



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0040631
(43) 공개일자 2008년05월08일

(51) Int. Cl.

C07K 14/195 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7028984

(22) 출원일자 2007년12월12일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년12월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/019684

국제출원일자 2006년05월19일

(87) 국제공개번호 WO 2007/018671

국제공개일자 2007년02월15일

(30) 우선권주장

11/244,105 2005년10월06일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

더 보드 오브 트러스티즈 오브 더 유니버시티 오브 일리노이

미국, 일리노이주 60612, 시카고, 슈이트 446, 웨스트 폴크 스트리트 1853, 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트

(72) 발명자

차카라바티, 아난다

미국, 일리노이 60181, 빌라 파크, 줄리아 드라이브 206

다스 구프타, 타파스

미국, 일리노이 60305, 리버 포레스트, 잭슨 애버뉴 1317

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구

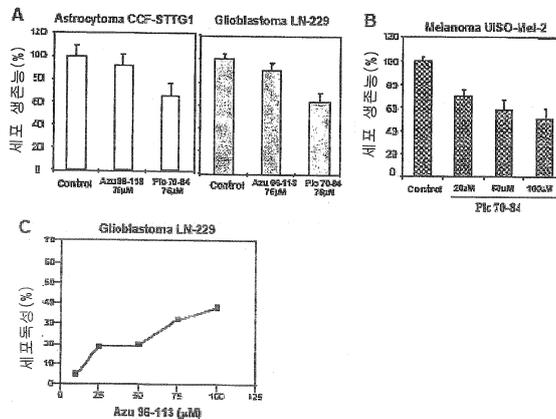
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 에프린 신호전달과 관련된 질환을 쿠프레독신으로 치료하기 위한 조성물과 방법

(57) 요약

본 발명은 포유동물 세포에서 에프린(efrin) 신호전달 체계를 간섭하는 쿠프레독신(cupredoxin) 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 이용하는 조성물과 방법에 관계한다. 구체적으로, 본 발명은 포유동물에서 암을 치료하기 위하여 쿠프레독신, 예를 들면, 아주린(azurin), 루스티시아닌(rusticyanin), 플라스토시아닌(plastocyanin) 및 이들의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 이용하는 조성물과 방법에 관계한다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

야마다, 토루

미국, 일리노이 60148, 롬바드, 이스트 노쓰 브로드웨이스트리트 422

차우다하리, 아니타

미국, 뉴욕 12065, 클리프톤 파크, 코치맨 스퀘어 23씨

피알로, 아르세니오

포르투갈, 리스본 피-1500-401, 로트 23 3 에스 크, 프라세타 마에스트로 이보 크루즈

쥬, 용후아

미국, 일리노이 60607, 시카고, 에스. 아셀랜드 애버뉴901, 아파트먼트 #803

(30) 우선권주장

60/682,812 2005년05월20일 미국(US)

60/764,749 2006년02월03일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 포유동물 암 세포의 성장을 저해할 수 있는 분리된 펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 쿠프레독신은 아주린(azurin), 플라스토시아닌(plastocyanin), 슈도아주린(pseudoazurin), 플라스토시아닌(plastocyanin), 루스티시아닌(rusticyanin), 아우라시아닌(auracyanin)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 쿠프레독신은 아주린, 플라스토시아닌, 루스티시아닌에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 쿠프레독신은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 메틸로모나스 종(*Methylobacterium* sp.), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*), 오이(*Cucumis sativus*), 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 선택되는 생물체로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 선택되는 생물체로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 6

청구항 1에 있어서, SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택되는 펩티드의 일부인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 7

청구항 1에 있어서, SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택되는 서열과 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 쿠프레독신의 절두인 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 10개 이상의 잔기 및 100개 이하의 잔기를 보유하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 88-113, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 70-84, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98, SEQ ID NO:22-30에서 선택되는 쿠프레독신의 한 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 88-113, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 70-84, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98, SEQ ID NO:22-30에서 선택되는 쿠프레독신의 한 영역으로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 88-113, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 70-84, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98, SEQ ID NO:22-30에서 선택되는 목적 쿠프레독신의 한 영역과 등가의 표적 쿠프레독신 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 13

적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 청구항 1의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 정맥내 투여용으로 제조되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 쿠프레독신은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 메틸로모나스 종(*Methylomonas sp.*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*), 오이(*Cucumis sativus*), 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 선택되는 생물체로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 쿠프레독신은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 선택되는 생물체로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 쿠프레독신은 SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 18

에프린 신호전달 체계와 관련된 병리학적 이상 또는 암으로 고통받는 포유동물 환자를 치료하는 방법에 있어서, 청구항 13의 조성물의 치료 효과량을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 환자는 간질성 방광염(interstitial cystitis, IC), 염증성 장 질환(IBD)과 연관된 병소, HIV 감염, 심혈관 질환, 중추신경계 질환, 말초 혈관 질환, 바이러스 질환, 중추신경계의 퇴행 (Christopher Reeve 병), 알츠하이머병에서 선택되는 병리학적 장애로 고통받는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 환자는 유방암, 간암, 위장관암, 신경모세포종, 신경암, 백혈병, 림프종, 전립선암, 췌장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 자궁내막 증양, 용모막암종, 기형암종, 갑상선암, 연부 조직(soft tissue)과 뼈로부터 발생하는 것들을 비롯한 모든 육종, 신장 암종, 표피암, 비-소세포 폐암에서 선택되는 암으로 고통받는 것을

특징으로 하는 치료 방법.

청구항 21

청구항 18에 있어서, 환자는 인간인 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 22

청구항 18에 있어서, 조성물은 정맥내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 흡입, 국소 투여, 경피 패치, 좌약, 경구에서 선택되는 방식으로 투여되는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 투여 방식은 정맥내 주사인 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 24

청구항 18에 있어서, 조성물은 병리학적 이상 또는 암을 치료하는 것으로 공지된 다른 약제의 투여와 동시에 내지 이러한 투여후 1주 이내에 투여되는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 조성물은 다른 항암제와 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

청구항 26

쿠프레독신 및 청구항 1에 따른 분리된 펩티드에 선택되는 적어도 2개의 분리된 폴리펩티드를 함유하는 조성물.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 계약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 28

바이알에 담긴 청구항 13의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 정맥내 투여용으로 설계된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 30

포유동물 암 세포를 청구항 13의 조성물과 접촉시키고, 이들 암 세포의 성장을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 암 세포는 유방암, 간암, 위장관암, 신경모세포종, 신경암, 백혈병, 림프종, 전립선암, 췌장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 자궁내막 종양, 융모막암종, 기형암종, 갑상선암, 연부 조직과 뼈로부터 발생하는 것들을 비롯한 모든 육종, 신장 암종, 표피암, 비-소세포 폐암에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

청구항 30에 있어서, 암 세포는 생체내 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

청구항 1의 펩티드를 인코딩하는 발현 벡터.

청구항 34

쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 에프린 수용체에 결합하는 분리된 펩티드.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 에프린 수용체는 EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 에프린에 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 37

청구항 36에 있어서, 에프린은 ephrinA1, ephrinA2, ephrinA3, ephrinA4, ephrinA5, ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 38

청구항 36에 있어서, 에프린과 이의 수용체에 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 39

청구항 38에 있어서, Ephrin2B와 Eph2B에 결합하는 것을 특징으로 하는 분리된 펩티드.

청구항 40

쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, ephrinA1, ephrinA2, ephrinA3, ephrinA4, ephrinA5, ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4에서 선택되는 에프린에 결합하는 분리된 펩티드.

청구항 41

포유동물 환자에 청구항 13의 조성물을 투여하여 환자에서 혈관의 성장을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

포유동물 환자에 청구항 13의 조성물을 투여하여 환자에서 혈관의 성장을 감소시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 43

포유동물 환자에 청구항 13의 조성물을 투여하여 환자에서 신경의 성장을 조절하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 44

포유동물 환자에 청구항 13의 조성물을 투여하여 환자에서 골형성(osteogenesis)을 촉진하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 45

에프린의 이용을 필요로 하는 치료 방법에서 에프린 대신에 청구항 13의 조성물의 효과량을 포유동물 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 46

청구항 13의 조성물을 포유동물 세포에 접촉시켜 상기 세포와 연관된 에프린 수용체의 활성을 저해하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 13의 조성물을 포유동물 세포에 접촉시켜 상기 세포와 연관된 에프린 수용체의 활성을 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 48

에프린 수용체를 발현하는 조직을 보유하는 인간 환자에, 제약학적 약제에 용해된 쿠프레독신의 유도체, 또는 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 청구항 13의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 조직은 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

포유동물 환자에서 에프린 수용체를 보유하는 조직을 탐지하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 탐지가능 프로브에 융합된 쿠프레독신의 유도체, 또는 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 청구항 13의 조성물을 환자에게 투여하고;
- (b) 환자 내에서 상기 프로브의 분포를 탐지한다.

명세서

기술분야

<1> 관련된 출원

<2> 본 출원은 35 U.S.C. § § 119와 120 하에, 2006년 2월 3일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/764,749; 2005년 5월 20일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/682,812; 2004년 10월 7일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/616,782 및 2005년 5월 13일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/680,500에 우선권을 주장하고 2003년 11월 11일자 제출된 U.S. 특허 출원 No. 10/720,603의 일부 계속 출원인 2005년 10월 6일자 제출된 U.S. 특허 출원 No. 11/244,105에 우선권을 주장하고, 상기 U.S. 특허 출원 No. 10/720,603은 2003년 8월 15일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/414,550에 우선권을 주장하고 2002년 1월 15일자 제출된 U.S. 특허 출원 No. 10/047,710의 일부 계속 출원이며, 상기 U.S. 특허 출원 No. 10/047,710은 2001년 2월 15일자 제출된 U.S. 가출원 No. 60/269,133에 우선권을 주장한다. 이들 선행 출원의 전체 내용은 순전히 참조로서 편입된다.

<3> 정부 권리의 진술

<4> 본 출원의 요부는 National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, U.S.A.로부터 연구 기금(Grant Number AI 16790-21, ES 04050-16, AI 45541, CA 09432, N01-CM97567)을 지원받았다. 정부는 본 발명에 일부 권리를 주장할 수 있다.

<5> 본 발명의 기술 분야

<6> 본 발명은 쿠프레독신(cupredoxin) 및 에프린(ephrlin)과 에프린 수용체가 관여하는 세포 기능의 조절에서 이들의 용도에 관계한다. 본 발명은 또한, 에프린-관련된 질환을 치료하는 방법에 관계한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 암 세포와 병리학적 이상(pathological condition), 구체적으로, 에프린/에프린 수용체 신호전달과 관련된 병리학적 이상의 성장과 전이를 지연시키는 방법 및 에프린/에프린 수용체 신호전달과 관련된 다른 치료 방법에서 실질적으로 순수한 쿠프레독신의 용도에 관계한다. 본 발명은 또한, 세포 내에서 에프린 신호전달 체계를 간섭하는 능력을 유지하는, 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체에 관계한다.

배경 기술

<7> 에프린 수용체(Eph 수용체)는 에프린으로 불리는 리간드 집단에 결합함으로써 발달 중인 조직과 성체 조직에서 복수의 과정을 조절하는 수용체 티로신 키나아제의 대과(large family)이다. Eph 수용체는 에프린 리간드를 보유하는 A-형 또는 B-형으로 구분된다. 현재, 9개의 공지된 A-형 구성원, EphA1-8과 EphA10 및 4개의 공지된 B-형 구성원, EphB1-4와 EphB6이 존재한다. 일반적으로, A 부류 수용체는 A-형 리간드에 우선적으로 결합하는 반면, B 부류 수용체는 B형 리간드에 우선적으로 결합한다. 이러한 Eph 수용체는 다른 수용체 티로신 키나아제와 유사하게, 단일 막통과 전장 도메인(single transmembrane spanning domain)을 포함하고, 당화된 세포외 영역은 면역글로불린-유사 모티프를 포함하는 리간드-결합 도메인, 시스테인 풍부한 영역(cysteine rich region), 2개의 피브로넥틴 III형 반복(repeat)을 포함한다(Surawska *et al.*, Cytokine & Growth Factor Reviews 15:419-433(2004)). 이들 에프린 리간드는 서열 보존(sequence conservation)에 따라, A 부류와 B 부류로 구분된다. ephrinA 리간드는 글리코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol) 고정되고, 통상적으로 Eph-A형 수용체에 의해 결합되는 반면, ephrinB 리간드는 막통과 도메인(transmembrane domain)과 짧은 세포질 영역

(cytoplasmic region)을 보유하고, 통상적으로 EphB-형 수용체에 의해 결합된다(*Id*).

- <8> 신호전달 과정은 Eph 수용체가 에프린 리간드로 이량화되어 인산화될 때 시작된다. 에프린-Eph수용체 복합체의 집합체는 고급 클러스터링(higher-order clustering)에 의해 형성된다. 수용체 활성화는 다중화(multimerization)의 정도에 좌우되는 것으로 생각되긴 하지만 수용체 인산화(receptor phosphorylation)가 하급 형태(lower-order form)와 고급 형태(higher-order form) 모두에서 관찰된다는 점에서 이러한 구조이성 형태(tetrameric form)에 한정되지 않는다. 다중화 상태에 따라, 별개의 Eph 수용체 복합체가 생물학적 효과를 유도할 수 있다. Eph 수용체를 통한 수용체-발현 세포로의 “전방(forward)” 신호전달 이외에, 에프린을 통한 에프린-발현 세포로의 “후방(backward)” 신호전달 역시 존재한다. 가령, B-에프린 상에서 세포질 꼬리(cytoplasmic tail)가 인산화되어 에프린-신호전달 세포 내에서 신호전달 작동체(effector)의 동원(recruitment) 및 신호 전달 캐스케이드(signal transduction cascade)를 유도할 수 있다(*Id*).
- <9> 에프린은 축색 길잡이(axon pathfinding), 신경 세포 이동(neuronal cell migration) 및 혈관 내피세포와 특수한 상피 내에서 상호작용을 비롯한 많은 세포-세포 상호작용(cell-cell interaction)에서 일정한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Flanagan & Vanderhaeghen, *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345(1998); Frisen *et al.*, *EMBO J.* 18:5159-5165(1999)). Eph 수용체는 또한, 종양 진행(tumor progression), 혈관신생(angiogenesis)의 병리학적 형태, 조직 손상이후 만성 통증, 척수(spinal cord) 손상이후 신경 재생(nerve regeneration)의 저해, 인간 선천성 기형(congenital malformation)을 비롯한 다양한 병리학적 과정(pathological process)에도 관여한다(Koolpe *et al.*, *J Biol Chem.* 280:17301-17311(2005)). Eph 수용체는 또한, 줄기 세포 자기-재생 vs. 세포-운명 결정과 분화의 균형에서 일정한 역할을 하는 것으로 보고되었다(*Id*).
- <10> Eph 수용체와 에프린 과다-발현(over-expression)은 종양형성(tumorigenesis)을 유발할 수 있고, 폐암, 유방암, 전립선암, 흑색종, 백혈병을 비롯한 다양한 유형의 인간 암에서 혈관신생과 전이와 연관한다(Surawska *et al.*, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15:419-433(2004)). Eph 수용체의 과다-발현은 세포의 증식에 영향을 주는 것이 아니라 이들의 침해성 행동(invasive behavior)을 변화시키는 것으로 생각된다. 한 이론에 따르면, 높은 수준의 EphA2를 보유하는 악성 세포에서, 이들 수용체는 잘못된 장소에 배치되고, 그들의 에프린 리간드에 결합하지 못하고, 따라서 인산화되지 못하여 증가된 세포내 매트릭스 점착(extracellular matrix adhesion) 및 더욱 높은 전이 잠재력(metastatic potential)이 결과된다(Ruoslahti, *Adv. Cancer Res.* 76:1-20(1999)). 혈관신생은 기존의 맥관구조(vasculature)로부터 새로운 혈관과 모세혈관의 형성이고, 종양 생존과 성장에 필수적인 과정이다. 종양의 혈관 침입 동안 Eph 수용체/에프린 상향-조절(up-regulation)을 암시하는 증거가 존재한다(Surawska *et al.*, (2004)). 특히, A-형 에프린은 종양 혈관신생과 연관되고, EphA2-Fc와 EphA3-Fc 융합 단백질은 종양 혈관 밀도(tumor vascular density), 종양 체적(tumor volume), 세포 증식(cell proliferation)을 감소시키고, 또한 아포토시스를 증가시켰다(Brantley *et al.*, *Oncogene* 21:7011-7026(2002)).
- <11> EphB2 수용체-ephrinB2 복합체의 결정 구조는 ephrinB2 접힘 위상(folding topology)의 엑토도메인이 통상적인 그리스 열쇠 β-배럴(barrel) 접힘 상에서 이형인 8개-가닥 배럴이고, ephrinB2가 구리에 결합하진 않지만 구리-보유 단백질의 쿠프레독신 집단과 상당한 유사성을 공유한다는 것을 암시한다. 에프린과 쿠프레독신-접힘 단백질 사이의 주요한 차이점은 각각, 이량화와 사량화(tetramerization) 리간드 수용체 인터페이스의 일부인 에프린 G-H₁과 C-D₁ 루프(loop)의 특별한 길이이다. 결정화(Crystallization) 연구 결과는 G-H₁ 루프가 수용체 결합에 관여한다는 것을 더욱 뒷받침한다(Himanen *et al.*, *Nature* 414:933-938(2001)). 생쥐 ephrinB2의 세포외 도메인(extracellular domain) 역시 식물 노둘린(nodulin)과 피토시아닌에 위상적 유사성(topological similarity)을 갖는다(Toth *et al.*, *Developmental Cell*, 1:83-92(2001)).
- <12> 미생물 병원체로 감염된 인간과 동물에서 암의 진행에 관한 보고서는 100여 년 전으로 거슬러 올라가는데, Coley(*Clin. Orthop. Relat. Res.* 262:3-12 (1891))에 의해 최초로 보고되었다. 여러 후속 보고서에서는 미생물 병원체가 혈중산소감소 조건(hypoxic condition) 하에 종양 부위에서 복제하고, 또한 감염 동안 숙주의 면역계를 자극하여 암 진행의 저해를 유도한다는 것을 입증하였다(Alexandrof *et al.*, *Lancet* 353:1689-1694(1999); Paglia & Guzman, *Cancer Immunol. Immunother.* 46:88-92(1998); Pawelek *et al.*, *Cancer Res.* 57:4537-4544(1997)). 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 등과 같은 세균 병원체는 이러한 세균이 숙주 방어(host defense)를 회피하고 질병을 유발할 수 있도록 하는 여러 다양한 독력 인자(virulence factor)를 생산한다(Tang *et al.*, *Infect. Immun.* 64:37-43(1996); Clark and Bavoil, *Methods in Enzymology*, vol.235, *Bacterial Pathogenesis*, Academic Press, Inc. San Diego Calif.(1994); Salyers and Whitt, *Bacterial*

Pathogenesis: A Molecular Approach, ASM Press, Washington D.C.(1994)). 일부 독력 인자는 대식세포 (macrophage)와 같은 식세포(phagocytic cell)에서 아포토시스를 유도하여 숙주 방어를 파괴한다(Monack *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10385-10390(1997); Zychlinsky and Sansonetti, J. Clin. Investig. 100:493-495(1997)).

<13> 녹농균(*P. aeruginosa*)에 의해 만들어지는 2가지 산화환원 단백질, 쿠프레독신 아주린과 시토크롬 c₅₅₁(Cyt c₅₅₁)은 둘 모두 J774 세포 내로 들어가고 정상 세포에 비하여 인간 암 세포에 대하여 현저한 세포독성 활성을 나타낸다(Zaborina *et al.*, Microbiology 146: 2521-2530 (2000)). 아주린은 또한, 인간 흑색종 UISO-Mel-2 또는 인간 유방암 MCF-7 세포 내로 들어갈 수도 있다(Yamada *et al.*, PNAS 99:14098-14103(2002); Punj *et al.*, Oncogene 23:2367-2378(2004); Yamada *et al.*, Cell. Biol. 7:14181431(2005)). 이에 더하여, 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 아주린은 J774 뮤린 세망 세포(reticulum cell) 육종 세포(sarcoma cell) 내로 우선적으로 들어가고, 종양 억제 단백질 p53과 복합체를 형성하여 이를 안정화시키고, p53의 세포내 농도를 강화시키고, 아포토시스를 유도한다(Yamada *et al.*, Infection and Immunity, 70:7054-7062(2002)). 아주린은 또한, 비-암성 세포에 비하여 인간 골육종(osteosarcoma) 세포에서 아포토시스의 현저한 증가를 유도하였다(Ye *et al.*, Ai Zheng 24:298-304(2003)).

<14> 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 시토크롬 C₅₅₁(Cyt C₅₅₁)은 종양 억제 단백질 p16^{Ink4a}의 수준을 강화시키고, J774 세포에서 세포 주기를 저해한다(Hiraoka *et al.*, PNAS 101:6427-6432(2004)). 하지만, HCT 116 세포와 같은 결합 암 세포, 또는 p53-없는 폐암 H1299 세포가 야생형 아주린 또는 야생형 시토크롬 c₅₅₁의 존재에서 3일 동안 배양되는 경우에, 이들은 H1299 세포(>20 µg/ml)에서보다 훨씬 낮은 농도(아주린의 경우 IC50 = 17 µg/ml; Cyt C의 경우에 12 µg/ml)에서 HCT116 세포의 성장을 저해하였다(*Id*).

<15> 암은 성장이 잠재적으로 제한되지 않는 악성 종양이다. 이는 일차적으로, 인간 체내에서 발견되는 다양한 유형의 세포의 병원성 복제(pathogenic replication)(정상적인 조절 통제의 상실)이다. 이러한 질환의 최초 치료는 주로 수술, 방사선 치료(radiation treatment) 또는 이들 치료의 조합이지만, 국소 재발성과 전이성 질환이 빈번하게 발생한다. 일부 암의 경우에 화학치료제가 가용하긴 하지만, 이들은 장기적인 완화(long term regression)를 거의 유도하지 못한다. 이런 이유로, 이들은 종종 치료력이 없다. 통상적으로, 종양과 이들의 전이는 다제약제 내성(multidrug resistance)의 발생으로 알려져 있는 현상으로 인하여, 화학요법에 반응하지 않게 된다. 많은 경우에, 종양은 일부 부류의 화학치료제에 선천적으로 내성이다. 이에 더하여, 이들 치료제는 비-암성 세포를 파괴하고, 인체에 스트레스를 유발하고, 많은 부작용을 발생시킨다. 이런 이유로, 암 세포의 확산을 예방하기 위하여, 개선된 치료제가 요구된다.

<16> 본 발명의 요약

<17> 본 발명은 포유동물 세포에서 에프린(ephlin) 신호전달 체계를 간섭하는 쿠프레독신(cupredoxin) 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 이용하는 조성물과 방법에 관계한다. 구체적으로, 본 발명은 포유동물에서 암을 치료하기 위하여 쿠프레독신, 예를 들면, 아주린(azurin), 루스티시아닌(rusticyanin), 플라스토시아닌(plastocyanin) 및 이들의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 이용하는 조성물과 방법에 관계한다.

<18> 본 발명의 한 측면은 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 포유동물 세포 또는 조직 내에서 암의 성장을 저해할 수 있는 분리된 펩티드에 관계한다. 이러한 펩티드는 아주린(azurin), 플라스토시아닌(plastocyanin), 슈도아주린(pseudoazurin), 루스티시아닌(rusticyanin) 또는 아우라시아닌(auracyanin), 구체적으로, 아주린, 플라스토시아닌, 루스티시아닌이다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 알칼리케네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*), 보르테텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 메틸로모나스 종(*Methylomonas sp.*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*), 오이(*Cucumis sativus*), 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*), 구체적으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 유래된다. 이러한 분리된 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택되는 서열의 일부이다. 부가적으로, 상기 펩티드는 SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택되는 서열과 적어도 90% 아미노산 서

열 동일성(identity)을 갖는다.

- <19> 일부 구체예에서, 분리된 펩티드는 쿠프레독신의 절두이다. 특정한 구체예에서, 펩티드는 10개 이상의 잔기 및 100개 이하의 잔기를 보유한다. 이러한 펩티드는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 88-113, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 70-84, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98 또는 SEQ ID NO:22-30을 포함하거나, 또는 이러한 영역으로 구성된다. 일부 구체예에서, 분리된 펩티드는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 88-113, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 70-84, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98, SEQ ID NO:22-30에서 선택되는 목적 쿠프레독신의 한 영역과 등가의 표적 쿠프레독신 잔기를 포함한다.
- <20> 본 발명의 다른 측면은 포유동물 세포 또는 조직 내에서 암의 성장을 저해할 수 있는 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물이다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 정맥내 투여용으로 제조된다. 쿠프레독신은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*), 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 메틸로모나스 종(*Methylomonas sp.*), 수막염균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*), 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*), 오이(*Cucumis sativus*), 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*), 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*), 구체적으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*), 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신은 SEQ ID NO: 1-17 및 22-23에서 선택된다.
- <21> 본 발명의 다른 측면은 에프린 신호전달 체계와 관련된 병리학적 이상 또는 암으로 고통받는 포유동물 환자를 치료하는 방법인데, 상기 방법은 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물의 치료 효과량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 환자는 간질성 방광염(interstitial cystitis, IC), 염증성 장 질환(IBD)과 연관된 병소, HIV 감염, 심혈관 질환, 중추신경계 질환, 말초 혈관 질환, 바이러스 질환, 중추신경계의 퇴행(Christopher Reeve 병), 또는 알츠하이머 병으로 고통받는다. 다른 구체예에서, 환자는 유방암, 간암, 위장관암, 신경모세포종, 신경암, 백혈병, 림프종, 전립선암, 췌장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 자궁내막 종양, 용모막암종, 기형암종, 갑상선암, 연부 조직(soft tissue)과 뼈로부터 발생하는 것들을 비롯한 모든 육종, 신장 암종, 표피암, 또는 비-소세포 폐암과 같은 암으로 고통받는다. 일부 구체예에서, 환자는 인간이다.
- <22> 본 발명의 다른 측면은 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체인 적어도 2개의 분리된 폴리펩티드를 함유하고 포유동물 세포 또는 조직 내에서 암의 성장을 저해할 수 있는 제약학적 조성물이다. 일부 구체예에서, 조성물은 제약학적 조성물이다.
- <23> 본 발명의 다른 측면은 바이알 내에, 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물을 포함하는 키트이다. 이러한 키트는 정맥내 투여용으로 설계된다.
- <24> 본 발명의 다른 측면은 포유동물 암 세포를 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체와 접촉시키고, 이들 암 세포의 성장을 측정하는 단계를 포함하는 방법이다. 암 세포는 유방암, 간암, 위장관암, 신경모세포종, 신경암, 백혈병, 림프종, 전립선암, 췌장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 자궁내막 종양, 용모막암종, 기형암종, 갑상선암, 연부 조직과 뼈로부터 발생하는 것들을 비롯한 모든 육종, 신장 암종, 표피암, 또는 비-소세포 폐암이다. 일부 구체예에서, 암 세포는 생체내 존재한다.
- <25> 본 발명의 다른 측면은 포유동물 세포 또는 조직 내에서 암의 성장을 저해할 수 있는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 인코딩하는 발현 벡터이다.
- <26> 본 발명의 다른 측면은 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, 에프린 수용체, 예를 들면, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6에 결합할 수 있는 분리된 펩티드이다. 일부 구체예에서, 펩티드는 에프린, 예를 들면, ephrinA1, ephrinA2, ephrinA3, ephrinA4, ephrinA5, ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4에 결합한다. 다른 구체예에서, 분리된 펩티드는 에프린과 이의 수용체, 구체적으로, Ephrin2B와 Eph2B에 결합한다. 관련된 측면에서, 분리된 펩티드는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체이고, ephrinA1, ephrinA2, ephrinA3, ephrinA4,

ephrinA5, ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4와 같은 에프린에 결합할 수 있다.

