(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. 7 C12N 15/63	(11) 공개번호 특2002-0002354 (43) 공개일자 2002년01월09일

---

(21) 출원번호	10-2001-7004689		
(22) 출원일자	2001년04월13일		
번역문 제출일자	2001년04월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/23731	(87) 국제공개번호	WO 2000/22112
(86) 국제출원출원일자	1999년10월12일	(87) 국제공개일자	2000년04월20일

---

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 남아프리카, 인도네시아, 인도, 가나, 감비아, 크로아티아, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨, 그레나다,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비쏘,

(30) 우선권주장	60/104,013	1998년10월13일	미국(US)
	60/112,150	1998년12월14일	미국(US)

(71) 출원인

더 유니버시티 오브 죠지아 리서치 파운데이션, 인코포레이티드
추후제출
미합중국 죠지아 30602-7411 아텐스 보이드 그래주에이트 스터디즈 리서치 센터

(72) 발명자

알트만, 엘리오트
미국 조지아 아텐스 그레이트 오크 드라이브 210 (우:30605)

(74) 대리인

남상선

심사청구 : 없음

---

(54) 안정화된 생활성 펩티드 및 이들을 동정, 합성 및이용하는 방법

요약

본 발명은 펩티드 생활성 및 안정성을 동시에 스크리닝하도록 해주는 세포내 선별 시스템에 관한 것이다. 무작위배치된 재조합 펩티드는 엄격히 조절된 발현 시스템에서 생활성에 대해 스크리닝되며, 바람직하게는 야생형lac오페론으로부터 유도된다. 이렇게 하여 동정된 생활성 펩티드는 본질적으로 프로테아제 - 및 펩티다제 - 내성이다. 또한 본 발명은 N - 말단, C - 말단 또는 둘 모두에서 안정화기에 의해 안정화된 생활성 펩티드를 제공한다. 안정화기는 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 또는 글루타티온 환원효소, 또는 하나 이상의 프롤린 잔기와 같은 작고 안정한 단백질의 형태를 취할 수 있다.

명세서

배경기술

생활성 펩티드는 생물학적 활성을 유발시키는 작은 펩티드이다. 1902년에 세크레틴이 발견된 이래, 평균 20개 아미노산 크기의 500종 이상의 상기 펩티드들이 동정되고 특징화되었다. 이들은 다양한 시스템으로부터 단리되었고, 폭넓은 작용 범위를 나타냈으며, 의학 분야에서 치료제로서 사용되고 기초 연구 및 응용 연구 둘 모두에서 진단 도구로서 사용되고 있다. 표 1 및 표 2는 가장 잘 공지되어 있는 생활성 펩티드들 중 일부를 기재한 것이다.

표 1: 의학에 사용되고 있는 생활성 펩티드

이름	단리된 곳	아미노산 크기	치료 용도
앤지오텐신 II	인간 혈장	8	혈관수축제
브라디키닌	인간 혈장	9	혈관확장제
캐룰레인	개구리 피부	10	이담제
칼시토닌	인간 부갑상선	32	칼슘 조절제
콜레시스토키닌	돼지 대장	33	이담제
코르티코트로핀	돼지 뇌하수체	39	호르몬
엘레도이신	옥토포드(Octopod) 독	11	강압제
가스트린	돼지 위	17	위 활성제
글루카곤	돼지 췌장	29	당뇨병치료제
그라미시딘 D	바실러스 브레비스(Bacillus brevis) 세균	11	항세균제
인슐린 인슐린 A 인슐린 B	개 췌장	2130	당뇨병치료제
칼리딘	인간 혈장	10	혈관확장제
황체화 호르몬 - 방출 인자	소 시상하부	10	호르몬 자극제
멜리틴	벌 독	26	류마티스치료제
옥시토신	소 뇌하수체	9	분만촉진제
세크레틴	개 대장	27	호르몬
세르모렐린	인간 췌장	29	호르몬 자극제
소마토스타틴	소 시상하부	14	호르몬 억제제
바소프레신	소 뇌하수체	9	이뇨치료제

표 2: 응용 연구에 사용되고 있는 생활성 펩티드

이름	단리된 곳	아미노산 크기	생물학적 활성
심방성 나트륨이뇨 펩티드	래트 심방	28	나트륨이뇨제
봄베신	개구리 피부	14	위 활성제
코난토킨 G	달팽이 독	17	신경전달체
코노톡신 GI	달팽이 독	13	신경근육 억제제
디펜신 HNP-1	인간 호중구	30	항미생물제
델타 양-유도 펩티드	토끼 뇌	9	신경학적 작용제
더마셉틴	개구리 피부	34	항미생물제
다이놀핀	돼지 뇌	17	신경전달체
EETI II	엑발리움 엘라테리움(Ecballium elaterium) 씨앗	29	프로테아제 억제제
엔돌핀	인간 뇌	30	신경전달체
엔케팔린	인간 뇌	5	신경전달체
히스타틴 5	인간 타액	24	항세균제
마스토파란	말벌(VespidWasps)	14	비만세포 탈과립제
마가인인 I	개구리 피부	23	항미생물제
멜라닌세포 자극 호르몬	돼지 뇌하수체	13	호르몬 자극제
모틸린	개 대장	22	위 활성제
뉴로텐신	소 뇌	13	신경전달체
파이살래민	개구리 피부	11	강압제
기질 P	말 대장	11	혈관확장제
혈관작용성 장 펩티드	돼지 대장	28	호르몬

상기 펩티드들의 작용 모드가 결정되었는데, 생활성 펩티드가 특이적인 단백질 표적과 상호작용하는 것으로 밝혀졌다. 대부분의 경우에 있어서, 생활성 펩티드는 극도로 높은 특이성으로 이의 단백질 표적에 결합하여 불활성화시킴으로서 작용한다. 전형적으로 상기 펩티드의 단백질 표적에 대한 상기 펩티드의 결합 상수는 보고되어 있는 10^{-12} M(피코몰 범위)만큼 높은 결합 상수와 함께 나노몰(nM, 10^{-9} M) 범위인 것으로 결정되었다. 표 3은 몇몇 상이한 생활성 펩티드에 의해 불활성화된 표적 단백질 뿐만 아니라 여기에 결합하는 것과 관련된 결합 상수를 보여준다.

표 3: 생활성 펩티드의 결합 상수

생활성 펩티드	아미노산 크기	억제되는 단백질	결합 상수
α-코노톡신 GIA	15	니코틴 아세틸콜린 수용체	1.0x10^{-9} M
EETI II	29	트립신	1.0x10^{-12} M
H2(7-15)	8	HSV 리보누클레오티드 환원효소	3.6x10^{-5} M
히스타틴 5	24	박테로이드 긴기발리스 프로테아제	5.5x10^{-8} M
멜리틴	26	칼모듈린	3.0x10^{-9} M
미오톡신(29-42)	14	ATPase	1.9x10^{-5} M
뉴로텐신	13	Ni 조절 단백질	5.6x10^{-11} M
뇌하수체 아데닐화 사이클라제 활성화 폴리펩티드	38	칼모듈린	1.5x10^{-8} M
PKI(5-24)	20	cAMP-의존성 단백질 키나제	2.3x10^{-9} M
SCP(153-180)	27	칼파인	3.0x10^{-8} M
세크레틴	27	HSR G 단백질	3.2x10^{-9} M
혈관작용성 장 펩티드	28	GPRN1 G 단백질	2.5x10^{-9} M

최근, 특정 단백질 표적에 결합하여 억제시키는 천연 발생 펩티드의 인상적인 능력에 기인하여 신규한 약제학적 제제로서 합성적으로 유도된 생활성 펩티드들을 사용하는 것에 대한 관심이 증가하고 있다. 합성적으로 유도된 펩티드들은 새로운 항세균제제, 항바이러스제제 및 항암제의 개발에 있어서 유용할 수 있다. 합성적으로 유도된 항세균성 또는 항바이러스성 펩티드 제제의 예들은 세균 또는 바이러스 표면 단백질에 결합하여 이들이 숙주 세포 수용체와 상호작용하는 것을 방지시키거나 특정 독소 또는 프로테아제 단백질의 작용을 방지시킬 수 있는 것들일 것이다. 항암제의 예는 특정

종양발생 단백질에 결합하여 이들의 작용을 방지시킬 수 있는 합성적으로 유도된 펩티드를 포함할 것이다.

현재까지, 신규한 생활성 펩티드들은 두 가지 상이한 시험관내 접근법을 사용함으로써 조작되어 왔다. 제 1 접근법은 6개 내지 10개 아미노산 펩티드의 무작위배치된 라이브러리를 화학적으로 합성함으로써 후보 펩티드를 생성시키는 것이다[참조 : J. Eichler et al., Med. Res. Rev. 15:481-496 (1995); K. Lam, Anticancer Drug Des. 12:145-167 (1996); M. Lebl et al., Methods Enzymol. 289:336-392 (1997)]. 제 2 접근법에 있어서, 후보 펩티드는 무작위배치된 올리고누클레오티드 라이브러리를 Ff 사상(絲狀) 파지 유전자내로 클로닝함으로써 합성되며, 이것은 펩티드가 박테리오파지의 표면상에서 발현되는 크기를 훨씬 더 크게 해준다[참조 : H. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-424 (1997); G. Smith et al., et al. Meth. Enz. 217:228-257 (1993)]. 현재까지, 아미노산의 길이가 38개 이하인 무작위배치된 펩티드 라이브러리가 만들어졌고, 더 긴 펩티드들은 상기 시스템을 사용하여 달성될 수 있을 것 같다. 상기 전략들 중 하나를 사용하여 생성된 펩티드 라이브러리들은 곧이어 전형적으로 예비선별된 매트릭스-결합된 단백질 표적과 혼합된다. 결합한 펩티드들을 용리시키고, 이들의 서열을 결정한다. 이 정보로부터 새로운 펩티드들이 합성되고 이들의 억제 특성이 결정된다. 한꺼번에 하나의 생물학적 활성을 위해 스크리닝만 하는 것은 지루한 방법이다.

이러한 시험관내 접근법들이 유망함을 보여주지만, 합성적으로 유도된 펩티드의 용도는 아직 약제학적 산업에 있어서 상당한 비중을 차지하지는 않고 있다. 현존하는 일차적인 장애는 숙주 세포의 프로테아제 및/또는 펩티다제에 의한 잠재적인 펩티드 약제의 바람직하지 않은 분해에 의해 입증된 바와 같이 원하는 생물학적 시스템내에서의 펩티드 불안정성에 대한 장애이다. 더 큰 펩티드를 분해시킬 수 있는 펩티다제에는 세 가지 주요 클래스가 있다: 펩티드의 아미노 또는 카복시 말단 각각에 작용하는 아미노 및 카복시 엑소펩티다제, 및 펩티드의 내부에 작용하는 엔도펩티다제. 아미노펩티다제, 카복시펩티다제 및 엔도펩티다제는 원핵 및 진핵 세포 둘 모두에서 동정되었다. 폭넓게 특징화된 많은 펩티다제들이 양 세포 타입에서 유사하게 기능하는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, 원핵 및 진핵 시스템 둘 모두에 있어서, 카복시펩티다제보다 많은 아미노펩티다제가 현재까지 동정되었다.

펩티드 분해의 문제를 다루기 위해 사용되는 접근법에는 천연 발생 L-아미노산과 반대되는 것으로서 D-아미노산 또는 변형된 아미노산의 사용[참조 : J. Eichler et al., Med Res Rev. 15:481-496 (1995); L. Sanders, Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics 15:95-102 (1990)], 환형화된 펩티드의 사용[참조 : R. Egleton, et al., Peptides 18:1431-1439 (1997)], 및 환자 체내에서 펩티드가 이의 표적에 도달하기 전에 펩티드의 분해를 방지시키는 향상된 운반 시스템의 개발[참조 : L. Wearley, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 8:331-394 (1991); L. Sanders, Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinetics 15:95-102 (1990)]이 포함된다. 펩티드를 안정화시킴으로써 선택된 생물시스템(예컨대, 환자)내에서의 이들의 바람직하지 않은 분해를 방지시키기 위한 이러한 접근법들이 유망하지만, 펩티드 약제 및 약제 후보물질을 보편적으로 확실하게 안정화시키기 위한 방법은 없다. 또한, 수많은 기존의 안정화 및 운반 방법들은 신규한 유용한 생활성 펩티드의 스크리닝 및 개발에 직접 사용될 수 없다. 펩티드를 안정화시키는 방법 및 신규한 생활성 펩티드를 동정하는 방법 둘 모두로서 사용되는 생물학적 접근법은 펩티드 약제 개발 분야에서 요구되는 더욱 진보된 방법일 것이다.

발명의 요약발명의 요약

본 발명은 신규한 생활성 펩티드를 동정하기 위한 세포내 스크리닝 방법을 제공한다. 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열에 작동가능하도록 연결되어 있는 엄격하게 조절할 수 있는 제어 영역을 포함하고 있는 발현 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시킨다. 형질전환된 숙주 세포를 우선 펩티드의 발현을 억제하는 조건하에서 성장시킨 다음, 이어서, 펩티드의 발현을 유도시킨다. 펩티드의 발현시에 숙주 세포의 표현형적 변화는 생활성을 나타내는 것이며, 이를 평가한다. 예를

들어, 펩티드의 발현이 숙주 세포 성장의 억제에 의해 수행되는 경우, 발현된 펩티드는 생활성 펩티드를 구성하고 있으며, 이것은 억제 펩티드로서 기능한다.

생활성 펩티드의 세포내 동정은 병원성 미생물 숙주 세포에서 장점적으로 수행될 수 있다. 항미생물 활성을 가진 생활성 펩티드들은 미생물 숙주 세포 시스템에서 쉽게 동정된다. 또한, 상기 방법은 천연적으로 발현되는 프로테아제 또는 펩티다제의 발현을 감소시키거나 제거하도록 변형되지 않은 숙주 세포에서 수행될 수 있다. 프로테아제 및 펩티다제를 포함하고 있는 숙주 세포에서 수행되는 경우, 본 발명의 선별 방법은 프로테아제- 및 펩티다제-내성인 생활성 펩티드의 조력에 치중되어 있다.

본 발명에 따라 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용된 발현 벡터의 엄격하게 조절할 수 있는 제어 영역은 바람직하게는 야생형 대장균lac오페론으로부터 유도되며, 형질전환된 숙주 세포는 바람직하게는 억제되는 조건하에서의 숙주 세포 성장 동안 펩티드의 발현을 억제하기에 효과적인 양의 Lac 리프레서 단백질을 포함하고 있다. 충분한 양의 Lac 리프레서 단백질을 보장하기 위해서, 숙주 세포는 Lac 리프레서 단백질을 과잉생성시키는 제 2 벡터를 사용하여 형질전환될 수 있다.

임의적으로, 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용되는 발현 벡터는 유전학적으로 조작되어 펩티다제 및 프로테아제에 내성인 안정화된 펩티드를 엔코딩할 수 있다. 예를 들어, 코딩 서열은 펩티드 N-말단 또는 C-말단중 하나 또는 둘 모두에 안정화기를 엔코딩하도록 디자인될 수 있다. 또 다른 예로서, 코딩 서열은 하기 기술하는 바와 같이 α-헬릭스 모티프 또는 반대 전하 말단 모티프와 같은 안정화 모티프를 엔코딩하도록 디자인 될 수 있다. 펩티드 말단에 안정화기 또는 안정화 모티프의 존재는 펩티드의 세포내 분해의 속도를 늦출 수 있다.

또한 본 발명은 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 가진 생활성 펩티드를 제공한다. 바람직하게는, 제 1 안정화기는 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고; 제 2 안정화기는 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택된다. 적합한 작고 안정한 단백질에는 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 및 글루타티온 환원효소가 있다. 추가적으로, 본 발명은 하기 기술하는 바와 같이 반대 전하 말단 모티프에 의해 안정화된 생활성 펩티드를 제공한다. 생활성 펩티드는 바람직하게는 항미생물 펩티드 또는 치료 펩티드 약제이다.

또한 본 발명은 N-말단 및 C-말단중 하나 또는 둘 모두에 안정화기를 가지는 생활성 펩티드가 생성되도록 절단될 수 있는 폴리펩티드를 제공한다. 따라서 절단가능한 폴리펩티드는 생활성 펩티드의 N-말단 바로 앞 또는 생활성 펩티드의 C-말단 바로 다음에 위치하는 화학적 또는 효소적 절단 부위를 포함하고 있다.

또한 본 발명은 4-헬릭스 번들 단백질(4-helix bundle protein), 바람직하게는 Rop 단백질, 및 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 4-헬릭스 번들 단백질은 융합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 위치되어 있으며, 따라서 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단과 융합될 수 있다.

또한 본 발명은 항미생물 펩티드를 사용하는 방법을 제공한다. 항미생물 펩티드는 제 1 안정화기를 항미생물 펩티드의 N-말단에 연결시키고, 임의적으로, 제 2 안정화기를 항미생물 펩티드의 C-말단에 연결시킴으로써 안정화된다. 또한, 항미생물 펩티드는 하기 기술하는 바와 같이 반대 전하 말단 모티프를 가진 펩티드 서열을 측면에 위치시킴으로써 안정화된다. 그 결과 안정화된 항미생물 펩티드는 미생물, 바람직하게는 병원성 미생물과 접촉됨으로써, 예컨대 미생물의 성장 또는 독성을 억제시킨다.

또한 본 발명은 안정화된 펩티드 약제의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 안정화된 펩티드 약제의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기중 적어도 하나를 가지는 안정화된 펩티드 약제를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 펩티드 약제를 사용하여 치료할 수 있는 질환을 가진 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 임의적으로, 안정화된 펩티드 약제의 투여 전에, 제 1 안정화기를 펩티드 약제의 N-말단에 공유 결합시키고, 제 2 안정화기를 펩티드의 C-말단에 공유 결합시킴으로써 안정화된 펩티드 약제를 생성시킨다. 또한, 상기 방법은 하기 기술하는 바와 같이 반대 전하 말단 모티프를 가진 펩티드 서열을 측면에 위치시킴으로써 안정화시킨 펩티드 약제를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명도면의 간단한 설명

도 1은 보조 오퍼레이터 O3로부터lacZ유전자의 번역 개시 부위까지의 야생형lac오페론의 제어 영역(SEQ ID NO:1)을 도시한 것이다. DNA 결합 부위는 오퍼레이터 O3 및 O1(둘 모두 밑줄표시), CAP(박스표시), -35 부위(박스표시) 및 -10 부위(박스표시)를 포함하고 있지만, 중요 RNA 및 단백질 부위는 LacI 번역 종결 부위(TGA), +1lacZ전사 개시 부위,lacZ을 위한 샤인 달가노(SD) 리보솜 결합 부위 및 LacZ 번역 개시 부위(ATG)를 포함하고 있다.

도 2는 플라스미드 pLAC11의 지도이다. 이들이 절단되는 유일한 제한 부위 및 염기쌍을 표시하였다. 또한 관심있는 다른 부위들을 도시하였는데, 이에는 Tet(98-1288), Rop(1931-2122), ori(2551-3138), Amp(3309-4169) 및 lacPO(4424-4536)가 있다.

도 3은 플라스미드 pLAC22의 지도이다. 이들이 절단되는 유일한 제한 부위 및 염기쌍을 표시하였다. 또한 관심있는 다른 부위들을 도시하였는데, 이에는 Tet(98-1288), Rop(1927-2118), ori(2547-3134), Amp(3305-4165),lacIq(4452-5536) 및lacPO(5529-5641)가 있다.

도 4는 플라스미드 pLAC33의 지도이다. 이들이 절단되는 유일한 제한 부위 및 염기쌍을 표시하였다. 또한 관심있는 다른 부위들을 도시하였는데, 이에는 Tet(98-1288), ori(1746-2333), Amp(2504-3364) 및lacPO(3619-3731)가 있다.

도 5는 다양한 양의 이소프로필 β-D-티오갈락토시드(IPTG)에 대한 pLAC11-lacZ구성물(개방환)의 반응을 도시한 것이다. 채워진 사각형은 MG1655 또는 CSH27 세포가 1 mM IPTG를 사용하여 유도시킨 농후 배지에서 성장되는 경우 수득된 β-갈락토시다제 활성을 나타내는 반면, 채워진 다이아몬드형은 MG1655 또는 CSH27이 M9 최소 락토오스 배지에서 성장되는 경우 수득된 β-갈락토시다제 활성을 나타낸다.

도 6은 2일 억제제(pPep12) 대 1일 억제제(pPep1)의 억제 효과를 묘사한 성장 곡선을 도시한 것이다. 대조군, pPep1에 대한 pLAC11 및 pPep12에 대한 pLAC11을 위한 데이터 지점을 각각 사각형, 원형 및 삼각형으로 표시하였다.

도 7은 p-Rop(C) 융합 벡터의 지도이다. 이들이 절단되는 유일한 제한 부위 및 염기쌍을 표시하였다. 또한 관심있는 다른 부위들을 도시하였는데, 이에는 Rop(7-198), ori(627-1214), Amp(2245-1385), lacPO(2500-2612)가 있다.

도 8은 p(N)Rop-융합 벡터의 지도이다. 이들이 절단되는 유일한 제한 부위 및 염기쌍을 표시하였다. 또한 관심있는 다른 부위들을 도시하였다: Rop(7-204), ori(266-853), Amp(1024-1884), lacPO(2139-2251).

도 9는 반대 전하 말단 모티프를 가진 펩티드(SEQ ID NO:2)를 예시한 것이며, 여기서 펩티드의 아미노 및 카복시 말단은 반대 전하 말단 아미노산의 상호작용에 의해 안정화된다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 펩티드 생활성 및 안정성을 동시에 스크리닝하도록 함으로써 펩티드 약제 개발 분야에서의 주요한 진보를 대표한다. 무작위배치된 재조합 펩티드들은 바람직하게는 숙주 세포에서의 펩티드 발현을 필수적으로 완전하게 억제시키도록 하는 야생형lac오페론으로부터 유도된, 엄격하게 조절되어 유도될 수 있는 발현 시스템내에서 생활성에 대해 스크리닝된다. 그런 다음 펩티드 발현의 후속적인 유도를 사용하여 숙주 세포 성장을 억제하거나 다른 생활성을 가진 펩티드들을 동정할 수 있다.

무작위배치된 펩티드의 세포내 스크리닝은 기존의 방법을 능가하는 많은 장점을 가지고 있다. 생활성을 쉽게 식별할 수 있고, 다양한 많은 생활성들을 동시에 스크리닝할 수 있고, 수많은 펩티드를 용이하게 생성된 펩티드 라이브러리를 사용하여 스크리닝할 수 있고, 원하는 경우, 숙주 세포를 유전학적으로 조작하여 영향을 미치는 단백질 표적을 밝혀낼 수 있다. 장점적으로는, 무작위배치된 펩티드는 항미생물 적용을 위한 궁극적인 표적 세포와 동일하거나 매우 유사한 숙주 세포내에서 스크리닝될 수 있다. 상기 시스템의 추가적이면서 매우 중요한 특성은 선별이 천연적으로 세포내 환경에서 안정적인; 즉, 프로테아제 및 펩티다제에 내성인 펩티드의 조력에 치중되어 있다는 것이다. 우연적으로, 세균 펩티다제는 진핵 펩티다제와 매우 유사하다. 따라서 세균 숙주내에서 안정한 펩티드는 진핵 세포에서도 안정하며, 세균 세포를 초기 스크리닝에 사용하여 궁극적으로 인간 또는 동물 치료제로서 유용함을 증명할 수 있는 약제를 동정할 수 있을 것이다.

본 발명은 생활성 펩티드의 동정 및 용도에 관한 것이다. 생활성 펩티드는 생물학적 활성을 가진 펩티드이다. 본 명세서에서 사용하는 바와 같이 용어 " 생활성" 에는 상호작용이 공유 결합이나 비공유 결합과 관련이 있든 없든, 단백질, 당단백질, 탄수화물, 예컨대 올리고당류 또는 다당류, 누클레오티드, 폴리누클레오티드, 지방산, 호르몬, 효소, 보조인자 등과 같은 또 다른 생체분자와의 임의적인 타입의 상호작용이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또한 생활성에는 염, 이온, 금속, 영양분, 바이러스, 파지 등과 같은 세포내에 존재하는 외래 또는 외인성 제(agent)를 포함하는 다른 세포내 구성성분 또는 구성물질과 임의 타입의 상호작용, 예컨대 결합, 격리 또는 전달과 관련된 상호작용이 포함된다. 펩티드의 생활성은 예컨대, 펩티드가 발현된 숙주 세포의 표현형적 결과를 관찰하거나 표적 분자에 대한 결합 친화도, 효소적 활성의 변화 등과 같은 특정 생활성에 대한 시험관내 검정을 수행함으로써 탐지될 수 있다. 생활성 펩티드의 예에는 항미생물 펩티드 및 펩티드 약제가 포함된다. 항미생물 펩티드는 세균, 바이러스, 원생동물 등과 같은 미생물에 악영향을 미치는 펩티드이다. 예를 들어, 항미생물 펩티드에는 미생물의 성장을 지연시키는 억제 펩티드, 미생물을 죽이기에 효과적인 미생물유독성 펩티드(예컨대, 세균유독성 및 바이러스유독성 펩티드 약제, 살균제 및 소독제), 및 미생물 생식, 숙주 독성 등을 방해하기에 효과적인 펩티드가 포함된다. 인간 또는 다른 동물의 치료 용도를 위한 펩티드 약제에는 예컨대, 환자에게 금지된 독성이 아닌 항미생물 펩티드, 인슐린, 옥시토신, 칼시토닌, 가스트린, 소마토스타틴, 항암 펩티드 등과 같은 숙주의 여러 물질대사 과정을 이끌어내고, 가속시키고, 지연시키거나 방지시키도록 디자인된 펩티드가 포함된다.

본 명세서에 사용하는 바와 같이, 용어 " 펩티드" 는 펩티드 결합을 통해 선형 사슬로 함께 연결된 다수의 아미노산을 말한다. 따라서, 본 명세서에 사용하는 바와 같이 용어 " 펩티드" 에는 디펩티드, 트리펩티드, 올리고펩티드 및 폴리펩티드가 포함된다. 디펩티드는 2개의 아미노산을 포함하고; 트리펩티드는 3개의 아미노산을 포함하고; 용어 올리고펩티드는 전형적으로 2개 내지 약 50개 이상의 아미노산을 가진 펩티드를 설명하기 위해 사용된다. 약 50개를 넘는 펩티드를 종종 폴리펩티드 또는 단백질이라 부른다. 본 발명의 목적을 위해, " 펩티드" 는 임의의 특정 수의 아미노산에 제한되지 않는다. 그러나, 바람직하게는, 펩티드는 약 2개 내지 약 50개 아미노산, 더욱 바람직하게는 약 5개 내지 약 40개 아미노산, 가장 바람직하게는 약 5개 내지 약 20개 아미노산을 포함한다.

숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용된 라이브러리는 무작위배치되어 있고 펩티드를 엔코딩하는 올리고누클레오티드를 엄격하게 조절할 수 있는 발현 제어 영역을 가진 핵산 구성물내로 클로닝함으로써 형성된다. 발현 제어 영역은 돌연변이체 비기능 유전자 " X" 를 포함하도록 조작된 숙주 세포내에서의 생물검정에 의해 본 명세서에 사용되는 용어와 같

이 " 엄격하게 조절할 수 있는" 지를 결정하기 위해 손쉽게 평가될 수 있다. 조작된 숙주 세포를 클로닝된 야생형 유전자 " X" 에 작동가능하도록 연결되어 있는 엄격하게 조절할 수 있는 발현 제어 영역을 포함하는 발현 벡터를 사용하여 형질전환시키는 것은 억제되는 조건하에서 조작된 숙주 세포의 표현형을 유지시킬 것이다. 그러나, 유도되는 조건하에서 클로닝된 야생형 유전자 " X" 에 작동가능하도록 연결되어 있는 엄격하게 조절할 수 있는 발현 제어 영역을 포함하는 발현 벡터는 돌연변이체 비기능 유전자 X를 보충함으로써 야생형 표현형을 생성시킬 것이다. 바꾸어 말하면, 염색체적으로 불활성화된 유전자를 발현시킬 수 있는 엄격하게 조절할 수 있는 발현 벡터를 사용하여 형질전환된 널(null) 돌연변이를 포함하는 숙주 세포는 억제되는 조건하에서 널 표현형을 나타낼 것이지만; 발현이 유도되는 경우, 세포는 야생형 세포와 식별할 수 없는 표현형을 나타낼 것이다. 본 발명의 엄격하게 조절할 수 있는 발현 벡터의 발현 제어 영역은 원하는 경우, 더 높은 레벨의 엔코딩된 생체펩티드를 생성시키기 위해 쉽게 변형될 수 있음을 이해해야 한다(하기 실시예 I 참조). 상기 변형은 불가피하게 발현 제어 영역내에 어떤 " 누출(leakiness)" 을 도입시킴으로써 억제되는 조건하에서 낮은 레벨의 펩티드 발현을 초래할 수 있다.

바람직한 양태에서, 유도가능한 발현 벡터의 발현 제어 영역은 야생형 대장균lac프로모터/오퍼레이터 영역으로부터 유도된다. 특히 바람직한 형태에 있어서, 발현 벡터는 보조 오퍼레이터 O3, CAP 결합 영역, -35 프로모터 부위, -10 프로모터 부위, 오퍼레이터 O1,lacZ을 위한 샤인-달가노 서열, 샤인-달가노 서열과lacZ코딩 서열의 ATG 개시 영역사이의 스페이서 영역을 포함하고 있다(도 1 참조).

발현 제어 영역이 본 명세서에 정의된 바와 같이 엄격하게 조절할 수 있도록 남아있는 경우,lac프로모터/오퍼레이터 영역의 야생형 핵산 서열의 변화가 바람직한 발현 벡터의 발현 제어 영역내에서 허용될 수 있으며 본 발명에 의해 포함되어 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 야생형lac오페론의 -10 부위(TATGTT)는 세균의 컨센서스 -10 부위 서열 TATAAT(6개 위치중 4개를 공유함)에 비해 약하다. 공통적으로 약한 다른 프로모터들은 발현 제어 영역의 -10 부위에서 동일하게 효과적임을 고찰하였고; 강한 프로모터는 유도되지 않는 상태에서의 완전한 억제를 보증하기 위해 회피하였다. -35 영역에 대해서는, 야생형lac오페론의 서열인 TTTACA는 컨센서스 -35 서열인 TTGACA로부터 하나의 염기가 제거된 것이다. 엄격하게 조절할 수 있는lac오페론-유도된 발현 제어 영역을 더 약한 -35 서열(즉, 컨센서스 -35 서열과 조금의 동일성을 가진 것)과 야생형 -10 서열(TATAAT)를 사용하여 구성하여 CAP 활성 단백질의 보조를 필요로 하는 약한 프로모터를 생성시킬 수 있음을 고찰하였다. 마찬가지로, CAP 결합 영역의 핵산 서열이 필수적으로 동일한 친화도로 CAP 단백질이 CAP 결합 영역에 결합하는 한 변화될 수 있음을 이해할 것이다. 샤인-달가노 서열의 말단과lacZ코딩 서열의 ATG 개시 영역사이의 스페이서 영역은 전형적으로 길이가 약 5 내지 약 10 누클레오티드, 바람직하게는 약 5 내지 약 8 누클레오티드, 더욱 바람직하게는 약 7-9 누클레오티드이다. 스페이서 영역의 가장 바람직한 조성 및 길이는 샤인-달가노 서열의 조성 및 길이 뿐만 아니라 이와 작동가능하도록 연결되어 있는 활용된 번역 개시 코돈(즉, AUG, GUG 또는 UUG)에 달려 있으며, 따라서 당업자에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는 스페이서 영역의 누클레오티드 조성은 " 풍부한 AT" ; 즉, G와 C를 포함하는 것보다 A와 T를 더 많이 포함하고 있다.

본 발명의 방법의 바람직한 양태에서, 발현 벡터는 pLAC11(ATCC 제 207108호)의 동정된 특징을 가지고 있다. 더욱 바람직하게는, 발현 벡터는 pLAC11(ATCC 제 207108호)이다.

