



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년08월09일
C12N 15/12 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0748293
	(24) 등록일자	2007년08월03일

(21) 출원번호	10-2005-7019204(분할)	(65) 공개번호	10-2005-0107527
(22) 출원일자	2005년10월10일	(43) 공개일자	2005년11월11일
심사청구일자	2005년10월10일		
번역문 제출일자	2005년10월10일		
(62) 원출원	특허10-2000-7009953		
	원출원일자 : 2000년09월08일	심사청구일자	2003년05월07일
(86) 국제출원번호	PCT/IL1999/000158	(87) 국제공개번호	WO 1999/47672
국제출원일자	1999년03월18일	국제공개일자	1999년09월23일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장	123758	1998년03월19일	이스라엘(IL)
	126024	1998년09월01일	이스라엘(IL)

(73) 특허권자

예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 76100 피.오. 박스 95 웨이쯔만 인스티튜트 오브 사이언스

(72) 발명자

알라치, 데이비드
이스라엘 레호보트 76406, 보로초브 스트리트 24

코발레코, 안드레이
이스라엘, 레호보트 76100, 웨이쯔만 인스티튜트 오브 사이언스, 베이트 크로레

(74) 대리인 강명구
 강석용

(56) 선행기술조사문헌
WO 96/25941

WO 96/36730

심사관 : 조명선

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) TNF/NGF 수용체 패밀리와 다른 단백질의 수용체의기능조절물질

(57) 요약

염증, 세포 생존, 세포 사멸경로에서 RIP의 세포내 활성을 조절 또는 조정할 수 있는 신규한 단백질을 제공한다. 또한, 이를 인코딩한 DNA, 이의 생산 방법, 이의 용도를 제공한다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

RAP-2(Receptor Interaction Protein Associated Protein-2)와 결합할 수 있는 단백질을 분리하고, 확인하는 방법에 있어서,

곰팡이 이중-하ybrid 과정을 적용하고, 여기서, RAP-2를 인코딩하는 서열(서열 1, 2)은 하나의 하ybrid 벡터에 의해 운반되고, cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리로부터 얻은 서열은 제 2 하ybrid 벡터에 의해 운반되고;

상기 벡터를 이용하여 곰팡이 숙주세포를 형질전환시키고;

형질전환된 파지티브 세포를 분리하고;

상기 제 2 하ybrid 벡터를 추출하여 RAP-2 단백질과 결합하는 단백질을 인코딩하는 서열을 수득하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

1. 기술분야

본 발명은 TNF/NGF 슈퍼패밀리 수용체에 속하는 수용체 및 이들의 생물학적 기능의 조절 분야에 관한다. TNF/NGF 슈퍼패밀리 수용체에는 p55 및 p75 종양 괴사 인자 수용체(TNF-Rs, 이후, p55-R 및 p75-R로 통칭), FAS 리간드 수용체(FAS/APO1 또는 FAS-R, 이후 FAS-R로 통칭), 다른 수용체가 포함된다. 특히, 본 발명은 TNF/NGF 수용체 패밀리의 구성원 및 다른 세포내 조절 단백질과 직접 또는 간접적으로 결합하는 다른 단백질과 결합하는 신규한 단백질에 관한다.

좀더 구체적으로, RAP-2(RIP-결합 단백질-2) 단백질, 이의 동소체, 단편, 유도체, RAP-2와 결합하는 단백질에 관한다.

RAP-2는 RIP("수용체 상호작용 단백질")과 결합하고, RIP의 기능을 조절 또는 조정할 수 있고, 따라서, RIP와 직접 또는 간접적으로 결합하는 다른 단백질의 기능을 직접 또는 간접적으로 조절 또는 조정할 수 있다. RAP-2 결합 단백질은 RAP-2 기능의 조절물질/조절물질이다.

2. 기술분야

종양 괴사 인자(TNF- α)와 임파독신(TNF- β)(이후, TNF는 TNF- α 와 TNF- β 를 의미한다)은 단핵 식세포에 의해 주로 만들어지는 다기능 친-염증성 사이토킨으로, 세포에 많은 영향을 준다(Wallach, D. 1986 In: Interferon 7 (Ion Gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, London; and Beutler and Cerami (1987)). TNF- α 와 TNF- β 는 특정 세포 표면 수용체에 결합하여 이들 효과를 개시한다. 일부 효과는 미생물에 유익한데, 예를 들면, 이들은 종양 세포 또는 바이러스에 감염된 세포를 파괴하고, 입상세포의 항균 활성을 증가시킨다. 이런 방식으로, TNF는 종양과 감염성 물질로부터 미생물의 방어에 기여하고, 손상으로부터 회복을 촉진한다. 따라서, TNF는 항-종양 물질로 이용할 수 있는데, 여기서, 이것은 종양 세포 표면의 수용체에 결합하고, 따라서, 종양 세포를 죽음에 이르게 한다. TNF는 또한, 항-감염성 물질로 이용할 수 있다.

하지만, TNF- α 및 TNF- β 는 유해한 효과를 가진다. TNF- α 의 과다생산은 몇 가지 질병에서, 주요 병인 역할을 한다. 가령, 맥관구조에 대한 TNF- α 의 효과는 폐혈증 쇼크 증상의 주원인인 것으로 알려져 있다(Tracey et al., 1986). 일부 질병에서, TNF는 지방세포의 활성을 억제하고, 식욕감퇴를 일으켜 지나친 체중감소(악액질)를 야기하여, TNF- α 는 카케틴(cachetin)이라 불렸다. 또한, 류머티스 질환에서 조직 파괴의 매개물질(Beutler and Cerami, 1987)로, 이식편-숙주 반응에서 관찰되는 손상의 주요 매개물질(Piquet et al., 1987)로 알려졌다. 또한, TNF는 염증 과정 및 많은 다른 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다.

독립적으로 발현되는 2개의 수용체인 p55 및 p75 TNF-Rs(각각 특이적으로 TNF- α 및 TNF- β 와 결합)는 전술한 TNF의 생물학적 효과를 개시하고 조절한다. 이들 2개의 수용체는 구조적으로 다른 세포내 도메인을 보유하는데, 이것은 이들이 다른 시그널을 만든다는 것을 암시한다(Hohmann et al., 1989; Engelmann et al., 1990; Brockhaus et al., 1990;

Leotscher et al., 1990; Schall et al., 1990; Nophar et al., 1990; Smith et al., 1990; and Heller et al., 1990)). 하지만, 세포내 기작, 예를 들면, p55 및 p75 TNF-Rs의 세포내 시그널발생에 관계하는 다양한 단백질 및 다른 기능인자에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다. 리간드, 다시 말하면, TNF(α 또는 β)와 수용체의 결합 후에 발생하는 세포내 시그널은 반응 캐스케이드를 개시하고, 최종적으로, TNF에 대한 세포의 반응을 유발시킨다.

현재까지 연구된 대부분 세포에서, 전술한 TNF의 세포파괴 효과에 있어서, 이런 효과는 주로 p55 TNF-R에 의해 촉발된다. p55 TNF-R의 세포외 도메인(리간드 결합 도메인)에 대한 항체 자체가 세포파괴 효과를 촉진하는데(EP 412486참고), 이는 항체에 의한 수용체 교차 연결의 효능과 상관하며, 세포내 시그널발생 과정의 의 제 1 단계로 보인다. 또한, 돌연변이 연구에서(Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993), p55 TNF-R의 생물학적 기능은 세포내 도메인의 보존성에 의존하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, TNF의 세포파괴 효과를 유도하는 세포내 시그널의 개시는 p55 TNF-R의 두 개 이상 세포내 도메인의 결합결과로 발생하는 것으로 추정된다. 또한, TNF(α 및 β)은 동중량체로 생성되고, 수용체 분자에 결합하여, 이를 교차-연결시키는 능력, 다시 말하면, 수용체 집합을 야기하는 능력에 의해, p55 TNF-R을 통하여 세포내 시그널을 유도하는 것으로 알려져 있다.

TNF/NGF 슈퍼패밀리 수용체의 다른 구성원은 FAS 수용체(FAS-R)로, 이는 FAS 항원으로 불리기도 하는데, 이는 다양한 조직에서 발현되고, TNF-R 및 NGF-R을 포함하여 다수의 세포-표면 수용체와 상동성을 공유하는 세포 표면 단백질이다. FAS-R은 아파토시스 형태로 세포 죽음을 중개하고(Itoh et al., 1991), T 세포의 성숙동안 자가활성 T 세포의 네거티브 선택물질로써 작용하는 것으로 보인다. FAS-R은 자가-항원을 인지하는 T 세포의 아파토시스성 죽음을 중개한다. FAS-R 유전자(*lpr*)에서 돌연변이는 쥐에서 임파종식 질환을 일으키는 것으로 밝혀졌는데, 이 질환은 사람의 자가면역 질환인 전신 홍반성 낭창(SLE)(Watanabe-Fukunaga et al., 1992)과 유사하다. FAS-R에 대한 리간드는 주로 킬러 T 세포(또는 세포독성 T 임파세포-CTLs)에 의해 운반되는 세포-표면 결합분자인 것으로 보이고, 따라서, 이런 CTLs는 FAS-R을 보유한 세포와 접촉하였을 때, FAS-R-보유 세포의 아파토시스성 세포 죽음을 유도할 수 있다. 또한, FAS-R에 특이적인 단클론 항체를 준비하는데, 이들 단클론 항체는 사람 FAS-R을 인코딩하는 cDNA에 의해 형질변환된 생쥐 세포를 비롯하여 FAS-R을 보유한 세포에서 아파토시스성 세포 죽음을 유도할 수 있다(Itoh et al., 1991).

출원인은 다수의 출원(EP 186833, EP 308378, EP 398327, EP 412486)에서, TNF와 이의 수용체의 결합을 저해하여 TNF의 유해한 효과를 조절하는 방법을 연구하였는데, 여기서, 세포 표면-결합 TNF-Rs와 TNF의 결합과 경쟁하기 위하여 가용성 TNF 수용체(수용체의 가용성 세포의 도메인이 필수적) 또는 항-TNF 항체를 이용하였다. 또한, TNF 수용체와 TNF의 결합이 TNF-유도된 세포효과에 필요하다는 것에 기초하여, 출원인은 TNF-Rs의 활성을 조절함으로써 TNF 효과를 조절하였다(EPO 568925).

간단히 말하면, EPO 568925는 TNF-Rs에서 시그널 유도 또는 분할을 조절하는 방법에 관하는데, 여기서, 펩티드 또는 다른 분자는 수용체 자체 또는 주효체 단백질과 상호작용할 수 있는 다른 효과물질과 상호작용하여, TNF-Rs의 정상 기능을 조절한다. EPO 568925에서는 세포외 도메인, 막통과 도메인, 세포내 도메인에 돌연변이를 가지는 다양한 CD120a 돌연변이를 작제하고, 이의 특징을 조사하였다. 이런 방식으로, CD120a의 상기 도메인내 영역은 수용체의 기능, 다시 말하면, 리간드(TNF)의 결합, 연이은 시그널 유도, 세포내 시그널 전달, 최종적으로 세포에서 관찰되는 TNF 효과의 발생에 필수적이다. 또한, TNF-R의 상기 다양한 도메인에 결합할 수 있는 단백질, 펩티드 또는 다른 인자를 분리 및 확인하는 여러 가지 방법에 대해 설명하는데, 여기서, 단백질, 펩티드, 다른 인자는 TNF-R의 활성 조절 또는 조정에 관계한다. 이와 같은 단백질 및 펩티드를 인코딩하는 DNA 서열의 분리 및 클로닝 방법; 이들 단백질 및 펩티드를 생산하기 위한 발현 벡터의 작제 방법; CD120a 또는 CD120a의 다양한 부분에 결합하는 상기 단백질 및 펩티드와 상호작용하는 항체 또는 이의 단편을 제조하는 방법은 EPO 568925에 설명되어 있다. 그러나, EPO 568925에서는 TNF-Rs(예, CD95)의 세포내 도메인(가령 CD120a)에 결합할 수 있는 실제 단백질 및 펩티드를 명시하지 않았고, 또한 TNF-Rs의 세포내 도메인에 결합할 수 있는 이런 단백질 및 펩티드를 분리 및 확인하기 위해 고평이 이중-하이브리드 방법에 대해서도 설명하지 않았다. 유사하게, EPO 568925에서, CD95의 세포내 도메인에 결합할 수 있는 단백질 또는 펩티드에 대해서 설명한바 없다.

중양 괴사 인자(TNF) 수용체 및 구조적으로 관련된 수용체 CD95가 백혈구 세포-생산 리간드에 의한 자극후, 세포를 죽음에 이르게 하는 파괴 활성을 촉진하기 하지만, 이런 자극의 기작에 대해서는 알려지지 않고 있다. 돌연변이 연구에 따르면, 세포 독성을 위한 CD95 및 CD120a 시그널발생에 세포내 도메인 내에 별개의 부분이 관여한다는 것을 알 수 있다(Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh and Nagata, 1993). 이들 부분('죽음 도메인')은 유사한 서열을 가진다. CD95 및 CD120a의 '죽음 도메인'은 자체-연합하는 경향이 있다. 이런 자체-연합이 실제 수용체 응집을 촉진시키는 데, 응집은 시그널 개시에 필수적이며(Song et al., 1994; Wallach et al., 1994; Boldin et al., 1995), 높은 수준의 수용체 발현에서, 리간드-독립된 시그널발생을 야기할 수 있다(Boldin et al., 1995).

다른 수용체-유도 효과와 같이, TNF 수용체 및 CD95에 의한 세포 사멸 유도는 일련의 단백질-단백질 상호작용을 통하여 일어나고, 이것은 리간드-수용체 결합부터 효소 주효체 기능의 활성화까지 야기하는데, 이런 경우에 대한 조사에서, 세포 죽음에 대한 시그널을 개시하는 비-효소 단백질-단백질 상호반응: 수용체와 삼량체 TNF 또는 CD95 리간드 분자의 결합, 자체 연합하는 죽음-도메인 모티프의 성질(Boldin et al., 1995a)에 의해 증폭된 세포내 도메인의 결과적인 상호작용(Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh and Nagata, 1993), 2개의 세포질 단백질과 수용체의 세포내 도메인-MORT-1(또는 FADD)과 CD95(Boldin et al., 1995b; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995) 및 TRADD와 CD120a(Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996)의 결합 유도가 명료하게 밝혀졌다. 독립적인 상동성 영역의 이형-결합을 통해 수용체에 유도되는 세포 사멸에 관여하고, 독립적으로 세포 죽음을 촉진할 수 있는 '죽음-도메인' 부분에서, CD95와 CD120a의 세포내 도메인과 결합하는 세 가지 단백질은 곰팡이 이중-하이브리드 스크리닝 처리에 의해 동정되었다. 이들 단백질 중에 하나인 MORT-1(Boldin et al. 1995b)은, CD95에 특이적으로 결합하는 FADD(Chinnaiyan et al., 1995)로도 알려져 있다. 두 번째 것인 TRADD(Hsu et al., 1995, 1996)는 Cd120a와 결합하고, 세 번째 것인 RIP(Stanger et al., 1995)는 CD95와 CD120a와 결합한다. CD95 및 CD120a와의 결합이외에도, 이들 단백질은 서로 결합하여, CD95 및 CD120a사이에 기능적으로 "교차-신호전달"을 제공한다. 이들 결합은 수용체 및 결합 단백질에 공통된 보존 서열 모티프 "죽음 도메인 모듈"을 통하여 발생된다. 또한, 곰팡이 이중-하이브리드 테스트에서, MORT-1은 포유류 세포에서 자발적으로 CD95에 결합하긴 하지만, 이런 결합은 수용체 자극이후에만 발생되는데, 이것은 MORT-1이 CD95 시그널발생의 초기 단계에 관여한다는 것을 암시한다. MORT-1에는 효소 활성 특징이 있는 임의 서열 모티프가 없고, 따라서, 세포 죽음을 촉진시키는 이들의 능력은 MORT-1 자체의 고유 활성이 아닌, 오히려, MORT-1과 결합하는 일부 다른 단백질의 활성화에 관여하여, 시그널발생 캐스케이드의 하류에 작용하는 것으로 보인다. 분자의 N-말단이 없는 MORT-1 변이체를 세포내에 발현시키면, CD95 또는 CD120a에 의한 세포 독성 유도가 차단되는 것을 볼 수 있는데(Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996), 이것은 N-말단 영역이 단백질-단백질 상호작용을 통하여 양 수용체의 세포과괴 효과에 대한 시그널을 전달하는 것을 암시한다.

따라서, 수용체 p55-R과 FAS-R, 이들의 결합하는 3개의 단백질 MORT-1, RIP, TRADD의 '사멸 도메인'모티프는 단백질-단백질 상호작용 위치로 보인다. 3개의 단백질 MORT-1, RIP, TRADD는 이들의 사멸 도메인과 수용체의 결합으로, p55-R과 FAS-R 세포내 도메인과 상호작용하고, RIP와 TRADD의 경우, 이들의 사멸 도메인 또한 자가-결합한다(하지만, MORT-1은 사멸 도메인이 자가-결합하지 않는다는 점에서 상이하다). 또한, MORT-1과 TRADD는 FAS-R과 p55-R과 특이하게 결합하고, 또한, 서로 결합한다. 게다가, MORT-1과 TRADD는 RIP와 효과적으로 결합한다. 따라서, 3개의 단백질 MORT-1, RIP와 TRADD사이의 상호작용은 이들 단백질에 의해 조절되는 세포내 시그널발생의 전반적인 조절에 중요한 일부분인 것으로 보인다. 이들 3개의 세포내 단백질사이의 상호작용의 간섭은 이런 상호작용에 의해 야기된 효과를 조절하게 된다. 가령, MORT-1에 결합하는 TRADD를 저해하면, FAS-R-p55 TNF-R 상호작용을 조절할 수 있다. 유사하게, MORT-1에 결합하는 TRADD의 상기 저해에 더하여, RIP를 저해하면, FAS-R-p55 TNF-R 상호작용을 더욱 조절할 수 있다.

p55-R의 '사멸 도메인'에 대하여, 특히, TRADD와 RIP의 결합위치에 대하여 생성된 단클론 항체를 이용하여, 이들 단백질의 결합을 저해 또는 예방하고, 따라서, FAS-R과 p55-R사이의 상호작용을 조절할 수 있다.

최근에, 다양한 수용체와 이들의 결합단백질(예, FAS-R, p55-R, MORT-1, TRADD, RIP, MACH, Mch4, G1)에 의해 매개되는 전술한 세포독성활성 및 이들의 조절이외에도, 다수의 수용체와 이들의 결합 단백질이 핵 전사 인자 NF- κ B의 활성 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌는데, 상기 NF- κ B는 세포 성장 또는 생존의 핵심 조절물질로, 다수의 면역-과 염증-반응 유전자의 발현을 조절한다. 가령, TNF- α 은 실제로 NF- κ B의 활성을 자극하고, 따라서, TNF- α 은 세포에서 2종류의 시그널(하나는 세포사멸을 유도, 다른 하나는 NF- κ B를 통해 유전자 발현을 유도하여 사멸유도로부터 세포를 보호)을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Beg and Baltimore, 1996; Wang et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996). FAS-R에서 유사한 이중 효과가 보고되었다(Van Antwerp et al., 1996). 따라서, TNF- α 및/또는 FAS-R 리간드로 다양한 세포를 자극한 직후, 세포 사멸과 세포 생존사이에 미묘한 균형이 존재하며, 이런 자극의 최종 결과는 어떤 세포 경로(세포 사멸 유도 경로(아폽토시스) 또는 NF- κ B 활성화를 통한 세포 생존 유도 경로)가 어느 정도로 자극되는가에 따라 달라진다.

또한, 본 발명자는 최근에, TNF/NGF 수용체 페밀리의 구성원이 NF- κ B를 활성화시키는 가능기작을 밝혔다(Malinin et al., 1997, Israel Patent Application Nos. IL 117800와 IL 119133에서 인용한 참고문헌). 간단히 말하면, TNF/NGF 수용체 페밀리의 일부 구성원이 공통된 어댑터 단백질 TRAF2를 통하여 NF- κ B를 활성화시킬 수 있다는 것이다. 새롭게 밝혀진 단백질 카이나제 NIK(Malinin et al., 1997 and IL 117800 and IL 119133)는 TRAF2와 결합할 수 있고, NF- κ B 활성

을 자극할 수 있다. 실제로, 카이나제-결핍된 NIK 돌연변이체의 세포에서 발현은 정상적인 내재된 방식으로 NF- κ B를 자극할 수 없고, FAS-R을 통한 TNF의 NF- κ B 활성 유도과 TRADD, RIP, MORT-1(p55-R 및/또는 FAS-R 수용체와 결합하는 어댑터 단백질)의 NF- κ B 유도를 차단할 수 없는 것으로 보였다(Malinin et al., IL 출원). 이들 수용체 p55-R, p75-R, FAS-R과 이들의 어댑터 단백질 MORT-1, TRADD, RIP는 TRAF2와 직접 또는 간접적으로 결합하고, 상기 TRAF2는 NIK와 결합하여 NF- κ B 유도를 조절한다.

FAS-R 및/또는 p55-R 자극후, 세포 사멸과 생존사이의 미묘한 균형에 관여하는 상기 조절물질중에서, 단백질 RIP이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. RIP(Stanger et al., 1995, Malinin et al., 1997)는 C-말단 영역에 '사멸 도메인'을 보유하는데, 상기 도메인을 통해, RIP는 독립된 방식으로, 또한 MORT-1, p55-R, FAS-R, TRADD의 사멸도메인과 결합하여 세포 독성을 유도할 수 있다. RIP는 중간도메인과 N-말단 영역에 단백질 카이나제 도메인을 보유하는데, 상기 중간 도메인은 TRAF2와 교차(결합)를 가능하게 하고, 따라서, NF- κ B 유도에 관여하는 것으로 여겨진다. 따라서, RIP의 특성과 서열(DNA와 아미노산)에 관한 세부사항은 전술한 간행물에서 제시한다(특히, Stanger et al., 1995).

TNF는 숙주 항-바이러스 방어의 개시와 조절에 관여한다. 유사하게, 바이러스는 진화되어, 사이토킨의 활성을 조절하는 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현하고, 이들 사이토킨-조절 바이러스 단백질은 동물 숙주내에서 바이러스의 저항능력을 증진시키는 것으로 생각된다. 이런 단백질중 잘 알려진 예로는 2형과 5형의 C 사람 아데노바이러스(Ad)에서 얻은 E3-14.7K를 들 수 있는데, 이것은 TNF-매개의 세포용해의 강한 길항물질이다.

바이러스 감염직후, E3-14.7K의 표적이 되는 TNF 시그널발생 캐스케이드의 분자성분을 분리하기 위하여, 사람 E3-14.7K 결합 단백질은 이중 하이브리드 스크리닝(FIP-2 for Fourteen-K Interacting Protein, Li. Y. et al. 1998)으로 최근에 분리하였다. FIP-2는 그 자체로는 비-독성이지만, TNFR-I 또는 RIP의 과다-발현으로 상기 언급한 두 단백질과 결합하지 않고, 세포독성에 대한 E3-14.7K의 보호효과를 역행시키는 것으로 밝혀졌다. FIP-2는 본 발명의 단백질인 RAP-2와 일부 상동성을 보유한 것으로 밝혀졌다. RAP-2와 FIP-2의 전반적인 유사성정도는 두 아미노산 서열의 전체 배열(도 3)에서 보는 바와 같이, 극히 낮다. 하지만, 상동성은 단백질의 C-말단방향의 특정영역에서는 상당히 높고, 30개의 C-말단 아미노산에서는 거의 동일하다. 전술한 C-말단 도메인외에도, FIP-2상의 추정 Leucine Zipper 모티프는 RAP-2(Ile의 Ala 치환 제외)에서 거의 보존되어 있다.

RAP-2의 유사체로 보이는 HYPL(헌팅턴병과 관련된 단백질을 인코딩)이라고 하는 유사서열이 "헌팅턴 상호작용 단백질, HYPL" 이름으로 최근에 GenBank에 제출되었다(수탁번호 AF049614). 하지만, 이 단백질의 기능을 설명하는 간행물은 아직 출판되지 않고 있다.

최근 간행물(Yamaoka S. et al. (1998))에서 무린 RAP-2 유사체의 동정을 보고하였다. 무린 유사체 NEMO(NF- κ B 필수 조절물질)는 NF- κ B 시그널발생의 활성화를 조절하는 핵심 분자를 찾던 중에 동정되었다. HTLV-1 Tax-형질전환된 쥐 섬유아세포의 편평 세포 변이체를 특성화하고, 5R로 칭하였는데, 이것은 실험한 모든 NF- κ B-활성화 자극(LPS, PMA, IL-I, TNF)에 반응을 보이지 않았고, 이의 유전적 상보성을 나타냈다. 이런 과정의 결과로, NEMO 48kD 단백질을 인코딩한 cDNA가 수거되었다. 이런 데이터에 기초하여, 이 단백질은 5R 세포에서 부재하고, 고분자량 I κ B-카이나제 복합체의 일부이며, 이의 형성을 위해 필요하다. 시험관내에서, NEMO는 동형-이량체를 구성할 수 있고, IKK β 와 직접 상호작용한다.

이스라엘 특허 No. 120485는 RIP-결합된 단백질 RAP을 공개하는데, 이것은 RIP와 특이적으로 결합하고, NF- κ B 유도를 저해한다.

이스라엘 특허 No. 123758은 RIP-결합된 단백질 RAP-2에 관하는데, 이것은 동일 또는 유사한 성질을 보유한다.

본 발명에 따른 RAP-2는 303, RAP-303 또는 RAT-303이라 한다. 편의상, 이 글에서는 RAP-2라 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 요약

RIP는 염증, 세포독성/세포 사멸의 세포내 조절물질(예, p55-R과 FAS-R)과 이들과 결합하는 어댑터 또는 조절 단백질(예, MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1등)과 직접 또는 간접적으로 상호작용할 수 있기 때문에, 본 발명의 신규한 단백질은 RIP와 결합하고, 따라서, FAS 리간드와 이의 수용체의 결합과 TNF와 이의 수용체(p55-R)의 결합으로 개시된 세포내 시그널발생 과정에 영향을 줄 수 있고, 본 발명의 이런 신규한 단백질은 세포에 대한 p55-R과 FAS-R-매개된 효과의 조절물질이다. RIP는 또한, TRAF2와 상호작용할 수 있고, 따라서, NIK와 직접 또는 간접적으로 상호작용할 수 있는데, 이와 같이, RIP는 NF- κ B 유도를 포함하는 염증과 세포 생존 경로의 조절물질 역할을 하고, 따라서, 본 발명의 신규한 단백질은 RIP-관련된 염증과 세포 생존 활성의 조절이 된다. 유사하게, FAS-R을 통해, p55-R과 이들의 조절 단백질 MORT-1과 TRADD는 RIP와 결합하여 또는 RIP가 결합하는 TRAF2와 결합하여, 직접 또는 간접적으로 NF- κ B와 세포 생존을 유도할 수 있고, 따라서, 본 발명의 단백질은 공통 또는 관련된 세포 시그널 경로를 통하여 작동하는 세포 생존 경로의 조절 물질이 되는데, 상기 시그널 경로에서, 다양한 단백질이 세포 생존을 유도한다. 유사하게, p75-R은 RIP가 결합하는 TRAF2와 결합하기 때문에, 본 발명의 신규한 단백질은 또한, p75-R 매개된 활성의 RIP-관련된 조절의 조절물질이 된다.

본 발명에 따라, 신규한 단백질 RAP-2를 분리하였다. RAP-2는 RIP와 결합 또는 상호작용할 수 있고, 따라서, RIP 세포내 활성의 조절물질 또는 조정물질이 된다. RIP는 세포내 시그널발생 경로, 예를 들면, 세포 독성 또는 세포 사멸 관련된 경로의 조절 또는 조정에 관여하는데, 여기서, RIP는 자체로 그리고 다수의 세포-사멸 관련 단백질(MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1, p55-R, FAS-R)과 직접 또는 간접적으로 결합하여 세포독성을 나타내는데, 이때, RIP는 RIP와 전술한 모든 단백질에 존재하는 '사멸 도메인' 모티프/모듈을 통해 직접 또는 간접적으로 상기 단백질과 결합할 수 있다; 다른 경로는 염증 세포 생존 경로가 되는데, 여기서 RIP는 RIP에 존재하는 카이나제 모티프 또는 도메인의 존재에 의해 직접 또는 간접적으로 활성역할을 수행하고, NIK와 결합할 수 있는 TRAF2와 결합하는 RIP의 능력은 NF- κ B 활성화와 직접 관계하는데, 상기 NF- κ B 활성화는 염증과 세포 생존에 중요한 역할을 한다. 또한, p55-R은 TRADD 및 TRAF2(TRADD를 통해)와 상호작용할 수 있고, NF- κ B 활성화에도 관여하고, 따라서, 세포생존 경로에 관여하며, 이를 통해, RIP는 FAS-R, TRADD, p55-R(TRADD를 통해), TRAF2와 결합 또는 상호작용하고, 염증의 조절과 이들 단백질에 의한 세포 생존 활성화에 관여하게 된다. 따라서, RIP는 이들 경로의 조절물질 또는 조정물질이고, 유사하게, RIP와 결합하는 본 발명의 신규한 RAP-2는 이들 세포내 경로의 조절물질 또는 조정물질이 된다.

