



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년08월18일  
(11) 등록번호 10-0852415  
(24) 등록일자 2008년08월08일

(51) Int. Cl.

C07K 2/00 (2006.01) C07K 4/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-0054447

(22) 출원일자 2004년07월13일

심사청구일자 2004년07월13일

(65) 공개번호 10-2006-0005595

(43) 공개일자 2006년01월18일

(56) 선행기술조사문헌

논문

KR1020030086779 A

(73) 특허권자

재단법인서울대학교산학협력재단

서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지

(72) 발명자

정중평

서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대 치대

장준혁

서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대 치대

정필훈

서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대 치대

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

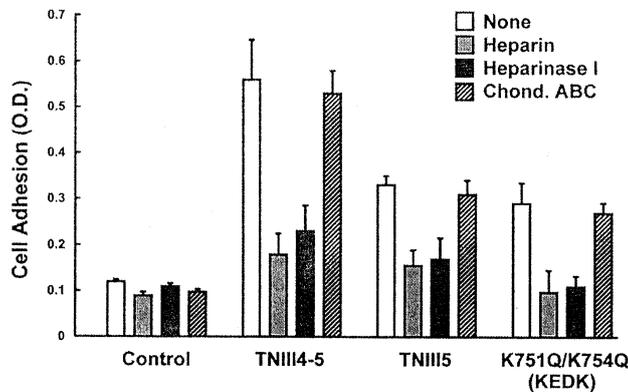
심사관 : 양희용

(54) 인간 테나신-C 유래의 신규한 헤파린-결합부위를포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체

(57) 요약

본 발명은 인간 테나신-C(tenascin-C, TN) 유래의 신규한 헤파린-결합부위(heparin-binding site)를 포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체에 관한 것으로, 구체적으로 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)의 결합부위를 포함하고 테나신-C 타입 III 도메인 5(TNIII5)에 대한 HSPG-의존성 세포 부착 활성을 증가시키며, 테나신-C 타입 III 도메인 4(TNIII4)의 아미노산 서열 일부를 포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 헤파린에 높은 친화력을 가지고 결합하고 세포의 부착을 증진 시키므로 세포부착용 펩타이드로 유용하게 사용될 수 있다

대표도 - 도4



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

헤파린 결합부위로 서열번호 3의 KEDK 아미노산 서열을 포함하고 인간 테나신 C의 하이브로넥틴 타입 III 도메인 4(TNIII4)로 구성되는 헤파린-결합활성을 갖는 폴리펩타이드.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 헤파린 결합부위는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)에 결합하는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 테나신-C 타입 III 도메인 5 (TNIII5)의 헤파린-결합부위와 함께 공동 기작(cooperative mechanism)에 의해 테나신-C의 헤파린-결합 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 테나신-C 타입 III 도메인 5(TNIII5)에 대한 HSPG-의존성 세포 부착활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

헤파린 결합부위로 서열번호 3의 KEDK 아미노산 서열을 포함하고 인간 테나신 C의 하이브로넥틴 타입 III 도메인 4(TNIII4) 및 5(TNIII5)로 구성되는 헤파린-결합 활성을 갖는 폴리펩타이드.

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

<12> 본 발명은 인간 테나신-C(tenascin-C, TN) 유래의 신규한 헤파린-결합부위(heparin-binding site)를 포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)의 결합부위를 포함하고 테나신-C 타입 III 도메인 5(TNIII5)에 대한 HSPG-의존성 세포 부착활성을 증가시키며, 테나신-C 타입 III 도메인 4(TNIII4)의 아미노산 서열 일부를 포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체에 관한 것이다.

<13> 테나신-C(TN)는 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 피브로넥틴 타입 III 도메인(FNIII) 및 피브리노겐과 상동성을 갖는 도메인들이 일직선상으로 배열된 거대한 세포외 기질(ECM) 당단백질이다(Jones FS, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6497-6501, 1990; Jones FS, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:

2186-2190, 1988). 인간 테나신-C 유전자(GenBank Accession NO: NM\_002160)는 **서열번호 1**로 기재되는 7560 bp의 염기서열을 가지며, 이로부터 **서열번호 2**로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩한다. 테나신-C는 헥사브라키온(hexabrachion)이라 불리는 방사상으로 배열된 여섯 개의 가지 구조 내에 여섯 개의 동일한 아형들로 구성된 올리고머 구조(oligomeric structure)를 갖는다 (Erickson HP, et al., *Nature* 311: 267-269, 1984). 각각의 아형은 FNIII 도메인 8 내지 15를 포함하는 일련의 작은 구형의 도메인들로 존재한다(Gulcher JR, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9438-9442, 1991; Erickson HP, et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 869-876, 1993). FNIII는 세포 표면 수용체들 및 세포 부착 분자들을 포함하는 매우 광범위한 범위의 단백질에서 발견되는데(Bork P, et al., *Protein Sci.* 2: 1185-1187, 1993), FNIII 반복단위들의 중심 구조는 한쪽에 네 개의  $\beta$ -가닥을, 다른 한쪽에 세 개의  $\beta$ -가닥을 가지고 있고 이들이  $\beta$ -샌드위치를 형성하면서 보존되어 있다(Leahy DJ, et al., *Science* 258: 987-991, 1992; Dickson CD, et al., *J. Mol. Biol.* 236: 1079-1092, 1994). Arg-Gly-Asp(RGD) 삼중펩타이드 서열을 포함하는 테나신-C의 세 번째 FNIII 반복단위(TNIII3)는 다양한 인테그린들, 예를 들면  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha 9\beta 1$  및  $\alpha 2\beta 1$ 과 같은 인테그린들을 통해 세포와 상호작용하는 것으로 보인다(Prieto AL, et al., *J. Cell Biol.* 119: 663-678; Prieto AL, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10154-10158, 1993; Joshi P, et al., *J. Cell Sci.* 106: 389-400, 1993; Yokosaki Y, et al., *J. Biol. Chem.* 269: 26691-26696, 1994; Dorries U, et al., *J. Neurosci. Res.* 43: 420-438, 1996). 또한, 테나신-C는 CTB-프로테오글리칸(Hoffman S, et al., *J. Cell Biol.* 106: 519-532, 1988), 뉴로칸, 포스포칸(Grumet M, et al., *J. Biol. Chem.* 269: 12142-12146, 1994) 및 신데칸-1(Salmivirta M, et al., *J. Biol. Chem.* 266: 7733-7739, 1991)과 같은 다른 수많은 세포 표면 단백질들에 결합한다. 신데칸-1과 테나신-C는 중간엽과 상피 사이의 경계면에 존재하는 원시 기관에서 일시적으로 동시-발현되며(Thesleff I, et al., *Development* 101: 289-296, 1987; Vainio S, et al., *J. Cell Biol.* 108: 1945-1953, 1989), 테나신-C에 대한 신데칸-1의 결합은 프로테오글리칸의 헤파란 설페이트 결합지들에 의존한다 (Salmivirta M, et al., *J. Biol. Chem.* 266: 7733-7739, 1991).