본 발명에서 사용하는 바와 같이, 용어 " 벡터" 는 플라스미드를 포함하는 것으로서 폭넓게 해석되며, 이에는 에피좀, 바이러스 벡터, 코스미드 등이 포함된다. 벡터는 환형 또는 선형, 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있으며, RNA, DNA, 또는 이들의 변형물 및 조합물을 포함할 수 있다. 벡터 또는 플라스미드 골격의 선택은 선별 마커(들), 플라스미드 복제수 등과 같은 생성된 구성물의 원하는 여러가지 특징에 달려있다. 핵산 서열은 발현 제어 서열이 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하거나 조절하는 경우, 프로모터와 같은 벡터의 조절 영역에서 발현 제어 서열에 " 작동가능하도록 연결" 된다. 발현 제어 서열에 " 작동가능하도록 연결" 되어 있는 핵산에는, 예컨대, 발현될 핵산 서열의 시작부위에 위치되어 있는 적절한 개시 신호(예컨대, ATG) 및 엔코딩된 펩티드를 생성시키기 위한 발현 제어 서열의 제어하에서 핵산 서열의 발현이 가능하도록 해주는 리딩 프레임이 포함된다. 발현 벡터의 조절 영역에는 임의적으로 상응하는 아미노아세틸-tRNA가 없는 코돈과 같은 종결 서열이 포함되며, 따라서 펩티드 합성이 종결된다. 전형적으로, 리보솜이 mRNA의 번역 동안 종결 서열 또는 코돈에 도달하는 경우, 폴리펩티드는 방출되고 리보솜-mRNA-tRNA 복합체는 분리된다.

발현 벡터는 임의적으로 선별 또는 마커 서열을 하나 이상 포함하고 있으며, 이들은 전형적으로 성장 배지중의 화합물을 불활성화시킬 수 있는 효소를 엔코딩하고 있다. 예를 들어, 마커 서열의 포함은 숙주 세포를 항생제에 대해 내성으로 만들거나, 숙주 세포에게 화합물-특이적인 물질대사적 장점을 부여할 수 있다. 세포는 화학적 형질전환(예컨대, 이로써 세포는 $CaCl_2$ 와 같은 시약을 사용하여 처리됨으로써 수용성이 된다); 일렉트로포레이션 및 다른 전기적 기술들; 미세주입 등을 포함하는 당분야에 공지된 임의의 편리한 방법을 사용함으로써 발현 벡터를 사용하여 형질전환될 수 있다.

lac오페론으로부터 유도된 엄격하게 조절할 수 있는 발현 시스템을 사용하는 방법의 양태에서, 숙주 세포는 야생형 대장균에서 생성되는 양을 초과하는 Lac 레프레서 단백질의 공급원을 포함하도록 유전학적으로 조작되거나 아니면 변형되어 있다. 과잉의 Lac 리프레서 단백질의 공급원을 포함하는 숙주 세포는 억제되는 조건, 즉 이소프로필 β-D-티오갈락토시드(IPTG)와 같은 유발원의 부재하에서 펩티드의 발현을 억제시키기에 충분한 양의 Lac 리프레서 단백질을 발현시키는 숙주 세포이다. 바람직하게는, Lac 리프레서 단백질의 발현은 구조적이다. 예를 들어, 숙주 세포는 Lac 리프레서 단백질을 엔코딩하는 유전자, 바람직하게는lacI, 더욱 바람직하게는$lacI^q$를 포함하는 제 2 벡터를 사용하여 형질전환됨으로써 트랜스(trans), 즉, 외부로부터 엄격하게 조절할 수 있는 발현 벡터로 과량의 Lac 리프레서 공급원을 제공할 수 있다. Lac 리프레서 단백질의 트랜스 공급원을 제공하기 위한 또 다른 선택은 숙주 염색체 자체이며, 이것은 유전학적으로 조작됨으로써 과량의 Lac 리프레서 단백질을 발현시킬 수 있다. 또한, Lac 리프레서 단백질을 엔코딩하는 유전자는 펩티드-엔코딩 올리고누클레오티드를 포함하는 엄격하게 조절할 수 있는 발현 벡터상에 포함됨으로써 Lac 리프레서 단백질을 시스(cis)로 제공할 수 있다. Lac 리프레서 단백질을 엔코딩하는 유전자는 바람직하게는 구조성 프로모터의 제어하에 있다.

본 발명을 어떠한 방식으로든 스크리닝을 위해 사용되는 숙주 세포의 타입에 의해 제한하지 않고자 한다. 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 바람직한 포유동물 세포에는 임의 조직 타입의 인간 세포가 포함되며, 제한됨이 없이 암세포 또는 하이브리도마를 포함할 수 있다. 바람직한 세균 숙주 세포에는 대장균과 다양한 살모넬라 종과 같은 그람 음성 세균 및 스태필로코쿠스, 스트렙토코쿠스 및 엔테로코쿠스 속으로부터의 세균과 같은 그람 양성 세균이 포함된다. 또한 원생동물 세포도 적합한 숙주 세포이다. 통상적인 재조합 단백질 발현 시스템과는 명백히 대조적으로, 숙주 세포가 프로테아제 및/또는 펩티다제를 포함하는 것이 바람직하며, 그 이유는 이러한 선택이, 결과적으로, 장점적으로 프로테아제- 및 펩티다제-내성인 펩티드의 조력에 치중될 것이기 때문이다. 더욱 바람직하게는, 숙주 세포는 임의의 천연적으로 발현되는 프로테아제 또는 펩티다제의 발현을 감소시키거나 제거시키도록 유전적으로 또는 다른 식으로 변형되지 않는다. 숙주 세포는 특정 목적에 맞게 선택될 수 있다. 예를 들어, 스태필로코쿠스를 억제시키기에 특이적인 펩티드 약제를 수득하고자 하는 경우, 펩티드는 스태필로코쿠스내에서 장점적으로 발현되고 스크리닝될 수 있다.

따라서, 다양한 병원성 세균을 치료하기에 유용한 새로운 항세균 펩티드의 개발에 있어서 상기 기술의 적용에 대한 가공할 잠재력이 존재한다. 특히 관심있는 것은 병원성 스태필로코쿠스, 스트렙토코쿠스 및 엔테로코쿠스이며, 이들은 원내 감염의 일차적인 원인이다. 이러한 수많은 균주들은 놀라운 속도로 점차적으로 약제-내성이 되어가고 있다. 본 발명의 기술은 선정된 병원성 균주를 특이적으로 표적화하는 억제 펩티드를 단리시키기 위해 병원성 숙주 세포에 실행될 수 있다. 본 발명에 따라 병원성 미생물 숙주 세포를 사용하여 동정된 억제 펩티드는 직접적인 치료적 유용성을 가질 수 있으며; 펩티드 입수에 대해 공지된 것에 기초하여, 작은 펩티드들은 스태필로코쿠스, 스트렙토코쿠스 및 엔테로코쿠스에 의해 쉽게 흡수되는 것 같다. 일단 내재되면, 본 발명에 따라 동정된 억제 펩티드들은 문제의 세균의 성장을 억제시킬 것으로 예상된다. 그러므로 이렇게 동정된 신규한 억제 펩티드들이 미생물 감염에 대한 의학적 치료 및 치료법에 사용될 수 있음을 고찰하였다. 상기 신규한 억제 펩티드가 합성적 접근법을 사용하여 추가적인 신규한 항세균 펩티드를 동정하기 위해 사용될 수 있음을 추가로 고찰하였다. 억제 펩티드의 코딩 서열을 결정하고, 그런 다음 펩티드를 화학적으로 합성하고 숙주 세포내에서 이들의 억제 성질에 대해 시험하였다.

또한 본 발명에 따라 병원성 미생물 숙주 세포에서 동정된 신규한 억제 펩티드는 잠재적인 새로운 약제 표적을 밝히기 위해서도 사용될 수 있다. 억제 펩티드가 불활성화된 단백질 표적은 상기 펩티드에 의해 더 이상 억제되지 않는 돌연변이체를 단리시킴으로써 반대의 유전학을 사용하여 동정된다. 그런 다음 상기 돌연변이체를 맵핑하여 억제된 단백질 표

적을 자세하게 결정한다. 그런 다음 새로운 항세균 약제를 여러가지 공지되거나 지금까지 발견되어 있는 약제학적 전략을 사용하여 개발할 수 있다.

숙주 세포의 형질전환 다음에, 형질전환된 숙주 세포를 초기에 펩티드의 발현이 억제되는 조건하에서 성장시킨다. 그런 다음 펩티드의 발현을 유도시킨다. 예를 들어,lac프로모터/오퍼레이터 시스템이 발현을 위해 사용되는 경우, IPTG를 배양 배지에 첨가한다. 이어서 펩티드가 숙주 세포 성장을 억제하는 지를 결정하며, 여기서 억제되는 조건이 아닌 유도되는 조건하에서의 숙주 세포 성장의 억제는 생활성 펩티드의 발현을 나타낸다.

명백하게, 본 발명의 방법에 따라 동정된 생활성 펩티드는, 상기 방법 자체로 인해, 숙주 세포의 세포내 환경내에서 안정하다. 따라서 본 발명의 방법은 바람직하게는 프로테아제 및 펩티다제에 내성인 생활성 펩티드를 동정한다. 프로테아제 및 펩티다제에 대한 내성은 당분야에 널리 공지되어 있는 방법을 사용하여 적절한 세포 추출물 또는 정제된 펩티다제 및/또는 프로테아제와 접촉시키는 경우, 펩티드 분해를 측정함으로써 평가될 수 있다. 프로테아제- 또는 펩티다제 내성 펩티드는 프로테아제 또는 펩티다제의 존재하에서 대조군 펩티드에 비해 더 긴 반감기에 의해 증명된다.

본 발명의 스크리닝 방법에 사용된 무작위배치된 펩티드는 합성에 치중된 본 발명의 방법에 따라 임의적으로 조작되어 N-말단 또는 C-말단중 하나 또는 둘 모두를 프로테아제 또는 펩티다제에 대해 더욱 내성으로 만들고/만들거나 펩티드 안정화 모티프내로 조작함으로써 이들의 안정성을 증가시킬 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법중 하나의 양태에서, 추정 생활성 펩티드는 N-말단, C-말단 또는 양 말단 모두에 안정화기를 부가시킴으로써 안정화된다. 이를 위해, 발현 벡터내에 무작위배치된 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 또는 발현 벡터 자체는 바람직하게는 펩티드의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기를 엔코딩하고 펩티드의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 엔코딩하도록 변형된다.

어떠한 단백질 앵커상에 특정 크기를 제한하고자 하는 것은 아니지만, 안정화기는 안정한 단백질, 바람직하게는 티오레독신, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 말토오스 결합 단백질, 글루타티온 환원효소와 같은 작고 안정한 단백질 또는 Rop 단백질과 같은 4-헬릭스 번들 단백질일 수 있다. 안정화기로서 사용하기에 적합한 단백질은 천연적으로 발생한 것이거나 합성된 것이다. 이들은 재조합 DNA 기술을 사용함으로써 화학적 또는 효소적으로 합성되거나 생성된 외인성 공급원으로부터 단리될 수 있다. 안정화기로서 사용하기에 특히 최적인 단백질들은 길이가 비교적 짧고 용액중에서 매우 안정한 구조를 형성하는 것들이다. 약 50 kD 미만의 분자량을 가진 단백질들이 안정화기로서 사용되기에 바람직하며; 더욱 바람직하게는 작고 안정한 단백질의 분자량은 약 25 kD 미만이고, 가장 바람직하게는 약 12 kD 미만이다. 예를 들어, 대장균 티오레독신의 분자량은 약 11.7 kD이고; 대장균 글루타티온 설포트랜스퍼라제의 분자량은 약 22.9 kD이고, ColE1 레플리콘으로부터의 Rop의 분자량은 약 7.2 kD이고; 말토오스 결합 단백질(이의 신호 서열을 제외한)은 약 40.7 kD이다. Rop 단백질의 작은 크기는 이를 안정화기, 융합 파트너 또는 펩티드 앵커로서 특히 유용하도록 만들고, 더 큰 단백질들보다 연결된 펩티드의 접근성을 덜 방해하기 때문에, 이의 생활성을 보존할 것 같다. 또한 Rop의 고도로 정렬된 역평형 4-헬릭스 번들 위상기하학(이량체화 후에) 및 느린 펼침 역학[참조 : Betz et al, Biochemistry 36, 2450-2458 (1997)]은 본 발명에 따른 펩티드 앵커로서의 이의 유용성에 기여한다. 또한 유사한 접힘 역학 및/또는 열역학적 안정성을 가진 다른 단백질[참조 : Rop는 약 71℃의 변성 중간점 온도(Tm)을 가지고 있다, Steif et al., Biochemistry 32, 3867-3876 (1993)]들도 바람직한 펩티드 앵커들이다. 4-헬릭스 번들 위상기하학과 같은 고도로 안정한 제 3의 모티프를 가진 펩티드 또는 단백질들이 특히 바람직하다.

또한, 안정화기는 하나 이상의 프롤린(Pro)으로 구성될 수 있다. 바람직하게는, 프롤린 디펩티드(Pro-Pro)가 안정화기로서 사용되지만, 추가적인 프롤린을 포함할 수 있다. 엔코딩된 프롤린(들)은 전형적으로 천연 발생한 아미노산이지만, 프롤린 유도체, 예컨대 하이드록시프롤린 또는 메틸- 또는 에틸-프롤린 유도체의 범위가 펩티드내에 엔코딩되거나 아니면 혼입될 수 있는 경우, 이러한 프롤린 유도체들 역시 안정화기로서 유용하다.

펩티드의 N-말단에서, 안정화기는 대안적으로 서열 Xaa-Pro$_m$-을 가진 올리고펩티드를 포함할 수도 있으며, 여기서 Xaa는 임의의 아미노산이고 m은 0보다 크다. 바람직하게는, m은 약 1 내지 약 5; 바람직하게는 m=2 또는 3, 더욱 바람직하게는, m=2이다. 또한, 펩티드의 C-말단에서, 안정화기는 대안적으로 서열 -Pro$_m$-Xaa를 가지는 올리고펩티드를 포함할 수도 있으며, 여기서 Xaa는 임의의 아미노산이고, m은 0보다 크다. 바람직하게는, m은 약 1 내지 약 5; 바람직하게는 m=2 또는 3, 더욱 바람직하게는, m=2이다. 본 발명의 방법의 특히 바람직한 양태에서, 발현 벡터에서 무작위배치된 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열은 펩티드의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기, 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택된 제 1 안정화기 및 펩티드의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기, 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, Pro-Xaa 및 Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택된 제 2 안정화기 각각을 엔코딩하도록 변형된다. 생성된 펩티드는 말단 안정화기가 결핍된 펩티드에 비해 세포내 환경에서 향상된 안정성을 가졌다.

본 발명의 스크리닝 방법의 또 다른 바람직한 양태에서, 발현 벡터는 C-말단 또는 N-말단에서 무작위배치된 펩티드와 융합된 4-헬릭스 번들 단백질을 엔코딩하고 있다. 바람직하게는, 4-헬릭스 번들 단백질은 대장균 Rop 단백질 또는 이의 동족체이다. 무작위배치된 펩티드의 비융합된 말단은 필요한 건 아니지만 안정화기를 포함할 수 있다. 생성된 융합 단백질은 숙주 세포내 환경에서 무작위배치된 펩티드 자체보다 더욱 안정할 것으로 예상된다. 4-헬릭스 번들 단백질이 N-말단과 융합되는 경우, 무작위배치된 펩티드는 임의적으로 다음에 정의되지 않은 아미노산(예컨대, -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa, -Pro-Pro-Xaa 등)의 존재 또는 부재하에서 펩티드 서열의 C-말단에 하나 이상의 프롤린을 조작함으로써 추가로 안정화될 수 있으며; 또한, 4-헬릭스 번들 단백질이 C-말단과 융합된 경우, 무작위배치된 펩티드는 앞에 정의되지 않은 아미노산(예컨대, Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro-, Xaa-Pro-Pro- 등)의 존재 또는 부재하에서 펩티드 서열의 N-말단에 하나 이상의 프롤린을 조작함으로써 추가로 안정화될 수 있다.

본 발명의 스크리닝 방법의 또 다른 양태에서, 추정 생활성 펩티드는 α-헬릭스 모티프 또는 반대 전하 말단 모티프와 같은 펩티드 안정화 모티프내로의 조작에 의해 안정화된다. 개략도 [(CAG)A(TCAG)]에 따른 올리고누클레오티드의 화학적 합성은 친수성 아미노산 His, Gln, Asn, Lys, Asp 및 Glu의 무작위 혼합물로 구성된 펩티드를 엔코딩하는 올리고누클레오티드를 생성시킨다(표 14 참조). Asp를 제외한 상기 아미노산들은 α-헬릭스 이차 구조 모티프와 가장 자주 결합되어 있으며; 따라서 생성된 올리고누클레오티드는 용액중에서 α-헬릭스를 형성할 것 같은 펩티드를 엔코딩하는 올리고누클레오티드의 조력에 치중되어 있다. 또한, 추정 생활성 펩티드는 무작위배치된 영역의 측면에 한쪽 말단에는 균등 전하(예컨대, 양전하) 영역 및 다른쪽 말단에는 반대 전하(예컨대, 음전하)의 영역을 위치시켜, 반대 전하 말단 모티프를 형성시킴으로써 안정화된다. 이를 위해, 발현 벡터의 무작위배치된 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열 또는 발현 벡터 자체는 바람직하게는 펩티드의 N-말단을 포함하는 다수의 연속적인 균등 하전된 아미노산 및 펩티드의 C-말단을 포함하는 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산을 엔코딩하도록 변형된다. 양전하는 리신, 히스티딘, 아르기닌 또는 이들의 조합물로 구성된 다수의 양전하로 하전된 아미노산에 의해 공급되고; 음전하는 아스파르테이트, 글루타메이트 또는 이들의 조합물로 구성된 다수의 음전하로 하전된 아미노산에 의해 공급된다. 상기 펩티드는 두 가지 반대 하전된 전하 말단들의 이온 상호작용에 의해 안정화되는 것으로 예상된다. 바람직하게는, 추정 생활성 펩티드는 각 말단에 적어도 3개의 하전된 아미노산을 포함하고 있다. 더욱 바람직하게는, 각 말단에 적어도 4개의 하전된 아미노산을 포함하고 있다. 특히 바람직한 양태에서, 더 큰 산성 아미노산 글루타메이트는 더 작은 염기성 아미노산 리신과 쌍을 이루고 있으며, 더 작은 산성 아미노산 아스파르테이트는 더 큰 염기성 아미노산 아르기닌과 쌍을 이루고 있다.

본 명세서에 기술된 생활성 펩티드의 동정을 위한 방법을 사용하여 동정된 신규한 생활성 펩티드들이 또한 본 발명에도 포함됨이 이해될 것이다.

본 발명은 세포내 환경에서 생활성 펩티드의 안정성을 향상시키기 위해 선택된 구조적 특성 또는 모티프를 하나 이상 포함하는 생활성 펩티드를 추가로 제공한다. 본 발명의 세포내 스크리닝 방법의 개발 및 시험 동안에, 놀랍게도 무작위배치된 펩티드 라이브러리로부터 동정된 몇몇 생활성 펩티드들이 특정한 구조적 특성을 공유하고 있음을 발견하였다. 예를 들어, 세포내 스크리닝 방법을 사용하여 동정된 불균형적으로 많은 수의 생활성 펩티드들은 펩티드 말단 또는 그

근처에 하나 이상의 프롤린을 포함하고 있었다. 또한 불균형적인 수는 당분야에 널리 공지된 구조 예측 알고리즘을 사용하여 예측된 바로는 α 헬릭스 또는 β 시트와 같은 이차 구조 또는 소수성 막에 달하는 도메인을 형성하기 위한 서열을 포함하고 있었다. 발현 벡터내의 결실 사건에 기인하여, Rop 단백질과 융합된 무작위배치된 펩티드 서열을 포함하고 있는 생활성 융합 단백질을 또한 동정하였다.

따라서, 본 발명은 생활성 펩티드의 N-말단, 생활성 펩티드의 C-말단 또는 양 말단 모두에 안정화기를 가진 생활성 펩티드를 제공한다. 하나의 말단(즉, N-말단 또는 C-말단)에서만 안정화된 생활성 펩티드에 있어서, 안정화기는 바람직하게는 Rop 단백질과 같은 4-헬릭스 번들 단백질, 프롤린(Pro) 또는 프롤린 디펩티드(Pro-Pro)이다. 본 발명에 따른 하나 이상의 프롤린을 포함하는 안정화기를 가진 임의의 합성 펩티드에 있어서, 프롤린은 바람직하게는 천연 발생 아미노산이며; 대안적으로는, 이것은 프롤린의 합성 유도체, 예컨대 하이드록시프롤린 또는 메틸- 또는 에틸-프롤린 유도체일 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 약어 " Pro" 가 합성 펩티드의 일부분인 안정화기와 관련하여 사용되는 경우, 이것은 천연 발생 프롤린에 추가적으로 프롤린 유도체를 포함하는 의미이다.

양 말단에 안정화된 펩티드는 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 C-말단을 안정화시키는 제 2 안정화기를 포함하며, 제 1 및 제 2 안정화기는 생활성 펩티드를 동정하기 위한 방법과 관련하여 앞서 정의한 바와 같다. 안정화기는 펩티드에 공유결합되어 있다. 본 발명의 생활성 펩티드는 이것이 본 명세서에서 제공되는 바와 같이 하나 이상의 말단 안정화기를 포함하는 경우, 사용하기 전에 임의의 바람직한 수단으로 탐지가능하도록 표지되거나 유도되거나 변형된 생활성 펩티드를 포함한다. 본 발명의 생활성 펩티드의 하나의 바람직한 양태에서, N-말단을 포함하는 제 1 안정화기는 Xaa-Pro-Pro-, Xaa-Pro-, Pro- 또는 Pro-Pro-이고; C-말단을 포함하는 제 2 안정화기는 Pro-Pro-Xaa, -Pro-Xaa, -Pro 또는 -Pro-Pro; 바람직하게는 -Pro-Pro이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 제 1(N-말단) 안정화기는 작고 안정한 단백질, 바람직하게는 Rop 단백질과 같은 4-헬릭스 번들 단백질이고; 제 2(C-말단) 안정화기는 Pro-Pro-Xaa, -Pro-Xaa, -Pro 또는 -Pro-Pro; 바람직하게는 -Pro-Pro이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 제 2(C-말단) 안정화기는 작고 안정한 단백질, 바람직하게는 Rop 단백질과 같은 4-헬릭스 번들 단백질이고, 제 1(N-말단) 안정화기는 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 또는 Xaa-Pro-Pro-이다.

본 발명은 본 명세서에 기술한 바와 같이, 생활성 펩티드의 아미노산 서열 측면에 반대 전하 말단 모티프를 위치시킴으로써 안정화된 펩티드를 추가로 제공한다. 바람직하게는, 생성된 안정화된 펩티드는 적어도 생활성 단백질의 생물학적 활성의 일부분을 보유하고 있다. 안정화된 펩티드는 사용하기 전에 임의의 바람직한 수단으로 탐지가능하도록 표지되거나 유도되거나 변형된 펩티드를 포함한다.

임의의 생활성 펩티드(이에 제한되지 않는)는 N- 및 C-말단중 하나 또는 둘 모두에 안정화기를 결합시키거나, N- 및 C-말단에 반대 하전된 기를 결합시켜 반대 전하 말단 모티프를 형성시킴으로써 본 발명에 따라 안정화될 수 있다. 본 발명에는 임의의 그리고 다양한 항미생물 펩티드, 억제 펩티드, 치료 펩티드 약제 등(예컨대, 표 1 및 표 2에 기재된 것들 및 이에 제한되지 않는)이 포함되며, 이들은 안정화기, 예컨대 N-말단에 Rop 단백질, 프롤린(Pro-), 프롤린-프롤린 디펩티드(Pro-Pro-), Xaa-Pro- 디펩티드 또는 Xaa-Pro-Pro- 트리펩티드와 같은 4-헬릭스 번들 단백질, 및/또는 C-말단에 Rop 단백질, 프롤린(-Pro) 또는 프롤린-프롤린 디펩티드(-Pro-Pro), Pro-Xaa 디펩티드 또는 Pro-Pro-X 트리펩티드와 같은 4-헬릭스 번들 단백질를 포함하도록 하나의 펩티드 말단 또는 양 펩티드 말단에서 변형되어 있거나; 본 발명에 따른 반대 전하 말단 모티프를 포함하도록 변형되어 있다. 이러한 일면에서 본 발명은 Pro-Pro-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ile-Pro-Pro(SEQ ID NO:3) 및 Glu-Asp-Glu-Asp-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ile-Arg-Lys-Arg-Lys(SEQ ID NO:4)와 같은 펩티드에 의해 예시되며, 여기서 중앙의 9개 아미노산(-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ile-; SEQ ID NO:5)은 앤지오텐신의 서열을 구성한다.

본 발명에 따른 안정화된 생활성 펩티드를 생성시키기 위한 생활성 펩티드의 변형은 유전학 및 펩티드 합성 분야에 널리 공지된 표준 기술에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 펩티드가 처음부터 합성되는 경우, 고체 상태에서의 펩티드 합성과 같이, 하나 이상의 프롤린은 합성 반응 동안 펩티드 사슬의 처음과 끝에 첨가될 수 있다. 재조합적 합성에 있어서, 예를 들어 본 명세서 실시예 III에서 기술하는 바와 같이 프롤린을 엔코딩하는 하나 이상의 코돈은 바라는 대로 서열의 처음 및/또는 끝에 펩티드 코딩 서열내로 삽입될 수 있다. 바람직하게는, N-말단의 프롤린을 엔코딩하는 코돈은 개시 부위 ATG(메티오닌을 엔코딩함) 다음에(즉, 3'에) 삽입된다. 유사한 기술들이 반대 전하 말단 모티프를 가진 생활성 펩티드를 합성하기 위해 사용된다. 공지된 생활성 펩티드가 본 발명에 따른 안정화된 생활성 펩티드를 생성시키기 위해 변형되는 경우, 변형되지 않은 펩티드는 원하는 경우, 변형된 펩티드가 증가된 안정성을 나타내는 것을 확정시키기 위해 상기에서 기술한 바와 같이 프로테아제- 또는 펩티다제-내성 검정에서의 대조군으로서 편리하게 사용될 수 있다.

또한 본 발명은 절단 부위 바로 앞(즉, 생활성 펩티드의 N-말단에 인접한) 또는 절단 부위 바로 다음에(즉, 생활성 펩티드의 C-말단에 인접한) 위치한 안정화된 생활성 펩티드를 포함하는 절단할 수 있는 폴리펩티드를 제공한다. 따라서, 본 발명에 의해 고찰된 바와 같이 생활성 펩티드는 절단할 수 있는 폴리펩티드의 일부분일 수 있다. 절단할 수 있는 폴리펩티드는 시아노겐 브로마이드를 사용함으로써 화학적으로, 또는 효소적으로 절단되어 생활성 펩티드를 생성시킬 수 있다. 생성된 생활성 펩티드는 이의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 이의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함하거나, 상기 기술한 바와 같이 양 말단에 반대 전하 말단 모티프를 포함한다. 절단 부위는 N-말단 안정화기 바로 앞에 위치하거나 C-말단 안정화기 바로 다음에 위치한다. 반대 전하 말단 모티프를 가진 생활성 펩티드의 경우에 있어서, 절단 부위는 제 1 하전된 영역 바로 앞에 위치하거나 제 2 하전된 영역 바로 다음에 위치한다. 절단 부위는 생활성 펩티드를 세포내 표적화 및/또는 활성화가 가능한 형태로 관리할 수 있도록 해준다.

또한, 본 발명의 생활성 펩티드는 절단할 수 없는 N-말단 또는 C-말단 표적화 서열과 융합될 수 있으며, 여기서 표적화 서열은 생활성 펩티드의 표적화된 운반, 예컨대 생활성 펩티드의 세포내 표적화 또는 조직-특이적인 표적화가 가능하도록 해준다. 본 발명의 이러한 일면의 하나의 양태에서, 생활성 펩티드의 자유 말단은 생활성 펩티드, 예컨대 하나 이상의 프롤린을 동정하기 위한 스크리닝 방법과 관련하여 상기 기술한 바와 같이 안정화기를 포함하고 있다. 다른 펩티드 말단을 형성하고 있는 표적화 서열은 필요한 건 아니지만, 표적화 서열의 표적화 기능이 유지되는 한, Rop와 같은 작고 안정한 단백질 또는 이의 말단을 포함하는 하나 이상의 프롤린을 포함한다. 본 발명의 이러한 일면의 또 다른 양태에서, 생활성 펩티드는 상기 기술한 바와 같이 전하 말단 모티프를 포함하고 있으며, 여기서 하나의 하전된 영역은 생활성 펩티드의 자유 말단을 점유하고 있으며, 그 밖의 하전된 영역은 생활성 펩티드의 표적화 서열과 활성 서열사이에 배치되어 있다.

본 발명은 상기 기술한 바와 같이 안정화기를 N-말단, C-말단 또는 양 말단 모두에 공유 결합시켜 안정화된 항미생물 펩티드를 생성시킨 다음, 미생물을 안정화된 항미생물 펩티드에 접촉시키는 것을 포함하는 항미생물 펩티드를 사용하는 방법을 추가로 포함한다. 또한, 본 발명의 이러한 일면에서 사용된 안정화된 항미생물 펩티드는 상기 기술한 바와 같이 반대 하전된 영역을 항미생물 펩티드의 각 말단에 공유 결합시켜 반대 전하 말단 모티프를 형성시킴으로써 만들어진다. 항미생물 펩티드는 상기에 더욱 상세히 기술하는 바와 같이 세균, 바이러스, 원생동물 등과 같은 미생물에 불리하게 영향을 미치는 임의의 생활성 펩티드를 포함하는 것으로서 폭넓게 이해되고 있다. 항미생물 펩티드의 예는 미생물의 성장을 억제시키는 억제 펩티드이다. 항미생물 펩티드가 하나의 펩티드 말단에서만 안정화기에 공유결합되는 경우, 상기에 기술된 임의의 안정화기가 이용될 수 있다. 항미생물 펩티드가 양 펩티드 말단 모두에서 안정화기에 공유 결합되는 경우, 상기 방법은 제 1 안정화기를 항미생물 펩티드의 N-말단에 공유 결합시키고 제 2 안정화기를 항미생물 펩티드의 C-말단에 공유 결합시키는 것을 포함하며, 제 1 및 제 2 안정화기는 생활성 펩티드를 동정하기 위한 방법과 관련하여 앞서 정의한 바와 같다. 항미생물 펩티드를 사용하기 위한 방법의 바람직한 양태에서, 하나 이상의 프롤린, 더욱 바람직하게는 프롤린-프롤린 디펩티드는 항미생물 펩티드의 적어도 하나의 말단, 바람직하게는 양 말단 모두에 결합된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, Xaa-Pro- 또는 Xaa-Pro-Pro 서열은 미생물 펩티드의 N-말단에 결합되고/되거나 Pr o - Xaa 또는 Pro - Pro - Xaa 서열은 C - 말단에 결합되어 안정화된 항미생물 펩티드를 생성시킬 수 있다.

따라서 본 발명에 따라 변형된 항미생물 펩티드는 변형되지 않은 항미생물 펩티드에 비해 세포내 환경에서의 안정성을 향상시켰다. 앞서 언급한 바와 같이, 변형되지 않은 펩티드는 상기 기술한 바와 같이 프로테아제 - 또는 펩티다제 - 내성 검정에서 대조군으로서 편리하게 사용되어, 원하는 경우, 변형된 펩티드가 증가된 안정성을 나타내는 것을 확정할 수 있다. 또한, 항미생물 펩티드의 항미생물 활성은 바람직하게는 변형된 항미생물 펩티드에 보존되거나 향상되며; 항미생물 펩티드의 항미생물 활성을 감소시키거나 제거시키는 변형은 쉽게 탐지되고 회피된다.

