 T-테스트(마이크로소프트 엑셀)를 사용하였다. 시간 경로 곡선의 의미는 두가지 ANOVA 테스트(Stat view®)를 사용하여 결정하였다.

결과

이들 실험 조건 D(86)A 돌연변이 하에서 야생형(Wt) 효소와 비교할 때 Arg C에 의한 분해에 대한 효소의 민감성을 변경시키지 않지만, D(86)N 돌연변이는 D(86)A 또는 Wt 보다 단백질 가수분해에 대하여 현저히 더 내성이었다.

실시예 5

ϵ RACK에 대한 ϵ PKC 돌연변이의 결합

RACK는 활성 PKC에 결합한다 [Mochly-Rosen, D. & Gordon, A. S., FASEB J. 12: 35- 42 (1998); Mochly-Rosen, D. et al., Molec. Biol. Cell. (formerly Cell Regulation) 1: 693-706 (1990)]. $\Psi\epsilon$ RACK 및 RACK-결합 부위 사이의 분자 내 상호작용이 비활성의 단핵진 형태를 안정화 한다면, 이 분자 내 상호작용의 친화성을 증가 또는 감소시키는 것은 그것의 RACK에 결합하기 위한 효소의 능력에 있어서의 상응하는 감소 또는 증가를 야기할 것이다. 비활성 폐쇄형 형태를 안정화하기 위해 본원에서 제안된 $\Psi\epsilon$ RACK 및 RACK-결합 부위 간 분자 내 상호작용의 친화성을 증가 또는 감소시키는 것이 그것의 RACK에 결합하는 효소의 능력의 감소 또는 증가를 야기할지의 여부를 테스트하기 위해, 인지질(PL) 활성화제의 존재 및 부재하에서 고정된 GST- ϵ RACK에 대한 곤충 세포-발현된 ϵ PKC(Wt 및 $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이)의 결합을 결정하였다.

ϵ RACK 결합 분석

ϵ PKC 또는 GST- ϵ RACK를 발현시키는 곤충 세포를 실시예 4에서 설명한 바와 같이 용해하였다. GST- ϵ RACK, 10ng을 글루타티온-세파로스 4B 비즈(아머샴-파마시아) 상에서 고정시키고, 세척 버퍼(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 100mM NaCl, 12 mM ME, 및 0.1% 트리톤X-100)로 철저히 세척하였다. 후속하여 고정된 GST- ϵ RACK를 4℃에서 1 시간 동안 인지질 활성화제(PL)(포스파티딜세린 12 μ g/반응 및, Sn-1,2 디올레오일글리세롤 400 ng/반응)의 존재 또는 부재하에서, 100ng Wt, D(86)A, 또는 D(86)N ϵ PKC 단백질을 함유하는 곤충 세포 용해물의 가용성 부분과 함께 배양시켰다. 세척 버퍼와 함께 세척시에, 결합된 단백질을 SDS-PAGE 샘플 버퍼에 용리시키고 단백질을 8% SDS-PAGE 겔 상에서 분리시켰다. ϵ RACK와 상호작용하는 ϵ PKC의 양을 항- ϵ PKC-V5 항체와 함께 ϵ PKC에 대하여 프로브하는 웨스턴 블롯에 의해 결정하였다. 후속하여 블롯을 항-GST(Santa Cruz)와 함께 다시 프로브하여 동일한 양의 GST- ϵ RACK가 각각의 결합 분석에서 존재함을 입증하였다. 이 실시예에 대한 모든 다른 방법은 예를 들어, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

결과

PL 활성화제의 부재하에서 ϵ RACK에 대한 D(86)A ϵ RACK의 결합은 D(86)N 또는 Wt 효소에 대한 결합 보다 적어도 2배 더 많았다(도 5C, D). ϵ RACK에 대한 D(86)N 및 Wt 효소의 결합은 PL의 존재하에서 현저히 증가한 반면, ϵ RACK에 대한 D(86)A 돌연변이의 결합은 증가하지 않았다(도 5C, D). 동일한 농도의 PL의 존재하에서, D(86)A 또는 Wt ϵ PKC 보다 D(86)N ϵ PKC의 ϵ RACK 결합이 덜 존재하였다. 이들 결과는 D(86)A 돌연변이 내 ϵ RACK-결합 부위가 이미 ϵ RACK에 대한 결합에 대하여 이용가능하다는 예측과 일치하는 반면, 이 부위는 Wt 또는 D(86)N ϵ PKC 모두에서 가려지며 단지 활성화시에 결합에 대하여 접근가능하게 된다.

실시예 6

세포 내 ϵ PKC 및 ϵ PKC의 전위율

본원에서 설명된 $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이 및 Wt ϵ PKC의 시험관 내 연구는 $\Psi\epsilon$ RACK가 비활성 폐쇄 상태를 안정화시키는 분자 내 상호작용에 연루되어 있다는 본원에서 제시한 가설을 지지한다. 이 가설을 더 테스트하기 위해, 자극에 대한 반응에서 $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이 및 Wt ϵ PKC의 전위율을 조사하였다. 전위의 과정의 일부는 $\Psi\epsilon$ RACK 부위 및 ϵ RACK 결합 부위 간 분자 내 상호작용의 붕괴를 필요로 한다는 것을 본원에서 가정하였다. 이 분자 내 상호작용의 조절이 ϵ PKC의 전위율에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 조사하기 위해, $\Psi\epsilon$ PKC $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이를 GFP, CFP 또는 YFP 단백질에 대하여 그들의 아미노-말단에 융합시키고 전위를 세포 분류 및 실시간 이미징에 의해 분석하였다.

키나제 분석

기질을 인산화하는 상이한 ϵ PKC 돌연변이의 능력은 [Kikkawa, U. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 135: 636-643(1986)]로부터 변형된 방법에 따라서 미엘린 염기성 단백질로의 [γ^{32} P]ATP의 통합에 의해 분석하였다. 미엘린 염기성 단백질 인산화를 액체 섬광에 의해 또는 방사선 자동 사진에 의해 면역 침전 실험에 대하여 측정하였다. 면역 침전된 효소의 키나제 반응을 위해, 비즈를 20mM Tris pH 7.5, [[γ^{32} P] ATP (에머삼) 0.3 μ Ci/반응, ATP (시그마) 9 μ M/반응물, 미엘린 염기성 단백질(시그마) 12 μ g/반응물 및 $MgCl_2$ 50mM/반응물로 이루어진 20 μ l이 키나제 반응 버퍼에 재현탁시켰다. 4 μ l 인지질을 필요한 때 반응물 마다 첨가하였다. 인지질을 상기 설명한 바와 같이 제조하였다. 키나제 반응물을 SDS 샘플 버퍼 및 비등과 함께 정지시켰다. 샘플을 12% SDS PAGE 상에서 작업수행 한 후 자동 방사능 사진을 위해 노출된 니트로셀룰로스로 옮겼다. 후속하여 동일한 니트로셀룰로스를 항 ϵ PKC(V5) 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 함께 발현시켜서 면역침전된 융합 단백질의 양을 확인하였다.

웨스턴 블롯에 의한 PKC 전위의 분석

트랜스펙션의 24시간 후 세포를 추가적 24시간 동안 혈청 기아시키고 실온에서 나타난 시간 및 농도로 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)(LC Laboratories)로 배양시키고 후속하여 앞서 설명한 바와 같이 분류하였다 [Schechtman, D & Mochly-Rosen, D., Methods Enzymol. 345: 470-489 (2002)]. PKC 분포를 평가하기 위해, 상이한 세포 부분을 SDS PAGE 상에서 수행하고, 웨스턴 블롯 분석을 위해 옮기고 항- ϵ PKC V5 항체로 브로브하였다. 과잉발현된 GFP- ϵ PKC의 용해물을 약 0.2 μ g/웰로 희석시켰다. 이 농도에서 내인성 ϵ PKC가 검출되지 않았다. 이 실험에 대한 모든 다른 방법들은 예를 들어, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

검정 및 분석

CHO 세포를 유리 커버슬립 상에서 성장시키고, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 혈청 기아시켰다. 각 실험에 대하여, 세포를 상업적으로 이용가능한 금속 커버슬립 홀더(Molecular Probes)로 옮겼으며, 여기서 커버슬립은 1 ml 베스의 바닥을 형성하였다. 후속하여 배지를 세포 외 버퍼(120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM $CaCl_2$, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES 및 30mM 글루코스)로 대체하였다. 세포를 세포외 버퍼에서 PMA(100 nM), 또는 ATP(1 nM)로 자극하였다. GFP-태그된 구조체의 형광성 이미지는 레이저 스캐닝 공초점의 현미경(Pascal, Zeiss)의 488nm 여기 선을 사용하여 획득하였으며, 방출은 505-550 nm 밴드 통과 필터를 사용하여 수집하였다. 세포를 1.2 개구수를 갖는 40x Zeiss Plan-apo 오일 담금 대물렌즈를 사용하여 역광 현미경(Axiovert 100M)의 단계에서 영상화하였다. CFP 및 YFP 융합 단백질의 두개의 색 영상화를 위해, 회전 디스크 Nipkow 공초점 현미경을 사용하였다. 세포를 40x 오일 담금 올림푸스 대물렌즈(1.35 NA)를 갖는 역상 올림푸스 IX7 현미경을 사용하여 관찰하였으며 이미지는 CCD 카메라(Hamamatsu) 및 2X2 픽셀 비닝으로 획득하였다. CFP는 헬륨-카드뮴 레이저(Kimmon)의 442nm 레이저 라인으로 자극되는 반면 YFP는 아르곤 이온 레이저(Melles-Griot)의 514 nm 라인으로 영상화하였다. FRAP 실험을 위한 세포질의 국소 부위에서 YFP 표지된 단백질을 선택적으로 광표백하기 위해, 최대 전력(~400 mW)에서 514 nm 라인의 엔터프라이즈 레이저(Coherent)를 사용하였다. 이들 실험을 위해, 60x 오일 담금 대물렌즈를 사용하였다(1.4NA). 이들 조건하에서, 그리고 광선 경로에 조리개를 위치시킴으로써, 약 35 μ m²를 측정하는 시토솔의 영역 내 500ms에서 80%의 YFP 형광성을 표백하는 것이 가능하였다. 실시간 공초점 이미지를 PMA를 이용하는 실험에 대하여 20분간 10-15초 마다, 그리고 ATP로 자극된 세포의 경우에 총 3분의 기간 동안 5초 마다 획득하였다. 시약을 매 시간 연속으로 5번째 이미지 후 세포 챔버에 첨가하였다. 대조군 시간 경과를 일반적인 염색 광표백의 수준이 10-30%를 넘지 않았음을 체크하기 위해 실험에서 사용된 동일한 영상화 조건을 사용하여 획득하였다. 모든 이미지를 실온에서 획득하였다. 이미지는 12 또는 16 비트 파일로서 밖으로 전하였으며 형광성 강도의 변화를 MetaMorph® 데이터 분석 소프트웨어(Universal Imaging Corp.)를 사용하여 측정하였다. PKC의 전위를 모니터

링하기 위해, 관심있는 소영역이 각 세포의 시토솔에서 선택되었으며 형광성 강도 값을 배경 값의 삭감 후 시간에 대하여 그래프화하였고 초기 형광성이 100%이도록 표준화하였다. 3개의 독립적 실험으로부터의 평균 10-15 세포를 사용하였다. 통계적 중요성을 결정하기 위해, 1 꼬리 유형 2 T-테스트(마이크로소프트 엑셀)를 사용하였다.

면역침강

CHO-Hir 세포를 무혈청 배지에서 2번 세척하고 트랜스펙션 후 12-24시간 혈청 기아시켰다. 후속하여 세포를 실험 전 약 12 시간 동안 무혈청 배지에서 유지시켰다. 세포를 균질화 버퍼[20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 0.25M 수크로스, 12mM β -메르캅토에탄올, PMSF (17/ml), 대두 트립신 억제제(SBTI), (20 μ g/ml), 류펩틴 (25 μ g/ml), 아프로타닌 (25 μ g/ml) 및 0.1% 트리톤 X 100 (시그마)]에서 용해시키고 30분 동안 1000 X g에서 원심분리하였다. 후속하여 상청액을 면역침강 실험을 위해 사용하였다. 제조업자의 설명서에 따라서 항-GFP 단일클론 항체 3E6(Molecular Probes)과 함께 면역침강을 수행하였다. 간단히 말해, 용해물(약 2mg/ml)을 최소한 30분간 단백질 G 아가로스 비즈(25 μ l 패킹된 부피 인비트로젠)에서 미리 정화하고 1000 X g에서 회전시켰다. 후속하여 상청액을 최소 2시간 동안 1 μ g 항-GFP 단일클론 항체와 함께 배양하였다. 후속하여 단백질 G 아가로스 비즈(25 μ l 패킹된 부피)를 용해물-항체 복합체에 첨가하고 최소 2시간 동안 배양하였다(모든 배양은 4°C에서 행하였음). 후속하여, 비즈를 버퍼 1(50 mM Tris, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% 트리톤 X100, pH 7.5)로 3번, 버퍼 2(50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.1% 트리톤 X 100, pH 7.5)로 1번 그리고 버퍼 3(50 mM Tris, 0.1% 트리톤 X100, pH 7.5)으로 1번 세척하였다. 키나제 분석을 위해, 비즈를 20mM Tris-HCl, pH 7.5로 추가적 1번 세척하였다.

결과

시험관 내 키나제 분석에서, GFP-융합 단백질은 유사한 촉매 활성을 가짐을 처음으로 확인하였다. 도 6A 및 B에서 나타난 바와 같이, 면역침강된 GFP- ϵ PKC 돌연변이를 활성화 시 유사한 정도로 미엘린 염기성 단백질을 인산화하였다.

또한, Wt 및 $\Psi\epsilon$ RACK ϵ PKC 돌연변이는 포볼 에스테르에 의해 활성화에 민감하며 그들은 활성화시에 가용성 물질로부터 세포의 미립자 부분으로 전위하였다. ϵ PKC 돌연변이의 전위를 2개의 상이한 셀라인, MCF-7 및 CHO를 사용하여 결정하였다. [CHO 세포를 100 nM PMA와 함께 10분 동안 자극하였다(도 6C). MCF-7 세포를 10분 동안 10nM PMA로 자극하였으며(도 6D, 6E), 이는 PMA의 높은 투여량을 갖는 MCF-7 세포의 자극은 세포의 이탈을 유발하였기 때문이다]. PMA로 처리 후, 세포를 가용성 및 미립자 부분으로 분류하고, GFP- ϵ PKC를 검출하고 항- ϵ PKC를 사용하는 웨스턴 블롯에 의해 정량하였다. 오직 GFP- ϵ PKC 융합 단백질(약 110Kda) 및 비 내인성 ϵ PKC(약 80Kda)를 20ng의 단백질이 각 레인마다 부하된 때 검출되었으며 모든 돌연변이는 유사한 수준의 발현을 가졌다(도 6C-6E). PMA 처리시에, D(86)N 또는 Wt ϵ PKC 보다 미립자 부분의 D(86)A ϵ PKC의 더 큰 증가가 있었다(도 6C, D). 이것은 PKC 분해로 인한 것이 아니다; ϵ PKC의 총량은 활성화시에 변하지 않았다. 따라서, GFP- ϵ PKC $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이는 촉매 활성이었으며 가용성 물질로부터 세포의 미립자 부분으로 전위함으로써 PMA에 의한 활성화에 반응하였다. 2개의 상이한 셀라인을 사용하여, PMA로 처리 10분 후에, Wt 또는 D(86)N ϵ PKC에 비하여 그 이상의 D(86)A ϵ PKC가 미립자 부분으로 전위하였음을 발견하였다.

