



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월25일
 (11) 등록번호 10-1651330
 (24) 등록일자 2016년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0095927
 (22) 출원일자 2014년07월28일
 심사청구일자 2014년07월28일
 (65) 공개번호 10-2016-0013730
 (43) 공개일자 2016년02월05일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020060054196 A*
 KR1020090039772 A*
 WO2008127291 A2
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
 서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
 성의교정내 (반포동)
 (72) 발명자
주대명
 서울특별시 동작구 장승배기로4길 9, 106동 302
 호(상도동, 상도더#아파트)
 (74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 4 항

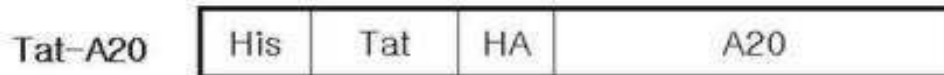
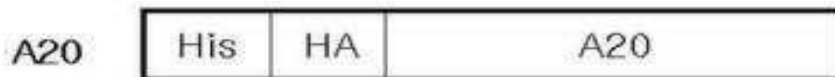
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 세포투과성이 우수한 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질이 융합된 TAT-A20 융합단백질 유전자를 발현하는 형질전환체를 배양하는 단계; 상기에서 수득된 배양액의 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계; 상기에서 수득된 봉입체를 용성화시키는 단계; 및 상기에서 수득된 단백질을 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하여 재접힘시키는 단계를 포함하는 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 TAT-A20 융합단백질, 상기 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 제조방법에 따라 종양괴사인자(TNF)에 대한 억제 활성이 우수한 TAT-A20 융합단백질을 제조할 수 있고, 이를 포함하는 약학 조성물을 통해 기존 염증성 질환 및 류마티스 치료제의 한계를 극복하고 다수 환자에게 더욱 안정적으로 작용하고 치료 효과도 우수한 생물학적 제제를 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0024179

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 세포 투과형 A20을 이용한 류마티스 관절염의 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 가톨릭대학교(성의교정)

연구기간 2011.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포 투과성 TAT 단백질과 A20 단백질이 융합된 TAT-A20 융합단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 발현벡터로 형질 전환된 형질전환체를 배양하는 단계;

형질전환체의 배양물을 수득하고 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계;

봉입체를 가용화시키는 단계; 및

상기 가용화되어 수득된 TAT-A20 융합단백질을 pH 8.2 조건하에서 600 mM L-arginine, 45~55 mM Tris, 18~22 mM NaCl, 0.7~0.9 mM KCl, 0.8~1.2 mM EDTA, 1.8~2.2 mM 글루타치온(환원형) 및 0.8~1.2 mM 글루타치온(산화형)이 함유된 용액에 투석하여 재접힘(refolding)시키는 단계를 포함하는, 세포투과성이 우수한 TATA20 융합단백질의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환체를 배양하는 단계는,

- i) 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 제조하는 단계,
- ii) 상기 DNA 서열을 발현 벡터에 작동가능하게 융합되도록 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계,
- iii) 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시키는 단계, 및
- iv) 형질전환체 내에서 TAT-A20 융합단백질이 발현되도록 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포를 파쇄하는 과정은 라이소자임을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가용화하는 단계는 변성제인 구아니딘 클로라이드 용액을 가하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포투과성이 우수한 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 외상, 감염, 허혈(post-ischemic), 독성 또는 자가면역 반응에 의한 손상에 반응하는, 조직에서 발생하는 염증관련 요소와 세포들 사이의 매우 복잡한 현상이다. 보통 이 과정은 감염후의 회복 및 치료를 유도하지만, 만약 이런 과정들이 제대로 이루어지지 않을 경우 염증은 염증세포 또는 콜라겐 분해효소 등에 의한 지속적인 조직 손상을 야기 시킬 수도 있다. 또한, 류마티스 관절염은 비교적 흔한 만성 염증성 질환으로 항 류마티스제제, 면역억제제 및 부신피질호르몬 등을 이용한 치료에도 불구하고 관절과괴가 진행될 수 있어 관절 변형으로 인한 장애를 유발한다.

[0003] 이러한 류마티스 관절염은 자가면역 질환으로써 유전적 요인과 외부 인자에 의해 자가반응성 T 세포 및 류마티스 인자와 같은 자가항체가 발생하고 이들이 활막조직에 염증을 유발하면서 시작된다. 자가반응성 T세포는 활막 조직의 염증에 있어 핵심적인 역할을 담당하며 활막조직에 있는 대식세포, 활막세포, 수지상세포 및 B세포 등과 상호작용을 통하여 염증과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이들 세포간의 상호작용에는 여러 가지 세포표면 분자들이나 분비단백질이 관여하는데 그 중에서 특히 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 리간드 슈퍼패밀리와 TNF 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 TRANCE/RANK, CD40/CD40L, GITR/GITRL, 및 LTβ/LTβR 의 상호작용은 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다.

[0004] 상기 염증 반응을 일으키는 주요 인자인 종양괴사인자를 차단하는 기능을 하는 것으로 A20 단백질이 알려져 있다. 상기 A20 단백질(tumor necrosis factor alpha induced protein 3, *TNFAIP3*)은 TNFAIP3 유전자에 의하여 발현되는 아연집게단백질(zinc finger protein)로, 종양괴사인자(tumor necrosis factor alpha, TNF)나 toll-like receptor에 대한 NF-κB작용의 역 조절인자로서 알려져 있다. 상기 TNFAIP3 유전자는 종양괴사인자에 의하여 발현이 유도되고, 상기 유전자에 의하여 발현된 단백질은 종양괴사인자알파(TNF)에 의하여 유도된 핵전사인자 NF-kappa B 활성화 및 종양괴사인자 매개 세포괴사(TNF-mediated apoptosis)를 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서, TNFAIP3 단백질은 종양괴사인자알파(TNF)에 의하여 유도된 핵전사인자 NF-kappa B 반응을 종결시켜서 염증반응을 종결시키는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 추정된다.

[0005] 현재 국내 및 외국에서 사용되어지고 있거나 개발 중에 있는 류마티스 관절염의 치료 방법으로는 비스테로이드 성 항염증약물(NSAIDs) 또는 스테로이드를 이용한 소염제, 항 류마티스 약물 (antirheumatic drugs or disease modifying antirheumatic drugs: DMARD), 생물학적 매체(Biologic agents): 사이토카인의 하나인 TNF-α의 기능을 저해하는 항체 또는 가용성 수용체 (ENBREL 등), 유전자 치료: IL-1 및 TNF-α의 길항제(antagonist) 또는 IL-10, TGF-β1과 같은 항염증성 사이토카인을 발현하는 유전자 치료 및 경구용 타입 II콜라겐 면역치료 등을 들 수 있다. 그러나 이들 방법은 류마티스 관절염의 증상을 완화하는데 머물 뿐 근본적인 치료가 되지 않고, 대부분의 방법이 발병에 관련된 면역현상과 감염에 대항하는 면역현상을 구분하지 못하는 비특이적(nonspecific) 면역제어에 기초하기 때문에 류마티스 관절염의 치료와 함께 면역기능의 저하라는 부작용(side-effect)을 동반할 가능성이 크다.

[0006] 따라서, 기존 치료제의 한계를 극복하기 위해서는 류마티스 관절염의 병인기전을 좀 더 정확히 이해하고 새로운 치료법 개발이 필요하다. 최근에는 류마티스 관절염의 병인기전에 중요한 것으로 밝혀진 종양괴사인자-α(TNF-α) 및 인터루킨-1β(IL-1β)를 차단하는 생물학적 제제를 개발하여 치료에 이용한 결과 매우 효과적인 것으로 보고 되었다. 하지만 이런 생물학적 제제에 반응하지 않는 환자들이 아직 많고 반응이 불완전한 경우도 많아 좀

더 효과적이거나 보완작용이 있는 약제의 개발이 필요하다.

[0007] 한편, 중앙괴사인자 활성화 억제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 A20 단백질은 아연 이온과 배위 결합하고 있으므로, 생물학적 막을 통해 이동(translocation)할 수 있는지, 그리고 그들의 기능을 유지할 수 있는지 분명하지 않았다. 이동 도중에 도메인이 풀리면, 아연 이온이 방출되어 소실될 수 있다. 반대로, 폴딩된 상태는 도메인의 이동을 방해할 것이다. 또한, 세포의 환경의 산화 조건에 징크 핑거 도메인이 노출된다면 시스템 인 잔기 사이에 유해한 이황화 결합(disulfide bond)이 형성되어 DNA결합 활성을 잃게 될 수도 있다.

[0008] HIV-1 TAT 단백질은 바이러스 단백질과 DNA의 복제를 증가시키는데 필수적인 역할을 하는 바이러스의 전사인자로서, 세포질에서 발현된 후 자신의 RNA를 전사하기 위해 핵 안으로 이동하는 특성을 지니고 있다. TAT의 돌연변이 분석(mutational analysis)을 통해 TAT은 아미노 말단의 산성그룹(acidic group)과 7개의 시스테인을 가지는 사이토신이 풍부한 부위(cysteine-rich cluster) 그리고 아르기닌(arginine)과 라이신(lysine)이 많이 존재하는 양전하를 띤 염기성 부위(positively charged basic region)의 3개의 기능성 도메인(functional domain)을 가진다고 알려졌다. 산성그룹은 TAT의 발현을 더욱 활성화시키는 역할을 하며, 시스테인이 풍부한 도메인(cysteine-rich domain)은 TAT의 유사금속 다이머(metal-liked dimer)를 형성하는 역할을 한다. 염기성 도메인은 TAT 단백질의 핵으로의 이동과 RNA와의 결합에 관여한다.

