



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월05일
 (11) 등록번호 10-0834809
 (24) 등록일자 2008년05월28일

(51) Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2001-7009356

(22) 출원일자 2001년07월25일

심사청구일자 2004년11월18일

번역문제출일자 2001년07월25일

(65) 공개번호 10-2001-0105331

(43) 공개일자 2001년11월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/001788

국제출원일자 2000년01월25일

(87) 국제공개번호 WO 2000/43032

국제공개일자 2000년07월27일

(30) 우선권주장

60/117169 1999년01월25일 미국(US)

60/143228 1999년07월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

J. Exp. Med. 1999, 189(11), pp. 1747-1756

J. Exp. Med. 1999. 190(11), pp. 1697-1710

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 강춘원

(54) B A F F , 관련 차단제 및 면역 반응에서 B 세포와 면역글로불린을 촉진 및 억제하는데에 있어서 이들의 용도

(57) 요약

본 발명은 BAFF 및 이의 단편, 항체, 작동약 및 길항약을 포함하는 BAFF의 발현과 관련된 질환들을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

맥케이파비엔느

오스트레일리아엔에스더블유2030보클루즈밸라가든
즈1

죠프저그

스위스체하-1066에팔린게즈슈맹데폰탄낭10

슈나이더파스칼

스위스체하-1066에팔린게즈유니버시티오브로잔느

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카, 그루지야, 그鲁나다, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 모로코, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 탄자니아, 시에라리온, 남아프리카, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

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

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

특허청구의 범위

청구항 1

자가면역질환 치료 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열 139-285에 특이적인 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 자가면역질환 치료용 약학 조성물

청구항 2

B 세포 림프증식성 질환 치료 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열 139-285에 특이적인 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, B 세포 림프증식성 질환 치료용 약학 조성물

청구항 3

면역억제성 질환 치료 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열 139-285을 포함하는 가용성 BAFF 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 면역억제성 질환 치료용 약학 조성물

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 면역억제성 질환이 HIV에 의해 기인한 것인 면역억제성 질환 치료용 약학 조성물

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

명세서**기술 분야**

<1>

본 발명은 B 세포 및 면역글로불린의 발현을 촉진하거나 또는 억제하는 리간드인 종양 괴사 군에 속하는 BAFF, β 세포 활성화 인자 및 이의 차단제의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 및 이의 수용체는 항암 및/또는 면역조절시 사용될 수 있으며 또한 HIV와 같은 면역 억제성 질환의 치료에 사용될 수도 있다. 특히, 리간드 및 이의 차단제는 고혈압 및 이와 관련된 질환의 발병에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 더욱이, 상기 리간드에 대한 유전자로 형질 감염된 세포들은 B 세포가 관여하는 종양, 자가면역성 질병 또는 선천성 유전 질환을 치료하는 유전자 치료법에 사용될 수 있다. 재조합 변이체 또는 상기 리간드 또는 이의 수용체에 특이적인 항체와 같은 차단제는 또한 면역 조절시 사용될 수 있다. 예를 들어 B 세포 생성을 촉진하기 위하여 장기 이식 환자(즉, 골수 이식) 및 암 치료의 회복기에 있는 환자에 사용하는 것을 포함하는, 면역 억제성 질병에 대하여 BAFF를 B 세포 촉진제로 사용하는 방법이 고려되고 있다. BAFF를 보조제 및/또는 공동 촉진제로 사용하여 B 세포 수준을 상승시키고/시키거나 대략 보통의 수준으로 회복시키는 방법도 고려되고 있다.