세포 분류 실험은 동적 연구에 적합하지 않으므로, GFP 태그는 CHO 세포 내 실시간 현미경에 의한 상이한 ϵ PKC의 전위를 쫓는데 사용되었다(도 7A-7C). ϵ PKC의 전위는 세포 주위에서 형광성 강도의 증가와 동시에 세포질 내 형광성 강도의 감소로서 나타내었다. 모든 ϵ PKC 돌연변이는 PMA에 의해 자극되는 경우 동일한 장소(세포 주위)로 전위되었다(도 7A). 세포 주위로의 D(86)A 돌연변이의 전위는 1분의 PMA 자극 내에 시작하였으며, 반면 Wt 효소의 전위는 PMA 자극의 단지 2-3분 후 분명해졌다(도 7A, 화살표). 반대로, D(86)N 돌연변이의 전위는 단지 5분의 자극 후 분명해졌다. 세포 주위 및 시토솔 사이의 각각의 ϵ PKC의 분포를 나타내는 전형적인 선 강도 프로파일이 상이한 시간 지점에서 대표적인 세포에 대하여 나타내어진다(도 7B).

총 형광성이 변하지 않았기 때문에, 세포질 내 형광성 감소의 양은 세포 주위에서 형광성 증가의 양에 비례한다 [Raghunath, A. et al. Biochem. J. 370: 901-912 (2003)]. 상이한 ϵ PKC 효소의 전위를 정량적으로 모니터링하기 위해, 형광성 강도의 감소를 MetaMorph® 소프트웨어(Universal Imaging Corp.)를 사용하여 PMA 자극에 있어서 세포질의 영역에서 측정하였다. 세포질 내 형광성의 감소에 의해 획득된 ϵ PKC 전위의 도해적 비교는 전위율이 두개의 돌연변이 및 Wt ϵ PKC($p < 0.001$; 도 7C) 간에 현저히 상이하였음을 나타냈다. D(86)A 돌연변이는 Wt 또는 D(86)N ϵ PKC 돌연변이보다 더 빠른 속도로 전위하였다. Wt 효소는 D(86)A 돌연변이와 같이 유사한 안정된 상태 수준(세포 주위에서 ϵ PKC의 추가적 축적이 존재하지 않는 수준)에 도달하였으나, 그렇게 저속이 아니었다. 반대로, D(86)N 돌연변이는 Wt 또는 D(86)A 돌연변이보다 더 높은 수준에서 안정된 상태에 도달하였다. 따라서, D(86)A 돌연변이는 D(86)N 또는 Wt ϵ PKC에서 보다 고속으로 전위하였으며, 세포 주위에 도달한 D(86)N ϵ PKC 돌연변이의 양은 D(86)A 또는 Wt ϵ PKC의 양보다 더 낮았다.

실시예 7

ϵ PKC 전위의 수학적 모델링은 ϵ PKC 전위가 적어도 두 단계임을 시사한다.

상이한 ϵ PKC $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이의 전위의 초기 과정을 더 특성화하기 위해, 세포질 내 형광성의 감소를 수학적 모델로 적합화하였다.

수학적 모델링

수학적 모델링은 상이한 ϵ PKC $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이의 유사한 수준을 발현시키는 세포의 데이터로부터 획득하였다. 비선형 최단 사각형 곡선 피팅 분석을 EView 소프트웨어(QMS)를 사용하여 수행하였으며 미분 방정식 분석을 Berkeley MadonnaTM을 사용하여 수행하였다. 이 실시예에 대한 모든 다른 방법을 예를 들어, 실시예 4 및 6에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

형광성 시간 곡선을 [Nalefski and Newton Nalefski, E. A. & Newton, A. C., Biochemistry 40 : 13216-13229 (2001)]에 의해 앞서 행한 바와 같이 1차 및 2차 방정식(1 및 2)을 포함하는 비선형 회귀 분석에 의해 분석하였으며, 여기서 $I(t)$ 는 시간 (t)에서 시토솔 내 관찰된 분자의 농도이며, C_{1-5} 는 상수이다.

$$1. I(t) = C_1 + C_2e^{(-C_3(t))}$$

$$2. I(t) = C_1 + C_2e^{(-C_3(t))} + C_4e^{(-C_5(t))}$$

D(86)A ϵ PKC 돌연변이 전위 과정에 대하여 단일 2차 방정식(도 8A) 및 2차 방정식(도 8B)를 사용하여 얻은 나머지 오차 그래프를 도 8A-8D에서 나타낸다. D(86)N 및 Wt ϵ PKC에 대한 나머지 오차 분석은 유사한 결과를 보여줬다(데이터는 나타내지 않음). 보다 유사하고 더 동등하게 분배된 오차를 갖는 탁월한 피팅을 2차 방정식으로 획득하였으므로, 2 단계 모델을 ϵ PKC 전위의 초기 과정을 설명하기 위해 채택하였고, 여기서 제 1 단계는 ϵ PKC의 개방 및 $\Psi\epsilon$ RACK 및 ϵ RACK 결합-부위 간의 분자내 상호작용의 붕괴이며, 제 2 단계는 막에 대한 ϵ PKC 결합이다(이 경우에 막에 대한 결합은 지질 또는 단백질에 대한 결합일 수도 있음). 이 과정은 하기와 같이 설명될 수 있으며:

k_1 k_2

시토솔 내 폐쇄형 ϵ PKC $\rightarrow$ 시토솔 내 개방형 ϵ PKC $\rightarrow$ 막 결합된 ϵ PKC

$\leftarrow \leftarrow$

k_{-1} k_{-2}

상기에서 k_1 은 시토솔 내 ϵ PKC 개방의 비율이며, k_{-1} 은 시토솔 내 폐쇄의 비율이고, k_2 는 막에 대한 ϵ PKC 결합의 비율이며, k_{-2} 는 막으로부터의 이탈율이다. 2차 방정식을 사용하여, 상수 C_1 , C_3 및 C_5 (표 1)에 대한 값을 어림잡았다.

표 1은 2차 방정식을 사용하여 어림잡은 상수 및 k_1 , k_{-1} , k_2 및 k_{-2} 에 대한 계산된 값을 보여준다.

ϵ PKC	D(86)A	Wt	D(86)N
C_1	30.59 ± 0.286	30.46 ± 0.991	38.38 ± 0.254
C_3	0.016 ± 0.001	0.016 ± 0.004	0.010 ± 0.0003
C_5	0.040 ± 0.007	0.009 ± 0.001	0.034 ± 0.004
$k-2/(k2+k-2)=C_1/100$	0.306 ± 0.002	0.305 ± 0.010	
$(k2+k-2)=C_3$	0.016 ± 0.001	0.016 ± 0.004	
$k-2$	0.005 ± 0.0004	0.005 ± 0.0011	0.0052
$k2$	0.011 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.01138
$*k1=C_5$	0.040 ± 0.007	0.009 ± 0.001	0.0135
$k-1$	~ 0	~ 0	0.005

* D(86)N에 관하여, 관계 $k1=c5$ 는 $k1$, $k-1$, $k2$ 및 $k-2$ 에 대한 대응값이 미분 방정식을 사용하는 시뮬레이션에 의해 획득하였으므로 유효하지 않다.

$C1$ 의 값은 안정한 상태에서 시토졸 내 ϵ PKC의 수준에 대응한다. 다음으로, D(86)A 및 Wt ϵ PKC의 $C1$ 및 $C3$ 에 대하여 획득한 값이 통계적으로 등가라는 가정의 여부를 결정하였다. WALD의 파라미터 테스트를 사용하고, F-테스트 및 χ^2 -스퀘어드 테스트를 사용하여, 각각 0.9 및 0.7의 p 값을 획득하였다. 따라서, A 및 D에 대한 안정된 상태 수준, $C1$ 이 동일함을 추측하였다. 또한, $C3$ 가 Wt 및 D(86)A ϵ PKC 모두에 대하여 동등하므로, 제 2 단계(막에 대한 결합)가 ϵ RACK ϵ PKC 돌연변이 간에 상이하지 않음을 추측하였다. 따라서, 만일 안정한 상태 수준($C1$)이 D(86)A 및 Wt ϵ PKC에 대하여 동일하고 또한 제 2 단계(막에 대한 결합)가 동일하다면, D(86)A 및 D(86)N ϵ PKC 모두에 대한 $k-1$ (ϵ PKC의 폐쇄율)이 무시해도 좋을 만하다는 것이 타당하다. $k-1$ 이 무시할 만한 경우, 하기 방정식(3-5)가 차지하며 $k-2$ (방정식 6) 및 $K2$ (표 1)를 계산하는데 사용될 수 있다.

$$3. (C1/100) = k-2/(k2 + k-2)$$

$$4. C3 = (k2 + k-2)$$

$$5. C5 = k1$$

$$6. k-2 = [(C1/100)(C3)]$$

$I_0(t)$ 가 시간 (t)에서 시토졸 내 폐쇄 ϵ PKC의 농도와 동일하고, $I_1(t)$ 가 시간 (t)에서 시토졸 내 개방 ϵ PKC의 농도와 동일하며, $I_2(t)$ 가 시간 (t)에서 막에 있어서 ϵ PKC의 농도와 동일하며 $I(t)$ 가 시간 (t)($I_0(t) + I_1(t)$)에서 시토졸 내 개방 및 폐쇄 ϵ PKC의 농도와 동일한 경우, 하기 미분 방정식(7-8)가 이 모델을 설명하기 위해 사용될 수 있다:

$$7. dI_0(t)/dt = -(K1)(I_0(t)) + (K-1)(I1(t))$$

$$8. dI_1(t)/dt = -(K-1 + K2)I_1(t) + (K1)(I_0(t)) + (K-2)(I_2(t))$$

$$9. dI_2(t) = -(K-2)(I_2(t)) + (K2)(I_1(t))$$

다음으로, 미분 방정식을 Runge-Kutta 알고리즘(Berkeley-Madonna)을 사용하여 $I(t)$ 에 대하여 풀고 용액을 실험적 데이터(세포질 내 형광성의 손실)와 비교하였다. $I(t)$ 를 풀고 계산된 파라미터를 $k1$, $k-1$, $k2$ 및 $k-2$ (표 1)에 대하여 사용하여 세포질 내 폐쇄 ϵ PKC의 초기 양이 100% [$I_0(0)=100$]와 동일함을 추측하였다. 도 8C는 D(86)A ϵ PKC에 대한 처리하지 않은 데이터 및 $I(t)$ 에 대하여 풀 미분 방정식에 의해 얻은 곡선 간의 피팅을 보여준다. 유사한 피팅 결과를 D(86)N 및 Wt ϵ PKC에 관하여 얻었다(데이터는 나타내지 않음). 모든 피팅 데이터에 대한 나머지 오차는 2차 방정식을 사용하여 미선형 회귀로 획득한 것과 유사하였다(도 4B; 데이터는 나타내지 않음).

D(86)N에 대한 안정된 상태 수준은 D(86)A 또는 Wt(표 1)에 대하여 보다 더 높았으며, 따라서, 이 돌연변이에 대한 $k-1$ 은 무시할 만하였음을 추측하는 것이 불가능하다. 이 경우에, 또한, Runge-Kutta 알고리즘을 미분 방정식을 푸는데 사용하였다. 막에 결합하는 제 2 단계는 ϵ PKC 돌연변이에 대하여 변경될 수 없기 때문에, $k2$ 및 $k-2$ 의 값은 D(86)A 및 Wt에 대하여 얻은 값의 범위 내일 것임을 추측하였다. 이와 함께, 본원에서의 실험 데이터 및 수학적 모델링은 활성화 시 세포막에 대한 ϵ PKC의 2 단계 전위 과정을 시사한다. 제 2 단계는 분자내 상호작용에 독립적인 반면, 효소의 개방에 참여하는 것으로 본원에서 미리 언급된 제 1 단계는 이들 분자내 상호작용에 대단히 의존적이었다.

실시예 8

동일한 세포에서 D(86)A Ψ eRACK 돌연변이 및 Wt ϵ PKC의 공동-트랜스펙션

하나의 세포 내에서 ϵ PKC 돌연변이의 행동을 더 조사하기 위해, 2개의 상이한 ϵ PKC 구조체를 CHO 세포로 공동 트랜스펙션시키고, YFP 또는 CFP로 융합시켰다. 이 실시예에 대한 모든 방법은 예를 들어, 실시예 4, 6 및 7에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

결과

유사한 수준에서 YFP-A 및 CFP-D ϵ PKC를 공동 발현시키는 대표적인 세포가 도 9A에 나타나 있다. PMA로 자극시에, D(86)A 돌연변이는 Wt 효소에서 보다 더 빠르게 전위하였다(도 9A). 세포질 내 형광성 강도의 감소를 나타내는 정량적 분석이 도 9C에 나타나 있다. D(86)A 돌연변이가 PMA 자극 1.5 분 후에 세포 주위에서 발견된 반면, Wt ϵ PKC의 전위는 10 분 후에도 여전히 최소였다(도 9A). 따라서, D(86)A Ψ eRACK 돌연변이 및 Wt ϵ PKC가 동일한 세포 내에 존재하는 때에도, D(86)A는 Wt ϵ PKC 보다 더 빨리 전위하였다.

실시예 9

G 단백질 커플링된 수용체에 의한 세포 자극시 Ψ eRACK ϵ PKC 돌연변이의 전위율

다음으로, 또한 상이한 ϵ PKC의 전위율의 차이는 전위가 PMA에 의하기 보다 수용체 신호화를 통해 자극되는 경우 관찰되었는지 여부를 결정하였다. ATP를 푸린작동성 G 단백질-커플링된 수용체를 자극함으로써 CHO 세포 내 PKC를 활성화하는데 미리 사용하였다[Maasch, C. et al., FASEB J. 14: 1653-1663 (2000)]. 이 실시예를 위한 모든 방법은 예를 들어, 실시예 4, 6 및 7에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

결과

본원에서, 세포 주위에 대한 ATP를 포함하는 자극 시 GFP- ϵ PKC의 전위는 PMA-유도된 전위 보다 더 빨랐음을 발견하였다(도 9B 대 도 7A-7C). D(86)A 및 Wt ϵ PKC의 전위는 자극 10 초 후에 이미 분명하였으며, 반면 D(86)N ϵ PKC 효소의 전위는 자극 40초 후에 발생하여 D(86)A 또는 Wt ϵ PKC에서 보다 현저히 더 높은 수준으로 안정된 상태에 도달하였다. 세포질 내 형광성 강도의 감소를 나타내는, 정량적 분석이 도 9D에 나타난다.

실시예 10

ϵ PKC Ψ eRACK 돌연변이의 전파율

상이한 전위율은 세포 내 ϵ PKC의 전체적 운동성(전파)의 차이를 반영할 수도 있다. 따라서, 세포질 효소의 광표백 후 형광성 회복(FRAP)을 측정하고; ϵ PKC의 운동성은 표백된 영역에서 회복하기 위한 형광성을 위해 필요한 시간을 모니터링함으로써 측정하였다. 이 실시예에 대한 모든 방법은 예를 들어, 실시예 4, 6 및 7에서 설명한 바와 같이 수행하였다.

50% FRAP는 모든 ϵ PKC에 대하여 유사한 시간에 도달하였다. (각각의 ϵ PKC에 대한 적어도 10 세포의 평균은 Wt = 9.0 ± 1.2 , D(86)A = 9.2 ± 1.1 및 D(86)N = 9.1 ± 1.6 초였다.) 총 회복(F_{∞}) 후 표백된 영역 내 형광성을 표백 전(F_i) 및 표백 직후(F_0) 관찰된 것과 비교함으로써, 전위성 부분 = $(F_{\infty} - F_0)/(F_i - F_0)$ 을 측정하였다. 전위성 부분이 Wt 및 돌연변이 ϵ PKC와 다른 단백질 및 막과의 상호작용에 있어서의 차이에 의해 영향받을 수도 있기 때문에, 이것은 결정하는 것이 중요하다. 본원에서 전위성 부분은 모든 ϵ PKC에 대하여 동일하였음을 발견하였다(Wt에 대하여 $63 \pm 2\%$, D986)A에 대하여 63 ± 4 및 D(86)N에 대하여 $64 \pm 2.5\%$, 각각에 대하여 적어도 10 세포의 평균). 그러므로, 전위율의 차이는 비활성 효소의 운동성의 차이로 인한 것이 아니라, Ψ eRACK 및 RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용의 조절로 인한 것이었다.