- <27> 본 발명의 다른 측면은 포유동물 환자에 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 투여하여 환자에서 혈관의 성장을 조절하는 단계를 포함하는 방법이다. 본 발명의 다른 측면은 포유동물 환자에 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 투여하여 환자에서 혈관의 성장을 감소시키는 단계를 포함하는 방법이다.
- <28> 본 발명의 다른 측면은 포유동물 환자에 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 투여하여 환자에서 신경의 성장을 조절하는 단계를 포함하는 방법이다. 본 발명의 다른 측면은 포유동물 환자에 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 투여하여 환자에서 골형성(osteogenesis)을 촉진하는 단계를 포함하는 방법이다.
- <29> 본 발명의 다른 측면은 에프린의 이용을 필요로 하는 치료 방법에서 에프린 대신에 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물의 효과량을 포유동물 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법이다.
- <30> 본 발명의 다른 측면은 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 포유동물 세포에 접촉시켜 상기 세포와 연관된 에프린 수용체의 활성을 저해하는 단계를 포함하는 방법이다.
- <31> 본 발명의 다른 측면은 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 포유동물 세포에 접촉시켜 상기 세포와 연관된 에프린 수용체의 활성을 증가시키는 단계를 포함하는 방법이다. 본 발명의 다른 측면은 에프린 수용체를 발현하는 조직을 보유하는 인간 환자에, 제약학적 약제에 용해된 적어도 하나의 쿠프레독신; 또는 쿠프레독신의 유도체, 또는 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 포함하는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이다. 일부 구체예에서, 에프린 수용체를 발현하는 조직은 암이다.
- <32> 본 발명의 다른 측면은 에프린 수용체를 보유하는 조직을 탐지하는 방법인데, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다: 탐지가능 프로브에 용해된 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 본 발명의 펩티드를 함유하는 제약학적 조성물을 인간 환자에게 투여하고; 환자 내에서 상기 프로브의 분포를 탐지한다.
- <33> 본 발명의 이와 같은 측면, 이점, 특징은 아래의 도면 및 특정한 구체예의 상세한 설명으로부터 명백할 것이다.
- <34> 서열에 관한 간단한 설명
- <35> SEQ ID NO: 1. 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <36> SEQ ID NO: 2. 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*)으로부터 플라스토시아닌의 아미노산 서열.
- <37> SEQ ID NO: 3. 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*)로부터 루스티시아닌의 아미노산 서열.
- <38> SEQ ID NO: 4. 아크로모박터 사이클로클라스테스(*Achromobacter cycloclastes*)로부터 슈도아주린의 아미노산 서열.
- <39> SEQ ID NO: 5. 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*)로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <40> SEQ ID NO: 6. 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*) ssp. *데니트리피칸스(denitrificans)* I로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <41> SEQ ID NO: 7. 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <42> SEQ ID NO: 8. 메틸로모나스 종(*Methylomonas* sp.) J로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <43> SEQ ID NO: 9. 수막염균(*Neisseria meningitidis*) Z2491로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <44> SEQ ID NO: 10. 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)으로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <45> SEQ ID NO: 11. 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <46> SEQ ID NO: 12. 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*)로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <47> SEQ ID NO: 13. 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*) 9a5c로부터 아주린의 아미노산 서열.
- <48> SEQ ID NO: 14. 오이(*Cucumis sativus*)로부터 스텔라시아닌(stellacyanin)의 아미노산 서열

- <49> SEQ ID NO: 15. 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 아우라시아닌 A의 아미노산 서열.
- <50> SEQ ID NO: 16. 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 아우라시아닌 B의 아미노산 서열.
- <51> SEQ ID NO: 17. 오이(*Cucumis sativus*)로부터 오이 기초 단백질(cucumber basic protein)의 아미노산 서열.
- <52> SEQ ID NO: 18. 잔기 96-113으로부터 18-mer 아주린 펩티드, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린의 아미노산 서열.
- <53> SEQ ID NO: 19. 잔기 88-113으로부터 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린의 아미노산 서열.
- <54> SEQ ID NO: 20. 잔기 70-84로부터 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌의 아미노산 서열.
- <55> SEQ ID NO: 21. 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*) 아주린의 아미노산 서열.
- <56> SEQ ID NO: 22. 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌의 아미노산 서열.
- <57> SEQ ID NO: 23. 인간으로부터 ephrinB2 엑토도메인(ectodomain)의 아미노산 서열.
- <58> SEQ ID NO: 24. 인간 ephrinB2의 G-H 루프 영역(loop region)의 아미노산 서열.
- <59> SEQ ID NO: 25. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 영역의 아미노산 서열.
- <60> SEQ ID NO: 26. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 티오바실루스(*Thiobacillus*)(*Acidithiobacillus*) 페로옥시단스(*ferrooxidans*) 루스티시아닌 영역의 아미노산 서열.
- <61> SEQ ID NO: 27. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 아우라시아닌 B 영역의 아미노산 서열.
- <62> SEQ ID NO: 28. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 영역의 아미노산 서열.
- <63> SEQ ID NO: 29. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 오이(*Cucumis sativus*) 오이 기초 단백질 영역의 아미노산 서열.
- <64> SEQ ID NO: 30. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 오이(*Cucumis sativus*) 스텔라시아닌 영역의 아미노산 서열.
- <65> SEQ ID NO: 31. 인간 ephrinB2 잔기 69-138의 아미노산 서열.
- <66> SEQ ID NO: 32. 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 잔기 57-98의 아미노산 서열.
- <67> SEQ ID NO: 33. 인간 ephrinB2 잔기 68-138의 아미노산 서열.
- <68> SEQ ID NO: 34. 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 76-128의 아미노산 서열.

발명의 상세한 설명

- <79> 정의
- <80> 본 명세서에서, “세포”는 “단일 세포”로서 구체적으로 명시되지 않는 경우에, 상기 용어의 단수와 복수를 모두 포괄한다.
- <81> 본 명세서에서, “폴리펩티드”, “펩티드”, “단백질”은 동일한 의미로서 이용되고, 아미노산 잔기의 중합체를 지시한다. 상기 용어는 하나이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공적인 화학 유사체인 아미노산 중합체에 적용된다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다. “폴리펩티드”, “펩티드”, “단백질”은 당화(glycosylation), 지질 부착(lipid attachment), 황화(sulfation), 글루탐산(glutamic acid) 잔기의 감마-카르복실화(gamma-carboxylation), 하이드록실화(hydroxylation), ADP-리보실화(ribosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 변형 역시 포함한다. 폴리펩티드가 항상 완전하게 선형인 것은 아니다. 가령, 폴리펩티드는 유비퀴틴화(ubiquitination)의 결과로써 분지화되고, 이들은 일반적으로, 자연적인 처리 현상(natural processing event) 및 자연적으로 발생하지 않고 인간 조작에 의해 유발되는 현상을

비슷한 번역후 현상(post-translation event)의 결과로써 환형(분지화되거나 분지화되지 않음)이다. 환형 폴리펩티드, 분지화된 폴리펩티드, 분지화된 환형 폴리펩티드는 비-번역 자연 과정 및 전적으로 합성 방법에 의해 합성될 수도 있다. 더 나아가, 본 발명에서는 본 발명의 단백질의 메티오닌-보유 아미노 말단 변이체와 메티오닌-없는 아미노 말단 변이체 모두의 이용을 고려한다.

- <82> 본 명세서에서, “병리학적 장애(pathological condition)”는 생존 동물 또는 이의 일부분의 정상 상태(normal state)의 손상을 구성하고; 신체 기능의 수행을 교란시키거나 변형하고; 다양한 인자(가령, 영양실조(malnutrition), 산업재해(industrial hazards), 또는 기후), 특정한 감염성 병원체(가령, 벌레, 기생 원충, 세균 또는 바이러스), 생물체의 유전적 결함(가령, 유전적 이형(genetic anomaly)), 또는 이들 인자의 조합에 대응하는, 정상으로부터 해부학적 이탈과 생리학적 이탈을 포괄한다.
- <83> 본 명세서에서, “장애”는 생존 동물 또는 이의 일부분의 정상 상태의 손상을 구성하고, 신체 기능의 수행을 교란시키거나 변형하는, 정상으로부터 해부학적 이탈과 생리학적 이탈을 포괄한다.
- <84> 본 명세서에서, “세포 성장의 저해”는 세포 분열(cell division) 및/또는 세포 팽창(cell expansion)의 지연 또는 중지를 의미한다. 상기 용어는 세포 발달의 저해 또는 세포 사멸의 증가 역시 포괄한다.
- <85> 본 명세서에서, “고통받는”은 현재 병리학적 장애의 증상을 나타내고, 관찰가능 증상이 없음에도 병리학적 장애를 앓고, 병리학적 장애로부터 회복하고, 병리학적 장애로부터 회복된 것을 포괄한다.
- <86> 본 명세서에서 “치료”는 치료하려는 장애 또는 이러한 장애와 연관된 증상의 진행 또는 심각도를 예방, 저하, 중단 또는 반전시키는 것을 포괄한다. 따라서, “치료”에는 적절한 의학적, 치료적 및/또는 예방적 투여가 포함된다.
- <87> “치료 효과량”은 치료되는 개체에서 특정한 장애의 발생을 예방 또는 지연시키고, 또는 이러한 장애에서 기존 증상을 완전하게 완화시키는데 효과적인 양이다. 치료 효과량의 결정은 당업자의 능력 범위 내에 속한다.
- <88> 본 명세서에서 “p53 종양 억제 유전자의 발현이 결여된”은 불활화, 돌연변이, 상실 또는 과소 생산되는 p53 종양 억제 유전자를 보유하는 세포를 지시한다. 가령, 이런 결여는 p53 유전자 내에서 유전적 변이(genetic aberration)의 결과로써 발생하거나, 또는 상기 종양 억제 유전자의 상류 CG 섬(island) 내에서 C 잔기의 과다 메틸화(hypermethylation) 또는 바이러스와 세포 종양유전자와의 상호작용과 같은 유전자외적(epigenetic) 원인으로 인하여 발생한다.
- <89> 본 명세서에서 “쿠프레독신”을 수식하는데 이용되는 “실질적으로 순수한”은 다른 단백질 및/또는 활성 저해 화합물이 실질적으로 존재하지 않거나 섞이지 않은 형태의 쿠프레독신, 예를 들면, 성장 배지 또는 세포 내용물로부터 분리된 쿠프레독신을 지시한다. “실질적으로 순수한”은 분리된 분획물의 건물 중량(dry weight)당 적어도 75%의 인자(factor), 또는 적어도 “75% 실질적으로 순수한” 인자를 의미한다. 더욱 적절하게는, “실질적으로 순수한”은 활성 화합물의 건물 중량당 적어도 85%의 화합물, 또는 적어도 “85% 실질적으로 순수한” 화합물을 의미한다. 가장 적절하게는, “실질적으로 순수한”은 활성 화합물의 건물 중량당 적어도 95%의 화합물, 또는 적어도 “95% 실질적으로 순수한” 화합물을 의미한다. 실질적으로 순수한 쿠프레독신은 실질적으로 순수한 한 가지이상의 다른 화합물 또는 분리된 쿠프레독신과 병용될 수 있다.
- <90> “분리된”, “정제된” 또는 “생물학적으로 순수한”은 자연 상태에서 통상적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 존재하지 않는 물질을 지시한다. 따라서, 본 발명에 따른 분리된 펩티드는 가급적, *in situ* 환경에서 이들 펩티드와 통상적으로 연관되는 물질을 포함하지 않는다. “분리된” 영역은 이러한 영역이 유래되는 폴리펩티드의 전체 서열을 보유하지 않는 영역을 의미한다. “분리된” 핵산, 단백질, 또는 이의 개별 단편은 뉴클레오티드 염기서열분석(nucleotide sequencing), 제한 절단(restriction digestion), 특정 부위 돌연변이유발(site-directed mutagenesis), 핵산 단편에 대한 발현 벡터로의 서브클로닝(subcloning) 및 실질적으로 순수한 양으로 단백질 또는 단백질 단편의 획득이 포함되지만 이들이 국한되지 않는 당업자에 의한 조작으로 생체내 환경으로부터 실질적으로 이전된다.
- <91> 펩티드와 관련하여 본 명세서에서, “변이체”는 야생형 폴리펩티드와 비교하여, 아미노산이 치환된, 결실된, 또는 삽입된 아미노산 서열 변이체를 의미한다. 변이체는 야생형 펩티드의 절두(truncation)일 수도 있다. 따라서, 변이체 펩티드는 이러한 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 조작으로 만들어진다. 변이체는 폴리펩티드의 근본적인 활성의 적어도 일부에는 변화 없이 기본적인 조성이나 특성을 변화시킴으로써 만들어진다. 가령, 아주린의 “변이체”는 포유동물 암 세포의 성장을 저해하는 능력을 유지하는 돌연변이된 아주린일 수 있다. 일부 사례에서, 변이체 펩티드는 비-자연 아미노산, 예를 들면, ε-(3,5-디니트로벤조일)-Lys 잔기로 합성된다

(Ghadiri & Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990)). 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 20개, 19개, 18개, 17개 또는 16개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 15개, 14개, 13개, 12개 또는 11개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 10개, 9개, 8개 또는 7개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 6개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 5개 또는 4개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다. 일부 구체예에서, 변이체는 야생형 펩티드와 비교하여 3개, 2개 또는 1개 이하의 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된다.

<92> 본 명세서에서, “아미노산”은 임의의 자연-발생 또는 비-자연 발생 또는 합성 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 모이어티(moiety), 다시 말하면, 적어도 하나의 카르복실 잔기 및 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 탄소 원자, 전형적으로, 1개의 (α) 탄소 원자에 의해 직접적으로 연결된 적어도 하나의 아미노 잔기를 포함하는 임의의 모이어티를 의미한다.

<93> 펩티드와 관련하여 본 명세서에서 “유도체”는 표적 펩티드로부터 유래된 펩티드를 의미한다. 유래(derivation)는 펩티드가 근본적인 활성의 일부를 여전히 유지하도록 하는 상기 펩티드의 화학적 변형을 포함한다. 가령, 아주린의 “유도체”는 포유동물 암 세포의 성장을 저해하는 능력을 유지하는 화학적으로 변형된 아주린일 수 있다. 목적하는 화학적 변형에는 펩티드의 아미드화(amidation), 아세틸화(acetylation), 황화(sulfation), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 인산화(phosphorylation) 또는 당화(glycosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이에 더하여, 유도체 펩티드는 화학적 화합물, 예를 들면, 다른 펩티드, 약제 분자 또는 다른 치료제 또는 조제약, 또는 탐지가능 프로브에 폴리펩티드 또는 이의 단편의 융합체(fusion)일 수도 있다.

<94> 본 명세서에서 “아미노산 서열 동일성 비율(%)”은 두 서열을 정렬하는 경우에 후보 서열에서 아미노산 잔기와 일치하는 폴리펩티드에서 아미노산 잔기의 비율로서 정의된다. 아미노산 동일성 비율(%)을 결정하기 위하여, 서열은 정렬하고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성 비율(%)을 확보하기 위하여 갭(gap)을 도입한다; 보존성 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주되지 않는다. 동일성 비율(%)을 측정하기 위한 아미노산 서열 정렬 절차는 당업자에게 공지되어 있다. 공개적으로 가용한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들면, BLAST, BLAST2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어가 펩티드 서열을 정렬하는데 이용된다. 특정한 구체예에서, Blastp(National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD로부터 입수가능)는 long complexity filter, expect 10, word size 3, existence 11, extension 1의 디폴트 모수에서 이용된다.

<95> 아미노산 서열을 정렬하는 경우에, 일정한 아미노산 서열 B에 대한 일정한 아미노산 서열 A(또는, 일정한 아미노산 서열 B에 대한 특정 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 일정한 아미노산 서열 A)의 아미노산 서열 동일성 비율(%)은 아래와 같이 산정될 수 있다:

<96> 아미노산 서열 동일성 비율(%) = $X/Y * 100$

<97> 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 또는 알고리즘 정렬에 의해 A와 B의 동일한 정합(match)으로 기록되는 아미노산 잔기의 수이고,

<98> Y는 B에서 아미노산 잔기의 총수이다.

<99> 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 비율(%)은 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 비율(%)과 일치하지 않을 것이다. 더욱 짧은 서열에 더욱 긴 서열을 비교하는 경우에, 더욱 짧은 서열은 “B” 서열이 될 것이다. 가령, 상응하는 야생형 폴리펩티드에 절두된 폴리펩티드를 비교하는 경우에, 절두된 펩티드는 “B” 서열이 될 것이다.

<100> **총론**

<101> 본 발명의 일부 측면에서는 다양한 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린 신호전달 체계를 간섭하고, 포유동물 암 세포의 성장을 저해하기 위하여 에프린에 구조적 유사성을 갖는 쿠프레독신을 이용하는 조성물과 방법을 제시한다. 구체적으로, 본 발명에서는 에프린 신호전달 체계를 간섭하고, 시험관내와 생체내에서 포유동물 암 세포의 성장을 저해하기 위하여 쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 이용하는 조성물과 방법을 제시한다.

<102> 본 발명자들은 병원성 미생물이 ATP-독립성 세포독성 인자, 예를 들면, 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 아주린

과 같은 산화환원(redox) 단백질을 분비하고, 이런 인자가 특히, 암 세포에서 아포토시스(apoptosis)에 의한 J774 세포 사멸을 유도하는 것을 앞서 발견하였다. 또한, 아주린은 상기 단백질이 암 세포 내로 우선적으로 침투하여 세포독성(cytotoxicity)을 유도하도록 조장하는 대략 50-77개 아미노산 잔기의 도메인을 보유하고 있다.

<103> 놀랍게도, 본 발명자들은 이들 에프린에 구조적 유사성을 나타내는 아주린과 다른 쿠프레독신에서 C-말단 도메인이 관찰된다는 것을 발견하였다(실시예 2, 5, 9 참조). 또한, 아주린과 플라스토시아닌 및 에프린 G-H 루프에 구조적으로 상동한 이들 펩티드의 특정 영역은 1:1 비율로 에프린 수용체에 경쟁적으로 결합하는 것으로 알려져 있다(실시예 6-8 참조). 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린은, 특히 에프린 수용체 EphB2와 EphA6에 결합한다(실시예 6 참조). 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*) 플라스토시아닌은 에프린 수용체 EphA1, A3, B2 및 정도가 덜하긴 하지만, 에프린 수용체 EphA2와 A6에 결합 친화성을 나타낸다(실시예 6 참조). 최종적으로, 루스티시아닌은 에프린 수용체 EphA8과 B1에 약한 결합을 나타낸다(실시예 6 참조). 또한, 에프린 G-H 루프 영역에 구조적 상동성을 갖는 아주린 영역 아미노산 잔기 88-113은 에프린 수용체 EphB2에 결합하는 것으로 알려져 있다(실시예 7 참조). 최종적으로, 아주린 및 아주린의 88-113 영역은 ephrinB2와 에프린 수용체 EphB2에 결합하고, EphB2 수용체에 대하여 ephrinB2와 경쟁할 수 있는 것으로 알려져 있다(실시예 8).

<104> 본 발명자들은 또한, 에프린 G-H 루프 영역에 구조적 유사성을 갖는 영역을 보유하는 쿠프레독신이 시험관내에서 포유동물 암 세포의 성장을 저해한다는 것을 발견하였다. 일반적으로, 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*) 플라스토시아닌, 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*) 루스티시아닌, 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린은 트립판 블루(trypan blue) 측정검사서에서 Mel-2 인간 흑색종 세포와 MCF-7 인간 유방 암 세포의 시험관내 성장을 저해한다(실시예 4 참조). 더 나아가, 아주린의 88-113 잔기 영역은 MCF-7 유방암 세포의 세포 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다(실시예 10 참조). 최종적으로, ephrinB2 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 영역에 상응하는 18-mer 아주린 펩티드와 15-mer 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌 펩티드는 현재, MCF-7 인간 유방 암 세포, CCF-STTG1 뇌종양 별아교세포종(astrocytoma) 세포, LN-229 교모세포종(glioblastoma) 세포를 시험관내에서 저해하는 것으로 알려져 있다(실시예 3과 9 참조).

<105> 놀랍게도, ephrinB2의 G-H 루프에 구조적 유사성을 갖는 쿠프레독신은 생체내에서 에프린-관련된 발달에도 영향을 준다. 꼬마선충(*C. elegans*)에서 에프린-관련된 발달의 생체내 연구로부터, 쿠프레독신 루스티시아닌이 꼬리 근육 형성(tail muscle formation)을 간섭하는 반면, 쿠프레독신 아주린이 태아 발달(embryonic development)에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, 양쪽 모두 에프린-관련된 발달 과정이다(실시예 1 참조).

<106> 아주린 이외에, 쿠프레독신 루스티시아닌과 플라스토시아닌 역시 ephrinB2의 G와 H 영역과 구조적 상동성을 공유하는 것으로 알려져 있다(실시예 2와 5 참조). 더 나아가, 아주린, 피토시아닌 스텔라시아닌, 오이 기초 단백질 역시 에프린과 현저한 구조적 상동성을 공유하는 것으로 알려져 있다. 전반적으로 단백질의 쿠프레독신 집단 내에서 구조적 보존(structural conservation)으로 인하여, 많은 다른 쿠프레독신과 쿠프레독신-유사 단백질 역시 에프린에 현저한 구조적 상동성을 나타낼 것으로 예측된다(실시예 2 참조). 이런 이유로, 전반적으로 쿠프레독신 집단 단백질은 본 발명의 조성물과 방법을 이용하여, 에프린-신호전달에 관련된 질환 및 암을 치료하는데 이용될 수 있을 것으로 생각한다. 목적하는 특정 쿠프레독신에는 아주린, 루스티시아닌, 플라스토시아닌, 스텔라시아닌, 아우라시아닌, 슈도아주린, 오이 기초 단백질이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 전형적인 단백질 서열은 본 명세서에서, 플라스토시아닌(SEQ ID NO: 2와 22), 루스티시아닌(SEQ ID NO: 3), 슈도아주린(SEQ ID NO: 4), 스텔라시아닌(SEQ ID NO: 14), 아우라시아닌(SEQ ID NO: 15와 16), 오이 기초 단백질(SEQ ID NO: 17)에서 확인된다. 본 명세서에서, “쿠프레독신”은 나이세리아속(*Neisseria*)으로부터 Laz와 같은 쿠프레독신-유사 단백질을 비롯한 쿠프레독신 단백질 집단의 임의의 구성원을 의미한다.

<107> 특히, 아주린이 특이적인데, 이들 쿠프레독신에 대한 전형적인 단백질 서열은 본 명세서에서, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)(SEQ ID NO: 1); 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*)(SEQ ID NO: 5); 아크로모박터 실로속시단(*Achromobacter xylosoxidans*) ssp. 데니트리피칸스(*denitrificans*) I(SEQ ID NO: 6); 보르테텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)(SEQ ID NO: 7); 메틸로모나스 종(*Methylomonas sp.*) J(SEQ ID NO:8); 수막염균(*Neisseria meningitidis*)(SEQ ID NO: 9); 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)(SEQ ID NO:10); 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)(SEQ ID NO: 11); 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*)(SEQ ID NO: 12); 포도피어슨병균(*Xylella fastidiosa*) 9a5c(SEQ ID NO: 13); 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)(SEQ ID NO:21)로부터 분리된 것들에서 확인된다. 가장 특이적인 구체예에서, 아주린은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 유래된다. 다른 특이적인 구체예에서, 쿠프레독신은 플라스토시아닌(SEQ ID NO: 2와 22), 루스티시아닌 (SEQ ID NO: 3), 슈도아주린(SEQ ID NO: 4), 스텔라시아닌

(SEQ ID NO: 14), 아우라시아닌(SEQ ID NO: 15와 16), 오이 기초 단백질 (SEQ ID NO: 17)이다.

<108> 일부 구체예에서, 쿠프레독신은 그리스 열쇠 베타-배럴 구조를 보유한다. 그리스 열쇠 베타-배럴 구조는 널리 공지된 단백질 접힘이다(참조: Zhang & Kim (*Proteins* 40:409-419 (2000)). 그리스 열쇠 위상(topology)은 그리스 도기에서 흔히 나타나는 패턴에서 이름을 따다. 이는 헤어핀(hairpin)에 의해 연결되는 3개의 업-앤-다운(up-and-down) 베타 가닥을 보유하는데, 이들에 뒤이어 첫 번째 베타 가닥에 인접하여 위치하는 네 번째 베타 가닥에 더욱 긴 연결(connection)이 위치한다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 적어도 하나의 그리스 열쇠 베타-배럴 구조를 포함한다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 적어도 4개의 베타 가닥의 그리스 열쇠 구조를 포함한다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 적어도 8개의 베타 가닥의 그리스 열쇠 구조를 포함한다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 하나 이상의 그리스 열쇠 베타-배럴 구조를 포함한다.

<109> 본 발명의 조성물

<110> 본 발명에서는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체인 펩티드를 제시한다. 일부 구체예에서, 펩티드는 실질적으로 순수하다. 다른 구체예에서, 펩티드는 이러한 펩티드를 함유하거나, 이러한 펩티드로 구성되거나, 또는 이러한 펩티드로 본질적으로 구성되는 조성물 내에 존재한다. 다른 구체예에서, 펩티드는 분리된다. 일부 구체예에서, 펩티드는 전장 이하의 쿠프레독신이고, 쿠프레독신의 기능적 특징의 일부를 유지한다. 일부 구체예에서, 펩티드는 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린-신호전달을 간섭하고 및/또는 포유동물 암 세포의 성장을 저해하는 능력을 유지한다. 다른 특정한 구체예에서, 펩티드는 포유동물, 더욱 바람직하게는, 인간에서 면역 반응을 유발하지 않는다.

<111> 본 발명에서는 또한, 적어도 하나의, 적어도 2개의 또는 적어도 3개의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 조성물을 제시한다. 본 발명에서는 또한, 적어도 하나의, 적어도 2개의 또는 적어도 3개의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다.

<112> 쿠프레독신 사이에 높은 구조적 상동성으로 인하여, 이러한 집단의 다른 쿠프레독신은 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린 신호전달을 간섭하고, 구체적으로, 암의 성장을 저해할 수 있을 것으로 고려된다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신에는 아주린, 슈도아주린, 플라스토시아닌, 루스티시아닌 또는 아우라시아닌이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정한 구체예에서, 아주린은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*); 알칼리게네스 파이칼리스(*Alcaligenes faecalis*); 아크로모박터 실로속시단 ssp. 데니트리피칸스(*denitrificans*) I; 보르테텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*); 메틸로모나스 종(*Methylomonas sp.*); 수막염균(*Neisseria meningitidis*); 임균(*Neisseria gonorrhoeae*); 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*); 슈도모나스 클로로라피스(*Pseudomonas chlororaphis*); 포도피어스병균(*Xylella fastidiosa*) 9a5c, 또는 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)로부터 유래된다. 더욱 특정한 구체예에서, 아주린은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 유래된다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신은 플라스토시아닌, 더욱 구체적으로, 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*) 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 유래된 플라스토시아닌이다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신은 루스티시아닌, 더욱 구체적으로, 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*)로부터 유래된 루스티시아닌이다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신은 SEQ ID NO: 1-17, 21-22 인 아미노산 서열을 포함한다.

<113> 본 발명에서는 야생형 폴리펩티드와 비교하여 아미노산이 치환, 결실 또는 삽입된 쿠프레독신의 아미노산 서열 변이체를 제시한다. 본 발명의 변이체는 야생형 폴리펩티드의 절두일 수도 있다. 본 명세서에서, 폴리펩티드의 “절두”는 이러한 폴리펩티드 서열의 적어도 하나의 단부로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기의 제거로부터 유래되는 펩티드이다. 일부 구체예에서, 절두 펩티드는 이러한 폴리펩티드 서열의 한쪽 또는 양쪽 단부로부터 적어도 하나의 아미노산 잔기, 적어도 5개의 아미노산 잔기, 적어도 10개의 아미노산 잔기, 적어도 50개의 아미노산 잔기, 또는 대략 100개의 아미노산 잔기의 제거로 유래된다. 일부 구체예에서, 조성물은 전장 이하의 야생형 폴리펩티드인 쿠프레독신의 한 영역으로 구성되는 펩티드를 함유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 절두된 쿠프레독신의 10개 이상의 잔기, 15개 이상의 잔기 또는 20개 이상의 잔기로 구성되는 펩티드를 함유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 절두된 쿠프레독신의 100개 이하의 잔기, 50개 이하의 잔기, 40개 이하의 잔기 또는 30개 이하의 잔기로 구성되는 펩티드를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체는 쿠프레독신, 더욱 구체적으로, SEQ ID NO: 1-17, 21-22와 적어도 90% 아미노산 서열 동일성, 적어도 95% 아미노산 서열 동일성 또는 적어도 99% 아미

노산 서열 동일성을 갖는 펩티드이다.