<14> 헤파린/헤파란 설페이트 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPGs)은 단백질 코어에 부착된 길고, 독특한 탄수화물 사슬을 갖는 거대분자들이다(Gallagher JT, et al., *Biochem. J.* 236: 313-325, 1986; Hardingham TE, et al., *FASEB J.* 6: 861-870, 1992). 이들은 세포외 기질(ECM)의 구성성분 또는 막-결합 단백질로서 존재하고, ECM 단백질을 포함하는 여러 단백질들과의 상호작용을 통해 다양한 생화학적 및 생리학적 과정에 참여하게 된다 (Rouslahti E, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 229-255, 1988; Jackson RL, et al., *Physiol. Rev.* 71: 481-539, 1991; Kjellen L, et al., *Annu. Rev. Biochem.* 60: 443-475, 1991). 헤파린은 배양시 말초 신경세포들이 테나신-C에 부착하는 것을 방해한다(Chiquet M, et al., *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2: 67-74, 1994; Wehrler-Haller B, et al., *J. Cell Sci.* 106: 597-610, 1993). 헤파린-단백질의 상호작용은 단백질의 양전하를 띤 잔기들(Arg, Lys)과 헤파린의 음전하를 띤 작용기(글루코사민의 황산기들 또는 이두론산의 카복실기)간의 이온 접촉에 의해 이루어진다(Faham S, et al., *Science* 271: 1116-1120, 1996). 따라서, 테나신-C의 생물학적 기능을 규명하기 위해서는 글리코사미노글리칸과의 결합을 담당하는 특정한 도메인을 동정하는 것이 매우 중요하다. 이러한 연구의 일환으로, 두 개의 헤파린-결합부위가 테나신-C 내에서 동정되었는데(Aukhil I, et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2542-2553, 1993; Weber P, et al., *J. Biol. Chem.* 270: 4619-4623, 1995), 하나는 다섯 번째 FNIII 반복단위를 포함(TNIII5)하고 다른 하나는 카복실기-말단 피브리노젠-유사 도메인(Fbg)을 포함한다.

<15> 헤파린/헤파란 설페이트 결합은 테나신-C를 포함하는 ECM 분자들의 공통적인 특징으로 파악된다. 헤파린에 대한 테나신-C의 결합 친화력에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만, 테나신-C는 생리학적 염 농도에서 헤파린과 결합하는 것이 보고된 바 있다(Marton LS, et al., *J. Biol. Chem.* 264: 13145-13149, 1989).

<16> 헤파린과 상호작용을 하는 테나신-C 내 FNIII 도메인들에 대한 특징 규명은 대부분 TNIII5 도메인에 초점이 맞추어져 있는데, TNIII5 도메인이 헤파린과의 상호작용을 위해 요구되는 유일한 모티프인지는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않은 실정이다.

<17> 이에, 본 발명자들은 헤파린과 테나신-C와의 상호작용을 보다 구체적으로 조사하고 상기 상호작용을 매개하는 테나신-C 내 신규한 헤파린-결합부위를 추정하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 테나신-C 타입 III의 도메인 4 절편을 포함하는 폴리펩티드가 이차적인 헤파린-결합부위를 포함하고 있어 테나신-C 타입 III의 도메인 5(TNIII5)와의 공동작용에 의해 헤파린에 대한 테나신-C 타입 III의 최적의 결합활성을 나타내고 TNIII5에 대한 HSPGs-의 존성 세포 부착활성을 증가시킴을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

<18> 본 발명의 목적은 높은 헤파린-결합 친화력과 세포 부착활성을 나타내는 테나신-C 타입Ⅲ 내 신규한 헤파린-결합 도메인을 제공하는 것이다.

**발명의 구성 및 작용**

<19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 테나신-C와 헤파린과의 상호작용에 관여하는 신규한 헤파린-결합부위로서 세포 부착활성을 나타내는 KEDK 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 그의 유도체를 제공한다.

<20> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩티드 및 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 세포부착용 약학 조성물을 제공한다.

<21> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<22> 본 발명은 신규한 헤파린-결합부위로서 세포 부착활성을 나타내는 KEDK 서열을 포함하는 폴리펩티드 및 그의 유도체를 제공한다.

<23> 본 발명은 헤파린과 테나신-C의 상호작용에 있어서 TNⅢ4 도메인의 역할을 규명하고 기존에 헤파린-결합부위로 알려진 TNⅢ5 도메인과 공동으로 헤파린-결합을 매개하는 TNⅢ4 도메인 내 폴리펩타이드 서열을 제공한다.

<24> 본 발명의 폴리펩타이드 서열은 헤파린-결합부위로서 **서열번호 2**의 아미노산 서열 중 테나신-C 타입Ⅲ의 도메인 4에 해당하는 969 내지 972번째 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 **서열번호 3**의 KEDK 아미노산 서열을 포함한다.

<25> 본 발명의 폴리펩타이드는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG)의 결합부위를 포함하여 테나신-C 타입Ⅲ 도메인 5 (TNⅢ5)의 헤파린-결합부위와 함께 공동 기작(cooperative mechanism)에 의해 테나신-C의 헤파린-결합 활성을 증가시키고, TNⅢ5에 대한 HSPG-의존성 세포 부착활성을 증진시키는 것을 특징으로 한다.

<26> 구체적으로, 본 발명에서는 헤파린-결합부위로서 세포 부착활성을 나타내는 TNⅢ4 내 특정 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 선별하기 위하여, 테나신-C(TNⅢ)의 피브로넥틴 타입Ⅲ 도메인들의 제조합 단백질을 제조한 후 (**도 1a** 및 **1b** 참조), 이들의 헤파린에 대한 결합 친화력을 조사하였다. 그 결과, 이전에 보고된 바와 같이, 주요 헤파린-결합부위를 포함하는 TNⅢ5 도메인이 생리학적 염 농도 및 pH 조건에서 헤파린과 결합하였다. 그러나, 헤파린에 대한 TNⅢ5 도메인 단독의 결합 친화력은 TNⅢ5 및 TNⅢ4 도메인을 모두 포함하는 절편들보다 현저하게 낮았다(**도 2** 참조). 또한, 동역학 분석결과, TNⅢ3-5 및 TNⅢ4-5 도메인을 포함하는 제조합 절편들은 모두 헤파린에 대한 빠른 결합속도상수를 나타낸 반면, 느린 해리속도상수를 나타내어 매우 안정적임을 알 수 있다(**표 1** 참조). TNⅢ5 도메인만을 포함하는 제조합 절편의 헤파린에 대한 결합 친화력은 TNⅢ3-5 또는 TNⅢ4-5 도메인을 포함하는 제조합 절편들의 결합 친화력보다 훨씬 낮았는데, 이러한 결과는 TNⅢ4 도메인이 테나신-C와 헤파린간의 최적의 결합에 상당히 기여함을 의미하는 것이다.