RAP-2는 이중-하이브리드계를 이용하여 분리하고, 클론하고, 서열분석하고, 특성화하였는데, 후술한 바와 같이, RAP-2는 고 특이적 RIP-결합 단백질이고, 따라서, 특이적 RIP 조절물질/조정물질이 되는 것으로 보인다. RAP-2는 TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R, MACH와 결합하지 않는다. 또한, RAP-2는 특징적인 사멸 도메인 모듈 또는 모티프를 보유하지 않는데, 이것은 RAP-2가 자체로는 세포 독성을 유도하지 않는다는 발견과 일치한다.

이 글 전체에서, RIP 활성은 염증과 세포 사멸/생존 경로에서 이의 조절/조정 활성을 포함한다. 이 글에서 언급한 모든 참고자료를 비롯하여, 이 글 전체에서, 이들 활성을 지시한다. 유사하게, 이 글 전체에서, RAP-2 활성은 RIP와 특이적 결합을 통한 RIP 활성의 조절/조정을 포함하며, RAP-2에 의한 RIP의 조절/조정에는 RIP가 직접 또는 간접적으로 관여하는 염증, 세포사멸, 세포 생존 경로의 조절/조정이 포함되는데, 이와 같이 RAP-2는 전술한 모든 단백질 및 다른 단백질, 예를 들면, 염증, 세포 사멸 또는 세포 생존에 관여하고, RIP가 결합하거나 또는 RIP가 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 단백질의 간접적인 조절물질/조정물질로 간주된다.

본 발명은 2개의 신규한 RAP-2 결합 단백질을 공개하는데, 이것은 전장 RAP-2 단백질 서열을 미끼로 사용한 이중 하이브리드 스크리닝으로 동정하였다.

전장 RAP-2 단백질을 미끼로 한 이중-하이브리드 스크리닝에서, 신규한 RAP-2-상호작용 단백질은 이후, 클론#10(클론 #10-인코딩된 단백질, RAT-결합 단백질 #10 또는 RBP-10)으로 표시한다. 수득한 cDNA 서열은 당분야에 공지된 공통 서열화 방법으로 5'방향으로 확장하여, 종결코돈이 결핍된 단백질의 부분 해독틀을 재구성한다.

클론 #10의 결합 레퍼토리의 이중-하이브리드 분석에서, 이 단백질은 RAP-2와 결합할 뿐만 아니라, TRAF2에 대해서도 상당히 강한 친화성을 보이는 것을 밝혀졌다. 하지만, 클론 #10은 RIP, TRADD, MORT1, MACH, TNFR-I, TIP60, NIK와 결합하지 않으며, 또한, 몇 개의 컨트롤 단백질(예, 라민과 사이클린D)과 결합하지 않는다. 하지만, NIK의 특이한 습성을 고려하면, 곰팡이에서 클론 #10과 NIK의 결합이 포유동물에서 발견될 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 클론 #10은 후자의 C-말단 200개 아미노산, 다시 말하면, RIP, TIP60, NIK, IKKB와의 결합에 필요하지 않은 영역에서 RAP-2와 결

합하는 것으로 밝혀졌다. 이 서열은 부정확하긴 하지만, 클론 #10의 상동체를 동정하기 위한 GenBank 검색은 실시할 수는 있다. 클론 #10에 의해 인코딩된 단백질과 상동한 유사성을 보인 유일한 단백질은 F40F12.5(선충(*C. elegans*)에서 얻은 가상분자)였는데, 여기에 생물학적 역할은 없다.

흥미롭게도, F40F12.5는 상당히 보존된 유비퀴틴-주도의 프로테아제의 일부구성원과 상당한 유사성을 보이는 것으로 밝혀졌다. 이들 효소는 유비퀴틴화 장치의 파괴 효과를 상쇄하는데, 상기 장치는 세포에서 대부분의 세포 분해를 주관하는 것으로 밝혀졌다. 유비퀴틴 리가아제는 폴리-유비퀴틴 트리를 분해할 단백질에 부착시키지만, 유비퀴틴 프로테아제는 성장하는 트리의 분지화를 효과적으로 예방한다. 아직, 이들 특정 단백질이 유비퀴틴 중합체에 대한 효소 활성을 보유하는지가 밝혀지지 않았기 때문에, 전술한 유비퀴틴-주도 프로테아제와의 유사성에 기초한 F40F12.5 기능과 관련한 이런 추정 은 의문시되고 있다. 또한, 2가지 점에서, 이런 우연의 일치가 일어날 가능성은 거의 없다.

a) 유비퀴틴 프로테아제의 소그룹에서, 심부 촉매 영역을 구성하는 것으로 여겨지는 잔기가 F40F12.5와 클론 #10 모두에 존재하지 않는다.

b) 이들 촉매 위치를 제외하고, 다양한 종(박테리아에서 인간까지)에서 유래한 유비퀴틴-주도 프로테아제 페밀리는 서열 상동성을 보이지 않은 반면, F40F12.5와 클론 #10은 어느 정도의 상동성을 보인다.

따라서, RAP-2는 특이적 RIP-결합 단백질이고, 따라서, RIP 세포내 활성의 조절물질/조절물질이 되는 것으로 보인다. RAP-2와 결합하는 능력에 의해, RAP-2 결합 단백질은 RIP에 간접적인 영향을 주고, 따라서, RIP 세포내 활성의 조절물질/조절물질이 된다.

따라서, RAP-2는 RIP가 직접 또는 간접적으로 관여하는 염증, 세포생존 및/또는 세포 사멸 활성, 특히, TNF/NGF 수용체 페밀리 수용체와 다른 수용체를 통해 전달된 자극을 비롯한 다양한 자극에 의해 야기 또는 유도된 세포독성 및 염증과 관련된 활성의 조절/조정에 일정한 역할을 한다(도1, Malinin et al., 1997).

RAP-2는 다른 단백질의 복합체, 예를 들면, RIP와 RIP에 결합된 단백질의 일부로서 세포독성 및 염증의 저해물질 역할을 하고, 이와 같이, 이들 다른 단백질(예, p55-R, FAS-R, MACH, Mch4, G1, MORT-1)의 세포독성 또는 염증효과에 영향을 주고, 궁극적으로 이들의 세포독성 또는 염증에서 활성을 저해한다.

RAP-2는 또한, 세포독성 및 염증의 강화제 또는 증폭제 역할을 하는데, 이것은 다른 단백질, 예를 들면, 전술한 바와 같이 RIP와 RIP에 결합된 다른 단백질의 활성을 증폭시켜, RIP에 의한 이들 단백질의 동원을 촉진하여 이루어지는데, 여기서 동원은 다양한 단백질의 세포독성 활성을 증폭시키거나 또는 이들의 염증효과를 증폭시키는 역할을 한다.

유사하게, RAP-2는 또한, 이런 경로에 대한 RIP의 관여에 의해, 전술한 세포-생존 경로의 저해물질 또는 증폭물질 역할을 한다.

따라서, 본 발명은 RIP-결합 단백질(RAP-2), 동소체, 유사체 또는 이의 단편을 인코딩한 DNA 서열을 제공하는 것인데, 상기 단백질은 RIP와 결합하여, RIP의 세포내 활성을 조절 또는 조정할 수 있고, 상기 세포내 활성은 염증, 세포 사멸 및/또는 세포 생존의 조절/조정이 된다.

특히, 본 발명은 다음에서 선택되는 DNA 서열을 제공한다;

(a) 고유 RAP-2 단백질의 코딩 부분에서 유도된 cDNA 서열;

(b) 생물학적 활성 RAP-2 단백질을 인코딩하고, 적당히 엄격한 조건하에서 (a)의 서열과 하이브리드를 형성할 수 있는 DNA 서열;

(c) 생물학적 활성 G1 단백질을 인코딩하고, (a)와 (b)에서 정의한 것과 같은 DNA 서열로 측정되는 DNA 서열.

본 발명의 상기 DNA 서열의 또 다른 구체예는 RAP-2 단백질의 하나이상의 동소체를 인코딩하는 서열의 적어도 일부분을 포함하는 DNA서열이다. 상기 DNA 서열의 다른 구체예는 도 1에서 나타난 것과 같이, RAP-2 단백질을 인코딩하는 서열이다. 또 다른 구체예는 도 2에서 보인 DNA 서열이다.

본 발명은 본 발명의 서열에 의해 인코딩된 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 제공하는데, 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편, 유도체는 RIP와 결합하거나, 또는 세포내 세포 사멸 및/또는 세포 생존 경로에서 이의 생물학적 활성을 조정/조절할 수 있다.

본 발명의 특정 구체예는 RAP-2 단백질, 유사체, 단편, 이의 유도체이다. 도1과 2에서 추정된 RAP-2 단백질 서열은 도3에 제시한다. 다른 구체예는 RAP-2 단백질, 유사체, 단편, 이의 유도체의 동소체이다.

또한, 본 발명은 상기 DNA를 포함하는 복제가능 발현 운반체, 이들 복제가능 발현 운반체는 진핵 또는 원핵 숙주 세포에서 발현할 수 있고; 이런 복제가능 발현 운반체를 포함하는 형질변환된 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 제공하고; 또한, 본 발명의 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 생산하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 상기 단백질, 동소체, 유사체, 단편 이의 유도체를 발현시키기 위한 적절한 조건하에서 형질변환된 숙주 세포를 생장시키고, 이런 단백질을 얻는데 필수적인 상기 단백질의 해독후 수식을 실시하고, 형질변환된 세포의 배양 배지 또는 형질변환된 세포 추출물로부터 발현된 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 추출하는 단계로 구성된다. 상기 정의에는 RAP-2 단백질의 모든 동소체가 포함된다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 RAP-2 단백질, 유사체, 단편, 이의 유도체에 특이적인 항체, 활성 유도체 또는 이의 단편을 제공한다.

발명의 또 다른 특징에서, 본 발명에 따른 상기 DNA 서열 및 이들이 인코딩하는 단백질의 다양한 용도를 제공하는데, 일반적으로는 다음에 이용된다;

(i) 단백질 RIP에 의해 조절 또는 조정되는 염증, 세포 죽음 또는 세포 생존 경로를 조절하는 방법, 상기 방법은 세포를 본 발명의 하나 또는 복수의 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체로 처리하고, 여기서, 세포의 처리는 세포내 도입에 적절한 형태로 하나 또는 복수의 단백질, 동소체, 단편, 유사체 또는 이의 유도체를 상기 세포로 도입하거나, 또는 상기 서열을 보유한 적당한 벡터의 형태로 하나 또는 복수의 단백질, 동소체, 단편, 유사체 또는 이의 유도체를 인코딩한 DNA 서열을 상기 세포로 도입하는 것으로 이루어지고, 상기 벡터는 상기 서열을 상기 세포로 삽입하여, 상기 서열이 상기 세포에서 발현되도록 한다.

(ii) 상기 (i)에 따른 RIP 단백질의 세포에 대한 작용 효과로 TNF 패밀리에 의해 조절되는 염증, 세포 죽음 또는 세포 생존 경로를 조절하는 방법, 여기서, 세포의 처리는 세포내 도입에 적절한 형태로 하나 또는 복수의 단백질, 동소체, 단편, 유사체 또는 이의 유도체를 상기 세포로 도입하거나, 또는 상기 서열을 보유한 적당한 벡터의 형태로 하나 또는 복수의 단백질, 동소체, 단편, 유사체 또는 이의 유도체를 인코딩한 DNA 서열을 상기 세포로 도입하는 것으로 이루어지고, 상기 벡터는 상기 서열을 상기 세포로 삽입하여, 상기 서열이 상기 세포에서 발현되도록 한다.

(iii) 상기(ii) 방법, 여기서, 세포는 다음의 단계로 상기 세포를 상기 재조합 동물 바이러스 벡터로 트랜스펙션 처리한다:

(a) 바이러스 표면 단백질(리간드)을 인코딩한 서열 및 단백질을 인코딩한 서열을 보유한 재조합 동물 바이러스 벡터를 작성하고, 이때, 상기 리간드는 FAS-R-또는 p55-R-보유 세포의 표면에서 특정 세포 표면 수용체와 결합할 수 있고, 상기 단백질은 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체에서 선택되고, 상기 벡터는 세포에서 발현되는 경우, RIP의 활성을 조절/조절할 수 있고;

(b) 세포를 (a) 벡터로 감염시킨다.

(iv) 항체, 활성 단편 또는 이의 유도체로 세포를 처리하여 세포에 대한 RIP 단백질의 작용 효과로 TNF 패밀리의 리간드에 의해 매개되는 염증, 세포 사멸 및/또는 세포 생존 경로를 조절하는 방법, 상기 처리는 항체, 활성 단편 또는 이의 유도체를 함유한 적당한 조성물을 세포에 부가하는 것이고, 여기서, RAP-2 단백질의 적어도 일부가 세포의 표면에 노출되면, 상기 조성물은 세포의 용도로 조제되고, 상기 RAP-2 단백질이 세포내에 있는 경우 상기 조성물은 세포내 용도로 조제된다.

(v) 본 발명의 RAP-2 단백질 서열의 적어도 일부에 대한 앤티센스 서열을 인코딩한 올리고뉴클레오타이드로 세포를 처리하여, 세포에 대한 RIP 단백질의 효과로 TNF 패밀리에 의해 매개되는 염증, 세포 사멸 및/또는 생존 경로를 조절하는 방법, 상기 올리고뉴클레오타이드 서열은 RAP-2 단백질의 발현을 차단할 수 있다.

(vi) 종양 세포, HIV-감염된 세포 또는 다른 질병에 걸린 세포를 치료하기 위한 상기 (ii)에서와 같은 방법:

(a) 바이러스 표면 단백질을 인코딩하는 서열 및 단백질을 인코딩한 서열을 보유한 재조합 동물 바이러스 벡터를 작제하고, 여기서, 상기 표면 단백질은 특이적 종양 세포 표면 수용체, HIV-감염된 세포 표면 수용체 또는 다른 병든 세포가 보유한 수용체와 결합할 수 있고, 상기 단백질은 RAP-2 단백질, 유사체, 단편, 이의 유도체에서 선택되고, 상기 벡터는 종양, HIV-감염된 세포 또는 다른 병든 세포에서 발현되면, RIP 단백질의 작용을 통해 상기 세포를 죽일 수 있고;

(b) 상기 종양, HIV-감염된 세포 또는 다른 병든 세포를 (a)의 벡터로 감염시킨다.

(vii) 리보자임 과정을 부가하여, 세포에 대한 RIP 효과로 TNF 패밀리 리간드에 의해 매개되는 세포 사멸 및/또는 세포 생존 경로를 조절하는 방법, 본 발명에 따른 RAP-2 단백질을 인코딩한 세포 mRNA 서열과 상호작용할 수 있는 리보자임 서열을 인코딩하는 벡터는 상기 세포에 도입시켜, 세포에서 리보자임 서열이 발현되도록 하고, 상기 리보자임 서열이 상기 세포에서 발현되는 경우, 상기 세포내 mRNA와 상호작용하여 상기 mRNA 서열을 절단하고, 이를 통해, 상기 세포에서 상기 RAP-2 단백질의 발현을 저해한다.

(viii) 본 발명에 따른 방법에서 선택된 방법, 여기서, 상기 RAP-2 인코딩 서열은 RIP와 결합할 수 있는 본 발명에 따른 RAP-2 동소체, 유사체, 단편, 이의 유사체중 적어도 하나를 포함한다.

(ix) RAP-2와 결합할 수 있는 본 발명에 따른 단백질을 분리하고, 확인하는 방법, 상기 방법은 곱팡이 이중-하이브리드 과정을 적용하는 것으로 이루어지고, 여기서, RAP-2를 인코딩하는 서열은 하나의 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리로부터 얻은 서열은 제 2 하이브리드 벡터에 의해 운반되고, 이후, 상기 벡터를 이용하여 곱팡이 숙주세포를 형질전환시키고, 형질전환된 파지티브 세포를 분리하고, 상기 제 2 하이브리드 벡터를 추출하여 RAP-2 단백질과 결합하는 단백질을 인코딩하는 서열을 수득한다.

(x) (i)-(ix)중 어느 한 방법, 여기서, RAP-2 단백질은 RAP-2 단백질의 동소체, 유사체, 단편, 이의 유도체의 중 하나가 된다.

(xi) (i)-(ix)중 어느 한 방법, 여기서, RAP-2 단백질, 동소체, 유사체 또는 이의 단편 및 유도체는 다른 조절물질 또는 유도물질에 의해 조절 또는 조정되는 세포내 효과의 조절에 관여하고, 상기 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체는 상기 조절물질 또는 유도물질과 직접 또는 간접적으로 결합할 수 있다.

본 발명은 또한, 세포에 대한 RIP 단백질의 활성화, 또는 임의 다른 조절물질 또는 유도물질의 작용으로, TNF 패밀리에 의해 매개되는 염증, 세포 사멸 및/또는 세포 생존 경로를 조절하는 제약학적 조성물을 제공하는데, 여기서, 제약학적 조성물은 다음중 하나를 활성 성분으로 포함한다:

(i) 본 발명에 따른 RAP-2 단백질, 생물학적 활성 단편, 유사체, 이의 유도체;

(ii) 본 발명에 따른 RAP-2 단백질, 생물학적 활성 단편, 유사체, 이의 유도체를 인코딩하고, 세포 표면 수용체와 결합할 수 있는 단백질을 인코딩하는 재조합 동물 바이러스성 벡터;

(iii) 본 발명에 따른 RAP-2 단백질 서열의 앤티-센스 서열을 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드 서열, 여기서, 올리고뉴클레오타이드는 상기(ii)의 재조합 동물 바이러스 벡터의 제 2 서열이 된다.

본 발명은 또한, 다음을 제공한다:

I. 세포에서 RIP 단백질, 임의의 다른 중개물질 또는 유도물질의 효과, 또는 임의의 다른 NF- κ B 유도물질 또는 저해물질에 의해 조절/조정되는 염증, 세포내 세포 사멸 및/또는 세포 생존 경로의 조절 방법, 상기 방법은 (i)-(x)중 임의 방법에 따라, 세포를 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 이의 단편 또는 이의 유도체, 또는 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편, 이의 유도체를 인코딩하는 서열로 처리하는 것으로 이루어지고, 상기 처리를 통해, RIP-매개된 효과를 강화 또는 저해하고, 따라서, FAS-R 또는 p55-R-매개된 효과, 다른 세포독성 중개물질 또는 유도물질의 효과, 또는 NF- κ B 유도물질 또는 저해물질의 효과를 강화 또는 저해한다.

II. 상기 방법, 여기서, RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체는 RIP, 다른 조절물질 또는 유도물질, 또는 다른 NF- κ B 유도물질 또는 저해물질과의 결합에 특이적으로 관여하는 RAP-2 단백질의 일부이거나, 또는 상기 RAP-2 단백질은 RIP, 다른 조절물질 또는 유도물질, 또는 다른 NF- κ B 유도물질 또는 저해물질과의 결합에 특이적으로 관여하는 RAP-2 단백질의 일부를 인코딩한다.

III. 상기 방법, 여기서, 상기 RAP-2 단백질은 RAP-2 동소체중 하나이고, 상기 동소체는 RIP-결합효과 강화시킬 수 있다.

IV. 상기 방법, 여기서, RAP-2 단백질은 RAP-2 동소체중 하나이고, 상기 동소체는 세포에 대한 RIP-결합 효과, 또는 다른 세포독성 증개물질 또는 유도물질 결합효과를 저해하고, 따라서, 세포에 대한 FAS-R- 또는 p53-R-결합효과를 저해시키거나 또는 다른 세포독성 증개물질 또는 유도물질 효과를 저해할 수 있다.

V. 상기 방법, 여기서, 상기 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 유도체는 NF- κ B의 직접 또는 간접억제, 또는 JNK 또는 p38 카이나제의 직접 또는 간접 활성화를 통해, 염증과 세포 생존 경로에 대한 RIP-결합효과를 강화 또는 억제한다.

RAP-2 단백질의 분리, 이들의 확인, 특성화는 단백질의 분리와 동정에 사용하는 표준 스크리닝 기술, 예를 들면, 고풍이 이중-하이브리드 방법, 친화성 크로마토그래피 방법, 이런 목적에 사용하는 다른 공지된 표준 기술중 임의의 하나로 실시할 수 있다.

본 발명의 다른 측면에서, RAP-2 단백질, 동소체, 단편, 이의 유도체는 이와 결합하는 단백질에 대한 고풍이 이중 하이브리드 스크리닝에서, 미끼로서 사용된다.

RAP-2, 동소체, 단편, 이의 유도체에 결합하는 단백질 또한, 본 발명의 일부다.

본 발명의 다른 특징 및 구체에는 다음의 발명의 상세한 설명에 기술한다.

여기에서 사용된 용어중, "세포에 대한 RIP, FAS-리간드 또는 TNF 효과의 조절/조정" 및 명세서에 언급된 임의의 "조절/조정"에는 *in vitro* 및 *in vivo* 처리가 포함되고, 또한, 저해 또는 강화/증폭이 포함된다.

발명의 구성

한 측면에서, 본 발명은 RIP 단백질과 결합하여, 특히, 전술한 염증, 세포 사멸 및/또는 세포 생존에 관여하는 경우에 RIP의 세포내 활성을 조절 또는 조정하는 신규한 RAP-2 단백질에 관한다. 따라서, RAP-2는 세포 사멸/염증 생존 경로에서 RIP 활성을 제해하고, RAP-2는 염증 또는 세포 사멸 생존 경로에서 RIP 활성을 강화하고, 또는 이들 경로중 하나에서 RIP 활성을 강화하면서 다른 경로에서 이를 억제할 수 있다.

좀더 구체적으로, 본 발명에 따른 신규한 단백질 RAP-2를 제공한다. RAP-2는 서열분석하고, 특성화하였는데, RAP-2는 RIP에 대하여 고 특이성을 갖지만, 염증, 세포 사멸 또는 세포 생존을 야기하는 시그널발생 경로에 관여하는 것으로 알려진 다수의 다른 단백질과는 결합하지 않는 RIP-결합 단백질이라는 것이 밝혀졌다. RAP-2는 또한, 이들 경로중 하나가 활성화된 환자에서 공통된 도메인을 갖지 않는다, 다시 말하면, RAP-2는 '사멸 도메인' 모티프 또는 모듈을 보유하지 않고, 카이나제 모티프 또는 도메인을 보유하지 않고, 프로테아제 도메인 또는 모티프를 보유하지 않는다. 결정된 RAP-2 서열은 Genbank, Genome database 1, 'dbest' 데이터베이스를 비롯한 다수의 데이터베이스상의 서열과 비교할 때, 유일한 서열이다. 전술한 바와 같이 RIP는 세포내 염증, 세포 사멸, 세포 생존 경로에 관여한다. 따라서, RIP 활성의 제어 또는 조절은 이런 경로가 TNF 또는 Fas-리간드와 이들의 수용체(TNF의 경우, p53-R)와의 결합에 의해 개시되는 경우, 이들 경로 모듈을 조절할 수 있다. RIP는 어떤 경로가 어느 정도로 활성화될 지를 결정하는데, 이것은 사멸도메인을 보유한 다수의 세포독성 단백질과 카이나제 활성을 보유한 다수의 단백질과 결합할 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 RAP-2 단백질과 같은 단백질은 RIP와 특이적으로 결합하여, RIP 활성을 조절하고, 따라서, 다른 경로에 대하여 상대적으로 한 경로를 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명의 RAP-2 단백질은 중요한 세포내 시그널 조절물질 또는 조정물질이 된다.

본 발명의 RAP-2 전장 단백질 외에도, 클론된 좀더 짧은 cDNA는 "전체" cDNA의 일부 외곽 영역에서 유래한 "차단"서열로 이루어지는 것으로 밝혀졌는데, 이것은 동일한 유전자의 대체 스플라이싱에 기인하는 것으로 보인다. 사람 RAP-2의 뮤린 대응체는 생쥐 EST 컬렉션을 유사하게 검색하여 동정하였다. 부분 뮤린 cDNA는 전체 코딩 영역에서 사람 대응체와 거의 동일하였다.

RIP-RAP-2 상호작용의 생리학적 타당성은 트랜스펙션된 HEK-293T와 HeLa 세포에서 추가로 확인하였다. 하지만, 이런 복합체의 형성은 RIP 효소 활성을 야기하지 않는데, 이것은 과다-발현된 RIP가 RAP-2를 인산화시키지 않는다는 점에서 분명해 진다.

포유동물 HEK-293T 세포의 트랜스펙션 실험에서, RAP-2-NIK 복합체가 안정적으로 만들어졌다.

RAP-2는 NIK, IKK β , TIP60(히스톤 아세틸트랜스퍼라제)과 결합하고, NF- κ B와 c-Jun 의존 전사를 조절한다는 점에서, NF- κ B와 c-Jun 시그널 도입경로의 중요한 요소인 것으로 보인다. 실제로, RAP-2의 향상된 이소성 발현은 NF- κ B 반응을 억제하는 반면, 엔티센스 구조체에 의해 세포로부터 상기 발현이 고갈되면, NF- κ B와 c-Jun 트랜스액티베이션이 유도 된다.

RAP-2는 c-Jun 초인산화를 강화하는 것으로 밝혀졌는데, 이것은 NIK 활성화에 의해 조절되지 않는다. RAP-2는 c-Jun과 RelA가 DNA와 결합하는 것을 저해하지 않는다. RAP-2의 결합 및 기능 도메인은 연속 결손 분석으로 확인하였다. 이들 연구에서, RIP, NIK, TIP60의 결합 영역은 중복되고, RAP-2의 아미노산 95-264사이에 위치하는 것으로 밝혀졌다. 하지만, RAP-2에 의해 조절되는 하류 기능효과는 아미노산 1-264를 포함한 단백질의 N-말단 도메인에 위치하는 것으로 밝혀졌다.

상기 측면에서, RAP-2는 스트레스-반응 네트워크의 시그널-약화 회로의 중요한 요소인 것으로 보인다: 센스-인코딩 구조체의 이소성 발현은 반응을 저해하는 반면, 엔티센스-인코딩 구조체의 발현은 반응을 강화한다. 실제적, RAP-2는 본 발명자의 실험실에서 RAT(RIP의 감쇠장치)로 알려져 있고, 따라서, RAT, RAT-303 및/또는 클론 303으로 표시한다.

다중 조각 변이체의 존재는 임의의 조건하에서 RAP-2의 순효과중 적어도 일부는 특정 서열 블록의 존재에 의존한다는 것을 암시하는데, 상기 블록은 주로 동소체 형태로, 단백질 결합/표적/전좌/수식에 필요하다. 가령, RAP-2와 TIP60이 결합하여, 전자의 핵국소화가 이루어진다면, 조각난 핵국소화신호(NLS)를 갖는 RAP-2의 변이체는 NF- κ B/AP-1 발현에서, 결합이 발생하거나 또는 반대로 과도하게 활성화된다. 서열 분석에서, RAP-2는 대부분의 공지된 NLS에 특징적인 양으로 대전된 아미노산의 덩어리(E, K, R)를 여러 개 보유하는 것을 알 수 있다.

RIP에 결합하는 RAP-2의 영역은 RAP-2 단백질의 아미노산 177-218사이에서 시작하여 아미노산 264에서 종결된다. RAP-2내 RIP 결합 도메인은 IKK β 와 NIK 결합위치와 중복되지 않았다.

히스톤 아세틸트랜스퍼라제라고 불리는 핵단백질 패밀리의 구성원인 TIP60과 결합하는 영역은 아미노산 95-264에 걸쳐 있다. 동형-이량체화에 관여하는 영역은 아미노산 217-264에 위치하는 것으로 밝혀졌다.

