



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0007289

(43) 공개일자 2007년01월15일

(21) 출원번호 10-2006-7017297

(22) 출원일자 2006년08월27일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년08월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/002996

(87) 국제공개번호 WO 2005/072419

국제출원일자 2005년01월27일

국제공개일자 2005년08월11일

(30) 우선권주장 60/539,605 2004년01월27일 미국(US)
60/619,241 2004년10월15일 미국(US)

(71) 출원인 기린 비루 가부시키가이샤
일본 도쿄-도 츄오-구 신카와 2-쵸메 10-1
누베로, 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아주 94070-6211 산 카를로스 슈트 310 인더스트리얼 로드 201

(72) 발명자 보일, 브라이언, 제이.
미합중국 캘리포니아주 65053-2752 산타클라라 500 엘 카미노리얼 에
스씨유-2752
펑크, 월터
미합중국 캘리포니아주 94542 헤이워드 모독 코트 25432
카키타니, 마코토
일본국 다카사키 이노마치 95-1 이노료 310
오시마, 다케시
일본국 마에바시 가미코이데 2쵸메 37-16 기린비루 시키시마료B-203
박, 은 주
미합중국 캘리포니아주 94022 로스 알토스 파사 로블스 애비뉴251
탕, 톰, 와이.
미합중국 캘리포니아주 95118 산 호세 랜워크 코트 4230
야기, 미키오
일본국 사이타마 우라와쿠 가미키사키 1쵸메 10-1 구란두오호쿠가이쿠
1005
도미즈카, 가즈마
일본국 다카사키 다카시마쵸 110-1 다카사키 알렘2 401

(74) 대리인 이한영

전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 위장의 증식인자 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 위장 증식 요소(gastrointestinal proliferative factor(GIPF)) 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 나아가 본 발명은 상피 점막층의 손상(degeneration)과 관련된 상태나 질환을 예방 또는 치료하기 위한 GIPF의 치료적 이용에 관한 것이다.

대표도

도 19

특허청구의 범위

청구항 1.

치료적으로 유효한 양의 GIPF 폴리펩티드, 그의 단편 또는 유사체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 2.

GIPF의 생물학적으로 활성을 갖는 단편을 포함하는 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 3.

제 2항에 있어서,

GIPF는 사람 GIPF인 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 4.

제 2항에 있어서,

폴리펩티드는 서열번호 4의 폴리펩티드의 생물학적으로 활성을 갖는 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 5.

서열번호 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 서열번호 4의 폴리펩티드의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물.

청구항 6.

제 1항 내지 제 5항의 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드는 글리코실화된 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 7.

제 1항 내지 제 5항의 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드는 글리코실화되지 않은 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 8.

제 1항 내지 제 6항의 어느 한 항에 있어서,

폴리펩티드는 상피세포의 증식을 촉진시키는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 9.

제 1항에 있어서,

서열번호 4의 아미노산 서열과 적어도 80%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 10.

GIPF 폴리펩티드, 그의 단편 또는 그의 유사체 및 담체를 포함하는 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 환자의 상피세포 증식을 촉진시키는 방법.

청구항 11.

GIPF 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 그를 필요로 하는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 치료방법.

청구항 12.

GIPF 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 그를 필요로 하는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 점막염(mucositis), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 또는 단장 증후군(short bowel syndrome)의 치료방법.

청구항 13.

GIPF 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 위장관에서 상피세포의 증식을 촉진시키는 방법.

청구항 14.

제 13항에 있어서,

식도내의 상피세포증식이 촉진되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 15.

제 13항에 있어서,

소장내의 상피세포증식이 촉진되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 16.

제 13항에 있어서,

대장내의 상피세포증식이 촉진되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 17.

제 13항에 있어서,

위장내의 상피세포증식이 촉진되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 18.

GIPF 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 위장관의 적어도 일부의 내측 상피세포가 손상된 환자를 치료하는 방법.

청구항 19.

제 18항에 있어서,

환자는 방사능 치료를 받았거나 또는 받을 예정인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

제 18항에 있어서,
환자는 화학요법 치료를 받았거나 또는 받을 예정인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.

GIPF 폴리펩티드 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방사능 또는 화학요법 치료를 경험한 환자의 치료방법.

청구항 22.

제 10항 내지 제 13항, 제 18항 및 제 21항의 어느 한 항에 있어서,
포유동물은 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

발현조절 서열과 작동가능하게 연결된 GIPF를 암호화하는 유전자를 포함하는 아데노바이러스 벡터.

청구항 24.

제 23항의 아데노바이러스 벡터를 포함하는 약학 조성물.

청구항 25.

제 24항의 약학 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하는 환자의 상피세포의 증식을 촉진시키는 방법.

청구항 26.

B 세포의 발현을 지시하는 전사적 조절서열과 작동가능하게 연결되고 GIPF 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는, 전이 유전자 구축물(transgene construct).

청구항 27.

제 26항에 있어서,

B 세포 특이적인 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는

전이유전자 구축물.

청구항 28.

GIPF 단백질을 암호화하는 핵산서열을 지놈 내부에 안정적으로 통합시키며, B 세포의 발현을 지시하는 전사적 조절서열에 작동가능하게 연결되어, B 세포에서 검출가능한 수준의 야생형 사람 GIPF 단백질을 생산하는 형질전환 마우스.

청구항 29.

제 28항에 있어서,

상기 전사적 조절서열은 B 세포 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는

형질전환 마우스.

청구항 30.

(a) B 세포에서 재조합 GIPF 폴리펩티드를 발현시키고, 장의 상피세포 증식을 촉진하는 재조합 GIPF 폴리펩티드를 발현하지 않는 또 다른 동일한 마우스와 비교하여 향상된 장의 상피세포 증식을 나타내는 형질전환 마우스에 시험 화합물을 투여하는 단계; 및,

(b) 장의 세포증식의 향상을 통해 점막염(mucositis), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 또는 단장 증후군(short bowel syndrome)의 치료용 약물 후보물질로서 상기 시험 화합물을 동정하는 방식으로, 장의 상피세포 증식에 대한 상기 시험 화합물의 효과를 평가하는 단계를 포함하는, 점막염, 염증성 장질환 또는 단장 증후군의 치료를 위한 약물 후보물질의 동정방법.

청구항 31.

제 30항에 있어서,

상기 소장의 상피세포는 소낭선 세포(crypt cell)인 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 32.

서열번호 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102 및 104로 구성된 그룹으로부터 선택되는 핵산서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 33.

제 32항의 폴리뉴클레오티드와 약 95% 이상의 서열상동성을 가지는, 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 34.

서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103 및 105로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 35.

서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103 및 105로 구성된 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95%의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 36.

서열번호 5, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102 및 104로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열과 작동가능하게 연결된 발현 조절요소를 포함하는 발현벡터.

청구항 37.

서열번호 5, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 177의 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 또는 형질도입된 숙주세포.

청구항 38.

제 37항에 있어서,

상기 세포는 원핵세포 또는 진핵세포인 것을 특징으로 하는

형질전환되거나 또는 형질도입된 숙주세포.

청구항 39.

a) 폴리펩티드를 발현시키기 위한 적절한 조건에서 배지에 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103 또는 105의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 분리된 세포를 배양하는 단계; 및,

b) 상기 세포 또는 배양액으로부터 상기 폴리펩티드를 순수분리하는 단계를 포함하는, 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103 또는 105의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 생산방법.

청구항 40.

a) 폴리펩티드를 발현시키기 위한 적절한 조건에서 배지에 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 분리된 세포를 배양하는 단계;

b) 상기 세포 또는 배양액으로부터 상기 폴리펩티드를 순수분리하는 단계; 및,

c) 순수분리된 폴리펩티드를 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법.

청구항 41.

a) 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 합성하는 단계;

b) 상기 폴리펩티드를 순수분리하는 단계; 및,

c) 순수분리된 폴리펩티드를 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 서열번호 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법.

청구항 42.

장의 상피세포에서 GIPF 단백질의 발현을 지시하는 전사적 조절서열과 작동가능하게 연결되고 GIPF 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는, 발현벡터.

청구항 43.

GIPF 단백질을 암호화하는 핵산서열을 자체의 지놈 내부에 안정적으로 통합하고, 상기 GIPF 단백질을 암호화하는 핵산서열은 소장상피세포에서 GIPF 단백질의 발현을 통제하는 전사적 조절서열과 작동가능하게 연결된, 자체의 소장상피세포에서 상당량의 GIPF 단백질을 생산하는 형질전환 마우스.

청구항 44.

소장의 상피세포에서 자체 핵산의 발현을 통제하는 전사적 조절서열과 작동가능하게 연결되고 GIPF 단백질 및 Wnt3a 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는, 발현벡터 구축물.

청구항 45.

GIPF 단백질을 암호화하는 염기서열을 자체의 지놈 내부에 안정적으로 통합하고, 소장상피세포에서 GIPF 단백질의 발현을 통제하는 전사적 조절서열과 작동가능하게 연결된, 자체의 소장상피세포에서 상당량의 GIPF 단백질 및 Wnt3a 단백질을 생산하는 형질전환 마우스.

청구항 46.

제 43항 또는 제 45항에 있어서,

상기 마우스는 소장 팽만(intestinal distension)을 나타내는 것을 특징으로 하는

형질전환 마우스.

청구항 47.

제 1항에 있어서,

점막염(mucositis)의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 48.

제 1항에 있어서,

염증성 장질환(inflammatory bowel disease)의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 49.

제 1항에 있어서,

단장 증후군(short bowel syndrome)의 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는

약학 조성물.

청구항 50.

화학적 치료 또는 방사능 치료에 의한 위장관의 손상부위에 사용하기 위한 제 1항의 약학 조성물.

청구항 51.

제 13항에 있어서,

구강내의 상피세포 증식이 촉진되는 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 52.

50번 아미노산의 발린이 이소류신으로 치환된, 서열번호 4의 변이체를 포함하는 폴리펩티드.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 위장 증식인자인 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 이를 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

이온화 방사선 조사요법(ionizing radiation therapy)과 세포독성 화학요법(cytotoxic chemotherapy)은 구강 및 위장 점막에 상처를 만들므로, 항증상치료를 받는 환자들에게 아주 중요한 문제를 일으킨다. 점막염(mucositis)이란 점막의 염증으로, 치료목적으로 또는 통증완화하려는 의도를 갖고 사용하는 화학요법과 방사선 요법의 사용때문에, 이러한 환자군에서 특별히 공통적인 문제이다. 방사선 조사요법과 화학요법에서 볼 수 있는 위장관에서의 점막 상처는 (이러한 부분에 대하여) 소낭선 세포(crypt cell)의 파괴, 용모로 덮인 높이의 감소, 궤양 및 위장 상피세포의 세포괴사를 포함하며(참조: Berthrong M, World J Surg 10:155-170(1986)), 이는 위장 점막염과 대장염을 포함하는 질환의 배경이 된다. 환자들에 대하여 이는 복부 통증, 혈액이 섞인 설사, 흡수 장애 및 일부 경우에 있어서 세균의 전좌(bacterial translocation)를 의미한다(참조: Guzman et al., J Surg Res 46:106-107(1989)). 그 외에도, 화학요법과 이온화 방사선은 인두 중앙부, 입술 및 식도의 점막을 포함하는 다른 점막에도 영향을 준다. 방사선과 화학요법을 동시에 실시하는 복합 치료법은 뇌와 목의 암 환자에서는 높은 증상(highly symptomatic)의 구내염을, 작은 세포 폐암을 지닌 환자에서는 식도염을 일으킬 수 있다는 것이 잘 알려져 있다. 화학요법과 방사선 요법은 직접 및 간접 독성을 통해 구강 및 위장 점막에 상처를 만든다. 직접적인 점막염에 대한 기작은 빠르게 분열하는 기본 상피세포의 비특이적 세포 살상으로서, 그 결과 상피세포가 가늘어지고 염증, 세포재생의 감소 및 궁극적으로 궤양이 된다. 이러한 고통스런 상처는 또한 국부적이고 전신적인 감염에 대하여 더 큰 위험을 초래한다. 간접적인 점막독성은 화학요법이 유도하는 골수억제(myelosuppression)의 부작용으로서, 직접적인 점막 상처 부위에서 세균과 바이러스의 감염을 허용한다. 이러한 효과의 심각성은 투여량의 단계적 확대, 지연된 처치, 및 안전한 투여량 감소를 배제하고, 그럼으로써 암치료의 효율성을 제한한다.

화학요법과 방사선 요법에 의한 (점막의) 위장 손상(점막염)에 대한 예방법 및 치료법은, 일반적으로 화학요법 또는 방사선 요법의 부분적으로 최적화된 투여량, 그 후의 독성에 따른 치료 과정의 투여량 조절, 또는 보통의 투여량의 또는 다량의 메토트렉세이트(methotrexate) 사용 후의 류코보린(leucovorin) 등의 특이적인 해독제의 사용을 포함한다(참조: Allegra C J. Antifolates. In: Chabner and Collins, des. Cancer Chemotherapy: Principles and Practice. Philadelphia, Pa. JP Lippincott Co; 1990:110-153.)

위장 점막에 대한 손상은 또한 위장관의 만성적인 염증성 질환에 관련되어 있고, 이는 집합적으로 염증성 장질환(inflammatory bowel disease)이라 부른다. 사이토카인(cytokine)에 기초한 치료법들은 염증성 장질환의 치료에 유용하다(참조: Bouma and Strober Nature Rev 3:521-533(2003)). 그러나, 흔히 크론병(Crohn's disease) 등의 염증성 장질환을 지닌 환자에서 소장의 절제가 시술되기도 한다. 소장의 외과적 절제는 또한 외상의 상처, 도관의 이상 및 암 이후에 필요하다. 살아 있는 소장의 200도 안되게 남기는 외과 절제술은 환자로 하여금, 진전하는 단장 증후군(SBS: short-bowel syndrome)에 대하여 위험에 빠지게 한다. SBS는 흡수장애, 설사, 혈류 및 전해질 손상과 영양장애에 의해 임상적으로 정의되는 질환이다. 만약, 비경구적 영양의 오랜 사용에 의한 생명연장이 아니라면, SBS 환자는 흔히 장기적으로 판리된다(참조: DiBaise et al., Am J Gastroenterol 99:1823-1832(2004)).

따라서, 예방적 또는 치료적으로 항암치료에 대한 저항성을 증가시키고, 염증성 장질환을 치료하는데 있어서 현재의 치료법을 개선시키고 소장의 외과적 절제술 이후에 실시하는 소화, 흡수 과정을 복구시키는데 이용할 수 있는 물질을 찾아야 할 필요성이 대두되었다.

발명의 요약

본 발명은 부분적으로는 GIPF(GastroIntestinalProliferativeFactor)가 위장관의 상피세포의 증식을 유도한다는 발견에 근거한다. 그래서, GIPF, 그의 단편 또는 유사체들을 포함하는 조성물들은 화학요법과 방사선 요법에 의한 점막염, 인두중앙부, 입술과 식도의 점막염, 염증성 장질환과 상처, 화상, 안질환을 포함하는 다른 조건 등 상피화(epithelialization)가 필요한 상황의 치료 및 상피세포의 증식을 자극하거나 재생이 요구되는 다른 질환에 이용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 하나의 실시예에 의하면, 본 발명은 치료적으로 유효량의 GIPF 폴리펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물에 초점을 맞춘다.

본 발명의 조성물들은 재조합 DNA 분자들을 포함하는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드와 복제된 유전자들 또는 변질된 변이체, 특히 대립형질 변이처럼 자연스럽게 나타나는 변이체를 포함한다. 특히, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 사람의 태아 피부 mRNA(서열번호 2)로부터 제조한 cDNA 라이브러리에서 분리된 GIPF 폴리뉴클레오티드에 기초한다.

또한, 본 발명의 조성물들은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터 등의 벡터들과, 이런 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 조작된 세포들, 및 이러한 폴리뉴클레오티드를 발현하도록 유전자 조작된 세포들을 포함한다.

본 발명의 조성물들은, 이에 제한되는 것은 아니나, GIPF 폴리뉴클레오티드, 단편 또는 그들의 변이들; 서열번호 2 또는 3 (예를 들어, 서열번호 4; GIPFwt)의 전장 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 5(예를 들어, 서열번호 6; GIPFt)의 V5-His 결합된 단백질 암호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 9(예를 들어, 서열번호 10)의 우점(dominant)의 성숙 단백질을 암호화하는 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 11(예를 들어, 서열번호 12)의 성숙 단백질 암호화 서열의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 13(예를 들어, 서열번호 14)의 트롬보스폰딘(thrombospondin) 영역의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 퓨린(furin) 절단부위(예를 들어, 서열번호 16)가 없는 우점의 성숙한 단백질 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 서열번호 15의 폴리뉴클레오티드; 변이된 퓨린 절단부위(서열번호 18)를 포함하는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 서열번호 17의 폴리뉴클레오티드; 및, 전장 GIPF(서열번호 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177)의 다양한 길이를 포함하는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 조성물들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 엄격한 혼성화 조건에서, (a) 서열번호 2, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 또는 177에 기재된 뉴클레오티드 서열의 보체, (b) 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화되는 폴리뉴클레오티드; 상술한 폴리뉴클레오티드에 대하여 최소한 70%의 폴리뉴클레오티드 서열 동질성(75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 또는 99%)을 가지는 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체(예를 들면, 대립형질 변이체); 상술한 폴리펩티드의 종 유사체(species homolog, 예를 들면, ortholog)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 또는, 서열번호 4 또는 6 폴리펩티드의 특정 영역 또는 절단부위(truncation)를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

아울러, 본 발명은 상술한 폴리뉴클레오티드의 최소한의 단편을 포함하는 복제(cloning) 또는 발현(expression) 벡터들과 이런 발현 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 개체를 제공한다. 유용한 벡터들은 당업계에 잘 알려진 플라스미드, 코스미드(cosmid), 람다 파지 유도체(lamda phage derivative), 파지미드(phagemid) 등을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터와 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 일반적으로, 벡터는 최소한 하나의 개체에서 작용하는 복제원점, 유용한 제한 내부효소 절단부위, 및 숙주세포에 대한 선택적인 마커(marker)를 포함한다. 본 발명에 따른 벡터들은 발현 벡터들, 복제 벡터들, 탐침 생산 벡터들, 그리고 서열분석(sequencing) 벡터들을 포함한다. 본 발명의 숙주세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있고, 단세포생물 또는 다세포생물의 일부가 될 수 있다.

본 발명의 의약 조성물들은, 이에 제한되는 아니나, 서열번호 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178의 아미노산 서열을 포함하는 그룹에서 선택되어 분리된 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 (a) 상술한 서열번호 2, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 177에 지정된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 모든 폴리뉴클레오티드들 또는 (b) 엄격한 혼성화 조건에서 (a)의 폴리뉴클레오티드들의 보체에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드들에 의해 암호화되어 있는 생물학적 활성을 가지는 폴리펩티드들을 포함한다. 서열번호 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 또는 178에 열거된 모든 단백질 서열들의 생물학적 또는 면역학적 활성을 가지는 유사체들과 생물학적인 특성을 지니는 이들의 실제적 등가물(substantial equivalent)들이 의도되었다. 본 발명의 폴리펩티드들은 완전히 또는 부분적으로 화학합성할 수 있으나, 바람직하게는 본 발명의 유전적으로 조작된 세포들(예를 들면, 숙주세포들)을 이용한 재조합 방법에 의해 생산할 수 있다. 본 발명은 서열번호 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178과 최소한 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드들을 포함한다. 또한, 본 발명은 서열번호 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 178의 서열과 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 아미노산 잔기(residue)에서 다른 폴리펩티드를 포함한다. 아미노산 변이는 보존적이거나 비보존적일 수 있다.

또한, 본 발명은 바람직한 폴리펩티드의 발현을 허용하고 배양액 또는 숙주세포로부터 단백질 또는 펩타이드를 정제하는 조건하에 적절한 배양배지에서 본 발명의 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 GIPF 폴리펩티드의 최소 단편을 지니는 발현벡터를 포함하는 숙주세포 배양을 포함하는 GIPF 폴리펩티드를 생산하는 방법들에 관련되어 있다. 바람직한 실시예들은 이러한 과정에 의해 생산된 단백질이 성숙한 또는 우점의 성숙 형태의 단백질인 실시예를 포함한다.

본 발명에 의한 폴리펩티드들은 다른 단백질에도 동시에 적용하는 다양한 통상의 과정들과 방법들에 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는데 이용할 수 있다. 이러한 항체들, 특히 단일클론 항체들은 조직에서 폴리펩티드를 찾거나 정량하는데 이용할 수 있다.

또 다른 실시예들에 의하면, 본 발명은 상피세포의 증식을 촉진시키는 방법을 지향한다. 이 방법은 상피세포가 GIPF 폴리펩티드, 단편, 또는 그것들의 유사체의 치료적으로 효과적인 양, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 접촉하는 단계를 포함한다. 특히, 상피세포들의 자극(세포보호, 증식 및/또는 분화)을 필요로 하는 개체는 GIPF 단백질, 단편들 또는 그것들의 유사체들의 치료적으로 효과량이나 예방적으로 효과량으로 투여될 것이다.

상술한 모든 방법들에서, 상피 세포들은 실험실 조건 또는 생체 조건에서 GIPF 폴리펩티드와 접촉할 수도 있다.

또한, 포유동물 개체에 본 발명의 펩티드와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는, 의학적 상태를 예방하고, 치료하고 또는 개선하는 방법이 제공된다.

특히, 본 발명의 GIPF 폴리펩티드들은 영양관(alimentary tract)의 상피층을 재생하는 위장의 소낭선 세포(crypt cell)들의 증식과 또는 분화를 유도하는데 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 GIPF 폴리펩티드들과 폴리뉴클레오티드들은 화학요법 또는 방사선 치료에 의한 점막염과 장염 및 염증성 장질환의 치료에 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 GIPF 폴리펩티드들과 폴리뉴클레오티드들은 질병과 상처, 화상, 안질환을 포함하는 조건, 그리고 상피세포의 증식 및 재생이 촉진되는 다른 질환의 치료에서도 이용될 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드들은 위장 상피의 분화와 발달의 마커로서 이용할 수 있다.

본 발명의 방법들은 본 명세서에 열거된 질환에 관련된 증상과 경향성을 보이는 포유류에 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물의 치료적으로 효과적인 양의 투여를 포함하는, 본 명세서에 언급된 질환들의 치료에 사용하는 방법을 제공한다. 부가적으로, 본 발명은 본 명세서에 언급된 목표 유전자 산물과 약학적으로 허용되는 담체의 전반적인 활성을 조절하는 화합물과 다른 물질들을 포함하는 구성요소를 투여하는 단계를 포함하는 여기 언급된 질병들과 질환들을 치료하는 방법을 포함한다. 화합물과 다른 물질들은 목표 유전자/단백질 발현의 수준 또는 목표 단백질 활성의 조절에 영향을 줄 수 있다. 구체적으로 점막염, 염증성 장 질환, 상처들을 포함하는 의학적 상태를 예방하고, 치료하고 또는 개선하는 방법들을 제공한다. 이는 사람에게 제한되지 않지만 포유류에 대하여 본 발명의 폴리펩티드를 구성하는 조성물의 치료적으로 효과적인 양 또는 본 발명의 GIPF 폴리펩티드의 결합 상대를 구성하는 조성물의 치료적으로 효과적인 양으로 이루어진 투여를 포함한다. 특정 조건이나 병리학의 기작은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이들의 결합 대상의 치료가 필요시에 각각에 유용한 지를 설명할 것이다.

아울러, 본 발명은 상술한 방법들에 유용한 의약품들을 생산하는 방법들을 제공한다.

또한, 본 발명은 시료(예를 들면, 조직 또는 표본)에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드의 존재를 탐색하는 방법들에 관한 것이다. 이러한 방법들은 예를 들어 본 명세서에 열거된 질환들의 예후(prognostic) 내지는 진단(diagnostic) 평가의 부분으로서, 그리고 이러한 상태들에 대한 질병소질(predisposition)을 나타내는 개체들의 판정에 이용할 수 있다.

본 발명은 여러 조건하에서 본 발명의 폴리펩티드와 결합하여 복합체를 형성하는 화합물과 복합체를 형성하는데 충분한 시간동안 시료를 접촉시키는 단계 및 복합체 형성을 탐지하는, 그래서 만약, 복합체가 형성되면 폴리펩티드를 탐색할 수 있는 단계를 포함하는, 시료에서 본 발명의 폴리펩티드를 탐색하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법들을 실시하기 위한, 폴리뉴클레오티드 탐침들 및/또는 단일클론 항체들, 그리고 선택적으로 정량적인 표준들을 포함하는 키트(kit)들을 제공한다. 더욱이, 본 발명은 상술한 질환들의 치료를 위한 임상시험들에 관련된 약물들의 효능을 평가하고, 환자의 진전을 모니터링하는 방법들을 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드의 발현 및 활성을 조절(예를 들면, 증가 또는 감소)하는 화합물의 동정을 위한 방법을 제공한다. 이러한 방법들은, 예를 들어 GIPF 폴리펩티드의 치료적 활성을 증가시키고, 본 명세서에 기술된 질환들의 증상들을 개선할 수 있는 화합물의 동정에 이용할 수 있다. 이러한 방법들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 폴리펩티드들과 반응하는(예를 들면, 결합하는) 화합물과 다른 물질들을 동정하는 방법들을 포함한다.

본 발명은 여러 조건하에서 본 발명의 폴리펩티드와 결합하여 폴리펩티드/화합물 복합체가 형성되는데 충분한 시간동안 폴리펩티드와 화합물을 접촉시키는 단계, 및 폴리펩티드/화합물 복합체를 탐지하는, 그래서 만약, 폴리펩티드/화합물 복합체가 형성되면 본 발명의 폴리펩티드와 결합하는 화합물을 동정할 수 있는 단계를 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드와 결합하는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다.

또한, 폴리펩티드/화합물 복합체를 형성되는데 충분한 시간 동안 세포 내에서 폴리펩티드와 화합물이 접촉하여 세포내 전달 유전자 서열의 발현을 유도하는 단계, 및 전달 유전자 서열의 발현을 탐지함으로써 복합체를 탐지하는, 그래서 만약 폴리펩티드/화합물 복합체가 탐지되면, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 동정할 수 있는 단계를 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 동정하는 방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 실시예는 본 명세서에 상술한 조건들이나 질환들의 치료를 위해 GIPF 폴리펩티드의 운반하는 유전자 치료법을 제공한다.

본 발명의 관련된 실시예에서, 본 발명은 본 명세서에 상술한 질환들을 치료함에 있어 약제의 제조시에 GIPF 폴리펩티드의 발현을 제공하는 발현조절서열에 작동가능하게 결합하는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터의 사용을 지향한다. 좀 더 특별히, 본 발명은 예를 들면, 후술하는 바와 같이, 점막염 또는 염증성 장질환을 치료를 위한 약제의 제조시의 본 발명의 아데노바이러스 벡터의 용도를 제공한다.

상술한 방법들과 용도들 이외에도, 본 발명은 발현조절서열과 작동가능하게 결합된 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 포함하는 새로운 바이러스 벡터를 제공한다. 바람직한 실시예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus) 벡터이다. 상술한 바와 같이, 본 발명의 바이러스 벡터들은 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 바이러스 벡터들과 약학적으로 허용되는 담체들을 포함하는 의약 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 GIPF 단백질의 발현을 B 세포들로 지향하는 전사적 조절서열들의 조절하에 있는 천연(native) 사람 GIPF 단백질, 유사체 또는 그 단백질의 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자 도입 구축물(construct)에 관련되어 있다. 유전자 도입 구축물은 우선적으로 면역항체 카파(kappa) 서열 프로모터 등의 B 세포 특이적인 프로모터를 포함한다.

본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 자체의 B 세포에서 상당량의 야생형 사람 GIPF 단백질, 유사체, 또는 그 단백질의 단편을 생산하는 사람이 아닌 유전자 도입 포유류에 관련되어 있고, 여기서 의미하는 바는 형질전이 포유류가 기능적으로 B 세포들에서의 발현을 지향하는 전사적 조절서열들과 연계되어 있는 야생형 사람 GIPF 단백질의 생물학적 활성을 가지고 야생형 사람 GIPF 단백질, 유사체 또는 단편을 암호화하는 자체 지놈(genome) 핵산서열을 안정적으로 통합(integrate)하고 있다는 것이다. 전사적 조절서열들은 우선적으로 면역항체 카파(kappa) 서열 프로모터 등의 B 세포 특이적인 프로모터를 지닌다. 사람이 아닌 유전자 도입 포유류는, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들면, 마우스, 랫트, 돼지, 양, 염소, 또는 소이다.

본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 (a) B 세포들에서 GIPF 폴리펩티드를 발현하면서 상피세포들의 과잉성장에 관련된 소장의 비정상 팽창을 발달시키는 유전자 도입 마우스에 대한 약물 후보물질들을 투여하는 단계 및 (b) 상피세포들의 과잉성장에 대한 약물 후보물질의 효과를 평가하는 단계를 포함하는 본 명세서에서 상술한 질병 또는 질환의 치료에 대한 약물 후보물질군들을 탐색하는 방법에 관련되어 있다. 약물 후보물질군들은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드의 발현 또는 활성을 조절할 수 있다(예를 들면, 증가 또는 감소).

또한, 본 발명은 사람에만 국한되지 않는, 사이토카인과 함께 치료적으로 효과적인 GIPF 폴리펩티드의 양을 포함하는, 포유류를 대상으로 투여하는 방법을 구성하는 점막염, 염증성 장질환, 상처들을 포함하는 의학적 상태를 치료하거나 개선하는 방법을 포함한다.

본 발명의 다른 측면에 의하면, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드, 2차적인 치료제, 예를 들면, 사이토카인과 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 의약 조성물을 포함한다.

본 발명의 추가적인 측면들과 장점들은, 본 발명을 실시하도록 하는 이하의 설명을 고려하면 당업계에서 숙련된 자들에게는 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 폴리펩티드를 도 3에 설명하고, 아래에 자세히 언급하였다.

서열번호 4의 GIPF 폴리펩티드는 대략 29kDa 분자량의 비글리코실화 형태인 263아미노산으로 구성된 단백질이다. 서열번호 2는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA이다. 최초의 메티오닌은 서열번호 2의 603 위치에서 시작하며 예상되는 종결코돈은 서열번호 2의 1392 위치에서 시작한다. BLAST 알고리즘(참조: Altschul S. F. et al., J. Mol. Evol. 36:290-300(1993) 및 Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol. 21:403-10(1990), 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨) 을 이용한 단백질 데이터베이스 탐색은 서열번호 4가 서열번호 23 줄기세포 성장인자 A-1(참조: PCT WO01/77169 A2로부터의 서열번호 10)(도 4A) 및 사람의 트롬보스판딘 1(서열번호 28)(도 4B)와 유사함을 알려 준다.

예상되는 대략 20 잔기의 신호 펩타이드(서열번호 8)는 서열번호 4의 잔기 1부터 잔기 20까지이다. 세포외 부분은 그 자체로 유용하다. 신호 펩타이드 부분은 중성 네트워크 신호 P.VI.I 프로그램(참조: Nielsen et al., Int. J. Neural Syst. 8:581-599(1997)), 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨) 및 중성 네트워크 신호 P.V1.1 프로그램(참조: Nielsen et al., (1997) Int. J. Neural Syst. 8, 581-599)을 이용하여 추정한다. 본문의 기술 중 하나는 실제적인 절단 위치가 컴퓨터 프로그램이 예상한 위치와 다르다는 점을 인식할 것이다. 서열번호 10은 예상되는 신호 펩타이드(서열번호 8)이 결핍된 서열번호 4의 GIPF 폴리펩티드이다.

서열번호 4로부터의 두 종류의 폴리펩티드는 포유동물 세포 배양에서 복제하여 정제하였다. 서열번호 10은 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 지닌 벡터 구축물로 형질전환시킨 CHO 세포의 세포 배지에서 정제된 폴리펩티드 형태이다. 서열번호 10은 본 명세서에서 GIPF의 우점 성숙 형태로 알려져 있다. 서열번호 9는 서열번호 10을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이다. 이 폴리펩티드 형태의 N-말단 서열은 에드만 분해 서열분석(참조: Speicher, D. W., Methods 6:248-261(1994); Tempst et al, Methods 6:248-261(1994))을 통해 결정한다. 서열번호 12는 서열번호 3을 지닌 벡터 구축물로 형질전환시킨 사람 배아 신장 293 세포의 세포 배지로부터 분리된 성숙한 폴리펩티드 형태이다. 서열번호 11은 서열번호 12의 폴리펩티드를 암호화하는 유사한 뉴클레오티드 서열이다. 에드만 분해 서열분석을 통해서, 서열번호 12는 서열번호 4의 최초 31 아미노산 잔기가 결핍되어 있음을 결정한다. 31 아미노산 펩타이드는 퓨린(furin) 절단 위치에 대한 컨센서스(consensus) 위치(서열번호 20)을 포함하고, 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 인용되었다.

Pfam 소프트웨어 프로그램(참조: Sonnhammer et al., Nucleic Acids Res., Vol. 26(1) pp 320-322(1998), 본 명세서에 참고문헌으로 인용됨)을 이용하여, GIPF 폴리펩티드(서열번호 4)는 알려진 펩타이드 영역에 대해 유사성을 지닌 영역에 대하여 검사한다. 서열번호 4의 GIPF 폴리펩티드는 트롬보스판딘 형태 1 영역(서열번호 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화한 서열번호 14)을 포함하는 것으로 예상하였다. 서열번호 4 내 포함된 트롬보스판딘 형태 1 영역에 대한 Pfam 수치는 0.0034이며, 서열번호 4의 206을 통해 아미노산 잔기 151로부터 구성함을 예상하였다. 트롬보스판딘 영역은 그 자체적으로 유용할 것이다.

eMATRIX 소프트웨어 일체(Stanford University, Stanford, CA)(참조: Wu et al., J. Comp. Biol., vol.6, pp 219-235 (1999), 본 명세서에 참고문헌으로 인용됨)를 이용하여, 서열번호 4의 GIPF 폴리펩티드는 아래 표에 그린 영역을 포함하는 것으로 예상된다. 여기서, A=알라닌, C=시스테인, D=아스파르트산, E=글루탐산, F=페닐알라닌, G=글라이신, H=히스티딘, I=아이소류신, K=라이신, L=류신, M=메티오닌, N=아스파라진, P=프롤린, Q=글루타민, R=아르기닌, S=세린, T=트레오닌, V=발린, W=트립토판, Y=타이로신:

서열번호	p 값	확인 번호	eMATIX 영역 이름	아미노산 서열(위치)
24	8.63e-10	IPB001862A	막 공격 복합체 요소/perforin/보체 C9	PAQCEMSEWSPWGPCS (145-160)
25	9.03e-10	IPB002174A	퓨린(furin)-유사 시스테인 풍부영역	GKRQRRISAEGSQACAKGCCLCSEVNGCLKCS (26-57)
26	9,80e-08	IPB000433	ZZ 징크핑거 표시	IEHCEACFSHNFCTKCK (99-115)

CHO 및 293 세포(각각 서열번호 10 및 서열번호 12)가 우선적으로 생산한 우점 성숙 또는 성숙한 폴리펩티드 형태의 생산량을 조절하기 위해, 합성 구축물을 만들었다. 서열번호 16은 예상한 신호 펩타이드(서열번호 10)를 293 세포(서열번호 10)에서 생산한 우점 성숙 형태에 연결시킨 폴리펩티드(서열번호 16)을 발현시키는 벡터 시스템에 포함된 뉴클레오티드 서열이다. 서열번호 17은 퓨린(furin)-단백질 분해효소 절단 컨센서스(consensus) 위치(서열번호 22)에 변이를 포함하는 위치-지정한 돌연변이 생성(참조: Weiner et al., Gene 126:35-41(1993))에 의해 생산한 뉴클레오티드 구축물이다. 이러한 변이는 서열번호 20의 첫 번째 R(아르기닌) 잔기를 Q(글루타민)으로 변화시킨다. 아르기닌의 글루타민으로의 변이는 293 세포에 의해 GIPF 우점 성숙 형태의 생산을 가능하게 한다(서열번호 10).

트롬보스판딘은 세포-세포 및 세포-기질 정보교환에 관련하는 세포의 기질 단백질군이다(참조: Lawler et al., Curr. Opin. Cell. Bio. 12:634-640(2000)). 다섯 가지 이상의 다른 트롬보스판딘은 뚜렷한 형태의 조직 분포를 포함한다고 알려졌다. 심장, 연골, 및 뇌 등의 일부 조직은 트롬보스판딘 유전자 산물의 대부분을 발현시킨다. 트롬보스판딘-1은 혈액 혈소판의 주요 구성물이다. 트롬보스판딘-1은 세포 표면에서 막 단백질, 사이토카인 및 다른 수용성 인자를 운반하는 기능을 하는 것으로 보인다. 트롬보스판딘-1에 결합하는 막 단백질은 인테그린(integrin), 인테그린-결합성 단백질(CD47), CD36, 프로테오글리칸(proteoglycan)을 포함하였다.

트롬보스판딘-1은 다수의 다른 영역을 지닌 대형 단백질이다. 트롬보스판딘-1은 아미노 말단 및 카르복시 말단 양쪽, 프로콜라겐(procollagen)과 유사한 부분 및 트롬보스판딘 형태 1, 형태 2 및 형태 3 반복(TSP)으로 명명한 세 가지 형태의 반복된 서열 모티프(motif)에 구형 영역을 포함하였다. TSP1 반복은 보체 조성물(C6, C7, C8A 등등), ADAMTS 등의 세포의 기질 단백질, 민딘(mindin), F-스폰딘(F-spondin) 세마스포린(semaphorins) 등의 축색유도 분자, SCO-스폰딘(spondin) 및 플라스모디움(Plasmodium)의 TRAP 단백질을 포함하는 다양한 다른 단백질에서 볼 수 있다.

TSP1 반복은 세포의 성장, 분화, 접착, 이동 및 죽음에 관련하는 TGF β 상피 조직을 활성화시킬 수 있다. TSP1은 또한 단백질 결합, 헤파린(heparin) 결합, 세포 부착, 신경돌기 부산물, 증식억제, 혈관신생 억제, 세포사멸 활성화에 관련되어 있다. Plasmodium circumsporozoite(CS) 단백질 및 TRAP 단백질의 TSP1 영역은 중충(sporozoite)에 의한 타액 분비선 침투에 관련되어 있다.

TSP1 서열은 일정한 시스템, 가까운 곳의 트립토판 및 염기성 잔기의 클러스터(cluster)에 의해 특성화된다. TSP1 서열의 공간 구성은 헤파린에 결합하는 것처럼 보이는 2개의 β 병풍 영역을 보여 준다(참조: Kilpelainen et al(200) J. Biol. Chem. 275, 13564-13570, 본 명세서에 참고문헌으로 인용됨). 유사한 공간 접힘(spatial fold)은 헤파린-결합 성장 관련 분자(HB-GAM)에 대하여 언급하였다. HB-GAM은 세포분열성 및 신경돌기 부산물-촉진 단백질인 플레이트로핀(pleiotrophin); 조골세포 특이인자(osteoblast specific factor)-1; 헤파린-결합 향신경성 인자; 및 헤파린 affin 조절 펩타이드와 동일하다. HB-GAM의 발현은 축색 관 및 시냅스의 세포의 기질과 결합하였고, 뇌 외곽의 기저막 및 연골 기질에도 결합하였다. 최근에, N-신데칸(syndecan)은 뇌에서 HB-GAM에 대한 수용체로 알려졌고, 해마(hippocampal)의 장기 상승(long-term potentiation)의 조절, 일련의 기억과 학습에 관련한 뇌의 유연성에서 역할을 하는 것으로 알려졌다. 그러므로, 단백질을 포함하는 TSP1은 상장 프로모터로 작용하며 GIPF 활성을 보일 것이다.

부가적으로, 골수에서 합성하여 세포의 기질에 위치하는 트롬보스판딘은 적혈구, 과립세포(granulocytic) 및 메가케리오프트(megakaryocytic) 계통으로 이동하는 혈구 원조 세포 뿐만 아니라, 최초의 다분화성 원조 세포에 대하여 세포부착 분자로서 기능하였다. 따라서, 트롬보스판딘은 혈액세포 발달에 중요할 것이다(참조: Long and Dixit(1990) Blood 75, 2311-2318, 본 명세서에 참고문헌으로 인용됨).

본 발명의 GIPF 폴리펩티드 및 폴리펩티드는 위장 소낭선 세포의 증식 또는 분화 유도에 이용할 수 있다. 이들은 또한 상피화가 필요한 화학치료법 및 방사선 치료법-유발한 점막염, 인두중양부의 점막염, 입술 및 식도, 염증성 장 질환을 포함하는 다른 조건위장 질환 및 상처, 화상, 안 질환을 포함하는 다른 조건 및 상피세포 증식 또는 재생 촉진이 필요한 질환에 대한 조건의 처리에 이용할 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 또한 이식 조직이 필요한 환자를 도울 수 있는 새로운 조직 및 기관의 생성에 이용할 수 있다.

4.1 정의

본 발명을 기술하는데 있어서, 다음의 용어들이 사용되고, 이하에 적시한 바와 같이 정의될 것이다.

본 명세서와 첨부된 특허청구범위에서 사용된 단수형 명사는 문맥에서 명백히 달리 지시하지 않는 한, 복수를 포함한다.

"GIPF"라는 용어는 상피세포에서 특별히 활성을 갖는 위장 증식인자(gastrointestinal proliferative factor)를 의미한다.

본 발명에 따르면, "GIPF 단백질(GIPF protein)"이나 "GIPF 폴리펩티드(GIPF polypeptide)"라는 용어는 아미노산 메티오닌부터 알라닌까지에 의해 정의되는 전장 단백질(full-length protein)(서열번호 4), 그의 단편(fragment)들, 유사체(analog)들을 의미한다.

본 명세서에 사용된 "전장(full-length) GIPF", "long form of GIPF", "야생형(wild type) GIPF", 또는 "자연의(native) GIPF"라는 용어들은 모두 도 1B에 나타난 바와 같이 263개의 아미노산 잔기들을 포함하는 폴리펩티드(서열번호 4)를 의미한다.

"야생형 위장 증식인자(GIPFwt)"나 "사람의 위장 증식인자(hGIPF)"라는 용어는 사람의 야생형(wild type), 전장(full-length) GIPF 폴리펩티드(서열번호 4)를 의미한다; "GIPFt"라는 용어는 사람 위장 증식인자에 V5His6가 붙은 폴리펩티드를 의미하고(서열번호 6); "mGIPFt"라는 용어는 마우스로부터 나온 V5His6가 붙은 위장 증식인자를 의미한다(서열번호 69). 변형된 위장 증식인자 폴리펩티드는 서열번호 4의 50번 위치에 발린보다는 이소류신을 갖는다.

"단편(fragment)"이라는 용어는 자연의 위장 증식인자(native GIPF)로부터 유래된 위장 증식인자의 전체 서열을 포함하지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 그러한 단편들은 서열번호 16과 같이 내부적으로 결실된 폴리펩티드뿐만 아니라, 서열번호 9나 12와 같이 전장 분자의 끝을 자른 변형이 될 수 있다. 위장 증식인자의 단편은 본 명세서에서 기술되듯이, 시험관내(in vitro)나 생체내(in vivo)에서 상피세포의 증식에 미치는 영향에 의해 결정되는 위장 증식인자의 생물학적 활성을 가질 것이다.

"유사체(analog)"라는 용어는 참조 분자(reference molecule)의 유도체를 의미한다. 유사체는 상술한 생물학적 활성을 가질 수 있다. 일반적으로, "유사체"라는 용어는 변형이 활성을 저해하지 않는 한, 본래의 분자에 하나 또는 그 이상의 아미노산 부가, 치환, 결실을 갖는 자연의(native) 폴리펩티드 서열과 구조를 갖는 화합물을 의미한다. 서열번호 18은 위장 증식인자 유사체의 예이다. 바람직하게는, 유사체는 부모(parent) 분자와 적어도 같은 생물학적 활성을 갖거나, 그보다 향상된 것을 보인다. 폴리펩티드 유사체를 제조하는 방법들이 알려졌다. 특히 선호되는 유사체들은 자연계에 보존된(conservative) 치환체들, 즉 그들의 곁사슬(side chain)이 관련이 있는, 한 족의 아미노산 안에서 일어나는 치환체들을 포함한다. 구체적으로, 아미노산들은 일반적으로 4개 족으로 나뉜다: (1) 산성(acidic): 아스파르트산, 글루탐산; (2) 염기(basic): 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 티로닌, 트립토판; (4) 비대전 극성(uncharged polar): 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신이다. 페닐알라닌, 트립토판, 티로신은 흔히 방향족(aromatic) 아미노산으로 분류되기도 한다. 예를 들어, 류신을 이소류신이나 발린으로, 아스파르트산염을 글루탐산염으로, 트레오닌을 세린으로, 이와 유사하게 아미노산을 그와 구조적으로 유사한 아미노산으로 보존적 치환(conservative replacement)을 하면 위장 증식인자의 생물학적 활성이 보존될 것이라는 것을 합리적으로 예측할 수 있다.

어떤 아미노산 잔기(residue)가 활성의 파괴 없이 치환, 부가, 결실될 것인가를 결정하는 것에 대한 지침은 특정 폴리펩티드 서열을 그것의 상동 펩티드와 비교하고, 높은 상동성 영역(보존된 영역)에서의 아미노산 서열변화 수를 최소화하거나 아미노산을 일치(consensus) 서열로 대체함으로써 찾을 수 있다.

선택적으로, 이것들과 같은 또는 유사한 폴리펩티드를 암호화(encoding)하는 재조합 유사체(recombinant analog)는 유전부호(genetic code)에서의 퇴행성(redundancy)을 이용하여 합성되거나 선별될 수 있다. 다양한 제한부위(restriction site)를 생산하는 중성변이(silent change) 등의 다양한 코돈 치환들이 플라스미드나 바이러스 벡터 클로닝이나 원핵 또는 진핵생물 시스템에서의 발현을 최적화시키도록 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열에서의 변이는 폴리펩티드의 특정 부분의 성질을 변화시키거나, 리간드 결합 친화성, 내부사슬 친화성(interchain affinity), 또는 분해/전복(turnover) 비율 등의 특징들을 변화시키기 위해 폴리펩티드에 부가된 폴리펩티드나 다른 펩티드의 영역(domain)들에 의해 영향 받는다.

바람직하게는, 아미노산 치환체(substitution)들은 하나의 아미노산을 유사한 구조나 화학적 특징을 갖는 다른 아미노산으로 대체한 결과이다. 즉, 보존적인 아미노산 대체이다. 보존적 아미노산 치환체들은 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 친양쪽성(amphipathic)의 유사성에 기초하여 만들어진다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌을 포함한다; 극성 중성(polar neutral) 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민을 포함한다; 양극으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신, 히스티딘을 포함한다; 및, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트산과 글루탐산을 포함한다. 삽입 또는 결실은 약 1부터 20개 아미노산의 범위에서 바람직하며, 더 바람직한 것은 1에서 10의 범위이다. 허용되는 변이는 재조합 DNA 기술을 이용하고 활성을 평가함으로써 체계적으로 폴리펩티드 분자에서 아미노산을 삽입, 결실, 치환시킴으로써 실험적으로 결정될 수 있다.

기능의 변경을 원하는 곳에, 변경된 폴리펩티드를 만들기 위해 선택적으로 삽입, 결실 또는 비보존적 변경들이 가해질 수 있다. 그러한 변경들은 예를 들어 하나 또는 그 이상의 본 발명의 폴리펩티드들의 생물학적 기능들이나 생화학적 특성들을 변경시킬 수 있다. 예를 들면, 그러한 변경들은 리간드 결합 친화성, 내부사슬 친화성(interchain affinity), 또는 분해/반전

(turnover) 비율 등의 폴리펩티드 특성들을 변화시킬 것이다. 게다가 그러한 변형들은 숙주세포에서 더 발현에 적합한 폴리펩티드들을 생성하기 위해 선별될 수 있다. 예를 들어, 이황화 결합(disulfide bridge)을 절단하기 위해 시스테인 잔기가 제거되거나 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다.

"유도체(derivative)"라는 용어는 편재화(ubiquitination), 표지(labeling)(예를 들어, 방사성 핵종(radionuclide) 또는 다양한 효소들), pegylation(폴리에틸렌 글리콜로 유도체화)과 사람 단백질에서 정상적으로는 발생하지 않는 오르니틴(ornithine) 등의 아미노산의 화학적 합성에 의한 부가나 치환 등의 공유적 중합체 부착(covalent polymer attachment)에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩티드를 의미한다.

"폴리펩티드(polypeptide)"와 "단백질(protein)"이라는 용어는 아미노산 잔기의 중합체를 의미하며, 산물의 최소길이에만 국한되지는 않는다. 이 용어들은, 달리 표시되지 않는 한, 글리코실화, 아세틸화, 인산화된 형태와 같이 아미노산 서열의 변화가 없는 폴리펩티드의 변형도 포함한다. 폴리펩티드나 단백질은 본 발명의 목적을 위해 자연의 근원으로부터 분리될 수 있을 뿐만 아니라, 합성 또는 재조합기술로 생산될 수 있다.

"정제된(purified)"과 "분리된(isolated)"이란 용어는, 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드와 관련하여 동 종류의 다른 생물학적 거대분자들의 실제적 부재(substantial absence) 속에서 지정된 분자가 존재하는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 "정제된(purified)"이라는 용어는 동 종류의 생물학적 거대분자들의 바람직하게는 적어도 75중량%, 보다 바람직하게는 적어도 85중량%, 보다 바람직하게는 적어도 95중량%, 가장 바람직하게는 적어도 98중량%가 시료에 존재하는 것을 의미한다. 본 발명의 한가지 실시예에 따르면, 폴리뉴클레오티드나 폴리펩티드가 정제되어 지시된 생물학적 거대분자의 적어도 95중량%를 나타내나, 물, 완충액, 그리고 다른 작은 분자들, 특히 1000달톤(dalton) 보다 적은 중량의 분자들을 가진 것들이 나타날 수 있다.

"특정 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오티드(isolated polynucleotide which encodes a particular polypeptide)"라는 용어는 실제로 주(subject) 폴리펩티드를 암호화하지 않는 다른 핵산분자들이 실제로 부재하는 핵산 분자를 의미한다; 그러나, 그 분자는 조성물의 염기적 특징에 유해한 영향을 주는 어떤 추가적인 염기나 일부를 포함할 수 있다.

"자연 발생의 폴리펩티드(naturally occurring polypeptide)"라는 용어는 유전적으로 조작되지 않은 세포로부터 생성된 폴리펩티드를 의미한다. 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화, 아실화(acylation) 등을 포함하는 폴리펩티드의 번역 후 변형(post-translational modification)으로부터 나오는 다양한 폴리펩티드들을 생각할 수 있다.

"번역된 단백질 암호화 부분(translated protein coding portion)"이라는 용어는 어떤 선도서열(leader sequence)이나 프로세싱(processing)서열을 포함하는 전장 단백질을 암호화하는 서열을 의미한다.

"우점 성숙 단백질 암호화 서열(dominant mature protein coding sequence)"이라는 용어는 어떠한 선도/신호(leader/signal)서열도 없는 펩티드나 단백질을 암호화하는 서열을 의미한다. "우점 성숙 단백질 부분(dominant mature protein portion)"이라는 용어는 선도/신호 서열이 없는 단백질의 부분을 의미한다. "성숙(mature)"한 형태라는 용어는 선도/신호 서열과 푸린(furin) 절단 부위가 없는 위장 증식인자 폴리펩티드를 의미한다. 펩티드는 선도서열 또는 푸린 절단 부위를 가질 수 있으나 세포에서 가공과정 중에 제거되거나 단백질이 합성적으로 또는 성숙 단백질 암호화 서열만을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 생산되어질 수 있다. 성숙 또는 우점 성숙 단백질 부분은 최초의 메티오닌 잔기를 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있다는 것을 예상할 수 있다. 최초의 메티오닌은 종종 펩티드 가공과정에서 제거된다.

본 명세서에 사용된 "분리된(isolated)"이라는 용어는 그것의 자연의 출처에서 핵산이나 폴리펩티드가 있는 적어도 하나의 다른 구성요소(예를 들면, 핵산이나 폴리펩티드)로부터 분리된 핵산이나 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명의 한가지 실시예에 따르면, 핵산이나 폴리펩티드는 단지 용매, 완충액, 이온, 또는 그 등의 용액에 보통 존재하는 다른 구성요소들의 존재 하에서 발견된다. "분리된(isolated)"이라는 용어와 "정제된(purified)"이라는 용어는 그것들의 본래의 출처에 있는 핵산이나 폴리펩티드들을 포함하지 않는다.

"재조합(recombinant)"이라는 용어가 본 명세서에서 폴리펩티드나 단백질을 지칭하기 위해 사용될 때에는 폴리펩티드나 단백질이 미생물, 곤충, 포유동물 등의 재조합 발현 시스템(recombinant expression system)에서 획득된 것을 의미한다. "미생물의(microbial)"라는 용어는 박테리아나 곰팡이(효모 등) 발현 시스템에서 만들어진 재조합 폴리펩티드나 단백질을 의미한다. 그 결과로서, "재조합 미생물(recombinant microbial)"이라는 용어는 본질적으로 내생의 물질이 없고, 본래의

글리코실화(glycosylation)를 수반하지 않는 폴리펩티드나 단백질을 정의한다. 대장균 등 대부분의 박테리아 배양에서 발현된 폴리펩티드나 단백질들은 글리코실화 변형(glycosylation modification)이 없을 것이다; 효모에서 발현된 것들은 포유류 세포에서 발현된 것들에서 나타나는 것과는 다른 글리코실화 패턴을 가질 것이다.

"재조합 폴리펩티드(recombinant polypeptide)"라는 용어는 본 명세서에서 기술한 재조합 DNA 기술(recombinant DNA technique)에 의해 제조된 폴리펩티드로 해석된다. 일반적으로, 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자는 복제된 후 아래 기술하는 대로 형질전환된(transformed) 유기체로 발현된다. 그러면 숙주 유기체는 발현 조건 아래에서 그 폴리펩티드를 생산하는 외래 유전자(foreign gene)를 발현한다. 또는 선택적으로, 내생적(endogenous) 폴리펩티드의 발현을 조절하는 프로모터(promoter)를 재조합 폴리펩티드로 바꿀 수도 있다.

"활성을 가지는(active)"라는 용어는 자연적으로 생기는 폴리펩티드의 생물학적 또는 면역학적 활성 상태를 의미한다. 본 발명에 따르면, "생물학적 활성을 가지는(biological active)" 또는 "생물학적 활성(biological activity)"이라는 용어는 단백질 또는 펩티드가 구조적이거나 규칙적이거나 자연 발생 분자의 생화학적 기능을 가진 것을 의미한다. 마찬가지로, "생물학적 활성을 가지는(biological active)" 또는 "생물학적 활성(biological activity)"이라는 용어는 자연적이거나 재조합되거나 합성된 위장 증식인자(GIPF) 펩티드 또는 어떤 펩티드가 적당한 동물 또는 세포에 특정한 생물학적 반응을 보이고 특정한 항체에 붙는 능력을 의미한다.

"분비된(secreted)"이라는 용어는 신호서열(signal sequence)의 아미노산 서열이 적합한 숙주세포 안에서 발현될 때 그 신호서열의 결과인 운반을 포함하여, 세포막을 가로지르거나 통과하여 운반된 단백질을 의미한다. "분비된" 단백질은 발현된 세포로부터 전부(예: 용해 단백질) 또는 부분적으로(예: 수용기) 분비된 제한 없는 단백질(without limitation protein)을 포함한다. "분비된(secreted)" 단백질은 또한 소포체(endoplasmic reticulum)의 세포막을 가로질러 운반되는 제한 없는 단백질도 포함한다. "분비된(secreted)" 단백질은 또한 비전형 신호서열(예: Interleukin-1 베타, Krasney P.A.와 Young P.R.(1992), Cytokine 4(2), p.p. 134-143 참조)을 가진 단백질과 손상된 세포에서 유출된 인자(예: Interleukin-1 Receptor Antagonist, Arend W.P et al.(1998) Annu. Rev. Immunol. 16, p 27-55참조)를 포함한다.

본 명세서에서 사용된 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 "핵산분자(nucleic acid molecule)"라는 용어는 리보뉴클레오티드 뿐만 아니라 디옥시리보뉴클레오티드 등 온갖 길이의 뉴클레오티드 중합체를 의미한다. 이 용어는 분자의 1차적 구조만을 의미하고, 따라서 이중 또는 단일 사슬의 DNA 또는 RNA만을 의미한다. 이것은 또한 변형의 알려진 유형, 예를 들어 당해 분야에서 알려진 표지(label), 메틸화, "caps", 유사체의 하나 혹은 그 이상의 자연 발생의 뉴클레오티드 치환, 탈결합(예: methyl phosphonate, phosphotriester, phosphoamidate, carbamate, 등)과 결합(예: phosphorothioate, phosphorodithioate, 등), 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드(signal peptide), poly-L-lysine, 등) 등의 부속물을 포함하는 것, 삽입물(예: 아크리딘, Psolalen, 등)을 가지는 것, 킬레이트(예: 금속원소, 방사성 금속원소, 붕소, 산화 금속원소, 등)를 가지는 것, 알킬화합물을 가지는 것, 변형된 결합(예: alpha anomeric 핵산, 등)을 가지는 것, 또한 폴리뉴클레오티드의 비변형을 포함한 뉴클레오티드간 변형을 의미한다. 일반적으로, 본 발명에 의해 제공되는 핵산 부분은 지놈(genome)의 파편과 짧은 올리고뉴클레오티드 결합자 또는 일련의 올리고뉴클레오티드, 미생물 또는 바이러스 오페론(operon)이나 진핵세포 유전자로부터 유도된 조절인자(regulatory element)를 포함하는 재조합 전사 단위로 발현될 수 있는 합성 핵산을 제공하는 특유의 뉴클레오티드들로 뭉쳐질 것이다.

"올리고뉴클레오티드 단편(oligonucleotide fragment)" 혹은 "폴리뉴클레오티드 단편(polynucleotide fragment)", "부분(portion)", "절편(segment)", "탐침(probe)", "프라이머(primer)"는 상호 혼용되어 사용되며, 그것은 최소한 대략 5 뉴클레오티드 또는 보다 바람직하게는 최소한 대략 7 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 최소한 대략 9 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 최소한 대략 11 뉴클레오티드, 그리고 가장 바람직하게는 최소한 17 뉴클레오티드로 된 뉴클레오티드 잔기의 서열을 의미한다. 전기 단편은 바람직하게는 대략 500 뉴클레오티드 이하, 바람직하게는 대략 200 뉴클레오티드 이하, 보다 바람직하게는 대략 100 뉴클레오티드 이하, 보다 바람직하게는 대략 50 뉴클레오티드 이하, 가장 바람직하게는 대략 30 뉴클레오티드 이하이다. 바람직한 탐침은 약 6 뉴클레오티드에서 약 20 뉴클레오티드이며, 바람직하게는 약 15에서 약 50 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 약 17에서 30 뉴클레오티드이며, 가장 바람직하게는 약 20에서 25 뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 그 절편은 mRNA나 DNA분자의 동일하거나 관련된 부분을 동정하거나 증폭시키는 중합효소연결반응(polymerase chain reaction, PCR), 다양한 혼성화(hybridization) 또는 미세정렬(microarray) 과정에 사용될 수 있다. 절편 또는 단편은 본 발명의 각 폴리뉴클레오티드 서열을 독특하게 밝힐 것이다. 바람직하게는, 단편은 서열번호 "1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 107"로 된 부분과 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

예를 들어, 탐침은 특정 mRNA 분자가 세포에 존재하는지 아니면 조직에 존재하는지 결정하는 데 사용될 수 있으며, 월시 등(Walsh et al.)의 문헌(Walsh P.S et al, 1992, PCR Methods Appl, 1, p.p.241-250)에 기재된 염색체(chromosomal)

DNA와 유사한 핵산서열을 분리하는 데 이용할 수 있다. 그들은 틸번역(nick translation), 클레노우 채움(Klenow fill-in) 반응, PCR, 또는 당해 분야에서 잘 알려진 다른 방법에 의해 표지된다. 본 발명의 탐침, 제조와 표지는 모두 본 명세서에 전체적으로 참고문헌으로 인용된, Sambrook, F et al, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 또는 Ausubel, F. M. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Jhon Wiley와 Sons, New York NY 에 의해 상세히 설명되었다.

본 발명의 핵산서열은 또한 핵산서열 번호 "1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 107"의 서열정보를 포함한다. 그 서열정보는 유일하게 핵산서열 번호 "1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 107"의 서열정보를 밝히거나 나타내는 핵산서열 번호 "1, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 107"의 단편일 수 있다. 하나의 단편은 20-mer의 핵산서열일 수 있다. 왜냐하면, 20-mer가 사람 지놈에 완전히 맞을 확률이 300분의 1이기 때문이다. 사람 지놈에는 염색체 하나에 30억개의 염기쌍(base pair)이 있다. 4^{20} 개의 20-mer가 존재할 수 있기 때문에, 사람 염색체 하나의 염기쌍보다 20-mer가 300배 더 많게 된다. 같은 해석을 사용하여, 17-mer가 사람 지놈에 완전히 맞을 확률은 대략 5분의 1이다. 이 단편이 합성 연구를 위한 배열에 쓰일 때에는 15-mer 단편이 사용될 수 있다. 합성된 서열은 대략 전체 지놈서열의 5% 이하를 포함하기 때문에, 15-mer가 합성된 서열에 완전히 맞을 확률 또한 대략 5분의 1이다.

마찬가지로, 하나의 미스매치(mismatch)를 찾아내기 위한 서열정보를 사용할 때는 단편은 25-mer가 될 수 있다. 하나의 미스매치가 있는 사람 지놈에서 25-mer가 나타날 확률은 전부 맞을 확률(4^{25} 분의 1)에 각 뉴클레오티드 위치가 미스매치될 증가된 확률(3×25)에 곱해서 계산된다. 하나의 미스매치를 가진 18-mer가 합성 연구를 위한 배열(array)에서 발견될 확률은 약 5분의 1이다. 하나의 미스매치를 가진 20-mer가 사람 지놈에서 발견될 확률은 대략 5분의 1이다.

"개방해독틀(open reading frame, ORF)"이라는 용어는 종결코돈(codon) 없이 아미노산을 암호화하는 뉴클레오티드 삼합체(triplet)을 의미하며, 단백질로 전사될 수 있는 서열을 의미한다.

"작동가능하게 연결된(operably linked)" 또는 "작동가능하게 연관된(operably associated)"이라는 용어는 작동가능하게 관련된 핵산서열을 의미한다. 예를 들어, 프로모터는 만약 그 프로모터가 암호화 서열의 전사를 조절한다면, 암호화 서열과 작동가능하게 연관되거나 작동가능하게 연결될 수 있다. 작동가능하게 연결된 핵산서열은 인접하거나 같은 발현단위에 있을 수 있으나, 어떤 유전인자 예를 들어 억제유전자(repressor)들은 암호화 서열에 인접하여 연결되어 있지 않으면서도 암호화 서열의 전사/합성을 조절한다.

"재조합 DNA 분자(recombinant DNA molecule)" 또는 "재조합 폴리뉴클레오티드(recombinant polynucleotide)"라는 용어는 본 명세서에서 기원(origin) 또는 조작으로 생긴 지놈, cDNA, 반합성 또는 합성 기원의 폴리뉴클레오티드를 의미하는 것으로 사용되었으며, 그것은 <1> 자연적인 것과 연관된(associated) 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 부분과 관련되어 있지 않거나, <2> 자연적인 것과 연관된(linked) 폴리뉴클레오티드와 달리 연관되어 있으며, 또는 <3> 자연에서는 생기지 않는다. 따라서, 이는 "합성적으로 생성된(synthetically derived)" 핵산 분자를 의미한다.

"상보적인(complementary)" 또는 "상보성(complementarity)"이라는 용어는 염기쌍에 의한 자연적인 폴리뉴클레오티드의 결합을 의미한다. 예를 들어, 5'-AGT-3' 서열은 상보적 서열인 3'-TCA-5'에 결합한다. 두 단일 사슬 분자(single strand molecule) 사이의 상보성은 "부분적(partial)"이어서 핵산의 일부만이 결합하거나 또는 "완전한(complete)"것이어서 전체적인 상보성이 두 단일 사슬 분자 사이에 존재할 것이다. 핵산 사슬간의 상보성은 명백하게 핵산 사슬간의 혼성화의 효율과 강도에 영향을 준다.

"엄격한(stringent)"이라는 용어는 일반적으로 당해 분야에서 엄격한 것으로 이해되는 상태를 가리키는 것으로 사용된다. 엄격한 상태는 고도로 엄격한 상태(즉, 0.5M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate(SDS), 65°C의 1mM EDTA에서의 filter-bound DNA에의 혼성화(hybridization) 및 68°C의 0.1X SSC/0.1%SDS에서의 세척) 그리고 중간정도의 엄격한 상태(즉, 42°C의 0.2X SSC/0.1%SDS에서의 세척)를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 혼성화 조건은 본 명세서의 실시예에 기술되었다.

데옥시올리고뉴클레오티드의 혼성화의 경우, 추가적인 예시적 엄격한 혼성화조건은 37°C에서의 6X SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트(sodium pyrophosphate)(14-염기 올리고뉴클레오티드에서), 48°C(17-염기 올리고뉴클레오티드에서), 55°C(20-염기 올리고뉴클레오티드에서) 그리고 60°C(23-염기 올리고뉴클레오티드에서)에서의 세척을 포함한다.

본 명세서에서 사용된, "실질적 등가물(substantially equivalent)"이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준(reference) 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오티드와 핵산서열 모두를 의미한다. 통상적으로, 그런 실질적 등가물인 서열은 단지 약 35%(즉, 실질적으로 등가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 등가적인 서열에서의 나머지 전체 숫자로 나누었을 때 약 0.35 또는 그 이하이다) 정도로 본 명세서에 나열된 것에서부터 다양하다. 그런 서열은 나열된 서열과 65%의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명의 하나의 실시예에 따르면, 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 본 발명의 서열은 나열된 30%(70% 서열 동일성) 정도, 또는 이 실시예의 변형으로서 25%(75%의 서열 동일성), 이 실시예의 다른 변형으로서 20%(80% 서열 동일성) 정도, 이 실시예의 또 다른 변형으로서 10%(90%서열 동일성) 정도, 그리고 이 실시예의 또 다른 변형으로서 5%(95% 서열 동일성) 정도의 서열로 다양하다. 본 발명에 따른 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 아미노산 서열은 나열된 아미노산 서열과 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90%의 서열 동일성을 갖는다. 실질적 등가물인 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 유전자 암호의 중복(redundancy) 또는 축퇴(degeneracy)를 고려할 때, 더 낮은 백분율의 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오티드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가져야 한다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 등가적인 생물학적 활성과 실질적으로 등가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다. 등가물을 결정하기 위해, 성숙 서열(예를 들어, 위(spurious) 종결코돈(stop codon)을 제조하는 돌연변이를 통한)의 절단(truncation)은 무시되어야 한다. 서열 동일성은 예를 들어, 조턴 하인(Jotun Hein)의 방법(참조: Hein, J., 1990, Methods Enzymol, 183, p626-645)을 사용하여 결정될 것이다. 서열 사이의 동일성은 예를 들어 합성 조건을 달리하는 등 당해 분야에서 알려진 다른 방법에 의해서도 결정될 수 있다.

"벡터(vector)"라는 용어는 다른 핵산을 그것이 연관된 곳으로 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. "발현벡터(expression vector)"라는 용어는 벡터에 의해 운반된 각각의 재조합 유전자에 의해 암호화된 위장 증식인자(GIPF) 단백질을 합성할 수 있는 플라스미드, 코스미드(cosmid) 또는 파지(phage)를 포함한다. 바람직한 벡터는 연관된 핵산의 자가 복제와 발현이 가능한 것이다.

"형질전환(원핵세포)(transformation)"이라는 용어는 DNA를 적절한 숙주세포로 도입하여 DNA가 염색체 외부 인자 또는 염색체 병합 형태로 복제가능함을 의미한다.

"형질전환(진핵세포)(transfection)"이라는 용어는 암호화 서열이 실제로 발현됨에 관계없이 적절한 숙주세포가 발현 벡터를 받아들임을 의미한다. "감염"이라는 용어는 바이러스 또는 바이러스 벡터의 이용에 의해 적절한 숙주세포로 핵산을 도입하는 것을 의미한다.

"전사적 조절 요소(transcriptional regulatory element)" 및 "전사적 조절서열(transcriptional regulatory sequence)"라는 용어는 특정 생명체에서 작동적으로 연결된 암호화 서열의 발현에 필요한 DNA 서열에 대하여 상호변환가능하게 이용하였다. 원핵생물에 적합한 조절서열은, 예를 들어, 프로모터, 선택적인 조절서열 및 리보솜 결합 부위를 포함하였다. 진핵세포는 프로모터, 인핸서, 스플라이싱(splicing) 신호 및 폴리아데닐레이션 신호를 이용한다고 알려졌다. 이러한 용어는 프로모터, RNA 중합효소와 전사인자, 상류인자(upstream element), 인핸서, 및 반응인자 간의 기본적 상호작용에 필요한 프로모터나 코어(core) 인자를 포함하여, 전사를 촉진하거나 조절하는 모든 인자를 포함한다(참조: Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873).

암호화 서열은 RNA 중합효소가 암호화 서열을 mRNA로 전사하여, 선택적으로 트랜스-RNA 스플라이싱(trans-RNA splicing)하여 암호화 서열이 암호화하는 단백질로 번역시킬 때, 세포 내의 전사 및 번역 조절서열의 "조절하(under the control)"에 있다.

"조직-특이적 프로모터(tissue-specific promoter)"라는 용어는, 예를 들어 프로모터에 작동적으로 연결된 선택적 DNA 서열의 발현을 조절하며 B-세포 등의 특정 세포에서의 선택적 DNA 서열의 발현에 영향을 주는 프로모터로 작용하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 본 발명의 예시적인 실시예에서, B-세포 특이적 프로모터를 이용하는 유전자 구축물은 우선적으로 GIPF 단백질 또는 B-세포의 단백질 단편의 발현에 이용할 수 있다.

"발현조절 단편(expression modulating fragment, EMF)"는 작동적으로 연결된 ORF 또는 다른 EMF의 발현을 조절하는 일련의 뉴클레오티드를 의미한다.

본 명세서에서 사용된 바대로, 서열은 서열의 발현이 EMF의 존재에 의해 바뀔 때 "작동적으로 연결된 서열의 발현을 조절(modulate the expression of an operably linked sequence)"을 의미한다. EMF는, 이에 제한되는 것은 아니나, 프로모터 및 프로모터 조절서열(유도인자)을 포함한다. 한 종류의 EMF는 특이적 조절인자 또는 생리적 사건에 반응하는 작동적으로 연결된 ORF의 발현을 유도하는 핵산의 단편이다.

"재조합 발현 운반체 또는 벡터(recombinant expression vehicle or vector)"라는 용어는 DNA(RNA) 서열로부터 폴리펩티드를 발현시키는 플라스미드 또는 과지 또는 바이러스 또는 벡터를 의미한다. 발현 운반체는 (1) 유전적 인자 또는 예를 들어 프로모터, 인핸서 등의 유전자 발현시에 조절기능을 하는 인자의 집합체, (2) mRNA로 전사하여 단백질로 번역되는 구조적 또는 암호화 서열, (3) 적절한 전사 개시 및 종료 서열을 지닌 전사적 단위를 포함할 수 있다. 효모 또는 진핵 발현 시스템에 사용하려는 의도의 구조적 단위는, 바람직하게는 숙주세포에 의해 번역한 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 선도(leader) 서열을 포함한다. 선택적으로, 선도 또는 운반 서열 없이 재조합 단백질이 발현되는 장소에서, 아미노 말단 메티오닌 잔기를 포함할 것이다. 이 잔기는 결과적으로 최종 산물을 제공하는 발현된 재조합 단백질로부터 절단되거나 절단되지 않을 수 있다.

"재조합 발현 시스템(recombinant expression system)"이라는 용어는 재조합 전사 단위를 안정적으로 염색체 DNA에 병합시키거나 재조합 전사단위를 염색체 외부로 운반하는 숙주세포를 의미한다. 본 명세서에서 정의한 재조합 발현 시스템은 발현시킬 DNA 절편 또는 합성 유전자에 연결한 조절인자의 유도에 대한 이질적 폴리펩티드 또는 단백질을 발현할 수 있다. 이 용어는 또한 재조합 유전적 요소 및 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 등의 유전자 발현시 조절기능을 지닌 인자를 안정적으로 병합시키는 숙주세포를 의미한다. 본 명세서에서 정의한 재조합 발현 시스템은 발현시킬 내생적인 DNA 단편 또는 유전자에 연결한 조절인자의 유도시 세포에 내생적인 폴리펩티드 또는 단백질을 발현시킬 것이다. 세포는 원핵성 또는 진핵성일 수 있다.

"전이유전자(transgene)"라는 용어는 부분적으로 또는 전반적으로 이질적인, 예를 들어, 유전자 도입 동물 또는 유전자 도입한 세포에 대해 외부인, 또는 유전자 도입 동물 또는 유전자 도입한 세포의 내생적 유전자에 대하여 동질인, 그러나 삽입하려고 계획한, 또는 삽입한 예를 들어 본래 유전자와 다른 위치에서 삽입하는 세포의 지놈을 바꾸는 방법에서 동물의 지놈에 삽입한 핵산서열을 의미한다. 전이유전자는 하나 또는 그 이상의 전사적 조절서열 및 인트론(intron) 등의 선택된 핵산의 최적 발현에 필요한 다른 핵산에 작동가능하게 연결시킬 수 있다.

따라서, "전이유전자 구축물(transgene construct)"이라는 용어는 숙주동물의 지놈에서 삽입에 대한 전이유전자의 일반적 조작에 이용할 수 있는 전이유전자 및 선택적으로 전사적 조절서열, 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 위치, 복제 원점(replication origin), 마커(marker) 유전자 등의 다른 핵산서열을 포함하는 핵산을 의미한다.

본 명세서에서 "전이(transgenic)"라는 용어는 예를 들어, 전이유전자를 함유하는 동물 또는 구축물의 특성을 언급하는 형용사로서 이용된다. 예를 들어, 본 명세서에 사용된 대로, "전이동물(transgenic organism)"이라는 용어는 동물이고, 바람직하게는 사람이 아닌 포유동물로서, 동물의 하나 또는 그 이상의 세포는 당해 분야에 공지된 유전자 도입기술 등을 사람을 매개로 도입한 이질적인 핵산을 포함한다. 핵산은 미세주입 또는 재조합 바이러스의 감염을 이용한 신중한 유전적 조작을 이용하여 세포의 전구체로 직접 또는 간접적으로 세포에 도입한다. 핵산은 염색체 내에서 병합할 수 있거나 염색체 외부에서 DNA를 복제할 수 있다. 본 명세서에 기술한 유전자 도입 동물에서, 전이유전자(transgene)는 세포의 GIPF 단백질(GIPF protein) 발현 또는 과발현을 일으킨다.

"다분화능(pluripotent)"이라는 용어는 성체 생명체에 존재하는 다수의 분화된 세포 형태로 분화하는 세포의 능력을 의미한다. 다분화능 세포는 전분화능 세포(totipotent cell)와 비교하여 분화능력이 제한되어 있다.

"배아줄기세포(embryonic stem cells, ES)"라는 용어는 생식세포를 포함하는 배아 또는 성체에서 다수의 분화된 세포형태가 되는 세포를 의미한다. "생식선 줄기세포(germ line stem cells, GSCs)"라는 용어는 배우자 생산에 대하여 생식세포의 지속적인 근원을 제공하는 원시 줄기세포로부터 유래한 줄기세포를 의미한다. "원시 생식세포(primordial germ cells, PGCs)"라는 용어는 생식세포 및 다른 세포로 분화할 잠재성을 지닌 배발생 동안의 난황낭, 장간막 또는 생식선으로부터 특별히 다른 세포계통으로부터 다른 작은 세포군을 의미한다. PGCs는 GSCs 및 줄기세포가 유래한 근원이다. PGCs, GSCs 및 줄기세포는 자체-재생할 수 있다. 그래서, 이러한 세포는 생식선을 증식하고 성체 특화된 기관을 포함하는 과반수의 최종 분화된 세포를 만들 뿐 아니라, 자체를 재생할 수도 있다. "전분화능(totipotent)"이라는 용어는 성체의 모든 세포형태로 분화할 수 있는 세포의 능력을 의미한다. "다분화능(pluripotent)"이라는 용어는 성체에 존재하는 다수의 분화된 세포형태로 분화하는 세포의 능력을 의미한다. 다분화능 세포는 전분화능 세포와 비교하여 분화능력이 제한되어 있다.

"선택계(founder line)"과 "선택동물(founder animal)"이라는 용어는 전이유전자(transgene)가 삽입되는 배(embryo)들의 성숙한 산물을 의미한다. 즉, DNA가 삽입되고, 하나 또는 그 이상의 대리 숙주(surrogate host)로 이식될 배들로부터 성장한 동물들을 의미한다.

"자손(progeny)"과 "유전자 도입 동물의 자손(progeny of the transgenic animal)"이라는 용어는 최초의 형질전환 포유류 이후의 모든 세대의 특정한 또는 모든 자손을 의미한다.

"사람이 아닌 포유류(non-human mammal)"라는 용어는 사람을 제외한 포유류에 속하는 모든 동물을 의미한다. 포유류는 사람과 들쥐, 생쥐, 토끼, 돼지, 양, 염소, 소, 더 고등한 영장류 등의 가축, 동물원, 스포츠, 애완용 동물들을 포함하여, 포유강(mammalia)으로 분류되는 동물들을 의미한다.

"치료하다(treat)"나 "치료(treatment)"라는 용어는 화학요법이나 방사선 요법에 의해 유발된 대장염과 같이 예기치 않은 생리학적인 변화나 상태를 예방 또는 경감시키기 위한 목적을 가진 치료용, 예방용 수단들을 의미한다. 본 발명의 목적을 위하여, 유용하거나 바람직한 임상결과들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 탐지될 수 있는 아니든 증상의 경감, 병소의 감소, 병의 상태의 안정화를 포함한다.

"질환(disorder)"이라는 용어는 본 발명의 유전자도입 동물 모델을 사용하여 동정되는 분자를 이용하여 치료하는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 어떤 상태이다. 이것은 포유류를 의문의 질환에 걸리기 쉽게 하는 병리학적인 조건들을 포함한 만성과 급성 질환들 또는 질병들을 포함한다. 본 명세서에서 다루어질 질병들의 예들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 대장염, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 피부손상을 포함한다. 본 발명을 통해 치료하고자 하는 바람직한 질환은 대장염(mucositis)이다.

본 명세서에서 "염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)"이라는 용어는 소장이나 대장 어느 하나 또는 모두의 특발성(idiopathic) 또는 만성적인 염증성 질환을 의미하며, 크론병(Crohn's disease), 궤양 대장염(ulcerative colitis), 감염성 병원체에 의해 유발된 염증성 장 질환, 염증성 장 질환과 관련된 항생물질을 포함한다.

본 명세서에서 "대장염(Mucositis)"이라는 용어는 입인두(oropharynx)와 입술, 식도(esophagus), 및 대장과 소장을 포함한 소화관 점막의 감염을 의미한다.

본 명세서에서 "단장 증후군(Short Bowel Syndrome)" 또는 "SBS"라는 용어는 소장의 상당한 길이의 손실의 해부학적 또는 기능적 손실에서 기인한 영양실조를 의미한다.

"효과적인 양(effective amount)" 또는 "약학적으로 효과적인 양(pharmaceutically effective amount)"이라는 용어는 비독성이지만, 원하는 생물학적 결과를 나타내는 물질의 양이 충분한 것을 의미한다. 그 결과는 병징, 증상, 병인의 감소나 경감, 또는 다른 생물계(biological system)의 바람직한 변화이다. 예를 들어, 본 방법으로 사용되는 위장 증식인자(GIPF) 단편의 효과적인 양은 상피 세포를 자극이나 증식을 유발하기에 충분한 양이고, 바람직하게는 화학요법이나 방사선 요법에 의해 유발된 대장염, 감염성 장염, 또는 다른 질환들로부터 고통 받는 환자들의 위장 상피의 재생 증가를 유발하기에 충분한 양이다. 그러한 양들이 아래 기술되어 있다. 특정 개개인에 따른 적절한 "효과적인(effective)" 양은 일상적인 실험을 이용하여 사용되는 일반적인 기술 중 하나에 의해 결정될 것이다.

"약학적으로 허용되는(pharmaceutically acceptable)" 또는 "약리학적으로 허용되는(pharmacologically acceptable)"이라는 용어는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 물질이라는 의미이다. 즉, 그 물질은 어떤 예상치 못한 생물학적 효과를 일으키거나 그것이 포함된 담체의 조성물과 유해한 방식으로 반응하지 않고 개체에 투여될 수 있다.

"생리 수소이온 농도(physiological pH)" 또는 "생리적 범위에서의 수소이온 농도(pH in the physiological range)"라는 용어는 약 7.0에서 8.0을 포함하는 범위의 수소이온 농도를 의미한다. 바람직한 생리적 수소이온 농도는 약 7.2에서 7.6을 포함하는 범위이다.

본 명세서에 사용된 바대로, "개체(subject)"라는 용어는 포유류와 사람이외의 포유류(non-human mammal)를 포함한다. 포유류의 예들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 포유강(Mammalia class)의 구성원: 사람, 침팬지, 다른 유인원, 원숭이 중 등의 사람이 아닌 영장류; 소, 말, 양, 염소, 돼지 등의 농가축(farm animal); 토끼, 개, 고양이 등의 가축류(domestic

animal); 들쥐, 생쥐 등의 설치류, 기니아 피그(guinea pig) 등의 실험용 동물들을 포함한다. 사람이 아닌 포유류(non-human mammal)의 예들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 조류, 어류 등이다. 용어는 특정한 나이나 성별을 나타내지 않는다.

4.2 본 발명의 조성물

4.2.1 핵산 조성물

본 발명은 상피세포 성장인자 폴리펩티드, GIPF 및 소낭선 세포를 포함하여 장 상피세포의 성장 및 증식을 촉진하는 GIPF 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물의 발견에 기초한다. 따라서, 상피세포 증식 또는 재생의 촉진을 원하는 상태의 진단 및 치료에 대한 이러한 조성물의 이용을 계획하였다.

분리한 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177의 뉴클레오티드 중 어느 것을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 서열번호 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177의 전장 단백질 암호화 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; (예를 들어, 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 105 및 178을 암호화하는); 및, 서열번호 4의 폴리펩티드의 성숙 및 우점 성숙 단백질 암호 서열을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 이에 제한되는 것은 아니나, 엄격한 조건하에서 (a) 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177 중 어느 하나의 보체; (b) 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178의 어느 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; (c) 상기 나열된 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나의 대립형질 변이체인 폴리뉴클레오티드; (d) 상기 나열된 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나의 중 유사체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 또는 (e) 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 105 및 178에 대한 폴리뉴클레오티드의 특이적 영역(domain) 또는 절단체(truncation)를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 관심을 끄는 영역은 세포외, 경막(transmembrane) 또는 세포질 영역 또는 이들의 조합 및 기질 결합영역을 포함한다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 자연발생의 또는 전체적으로 또는 부분적으로 합성한 DNA, 예를 들어, cDNA, 지놈 DNA 및 RNA, 예를 들어, mRNA를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 cDNA의 암호화 부분의 전부를 포함할 수도 있고, cDNA의 암호화 부분의 일부를 나타낼 수도 있다.

또한, 본 발명은 본 명세서에 개시된 cDNA에 상응하는 유전자를 포함하는 조성물을 제공한다. 상응하는 유전자는 본 명세서에 개시된 서열정보를 이용하여 알려진 방법에 따라 분리할 수 있다. 이러한 방법은 적절한 지놈 라이브러리(library) 또는 유전 물질의 다른 출처에서의 유전자 확인 및 증폭에 대한 개시된 서열정보로부터의 탐침 또는 프라이머의 제조를 포함한다. 또한, 5' 및 3' 서열은 당업계에 공지된 방법에 따라 수득할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 중 어느 것에 상응하는 전장 cDNA 또는 지놈 DNA는 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177의 폴리뉴클레오티드 중 어느 것 또는 그들의 일부를 탐침으로 이용하는 적절한 혼성화 조건에서 적절한 cDNA 및 지놈 DNA를 검색하여 수득할 수 있다. 선택적으로, 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177의 폴리뉴클레오티드는 적절한 지놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리의 유전자 확인 및 증폭을 허용하는 적절한 프라이머에 대한 근거로 이용할 수 있다.

본 발명의 핵산서열은 dbEST, gbpr1 및 Unigene 등의 하나 또는 그 이상의 공용 데이터베이스(cDNA 및 지놈 서열을 포함하는)로부터 모을 수 있다. EST 서열은 검증한 서열정보, 시료 단편 또는 구분 정보 또는 전장 유전자에 대한 신규한 구분 정보를 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 나열된 폴리뉴클레오티드에 상당히 대응하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 상기 나열된 폴리뉴클레오티드에 대하여 최소 65%, 최소 70%, 최소 75%, 최소 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% 또는 89%, 좀더 통상적으로 최소 90%, 91%, 92%, 93% 또는 94% 및 아주 많이 통상적으로 최소 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동질성을 가질 수 있다.

본 발명의 핵산서열 범주에 포함되는 것은 서열번호 1, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 또는 177의 어느 하나의 뉴클레오티드 또는 단편은 약 5 뉴클레오티드보다 크고, 바람직하게는 7 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 9 뉴클레오티드보다 크고, 가장 바람직하게는 17뉴클레오티드보다 큰 이들의 보체에 대하여 엄격한 조건에서 혼성화하는 핵산서열 단편이다. 예를 들어, 선택적인(특이적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나에 혼성화

하는) 15, 17 또는 20 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 단편을 계획하였다. 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 혼성화할 수 있는 탐침은 사람의 유전자와 다른 종의 유전자를 구분할 수 있는 유전자의 같은 부류에서의 다른 폴리뉴클레오타이드 서열과 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열을 구별할 수 있고, 바람직하게는 독특한 뉴클레오타이드 서열에 근거하고 있다.

본 발명의 범주에 속하는 서열은, 이러한 특이적 서열에 제한되는 것은 아니나, 이들의 대립형질 변이 및 종 변이를 포함한다. 대립형질 및 종 변이는 임의적으로 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177이 제공하는 서열, 이들의 시료 단편 또는 같은 종의 다른 분리물의 서열을 가지는 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177에 대하여 최소 90% 동일한, 바람직하게는 95% 동일한 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 결정할 수 있다. 또한, 코돈 변이성을 수용하기 위해, 본 발명은 본 명세서에 개시된 특이적 ORF 등의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 달리 말해서, ORF의 암호화 부분에서, 같은 아미노산을 암호화하는 하나의 코돈의 다른 코돈으로의 치환은 특별히 고려하였다.

본 발명의 핵산에 대한 가장 근접한 결과는 알고리즘 또는 프로그램을 이용하여 데이터베이스를 검색하여 수득할 수 있다. 바람직하게는, Basic Local Alignment Search Tool을 대표하는 BLAST를 부분서열 정렬(local sequence alignment)을 찾기 위해 이용한다(참조: Altshul, S.F. J Mol. Evol. 36, 290-300(1993); 및 Altschul S.F. et.al. J. Mol. Biol. 21:403-410(1990)).