[0009] TAT 단백질은 어떤 수용체(receptor)나 수송체(transporter)의 도움 없이 세포막과 핵막을 통과할 수 있는 능력을 가진다고 알려져 있다. 많은 연구에서 세포의 배양액에 TAT 단백질을 처리하였을 경우 세포의 핵 안까지 TAT 단백질이 이동하는 것을 증명하였고, TAT의 여러 도메인 중 염기성 도메인(49~57번째 아미노산, 2개의 라이신과 6개의 아르기닌을 포함하는 총 9개의 아미노산으로 구성)이 단백질의 형질도입에 관여한다고 알려져 있다. 비록 단백질의 형질도입에 대한 정확한 기작은 잘 알려지지 않았지만, TAT 염기성 도메인은 공유결합으로 연결된 융합단백질을 모든 세포 안으로 이동시킬 수 있다고 알려졌다.

[0010] TAT의 형질도입 능력은 시그널 분자(signal molecules)의 기작을 밝히는데 중요한 역할을 하고 있으며, 유전자 치료법의 문제점을 극복할 수 있는 대안책으로 제시되고 있다. 그러나, 실제 모든 단백질이 TAT 단백질에 의해 운반되는 것은 아니며, TAT에 의해 세포 내로 운반된 모든 단백질이 생물학적 활성을 나타내는지 여부도 확실히 밝혀지지 않은 상태이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2013-0037271

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) 1. Christioane Ferran 등, A20 inhibits NF- κ B activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis, blood 1998 91 : 2249-2258.

(비특허문헌 0002) 2. Noula Shembade 등, Inhibition of NF- κ B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes, Science. 2010 February 26; 327(5969) : 1135-1139.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 기존 치료제의 한계를 극복하기 위해서는 염증성 질환 및 류마티스 관절염의 병인기전을 좀 더 정확히 이해하고 새로운 치료법 개발하기 위한 것으로, 보다 구체적으로 다수 환자에게 더욱 안정적으로 작용하고 치료 효과도 우수한 생물학적 제제를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 태양에 따르면, 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질이 융합된

TAT-A20 융합단백질 유전자를 발현하는 형질전환체를 배양하는 단계; 상기에서 수득된 배양액의 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계; 상기에서 수득된 봉입체를 용성화시키는 단계; 및 상기에서 수득된 단백질을 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하여 재접힘시키는 단계를 포함하는 TAT-A20 융합단백질의 제조방법을 제공한다.

- [0015] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 중 형질전환체를 배양하는 단계는, i) 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 제조하는 단계, ii) 상기 DNA 서열을 발현 벡터에 작동 가능하게 융합되도록 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계, iii) 상기 재조합 발현 벡터를 숙주를 형질전환시키는 단계, 및 iv) 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 배양하는 단계인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 중 세포를 파쇄하는 과정은 라이소자임을 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 중 용성화하는 단계는 변성제인 구아니딘 클로라이드 용액을 가하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 중 단백질을 재접힘시키는 단계는 상기 용성화 단계에서 수득된 단백질을 크로마토그래피로 분리한 후 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상기 상술한 방법 중 어느 하나의 방법에 의하여 제조된 TAT-A20 융합단백질을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 중 TAT 유전자는 서열번호 1에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 중 TAT 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 중 A20 유전자는 서열번호 3에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 일 태양에 따르면, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 중 A20 유전자는 서열번호 4에 기재된 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열인 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 일 태양에 따르면, 상술한 방법 중 어느 하나의 방법에 의하여 제조된 TAT-A20 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 TAT-A20 융합단백질 제조방법에 따라 종양괴사인자(TNF)에 대한 억제 활성이 우수한 TAT-A20 융합단백질을 제조할 수 있고, 이를 포함하는 약학 조성물을 통해 기존 염증성 질환 및 류마티스 치료제의 한계를 극복하고 다수 환자에게 더욱 안정적으로 작용하고 치료 효과도 우수한 생물학적 제제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질을 발현하도록 구성된 재조합 벡터에 대한 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질에 대한 대략적인 모식도이다. A20은 Tta와 융합하지 않은 대조군이다.
- 도 3은 본 발명에 따라 TAT-A20 융합단백질을 발현하도록 구성된 벡터를 숙주세포에 도입하여 발현하여, TAT-A20 융합단백질이 합성되는 것을 확인한 결과이다.(융합단백질의 예상크기 94kD, 적색화살표 참조)
- 도 4는 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질의 존재를 정제과정 중에 확인한 그림이다.
- 도 5는 TAT-A20 융합단백질을 제조하는 과정 중에서 재접힘 버퍼의 종류에 따른 융합단백질의 생성량을 비교한 실험결과이다.
- 도 6은 TAT-A20 융합단백질을 제조하는 과정 중에서 Superdex 200 크로마토그래피를 이용하여 분리한 결과이다.
- 도 7은 본 발명에 따라 발현 및 정제과정을 통해 제조된 TAT-A20 융합단백질을 확인한 결과이다.(융합단백질의

예상크기 94kD, 적색화살표 참조)

도 8은 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질을 농도별로 세포에 가하여 NF-κB의 활성화 억제를 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질을 세포에 가한 후 NF-κB의 활성화 억제를 시간대별로 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질을 농도별로 세포에 가한 후 TNF를 가하여 NF-κB 신호경로에 대한 영향을 확인한 결과이다. NE(nuclear extract): 핵추출물을 나타낸 것이고, Nucln: nucleolin을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질(형광표지)이 세포 내로 유입된 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명의 구체적인 내용을 기술하기에 앞서 본 명세서에 사용된 용어에 대하여 의미를 서술한다.
- [0028] 본 명세서에서 사용되는 '폴리펩타이드'는 펩타이드 결합에 의해 연결된 세 개 이상의 아미노산의 중합체를 의미한다. 용어 "단백질"은 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있으며, 폴리펩타이드 및 펩타이드를 포괄한다. 단백질 또는 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형, 예를 들어, 천연적 변형 또는 인공적 변형을 역시 포함할 수 있다. 용어 "도메인"은 폴리펩타이드 내의 기능성 단위를 말한다. 도메인의 3차 구조는 접혀있거나 풀려있을 수 있다.
- [0029] 또한 폴리펩타이드는 해당 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 90%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0030] 예를 들어, 상기 폴리펩타이드는 기재된 특정의 아미노산 서열과 약 60% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상, 99.1% 이상, 99.2% 이상, 99.3% 이상, 99.4% 이상, 99.5% 이상, 또는 99.9% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 일반적으로, 동일성 % 는 높을수록 더욱 바람직하다.
- [0031] 또한 상기 동일성을 가지는 폴리펩타이드는 기재된 특정 아미노산 서열의 폴리펩타이드에서 1개 이상 아미노산 잔기가 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가된 아미노산 서열을 포함하면서 베타-아디페이트 경로와 관련된 폴리펩타이드를 포함한다. 일반적으로, 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가의 수는 적을수록 더욱 바람직하다.
- [0032] 본 명세서에 사용되는 "폴리뉴클레오타이드"는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(anaLogues)도 포함한다.
- [0033] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 상기 기재된 특정의 아미노산 서열(폴리펩타이드)을 암호화하는 핵산 분자에 제한되지 않고, 상기에서 서술한 것처럼 특정 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 아미노산 서열 또는 그에 상응하는 기능을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 90%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0034] 상기 상응하는 기능을 가진 폴리펩타이드는 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가되는 아미노산 서열의 폴리펩타이드를 포함한다. 그러한 폴리펩타이드는 상기 상술한 것처럼 1 개 이상의 아미노산 잔기가 소실, 치환, 삽입, 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 이루어지며 3-하이드록시프로피온산 합성 관련되는 폴리펩타이드를 포함하며, 아미노산 잔기의 소실,치환,삽입, 및/또는 첨가의 수가 적은 것이 바람직하다. 또한, 상기 폴리펩타이드는 상기 상술한 것처럼 기재된 특정의 아미노산 서열과 약 60% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하며, 동일성이 높을 수록 바람직하다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상보적" 또는 "상보성"은 퓨린 및 피리미딘 뉴클레오타이드가 수소 결합을 통해 결합하여 더블 스트랜드 폴리뉴클레오타이드를 형성하는 능력을 의미하며, 부분적으로 상보적인 경우도 포함한다. 하기 염기쌍이 상보성과 관련된다: 구아닌 및 시토신; 아데닌 및 티민; 및 아데닌 및 우라실. "상보적"은 상기

언급된 관계가 전장의 상기 분자에 걸쳐 2개의 싱글-스트랜드 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 모든 염기쌍에 실질적으로 적용된다. "부분적으로 상보적"은 2개의 싱글-스트랜드 폴리뉴클레오타이드 중 하나의 길이가 짧기 때문에 그 분자들 중 하나의 일부가 싱글 스트랜드로 남아있는 것 관계를 의미한다.