축적된 자료에서, RAP-2의 모든 기능효과(즉, NF- κ B 저해와 c-Jun 초-인산화의 유도)는 동일 영역에 위치한다.

클론 #10에 의해 인코딩된 단백질은 아미노산 218-309에서 시작하여 아미노산 416에 종결되는 영역내에서 결합하고, 따라서, 이의 결합위치는 RIP, NIK, IKK β , TIP60에 대한 결합위치와 중복되는 영역을 보유한다.

또한, 모든 유도물질에 의한 시그널의 효과적인 조절에 필요한 영역은 단백질의 N-말단 분절에 위치할 수도 있다.

아미노산 95-416에 포함되는 영역은 전장 단백질에 의해 야기된 효과에 비하여 약하긴 하지만 일정한 효과를 나타내는데, 이것은 내인성 RAP-2의 강제적인 집합에 따른 것이다.

또한, RelA를 제외하고, 본 실험에 사용된 모든 유도물질의 효과는 RAP-2 N-말단의 100개정도의 아미노산으로 조절할 수 있다. 실제로, 아미노산 1-102를 포함한 단편은 상당히 약하긴 하지만, 분명하게 이런 효과를 조절한다.

한편, RelA-조절 효과의 억제에는, RAP-2의 훨씬 긴 영역이 필요하다. 아미노산 1-264내에서 이 영역의 경계를 한정할 수 있었는데, 이 영역중 아미노산 157과 264사이의 영역에, 특이적인 RelA-관련 결합 특성이 일부 부여된다.

상기 관찰결과에서, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

a. RelA를 제외하고, RIP, 클론#10, NIK, TIP60과 결합하는 RAP-2는 단백질 기능에 필요하지 않고, 과다-발현에 의해 유도된 NF- κ B의 저해물질 역할을 한다.

b. 과다-발현-유도된 활성화에서 RelA에 대한 RAP-2의 효과는 상이한 결합에 의해 적어도 일부 조절된다. 필연적으로, 상기 언급한 모든 단백질은 지금까지 실시한 실험에서 추론할 때, 임의의 활성화에 기여한다.

세포 사멸을 유도하는 FAS-R과 TNF 수용체의 독특한 능력과 다양한 다른 조직-손상 활성을 촉진시키는 TNF의 능력으로 인해, 이들 수용체의 기능 변형은 특히, 미생물에 유해하다. 실제로, 이들 수용체의 과도한 또는 불완전한 기능은 다양한 질병의 병인의 원인이 되는 것으로 밝혀졌다. 이들 수용체의 시그널발생 활성화에 참여하는 분자를 확인하고, 이들 분자의 기능을 조절하는 방법을 찾는 것은 이들 질병에 대한 새로운 치료요법에 대한 효과적인 단서가 된다. FAS-R과 TNF 독성에서 추정되는 RIP의 역할 및 RIP의 조절을 통해 FAS-R과 TNF에서 추정되는 RAP-2의 역할 측면에서 볼 때, RAP-2가 RIP-매개된 세포독성(전술한 바와 같이, RIP는 자체로 독성이고, 사멸 도메인 영역을 보유한 다른 단백질과 혼합하여도 독성이다)을 강화하는 조건하에서, RIP와 RAP-2의 결합을 차단하거나 또는 RAP-2와 RIP사이의 상호작용을 저해하는 방식으로, RIP의 세포독성 기능을 차단할 수 있는 약물을 고안하는 것이 중요해 보인다.

유사하게, FAS-F와 TNF은 NF- κ B의 활성화에 관여하고, 이로 인해, 세포 생존의 활성화에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 따라서, 세포, 예를 들면, 암세포, HIV-감염된 세포등을 사멸시켜야 하는 경우, FAS-R과 p55-R(또한, 이들의 결합단백질 MORT-1, MACH, Mch4, G1, TRADD)의 세포독성 효과를 강화시키고, 동시에, NF- κ B를 유도하는 이들의 능력은 저해하는 것이 바람직하다. 따라서, RIP와 RAP-2의 상호작용 또는 결합은 NF- κ B 유도(TRAF2를 통해, RIP의 카이나제 도메인 및/또는 중간 도메인을 통해)를 강화하는 RIP의 역할을 증폭시키는 경우, RAP-2와 RIP의 상호작용을 저해하거나 또는 적어도 NF- κ B 활성화의 증폭을 예방하여, TNF-또는 FAS-리간드-유도된 효과의 균형을 세포독성 방향으로 이동시키고, 궁극적으로 세포 사멸을 증가시키는 것이 바람직하다.

유사하게, RIP와 RAP-2의 결합이 실질적으로 FAS-R과 p55-R 염증 또는 세포독성 효과를 저해하여 이들 세포독성을 차단하는 것이 바람직한 상기와 반대의 경우, 예를 들면, 증가된 세포 생존이 필요한 염증과 다양한 자가면역질환에서, RAP-2와 RIP사이의 상호작용을 강화하여 전체적인 세포 사멸의 저해를 강화하고, 세포생존 방향으로 균형을 이동시키는 약물을 고안하는 것이 중요하다. RIP와 RAP-2의 상호작용이 NF- κ B 활성을 증폭하는 RIP의 기능을 억제하는 경우, 즉, 세포 생존이 필요한 경우, RAP-2와 RIP의 상호작용을 차단하여, NF- κ B 활성화를 증폭시키는 RIP의 기능을 강화하는 것이 필요하다.

전술한 측면에서, RIP는 염증, 세포 사멸 또는 세포 생존 경로의 유도 또는 조절의 균형에 핵심 역할을 하고, 따라서, RIP의 조절물질인 RAP-2는 중요한 역할을 한다. 다양한 약물 또는 처리를 이용하여 RAP-2-RIP 상호작용/결합에 영향을 줌으로써, 원하는 경우에 세포내 시그널발생 경로를 세포 사멸 내지 세포 생존으로 이동시킬 수 있다.

본 발명은 또한, RAP-2 단백질을 인코딩하는 DNA 서열 및 이 DNA 서열에 의해 인코딩되는 RAP-2 단백질에 관한다.

또한, 본 발명은 RAP-2 단백질의 생물학적 활성 유사체, 단편, 이의 유도체를 인코딩하는 DNA 서열에 관한다. 이런 유사체, 단편, 유도체는 표준 방법(Sambrook, et al., 1989)으로 제조할 수 있는데, 여기서, RAP-2 단백질을 인코딩하는 DNA 서열에 하나 또는 복수의 코돈을 결손, 추가 또는 다른 것으로 치환하여, 고유 단백질에 대해 적어도 하나 이상의 아미노산 잔기가 변화된 유사체를 만든다.

RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 인코딩하는 본 발명의 DNA 서열에는 또한, 고유 PAP-2 단백질의 코딩영역에서 유래한 cDNA와 하이브리드를 형성할 수 있는 DNA 서열이 포함되는데, 여기서, 이런 하이브리드법은 적당히 엄격한 조건하에서 진행되고, 하이브리드가능 DNA 서열은 생물학적 활성 RAP-2 단백질을 인코딩한다. 따라서, 이들 하이브리드가능 DNA 서열은 고유 RAP-2 cDNA 서열과 상당히 높은 상동성을 보유한 DNA 서열을 포함하고, 다양한 RAP-2 동소체를 인코딩하는 자연-유래 서열, 다양한 RAP-2 동소체를 인코딩하는 자연-유래 서열 또는 RAP-2 활성을 보유한 단백질을 인코딩한 RAP-2-유사 서열군에 속하는 단백질을 인코딩한 자연-발생 서열을 대표한다. 또한, 이들 서열에는 예를 들면, 고유 RAP-2 cDNA 서열과 유사하지만 다수 변형된 비-자연 발생 합성 서열이 포함된다. 따라서, 이런 합성 서열에는 RAP-2의 활성을 보유한 RAP-2의 유사체, 단편, 유도체를 인코딩하는 모든 서열이 포함된다.

전술한 다양한 자연 발생 RAP-2-유사 서열을 수득하기 위하여, RAP-2 cDNA 또는 이의 일부분을 프로브로 사용하여, 다양한 조직에서 얻은 자연-유래의 DNA 또는 RNA 샘플의 표준 스크리닝과 분리과정을 실시한다.

유사하게, RAP-2의 유사체, 단편 또는 유도체를 인코딩하는 전술한 다양한 RAP-2-유사 합성서열을 수득하기 위하여, 이런 유사체, 단편, 유도체의 제조에 관하여 아래에 자세하게 밝힌 다수의 표준과정을 이용한다.

RAP-2 단백질에 "실제 상응하는" 단백질 또는 폴리펩티드에는 RAP-2 단백질 또는 RAP-2 유사체인 폴리펩티드 또는 단백질이 포함된다.

RAP-2 단백질에 상응하는 유사체는 RAP-2 단백질의 아미노산중 한 가지 이상의 아미노산이 또 다른 아미노산으로 치환되거나, 결손 또는 삽입된 것으로, 이들 생성된 단백질은 상응하는 RAP-2 단백질과 동등한 또는 더 높은 생물학적 활성을 보여야 한다.

RAP-2-결합 단백질에 실제 상응하도록 하기 위해서, 동소체와 같은 RAP-2 단백질의 서열상의 변화는 상대적으로 적다. 변화의 수는 10개 미만이고 적절하게는 5개 이하의 변화, 가장 적절한 수는 3개 이하가 된다. 임의 기술을 이용하여, 실제로 RAP-2 단백질에 상응하는 생물학적 활성 단백질을 만들 수 있는데, 이런 기술중의 하나는 단백질을 인코딩하는 DNA에 통상적인 돌연변이유발 기술을 이용하는 것으로, 약간의 변형을 유발한다. 이런 클론에 의해 발현되는 단백질들은 전술한 세포내 경로의 조절/조정에서 RIP와 결합하고 RIP 활성을 조절하는 능력으로 스크리닝할 수 있다.

"보존성" 변화는 단백질의 활성을 변화시키지 않고, 단백질의 크기, 전하, 모양을 실제로 변화시키지 않고, 따라서, 이의 생물학적 활성을 변화시키지 않는 변화다.

RAP-2 단백질의 보존성 치환체에는 폴리펩티드상의 적어도 하나의 아미노산이 상이한 아미노산 서열로 보존치환되는 유사체가 포함된다. 이런 치환은 적절하게는 표 1A에서 제시하는 리스트에 따라 이루어지는데, 이런 치환은 일상적인 실험에 의해, RAP-2 단백질의 생물학적 활성 특징을 유지하면서, 합성된 폴리펩티드 분자의 변형된 구조와 기능적 성질을 제공하도록 실시한다.

[표 1a]

원래 아미노산	예시적인 치환체
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

또는, RAP-2 단백질의 치환체의 또 다른 그룹은 다음의 표 1B에 있는 것과 같이 폴리펩티드에 있는 적어도 하나의 아미노산을 제거하고 그 위치에 상이한 잔기가 삽입된 것이 된다. 폴리펩티드에서 이루어진 이와 같은 치환은 Schulz et al., Principles of Protein Structure Springer-Verlag, New York, NY, 1798 and Figs. 3-9 of Creighton, T.E. Protein; Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA 1983의 표 1-2에 제시한 것과 같은 상이한 종간의 단백질 유사성에서 아미노산 변화 빈도를 분석한 결과를 기초로 한 것이다. 이와 같은 분석을 기초로 하여 또 다른 보존성 치환체는 다음의 다섯 가지 그룹중 하나로 교환이 이루어진 것이다.

[표 1b]

1. 작은 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기; Ala, Ser, Thr, (Pro, Gly)
2. 극성 음전하를 띤 잔기와 이의 아마이드; Asp, Asn, Glu, Gln
3. 극성 양전하를 띤 잔기; His, Arg, Lys
4. 큰 지방족 비극성 잔기; Met, Leu, Ile, Val(Cys)
5. 큰 방향족 잔기; Phe, Tyr, Trp

팔호안에 있는 세 가지 아미노산은 단백질 구조에 중요한 역할을 한다. Gly는 어떠한 측쇄도 가지지 않는 유일한 것이고 따라서 사슬에 유연성을 부여한다. 그러나 이는 α 사슬 이외의 제2차 구조 형성을 촉진시키는 경향이 있다. Pro는 이의 구조적인 특징으로 인하여, 사슬을 단단하게 억압하고 일반적으로 β -회전과 같은 구조를 만드는 경향이 있는데, 일부 경우에 Cys는 단백질의 접합에 중요한 역할을 하는 이황화결합에 참가할 수 있다. Tyr은 이의 수소결합 가능성 때문에 Ser, Thr와 상당히 유사한 특징을 가진다.

본 발명에 따른 전술한 것과 같은 보존성 아미노산 치환은 당분야에 공지된 것으로, 아미노산 치환 후에 폴리펩티드의 생물학적 그리고 구조상의 성질을 유지하는 것으로 예상된다. 본 발명에 따른 대부분의 결손 및 치환은 단백질 또는 폴리펩티드 분자의 특징에 급진적인 변화를 주지는 않는다. "특징"은 α -이중나선, β -시트 등의 2차 구조에서의 변화 및 생물학적 활성, 예를 들면 RIP과의 결합 및/또는 세포 사멸에 대한 RIP의 효과를 한정하기 위하여 제한적인 방식으로 정의한다.

본 발명의 RAP-2 단백질의 유사체를 만들기 위해 이용할 수 있는 단백질에 아미노산 치환을 만드는 예에는 임의의 공지된 방법이 포함된다(미국 특허 RE 33,653; 4,959,314; 4,588,585; 4,737,462(Mart et al.); 5,116,943(Koths et al.); 4,965,195(Namen et al.); 4,879,111(Chong et al.); 5,017,691(Lee et al.); 미국 특허 4,904,584(Shaw et al.))

전술한 RAP-2 단백질의 활성에 큰 변화를 주지 않는 보존성 치환 이외에, RAP-2 단백질 유사체의 생물학적 활성을 상당히 증가시키는 보존성 치환 또는 보존성 약한 치환 및 다소 무작위 치환도 본원 발명의 범위에 속한다.

치환 또는 결손의 정확한 효과를 확인하려는 경우, 당업자는 치환, 결손등의 효과를 일상적인 결합 및 세포 죽음 검사를 통하여 평가할 수 있음을 인지할 것이다. 이와 같은 표준 테스트를 이용하는 스크리닝은 과도한 실험을 요하지는 않는다.

수용가능한 RAP-2 유사체는 적어도 RIP와 결합하고, 따라서, 전술한 세포내 경로에서 RIP의 활성을 조절하는 능력을 보유한 것들이다. 이런 경우에, 소위 음성 주도적 효과를 주는 유사체, 다시 말하면, RIP와의 결합, 일련의 시그널발생 또는 이런 결합이후의 다른 활성에 결합이 있는 유사체가 만들어진다. 이런 유사체를 이용하여 RIP의 효과를 제해하거나 또는 RIP의 효과를 유도하는 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (직접 또는 간접)를 저해할 수 있는데, 이것은 이들 활성중 어떤 것이 RAP-2와 RIP의 상호작용과 RIP와의 결합에 대해 자연 RAP-2와 경쟁하는 이런 유사체에 의해 조절되는 지에 달려있다.

유전자 수준에서, 이와 같은 유사체는 RAP-2 단백질을 인코딩하는 DNA 서열의 뉴클레오티드에 특정 부위-돌연변이를 유발하고, 이런 유사체를 인코딩하는 DNA 서열을 만들고, 이후, DNA를 합성하고 재조합 세포 배양물에서 폴리펩티드를 발현시킨다. 일반적으로, 유사체는 천연 발생 단백질과 동일한 또는 이보다 양적으로 증가된 생물학적 활성을 보인다(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989).

RAP-2 단백질 또는 동일한 폴리펩티드를 인코딩하지만, 유전자의 축중성으로 인해 자연 서열과 상이한 대체 뉴클레오티드 서열은 RAP-2 단백질의 사전에 준비한 유사체 또는 고유형을 인코딩한 DNA의 특정부위-돌연변이유발로 성취할 수 있다. 특정부위-돌연변이에서, 돌연변이를 가지는 DNA 서열을 인코딩하는 특정 올리고뉴클레오티드 서열과 다수의 인접 뉴클레오티드를 이용하여 유사체를 만들고, 충분한 크기의 프라이머를 제공하여, 뒤집어진 결손 접합점의 양 측면에 안정한 이중 나선을 형성하는 서열 복합체를 제공한다. 일반적으로 길이가 20 내지 25개 뉴클레오티드로 된 프라이머가 적절한데, 서열의 각 측면에는 약 5 내지 10개의 상보성 뉴클레오티드가 바뀔 수 있다. 일반적으로, 특정부위-돌연변이유발 기술은 당업자에게 공지된 기술이고, 이는 Adelman et al., DNA 2:183(1983)에 예시하고 있다.

인지하는 바와 같이, 특정부위-돌연변이유발 기술은 일반적으로, 단일 가닥 및 이중 가닥형태로 존재하는 파아지 벡터를 이용한다. 특정부위 돌연변이에 유용한 전형적인 벡터는 Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor, A. Walton, Elsevier, Amsterdam(1981)에 제시하고 있는 M13 파아

지이다. 이들 파아지는 시판되는 것을 이용할 수 있는데, 일반적으로 당업자에게 공지된 것이다. 또는, 복제기점을 포함하는 단일-가닥 파아지를 보유한 벡터를 이용하여, 단일-가닥 DNA를 얻을 수 있다(Veira et al., Meth. Enzymol. 153;3, 1987).

일반적으로, 본 발명에 따르는 특정부위-돌연변이유발은 먼저, 관련 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 한 가닥 벡터를 수득하여 실시한다. 돌연변이된 원하는 서열을 보유한 올리고뉴클레오티드 프라이머는 자동화된 DNA/올리고뉴클레오티드 합성을 이용하여 준비한다. 이런 프라이머를 단일가닥 단백질 서열을 포함하는 벡터에 어닐링하고, 대장균 폴리메라제 I Klenow 단편과 같은 DNA 중합효소로 처리하여 돌연변이를 포함하는 가닥을 완전히 합성한다. 따라서, 돌연변이된 서열과 제2 가닥은 원하는 돌연변이를 가진다. 이 이형이중나선 벡터를 이용하여, 대장균(*E. coli*) JM101과 같은 적절한 세포를 형질전환시키고, 돌연변이된 서열을 가지는 재조합 벡터를 포함하는 클론을 스크리닝한다.

이와 같은 클론을 선택한 후에, 돌연변이된 RAP-2 단백질 서열을 떼어내 적절한 벡터에 옮기고, 이때, 벡터는 일반적으로 적절한 숙주의 트랜스펙션에 이용되는 형태의 전달 또는 발현 벡터가 된다.

따라서, RAP-2 단백질을 인코딩하는 유전자 또는 핵산은 PCR 및 화학적 올리고뉴클레오티드 합성과 같은 공지된 DNA 또는 RNA 증폭 기술을 이용하여 *in vitro*, *in vivo*에서 탐지, 수득 및 변형한 것이다. PCR을 이용하면, 반복된 DNA 폴리메라제 반응에 의해 특정 DNA를 증폭(수의 증가)시킬 수 있다. 이와 같은 반응은 클로닝을 대신하여 사용할 수 있다; 클로닝의 경우, 모든 핵산 서열을 알아야 한다. PCR을 실행하기 위해, 원하는 서열에 상보적인 프라이머를 만든다. 일반적으로 자동화된 DNA 합성에 의해 프라이머를 만들 수 있다. 프라이머는 유전자의 임의 부분과 하이브리드를 형성할 수 있도록 만들어진 것이기 때문에, 상보적인 염기쌍에 짝이 잘못된 것(mismatch)을 견딜 수 있도록 환경을 만든다. 이와 같이 짝을 잘못이룬 쌍을 증폭시키면 돌연변이된 생성물이 만들어지고, 새로운 성질을 가지는 펩티드가 형성된다(가령, 특정부위 돌연변이유발)(Ausubel., Ch.16). 또한, 역전사효소를 이용하여, 상보적인 DNA(cDNA)을 PCR과 커플링하여, 클로닝없이 프로락틴 수용체의 세포의 도메인 합성을 위한 출발물질로 RNA를 이용할 수 있다.

또한, PCR 프라이머는 증폭된 유전자 부분의 말단상의 종료 코돈과 같은 특정 및 새로운 제한위치를 가지도록 고안할 수 있다. 증폭된 유전자 서열의 5'와 3'단부에 제한위치가 위치하면, RAP-2 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 유전자 단편은 벡터상의 다른 서열 및/또는 클로닝 위치와 결합하도록 고안할 수 있다.

PCR 또는 RNA 및 DNA를 증폭시키는 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 이 글에서 제시한 기술에 기초하여, 과도한 실험없이 본 발명에 따라 사용할 수 있다. DNA 또는 RNA를 증폭시키는 공지된 방법은 폴리메라제 연쇄반응(PCR)과 관련된 증폭 과정(참고; 미국 특허, 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188(Mullis et al.); 4,921,794(Tabor et al.); 5,142,033(Innis et al.); 5,122,464(Wilson et al.); 5,091,310(Innis); 5,066,584(Gyllenstein et al.); 4,889,818(Gelfand et al.); 4,994,370(Silver et al.); 4,766,067(Biswas); 4,656,134(Ringold); Innis et al., eds, PCR Protocols: A Guide to Method and Applications), 표적 서열에 앤티센스 RNA를 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로 이용하는 RNA 증폭된 증폭(미국 특허 5,130,238(Malek et al., NASBA), DNA 증폭과 항체 라벨링을 동시에 사용하는 면역-PCR(Ruzick et al., Science 260;487(1993); Sano et al., Science 258;120(1992); Sano et al., Biotechniques 9;1378(1993); Sano et al., Science 258;120(1992); Sano et al., Biotchnique 9;1378(1991)을 포함하나, 이들에 국한시키지 않는다.

유사한 방식으로, RAP-2 단백질의 생물학적 활성 단편(가령, RAP-2의 동소체)은 RAP-2 단백질의 유사체에 대해 전술한 바와 같이 만들 수 있다. RAP-2 단백질의 적절한 단편은 RAP-2 단백질 능력을 보유하고, RIP의 생물학적 활성 또는 RIP와 직접 또는 간접적으로 결합하는 다른 단백질의 생물학적 활성을 조절 또는 조정할 수 있는 것을 말한다. 따라서, 유사체에 대해 전술한 바와 같이 네거티브-주도적 또는 포지티브-주도적 효과를 보유한 RAP-2 단백질 단편을 만들 수 있다. 이런 단편은 본 발명 유사체의 특정 부위를 대표하는데 즉, 이들은 완전 RAP-2 단백질 서열에서 유래한 RAP-2 단백질의 일부이고(가령, RAP-2 또는 이의 동소체중 하나), 이런 일부분 또는 단편은 각각 전술한 활성중 하나를 가진다. 이런 단편은 펩티드가 될 수 있다.

유사하게, RAP-2 단백질, 이의 유사체, 단편의 하나 또는 복수의 아미노산 잔기의 측쇄에 표준 변형 또는 다른 분자 예를 들면, 항체, 효소, 수용체와 RAP-2 단백질, 유사체 또는 단편을 결합시켜 만든 유도체는 당분야에 공지된 것이다. 따라서, 여기에서 언급하는 "유도체"는 당업자에게 공지된 방법으로 잔기의 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 그룹에 있는 기능기로부터 만든 유도체를 포함하는데, 이것은 본 발명의 범위에 속한다. 유도체는 탄수화물 또는 인산 잔기와 같은 화학적 부분을 보유할 수 있는데, 단 이런 분취물은 RAP-2 단백질과 동일한 또는 더 큰 생물학적 활성을 가져야 한다.

가령, 유도체에는 카르복실기의 지방족 에스테르, 암모니아 또는 일차 또는 2차 아민과 반응하는 카르복실기의 아미드, 아실 부분을 형성한 아미노산의 자유 아미노기 또는 N-아실 유도체(가령, 알카노일 또는 카르복실 아로일 기) 또는 아실 부분을 형성하는 자유 하이드록실기의 O-아실 유도체(가령, 세릴 또는 트레오닐 잔기)가 포함된다.

"유도체"는 하나의 아미노산이 20개의 자연 발생 아미노산중 다른 아미노산으로 바뀌지 않은 유도체만을 포함한다.

RAP-2 단백질은 단백질 또는 폴리펩티드 즉, 아미노산 잔기 서열이다. 정의에 따르면, RAP-2 단백질의 전체 아미노산 서열을 포함하는 큰 아미노산 서열로 구성된 폴리펩티드는 본 발명의 기본적인이고 신규한 특성에 영향을 주지 않는 한, 다시 말하면, 이들이 RAP-2 단백질의 생물학적 활성을 보유 또는 증가시키거나 또는 분할된 단백질 또는 폴리펩티드가 RAP-2 단백질의 생물학적 활성을 보유하는 경우, 이런 폴리펩티드의 범위에 속한다. 따라서, 본 발명은 다른 아미노산 또는 펩티드와 RAP-2 단백질의 융합 단백질을 포함한다.

신규한 RAP-2, 이의 동소체, 유사체 또는 단편 및 유도체는 다음과 같은 용도를 갖는다;

(i) RAP-2 단백질, 유사체, 단편, 이의 유도체는 전술한 염증, 세포 사멸 또는 세포 생존 경로중 하나에서 RIP의 기능을 조절할 수 있다. 가령, RAP-2가 NF- κ B, JNK(Jun 카이나제) 또는 p38 카이나제의 활성화에 대한 RIP 효과를 조절할 수 있는 경우, 이런 RAP-2-RIP 효과를 강화하는 RAP-2 효과는 항-중앙, 항-염증, 항-HIV 치료등에 바람직하다. 이런 경우에, 염증을 조절하고, 세포독성 효과를 강화하고, 또는 세포 생존 효과를 차단하는 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체는 공지된 표준과정을 이용하여 세포내로 도입한다. 가령, RAP 단백질이 완전히 세포내에 있고, RIP에 의해 조절되는 FAS-R 리간드, TNF- 또는 다른 단백질 효과가 필요한 세포에만 도입해야 하는 경우, 이들 단백질을 세포로 특정하게 도입하는 시스템이 필수적이다. 이를 실시하는 한 가지 방법은 우두(*Vaccinia*)에서 유래한 것과 같은 재조합 동물 바이러스를 만들고, 다음의 두 유전자에 도입한다: 세포에 의해 특이적으로 발현되는 세포 표면 단백질에 결합할 수 있는 리간드를 인코딩하는 유전자 가령, 일부 세포(CD4 림프구와 관련된 백혈구종)에 특이적으로 결합하는 AID(HIV) 바이러스 gp120 또는 FAS-R 또는 p55-R을 보유한 세포와 결합할 수 있는 임의의 리간드, 여기서 재조합 바이러스 벡터는 이런 FAS-R 또는 p55-R-보유 세포와 결합할 수 있다; RAP-2 단백질을 인코딩하는 유전자. 따라서, 바이러스 표면에서 세포-표면 결합 단백질의 발현을 통해, 바이러스는 중앙 세포 또는 다른 FAS-R 또는 p55-R-보유 세포를 표적으로 하고, 이후, 서열을 인코딩한 RAP-2 단백질은 바이러스를 통하여 세포로 도입하고, 일단 세포내에서 발현되면, FAS-R 리간드 또는 TNF-효과의 RIP 조절 또는 독립된 RIP를 강화시킨다. 이런 재조합 동물 바이러스의 작제는 표준과정에 따른다(Sambrook et al., 1989). 또 다른 가능성은 세포에 의해 흡수되는 올리고뉴클레오타이드 형태로, RAP-2 단백질(예, RAP-2 또는 이의 동소체 중 하나)의 서열을 도입하는 것이다.

(ii) 패혈증 쇼크, 이식편대 숙주 반응 또는 급성 간염과 같은 조직 손상의 경우에, RIP 또는 독립된 RIP 효과에 의해 매개되는 FAS-R 리간드, TNF 또는 다른 단백질 효과를 저해하는데 이들을 이용하는데, 여기서, FAS-R 리간드, TNF 유도된 FAS-R 또는 p55-R 세포내 시그널발생, 독립된 RIP 효과 또는 다른 단백질이 중개하는 시그널 발생과정을 차단하고, 동시에 세포 생존 경로를 증가시키는 것이 바람직하다. 이와 같은 상황에서는 표준 공정에 따라 RAP-2 단백질에 대한 앤티-센스 코딩 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드를 세포내로 유도할 수 있는데, 상기 올리고뉴클레오타이드는 RAP-2 단백질을 인코딩하는 mRNA의 번역을 효과적으로 차단하고, 따라서, 이의 발현을 차단하여, FAS-R 리간드, TNF-, RIP 또는 다른 단백질 효과를 저해한다. 이런 올리고뉴클레오타이드는 상기 재조합 바이러스 방식을 이용하여 세포내로 도입시킬 수 있는데, 바이러스에 의해 운반되는 제 2 서열은 올리고뉴클레오타이드 서열이 된다.