<27> 이에, 본 발명자들은 TNⅢ4 도메인이 일종의 공동기작(cooperative mechanism)에 의해 TNⅢ5 도메인의 헤파린-결합 활성을 증대시키는 것으로 판단하고, 헤파린에 동시에 결합할 수 있는 부위가 TNⅢ4 및 TNⅢ5 도메인에 각각 하나씩 존재한다고 가정하였다. 이러한 공동기작은 여러 도메인에서도 관찰되는데, 피브로넥틴의 13번째 타입Ⅲ 반복단위(FNⅢ13) 내 일차 헤파린-결합부위 및 피브로넥틴의 14번째 타입Ⅲ 반복단위(FNⅢ14) 내 잠정적 부위(~60Å)가 상호 공동작용에 의해 헤파린-결합 활성을 최대한으로 유도하였고(Sharma A, et al., *EMBO J.* 18: 1468-1479, 1999), 테나신-X(TN-X)의 10번째 및 11번째 타입Ⅲ 반복단위 내 두 개의 인접한 헤파린-결합부위 역시 이와 유사하게 작용함이 보고되었다(Lethias C, et al., *J. Biol. Chem.* 276: 16432-16438, 2001).

<28> 테나신-C 내 FNⅢ 반복단위 분자들의 전체적인 구조는 반복단위들 간의 기울어진 각도 및 이들 반복단위들 사이 지역의 길이에 의존하여 다양한 모양으로 변화될 수 있다. 이전의 보고에 따르면, TNⅢ4 및 5 반복단위들은 뺨뺨이 채워져 있어서 긴 일직선상의 가닥을 형성하고 있다(Leahy DJ, et al., *Science* 258: 987-991, 1992). TNⅢ 도메인 3 내지 5 및 FNⅢ 도메인 10의 구조-기초 서열 정렬분석 결과, TNⅢ3 내지 5 도메인들은 표면 루프를 점유하는 기능적 절편들을 갖는, 전체적으로 동일한 구조를 공유하고 있었다(**도 3a** 참조). 상기 루프 지역은 단백질의 표면에 위치하고 있어 주로 친수성 아미노산을 포함하고 있는데, 이들 중 현저하게 표면 양전하를 띠고 있는 TNⅢ4 내 KEDK 서열(**서열번호 2**의 아미노산 서열중 969-972 해당)이 잠정적인 헤파린-결합부위로서

작용가능함을 확인하였다. TNIII4의 KEDK 서열과 TNIII5의 KGR 서열은 약간 나선형으로 서로 연결되어 있지만, TNIII4의 F 및 G β-쉬트 사이의 루프 지역 내 KEDK 서열이 TNIII5 내 KGR 서열과 동일한 분자의 표면에 위치하고 있음을 알 수 있다(도 3a 참조). 더욱이, TNIII4 도메인 상의 KEDK 루프는 병아리, 쥐, 돼지 및 인간을 포함하는 서로 다른 종들 사이에서 높은 서열 상동성을 나타내며 보존되어 있다(도 3b 참조).

- <29> 상기와 같이, TNIII4 도메인 내 KEDK 서열이 TNIII5 도메인과 함께 테나신-C의 헤파린에 대한 최적의 결합 활성을 유도함을 확인한 본 발명자들은 KEDK 서열 중 상기 활성에 필수적인 잔기를 선별하기 위하여 이들의 치환 돌연변이체를 제조하고 헤파린-결합 활성을 조사하였다. 그 결과, KEDK 서열에 이중 돌연변이를 갖는 치환 돌연변이체가 현저하게 감소된 헤파린-결합 활성을 나타내어 TNIII4 도메인의 KEDK 서열에서 **서열번호 2**의 969 내지 972번째 라이신 잔기들이 헤파린-결합활성에 필수적으로 작용함을 확인하였다(표 2 참조).
- <30> 따라서, 구조-기초 서열 정렬, 돌연변이 및 서열 상동성 분석결과들을 종합해 볼 때, TNIII4 내 KEDK 서열이 헤파린에 대한 높은 결합 친화력을 나타내는데 필수적임을 알 수 있다. TNIII4 내 KEDK 서열은 TNIII5 내 KGR 서열과 동일한 분자의 표면에 위치하고 있기 때문에, 테나신-C의 헤파린-결합부위들은 TNIII4-5 도메인들을 가로질러 존재하고, 그로 인해 TNIII4 유래 KEDK 잔기들이 TNIII5 도메인의 일차적인 헤파린-결합부위와 공동작용에 의해 최적의 헤파린-결합 활성을 유도하게 된다.
- <31> TNIII5 내 KGRHKSKPARVK 서열이 헤파린-결합 활성에 관여하는 것은 이미 보고된 바 있다(Weber P, et al., *J. Biol. Chem.* 270: 4619-4623, 1995). 본 발명에서는 **서열번호 2**의 아미노산 서열 중 1057번째 라이신 및 1059번째 아르기닌 잔기에서의 돌연변이가 헤파린-결합 활성을 현저하게 감소시킴을 또한 확인하였다. 상기 결과들로부터, 테나신-C 타입 III는 헤파린에 동시에 결합할 수 있는 부위를 TNIII5 및 TNIII4에 각각 하나씩 포함하고 있고, 상기 두 결합부위는 공동작용에 의해 테나신-C의 헤파린에 대한 최적의 결합 활성을 유도함을 알 수 있다.
- <32> 상기에서 헤파린-결합 도메인으로 동정된 TNIII4의 헤파린-결합 활성이 세포부착과 연관되어 있는지 여부를 조사한 결과, TNIII4-5는 TNIII5보다 현저하게 높은 세포 부착활성을 나타낸 반면, KEDK 서열에 이중 돌연변이를 갖는 TNIII4-5 치환 돌연변이체는 세포 부착활성을 현저하게 감소시켰다. 또한, TNIII4-5에 대한 세포의 부착은 헤파린 존재하에 완벽하게 억제되었는데, 이는 수용성 헤파린이 TNIII4-5 내 헤파린-결합부위에 미리 결합하게 되면 세포 표면의 HSPGs에 대한 TNIII4-5의 결합활성이 저해될 수 있음을 나타내는 것이다. 이는 헤파리네이즈 I 처리에 의해 TNIII4-5의 세포 부착활성이 상당히 감소된 결과로부터 입증되었다. 상기 결과로부터, TNIII4가 HSPGs의 결합부위를 포함하고 있으며, 공동 기작에 의해 HSPGs에 대한 TNIII5의 부착활성을 증가시킴을 확인하였다.
- <33> 따라서, 본 발명의 헤파린에 높은 결합 친화력을 가지고 헤파린-결합부위로 작용가능하며, 세포 부착활성을 나타내는 폴리펩타이드는 **서열번호 3**으로 기재되는 KEDK(Lys-Glu-Asp-Lys) 서열을 포함하는 폴리펩타이드인 것이 바람직하고, 상기 아미노산 서열의 수식(modification)된 형태를 모두 포함하며 이를 반복하여 사용할 수도 있다. 또한, 본 발명에서는 상기 **서열번호 3**으로 기재되는 KEDK 서열을 전체 또는 일부를 사용할 수도 있으나, 첫 번째 및 네 번째 라인신 잔기를 필수적으로 포함하는 것이 바람직하다.
- <34> 또한, 본 발명은 헤파린에 대한 높은 결합 친화력을 나타내고 세포의 부착활성을 증진시킬 수 있는 상기 폴리펩타이드의 기능적 유도체를 포함한다. 본 발명에서 기능적 유도체는 높은 결합 친화력과 세포 부착활성을 가지고 헤파린에 결합할 수 있는 상기 폴리펩타이드의 가변체, 유사체 또는 화학적 유도체를 의미한다.
- <35> 여기에서 사용된 가변체는 아미노산 서열내에 글리코실화 패턴 또는 비공유적 또는 공유적 방식으로 수정된 분자를 의미하는데, 여기에는 돌연변이를 포함한다. 높은 결합 친화력을 가지고 세포 부착활성을 증진시키는 방식으로 헤파린에 결합하는 능력이 최종 구조에 포함된다면, 본 발명에 속하는 가변체의 일부는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함한다.
- <36> 여기에서 사용된 화학적 유도체는 자연 발생 또는 다양한 화학적 수정, 예를 들면 알킬, 아실 또는 아민기에 의해 서로 대체되어 생산될 수 있는 폴리펩타이드를 의미한다.
- <37> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩타이드 및 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 세포부착용 약학적 조성물을 제공한다.
- <38> 상기 폴리펩타이드 및 그의 유도체는 임상투여시에 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또