- [0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "천연"은 천연의 유기체, 즉 분자생물학적 기술에 의해 변형되지 않은 유기체의 세포에 존재하는 서열 (예, 핵산 또는 아미노산 서열)을 말한다. 예를 들어, 유전자전이 마우스는 천연의 유기체가 아니지만, 분자생물학적 기술에 의해 변형되지 않은 고도로 근친교배시킨 마우스는 천연형으로 간주된다. 서열을 기술할 때, 용어 "바이러스성"은 천연형 바이러스, 즉, 분자생물학적 기술에 의해 변형되지 않은 바이러스의 서열을 말한다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "외래"는 일반적으로 야생형 세포 또는 유기체에서 자연적으로 발생하는 것이 아니고, 전형적으로 분자생물학 기술, 즉, 재조합 미생물을 생성하기 위한 공학적 처리로 세포에 도입된 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "재조합" 미생물은 전형적으로, 예컨대 플라스미드 또는 벡터에 하나 이상의 외래 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"라는 용어는 숙주세포에 삽입되어 숙주세포 계놈과 재조합되고 이에 삽입되거나, 또는 에피솜으로서 자발적으로 복제하는 컴피턴트 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 핵산을 의미한다. 이러한 벡터로는 선형핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 등이 있다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형질전환 또는 트랜스펙션"은 세포 외부 DNA가, 수반물질이 있고 없는 상태로 숙주 세포로 들어가는 과정을 말한다. "트랜스펙션된 세포"란 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입되어 세포 외부 DNA를 가지고 있는 세포를 가리킨다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 물질로 복제될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 임의의 재조합 벡터(들) 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 수용체일 수 있거나, 수용체인 개별 세포 또는 세포 배양물을 포함한다. 숙주 세포는 단일숙주 세포의 자손일 수 있으며, 자손은 자연적, 우발적 또는 인공 돌연변이 및/또는 변화로 인해 원래의 모 세포와 완전히 동일하지 않아도 된다(형태 또는 총 DNA 상보면에서). 숙주 세포는 생체내 또는 시험관 내에서 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질감염되거나, 형질전환되거나 또는 감염된 세포를 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "융합"은 융합되는 구성요소들을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 말한다. 예시적인 융합 단백질은 DNA 결합 단백질 및 단백질 전달 도메인이다 융합된 성분들은 직접 연결될 필요는 없다. 예를 들어, 다른 서열(예, 링커 또는 기능성 도메인)이 융합된 요소들 사이에 위치할 수 있다
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포 투과성 도메인"은 생물학적 막, 특히 세포 막을 통과할 수 있는 아미노산 서열을 말한다. 이중 폴리펩타이드에 부착될 때, PTD는 이중 폴리펩타이드의 생물학적 막을 통한 이동을 향상시킨다. 용어 "세포 투과성 도메인"는 핵 외피에 있는 기공을 통한 화합물의 수송을 용이하게 하는 핵 위치 시그널을 말하는 것은 아니다. 핵으로 들어가는 단백질들은 실제적인 막 이중층을 통과하지 않는다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 "치료하다" 또는 "치료"는 질병, 질병의 증상 또는 예후들을 치료하거나 상처를 치료, 약화, 감소, 변화, 치유, 제거, 개선 또는 영향을 주기 위하여 징크 핑거 단백질이 세포 내로 들어가서 대상, 예를 들어, 환자의 세포 내에서 유전자 발현을 조절할 수 있도록 TAT-A20 단백질을 가하거나 투여하는 것, 또는 환자와 같은 대상으로부터 분리한 조직이나 세포주와 같은 세포에 약물을 가하거나 투여하는 것으로 정의되는데, 이때 환자는 염증성 질환 내지 류마티스를 가지고 있거나 상기 질환의 증상이나 예후를 보이고 있는 대상을 말한다.
- [0045] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질이 융합된 TAT-A20 융합단백질 유전자를 발현하는 형질전환체를 배양하는 단계; 상기에서 획득된 배양액의 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계; 상기에서 획득된 봉입체를 용성화시키는 단계; 및 상기에서 획득된 단백질을 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하여 재접힘시키는 단계를 포함하는 TAT-A20 융합단백질의 제조방법, 이에 의하여 제조된 TAT-A20 융합단백질 및 이를 포함하는 염증성질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이하 도면을 참조하여 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0046] 본 발명은 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질이 융합된 TAT-A20 융합단백질 유전자를 발현하는 형질전환체

를 배양하는 단계; 상기에서 수득된 배양액의 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계; 상기에서 수득된 봉입체를 용성화시키는 단계; 및 상기에서 수득된 단백질을 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하여 재접힘시키는 단계를 포함하는 TAT-A20 융합단백질의 제조방법을 특징으로 한다.

- [0047] 상기 TAT-A20 융합단백질의 제조방법 중 형질전환체를 배양하는 단계는, i) 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 제조하는 단계, ii) 상기 DNA 서열을 발현 벡터에 작동가능하게 융합되도록 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계, iii) 상기 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환시키는 단계, 및 iv) 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 배양하는 단계일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 TAT-A20 융합단백질을 제조함에 있어서, 먼저 i) 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 제조하는 단계를 수행할 수 있다. 세포 투과성 TAT 단백질 및 A20 단백질을 코딩하는 DNA 서열은 화학적 합성법, RT-PCR 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조할 수 있으나, 바람직하게는 목적 단백질의 DNA를 주형으로 하고, 상기 목적 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하는 PCR을 통하여 제조하는 것이 바람직하다. 상기 목적 유전자 증폭용 프라이머는 예를 들면, 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해, 나랑(Narang) 등의 포스포트리에스테르 방법, 보카지(Beaucage) 등의 디에틸포스포라미다이트 방법 및 미국 특허 제 4,458,066호의 고품질 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 다양한 방법으로 제조할 수 있다.
- [0049] 상기 TAT 단백질을 코딩하는 DNA 서열은 서열번호 1에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열일 수 있고, 이는 또한 서열번호 2에 기재된 염기서열 또는 그에 상보적인 염기서열일 수 있다. 바람직하게 상기 TAT 단백질에서 세포 투과성을 나타내는 것으로 알려진 폴리펩타이드는 YGRKKRRQRRR 이다.
- [0050] 또한, 상기 A20단백질을 코딩하는 폴리펩타이드 서열은 서열번호 3일 수 있고, 이를 암호화하는 A20의 염기서열은 서열번호 4일 수 있다.
- [0051] 다음으로, ii) 상기 DNA 서열을 발현 벡터에 작동가능하게 융합되도록 도입하여 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0052] 상기 융합을 위하여 TAT DNA는 예를 들어 유연성 링커 (flexible linker)를 사용하여 A20 DNA와 연결될 수 있다. 유연성 링커는 자유 회전을 부여하기 위하여 하나 또는 그 이상의 글라이신 (glycine) 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, TAT DNA는 A20 DNA로부터 10, 20, 또는 50개 아미노산 이상 간격을 둘 수 있다.
- [0053] 사용할 수 있는 링커의 유용성과 디자인은 이 기술분야에서 잘 알려져 있다. 특히 유용한 링커는 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 링커이다. 따라서, TAT, 펩타이드 링커, 및 A20을 코딩하는 합성 유전자를 제조할 수 있다. 이러한 디자인은 대규모의 합성 다수 TAT-A20 융합 단백질을 제조하기 위해 반복될 수 있다. 징크 핑거 도메인을 활용한 실시를 위해, 징크 핑거 사이에서 자연적으로 발견되는 펩타이드를 핑거들을 함께 연결하기 위한 링커로서 사용할 수 있다. 그러한 자연적으로 발견되는 링커로서 전형적인 것은 Thr-Gly-(Glu-Gln)-(Lys-Arg)-Pro-(Tyr-Phe)이다.
- [0054] 무작위 코일, α -나선 또는 β -주름의 3차 구조를 형성하는 추가적인 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 적합한 유연성 있는 링커를 형성하는 폴리펩타이드는 이 기술분야에서 잘 알려져 있다. 유연성 있는 링커는 전형적으로 글리신을 포함하는데, 이는 글리신이 측쇄가 결여되어 있어서 회전 자유도가 있는 유일한 아미노산이기 때문이다. 친수성을 증가시키기 위하여 세린 또는 트레오닌을 링커에 삽입할 수 있다. 아울러, 결합 친화도를 증가시키기 위해 DNA의 인산 골격과 상호작용할 수 있는 아미노산이 사용될 수 있다.
- [0055] 펩타이드 링커의 대용물은 다른 타입의 화학적 결합을 사용하는 링커이다. 따라서, TAT DNA 및 A20 DNA는 합성 비-펩타이드성 링커에 의해 연결될 수 있다. TAT를 포함하는 폴리펩타이드는 합성 반응에서 A20을 포함하는 폴리펩타이드에 결합될 수 있다. 동종(homo)- 또는 이종이기능성(heterobifunctional) 교차링커가 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 합성 링커는 세포 내에서 절단된다. 예를 들어, 합성 링커는 환원성 티올 결합을 포함한다. 합성 링커의 예는 BM[PEO]3 (1,8-비스-말레이미도트리에틸렌글리콜), OCOES (비스[2-(석신이미도옥시카보닐옥시)에틸]설폰), 및 DSG(디석신이미딜 글루타레이트)를 포함한다.
- [0056] TAT DNA는 A20 DNA를 기준으로 N- 또는 C-말단에 위치할 수 있다. 특정 DNA에 대하여 N- 또는 C-말단에 위치하는 것은 그 특정 DNA에 인접할 것을 요구하는 것은 아니다. 예를 들어, A20 DNA에 대하여 N-말단에 있는 TAT DNA는 스페이서 및/또는 다른 형태의 도메인에 의하여 A20 DNA로부터 분리될 수 있다. TAT DNA는 화학적으로 합성되어 링커 펩타이드의 존재 또는 부재 하에, 별도로 제조된 A20 DNA에 화학적으로 접합될 수 있다. 또한 복

수의 세투 투과성 도메인, 예를 들어 상이한 종류의 세포투과성 도메인 또는 2 카피 이상의 동일한 TAT DNA를 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 TAT-A20 융합단백질을 발현하기 위해 표준 재조합 핵산 방법이 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질을 코딩하는 핵산 서열이, 예를 들어, 적당한 시그널 및 프로세싱 서열 및 전사 및 번역을 위한 조절 서열과 함께, 핵산 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0058] 본 발명의 TAT-A20 융합단백질을 위한 재조합 발현 벡터는, 예를 들어 본 발명의 TAT-A20 융합단백질을 코딩하는 서열에 작동가능하도록 연결된 프로모터를 포함하는 조절서열을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 유도성 프로모터의 비제한적 예는 스테로이드-호르몬 반응성프로모터 (예, 엑디손(ecdysone)-반응성, 에스트로젠-반응성, 및 글루타코르티코이드-반응성 프로모터), 테트라사이클린 "Tet-on" 및 "Tet-Off" 시스템, 및 금속-반응성 프로모터를 포함한다. 이 구조물은 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 세균세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 조직 배양 세포 내로 도입될 수 있다. 이 구조물은 또한 모델 대상으로서 유전자 전이 유기체를 생성하기 위해 배아 줄기 세포 내로 도입될 수 있다. 많은 수의 적절한 벡터 및 프로모터가 당 분야의 숙련자들에게 공지되어 있고 본 발명의 재조합 구조물을 생성하기 위해 상업적으로 입수할 수 있다.