유사하게, 전술한 바와 같이, RAP-2-RIP 상호작용의 성질에 따라, 원하는 경우 (i)와 (ii)의 방법으로 세포 염증과 생존 경로를 억제 또는 강화할 수 있다.

또 다른 가능성은 RAP-2 단백질에 특이적인 항체를 이용하여, 세포내 시그널 활성을 저해하는 것이다.

FAS-R 리간드 또는 TNF 효과를 저해하는 또 다른 방법은 최근에 개발된 라이소자임 방식이다. 라이소자임은 특이적으로 RNA를 절단하는 촉매 RNA 분자이다. 라이소자임은 선택된 표적 RNA, 예를 들면, 본 발명의 RAP-2 단백질을 인코딩하는 mRNA를 절단하도록 가공할 수 있다. 이런 라이소자임은 RAP-2 단백질 mRNA에 특이적인 서열을 갖고, 이와 상호작용(상보적인 결합)할 수 있는데, 이후 mRNA를 절단하여, RAP-2 단백질 발현을 감소(또는 완전히 상실)시키는데, 발현의 감소정도는 표적 세포에 있는 라이소자임 발현정도에 따라 달라진다. 선택된 세포(가령, FAS-R 또는 p55-R을 보유한 세포)내로 라이소자임을 도입하기 위해, 플라스미드, 동물 바이러스(레트로바이러스) 벡터등과 같은 적절한 벡터를 이용한

다(상기 (i)에서와 같이, 바이러스가 리보자임 서열의 cDNA를 제 2 서열로 갖는 경우)(Methods etc., concerning ribozymes see Chen et al., 1992; Zhao and Pick, 1993; Shore et al., 1993; Joseph and Burke, 1993; Shimayama et al., 1993; Cantor et al., 1993; Barinaga, 1993; Crisell et al., 1993 and Koizumi et al., 1993)

(iii) RAP-2 단백질, 동소체, 유사체 또는 이의 단편 및 유도체는 세포내 시그널 발생과정에 관여하는 동일한 종류의 다른 단백질, 다시 말하면, RIP, 기능적으로 관련된 수용체 또는 단백질을 분리, 확인, 클론하는데 이용된다. 이런 경우에, 상기에서 언급한 것과 같은 곰팡이 이중-하이브리드 시스템을 이용하거나 또는 엄격하지 않은(non-stringent) 서던 하이브리드법과 이후 PCR 클로닝을 실시하는 최근에 개발된 시스템을 이용할 수 있다(Wilks et al., 1989). Wilk등은 엄격하지 않은 서던 하이브리드법 및 카이나제 모티프의 공지된 서열에 기초한 PCR로 클로닝으로, 2개의 추정 단백질-티로신 카이나제를 동정하고, 클로닝하는 방법에 대해 설명하였다. 이런 방법에서는 본 방법에 따라, RAP-2 단백질 서열을 이용하여, 관련된 RIP 결합 단백질을 동정하고 클론한다.

iv) 본 발명의 RAP-2 단백질, 이의 동소체, 유사체 또는 단편 및 유도체를 이용하는 다른 방법은 세포내 시그널 과정에 관계하는 다른 단백질 또는 인자와 결합할 수 있는 다른 단백질 또는 인자를 분리 및 확인하기 위한 친화성 크로마토그래피 방법에 이들을 사용하는 것이다. 이런 용도에서, 본 발명의 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 개별적으로 부착시키고, 이후, 세포내 시그널과정에 관계하는 것으로 보이는 세포 추출물, 분리된 단백질 또는 인자와 접촉시킨다. 친화력 크로마토그래피 과정후, RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체와 결합된 다른 단백질 또는 인자를 용출시키고, 분리하고, 특성을 조사한다.

(v) 전술한 바와 같이, 본 발명의 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 면역원(항원)으로 이용하여, 이에 대한 특이적인 항체를 만들 수 있다. 이들 항체를 이용하여, 세포 추출물 또는 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체를 생산하는 형질변환된 세포로부터 RAP-2 단백질(예, RAP-2 또는 이의 동소체중 하나)을 정제할 수 있다. 또한, 이들 항체는 RIP-매개의 FAS-R 리간드 또는 TNF 시스템, 또는 독립된 RIP 활성의 비정상적 기능, 예를 들면, RIP에 의해 조절되는 과다활성 또는 소극적활성 FAS-R 리간드 또는 TNF-유도된 세포 효과 또는 RIP 자체의 특이적 세포 효과와 연관된 질병을 확인하기 위한 진단목적에 사용할 수 있다. 따라서, 이런 질환이 RIP 단백질, 다양한 단백질, 전술한 RIP-결합 단백질 또는 RAP-2 단백질 자체가 관여하는 시그널 시스템과 관련되는 경우, 이런 항체들은 중요한 진단 도구 역할을 한다.

공지의 표준 스크리닝 과정을 이용하여, 본 발명의 RAP-2 단백질을 분리, 확인 및 특성화할 수 있다. 예를 들면, 후술하는 바와 같이, 스크리닝 과정중 하나인 곰팡이 이중-하이브리드 과정을 이용하여, RIP 단백질(Stanger et al., 1995)을 확인하고, 이어서 본 발명의 다양한 RAP-2 단백질을 확인할 수 있다. 유사하게, 당분야에 공지된 친화성 크로마토그래피, DNA 하이브리드 과정등을 이용하여, 본 발명의 RAP-2 단백질 또는 본 발명의 RAP-2 단백질에 결합할 수 있는 추가 단백질, 인자, 수용체등을 분리, 확인, 특성화할 수 있다.

여기에서 제시된 바와 같이, RAP-2 단백질을 이용하여 RAP-2에 특이적인 항체, 예를 들면, RAP-2 및 이의 동소체에 특이적인 항체를 만든다. 이와 같은 항체 또는 이의 단편은 후술하는 바와 같이 사용하는데, 여기서, 이의 항체 또는 단편은 들은 RAP-2 단백질에 특이적이다.

RAP-2가 RIP와 특이적으로 결합하고, 이와 같이, RIP의 조절물질/조절물질이 되고, 따라서, RIP가 독립적으로, 또는 다른 단백질(예, FAS-R, p55-R, MORT-1, MACH, Mch4, G1, TRADD)과 병행하여 작용하는 염증, 세포 사멸 또는 생존 경로를 조절/조정한다는 발견에 기초하여, 원하는 경우에 RAP-2-RIP 상호작용에 의해 강화/억제하는 약물을 고안하는 것이 중요하다. 이들 질병에는, 급성 간염, 여기서, 간에 대한 급성 손상은 간세포의 FAS-R 리간드-매개된 사멸을 반영한다; 췌장의 β 랑게르한스 세포의 죽음과 같은 자가면역-유도된 세포 사멸, 이것은 당뇨병을 야기한다; 이식편 거부로 인한 세포 죽음(신장, 심장, 간); 다발성 경색으로 뇌에서 회돌기신경교의 죽음; AIDS 바이러스를 증식시켜, AIDS 질병을 야기하는 AIDS-저해된 T 세포 자살이 포함된다.

RAP-2 또는 이의 하나 또는 복수의 동소체는 하나 또는 복수의 상기 경로에서 RIP의 "자연" 저해물질로 작용하고, 따라서, 이들은 RIP의 전술한 특정 저해물질로 이용할 수 있다. 유사하게, 펩티드, 유기 화합물, 항체등과 같은 다른 물질을 스크리닝하여, RAP-2 프로테아제를 저해할 수 있는 특정 약물을 수득한다.

RAP-2-RIP 상호작용의 펩티드 방해물질을 고안하고 스크리닝하는 무제한적 예는 ICE 또는 ICE-유사 프로테아제의 펩티드 저해물질에 대한 기존 연구, 펩티드 합성을 이용한 에피토프 분석 전략, ICE 기질 특이성에 대한 연구를 기초로 한다. ICE에 의한 펩티드의 효과적인 절단에 필요한 최소 요건은 P_1 위치에 아스파르트산을 선호하는 절단 위치의 우측에 위치한 네 가지 아미노산과 관계하고, P_1 위치의 우측은 메틸아민으로 충분하다는 것이 밝혀졌다(Sleath et al., 1990;

Howard et al., 1991; Thornberry et al., 1992). 또한, 형광발생성 지질 펩티드(테트라펩티드) 아세틸-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-메틸-코마틸-7-아미드)[약어 Ac-DEVD-AMC]는 FAS-R 자극과 다른 아파토시스 과정 직후에(Kaufmann, 1989; Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994) 세포에서 절단되는 것으로 밝혀진 폴리(A에-리보즈) 폴리메라제(PARP)상의 서열과 상응하고, CPP32(CED/ICE 프로테아제 족의 한 구성원)와 MACH 프로테아제(및 RAP-2 프로테아제에 의해 가능한 것)에 의해 효과적으로 절단된다.

기질의 P1 위치에 Asp가 중요한 것으로 보이기 때문에, 4번째 아미노산으로 Asp를 가지는 테트라펩티드와 처음 3개 잔기 위치가 다양하게 변형된 아미노산은 Gelyson(Geysen, 1985; Geysen et al., 1987)이 개발한 방법을 이용하여, 프로테아제의 활성부위와의 결합을 스크리닝하는데, 여기서, 고품 지체상의 다수 펩티드는 항체와 특이적인 상호작용에 대하여 스크리닝하였다. 특정 펩티드와 MACH 프로테아제의 결합은 G1 프로테아제의 방사능라벨링과 같이 당업자에게 공지된 다양한 방법을 이용하여 탐지할 수 있다. Geysen의 방법으로, 하루 일과동안 적어도 4000펩티드를 테스트할 수 있다.

유사한 방식으로, RAP-2와 RIP사이의 상호작용을 결정하는 정확한 결합 영역 또는 상동성 영역을 밝히고, 이후, 이런 상호작용을 차단할 수 있는 펩티드, 예를 들면, RIP와의 결합에 대하여 자연 RAP-2와 경쟁할 수 있는 결합 영역 또는 상보성 영역의 서열과 유사한 서열을 보유한 합성 펩티드를 스크리닝할 수 있다.

RAP-2-RIP 상호작용을 저해하여, RAP-2의 염증 또는 세포 사멸 활성을 저해할 수 있는 약물 또는 펩티드 저해물질은 분자와 결합하거나 복합체를 구성하여, 세포로의 진입을 용이하게 한다.

미국 특허 5,149,782에서는 세포막을 통하여, 전달할 분자와 융합유발성(fusogenic) 폴리펩티드, 이온-채널 형성 폴리펩티드, 다른 막 폴리펩티드, 미리스틱산, 팔미드산과 같은 긴 사슬 지방산등과 같은 막 혼합물질과 접합시키는 것을 제시한다. 이와 같은 막 혼합 작용제는 세포막의 지질이중층으로 분자 결합물질을 삽입하여, 세포질로 이들을 용이하게 들어가도록 한다.

Low등(미국 특허 5,108,921)은 수용체 매개된 엔도사이토시스 활성의 기작에 의해 단백질 및 핵산을 포함하나 이에 국한시키지 않는 분자를 막을 통하여 수송하는 방법을 검토하였다. 이들 수용체 시스템에는 이들을 인지하는 갈락토즈, 만노즈, 만노즈-6-포스페이트, 트랜스페린, 아시알글리토프로테인, 트란스코발민(비타민 B₁₂), α-2 마크로글로불린, 인슐린, 상피 성장 인자(EGF)와 같은 다른 펩티드 성장 인자등이 포함된다. Low등은 비오틴 및 엽산염(folate)에 대한 수용체와 같은 영양 수용체를 이용하여, 막을 통한 수송을 강화시킬 수 있다고 지적하였는데, 이것은 대부분의 세포 표면에서 비오틴과 엽산염의 위치와 다중성 및 다른 관련된 수용체 매개의 막통 전달과정에 기인한다. 따라서, 세포질로 수송할 화합물과 비오틴 또는 엽산염과 같은 리간드사이에 형성된 복합체는 비오틴 또는 엽산염을 보유한 세포막과 접촉하여, 수용체 중개된 막통 전달 기작을 개시하고, 따라서, 세포안으로 원하는 화합물이 들어가게 된다.

또한, 당분야에 공지된 바와 같이, 원하는 펩티드 서열과 리더/시그널 펩티드 서열을 융합하여 "키메라 펩티드"를 만들고, 이런 "키메라 펩티드"는 세포막을 통하여 세포질로 이동하게 된다.

펩티드 분야에 통상의 지식을 가진 자가 인식하는 바와 같이, 본 발명에 따른 RAP-2-RIP 상호작용의 펩티드 저해물질에는 펩티드 유사 약물 또는 저해물질을 포함되는데, 상기 약물 또는 저해물질은 좀더 안정적인 저해물질을 고안하기 위하여, RAP-2/RIP 프로테아제와 결합을 신속하게 스크리닝할 수 있다.

전술한 것과 같이, 세포막을 통하여 펩티드 저해물질의 수송을 실행하거나 강화하기 위한 동일한 수단은 RAP-2 또는 이의 동소체 및 세포내에서 이들 효과를 발휘할 수 있는 다른 펩티드와 단백질에 적용할 수 있다.

명세서 전반에서 언급된 "항체"에는 다클론성 항체, 단클론성 항체(mAbs), 키메라 항체, 가용성 또는 결합형태로 라벨된 항체에 대한 항-이디오타입(항-Id) 항체를 비롯하여 효소 절단, 펩티드 합성, 재조합 기술등과 같은 임의의 공지된 기술에 의해 만들 수 있는 항체 단편이 포함된다.

다클론성 항체는 항원으로 면역 처리한 동물의 혈장으로부터 유래한 이형 집단 항체 분자를 말한다. 단클론성 항체는 항원에 특이적인 동종의 항체 집단을 의미하는데, 이들 집단은 실제로 유사한 에피토프 결합 부위를 보유한다. MAbs는 Kohler and Milstein, Nature 256:495-497(1975); 미국 특허 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory(1988); and Colligan et al., eds, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y.,(1992-199)에 제시한 기

술을 이용하여 만들 수 있다. 이런 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, GILD, 이의 아종을 포함하는 임의의 면역글로불린이다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마는 *in vitro*, *in vivo*, *in situ*에서 배양할 수 있다. *in vivo* 또는 *in situ*에서 고역가의 단클론항체 생산이 적절한 방법이다.

키메라 항체는 상이한 영역이 다른 동물종, 예를 들면, 뮤린(murin) mAb에서 유래된 변이영역과 사람 면역글로불린 불변 영역에서 유래한 분자다. 주로, 키메라 항체는 면역원성을 감소시키고, 생산성을 증가시키는데 이용하는데, 예를 들면, 뮤린 mAb는 하이브리도마에서 높은 산출량을 갖지만 사람에서는 높은 면역원성을 가지기 때문에, 사람/뮤린 키메라 mAb를 이용한다. 키메라 항체와 이를 생산하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다(Cabily et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277(1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646(1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270(1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496(published Feb 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494(published Mar 13, 1996); Kudo et al., European Patent Application 184187(published June 11, 1986); Sahagan et al., J. Immunol 137:1066-1074(1986); Robinson et al., International Patent Application No. Wo 8702671(published May 7, 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443(1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84-214-218(1987); Better et al., Science 240:1041-1043(1988) and Harlow and Lane, Antibodies; A Laboratory Manual, supra.

항-이디오타입(항-Id) 항체는 항체의 항원 결합 부위와 일반적으로 결합하는 독특한 결정 부위를 인식하는 항체다. Id 항체는 동일 종과 동일한 유전자형의 동물(가령, 생쥐주)을 항-Id이 만들어진 mAb 공급원으로 면역하여 만들 수 있다. 면역된 동물은 이들 이디오타입 항원결정기(항-Id 항체)에 대한 항체를 만들어, 면역된 항체의 이디오타입 결정부위를 인지하고 이와 반응한다(미국 특허 4,699,880).

항-Id 항체는 또한, 다른 동물에서 소위 항-항-Id 항체를 만드는 면역 반응을 유도하는 "면역원"으로 이용할 수 있다. 항-항-Id는 항-Id를 유도한 원래 mAb와 에피토프가 동일하다. 따라서, mAb의 이디오타입 결정부위에 대한 항체를 이용하여, 동일한 특이성을 가지는 항체를 발현하는 다른 클론을 동정할 수 있다.

따라서, 본 발명의 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 유도체에 대하여 발생된 mAb을 이용하여, BALB/c 생쥐과 같은 적절한 동물에 항-Id 항체를 유도할 수 있다. 이와 같은 면역된 쥐의 체장 세포를 이용하여, 항-Id mAb를 분리하는 항-Id 하이브리드를 생산한다. 또한, 항-Id mAb를 키홀 림페트 헤모시아닌(KLH)에 결합시켜, 추가 BALB/c 쥐를 면역할 수 있다. 이들 쥐의 혈청은 상기 RAP-2 단백질, 유사체, 단편 또는 이의 유도체의 에피토프에 특이적인 고유 mAb의 결합 성질을 보유한 항-항-Id 항체를 포함한다.

따라서, 항-Id mAbs는 자체의 이디오타입 에피토프, 또는 GRB 단백질-a와 같은 평가할 에피토프와 구조적으로 유사한 "이디오토프(idiotopes)"를 가진다.

"항체"는 고유 항체뿐만 아니라 Fab, F(ab')₂와 같은 단편을 포함하는데, 이들은 항원과 결합할 수 있다. Fab와 F(ab')₂ 단편은 고유 항체의 Fc 단편이 부족하여, 순환계로부터 더 빨리 제거되고, 고유 항체보다는 비-특이적인 조직 결합이 적다(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325(1983)).

Fab와 F(ab')₂ 및 본 발명에 유용한 항체의 다른 단편을 이용하면, 고유 항체 분자에 대해 본 발명에서 상술하고 있는 RAP-2 단백질을 탐지하고, 정량할 수 있다. 이런 단편은 일반적으로, 파파인(Fab 단편을 만듦) 또는 펩신(F(ab')₂ 단편을 만듦)과 같은 효소를 이용한 단백질 분해로 만들 수 있다.

항체는 분자에 특이적으로 반응하여, 분자와 항체가 결합시키는 경우, 항체는 분자와 "결합할 수 있는"라고 한다. "에피토프"는 항체에 의해 인지되고, 항체와 결합할 수 있는 분자의 부분을 말한다. 에피토프 또는 "항원 결정부위"는 일반적으로 아미노산 또는 당의 측쇄와 같은 분자의 화학활성 표면기로 구성되고, 3차 구조적인 특징과 특이적인 전하 특성을 가진다.

"항원"은 항체와 결합할 수 있는 분자 또는 분자의 일부분인데, 상기 항체는 동물이 항원의 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 만들어 내도록 유도할 수 있다. 항원은 하나 이상의 에피토프를 가진다. 상기에서 언급한 특이적인 반응은 매우 특이적인 방식으로, 항원이 상응하는 항체에 반응하고, 다른 항원에 의해 야기된 다른 항체와는 반응하지 않는다는 것을 의미한다.

본 발명에 유용한 항체의 일부분을 포함하는 항체를 이용하여, 샘플에서 RAP-2 단백질을 정량 또는 정성적으로 탐지하거나 또는 본 발명의 RAP-2 단백질을 발현시키는 세포의 존재를 확인할 수 있다. 이것은 광 현미경, 혈구 유량 계산기 또는 형광측정 탐지기와 함께, 형광 라벨된 항체(하기 참조)를 이용한 면역형광 기술을 성취할 수 있다.

본 발명의 항체(또는 이의 단편)는 면역형광 또는 면역전자 현미경과 같은 조직학적 방법에 이용하여, 본 발명의 RAP-2 단백질을 *in situ*에서 탐지한다. *In situ* 탐지는 환자에서 조직학적 견본을 떼어내고, 본 발명의 라벨된 항체를 이 견본에 제시하여 이루어진다. 항체(또는 이의 단편)는 가급적, 생물학적 샘플에 라벨된 항체(또는 이의 단편)를 제공하거나 또는 겹치게 하여 제공한다. 이와 같은 과정을 이용하여, RAP-2 단백질의 존재를 결정하고, 검사한 조직에서 이의 분포를 알 수 있다. 본 발명을 이용하여, 당업자는 광범위한 다수의 조직학적 방법(가령 착색 과정)을 변형하여 이런 *in situ* 탐지를 성취할 수 있다.

본 발명의 RAP-2 단백질에 대한 분석은 일반적으로, RAP-2 단백질을 확인할 수 있는 탐지가능한 라벨된 항체 존재하에 생물유체와 같은 생물샘플, 조직 추출물, 임파세포 또는 백혈구세포와 같은 새로 수득한 세포, 또는 조직 배양물에서 배양된 세포를 배양하고, 공지의 여러 가지 방법을 이용하여 항체를 탐지하는 것으로 구성된다.

생물학적 샘플은 니트로셀룰로오스와 같은 고형상 지지체 또는 담체, 또는 세포, 세포 입자 또는 가용성 단백질을 고정시킬 수 다른 지지체 또는 담체로 처리한다. 지지체 또는 담체는 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 탐지가능한 라벨링된 항체로 처리한 후, 적절한 완충액으로 세척한다. 고형상 지지체 또는 담체는 다시 세척하여, 결합안된 항체를 제거한다. 고형상 지지체 또는 담체에 결합된 라벨의 양은 통상적인 방법을 이용하여 탐지한다.

"고형상 지지체", "고형상 담체", "고형 지지체", "고형 담체", "지지체" 또는 "담체"는 항원 또는 항체가 결합할 수 있는 임의의 지지체 또는 담체를 의미한다. 공지의 지지체 또는 담체는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론 아밀라제, 천연 또는 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철광을 포함한다. 천연 담체는 본 발명의 목적을 위해 어느 정도 가용성 또는 불용성일 수 있다. 지지체 물질은 항원 또는 항체와 결합할 수 있는 한, 실제로 거의 모든 구조적 형태가 가능하다. 따라서, 지지체 또는 담체 형태는 비드와 같은 원형 또는 시험관의 내부 또는 막대의 외부와 같은 실린더형이 될 수 있다. 달리 표면은 쉬트와 편평한 형태, 테스트 스트립등일 수 있다. 적절한 지지체 또는 담체는 폴리스테렌 비드를 포함한다. 당업자는 항원 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 공지된 적절한 담체를 이용하거나 또는 일상적인 실험을 통하여 이를 결정할 수 있다.

상기에서 언급한 것과 같이, 본 발명의 임의의 항체에 대한 결합 활성은 공지된 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 당업자는 일상적인 실험을 이용하여, 각 측정에 적합한 실험 조건을 결정할 수 있다.

세척, 교반, 혼합, 여과등과 같은 다른 과정은 특정 상황에 따라 또는 통상적인 과정에 따라 추가할 수 있다.

본 발명에 따른 항체를 탐지가능하도록 라벨할 수 있는 방법중의 하나는 상기 항체와 효소를 연결하여, 효소 면역검사(EIA)에 사용하는 것이다. 이런 효소는 적절한 기질에 노출되면 기질과 반응하는데, 여기서, 분광광도계, 형광 측정 또는 다른 시각적 수단등으로 탐지할 수 있는 화학적 부분이 만들어진다. 항체에 탐지가능한 라벨링을 하기 위하여 사용되는 효소로는 말레이트 디하이드로게나제, 스타필로코커스 핵산분해효소, 델타-5-스테로이드 이소메라제, 이스트 알코올 디하이드로게나제, 알파-글리세로포스페이트 디하이드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소메라제, 양고추냉이 과산화효소, 알칼리 포스포타제, 아스파라기나제, 포도당 산화효소, 베타-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 유레이즈, 카탈라제, 포도당-6-포스페이트 디하이드로게나제, 글루코아밀라제, 아세틸콜린-에스테라제 등을 들 수 있지만, 이들에 국한시키지는 않는다. 탐지는 효소에 대한 발색 기질을 이용한 발색 방법으로 성취할 수 있다. 유사하게 준비된 표준과 기질의 효소반응의 정도를 시각적으로 비교하여 탐지할 수 있다.

다양한 다른 면역검사를 이용하여 탐지할 수 있다. 가령, 항체 또는 항체 단편에 방사능활성 라벨링하여, 방사능 면역검사(RIA)로 R-PTPase를 탐지할 수 있다. RIA에 대해서는 Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY(1978) with particular reference to the chapter entitled "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques" by Chard. T.에 상세하게 기술하고 있다. 방사능활성 에피토프는 카운터, 신틸레이션 카운터 또는 자가방사사진 등으로 탐지할 수 있다.

본 발명에 따른 항체는 형광 화합물로 라벨할 수 있다. 형광 라벨된 항체를 적절한 파장의 빛에 노출시키면, 형광이 나타나기 때문에 이의 존재를 확인할 수 있다. 흔히 이용되는 형광 라벨링 화합물에는 형광 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리틴, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데히드 및 플로로카민등이 포함된다.

항체는 ^{152}E 또는 다른 란타니드와 같은 형광방출 금속을 이용하여, 라벨링할 수 있다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(ETPA)과 같은 금속 킬레이트기를 이용하여 항체와 결합할 수 있다.

항체는 또한, 화학적 발광 화합물에 결합시켜, 탐지가능하게 라벨링할 수 있다. 화학적 발광 화합물이 결합된 항체는 화학 반응동안에 발생하는 발광을 탐지하여 결정할 수 있다. 특히 유용한 화학적 발광 라벨링 화합물의 예로는 루미놀, 이소루미놀, 트레오마틱 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 및 옥살레이트 에스테르를 들 수 있다.

유사하게, 생물학적 발광 화합물을 이용하여, 본 발명의 항체를 라벨링할 수 있다. 생물발광은 생물계에서 볼 수 있는 일종의 화학적 발광으로, 여기서, 촉매 단백질은 화학발광 반응의 효과를 증가시킨다. 생물발광 단백질의 존재는 발광의 존재를 탐지하여 결정할 수 있다. 라벨링 목적의 중요한 생물발광 화합물은 루시페린, 루시페라제, 에쿠오린이다.

본 발명의 항체 분자는 "이중-위치" 또는 "샌드위치" 검사로 알려진 면역측정 검사에 이용할 수 있다. 일반적인 면역측정 검사에서, 일정량의 라벨안된 항체(또는 항체의 단편)를 고정 지지체 또는 담체와 결합시키고, 일정량의 탐지가능한 라벨된 가용성 항체를 첨가하면, 고정-상 항체, 항원, 라벨된 항체사이에 형성된 3 자 복합체를 탐지 및 정량할 수 있다.

일반적인 그리고 적절한 면역측정 검사에는 "선행" 검사가 포함되는데, 여기서, 고정상에 결합된 항체는 먼저 실험할 샘플과 접촉시키고, 이중 고정상 항체-항원 복합체를 형성하여 샘플로부터 항원을 추출한다. 적당한 배양 후에, 고정상 지지체 또는 담체는 세척하여, 반응하지 않은 항원을 포함하는 유체 샘플 잔류물을 제거하고, 이후, 양을 알지 못하는 라벨된 항체를 포함하는 용액과 접촉시킨다(이는 "리포터 분자"로 작용함). 고정 지지체 또는 담체와 결합된 항원 복합체에 라벨된 항체를 결합시키기 위한 제 2 배양 후, 고정 지지체 또는 담체는 2번째로 세척하여 반응 안된 라벨링 항체를 제거한다.

다른 형태의 "샌드위치" 검사는 본 발명의 항원을 유용하게 이용하여 소위 "동시" 또는 "역행" 검사를 이용한다. 동시분석은 고정상 지지체에 결합된 항체와 라벨된 항체를 동시에 테스트할 샘플에 첨가하는 단일 배양 단계로 구성된다. 배양이 완료된 후에, 고정상 지지체 또는 담체를 세척하여, 유체 샘플 잔류물과 결합 안된 라벨된 항체를 제거한다. 고정상 지지체 또는 담체와 결합된 라벨된 항체는 "선행" 샌드위치 검사와 같이 결정된다.