는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<39> 또한, 상기 폴리펩타이드 및 그의 유도체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용가능한 여러 담체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 펩타이드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.

<40> 본 발명의 약학적 조성물에서 폴리펩타이드의 총 유효량은 거환(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 확산(diffusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할치료방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 폴리펩타이드의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 펩타이드의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

<41> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<42> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<43> <실시예 1> TNIII 도메인들의 동역학 분석

<44> <1-1> TNIII 도메인 발현벡터의 제조

<45> 테나신-C 타입 III 도메인들 중 헤파린과의 상호작용에 필수적인 도메인을 밝히기 위하여 인간 테나신-C FNIII(TN III)의 일부 도메인만을 포함하는 재조합 절편들을 제조하였다.

<46> 먼저, 인간 테나신-C(TN)의 cDNAs는 성인 인간 cDNA 라이브러리를 주형으로 사용하여 통상적인 PCR 방법에 의해 증폭하였다. 이때, PCR 프라이머로 TNIII 도메인 3 내지 5를 인식하도록 고안된 **서열번호 4**의 정방향 TN3F; **서열번호 5**의 역방향 TN3R; **서열번호 6**의 역방향 TN4R; 및 **서열번호 7**의 역방향 TN5R을 사용하였다.

<47> PCR은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μg/ml 젤라틴, 0.2 mM dNTPs, 1.25 단위 Taq 중합효소(Perkin-Elmer) 및 50 pmol 프라이머를 포함하는 50 μl 반응용액에서 수행하였다. PCR 조건은 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 및 94°C에서 1분의 반응을 30회 반복 수행하였다. 이로부터 증폭된 cDNA 산물들을 Kpn I 및 EcoR I 제한효소로 절단한 후 PCR 정제 키트(Qiagen, Chatsworth, CA)를 사용하여 분리하였다. 상기에서 분리된 PCR 산물을 C-말단에 6개의 His 표지(His tag)가 있는 pBAD/HisA 발현벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였다. 폴리-His 표지를 포함하는 TNIII3-5, TNIII4-5 및 TNIII5 융합 단백질을 발현시키고 Ni<sup>2+</sup> 친화 컬럼 (Invitrogen)을 사용하여 변성조건 하에서 제조사의 지침에 따라 정제하였다. 세포 분쇄액 및 정제된 융합 단백질은 12% (w/v) 아크릴아미드 겔에 환원조건 하에서 전기영동하여 분리한 후, 코마시 블루 (Coomassie Blue)로 염색하여 관찰하였다. 그 결과, **도 1**에 나타난 바와 같이, 재조합 TNIII 도메인들이 발현되어 균질하게 분리·정제되었음을 확인하였다.

<48> <1-2> 재조합 TNIII 도메인들의 헤파린-결합 활성 분석

<49> 상기 **실시예 <1-1>**에서 분리·정제된 각각의 재조합 TNIII 도메인 절편들의 헤파린에 대한 결합 활성을 분석하기 위하여 표면 양자 공명(surface plasmon resonance, SPR) 원리를 기본으로 하는 BIAcore X 시스템을 이용하였다. BIAcore 시스템은 실시간으로 분자간의 상호작용을 정량적으로 분석 가능하게 해주며, 이로부터 결합 및 해리속도상수가 즉시 계산된다.