[0059] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 적절한 전사/번역 조절 시그널을 포함하는 벡터를 구축하기 위해 공지 방법을 사용할 수 있다. 이 방법들은 생체 외 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체 내 재조합/유전자 재조합을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001) 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)]에 기재된 기술 참조.

[0060] 다음으로, iii) 상기 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환시키는 단계를 수행할 수 있다.

[0061] 본 발명에 따른 TAT-A20 융합단백질의 DNA 서열을 발현시키는 데에는 매우 다양한 단핵세포성 숙주세포가 이용될 수 있다. 이들 숙주에는 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 마우스 세포와 같은 동물 세포, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포 및 조직배양된 인간 세포 및 식물 세포들이 포함된다. 바람직한 숙주 생명체로는 이. 콜라이 및 곤충 세포가 포함된다.

[0062] 본 발명에서 숙주세포로의 형질 전환 또는 형질감염은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO4) 침전, 염화 칼슘(CaCl2) 침전, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0063] 다음으로, iv) 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 배양하는 단계를 수행할 수 있다. 본 발명에 따라 형질전환된 숙주 세포들은 공지된 기술을 이용하여 융합 단백질의 생산에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 예를 들어, 세포들은 적당한 배지와 폴리펩타이드가 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지된 기술을 사용해서 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적절한 영양배지에서 일어난다. 적합한 배지는 상업적인 공급자로부터 입수하거나 예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있다. 융합 단백질이 배지로 직접 분리된다면 배지로부터 직접 분리할 수 있으며, 분리되지 않는다면 세포의 여액(lysate)으로부터 분리할 수 있다.

[0064] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 재조합 단백질을 생산하기 위해 TAT-A20의 cDNA를 pRSET 벡터에 클로닝하고 E. coli에서 발현하였다.

[0065] 본 발명에 TAT-A20 융합단백질의 제조방법의 다음 단계는 상기에서 수득된 배양액의 세포를 파쇄시켜 봉입체를 회수 및 세척하는 단계이다. 이 단계에서는, 원심분리 또는 여과에 의해 세포 펠렛(cell pellet)을 수득하고, 파열된 세포벽 또는 세포막이 포함된 배지 성분들을 제거함으로써 세포파쇄물(cell lysate)을 포함하는 용리액을 얻는다. 구체적으로, 세포펠렛은 당업계에 잘 알려진 방법, 예컨대 알칼리, 계면활성제 (CHAPS 및 SDS 등),

유기 용매 및 효소 (라이소자임 등)의 사용, 초음파처리(sonication) 및 고압분쇄기(French Press)의 사용, 주기적인 고온, 압력, 냉동 및 해동 사이클의 적용 등에 의하여 파쇄(lysis)할 수 있다. 상기에서 얻은 세포 파쇄물은 세포분획(fractionation)을 통해 세포 파쇄물 내의 바이오매스의 최소 영역을 제거함으로써 깨끗한 용리액을 얻을 수 있는데, 예컨대 원심분리를 통해 세포의 파쇄되지 않은 부분 또는 불용성 세포 파편이 없는 상층액을 취함으로써 깨끗한 용리액을 얻을 수 있으며, 필요하다면 기타 당업계에 알려진 정제과정을 거칠 수 있다. 일례로, 상기 세포를 파쇄하는 과정은 라이소자임을 이용할 수 있으며, 라이소자임을 이용해 E. coli를 깨뜨린 후 원심분리를 통해 봉입체를 회수하고 세제가 들어있는 완충액으로 수차례 세척하여 불순물을 제거한다.

[0066] 그 다음 단계는 상기에서 수득된 봉입체를 용성화시키는 단계이다. 용성화 시키는 방법은 당업자에게 알려진 통상의 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들어 변성제를 사용할 수 있다. 일례로 상기 용성화하는 단계는 변성제인 구아니딘 클로라이드 용액을 가하는 것일 수 있다. 상기 구아니딘 클로라이드 용액의 농도는 2 내지 15M, 바람직하게는 8M 일 수 있다.

[0067] 다음 단계는 상기에서 수득된 단백질을 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하는 과정을 특징으로 한다. 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하여 재접힘시키는 경우 TAT-A20 용합단백질의 정제율이 우수하다. 상기 완충액에 포함되는 아르기닌은 L-arginine으로 농도는 10mM 이상 10M 이하 일 수 있으며, 바람직하게는 100mM 내지 1M 이며, 특히 440mM 경우 가장 바람직하다. 또한 상기 완충액은 당업계에서 사용되는 통상의 완충액 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어 트리스, 염화나트륨, 염화칼륨을 포함할 수 있다. 완충액의 산도는 7 내지 8 정도, 그 중에서도 8.2 인 것이 정제율이 우수하다.

[0068] 또한 일례로 상기 용성화 단계에서 수득된 단백질을 크로마토그래피로 분리한 후 아르기닌이 포함된 완충액에 투석하는 과정을 거칠 수 있다. 본 발명에서 사용된 상기 분리 단계는 단백질의 분리에 통상적으로 사용되는 임의의 분리단계일 수 있다. 상기 분리단계는 역상 크로마토그래피 (e.g., HPLC), 크기-배제 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 및 전기영동 예를 들면 모세관 전기영동으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기술을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 상기 크로마토그래피는 Superdex 200을 이용한 사이즈배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)일 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 상기 상술한 TAT-A20 용합단백질 제조방법에 의하여 제조된 TAT-A20 용합단백질을 제공한다.

[0070] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 상술한 방법 중 어느 하나의 방법에 의하여 제조된 TAT-A20 용합단백질을 유효성분으로 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명의 약학적 조성물은 상기에서 제조한 TAT-A20 단백질에 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다. "약학적으로 허용되는 담체"는 임의의 또는 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 항박테리아 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 및 생리적으로 호환될 수 있는 유사한 것을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추, 상피의 투약 (예를 들어, 주사 또는 주입)에 적합한 것이다. 투약의 경로에 따라, 활성 물질은 그 물질을 불활성화 할 수 있는 산 혹은 다른 자연적 환경의 작용으로부터 그 물질을 보호하기 위한 재료 내에 코팅될 수 있다.

[0072] "약학적으로 허용되는 염"은 원 물질의 바람직한 생물학적 활성을 유지하고 어떠한 바람직하지 않은 독성 효과를 주지 않는 염을 지칭한다. 이러한 염의 예에는 산부가염 (acid addition salt)과 염기부가염 (base addition salt)을 포함한다. 산부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 3가 인산 등으로부터 유도된 무독성 무기산 뿐 아니라 지방족 모노- 및 다이카복실산, 페닐로 치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족 산들, 지방족 및 방향족 술폰산 등과 같은 무독성 유기산으로부터 유래된 염을 포함한다. 염기부가염은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등의 알칼리 토금속에서 유도된 것 뿐 아니라 N,N'-다이벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 다이에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등의 무독성 유기아민으로부터 유도된 것을 포함한다.

[0073] 약학 조성물은 다양한 형태가 될 수 있다. 이들은 예를 들어, 액체 용액 (예를 들어 주사 또는 주입 가능한 용액), 분산제 또는 현탁제, 정제, 환제, 분말제, 리포솜 및 좌약과 같은 액체, 반고체 및 고체 제형을 포함한다. 상기 제형은 목적하는 투여의 방법과 치료적 적용에 따라 달라진다. 조성물은, 예를 들어 조성물을 안정화시키기 위해, 음이온성 또는 음전하를 띤 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 폴리A-폴리T DNA 이중나선의

작은 단편을 포함할 수 있다.