- <114> 특정한 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113(SEQ ID NO:18), 88-113(SEQ ID NO:19) 또는 SEQ ID NO:25를 포함한다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 잔기 96-113(SEQ ID NO:18), 88-113(SEQ ID NO:19) 또는 SEQ ID NO:25로 구성된다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 70-84(SEQ ID NO:20), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98(SEQ ID NO:32), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 서열 SEQ ID NO:28을 포함한다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 70-84(SEQ ID NO:20), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 잔기 57-98(SEQ ID NO:32), 또는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 서열 SEQ ID NO:28로 구성된다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*) 루스티시아닌 서열 SEQ ID NO:26, 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 아우라시아닌(SEQ ID NO:27), 오이(*Cucumis sativus*) 서열 SEQ ID NO:29와 30을 포함한다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신의 변이체는 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*) 루스티시아닌 서열 SEQ ID NO:26, 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 아우라시아닌(SEQ ID NO:27), 오이(*Cucumis sativus*) 서열 SEQ ID NO:29와 30으로 구성된다. 다른 특정한 구체예에서, 변이체는 다른 쿠프레독신으로부터 상기 절두된 서열에 등가 잔기(equivalent residue)로 구성된다. 또한, 상기한 변이체 중에서 임의의 하나와 유사한 활성을 갖는 다른 쿠프레독신 변이체가 설계될 수도 있다. 이를 위하여, 표적 쿠프레독신 아미노산 서열은 BLAST, BLAST2, ALIGN2 또는 Megalign(DNASTAR)을 이용하여 목적 쿠프레독신 서열, 예를 들면, 상기 절두된 변이체를 포함하는 서열, 목적 쿠프레독신 서열 상에서 발견되는 상기 절두된 변이체의 관련된 잔기, 표적 쿠프레독신 서열에서 발견되는 등가 잔기에 정렬되고, 따라서, 등가의 절두된 변이체가 설계된다.
- <115> 변이체에는 자연적으로 발생하지 않는 합성 아미노산으로 만들어진 펩티드 역시 포함된다. 가령, 비-자연 발생 아미노산은 혈류(bloodstream) 내에서 조성물의 반감기(half-life)를 연장하거나 최적화하기 위하여 변이체 펩티드 내로 편입된다. 이런 변이체에는 D,L-펩티드(부분입체이성질체(diastereomer))(Futaki *et al.*, J. Biol. Chem. 276(8):5836-40(2001); Papo *et al.*, Cancer Res. 64(16):5779-86(2004); Miller *et al.*, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)); 특수한 아미노산을 보유하는 펩티드(Lee *et al.*, J. Pept. Res. 63(2):69-84(2004)), 탄화수소 스테이플링(hydrocarbon stapling)이 후행하는 올레핀-보유 비-자연 아미노산의 통합(Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470(2004)), ϵ -(3,5-디니트로벤조일)-Lys 잔기를 포함하는 펩티드가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <116> 다른 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 쿠프레독신의 유도체이다. 쿠프레독신의 유도체는 펩티드가 근본적인 활성 중에서 일부를 여전히 유지하도록 하는 상기 펩티드의 화학적 변형(chemical modification)이다. 가령, 아주린의 “유도체”는 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린-신호전달을 간섭하고, 구체적으로, 암의 성장을 저해하는 능력을 유지하는 화학적으로 변형된 아주린일 수 있다. 목적하는 화학적 변형에는 펩티드의 아미드화(amidation), 아세틸화(acetylation), 황화(sulfation), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 변형, 인산화(phosphorylation) 또는 당화(glycosylation)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이에 더하여, 유도체 펩티드는 화학적 화합물, 예를 들면, 다른 펩티드, 약제 분자 또는 다른 치료제 또는 조제약, 또는 탐지가능 프로브에 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체의 융합체(fusion)일 수도 있다. 목적하는 유도체는 예로써, 원형화된 펩티드(Monk *et al.*, BioDrugs 19(4):261-78,(2005); DeFrest *et al.*, J. Pept. Res.63(5):409-19(2004)), N-과 C-말단 변형(Labrie *et al.*, Clin. Invest. Med. 13(5):275-8,(1990)), 탄화수소 스테이플링(hydrocarbon stapling)이 후행하는 올레핀-보유 비-자연 아미노산의 통합(Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470(2004))이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 당업자에게 널리 공지된 여러 방법에 의해, 혈류 내에서 본 발명의 펩티드와 조성물의 반감기가 연장되거나 최적화될 수 있는 화학적 변형을 보유한다.
- <117> 본 발명의 펩티드는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 및/또는 구조적 등가체일 수 있다. 가령, 이들 펩티드는 PEG화된 아주린의 절두이고, 따라서, 변이체와 유도체가 모두 가능하다. 한 구체예에서, 본 발명의 펩티드는 올레핀-보유 사슬(olefin-bearing tether)을 보유하고, 루테늄(ruthenium) 촉매된 올레핀 메타세시스(olefin metathesis)에 의한 전체-탄화수소 “주요소(staple)”가 후행하는 α, α -이중치환된 비-자연 아미노산으로 합성된다(Schafmeister *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski *et al.*, Science 305:1466-1470(2004)). 부가적으로, 아주린의 구조적 등가체인 펩티드는 다른 펩티드에 융합되고, 따라서, 구조적 등가체와 유도체가 모두 가능한 펩티드를 산출한다. 이들 실행예는 본 발명을 예시할 뿐이며 한정하지 않는다. 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 구리에 결합하거나 결합하지 않을 수 있다.

- <118> 다른 구체예에서, 펩티드는 쿠프레독신의 구조적 등가체이다. 쿠프레독신과 다른 단백질 사이에 현저한 구조적 상동성을 결정하는 연구의 실례에는 Toth *et al.*, *Developmental Cell* 1:82-92(2001)가 포함된다. 구체적으로, 쿠프레독신과 구조적 등가체 사이에 현저한 구조적 상동성은 VAST 알고리즘을 이용함으로써 결정된다(Gibrat *et al.*, *Curr Opin Struct Biol* 6:377-385(1996); Madej *et al.*, *Proteins* 23:356-3690(1995)). 특정한 구체예에서, 구조적 등가체에 대한 쿠프레독신의 구조적 비교로부터 VAST p 값은 대략 10^{-3} 이하, 대략 10^{-5} 이하, 또는 대략 10^{-7} 이하이다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신과 구조적 등가체 사이에 현저한 구조적 상동성은 DALI 알고리즘을 이용함으로써 결정된다(Holm & Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138 (1993)). 특정한 구체예에서, 쌍별 구조적 비교(pairwise structural comparison)에 대한 DALI Z 스코어는 적어도 3.5, 적어도 7.0, 또는 적어도 10.0이다. 이들 결정의 실례는 실시예 2와 9에서 확인된다.
- <119> 일부 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*) 플라스토시아닌, 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*) 플라스토시아닌 또는 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*) 루스티시아닌의 기능적 특징 중에서 일부를 갖는다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린-신호전달 체계를 간섭하고 및/또는 암의 성장을 저해한다. 포유동물 암 세포 또는 조직의 성장의 저해는 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체에 의한 에프린-신호전달 체계의 간섭과 관련되거나 관련되지 않을 수 있다. 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체가 에프린 신호전달을 간섭하는 지를 결정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체가 에프린 신호전달 경로의 구성요소, 예를 들면, 에프린 및/또는 에프린 수용체에 결합하는 지를 결정하는 단계를 포함한다. 광의에서 에프린 신호전달 체계는 에프린 및 연관된 에프린 수용체, 그리고 신호를 후방과 전방으로 전달하는데 필요한 임의의 분자(또는 “구성요소”)를 포함한다. 협의에서, 에프린 신호전달 체계는 이러한 신호전달을 담당하는 에프린 및 관련된 에프린 수용체만을 포함한다. 에프린 신호전달 체계와 관련하여 “간섭”은 “전방”과 “후방” 중에서 한쪽 또는 양쪽에서, 연관된 에프린 신호전달의 증가 또는 감소를 유도할 수 있다. 에프린 신호전달 체계에서 간섭을 측정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 에프린 신호전달의 간섭을 결정하는 한 가지 방법은 실시예 6-8에 도시된 바와 같이, 에프린 또는 에프린 수용체, 또는 에프린 신호전달 체계의 다른 구성요소에 상기 펩티드의 결합 또는 이러한 구성요소와 상기 펩티드의 경쟁이다. 생체내 시스템, 예를 들면, 쿠프레독신이 에프린 신호전달을 간섭하여 꼬리 근육 형성과 태아 발달을 변화시킬 수 있는 것으로 알려져 있는 꼬마선충(*C. elegans*)이 실시예 1에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. 다른 방법에는 Himanen *et al.*, *Nat. Neurosci.* 7:501-509(2004)와 Koolpe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280:17301-17311 (2005)에 기술된 Eph 수용체 인산화 측정검사가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <120> 쿠프레독신과 쿠프레독신의 변이체가 특히, 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린 신호전달을 간섭하고 암의 성장을 저해할 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 예로써, 이러한 활성을 유지하는 쿠프레독신의 변이체, 유도체, 구조적 등가체를 설계하는 것이 가능하다. 이런 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 예로써, 다양한 변이체, 유도체, 구조적 등가체의 “라이브러리(library)”를 만들고, 이후 예로써, 당분야에 공지된 방법, 예를 들면, 실시예 3, 9, 10에 기술된 전형적인 방법을 이용하여 이들 각각에서 항암 활성을 조사함으로써 제조될 수 있다. 항-암 활성을 갖는 쿠프레독신의 생성된 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 쿠프레독신 대신에, 또는 쿠프레독신에 추가하여 본 발명의 방법에 이용될 수 있다.
- <121> 다른 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린과 현저한 구조적 상동성을 갖는다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체와 유도체는 에프린의 G-H 루프 영역 주변에서 현저한 구조적 상동성을 갖는다. 쿠프레독신과 에프린 사이에 현저한 구조적 상동성을 결정하는 연구의 실례에는 Toth *et al.*, *Developmental Cell* 1:82-92(2001) 및 본 명세서에서 실시예 2가 포함된다. 구체적으로, 쿠프레독신과 에프린 사이에 현저한 구조적 상동성은 VAST 알고리즘을 이용함으로써 결정된다(Gibrat *et al.*, *Curr Opin Struct Biol* 6:377-385(1996); Madej *et al.*, *Proteins* 23:356-3690(1995)). 특정한 구체예에서, 에프린에 대한 쿠프레독신의 구조적 비교로부터 VAST p 값은 대략 10^{-3} 이하, 대략 10^{-5} 이하, 또는 대략 10^{-7} 이하이다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신과 에프린 사이에 현저한 구조적 상동성은 DALI 알고리즘을 이용함으로써 결정된다(Holm & Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138 (1993)). 특정한 구체예에서, 쌍별 구조적 비교(pairwise structural comparison)에 대한 DALI Z 스코어는 적어도 3.5, 적어도 7.0, 또는 적어도 10.0이다.
- <122> 다른 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린 및/또는 Eph 수용체에 결합한다. 여러 쿠프레독신이 ephrinB2 엑토도메인에 구조적으로 유사한 C-말단 영역을 보유하는 것으로 알려져

있다(실시예 2, 5, 9 참조). 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린에 결합한다. 특정한 구체예에서, 에프린에는 ephrinA1, ephrinA2, ephrinA3, ephrinA4, ephrinA5, ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 더욱 특정한 구체예에서, 에프린에는 ephrinB1, ephrinB2, ephrinB3, ephrinB4가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 Eph 수용체에 결합한다. 더욱 특정한 구체예에서, Eph 수용체에는 EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린과 에프린 수용체 모두에 결합한다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린과 이의 수용체, 구체적으로, ephrinB2와 EphB2에 결합한다. 다른 단백질에 대한 단백질의 결합을 결정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. Eph 수용체에 대한 결합을 결정하는 방법의 실례에는 실시예 6-8 및 Koolpe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280:17301-17311 (2005)과 Himanen *et al.*, *Nat. Neurosci.* 7:501-509(2004)가 포함된다.

<123> 일부 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 포유동물 암 세포, 더욱 구체적으로, J774 세포에서 아포토시스(apoptosis)를 유도한다. 아포토시스를 유도하는 쿠프레독신 또는 다른 폴리펩티드의 능력은 MITOSENSOR™ APOLERT™ 미토콘드리아 막 센서 키트(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, U.S.A)를 이용한 미토센서 ApoAlert 공초점 현미경에 의해, Zou *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:11549-11556(1999)에 기술된 방법을 이용하여 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-3을 측정함으로써, 그리고 예로써, APOLERT™ DNA 단편화 키트(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, U.S.A.)를 이용하여 아포토시스-유도된 핵 DNA 단편화를 탐지함으로써 관찰될 수 있다.

<124> 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 포유동물 암 세포, 더욱 구체적으로, J774 세포에서 세포 성장 정지(cellular growth arrest)를 유도한다. 세포 성장 정지는 예로써, Yamada *et al.*, *PNAS* 101:4770-4775(2004)에 기술된 방법으로, 세포 주기 진행(cell cycle progression)의 저해 정도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 포유동물 암 세포, 더욱 구체적으로, J774 세포에서 세포 주기 진행을 저해한다.

<125> **쿠프레독신**

<126> 이들 작은 청동(blue copper) 단백질(쿠프레독신)은 세균 전자 전달 연쇄(electron transfer chain)에 참여하거나, 또는 기능이 알려지지 않은 전자 전달 단백질(10-20 kDa)을 이다. 구리 이온은 단백질 매트릭스(단백질 matrix)에 의해서만 결합된다. 구리 주변에 2개의 히스티딘과 1개의 시스테인에 독특한 뒤틀린 삼각형 2차원 정렬은 금속 부위의 매우 고유한 전자 특성 및 강렬한 푸른색을 발생시킨다. 다수의 쿠프레독신이 중간 내지 높은 해상도(resolution)에서 결정학적으로 특성화되었다.

<127> 쿠프레독신은 일반적으로, 서열 상동성(sequence homology)이 낮은 반면 구조 상동성(structural homology)이 높다(Gough & Clothia, *Structure* 12:917-925 (2004); De Rienzo *et al.*, *Protein Science* 9:1439-1454 (2000)). 가령, 아주린의 아미노산 서열은 아우라시아닌 B의 아미노산 서열에 31%, 루스티시아닌의 아미노산 서열에 16.3%, 플라스토시아닌의 아미노산 서열에 20.3%, 슈도아주린의 아미노산 서열에 17.3% 동일하다(표 1 참조). 하지만, 이들 단백질의 구조 유사성(structural similarity)은 더욱 현저하다. 아주린 대 아우라시아닌 B의 구조 비교에 대한 VAST p 값은 $10^{-7.4}$ 이고, 아주린 대 루스티시아닌의 구조 비교에 대한 VAST p 값은 10^{-5} 이고, 아주린 대 플라스토시아닌의 구조 비교에 대한 VAST p 값은 $10^{-5.6}$ 이고, 아주린 대 슈도아주린의 구조 비교에 대한 VAST p 값은 $10^{-4.1}$ 이다.

<128> 모든 쿠프레독신은 8개-가닥 그리스 열쇠 베타-배럴(beta-barrel) 또는 베타-샌드위치(beta-sandwich) 접힘(fold)을 공유하고, 고도로 보존된 부위 구조(site architecture)를 보유한다(De Rienzo *et al.*, *Protein Science* 9:1439-1454 (2000)). 많은 장쇄 지방족 잔기, 예를 들면, 메티오닌(methionine)과 루이신(leucine)의 존재로 인한 현저한 소수성 패치(hydrophobic patch)가 아주린, 아미시아닌(amicyanin), 시아노박테리아(cyanobacterial) 플라스토시아닌, 오이 기초 단백질 및 정도가 덜하지만, 슈도아주린과 진핵생물 플라스토시아닌 내에서 구리 부위 주변에 존재한다(*Id.*). 소수성 패치는 정도가 덜하지만 스텔라시아닌과 루스티시아닌 구리 부위 내에서도 관찰되는데, 하지만 특징이 상이하다(*Id.*).

표 1

<129> VAST 알고리즘을 이용하여, 다른 단백질에 대한 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 아주린(IJZG)의 서열과 구조 정렬

| PDB | 정렬 길이 ¹ | aa 동일성 % | P-값 ² | 스코어 ³ | RMSD ⁴ | 설명 |
|----------|--------------------|----------|------------------|------------------|-------------------|----------------------------|
| 1AOZ A 2 | 82 | 18.3 | 10e-7 | 12.2 | 1.9 | 아스코르브산 산화효소 |
| 1QHQ_A | 113 | 31 | 10e-7.4 | 12.1 | 1.9 | 아우라시아닌B |
| 1V54 B 1 | 79 | 20.3 | 10e-6.0 | 11.2 | 2.1 | 시토크롬 c 산화효소 |
| 1GY2 A | 92 | 16.3 | 10e-5.0 | 11.1 | 1.8 | 루스티시아닌 |
| 3MSP A | 74 | 8.1 | 10e-6.7 | 10.9 | 2.5 | 운동성 주요 정자 단백질 ⁵ |
| 1IUZ | 74 | 20.3 | 10e-5.6 | 10.3 | 2.3 | 플라스토시아닌 |
| 1KGY E | 90 | 5.6 | 10e-4.6 | 10.1 | 3.4 | ephr inB2 |
| 1PMY | 75 | 17.3 | 10e-4.1 | 9.8 | 2.3 | 슈도아주린 |

<130> ¹정렬된 길이: 2개의 구조 사이에 중첩된 C-알파와 원자의 동등 쌍(equivalent pair)의 총수, 다시 말하면, 3D 중첩을 산정하기 위하여 이용되는 잔기의 총수.

<131> ²P-VAL: VAST p 값은 확률(probability)로서 표시되는, 이러한 비교의 유의성(significance)의 척도(measure)이다. 가령, p 값이 0.001이면, 우연히 이러한 특성(quality)의 매치(match)를 볼 가능성(odds)은 1000 대 1이다. VAST로부터 p 값은 MMDB 데이터베이스 내에 500개의 독립되고 무관한 유형의 도메인이 존재한다는 가설을 이용하여 복수 비교의 효과에 대하여 조정된다. 이렇게 도출된 p 값은 500으로 나뉘진, 각 도메인 쌍의 쌍별 비교에 대한 p 값에 상응한다.

<132> ³스코어: VAST 구조-유사성 스코어(structure-similarity score). 이 숫자는 중첩된 이차 구조 요소의 총수 및 이러한 중첩의 특성에 관련된다. 더욱 높은 VAST 스코어는 더욱 높은 유사성과 상관한다.

<133> ⁴RMSD: 제곱 평균 제곱근(root mean square) 중첩 잔기(옹스트롬(Angstrom) 단위). 이 숫자는 두 구조의 최적 중첩이후, 동등한 C-알파와 원자 사이의 평균 제곱 거리의 제곱근(square root)으로서 산정된다. 주목할 점은 RMSD 수치가 구조적 정렬의 정도에 비례하고, 이러한 크기가 전체 구조 유사성의 서술자(descriptor)로서 RMSD를 이용하는 경우에 고려되어야 하는 것이다.

<134> ⁵난모세포(oocyte) 성숙에서 에프린 길항제인 것으로 입증된 꼬마선충(*C. elegans*) 주요 정자 단백질(Kuwabara, 2003 “The multifaceted *C.elegans* major sperm Protein: an ephrin signalling antagonist in oocyte maturation” Genes and Development, 17:155-161).

<135> **아주린**

<136> 아주린은 특정 세균에서 전자 전달에 관여하는 쿠프레독신 집단에 속하는 128개의 아미노산 잔기로 구성되는 구리-보유 단백질이다. 아주린에는 녹농균(*P. aeruginosa*)(SEQ ID NO: 1), 알칼리게네스 자일로족시단스(*Alcaligenes xylosoxidans*), 알칼리게네스 데니트리피칸(*Alcaligenes denitrifican*)으로부터 유래된 것들이 포함된다(Murphy et al., J. Mol. Biol. 315:859-71 (2002)). 아주린 사이에 아미노 서열 동일성이 60-90% 사이에서 변하긴 하지만, 이들 단백질은 강한 구조적 상동성을 나타낸다. 모든 아주린은 그리스 열쇠 모티프를 포함하는 특징적인 β-샌드위치를 보유하고, 단일 구리 원자는 상기 단백질의 동일 영역에 항상 위치한다. 이에 더하여, 아주린은 구리 부위를 둘러싸는 본질적으로 중성의 소수성 패치를 본질적으로 보유한다(Murphy et al.).

<137> **플라스토시아닌**

<138> 플라스토시아닌은 한 분자당 하나의 구리 분자를 보유하고 산화된 형태에서 푸른빛을 띠는 시아노박테리아

(cyanobacteria), 조류(algae), 식물의 가용성 단백질이다. 이들은 엽록소(chloroplast)에서 생성되는데, 여기서 이들은 전자 운반체(electron carrier)로서 기능한다. 1978년에 포플러 플라스토시아닌 구조의 결정이후, 조류(때목말(*Scenedesmus*), 파래속(*Enteromorpha*), 클라미도모나스(*Chlamydomonas*))와 식물(강낭콩(French bean)) 플라스토시아닌의 구조가 결정학적 방법 또는 NMR 방법으로 결정되었는데, 이러한 포플러 구조는 1.33 Å 해상도에서 세밀히 구별되었다. SEQ ID NO: 2에서는 호열성 시아노박테리아, 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*)으로부터 플라스토시아닌의 아미노산 서열을 도출한다. SEQ ID NO: 22에서는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 플라스토시아닌의 아미노산 서열을 도출한다.

<139> 조류와 관속 식물(vascular plants)의 플라스토시아닌 사이에 서열 불일치(sequence divergence)(가령, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)와 포플러 단백질 사이에 62% 서열 동일성)에도 불구하고, 이들 3차원 구조가 보존되었다(가령, 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)와 포플러 단백질 사이에 C 알파 위치에서 0.76 Å rms 편차). 구조적 특징에는 8개-가닥 역평행 베타-배럴(beta-barrel)의 한 단부에서 뒤틀린 4배위자리(tetrahedral) 구리 결합 부위, 현저한 네거티브 패치(negative patch), 평평한 소수성 표면(hydrophobic surface)이 포함된다. 구리 부위는 전자 전달 기능을 위하여 최적화되고, 네거티브와 소수성 패치는 생리학적 반응 파트너의 인식에 관여하는 것으로 제안된다. 화학적 변형, 교차-결합, 특정부위 돌연변이 유발 실험은 시토크롬 f와의 결합 상호작용에서 네거티브와 소수성 패치의 중요성을 확인하고, 플라스토시아닌이 관여하는 2가지 기능적으로 중요한 전자 전달 통로의 모형을 확인하였다. 첫 번째 추정 전자 전달 통로는 상대적으로 짧고(대략 4 Å) 소수성 패치 내에 용제-노출된 구리 리간드 His-87을 수반하는 반면, 다른 통로는 더욱 길고(대략 12-15 Å) 네거티브 패치 내에 거의 보존된 잔기 Tyr-83을 수반한다(Redinbo et al., J. Bioenerg. Biomembr. 26(1):49-66 (1994)).

<140> 루스티시아닌

<141> 루스티시아닌은 티오바실루스(*Thiobacillus*)(현재, *Acidithiobacillus*)로부터 획득된 청동-보유 단일-사슬 폴리펩티드이다. 티오바실루스 페로옥시단스(*Thiobacillus ferrooxidans*)로부터 극히 안정한 고도 산성화 쿠프레독신 루스티시아닌(SEQ ID NO: 3)의 산화된 형태의 X-레이 결정 구조는 다파장 비정상 회절(multiwavelength anomalous diffraction)로 결정되었고 1.9 Å 해상도에서 세밀히 구별되었다. 루스티시아닌은 6-개와 7-개 가닥 β-시트로 구성되는 코어 베타-샌드위치 접힘(core beta-sandwich fold)으로 구성된다. 다른 쿠프레독신과 유사하게, 구리 이온은 뒤틀린 4배위자리 내에 정렬된 4개의 보존된 잔기의 클러스터(His85, Cys138, His143, Met148)에 의해 동위(coordination)된다(Walter et al., J. Mol. Biol. 263:730-51 (1996)).

<142> 슈도아주린

<143> 슈도아주린은 청동-보유 단일-사슬 폴리펩티드 집단이다. 아크로모박터 시클로클라스테스(*Achromobacter cycloclastes*)로부터 획득된 슈도아주린의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 4에서 열거된다. 슈도아주린의 X-레이 구조 분석 결과는 슈도아주린이 아주린과의 서열 상동성(sequence homology)이 낮은 하지만 아주린에 유사한 구조를 갖는다는 것을 보여준다. 2가지 주요한 차이는 슈도아주린과 아주린의 전체 구조 사이에 존재한다. 아주린과 비교하여 슈도아주린에는 2개의 알파-나선으로 구성되는 카르복시 말단 신장이 존재한다. 중간-펩티드 영역에서, 아주린은 슈도아주린에 비하여 연장된 루프를 보유하는데, 이는 짧은 α-나선을 보유하는 플랩(flap)을 형성한다. 구리 원자 부위에서 유일한 주요 차이점은 MET 측쇄의 형태(conformation)와 Met-S 구리 결합 길이인데, 상기 길이는 아주린에서보다 슈도아주린에서 훨씬 짧다.

<144> 피토시아닌

<145> 피토시아닌(phytoeyanin)으로 확인된 단백질에는 오이 기초 단백질, 스텔라시아닌, 마비시아닌(mavicyanin), 우메시아닌(umecyanin), 오이 껍질(cucumber peeling) 쿠프레독신, 피 파드(pea pod)에서 추정 청동 단백질, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 청동 단백질이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 오이 기초 단백질과 피-파드 단백질을 제외하고, 청동 부위에서 통상적으로 관찰되는 축 메티오닌 리간드(axial methionine ligand)가 글루타민(glutamine)으로 대체된다.

<146> 아우라시아닌

<147> 아우라시아닌 A, 아우라시아닌 B-1, 아우라시아닌 B-2로 명명된 3개의 작은 청동 단백질이 호열성 녹색 활주 광합성 세균(thermophilic green gliding photosynthetic bacterium) 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 분리되었다. 이들 2가지 B 형태는 당단백질이고 서로 거의 동일한 특성을 갖지만 A 형태와는 상이하다. 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에서, 겔보기 단량체 분자 질량(apparent monomer molecular mass)이 14(A), 18(B-2), 22(B-1) kDa인 것으로 확인되었다.