"역행" 검사에서, 유체 샘플에 라벨된 항체 용액을 조금씩 첨가하고, 이후 적당히 배양한 후 고정 지지체 또는 담체와 결합된 라벨안된 항체를 첨가한다. 제2차 배양 후, 고정상은 통상의 방식으로 세척하여, 테스트할 샘플 잔류물과 반응 하지 않은 라벨된 항체 용액을 버린다. 고정 지지체 또는 담체와 결합된 라벨된 항체는 이후, "동시" 또는 "역행" 검사에서와 같이 결정할 수 있다.

본 발명의 RAP-2 단백질은 임의의 표준 재조합 DNA 과정(Sambrook et al., 1989, and Ansabel et al., 1987-1995, supra)을 이용하여 생산할 수 있는데, 여기서, 당분야에 공지된 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포는 본 발명의 단백질을 인코딩하는 진핵 또는 원핵 벡터로 형질변환시킨다. 따라서, 본 발명은 이런 발현 벡터 및 본 발명의 단백질 생산에 이용된 형질변환된 숙주에 관한다. 전술한 바와 같이, 이들 단백질에는 또한, 이들의 생물학적 활성 유사체, 단편, 유도체가 포함되고, 따라서, 이들을 인코딩하는 벡터에는 이런 유사체와 단편을 인코딩하는 벡터가 포함되고, 형질변환된 숙주에는 이런 유사체 및 단편을 생산하는 숙주가 포함된다. 형질변환된 숙주에 의해 생산되는 이런 단백질의 유도체는 표준 방법에 따라 만들어진 상기 단백질, 이의 유사체 또는 단편의 유도체가 된다.

본 발명은 또한 RAP-2 단백질을 인코딩하는 재조합 동물 바이러스를 포함하는 제약학적 조성물에 관하는데, 상기 벡터에는 RAP-2 서열의 세포삽입을 주도하는 특정 표적 세포(암 세포) 표면 단백질과 결합할 수 있는 바이러스 표면 단백질을 인코딩한다. 또한, 본 발명의 제약학적 조성물은 활성성분으로써 RAP-2 단백질 서열의 엔티-센스 서열을 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드(a) 및 RAP-2-RIP 상호작용을 약물(b)을 포함한다.

본 발명에 따른 제약학적 조성물은 의도한 목적을 실행하기 위해 충분한 양의 활성성분을 포함한다. 또한, 제약학적 조성물은 부형제와 보조제로 이루어진 제약학적으로 수용가능한 적당한 화합물을 포함하는데, 상기 부형제와 보조제는 활성성분을 제약학적으로 사용할 수 있는 제제로 가공하는 것을 용이하게 하고, 이를 필요로 하는 개체에 투여시 이런 제제를 안정화시킬 수 있다.

RAP-2 단백질과 이의 동소체 또는 이소타입은 세포내 시그널발생 경로에 관여하는 다양한 다른 단백질의 발현과 유사한 방식으로, 상이한 패턴의 이소타입과 함께 여러 조직에서 상당히 다른 수준으로 발현되는 것으로 보인다. 이런 차이는 Fas/APO1-리간드와 TNF에 대한 조직-특이적 반응특성의 원인이 된다. 다른 CED3/ICE 동소체의 경우와 같이(Wanh

etal.,; Alnemri et al., 1995), 불완전한 CED3/ICE부분(가령, MACHa3)을 포함하는 MACH 동소체는 동시 발현된 MACHa1 또는 MACHa2 분자의 활성화에 저해효과를 갖는 것으로 밝혀졌고; 이는 Fas/APO1과 p55-R에 의한 세포 사멸 유도를 차단하는 것으로 밝혀졌다. 세포에서 이런 저해성 동소체의 발현은 Fas/APO1과 TNF-매개된 세포독성에 대해 세포의 자가-방어 기작이 된다. 적어도 일부 G1 동소체의 유사한 방해 효과를 예상할 수 있다(G1은 최근에 분리된 신규한 Mch4-와 MACH-결합 단백질이고, 또한 MORT MODULE과 프로테아제 도메인을 보유한 MORT-1-결합 단백질이다-IL 120367). CED3/ICE 족의 다른 프로테아제에서 관찰된 이형성을 상당히 초과하는 MACH 동소체의 광범위한 이형성(heterogeneity)과 G1 동소체의 상동한 추정 이형성으로 인하여, 활성 MACH 동소체의 기능 및 상동하게 활성 G1 동소체의 기능을 매우 정교하게 조절할 수 있다.

가능한 RAP-2 동소체의 일부는 다른 기능을 할 수 있다. 가령, RAP-2 또는 이의 일부 동소체는 RIP와의 상호작용 또는 RIP와 독립적으로, Fas/APO1과 TNF 수용체의 다른 비-세포독성 효과에 관여하는 분자의 결합 부위역할을 한다.

염증, 세포 사멸의 원인이 되는 Fas/APO1 수용체 독특한 능력 및 다른 조직-손상 활성을 자극하는 TNF 수용체의 능력으로 인하여, 이들 수용체의 기능변형은 유기체에 상당히 유해하다. 또한, 이들 수용체의 과도한 또는 결핍된 기능은 다양한 질병의 병인의 원인이 된다(Vassalli, 1992, Nagata and Golstein, 1995). 수용체의 시그널발생에 참여하는 분자를 확인하고, 이들 분자의 활성을 조절하는 방법을 발견하는 것은 새로운 치료요법의 방향을 제시할 수 있다. 본 발명의 다른 측면은 다음의 실시예에서 명확히 알 수 있다.

본 발명은 다음의 실시예와 첨부된 도면에서 자세히 설명한다.

i) 이중-하이브리드 스크리닝과 이중-하이브리드 β -갈락토시다제 발현 검사; (ii) 단백질의 유도된 발현, 대사적 라벨링, 면역침전; (iii) *in vitro* 결합; (iv) 세포독성의 평가; (v) MORT-1과 MORT-1 결합 단백질(예, MACH) 및 새롭게 분리된 단백질 G1(IL 120367)에 대한 노란 분석 및 서열 분석(Boldin et al., 1995b) 2, 3(Boldin et al., 1995b), 4(아래)는 본 발명의 RAP-2와 이의 동소체의 분리, 클로닝, 특성화에 동일하게 적용할 수 있다. 이들 과정은 이스라엘 출원 114615, 114986, 115319, 116588, 117932, 120367 및 PCT/US96/10521에서 상세하게 설명한 본 발명에 따른 RAP-2의 분리, 클로닝, 특성화에 사용한 과정과 동일하다. 또한, NIK 단백질과 NF-kB 활성화에서 이의 역할, 이에 따른 이들 세포 생존 경로에서 TRAF2에 수행되는 역할, 예를 들면, TRAF2, RIP와 다른 단백질사이의 상호작용에 관해서는 IL 117800, IL 119133, Malinin et al., 1997에서 상세하게 설명한다.

실시예

실시예 1: RIP 단백질에 결합하는 RAP-2 단백질의 클로닝 및 분리, 이중-하이브리드 스크리닝, 서열화 및 예비 분석

B-세포 라이브러리에서 바이트로 RIP를 이용하여 이중-하이브리드 스크리닝을 하여(Fields and Song, 1989, WO/96/18641), 약 1.5Kb의 클론을 분리하였다. 1.5Kb 클론(도 1과 2의 화살표)을 이용하여 파아지 cDNA 라이브러리를 스크리닝하면, 약 2.0Kb 클론을 얻는데, 이 서열은 도 1에 나타내었다.

1.5Kb 클론의 서열과 매칭되는 EST를 이용하여, EST 단편을 얻을 수 있는데, 이단편은 I.M.A.G.E. 콘조르티움 클론 # 41072(Research Genetics Institute)의 3' 말단으로 구성된다. 태아 뇌 라이브러리에서 기원된 이들 클론중에 3' 및 5' 말단에 있는 두 개의 작은 서열 단편만이 공개되었다. 클론을 수득한 후에, 서열을 조사해보면, 이미 공개된 서열 단편에도 에러가 포함되었다는 것을 알 수 있다. 서열화된 클론(도 2)은 코딩 부분에서 도 1의 클론과 동일하나, 5'-비코딩 부분이 다르다는 것을 알 수 있다. 따라서, 두 개 cDNA는 동일한 유전자의 또 다른 접합형이라는 것을 추측할 수 있다.

서열을 분석하면, RAP와 유사하게, RAP-2 단백질은 "죽음" 도메인을 가지지는 않으며, MORT DODULE을 가지지 않고, ICE 족의 것과 유사한 프로테아제 도메인도 가지지 않으며, 카이나제 도메인이나 TRAF 도메인을 가지지도 않는다(상기 계류중인 공동 소유의 특허 출원 및 다양한 문헌 참고, 특히, Malinin et al., 1997에서는 세포내 시그널발생 과정에 존재하는 모든 다양한 도메인에 대해). 단백질 코딩 부분을 따라 고르게 분포된 루이신 지퍼(LZ)와 유사한 블록을 제외하고는 주어진 서열에서 임의의 중요한 모티프가 존재하는 것으로는 보이지 않는다. 이들을 "유사"라고 칭한 이유는 이들 중 두 개는 Leu이 Val, Met, Ile 치환된 치환체를 포함하기 때문이다. 통상 상당히 보존되어 있지만, 루이신 지퍼 도메인내에 이와 같은 변화로 인하여 단백질이 다른 LZs에 결합할 수 있는 등의 기능을 가진 활성을 보유하는지에 대해서는 분명하지 않다. 결합 연구에 따르면, RAP-2는 기본적으로 RIP에 결합하고, RAP-2는 TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R, MACH에 결합할 수 없다(현재까지 실행한 연구에서). 이와 같은 결과로써, RAP-2에는 "죽음 도메인" 및 MORT MODULE이 실재 없다는 것을 뒷받침해준다.

따라서, RAP-2는 매우 특이적인 방식으로 RIP에 결합하거나 상호작용하는 특이적인 RIP-결합 단백질이라는 것을 알 수 있다. 따라서, RAP-2는 염증, 세포 죽음 및 세포 생존 과정에서 RIP 조절/중개에서 중요한 역할을 하는 RIP 세포내 활성의 특이적인 중개물질/조절물질이라는 것이다.

간단하게 설명하면, "바이트"로 전체 길이 RIP 단백질을 이용한 사람의 B-세포 cDNA 라이브러리의 이중-하이브리드 스크리닝을 이용하면 RAP-2 클론을 얻을 수 있다. 기존의 문헌(e.g. Stanger et al., 1995)으로부터 RIP 서열을 얻거나 사람의 RIP 서열로써 GenBank 데이터베이스(기탁번호 U 25994)(또는 생쥐 RIP 서열, 기탁번호 U 25995)에 존재하는 것을 이용할 수 있다. 이와 같은 서열 정보를 이용하여, 적절한 PCR-프라이머를 OLIGO4TM 소프트웨어를 이용하여 만들 수 있고, RIP의 코딩 부분에 상응하는 DNA 단편은 전체 cDNA 사람 섬유아세포 세포 라이브러리(표준 과정을 이용)로부터 주형 cDNA를 이용하여 PCR에 의해 수득할 수 있다. 이와 같은 RIP의 코딩 부분을 pGBT-9 벡터(Clontech)에 클론시키고, 이를 상기에서 설명한 것과 같은 바이트로 이용하여, 이중-하이브리드 스크리닝 과정을 실시한다. 이중-하이브리드 스크리닝에서 RIP와 상호작용할 수 있는 RIP-결합 단백질을 코딩하는 클론을 얻을 수 있다.

상기에서 설명한 것과 같이 이와 같은 클론을 이용하여 파아지 cDNA 라이브러리 및 EST 데이터뱅크를 스크리닝한다. 이는 도 1과 2에서 볼 수 있는 것과 같이, 두 개 클론의 코딩 서열은 동일하지만, 5'-년코딩 부분이 다르다. 따라서, 우리는 또 다른 접합형이 관련된 것으로 추측할 수 있다. 클론은 약 2.0Kb로 ORF(개방해독틀)이 1.5Kb 포함되고, 단백질 자체의 분자량은 약 50Kb이다. RAP-2의 유추 아미노산 서열은 도 3에 나타내었다.

"dbest" 데이터베이스, 사람 게놈 데이터베이스 레벨 1, GenBank 데이터베이스에서 RAP-2 클론 및 서열의 분석에 따르면, RAP-2 서열은 공지된 서열이 아닌 독특한(신규한) 서열로써 RAP-2 서열에 임의의 유의성있는 상동성을 나타낸다. 본 출원이 우선권으로 주장하는 IL 123758 출원 후에, Yamaoka S. et al.(1998)는 48kDa 단백질을 인코딩하는 뮤린 cDNA의 특징에 대해서 보고한 바 있고, 이는 NF- κ B 필수적인 조절물질로 NEMO로 지정하였다(배경 참고).

추가 데이터베이스(in silico) 연구에서 Li Y. et al.(1988, 배경 참고)의해 클론된 기능이 알려지지 않은 단백질인 FIP-2 단백질로 확인되었다.

RAP-2 및 FIP-2 서열(도 3B)의 구형 배열로부터 알 수 있는 바와 같이, 전반적인 유사도는 상당히 낮다(따라서, 구형 알고리즘에 기초한 스캔을 이용하여 이 서열이 확인되지 않았다는 것이 당연한 일이다). RAP-2와 FIP-2 사이의 상동성은 단백질의 C-말단으로 갈수록 증가하여, C-말단의 30개 아미노산의 가상 동일성이 정점에 이른다. 주목할 만한 것은, 후자 부분 이외에, FIP-2에서 가상 LZ-모티프는 RAP-2에서 대개 보존되어 있다(Ile/Ala 치환을 제외).

약 0.5kb인 추가의 짧은 RAP-2 cDNA가 확인되었고(ID: 1469996), 이는 이후에, *Human shrt*로 지정되었다. 이와 같은 변이체는 1.5kb의 "전체" cDNA의 몇 가지 멀리있는 부분에서 유도된 코딩 서열 "블록"으로 구성되는데, 이는 아마도 동일한 유전자의 또 다른 접합형으로 보인다.

다중 조직 노란 블랏(Clontech)과 RAP-2 cDNA의 0.9kb BglIII-단편의 노란 하이브리드 반응 분석에서는 RAP-2 mRNA의 복합 패턴이 노출되었다. 1kb이상 최고 7kb정도 범위의 적어도 5개 다른 mRNAs가 감지되는데, 2.5kb 및 6kb 변이체가 다소 산재되어 있다(도 4A).

실시예 2: 뮤린 RAP-2의 확인

TIGR에서 정립된 생쥐 ESTs 컬렉션의 유사한 연구에서 생쥐 RAP-2에 상응하는 것으로 보이는 1.6kb의 cDNA(생쥐 부분 ID:761011. 도 3)이 나타났는데, 이는 실제 코딩 부분을 통하여 사람에서의 상응하는 부분과 실제 동일(95%)하기 때문이다.

그럼에도 불구하고, 사람과 생쥐의 RAP-2 및 NEMO 서열의 차이는 규칙적인 중간 차이에 분명한 부분을 초과한다. 사실, 전체 길이의 사람 변이체 및 부분적인 뮤린 서열과 비교하였을 때, 뮤린 RAP-2의 7개 아미노산의 손실 블록(위치 249 in 20.4)과 NEMO 개방 해독틀에 있는 3개 아미노산(위치 111의 KLE)이 삽입되었다는 것이 가장 눈에 띄는 예가 된다(도 3). 그러나, 이것들이 단백질의 활성에 기능상의 영향을 주게된다. NEMO에 대해 보고된 기능상의 성질로 사람의 RAP-2에서 발견되는 것의 반대되는 것으로써, NEMO에 대해 보고된 분별 분석에서는 이것이 signalsome에 국소되어 있다는 것을 확인할 수 있다.

실시예 3: 포유류 세포에서 RAP-2에 RIP의 결합

RAP-2-RIP 상호작용의 생리학적 관련성에 대한 추가 증거는 트랜스펙트된 HEK-293T 및 HeLa 세포에서 획득할 수 있다. 또한, 이들 두 개 단백질은 도 4B의 각 라인에서 나타낸 것과 같이 HEK-293(ATCC No. CRL 1573) 세포의 세포 용해 물질로부터 공동-침전시킬 수 있는데, 항-FLAG mAbs(Kodak)로 면역침전시킬 수 있다. 면역복합체는 HIS-RAP-2 존재 하에, 통상적인 웨스턴 블랏 과정으로 His6 mAbs(Sigma)을 이용하여 분석한다(도 4B, 데이터는 나타내지 않음). 그러나, 이와 같은 복합체 형성이 RIP 효소적 활성화는 아니며, *in vitro* 면역복합체 카이나제 검사에 의해 우리가 판단하는 정도에서는 과다-발현된 RIP는 RAP-2를 포스포릴화시키지 않았다(나타내지 않음).

RAP-2가 임의 다른 공지의 세포내 시그널발생 단백질에 결합하는지를 결정하지 위한 결합 검사 테스트를 실시하였다. 이와 같은 테스트에서, 단백질 TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R, MACH에 대해 RAP-2에 결합하는 능력이 있는 지를 테스트하였다. 그러나, RAP-2는 이들 단백질중 어느 것에도 결합할 수 없었다. 또한, RAP-2는 기준 단백질 가령, 라민, 사이클린 D에도 결합하지 않았다.

상기 결과로부터 새로운 RAP-2 단백질은 아마도 매우 특이적인 방식으로 RIP와 상호작용을 하고, 이는 RIP의 특이적인 조절물질/중개물질이 된다.

실시예 4; RAP-2는 NIK와 상호작용을 하고, NF- κ B 및 c-Jun-의존하는 전사를 조절한다.

이스트상에서 이중-하이드리드 테스트에서 RAP-2-NIK 상호작용이 감지되지는 않았지만(상기 참고), HEK-293T 포유류 세포의 트랜스펙션 실험에서 이와 같은 안정한 형태의 복합체라는 것을 알 수 있다. NIK-RAP-2 상호작용은 실시예 3에서 설명하는 것과 같은 방법으로 감지되는데, 단, 항-FLAG 항체를 웨스턴 블랏에 이용하고, 항-His6으로 면역침전시켰다는 것이 다른 점이다(도 4C). 이스트 및 포유류 세포에서 결합에 있어서, 다른 것은 전체 길이의 NIK가 이스트에서 발현되는 경우에 이 결합 성질을 느슨하게 하는 경향이 있기 때문에 놀라운 일이 아니다.

*in vivo*상에서 RIP 및 NIK는 TNF-유도된 NF- κ B 활성화의 필수적인 중개물질로 여겨지는 상황에서, 우리는 세포 배양물에서 RAP-2가 과다 발현되면, 이와 같은 특정 시그널발생 과정을 방해할 수 있는 지를 검사하였다. 초기 실험은 HIV-LTR 미니 프로모터의 제어하에서 루시페라제 유전자로 구성된 리포터 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션된 HEK-293T 세포로 실시하였다. 유사한 셋업에서, RAP-2가 초기에 거의 기저 수준으로 하향 조절된다는 것이 밝혀졌고, TNF 시그널(NIK, TRAF2, RIP 등)에 관여하는 다양한 공지의 NF- κ B 유도물질의 과다 발현 및 외부 자극(TNF 및 PMA, 도 5A)을 이용한 세포 처리에 의해 리포터 활성이 된다는 것을 밝혔다. HEK-293T 세포를 리포터 플라스미드(NF- κ B(5A)의 경우에 HIVLTR-Luc 또는 CMV-Luc, c-Jun(5B)의 경우에 GAL4-Luc)와 지시한 발현벡터 및 비어있는 비이클(pcDNA3) 또는 전체 길이의 RAP-2(pcRAP-2)를 인코딩하는 플라스미드로 일시적으로 트랜스펙션시킨다. 주목할만한 것은, RelA와 같이 RelA와 같이 시그널 트랜스덕션 과정을 하향시키는데 RAP-2가 영향을 발휘한다는 것은 이 단백질의 일부분이 다양한 시그널발생 과정에 공통적이라는 것을 의미한다(아래 참고). 동시에, 루시페라제의 κ B-독립적인 전사(CMV 초기 프로모터에 의해 구동된)가 손상되지 않았다는 것으로(도 5A), 따라서 우리는 RAP-2에 의한 기본적인 전사/해독 기작의 가능한 혼란은 배제된 것으로 보인다. 이 결과는 HeLa 세포에서 충분히 확인되었다(나타내지 않음).

그러나, 추가 역가 검사에서 나타난 바와 같이, 실제 현상은 복합체와는 거리가 멀다. 사실, TRAF2가 도 6에서 나타낸 바와 같은 다양한 양의 pcRAP-2와 함께 HEK-293T 세포에서 일시적으로 발현되었을 경우에, RAP-2는 낮은 농도에서도(20ng/10⁶ 세포) 이의 거동이 급격히 변화되고, TRAF2 NF- κ B 유도된 전사를 강화시킨다(도 6A 참고). 또한, 원해 삼입체를 역 방향으로 한 개 치환시킴으로써, 효과적인 RAP-2 앤티센스-발현 비이클을 만들 수 있고, TRAF2는 다양한 양의 pcRAP-2-a/s(앤티센스) 구조물과 함께 HEK-293T 세포에서 일시적으로 발현되고, RAP-2를 점진적으로 결손시키는 효과를 분석하였고, 이는 농도-관련된 다이어그램의 윤곽을 얻을 수 있다. 플롯의 전체적인 경향은 세포 반응이 트랜스펙션된 RAP-2 DNA의 양에 대체로 역비례한다는 것을 나타내고, 단백질의 명목상의 내생 수준에 상응하는 "0"점에 드는 특징만이 예외가 된다(도 6). 센스 과다발현과는 반대로, 앤티센스를 도입함으로써 주어진 유전자의 하향 조절에 대해서는 아마도 좀더 상세하게 논술되어야 할 것이다. 사실 앤티센스는 세포내에서 임의 외부 단백질의 인위적인 생산에는 관계하지 않고, 따라서, RAP-2 저해 활성화의 유효성을 분명하게 암시하고 있다. 그럼에도 불구하고, 낮은 농도에서 언급된 상승이 차트의 절반에서 앤티센스로 반영된다는 것이다(도 6).

RAP-2가 관련된 전사 시스템의 다양성을 평가하기 위해, 우리는 c-Jun 연구로 방향을 전환하였는데, 이는 NF- κ B와 같이 적절한 스트레스-반응을 성립시키고, 유지하는데 중요한 것으로 증명된 핵 인자이다. 시판되는 "Path Detect" 시스템 (Stratagene)의 성분을 이용하여, HEK-293T 및 HeLa 세포에서 AP-1의 몇 가지 인지된 활성물질과 관련하여, RAP-2의 유사한 이중-상 능력을 확인하였다(도 5B 및 6B).

실시예 5; JNK 활성 변화없이 RAP-2는 c-Jun 과-포스포릴화반응을 가능하게 한다.

전사에서 이와 같은 복잡한 효과를 암시하는 기작을 연구하기 위해, 정상적인 시그널이 제거되는 정확한 수준을 결정하는 것이 필수적이다. c-Jun의 트랜스-활성화 기능이 이의 아미노-말단의 활성화부분 도메인의 두 개 세린 잔기(⁶³Ser & ⁷³Ser)의 세포외 시그널-유도된 포스포릴화반응에 의해 조절된다는 것을 알았다. 상기 포스포릴화반응을 관찰하는 JNK/SAPK 단백질 카이나제는 일정한 거리를 둔 MAP 카이나제 즉 서브세트 구성되고, 이들 자체가 상류 이중-특이성을 가진 카이나제에 의해 중개되는 ¹⁸³Thr 및 ¹⁸⁵Tyr에서의 포스포릴화반응을 통하여 활성화된다. 따라서, c-Jun 및 JNKs내에서 적절한 부위에 포스포릴화반응 상태를 이용하여, 단백질의 활성화 상태를 반영하는 표식으로 삼는다. 일시적으로 트랜스펙션된 HEK-293T 세포 용해물질을 웨스턴 블랏 분석하면, c-Jun-중개된 전사가 손상되었음에도 불구하고, RAP-2는 여러 번의 자극에 의해 유도된 ⁶³Ser 위치에서 내생 c-Jun의 포스포릴화반응을 상당히 강화시켰다는 것을 알 수 있다(도 7A). 지적인 발현 구조물과 도 7A에서 (-)로 나타낸 pc-DNA3-담체 또는 동일한 도면에서 (+)로 나타낸 pcRAP-2와 함께 트랜스펙션된 HEK-293T 세포의 총 세포 용해물질을 SDS-PAGE상에서 분리시키고, ECL-막으로 옮기고, 항-인산-⁶³Ser-c-Jun Abs(NEB)로 브로브시켰다. 도 7A의 아래 패널에 나타낸 막은 기준으로 항-전체-c-Jun Abs로 다시 프로브시켰다(NEB).

그러나, 변형의 가능성이 있는 소스로써 c-Jun 수준이 상승한 것을 제외하고는 c-Jun의 총 양은 일정하게 유지되었다. JNK1/2의 포스포릴화된 형에 특이적인 항체는 RAP-2 과다-발현에 반응하여 활성화된 카이나제의 양에서 실제 증가를 감지하지 못하였고, 이는 c-Jun의 추가 포스포릴화가 RAP-2-의존한 JNKs 활성 부스트로 인한 것이 아니라는 것을 말해 준다(도 7B). pcDNA3 또는 pcRAP-2로 트랜스펙션시키고, 시간에 따라 증가시키기 위해 hrTNF α 로 처리한 HEK-293T 세포로부터 활성화된 JNK1/2를 도 7에서 볼 수 있는 것과 같이, 인산-(¹⁸³Thr/¹⁸⁵Tyr)-JNK Abs(NEB)로 전체 용해물질을 웨스턴 블랏으로 감지하였다.

나중에 언급된 부분을 뒷받침하기 위해, 면역침전된 JNK1과 정제된 GST-c-Jun을 이용한 *in vitro* 카이나제 검사에서 기본적으로 동일한 결과를 얻었다(도 7C). HEK-293T 세포는 빈 벡터, HA-JNK1-발현 플라스미드와 함께 다양하게 복합된 pcRAP-2 및 pcRIP로 공동-트랜스펙트시킨다. 그 다음 JNK1은 이의 N-말단 HA-tag를 통하여 면역침전시키고, 박테리아에 의해 만들어지는 정제된 GST-Jun를 포스포릴화시키는 능력은 *in vitro* 카이나제 검사에서 ³²P-결합으로 결정한다. 반응 생성물은 도 7에서 볼 수 있는 것과 같이 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다.

RAP-2는 트랜스펙션된 HEK293 세포로부터 면역침전된 RAP-2-IKK1복합체가 *in vitro* 포스포릴화조건하에서 배양시키면 포스포릴화된다. RAP-2의 포스포릴화반응의 기능적인 역할에 대한 연구에서, 이 단백질의 한 개 특정 위치(위치 148)에 돌연변이가 되면, 이에 의해 Jun 포스포릴화반응의 활성이 완전히 사라진다. 도 13에서 설명한 것과 같이, 야생형 RAP-2가 과다발현되면, Jun 포스포릴화반응이 대량으로 증가되고, RAP2(S148A)의 과다 발현으로는 Jun의 전체 포스포릴화반응에 영향을 주지 않는다. 그러나, NF- κ B 상에서 RAP-2의 영향은 이 돌연변이에 의해 영향을 받지 않았다. 이로써, RAP-2의 세린 148위치의 포스포릴화반응은 Jun 포스포릴화에서 이의 효과가 특별히 관련되었다는 것을 알 수 있다.

실시예 6; RAP-2는 DNA에 c-Jun 및 RelA 결합을 저해하지 않는다.

실시예 5에서 보고한 실험에서, NF- κ B와 AP-1-시그널발생 캐스케이드의 RAP-2 과다-발현의 시토졸 조절 표적이 드러나지 않았다는 점에서, 전사에 필요한 핵 과정의 충실성을 조사하였다. 트랜스펙션된 HEK-293T 세포의 핵 추출물에서 실시한 전자유동성 이동분석(EMSA)에서, RAP-2는 이들의 고전적 인식 서열(도 8)과 c-Jun과 RelA의 결합에 간섭하지 않는다는 것이 밝혀졌다. 실제로, RAP-2-트랜스펙션된 세포에서 DNA/AP-1 복합체 형성 효율의 7배 증가가 관찰되었다. 또한, 후자의 활성화도 도메인을 입체적으로 봉쇄할 수도 있는 RAP-2와 c-Jun/RelA사이의 상호작용은 전혀 관찰되지 않았다. 핵으로 RAP-2 진입 효과는 증폭제-결합의 하류지점에서 표적이 되는 것으로 추정된다.