토의

신호 도입의 중요한 성분은 효소가 세포의 자극의 부재하에 비활성인 채로 유지되는 고유의 메카니즘이다. 이 메카니즘은 노출되지 않은 활성 부위와 함께 폐쇄 배치를 안정화하는 분자내 상호작용의 사용을 포함한다. 자극시, 효소는 개방 배치를 채택하며, 이로써 분자내 상호작용은 방해되고 개방 형태를 안정화하는 분자내 상호작용을 위한 결합 부위가 노출되어,

촉매 활성 효소를 결과로 가져온다. PKC의 경우에, 분자내 상호작용 부위는 인지질 및 고정 단백질에 대한 결합 부위이다 [Mochly-Rosen, D & Gordon, A. S. FASEB J. 12: 35-42 (1998); Oancea, E. et al., J. Cell. Biol. 140: 485-498 (1998)]. 여기에서, ϵ RACK 결합 부위 및 $\Psi\epsilon$ RACK 간 분자내 상호작용의 변경이 효소의 전위율에 영향을 미치고, 더 나아가 ϵ PKC 전위 및 신호화에서 이 분자내 상호작용의 역할을 지원할 수 있음을 실증하였다.

초기에 언급한 바와 같이, ϵ PKC 내 $\Psi\epsilon$ RACK 서열은 ϵ RACK 내 서열과 약 25% 상이하다. 전하 변화(N-D)는 ϵ PKC 및 그것의 RACK, ϵ RACK 간 분자내 상호작용과 비교하여 ϵ PKC 내 분자내 상호작용의 강도의 차이에 기여하였음을 본원에서 제안하였다[Souroujon, M. C. & Mochly-Rosen, D. Nat. Biotechnol. 16: 919-924 (1998); Dorn, G. W. 2nd, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 12798-12803 (1999)]. N으로 ϵ PKC의 $\Psi\epsilon$ RACK 서열 내 D(86)을 돌연변이시킴으로써, 야생형 효소 보다 더 낮게 전위하는 효소가 생성되었으며, 아마도 이것은 $\Psi\epsilon$ RACK 및 ϵ PKC 내 RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용의 증가 때문이다. ϵ PKC에서 A로 D(86)을 돌연변이화하는 $\Psi\epsilon$ RACK 및 RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용을 파괴하였으며, 야생형 효소보다 더 빠른 속도로 전위된 효소를 결과로 하였다.

ϵ PKC 내 $\Psi\epsilon$ RACK 부위의 돌연변이는 ϵ PKC의 고유의 특성에 영향을 미친다

3개의 척도는 ϵ PKC 내 분자내 상호작용에 있어서 $\Psi\epsilon$ RACK의 역할 및 이 상호작용에 있어서 D86의 역할을 증명하는데 사용하였다. 첫번째 척도는 프로테아제에 대한 효소의 민감도였으며; 개방 효소는 활성화 후 프로테아제 분해에 더 민감할 것이다(Orr, J. W. et al., J. Biol. Chem. 267: 15263-15266 (1992)). 본원에서, D(86)N 돌연변이는 단백질 가수분해에 더 내성이고; D(86)N 돌연변이는 D(86)A 또는 Wt 효소의 동일한 정도의 분해를 위한 시간을 2배 더 필요로 함을 나타냈다(도 5). 따라서, D(86)N 돌연변이는 더 폐쇄되어 있거나 비활성인 효소이다. A 돌연변이의 단백질 가수분해에 대한 민감성이 야생형 D(86) ϵ PKC와 동일하였기 때문에, 이 방법을 사용하여 야생형 효소와 공간배치적으로 상이한지 여부를 결정할 수 없었다.

두번째 척도는 ϵ RACK에 대한 야생형 및 돌연변이 효소의 PL-의존성 결합을 조사하였다. D(86)이 분자내 상호작용에 중요하다면, D(86)A는 ϵ RACK-결합에 대한 지질 활성화에 덜 의존적일 것이다. 실제로, 하나의 아미노산 치환은 $\Psi\epsilon$ RACK 및 ϵ RACK 결합 부위 간 분자내 상호작용을 조절하였으며; D(86)N 돌연변이는 ϵ RACK 서열에 대하여 보다 큰 유사성을 가졌고, 그것의 ϵ RACK에 대하여 결합하는 능력을 감소시켰으며, 이것은 D(86)N 돌연변이가 보다 폐쇄된 배치 내 존재함을 나타낸다. 반대로, D(86)A ϵ PKC 돌연변이는 RACK 결합에 대한 활성화제에 덜 의존적이었으며, 이것은 그것이 더 개방된 공간배치 내에 존재함을 나타낸다.

$\Psi\epsilon$ RACK 부위 내 돌연변이 및 세포 내 ϵ PKC의 전위율

분자내 상호작용에 있어서 $\Psi\epsilon$ RACK 부위의 중요한 역할을 예증하는 3번째 척도는 세포 내 활성시 효소의 전위율을 조사하였다. D(86)A ϵ PKC 돌연변이는 세포 분류 연구에 의해 측정되는 바와 같이, D(86)N 또는 Wt ϵ PKC 보다 현저히 빠르게 전위하였다. 실시간 공초점 현미경을 사용하여, 본원에서 D(86)A 돌연변이가 야생형 ϵ PKC 보다 더 빠른 속도로 전위하였으며, 이것은 차례로 D(86)N 돌연변이보다 더 빠르게 전위하였음을 예증하였다. 이와 함께, $\Psi\epsilon$ RACK 부위는 자극의 부재하에 ϵ PKC의 폐쇄 배치를 안정화하는 중요한 분자내 상호작용을 매개하는 것으로 보인다.

상이한 ϵ PKC의 전위의 메커니즘에 대한 반응도가 도 10에서 나타나 있다. $\Psi\epsilon$ RACK 부위 및 ϵ RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용의 분해는 막에 대한 결합에 선행하여야 하며 과정 중 속도-제한 단계이다. D(86)을 돌연변이시킴으로써 이 분자내 상호작용을 조절하는 것은 전위 과정의 첫번째 단계에 영향을 미침으로써, ϵ PKC의 전위율을 변경시켰다. 본원에서 데이타의 수학적 모델링은 전위로 이끄는 분자 이벤트를 더욱 명료하게 하였다(도 8). 비선형 회귀 분석을 사용하여, 2차 방정식은 1차 방정식 보다 더 나은 피팅을 제공하며, 이것은 PMA-유도된 전위가 적어도 2 단계를 포함함을 나타낸다(도 7). 본원에서 제 1 단계는 효소의 개방 및 폐쇄 과정을 나타내며 제 2 단계는 세포 막에 대한 개방 효소의 결합을 나타낸다. 중요하게, D(86)N 돌연변이의 안정한 상태 수준은 D(86)A 또는 Wt PKC의 것 보다 더 높았으며, 이는 세포 주위에 도달한 D(86)N의 양이 Wt 또는 D(86)A ϵ PKC의 양보다 더 낮았음을 나타낸다. D(86)A 돌연변이는 D(86)N 또는 Wt ϵ PKC 보다 현저히 더 빠르게 전위하였다. 미립자 부분 내 D(86)A의 안정한 상태 수준은 Wt 효소의 안정한 상태 수준과 유사하였으므로, 전위의 제 2 단계(막에 대한 결합)는 모든 돌연변이에 대하여 동일하였으며, 효소의 폐쇄율은, 일단 그것이 개방되었다면, 무시할만한 것으로 여겨질 수 있다. Ochoa 등[J. Mol. Biol. 311: 837-849 (2001)]은 PL에 대한 V1 도메인의 결합이 D(86)A 돌연변이에 의해 변경되지 않았으며, 이것은 제 2 단계 전위(막에 대한 결합)가 변경되지 않음을 본원에서 제안한 가설을 지지한다[Ochoa et al[J. Mol. Biol. 311: 837-849 (2001)]]. 그러나, N 돌연변이에 대하여, k1(PKC 개방율)은 D(86)A의 것보다 더 낮았으며 Wt ϵ PKC와 유사하였고, k-1(ϵ PKC 폐쇄율)은 PKC 보다 더이상 무시할 만하지 않았다.

Shirai 등[J. Cell. Biol. 143:511-521(1998)]과 유사하게, 본원에서 ϵ PKC의 ATP-유도된 전위는 PMA-유도된 전위 보다 훨씬 더 빨랐음을 발견하였다(도 9B 대 7). ATP-매개된 전위는 빠른 과정이었기 때문에 Wt 및 D(86)A 돌연변이 간 차이점은 분석된 시간 간격에서 관찰되지 않았다. 그러나, D(86)N 돌연변이의 전위는 야생형 또는 A 돌연변이 보다 현저히 더 낮았으며, 이는 ϵ RACK 부위의 중요성 및 PKC 전위를 위한 분자내 상호작용의 붕괴를 더 지지한다.

Schaefer 등은 전통적인 그리고 신규한 PKC 간 전위의 차이점이 막과의 확산율, 및 충돌 효율의 차이점으로 인한 것이다 [Schaefer, M. et al., FASEB J. 15:1634-1636(2001); Lenz, J. C. et al., J. Cell. Biol. 159:291-302(2002)]. 막과의 확산 및 충돌이 전위율에서의 인자인 것 같지만, 또한 본원에서 데이터는 효소 내 공간배치적 변화가 발생하며, 최소 2 단계 과정을 이끈다는 것을 증명한다.

효소의 신규한 PKC(칼슘-의존성)의 경우에, 그것의 효소의 개방을 유발하는 것인지가 여전히 불분명하다. 여기에서, ϵ RACK 및 RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용의 붕괴는 전위 및 세포 주위에 대한 고정에 앞서는 활성화에 있어서 중요한 단계임을 나타냈다. 이러한 고정이 막에 대한 결합에 의해 주로 매개되는지 여부, 그것이 고정 단백질에 관련하는지 여부, 지질에 대한 결합이 단백질에 대한 결합에 앞서는지 여부는 ϵ PKC를 과잉발현하는 세포에서 결정되지 않았다. 그러나, 내인성 ϵ PKC의 전위는 그것의 ϵ RACK와 함께 그것의 공동-국소화를 결과로 하였으며 [Csukai, M. et al., J. Biol. Chem. 272: 29200-29206 (1997)] 그리고 ϵ PKC(ϵ V1-1 펩티드)에서 RACK-결합 부위 중 하나에 대응하는 펩티드와 함께 세포에서 ϵ RACK에 대한 결합의 붕괴는 ϵ PKC 전위 및 ϵ RACK와의 공동국소화를 억제하였음을 이미 예증하였다 [Johnson, J. A., et al., J. Biol. Chem. 271: 24962-24966 (1996); Mochly-Rosen, D. et al., Circ. Res. 86: 1173- 1179 (2000)]. 중요하게도, $\Psi\epsilon$ RACK 서열에 대응하는 펩티드는 ϵ PKC 전위 및 ϵ RACK와의 공동-국소화를 야기하며 ϵ PKC 작용을 유발함을 이미 나타냈다 [Dorn, G. W., 2nd, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 12798-12803 (1999)].

이 연구에서와 같이, 효소가 과잉 발현되는 경우, RACK를 포함하는 결합 단백질이 효소에 대한 화학양론적 양으로 더이상 존재하지 않는 듯하다. 실제로, 과잉-발현된 야생형 ϵ PKC 및 내인성 ϵ RACK는 세포내에서 공동-국소화하지 않았으며, 반면 내인성 ϵ PKC는 비-트랜스펙션된 세포 내 활성화 이후 ϵ RACK와 함께 공동-국소화되었다(도시하지 않음). ϵ RACK와 ϵ PKC를 공동-발현시키기 위한 많은 시도들이 실패하였기 때문에, 본 실시예에서 수행된 전위 실험은 GFP-효소와 세포막 내 지질과의 상호작용을 주로 반영한다.

ϵ PKC에서 이 RACK-결합 부위는 어디인가? ϵ PKC의 V1 도메인은 β PKC의 C2 도메인과 일치한다 [Dekker, L. V., et al. Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 396-402 (1995)]. 그러나, β PKC(30)의 V5 영역 내에 추가적 RACK-결합 부위가 존재하며 β PKC의 C2 영역은 C2 영역 내 Ψ RACK 및 RACK-결합 부위 간의 분자내 상호작용이 불가능함을 보여줬다 [Banci, L. et al., J. Biol. Chem. 277: 12988-12997 (2002)]. 그 대신, 여기에서 β PKC 내 ϵ RACK 및 RACK-결합 부위 간 분자내 상호작용은 β PKC 내 C2 및 V5 영역 사이에서 발생할 수도 있음을 제안한다. 또한, 이것은 ϵ PKC에 관한 경우일 수도 있다. 최근 Stubbs 및 공동 연구자들은 α PKC 내에, 그것의 비활성 상태에서 효소를 유지시키는 C1 및 C2 도메인 간의 추가적 분자내 상호작용이 또한 존재함을 증명하였다 [Slater, S. J., et al., J. Biol. Chem. 277: 15277-15285(2002)]. 또한, 그들은 α PKC가 C1 및 C2 도메인 사이의 분자내 상호작용을 통해 이량체를 형성한다는 것을 제안하였다. 이것은 또한, ϵ RACK 결합 부위 및 $\Psi\epsilon$ RACK에 대한 경우의 가설로서, 받아들여지지 않을 수 있다 [Slater, S. J., et al., J. Biol. Chem. 277: 15277-15285 (2002)].

손상되지 않은 ϵ PKC에서 $\Psi\epsilon$ RACK 부위를 돌연변이시킴으로써, 본원에서 ϵ PKC 전위의 과정에서 $\Psi\epsilon$ RACK 및 ϵ RACK-결합 부위 간의 분자내 상호작용을 방해하는 것의 중요성을 증명하였다. 발명자의 인지에서, 이것은 (Ψ -기질) 부위 또는 촉매 부위, 또는 칼슘 결합 부위의 외부에서 이루어진 하나의 전하 변화가 전위율의 변화를 불러일으킨 첫 시간이다. 이와 함께, 본원에서 $\Psi\epsilon$ RACK 및 RACK-결합 부위 간 상호작용의 붕괴는 결정적이며 PKC 전위에서 속도 제한적 단계임이 결론지어 진다.

앞서 말한 것으로부터, 본 발명의 각종 목적 및 특징이 어떻게 충족되는지 불수 있다. 예를 들어, 아미노산 잔기를 변화시켜서 작용제 내 전하 변화에 영향을 미침으로써 PKC 펩티드 작용제를 PKC 펩티드 길항제로 전환시키는 방법이 설명되며, 이와 같은 본 발명의 한 형태에서, 변형된 작용제 펩티드는 RACK와 보다 근접하게 유사하다. 현재 PKC 동종효소-선택적 길항제 및 작용제를 확인하기 위해 사용되는 접근법은 많은 단백질의 제 1 서열을 함유하는 대규모 데이터베이스의 유용성을 이용한다. 여기에서, 접근법은 $\Psi\epsilon$ RACK를 포함하는 펩티드 작용제를 취하고, 하나의 아미노산 잔기(D 내지 N)를 변화시킴으로써 동종효소 특이적 전위 작용제를 길항제로 전환시키는데 사용하였다. 이 변화는 RACK-유도된 서열에 대한 펩티드 유사성을 증가시켰으며 또한 펩티드 내 전하 변화에 영향을 미쳤다. 변형된 펩티드의 활성화에 있어서의 변화는 $\Psi\epsilon$ RACK에 의해 유도될 수 있는 ϵ PKC-매개된 작용인, 심장근육세포 수축율의 조절은 $\Psi\epsilon$ RACK 내 아스파르트레이트(D)의 잔여 위치에서 아스파라긴(N- $\Psi\epsilon$ RACK) 또는 알라닌(A- $\Psi\epsilon$ RACK)과 함께 펩티드에 의해 유도되지 않았음을 보여줌으로

써 본원에서 설명된 실시예에서 예증된다. 더욱이, N-ΨεRACK는 PMA- 또는 N-ΨεRACK-유도된 εPKC 전위 뿐만 아니라 PMA 또는 ΨεRACK 수축의 조절을 억제하였다. 따라서, 전하의 변화를 야기하는 단일 아미노산 치환은 RACK 서열에 대한 펩티드의 유사성을 증가시켰으며 작용제 활성의 손실 및 길항제 활성을 얻는 것을 결과로 하였다.