- [0074] 통상적인 조성물은 인체에 항체를 투여하기 위해 사용되는 것과 유사한 조성물과 같은 주사 또는 주입 가능한 용액의 형태이다. 통상적인 투여 방법으로 비경구 (예를 들어 정맥내, 피하, 복강내, 근육내) 투여가 있다. 한 구현예에서, TAT-A20 융합단백질은 정맥내 주입 또는 주사에 의하여 투여된다. 다른 구현예에 있어서, TAT-A20 융합단백질은 근육 내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 예시적인 투여 경로는 경구 투여, 표피 조직(예, 피부) 또는 점막 (예, 눈) 투여, 또는 흡입을 포함한다. 다른 투여 경로가 역시 사용될 수 있다.
- [0075] 여러 적용에 있어서 투여의 경로/방법은 정맥 주사 또는 주입이지만, TAT-A20 융합단백질은 공지의 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료적 적용을 위하여, TAT-A20 융합단백질은 30, 20, 10, 5, 3, 1, 또는 0.1 mg/분 이하 속도의 정맥 주입으로 투여되어 1 내지 100 mg/m², 7 내지 25 mg/m², 또는 0.5 내지 15 mg/m²의 양을 투여할 수 있다. 투여의 경로 및/또는 방법은 기대하는 결과에 따라 달라질 수 있다. 어떤 실시예에 있어서는 활성 성분은 신속한 방출로부터 성분을 보호할 수 있는, 예를 들어 조절성 방출 제형, 즉, 이식, 미세캡슐 전달 시스템과 같은 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리엔하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스터 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 폴리머들이 사용될 수 있다.
- [0076] 약학적 조성들은 공지의 의료 기구로 투여될 수 있다. 예를 들어, 약학적 조성물은 미국 특허 제5,399,163호에 개시된 기구와 같은 바늘없는 피하주사 기구로 투여될 수 있다. 본 발명에서 잘 알려진 유용한 이식장치와 모듈은 서방성 속도로 약물을 분산시키기 위한, 이식가능한 미세-주입 펌프 (미국 특허 제4,487,603호); 피부를 통과하여 약을 투여하는 치료기구(미국 특허 제4,486,194호); 정확한 주입 속도로 약을 전달하기 위한 약물 주입 펌프 (제4,447,233호); 지속적인 약 전달을 위한 가변 유속 이식 가능한 주입 장치 (제4,447,224호); 다중 챔버 분획을 가지는 삼투성 약물 전달 시스템 (제4,439,196호); 및 삼투성 약물 전달 시스템 (제4,475,196호)을 포함한다. 많은 다른 이식체, 전달 시스템, 그리고 모듈도 역시 잘 알려져 있다.
- [0077] 약학적 조성물은 "치료적으로 효과적인 양" 또는 "예방적으로 효과적인 양"의 TAT-A20 융합단백질을 포함할 수 있다. "치료적으로 효과적인 양"은 투여량 및 필요한 시간 주기에서 바람직한 치료 결과를 얻을 수 있는 유효한 양을 지칭한다. 조성물의 치료적으로 효과적인 양은 개인의 질병의 단계, 연령, 성별, 및 체중에 따라, 그리고 상기 TAT-A20 융합단백질이 개인에서 바람직한 반응을 도출하는 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료적으로 효과적인 양은 또한 치료적으로 유익한 효과를 제공하는 것이며, 통상적으로 조성물의 임의의 독성 또는 해로운 효과보다 유익한 효과가 더 큰 양이다.
- [0078] "예방적으로 효과적인 양"은 투여량 및 필요한 시간 주기 동안 바람직한 예방적 결과를 달성하기 위하여 효과적인 양을 지칭한다. 전형적으로, 예방적 투여는 질병의 초기 단계 이전 또는 초기 단계에서 사용되기 때문에, 예방적으로 효과적인 양은 치료적으로 효과적인 양보다 적을 것이다.
- [0079] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0080] **[실시예1] 융합단백질을 발현하는 형질전환체의 제작, 발현, 정제**

[0081] 1) 제작

[0082] 연구에 사용한 A20 단백질과 세포투과형 TAT-A20 단백질은 모두 단백질 분리에 이용되는 polyhistidine tag(His, HHHHHH)과 검출에 이용되는 hemagglutinin tag(HA, YPYDVPDYA)을 포함하도록 설계되었다(도 1).

[0083] TAT-A20은 별도로 HIV-1 TAT 단백질의 세포투과 서열(YGRKKRRQRRR)을 가지도록 클로닝 하였다(도 2). 보다 구체적으로 A20의 발현벡터를 제조하기 위해 A20의 cDNA를 세균 발현벡터인 pRSET에 클로닝하였다. pRSET 플라스미드(Invitrogen, Carlsbad, USA)는 T7 promoter와 6xHis tag을 포함하고 있어 우리는 벡터에 세포막 투과를 위한 HIV-1 transactivator의 Tat 서열(YGRKKRRQRRR)과 단백질 검출을 위한 hemagglutinin(HA) tag 서열(YPYDVPDYA)을 가진 oligonucleotide를 합성하여 pRSET에 삽입하였다(보충표1, Tat-HA). 이 서열에는 5' 쪽에 BamHI, 3' 쪽에 SacI과 BglII 제한효소 절단부위를 가지며, Tat 서열과 HA 서열 사이에는 XhoI 절단 부위를 가지도록 합성하였다. PCR을 통해 증폭한 Tat-HA oligoDNA의 양쪽 끝을 BamHI과 BglII로 잘라 접합부위를 만들고,

같은 제한효소로 자른 pRSET 벡터와 접합(ligation)하였다. 이를 E. coli DH5 α에 이식하여 pRSET-His-Tat-HA의 제조합 클론을 얻었다. 다음단계로 A20의 cDNA를 얻기 위해 사람 단구계열 세포주인 THP-1세포를 PMA/ionomycin으로 자극한 후 세포용해액으로부터 총RNA를 분리하였다. 역전사 효소와 oligo-dT와 random primer를 이용해 전체 cDNA를 제조한 후, A20 특이서열을 가진 하기 표 1의 프라이머 쌍을 이용하여 790개의 아미노산 서열을 가진 A20 cDNA를 증폭하여 분리하였다. 증폭을 위한 PCR은 DNA 중합효소(Takara, PrimeSTAR HS) 1unit, dNTP 각 2.5 mM, primer 각 0.2 μM, cDNA 0.1 μg, 1x 효소완충액이 반응액을 98℃ 5분 변성 후, 35 cycle의 증폭(98℃ 10초, 65℃ 15초, 72℃ 1분), 72℃ 3분간 반응시켜 진행하였다. 증폭에 사용한 primer는 5' 위치에 BglII, 3' 위치에 EcoRI 제한효소 절단부위를 가지도록 고안되어 PCR로 증폭한 DNA를 두 효소로 절단하여 접합부위를 만들고, 같은 제한효소로 자른 pRSET-His-Tat-HA 벡터와 접합하였다. 이를 E. coli DH5 α에 이식하여 pRSET-His-Tat-HA-A20의 제조합 클론을 얻었다. 실험에 대조군으로 사용하기 위해 Tat 서열이 없는 A20의 발현을 위한 벡터(pRSET-His-HA-A20)는 pRSET-His-Tat-HA-A20 플라스미드를 Tat 서열의 5' '과 3' 위치에 있는 BamHI과 XhoI 제한효소 부위를 각각의 효소로 자른 후 oligonucleotide linker(표1)를 삽입한 후 접합하여 제조하였다. 합성된 각각의 플라스미드 벡터는 DNA 서열 결정을 통해 모두 올바르게 클로닝 된 것을 확인하였다.

표 1

프라이머 서열

[0084]

이름	서열
Tat-HA (sense)	5 '-CGC GGA TCC GGT TAC GGT CGT AAA AAA CGT CGT CAG CGT CGT GGT CTC GAG TAC CCG TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT GAG CTC AAG ATC TGC GCG-3'
Tat-HA (anti-sense)	5'-CGC GCA GAT CTT GAG CTC-3'
A20 (sense)	5'-GCC AGA TCT GCA TGG CTG AAC AAG TCC TT-3'
A20 (anti-sense)	5'-GCG GAA TTC TTA GCC ATA CAT CTG CTT-3'
BamHI/XhoI linker	5'-GA TTC GGT GGT C-3', 5'-TC GAG ACC ACC G-3'

[0085]

2) 발현

[0086]

배양으로 얻어진 단백질을 전기영동을 통하여 융합단백질의 합성을 확인하였다. 융합단백질의 예상 사이즈는 94kD 이다(도 3).

[0087]

3) 정제

[0088]

상기에서 수득한 배양액을 라이소자임을 이용해 대장균을 깨뜨린 후 원심분리를 통해 봉입체(inclusion body)를 회수하고 세제가 들어있는 완충액으로 수차례 세척하여 불순물을 제거하였다.

[0089]

분리된 봉입체에 변성제인 8 M 구아니딘염산(guanidine hydrochloride) 용액을 가하여 제조합 단백질을 용성화(solubilize) 하였다. 전기영동을 하여 단백질 용성화를 확인하였다(도 4).

[0090]

이후 용성화된 단백질을 Superdex 200 크로마토그래피를 이용하여 더 분리(사이즈배제 크로마토그래피)한 후, 완충액에서 투석하여 재접힘(refolding)을 시행하였다. 완충액의 종류에 따른 정제 순도를 비교하기 위하여, 다음과 같은 완충액을 가하여 투석하였다.

표 2

[0091]

구분	아르기닌 (L-arginine)	구아니딘 (guanidine)	트리스 (Tris)	염화나트륨 (NaCl)	염화칼륨 (KCl)	EDTA	글루타치온(환원형)	글루타치온(산화형)	pH
완충액1	-	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2	400mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액3	800mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액4	-	500mM	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액5	400mM	500mM	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액6	800mM	500mM	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액7	-	1M	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액8	400mM	1M	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2

완충액9	800mM	1M	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-1	-	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-2	100mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-3	200mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-4	300mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-5	400mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-6	600mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2
완충액2-7	800mM	-	50mM	20mM	0.8mM	1mM	2mM	1mM	8.2

[0092] 상기 각 완충액을 사용하여 실험한 결과는 도 5에 도시하였다. 실험결과 아르기닌을 포함하는 완충액을 사용하는 경우 단백질 수율이 많았으며, 특히 완충액2-6을 사용한 경우가 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 다른 성분의 조합으로 이루어진 완충액에 비해 2-6의 완충액을 사용하는 것이 가장 활성이 좋은 A20 단백질을 높은 수율로 수득할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0093] 상기 사이즈배제 크로마토그래피는 4M 구아니딘염산 완충액을 사용하여 수행하였으며, 시간대별 분리결과는 도 6에 도시하였다.

[0094] 상기의 변성과 재접힘 과정을 거친 단백질을 전기영동 하여 대장균 추출액과 함께 전기영동 한후 단백질 염색을 한 결과 80% 이상의 순도를 나타내었다 (도 7).