개시된 폴리뉴클레오타이드 및 단백질의 종 유사체(또는, ortholog)는 또한, 본 발명에서 제공한다. 종 유사체는 본 명세서에서 제공된 서열로부터 적절한 탐침 또는 프라이머를 만들고 바람직한 종으로부터 적절한 핵산 출처를 검색함으로써, 분리 및 확인한다.

본 발명은 또한, 개시된 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질의 대립형질 변이체를 포함한다. 이는, 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 것과 동일하거나 비슷하거나 또는 관련된 단백질을 암호화하는 분리된 폴리뉴클레오타이드의 자연 발생적인 다른 형태이다.

본 발명의 핵산서열은 또한, 상술한 핵산의 유사체를 암호화하는 서열을 지향한다. 이러한 아미노산 서열 유사체는 당업계에 잘 알려진 자연적인 또는 변이 폴리뉴클레오타이드로 적절한 뉴클레오타이드 변화를 도입하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 아미노산 서열 변이체의 구축에는 두 가지 변수(variable)가 있다: 변이의 위치(location of mutation) 및 변이의 본질(nature of mutation). 아미노산 서열 유사체를 암호화하는 핵산은 바람직하게는 자연적으로 발생하지 않는 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 변이시켜서 구축한다. 이러한 핵산의 변화는 다른 종(가변 위치, variable position) 또는 아주 잘 보존된 부분(고정영역, constant region)과는 핵산을 구분시키는 위치에서 형성한다. 이러한 위치는, 예를 들어, 첫째를 보존적 선택으로 치환하여(예를 들어, 다른 소수성 아미노산에 대하여 소수성 아미노산) 연속적으로 변경하고, 결실 또는 삽입은 목표위치(target site)에서 실시한다. 아미노산 서열의 결실은 일반적으로 1-30 잔기의 범위이며, 바람직하게는 1-10 잔기이고, 통상적으로 인접(contiguous)한다. 아미노산 삽입은 단일 또는 여러 개의 아미노산 잔기의 서열 내 삽입 뿐만 아니라, 길이가 하나에서 100 또는 그 이상의 잔기에 걸친 아미노(amino)- 또는 카복실(carboxyl)-말단 융합을 포함한다. 서열내 삽입은 일반적으로 1-10 아미노 잔기이며, 바람직하게는 1-5 잔기의 범위이다. 말단 삽입의 예는 다른 숙주세포에서의 분비 또는 세포내 표적화에 필요한 이질적인 신호서열 및 발현한 단백질 정제에 유용한 폴리-히스티딘(poly-histidine) 서열 등의 서열을 포함한다.

바람직한 방법에서는, 신규한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 위치-지향적 돌연변이생성(site-directed-mutagenesis)을 통해 변화시켰다. 이 방법은 변화시키고자 하는 위치의 다른 면에서 안정적인 이중성을 형성하는 변화한 아미노산의 양 측면의 충분한 인접 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 원하는 아미노산 변이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 바꾸는 올리고뉴클레오타이드 서열을 이용한다. 일반적으로, 위치-지향적 돌연변이생성의 기술은 당해분야에 잘 알려져 있고, 이 기술은 에델만 등(Edelman et al.)의 논문(DNA 2:183(1983))에 예시되어 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열 내에서 위치-특이적 변화를 만드는 다양하고 효율적인 방법은 졸러와 스미스(Zoller and Smith)의 논문 *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500(1982)에 개시되어 있다. PCR은 또한, 신규한 핵산의 아미노산 서열 변이체를 만들 때 이용할 수 있다. 소량의 주형 DNA를 시작 물질로 이용할 때, 주형 DNA의 대응 부분과 서열이 조금 다른 프라이머는 원하는 아미노산 변이체를 만들 수 있다. PCR 증폭은 결과적으로 프라이머에 의한 특이적인 위치에서 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 주형과 다른 DNA 단편 산물이 집단이 된다. DNA 단편 산물은 플라스미드 내의 대응하는 위치를 대체하고 이는 원하는 아미노산 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

또한, 아미노산 변이체를 생산하는 기술은 웰스 등(Wells et al.)의 논문 *Gene* 34:315(1985)에 언급한 카세트(cassette) 돌연변이생성이다; 다른 돌연변이생성 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, Sambrook et al., supra, and *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.에 기술된 것이다. 유전자 코드(genetic code)의 고유의 축퇴(inherent

degeneracy) 때문에, 상당히 동일하거나 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 암호화하는 다른 DNA 서열은 이러한 신규 핵산의 클로닝 및 발현에 대한 발명의 실행시 이용할 수 있다. 이러한 DNA 서열은 엄격한 조건에서 적절한 신규 핵산서열에 혼성화할 수 있는 것들을 포함한다.

본 발명의 바람직한 폴리펩티드 절단체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명 도는 이질적인 단백질 서열을 가지는 하나 또는 그 이상의 영역(domain)을 포함하는 키메라 또는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 생산하기 위해 이용할 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 추가적으로 상기 나열한 폴리뉴클레오티드들의 보체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 DNA(지놈, cDNA, 증폭 또는 합성한) 또는 RNA이다. 이러한 폴리뉴클레오티드를 수득하는 방법과 알고리즘은 당업자들에게 잘 알려져 있고, 예를 들어, 임의적으로 원하는 서열 동질성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 분리할 수 있는 혼성화 조건을 결정하는 방법을 포함한다.

본 발명에 따르면, 우점 성숙(dominant mature) 또는 성숙 단백질을 암호화하는 서열을 구성하며, 서열번호 6 또는 8 중 한 가지 또는 이들의 기능적 등가물(functional equivalent)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은, 적절한 숙주세포에서 이 핵산의 발현 또는 이들의 기능적 등가물의 발현을 지시하는 재조합 DNA 분자의 생산에 이용할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 동정된 클론의 cDNA 삽입체를 포함한다.

본 발명에 따르는 폴리뉴클레오티드는 잘 설정한 재조합 DNA 기술(Sambrook J et al.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 참조)에 의해 다른 다양한 뉴클레오티드 서열에 결합시킬 수 있다. 폴리뉴클레오티드 결합을 위한 유용한 뉴클레오티드 서열은 벡터의 분류, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 유도체, 파지미드 및 당업계에 잘 알려진 것들을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주세포를 제공한다. 일반적으로, 벡터는 최소한 하나의 생명체에서 작용하는 복제 원점, 유용한 제한효소 위치 및 숙주세포에 대한 선택적 표지자를 포함한다. 본 발명에 따른 벡터는 발현벡터, 복제 벡터, 탐침생성(probe generation) 벡터 및 서열분석 벡터를 포함한다. 본 발명에 따른 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포이고, 단세포 생명체 또는 다세포 생명체의 일부일 수 있다.

또한, 본 발명은 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102 및 177의 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나를 가지는 핵산 또는 이들의 단편 또는 다른 GIPF 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 구축물을 제공한다. 한가지 실시예에 의하면, 본 발명의 재조합 구축물은 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177의 뉴클레오티드 중 어느 하나를 지니는 핵산 또는 이들의 단편이 삽입된 플라스미드나 바이러스 벡터 등의 벡터를 포함한다. 본 발명의 ORF 중 하나를 포함하는 벡터의 경우, 벡터는 또한, 예를 들어, ORF에 기능적으로 연결된 프로모터를 지니는 조절서열을 포함한다. 다수의 적절한 벡터 및 프로모터가 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하며 본 발명의 재조합 구축물의 생산에 유용하다. 그 예로서 다음의 벡터가 있다. 세균성: pBs, phagescript, PsiX74, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a(Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5(Pharmacia). 진핵성: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXTI, pSG(Staratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVL(Pharmacia). 한가지 실시예에 의하면, 서열번호 3의 핵산을 실시예에 언급한 대로 본 발명의 CkP2KI 벡터로 삽입한다.

분리된 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단백질을 재조합적으로 생산하기 위하여, 카우프만 등(Kaufman et al.)의 *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490(1991) 논문에서 개시된 pMT2 또는 pED 발현벡터 등의 발현 조절서열에 작동적으로 연결된다. 많은 적절한 발현 조절서열은 당업계에 잘 알려져 있다. 재조합 단백질을 발현시키는 일반적인 방법이 R.Kaufman. *Methods in Enzymology* 185, 537-566(1990)에 개시되어 있고, 예시한다. 본 명세서에서 정의하였듯이, "작동적으로 연결된(operably linked)"의 의미는 분리된 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 발현 조절서열이 연결한 폴리뉴클레오티드/발현 조절서열로 형질전환된 숙주세포에 의해 단백질이 발현하는 방식으로 벡터나 세포내에 위치한다는 의미이다.

프로모터 부분은 CAT(chloramphenicol transferase) 벡터 또는 선택 표지자를 가지는 다른 벡터를 이용하여 원하는 유전자로부터 선택할 수 있다. 두 가지 적절한 벡터는 pKK232-8 및 pCM7이다. 특히 명명된 세균의 프로모터는 lac I, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR 및 trc를 포함한다. 진핵세포 프로모터는 CMV 초기 즉시(immediate early), HSV 티미딘 키나제(thymidine kinase), 초기 및 만기(early and late) SV40, 레트로바이러스(retrovirus)로부터의 LTRs, 마우스 메탈로티오네인-I(mouse metallothionein-I)을 포함한다. 적절한 벡터의 프로모터의 선택은 당해분야의 평범한 기술 수준 이내에 있다. 일반적으로, 재조합 발현벡터는 숙주세포의 형질전환을 허용하는 복제 원점 및 선택 표지자, 예를 들어, 대장균의 암피실린(ampicillin) 저항성 유전자 및 *S. cerevisiae* TRP1 유전자, 아래 부분의 구조적 서열의 직접적인 전사를 위해 잘 발현되는 유전자로부터 유래한 프로모터를 포함할 수 있다. 이러한 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제(3-

phosphoglycerate kinase, PGK) 등의 당분해 효소, a-인자(a-factor), 산 인산가수분해효소(acid phosphatase), 또는 열충격 단백질(heat shock protein)을 암호화하는 오페론으로부터 유래한다. 이질적인 구조 서열은 번역 개시 및 종료 서열을 가지고, 바람직하게는 번역된 단백질을 세포질(periplasmic) 공간 또는 세포의 배지로 분비를 지령할 수 있는 리더(leader) 서열을 가지는 적절한 단계에서 모여 있다. 선택적으로, 이질적인 서열은 원하는 특성, 예를 들어, 발현된 재조합 생산물의 안정화 및 단순화한 정제를 전달하는 아마노 말단의 확인을 포함하는 융합 단백질을 암호화할 수 있다. 세균용의 유용한 발현백터는 기능적 프로모터를 가지는 작동적인 해독(reading) 단계에서 적절한 번역 개시 및 종료 신호 및 원하는 단백질을 암호화하는 구조적 DNA 서열을 삽입하여 구축한다. 본 백터는 하나 또는 그 이상의 표현형적 선택 표지자 및 바람직하게는 백터의 유지를 확신하고, 숙주 내에서 증폭을 제공하는 복제 원점을 포함할 수 있다. 다른 것들은 선택의 문제일지라도, 형질전환을 위한 적절한 원핵 숙주는 *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* 및 *Pseudomonas*, *Streptomyces*, 및 *Staphylococcus* 속 내의 다양한 종을 포함한다.

대표적이기는 하지만, 이에 제한되지 않는 실시예로서, 세균용의 유용한 발현백터는 선택 표지자(selectable marker) 및 잘 알려진 클로닝 백터 pBR322(ATCC 37017)의 유전 요소를 포함하는 상업적으로 입수가 가능한 플라스미드로부터 유래한 세균의 복제 원점을 포함할 수 있다. 이러한 상업용 백터는, 예를 들어, pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 및 GEM 1(Promega Biotech, Madison, WI, USA)를 포함한다. 이러한 pBR322 "골격(backbone)" 절편은 적절한 프로모터 및 발현시키기 위한 구조적 서열에 결합한다. 적절한 숙주 종의 형질전환 및 적절한 세포 밀도로의 숙주 종의 성장 이후에, 선택한 프로모터를 유도하거나 또는 적절한 방법(예를 들어, 온도변화 또는 화학적 유도)으로 유도하거나 발현-활성화시킨다. 세포는 통상적으로 원심분리로 수집하고, 물리적 화학적 방법으로 분쇄시켜, 그 결과 천연의 추출물은 차후의 정제를 위해 보존한다.

본 발명을 실시하는데 있어서의 발현백터의 이용 이외에도, 본 발명은 또한, 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 조성물을 포함하는 신규한 발현백터를 포함한다. 이러한 백터의 한가지 예는 실시예 8에서 설명한 pcDNA/백터이다.

4.2.2 숙 주

또한, 본 발명은, 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 클로닝 백터 또는 발현백터인 본 발명의 백터로 유전적 조작한 숙주세포를 제공한다. 예를 들어, 이러한 숙주세포는 알려진 형질전환(transformation), 형질전이(transfection) 또는 감염(infection) 방법을 이용하여 숙주세포로 도입한 본 발명의 핵산을 포함할 수 있다. 그 백터는 아마도 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 입자, 파지 등의 형태일 수 있다. 작제된 숙주세포는 프로모터 활성화, 형질전환체의 선별 또는 GIPF 유전자 증폭에 적절하게 수정한 통상적인 영양배지에 배양할 수 있다. 온도, pH 등의 배양조건들은 이미 발현을 위해 선택한 숙주세포에 사용한 조건들이고, 당업자들에게 있어서는 명백한 것이다. 또한, 본 발명은 세포 내의 폴리뉴클레오티드의 발현을 이끄는 숙주세포에 이질적인 조절서열과 작동적으로 결합하고 있는(in operative association) 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키도록 유전적으로 조작한 숙주세포를 제공한다.

숙주세포는 포유동물 세포 등의 고등 진핵 숙주세포일 수도 있고, 효모 세포 등의 하등 진핵 숙주세포일 수도 있지만 숙주세포는 세균 세포 등의 원핵세포일 수도 있다. 숙주세포로 재조합 구축물의 도입은 인산칼슘(calcium phosphate) 형질전환, DEAE, 덱스트란(dextran) 매개(mediated) 형질전환, 또는 전기천공에 의해 효과적일 수 있다(참조: Davis, L et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986)). 본 발명의 폴리뉴클레오티드 중 하나를 포함하는 숙주세포는, 통상적 방법으로 분리한 단편(ORP의 경우)에 의해 암호화된 유전자 산물을 생산할 때 이용할 수도 있고, EMF의 조절 하에 이질적인 단백질을 생산하는데 이용할 수도 있다.

어떠한 숙주/백터 시스템이라도 GIPF 폴리펩티드의 하나 또는 그 이상을 발현시키도록 이용할 수 있다. 이는, 이에 제한되는 것은 아니나, *E.coli* 및 *B.subtilis* 등의 원핵세포뿐만 아니라, Hela 세포, Cv-1 세포, COS 세포 및 Sf9 세포 등의 진핵 숙주를 포함한다. 가장 우수한 세포는 특별한 폴리펩티드나 단백질을 정상적으로 발현시킬 수 없는 세포이거나, 낮은 자연적 수준으로 폴리펩티드 또는 단백질을 발현시키는 세포이다. 성숙한 단백질은 포유동물 세포, 효모, 세균 또는 적절한 프로모터의 조절을 받는 다른 세포에서 발현할 수 있다. 또한, 무세포(cell-free) 번역 시스템이 본 발명의 DNA 구축물로부터 유래한 RNA를 이용한 이러한 단백질을 생산하는데 사용할 수 있다. 원핵 또는 진핵 숙주를 이용하는데 적절한 클로닝 또는 발현백터는, 본 명세서에 참고문헌으로 언급된 Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York(1989)에 개시되어 있다.

다양한 포유동물 세포배양 시스템은 재조합 단백질을 발현시키는데 사용할 수 있다. 포유동물 발현 시스템의 실시예는 Gluzman, Cell 23:175(1981)이 언급한 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 계열과 적절한 백터를 발현시킬 수 있는 다른 세포계열, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, Hela 및 BHK 세포계열을 포함한다. 포유동물 발현백터는 복제 원점, 적절한 프

로모터를 포함할 수 있고, 또한, 필요한 리보솜 결합 위치, 폴리아데닐화(polyadenylation) 위치, 접합 공여 및 수용 위치, 전사 종료 서열 및 5' 인접한 비전사 서열을 포함할 수 있다. SV40 바이러스 지놈, 예를 들어, SV40 원점, 초기(early) 프로모터, 인핸서(enhancer), 접합(splice) 및 폴리아데닐화 위치로부터 유래한 DNA 서열은 필요한 비전사 유전적 조성물을 제공하는데 이용할 수 있다. 세균배양에 의해 생산되는 재조합 폴리펩티드 및 단백질은 흔히 한 번 또는 그 이상의 염색(salting-out), 수용액 이온교환 및 크기배제 크로마토그래피 단계 후에 세포 덩어리(pellet)로부터 초기 추출에 의해 분리된다. 단백질 재결합(refolding) 단계는 필요하다면 성숙 단백질의 배치를 완성하는데 이용할 수 있다. 최종적으로, HPLC (high performance liquid chromatography)를 마지막 정제단계에서 사용할 수 있다. 단백질 발현에 사용한 세균 세포는 냉동-해동 반복, 초음파분해, 기계적 분해 및 세포용해 물질의 이용을 포함하는 유용한 방법에 의해 분쇄시킬 수 있다.

다양한 형태의 세포는 단백질 발현을 위한 적절한 숙주세포로 작용할 수 있다. 포유동물 숙주세포는 예를 들어, 원숭이 COS 세포, 사람의 상피 A421 세포, 사람의 Colo205 세포, CV-1 세포, 다른 형질전환된 영장류 세포 계열, 정상적인 이핵성 세포, primary 조직의 실험적 조건 배양으로부터 유래한 세포 주, Hela 세포, 마우스 L 세포, BHK, HL-60, U937, HaK 또는 Jurkat 세포를 포함한다. 바람직하게는, GIPF 단백질은 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포 및 사람 배아 신장(Human embryonic kidney) 293 세포에서 발현시켰다.

달리 말해서, 효모 등의 하등 진핵생물 또는 세균 등의 원핵생물에서 단백질을 생산하는 일이 가능할 수 있다. 잠재적으로 적절한 효모 종은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces strains*, *Candida*, *Pichia pastoris* 또는 이질적 단백질을 발현시킬 수 있는 다른 효모 종을 포함한다. 잠재적으로 적절한 세균 종은 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, 또는 이질적 단백질을 발현시킬 수 있는 다른 세균 종을 포함한다. 효모나 세균에서 단백질을 만들었다면, 기능적 단백질을 수득하기 위해서 거기서 생산한 단백질의 변형, 예를 들어, 적절한 위치에서의 인산화 또는 당질화에 대한 필요성이 있다. 이러한 공유성 부착은 알려진 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 완성할 수 있다.

4.2.3. 키메라 단백질 및 융합 단백질

또한, 본 발명은 GIPF 키메라 또는 융합 단백질을 제공한다. 본 명세서에 사용하였듯이, GIPF "키메라 단백질(chimeric protein)" 또는 "융합 단백질(fusion protein)"은 GIPF 아닌 폴리펩티드에 작동적으로 연결된 GIPF 폴리펩티드를 포함한다. "GIPF 폴리펩티드(GIPF polypeptide)"는 GIPF 단백질에 대응하는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드이다. 반면 "GIPF 아닌 폴리펩티드(non-GIPF protein)"는 GIPF 단백질과 상당히 유사하지 않은 단백질, 예를 들어, GIPF와 다르며 같은 또는 다른 생명체에서 유래한 단백질에 대응하는 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드이다. GIPF 융합 단백질내에서, GIPF 폴리펩티드는 GIPF 단백질의 전부 또는 일부에 상응할 수 있다. 한가지 실시예에 의하면, GIPF 융합 단백질은 GIPF 단백질의 최소 하나의 생물학적 활성 부분을 포함한다. 또 다른 실시예에 의하면, GIPF 융합 단백질은 최소한 GIPF 단백질의 2 가지 생물학적 활성 부분을 포함한다. 다른 실시예에 의하면, GIPF 융합 단백질은 GIPF 단백질의 최소 3 가지 생물학적 활성 부분을 포함한다. 융합 단백질 내에서, 용어 "작동적으로 연결된(operably linked)"은 GIPF 폴리펩티드 및 GIPF 아닌 폴리펩티드가 서로 골격에 맞춰 융합하였음을 설명하기 위한 의도이다. GIPF 아닌 폴리펩티드는 GIPF 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합할 수 있다.

한가지 실시예에 의하면, 융합 단백질은 GIPF 서열이 GST(glutathione S-transferase) 서열의 C-말단에 융합한 GST-GIPF 융합 단백질이다. 이러한 융합 단백질은 재조합 GIPF 폴리펩티드의 정제를 촉진시킬 수 있다. 다른 실시예에 의하면, 융합 단백질은 자체의 N-말단에 이질적인 신호서열을 포함하는 GIPF 단백질이다. 특정 숙주세포에서(예를 들어, 포유동물 숙주세포), GIPF의 발현 및 분비는 이질적인 신호서열의 이용을 통해 증가시킬 수 있다. 바람직하게는, GIPF 폴리펩티드는 항-V5 항체를 이용한 쉬운 검색 및 실시예에 언급한 대로 빠른 정제를 위해 V5-His tag에 융합시켰다.

본 발명의 GIPF 키메라 또는 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다. 예를 들어, 다른 폴리펩티드 서열을 암호화하는 DNA 단편은 통상적 기술, 예를 들어, 연결을 위한 평활말단(blunt-ended) 또는 부착말단(staggered ended)의 이용, 적절한 말단을 제공하는 제한효소 절단, 적절한 점착(cohesive) 말단을 채우는 것(filling in), 원하지 않는 결합을 피하기 위한 알칼리 인산가수분해효소 처리 및 효소적 연결에 부합하여 골격에 맞게 함께 연결시킨다. 또 다른 실시예에 의하면, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기를 포함하는 통상적 기술에 의해 합성할 수 있다. 선택적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 결과적으로 결합하여 키메라 유전자 서열을 생산하도록 재증폭할 수 있는 두 개의 연속된 유전자 단편 사이에 상보적인 돌출부(complementary overhang)를 형성하는 고정 프라이머(anchor primer)를 이용하여 실시할 수 있다(예를 들어, Ausubel, et al.(eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992 참조). 더욱이, 이미 융합영역(예를 들어, GST 폴리펩티드)을 암호화하고 있는 많은 발현벡터들이 상업적으로 입수가능하다. GIPF 암호화 핵산은 융합 일부분이 GIPF 단백질과 골격에 맞게 연결되도록 이러한 발현벡터에 연결시킬 수 있다.

4.2.4. 폴리펩티드 조성물

본 발명의 의약 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178 중 어느 하나에 개시된 아미노산 서열, 또는 뉴클레오티드 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 및 177 중 어느 하나에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드를 포함하는 분리한 GIPF 폴리펩티드를 포함한다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 (a) 서열번호 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102 및 104에 설정한 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나를 가지는 폴리뉴클레오티드 또는 (b) 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178에 설정한 아미노산 서열 중 어느 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 (c) 엄격한 혼성화 조건에서 (a) 또는 (b)의 폴리뉴클레오티드의 보체에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화하는 생물학적 또는 면역학적 활성을 가지는 폴리펩티드를 포함한다. 또한, 본 발명은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105 또는 178; 및 생물학적 활성을 보유한 그들의 "실체적 등가물(substantial equivalents)"(예를 들어, 최소한 약 65%, 최소한 약 70%, 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 일반적으로 최소한 약 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 좀 더 일반적으로 최소한 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%, 가장 일반적으로는 약 99% 아미노산 동질성)에 설정한 아미노산 서열 중 어느 하나의 생물학적 또는 면역학적으로 활성화된 변이체를 제공한다. 대립형질 변이체가 암호화하는 폴리펩티드는 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 또는 178을 포함하는 폴리펩티드와 비교하여 유사한, 증가된, 또는 감소된 활성을 지닐 수 있다.

생물학적 활성을 보여줄 수 있는 본 발명의 단백질 단편은 또한, 본 발명에 의해 포함되어 있다. 단백질의 단편은 공지된 방법, 예를 들어, 본 명세서에 참고문헌으로 언급된 H. U. Saragovi, et. al., Bio/Technology 10, 773-778(1992) 및 R. S. McDowell, et al., J. Amer. Chem. Soc. 114, 9245-9253(1992)에 개시된 방법에 의해 선형화되거나 환형화될 수 있다. 이러한 단편은 단백질 결합 위치의 원자가(valency)를 증가시키는 것을 포함하여, 다양한 목적을 위해 면역글로블린 등의 운반체 분자에 융합시킬 수 있다.

본 발명은 또한, 본 명세서에 개시된 단백질의 전장(full-length) 및 우점 성숙(dominant mature) 형태(예를 들면, 신호서열이나 전구체 서열이 없는) 또는 성숙(mature) 형태(예를 들면, 신호서열 및 푸린(furin) 절단부위가 없는)를 제공한다. 단백질 암호화 서열은 개시된 뉴클레오티드 서열의 번역에 의해 나열한 서열에서 확인한다. 이러한 단백질의 성숙형태는 적절한 포유동물 세포 또는 다른 숙주세포에서 전장 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 수득할 수 있다. 단백질의 성숙형태의 서열은 또한, 전장 형태의 아미노산 서열로부터 결정할 수 있다.

또한, 본 발명의 단백질 조성물은, 예를 들어, 친수성의, 약학적으로 허용되는 담체 등의 적절한 담체를 포함할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 핵산 단편에 의해서 또는 본 발명의 핵산 단편의 축퇴 변이체에 의해 암호화된 분리한 폴리펩티드를 제공한다. "축퇴 변이체(degenerative variant)"는 본 발명의 핵산 단편(예를 들어, ORF)과는 다른 뉴클레오티드이지만 유전자 코드의 축퇴(degeneracy) 때문에 동일한 폴리펩티드 서열을 암호화한다. 본 발명의 바람직한 핵산 단편은 단백질을 암호화하는 ORFs였다.

당업계에 공지된 다양한 방법들이 분리된 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질을 수득하는데 이용할 수 있다. 가장 단순하게는, 아미노산 서열은 상업적으로 입수가능한 펩타이드 합성기를 이용하여 합성할 수 있다. 합성에 의해 구축한 단백질 서열은 단백질과 1차, 2차 또는 3차의 구조적, 형태적 특징을 공유하는 장점에 의해, 단백질 활성을 포함하여 공통적인 생물학적 특성을 지닐 수 있다. 이러한 기술은 특히 작은 펩티드 및 큰 폴리펩티드의 단편을 생산하는데 있어서 유용하다. 예를 들어, 이러한 단편들은 본래의 폴리펩티드에 대한 항체를 생산하는데 유용하다. 따라서, 단편은 치료 화합물의 검색 및 항체의 발달에 대한 면역학적 과정에서 자연적인 정제 단백질에 대한 생물학적으로 활성을 지니거나 면역학적인 치환체로서 사용할 수 있다.

선택적으로, 본 발명의 폴리펩티드 및 단백질은 원하는 폴리펩티드 또는 단백질을 발현시키도록 변형시킨 세포로부터 정제할 수 있다. 본 발명에서 사용된 대로, 유전적 조작을 통해 세포가 정상적으로는 생산할 수 없는, 또는 세포가 정상적으로는 매우 적은 양을 생산하는 폴리펩티드 또는 단백질을 생산하도록 만들어졌을 때, 세포를 원하는 폴리펩티드 또는 단백질을 발현하도록 변형시킬 수 있다. 당업자라면 용이하게 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질의 하나를 생산하는 세포를 만들기 위해 진핵 또는 원핵세포로 재조합 또는 합성한 서열을 도입 및 발현시키는 과정에 적용할 수 있다.

본 발명은 또한, 적절한 배양배지에서 본 발명의 숙주세포배양 증가 및 세포 또는 세포가 자라는 배지로부터 단백질을 정제를 포함하는 폴리펩티드 생산방법에 관련되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 적

절한 발현백터가 있는 숙주세포가 암호화한 폴리펩티드의 발현을 허용하는 조건에서 배양하였을 때 폴리펩티드를 생산하는 과정을 포함한다. 폴리펩티드는 배양으로부터, 배양배지로부터 분리하게, 또는 숙주세포에서 준비하여 정제된 용해물로부터 회수할 수 있다. 바람직한 실시예는 이러한 과정에 의해 생산한 단백질이 전장 또는 단백질의 성숙한 형태인 것을 포함한다.

선택적으로, 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질은 폴리펩티드 또는 단백질을 생산하기 위한 GIPF-암호화 DNA로 형질전환된 세균의 세포로부터 정제된다. 당업자는 분리된 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질의 어느 한 가지를 수득하기 위해, 폴리펩티드 및 단백질 분리를 위한 알려진 방법을 용이하게 따른다. 이러한 방법들은, 이에 제한되는 것은 아니나, 면역크로마토그래피, HPLC, 크기-배제 크로마토그래피를 포함한다. 예를 들어, *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Spriner-Verlag(1994); Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology* 참조하라. 생물학적/면역학적 활성을 보유한 폴리펩티드 단편은 약 100 아미노산보다 크거나 약 200 아미노산보다 큰 단편 및 특이적인 단백질 영역을 암호화하는 단편을 포함한다.

정제된 폴리펩티드는 폴리펩티드에 결합하는 분자를 확인하기 위해 당업계에 잘 알려진 실험실 조건에서의 결합실험에 이용할 수 있다. 이러한 분자는, 이에 제한되는 것은 아니나, 조합 라이브러리, 항체 또는 다른 단백질로부터의 작은 분자, 분자에 대한 것을 포함한다. 결합실험에서 확인한 분자는 당업계에 잘 알려진 생체 조건에서의 조직배양 또는 동물모델에서 길항약(antagonist) 또는 효능약(agonist)의 활성에 대하여 검사한다. 요약하면, 분자는 대다수 세포배양 또는 동물에 대하여 적정하고, 그후에 세포/동물의 죽음 또는 동물/세포의 생존연장에 대하여 시험한다.

또한, 본 발명의 단백질은 유전자 도입 동물, 예를 들어 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 체세포 또는 생식세포에 의해 특성화한 유전자 도입 소, 염소, 돼지 또는 양의 산물로서 발현시킬 수 있다.

본 발명에서 제공하는 단백질은 또한, 정제된 단백질과 유사한 아미노산 서열에 의해 특성화한 단백질을 포함하지만, 변형이 자연적으로 제공되거나 자유롭게 조작할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 또는 DNA 서열에서의 변형은 알려진 기술을 이용하여 당업자에 의해 실행할 수 있다. 단백질 서열에서의 관심있는 변형(modification)은 암호화 서열 내에서 선택한 아미노산 잔기의 변화(alteration), 치환(substitution), 교환(replacement), 삽입(insertion) 및 결실(deletion)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 분자의 형태를 바꾸기 위해 시스테인 잔기 하나 또는 그 이상을 결실 또는 다른 아미노산으로 교환할 수 있다. 이러한 변화, 치환, 교환, 삽입 및 결실에 대한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국특허 제 4, 518, 584호 참조). 바람직하게는, 이러한 변화, 치환, 교환, 삽입 및 결실은 단백질의 원하는 활성을 포함하고 있다. 단백질 기능에 중요한 단백질의 부분은 단일 아미노산 또는 연속한 아미노산을 알라닌으로 전반적으로 치환한 후, 생물학적 활성에 대해 알라닌-함유 변이체(alanine-containing variant)의 시험을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정할 수 있다. 이러한 형식의 분석은 생물학적 활성에서 치환한 아미노산의 중요성을 알려 주었다. 단백질 기능에 중요한 단백질 부분은 eMATRIX 프로그램에 의해 결정할 수 있다.

전체적 또는 부분적으로 단백질 활성을 갖도록 하고 검색 및 다른 면역학적 방법에 유용한 단백질 서열의 다른 단편이나 유도체는 또한, 본 명세서에 기재된 당업자에 잘 알려진 방법에 의해 쉽게 만들 수 있다. 본 발명은 그러한 변형을 포함한다.

단백질은 또한, 하나 또는 그 이상의 곤충 발현백터내의 적절한 조절서열에 대해 본 발명의 분리한 폴리뉴클레오티드를 기능적 연결 및 곤충 발현 시스템을 이용하여 생산할 수 있다. Baculovirus/곤충세포 발현 시스템에 대한 재료와 방법은 예를 들어 Invitrogen, San Diego, Calif. U.S.A.(the MaxBatTM kit)의 키트 형태로 상업적으로 입수가 가능하고, 이러한 방법은 본 명세서의 참고문헌에 의한 Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987)에서 언급한 대로 당해분야에 잘 알려져 있다. 본 발명에서 사용한 대로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있는 곤충 세포는 "형질전환(transformed)" 시켰다.

본 발명의 단백질은 재조합 단백질을 발현시키기에 적합한 배양 조건에서 형질 전환한 숙주 세포를 배양하여 제조할 수 있다. 그 결과 발현한 단백질은 젤 여과 및 이온 교환 크로마토그래피 등의 알려진 정제 과정을 이용하여 이러한 배양(예를 들어 배양 배지 또는 세포 추출물)에서 정제한다. 단백질 정제는 또한, 단백질에 결합하는 물질을 지닌 흡착 컬럼을 포함할 수 있다.; concanavalin A-agarose, heparin-toyopearlTM 또는 Cibacrom blue 3 GA SepharoseTM 등의 흡착 수지에 대한 하나 또는 그 이상의 컬럼 단계; phenyl ether, butyl ether, 또는 propyl ether 등의 수지를 이용한 소수성 반응 크로마토그래피를 포함하는 하나 또는 그 이상의 단계; 또는 면역흡착 크로마토그래피.

다른 방법으로써, 본 발명의 단백질은 또한, 정제를 촉진하는 형태로 발현할 수 있다. 예를 들어, MBP(maltose binding protein), GST(glutathione-S-transferase) 또는 TRX(thioredoxin) 또는 His tag 등의 융합 단백질로써 발현시킬 수 있다. 이러한 융합 단백질의 발현 및 정제에 대한 키트는 각각 New England BioLab(Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) 및 Invitrogen에서 구입할 수 있다. 단백질은 또한, 항원요소로 표지하여 그 후에 그러한 항원요소에 대한 특이적 항체를 이용하여 정제할 수 있다. 하나의 그러한 항원표지자("FLAG?")은 상업적으로 Kodak(New Haven, Conn.)에서 입수가 가능하다.

최종적으로, 소수성 역-상 HPLC, 예를 들어 부속물로 메틸 또는 다른 사슬모양의 그룹을 지닌 실리카 젤을 이용한 하나 또는 그 이상의 역-상 HPLC 단계는 또한, 단백질 정제에 이용할 수 있다. 다양한 조합에서 이후의 정제 단계 일부 또는 전부는 또한, 상당한 균질의 분리한 재조합 단백질 제공에 이용할 수 있다. 그후, 정제한 단백질은 다른 포유동물 단백질과 아주 다르며 본 발명에 따라 "분리한 단백질(isolated protein)"로 정의하였다.

본 발명의 폴리펩타이드는 GIPF 유사체를 포함한다. 이는 결실, 삽입 또는 치환한 하나 또는 그 이상의 아미노산으로 구성된 GIPF 폴리펩티드 뿐만 아니라 GIPF 폴리펩티드 단편을 포함한다. 또한, 본 발명의 GIPF 폴리펩티드 유사체는 GIPF 폴리펩티드의 융합체 또는 GIPF 폴리펩티드의 변형체를 포함하였고, GIPF 폴리펩티드 또는 유사체는 다른 일부분, 예를 들어 표적자 일부분 또는 다른 치료용 물질에 융합시켰다. 이러한 유사체는 활성이나 안정성 등의 특성이 향상되었음을 보여주었다. GIPF 폴리펩티드 또는 유사체에 융합시킨 일부분의 예는 소장으로의 폴리펩티드 운반을 제공하는 표적 일부분, 예를 들어 소장에 대한 항체, 또는 위장 세포에 발현하는 수용체나 리간드에 대한 항체들을 포함한다. GIPF 폴리펩티드에 융합시킬 수 있는 다른 부분(moiety)은 예를 들어 위장 질환에 대한 사이토카인 또는 다른 약물 및 본 명세서에 기재한 다른 상태의 처치에 이용하는 치료제를 포함한다.

4.2.5. 유전자 치료법

본 발명은 본 명세서에서 기재된 질병을 치료하는 유전자 치료법을 제공한다. 적절한 세포로 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 기능적 유전자의 운반은 벡터, 특히 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, 아데노바이러스-의존 바이러스, 또는 레트로바이러스)에 의한 생체의(ex vivo), 제자리(in situ), 또는 생체(in vivo) 조건에서 효과가 있고, 또는 물리적인 DNA 운반방법(예를 들어, 리포솜 또는 화학 처리)에 의해서는 생체의 조건에서 효과가 있다. 예를 들어, Anderson, Nature, supplement to vol.392, no. 6679, pp25-20(1998)을 참조하라. 그 외에도, 유전자 치료법의 기술적 개관은 Friedmann, Science, 244:1275-1281(1989); Verma, Scientific American:68-84(1990); 및 Millern Nature, 357:455-460(1992)를 참조하라.

상술한 바와 같이, "벡터(vector)"는 숙주세포로 본 발명에 따르는 핵산의 운반수단이다. 바람직한 벡터로는 레트로바이러스(retrovirus), 헤르페스 바이러스(herpes virus), 아데노바이러스 및 아데노바이러스-의존 바이러스 등 바이러스 벡터가 있다. GIPF 단백질 또는 그 폴리펩티드 영역 단편을 암호화하는 유전자 또는 핵산서열을 바이러스 벡터를 이용한 생체 조건, 생체의 조건 또는 실험실 조건에서 도입하거나 DNA를 직접 도입시켰다. 목표 조직에서의 발현은 유전자 도입 벡터를 특정 세포로 표적화, 예를 들어 바이러스 벡터 또는 수용체 리간드를 이용하거나 조직 특이적 프로모터의 이용 또는 두 가지 모두를 이용하여 실행할 수 있다.

생체 조건 또는 생체의 조건에서의 표적화 및 치료과정에 일반적으로 이용하는 바이러스 벡터는 DNA-기초한 벡터 및 레트로바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터의 구축 및 이용하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있다(예를 들어, Miller and Rosman, BioTechniques 7:980-990(1992) 참조). 바람직하게는, 복제능력이 결핍되어서, 목표 세포에서 스스로 복제할 수 없는 바이러스 벡터가 이용된다. 일반적으로, 본 발명의 범주 내에서 이용된 복제능력 상실한 바이러스 벡터는 감염된 세포에서 바이러스의 복제에 필요한 최소 한 가지 부분이 부족하다. 이러한 부분은 (전체적 또는 부분적으로) 제거할 수 있고, 당업자에게 알려진 기술에 의해 기능을 못하도록 할 수도 있다. 이러한 기술은 전체적인 제거, 치환(다른 서열에 의해서, 특히 삽입한 핵산에 의해서), 부분 결실 또는 필수 부분(복제에 대하여)에 하나 또는 그 이상의 염기의 부분 결실 또는 부가를 포함한다. 이러한 기술은 유전자 조작 기술의 이용 또는 돌연변이 유발물질의 처리에 의해 실험실 조건(분리한 DNA에 대하여) 또는 제자리(in situ)에서 실행할 수 있다. 바람직하게는, 복제결핍 바이러스는 바이러스 입자의 포획(encapsulation)에 필요한 자체의 지놈 서열을 보유하고 있다.

DNA 바이러스 벡터는, 이에 제한되는 것은 아니나, HSV, 파필로마 바이러스(papillomavirus), EBV(Epstein-Barr virus), 아데노바이러스, 아데노바이러스-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV) 등의 감쇠(attenuated) 또는 결핍(defective) DNA 바이러스 등을 포함한다. 바이러스 유전자 전부 또는 거의 전부가 부족한 결핍 바이러스가 바람직하다. 결핍 바이러스는 세포로 도입시 감염이 일어나지 않았다. 결핍 바이러스 벡터의 이용은 특이적, 국지적 부분에서 벡터

가 다른 세포를 감염시킬 우려가 없이 세포에의 투여를 허용한다. 그래서, 특정 조직은 특이적으로 표적화한다. 특이적 벡터의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 결핍 허피스 바이러스(herpes virus, HSV1) 벡터(참조: Kaplitt et al, Molec. Cell. Neurosci. 2:320-330(1991)), 당 단백질 L 유전자가 없는 결핍 허피스 바이러스 벡터(참조: Patent Publication RD 371005 A), 또는 다른 결핍 허피스 바이러스 벡터(참조: International Patent Publication No WO 94/21807, 1994년 9월 29일 출간; International Patent Publication No. WO 92/05263, 1994년 4월 2일 출간); 스트래포드-페리카우데 등(Stratford-Perricaudet et al.)의 [J. Clin. Invest. 90:626-630(1992); La Salle et al., Science 259:988-990(1993)]에 기재된 벡터 등 감쇠한 아데노 바이러스 벡터; 및 결핍 아데노-연관(adeno-associated) 바이러스 벡터(참조: Samulski et al, J. Virol. 61:3096-3101(1987); Samulski et al., J. Virol. 63:3822-3828(1989); Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996(1988))를 포함한다.

바람직하게는, 생체 조건의 투여를 위해, 적절한 면역억제 처리가 바이러스 벡터 및 감염세포의 면역 비활성화를 피하기 위해 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터)와 결합시켜 실행한다. 예를 들어, 인터루킨-12(IL-12), 인터페론- γ (IFN- γ), 또는 항-CD4-항체 등 면역억제 사이토카인은 바이러스 벡터에 대한 체액성(humoral) 또는 세포성(cellular) 면역을 억제하기 위해 투여할 수 있다[예를 들어, Willson, Nature Medicine(1995) 참조]. 부가적으로, 최소한의 항원을 발현시키도록 조작한 바이러스 벡터를 이용하는 것이 유리하다.

본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 벡터는 아데노바이러스 벡터이다. 실시예에서 보는 바와 같이, 소낭선 상피의 비정상 성장 및 소낭선 길이와 복합체의 확장에 의한 점막의 명백하고 널리 퍼진 두터워짐의 결과를 일으키는 장 상피세포 증식 촉진의 예상치 못한 유효한 효과에 의해 보여진 것처럼, 아데노바이러스 벡터는 자체적으로 GIPF 폴리펩티드의 운반에 특별히 효과적임을 보여 준다. 아데노바이러스는 다양한 세포 형태로 본 발명의 핵산을 효율적으로 운반하도록 변형할 수 있는 진핵세포 DNA 바이러스이다. 다양한 아데노바이러스의 항원형이 존재한다. 이러한 항원형 중에서, 본 발명의 범주 내에서 바람직한 형태는 사람의 아데노바이러스 type 2 및 type5(Ad 2, Ad 5) 또는 동물 근원의 아데노바이러스(WO94/26914 참조)를 이용하는 것이다. 본 발명의 범주 내에서 이용할 수 있는 그러한 동물 근원의 아데노바이러스는 개, 소, 쥐(실시예: Mav1, Beard et al., Virology 75(1990) 81), 양, 돼지, 조류 및 원숭이(실시예: SAV) 근원을 지닌 아데노바이러스를 포함한다.

바람직하게는, 본 발명의 복제 결핍 아데노바이러스 벡터는 ITRs, 피포화(encapsidation) 서열 및 관심있는 핵산을 포함한다. 보다 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터의 최소한 E1 부분은 기능이 부재하다. 또한, 다른 부분을 변형시키는데, 특히 E3 부분(WO95/02697), E2 부분(WO94/28938), E4 부분(WO94/28152, WO94/12649 및 WO95/02697), 또는 late 유전자 L1-L5이다.

바람직한 실시예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 및 E3 부분에서 결실을 지니고 있다. E1 결실 아데노바이러스의 실시예는 EP 185,573, 본 명세서에 참고문헌으로 인용하였다.

본 발명에 따라 복제 결핍 재조합 아데노바이러스는 당업자에게 알려진 기술에 의해 제조할 수 있다(참조: Levrero et al., Gene 101(1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3(1984) 2917). 특히, 이들은 아데노바이러스, 그중에서도 관심 있는 DNA를 운반하는 플라스미드 사이의 상동 재조합에 의해 제조한다. 상동 재조합은 적절한 세포주에 대하여 아데노바이러스 및 플라스미드의 동시 형질전환 후에 효과가 있었다. 사용한 세포주는 (i) 언급한 조성물에 의해 형질전환되고, (ii) 복제 결핍 아데노바이러스의 지놈 일부, 바람직하게는 재조합의 위험을 피하기 위해 통합된 형태를 보충할 수 있는 서열을 포함해야 한다. 사용할 수 있는 세포주의 실시예는 자체 지놈에 Ad5 아데노바이러스(12%)의 지놈의 좌측 일부를 지닌 사람의 신장 세포주 293(참조: Graham et al., J. Gen. Virol. 36(1977) 59)와 응용법 WO94/26914 및 WO95/02697에 언급한 E1과 E4 기능을 보충할 수 있는 세포주이다. 재조합 아데노바이러스는 당해분야의 일반적 기술 중 하나에 잘 알려진 표준 분자 생물학적 기술을 이용하여 회수, 정제한다.

본 발명에 이용할 수 있는 프로모터는 구성(constitutive) 및 조절(regulated, 유도성) 프로모터를 모두 포함한다. 프로모터는 자연적으로 핵산의 발현에 대해 관련이 있다. 프로모터는 또한, 이질적인 근원(heterologous source)에서 생성할 수 있다. 특히, 이질적인 근원은 진핵 유전자 또는 바이러스 유전자의 프로모터 서열이다. 예를 들어, 이질적 근원은 감염시키려는 세포의 지놈에서 유래한 프로모터 서열일 수 있다. 또한, 이질적 근원은 사용한 아데노바이러스를 포함한, 바이러스 지놈에서 유래한 프로모터 서열일 수 있다. 이러한 측면에서, 예를 들어, E1A, MLP, CMV 및 RSV 유전자 등의 프로모터를 들 수 있다.

그외에도, 프로모터는 활성화 서열 또는 조절서열, 조직-특이적(tissue-specific) 또는 전우점적(predominant) 발현(enolase 및 GFAP 프로모터 등등)을 허용하는 서열의 첨가에 의해 변형시킬 수 있다. 또한, 핵산이 프로모터 서열을 포함하지 않을 때, 프로모터는 그러한 서열의 바이러스 지놈 아래 부분으로 삽입할 수 있다.

본 발명을 실행할 수 있는 프로모터는 편재성(ubiquitous) 프로모터(예를 들어, HPRT, vimentin, actin, tubulin), 중간 사상체(intermediate filament) 프로모터(예를 들어, desmin, neurofilament, keratin, GFAP), 치료용 유전자 프로모터(예를 들어, MDR 형태, CFTR, factor VIII), 조직 특이적 프로모터(예를 들어, 평활근 세포의 액틴 프로모터), 우선적으로 분열하는 세포에서 활성화하는 프로모터, 자극에 반응하는 프로모터(예를 들어, 스테로이드 호르몬 수용체, 레티논산(retinoic acid) 수용체), 테트라사이클린-조절 전사 조절인자, CMV 즉시초기(immediate-early), retroviral LTR, 메탈로프로테인(metallothionein), SV-40, E1a 및 MLP 프로모터 등이다. 테트라사이클린-조절 전사적 조절인자 및 CMV 프로모터는 WO96/01313, U.S. Pat. Nos. 5, 168, 062 및 5, 385, 839, 본 명세서에 참고문헌으로 인용하였다.

그러므로, 유전자 발현조절에 이용할 수 있는 프로모터는 CMV 프로모터, SV40 early 프로모터 부분(참조: Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), Rous sarcoma virus의 3'LTR(long terminal repeat)에 포함된 프로모터(참조: Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), 허피스 티미딘 키나제(herpes thymidine kinase) 프로모터(참조: Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), 메탈로프로테인(metallothionein) 유전자의 조절 서열(참조: Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); 원핵세포 발현벡터, 예를 들어 β -락탐분해효소(β -lactamase) 프로모터(참조: Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), 또는 tac 프로모터(참조: DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); 참고문헌 "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; Gal4 프로모터, ADC(alcohol dehydrogenase) 프로모터, PGK(phosphoglycerol kinase) 프로모터, 알칼리 인산가수분해효소 프로모터 같은 또는 다른 고품양의 프로모터 조성물; 조직 특이성을 보이며 유전자 도입 동물에 이용해 온 동물 전사 조절부분: 이자 포상(acinar) 세포에서 활성을 가지는 엘라스타제(elastase) I 유전자 조절부분(참조: Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 이자 β 세포에서 활성을 가지는 인슐린 유전자 조절부분(참조: Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), 림프 세포에서 활성을 가지는 면역글로블린 유전자 조절부분(참조: Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), 고환주변세포, 유방세포, 림프 세포 및 비만세포에서 활성을 가지는 마우스 선 종양 바이러스 조절부분(참조: Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), 간에서 활성을 가지는 알부민 유전자 조절부분(참조: Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58), 간에서 활성을 가지는 α 1-안티트립신(α 1-antitrypsin) 유전자 조절부분(참조: Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), 골수 세포에서 활성을 가지는 β -글로빈(β -globin) 유전자 조절부분(참조: Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94), 뇌의 퓌지교세포(oligodendrocyte cell)에서 활성을 가지는 미엘린 염기(myelin basic) 단백질 조절부분(참조: Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712), 골격근에서 활성을 가지는 미오신 경쇄-2(myosin light chain-2) 유전자 조절부분(참조: Sani, 1985, Nature 314:282-286), 및 시상하부에서 활성을 가지는 생식샘자극성 분리 호르몬 유전자 조절부분(참조: Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)을 포함한다.

본 발명의 뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자는 또한, 염색체 외부 기질(extrachromosomal substrate, 일시적 발현) 또는 인공 염색체(artificial chromosome, 안정적 발현)에 의해 도입할 수 있다. 세포는 그러한 세포를 증식하거나 원하는 효과 또는 활성을 생산하기 위해서, 본 발명의 단백질이 있는 생체의 조건에서 배양할 수 있다. 그 후, 처리한 세포는 치료용 목적으로 생체 조건에서 도입할 수 있다. 본 발명을 실시하는데 있어서 바이러스 벡터의 이용에 부가하여, 본 발명은 또한, 관심 있는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 기능적으로 연결시킨 조절인자 및 프로모터 조성물을 포함하는 신규한 벡터를 포함한다. 신규한 아데노바이러스 벡터는 pAdenoVator-CMV-Intron 벡터이며, 실시예에서 자세히 언급하였다.

4.2.6 형질전이 동물

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 B세포에서 특이적으로 GIPF 폴리펩티드를 발현시키는 키메라 동물을 발생을 가능하게 한다. 본 발명의 폴리펩티드의 조절인자에 관한 연구 뿐만 아니라, 생체 조건(in vivo)에서의 폴리펩티드의 활성을 연구하는데 있어서 키메라 동물은 유용하다. 본 발명의 바람직한 실시예는 GIPF의 생물학적 기능을 빠르게 결정하도록 고안된 형질전이 녹인(knock-in, KI) 마우스와 관련이 있다. 형질전이 녹인(KI) 동물모델은 국제특허출원 PCT/JP02/11236에 기술되어 있고, WO2003/041495로 공개되었다. 형질전이 모델은 면역글로블린 카파 경쇄 프로모터(immunoglobulin kappa light chain promoter)의 조절하에 B세포에서 GIPF를 특이적으로 발현을 암호화하는 GIPF유전자와 관련이 있다. 전이유전자(전이유전자)를 야생형(intact) 면역글로블린의 중쇄 및 경쇄좌(immunoglobulin heavy and light chain loci)가 포함된 TT2F ES 세포에 주입시키고, GIPF 전이유전자를 함유하는 ES 세포를 항체의 중쇄(antibody heavy chain)에 대한 대립유전자(allele)를 가지고 있지 않는 마우스에 도입한다. 그럼으로써, IG사슬을 발현시키는 ES 세포에서 유래된 기능적 B세포(functional B cell)에서만 면역글로블린 카파 경쇄가 발현될 수 있다(참조: WO00/10383; EP1106061A1). 마찬가지로, B세포에 의한 GIPF의 발현은 GIPF-KI 키메라 마우스에서만 나타난다. 그리하여, 본 발명의 형질전이 동물모델은 생

식계열(germ line)을 통해 전달되는 전이유전자를 함유하고 있는 이형접합체(heterozygous), 동형접합체(homozygous) 동물들보다도, 오히려 키메라 동물에 대하여 빠른 표현형 분석(phenotype analysis)을 할 수 있게 되었다. 또한, 전이유전자(전이유전자)는 B세포에서만 발현되어 GIPF 단백질을 체내에 분비하여 순환시키며, 따라서 체내 모든 조직이 GIPF에 노출되고, GIPF 기타 다른 암호화된 폴리펩티드의 생물학적 효과에 대하여 빠른 평가를 가능하게 한다. 본 발명의 형질전 이 시스템은 모든 폴리펩티드의 생물학적 기능의 발현 및 평가에 사용될 수 있다. 본 발명의 형질전 이 모델의 다른 장점은 전이유전자의 임시적 발현과 관련이 있다. 카파 경쇄 프로모터의 활성화는 착상(post-gestation) 후 14일 정도 되었을 때 시작되고, 두드러지게 순환하는 면역글로블린 농도가 높아지는 시기는 젖을 막 때일 때쯤에 관찰되는 바, 이렇게 함으로써 잠재적으로 마우스의 초기 성장에 해가 될 수 있는 GIPF의 효과를 회피한다. 대표적인 본 발명의 형질전 이 동물은 실시예에 기재되어 있다.

4.2.6.1 사람이외의 형질전 이 포유동물을 작제하는 일반적 방법

모든 본 발명의 형질전 이 동물은 그들의 많은 세포내에 본 발명의 전이유전자를 함유하고 있는데, 이 유전자는 B세포에서 GIPF를 특이적으로 발현하는 것과 관련한 세포의 표현형을 변환시키고, GIPF 폴리펩티드를 분비하여 순환시킨다. 형질전 이 동물기술의 다양한 측면들이 당해 분야에 잘 소개되어 있고, 호간 등(Hogan et. al.)의 Manipulating the Mouse Embryo(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., [1986]) 등의 문헌에 세부적으로 기술되어 있다. 본 명세서에서는 마우스를 이용한 형질전 이 동물의 작제를 기술하고 있지만, 이는 설명을 하기 위한 목적일 뿐, 발명의 범위를 제한하고자 함은 아니다. 이 전문적인 기술은 당업자에 의해 용이하게 적용될 수 있고, 이하에 소개된 방법 및 재료를 활용하여 GIPF 전이유전자 서열을 사람이외의 포유동물에 도입하는데 적용할 수 있다. 형질전 이 실험에 적합한 동물은 Taconic(Germantown, N.Y.) 등의 표준 상업기관에서 얻을 수 있다.

A. 전이유전자의 구축

전이유전자는, 이에 제한되는 것은 아니나, 샘브룩 등(Sambrook, et al.)의 Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Cold Spring Harbor Laboratory, NY(1989)]에 기술된 제한효소처리(restriction endonuclease digestion), 연결(ligation), 형질전환(transformation), 플라스미드 정제(plasmid purification), DNA 서열분석(DNA sequencing), 분자클로닝(molecular cloning) 등의 표준기술을 포함하는 당해 분야에 잘 알려진 유전공학기술을 이용하여 작제될 수 있다.

본 발명의 전이유전자는 특별한 방식으로 발현을 조절하기 위해 일반적으로 프로모터(promoter)나 인핸서(enhancer) 등의 전사조절서열(transcriptional regulatory sequence)에 작동적으로 연결된다. 특정 실시예에서는, 시간적, 공간적인 활동을 잘 조절하는 전사 조절서열이 유용하다. 따라서, 선택된 프로모터는 특정한 조직과 세포에서만 활동한다. 생체 내에서 도입 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 및 인핸서는, 이에 제한되는 것은 아니나, 다음을 포함한다: 사람 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서(human cytomegalovirus promoter/enhancer), 사람 β -액틴 프로모터(human β -actin promoter), 마우스 유방 종양바이러스 긴 말단 반복서열(mouse mammary tumor virus long terminal repeat)에 존재하는 글루코코르티코이드-유도 프로모터, 몰로니 생쥐 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus)의 긴말단 반복서열, SV40 초기 또는 만기 영역 프로모터(SV40 early or late region promoter), 라우스 사르코마 바이러스(Rous sarcoma virus)의 3' 긴 말단 반복서열에 함유된 프로모터, 허피스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 프로모터/인핸서(thymidine kinase promoter/enhancer), 메탈로티오네인 프로모터(metallothionein promoter), 허피스 심플렉스 바이러스 LAT 프로모터(LAT promoter). 바람직하게는, 프로모터는 면역글로블린 카파 경쇄의 P2 프로모터이다.

전이유전자와 전사조절서열과 함께, 본 발명의 전이유전자를 작제하는데 유용한 벡터들은 실험동물에서 발현을 적합하게 하는데 유용한 하나 이상의 요소들을 포함한다. 따라서, 전이유전자의 구축은 인트론 서열(intronic sequence)뿐만 아니라, mRNA 전사체의 직접 폴리아데닐화(DPOMR, direct polyadenylation of an mRNA transcript)를 포함한다. 예컨대, 전이유전자는 SV40서열의 3'의 종결부위에 나란히 위치할 수 있다. SV40은 전사종결신호와 폴리아데닐 신호를 전이유전자의 전사된 부분에 결합한다. 다른 상황에서 전이유전자는 인트론서열을 포함할 수 있다. 많은 경우에 코드서열에서 하나 이상의 인트론이 존재함으로써 전이유전자(전이유전자)의 발현은 증가한다.

상황에 따라서는 전이유전자를 구축할 때, 수용세포에 본 발명의 물질을 주입하는데 앞서서 세포내에서 조절을 촉진시키는 부가적 물질이 필요할 수 있다. 예를 들어, 원핵생물(prokaryotic) 세포에서 벡터는 증폭을 위한 복제요소의 원인이 되는 물질을 보유하고 있어야 한다. 또한, 형질전환 유전자를 구축할 때, 수용동물이나 형질전 이 동물을 만들 때 매개체로서 발생하는 세포로부터 세포들을 분리하기 위한 선택적 표지자(selectable marker)를 함유하고 있어야 한다. 선택적 표지 유전자는, 배양조건에서 전이된 세포(transfected cell)의 성장에 필요한 단백질을 암호화한다. 통상적인 선택적 표지 유전자는 예를 들면 다음 등의 단백질을 암호화한다: (i) 원핵 숙주세포들을 위한 암피실린(ampicillin), 테트라사이클린

(tetracycline) 또는 카나마이신(kanamycin), 및 포유동물 세포를 위한 네오마이신(neomycin), 하이그로마이신(hygromycin) 또는 메토틱렉세이트(methotrexate) 등의 항생제 또는 다른 독소에 대한 내성 제공하는 단백질; 또는, (ii) 세포의 영양요구 결핍(complement auxotrophic deficiency)을 보완하는 단백질.

B. 전이유전자를 주입하는데 사용하는 세포

본 발명의 대표적 실시예에 따르면, 본 발명의 "사람이외의 형질전이 포유동물(transgenic non-human mammals)"은 GIPF 유전자를 사람이외의 포유동물의 생식계열(germline)에 주입함으로써 작제할 수 있다. 다양한 발달단계에서 배의 표적세포(embryonal target cell)를 GIPF를 주입하는데 사용할 수 있다. 배의 표적세포의 발달단계에 따라 다른 방법들이 사용된다. 본 발명을 수행하는데 이용되는 동물들은 대체적으로 좋은 건강상태, 좋은 배 수율(embryo yield), 배에 있어서의 좋은 전핵(pronucleus) 가시도(visibility), 좋은 번식 적응도(reproductive fitness) 등이 선택된다.

한가지 실시예에 따르면, 전이유전자를 단일배(single stage embryo)로 주입한다. 일반적으로, 암컷 동물은 호르몬 처리에 의하여 과잉배란하고(superovulated), 교미하고(mated), 수정란이 얻어진다. 예를 들면, 마우스의 경우에 6개월된 암컷을 다음의 방법으로 과잉배란되게 한다. PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, SIGMA)의 5IU(0.1ml, i.p.)를 주입하고, 48시간 지나서 사람 융모막 생식샘 자극호르몬(human chorionic gonadotrophin, hCG) 5IU를 주입한다. 이 경우에는, 마우스 FVB 종을 사용한다. 즉시, 암컷 마우스를 큰 수컷과 밤새 교미시키고, 교미전(copulation plug)을 관찰한다. 교미한 마우스들을 CO₂ 질식(asphyxiation)이나 경부전위(cervical dislocation)로 안락사시킨 다음, 수정란을 수란관에서 채취하여 0.5% BSA(Sigma)가 함유된 돌베코(Dulbecco)의 인산 완충액에 넣는다. 주위의 누적된(cumulus) 세포들은 히알루로니다제(hyaluronidase, 1mg/ml)로 제거한다. 그런 다음, 전핵 배(pronuclear embryo)를 세척하고, 37.5°C의 조건에서 0.5% BSA(EBSS)를 함유한 Earle's balanced salt solution에 넣는다. 주입하기 전까지 5% CO₂, 95% 공기의 습도가 높은 환경에서 배양한다.

보통 수정란은 전핵이 발생되기 전까지 적합한 조건에서 배양된다. 이때, 전이유전자를 다음 설명과 같이 암컷 또는 수컷 전핵에 주입한다. 마우스 등의 일부 종에서는 수컷 전핵에 주입하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 외인성 유전자(exogenous gene)를 초기 수컷의 전핵에, 가능한 한 수컷 전핵(male pronucleus)의 생성 후에 첨가한다. 그러면, 수컷 전핵과 암컷 전핵이 잘 구분되고, 둘 다 세포막 가까이 위치하게 된다. 외인성의 유전자 물질이 응결이 풀어진 후, 정자의 핵에 첨가될 수 있다. 외인성 유전물질이 포함된 정자는 난자에 결합시키거나, 응결이 풀어진(decondensed) 정자가 난자에 결합할 수 있다.

생물학적 고찰 이외에도, 한 개체는 외인성 유전물질을 조절하여 접합체의 핵에 결합하거나, 접합체 핵의 부분을 형성하는 유전물질과 결합할 수 있다. 일반적으로, 주입되는 외인성 유전물질의 양은 10피코리터(picoliter)를 초과하여서는 안된다. 접합체의 생존능력을 없애기 위해 큰 효과도 필요 없다. 상기 접합체의 외인성 유전물질을 포함하는 유전물질은 상기 접합체를 기능적인 기관에서 생물학적으로 분화 및 발달시켜야 하기 때문에, DNA 서열의 수와 종류의 생물학적 제한은 특정한 접합체와 외인성 유전물질의존적으로 변형될 수 있고, 이는 당업자에게 있어 자명할 것이다.

접합체에 가해지는 전이유전자의 개수는 가해진 외인성 유전물질의 총량에 따라 다르게 되고 유전적 형질전환이 가능하게 하는 양이어야 한다. 이론적으로는, 한 개의 복제본만 있으면 되지만, 일반적으로 단 한 개가 제대로 기능하는 것을 보장하기 위해 1,000에서 20,000개의 복제본이 활용된다.

C. 전이유전자 주입법

환형(circular) 분자와 비교해 볼 때, 직선형의(linear) DNA서열이 더욱 많은 수의 재조합을 일어나게 하므로, 세포에 주입하는 각각의 전이유전자는 우선 일직선 형태로 존재하고 있어야 한다. 따라서, 전이유전자가 벡터에 삽입되어 있다면 선형화시킨다. 전이유전자 서열에서는 절단시키지 못하고, 벡터 서열에서만 절단하도록 되어 있는 적절한 내부절단효소(restriction endonuclease)를 이용하여 DNA를 절단하여 선형화한다.

당업계에 알려진 방법을 이용하여, 세포와 핵막, 기타 세포 또는 유전자구조를 파괴하지 않는 한 전이유전자를 수정란(embryo)에 주입할 수 있다. 미세주입(microinjection), 전기영동, 또는 리포펙션(lipofection)이 널리 알려진 방법들이다. 유전자를 주입한 다음, 수정란은 실험실 조건(in vitro)에서 다양한 시간 조건에서 배양되거나, 대리모(surrogate host)에 이식된다. 한가지 공통된 방법은 종에 따라 수정란을 시험관에서 1 내지 7일간 배양하고, 대리모에 다시 재주입하는 것이다.

접합체(zygote)는 미세주입법에 의하여 전이유전자를 주입하는 가장 우수한 표적이다. 마우스에서 수컷 전핵(male pronucleus)은 지름이 약 20마이크로미터의 크기로 되는데, DNA 용액 1~2pL를 주입할 수 있다. 대부분의 경우에 유전자 전이 표적으로 접합체를 이용하면, 첫 분열 전에 주입된 DNA가 숙주 유전자에 결합하게 되는 주요 이점이 있다. 그 결과, 일반적으로 형질전이 동물의 모든 세포는 합입된 전이유전자를 함유하게 되고, 또한, 절반의 생식세포는 전이유전자를 가지기 때문에, 최초 조상의 자손에 전이유전자가 잘 전달되게 된다고 볼 수 있다.

레트로바이러스 감염(retroviral infection)은 사람이외의 포유동물에 전이유전자를 주입시키는데 사용될 수 있다. 분화하는 사람이외의 배는 배반포(blastocyst) 단계에서 시험관내에서 배양될 수 있다. 배양기간에 할구(blastomere)는 레트로바이러스 감염의 표적이 될 수 있다(참조: Jaenich, R. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73:1260-1264(1976)). 효소처리방법을 이용하여 투명대(zona pellucida)를 제거하고, 할구에 효과적으로 주입시킨다(참조: Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor(1986)). 도입 유전자를 주입하는데 이용되는 바이러스 벡터시스템은 전이유전자를 함유하는 통상적인 복제결함(replication-defective) 바이러스이다(참조: Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:6927-6931(1985); Van der Putten, supra; Stewart et al., EMBO J. 6:383-388(1987)). 바이러스를 작제하는 세포의 단층에서 할구를 배양함으로써 효과적으로 감염이 될 수 있다(참조: Van der Putten, supra; Stewart et al., EMBO J. 6:383-388(1987)). 선택적으로, 나중에 감염을 시킬 수도 있다. 바이러스나 바이러스 작제세포는 또한, 할강(blastocoele)에 주입될 수 있다(참조: Jahner et al., Nature, 298:623-628(1982)). 합입(incorporation)이 형질전이 동물을 형성하는 세포의 작은 부분에서만 일어나기 때문에, 대부분의 감염 1세대는 전이유전자를 위한 모자이크를 하게 된다. 또한, 1세대는 다양한 레트로바이러스 감염으로 삽입된 유전자를 자손세대와는 다른 위치에서 가지고 있다. 또한, 임신중반의 배에 자궁내 레트로바이러스 감염을 함으로써, 전이유전자를 생식계열(germ line)에 주입하는 것이 가능하다.

전이유전자는 ES세포에 전기영동, 미세주입, 인산칼슘처리 등 당업계에 널리 알려진 방법을 이용하여 주입할 수 있다. 가장 좋은 방법은 전기영동이다. 전기영동기를 이용하여 사용자 지침을 따라 ES 세포와 전이유전자 DNA를 전기충격에 노출시킨다. 전기영동 후 ES세포를 적절한 배양조건에서 회수할 수 있다. 다음으로, 세포들에서 전이유전자의 존재를 확인한다.

D. 배의 주입

전이 유전자를 도입함으로써 개조된 배를 이식하기 위해, 가임신(pseudopregnant), 수양모(foster mother) 또는 대리모(surrogate mother)를 준비한다. 보통 같은 종의 정관을 절제한 수컷과 교배시킴으로써 대리모들이 준비된다. 가임신 대리모 단계는 성공적인 이식을 위해 중요한 단계이며, 종에 따라 기일이 다르다. 마우스의 경우, 약 2~3일의 가임신 기간이 필요하다. 배를 이식받는 암컷은 동시에 배를 이식하는 암컷으로서 교배된다. 이하의 설명은 마우스를 예로 들었지만, 당업자라면 사람 이외의 포유동물에 적용할 수 있다. 배를 이식하는 시점에 이식받는 암컷을 체중 1그램당 2.5% 애버틴(avertin) 0.015ml를 복강내 주입함으로써 마취시킨다. 수란관(oviduct)은 단일의 중간위치 척추 절개에 노출되어 있다. 다음으로, 수란관의 겉의 신체벽을 통해 절개를 한 후, 난소의 포낭을 집게로 절개한다. 전이되는 배들은 DPBS와 전이피펫(transfer pipet)의 팁(tip)에 위치시킨다. 팁을 누두(infundibulum)와 전이되는 배에 삽입한다. 전이한 후에 두 바늘로 봉합한다. 특별한 호스트에 이식되는 배들은 종에 따라 다양하나, 종들이 자연적으로 번식해내는 자손들의 수에 필적된다.

ES세포가 전이유전자를 주입하는데 사용되는 반면, 전이된 ES세포는 배(embryo)와 결합하고, 배는 임신기간중의 대리모에 이식된다.

E. 전이유전자의 존재 또는 발현을 위한 선별

형질전이된 대리모의 자손은 적절한 방법에 의해 전이된 유전자의 존재 및/또는 발현을 위해 선별될 수 있다. 대리모 자손들은 최초로 모자이크 코트 컬러 선별전략(상술함)이 채용되는 모자이크 코트컬러를 위해 선별된다. 선택적으로 또는 부가적으로, 서던 블롯(Southern blot)이나 꼬리조직에서 얻어진 DNA를 전이유전자의 최소한 일부분에 상보적인 프로브를 이용하여 PCR 증폭시켜 선별할 수 있다. 선택적으로 또는 부가적 방법으로서, 전이유전자에서 암호화한 단백질과 대립되는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯이나 면역조직화학이 이용될 수 있다. 선택적으로, 전이유전자를 높은 수준으로 발현할 것으로 여겨지는 조직이나 세포를 노던(Northern) 분석이나 RT-PCR을 함으로써 전이유전자의 RNA발현을 테스트할 수 있다.

선택적 혹은 부가적인 전이유전자의 존재를 측정하기 위한 방법에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 효소분석이나 면역분석 등의 생화학적 분석, 특별한 표지를 나타내는 조직 착색(histological stains), 흐름세포측정(flow cytometric) 분석 등이 있다. 또한, 혈액분석은 혈액의 구성성분의 전이유전자의 효과의 측정뿐만 아니라, 혈액 내 전이유전자의 존재를 측정하는데 유용하다.

F. 형질전이 동물의 번식

형질전이 동물을 적절한 배우자와 교배시키거나, 실험실 조건에서 형질전이 동물로부터 수득한 난자 및/또는 정자를 수정시켜서 그 자손을 얻을 수 있다. 상대와 교배가 이루어질 때 상대는 형질전이 동물일 수도 아닐 수도 있고, 형질전이 동물일 때 같고나 다른 전이유전자, 또는 둘다를 포함할 수도 있다. 선택적으로, 교미상대는 부모세대(parental line)일 것이다. 시험관 수정을 할 경우, 수정란은 대리모나 시험관에 이식될 수 있다. 어떤 방법을 사용하든지, 자손은 상술한 방법이나 기타 가능한 방법을 이용하여 전이유전자의 존재를 확인할 수 있다. 통상적으로, 번식과정에서의 각각의 특별한 단계의 목적에 따라, 자손(offspring)을 형제(siblings)나 부모(parental strain)와 교배하여 교배(crossing)나 역교배(backcrossing)를 달성할 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시태양은 항체 중쇄(antibody heavy chain)(IgH-KOΔH^{-/-})에 대한 대립유전자가 결여된 마우스와 관련되고, 항체를 순환시키는 아주 낮은 수준을 갖는다(참조: Kitamura et al., Nature 350:423-426(1991)). 본 발명의 한가지 측면에 따르면, 본 발명은 B세포에서 GIPF단백질이나 그것의 단편을 제조하는 사람의 외의 형질전이 포유동물과 관련이 있다. 형질전이 포유동물은 지능에 GIPF나 본래의 단백질의 생물학적 활동을 암호화하는 핵산서열이 B세포에서의 발현을 지시하는 전사 조절서열에 작동적으로 연결되어, 안정적으로 통합되어 있다. 전사조절서열은 면역글로블린 카파 사슬 등의 B세포의 프로모터를 가지고 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 염소, 소를 이용하여 사람의 외의 형질전이 포유동물을 작제할 수 있다.

4.2.7 소낭선 세포와 조직 성장 활성

본 발명의 GIPF 폴리펩티드는 성장인자 활성을 나타내는데, 장내 소낭선 세포의 증식과 분화에 관련되어 있다. 또한, GIPF는 위장 계통(tract)의 다른 상피세포에서 성장인자 활성을 나타낸다.

생체 내 또는 생체 외 조건에서 소낭선 세포에의 본 발명의 폴리펩티드 투여는 손상되거나 병든 조직의 개선, 이식, 생약의 제조와 바이오센서의 개발에 유용한 분화 전능 상태(totipotent state)의 세포집단을 유지하고 확장시킨다. 다량의 사람 세포를 생산하는 능력은 현재 사람의 외의 근원이나 공여자, 위장세포 조직을 치료하기 위한 세포의 이식으로부터 얻어야 하는 사람 단백질의 생산에 중요한 실제적 응용성을 가진다.

다양한 외인성의 성장인자 및/또는 사이토카인(cytokine)은 본 명세서에 개시된 성장인자, 다른 줄기세포 유지 인자를 포함하고, 특히 줄기세포 인자(SCF), 백혈병 억제인자(LIF), Flt-3 리간드(Flt-3L), 인터루킨(interleukin), IL-6와 융합된 재조합 용해성의 IL-6 수용체, 마크로파지 염증성 단백질 1-알파(macrophage inflammatory protein 1-alpha, MIP-1-alpha), G-CSF, GM-CSF, 트롬보포이에틴(thrombopoietin, TPO), 혈소판 인자-4(PF-4), 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 신경성장인자(neural growth factor), 기초 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF), 각질형성세포 성장인자-2(keratinocyte growth factor-2, KGF2)와 글루카곤-유사 펩티드-2(glucagon-like peptide-2, GLP-2)를 포함하며, 원하는 효과를 얻기 위해 본 발명의 폴리펩티드와 함께 투여된다.

소낭선 세포를 포함하는 장의 상피세포는 본 발명의 폴리펩티드의 자가분비 발현(autocrine expression)을 유도하기 위하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 형질전이될 수 있다. 이것은 유용하거나 원하는 성숙된 세포 형태로 분화될 수 있는 미분화 세포계의 생성을 유도할 것이다. 이 안정한 세포계는 cDNA 라이브러리와 중합효소 연쇄반응(PCR)의 주형을 생성하기 위한 미분화된 mRNA의 근원이 될 수 있다. 본 연구는 소낭선의 증식 또는 유지를 조절하는 소낭선 세포집단에 있어 분화 발현된 형태의 유전자의 분리와 식별에 목적이 있다.

상피 줄기세포 집단의 확장과 유지는 여러 병리적 상태의 치료에 유용할 것이다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 질병, 자가면역질환, 사고에 의한 손상 또는 유전적 장애, 이온화 방사선에 의한 염증, 화학요법, 감염과 염증에 의해 손상된 세포를 증가시키거나 대체할 수 있는 위장 상피세포로 유도되도록 배양액에서 소낭선 세포를 조작하는데 이용된다.

또한, 본 발명의 폴리펩티드 발현과 소낭선 세포에 있어 그것의 효과는 더 분화된 세포 형태의 소낭선 세포의 분화조절을 수행하도록 조작될 수 있다. 미분화된 줄기세포 집단으로부터 특정한 분화된 세포형태의 순수한 집단을 얻기 위한 범용적 방법은 선택적 표지자(selectable maker)를 유발하는 세포 특이적 프로모터의 이용을 포함한다.

소낭선 세포를 포함하는 위장 상피세포의 시험관내 배양은 본 발명의 폴리펩티드가 성장인자 활성을 나타낼지 아닐지를 결정하는데 이용할 수 있다. 소낭선 세포는 사람과 생쥐의 대장 점막층으로부터의 분화된 대소낭선으로부터 분리되는데, GIPF의 클론원성 활성은 전체가 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 화이트헤드 등(Whitehead et al.)의 논문, Gastroenterology 117:858-865(1999)에 기술된 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 성장인자 활성은 본 발명의 폴리펩티드 단독 또는 다른 성장인자나 사이토카인과 결합한 상태로 측정한다.

본 발명의 조성물은 소낭선 세포를 포함한 장내 상피세포의 증식과 구강 및 위장조직의 재생, 즉 상피 소낭선 세포의 변성, 죽음 또는 외상과 관련된 상피층이 입은 손상의 치료에 유용할 것이다. 특히, 이 조성물은 본 명세서에 열거된 위장 계통의 질병의 치료에 유용할 것이다.

또한, 본 발명의 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 압박성 궤양(pressure ulcer), 혈관 기능저하와 연관된 궤양, 외과적 창상을 포함하는 치유되지 않은 상처를 빨리 낫게 하는데 유용할 것이다. 상처치유 활성에 대한 측정은, 이에 제한되는 것은 아니나, Eaglstein and Mertz, J. Invest. Dermatol., 71:382-84(1978)에 수정된 Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71-112(Maibach, H.I. and Rovee, D. T., eds), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicaco)에 개시된 방법을 포함한다.

4.2.8 면역조절 활성

본 발명의 폴리펩티드는, 이에 제한되는 것은 아니나, 사이토카인 생성 및/또는 활성, 및/또는 면역시스템의 세포들을 포함하는 면역시스템 요소의 조절과 관련된 활성을 나타낸다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이러한 속성을 나타내는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 사이토카인이나 면역시스템의 세포들의 조절은 사이토카인의 농도나 면역시스템에 관련된 특정 세포의 수를 증가 및/또는 감소시키는 것을 포함한다.

이러한 면역조절활성을 가진 본 발명의 폴리펩티드는 다양한 면역질환을 치료하는데 이용된다. 이러한 질환은, 이에 제한되는 것은 아니나, 궤양대장염 및/또는 크론병을 포함하는 염증성 장염(inflammatory bowel disease, IBD), 및 방사선 치료나 화학요법을 포함하는 항암치료의 예후인 장막염을 포함한다. 면역질환의 원인은, 예를 들어, 특발성(idiopathic, 즉, 원인불명), 유전적 요인, 감염성 인자(예를 들면, 바이러스, 박테리아, 곰팡이), 및/또는 항암치료(예를 들면, 방사선 치료나 화학요법)에 의한 손상 등이 있다.

면역반응 및/또는 면역시스템과 관련된 성분의 조절은 여러가지 방법으로 달성될 수 있다. 하향조절(down-regulation)은 이미 진행된 면역반응을 억제하거나(inhibiting), 막는(blocking) 형태로 되거나, 면역반응의 유발을 방해하는(preventing) 것을 포함한다. 활성화된 T-세포의 기능은 T세포 반응을 억제하거나 또는 T세포의 특별한 내성(tolerance)을 유도함으로써, 또는 두 가지 방법 모두에 의해 억제된다. T세포 반응의 면역억제는 일반적으로 활성이고 항원특이성이 없으며, 억제 물질로의 T세포의 지속적인 노출을 요하는 과정이다. T세포에 있어 비반응 또는 에너지의 유도를 포함하는 내성은 일반적으로 항원 특이성이 있고 내성 물질에의 노출이 멈춘 후까지 지속된다는 점에서 면역억제와 구별된다. 내성은 내성물질의 부재 상태에서 특이 항원에 재노출된 경우 T세포 반응의 결여에 의해 입증될 수 있다.

염증성 장염(IBD)은 거의 대부분 2가지 경로 중 하나로 조절되는데, 고농도의 IL-12, IFN-감마, 및/또는 TNF와 관련된 과다한 T헬퍼-1(Th-1)-세포반응이나 고농도의 IL-4, IL-5, IL-13와 연관된 과다한 T헬퍼-2(Th-2)-세포반응이다(본 명세서에 전체가 참고문헌으로 인용된 보우마 등(Bouma et al.)의 문헌 참조). 따라서, 본 발명의 폴리펩티드가 질병치료에 있어 면역조절 활성을 조정할 수 있는 기작은 Th-1 및/또는 Th-2 세포집단의 수를 하향조절하는 것일 것이다. 선택적으로, 다른 활성은 면역반응연관되고/연관되거나 조절하는 사이토카인(예를 들면, IL-12, TNF, IL-4, IL-5, 및/또는 IL-13)의 농도를 감소시킬 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드 활성은 여러 가지 수단 중에서도 다음의 방법에 의해 측정된다.

T세포나 가슴샘 세포(thymocyte) 증식을 위한 분석은, 이에 제한되는 것은 아니나, 다음 문헌에 기술되어 있다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience(Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function

3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in humans); Takai et al. J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Bertagnolli, et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992; Bowman et al., J. Immunol. 152:1756-1761, 1994.

사이토카인 생성이나 지라세포, 림프절 세포, 가슴샘 세포의 분석은, 이에 제한 되는 것은 아니나, 다음 문헌에 기술되어 있다: Polyclonal T cellstimulation, Kruisbeek, A.M. and Shevach, E.M. In Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan des. Vol 1 pp.3.12.1-3.12.14, Jphn Wiley and Sons, Toronto. 1994;and Measurement of mouse human interferon- γ , Schreiber, R.D. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp.6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

항원에 대한 T세포 클론반응(이는 증식과 사이토카인 생산을 측정함으로써 직접적인 T세포 효과뿐만 아니라, APC-T세포 상호작용에 영향을 미치는 단백질을 다른 것들 중에서 식별할 것이다)에 대한 분석은, 이에 제한되는 것은 아니나, 다음 문헌에 기술되어 있다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience(Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6091-6905, 1980; Weinberger et al., Eur.J.Immun. 11:405-411, 1981; Takai et al., J.Immunol.137:3494-3500, 1986; Takai et al., J.Immunol.140:508-512, 1988.

4.2.9 화학주성(chemotactic)/화학운동(chemokinetic) 활성

본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어, 단핵구, 섬유모세포, 중성구, T세포, 비만세포, 호산구, 상피세포, 림프/또는 내피세포를 포함하는 포유동물 세포의 화학주성 또는 화학운동 활성과 관련된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이러한 속성을 나타내는 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 화학주성과 화학운동 수용체의 활성화는 원하는 세포집단을 원하는 부위에 작용하도록 동원하거나 영향을 미치게 할 수 있다. 화학주성 또는 화학운동 조성물(예를 들면, 단백질, 항체, 결합파트너(binding partner), 본 발명의 조절인자(modulator))은 국부적인 감염의 치료뿐만 아니라, 조직의 어떤 외상과 상처의 치료에 있어 특별한 이점을 제공한다. 예를 들어, 종양이나 감염 부위로의 림프구, 단핵구, 중성구의 끌어당김은, 종양이나 감염 물질에 대하여 향상된 면역반응을 일으키는 결과가 된다.

단백질이나 펩티드는 특정 세포집단에 대한 화학주성의 활성을 가지는데, 이는 직접적 혹은 간접적으로 세포집단의 지시된 방향이나 이동을 자극시킬 수 있다. 바람직하게는, 단백질 또는 펩티드는 직접적으로 세포로의 지시된 이동을 자극시키는 능력을 가진다. 특정 단백질이 세포집단에서 화학주성 활성을 가지는지 아닌지는 세포화학주성에 대한 어떠한 알려진 분석법에 단백질이나 펩티드를 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다.

화학주성 활성에 대한 분석(이는 화학주성을 유도하거나 방해하는 단백질을 식별할 것이다)은 하나의 세포집단에서 다른 세포집단으로의 부착을 유도하기 위한 단백질의 능력뿐만 아니라, 막을 통해 세포의 이동을 유도시키는 단백질의 능력을 측정하는 분석으로 구성된다. 이동과 부착에 대한 적합한 분석은, 이에 제한되는 것은 아니나, 다음 문헌에 기술되어 있다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience(Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub et al. J. Clin. Invest. 95: 1370-1376, 1995; Lind et al. APMIS 103:140-146, 1995; Muller et al Eur. J. Immunol. 25:1744-1748; Gruber et al. J. of Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnston et al. J. of Immunol. 153:1762-1768, 1994.

4.2.10 약물검색

본 발명에서 유전자 전이된 사람 이외의 포유동물과 그들의 자손은 기능에 있어 정상 기능의 하나로서 용이한 외관을 가지는 몇 가지 중요한 용법을 제공한다. 유전자 전이동물은 특히 GIPF 폴리펩티드의 활성을 조절하는(즉, 증가 또는 감소시키는) 화합물을 검색하는 데 유용하다. 유용한 화합물의 검색은 유전자 전이동물에 투여 범위를 넘어 후보 화합물(candidate compound)을 투여하는 단계와, GIPF 단백질 활성에 대한 그 화합물의 효과를 다양한 시간 지점에서 분석하는 단계를 포함한다. 이 화합물은 복부 팽만(abdominal distension) 전에 또는 시작점에서 투여될 것이다. 투여는 평가된 화합물의 화학적 성질에 따라, 구강을 통하거나, 적합한 주입에 의한다. 화합물에 대한 세포반응은 생화학적 또는 조직학적 분석을 통해 평가된다.

본 발명의 폴리펩티드 활성을 결합하거나 조절하는(즉, 증가 또는 감소시키는) 능력을 선별하는 시험 화합물의 근원은 (1) 무기 및 유기 화학적 라이브러리, (2) 천연물 라이브러리, 및 (3) 임의적 또는 유사체 펩티드, 올리고뉴클레오타이드 또는 유기분자로 구성된 조합 라이브러리를 포함한다.

화학적 라이브러리는 용이하게 합성되거나 수많은 상업적으로 입수가능하며, 공지된 화합물이나 천연물 검색을 통해 "히트(hit)" 또는 "선도(lead)"로 규정된 화합물의 구조 유사체를 포함한다.

천연물 라이브러리의 근원은 미생물(박테리아 또는 곰팡이를 포함), 동물 또는 식물, 또는 다른 초목류, 또는 해양 생물이며, 검색을 위한 혼합물의 라이브러리는(1) 토양, 식물, 해양 미생물의 발효와 배양물로 부터의 추출, 또는 (2) 생물 그 자체의 추출에 생성된다. 천연물 라이브러리는 폴리케티드(polyketide), 비-리보솜 펩티드(non-ribosomal peptide) 및 (자연계에 존재하지 않는) 변이체를 포함한다(참조: Science, 282:63-68(1998)).

조합 라이브러리(combinational library)는 여러가지 펩티드, 올리고뉴클레오타이드 또는 유기화합물로 구성되고, 통상적인 자동 합성방법, PCR, 클로닝이나 특정 합성방법에 의해서 용이하게 제조될 수 있다. 유용한 것은 펩티드와 올리고뉴클레오타이드 라이브러리이다. 더욱 유용한 라이브러리로는 펩티드, 단백질, 펩티드 유사체(peptidomimetic), 복합평행 합성물(multiparallel synthetic collection), 재조합 및 폴리펩티드 라이브러리를 포함한다. 조합화학에 대해서는 Myers, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707(1997)를, 펩티드 유사체의 라이브러리에 대해서는 Al-Obechnol, *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 9(3):205-23(1998); Hruby *et al.*, *Curr Opin Chem Biol*, 1(1):114-19(1997); Dorner *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 4(5):709-15(1996)(알킬화 디펩티드)를 참조하라.