본 발명은 미생물을 안정화된 억제 펩티드와 접촉시키는 것을 포함하여 미생물의 성장을 억제시키기 위한 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 이러한 일면의 한가지 양태에서, 안정화된 억제 펩티드는 N - 말단, C - 말단 또는 둘 모두에 안정화기를 가지고 있다. 바람직하게는, 억제 펩티드는 억제 펩티드의 N - 말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 억제 펩티드의 C - 말단을 포함하는 제 2 안정화기를 가지고 있으며; 제 1 및 제 2 안정화기는 생활성 펩티드를 동정하기 위한 방법과 관련하여 앞서 정의한 바와 같다. 본 발명의 이러한 일면의 또 다른 양태에서, 억제 펩티드는 반대 하전된 영역을 각 말단에 첨가하여 상기 기술한 바와 같이 반대 전하 말단 모티프를 형성시킴으로써 안정화된다.

또한 본 발명에는 본 명세서에 기술한 바와 같이 안정화된 펩티드 약제를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 펩티드 약제를 사용하여 치료할 수 있는 질환에 걸린 환자를 치료하기 위한 방법이 포함된다. 치료적 처리에서 사용하기 위한 펩티드 약제는 널리 공지되어 있다(표 1 참조). 그러나, 이들은 종종 생물학적 시스템내에서 쉽게 분해되며, 이것은 이들의 유효성에 영향을 미친다. 본 방법의 하나의 양태에서, 환자는 선정된 펩티드 약제 및 펩티드 약제의 N - 말단, C - 말단 또는 양 말단 모두에 결합된 안정화기를 포함하는 안정화된 약제를 사용하여 치료된다. 본 방법의 또 다른 양태에서, 환자는 선정된 펩티드 약제 및 반대 하전된 영역을 펩티드 약제의 양 말단에 결합시킴으로써 안정화된 펩티드 약제를 포함하는 안정화된 약제를 사용하여 치료된다. 이로써 펩티드 약제가 단백질가수분해에 대해 안정화되었기 때문에, 상당양의 약제가 환자의 의도된 표적에 도달할 것이다.

하나의 펩티드 말단에서만 안정화기에 공유 결합되어 있는 펩티드 약제를 투여하는 것과 관련되어 있는 방법의 양태에서, 펩티드 말단에 4 - 헬릭스 번들 단백질의 결합이 약제에 대한 유효성을 충분한 양으로 유지하는 경우, 안정화기는 바람직하게는 Rop 단백질과 같은 4 - 헬릭스 번들 단백질이다. 펩티드 약제를 안정화시키기 위해 사용된 군 또는 군들은 상기 정의한 바와 같음이 이해되지만, 이에 제한되지 않는다. 양 펩티드 말단에서 안정화기에 공유 결합된 펩티드 약제의 투여와 관련있는 양태에서, 펩티드 약제는 펩티드 약제의 N - 말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 펩티드 약제의 C - 말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함한다. 따라서, 본 발명의 치료 방법의 또 다른 바람직한 양태에서, 안정화된 펩티드 약제는 펩티드 약제의 한쪽 말단 또는 양 말단에 결합된 하나 이상의 프롤린, 더욱 바람직하게는 프롤린 - 프롤린 디펩티드를 포함한다. 예를 들어, 펩티드 약제는 하나의 말단에서 Rop 단백질의 공유 결합 및 다른 말단에서 프롤린 또는 프롤린 디펩티드에 의해 안정화될 수 있으며; 또 다른 바람직한 양태에서, 펩티드 약제는 N - 말단 및 C - 말단 각각에서 프롤린 디펩티드에 의해 안정화될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 본 치료 방법에 사용된 안정화된 펩티드 약제는 펩티드 약제의 N - 말단에 Xaa - Pro - 또는 Xaa - Pro - Pro - 서열 및/또는 C - 말단에 - Pro - Xaa 또는 - Pro - Pro - Xaa 서열을 포함한다. 임의적으로, 안정화된 펩티드 약제를 투여하기 전에, 치료 방법은 안정화기를 펩티드 약제의 하나의 말단 또는 양 말단에 공유 결합시켜 안정화된 펩티드 약제를 생성시키는 것을 포함하는 단계를 포함할 수 있다.

원하는 경우, 변형되지 않은 펩티드 약제는 상기 기술한 바와 같이 프로테아제 - 또는 펩티다제 - 내성 검정에서 대조군으로써 편리하게 사용되어 안정화된 펩티드가 증가된 안정성을 나타내는 것을 확정할 수 있다. 또한, 펩티드 약제의 치료 효능은 바람직하게는 약정화된 펩티드 약제에 보존되거나 향상되며; 펩티드 약제의 치료 효능을 감소시키거나 제거시키는 변형은 쉽게 탐지되고 회피된다.

본 발명은 4-헬릭스 번들 단백질, 바람직하게는 Rop 단백질, 및 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 추가로 포함한다. 바람직하게는 폴리펩티드는 생활성이고; 더욱 바람직하게는 이것은 생활성 펩티드이다. 본 발명의 융합 단백질은 관심있는 펩티드 또는 단백질의 발현 또는 과잉발현을 위한 당분야에 공지된 임의의 편리한 발현 벡터에 사용될 수 있다. 임의적으로, 절단 부위는 4-헬릭스 번들 단백질 및 폴리펩티드사이에 존재하여 폴리펩티드의 절단, 단리 및 정제를 가능하도록 해준다. 융합 단백질의 하나의 양태에서, 4-헬릭스 번들 단백질은 이의 C-말단에서 폴리펩티드의 N-말단에 공유 결합되어 있으며; 대안적인 양태에서, 4-헬릭스 번들 단백질은 이의 N-말단에서 폴리펩티드의 C-말단에 공유 결합되어 있다. 본 발명의 융합 단백질, 및 핵산 서열이 프로모터와 같은 조절 제어 요소에 작동가능하도록 연결되어 있는 융합 단백질을 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터는 관심있는 임의의 펩티드 또는 단백질을 생성시키거나 과잉생성시키기에 유용하다.

실시예

본 발명은 하기 실시예에 의해 예증된다. 특정 예, 물질, 양 및 방법들이 본 명세서에 설명된 바와 같이 본 발명의 범위와 사상에 따라 폭넓게 해석되어 있음을 이해해야 한다.

실시예 I실시예 I

엄격하게 조절할 수 있는 발현 벡터인 pLAC11, 및 이의 다목적 유도체인 pLAC22 및 pLAC33의 구성 및 특징화

수많은 상이한 발현 벡터들이 대장균 및 관련 세균의 단백질의 생성을 촉진시키기 위해 수년에 걸쳐 개발되어 왔다. 통상적으로 사용된 발현 벡터 대부분은 선정된 유전자를 과잉생성시키기 위한lac제어에 의존하고 있다. 상기 벡터들이 관심있는 유전자 산물의 과잉발현을 가능하도록 해주지만, 이들은lac제어 영역내로 도입된 변화때문에 누출성이 되어 유전자 발현은 하기에 상술된 바와 같이 억제되는 조건하에서 결코 중단될 수 없다. 많은 연구자들은 더욱 보편적인 발현 벡터 pKK223-3[참조 : G. Posfai et al. Gene. 50:63-67 (1986); N. Scrutton et al., Biochem J. 245:875-880 (1987)], pKK233-2[참조 : P. Beremand et al., Arch Biochem Biophys. 256:90-100 (1987); K. Ooki et al., Biochemie. 76:398-403 (1994)], pTrc99A[참조 : S. Ghosh, Protein Expr. Purif. 10: 100-106 (1997); J. Ranie et al., Mol. Biochem. Parasitol. 61:159-169 (1993)] 뿐만 아니라 pET 시리즈[참조 : M. Eren et al., J. Biol. Chem. 264:14874-14879 (1989); G. Godson, Gene 100: 59-64 (1991)]도 이러한 문제점을 가지고 있음을 알게 되었다.

본 예에서 기술하는 발현 벡터인 pLAC11은 더욱 조절가능하도록 디자인되었으며 따라서 억제되는 조건하에서 성장되는 경우 더욱 엄격하게 조절할 수 있다. 이것은 생리학적 실험을 수행하기 위해 클로닝된 유전자를 보다 잘 조절할 수 있도록 해준다. pLAC11은 클로닝된 유전자를 본 유전자의 염색체 복사본으로부터 수득될 수 있는 레벨과 동등한 레벨로 발현시키는 생리학적으로 적합한 연구를 수행하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 발현 벡터를 상기 목적을 수행하기 위해 야생형lac프로모터/오퍼레이터를 사용하여 디자인함으로써 변형시키기 않은 채로, lac 제어 영역 전부를 O3 보조 오퍼레이터의 개시 영역으로부터 O1 오퍼레이터의 말단 영역까지의 사이에 포함시켰다. 모든lac기재 벡터에서와 같이, 본 명세서에 기술된 pLAC11 발현 벡터는 무상 유발물질 IPTG의 존재 또는 부재에 의해 개시되거나 종결될 수 있다. 염색체내의 널 대립형질 및 pLAC11상에 야생형 대립형질의 제 2의 복사본 둘 모두를 포함하고 있는 세균 세포의 실험에 있어서, 억제되는 조건하에서 성장된 세포는 널 표현형을 나타내었지만, 유도되는 조건하에서 성장된 세포는 야생형 표현형을 나타내었다. 따라서 pLAC11 벡터는 분명히 관심있는 유전자가 완전하게 억제되는 조건 또는 완전히 유도되는 조건하에서 성장되도록 해준다. 또한 다른 실험적 요구를 수행하기 위해 pLAC11의 두 가지 다목적 유도체인 pLAC22와 pLAC33을 구성하였다.

벡터 pLAC11, pLAC22 및 pLAC33을 1999년 2월 16일에 아메리칸 타입 컬춰 콜렉션(ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, USA)에 기탁하였고, ATCC 기탁 번호 ATCC 207108호, ATCC 207110호 및 ATCC 207109호를 각각 부여받았다. 그러나 본 명세서에 기재된 설명이 당업자가 본 발명을 완전하게 실행하기에 충분하다고 생각되리라고 이해된다. 또한, 기탁된 양태는 본 발명의 일면중 한가지 예시로서 의도된 것이지, 어떤 방식으

로든 청구의 범위를 제한시키는 것으로서 해석되어서는 안된다.

재료 및 방법

배지.M9 최소 배지(6 g 인산이나트륨, 3 g 인산칼륨, 1g 염화 암모늄, 0.5 g 염화나트륨, 증류수를 1L까지 채움; 가압증기멸균; 1 mL 마그네슘 설페이트(1M) 및 0.1 mL 염화칼슘(1M)을 첨가; 설탕을 최종 농도 0.2%까지 첨가; 비 - 원영양 균주를 위해 필요한 비타민과 아미노산) 및 LB 영양 배지(10 g 트립톤, 5 g 효모 추출문, 10 g 염화나트륨, 1L까지 증류수로 채움; 가압증기멸균)를 밀러(Miller)에 의해 기술된 바와 같이 제조하였다[참조 : J. Miller, " Experiments in molecular genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)]. 항생제 암피실린, 카나마이신, 스트렙토마이신 및 테트라사이클린(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)을 각각 100, 40, 200, 및 20 ug/ml의 최종 농도로 영양 배지중에 사용하였다. 최소 배지중에 사용되는 경우, 테트라사이클린을 10 ug/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 달리 언급하지 않는 한, 5 - 브로모 - 4 - 클로로 - 3 - 인도일 β - D - 갈락토피라노시드 (X - gal)를 40 ug/ml의 최종 농도로 배지중에 첨가하였다. IPTG를 1 mM의 최종 농도로 배지에 첨가하였다.

화학약품 및 시약.증폭된 DNA가 본 연구에서 생성되는 플라스미드를 구성하기 위해 사용되는 경우, PCR 반응을 스트라타진(Stratagene)으로부터의 본래의Pfu중합효소(Cat. No. 600135)를 사용하여 수행하였다. Xgal 및 IPTG를 디아그노스틱 케미칼즈 리미티드(Diagnostic Chemicals Limited)로부터 구입하였다.

세균 균주 및 플라스미드.세균 균주 및 플라스미드를 표 4에 기재하였다. ALS225를 구성하기 위해, ALS224를 ALS216과 메이팅(mating)시키고 스트렙토마이신 내성인 청색 재조합체를 스트렙토마이신, Xgal 및 IPTG가 함유되어 있는 영양 LB 플레이트상에서 선별하였다. ALS226을 구성하기 위해, ALS224를 ALS217과 메이팅시키고 스트렙토마이신 내성이면서 카나마이신 내성인 재조합체를 스트렙토마이신 및 카나마이신이 함유되어 있는 영양 LB 플레이트상에서 선별하였다. ALS515를 구성하기 위해, ALS514를 ALS216과 메이팅시키고 스트렙토마이신 내성인 청색 재조합체를 스트렙토마이신, Xgal 및 IPTG가 함유되어 있는 영양 LB 플레이트상에서 선별하였다. ALS527을 구성하기 위해, ALS524를 ALS224와 메이팅시키고 스트렙토마이신 저항성이면서 테트라사이클린 저항성인 재조합체를 스트렙토마이신 및 테트라사이클린이 함유되어 있는 영양 LB 플레이트상에서 선별하였다. ALS535를 구성하기 위해, ALS533을 ALS498과 메이팅시키고 테트라사이클린 내성 재조합체를 테트라사이클린, 류신 및 티아민(B_1)(Sigma Chemical Company)이 함유되어 있는 최소 M9 글루코오스 플레이트상에서 선별하였다. ALS533을 구성하기 위해, 대장균 균주 K5076으로부터 제조된 P1 용해질[참조 : H. Miller et al., Cell 20: 711 - 719 (1980)]을 사용하여 ALS224를 형질도입시키고 테트라사이클린 내성 형질도입체를 선별하였다.

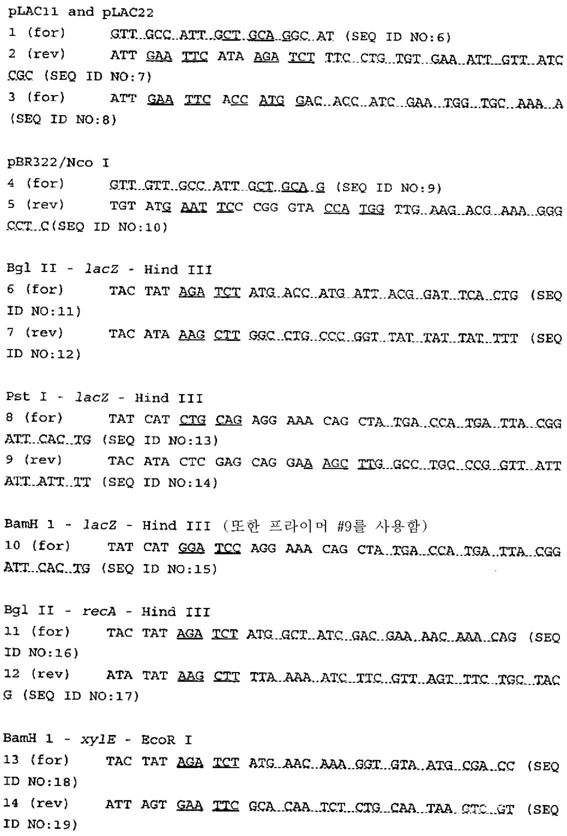
표 4: 실시예 I에 사용된 세균 균주 및 플라스미드

대장균 균주			
실험실 명	원명	인자형	공급원
ALS 216	SE9100	araD139 Δ(lac)U169 thi f1bB5301 deoC7 ptsF25 rpsE/F'lacI ^{q1} Z+$^{+}$ Y+$^{+}$ A+$^{+}$	참조[E. Altman et al., J. Biol. Chem. 265:18148 (1990)]
ALS 217	SE9100.1	araD139 Δ(lac)U169 thi f1bB5301 deoC7 ptsF25 rpsE/F'lacI ^{q1} Z::Tn5Y+ $^{+}$ A+$^{+}$	에스. 이엠알(S. Emr)(샌디애고, 캘리포니아 대학교)
ALS 221	BL21 (DE3)	ompT hsdS(b) (R-M-)gal dcm	참조[F. Studier et al., J. Mol. Biol. 189: 113-130 (1986)]
ALS 224	MC1061	araD139Δ(araABOIC-leu)7679 Δ(lac) X74 galU galK rpsL hsr- $^{-}$ hsm+$^{+}$	참조[M. Casadaban et al., J. Mol. Biol. 138: 179-207 (1980)]
ALS 225		MC1061/F'lacI^{q1} Z+$^{+}$ Y+$^{+}$ A+$^{+}$	본 실시예
ALS 226		MC1601/F'lacI^{qi}Z::Tn5Y+ $^{+}$ A+$^{+}$	본 실시예
ALS 269	CSH27	F^{-} trpA33 thi	참조[J. Miller, " Experiments in molecular genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)]
ALS 413	MG1655	대장균 야생형 F^{-} λ^{-}	참조[M. Guyer et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 135-140 (1980)]
ALS 498	JM101	supE thiΔ(lac-proAB)/F'traD36 proA+ $^{+}$ B+$^{+}$ lacI^{q}Δ(lacZ)M15	참조[C. Yanisch-Perron et al., Gene. 33: 103-119 (1985)]
ALS 514	NM554	MC1061recA13	참조[E. Raleigh et al., Nucl. Acids Res. 16: 1563-1575 (1998)]
ALS 515		MC1061recA13/F'lacI ^{q1} Z+$^{+}$ Y+$^{+}$ A+$^{+}$	본 실시예
ALS 524	XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac/F'proAB lacI ^{q}Δ(lacZ)M15Tn10	스트라타진(Stratagene)(Cat. No. 200268)
ALS 527		MC1061/F'proAB lacI ^{q}Δ(lacZ)M15Tn10	본 실시예
ALS 533		MC1061proAB::Tn10	본 실시예
ALS 535		MC1061proAB::Tn10/F'lacI ^{q}Δ(lacZ)M15 proA+$^{+}$ B+$^{+}$	본 실시예
ALS 598	CAG18615	zjb-3179::Tn10dKan 람다-rph- 1	참조[M. Singer et al., Microbiol. Rev. 53: 1-24 (1989)]

플라스미드		
플라스미드명	관련 특징	공급원
pBH20	야생형lac프로모터/오퍼레이터, Amp^R, Tet^R, colE1 레플리콘	참조[K. Itakura et al., Science. 198:1056 - 1063 (1977)]
pBR322	Amp^R, Tet^R, colE1 레플리콘	참조[F. Bolivar et al., Gene. 2:95 - 113 (1977)]
pET - 21(+)	T7 프로모터/lac오퍼레이터, lacI^q, Amp^R, colE1 레플리콘	노바젠(Novgen)(Cat No. 69770 - 1)
pGE226	야생형recA유전자, Amp^R	참조[J. Weisemann, et al., J. Bacteriol. 163:748 - 755 (1985)]
pKK223 - 3	tac프로모터/오퍼레이터, Amp^R, colE1 레플리콘	참조[J. Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6929 - 6933 (1984)]
pKK233 - 2	trc프로모터/오퍼레이터, Amp^R, colE1 레플리콘	참조[E. Amann et al., Gene. 40:183 - 190 (1985)]
pLysE	T7 라이소자임, Cam^R, P15A 레플리콘	참조[F. Studier, J. Mol. Biol. 219:37 - 44 (1991)]
pLysS	T7 라이소자임, Cam^R, P15A 레플리콘	참조[F. Studier, J. Mol. Biol. 219:37 - 44 (1991)]
pMS421	야생형lac프로모터/오퍼레이터,lacI^q, Strep^R, Spec^R, SC101 레플리콘	참조[D. Gra Ĩ a et al., Genetics. 120:319 - 327 (1988)]
pTer7	야생형lacZ코딩 영역, Amp^R	알. 영(R. Young)(텍사스 에이앤드엠 대학교)
pTrc99A	trc프로모터/오퍼레이터,lacI^q, Amp^R, colE1 레플리콘	참조[E. Amann et al., Gene. 69:301 - 315 (1988)]
pUC8	lac프로모터/오퍼레이터, Amp^R, colE1 레플리콘	참조[J. Vieira et al., Gene, 19:259 - 268 (1982)]
pXE60	야생형 TOL pWWOxylE유전자, Amp^R	제이. 웨스트펠링(J. Westpheling)(조지아 대학교)

pLAC11, pLAC22 및 pLAC33 발현 벡터의 구성.pLAC11을 구성하기 위해, 프라이머 #1 및 #2(표 5 참조)를 사용하여 야생형lac오페론을 포함하고 있는 플라스미드 pBH20으로부터의 952 염기쌍(bp) 단편을 PCR 증폭시켰다. 프라이머 #2는 두 개의 상이한 염기쌍 돌연변이를 샤인 달가노 부위와lacZ의 ATG 개시 부위사이의 7개 염기 스페이서내로 도입시켜 이를 AACAGCT에서 AAGATCT로 변환시킴으로써 샤인 달가노와lacZ유전자의 개시 코돈사이에 Bgl II 부위를 배치시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Pst I 및 EcoR I을 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 플라스미드 pBR322ΔAvaI으로부터의 3614 bp 단편내로 연결시켰다. pBR322ΔAvaI을 구성하기 위해, pBR322를 AvaI을 사용하여 분해시키고, 클레나우(Klenow)를 사용하여 메운 다음 재연결시켰다. pLAC22를 구성하기 위해, 1291 bp Nco I. EcoR I 단편을 pLAC21로부터 겔 단리시키고 pBR322/NcoI으로부터 겔 단리시킨 4361 bp Nco I. EcoR I 단편에 연결시켰다. pLAC21을 구성하기 위해, 프라이머 #2 및 #3(표 5 참조)을 사용하여 야생형lac오페론 뿐만 아니라lacIq리프레서를 포함하고 있는 플라스미드 pMS421로부터의 1310 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, EcoR I을 사용하여 분해시킨 다음, EcoR I을 사용하여 분해시켜 놓은 pBR322내로 연결시켰다. pBR322/Nco I을 구성하기 위해, 프라이머 #4 및 #5(표 5 참조)를 사용하여 플라스미드 pBR322로부터의 788 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Pst I 및 EcoR I을 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 플라스미드 pBR322로부터의 3606 bp 단편내로 연결시켰다. 또한 pBR322/Nco I 벡터는 새로운 Nco I 부위에 추가적으로 추가된 Kpn I 및 Sma I 부위를 포함하고 있다. pLAC33을 구성하기 위해, 2778 bp 단편을 BsaB I 및 Bsa I을 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC12로부터 겔 단리시키고 Afl III를 사용하여 분해시켜 놓은 pUC8으로부터의 960 bp 단편에 연결시키고, 클레나우를 사용하여 메운 다음, Bsa I을 사용하여 분해시켰다. pLAC12를 구성하기 위해, 1310 bp Pst I, BamH I 단편을 pLAC11로부터 겔 단리시키고 pBR322로부터 겔 단리시킨 3232 bp Pst I, BamH I 단편에 연결시켰다.

표 5. 실시예 1에 기술한 여러 플라스미드의 구성에 사용된 DNA 단편들을 PCR 증폭시키기 위해 사용된 프라이머들



pLAC11 and pLAC22
1 (for) GTT GCC ATT GCT GCA GGC AT (SEQ ID NO:6)
2 (rev) ATT GAA TTC ATA AGA TCT TTC CTG TGT GAA ATT GTT ATC
CGC (SEQ ID NO:7)
3 (for) ATT GAA TTC ACC ATG GAC ACC ATC GAA TGG TGC AAA A
(SEQ ID NO:8)

pBR322/Nco I
4 (for) GTT GTT GCC ATT GCT GCA G (SEQ ID NO:9)
5 (rev) TGT ATG AAT TCC CGG GTA CCA TGG TTG AAG ACG AAA GGG
CCT C(SEQ ID NO:10)

Bgl II - *lacZ* - Hind III
6 (for) TAC TAT AGA TCT ATG ACC ATG ATT ACG GAT TCA CTG (SEQ
ID NO:11)
7 (rev) TAC ATA AAG CTT GGC CTG CCC GGT TAT TAT TAT TTT (SEQ
ID NO:12)

Pst I - *lacZ* - Hind III
8 (for) TAT CAT CTG CAG AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGG
ATT CAC TG (SEQ ID NO:13)
9 (rev) TAC ATA CTC GAG CAG GAA AGC TTG GCC TGC CCG GTT ATT
ATT ATT TT (SEQ ID NO:14)

BamH 1 - *lacZ* - Hind III (또한 프라이머 #9를 사용함)
10 (for) TAT CAT GGA TCC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGG
ATT CAC TG (SEQ ID NO:15)

Bgl II - *recA* - Hind III
11 (for) TAC TAT AGA TCT ATG GCT ATC GAC GAA AAC AAA CAG (SEQ
ID NO:16)
12 (rev) ATA TAT AAG CTT TTA AAA ATC TTC GTT AGT TTC TGC TAC
G (SEQ ID NO:17)

BamH 1 - *xylE* - EcoR I
13 (for) TAC TAT AGA TCT ATG AAC AAA GGT GTA ATG CGA CC (SEQ
ID NO:18)
14 (rev) ATT AGT GAA TTC GCA CAA TCT CTG CAA TAA GTC GT (SEQ
ID NO:19)

표 5에서 DNA 표적 주형과 상동성인 프라이머들의 영역들을 점선의 밑줄을 사용하여 표시한 반면, 적절한 제한 부위는 직선의 밑줄을 사용하여 표시하였다. 모든 프라이머들을 5'→3' 방향으로 기재하였다.

pLAC11, pLAC22 및 pLAC33 발현 벡터에 대한 DNA 서열의 작성.pLAC11, pLAC22 및 pLAC33 벡터에 포함되어 있는 DNA 전부를 서열분석하였다.

4547 bp인 pLAC11 벡터에 대한 서열은 다음과 같이 작성될 수 있다: bp 1-15는 프라이머 #2(표 5 참조)로부터의 AGATCTTATGAATTC(SEQ ID NO:20)이고; bp 16-1434는 pBR322(GenBank 수탁번호 #J01749)로부터의 bp 4-1422이고; bp 1435-1442는 pBR322ΔAvaI의 Ava I 부위에서의 메움에 의해 초래된 TCGGTCGG이고; bp 2443-4375는 pBR322(GenBank 수탁번호 #J01749)로부터의 bp 1427-4359이고; bp 4376-4547은 야생형 대장균 lac오페론(GenBank 수탁번호 #J01636)으로부터의 bp 1106-1277이다.

5652 bp인 pLAC22 벡터에 대한 서열을 다음과 같이 작성될 수 있다: bp 1-15는 프라이머 #2(표 5 참조)로부터의 AGATCTTATGAATTC(SEQ ID NO:21)이고; bp 16-4370은 pBR322(GenBank 수탁번호 #J01749)로부터의 bp 4-4358이고; bp 4371-4376은 pBR322/Nco I로부터의 Nco I 부위인 CCATGG이고; bp 4377-5652는 야생형 대장균lac오페론(GenBank 수탁번호 #J01636)으로부터의 bp 2-1277이며, 단, pLAC22 서열의 bp #4391 또는 야생형 대장균lac오페론 서열로부터의 bp #16을 " C" 에서 " T" 로 변화시켜 lacI ^{q}돌연변이의 존재를 반영시켰다[참조 : J. Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6929-6933 (1984)].

3742 bp인 pLAC33 벡터에 대한 서열은 다음과 같이 작성될 수 있다: bp 1 - 15는 프라이머 #2(표 5 참조)로부터의 AGATCTTATGAATTC(SEQ ID NO:22)이고; bp 16 - 1684는 pBR322(GenBank 수탁번호 #J01749)로부터의 bp 4 - 1672이고; bp 1685 - 2638은 pUC8(GenBank 수탁번호 #L09132)로부터의 bp 786 - 1739이고; bp 2639 - 3570은 pBR322(GenBank 수탁번호 #J01749)로부터의 bp 3428 - 4359이고; bp 3571 - 3742는 야생형 대장균lac오페론(GenBank 수탁번호 #J01636)으로부터의 bp 1106 - 1277이다. 상기 벡터들에 대한 지도에서, ori를 발바스[참조 : P. Balbás et al., Gene. 50:3 - 40 (1986)]의 방법에 따라 동정한 반면lacPO는 뮬러 - 힐[참조 : B. Müller - Hill,ThelaclacOperon: A Short History of a Genetic Paradigm, Walter de Gruyter, Berlin, Germany (1996)]의 방법에 따라 O3 보조 오퍼레이터를 가진 개시 부위 및 O1 오퍼레이터를 가진 종결 부위를 표시하였다.

pLAC11 - , pLAC22 - , pLAC33 - , pKK233 - 3 - , pKK233 - 2 - , pTrc99A - 및 pET - 21(+)lacZlacZ구성물의 구성.pLAC11 - lacZ, pLAC22 - lacZ및 pLAC33 - lacZ을 구성하기 위해, 프라이머 #6 및 #7(도 5 참조)을 사용하여 야생형lacZ유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pTer7로부터의 3115 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Bgl II 및 Hind III를 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11, pLAC22 또는 pLAC33내로 연결시켰다. pKK233 - 3 - lacZ및 pKK233 - 2 - lacZ을 구성하기 위해, 프라이머 #8 및 #9(표 5 참조)를 사용하여 플라스미드 pTer7으로부터의 3137 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Pst I 및 Hind III를 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pKK233 - 3 또는 pKK233 - 2 벡터내로 연결시켰다. pTrc99A - lacZ및 pET - 21(+) - lacZ을 구성하기 위해, 프라이머 #9 및 #10(표 5 참조)을 사용하여 플라스미드 pTer7으로부터의 3137 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, BamH I 및 Hind III를 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pTrc99A 또는 pET - 21(+) 벡터내로 연결시켰다.

pLAC11 - recArecA및xylExylE구성물의 구성.pLAC11 - recA를 구성하기 위해, 프라이머 #11 및 #12(표 5 참조)를 사용하여 야생형recA유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pGE226으로부터의 1085 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Bgl II 및 Hind III를 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 벡터내로 연결시켰다. pLAC11 - xylE를 구성하기 위해, 프라이머 #13 및 #14(표 5 참조)를 사용하여 TOL pWWO 플라스미드로부터 단리된 야생형 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)xylE유전자를 포함하고 있는 플라스미드 pXE60으로부터의 970 bp 단편을 PCR 증폭시켰다. 생성된 단편을 겔 단리시키고, Bgl II 및 EcoR I을 사용하여 분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 벡터내로 연결시켰다.

검정.β - 갈락토시다제 검정을 밀러[참조 : J. Miller, " Experiments in molecular genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972)]에 의해 기술된 바와 같이 수행한 반면, 카테콜 2,3 - 디옥시게나제(catO$_2$ase) 검정은 주코우스키(Zukowski) 등[참조 : M. Zukowski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1101 - 1105 (1983)]에 의해 기술된 바와 같이 수행하였다.