실시예 7: RAP-2는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 TIP60와 *in vivo*에서 상호작용한다.

TIP60(GeneBank U 74667)은 히스톤 트랜스퍼라제(HATs)로 불리는 최근에 밝혀진 핵단백질 패밀리에 속한다. 이들 단백질의 효소활성은 뉴클로솜 복합체에서 크로마틴 구조의 상태와 관련된다. HATs는 주로, 전사장치의 특정 요소와 관계하여, 전사율을 조절할 수 있다. HATs는 아세틸기를 히스톤의 특정 리신기로 전이하여, 개시위치의 근처에서 크로마틴 패키지를 이완시키고, 따라서, 다양한 관련 인자의 DNA 접근을 촉진하는 작용을 한다. 이것은 증폭제-결합 인자와 RNA 중합효소 II사이의 크로스 토크를 용이하게 하는 보조 핵 단백질중 하나다. 따라서, TIP60이 RAP-2와 복합체를 형성할 수 있는지를 조사하였다. HeLa 세포로부터 면역침강과 이후 이중-하이브리드 실험에서, RAP-2가 양 시스템에서 TIP60과 강하게 결합한다는 것이 밝혀졌다. HEK-293T 세포에서 TIP60의 동시 발현직후, NF- κ B와 c-Jun에 대한 RAP-2-매개된 효과에 두드러진 변화는 나타나지 않았다(제시하지 않음). 동일한 변화부재는 컨트롤 실험, 다시 말하면, 자극±TIP60 (w/o RPA-2)에서 관찰되지 않았고, 이로부터 짧은 시간 해독(트랜스펙션 20-30시간 후)은 리포터 DNA의 크로마틴화를 불가능하게 하여, HAT-유사 효소가 실행될 수 있는 시간이 없다는 결론에 도달하게 되었다.

실시예 8: 클론 #10-RAP-2와 상호작용하는 신규한 단백질

B-세포 cDNA 라이브러리의 이중-하이브리드 스크리닝에서, 전장 RAP-2 단백질을 미끼로 이용하여, RAP-2와 상호작용하는 신규한 단백질을 분리하였다(이후, 클론 #10, 클론 #10-인코딩된 단백질, RAT-결합 단백질 #10 또는 RBP-10으로 표시)(도 10). 원 클론(대략 2.2kb)은 60kDa MW의 추정 폴리펩티드를 인코딩하는 것으로 밝혀졌다. 하지만, 추정 제 1 코돈 ATG는 이 서열에서 빠져있다. 따라서, 이의 상당한 길이에도 불구하고, 전체 개방 해독들을 재구성하기 위해서는 수득한 cDNA를 5'방향으로 추가로 확장해야 한다.

클론 #10의 결합 레퍼토리의 이중 하이브리드 분석에서, RAP-2외에 이 단백질은 TRAF2에 대해 강한 친화성을 보유한다는 것이 밝혀졌다. 클론 #10은 하지만, RIP, TRADD, MORT1, MACH, TNFR-I, TIP60, NIK, 일부 컨트롤 단백질(예, 라민과 사이클린)과 결합하지 못한다. 하지만, 곰팡이에서 NIK 독특한 행동을 고려할 때, 클론 #10과 NIK의 결합 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 클론 #10은 후자의 C-말단 200개 아미노산, 다시 말하면, RIP, TIP60, NIK, IKK β 결합과 관여하지 않는 영역에서 RAP-2와 결합하는 것으로 밝혀졌다.

포유동물 293T 세포에서, 클론 #10과 TRAF-2의 공동발현은 NF- κ B의 TRAF-2-매개된 활성화를 예방하는 반면, 클론 #10과 NIK의 공동발현은 후자의 NF- κ B 활성화를 강하게 상승시킨다. 이들 발견은 클론 #10의 중요한 조절 기능을 암시한다. 관찰된 조절효과는 세포에서 단백질 작용의 상이한 증폭되지 않은 위치의 존재를 암시한다.

RBP-10 상동체의 동정을 위한 여러 차례의 GenBank 검색에서, F40F12.5(수탁번호 S42834)-선충(*C. Elegans*)에서 얻은 가상 단백질을 찾아낼 수 있었는데, 상기 단백질은 잘 보존된 유비퀴틴-주도의 프로테아제 패밀리의 일부 구성원과 유사성을 보인다는 것이 밝혀졌다. 이들 효소는 유비퀴틴 장치의 파괴효과를 상쇄하는데, 상기 효과는 세포에서 대다수의 단백질 분해를 주도하는 것으로 알려져 있다. 유비퀴틴 리가아제 폴리-유비퀴틴 트리를 분해할 단백질에 부착시키지만, 유비퀴틴 프로테아제는 성장하는 트리의 분지화를 효과적으로 예방한다. 아직, 이들 특정 단백질이 유비퀴틴 중합체에 대한 효소 활성을 보유하는지가 밝혀지지 않았기 때문에, 전술한 유비퀴틴-주도 프로테아제와의 유사성에 기초한 F40F12.5 기능과 관련한 이런 추정은 의문시되고 있다. 또한, 2가지 점에서, 이런 우연의 일치 가능성이 일어날 가능성은 거의 없다.

a) 유비퀴틴 프로테아제의 소그룹에서, 심부 측매 영역을 구성하는 것으로 여겨지는 잔기가 F40F12.5와 RBP-10 모두에 존재하지 않는다.

b) 이들 측매 위치를 제외하고, 다양한 종(박테리아에서 인간까지)에서 유래한 유비퀴틴-주도 프로테아제 패밀리는 서열 상동성을 보이지 않은 반면, F40F12.5와 클론 #10은 어느 정도의 상동성을 보인다.

실시예 9: 클론 #84: RAP-2 상호작용 단백질

B-세포 cDNA 라이브러리의 이중-하이브리드 선별에서, 전장 RAP-2 단백질을 미끼로 하여, RAP-2 결합 단백질을 추가로 확인하였다.

클론 #84는 전장 RAP-2와 특이적으로 결합하지만, TRAF2, MORT1, TRADD, RIP, NIK, TIP60, 라민을 비롯하여 분석한 다른 단백질과는 상호작용을 보이지 않는 것으로 밝혀졌다. 클론 #84의 부분 5'서열은 세포 조절 단백질 CGR19을 인코딩한 클론된 cDNA의 서열과 동일한 것으로 밝혀졌는데, 상기 조절 단백질은 기능 p53 단백질을 보유한 세포에서, 특이적으로 상향-조절되는 전사체로 확인되었다(Madden S. et al. 1996, accession # U66469). CGR19의 서열분석에서,

C₃H₄-Zink 핑거 모티프(RING 핑거)가 C 말단 도메인으로 확인되었다. CGR19의 발현은 몇몇 세포계의 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌다. RAP-2와 결합을 통한 NF- κ B 조절에 CGR19의 관여는 세포 사이클 조절 네트워크의 TNF-R 패밀리 구성원에 의한 조절가능성을 암시한다.

실시예 10: RAP-2의 구조-기능 관계

A. 결합 영역

연속 결손분석으로, RAP-2상의 결합영역을 정확하게 확인하고, RIP, NIK, TIP60-결합 결합도메인 및 자가-결합 도메인을 확인하였다(도 11).

RIP와 결합하는 RAP-2 단백질의 영역은 아미노산 177-218에서 시작하여 아미노산 264에서 종결된다.

IKK β 와 NIK 결합 위치(각각, 아미노산 95-264와 아미노산 1-264)는 RAP-2상의 RIP 결합 위치와 중복되지 않는 것으로 밝혀졌다(도 11).

영역에서 TIP60와 결합하는 위치는 아미노산 95-264에 걸쳐있다. 아미노산 95-309에 해당하는 결손 단편과의 상호작용 부재는 특정 결손으로 인한 특이적 방해 구조에 기인할 가능성이 높다.

결손단편과의 결합에서와 유사한 불일치는 클론 #10의 결합과 RAP-2의 자가결합에서 찾아볼 수 있다. 하지만, TIP-60과는 반대로, 전장 RAP-2는 아미노산 218-416을 보유한 결손 단편과 아미노산 1-264를 보유한 결손단편과 결합할 수 있는데, 이것은 동형-이량체에 관여하는 영역이 아미노산 217-264에 위치한다는 것을 암시한다.

클론 #10에 의해 인코딩된 단백질은 아미노산 218-309에서 시작하여 아미노산 416에 종결되는 영역에서 결합하고, 따라서, 이의 결합위치는 RIP, NIK, IKK β , TIP60에 대한 결합위치와 중복되는 영역을 보유한다.

B 기능영역

현재 알려진 바에 의하면, RAP-2의 모든 기능효과(즉, NF- κ B 저해와 c-Jun 초-인산화의 유도)는 동일 영역에 위치한다(도 11).

또한, 모든 유도물질에 의한 시그널의 효과적인 조절에 필요한 영역은 단백질의 N-말단 분절에 위치한다.

아미노산 95-416에 포함되는 영역은 전장 단백질에 의해 야기된 효과에 비하여 약하긴 하지만 일정한 효과를 나타내는 데, 이것은 내인성 RAP-2의 강제적인 집합에 기인한 것이다.

또한, RelA를 제외하고, 본 실험에 사용된 모든 유도물질의 효과는 RAP-2 N-말단의 100개정도의 아미노산으로 조절할 수 있다. 실제로, 아미노산 1-102를 포함한 단편은 상당히 약하긴 하지만, 분명하게 이런 효과를 조절한다(도12).

한편, RelA의 성공적인 유도에는 RAP-2 단백질의 훨씬 긴 영역이 필요하다. 아미노산 1-264내에서 위치한 이 영역의 경계를 한정할 수 있었는데, 이 영역중 아미노산 157과 264사이의 영역에, 특이적인 RelA-관련 결합 특성이 일부 부여된다.

C. 결합-기능 관계

도 11과 12에서 보인 관찰결과에서, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

a. RelA를 제외하고, RIP, 클론#10, NIK, TIP60과 결합하는 RAP-2는 단백질 기능에 필요하지 않고, 과다-발현에 의해 유도된 NF- κ B의 저해물질 역할을 한다.

b. 과다-발현-유도된 활성화에서 RelA에 대한 RAP-2의 효과는 상이한 결합에 의해 적어도 일부 조절된다. 필연적으로, 상기 언급한 모든 단백질은 지금까지 실시한 실험에서 추론할 때, 임의의 활성화에 기여한다.

RAP-2와 RIP사이의 상호작용의 정확한 위치는 아직 밝혀지지 않았지만, 이 위치는 RIP와 RAP-2에 특이적이지만, RIP와 상호작용하는 것으로 알려진 다른 단백질, 예를 들면, MORT-1, TRADD, FAS-R, TRAF2와는 공유되지 않는 위치다 (Malinin et al., 1997). RAP-2는 '사멸 도메인', MORT MODULE, 프로테아제 도메인(예, ICE/CED3 모티프), 카이나제 도메인/모티프, TRAF 도메인을 보유하지 않는다(서열 분석과 전술한 다양한 데이터 베이스상의 서열과 비교). 이와 더불어, 생물활성 분석에서, RAP-2는 다음과 같은 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다:

(i) 과다 발현되는 경우, RAP-2는 TNF로 또는 TRADD, RIP, TRAF-2, NIK 또는 p65 NF- κ B 소단위의 과다발현으로 NF- κ B 활성화를 강하게 억제한다;

(ii) RAP-2는 JNK 활성을 변화시키지 않고, c-Jun 초-인산화를 증가시킨다;

(iii) 결손분석에서 보인 바와 같이, RPA-2는 RIP의 사멸 도메인 및 RIP과의 결합을 위한 RIP의 카이나제 활성을 필요로 하지 않는다;

(iv) 전술한 결손 분석에 기초하여, RIP와 RAP-2의 결합영역은 대략 200개 아미노산의 N-말단 영역으로 좁혀진다;

(v) RAP-2는 트랜스펙션된 포유동물 세포에서 NIK와 결합하지만, 곰팡이 세포에서는 이와 결합하지 않는다.

전술한 측면에서, RAP-2는 고 특이적 RIP-결합 단백질로, RIP-매개된 세포내 시그널발생 경로에 관여하는 RIP 조절물질/조절물질이 된다.

전술한 내용에 비추어, RAP-2는 RIP 활성의 조절/조정에 관여하는 것으로 보인다. 세포내에서, RIP는 세포 생존 경로(NF- κ B 활성화, TRAF2와의 상호작용을 통해) 및 염증과 세포 사멸 경로(독립적으로 '사멸 도메인'을 통해 또는 MORT-1, TRADD, p55-R, FAS-R, 관련 프로테아제(예, MACH, Mch4, G1등)를 통해)에 관여한다. RAP-2가 RIP의 활성을 조절/조정할 수 있는 방법은 전술하였다. 가령, RAP-2-RIP 상호작용은 세포 사멸 또는 세포 생존 경로를 강화시키고, 또는 세포 사멸 또는 세포 생존 경로를 저해하는데, 이런 강화 또는 저해는 이들 상반되는 두 세포내 경로의 다른 구성원의 상대적 활성에 따라 달려있다. RAP-2는 다수의 RIP 분자 또는 다른 RIP-또는 RAP-2의 집합을 위한 도킹 단백질 역할을 하는데, 이후, 공액체는 세포내 이들 경로의 다른 구성원의 상대적 활성/양에 따라, 세포 사멸 또는 세포 생존(또는 둘 모두)을 유도하게 된다.

실시예 11: RAP-2에 대한 다중클론 항체의 제조

토끼는 완전 프로인드 보조액에서 에멀션화된 RPA-2의 5 μ g 정제된 제제를 피하에 주사하였다. 3주후, 이들은 불완전 프로인드 보조액에 녹인 5 μ g RAP-2 제제를 피하에 한번 더 주사하였다. PBS에 녹인 용액으로 RAP-2는 10일 간격으로 2번 추가로 투여하였다. 토끼는 마지막 면역한지 10일후에 방혈하였다. 항체 수준의 확대는 방사성면역분석후 이루어졌다. ¹²⁵I-라벨된 RPA-2는 다양하게 희석한(1:50, 1:500, 1:5,000, 1:50,000) 토끼 혈청과 혼합하였다. 단백질-G 아가로스 비드(20 μ l, Pharmacia) 현탁액은 전체 200 μ l 부피로 첨가한다. 혼합물은 1시간동안 실온에서 놓아두고, 이후, 비드는 3번 세척하고, 결합된 방사활성을 계수한다. 사람 렙틴에 대한 토끼 항혈청은 네거티브 컨트롤로 사용한다. RAP-2 항혈청의 역가는 네거티브 컨트롤과 비교하여 측정하였다.

실시예 12: RAP-2에 대한 단클론 항체의 제조

암컷 Balb/C 생쥐(3달)는 완전 프로인드 보조액에서 에멀션화된 2 μ g 정제된 RPA-2 제제를 먼저 주사하고, 3주후, 불완전 프로인드 보조액에 녹인 RPA-2 제제를 피하에 주사하였다. PBS에 녹인 용액으로 RAP-2는 10일 간격으로 3번 추가로 투여하였다. 최종 부스트는 최고 결합 역가(IRIA로 결정)를 보이는 생쥐와 융합하기 3 내지 4일 전에 복강에 투여한다. 융합은 NSO/1 골수종 세포계 및 동물의 비장과 림프절로부터 만든 림프구를 융합 파트너로 사용하였다. 융합된 세포는 미소 배양 평판으로 분산시키고, 하이브리도마는 HAT와 15% 말 혈청으로 보충한 DMEM에서 선별하였다. RAP-2에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마는 제한 희석법으로 서브클oning하고, 복수 생산을 위해 프리스탄으로 촉진한 Balb/C 생쥐에 주사하였다. 항체의 이소타입은 상업적으로 입수가 가능한 ELISA 키트(Amersham, UK)를 이용하여 정의한다.

항-RPA-2 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 스크리닝은 아래와 같이 실시한다: 하이브리도마 상층액은 역 고형상 방사성면역(IRIA)분석으로 항-RAP-2 항체의 존재를 검사한다. ELISA 평판(Dynatech Laboratories, Alexandria, VA)

은 Talon-정제된 IL-18BPa-His₆(10 μ g/ml, 100 μ l/웰)으로 피복하였다. 4℃에서 하룻밤동안 배양한 후, 평판은 BSA (0.5%)와 Tween20(0.05%)을 함유한 PBS로 2번 세척하고, 2시간동안 37℃에서 세척용액으로 차단하였다. 하이브리도마 배양 상층액(100 μ l/웰)은 첨가하고, 평판은 4시간동안 37℃에서 배양하였다. 평판은 3번 세척하고, 염소-항-생쥐 양고추냉이 페록시다제(HRP, Jackson Labs, 1:10,000, 100 μ l/웰) 공액체는 2시간동안 실온에서 첨가하였다. 평판은 4번 세척하고, 색깔은 H₂O₂를 기질로 하여, ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산, Sigma)로 현상한다. 평판은 자동 ELISA 판독기로 판독한다. 네거티브보다 5배이상의 OD를 제공하는 샘플은 파지티브로 한다.

RPA-2 항체는 친화성 크로마토그래피에 의한 RAP-2의 정제에 사용할 수 있다.

실시예 13: ELISA 검사

미소역가 평판(Dynatech or Maxisorb, by Nunc)은 4℃에서 하룻밤동안, 항-RAP-2 단클론 항체(무혈청 하이브리도마 상층액 또는 복수액 면역글로불린)으로 피복한다. 평판은 BSA(0.5%)와 Tween 20(0.05%)을 함유한 PBS로 세척하고, 37℃에서 2시간이상동안 동일용액으로 차단한다. 실험샘플은 차단 용액으로 희석하고, 37℃에서 4시간동안 웰(100 μ l/웰)에 첨가한다. 이후, 평판은 Tween 20(0.05%)을 함유한 PBS로 3번 세척하고, 토끼 항-RPA-2 혈청(1:1000, 100 μ l/웰)을 첨가하고 4℃에서 하룻밤동안 추가로 배양한다. 평판은 3번 세척하고, 염소-항-토끼 양고추냉이 페록시다제(HRP, Jackson Labs, 1:10,000, 100 μ l/웰) 공액체는 실온에서 2시간동안 첨가하였다. 평판은 4번 세척하고, 칼라는 H₂O₂를 기질로 하여 ABTS(2,2'-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산, Sigma)로 현상한다. 평판은 자동 ELISA 판독기로 판독한다.

본 발명을 충분하게 설명하였기 때문에, 당업자는 본 발명의 개념과 범주에서 벗어나지 않고, 과도한 실험없이 등가의 변수, 농도, 조건에서 동일하게 실시할 수 있을 것이다.

본 발명은 특정 구체예로 설명하였지만, 이들은 추가로 변형할 수 있다. 본 출원은 본 발명의 원리등을 포함한 다양한 용도, 적용 범위를 수용하는데, 이들의 필수적인 특징은 첨부된 청구범위에서 제시한다.

여기에서 이용한 문헌(모든 문헌, 요약서, 미국 또는 다른 외국 출원의 공개공보, 또는 임의 다른 문헌)을 참고문헌으로 하여 제시한다. 또한, 전체 내용도 첨부한다. 이들 참고문헌의 내용은 이 글에 순전히 참고로 한다.

본 발명의 특징, 명세서 또는 구체예는 본 발명의 명세서 기재한 공지의 방법과 통상적인 방법에 대한 참고문헌에 공개되었거나 또는 제안된바 없다.

특정 구체예의 설명은 본 발명의 일반적인 특징을 충분히 제시하는 것으로, 당분야에 숙지된 지식을 가진 자는 과도한 실험없이 다양하게 변형 및 조절할 수 있다. 따라서, 이와 같은 변형 및 수정도 본 발명의 범위에 속한다. 여기에서 이용한 기술적인 용어는 설명을 하기 위한 것으로, 본 발명을 한정하지 않지 않는다. 본 발명의 용어는 당업자가 이해하고, 실시할 수 있도록 설명하였다.

REFERENCES

Alnemri, E.S. et al.(1995) J. Biol. Chem.. 270:4312-4317.

Barinaga, M. (1993) Science 262:1512-1514.

Beg, A.A. and Baltimore, D. Science 274:782-784.

Beidler, J. et al., (1995) J. Biol. Chem. 270:16526-16528.

Berger, J. et al., (1988) Gene 66:1-10.

Beutler, b. and Cerami, C. (1987) NEJM: 316:379-385.

Bigda, J. et al. (1994) J. Exp. Med. 180:445-460.

Boldin, M.P. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:337-341.

- Boldin, M.P. et al. (1995b) J. Biol. Chem. 270:7795-7798.
- Boldin, M.P. et al. (1996) Cell 85:803-815.
- Brakebusch, C. et al. (1992) EMBO J., 11:943-950.
- Brockhaus, M. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3127-3131.
- Cantor, G.H. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10932-6.
- Cerreti, D.P. et al. (1992) Science 256:97-100.
- Chen, C.J. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:271-3.
- Chinnaiyan et al. (1995) Cell 81:505-512.
- Chinnaiyan et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:4961-4965.
- Cifone, M.G. et al. (1995) EMBO J. 14:5859-5868.
- Clement, M.V. et al. (1994) J. Exp. Med. 180:557-567.
- Crisell, P. et al., (1993) Nucleic Acids Res. (England) 21(22):5251-5.
- Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., eds.), (1994) pp. 8.1.1-8.1.6 and 16.7-16.7.8, Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.
- Dirks, W., et al., (1993) Gene 128:247-249.
- Durfee, T. et al. (1993) Genes Dev. 7:555-569.
- Eischen, C.m. et al. (1994) J. Immunol. 153:1947-1954.
- Ellis, H.M. et al. (1986) Cell 44:817-829.
- Enari, M. et al. (1995) Nature 375:78-81.
- Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:1531-1536.
- Faucheu, C. et al. (1995) EMBO J. 14:1914-1922.
- Fernandes-Alnemri, T. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:30761-30764.
- Fernandes-Alnemri, T. et al. (1995) Cancer Res. 55:2737-2742.
- Fernandes-Alnemri, T. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7464-7469.
- Field, J. et al. (1988) Mol. Cell Biol. 8:2159-2165.
- Fields, S. and Song, O. (1989) Nature, 340:245-246.
- Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993) Anal. Biochem. 210:179-187.

- Geysen, H.M. (1985) *Immunol. Today* 6:364-369.
- Geysen, H.M. et al. (1987) *J. Immunol. Meth.* 102:259-274.
- Gossen, M. and Boujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551.
- Grell, M. et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2563-2566.
- Heller, R.A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6151-6155.
- Henkart, P.A. (1996) *Immunity* 4:195-201.
- Hohmann, H.-P. et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934.
- Howard, A.D. et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2964-2969.
- Hsu, H. et al. (1995) *Cell* 81:495-504.
- Hsu, H. et al. (1996) *Cell* 81:299-308.
- Itoh, N. et al. (1991) *Cell* 66:233.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:10932-7.
- Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:24515-8.
- Kamens, J. et al. (1995). *J. Biol. Chem.* 270:15250-15256.
- Kaufmann, S.H. (1989) *Cancer Res.* 49:5870-5878.
- Kaufmann, S.H. (1993) *Cancer Res.* 53:4976-3985.
- Kischkel, F.C. et al. (1995) *EMBO J.* 14:5579-5588.
- Koizumi, M. et al. (1993) *Biol. Pharm. Bull (Japan)* 16(9):879-83.
- Kumar, S. et al. (1994) *Genes Dev.* 8:1613-1626.
- Kumar, S. (1995) *Trends Biochem Sci.* 20:198-202.
- Lazebnik, Y.A. et al. (1994) *Nature* 371:346-347.
- Leithauser, F. et al. (1993) *Lab Invest.* 69:415-429.
- Li, Y. et al. (1989) *Mol Cell Biol* 18:1601-1610.
- Loetscher, H. et al. (1990) *Cell*, 61:351-359.
- Los, M. et al. (1995) *Nature* 375:81-83.
- Madden, S.L. et al. (1996) *Cancer Res* 56:5384-5390.
- Malinin, N.L. et al. (1997) *Nature* 385:540-544.

- Martin, S.J. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:6425-6428.
- Mashima, T. et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:907-915.
- Miller, B.E. et al. (1995) J. Immunol. 154:1331-1338.
- Milligan, C.E. et al. (1995) Neuron 15:385-393.
- Miura, M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8318-8322.
- Munday, N.A. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:15870-15876.
- Muranishi, S. et al. (1991) Pharm. Research 8:649.
- Musti AM, et al. (1997) Science 197 275:400-402
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995) Science 267. 1449-1456
- Natoli, G. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 26079-26082.
- Nicholson, D.W. et al. (1995) Nature 376:37-43.
- Nophar, Y. et al. (1990) EMBO J., 9:3269-3278.
- Riquet, P.F. et al. (1987) J. Exp. Med., 166:1280-89.
- Ray et al. (1992) Cell 69:597-604.
- Ruggiero, V. et al. (1987) Cell Immunol. 107:317-325.
- Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schall, T.J. et al. (1990) Cell, 61:361-370.
- Schlegel, et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:1841-1844.
- Schulze-Osthoff, K. et al. (1994) EMBO J. 13:4587-4596.
- Shimayama, T. et al., (1993) Nucleic Acids Symp. Ser. 29:177-8.
- Shore, S.K. et al. (1993) Oncogene 8:3183-8.
- Sleath, P.R. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14526-14528.
- Smith, C.A. et al. (1990) Science, 248:1019-1023.
- Song, H.Y. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:22492-22495.
- Srinivasula, S.M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14486-14491.
- Stanger, B.Z. et al. (1995) Cell 81:513-523.

- Tartaglia, L.A. et al. (1993) Cell, 74:845-853.
- Tewari, m. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:3255-3260.
- Tewari, M. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:18738-18741.
- Tewari, M. et al. (1995b) Cell 81:1-20.
- Thornberry, N.A. et al. (1992) Nature 356:768-774.
- Thornberry, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33:3934-3940.
- Tracey, J.T. et al. (1987) Nature, 330:662-664.
- Van Antwerp, D.J. et al. (1996) Science 274:787-789.
- Vandenabeele, P. et al. (1995) Trends Cell Biol. 5:392-400.
- Vassalli, P. (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:411-452.
- Wallach, D. (1984) J. Immunol. 132:2464-9.
- Wallach, D. (1986) In: Interferon 7 (Ion Gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, London.
- Wallach, D. et al. (1994) Cytokine 6:556.
- Wang, L. et al. (1994) Cell 78:739-750.
- Wang, C.-Y et al., (1996) Science 274:784-787.
- Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) Nature, 356:314-317.
- Watanabe, F.R. et al. (1992) J. Immunol. 148:1274-1279.
- Weitzen, M. et al. (1980) J. Immunol. 125:719-724.
- Wilks, A.F. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1603-1607.
- Wong et al. (1994) J. Immunol. 152:1751-1755.
- Xue, D. et al. (1995) Nature 377:248-251.
- Yamaoka S, et al. (1998) Cell 93:1231-1240.
- Yonehara, S. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:1747-1756.
- Yuan, J. et al. (1993) Cell 75:641-652.
- Zaccaria, S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 203:353-357.
- Zhao, J. J. and Pick, L. (1993) Nature (England) 365:448-51.

본 발명의 목적은 RIP 단백질(이후, 'RIP')과 결합할 수 있는 신규한 단백질 RAP-2, 동소체, 단편 또는 이의 유도체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 및 유도체에 대한 길항물질(예, 항체, 펩티드, 유기 화합물 또는 일부 동소체)을 제공하는 것으로, 원하는 경우, 이들은 시그널발생 과정, 좀더 구체적으로, 염증 세포-독성 또는 세포-생존 과정을 저해하는데 이용한다.

본 발명의 또 다른 목적은 신규한 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 및 이의 유도체를 이용하여, 수용체 활성 조절과 관련된 추가의 단백질 또는 인자, 예를 들면, RAP-2 단백질과 결합하여, 이의 활성에 영향을 주는 단백질을 분리하여 특성화하고, 및/또는 이들 신규한 단백질, 유사체, 단편 및 이의 유도체가 결합하는 시그널발생 과정의 상류 또는 하류의 다른 수용체(가령, FAS-Rs 및 관련 수용체)를 분리하고 동정하는 것이다.