<50> 사용한 칩은 단백질 고정을 위해 카르복시메틸-텍스트란(CM-Dex)으로 코팅되어 있는 CM5 센서 칩을 이용하였다. 먼저, HBS 완충용액(10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl 및 0.005% 계면활성제 P20 함유)으로 칩 표면을 안정화시킨 후, 0.1 M NHS(N-hydroxysuccinimide)와 0.4 M EDC(N-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl) carbodi imide)의 혼합액 200 μl를 흘려주어 칩 표면을 활성화시켰다. 이 상태에서 스트렙타비딘(streptavidin)을 제조사의 지침에 따라 아민 커플링 키트(amine coupling kit, BIAcore Inc.)를 사용하여 상기 CM5 센서 칩

에 결합시켰다. 바이아코어 X 시스템을 위한 센서 칩당 두 개의 유세포(flow cell)를 사용하는데, 상기 스트랩타비딘은 20k 공명단위(resonance unit, RU)로 첫 번째 유세포 내에서 고정되었고, BSA(bovine serum albumin)는 배경 수정을 위한 음성 대조군으로 950 공명단위로 두 번째 유세포 내에 고정되었다. 상기와 같이 준비된 스트랩타비딘-결합 CM5 센서 칩에 바이오틴화 헤파린(biotinylated heparin, BiHep, Sigma)을 제조사의 지침에 따라 고정시켰다. 이후, 1.0 M 에탄올아민(ethanolamine) 20  $\mu$ l를 흘려주어 BiHep와 붙지 않고 활성화 상태로 남아있는 칩 표면을 치환시켰다. 재조합 TNIII 도메인 절편들의 헤파린에 대한 결합 친화력 측정은 CM5 센서 칩에 BiHep를 고정시킨 후, 결합 완충용액(binding buffer)(0.01 M HEPES, 0.15 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 폴리소르베이트 20, pH 7.4)을 계속해서 흘려 평형화 (equilibration)시키고 상기 재조합 절편들이 20, 40, 80 mM 농도로 용해되어 있는 결합 완충용액을 흘려주어 결정하였다. 이때, 재조합 절편과 헤파린과의 결합 친화력에 따라서 펩타이드가 각각 다른 속도와 기울기로 결합하게 되는데, 각각의 결과로부터 헤파린에 대한 결합 친화력을 측정하였다.

<51> 동역학 속도상수( $k_a$  및  $k_d$ ) 및 평형 분리상수( $K_D$ )는 BIAcore 동역학 평가 소프트웨어(BIAcore kinetic evaluation software, BIAcore사, Uppsala, Sweden)를 사용하여 결정하였다. 재조합 TNIII 도메인 절편들 각각의 결합 동역학을 결정하기 위하여, 농도를 달리한 일련의 시료들을 5분간의 결합기(association phase) 동안 40  $\mu$ l/분의 속도로 주입하였다. 상기 결합기는 10분 이상 수행되었다. 유세포는 1.0 mM NaCl을 3분간 주입하여 재생시켰고, 이로 인해 헤파린은 천연 상태로 남게되는 반면, 재조합 TNIII 도메인 절편들은 제거된다. 다양한 재조합 TNIII 도메인 절편들과 고정된 헤파린 사이의 상호작용 정도를 나타내는 BIAcore 감지장치 기록(sensorgrams)의 동역학 분석은 하기 **수학식 1**에 따라 결정하였다.

**수학식 1**

<52> 
$$dR/dt = k_a CR_{max} - (k_a C + k_d) R_t$$

<53> 상기 식에서,  $dR/dt$ 는 시간  $t$ 초에서 고정된 헤파린과 시료간의 상호작용에 기인한 SRP 신호 (RU)의 변화율이고,  $k_a$  및  $k_d$ 는 각각 결합 및 해리속도상수를 나타내고,  $C$ 는 시료의 농도이고,  $R_{max}$ 는 RU에서 고정된 헤파린에 대한 시료의 최대 결합 용량(maximum analyte binding capacity)을 나타낸다. 결합 및 해리속도상수 모두 BIA 평가 소프트웨어(BIAevaluation software, version 3.0)를 사용하여 센소그램들의 크기 분석으로부터 결정되었다. 모든 결합 곡선들은 배경과 부피 굴절 지수 (bulk refractive index) 공여에 대해 유세포 대조군의 값을 공제함으로써 보정되었다.

<54> 테나신-C에서 TNIII 도메인 5는 이미 주요 헤파린-결합부위로 동정된 바 있는데(Weber P, et al., *J. Biol. Chem.* 270: 4619-4623, 1995), 본 발명의 SPR-기초 BIAcore 시스템 분석에서도 TNIII5가 헤파린과의 상호작용을 위한 결합부위로 작용함을 확인하였다. 생리적 조건하에서 스트랩타비딘-결합 CM5 센서 칩에 고정된 헤파린에 대한 재조합 TNIII3-5 및 TNIII4-5에 대한  $k_d$ 는 각각 30 nM 및 40 nM로 측정되어 헤파린에 대해 높은 친화력을 나타내었다(도 2). 하기 표 1에 나타난 바와 같이, TNIII3-5 및 TNIII4-5는 모두 칩 표면에서 헤파린에 대한 빠른 결합속도 ( $k_a$  TNIII3-5,  $8.64 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ xM}^{-1}$ ;  $k_a$  TNIII4-5,  $4.46 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ xM}^{-1}$ )를 나타낸 반면, 느린 해리속도 ( $k_d$  TNIII3-5,  $0.29 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_d$  TNIII4-5,  $0.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ )를 나타내어 매우 안정적임을 확인하였다.

**표 1**

<55>

시료	$k_d$ ( $\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$ )	$k_a$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \times 10^3$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
TNIII3-5	0.29	8.64	0.03
TNIII4-5	0.2	4.46	0.04
TNIII5	0.82	0.19	4.25
TNIII4	NB	NB	NB
TNIII3	NB	NB	NB

$k_d$ : 해리속도상수,  $k_a$ : 결합속도상수,  $K_D$ : 평형상수, NB: not bind

<56> 흥미롭게도, TNIII5는 TNIII3-5 및 TNIII4-5에 비하여 각각 160배 및 106배 감소된 친화력( $K_D=4.25 \mu\text{M}$ )을 나타내었다. 그러나, TNIII3 및 TNIII4는 모두 헤파린이 고정된 칩 표면에 매우 빈약하게 결합하기 때문에 결합 및 해

리 동역학을 정량할 수 없었다(표 1). TNIII5를 포함하는 재조합 절편의 헤파린에 대한 결합 친화력은 항상 TNIII3-5 또는 TNIII4-5를 포함하는 재조합 절편들의 결합 친화력보다 훨씬 낮았는데, 이러한 결과는 TNIII4 도메인이 테나신-C와 헤파린간의 최적의 결합에 상당히 기여함을 나타내는 것이다.