결과

pLAC11, pLAC22 및 pLAC33의 구성 및 특성.pLAC11, pLAC22 및 pLAC33내에 포함되어 있는 유일한 제한 부위, 약물 내성, 복제 원점 및 기타 관련 영역들을 표시한 플라스미드 지도를 각각 도 2, 도 3 및 도 4에 제시하였다. pLAC11은 상기 벡터중에서 가장 엄격하게 조절할 수 있도록 디자인되었다. 이것은 pBR322로부터의 ColE1 복제 원점을 사용하며 LacI 리프레서는 에피좀 또는 또 다른 공존성 플라스미드로부터 트랜스로(in trans) 제공된다. pLAC22는 pLAC11과 매우 유사하지만, 이것은$lacI^q$를 포함하고 있으며, 따라서 LacI의 공급원은 트랜스로 제공될 필요가 없다. pLAC33은 pUC8로부터의 돌연변이된 ColE1 복제 원점을 사용하는 pLAC11의 유도체이며, 따라서 pLAC33의 복제수는 pLAC11보다 훨씬 많으며 이는 다른 pUC 벡터들의 복제수와 비슷하다. 상기 세 개의 벡터들의 클로닝 영역이 동일하기 때문에, 클로닝된 유전자들은 본 실험의 발현 요구에 따라 이들 사이에 흔히 뒤섞일 수 있다.

pLAC11, pLAC22 또는 pLAC33내로 클로닝하기 위해, 관심있는 유전자의 적당한 상류 및 하류에 유일한 제한 부위를 도입시키도록 디자인된 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 통상적으로 Bgl II 부위를 ATG 개시 코돈의 바

로 앞에 도입시키고 EcoR I 부위를 종결 코돈 바로 다음에 도입시켰다. 추가적인 6개 염기를 올리고누클레오티드의 양 말단에 첨가하여 증폭된 PCR 생성물의 완전한 분해가 일어나도록 하였다. 증폭 후에, 이중가닥(ds) DNA를 Bgl II 및 EcoR I을 사용하여 제한분해 시키고, 동일한 두 가지 효소를 사용하여 제한분해시켜 놓은 벡터내로 클로닝하였다. 관심있는 유전자가 Bgl II 부위를 포함하고 있는 경우, Bgl II에 적합한 돌출부(overhang)를 생성시키기 때문에, BamH I 또는 Bcl I을 대신 사용할 수 있다. 관심있는 유전자가 EcoR I 부위를 포함하는 경우, (Hind III와 같은) 상기 벡터에서 EcoR I의 부위 하류는 치환될 수 있다.

pLAC11, pLAC22 및 pLAC33과 그 밖의 발현 벡터들의 비교.pLAC11, pLAC22 및 pLAC33 발현 벡터를 어떻게 조절할 수 있는 지를 설명하기 위해, 야생형lacZ유전자를 pLAC11, pLAC22, pLAC33, pKK223-3, pKK233-2, pTrc99A 및 pET-21(+)내로 클로닝하였다. 이들의 억제를 위해 LacI의 외인성 공급원을 필요로 하는 구성물을 ALS225내로 형질전환시킨 반면, 상기 벡터상의 LacI의 공급원이 포함되어 있는 구성물을 ALS224내로 형질전환시켰다. pET-21(+) 구성물을 이들의 발현을 위해 T7 RNA 중합효소를 필요로 하기 때문에 BL21내로 형질전환시켰다. 4개의 클론을 상기 7개 구성물 각각에 대해 선정하였고 억제되는 조건 및 유도되는 조건하에서 β-갈락토시다제 검정을 수행하였다. 밤새 풍부해진 Amp를 풍부한 Amp 글루코오스 또는 풍부한 Amp IPTG 배지중에 1 대 200으로 희석시키고 중간-지수기(OD_{550} =0.5)에 도달할 때까지 성장시켰다. pET-21(+)의 경우에 있어서, T7 라이소자임을 만들어 유용한 T7 중합효소의 양을 더 낮게 만드는 pLysE 및 pLysS 플라스미드를 각각의 구성물내로 형질전환시켰다. 표 6은 상기 연구의 결과를 보여주며 각각의 발현 벡터들에 대해 결정된 유도비가 기재되어 있다. 상기 데어터가 명백히 가리키는 바와 같이, pLAC11이 상기 발현 벡터들중 가장 조절가능하며 이의 유도비는 야생형lac오페론을 사용하여 달성될 수 있는 것에 가깝다. 억제되는 조건하에서 가장 낮은 레벨의 발현을 생성시킨 벡터는 pLAC11인 반면, 유도되는 조건하에서 가장 높은 레벨의 발현을 생성시킨 벡터는 pLAC33이었다.

표 6: 억제되는 조건 또는 유도되는 조건하에서 성장된 상이한 발현 벡터에서 수득된 β-갈락토시다제 레벨

벡터	공급원	관찰된 밀러(Miller) 유닛의 #		
		억제되는 조건	유도되는 조건	유도 배수
pLAC11	F'	19	11209	590X
pLAC22	플라스미드	152	13315	88X
pLAC33	F'	322	23443	73X
pKK223-3	F'	92	11037	120X
pKK233-2	F'	85	10371	122X
pTrc99A	플라스미드	261	21381	82X
pET-21(+)	플라스미드	2929	16803	6X
pET-21(+)/pLysE	플라스미드	4085	19558	5X
pET-21(+)/pLysS	플라스미드	1598	20268	13X

각 벡터로부터 시험된 4개의 클론에 대해 수득된 평균값을 상기 표에 기재하였다. 표준 편차를 제시하지 않았지만 각 경우에 있어서 5% 미만이었다. 유도비를 완전히 유도되는 조건 대 완전히 억제되는 조건에서 관찰된 효소 활성의 비로서 표현하였다. 플라스미드 pLysE는 예상치못한 결과를 생성시켰는데; 억제되는 조건하에서 pET-21(+)로부터 발현되는 lacZ의 양을 낮게 만들것이라고 예상되었지만, 오히려 더 많은 양이 관찰되었다. 결과로서, pLysE 및 pLysS 둘 모두를 제한 맵핑함으로써 이들이 정확함을 확정하였다.

pLAC11 구성물은 엄격하게 조절될 수 있음에 대한 증명.pLAC11을 이것이 발현되지 않는 완전히 억제되는 조건 또는 생리학적으로 적절한 레벨로 발현되는 부분적으로 유도되는 조건하에서 클로닝된 유전자를 연구하는 생리학적 실험을 수행하기 우해 사용될 수 있는 발현 벡터를 연구자에게 제공하기 위해 디자인하였다. 도 5는 어떻게 pLAC11 - lacZ구성물을 사용하여 첨가된 IPTG 유도물질의 다양한 양에 의해 다양한 생리학적 조건하에서 일어나는 염색체적으로 발현되는lacZ을 모방할 수 있는 지를 보여준다.pLAC11 - lacZ을 포함하고 있는 ALS226 세포를 다양한 양의 IPTG를 함유하고 있는 영양 배지중에서 중간 - 지수기까지 성장시킨 다음, β - 갈락토시다제 활성을 검정하였다. 또한 상이한 조건하에서 성장된 야생형lacZ유전자의 단일 염색체 복사본을 가진 균주에 대해 수득된 평균 β - 갈락토시다제 활성을 그래프에 표시하였다.

어떻게 pLAC11을 조절할 수 있는 지를 증명하기 위해,recA유전자를 pLAC11 벡터내로 클로닝하고 염색체에 널recA 대립형질을 포함하고 있는 세포내로 형질전환시켰다. 표 7의 결과가 명백하게 제시하는 바와 같이, 재조합은 비기능 RecA 단백질을 포함하고 있는 숙주 세포내에서 일어날 수 없으며, 따라서 Tn10dKan 트랜스포손을 제공하는 P1 용해질은 높은 빈도로 상기 균주를 Kan^{R}로 형질도입시키기 위해 사용될 수 없다. 또한 pLAC11 - recA구성물을 포함하고 있는recA - $^{-}$ 세포는 유도되는 조건하에서 성장되는 경우에 높은 빈도로 Kan^{R}로 형질도입될 수 있지만 억제되는 조건하에서 성장되는 경우에는 Kan^{R}로 형질도입될 수 없다.

표 7:recArecA널 돌연변이체 균주의 재조합 (-) 표현형은 억제되는 조건하에서 pLAC11 - recArecA(야생형)를 사용함으로써 보존될 수 있다

	억제되는 조건	유도되는 조건
균주	Kan^{R}형질도입체의 수	Kan^{R}형질도입체의 수
ALS225(recA+ $^{+}$)	178,000	182,000
ALS514(recA - $^{-}$)	5	4
ALS515(recA - $^{-}$ pCyt - 3 - recA)	4	174,000

표 7에 제공된 데이터는 상이한 MC1061 유도 균주들이 Tn10dKan 트랜스포손 삽입부분을 포함하고 있는 균주 ALS598로부터 준비된 P1 용해질을 사용하여 형질도입되는 경우, 이들로부터 수득된 Kan ^{R}형질도입체의 수이다. 글루코오스를 최종 농도 0.2%가 되도록 첨가한 영양 배지(억제되는 조건) 또는 IPTG를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 영양 배지(유도되는 조건)를 사용하여 상기 균주 각각으로부터 밤새 준비하였다. 그런 다음, 이들을 최종 농도 10 mM이 되도록 첨가된 CaCl$_2$를 함유하는 동일 배지내로 1 대 10으로 희석하고 2시간 동안 통기시켜 이들을 P1 파지를 사용하는 형질도입을 위한 수용성으로 만들었다. 그런 다음, 세포를 분광광도계적으로 표준화시키고 약 0.1 ml의 부피중의 5 OD$_{550}$ 세포 당량의 분취액을 농축된 P1 용해질 0.1 ml 뿐만 아니라 10 $^{-1}$, 10 $^{-2}$ 또는 10^{-3} 으로 희석시킨 P1 용해질 0.1 ml를 사용하여 형질도입시켰다. 0.1M 나트륨 시트레이트 0.1 ml을 세포/파지 혼합물에 첨가하고 최종 혼합물 0.2 ml을 풍부한 카나마이신 플레이트상에 플레이팅하고 37°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 그런 다음 Kan ^{R}콜로니의 전체 수를 계수하였다. ALS225recA+ $^{+}$ 데이터 지점을 10^{-3} 희석된 파지를 사용한 형질도입으로부터 수득한 반면, ALS514recA - $^{-}$ 데이터 지점은 원심분리된 파지를 사용한 형질도입으로부터 수득하였다. 억제되는 조건하에서 성장된 ALS515 recA $^{-}$ pCyt - 3 - recA에 대한 데이터 지점을 원심분리된 파지를 사용한 형질도입으로부터 수득한 반면, 유도되는 조건하에서 성장된 ALA515 recA $^{-}$ pCyt - 3 - recA에 대한 데이터 지점은 10 $^{-3}$ 희석된 파지를 사용한 형질도입으로부터 수득하였다.

pLAC11의 트랜스 억제를 위한 LacI의 다양한 공급원에 대한 시험.pLAC11이 LacI 리프레서의 외인성 공급원과 함께 사용되도록 디자인되었기 때문에, 연구자들에 의해 통상적으로 사용되고 있는 LacI의 상이한 에피좀 공급원 또는 플라스미드 공급원을 시험하였다. 또한 LacI 공급원중 어떤 것은lacZ유전자를 포함하고 있기때문에, pLAC11 - lacZ이외의 리포터 구성물이 필요하며, 따라서 pLAC11 - xylE구성물을 조작하였다. 표 8은 본 연구의 결과를 보여준다.

시험된 LacI 공급원 모두는 pLAC11로부터의 발현을 억제시키기에 적합하고, 일부는 나머지보다 더 나은 것으로 증명되었다.lacI^{q1} 을 제공하는 F' 또는 세포당 약 6개 복사본으로lacI ^{q}를 제공하는 플라스미드 pMS421을 사용하여 관찰된 기저 레벨의 발현은 3회 수행한 검정 모두에서lacI^{q}를 제공하는 F'를 사용하여 관찰된 기저 레벨의 발현보다 낮았다. 그러나, 불행하게도,xylE유전자는 F'상의lacI ^{q1} 또는 플라스미드상의lacI^{q}가 Lac 리프레서의 공급원으로서 사용되는 경우처럼 높게 유도될 수 없었다.

표 8: Lac 리프레서가 다양한 공급원에 의해 제공되는 경우, pLAC11 - xylExylE구성물에 대해 수득된 카테콜 2,3 - 디옥시게나제 레벨

균주	LacI의 공급원	카테콜 2,3 - 디옥시게나제 활성(밀리유닛/mg)	
		억제되는 조건	유도되는 조건
ALS224	없음	32.7	432.8
ALS535	F'lacI^{q}Δ(lacZ)M15 proA+ $^{+}$B+$^{+}$ Tn10	.3	204.4
ALS527	F'lacI^{q}Δ(lacZ)M15 proA+ $^{+}$B+$^{+}$	.3	243.3
ALS227	pMS421lacI^{q}	.2	90.9
ALS225	F'lacI^{q}Z+$^{+}$ Y+$^{+}$ A+$^{+}$	.2	107.4
ALS226	F'lacI^{q}Z::Tn5Y+ $^{+}$A+$^{+}$	.2	85.1

야생형xylE유전자를 pLAC11 벡터내로 클로닝시킨 다음, 생성된 pLAC11 - xylE구성물을 상기 표에 기재된 각각의 MC1061 유도 균주내로 형질전환시켰다. 밤새 풍부해진 것을 풍부한 글루코오스 또는 풍부한 IPTG 배지중에 1 대 200으로 희석시키고 중간 - 지수기(OD_{550} =0.5)에 도달할 때까지 성장시켰다. 그런 다음 세포 추출물을 제조하고 카테콜 2,3 - 디옥시게나제 검정을 주코우스키(Zukowski) 등[참조 : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1101 - 1105 (1983)]에 의해 기술된 바와 같이 수행하였다. 3가지 상이한 실험에서 수득된 평균값을 상기 표에 기재하였다. 표준 편차를 제시하지는 않았지만 각 경우에 있어서 10% 미만이었다.

토론

통상적으로 사용되는 발현 벡터 대부분은 선정된 유전자를 과잉생성시키기 위해lac제어에 의존하고 있다.lac프로모터/오퍼레이터는 3개의 주요 구성성분의 상호작용에 기인하는 것처럼 기능한다. 첫째, 야생형lac - 10 영역(TATGTT)은 매우 약하다. c - AMP 활성화된 CAP 단백질은 약한 - 10 부위에 RNA 중합효소의 결합을 자극시키는 - 35 영역의 적당한 상류에서 CAP 부위에 결합할 수 있다.lac프로모터의 억제는 매우 적은 양의 c - AMP가 존재하는 것이 유용한 c - AMP 활성화된 CAP 단백질의 양을 낮추기때문에 글루코오스가 주요 탄소원인 경우에 관찰된다. 락토오스 또는 글리세롤과 같은 빈약한 탄소원이 사용되는 경우, c - AMP 레벨은 상승하며 많은 양의 c - AMP 활성화된 CAP 단백질이 유용하게 된다. 따라서lac프로모터의 유도가 일어날 수 있다. 둘째, Lac 리프레서는lac오퍼레이터에 결합한다. Lac 리프레서는 세포의 락토오스 이용의 천연 부산물인 알로락토오스 또는 무상 유발물질인 IPTG에 의해 극복될 수 있다. 세째, lac오퍼레이터는 Lac 리프레서와lac오퍼레이터(O1) 및 보조 오퍼레이터들(lacZ유전자의 코딩 영역의 하류에 위치하고 있는 O2 또는 CAP 결합 부위의 적당한 상류에 위치되어 있는 O3)중 하나와의 상호작용에 기인하는 전사의 개시를 방지시키는 안정한 루프 구조체를 형성할 수 있다.

lac오퍼레이터에 Lac 리프레서의 결합이lac조절의 주요 이펙터이긴 하지만, 다른 두 가지 구성성분이 불필요한 것은 아니다. 그러나, 통상적으로 사용되는lac조절가능한 벡터 대부분은 다른 두 가지 구성성분의 영향을 변화시키는 돌연변이 또는 결실을 포함하고 있다. pKK223 - 3[참조 : J. Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6929 - 6933 (1984)], pKK233 - 2[참조 : E. Amann et al., Gene. 40:183 - 190 (1985)], pTrc99A[참조 : E. Amann et al., Gene. 69:301 - 315 (1998)] 및 pET 패밀리 벡터들[참조 : F. Studier, Method Enzymol. 185:60 - 89 (1990)]은lac오퍼레이터(O1)만을 포함하고 있으며 CAP 결합 부위 뿐만 아니라 O3 보조 오퍼레이터 둘 모두가 결핍되어 있다. pKK223 - 3, pKK233 - 2 및 pTrc99는 약한 TATGTT 부위 대신 강력한 TATAAT 부위를 포함하고 있는trp - 35 영역 및lacUV5 - 10 영역을 포함하고 있는trp - lac하이브리드 프로모터를 사용한다. pET 패밀리 벡터들은 강력한 T7 프로모터를 사용한다. 상기 정보로 보아, 아마도 상기 벡터내로 클로닝된 유전자를 엄격하게 차단시킬 수 없다는 발견은 연구자에게 그리 놀라운 것이 아닐 것이다.

실시예 I에 기술된 본 연구의 목적은 연구자가 생리학적 실험들을 수행하기 위해 이들의 클로닝된 유전자를 보다 잘 조절하도록 해주는 벡터를 디자인하는 것이었다. 본 명세서에 기술된 발현 벡터들은 상기 목적을 수행하기 위해 야생형lac프로모터/오퍼레이터를 사용하여 디자인되었으며 변형시키지 않은 채로, O3 보조 오퍼레이터의 개시 부위로부터 O1 오퍼레이터의 종결 부위사이에 포함되어 있는lac제어 영역 전부를 포함하고 있다. 모든lac기재 벡터들과 함께, pLAC11, pLAC22 및 pLAC33 발현 벡터는 무상 유발물질 IPTG의 존재 또는 부재에 의해 개시 또는 종결될 수 있다.

새로운 벡터인 pLAC11이 보조lacO3 오퍼레이터로부터lacO1 오퍼레이터까지의 야생형lac제어 영역에 의존하고 있기 때문에, 이것은 다른 유용한 발현 벡터들보다 더욱 엄격하게 조절될 수 있다. pKK223 - 3, pKK233 - 2, pTrc99A 및 pET - 21(+)와의 직접 비교 연구에 있어서, 억제되는 조건하에서 가장 낮은 레벨의 발현은 pLAC11 발현 벡터를 사용하여 달성될 수 있다. 완전히 유도되는 조건하에서, pLAC11은 다른 발현 벡터들을 사용하여 달성될 수 있는 레벨과 비슷한lacZ단백질을 발현시켰다. 1000x의 유도비가 야생형lac오페론을 사용하여 관찰되었다. 시험된 모든 발현 벡터들중에서, pLAC11만이 야생형lac오페론을 사용하여 관찰된 것과 비슷한 유도비를 생성시켰다. pLAC11에 의해 달성될 수 있는 조절은 표 6에 표시된 데이터보다도 우수할 수 있음에 주목해야 한다.lacZ이 상기 시험에서 사용되었기 때문에, lacZ유전자의 코딩 영역에 존재하는 보조lacO2 오퍼레이터를 O2 또는 O3 보조 오퍼레이터를 정상적으로 포함하고 있지 않은 pKK223 - 3, pKK233 - 3, pTrc99A 및 pET - 21(+) 벡터에 제공하였다. 표 6의 연구에서 관찰된 이렇게 억제된 상태는 아마 pKK223 - 3, pKK233 - 2, pTrc99A 및 pET - 21(+) 벡터를 사용하여 정상적으로 관찰되는 것보다 낮을 것이다.

상이한 실험 환경하에서 필요로 하는 발현 요구를 만족시키기 위해, pLAC11의 유도체인 두 가지 발현 벡터를 디자인하였다. pLAC22는 벡터상에lacI^{q}를 제공하며 따라서 다른 pLAC11은 이의 억제를 위한 LacI의 외인성 공급원을 필요로 하지 않는다. pLAC33은 pUC8로부터의 돌연변이된 ColE1 레플리콘을 포함하고 있으며 따라서 단백질이 벡터의 복제수의 증가에 기인하여 더욱 높은 레벨로 발현되도록 해준다. 직접적인 비교 연구에서 평가된 모든 발현중에서, 완전히 유도되는 조건하에서 가장 높은 레벨의 단백질 발현은 pLAC33 벡터를 사용함으로써 달성되었다. 클로닝 영역이 pLAC11, pLAC22 및 pLAC33에서 동일하기 때문에, 상기 벡터들중 하나내로 클로닝된 유전자는 실험 환경에 따라 다른 두 가지 벡터중 어느 하나내로 평범하게 서브클로닝될 수 있다. 생리학적 연구에 있어서, pLAC11가 상기 세 가지 벡터들중에서 가장 적합하다. 그러나, 선정된 세균 균주가lacI^{q}또는lacI^{q1} 을 제공하는 F' 또는 호환성 플라스미드에 의해 달성될 수 있는 상승된 레벨의 Lac 리프레서 단백질을 도입시키도록 변형될 수 없는 경우, pLAC22 벡터를 사용할 수 있다. 유전자 생성물의 최대의 과잉발현이 목적이라면, pLAC33 벡터를 사용할 수 있다.

많은 실험들은 생리학적 레벨; 즉, 유전자의 염색체 복사본에 대해 관찰된 발현 레벨과 동등한 발현 레벨로 클로닝된 유전자 생성물의 발현을 필요로 한다. 이것이 임의의 보편적으로 사용되는 발현 벡터를 사용하여 쉽게 달성할 수 있는 것은 아니지만, 이러한 종류의 실험들은 pLAC11 발현 벡터를 사용하여 수행될 수 있다. 다양한 IPTG 농도에 의해, pLAC11 벡터로부터의 발현이 유전자의 염색체 복사본에 대한 상이한 생리학적 조건하에서 일어나는 발현 레벨에 일치하도록 조정할 수 있다. 실제적으로, 본 유전자 및 유전자의 pLAC11 구성물의 염색체 널 돌연변이 둘 모두를 포함하고 있는 균주는 억제되는 조건하에서 널 돌연변이의 생리학적 표현형을 보존하고 있다.

Lac 리프레서의 사용이lac오페론의 조절을 위해lac오페론을 사용하는 임의의 발현 벡터의 필수적인 구성성분이기 때문에, pLAC11 벡터를 억제시키기 위한 LacI의 상이한 공급원의 능력을 또한 조사하였다. 연구자들은 역사적으로 야생형 lacI보다 10배 많은 Lac 리프레서를 만들어내는lacI ^{q}구성물 또는 야생형lacI보다 100배 많은 Lac 리프레서를 만들어 내는lacI^{q1} 구성물을 사용해 왔다[참조 : B. ü ller - Hill, Prog. Biophys. Mol. Biol. 30:227 - 252 (1952)]. pLAC11 구성물의 가장 높은 레벨의 억제는lacI^{q1} 유전자의 약 1개 복사본을 제공하는 F' 또는 lacI ^{q}유전자의 약 6개 복사본을 제공하는 다중복사본 호환성 플라스미드를 사용하여 달성될 수 있다. 그러나, 이러한lacI공급원을 사용하여 달성할 수 있는 유도는lacI^{q}유전자의 약 1개 복사본을 제공하는 F'이 pLAC11 구성물을 억제시키기 위해 사용되는 경우 달성될 수 있는 것보다 현저하게 낮았다. 따라서, 생리학적 연구가 조사의 목적인 경우,lacI ^{q1} 유전자의 약 1개 복사본을 제공하는 F' 또는lacI^{q}유전자의 약 6개 복사본을 제공하는 다중복사본 호환성 플라스미드를 사용하여 pLAC11 벡터를 조절할 수 있다. 그러나, 최대 발현을 원하는 경우,lacI ^{q}유전자의 약 1개 복사본을 제공하는 F'를 사용할 수 있다. 또한, 세균 균주가 발현된 유전자의 연장된 과잉발현에 내성일 수 있고 유전자 생성물의 과잉발현이 원하는 목적인 경우, 유도된느 조건하에서 최대 발현은 세균 균주가 Lac 리프레서의 임의의 공급원을 결핍한 경우에 수득된다.

실시예 II실시예 II

대장균의 성장을 억제하는 신규한 생활성 펩티드를 생성하기 위한 생체내 접근법

20개 아미노산 이하를 포함하는 펩티드를 엔코딩할 수 있는 서열을 포함하는 무작위배치된 올리고누클레오티드 라이브러리를 상기 펩티드가 대장균의 세포질에서 엄격하게 중단되거나 과잉생성될 수 있도록 해주는 pLAC11(실시예 I)내로 클로닝하였다. 무작위배치된 라이브러리를 대부분의 융합 - 파지 기술 연구자들에 의해 사용되는 [NN(G,T)] 또는 [NN(G,C)] 코돈 디자인 대신 [NNN] 코돈 디자인을 사용하여 제조하였다. 세 개의 종결 코돈중 2개를 제거하여 종결 코돈없이 합성될 수 있는 완전한 길이의 펩티드의 양을 증가시키기 위해 [NNN] 코돈 대신 [NN(G,T)] 또는 [NN(G,C)] 코돈이 폭넓게 사용되고 있다[참조 : J. Scott et al., Science 249:386 - 390 (1990); J. Delvin et al., Science 249:404 - 406 (1990); S. Cwirla et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 87:6378 - 6382 (1990)]. 그러나, [NN(G,T)] 및 [NN(G,C)] 올리고누클레오티드 코돈 체계는 다른 점에서는 유용한 코돈의 절반을 제거시키며, 직접적인 결과로서, 생성되는 아미노산의 분포에 치중하고 있다. 또한, [NN(G,T)] 및 [NN(G,C)] 코돈 체계는 고도로 발현되는 유전자의 차별적인 코돈 처리에 철저하게 영향을 미치며 대장균내에 존재하는 풍부한 tRNA에 의해 사용되는 수많은 코돈들을 제거한다[참조 : H. Grosjean et al., Gene. 18:199 - 209 (1982); T. Ikemura, J. Mol. Biol. 151: 389 - 409 (1981)].

본 실시예에서 스크리닝된 20,000개 펩티드중에서, 세포 성장의 21개 억제제가 발견되었는데, 이들은 최소 배지상에서 대장균의 성장을 방지시킬 수 있다. 상위 20개 억제제 펩티드를 억제 강도에 대해 평가하였고, 상위 10개 " 앵커가 없는" 억제제 펩티드의 추정 아미노산 서열을 통상적으로 공유되어 있는 특성 또는 모티프에 대해 검사하였다.

재료 및 방법

배지.본 연구에 사용된 풍부한 LB 및 최소 M9 배지를 실시예 I에서와 같이 제조하였다. 암피실린을 영양 배지중에는 최종 농도 100 ug/ml로 사용하고 최소 배지중에는 최종 농도 50 ug/ml로 사용하였다. IPTG를 최종 농도 1 mM로 배지에 첨가하였다.

화학약품 및 시약.신장 반응을 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)사(社)로부터의 클레나우를 사용하여 수행한 반면, 연결 반응은 라이프 사이언시스(Life Sciences)사로부터의 T4 DNA 리가제를 사용하여 수행하였다. IPTG를 디아그노스틱 케미칼즈 리미티드(Diagnostic Chemicals Limited)사로부터 입수하였다.

세균 균주 및 플라스미드.MC1061/F'lacI^{q1} Z$+^{+}$ Y$+^{+}$ A$+^{+}$ (실시예 I 참조)인 ALS225가 본 실시예에 사용된 대장균 세균 균주이다. MC1061에 대한 인자형은araD139 Δ(araABOIC - leu)7679 Δ(lac)X74 galU galK rpsL hsr - $^{-}$ hsm$+^{+}$ 이다[참조 : M. Casadaban et al., J. Mol. Biol. 138:179 - 207 (1980)]. 고도로 조절할 수 있는 발현 벡터인 pLAC11은 실시예 I에 기술되어 있다.

무작위배치된 펩티드 라이브러리의 생성.93개 염기 올리고누클레오티드 5' TAC TAT AGA TCT ATG (NNN)$_{20}$ TAA TAA GAA TTC TCG ACA 3'(SEQ ID NO:23)(여기서, N은 누클레오티드 A, C, G 또는 T의 등몰 혼합물을 나타낸다)을 트리틸기를 사용하여 합성하였고 이어서 표준 방법을 사용하여 OPC 카트리지로 정제하였다. 93개 염기 올리고누클레오티드의 상보적인 가닥을 18개 염기 올리고누클레오티드 프라이머 5' TGT CGA GAA TTC TTA TTA 3'(SEQ ID NO:24)의 등몰 양을 사용하여 클레나우로 신장/메움 반응시킴으로써 생성시켰다. 신장시킨 후에, 생성된 ds - DNA를 프로메가 DNA 클린 - 업 키트(Promega DNA clean - up kit)를 사용하여 정제하고 EcoR I 및 Bgl II(Promega, Madison, WI)를 사용하여 제한분해시켰다. 분해된 DNA를 프로메가 DNA 클린 - 업 키트를 사용하여 제차 정제하고 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11에 연결시켰다. 생성된 라이브러리를 억제되는 조건(LB, 암피실린 및 0.2%로 첨가된 글루코오스)하에서 전기수용성 ALS225 대장균 세포내로 형질전환시켰다.

억제제 클론을 동정하기 위한 형질전환체의 스크리닝.형질전환체를 스크리닝하여 펩티드가 과잉생성된 경우, 최소 배지상에서 성장할 수 없는 형질전환체를 동정하였다. 본 체계를 사용함으로써 최소 배지상의 형질전화체의 성장을 위해 필수적인 단백질의 생성 또는 기능을 억제하는 펩티드를 과잉생성시키는 임의의 형질전환체 세균 콜로니가 동정될 것이다. 세포상에 더욱 엄격한 성장 요구를 부과시키는 최소 배지상에서의 스크리닝은 라이브러리로부터 잠재적인 억제제의 단리를 촉진시킬 것이다. 철저하게 감소된 성장율에 의해 증명되는 바와 같이 최소 배지에서의 성장이 영양 배지에서의 성장보다 세균 세포상에 더 많은 요구를 부과하는 것은 널리 공지되어 있고; 따라서 세포 성장에 악영향을 미치는 펩티드는 최소 배지상에서 더욱 많이 검출될 것 같다. 스크리닝을 그리드-패칭 기술을 사용하여 수행하였다. 한꺼번에 50개 클론을 정렬된 그리드를 사용하여 영양 억제 플레이트(LB Amp 글루코오스) 및 최소 유도 플레이트(M9 글리세롤 Amp IPTG)상으로패칭시켰다. 성장하지 않는 패치가 발견되었는데, 그 이유는 이들이 추정적으로 발현된 생활성 펩티드에 의해 억제되고 있는 세균을 나타내기 때문이다. 모든 억제제가 적합한 지를 입증하기 위해, 플라스미드 DNA를 각 억제 클론으로부터 만들고(QIA Prep Spin Miniprep kit; Qiagen Cat. No. 27104) 새로운 백그라운드(ALS225 세포)내로 형질전환시킨 다음, 이들이 플레이트상에서 여전히 억제성이고 이들의 억제가 유도물질인 IPTG의 존재에 의존하는 지를 확정하기 위해 검사하였다.

액제 배지에서의 성장율 분석.펩티드의 억제 강도를 억제 클론을 액체 배지에서의 성장율 분석시킴으로써 평가하였다. 성장율 억제를 결정하기 위해, 시험될 펩티드 및 pLAC11을 포함하고 있는 대조 균주 둘 모두의 출발 배양물을 밤새 포화시킨 배양물로부터 약 .01의 초기 OD_{550} 으로 희석하였다. 그런 다음 모든 배양물을 1 mM IPTG를 사용하여 유도시키고 대조 배양물이 약 0.5의 OD_{550} 에 도달할 때까지 OD_{550} 을 판독하였다. 표 9의 가설 데이터는 대조 균주가 약 0.64의 OD_{550} 에 도달하는 경우(약 15시간에), 성장율을 50%로 억제시키는 펩티드를 포함하는 균주가 겨우 약 0.08의 OD_{550} 에 도달할 뿐일 것임을 보여준다. 따라서, 15시간에서 50% 억제된 배양물의 성장(즉, 15시간에서의 OD_{550} 으로서, 이것은 배양물의 소정의 부피에서의 세포수에 대한 비율이다)은 동일 시간 후에 대조 균주의 성장의 겨우 약 12.5%(즉, 0.08/0.64 x 100)이며, 따라서 억제제 펩티드는 배양물의 성장을 87.5%(=100%-12.5%)까지 (종점에서 OD_{550} 에 의해 측정한 바와 같이) 효과적으로 억제시킨 것이다.

표 9: 30%, 50% 및 70%로 성장율을 억제시키는 펩티드로부터의 가설 데이터

시간	pLAC11을 포함하고 있는 대조 배양물에 대한 OD_{550} 판독값	다음 %만큼 성장율을 억제시키는 펩티드를 포함하고 있는 배양물에 대한 OD_{550} 판독값		
		25%	50%	75%
0	.010	.010	.010	.010
2.5	.020	.017	.015	.012
5	.040	.028	.020	.014
7.5	.080	.047	.030	.017
10	.160	.079	.040	.020
12.5	.320	.133	.060	.024
15	.640	.226	.080	.028

예를 도 6에 제시하였는데, 여기서 pLAC11 벡터(대조군), 및 1일 억제제 pPep1 또는 2일 억제제 pPep12(하기 참조)를 포함하고 있는 ALS225 세포를 1 mM로 첨가된 IPTG를 함유하는 최소 M9 글리세롤 배지중에 성장시켰다. 그런 다음, 배양물이 지수기를 지날 때까지 매시간 OD_{550} 을 판독하였다. 성장율을 성장의 지수기내에 단위 시간당 OD_{550} 의 분광 광도적 변화를 측정함으로써 결정하였다. 그런 다음, 성장율의 억제를 대조군으로서 pLAC11를 사용하여 억제제에 대해 계산하였다.