4.3 GIPF 요법에 적용되는 질병들

본 발명의 한가지 측면에 의하면, 본 발명은 상피화(epithelialization)가 바람직한 질병과 상태의 치료에 유용한 의약과 방법을 제공한다. GIPF 폴리펩티드는 세포보호, 복제, 및/또는 구강이나 위장관의 상피세포의 분화를 증강시키기에 유용하다. 특히, GIPF 폴리펩티드는, 이에 제한되는 것은 아니나, 위장관 질병, 위장관 점막염, 구인두 점막염, 입술, 식도, 염증성 장염, 단장 증후군, 위, 십이지장 괴양, 미란성 위염(erosive gastritis), 식도염, 식도통 역류를 포함하는 위장관 미란(erosion) 및 상처, 화상, 눈병 등을 포함하는 다른 상피 및 상피세포 증식이나 재생이 요구되는 다른 질병을 포함하는 질병 또는 상피의 치료 또는 예방에 유용하다. 또한, 결과적으로 구강과 위장관에 점막 과소를 야기시키는 질병의 치료가 고려될 수 있다.

구강과 위장 내의 점막염을 포함하는 점막염(mucositi)은 소화체계가 염증이 생기게 되는 암치료 요법의 합병증(complication)이다. GIPF는 항암치료 중인 환자에게 투여되는 화학요법이나 방사선 요법에 의해 발생하는 소화계 점막의 퇴화를 막아주거나 개선하는데 도움을 주고, 또한, 종양의 제거를 위해 보조 치료제로서 효과가 있다. 대표적인 화학요법제는 이에 제한되는 것은 아니나, BCNU, 부설판(busulfan), 카보플라틴(carboplatin), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 탄노루비신(tannorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에토포시드(etoposide), 5-플루오우라실(5-fluorouracil), 겐시타빈(gemcytabine), 이포파미드(ifophamide), 이리노테칸(irinotecan), 멜팔란(melphalan), 메토크세이트(methotrexate), 나벨빈(navelbine), 토토테칸(totpotecan)과 택솔(taxol)을 포함하고, 대표적인 투여는, 이에 제한되는 것은 아니나, BEAM(busulfan, etoposide, cytosine, arabinoside, methotrexate); 사이클로포스파미드(cyclophosphamide) 및 전신 방사선 요법; 사이클로포스파민(cyclophosphamine) 및 전신 방사요법과 에토포시드(etoposide); 사이클로포스파미드(cyclophosphamide)와 부설판(busulfan); 및 루코보린(leucovorin) 또는 레바미솔(levamisole)과 함께 하는 5-플루오우라실(5-fluorouracil)을 포함한다. GIPF로 치료하고, 전치료하며, 후치료하는 것은, 예를 들어 잠재적 부작용을 감소시키면서 치료용량을 증가시키는 것을 허용하는 소장 및 결장(colon)의 점막의 세포보호 효과 또는 재생효과, 이들 모두에 유용하다.

GIPF로 치료될 수 있는 염증성 장질환은, 만성적, 재발하는, 원인이 밝혀지지 않은 염증성 질환, 크론씨병, 염증성 장질환에 연관된 이형성증(dysplasia), 중간 대장염(intermediate coliti), 궤양성 대장염(ulcerative coliti)로 특징지어지는 일반적 염증성 장질환(general inflammatory bowel disease); 활동성 대장염(active coliti), 항생제에 의한 대장염, 교원질성 대장염(collagenous coliti), 전환성 대장염(diversion coliti), 호산구성 대장염(eosinophilic coliti), 이식편대숙주병(graft versus host disease), 육아종성 대장염(granulomatous coliti), 허혈성 대장염(ischaemic coliti), 출혈성 대장염(hemorrhage coliti), 연반증(malakoplakia), 괴사성 장염(necrotizing enterocoliti), 방사성 장염(radiation enterocoliti), 맹장염을 포함하는 비감염성 대장염(non-infectious coliti); 및, 아데노바이러스(adenovirus)와 아메바성 대장염, 발라티둠증, HSV/AIDS에 속하는 장염, trypanosome, E. coli, Mycobacterium avium intracellulare, Sotavirus,

Salmonella, Shigella, Campylobacter jejuni, Clostridium Botulinum에 의해 야기되는 장염, 주혈흡충증(schistosomiasis), 스피로헤타증(spirochetosis), 매독(syphilis), trichuriasis, tuberculosis typhoid fever, Vibrio cholera와 Yersinia와 연관된 장염을 포함하는 감염성 대장염(infectious colitis)을 포함한다.

단장 증후군은 소장을 반이나 그 이상 절제한 사람들에게 영향을 미치는 문제의 그룹이다. 소장의 일부를 절제하는 대부분의 이유는 크론씨병의 치료이다. 또한, 장의 외과적 절제는 암으로의 진전을 제거하기 위해서도 필요하다. 설사는 단장 증후군의 대표적인 증상이다. 다른 증상으로는 경련, 복부팽만, 가슴앓이가 있다. 단장 증후군을 앓는 많은 사람들이 영양부족을 갖게 되는데, 이는 그들의 남은 소장이 식품에서 물, 비타민 그리고 다른 영양분을 충분히 흡수하는 것이 불가능하기 때문이다. 그들은 또한, 탈수가 일어날 수 있고, 이것이 생명을 위협할 수도 있다. 단장 증후군은 식이요법과 정맥영양, 비타민과 미네랄 보충제와 약을 통해 치료하여 증상을 경감시킨다. GIPF 폴리펩티드는 비절제된 위조직의 증식을 증가시키고, 그로 인해 장의 흡수성 있는 표면을 증가시켜 단장증후군의 증상을 개선한다.

GIPF 폴리펩티드의 세포보호 및/또는 재생 능력은 방사선이 점막염을 유도한 생체 내 시료(Withers and Elkind, Int J Radiat 17:261-267(1970), 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨) 생체내 화학요법으로 유도한 점막염(참조: Soris et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol 69:437-443(1990); Moore, Cancer Chemother Pharmacol 15:11-15(1985); Farell et al., Cel Prolif 35:78-85(2002), 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨); 대장염과 소장 궤양 또는 염증의 텍스트란 설페이트 나트륨(dextran sulfate sodium: DS) 모델(참조: Feffers et al., Gastroenterology 123:1151-1162(2002), Han et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279:G1011-G1022(2000)) 및 단장증후군의 외과수술 시료(참조: Scott et al. Am J Physiol G911-G921(1998); Helmrath et al., J Am Coll Surg 183:441-449(1996)), 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨)에 의해 시험되어질 수 있다.

만약 환자가 GIPF 치료에 반응한다면, 병든 세포 조직과 정상적 시료들 간의 GIPF mRNA와 단백질 발현 정도의 비교가 결정되어야 한다. GIPF 폴리펩티드 mRNA와 단백질 발현의 검출과 정량방법은 당업계에 잘 알려진 표준의 핵산과 단백질의 검출 및 정량법을 사용하고, 이는 [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY(1989)] 또는 [Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY(1989)]에 설명되어 있으며, 상기 두 문헌 모두 본 명세서에 참조문헌으로 삽입되어 있다. GIPF mRNA의 검출과 정량에 사용되는 표준방법에는 표지된 GIPF 리보탐침(riboprobe)을 사용하는 in situ 혼성화방법(참조: Gemou-Engesaeth, et al., Pediatrics 109:E24-E32(2002)), GIPF 폴리뉴클레오티드 탐침을 사용하는 노던 블랏(Northern blot) 및 관련 기술(참조: Kunzli, et al., Cancer 94:228(2002), 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨) GIPF-특이적 프라이머를 사용하는 RT-PCR방법(참조: Angchaisirisiri, et al., Blood 99:130(2002)), 및 분지쇄 혼성화방법 등의 증폭탐지방법(참조: Jardi, et al., J. Viral Hepat. 8:465-471(2001) 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨), 전사조절 증폭(참조: Kimura, et al., J. Clin. Microbiol. 40:439-445(2002)), oligo, cDNA들, 단클론항체들 등의 마이크로어레이(microarray) 생성물과 실시간(real-time) PCR이 포함된다(참조: Simpson, et al., Molec. Vision, 6:178-183(2002), 본 명세서에 참조문헌으로 삽입됨). GIPF 단백질의 검출과 정량 표준법에는 Western blot 분석(참조: Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY(1989), Ausube, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY(1989))이 포함된다.

본 발명의 방법에 의해 치료할 수 있는 질병과 상태는 포유동물에서 더 나타난다. 포유동물에는, 예를 들어, 사람, 개, 고양이 등의애완동물이나 반려동물, 랫트나 마우스, 토끼 등의실험동물, 그리고 말, 돼지, 양, 소들 등의농장동물 등의 다른 영장류들이 포함된다.

4.3.1 치료법

본 발명의 조성물(폴리펩티드 단편, 유사체, 변이체들, 항체들, 다른 결합 파트너 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조절인자)는 다양한 치료법에서 많은 응용성을 갖는다. 치료적 응용의 예에는, 이에 한정되는 것은 아니나, 본 명세서에 예시된 것들을 포함한다.

본 발명의 실시예 중의 하나는 본 발명의 GIPF 폴리펩티드의 투여 또는 조성물의 유효량을 본 발명의 펩티드로 치료될 수 있는 기능장애를 앓고 있는 환자에게 투여하는 것이다. 투여방법은 특별히 중요하지 않으나, 비경구적 투여가 바람직하다. 투여의 대표적 방식은 피하나 정맥 볼루스(intravenous bolus)로 전달하는 것이다. 본 발명의 GIPF 폴리펩티드나 다른 조성물의 투여량은 정상적으로는 처방의에 의해서 결정된다. 투여량은 나이, 체중, 상태, 환자 개개인의 반응에 따라 변경될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 바람직한 투여량은 환자 몸무게에 대해 0.1 μ g/kg에서 10mg/kg이지만, 통상적으로는, 1회 투

여량 당 폴리펩티드의 투여량은 몸무게의 0.01 μ g/kg에서 100mg/kg의 범위이다. 비경구적인 투여의 경우에는 본 발명의 GIPF 펩티드는 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 주사제 형태로 제제화될 것이다. 이러한 부형제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 그 예로는 물, 식염수, 링거액, 포도당액과 사람 혈청알부민의 미량으로 구성된 용액을 포함한다. 부형제는 폴리펩티드와 다른 유효성분의 등장성(isotonicity)과 안정성(stability)을 유지시켜 주는 미량의 첨가제도 포함할 수 있다. 이러한 용액의 제조는 당업자의 범주내에 있다.

4.3.2 의약 제제

본 발명의 단백질 또는 다른 조성물(제조합 및 비제조합의 근원에 제한되지 않고, 이를 포함하여, 본 발명의 항체 및 다른 폴리펩티드의 결합 파트너를 포함하여 어떠한 근원으로 부터 유도된)은 다양한 질병을 치료 또는 개선하기 위한 양으로 적절한 담체 또는 부형제와 혼합된 의약 조성물 형태로 그를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 이러한 조성물은(단백질이나 다른 활성성분 및 담체이외에도) 희석액, 충전제, 염, 완충제, 안정제, 액화제, 및 당해 분야에 잘 알려진 물질을 포함할 수 있다. "약학적으로 허용되는(pharmaceutically acceptable)"이라는 용어는 생물학적 활성을 가진 활성성분의 유효성을 방해하지 않으면서 해가 없는 비독성 물질을 의미한다. 담체의 특성은 투여경로에 의존적이게 될 것이다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은 싸이토카인, 림포카인 또는 다른 조혈요소 그리고 본 명세서에 설명된 싸이토카인은 물론, 다양한 FGFs, 상피세포성장인자(EGF), 혈소판-유래 성장인자(PDGF), 형질전이 성장인자(TGF-a 및 TGF-b), 인슐린양 성장인자(IGF), 케라티노사이트 성장인자(KGF) 등의 성장인자(growth factor)를 포함할 수 있다.

의약 조성물은 단백질 또는 다른 활성성분의 활성을 증강시키거나, 그의 활성을 보조하거나 치료에 사용되는 다른 성분을 포함할 수 있다. 이러한 부가적인 요소 및/또는 성분은 의약 조성물에 본 발명의 단백질 또는 다른 활성성분과 더불어 상승 효과를 나타내거나, 부작용을 최소화하기 위하여 포함된다. 반대로, 본 발명의 단백질이나 다른 활성성분은 응집요소(clotting factor), 싸이토카인, 림포카인, 다른 조혈요소, 혈전용해나 항혈전 요소 또는 항염증제(예를 들면, IL-1Ra, IL-1Hy1, IL-1Hy2, anti-TNF, 코르티코스테로이드(corticosteroid), 면역억제제)의 부작용을 줄이기 위한 특이한 싸이토카인, 림포카인, 다른 조혈요소, 혈전용해나 항혈전 요소 또는 항염증제를 조성물에 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질은 다중체(multimer) 형태(예를 들면, 이질 이중체(heterodimer) 또는 동질 이중체(homodimer))나, 그들끼리, 또는 다른 단백질과 혼합된 복합체 형태로 활성을 나타낸다. 결과적으로, 본 발명의 의약 조성물은 이러한 다중체 또는 복합체 형태의 단백질을 포함할 수 있다.

첫 번째 단백질을 포함하는 본 발명의 의약 조성물에 포함되기 위한 대안은 첫 번째 단백질과 함께 두 번째 단백질 또는 치료제를 함께 투여하는 것이다(예를 들어, 어떤 치료 부위에서 조합된 약물의 치료농도를 얻을 수 있다면, 동시에 또는 다른 때에). 즉각적인 적용을 위한 화합물의 제제화나 투여의 기술은 "Remington's Pharmaceutical Science" Mark Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾아 볼 수 있다. 또한, 치료적으로 효과가 있는 투여량은 증상의 개선을 가져오기에 충분한 조성물의 양을 의미한다(예를 들어, 관련한 의학적 상태에서의 치료, 치유, 예방이나 개선 또는 이러한 상태에서의 치료율, 치유율, 예방율 또는 개선률). 환자에게 유효성분을 단독투여하는 경우, 치료적으로 효과있는 투여량은 단독성분을 의미한다. 조합하여 투여하는 경우에는, 치료적으로 효과가 있는 투여량은 조합하거나, 연속적이거나 동시 이진 간에 치료효과를 나타내는 활성성분의 조합량(combined amount)을 의미한다.

본 발명의 치료방법이나 용도를 실시하는데 있어서, 단백질이나 다른 유효성분의 치료적 효과량이 치료하여야 할 상태에 있는 포유동물들에 투여된다. 본 발명의 단백질이나 유효성분은 본 발명의 방법에 따라 단독으로, 또는 사이토카인(cytokine), 림포카인(lymphokine), 다른 조혈인자(hematopoietic factor)를 사용하는 다른 치료법과 조합하여 투여될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 사이토카인, 림포카인 또는 다른 조혈인자를 동시투여 할 경우, 본 발명의 단백질이나 다른 유효성분은 사이토카인, 림포카인, 다른 조혈인자, 혈전용해(thrombolytic) 또는 항혈전(anti-thrombotic) 인자와 함께 동시에 또는 차례대로 투여될 것이다. 만약 연속적으로 투여된다면, 주치의는 본 발명의 단백질이나 다른 유효성분을 사이토카인, 림포카인 또는 다른 조혈인자, 혈전용해 또는 항혈전인자와 조합하여 적절한 순서로 투여되도록 결정할 것이다.

4.3.3 투여방법

투여를 위한 적절한 방법으로, 예를 들어, 구강(oral), 직장(rectal), 경점막(transmucosal)이나 장투여(intestinal administration); 및 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous), 척수내(intramedullary) 주사 또 경맥내(intrathecal), 직접적인 뇌실내(intraventricular), 정맥(intravenous), 복강내(intraperitoneal), 비강내(intranasal) 또는 안내(intraocular) 주사를 포함한다. 의약 조성물에 이용되는 본 발명의 단백질이나 유효성분의 투여나, 본 발명의 방법을 실시하기 위해서는, 경구투여, 흡입제, 마사지법, 피부, 피하 복강내(ip) 또는 비경구적, 정맥주입 등의 통상적 방법이 사용될 수 있다.

선택적으로는, 전신보다는 국부적으로, 예를 들어, 종종 데포제(depot formulation)나 서방형 제제(sustained release formulation) 형태로 조직에 직접 화합물을 투여할 수도 있다.

다른 실시예에 의하면, GIPF를 생산하는 세포를 상피세포의 증식 및/또는 자극을 필요로 하는 환자에게 주입(세포치료)하는 것이 고려된다. GIPF를 보통으로 발현하지 않거나 낮은 수준의 GIPF를 발현하는 세포는 GIPF를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로의 형질전환에 의해 GIPF의 치료수준을 나타내도록 변형될 수 있을 것이다. 세포는 환자 등의 종이거나, 다른 종에서도 얻어질 수도 있다. 바람직하게는, 세포는 GIPF 치료를 필요로 하는 환자에서 얻는다. 사람 또는 사람 이외에서의 세포는 생체합성(biocompatible)이면서, 반투과성인 중합체(semi-permeable polymeric enclosure)를 이용하여 GIPF 단백질에서 분리되도록 환자에게 이식되거나 캡슐없이 직접 이식될 수도 있다.

또 다른 실시예에 의하면, 생체 내 유전자 치료가 고려된다. GIPF를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 본 명세서에 개시된 질병들의 치료나 예방을 위한 단백질을 분비하기 위해 환자에게 직접 도입된다. GIPF를 암호화하는 뉴클레오티드는 치료를 위해 조직에 직접 주사되거나, 아데노바이러스 벡터나 레트로바이러스 벡터 등의 바이러스 벡터에 의해 감염된 조직의 세포에 이동될 수도 있을 것이다. GIPF를 암호화하는 핵산을 포함하는 적절한 벡터의 물리적 이동은 리포솜-매개 전이(liposome-mediated transfer), 네이키드 DNA(naked DNA)의 직접 주사, 수용체-매개 전이(receptor-mediated transfer) 또는 미립자 충격을 포함하는 방법으로 시행될 수 있을 것이다.

본 발명의 폴리펩티드는 유효한 투여량을 작용을 원하는 부위로 전달하는 어떠한 경로에 의해서도 투여될 수 있다. 적절한 투여경로와 특정 작용을 위한 유효량은 당업계의 기술수준의 범위 내에서 결정된다. 바람직하게는, 상처 치유를 위해서 치료 화합물을 치료부위에 직접 투여한다. 본 발명의 폴리펩티드의 적절한 투약 범위는 투여량이나 동물모델을 이용한 유사 연구를 통해 추측할 수 있다. 투여량은 임상시험에 의해 최대의 치료성과를 가져올 수 있도록 조절될 수 있다.

4.3.4 조성물/제제

본 발명에 따른 용도를 위한 의약 조성물은 활성물질을 의약적으로 사용되어질 수 있는 제제로 전환하는 가공을 용이하게 하는 부형제(excipient)와 보조제(auxiliary) 등의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 통상적인 방법으로 제제화될 수 있을 것이다. 이러한 의약 조성물들은, 예를 들면, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정화, 분말화, 유화, 캡슐화, 포획화(entrapment) 또는 동결건조 등의 공지된 방법으로 생산될 수 있을 것이다. 적절한 제형은 선택되는 투여방법에 따라 결정되어질 것이다. 본 발명의 치료적으로 효과적인 단백질이나 다른 활성물질의 양이 경구적으로 투여될 때, 이는 정제, 캡슐, 분말, 용액 또는 엘릭서(elixir)의 형태를 띠게 된다. 정제의 형태로 투여될 때, 본 발명의 의약 조성물은 부가적으로 젤라틴(gelatin)이나 어쥘런트(adjuvant) 등의 고형 담체를 포함하게 된다. 정제, 캡슐 및 분말제는 본 발명의 단백질이나 활성성분을 약 5% 내지 95% 포함하며, 바람직하게는 약 25% 내지 90%를 포함한다. 액제 형태로 투여할 경우에는, 물, 페트롤륨(petroleum), 그리고 동물유와 땅콩기름, 무기질유, 대두유, 참기름 등의 식물성유 및 합성유가 첨가된다. 의약 조성물의 액제형태는 추가로 생리식염수, 포도당이나 당류 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 글리콜류를 포함할 수 있다. 액제 형태로 투여될 때, 의약 조성물은 본 발명의 단백질 또는 활성물질을 중량비로 약 0.5% 내지 90%를 포함하며, 바람직하게는 1% 내지 50%를 포함한다.

본 발명의 치료적으로 효과적인 양을 정맥내로 투여하거나 피부 또는 피하로 투여할 경우, 본 발명의 단백질이나 활성성분은 발열원이 없는(pyrogen-free) 비경구적으로 허용되는 수용성 액체의 형태를 띤다. pH, 등장성(isotonicity), 안정성(stability) 등을 충분히 고려하여, 비경구적으로 허용되는 단백질이나 활성성분을 준비하는 것은 당업자의 범주내에서 이루어진다. 정맥내로 투여하거나 피부 또는 피하주사로 투여하기 위한 바람직한 의약 조성물은, 본 발명의 단백질이나 활성성분 이외에 소듐 클로라이드 주사제(Sodium Chloride Injection), 링거 주사제(Ringer's Injection), 덱스트로스 주사제(Dextrose Injection), 덱스트로스/소듐 클로라이드 주사제(Dextrose and Sodium Chloride Injection), 락산 링거액(Lactated Ringer's Injection) 또는 당업계에 공지된 담체를 포함해야 한다. 본 발명의 의약 조성물에 안정제, 보존제, 완충용액, 산화방지제 또는 다른 첨가물이 함유될 수 있다. 주사를 위해서는, 본 발명의 약물이 가급적이면 행크액(Hank's solution), 링거액(Ringer's solution) 또는 생리식염수 등의 생리학적으로 친화성이 있는 완충용액이 사용되어 수용성 액체로 제제화될 것이다. 점막을 통한 투여를 위해서는, 장벽들을 투과하기 위한 적절한 투과제(penetrant)가 제제화 과정에 사용되며, 이러한 투과제는 당업계에 잘 알려져 있다.

경구투여를 위해서는, 본 발명의 활성성분들이 당업계에 공지된 약학적으로 허용되는 담체와 결합됨으로서 쉽게 제제화될 수 있다. 이러한 담체들은 본 발명의 화합물들이 정제, 정제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 현탁액, 부유액 등의 형태로 제제화되어 환자들이 치료를 위해 구강으로 섭취할 수 있게 해 준다. 구강섭취를 위한 의약조제는 적절한 보조제를 첨가한 다음에 고형 부형제로 얻어지거나, 마지막 혼합물을 선택적으로 갈아서 분말로 만들거나, 과립 혼합과정을 사용하고, 원하는

다면 정제나 당의정 핵을 얻기 위해 사용하기도 한다. 특히 적절한 부형제는 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 솔비톨을 포함하는 당류(sugar) 등의 충전제(filler); 예를 들어, 옥수수 전분(maize starch), 소맥 전분(wheat starch), 쌀 전분(rice starch), 감자 전분(potato starch), 젤라틴, 검 타가칸스(gum tragacanth), 메틸 셀룰로스(methyl cellulose), 하이드록시메틸 셀룰로스(hydroxypropylmethyl cellulose), 카복시메틸 셀룰로소나트륨(sodium carboxymethylcellulose), 및/또는 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP) 등의 셀룰로스이다. 원하는 경우, 교차결합(cross-link)된 폴리비닐피롤리돈, 아가(agar), 또는 알긴산(alginic acid)과 알긴산 나트륨(sodium alginate)의 염(salt) 등 붕해제가 첨가될 수 있다. 당의정 핵은 적당하게 코팅되어 제공된다. 이러한 목적으로, 선택적으로 아라비아 검(gum arabic), 활석(talc), 폴리비닐피롤리돈, 카보폴 겔(carbopol gel), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 및/또는 티타늄 디옥사이드(titanium dioxide), 라커액(lacquer solution)이 포함되는 농축된 설탕 용액과 적절한 유기용매 혹은 혼합용매가 사용된다. 염료나 색소가 활성화합물 투여량의 각각 다른 결합이나 특징 또는 구분을 나타내기 위하여 정제나 당의정 코팅에 첨가될 수 있다.

경구로 사용되는 의약 조성물은 젤라틴으로 만들어진 푸쉬핏(push-fit) 캡슐 뿐만 아니라, 젤라틴과, 글리세롤, 솔비톨 등의 가소제로 만들어진 부드럽고 봉인된 캡슐을 포함한다. 푸쉬핏 캡슐은 락토스 등의 충전제, 전분 등의 결합제(binder) 및/또는 활석(talc), 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate) 등의 윤활제, 및 선택적으로 안정제들과의 혼합물내에 유효성분을 함유할 수 있다. 부드러운 캡슐 안에서, 유효성분들은 지방유(fatty oil), 파라핀액(liquid paraffin) 혹은 폴리에틸렌글리콜액(liquid polyethyleneglycol) 등의 적절한 용액에 용해되거나 현탁된다. 그외에도, 안정제가 첨가될 수 있다. 경구투여를 위한 모든 제제는 이러한 투여에 적절한 투여량으로 제제화되어야 한다. 구강투여의 경우에는, 그 조성물들이 정제 또는 구중정(lozenge)의 형태로 통상적인 방법에 의해 제제화될 것이다.

흡입투여의 경우에는, 본 발명의 사용을 위해 조성물들이 적절한 추진제(propellant, 예를 들어, 디클로로디플로오로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플로오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로테트라플로오로에탄(dichlorotetrafluoroethane), 이산화탄소(carbon dioxide) 또는 다른 적절한 기체의 사용과 함께 압축된 액의 분무 스프레이나 분무기의 형태로 편리하게 전달된다. 압축 분무(pressurized aerosol)의 경우, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브(valve)에 의해서 결정된다. 예를 들어, 흡입기(inhaler) 또는 취분기(insufflator)에 사용되는 젤라틴(gelatin) 등의 캡슐과 약포(cartridge)는 화합물의 분말 혼합물과 락토스나 전분 등의 적절한 분말을 함유하여 제제화될 수 있다. 화합물들은 예를 들면, 보울스 주사(bouls injection) 혹은 계속적인 주입에 의해서 비경구적으로 투여되도록 제제화될 수 있을 것이다. 주사제는 첨가되는 보존제와 함께, 예를 들어, 앰플(ampule)이나 반복 투여용기(multi-dose container)에 단위 투여량 형태로 제공될 수 있다. 조성물들은 지용성 또는 수용성 용매에 용해시킨 현탁액, 용액 혹은 유액(emulsion)의 형태를 취할 것이며, 물질을 현탁시키거나, 안정화시키고 및/또는 분산시키는 물질들을 함유할 것이다.

비경구적 투여를 위한 의약 제제는 유효성분의 수용액을 수용성 형태로 포함한다. 또한, 유효성분의 현탁액은 적절한 지용성의 주사 현탁액으로서 제제될 수 있다. 적당한 지방친화성(lipophilic) 용매 또는 담체로는 참기름 등의 지방산(fatty acid) 또는 에틸올레인산(ethyl oleate)나 트리글리세라이드(triglyceride) 등의 합성 지방산에스테르(fatty acid ester) 또는 리포솜(liposome) 등을 포함한다. 수용성 주사 현탁액은 탄산나트륨셀룰로스(sodium carboxymethyl cellulose), 솔비톨(sorbitol) 또는 덱스트란(dextran) 등의 현탁액의 점도를 증가시키는 물질들을 함유한다. 선택적으로, 현탁액은 적절한 안정제나 화합물의 용해도를 높여 고농도 농축액으로 만들 수 있게 하는 물질들을 함유한다. 선택적으로, 유효성분은, 예를 들어, 살균된 발열원없는(pyrogen-free) 물 등의 적절한 용매와 사용 전에 혼합할 수 있도록 분말형태로 만들어 질 수 있다.

또한, 화합물들은, 예를 들어, 통상적인 좌약의 기체(base)인 코코아 버터(cocoa butter)나 다른 글리세라이드(glyceride)를 포함하는 좌약제(suppository)나 정체성 관장제(retention enema) 등의 직장 조성물로도 제제화될 수 있다. 전술한 제제 이외에도, 화합물들은 데포제(depot preparation)로 제제화될 수 있다. 이렇게 장시간 작용하는 제제들은 주입(implantation, 예를 들어, 피하나 근육내로) 또는 근육내 주사에 의해서 투여될 수 있다. 따라서, 화합물들은 예를 들어, 적절한 고분자(polymeric) 또는 소수성, hydrophobic) 물질(예를 들어, 허용되는 기름의 유제액으로)과 함께, 또는 이온교환수지 또는 수용성 염 등의 경제적인 수용성 유도체들과 함께 제제화된다.

본 발명의 소수성 화합물을 위한 약학적 담체는 벤질알콜(benzyl alcohol), 비극성 계면활성제, 수-혼합성 유기고분자(water-miscible organic polymer) 및 수용성 부분을 포함하는 공용매 시스템(co-solvent system)이다. 공용매 시스템은 VPD와의 공용매 시스템일 것이다. VPD는 무게당 부피를 기준으로 3%(w/v) 벤질 알콜, 8%(w/v) 비극성 계면활성제 폴리솔베이트 80(nonpolar surfactant polysorbate 80) 및 65%(w/v) 폴리에틸렌글리콜 300에 나머지 양은 100% 에탄올로 채움으로써 만들어진 용액이다. VPD 공용매 시스템(VPD:5W)는 물에 용해시킨 5% 덱스트로스와 1:1로 희석된 VPD로 이루어진다. 이 VPD 공용매 시스템은 소수성 조성물을 잘 용해시키고, 전신으로 투여하였을 때 낮은 독성을 보인다. 자연적으로, VPD 공용매 시스템의 비율은 그것의 용해도와 독성의 유무와 상관없이 상당히 다양화될 수 있다. 게다가,

VPD 공용매 시스템의 본질은 변화될 수 있다; 예를 들어, 다른 낮은 독성의 비극성 계면활성제가 폴리솔베이트 80 (polysorbate 80) 대신에 사용될 수 있다; 폴리에틸렌 글리콜의 부분적인 크기가 변할 수 있다; 다른 생체합성 고분자들이 폴리에틸렌을 대체하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 및 다른 당류 또는 다당류 등이 텍스트로스를 대신할 수 있다. 선택적으로, 소수성 의약 조성물들을 위한 다른 전달 체계가 사용될 수 있다. 리포솜과 유제액(emulsion)은 잘 알려진 소수성 약물의 운반체(delivery vehicle) 또는 담체(carrier)의 예이다. 디메틸설폭사이드 등의 특정 유기용매가 비록 높은 독성에도 불구하고 사용되어 질 것이다. 게다가, 조성물들은 치료적인 물질을 포함하는 고형 소수성 고분자(solid hydrophobic polymer)의 반투과성 세포간질의 서방성 시스템(sustained-release system)을 사용하여 전달될 것이다. 다양한 종류의 서방성 물질들이 당업자의 범주 내에서 알려져 왔다. 서방형 캡슐은 그것의 화학적 성질에 따라, 몇 주에서부터 100일 이상에 걸쳐 조성물들을 방출할 것이다. 치료제의 화학적 본질과 생물학적 안정성에 따라, 단백질이나 다른 활성 물질의 안정성에 관한 부가적인 전략이 수립될 것이다.

의약 조성물은 적절한 고형 또는 젤 타입의 담체나 부형제를 포함하기도 한다. 이러한 담체나 부형물의 예로서는, 이에 제한되는 것은 아니나, 탄산칼슘(calcium carbonate), 인산칼슘(calcium phosphate), 다양한 당류, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 고분자를 포함한다. 본 발명의 많은 유효성분은 의약적으로 이온과 용화할 수 있는 염으로서 제공된다. 이러한 약학적으로 허용되는 염기가 첨가된 염은 생물학적인 유효성과 자유산(free-acid)의 특성을 유지하고 수산화나트륨, 수산화마그네슘, 암모니아, 트리알킬아민, 디알킬아민, 모노알킬아민, 이염기 아미노산(dibasic amino acid), 탄산나트륨(sodium acetate), 안식향산 칼륨(potassium benzoate), 트리에탄올아민 등의 비유기적 또는 유기적인 염기와 반응하여 수득된다.

본 발명의 의약 조성물은 단백질 또는 단백질 항원에 따라, 본 발명의 다른 유효성분이 단백질 복합체의 형태를 띠게 될 것이다. 단백질 및/또는 펩티드 항원은 B와 T 림프세포(lymphocyte)에 자극적인 신호를 보낼 것이다. B 림프세포는 그것의 세포표면에 존재하는 면역글로불린(immunoglobulin) 수용기를 통하여 반응할 것이다. T 림프세포는 MHC 단백질에 의한 항원에 따른 T 세포 항원 수용기(TCR)를 통하여 반응할 것이다. 숙주세포에서 class I 과 class II MHC 유전자에 의해서 암호화되는 단백질들을 포함하며, 구조적으로 관계가 있는 단백질들과 MHC는 T 림프세포에 펩티드 항원을 제공할 것이다. 항원 조성물들은 역시 정제된 MHC-펩티드 복합체 단독이든지 또는 T 세포에 직접적으로 신호를 보낼 수 있는 보조 자극제 역할의 분자와 함께 공급되어질 수 있다. 선택적으로, 표면 면역글로불린과 B 세포의 다른 분자들과 함께 화합할 수 있는 항체들 뿐만 아니라, TCR과 T세포의 다른 분자들과 화합할 수 있는 항체들이 본 발명의 의약 조성물과 결합할 수 있다.

본 발명의 의약 조성물은, 다른 약학적으로 허용되는 담체 외에도, 본 발명의 단백질이 미셀(micelle)처럼 군집 형태(aggregated form)의 내부나, 불용성 단층(insoluble monolayer), 액상 크리스탈(liquid crystal)에 존재하는 지질 등의 양친매성 물질(amphiphetic agent) 또는 수용성 용액 내의 판 층(lamellar layer)과 결합할 수 있는 리포솜(liposome)의 형태일 수도 있다. 리포솜 제제를 위한 적절한 지질은, 이에 제한되는 것은 아니나, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설파티드(sulfatide), 리소레시틴(lysolecithin), 인지질, 사포닌(saponin), 담즙산(bile acid)을 포함한다. 이러한 리포솜 제제의 제조는 당업자의 범주 내에서, 예를 들어 미합중국 특허 제 4,235,871호; 제 4,501,728호; 제 4,837,028호; 및, 제 4,737,323호(상기 문헌 모두 본 명세서에 참고문헌으로 인용되어 있다)에 개시된 바대로 이루어진다.

본 발명의 의약 조성물들의 단백질 또는 유효성분의 양은 치료되는 상태의 성격과 심각성, 및 환자가 이전에 사용해 본적이 있는 치료에 의존한다. 궁극적으로, 담당 의사가 개개인의 환자를 치료하기 위한 양으로, 본 발명의 단백질 또는 유효성분의 양을 결정할 것이다. 첫 단계로, 담당의사는 본 발명의 단백질 또는 유효성분의 낮은 농도를 투여하고 환자의 반응을 관찰할 것이다. 환자에게서 최적의 치료효과가 보일 때까지 본 발명의 단백질 또는 유효성분의 농도를 조금씩 높여 투여할 것이고, 효과가 보이는 시점에서는 더 이상 투여량을 높이지 않을 것이다. 본 발명의 방법을 실행하기에 다양한 의약적 조성물은 본 발명의 단백질 또는 다른 활성 성분을 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 약 100mg(약 0.1 μ g에서 약 10mg, 바람직하게는 약 0.1 μ g 내지 약 1mg) 함유해야 함이 고려된다. 뼈, 연골, 힘줄 또는 인대의 재생에 효과적인 본 발명의 조성물의 경우, 치료방법은 본 발명의 조성물을 삽입(implant) 또는 고안물(device)로서 국소적, 전신적 또는 국부적으로 투여하는 단계를 포함한다. 투여시에, 본 발명의 치료적 조성물을 사용하기 위해서는 물론 발열원이 없고 생리학적으로 허용되는 형태여야 한다. 게다가, 조성물은 캡슐화되거나 뼈, 연골 또는 조직적 상처에 전달되기 위해 점성이 있는 형태로 주사되어지는 것이 바람직할 것이다. 국소적 투여는 상처치유와 조직 재생에 적합할 것이다. 상술한 바와 같이, 본 발명의 단백질 또는 유효성분보다, 선택적으로 조성물에 포함될 수 있는 치료적으로 더 유용한 물질이 본 발명의 조성물과 함께 선택적으로 또는 부가적으로, 동시에 또는 차례로 투여될 것이다. 뼈 및/또는 연골의 생성을 위해서 조성물은 단백질을 포함하거나 또는 다른 유효성분을 포함하는 화합물을 뼈 및/또는 연골의 상처부위로 운반할 수 있는 세포 기질을 포함할 것이며, 뼈와 연골의 발달을 위한 구조를 제공하고 최적으로 체내에 흡수될 것이다.

기질(matrix material)의 선택은 생체합성(biocompatibility), 생체분해성(biodegradability), 물리적 특성, 미용적 외관과 조화성에 기본을 두고 있다. 조성물의 특별한 적용은 적절한 제제화를 정의할 것이다. 조성물의 잠재적인 기질은 생체 분해적이고 화학적으로 정의된 황산칼슘(calcium sulfate), 인산삼칼슘(tricalcium phosphate), 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite), 폴리락트산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic acid) 및 다불수소화물(polyanhydride) 일 것이다. 다른 잠재적인 물질들은 생체 분해적이고 생물학적으로 정의가 잘 내려진 뼈 또는 진피의 콜라겐이다. 그 이상의 기질들은 순수 단백질 또는 세포의 기질 구성요소를 포함한다. 또 다른 잠재적인 기질들은 비생분해적이고 화학적으로 정의 내려진 천화된 하이드록시아파타이트(sintered hydroxyapatite), 생체유리(bioglass), 알루미늄염(aluminate) 또는 다른 세라믹(ceramic)이다. 세포 기질은 전술한 폴리락트산, 하이드록시아파타이트, 콜라겐(collagen) 또는 인산삼칼슘등의 어떤 결합으로도 이루어진다. 바이오세라믹(bioceramic)은 조성물 내에서 칼슘-알루미늄-인산염(calcium-aluminate-phosphate)와 반응하거나 구멍(pore)의 크기, 입자의 크기, 입자의 모양의 처리과정 및 생체 분해성에 의해서 변형될 수 있다. 오늘날 범위가 150에서 800 마이크로미터(micron)에 이르는 지름을 가지고 있는 다공성 입자의 형태로 젖산(lactic acid)과 글리콜산(glycolic acid)의 분자량 비율로 50:50의 공중합체(copolymer)가 선호된다. 어떤 방법에서는, 칼복시메틸 셀룰로스(carboxymethyl cellulose) 또는 자가유래성 혈괴(autologous blood clot) 등의 격리 작용물을 사용하는 것이 단백질 조성물이 기질에서부터 해리되는 것을 예방하기에 유용할 것이다.

격리 작용물들 중에서 선호되는 부류는 알킬셀룰로스(alkylcellulose)(하이드록시알킬셀룰로스(hydroxyalkylcellulose)포함), 메틸셀룰로스(methylcellulose), 에틸셀룰로스(ethylcellulose), 하이드록시에틸셀룰로스(hydroxyethylcellulose), 하이드록시프로필셀룰로스(hydroxypropylcellulose), 하이드록시프로필메틸셀룰로스(hydroxypropylmethylcellulose) 및 카복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose) 등의 셀룰로스(cellulose) 물질들이며, 가장 선호되는 것은 카복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose, CMC)의 양이온성 염(cationic salt)이다. 다른 격리 작용물은 하이알루론산(hyaluronic acid), 알진산 나트륨(sodium alginate), 폴리에틸렌글리콜(poly(ethylene glycol)), 폴리옥시에틸렌 옥사이드(polyoxyethylene oxide), 카복시비닐 중합체(carboxyvinyl polymer) 및 폴리비닐알콜(poly(vinyl alcohol))을 포함한다. 본 발명에서 유용한 격리작용물의 양은 전체적인 제제 무게에 대하여 0.5-2%이며, 바람직하게는 1-10%이며, 이것은 고분자 기질로부터 단백질의 탈리(desorption)를 예방하고 조성물을 적절히 취급하기에 필수적인 양을 나타내지만, 선조세포(progenitor)가 기질을 침윤 하는 것으로부터 예방되어지고, 따라서 단백질이 선조세포의 골 형성 활성을 보조하는 기회를 제공할 만큼 많은 양은 아니다. 이에 더하여, 본 발명의 단백질 또는 활성 물질들은 뼈 및/또는 연골의 결합, 상처 또는 조직의 치유에 유용한 다른 물질들과 결합하게 된다. 이러한 물질들은 상피세포 성장인자, 혈소판-유래 성장인자(platelet derived growth factor, PDGF), 형질전이 성장인자(transforming growth factor(TGF- α , TGF- β)) 및 인슐린양 성장인자(insulin-like growth factor(IGF)) 등의 다양한 성장인자들을 포함한다.

치료적 조성물은 현재 수의학적인 적용에도 가치가 있다. 특히 사람 이외에도 가축들과 서러브레드 종 말(thoroughbred horse)이 본 발명의 단백질 또는 유효성분을 실험해 보기에 요구되어지는 환자이다. 조직 재생에 사용되어 온 단백질을 함유하는 의약적 조성물의 투약계획은 담당의사에 의해 단백질의 작용을 일부 수정하는 다양한 인자들을 고려하여 결정될 것이다. 예를 들어, 형성되기까지 필요한 조직의 양, 상처의 부위, 상처 조직의 상태, 상처의 크기, 상처 조직의 종류(예를 들면, 뼈), 환자의 나이, 성별 및 식이요법, 감염성 여부, 투여시간 및 다른 여러 임상적 요인들이다. 투여량은 상처재생에 쓰인 기질의 종류와 의약적 화합물안의 단백질의 세포함유물에 의해서 다양해질 것이다. 예를 들어, 인슐린양 성장인자 I (IGF I (insulin like growth factor I))등의 성장인자를 최종 조성물에 첨가하는 것도 투여량에 영향을 미칠 것이다. 진행과정은 조직/뼈의 성장 및/또는 회복정도를 X-ray, 조직형태학적 및 테트라사이클링(tetracyclining) 표지법으로 주기적인 측정에 의하여 관찰될 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드는 유전자 치료에도 사용될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 포유류에서 발현하기 위해 세포 속으로 생체내 조건(in vivo)이나 생체의 조건(ex vivo)의 실험에 의해 도입될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 역시 핵산을 세포나 다른 유기체(제한적이지는 않지만 바이러스성 벡터나 DNA 단독으로)안으로 유입하는 이미 알려진 방법에 의해 투여되어 질 것이다. 세포는 이러한 형질전환된 세포내에서 증식하거나 활성을 나타내기 위하여 본 발명의 단백질 존재 하에 생체의 조건(ex vivo)상에서 배양될 것이다. 처리과정을 거친 세포는 치료적인 목적을 위하여 생체내 조건(in vivo)상으로 도입될 수 있다.

4.3.5 효과적인 투여량

본 발명에서 사용하기에 적합한 의약조성물은, 계획된 목적을 달성하기 위해 유효량이 함유된 활성있는 재료들을 포함하고 있는 성분을 의미한다. 좀더 명확하게 말하면, 치료의 효과적인 양은 치료대상(환자)의 증상의 발생을 방지하거나 혹은 나타나는 증상을 완화하는데 효과적인 양을 의미한다. 유효량의 결정은, 특히 여기 명시된 명세서의 상세한 설명에 나타나는 기술분야에서 숙련된 전문가(당업자)의 능력에 따라 달려있다. 본 발명의 방법에서 사용된 어떤 조성물에 의해, 치료적

으로 유효한 투여량은 생체내(in vitro assay)에서 먼저 적합한지 결정될 수 있다. 예를 들면, 인간에게 알맞은 투여량을 좀 더 정확히 결정할 수 있는 순환농도(circulating concentration) 범위를 얻기 위해 동물에 투여하여 수치화할 수 있다. 또는 세포배양에서 결정되는 IC50을 포함하는 순환농도범위(즉, 단백질의 생물학적 활성을 최대 반정도 저해하는 시험용 화합물의 농도)를 얻기 위해서도 가능하다. 그러한 정보는 사람에게 알맞은 투여량을 좀 더 정확하게 결정하는데 사용될 것이다.

치료적으로 유효한 투여량은 환자의 생명을 연장하거나 증상을 개선할 수 있는 화합물의 양을 의미한다. 그러한 화합물의 독성과 치료능력은 세포배양이나 실험용 동물의 표준 의약적 진행경과(standard pharmaceutical procedures) - 예를 들면, LD50(표본의 50%치사량을 의미) 과 ED50(표본의 50%에서 치료적으로 효과적인 투여량) - 에 의해 결정될 수 있다. 유독성과 치료효과의 투여비율은 치료기준이 되며, 이는 LD50과 ED50의 비율에 의해 표현될 수 있다. 고효율의 치료기준들을 나타내는 조성물은 앞에서 언급되었다. 이같은 세포배양분석에서 획득된 데이터와 동물연구들은 인간에 사용되는 투여량의 범위를 수치화하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량은 독성이 전혀 없거나 거의 없는 ED50을 포함하는, 바람직한 순환농도범위에 달려있다. 투여형태 대상자와 이용된 투약경로에 의존하는 이 범위에서 투여량은 변할 수 있다. 투약경로와 투여량의 정확한 수치화는 환자상태를 고려해서 개개인의 주치의에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, "치료의 의약적 원칙(The Pharmacological Basis of Therapeutics), 1975"을 보면, 1장 첫페이지에서 투여량과 투여간격은 바람직한 결과나 최소한의 효과적인 농도(MEC)를 유지하는데 충분한 혈장수치의 일부분을 공급하기 위해 개별적으로 조절될 수 있다고 한다. MEC는 화합물 각각마다 변할수 있으나, 시험관내 데이터로부터 측정될 수 있다. MEC를 달성하기 위해 필요한 투여량은 개개인의 특성과 투약경로에 의해 의존될 것이다. 그러나 HPLC분석 혹은 생물학적 정량(bioassays)은 혈장농도를 결정하는데 사용될 수 있다.

투여간격은 또한, MEC수치에 의해 결정될 수 있다. 조성물들은 혈장수치를 - 그 시간의 10~90%, 바람직하게는 30~90%, 가장 바람직하게는 50~90% 로서 - MEC보다 높게 유지하는 처방계획(regimen)에 따라 투여되어야 한다. 국부 투여나 선택적인 투여의 경우, 약의 효과적인 국부농도는 혈장농도와는 관련이 없을 수도 있다.

폴리펩타이드나 발명의 다른 조성물들에 대한 대표적인 투여 처방기준은 평소 환자 체중의 0.01ug/kg에서 100mg/kg이며, 바람직한 투여량은 체중의 0.01ug/kg에서 25mg/kg이 될 것이다. 이 수치는 성인인지 소아인지에 따라 바뀔 수 있다. 투여는 하루 한번이며, 같은양이 더 길게 혹은 더 짧은 간격으로 투여될 수 있다.

물론 투여되는 조성물의 양은 치료대상의 나이, 몸무게, 통증정도, 투약방법이나 의사의 처방전에 따라 달라질 수 있다.

4.3.6 진단방법과 기구들

본 발명은 더욱이 선택적으로 접합되거나 그 밖의 적절한 표지로 결합된 핵산탐침(a nucleic acid probe)이나 항체들(antibodies)을 사용하여, 본 발명의 ORFs중의 하나의 발현이나 시험용 샘플에서 상동기관 그자체, 혹은 그 존재를 확인하기 위한 방법들을 제공한다.

보통 발명의 폴리뉴클레오티드를 발견하기 위한 방법은, 충분한 시간동안 폴리뉴클레오티드와 결합해서 복합체를 형성하는 조성물을 포함하는 샘플과 접촉하는 것으로 구성될 수 있다. 그리고 복합체가 발견된다면 발명의 폴리뉴클레오티드는 그 샘플에서 발견될 것이다. 또한, 그러한 방법은 그러한 조건하에서 발명의 폴리뉴클레오티드로 폴리는 핵산프라이머(nucleic acid primers)와 엄격한 혼성화 조건하에서 샘플과 접촉하는 것을 구성하거나 폴린 폴리뉴클레오티드를 증폭하는 것으로 구성될 수 있다. 만약 폴리뉴클레오티드가 증폭된다면 발명의 폴리뉴클레오티드는 그 샘플에서 발견될 것이다.

일반적으로 발명의 폴리펩타이드를 발견하기 위한 방법은, 충분한 시간동안 폴리펩타이드와 결합해서 복합체를 형성하는 조성물을 포함하는 샘플과 접촉하는 것으로 구성될 수 있다. 그리고 복합체가 발견된다면 발명의 폴리펩타이드는 그 샘플에서 발견될 것이다.

세부적으로, 그러한 방법들은 본 발명의 하나 혹은 다수의 핵산탐침이나 항체가 있는 시험용 샘플(a test sample)을 배양하거나, 핵산탐침이나 항체와 결합한 시험용 샘플내의 조성물을 분석하는 것을 포함하고 있다.

테스트 샘플(a test sample)의 핵산탐침이나 항체를 배양하는 조건은 변화할 수 있다. 배양조건은 검정에 사용된 핵산탐침이나 항체의 종류와 특성, 채택된 검출방법들, 검사에 사용된 형식(the formats)에 달려있다. 당업자는 보통 사용되는 혼성화 · 증폭 · 면역적 검사 방법들(immunological assay formats)중의 어느 하나로 쉽게, 본 발명의 핵산탐침이나 항체를 사용할 수 있다는 것을 알 수 있다. 그러한 검사들의 실례는 Chard, T., An Introduction to Radioimmunoassay and Related Technique, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands(1986); Bullock, G.R et al.,

Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1(1982), Vol. 2(1983), Vol. 3(1985); Tijssen, P., Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands(1985)에 나타나 있다. 본 발명의 실시예들은 세포들, 단백질, 혹은 세포의 막추출물, 혹은 타액·혈액·혈청·혈장·소변등의 생체유액들을 포함한다. 상기 서술된 방법에서 사용된 실시예들은 검사형식, 검출방법의 특성, 검정하기 위해 샘플로서 사용된 조직, 세포, 추출물등에 따라 바뀔 수 있다. 단백질 추출물이나 세포의 막추출물을 얻기위한 방법들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 사용된 방식에 적합한 샘플을 쉽게 얻을 수 있다.

본 발명의 또다른 구현은 키트(kits)가 발명의 검정을 수행하기 위해 필요한 반응물들을 포함하고 있다는 것이다. 특히 본 발명은 하나 또는 그 이상의 밀착되고 제한된 용기를 수용하기 위한 구분된 키트로 구성되며, (a)첫번째 용기는 발명의 탐침이나 항체를 포함하고 있으며, (b)또다른 용기는 wash reagents, bound probe나 항체의 존재를 발견할 수 있는 시약들을 포함하고 있다.

구체적으로, 하나의 구분된 키트는 시약들을 포함하는 분리된 용기로 되어있다. 그러한 용기들은 작은 유리용기이거나 플라스틱 용기, 또는 플라스틱·종이로 된 비어있는 용기들이다. 이런 용기들은 시약을 한부분에서 다른 부분으로 효율적으로 이동시키는데 적합하며 샘플들과 시약들은 교차로 오염되지 않게 된다. 그리고, 각각의 용기속의 시약이나 용매는 한부분에서 다른 부분으로 양적인 방식(quantitative fashion)으로 더해진다. 또한, 용기들은 테스트 샘플들을 수용할 수 있고, 검정에 사용된 항체를 포함하며, 인산염분완충제(phosphate buffered saline)나 트리스-완충제(Tris-buffers)같은 wash reagents를 가지고 있다. 그리고 용기들은 또한, 바운드 항체(The bound antibody)나 항체를 검정하기 위해 사용된 시약들도 포함한다. 만약 첫 번째 항체가 효소적으로(enzymetica) 혹은 표지된 항체와 반응할 수 있는 항체 결합 시약(antibody binding reagents)들로 표지되었다면, 검출시약(detection reagents)의 형태는 표지된 핵산탐침과 표지된 두 번째 항체, 혹은 대체될 수 있는 항체를 포함하게 된다. 당업자라면 본 발명에서 노출된 탐침들과 항체들이 당해 기술분야에서 확립된 키트형식에 의해 쉽게 합체(incorporated)될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있을 것이다.

4.3.7 집단검진 분석

추출된 단백질과 폴리뉴클레오티드를 사용하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 2, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104 or 177에서 밝혀진 뉴클레오티드 서열에 대응하는 ORF에 의해 암호화된 폴리펩티드에 결합하는 조절 작용제(modulatory agents), 혹은 핵산(the nucleic acid)에 의해 암호화된 폴리펩티드의 특정 영역(a specific domain)에 결합하는 조절 작용제를 획득하고 발견하는 방법을 제공한다.

세부적으로는 (a) 본 발명의 ORF나 핵산에 의해 암호화된 추출단백질을 작용제에 접촉시키고,

(b) 그 작용제와 결합된 것이 단백질인지 핵산인지를 결정하는 단계로 구성되어 있다.

보통 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 결합하는 조성물을 확인하는 방법들은, 폴리뉴클레오티드/조성물 복합체를 형성하기에 충분한 시간동안 발명의 폴리뉴클레오티드와 접촉하는 조성물과 탐지된 그 복합체를 포함할 수 있다. 그러므로 만약 폴리뉴클레오티드/조성물 복합체가 탐지된다면 발명의 폴리뉴클레오티드에 결합하는 조성물이 확인될 수 있을 것이다.

더욱이, 또한, 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 조성물을 확인하는 이러한 방법들은 폴리펩티드/조성물 복합체를 형성하기에 충분한 시간동안 발명의 폴리펩티드와 접촉하는 조성물과 탐지된 그 복합체를 포함할 수 있다. 그러므로 만약 폴리펩티드/조성물 복합체가 탐지된다면 발명의 폴리뉴클레오티드에 결합하는 조성물이 무엇인지도 확인될 수 있을 것이다.

본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 조성물을 확인하는 방법들은, 폴리펩티드/조성물 복합체 - 세포의 목표 유전자서열의 발현을 조정하는 복합체 - 를 형성하기에 충분한 시간동안 세포내에서 발명의 폴리펩티드와 접촉하는 조성물과 탐지된 리포터 유전자서열(reporter gene sequence)의 발현에 의해 발견된 그 복합체를 포함할 수 있다. 그러므로 만약 폴리펩티드/조성물 복합체가 탐지된다면 발명의 폴리펩티드에 결합하는 조성물이 무엇인지 또한, 확인될 것이다.

이러한 방법들에 의해서 확인된 조성물들은 본 발명의 폴리펩티드의 활성을 조절하는 조성물을 포함할 수 있다(즉, 그 조성물의 결핍에서 발견된 활성에 관련하여 활성이 증가하거나 감소할 수 있다). 대체적으로는 이러한 방법들에 의해 확인된 조성물들은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현을 조정하는 조성물을 포함할 수 있다(즉, 그 조성물의 부재에서 관찰된 발현수준에 관련하여 발현이 증가하거나 감소할 수 있다). 본 발명의 방법들에 의해 확인된 조성물 등은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 표준검사방법에 의해, 활성/발현을 조정하기 위한 능력이 평가될 수 있다.

상기 검사방법에서 탐색된 작용제들은 펩티드, 탄수화물, 비타민 유도체, 혹은 의약작용제들(pharmaceutical agents)이 있으나 이에 한정되지는 않는다. 이 작용제들은 무작위로(at random) 또는 일정하게(rationally) 선택되고 검색되거나, 아니면 단백질 모형기술(protein modeling techniques)을 사용하여 선택되고 설계될 것이다.

무작위 탐색법(random screening)으로 펩티드, 탄수화물, 의약작용제나 유사체등의 작용제들은 무작위로 선택되고 본 발명의 ORF에 의해 암호화된 단백질에 결합하는 능력이 검정될 것이다. 대체적으로 작용제들은 일정하게 선택되거나 설계될 것이다. 이에 따라 그 작용제들은 특정 단백질의 배열에 기초해서 선택될때 "일정하게 선택 혹은 설계된(rationally selected or designed)" 작용제라 불리우게 된다. 예를 들면, 당업자는 설계된 항펩티드 펩티드(designed anti-peptide peptides)를 일정하게 발생시키기 위해 특정 펩티드서열에 결합할 수 있는 펩티드들, 의약작용제들, 이와 유사한 물질들을 발생시키는 유용한 과정들을 쉽게 채택할 수 있을 것이다. 이와 같은 예는 Hurby등의 Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides, "In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, NY(1992), pp. 289~307 과 Kaspacz등의 Biochemistry 28:9230-8(1989)에 잘 나타나 있다.

앞에서 언급한 것에 더해서, 포괄적으로 서술되는 본 발명의 작용제들중의 한 분류는 ORFs나 EMFs중의 하나에 결합함으로써 유전자발현을 통제하기 위해 사용될 수 있다. 상기에서 서술한 바와 같이 이러한 작용제들은 무작위적으로 탐색되거나 일정하게 계획/선택될 것이다. 본 발명의 ORF나 EMF를 표적화함으로써, 발현통제를 위해 같은 EMP에 의존하는 하나의 ORF나 여러개의 ORF의 발현을 조정하는 특정서열이나 특정 작용제 성분(element specific agents)을 당업자들이 설계할 수 있게 한다. DNA와 결합하는 작용제들중의 한 부류는 DNA 혹은 RNA와 결합함으로써 삼중나선구조를 형성하거나 혼성화함으로써 잔여 염기를 포함하는 작용제들이다. 이러한 작용제들은 전형적인 포스포디에스터(phosphodiester), 리보뉴클레익엑시드 중심축(ribonucleic acid backbone)에 기초하며, 혹은 염기부착능력이 있는 다양한 설프하이드릴(sulfhydryl)이나 폴리머릭유도체들(polymeric derivatives)을 말한다.

이러한 방법들을 사용하기에 적합한 작용제들은 항상 20~40개의 염기들을 포함하며 전사에 관여하는 유전자의 특정부분에 보완작용할 수 있게 설계되어 있다(Lee등의 triple helix, Nucl. Acids Res. 6:3073(1979); Cooney등의 Science 241:456(1988); 그리고, Dervan등의 Science 251: 1360(1991)). 또는 작용제들은 mRNA 그 자체로 설계되어 있다(antisense - Okano, J. Neurochem. 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Rato, FL(1988)). 삼중나선-형성은 DNA에서 RNA로의 전사의 셧 오프(shut-off)를 최적으로 하는 반면, 안티센스 RNA 혼성화(antisense RNA hybridization)는 폴리펩티드에서 mRNA 분자로의 번역을 차단한다. 두 기술 모두 모델시스템(model system)에서 효과적인 것으로 입증되었다. 본 발명의 서열에서 포함된 정보는 안티센스(antisense)나 삼중나선 올리고뉴클레오티드(triple helix oligonucleotide), 그 밖의 DNA 결합작용제(DNA binding agents)의 설계에 필요하다.

본 발명의 ORFs중의 하나에 의해 암호화된 단백질에 결합하는 작용제들은 진단시약(a diagnostic agents)으로써 쓰일 수 있다. 또한, 이러한 작용제들은 의약합성(a pharmaceutical composition)을 일으키기 위해 공지의 기술을 사용하여 수처리화할 수 있다.

실시예

실시예 1: 사람의 cDNA 라이브러리로부터 서열번호 1의 분리

서열번호 1의 신규한 핵산은 표준 PCR, 혼성화 서열(signature) 분석 및 생거(Sanger)의 서열결정 기술을 이용해 배아피부(Invitrogen)로부터 제조한 사람 cDNA 라이브러리로부터 획득하였다. 라이브러리의 삽입체들은 삽입체에 인접하는 벡터 서열에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR을 통해 증폭시켰다. 이러한 시료들은 나일론막(nylon membrane) 위로 점적(spotting)하여, 서열 시그내처(sequence signature)를 제공하는 올리고뉴클레오티드 탐침으로 분석하였다. 여러 클론을 유사하거나 동일한 서열의 그룹으로 묶고, 하나의 대표적인 클론을 젤 서열분석을 위해 각각의 그룹으로부터 선택하였다. 그런 다음, 증폭된 삽입체의 5' 서열을 전형적인 생거의 서열분석 방법의 역 M13 서열분석 프라이머를 이용하여 추론하였다. PCR 산물을 정제하여 형광염색 말단 싸이클 분석에 도입하였다. 싱글-패스(single-pass) 젤 서열분석을 377 Applied Biosystem(ABI) 서열분석기기를 이용하여 수행하였다. 서열번호 1의 삽입체는 국제 특허공개 WO 03/(029405)에 신규한 서열로 기재되어 있다.

실시예 2: 서열번호 2의 서열구성(assembly)

본 발명의 핵산(서열번호 2)은 상기 실시예 1에 기술된 방법에 의해 cDNA 라이브러리로부터 수득한 서열 및 경우에 따라서는 하나 또는 그 이상의 공용 데이터베이스(database)로부터 수득한 서열을 근거로 구성하였다. 최종 서열은 시작서열(seed)으로서 EST서열을 이용하여 구성하였다. 그런 다음, 순환알고리즘(recursive algorithm)을 이 서열구성에 속하는 다른 데이터베이스들(예를 들어, EST 서열, db EST 버전 124, gbpr1 124 및 Unigene 버전 124를 가지는 Nuvelo의 데이터베이스)로부터의 추가서열들을 끌어들이어 확장된 서열구성에 시작서열 영역을 확장하기 위해 사용하였다. 이 서열구성을 확장시킬 수 있는 상기 데이터베이스들로부터 추가서열들이 없을 때 알고리즘은 종료하였다. 300보다 큰 BLAST 값 및 95% 이상의 동질성을 가지는 확장된 서열구성에 대한 BLASTN hit에 근거하여, 구성요소들을 서열구성에 포함시켰다.

PHRAP(Univ. of Washington) 또는 CAP4(Paracel)을 이용하여, 서열구성으로부터 전장 유전자 cDNA 서열 및 그에 상응하는 단백질 서열이 생성되었다. 구조적 이동(frame shift) 및 잘못된 종로코돈은 직접 교정(hand editing)에 의해 수정하였다. 교정과정에서, 서열은 GenBank(즉, dbEST 버전 124, gbpr1 124, Unigene 버전 124, Genpept release 124)에 대한 FASTY 및 BLAST를 이용하여 점검하였다. 교정과정(editing process)에서 사용해 온 다른 컴퓨터 프로그램은 phredPhrap, Consed(Univ. of Washington), ed-ready, ed-ext 및 cg-zip-2(Hyseq, Inc.)이다. 전장 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들은 각각 서열목록에 서열번호 2 및 4로 나타낸 서열에서 볼 수 있다.

GIPF(서열번호 4)를 발현시키기 위해, 전장 GIPF DNA를 Marathon-ready cDNA 라이브러리(Clontech)으로부터 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭시켰다. 또한, 1차 PCR 산물은 후속하는 바와 같이, 적절한 세포주에서 발현된 GIPF 폴리펩티드를 생산하는 네스티드(nested) PCR 프라이머를 이용하여 증폭시켰다.

실시예 3: 생쥐 및 사람 조직에서 GIPF 의 발현

A. GIPF mRNA의 조직 분포

도 2는 사람(A) 과 생쥐(B) 조직으로부터 유래한 GIPF mRNA의 상대적 발현을 보여준다.

총세포 mRNA를 생산자(Qiagen, Valencia, CA)가 제공한 방법에 따라, 도 2에 표시된 조직들로부터 유도하였다. RNA는 도 2에 나타낸 조직들에서 GIPF의 상대적 발현을 결정하기 위한 정량적 실시간(real-time) PCR(TaqMan)(참조: Simpson et al., Molec Vision 6:178-183(2000))에 적용하였다. 사람 RNA의 PCR 반응에 사용하는 정방향과 역방향 프라이머는 각각 다음과 같았다: 5'-gaccatgctgctgctctgAcac-3'(정방향; 서열번호 29) 및 5'-caccgcctccttgctctcc-3'(역방향; 서열번호 30); 그리고, 생쥐 RNA의 PCR 반응에 사용하는 정방향 역방향 프라이머는 다음과 각각 같았다: 5'-gggggagaccacaccacctgct-3'(서열번호 31) 및 5'-ttggacctcggtccttgctgttc-3'(서열번호 32). 연장인자(elongation factor) 1, β -actin, 및 ATP 합성효소 6를 암호화하는 DNA 서열을 모든 시료에서 양성 대조군(positive control) 및 표준화 인자로서 이용하였다. 모든 실험들은 평균화된 결과 값을 이용해 세번 반복수행하였다.

Y 축은 각 세포가 1.2 Kb의 중간 길이 40,000 mRNA 전사체를 가지고, 세포 내 총세포 RNA의 2%가 mRNA라는 가정 아래, 세포당 GIPF mRNA의 카피수를 나타낸다. 도 2는 GIPF mRNA가 조사된 모든 조직들에서 낮은 수준으로 발현하는 것을 보여준다. GIPF mRNA의 가장 높은 수준은 마우스의 피부, 폐, 난소 및 뇌와 사람의 소장, 피부, 피부, 난소, 정소 및 유방에서 볼 수 있었다.

B. GIPF 단백질의 조직분포

사람 조직 시료에서의 GIPF 발현은 토끼의 다클론성(polyclonal) 항 GIPF 항체를 이용하여 탐색할 수 있다(참조: 표 1). 토끼 다클론성 항체는 면역반응을 일으킬 것으로 예상되고, 아미노산 서열 Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln(서열번호 67)을 가지고 있는 펩타이드로 토끼를 면역화시켜서 만들었다. 항 GIPF 항체는 GIPF 펩타이드와 결합된 Affi-Gel(Bio-rad)를 이용하여 토끼 혈청으로부터 친화-정제하여, 0.1% 아지화나트륨(sodium azide)을 넣은 PBS(phosphate buffered saline)에 저장하였다. 부신, 방광, 유방, 대장, 소장, 간, 폐, 난소, 이자, 태반, 부정소, 피부, 소장, 비장, 위, 정소, 갑상선, 편도선 및 자궁의 조직 시료는 면역조직화학 분석(immunohistochemical analysis, IHC)(LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA)을 위해 10% 포르말린(formalin)에 조직을 고정시키고, 파라핀(paraffin)에 포매(embedding)시켜, 표준화된 기술을 이용한 절단을 통해 준비하였다. 절단체는 GIPF 특이적 항체를 이용하여 탐침하고, AEC 를 기질로 사용하는 바이오틴(biotin) 결합된 항 토끼 2차항체를 이용하여 가시화시켰다.

사람 조직에서 GIPF의 세포내 위치는 표 1에 나타내었다. 가장 짙은 염색은 이자섬 세포 하부의 세포질 및 소장과 위장의 상피간 신경내분비 세포의 세포질에서 볼 수 있었다. 또한, 두드러진 염색은 부신, 위장 소와(foveolar) 상피 및 신장 관 상

피에서 나타났다. 림프구(lymphocyte)는 흔히 양성적이고 핵 염색에서 두드러지게 나타났다. 피부에서, 국부 양성(focal positivity)은 과립층(stratum granulosum) 및 모낭지선 단위(pilosebaceous unit)에 존재하였다. 소수의 세포 형태들은 호흡 상피, type II 기포세포(pneumocyte), 부정소 상피, 태반의 영양포(trophoblast), 유방 상피, 난소 및 갑상선 세포상피에서 약간 덜한 세포 및 핵 염색을 보여주었다.

신경절(ganglion) 세포는 붉은 염색을 나타내었으나, 선(glandular) 상피, 평활근, 내피, 혈관내의 식세포(neutrophil) 및 섬유아세포(fibroblast)를 포함하는 다른 세포에서는 GIPF에 대하여 음성을 나타내었다.

[표 1]

기관 / 조직	세포내 위치	염색
부신, 상피	핵 및 세포질	국지적, 보통
방광, 상피	핵 및 세포질	낮음
유방, 상피	핵 및 세포질	보통
대장, 상피	핵 및 세포질	보통
대장, 신경내분비세포	핵 및 세포질	희미함
신장 피질, 사구체	핵	낮음
신장 피질, 상피	세포질	보통
신장 수질, 사구체	핵	강함
신장 수질, 상피	세포질	보통
간, 간세포	핵	보통
폐, 호흡 상피	핵 및 세포질	보통
폐, 제 2형 폐포세포	주로 핵	보통
폐, 폐포의 식세포	주로 핵	보통
기관 / 조직	세포내 위치	염색
난소, 상피	핵	보통
이자, 랑게르한스섬	세포질	강함
태반, 영양포	핵	약함
부정소, 상피	핵	보통
피부, 상피층	세포질	국지적
소장, 신경내분비세포	세포질, 반점의 핵	강함
소장, 염증 세포	주로 핵	보통
비장, 림프구	주로 핵	강함
위장, 신경내분비세포	핵 및 세포질	국지적, 보통에서 강함 사이
위장, 상피	핵 및 세포질	보통에서 강함 사이
정소, 라이디히(Leydig)세포	세포질	약함, 산발성
흉선, 림프구	핵 및 세포질	보통
갑상선, 소낭모양의 상피	핵	약함
편도선, 림프구	핵 및 세포질	보통
태반, 자궁내막 기질	핵	보통, 산발성

실시예 4: GIPF 유전자도입 동물

A. GIPF KI 벡터의 구축

유전자도입 GIPF-knock-in(GIPF-KI)벡터(도 5A)의 구축은 아래 기술한 방법에 따라 수행하였고, 도 5B 내지 5R에 나타내었다.

마우스의 면역 글로블린 kappa 불변영역(constant region, IgCk)과 그 인접하는 영역을 암호화하는 DNA는 다음과 같이 두 단편들의 증폭을 통해 수득하였다:

도 5B IgCk 단편 1의 제조

PCR의 정방향(igkc1 ; 서열번호 34)과 역방향(igkc2 ; 서열번호 35)의 프라이머는 마우스의 면역 글로블린 kappa 불변영역(IgCk) 및 GenBank(gi: V00777; 서열번호 33)으로부터 수득한 인접 영역의 서열을 토대로 합성하고, IgCk 단편 1의 단편 1을 암호화하는 DNA를 증폭하는데 이용하였다.

igkc1:atctcgaggaaccactttctgaggacacagtgatagg(서열번호 34)는 5' 말단에 Xho I 인식서열을 부가하여 제조하고,

igkc2:atgaattcctaacactcattctctgttgaag ctcttgac(서열번호 35)는 5'말단에 EcoRI 인식서열을 부가하여 제조하였다.

PCR은 마우스의 불변영역과 결합영역(joining region, WO 00/10383)을 포함하고, 주형역할을 하는 pBluescript SK II (+) 클론 25 ng을 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 EcoR I과 Xho I을 이용하여 절단하였고, 제한효소 EcoR I과 Xho I으로 미리 절단해 놓은 pBluescript II KS(-) 벡터(Stratagene)에 연결시켰다. 그 결과인 플라스미드 pIgCkA는 Xho I과 EcoR I 사이의 영역 내에서 뉴클레오티드 서열의 치환이 없는 마우스 IgCk 단편 1의 지정된 cDNA 서열을 포함한다.

도 5C IgCk 단편 2의 제조

PCR의 정방향(igkc3; 서열번호 36) 및 역방향(igkc4; 서열번호 37) 프라이머는 GenBank(gi:V00777; 서열번호 33)로부터 수득한 면역 글로블린 kappa 불변영역(IgCk)의 마우스 아래쪽(downstream) 영역의 서열에 기초하여 합성하고, IgCk 단편 2를 암호화하는 DNA를 증폭하는데 이용하였다.

Igkc3:atgaattcagacaaaggtcctgagacgccacc(서열번호 36)은 5'말단 에 EcoR I 인식서열을 부가하여 제조하였다. 또한,

igkc4:atggatcctcgagtcgactggatttcagggaactaaacatt(서열번호 37)은 5'말단에 BamH I, Xho I 및 Sal I 인식서열을 부가하여 제조하였다.

마우스의 불변영역과 결합영역을 포함하고 주형(WO 00/10383) 기능을 하는 pBluescript SK II(+)클론 25ng을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 EcoR I 및 BamH I을 이용하여 절단하고, 제한효소 EcoR I 및 BamH I으로 미리 절단한 pIgCkA 벡터(위를 참조)에 연결하였다. 그 결과 플라스미드 pIgCkAB는 EcoR I 및 BamH I사이의 영역 내에 뉴클레오티드 서열의 치환이 없는 마우스 면역 글로블린 불변영역으로부터 유래된 지정된 cDNA를 포함한다.

도 5D pIgCkAB로 퓨로마이신(puromycin) 유전자의 삽입

Lox-P Puro 플라스미드(WO 00/10383)은 제한효소 EcoR I 및 Xho I을 이용하여 절단하고, T4DNA 중합효소를 처리하였다. 그 결과 단편은 제한효소 Sal I으로 미리 절단된 pIgCkAB 벡터(위를 참조)에 연결하여 T4DNA 중합효소를 처리하였다. pIgCkAB와 Lox-P 단편 사이의 연결영역(connecting region)을 검증한 후, 플라스미드 pIgCkABP를 수득하였다.

도 5E IRES cDNA의 pIgCkABP로의 삽입

PCR의 아래 정방향(iresfw; 서열번호 38) 및 역방향(iresrv; 서열번호 39) 프라이머는 pIRESHyg 플라스미드(Clontech)의 IRES 영역 서열에 기초하여 합성하였다.

iresfw:atgaattcgcccctctcctcccccccccta(서열번호 38)은 5'말단에 EcoRI 인식서열을 부가하여 제조하였다.

iresrv:atgaattcgtcgacttgggaagcttatcatcgtgtt(서열번호 39) SMS 5'말단에 EcoR I 및 Sal I 인식서열을 부가하여 제조하였다.

PCR은 pIRESHyg 플라스미드(Clontech) 150ng을 주형으로 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 EcoR I으로 절단하여 제한효소 EcoR I으로 미리 절단해 놓은 pGEM-T 벡터(Promega)에 연결하였다. 뉴클레오티드 서열의 치환없이 지정된 cDNA 서열을 포함하는 플라스미드 IRES-Sal/pGEM을 수득하였다. IRES-Sal/pGEM 플라스미드는 제한효소 EcoR I으로 절단하여 제한효소 EcoR I으로 미리 절단해 놓은 pIgCkABP플라스미드(위를 참조)에 연결하였다. pIgCkABP와 IRES-Sal 사이의 연결영역 서열을 검증한 후, 플라스미드 pIgCkABP IRES를 수득하였다.

도 5F PΔCk Sal 플라스미드의 제조

IgCk KO백터(WO 00/10383)은 제한효소 Sac II로 절단하여 그 후 제한효소 EcoR I으로 부분절단하였다. LoxP-PGK Puro 영역이 부족한 14.6 Kb 밴드(band)를 분리하여, LoxP-PGK Puro 영역을 Sal I 절단 위치로 대체하기 위하여 차후의 두 가지 뉴클레오티드(Sal 1 plus 및 Sal 1 minus)를 이어줌으로써 만들어진 SacII/EcoRI 융화성 연결자(compatible linker)와 연결하였다. 서열검증 후에 pΔCkSal 플라스미드를 수득하였다.

Sal 1 plus: 5'-agtcgaca-3'(서열번호 40)

Sal 1 minus: 5'-aattgtcgcactgc-3'(서열번호 41)

도 5G pKIk 플라스미드의 제조

pIgCkABP IRES 플라스미드는 제한효소 Xho I으로 절단하여 그 결과 C 영역, IRES 및 loxP-Puromycin으로 구성된 단편은 제한효소 Sal I으로 미리 절단한 pΔCkSal 백터(위를 참조)에 연결하였다. 서열검증 후에 pKIk 플라스미드를 수득하였다.

도 5H pIgCkΔ IRES 단편의 제조

pIgCk ABP IRES 플라스미드는 제한효소 EcoR I 및 Bgl II로 부분절단하여, 그 결과 IRES 유전자의 부분이 부족한 pIgCkΔ IRES 단편을 분리하였다.

도 5I PCR에 의한 마우스 P2 프로모터 단편의 제조

PCR을 위한 아래의 프라이머들은 GenBank(gi:aj231225; 서열번호 42)로부터 수득한 마우스 면역 글로블린 kappa 프로모터의 서열에 기초하여 합성하였다.

P2F:cccaagctttggtgattattcagagtagtttagatgagtgcat(서열번호 43)은 5'말단에 Hind III 인식서열을 부가하여 제조하고, P2R:acgcgtcgactttgtctttgaactttggtccctagctaatctacta(서열번호 44)은 5'말단에 Sal I 인식서열을 부가하여 제조하였다. PCR은 마우스의 지놈 DNA 25ng를 주형(TT2F ES세포로부터의 지놈 DNA)으로 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 Hind III 및 Sal I으로 절단하여, 제한효소 Hind III 및 Sal I로 미리 절단한 pBluescript II KS-백터(Stratagene)에 연결하였다. 서열검증 후에, 그 결과물인 플라스미드는 제한효소 Hind III 및 Sal I로 절단하여, 마우스 P2 프로모터 단편(P2 promoter fragment)을 포함하는 Hind III 및 Sal I 단편을 분리하였다.

도 5J. PCR에 의한 부분적인 Ck poly A 단편의 제조

PCR을 위한 아래의 프라이머는 GenBank(gi:v00777)로부터 수득한 마우스 면역 글로블린 카파 폴리 A 영역의 서열에 근거하여 합성하였다. PPF:acgcgtcgacgcgcgcgcgcgcgtagcagacaaaggtcctgagacgccaccaccagctcccc(서열번호 45)는 5'말단에 Sal I, Fse I 및 Nhe I 인식서열을 부가하여 제조하고, PPR:gaagatctcaagtgcaaagactcactttattgaatattttctg(서열번호 46)은 5'말단에 Bgl II 인식서열을 부가하여 제조하였다. PCR은 마우스 지놈 DNA 25ng를 주형(TT2F ES 세포로부터의 지놈 DNA)으로 사용하여 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 Sal I 및 Bgl II로 절단하여 제한효소 Sal I 및 Bgl II로 미리 절단한 psp72 백터(Promega KK)에 연결하였다. 서열검증 후에, 정제된 플라스미드는 제한효소 Sal I 및 Bgl II로 절단하여, "부분적인 Ck 폴리 A 단편(partial Ck poly A fragment)"을 생성하였다.

도 5K. PCR에 의한 완전한 Ck poly A 단편의 제조

PCR을 위한 아래의 프라이머는 GenBank(gi:v00777)로부터 수득한 마우스 면역 글로블린 카파 폴리 A 부분의 서열에 기초하여 합성하였다.

TPF:ggaattcagAcaaaggtcctgagacgccaccaccagctcccc(서열번호 47)은 5'말단에 Hind III 인식서열을 부가하여 제조하고, TPR:ccaagcttgctcctcctcaaacctaccatggcccccagagaaataag(서열번호 48)은 5'말단에 Hind III 인식서열을 부가하여 제조하였다. PCR은 마우스 지놈 DNA 25ng를 주형(TT2F ES세포로부터 지놈 DNA)으로 사용하여 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 EcoR I 및 Hind III로 절단하여 제한효소 EcoR I 및 Hind III로 미리 절단한 pBluescript II KS-백터(Stratagene)에 연결시켰다. 서열검증 후에 플라스미드는 제한효소 EcoR I 및 Hind III로 절단하여 "완전한 Ck poly A 단편(total Ck poly A fragment)"를 생성하였다.

도 5L. 완전한 Ck poly A 단편, P2 프로모터 단편 및 부분적인 Ck poly A 단편으로 구성되어 있는 DNA 단편 A의 제조.

상술한 바와 같이 생성된 “완전한 Ck poly A 단편(total Ck poly A fragment)”, “P2 프로모터 단편(P2 promoter fragment)” 및 “부분적인 Ck poly A 단편(partial Ck poly A fragment)”은 제한효소 EcoR I 및 Bgl II로 미리 절단한 pBluescript II KS-벡터(Stratagene)에 기술한 대로 연결시켰다. 서열검증 후에, 정제된 플라스미드는 제한효소 EcoR I 및 Bgl II로 절단하여 “DNA 단편 A(DNA fragment A)”를 생성하였다.

도 5M. pIgCkΔ IRES ProA 플라스미드의 제조

“DNA 단편 A(DNA fragment A)”는 상술한 바와 같이 분리한 “pIgCkΔ IRES 단편(pIgCkΔ IRES fragment)”에 연결시켰다. 서열검증 후에 플라스미드 pIgCkΔ IRES Pro A를 수득하였다.

도 5N. Ck P2 H 플라스미드의 제조

pIgCkΔ IRES Pro A 플라스미드는 Xho I으로 절단하고, 마우스의 IgCk, DNA 단편 A 및 Lox-P Pro의 상류(upstream) 지놈 영역을 포함하는 주요 단편을 분리하여, 제한효소 Sal I으로 미리 절단한 pΔCk Sal에 연결시켰다. 서열검증 후 플라스미드 Ck P2 H를 수득하였다.

도 5O. Ck 5 지놈 플라스미드의 제조

PCR을 위한 다음의 프라이머는 GenBank(gi:v00777)로부터 마우스의 면역 글로블린 카파 J 및 C 영역 유전자를 포함하는 DNA 단편의 서열에 기초하며 합성하였다.

5GF:ataagaatgcgccgcctcagagcaaatgggttctacaggcctaacaacct(서열번호 49)는 5'말단에 Not I 인식서열을 부가하여 제조하고,

5GR:ccggaattcctaacaactcattcctgttgaagctcttgacaatgg(서열번호 50)은 5'말단에 EcoR I 인식서열을 부가하여 제조하였다.

PCR은 마우스의 지놈 DNA(TT2F ES 세포에서 나온 지놈 DNA를 주형으로) 25ng을 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 Not I 및 EcoR I으로 절단하고, 제한효소 Not I 및 EcoR I으로 미리 절단한 pBluescript II KS-벡터(Stratagene)에 연결하였다. 서열검증 후, Ck 5'지놈 플라스미드를 수득하였다.

도 5P. Ck P2 KIΔ DT 플라스미드의 제조

Ck P2 H 플라스미드는 EcoR I 및 Xho I으로 절단하여 11 Kb를 수득하고, 제한효소 EcoR I 및 Xho I으로 미리 절단한 Ck 5' 지놈 플라스미드에 연결시켰다. 서열검증 후 Ck P2 KIΔ DT 플라스미드를 수득하였다.

도 5Q. Ck P2 KI 벡터의 제조

DT-A 단편은 제한효소 Xho I, Kpn I으로 절단한 후, 제한효소 Xho I 및 Kpn I으로 미리 절단한 Ck P2 KIΔDT 플라스미드로 연결시켰다. 서열검증 후에 CkP2 KI 벡터로 연결시켰다.

도 5R. GIPF-KI 벡터의 모음(assembly).

GIPF cDNA 단편은 PCR을 위해 사람의 GIPF cDNA(서열번호 2)의 서열에 기초하여 합성한 아래의 프라이머를 이용하여 증폭시켰다.

SA3F:acgcgtcgaccacatgcggttgggctgtgtgt(서열번호 51)은 5'말단에 Sal I 인식서열과 코작(kozak) 서열을 부가시켜 제조하였다.

SA3R:acgcgtcgacgtcgacctagcaggccctg(서열번호 52)는 5'말단에 Sal I 인식서열을 부가시켜서 제조하였다.

PCR은 일련의 Marathon-Ready cDNA(태아 피부 및 태아 폐, BD Biosciences Clontech)을 주형으로 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 제한효소 Sal I으로 절단하고, 제한효소 Sal I으로 미리 절단한 pBluescript II KS-벡터(Stratagene)에 연결하였다. 서열검증 후 하나의 클론을 수득하여 뉴클레오타이드 서열에 치환이 없는 정확한 GIPF cDNA서열을 가지고 있는지 검증하였다. 이 클론을 제한효소 Sal I으로 절단하고, GIPF cDNA 단편을 정제하여 제한효소 Sal I으로 미리 절단한 CkP2 KI 벡터에 연결시켰다. 서열검증 후 GIPF-KI 벡터를 수득하였다(참조: 도 5A)

B. GIPF-KI 유전자 도입 마우스의 생산

마우스의 배아(embryo)를 수득, 배양, ES 세포를 배아에 주입, 양모(foster mother)로 이식하는 일반적 과정은 1995년에 요시다(Yodasha)에 의해 출간한 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene targeting"에 기술된 방법에 맞게 수행하였다.

GIPF-KI 벡터는 Not I을 이용하여 선형화되어, 1995년 요시다(Yodasha)에 의해 출간한 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene targeting"에 기술된 방법에 따르는 전기천공법에 의해 C57BL/6X CBA F1이 유래한 마우스의 TT2F ES 세포((Uchida, 1995), Lifetech oriental)로 옮겼다. 전기천공된 ES세포들은 ES 배양액 [DMEM(GIBCO), 18% FCS (GIBCO) 0.1 mM 2-머캅토에탄올(GIBCO), 1000U/ml LIF(백혈병 억제인자, leukemia inhibitory factor, CHEMICON International, Inc.)에 넣어서 피더(feeder) 세포(Invitrogen)가 미리 도말된 두 개의 100mm 조직배양 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종하였다. 하루가 지난 후, 배양액을 0.75g/ml의 푸로마이신(puromycin, Sigma)을 포함하는 배양액으로 교체하였다. 그 후 7-9일 후에, 형성된 전체 119 개 콜로니를 집어내었다. 각각 콜로니는 12-well 플레이트에서 충분히 성장하여 배양의 4/5를 0.2 ml 세포보존 배양액[ES 배양액 + 10% DMSO(Sigma)]에 넣고 -80℃에 얼려서 보관하였다. 남은 1/5는 12-웰(well)의 젤라틴(gelatin) 코팅된 플레이트에 접종하여 2일간 배양하였다. 그 후, 지놈 DNA를 Puregene DNA 분리 키트(Gentra System)을 이용하여 분리하였다. 푸로마이신 저항성 TT2F 세포로부터 지놈 DNA를 제한효소 EcoR I(Takara Shuzo)으로 절단하여, 0.8% 아가로즈 겔에서 전기영동시켰다. 분리된 DNA 단편들은 막 (GeneScreen, NENTM Life Science Products)으로 옮겨서, IgJk-Ck 지놈 DNA 3' 영역(Xho I-EcoR I, 1.3 Kb(서열번호 67): WO 00/10383, 실시예 48)로부터 제조된 탐침으로서 DNA 단편을 이용하여 혼성화를 수행하였다. 비표적(untargeted) ES 클론은 분자량 약 15 Kb의 단일 밴드를 나타내고, 표적(targeted) ES 클론은 분자량 15Kb 및 13.4 Kb의 두 밴드를 나타내었다(참조: 도 6). 48개의 타겟 ES 클론 중 2개 #10, 12를 서던(Southern) 분석(유사체 재조합 비율이 약 4.2%) 후에 선별하였다. 또한, 선별한 ES 클론들은 1995년 요시다(Yodasha)에 의해 출간한 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene targeting"에 기술한 방법에 따라 핵형 분석에 의해 검사하였다. 두 개의 ES 클론 #10, 12는 정상적인 핵형이 배아로의 이식에 사용했음을 보여준다.

타겟 ES 클론 #10, 12의 동결된 보관세포를 해동시키고, 배양한 다음, 면역글로불린 중쇄(heavy chain)가 제거된(knock out) 마우스주의 숫컷과 암컷의 교배에 의하여 얻어진 8세포기 배아에 주입하였다(참조: Tomizuka et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727, 2000); 상기 주입비율은 배아당 10-12세포였다. 상기 배아를 ES 세포배지에서 하룻밤동안 배양하여, 포배로 진행시킨 다음, TT2F 세포가 주입된 배아 10개를 수양모(foster mother) 마우스의 자궁의 일 측면에 주입하고 2.5일동안 가임신 처리를 수행하였다. 120 배아를 주입한 결과로서, 24의 자손마우스가 탄생하였다. 자손마우스에서의 키메라증은 흰 털색의 숙주 배아에 대하여, 아구티 털색의 TT2F 세포의 양에 의하여 결정되었다. 24의 신생마우스 이외의, 11 마우스(넉인 마우스)는 ES 세포의 제공을 나타내는 부분적인 아구티 털색을 갖는 것으로 인식되었다. 넉인 마우스의 꼬리에서 추출한 지놈 DNA는 PCR 분석에 사용되었다. PCR을 위한 하기의 2개의 프라이머가 GIPF-KI 벡터의 서열에 근거하여 합성되었다: SACF:ctgactagactctatcttgc(서열번호 53), 및 SACR:ccacggagaccactcgctcatt(서열번호 54).