- <148> 아우라시아닌 A의 아미노산 서열은 139개 잔기의 폴리펩티드인 것으로 밝혀졌다(Van Dreissche et al, Protein Science 8:947-957 (1999)). His58, Cys123, His128, Met132는 이들이 공지된 소형 구리 단백질 플라스토시아닌과 아주린에서처럼 진화적으로 보존된 금속 리간드인 경우에 예상되는 방식으로 일정한 거리를 두고 위치한다. 2차 구조 예측 역시 아우라시아닌이 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린 및 포플러 잎으로부터 플라스토시아닌의 베타-배럴 구조와 전반적으로 유사한 베타-배럴 구조를 갖는다는 것을 암시한다. 하지만, 아우라시아닌은 양쪽 소형 구리 단백질 서열의 서열 특징을 모두 갖는 것으로 보인다. 아주린의 공통 서열과 전반적인 유사성은 플라스토시아닌의 공통 서열과의 유사성과 거의 동일하다(다시 말하면, 30.5%). 아우라시아닌의 N-말단 서열 영역 1-18은 글리신과 하이드록시 아미노산이 눈에 띄게 풍부하다(*Id*). 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 아우라시아닌의 사슬 A에 대한 전형적인 아미노산 서열 SEQ ID NO: 15(NCBI Protein Data Bank Accession No. AAM12874)를 참조한다.
- <149> 아우라시아닌 B 분자는 표준 쿠프레독신 접힘을 보유한다. 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 아우라시아닌 B의 결정 구조가 조사되었다(Bond et al., J. Mol. Biol. 306:47-67 (2001)). 부가적인 N-말단 가닥을 제외하고, 상기 분자는 세균 쿠프레독신, 아주린과 매우 유사하다. 다른 쿠프레독신에서처럼, Cu 리간드 중에서 하나는 상기 폴리펩티드의 가닥 4에 위치하고, 다른 3개는 가닥 7과 8 사이의 대형 루프를 따라서 위치한다. Cu 부위 기하학은 3개의 후자 리간드 사이에 아미노산 간격(amino acid spacing)을 참조하여 논의된다. 아우라시아닌 B의 결정학적으로 특성화된 Cu-결합 도메인은 아마도, 막-결합된 여러 다른 전자-전달 단백질 내에서 공지된 사슬(tether)과 현저한 서열 동일성을 보이는 N-말단 꼬리에 의해 세포질 막의 주변질 부분(periplasmic side)에 속박된다. B 형태의 아미노산 서열은 McManus et al., J Biol Chem. 267:6531-6540 (1992)에서 제시된다. 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*)로부터 아우라시아닌의 사슬 B에 대한 전형적인 아미노산 서열 SEQ ID NO: 16(NCBI Protein Data Bank Accession No. 1QHQA)을 참조한다.
- <150> **스텔라시아닌**
- <151> 스텔라시아닌은 식물 쿠프레독신의 편재성 집단, 피토시아닌의 하위분류이다. 본 명세서에서 스텔라시아닌의 전형적인 서열은 SEQ ID NO: 14에서 열거된다. 양고추냉이 뿌리로부터 스텔라시아닌, 우메시아닌(umecyanin)(Koch et al., J. Am. Chem. Soc. 127:158-166(2005))과 오이 스텔라시아닌(Hart et al., Protein Science 5:2175-2183(1996))의 결정 구조 역시 공지되어 있다. 상기 단백질은 다른 피토시아닌과 유사한 전체 접힘을 보유한다. ephrinB2 단백질 엑토도메인 3차 구조는 스텔라시아닌에 현저한 유사성을 갖는다(Toth et al., Developmental Cell 11 :83-92(2001)). 스텔라시아닌의 전형적인 아미노산 서열은 SEQ ID NO:14(National Center for Biotechnology Information Protein DataBank Accession No. 1JER)에서 확인된다.
- <152> **오이 기초 단백질**
- <153> 오이 기초 단백질로부터 전형적인 아미노산 서열은 본 명세서에서 SEQ ID NO: 17에서 열거된다. 1형 청동 단백질, 오이 기초 단백질(CBP)의 결정 구조는 1.8 해상도에서 세밀히 구별되었다. 상기 분자는 그리스 열쇠 베타-배럴 구조를 보유하는 점에서 다른 청동 단백질과 유사하지만, 상기 배럴은 한 측면에서 개방되고 “베타-샌드위치(beta-sandwich)” 또는 “베타-타코(beta-taco)” 로서 기술된다(Guss et al., J. Mol. Biol. 262:686-705 (1996)). 이러한 ephrinB2 단백질 엑토도메인 3차 구조는 오이 기초 단백질에 높은 유사성을 갖는다(50 Å 탄소에 대한 rms 편차 1.5)(Toth et al., Developmental Cell 1: 83-92(2001)).
- <154> Cu 원자는 결합 길이 Cu-N(His39) = 1.93 , Cu-S(Cys79) = 2.16 , Cu-N(His84) = 1.95 , Cu-S(Met89) = 2.61로, 정상적인 청동 NNSS' 동위(co-ordination)를 갖는다. 이황화 연결, (Cys52)-S-S-(Cys85)는 이러한 분자 구조를 안정화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 폴리펩티드 접힘은 청동 단백질(피토시아닌)의 부분집합(sub-family) 및 CBP가 높은 서열 상동성을 갖는 비-금속단백질(non-metalloprotein), 돼지풀 알레르겐(ragweed allergen) Ra3에 전형적이다. 현재 피토시아닌으로 확인된 단백질은 CBP, 스텔라시아닌, 마비시아닌, 우메시아닌, 오이 껍질 쿠프레독신, 피 파드에서 추정 청동 단백질, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 청동 단백질이다. CBP와 피-파드 단백질을 제외하고, 청동 부위에서 통상적으로 관찰되는 측 메티오닌 리간드가 글루타민으로 대체된다. 오이 기초 단백질에 대한 전형적인 서열은 SEQ ID NO: 17(NCBI Protein Data Bank Accession No. 2CBP)에서 확인된다.
- <155> **본 발명의 방법**
- <156> 본 발명의 다른 측면은 병리학적 장애로 고통받는 포유동물 환자를 치료하는 방법에서 하나 이상의 쿠프레독신

및 이의 변이체, 유도체, 구조적 등가체의 용도에 관계한다. 더욱 구체적으로, 이러한 장애는 에프린 신호전달 체계에 관련된다. 부가적으로, 포유동물 환자는 암으로 고통받는다.

<157> 일반적으로, 쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 세포 또는 조직 내에서 에프린 신호전달 체계의 활성을 간섭한다. 이에 더하여, 쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체, 구조적 등가체는 세포와 조직 내에서 암의 성장을 저해한다. 특정한 구체예에서, 세포 또는 조직은 포유동물이다. 더욱 특정한 구체예에서, 세포는 인간이다. 일부 구체예에서, 세포는 비-인간이다. 한 구체예에서, 쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 세포의 표면에서 에프린 수용체의 활성을 저해하기 위하여 세포에 투여된다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 세포의 표면에서 에프린 수용체의 활성을 증가시키기 위하여 투여된다. 다른 특정한 구체예에서, 쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체와 유도체는 전방 및/또는 후방 에프린 신호전달을 저해 및/또는 증가시킨다. 더 나아가, 예로써, 전방 신호는 저해되는 반면, 후방 신호는 증가되는 것이 가능하다.

<158> 포유동물 환자를 괴롭히는 병리학적 장애는 구체적으로, 에프린 신호전달 체계의 활성화에 관련된 장애이다. 쿠프레독신은 에프린에 특정의 구조적 상동성을 갖고, 에프린 신호전달 체계와 관련하여 생체내에서 에프린과 유사하게 기능할 수 있는 것으로 알려져 있다. 쿠프레독신은 에프린 신호전달 체계에 관련된 병리학적 장애를 치료 하는데 이용될 수 있다. 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 정상보다 높은 또는 정상보다 낮은 농도를 수반한다. 다른 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 과다-발현(over-expression) 또는 과소-발현(under-expression)에 기인한다. 다른 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 과도한 전환(excessive turnover) 또는 전환의 부족에 기인한다. 다른 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 과다-발현 또는 과소-발현을 유도한다. 다른 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 과도한 전환 또는 전환의 부족을 유발을 유발한다. 에프린 신호전달 체계의 “구성요소”는 에프린 수용체에 에프린 결합에 기인하는 신호를 전달하거나 전달하도록 유도되는 임의의 분자를 포괄한다. 더욱 특정한 구체예에서, 구성요소는 에프린 또는 에프린 수용체이다.

<159> 부가적으로, 병리학적 장애는 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 세포내, 세포간, 또는 조직-특이적인 비정상적 분포(abnormal distribution)를 수반할 수 있다. 특정한 구체예에서, 에프린 수용체는 세포의 표면에서 더욱 높은 농도로 발견된다. 더욱 특정한 구체예에서, 에프린 수용체는 조직 내에서 상향-조절되거나 하향-조절된다. 다른 더욱 특정한 구체예에서, 에프린은 조직 내에서 상향-조절되거나 하향-조절된다.

<160> 본 발명의 다른 측면에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 암 환자에 투여된다. 일부 구체예에서, 환자는 포유동물, 구체적으로, 인간이다. 다른 구체예에서, 환자는 비-인간이다. 이러한 치료 방법의 작용 메커니즘에 제한됨 없이, 다양한 암이 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 증가된 또는 감소된 농도와 연관된다. 다양한 에프린과 Eph 수용체가, 특히, 종양 진행(tumor progression)의 더욱 공격적인 단계의 종양에서 상향-조절되거나 하향-조절되는 것으로 밝혀졌다. 가령, EphA2는 유방암, 간암, 전립선암, 교모세포종(glioblastoma), 식도 편평 세포(esophageal squamous cell) 암, 난소암, 흑색종에서 상향-조절된다. 특정한 구체예에서, 암은 상향-조절된 EphA2 수용체와 연관된다. 하지만, 많은 암에서, 에프린 신호전달 체계의 상이한 구성요소가 특히, 에프린과 Eph 수용체에서 상향-조절되거나 하향-조절된다. 다양한 종양에서 에프린과 에프린 수용체의 비정상적인 발현의 실례는 당분야에 널리 공지되어 있고, Surawska *et al.*, Cytokine & Growth Factor Reviews 15:419-433(2004)에서 기술된다. 다른 구체예에서, 암은 에프린 신호전달 체계의 구성요소의 비정상적인 양 또는 활성과 무관하다. 특정한 구체예에서, 암에는 유방암, 간암, 위장관암, 신경모세포종, 신경암, 백혈병, 림프종, 전립선암, 췌장암, 폐암, 흑색종, 난소암, 자궁내막 종양, 용모막암종, 기형암종, 갑상선암, 연부 조직과 뼈로부터 발생하는 것들을 비롯한 모든 육종, 신장 암종, 표피암, 비-소세포 폐암이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 특정한 구체예에서, 암은 p53 종양 억제 유전자의 발현이 불충분하다.

<161> 다른 구체예에서, 암은 종양 성장 단계에 관련된 다양한 속성을 갖는다. 종양 발생에서 초기 단계는 맥관화(vascularization)인데, 여기서 종양에 혈액을 공급하기 위하여 동맥이 동원된다. 임의의 수단으로 작동 메커니즘의 한정됨 없이, 에프린 신호전달 체계는 혈관신생에 관련되는 것으로 알려져 있다. 한 구체예에서, 암은 혈관신생이 연관된다. 종양 발생의 다른 단계는 전이(metastasis)인데, 여기서 종양은 일차 종양(primary tumor)이 불연속적으로 존재하는 종양 이식물로서 정의되는 전이 암세포(metastase)를 형성한다. 임의의 수단으로 작동 메커니즘의 한정됨 없이, 전이는 에프린 신호전달 체계에도 관련된 것으로 생각된다. 한 구체예에서, 암은 전-전이성(pre-metastatic)이다. 다른 구체예에서, 암은 전이성(metastatic)이다. 혈관신생에 대한 화합물의 효과를 측정하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 혈관신생을 측정하는 특이적인 방법에는 참조로서 편입되

는 아래의 보고서에서 확인되는 측정검사법이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다: Daniel *et al.*, *Kidney Int. Suppl.* 57:S73-S81(1996); Myers *et al.*, *J. Cell Biol.* 148:343-351(2000); Pandey *et al.*, *Science* 268:567-569(1995); Brantley *et al.*, *Oncogene* 21:7011-7026(2002).

- <162> 종양 이외에, 에프린 신호전달 경로와 연관된 다수의 병리학적 장애, 예를 들면, 혈관신생의 병리학적 형태 (Adams & Klein, *Trends Cardio. Medicine* 10:183-188(2000); Brantley-Sieders & Chen, *Angiogenesis* 7:17-28(2004); Noren *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:5583-558(2004)), 조직 손상이후 만성 통증 (Battaglia *et al.*, *Nat Neurosci.* 6:339-340(2003)), 척수 손상이후 신경 재생의 저해(Goldscmit *et al.*, *J. Neurosci.* 6:339-340(2003)), 인간 선천성 기형(Twigg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8652-8657(2004); Wieland *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 74:1209-1215(2004))이 존재하고, 본 발명의 특정한 구체예에는 이들 병리학적 장애를 치료하기 위하여 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 이용한다. 특정한 구체예에서, 병리학적 장애는 간질성 방광염(interstitial cystitis, IC), 염증성 장 질환(IBD)과 연관된 병소, HIV 감염, 심혈관 질환, 중추신경계 질환, 말초 혈관 질환, 바이러스 질환, 중추신경계의 퇴행(Christopher Reeve 병), 알츠하이머병이다. 간질성 방광염과 염증성 장 질환 환자의 치료에 관련된 방법은 예로써, U.S. 특허 출원 제20050049176호(2005년 3월 3일자 공개됨)를 참조한다. 혈관신생의 저해 또는 자극과 관련된 방법은 예로써, U.S. 특허 출원 제20040136983호(2004년 7월 15자 공개됨)를 참조한다. 골형성의 치료에 관련된 방법은 예로써, U.S. 특허 출원 제20040265808호(2004년 7월 15일자 공개됨)를 참조한다.
- <163> 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 당업자에게 널리 공지된 여러 경로에 의해 다양한 섭생(regimen)으로 환자에 투여될 수 있다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체 또는 유도체는 정맥내, 근육내, 피하 또는 종양 내로 주입에 의해 투여된다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 정맥내 투여된다. 더욱 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체 또는 유도체는 암을 앓고 있거나 암으로부터 회복중인 환자에 화학요법과 함께 투여된다.
- <164> 병리학적 장애 이외에, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 환자를 괴롭히는 다른 질환에 관련된 치료 방법에 이용될 수 있다. 이런 장애는 신경계 또는 혈관계를 손상시키는 사고, 수술과 같은 다른 치료로부터 회복 및 특히, 노령에 관련된 장애의 결과일 수 있다. 한 구체예에서, 환자는 혈관의 성장 또는 재생을 필요로 하고, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 혈관의 성장을 유도하기 위하여 투여된다. 다른 구체예에서, 환자는 혈관의 성장 감소를 필요로 하고, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 혈관의 성장을 저해하기 위하여 투여된다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 신경 발생 또는 재생을 필요로 하는 환자에 신경의 성장을 유도하기 위하여 투여된다. 다른 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 골형성을 증진하기 위하여 환자에 투여된다.
- <165> 본 발명의 다른 측면은 생체내에서 특이적인 에프린 수용체를 전시하는 세포를 탐지하는 방법이다. 쿠프레독신은 에프린 B2와 다른 에프린에 대한 고도 구조적 상동성의 영역을 보유하고, 시험관 내에서 에프린 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이런 이유로, 쿠프레독신은 에프린 수용체를 발현하는 세포의 표면에 집중될 것이다. 따라서, 일부 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 비-Eph 수용체 발현 세포 또는 조직 사이에서 Eph 수용체-발현 세포와 조직을 찾는 데 이용될 수 있다. 이에 더하여, 특정한 부류의 Eph 수용체의 결합 선호(binding preference)를 나타내는 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 이런 부류의 Eph 수용체를 특이적으로 발현하는 세포 또는 조직을 찾는 데 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체 또는 유도체는 탐지가능 프로브에 연결되고 인간 환자에 투여되는데, 상기 환자에서 상기 탐지가능 프로브의 정위(localization)가 측정되고 Eph 수용체-발현 세포 또는 조직의 정위가 결정된다. 더욱 특정한 구체예에서, 세포는 암 세포이다. 탐지가능 프로브는 현재 당분야에 널리 공지되어 있다. 적합한 프로브에는 형광 프로브(fluorescent probe), 방사성 프로브(radioactive probe), 요오드(iodine), 가돌리늄(gadolinium), 금이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <166> 본 발명의 다른 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 약제에 연결되고, 상기 약제를 Eph 수용체-발현 세포 또는 조직에 전달하기 위하여 인간 환자에 투여된다. 다른 특정한 구체예에서, 조직은 종양이다. 더욱 특정한 구체예에서, 세포는 암 세포이다. 약제는 Eph 수용체를 발현하는 세포에 효과를 나타내는 임의의 화학적 화합물일 수 있다. 약제는 펩티드, DNA 분자, RNA 분자, 제약학적 조성물, 이들의 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 유기 또는 무기 화합물일 수 있다. 특정한 구체예에서, 약제는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소(exotoxin) A 도메인 III과 같은 독소(toxin), 또는 탁솔(taxol)과 같은 화

학적 화합물, 또는 암 세포를 죽이는 다른 약제이다.

- <167>

쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 인간 환자의 원하는 세포 또는 조직 내에서 발현되는 프로모터 영역에 작동가능하게 연결된 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 인코딩하는 코딩 영역을 보유하는 DNA를 투여함으로써 세포 또는 인간 환자에 투여될 수 있다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 인코딩하는 DNA는 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체로 치료에 민감한 질환을 치료하기 위하여 환자에 투여된다. 이들을 세포와 인간 환자에 투여하는데 적합한 벡터와 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 인간 개체에서 외래 단백질을 발현하는 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 환자에서 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 발현하도록 개조될 수 있다. 전형적인 프로토콜은 특히, 아래의 U.S. 특허에서 확인된다: 2002년 1월 15일자 허여된 U.S. Pat. No.6,339,068; 2005년 3월 15일자 허여된 U.S. Pat. No. 6,867,000; 2004년 11월 23일자 허여된 U.S. Pat. No. 6,821,957; 2004년 11월 23일자 허여된 U.S. Pat. No. 6,821,955; 2003년 5월 13일자 허여된 U.S. Pat. No. 6,562,376, 이들 모두 순전히 참조로서 편입된다. 더욱 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 인코딩하는 DNA는 암으로 고통받는 환자의 종양 내로 주입된다. 더욱 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 인코딩하는 DNA는 암으로 고통받는 환자의 종양 내로 주입된다.
- <168>

일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 정맥내 주사, 근육내 주사, 피하 주사, 흡입, 국소 투여, 경피 패치, 좌약, 또는 경구, 구체적으로, 정맥내 주사에 의해 환자에 투여된다. 제약학적 조성물은 에프린 신호전달에 관련된 특이적인 병리학적 장애 또는 암을 치료하는 것으로 공지된 다른 약제의 투여와 동시에 또는 이러한 투여 후 1분 내지 1주 이상의 기간 내에 환자에 투여될 수 있다. 제약학적 조성물은 다른 항암제와 거의 동시에 투여될 수 있다.
- <169>

쿠프레독신 및 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물
- <170>

적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 제약학적 조성물은 임의의 통상적인 방식, 예를 들면, 통상적인 혼합, 분해, 과립화, 당의정-만들기, 에멀전화, 캡슐화, 포획, 또는 냉동 건조 과정으로 제조될 수 있다. 실질적으로 순수한 쿠프레독신, 또는 쿠프레독신의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 당분야에 공지된 제약학적으로 허용되는 담체와 쉽게 혼합될 수 있다. 이들 담체는 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등의 형태로 제조를 가능하게 한다. 적절한 부형제에는 예로써, 충전제와 셀룰로오스 제조물이 포함될 수 있다. 다른 부형제에는 예로써, 향료, 착색제, 디태크피어(detackifier), 농후제(thickness) 및 다른 허용되는 첨가제, 어쥬번트 또는 결합제가 포함될 수 있다. 제약학적 제형(dosage form)에 관한 전반적인 방법은 Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lippencott Williams & Wilkins, Baltimore MD (1999))에서 확인된다.
- <171>

본 발명에 이용되는 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 조성물은 주사(가령, 피내, 피하, 근육내, 복강내 등), 흡입, 국소 투여, 좌약, 경피 패치 또는 경구를 비롯한 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 약제 전달 시스템에 관한 전반적인 정보는 Ansel *et al.*, *Id.*에서 확인할 수 있다. 일부 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 조성물은 특히, 피하 주사와 정맥내 주사를 위한 주사가능물질(njectible)로서 제조되고 직접 이용될 수 있다. 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 조성물은 또한, 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol)과 같은 보호제(protective agent) 또는 유사한 코팅제(coating agent)와의 혼합이후 경구 복용될 수 있다.
- <172>

주사로 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 수용액, 바람직하게는, 생리 적합성 완충제, 예를 들면, Hanks 용액, 링거액, 또는 생리 식염수 내에서 제조된다. 용액은 제제 약물(formulatory agent), 예를 들면, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유한다. 대안으로, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 사용에 앞서, 적절한 운반제, 예를 들면, 발열된 없는 무균수로 구성(constitution)을 위한 분말 형태로 조제된다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 어쥬번트(adjutant) 또는 이러한 펩티드에 의해 자극되는 면역 반응을 강화시키기 위하여 추가되는 임의의 다른 물질을 함유하지 않는다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 이러한 펩티드에 면역 반응을 저해하는 물질을 함유한다.
- <173>

정맥액(intravenous fluid)으로 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 투여하기 위하여 이용되는 정맥액은 결정질(crystalloid) 또는 콜로이드(colloid)로 구성될 수 있다. 본 명세서에서 결정질은 무기 염 또는 다른 수용성 분자의 수용액이다. 본 명세서에서 콜로이드에는 젤라틴(gelatin)과 같은 대형 불용성 분자가 포함된다. 정맥액은 무균이다.

<174> 정맥내 투여에 이용되는 결정질액(crystalloid fluid)에는 표 2에 기술된 바와 같이, 정상 염수(0.9% 농도에서 염화나트륨 용액), 링거 락테이트(Ringer's lactate) 또는 링거액(Ringer's solution), 물에 녹인 5% 텍스트로스 용액(일명, D5W)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

표 2

<175> **공통 결정질 용액의 조성**

| 용액 | 다른 명칭 | [Na ⁺] | [Cl ⁻] | [글루코오스] |
|-----------|------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| D5W | 5% 텍스트로스 | 0 | 0 | 252 |
| 2/3 & 1/3 | 3.3% 텍스트로스/ 0.3% 염수 | 51 | 51 | 168 |
| 반-정상 염수 | 0.45% NaCl | 77 | 77 | 0 |
| 정상 염수 | 0.9% NaCl | 154 | 154 | 0 |
| 링거 락테이트* | 링거액 | 130 | 109 | 0 |

<176> *링거 락테이트는 28 mmol/l 락테이트, 4 mmol/l K⁺, 3 mmol/l Ca²⁺ 역시 함유한다.

<177> 흡입으로 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 적절한 추진제(propellant), 예를 들면, 디클로로디플루오르메탄, 트리클로로플루오르메탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스를 이용한, 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 가압된 에어로졸의 경우에, 투약 단위(dosage unit)는 정량을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예로써, 흡입기 또는 취입기에 이용되는 젤라틴의 캡슐과 카트리지는 단백질 및 적절한 분말 기부(base), 예를 들면, 락토오스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제조된다.

<178> 국소 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 당분야에 널리 공지된 바와 같이, 용액, 겔, 연고, 크림, 현탁액 등으로 제조된다. 일부 구체예에서, 투여는 경피 패치에 의해 달성된다. 좌약(가령, 직장 또는 질)으로 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 통상적인 좌약 기부를 함유하는 조성물 형태로 제조된다.

<179> 경구 투여되는 경우에, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 이러한 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 당분야에 널리 공지된 제약학적으로 허용되는 담체와 혼합함으로써 용이하게 제조될 수 있다. 고품 담체, 예를 들면, 만니톨, 락토오스, 스테아르산마그네슘 등이 이용된다; 이들 담체는 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체가 치료되는 개체에 의한 경구 섭취를 위한 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제조될 수 있도록 한다. 경구 고품 제제, 예를 들면, 분말, 캡슐, 정제에 적합한 부형제에는 충전제(가령, 당), 셀룰로오스 제조물, 과립화제, 결합제 등이 포함된다.

<180> 당분야에 널리 공지된 다른 통상적인 담체에는 다가 담체, 예를 들면, 세균 캡슐 다당류, 텍스트란 또는 유전자 조작된 백터 역시 포함된다. 이에 더하여, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 서방 제제는 연장된 기간 동안 이러한 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 방출하는데, 이런 서방 제제가 없는 경우에 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 치료 효과를 유도하거나 강화하기에 앞서, 예로써 프로테아제 및 단순한 가수분해에 의해 개체의 조직으로부터 제거되고 및/또는 분해된다.

<181> 본 발명의 조성물의 혈류에서 반감기는 원형화된 펩티드(circularized peptide)(Monk et al., BioDrugs 19(4):261-78, (2005); DeFreest et al., J. Pept. Res. 63(5):409-19 (2004)), D,L-펩티드(부분입체이성질체)(Futaki et al., J. Biol. Chem. Feb 23;276(8):5836-40 (2001); Papo et al., Cancer Res. 64(16):5779-86 (2004); Miller et al, Biochem. Pharmacol. 36(1):169-76, (1987)), 특수한 아미노산을 보유하는 펩티드(Lee et al., J. Pept. Res. 63(2):69-84 (2004)), N-과 C-말단 변형(Labrie et al., Clin. Invest. Med. 13(5):275-8, (1990)), 탄화수소 스테이플링(hydrocarbon stapling)(Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892(2000); Walenski et al., Science 305:1466-1470(2004))을 비롯한 당업자에게 널리 공지된 여러 방법으로 연장되거나 최적화될 수 있다. 특히, d-이성질화(isomerization)(치환) 및 D-치환 또는 L-아미노산 치환에 의한 펩티드 안정성의 변형이 주목된다.