<57> <실시예 2> 서열 정렬 및 상동성 분석

<58> NMR 및 결정 구조분석에 의해 피브로넥틴 타입 III의 도메인 10(FIII10)의 RGD 서열이 도메인 표면으로부터 뺀어져 나온 루프내에 존재하고 있음이 보고되었다 (Sharma A, et al., *EMBO J.* 18: 1468-1479, 1999; Grant RP, et al., *J. Biol. Chem.* 272: 6159-6166, 1997). 이에, FIII10과 TNIII3, TNIII4 및 TNIII5의 구조를 기초로한 서열 정렬 및 상동성 분석을 수행하여 그 결과를 도 3a에 나타내었다. 도 3a에서 초록색으로 표기된 아미노산 잔기는 FIII10, TNIII3, TNIII4 및 TNIII5 모두에서 보존되어 있는 잔기를 나타내고, 노란색 잔기는 상기 도메인들 중 적어도 세 개의 도메인에서 보존되어 있는 잔기를 나타낸다.

<59> 도 3a에 나타난 바와 같이, TNIII3 내지 5 도메인들은 표면 루프를 점유하는 기능적 절편들을 갖는, 전체적으로 동일한 구조를 공유하고 있었다. 상기 루프 지역은 단백질의 표면에 위치하고 있어 주로 친수성 아미노산을 포함하게 된다. TNIII5 내 KGRHKS<sup>1059</sup>PARVK 서열(서열번호 2의 아미노산 서열에서 1057-1068에 해당)은 이미 헤파린-결합 활성에 관여하는 것으로 보고된 바 있다(Weber P, et al., *J. Biol. Chem.* 270: 4619-4623, 1995). F 및 G 가닥들 사이의 루프로부터 제공된 이들 여섯 개의 양전하를 띤 잔기들, 즉 K 또는 R은 용매 내로 돌출된다. 이에, 본 발명자들은 테나신-C 내 헤파린에 대한 새로운 결합부위를 밝히기 위하여 TNIII4 내 루프 지역에 초점을 맞추어 연구하였고, 그로부터 현저하게 표면 양전하를 띠고 있는 TNIII4 내 KEDK 서열(서열번호 2의 아미노산 서열에서 969-972에 해당)이 잠정적인 헤파린-결합부위로 작용가능함을 확인하였다. 더욱이, TNIII4 도메인 상의 KEDK 서열은 병아리, 쥐, 돼지 및 인간을 포함하는 서로 다른 종들 사이에서 높은 서열 상동성을 나타내었다(도 3b).

<60> <실시예 3> TNIII4 내 헤파린-결합부위 동정

<61> <3-1> 위치-지정 돌연변이에 의한 치환 돌연변이체의 제조

<62> 상기 실시예 2의 서열 정렬 및 상동성 분석 결과 확인된 TNIII4 내 KEDK 서열의 헤파린에 대한 결합활성을 좀더 조사하기 위하여, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 969번째 및 972번째 라이신(Lys)을 글루타민(Gln)으로 치환시킨 이중 돌연변이를 포함하는 재조합 TNIII3-5 단백질의 치환 돌연변이체를 제조하였다.

<63> 구체적으로, 재조합 TNIII4-5 단백질의 KEDK 서열에서 Lys<sup>969</sup> 과 Lys<sup>972</sup>가 각각 Gln으로 치환된 돌연변이체를 제조하기 위해 PCR을 이용한 위치-지정 돌연변이 (site-directed mutagenesis)를 실시하였다. 위치-지정 돌연변이는 퀵체인지 키트 (Quickchange kit, Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행되었다. 주형으로 상기 실시예 1에서 제조된 재조합 TNIII3-5를 이용하고 서열번호 8 및 서열번호 9를 프라이머 쌍으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머 쌍은 재조합 TNIII3-5에서 Lys<sup>969</sup> 과 Lys<sup>972</sup> 위치에 Gln으로의 치환이 도입되도록 고안되었다. PCR은 증합효소로서 2.5 단위의 *Pfu turbo* DNA 증합효소(Stratagen, Ca. No. 200518)를 사용하고 95°C에서 5분 동안 예비 변성시킨 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 60초, 72°C에서 2분의 반응을 30회 수행하였다.

<64> 또한, 상기와 동일한 방법으로 서열번호 2의 TNIII5 단백질의 KGR 서열에서 1057번째 라이신이 글루타민으로, 1059번째 아르기닌(Arg)이 글루타민으로 치환된 돌연변이체들을 제조하였다. 이때, 위치-지정 돌연변이를 위한 PCR의 시발체 쌍으로 재조합 TNIII5에서 Lys<sup>1057</sup> 위치에 Gln으로의 치환이 도입되도록 고안된 서열번호 10 및 서열번호 11의 프라이머 쌍; 및 Arg<sup>1059</sup> 위치에 Gln으로의 치환이 도입되도록 고안된 서열번호 12 및 서열번호 13의 프라이머 쌍을 사용하였다.

<65> 이로부터 재조합 TNIII4-5 단백질의 KEDK 서열에서 Lys<sup>969</sup> 과 Lys<sup>972</sup>가 각각 Gln으로 치환된 이중 돌연변이체 K969Q/K972Q(KEDK); 및 재조합 TNIII5 단백질의 RGD 서열에서 Lys<sup>1057</sup>이 Gln으로 치환된 돌연변이체 K1057Q(KGR) 및 Arg<sup>1059</sup>이 Gln으로 치환된 돌연변이체 R1059Q(KGR)를 얻었다.

<66> 상기에서 증폭된 PCR 산물들을 회수하여 제한효소 Kpn I 및 EcoR I으로 절단한 후 PCR 정제 키트(Qiagen, Chatsworth, CA)를 사용하여 분리하였다. 이와 같이 분리된 PCR 산물들을 각각 C-말단에 6개의 His 표지가 있는 pBAD/HisA 발현벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였다. 폴리-His 표지를 포함하는 K969Q/K972Q(KEDK),

K1057Q(KGR) 및 R1059Q(KGR) 치환 돌연변이 융합 단백질을 발현시키고 Ni<sup>2+</sup> 친화 컬럼(Invitrogen)을 사용하여 변성조건 하에서 제조사의 지침에 따라 정제하였다.

<67> 상기와 같이 정제된 치환 돌연변이 융합 단백질들의 염기서열을 분석하여 각각의 치환 돌연변이체에 목적하는 돌연변이가 도입되었음을 확인하였다.

<68> <3-2> **헤파린-결합 활성 분석**

<69> 상기에서 제조된 TNIII4-5 돌연변이체들의 헤파린-결합 활성을 상기 실시예 <1-2>와 동일한 방법으로 BIAcore 시스템을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 이때, TNIII4-5 돌연변이체들의 헤파린-결합 활성은 TNIII4-5 야생형 단백질과 비교하여 상대적인 값으로 나타내었다.