PCR은 주형으로서 25ng의 마우스 꼬리 지놈 DNA를 사용하여 수행되었다. 결과로서 얻어진 반응용액은 0.8% 아가로즈 겔 전기영동에 적용되었고, 606bp의 밴드가 검출되었다. 정상 TT2F 세포 클론이 키메라 마우스 생산 대조군으로 사용되었다.

마우스는 12/12시간 명암주기(오전 8시에 밝아짐)조건 하에서 방치하였고, 임의로 5μm 여과된 물과 CE-2 사료(Crea Japan, Inc.)를 섭취시켰다. 수컷 마우스는 이유기 이후에 개별적으로 사육하였다.

실시예 5: 유전자 도입 GIPF-KI 마우스를 이용한 GIPF의 생물학적 활성측정

상술한 유전자 도입 마우스로부터 소장과 대장의 전체적인 병리적 변화와 조직학적 변화는 다음과 같이 측정하였다:

GIPF 유전자 도입 KI 마우스는 4주령 시기에 시작하는 소장의 생장촉진 성장 및 발달과정 동안 복부의 현저한 비정상 팽창을 보여준다. 도 7은 15주령의 GIPF 유전자도입 KI 마우스를 소장의 비정상 팽창과 대조군 KI 마우스와 비교했을 때 증가된 소장 크기를 보여준다. 헤마톡실린(hematoxylin) 및 이오신(eosin) (H&E) 염색(참조: Issacson, P.G. and Wright, D.H., 1983)을 이용한 조직-병리학적 측정은 간, 비장, 폐, 신장, 심장, 소장 및 대장을 포함하는 다양한 조직의 단면(5 μ m 두께)을 넣은 파라핀(paraffin)에서 수행하였다. 소장의 H&E 단면은 도 8(저배율) 및 도 9(고배율)에서 볼 수 있다. 조직 병리학 보고서는 IDEXX Laboratories, Inc.가 제공하였고, 아래에 기술하였다.

대조군과 유전자 도입 마우스에서의 조직들의 조직학적 모습간의 유일하게 현저한 차이는 소장에서만 볼 수 있다. 이러한 변화는 옆가지의 살아있는 길이와 복잡성에서 상당히 증가한 살아있는 상피의 과형성에 의해 표지된, 두텁게 넓게 퍼진 점막으로 구성되어 있다. 살아있는 소낭선(crypt)은 호염기성(basophilic) 세포질 및 빈번한 세포분열을 지니고, 기본적으로 위치한 큰 알모양의 다색의 핵을 지닌 통통한 원주형 상피세포로 채워져 있다. 상당수의 세포자살체가 소낭선 상피 전반에 걸쳐 퍼져있고 이는 세포의 교체주기(turnover rate)의 증가를 의미하였다. 소낭선 상피세포는 또한 공통적으로 소낭선의 길이 전체를 통해 파네드(paneth) 세포 및 점막성-분비 잔모양(globlet) 세포로 분화하였다. 융모성 상피(villous epithelium)는 크게 바뀌지 않았다. 유사한 변화를 파이어 판(Peyer's patch)과 결합한 소장 점막에서 볼 수 있다. 장 점막은 보통 바깥쪽을 향하고 작은 함입체를 형성하여 파이어 판의 림프 조직이 된다. GIPF-KI 마우스에서, 과형성 변화는 표면과 함입체에서 볼 수 있고, 거기에서 그들은 느린 급성 염증 및 소낭선(예를 들어, 소낭선 소농양(microabscess)) 내에서 괴사된 세포의 축적과 관련되어 있다. 이러한 파이어 판은 수직을 절단하여 림프 조직의 양과 특성을 측정하기 어렵다. 그러나, B-세포가 항체 생산 세포로 변이되었음을 알리는 플라즈마(plasma) 세포가 소수 존재하였다. 소장 또는 다른 조직에서 림프구나 염증성 세포군의 다른 변화는 없었다.

KI 마우스에서 장 상피세포 증식을 측정하기 위해, 단일성 랫 항-마우스 Ki67 항원(Dako Ltd., High Wycombe, UK)를 이용한 면역조직화학법이 대조군과 GIPF KI 마우스의 소장 단면이 박힌 파라핀에서 제조자의 지시와 상술한 방법(참조: Scholzen, T. et al. 2000)에 따라 수행하였다. 도 10에서 본 바와 같이, GIPF KI 마우스는 소장내 증가된 Ki 67 양성 상피세포를 보여주고, 이는 GIPF 단백질 발현에 의한 증식의 증가를 제시하였다.

GIPF-KI 마우스 세 마리를 12 개월에 취하였다. 이런 12개월된 마우스는 전형적인 복부 비정상팽창 및 어린 동물에서 볼 수 있는 소장 크기의 증가를 보여준다. H&E 단면들은 비장, 간, 부신, 신장, 흉선, 심장, 폐, 소장, 대장, 위 및 뇌를 포함하는 다양한 조직에서 제조하였다.

12개월된 GIPF-KI 마우스의 소장의 단면의 조직은 GIPF가 소낭선 길이의 현저한 증가 및 15주 된 GIPF-KI 동물에서 볼 수 있는 같은 정도로 유도하였다는 것을 보여준다. 게다가, 다른 기관으로부터의 단면들의 조직학적 분석은 12개월 이상되는 기간이 되면, GIPF는 어떤 명백한 종양형성 활성을 보이지 않는다는 점을 밝혀주었다. 자발적인 종양형성은 마우스가 정상인지 KI 유전자 도입 동물인지에 관계없이 일부 마우스에서 때때로 관찰할 수 있다.

실시예 6: GIPF 아데노바이러스 벡터

GIPF cDNA (서열번호 2)는 V5 His6-표지된 GIPF 재조합 아데노바이러스를 만들기 위해 다클론부위(multiple-cloning site, MCS)내에 Nhe I 및 Xba I 위치를 이용하여 pAdenoVatorCMV5-인트론으로 복제하였다. pAdenoVator-CMV5L-인트론은 pAdenoVatorCMV5-IRES-GFP(Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.)의 수정에 의해 획득하였다. pAdenoVatorCMV5-IRES-GFP는 자신의 MCS, IRES 및 GFP를 제거하기 위해 Spe I로 절단한 후, pcDNA/인트론 벡터를 프라이머: 5'-CACCCCTAGGTCAATATTGGCCATTAGC-3' 및 5'CACCCCT-AGGTAGGCATCCCCAGCATGC-3'를 이용한 PCR에 의해 증폭된 Intron-MCS-V5His-BGH polyA에 연결시켰다.

선형화된 운반벡터를 아데노바이러스-5 지놈(E1/E3 제거된) AdEasy-1 플라스미드를 지닌 세균 세포, BJ5183, (Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.)로의 형질전환은 제조자의 지시에 따라 전기천공에 의해 수행하였다. 재조합 아데노바이러스를 생산하여 QBI-293A 세포(Qbiogene, Carlsbad, CA, U.S.A.)에서 증폭하고, 상술한 바(참조: Garnier, A., J. Cote et al. 1994)에 따라 CsCl 결합에 의해 정제하였다. 재조합 아데노바이러스에 감염된 293A 세포에 의한 재조합 단백질 발현은 항-V5 항체(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)를 이용한 웨스턴(western) 분석을 통해 측정하였다. CsCl 정제된 재조합 바이러스의 역가(titer)는 Adeno-X rapid titer kit(BD biosciences, Palo Alto, U.S.A.)을 이용하여 생산자의 프로토콜(protocol)에 따라 측정하였다. 요약하면, 바이러스 스톡(stock)은 감염 후에 마우스의 항-헥손(hexon) 항체로 48 시간동안 형질도입된 세포를 고정 및 염색한 후 293 A 세포를 재조합 아데노바이러스의 단계적 희석물로 감염시켜서 평가하였다. 신호는 horseradish peroxidase에 연결된 염소의 항-마우스 항체를 이용하여 측정하였고 금속-강화(metal-enhanced) 3,3' DAB(diaminobenzidine tetrahydro-chloride)를 이용하여 현상하였다.

실시예 7: GIPF의 생물학적 활성을 측정하는 모델로서의 GIPF 아데노바이러스 투여

GIPF 재조합 아데노바이러스는 정상적인 마우스에 투여하여 장 및 결장 상피에 대한 GIPF의 효과를 결정하고, GIPF 유전자 도입 마우스에서 관찰된 표현형이 유전자도입이 아닌 마우스에서도 형성됨을 확인하였다. 아데노 바이러스의 주입에 앞서, 6-8주 된 BALB/C 마우스를 이소플루란(isoflurane)을 이용해 마취하였다. 각각의 마우스마다 1×10^{10} 개의 바이러스 입자를 retro-orbital 정맥을 통해 주입하였다. 대조군 바이러스(빈 바이러스) 또는 PBS 한 가지만의 동일한 적정량을 대조구로 이용하였다. 바이러스 주입(모든 그룹에 대해 $n=3$) 후 3일 또는 5일에 마우스를 희생시켰다. 희생 4시간 전, BrdU(bromodeoxyuridine)을 복강(ip) 주사하고, 실험실 조건에서 상피세포의 증식을 결정하였다. 소장, 결장, 비장, 간 및 골수를 포함하는 다양한 조직을 모아서 포르말린에 고정시켰다. 파라핀에 포매된 단면들은 조직학적 측정을 위해 H&E로 염색하였다. 또한, 절단체는 상술한 바(참조: McKinley, J.N. et. al. 2000) 생산자의 지시(Oncogene Research product, Boston, U.S.A.)에 따라, BrdU 면역조직검사를 위해 가공하였다. 아울러, 단일클론 랫 항-마우스 Ki67 항원(Dako Ltd., High Wycombe, UK)을 이용한 면역조직검사는 생산자의 지시 및 상술한 방법(참조: Scholzen, T. et. al. 2000)에 따라 소장 상피세포의 증식을 측정하기 위해 수행하였다.

아데노바이러스 주입(도 11) 이후 3일에 희생된 소장에서 추출한 단면의 H&E 염색은 GIPF 아데노바이러스를 주입한 마우스의 소장이 상당히 변화하였고, GIPF 유전자도입 마우스(도 8 및 9)에서 볼 수 있는 동일한 조직학적 특성을 보여준다. GIPF에 의해 나타나는 조직학적 변화는, 소낭선(crypt) 길이와 결가지의 현저한 증가를 지닌 소낭선 상피의 과형성에 의한 점막의 현저하고 넓게 두터워짐을 포함한다. 소낭선은 호염기성 세포질을 지닌 통통한 원주형 상피세포(columnar epithelial cell) 및 빈번히 유사분열(mitosis)하는 기저에 위치한 큰 알모양의 이질염색질의 핵(heterochromatic nucleus)이 늘어서(lined) 있다. 또한, 소낭선 상피세포는 살아있는 부분의 길이를 통해 보통 파넬(paneth) 세포 및 점액 분비성 잔모양 세포로 분화하였다. 소낭선 상피세포의 증식에 대한 GIPF의 효과는 또한 도 12에서 보는 바와 같이 바이러스 주입 5일 후에 증가하였다. 장 상피세포의 증식에 대한 GIPF의 효과를 측정하기 위해, BrdU 결합 및 Ki67 면역염색을 대조군 및 GIPF 아데노바이러스를 주입한 마우스의 소장 단면에 대해 수행하였다. 도 13 및 14에서 보는 바와 같이, GIPF 아데노바이러스를 주입한 마우스는 각각 상당히 많은 BrdU 및 Ki 양성 세포를 지닌 소장의 소낭선을 지니고 있다. 소낭선 상피세포의 증식에 대한 GIPF의 생물학적 효과는 각각의 마우스에 낮은 양의 1×10^9 바이러스 입자의 투여량(도 15)에서 볼 수 있다. 소장에서 본 효과에 더해서, GIPF는 또한 살아있는 길이의 현저한 증가 및 결장의 배상세포의 숫자 및 크기가 증가된 살아있는 상피 과형성체를 유발하였다(참조: 도 16).

실시예 8: GIPF 및 GIPF 유사체를 암호화하는 발현벡터

GIPF(서열번호 3)을 암호화하는 cDNA는 Kpn I 및 Xba I 위치를 이용한 pcDNA/인트론 벡터에 연결시켜서 야생형 카복시(carboxy) 말단 V5His6 표지된 GIPF(서열번호 5)를 제조하였다. 포유동물 발현벡터 pcDNA/인트론은 pcDNA3.1 TOPO 벡터(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)에 pCI 포유동물 발현벡터(Promega, Madison, WI)에서 유래한 조작된 키메라 인트론(intron)을 도입하여 유전적으로 변형시켜서 수득하였다. pCI는 Bgl II 및 Kpn I으로 절단하였고, 인트론 서열은 pcDNA3.1에 연결시켜서 Bgl II 및 Kpn I으로 절단하였다. 서열번호 2의 GIPF ORF(서열번호 3)은 먼저 아래의 정방향 5'-caccatgctggcttgggtgtctc-3'(서열번호 57) 역방향 5'-ggcaggccctgcagatgtgagtg-3'(서열번호 58)를 이용한 PCR에 의해 pcDNA3.1/V5His-TOPO(Invitrogen)으로 연결하였고 완전한 GIPF ORF를 포함하는 pcDNA3.1/V5TOPO로부터의 Kpn I-Xba I 삽입체(insert)는 변형된 pcDNA/인트론 벡터에 연결시켜서 pcDNA/인트론 구축물을 제조하였다.

전장 GIPF 단백질의 유사체는 다음과 같이 제조하였다. pcDNA/인트론내 GIPF의 예상되는 일치 퓨린 절단 위치(아미노산 28 R/Q)의 변이는 프라이머 5'-gatcaaggggaaacagcagaggcggtatcag-3'(서열번호 59) 및 5'-ctgatccgcctctgtgtttcccttgatc-3'(서열번호 60)을 이용한 위치 지정된 변이(site directed mutagenesis)에 의해 수행하였다. GIPF 결실 변이체(결실된 아미노산 잔기 21-31)(서열번호 16)은 스티칭(stitching) 방법을 이용하여 제조하였다. 결실은 두 단편의 연결 후에 프라이머 set1:5'-caccgtagcctcgagaattcacgcgtg-3'(서열번호 61) 및 인산화 5'-gctgatggtgaggtgcgtc-3'(서열번호 62), set2:인산화 5'-atcagtgccgaggggagccag-3'(서열번호 63) 및 5'-gccctctagagcggcaggccctgcagatg-3'(서열번호 64)를 이용한 두 단편의 PCR 증폭에 의해 수행하였다. 아미노산 21-31의 결실을 지닌 GIPF cDNA는 서열번호 61 및 64 각각의 정방향, 역방향 프라이머를 이용한 PCR에 의해 증폭하였고, Nhe I 및 Xba I으로 절단하여 자체의 다클론부위(multiple cloning site)의 Nhe I 및 Xba I 위치를 이용한 pcDNA/인트론에 연결하였다. 서열은 두 가지 변이체에 대해 확인하였다.

트롬보플라스틴(TSP) 영역(GIPF ORF의 nt 451 to nt 618(서열번호13))은 또한 포유동물 발현을 위해 pcDNA/인트론에 연결시켰다. TSP 영역을 암호화하는 cDNA는 Nhe I 정방향 프라이머:ccggtagccaccatggcgcaatgtgaaatg(서열번호 65) 및 Not I 역방향 프라이머:ccatgctggccgcccctcctactgtgcacct(서열번호 66)을 이용한 PCR로 증폭하였다. Nhe I 및 Not I

제한효소로 절단한 PCR 산물은 Nhe I 및 Not I 절단한 pcDNA/인트론 벡터에 연결시켰다. 재조합 아데노바이러스를 제조하기 위해, 상술한 PCR 증폭으로부터 TSP 영역을 Nhe I 및 Not I 제한효소를 이용한 pAdenoVator-CMV5-인트론에 연결하였다. PCR-증폭된 TSP 영역의 서열을 확인하였다.

GIPF의 퓨린-양 시스테인 풍부영역((furin-like cysteine-rich region)의 다양한 부분이 결실된 다른 유사체들은 실시예 19에 설명하였다.

상술한 GIPF 유사체의 생물학적 활성은 생체 조건 및 실험 조건에서 아래의 실시예에서 설명한 방법을 이용하여 평가하였다. GIPF 유사체의 생물학적 활성은 GIPF 유전자 도입 모델을 이용하여 평가하였다.

실시예 9: 재조합 GIPF의 정제

A. 진핵 세포에서 GIPF의 발현 및 정제

V5-His-표지된 GIPF(GIPFt)(서열번호 5)는 HEK293 및 CHO 세포에서 발현시켜서 다음과 같이 정제하였다.

V5-His-표지된 GIPF 폴리펩티드(서열번호 5)를 암호화하는 DNA를 포함하는 GIPF pcDNA/인트론 구축물로 형질전환된 HEK 293 세포의 안정적인 세포 배양은 무혈청 293 자유형 배지(GIBCO)에서 키웠다. 부유 배양(suspension culture)은 세포 밀도 1×10^{10} 세포/ml에서 시작해서 4-6일 후에 수득하였다. 배양배지로 분비된 V5-His-표지된 GIPF의 양은 ELISA에 의해 검사하였다.

V5-His 표지된 GIPF(서열번호 5)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 pDEF 2S 벡터로 형질전환된 CHO 세포의 안정적인 세포 배양은 무혈청 EX-CELL302 배지(JRH)에서 수행하였다. 발현벡터는 DHFR을 암호화하는 DNA 서열을 포함하며, 이는 MTX가 있을 때 양성 선택 및 증폭을 가능하게 하였다. 배양배지로 분비되는 V5-His-표지된 GIPF의 양은 ELISA에 의해 검사하였다.

분비된 GIPF 단백질을 포함하는 배지를 수득하여 -80°C 에 얼려 놓았다. 배지를 4°C 에서 용해시키고 GIPF의 분해를 막기 위해 단백질 분해효소 저해제, EDTA 및 Pefabloc(Roche, Basel, Switzerland)를 최종농도 1 mM로 각각 가하였다. 배지를 0.22 μm PES 필터(Corning)를 통해 걸러내서 10kDa 분자량 컷-오프 막(cut-off membrane)을 지닌 TFF 장치(Pall Filtron)를 이용해 10배 농축하였다. 농축된 배지의 완충액은 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7로 교환하였다. 인산 완충액(phosphate buffer)에 0.5 M NaCl의 첨가는 정제하는 동안 pH 7에서 V5-His 표지된 GIPF의 완전한 용해성을 유지하는데 중요하다. 한외여과(ultrafiltration) 및 정용여과(diafiltration) 후에, 포유동물 단백질 분해효소 저해제 cocktail(Sigma)를 최종농도 1:500(v/v)로 가하였다.

HiTrap Ni²⁺ -킬레이트(chelating) 흡착컬럼(Pharmacia)는 20mM sodium phosphate, pH 7, 0.5 M NaCl로 평형화하였다. 완충액 교환된 배지는 0.22 μm PES 필터로 걸러서 Ni²⁺ -킬레이팅 흡착컬럼에 가하였다. Ni²⁺ 컬럼을 10배 컬럼 부피에 대하여 20 mM 이미다졸을 10배 컬럼부피로(CV) 세척하였고, 단백질을 35 CV에 걸쳐 20mM부터 200mM 이미다졸의 농도구배로 용해분리하였다. 분획(fraction)들은 SDA-PAGE 및 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. V5-His 표지된 GIPF를 포함하는 분획들을 분석하여 모아서 75-80% 정도로 순수한 GIPF 단백질을 용액을 제조하였다.

Ni²⁺ 컬럼을 이용해서 분리한 GIPF 단백질을 포함하는 완충액은 NaCl을 제거하기 위해 20mM sodium phosphate, 0.3 M Arginine, pH 7으로 교환하였다. NaCl은 이후의 정제 단계 동안 V5-His 표지된 GIPF 단백질의 완전한 용해성을 유지하는 0.3 M Arg 인산화 완충액으로 교환하였다. Ni²⁺ 컬럼을 이용하여 분리한 GIPF 단백질은 20mM sodium phosphate, 0.3 M Arginine, pH 7으로 평형화시킨 SP 세파로스 고효율 양이온 교환 컬럼(Pharmacia, Piscataway, NJ)에 옮겼다. 컬럼은 8 CV에 대해 0.1 M NaCl로 세척하였고 30CV를 넘어 0.1M to 1M NaCl 농도구배로 용해분리하였다. V5-His 표지된 GIPF를 포함하는 분획들은 모아서 90-95% 순수한 단백질 용액을 제조하였다.

모든 분획의 완충액은 20mM sodium phosphate, pH 7, 0.15M NaCl로 교환하였고, 단백질은 1 또는 2 mg/ml 농도로 농축하여, 멸균한 0.22 μm 필터에 통과시켰다. 순수한 GIPF은 -80°C 에 보관하였다.

각 정제단계의 끝에서 수득한 단백질 양을 분석하여, ELISA, 단백질 브래드포드분석(Bradford assay) 및 HPLC로 정량하였다. GIPFt 단백질의 회수율은 정제과정 매 단계마다 점검하였고, 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

단계	단계 회수율	총회수율
배지 농도 / 정용여과(diafiltration)	100%	100%
Ni-킬레이팅 흡착	65%	65%
SP 양이온 교환	80%	52%
최종 조성 및 필터	95%	49%

정제한 GIPF 단백질의 SDS-PAGE 분석은 환원 및 비환원 조건에서 수행하였고, CHO 세포 및 293 세포로부터 유래한 V5-His 표지된 GIPF 단백질은 단량체로 존재함을 보여주었다. GIPF 단백질은 당 결합하여(glycosylated) 비환원 조건에서 대략 42kDa의 분자량(MW)을 지니고 SDS-PAGE상에서 이동하였다. CHO 세포에서 정제한 GIPF 단백질과 HEK 293세포에서 정제한 GIPF 단백질의 분자량에 약간의 차이가 있다. 이 차이는 다른 세포 형태에서 GIPF가 당 결합되는 정도에 의해 설명할 수 있다. N-말단 서열분석은 HEK 293세포는 두 가지 형태의 폴리펩티드 [신호서열이 부족한 서열번호 4의 GIPF 단백질에 상응하는 우점의 성숙형태(서열번호 10) 및 신호 펩타이드와 퓨린 절단부위가 모두 없는 서열번호 4의 GIPF 단백질에 상응하는 성숙형태]를 생산한다는 것을 보여준다. 두 형태는 SP 컬럼에서 잘 분리하고, 성숙형태와 우점의 성숙형태의 비율을 1:2 정도로 발현시킨다.

pH 7에서의 GIPF 단백질의 용해성에 대한 NaCl 및 아르기닌(Arg)의 효과를 측정해서 도 17A에 나타내었다. 0.3M Arg가 없을 때 단백질의 50% 손실이 정제 중 초래함을 확인하였다.

도 17B는 PBS(20mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, pH 7)에서 정제된 단백질의 용해성을 보여준다. GIPF 단백질은 4°C, pH 7에서 7일간 8mg/ml 농도까지 용액속에 남아 있다.

요약하면, HEK293 또는 CHO 세포로부터의 V5-His-표지된 GIPF 정제는 1) 배양배지에 있는 GIPF 단백질의 농축 및 정용여과(diafiltration), 2) Ni²⁺ 킬레이팅 흡착 크로마토그래피, 및 3) SP 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 수행하였다. 이러한 정제과정을 통해 90%이상 순수한 GIPF 단백질을 생산할 수 있다. 본 정제과정의 총회수율은 대략 50%이다. 배지 정용여과(diafiltration)의 정제과정 동안의 완충액에 0.5M NaCl 첨가 및 Ni 컬럼은 pH 7에서 GIPF를 완전히 용해상태로 유지하는데 중요하다. SP 컬럼위로 GIPF를 결합시키기 위해, NaCl은 제거되고, 0.3M Arg는 높은 용해성을 유지시키고 단백질 회수를 증가시키기 위해 첨가하였다. 1차 및 2차 정제과정 중에 0.5M NaCl 및 0.3 Arg의 첨가는 총회수율을 최소 25%에서 50%까지 증가시킴을 보여주었다.

주요한 성숙 및 성숙형태의 V5-His-표지된 GIPF는 실시예 10에 기술한 실험조건에서 GIPF의 생물학적 활성을 검사하는데 이용하였다. 이번 실시예에서의 방법에 따라 정제한 단백질은 지속적으로 소장의 살아있는 상피세포의 상당한 증식을 일으키고 이는 정제된 GIPF 단백질을 투여한 마우스 소장의 비정상 팽창을 설명해 준다.

B. 진핵 세포에서 GIPFwt의 발현 및 정제

표지되지 않은(untagged) 야생형 GIPF 단백질(GIPFwt; 서열번호 4)는 표지된 GIPF 단백질에 경우에 기술된 방법과 유사하게 발현시키고 정제하였다. 전장 GIPF 폴리펩티드(GIPFwt)(서열번호 4)를 암호화하는 DNA(서열번호 3)을 포함하는 pcDNA/인트론 벡터로 형질전환된 HEK293 세포의 안정적인 세포배양은 부유상태의 성장 및 25µg/ml 농도의 제네티신(geneticin)이 있을 때 무혈청 293 자유형 배지(GIBCO)에서 성장시키도록 적응시켰다.

스피너(spinner)에서의 세포배양 성장: 스피너에서의 소량 생산을 위해, 얼려놓은 세포의 스톡(stock)의 일정부분(aliquot)을 배양하여, 0.5% FBS(fetal bovine serum)을 넣은 293 자유형(free-style) 배지에서 배양하였다. 세포는 각각 계대에서 0.3-0.5×10⁶/ml의 세포 밀도에서 스피너에 시작하여 배양하였다. 충분한 세포가 축적되어 세포 밀도가 생산을 위한 1×10¹⁰/ml에 도달했을 때, 배지를 무혈청 293 자유형 배지로 교환하여 0.5% FBS를 제거하고 6일 후에 세포를 수집하였다. 배양배지로 분리된 GIPFwt의 양은 ELISA 및 웨스턴(western)으로 분석하였다. 스피너에서의 GIPFwt의 성장은 1.2-1.5mg/l를 생산하였다.

바이오리액터(bioreactor)에서의 세포배양 성장: 바이오리액터에서의 다량 생산을 위해서는 유가식(fed-batch) 배양이 이용되었다. 무혈청으로 적응한 HEK293 세포의 부유배양은 세포 계대 시에 세포밀도가 0.2-0.4×10⁶/ml일때 시작하였

다. 세포는 무혈청 293 자유형 배지에서 배양하여서, 200L 및 500L 바이오리액터에 접종하기 위해 50-500ml 교반 플라스크로부터 20-50 교반 탱크(stir tank)까지 증식시켰다. 충분한 세포가 축적되면, 세포를 바이오리액터에 밀도 0.2-0.4×10⁶세포/ml로 접종하였다. 세포밀도가 1×10⁶세포/ml가 되면, 비타민(vitamin) 및 MEM 아미노산(GIBCO)을 넣어서 성장을 급가속시키고 유지시켰다. 세포 생존율이 25-30%로 감소하였을 때, 6-7일 후 세포를 수집하였다. 배양배지로 분비된 GIPFwt의 양은 ELISA 및 웨스턴으로 분석하였다. 분비된 GIPF의 웨스턴 분석은 단백질의 분해가 전혀 일어나지 않았음을 보여준다. 웨스턴 분석은 정제된 항-GIPF 폴리클로날 항체를 이용하여 수행하고, ELISA에 의한 단백질 확인은 정제된 닭의 항-GIPF 폴리클로날 항체를 포착항체(capture antibody)로 토끼의 항-GIPF 폴리클로날 항체를 확인항체(detection antibody)로 이용하여 수행하였다. 토끼 및 닭의 폴리클로날 항체는 전체 단백질에 대응하여 반응하였다. 바이오리액터에서의 GIPFwt의 성장은 2.3-3mg/l를 생산하였다.

한외여과(ultrafiltration)-정용여과(diafiltration): 분비된 GIPFwt 단백질을 포함하는 배지를 원심분리에 의해 수집하였다. 단백질 분해효소 저해제 1 mM EDTA 및 0.2 mM Pefabloc(Roche, Basel, Switzerland)을 GIPF 분해를 억제하기 위해 첨가하였다. 배지는 0.22μm PES 필터(Corning)를 통해 걸러서 TFF system(Pall Filtron) 또는 10kDa 컷-오프 막(cut-off membrane)을 포함하는 hollow-fiber system(Spectrum)을 이용해 10배 농축하였다. 농축된 배지의 완충액은 20mM sodium phosphate, 0.3M Arg, pH 7로 교환하였다. 인산화 완충액에 0.3M Arg의 첨가는 GIPFwt을 정제 중에 pH 7에서 완전히 용해된 상태를 유지하는데 필요하다. 한외여과 및 정용여과후에, 포유동물 단백질 분해효소 저해제 각테일(Sigma)을 1:500(v/v) 희석비율로 첨가하였다.

Q 음이온 교환 크로마토그래피: 음이온 교환 Q 세파로스 HP 컬럼(Amersham)은 pH 7.0에서 0.3M Arg를 포함하는 20mM sodium phosphate(NaP)완충액으로 평형화하였다. 10배 농축한 완충액 교환한 배지는 0.22μm PES 필터로 걸러서 Q 세파로스 컬럼에 옮겨 불순물들 및 핵산이 결합하도록 하였다.

SP 양이온 교환 크로마토그래피: GIPFwt을 포함하는 Q-세파로스 flow를 모아서 양이온 SP 세파로스 HP(Amersham)에 옮기는데 이는 GIPF 단백질에 결합하였다. SP 세파로스 컬럼을 20mM NaP, 0.3M Arg, 0.1M NaCl, pH 7의 15배 컬럼 부피로(CV) 세척하고, 40배 컬럼부피가 넘는 0.1M에서 0.7M NaCl의 농도구배로 용해분리하였다. 분획은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 분석하였다. GIPFwt를 포함하는 분획을 분석하여 수집하였다. 수집된 분획의 완충액은 20mM sodium phosphate, pH 7, 0.15 NaCl으로 교환하였다. 정제된 단백질의 순도는 SDS-gel의 쿠마시에(Coomassie) 염색에 의해 분석했을 때 92-95%로 확인하였다. 단백질은 1mg/ml로 농축하였고, 멸균한 0.22μm 필터에 통과시켜서 -80℃에 저장하였다.

정제 과정의 각 단계에서 수율은 ELISA 및 브래드포드 분석(Bradford assay)으로 정량화하였고, GIPF 단백질의 회수율은 표 3에 나타난 대로 계산하였다.

[표 3]

단계	단계 회수율	총회수율
배지 농도/정용여과(diafiltration)	100%	100%
Q 음이온 교환	95%	95%
SP 양이온 교환	75%	71%
최종 조성물 및 필터	98%	70% 48%(주요 성숙형태 한가지)

최종 GIPF 단백질 용액의 내독소 양은 chromogenic LAL(Limulus Amebocyte Lysate) assay kit(Charles River)를 이용하여 분석하고, GIPF 1mg 당 0.24 EU로 확인하였다.

C. 효모에서 GIPFt의 발현 및 정제

GIPFt는 효모배양으로부터 발현하여 정제하였고, 생물학적 활성을 상술한 HEK 293 세포배양으로부터 정제된 GIPFt의 활성과 비교하였다.

GIPFt(서열번호 5)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 효모 α -요소 분비 신호서열을 포함하는 Pichia 발현벡터 pPICZaA로 연결시켰다. Pichia Pastoris 야생형 X-33 중은 GIPFt를 발현시키는데 사용하였다. Pichia 벡터의 이용, 재조합 단백질의 발현 및 정제를 위한 방법(protocol)은 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)로부터 얻을 수 있고 "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology"(참조: D.R. Higgins and J. Cregg eds., The Humana Press, Totowa, NJ 1998))에 기술되었다.

간략하게, GIPFt는 IMAC Ni²⁺ 컬럼에 흡착 크로마토그래피에 이어 SP 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. Ni²⁺ 컬럼은 20mM 이미다졸로 세척하였고, GIPFt는 30 컬럼부피를 넘어 20-300mM 이미다졸의 농도구배로 용해 분리하였다. 정제된 산물의 SDS-PAGE는 약 50kDa의 넓고 선명하지 않은 단백질 밴드를 보여주는데, 이는 GIPFt가 다양한 정도로 당결합되어 있음을 알려준다. 생물학적 활성은 실시예 17, 20에서 언급한 대로 각각 실험실 조건 및 생체 조건에서 분석하였다.

Pichia pastoris에서 발현된 GIPFt 단백질은 마우스의 장 상피의 증식을 유발하고, HEK 293 세포에서 정제된 GIPF 단백질은 수득한 것보다 적음에도 불구하고 β -catenin을 안정화시킨다(데이터는 없다).

D. GIPF 생쥐의 ortholog(-mGIPFt)의 정제

사람 GIPF의 마우스 ortholog를 암호화하는 서열번호 68은 V5-His 표지된 단백질 mGIPFt를 발현시키는 pcDNA/인트론 벡터로 연결시켰다. 표지된 마우스 단백질은 HEK293세포에서 발현하였고, 사람 GIPFt 단백질 정제에 대해 상술한 방법에 따라 정제하였다. 단백질을 80% 순도로 정제하고, PBS에 조성시켰다. mGIPFt의 생물학적 활성은 생체 조건과 실험실 조건에서 분석하여, 사람 GIPF(실시예 20)에서 동일한 증식 특성을 가지고 있음을 보여주었다.

E. 정제된 재조합 GIPF의 특성

정제된 GIPF 단백질(GIPF 및 GIPFwt)의 SDS-PAGE 분석은 환원 및 비환원 조건에서 수행하고, 293 세포로부터 유래한 V5-His 표지된 GIPF 단백질은 단량체로 존재함을 보여주었다. GIPFt 및 GIPFwt 단백질은 당결합되어 있어서, 비환원 조건에서 각각 대략 42kDa 및 38kDa의 분자량으로 SDS-PAGE에서 이동하였다. 신호서열이 없는 GIPF 및 GIPFwt의 이론상 분자량은 각각 30.2kDa, 26.8kDa이지만, MALDI(Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy)의 결과는 GIPFt 및 GIPFwt의 예상되는 분자량이 37.8 kDa, 32.9kDa으로 보여준다. 분자량에서의 불일치는 단백질의 당결합을 설명해준다. 결과적으로, N-linked 및 O-linked 올리고당(oligosaccharide)의 완전한 당제거는 제조자의 지시에 따라 N- 및 O-glycanase(Prozyme, San Leandro, CA, USA)를 이용해 수행하였다. 당이 제거된 단백질의 SDA-PAGE 분석은 결과적으로 분자량 4-5kDa의 명백한 감소를 보여준다. 실시예 17 및 20에서 각각 언급한 대로, 실험실 조건과 생체 조건에서 측정했을 때 당제거(deglycosylation)는 GIPF의 생물학적 활성에 영향을 주지 않는다.

단백질 안정성: 변성 후에 GIPF의 활성을 측정하기 위해, GIPF를 5분간 끓이고 얼음에서 갑작스레 냉각시켰다. 온전한 활성을 지닌 GIPF는 실험조건(실시예 17 참조), 생체 조건(실시예 21 참조)에서 측정하였다.

시스테인 잔기의 캐핑: 시스테인 잔기의 환원 및 알킬화(alkylation)는 GIPF의 활성을 파괴하기 위해 수행하였다. GIPF(1 mg/ml) 이황화 결합의 환원은 GIPF를 30mM DTT, pH 8, 37°C에서 1시간 동안 배양함으로써 수득하였다. 결과적으로 자유설프하이드릴기(free sulfhydryl)는 암상대 37°C에서 30분 동안 20mM 요오드아세트산(참조: Crestfield A M; Moore S; Stein W H.J. Biol. Chem. 1963;238, 622)로 S-carboxymethylation에 의한 것이다. 반응은 냉각에 의해 정지시키고, 과량의 DTT 및 요오드아세트산을 PBS에 대한 투석으로 제거하였다. 캐핑된(capped) GIPF의 생물학적 활성은 실험조건 및 생체 조건의 실험을 모두 이용해 분석하였다. GIPF의 생물학적 활성은 캐핑(실시예 17 및 20 참조)에 의해 제거하였다.

N-말단 서열분석결과는 HEK293세포가 GIPFt 또는 GIPFwt 폴리펩티드 중 하나를 생산함을 나타내었다: 신호서열이 없는 서열번호 4의 GIPF 단백질에 상응하는 우점의 성숙형태(서열번호 10), 신호 펩타이드 및 푸린(furin) 절단서열이 모두 없는 서열번호 4의 GIPF 단백질에 상응하는 성숙형태(서열번호 12). 두 가지 형태는 SP 컬럼에서 잘 분리되고, 성숙형태와 우점의 성숙형태의 비율은 대략 1:2정도로 발현하였다. 두 가지 우점의(dominant) 성숙형태와 성숙형태의 GIPFt는 생체 조건에서 장의 소낭선 세포증식을 유발하지만, 우점의 성숙형태는 실시예 11, 12, 13 및 14에 언급된 동물 질병 모델에서 GIPF의 치료적 효과를 시험하는데 이용하였다. CHO 세포는 오직 GIPF의 우점의 성숙형태만을 발현하였다.

푸린 절단부위의 돌연변이 생성(Arg28-->Gln): HEK 293 세포로부터 생성된 GIPF의 성숙형태가 푸린 가수분해효소에 의해 자연스런 과정으로부터 나타남을 보여주기 위해서, 푸린 절단부위의 보존된 서열을 Arg28QRR을 Gln28-QRR로 바

꿈으로써 변이시켰다. 변이 단백질(서열번호 18)은 HEK293세포에서 발현시키고 GIPFt의 정제(실시예 9A)를 위해 사용한 방법에 따라 정제하였다. 정제된 단백질의 N-말단 서열분석은 오직 주요한 성숙형태만이 배양액 속에서 발현됨을 확인하였다. 이러한 발견은 성숙형태가 세포내 퓨린 가수분해효소 활성화에 의해 단백질 절단의 결과로 생성되었음을 확인하였다. 부가적으로, 정제된 우점의 성숙형태의 전반적인 회수는 50%에서 68%로 증가하였다.

요약하면, 정제과정은 GIPFt 단백질은 90%이상의 순도로, GIPFwt 단백질은 93%이상의 순도로 생산하였다. 정제과정을 이용한 GIPF의 우점의 성숙형태의 총회수율은 대략 50%이다. 그러나, 그 양은 퓨린 절단 위치가 변이된 단백질을 발현시킴으로써 증가할 수 있다. 배지의 정용여과(diafiltration) 및 Ni 컬럼의 정제과정 중 완충액에 0.5M NaCl의 첨가는 pH 7에서 GIPF를 완전히 용해상태로 유지시키는데 중요하다. GIPF를 SP 컬럼에 결합시키기 위해, NaCl을 제거하고, 0.3M Arg를 첨가하여 높은 용해도를 유지하였고 단백질 회수를 증가시켰다.

GIPFt 및 GIPFwt의 우점의 성숙형태 및 성숙형태는 생체 조건에서 GIPF의 생물학적 활성을 측정하는데 이용하였다. 금번 실시예에서의 방법에 의해 정제된 단백질은 지속적으로 장의 소낭선 상피세포의 상당한 증식을 유발하였고, 이는 정제된 GIPF 단백질을 투여한 마우스의 소장 팽창의 원인이 된다.

GIPF의 생물학적 활성은 당제거 또는 끓임(boiling)에 의해 영향을 받지 않지만, 시스테인잔기를 요오드아세트산으로 캐핑시킴으로써 제거되었다.

실시예 10: 생체조건에서의 HEK293 및 CHO 세포에서 발현시킨 재조합 GIPF 단백질의 생물학적 실험

HEK293 및 CHO 세포에서 유래한 GIPFt 단백질의 생체조건에서의 생물학적 효과를 다음과 같이 같이 정상 마우스에서 측정하였다:

재조합 V5His6-표지된 (GIPF V5His6-tagged) GIPF 단백질(GIPFt)의 약물동력학(PK)은 마우스에서 실시하였다. 6-8주 된 BALB/C 마우스에 40mg/KG GIPFt 단백질 또는 대조군으로서 조성 완충액(formulation buffer)만을 한 번씩 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사하였다. 주사 후 0, 30분, 1시간, 6시간 및 24시간에 혈액을 빼내고, 각 시간대에서의 혈청내 단백질 수준을 V5 항체(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)를 이용하여 웨스턴 분석하였다(참조: 도 18A). 도 18A는 혈청 GIPF 단백질의 분해가 전혀 관찰되지 않음을 보여준다. 혈청의 GIPF 단백질 반감기는 Positope(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)를 V5 표지된 단백질을 표준으로 이용하여 주사 후 단백질 농도를 세미 로그 플롯(plot)에 의해 계산하고, 5.3 시간으로 측정하였다(참조: 도 18B).

정제된 재조합 GIPFt 단백질이 GIPF 녹인(knock-in) 마우스 및 재조합 아테노바이러스를 주입한 마우스에서 관찰되는 유사한 표현형을 나타내는지 조사하기 위해, 6-8주 된 BALB/C 마우스에 40mg/KG GIPFt 단백질 또는 대조군으로서 조성 완충액을 7일간 꼬리 정맥을 통해 매일 주입하였다. 마지막 주입 후 24시간 되는 8일째에 마우스를 희생시켰다. 희생시키기 4시간 전, 1mg의 브로모데옥시유리딘(bromodeoxyuridine: BrdU)을 GIPF의 생체조건에서의 증식활성을 측정하기 위해 복강내(ip) 주사하였다. 소장, 결장, 비장, 간 및 골수를 포함하는 다양한 조직을 모아서 포르말린에 고정시켰다. 파라핀 포매된 절편은 조직검사를 위해 H&E 염색하였다. 절단(section)은 또한 BrdU 면역조직화학분석을 위해, 제조자의 지시(Oncogene Research product, Boston, U.S.A.) 및 상기 기술된 사항(McKinley, J.N. et al. 2000)에 따라 가공하였다. 모든 실험에서, 최소 3 마리의 동물을 그룹마다 분석하고, 실험은 최소 두 번 반복하였다.

위장 절편의 H&E 염색은 GIPF를 주사한 마우스에서 소장 및 결장의 살아있는 상피 세포의 상당한 증식이 나타남을 보여주었다(참조: 도 19 및 21). 이러한 결과는 유전자 도입 GIPF 녹인 마우스 및 GIPF 아테노바이러스를 주입한 마우스(상기 실시예 참조)에서 얻은 결과와 일치한다. GIPF 단백질의 증식 효과는 소장(도 20) 및 결장(도 22) 모두에서 BrdU 결합을 검사함으로써 확증하였다.

실시예 11: 방사선-유도 점막염에 대한 GIPF의 예방효과

예방 및 치료제로서의 GIPF의 효능을 방사선-유도 점막염의 동물모델에서 검사하였다.

48마리의 성숙한 수컷, 10-12주 된 BDF1 마우스를 이용하였다. 공급처로부터 운반시 실험 전에, 일주기성 리듬을 안정시키기 위해 동물을 2주간 개별적으로 환기가 되는 케이지(cage)에서 12시간 명:암 주기로 키웠다. 동물에게는 식량과 물에 임의적(*ad libitum*) 접근을 허용하였다. 동물은 6마리씩 8그룹으로 나누어서, 각각 아래와 같이 처리하였다:

1. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이전 72, 48 및 24시간에 2mg/kg GIPF 정맥내(정맥내) 주사

2. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이전 72, 48 및 24시간에 5mg/kg GIPF 정맥내 주사
3. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이전 72, 48 및 24시간에 125 μ g GIPF 정맥내 주사
4. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이전 72, 48 및 24시간에 식염수 정맥내 주사
5. 아무런 처리를 하지 않고, 방사선 처리도 하지 않은 대조군
6. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이후 72, 48 및 24시간에 2mg/kg GIPF 정맥내 주사
7. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이후 72, 48 및 24시간에 5mg/kg GIPF 정맥내 주사
8. 13Gy X-ray(전신조사) 노출 이후 72, 48 및 24시간에 식염수 정맥내 주사

모든 주사는 15:00에 실시하였다. 소장의 손상(intestinal damage)은 15:00 일회 투여의 13Gy X-방사선 조사(0.7Gy/min)에 의해 유발시켰다.

방사선 조사 4일 후, 동물을 선발제거(culling)하였다. 소장을 추출하여, 조직검사에 앞서 카노이(Carnoy's) 고정액에 고정시켰다. 3 μ m 두께의 횡단 절편을 잘라내어 H&E 염색하였다. 또한, 희생 직후 십이지장, 중간 결장, 간, 폐, 허, 비장, 위 및 이자를 즉시 취하여, 70% 에탄올에 보존하기 전에 밤새 정격 식염수(formal saline)에 고정시켰다.

각 동물에 대하여, 10개의 장의 주경(intestinal circumference)을 분석하였다(그룹마다 60가지) - 하나의 주경은 소장의 길이와 일치하였고, 따라서 길이의 유용한 기준선 단위가 되었다. 주경마다 생존한 소낭선(crypt)의 수를 세어서 그룹마다 평균치를 계산하였다(참조: 표 4). 10 또는 그 이상 강하게 H&E 염색된 세포(Paneth 세포 제외) 및 오직 페이어 패치(Peyers patch)를 포함하지 않는 온전한 주경만을 계산하였다.

평균 소낭선 폭(자체의 가장 넓은 값으로 계산)을 또한 소낭선 크기의 차이 때문에 잘못된 측정을 보정하기 위해 측정하였다. 이렇게 적용한 보정값은 다음과 같았다:

소낭선/주경의 보정값=

비처리 대조군의 평균 소낭선 폭 $\times$ 처리그룹에서의 생존한 소낭선 평균값

처리 동물에서의 평균 소낭선 폭

모든 동물이 처리시 살아남았고, 명백한 상반효과를 보이지 않았다. 도 23 A-D는 미처리된 그룹 5(A), 식염수 전처리 그룹 4(B), KGF-처리 그룹 3(C) 및 GIPF 처리된 그룹 2(D) 동물로부터 소장의 절편을 보여준다. 재생의 병소(foci, 하나 또는 그 이상의 클론생성 세포를 가지는 생존한 소낭선)는 식염수 처리된 동물(그룹 4)로부터의 조직 절편에서 명백히 관찰되었다(참조: 도 23B). 이런 병소 외에도, 간충직(mesenchyme)이 완전히 노출되었고, 이런 동물은 설사를 일으켜서 방사선 조사 후 4일 이상 살려 두었을 때 점막염으로 죽었다. GIPF는 KGF(도 23C)에 의해 도모되는 것과 필적하는 수준으로, 장 구조(intestinal architecture, 도 23D)의 보호를 도모하였다.

【표 4】

실험 그룹	소낭선/주경 수 (평균 $\pm$ 표준편차)	소낭선 폭(μ m) (평균 $\pm$ 표준편차)	소낭선/주경 보정값 (평균 $\pm$ 표준편차)
1	12.96 $\pm$ 4.9	51.98 $\pm$ 5.4	7.4 $\pm$ 3.3
2	15.4 $\pm$ 4.9	45.03 $\pm$ 2.8	10.1 $\pm$ 3.3
3	22.1 $\pm$ 3.8	54.46 $\pm$ 2.1	12.0 $\pm$ 1.2
4	7.2 $\pm$ 2.6	55.27 $\pm$ 6.4	3.8 $\pm$ 1.2
5	109.1 $\pm$ 5.3	29.56 $\pm$ 3.0	
6	10.7 $\pm$ 4.5	57.16 $\pm$ 3.9	5.5 $\pm$ 2.3

7	10.6±4.1	55.50±4.7	5.6±2.1
8	9.4±1.9	56.85±6.9	5.0±1.4

GIPF 전처리는 13Gy 방사선 조사시 생존하는 소낭선의 수를 상당히 증가시키며 명백하다. 투여량 2mg/kg(그룹 1)에서 GIPF의 전처리는 미처리 그룹 4(보호요소로 알려져 있는)로부터의 소낭선보다 1.95배 생존율을 높여주고, GIPF 투여량 5mg/kg(그룹 2)는 소낭선 생존율을 2.66배로 더욱 증가시켰다. 이는 매우 유의적인 결과로서 알려진 최적 투여량의 KGF(그룹 3)을 처리했을 때의 소낭선 생존율을 3.16배 증가시키는 효과에 필적한 결과이다.

따라서, GIPF는 방사선 조사의 해로운 효과로부터 소장 상피를 보호하는 것처럼 보이고, 방사선 치료를 받을 환자들에서 잠재적 예방법으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

실시예 12: 화학요법-유도 점막염 모델

화학요법-유도 점막염을 치료할 때의 재조합 사람 GIPF(GIPFwt)의 효능은 건강한 마우스 및 종양이 있는 마우스에서 측정하였다. 실험은 보쉬(Boushey) 등에 의해 이미 발표된 방법에 기초하여 수행하였다(참조: Cancer Res 61:687-693 (2001)).

1×10⁶ CT26 생쥐 결장암 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 동계의 암컷 BALB/c 마우스에 피하(sc, subcutaneous) 주입하고, 종양을 5일간 키웠다. 건강하고 종양을 지닌 동물을 각각 6 마우스씩 실험그룹으로 나누어서 다음과 같이 처리하였다:

1. 종양을 지닌 마우스, 1일에서 5일까지 담체(50% DMSO) 정맥내 주사

0일에서 7일까지 식염수 정맥내 주사(TVS)

2. 종양을 지닌 마우스, 1일에서 5일까지 담체(50% DMSO) 정맥내 주사

0일에서 7일까지 50μg GIPF/100μl 식염수 매일 정맥내 주사(TVG)

3. 종양을 지닌 마우스, 1일에서 5일까지 50mg/kg 5FU 주사

0일에서 7일까지 식염수 정맥내 주사(TDS)

4. 종양을 지닌 마우스, 1일에서 5일까지 50mg/kg 5FU 주사

0일에서 7일까지 50μg/kg-5FU 정맥내 주사(TDG)

5. 건강한 마우스, 1일에서 5일까지 50mg/kg 5FU 주사

0일에서 7일까지 식염수 정맥내 주사(NDS)

6. 건강한 마우스, 1일에서 5일까지 50mg/kg 5FU 주사

0일에서 7일까지 50μg/100μl 식염수 정맥내 주사(NDG)

0일, 2일, 4일, 6일 및 8일에 동물의 체중을 측정하였을 때, 격렬한 설사 및 종양의 크기를 기록하였다. 0-3의 설사값(diarrhea score)은 0(정상)부터 3(심각함)까지 증상의 악화를 반영하였다. 체중의 변화는 비치료 그룹의 % 체중으로 계산하였다. 종양의 길이, 폭 및 높이를 측정양각기(cliper)로 측정하고, 종양의 부피를(길이×폭×높이)/2로 계산하였다.

모든 동물은 8일째에 안락사시켰다. 대장과 소장을 적출해 무게를 재고 길이를 측정하였으며, 중간 공장 직경을 기록하였다. 중간 공장 조각(1cm)은 유문으로부터 14-15cm 잘라내고, 횡단 결장의 조각(1cm)은 회맹(ileocaecal) 접합부로부터 4cm 잘라내었다. 내장 조각은 세척하여 조직분석을 위해 중성 완충액의 포르말린으로 고정시켰다. 점막의 조직분석이나 형태학은 Image Pro Software(Imagepro, Ltd., Ashford, Middlesex, UK)를 이용하여 조직 절편상에서 수행하였다.

심각한 설사, 체중 및 종양크기에 대한 GIPFwt의 효과는 아래에 요약되었다.

설사값(평균±표준편차): 체중(미처리의 %)

그룹 3 TDS 28.3±0.41 74.7±5.2

그룹 4 TDG 0.33±0.52 85.1±5.7

그룹 5 NDS 3±0 73.2±4.3

그룹 6 NDG 0.5±0.55 87.0±6.0

종양 부피(평균±표준편차: mm3)

그룹 1 TVS 95.8±8.1

그룹 2 TVG 95.1±4.2

그룹 3 TDS 21.8±3.0; p<0.05

그룹 4 TDG 16.7±8.6; p<0.05

GIPF는 GIPF를 주입하지 않은 그룹 5 및 3의 값과 비교하였을 때, 그룹 6 및 4 각각에서 건강한 마우스와 아래와 같이 마우스에서의 5-FU에 의한 심각한 설사를 현저하게 감소시켰다. 마찬가지로, GIPF도 5-FU 처리한 실험동물에서 체중손실을 감소시켰다.

미처리 종양을 지닌 마우스(그룹 1)의 종양은 GIPF 처리한 종양을 지닌 마우스(그룹 2)의 것과 크기가 비슷하였다. 즉, GIPF는 종양의 성장에 영향을 주지 않았다. 예상대로, 5-FU는 그룹 3에서 마우스의 종양크기를 감소시켰고, 또한 그룹 4의 마우스의 종양크기를 감소시켰다. 즉, GIPF는 종양의 크기를 감소시키는데 있어 5-FU의 활성을 저해하지 않았다(참조: 도 24).

소장의 전반적 외형에 대한 GIPF의 효과는 도 25에서 볼 수 있고, 소장 직경, 무게, 길이의 상응하는 측정결과는 표 5에 나타내었다. 5-FU를 주입한 정상 마우스 및 종양을 지닌 마우스의 소장은 위축되었고(참조: 도 25E), 출혈과 관련된 다수의 손상을 관찰하였다. 반면, GIPF를 주입한 마우스의 소장 모습은 명백히 정상이고, 소장상피에 대한 GIPF의 증식효과 때문에 전형적인 비정상 팽창을 동반하였다(참조: 도 25B, C, D 및 F)

[표 5]

CT26 종양을 지닌 마우스	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4
중간 공장 직경(mm)	2.66±0.15	3.65±0.21*	2.53±0.15	3.58±0.14 [#]
무게				
소장(g)	1.16±0.09	1.47±0.14*	0.90±0.01	1.51±0.13 [#]
대장(g)	0.32±0.02	0.38±0.02*	0.25±0.03	0.39±0.12 [#]
길이				
소장(cm)	35.2±2.0	40.5±1.0*	30.2±1.3	39.7±2.1 [#]
대장(cm)	8.7±0.3	9.7±0.3*	6.3±0.3	9.5±0.5 [#]

정상 마우스	그룹 5	그룹 6
중간 공장 직경 (mm)	2.38±0.13	3.44±0.13**
무게		
소장 (g)	0.88±0.08	1.43±0.13**
대장 (g)	0.25±0.02	0.38±0.04**
길이		
소장 (cm)	30.3±1.9	39.3±1.0**
대장 (cm)	6.9±0.9	9.7±1.0**

* P<0.05(ANOVA, 그룹 2 vs 그룹 1)

P<0.05(ANOVA, 그룹 4 vs 그룹 3)

** P<0.05(ANOVA, 그룹 6 vs 그룹 4)

모든 실험그룹의 소장과 결장 장 절편의 조직학적 분석은 GIPF가 5-FU에 의한 장 점막의 용모 및 소낭선 부분에 대한 큰 피해를 막아줌으로써, 5-FU를 주입한 마우스의 장 구조를 유지시켜 줌을 보여주었다(참조: 도 26). 도 26A는 소장에 대한 5-FU의 효과를 나타내고, 도 26B는 결장에 대한 5-FU의 효과를 보여준다. 중간 공장의 용모 높이와 소낭선 깊이의 미세 형태분석(micromorphometry)은 GIPF의 효과가 매우 중요함을 확증한다(참조: 도 27).

GIPF는 5-FU의 해로운 효과로부터 소장 및 결장을 보호하고, 5-FU의 치료효과를 방해하지 않는다. 따라서, GIPF는 항암치료의 해로운 부작용을 감소시키는 화학요법제와 결합하여 이용할 수 있을 것이다.

실시예 13: 화학요법 및 방사선 유도 구강 점막염에 대한 GIPF의 예방효과

혀의 등(구강) 및 복부 상피의 증식에 대한 GIPF의 효과는 X-ray 조사하거나 5-FU를 투여한 마우스에서 각각 실시예 11 및 12에 기재된 바와 같이 시험하였다.

단클론성 랫트 항 마우스 Ki67 항원(Dako Ltd., High Wycombe, UK)를 이용한 면역조직화학법은 생산자의 지시와 상술한 방법(참조: Scholzen, T. et. al. 2000)에 따라, 비방사선 조사 및 방사선 조사 마우스(실시예 11의 그룹 1, 2 및 3)로부터 혀의 파라핀 포매한 절편에 대해 수행하였다.

GIPF는 GIPF를 주입하지 않은 동물의 것과 비교하였을 때, 방사선 조사 동물의 복부 및 등의 혀 상피에서 Ki67에 대해 염색한 핵의 수를 확연히 증가시켰다(참조: 도 28 및 29). Ki67에 대하여 양성염색되는 % 복부 상피세포의 수로 계산하는 상피 증식 지표는 GIPF가 복부 혀 상피에 대해 방사선 조사에 의한 세포질 손실을 현저하게 감소시킨다는 것을 확증하였다(참조: 도 30).

5-FU를 처리한 동물의 혀의 절편에 대한 조직학적 분석(실시예 12의 그룹 2-6)은 GIPF가 5-FU를 처리한 정상 및 종양을 지닌 동물의 등 및 복부 상피층의 형태를 보존시킴을 보여준다(참조: 도 31).

GIPF를 처리한 모든 동물의 혀 상피층은 GIPF를 처리하지 않은 실험동물의 것보다 5-FU에 의한 피해가 상당히 감소하였다.

따라서, GIPF는 화학치료법 및 방사선 치료-유도하는 구강 점막염의 치료 또는 예방에 치료제로서 이용할 수 있다. 구강 점막염의 정량적 동물 모델(참조: 예를 들어 Wardly et al., Arch Oral Biol 43:567-577(1998); Potten et al., Cell Prolif 35:32-47(2002))는 세포고갈의 심각성을 감소시키는데 GIPF의 잠재적 역할을 평가하고 구강 및 장 상피의 상피층 재생 비율을 증가시키기 위한 다른 세포독성제와의 혼합 투여시에, GIPF의 치료특성을 시험하는데 이용할 수 있다.

실시예 14: 텍스트란 설페이트 소듐-유도 대장염에 대한 GIPF의 치료효과

대장염 치료시 재조합 사람 GIPF(GIPFwt)의 효능을 DSS(dextran sulfate sodium)-유도 대장염의 마우스 모델에서 측정하고, GLP-2의 효능(참조: L'Heureux and Brubaker J Pharmacol Exp Ther 306:347-354(2003); Kriegelstein et al., J Clin Invest 110:1773-1782(2002); Siegmund et al., J Pharmacol Exp Ther 296:99-105(2001))과 비교하였다.

6-8주 된 암컷 BALB/c 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)를 환기된 케이지에서 키우고, 일주일간 12시간 명:암 주기에 적응시켰다. 비슷한 몸무게를 지닌(대략 20g; <5% 편차) 24마리 마우스를 4 케이지에서 키우고, 7일간 4% DSS(v/w) 흡입용액을 임의적으로 공급하였다.

7일째, 각각 동물의 체중을 기록하고 체중손실에 대한 값, 대변(stool)의 농도(consistency) 및 출혈을 아래의 표 6에 나타는 것처럼 확인하였다.

[표 6]

점수	무게 손실(%)	대변의 농도	잠재적/조대한(occult/gross) 직장출혈
0	없음	정상	정상
1	0-5%		
2	5-10%	물은	헤모컬트(hemocult)
3	10-20%		
4	>20%	설사	조대한(gross)

점수를 대장염 심각성의 척도로 IBD 활성지표(IBDAI)를 계산하는데 이용하고,, 표로 만든 패러미터(parameter)에 대한 점수의 평균을 계산하였다. 체중 손실, 대변의 농도 및 직장의 출혈을 매일 검사하고, IBDAI는 실험기간 동안 매일 기록하였다.

7일째, 4%(v/w) DSS 흡입용액은 DSS의 효과를 악화시키지 않고, 질병의 활성(disease activity)을 유지하기 위해 1%(v/w) DSS 용액으로 치환하였다. DSS 섭이시킨 동물 16마리를 지속적으로 유사한 질병 활성에 대해 선별하고, 4 마리씩 그룹으로 나누어 다음과 같이 처리하였다.

1. 7일간 매일(10am) 물, 식염수 정맥내 주입
2. 7일간 DSS(1%), 7일간 매일(10am) 식염수 정맥내 주입
3. 7일간 DSS(1%), 7일간 매일(10am) 100 μ g GIPF 정맥내 주입
4. 7일간 DSS(1%), 7일간 매일(10am) 50 μ g GIPF 정맥내 주입
5. 7일간 DSS(1%), 7일간 매일(10am 및 6pm) 두 번씩 10 μ g GLP-2 피하(sc) 주사

이 실험에 사용한 GIPF 단백질은 사람 재조합 GIPF 단백질(서열번호 4; GIPFwt)이고, 실시예 8에 기재된 방법에 따라 발현하고 정제하였다. GLP-2 유사체, h[Gly2]GLP-2를 합성하여 Biosource International(Camarillo, CA, USA)로부터 구입하였다.

14일째, 케이지에서 식량을 제거하여 소장을 비우고, 동물을 경부탈골(cervical dislocation)에 의해 선별제거하였다. 모든 동물은 희생 전에 2시간동안 4mg/0.1ml BrdU를 주입하였다. 대장 및 소장을 잘라내어 무게를 재고, 길이를 측정한 다음, 중간 공장의 직경을 기록하였다. 중간 공장의 단편(1cm)를 유문으로부터 14-15cm에서 잘라내고, 횡단 결장의 단편(1cm)를 세척(flush)한 다음, 조직분석을 위해 10% 중성 완충액의 포르말린을 이용하여 고정시켰다. 조직학 분석과 점막의 형태계측(morphometry)은 ImagePro Software(Imagepro, Ltd., Ashford, Middlesex, UK)를 이용하여 조직절편에 대해 수행하였다. 실험그룹 2-5의 마우스에 대한 IBDAI는 도 32에 나와 있고, 무게 손실, 대변의 농도 및 직장 출혈에 대한 대응 값은 도 33, 34 및 35에 각각 나타내었다. 이러한 자료는 GIPF가 11일처럼 빠른 시간에 대장염의 심각성을 감소시켜

서 치료효과를 제공함을 보여준다. 14일째, 그룹 3, 4의 GIPF 처리한 마우스(각각 1.75 및 1.83)는 처리하지 않은 그룹 2의 마우스(3.75)보다 현저히 낮은 IBDAI를 지닌다. GLP-2SMS 대장염의 심각성에 대해 보통의 효과를 지니며, 14일경 GLP-2는 DSS 처리한 마우스의 IBDAI를 3.25로 감소시킨다.

그룹 1, 2, 3 및 5의 마우스의 소장 및 결장의 총체적 병변의 예를 도 36에 나타내었다. 식염수로 DSS를 주입한 동물에서는 대조군과 비교시 전형적으로 위축, 충혈(hyperemia) 및 설사와 관련된 심각한 대장염이 발달하였다. GIPF를 처리한 동물의 소장과 대장은 약간의 비정상팽창이 보였고, 대조군의 장과는 아주 유사하였다. 이러한 결과는 GIPF는 염증성 장질환의 치료에 효과가 좋은 치료제로 이용할 수 있음을 알려준다. GLP-2가 약간의 치료효과를 제공하는 반면, 이 그룹의 소장과 대장은 대조군의 동물군에 비해 덜 손상되는 것으로 보인다. 변화의 유의성은 표 7의 아래에 보이는 소장 및 대장의 측정으로 반영되었다.

[표 7]

	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5
중간 공장 직경(mm)	2.25±0.09	1.72±0.05*	2.50±0.18 [#]	2.23±0.10 [#]	1.97±0.04**
무게					
소장(g)	0.94±0.06	0.78±0.05*	0.91±0.09 [#]	0.89±0.05 [#]	0.88±0.07
대장(g)	0.26±0.02	0.18±0.01*	0.23±0.01 [#]	0.22±0.01 [#]	0.18±0.01
길이					
소장(cm)	32.0±1.4	26.6±0.9*	31.1±0.9 [#]	30.3±0.6 [#]	28.9±0.8**
대장(cm)	7.3±0.3	4.9±0.5*	6.6±0.5 [#]	6.4±0.3 [#]	5.4±0.6

*P<0.05(ANOVA, 그룹 2 vs 그룹 1)

[#]P<0.05(ANOVA, 그룹 3 또는 4 vs 그룹 2)

**P<0.05(ANOVA, 그룹 5 vs 그룹 2)

파라핀 포매한 절편의 H&E 염색은 DSS가 염증세포에 의한 다량의 침투 및 소장 및 결장의 점막내 용모부분과 소낭선 부분의 분리를 일으킨다는 점을 보여주었다(참조: 도 37). 상술한 총체적 병변의 관찰과 일치하듯이, GIPF는 DSS에 의한 효과를 반전시키고, 소낭선(crypt)과 용모의 장 구조를 회복시켰다. GIPF 처리한 동물의 소낭선은 대조군과 비교하였을 때 팽창하였다. GLP-2는 GIPF보다는 아주 덜하지만 약간의 치료효과를 부여한다(테이타는 나타내지 않았음). 용모와 소낭선의 미세형태(micromorphometry)(참조: 도 38)는 GIPF의 치료효과가 대장염에 의해 심각하게 손상된 용모의 높이와 소낭선의 깊이의 현저한 복구에 의해 나타난다고 확증하였다. GIPF에 의한 점막구조의 회복은 소낭선 세포의 상당한 증식에 의해 강조하였다(참조: 도 39 및 40). BrdU에 대해 양성 염색되는 % 소낭선 세포로서 계산하는 소낭선 증식 지표는 식염수(P<0.05)를 주입한 DSS 처리 마우스에서보다 GIPFwt를 주입한 DSS 처리 마우스에서 상당히 크다.

실시예 15: 다량의 장 절제 후에 GIPF의 치료효과

다량의 장 절제에 대한 적응반응을 증가시키는 GIPF의 효과는 SBS(short bowel syndrome)의 랫트 동물모델에서 시험하였다. 장항성(enterotrophic) 제제의 효과를 시험하는데 이용한 동물모델은 이미 알려져 있다(참조: Scott et al. Am J Physiol G911-G921(1998); Helmrath et al., J Am Coll Surg 183:441-449(1996)), 실험방법은 본 명세서에 참고문헌으로 삽입하였다).

동물은 장이 절제되고 리아노스토모스(reanastomose)된 75%의 중간 공장-회장(mid-jejenum-ileum) 외과절제 및 sham 절제 수술 대조군과 수술받지 않은 대조군으로 나누었다. 동물에 대해 식염수 또는 2mg/kg GIPF를 투여하였다. 75% 장의 절제는 적응반응을 극대화하기 위해 선택하고, 근위 공장(proximal jejunum) 및 원위 회장(distal ileum)의 동량부분 보존은 말단 회장의 비타민 B12 및 쓸개즙에 대한 특성화된 흡입능력을 제거하는 영양적 근거 및 회장 브레이크(ileal brake)에 근거하였다. 랫트에서, 먼 회장의 일부를 포함하여 소장의 255 보존은 절제된 동물이 대조군 동물의 같은 성장속도를 보이도록 하기에 충분하다.

절제 및 GIPF 처리에 대한 창자의 대사적, 형태적, 조직학적 및 기능적 반응은 실험과정 중에 측정하고, 10일째에 말단 분석(end-point)으로 나타내었다. 음식섭취 및 성장, 전반적이고 미세한 소장 형태 및 점막 흡수특성의 기능적 평가는 기술한 대로 평가하였다(참조: Scott et al., supra).

GIPF는 음식소비를 현저하게 증가시키고, 소장 절제와 전형적으로 동반하는 체중 손실을 감소시킨다. 또한, GIPF는 나머지 장의 길이, 직경, 습윤중량(wet weight) 및 점막의 습윤중량을 증가시키고, 남은 소장의 흡수능력을 향상시킨다. 소장의 교차 절편의 H&E 염색은 GIPF가 용모 높이 및 소낭선 깊이를 모두 연장시키고, 절제된 소장을 지닌 동물의 창자에서 소낭선 세포증식을 증가시킴을 보여주었다. 따라서, GIPF는 장 적응력(intestinal adaptation)을 증강시킴으로써, 장 재절제(bowel resection)의 효과를 감소시킨다.

실시예 16: 종양세포 증식에 대한 GIPF의 효과

GIPF는 생체조건에서 소장의 소낭선 상피 세포에 대해 강한 증식효과를 유발한다. 실험조건에서의 증식효과를 조사하기 위해, 재조합 GIPFwt의 효과를 실험조건에서 다양한 종양 및 정상 세포주의 증식에 대해 시험하였다. 아래의 세포주(ATCC)의 세포 증식 비율은 3H-티미딘(thymidine)의 결합을 검사하여 측정하였다.

Caco-2	사람의 결장 선암; 상피
COLO 205	전이성 결장 선암으로부터 사람의 복수; 상피
HCC 70	사람의 유선 도관 암; 상피
HCT 116	사람의 결장 암; 상피
HT-29	사람의 결장 선암; 상피
IEC-18	랫트 회장; 상피
IEC-6	랫트 소장; 상피
LS 513	사람 맹장; 결장의 암; 상피
MCF 7	전이된 유방 암으로부터 사람의 늑막 유출; 상피
NCI-H1373	사람의 폐 선암
PC-3	부정소 암으로부터 사람의 뼈 전이; 상피
SCC-25	사람의 혀 비늘 모양 세포 암
SCC-4	사람의 혀 비늘 모양 세포 암
SK-BR-3	전이성 결장 선암으로부터 사람의 늑막 유출; 상피
SK-BES-1	전이성 비늘모양 세포 폐 선암으로부터 사람의 늑막 유출; 상피
SW 620	결장 선암으로부터 사람의 림프 노드 전이; 상피
T 84	결장 선암으로부터 사람의 폐 전이; 상피
293	사람의 배아 신장; 상피

세포는 웰(well)마다 10,000-50,000 세포로 시작하였고 세포주에 따라 다르며, GIPFwt의 비교된 투여량(1.37-1000 ng/ml)을 처리하였다. GIPF 처리한 세포의 성장속도는 비처리 세포 또는 10% 완전한 배지(성장배지, 2.5% 투석한 FBS, 및 pen/strep)에서 배양한 세포의 성장속도와 비교하였다. 세포는 48시간 동안 37℃에서 배양하고, 배양 마지막 20-24시간 동안 0.5 uCi 3H-티미딘을 처리하였다. 세포를 모아서, 결합한 3H-티미딘의 양을 측정하고, 반복된 실험의 두배의 시료에서 결과를 얻었다.

GIPFwt은 시험한 대부분의 종양세포의 성장속도에 영향을 주지 않았다. 성장속도의 증가는 오직 IEC28, T84, HCT 116 및 HT29 세포에서 높은 투여량의 GIPF에서만 유발한다. 성장 정도는 비처리 세포의 40% 속도보다 낮다.

따라서, 이러한 결과는 GIPF는 생체조건에 존재하는 종양의 성장속도를 악화시키지 않고, GIPF는 항종양 치료에 의해 발생한 점막염으로 고통받는 환자들의 종양치료를 이용할 수 있음을 암시한다.

실시예 17: 세포내 신호전달에 대한 GIPF의 효과

wnt/ β -카테닌(catenin) 신호전달 경로는 발생과 항상성에서 중요한 역할을 한다. 소장에서, wnt 신호전달은 β -카테닌을 안정시켜서 소장의 소낭선 세포 증식의 조절자로서 중요한 역할을 하고, 그 결과 T 세포요소(TCF) 목표 유전자의 활성화

(transactivation)를 유발하는 것으로 알려져 있다(참조: Wetering et al., Cell 111:241-250(2002); Batle et al., Cell 111:251-263(2002); Perreault et al., J Biol Chem 276:43328-43333(2001); Booth et al., Nat Med 8:1360-1361(2002)).

wnt/ β -카테닌 신호전달 경로에 대한 GIPF의 효과를 측정하기 위해, β -카테닌의 안정화를 다양한 배양 세포주에서 측정하였다. 세포는 10% FBS 보충한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 넣은 6 웰에서 웰마다 1×10^6 세포로 시작하였다. 다음날, 세포는 무혈청 배지에서 배양하고, 50ng/ml 농도로 GIPF를 처리하거나 낮은 혈청조건(0.1% FBS)에서 10mM 농도의 LiCl₂(양성 대조군)을 처리하였다. 세포질 분획은 헤텔-와이즈만 등(Haertel-Weismann et al.)의 문헌(참조: J Biol Chem 175:32046-32051(2000))에 기재된 대로 준비하였다. 단백질을(4-20%) 농도구배의 SDA-PAGE로 분석하고, β -카테닌 양은 과산화분해효소 결합된 2차 항체(cell signaling)를 이용하여 가시화되는 β -카테닌 토끼항체(Abcam)를 이용해 측정하였다.

시험한 세포주 중에서, GIPF는 사람의 내분비 L 세포주(NCI-H716, 데이터는 나타내지 않음)에서 β -카테닌의 안정화를 유발하고, HEK 293세포에서는 투여량 의존적, 시간 관련된 형태의 효과를 보였다(참조: 도 41A 및 B). 실시예 18에 기재된 결과와 마찬가지로, GIPF를 끊이는 것은 β -카테닌을 안정화시키는 효과에 영향을 주지 못하였으나, 그 효과는 단백질 가수분해효소(proteinase) K 처리 또는 DTT 처리시 환원에 의해 파괴된다(참조: 도 41C).

GIPF가 β -카테닌을 축적시키는 신호전달 경로를 더 조사하기 위해, GSK3 β 의 활성을 HEK 293세포에서 분석하였다. 기존의 Wnt 신호전달 경로에서, Wnt는 β -카테닌을 인산화시켜서 프로테아좀(proteasome)에 의한 파괴를 표지하는 GSK3 β 를 억제함으로써 β -카테닌을 활성화시킨다.

GIPF는 시간에 의존하여 HEK 293 세포에서 GSK3 β 인산화를 증가시켰다(참조: 도42). 이러한 데이터는 GIPF가 GSK3에 의한 β -카테닌 인산화를 억제함으로써 기존의 wnt 신호전달 경로에 의해 β -카테닌을 활성화시킬 수 있음을 보여 준다. 그러나, GIPF는 Wnt3A가 β -카테닌 활성화 유도에 잠재적 효과를 지닌다고 나타내는 마우스 상피 세포주 C57MG를 포함한 다른 세포주에서는 β -카테닌 DML 안정화를 유발하지 않는다. 게다가, Wnt 신호전달 경로의 잠재적 저해제(참조: Kuhnert, PNAS 101:266-271,2004)인 Dickkopf-1(Dkk1)은 293 세포에서 GIPF에 의한 β -카테닌 안정화를 완전히 억제하지는 못한다(데이터는 나타내지 않음). 이러한 자료는 GIPF가 기존의 알려진 Wnt/ β -카테닌 신호전달경로와는 다른 경로를 통해 β -카테닌을 안정시킨다는 점을 암시한다.

실시예 18: β -카테닌 목표 유전자의 발현에 대한 GIPF의 효과

β -카테닌 축적은 결과적으로 TCF/LEF 그룹의 전사요소와 결합하는 핵으로의 β -카테닌 이동을 유발한다. β -카테닌의 활성화능(transactivating activity)에 기초하여, β -카테닌-전사요소-복합체는 DNA에 결합하고 wnt 목표 유전자를 활성화시킨다. 또한, GIPF에 의해 유도하는 β -카테닌 신호전달을 조사하기 위해, 우리는 정량 PCR에 의해 HEK293 및 NCI-H716 세포에서 아래쪽 목표 유전자의 활성화를 측정하였다.

1×10^6 HEK 293 세포 및 2×10^6 NCI-H716 세포(ATCC)는 6 웰 플레이트에서 시작하고, 완전한 배지에서 6시간 동안 불독로 하였다. 그 때, 세포는 0.1% FBS 실험 배지로 옮기고 밤새 배양하였다. 실험당일, 추가적인 1ml 실험배지를 세포에 첨가하였다. 세포는 20mM LiCl(Sigma), 100ng/ml Wnt-3A(R&D Systems), 250ng/ml GIPFt, 또는 250ng/ml 캡핑된(capped) GIPF 단백질을 넣어서 37°C/5% CO₂에서 8시간 동안 배양하였다. 실험배지에서 보존한, 처리하지 않은 세포의 하나의 웰은 유전자 발현에 대한 배경 역할을 한다. 전체 RNA는 RNeasy Mini kit 및 DNase I kit(Qiagen)을 이용해 두 세포 주에서 분리하고, 전체 RNA의 질과 농도를 정량하였다. 각 시료에 대하여, 4 μ g의 전체 RNA를 3 μ g 무작위 헥사머(hexamer) 및 2 mM 각 dNTP로 70°C에서 3분간 준비하였다. 반응물을 얼음에서 1분간 냉각시켰다. 반응부피는 5X M-MLV 완충용액(Promega), 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT 및 RNaseOut(Invitrogen)을 넣어서 22 μ l로 맞추었다. 400 units M-MLV 역전사 효소(Promega)를 첨가한 후, 반응물을 23°C에서 10분, 42°C에서 50분 배양하고, 반응을 종료시키기 위해 70°C에서 5분간 배양하였다. 그때, cDNA는 희석하여 남아있는 RNA를 절단하기 위해 1 unit의 RNaseH(Invitrogen)을 처리하였다. 260nm에서의 OD로 cDNA 농도를 정량하였다. 각각 10 μ l의 정량적 SYBR Green PCR 반응을 위해, 정방향 및 역방향 프라이머 1.25 μ M 및 2X SYBR Green mastermix(Eurogentec)과 함께 2 μ l cDNA(440ng)를 사용하였다. 반응은 세 번 수행하였다. 정량적 PCR을 위한 프라이머는 아래의 사람 β -카테닌 목표 유전자: 액신-2(Axin-2, 서열번호 70 및 71), CD44(서열번호 72 및 73), Epherin B2(서열번호 74 및 75), c-myc(서열번호 76 및 77), Proglucagon(서열번호 78 및 79) 및 Cox-2(서열번호 80 및 81)을 위해 고안하였다. 사람의 EF1(서열번호 82 및 83)은 발현 수준을 표준화하기 위한 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로 이용하였다.

GIPF는 HEK-293 세포 및 NCI-H716 세포에서 액신-2(Axin-2)의 발현을 증가시켰고, Wnt3A 또는 리튬(lithium)에 의한 자극으로부터의 결과보다 큰 수준으로 CD44 및 Ephrin B2를 상향 조절시켰다. Cox-2, c-myc 및 프로글루칸(proglucagon) 유전자의 발현 수준은 GIPF에 영향을 받지 않는다(데이터는 나타내지 않음).

이러한 데이터는 GIPF가 유도하는 목표 유전자의 활성화에 관련된 기작에 대한 시각을 제공한다. 이하의 시험은 GIPF 신호전달의 이후의 일들을 밝히기 위해 수행하였다.

실시예 19: 실험실 조건에서의 GIPF 활성화의 측정

GIPF의 11가지 결실 변이체(서열번호 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102 및 104)는 pIntron/IgK 벡터로 삽입-결합시키고, HEK293 세포에서 일시적 발현시켰다. 전장 GIPF 폴리펩티드 내의 암호화된 폴리펩티드 단편(서열번호 85, 87, 89, 91, 95, 97, 99, 101, 103, 105 및 178) 각각의 위치는 도 43에 나타내었다. 포유동물 발현벡터 pIntron/IgK는 pCI 포유동물 발현벡터(Promega, Madison, WI)로부터 유래한 조작된 키메라 인트론(intron)을 도입함으로써 pSectag 벡터(Invitrogen Inc. Carlsbad, CA)의 유전적 조작에 의해 수득하였다. pcDNA/인트론 벡터는 Bgl II 및 Nhe I으로 절단하고, 인트론 서열은 Bgl II 및 Nhe I으로 절단한 pSectag에 연결하였다. 폴리뉴클레오티드 단편을 증폭 삽입 연결시키기 위해 사용한 정방향 및 역방향 프라이머는 서열목록에 나타난 대로 서열번호 106-119에 일치한다. 서열번호 106의 정방향 프라이머는 단편 1-7(프라이머 서열번호 107-113; 서열번호 114의 정방향 프라이머는 단편 8-10(서열번호 115-17)에 대한 역방향 프라이머와 같이 사용함)에 대한 역방향 프라이머와 같이 사용하였다.

폴리펩티드 단편은 HEK293 세포에서 일시적 발현시키고, β -카테닌(catenin)을 안정화시키는 단편의 활성화는 실시예 17에 기재된 대로 시험하였다. 서열번호 91의 폴리펩티드 단편은 다른 검사한 단편에 의해 보여준 활성화와 비교했을 때, β -카테닌의 가장 큰 안정화를 보여 주었다. 이러한 결과는 GIPF의 퓨린-양 시스테인 풍부영역(furin-like cysteine-rich domain)이 GIPF의 증식 활성을 매개하는데 필수적이라는 점을 암시한다. 그러나, 서열번호 91의 폴리펩티드 활성화는 전장 GIPF의 활성화보다 낮다(참조: 도 44). 따라서, GIPF의 다른 부분은 β -카테닌의 최대한 안정화를 형성하는데 필요하다.

실시예 20: 생체조건에서의 재조합 GIPF 활성화의 신속한 측정

정제한 GIPF의 생물학적 활성을 시험하기 위해, 생체조건에서의 신속한 검사를 고안하였다.

사람 및 마우스 GIPF(GIPFwt 및 mGIPF)의 활성화는 아래와 같이 그룹화하고 처리한 마우스에서 시험하였다.

1. 식염수, 정맥내 주사
2. GIPFwt, 100 μ g 정맥내 주사
3. GIPFwt, 50 μ g 정맥내 주사
4. mGIPFt, 100 μ g 정맥내 주사
5. mGIPFt, 50 μ g 정맥내 주사
6. GIPFwt(끓임), 100 μ g 정맥내 주사
7. GIPFwt(캡핑됨(capped)), 100 μ g 정맥내 주사
8. GIPFwt, 100 μ g 피하주사

24마리 암컷 BALB/c 마우스를 실험에서 사용하였다. GIPF는 3일간 매일 주입하였다. 동물은 4일째에 희생시켰다. 희생시키기 전에, 혈액 0.5ml를 혈액분석을 위해 모았고, 동물희생 2 시간 전에, 모든 동물은 1mg/ml BrdU 용액 0.4ml를 피하 주사하였다. 소장 및 결장은 절제하여, 상술한 대로 측정하고 중간 공장 및 결장의 단편은 조직학적 분석을 위해 이전의 실시예에 기재된 대로 실시하였다.

결과는 도 45에 나타내었다. 마우스 GIPF 단백질, mGIPFt를 주입한 마우스로부터 장의 비정상 팽창은 사람 GIPFwt에 의해 유도된 것과 유사하였다. 더욱이, 피하 투여에 통해 GIPFwt을 주입한 마우스 장의 표현형은 GIPFwt을 정맥내 주사한 마우스 장의 표현형과 유사하였다. 상술한 바와 같이, GIPFwt을 끊이는 것은 장의 비정상팽창을 일으키는 GIPFwt의 능력에 영향을 주지 않는다. 이러한 결과는 모든 동물그룹의 장의 길이, 무게 및 직경의 측정과 일치하였다.

[표 8]

동물 그룹	직경(mm) 중간 공장 평균±표준편차	무게(g) 소 장 평균±표준편차	무게(g) 대 장 평균±표준편차	길이(cm) 소 장 평균±표준편차	길이(cm) 대 장 평균±표준편차
1	2.31±0.15	0.90±0.04	0.24±0.03	29.5±1.5	6.7±0.3
2	3.64±0.14*	1.34±0.10*	0.33±0.02*	36.0±1.3*	8.5±0.5*
3	3.55±0.12*	1.32±0.07*	0.32±0.03*	36.5±0.5*	8.7±0.3*
4	3.68±0.06*	1.39±0.05*	0.35±0.02*	37.8±0.8*	8.8±0.3*
5	3.45±0.09*	1.23±0.04*	0.33±0.01*	36.5±0.5*	8.5±0.5*
6	3.07±0.12*	1.25±0.06*	0.34±0.01*	35.5±0.5*	8.3±0.3*
7	2.28±0.11	0.88±0.07	0.21±0.03	31.0±1.3	6.3±0.3
8	3.03±0.10*	1.12±0.04*	0.28±0.02*	34.2±0.8*	7.8±0.3*

*P<0.05(ANOVA, 그룹 1-8 vs 그룹 1)

모든 혈액관련 결과는 동물에 대해 정상 범위에 있는데 이는 GIPF가 어떤 상반된 즉각적인 효과를 만들지 않음을 의미한다. 용모 높이 및 소낭선 깊이에 대한 GIPFwt 및 mGIPFt의 효과는 GIPF가 3일의 처방계획 후에 건강한 마우스에서 소낭선 깊이를 현저하게 증가시킴을 보여 주었다. 질환이 있는 동물의 장에서 용모의 높이를 증가시키는 GIPF 효과에 반해서, GIPF는 정상적인, 건강한 동물의 용모의 높이에 영향을 주지 않았다(참조: 도 46).

이러한 데이터는 사람의 재조합 GIPF의 증식효과는 전위효과(ectopic effect)의 결과가 아니라는 점을 보여주었다. 그외에도, GIPF는 정맥투여든 피하투여든 간에 자체의 생물학적 활성을 보여주었다.

실시에 21: 분리한 소낭선 세포에서 GIPF 활성화에 대한 실험실 조건에서의 검사

소낭선 상피세포의 신호전달 및 증식에 대한 GIPF 효과는 후지모토 등(Fujimoteo et. al)의 방법에 따라 분리한 마우스 결장의 소낭선 세포에서 실험하였다(참조: Fujimoto et al., Gastroenteology 117:858-865(2002)).

마우스에서 결장을 절제하고, 0.04% 아염소산염 나트륨(sodium hypochlorite) 용액에서 15분간 멸균하였다. PBS로 세척한 후, 결장은 상온에서 DTT/EDTA용액(0.5 mM DTT, 3 mM EDTA in PBS)에서 배양하였다. 배양 후에, 조직은 PBS로 한 번 세척하고, 10ml의 PBS를 첨가하였다. 튜브는 강하게 흔들어서 하점막으로부터 소낭선을 분리시켰다. 소낭선을 포함한 PBS는 원심분리 튜브로 옮기고, 흔드는 단계는 소낭선 수득량이 감소할 때까지 반복하였다. 소낭선은 가볍게 원심분리(400 rpm에서 5분간)하고, 신선한 PBS로 세척하였다. 소낭선은 PBS내의 0.3% 췌액소(pancreatin) 20ml속에 부유시키고, 처음 30분간 매 10분마다 흔들어 준 다음, 매 30분마다 흔들어주는 방식으로 90분간 배양하였다. 배양이 끝날 즈음, 동일 부피의 PBS를 첨가한 다음, 소낭선을 1000rpm에서 5분간 원심분리하고, 모든 점막성이 사라질 때까지 EDTA/DTT 용액에서 1-2회 세척하였다. 소낭선 세포는 1X 배지(5% FCS, 글루타민, NaHCO₃, 인슐린, 트랜스페린(transferrine), 셀레늄을 보충한 RPMI 1640배지)에 부유시켰다. 세포 덩어리를 21G, 23G 바늘과 주사기를 이용해 깨뜨렸다. 세포의 수를 세어서 β-카테닌의 안정화를 위한 실험; 3H-티미딘(thymidine)의 결합에 의한 증식 활성의 확인에 대한 실험; 소낭선 세포의 클론형성능에 영향을 주는 GIPF의 능력을 검사하는 실험에 이용하였다.