[0095] 이하 실험에서는 최적 완충액인 완충액 2-6을 사용하여 제조한 융합단백질로 진행하였다.

[0096] **[실시예 2] NF-κB 활성화 실험**

[0097] 1) 실험방법

[0098] 본 발명의 TAT-A20 융합단백질이 NF-κB 활성화에 미치는 효과를 알아보기 위해 NF-κB 기자유전자(reporter gene)를 가진 플라스미드인 IgB-Luc을 대조 기자유전자인 -actin/-gal 벡터와 함께 HEK293 세포에 이식하여 2일간 배양하였다. 일부 세포군에 A20(대조군)와 본 발명의 실시예(TAT-A20)를 농도별로 가해 1시간 배양하고, 염증성 사이토카인으로 NF-κB 활성을 유도하는 물질로 알려진 TNF를 세포에 가하고 6시간을 더 배양하였다. 세포를 용해한 후 NF-κB 활성화에 의해 유도된 luciferase 활성을 assay system(Promega)을 이용하여 luminometry를 통해 측정하였다. 별도로 세포 용해액 내 갈락토시데이즈 활성을 측정하여 루시퍼레이즈 측정값을 보정하였다.

[0099] 또한, TAT-A20의 저해효과가 지속적으로 나타나는지 알아보기 위하여, 상기 HEK 세포에 3 g/ml 농도의 본 발명의 실시예(TAT-A20)를 가한 후 종양괴사인자(TNF)로 자극한 후 시간에 따른 루시퍼레이즈 발현을 측정하였다. TNF만을 처리한 무처리군, TNF와 A20 단백질을 처리한 대조군과 비교하였다.

[0100] 2) 실험결과

[0101] 실험 결과, 본 발명의 TAT-A20 융합단백질은 처리 농도에 따른 저해효과를 나타낸 반면, 대조군인 A20의 경우는 같은 농도 범위에서 실시예에 비해 낮은 저해 효과를 나타내었다(도 8).

[0102] TNF 자극 후 시간에 따른 NF-κB 기자유전자 발현을 측정한 결과, 그 효과는 24시간 후에도 나타나는 것을 알 수 있었다 (도 9).

[0103] **[실시예3] 융합단백질의 NF-κB 활성 억제 기전 확인실험**

[0104] 1) 실험방법

[0105] TAT-A20에 의한 NF-κB 활성화 저해가 나타나는 기전을 알아보기 위해 HEK293 세포에 A20(대조군)와 TAT-A20를 가한 후 NF-κB 활성유도물질인 TNF로 자극하였다.

[0106] 평상시 전사인자 NF-κB는 세포질내에서 IκBα(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) 단백질과 결합하여 비활성 상태로 있다가, TNF α 나 지질다당류 등 염증유도 물질로

세포가 자극을 받으면 NF-κB 신호경로가 활성화되며 IκBα가 분해되고, 이어 IκBα로부터 풀려난 NF-κB가 핵 내로 이동하게 된다. p65 단백질은 NF-κB를 구성하는 아단위이다.

[0107] NF-κB의 핵으로의 이동을 알아보기 위해 HEK293 세포를 TNF로 자극한 후 세포를 용해하여 핵 추출액을 분리하고 p65 단백질 함량을 웨스턴 블롯을 이용하여 측정하였다. 대조 단백질로는 핵 단백질인 뉴클레오포린(nucleoporin)을 측정하였다.

[0108] 2) 실험결과

[0109] NF-κB p65의 핵으로의 이동은 본 발명의 융합단백질을 처리한 실시예가 대조군(A20)에 비해 뚜렷하게 저해하였다(도 10). 이는 본 발명의 융합단백질이 IκBα 분해 등 NF-κB 핵 이동의 상위단계를 저해하여 NF-κB의 활성화를 저해하는 것을 의미한다.

[0110] [실시예4] 융합단백질의 세포내 유입 확인실험

[0111] 1) 실험방법

[0112] 생산된 재조합 단백질이 세포 내로 들어가는지 알아보기 위해 대조군(A20)과 본 발명의 실시예(TAT-A20)를 형광물질인 플루오레세인이소티오시안염(fluorescein isothiocyanate, FITC)와 반응시켜 형광으로 표시된 재조합 단백질을 제조하였다. 형광 표시된 대조군(A20)과 본 발명의 실시예(TAT-A20) 각 1 g/ml 농도로 대식세포인 RAW264.7 세포에 가하고 1시간 배양한 후, 세포를 인산완충식염수로 수 차례 세척하였다.

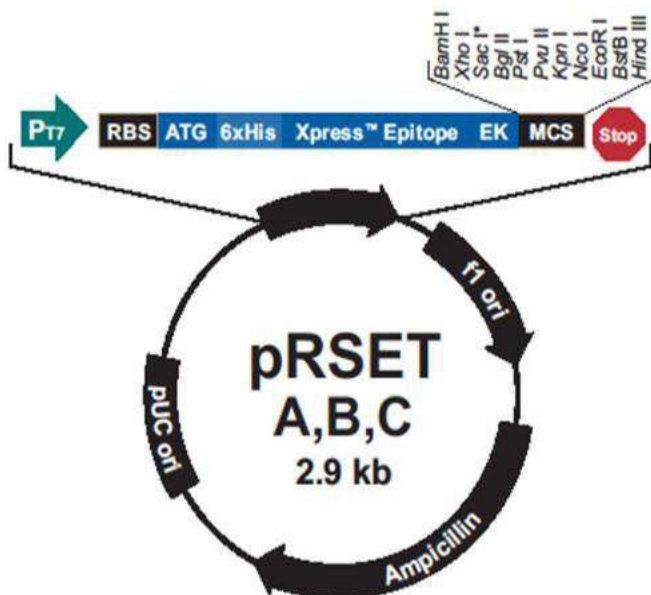
[0113] 2) 실험결과

[0114] 세포를 광학현미경(LM)과 형광현미경(FITC)에서 관찰하여 본 결과 측정된 농도에서 본 발명의 실시예(TAT-A20)는 세포 내로 유입되었으나, 대조군(A20)의 경우 세포 내 유입이 적은 것을 확인할 수 있었다(도 11).

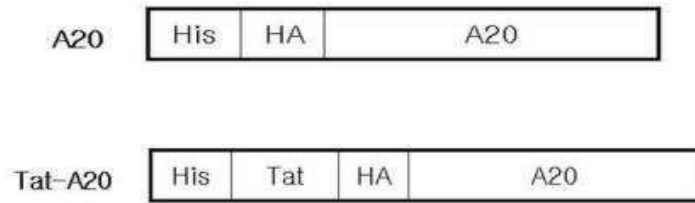
[0115] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