억제제 펩티드 클론의 코딩 영역의 서열분석.정방향 프라이머 5' TCA TTA ATG CAG CTG GCA CG 3'(SEQ ID NO:25) 및 역방향 프라이머 5' TTC ATA CAC GGT GCC TGA CT 3'(SEQ ID NO:26)을 사용하여 그리드-패칭 기술에 의해 동정된 상위 10개 " 앵커가 없는" 억제제 펩티드 클론의 양 가닥을 서열분석하였다. 오차-없는 컨센서스 서열이 상기 두 가지 서열분석 수행으로부터 추정될 수 없는 경우, 본 억제제 펩티드 클론의 양 가닥을 정방향 프라이머 5' TAG CTC ACT CAT TAG GCA CC 3'(SEQ ID NO:27) 및 역방향 프라이머 5' GAT GAC GAT GAG CGC ATT GT 3'(SEQ ID NO:28)을 사용하여 재서열분석하였다. 제 2의 프라이머 세트를 디자인하여 pLAC11 벡터의 제 1의 프라이머 세트의 하류를 결합시켰다.

상위 5개 " 앵커가 없는" 억제제 클론의 안티센스 유도체의 생성.올리고누클레오티드를 합성하였는데, 이는 하나의 주요 누클레오티드 변화를 가진 표 12에 제시한 바와 같이 상위 5개 " 앵커가 없는" 억제제 펩티드에 대해 Bgl II 및 EcoR I 제한 부위사이에 포함되어 있는 DNA 삽입서열을 복제한 것이다. ATG 개시 코돈의 " T" 를 " C" 로 변화시켰으며 이로 인해 생성된 ACG는 개시 코돈으로서 사용될 수 없다. 올리고누클레오티드를 본래의 펩티드 라이브러리를 만들기 위해 사용했던 동일한 18개 염기 올리고누클레오티드 프라이머를 사용하여 신장시켰다. 그런 다음, 생성된 ds - DNA를 제한분해시키고, 이전 단락 " 무작위배치된 펩티드 라이브러리의 생성" 에서 기술한 바와 똑같이 pLAC11내로 클로닝하였다. 사용된 안티센스 올리고누클레오티드는 다음과 같다:

pPep1(안티센스): 5' TAC TAT AGA TCT ACG GTC ACT GAA TTT TGT
GGC TTG TTG GAC CAA CTG CCT TAG TAA TAG TGG AAG GCT GAA
ATT AAT AAG AAT TCT CGA CA 3' (SEQ ID NO: 29);

pPep5(안티센스): 5' TAC TAT AGA TCT ACG TGG CGG GAC TCA TGG
ATT AAG GGT AGG GAC GTG GGG TTT ATG GGT TAA AAT AGT TTG
ATA ATA AGA ATT CTC GAC A 3' (SEQ ID NO: 30)

pPep12(안티센스): 5' TAC TAT AGA TCT ACG AAC GGC CGA ACC AAA
CGA ATC CGG GAC CCA CCA GCC GCC TAA ACA GCT ACC AGC TGT
GGT AAT AAG AAT TCT CGA CA 3' (SEQ ID NO: 31)

pPep13(안티센스): 5' TAC TAT AGA TCT ACG GAC CGT GAA GTG ATG
TGT GCG GCA AAA CAG GAA TGG AAG GAA CGA ACG CCA TAG
GCC GCG TAA TAA GAA TTC TCG ACA 3' (SEQ ID NO: 32)

pPep19(안티센스): 5' TAC TAT AGA TCT ACG AGG GGC GCC AAC TAA
GGG GGG GGG AAG GTA TTT GTC CCG TGC ATA ATC TCG GGT GTT
GTC TAA TAA GAA TTC TCG ACA 3' (SEQ ID NO: 33)

결과

라이브러리로부터의 억제제 펩티드의 동정 및 특징화.약 20,000개 잠재적인 후보를 상기 기술한 바와 같이 스크리닝하였고, 21개 IPTG - 의존성 성장 억제제를 단리하였다. 그리드 패칭 기술을 사용하여 이렇게 동정된 억제제 모두는 24시간에 대장균 세균의 성장을 방지시킬 수 있었으며, 21개 억제제중 3개는 48시간에 대장균 세균의 성장을 방지시킬 수 있었다. 상기 3개 억제제를 " 2일" 억제제로서 분류하였고; 나머지 18개를 " 1일" 억제제로서 분류하였다.

후보 펩티드 억제제에 대한 성장율 분석으로부터의 결과들을 표 10에 제시하였다. 성장율의 억제 %를 유도된 펩티드를 포함하고 있는 세포의 성장율과 유도된 pLAC11 벡터를 포함하고 있는 세포의 성장율을 비교함으로써 계산하였다. 3회 독립적인 결정의 평균값을 제시하였다.

표 10: 세포 성장을 억제시키는 억제제 펩티드의 능력

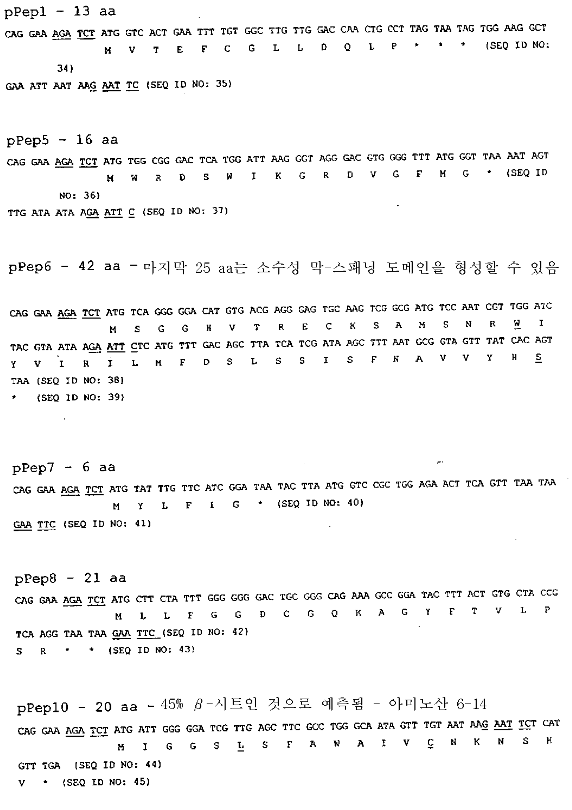
억제제	타입	억제(%)	억제제	타입	억제(%)
pLAC11(대조군)	- - -	0	pPep11	1일	22
pPep1	1일	25	pPep12	2일	82
pPep2	1일	23	pPep13	1일	28
pPep3	2일	80	pPep14	2일	71
pPep4	1일	21	pPep15	1일	23
pPep5	1일	24	pPep16	1일	24
pPep6	1일	27	pPep17	1일	28
pPep7	1일	26	pPep18	1일	24
pPep8	1일	29	pPep19	1일	29
pPep9	1일	22	pPep20	1일	19
pPep10	1일	24	pPep21	1일	23

시험된 21 펩티드중에서, 1일 억제제 펩티드들은 약 25%의 레벨로 세균 성장율을 억제시킨 반면, 2일 억제제 펩티드들은 75%를 넘는 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 표 9의 가설 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 성장율을 25%로 억제시킨 1일 억제제는 대조 균주가 0.64의 OD_{550} 에 도달하였을 때, 겨우 0.226의 OD_{550} 에 도달하였다. 이 시점에서, 1일 억제제에 의해 억제된 배양물의 성장(종점 OD_{550} 에 의해 측정된 바와 같이)은 동일 지점에서 대조 균주의 성장의 겨우 35.3%일 것이며; 따라서 억제제 펩티드는 배양물의 성장을 64.7%까지 효과적으로 억제시킬 것이다. 성장율을 75%로 억제시킨 2일 억제제는 대조 균주가 0.64의 OD_{550} 에 도달하였을 때, 겨우 0.028의 OD_{550} 에 도달하였다. 따라서 2일 억제제에 의해 억제된 배양물의 성장은 이 지점에서 대조 균주의 성장의 겨우 4.4%일 것이며, 억제제 펩티드는 배양물의 성장을 95.6%까지 효과적으로 억제시킬 것이다. 이러한 계산들은 2일 억제제가 48시간 내내 플레이트상의 세균의 성장을 방지시키는 반면, 1일 억제제는 단지 24시간 동안 플레이트상의 세균의 성장을 방지시킨다는 관찰과 일치한다.

21개 후보 모두를 제한 분석법을 사용하여 검사함으로써 이들이 예상한 대로 66 bp 삽입서열을 포함하고 있는 지를 결정하였다. 이들 중 대부분은 포함하고 있었지만, 2일 억제제 pPep3와 pPep14는 거대한 결실부위를 포함하는 것으로 밝혀졌다. 상기 클론들의 서열 분석에 의해 상기 결실이 억제제 펩티드의 카복시-말단이 짧은 63 아미노산 Rop 단백질의 아미노-말단과의 융합을 초래하였음이 밝혀졌다. ColE1 레플리콘의 일부분인rop유전자는 pLAC11 벡터내로 삽입되어 있는 올리고누클레오티드 라이브러리로부터의 하류에 위치되어 있다.

상위 10개 " 앵커가 없는" 억제제 펩티드의 서열 분석.상위 10개 " 앵커가 없는" 억제제 펩티드(즉, 두 개의 Rop 융합 펩티드가 제외된)를 엔코딩하는 서열을 포함하는 DNA 단편을 서열분석하였고, 이들의 코딩 영역을 표 11에 제시하였다. 종결 코돈을 별표시하였고, 삽입 영역을 위한 경계표시 Bgl II 및 EcoR I 제한 부위를 밑줄표시하였다. 이렇게 구성되어 있는 억제제로부터의 올리고누클레오티드의 말단은 상기 제한 부위를 포함하고 있기 때문에, 라이브러리가 올리고누클레오티드 생성을 최대화하기 위해 제조되는 경우, 겔 단리시키지 않았다. 이러한 이유로, 몇가지 억제 클론은 올리고누클레오티드의 무작위배치된 부분에 1개(n-1) 또는 2개(n-2) 염기 결실을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다.

표 11. 상위 10개 억제 클론으로부터의 삽입 영역의 서열 분석 및 이들이 엔코딩하는 것으로 예측되는 펩티드



pPep1 - 13 aa

```
CAG GAA AGA TCT ATG GTC ACT GAA TTT TGT GGC TTG TTG GAC CAA CTG CCT TAG TAA TAG TGG AAG GCT
                M   V   T   E   F   C   G   L   L   D   Q   L   P   *   *   *   (SEQ ID NO:
    34)
GAA ATT AAT AAG AAT TC (SEQ ID NO: 35)
```

pPep5 - 16 aa

```
CAG GAA AGA TCT ATG TGG CGG GAC TCA TGG ATT AAG GGT AGG GAC GTG GGG TTT ATG GGT TAA AAT AGT
                M   W   R   D   S   W   I   K   G   R   D   V   G   F   M   G   *  (SEQ ID
    NO: 36)
TTG ATA ATA AGA ATT C (SEQ ID NO: 37)
```

pPep6 - 42 aa - 마지막 25 aa는 소수성 막-스패닝 도메인을 형성할 수 있음

```
CAG GAA AGA TCT ATG TCA GGG GGA CAT GTG ACG AGG GAG TGC AAG TCG GCG ATG TCC AAT CGT TGG ATC
                M   S   G   G   H   V   T   R   E   C   K   S   A   M   S   N   R   W   I
TAC GTA ATA AGA ATT CTC ATG TTT GAC AGC TTA TCA TCG ATA AGC TTT AAT GCG GTA GTT TAT CAC AGT
Y   V   I   R   I   L   M   F   D   S   L   S   S   I   S   F   N   A   V   V   Y   H   S
TAA (SEQ ID NO: 38)
*   (SEQ ID NO: 39)
```

pPep7 - 6 aa

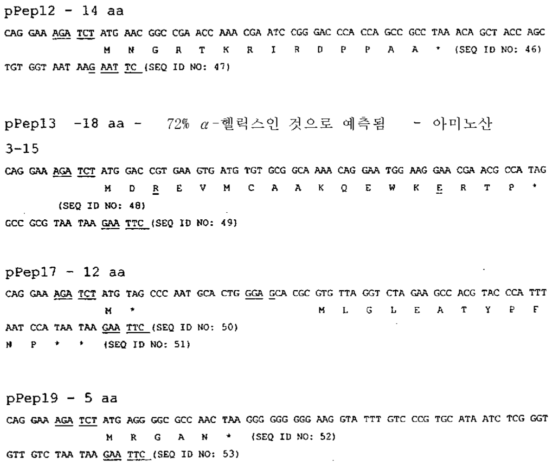
```
CAG GAA AGA TCT ATG TAT TTG TTC ATC GGA TAA TAC TTA ATG GTC CGC TGG AGA ACT TCA GTT TAA TAA
                M   Y   L   F   I   G   *  (SEQ ID NO: 40)
GAA TTC (SEQ ID NO: 41)
```

pPep8 - 21 aa

```
CAG GAA AGA TCT ATG CTT CTA TTT GGG GGG GAC TGC GGG CAG AAA GCC GGA TAC TTT ACT GTG CTA CCG
                M   L   L   F   G   G   D   C   G   Q   K   A   G   Y   F   T   V   L   P
TCA AGG TAA TAA GAA TTC (SEQ ID NO: 42)
S   R   *   *  (SEQ ID NO: 43)
```

pPep10 - 20 aa - 45% β-시트인 것으로 예측됨 - 아미노산 6-14

```
CAG GAA AGA TCT ATG ATT GGG GGA TCG TTG AGC TTC GCC TGG GCA ATA GTT TGT AAT AAG AAT TCT CAT
                M   I   G   G   S   L   S   F   A   W   A   I   V   C   N   K   N   S   H
GTT TGA  (SEQ ID NO: 44)
V   *  (SEQ ID NO: 45)
```



```
pPep12 - 14 aa
CAG GAA AGA TCT ATG AAC GGC CGA ACC AAA CGA ATC CGG GAC CCA CCA GCC GCC TAA ACA GCT ACC AGC
                 M   N   G   R   T   K   R   I   R   D   P   P   A   A   *  (SEQ ID NO: 46)
TGT GGT AAT AAG AAT TC (SEQ ID NO: 47)

pPep13  -18 aa -   72% α-헬릭스인 것으로 예측됨   - 아미노산
3-15
CAG GAA AGA TCT ATG GAC CGT GAA GTG ATG TGT GCG GCA AAA CAG GAA TGG AAG GAA CGA ACG CCA TAG
                 M   D   R   E   V   M   C   A   A   K   Q   E   W   K   E   R   T   P   *
       (SEQ ID NO: 48)
GCC GCG TAA TAA GAA TTC (SEQ ID NO: 49)

pPep17 - 12 aa
CAG GAA AGA TCT ATG TAG CCC AAT GCA CTG GGA GCA CGC GTG TTA GGT CTA GAA GCC ACG TAC CCA TTT
                 M   *                               M   L   G   L   E   A   T   Y   P   F
AAT CCA TAA TAA GAA TTC (SEQ ID NO: 50)
 N   P   *   *   (SEQ ID NO: 51)

pPep19 - 5 aa
CAG GAA AGA TCT ATG AGG GGC GCC AAC TAA GGG GGG GGG AAG GTA TTT GTC CCG TGC ATA ATC TCG GGT
                 M   R   G   A   N   *   (SEQ ID NO: 52)
GTT GTC TAA TAA GAA TTC (SEQ ID NO: 53)
```

상위 10개 억제제중 8개는 올리고누클레오티드내로 조작된 이중 TAA TAA 종결 부위전에 종결되는 펩티드를 엔코딩하는 것으로 예측되었다. 올리고누클레오티드의 무작위배치된 부분내에 결실부위를 포함하고 있는 두 가지 억제제인 pPep6 및 pPep10은 EcoR I 부위를 넘어서 종결되었다. 억제제중 하나인 pPep17은 ATG 개시 코돈 바로 이후에 종결 신호를 포함하고 있다. 그러나, 이곳으로부터 바로 인접한 하류는 샤인 달가노 부위 및 개시 코돈으로서 기능하는 GTG 코돈이다. 흥미롭게도, Rop와 같은 몇몇 단백질의 개시 부위는 pPep17 펩티드에 대해 제안된 것과 동일하다[참조 : G. Cesareni et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:6313-6317 (1982)]. 이중 TAA TAA 종결 부위에서 또는 이전에서 종결 신호가 발생하는 8개 펩티드에 대한 평균 길이 및 중간 길이는 13개 아미노산이었다.

억제제 펩티드의 예측된 코딩 영역의 특징은 매우 흥미로운 것으로 증명되었다. 상위 10개 펩티드중 3개인 pPep1, pPep13 및 pPep17은 이들의 마지막(C-말단) 아미노산으로서 프로린 잔기를 포함하고 있었다. 또한, 펩티드중 하나인 pPep12는 n-2 및 n-3 위치에서 C-말단 근처에 2개의 프롤린 잔기를 포함하고 있었다. 따라서, 프롤린 잔기의 위치는 몇 가지 억제 펩티드의 말단 또는 말단 근처에 치중되어 존재하는 것 같다. 이차 구조 분석을 통해 10개 펩티드중 3개가 잠재적으로 매우 안정한 구조를 형성할 수 있는 공지된 모티프를 포함하고 있음을 예측하였다. C-말단 프롤린을 포함하고 있는 펩티드인 pPep13는 72% α-헬릭스일 것으로 예측되고, pPep10은 45% β-시트일 것으로 예측되며, pPep6은 소수성 막 스패닝 도메인을 형성할 것으로 예측된다.

억제 클론이 안티센스로서 기능하지 않음에 대한 입증.억제 클론의 생활성이 엔코딩된 펩티드에 의해서라기 보다 안티센스 RNA 또는 DNA(따라서 숙두 DNA 또는 RNA와 하이브리드화되는)로서의 이들의 기능으로부터 초래될 가능성을 배제시키기 위해, 표 10으로부터의 상위 5개 억제제에 대한 Bgl II 및 EcoR I 부위사이의 삽입 영역을 ATG 개시 코돈을 ACG 코돈으로 변형시켜 개시 부위를 없애버린 올리고누클레오티드를 사용하여 pLAC11내로 재클로닝시켰다. 5개 경우 모두에서 새로운 구성물은 더 이상 억제성이 아니었으며(표 12 참조), 따라서 이것이 억제를 일으키는 엔코딩된 펩티드이며 DNA 또는 전사된 mRNA가 아니라는 것을 확정하였다.

표 12: 상위 5개 " 앵커가 없는" 억제 펩티드에 대한 안티센스 시험

억제 펩티드	pLAC11 대조군에대한 억제(%)	안티센스 구성물	pLAC11 대조군에대한 억제(%)
pPep1	26	pPep1-안티	0
pPep5	23	pPep5-안티	0
pPep12	80	pPep12-안티	0
pPep13	28	pPep13-안티	0
pPep19	29	pPep19-안티	0

유도된 억제제 또는 안티센스 구성물을 포함하는 세포에 대한 성장율을 결정한 다음 억제 %를 유도된 pCyt-3 벡터를 포함하는 세포의 성장율에 대한 상기 값들을 비교함으로써 계산하였다.

토론

엄격하게 조절할 수 있는 pLAC11 발현 벡터의 사용은 신규한 생활성 펩티드의 동정을 가능하도록 해주었다. 본 실시예에 기술된 상기 시스템을 사용하여 동정된 생활성 펩티드는 최소 배지상에서 숙주 생물(대장균)의 성장을 억제한다. 또한, 이렇게 동정된 생활성 펩티드는 선별 방법 자체의 이유로 인해, 숙주의 세포 환경에서 안정하다. 숙주 세포에서 불안정한 펩티드는 생활성이든 아니든간에, 분해될 것이며; 결과적으로, 짧은 반감기를 가지는 것은 선택될 수 있는 내기의 부분이 아니다. 따라서 상기 선별 시스템은 필수적으로 단일 실험에서 신규한 안정한 분해-내성인 생활성 펩티드를 동정하고 특징화할 수 있도록 해준다.

본 실시예에서 동정된 억제 펩티드의 안정성은 어떤 공유된 구조적 특성의 존재와 관련될 수 있다. 예를 들어, 상위 10개 억제 " 앵커가 없는" (즉, 비-Rop 융합) 펩티드중 3개는 이들의 마지막 아미노산으로서 프롤린 잔기를 포함하고 있었다. 유전자 코드에 따라, 본 실시예에 사용되는 것과 같이 무작위로 생성된 올리고누클레오티드의 소정의 위치에 프롤린이 엔코딩될 기회는 겨우 6%이지만, 상위 10개 억제 펩티드간의 C-말단 프롤린의 빈도는 최고 30%이다. C-말단 프롤린의 조력에 있어서 이러한 5배 치중은 매우 놀라운 것이며, 그 이유는 폴리펩티드 사슬에 프롤린의 존재가 일반적으로는 비특이적인 효소적 분해에 대해 생물학적으로 활성인 단백질을 보호하지만, 펩티드 기질의 N- 및 C-말단에서 또는 근처에서 프롤린을 특이적으로 인식하는 일군의 효소들이 존재하기 때문이다. 실제로, 프롤린-특이적인 펩티다제는 프롤린 잔기가 잠재적인 기질에서 발생할 수 있는 모든 상황을 실제적으로 포함하는 것이 발견되었다[참조 : D.F. Cunningham et al., Biochimica et Biophysica Acta 1343:160-186 (1997)]. 예를 들어, N-말단 서열 Xaa-Pro-Yaa-와 Xaa-Pro-Pro-Yaa(SEQ ID NO:54)가 비특이적인 N-말단 분해에 대해 보호하는 것으로서 동일할지라도, 전자 서열은 아미노펩티다제 P(Xaa-Pro 결합에서) 및 디펩티딜 펩티다제 IV 및 II(-Pro-Yaa- 결합에서)에 의해 절단되며[참조 : 표 5, G. Vanhoof et al., FASEB J. 9:736-44 (1995); D.F. Cunningham et al., Biochimica et Biophysica Acta 1343:160-186 (1997)], 브라디키닌, 인터루킨 6, 인자 XII 및 에리쓰로포이에틴에 존재하는 후자 서열은 아미노펩티다제 P 및 디펩티딜 펩티다제 IV(DPPIV)의 연속 작용, 또는 프롤일 올리고누클레오티드(Pro-Pro 결합 후에서)에 의해 절단될 수 있다[참조 : 표 5, G. Vanhoof et al., FASEB J. 9:736-44 (1995)]. 또한 프롤일 올리고펩티다제가 N-말단 아실-Yaa-Pro-Xaa 서열을 포함하는 펩티드에서 Pro-Xaa 결합을 절단하는 것으로 공지되어 있다[참조 : D.F. Cunningham et al., Biochimica et Biophysica Acta 1343:160-186 (1997)]. 기질의 N-말단에 대해 작용하는 다른 프롤린 특이적인 펩티다제에는 프롤리다제, 프롤린 이미노펩티다제 및 프롤리나제가 있다. 다른 한편으로는, 프롤일 카복시펩티다제 및 카복시펩티다제 P는 프롤린 바람직하게는 P_1 을 가진 펩티드로부터의 C-말단 잔기를 절단한다[참조 : D.F. Cunningham et al., Biochimica et Biophysica Acta 1343:160-186 (1997)].

또한 억제 펩티드의 안정성에 관하여 관심있는 것 중에서, 상위 10개중 3개(30%)는 표준 단백질 구조 예측 알고리즘을 사용하여 안정한 이차 구조를 형성할 것으로 예측된 모티프를 포함하고 있었다. 펩티드중 하나(이것은 C-말단 프롤린도 가지고 있다)는 72% α-헬릭스일 것으로 예측되었다. 또 다른 것은 45% β-시트일 것으로 예상되었는데; 이 펩티드는 β-시트를 형성하기 위해 필요한 수소 결합을 이루기 위해 이량체화될 수 있다. 세번째 펩티드는 소수성 막스패닝 도메인을 가지고 있을 것으로 예측되었다. 상기 알고리즘[참조 : P. Chou et al., Adv. Enzymol. 47:45-148 (1978); J. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97-120 (1978); P. Chou, " Prediction of protein structural cla sses from amino acid composition" , In Prediciton of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman, G.D. ed.). Plenum Press, New York, N.Y. 549 - 586 (1990); P, Klein et al., Biochim. Biophys. Acta 815:468 - 476 (1985)]에 따라, 본 연구에 사용된 바와 같은 무작위로 생성된 올리고누클레오티드는 상기 펩티드에서 발생된 모티프를 생성시키는 1000번의 기회중 1번에 불과할 것이다.

마지막으로, 3개 2일 억제제중 2개는 펩티드의 카복실 말단이 Rop 단백질의 아미노 말단과 융합된 융합 펩티드임이 증명되었다. Rop는 뾰족한 헤어핀 루프에 의해 연결되어 있는 2개의 역평행 α - 헬릭스로 구성된 작은 63개 아미노산 단백질이다. 이것은 pBR322와 같은 플라스미드에 의해 사용되는 ColE1 레플리콘의 불필요한 부분이며, 이것은 ColE1 ori를 포함하고 있는 플라스미드의 복제, 분할 또는 복제수에 어떤 악영향을 일으키지 않고 제거될 수 있다[참조 : X. Soberon, Gene. 9:287 - 305 (1980)]. Rop는 고도로 안정한 구조를 가지는 것으로 공지되어 있으며[참조 : W. Eberle et al., Biochem. 29:7402 - 7407 (1990); S. Betz et al., Biochemistry 36:2450 - 2458 (1997)], 따라서 이것은 상기 두 가지 펩티드를 위한 안정한 단백질 앵커로서 역할할 수 있을 것이다.

표 13에는 구조가 결정되어 있는 천연 발생 생활성 펩티드가 기재되어 있다. 상기 펩티드 대부분은 정렬된 구조를 가지고 있으며, 구조적 안정화의 중요성을 추가로 강조해 놓았다. 최근 수년에 걸쳐 잠재적인 치료제로서 사용하기 위한 신규한 합성 억제 펩티드를 개발하려는 연구는 디자이너가 합성 펩티드를 약제학적 산업에서 상당한 비중을 차지하도록 만드는 경우, 펩티드 안정성이 해결해야 하는 주요한 문제점이라는 것을 제시하고 있다[참조 : J. Bai et al., Crit. Rev. Ther. Drug. 12:339 - 371 (1995); R. Egleton Peptides. 18:1431 - 1439 (1997); L. Wearley, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 8:331 - 394 (1991)]. 본 실시예에 기술된 시스템은 세포내 환경에서 높은 수준의 안정성을 나타내는 생활성 펩티드에 유리한 선별 방법에 치중함으로써 펩티드 약물 개발 분야에서의 주요한 진보를 대표한다.

표 13: 천연 발생 생활성 펩티드에서 관찰된 구조적 모티프

생활성 펩티드	아미노산 크기	구조적 모티프	참조
더마셉틴	34	α-헬릭스	34
엔돌핀	30	α-헬릭스	7
글루카곤	29	α-헬릭스	6
마가인인[a]	23	α-헬릭스	5
마스토파란	14	α-헬릭스	11
멜리틴	26	α-헬릭스	44
모틸린	22	α-헬릭스	25
PKI(5-24)	20	α-헬릭스	38
세크레틴	27	α-헬릭스	8
심방성 나트륨이뇨 펩티드	28	디설파이드 결합	33
칼시토닌	32	디설파이드 결합	4
코노톡신[a]	10-30	디설파이드 결합	37
데펜신[a]	29-34	디설파이드 결합	30
EETI II	29	디설파이드 결합	23
옥시토신	9	디설파이드 결합	45
소마토스타틴	14	디설파이드 결합	35
바소프레신	9	디설파이드 결합	20
봄베신	14	무질서함	12
히스타틴	24	무질서함	51
기질 P	11	무질서함	50

[a] 이 펩티드는 다중-구성원 패밀리에 속한다.

실시예 III실시예 III

안정한 합성적으로 조작된 억제제 펩티드의 합성에 대해

본 실험은 실시예 II에 기술된 선별 방법에 의해 생성된 생활성 펩티드의 수를 증가시키는 것에 관한 것이다. 초기 실험에서, 말단 프롤린에 의해 측면배치된 무작위배치된 내부 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 평가하였다. 다른 실험에는 펩티드 α-헬릭스 구조적 모티프내로의 조작 및 펩티드의 N- 및 C-말단에서 반대 전하의 클러스터내에서의 조작이 포함된다.

재료 및 방법

배지.본 연구에 사용된 영양 LB 및 최소 M9 배지를 밀러(실시예 I 참조)에 의해 기술된 바와 같이 제조하였다. 암피실린을 영양 배지에는 최종 농도 100 ug/ml로 사용하였고, 최소 배지에서는 최종 농도 50 ug/ml로 사용하였다. IPTG를 최종 농도 1 mM로 배지에 첨가하였다.

화학약품 및 시약.신장 반응을 뉴 잉글랜드 바이오랩스(Bedford, MA)로부터의 클레나우를 사용하여 수행한 반면, 연결 반응은 라이프 사이언시스(Gaithersburg, MD)로부터의 T4 DNA 리가제를 사용하여 수행하였다. 탈인산화를 위해 파마시아(Pharmacia, Piscataway, NJ)로부터의 알칼라인 포스패타제(소 대장 점막)를 사용하였다. IPTG를 디아그노스틱 케미칼즈 리미티드(Oxford, CT)로부터 입수하였다.

세균 균주 및 플라스미드.MC1061/F'lacq1 ^{q1} Z+$^{+}$ Y+$^{+}$ A+$^{+}$ 인 ALS225가 본 실험에 사용된 대장균 세균 균주이다(실시예 I 참조). MC1061에 대한 인자형은 앞서 기술한 바와 같이araD139 Δ(araABOIC-leu)7679 Δ(lac)X74 galU galK rpsL hsr- hsm+이다. 고도로 조절할 수 있는 발현 벡터인 pLAC11(실시예 I)을 사용하여 p-Rop(C) 및 p(N)Rop-융합 벡터 뿐만 아니라 하기 기술하는 다른 무작위배치된 펩티드 라이브러리를 만들었다.

p-Rop(C) 융합 벡터의 구성.정방향 프라이머 5' TAC TAT AGA TCT ATG ACC AAA CAG GAA AAA ACC GCC 3'(SEQ ID NO:55) 및 역방향 프라이머 5' TAT ACG TAT TCA GTT GCT CAC ATG TTC TTT CCT GCG 3'(SEQ ID NO:56)을 사용하여 558 bp DNA 단편을 주형으로서 pBR322를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 상기 단편은 정방향 프라이머에 이어서 ATG 개시 코돈 및 Rop 코딩 영역내에 혼입된 Bgl II 제한 부위를 포함하고 있었다. 상기 단편은 pBR322에서 Rop 종결 코돈을 지나 Afl III 제한 부위까지 신장되었다. 증폭된 dsDNA를 겔 단리시키고, Bgl II 및 Afl III를 사용하여 제한분해시킨 다음, 동일한 두 개의 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시켰다. 생성된 p-Rop(C) 융합 벡터의 크기는 2623 bp이다(도 7 참조).

p(N)Rop-융합 벡터의 구성.정방향 프라이머 5' AAT TCA TAC TAT AGA TCT ATG ACC AAA CAG GAA AAA ACC GC 3'(SEQ ID NO:57) 및 역방향 프라이머 5' TAT ATA ATA CAT GTC AGA ATT CGA GGT TTT CAC CGT CAT CAC 3'(SEQ ID NO:58)을 사용하여 201 bp DNA단편을 주형으로서 pBR322를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 상기 단편은 정방향 프라이머에 이어서 ATG 개시 코돈 및 Rop 코딩 영역내에 혼입된 Bgl II 제한 부위를 포함하고 있었다. 역방향 프라이머는 Rop TGA 종결 코돈 바로 전에 EcoR I 제한 부위를 위치시키고 Rop TGA 종결 코돈 바로 다음에 Afl III 제한 부위를 위치시켰다. 증폭된 dsDNA를 겔 단리시키고, Bgl II 및 Afl III를 사용하여 제한분해시킨 다음, 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시켰다. 생성된 p(N)Rop-융합 벡터의 크기는 2262 bp이다(도 8 참조).