A. 생체조건에서 β-카테닌의 활성화에 대한 GIPF 효과는 상술한 대로, 100μg의 GIPFwt을 정맥내 주사한 6시간 후, Balb/c 마우스로부터 분리한 소낭선 세포에서 시험하였다.

도 47에서 보듯이, GIPFwt는 대조군 마우스로부터 소낭선 세포에서 보여진 β -카테닌 안정화와 비교했을 때 분리한 소낭선 세포의 세포질에서 β -카테닌의 현저한 안정화를 유도하였다. 도 47A는 비인산화된 활성 β -카테닌의 양을 나타내고, 도 47B는 세포질에 존재하는 모든 β -카테닌의 양을 보여준다. 비인산화 β -카테닌은 Upstate(Waltham, MA, USA)로부터 구입한 β -카테닌 항체에 의해 인식되는 반면, 모든 β -카테닌 양은 Abcam(Cambridge, MA, USA)의 항체를 이용해 측정하였는데, 이 항체는 인산화 및 비인산화된 단백질을 모두 인식한다. 이 결과는 마우스에서 GIPF에 의해 유발하는 소낭선 상피세포의 증식은 β -카테닌 신호전달을 매개함을 암시한다.

B. 분리한 소낭선 세포의 증식에 대한 GIPFwt의 효과는 3H-티미딘 결합에 대한 실험실 조건에서 실시하였다. 그 결과는 GIPFwt 단백질은 투여량 의존적 형태로 분리한 소낭선 세포의 증식을 증가시킴을 보여주었다.

따라서, GIPF는 β -카테닌을 안정화시킴으로써 분리된 소낭선 세포의 증식을 유발하고, 분리한 장 세포는 GIPF의 증식 효과를 뒷받침하는 신호 전달 경로를 찾아내는데 이용할 수 있다.

C. 화이트헤드 등(Whitehead et al.)에 의해 기술된 클론형성 시험(Whitehead et al. Gastroenterology, 117:858-865 (1999))을 장 점막의 증식 또는 분화를 조절하는데 있어서 GIPF의 능력을 시험하기 위해 실시하였다. 요약하면, 동일한 혼성의 1% 한천배양기 및 10% FBS를 더한 2X RPMI 배지를 포함하는 깔개(underlay)를 35 mm 디쉬에 가하였다. 분리한 결장의 소낭선 세포를 맨 상층 배지(0.8% 아가로스 및 10% FBS를 더한 2X RPMI 배지)에 50,000세포/ml 비율로 첨가하고, 2ml의 세포 부유액은 각각의 웰에 분주하였다. 플레이트는 37°C에서 3-4 주간 GIPF 50, 100 및 200 ng/ml GIPF에서 배양하였다. 배양 후에, 플레이트를 검사하여 콜로니의 수를 계산하였다. 콜로니는 40 세포 이상일 때 덩어리(aggregate)로 정의하였다.

GIPF는 콜로니형성을 촉진하였다. 콜로니형성 실험은 실험실 조건에서 GIPF 및 GIPF 유사체의 증식활성을 검사하기 위해 이용하였다.

실시예 22: TNBS-유발 대장염에 대한 GIPF의 효과

합텐물질(hapten agent)인 TNBS(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)는 설사, 직장 탈수 및 체중 손실과 관련된 심각하고, 변질환 염증에 의해 특징지어지는 만성 대장염(chronic colitis)을 유발시킨다. 이러한 임상적 및 조직 병리학적 특성은 TNBS-유발 대장염이 사람의 크론병(Crohn's disease, 참조: Neurath et al., J Exp Med 182:1281-1290(1995))의 중요한 특징과 유사함을 시사한다.

GIPF의 치료효과는 TNBS-유발 대장염을 지닌 마우스에서 시험하였다. 장염을 뉴라쓰 등의 문헌(Neurath et al, supra)에 개시된 바와 같이, 1mg TNBS를 1회 직장 투여에 의해 6-8주령 암컷 BALB/c 마우스(그룹 2)에서 유도하였다. 대조군 동물 그룹(그룹 1)은 담체(vehicle, 45% 에탄올)만을 직장투여하였다. hGIPF의 치료효과는 3일간 TNBS를 주입한 동물에 대해 매일 투여량 100 μ g(그룹 3), 50 μ g(그룹 4) hGIPF(4mg/kg 또는 2mg/kg)의 피하투여에 의해 시험하였다. 7일 후에 마우스를 희생시켰고, TNBS에 의한 대장염 유발을 측정하였다. hGIPF는 그룹 2의 동물에서 TNBS에 의한 유발되는 체중감소를 현저하게 감소시킨다(참조: 도 48). hGIPF는 또한 TNBS 처리한 동물그룹 2가 손상을 주는 심각한 설사, 궤양, 출혈 및 결장의 위축증을 감소시켰다(결과는 나타내지 않음).

조직학적 변화는 대조군과 TNBS 그룹의 결장으로부터 H&E 염색한 파라민 포매된 절편에서 측정하였다. hGIPF는 마우스 결장에서 TNBS-유발한 변질된 침투 및 점막 소낭선의 구조적 분리를 감소시켰다(참조: 도 49). 도 49의 그래프는 아래와 같이 결장의 대장염의 조직학적 등급에 의해 결정되는 hGIPF의 효과를 나타낸다.

결장 대장염의 조직학적(현미경의) 등급	
값	기준
0	정상
1	낮은 양의(때때로)백혈구 침투, 구조적 변화 없음
2	얇은 층 propria에서 평균 백혈구 침투, 표면 상피 상처, 궤양 없음
3	하점막, 점막 침식, 부분 궤양, 결장 벽의 평균 두터움으로 확장하는 염증세포를 지닌 높은 백혈구 침투
4	변질된 염증, 확장된 점막 피해, 잔모양(goblet) 세포의 손실, 높은 막 밀도, 결장 벽의 두터워짐, 궤양을 지닌 매우 높은 백혈구 침투

이외에도, hGIPF는 TNBS-유발 미엘린 과산화효소의 증가를 감소시키는데, 이는 마우스 결장의 호중성 백혈구의 표지이다. GIPF 처리는 TNBS-유발 설사, 염증 및 결장벽의 두터워짐 및 잔모양(goblet) 세포의 손실, GIPF 처리하지 않은 동물과의 관련성을 현저하게 감소시켰다. 따라서, GIPF는 잠재적으로 크론병을 지닌 환자를 치료하기 위한 치료제로서 이용할 수 있다.

실시예 23: 만성 DSS-유발 마우스의 대장염에 대한 GIPF의 치료효과

대장염 치료에 있어서 재조합 사람 GIPF(GIPFwt)의 효능은 만성 DSS-유발 대장염의 마우스 모델에서 시험하였다(참조: L' Heureus and Brubaker J Pharmacol Exp Ther 306:347-354(2003); Krieglstein et al., J Clin Invest 110:1773-1782(2002); Siegmund et al., J Pharmacol Exp Ther 296:99-105(2001)).

6-8주령의 암컷 BALB/c 마우스(Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)는 환기되는 케이지에서 키우면서, 일주일간 12시간 명:암 주기에 순응시켰다. 마우스는 0일부터 7일까지 대장염을 유발하기 위해 음료수에 4% DSS(v/w)를 공급하였다. 7일부터 21일까지, 마우스는 1차 소강단계(remission phase)를 유도하기 위해 DSS 없는 물을 공급하였다. 21일부터 28일까지, 마우스는 1차 재발단계(relapse phase)를 유도하기 위해 4% DSS를 다시 공급하였다. 28일부터 35일까지, 마우스는 다시 2차 소강단계를 유도하기 위해 DSS 없는 물을 공급하였다. 35일에, 마우스는 다양한 실험그룹으로 무작위 분류하였고 GIPF 치료는 35일에 시작하여 42일까지 지속하였다. 42일에, 실험은 종료하였고, 마우스를 희생시켜서, 장 조직은 분석을 위해 모았다.

GIPF는 염증성 장질환 활성지표(inflammatory bowel disease activity index, IBDAI)의 현저한 감소가 반영되는 투여량의존성으로 마우스의 DSS-유발 대장염을 감소시켰다(참조: 도 50; *P<0.05(ANOVA, DSS/식염수 vs DSS/hGIPF 그룹); #P<0.05(ANOVA, DAA/식염수 vs. DSS/KGF); **P<0.05(ANOVA), DSS/식염수 vs/ DSS/GLP-2)). IBDAI의 정의는 실시예 14에 나타내었다. 소장과 결장의 H&E 염색 절편은 hGIPF가 마우스의 장 점막에 대한 DSS-유발 피해를 막고, DSS-유발 용모 높이 및 소낭선 깊이의 감소를 반전시킴을 보여주었다(참조: 도 51). 또한, GIPF는 소장의 소낭선 세포의 증식에 대한 DSS의 억제효과를 바꾸었다(참조: 도 52; *P<0.05(ANOVA, DSS/식염수 vs. 물/식염수);

#P<0.05(ANOVA, DSS/hGIPF vs. DSS/식염수).

**P<0.05(ANOVA, DSS/KGF vs. DSS/식염수); ###P<0.05(ANOVA, DSS/GLP-2 vs. DSS/식염수)). 소낭선의 증식 지표는 실시예 14에 정의하였다.

요약하면, GIPF의 치료적 처리는 마우스에서의 DSS-유발 만성 대장염을 현저하게 감소시키고, 이는 GIPF가 사람의 염증성 장질환을 치료하는 잠재적으로 유용한 치료제임을 암시한다.

실시예 24: hGIPF에 의한 5-FU 유발 독성의 감소

5-FU의 위장독성(gastrointestinal toxicity)을 감소시키는 hGIPF의 효능을 정상 BDF 마우스에서 측정하였다.

마우스는 다음과 같은 그룹으로 나누었다:

- 1) 식염수 담체(vehicle) 주입
- 2) 식염수 처리와 5-FU 주입
- 3) GIPF 처리와 5-FU 주입

암컷 BDF-1 마우스는, 11-13 주령에, 3일째에 시작하여 매일 식염수 또는 100 μ g의 hGIPF 투여량을 피하주사하였다. 0일부터 4일까지, 각 마우스는 4일 연속으로 5 FU 50mg/kg 투여량을 복강내(i.p.) 주사하였다. 마우스는 체중, 설사의 발생 및 사망률을 매일 검사하였다.

GIPF 처리는 5-FU 유발 위장독성, 최대 체중감소를 포함하여, 설사 수치 및 사망률을 현저하게 감소시켰고(참조: 표 9), 이는 마우스에서의 GIPF가 화학요법 유발 위장독성에 효과적임을 암시한다.

[표 9]

5-FU	처리	독성			
		최대 체중손실(%)	설사 수치	사망률(%)	생존시간(day)
처리	미처리	33.1±3.6	2.8±0.5	92	8.5±1.2
처리	hGIPF	12.5±6.9*	0.9±0.6*	8.3	10.0±0.0*
처리	KGF	16.8±7.9*	1.7±0.8*	25	9.0±1.0
처리	GLP-2	17.4±8.3*	1.9±0.8	42	8.4±1.1

*P<0.05(ANOVA, 5-FU/KGF 또는 5-FU/GLP-2 vs 5-FU/식염수)

실시예 25: 사람이 아닌 영장류 생체조건에서 GIPF 활성

GIPF 활성의 반복되는 투여량을 사람이 아닌 영장류에서의 GIPF 활성을 측정하기 위해 사이노몰구스(Cynomolgus) 원숭이에서 시험하였다.

아홉 마리 암컷 비-천연의 원숭이는 SNBL USA(Everett, Washington, USA) 직원 의사 또는 수의 기능원에 의해 건강을 검사하고, 혈액학과 혈청화학 검사를 실시하였다. 건강하다고 판정된 아홉 마리 암컷 동물 중, 8마리를 선택하여 시험 그룹에 포함시켰다. 이미 검증된 동물은 시험의 시작에 앞서 최소 14일 동안 SNBL USA 시설의 시험 공간에 순응시켰다.

방법: 암컷 8마리는 아래 표에 표시한 대로 4 처리그룹으로 지정하고, 3일 동안 하루에 한 번씩 GIPF 단백질의 덩어리(bolus)를 정맥내 투여하였다. 4일째에, 모든 동물은 대략 부검 4시간 전에 BrdU 덩어리 50mg/kg을 일회 정맥내 투여하였다. 선택한 조직을 부검시 모았다.

시험계획

그룹	투여량(mg/kg)	농도(mg/ml)	투여부피(ml/kg)	동물수
1	0mg/kg(대조군)	0	3.3ml/kg	2
2	0.1mg/kg	1.5mg/ml	0.067ml/kg	2
3	1.0mg/kg	1.5mg/ml	0.67ml/kg	2
4	5.0mg/kg	1.5mg/ml	3.3ml/kg	2

관찰 및 시험: 임상적 관찰은 순응(acclimation) 기간 동안 및 아래와 같이 시험기간 내내 실시하였다. 사망률과 대변(stool) 검사는 매일 아침 한 번씩 실시하고, 일반적 건강 및 외형에 대한 임상적 관찰은 생존의 끝(end of in-life)에 순응하기 시작하는 오후에 하루 한 번 실시하였다. 추가적인 임상적 관찰은 필요하거나 기록하면 실시하였다. 의사 스태프 또는 수의 기능원이 임상적 관찰이 감소 상태를 보이거나 시험 지휘자가 지시할 때, 각 동물을 시험하였다.

혈액시료 모음: 혈액을 순응과정(acclimation) 중 한 번, 혈액학과 혈청화학 시험을 위한 BrdU 투여 전에 부검하는 날에 한 번 모았다.

총체적인 병리검사: 부검시, 몸의 외부 표면, 모든 구멍 및 두개골, 흉부 및 복강 및 그 내용물을 검사하였다. 기관 무게 및 조직 병리검사는 육안으로 실시하여 모으고 조직병리검사를 위해 10% 중성 완충액의 포르말린에 보존하였다. 검사한 조직은 아래와 같이 나열하였다.

뇌	대장 ¹	소장 ¹
- 뇌 줄기	- 맹장	- 공장(jejunum)
- 소 뇌	- 결장	- 십이지장
- 대 뇌	- 직장	- 회장
비장	간	혀

BrdU IHC를 이용한 조직증식 시험: 파라핀 포매한 절편을 BrdU 시험을 위해 준비하였다.

결과: 부검시의 총체적인 병리검사는 이러한 처리 섭생법(treatment regimen)에서 hGIPF의 즉각적인 독성이 나타나지 않음을 의미하는 시험된 기관의 명백한 변화를 찾지 못하였다. 이외에도, hGIPF 처리 전 후로 모은 혈액시료에 대한 혈액학(hematology)과 혈청화학(serum chemistry)은 시험한 혈청 생화학 기준에서 뿐만 아니라, 혈액세포 성분에서도 아무 변화가 없음을 증명하였다.

소장의 길이에서의 투여량에 관련된 증가는 있는 것 같다. 그룹 1, 2, 3 및 4에 대한 평균 장 길이(in cm)는 각각 120.65, 122.555, 133.350 및 142.875였다. 부가하여, 하기 표 10에 요약한 바와 같이, 각 조직의 구조에 대한 현미경 측정은 모든 GIPF 처리그룹에서 십이지장, 공장(jejenum) 및 회장의 소낭선 과형성(증생, hyperplasia)을 증명하였다. 이 결과는 hGIPF는 마우스와 랫트에서 관찰한 결과에 일치하는 원숭이 장의 소낭선 상피세포에 대한 증식효과를 지님을 암시하였다.

hGIPF의 증식효과를 확증하기 위해, 면역조직화학법을 실시하여 소장과 대장에서 BrdU의 결합을 분석하였다. hGIPF는 소장과 결장 모두에서 양성의 BrdU 증식지표를 증가시켰다.

이러한 결과는 hGIPF가 사람이 아닌 영장류에서 소낭선 상피의 증식을 증가시킨다는 점을 보여주었다.

[표 10]
암컷 사이노몰구스(Cynomolgus) 원숭이에서의 각 조직병리학적 결과

조직	결 과	그룹(동물수)							
		1		2		3		4	
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
십이지장	소낭선 과형성	-	-	-	±	±	±	+	2+
공장	소낭선 과형성	-	-	±	±	±	±	±	+
회장	소낭선 과형성	-	-	-	±	+	±	+	+
맹장	소낭선 과형성	-	-	-	-	±	±	+	+
결장	선(gland) 길이증가	-	-	-	-	-	-	±	+
	소낭선 과형성	-	-	-	-	±	±	±	+
직장	선(gland) 길이증가	-	-	-	-	-	-	-	±
	소낭선 과형성	-	-	-	-	±	+	±	+
간	-	-	-	-	-	-	-	-	-
비장	-	-	-	-	-	-	-	-	-
대뇌	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소뇌	-	-	-	-	-	-	-	-	-
뇌줄기	-	-	-	-	-	-	-	-	-

각각의 조직병리학적 결과등급:

-: 비정상적 변화 없음, ±: 매우 미세함, +: 미세함, 2+: 보통, 3+: 주목할 만한

실시예 26: 방사선 표지된 125I-hGIPF 단백질을 이용한 흡수분포 대사배설(ADME) 시험

시험 목적: 마우스에서 [125I-hGIPF] 의 혈장 약물동력학과 조직분포 조사

단백질 표지: hGIPF 단백질은 IODO-GEN 표지법(Amersham)에 의해 [125I]로 표지하였다. 표지 시에 초기의 비활성(specific activity)은 35 uCi/μg(1020 Ci/mmol)이었다. 표지된 단백질은 또한 마우스에 주입하기 전 정제하였다.

동물: 수컷 CD-1@[CrI:CD-1@ICR)BR 마우스는 주입 전 7일간 순응시키고, 각각 깨끗하게 매단 철사-그물 케이지에서 키웠다. 케이지는 케이지-판 위나 다른 적절한 물질 위에 올려서 매주 최소 세번 이상 교환하였다. 각각 마우스는 3 uCi 125I-hGIPF 단백질을 포함하는 hGIPF 1.67mg/kg 투여량을 공급하였다. 방사선 표지된 투여량을 주입한 후에, 소변 및 배설물을 모으기로 계획한 동물은 대사단위(metabolism unit)로 각각 키웠다.

연구 설정

그룹	1	2
모든 시료	혈액 및 조직	소변, 배설물, 조직 및 사체
투여량	1.67mg/kg	1.67mg/kg
투여부피	10ml/kg	10ml/kg
안락사 시간	투여 후 5, 30 분 및 1, 3, 6, 24시간	투여 후 24시간
시간대별 동물수	3	3
동물의 합계	18	3

본 시험을 위한 모든 동물은 요오드화 나트륨(sodium iodide)를 처리하여 표지된 시험관으로부터 유래한 자유 요오드의 갑상선에 의한 흡수를 막았다. 1% NaI 용액의 0.1ml 경구(위관의) 투여는 방사선 표지된 단백질의 투여 전 대략 48, 24, 1 시간 전에 투여하였다. 각각의 동물은 정맥내 주사를 통해 투여된 ¹²⁵I-hGIPF를 한 번 주입하고, 상기 시험계획에 표시한 대로 분석하였다. 안락사에 대한 지정된 시간에, 혈액 시료를 모아서, 세포분획 및 혈장을 분석을 위해 분리하였다. 간, 신장, 폐, 허, 비장, 뇌, 식도, 위, 소장, 대장 및 내용물을 포함하는 대장의 조직 시료를 모아서 조직의 [¹²⁵I]-hGIPF 결합을 시험하였다.

¹²⁵I-hGIPF의 함입(incorporation)에 대한 분석은 WIL 표준 작동방법에 따라, DPC GAMMA-C12 멀티 크리스탈 감마 계수장치에 의해 실시하였다. 감마 계수의 결과를 동위원소 반감기를 위해 보정하였다. 본 시험의 다양한 물질에서 방사선량은 WIL 표준 작동방법에 따라 WIL 독성학 자료처리 시스템 또는 매트릭스 정산표의 프로그램을 이용하여 계산하였다. 일반적으로, 오직 설명적인 통계학(예를 들어, 총계, 수리적 평균, 표준편차, 표준오차, 변이계수(co-efficient of variation), 백분율)만을 이용하였다. 가능하면, 표준 약물동력학 매개변수(예를 들어, Cmax, Tmax, AUC(Area Under the Curve), T1/2(반감기)) FMF 표준 약물동력학 방정식을 이용하여 계산하였다.

결과: 마우스 혈장, 백혈구, 간, 신장, 폐, 심장, 뇌, 비장, 식도, 위, 소장 및 대장에서의 [¹²⁵I]-hGIPF 농도 및 동력학을 나타내는 데이터는 표 11-14에 나타내었다.

[표 11]

1.67 MG/KG 정맥투여 후 마우스 혈장과 적혈구에서 [¹²⁵I]-hGIPF 등가물(equivalent)의 농도와 동력학

시간(hr)	혈장(ng/g) (평균 ± 표준편차)	백혈구(ng/g) (평균 ± 표준편차)
0.083	11145(113)	2745
0.5	3894(485)	2121
1	2506(490)	1658
3	1347(68)	971
6	476(204)	295
24	60(7)	23
Cmax(ng/g)	11145	2745
tmax(h)	0.083	0.083
AUC ₀₋₂₄ (ng-h/g)	16607	9458

최종단계 약물동력학(terminal phase kinetics)

(3-24시간의 log 농도 vs. 시간의 회귀곡선)

기울기(slope, b)	-0.05939	-0.07225
Y-절편	1517.75	1161.79
결정계수(coefficient of determination, r ²)	0.960	0.967
제거율 상수(elimination rate constant, h ⁻¹)	0.1367	0.1664
반감기(h)	5	4

N=3 except 24h, N=6

[표 12]

1.67 MG/KG 정맥투여 후 마우스 간, 신장, 폐, 심장, 뇌 및 비장의 [125I]-hGIPF 등가물(equivalent)의 농도 및 동력학

	간(ng/g) 평균± 표준편차	신장(ng/g) 평균± 표준편차	폐(ng/g) 평균± 표준편차	허(ng/g) 평균± 표준편차	뇌(ng/g) 평균± 표준편차	비장(ng/g) 평균± 표준편차
0.083hr	9104(959)	24581(5032)	3332(462)	1157(88)	141(25)	1956(354)
0.5hr	4982(1319)	21283(4731)	1997(375)	1124(202)	105(28)	1905(663)
1 hr	3635(413)	17039(1543)	1575(375)	1044(292)	95(18)	1380(106)
3 hr	2706(185)	13445(1084)	633(450)	588(32)	51(7)	840(74)
6 hr	1757(213)	8933(800)	337(106)	227(91)	17(9)	457(193)
24 hr	875(75)	4707(485)	63(13)	35(7)	5(3)	157(49)
Cmax(ng/g)	9104	24581	3332	1157	141	1955.54
tmax(h)	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
AUC ₀₋₂₄ (ng-h/g)	42191	206968	9404	6282	554	11400

최종단계 약물동력학

(3-24시간의 log 농도 vs. 시간의 회귀곡선)

기울기(b)	-0.02106	-0.01953	-0.04512	-0.05344	-0.04209	-0.3164
Y-절편(ng)	2742.03	13559.24	746.08	649.87	47.18	873.39
결정계수(r ²)	0.936	0.932	0.982	0.958	0.883	0.947
제거율상수(h ⁻¹)	0.0485	0.0450	0.1039	0.1230	0.08969	0.0728
반감기(h)	14	15	7	6	7	10

N=3 except 24h, N=6

[표 13a]

1.67 MG/KG 정맥투여 후 마우스 식도, 위, 소장 및 대장에서의 [125I]-hGIPF 등가물(equivalent)의 농도

	식도(ng/g) 평균±표준편차	위(ng/g) 평균±표준편차	소장(ng/g) 평균±표준편차	대장(ng/g) 평균±표준편차
0.083hr	1560(321)	1960(166)	1117(135)	1016(150)
0.5hr	1743(178)	2855(1140)	1191(423)	910(135)
1 hr	1666(743)	5545(3546)	1053(369)	1006(189)
3 hr	1199(330)	3678(2047)	664(28)	694(11)
6 hr	350(63)	1021(475)	222(110)	383(175)
24 hr	48(43)	106(40)	32(6)	74(13)
Cmax(ng/g)	1743	5545	1191	1016
tmax(h)	0.5	1	0.5	0.083
AUC ₀₋₂₄ (ng-h/g)	10372	29604	6421	8344

[표 13b]

최종단계 약물동력학(3-24시간의 log 농도 vs. 시간의 회귀곡선)

기울기(b)	-0.06022	-0.06683	-0.05745	0.04408
Y-절편(ng)	1247.25	3997.67	715.76	822.73
결정 계수(r^2)	0.936	0.947	0.948	0.984
제거율상수(h^{-1})	0.1387	0.1539	0.1323	0.1015
반감기(h)	5	5	5	7

** N=3 except 24h N=6

[표 14a]

1.67 MG/KG 정맥투여 24시간 후 마우스의 조직

간	소장	결장	뇌	비장	폐	신장	위	식도	혀	Su
2.39	0.07	0.06	0.01	0.02	0.02	4.83	0.03	0.01	0.01	7.43
2.13	0.10	0.06	0.00	0.02	0.02	5.17	0.10	0.00	0.01	7.61
2.64	0.07	0.04	0.01	0.02	0.02	4.21	0.03	0.00	0.01	7.03

[표 14b]

1.67 MG/KG 정맥투여 24시간 후 마우스의 hGIPF 등가물(equivalent)의 회수

동물수	% GIPF / 조직	% GIPF / 장 내용물	% GIPF / 소변	% GIPF / 배설물	% GIPF / 사체	전체 회수
1	7.43	0.13	85.70	3.48	1.87	98.6
2	7.61	0.13	76.70	3.12	1.82	89.4
3	7.03	0.32	87.47	3.53	1.76	100.1
평균	7.35	0.19	83.29	3.38	1.82	96.0
표준편차	0.30	0.11	5.77	0.23	0.06	5.81

†조직의 합, GI 내용물, 케이지청소를 포함하는 소변, 배설물 및 사체

예상대로, 가장 널리 퍼진(highly perfused) 조직, 예를 들어, 간, 신장, 비장 및 폐에서 가장 앞의(the earliest) Tmax 및 가장 큰(the greatest) Cmax 이 관찰되었고, 가장 긴(the longest) 반감기는 신장과 간에서 관찰되었다(참조: 표 11).

식도, 위 및 소장을 포함하는 위장관의 조직은 각각 연장된(protracted) Tmax를 보여주었다. 표 13A는 다양한 기관의 조직과 방사선 표지된 hGIPF 투여 24시간 후 소장 내용물, 소변, 배설물 및 동물의 사체에서 방사선 표지된 GIPF의 회수율(%)을 보여준다. 각각 기관 조직으로부터 hGIPF의 회수는 표 13B에 나타나 있다. 이 데이터는 방사선 표지된 hGIPF의 분포가 정맥을 통해 투여된 후 위장관의 기관에 비정상적으로 높다는 점을 나타내고, 이는 hGIPF는 위장 조직에 대한 높은 친화성을 지닐 것이라는 것을 암시한다.

실시예 27: 방사선 조사-유발 대장염: 최적의 치료 식이요법의 평가

이번 시험의 목적은 방사선 조사-유발 대장염에 대한 최대한의 예방효과를 제공하는 치료방법을 정하는 것이다.

성숙한 수컷 BDF-1 마우스는 사용시기가 10-12주령이다. 동물은 1주일간 12시간 명/암 주기에서 키웠고, 모든 동물에 대하여 식량과 물을 무작위로 먹도록 하였다. 동물은 임의로 각 5 마리씩 6그룹(총 30 마우스)으로 나누었고 아래와 같이 처리하였다.

1. 비처리, 비 방사선 조사 대조군
2. 13Gy X-ray 노출이전에 3, 2, 1 일에 4mg/kg hGIPF 정맥주사(몸 전체 방사선조사)
3. 13Gy X-ray 노출이전에 4, 3, 2 일에 4mg/kg hGIPF 정맥주사(몸 전체 방사선조사)
4. 13Gy X-ray 노출이전에 5, 4, 3 일에 4mg/kg hGIPF 정맥주사(몸 전체 방사선조사)
5. 13Gy X-ray 노출이전에 6, 5, 4 일에 4mg/kg hGIPF 정맥주사(몸 전체 방사선조사)
6. 13Gy X-ray 노출이전에 72, 48, 24 시간에 saline 정맥주사(몸 전체 방사선조사)

동물은 2.7Gy/min 단위로 13Gy X-ray 단일 투여를 몸 전체에 방사선 조사에 노출시켰다. 동물은 방사선 조사 후에 매일 검사하였다.

방사선 조사 4일 후 동물을 희생시켰다. 희생 2 시간 전, 동물은 0.4ml 부피에 4mg BrdU를 주입하였다. 절제 시에, 소장과 대장의 길이와 무게를 측정하고, 소장(중간 공장), 결장(수평 결장), 췌, 식도 및 위장의 ~1cm 조직 단편을 10% 포르말린에 고정시켰다.

소장의 횡단 절편은 BrdU 흡수에 대해 분석하였다. 절편마다 살아있는(surviving) 소낭선의 수를 계산하여, 그룹마다 평균값을 측정하였다. 10 또는 그 이상의 강하게 H&E 염색된 세포(파네트(Paneth) 세포 제외) 및 페이어 패치(Peyers patch)가 부족한 온전한 절편만을 포함하는 소낭성을 계산하였다. 소낭선의 평균 폭(가장 넓은 위치(widest point)에서 측정)은 또한 소낭선 크기의 차이에 의한 계산상의 실수를 보정하기 위해 실시하였다. 보정은 다음과 같이 적용하였다.

보정된 소낭선의 수 / 횡단 절편 =

비처리 대조군의 평균 소낭선 길이 × 처리그룹에서 살아있는 소낭선의 평균 수

처리한 동물의 평균 소낭선 길이

결과: 방사선 조사에 대한 노출이후에 소낭선의 생존에 대한 hGIPF의 효과는 도 53에 나타내었다. 그 데이터는 hGIPF를 몸 전체 방사선 조사 24시간 또는 48시간 전에 동물에 투여했을 때, hGIPF가 방사선 조사-유발하는 장 점막염을 현저하게 감소시킴을 보여주었다(참조: 표 15).

이러한 결과는 hGIPF가 방사선 조사-유발하는 장 점막염의 해로운 효과를 상쇄하는 예방제로서 이용할 수 있다는 점과 몸 전체 방사선 조사 24시간 전에 hGIPF를 투여하면 장 소낭성에 대한 가장 큰 보호효과를 제공함을 확인하였다.

[표 15]

hGIPF 치료			
방사선 조사량(Gy)	GIPF(mg/kg/day)	처리 계획	hGIPF 보호 요소(평균 ± 표준편차)
13	없음	없음	1.0 ± 0.5
13	4	3일에서 1일 전	15.8 ± 6.2*
13	4	4일에서 2일 전	9.4 ± 6.8*
13	4	5일에서 3일 전	4.8 ± 3.3
13	4	6일에서 4일 전	5.3 ± 4.4

*P<0.05(ANOVA, 13 Gy/hGIPF vs. 13 Gy/Saline)

실시예 28: 마우스 소장에서 세포 혈통(lineage)-의존적 증식시험

소장의 소낭선에 대한 hGIPF의 효과는 형태적 변화의 시작에 앞서 hGIPF의 효과가 줄기 세포나 소낭선의 변화하는 증식 세포에 영향을 줌으로써 일어나는지를 결정하기 위해 시험하였다. 동물은 무작위로 아래 그룹으로 분류하였다.

1. PBS(그룹마다 1 마우스): 주입 후 1, 3, 6, 12, 24 또는 48 시간
2. hGIPF(그룹마다 2 마우스, 100 μ g 일회 주입): 주입 후 1, 3, 6, 12, 24 또는 48시간

각 동물은 희생시키기 2시간 전에 BrdU(4mg/kg)을 주입하였다. 소낭선 깊이, 소낭선 증식 지표 및 세포 위치의 증식 분석은 소장의 중간 공장(mid-jejunal)의 절편에서 실시하였다. 소장선 증식 지표는 한 번의 hGIPF(100 μ g) 주입한 후 지정된 시간(3, 6, 12, 24 및 48 시간)에 BrdU 면역조직화학법에 의해 측정하였다. 2 마우스에서 40 소낭선을 BrdU 결합에 대해 분석하고 그 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(*P<0.01, ANOVA).

결과: 표 16에서 보는 바와 같이, hGIPF는 3시간처럼 빠른 시기에 소장 소낭선 세포의 증식을 증가시켰고, 증식은 hGIPF 처리 후 24시간에 최고점에 도달했다. hGIPF-유발하는 소낭선 증식은 48시간 이내에 역전되었다. 부가하여 BrdU 양성 세포(참조: Potten et al., Int J Exp Path 78:219-243(1997))의 위치분석은 소낭선 윗부분 뿐만 아니라, 3-5 위치에서(줄기세포가 위치한 소낭선의 아래 부분으로부터) 소낭선의 증식의 현저한 증가를 보여 주었다.

이러한 데이터는 hGIPF가 줄기세포(stem cell) 및 분열하는 전이세포(transit cell) 개체군 모두에 영향을 준다는 점을 암시한다.

[표 16]

시간(hr)	% BrdU 양성 세포 PBS 대조군 그룹	% BrdU 양성 세포 hGIPF 그룹
3	38.0±12.47	47.7±8.38
6	36.45±8.33	49.75±11.3
12	39.16±8.57	51.24±9.86
24	36.55±9.62	74.97±9.0
48	33.0±5.32	19.5±6.5

실시예 29: 소낭선 세포의 분화 및 이동에 대한 hGIPF의 효과

hGIPF가 소장에서 이러한 세포 형태의 개체수 및 분포에 영향을 미치는지를 결정하기 위해 마우스에 hGIPF를 처리한 후 잔모양(goblet) 및 파네드(Paneth) 세포의 수를 계산하였다.

엘시안 블루(Alcian blue) 염색을 PBS 또는 hGIPF 처리한 마우스(n=3)로부터의 mid jejunal 절편에서 잔모양(goblet) 세포를 시각화하기 위해 실시하였다. 동물은 매일 hGIPF(100 μ g)을 주입하거나 3일 또는 7일간 PBS를 주입하였다. 파네드(Paneth) 세포를 가시화하기 위해, 면역조직화학법(immunohistochemistry, IHC)를 항-라이소자임(lysozyme) 항체를 이용한 같은 동물의 중간 공장(mid jejunal) 절편에서 실시하였다.

결과: 소장의 면역조직화학 분석 및 엘시안 블루(Alcian blue) 염색은 hGIPF 처리한 마우스의 소장에서 파네드(Paneth) 세포 및 잔모양(goblet) 세포의 수에 의미 있는 변화가 없음을 확인하였다. hGIPF는 소낭선 축/융모 축 결의 분화된 세포의 성숙 및 이동에 영향을 주지 않았다.

실시예 30: 장 상피세포에서 hGIPF를 발현시키는 유전자도입 키메라(chimeric) 마우스

- (1) 마우스 빌린(villin) 유전자 프로모터의 긴 단편의 제조(도 54A)

흡수 조직(absorptive tissue)의 정점의 브러시(brush)의 경계에서 볼 수 있는 액틴(actin)을 묶는 단백질인 빌린(villin)은 배아 장 내배엽에서 전사적으로 활성화되는 첫 번째 구조 유전자의 하나이다. 성체에서 빌린은 장의 수직축(음모 끝에 대한 소낭선) 및 장의 수평축(결장을 통한 십이지장)에 대한 장 상피의 모든 세포에서 널리 발현된다. 매디슨 등(Madison et al.)은 마우스의 빌린 유전자 12.4 Kb 부분은 두 가지 다른 전달자 유전자(Lac Z 및 Cre 재조합효소)의 높은 수준의 발현을 유전자 도입 마우스의 모든 장 상피에서 유도함을 입증하였다(참조: J. Biol. Chem. 277, p33275-33283, 2002). 장 상피세포에서 사람의 GIPF를 발현시키는 유전자도입 키메라 마우스를 작제하기 위해, GIPF cDNA를 장 상피세포에서 발현을 유도하는 이러한 전사적 조절서열과 연결시키는 발현벡터를 구축하였다.

마우스 빌린(villin) 유전자의 윗부분의 뉴클레오티드 서열정보를 공용 데이터베이스(ensembl)로부터 얻었다. 마우스 BAC(RP23-278N11; GenBank Accession No. AC098570)는 EcoRI 및 BamHI(Roche)로 절단하고, 대략 11kb의 단편을 분리하기 위해 0.8% 아가로스 젤 전기영동을 실시하였다. pBluescript II SK(-)(Stratagene)를 EcoRI 및 BamHI로 절단한 후, 벡터 단편을 0.8% 아가로스 젤 전기영동에 의해서 분리하고, 단편의 양끝을 탈인산화시키기 위해서 소장 인산가수분해효소를 처리하였다. 상기 대략 11kb의 DNA 단편은 탈인산화된 벡터 단편에 연결시키고, 연결 혼합물은 XL10-Gold Ultracompetent 세포(Stratagene)에 형질전환시켰다. 그 결과 형질전환체에서 제조한 DNA 시료를 후술하는 프라이머 세트(서열번호 120 및 121)을 이용해 PCR 증폭시켰다. 증폭된 단편의 서열분석은 대략 11.2kb의 마우스 빌린(villin) 유전자 프로모터 단편(pPvil 11.2)를 포함하고 있음을 알려 주었다. pPvil 11.2는 제한효소 Cla I 및 BamHI으로 절단하고, 반응 혼합물은 대략 11.2 kb 단편을 분리하기 위해 0.8% 아가로스 젤 전기영동시켰다.

PvilEIBI-FW1(서열번호 120): gatcagcagctggaacaaacacag

PvilEIBI-RV1(서열번호 121): tgcacaatcAgtcaatcaacagagc

(2) 마우스 빌린(villin) 유전자 프로모터의 짧은 단편 제조(도 54B)

공용 데이터베이스(ensembl)로부터 수득한 마우스 빌린(villin) 유전자 앞부분의 뉴클레오티드 서열에 근거하여, 두 가지 합성 DNA를 합성하였다(서열번호 122 및 123)

PvilBI-FW(서열번호 122): ggcgatccctgagttggaggccagtttgg

PvilBI-NcoIXbaIRV(서열번호 123):

gctctagaccatggtggacgagcctagaggagaaggcat

KOD-puls(TOYOBO)는 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응 혼합물은 각 프라이머 10pmol 및 마우스 BAC(RP23-278N11; GenBank Accession No. AC098570) DNA를 주형으로 포함하고 있다. 이러한 PCR 증폭은 2분간 94℃에서 초기의 변성 배양(initial denaturing incubation)(initial denaturing incubation)(initial denaturing incubation)을 이용함으로써 실시하였다. 그 후 변성, 결합(annealing) 및 증폭 30회를 94℃ 15초 및 68℃ 2분간 배양함으로써 실시하였다. PCR 산물(대략 1.9kb)은 0.8% 아가로스 젤 전기영동 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다. 분리한 PCR 산물을 BamHI 및 XbaI으로 절단한 후, 절단한 단편은 0.8% 아가로스 젤 전기영동 및 QIA quick Gel Extraction Kit(Qiagen)으로 정제하였다. 정제된 단편은 XhoI 및 XbaI으로 절단한 pBluescript II SK(-)(Stratagene)에 연결시키고, 양 끝을 탈인산화시키기 위해 소장(calf intestine) 알칼리 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시키고, 그 결과물인 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입된 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론은 NcoI으로 절단하였다. 단편의 양 말단을 평활말단화(blunting)시키기 위해 클레노우 단편(Klenow fragment, TAKARA BIO)으로 절단한 단편을 처리한 후, 단편을 또한 XbaI으로 절단하고, 0.8% 아가로스 젤 전기영동에 의해 정제하였다. 그 결과물인 단편은 양 말단을 탈인산화시키기 위해, E.coli C75 알칼리 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)를 처리하였다.

(3) GIPF 단편의 제조(도 54C)

Hy01XhISphIFW(서열번호 124)

ccgctcgaggcatgcggcttgggtgtgtgtgtggccctg

Hy01BgXb-RV(서열번호 125)

gctctagaagatctctaggcaggccctgcAgatgtgagtggccc

KOD-puls-(TOYOBO)는 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응 혼합물은 각각 프라이머 10pmole(서열번호 124 및 125) 및 GIPF cDNA를 주형으로 포함하였다. 이러한 PCR 증폭은 94℃에서 3 분간 초기 변성 배양(initial denaturing incubation)을 이용하여 실시하였다. 그후, 변성, 결합(annealing) 및 증폭 30 사이클을 94℃ 15초, 68℃ 2분간 배양으로 실시하였다. PCR 산물(대략 800bp)은 0.8% 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다. 분리한 PCR 산물을 XhoI 및 XbaI로 절단한 후, XhoI 및 XbaI로 절단한 pBluescript II SK(-)로 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α에 형질전환시키고, 그 결과물인 형질전환체에서 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열의 단편을 지닌 클론은 SphI로 절단하였다. 양 끝을 평활말단화(blunting)시키기 위해 Blunting high(TOYOBO)로 단편을 절단하는 처리 이후에, 또한 XbaI로 절단하고 0.8% 아가로즈 젤 전기영동에 의해 정제하였다.

(4) pPvil2-01의 제조(도 54D)

(3)에서 제조한 GIPF 단편은(2)에서 제조한 pPvil2에 연결시키고, 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시켰다. 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pPvil 2-01).

(5) pIRES-GFP의 제조(도 54E)

pIRES2-GFP(BD Bioscience Clontech)을 EcoRI 및 NotI로 절단한 후, IRES-GFP 부분을 포함하는 단편은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동 및 QIA quick Gel Extraction Kit(Qiagen)을 이용해 정제하였다. 정제한 단편(IRES-GFP)을 XhoI 및 XbaI로 절단한 pcDNA3(Invitrogen)에 연결하고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α에 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pUC119IRES-GFP).

(6) pUC119 IRES-GFP의 작제(도 54F)

BamHI과 XbaI를 이용한 pIRES-GFP의 절단에 이어, IRES-GFP 영역을 포함하는 단편이 0.8% 아가로즈 젤 전기영동과 QIA 신속 젤 추출키트(QIAGEN)에 의하여 순수분리되었다. 순수분리된 단편(IRES-GFP)은 BamHI과 XbaI로 절단된 pUC119에 연결되고, 그의 양쪽 말단을 탈인산화시키기 위하여, 송아지 장 알칼라인 포스파타아제로 처리되었다. 연결 혼합물은 DH5α에 도입되었고, 결과인 형질전환체로부터 얻어진 DNA 시료는 삽입된 단편의 구조를 확인하기 위하여 뉴클레오티드 서열로 분석되었다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 갖는 단편을 포함하는 클론이 선별되었다(pUC119 IRES-GFP).

(7) pUC119 IRES-GFP+ As의 구축(도 54G)

아래 언급한 합성 올리고뉴클레오티드(서열번호 126 및 127)의 결합에 의해 제조한 DNA 단편은 EcoRI 및 BamHI로 절단한 pUC119 IRES-GFP에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α에 형질전환시키고, 그 결과인 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pUC119 IRES-GFP-As).

EI-BIAscI-(BI) S(서열번호 126) aattcgatccggcgcgcc

EI-BIAscI-(BI) AS(서열번호 127) gatcggcgcgcggatccg

(8) pUC119 IRES-GFP+ loxP의 구축(도 54H)

아래 언급한 합성 올리고뉴클레오타이드(서열번호 128 및 129)의 결합에 의해 제조한 DNA 단편은 NotI 및 XhoI으로 절단한 pUC119 IRES-GFP+ As에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소로 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오타이드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오타이드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다 (pUC119 IRES-GFP+ loxP).

Nt-PmlxpP-Xh S(서열번호 128)

ggccggtttaaacataacttcgtataatgtatgctatacgaagttatc

Nt-PmlxpP-Xh AS(서열번호 129)

tcgagataacttcgtatagcatatcattatacgaagttatgtttaaac

(9) 소의 성장 호르몬(BGH) 폴리 A 단편의 제조(도 54I)

BGHpAFW(서열번호 130)

cgggatccgtttaaacctgtgccttctagtgtccagccatc

BGGpARV(서열번호 131)

cggatatcccatagagcccaccgcacatccccagc

KOD-puls-(TOYOBO)는 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응 혼합물은 각 프라이머 10pmole(서열번호 130 및 131) 및 주형으로(6)에서 제조한 IRES-GFP 단편을 포함하였다. 이 PCR 증폭은 94℃에서 3분간 초기 변성 배양(initial denaturing incubation)을 이용해 실시하였다. 그 후 변성, 결합(annealing) 및 증폭 30 사이클을 94℃ 15초, 68℃ 2분 배양함으로써 실시하였다. PCR 산물(대략 0.2 kb)은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다. 분리한 PCR 산물을 BamHI 및 EcoRV로 절단한 후, BamHI 및 EcoRV로 절단한 pBluescriptII SK(-)에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화하기 위해 소장 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물을 DH5α에 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체에서 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오타이드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오타이드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 PmeI 및 EcoRV로 절단하고, 소의 성장 호르몬(BGH) 폴리 A 부분을 포함하는 단편은 0.8% 아가를 이용한 전기영동 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다.

(10) IRES-GFP, 소의 성장 호르몬 폴리 A 및 lox P 서열을 포함하는 DNA 단편의 제조(도 54J)

pUC119 IRES-GFP+ loxP를 PmeI으로 절단하고 0.8% 아가로즈 젤 전기영동에 의해 정제하였다. (9)에서 제조한 BGH 폴리A 단편을 양 말단을 탈인산화시키는 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리한 정제된 pUC119 IRES-GFP+ loxP에 연결시켰다. 연결 혼합물은 DH5α에 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위한 뉴클레오타이드 서열에 의해 분석하였다. GFP 암호화 서열에 대하여 같은 방향에 있는 BGH 폴리 A 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pIRES-GFP+ pA). pIRES-GFP+ pA를 BamHI 및 XbaI으로 절단하고 IRES-GFP, 소의 성장 호르몬 폴리 A 및 lox P 서열을 포함하는 단편을 0.8% 아가를 이용한 전기영동과 QIAquick Gel Extractin Kit (Qiagen)에 의해 정제하였다.

(11) pPvil 2-01 GFP의 구축(도 54K)

IRES-GFP, 소의 성장 호르몬 폴리 A 및 lox P 서열[(10) 참조]을 포함하는 DNA 단편은 Bgl II 및 XbaI으로 절단한 pPvil2GIPF에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오타이드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오타이드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pPvil 2-01 GFP).

(12) pPv-total의 구축(도 54L)

대략 11.2kb의 마우스 빌린(villin) 유전자 프로모터[(1) 참조] 긴 단편은 Bgl II 및 Cla I으로 절단한 pPv12-01 GFP에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 E.coli C75 알칼리 가수분해효소(alkaline phosphatase)를 처리하였다. 연결 혼합물은 XL-10 Gold Ultracompetent 세포(Stratagene)으로 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pPv-total).

(13) pLoxP-STneoR의 구축(도 54M)

WO 00/10383에 언급한 pLoxP-STneo를 XhoI으로 절단하고, 양 말단을 평활말단화(blunting)시키기 위해 Blunting high(TOYOBO)로 처리하였다. loxP-Neor-loxP를 포함하는 결과 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤 전기영동에 의해 정제하였다. 아래 언급한 합성 올리고뉴클레오티드(서열번호 132 및 133)의 결합에 의해 제조한 DNA 단편을 PacI 및 FseI으로 절단한 pBlueLAB(WO 00/10383)에 연결하고, 0.8% 아가로즈 젤 전기영동에 의해 정제하였다. 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위한 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pBlueLAB2). loxP-Neor-loxP를 포함하는 상기 DNA 단편을 EcoRV로 절단한 pBlueLAB2 벡터에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소로 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5α로 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. pLoxP-STneo(WO 00/10383)에 대하여 반대 방향인 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pLoxP-STneoR).

AsiSI-S(서열번호 132) taaccgcatcgccggccgg

AsiSI-AS(서열번호 133) ccgcatcgcccttaat

(14) pPV01GFP의 구축(도 54N)

pPV-total 플라스미드 DNA는 제한효소 Cla I 및 Xho I으로 절단하고, Pv-GIPF를 포함하는 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤 전기영동에 의해 정제하였다. 정제된 DNA 단편을 Cla I 및 Xho I으로 절단한 pLoxP-STneoR에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 XL-10-Gold Ultracompetent 세포(Stratagene)에 형질전환시키고, 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료를 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위한 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pPv01GFP).

(15) 마우스 ES 세포의 전기천공에 대한 pPv01GFP 플라스미드 DNA의 제조

플라스미드 DNA pPv01GFP(60μg)을 37℃에서 5시간 동안 1mM 스퍼미딘(spermidine, pH 7.0, Sigma)를 포함하는 반응 혼합물에서 Cla I으로 절단하였다. 그 후 반응 혼합물은 페놀/클로로포름(phenol/chloroform) 추출하여, -20℃에서 16시간 동안 에탄올 침전(0.3M NaHCO₃)시켰다. 선형화된 벡터 단편은 HBS 완충액(0.5μg/μl)에 용해시키고, 이후의 전기천공 실험에 이용하였다.

(16) 장 상피세포에서 사람의 GIPF 및 GFP를 발현시키는 유전자도입 키메라 마우스의 작제

마우스 배의 수득, 배양, 배로의 ES 세포 주입, 대리모의 태반으로 이식하는 일반적인 과정은 1995년 요시다(요시다(Yodosha))가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomanual Series 8, Gene Targeting"에 기재된 방법에 따라 실시하였다.

선형화된 pPv01GFP는 1995년 요시다(요시다(Yodosha))가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomanual Series 8, Gene Targeting"에 기술된 방법에 따라 전기천공에 의해 C57BL/6X CBA F1 종이 유래한 마우스 TT2F ES 세포(Uchida, 1995), Lifetech oriental)로 형질전환시켰다. 전기천공한 ES 세포는 20ml ES 배지에 부유시키고, 영양(feeder) 세포가 우선적으로 뿌려진 두 개의 100mm 조직배양 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종하였다. 하루가 지난 후, 배지를 G418 (Invitrogen) 200μg/ml을 포함하는 배지로 교환하였다. 그 후, 7일에서 9일까지, 각 벡터에 대한 24 콜로니 모두를 취하였다. 각각 콜로니는 12 웰 플레이트에서 번성할 때까지 성장시키고, 그때 배양의 4/5를 0.2 ml 세포 보존 배지(ES 배지 + 10% DMSO(Sigma))에 부유시키고, -80℃에 얼려서 보관하였다. 남은 1/5는 12 웰 젤라틴 막을 입힌 플레이트에 접종하여 2일간 배양하였다. 그 후, 지놈 DNA를 Puregene DNA 분리 kit(Gentra System)을 이용하여 분리하였다. G418 저항성 TT2F 세포에서 분리한 지놈 DNA는 제한효소 EcoRI 및 Xho I으로 절단하여, 0.8% 아가로즈 젤 전기영동시켰다. EcoRI-XhoI 절단을 이용하여, 빌린(villin) 프로모터를 포함하는 온전한 발현 단위의 보존, 사람의 GIPF cDNA, GFP

cDNA 및 G418-저항성 클론의 pPv01GFP의 BGH 폴리A 서열을 16kb 밴드로 확인하였다. 분리한 DNA 단편은 막(Gene Screen, NEN Life Science Products)에 옮겨서 아래 언급한 프라이머 세트(서열번호 134 및 135)(IRESprobeF1,R1)를 이용한 PCR에 의한 pPV01GFP[(13) 참조]의 IRES 부분으로부터 제조한 탐침으로서 DNA 단편을 이용하여 실시하였다. 우리는 서던 블롯팅(Southern blotting)에서 16kb 밴드를 보여주는 ES 클론을 선택하였다. 또한, 선택한 ES 클론을 1995년 요시다(요시다(Yodosha))가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomannual Series 8, Gene Targeting"에 기술된 방법에 따라 핵형 분석(karyotype analysis)으로 검사하였다. 정상적인 핵형을 보여주는 하나의 ES 클론인 #2를 배에 주입하기 위해 이용하였다.

IRESprobeF1(서열번호 134): ctaacgttactggccgaagc

IRESprobeR1(서열번호 135): attatcatcgtgttttcaaaggaa

형질전환된 ES 세포 클론 #2의 동결된 저장고 내의 세포는 해동시켜서, 배양을 시작하고, MCH(ICR) 마우스 종(Crea Japan, Inc.)의 암컷과 수컷을 교미시켜서 수득한 8세포기의 배에 주입하였다; 주입비율은 배마다 10-12세포이다. ES 세포를 배반포로 발달시키기 위해 배를 배지에서 밤새 배양시킨 후, 10개의 ES 세포를 주입한 배를 대리모 ICR 마우스(Crea Japan, Inc.)의 태반 양측면에 이식하고, 이는 2.5일단 가임신 처리하였다. 숙주 배(알비노(albino))의 TT2F(아고우티(agouti)) ES 클론 유래한 조직의 분포는 배에서의 눈 염색 및 다양한 자손에서의 털 색깔에 의해 확인하였다.

(17) 유전자도입 키메라 마우스에서 사람의 GIPF-GFP mRNA 발현

전체 RNA 시료를 다양한 발생단계(E13.5, E16.5, E19.5, 3일, 7일)의 pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라의 장관으로부터 제조하고, 반-정량 RT-PCR 분석을 실시하여 GIPF-GFP mRNA의 발현을 확인하였다. 1차 성분 cDNA는 무작위 핵사머를 이용한 Superscript III(Invitrogen)와 Isogen(Nippon Gene)과 RNasy Mini(Qiagen)을 이용한 pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라 및 대조군 TT2F-유래한 키메라의 장관으로부터 추출한 500ng의 전체 RNA를 이용하여 합성하였다. 반-정량 RT-PCR분석은 각 프라이머 쌍에 대해 특이적인 결합 온도에서 cDNA를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 2% 아가 젤에서 전기영동시켜, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다. RNA 보존(integrity)은 쥐의 GAPDH에 의해 생산한 cDNA 증폭에 의해 조절하였다. GIPF(Pv01RT F1, RA; 서열번호 136 및 137), 액신-2(Axin2 F, R; 서열번호 138 및 139) 및 mGAPDH(mGAP DH5,3; 서열번호 140 및 141)에 대한 프라이머 세트의 뉴클레오티드 서열과 결합온도(annealing temperature)는 아래에 나열하였다.

Pv01RT F1(서열번호 136) gctctgacaccaaggagacc

Pv01RT R1(60°C)(서열번호 137) ccctaggaatgctcgtaag

액신-2 F(MUS)(서열번호 138) caggagcctcacccttcg

액신-2 R(MUS)(60°C)(서열번호 139) acgccgaggtgcttgccc

mGAPDH5(서열번호 140) caccatggagaaggccggggccac

mGAPDH3(65°C)(서열번호 141) atcatacttggcaggtttctccagg

도 55에서 보듯이, GIPF-GFP 전사체는 pV01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라의 장관 내에서 E13.5 발생단계에서는 나타나지만, 검사한 모든 간 시료에서는 없었다. 이는 13kb의 빌린(villin) 프로모터가 유도하는 도입유전자의 발현은 처음에 12.5dpc에서 배아 후장 및 전장에서 관찰되었고, 그 발현은 장 상피에 주로 특이적이라고 설명하는 이전의 연구(참조: Madison et al., J. Biol. Chem. 277, p33275-33283, 2002)와 잘 일치하였다. 또한 GIPF-GFP 전사체의 발현 양은 발생과정 중 연령에 따라 점차적으로 증가함이 명백하였다. 역훈 등(Eek-hoon et al.)은 내분비 액신-2 mRNA 발현이 Wnt 신호전달 경로의 활성화에 의해 유발한다고 보고하였다(참조: Mol. Cell. Biol., 22, 1171-1183, 2002). 또한 Wnt 신호전달은 장관의 발생에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라의 장관에서 액신-2의 발현을 검사하였다. 도 55의 결과는 대조군 키메라와 비교했을 때, 3일과 7일에서 액신-2 mRNA의 발현 증가가 명백함을 보여주었고, 이는 사람의 GIPF 발현은 신생아의 장관에서 Wnt 신호전달 경로를 활성화시킨다는 점을 암시하였다.

(18) 유전자도입 키메라 마우스의 장관에서 β -카테닌의 안정화

Wnt- β -카테닌 신호전달 경로에 대한 GIPF의 효과를 검사하기 위해, β -카테닌 안정화를 10일째 pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라의 소장 및 결장 시료에서 측정하였다. β -카테닌 안정화 실험의 과정은 실시예 17에 기술하였다. 도 56에서 보듯이, GIPF 발현은 대조군 키메라(야생형)와 비교했을 때, pPv01GFP/TT2F-#2(Pv01#2)로부터의 소장 및 결장 시료에서 β -카테닌의 안정화를 유발시킨다.

(19) 유전자 도입 키메라 마우스에서 장관의 표현형 변화의 측정

pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라 신생아는 3일째에 복부의 현저한 비정상 팽창을 보여주었고, 이러한 표현형의 정도는 연령에 따라 점차적으로 강화되었다. 부검시 3일째의 키메라의 시각적 조사는 증가한 표면 혈관신생과 연관하여 소장 전체 직경의 현저한 증가를 보여주었다. 파라핀 포매한 절편은 조직학적 검사를 위해 H&E 염색하였다. 도 57에서 보듯이, pPv01GFP/TT2F-#2(Pv01#2)로부터 H&E 절편의 조직 병리학 분석은 대조군과 비교하여, 배아의 19.5일(E19.5)에서 14일(d14)까지의 소장선과 겹가지 수의 증가를 보여주었다.

실시예 31: 장 상피세포에서 GIPF 및 Wnt3a를 발현시키는 유전자 도입 키메라 마우스

(1) Wnt3a 단편의 제조(도 58A)

Wnt3a FW(서열번호 142)

cgggatcccatggctcctcgcgatacctcttagtgct

Wnt3a RV(서열번호 143)

gctctagagtttaaacctacttgcaggtgtgcacgtcatag

KOD-puls-(TOYOBO)는 PCR 반응에 이용하였다. PCR 반응 혼합물은 각 프라이머 10pmole(서열번호 142과 143) 및 주형으로 사람의 Wnt3a cDNA를 포함하였다. 이러한 PCR 증폭은 94°C 3분간 초기 변성배양(initial denaturing incubation)을 실시하였다. 그후 변성, 결합 및 증폭 30 사이클을 94°C 15초 및 68°C 2분간 배양해서 실시하였다. PCR 산물(대략 1.06kb)은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다. 분리한 PCR 산물을 BamHI 및 XbaI으로 절단한 후, BamHI 및 XbaI으로 절단한 pBluescriptIISK(-)에 연결시키고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5a에 형질전환시켰고, 그 결과 형질전환체로부터 준비한 DNA 시료는 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론은 NcoI 및 PmeI으로 절단하였고, Wnt3a cDNA를 포함하는 단편은 0.8% 이용한 전기영동과 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)으로 정제하였다.

(2) IRES/Wnt3a+ pA 단편의 제조(도 58B)

pIRES/GFP+ pA 플라스미드 DNA[실시예 30-(13) 참조]는 NcoI 및 PmeI으로 절단하였고, GFP 암호화 서열이 없는 벡터 단편은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동으로 정제하였다. Wnt3a cDNA[(1) 참조]를 포함하는 단편은 양 말단을 탈인산화시키기 위한 E. coli C75 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. 연결 혼합물은 DH5a로 형질전환시켰고, 결과 형질전환체로부터 준비한 DNA 시료는 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위한 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열(pIRES/Wnt3a+ pA)을 지닌 단편을 포함하는 클론은 AscI 및 XhoI으로 절단하여 IRES/Wnt3a+ pA 단위를 포함하는 DNA 단편은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동 및 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)에 의해 정제하였다.

(3) pPv01Wnt3a의 구축(도 58C)

pPv01GFP 플라스미드 DNA[실시예 30-(13)]은 제한효소 AscI 및 XhoI으로 절단하였고, 절단한 반응 혼합물은 0.8% 아가로즈 젤 전기영동시켰다. IRES/GFP+ pA 부분을 포함하지 않는 벡터 단편을 분리하고, 양 말단을 탈인산화시키기 위해 소장 알칼리 인산가수분해효소를 처리하였다. IRES/Wnt3a+ pA 연결 혼합물[(2) 참조] 및 상기 벡터 단편은 XL10-Gold Ultracompetent 세포(Stratagene)에 형질전환시켰다. 그 결과 형질전환체로부터 제조한 DNA 시료는 삽입한 단편의 구조를 확인하기 위해 뉴클레오티드 서열에 의해 분석하였다. 올바른 뉴클레오티드 서열을 지닌 단편을 포함하는 클론을 선택하였다(pPv01Wnt3a).

(4) 마우스 ES 세포로의 전기천공을 위한 pPv01Wnt3a 플라스미드 DNA의 제조

pPv01Wnt3a 플라스미드 DNA(60 μ g)을 1mM 스퍼미딘(pH 7.0, Sigma)를 포함하는 반응 혼합물에서 37 $^{\circ}$ C, 5시간 동안 Cla I으로 절단하였다. 그 후, 반응 혼합물은 페놀/클로로포름 추출한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 에탄올 침전(0.3M NaHCO₃)시켰다. 선형화된 벡터 단편은 HBS 완충액(0.5 μ g/ μ l)에 해동시켜 다음의 전기천공 실험에 사용하였다.

(5) 장 상피세포에서 사람의 GIPF 및 Wnt3a를 발현하는 유전자도입 키메라 마우스의 생산

마우스 배아, 배양, 배아로의 ES 세포 주입, 대리모의 태반으로의 이식을 수득하는 일반적 방법은 1995년 요시다(Yodosha)가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomanual Series 8, Gene Targeting"에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

선형화된 pPv01Wnt3a 벡터는 1995년 요시다(Yodosha)가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomanual Series 8, Gene Targeting"에 기술된 방법에 따라 전기천공에 의해 C57BL/6X CBA F1 종 유래한 마우스 TT2F ES 세포((Uchida, 1995)로 형질전환시켰다. 전기천공된 ES 세포는 ES 배지 20ml에 부유시키고, 우선적으로 영양(영양(feeder)) 세포를 뿌려놓은 2 개의 100 mm 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종시켰다. 하루 뒤 배지를 G418 200 μ g/ml(Invitrogen)을 포함하는 배지로 교환한 다음, 7일에서 9일까지 각 벡터에 대해 총 24 콜로니를 선택하였다. 각 콜로니는 12-웰 플레이트에 꼭차도록 키우고, 그때 배양의 4/5는 0.2ml 세포저장 배지(ES 배지+ 10% DMSO(Sigma))에 부유시키고 -80 $^{\circ}$ C에 얼려서 보관하였다. 남은 1/5은 12웰 젤라틴 코팅된 플레이트에 접종하여 2일간 배양하였다. 그 후, 지놈 DNA를 Puregene DNA 분리 Kit(Gentra System)을 이용하여 분리하였다. G418 저항성 TT2F 세포로부터 분리한 지놈 DNA는 제한효소 EcoRI 및 XhoI으로 절단하고, 0.8% 아가로즈 겔 전기영동시켰다. EcoRI-XhoI 이용하여 G418 저항성 클론에서 빌린(villin) 프로모터, 사람의 GIPF cDNA, Wnt3a cDNA 및 BGH 폴리 A 서열을 포함하는 온전한 발현 단위의 보유는 대략 16kb 밴드의 탐지를 통해 확인하였다. 분리한 DNA 단편은 막(Gene Screen, NEN Life Science Products)에 옮겨서, 실시예 30-(16)(IRESprobe F1,R1)에 언급한 프라이머 셋트를 이용한 PCR에 의해 pPV01GFP[실시예 30-(13)]의 IRES 부분으로부터 제조한 탐침으로서 DNA 단편을 사용하여 혼성화를 실시하였다. 우리는 서던 블랏팅(Southern blotting)에서 단일 16kb 밴드를 보이는 클론을 선택하였다. 또한, 선택한 ES 클론은 1995년 요시다(Yodosha)가 출판한 Shinichi Aizawa "Biomanual Series 8, Gene Targeting"에 기술된 방법에 따라 핵형 분석에 의해 검사하였다. 정상적인 핵형을 보이는 두 가지 ES 클론 #7, #13은 배아로의 주입에 이용하였다.

형질전환된 ES 세포 클론 #7 및 #13의 냉동시킨 저장고의 세포는 해동시켜 배양을 시작하였고, MCH(ICR)마우스 종(Crea Japan, Inc.)의 수컷 및 암컷 마우스를 교미시켜서 수득한 8 세포기의 배아에 주입하였다. 주입 비율은 배아마다 10-12세포였다. 배아를 ES 세포가 배반포로 발달하는 배지에서 밤새 배양한 후, ES 세포 주입한 배아 약 10개를 대리모 ICR 마우스(Crea Japan, Inc.)의 태반 양측면에 이식하고, 이 마우스는 2.5일간 가임신 처리하였다. 숙주 배아(알비노(albino)) 유래한 조직의 TT2F(아고우티(agouti)) ES 클론-유래한 조직의 분포는 배아의 눈 염색 및 살아있는 자손의 털 색깔로 확인하였다.

(6) 유전자도입 키메라 마우스에서 사람의 GIPF/Wnt3a mRNA의 발현

전체 RNA 시료를 pPv01Wnt3a/TT2F-7# 및 13# 유래한 신생 키메라의 장관으로부터 제조하고, GIPF-GFP mRNA의 발현을 검사하기 위해 반-정량 RT-PCR 분석하였다. 첫 번째 성분 cDNA는 무작위 헥사머와 Isogen(Nippon Gene) 및 RNasy Mini를 이용해 pPv01Wnt3a/TT2F-7#의 장관, #13 유래한 키메라 및 대조군 TT2F-유래한 키메라로부터 추출한 전체 RNA 500ng을 이용해 Superscript III(Invitrogen)으로 합성하였다. 반-정량 RT-PCR 분석은 각 프라이머에 대한 특이적 결합온도에서 cDNA를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 2% 아가 겔에서 전기영동시켰고, 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다. RNA의 완전함은 쥐의 GAPDH에 의해 생산한 cDNA의 증폭에 의해 조절하였다. GIPF(Pv01RT F1, R1), 액신 2(액신-2 F,R) 및 mGAPDH(mGAPDH 5, 3)에 대한 프라이머 셋트의 뉴클레오티드 서열과 결합 온도는 아래에 나열하였다.

Pv01RT F1(서열번호 136) gctctgacaccaaggagacc

Pv01RT R1(60 $^{\circ}$ C)(서열번호 137) ccctaggaatgctcgtaag

액신-2 F(MUS)(서열번호 138) caggagcctcacccttcg

액신-2 R(MUS)(60 $^{\circ}$ C)(서열번호 139) acgccgaggtgcttgccc

mGAPDH5(서열번호 140) caccatggagaaggccggggcccccac

mGAPDH3(65°C)(서열번호 141) atcatacttggcaggtttctccagg

도 59에서 보듯이, GIPF-Wnt3a 전사체는 신생 키메라(Pv01Wnt3a: 1-4)로부터 유래한 pPv01Wnt3a/TT2F-#7 및 #13의 장 조직에서 관찰하였다. 또한, 도 59의 결과는 대조군 키메라(TT2F: 5 및 6)와 비교하였을 때, 액신-2 mRNA의 증가한 발현이 명백함을 보여 주었다.

(7) 유전자 도입 키메라 마우스의 장관에서 β -카테닌의 안정화

Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로에 대한 GIPF의 효과를 검사하기 위해, β -카테닌 안정화는 pPv01Wnt3a/TT2F-#7 및 #13의 소장 및 결장 시료에서 측정하였다. β -카테닌 안정화 실험에 대한 순서는 실시예 17에 기술하였다. 도 60에서 보듯이, GIPF 및 Wnt3a의 동시 발현은 대조군 키메라(야생형: 3 및 4)와 비교하였을 때 pPv01Wnt3a/TT2F-#7 배아(F20.5: 1 및 2)로부터 십이지장 및 결장의 시료에서 β -카테닌의 안정화를 유발하였다.

(8) 유전자 도입 키메라 마우스의 장관에서 표현형 변화의 측정

신생 pPv01Wnt3a/TT2F-#7 및 -#13 유래한 키메라 자손(pup)은 복부의 현저한 비정상 팽창을 보여 주었다. 부검시 신생 키메라의 시각적 조사는 증가한 표면 혈관신생과 관련하여 소장 전체에서 직경의 상당한 증가를 보여 주었다. 전체 배아, 자손 또는 위장관은 보윈(Bouin) 용액에서 고정시켰다. 파라핀 포매한 절편은 조직학 검사를 위해 H&E(hematoxiline and eosin) 염색하였다. 도 61에서 보듯이, pPv01Wnt3a/TT2F-#13 20.5일된 배아(E 20.5)로부터 H&E 절편의 조직병리학적 분석은 용모세포수의 증가, 비정상적 결가지 및 용모의 과형성을 확인하였다. 이러한 표현형의 정도는 pPv01GFP/TT2F-#2 유래한 키메라[실시예 30-(19)]의 표현형에서보다 강했는데, 이는 Wnt3a 발현에 의해 GIPF의 효과의 증가를 암시하였다.

실시예 32: RS-KO 마우스 ES 세포

A. RS-KO 벡터의 구축

RS-KO 벡터(도 62A)의 구축은 아래 언급한 방법 및 도 62B-1K에 따라서 실시하였다.

도 62B.

pBluescript II SK(-)(Staratagene)으로 새로운 절단부위(NruI, SgrAI 및 AscI)의 추가

pBluescript II SK(-)에 새로운 절단부위의 부가를 위해 올리고 DNA 단편(서열번호 144 및 145)을 합성하였다.

LinkA1: tcgagtcgcgcacaccggcgggcgcgccc(서열번호 144)

LinkA2: tcgagggcgcgccccgccgtgtcgcgac(서열번호 145)

제조한 LinkA1 및 LinkA2를 제한효소 Sal I 및 XhoI으로 미리 절단한 pBluescript II SK(-)로 연결시켰다. 그 결과의 플라스미드 pBlueLA는 새로이 추가한 절단부위(NruI, SgrAI 및 AscI)를 포함하였다.

도 62C.

pBlueLA에 새로운 절단부위(Pac I, Fse I 및 Sal I)의 추가

pBlueLA에 새로운 절단부위를 부가하기 위해, 올리고 DNA단편(서열번호 146 및 147)을 합성하였다.

LinkB1: ggccgcttaattaaggccggccgtcgacg(서열번호 146)

LinkB2: aattcgctcgacggccggccttaattaagc(서열번호 147)

제조한 LinkB1 및 LinkB2는 제한효소 Not I 및 EcoR I으로 미리 절단한 pBlueLA에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBlueLAB는 새로이 부가한 절단부위(Pac I, Fse I 및 Sal I)을 포함하였다.

도 62D. LoxP-Neo-B 단편의 제조

LoxP-Neo-B 단편은 pLoxP-STneo(WO 00/10383)의 XhoI 절단으로부터 수득한 LoxP-Neo에 T4 DNA 중합효소를 처리하여 제조하였다.

도 62E. pBlueLAB-LoxP-Neo 플라스미드의 제조

LoxP-Neo-B 단편은 제한효소 EcoRV로 미리 절단한 pBlueLAB에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBlueLAB-LoxP-Neo는 LoxP-Neo-B 단편을 포함하였다.

도 62F. DT-A 단편의 제조

pMC1DT-A(Gibco BRL)를 Xho I 및 Sal I으로 절단하고, 그 결과 DT-A 단편을 분리하여 아가로스 젤 전기영동으로 회수하였다.

도 62G. pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A 플라스미드의 제조

DT-A 단편은 제한효소 XhoI으로 미리 절단한 pBlueLAB-LoxP-Neo에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A는 DT-A 단편을 포함하였다.

도 62H. RS 성분의 3' 지놈 부분의 제조

PCR을 위한 정방향(RS3'FW2; 서열번호 148) 및 역방향(RS3'RV3; 서열번호 149) 프라이머는 GenBank(Accession No. AC090291)로부터 수득한 마우스의 서열에 근거하여 합성하고, RS 성분의 3' 지놈 부분의 DNA를 증폭하기 위해 사용하였다.

RS3'FW2:ttggcgcgcctccctaggactgcagttgAgctcagatttga(서열번호 148)은 5' 말단부위에 AscI 인식서열을 첨가하여 제조하고,

RS3'RV3:ccgctcgagtcttactgtctcagcaacaataataaacagggg(서열번호 149)는 5' 말단부위에 XhoI 인식서열을 첨가하여 제조하였다.

PCR은 주형으로 BAC 클론 RP23-435I4(GenBank Accession No. AC090291)을 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 AscI 및 XhoI으로 절단하고 제한효소 AscI 및 XhoI으로 미리 절단한 pBlueLAB에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드는 AscI과 XhoI 사이의 부분 내에 뉴클레오티드 서열의 치환이 없는 RS 성분의 3'지놈 부분의 지정한 DNA 서열을 포함하였고 AscI 및 XhoI으로 처리한 후 RS 성분의 3' 지놈 부분(약 2 Kb)를 수득하였다.

도 62I. RS 성분의 3' 지놈 부분을 pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A로의 삽입

RS 성분의 3' 지놈 부분은 AscI 및 XhoI으로 미리 절단한 pBlueLAB-LoxP-Neo

-DT-A로 연결시켰다. pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A와 RS 성분의 3' 지놈 부분 사이의 연결 부분을 검증한 후, 플라스미드 pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3' RS를 수득하였다.

도 62J. 마우스 RS 성분의 5' 지놈 부분의 제조

PCR을 위한 정방향 프라이머(RS5'FW3; 서열번호 150) 및 역방향 프라이머(RS5'RV3; 서열번호 151)를 GenBank로부터 수득한 마우스 서열(Accession No.AC090291)에 근거하여 합성하고, RA 성분의 5' 지놈 부분 DNA를 증폭하는데 이용하였다.

RS5'FW3:ataagaatgcggccgcaaagctggtgggttaagactatctcgtgaagtg(서열번호 150)는 5'말단부위에 NotI 인식서열을 첨가하여 제조하였다.

RS5'RV3:acgcgtcgactcacaggttggtccctctctgtgtgtggttgctgt(서열번호 151)는 5'말단부위에 SalI 인식서열을 첨가하여 제조하였다.

PCR은 주형으로 BAC 클론 RP-23-435I4(GenBank Accession No. AC090291)을 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Not I 및 Sal I으로 절단하고, 제한효소 Not I 및 Sal I으로 미리 절단한 pBlueLAB에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드는 Not I과 Sal I사이의 부분 내 뉴클레오티드 서열의 치환 없는 RS 성분의 5' 지놈 부분의 지정된 DNA 서열을 포함하였다. Not I 및 Sal I으로 처리하여 RS 성분의 5'지놈 부분(약 5Kb)을 수득하였다.

도 62K. pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RS에 RS 성분의 5'지놈 부분 삽입

RS 성분의 5'지놈 부분을 Not I 및 Sal I으로 미리 절단한 pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RS에 연결시켰다.
pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'

RS와 5'지놈 부분 사이의 연결 부분을 검증한 후, RS-KO 벡터를 구축하였다.

B. RS-KO 마우스 ES 세포의 제조

마우스 배아를 수득하여 배양하는 일반적 순서는 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 실시하였다. RS-KO 벡터는 Not I에 의해 선형화되었고, 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 전기천공에 의해 C57BL/6X CBA F1 유래한 TT2F ES 세포((Uchida, 1995), Lifetech oriental)로 옮겼다. 전기천공된 ES 세포는 ES 배지[DMEM(Gibco), 18% FBS(Gibco), 0.1 mM 2-머캅토에탄올(Gibco), 1000U/ml(leukemia inhibitory factor, CHEMICON International, Inc.)에 부유시키고 영양(feeder) 세포(Invitrogen)을 우선적으로 뿌려놓은 2개의 100mm 조직배양 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종하였다. 하루 뒤에, 배지를 0.75g/ml 퓨로마이신(puromycin, Sigma)를 포함하는 배지로 교환하였다. 그로부터 7일 후, 형성된 퓨로마이신 내성 콜로니를 선택하였다. 각 콜로니는 24웰-플레이트에서 많이 키워서, 배양의 2/3를 0.2ml 세포보존 배지[FBS+ 10% DMSO(Sigma)]에 부유시켰고, -80℃에 얼려서 보관하였다. 남아 있는 1/3은 12-웰 젤라틴 코팅된 플레이트에 접종하여 2일간 배양하였다. 그후, 지놈 DNA는 Purogene DNA 분리 Kit(Gentra System)을 이용하여 분리하였다.

서던(Southern) 분석을 위한 3' KO-탐침은 아래와 같이 제조하였다. RS3' Southern FW1(서열번호 152) 및 RS3' Southern RV2(서열번호 153) 프라이머는 GenBank(Accession No. AC090291)로부터 수득한 마우스의 서열에 근거하여 합성하고 RS 성분의 3' 지놈 부분의 약 600-머 길이의 DNA 단편을 증폭하는데 이용하였다.

RS3'Southern FW1:tcttactagagtctcactagctct(서열번호 152)

RS3'Southern RV2:ggaaccaaagaatgaggaagctgtt(서열번호 153)

퓨로마이신 내성 TT2F 세포로부터 분리한 지놈 DNA는 제한효소 EcoR I(Takara Shuzo)로 절단한 후 0.8% 아가로즈 젤 전기영동시켰다.

분리한 DNA 단편은 막(GeneScreen, NENTM Life Science Products)에 옮겨서 RS 성분 DNA(3'KO-탐침)의 3' 지놈 부분으로부터 제조한 탐침으로서 DNA 단편을 이용하여 실시하였다. untargeted ES 클론의 밴드 형태는 분자량 약 5.7Kb의 단일 밴드를 보여주었고 targeted ES 클론은 약 5.7Kb 및 7.4Kb(도 63)의 두 밴드를 보여주었다. 선택한 RS-KO 마우스 ES 클론은 또한 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 핵형 분석에 의해 검사하였다. 정상 핵형을 보여주는 RS-KO 마우스 ES 클론은 차후의 실험에 이용하였다.

실시에 33: 유전자 도입 GIPF 결실 변이체 동물

A. pCk m4 KI 벡터의 구축

GIPF 결실 변이체 4 Ck 녹인(knock-in, pCk m4 KI) 벡터의 구축(도 64A)은 후술하는 방법에 따라 실시하고, 도 64B-64K에 자세히 설명하였다.

도 64B. Ck P2 KI+ AS KI의 제조

Ck P2 KI에 새로운 절단부위를 부가하기 위해, 올리고 DNA 단편(서열번호 154 및 155)을 합성하였다.

Asc I top 링커:ggccaggcgcgcttgct(서열번호 154)

Asc I bottom 링커:ggccgcaaggcgcgct(서열번호 155)

제조된 Asc I top 링커 및 Asc I bottom 링커는 제한효소 Not I으로 미리 절단한 Ck P2 KI로 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 Ck P2 KI+ AS KI는 새로이 첨가된 절단부위(Asc I)을 포함하였다.

도 64C. pBlueLAB+ Nh의 제조

pBlueLAB내에 새로운 절단부위를 부가하기 위해 올리고 DNA 단편(서열번호 156 및 157)을 합성하였다.

Pac-Nhe-Fse S:taagggtctagctagggccggac(서열번호 156)

Pac-Nhe-Fse AS:ccctagctagcccttaac(서열번호 157)

제조된 Pac-Nhe-Fse S 및 Pac-Nhe-Fse AS를 제한효소 Pac I 및 Fse I으로 미리 절단한 pBlueLAB에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBlueLAB+ Nh는 새로이 첨가된 절단부위(Nhe I)을 포함한다.

도 64D. pBlueLAB+ NhHp

pBlueLAB+ Nh 내에 새로운 절단부위를 부가하기 위해, 올리고 DNA 단편(서열번호 158 및 159)를 합성하였다.

S/HpaI/Hd-S:tcgagttaac(서열번호 158)

S/HpaI/Hd-AS:agctgttaac(서열번호 159)

제조된 S/HpaI/Hd-S 및 S/HpaI/Hd-AS는 제한효소 Sal I 및 Hind III로 미리 절단한 pBlueLAB+ Nh에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBlueLAB+ NhHp는 새로이 첨가된 절단부위(Hpa I)을 포함하였다.

도 64E. pCkpAP2의 제조

pCkP2+ As KI는 Hpa I 및 Nhe I으로 절단하고 그 결과 952bp 단편을 분리하여 아가로스 젤 전기영동에서 회수하였다. 952bp 단편은 제한효소 Hpa I 및 Nhe I으로 미리 절단한 pBlueLAB+ NhHp로 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pCkpAP2는 952bp 단편을 포함하였다.

도 64F. pCkpAMCS의 제조

pCkpAP2내에 새로운 절단부위를 부가시키기 위해, 올리고 DNA 단편(서열번호 160 및 161)을 합성하였다.

SPFN 링커-S:agctgtcgacttaattaaggccggccg(서열번호 160)

SPFN 링커-AS:ctagcgccggccttaattAagtcgac(서열번호 161)

제조된 SPFN 링커-S 및 SPFN 링커-AS는 제한효소 Hind III 및 Nhe I으로 미리 절단한 CkpAMCS에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 CkpAMCS는 새로이 첨가된 절단부위(Pac I)을 포함하였다.

도 64G. pCkP2ΔP의 제조

pCkPAMCS는 Hpa I 및 Nhe I으로 절단하고 그 결과 길이 700bp 단편을 분리하여 아가로스 젤 전기영동에서 회수하였다. 700bp 단편은 제한효소 Hpa I 및 Nhe I으로 미리 절단한 pCkP2+ As KI로 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pCkP2ΔP는 700bp 단편을 포함하였다.

도 64H. pBS+ PFN의 제조

pBluescript II SK(-)내에 새로운 절단부위를 추가하기 위해, 올리고 DNA 단편(서열번호 162 및 163)을 합성하였다.

S/PFN/Hd-S:tcgacttaattaaggccggccttagctagca(서열번호 162)

S/PFN/Hd-AS:agcttgctagctaggccggccttaattaag(서열번호 163)

제조된 S/PFN/Hd-S 및 S/PFN/Hd-AS는 제한효소 Sal I 및 Hind III로 미리 절단한 pBluescript II SK(-)에 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pBS+ PFN은 새로이 부가된 절단부위(Pac I, Fse I 및 Nhe I)를 포함하였다.

도 64I. pPSs3.8의 제조

PCR을 위한 정방향 프라이머(PsecSP FW1: 서열번호 164) 및 역방향 프라이머(PsecSP RV:서열번호 165)는 GenBank (Accession No. K02159)로부터 수득한 마우스 서열에 근거하여 합성하고, Igk의 프로모터 및 리더(leader) 서열 암호화 부분의 DNA를 증폭하는데 이용하였다. 리더 서열 암호화 부분은 고유의 인트론 서열을 포함한다.

PsecSP FW1:ccttaattaaagtattgtgtccttagagggtgcaactcaagatc(서열번호 164)는 5'말단부위에 Pac I 인식서열을 첨가하여 제조하였다. PsecSP RV:ttggccggccttgccgccagtggacctggaatgataaacacaaagattattg(서열번호 165)는 5'말단부위에 Fse I 인식서열을 첨가하여 제조하였다.

PCR은 주형으로 TT2F ES 세포((Uchida, 1995), Lifetech oriental)로부터 마우스 지놈을 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Pac I 및 Fse I으로 절단하고, 제한효소 Pac I 및 Fse I으로 미리 절단한 pBS+ PFN으로 연결시켰다. 그 결과 플라스미드 pPSs3.8은 Igk의 프로모터 및 leader 서열을 암호화하는 부분의 DNA 단편을 포함하였다.

도 64J. m4(+ SP) 및 m4(-SP)의 제조

PCR을 위한 정방향 프라이머(Sal kazak GIPF F; 서열번호 166) 및 역방향 프라이머(GIPF m4 RV Fse; 서열번호 167)는 결실 변이체 #4(도43; 서열번호 91)의 서열에 근거하여 합성하고, GIPF의 leader 서열 및 GIPF의 결실 변이체 #4 서열의 DNA를 증폭하는데 이용하였다. Sal kazak GIPF F:aagcgtcgaccaccatgcggcttggtgtgtg(서열번호 166)은 5'말단부위에 Sal I 인식서열을 첨가하여 제조하고 GIPF m4 RV Fse:atggccggcctacatggtgccattggcag(서열번호 167)는 5'말단부위에 Fse I 인식서열을 첨가하여 제조하였다. PCR은 주형으로 GIPF KI 벡터를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Sal I 및 Fse I으로 절단한 후 m4(+ SP) 단편을 수득하였다.

PCR을 위한 정방향 프라이머(Hy01(-SP) FW;서열번호 168) 및 역방향 프라이머(GIPF m4 RV Fse;서열번호 169)는 결실 변이체 #4(도 43; 서열번호 91)의 서열에 근거하여 합성하고, GIPF 결실 변이체 #4의 DNA를 증폭하는데 이용하였다.

Hy01(-SP) FW:agccgggggatcaaggggaaaaggcagagg(서열번호 168)은 5'말단부위에 인산을 첨가하여 제조하고, GIPF m4 RV Fse:atggccggcctacatggtgccattggcag(서열번호 169)는 5'말단부위에 Fse I 인식서열을 부가하여 제조하였다.

PCR은 주형으로 GIPF KI 벡터를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Fse I으로 절단한 후, m4(-SP) 단편을 수득하였다.

도 64K. pCk m4 KI 벡터의 구축

m4(+ SP) 단편은 제한효소 Sal I 및 Fse I으로 미리 절단한 pCkP2+ As KI로 연결시켰다. 그 결과 pCk m4 KI 벡터는 m4(+ SP) 단편을 포함하였고, 이는 GIPF 결실 변이체 마우스를 생산하는데 이용하였다.

B. pPA4 KI 벡터의 구축

GIPF 결실 변이체 4 PS 녹인(knock-in)(pPS m4 KI)벡터(도 65A)를 후술하는 방법에 따라 실시하고, 도 65B-65C에 자세히 설명하였다.

도 65B. pPSs 3.8m4의 제조

m4(-SP) 단편은 제한효소 Sfo I 및 Fse I으로 미리 절단한 pPSs3.8에 연결시켰다. 그 결과 pPSs3.8m4는 m4(-SP) 단편을 포함하였다.

도 65C. pPSm4 KI 벡터의 구축

pPSs3.8ms는 Pac I 및 Fse I으로 절단하고, 그 결과 약 길이 1.2 Kb 단편을 분리해서 아가로스 젤 전기영동에서 회수하였다. 1.2 Kb 단편은 제한효소 Pac I 및 Fse I으로 미리 절단한 CkP2ΔP에 연결시켰다. 그 결과 pPSm4 KI 벡터는 1.2 Kb 단편을 포함하였고, 이는 GIPF 결실 변이체 마우스의 생산에 이용하였다.