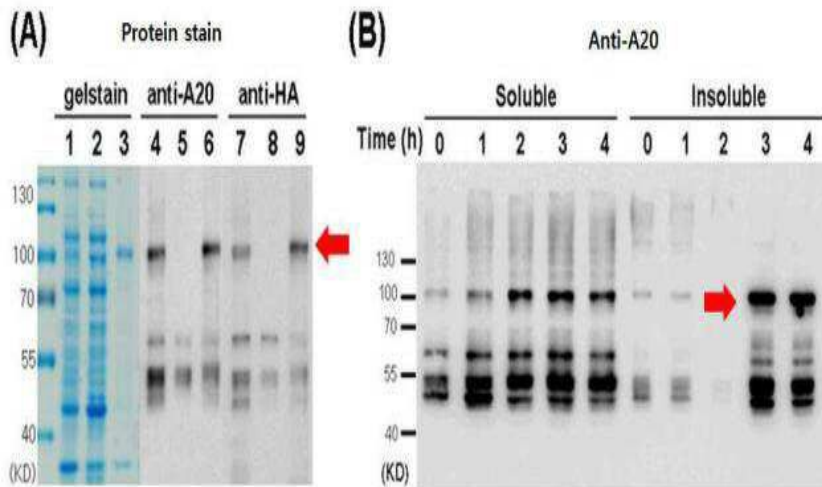
도면1



도면2

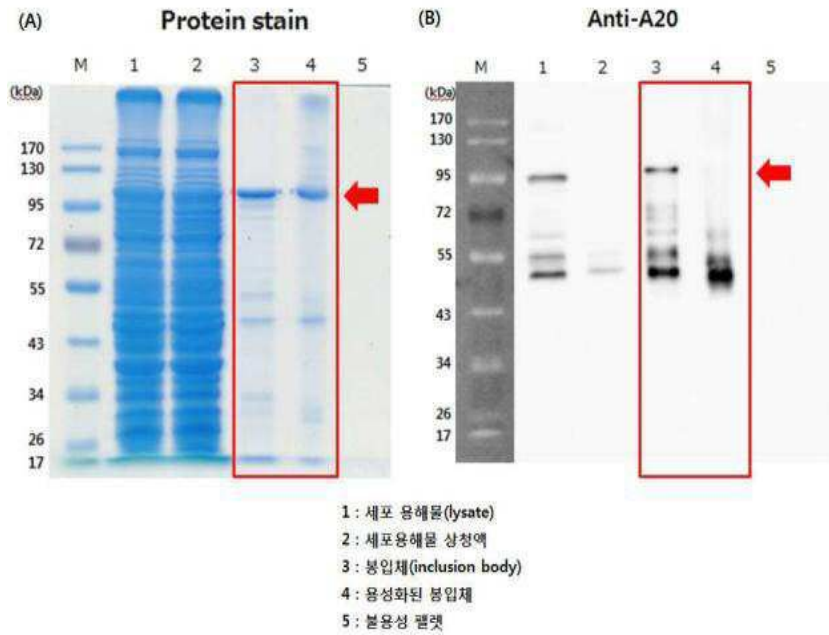


도면3

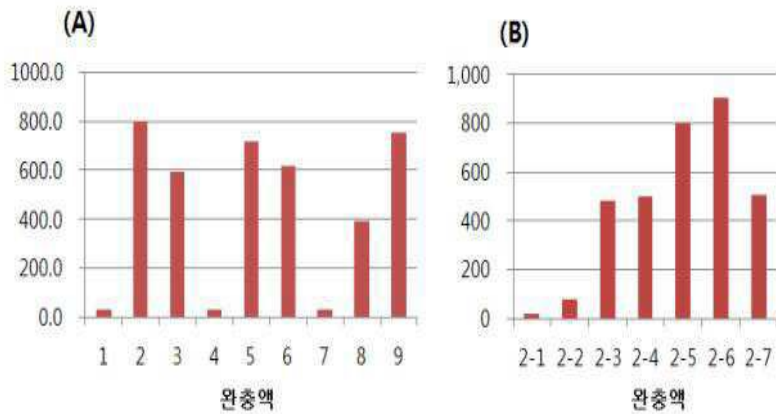


Lane 1,4,7 : 총 세포용해물 (lysate)
 Lane 2,5,8 : 상청액
 Lane 3,6,9 : 펠렛

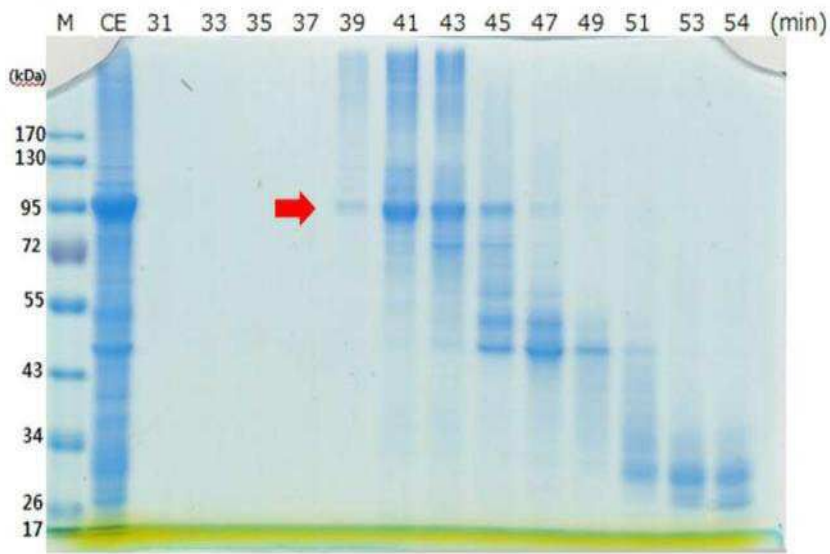
도면4



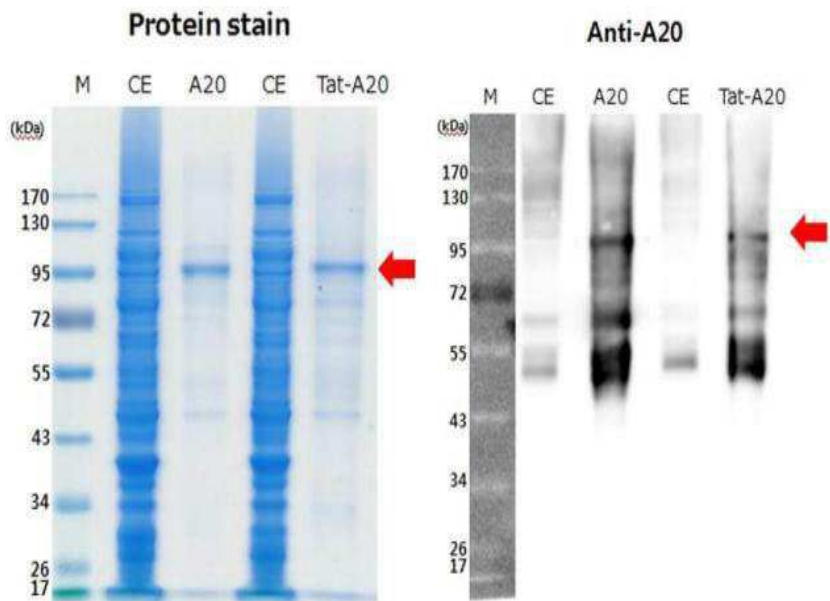
도면5



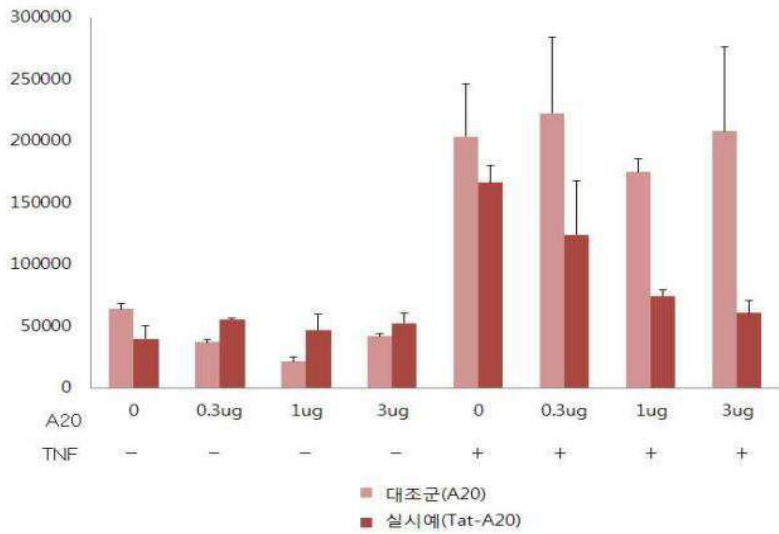
도면6



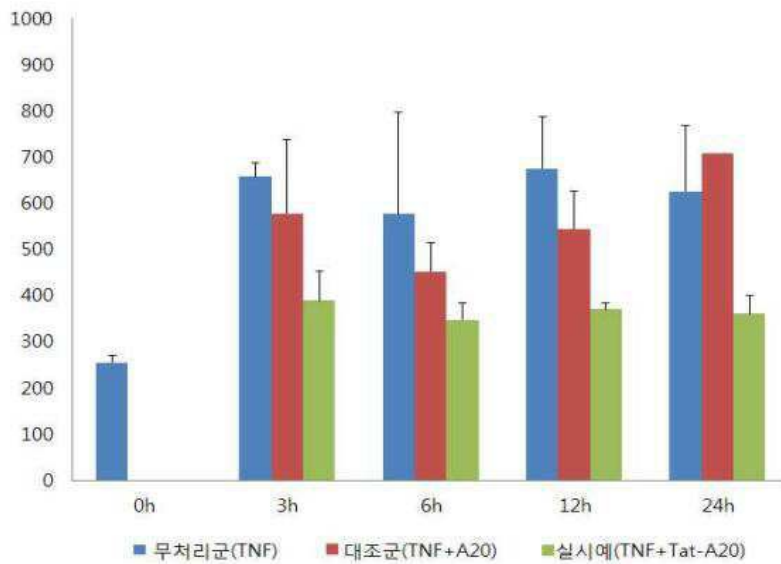
도면7



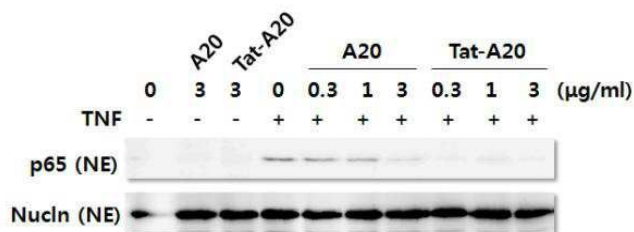
도면8



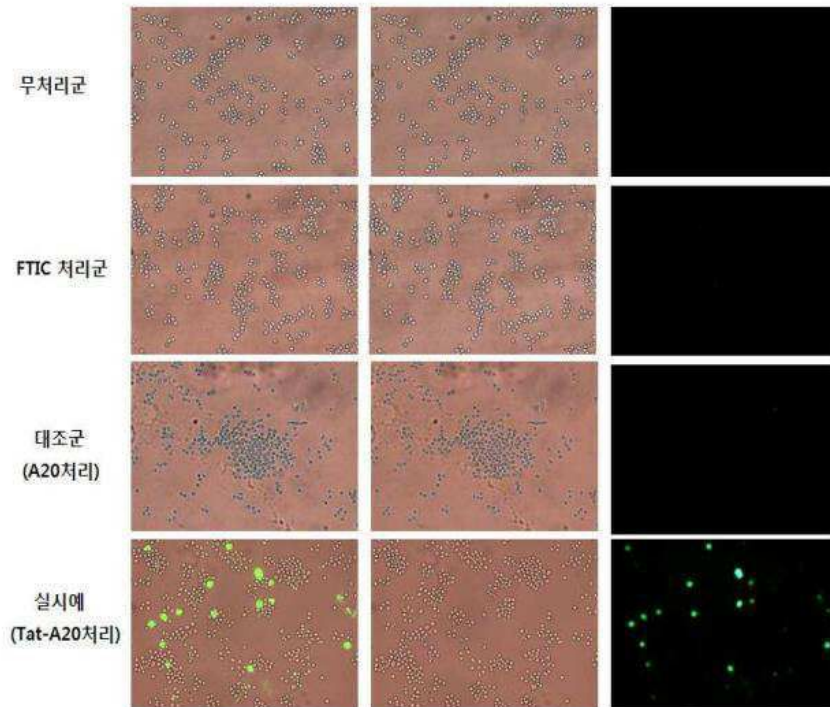
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Catholic University
- <120> Methods of TAT-A20 fusion protein with good cell penetration and use thereof
- <130> PN1405-153
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> TAT polypeptide sequence
- <400> 1