표 2

<70>

시료	$k_d$ ( $s^{-1} \times 10^{-3}$ )	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1} \times 10^3$ )	$K_D$ ( $\mu M$ )
K969Q/K972Q(KEDK)	0.01	1.38	9.2
K1057Q(KGR)	NB	NB	B
R1059Q(KGR)	NB	NB	B

<71> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 재조합 TNIII4-5 K969QA/K972Q 이중 돌연변이체에 대한  $k_d$ 는 야생형 TNIII4-5와 비교하여 헤파린에 대해 약 70배정도 감소된 결합 친화력( $k_d=29.2 \mu M$ )을 나타내었고, TNIII5 내 KGR 서열의 돌연변이를 갖는 TNIII4-5 K1057Q 및 TNIII4-5 R1059Q는 헤파린에 대한 결합이 완벽하게 억제되었다. 상기 결과로부터, TNIII5 도메인이 일차적인 헤파린-결합부위이고, 상기 도메인 내 KGR 서열의 Arg<sup>1059</sup> 및 Lys<sup>1057</sup> 잔기들이 헤파린과의 상호작용에 결정적으로 중요하게 작용한다는 것을 확인하였다. 또한, TNIII4 도메인 내 KEDK 서열의 돌연변이가 헤파린에 대한 결합 친화력을 상당히 감소시킨다는 사실은 테나신-C와 헤파린과의 최적의 결합을 위해서 KEDK 잔기들이 이차적인 헤파린-결합부위로 작용한다는 것을 나타내는 것이다. 이러한 결과들은 F 및 G가닥들 사이의 루프 지역 내 KEDK 잔기들이 테나신-C와 헤파린과의 최적의 결합활성을 유도하는데 기여하고, 테나신-C 내 헤파린-결합부위들이 TNIII4 및 TNIII5 도메인 모두에 걸쳐 연장되어 있음을 암시하는 것이다.

<72> <실시예 4> **TNIII4 헤파린-결합 도메인의 세포부착 활성**

<73> 상기에서 헤파린-결합 도메인으로 동정된 TNIII4의 KEDK 서열의 생물학적 중요성을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 테나신-C의 헤파린-결합 활성이 세포부착과 연관되어 있는지 여부를 하기와 같이 조사하였다.

<74> 인간 잇몸 섬유아세포(human gingival fibroblast, HGF)를 10% 소 태아 혈청, 100 단위/ml 페니실린, 및 100  $\mu g/ml$  스트렙토마이신(Invitrogen)을 포함하는 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEN)에서 배양하였다. HGFs를 다시 24시간 동안 동일한 배지에서 무혈청 배양한 후, 0.02% 트립신 및 1 mM EDTA 처리에 의해 수확하였다. 수확된 HGFs를  $\alpha$ -MEN에 재현탁한 후 100  $\mu g/ml$  콩 트립신 저해제 및 1% BSA를 포함하는  $\alpha$ -MEN으로 세 번 세척하여 준비하였다. 24-웰 플레이트에 상기 실시예 <1-1>에서 제조된 재조합 단백질 TNIII4-5 및 TNIII5와 실시예 <3-2>에서 제조된 이중 돌연변이체 K969Q/K972Q(KEDK)를 각각 1  $\mu M$  농도로 참가한 후 4°C에서 밤새 배양하여 코팅하였다. 상기 웰 플레이트에 1%(w/v) BSA를 포함하는 PBS를 첨가하여 실온에서 30분 동안 블로킹시킨 후, BSA 무첨가 PBS로 세척하였다. 상기에서 준비된 HGFs를  $5 \times 10^4$  세포/웰의 농도로 재조합 단백질이 코팅된 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 이때, 세포를 웰 플레이트에 첨가하기 전에 2 단위/ml 농도의 헤파리네이즈 I (heparinase I) 또는 콘드로이티네이즈(chondroitinase) ABC로 37°C에서 1시간 동안 전처리하거나, 5  $\mu g/ml$  농도의 헤파린과 함께 37°C에서 1시간 동안 동시-배양하였다. 대조군 세포의 현탁액은 정해진 시간동안 BSA-코팅 플레이트에서 유지하였다. 37°C에서 60분 동안 배양시킨 후, 부착되지 않은 세포들을 PBS로 두 번 세척하여 제거하였다. 부착된 세포는 3% 파라포름알데히드(Sigma)로 고정된 후 0.25% 크리스탈 바이올렛을 포함하는 2%(v/v) 에탄올 수용액으로 염색하였다. 웰 플레이트를 증류수로 충분히 세척하고 건조시킨 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 비-특이적 세포부착은 음성 대조군으로서 1% BSA로 코팅된 웰에서 결정하였다.

<75> 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, TNIII4-5는 TNIII5보다 현저하게 높은 세포 부착활성을 나타낸 반면, TNIII4-5 K969Q/K972Q 이중 돌연변이체는 세포 부착활성을 현저하게 감소시켰다. 또한, TNIII4-5에 대한 HGF의 부착은 5  $\mu g/ml$ 의 헤파린 존재하에 완벽하게 억제되었는데, 이는 수용성 헤파린이 TNIII4-5 내 헤파린-결합부위에 미리 결

합하게 되면 세포 표면 HSPGs에 대한 TNIII4-5의 결합활성이 저해될 수 있음을 암시하는 것이다. 이러한 가능성을 조사하기 위하여, 고도로 황화된 HSPGs에 작용하는 효소인 헤파리네이즈 I으로 먼저 세포를 처리함으로써 (Feitsma K, et al., *J. Biol. Chem.* 275: 9396-9402, 2000) 세포 표면 HSPGs를 제거하였다. 그 결과, HGF 세포의 헤파리네이즈 I 처리는 TNIII4-5의 HGF 세포에 대한 부착활성을 75% 정도 감소시켰다. 또한, HGF의 콘드로이티네이즈 ABC 처리 결과로부터, TNIII4-5의 세포 부착활성이 콘드로이틴 설페이트가 아닌 세포 표면의 헤파란 설페이트에 의해 매개된 것임을 알 수 있었다(도 4). 이러한 결과들은 TNIII4가 HSPGs의 결합부위를 포함하고 있으며, 공동 기작에 의해 HSPGs에 대한 TNIII5의 부착 활성을 증대시킴을 입증하는 것이다.