C. GIPF 결실 변이체 마우스의 생산

마우스 배아의 수득, 배양, 배아로의 ES 세포 주입, 대리모 태반으로의 이식에 대한 일반적 순서는 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

pCkm4 KI 벡터 및 pPSm4 KI 벡터는 Not I을 이용하여 선형화하고, 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 전기천공에 의해 RS-KO 마우스 ES 세포로 옮겼다. 전기천공을 실시한 RS-KO 마우스 ES 세포는 20ml ES 배지[DMEM(Gibco), 18% FBS(Gibco), 0.1 mM 2-머캅토에탄올(Gibco), 1000U/ml LIF(leukemia inhibitory factor, CHEMICON International, Inc.)]에 부유시켰고 영양(feeder) 세포(Invitrogen)이 미리 뿌려진 두 개의 100 mm 조직배양 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종하였다. 하루 뒤, 배지를 푸로마이신(Sigma) 0.75g/ml 포함하는 배지로 교환하였다. 그 후 7-9일에, pCkm4 KI 벡터를 전기천공한 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 형성된 24 콜로니 및 pPSm4 KI 벡터를 전기천공한 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 형성한 24 콜로니를 선택하였다. 각 콜로니를 12 웰 플레이트에 키워서 배양의 2/3ms 0.2 ml 세포 보존 배지[FBS+ 10% DMSO(Sigma)]에 부유시켰고 -80℃에 얼려서 보관하였다. 남은 1/3은 12웰 젤라틴 코팅한 플레이트에 접종하여 2일간 배양하였다. 그 후, 지놈 DNA를 Puregene DNA Isolation Kit(Gentra System)을 이용하여 분리하였다. 푸로마이신 내성 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 분리한 지놈 DNA는 제한효소 EcoRI(Takara Shuzo)으로 절단하고 0.8% 아가로스 젤 전기영동시켰다. 분리한 DNA 단편은 막(GeneScreen, NENTM Life Science Products)으로 옮겨서, IgJk-Ck 지놈 DNA(Xho I-EcoRI, 1.3 Kb(서열번호 67): WO 00/10383, 실시예 48)의 3'부분에서 제조한 DNA 단편을 탐침으로 이용하여 혼성화를 실시하였다. untargeted ES 클론의 밴드 형태는 분자량 15.6Kb의 단일 밴드를 나타내었다. pCkm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론은 각각 분자량 15.6Kb 및 12.5Kb의 두 개 밴드를 나타내었다(참조: 도 66 및 67). 서던(Southern) 분석(상동일 치하는 재조합 비율은 약 41.7%)후에 10개의 pCkm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론 #3로부터 하나를 선택하였다. 선택한 ES 클론은 또한 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 핵형 분석을 실시하였다. 정상 핵형을 보여주는 pCkm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #3 및 pPSm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #7을 각각 배아로의 이식에 이용하였다.

pCkm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #3 및 pPSm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #7의 냉동시킨 저장고에서 세포를 해동시켜 배양을 시작하고 면역글로블린 중쇄 녹아웃 마우스 종의 수컷과 암컷을 교미시켜 수득한 8 세포기의 배아(참조: Tomizuka et.al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97:722-727, 2000)에 주입하였다; 주입 비율은 배아마다 10-12세포였다. 배아를 ES 세포가 배반포로 발달하는 배지에서 밤새 배양한 후, 약10개의 ES 세포 주입한 배아를 대리모 ICR 마우스(Crea Japan, Inc.)의 태반 양 측면에 이식하고, 이는 2.5일간 가임신 처리시켰다. 80개의 주입한 각각 배아의 이식 결과로서, 15 및 20 마리 자손 마우스가 각각 태어났다. 자손에서의 키메라 현상은 숙주 배아(ICR)-유래한 알비노(albino) 털 색깔에서 TT2F 세포-유래한 아고우티(agouti) 털 색깔(암갈색)의 정도에 따라 확인하였다. 15마리의 자손 중에서, 9 마우스(pCkm4 knock-in 마우스)는 부분적인 아고우티(agouti) 털 색깔을 지니고 있는데, 이는 RS-KO 마우스 ES 세포의 분리를 의미하며, 20 마리의 자손 중 16 마우스(pPSm4 knock-in 마우스)는 부분적인 아고우티(agouti) 털 색깔을 지니고 있는데, 이는 RS-KO 마우스 ES 세포의 분리를 의미한다. GIPF 결실 변이체 마우스는 pCkm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 세포 및 pPSm4 KI targeted RS-KO 마우스 ES 세포의 다른 클론으로부터 상술한 방법과 같이 수득하였다.

마우스는 12/12시간 암/명 주기(8:00 am 점등)에서 키웠고, 5 μ m 거른 물과 CE-2 먹이(CLEA JAPAN, INC.)를 무작위로 공급하였다. 수컷 마우스는 젖을 떼고 난 후에 각각 키웠다.

실시예 34: 유전자 도입 GIFP 변이 동물

A. pCk VR KI 벡터의 구축

GIFP 변이 Ck knock-in(pCk VR KI) 벡터의 구축(도 68A)는 후술하는 방법에 따라 실시하고, 도 68B-68C에 자세히 설명하였다.

도 68B. 코작(kozak, VR+ kz)을 지닌 GIFP 변이 및 GIFP 변이(VR) 제조

PCR을 위한 정방향 프라이머(VR Ck Fw; 서열번호 171) 및 역방향 프라이머(VR KI Rv; 서열번호 171)은 GenBank (Accession No. AK0983225)의 서열에 근거하여 합성하고, 5'말단부위에 코작(kozak)을 지닌 GIFP 변이의 DNA를 증폭하는데 이용하였다.

VR Ck Fw:acgcgtcgaccaccatgatattccgagtcagtg(서열번호 170)은 5'말단부위에 Sal I 인식서열을 첨가하여 제조하고 VR KI Rv:ggccggccctagggcagggccctgcagatgtgagtg(서열번호 171)은 5'말단부위에 Fse I 인식서열을 첨가하여 제조하였다. PCR은 주형으로 GIFP KI 벡터를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Sal I 및 Fse I으로 절단한 후 VR+ kz를 수득하였다.

PCR을 위한 정방향 프라이머(VR Fw; 서열번호 172) 및 역방향 프라이머(VR KI Rv;서열번호 173)은 GenBank (Accession No. AK098225)의 서열에 근거하여 합성하고 GIFP 변이의 DNA를 증폭하는데 이용하였다. VR Fw:atgatattccgagtcagtgccgagggagccag(서열번호 172)는 5'말단부위에 인산을 첨가하여 제조하고, VR KI Rv:ggccggccctagggcagggccctgcagatgtgagtg(서열번호 173)은 5'말단부위에 Fse I 인식서열을 첨가하여 제조하였다. PCR은 주형으로 GIFP KI 벡터를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 제한효소 Fse I을 이용하여 절단한 후 VR을 수득하였다.

도 68C. pCk VR KI 벡터의 구축

VR+ kz는 제한효소 Sal I 및 Fse I으로 미리 절단한 pCkP2+ As KI에 연결시켰다. 그 결과 pCk VR KI 벡터는 VR+ kz를 포함하였고, 이는 GIFP 변이 마우스의 생산에 이용하였다.

B. pPS VR KI 벡터의 구축

GIFP 변이 PS knock-in(pPS VR KI) 벡터(도 69A)의 구축은 후술하는 방법에 따라 실시하고 도 69B-69C에 자세히 설명하였다.

도 69B pPSs3.8 VR의 제조

VR은 제한효소 Sfo I 및 Fse I으로 미리 절단한 pPS3.8에 연결시켰다. 그 결과 pPSs3.8VR은 VR을 포함하였다.

도 69C pPS VR KI 벡터의 구축

pPSs3.8 VR은 Sal I 및 Fse I으로 절단하고 그 결과 약 1.5Kb 길이의 단편을 분리하고 아가로즈 젤 전기영동에서 회수하였다. 1.5Kb 단편은 제한효소 Sal I 및 Fse I으로 미리 절단한 pCkP2 Δ P에 연결시켰다. 그 결과 pPS VR KI 벡터는 1.5Kb 단편을 포함하였고, 이는 GIFP 변이 마우스의 생산에 이용하였다.

C. GIFP 변이 마우스의 생산

마우스 배아의 수득, 배양, 배아로의 ES 세포의 주입, 대리모 태반으로의 이식에 대한 일반적 순서는 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 실시하였다.

pCkVR KI 벡터 및 pPSVR KI 벡터는 Not I로 선 모양으로 만들어서 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 전기천공에 의해 RS-KO 마우스 ES세포로 옮겼다. 전기천공된 RS-KO 마우스 ES 세포는 20 ml ES 배지[DMEM(Gibco), 18% FBS(Gibco), 0.1 mM 2-머캅토에탄올(Gibco), 1000U/ml LIF(leukemia inhibitory factor, Chemicon International, Inc.)에 부유시켰고, 영양(feeder) 세포(Invitrogen)이 미리 뿌려진 두 개의 100mm 조직배양 플라스틱 플레이트(Corning)에 접종하였다. 하루 뒤, 배지는 퓨로마이신 0.75g/ml을 포함하는 배지로 교환하였다. 그 후 7-9일에, pCkVR KI 벡터를 전기천공한 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 형성한 24 콜로니 및 pPSVR KI 벡터를 전기천공한 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 형성한 24 콜로니를 각각 선택하였다. 각 콜로니는 12웰 플레이트에서 키워서, 배양의 2/3는 0.2 ml 세포 보존 배지[FBS+ 10% DMSO(Sigma)]에 부유시켜서 2일간 배양하였다. 그 후, 지놈 DNA를 Puregene DNA 분리 Kit(Gentra System)을 이용하여 분리하였다. 퓨로마이신 내성 RS-KO 마우스 ES 세포로부터 분리한 지놈 DNA는 제한효소 EcoR I(Takara Shuzo)로 절단하여 0.8% 아가로스 젤 전기영동시켰다. 분리한 DNA 단편은 막(GeneScreen, NENTM Life Science Products)에 옮겨서, IgJk-Ck 지놈 DNA(Xho I-EcoR I, 1.3Kb(서열번호 667); WO 00/10383, 실시예 48)로부터 제조한 DNA 단편을 탐침으로 이용하여 혼성화를 실시하였다. Untargeted ES 클론의 밴드 형태는 분자량 15.6Kb의 단일 밴드를 나타내었다. pCkVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론은 분자량 15.6Kb 및 13.1Kb의 두 가지 밴드를 나타내었고, pPSVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론은 분자량 15.6Kb 및 12.9Kb의 두 가지 밴드를 나타내었다. 12개의 pCkVR KI targeted RS-KO 마우스 클론 #3 중 하나를 서던분석(유사체 재조합 비율은 약 37.5%)후에 선택하였고 8 개의 pPSVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론 #14중의 하나를 서던분석(유사체 재조합 비율은 약 25%)후에 선택하였다. 선택한 ES 클론은 또한 1995년 요시다(Yodosha)에 의해 출간된 Aizawa Shinichi, "Biomanual Series 8, Gene Targeting)에 기술된 방법에 따라 핵형 분석에 의해 검사하였다. 정상적인 핵형을 보여주는 하나의 클론인 pCkVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #3 및 하나의 클론인 pPSVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론의 #14는 각기 배아로의 이식에 이용하였다.

pCkVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론#3 및 pPSVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 클론 #14의 동결된 저장고의 세포를 해동시켜서 배양을 시작하고, 면역글로블린 중쇄 녹아웃(knock out) 마우스 중(참조: Tomizuka et. Al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97:722-727, 2000)의 암컷과 수컷을 교미시켜 수득한 8 세포기의 배아에 주입하였다; 주입 비율은 배아마다 10-12세포였다. 배아를 ES 세포를 배반포로 발달시키는 배지에서 밤새 배양시킨 후, 약 10개의 ES 세포 주입한 배아를 대리모 ICR 마우스(Crea Japan, Inc.)의 태반 양 측면에 이식하고, 이는 2.5일간 가임신 처리하였다. 220개의 주입한 배아 각각의 이식 결과로서 68 및 60 마리의 자손 마우스가 각기 태어났다. 자손에서의 키메라 현상은 숙주 배아(ICR)-유래한 알비노(albino) 털 색깔에서 TT2F 세포 유래한 아고우티(agouti) 털 색깔(암갈색)의 정도에 따라 확인하였다. 68 마리 자손 중에서 47 마우스(pCkVR 녹인(knock-in) 마우스)는 부분적인 아고우티(agouti) 털 색깔을 지님을 확인하였는 바, 이는 RS-KO 마우스 ES세포의 분포를 암시하였다. 60마리 자손 중에서, 38 마우스(pPSVR 녹인 마우스)는 부분적인 아고우티(agouti) 털 색깔을 지님을 확인하였고, 이는 RS-KO 마우스 ES 세포의 분포를 암시하였다. GIPF 변이 마우스는 상술한 바와 똑같이 pCkVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 세포 및 pPSVR KI targeted RS-KO 마우스 ES 세포로부터 수득하였다.

마우스는 12/12시간 암/명 주기(8:00am 점등)로 키웠고 5μm 거른 물과 CE-2 먹이(CLEA JAPAN, INC.)을 무작위로 공급하였다. 수컷 마우스는 젖을 뗀 후에 각기 키웠다.

실시예 35: 유전자 도입 GIPF 결실 변이체 KI 마우스를 이용한 GIPF 결실 변이체의 생물학적 활성의 측정

상술한 유전자 도입 마우스의 소장과 결장의 전반적인 병리학 변화 및 조직학적 변화는 아래와 같이 측정하였다. GIPF 결실 변이체-KI(Ckm4-KI 및 PSm4-KI) 마우스는 4 주령에 모았다. GIPF 결실 변이체-KI 위장관의 전반적인 모습은 대조군과 비교했을 때 거의 차이가 없었다(참조: 도 72). 조직병리학 측정을 위해, 위장관을 추출하여 포르말린에 고정시켰다. 파라핀 포매한 절편은 조직학적 측정을 위해 H&E 염색하였다. 소장의 H&E 절편은 도 73(저배율) 및 도 74(고배율)에 나타내었다.

GIPF 결실 변이체-KI 마우스의 소장으로부터의 H&E 절편은 대조군과 비교했을 때 약간의 소낭선 길이 및 수의 증가를 확인하였다. PSm4-KI의 소낭선 길이와 수의 증가는 Ckm4-KI보다 큰 경향이 있었다.

GIPF 결실 변이체 #4 유전자 발현 및 β-카테닌 targeted 액신-2 유전자 발현은 GIPF 결실 변이체 KI 마우스에서 유래한 소장 및 결장 시료를 이용하여 분석하였다. 50mg의 회장, 결장 및 간 시료를 추출하여 액체질소를 이용해 급속 냉동시켰다. 냉동시킨 절편은 1ml ISOGEN(Nippon Gene)으로 균질화시켰고 전체 RNA를 적절한 조건에서 추출하였다. 지놈 DNA를 제거하기 위해, RNA 용액은 DNase(WAKO; Deoxyribonuclease RT grade)로 37℃에서 15분간 처리하였다. 그후 전체 RNA를 적절한 조건에서 RNasy Mini(Qiagen)으로 정제하였다. 각 시료에 대하여, cDNA는 적절한 조건에서 SuperScript

III(Invitrogen)을 이용하여 500ng 전체 RNA로부터 합성하였다. 그 후, 남아 있는 RNA를 제거하기 위해 cDNA를 1 unit의 RNaseH(Invitrogen)을 37°C에서 20분간 처리하였다. PCR은 주형으로 합성한 cDNA를 이용하여 실시하였다. 아래의 두 프라이머는 GIPF 결실 변이체의 확인에 이용하였다.

PSm4RT F1:atcaaggggaaaaggcagag(서열번호 174)

Ck폴리A R2:cgcttggtgggaagcctccaagacc(서열번호 175)

액신-2를 확인하기 위해, 아래의 두 프라이머를 이용하였다.

액신-2 F(MUS):caggagcctcacccttcg(서열번호 138)

액신-2 R(MUS):acgccgaggtgcttgccc(서열번호 139)

마우스 GAPDH 프라이머는 일상적인 유전자 발현의 확인에 이용하였다.

mGAPDH5:caccatggagaaggccggggccac(서열번호 140)

mGAPDH3:atcatacttggcaggtttctccagg(서열번호 141)

PCR 반응 혼합물은 25 μ l가 되도록 2.5 μ l 10X LA PCR 완충액 II(Takara Shuzo), 4 μ l 2.5mM dNTP 혼합물(Takara Shuzo), 0.5 μ l 10mM 프라이머, 멸균 증류수로 희석시킨 2 μ l 10X cDNA 및 0.5 μ l LA Taq(Takara Shuzo)에 멸균 증류수를 첨가하여 제조하였다. GIPF 결실 변이체 및 액신-2를 확인하기 위해, PCR 반응 혼합물은 94°C에서 2분간 배양하고, 33 사이클 반응을 94°C 30초, 60°C 30초, 및 72°C 30초로 실시하였다. GAPDH 확인을 위해, PCR 반응 혼합물을 94°C에서 2분간 배양하고, 22 사이클의 반응을 94°C 30초, 65°C 30초 및 72°C 30초로 실시하였다.

GIPF 결실 변이체 유전자 발현은 PSm4-KI 마우스의 회장과 결장에서 확인하였다. 액신-2의 발현 정도는 대조군과 비교했을 때 PSm4-KI 마우스에서 증가하였다(도 75). 이러한 자료는 GIPF 결실변이체가 β -카테닌 목표 유전자 발현 및 β -카테닌 신호전달 경로의 아래 부분의 활성화시키는 능력을 지니고 있음을 암시하였다.

그래서, 이 결과는 GIPF 결실 변이체 #4SMS β -카테닌 신호전달 경로를 촉진시키는 활성을 지님을 암시하였다.

실시예 36: 유전자 도입 GIPF 변이체-KI 마우스를 이용한 GIPF 변이체의 생물학적 활성의 측정

상술한 유전자 도입 마우스로부터의 소장과 결장의 전반적인 병리적 변화 및 조직학적 변화는 아래와 같이 측정하였다. GIPF 변이체-KI(CkVR-KI 및 PSVR-KI)마우스는 4 주령에 모았다. 모은 PSVR-KI의 전반적 모습은 대조군 마우스와 비교했을 때 현저한 장 비정상 팽창 및 증가한 소장 크기를 보여주었다(참조: 도 76). 조직병리학적 측정을 위해, 위장관을 추출하여 포르말린에 고정시켰다. 파라핀 포매한 절편은 조직학적 측정을 위해 H&E 염색하였다. 소장의 H&E 절편은 도 77(저배율) 및 도 78(고배율)에 나타내었다.

소장의 H&E 절편은 PSVR-KI와 대조군 사이의 현저한 차이를 확인하였다. 도 76에서 보듯이, PSVR-KI의 소낭선 세포 과성장은 대조군 마우스와 비교했을 때 소낭선 길이 및 파네트(Paneth) 세포의 증가를 보여 주었다. 달리 말해서, CkVR-KI는 명백한 장의 비정상팽창 및 소낭선 길이의 증가를 보여주지 않았다(결과는 나타내지 않음). CkVR-KI 및 PSVR-KI의 관찰한 표현형의 차이는 그들의 KI-벡터 구조의 차이 때문임을 확인하였다.

GIPF 변이체 유전자발현 및 β -카테닌의 목표인 액신-2 유전자 발현은 GIPF 변이-KI 마우스에서 유래한 소장 및 결장 시료를 이용하여 분석하였다. 50mg 회장, 결장 및 간 시료를 추출하여 액체질소를 이용해 급속냉동시켰다. 냉동 절편은 1ml ISOGEN(Nippon Gene)으로 균질화시켰고, 전체 RNA는 적절한 조건에서 추출하였다. 지놈 DNA를 제거하기 위해, RNA 용액은 37°C에서 15분간 DNase(Wako; Deoxyribonuclease RT grade)를 처리하였다. 그후, 전체 RNA는 적절한 조건에서 RNasy Mini(Qiagen)으로 정제하였다. 각 시료에 대하여, cDNA는 적절한 조건에서 Super Script III(Invitrogen)을 이용하여 500ng 전체 RNA로부터 합성하였다. 그 후, 잔여 RNA를 제거하기 위해 cDNA를 37°C에서 20분간 1unit RNase H(Invitrogen)으로 처리하였다. PCR은 주형으로 합성한 cDNA를 이용하여 실시하였다. 아래의 두 프라이머는 GIPF 변이체를 확인하기 위해 이용하였다.

PSFLJRT F1:ataacttctgcaccaagtgtgaagga(서열번호 176)

Ck폴리A R2:cgcttggtggggaagcctccaagacc(서열번호 175)

액신-2의 확인을 위해 아래의 두 프라이머를 이용하였다.

액신-2 F(MUS):caggagcctcacccttcg(서열번호 138)

액신-2 R(MUS):acgccgaggtgcttgccc(서열번호 139)

마우스 GAPDH 프라이머는 일상적인 유전자 발현의 확인에 이용하였다.

mGAPDH5:caccatggagaaggccggggccac(서열번호 140)

mGAPDH3:atcatacttgccaggtttctccagg(서열번호 141)

PCR 반응 혼합물은 25 μ l가 되도록 2.5 μ l 10X LA PCR 완충액 II(Takara Shuzo), 4 μ l 2.5mM dNTP 혼합물(Takara Shuzo), 0.5 μ l 10mM 프라이머, 멸균 증류수로 희석시킨 2 μ l 10X cDNA 및 0.5 μ l LA Taq(Takara Shuzo)에 멸균 증류수를 첨가하여 제조하였다. GIPF 변이체 및 액신-2의 확인을 위해, PCR 반응 혼합물은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 배양하고, 33 사이클의 반응은 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초 및 72 $^{\circ}$ C 30초간 실시하였다. GAPDH 확인을 위해, PCR 반응 혼합물은 94 $^{\circ}$ C 2분간 배양하고, 23 사이클 반응은 94 $^{\circ}$ C 30초, 65 $^{\circ}$ C 30초 및 72 $^{\circ}$ C 30초 간 실시하였다.

GIPF 변이체 유전자 발현은 PSVR-KI 마우스의 회장과 결장에서 확인하였다. 액신-2의 발현수준은 대조군과 비교했을 때 PSVR-KI 마우스에서 증가하였다(참조: 도 79). 이러한 자료는 GIPF 변이체는 β -카테닌 목표 유전자 발현의 유도 및 β -카테닌 신호전달 경로의 아래 부분 활성화시키는 능력을 지님을 암시하였다.

그래서 GIPF 변이체는 β -카테닌 신호전달 경로를 촉진시키는 능력이 있음을 나타내었다.

실시예 37: CD4+ CD45RBhighT-세포 운반 모델

면역 결핍 SCID 마우스로 CD4+ CD45RBhighT 림프구 셋트를 옮김으로써 생기는 염증성 장질환과 유사한 만성 장 염의 유발은 아란다 등(Aranda et al.)이 보고하였다(참조: J. Immunol 158:3464-3473). 따라서, 면역적으로 유발한 대장염에 대한 GIPF의 치료 효능은 아래와 같이 CD4+ CD45RBhighT 운반한 모델에서 검사하였다.

성숙한 암컷 C.B-17/Icr Crj-scid 마우스(Charles River Japan, Inc.)는 7주령이 되어서 이용하였다. 임신한 마우스로부터 분만시 및 실험 이전에, 동물은 일주기성 리듬을 안정시키기 위해 각각의 환기되는 케이지에서 12시간 명:암 주기로 2주간 키웠다. 동물은 먹이와 물을 임의로 공급하였다.

세포를 운반하는 날에(0일째), CD4+ CD45RBhighT세포를 20 BALB/c 암컷 마우스 비장으로부터 모았다. 비장세포는 2% FBS, 2mM EDTA, PBS 분류 완충액에 부유시키고, CD4 양성 세포는 FACS(Becton Dickinson FACS Aria)에 의해 분류하였다. 그 후, 분류한 CD4 양성 세포는 분류 완충액(sorting buffer)에 2X10⁷ 세포/ml로 부유시키고, CD4 양성 및 CD45RBhigh 세포 분획을 제어(gate)하였다. 모은 CD4+ CD45RBhighT세포를 원심분리하여, 6ml PBS에 1.1X10⁶ 세포/ml 농도로 부유시켰다. 4.5X10⁵ 세포 / 마우스의 CD4+ CD45 RBhighT 세포는 13마리 암컷 C.B-17/Icr Crj-scid/scid 마우스에 복강으로 주입하였다.

T 세포 주입후, 혈청 아밀로이드(amyloid) A(SAA) 농도를 염증 진행에 대하여 관찰하였다. 또한, 대장염의 진행은 체중 감소, 대변(stool) 일치 및 잠재(occult) 혈액 시험에 의해 관찰하였다. SAA 농도는 주입후 7일로부터 증가하였고, 염증은 T 세포 주입한 마우스에서 명백하였다. T세포 주입후 12일에, 묽은 대변(loose stool) 및 잠재(occult) 혈액양성 개체가 나타났다. T세포 주입후 30일에, 설사 및 전반적 출혈을 T 세포 주입한 마우스를 관찰하였다. 또한 40일에, 체중감소를 T 세포 주입한 마우스에서 관찰하였다. T 세포 주입후 61일에, 100ug/GIPF 투여량은 T세포 주입한 마우스의 3일-4일 동안 정맥내 주입하였다. 또한, PBS는 음성 대조군으로서 T 세포 주입한 마우스 3마리에 대하여 3일간 정맥 주입하였다. T 세포 주입 후 70일에, 이 동물들을 희생시켰다. 장을 추출하여 포르말린에 고정시켰다. 파라핀 포매한 절편은 조직학적 측정을 위해 H&E 염색시켰다.

도 80에서 보듯이, GIPF 100ug/투여량을 주입한 대장으로부터의 절편에 대한 H&E 염색은 PBS 주입한 마우스와 비교했을 때, 명백한 선 구조, 분열세포 수의 증가 및 세포괴사 세포괴편의 감소를 나타내었다. T 세포 주입에 의해 나타나는 대장 점막염에서의 조직병리학적 변화는 실제적으로 GIPF 주입에 의해 감소하였다.

산업상 이용 가능성

따라서, GIPF는 크론병을 포함하는 염증성 장질환에 의해 나타나는 대장염으로부터 고통받는 환자를 치료하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 DNA 서열(서열번호 2)(A)과 이에 상응하는 전체길이 GIPF의 아미노산 서열(서열번호 4)(B)을 도시한다. 서열번호 2는 개방해독틀(open reading frame)와 융합된 비전사부위인 5'말단과 3'말단을 포함한다.

도 2는 사람(A)과 마우스(B)로부터 수득한 조직에서 GIPF mRNA의 발현을 도시한다.

도 3은 본 발명의 조성물의 GIPF 폴리펩티드의 모식도이다. 밑줄친 숫자는 폴리펩티드의 서열번호에 상응하고, 나머지 숫자는 암호화하는 염기서열의 서열번호이다.

도 4a는 서열번호 2 또는 3에 의하여 암호화된 GIPF 단백질(예를 들어, 서열번호 4)과 사람의 줄기세포 성장인자 A1 서열번호 23(WO 01/77169의 서열번호 10) 사이의 블라스트 아미노산 서열 정렬을 나타내며, 상기 서열번호 4의 251번부터 10개의 아미노산 잔기와 서열번호 23의 257번 부터 11개의 아미노산 잔기는 63%의 유사성을 나타내고, 상기 서열번호 4의 251번부터 10개의 아미노산 잔기와 서열번호 23의 257번 부터 11개의 아미노산 잔기는 46%의 동일성을 나타낸다.

도 4b는 서열번호 2 또는 3에 의하여 암호화된 GIPF 단백질(예를 들어, 서열번호 4)과 사람의 트롬보스폰딘 1(SwissProt Accession No. P07996의 657번 부터 501개의 아미노산 잔기; 서열번호 28) 사이의 블라스트 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 상기 도면에서 상기 서열번호 4의 166번부터 14개의 아미노산 잔기와 서열번호 28의 657번 부터 501개의 아미노산 잔기는 36%의 유사성과 26%의 동일성을 나타내고, 이때 A=알라닌, C=시스테인, D=아스파르트산, E=글루탐산, F=페닐알라닌, G=글리신, H=히스티딘, I=이소류신, K=리신, L=류신, M=메티오닌, N=아스파라긴, P=프롤린, Q=글루타민, R=아르기닌, S=세린, T=트레오닌, V=발린, W=트립토판, Y=타이로신. 겹은 대쉬로 표시된다.

도 5A-5R은 본 발명의 GIPF 억제(GIPF-KI) 벡터의 제조에 사용되는 방법의 각 단계를 도시한다. 또한, 그들의 B 세포에서 GIPF를 발현시키는 형질전환 마우스의 제조를 위한 바람직한 방법이 기재되어 있다.

도 6은 상동 재조합의 결과에서 선택되는 ES 클론에 대한 서던블롯에 사용되는 프로브의 위치뿐만 아니라, 상동 또는 비상동 재조합된 마우스 게놈 DNA의 EcoRI 절단 절편의 크기를 도시한다.

도 7은 GIPF-KI 마우스(대조군 A, GIPF-KI B)의 장관의 총체적 병리증상을 나타낸다.

도 8은 각각 GIPF-KI 마우스(A) 및 대조군 키메라 마우스(B)의 소장의 횡단면의 H&E 염색을 나타낸다.

도 9는 고배율하에서 도 8에 도시된 장 절편의 H&E 염색을 나타낸다. 패널 A 및 C는 도 8의 패널 A에 도시된 GIPF-KI 절편에 상응하고, 패널 B 및 D는 도 8의 패널 B에 도시된 대조군 키메라 마우스의 장 절편에 상응한다.

도 10은 대조군 키메라 마우스(A 및 C) 및 GIPF-KI 마우스(B 및 D)의 소장의 단면의 Ki67 염색을 나타낸다.

도 11은 대조군 마우스(A 및 C) 및 1×10^{10} 바이러스 입자로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장의 단면을 나타낸다. 상기 단면은 각각 아무것도 주입하지 않거나 또는 GIPF 아데노바이러스를 주입하고 3일이 경과한 후에 얻어진다.

도 12는 대조군 마우스(A 및 C) 및 1×10^{10} 바이러스 입자(VP)로 처리된 마우스(도 12의 B 및 D)의 소장의 단면을 나타낸다. 상기 단면은 각각 아무것도 주입하지 않거나 또는 GIPF 아데노바이러스를 주입하고 5일이 경과한 후에 얻어진다.

- 도 13은 대조군 마우스(A 및 C) 및 1×10^{10} 바이러스 입자(VP)로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장의 증식하는 소낭선 세포에의 BrdU의 도입결과를 나타낸다.
- 도 14는 대조군 마우스(A 및 C) 및 GIPF 아데노바이러스로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장의 증식하는 소낭선 세포의 Ki67 염색결과를 나타낸다.
- 도 15는 대조군 마우스(A 및 C) 및 1×10^9 입자의 GIPF 아데노바이러스로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 16은 대조군 마우스(A 및 C) 및 GIPF 아데노바이러스로 처리된 마우스(B 및 D)의 대장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 17(A 및 B)은 CHO 세포에서 정제된 천연 V5-His-표지된 GIPF 단백질의 용해성 분석결과를 나타낸다.
- 도 18(A 및 B)은 마우스 혈청에서 V5-His-표지된 GIPF 단백질의 약동학적 분석결과를 나타낸다.
- 도 19는 대조군 마우스(A 및 C) 및 정제된 GIPF 단백질로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 20은 대조군 마우스(A 및 C) 및 정제된 GIPF 단백질로 처리된 마우스(B 및 D)의 소장의 증식하는 소낭선 세포에의 BrdU의 도입결과를 나타낸다.
- 도 21은 대조군 마우스(A) 및 정제된 GIPF 단백질로 처리된 마우스(B)의 대장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 22는 대조군 마우스(A 및 C) 및 정제된 GIPF 단백질로 처리된 마우스(B 및 D)의 대장의 증식하는 소낭선 세포에의 BrdU의 도입결과를 나타낸다.
- 도 23은 방사능이 조사되지 않은 마우스(A), 생리식염수(B), KGF(C) 또는 GIPFwt(D)로 처리되고 방사능이 조사된 마우스의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 24는 정상 및 GIPFwt를 수용하는 마우스에서 종양의 크기에 미치는 5-FU의 효과를 나타낸다.
- 도 25는 정상(E 및 F) 및 종양(A 내지 D)을 지닌 마우스의 소장 및 대장의 총체적 병리증상에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.
- 도 26은 5-FU 및/또는 GIPF를 수용하는 정상 및 종양을 지닌 마우스의 소장 및 대장의 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 27은 용모의 길이와 소낭선의 깊이의 미세형태 측정값은 5-FU를 수용한 마우스의 소장상피에 대한 GIPF의 효과를 나타낸다.
- 도 28은 대조군(A 및 B) 및 KGF 또는 GIPF로 처리하고(C 및 D), 몸 전체에 방사능을 조사한 마우스의 혀 배면의 증식하는 상피세포의 Ki67 염색결과를 나타낸다.
- 도 29는 대조군(A 및 B) 및 KGF 또는 GIPF로 처리하고(C 및 D), 몸 전체에 방사능을 조사한 마우스의 혀 복면의 증식하는 상피세포의 Ki67 염색결과를 나타낸다.
- 도 30은 KGF 또는 GIPF를 처리하고, 몸 전체에 방사능을 조사한 마우스의 혀의 배면상피의 증식지표를 나타낸다.
- 도 31은 DSS 및/또는 GIPF를 수용하는 마우스의 소장 및 대장의 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.
- 도 32는 DSS에 의해 유발된 대장염 마우스의 염증성 장질환 활성지표(IBDAI)에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 33은 DSS에 의해 유발된 대장염 마우스에서 동물 체중값에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 34는 DSS에 의해 유발된 대장염 마우스에서 대변의 농도 값에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 35는 DSS에 의해 유발된 대장염 마우스에서 직장출혈 값에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 36은 대조군과 DSS-처리된 마우스의 소장 및 대장의 총체적 병리증상에 미치는 사람 및 마우스 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 37은 DSS 및/또는 GIPF를 수용하는 마우스의 소장 및 대장의 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.

도 38은 용모의 길이와 소낭선의 깊이의 미세형태 측정값은 DSS로 유발된 대장염 마우스의 장상피에 대한 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 39는 DSS 및/또는 GIPF를 수용하는 마우스의 소장 및 대장의 증식하는 소낭선 세포에의 BrdU의 도입결과를 나타낸다.

도 40은 DSS에 의해 유발된 대장염 동물의 소장상피의 증식에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 41은 사람의 내분비 및 신장상피세포에서 β -카테닌의 안정성에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다. GIPF는 HEK293 세포에서 β -카테닌의 투여량 의존형(A) 및 시간 의존형(B) 안정성을 유발시킨다. 상기 GIPF의 안정성 효과는 가열에 의하여 제한되지 않는다(C)

도 42는 GSK3 β 의 인산화에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 43은 안정된 β -카테닌에서 GIPF의 변이영역의 능력을 결정하도록 고안된 GIPF 폴리펩티드 유도체의 모식도. 절편 1-11은 각각 서열번호 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103 및 105의 폴리펩티드에 상응한다.

도 44는 도 43에 도시된 GIPF 유도체에 의한 β -카테닌의 안정성을 나타낸다.

도 45는 마우스의 소장의 총체적 병리증상에 미치는 사람 및 마우스 GIPF의 활성을 비교한 결과를 나타낸다.

도 46은 소낭선 깊이에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 47은 분리된 소낭선 세포에서 β -카테닌의 안정성에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 48은 TNBS에 의해 유발된 대장염을 갖는 동물의 체중에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 49는 TNBS에 의해 유발된 대장염을 갖는 동물의 대장염의 조직학적 등급(colitis score)에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 50은 DSS에 의해 유발된 만성 대장염에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 51은 DSS에 의해 유발된 만성 대장염 동물의 용모길이 및 소낭선 깊이에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 52는 DSS에 의해 유발된 만성 대장염 동물의 소낭선 증식지표에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 53은 방사능조사 이후의 소낭선의 생존에 미치는 GIPF의 효과를 나타낸다.

도 54 A-N: 형질전환 마우스의 상피에서 GIPF의 빌린-유도발현을 위한 전이 유전자의 구조를 나타내는 그림이다.

도 55는 형질전환 마우스의 소장상피 및 간에서의 GIPF의 배아발현을 나타낸다.

도 56은 GIPF를 발현하는 형질전환 마우스에서 β -카테닌의 안정성을 나타낸다.

도 57은 GIPF를 발현하는 형질전환 마우스의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.

도 58 A-C: 형질전환 마우스에서 GIPF와 Wnt3a의 발현-유도발현을 위한 전이 유전자의 구조를 나타내는 그림이다.

도 59는 형질전환 마우스의 소장 및 대장에서 GIPF와 Wnt3a의 배아발현을 나타낸다.

도 60은 GIPF와 Wnt3a를 발현하는 형질전환 마우스 에서 β -카테닌의 안정성.

도 61은 GIPF와 Wnt3a를 발현하는 형질전환 마우스 배아의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다.

도 62 A-K: RS- KO 벡터의 구조를 나타내는 그림이다.

도 63은 야생형 및 재조합 RS-KO 클론의 유전자 지도이다.

도 64 A-K: 형질전환 마우스에서 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하기 위한 녹인 벡터 pCk m4 KI의 구조를 나타내는 그림이다.

도 65 A-C: 형질전환 마우스에서 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하기 위한 녹인 벡터 pPS m4 KI의 구조를 나타내는 그림이다.

도 66은 야생형 및 재조합 PS m4 KI 클론의 유전자 지도이다.

도 67은 야생형 및 재조합 PS m4 KI 클론의 유전자 지도이다.

도 68 A-C: 형질전환 마우스에서 GIPF 변이체(서열번호 177은 GenBank Accession No. AK098225)를 발현하기 위한 녹인 벡터 pCk VR KI의 구조를 나타내는 그림이다.

도 69 A-C: 형질전환 마우스에서 GIPF 변이체(서열번호 177은 GenBank Accession No. AK098225)를 발현하기 위한 녹인 벡터 pPS VR KI의 구조를 나타내는 그림이다.

도 70은 야생형 및 재조합 Ck VR KI 클론의 유전자 지도이다.

도 71은 야생형 및 재조합 PS VR KI 클론의 유전자 지도이다.

도 72는 대조군 및 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하는 형질전환 마우스의 소장 및 대장을 비교한 결과를 나타낸다.

도 73은 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하는 형질전환 마우스의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다(저배율).

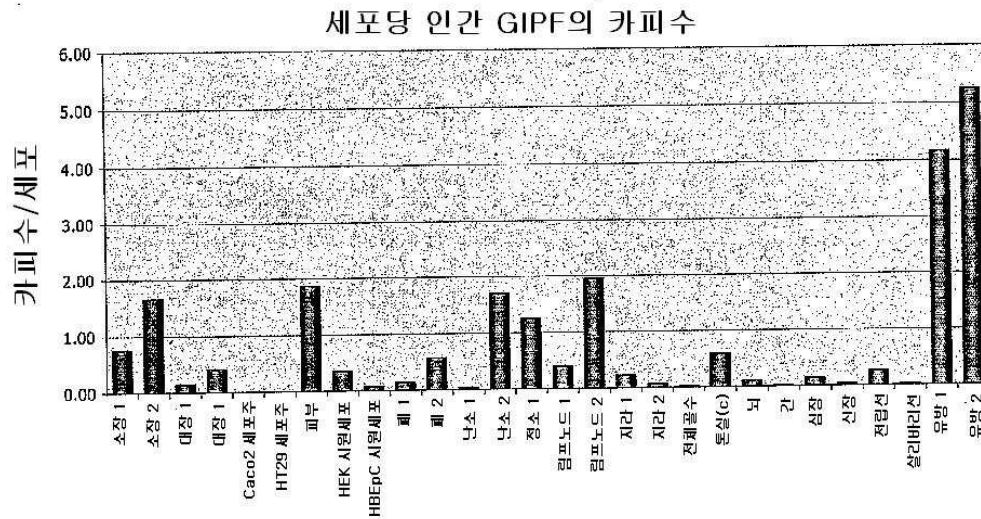
도 74는 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하는 형질전환 마우스의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다(고배율).

도 75는 GIPF 결실 돌연변이체(서열번호 91)를 발현하는 형질전환 마우스에서의 액신-2의 안정성을 나타낸다.

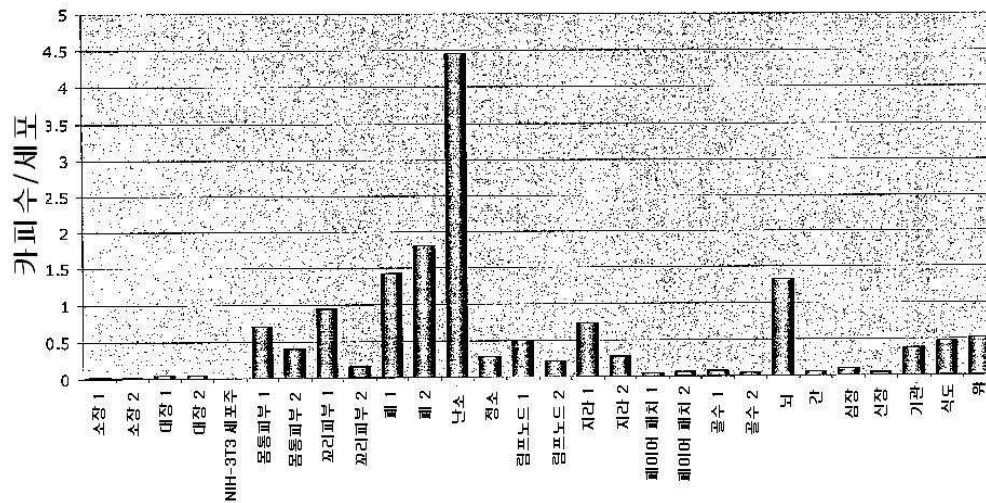
도 76은 대조군 및 GIPF 변이체(서열번호 177은 GenBank Accession No. AK098225)를 발현하는 형질전환 마우스 (PSVR KI)의 소장 및 대장을 비교한 결과를 나타낸다.

도 77은 대조군 및 GIPF 변이체(서열번호 177은 GenBank Accession No. AK098225)를 발현하는 형질전환 마우스 (PSVR KI)의 소장 절편의 H&E 염색결과를 나타낸다(저배율).

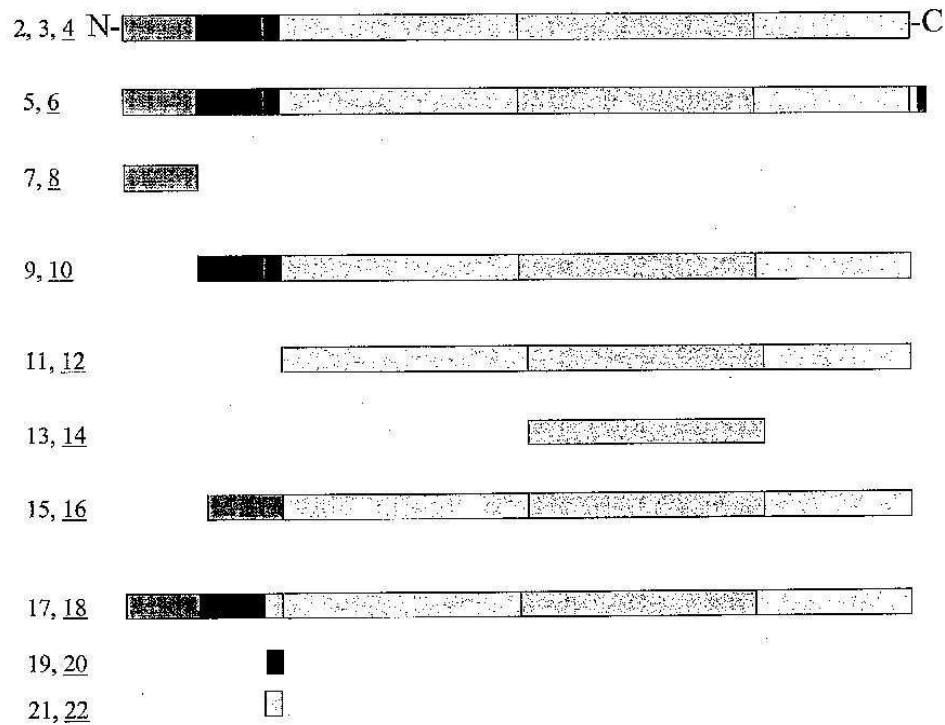
도면2a



도면2b



도면3



도면4a

```

>gi|18490982|ref|NP_116173.2| 트롬보스폰딘; 트롬보스폰딘-유사
    유전자[호모 사피엔스]
gb|AAK34947.1|AF251057.1 트롬보스폰딘[호모 사피엔스]
gb|AAH22367.1| 트롬보스폰딘[호모 사피엔스]
    길이 = 272

점수 = 252 bits (644), 기대값 = 4e-56
동일성 = 116/252 (46%), 긍정값 = 159/252 (63%), 갭 = 15/252 (5%)

Query: 10  LVLSTWTLTISRGIGKRRRISAEQSQAQKGCSEVNGCLKCSFKLFILERNDI 69
      ++L++ S +G+RQRR+ SQ C GC CS+ NGCL C P+LP LER +
Sbjct: 11  IILNFMETIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSGCGGCATCSDVNGCLSKPRLFFALERIGM 70

Query: 70  RQVGVCCLFSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACPSHNPCTKCKEGLYLHKGRCPAC 129
      +Q+GVCL SCP GY+ R PD+NKC KCK + C+ CF+ NFCTRCK G YLH G+C C
Sbjct: 71  KQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKAD-CDTCFNKNPCTKCKSGFYLLGKCLDNC 129

Query: 130  PEGSSAANGTMECSSPAQCSEMSWPWGPCSKKQQLCGFRRGSEEBTRRVLHAPVGDHAA 189
      PEG A N TMEC S CE+SEW+PW PC+KK + CGF+RG+E R R ++ P
Sbjct: 130  PEGLEANNETMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFRRGTETRVRETIQHPSAKGNL 189

Query: 190  CSDTKETRRTCTVRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANENLARKESKEAGAGSR----- 240
      C T ETR+CTV+R C +G++ +KG + +R+ N+ ESKEA S+
Sbjct: 190  CPPTNETRKCTVQRKKQKGERGKGRERKRKKPNKG----ESKEA PDEKSLESSKEIP 245

Query: 241  -RRKQQQQQQQ 251
      +R+ +QQQ+++
Sbjct: 246  BQRENKQQQKKR 257
  
```

도면4b

```
>sp|P07996|TSP1_인간 트롬보스폰딘 1 전구체 - 호모 사피엔스
(인간) _from.residues_501-through-657
길이 = 157

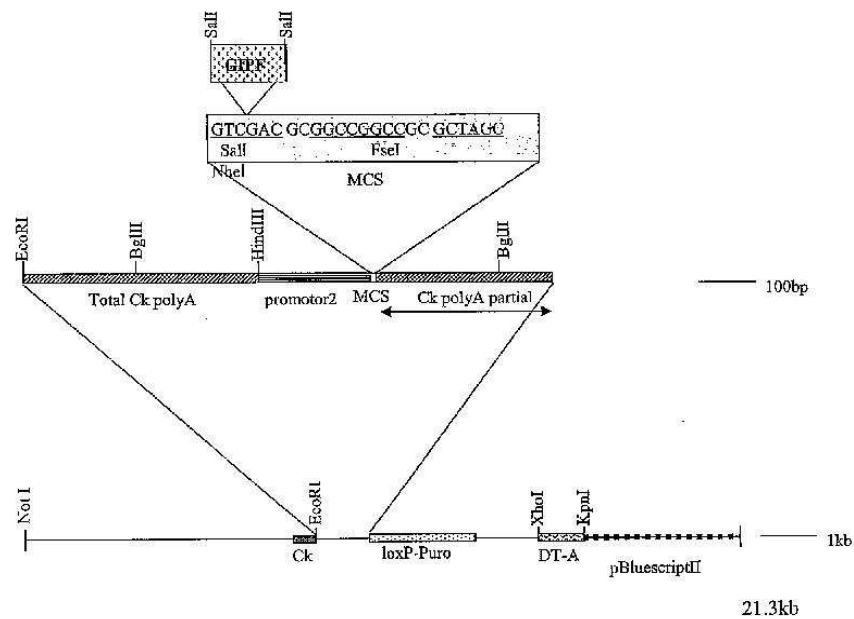
점수 = 73 (30.8 bits), 기대값 = 1.0e-05, P = 1.0e-05
상동성 = 38/165 (23%), 긍정값 = 61/165 (36%)

Query: 14 WTHLTSSRGIKGKRQRISAEQSQACAKGC-----ELCSE---VNGCLKCSPKLF 62
      W   +++ G  KR R  +   Q  K  C   ++C++   ++GCL  +P  F
Sbjct: 501 WDICSVTCGGGVQKRRLCNPPTQFGGKDCVGDVTENQICNKQDCPIDGCLS-NP-CFA 58

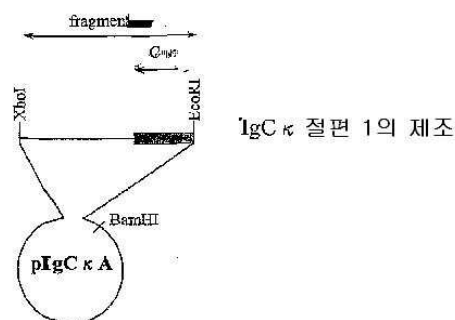
Query: 63 LLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFTCKCKEGLYLHK 122
      ++          +CPFGY          +CK E  +ACP+HN  +C+
Sbjct: 59 GVKCTSYPDGSWKCGACPPGY-SGNGIQCTDVDECK-EVPDACFNHNGEHCEN---TDP 113

Query: 123 G-RCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLC 166
      G  C  P  CP  + +  +  A   P  PC+   C
Sbjct: 114 GYNCLP-CPPRFTGSQPFQGVGHATANKQVCKPRNPCTDGTDC 657
```

도면5a

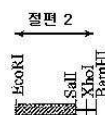


도면5b

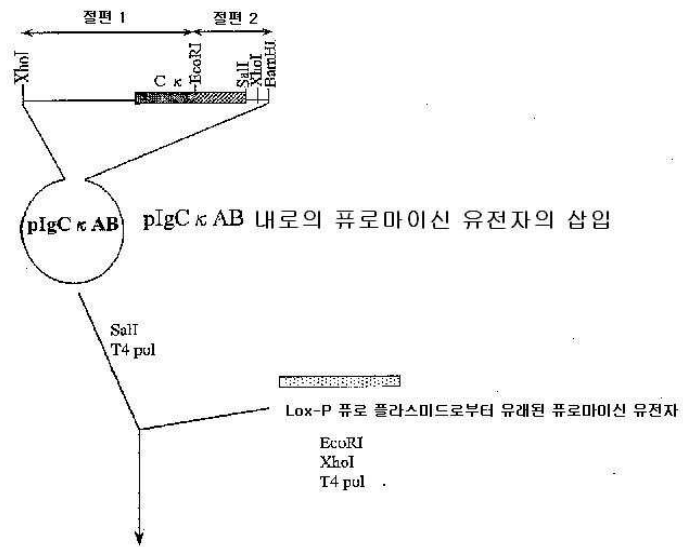


도면5c

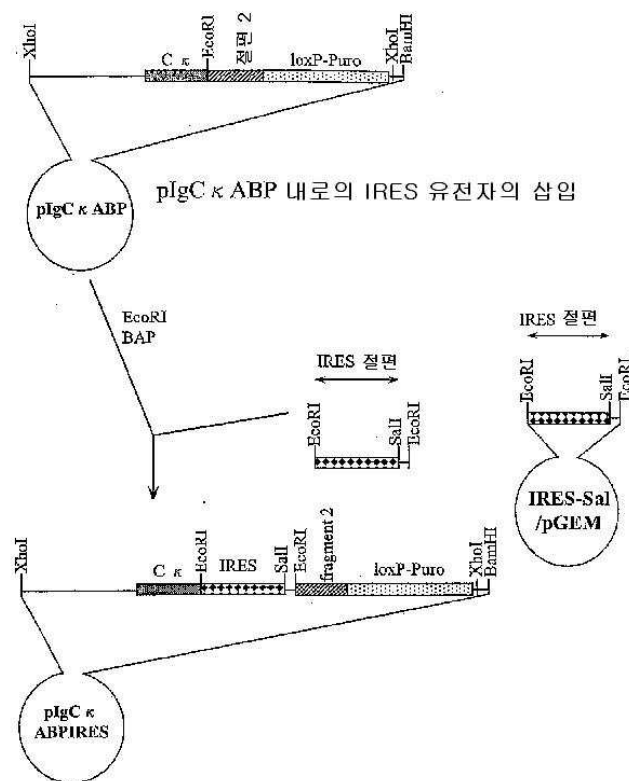
IgC kappa 절편 2의 제조



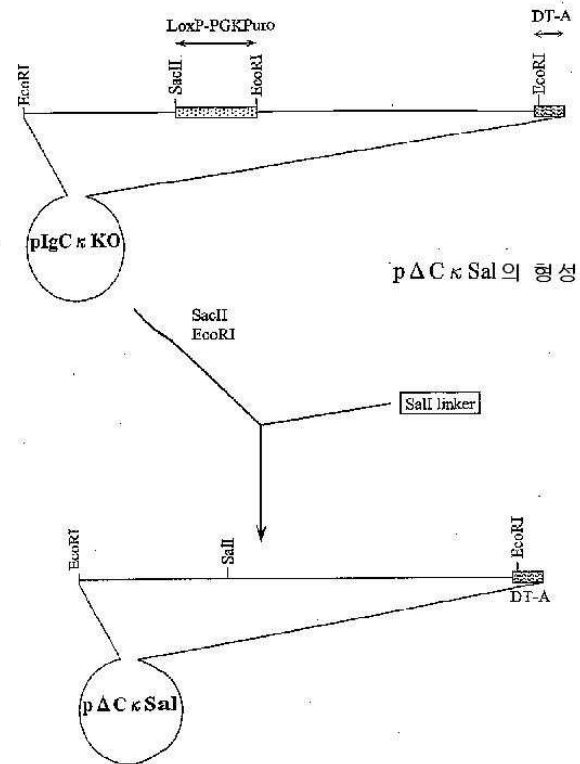
도면5d



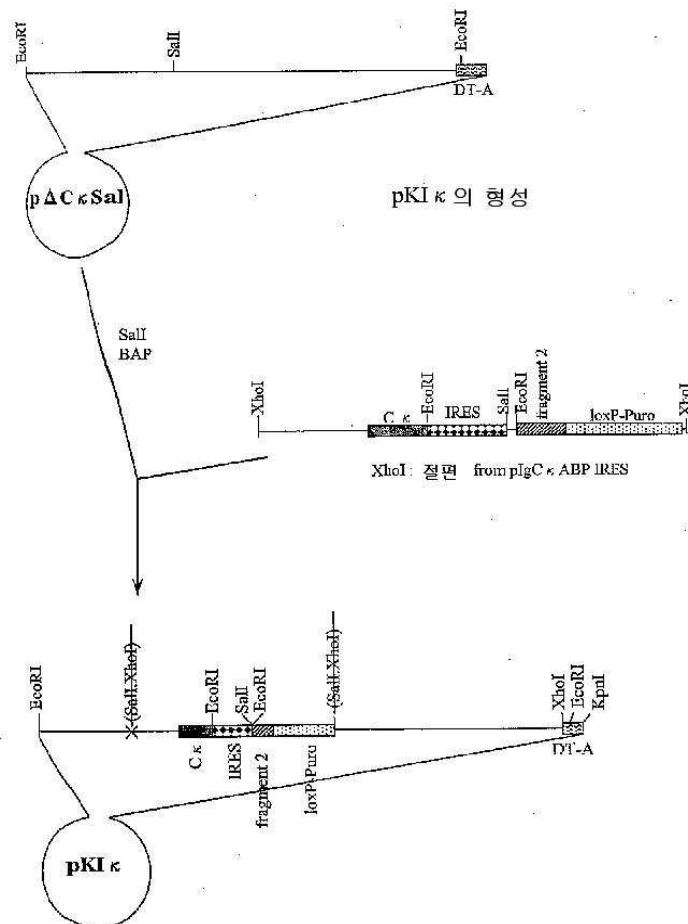
도면5e



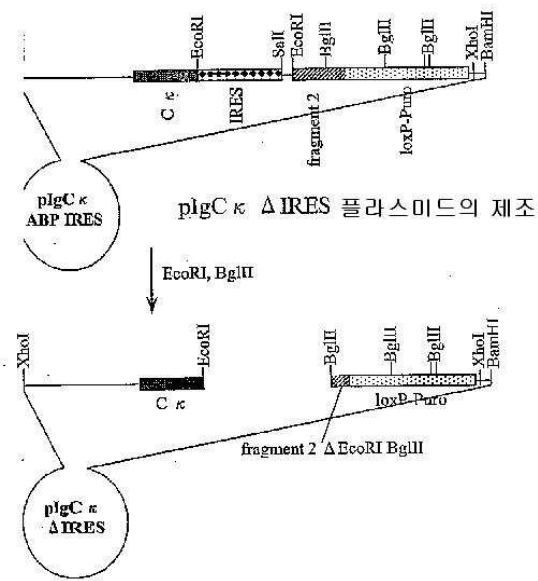
도면5f



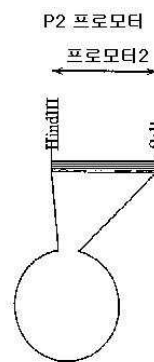
도면5g



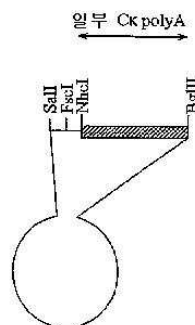
도면5h



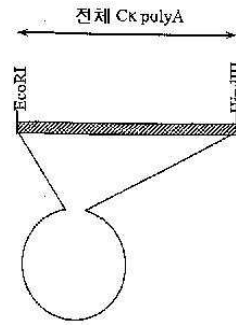
도면5i



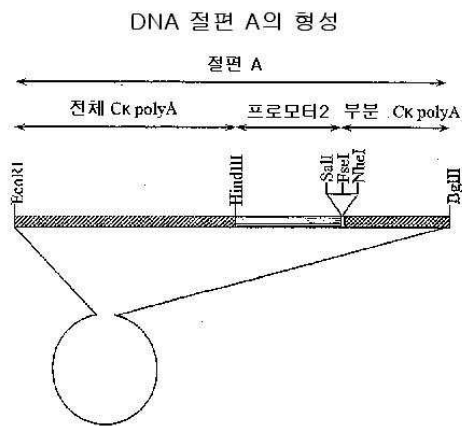
도면5j



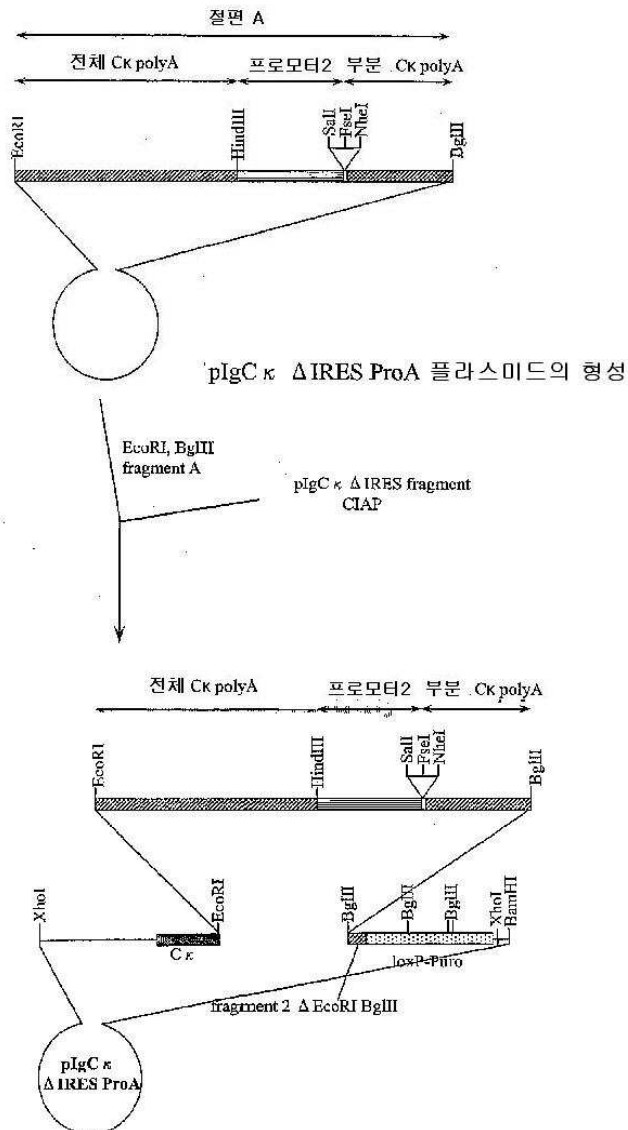
도면5k



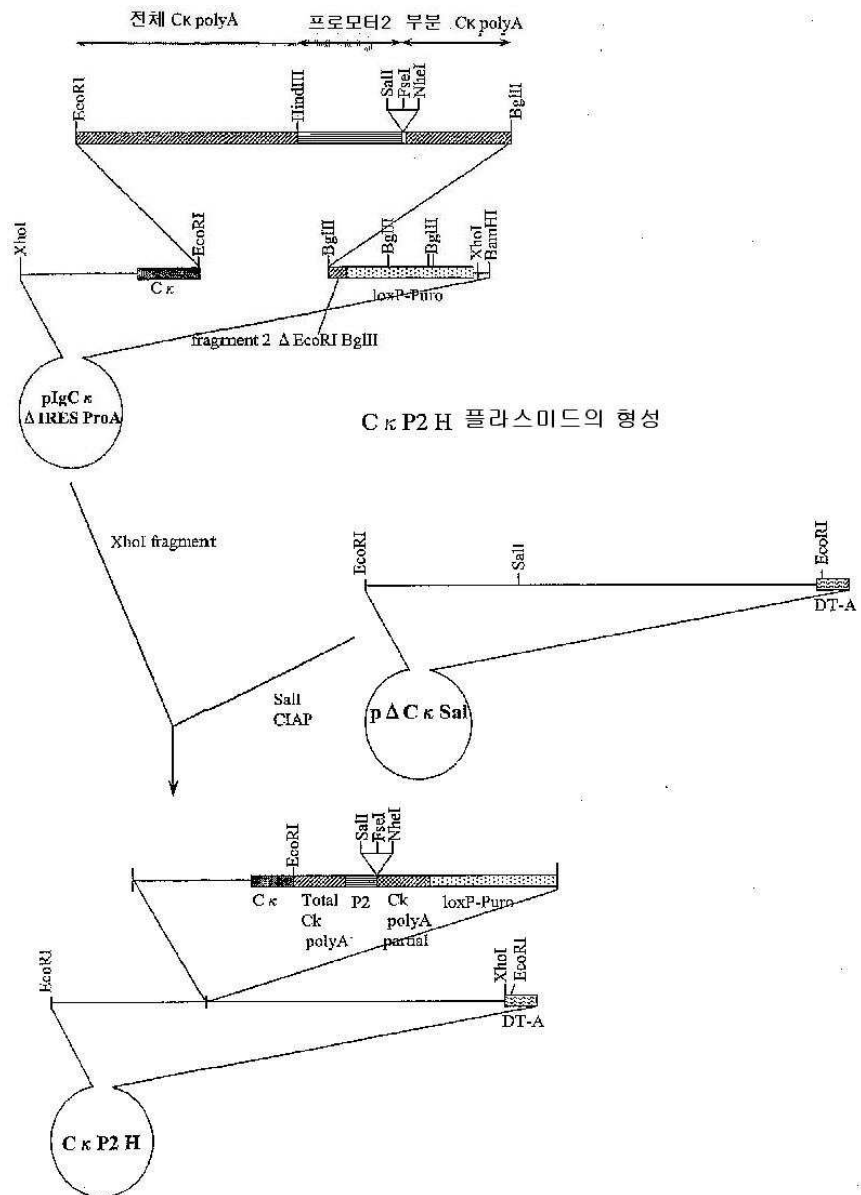
도면5l



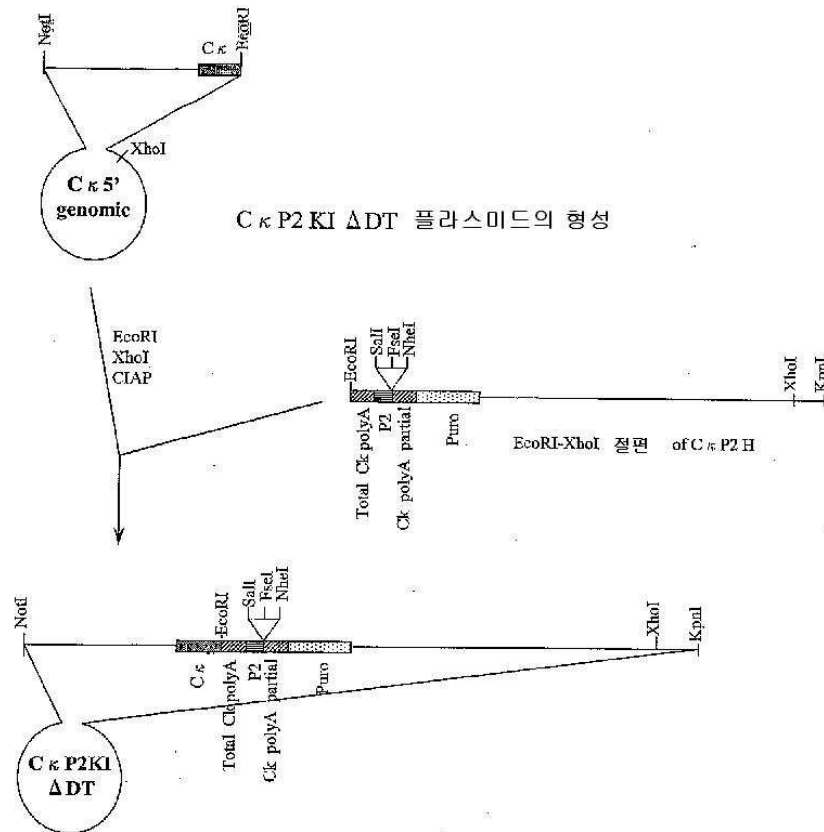
도면5m



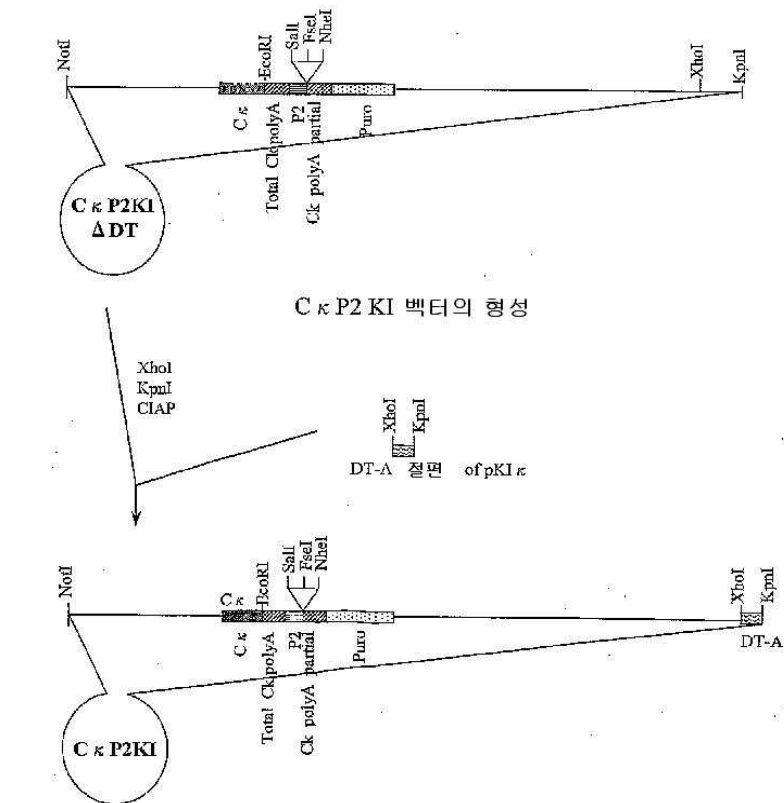
도면5n



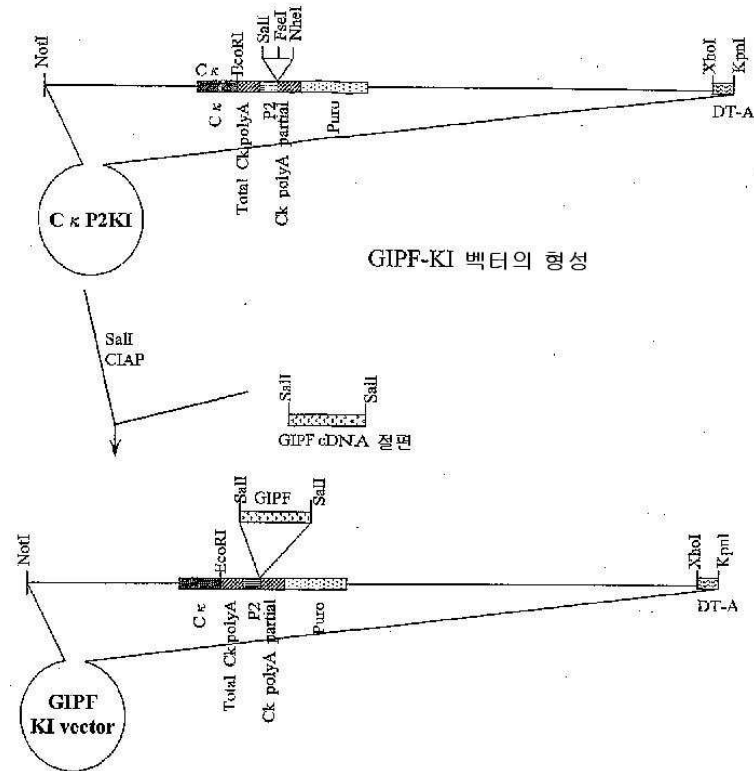
도면5p



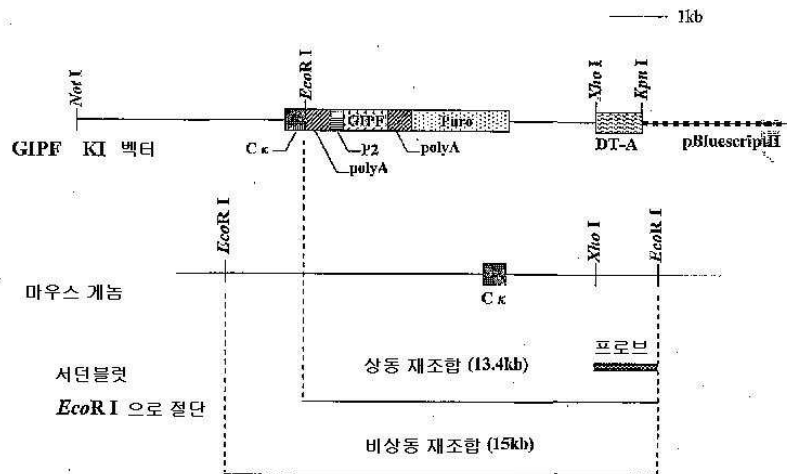
도면5q



도면5r



도면6

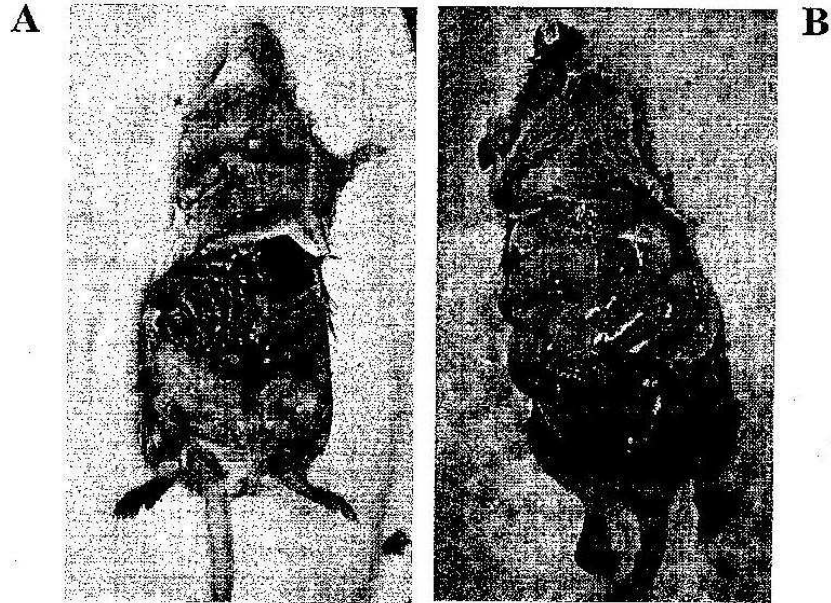


도면7

GIPF-KI 마우스의 총체적 병리증상: 장 팽창

키메라 마우스

GIPF-KI 마우스

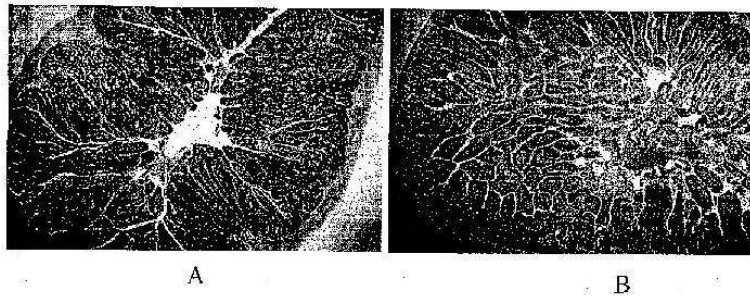


도면8

KI 마우스의 H&E 염색된 소장절편(5배)

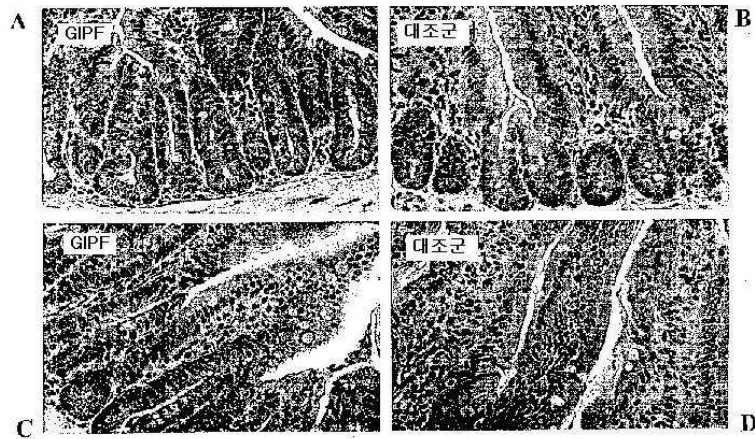
GIPF

대조군

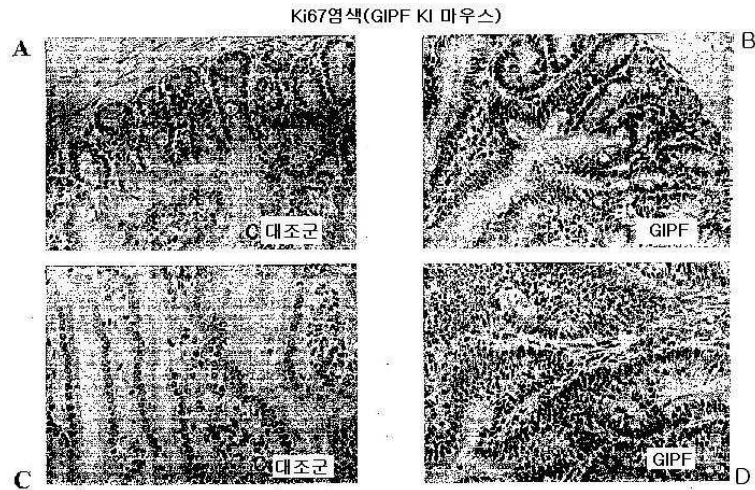


도면9

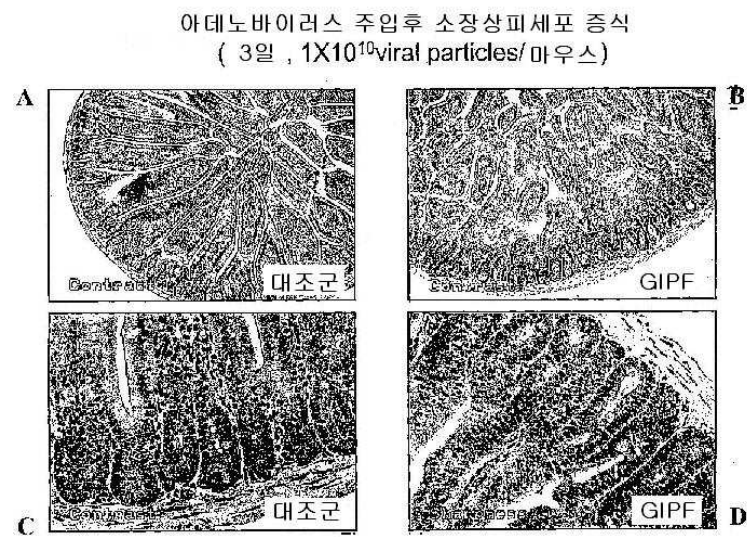
KI 마우스의 H&E 염색된 소장절편(40배)



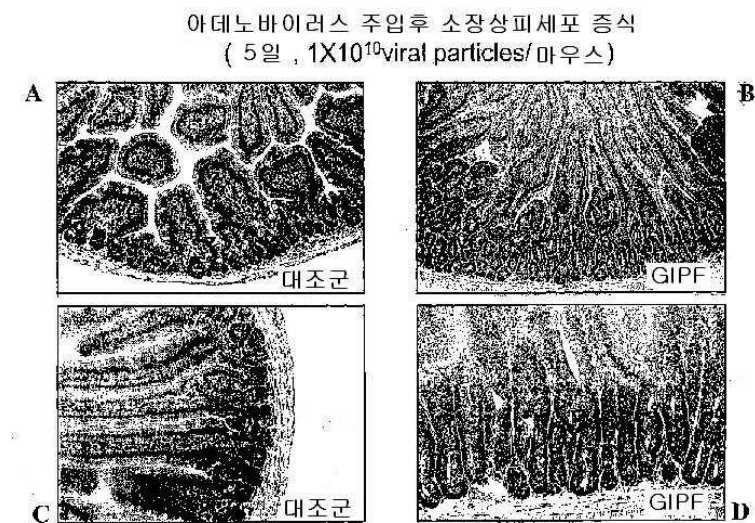
도면10



도면11

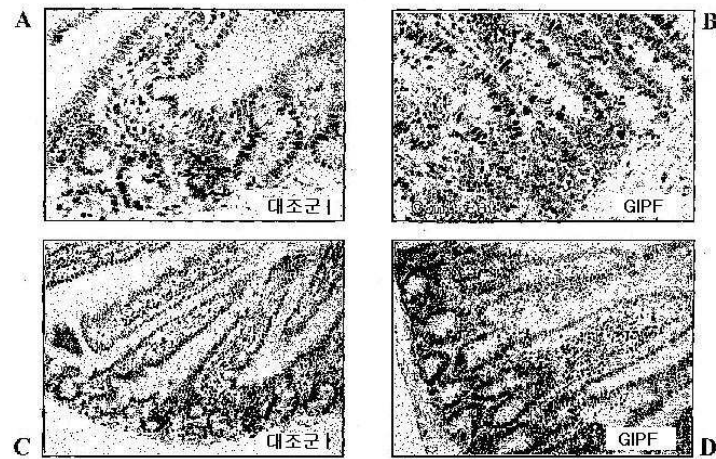


도면12



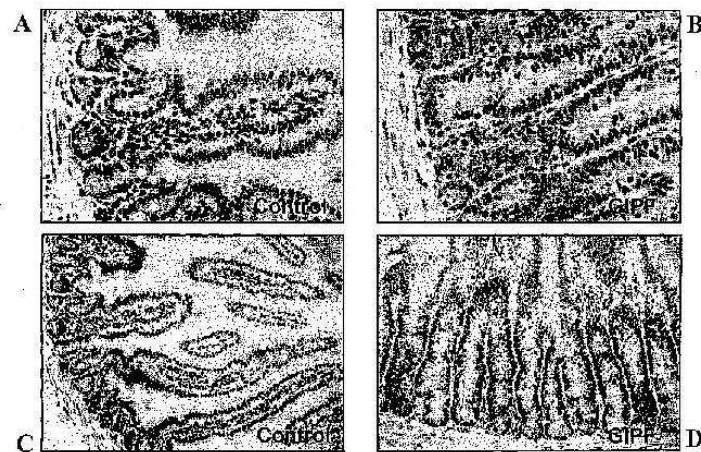
도면13

생체내 증식 분석: BrdU IHC (아데노바이러스
3일, 1×10^{10} VP)



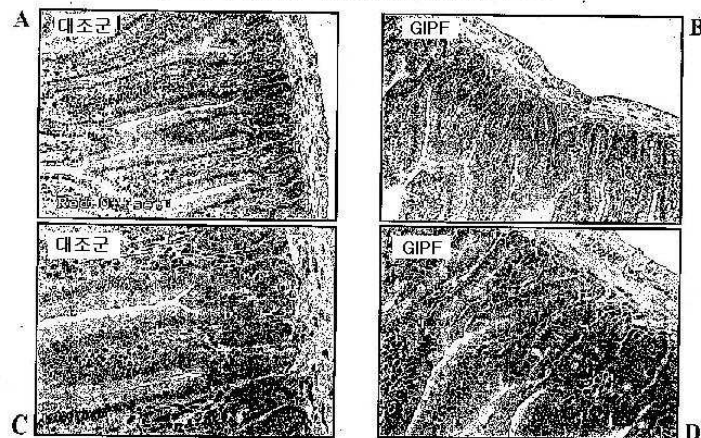
도면14

Ki67 IHC (아데노바이러스 5일, 1×10^{10} VP)

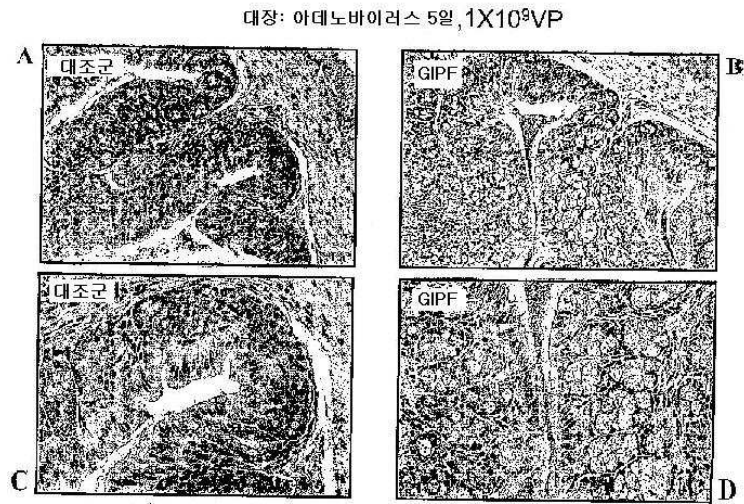


도면15

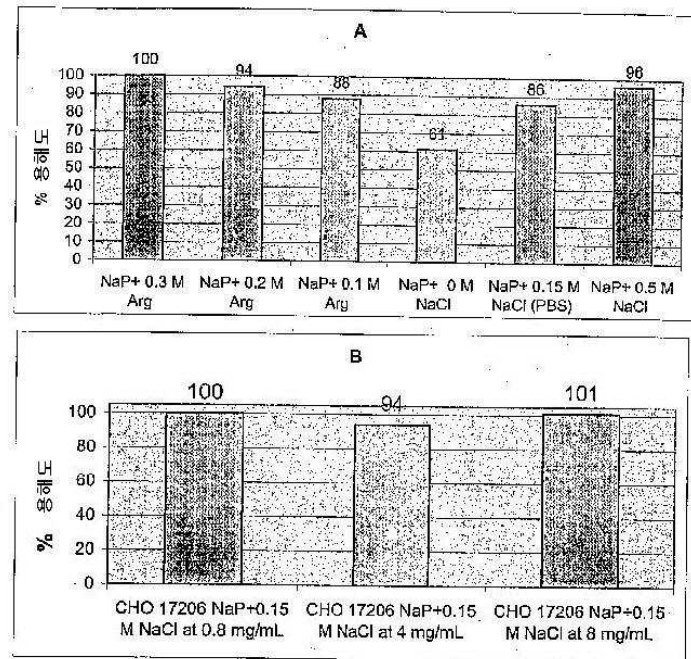
아데노바이러스 주입후 소장상피세포 증식
(5일, 1×10^9 viral particles/마우스)