Thr Tyr Arg Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala

1 5 10 15

Arg Gly Ala Arg Gly Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg

20 25 30

Gly

<210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> TAT polynucleotide sequence
 <400> 2

tacggtcgta aaaaacgtcg tcagcgtcgt cgt

33

<210> 3
 <211> 790
 <212> PRT
 <213> A20 amino acid sequence
 <400> 3

Met Ala Glu Gln Val Leu Pro Gln Ala Leu Tyr Leu Ser Asn Met Arg

1 5 10 15

Lys Ala Val Lys Ile Arg Glu Arg Thr Pro Glu Asp Ile Phe Lys Pro

20 25 30

Thr Asn Gly Ile Ile His His Phe Lys Thr Met His Arg Tyr Thr Leu

35 40 45

Glu Met Phe Arg Thr Cys Gln Phe Cys Pro Gln Phe Arg Glu Ile Ile

50 55 60

His Lys Ala Leu Ile Asp Arg Asn Ile Gln Ala Thr Leu Glu Ser Gln

65 70 75 80

Lys Lys Leu Asn Trp Cys Arg Glu Val Arg Lys Leu Val Ala Leu Lys

85 90 95

Thr Asn Gly Asp Gly Asn Cys Leu Met His Ala Thr Ser Gln Tyr Met

100 105 110

Trp Gly Val Gln Asp Thr Asp Leu Val Leu Arg Lys Ala Leu Phe Ser

115 120 125

Thr Leu Lys Glu Thr Asp Thr Arg Asn Phe Lys Phe Arg Trp Gln Leu

130 135 140

Glu Ser Leu Lys Ser Gln Glu Phe Val Glu Thr Gly Leu Cys Tyr Asp

145 150 155 160

Thr Arg Asn Trp Asn Asp Glu Trp Asp Asn Leu Ile Lys Met Ala Ser

	165	170	175	
Thr Asp Thr Pro Met Ala Arg Ser Gly Leu Gln Tyr Asn Ser Leu Glu				
	180	185	190	
Glu Ile His Ile Phe Val Leu Cys Asn Ile Leu Arg Arg Pro Ile Ile				
	195	200	205	
Val Ile Ser Asp Lys Met Leu Arg Ser Leu Glu Ser Gly Ser Asn Phe				
	210	215	220	
Ala Pro Leu Lys Val Gly Gly Ile Tyr Leu Pro Leu His Trp Pro Ala				
225	230	235	240	
Gln Glu Cys Tyr Arg Tyr Pro Ile Val Leu Gly Tyr Asp Ser His His				
	245	250	255	
Phe Val Pro Leu Val Thr Leu Lys Asp Ser Gly Pro Glu Ile Arg Ala				
	260	265	270	
Val Pro Leu Val Asn Arg Asp Arg Gly Arg Phe Glu Asp Leu Lys Val				
	275	280	285	
His Phe Leu Thr Asp Pro Glu Asn Glu Met Lys Glu Lys Leu Leu Lys				
	290	295	300	
Glu Tyr Leu Met Val Ile Glu Ile Pro Val Gln Gly Trp Asp His Gly				
305	310	315	320	
Thr Thr His Leu Ile Asn Ala Ala Lys Leu Asp Glu Ala Asn Leu Pro				
	325	330	335	
Lys Glu Ile Asn Leu Val Asp Asp Tyr Phe Glu Leu Val Gln His Glu				
	340	345	350	
Tyr Lys Lys Trp Gln Glu Asn Ser Glu Gln Gly Arg Arg Glu Gly His				
	355	360	365	
Ala Gln Asn Pro Met Glu Pro Ser Val Pro Gln Leu Ser Leu Met Asp				
	370	375	380	
Val Lys Cys Glu Thr Pro Asn Cys Pro Phe Phe Met Ser Val Asn Thr				
385	390	395	400	
Gln Pro Leu Cys His Glu Cys Ser Glu Arg Arg Gln Lys Asn Gln Asn				
	405	410	415	
Lys Leu Pro Lys Leu Asn Ser Lys Pro Gly Pro Glu Gly Leu Pro Gly				

Tyr Cys Gln Lys Cys Phe Ile Glu Ala Gln Asn Gln Arg Phe His Glu
 675 680 685
 Ala Lys Arg Thr Glu Glu Gln Leu Arg Ser Ser Gln Arg Arg Asp Val
 690 695 700
 Pro Arg Thr Thr Gln Ser Thr Ser Arg Pro Lys Cys Ala Arg Ala Ser
 705 710 715 720
 Cys Lys Asn Ile Leu Ala Cys Arg Ser Glu Glu Leu Cys Met Glu Cys
 725 730 735
 Gln His Pro Asn Gln Arg Met Gly Pro Gly Ala His Arg Gly Glu Pro

740 745 750
 Ala Pro Glu Asp Pro Pro Lys Gln Arg Cys Arg Ala Pro Ala Cys Asp
 755 760 765
 His Phe Gly Asn Ala Lys Cys Asn Gly Tyr Cys Asn Glu Cys Phe Gln
 770 775 780

Phe Lys Gln Met Tyr Gly
 785 790

<210> 4

<211> 2373

<212> DNA

<213> A20 cDNA sequence

<400> 4

atggctgaac aagtccttcc tcaggctttg tatttgagca atatgcggaag agctgtgaag 60

atacgggaga gaactccaga agacatTTTT aaacctacta atgggatcat tcatcatttt 120

aaaaccatgc accgatacac actggaatg ttcagaactt gccagttttg tcctcagttt 180

cgggagatca tccacaaagc cctcatcgac agaaacatcc aggccaccct ggaaagccag 240

aagaaactca actgggtgtcg agaagtccgg aagcttgtgg cgctgaaaac gaacggtgac 300

ggcaattgcc tcatgcatgc cacttctcag tacatgtggg gcgttcagga cacagacttg 360

gtactgagga aggcgctgtt cagcacgctc aaggaaacag acacacgcaa cttaaattc 420

cgctggcaac tggagtctct caaatctcag gaatttgttg aaacggggct ttgctatgat 480

actcggaact ggaatgatga atgggacaat cttatcaaaa tggtttccac agacacaccc 540

atggcccgaa gtggacttca gtacaactca ctggaagaaa tacacatatt tgcctttgc 600

aacatcctca gaaggccaat cattgtcatt tcagacaaaa tgctaagaag ttggaatca 660

ggttccaatt tcgccccttt gaaagtgggt ggaatttact tgcctctcca ctggcctgcc 720
 caggaatgct acagataccc cattgttctc ggctatgaca gccatcattt tgtacccttg 780
 gtgaccctga aggacagtgg gcctgaaatc cgagctgttc cacttgtaa cagagaccgg 840
 ggaagatttg aagacttaaa agttcacttt ttgacagatc ctgaaaatga gatgaaggag 900
 aagctcttaa aagagtactt aatggtgata gaaatccccg tccaaggctg ggacatggc 960

 acaactcacc tcactcaatgc cgcaaagttg gatgaagcta acttacaaa agaatcaat 1020
 ctggtagatg attactttga acttgttcag catgagtaca agaaatggca ggaaaacagc 1080
 gagcagggga ggagagaggg gcacgcccag aatcccatgg aaccttccgt gccccagctt 1140
 tctctcatgg atgtaaaatg tgaaacgccc aactgcccct tcttcatgtc tgtgaacacc 1200
 cagcctttat gccatgagtg ctgagagagg cggcaaaaga atcaaaaca actcccaaag 1260
 ctgaactcca agccggggccc tgaggggctc cctggcatgg cgctcggggc ctctcgggga 1320
 gaagcctatg agcccttggc gtggaaccct gaggagtcca ctggggggcc tcattcggcc 1380

 ccaccgacag caccagccc ttttctgttc agtgagacca ctgccatgaa gtgcaggagc 1440
 cccgctgcc cttcacact gaatgtgcag cacaacggat tttgtgaac ttgccacaac 1500
 gcccggcaac ttacgccc ccacgcccc gaccacaca ggcaacttga tcccgggaag 1560
 tgccaagcct gcctccagga tgttaccagg acatttaatg ggatctgcag tacttgcttc 1620
 aaaaggacta cagcagaggg ctctccagc ctgagcacca gcctccctcc ttcctgtcac 1680
 cagcgttcca agtcagatcc ctgcggctc gtccggagcc cctccccgca ttcttgccac 1740
 agagctggaa acgacgcccc tgetggtgc ctgtctcaag ctgcacggac tctggggac 1800

 aggacgggga cgagcaagtg cagaaaagcc ggctgcgtgt atttgggac tccagaaaac 1860
 aagggtttt gcacactgtg tttcatcgag tacagagaaa acaaacattt tgetgctgcc 1920
 tcagggaaag tcagteccac agcgtccagg ttccagaaca ccattccgtg cctggggagg 1980
 gaatcggca cccttgaag caccatgttt gaaggatact gccagaagtg tttcattgaa 2040
 gctcagaatc agagatttca tgaggccaaa aggacagaag agcaactgag atcgagccag 2100
 cgagagatg tgctcgaac cacacaaagc acctcaagge ccaagtgcgc cgggctctcc 2160
 tgcaagaaca tcttggcctg ccgacgag gagctctgca tggagtgtca gcatccaac 2220

 cagaggatgg gccttggggc ccaccggggt gacctgccc ccgaagacc ccccaagcag 2280
 cgttgccggg cccccgctg tgatcatttt ggcaatgcca agtgcaacgg ctactgcaac 2340
 gaatgcttc agttcaagca gatgtatggc taa 2373