Rop 융합 무작위배치된 펩티드 라이브러리의 생성.펩티드 라이브러리를 실시예 II에서 기술한 바와 같이 구성하였다. 합성 올리고누클레오티드 5' TAC TAT AGA TCT ATG (NNN)$_{20}$ CAT AGA TCT GCG TGC TGT GAT 3'(SEQ ID NO:59)를 사용하여 실질적으로 실시예 II에 기술한 바와 같이 p-Rop(C) 융합 벡터와 함께 사용하기 위한 무작위배치된 펩티드 라이브러리를 구성하였다. 상기 올리고누클레오티드의 상보적인 가닥을 등몰 양의 올리고누클레오티드 프라이머 5' ATC ACA GCA CGC AGA TCT ATG 3'(SEQ ID NO:60)을 사용하여 클레나우를 사용하여 메움 반응에 의해 생성하였다. 신장시킨 후에, 생성된 dsDNA를 Bgl II를 사용하여 분해시키고 동일한 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시키고 이어서 알칼라인 포스패타제를 사용하여 탈인산화시켰다. 올리고누클레오티드 라이브러리를 조작하는 방식때문에, 삽입된 분해된 이중가닥 DNA 단편의 방향중 하나는 융합 생성물을 생성시켰다.

p(N)Rop-융합 벡터와 함께 사용하기 위한 무작위배치된 펩티드 라이브러리를 구성하기 위해, 무작위배치된 올리고누클레오티드 5' TAC TAT GAA TTC (NNN)$_{20}$ GAA TTC TGC CAC CAC TAC TAT 3'(SEQ ID NO:61) 및 프라이머 5' ATA GTA GTG GTG GCA GAA TTC 3'(SEQ ID NO:62)를 사용하였다. 신장시킨 후에, 생성된 dsDNA를 EcoR I을 사용하여 분해시키고 동일한 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시키고 이어서 알칼라인 포스패타제를 사용하여 탈인산화시켰다. 올리고누클레오티드 라이브러리를 조작하는 방식때문에, 삽입된 분해된 이중가닥 DNA 단편의 방향중 하나는 유합 생성물을 생성시켰다.

말단 프롤린을 포함하는 무작위배치된 펩티드 라이브러리의 생성.펩티드의 아미노 말단 및 카복시 말단 둘 모두에 2개의 프롤린 잔기를 포함하고 있는 무작위배치된 20개 아미노산 펩티드 라이브러리를 합성 올리고누클레오티드 5' TAC TAT AGA TCT ATG CCG CCG (NNN)$_{16}$ CCG CCG TAA TAA GAA TTC GTA CAT 3'(SEQ ID NO:63)을 사용하여 구성하였다. 93개 염기의 무작위배치된 올리고누클레오티드의 상보적인 가닥을 올리고누클레오티드 프라이머 5' ATG TAC GAA TTC TTA TTA CGG CGG 3'(SEQ ID NO:64)를 사용하여 클레나우를 사용하여 메움에 의해 생성하였다. 신장시킨 후에, 생성된 dsDNA를 Bgl II 및 EcoR I을 사용하여 분해시키고 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시켰다. 상기 라이브러리에 의해 코딩된 펩티드의 개시 메티오닌이 프롤린 잔기에 후속하기 때문에, 개시 메티오닌은 제거될 것이다[참조 : F. Sherman et al, Bioessays 3:27-31 (1985)]. 따라서 상기 체계에 의해 엔코딩된 펩티드 라이브러리의 길이는 20개 아미노산이다.

무작위배치된 친수성 α-헬릭스 펩티드 라이브러리의 생성.표 14는 특정 아미노산 성질을 나타내기 위해 강조된 유전자 코드를 보여준다.

표 14: 아미노산 성질을 나타내기 위해 강조된 유전자 코드

TTT phe h_a	TCT ser	TAT tyr b_a	TGT cys
TTC phe h_a	TCC ser	TAC tyr b_a	TGC cys
TTA leu H_a	TCA ser	TAA OCH	TGA OPA
TTG leu H_a	TCG ser	TAG AMB	TGG trp
CTT leu H_a	CCT pro B_a	CAT *his* h_a	CGT *arg*
CTC leu H_a	CCC pro B_a	CAC *his* h_a	CGC *arg*
CTA leu H_a	CCA pro B_a	CAA *gln* h_a	CGA *arg*
CTG leu H_a	CCG pro B_a	CAG *gln* h_a	CGG *arg*
ATT ile h_a	ACT thr	AAT *asn* b_a	AGT ser
ATC ile h_a	ACC thr	AAC *asn* b_a	AGC ser
ATA ile h_a	ACA thr	AAA *lys* h_a	AGA *arg*
ATG met H_a	ACG thr	AAG *lys* h_a	AGG *arg*
GTT val h_a	GCT ala H_a	GAT *asp* h_a	GGT gly B_a
GTC val h_a	GCC ala H_a	GAC *asp* h_a	GGC gly B_a
GTA val h_a	GCA ala H_a	GAA *glu* H_a	GGA gly B_a
GTG val h_a	GCG ala H_a	GAG *glu* H_a	GGG gly B_a

볼드체아미노산이 소수성인 반면이탤릭체아미노산은 친수성이다. 또한 α-헬릭스 구조를 형성하기 위한 다양한 아미노산에 대한 경향을 쵸우(Chou) 및 파스만(Fasman)[참조 : P. Chou et al., Adv, Enzymol. 47:45-148 (1978)]에 의해 최초로 기술된 협정을 사용하여 본 표에 표시하였다. H_a=강력한 α-헬릭스 형성체, h_a=α-헬릭스 형성체, B_a=강력한 α-헬릭스 파괴체, b_a=α-헬릭스 파괴체. 본 표에서의 소정의 할당은 몇몇 상이한 공급원으로부터의 컨센서스 일치이다. 아미노산에 대한 친수성 대 소수성 할당을 울펜덴(Wolfenden) 등의 문헌[참조 : Biochemistry. 20:849-55 (1981)]; 밀러(Miller) 등의 문헌[참조 : J. Mol. Biol. 196-641 (1987)]; 및 로우즈만(Roseman)의 문헌[참조 : J. Mol. Biol. 200:513-22 (1988)]에서 밝혀진 데이터로부터 만들었다. α-헬릭스 구조를 형성하는 아미노산에 대한 경향을 쵸우 및 파스만[참조 : P. Chou et al., Adv. Enzymol. 47:45-148 (1978); P. Chou, " Prediction of protein structure and the principles of protein conformation(G. Fasman, G.D. ed.). Plenum Press, New York, N.Y. 549-586 (1990)]의 컨센서스 일치; 및 이차 구조를 예측하기 위한 오네일(O'Neill) 및 데그라도(DeGrado)[참조 : Science. 250:646-651 (1990)] 방법으로부터 수득하였다.

각 누클레오티드 트리플렛에 의해 엔코딩된 아미노산의 성질에 관한 유전자 코드에서 단일 누클레오티드의 분포 패턴을 분석함으로써, α-헬릭스를 형성하는 경향을 가진 무작위배치된 18개 아미노산 친수성 펩티드 라이브러리를 생성시키는 신규한 합성 접근법을 동정하였다. 표 14에 따라, [(CAG)A(TCAG)] 코돈 혼합물의 사용은 친수성 아미노산 His, Gln, Asn, Lys, Asp 및 Glu를 생성시킨다. 상기 아미노산들은 약한 α-헬릭스 파괴체로서 분류되어 있는 아스파라긴을 제외하고는 α-헬릭스 모티프와 빈번하게 결합되어 있다. 상기 코돈 혼합물이 α-헬릭스 펩티드를 만들기 위해 사용되는 경우, 아스파라긴은 상기 부분의 약 17%에서 발생할 것으로 예상되며, 이는 쵸우 및 파스만[참조 : P. Chou et al., Adv. Enzymol. 47:45-148 (1978); P. Chou, " Prediction of protein structural classes from amino acid compositions" , in Prediction of protein structure and the principles of protein conformation(G. Fasman, G.D. ed.). Plenum Press, New York, N.Y. 549-586 (1990)] 또는 가르니에르(Garnier), 오스구토르프(Osguthorpe) 및 로브슨(Robson)[참조 : J. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97-120 (1978)]의 이차 구조 예측 기준에 따른 α-헬릭스 구조에 허용된다. 또한, 몇가지 충분히 특징화된 단백질이 상기 단백질의 동일 크기의 α-헬릭스 영역내에 3개 이하의 b_a파괴체 아미노산을 포함하고 있음이 관찰되었다[참조 : T. Creighton, " Conformational properties of polypeptide chains" , in Proteins: structures and molecular properties, W.H. Freeman and Company, N.Y., 182-186 (1993)]. 대부분의 α-헬릭스에 있어서 완전 회전당 3.6개 아미노산이 존재하기 때문에, 18개 아미노산 길이를 선택하여 5 완전 회전을 가지는 α-헬릭스 펩티드를 생성시켰다. 또한, 친수성 아미노산의 사용은 세포의 세포질내에서 가용성인 펩티드를 생성시킬 것으로 예상된다.

무작위배치된 18개 아미노산 친수성 α-헬릭스 펩티드 라이브러리를 합성 올리고누클레오티드 5' TAC TAT AGA TCT ATG (VAN) $_{17}$ TAA TAA GAA TTC TGC CAG CAC TAT 3'(SEQ ID NO:65)를 사용하여 합성하였다. 90개 염기 무작위배치된 올리고누클레오티드의 상보적인 가닥을 올리고누클레오티드 프라이머 5' ATA GTG CTG GCA GAA TTC TTA TTA 3'(SEQ ID NO:66)을 사용하여 클레나우를 사용하여 메움으로써 생성시켰다. 신장시킨 후에 생성된 dsDNA를 Bgl II 및 EcoR I을 사용하여 분해시키고 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시켰다.

+/- 전하 말단 모티프를 가진 무작위배치된 펩티드 라이브러리의 생성.아미노 말단 및 카복시 말단에서 반대 전하 아미노산의 상호작용에 의해 안정화된 무작위배치된 펩티드 라이브러리를 도 9에 제시된 개략도에 따라 생성시켰다. 하전된 아미노산의 잠재적인 상호작용을 최대화시키기 위해, 더 큰 산성 아미노산 글루타메이트를 더 작은 염기성 아미노산 리신과 쌍을 이루게 한 반면, 더 작은 산성 아미노산 아스파르테이트를 더 큰 염기성 아미노산 아르기닌과 쌍을 이루게 하였다. 무작위배치된 펩티드 라이브러리를 구성하기 위해, 합성 올리고누클레오티드 5' TAC TAT AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC (NNN) $_{16}$ CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC GTA CAT 3'(SEQ ID NO:67) 및 올리고누클레오티드 프라이머 5' ATG TAC GAA TTC TTA TTA TTT ACG TTT ACG 3'(SEQ ID NO:68)을 사용하였다. 신장시킨 후에 생성된 dsDNA를 Bgl II 및 EcoR I을 사용하여 분해시키고 동일한 두 가지 제한 효소를 사용하여 분해시켜 놓은 pLAC11 발현 벡터내로 연결시켰다.

무작위배치된 올리고누클레오티드의 모든 라이브러리에 있어서, N은 4가지 누클레오티드 A, C, G 및 T의 등몰 혼합물이 사용된 것을 나타내고, V는 세 가지 누클레오티드 A, C 및 G의 등몰 혼합물이 사용된 것을 나타낸다. 생성된 라이브러리를 실시예 II에 기술한 바와 같이 억제되는 조건하에서 전기수용성 ALS225 대장균 세포(실시예 I)내로 형질전환시켰다.

억제제 클론을 동정하기 위한 형질전환체의 스크리닝.형질전환체를 초기에 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝함으로써 펩티드가 과잉생성되는 경우, 실시예 II에 기술한 바와 같이 최소 배지상에서 성장할 수 없는 것들을 동정하였다. 모든 억제제들이 적합한지를 입증하기 위해, 플라스미드 DNA를 각 억제 클론으로부터 만들고, 새로운 백그라운드내로 형질전환시킨 다음, 이들이 플레이트상에서 여전히 억제성이고 이들의 억제가 실시예 II에서와 같이 유도물질인 IPTG의 존재에 의존하는 지를 확인하기 위해 검사하였다.

액체 배지에서의 성장율 분석.억제 클론을 액체 배지에서 성장율 분석함으로써 펩티드의 억제 강도를 평가하였다. 시험될 억제제 또는 대조군으로서 관련 벡터를 포함하고 있는 최소 또는 영양 배양물을 새로운 배지를 사용하여 약 0.01의 초기 OD_{550} 로 희석시키고 1 mM IPTG를 사용하여 유도시켰다. 그런 다음, 배양물이 지수기를 지날 때까지 매시간마다 OD_{550} 을 판독하였다. 성장율을 성장의 지수기내에서 단위 시간당 OD_{550} 의 분광 광도 변화로서 결정하고, 성장율의 억제를 대조군으로서 적절한 벡터를 사용하여 억제제에 대해 계산하였다.

결과

억제제 펩티드의 카복시 말단에서 Rop 단백질의 아미노 말단과 융합된 억제제 펩티드의 단리 및 특징화.펩티드의 카복시 말단에 Rop 단백질에 의해 보호된 약 10,000개 펩티드를 실시예 II에 기술한 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝하고, 16개 2일 억제제를 단리하였다. 억제 효과를 대조군으로서 pRop(C)를 사용하여 실시예 II에 기술한 바와 같이 결정하였다. 최소 배지에서만 억제성이었던 실시예 II에서 동정된 앵커가 없는 억제제와는 달리, 많은 Rop 융합 억제제들은 영양 배지상에서도 억제성이며, 이는 증가된 유효성을 반영한다. 표 15에 표시된 바와 같이, 억제제들은 최소 배지에서는 평균 90%의 레벨 및 영양 배지에서는 평균 50%의 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 표 15의 데이터는 중복 실험의 평균이다.

표 15: 펩티드의 카복시 말단을 Rop 단백질(Rop(C) 융합 펩티드 억제제)의 아미노 말단과 융합시킴으로써 안정화된 펩티드 억제제의 억제 효과

억제제	최소 배지에서의 억제(%)	영양 배지에서의 억제(%)
pRop(C)1	87	47
pRop(C)2	99	58
pRop(C)3	85	54
pRop(C)4	98	49
pRop(C)5	95	54
pRop(C)6	99	46
pRop(C)7	91	59
pRop(C)8	86	51
pRop(C)9	93	57
Rop(C)10	91	35

억제제 펩티드의 아미노 말단에서 Rop 단백질의 카복시 말단과 융합된 억제제 펩티드의 단리 및 특징화.Rop 단백질에 의해 펩티드의 아미노 말단에 보호된 약 6000개 펩티드를 실시예 II에 기술된 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝하고 14개 2일 억제제를 단리하였다. p-Rop(C) 벡터를 사용하여 단리된 Rop 융합 펩티드에 대해 관찰된 바와 같이, p(N)Rop-벡터를 사용하여 단리된 대부분의 억제제 펩티드는 영양 배지 뿐만 아니라 최소 배지상에서 억제성이었다. 억제제를 상기 기술한 바와 같이 입증하였고 대조군으로서 p(N)Rop-를 사용하는 성장율 분석을 수행하여 이들의 유효성을 결정하였다. 표 16에 표시된 바와 같이, 억제제는 최소 배지에서 평균 90%의 레벨 및 영양 배지에서 평균 40%의 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 표 16의 데이터들은 중복 실험의 평균이다.

표 16: 펩티드 억제제의 아미노 말단을 Rop 단백질(Rop(N) 융합 펩티드 억제제)의 카복시 말단과 융합시킴으로써 안정화된 펩티드 억제제의 억제 효과

억제제	최소 배지에서의 억제(%)	영양 배지에서의 억제(%)
pRop(N)1	81	30
pRop(N)2	96	53
pRop(N)3	95	43
pRop(N)4	92	38
pRop(N)5	99	33
pRop(N)6	93	38
pRop(N)7	87	34
pRop(N)8	91	44
pRop(N)9	95	37
pRop(N)10	96	40

아미노 말단 및 카복시 말단 둘 모두에 두 개의 프롤린을 포함하고 있는 앵커가 없는 억제제 펩티드의 단리 및 특징화. 약 7500개 펩티드를 실시예 II에 기술된 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝하고, 12개 2일 억제제를 단리하였다. 표 17에 표시된 바와 같이, 상위 10개 억제제는 최소 배지에서 평균 50%의 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 억제 효과를 대조군으로서 pLAC11을 사용하여 본문에 기술된 바와 같이 결정하였다. 표 17의 데이터는 중복 실험의 평균이다.

표 17: 펩티드의 아미노 말단 및 카복시 말단 둘 모두에서 두 개의 프롤린 잔기에 의해 안정화된 펩티드 억제제의 억제 효과

억제제	최소 배지에서의 억제(%)
pPro1	50
pPro2	49
pPro3	50
pPro4	59
pPro5	52
pPro6	93
pPro7	54
pPro8	42
pPro9	41
pPro10	42

상위 10개 억제제에 대한 코딩 영역의 서열 분석을 표 19에 제시하였다. 삽입 영역에 대한 경계표시 Bgl II 및 EcoR I 제한 부위를 밑줄표시하였고, 프롤린 잔기들도 밑줄표시하였다.

구성된 상기 억제제로부터의 올리고누클레오티드의 말단이BglII 및EcoRI 제한 부위를 포함하고 있기 때문에, 라이브러리가 올리고누클레오티드 생성을 최대화시키기 위해 제조되는 경우, 겔 단리시키지 않았다. 이로 인해, 억제 클론중 3개인 pPro2, pPro5 및 pPro6는 올리고누클레오티드의 무작위배치된 부분에 결실부위를 포함하고 있음이 밝혀졌다.

표 18: 프롤린 펩티드로부터의 삽입 영역의 서열 분석

```
pHelix1 - 18aa, 83% α-헬릭스

AGA TCT ATG CAT GAC GAA CAA GAG GAG GAG CAC AAT AAA AAG GAT AAC GAA AAA GAA CAC TAA TAA GAA
         M   H   D   E   Q   E   E   E   H   N   K   K   D   N   E   K   E   H   *   *  (SEQ
ID NO: 90)
TTC  (SEQ ID NO: 89)


pHelix2 - 22aa, 68% α-헬릭스

AGA TCT ATG CAG CAG GAG CAC GAG CAA GGC AGG ATG AGC AAG AGG ATG AAG AAT AAT AAG AAT TCT CAT
         M   Q   Q   E   H   E   Q   G   R   M   S   K   R   M   K   N   N   K   N   S   H
GTT TGA  (SEQ ID NO: 91)
V   *  (SEQ ID NO: 92)


pHelix3 - 22aa, 55% α-헬릭스

AGA TCT ATG AAC CAT CAT AAT GAG GCC ATG ATC AAC ACA ATG AAA ACG AGG AAT AAT AAG AAT TCT CAT
         M   N   H   H   N   E   A   M   I   N   T   M   K   T   R   N   N   K   N   S   H
GTT TGA  (SEQ ID NO: 93)
V   *  (SEQ ID NO: 94)


pHelix4 - 18aa, 17% α-헬릭스

AGA TCT ATG AAC GAC GAC AAT CAG CAA GAG GAT AAT CAT GAT CAG CAT AAG GAT AAC AAA TAA TAA GAA
         M   N   D   D   N   Q   Q   E   D   N   H   D   Q   H   K   D   N   K   *   *  (SEQ
ID NO: 96)
TTC  (SEQ ID NO: 95)


pHelix5 - 18aa, 50% α-헬릭스

AGA TCT ATG CAA GAG CAG GAT CAG CAT AAT GAT AAC CAT CAC GAG GAT AAA CAT AAG AAG TAA TAA GAA
         M   Q   E   Q   D   Q   H   N   D   N   H   H   E   D   K   H   K   K   *   *  (SEQ
ID NO: 98)
TTC  (SEQ ID NO: 97)
```

모든 억제제들은 예상된 바와 같이 이들의 아미노 또는 카복시 말단에 두 개의 프롤린 잔기를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. 4개 억제제는 이들의 아미노 및 카복시 말단 둘 모두에 두 개의 프롤린 잔기를 포함하고 있고, 5개 억제제는 이들의 아미노산 말단에만 두 개의 프롤린 잔기를 포함하고 있고, 1개 억제제는 이의 카복시 말단에만 두 개의 프롤린 잔기를 포함하고 있었다.

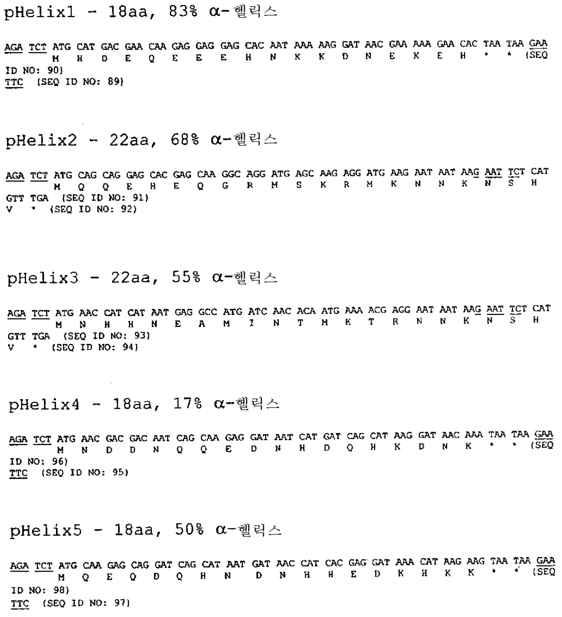
α-헬릭스 모티프에 의해 안정화된 앵커가 없는 친수성 억제제 펩티드의 단리 및 특징화.약 12,000개 펩티드를 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝하였고 5개 2일 억제제를 단리하였다. 상기 억제제들을 Rop-펩티드 융합 연구에 대해 이미 기술된 바와 같이 입증하였고 대조군으로서 pLAC11을 사용하여 성장율 분석을 수행함으로써 이들의 유효성을 결정하였다. 표 19에 표시된 바와 같이, 억제제 펩티드는 최소 배지에서 평균 50%의 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 2회의 독립적인 결정의 평균값을 제시하였다.

표 19: 친수성 α-헬릭스 펩티드의 억제 효과

억제제	최소 배지에서의 억제(%)
pHelix1	67
pHelix2	46
pHelix3	48
pHelix4	45
pHelix5	42

5개 억제제에 대한 코딩 영역의 서열 분석을 표 20에 제시하였다. 삽입 영역에 대한 경계표시 Bgl II 및 EcoR I 제한 부위를 밑줄표시하였다. 구성된 상기 억제제로부터의 올리고누클레오티드의 말단이 상기 제한 부위를 포함하고 있기 때문에, 라이브러리가 올리고누클레오티드 생성을 최대화시키기 위해 제조되는 경우, 올리고누클레오티드를 겔 단리시키지 않았다. 이로 인해, 억제 클론중 2개인 pHelix2 및 pHelix3는 올리고누클레오티드의 무작위배치된 부분에 결실부위를 포함하고 있음이 밝혀졌다. 상기 펩티드의 예측된 α-헬릭스 함량을 가르니에르, 오스구토르프 및 로브슨의 이차 구조 예측 기준[참조 : J. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97-120 (1978)]에 따라 표 20에 표시하였다.

표 20: 친수성 α-헬릭스 펩티드로부터의 삽입 영역의 서열 분석



pHelix1 - 18aa, 83% α-헬릭스

```
AGA TCT ATG CAT GAC GAA CAA GAG GAG GAG CAC AAT AAA AAG GAT AAC GAA AAA GAA CAC TAA TAA GAA
         M   H   D   E   Q   E   E   E   H   N   K   K   D   N   E   K   E   H   *   *  (SEQ
ID NO: 90)
TTC  (SEQ ID NO: 89)
```

pHelix2 - 22aa, 68% α-헬릭스

```
AGA TCT ATG CAG CAG GAG CAC GAG CAA GGC AGG ATG AGC AAG AGG ATG AAG AAT AAT AAG AAT TCT CAT
         M   Q   Q   E   H   E   Q   G   R   M   S   K   R   M   K   N   N   K   N   S   H
GTT TGA  (SEQ ID NO: 91)
V   *  (SEQ ID NO: 92)
```

pHelix3 - 22aa, 55% α-헬릭스

```
AGA TCT ATG AAC CAT CAT AAT GAG GCC ATG ATC AAC ACA ATG AAA ACG AGG AAT AAT AAG AAT TCT CAT
         M   N   H   H   N   E   A   M   I   N   T   M   K   T   R   N   N   K   N   S   H
GTT TGA  (SEQ ID NO: 93)
V   *  (SEQ ID NO: 94)
```

pHelix4 - 18aa, 17% α-헬릭스

```
AGA TCT ATG AAC GAC GAC AAT CAG CAA GAG GAT AAT CAT GAT CAG CAT AAG GAT AAC AAA TAA TAA GAA
         M   N   D   D   N   Q   Q   E   D   N   H   D   Q   H   K   D   N   K   *   *  (SEQ
ID NO: 96)
TTC  (SEQ ID NO: 95)
```

pHelix5 - 18aa, 50% α-헬릭스

```
AGA TCT ATG CAA GAG CAG GAT CAG CAT AAT GAT AAC CAT CAC GAG GAT AAA CAT AAG AAG TAA TAA GAA
         M   Q   E   Q   D   Q   H   N   D   N   H   H   E   D   K   H   K   K   *   *  (SEQ
ID NO: 98)
TTC  (SEQ ID NO: 97)
```

가르니에르, 오스구토르프 및 로브슨 이차 구조 예측에 따라, 엔코딩된 펩티드 전부는 pHelix4를 제외하고는 대부분 α-헬릭스일 것으로 예상되었다. 흥미롭게도, 가장 높은 수준의 α-헬릭스 함량을 가진 pHelix1은 본 연구에서 단리된 가장 강력한 억제 펩티드이기도 했다.

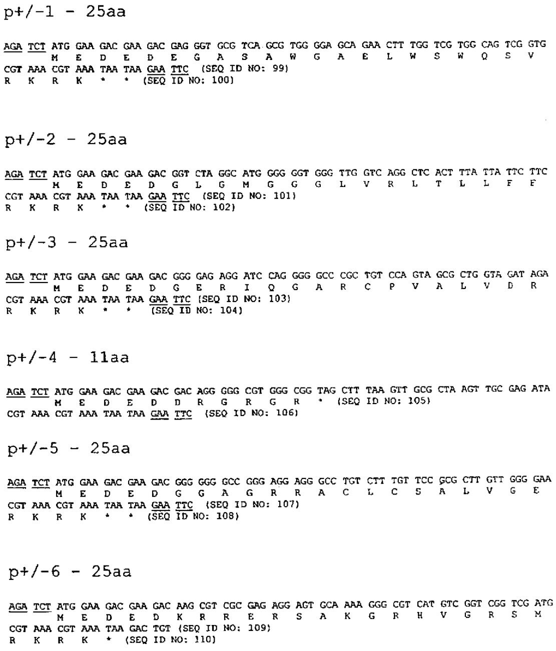
반대 전하 말단 모티프에 의해 안정화된 앵커가 없는 억제제 펩티드의 단리 및 특성화.약 20,000개 펩티드를 그리드-패칭 기술을 사용하여 스크리닝하였고 6개 2일 억제제를 단리하였다. 상기 억제제를 Rop-펩티드 융합 연구에 대해 이미 기술된 바와 같이 입증하였고 대조군으로서 pLAC11을 사용하여 성장율 분석을 수행함으로써 이들의 유효성을 결정하였다. 표 21에 표시한 바와 같이, 억제제 펩티드는 최소 배지에서 평균 50%의 레벨로 세균 성장율을 억제시켰다. 2번의 독립적인 결정의 평균값을 제시하였다.

표 21: 반대 전하 말단 모티프에 의해 안정화된 펩티드 억제제의 억제 효과

억제제	최소 배지에서의 억제(%)
p+/-1	41
p+/-2	43
p+/-3	48
p+/-4	60
p+/-5	54
p+/-6	85

6개 억제제에 대한 코딩 영역의 서열 분석을 표 22에 제시하였다. 삽입 영역을 위한 경계표시 Bgl II 및 EcoR I 제한 부위를 밑줄표시하였다. 너무 일찍 종결된 p+/-4를 제외하고, 억제제에 대한 코딩 영역은 펩티드 라이브러리를 생성시키기 위해 사용된 모티프에 기초하여 예상된 바와 같았다.

표 22: 반대 전하 말단 모티프로부터의 삽입 영역의 서열 분석



```
p+/-1 - 25aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC GAG GGT GCG TCA GCG TGG GGA GCA GAA CTT TGG TCG TGG CAG TCG GTG
         M   E   D   E   D   E   G   A   S   A   W   G   A   E   L   W   S   W   Q   S   V
CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC  (SEQ ID NO: 99)
R   K   R   K   *   *   (SEQ ID NO: 100)


p+/-2 - 25aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC GGT CTA GGC ATG GGG GGT GGG TTG GTC AGG CTC ACT TTA TTA TTC TTC
         M   E   D   E   D   G   L   G   M   G   G   G   L   V   R   L   T   L   L   F   F
CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC  (SEQ ID NO: 101)
R   K   R   K   *   *   (SEQ ID NO: 102)

p+/-3 - 25aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC GGG GAG AGG ATC CAG GGG GCC CGC TGT CCA GTA GCG CTG GTA GAT AGA
         M   E   D   E   D   G   E   R   I   Q   G   A   R   C   P   V   A   L   V   D   R
CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC (SEQ ID NO: 103)
R   K   R   K   *   *    (SEQ ID NO: 104)


p+/-4 - 11aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC GAC AGG GGG CGT GGG CGG TAG CTT TAA GTT GCG CTA AGT TGC GAG ATA
         M   E   D   E   D   D   R   G   R   G   R   *  (SEQ ID NO: 105)
CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC  (SEQ ID NO: 106)

p+/-5 - 25aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC GGG GGG GCC GGG AGG AGG GCC TGT CTT TGT TCC GCG CTT GTT GGG GAA
         M   E   D   E   D   G   G   A   G   R   R   A   C   L   C   S   A   L   V   G   E
CGT AAA CGT AAA TAA TAA GAA TTC  (SEQ ID NO: 107)
R   K   R   K   *   *  (SEQ ID NO: 108)


p+/-6 - 25aa

AGA TCT ATG GAA GAC GAA GAC AAG CGT CGC GAG AGG AGT GCA AAA GGG CGT CAT GTC GGT CGG TCG ATG
         M   E   D   E   D   K   R   R   E   R   S   A   K   G   R   H   V   G   R   S   M
CGT AAA CGT AAA TAA GAC TGT (SEQ ID NO: 109)
R   K   R   K   *  (SEQ ID NO: 110)
```

토론

실시예 II에서, 완전히 무작위배치된 펩티드를 억제 효과에 대해 스크리닝하는 경우, 20,000개 잠재적인 후보중에서 3개 펩티드(하나는 " 앵커가 없는" 펩티드이고 두 개는 결실에 의해 초래된 예상치 않은 Rop 융합 펩티드이다)를 대장균 세균의 강력한(즉, 2일) 억제제로서 동정하였다. 본 실시예에서와 같이 치중된 합성을 사용하여, 강력한 성장 억제제를 단리시키는 빈도를 현저하게 증가시킬 수 있었다(표 23 참조).