본 발명은 또한, RAP-2 기능을 조절/조정할 수 있는 RAP-2 결합 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 세포로 도입하여 RAP-2와 RAP-2 동소체와 결합 또는 상호작용할 수 있는 저해물질을 제공하는 것으로, 상기 억제물질은 세포독성 과정의 RIP-관련활성을 저해하고, 따라서, 원하는 경우 세포 생존을 강화할 수 있고, 또는 세포 생존 과정의 RIP-관련활성을 저해하고, 따라서, 원하는 경우 세포 독성을 강화할 수 있다.

또한, 본 발명의 목적은 다클론 또는 단클론 항체의 제조를 위한 항원으로 신규한 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체, 단편 및 이의 유도체를 이용하는 것이다. 이와 같이 만들어진 항체는 세포 추출물 또는 형질전환된 세포주와 같은 다른 출처로부터 신규한 단백질의 정제에 사용한다.

또한, 이들 항체는 진단 목적, 예를 들면, p55-R, FAS-R 또는 다른 관련 수용체에 의해 매개된 세포 효과의 비정상적인 기능과 관련된 질환의 확인에 사용한다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 RAP-2 단백질, 동소체, 유사체 또는 이의 단편 및 유도체로 구성된 제약학적 조성물과 전술한 항체 또는 다른 길항물질로 구성된 제약학적 조성물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

도1(A, B)(SEQ ID NO:1)은 RAP-2의 뉴클레오타이드 서열을 보여주는데, 개시 코돈과 종결코돈은 밑줄그었다. 화살표는 이중 하이브리드 스크리닝으로 수득한 1.5Kb 클론의 시작지점을 표시한다.

도2(A, B)(SEQ ID NO:2)는 클론 # 41072(실시예 1)의 뉴클레오타이드 서열을 보여주는데, 개시 코돈과 종결코돈은 밑줄그었다.

도3A(1, /2)는 RAP-2의 사람(20.4 전체 사람 *shr1*)과 무린(NEMO 전체 생쥐 *par1*)조각 변이체의 추정 아미노산 서열을 보여주고, B(1, /2)는 BCM Search Launcher(Baylor College of Medicine, Houston, TX)에서 입수가 가능한 소프트웨어 패키지를 이용하여 정렬된 FIP-2의 공개서열을 보여준다. 상동성 아미노산은 박스로 표시하고, 동일한 아미노산은 회색 음영으로 표시했다. (B)에서 별표는 FIP-2에서 추정 루이신-지퍼(LZ)-유사 모티프를 표시한다.

도4는 사람 MTN 블랏 I(Clontech)와 RAP-2의 DNA 단편과의 노잔 블랏 하이브리드법(A)에서 RAP-2의 분자 특성을 설명한다. B에서, RIP와 결합하는 RAP-2는 실시예 3에서 자세히 분석한다. C에서, NIK-RAP-2 상호작용은 (B)에서와 같이 탐지하였는데, 항-FLAG 항체를 웨스턴 블랏팅에 사용하고, 이후, 항-His6으로 면역침강한 점은 예외로 한다. 화살표는 면역침강된 단백질의 위치를 표시한다.

도5는 실시예 4에서 설명한 바와 같이, RAP-2의 이소성 발현으로, NF- κ B의 강한 하향조절 및 다양한 자극을 통한 c-Jun 활성화를 보여주는 막대그래프다. HEK-293T 세포는 리포터 플라스미드(NF- κ B(A) 활성화 분석의 경우 HIVLTR-Luc 또는 CMV-Luc, c-Jun(B) 활성화 분석의 경우 GAL-4Luc)로, 그리고 표시한 유도물질 및 빈 운반체(pcDNA3-도면에서 단독으로 표시)또는 전장 RAP-2(pcRAP-2-도면에 플러스로 표시)의 경우 발현벡터로 일시 트랜스펙션시켰다. 리포터 유전자 루시페라제 활성의 활성화 정도는 상대적 루시페라제 단위(R.L.U.)로 표현한다.

도6에서 RAP-2가 광범위한 농도 범위에서, NF- κ B와 c-Jun에 대한 억제활성을 보인다는 것을 알 수 있다. TRAF2는 다양한 표시량의 pcRAP-2(센스) 또는 pcRAP-2(엔티센스) 구조체와 함께, HEK-293T 세포에서 일시 발현시켰다. NF- κ B(A)와 c-Jun(B)의 평가를 위해, 각각 pHIVLTR-Luc와 pGAL4-Luc 리포터 플라스미드를 보유했다. 루시페라제 분석은 실시예 4의 도5에서 설명한 것과 같이 실시하였다.

도7은 RAP-2가 JNK1/2 활성화 수준을 간섭하지 않고, c-Jun의 시그널-유도 인산화를 강하게 증가시킨다는 것을 보여준다.

(A) 표시된 발현 구조체 및 pcDNA3-담체(도면에서 마이너스(-)로 표시) 또는 pcRAP-2(도면에서 플러스(+)로 표시)로 트랜스펙션시킨 HEK-293T 세포의 전체 세포 용해질은 실시예에서 밝힌 항 포스포-Jun 항체로 웨스턴 블랏 분석하여 확인하였다. 아래쪽 패널에 보이는 컨트롤 막은 항-전체-c-Jun Abs(NEB)로 다시 프로브하였다.

(B) pcDNA3 또는 pcRAP-2로 트랜스펙션시키고, 시간을 증가시키기 위해 hrTNF α 처리한 HEK-293T 세포에서 얻은 활성화된 JNK1/2는 실시예 5에서 밝힌 바와 같이 포스포-JNK에 대한 항체로, 전체 용해질 웨스턴 블랏팅하여 탐지하였다.

(C) HA-JBK1-발현 플라스미드 JNK1과 다양하게 혼합한 빈 벡터 pcRAP-2와 pcRIP로 동시 트랜스펙션시킨 HEK-293T 세포는 이후, N-말단 HA-단편을 통해 면역침강시키고, 박테리아에 의해 생산된 정제 GST-Jun을 인산화시키는 이의 능력은 *in vitro* 카이네제 분석으로 결정하였다. 반응산물은 SDS-PAGE로 분석하였다. GST-Jun은 화살표로 표시한다.

도8에서, RAP-2는 DNA와의 결합에 대하여 NF- κ B와 AP-1과 경쟁하지 않는다는 것을 알 수 있다. HEK-293T는 표시한 단백질 단독(-)으로 또는 pcRAP-2(+)와 함께 트랜스펙션시켰다. 세포에서 준비한 핵추출물은 ³²P-라벨된 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양하였는데, 상기 올리고뉴클레오타이드는 AP-1(A) 또는 NF- κ B(B)에 대한 고전적인 인식 서열을 포함한다. 반응산물은 비-변성 PAGE로 분석하였다.

도9에서, RAP-2는 다양한 양의 RAP-2(센스) 또는 RAP-2-엔티센스(a/s)로 일시 트랜스펙션시킨 HEK-293T 세포와 HeLa 세포에서, NF- κ B의 기저 수준에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 모든 조작은 실시예 4의 도6에서 설명한 대로 실시하였다.

도10(A, B)(SEQ ID NO:3)은 클론#10의 부분 뉴클레오타이드 서열을 보여준다.

도11은 RAP-2의 일련된 결손의 기능특성을 보여준다. A는 RAP-2의 연속 C-말단 결손을 보여주는 개요도다. 모든 절단체는 손상되지 않은 RAP-2-N-말단을 공유하는데, 이들의 C-말단은 화살표로 표시한다. RIP, NIK, IKK, TIP60 결합영역은 밑줄그었다. 교차평행선 박스는 추정 루이신-지퍼-유사 모티프에 해당한다. B는 HEK-293T 세포에서, NF- κ B에 대한 HIV-LTR 루시페라제 리포터 플라스미드를 이용한 RelA, TRAF2 TNF, NIK의 NF- κ B 활성화에 대한 A에서 밝힌 결손 구조체의 과다발현 효과를 보여준다. 리포터 유전자 루시페라제의 활성은 상대적 루시페라제 유니트(R.L.U.)로 표현한다.

도12는 RAP-2 기능 및 결합 영역을 보여준다.

(A) RAP-2의 다양한 결손체는 트랜스펙션 고평양(홀수 칼럼)과 포유동물 HEK-293T 세포(짝수 칼럼)내에서, 표시된 단백질과 결합하는 능력을 검사하였다. 가장 오른쪽에 있는 2개의 칼럼은 TNF- α 처리에 반응하여 NF- κ B 활성화를 억제하고, c-Jun 초인산화(c-Jun)를 강화하는 동일 결손체(실시예 9에서 밝힌 양으로 HEK-293T 세포에 트랜스펙션됨)의 능력을 보여준다. 십자가의 굵기는 임의의 효과강도와 비례한다. 별표는 Rel-A 자극에 대한 라벨된 구조체의 효과가 분명함을 나타낸다(도 11B).

(B) (A)에서 보인 결손체 분석에서 추론한 RAP-2 결합(상부)과 기능(하부)영역의 위치를 단백질 골격에 따라 배열하여 보여주는 차트. 교차 평행선 부분은 상응하는 최소영역의 접경가능위치를 표시한다.

도13은 RAP-2상의 ser-148이 ser-63에서 c-Jun 초인산화를 유도하는 능력에 필수적임을 보여준다.

도면1b

1141	CAGGAGCAGC	TGGAGCAGCT	GCAGAGGGAG	TACAGCAAAC	TGAAGGCCAG	CTGTCAGGAG	1200
1201	TCGGCCAGGA	TCGAGGACAT	GAGGAAGCGG	CATGTCGAGG	TC'TCCCAGGC	CCCCTTGCCC	1260
1261	CCCGCCCCCTG	CCTACCTCTC	CTCTCCCCCTG	GCCCTGCCCCA	GCCAGAGGAG	GAGCCCCCCC	1320
1321	GAGGAGCCAC	CTGACTTCTG	CTGTCCCAAG	TGCCAGTATC	AGGCCCCCTGA	TATGGACACC	1380
1381	CTGCAGATAC	ATGTCATGGA	GTGCATTGAG	TAGGGCCGGC	CAGTGCAAGG	CCACTGCCCTG	1440
1441	CCGAGGACGT	GCCCGGGACC	GTGCAGTCTG	CGCTTTCCTC	TCCCGCCTGC	CTAGCCCAGG	1500
1501	ATGAAGGGCT	GGGTGGCCAC	AACTGGGATG	CCACCTGGAG	CCCCACCCAG	GAGCTGGCCG	1560
1561	CGGCACCTTA	CGCTTCAGCT	GTTGATTCCG	CTGGTCCCCCT	CTTTTGGGGT	AGATGCGGCC	1620
1621	CCGATCAGGC	CTGACTCGCT	GCTCTTTTGT	TTCCCTTCTG	TCTGCTCGAA	CCACTTGCCCT	1680
1681	CGGGCTAATC	CCTCCCTCTTT	CCTCCACCCG	GCACTGGGGA	AGTCAAGAAAT	GGGGCCTGGG	1740
1741	GCTCTCAGGG	AGAACTGCTT	CCCCTGGCAG	AGCTGGGTGG	CAGCTCTTCC	TCCCACCGGA	1800
1801	CACCGACCCG	CCCGCTGCTG	TGCCCTGGGA	GTGCTGCCCT	CTTACCATGC	ACACGGGTGC	1860
1861	TC'TCCCTTTTG	GGCTGCATGC	TATTCCATTT	TGCAGCCAGA	CCGATGTGTA	TTTAACCAAT	1920
1921	CACATATTGAT	GGACATTTGG	GTTGTTTCCC	ATCTTTTGTGT	TACCATMAAT	ARTGGCMTAG	1980
1981	AKAAAAATCC	TTGTGCATTA	AAAAAAAAA				2009
	10	20	30	40	50	60	

도면2a

1	TTCTACTCCT	CCCTCCTCCT	CACTGCGGG	30	TCTGACCTA	CTCCTTGTGT	GAGGACTCCT	60
61	CTAGTTCAGA	GACATATCT	GTTACACAAA		CTTGACTCGG	CTCTATCGAG	GTCGTAAAT	120
121	TCTTTCGAAA	TGCCCTACAT	ATAGTTTGGC		AGCTAGCCCT	TGCCCTGTTG	GATGAATAGG	180
181	CACCTCTGGA	AGAGCCAACT	GTGTGAGATG		GTGCAGCCCA	GTGGTGCC	GGCAGCAGAT	240
241	CAGGACGTAC	TGGGCGAAGA	GTCTCCTCTG		GGGAAGCCAG	CCATGCTGCA	CCTGCCCTCA	300
301	GAACAGGGCG	CTCCTGAGAC	CCTCCAGCGC		TGCTTGGGAG	GAGAAATCAAG	AGCTCCGAGA	360
361	TGCCATCCCG	CAGTAGCAAC	CAGATTCTTG		CGGGAGCTGC	CGAAGGGAGC	TTTCTGCAAT	420
421	TTCCAAGCCA	GCCAGAGGGA	GGAGAAGGAG		TTCTTCATGT	GC ~~A~~ AGTTCCA	GGAGGCCAGG	480
481	AAACTGGTGG	AGAGACTCGG	CCTGGAGAAG		CTCGATCTGA	AGAGGCAGAA	GGAGCAGGCT	540
541	CTGCGGGAGG	TGGAGCACCT	GAAGAGATGC		CAGCAGCAGA	TGGCTGAGGA	CAAGGCTCT	600
601	GTGAAAGCCC	AGGTGACGTC	CTTGCTCGGG		GAGCTGCAGG	AGAGCCAGAG	TCCGTTGGAG	660
661	GCTGCCACTA	AGGAATGCCA	GGCTCTGGAG		GGTCGGGCCC	GGGCGGCCAG	CGAGCAGGCG	720
721	CGGAGCTGG	AGAGTGAGCG	CGAGGCGCTG		CAGCAGCAGC	ACAGCGTGCA	GGTGGACCCAG	780
781	CTGGCATGC	AGGGCCAGAG	CGTGAGGGCC		GCGCTCCGCA	TGGAGCGCCA	GGCCGCTCG	840
841	GAGGAGAAGA	GGAAGCTGGC	CCAGTTGCAG		GTGGCCCTATC	ACCAGCTCTT	CCAAGAATAC	900
901	GACAACCAAC	TCAAGAGCAG	CGTGGTGGGC		AGTGAGCGGA	AGCGAGGAAT	GCAGCTGGAA	960
961	GATCTCAAAC	AGCAGCTCCA	GCAGGCCGAG		GAGGCCCTGG	TGGCCAAACA	GGAGGTGATC	1020
1021	GATAAGCTGA	AGGAGGAGGC	CGAGCAGCAC		AAGATTGTGA	TGGAGATCCGT	TCCGCTGCTG	1080
1081	AAGGCCCAGG	CGGATATCTA	CAAGGCGGAC		TTCCAGGCTG	AGAGGCAGGC	CCGGGAGAAG	1140

도면2b

20-4 full	1	MNRHLWKSOLCEMVOPSSGGPAA	DODVVLGEES	PLGK
NEMO full	1	MNKHLPWKNQLS	ETVQESGGPA	EDQDMLGEES
Mouse part.	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Human shrt	1	MNRHLWKSOLCEMVOPSSGGPAA	DQDVVLGEES	PLG-
20-4 full	36	PAMLHLPSE	QGAPETLQRCLEEN	QELRDAIRO
NEMO full	36	PAMLHLPSE	QGTPTLQRCLEEM	QELRDAIRO
Mouse part.	1	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Human shrt	35	- - - - -	- - - - -	- - - - -
20-4 full	71	ILRERCEELLHF	OASOREEKEFL	MCKFOEARKLVE
NEMO full	71	MLRERCEELLHF	OVSORIV	KEFLMCKFOEARKLVE
Mouse part.	4	MLRERCEELLHF	OVSOREEKEFL	MCKFOEARKLVE
Human shrt	35	- - - - -	- - - - -	- - - - -
20-4 full	106	RLGLE	- - - - -	- - - - -
NEMO full	105	RLSLE	KL	DLKR
Mouse part.	39	RLSLE	KL	DLRS
Human shrt	35	RLSLE	KL	DLRS
20-4 full	138	DKASVKAOVTS	LLGEL	OESOSRLEAATKE
NEMO full	140	DKASVKAOVTS	LLGEL	OESOSRLEAATKDR
Mouse part.	71	DKASVKAOVTS	LLGEL	OESOSRLEAATKDR
Human shrt	36	DKASVKAOVTS	LLGEL	OESOSRLEAATKDR
20-4 full	173	RARAA	SEQARQLESERE	ALOOOHS
NEMO full	175	RIRAV	SEQVROLESERE	VLOOOHS
Mouse part.	106	RIRAV	SEQVROLESERE	VLOOOHS
Human shrt	60	- - - - -	- - - - -	- - - - -

도면3a1

20.4 full	1	MNRHLWKS	OLCEMVOP	SGGPAAD	DODVLGEES	PLGK
NEMO full	1	MNKHFWKN	IQLSLSE	VOE	SGGPAED	DODMLGEES
Mouse part.	1					
Human shrt	1	MNRHLWKS	OLCEMVOP	SGGPAAD	DODVLGEES	PLG-
20.4 full	36	PAMLHLP	SEQGAPET	LQRCLEE	NQELRDAI	RQSNQ
NEMO full	36	PAMLHLP	SEQGTPET	LQRCLEE	MQELRDAI	RQSNQ
Mouse part.	1					
Human shrt	35					
20.4 full	71	ILRERCE	ELLHF	FOASOREE	KEFLMCKF	OEARKLVE
NEMO full	71	MLRERCE	ELLHF	FOVSORW	KEFLMCKF	OEARKLVE
Mouse part.	4	MLRERCE	ELLHF	FOVSOREE	KEFLMCKF	OEARKLVE
Human shrt	35					
20.4 full	106	RLGLE	-	KL	DLK	ROKEOALRE
NEMO full	105	RLSLE	KL	DLRS	OREOALKE	LEOLKRC
Mouse part.	39	RLSLE	-	KL	DLRS	OREOALKE
Human shrt	35					
20.4 full	138	DKASVK	AQVTS	SL	LGEL	OESOSRLE
NEMO full	140	DKASVK	AQVTS	SL	LGEL	OESOSRLE
Mouse part.	71	DKASVK	AQVTS	SL	LGEL	OESOSRLE
Human shrt	36	DKASVK	AQVTS	SL	LGEL	OESOSRWE
20.4 full	173	RARA	SEAOAR	OLESE	REAL	OOOHS
NEMO full	175	RIRA	VSEOV	ROLES	REVL	OOOHS
Mouse part.	106	RIRA	VSEOV	ROLES	REVL	OOOHS
Human shrt	60					

도면3a2

20-4 full	208	SVEAALRMEROAASEEKRLAOLOVA YHOLFQ EYD
NEMO full	210	SVEAALRMEROAASEEKRLAOLAAA YHOLFQ DYD
Mouse part.	141	AWRLPCEWSGRLQRRSGTGLQLQAA YHOLFQ DYD
Human shrt	60	- - - - -
20-4 full	243	NH I K S S V V G S E R K R G M Q L E D L K O O L Q O A E E A L V A K
NEMO full	245	S H I K S S - - - - - K G M Q L E D L R O O L Q O A E E A L V A K
Mouse part.	176	S H I K S S - - - - - K G M Q L E D L R O O L Q O A E E A L V A K
Human shrt	60	- - - - -
20-4 full	278	O E V I D K L K E E A E O H K I V M E T V P V L K A Q A D I Y K A D F
NEMO full	273	O E L I D K L K E E A E O H K I V M E T V E V L K A Q A D I Y K A D F
Mouse part.	204	O E L I D K L K E E A E O H K I C D E T V - - - - -
Human shrt	60	- - - - -
20-4 full	313	Q A E R Q A R E K L A E K K E L L Q E Q L E Q L Q R E Y S K L K A S C
NEMO full	308	Q A E R H A R E K L V E K K E Y L Q E Q L E Q L Q R E F N K L K Y G C
Mouse part.	0	- - - - -
Human shrt	60	- - - - -
20-4 full	348	Q E S A R I E D M R K R H V E V S Q A P L P P A P A Y L S S P L A L P
NEMO full	343	H E S A R I E D M R K R H V E - T Q P P L L P A P A I H S F H L A L S
Mouse part.	0	- - - - -
Human shrt	60	- - - - -
20-4 full	383	S Q R R S P P E E P P D F C C P K C Q Y O - A P D M D T L Q I H V M E
NEMO full	377	N Q R R S P P E E P P D F C C P K C Q Y O - A P D M D T L Q I H V M E
Mouse part.	0	- - - - -
Human shrt	60	- - - - - C C P L T M I T G A L L G C M L E H F A A
20-4 full	416	- - - - -
NEMO full	411	- - - C I -
Mouse part.	0	- - - - -
Human shrt	82	R P M C I -

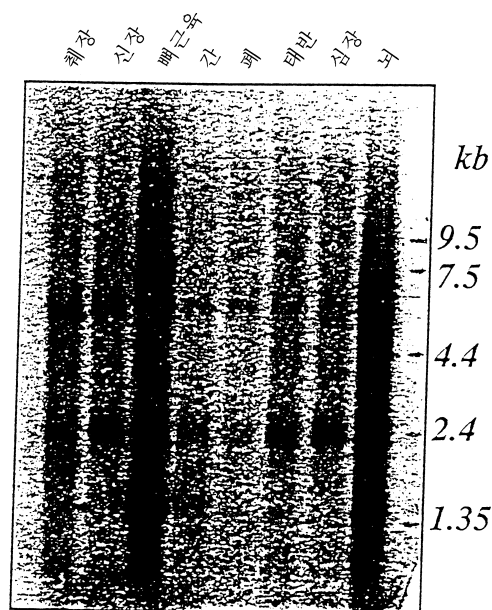
도면3b1

20.4 full	1	I	M	N	R	H	L	W	K	S	Q	L	C	E	M	V	-	Q	P	S	G	G	P	A	A	D	Q	D	V	L	G	E	S	P	L	G		
FIP-2 full	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	S	H	O	P	L	S	C	L	T	E	K	E	D	S	P	S	E	S	T	G	N	G
20.4 full	35	K	P	A	M	L	H	L	P	S	E	Q	G	A	P	E	T	L	-	-	-	Q	R	C	L	E	N	Q	E	L	R	D	A	I	-	-		
FIP-2 full	24	P	H	L	A	L	P	N	L	D	T	E	T	P	E	E	L	Q	M	K	E	L	L	E	N	H	Q	L	K	E	A	M	-	-	-	-	-	
20.4 full	66	R	Q	S	N	Q	I	L	R	E	R	C	E	E	L	L	H	F	Q	A	S	O	R	E	E	K	E	E	L	M	C	K	F	O	E	A	-	
FIP-2 full	59	K	L	N	N	Q	A	M	K	G	R	F	E	E	L	S	A	W	T	E	K	O	K	E	E	R	Q	E	E	I	Q	S	K	E	A	-	-	
20.4 full	101	R	K	L	V	E	R	L	G	L	E	K	L	D	L	K	R	Q	K	E	Q	A	L	R	E	V	E	H	L	K	R	C	Q	Q	M	-		
FIP-2 full	94	K	-	-	-	E	R	L	-	-	-	N	A	L	S	H	E	N	E	K	L	K	E	L	G	L	K	G	K	S	E	R	S	-	-	-	-	
20.4 full	136	A	E	D	K	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
FIP-2 full	122	S	E	D	P	T	D	D	S	R	L	P	R	A	E	A	E	Q	E	K	D	Q	L	R	T	Q	V	V	R	L	Q	A	E	K	A	D	-	
20.4 full	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
FIP-2 full	157	L	L	G	I	V	S	E	L	Q	L	K	L	N	S	S	G	S	S	E	D	S	F	V	E	I	R	M	A	E	G	E	A	E	G	S	-	
20.4 full	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
FIP-2 full	192	V	K	E	I	K	H	S	P	G	S	T	R	T	V	S	T	G	T	A	L	S	H	Y	R	R	S	A	D	G	A	K	N	Y	F	-	-	
20.4 full	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
FIP-2 full	227	E	H	E	E	L	T	V	S	Q	L	L	C	L	R	E	G	N	Q	K	V	E	R	L	E	V	A	L	K	E	A	K	E	R	V	-	-	
20.4 full	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
FIP-2 full	262	S	D	F	E	K	K	T	S	N	R	S	E	I	E	T	Q	T	E	G	S	T	E	K	E	N	D	E	K	G	P	E	T	V	G	-	-	

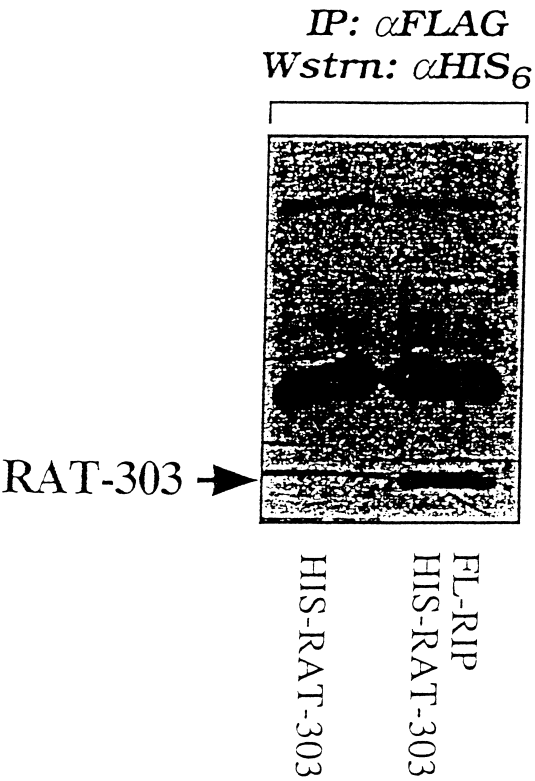
도면3b2

141	20.4 full	- - - S V K A Q V T S L G E L O E S Q S R L E A A T - - - - -	SEVEALNLQVTSLEFKELQEAHTKLESEL	SEELMKRLQ
297	FIP-2 full	KECQALEGRARAASEQARQLEREAALQQQH	SVQV	
165	20.4 full	EKKQALE- - - RKN S A I P S E L N E K Q E L V Y P N K - - -		
332	FIP-2 full	DQLRMGGQSVEAAALRME	RQAASEERKRLAQ	LQVAY
200	20.4 full	- KLELQVESMLSEIKMEQAKTEDEKSKLTVLOMTH		
360	FIP-2 full	HQLFOEYDNIHKS- - - S V V G S E R K R G M Q L L E D L K Q		
235	20.4 full	NKLLOEHNNALKTIEELTRKES	EKVIDRAVLKELSE	*
394	FIP-2 full	QLQQAEEALVAKQEVIDKLKEEA	EQHKI VME	TTVPV
266	20.4 full	KLELAEEKALASKOLQMD	EMKQTIAKOE	EDLETTNTI
429	FIP-2 full	LKAQADITYKADEQAERQAREKLAEKKEL	LQEE	OLLEQ
301	20.4 full	LRAQMEVYCSDEHAEARAAREKIH	EKEQLALQ	LQAV
464	FIP-2 full	LQREYSK LKAS CQESARI	EDMRKRNH-VEVS	QAAPLP
336	20.4 full	L L K E N D A F E D G G R Q S - - L M E N Q S R H G A R T S I D S - - -		
499	FIP-2 full	PAPAYLSSSPLALPSQR	RRSPP	EEPPDFCCGPKCQYQA
370	20.4 full	DQQAYL VQRGAEDRDWR	QQ-RNIP	IHSCPKCGEVL
529	FIP-2 full			
405	20.4 full	PDMDTLQIOTHVMECTIE		
563	FIP-2 full	PDIDTLQIOTHVMDCTI		