**발명의 효과**

<76> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 테나신-C 도메인 4 유래 KEDK 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 그의 유도체는 헤파린에 높은 친화력을 가지고 헤파린-결합부위로 작용할 수 있으며 세포의 부착활성을 증진시키므로 세포부착용 펩타이드에 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

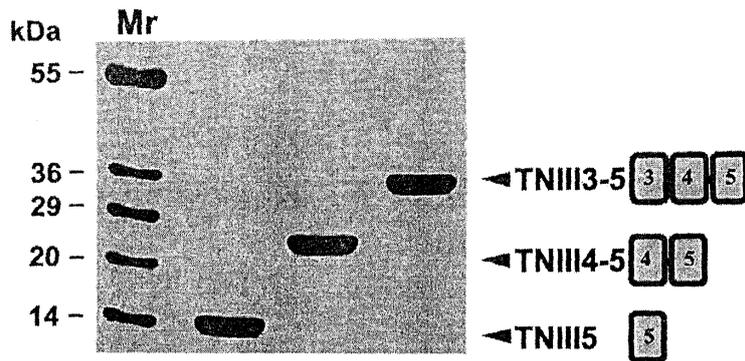
- <1> 도 1a는 인간 테나신-C 타입 III 단백질의 구성을 나타낸 모식도이고,
- <2> EGF: 상피세포 성장인자, FNIII: 피브로넥틴 타입 III
- <3> Fbg: 단일 피브리노겐-유사 도메인
- <4> 도 1b는 인간 테나신-C 타입 III의 일부 도메인만을 포함하는 재조합 단백질들의 모식도 및 이를 SDS-PAGE에 전기영동한 결과를 나타낸 것이고,
- <5> 레인 1: 분자량 마커, 레인 2: TNIII5,
- <6> 레인 3: TNIII4-5, 레인 4: TNIII3-5
- <7> 도 2는 칩사에 고정된 헤파린에 대하여 인간 테나신-C 타입 III의 일부 도메인만을 포함하는 재조합 단백질들의 결합 친화력을 BIAcore 시스템을 이용하여 분석한 결과이고,
- <8> A: TNIII3-5, B: TNIII4-5, C: TNIII5
- <9> 도 3a는 인간 테나신-C 타입 III의 도메인 3 내지 5 및 피브로넥틴 타입 III의 도메인 10의 구조-기초 서열 정렬 결과를 나타낸 것이고,
- <10> 도 3b는 인간 (*Homo sapiences*), 쥐 (*Mus musculus*), 닭 (*Gallus gallus*) 및 돼지 (*Sus scrofa*)에서의 테나신-C 타입 III 도메인 4의 아미노산 서열을 비교한 것이고,
- <11> 도 4는 인간 테나신-C 타입 III의 일부 도메인만을 포함하는 재조합 단백질들 및 이의 치환 돌연변이체의 세포 부착활성을 측정된 결과이다.

**도면**

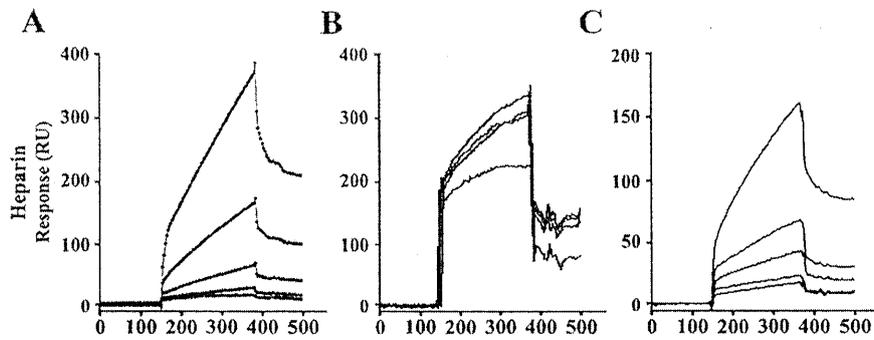
**도면1a**



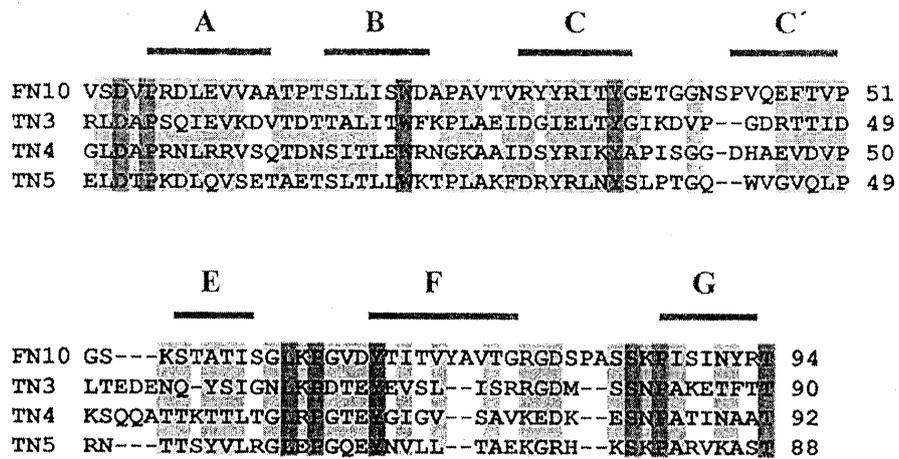
도면1b



도면2



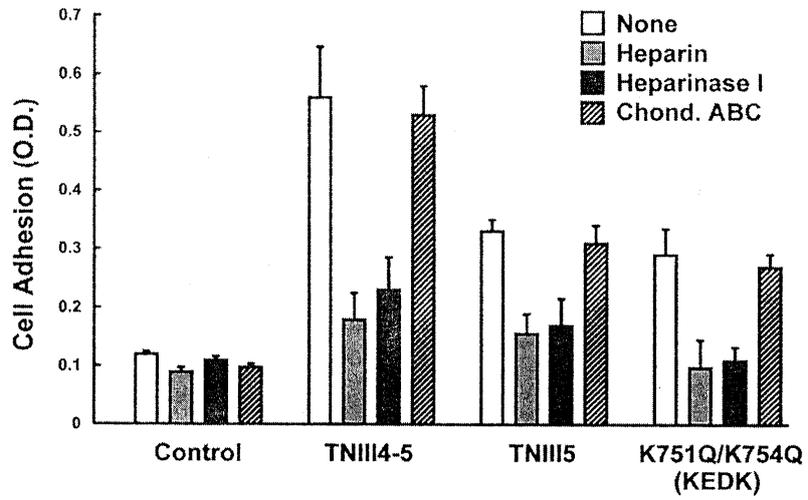
도면3a



도면3b

human	KEDKESN
mouse	KGDKESD
pig	KGDKESD
chicken	RQDRESA

도면4



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)