본 발명이 특정 구체예에 관하여 설명되었지만, 각종 변화 및 수정이 본 발명을 벗어나지 않고서 이루어질 수 있음이 당업계 숙련자에게 명백할 것이다. 달리 나타내지 않는다면, 본원에서 모든 용어는 그들 용어가 본 발명의 당업자에게 그러한 바와 동일한 의미를 가진다. 실행자는 특히 기술의 정의 및 용어에 대하여 규칙적으로 및 정기적으로 업데이트 되는 [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., John Wiley and Sons, Inc., Media Pa.)에 지시된다.

도면의 간단한 설명

도 1A는 대조군, 담체 펩티드(정사각형)로 처리된 세포의 시간의 함수로서 신생아 래트 심장 근육에서 15초 간격으로 측정된 수축의 수를 나타내며, 여기서 두개의 세포 집단(대조군 및 ΨεRACK 펩티드로 처리됨)은 실시예 1에서 더 충분히 설명되는 바와 같이 30분에 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)로 처리되었다.

도 1B는 실시예 1에서 보다 충분히 설명한 바와 같이, (i) εPKC 작용제 펩티드(ΨεRACK 펩티드), (ii) 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA), (iii) PMA 및 ΨεRACK 펩티드, (iv) PMA, ΨεRACK 펩티드, 및 εV1-2 펩티드, 또는 (v) PMA, ΨεRACK 펩티드, 및 체렐리트린(chelerythrine)(Che)의 처리 후, 바닥 수축율에 대한 농도비의 감소%로서 표현되는, 신생아 래트 심장 근육의 농도 비를 나타내는 막대 그래프이다.

도 2A-2C는 실시예 1에서 보다 충분히 설명된 바와 같이 시간의 함수로서, 바닥 농도비에 대한 수축율의 감소%로서 표현되는, 신생아 래트 심장 근육의 농도 비의 그래프이며; 도 2A-2B는 ΨεRACK 펩티드로부터 유도된 εPKC 길항제 펩티드(N-ΨεRACK 펩티드)(정사각형)로 처리되지 않은 세포 및 N-ΨεRACK(SEQ ID NO:2, 다이아몬드)로 처리된 세포에 대한 데이터를 나타내며, 여기서 두개의 세포 집단은 NΨεRACK 펩티드의 투여 15-20분 후 1 nM(도 2A) 또는 5 nM(도 2B)로 처리되고; 도 2C는 N-ΨεRACK 펩티드(다이아몬드)로 처리 후 ΨεRACK(SEQ ID NO:1) 및 1 nM PMA로 처리된 세포, 그리고 ΨεRACK(삼각형)로 처리 후 1 nM PMA로 처리된 세포에 대한 데이터를 나타낸다.

도 3A-3B는 실시예 2에서 보다 충분히 설명된 바와 같이 대조군, 담체 펩티드로 처리되거나(1번 라인), 1 nM PMA로 처리되거나(2번 라인), PMA 및 ΨεRACK로 처리되거나(SEQ ID NO:1, 3번 라인) 또는 N-ΨεRACK, ΨεRACK, 및 PMA(4번 라인)로 처리된 심장 근육세포의 세포 가용성 부분(S)으로부터 세포 미립(P) 부분에 이르는 εPKC(도 3A) 및 αPKC(도 3B)의 PMA-유도된 전위에 대한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 4는 허혈 에피소드로부터의 결과인 래트 심장 근육에 대한 세포 손상의 %를 나타내는 막대 그래프이고, 여기서 허혈을 겪지 않은 근육세포는 각각의 막대에서 투명한 영역으로 나타내며, 허혈 손상의 %는 채워진 영역으로 나타내며; 세포는 실시예 3에서 더욱 충분히 설명되는 바와 같이 ΨεRACK, N-ΨεRACK, A-ΨεRACK, εV1-2, 및 이들 펩티드의 각종 조합으로 허혈 에피소드 전에 미리 처리되었다.

도 5A는 실시예 4에서 더욱 충분히 설명되는 바와 같이 항-εPKCV5 항체를 사용하여, 프로테아제, Arg C에 의한 ΨεRACK 돌연변이의 분해율을 나타내는 웨스턴 블롯 분석을 묘사한다. Wt, 야생형; D(86)A, εPKC 돌연변이, 여기서 εPKC 상 ΨεRACK의 86 위치에서 D가 A로 치환되며; D(86)N, εPKC 돌연변이, 여기서 εPKC 내 ΨεRACK의 86 위치에서 D가 N으로 치환된다.

도 5B는 시간의 함수로서 Arg C에 의한 ΨεRACK εPKC 돌연변이의 분해율을 나타내는 그래프를 묘사하며, 여기서 데이터는 실시예 4에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 5개의 독립적 실험의 평균을 나타낸다. 데이터는 효소의 초기 농도에 맞추어 표준화되었으며, 총 길이 εPKC의 %로서 표현되었다. Wt(폐쇄형 정사각형); D(86)A(개방형 삼각형), D(86)N(개방형 원); T 테스트를 사용하여 *p<0.05.

도 5C는 실시예 5에서 보다 충분히 설명된 바와 같이 항-εPKC V5 항체를 사용하여 결정되는 바와 같이 PL의 존재 및 부재에 있어서 GST-εRACK로의 ΨεRACK εPKC 돌연변이의 결합을 나타내는 웨스턴 블롯 분석을 묘사한다. PL, 인지질 활성화제(포스파티딜세린 및 Sn-1,2 디옥레오일글리세롤).

도 5D는 실시예 5에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 PL의 부재(무늬없는 막대) 또는 존재(채워진 막대)(T 테스트를 사용하여 $*p < 0.05$)하에서, $\Psi\epsilon$ RACK ϵ PKC 돌연변이의 GST- ϵ RACK로의 결합을 위한 PKC 야생형 및 돌연변이(4개의 독립적 실험의 평균) 내 표준화된 결합을 나타내는 그래프이다.

도 6A는 실시예 6에서 더욱 충분히 설명된 바와 같이, 항- ϵ PKC V5 항체로 검출된 면역침강된 GFP- ϵ PKC 돌연변이(상부 패널) 및 [γ^{32} P] 표지된 미엘린 염기성 단백질의 방사능 사진 촬영에 의해 측정된 그들의 촉매 활성(하단 패널, 대표적 실험)의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 6B는 실시예 6에서 보다 충분히 설명된 바와 같이 ϵ PKC 야생형 또는 돌연변이에서 미엘린 염기성 단백질(MBP) 인산화의 그래프를 나타낸다(PL의 존재하에서 미엘린 염기성 단백질 인산화에 의해 나타난 바와 같은 활성화에 있어서 ϵ PKC 돌연변이의 동일한 활성을 나타내는 3개의 독립적 키나제 반응의 평균)(반응은 3 내지 15분 동안 수행되었음).

도 6C는 실시예 6에서 더욱 충분히 설명된 바와 같이 GFP- ϵ PKC $\Psi\epsilon$ RACK 돌연변이로 트랜스펙션되고 10분 동안 100nM PMA로 처리된 CHO 세포의 전위를 나타내는 웨스턴 블롯을 묘사한다.

도 6D는 실시예 6에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 10분 동안 10nM PMA를 포함하는 자극시 MCF-7 세포 내 GFP- ϵ PKC 돌연변이의 전위를 묘사하는 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다.

도 6E는 실시예 6에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 PMA 자극 후 Wt, 또는 D(86)N 돌연변이 또는 D(86)A 돌연변이에 있어서 GFP- ϵ PKC 전위의 그래프를 나타낸다. MCF-7 대조군(무늬 없는 막대) 및 10분 동안 10 nM PMA로 자극된 세포(채워진 막대)(T 테스트를 사용하여 $*p < 0.05$)의 GFP- ϵ PKC $\Psi\epsilon$ RACK의 전위에 대한 4개의 독립적 실험의 평균이 그림에 나타난다.

도 7A는 실시예 6에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 100 nM PMA를 포함하는 자극시 상이한 시간 지점에서 $\Psi\epsilon$ RACK ϵ PKC의 공초점의 이미지를 묘사한다. 패널 내 화살표는 세포 주위의 전위가 각각의 ϵ PKC 돌연변이에 대하여 분명해지기 시작하는 시간을 나타낸다.

도 7B는 실시예 7에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 상이한 시지점에서(A의 라인으로 나타냄, 왼쪽 패널) 대표적인 트랜스펙션된 세포에 대한 세포 주위 및 시토솔 사이의 PKC의 분배를 나타내는 전형적인 선-강도 프로파일을 묘사한다.

도 7C는 실시예 6에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 100 nM PMA로 자극 후 시간의 함수로서 Wt 세포 또는 D(86)A 또는 D(86)N $\Psi\epsilon$ RACK ϵ PKC 돌연변이의 시토솔 내 형광성의 그래프를 묘사한다: Wt(단혀진 사각형), D(86)A(개방형 삼각형); D(86)N(개방형 원형). 평균 전위율은 100%까지 초기 형광성 강도를 정상화함으로써 표현되었다(각각의 실험에 대하여 분석된 적어도 3개의 세포를 포함하는, 적어도 3개의 독립적인 실험의 평균). 돌연변이 및 Wt 효소에 대한 시간 경로는 $p < 0.001$ 을 갖는 2 가지 방법의 ANOVA에 의해 각각 통계적으로 상이하였다.

도 8A-8D는 D(86)A의 수학적 모델링 분석을 묘사하고 실시예 7에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 PMA 자극 후 시간의 함수로서 형광성의 그래프적 표시로서 분석하였다. 유사한 결과를 D(86)N 및 Wt ϵ PKC와 함께 획득하였다. 도 8A는 1차 방정식을 사용하여 비선형 회귀 분석을 나타내고; 도 8B는 2차 방정식을 사용하여 비선형 회귀 분석을 나타냈으며; 도 8C는 D(86)A에 대한 거친 데이터의 곡선 간의 피팅의 그래프적 표현이다. 곡선을 2차 방정식을 갖는 비선형 회귀에 의해 획득하고; 도 8D는 D(86)A에 대한 거친 데이터의 곡선 간의 피팅의 그래프적 표현이다. 곡선은 표 1에서 제공된 k_1 , k_{-1} 및 k_{-2} 에 대한 값을 사용하는 미분 방정식에 의해 획득하였다. 모든 곡선 피팅된 데이터에 대한 나머지 오차는 2차 방정식을 사용하여 비선형 회귀로 획득된 것과 유사하였다.

도 9A는 실시예 8에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 100 nM PMA로 자극 후 상이한 시간에, YFP- ϵ PKC D(86)A 및 CFP- ϵ PKC Wt 모두와 함께 트랜스펙션된 CHO 세포의 공초점의 이미지를 묘사한다.

도 9B는 실시예 9에서 보다 충분히 묘사한 바와 같이 1 mM ATP로 자극된 후 시간의 함수로서, D(86)A 및 D(86)N 돌연변이로 트랜스펙션된 CHO 세포의 공초점의 이미지를 묘사한다. 야생형과 비교하여, D(86)A 돌연변이는 유사한 전위율을 가지며 RACK D(86)N 돌연변이는 1 mM ATP를 갖는 자극시 낮은 전위율을 가졌다. 화살표는 세포 주위의 전위가 각각의 ϵ PKC 효소에 대하여 분명해지기 시작하는 시간을 나타낸다.

도 9C는 실시예 9에서 보다 충분히 설명한 바와 같이 D(86)A 및 D(86)N으로 형질감염된 세포 내 PMA 자극 후 시간의 함수로서 형광성 강도를 묘사한다. 전위율은 1 mM ATP의 첨가 후 시간에 비례하여 세포질 내 형광성의 손실을 측정함으로써 분석하였다: Wt(폐쇄형 정사각형), D(86)A(개방형 삼각형), D(86)N(개방형 원형). 데이터는 각각의 실험에서의 적어도 3개의 세포에서 적어도 3개의 독립적 실험의 평균이다. D(86)N의 돌연변이에 대한 시간 경로는 $p < 0.01$ 을 갖는 2 가지 방법의 ANOVA 테스트를 사용하여 D(86)A 또는 Wt ϵ PKC와 통계적으로 상이하였다.

도 9D는 실시예 8에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 CHO 세포 트랜스펙션된 CFP- ϵ PKC Wt(폐쇄형 정사각형) 및 YFP- ϵ PKC D(86)A(개방형 삼각형)의 ATP 자극 후 시간의 함수로서 형광성 강도를 묘사한다. 세포질 내 YFP- ϵ PKC D(86)A 돌연변이의 수준은 CFP- ϵ PKC Wt의 수준보다 더 빨리 감소한다.

도 10은 활성화시 막으로의 ϵ PKC 전위의 제 1 단계를 나타내는 그림을 묘사한다: 실시예의 논의 단락에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이, 2-단계 과정. 전위의 과정에서 추가적 단계는 RACK로의 결합을 포함한다(반응도에 나타내지 않음). 간단히, Ψ RACK 및 ϵ RACK-결합 부위 간의 분자 내 상호작용만을 나타낸다.

바람직한 구체예의 설명

본 발명의 원리의 이해를 촉진하기 위한 목적으로, 바람직한 구체예가 참고될 것이며 구체적 언어가 이와 같은 것을 설명하는데 사용될 것이다. 그러나, 본 발명의 이러한 변형 및 추가적 수정, 및 본 발명이 관련하는 당업계 숙련자에게 통상 발생하는 것으로서 고려되는 본원에서 설명된 본 발명의 원리의 추가적 적용으로서 본 발명의 범주를 한정하고자 하지 않음이 이해될 것이다.

본 발명은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 방법을 제공한다. PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하며, 펩티드 또는 펩티도미메틱의 전하 분포가 변하고 및/또는 펩티드 또는 펩티도미메틱은 각각의 RACK 단백질 상의 PKC 결합 부위 내 서열과 더욱 밀접히 닮도록 하는 것은 PKC 효소의 활성을 억제하는데 사용될 수도 있는 길항제를 생산한다는 것을 발견하였다. 하나의 형태에서, 방법은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산을 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 본 발명의 또 다른 형태에서, 치환은 상이한 아미노산을 갖는 펩티드 또는 펩티도미메틱을 합성하거나 이미 존재하는 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 아미노산을 변형시켜서, 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키도록 함으로써 이루어질 수도 있다. 본원에서 펩티도미메틱은 각각의 PKC 효소 상의 분자내 결합 부위로 선택적으로 결합하는 소분자를 포함한다.

또한, 단백질 키나제 C(PKC) 효소의 활성을 억제하는 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 PKC 효소를 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도된 PKC 억제제 펩티드 또는 펩티도미메틱과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산이 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키기에 충분한 다른 아미노산으로 치환된다.

또한, 치료 방법이 제공된다. 하나의 형태에서, 방법은 치료적으로 유효한 양의 ϵ PKC 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 그것을 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함한다. 방법은 ϵ PKC 효소의 활성을 조절함으로써 각종 질환 또는 상태를 치료하는데 사용될 수도 있다.

또한, PKC 길항 작용을 갖는 펩티드 또는 펩티도미메틱이 제공된다. 본 발명의 특정 형태에서, 펩티드 또는 펩티도미메틱은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도되며, 여기서 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키기에 충분한 다른 아미노산으로 치환된다.

본 발명의 한 양태에서, PKC 효소 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 PKC 효소 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키는 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산을 PKC 작용제를 PKC 길항제로 전환하기에 충분한 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 사슬을 구성하는 화합물을 나타낸다. 달리 나타내지 않는다면, 펩티드에 대한 서열은 아미노 말단으로부터 카르복실 말단으로의 순서로 제공된다.