- <182> 다양한 구체예에서, 제약학적 조성물은 담체와 부형제(완충제, 탄수화물, 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산(가령, 글리신), 향산화제, 세균발육 저해제, 킬레이트화제, 현탁제, 농후제 및/또는 보존제 포함), 물, 오일, 염수 용액, 수성 텍스트로스와 글리세롤 용액, 생리 조건을 근사하기 위하여 요구되는 다른 제약학적으로 허용되는 보조 물질(가령, 완충제, 긴장도 조절제(tonicity adjusting agent), 적심제(wetting agent) 등)를 함유한다. 당업자에게 공지된 임의의 담체가 본 발명의 조성물을 투여하는데 이용될 수 있긴 하지만, 담체의 유형은 투여 방식에 따라 달라진다. 화합물은 널리 공지된 기술을 이용하여 리포솜 내에 피포될 수도 있다. 생물 분해성 마이크로스피어 역시 본 발명의 제약학적 조성물에 대한 담체로서 이용될 수 있다. 적절한 생물분해성 마이크로스피어는 예로써, U.S. Patent No. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344; 5,942,252에서 기술된다.
- <183> 이들 제약학적 조성물은 널리 공지된 통상적인 멸균 기술로 멸균되거나, 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 원상태로 포장되거나, 또는 냉동 건조되는데, 이러한 냉동 건조된 제조물은 투여에 앞서 무균 용액과 혼합된다.
- <184> **쿠프레독신의 투여**
- <185> 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 예로써, 임의의 적절한 루트에 의해, 예를 들면, 경구, 흡입, 흡입, 설하, 직장, 질, 경요도(transurethral), 비강, 국소, 경피, 다시 말하면, 경피 또는 비경구(정맥내, 근육내, 피하, 관상동맥내 포함) 투여될 수 있다. 이의 제약학적 제제는 의도된 목적을 달성하는 효과량으로 투여될 수 있다. 더욱 구체적으로, 조성물은 치료 효과량으로 투여된다. 특정한 구체예에서, 치료 효과량은 일반적으로, 체중 kg당 대략 0.01-20 mg/kg이다.
- <186> 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 포함하는 화합물은 단독으로 또는 다른 활성제와의 조합으로, 포유동물 세포와 조직 내에서 에프린-신호전달에 관련된 질환, 또는 암의 치료에 유용하다. 적절한 용량은 예로써, 이용된 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체의 화합물, 호스트, 투여 방식, 치료되는 질환의 특성과 심각도에 따라 달라질 것이다. 하지만, 일반적으로, 인간에서 만족스런 결과는 체중 kg당 대략 0.01 내지 20 mg/kg의 일일 용량(daily dosage)에서 달성되는 것으로 지시된다. 인간에서 지시된 일일 용량은 예로써, 1일 분량, 1주일 분량, 1개월 분량 및/또는 연속 투약(continuous dosing)으로 편의하게 투여되는 대략 0.7 mg 내지 1400 mg 범위의 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체의 화합물이다. 1일 분량은 1일 1회 내지 12회 불연속적으로 투약될 수 있다. 대안으로, 분량은 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 1주일마다, 이와 유사하게 최대 31일 이상까지 하루씩 증가하여 투약될 수 있다. 대안으로, 투약은 패치, i.v. 투여 등을 이용한 연속 투약일 수 있다.
- <187> 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 환자에 도입하는 방법은 일부 구체예에서, 에프린 신호전달에 관련된 특정한 병리학적 장애 또는 암, 또는 다른 질환과 질병을 치료하는 것으로 공지된 다른 약제와의 공동-투여(co-administration)이다. 이들 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 에프린 신호전달에 관련된 특정한 병리학적 장애 또는 암을 치료하기 위한 다른 약제를 포함하는 콕테일의 일부이거나, 또는 이들 약제와 공동-투여된다. 이들 약제에는 염증성 장 질환, HIV 감염, 바이러스 질환, 심혈관 질환, 말초 혈관 질환, 중추신경계 질환, 중추신경계의 퇴행, 알츠하이머병을 치료하는데 이용되는 약제가 포함된다.
- <188> 염증성 장 질환을 치료하는 약제에는 아미노살리실레이트(aminosalicylate), 예를 들면, 설파살라진(sulfasalazine)(Azulfidine), 올살라진(olsalazine)(Dipentum), 메사라민(mesalamine)(Asacol, Pentasa), 발살라지드(balsalazide)(Colazal); 코르티코스테로이드(corticosteroid), 예를 들면, 프레드니손(prednisone), 메드롤(Medrol), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 하이드로코르티손(hydrocortisone), 부데소니드(Budesonide)(EntocortEC); 면역조절제(immunomodulator), 예를 들면, 아자티오프린(azathioprine)(Imuran), 6-메르캅토프린(mercaptopurine)(6-MP, Purinethol), 사이클로스포린(cyclosporine) A(Sandimmune, Neoral); 항생제(antibiotics), 예를 들면, 메트로니다졸(metronidazole)(Flagyl)과 시프로플록사신(ciprofloxacin)(Cipro); 생물학적 치료제, 예를 들면, 인플릭시맵(infliximab)(Remicade); 기타 치료제, 예를 들면, 타크롤리무스(tacrolimus)(FK506)와 미코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <189> HIV 감염을 치료하는 약제에는 역전사효소 전해물질(reverse transcriptase inhibitor): AZT(지도부딘(zidovudine)[Retrovir]), ddC(잘시타빈(zalcitabine)[Hivid], 디데옥시이노신(dideoxyinosine)), d4T(스타부딘(stavudine)[Zerit]), 3TC(라미부딘(lamivudine)[Epivir]), 비-뉴클레오시드 역전사효소 저해물질(non-

nucleoside reverse transcriptase inhibitor)(NNRTIS): 델라비르딘(delavirdine)(Rescriptor)과 네비라핀(nevirapine)(Viramune), 프로테아제 저해물질(protease inhibitor): 리토나비르(ritonavir)(Norvir), 알로피나비르(alopinavir)와 리토나비르(ritonavir) 조합(Kaletra), 사퀴나비르(saquinavir)(Invirase), 인디나비르 설페이트(indinavir sulphate)(Crixivan), 암프레나비르(amprenavir)(Agenerase), 넬피나비르(nelfinavir)(Viracept)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<190> 바이러스 질환을 치료하는 약제에는 아시클로비르(acyclovir), 바리셀라 조스터(varicella zoster) 면역 글로불린(immune globulin)(VZIG), 페킨테르펜(peginterferon), 리바비린(ribavirin), 아실클로비르(acyclovir)(Zovirax), 발라사이클로비르(valacyclovir)(Valtrex), 팜시클로비르(famciclovir)(Famvir), 아만타딘(amantadine), 리만타딘(rimantadine), 자나미비르(zanamivir), 오셀타미비르(oseltamivir), 알파 인터페론(alpha interferon)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<191> 심혈관 질환을 치료하는 약제에는 항응고제(anticoagulant), 항혈소판제(antiplatelet agent), 혈전용해제(thrombolytic agent), 아드레날린성 차단제(adrenergic blocker), 아드레날린성 촉진제(adrenergic stimulant), 알파/베타 아드레날린성 차단제, 안지오텐신 전환 효소(angiotensin converting enzyme, ACE) 저해물질, 칼슘 채널 차단제(calcium channel blocker)와 함께 안지오텐신 전환 효소(ACE) 저해물질, 이뇨제(diuretics)와 함께 안지오텐신 전환 효소(ACE) 저해물질, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 칼슘 채널 차단제, 이뇨제(탄산탈수효소 억제제(carbonic anhydrase inhibitor), 루프 이뇨제(loop diuretics), 칼륨-보존성 이뇨제(potassium-sparing diuretics), 티아지드(thiazide) 및 관련된 이뇨제 포함), 혈관확장제(vasodilator), 혈압 상승제(vasopressor) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<192> 말초 혈관 질환을 치료하는 약제에는 펜톡시필린(pentoxifylline)(Trental), 경구 메틸산틴 유도체(methylxanthine derivative), 실로스타졸(cilostazol)(Pletal), 포스포디에스테라제(phosphodiesterase) III 저해물질; 항혈소판(antiplatelet)/항혈전성(antithrombotic) 치료제, 예를 들면, 아스피린; 항응고제, 예를 들면, 아스피린과 와파린(warfarin)(Coumadin); 콜레스테롤 강하제(cholesterol lowering drug), 예를 들면, 니아신(niacin), 스타틴(statin), 피브레이트(fibrate), 로피드(lopid) 정제(젬피브로질(gemfibrozil); Parke-Davis); 트리코르(tricor) 정제(페노피브레이트(fenofibrate); Abbott) 담즙산 격리제(bile acid sequestrant), 콜레스티드(colestid) 정제(미소화된 콜레스티폴 염산염(micronized colestipol hydrochloride); Pharmacia and Upjohn); 웰콜(welchol) 정제(염산콜레세베람(colesevelam hydrochloride); Sankyo); 칼슘 채널 차단제; 비타민과 식이 보조제(dietary supplement), 예를 들면, 엽산염(folate), B-6, B-12, L-아르기닌, 오메가-3 지방산; HMG-COA 환원효소 저해물질(Reductase inhibitor), 예를 들면, 아드비코르(advicor) 정제(니아신/로바스타틴(Lovastatin); Kos); 알토코르(altocor) 연장된-방출 정제(로바스타틴; Andryx labs); 레스콜(lescol) 캡슐(플루바스타틴 나트륨(fluvastatin sodium); Novartis & Reliant); 리피토르(lipitor) 정제(아토르바스타틴(atorvastatin); Parke-Davis와 Pfizer); 메바코르(mevacor) 정제(로바스타틴; Merck); 프라바콜(pravachol) 정제(프라바스타틴 나트륨(Pravastatin sodium); Bristol-Myers Squibb) 프리비가르드(pravigard) PAC 정제(완충된 아스피린과 프라바스타틴 나트륨; Bristol-Myers Squibb); 자코르(zocor) 정제(심바스타틴(Simvastatin); Merck); 니코틴산 약제(nicotinic acid agent), 예를 들면, 아드비코르(advicor) 정제(니아신/로바스타틴; Kos(또한, HMG-COA 환원효소 저해물질)); 니아스판(niaspan)(니아신; Kos); 기타 약제, 예를 들면, 제티아(zetia) 정제(에제티미베(ezetimibe); Merck/Schering Plough)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<193> 중추신경계 질환을 치료하는 약제에는 정신치료제(psychotherapeutic agent), 예를 들면, 다양한 벤조디아제핀 제조물과 화합물, 항불안증제(antianxiety agent), 항우울제(antidepressant)(모노아민 산화효소 저해물질(monoamine oxidase inhibitor, MAOI), 선택적인 세로토닌 재흡수 저해물질(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant) 포함), 항조약(antimanic agent), 항공황제(antipanic agent), 항정신병약(antipsychotic agent), 정신자극제(psychostimulant), 강박 장애 관리제(obsessive-compulsive disorder management agent); 편두통 제제(migraine preparation), 예를 들면, 베타 아드레날린성 차단제(beta adrenergic blocking agent), 이소메토펜텐(isometheptene), 세로토닌 수용체 길항제(serotonin receptor agonist) 및 데파코테(depakote) 정제(디발프로엑스(Divalproex) 나트륨; Abbott)와 엑세드린(excedrin) 편두통 정제(아세트아미노펜(acetaminophen); BMS Products)에 활성 성분을 함유하는 기타 편두통 제제; 진정제(sedatives)와 최면제(hypnotics); 항경련제(anticonvulsant); 피모지드(pimozide)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 파킨슨병을 치료하는 약제에는 항콜린성제(anticholinergic agent), 카테콜-o-메틸트랜스퍼라아제 저해물질(catechol-o-methyltransferase inhibitor), 도파민제(dopamine agent), 모노아민

산화효소(monoamine oxidase, MAO) 저해물질이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

- <194> CNS 퇴행 질환을 치료하는 약제는 아래와 같다: 다발성 경화증을 치료하는 약제에는 아보넥스(avonex)에서 활성 성분(인터페론 베타(interferon beta)-1a; Biogen Neurology); SC 주사용 베타세론(Betaseron)(인터페론 베타-1b의 변형된 형태; Berlex); 주사용 코팍손(copaxone)(글라티라머 아세테이트(Glatiramer Acetate); Teva Neuroscience); 데포-메드롤(depo-medrol) 주사가능 현탁액(메틸프레드니솔론 아세테이트(Methylprednisolone acetate); Pharmacia & Upjohn); 주사용 노반트론(Novantrone) 농축액(미톡산트론 염산염(mitoxantrone hydrochloride)으로 공급되는 미톡산트론(Mitoxantrone); Serono); 오라프레드(Orapred) 경구 용액(드레드니솔론 나트륨 인산염 경구 용액; Ascent); 레비프(Rebif) 주사액(인터페론 베타-1a; Pfizer & Serono)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 헌팅턴병을 치료하는 약제에는 신경안정제(tranquilizer), 예를 들면, 클로나제팜(clonazepam) (Klonopin); 항정신병약, 예를 들면, 할로페리돌(haloperidol)(Haldol)과 클로자핀(clozapine)(Clozaril); 플루옥세틴(flouxetine)(Prozac, Sarafem), 세르트랄린(sertraline)(Zoloft), 노르트립틸린(nortriptyline)(Aventyl, Pamelor), 리튬(lithium)(Eskalith, Lithobid)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <195> 알츠하이머병을 치료하는 약제에는 아리셉트(aricept) 정제(도네페질 염산염(Donepezil Hydrochloride); Eisai 또는 Pfizer); 엑셀론(exelon) 캡슐(리바스티그민(rivastigmine)(수소 주석산염(hydrogen tartrate salt) 형태); Novartis); 엑셀론 경구 용액(리바스티그민 주석산염; Novartis); 레미닐(reminyl) 경구 용액(갈란타민 브롬화수소산염(galantamine hydrobromide); Janssen) 또는 레미닐 정제(갈란타민 브롬화수소산염; Janssen)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <196> 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 포함하는 화합물을 환자에 도입하는 방법은 일부 구체예에서, 암을 치료하는 것으로 공지된 다른 약제와의 공동-투여(co-administration)이다. 이들 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 특정한 구체예에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 포함하는 화합물은 암을 치료하기 위한 다른 약제를 포함하는 각테일의 일부이거나, 또는 이들 약제와 공동-투여된다. 이런 약제에는 예로써, 5-플루오르우라실(flourouracil); 인터페론 α; 메토티렉세이트(Methotrexate); 타목시펜(Tamoxifen); 빈크리스틴(Vincristine)이 포함된다. 이들 실례는 예시의 목적으로 제공되며, 이와 같은 많은 다른 화합물이 당업자에게 공지되어 있다.
- <197> 암을 치료하는데 적합한 다른 약제에는 알킬화제(alkylating agent), 예를 들면, 질소 겨자(nitrogen mustard), 알킬 설포네이트(alkyl sulfonate), 니트로소우레아(nitrosourea), 에틸렌이민(ethylenimine), 트리아젠(triazene); 대사길항물질(antimetabolite), 예를 들면, 엽산염 길항제(folate antagonist), 퓨린 유사체(purine analogue), 피리미딘 유사체(pyrimidine analogue); 항생제, 예를 들면, 안트라사이클린(anthracycline), 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신(mitomycin), 닥티노마이신(dactinomycin), 플리카마이신(plicamycin); 효소, 예를 들면, L-아스파라기나아제; 파르네실(farnesyl)-단백질 이전효소 저해물질; 5.알파.-환원효소 저해물질; 17.베타.-하이드록시스테로이드 디하이드로게나아제(hydroxysteroid dehydrogenase) 타입 3의 저해물질; 호르몬제, 예를 들면, 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 에스트로겐(estrogen)/항에스트로겐(antiestrogen), 안드로겐(androgen)/항안드로겐(antiandrogen), 프로제스틴(progestin), 황체 형성 호르몬-방출 호르몬 길항제(luteinizing hormone-releasing hormone) 길항제, 옥트레오티드 아세테이트(octreotide acetate); 미세소관-교란제(microtubule-disruptor agent), 예를 들면, 액틴아시딘(ecteinascidin) 또는 이들의 유사체와 유도체; 미세소관-안정화제(microtubule-stabilizing agent), 예를 들면, 파클리탁셀(paclitaxel)(Taxol™), 도세탁셀(docetaxel)(Taxotere™), 이들의 유사체와 같은 탁산(taxane) 및 에포틸론(epothilone) A-F와 이들의 유사체와 같은 에포틸론; 식물-유래된 산물, 예를 들면, 빈카알칼로이드(vinca alkaloid), 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxin), 탁산; 위상이성질화효소(topoisomerase) 저해물질; 프레닐(prenyl)-단백질 이전효소 저해물질; 기타 약제, 예를 들면, 하이드록시우레아(hydroxyurea), 프로카르바진(procarbazine), 미토탄(mitotane), 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 백금 배위 착화물(platinum coordination complex), 예를 들면, 시스플라틴(cisplatin)과 카보플라틴(carboplatin); 항암제와 세포독성제로서 이용되는 다른 약제, 예를 들면, 생물 반응 조절제(biological response modifier), 성장 인자(growth factor); 면역조절제(immune modulator)와 면역 항체(monoclonal antibody)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본 발명의 화합물은 방사성 요법 및 수술과 병용될 수도 있다.
- <198> 이들 부류의 항암제와 세포독성제의 대표적인 실례에는 메클로레타민 하이드로클로라이드(mechlorethamine hydrochloride), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 클로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 이포스파마이드(ifosfamide), 부설판(busulfan), 카르무스틴(carmustin), 로무스틴(lomustine), 세무스틴

(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 티오테파(thiotepa), 다카르바진(dacarbazine), 메토트렉세이트(methotrexate), 티오구아닌(thioguanine), 메르캅토피린(mercaptapurine), 플루다라빈(fludarabine), 펜타스타틴(pentastatin), 클라드리빈(cladribin), 시타라빈(cytarabine), 플루오르우라실(flourouracil), 독소루비신 하이드로클로라이드(doxorubicin hydrochloride), 다우노루비신(daunorubicin), 이다루비신(idarubicin), 블레오마이신 설페이트(bleomycin sulfate), 미토마이신(mitomycin) C, 악티노마이신(actinomycin) D, 사프라신(safracin), 사프라마이신(saframycin), 퀴노카르신(quinocarcin), 디스코데르몰리드(discodermolide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈 주석산염(vinorelbine tartrate), 에토포시드(etoposide), 에토포시드 인산염(etoposide phosphate), 테니포시드(teniposide), 파클리탁셀(paclitaxel), 타목시펜(tamoxifen), 에스트라무스틴(estramustine), 에스트라무스틴 인산염 나트륨(estramustine phosphate sodium), 플루타마이드(flutamide), 부세렐린(buserelin), 레우프롤리드(leuprolide), 프테리딘(pteridine), 디에네세스(diyneses), 레바미솔(levamisole), 아플라콘(aflacon), 인터페론(interferon), 인터루킨(interleukin), 알데스루킨(aldesleukin), 필그라스티움(filgrastim), 사르그라모스탐(sargramostim), 리툽시맵(rituximab), BCG, 트레티노인(tretinoin), 이리노테칸 하이드로클로라이드(irinotecan hydrochloride), 베타메타손(beta-methosone), 겐시타빈 하이드로클로라이드(gemcitabine hydrochloride), 알트레타민(altretamine), 토포테카(topotecan), 이들의 유사체 또는 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<199> 이들 부류의 선호되는 구성원에서는 파클리탁셀(paclitaxel), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 독소루비신(doxorubicin), 카르미노마이신(carminomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 아미노프테린(aminopterin), 메토트렉세이트(methotrexate), 메토프테린(methopterin), 미토마이신(mitomycin) C, 엑틴아시딘(ecteinascidin) 743, 또는 포피로마이신(pofiromycin), 5-플루오르우라실(flourouracil), 6-메르캅토피린(mercaptapurine), 겐시타빈(gemcitabine), 시토신 아라비노시드(cytosine arabinoside), 포도필로톡신(podophyllotoxin) 또는 포도필로톡신 유도체, 예를 들면, 에토포시드(etoposide), 에토포시드 인산염(etoposide phosphate) 또는 테니포시드(teniposide), 멜팔란(melphalan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 레우로시딘(leurosidine), 빈데신(vindesine), 레우로신(leurosine)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<200> 본 발명의 조성물과의 공동-투여에 유용한 항암제와 다른 세포독성제의 실례는 German Patent No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253, WO 00/00485에 기술된 에포틸론(epothilone) 유도체; WO 99/24416(참조: U.S. Pat. No. 6,040,321)에 기술된 사이클린 의존성 키나아제(cyclin dependent kinase) 저해물질; WO 97/30992와 WO 98/54966에 기술된 프레닐-단백질 이전효소 저해물질; U.S. Pat. No. 6,011,029(상기 U.S. 특허의 화합물은 특히, 암의 치료에서 임의의 NHR 조절제(본 발명에 기술된 것들 포함), 예를 들면, AR 조절제, ER 조절제 또는 LHRH 조절제와 함께, 또는 외과적 기술과 함께 이용될 수 있다)에 전반적으로/구체적으로 기술된 것들과 같은 약제 등이다.

<201> 정확한 제제, 투여 루트, 용량은 환자의 상태를 고려하여 담당 의사에 의해 결정된다. 용량과 휴지기는 치료 효과를 유지할 만큼 충분한 혈장 수준의 활성 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 제공하기 위하여 개별적으로 조절될 수 있다. 일반적으로, 원하는 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 의도된 투여 루트와 표준 제약학적 관례에 따라 선택된 제약학적 담체와의 혼합물로 투여된다.

<202> 한 측면에서, 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 DNA로서 전달되고, 이러한 폴리펩티드가 *in situ*에서 산출된다. 한 구체예에서, DNA는 예로써, Ulmer et al., Science, Vol.259, pp-1745-49(1993)에 기술되고 Cohen, Science, vol.259, pp-1691-92(1993)에서 논의된 바와 같이 “나신(naked)”이다. 나신 DNA의 흡수는 DNA를 담체, 예를 들면, 세포 내로 효과적으로 수송되는 생분해가능 비드 상에 피복함으로써 증가될 수 있다. 이런 방법에서, DNA는 핵산 발현 시스템, 세균 발현 시스템, 바이러스 발현 시스템을 비롯한 당업자에게 공지된 다양한 전달 시스템 내에 존재한다. DNA를 이런 발현 시스템 내로 통합하는 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다(WO90/11092, WO93/24640, WO93/17706, U.S. Pat. No. 5,736,524).

<203> 생물체로부터 생물체로 유전 물질을 이동시키는데 사용되는 벡터는 크게 2가지 부류로 구분될 수 있다: 클로닝 벡터는 적합한 숙주 세포 내에서 증식에 필수적이고 외래 DNA가 삽입될 수 있는 영역을 보유하는 복제 플라스미드 또는 파지이다; 외래 DNA는 벡터의 구성요소인 것처럼 복제되고 증식된다. 발현 벡터(가령, 플라스미드, 효모 또는 동물 바이러스 계통)는 외래 DNA, 예를 들면, 쿠프레독신의 DNA를 전사하고 번역하기 위하여 숙주 세포 또는 조직 내로 외래 유전물질을 도입하는데 이용된다. 발현 벡터에서, 도입된 DNA는 삽입된 DNA를 고도로 전사

하도록 숙주 세포에 신호하는 프로모터와 같은 요소에 작동가능하게 연결된다. 특정 인자에 대응하여 유전자 전사를 조절하는 유도성 프로모터와 같은 일부 프로모터가 특히 유용하다. 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체 폴리뉴클레오티드를 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결하면, 특정 인자에 대응하여 쿠프레독신 및/또는 시토크롬 c 및 이의 변이체와 유도체의 발현을 조절할 수 있다. 고전적인 유도성 프로모터의 실례는 α -인터페론, 열 충격, 중금속 이온 및 스테로이드, 예를 들면, 글루코코르티코이드(Kaufman, Methods Enzymol. 185:487-511 (1990))와 테트라사이클린에 반응하는 프로모터이다. 다른 바람직한 유도성 프로모터는 이러한 구조체가 삽입되는 세포에 내인성이 아니지만 유도 인자(induction agent)가 외부로부터 공급되면 이들 세포에서 반응하는 프로모터이다. 일반적으로, 유용한 발현 벡터는 주로 플라스미드이다. 하지만, 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들면, 바이러스 벡터(가령, 복제 결함성 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스) 역시 고려된다.

<204> 벡터 선택은 이용되는 생물체 또는 세포 및 벡터의 원하는 목적에 좌우된다. 일반적으로, 벡터는 신호 서열, 복제 기점, 마커 유전자, 폴리링커 부위(polylinker site), 인헨서 요소, 프로모터, 전사 종결 서열을 포함한다.

<205> **쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 포함하는 키트**

<206> 한 측면에서, 본 발명에서는 포장 또는 용기 내에 (1) 적어도 하나의 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체를 함유하는 생물학적 활성 조성물; (2) 공동-투여되는 약제를 함유하는 생물학적 활성 조성물; (3) 제약학적으로 허용되는 부형제; (4) 투여용 운반기(vehicle), 예를 들면, 주사기; (5) 투약을 위한 사용설명서 중에서 한가지이상을 포함하는 키트를 제시한다. 구성요소 (1)-(5) 중에서 2가지 이상이 동일 포장 또는 용기 내에서 발견되는 구체에 역시 고려된다. 공동-투여되는 약제는 앞서 언급된 것들로부터 선택될 수 있다.

<207> 키트가 공급되는 경우에, 조성물의 서로 다른 구성요소는 별개의 용기 내에 포장되고 사용 직전에 혼합될 수 있다. 이들 구성요소의 이와 같은 개별적인 포장은 활성 구성요소의 기능 상실 없이 장기적인 저장을 가능하게 한다.

<208> 키트에 포함되는 반응물은 일정한 용기에 담아 공급함으로써, 서로 다른 구성요소의 수명이 보존되고 용기 재료에 의해 흡수되거나 변형되지 않도록 한다. 가령, 밀봉된 유리 앰플은 냉동 건조된 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체, 또는 중성의 비-활성 가스, 예를 들면, 질소 하에 포장된 완충체를 포함한다. 앰플은 임의의 적절한 재료, 예를 들면, 유리, 유기 중합체(가령, 폴리카보네이트, 폴리스티렌 등), 세라믹, 금속, 또는 유사한 반응물을 유지시키는데 전형적으로 이용되는 임의의 다른 물질로 구성된다. 적절한 용기의 다른 실례는 앰플과 유사한 물질로부터 제조되는 간단한 병 및 알루미늄이나 합금과 같은 박을 입힌 내부를 보유하는 덮개이다. 다른 용기에는 검사 튜브, 바이알, 플라스크, 병, 주사기 등이 포함된다. 용기는 무균 접근 포트(access port), 예를 들면, 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개가 달린 병을 보유한다. 다른 용기는 쉽게 제거가능하고 제거 이후에 구성요소들이 혼합될 수 있도록 하는 막에 의해 분리되는 2개의 구획을 보유한다. 제거가능 막은 유리, 플라스틱, 고무 등이다.

<209> 키트에는 사용설명서 역시 제공될 수 있다. 사용설명서는 종이 또는 다른 기질에 인쇄되고 및/또는 전자-판독가능 매체, 예를 들면, 플로피 디스크, CD-ROM, DVD-ROM, Zip 디스크, 비디오테이프, 오디오테이프, 플래시 메모리 장치 등으로 제공될 수 있다. 상세한 사용설명서는 키트에 물리적으로 부착되지 않을 수도 있다; 대신에, 사용자는 이러한 키트의 제조업체 또는 유통업체에 의해 특정된 인터넷 웹 사이트를 안내받거나, 또는 사용설명서를 전자 메일로서 제공받을 수도 있다.

<210> **쿠프레독신 및 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체의 변형**

<211> 쿠프레독신, 또는 이의 변이체, 유도체 또는 구조적 등가체는 앞서 기술된 바와 같은 변이체와 유도체를 생산하기 위하여 화학적으로 변형되거나 유전적으로 변화될 수 있다. 이런 변이체와 유도체는 표준 기술에 의해 합성될 수 있다.

<212> 쿠프레독신의 자연-발생 대립형질 변이체 이외에, 인코딩된 쿠프레독신의 아미노산 서열에서 변형을 유발하지만 에프린 신호전달을 간섭하거나 암의 성장을 저해하는 쿠프레독신의 능력을 현저하게 변화시키지 않는 변화가 돌연변이에 의해 쿠프레독신 코딩 서열 내로 도입될 수 있다. “비-필수” 아미노산 잔기는 생물학적 활성의 변화 없이 쿠프레독신의 야생형 서열로부터 변형될 수 있는 잔기인 반면, “필수” 아미노산 잔기는 이런 생물학적 활성에 반드시 필요하다. 가령, 쿠프레독신 사이에 보존되는 아미노산 잔기는 특히, 변형되지 않고, 따라서 “필수” 일 것으로 예측된다.

<213> 폴리펩티드의 활성을 변화시키지 않는 보존성 치환이 달성될 수 있는 아미노산은 당분야에 널리 공지되어 있다. 유용한 보존성 치환은 표 3, “바람직한 치환”에 도시된다. 한 부류의 아미노산이 동일 유형의 다른 아미노산으로 치환되는 보존성 치환은 이런 치환이 화합물의 생물학적 활성을 물리적으로 변화시키지 않는다면, 본 발명의 범위 내에 속한다.

표 3

<214> 바람직한 치환

| 최초 잔기 | 전형적인 치환 | 바람직한 치환 |
|---------|-------------------------------------|---------|
| Ala (A) | Val, Leu, Ile | Val |
| Arg (R) | Lys, Gln, Asn | Lys |
| Asn (N) | Gln, His, Lys, Arg | Gln |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Glu (E) | Asp | Asp |
| Gly (G) | Pro, Ala | Ala |
| His (H) | Asn, Gln, Lys, Arg | Arg |
| Ile (I) | Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine | Leu |
| Leu (L) | Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile |
| Lys (K) | Arg, Gln, Asn | Arg |
| Met (M) | Leu, Phe, Ile | Leu |
| Phe (F) | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr | Leu |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr, Phe | Tyr |
| Tyr (Y) | Trp, Phe, Thr, Ser | Phe |
| Val (V) | Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucine | Leu |

<215> (1) 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면, β-시트 또는 α-나선 구조, (2) 전하, (3) 소수성, 또는 (4) 표적 부위 측쇄의 크기에 영향을 주는 비-보존성 치환은 세포독성 인자 기능을 변화시킬 수 있다. 잔기는 표 4에 제시된 바와 같이, 공통적인 측쇄 특성에 기초하여 여러 군으로 구분된다. 비-보존성 치환은 한 부류의 구성원을 다른 부류의 구성원으로 교체하는 과정을 수반한다. 치환은 보존성 치환 부위, 또는 더욱 구체적으로, 비-보존된 부위 내로 도입될 수 있다.

표 4

<216> 아미노산 부류

| 부류 | 아미노산 |
|-----------|-------------------------------------|
| 소수성 | Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile |
| 중성 친수성 | Cys, Ser, Thr |
| 산성 | Asp, Glu |
| 염기성 | Asn, Gln, His, Lys, Arg |
| 교란된 사슬 구조 | Gly, Pro |
| 방향족 | Trp, Tyr, Phe |

<217> 변이체 폴리펩티드는 당분야에 공지된 방법, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드-매개된(특정 부위) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, PCR 돌연변이유발을 이용하여 만들 수 있다. 특정 부위 돌연변이유발(Carter, Biochem J.

237:1-7(1986); Zoller and Smith, Methods Enzymol., 154:329-50(1987)), 카세트 돌연변이유발(cassette mutagenesis), 제한 선별 돌연변이유발(restriction selection mutagenesis)(Wells et al., Gene 34:315-23 (1985)), 또는 다른 공지된 기술을 클론된 DNA에서 수행하여 쿠프레독신 변이체 DNA를 산출할 수 있다.