표 23: 상이한 타입의 억제제 펩티드가 단리될 수 있는 빈도의 요약

억제제 펩티드의 타입	2일 억제제 펩티드가 단리될 수 있는 빈도	참조
앵커가 없음	20,000중의 1	실시예 II
Rop에 의하여 C-말단에서 보호됨	625중의 1	본 실시예
Rop에 의하여 N-말단에서 보호됨	429중의 1	본 실시예
두 개의 프롤린에 의하여 C-말단 및 N-말단 둘 모두에서 보호됨	625중의 1	본 실시예
α-헬릭스 구조적 모티프로 보호됨	2,400중의 1	본 실시예
반대 전하 말단 모티프로 보호됨	3,333중의 1	본 실시예

원핵 및 진핵 세포 둘 모두에서 카복시펩티다제보다 아미노펩티다제가 더 많이 동정되었다[참조 : J. Bai, et al., Pharm. Res. 9:969-978 (1992); J. Brownlees et al., J. Neurochem. 60:793-803 (1993); C. Miller, InEscherichia coliandSalmonella typhimuriumcellular and molecular biology, 2nd edition (Neidhardt, F.C. ed.), ASM Press, Washington, D.C. 1:938-954 (1996)]. 그러므로, Rop 융합 연구에 있어서, 펩티드의 아미노 말단을 안정화시키는 것이 펩티드의 카복시 말단을 안정화시키는 것보다 엑소펩티다제의 작용을 방지시키기에 더욱 효과적이라고 예상할 수 있다. 놀랍게도, 펩티드의 말단중 어느 하나를 안정화시키는 것은 거의 동일한 효과를 일으킨다는 것이 밝혀졌다.

또한 펩티드는 아미노 및/또는 카복시 말단에 두 개의 프롤린 잔기의 첨가, 아미노 및 카복시 말단에 반대 전하 말단 아미노산의 혼입 또는 헬릭스-생성 친수성 아미노산의 사용에 의해 안정화될 수 있다. 표 23에 제시된 바와 같이, 강력한 억제제 펩티드가 단리될 수 있는 빈도는 실시예 II에서 특징화된 앵커가 없는 펩티드의 빈도 이상으로 현저하게 증가하였다.

상기 발견들을 직접 고찰하여 펩티다제에 의한 분해에 내성인 더욱 효과적인 펩티드 약물을 디자인할 수 있다. 본 예에서, 세균 숙주의 펩티드를 안정화시키기 위한 몇가지 전략을 제시하였다. 원핵 및 진핵 시스템에서 특징화된 아미노펩티다제 및 카복시펩티다제는 매우 유사하게 기능하는 것 같기 때문에[참조 : C. Miller, In Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology, 2nd edition (Neidhardt, F.C. ed.), ASM Press, Washington, D.C. 1:938-954 (1996); N. Rawlings et al., Biochem J. 290:205-218 (1993)], 새로운 또는 공지된 펩티드 약물내로 하나 이상의 상기 모티프의 혼입은 진핵 숙주 세포에서도 엑소펩티다제의 작용을 늦추거나 방지시킬 것이다.

본문을 제외시킨 서열 목록본문을 제외시킨 서열 목록

SEQ ID NO:2

반대 전하 말단 모티프를 가진 펩티드 서열

SEQ ID NO:3-4

안정화된 앤지오텐신

SEQ ID NO:6-19, 24-28, 55-58, 60, 62, 64, 66, 68

프라이머

SEQ ID NO:20-22

프라이머 단편

SEQ ID NO:23, 59, 61, 63, 65, 67

무작위배치된 올리고누클레오티드

SEQ ID NO:29-33

안티센스 올리고누클레오티드

SEQ ID NO:34, 36, 39, 40, 43, 45, 46, 48, 51, 52, 70, 72, 74, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 105, 108, 110

안정화된 펩티드

SEQ ID NO:35, 37, 38, 41, 42, 44, 47, 49, 50, 53, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 106, 107, 109

안정화된 펩티드를 엔코딩하는 핵산

SEQ ID NO:54

N-말단 보호 서열

앞의 상세한 설명 및 예들은 단지 명쾌한 이해를 위해 제공한 것이다. 어떠한 불필요한 제한도 그것으로부터 이해되지 않는다. 본 발명은 제시되고 기술된 정확한 항목에 제한되지 않으며, 당업자에게 명백한 변형은 청구범위에 의해 정의된 본 발명내에 포함될 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a)펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열에 작동가능하도록 연결되어 있는 엄격하게 조절할 수 있는 제어 영역을 포함하는 발현 벡터를 사용하여 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

(b)펩티드의 발현을 억제시키는 조건하에서 형질전환된 세포를 성장시키는 단계;

(c)형질전환된 숙주 세포내에서 펩티드의 발현을 유도시키는 단계;

(d)펩티드의 발현이 숙주 세포 성장을 억제시키는 지를 결정하는 단계를 포함하여 생활성 펩티드를 동정하기 위한 재조합 방법으로서, 숙주 세포 성장의 억제가 생활성 펩티드의 발현을 나타내는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 발현 벡터의 엄격하게 조절할 수 있는 제어 영역이 적어도 야생형 대장균lac프로모터/오퍼레이터 영역을 포함하고, 상기 부분이 보조lac오퍼레이터 O3, CAP 결합 영역, -35lac프로모터 부위, -10lac프로모터 부위,lac오퍼레이터 O1,lacZ샤인-달가노 서열 및 스페이서 영역을 포함하고; 여기서 형질전환된 숙주 세포가 단계 (b)동안 펩티드의 발현을 억제시키기에 효과적인 양의 Lac 리프레서 단백질을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 숙주 세포가 세균임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 세균이 그람 양성 세균임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 3항에 있어서, 세균이 그람 음성 세균임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 3항에 있어서, 세균이 대장균임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 2항에 있어서, 숙주 세포가 미생물 병원체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 미생물 병원체가 스트렙토코쿠스, 스태필로코쿠스 및 엔테로코쿠스로 구성된 군으로부터 선택된 속(genus)의 구성원임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 2항에 있어서, 펩티드를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하고 있는 발현 벡터가 제 1 발현 벡터이고, 숙주 세포가 Lac 리프레서 단백질을 엔코딩하는 유전자에 작동가능하도록 연결되어 있는 프로모터를 포함하고 있는 제 2 발현 벡터를 사용하여 단계 (b) 이전에 추가로 형질전환됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제 2항에 있어서, 발현벡터가 pLAC11(ATCC 제 207108호)의 동정된 특징을 가짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제 10항에 있어서, 발현 벡터가 pLAC11(ATCC 제 207108호)임을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 프로테아제 또는 펩티다제 또는 둘 모두를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 천연적으로 발현되는 프로테아제 또는 펩티다제의 발현을 감소시키거나 제거시키도록 변형되지 않음을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 원핵생물임을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 미생물 병원체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 미생물 병원체가 스트렙토코쿠스, 스태필로코쿠스 및 엔테로코쿠스로 구성된 군으로부터 선택된 속의 구성원임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 진핵 세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 진핵 세포가 포유동물 세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제 17항에 있어서, 진핵 세포가 암세포임을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 1항에 있어서, 숙주 세포가 원생동물임을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

제 1항에 있어서, 펩티드가 펩티드의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 펩티드의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 21항에 있어서, 제 1 안정화기가 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro, Xaa-Pro 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고; 제 2 안정화기가 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 및 글루타티온 환원효소로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제 1항에 있어서, 펩티드가 안정화 모티프를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제 24항에 있어서, 안정화 모티프가 친수성 α-헬릭스 모티프를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제 24항에 있어서, 안정화 모티프가 반대 전하 말단 모티프를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제 1항에 있어서, 펩티드가 무작위배치된 아미노산 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제 27항에 있어서, 펩티드가 펩티드의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 펩티드의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

제 27항에 있어서, 펩티드가 안정화 모티프를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 30.

생활성 펩티드의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기 및 생활성 펩티드의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함하는 생활성 펩티드.

청구항 31.

제 30항에 있어서, 제 1 안정화기가 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고; 제 2 안정화기가 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 32.

제 31항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 및 글루타티온 환원효소로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 33.

제 31항에 있어서, 제 1 안정화기가 Pro-Pro-이고 제 2 안정화기가 -Pro-Pro임을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 34.

제 30항에 있어서, 제 1 및 제 2 안정화기중 적어도 하나가 작고 안정한 단백질을 포함함을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 35.

제 34항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 4-헬릭스 번들 단백질(4-helix bundle protein)임을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 36.

제 34항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 및 글루타티온 환원효소로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 37.

제 36항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 Rop 단백질임을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 38.

제 30항에 있어서, 항미생물 펩티드임을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 39.

제 30항에 있어서, 치료 펩티드 약제임을 특징으로 하는 생활성 펩티드.

청구항 40.

생활성 펩티드의 N-말단을 포함하는 연속적으로 균일 하전된 아미노산의 대부분 및 생활성 펩티드의 C-말단을 포함하는 연속적으로 반대 하전된 아미노산의 대부분을 포함하는 생활성 펩티드.

청구항 41.

4-헬릭스 번들 단백질과 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 42.

제 41항에 있어서, 4-헬릭스 번들 단백질이 Rop 단백질임을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 43.

제 42항에 있어서, 폴리펩티드가 생활성 펩티드를 포함함을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 44.

제 42항에 있어서, 4-헬릭스 번들 단백질이 이의 C-말단에서 폴리펩티드의 N-말단에 공유 결합되어 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.

제 42항에 있어서, 4-헬릭스 번들 단백질이 이의 N-말단에서 폴리펩티드의 C-말단에 공유 결합되어 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 46.

(i) (a) 작고 안정한 단백질인 -Pro-, -Pro-Pro-, -Xaa-Pro- 및 -Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택된 제 1 안정화기 및 (b) 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택된 제 2 안정화기를 포함하는 생활성 펩티드; 및 (ii) 제 1 안정화기 바로 앞에 위치하는 절단 부위를 포함하는 폴리펩티드로서, 제 2 안정화기가 폴리펩티드의 C-말단을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 47.

(i) (a) Pro, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택된 제 1 안정화기 및 (b) -Pro-, -Pro-Pro-, -Pro-Xaa- 및 -Pro-Pro-Xaa-로 구성된 군으로부터 선택된 제 2 안정화기를 포함하는 생활성 펩티드; 및 (ii) 제 2 안정화기 바로 다음에 위치하는 절단 부위를 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서 제 1 안정화기가 폴리펩티드의 N-말단을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 48.

생활성 펩티드의 N-말단을 포함하는 다수의 연속적인 균일 하전된 아미노산과 생활성 펩티드의 C-말단을 포함하는 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산을 포함하는 생활성 펩티드; 및 다수의 연속적인 균일 하전된 아미노산의 대부분 바로 앞에 위치하는 절단 부위를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 49.

생활성 펩티드의 N-말단을 포함하는 다수의 연속적인 균일 하전된 아미노산과 생활성 펩티드의 C-말단을 포함하는 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산을 포함하는 생활성 펩티드; 및 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산 바로 다음에 위치하는 절단 부위를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 50.

제 1 안정화기를 항미생물 펩티드의 N-말단에 공유 결합시키고 제 2 안정화기를 항미생물 펩티드의 C-말단에 공유 결합시켜 안정화된 항미생물 펩티드를 생성시키고; 미생물을 안정화된 항미생물 펩티드와 접촉시키는 것을 포함하여 항미생물 펩티드를 사용하는 방법.

청구항 51.

제 50항에 있어서, 제 1 안정화기가 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고; 제 2 안정화기가 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 50항에 있어서, 제 1 안정화기가 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고, 제 2 안정화기가 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

다수의 연속적인 균일 하전된 아미노산을 항미생물 펩티드의 N-말단에 공유 결합시키고 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산을 항미생물 펩티드의 C-말단에 공유 결합시켜 안정화된 항미생물 펩티드를 생성시키고; 미생물을 안정화된 항미생물 펩티드와 접촉시키는 것을 포함하여 항미생물 펩티드를 사용하는 방법.

청구항 54.

환자에게 안정화된 형태의 펩티드 약제를 투여하는 것을 포함하여 펩티드 약제를 사용하여 치료할 수 있는 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법.

청구항 55.

제 54항에 있어서, 안정화된 형태의 펩티드 약제가 펩티드 약제의 N-말단을 포함하는 제 1 안정화기와 펩티드 약제의 C-말단을 포함하는 제 2 안정화기를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 55항에 있어서, 제 1 안정화기가 작고 안정한 단백질인 Pro-, Pro-Pro-, Xaa-Pro- 및 Xaa-Pro-Pro-로 구성된 군으로부터 선택되고; 제 2 안정화기가 작고 안정한 단백질인 -Pro, -Pro-Pro, -Pro-Xaa 및 -Pro-Pro-Xaa로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

제 56항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 4-헬릭스 번들 단백질임을 특징으로 하는 방법.

청구항 58.

제 56항에 있어서, 작고 안정한 단백질이 Rop 단백질, 글루타티온 설포트랜스퍼라제, 티오레독신, 말토오스 결합 단백질 및 글루타티온 환원효소로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 59.

제 55항에 있어서, 안정한 형태의 펩티드 약제를 투여하기 전에, 제 1 안정화기를 펩티드 약제의 N-말단에 공유 결합시키고 제 2 안정화기를 펩티드 약제의 C-말단에 공유 결합시켜 안정화된 형태의 펩티드 약제를 생성시키는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 60.

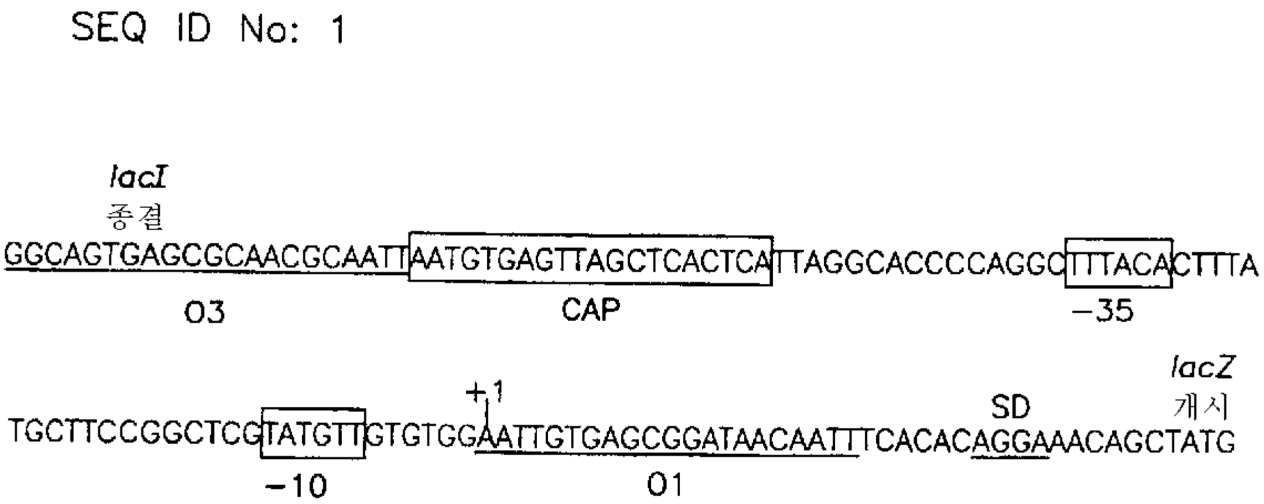
제 54항에 있어서, 안정화된 형태의 펩티드 약제가 반대 하전된 말단 모티프를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 61.

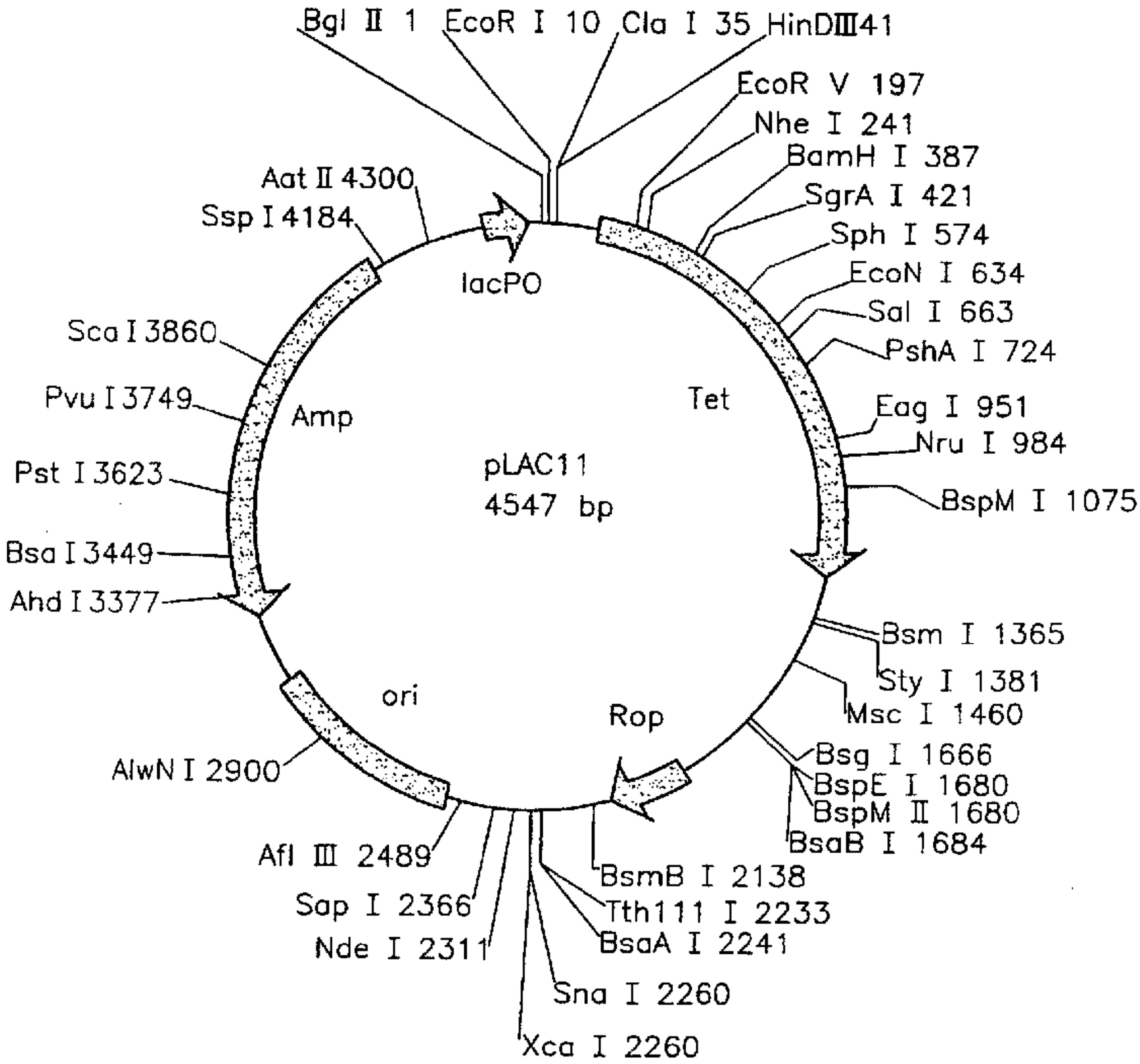
제 60항에 있어서, 안정화된 형태의 펩티드 약제를 투여하기 전에, 다수의 연속적인 균일 하전된 아미노산을 펩티드 약제의 N-말단에 공유 결합시키고 다수의 연속적인 반대 하전된 아미노산을 펩티드 약제의 C-말단에 공유 결합시켜 안정화된 형태의 펩티드 약제를 생성시키는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

도면

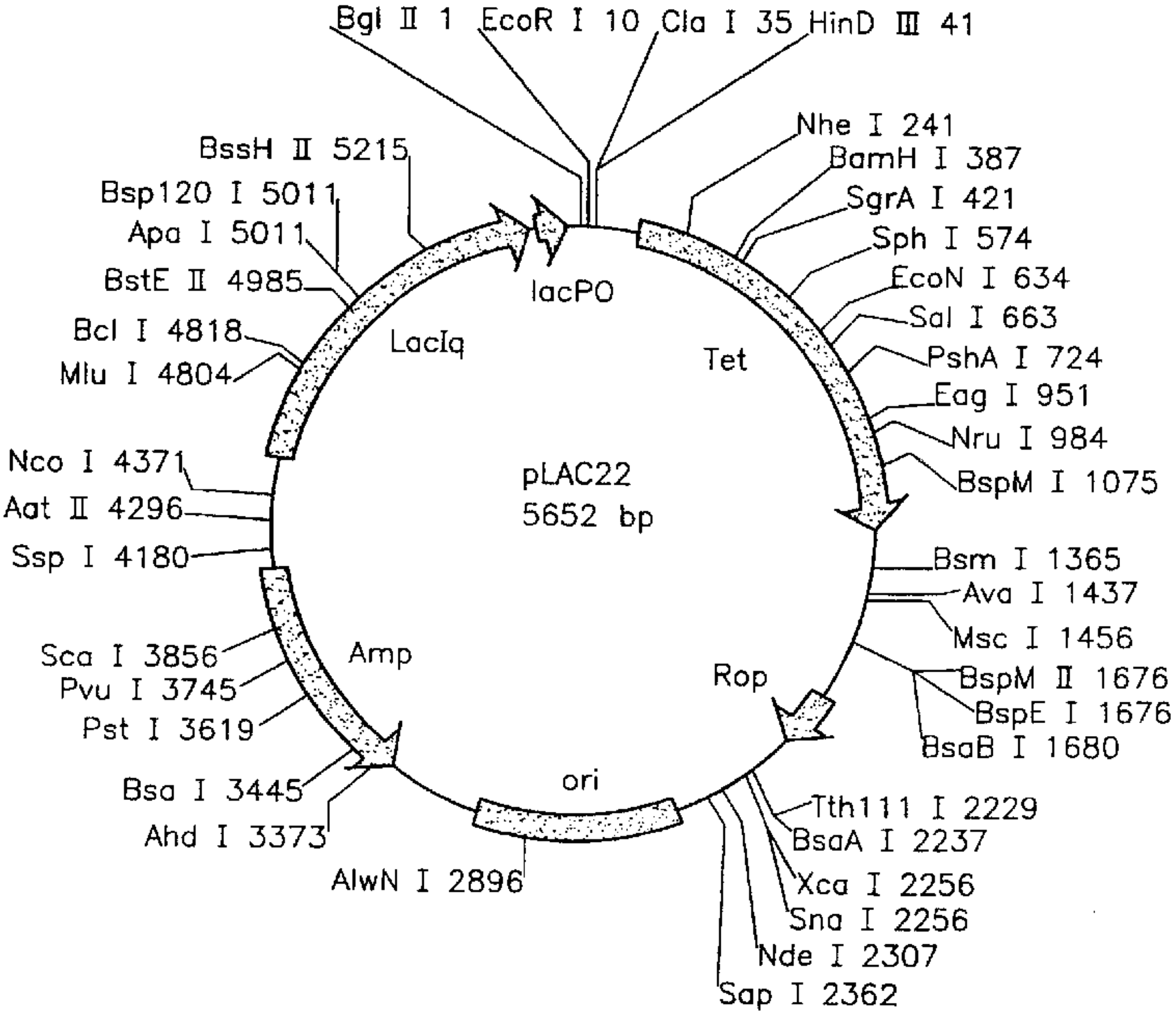
도면 1


SEQ ID No: 1
lacI
종결
GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTA
O3
CAP
−35
lacZ
+1
SD
개시
TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG
−10
O1

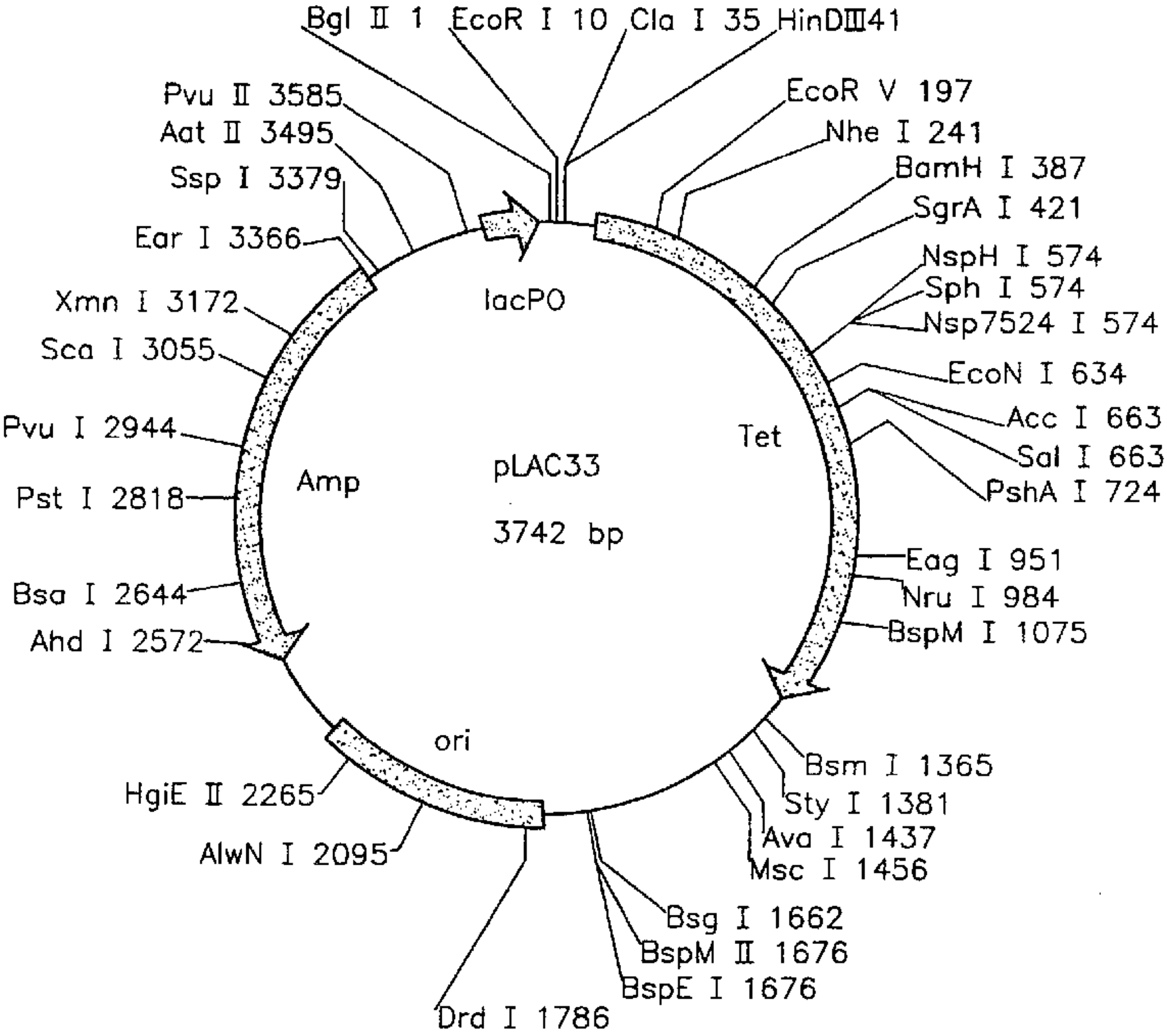
도면 2


Bgl Ⅱ 1
EcoR Ⅰ 10
Cla Ⅰ 35
HinDⅢ41
EcoR Ⅴ 197
Nhe Ⅰ 241
BamH Ⅰ 387
SgrA Ⅰ 421
Sph Ⅰ 574
EcoN Ⅰ 634
Sal Ⅰ 663
PshA Ⅰ 724
Eag Ⅰ 951
Nru Ⅰ 984
BspM Ⅰ 1075
Bsm Ⅰ 1365
Sty Ⅰ 1381
Msc Ⅰ 1460
Bsg Ⅰ 1666
BspE Ⅰ 1680
BspM Ⅱ 1680
BsaB Ⅰ 1684
BsmB Ⅰ 2138
Tth111 Ⅰ 2233
BsaA Ⅰ 2241
Sna Ⅰ 2260
Xca Ⅰ 2260
Nde Ⅰ 2311
Sap Ⅰ 2366
Afl Ⅲ 2489
AlwN Ⅰ 2900
Ahd Ⅰ 3377
Bsa Ⅰ 3449
Pst Ⅰ 3623
Pvu Ⅰ 3749
Sca Ⅰ 3860
Ssp Ⅰ 4184
Aat Ⅱ 4300
lacPO
Tet
Amp
pLAC11
4547 bp
ori
Rop

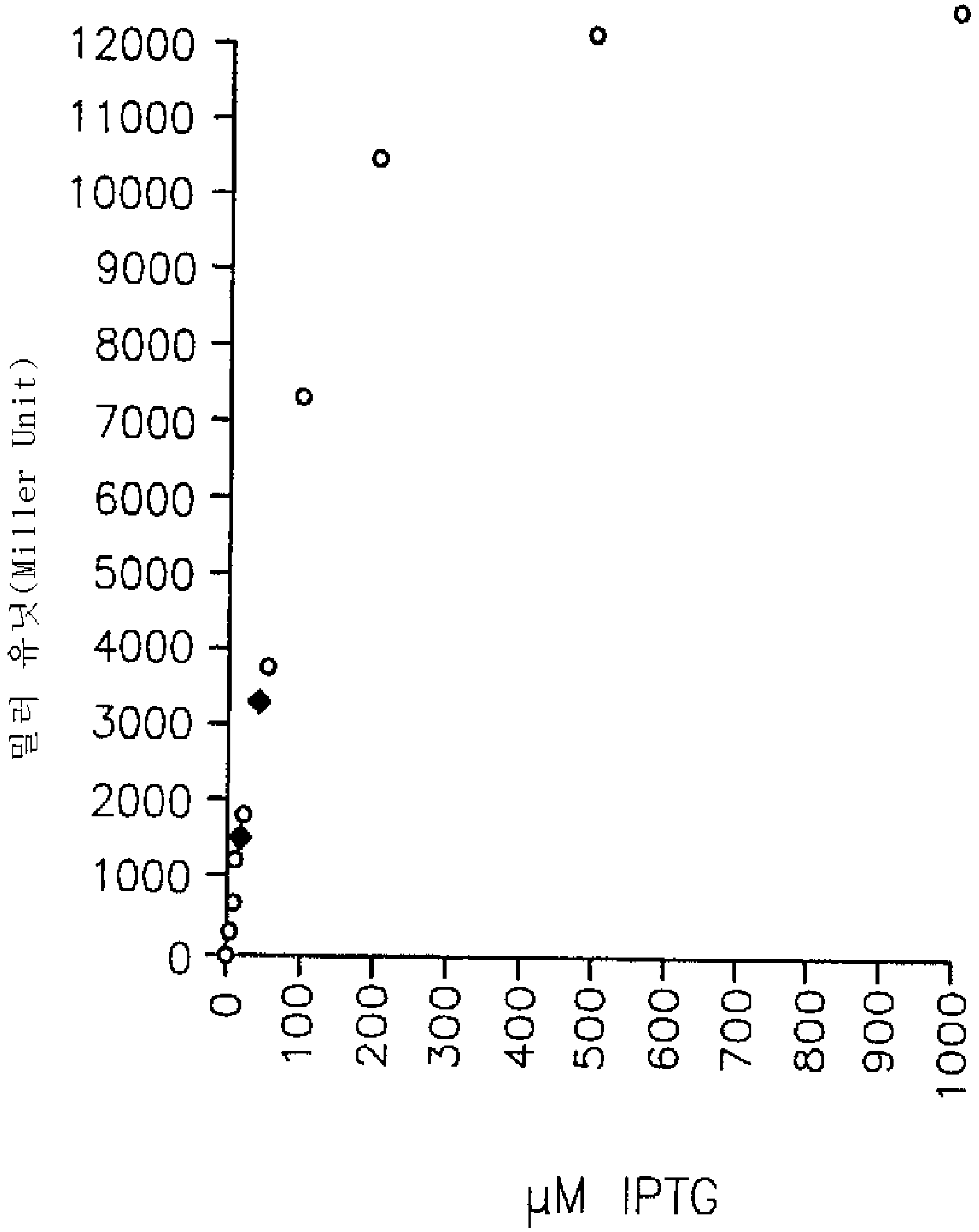
도면 3


Bgl II 1
EcoR I 10
Cla I 35
HinD III 41
Nhe I 241
BamH I 387
SgrA I 421
Sph I 574
EcoN I 634
Sal I 663
PshA I 724
Eag I 951
Nru I 984
BspM I 1075
Bsm I 1365
Ava I 1437
Msc I 1456
BspM II 1676
BspE I 1676
BsaB I 1680
Tth111 I 2229
BsaA I 2237
Xca I 2256
Sna I 2256
Nde I 2307
Sap I 2362
AlwN I 2896
Ahd I 3373
Bsa I 3445
Pst I 3619
Pvu I 3745
Sca I 3856
Ssp I 4180
Aat II 4296
Nco I 4371
Mlu I 4804
Bcl I 4818
BstE II 4985
Apa I 5011
Bsp120 I 5011
BssH II 5215
lacPO
LacIq
Tet
pLAC22
5652 bp
Amp
Rop
ori