방법은 각종 PKC 효소에 적용가능하다. 상기 설명되는 바와 같이, PKC 효소는 그들의 조절 도메인의 상동을 기초로 한 3개의 과로 분류된다: 전통적인 PKC(cPKC; α , β_1 , β_2 , 및 γ 를 포함), 신규한 PKC(nPKC; ϵ , δ , η , 및 θ 를 포함) 및 비전형적인 PKC(aPKC; ξ , ι , 및 λ 를 포함). 본원에서 이미 언급한 바와 같이, 그들의 생물학적 효과를 발휘하기 위한 PKC 효소를 위해, 그들은 활성화되어야 하며 이들 각각의 RACK 단백질에 결합하여야 한다. 예로서, ϵ PKC 결합 부위는 ϵ RACK 상에 존재한다(이것의 아미노산 서열은 NNVALGYD로서 SEQ ID NO:1에서 제시됨). 또한, PKC 결합 부위는 이들 각각의 PKC 효소와의 결합 상호작용을 위하여 다른 RACK 상에 존재한다. 예를 들어, RACK1 상의 β PKC 결합 부위는 SIKIWD로서 SEQ ID NO:2에서 제시된다. 이 서열은 그들이 단지 마지막 50개의 아미노산에서만 상이하고 α 및 γ PKC에서 동일하므로 β_1 및 β_2 사이에서 동일하다. 본 발명의 한 형태에서, 특정 작용제로부터 특정한 길항제를 설계하는 경우, 이들 결합 부위 서열은 적어도 하나의 아미노산이 펩티드 또는 펩티도미메틱을 각각의 PKC 효소 상 PKC 결합 부위와 더 밀접히 닮도록 만드는 아미노산으로 치환되는 것을 확증하거나 그렇지 않으면 결합 부위에 대한 펩티드 또는 펩티도미메틱의 결합 친화성을 증가시키기 위해 언급될 수 있다. 본 발명의 또 다른 형태에서, 본원에서 설명된 펩티드 작용제 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 하전된 아미노산을 하전되지 않은 아미노산으로 치환하는 것은 PKC 작용제를 PKC 길항제로 전환시키는 것으로 예상된다.

각종 PKC 펩티드 또는 펩티도미메틱 작용제는 변형되거나 그렇지 않으면 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환되고 그 결과 본 발명에서의 사용을 발견할 수도 있다. PKC 작용제는 적어도 약 4 내지 약 30개의 아미노산 또는 적어도 약 5 내지 약 15개의 아미노산 서열을 포함할 수도 있다. PKC 작용제는 약 30개 이상의 아미노산 서열로 구성될 수도 있음이 인지된다. 용어 "PKC 작용제"는, 본원에서 PKC를 활성화하여 활성화 PKC를 형성하거나, PKC를 촉진하거나 허용하여 그것의 생물학적 기능을 수행시키거나, 또는 PKC의 활성을 모방하여 PKC의 하나 이상의 생물학적 기능을 수행하기 위한 유사체를 허용하는 화합물을 의미한다. 예를 들어, 작용제는 활성화 PKC가 세포의 특이적 부위로 전위되도록 허용하여 그것의 생물학적 효과를 발휘할 수도 있다. 당업계 공지된 바와 같이, 효소의 PKC 과는 세린/트레오닌 키나제이며 세포 성장, 유전자 발현의 조절, 및 이온 채널 활성을 포함하는 수많은 세포 과정에 참여한다. 용어 "PKC 길항제" 또는 "PKC 억제제"는, 본원에서 비활성화 PKC 효소를 형성하기 위해 PKC 효소를 억제하거나, 그것의 생물학적 기능을 수행하는 것으로부터 PKC의 방해로 예방 또는 촉진하거나, 유사체가 PKC의 생물학적 기능을 억제하도록 허용하기 위해 PKC 길항제의 활성을 모방하는 화합물을 의미한다. 예를 들어, 길항제는 활성화 PKC가 세포의 특이적 부위로 전위되는 것을 막아서 PKC는 그것의 생물학적 효과를 발휘하는 것이 방해될 수도 있다. 용어 "길항제" 및 "억제제"는 본원에서 상호교환적으로 사용됨을 언급한다.

이러한 길항제는 예를 들어, 예를 들어, α PKC 작용제, β_1 PKC 작용제, β_2 PKC 작용제, 및 γ PKC 작용제와 같은 cPKC 작용제; ϵ PKC 작용제, δ PKC 작용제, η PKC 작용제, 및 θ PKC 작용제를 포함하는 nPKC 작용제; 및 ξ PKC 작용제, ι PKC 작용제 및 λ PKC 작용제를 포함하는 aPKC 작용제를 포함한다. 각각의 PKC 작용제는 각각의 PKC 효소에 존재하는 Ψ RACK 서열로부터 유도될 수도 있다(예를 들어, $\Psi\alpha$ RACK, $\Psi\beta_1$ RACK, $\Psi\epsilon$ RACK, $\Psi\lambda$ RACK 등). 펩티드 또는 펩티드 단편은 만일 그것이 동일한 아미노산 서열을 가지거나 그렇지 않으면, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 및 적어도 약 95% 동일성을 포함하여, 부모 펩티드 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 구체화된 동일성%를 갖는다면 부모 펩티드 또는 폴리펩티드"로부터 유도"된다. 이러한 정의는 부모 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티도미메틱과 비교할 때, 거기에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는 펩티드 또는 펩티도미메틱을 포함한다. 이론으로서 제한되지는 않을지라도, 이들 Ψ RACK 서열은 본원에서 본원의 실시예에서 보다 충분히 설명되는 바와 같이 PKC 효소 내 각각의 RACK 결합 부위와 함께 최소한으로 억제성 분자내 상호작용에 참여하는 것으로 밝혀졌다.

예를 들어, 동일성%는 미국 국립 보건소로부터 이용가능한 버전 2.2.9를 포함하는 발전된 BLAST 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수도 있다. BLAST 프로그램은 [Karlin and Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) and as discussed in Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993); and Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)]의 정렬 방법을 기초로 한다. 요약하면, BLAST 프로그램은 2개의 서열의 단축에 있어서 총 갯수로서 나뉘는 동일한 정렬된 상징(즉, 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 개수로서 동일성을 정의한다. 프로그램은 비교되는 단백질의 전체 길이 이상의 동일성%를 결정하는데 사용될 수도 있다. 디폴트 매개변수는 예를 들어, 프로그램과 함께 블라스트프(blastp)에서 짧은 질의(query) 서열과 함께 연구를 최적화하는데 제공된다. 또한, 프로그램은 [Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17: 149-163 (1993)]의 SEG 프로그램에 의해 결정되는 바와 같이 질의 서열의 마스크-오프 부분으로 SEG 필터의 사용을 허용한다.

각종 이러한 Ψ RACK 서열은 $\Psi\epsilon$ RACK(HDAPIGYD, SEQ ID NO:3); $\Psi\delta$ RACK(MRAAEPEM, SEQ ID NO:4); $\Psi\theta$ RACK(KGKNVDLI, SEQ ID NO:5); $\Psi\eta$ RACK(HETPLGYD, SEQ ID NO:6); 및 $\Psi\beta$ RACK(SVEIWD, SEQ ID NO:7)과 같은 하기 사람 서열을 포함하는 다양한 종으로 당업계 공지되어 있다. RACK 서열은 각각의 PKC 동종효소 및 그것의 RACK 간의 상동 부위를 찾음으로써 확인하였다. ϵ PKC에서, 예를 들어, $\Psi\epsilon$ RACK 서열 HDAPIGYD(SEQ ID NO:3; ϵ PKC 85-92)은 아미노산 NNVALGYD(SEQ ID NO: 1; ϵ RACK 285-292)로 구성되는 ϵ RACK의 서열과 약 75% 동일성을 갖는다. ϵ PKC를 포함하는 Ψ RACK 서열에 대응하는 펩티드는 ϵ PKC-선택적 작용제로서 작용한다.

작용제는 그것의 단편 또는 변형을 포함하여, 상기 설명된 서열의 유도체일 수도 있다. 변형은 본 발명에서 작용제로서 이롭게 이용될 수도 있는 펩티드의 유도체를 얻기 위해 아미노산 서열 내 보존적 아미노산 치환을 포함한다.

보존적 아미노산 치환은 활성에서(예를 들어, ϵ PKC-작용제 활성 또는 $\Psi\epsilon$ RACK-작용제 활성) 또는 선택된 펩티드 또는 폴리펩티드의 3차 구조에서 현저한 변화를 결과로 가져오지 않는 치환이다. 이러한 치환은 전형적으로 선택된 아미노산 잔기를 유사한 구조, 크기 또는 기타 물리화학적 특성을 갖는 상이한 잔기로 대체하는 것에 관련한다. 예를 들어, Asp에 대한 Glu의 치환은 두개 모두 유사한 크기의 음으로 하전된 아미노산이기 때문에 보존적 치환으로 여겨진다. 물리화학적 특성에 의한 아미노산의 그룹화는 당업계 숙련자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 각각의 하기 군들 내 아미노산은 동일한 기들 내 다른 아미노산과 상호작용할 수도 있다: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신을 포함하는 지방족 측쇄를 갖는 아미노산; 세린 및 트레오닌과 같은 비방향족, 히드록실-함유 측쇄를 갖는 아미노산; 아스파르트산 및 글루탐산과 같은 산성 측쇄를 갖는 아미노산; 글루타민 및 아스파라긴을 포함하는 아미드 측쇄를 갖는 아미노산; 리신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함하는 염기성 아미노산; 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판을 포함하는 방향족 고리 측쇄를 갖는 아미노산; 및 시스테인 및 메티오닌을 포함하는 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산.

따라서, ϵ PKC의 $\Psi\epsilon$ RACK 서열로부터 유도된 적당한 ϵ PKC 작용제는 예를 들어, HDAPIGYD (SEQ ID NO:3) 및 하기 서열을 포함하는 그들의 변형 및/또는 단편을 포함한다: SEQ ID NO:8 (HEADIGYD); SEQ ID NO:9 (HDAPIGYE); SEQ ID NO:10(HDAPVGYE); SEQ ID NO:11 (HDAPLGYE); SEQ ID NO:12 (HDAPIGDY); SEQ ID NO:13 (HDAPIGEY); SEQ ID NO:14 (ADAPIGYD); SEQ ID NO:15 (HDGPIGYD); SEQ ID NO:16(HDAAIGYD); SEQ ID NO:17 (AEAPVGEY); SEQ ID NO:18 (HEAPIGDN); SEQ ID NO:19 (HDGDIGYD); SEQ ID NO:20 (HDAPIG) 및 SEQ ID NO:21 (HDAPIPYD).

δ PKC의 $\Psi\delta$ RACK 서열로부터 유도된 적당한 δ PKC 작용제는 예를 들어, SEQ ID NO:4 (MRAAEPEV) 및 하기 서열을 포함하는 그들의 변형 및/또는 단편을 포함한다: SEQ ID NO:22 (MRVAEEPV); SEQ ID NO:23 (MRWEEPV); SEQ ID NO:24(MRAADEPV); SEQ ID NO:25(MRAAEPEP); SEQ ID NO:26 (MRLLEPV); SEQ ID NO:27 (MR η LAEEPV); 및 SEQ ID NO:28(MRAAEE).

η PKC 상 $\Psi\eta$ RACK 서열로부터 유도된 전형적인 η PKC 작용제는 예를 들어, HETPLGYD (SEQ ID NO:6) 및 하기 서열을 포함하는 그들의 변형 및/또는 단편을 포함한다: SEQ ID NO:29 (HDTPLGYD); SEQ ID NO:30 (HDTPLG); SEQ ID NO:31 (HDTPIGYD); SEQ ID NO:32 (HETPAGYD); SEQ ID NO:33 (HETPAGYE); SEQ ID NO:34 (KETPAGYD); SEQ ID NO:35 (KETPVGYD) 및 SEQ ID NO:36 (KETPVG).

θ PKC 상 $\Psi\theta$ RACK로부터 유도된 전형적인 θ PKC 작용제는 예를 들어, KGKNVDLI (SEQ ID NO:5) 및 하기 서열을 포함하는 그들의 변형 및/또는 단편을 포함한다: SEQ ID NO:37 (RGKNVELA); SEQ ID NO:38 (KNVDLI); SEQ ID NO:39 (RGRNVDLI); SEQ ID NO:40 (KGRNADLI); SEQ ID NO:41 (KGKNVELI); SEQ ID NO:42 (KGKNVELA); SEQ ID NO:43 (KGKQVDLI) 및 SEQ ID NO:44 (RGKNLDLI).

β PKC 상 $\Psi\beta$ RACK 서열로부터 유도된 전형적인 β PKC 작용제는 예를 들어, SVEIWD (SEQ ID NO: 7) 및 하기 서열을 포함하는 그것의 변형 및/또는 단편을 포함한다: SEQ ID NO:45 (SAEIWD); SEQ ID NO:46 (SVELWD); SEQ ID NO:47 (TVEIWD); SEQ ID NO:48 (SVEIWE) 및 SEQ ID NO:49 (SVEIW).

다른 적당한 작용제는 SEQ ID NO:3-49를 포함하는 본원에서 설명된 작용제의 아미노산 서열에 대하여 적어도 약 50% 동일성, 또한 적어도 약 60% 동일성, 적어도 약 70% 동일성, 또한 적어도 약 80% 동일성 및 또한 적어도 약 90% 동일성을 갖는 것을 포함하며 각각의 PKC 효소에 대한 작용제로서 작용한다는 것이 이해된다.

또한, 본원에서 설명된 Ψ RACK 서열은 본원에서 나타낸 잔기 이상으로 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수도 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 위치 85-92에서 $\Psi\epsilon$ RACK 서열에 관하여(서열 HDAPIGYD; SEQ ID NO:3에 대응), SEQ ID

NO:93 (TDVCNKRKIELAVFHDAPIGYDDFVANCTI)은 ϵ PKC 중 아미노산 71-100의 잔기의 서열을 보여준다. 위치 74-81에서 Ψ RACK 서열에 관하여(서열 MRAAEEPV ; SEQ ID NO:4에 대응), SEQ ID NO:94 (IQIVLMRAAEEPVSEVTV)는 δ PKC 중 아미노산 69-86의 잔기의 서열을 보여준다. 위치 75-82에서 Ψ RACK 서열에 관하여(서열 KGKNVDLI ; SEQ ID NO:5에 대응), SEQ ID NO:95 (MQIIVKGKNVDLISETTV)는 θ PKC 중 아미노산 70-87의 잔기의 서열을 보여준다. 위치 88-95에서 Ψ RACK 서열에 관하여(서열 HETPLGYD ; SEQ ID NO:6에 대응), SEQ ID NO:96 (ELAVFHETPLGYDHFVAN)은 η PKC 중 아미노산 83-100의 잔기의 서열을 보여준다. 위치 241-246에서 Ψ RACK 서열에 관하여(서열 SVEIWD ; SEQ ID NO:7에 대응), SEQ ID NO:97 (KDRRLSVEIWDWDWDL)은 β PKC 중 아미노산 236-251의 잔기의 서열을 보여준다. SEQ ID NO:93-96으로부터 유도되고 ϵ PKC, δ PKC, θ PKC 및 η PKC 작용제로서 활성을 갖는 서열은 예를 들어, 치환의 위치에서 전하를 감소 또는 증가시키는 것과 같이, 치환의 위치에서 펩티드 내 전하의 변화를 초래하는 치환 아미노산을 선택함으로써 생물학적 활성을 길항제의 생물학적 활성으로 전환시키기 위한 본원에서의 가르침에 따라 변형될 수 있다. 예를 들어, 음으로 또는 양으로 하전된 아미노산은 하전되지 않은 아미노산으로 치환될 수도 있다. 본 발명의 특정 형태에서, 변형된 서열은 각각의 효소에 대한 고유 RACK의 전하 분포와 더욱 밀접하게 유사하다.