<218> 쿠프레독신의 공지된 돌연변이는 본 발명의 방법에 이용되는 변이체 쿠프레독신을 산출하는 데에도 이용될 수 있다. 가령, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 아주린의 C112D와 M44KM64E 돌연변이체는 고유 아주린과 상이한 세포독성 활성화와 성장 정지 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 이런 변형된 활성은 본 발명의 치료 방법에서 유용할 수 있다. 본 발명의 이들 방법의 한 가지 구체예에서는 쿠프레독신 및 포유동물 세포에서 에프린 신호전달을 간섭하거나 암의 성장을 저해하는 능력을 유지하는 이의 변이체와 유도체를 이용한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 방법에서는 세포 성장 정지(cellular growth arrest)를 유도하는 능력을 갖는 쿠프레독신 변이체, 예를 들면, M44KM64E 변이체를 이용한다.

<219> 본 발명의 더욱 완전한 이해는 아래의 구체적인 실시예를 참조함으로써 달성될 수 있다. 이들 실시예는 예시의 목적으로만 기술되고, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다. 형태에서 변화 및 등가물의 치환은 편법으로 간주된다. 본 명세서에서 특정한 용어가 이용되긴 했지만, 이들 용어는 설명을 목적으로 하고 본 발명을 제한하지 않는다. 본 발명의 기술적 사상과 범주를 벗어나지 않는 본 발명의 개변이 가능하고, 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

실시예

<220> **실시예 1: 꼬마선충(*C. elegans*) 발달의 생체내 연구.**

<221> 일부 에프린은 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*) 내에서 꼬리에서 근육 형성 및 태아 발달에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예비 시험에서는 루스티시아닌이 꼬리 근육 형성을 간섭(꼬리의 마비를 유발)하는 반면, 아주린이 새끼 신생(태아 발달)을 예방하는 것으로 밝혀졌다.

<222> 이들 실험에서, 아주린과 루스티시아닌 유전자가 대장균(*E. coli*) 내에서 과다-발현되었다. 아주린 또는 루스티시아닌 유전자가 없는 대조 대장균(*E. coli*)이 유지되었다. 꼬마선충(*C. elegans*) 벌레에 최대 3일 동안 대조 대장균(*E. coli*)이 공급되는 경우에, 이들은 건강하고 새끼를 발생시켰다. 꼬마선충(*C. elegans*) 벌레에 아주린-발현 대장균(*E. coli*)이 공급되는 경우에, 이들은 건강하지만 새끼를 거의 발생시키지 못하였다. 꼬마선충(*C. elegans*) 벌레에 루스티시아닌-발현 대장균(*E. coli*)이 공급되는 경우에, 대략 30%는 머리 부분이나 상체 부분을 움직일 수 있었지만 꼬리 부분이나 하체 부분이 마비되었다.

<223> **실시예 2: 아주린 구조적 이웃 분석**

<224> 단백질 구조 이웃 분석(structure neighbors analysis)은 Molecular Modeling DataBase 내에서, Vector Alignment Search Tool(VAST) 알고리즘(Gibrat et al., Curr Opin Struct Biol 6:377-385(1996); Madej et al., Proteins 23:356-3690(1995))으로 3-차원 단백질 구조의 직접적인 비교에 의해 결정되었다. 상기 Molecular Modeling DataBase는 결정학적 결과와 NMR 구조 결정으로부터 실험 데이터를 보유하고, National Center for Biotechnology Information(Bethesda, MD, USA)에 의해 유지된다. VAST 단백질 구조 이웃 분석을 수행하는 프로그램은 National Center for Biotechnology Information을 통하여 입수가 가능하다.

<225> 아주린은 MMDB(Molecular Modeling Database) 엔트리 1 KGY E(EphB2-ephrinB2 복합체의 결정 구조)와 현저한 (Vast p 값: $10 \times 10^{-4.6}$; 정렬 길이(alignment length): 90 aa; 동일성(identity) %: 6)(도 1) 구조적 중첩을 보였다. 참고된 결정 구조와 아주린의 이러한 중첩 정렬(superposition alignment)은 에프린(Ephrin-B2)으로 명명된 단백질, 사슬 E(138 aa)에 관련된다. 이러한 컴퓨터 분석은 Himanen et al., Nature, vol 414:933-938(2001)에 기술된 구조 데이터에 따른다.

<226> 더 나아가, VAST 분석에서, 쿠프레독신 루스티시아닌, 아우라시아닌, 플라스토시아닌, 오이 기초 단백질, 스틸라시아닌 역시 G-H 루프 영역 내에서 ephrinB2에 현저한 구조적 상동성을 보이는 것으로 밝혀졌다(도 2)

<227> **실시예 3: 아주린과 플라스토시아닌으로부터 유래된 합성 펩티드의 효능.**

<228> 인간 에프린 B-2 G-H 루프에 구조적으로 유사한, 아주린과 플라스토시아닌으로부터 유래된 합성 펩티드의 효능을 분석하였다. 아래의 서열을 보유하는 18-mer 아주린 펩티드를 표준 기술로 합성하였다:

<229> TFDVSKLKEGEQYMFCT SEQ ID NO: 18

<230> MCF-7 유방암 세포는 0, 24, 48, 72시간동안 5와 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 18-mer 아주린 펩티드와 함께 16-웰 평판 내에서

배양하고, 이후 coulter 계수기에서 MCF-7 세포의 총수를 계산하였다. 상기 펩티드는 50 µg/ml에서, 합성 펩티드 처리가 없는 세포와 비교하여 48 내지 72시간 이내에 MCF-7 세포 성장을 50% 저해하는 것으로 관찰되었다. 세포 성장 저해의 정도는 처리되지 않은 대조와 비교하여 5 µg/ml의 상기 18-mer 합성 펩티드에서 대략 25%이었다. 이 실험에서는 B-2 에프린에 대한 구조적 유사성에만 기초하여 설계된 합성 펩티드가 B-2 에프린에 의해 촉진된 암 세포 성장을 실제로 저해한다는 것을 입증한다.

<231> 실시예 4: Me1-2와 MCF-7 세포의 성장에 대한 쿠프레독신 효과의 시험관내 측정

<232> 쿠프레독신으로 처리된 세포의 성장은 16-웰 평판을 이용하여 측정하였다. Me1-2 또는 MCF-7 세포 (5 x 10⁵ 세포/웰)는 24시간동안 멀티웰(multiwell)(이 경우에, 16-웰)에 부착되도록 하였다. 부착(adherence)이후, 성장 배지를 빨아드렸다. 이후, PBS(인산염 완충된 염수), 또는 PBS에서 0.1 내지 10 농도의 다양한 쿠프레독신/시토크롬을 새로운 성장 배지를 보유하는 웰에 추가하고, 암 세포의 성장을 24, 48, 72시간동안 추적하였다. 배양 기간이후, 배양액에 트립판 블루(trypan blue)를 추가하고, 죽은 상태로 유동하는 세포의 총수를 계산하였다. 생존 세포와 죽은 상태로 유동하는 세포는 다양한 쿠프레독신 용량에서 IC50을 결정하기 위하여 계산하였다. IC50은 세포 배양 성장을 50% 저해하는 단백질의 농도이다.

<233> 24시간 성장 시점에 500,000개 세포/웰에서, 재현가능 계산(reproducible count)을 위한 충분한 세포가 존재하였다. 쿠프레독신-마이너스 대조 세포 배양액 내에서, 세포가 성장함에 따라, 이들 세포는 웰의 바닥에 부착할 수 있는 공간이 줄어들고, 사멸하기 시작하고, 유동하는 세포가 되었다. 플라스토시아닌-처리된 또는 루스티시아닌-처리된 세포 배양액 내에서, 세포 역시 웰의 표면 구역에서 과다성장하고 사멸하기 시작하고 유동하지만, 이들의 총수는 대조보다 적었다. 하지만, 아주린-처리된 세포 배양액 내에서, Me1-2와 MCF-7 세포주 성장이 저해되었고 유동하는 세포가 극히 적었다.

<234> 실시예 5: ephrinB2 엑토도메인과 쿠프레독신 사이에 구조적 유사성

<235> ephrinB2 엑토도메인과 쿠프레독신 사이에 구조적 유사성은 각각, U.S. National Institute of Health 및 European Bioinformatics Institute를 통하여 입수가가능한 VAST와 DALI 알고리즘(Holm and Sander, *J. Mol. Biol.* 233:123-138(1993); Gibrat *et al.*, *Curr. Opin. Biol.* 6” 377-385(1996))을 이용하여 결정하였다. 구조-기초된 쌍별 서열 정렬(structure-based pairwise sequence alignment)은 VAST 알고리즘을 이용하여 산정하였다. 단백질 구조 다이어그램은 TOPS(Topology Of Protein Structure) 카툰(Torrance *et al.*, *Bioinformatics* 21:2537-2538(2005))을 이용하여 2차원에서 수행하였다. 이들 구조의 평가는 프로그램 Mol Mol(Koradi *et al.*, *J. Mol. Graphics* 14:51-55(1996))을 이용하여 수행하였다.

<236> 양쪽 프로그램으로, 모노머 쿠프레독신 단백질, 플라스토시아닌, 아주린, 루스티시아닌의 소형 부분집합을 비롯한 여러 동족체(homolog)가 발견되었다(데이터 제시하지 않음). 구체적으로, ephrinB2 엑토도메인 및 이들 3가지 쿠프레독신(이들은 쿠프레독신 집단의 대표 단백질로서 선택된다) 사이의 구조적 비교는 각각, 11.0 내지 9.7(최대 가능 15.7 중에서)과 6.7 내지 6.4 범위의 현저하고 상당히 유사한 스코어를 갖는 VAST와 DALI 정렬을 제공하였다. DALI Z 스코어 <2.0은 구조적으로 상이하(표 5). 가장 두드러진 구조적 보존은 ephrinB2 엑토도메인과 플라스토시아닌 사이에 존재하고, 1.8의 평균 평방근 편차(root mean square deviation, r.m.s.d.)(67개의 구조적으로 동등한 Ca 원자 상에서 산정됨)로 중첩되었다(표 5). 대조적으로, 아주린, 플라스토시아닌, 루스티시아닌은 ephrinB2 엑토도메인과 더욱 약한 일차 서열 동일성(primary sequence identity)(10% 이하)을 보였다(표 5).

표 5

<237> 모노도메인(monodomain) 쿠프레독신 집단의 3가지 구성원(플라스토시아닌, 아주린, 루스티시아닌)에 대한 인간 에프린 B2 엑토도메인의 구조적 유사성.

| PDB | 명칭 | VAST 스코어 ^a | DALI Z 스코어 ^b | IKGY_E에 RMSD ^c | 정렬 길이 | 동일성 % |
|------|---------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------|-------|
| 1IUZ | 플라스토시아닌 | 11.0 | 6.4 | 1.8 | 67 | 9.0 |
| 1JZG | 아주린 | 10.1 | 6.7 | 3.4 | 90 | 5.6 |
| 1RCY | 루스티시아닌 | 9.7 | 6.1 | 3.1 | 87 | 8.0 |

<238> a - VAST 스코어 - VAST 구조-유사성 스코어; 이 숫자는 중첩된 이차 구조 요소의 총수 및 이러한 중첩의 특성

에 관련된다.

- <239> b - DALI Z 스코어 - Z 스코어는 DALI 데이터베이스 내에서 다른 구조와 에프린 엑토도메인 구조의 쌍별 비교를 이용하여 산정된다. Z 스코어가 높을수록, 3D 구조 사이에 유사성이 랜덤(random)할 가능성이 낮다($Z < 2.0$ 을 갖는 쌍은 구조적으로 상이하다).
- <240> c - RMSD - 구조 쌍의 정렬된 부분 사이에서 골격 잔기의 평균 평방근 편차(옹스트롬(angstrom) 단위).
- <241> 도 3에서는 ephrinB2 엑토도메인 및 조사 중인 3가지 쿠프레독신 각각의 TOPS 카툰(A)과 MolMol 사진(B)을 도시한다. 이러한 위상적 기제는 이들 단백질이 그리스-열쇠 접합의 코어를 형성하는 2개의 β 시트의 샌드위치를 채택하고, β -가닥의 총수와 방향의 관점에서 현저한 구조적 유사성을 나타낸다는 것을 보였다; 1KGY_E(eph rinB2), 1IUZ(플라스토시아닌), 1JZG_A(아주린)(도 3). 대조적으로, α -나선의 총수와 정렬은 훨씬 적게 보존된다. JZG A에서, 이러한 나선 구조는 본 명세서에 제시된 다른 단백질과 비교하여 독특하다. 상이한 크기를 갖는 단백질에서 예상되는 바와 같이, 이차 구조의 요소들을 연결하는 루프는 길이와 입체구조(conformation)에서 차이를 보였다. 1RCY(루스티시아닌)는 공유된 이차 구조 요소(secondary structure element, SSE)의 길이에서 실질적인 차이 및 비-공유된 SSE의 존재로 인하여, 구조적 상동성이 가장 낮았다.
- <242> **실시예 6: 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance)에 의한 Eph-Fc 수용체-쿠프레독신의 분석**
- <243> Eph 수용체와 쿠프레독신의 특이적인 상호작용은 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석으로 결정하였다. 인간 별아교세포종 CCF-STTG1, 교모세포종 LN 229, MCF-7(유방암) 세포는 기존 문헌(Yamada *et al.*, *Cell Microbiol.* 7:1418-1431(2005); Hiraoka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6427-6432(2004))에 기술된 바와 같이, 5 % CO₂를 보유하는 가습 배양기(humidifier incubator) 내에서 37°C에서, 2 mM L-글루타민, 10 mM Hepes, 10%(vol/vol) 열-불활화된 FBS, 100 단위/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 배지 1640에서 배양하였다. UISO-Mel-2의 인간 흑색종 세포(Yamada *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:14098-14103(2002))는 10% FBS로 보충된 Hank 배지를 보유하는 MEM 내에서 배양하였다. 대장균(*Escherichia coli*) JM109와 BL21(DE3)이 아주린, 루스티시아닌, 플라스토시아닌의 과다생산을 위한 숙주 균주(host strain)로서 이용되었다. 아주린과 루스티시아닌은 기존 문헌(Yamada *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:14098-14103(2002); Yamada *et al.*, *Cell Cycle* 3:1182-1187(2004))에서 기술된 바와 같이 정제하였다. GST-아주린 융합 유도체의 작제와 정제는 기존 문헌(Yamada *et al.*, *Cell Microbiol.* 7:1418-1431(2005))에서 보고되었다. 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*)으로부터 플라스토시아닌의 정제와 발현은 대장균(*E. coli*) 균주 BL21(DE3)Cd+(RIL)이 BL21(DE3) 대신에 이용된 점을 제외하고, 기존 문헌(Schlarb *et al.*, *Gene* 234:275-283(1999))에서 기술된 바와 같이 본질적으로 수행되었다. 완전 산화된 단백질의 농도는 4700 M⁻¹cm⁻¹의 흡광 계수(extinction coefficient)를 이용하여, 598 nm에서 분광광도법으로 측정하였다.
- <244> Eph 엑토도메인 Fc 융합 단백질과 에프린은 R & D Systems, Minneapolis, MN으로부터 냉동 건조된 분말로 구입하였다. 표면 플라즈몬 공명과 성장 검사에 이용되는 모든 다른 화학약품은 Biacore AB International 또는 Sigma로부터 구입하였는데, 높은 분석용 등급을 보유하였다. 쿠프레독신 또는 GST-펩티드 및 Eph-Fc 또는 ephrinB2-Fc 사이의 직접적인 단백질-단백질 상호작용은 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술에 기초한 Biacore X 바이오센서 시스템(BiacoreAB)으로 결정하였다.
- <245> 최초 스크리닝 검사에서, CM5 센서 칩(sensor chip) 상에서 단일 채널에 아주린, 루스티시아닌, 또는 플라스토시아닌의 고정화(immobilization)는 아민 커플링 절차(amine coupling procedure)를 이용하여 달성하였다. 300 RU의 공명 신호(resonance signal)의 증가와 함께, N-하이드록시숙시니미드/N-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸카르보디이미드(0.05M/0.2M, 35 μ l), 쿠프레독신 단백질(255 μ M, 50 μ l), 1M 에탄올아민(50 μ l, pH 8.8), 이들 단백질에 공유 결합된 100 mM NaOH(10 μ l)의 CM5 센서 칩에 순차적인 주입. 결합 검사는 쿠프레독신-CM5 표면을 재생시키는 5와 30 μ l/min의 유속에서 2.3 분 동안 센서 표면상에서, HBS-EP 유동 완충액(running buffer)(0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20)에 담긴 100 nM의 Eph-Fc 단백질의 순차적인 주입(70 μ l 주입) 및 100 mM NaOH(10 μ l 펄스)의 중간 주입으로 수행하였다. 모든 결합 검사는 비특이적인 결합을 보정하기 위하여 노출된 Au CM5 센서 표면(네거티브 채널)을 대상으로 수행되었다.
- <246> 이들 결합 스크린(binding screen)은 2.3분 동안 30 μ l/min의 유속에서 100 nM의 Eph-Fc 수용체의 순차적인 주입으로, 쿠프레독신 변형된 센서 칩 상에서 수행하였다. 이들 곡선은 Eph-Fc와 아주린, 플라스토시아닌, 루스티시아닌의 상호작용에 대한 연합 단계(association phase)의 시작을 나타낸다. 상대적인 결합 친화성은 EphB1-Fc 또는 EphA8-Fc에 루스티시아닌 결합에 대한 79 RU에서부터 EphB2-Fc에 아주린 결합에 대한 1248 RU까지 변하는

포화 공명(saturating resonance, Req)의 함수로서 획득되었다. 특정 EphA와 EphB 수용체 단백질에 쿠프레독신의 교차-선택적 결합(cross-selective binding)은 쿠프레독신과 EphB 사이에서 발생하는 최적 상호작용에서 관찰된다.

<247> 고정된 쿠프레독신과 Eph-Fc의 결합의 SPR 센서그램은 이들 2가지 단백질 부분집합 사이에 선택적인 인식(selective recognition)을 암시하였다(도 4A-C). 이들 치수에서, Eph-Fc 농도는 100 nM에서 일정하게 유지되고, 따라서, Req로 표시된 연합 정도에서 차이는 Eph-Fc 수용체 단백질과 쿠프레독신 사이에 친화성 차이를 반영한다. 아주린은 EphB2-Fc와 A6에 대한 최대 친화성을 나타내고, 또한, A4와 A7에 단단하게 결합하였다(도 4A). 다른 한편, 플라스토시아닌은 EphA1-Fc, A3, B2에 선택성을 나타내고, 또한, 정도가 덜하긴 하지만, A2와 A6에 선택성을 나타냈다(도 4B). 마지막으로, 루스티시아닌은 EphA8-Fc와 B1을 약하게 인식하였다(도 4C). 아주린 및 EphB2-Fc와 EphA6-Fc의 연합 상호작용(associative interaction)은 각각, Req 수치 1248과 1200 RU에서 최대이었다.

<248> **실시예 7: EphB2-Fc-SPR 결합 측정으로 아주린과 GST-Azu 펩티드의 결합 친화성의 분석**

<249> EphB2-Fc-SPR 결합 측정으로 아주린과 GST-azu 펩티드의 결합 친화성의 분석은 EphB2-Fc 수용체에 대한 전장 아주린 또는 이의 다양한 도메인의 상대적인 결합 친화성을 평가하기 위하여 고정된 EphB2-Fc를 이용하여 아주린 또는 GST-Azu 펩티드로 수행하였다. 아주린 또는 GST-Azu 펩티드는 주입 간에 100 mM NaOH 펄스(pulse)를 보유하는 EphB2-Fc 또는 ephrinB2-Fc 변형된 CM5 칩에 증가하는 농도(0.05-100 nM)로 주입하였다. 이들 데이터는 랭뮤어(Langmuir)(1:1) 결합 모형[Req = Rmax/(1 + Kd/C)]에 맞추어 평형 결합 상수(equilibrium binding constant)(Kd)를 추정하였다.

<250> EphB2-Fc 결합에 대한 아주린의 구조적 결정요소(structural determinant)를 설명하기 위한 실험 전략(experimental strategy)은 도 5에 도시되는데, 이는 기존 문헌(Yamada *et al.*, *Cell Microbiol.* 7:1418-1431(2005))에서 기술된 바와 같은 아주린과 GST-Azu 구조체의 일차/이차 구조적 파라미터의 지도를 묘사한다. 특히, GST-Azu 88-113은 ephrinB2의 GH 루프 영역(고유 리간드)과 일치하고, 이런 이유로, EphB2-Fc와 이의 결합 효능이 특히 흥미로웠다. EphB2-Fc에 대한 아주린과 다양한 GST-Azu 구조체(모두, 100 nM에서)의 최초 결합 측정에서, 이들의 상대적 친화성이 확인되었다: 즉, 아주린 > GST-Azu 88-113 > GST-Azu 36-128 > ephrinB2-Fc > GST-Azu 36-89 >> GST(도 6A). 아주린과 GST-태그된 아주린은 필적하는 친화성을 보였다(데이터 제시하지 않음). 이들 결합 친화성을 정량하기 위하여, 아주린 또는 GST-Azu에 대한 포화 반응 수치(saturating response value, Req)를 농도(0-100 nM)의 함수로서 측정하였다(도 6B). 이들 결합 데이터는 간단한 랭뮤어(Langmuir)(1:1) 결합 방정식에 맞추어 평형 해리 상수(equilibrium dissociation constant)(Kd)를 추정하였다. 흥미롭게도, 아주린과 GST-Azu 88-113은 고유 ephrinB2-Fc 리간드(Kd = 30 nM)보다 EphB2-Fc에 대하여 각각, 5-배(Kd = 6 nM)와 2.5-배(Kd = 12 nM) 높은 친화성을 나타냈다. 또한, GST-Azu 36-128(표 6)은 ephrinB2-Fc(Kd = 30 nM)보다 약간 더 높은(Kd = 23 nM) 친화성을 나타냈다. 대조적으로, GST-Azu 36-89와 GST는 미미한 결합 친화성을 나타냈다(표 6). 이들 데이터는 높은 친화성 EphB2-Fc 상호작용에 대한 아주린의 Azu 88-113 영역의 중요성을 암시한다. 이러한 Azu 88-113 영역은 ephrinB2에서 관찰되는 GH 루프에 구조적으로 상동한 GH 루프 도메인으로 구성된다.

표 6

<251> **아주린과 GST-Azu 구조체 및 EphB2-Fc의 상대적인 결합 친화성**

| 분석물 | Req(RU) | 분자량 | K _d (nM) |
|----------------|---------|---------|---------------------|
| wt 아주린 | 427 | 13,929 | 6 ± 0.75 |
| ephrinB2-Fc | 159 | 130,200 | 30 ± 5.1 |
| GST | 14 | 26,000 | > 160 |
| GST-Azu 36-128 | 244 | 36,076 | 23 ± 1.5 |
| GST-Azu 36-89 | 57 | 31,924 | 61 ± 9.0 |
| GST-Azu 88-113 | 314 | 28,943 | 12 ± 1.5 |

<252> 아주린과 GST-Azu 구조체 및 EphB2-Fc의 상대적인 결합 강도는 SPR 결합 적정 실험(binding titration experiment)에서 측정하였는데, 이들 추정된 데이터 세트는 고유 ephrinB2-Fc 리간드와 GST의 결합과 비교된다. 최초 스크리닝 실험으로부터 데이터는 센서 표면에 100 nM 분석물의 주입 이후에 산출되었는데, 이들 포화 신호

(saturating signal, R_{eq})는 공명 단위(resonance unit)로서 기재된다. 결합에서 포화는 도 6b에 도시된 결합 곡선 내에서 각 적정 포인트(titration point)에서 달성되었는데, [분석물]에 대하여 도면에 기입된 이들 수치는 평형 해리 상수(K_d)를 산정하는데 이용되었다. K_d 수치는 아주린과 GST-Azu의 상호작용의 경우에 6 내지 61 nM 범위 내에 위치하는 반면, EphB2-Fc와 상기 고유 리간드의 상호작용은 상기 범위 내에서 중간 결합 친화성을 나타냈다.

<253> **실시예 8: EphB2-Fc에 대한 아주린/GST-Azu와 ephrinB2-Fc의 경쟁 결합 연구의 분석**

<254> 높은 친화성 아주린-EphB2-Fc 결합의 생리 효과를 더욱 명확하게 이해하기 위하여, 추가적인 결합 측정을 수행하였다. ephrinB2-Fc(246 nM) + 경쟁물질[아주린 또는 GST-Azu(0-1020 nM)]을 EphB2-Fc CM5 센서 표면에 주입한 점을 제외하고, 결합 상수 연구에서와 유사하게 경쟁 결합 적정(competition binding titration)을 수행하였다.

<255> 아주린 + ephrinB2-Fc 샘플은 상기 센서 표면에 상이한 아주린 농도(0-1020 nM, [ephrinB2-Fc]는 246 nM)로 추가하였는데, 이들 데이터는 공명의 비율, 전체 반응 $\%[Req(\text{아주린}+ephrinB2-Fc)/(Req/(ephrinB2-Fc))]$ 로서 도면에 기입되었다. GST-Azu 88-113과 GST-Azu 36-89는 고정된 EphB2-Fc에 대하여 ephrinB2-Fc로 적정하고, 유사한 방식으로 분석하였다. 경쟁 데이터는 고정된 EphB2-Fc에 대한 아주린 결합과 GST-Azu 88-113 결합 사이의 1:1 화학량(stoichiometry)을 암시한다.

<256> 먼저, EphB2-Fc 리간드, ephrinB2-Fc에 대한 아주린과 GST-Azu 구조체의 결합을 측정하였다. 도 7A에서는 아주린이 높은 친화성($K_d = 8.5 + 0.8$ nM)으로 ephrinB2-Fc에 실제로 결합한다는 것을 보여주는데, 이는 이들 두 단백질 사이에 구조적 유사성을 반영한다(표 5). ephrinB2-Fc에 대한 GST-Azu 88-113의 상대적으로 높은 친화성($K_d = 39 + 6.5$ nM)은 88과 113 사이의 영역이 ephrinB2-Fc에 대한 결합에도 관여한다는 것을 암시한다. 대조적으로, GST와 GST-Azu 36-89는 ephrinB2-Fc와 현저한 상호작용을 나타내지 않았다. 종합하면, 이들 데이터는 아주린이 GH 루프(88-113) 영역을 통하여 EphB2-Fc와 ephrinB2-Fc 모두에 높은 친화성으로 결합할 수 있다는 것을 암시한다.

<257> 이러한 개념을 더욱 검증하기 위하여, ephrinB2-Fc을 가변 농도의 아주린과 GST-Azu 구조체와 함께 배양한 이후, CM5 센서 칩으로 고정된 EphB2-Fc에 ephrinB2-Fc의 결합의 SPR 분석을 수행하였다. 도 7B에서는 각각, 0-1020 nM의 아주린, GST-Azu 88-113, GST-Azu 36-89에 의한, EphB2-Fc에 ephrinB2-Fc([ephrinB2-Fc] = 246 nM) 결합의 저해를 보여준다. 이러한 저해는 전체 반응 $\%(= [Req(\text{아주린} + ephrinB2-Fc)/Req(\text{ephrinB2-Fc alone})]*100)$ 로 표시된다. 이들 저해 프로파일은 ephrinB2-Fc가 아주린 또는 GST-Azu 88-113과 함께 사전 배양되는 경우에 고정된 EphB2-Fc에 전체 단백질의 감소된 결합을 암시하는데, 아주린은 GST-Azu 88-113보다 강력한 저해물질이다. ephrinB2-Fc와 함께 아주린 또는 GST-Azu 88-113의 사전 배양(preincubation)은 표면에 대한 전체 단백질 결합을 최대 60% 감소시켰다. 다른 한편, GST-Azu 36-89는 전체 단백질 결합에 영향을 주지 않았는데(도 7B), 이는 ephrinB2-Fc 또는 EphB2-Fc에 대한 이의 약한 결합과 일치한다. 최대 저해가 1:1 비율의 ephrinB2-Fc과 아주린(또는 GST-Azu 88-113)에서 달성된다는 점에서, 아주린(또는 GST-Azu 88-113)은 ephrinB2-Fc와 화학량적 복합체(stoichiometric complex)를 형성하는 것으로 보인다. 아주린 또는 GST-Azu 88-113에 의한 저해가 40 내지 50% 수준에서 도달한다는 사실은 이러한 추정 아주린-ephrinB2-Fc 복합체가 EphB2-Fc 수용체에 대한 상당한 친화성을 갖는다는 것을 암시한다. 종합적으로, 이들 결합 데이터는 아주린이 ephrinB2-Fc와 EphB2-Fc 모두에 대하여 높은 친화성을 나타내고, 리간드 격리(ligand sequestration)와 수용체 점유(receptor occupation)의 이중 기전으로 ephrinB2-Fc-EphB2-Fc 결합을 간섭할 수 있다는 것을 암시한다.