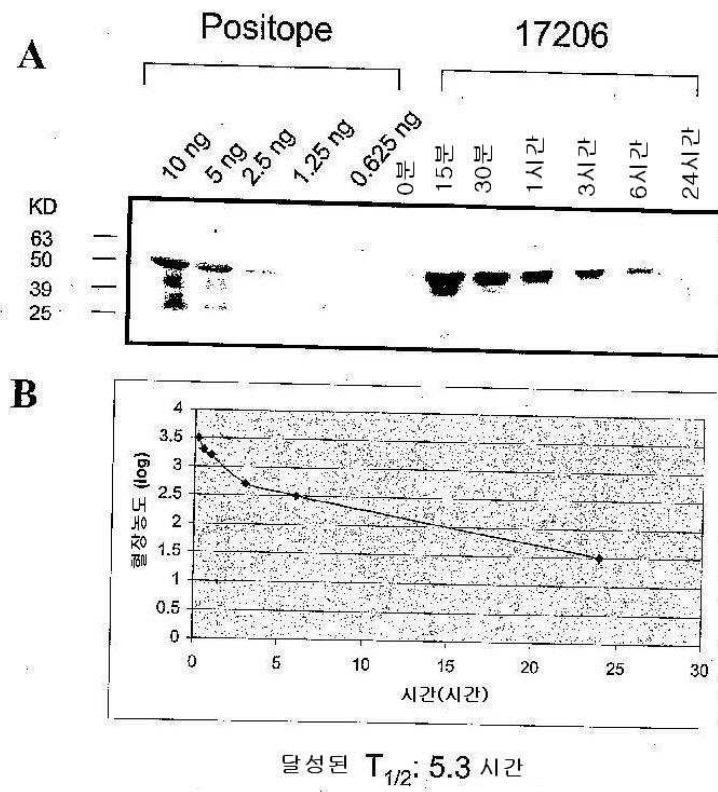
도면16



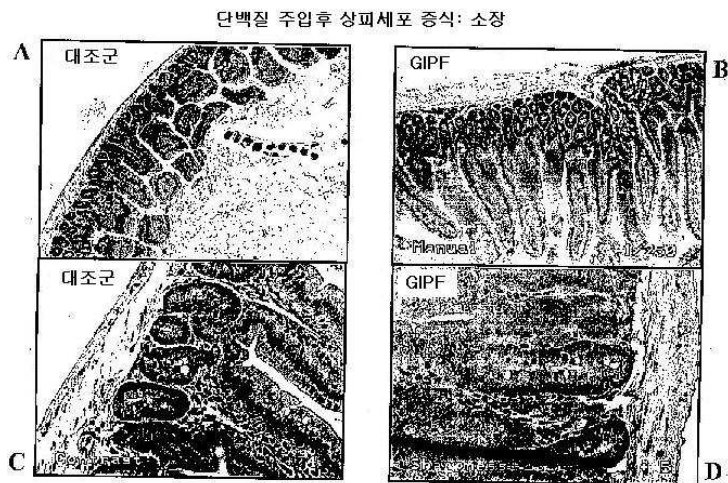
도면17



도면18

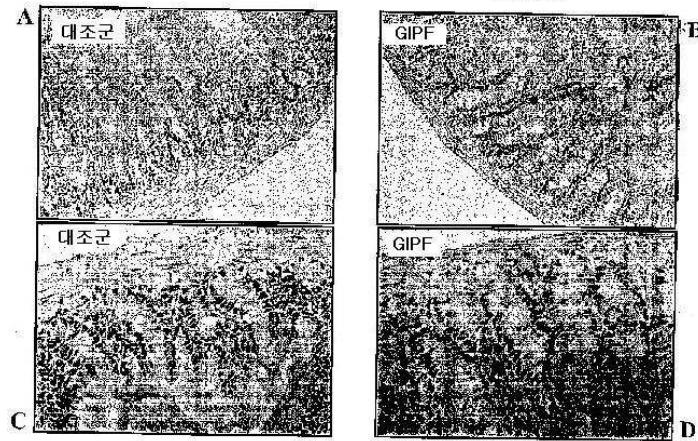


도면19



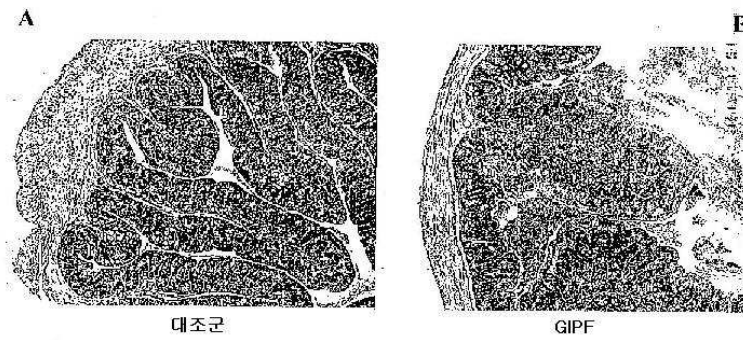
도면20

단백질 주입 후 생체내 증식 분석: 소장내 BrdU IHC



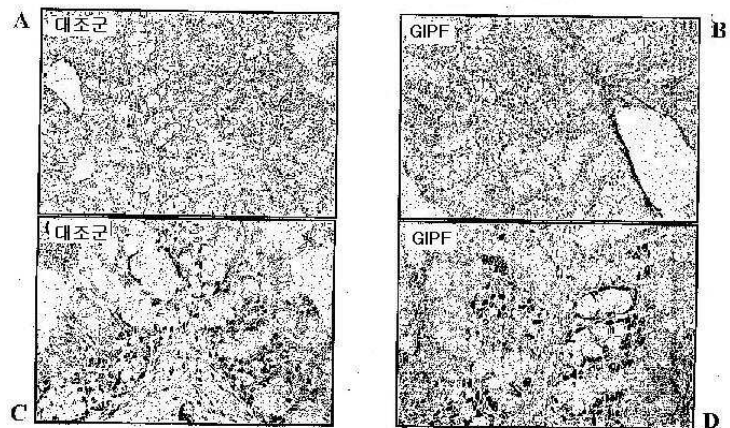
도면21

GIPF 단백질 주입 후 장상피세포 증식: 대장

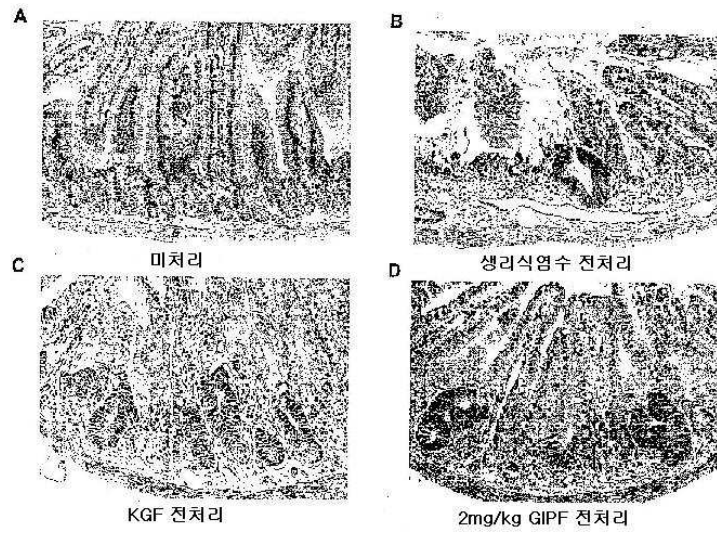


도면22

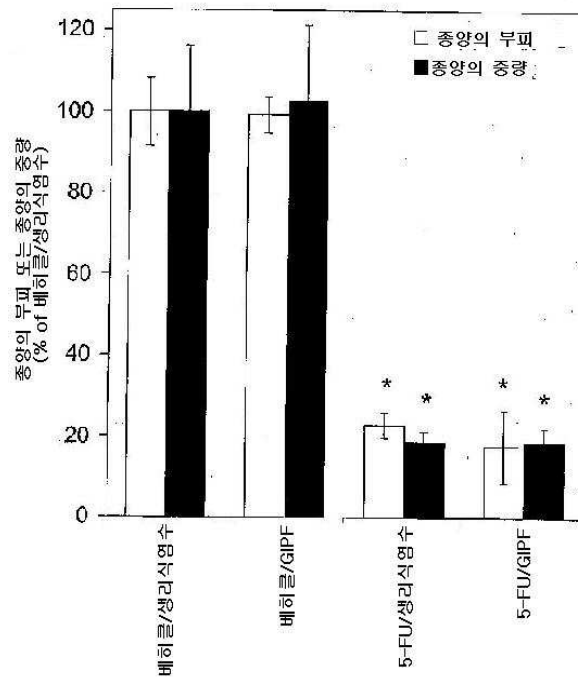
단백질 주입 후 생체내 증식 분석: 대장내 BrdU IHC



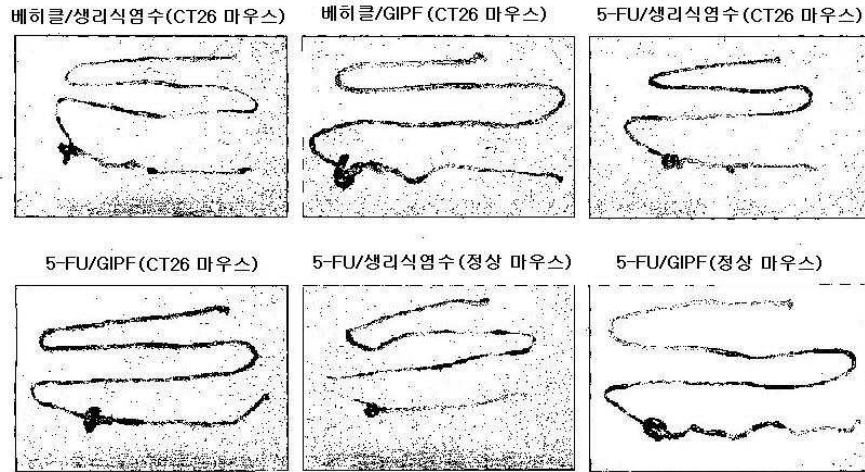
도면23



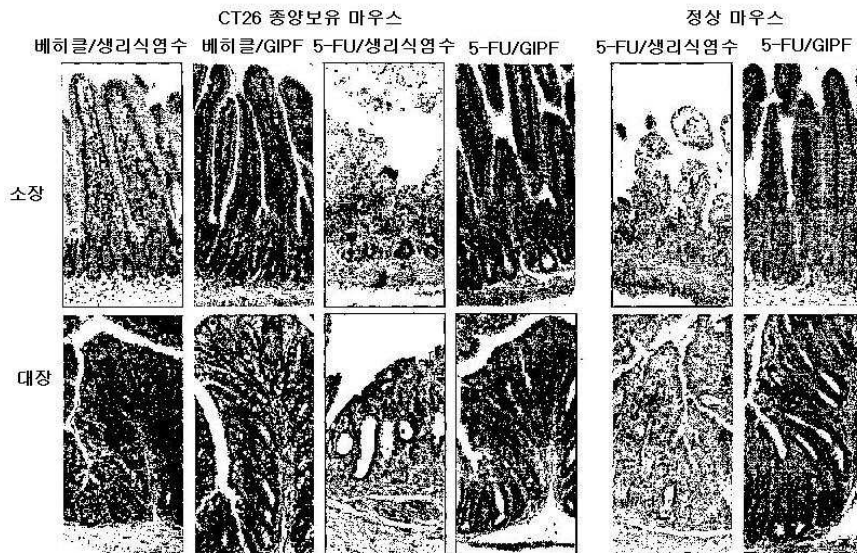
도면24



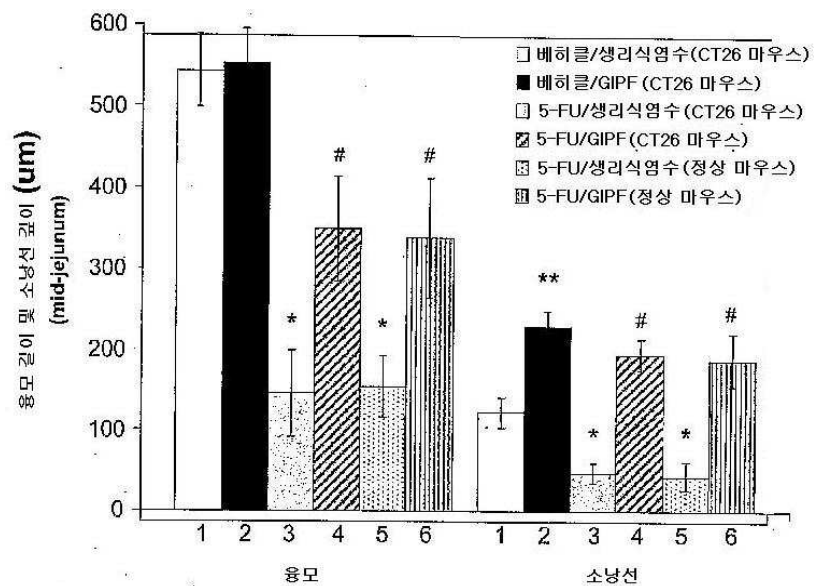
도면25



도면26

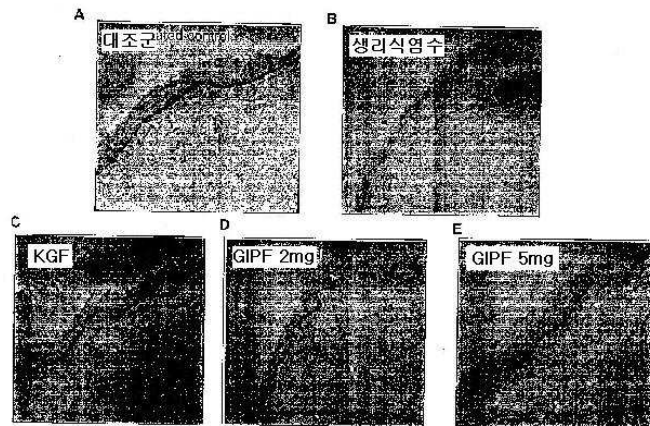


도면27



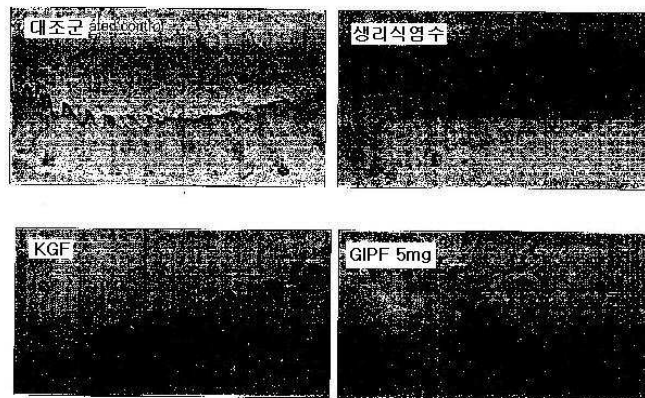
도면28

방사능조사 유발 경구 점막염
Ki67 IHC: 혀의 배면



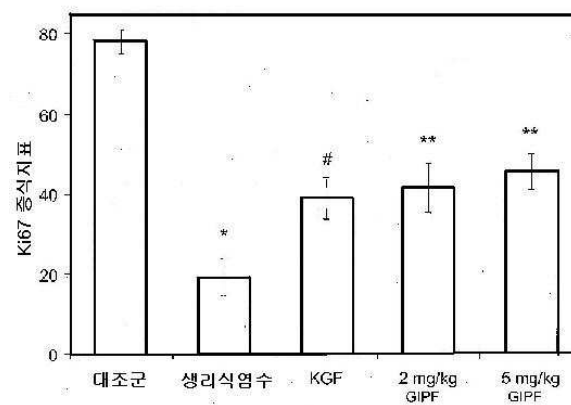
도면29

방사능조사 유발 경구 점막염
Ki67 IHC: 혀의 복면



도면30

Ki67 증식지표: 마우스 혀의 배면

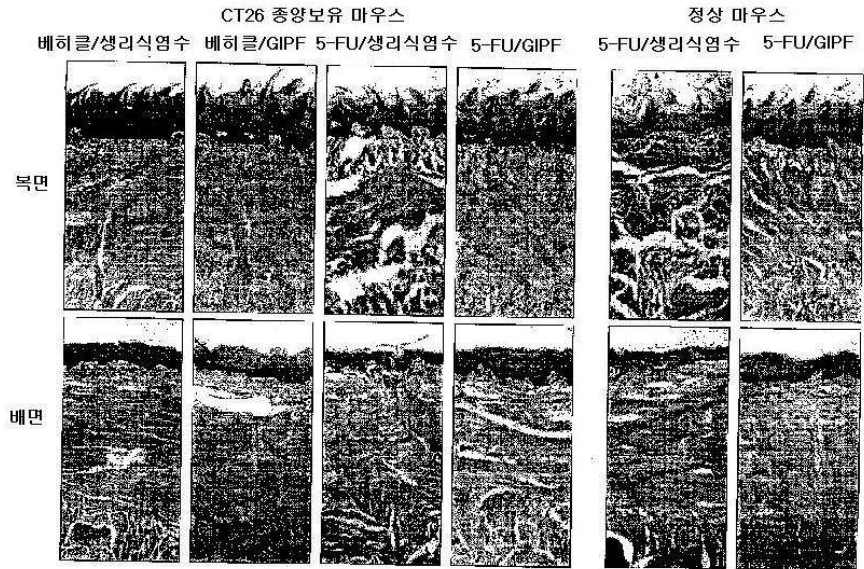


* $P < 0.05$ (ANOVA, 생리식염수 vs. 대조군)

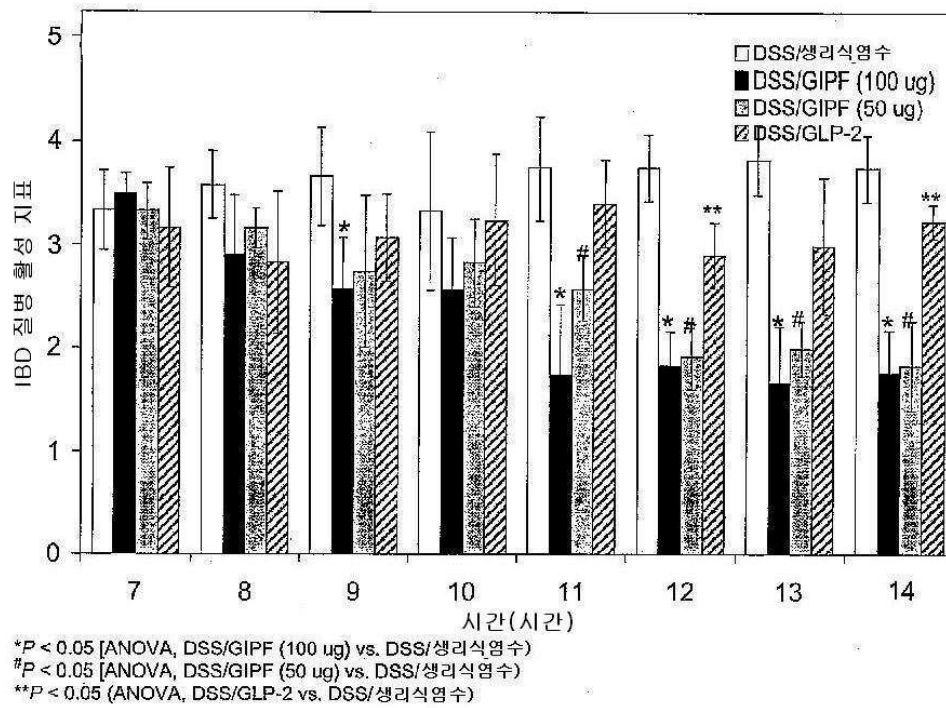
$P < 0.05$ (ANOVA, KGF vs. 생리식염수)

** $P < 0.05$ (ANOVA, 17206 vs. 생리식염수)

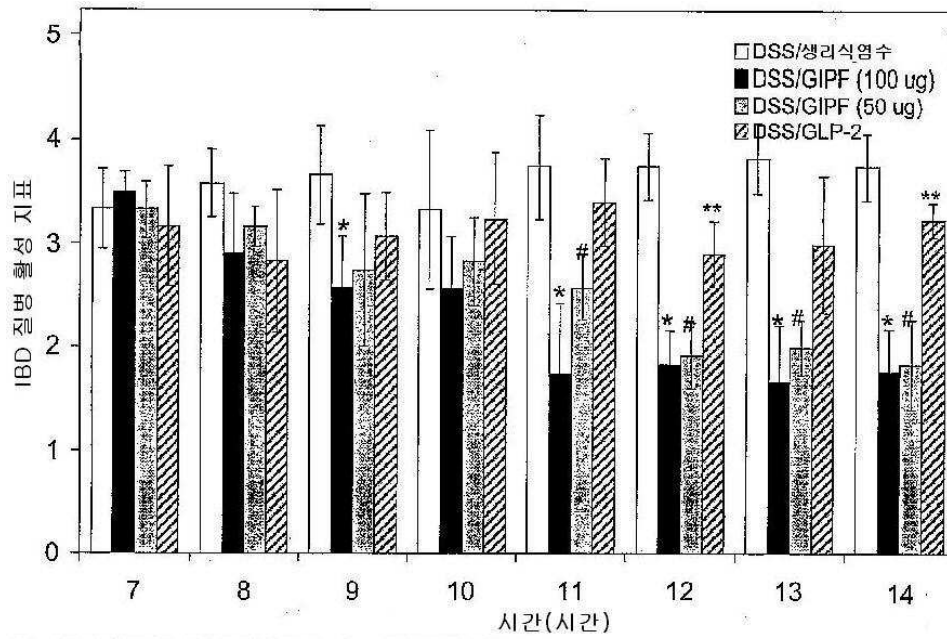
도면31



도면32



도면33

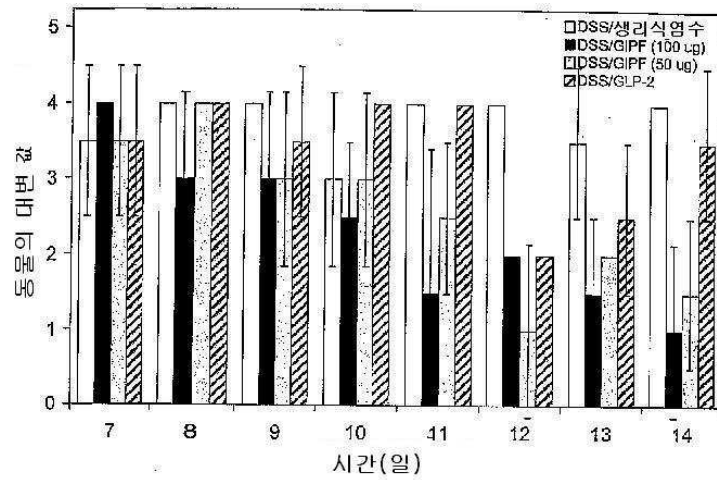


* $P < 0.05$ [ANOVA, DSS/GIPF (100 ug) vs. DSS/생리식염수]

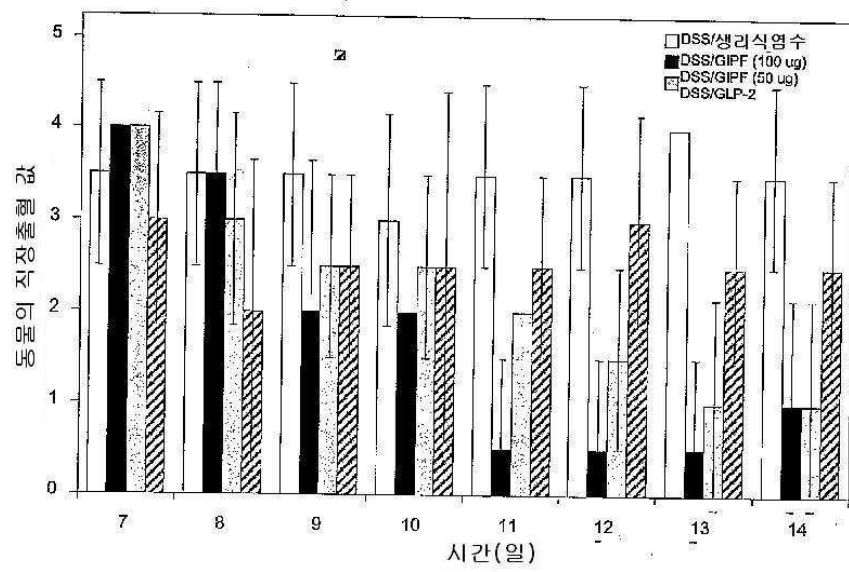
$P < 0.05$ [ANOVA, DSS/GIPF (50 ug) vs. DSS/생리식염수]

** $P < 0.05$ (ANOVA, DSS/GLP-2 vs. DSS/생리식염수)

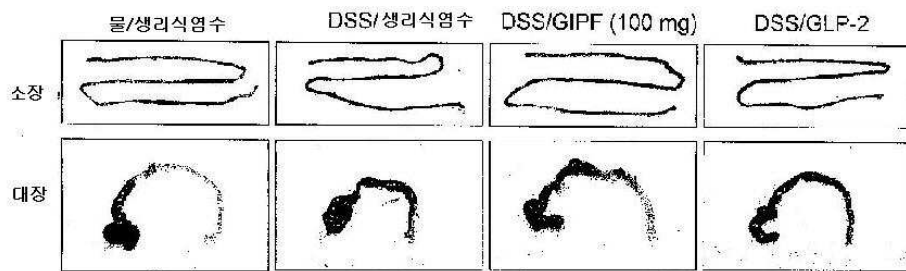
도면34



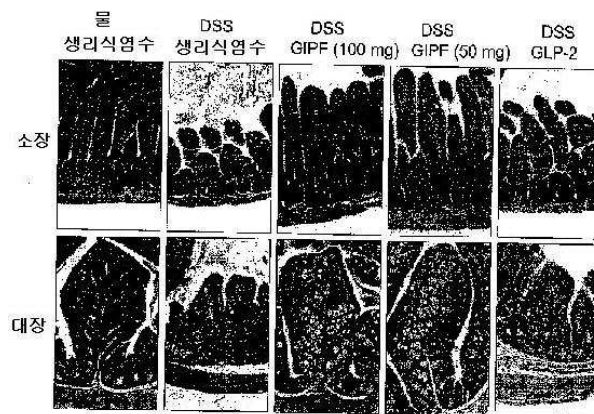
도면35



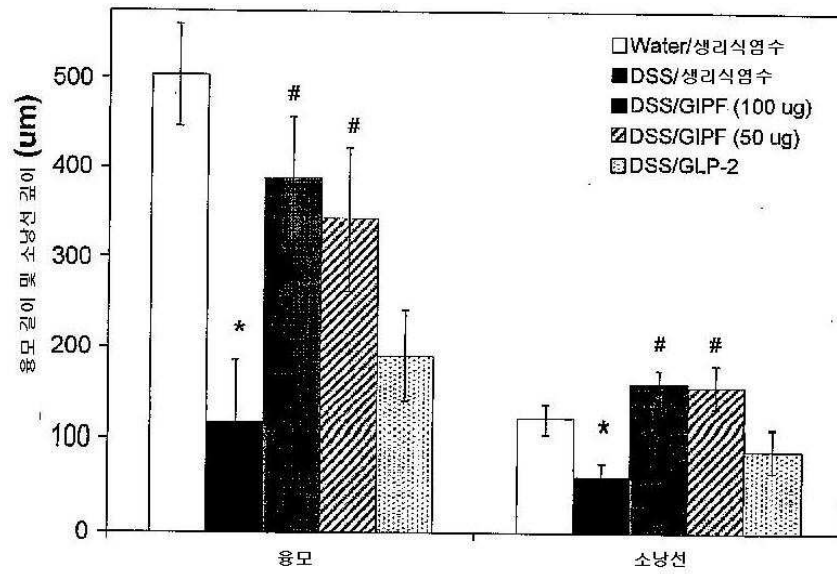
도면36



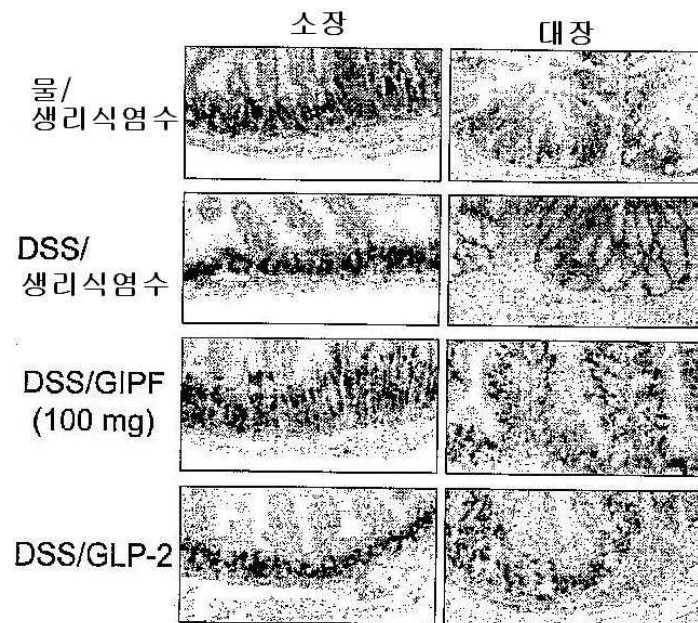
도면37



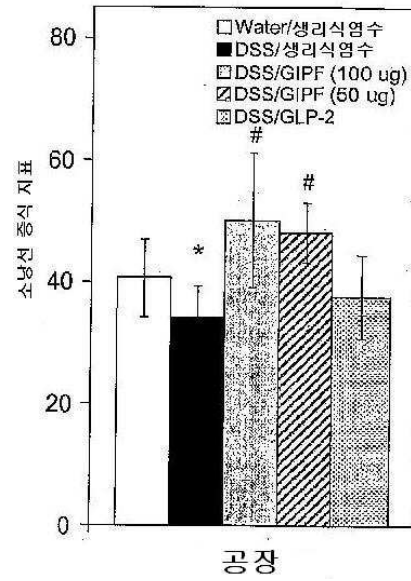
도면38



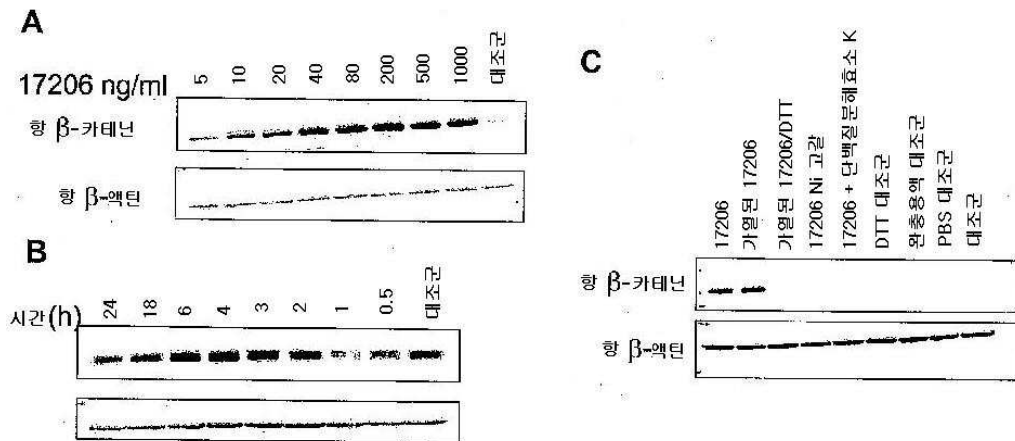
도면39



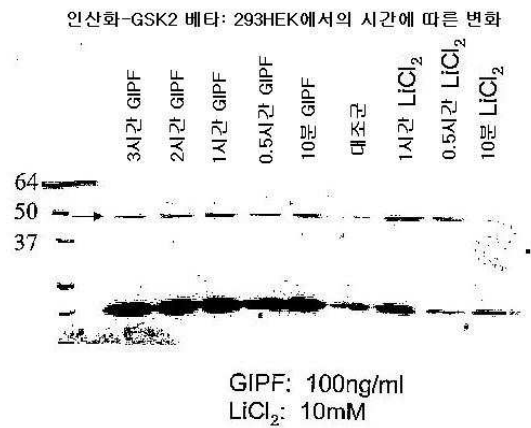
도면40



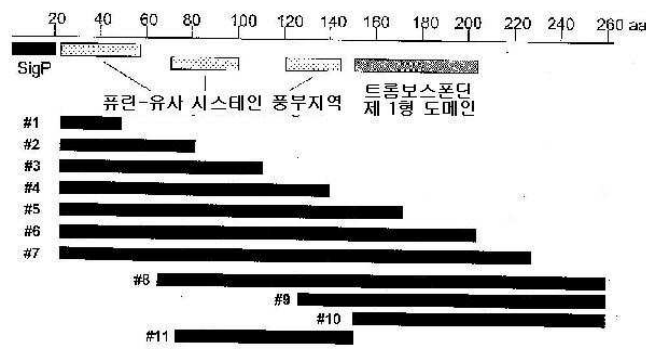
도면41



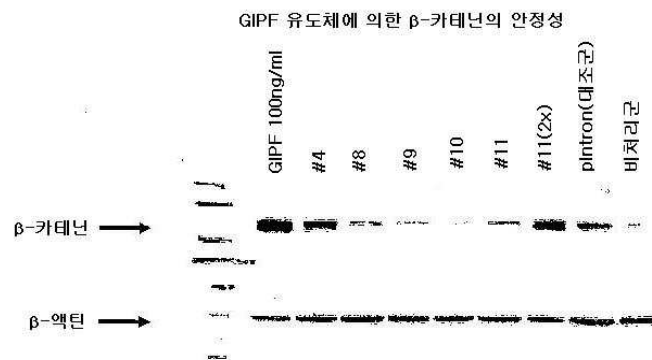
도면42



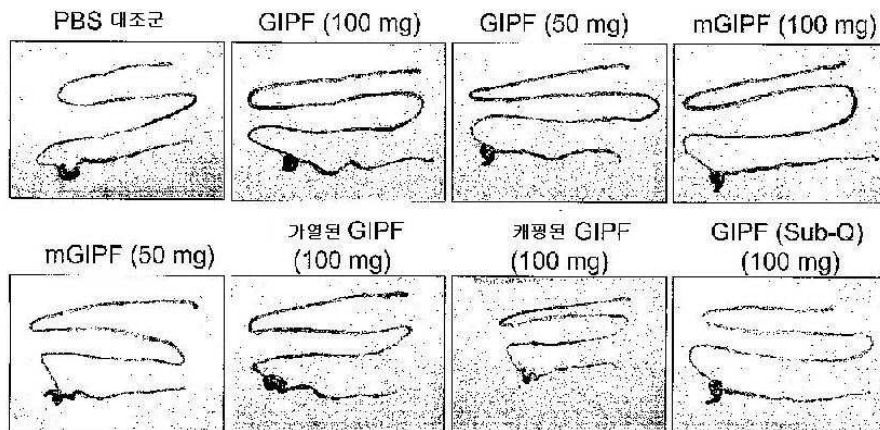
도면43



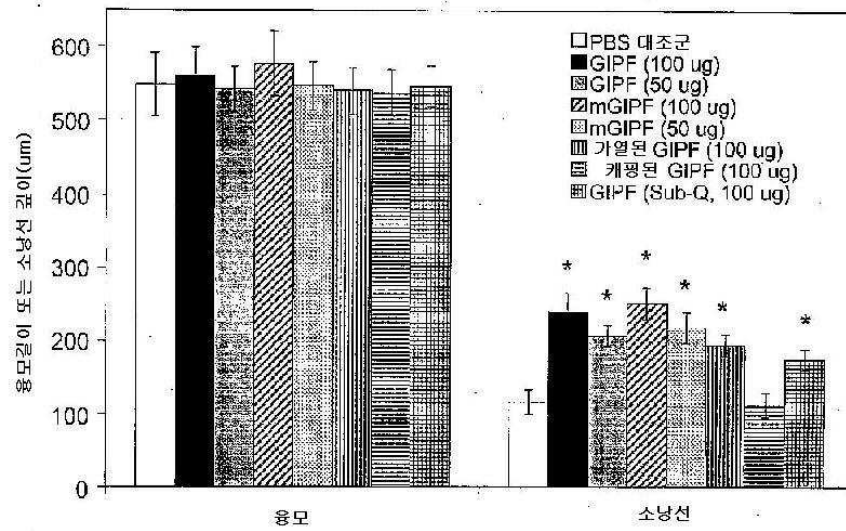
도면44



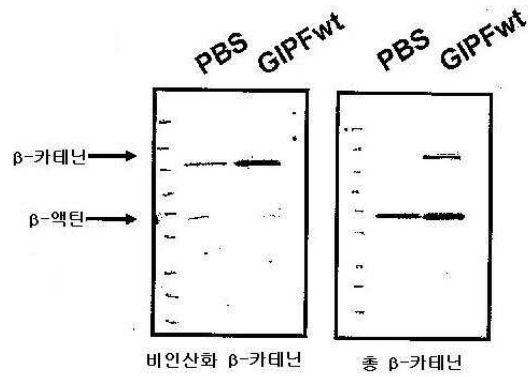
도면45



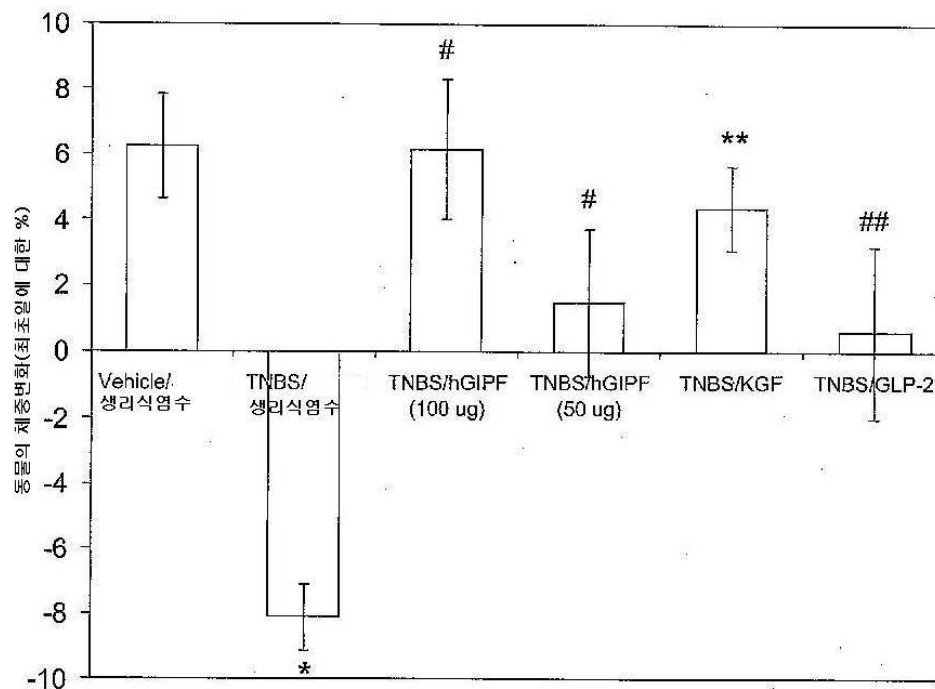
도면46



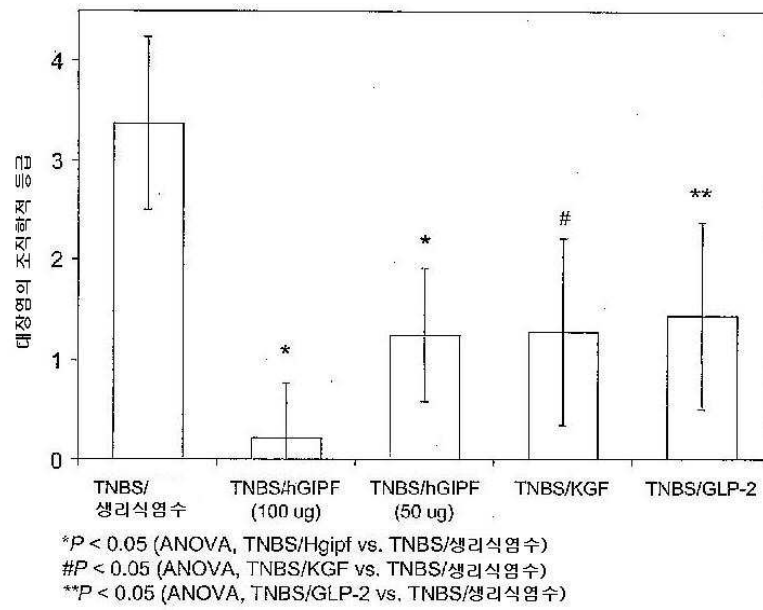
도면47



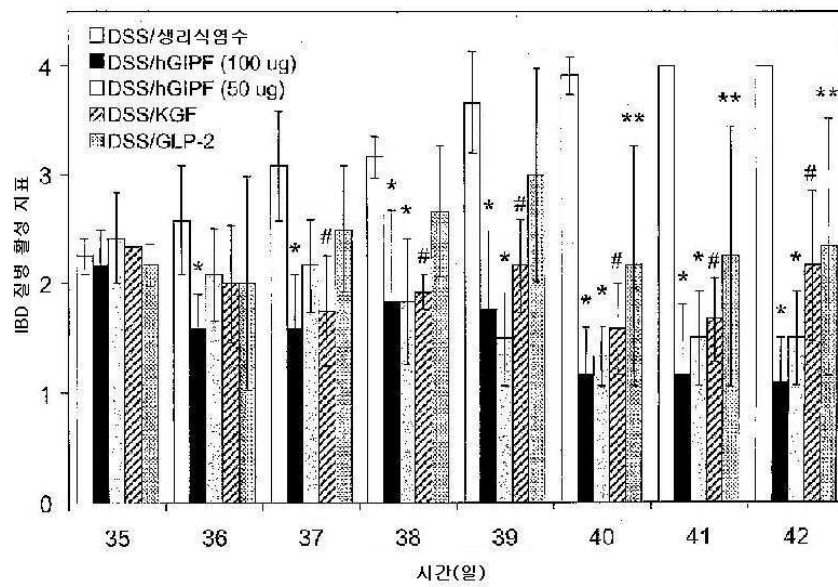
도면48



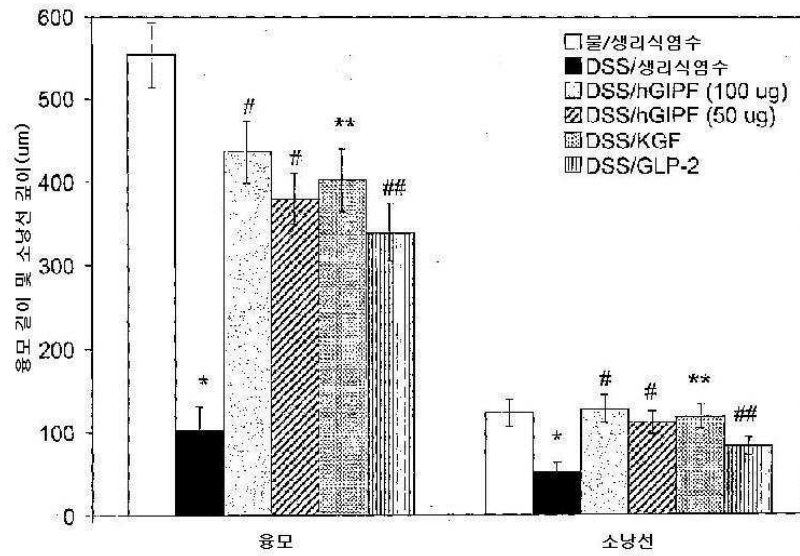
도면49



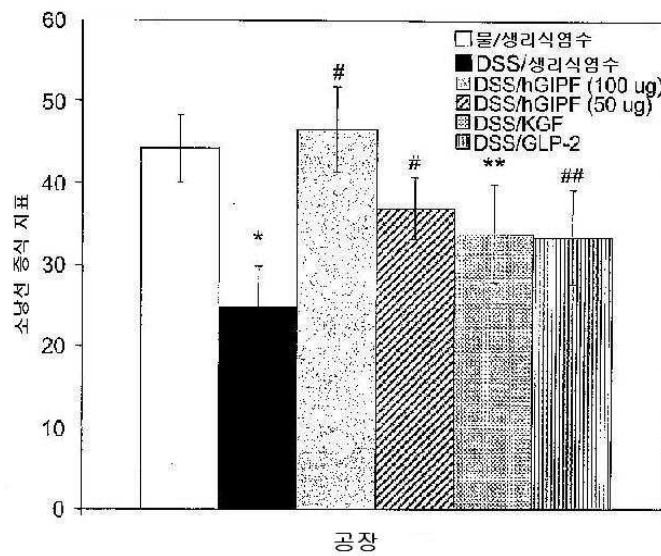
도면50



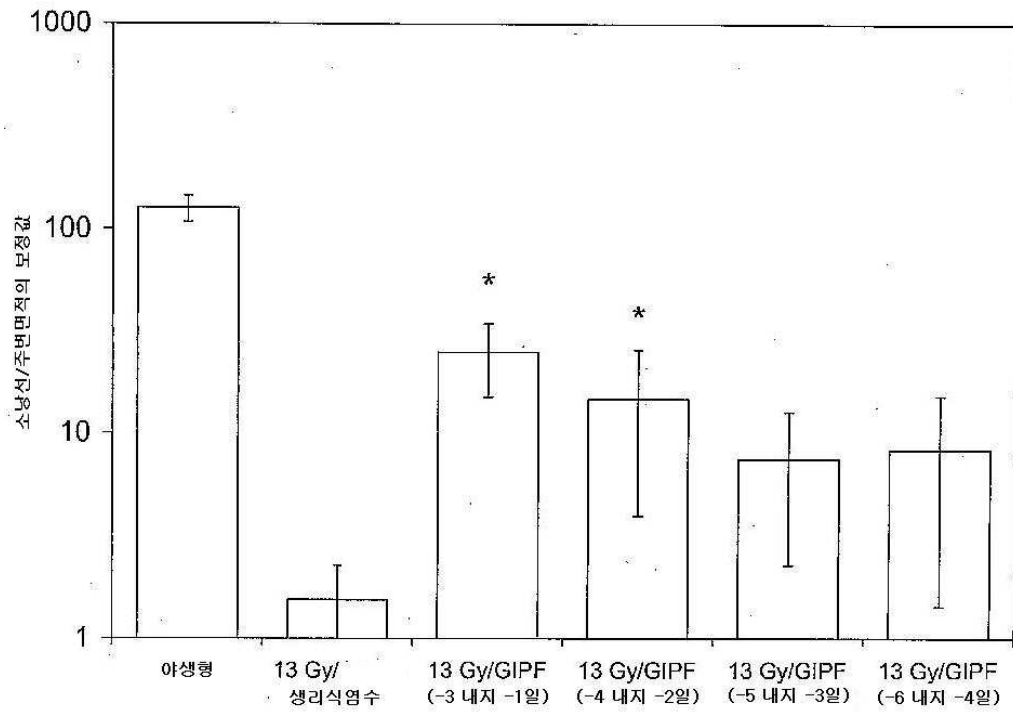
도면51



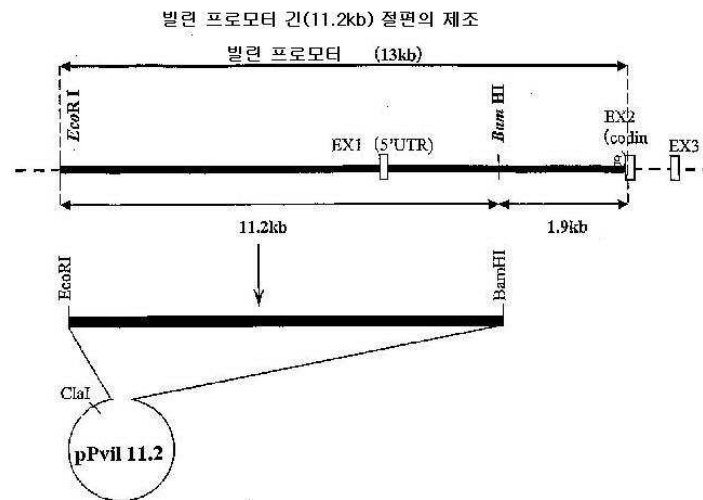
도면52



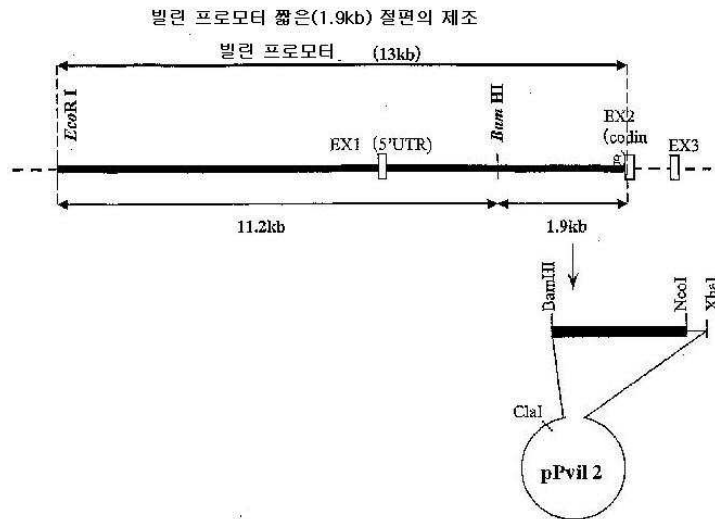
도면53



도면54a



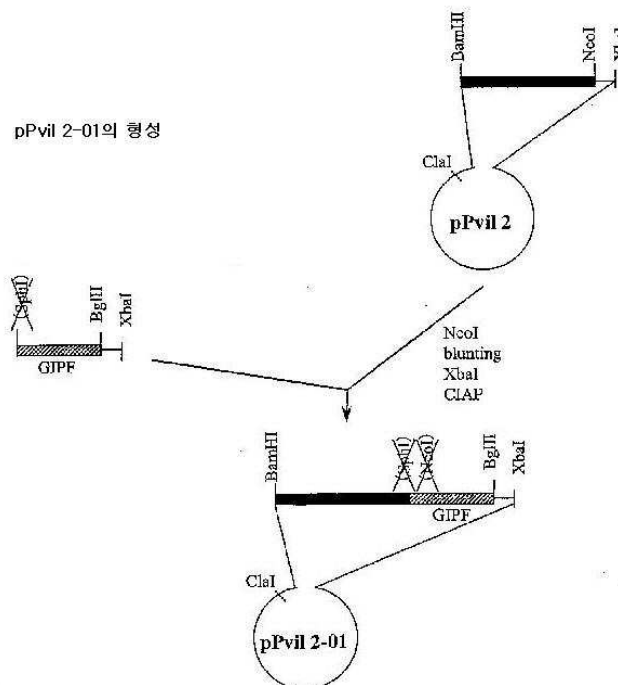
도면54b



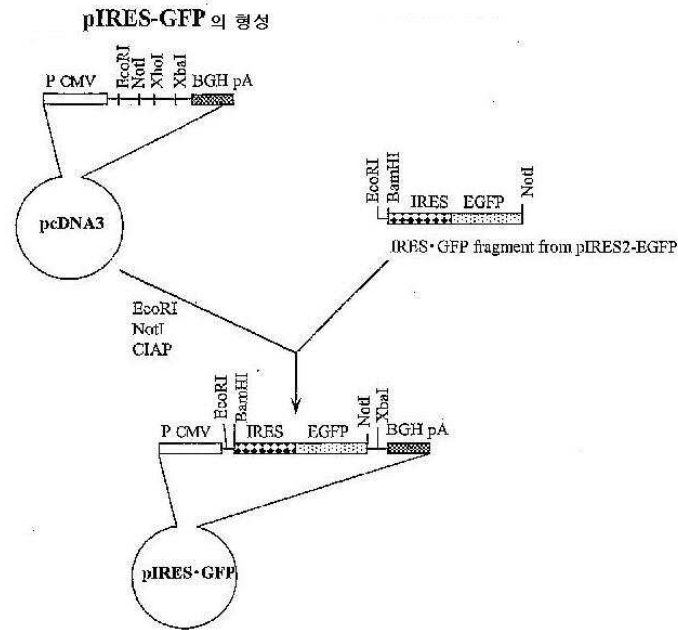
도면54c



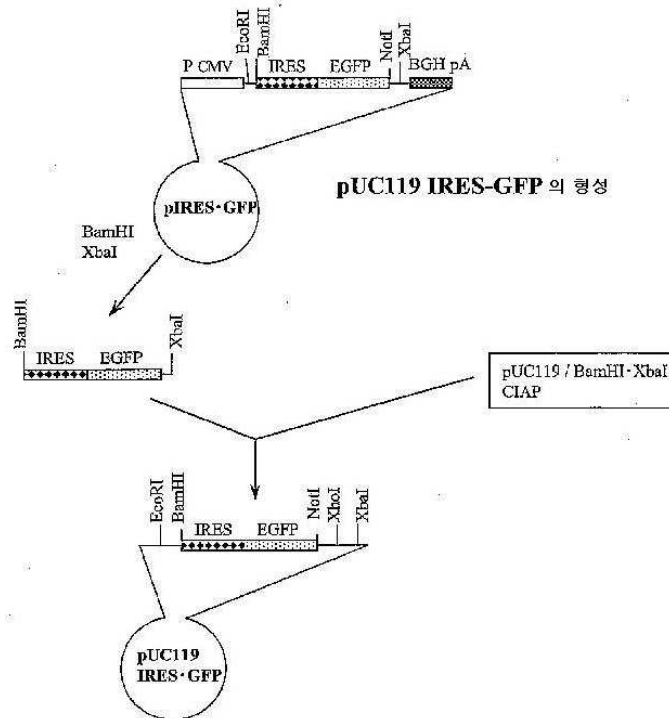
도면54d



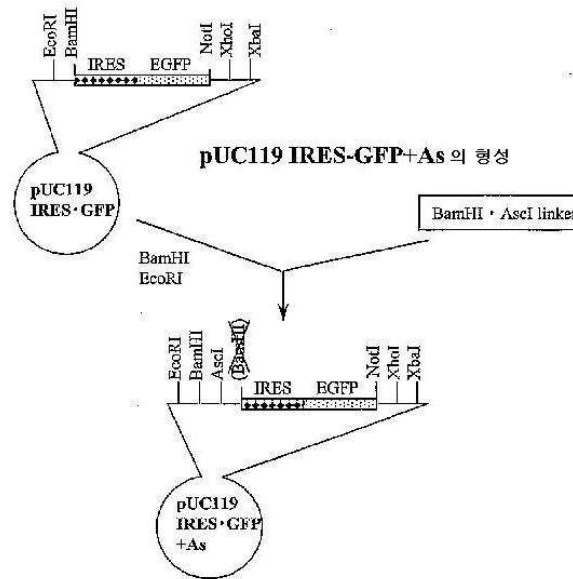
도면54e



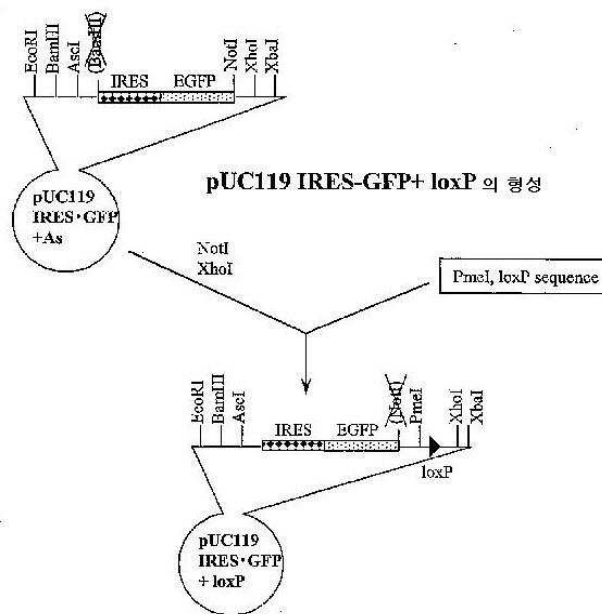
도면54f



도면54g

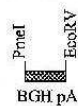


도면54h

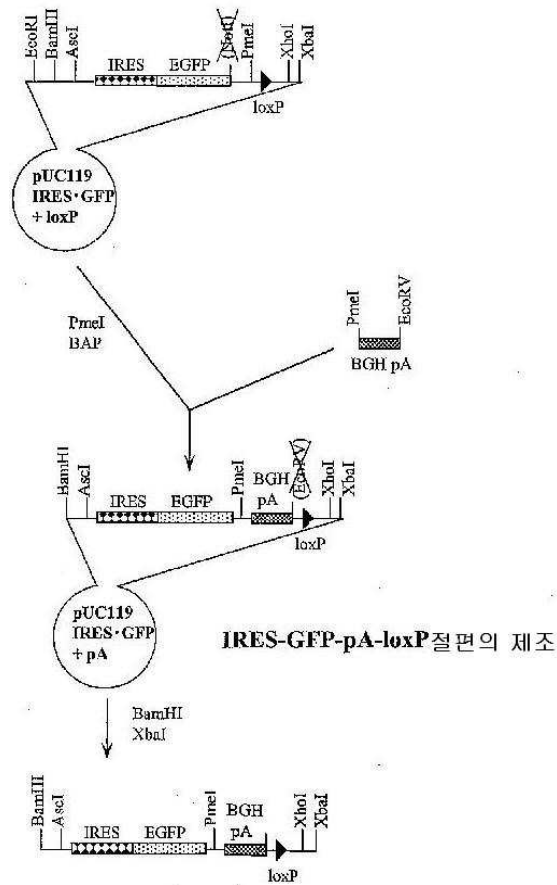


도면54i

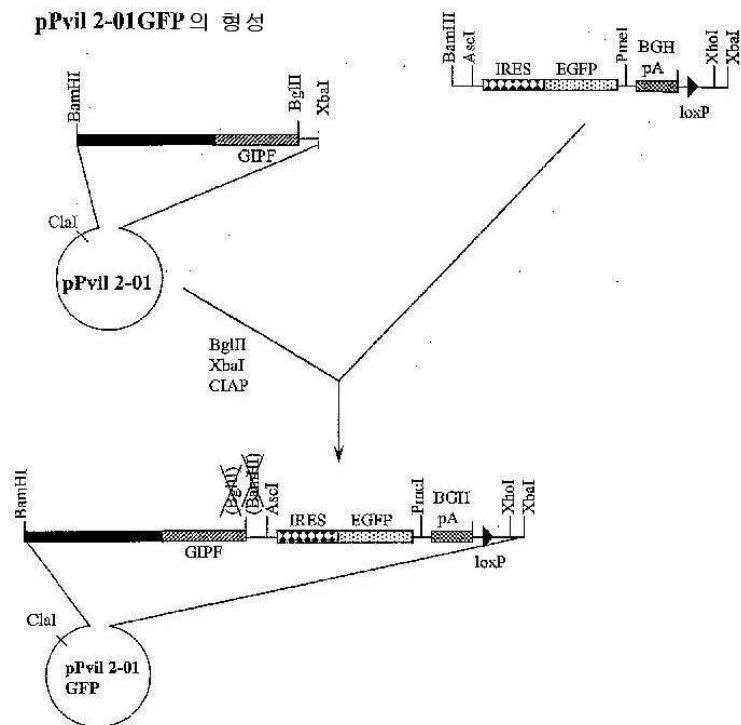
BGH polyA 절편의 제조



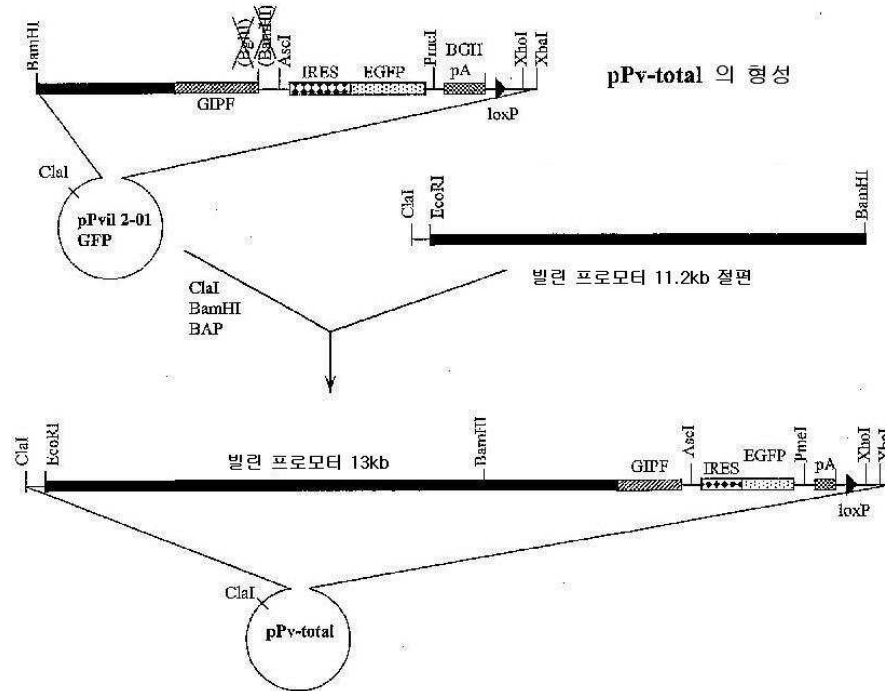
도면54j



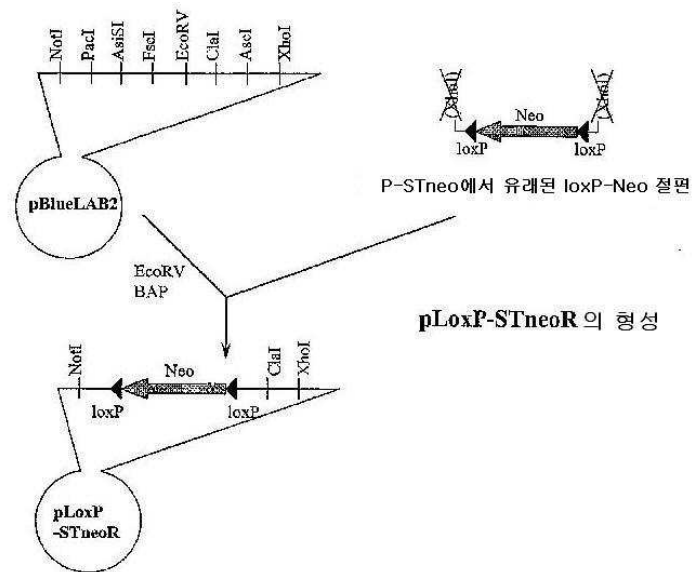
도면54k



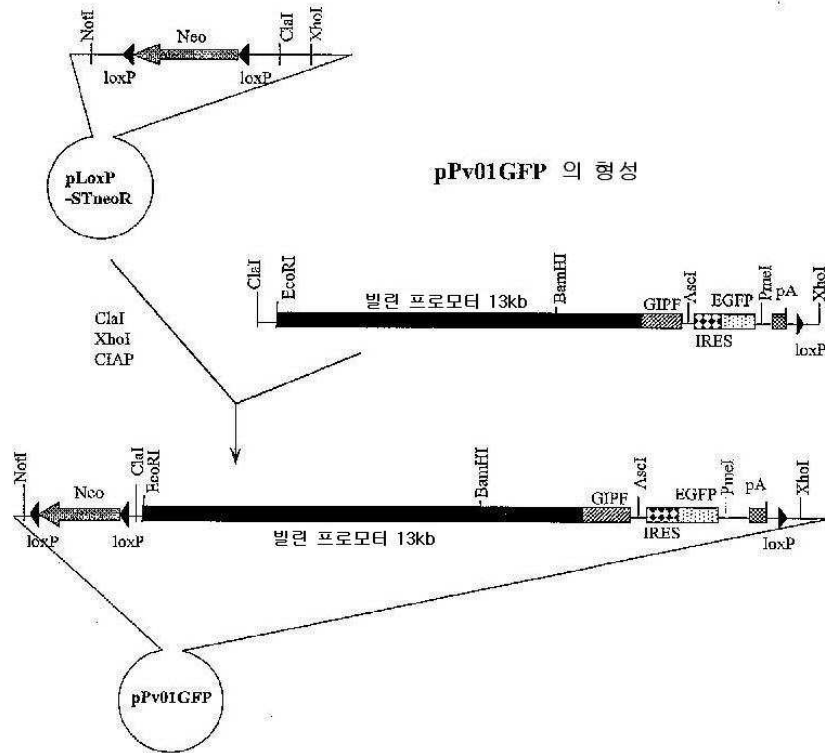
도면54l



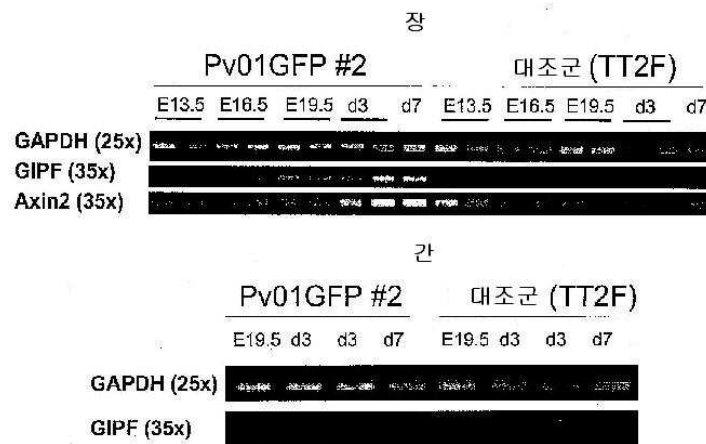
도면54m



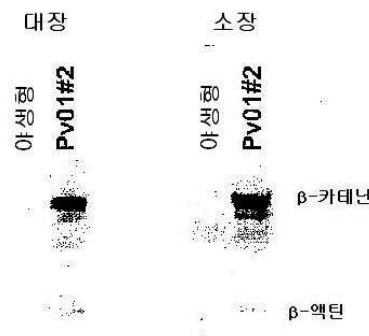
도면54n



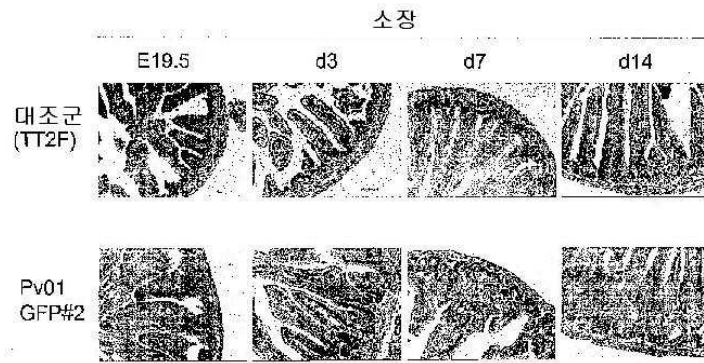
도면55



도면56

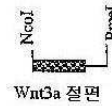


도면57

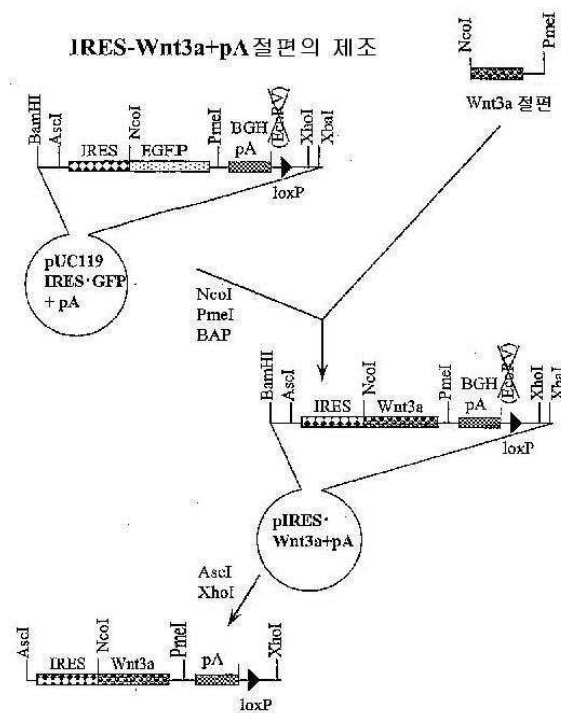


도면58a

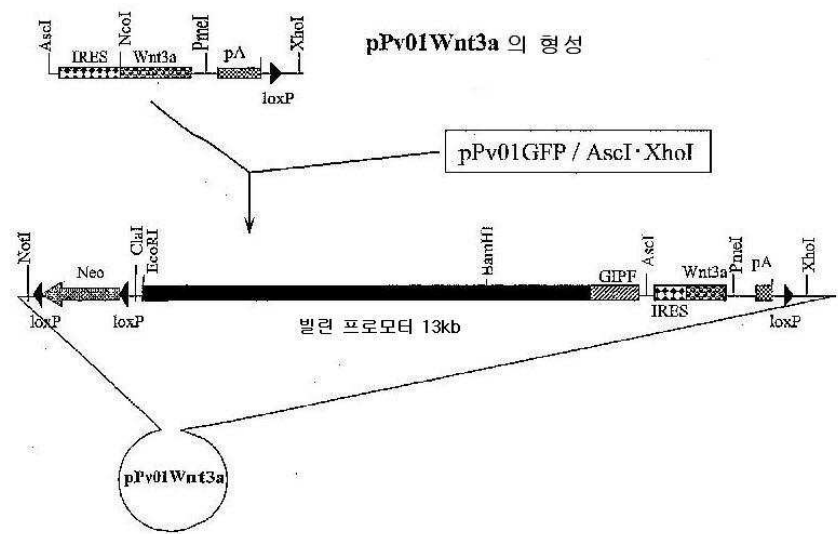
Wnt3a 절편의 제조



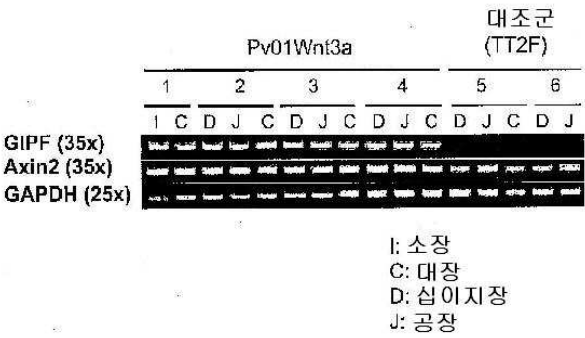
도면58b



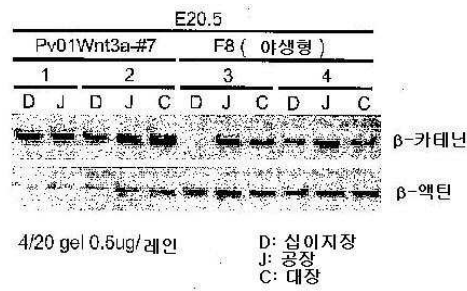
도면58c



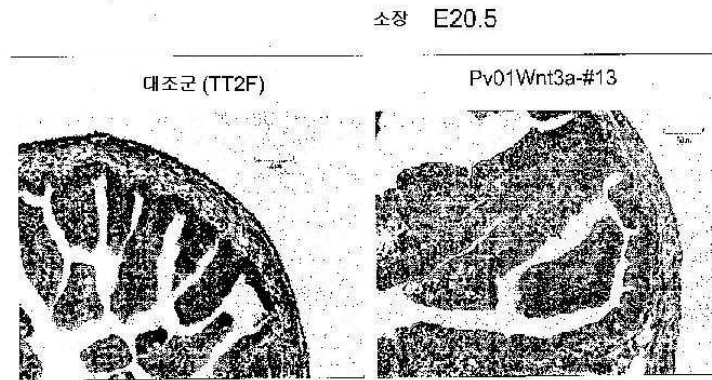
도면59



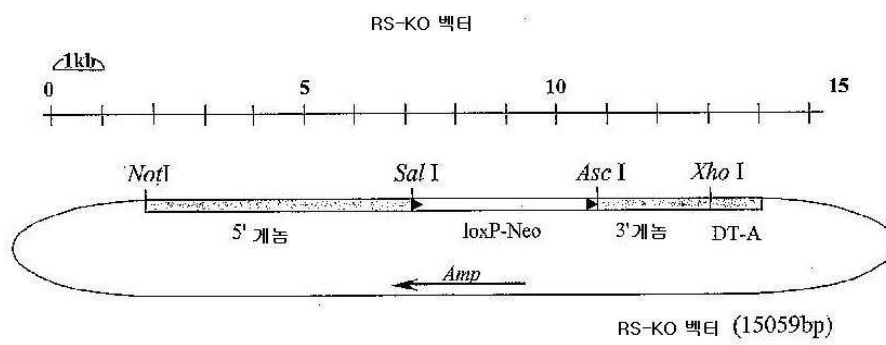
도면60



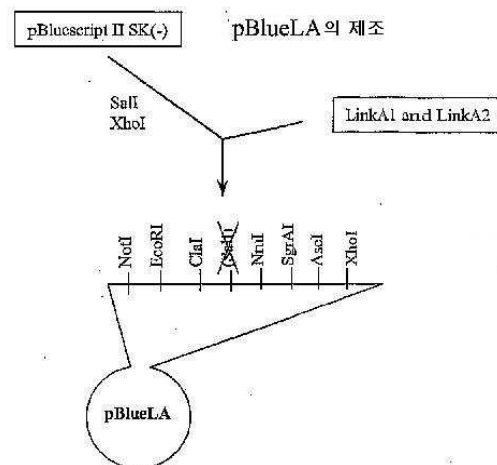
도면61



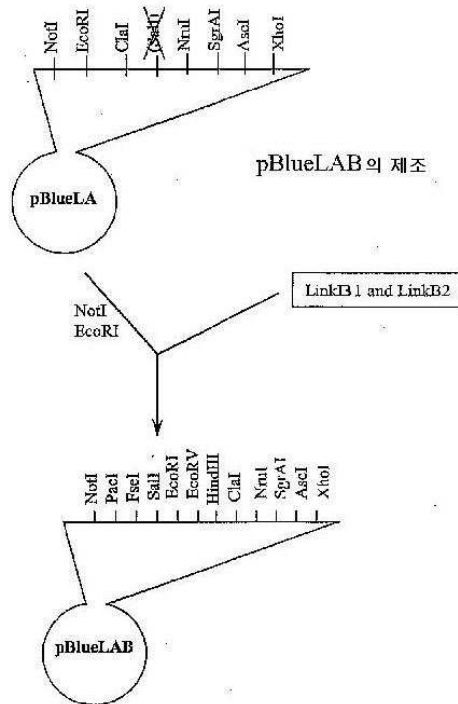
도면62a



도면62b



도면62c



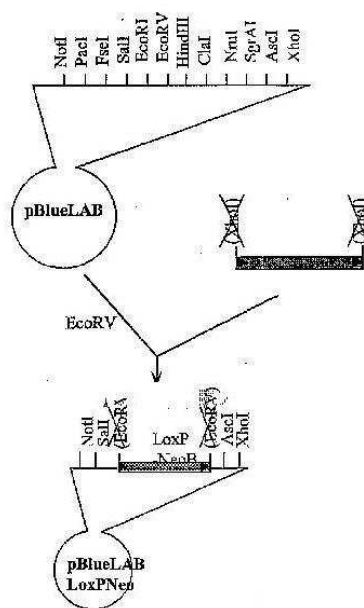
도면62d

LoxP-Neo-B 절편의 제조



도면62e

pBlueLAB-LoxP-Neo의 제조



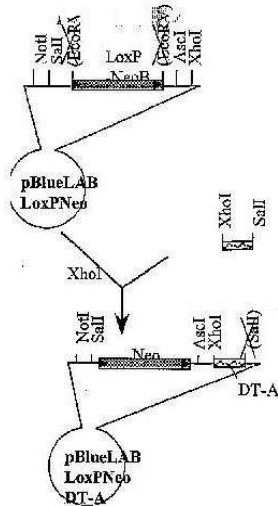
도면62f

DT-A 절편의 제조



도면62g

pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A 의 제조



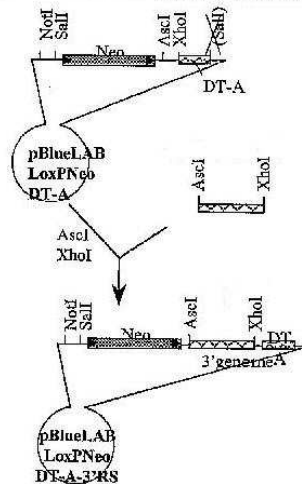
도면62h

RS element 의 3'계능 부분의 제조



도면62i

pBlueLAB-LoxP-Neo-DT-A-3'RS 의 제조



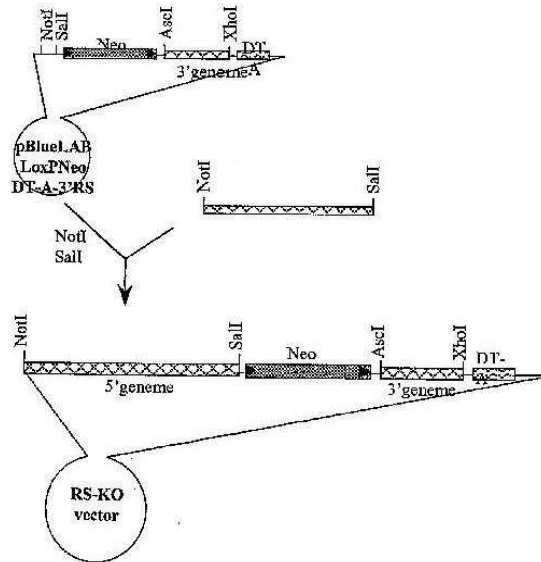
도면62j

RS element의 5'개능 부분의 제조



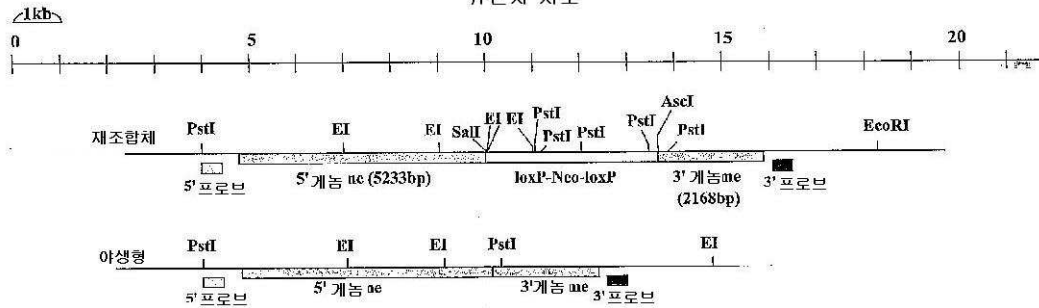
도면62k

RS-KO 벡터의 형성

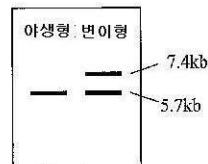


도면63

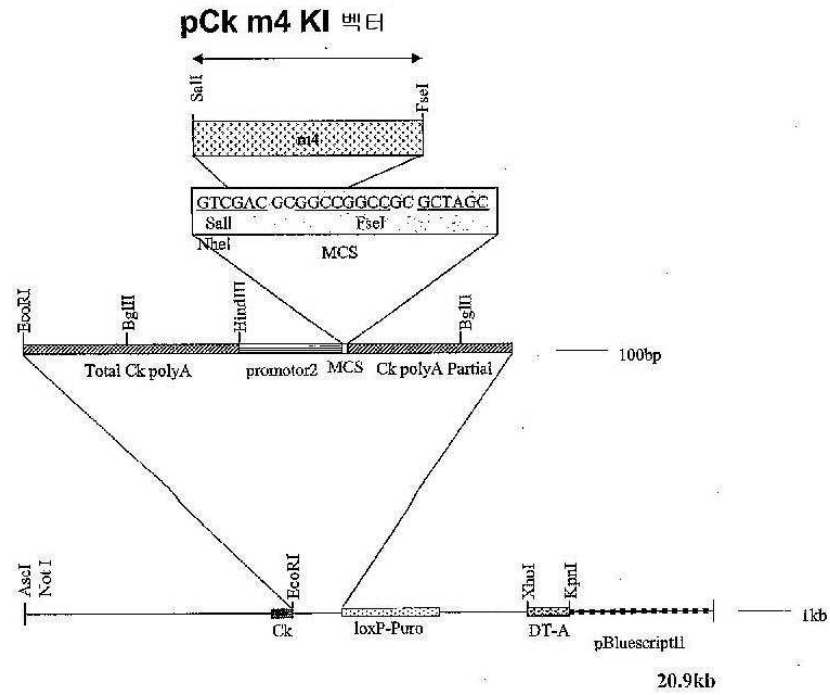
유전자 지도



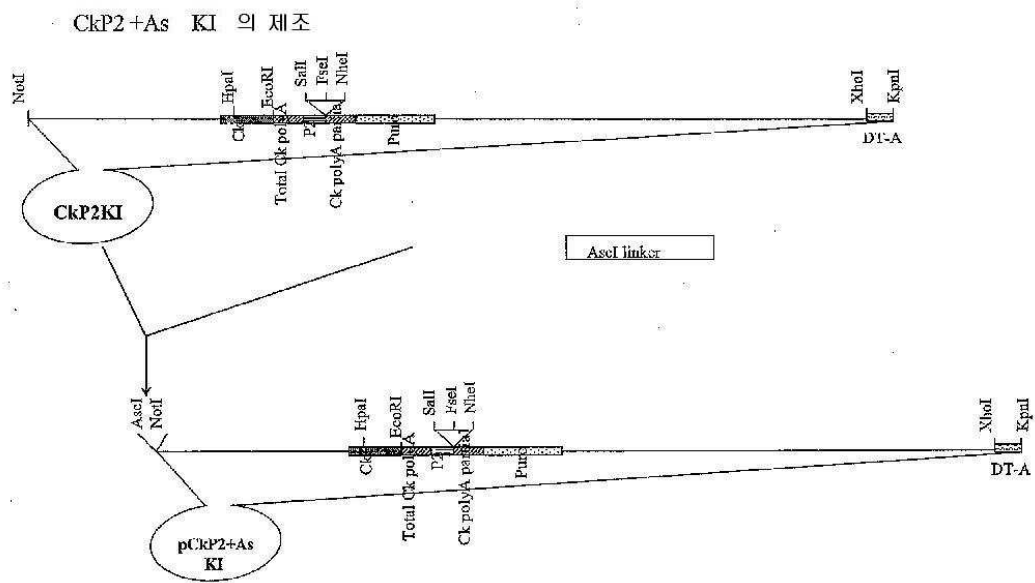
3' 서던 (EcoRI 절단)