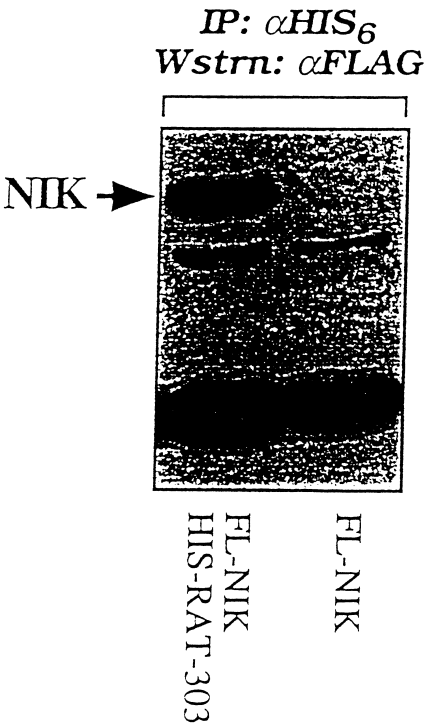
도면4a



도면4b



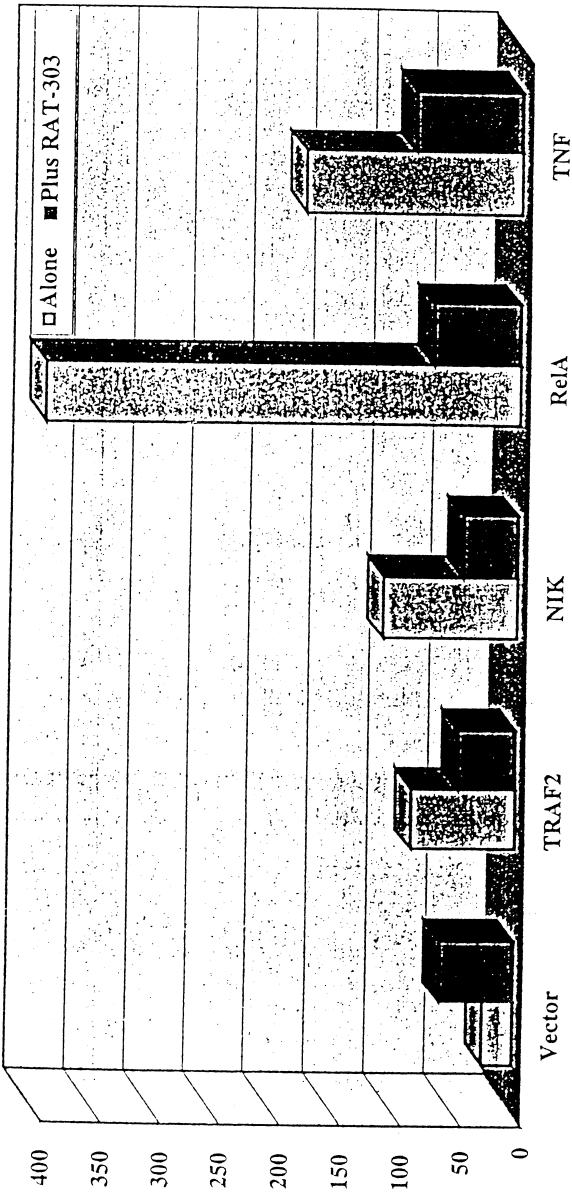
도면4c



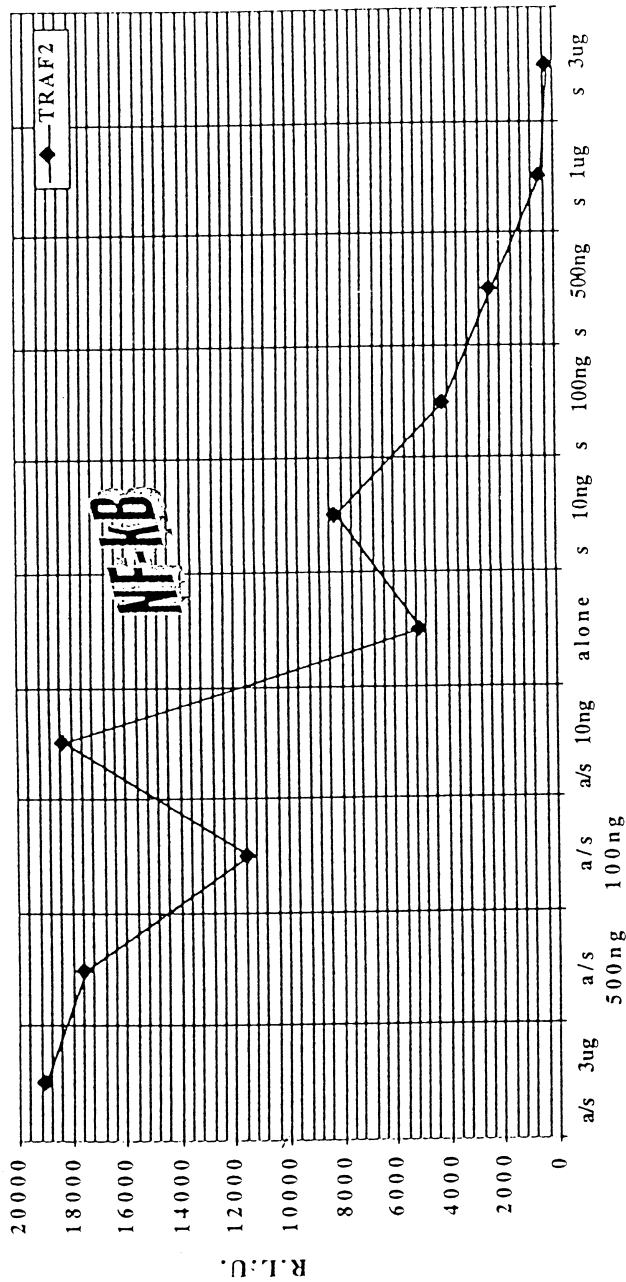
도면5a



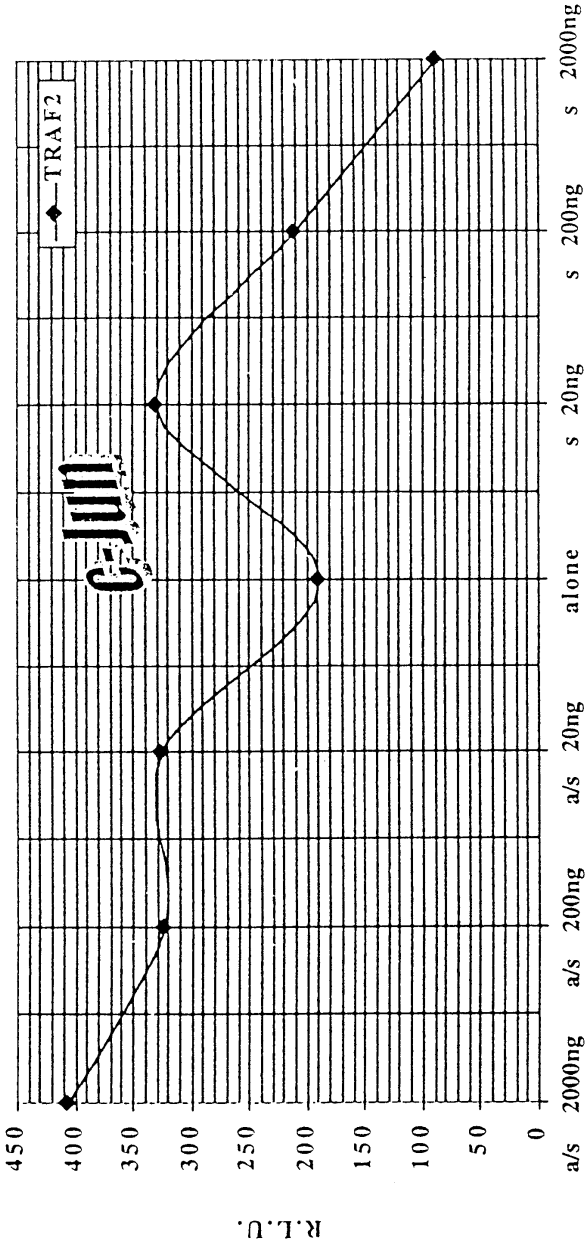
도면5b



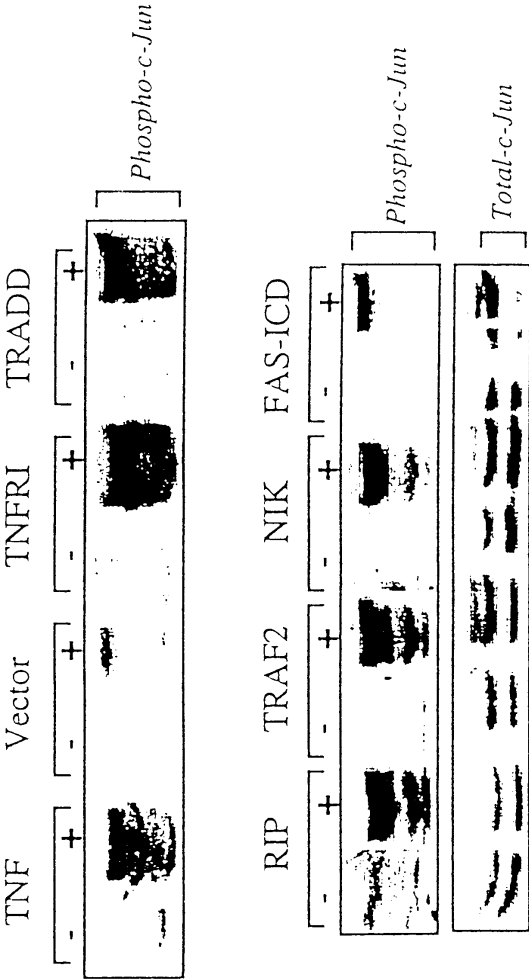
도면6a



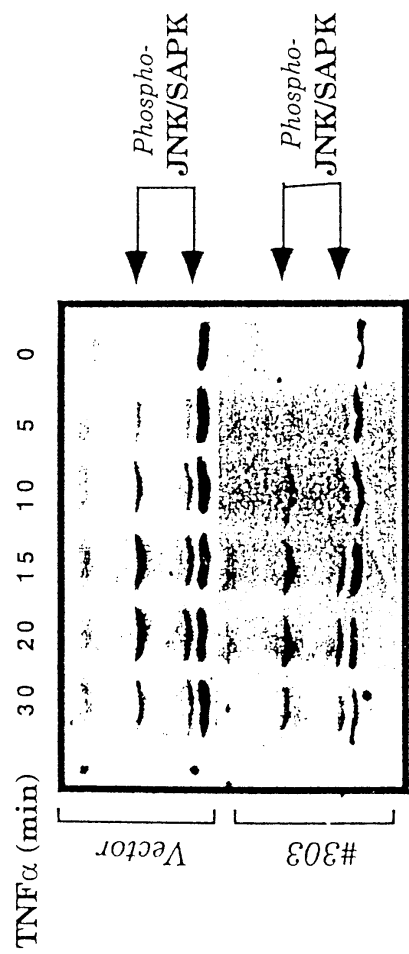
도면6b



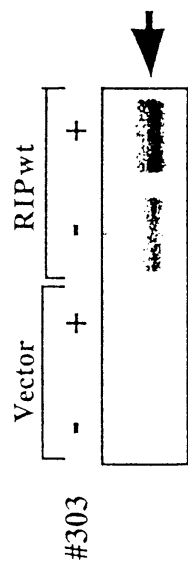
도면7a



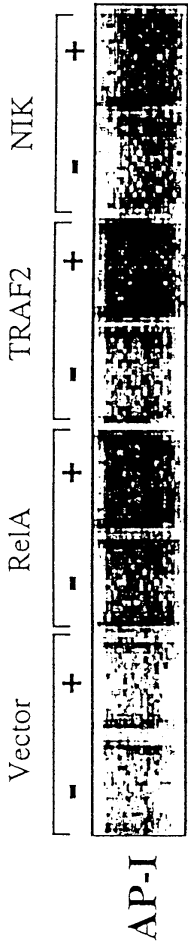
도면7b

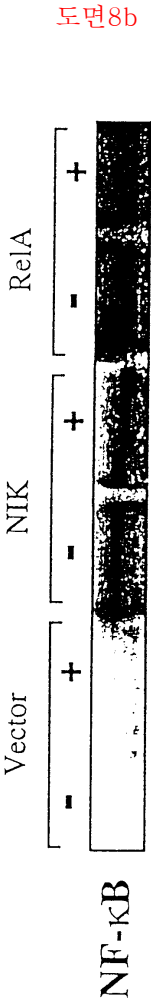


도면7c

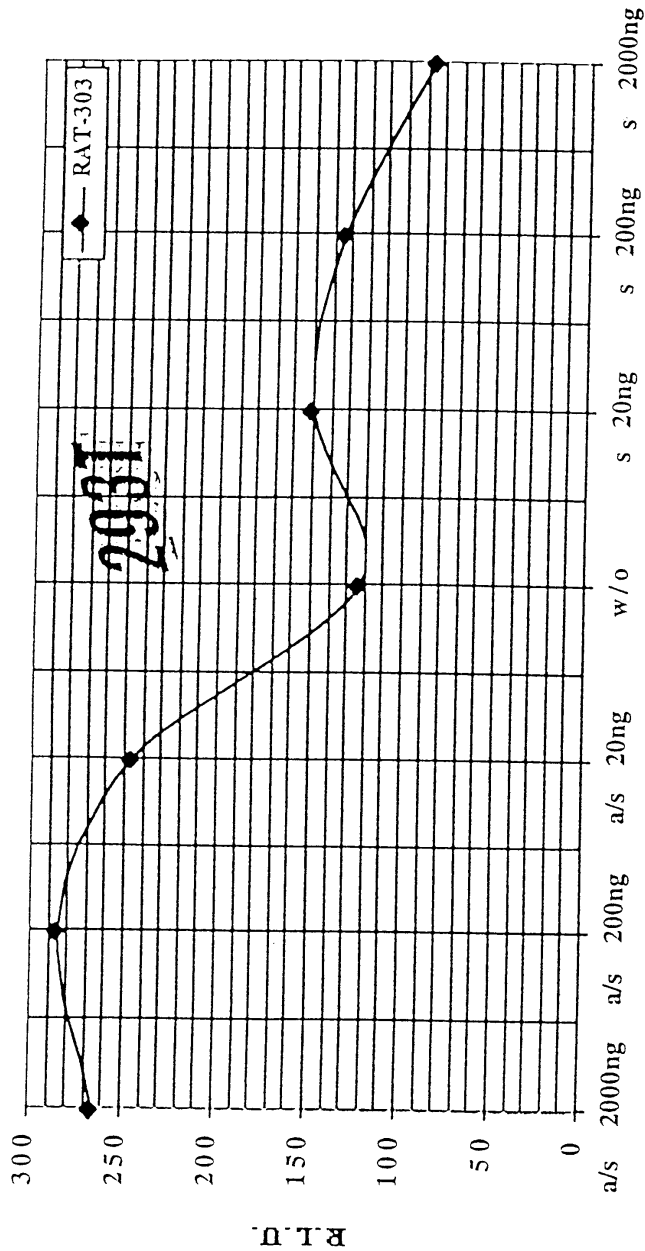


도면8a

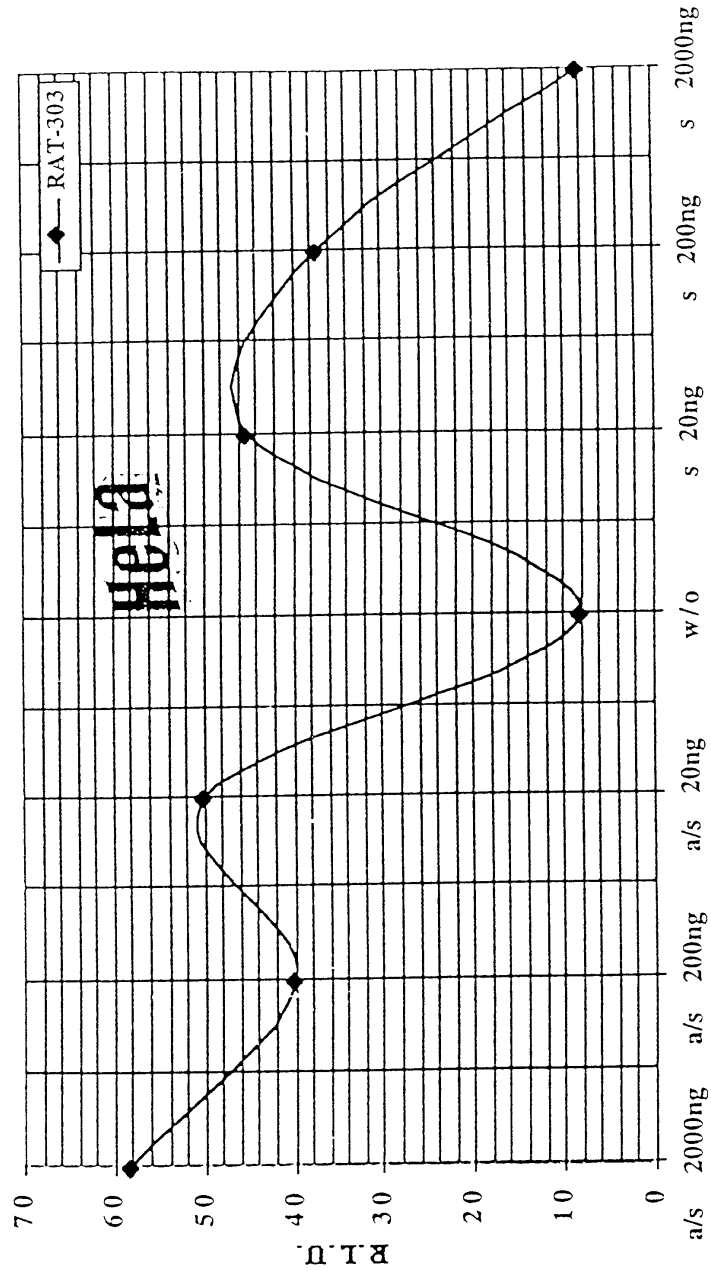




도면9a



도면9b



도면10a

클론 #10의 뉴클레오타이드 서열

	10		20		30		40		50		60		70		80		90		100
1	GCCACGAAGG	CCGAGACTTT	GACCGTTCCT	CACCACCACT	CCAGCCTCCT	CCTGTGAAC	CACTGACCAC	CGAGAACAGA	TTCCACTCTT	TACCATTCAG	100								
101	TCTCACCAG	ATGCCCAATA	CCAAATGGAAG	TATTTGGCCAC	AGTCCACTTT	CTCTGTTCAGC	CCAGTCTGTA	ATGGAGAGAC	TAAACACTGC	ACCCGTCAA	200								
201	GAGAGTCCAC	CCTTGGCCAT	GCCTCCTGGG	AACTCACATG	GTCTAGAAGT	GGGCTCATTTG	GCTGAAGTTA	AGGAGAACC	TCCTTTCTAT	GGGTAATCC	300								
301	GTATTTTACC	TCAGCCACCA	GGACTGAATG	AAGTGCTCGC	TGGACTGGAA	CTGGAAGATG	AGTGTCAGG	CTGTACGGAT	GGAACTTCA	GAGGCATCG	400								
401	GTATTTTACC	TGTGCCCTGA	AGAGGGCGCT	GTTTGTGAAA	CTGAAGAGCT	GCAGGCCCTGA	CTCTAGGTTT	GCATCATTCG	AGCCGGTTTC	CAATCAAGAT	500								
501	TGAGGGCTGT	AACCTCTTAG	CATTTGGAGG	CTACTTAAAT	GAAGTAGT:G	AAGAAATAC	T:CCA:CCAA	AAATGGAAA	AGAARGCTTG	GAGATAATGA	600								
601	TTGGGGAAAG	AAGAAAGGCA	TCCAAGGGTC	ATTACAATTTC	TTGKTACTTA	G:ACTCAACC	TTATTTCTKGC	TTATTTKGC	TTTATTTTATC	CTCTGAGAA	700								
701	CTGGTGTTAC	TTTAGACCCC	AAAGAAANAG	AAACGATGTT	AGAATATTTT	WKWGHMACCC	AAGAGCTACT	GAGGACAGAA	ATTTGTTTATC	CTCTGAGAA	800								
801	ATATGGATAT	GTGTGTGCCA	CAAAAATTTAT	GAAACTGAGG	AAAATACTTG	AAAAGGTGGA	GGCTGCATCA	GGATTTTACCT	CTGAAGAAA	AGATCCTGAG	900								
901	GAATTTCTGA	ATATTTCTGT	TCAATCATAT	TTAAGGGTAG	AACCTTTTCT	MAAATAAGA	TCAGCAGGTC	AAAAGGTACA	AGATTGTTAC	TTCTATCAA	1000								
1001	TTTTTTATGA	AAAAAATGAG	AAAGTTGGCG	TTCCACACAAT	TCAGCAGTTG	TTAGAATGGT	CTTTTATCAA	CAGTAACCTG	AAATTTGCAG	AGGCACCATC	1100								
1101	ATGCTGTGAT	ATTCAGATGC	CTCGATTTTG	AAAAGACTTT	AAACTATTTTA	AAAAATTTTT	CTTTCTCTGG	AATTAGATAT	AACAGATTTA	CTTGAAGACA	1200								
1201	CCCCAGACAG	TGCCGGATAT	GTGGAGGGCT	TGCAATGTAT	GAGTGTAAAGA	ATGCTACGAC	GATCCGGACA	CCAGCTGGAA	AAACAAGCAG	TTTTGTAAAA	1300								

도면10b

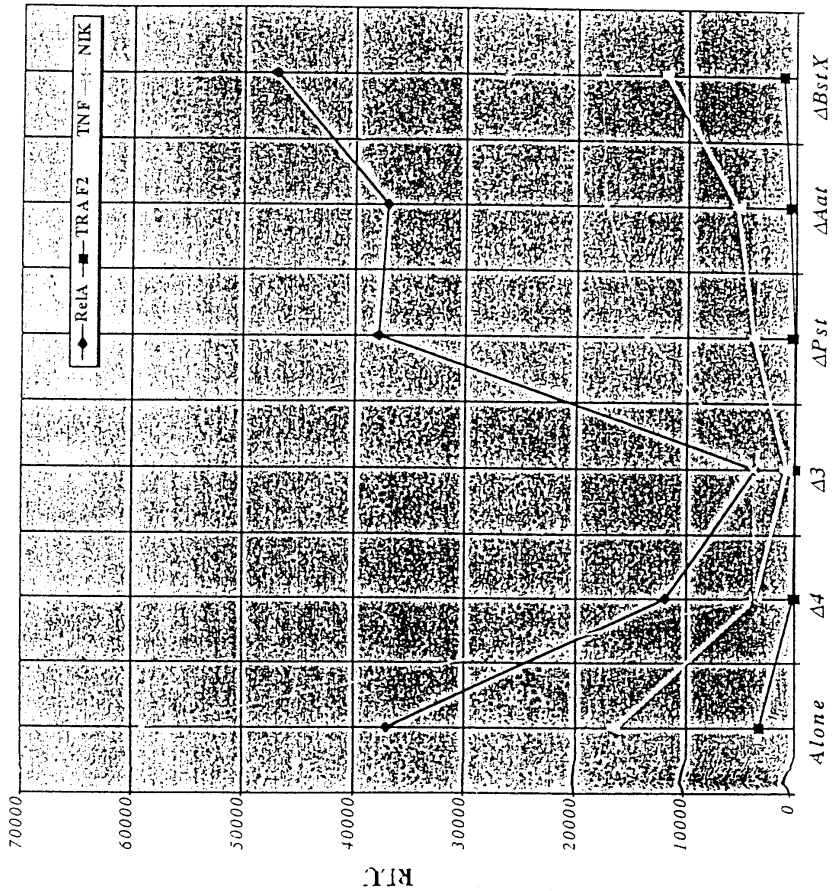
```
1301 CCTGCAACAC TCAAGTCCAC CTTTATCCGA AGAGGCTGAA TCATATAATAT AACCCAGTGT CACTTCCCA AGACTTACCC CGACTGGGAG ATTGGAGACA 1400
1401 CGCTGCATC CCTGCCAGA ATATGGAGTT APTTGTGTT CTCTGCATAG AAACAAGCCA CTATGTGTCT TTTGTGAAGT ATGGGAAGGA CGATTCTGCC 1500
1501 TGGCTCTTCT TTGGACAGCA TGGCCGATCC GGGATGGTGG TCAGAAATGGC TCACATTCC CCCAAGTCHC CCMGTGCCCA GAAGTAGGAG AGTACTTTGA 1600
1601 AGATGTCTCC TGGAGACCC TGSNWTVCCT TGGACTCCCA GGAGAAATCCC AAGGCTGTGC ACGAGACTG CTTTGTGATG CCATATATGT GCCATGTACC 1700
1701 CAGAGTCCAA CAATGAGTTT GTACAAATAA CTGGGGGTCA TCGGGAAAGG CAAGAAACT GGAAGCAGA GTCCCTAACG TTGCATCTTA TTCGGAGCTG 1800
1801 GCAGTTCTGT TCACGGTCCA TTGCCGGCAA TGGATGTCTT TGTGGTGATG ATCCTTCAGA AAGGATGCC TCCTTTTAA MACAAATGC TTTTGTGTCC 1900
1901 CTGAAGTATT TAATAAGAG CAITTTGCAC TCTAGAAAGT ATGTTTGTGT TGGTTTTTTA AGAAGTCAA ATGAAGTTAT TAATACCTGA AGCTTTAAGT 2000
2001 TAAGTGCATT GATCATATGA TATTTTGTGA AGCATACAAAT TTTAATTGTG GAAGTTTAAA GCCTCTTTTA GTCCATTGAG AATGTAAATA AATGTGTCTT 2100
2101 CTTTATGGAA AAAAAA
```

RAT-303

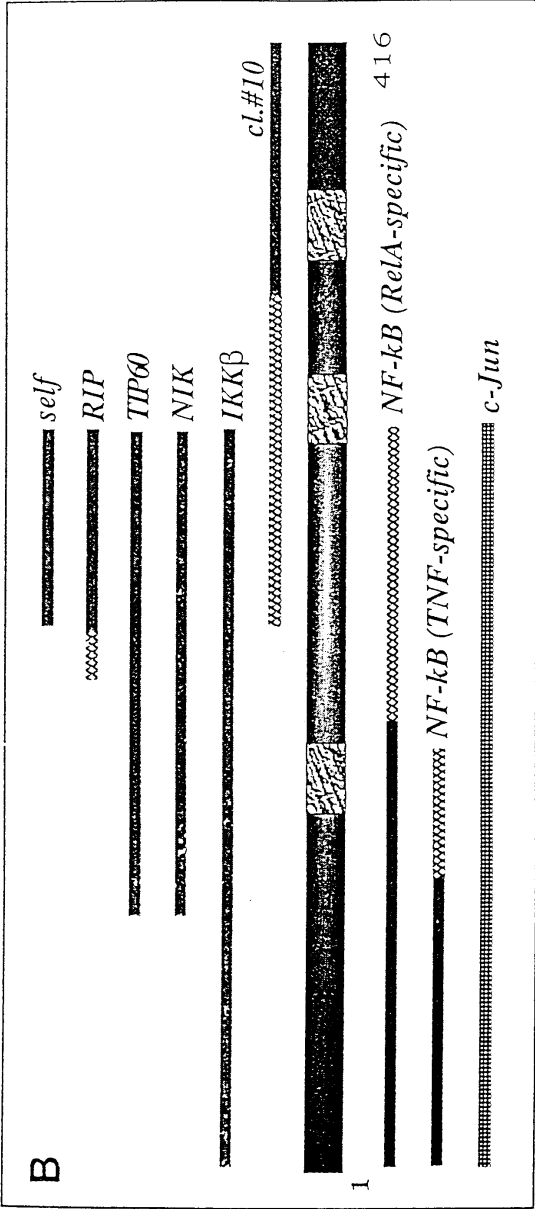


도면11a

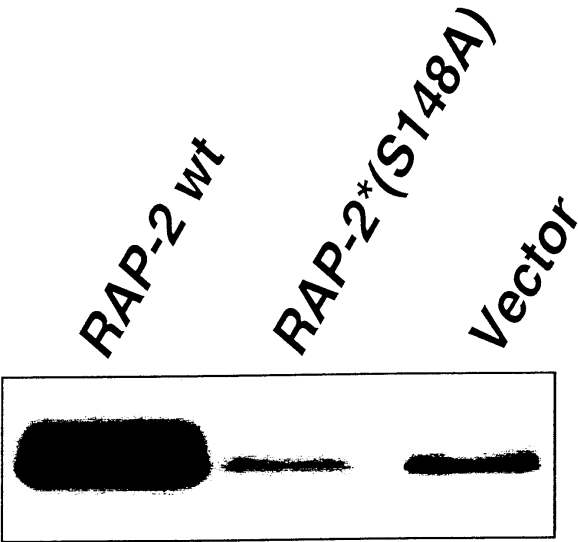
도면11b



도면12b



도면13



서열목록

서열목록 전자파일 첨부