PKC 작용제가 PKC 길항제로 전환되기에 충분한 PKC 작용제 펩티드에 존재하는 아미노산은 본 발명의 한 형태에서, 작용제 펩티드를 각각의 RACK 단백질 상 PKC 결합 부위 내 서열과 더욱 밀접히 유사하게 만드는 아미노산이다. 따라서, 치환은 작용제 펩티드 상 특정 위치에서 존재할 것이며 치환 전에 2개의 서열 간의 동일성%와 비교할 경우 PKC 작용제와 각각의 RACK 단백질 상 PKC 결합 부위 내 기준 서열간의 동일성%를 증가시키는 아미노산과 함께 존재할 것이다. 치환된 아미노산을 대체시키는 이러한 아미노산은 펩티드 내 비보존적 아미노산을 제공하는 아미노산을 포함할 수도 있다.

RACK 단백질 상 기준 서열은 펩티드 서열이 본원에서 앞서 설명한 BLAST 프로그램 또는 당업계 공지된 다른 유사한 프로그램을 사용하여 비교된 2개의 서열을 선택적으로 정렬함으로써 유도된 것과 비교된 것이며, 예를 들어, 약 4 내지 약 30 아미노산 또는 약 5 내지 약 15 아미노산의 서열을 나타낼 수도 있다. 또한, 각각이 RACK의 PKC 결합 부위 내 30 아미노산 이상의 기준 서열은 펩티드 길항제의 길이가 약 30 아미노산 이상인 경우를 포함하여, 기준 서열에 구조되는 펩티드 길항제를 비교할 때 이용될 수도 있다. 기준 서열이 본원에서 논의된 각종 동형의 PKC로부터 선택될 수도 있는 이러한 서열의 예는 앞서 본원에서 열거하였다. 치환되는 아미노산은 펩티드 내 임의의 아미노산일 수 있으며, 본원에서 설명된 바와 같이 다른 적절한 아미노산으로 치환되는 경우, PKC 효소의 RACK 단백질 상 PKC 결합 부위 내 서열에 대한 증가된 동일성%를 갖는 펩티드 서열을 야기하며, 결과적으로, PKC 작용제 펩티드의 PKC 길항제 펩티드로의 전환을 야기할 것이다. 이 적절한 아미노산은 펩티드 또는 펩티도미메틱과 PKC 효소의 RACK 단백질 상 PKC 결합 부위 간의 결합 친화성을 증가시키는 아미노산을 포함한다.

본 발명의 다른 형태에서, PKC 작용제를 PKC 길항제로 바꾸기에 충분한 아미노산은 펩티드 또는 펩티도미메틱이 그것의 각 RACK 단백질 상의 PKC 결합 부위로부터 선택된 기준 펩티드 내 전하 분포에 더욱 밀접히 근접하도록 허용하거나 하전된 아미노산을 하전되지 않은 아미노산으로 치환하는 아미노산이다. 치환된 아미노산을 대체하는 아미노산은 펩티드 내 비보존적 아미노산을 제공하는 아미노산일 수도 있다. 예로서, 8 아미노산의 기준 펩티드가 위치 2에서 하전되지 않은 아미노산을 가지며, 작용제가 BLAST 프로그램을 이용하여 선택적으로 정렬되는 때 동일한 위치에서 하전된 아미노산을 갖는 경우, 작용제 내 아미노산은 작용제 펩티드가 기준 펩티드 내 특정 위치에서 전하를 더욱 밀접히 근접하도록 허용하고 PKC 작용제가 길항제로 전환되도록 하기 위해 하전되지 않은 아미노산으로 치환될 수도 있다. 따라서, 하나는 PKC 작용제 내 음으로 하전된(예를 들어, 아스파르트산 또는 글루탐산) 아미노산을 극성의 하전되지 않은 아미노산(예를 들어, 아스파라긴 또는 글루타민)으로 치환할 수도 있으며, 이로써 펩티드 내 치환의 위치에서 전하를 감소시킨다. 일부 경우에, 주어진 서열 내 극성의 하전되지 않은 잔기는 양으로 또는 음으로 하전된 아미노산 잔기와 같은 하전된 잔기로 대체될 수도 있으며, 이로써 펩티드 작용기 내 변화를 초래하는 펩티드 내 치환의 위치에서 전하를 증가시키는 것이 이해될 것이다.

작용제에서 적어도 하나의 아미노산이 치환된다. 본 발명의 특정 형태에서, 2, 3, 또는 4 아미노산 또는 그 이상이 치환될 수도 있다. 또한, 작용제에서 치환될 수도 있는 아미노산의 수, 또는 퍼센트는 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 아미노산의 수에 의존적일 수 있다. 작용제의 길이가 더 길어지고, 및/또는 작용제 펩티드와 각각의 RACK 내 PKC 결합 부위의 서열간 동일성% 또는 전하 분포에서의 차이가 더 클수록, 더 많은 수의 치환이 허용될 것이다. 약 8 개의 아미노산의 작용제 내 적절한 수의 치환은 약 4개 이하를 포함한다. 예로써, 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 아미노산의 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 또한 적어도 약 40%, 또한 적어도 약 50%, 및 적어도 약 60%가 치환될 수도 있다.

본 발명의 방법에 따른 ϵ PKC 작용제 펩티드로부터 유도된 ϵ PKC 길항 활성을 가질 수도 있는 전형적인 펩티드는 SEQ ID NO:50-57에서 나타낸 것들을 포함한다. 이들 길항제는 SEQ ID NO:12 (HDAPIGDY), 20 (HDAPIG), 16(HDAAIGYD), 및 21(HDAPIPYD)로서 확인된 대안적인 Ψ RACK 서열을 기초로 하며, 이것은 미국 특허 제 6,165,977호에서 개시되며 예를 들어, NNVALGYD(SEQ ID NO:1)과 같은 ϵ RACK 상의 ϵ PKC 결합 부위 내 서열과 더욱 유사해 보이도록 및/또는 선

택된 아미노산 잔기에서 전하의 변화를 포함하도록 변형될 수도 있다. 이들 대안적 $\Psi\epsilon$ RACK 서열은 본원에서 개시된 방법에 따라 변형될 수도 있으며, 하나 이상의 아미노산 잔기가 펩티드 내 전하의 변화를 초래하는 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:12 (HDAPIGDY)는 N의 D에 대한 치환에 의해 SEQ ID NO:50 (HNAPIGDY) 및 SEQ ID NO:51 (HDAPIGNY)에 도달하여 변형될 수도 있다. SEQ ID NO:20 (HDAPIG)은 N의 D에 대한 치환에 의해 SEQ ID NO:52(HNAPIG)에 도달하여 변형될 수도 있다. SEQ ID NO:21 (HDAPIPYD)은 N의 D에 대한 치환에 의해 SEQ ID NO:53 (HNAPIPYD) 및 SEQ ID NO:54 (HDAPIPYN)에 도달하여 변형될 수도 있다. 추가적으로, SEQ ID NO:3 (HDAPIGYD)은 첫번째 D의 N에 대한 치환에 의해 SEQ ID NO: 55 (HNAPIGYD)에 도달하여 변형될 수도 있다. SEQ ID NO:16(HDAAIGYD)은 첫번째 또는 두번째 D를 N으로 치환함으로써 각각 SEQ ID NO:56(HNAAIGYD) 및 SEQ ID NO:57(HDAAIGYN)에 도달하여 변형될 수도 있다.

본 발명의 방법에 따른 δ PKC 작용제 펩티드로부터 유도된 δ PKC 길항 활성을 가질 수도 있는 전형적인 펩티드는 SEQ ID NO:58-65에 나타난 것들을 포함한다. 이들 작용제들은 상기 설명된 대안적인 $\Psi\delta$ RACK 서열을 기초로 할 수도 있으며 변형되어 본 발명에 따른 작용제를 형성할 수도 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:4 (MRVAEEPV)는 R을 D 또는 E로 변화시킴으로써 각각 SEQ ID NO:58 (MDVAEEPV) 및 SEQ ID NO:59 (MEVAEEPV)에 도달하여 변형될 수도 있다. 대안적으로, SEQ ID NO:4 (MRVAEEPV) 내 2차 E는 N 또는 Q로 치환되어 SEQ ID NO:60 (MRVAENPV) 및 SEQ ID NO:61 (MRVAEQPV)에 도달할 수도 있다. 예를 들어, 유사한 변형이 SEQ ID NO:27 (MRLAEEPV)로 이루어져 SEQ ID NO:62 (MDLAEEPV) (R에서 D로 변화함); SEQ ID NO:63 (MELAEEPV) (R에서 E로 변화함); SEQ ID NO:64 (MRLAENPV) (2차 E를 N으로 변화시킴); 및 SEQ ID NO:65 (MRLAEQPV) (2차 E를 Q로 변화시킴)에 도달할 수도 있다.

본 발명의 방법에 따른 η PKC 작용제 펩티드로부터 유도된 η PKC 길항 활성을 가질 수도 있는 전형적인 펩티드는 SEQ ID NO:66-69에 나타난 것들을 포함한다. 이들 길항제는 대안적인 $\Psi\eta$ RACK 서열뿐만 아니라 상기 설명된 $\Psi\eta$ RACK 서열을 기초로 할 수도 있으며 변형되어 본 발명에 따른 길항제를 형성할 수도 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:6 (HETPLGYD) 및 SEQ ID NO:34 (KETPAGYD)는 E를 Q 또는 N으로 치환함으로써 SEQ ID NO:66 (HQTPLGYD); SEQ ID NO:67 (KNTPAGYD); SEQ ID NO:68 (KQTPAGYD); 및 SEQ ID NO:69 (KNTPAGYD)에 도달하여 변형될 수도 있다.

본 발명의 방법에 따른 θ PKC 작용제 펩티드로부터 유도된 θ PKC 길항 활성을 가질 수도 있는 전형적인 펩티드는 SEQ ID NO:70-78에 나타난 것들을 포함한다. 이들 길항제는 대안적인 $\Psi\theta$ RACK 서열 뿐만 아니라 상기 설명된 $\Psi\theta$ RACK 서열을 기초로 할 수도 있으며 변형되어 본 발명에 따른 길항제를 형성할 수도 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:5 (KGKNVDLI)는 2차 K를 D 또는 E로 치환시킴으로써 SEQ ID NO:70 (KGDNVDLI) 및 SEQ ID NO:71 (KGENVDLI)에 도달하거나; N을 E로 치환시켜서 SEQ ID NO:72 (KGKEVDLI)에 도달하거나; 또는 D를 N으로 치환시켜서 SEQ ID NO:73 (KGKNVNLI)에 도달하여 변형될 수도 있고; 이와 유사하게, SEQ ID NO:37 (RGKNVELA)은 K를 D 또는 E로 치환시킴으로써 각각 SEQ ID NO:74 (RGDNVELA) 및 SEQ ID NO:75 (RGENVELA)에 도달하여 변형될 수도 있다. 추가적으로, SEQ ID NO:43 (KGKQVDLI)은 D를 N으로 치환하여 SEQ ID NO:76 (KGKQVNLI)에 도달하거나 또는 K를 D 또는 E로 치환하여 각각 SEQ ID NO:77 (KGDQVNLI) 및 SEQ ID NO:78 (KGEQVNLI)에 도달함으로써 변형될 수도 있다.

본 발명의 방법에 따른 β PKC 작용제 펩티드로부터 유도된 β PKC 길항 활성을 가질 수도 있는 전형적인 펩티드는 SEQ ID NO:79-85에 나타난 것들을 포함한다. 이들 길항제는 대안적인 $\Psi\beta$ RACK 서열 뿐만 아니라 상기 설명된 $\Psi\beta$ RACK 서열을 기초로 할 수도 있으며 변형되어 본 발명에 따른 길항제를 형성할 수도 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:7(SVEIWD), SEQ ID NO:45 (SAEIWD); SEQ ID NO:46 (SVELWD); SEQ ID NO:47 (TVEIWE); SEQ ID NO:48 (SVEIWE) 및 SEQ ID NO:49 (SVEIW)는 E를 K로 치환함으로써 SEQ ID NO:80 (SVKIWD); SEQ ID NO:81 (SAKIWD); SEQ ID NO:82 (SVKLWD); SEQ ID NO:83 (TVKIWE); SEQ ID NO:84 (SVKIWE) 및 SEQ ID NO:85 (SVKIW)에 도달하여 모두 변형될 수도 있다.

이것은 본원에서 설명된 각종 작용제에 의해 생산될 수도 있는 길항제의 완전한 목록이 아님은 물론이다. 다른 유사한 PKC 작용제 서열, 또는 본원에서 설명된 각각의 PKC 동종효소에 대한 대안적인 Ψ RACK 서열 및/또는 당업계 공지된 그 밖의 것들은 본원에서 설명된 방법을 사용하여 변형시켜서 PKC 길항제를 생산할 수도 있다. 또한, 방법론이 본원에서 설명된 특이적 치환 이상으로 확장된다는 것을 본원에서의 설명으로부터 이해할 것이다. 펩티드 내 음으로 하전되거나 또는 양으로 하전된 아미노산 잔기를 극성이며, 하전되지 않은 아미노산 잔기로의 치환은 극성이며, 하전되지 않은 아미노산을 양으로 또는 음으로 하전된 아미노산으로의 치환이기 때문에, 펩티드 또는 펩티도미메틱의 활성의 변화를 초래하는 것으로 여겨진다. 또한, 양으로 하전된 아미노산을 음으로 하전된 아미노산으로의 치환, 및 음으로 하전된 아미노산을 양으로 하전된 아미노산으로의 치환이 고려된다. 양으로 하전된 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함한다. 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 선택된 아미노산에 대하여 치환할 수 있는 극성이며, 하전되지 않은 아미노산은 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민을 포함한다. 아미노산은 최소한 생리학적 pH(예를 들어, 약 pH 7)에서 이미 언급된 전하를 갖는 것으로 예상된다. 따라서, 예를 들어, 리신, 아르기닌 및 히스티딘은 아스

파르트산 또는 글루탐산으로 치환될 수 있다. 아스파르트산 및 글루탐산은 예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 리신 또는 아르기닌으로 치환될 수 있다. 세린 및 트레오닌은 예를 들어, 글루탐산, 아스파르트산, 및 글루타민 또는 아스파라긴으로 치환될 수 있다.

본원에서 설명된 PKC 펩티드 작용제 또는 길항제는 당업계 숙련자에게 공지된 방법에 의해 획득될 수도 있다. 예를 들어, 단백질 작용제 및/또는 길항제는 당업계에 공지되고 예를 들어, 문헌[Williams, Paul Lloyd, et al. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL, (1997)]에서 설명된 바와 같은 각종 고체 상 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수도 있다. 추가적으로, 펩티드를 펩티도미메틱으로 전환시키는 방법이 또한 당업계 숙련자에게 주지되어 있다.

대안적으로, 단백질 작용제 또는 길항제는 당업계 공지된 바와 같으며, 예를 들어, 규칙적으로 및 정기적으로 업데이트 되는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Springs Harborlaboratory, 2nd ed., Cold Springs Harbor, New York (1989); Martin, Robin, Protein Synthesis : Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ (1998); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds.), John Wiley & Sons]에서 설명된 바와 같은 재조합 기술 방법에 의해 생산될 수도 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내 원하는 펩티드 작용제 또는 길항제를 생산하기 위해 사용될 수도 있으며 후속하여 생성물을 공지된 방법에 의해 단리시킬 수도 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 뉴클레오티드 서열이 프로모터 서열에 작동적으로 연결된 원하는 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수도 있다.

본원에서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 서열은 그것이 다른 뉴클레오티드 서열과 기능적 관계로 위치되는 경우 다른 뉴클레오티드 서열에 "작동적으로 연결"된다. 예를 들어, 코딩 서열이 프로모터 서열에 작동적으로 연결된다면, 이것은 일반적으로 프로모터가 코딩 서열의 전사를 촉진할 수도 있다. 작동적으로 연결된 연결된 DNA 서열이 전형적으로 인접하며, 여기서 인접하며 판독 프레임 내인 2개의 단백질 코딩 영역에 합류하는 것이 필수적이다. 그러나, 인헨서는 몇 킬로베이스 단위로 프로모터로부터 분리되는 때 작용할 수도 있으며 인트론 서열은 가변성 길이일 수도 있으며, 일부 뉴클레오티드 서열은 작동적으로 연결되지만 인접하지는 않을 수도 있다. 추가적으로, 본원에서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 서열은 천연 또는 합성의 선형 및 순차적 배열의 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오시드를 나타내도록 의도된다. 용어 "암호화" 및 "코딩"은 뉴클레오티드 서열이 전사 및 번역의 메카니즘을 통해, 일련의 아미노산이 특이적 아미노산 서열로 모여서 폴리펩티드를 생산할 수 있는 세포로 정보를 제공하는 과정을 나타낸다.