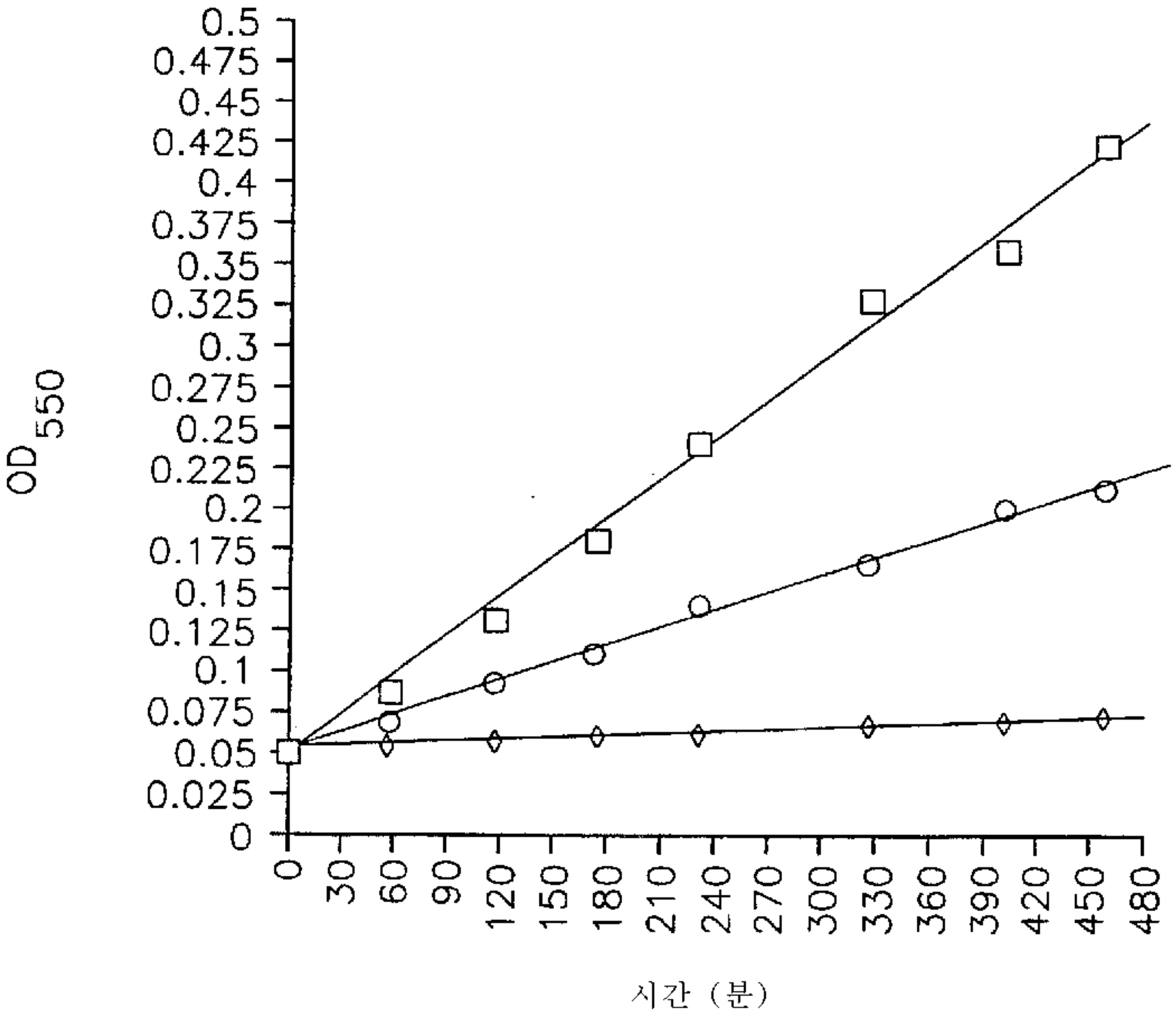
도면 4


BglII 1
EcoR I 10
Cla I 35
HinDIII41
EcoR V 197
Nhe I 241
BamH I 387
SgrA I 421
NspH I 574
Sph I 574
Nsp7524 I 574
EcoN I 634
Acc I 663
Sal I 663
PshA I 724
Eag I 951
Nru I 984
BspM I 1075
Bsm I 1365
Sty I 1381
Ava I 1437
Msc I 1456
Bsg I 1662
BspM II 1676
BspE I 1676
Drd I 1786
AlwN I 2095
HgiE II 2265
Ahd I 2572
Bsa I 2644
Pst I 2818
Pvu I 2944
Sca I 3055
Xmn I 3172
Ear I 3366
Ssp I 3379
Aat II 3495
Pvu II 3585
lacPO
Tet
Amp
ori
pLAC33
3742 bp

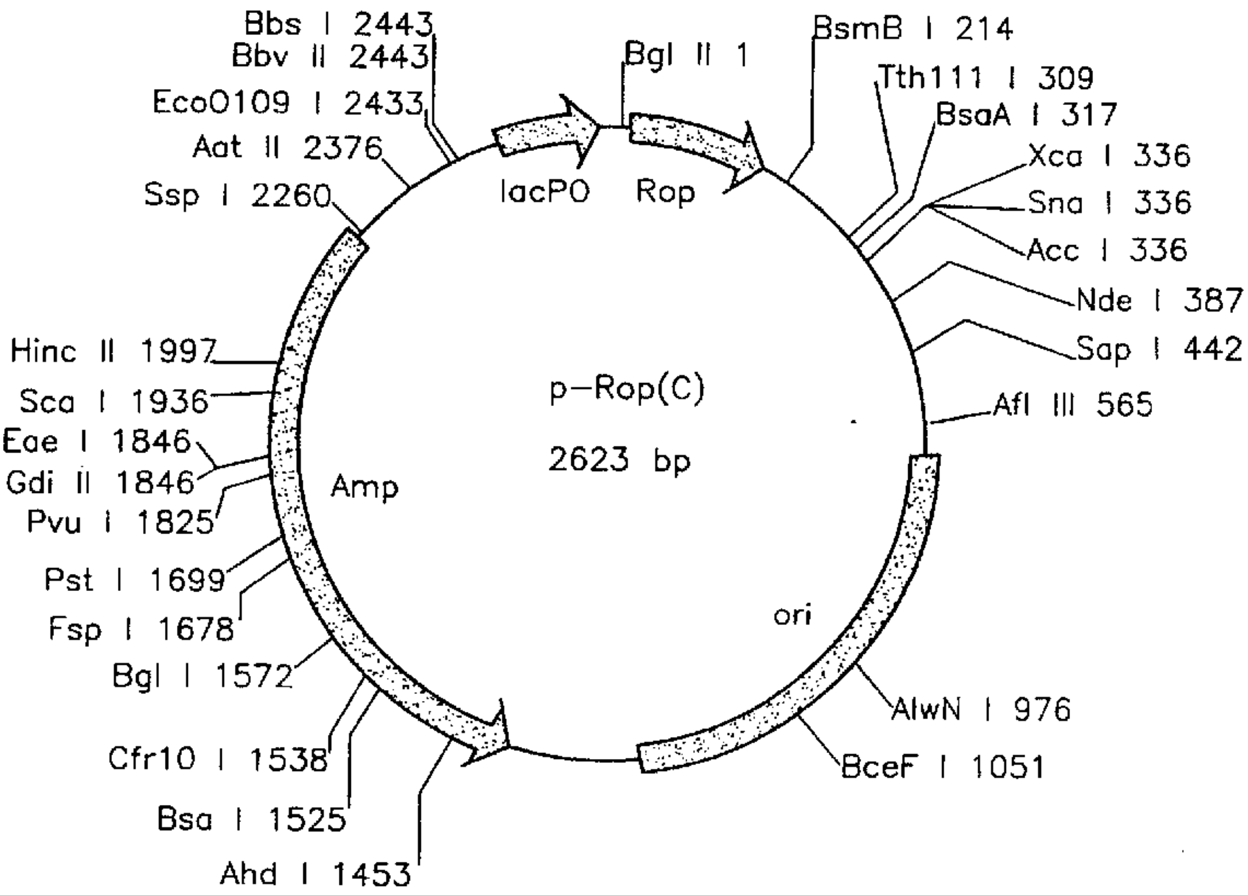
도면 5


12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
밀러 유닛(Miller Unit)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
μM IPTG

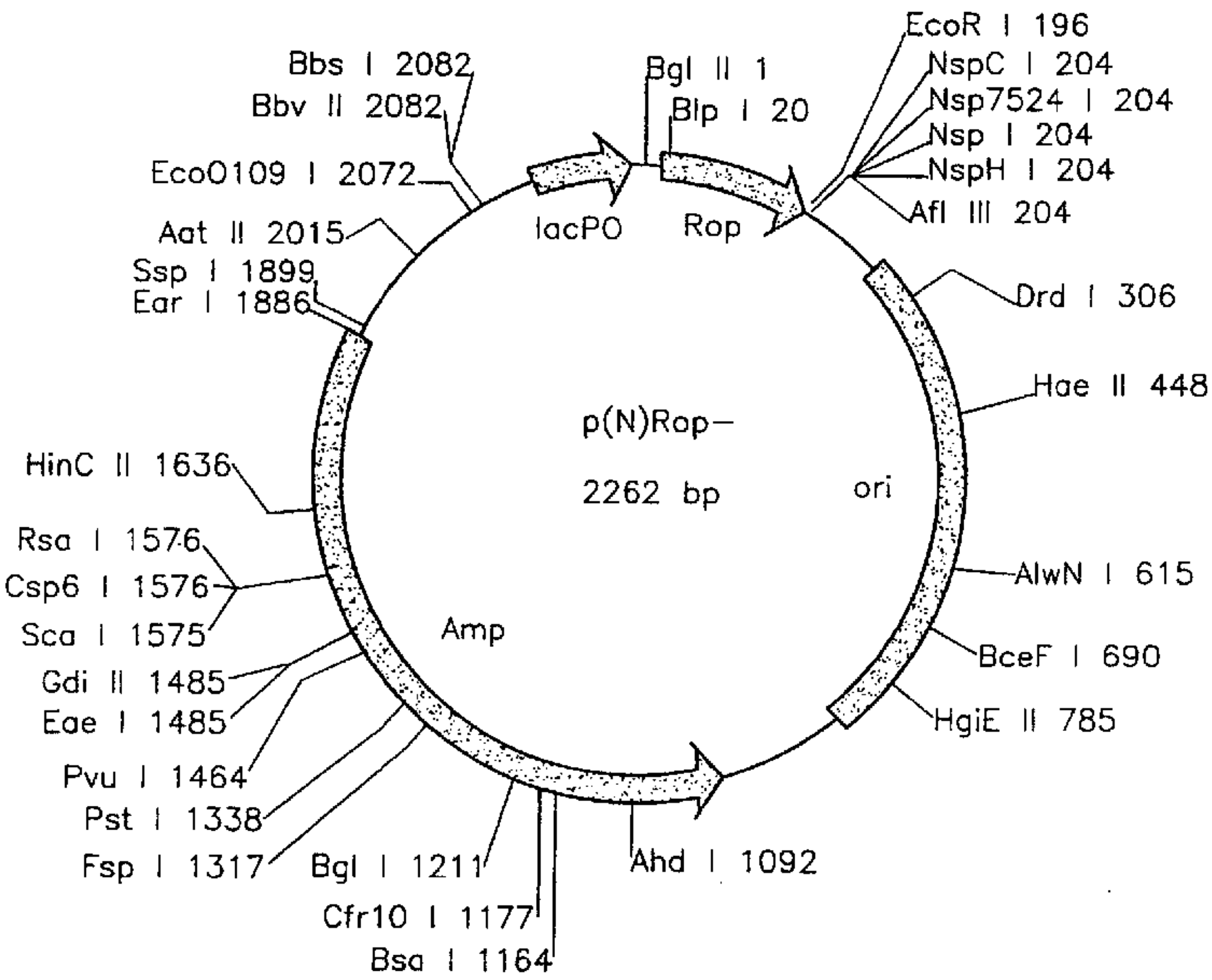
도면 6


OD$_{550}$
0.5
0.475
0.45
0.425
0.4
0.375
0.35
0.325
0.3
0.275
0.25
0.225
0.2
0.175
0.15
0.125
0.1
0.075
0.05
0.025
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
390
420
450
480
시간 (분)

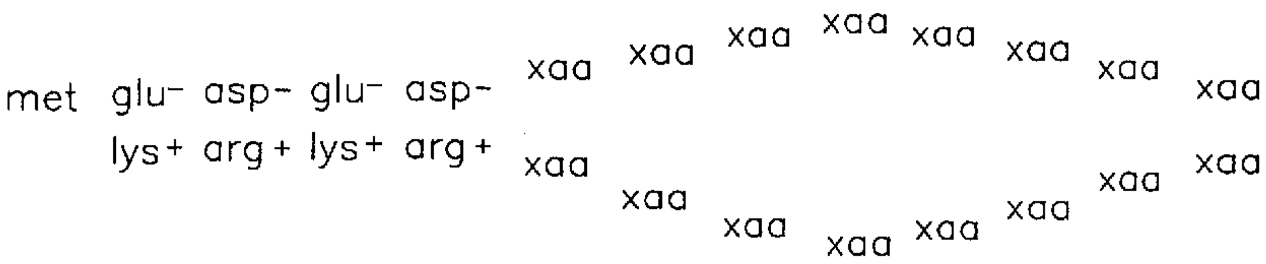
도면 7


Bbs I 2443
Bbv II 2443
Eco0109 I 2433
Aat II 2376
Ssp I 2260
Bgl II 1
lacPO
Rop
BsmB I 214
Tth111 I 309
BsaA I 317
Xca I 336
Sna I 336
Acc I 336
Nde I 387
Sap I 442
Afl III 565
p-Rop(C)
2623 bp
Amp
ori
Hinc II 1997
Sca I 1936
Eae I 1846
Gdi II 1846
Pvu I 1825
Pst I 1699
Fsp I 1678
Bgl I 1572
Cfr10 I 1538
Bsa I 1525
Ahd I 1453
AlwN I 976
BceF I 1051

도면 8



도면 9



SEQUENCE LISTING
<110> Altman, Elliot
      THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC

```
<120> STABILIZED BIOACTIVE PEPTIDES AND METHODS OF
      IDENTIFICATION, SYNTHESIS AND USE
<130> 235.00010201
<140> Unassigned
<141> 1999-10-12
<150> 60/104,013
<151> 1998-10-13
<150> 60/112,150
<151> 1998-12-14
<160> 110
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 133
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<400> 1
ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta 60
cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 120
ggaaacagct atg                                                    133
<210> 2
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  peptide
      having opposite charge ending motif
<400> 2
Met Glu Asp Glu Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
  1               5                  10                  15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Arg Lys
             20                  25
<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      angiotensin
<400> 3
Pro Pro Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Ile Pro Pro
  1               5                  10
<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      angiotensin
<400> 4
Glu Asp Glu Asp Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Ile Arg Lys
```

```
  1               5                  10                  15
Arg Lys
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Ile
  1               5                  10
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 6
gttgccattg ctgcaggcat                                             20
<210> 7
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 7
attgaattca taagatcttt cctgtgtgaa attgttatcc gc                    42
<210> 8
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 8
attgaattca ccatggacac catcgaatgg tgcaaaa                          37
<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 9
gttgttgcca ttgctgcag                                              19
<210> 10
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 10
tgtatgaatt cccgggtacc atggttgaag acgaaagggc ctc                   43
<210> 11
```

<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 11
tactatagat ctatgaccat gattacggat tcactg 36
<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 12
tacataaagc ttggcctgcc cggttattat tatttt 36
<210> 13
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 13
tatcatctgc agaggaaaca gctatgacca tgattacgga ttcactg 47
<210> 14
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 14
tacatactcg agcaggaaag cttggcctgc ccggttatta ttatttt 47
<210> 15
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 15
tatcatggat ccaggaaaca gctatgacca tgattacgga ttcactg 47
<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 16
tactatagat ctatggctat cgacgaaaac aaacag 36
<210> 17
<211> 40
<212> DNA

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 17
atatataagc ttttaaaaat cttcgttagt ttctgctacg                        40
<210> 18
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 18
tactatagat ctatgaacaa aggtgtaatg cgacc                             35
<210> 19
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 19
attagtgaat tcgcacaatc tctgcaataa gtcgt                             35
<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
      fragment
<400> 20
agatcttatg aattc                                                   15
<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
      fragment
<400> 21
agatcttatg aattc                                                   15
<210> 22
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
      fragment
<400> 22
agatcttatg aattc                                                   15
<210> 23
<211> 93
```

```
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucleotide
<400> 23
tactatagat ctatgnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnntaata agaattctcg aca                               93
<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 24
tgtcgagaat tcttatta                                                18
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 25
tcattaatgc agctggcacg                                              20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 26
ttcatacacg gtgcctgact                                              20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 27
tagctcactc attaggcacc                                              20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 28
gatgacgatg agcgcattgt                                              20
<210> 29
<211> 92
```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: antisense
      oligonucleotide
<400> 29
tactatagat ctacggtcac tgaattttgt ggcttgttgg accaactgcc ttagtaatag 60
tggaaggctg aaattaataa gaattctcga ca   92
<210> 30
<211> 91
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: antisense
      oligonucleotide
<400> 30
tactatagat ctacgtggcg ggactcatgg attaagggta gggacgtggg gtttatgggt 60
taaaatagtt tgataataag aattctcgac a   91
<210> 31
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: antisense
      oligonucleotide
<400> 31
tactatagat ctacgaacgg ccgaaccaaa cgaatccggg acccaccagc cgcctaaaca 60
gctaccagct gtggtaataa gaattctcga ca   92
<210> 32
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: antisense
      oligonucleotide
<400> 32
tactatagat ctacggaccg tgaagtgatg tgtgcggcaa aacaggaatg gaaggaacga 60
acgccatagg ccgcgtaata agaattctcg aca   93
<210> 33
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: antisense
      oligonucleotide
<400> 33
tactatagat ctacgagggg cgccaactaa gggggggga aggtatttgt cccgtgcata 60
atctcgggtg ttgtctaata agaattctcg aca   93
<210> 34
<211> 13

```
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  stabilized
      peptide
<400> 34
Met Val Thr Glu Phe Cys Gly Leu Leu Asp Gln Leu Pro
  1               5                  10
<210> 35
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 35
caggaaagat ctatggtcac tgaattttgt ggcttgttgg accaactgcc ttagtaatag 60
tggaaggctg aaattaataa gaattc                                      86
<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 36
Met Trp Arg Asp Ser Trp Ile Lys Gly Arg Asp Val Gly Phe Met Gly
  1               5                  10                  15
<210> 37
<211> 85
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 37
caggaaagat ctatgtggcg ggactcatgg attaagggta gggacgtggg gtttatgggt 60
taaaatagtt tgataataag aattc                                       85
<210> 38
<211> 141
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 38
caggaaagat ctatgtcagg gggacatgtg acgagggagt gcaagtcggc gatgtccaat 60
cgttggatct acgtaataag aattctcatg tttgacagct tatcatcgat aagctttaat 120
gcggtagttt atcacagtta a                                           141
<210> 39
```

```
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 39
Met Ser Gly Gly His Val Thr Arg Glu Cys Lys Ser Ala Met Ser Asn
  1               5                   10                  15
Arg Trp Ile Tyr Val Ile Arg Ile Leu Met Phe Asp Ser Leu Ser Ser
             20                  25                  30
Ile Ser Phe Asn Ala Val Val Tyr His Ser
         35                  40
<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 40
Met Tyr Leu Phe Ile Gly
  1               5
<210> 41
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 41
caggaaagat ctatgtattt gttcatcgga taatacttaa tggtccgctg gagaacttca 60
gtttaataag aattc                                                  75
<210> 42
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 42
caggaaagat ctatgcttct atttgggggg gactgcgggc agaaagccgg atactttact 60
gtgctaccgt caaggtaata agaattc                                     87
<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
```

```
<400> 43
Met Leu Leu Phe Gly Gly Asp Cys Gly Lys Ala Gly Tyr Phe Thr Val
  1               5                  10                  15
Leu Pro Ser Arg
             20
<210> 44
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 44
caggaaagat ctatgattgg gggatcgttg agcttcgcct gggcaatagt ttgtaataag 60
aattctcatg tttga                                                  75
<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 45
Met Ile Gly Gly Ser Leu Ser Phe Ala Trp Ala Ile Val Cys Asn Lys
  1               5                  10                  15
Asn Ser His Val
             20
<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 46
Met Asn Gly Arg Thr Lys Arg Ile Arg Asp Pro Pro Ala Ala
  1               5                  10
<210> 47
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 47
caggaaagat ctatgaacgg ccgaaccaaa cgaatccggg acccaccagc cgcctaaaca 60
gctaccagct gtggtaataa gaattc                                      86
<210> 48
<211> 18
<212> PRT
```

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 48
Met Asp Arg Glu Val Met Cys Ala Ala Lys Gln Glu Trp Lys Glu Arg
  1               5                  10                  15
Thr Pro
<210> 49
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 49
caggaaagat ctatggaccg tgaagtgatg tgtgcggcaa aacaggaatg gaaggaacga 60
acgccatagg ccgcgtaata agaattc                                     87
<210> 50
<211> 87
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 50
caggaaagat ctatgtagcc caatgcactg ggagcacgcg tgttaggtct agaagccacg 60
tacccattta atccataata agaattc                                     87
<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 51
Met Leu Gly Leu Glu Ala Thr Tyr Pro Phe Asn Pro
  1               5                  10
<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 52
Met Arg Gly Ala Asn
  1               5
<210> 53
<211> 87
```

```
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 53
caggaaagat ctatgagggg cgccaactaa ggggggggga aggtatttgt cccgtgcata 60
atctcgggtg ttgtctaata agaattc                                     87
<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: N-terminal
      protective sequence
<400> 54
Xaa Pro Pro Xaa
  1
<210> 55
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 55
tactatagat ctatgaccaa acaggaaaaa accgcc                           36
<210> 56
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 56
tatacgtatt cagttgctca catgttcttt cctgcg                           36
<210> 57
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 57
aattcatact atagatctat gaccaaacag gaaaaaaccg c                     41
<210> 58
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 58
tatataatac atgtcagaat tcgaggtttt caccgtcatc ac                    42
```

<210> 59
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucloetide
<400> 59
tactatagat ctatgnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnncatag atctgcgtgc tgtgat   96
<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 60
atcacagcac gcagatctat g   21
<210> 61
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucleotide
<400> 61
tactatgaat tcnnngaatt ctgccaccac tactat   36
<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 62
atagtagtgg tggcagaatt c   21
<210> 63
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucleotide
<400> 63
tactatagat ctatgccgcc gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nccgccgtaa taagaattcg tacat   105
<210> 64
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

```
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 64
atgtacgaat tcttattacg gcgg                                        24
<210> 65
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucleotide
<400> 65
tactatagat ctatgvanva nvanvanvan vanvanvanv anvanvanva nvanvanvan 60
vanvantaat aagaattctg ccagcactat                                  90
<210> 66
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 66
atagtgctgg cagaattctt atta                                        24
<210> 67
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: randomized
      oligonucleotide
<400> 67
tactatagat ctatggaaga cgaagacnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn 60
nnnnnnnnn nnnnncgtaa acgtaaataa taagaattcg tacat                 105
<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 68
atgtacgaat tcttattatt tacgtttacg                                  30
<210> 69
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 69
agatctatgc cgccgattct atggggcgaa gcgagaaagc gcttgtgggg tggggatcat 60
acaccgccgt aataagaatt c                                           81
<210> 70
```

```
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 70
Met Pro Pro Ile Leu Trp Gly Glu Ala Arg Lys Arg Leu Trp Gly Gly
  1               5                  10                  15
Asp His Thr Pro Pro
             20
<210> 71
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 71
agatctatgc cgccgccgtt ggatattgtg tcgggtattg aggtaggggg gcatttgtgg 60
tgccgccgta ttaagaattc tcatgtttga                                  90
<210> 72
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 72
Met Pro Pro Pro Leu Asp Ile Val Ser Gly Ile Glu Val Gly Gly His
  1               5                  10                  15
Leu Trp Cys Arg Arg Ile Lys Asn Ser His Val
             20                  25
<210> 73
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 73
agatctatgc cgccggacaa tccggtcctg tgatgaagcg gaggtcgacc aaggggatat 60
cagccgccgt aataagaatt c                                           81
<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
```

```
<400> 74
Met Pro Pro Asp Asn Pro Val Leu
  1               5
<210> 75
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 75
agatctatgc cgccgctatt ggacggagat gacaaataga tatatgcgtg gttgtttttc 60
tgtccgccgt aataagaatt c                                           81
<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 76
Met Pro Pro Leu Leu Asp Gly Asp Asp Lys
  1               5                  10
<210> 77
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 77
agatctatgc cgccgaggtg gaagatgttg ataagacagt gacagatgcg ttccattact 60
cccgccgtaa taagaattc                                             79
<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 78
Met Pro Pro Arg Trp Lys Met Leu Ile Arg Gln
  1               5                  10
<210> 79
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  nucleic acid
      encoding stabilized peptide
```

```
<400> 79
agatctatga tgagagtagc gccgccgtaa taagaattc                        39
<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 80
Met Met Arg Val Ala Pro Pro
  1               5
<210> 81
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 81
agatctatgc cgccgttgcg cggggcatgc gatgtatatg gggtaaattg aatgtcttgt 60
gggccgccgt aataagaatt c                                           81
<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 82
Met Pro Pro Leu Arg Gly Ala Cys Asp Val Tyr Gly Val Asn
  1               5                  10
<210> 83
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 83
agatctatgc cgccggggag aggggaagcg gtgggagtga catgcttgag cgcgaacgtg 60
tacccgccgt aataagaatt c                                           81
<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 84
```

Met Pro Pro Gly Arg Gly Glu Ala Val Gly Val Thr Cys Leu Ser Ala
1 5 10 15
Asn Val Tyr Pro Pro
20
<210> 85
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
encoding stabilized peptide
<400> 85
agatctatgc cgccgggaag ggtagtgttc tttgtcgcta tctttgtttc cgcaatatgc 60
ctcccgccgt aataagaatt c 81
<210> 86
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
peptide
<400> 86
Met Pro Pro Gly Arg Val Val Phe Phe Val Ala Ile Phe Val Ser Ala
1 5 10 15
Ile Cys Leu Pro Pro
20
<210> 87
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
encoding stabilized peptide
<400> 87
agatctatgc cgccgaggtt cgctcatgag agtgttaaag ggctggggga cgttacaaaa 60
gctccgccgt aataagaatt c 81
<210> 88
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
peptide
<400> 88
Met Pro Pro Arg Phe Ala His Glu Ser Val Lys Gly Leu Gly Asp Val
1 5 10 15
Thr Lys Ala Pro Pro
20
<210> 89
<211> 72

```
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 89
agatctatgc atgacgaaca agaggaggag cacaataaaa aggataacga aaaagaacac 60
taataagaat tc                                                     72
<210> 90
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 90
Met His Asp Glu Gln Glu Glu Glu His Asn Lys Lys Asp Asn Glu Lys
  1               5                  10                  15
Glu His
<210> 91
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 91
agatctatgc agcaggagca cgagcaaggc aggatgagca agaggatgaa gaataataag 60
aattctcatg tttga                                                  75
<210> 92
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 92
Met Gln Gln Glu His Glu Gln Gly Arg Met Ser Lys Arg Met Lys Asn
  1               5                  10                  15
Asn Lys Asn Ser His Val
             20
<210> 93
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 93
agatctatga accatcataa tgaggccatg atcaacacaa tgaaaacgag gaataataag 60
```

```
aattctcatg tttga                                                  75
<210> 94
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 94
Met Asn His His Asn Glu Ala Met Ile Asn Thr Met Lys Thr Arg Asn
  1               5                  10                  15
Asn Lys Asn Ser His Val
             20
<210> 95
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 95
agatctatga acgacgacaa tcagcaagag gataatcatg atcagcataa ggataacaaa 60
taataagaat tc                                                     72
<210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 96
Met Asn Asp Asp Asn Gln Gln Glu Asp Asn His Asp Gln His Lys Asp
  1               5                  10                  15
Asn Lys
<210> 97
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 97
agatctatgc aagagcagga tcagcataat gataaccatc acgaggataa acataagaag 60
taataagaat tc                                                     72
<210> 98
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
```

```
      peptide
<400> 98
Met Gln Glu Gln Asp Gln His Asn Asp Asn His His Glu Asp Lys His
  1               5                  10                  15
Lys Lys
<210> 99
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 99
agatctatgg aagacgaaga cgagggtgcg tcagcgtggg gagcagaact ttggtcgtgg 60
cagtcggtgc gtaaacgtaa ataataagaa ttc                               93
<210> 100
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 100
Met Glu Asp Glu Asp Glu Gly Ala Ser Ala Trp Gly Ala Glu Leu Trp
  1               5                  10                  15
Ser Trp Gln Ser Val Arg Lys Arg Lys
             20                  25
<210> 101
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 101
agatctatgg aagacgaaga cggtctaggc atggggggtg ggttggtcag gctcacttta 60
ttattcttcc gtaaacgtaa ataataagaa ttc                               93
<210> 102
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 102
Met Glu Asp Glu Asp Gly Leu Gly Met Gly Gly Gly Leu Val Arg Leu
  1               5                  10                  15
Thr Leu Leu Phe Phe Arg Lys Arg Lys
             20                  25
<210> 103
```

```
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 103
agatctatgg aagacgaaga cggggagagg atccaggggg cccgctgtcc agtagcgctg 60
gtagatagac gtaaacgtaa ataataagaa ttc                              93
<210> 104
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 104
Met Glu Asp Glu Asp Gly Glu Arg Ile Gln Gly Ala Arg Cys Pro Val
  1               5                  10                  15
Ala Leu Val Asp Arg Arg Lys Arg Lys
             20                  25
<210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 105
Met Glu Asp Glu Asp Asp Arg Gly Arg Gly Arg
  1               5                  10
<210> 106
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 106
agatctatgg aagacgaaga cgacaggggg cgtgggcggt agctttaagt tgcgctaagt 60
tgcgagatac gtaaacgtaa ataataagaa ttc                              93
<210> 107
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 107
agatctatgg aagacgaaga cgggggggcc gggaggaggg cctgtctttg ttccgcgctt 60
```

```
gttggggaac gtaaacgtaa ataataagaa ttc                              93
<210> 108
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 108
Met Glu Asp Glu Asp Gly Gly Ala Gly Arg Arg Ala Cys Leu Cys Ser
  1               5                  10                  15
Ala Leu Val Gly Glu Arg Lys Arg Lys
             20                  25
<210> 109
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: nucleic acid
      encoding stabilized peptide
<400> 109
agatctatgg aagacgaaga caagcgtcgc gagaggagtg caaaagggcg tcatgtcggt 60
cggtcgatgc gtaaacgtaa ataagactgt                                  90
<210> 110
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: stabilized
      peptide
<400> 110
Met Glu Asp Glu Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ser Ala Lys Gly Arg His
  1               5                  10                  15
Val Gly Arg Ser Met Arg Lys Arg Lys
             20                  25
```