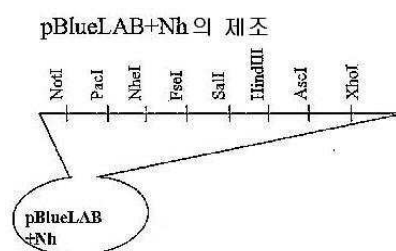
도면64a



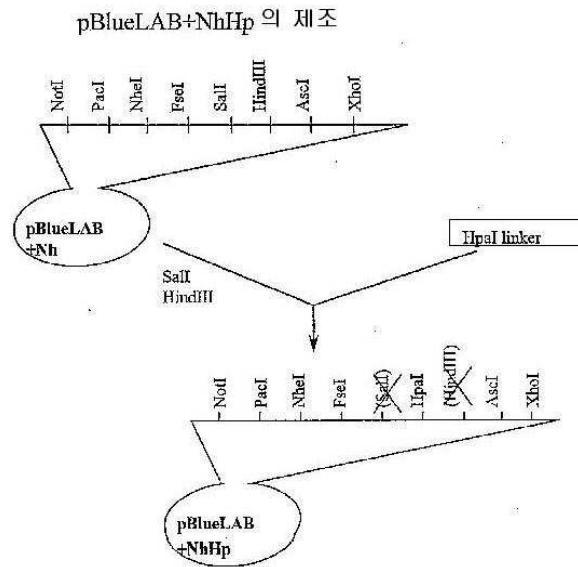
도면64b



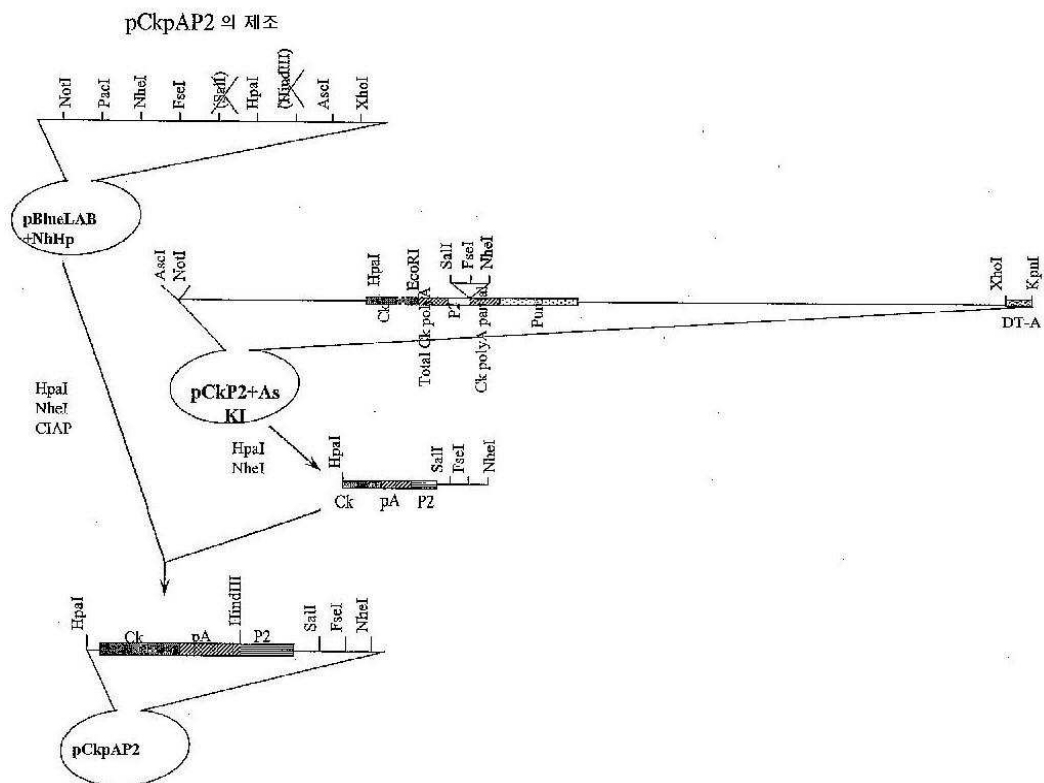
도면64c



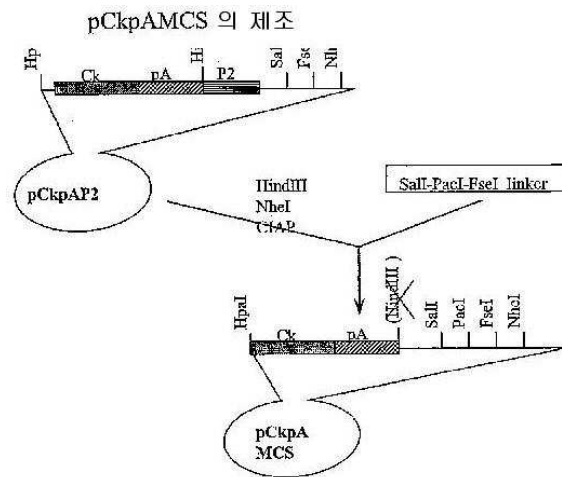
도면64d



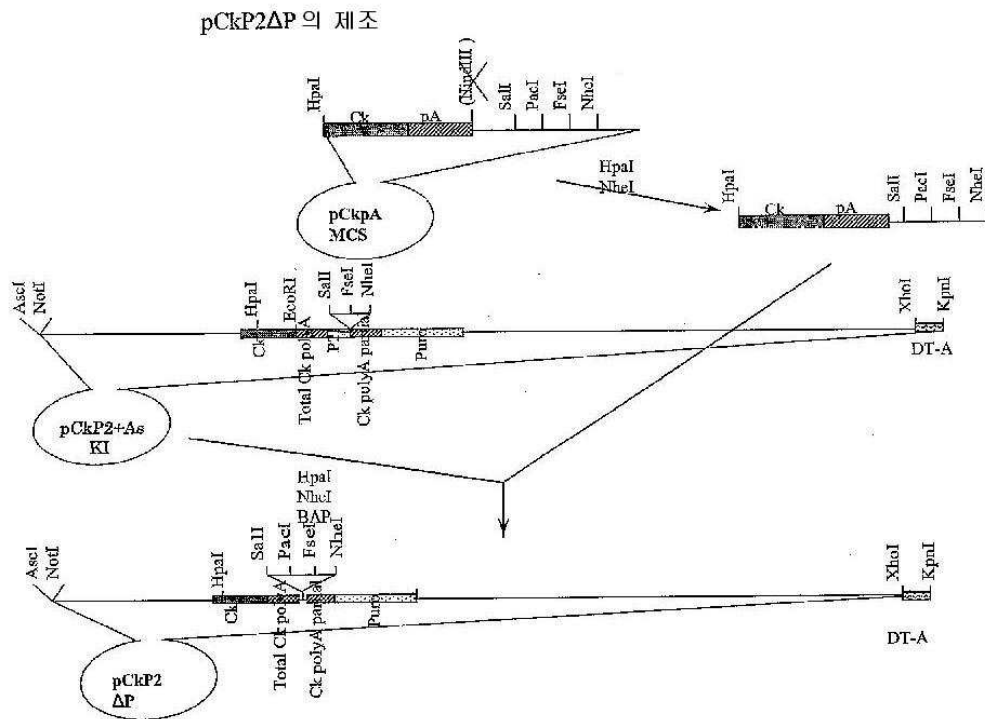
도면64e



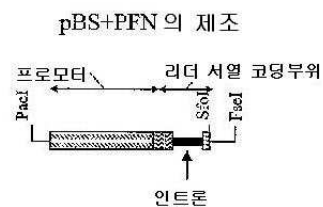
도면64f



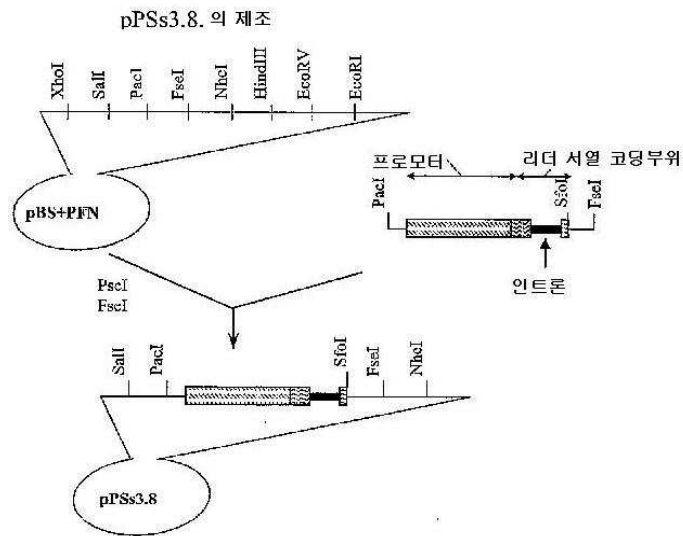
도면64g



도면64h



도면64i



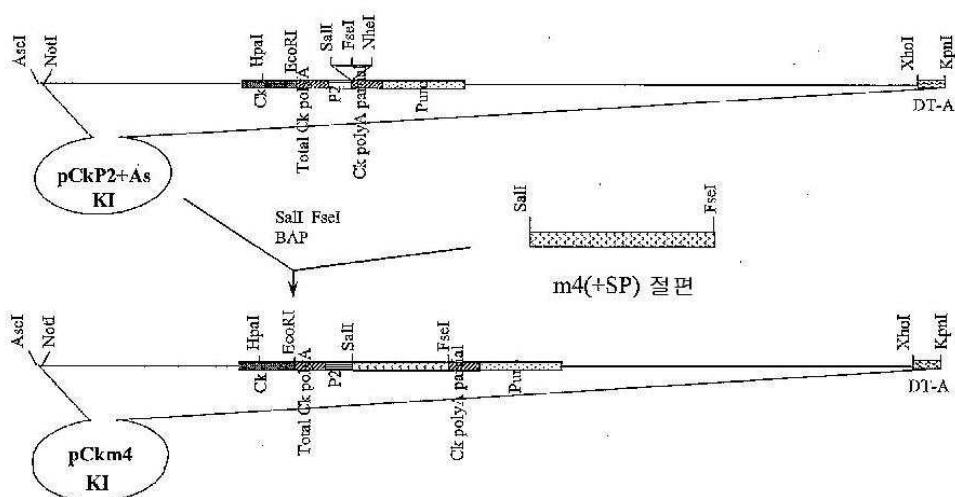
도면64j

m4(+SP) 및 m4(-SP)의 클로닝

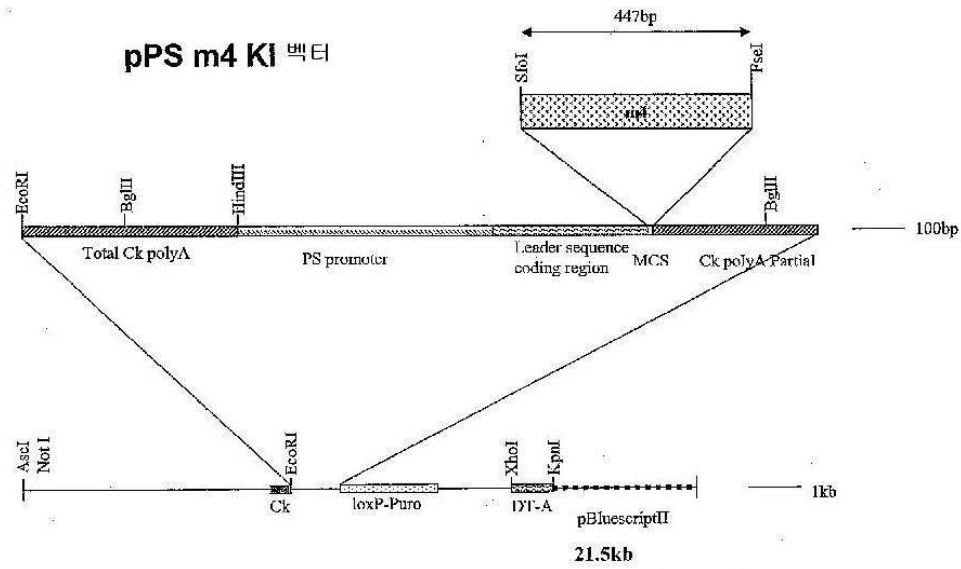


도면64k

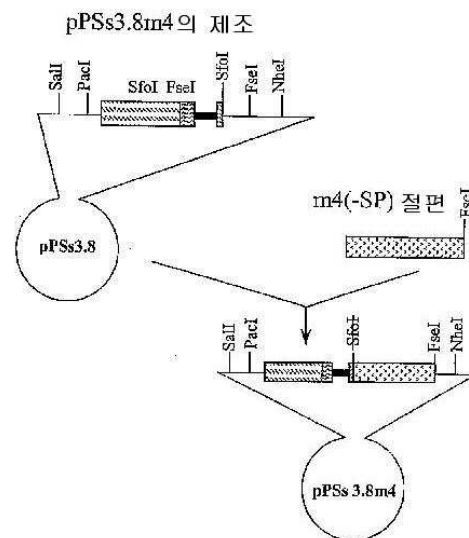
pCk m4 KI 의 형성



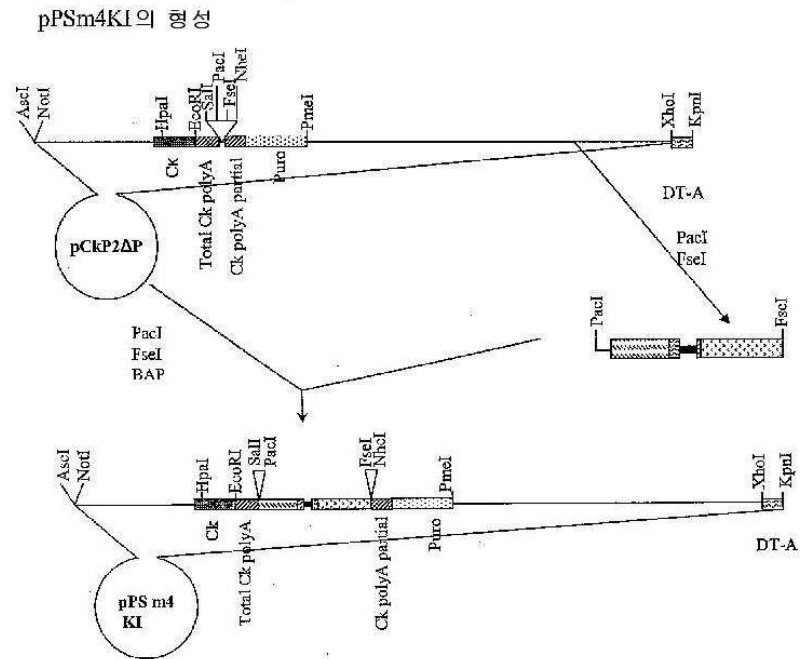
도면65a



도면65b

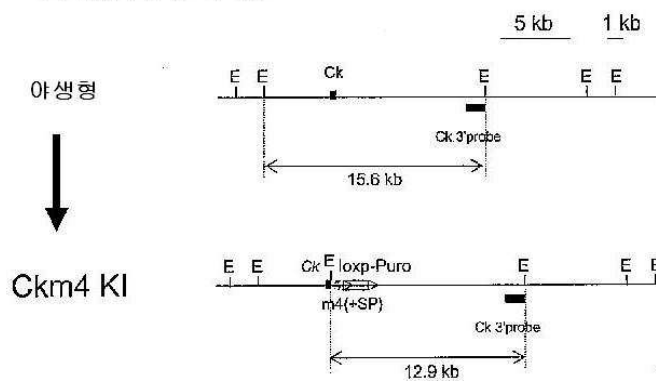


도면65c



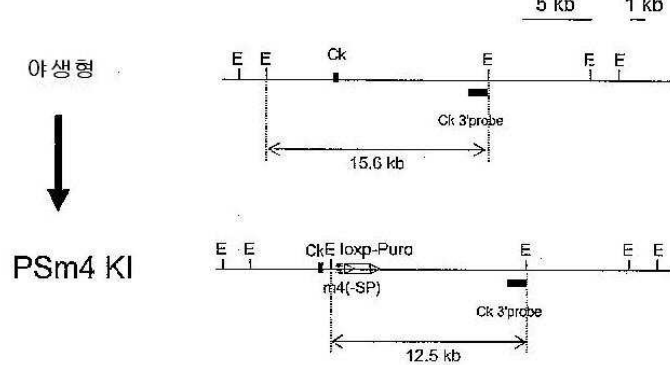
도면66

Ckm4 KI 유전자 지도

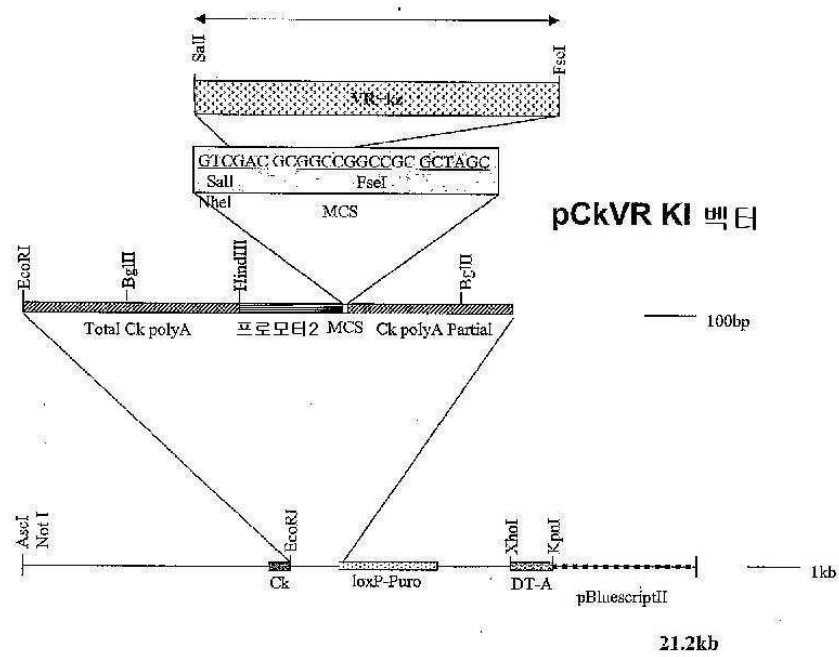


도면67

PSm4 KI 유전자 지도

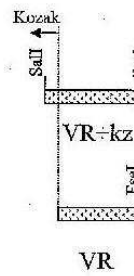


도면68a

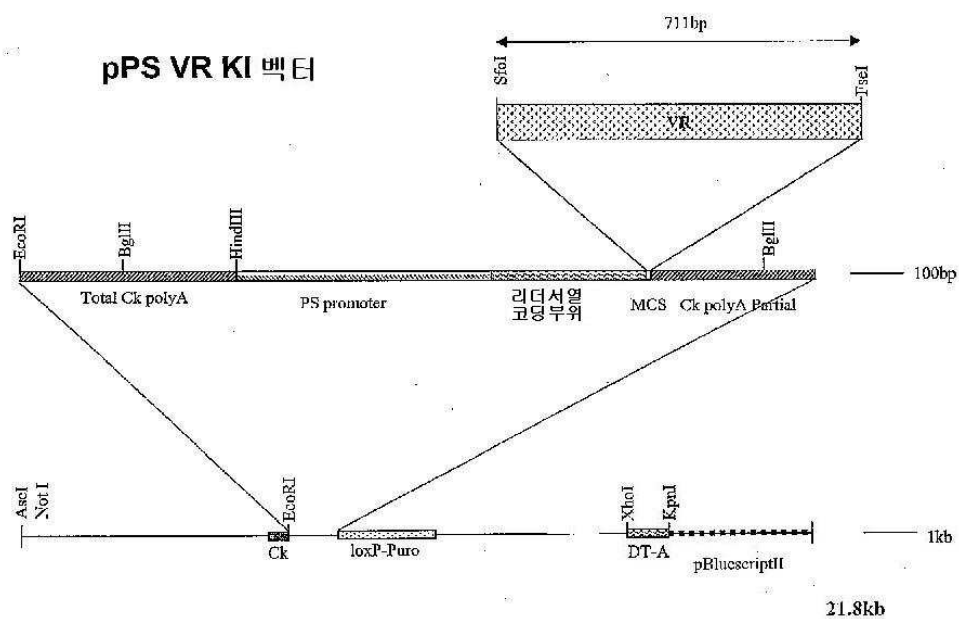


도면68b

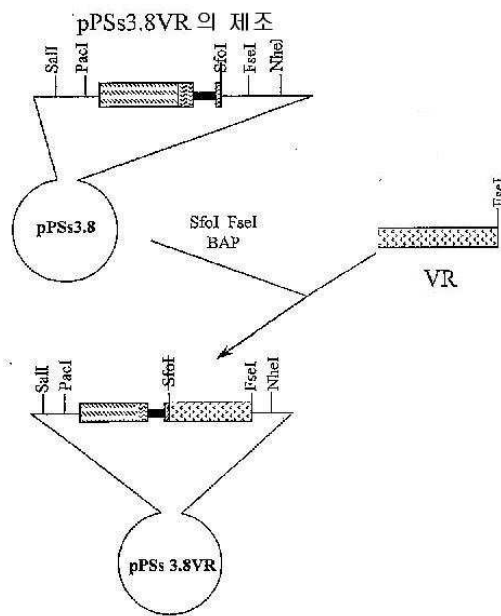
VR+kz 및 VR의 클로닝



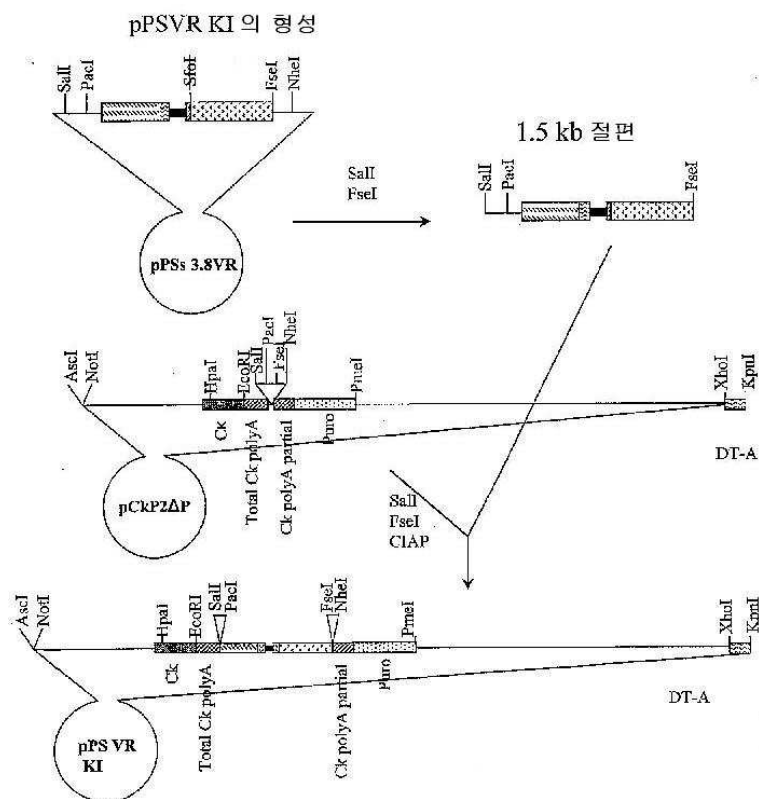
도면69a



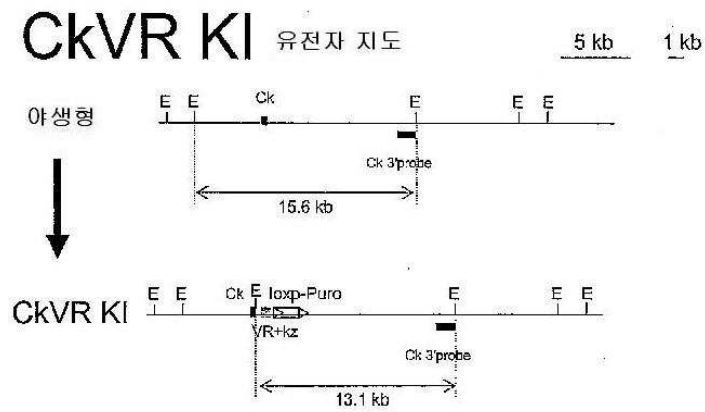
도면69b



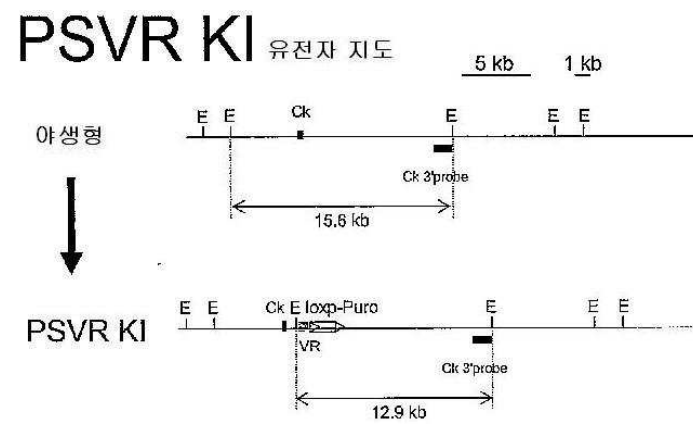
도면69c



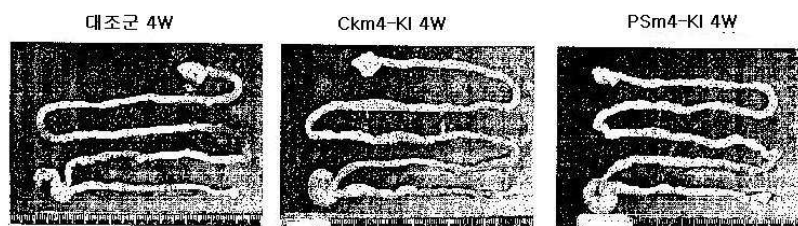
도면70



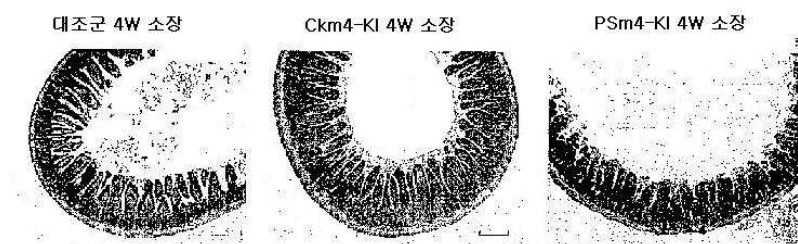
도면71



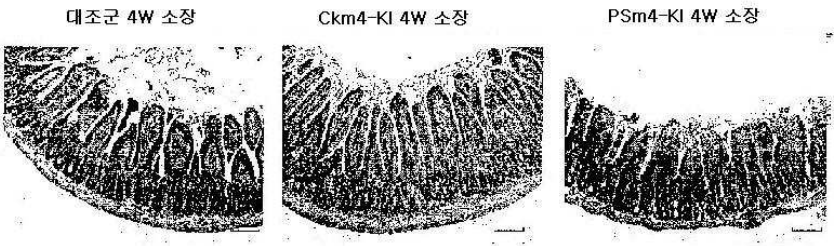
도면72



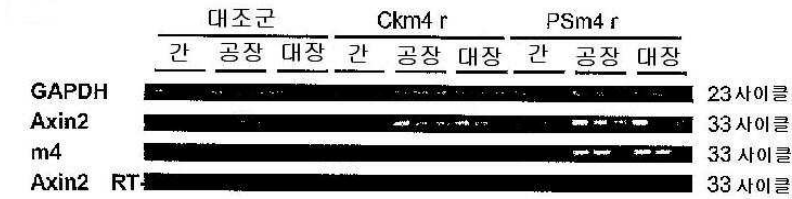
도면73



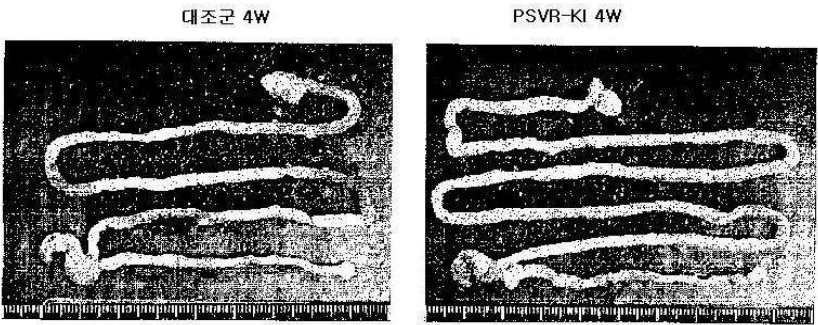
도면74



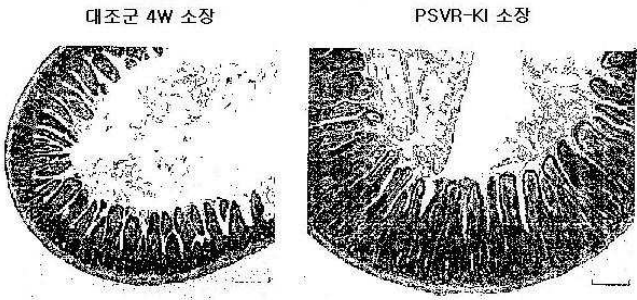
도면75



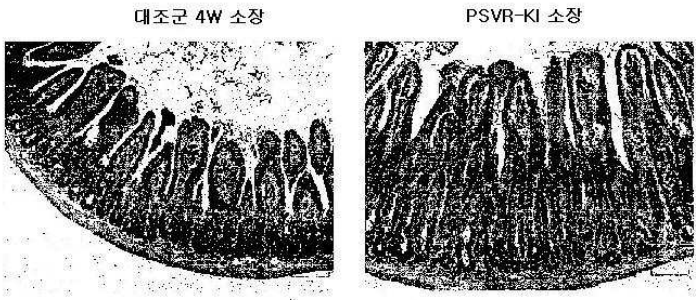
도면76



도면77



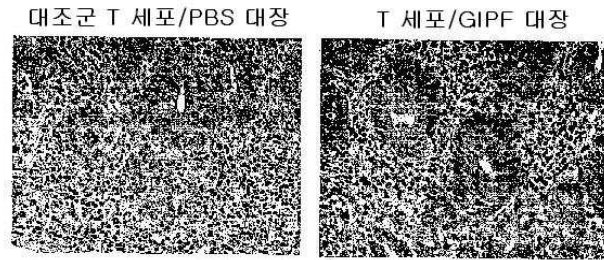
도면78



도면79

	대조군			CkVR-KI			PSVR-KI			
	간	공장	대장	간	공장	대장	간	공장	대장	
GAPDH										23사이클
Axin2										33사이클
Variant										33 사이클
Axin2 RT										33 사이클

도면80



서열목록

<110>	Nuvelo, Inc. and Kirin Beer Kapushiko Kaisha	
<120>	Gastrointestinal Proliferative Factor and uses thereof	
<150>	US 60/539,605	
<151>	2004-01-27	
<150>	US 60/619,241	
<151>	2004-10-15	
<160>	178	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	380	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	ttcccgggtc gacttcacgc gtcggaggaa gggaggccag ggccggcggg agaatgccaa	60
	caggaacctg gccaggaagg agagcaagga ggcgggtgct ggctctcgaa gacgcaaggg	120
	gcagcaacag cagcagcagc aagggacagt gggggcactc acatctgcag ggctgccta	180
	gggacactgt ccagcctcca ggcccatgca gaaagagttc agtgctactc tgcgtgattc	240
	aagcttttct gaactggaac gtcgggggca aagcatacac acacactcca atccatccat	300

gcatacacag acacaagaca cacacgctca aaccctgtc cacatataca accatacata	360
cttgcacatg tgtgttcatg	380
<210> 2	
<211> 2339	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
cgggtcgacg atttcgtcgc gccctcgccc ctcccgggccc tgcccccgtc gcgactggca	60
gcacgaagct gagattgtgg ttccctgggtg attcaggtgg gagtggggcca gaagatcacc	120
gctggcaagg actggtgttt gtcaactgta aggactcatg gaacagatct accagggatt	180
ctcagacctt agtttgagaa atgctgcaat taaaggcaaa tcctatcact ctgagtgatc	240
gctttgggtgt cgaggcaatc aaccataaag ataaatgcaa atatggaaat tgcataacag	300
tactcagtat taaggttgggt ttttgagta gtccctgctg acgtgacaaa aagatctctc	360
atatgatatt ccgaggtatc tttgaggaag tctctctttg aggacctccc tttgagctga	420
tggagaactg ggctccccac accctctctg tcccagctg agattatggg ggatttgggc	480
tacggcccag gcctgggcct cctgctgctg acccagcccc agaggtgtta gcaagagccg	540
tgtgctatcc accctccccg agaccacccc tccgaccagg ggcctggagc tggcgcgatga	600
ctatgcggct tgggctgtgt gtggtggccc tggttctgag ctggacgcac ctcaccatca	660
gcagccgggg gatcaagggg aaaaggcaga ggcggatcag tgccgagggg agccaggcct	720
gtgccaagg ctgtgagctc tgctctgaag tcaacggctg cctcaagtgc tcaccaagc	780
tgttcacct gctggagagg aacgacatcc gccaggtggg cgtctgcttg ccgtcctgcc	840
cacctggata cttcgacgcc cgcaaccccc acatgaacaa gtgcatcaaa tgcaagatcg	900
agcactgtga ggcctgcttc agccataact tctgcaccaa gtgtaaggag ggcttgtacc	960
tgcacaaggg ccgctgctat ccagcttgct ccgagggctc ctcagctgcc aatggcacca	1020
tggagtgcag tagtcctgcg caatgtgaaa tgagcgagtg gtctccgtgg gggccctgct	1080
ccaagaagca gcagctctgt ggtttccgga ggggctccga ggagcggaca cgcaggggtgc	1140
tacatgcccc tgtggggggac catgctgcct gctctgacac caaggagacc cggaggtgca	1200
cagtgaggag agtgccgtgt cctgagggggc agaagaggag gaaggagggc cagggccggc	1260

gggagaatgc caacaggaac ctggccagga aggagagcaa ggaggcgggt gctggctctc 1320
gaagacgcaa ggggcagcaa cagcagcagc agcaaggagc agtggggcca ctcacatctg 1380
cagggcctgc ctagggacac tgtccagcct ccaggcccat gcagaaagag ttcagtgcta 1440
ctctgcgtga ttcaagcttt cctgaactgg aacgtcgggg gcaaagcata cacacacact 1500
ccaatccatc catgcataca cagacacaag acacacacgc tcaaaccctt gtccacatat 1560
acaaccatac atacttgac atgtgtgttc atgtacacac gcagacacag acaccacaca 1620
cacacataca cacacacaca cacacgcaca cctgaggcca ccagaagaca cttccatccc 1680
tcgggcccag cagtacacac ttggtttcca gagctcccag tggacatgtc agagacaaca 1740
cttcccagca tctgagacca aactgcagag gggagccttc tggagaagct gctgggatcg 1800
gaccagccac tgtggcagat gggagccaag cttgaggact gctggtggcc tgggaagaaa 1860
ccttcttccc atcctgttca gcaactccag ctgtgtgact ttatcgttgg agagtattgt 1920
taccttccag gatacatatc agggttaacc tgactttgaa aactgcttaa aggtttatct 1980
caaattaaaa caaaaaaatc aacgacagca gtagacacag gcaccacatt cctttgcagg 2040
gtgtgagggg ttggcgaggt atgcgtagga gcaagaaggg acagggaatt tcaagagacc 2100
ccaaatagcc tgctcagtag agggatcatgc agacaaggaa gaaaacttag gggctgctct 2160
gacggtggta aacaggctgt ctatatcctt gttactcaga gcatggcccg gcagcagtg 2220
tgtcacaggg cagcttggtta ggaatgataa tctcaggtct cattccagac ctggagagcc 2280
atgagtctaa attttaagat tctgatgat tggcatgtta ccaaatttg agaagtgt 2339

<210> 3
<211> 789
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atgcggcttg ggctgtgtgt ggtggccctg gttctgagct ggacgcacct caccatcagc 60
agccggggga tcaaggggaa aaggcagagg cggatcagtg ccgaggggag ccaggcctgt 120
gcaaaggct gtgagctctg ctctgaagtc aacggctgcc tcaagtgtc acccaagctg 180
ttcatcctgc tggagaggaa cgacatccgc caggtgggag tctgcttgcc gtccctgccca 240
cctggatact tcgacgcccg caaccccgac atgaacaagt gcatcaaatg caagatcgag 300

cactgtgagg cctgcttcag ccataacttc tgcaccaagt gtaaggaggg cttgtacctg 360
 cacaagggcc gctgctatcc agcttgctcc gagggctcct cagctgcaa tggcaccatg 420
 gagtgcagta gtccctgcga atgtgaaatg agcgagtggg ctccgtgggg gccctgctcc 480
 aagaagcagc agctctgtgg tttccggagg ggctccgagg agcggacacg cagggtgcta 540
 catgcccctg tgggggacca tgctgcctgc tctgacacca aggagaccg gaggtgcaca 600
 gtgaggagag tgccgtgtcc tgaggggcag aagaggagga agggaggcca gggccggcgg 660
 gagaatgcca acaggaacct ggccaggaag gagagcaagg aggcgggtgc tggctctcga 720
 agacgcaagg ggcagcaaca gcagcagcag caagggacag tggggccact cacatctgca 780
 gggcctgcc 789

<210> 4
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
 20 25 30
 Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
 35 40 45
 Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
 50 55 60
 Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys
 85 90 95
 Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr
 100 105 110
 Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala
 115 120 125
 Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser
 130 135 140
 Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser

[illegible]

<210>	5
<211>	927
<212>	DNA
<213>	Artificial sequence

[illegible]

gagaatgccacacaggaacctggccaggaaggagagcaaggaggcggtgc tggctctcga 720
agacgcaaggggcagcaacagcagcagcagcaagggacagtggggccactcacatctgca 780
gggcctgccaggggcaattctgcagatatacagcacagtggcgggccgctc gagtctagag 840
ggcccgcggttcgaaggtaa gcctatccctaacctctctctcggtctcga ttctacgcgt 900
accggtcatcatcaccatca ccattga 927

<210> 6
<211> 308
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<400> 6
Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile
20 25 30
Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
35 40 45
Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
50 55 60
Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
65 70 75 80
Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys
85 90 95
Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr
100 105 110
Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala
115 120 125
Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser
130 135 140
Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser
145 150 155 160
Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr
165 170 175
Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp
180 185 190

Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu
 195 200 205

Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn
 210 215 220

Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg
 225 230 235 240

Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro
 245 250 255

Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala Lys Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln His
 260 265 270

Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro
 275 280 285

Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His
 290 295 300

His His His His
 305

<210> 7
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(60)

<400> 7
 atg cgg ctt ggg ctg tgt gtg gtg gcc ctg gtt ctg agc tgg acg cac 48
 Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15

ctc acc atc agc 60
 Leu Thr Ile Ser
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His

1	5	10	15	
Leu Thr Ile Ser				
	20			
<210>	9			
<211>	732			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1)..(729)			
<400>	9			
agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg				48
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly				
1 5 10 15				
agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc				96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly				
20 25 30				
tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac				144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp				
35 40 45				
atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc				192
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe				
50 55 60				
gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag				240
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu				
65 70 75 80				
cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag				288
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu				
85 90 95				
ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc				336
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly				
100 105 110				
tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt				384
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys				
115 120 125				
gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag				432
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln				
130 135 140				

ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta 480
 Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu
 145 150 155 160

cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc 528
 His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr
 165 170 175

cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct gag ggg cag aag agg 576
 Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg
 180 185 190

agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc aac agg aac ctg gcc 624
 Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala
 195 200 205

agg aag gag agc aag gag gcg ggt gct ggc tct cga aga cgc aag ggg 672
 Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly
 210 215 220

cag caa cag cag cag cag caa ggg aca gtg ggg cca ctc aca tct gca 720
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala
 225 230 235 240

ggg cct gcc t ag 732
 Gly Pro Ala

<210> 10
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
 35 40 45

Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
 50 55 60

Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
 65 70 75 80

His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
 85 90 95

Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly

100	105	110
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys		
115	120	125
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln		
130	135	140
Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu		
145	150	155
His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr		
165	170	175
Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg		
180	185	190
Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala		
195	200	205
Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly		
210	215	220
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala		
225	230	235
240		
Gly Pro Ala		

<210> 11
 <211> 696
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (696)

<400> 11	
atc agt gcc gag ggg agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc	48
Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys	
1 5 10 15	
tct gaa gtc aac ggc tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg	96
Ser Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu	
20 25 30	
ctg gag agg aac gac atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc	144
Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys	
35 40 45	

cca cct gga tac ttc gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc	192
Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile	
50 55 60	
aaa tgc aag atc gag cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc	240
Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys	
65 70 75 80	
acc aag tgt aag gag ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca	288
Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro	
85 90 95	
gct tgt ccc gag ggc tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt	336
Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser	
100 105 110	
agt cct gcg caa tgt gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc	384
Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys	
115 120 125	
tcc aag aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg	432
Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg	
130 135 140	
aca cgc agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct	480
Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser	
145 150 155 160	
gac acc aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct	528
Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro	
165 170 175	
gag ggg cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc	576
Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala	
180 185 190	
aac agg aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag gcg ggt gct ggc tct	624
Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser	
195 200 205	
cga aga cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag caa ggg aca gtg ggg	672
Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly	
210 215 220	
cca ctc aca tct gca ggg cct gcc	696
Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala	
225 230	

<210> 12
 <211> 232
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys
1 5 10 15

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

Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys
35 40 45

Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile
50 55 60

Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys
65 70 75 80

Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro
85 90 95

Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser
100 105 110

Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys
115 120 125

Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg
130 135 140

Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser
145 150 155 160

Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro
165 170 175

Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala
180 185 190

Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser
195 200 205

Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly
210 215 220

Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
225 230

<210> 13

<211> 168

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (168)

<400> 13

agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag ctc tgt	48
Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys	
1 5 10 15	

ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta cat gcc	96
Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala	
20 25 30	

cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc cgg agg	144
Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg	
35 40 45	

tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt	168
Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys	
50 55	

<210> 14

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys	
1 5 10 15	

Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala	
20 25 30	

Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg	
35 40 45	

Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys	
50 55	

<210> 15

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (756)

<400> 15
atg cgg ctt ggg ctg tgt gtg gtg gcc ctg gtt ctg agc tgg acg cac 48
Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
1 5 10 15

ctc acc atc agc atc agt gcc gag ggg agc cag gcc tgt gcc aaa ggc 96
Leu Thr Ile Ser Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly
20 25 30

tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc tgc ctc aag tgc tca ccc aag 144
Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys
35 40 45

ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac atc cgc cag gtg ggc gtc tgc 192
Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys
50 55 60

ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc gac gcc cgc aac ccc gac atg 240
Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met
65 70 75 80

aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag cac tgt gag gcc tgc ttc agc 288
Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser
85 90 95

cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag ggc ttg tac ctg cac aag ggc 336
His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly
100 105 110

cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc tcc tca gct gcc aat ggc acc 384
Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr
115 120 125

atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt gaa atg agc gag tgg tct ccg 432
Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro
130 135 140

tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc 480
Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly
145 150 155 160

tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac cat 528
Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His
165 170 175

gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg aga 576
Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg
180 185 190

gtg ccg tgt cct gag ggg cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc cgg 624
Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg
195 200 205

cgg gag aat gcc aac agg aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag gcg 672
 Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala
 210 215 220

ggt gct ggc tct cga aga cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag caa 720
 Gly Ala Gly Ser Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 225 230 235 240

ggg aca gtg ggg cca ctc aca tct gca ggg cct gcc 756
 Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 245 250

<210> 16
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 16
 Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly
 20 25 30

Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys
 35 40 45

Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys
 50 55 60

Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met
 65 70 75 80

Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser
 85 90 95

His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly
 100 105 110

Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr
 115 120 125

Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro
 130 135 140

Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly
 145 150 155 160

Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His
 165 170 175

Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg
180 185 190

Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg
195 200 205

Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala
210 215 220

Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
225 230 235 240

Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
245 250

<210> 17
<211> 789
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (789)

<400> 17
atg cgg ctt ggg ctg tgt gtg gtg gcc ctg gtt ctg agc tgg acg cac 48
Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His
1 5 10 15
ctc acc atc agc agc cgg ggg atc aag ggg aaa cag cag agg cgg atc 96
Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Gln Gln Arg Arg Ile
20 25 30
agt gcc gag ggg agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct 144
Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser
35 40 45
gaa gtc aac ggc tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg 192
Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu
50 55 60
gag agg aac gac atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca 240
Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
65 70 75 80
cct gga tac ttc gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa 288
Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys
85 90 95
tgc aag atc gag cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc 336
Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr

100	105	110	
aag tgt aag gag ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct			384
Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala			
115	120	125	
tgt ccc gag ggc tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt			432
Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser			
130	135	140	
cct gcg caa tgt gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc			480
Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser			
145	150	155	160
aag aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca			528
Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr			
165	170	175	
cgc agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac			576
Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp			
180	185	190	
acc aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct gag			624
Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu			
195	200	205	
ggg cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc aac			672
Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn			
210	215	220	
agg aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag gcg ggt gct ggc tct cga			720
Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg			
225	230	235	240
aga cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag caa ggg aca gtg ggg cca			768
Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro			
245	250	255	
ctc aca tct gca ggg cct gcc			789
Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala			
260			
<210> 18			
<211> 263			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<400> 18			
Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His			
1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Gln Gln Arg Arg Ile			

20	25	30
Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser		
35	40	45
Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu		
50	55	60
Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro		
65	70	75
Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys		
85	90	95
Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr		
100	105	110
Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala		
115	120	125
Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser		
130	135	140
Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser		
145	150	155
Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr		
165	170	175
Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp		
180	185	190
Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu		
195	200	205
Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn		
210	215	220
Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg		
225	230	235
Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro		
245	250	255
Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala		
260		

<210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (12)

<400> 19
 agg cag agg cgg 12
 Arg Gln Arg Arg
 1

<210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Arg Gln Arg Arg
 1

<210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (12)

<400> 21
 cag cag agg cgg 12
 Gln Gln Arg Arg
 1

<210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 22
 Gln Gln Arg Arg
 1

<210> 23
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1	5	10	15
Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg	20	25	30
Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys	35	40	45
Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala	50	55	60
Leu Glu Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys	65	70	75
Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr	85	90	95
Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr	100	105	110
Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn	115	120	125
Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser	130	135	140
Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr	145	150	155
Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val	165	170	175
Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro	180	185	190
Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys	195	200	205
Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn	210	215	220
Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser	225	230	235
Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys	245	250	255
Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His	260	265	270

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala
 1 5 10 15
 Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser
 20 25 30

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys
 1 5 10 15
 Lys

<210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Asn Gly Thr Met
 1

<210> 28

<211> 1170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 28
 Met Gly Leu Ala Trp Gly Leu Gly Val Leu Phe Leu Met His Val Cys
 1 5 10 15

 Gly Thr Asn Arg Ile Pro Glu Ser Gly Gly Asp Asn Ser Val Phe Asp
 20 25 30

 Ile Phe Glu Leu Thr Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Gly Arg Arg Leu
 35 40 45

 Val Lys Gly Pro Asp Pro Ser Ser Pro Ala Phe Arg Ile Glu Asp Ala
 50 55 60

 Asn Leu Ile Pro Pro Val Pro Asp Asp Lys Phe Gln Asp Leu Val Asp
 65 70 75 80

 Ala Val Arg Thr Glu Lys Gly Phe Leu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Gln
 85 90 95

 Met Lys Lys Thr Arg Gly Thr Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Asp His
 100 105 110

 Ser Gly Gln Val Phe Ser Val Val Ser Asn Gly Lys Ala Gly Thr Leu
 115 120 125

 Asp Leu Ser Leu Thr Val Gln Gly Lys Gln His Val Val Ser Val Glu
 130 135 140

 Glu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Gln Trp Lys Ser Ile Thr Leu Phe Val
 145 150 155 160

 Gln Glu Asp Arg Ala Gln Leu Tyr Ile Asp Cys Glu Lys Met Glu Asn
 165 170 175

 Ala Glu Leu Asp Val Pro Ile Gln Ser Val Phe Thr Arg Asp Leu Ala
 180 185 190

 Ser Ile Ala Arg Leu Arg Ile Ala Lys Gly Gly Val Asn Asp Asn Phe
 195 200 205

 Gln Gly Val Leu Gln Asn Val Arg Phe Val Phe Gly Thr Thr Pro Glu
 210 215 220

 Asp Ile Leu Arg Asn Lys Gly Cys Ser Ser Ser Thr Ser Val Leu Leu
 225 230 235 240

 Thr Leu Asp Asn Asn Val Val Asn Gly Ser Ser Pro Ala Ile Arg Thr
 245 250 255

Asn Tyr Ile Gly His Lys Thr Lys Asp Leu Gln Ala Ile Cys Gly Ile
 260 265 270
 Ser Cys Asp Glu Leu Ser Ser Met Val Leu Glu Leu Arg Gly Leu Arg
 275 280 285
 Thr Ile Val Thr Thr Leu Gln Asp Ser Ile Arg Lys Val Thr Glu Glu
 290 295 300
 Asn Lys Glu Leu Ala Asn Glu Leu Arg Arg Pro Pro Leu Cys Tyr His
 305 310 315 320
 Asn Gly Val Gln Tyr Arg Asn Asn Glu Glu Trp Thr Val Asp Ser Cys
 325 330 335
 Thr Glu Cys His Cys Gln Asn Ser Val Thr Ile Cys Lys Lys Val Ser
 340 345 350
 Cys Pro Ile Met Pro Cys Ser Asn Ala Thr Val Pro Asp Gly Glu Cys
 355 360 365
 Cys Pro Arg Cys Trp Pro Ser Asp Ser Ala Asp Asp Gly Trp Ser Pro
 370 375 380
 Trp Ser Glu Trp Thr Ser Cys Ser Thr Ser Cys Gly Asn Gly Ile Gln
 385 390 395 400
 Gln Arg Gly Arg Ser Cys Asp Ser Leu Asn Asn Arg Cys Glu Gly Ser
 405 410 415
 Ser Val Gln Thr Arg Thr Cys His Ile Gln Glu Cys Asp Lys Arg Phe
 420 425 430
 Lys Gln Asp Gly Gly Trp Ser His Trp Ser Pro Trp Ser Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Thr Cys Gly Asp Gly Val Ile Thr Arg Ile Arg Leu Cys Asn Ser
 450 455 460
 Pro Ser Pro Gln Met Asn Gly Lys Pro Cys Glu Gly Glu Ala Arg Glu
 465 470 475 480
 Thr Lys Ala Cys Lys Lys Asp Ala Cys Pro Ile Asn Gly Gly Trp Gly
 485 490 495
 Pro Trp Ser Pro Trp Asp Ile Cys Ser Val Thr Cys Gly Gly Gly Val
 500 505 510
 Gln Lys Arg Ser Arg Leu Cys Asn Asn Pro Thr Pro Gln Phe Gly Gly
 515 520 525
 Lys Asp Cys Val Gly Asp Val Thr Glu Asn Gln Ile Cys Asn Lys Gln

530	535	540
Asp Cys Pro Ile Asp Gly Cys Leu Ser Asn Pro Cys Phe Ala Gly Val		
545	550	555 560
Lys Cys Thr Ser Tyr Pro Asp Gly Ser Trp Lys Cys Gly Ala Cys Pro		
	565	570 575
Pro Gly Tyr Ser Gly Asn Gly Ile Gln Cys Thr Asp Val Asp Glu Cys		
	580	585 590
Lys Glu Val Pro Asp Ala Cys Phe Asn His Asn Gly Glu His Arg Cys		
	595	600 605
Glu Asn Thr Asp Pro Gly Tyr Asn Cys Leu Pro Cys Pro Pro Arg Phe		
	610	615 620
Thr Gly Ser Gln Pro Phe Gly Gln Gly Val Glu His Ala Thr Ala Asn		
	625	630 635 640
Lys Gln Val Cys Lys Pro Arg Asn Pro Cys Thr Asp Gly Thr His Asp		
	645	650 655
Cys Asn Lys Asn Ala Lys Cys Asn Tyr Leu Gly His Tyr Ser Asp Pro		
	660	665 670
Met Tyr Arg Cys Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Ile Ile		
	675	680 685
Cys Gly Glu Asp Thr Asp Leu Asp Gly Trp Pro Asn Glu Asn Leu Val		
	690	695 700
Cys Val Ala Asn Ala Thr Tyr His Cys Lys Lys Asp Asn Cys Pro Asn		
	705	710 715 720
Leu Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Tyr Asp Lys Asp Gly Ile Gly Asp		
	725	730 735
Ala Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asn Asp Lys Ile Pro Asp Asp Arg Asp		
	740	745 750
Asn Cys Pro Phe His Tyr Asn Pro Ala Gln Tyr Asp Tyr Asp Arg Asp		
	755	760 765
Asp Val Gly Asp Arg Cys Asp Asn Cys Pro Tyr Asn His Asn Pro Asp		
	770	775 780
Gln Ala Asp Thr Asp Asn Asn Gly Glu Gly Asp Ala Cys Ala Ala Asp		
	785	790 795 800
Ile Asp Gly Asp Gly Ile Leu Asn Glu Arg Asp Asn Cys Gln Tyr Val		
	805	810 815

Tyr Asn Val Asp Gln Arg Asp Thr Asp Met Asp Gly Val Gly Asp Gln
 820 825 830
 Cys Asp Asn Cys Pro Leu Glu His Asn Pro Asp Gln Leu Asp Ser Asp
 835 840 845
 Ser Asp Arg Ile Gly Asp Thr Cys Asp Asn Asn Gln Asp Ile Asp Glu
 850 855 860
 Asp Gly His Gln Asn Asn Leu Asp Asn Cys Pro Tyr Val Pro Asn Ala
 865 870 875 880
 Asn Gln Ala Asp His Asp Lys Asp Gly Lys Gly Asp Ala Cys Asp His
 885 890 895
 Asp Asp Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Asp Lys Asp Asn Cys Arg Leu
 900 905 910
 Val Pro Asn Pro Asp Gln Lys Asp Ser Asp Gly Asp Gly Arg Gly Asp
 915 920 925
 Ala Cys Lys Asp Asp Phe Asp His Asp Ser Val Pro Asp Ile Asp Asp
 930 935 940
 Ile Cys Pro Glu Asn Val Asp Ile Ser Glu Thr Asp Phe Arg Arg Phe
 945 950 955 960
 Gln Met Ile Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Pro Asn
 965 970 975
 Trp Val Val Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Val Asn Cys
 980 985 990
 Asp Pro Gly Leu Ala Val Gly Tyr Asp Glu Phe Asn Ala Val Asp Phe
 995 1000 1005
 Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Thr Glu Arg Asp Asp Asp Tyr Ala Gly
 1010 1015 1020
 Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val Met Trp
 1025 1030 1035 1040
 Lys Gln Val Thr Gln Ser Tyr Trp Asp Thr Asn Pro Thr Arg Ala Gln
 1045 1050 1055
 Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Val Lys Val Val Asn Ser Thr Thr Gly Pro
 1060 1065 1070
 Gly Glu His Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr Gly Asn Thr Pro Gly
 1075 1080 1085
 Gln Val Arg Thr Leu Trp His Asp Pro Arg His Ile Gly Trp Lys Asp

1090 1095 1100

Phe Thr Ala Tyr Arg Trp Arg Leu Ser His Arg Pro Lys Thr Gly Phe
 1105 1110 1115 1120

Ile Arg Val Val Met Tyr Glu Gly Lys Lys Ile Met Ala Asp Ser Gly
 1125 1130 1135

Pro Ile Tyr Asp Lys Thr Tyr Ala Gly Gly Arg Leu Gly Leu Phe Val
 1140 1145 1150

Phe Ser Gln Glu Met Val Phe Phe Ser Asp Leu Lys Tyr Glu Cys Arg
 1155 1160 1165

Asp Pro
 1170

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 29
 gaccatgctg cctgctctga cac 23

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 30
 caccgcctc cttgctctcc 20

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 31
 gggggagacc acaccacctg ct 22

<210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 32
 ttggacctcg gctccttgct gttc 24

<210> 33
 <211> 5495
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 33
 cttatctttc tcctttatta acggttgctg ttgtatccat aactcaattc caaaggatat 60
 aaaccttaac atatagatat aatttttgtgt accttctatg aaacagcatt aaagcaaaga 120
 agttcaaata gaaagactgg cttagttatt attaactaag agatgctagt gagttctaaa 180
 ttaataccat ttaaaattta taatttgcag aattaccacc accaccacca ctcagcccag 240
 gaaaagttac aaagaactgg ctgtaccatt tgtttgtttt cctccttttt agagttcttt 300
 tatttatgtg tgagtgaatg ccatgtactt gtggatgcag aggctgtcag attccttgca 360
 gctggagtaa cagacagttg tgagctactt atagtactag aactaagatc ctatggaaga 420
 gcagcgagtg ccactaactg ctgagccacc tctccagccc atttctttat ttttcaatga 480
 acaaataata agcagtccta tgtgacatgc ttctaaagca aaagatataa tatttagtat 540
 tatatacatt aataataaaa tacattatct tctaagaatt gaagtctcaa ctatgaaaat 600
 cagcagttct ctgtcagaga agcccaagcg cttccacgca tgcttgagaga gggggttaag 660
 ctttcgccta ccactgctc tgttcctctt cagtgaggag ggtttttgta cagccagaca 720
 gtggagtact accactgtgg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta 780
 agtagaatcc aaagtctctt tcttccgttg tctatgtctg tggcttctat gtctaaaaat 840
 gatgtataaa atcttactct gaaaccagat tctggcactc tccaaggcaa agatacagag 900
 taactccgta agcaaagctg ggaataggct agacatgttc tctggagaat gaatgccagt 960
 gtaataatta acacaagtga tagtttcaga aatgctcaaa gaagcagggg agcctgcctt 1020
 agacaaacct ttactcgggtg ctcagaccat gctcagtttt tgtatggggg ttgagtgaag 1080
 ggacaccagt gtgtgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa acgtaagtag 1140
 tcttctcaac tcttggtcac taagtctaac cttgttaagt tgttctttgt tgtgtgtttt 1200
 tcttaaggag atttcaggga tttagcaaat tccattctca gatcaggtgt taaggaggga 1260
 aaactgtccc acaagagggt ggaatgattt tcaggctaaa ttttaggctt tctaaaccaa 1320

agtaactaaa ctaggggaag agggataatt gtctacctag ggagggtttt gtggaggtaa	1380
agttaaaata aatcactgta aatcacattc agtgatggga ccagactgga aataaaacct	1440
aagtacattt ttgctcaact gcttgtgaag ttttgggtccc attgtgtcct ttgtatgagt	1500
ttgtggtgta cattagataa atgaactatt ccttgaacc caaaacttaa atagaagaga	1560
acaaaaaatc tagctactgt acaagctgag caaacagact gacctcatgt cagatttgtg	1620
ggagaaatga gaaaggaaca gtttttctct gaacttagcc tatctaactg gatcgctca	1680
ggcagggtttt tgtaaagggg ggcgcagtga tatgaatcac tgtgattcac gttcggctcg	1740
gggacaaagt tggaaataaa acgtaagtag acttttgctc atttacttgt gacgttttgg	1800
ttctgtttgg gtaacttgtg tgaatttgtg acattttggc taaatgagcc attcctggca	1860
acctgtgcat caatagaaga tccccagaa aagagtcagt gtgaaagctg agcgaaaaac	1920
tcgtcttagg cttctgagac cagttttgta aggggaatgt agaagaaaga gctgggcttt	1980
tcctctgaat ttggcccatc tagttggact ggcttcacag gcagggtttt gtagagaggg	2040
gcatgtcata gtcctcactg tggctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac	2100
gtaagtacac ttttctcatc tttttttatg tgtaagacac aggttttcat gttaggagtt	2160
aaagtcagtt cagaaaatct tgagaaaatg gagagggctc attatcagtt gacgtggcat	2220
acagtgtcag attttctggt tatcaagcta gtgagattag gggcaaaaag aggctttagt	2280
tgagaggaaa gtaattaata ctatggtcac catccaagag attggatcgg agaataagca	2340
tgagtagtta ttgagatctg ggtctgactg caggtagcgt ggtcttctag acgtttaagt	2400
gggagatttg gaggggatga ggaatgaagg aacttcagga tagaaaaggg ctgaagtcaa	2460
gttcagctcc taaaatggat gtgggagcaa actttgaaga taaactgaat gaccagagg	2520
atgaaacagc gcagatcaaa gaggggccta gagctctgag aagagaagga gactcatccg	2580
tgttgagttt ccacaagtac tgtcttgagt tttgcaataa aagtgggata gcagagttga	2640
gtgnagccg tanagtatac tctcttttgt ctctaagat ttttatgact acaaaaatca	2700
gtagtatgtc ctgaaataat cattaagctg tttgaaagta tgactgcttg ccatgtagat	2760
accatggctt gctgaatgat cagaagagg gtgactctta ttctaaaatt tgtcacaaaa	2820
tgtcaaaatg agagactctg taggaacgag tcccttgaca gacagctgca aggggttttt	2880

ttcctttgtc tcattttctac atgaaagtaa atttgaaatg atcntttttt attataagag	2940
tagaaataca gttgggtttg aactatatgt tttaatnggc cncacggttt tgtaagacat	3000
ttggtccttt gttttcccag ttattactcg attgtaattt tatatcgcca gcantggtct	3060
gaaacggttnn nnnncgcaac ctcttcgttt actaactggg tgaccttcgg ctgtgccagc	3120
catttggcgt tcaccctgcc gcnggccnat gagaaccccc gcggtagnnc ccttgctccg	3180
cggaaccac tttcctgagg acacagtgat aggaacagag ccactaatct gaagagaaca	3240
gagatgtgac agactacact aatgtgagaa aaacaaggaa agggtgactt attggagatt	3300
tcagaaataa aatgcattta ttattatatt cccttattta atttctattg ggaattagaa	3360
agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt aatgtatata atcttttaga	3420
ggtaaaatct acagccagca aaagtcatgg taaatattct ttgactgaac tctcactaaa	3480
ctcctctaaa ttatatgtca tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct	3540
taactggta ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac	3600
aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca gctactataa	3660
tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg acccttcctt gccaaaggca	3720
actatttaag gaccctttaa aactcttgaa actactttag agtcattaag ttatttaacc	3780
acttttaatt actttaaaat gatgtcaatt cccttttaac tattaattta ttttaagggg	3840
ggaaaggctg ctcataattc tattgttttt cttggtaaag aactctcagt ttctgtttta	3900
ctacctctgt cacccaagag ttggcatctc aacagagggg actttccgag agccatctgg	3960
cagttgctta agatcagaag tgaagtctgc cagttcctcc taggcagggtg gccagatta	4020
cagttgacct gttctggtgt ggctaaaaat tgtcccatgt ggttacaaac cattagacca	4080
gggtctgatg aattgctcag aatattttctg gacacccaaa tacagaccct ggcttaaggc	4140
ctgtccatac agtaggttta gcttggttac accaaaggaa gccatacaga ggctaatatc	4200
agagtattct tggaagagac aggagaaaaat gaaagccagt ttctgctctt accttatgtg	4260
cttgtgttca gactcccaaa catcaggagt gtcagtaaac tggctctgaat ctctgtctga	4320
agcatggaac tgaaaagaat gtagtttcag ggaagaaagg caatagaagg aagcctgaga	4380
atatcttcaa agggtcagac tcnnnaattt actttctaaa gaagtagcta ggaactaggg	4440

aataacttag aaacaacaag attgtatata tgtgcatcct ggcccattgt tccttatctg 4500
tagggataag cgtgcttttt tgtgtgttgt atataacata actgtttaca cataatacac 4560
tgaaatggag cccttccttg ttacttcata ccctcctctg tgcttccttc ctcaggggct 4620
gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccctccagtg agcagttaac atctggaggt 4680
gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc taccocaaag acatcaatgt caagtggaag 4740
attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa 4800
gacagcacct acagcatgag cagcacccctc acgttgacca aggacgagta tgaacgacat 4860
aacagctata cctgtgaggc cactcacaag acatcaactt caccattgt caagagcttc 4920
aacaggaatg agtggttagag acaaagggtc tgagacgcca ccaccagctc cccagctcca 4980
tcctatcttc ccttctaagg tcttgagggc tccccacaa gcgacctacc actgttgcg 5040
tgctccaaac ctctcccca cctccttctc ctctcctcc ctttccttg cttttatcat 5100
gctaataattt gcagaaaata ttcaataaag tgagtctttg cacttgagat ctctgtcttt 5160
cttactaaat ggtagtaatc agttgttttt ccagttacct gggtttctct tctaaagaag 5220
ttnaatgitt agttgccctg aaatccacca cacttaaagg ataaataaaa ccctccactt 5280
gccctggttg gctgtccact acatggcagt cctttctaag gttcacgagt actattcatg 5340
gcttatttct ctggccatgg taggtttgag gaggcatacc tcttagtttt cttcccctaa 5400
gtcgtcaaag tcctgaaggg ggacagtctt tacaagcaca tgttctgnnc tgattcaacc 5460
taccagtaa acttggcgaa gcagtagcat catta 5495

<210> 34
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<400> 34
atctcgagga accactttcc tgaggacaca gtgatagg 38

<210> 35
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<400> 35
atgaattcct aacactcatt cctgttgaag ctcttgac 38

<210>	36	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	36	
	atgaattcag acaaagggtcc tgagacgccca cc	32
<210>	37	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	37	
	atggatcctc gagtcgactg gatttcaggg caactaaaca tt	42
<210>	38	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	38	
	atgaattcgc ccctctccct ccccccccc ta	32
<210>	39	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	39	
	atgaattcgt cgacttgtag caagcttata atcgtggt	38
<210>	40	
<211>	8	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	40	
	agtcgaca	8
<210>	41	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	41	
	aatttgtcga ctgc	14

<210> 42
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 42
 tgggtgattat tcagagtagt tttagatgag tgcatcttca tgaatctcca gcccatattc 60
 tcccatgtgt ttatcagtta agaactgact agactctatc ttgctatttg catattacat 120
 tttcagtaac cacaaatatc tcacagttgg tttatagcaa agtacttatg agaatagtag 180
 taattagcta gggaccaaag ttcaaagaca aaatggattt tcaagtgcag attttcagct 240
 tcctgctaata cagtgcctca ggtaacagag ggcaggggaat ttgagatcag aatccaacca 300
 aaattatttt ccctggggaa tttgagtcta aaatacagtt ttttcatttt ctttcatctg 360
 aatgttgggt ggtataaaat tatttttgta tctctatttc tactaatccc tctctctcta 420
 ttttgctttt ttctagtcata actgtccaga ggacaaattg ttctcaccca gtctccagca 480
 atcatgtctg catctccagg ggagaagggt accatgacct gcagtgccag ctcaagtgtg 540
 agttacatgt actggtacca gcagaagcca ggatcctccc ccagactcct gatttatgac 600
 acatccaacc tggcttcttg agtccctgtt cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctct 660
 tactctctca caatcagccg aatggagggt gaagatgctg ccacttatta ctgccagcag 720
 tggagtagtt acccacccac acagtgatac agactggaac aaaaaccctc taagtcctta 780
 gggcttagct acttcctc 798

<210> 43
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 43
 cccaagcttt ggtgattatt cagagtagtt ttagatgagt gcat 44

<210> 44
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 44
 acgcgtcgac tttgtctttg aactttgggtc cctagctaata tacta 45

<210> 45
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 45
 acgcgtcgcac gcggccggcc gcgctagcag acaaaggtcc tgagacgcc ccaccagctc 60
 ccc 63

<210> 46
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 46
 gaagatctca agtgcaaaga ctactttat tgaatatattt ctg 43

<210> 47
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 47
 ggaattcaga caaaggctcct gagacgccac caccagctcc cc 42

<210> 48
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 48
 ccaagcttgc ctctcaaac ctaccatggc ccagagaaat aag 43

<210> 49
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 49
 ataagaatgc ggccgcctca gagcaaattgg gttctacagg cctaacaacc t 51

<210> 50
 <211> 44
 <212> DNA

<213>	Artificial sequence	
<400>	50	
	ccggaattcc taacactcat tcctgttgaa gctcttgaca atgg	44
<210>	51	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	51	
	acgcgtcgac ccacatgcgg cttgggctgt gtgt	34
<210>	52	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	52	
	acgcgtcgac gtcgacctag gcaggccctg	30
<210>	53	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	53	
	ctgactagac tctatcttgc	20
<210>	54	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	54	
	ccacggagac cactcgtca tt	22
<210>	55	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	55	
	caccctagg tcaatattgg ccattagc	28
<210>	56	

<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	56	
	caccctagg taggcatccc cagcatgc	28
<210>	57	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	57	
	caccatgcgg cttgggctgt ctc	23
<210>	58	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	58	
	ggcaggccct gcagatgtga gtg	23
<210>	59	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	59	
	gatcaagggg aaacagcaga ggcggatcag	30
<210>	60	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	60	
	ctgatccgcc tctgctgttt ccccttgatc	30
<210>	61	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	61	
	caccgctagc ctcgagaatt cacgcgtg	28

<210> 62
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 62
 gctgatggtg aggtgcgtc 19

<210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 63
 atcagtgccg aggggagcca g 21

<210> 64
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 64
 gccctctaga gcggcaggcc ctgcagatg 29

<210> 65
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 65
 ccggctagcc accatggcgc aatgtgaaat g 31

<210> 66
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 66
 ccatgcggcc gccctcctca ctgtgcacct 30

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 67
 Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln
 1 5 10 15

<210> 68
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CDS
 <222> (61) .. (795)

 <400> 68
 atgcggccttg ggctgtgcgt ggtggccctg gttctgagct ggacacacat cgccgtgggc 60

 agc cgg ggg atc aag ggc aag aga cag agg cgg atc agt gct gag ggg 108
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15

 agc caa gcc tgc gcc aag ggc tgt gag ctc tgt tca gaa gtc aac ggt 156
 Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30

 tgc ctc aag tgc tcg ccc aag ctc ttc att ctg ctg gag agg aac gac 204
 Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
 35 40 45

 atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ctg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttt 252
 Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
 50 55 60

 gat gcc cgc aac ccc gac atg aac aaa tgc atc aaa tgc aag atc gag 300
 Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
 65 70 75 80

 cac tgt gag gcc tgc ttc agc cac aac ttc tgc acc aag tgt cag gag 348
 His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Gln Glu
 85 90 95

 gcc ttg tac tta cac aag ggc cgc tgc tat cca gcc tgc cct gag ggc 396
 Ala Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
 100 105 110

 tct aca gcc gct aac agc acc atg gag tgc ggc agt cct gca caa tgt 444
 Ser Thr Ala Ala Asn Ser Thr Met Glu Cys Gly Ser Pro Ala Gln Cys
 115 120 125

 gaa atg agc gag tgg tcc ccg tgg gga ccc tgc tcc aag aag agg aag 492
 Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Arg Lys
 130 135 140

 ctg tgc ggt ttc cgg aag gga tcg gaa gag cgg aca cgc aga gtg ctc 540
 Leu Cys Gly Phe Arg Lys Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu

145	150	155	160	
cat gct ccc ggg gga gac cac acc acc tgc tcc gac acc aaa gag acc				588
His Ala Pro Gly Gly Asp His Thr Thr Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr				
	165	170	175	
cgc aag tgt acc gtg cgc agg acg ccc tgc cca gag ggg cag aag agg				636
Arg Lys Cys Thr Val Arg Arg Thr Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg				
	180	185	190	
agg aag ggg ggc cag ggc cgg agg gag aat gcc aac agg cat ccg gcc				684
Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg His Pro Ala				
	195	200	205	
agg aag aac agc aag gag ccg agg tcc aac tct cgg aga cac aaa ggg				732
Arg Lys Asn Ser Lys Glu Pro Arg Ser Asn Ser Arg Arg His Lys Gly				
	210	215	220	
caa cag cag cca cag cca ggg aca aca ggg cca ctc aca tca gta gga				780
Gln Gln Gln Pro Gln Pro Gly Thr Thr Gly Pro Leu Thr Ser Val Gly				
	225	230	235	240
cct acc tgg gca cag tga				798
Pro Thr Trp Ala Gln				
	245			
<210> 69				
<211> 245				
<212> PRT				
<213> Mus musculus				
<400> 69				
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly				
1	5	10	15	
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly				
	20	25	30	
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp				
	35	40	45	
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe				
	50	55	60	
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu				
	65	70	75	80
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Gln Glu				
	85	90	95	
Ala Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly				

100	105	110
Ser Thr Ala Ala Asn Ser Thr Met Glu Cys Gly Ser Pro Ala Gln Cys		
115	120	125
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Arg Lys		
130	135	140
Leu Cys Gly Phe Arg Lys Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu		
145	150	155
His Ala Pro Gly Gly Asp His Thr Thr Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr		
165	170	175
Arg Lys Cys Thr Val Arg Arg Thr Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg		
180	185	190
Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg His Pro Ala		
195	200	205
Arg Lys Asn Ser Lys Glu Pro Arg Ser Asn Ser Arg Arg His Lys Gly		
210	215	220
Gln Gln Gln Pro Gln Pro Gly Thr Thr Gly Pro Leu Thr Ser Val Gly		
225	230	235
Pro Thr Trp Ala Gln		
245		

<210> 70
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 70
 gtgtgaggtc cacggaac 19

<210> 71
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 71
 ggtgcaaaga catagccaga 20

<210> 72
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400>	72	
gcaaacaaca caggggtgta		20
<210>	73	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	73	
ggcaggtctg tgactgatgt		20
<210>	74	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	74	
tatgcagaac tgcgatttcc		20
<210>	75	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	75	
ccaatttgtc tcctatctgt gg		22
<210>	76	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	76	
tgctccatga ggagacacc		19
<210>	77	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	77	
cctgcctctt ttccacaga		19
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial sequence	
<400>	78	
	caacgttccc ttcaagacac	20
<210>	79	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	79	
	cgcttgtcct cgttcatct	19
<210>	80	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	80	
	ctcaacaccg gaatttttga	20
<210>	81	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	81	
	aattgcattt cgaaggaagg	20
<210>	82	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	82	
	gtagattcgg gcaagtccac cac	23
<210>	83	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	83	
	ttcccatctc agcagcctcc tt	22
<210>	84	

<211> 105
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (105)

<400> 84
 agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg 48
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc 96
 Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30
 tgc ctc aag 105
 Cys Leu Lys
 35

<210> 85
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30
 Cys Leu Lys
 35

<210> 86
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (180)

<400> 86
 agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg 48
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15

agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc 96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
20 25 30

tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac 144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
35 40 45

atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca 180
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
50 55 60

<210> 87
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
1 5 10 15

Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
20 25 30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
35 40 45

Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro
50 55 60

<210> 88
<211> 270
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (270)

<400> 88
agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg 48
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
1 5 10 15

agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc 96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
20 25 30

tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac 144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp

```

35          40          45
atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc      192
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
    50          55          60

gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag      240
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
    65          70          75          80

cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc      270
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe
    85          90

<210> 89
<211> 90
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
    1          5          10          15

Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
    20          25          30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
    35          40          45

Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
    50          55          60

Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
    65          70          75          80

His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe
    85          90

<210> 90
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (360)

<400> 90
agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg      48
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly

```

```

1           5           10           15
agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc          96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
           20           25           30

tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac          144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
           35           40           45

atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc          192
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
           50           55           60

gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag          240
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
           65           70           75           80

cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag          288
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
           85           90           95

ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc          336
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
           100           105           110

tcc tca gct gcc aat ggc acc atg          360
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met
           115           120

<210> 91
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
1           5           10           15

Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
           20           25           30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
           35           40           45

Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
           50           55           60

Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
           65           70           75           80

His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu

```

	85	90	95	
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly				
	100	105	110	
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met				
	115	120		
<210>	92			
<211>	450			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1) .. (450)			
<400>	92			
agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg				48
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly				
1 5 10 15				
agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc				96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly				
20 25 30				
tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac				144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp				
35 40 45				
atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc				192
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe				
50 55 60				
gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag				240
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu				
65 70 75 80				
cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag				288
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu				
85 90 95				
ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc				336
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly				
100 105 110				
tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt				384
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys				
115 120 125				
gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag				432
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln				

130 135 140 450

ctc tgt ggt ttc cgg agg
 Leu Cys Gly Phe Arg Arg
 145 150

<210> 93
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30
 Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
 35 40 45
 Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
 50 55 60
 Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
 65 70 75 80
 His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
 85 90 95
 Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys
 115 120 125
 Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln
 130 135 140
 Leu Cys Gly Phe Arg Arg
 145 150

<210> 94
 <211> 540
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (540)

<400> 94
 agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg 48
 Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc 96
 Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30
 tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac 144
 Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
 35 40 45
 atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc 192
 Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
 50 55 60
 gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag 240
 Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
 65 70 75 80
 cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag 288
 His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
 85 90 95
 ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc 336
 Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
 100 105 110
 tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt 384
 Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys
 115 120 125
 gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag 432
 Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln
 130 135 140
 ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta 480
 Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu
 145 150 155 160
 cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc 528
 His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr
 165 170 175
 cgg agg tgc aca 540
 Arg Arg Cys Thr
 180

<210> 95

<211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
 1 5 10 15

Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
 20 25 30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
 35 40 45

Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
 50 55 60

Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
 65 70 75 80

His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
 85 90 95

Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
 100 105 110

Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys
 115 120 125

Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln
 130 135 140

Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu
 145 150 155 160

His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr
 165 170 175

Arg Arg Cys Thr
 180

<210> 96
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (630)

<400> 96

agc cgg ggg atc aag ggg aaa agg cag agg cgg atc agt gcc gag ggg	48
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly	
1 5 10 15	
agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa gtc aac ggc	96
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly	
20 25 30	
tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac	144
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp	
35 40 45	
atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc	192
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe	
50 55 60	
gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag	240
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu	
65 70 75 80	
cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag	288
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu	
85 90 95	
ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc	336
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly	
100 105 110	
tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt	384
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys	
115 120 125	
gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag	432
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln	
130 135 140	
ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta	480
Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu	
145 150 155 160	
cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc	528
His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr	
165 170 175	
cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct gag ggg cag aag agg	576
Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg	
180 185 190	
agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc aac agg aac ctg gcc	624
Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala	
195 200 205	

agg aag
Arg Lys
210

630

<210> 97
<211> 210
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97
Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile Ser Ala Glu Gly
1 5 10 15
Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly
20 25 30
Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp
35 40 45
Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe
50 55 60
Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu
65 70 75 80
His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu
85 90 95
Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys
115 120 125
Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln
130 135 140
Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu
145 150 155 160
His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr
165 170 175
Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg
180 185 190
Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala
195 200 205
Arg Lys
210

<210> 98
 <211> 615
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (615)

<400> 98
 aag ctg ttc atc ctg ctg gag agg aac gac atc cgc cag gtg ggc gtc 48
 Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val
 1 5 10 15
 tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc gac gcc cgc aac ccc gac 96
 Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp
 20 25 30
 atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag cac tgt gag gcc tgc ttc 144
 Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe
 35 40 45
 agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag ggc ttg tac ctg cac aag 192
 Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys
 50 55 60
 ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc tcc tca gct gcc aat ggc 240
 Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly
 65 70 75 80
 acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt gaa atg agc gag tgg tct 288
 Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser
 85 90 95
 ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg 336
 Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg
 100 105 110
 ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac 384
 Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp
 115 120 125
 cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg 432
 His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg
 130 135 140
 aga gtg ccg tgt cct gag ggg cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc 480
 Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly
 145 150 155 160

cgg cgg gag aat gcc aac agg aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag 528
 Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu
 165 170 175

gcg ggt gct ggc tct cga aga cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag 576
 Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 180 185 190

caa ggg aca gtg ggg cca ctc aca tct gca ggg cct gcc 615
 Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 195 200 205

<210> 99
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp
 20 25 30

Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe
 35 40 45

Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys
 50 55 60

Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly
 65 70 75 80

Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser
 85 90 95

Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg
 100 105 110

Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp
 115 120 125

His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg
 130 135 140

Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu
 165 170 175

Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln

	180	185	190	
Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala				
	195	200	205	
<210>	100			
<211>	432			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1) .. (432)			
<400>	100			
ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc tcc tca gct				48
Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala				
1 5 10 15				
gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct gcg caa tgt gaa atg agc				96
Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser				
20 25 30				
gag tgg tct ccg tgg ggg ccc tgc tcc aag aag cag cag ctc tgt ggt				144
Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly				
35 40 45				
ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc agg gtg cta cat gcc cct				192
Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro				
50 55 60				
gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc aag gag acc cgg agg tgc				240
Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys				
65 70 75 80				
aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct gag ggg cag aag agg agg aag gga				288
Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly				
85 90 95				
ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc aac agg aac ctg gcc agg aag gag				336
Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu				
100 105 110				
agc aag gag gcg ggt gct ggc tct cga aga cgc aag ggg cag caa cag				384
Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln				
115 120 125				
cag cag cag caa ggg aca gtg ggg cca ctc aca tct gca ggg cct gcc				432
Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala				
130 135 140				

<210> 101
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser
 20 25 30
 Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly
 35 40 45
 Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro
 50 55 60
 Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys
 65 70 75 80
 Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly
 85 90 95
 Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu
 100 105 110
 Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln
 115 120 125
 Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala
 130 135 140

<210> 102
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (366)

<400> 102
 tgc agt agt cct gcg caa tgt gaa atg agc gag tgg tct ccg tgg ggg 48
 Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly
 1 5 10 15
 ccc tgc tcc aag aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag 96
 Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu

20	25	30	
gag cgg aca cgc agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc			144
Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala			
35	40	45	
tgc tct gac acc aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg			192
Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro			
50	55	60	
tgt cct gag ggg cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag			240
Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu			
65	70	75	80
aat gcc aac agg aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag gcg ggt gct			288
Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala			
85	90	95	
ggc tct cga aga cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag caa ggg aca			336
Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr			
100	105	110	
gtg ggg cca ctc aca tct gca ggg cct gcc			366
Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala			
115	120		
<210> 103			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 103			
Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly			
1	5	10	15
Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu			
20	25	30	
Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala			
35	40	45	
Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro			
50	55	60	
Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu			
65	70	75	80
Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala			
85	90	95	
Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr			

100	105	110	
Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala			
115	120		
<210>	104		
<211>	228		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1) .. (228)		
<400>	104		
cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct gga tac ttc gac			48
Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp			
1 5 10 15			
gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc aag atc gag cac			96
Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His			
20 25 30			
tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag tgt aag gag ggc			144
Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly			
35 40 45			
ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt ccc gag ggc tcc			192
Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser			
50 55 60			
tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct			228
Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro			
65 70 75			
<210>	105		
<211>	76		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	105		
Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp			
1 5 10 15			
Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His			
20 25 30			
Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly			
35 40 45			
Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser			

50	55	60
Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro		
65	70	75
<210> 106		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<400> 106		
caccgctagc agccggggga tcaagg		26
<210> 107		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<400> 107		
cacgcggccg ctcttgaggc agccgttg		28
<210> 108		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<400> 108		
cacgcggccg cttgggcagg acggcaagc		29
<210> 109		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<400> 109		
cacgcggccg ctgaagttat ggctgaagca g		31
<210> 110		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<400> 110		
cacgcggccg ctcattggtgc cattggcagc		30
<210> 111		

<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	111	
	cacgcggccg ctcctccgga aaccacagag	30
<210>	112	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	112	
	cacgcggccg cttgtgcacc tccgggtctc	30
<210>	113	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	113	
	cacgcggccg ctcttcctgg ccaggttcc	29
<210>	114	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	114	
	caccgctagc aagctgttca tcctgctgg	29
<210>	115	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	115	
	cacgcggccg ctggcaggcc ctgcagatg	29
<210>	116	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	116	
	caccgctagc ctgcacaagg gccgctg	27

<210>	117	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	117	
	caccgctagc tgcagtagtc ctgcgca	27
<210>	118	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	118	
	caccgctagc cgccaggtgg gcgtctg	27
<210>	119	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	119	
	cacgcggccg ctaggactac tgcactcca	29
<210>	120	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	120	
	gatcagcagc tggaacaaac acag	24
<210>	121	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	121	
	tgcaaatca gtcaatcaac agagc	25
<210>	122	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	122	
	ggcgggatccc tgagttggag gccagtttgg	30

<210>	123	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	123	
	gctctagacc atggtggacg agcctagagg agaaggcat	39
<210>	124	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	124	
	ccgctcgagg catgcggctt gggctgtgtg tggtaggcct g	41
<210>	125	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	125	
	gctctagaag atctctaggc aggccctgca gatgtgagtg gcc	44
<210>	126	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	126	
	aattcggatc cggcgcgcc	19
<210>	127	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	127	
	gatcggcgcg ccgatccg	19
<210>	128	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	128	
	ggccgtttaa acataacttc gtataatgta tgctatacga agttatc	47

<210>	129	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	129	
	tcgagataac ttcgtatagc atacattata cgaagttatg tttaaac	47
<210>	130	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	forward primer	
<400>	130	
	cgggatccgt ttaaacctgt gccttctagt tgccagccat c	41
<210>	131	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	131	
	cggatatccc atagagcca ccgcatcccc agc	33
<210>	132	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	132	
	taaccgcat cgcgccgg	19
<210>	133	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	133	
	ccgcatcgc ccttaat	17
<210>	134	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	134	
	ctaacgttac tggccgaagc	20

<210> 135
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 135
 attatcatcg tgtttttcaa aggaa 25

<210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 136
 gctctgacac caaggagacc 20

<210> 137
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 137
 ccctaggaat gctcgtcaag 20

<210> 138
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 138
 caggagcctc acccttcg 18

<210> 139
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 139
 acgccgaggt gcttgccc 18

<210> 140
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 140
 caccatggag aaggccgggg ccac 25

<210>	141	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	141	
atcataacttg gcaggtttct ccagg		25
<210>	142	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	142	
cgggatcccc atggctcctc tcggatacct cttagtgt		39
<210>	143	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	143	
gctctagagt ttaaacctac ttgcagggtgt gcacgtcata g		41
<210>	144	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	144	
tcgagtcgcg acaccggcgg gcgcgccc		28
<210>	145	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	145	
tcgagggcgc gcccgcgggt gtcgcgac		28
<210>	146	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	146	
ggccgcttaa ttaaggccgg ccgtcgacg		29

<210>	147	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	147	
aattcgtcga	cggccggcct taattaagc	29
<210>	148	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	148	
ttggcgcgcc	ctccctagga ctgcagttga gctcagattt ga	42
<210>	149	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	149	
ccgctcgagt	cttactgtct cagcaacaat aatataaaca gggg	44
<210>	150	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	150	
ataagaatgc	ggccgcaaag ctggtgggtt aagactatct cgtgaagtg	49
<210>	151	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	151	
acgcgtcgac	tcacaggttg gtccctctct gtgtgtgggt gctgt	45
<210>	152	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	152	
tcttactaga	gttctcacta gctct	25

<210> 153
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 153
 ggaaccaaag aatgaggaag ctggt 25

<210> 154
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 154
 ggccaggcgc gccttgc 17

<210> 155
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 155
 ggccgcaagg cgcgcct 17

<210> 156
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 156
 taagggctag ctagggccgg 20

<210> 157
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 157
 ccctagctag cccttaat 18

<210> 158
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<400> 158
 tcgagttaac 10

<210>	159	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	159	
	agctgttaac	10
<210>	160	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	160	
	agctgtcgac ttaattaagg ccggccg	27
<210>	161	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	161	
	ctagcggccg gccttaatta agtcgac	27
<210>	162	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	162	
	tcgacttaat taaggccggc cctagctagc a	31
<210>	163	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	163	
	agcttgctag ctagggccgg ccttaattaa g	31
<210>	164	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	164	
	ccttaattaa agttatgtgt cctagagggc tgcaaactca agatc	45

<210>	165	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	165	
	ttggccggcc ttggcgccag tggaacctgg aatgataaac acaaagatta ttg	53
<210>	166	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	166	
	aagcgtcgac caccatgcgg cttgggctgt gtg	33
<210>	167	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	167	
	atggccggcc ctacatggtg ccattggcag	30
<210>	168	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	168	
	agccggggga tcaaggggaa aaggcagagg	30
<210>	169	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	169	
	atggccggcc ctacatggtg ccattggcag	30
<210>	170	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	170	
	acgcgtcgac caccatgata ttccgagtca gtgc	34

<210>	171	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	171	
	ggccggccct aggcaggccc tgcagatgtg agtgg	35
<210>	172	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	172	
	atgatattcc gagtcagtgc cgaggggagc cag	33
<210>	173	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	173	
	ggccggccct aggcaggccc tgcagatgtg agtgg	35
<210>	174	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	174	
	atcaagggga aaaggcagag	20
<210>	175	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	175	
	cgcttgtggg gaagcctcca agacc	25
<210>	176	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<400>	176	
	ataacttctg caccaagtgt aagga	25

<210> 177
 <211> 2333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (219) .. (923)

<400> 177
 aggcgagccg ggcgcccagg acagtcccg cgcggggcggg tgagcgggcc gcgccctcgc 60
 ccctcccggg cctgcccccg tcgcgactgg cagcacgaag ctgagattgt ggtttcctgg 120
 tgattcaggt gggagtgggc cagaagatca ccgctggcaa ggactgggtt ggtttttgga 180
 gtagtccctg ctgacgtgac aaaaagatct ctcatatg ata ttc cga gtc agt 233
 Ile Phe Arg Val Ser
 1 5
 gcc gag ggg agc cag gcc tgt gcc aaa ggc tgt gag ctc tgc tct gaa 281
 Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu
 10 15 20
 gtc aac ggc tgc ctc aag tgc tca ccc aag ctg ttc atc ctg ctg gag 329
 Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu
 25 30 35
 agg aac gac atc cgc cag gtg ggc gtc tgc ttg ccg tcc tgc cca cct 377
 Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro
 40 45 50
 gga tac ttc gac gcc cgc aac ccc gac atg aac aag tgc atc aaa tgc 425
 Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys
 55 60 65
 aag atc gag cac tgt gag gcc tgc ttc agc cat aac ttc tgc acc aag 473
 Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His Asn Phe Cys Thr Lys
 70 75 80 85
 tgt aag gag ggc ttg tac ctg cac aag ggc cgc tgc tat cca gct tgt 521
 Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys
 90 95 100
 ccc gag ggc tcc tca gct gcc aat ggc acc atg gag tgc agt agt cct 569
 Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met Glu Cys Ser Ser Pro
 105 110 115
 gcg caa tgt gaa gtg agc gag tgg tct ccg tgg ggc ccc tgc tcc aag 617
 Ala Gln Cys Glu Val Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys

120	125	130	
aag cag cag ctc tgt ggt ttc cgg agg ggc tcc gag gag cgg aca cgc			665
Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser Glu Glu Arg Thr Arg			
135	140	145	
agg gtg cta cat gcc cct gtg ggg gac cat gct gcc tgc tct gac acc			713
Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala Ala Cys Ser Asp Thr			
150	155	160	165
aag gag acc cgg agg tgc aca gtg agg aga gtg ccg tgt cct gag ggg			761
Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro Glu Gly			
170	175	180	
cag aag agg agg aag gga ggc cag ggc cgg cgg gag aat gcc aac agg			809
Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg Glu Asn Ala Asn Arg			
185	190	195	
aac ctg gcc agg aag gag agc aag gag gcg ggt gct ggc tct cga aga			857
Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly Ala Gly Ser Arg Arg			
200	205	210	
cgc aag ggg cag caa cag cag cag cag caa ggg aca gtg ggg cca ctc			905
Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Thr Val Gly Pro Leu			
215	220	225	
aca tct gca ggg cct gcc tagggac actgtccagc ctccaggccc atgcagaaag			960
Thr Ser Ala Gly Pro Ala			
230	235		
agttcagtcg tactctgcgt gattcaagct ttcttgaact ggaacgtcgg gggcaaagca			1020
tacacacaca ctccaatcca tccatgcata cacagacaca agacacacac gctcaaacc			1080
ctgtccacat atacaaccat acatacttgc acatgtgtgt tcatgtacac acgcagacac			1140
agacaccaca cacacacata cacacacaca cacacacaca cacctgaggc caccagaaga			1200
cacttccatc cctcggggccc agcagtacac acttggtttc cagagctccc agtggacatg			1260
tcagagacaa cacttcccag catctgagac caaactgcag aggggagcct tctggagaag			1320
ctgctgggat cggaccagcc actgtggcag atgggagcca agcttgagga ctgctggtga			1380
cctgggaaga aaccttcttc ccatcctgtt cagcactccc agctgtgtga ctttatcggt			1440
ggagagtatt gttacccttc caggatacat atcaggggta acctgacttt gaaaactgct			1500
taaaggttta tttcaaatta aaacaaaaaa atcaacgaca gcagtagaca caggcaccac			1560
attcctttgc aggggtgtgag gggttggcga ggtatgcgta ggagcaagaa gggacaggga			1620

atttcaagag accccaaata gcctgctcag tagaggggtca tgcagacaag gaagaaaact 1680
taggggctgc tctgacggtg gtaaacaggc tgtctatatc cttgttactc agagcatggc 1740
ccggcagcag tgttgctcaca gggcagcttg ttaggaatga gaatctcagg tctcattcca 1800
gacctggtga gccagagtct aaattttaag attcctgatg attggcatgt tacccaaatt 1860
tgagaagtgc tgctgtaatt ccccttaaag gacgggagaa agggccccgg ccatcttgca 1920
gcaggaggga ttctggtcag ctataaagga ggactttcca tctgggagag gcagaatcta 1980
tatactgaag ggctagtggc actgccaggg gaagggagtg cgtaggcttc cagtgatggg 2040
tggggacaat cctgccc aaa ggcagggcag tggatggaat aactccttgt ggcattctga 2100
agtgtgtgcc aggtctctgga ctaggtgcta ggtttccagg gaggagccaa acacgggcct 2160
tgctcttgtg gagcttagag gttggtgggg aagaaaatag gcatgcacca aggaatcgta 2220
caaacacata tataactaca aaaggatggt gccaaaggga ggtgaccact ggcattctatg 2280
cttagctatg aaagtgaata aagcagaata aaaataaaat actttctctc agg 2333

<210> 178
<211> 235
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 178
Ile Phe Arg Val Ser Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys
1 5 10 15
Glu Leu Cys Ser Glu Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu
20 25 30
Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu
35 40 45
Pro Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn
50 55 60
Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe Ser His
65 70 75 80
Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys Gly Arg
85 90 95
Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala Ala Asn Gly Thr Met
100 105 110
Glu Cys Ser Ser Pro Ala Gln Cys Glu Val Ser Glu Trp Ser Pro Trp

115		120		125
Gly Pro Cys Ser Lys Lys Gln Gln Leu Cys Gly Phe Arg Arg Gly Ser				
130		135		140
Glu Glu Arg Thr Arg Arg Val Leu His Ala Pro Val Gly Asp His Ala				
145		150		155
				160
Ala Cys Ser Asp Thr Lys Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val				
		165		170
				175
Pro Cys Pro Glu Gly Gln Lys Arg Arg Lys Gly Gly Gln Gly Arg Arg				
		180		185
				190
Glu Asn Ala Asn Arg Asn Leu Ala Arg Lys Glu Ser Lys Glu Ala Gly				
		195		200
				205
Ala Gly Ser Arg Arg Arg Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly				
		210		215
				220
Thr Val Gly Pro Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala				
225		230		235