작용제 또는 길항제는 L-아미노산과 같은 천연 아미노산 또는 D-아미노산과 같은 비천연 아미노산을 포함할 수도 있다. 펩티드 내 아미노산은 펩티드 결합에 의해 또는, 비펩티드 결합에 의해 본원에서 설명된 펩티도미메틱을 포함하는 변형된 펩티드에서 결합될 수도 있다.

아미노산에 연결되는 아마이드 결합에서 각종 변형이 이루어질 수도 있으며 당업계에 공지되어 있다. 이러한 변형은 [Freidinger, R. M. "Design 및 Synthesis of Novel Bioactive Peptides and Peptidomimetics" J. Med. Chem. 46: 5553 (2003), and Ripka, A. S., Rich, D. H. "PeptidomimeticDesign" Curr . Opin. Chem. Biol. 2: 441 (1998)]을 포함하는 일반적 개관에서 논의 된다. 이들 변형은 2가지 중 하나에서 펩티드의 특성을 향상시키도록 설계된다:(a) 형태적 가요성을 제한함으로써 펩티드의 효능을 증가시킴; (b) 비분해성 부분을 펩티드 사슬로 도입시킴으로써 펩티드의 반감기를 증가시킴.

전형적인 전략 (a)는 예를 들어, Zuckerman 등의 펩토이드 전략과 같은 아마이드 결합의 질소 또는 알파-탄소 상 추가적 알킬 기의 배치 및 예를 들어, [Goodman, M. et. al. [Pure Appl. Chem. 68: 1303(1996)]의 알파 변형을 포함한다. 아마이드 질소 및 알파 탄소는 함께 결합하여 추가적 속박을 제공할 수도 있다[Scott et al,Org. Letts. 6: 1629-1632 (2004)].

전략 (b)의 예는 예를 들어, 우레아 잔기[Patil et al, J. Org. Chem. 68: 7274-7280 (2003)] 또는 아자펩티드 결합[Zega and Urleb, Acta Chim. Slov. 49: 649-662 (2002)]에 의한 아마이드 결합의 대체를 포함한다. 사슬로 추가적 탄소 ["beta peptides", Gellman, S. H. Acc. Chem. Res. 31: 173 (1998)] 또는 에텐 유닛[Hagihara et al, J. Am. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)]을 도입시키는 것과 같은 다른 예, 또는 히드록시에틸렌 부분의 사용[Patani, G. A., Lavoie, E. J. Chem. Rev. 96: 3147-3176(1996)]이 주지되어 있다. 하나 이상의 아미노산은 예를 들어, Hirschmann 등의 피롤리논[J. Am. Chem. Soc. 122: 11037 (2000)], 또는 테트라히드로피란 [Kulesza, A. et al., Org. Letts. 5: 1163 (2003)]과 같은 등 전자 부분에 의해 치환될 수도 있다.

본 발명의 또 다른 양태에서, 시험관 내 또는 생체 내에 PKC 길항제를 투여함으로써, ϵ PKC와 같은 PKC 효소의 활성을 조절하는 방법이 제공된다. PKC 길항제는 펩티드, 즉 아미노산 서열, 또는 펩티드의 작용을 자극하기 위해 선택된 펩티도미

메틱 유기 분자일 수 있다. 예로써, 단백질 키나제 C(PKC) 효소의 활성을 억제하는 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 PKC 효소를 PKC 억제제 펩티드 또는 펩티도미메틱과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 펩티드 또는 펩티도미메틱은 PKC 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로부터 유도되며 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱 내 적어도 하나의 아미노산은 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시키기에 충분한 다른 아미노산으로 치환된다. 사용상 적합한 작용제 펩티드가 본원에서 앞서 설명되어 있다. 또한, 작용제 펩티드 또는 펩티도미메틱을 길항제 펩티드 또는 펩티도미메틱으로 전환시킬 여지가 있는 아미노산 치환기가 본원에서 앞서 설명되어 있다.

본 발명의 또 다른 양태에서, PKC 효소에 의해 조절되는 상태를 치료하는 방법이 제공된다. 한 형태에서, 방법은 치료적으로 유효한 양의 펩티드, 또는 펩티도미메틱을 그것을 필요로 하는 환자에 투여하는 것을 포함하며, 이것은 대응 PKC 효소의 길항제 조절제로서 작용한다. 하나의 PKC 길항제, 또는 PKC 길항제의 조합이 투여될 수도 있다. 이러한 길항제는 본원에서 앞서서 설명된 것이다.

각종 질환 또는 상태가 치료될 수도 있으며, 이것은 PKC에 의해 조절된다. 본원에서 치료되는 질환 또는 상태는 전형적으로 각각의 PKC 동종효소의 증가된 활성과 관련되며 그것은 PKC 길항제의 투여로 이득을 얻을 것이다. 한 예로서, 각종 염증성 질환 및 섬유 형성 질환은 ϵ PKC의 증가된 활성과 관련되었다[Aksoy, E., et al., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 183-188 (2004); Fang, Q. et al., *Eur. Respir. J.* 24: 918-924 (2004)].

따라서, ϵ PKC 길항제로 치료받을 수 있는 상태는 예를 들어, 폐 섬유증, 및 피부 경화증을 포함하는 섬유형성 질환; 예를 들어, 염증성 내장 질환, 폐혈 속, 알러지성 비염을 포함하는 염증성 질환; 만성 폐쇄 폐질환, 및 천식을 포함하는 폐질환; 다발성 경화증, 길랭바레(Guillain-Barre) 증후군, 건선, 그레이브스 병(Grave's disease), 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역 질환 및 1형 진성 당뇨병을 포함하는 면역-매개 당뇨병을 포함한다.

본원에서 설명된 억제제는 융합 단백질의 일부로서 변형될 수도 있다. 융합 단백질은 펩티드 억제제의 세포 흡수를 증가시키기 위해 작용하는 단백질 또는 펩티드를 포함할 수도 있고, 치료적 효과와 같은 다른 원하는 생물학적 효과를 가지며, 또는 이들 작용 모두를 가질 수도 있다. 예를 들어, 원하는 생물학적 반응을 이끌어내는 사이토카인 또는 기타 단백질에 ϵ PKC 또는 다른 펩티드 또는 펩티도미메틱 길항제를 결합하거나 그렇지 않으면 부착시키는 것이 바람직할 수도 있다. 융합 단백질은 당업자에게 공지된 방법에 의해 생산될 수도 있다. 억제제 펩티드가 당업계 공지된 각종 방법으로 다른 펩티드에 속박되거나, 그렇지 않으면 결합할 수도 있다. 예를 들어, 억제제 펩티드 또는 펩티도미메틱은 가교 결합을 통해 본원에서 설명된 담체 펩티드 또는 다른 펩티드에 속박될 수도 있으며, 여기서 융합 단백질의 2개의 펩티드가 그들의 활성을 보유한다. 추가적 예로서, 펩티드는 하나의 펩티드의 C-말단으로부터 다른 펩티드의 N-말단에 이르는 아미드 결합에 의해 서로 연결되거나 그렇지 않으면 결합될 수도 있다. 융합 단백질의 억제제 펩티드 및 다른 구성원들 간의 연결은 펩티드 결합과 함께 비절단가능하거나, 또는 예를 들어, 에스테르 또는 당업계 공지된 다른 절단가능 결합과 함께 절단가능할 수도 있다.

더욱이, 본 발명의 다른 형태에서, 펩티드 길항제의 세포 흡수를 증가시킬 수도 있는 담체 단백질 또는 펩티드는 예를 들어, SEQ ID NO:91 (CRQIKIWFQNRRMKWKK)에 나타난 초파리 안테나페디아 호메오도메인(*Drosophila Antennapedia homeodomain*)-유도된 서열일 수도 있으며, [Theodore, L., et al. *J. Neurosci.* 15: 7158-7167 (1995); Johnson, J. A., et al. *Circ. Res.* 79: 1086 (1996)]에서 논의된 바와 같은 N-말단 Cys-Cys 결합을 통하여 가교 결합에 의해 억제제에 부착될 수도 있다. 택일적으로, 억제제는 [Vives, et al., *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017(1997), 미국 특허 제 5,804,604호 및 Genbank Accession No. AAT48070]에서 설명된 바와 같이 사람 면역결핍 바이러스, 타입 1으로부터 교류작용 조절 단백질(Tat)-유도된 수송 폴리펩티드(예를 들어, SEQ ID NO:92; YGRKKRRQRRR에서 나타난 아미노산 47-57과 같은 것)에 의해 변형되거나; 또는 [Mitchell, et al. *J. Peptide Res.* 56: 318-325 (2000) and Rolhbard, et al., *Nature Med.* 6: 1253-1257 (2000)]에서 설명된 바와 같이 폴리아르기닌과 함께 변형될 수도 있다. 억제제는 억제제의 세포 흡수를 증가시키기 위해 당업계 숙련자에게 공지된 다른 방법에 의해 변형될 수도 있다.

억제제는 각종 형태로 유리하게 투여될 수도 있다. 예를 들어, 억제제는 용액 또는 에멀전으로, 설하 투여를 위한 정제 형태로 투여될 수도 있다. 또한, 억제제는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클과 혼합될 수도 있다. 담체는 예를 들어, 물, 식염수 또는 기타 수성 용액을 포함하여 비경구 투여를 위한 적당한 액체일 수도 있으며, 또는 오일일 수도 있다. 담체는 정맥 내 또는 동맥 내 투여를 위해 선택될 수도 있으며, 당업계 공지된 보존제, 세균 발육 저지제, 완충제 및 항산화제를 포함할 수도 있는 멸균 수성 또는 비수성 용액을 포함할 수도 있다. 정제 형태에서, 고체 담체는 예를 들어, 락토스, 녹말, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트린, 인산칼슘, 탄산칼슘, 합성 또는 천연 칼슘 배분, 산화 마그네슘, 건조 수산화알루미늄, 스테아르산 마그네슘, 중탄산나트륨, 건조 효모 또는 그들의 조합을 포함할 수도 있다. 정제는 바람직하게는 경구 용해를 보조하는 하나 이상의 제제를 포함한다. 또한, 억제제는 당업계 공지된 다른 유사한 약물이 투여되는 형태로 투여될 수도 있다.

억제제는 각종 루트로 환자에게 투여될 수도 있다. 예를 들어, 억제제는 복막내, 정맥내, 동맥내, 피하, 또는 근육내를 포함하여, 비경구적으로 투여될 수도 있다. 또한, 억제제는 직장, 및 질내를 포함하는 점막 표면을 통하여; 흡입에 의한 것을 포함하는 비강내로; 설하로; 안내 및 경피로 투여될 수도 있다.

치료적으로 유효한 양의 ϵ PKC 또는 다른 억제제 펩티드가 제공된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 억제제의 치료적으로 유효한 양은 특정 질환 또는 상태와 관련한 증상을 감소 또는 제거시키기 위해 필요한 억제제의 양이다. 이러한 임상적 종점은 각종 질환 또는 상태에 대하여 당업계에 주지되어 있다. 이 양은 각각의 PKC 효소의 활성을 감소시키는 것과 같이, 조절에 효과적인 양을 포함한다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 양은 키나제 활성, PKC 효소 전위 활성을 포함하여, PKC 효소의 세포내 활성에 영향을 미치고 및/또는 그렇지 않으면 그것의 생물학적 작용을 수행하는 것으로부터 PKC를 방해하는데 유효한 양을 포함한다. 이 양은 당업계에 공지된 바와 같이 투여의 루트, 치료의 기간, 사용되는 특이적 억제제, 특정 질환 또는 상태 및 환자의 건강에 따라 변화할 것이다. 숙련자는 최적 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 일반적으로, 전형적으로 이용되는 억제제의 양은 예를 들어, 약 0.005 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중일 수도 있지만, 바람직하게는 약 0.01 mg/kg 내지 약 5 mg/kg이다.

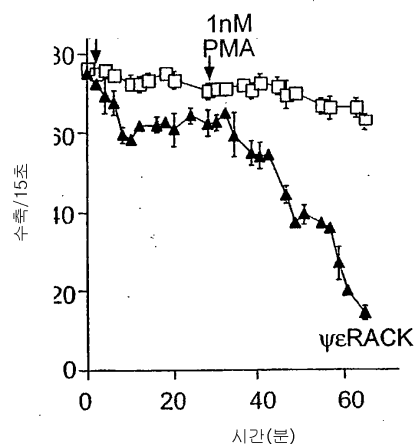
치료되는 환자는 전형적으로 PKC 길항제로 치료받을 수 있는 특정 질환 또는 상태에 의해 영향받는 이러한 치료가 필요한 환자이다. 환자는 더 전형적으로 척추동물, 바람직하게는 포유동물이며, 사람이 포함된다. 치료될 수도 있는 다른 동물들은 말, 양, 소, 및 돼지와 같은 농경용 가축이다. 치료될 수도 있는 다른 전형적인 동물들은 고양이, 개; 마우스, 래트, 저빌, 햄스터, 및 돼지쥐와 같은 설치목의 것들을 포함하는 설치류; 래빗 및 헤어(hare)를 포함하는 토끼목의 구성원들, 및 이러한 치료로부터 이들을 얻을 수도 있는 어떤 기타의 포유류를 포함한다. 환자는 바람직하게는 생체 내에서 치료된다.

따라서, 본원에서 설명된 ϵ PKC 길항제를 포함하는 PKC 펩티드 길항제는 전위 또는 ϵ PKC의 다른 활성에 참여하는 상태의 치료를 위한 치료제로서 사용을 발견한다. PKC 길항제의 투여는 예를 들어, 전위 및 후속하는 신호화 이벤트의 연속단계를 억제할 것이다. 또한, 길항제는 허혈 및 기타 상태에서 PKC 동질 효소의 효과에 관한 연구에서 사용을 발견하며, 또한 길항 작용을 갖는 치료제를 설계하는데 도움이 되는 스크리닝으로서 사용될 수 있거나 그것은 펩티드의 유사체로서 작용한다.

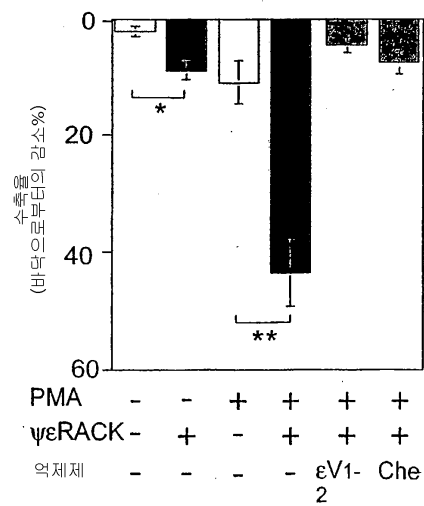
이제 상기 설명된 본 발명을 예증하는 구체적 실시예가 참고될 것이다. 실시예가 바람직한 구체예를 예증하기 위해 제공되며 본 발명의 범위를 이로써 제한하고자 의도하지 않음은 물론이다. 추가적으로, 본원에서 인용된 모든 문헌들은 당업계 기술의 수준을 나타내며 이로써 전체가 참고로써 인용된다.