<258> **실시예 9: 다양한 암 세포주에 대한 Azu 96-113과 Plc70-84 합성 펩티드 및 GST-Azu Fusion 유도체의 세포독성 활성의 분석**

<259> 인간 ephrinB2 엑토도메인과 함께 아주린과 플라스토시아닌의 구조-기초된 서열 정렬 이후에, ephrinB2의 G-H 루프 영역에 상응하는 펩티드(Azu 96-113(SEQ ID NO: 18)과 Plc 70-84 (SEQ ID NO: 20))를 설계하였는데, 상기 영역은 상기 Eph 수용체에 이들 에프린의 높은 친화성 결합을 매개하는 주요 영역이다(Himanen *et al.*, *Nature* 414:933-938(2001); Toth *et al.*, *Dev. Cell.* 1:83-92(2001)). 도 8에서, ephrinB2 엑토도메인, 아주린, 플라스토시아닌의 C-말단 분절의 구조적 중첩이 관찰할 수 있다. 인간 ephrinB2 엑토도메인과 함께 아주린과 플라스토시아닌의 구조적으로 기초된 서열 정렬을 이용하여 아주린과 플라스토시아닌의 EphB2 수용체에 ephrinB2의 높은 친화성 결합을 매개하는 영역(ephrinB2-Fc 엑토도메인의 G 가닥-루프-H 가닥)에 기초한 펩티드(각각, Azu 96-113(96-TFDVSKLKEGEQYMFCT-113)과 Plc 70-84 (70-VRKLSTPGVYGYCE-84))를 설계하였다(도 8). 이들 펩티드는

GenScript Corporation(Piscataway, NJ)으로부터 99% 순도로 구입하였다. 이들은 역상 고압 액체 크로마토그래피(reverse phase high-pressure liquid chromatography)로 정제하고, 질량 분석법(mass spectrometry)으로 그들의 실체를 확인하였다. 펩티드는 인산염-완충된 염수(PBS)(1x)에 용해시키고, 사용 때까지 -20℃에서 분량으로 보관하였다.

<260> 아주린의 이들 도메인이 암 진행에서 Eph 신호전달의 길항물질로서 기능할 수 있는지를 살펴보기 위하여, EphB 수용체/에프린 리간드를 과다 발현하는 것으로 알려져 있는 다수의 암 세포주에서 정량적 MTT 측정검사를 수행하였다. 37℃에서 24시간 배양 동안, 아주린과 플라스토시아닌 G-H 루프 펩티드 둘 모두 75 μM에서 뇌종양 별 아교세포종 CCF-STTG1과 교모세포종 LN-229의 세포 사멸을 유도하였다(도 9A). 플라스토시아닌 펩티드 Plc 70-84는 아주린 펩티드 Azu 96-113보다 다소간 높은 세포독성 활성을 나타냈다. 이런 세포독성이 용량 의존성(dose dependent)이고 다른 암 세포주에도 효과적인지를 결정하기 위하여, 여러 농도에서 이들 펩티드의 흑색종(도 9B) 또는 교모세포종세포(도 9C)에 대한 효과를 평가하였다. 양쪽 사례에서, 증가하는 펩티드 농도는 증가하는 세포독성을 유도하였다(도 9B와 9C).

<261> **실시예 10: 유방암 MCF-7 세포에서 세포 사멸을 유도하는 GST-Azu 융합 펩티드 능력의 분석**

<262> 유방암 MCF-7 세포에서 세포 사멸을 유도하는 GST-Azu 융합 펩티드의 능력을 조사하였다. 아주린과 플라스토시아닌 합성 펩티드의 세포독성을 측정하기 위하여, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일-2,5-디페닐 테트라졸륨 브롬화물)(MTT)(Sigma) 측정검사(Mosmann, J. Immunol. Methods 65:55-63 (1983))를 수행하였다. 웰당 대략 2 x 10⁴ 개의 세포를 96-웰 배양 평판에서 100 μl의 RPMI 1640 배지 내에 접종하였다. 하룻밤동안 성장이후, 상층액을 제거하고, 다양한 명시된 농도에서 아주린 또는 플라스토시아닌 합성 펩티드를 포함하는 새로운 배지를 부착된 세포에 추가하였다. 24 또는 48시간 처리이후, 배양액에 10 μl의 5 mg/ml MTT 용액을 추가하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. MTT 반응은 이소프로판올에 녹인 40 mM HCl의 추가로 중단시켰다. 형성된 MTT 포르마잔(formazan)은 기존 문헌(Mosmann, 1983)에서 기술된 바와 같이 분광광도법으로 측정하였다. 처리되지 않은 대조 세포는 처리된 세포와 비교하여 생존능(viability) 및 세포독성(cytotoxicity)의 기준을 결정하였다.

<263> 대조(단백질 처리 없음)와 유사하게, GST 또는 GST-Azu 36-89 융합 단백질에 의해 유인되는 세포독성은 거의 나타나지 않았다(도 10). 하지만, ephrinB2/EphB2 결합을 간섭할 수 있는 아주린 영역을 보유하는 GST-Azu 36-128 또는 GST-Azu 88-113은 용량 의존성 방식으로 현저한 세포독성을 나타내는데, 이는 MCF-7 세포 사멸을 유도함에 있어 Azu 88-113 영역의 역할을 뒷받침한다.

<264> **실시예 11: 에프린 신호전달에 관련된 병리학적인 장애로 고통받는 환자의 치료**

<265> 쿠프레독신 화합물(연구 약제)의 I/II기 임상 시험이 암 환자에서 수행된다. 구체적으로, 상기 쿠프레독신 화합물은 Plc 70-84(SEQ ID NO: 20)이다.

<266> 현재 가용한 FDA-승인된 화학치료제와 섭생에 의한 적절한 치료이후에도 임상적/방사선적 진행 또는 재발을 나타내는 유방암, 결장암, 흑색종이 조직학적으로 확증된 49명의 성인 환자가 상기 연구 약제를 투여하는 전향적 공개 연구(open-label prospective study)에 등록된다. 본 연구에 등록을 위한 자격요건으로, 모든 환자는 화학 치료 섭생의 승인된 코스의 완결이후 증가하는 체적의 측정가능 종양을 나타낸다. 지속적인 전이성 침착 및/또는 크기 또는 체적의 지속적인 증가의 증거가 조직학적으로 확립되어야 한다. 이러한 조직학적 증거는 미세 침흡인(fine needle aspiration, FNA) 생검으로 획득될 수 있다.

<267> 이러한 치료 프로그램은 Institutional Review Board of the University of Illinois(Chicago)와 FDA에 따라, 모든 환자로부터 서면 동의서(informed consent)를 받은 이후에 실시된다. 이들 환자는 제안된 요법의 효과의 적절한 평가를 방해하는 병발성(intercurrent) 질환, 예를 들면, 다른 악성 종양 질환, 이전 악성 종양의 병력, 혈액 이혼화증(blood dyscrasias), 인슐린 의존성 당뇨병(insulin dependent diabetes) 또는 다른 심각한 심혈관 질환이 없다. 요법을 시작하기에 앞서, 간 기능 검사(liver function study, LFT)를 비롯한 기준 혈액 작업(baseline blood work)(일반 혈액 검사(Complete Blood Count, CBC)와 혈청 화학 검사(Serum Chemistry))이 수행된다. 모든 적임의 환자는 임상 시험 기간 동안 임의의 암 화학치료제를 동시에 복용해서는 안 된다.

<268> 연구 약제는 12주 동안 이러한 연구 약제의 제약학적으로 허용되는 제제의 일일 정맥내 주사로 투여되고, 개체는 용량 제한 독성(dose limiting toxicity)이 관찰된다. 10 mg/kg/day으로 시작하여 최대 50 mg/kg/day의 용량까지 5 mg/kg/day씩 증가하는 7가지 용량 수준이 존재한다. 각 용량 수준의 효능은 진단된 측정가능 암(유방암, 결장암, 흑색종)으로 고통받는 7명의 환자에서 기록된다.

<269> 이러한 반응은 측정가능 종양을 2차원(a와 b)에서 측정함으로써 평가된다. 1) 표적 전이성 종양의 완전 소멸(total disappearance)은 완전 반응(CR)으로 간주된다; 2) 75% 감소는 우수한 부분적인 반응(PR)으로 간주된다; 3) 우수한 반응(PR)은 치료이후, 크기에서 50% 감소이다. 4) 크기에서 25% 감소는 안정 병변(stable disease, SD)으로 간주된다. 5) < 25%는 반응 없음(no response, NR)으로 간주된다. 병이 진행된 환자는 치료를 중단하고, 추가로 12주 동안 추적된다.

<270> 표적 전이성 종양의 완전 소멸과 크기 감소는 아주린 치료가 암을 치료하는데 효과적임을 암시할 것이다. Plc 70-84 치료가 효과적이라는 다른 암시는 새로운 전이성 종양의 출현에서 감소 및 종양과 연관된 혈관신생에서 감소이다.

도면의 간단한 설명

<69> **도 1.** 도 1에서는 ephrinB2를 보유하는 아주린의 구조적 정렬을 도시한다. ephrinB2의 G-H 루프(EphB 수용체와의 고도 친화성 상호작용을 매개하는 영역)는 박스로 표시된다. 1JZG_A는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린의 아미노산 서열(SEQ ID NO:1)이다. 1KGY_E는 인간으로부터 ephrinB2 엑토도메인의 아미노산 서열(SEQ ID NO: 23)이다.

<70> **도 2.** 도 2에서는 ephrinB2를 보유하는 쿠프레독신의 구조적 정렬을 도시한다. 박스는 Eph 수용체 결합에 관여하는, ephrinB2의 G-H 루프(15 aa)를 표시한다. 보존된 잔기는 굵은 글씨체와 밑줄로 표시된다. 대문자는 중첩(super-position)이다. 점선은 정렬이 없는 부분이다. ephrinB2 G-H 루프 영역은 SEQ ID NO: 24이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 녹농균(*P. aeruginosa*) 아주린 영역은 SEQ ID NO:25이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 티오바실루스(*Thiobacillus*)(*Acidithiobacillus*) 페로옥시단스(*ferrooxidans*) 루스티시아닌 영역은 SEQ ID NO: 26이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 클로로플렉서스 아우란티아쿠스(*Chloroflexus aurantiacus*) 아우라시아닌 영역은 SEQ ID NO: 27이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 포르미디움 라미노섬(*Phormidium laminosum*) 플라스토시아닌 영역은 SEQ ID NO: 28이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 오이(*Cucumis sativus*) 오이 기초 단백질 영역은 SEQ ID NO: 29이다. 상기 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 구조적으로 유사한 오이(*Cucumis sativus*) 스텔라시아닌 영역은 SEQ ID NO: 30이다.

<71> **도 3.** 도 3에서는 인간으로부터 ephrinB2 엑토도메인(1kgy_E), 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 플라스토시아닌(1iuz), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)으로부터 아주린(1jzg_A), 티오바실루스(*Thiobacillus*)(*Acidithiobacillus*) 페로옥시단스(*ferrooxidans*)로부터 루스티시아닌(1rcy)의 구조 사이에 비교를 도시한다. 도 3A에서, 각 단백질의 위상(topology)은 TOPS 카툰을 이용하여 표시된다. TOPS 카툰은 이차 구조 요소(secondary structure element, SSE)의 연속으로 이러한 구조를 타낸다: β-가닥(삼각형으로 표시됨)과 나선(알파와 310)(원으로 표시됨), 이들이 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 순차적으로 연결되는 방법, 이들의 상대적인 공간적 위치(spatial position)와 방향. 이들 요소의 방향은 연결선으로부터 추론될 수 있다. “업(Up)” 가닥은 상향 지시 삼각형(upward pointing triangle)으로 표시되고, “다운(down)” 가닥은 하향 지시 삼각형(downward pointing triangle)으로 표시된다. 도 3B에서, 그림은 MolMol 프로그램(Koradi *et al.*, J.Mol.Graphics14:51-55(1996))을 이용하여 작성되었다.

<72> **도 4.** 도 4에서는 결합된 Eph-Fc와 쿠프레독신의 연합에 대한 표면 플라즈몬 공명 센서그램(surface plasmon resonance sensorgram)을 도시한다. EphA-Fc와 EphB-Fc 단백질과 아주린(도 4A), 플라스토시아닌(도 4B), 루스티시아닌(도 4C)의 선별적인 결합이 제시된다.

<73> **도 5.** 도 5에서는 전장 아주린(SEQ ID NO: 1)으로부터 유래된 다양한 절두된 아주린 구조체의 개요도를 도시한다. 이차 구조 요소는 β-시트의 경우에 화살표로서, 나선(알파와 310)의 경우에 직사각형으로 표시된다. 128개의 아미노산 아주린을 인코딩하는 유전자의 다양한 분절은 gst 유전자(글루타티온 S-전이효소를 인코딩)의 3'-말단에서 인 프레임(in frame) 융합되고, 대장균(*E.coli*) 내에 클론되고, 과다발현되고, 융합 단백질은 기존 문헌(Yamada *et al.*, Cell Micro. 7:1418-1431(2005))에 기술된 바와 같이 정제되었다.

<74> **도 6.** 도 6에서는 표면 플라즈몬 공명 연구에서 측정된, 아주린 및 선택적으로 작제된 GST-Azu 융합체 융합체의 EphB2-Fc에 대한 상대적인 결합 친화성(relative binding affinity)을 도시한다. 도 6A에서, 아주린 또는 GST-Azu의 상대적인 결합 강도를 측정하기 위한 초기 스크리닝 실험이 수행되었는데, 여기서 쿠프레독신(100 nM)의 EphB2-Fc-변형된 CM5 센서 칩(sensor chip)으로의 주입이후 SPR 흔적(trace)이 기록되었다. 흥미롭게도, 아주린, GST-Azu 88-113, GST-Azu 36-128은 고유 리간드(ephinB2-Fc)보다 EphB2-Fc에 더욱 강하게 결합한다. 도

6B에서는 증가하는 농도(0.05-100 nM)의 쿠프레독신을 적정한 이후, 고정된 EphB2-Fc에 아주린, GST-Azu 88-113, ephrinB2-Fc, GST-Azu 36-89의 상호작용에 대한 결합 친화성 곡선(binding affinity curve)을 도시한다. 평형 공명 신호(equilibrium resonance signal, Req)는 이들 곡선을 구성하는 개별 센서그램으로부터 추정되었다. 결합 해리 상수(binding dissociation constant, Kd)는 방정식 $Req = R_{max}/(1 + Kd/C)$ 를 이용하여 랭뮤어(Langmuir)(1:1) 결합 모형에 이들 데이터를 맞추는 이후에 산정되는데(표 6), 이들 곡선 맞춤(curve fit)은 적정 곡선(titration curve) 내에서 연결되는 데이터 포인트(data point)로서 표시된다. 이러한 정량적 데이터 세트는 최초 결합 스크린(initial binding screen)으로부터 데이터 세트와 일치한다.

<75> **도 7.** 도 7에서는 결합 적정(binding titration)과 경쟁 검사에서 측정된, ephrinB2-Fc와 EphB2-Fc 및 아주린과 GST-Azu 사이의 결합 상호작용을 도시한다. 도 7A에서는 결합 친화성(Kd)이 앞서 기술된 바와 같이 측정된, ephrinB2-Fc 및 아주린과 GST-Azu 사이의 상호작용에 대한 SPR 결합 곡선을 도시한다. 도 7B에서는 CM5 센서 칩상에 고정된 EphB2-Fc를 이용한 SPR 결합 경쟁 연구결과를 도시한다.

<76> **도 8.** 도 8에서는 VAST 알고리즘에 의해 추정되는, 인간 ephrinB2 엑토도메인(1KGY_E)과 함께, 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 플라스토시아닌(1IUZ)과 녹농균(*P. aeruginosa*)으로부터 아주린(1JZG_A)의 C-말단을 포함하는 구조적 정렬을 도시한다(각각, 도 8A와 도 8B). 중첩된 이차 구조 요소는 굵은 대문자로 표시된다. 점선과 소문자는 정렬이 없는 부분이다. 이들 구조에 따른 이차 구조 요소는 β-시트의 경우에 화살표로서, 310 나선의 경우에 열린 직사각형으로 표시된다. 동일한 아미노산은 별표로 표시된다. 에프린 B2 서열 내에서 어두운 회색과 밝은 회색으로 강조된 아미노산은 각각, ephrinB2와 EphB2 수용체 사이의 상호작용과 리간드 이량화(ligand dimerization)에 관여하는 잔기이다(Himanen *et al.*, Nature 414:933-938(2001); Toth *et al.*, Dev. Cell. 1:83-92(2001)). Eph 수용체에 대한 에프린의 높은 친화성 결합을 매개하는 주요 영역인 ephrinB2의 G-H 루프 영역에 상응하는 플라스토시아닌과 아주린 펩티드(각각, P1c 70-84(SEQ ID NO: 20)와 Azu 96-113(SEQ ID NO: 18))는 상자로 표시되고 각 정렬 아래에 제시된다. G와 H 루프 영역은 ephrinB2의 아미노산 서열의 상부에 두꺼운 화살표로 표시된다. 1KGY_E 잔기 69-138과 68-138은 각각, SEQ ID NO: 31과 33에서 열거된다. 1IUZ 잔기 57-98은 SEQ ID NO: 32에서 열거된다. 1JZG_A 잔기 76-128은 SEQ ID NO: 34에서 열거된다.

<77> **도 9.** 도 9에서는 암 세포 생존능(viability)에 대한 쿠프레독신 펩티드의 효과를 도시한다. 도 9A에서는 별아교세포종(astrocytoma) CCF-STTG1과 교모세포종(glioblastoma) LN-229 암 세포주의 세포 생존능에 대한 아주린(Azu 96-113)과 플라스토시아닌(P1c 70-84) 합성 펩티드의 효과를 도시한다. 도 9B에서는 흑색종 U150-Mel-2 세포 생존능에 대한 상이한 농도의 플라스토시아닌(P1c 70-84) 합성 펩티드의 효과를 도시한다. 세포 생존능은 실시예 10에 기술된 바와 같이 MTT 측정검사에 의해 결정되었다. 암 세포(96-웰 평판 내에서 2×10^4 개 세포/웰)는 37°C에서 24시간동안 상이한 농도에서 이들 합성 펩티드로 처리되었다. 데이터는 처리되지 않은 대조(100% 생존능)의 비율과 비교하여 세포 생존능의 비율로서 표시된다. 도 9C에서는 교모세포종 LN-229 세포에 대한 Azu 96-113 합성 펩티드의 세포 독성을 도시한다. 세포독성 효과는 MTT 측정검사에 의해 결정되었다. 암 세포(96-웰 평판 내에서 2×10^4 개 세포/웰)는 37°C에서 24시간동안 상이한 농도의 Azu 96-113(10, 25, 50, 75, 100 μM)로 처리되었다. 세포독성 비율은 처리되지 않은 대조(0% 세포독성)의 비율과 비교하여 세포 사멸(cell death)의 비율로서 제시된다.

<78> **도 10.** MCF-7 세포의 세포 생존능에 대한 GST-Azu 36-128과 GST-Azu 88-113의 효과. GST-Azu 펩티드는 8×10^3 개 암 세포/웰을 보유하는 96 웰 평판에 증가하는 농도(1.25, 6.25, 12.5 μM)로 추가하고, 37°C에서 48시간동안 배양하고, MTT 측정검사를 이용하여 분석하였다. 동일한 농도에서 GST와 GST-Azu 36-89 및 처리되지 않은 세포는 GST-Azu 36-128 및 GST-Azu 88-113과 함께, 대조(control)로서 병행되었다.

도면

도면1

```

          10      20      30      40      50      60
    .....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
1JZG_A  1 AECSVDIQGndqm~~~qfntNAITVDKscKQFTVNLSHPgnl~~~pkNVMGHNWVLSTAAD 55
1KGY_E  1 IVLEPIYWNasnskfipgggLVLYPQL~~~GDKLDIICPKVdsktvgQYEYKYVYMVDKIQ 58
          70      80      90      100     110     120
    
```

```

          .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
1JZG_A  56 MGVVVIDgmasgldkdyllkpdsviaHRLKIGSG-EKDSVTFDVS~~~~~KLKEG 105
1KGY_E  59 ADRCTIKke~~~~~ntPLLNCRPQDVKFTIKFQefspnlwgIEFQKN 102
          130     140     150
    
```

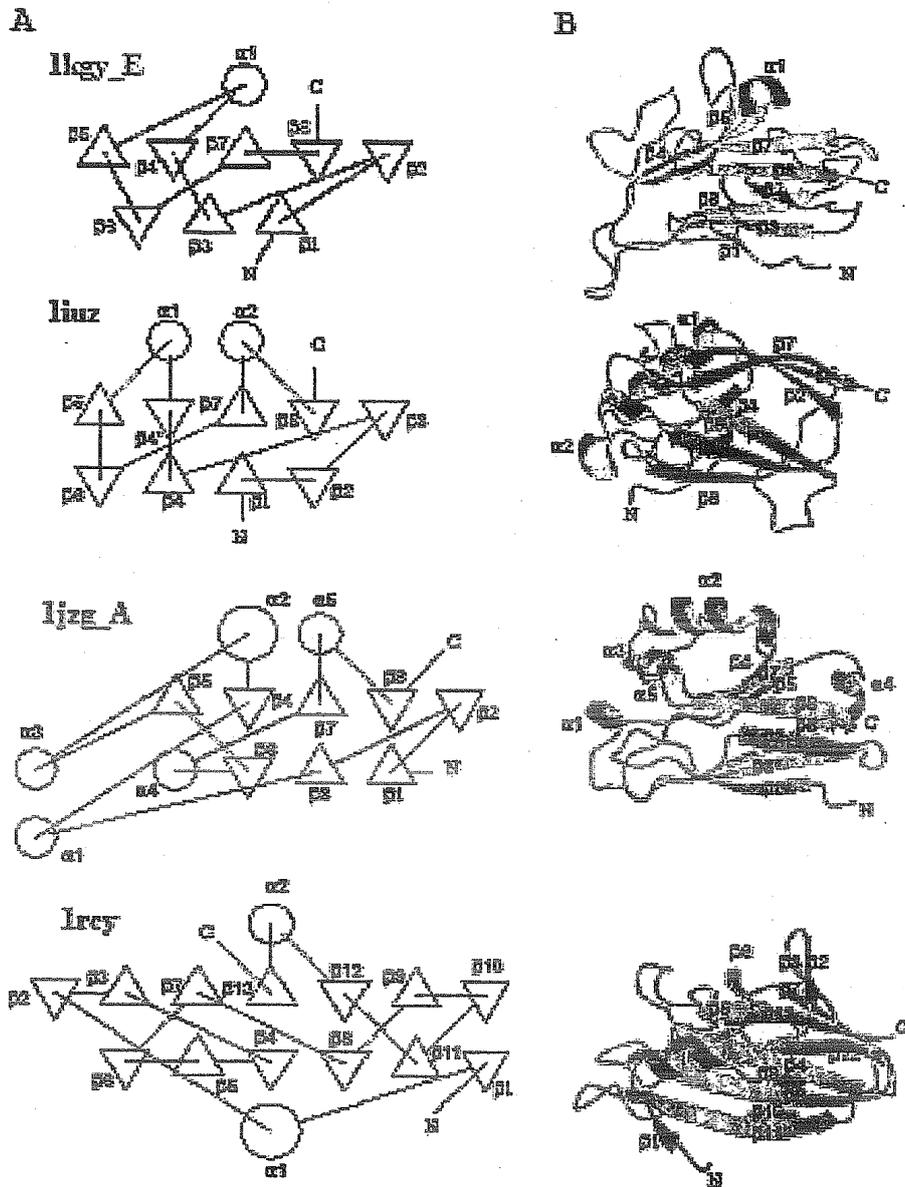
```

          .....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
1JZG_A 106 EQYMFFCTFPgh~~~~~sRLMKGLILK 128
1KGY_E 103 KDYIISTSNgslegldnqggvqgtrAMKILMKVG 138
    
```

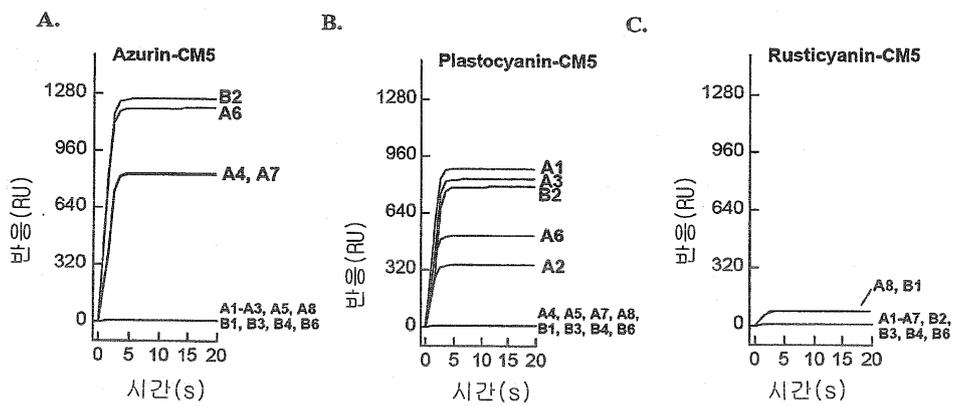
도면2

| | |
|------------------------------|--|
| Asarin | D S V <u>F</u> F D V S - - - - - K L K E G E Q Y M F F C H |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F <u>F</u> I K F Q e f s p n l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |
| Rusticyanin | Y T H P T E R P - - - - - T A G T Y Y F V C Q |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F T I K F q e f s p a l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |
| Auricyanin | S G S v - - - - - t F R T P A E G T Y L Y I C H |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F t i k f q e f s p n l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |
| Plastocyanin | E T V V R K L S e - - - - - p G V Y G V Y C E |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F T I K F Q e f s p a l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |
| Cucumber protein | G R D Q i k - - - - - l p K G Q S Y F I C H |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F T I K F q e f s p a l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |
| Stellacyanin | S E V I E R L d e - - - - - l G M H Y F V C H |
| G-H loop of human ephrin B-2 | V K F T I K F q e f s p a l w g l e f q k h K D Y Y I I S T |

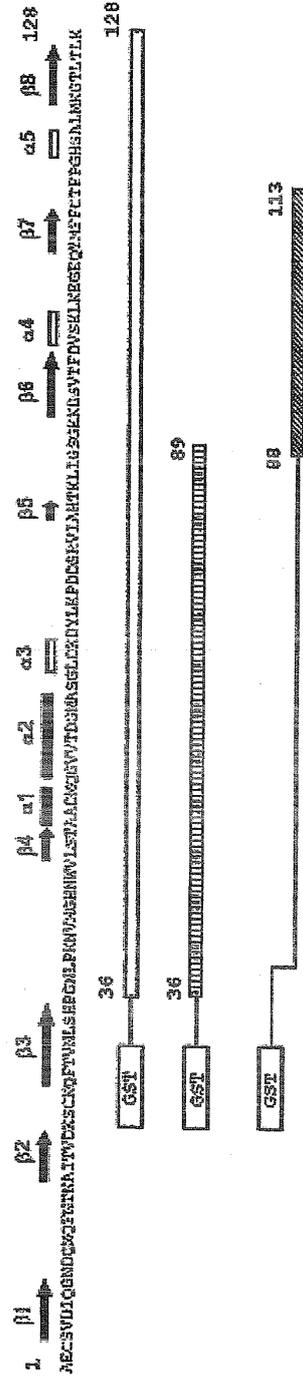
도면3



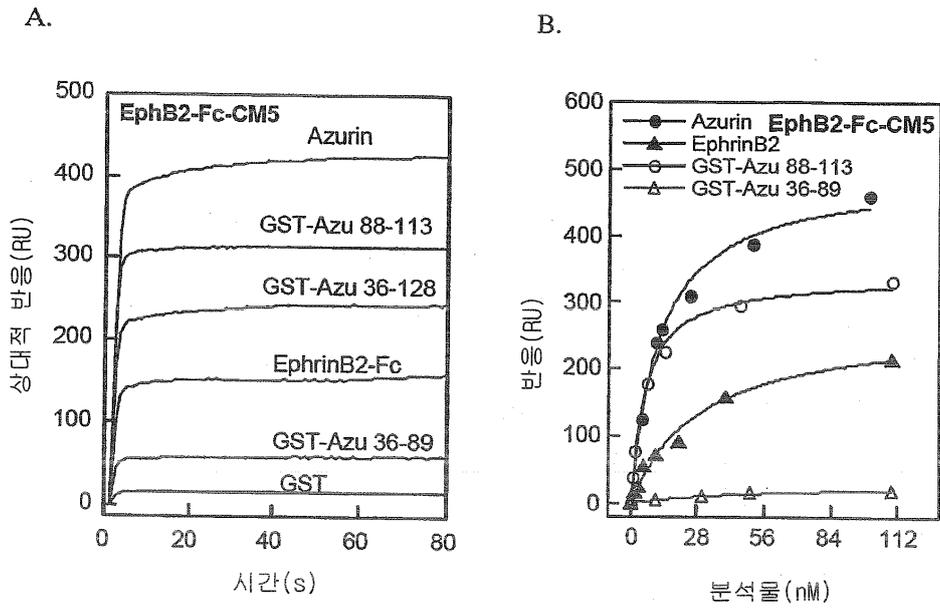
도면4



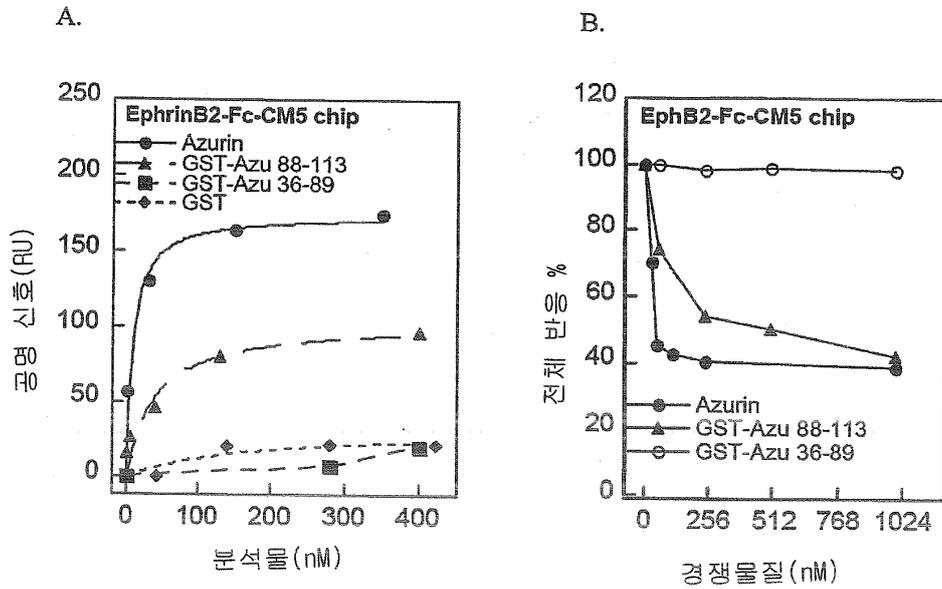
도면5



도면6

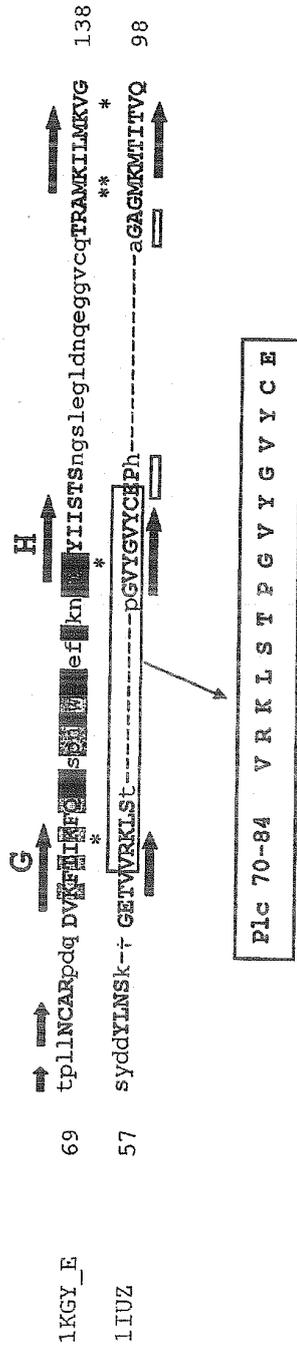


도면7

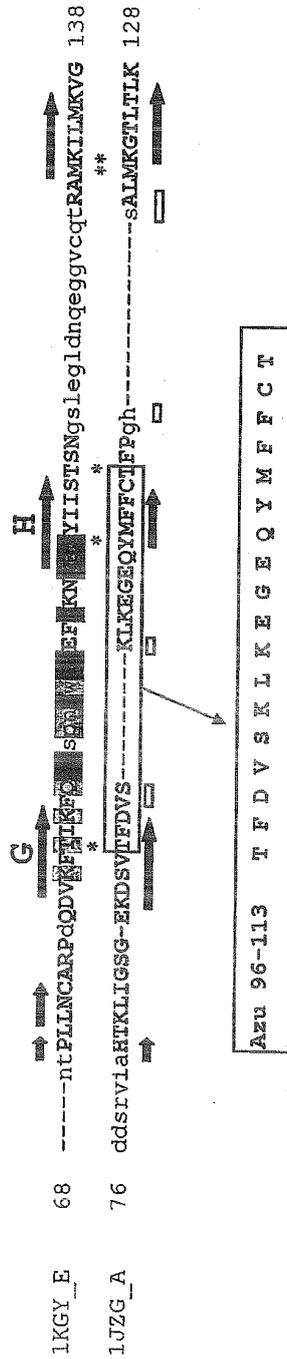


도면8

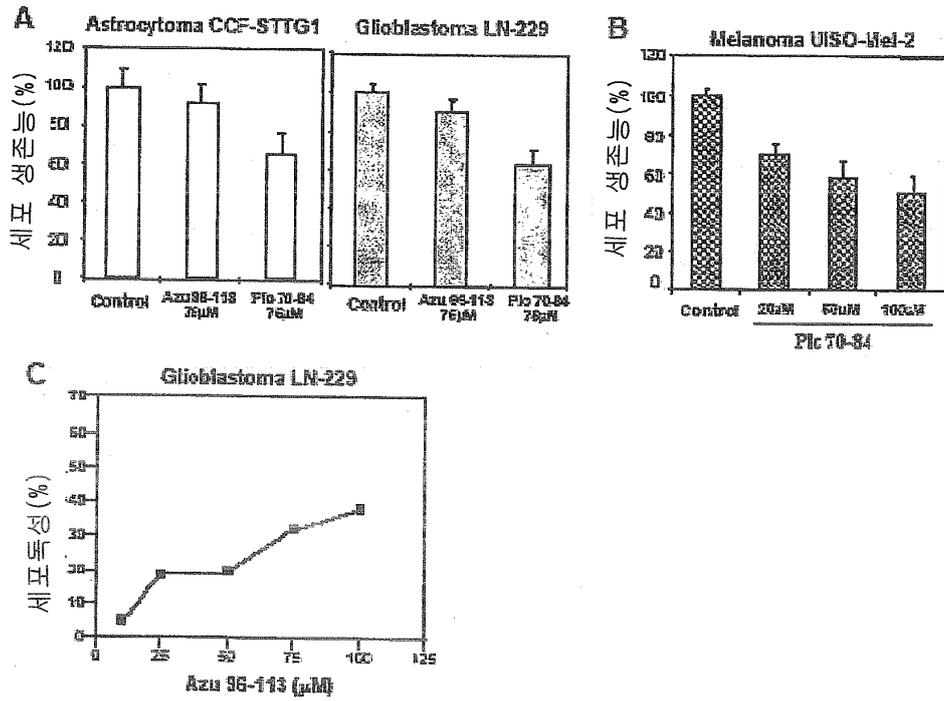
A



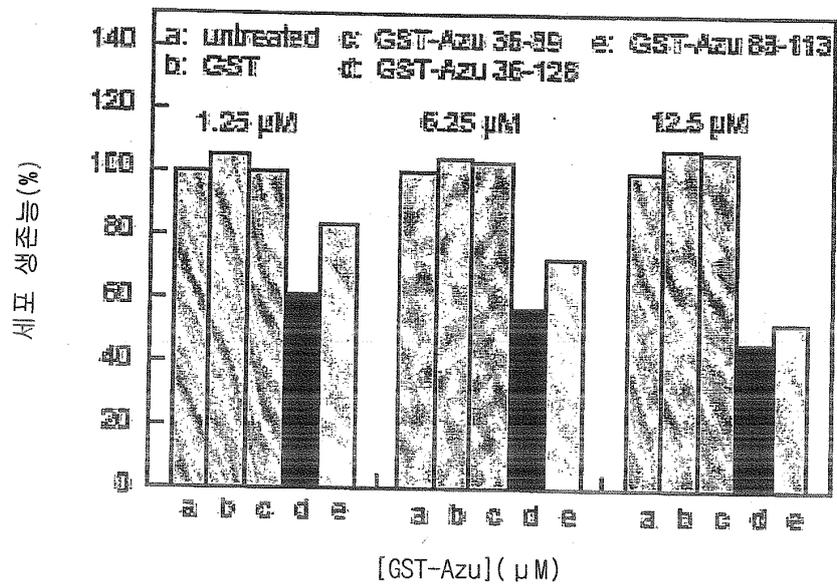
B



도면9



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the University of Illinois
 Chakrabarty, Ananda
 Das Gupta, Tapas
 Chaudhari, Anita

Fialho, Arsenio
Zhu, Yonghua
Yamada, Tohru

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING CONDITIONS RELATED TO

EPHRIN SIGNALING WITH CUPREDOXINS

<130> 51282-00065

<150> 11/244,105

<151> 2005-10-06

<150> 60/682,812

<151> 2005-05-20

<150> 60/764,749

<151> 2006-02-03

<150> 60/616,782

<151> 2004-10-07

<150> 60/680,500

<151> 2005-05-13

<150> 10/720,603

<151> 2003-11-11

<150> 60/414,550

<151> 2003-08-15

<150> 10/047,710

<151> 2002-01-15

<150> 60/269,133

<151> 2001-02-15

<160> 34

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 1

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Gln Gly Asn Asp Gln Met Gln Phe Asn
1 5 10 15

Thr Asn Ala Ile Thr Val Asp Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Ser His Pro Gly Asn Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Ser Thr Ala Ala Asp Met Gln Gly Val Val Thr Asp Gly Met
50 55 60

Ala Ser Gly Leu Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Asp Ser Arg Val
65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys
100 105 110

Thr Phe Pro Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Thr Leu Lys
115 120 125

<210> 2

<211> 105

<212> PRT

<213> *Phormidium laminosum*

<400> 2

Glu Thr Phe Thr Val Lys Met Gly Ala Asp Ser Gly Leu Leu Gln Phe

50

55

60

Lys Val Thr Phe Thr Ala Pro Gly Val Tyr Gly Val Lys Cys Thr Pro
65 70 75 80

His Tyr Gly Met Gly Met Val Gly Val Val Gln Val Gly Asp Ala Pro
85 90 95

Ala Asn Leu Glu Ala Val Lys Gly Ala Lys Asn Pro Lys Lys Ala Gln
100 105 110

Glu Arg Leu Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Asn
115 120

<210> 5

<211> 128

<212> PRT

<213> *Alcaligenes faecalis*

<400> 5

Ala Cys Asp Val Ser Ile Glu Gly Asn Asp Ser Met Gln Phe Asn Thr
1 5 10 15

Lys Ser Ile Val Val Asp Lys Thr Cys Lys Glu Phe Thr Ile Asn Leu
20 25 30

Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Lys Ala Ala Met Gly His Asn Val Val
35 40 45

Val Ser Lys Lys Ser Asp Glu Ser Ala Val Ala Thr Asp Gly Met Lys
50 55 60

Ala Gly Leu Asn Asn Asp Tyr Val Lys Ala Gly Asp Glu Arg Val Ile
65 70 75 80

Ala His Thr Ser Val Ile Gly Gly Gly Glu Thr Asp Ser Val Thr Phe

85

90

95

Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Asp Tyr Ala Phe Phe Cys Ser
 100 105 110

Phe Pro Gly His Trp Ser Ile Met Lys Gly Thr Ile Glu Leu Gly Ser
 115 120 125

<210> 6

<211> 129

<212> PRT

<213> *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* I

<400> 6

Ala Gln Cys Glu Ala Thr Ile Glu Ser Asn Asp Ala Met Gln Tyr Asn
 1 5 10 15

Leu Lys Glu Met Val Val Asp Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val His
 20 25 30

Leu Lys His Val Gly Lys Met Ala Lys Val Ala Met Gly His Asn Trp
 35 40 45

Val Leu Thr Lys Glu Ala Asp Lys Gln Gly Val Ala Thr Asp Gly Met
 50 55 60

Asn Ala Gly Leu Ala Gln Asp Tyr Val Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
 65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Val Ile Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
 85 90 95

Phe Asp Val Ser Lys Leu Thr Pro Gly Glu Ala Tyr Ala Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Met Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Ser

115

120

125

Asn

<210> 7

<211> 129

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 7

Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp
1 5 10 15

Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile
50 55 60

Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val
115 120 125

Asp

<210> 8
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Methylomonas sp. J.

<400> 8

Ala Ser Cys Glu Thr Thr Val Thr Ser Gly Asp Thr Met Thr Tyr Ser
 1 5 10 15

Thr Arg Ser Ile Ser Val Pro Ala Ser Cys Ala Glu Phe Thr Val Asn
 20 25 30

Phe Glu His Lys Gly His Met Pro Lys Thr Gly Met Gly His Asn Trp
 35 40 45

Val Leu Ala Lys Ser Ala Asp Val Gly Asp Val Ala Lys Glu Gly Ala
 50 55 60

His Ala Gly Ala Asp Asn Asn Phe Val Thr Pro Gly Asp Lys Arg Val
 65 70 75 80

Ile Ala Phe Thr Pro Ile Ile Gly Gly Gly Glu Lys Thr Ser Val Lys
 85 90 95

Phe Lys Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp Glu Ala Tyr Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ser Tyr Pro Gly His Phe Ser Met Met Arg Gly Thr Leu Lys Leu Glu
 115 120 125

Glu

<210> 9

<211> 166
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 9

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp
 20 25 30

Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu Ser
 35 40 45

Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys Ala
 50 55 60

Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro Lys
 65 70 75 80

Thr Ser Met Gly His Asn Ile Val Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met Asp
 85 90 95

Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys
 100 105 110

Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly Gly
 115 120 125

Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly Glu
 130 135 140

Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn Gly
 145 150 155 160

Lys Val Thr Leu Val Asp

165

<210> 10
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> *Neisseria gonorrhoeae* F62

<400> 10

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp
 20 25 30

Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu Ser
 35 40 45

Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys Ala
 50 55 60

Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro Lys
 65 70 75 80

Ala Ser Met Gly His Asn Leu Val Ile Ala Lys Ala Glu Asp Met Asp
 85 90 95

Gly Val Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys
 100 105 110

Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly Gly
 115 120 125

Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly Asp
 130 135 140

Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn Gly

145 150 155 160

Lys Val Thr Leu Val Asp
165

<210> 11
<211> 128
<212> PRT
<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 11

Ala Glu Cys Lys Thr Thr Ile Asp Ser Thr Asp Gln Met Ser Phe Asn
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ile Glu Ile Asp Lys Ala Cys Lys Thr Phe Thr Val Glu
20 25 30

Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Leu
35 40 45

Val Ile Ser Lys Gln Ala Asp Met Gln Pro Ile Ala Thr Asp Gly Leu
50 55 60

Ser Ala Gly Ile Asp Lys Asn Tyr Leu Lys Glu Gly Asp Thr Arg Val
65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Lys Asp Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Asp Val Ser Lys Leu Asn Ala Ala Glu Lys Tyr Gly Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Ile Ser Met Met Lys Gly Thr Val Thr Leu Lys
115 120 125

<210> 12
<211> 128

<212> PRT

<213> *Pseudomonas chlororaphis*

<400> 12

Ala Glu Cys Lys Val Asp Val Asp Ser Thr Asp Gln Met Ser Phe Asn
1 5 10 15

Thr Lys Glu Ile Thr Ile Asp Lys Ser Cys Lys Thr Phe Thr Val Asn
20 25 30

Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp
35 40 45

Val Leu Ser Lys Ser Ala Asp Met Ala Gly Ile Ala Thr Asp Gly Met
50 55 60

Ala Ala Gly Ile Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Gly Asp Ser Arg Val
65 70 75 80

Ile Ala His Thr Lys Ile Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr
85 90 95

Phe Asp Val Ser Lys Leu Thr Ala Gly Glu Ser Tyr Glu Phe Phe Cys
100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Asn Ser Met Met Lys Gly Ala Val Val Leu Lys
115 120 125

<210> 13

<211> 129

<212> PRT

<213> *Xylella fastidiosa* 9a5c

<400> 13

Lys Thr Cys Ala Val Thr Ile Ser Ala Asn Asp Gln Met Lys Phe Asp

1 5 10 15

Gln Asn Thr Ile Lys Ile Ala Ala Glu Cys Thr His Val Asn Leu Thr
 20 25 30

Leu Thr His Thr Gly Lys Lys Ser Ala Arg Val Met Gly His Asn Trp
 35 40 45

Val Leu Thr Lys Thr Thr Asp Met Gln Ala Val Ala Leu Ala Gly Leu
 50 55 60

His Ala Thr Leu Ala Asp Asn Tyr Val Pro Lys Ala Asp Pro Arg Val
 65 70 75 80

Ile Ala His Thr Ala Ile Ile Gly Gly Gly Glu Arg Thr Ser Ile Thr
 85 90 95

Phe Pro Thr Asn Thr Leu Ser Lys Asn Val Ser Tyr Thr Phe Phe Cys
 100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Asn Phe Gly
 115 120 125

Gly

<210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Cucumis sativus

<400> 14

Met Gln Ser Thr Val His Ile Val Gly Asp Asn Thr Gly Trp Ser Val
 1 5 10 15

Pro Ser Ser Pro Asn Phe Tyr Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys Thr Phe

20 25 30

Arg Val Gly Asp Ser Leu Gln Phe Asn Phe Pro Ala Asn Ala His Asn
35 40 45

Val His Glu Met Glu Thr Lys Gln Ser Phe Asp Ala Cys Asn Phe Val
50 55 60

Asn Ser Asp Asn Asp Val Glu Arg Thr Ser Pro Val Ile Glu Arg Leu
65 70 75 80

Asp Glu Leu Gly Met His Tyr Phe Val Cys Thr Val Gly Thr His Cys
85 90 95

Ser Asn Gly Gln Lys Leu Ser Ile Asn Val Val Ala Ala Asn Ala Thr
100 105 110

Val Ser Met Pro Pro Pro Ser Ser Ser Pro Pro Ser Ser Val Met Pro
115 120 125

Pro Pro Val Met Pro Pro Pro Ser Pro Ser
130 135

<210> 15
<211> 162
<212> PRT
<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 15

Met Lys Ile Thr Leu Arg Met Met Val Leu Ala Val Leu Thr Ala Met
1 5 10 15

Ala Met Val Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser
20 25 30

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Val Thr Ile Glu Ile Gly Ser

35

40

45

Lys Gly Glu Glu Leu Ala Phe Asp Lys Thr Glu Leu Thr Val Ser Ala
50 55 60

Gly Gln Thr Val Thr Ile Arg Phe Lys Asn Asn Ser Ala Val Gln Gln
65 70 75 80

His Asn Trp Ile Leu Val Lys Gly Gly Glu Ala Glu Ala Ala Asn Ile
85 90 95

Ala Asn Ala Gly Leu Ser Ala Gly Pro Ala Ala Asn Tyr Leu Pro Ala
100 105 110

Asp Lys Ser Asn Ile Ile Ala Glu Ser Pro Leu Ala Asn Gly Asn Glu
115 120 125

Thr Val Glu Val Thr Phe Thr Ala Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Leu Tyr
130 135 140

Ile Cys Thr Val Pro Gly His Tyr Pro Leu Met Gln Gly Lys Leu Val
145 150 155 160

Val Asn

<210> 16

<211> 140

<212> PRT

<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 16

Ala Ala Asn Ala Pro Gly Gly Ser Asn Val Val Asn Glu Thr Pro Ala
1 5 10 15

Gln Thr Val Glu Val Arg Ala Ala Pro Asp Ala Leu Ala Phe Ala Gln

20 25 30

Thr Ser Leu Ser Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Arg Leu Asp Phe Val
35 40 45

Asn Gln Asn Asn Leu Gly Val Gln His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly
50 55 60

Gly Asp Asp Val Ala Ala Ala Val Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala
65 70 75 80

Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro Asp Thr Pro Asn Ala Leu Ala Trp
85 90 95

Thr Ala Met Leu Asn Ala Gly Glu Ser Gly Ser Val Thr Phe Arg Thr
100 105 110

Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Tyr Ile Cys Thr Phe Pro Gly His Tyr
115 120 125

Leu Ala Gly Met Lys Gly Thr Leu Thr Val Thr Pro
130 135 140

<210> 17
<211> 96
<212> PRT
<213> Cucumis sativus

<400> 17

Ala Val Tyr Val Val Gly Gly Ser Gly Gly Trp Thr Phe Asn Thr Glu
1 5 10 15

Ser Trp Pro Lys Gly Lys Arg Phe Arg Ala Gly Asp Ile Leu Leu Phe
20 25 30

Asn Tyr Asn Pro Ser Met His Asn Val Val Val Val Asn Gln Gly Gly

35

40

45

Phe Ser Thr Cys Asn Thr Pro Ala Gly Ala Lys Val Tyr Thr Ser Gly
 50 55 60

Arg Asp Gln Ile Lys Leu Pro Lys Gly Gln Ser Tyr Phe Ile Cys Asn
 65 70 75 80

Phe Pro Gly His Cys Gln Ser Gly Met Lys Ile Ala Val Asn Ala Leu
 85 90 95

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 18

Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe
 1 5 10 15

Cys Thr

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 19

Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Glu Gly Glu Gln Tyr Met Phe Phe Cys Thr
 20 25

<210> 20

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Ulva pertusa*

<400> 20

Val Arg Lys Leu Ser Thr Pro Gly Val Tyr Gly Val Tyr Cys Glu
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*

<400> 21

Met Ser Leu Arg Ile Leu Ala Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Phe Gly Ala Gln Ala Ser Ala Glu Cys Glu Val Ser Ile Asp Ala Asn
 20 25 30

Asp Met Met Gln Phe Ser Thr Lys Thr Leu Ser Val Pro Ala Thr Cys
 35 40 45

Lys Glu Val Thr Leu Thr Leu Asn His Thr Gly Lys Met Pro Ala Gln
 50 55 60

Ser Met Gly His Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala
 65 70 75 80

Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys
 85 90 95

Pro Asp Asp Glu Arg Val Tyr Ala His Thr Lys Val Val Gly Gly Gly
 100 105 110

Glu Ser Thr Ser Ile Thr Phe Ser Thr Glu Lys Met Thr Ala Gly Gly

115

120

125

Asp Tyr Ser Phe Phe Cys Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Ile Met Gln
 130 135 140

Gly Lys Phe Glu Phe Lys
 145 150

<210> 22

<211> 98

<212> PRT

<213> Ulva pertusa

<400> 22

Ala Gln Ile Val Lys Leu Gly Gly Asp Asp Gly Ser Leu Ala Phe Val
 1 5 10 15

Pro Ser Lys Ile Ser Val Ala Ala Gly Glu Ala Ile Glu Phe Val Asn
 20 25 30

Asn Ala Gly Phe Pro His Asn Ile Val Phe Asp Glu Asp Ala Val Pro
 35 40 45

Ala Gly Val Asp Ala Asp Ala Ile Ser Tyr Asp Asp Tyr Leu Asn Ser
 50 55 60

Lys Gly Glu Thr Val Val Arg Lys Leu Ser Thr Pro Gly Val Tyr Gly
 65 70 75 80

Val Tyr Cys Glu Pro His Ala Gly Ala Gly Met Lys Met Thr Ile Thr
 85 90 95

Val Gln

<210> 23

<211> 138

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Ile Val Leu Glu Pro Ile Tyr Trp Asn Ser Ser Asn Ser Lys Phe Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Leu Val Leu Tyr Pro Gln Ile Gly Asp Lys Leu Asp
 20 25 30

Ile Ile Cys Pro Lys Val Asp Ser Lys Thr Val Gly Gln Tyr Glu Tyr
 35 40 45

Tyr Lys Val Tyr Met Val Asp Lys Asp Gln Ala Asp Arg Cys Thr Ile
 50 55 60

Lys Lys Glu Asn Thr Pro Leu Leu Asn Cys Ala Arg Pro Asp Gln Asp
 65 70 75 80

Val Lys Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Leu Trp Gly
 85 90 95

Leu Glu Phe Gln Lys Asn Lys Asp Tyr Tyr Ile Ile Ser Thr Ser Asn
 100 105 110

Gly Ser Leu Glu Gly Leu Asp Asn Gln Glu Gly Gly Val Cys Gln Thr
 115 120 125

Arg Ala Met Lys Ile Leu Met Lys Val Gly
 130 135

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Val Lys Phe Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Leu Trp Gly
 1 5 10 15

Leu Glu Phe Gln Lys Asn Lys Asp Tyr Tyr Ile Ile Ser Thr
 20 25 30

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 25

Asp Ser Val Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln Tyr
 1 5 10 15

Met Phe Phe Cys Thr
 20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Thiobacillus ferrooxidans

<400> 26

Tyr Thr Asn Phe Thr Trp His Pro Thr Ala Gly Thr Tyr Tyr Tyr Val
 1 5 10 15

Cys Gln

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Chloroflexus aurantiacus

<400> 27

Ser Gly Ser Val Thr Phe Arg Thr Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

Ile Cys Thr

<210> 28

<211> 18

<212> PRT

<213> Ulva pertusa

<400> 28

Glu Thr Val Val Arg Lys Leu Ser Thr Pro Gly Val Tyr Gly Val Tyr
1 5 10 15

Cys Glu

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 29

Gly Arg Asp Gln Ile Lys Leu Pro Lys Gly Gln Ser Tyr Phe Ile Cys
1 5 10 15

Asn

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Cucumis sativus

<400> 30

Ser Pro Val Ile Glu Arg Leu Asp Glu Leu Gly Met His Tyr Phe Val
 1 5 10 15

Cys Thr

<210> 31

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Thr Pro Leu Leu Asn Cys Ala Arg Pro Asp Gln Asp Val Lys Phe Thr
 1 5 10 15

Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Leu Trp Gly Leu Glu Phe Gln
 20 25 30

Lys Asn Lys Asp Tyr Tyr Ile Ile Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu
 35 40 45

Gly Leu Asp Asn Gln Glu Gly Gly Val Cys Gln Thr Arg Ala Met Lys
 50 55 60

Ile Leu Met Lys Val Gly
 65 70

<210> 32

<211> 42

<212> PRT

<213> Ulva pertusa

<400> 32

Ser Tyr Asp Asp Tyr Leu Asn Ser Lys Gly Glu Thr Val Val Arg Lys

1 5 10 15

Leu Ser Thr Pro Gly Val Tyr Gly Val Tyr Cys Glu Pro His Ala Gly
 20 25 30

Ala Gly Met Lys Met Thr Ile Thr Val Gln
 35 40

<210> 33
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Asn Thr Pro Leu Leu Asn Cys Ala Arg Pro Asp Gln Asp Val Lys Phe
 1 5 10 15

Thr Ile Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Leu Trp Gly Leu Glu Phe
 20 25 30

Gln Lys Asn Lys Asp Tyr Tyr Ile Ile Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu
 35 40 45

Glu Gly Leu Asp Asn Gln Glu Gly Gly Val Cys Gln Thr Arg Ala Met
 50 55 60

Lys Ile Leu Met Lys Val Gly
 65 70

<210> 34
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 34

Asp Asp Ser Arg Val Ile Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Ser Gly Glu

1 5 10 15

Lys Asp Ser Val Thr Phe Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Gln
 20 25 30

Tyr Met Phe Phe Cys Thr Phe Pro Gly His Ser Ala Leu Met Lys Gly
 35 40 45

Thr Leu Thr Leu Lys
 50