도면

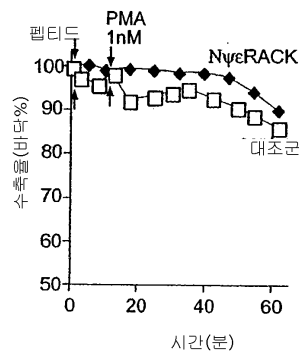
도면1A



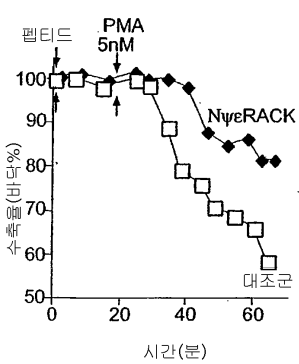
도면1B



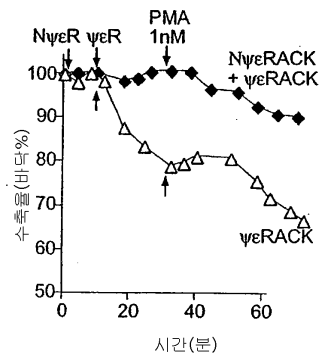
도면2A



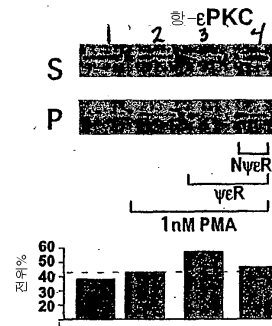
도면2B



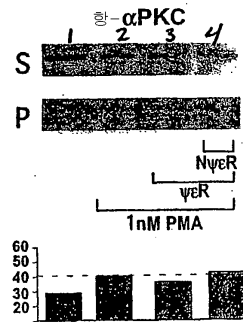
도면2C



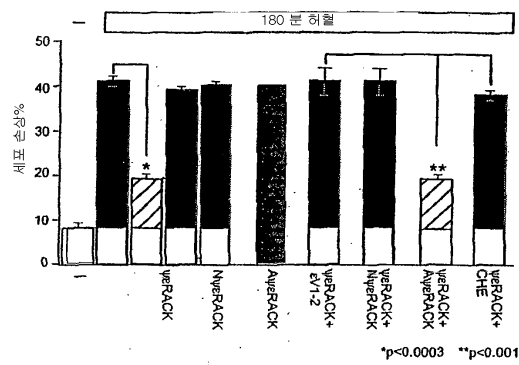
도면3A



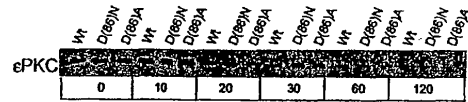
도면3B



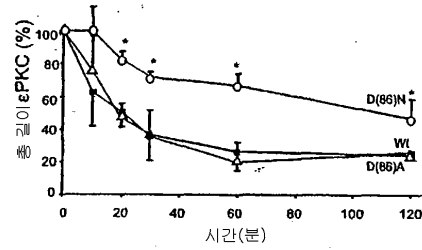
도면4



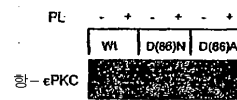
도면5A



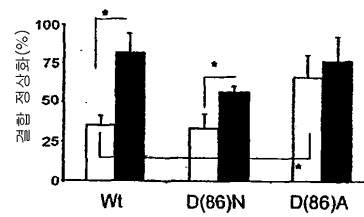
도면5B



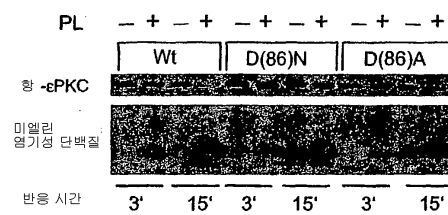
도면5C



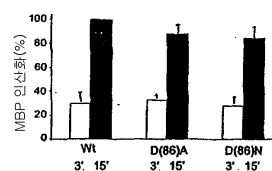
도면D



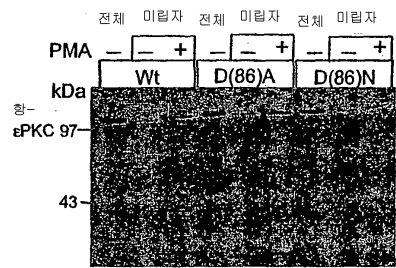
도면6A



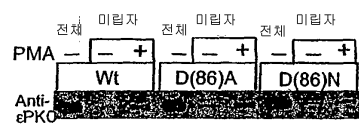
도면6B



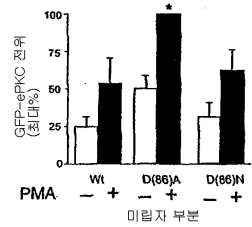
도면6C



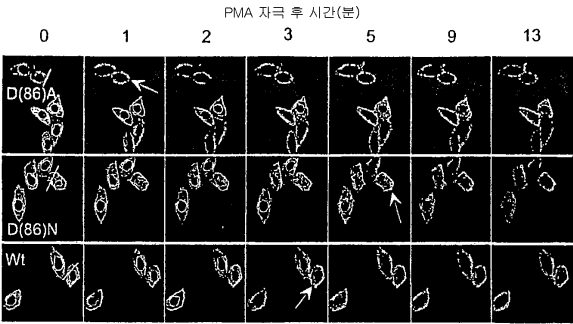
도면6D



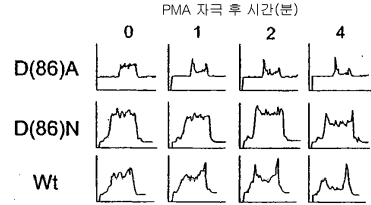
도면6E



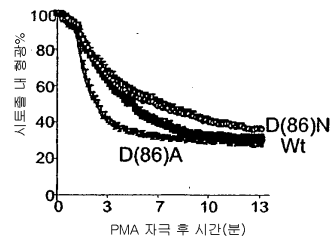
도면7A



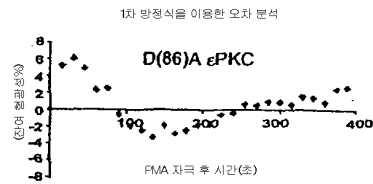
도면7B



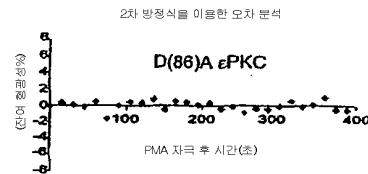
도면7C



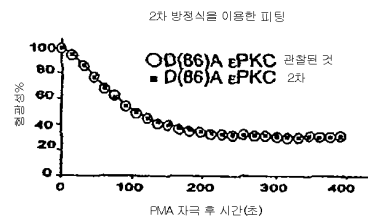
도면8A



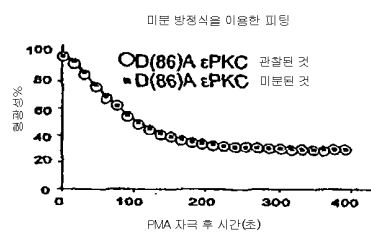
도면8B



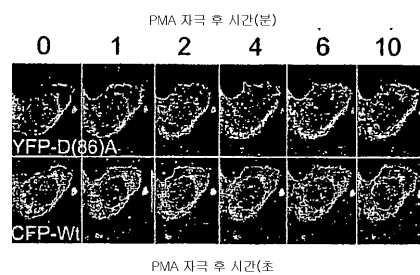
도면8C



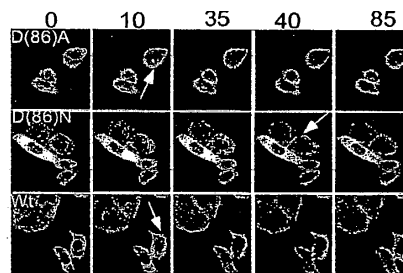
도면8D



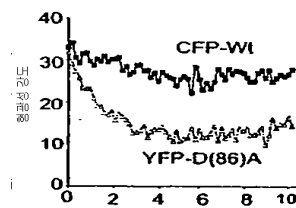
도면9A



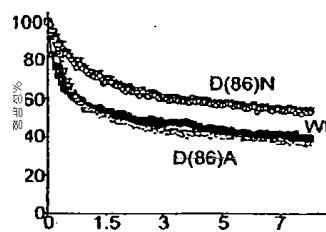
도면9B



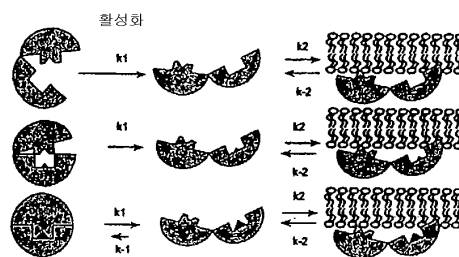
도면9C



도면9D



도면10



서열목록

- <110> The Board of Trustees of ths Leland Stanford junior University
- <120> Isozyme-Specific Antagonists of Protein kinase C
- <150> 60/529,223
- <151> 2003-12-11
- <160> 97
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Asn Asn Val Ala Leu Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ser Ile Lys Ile Trp Asp
 1 5

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 His Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro Met
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Lys Gly Lys Asn Val Asp Leu Ile
 1 5

<210> 6

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 His Glu Thr Pro Leu Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ser Val Glu Ile Trp Asp
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 8
 His Glu Ala Asp Ile Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternatiive pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 9
 His Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Glu
 1 5

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative Pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 10
His Asp Ala Pro Val Gly Tyr Glu
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative Pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 11
His Asp Ala Pro Leu Gly Tyr Glu
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 12
His Asp Ala Pro Ile Gly Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 13
His Asp Ala Pro Ile Gly Glu Tyr
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 14

Ala Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 15

His Asp Gly Pro Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 16

His Asp Ala Ala Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 17

Ala Glu Ala Pro Val Gly Glu Tyr

1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 18
 His Glu Ala Pro Ile Gly Asp Asn
 1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 19
 His Asp Gly Asp Ile Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 20
 His Asp Ala Pro Ile Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 21
His Asp Ala Pro Ile Pro Tyr Asp
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 22
Met Arg Val Ala Glu Glu Pro Val
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 23
Met Arg Val Val Glu Glu Pro Val
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 24
Met Arg Ala Ala Asp Glu Pro Val
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 25

Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 26

Met Arg Leu Leu Glu Glu Pro Val

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 27

Met Arg Leu Ala Glu Glu Pro Val

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-delta RACK peptide

<400> 28

Met Arg Ala Ala Glu Glu

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 29

His Asp Thr Pro Leu Gly Tyr Asp

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 30

His Asp Thr Pro Leu Gly

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 31

His Asp Thr Pro Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 32

His Glu Thr Pro Ala Gly Tyr Asp

1 5

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 33
 His Glu Thr Pro Ala Gly Tyr Glu
 1 5

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 34
 Lys Glu Thr Pro Ala Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 35
 Lys Glu Thr Pro Val Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-eta RACK peptide

<400> 36

Lys Glu Thr Pro Val Gly

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 37

Arg Gly Lys Asn Val Glu Leu Ala

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 38

Lys Asn Val Asp Leu Ile

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 39

Arg Gly Arg Asn Val Asp Leu Ile

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 40
Lys Gly Arg Asn Ala Asp Leu Ile
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 41
Lys Gly Lys Asn Val Glu Leu Ile
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 42
Lys Gly Lys Asn Val Glu Leu Ala
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 43
Lys Glu Lys Gln Val Asp Leu Ile
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-theta RACK peptide

<400> 44

Arg Glu Lys Asn Leu Asp Leu Ile

1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-beta RACK peptide

<400> 45

Ser Ala Glu Ile Trp Asp

1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-beta RACK peptide

<400> 46

Ser Val Glu Leu Trp Asp

1 5

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative pseudo-beta RACK peptide

<400> 47

Thr Val Glu Ile Trp Asp

1 5

<210> 48
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-beta RACK peptide

<400> 48
 Ser Val Glu Ile Trp Glu
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-beta RACK peptide

<400> 49
 Ser Val Glu Ile Trp
 1 5

<210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 50
 His Asn Ala Pro Ile Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 51
His Asp Ala Pro Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 52
His Asn Ala Pro Ile Gly
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 53
His Asn Ala Pro Ile Pro Tyr Asp
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 54
His Asp Ala Pro Ile Pro Tyr Asn
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 55

His Asn Ala Pro Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 56

His Asn Ala Ala Ile Gly Tyr Asp

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:3

<400> 57

His Asp Ala Ala Ile Gly Tyr Asn

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 58

Met Asp Val Ala Glu Glu Pro Val

1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 59

Met Glu Val Ala Glu Glu Pro Val

1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 60

Met Arg Val Ala Glu Asn Pro Val

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 61

Met Arg Val Ala Glu Gln Pro Val

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 62

Met Asp Leu Ala Glu Glu Pro Val

1 5

<210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 63
 Met Glu Leu Ala Glu Glu Pro Val
 1 5

<210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 64
 Met Arg Leu Ala Glu Asn Pro Val
 1 5

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:4

<400> 65
 Met Arg Leu Ala Glu Gln Pro Val
 1 5

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:6

<400> 66
His Gln Thr Pro Leu Gly Tyr Asp
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> a modification of SEQ ID NO:6

<400> 67
His Asn Thr Pro Leu Gly Tyr Asp
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:6

<400> 68
Lys Gln Thr Pro Ala Gly Tyr Asp
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:6

<400> 69
Lys Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Asp
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 70
Lys Gly Asp Asn Val Asp Leu Ile
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 71
Lys Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 72
Lys Gly Lys Glu Val Asp Leu Ile
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 73
Lys Gly Lys Asn Val Asn Leu Ile
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 74

Arg Gly Asp Asn Val Glu Leu Ala

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 75

Arg Gly Glu Asn Val Glu Leu Ala

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 76

Lys Gly Lys Gln Val Asn Leu Ile

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 77

Lys Gly Asp Gln Val Asn Leu Ile

1 5

<210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:5

<400> 78
 Lys Gly Glu Gln Val Asn Leu Ile
 1 5

<210> 79
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Alternative pseudo-epsilon RACK peptide

<400> 79
 His Ala Ala Pro Ile Gly Tyr Asp
 1 5

<210> 80
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 80
 Ser Val Lys Ile Trp Asp
 1 5

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 81
Ser Ala Lys Ile Trp Asp
1 5

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 82
Ser Val Lys Leu Trp Asp
1 5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 83
Thr Val Lys Ile Trp Glu
1 5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 84
Ser Val Lys Ile Trp Glu
1 5

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> A modification of SEQ ID NO:7

<400> 85

Ser Val Lys Ile Trp
1 5

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Glu Ala Val Ser Leu Lys Pro Thr
1 5

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer used for site-directed mutagenesis to form D(86)N mutant
in Example 4

<400> 87

gtagcctatg ggggcattgt gaaagacagc cag

33

<210> 88

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Complementary strand of SEQ ID NO:87

<400> 88

Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Ala
1 5 10 15

Ala Thr Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Ala Gly Gly Cys Thr Ala
20 25 30

Cys

<210> 89

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer used for site-directed mutagenesis to form D(86)A mutant
 in Example 4

<400> 89
 ctggctgtct ttcacgctgc ccccataggc tac 33

<210> 90
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Complementary strand of SEQ ID NO:89

<400> 90
 gtagcctatg ggggcagcgt gaaagacagc cag 33

<210> 91
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Drosophila Antennapedia homeodomain-derived carrier peptide

<400> 91
 Cys Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys
 1 5 10 15

Lys

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HIV type 1 Tat-derived carrier peptide

<400> 92

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Thr Asp Val Cys Asn Gly Arg Lys Ile Glu Leu Ala Val Phe His Asp
1 5 10 15

Ala Pro Ile Gly Tyr Asp Asp Phe Val Ala Asn Cys Thr Ile
20 25 30

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Gln Ile Val Leu Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro Val Ser Glu Val
1 5 10 15

Thr Val

<210> 95

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Gln Ile Ile Val Lys Gly Lys Asn Val Asp Leu Ile Ser Glu Thr
1 5 10 15

Thr Val

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Glu Leu Ala Val Phe His Glu Thr Pro Leu Gly Tyr Asp His Phe Val
1 5 10 15

Ala Asn

<210> 97

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Lys Asp Arg Arg Leu Ser Val Glu Ile Trp Asp Trp Asp Trp Asp Leu
 1 5 10 15