배경 기술

<2>

종양 괴사 인자(TNF) 관련 시토킨은 숙주 방어 및 면역 조절의 매개체이다. 상기 군의 일원들은 세포 대 세포 접촉을 통해 국소적으로 작용하는 막 고정 형태, 또는 보다 멀리 떨어져 있는 표적으로 확산될 수 있는 분비형 단백질로서 존재한다. 수용체의 유사 군은, 표적 조직에서 세포 사멸 또는 세포 증식 및 분화를 개시하는 분자들의 존재를 신호한다. 최근들어, 리간드 및 수용체의 TNF 군은 TNF:TNF-R ; LT- α :TNF-R ; LT- α / β :LT- β -R ; FasL:Fas ; CD40L:CD40 ; CD30L:CD30 ; CD27L:CD27 ; OX40L:OX40 및 4-1BBL:4-1BB를 포함하는 11개 이상의 인지된 수용체-리간드 쌍을 보유한다고 밝혀졌다. 상기 리간드를 암호화하는 DNA 서열은, 아미노산 근연성이 약 50%임에도 불구하고, 상당히 관련성이 높은 경우 조차도 단지 약 25% 내지 약 30%의 동일성을 보유한다.

<3>

시토킨 수용체의 상기 군의 현저한 특성은 2개의 뚜렷한 TNF 수용체를 분자 클로닝함으로써 처음으로 밝혀진 시스테인이 풍부한 세포외 도메인에서 찾아볼 수 있다. 이러한 유전자 군은 세포 기능을 활성화시키는데에 관여하는 세포외 리간드 결합 도메인, 단일막 전장 영역 및 세포질 영역을 보유하는 타입 I 경막단백질에 특징적인 당단백질을 암호화한다. 특정 군 일원에 의존성인, 견고하게 구성된 이황화 결합성 코어 도메인을 보유하는 시스테인이 풍부한 리간드 결합 영역은 복수개로서 반복되어 존재한다. 3개의 도메인을 보유하는 수용체나, 6개의 도메인을 보유하는 수용체도 있지만, 대부분의 수용체들은 4개의 도메인을 보유한다.

<4>

리간드의 TNF 군중의 단백질은 보통 종결 전이 서열로 작용하는 것으로 생각되는 몇몇 리신 또는 아르기닌 잔기를 포함하는, 보통 짧은 친수성 아미노산으로 이루어진 짧은 N-말단 범위를 특징으로 한다. 그 다음에는 다양한 길이의 경막 영역 및 세포외 영역이 존재하는데, 상기 영역들은 막으로부터 C-말단 결합 도메인을 분리시킨다. 상기 영역은 때때로 "경상부(stalk)"라고 불리워지기도 한다. 상기 C-말단 결합 영역은 단백질 덩어리를 포함하는데, 종종 (항상 그런것은 아니지만) 글리코실화 부위도 포함한다. 상기 유전자들은 타입 I 막단백질, C-말단이 세포 외부에 존재하는 타입 II 막단백질, 및 세포질에 존재하는 짧은 N-말단 도메인을 특징으로 하는 통상적인 신호 서열이 결여되어 있다. 예를 들어, TNF 및 LT- α 와 같은 몇몇 경우, 단백질 프로세싱의 초기 단계에서 경상부 영역이 절단될 수 있으며, 이때 상기 리간드는 주로 분비형으로서 발견된다. 그러나, 대부분의 리간드는 국소화된 신호전달을 조절하기 위하여 막형으로 존재한다.

<5>

상기 리간드의 구조는 TNF, LT- α 및 CD40L의 결정학적 분석법에 의하여 널리 규명되어 있다. TNF 및 림프독소-

α (LT- α)는 모두 "젤리 롤(jelly roll)" 즉, 그리스 열쇠 형상을 취하고 있는, 2개의 역평형 상태의 β 판형 시이트 사이에 샌드위치된 구조를 갖고 있다. α 및 β 잔기 사이의 제곱평균의 제곱근 편자는 0.61C로서, 이는 곧 이의 분자 형태의 유사성 정도가 높다는 사실을 뒷받침해주는 것이다. CD40L, TNF 및 LT- α 의 분자 연구로부터 밝혀진 구조적 특성은 올리고며 복합체로 조립되는 성향을 나타내는 것이다. 상기 올리고며 구조에 내재된 특성은 다가 리간드를 형성하는 인접한 서브유닛 사이의 접합부에서 수용체 결합 부위를 형성하는 것이다. TNF, CD40L 및 LT- α 의 4차 구조는 이의 결정 구조를 분석한 결과 삼량체로 존재한다는 사실을 알 수 있었다. 상이한 리간드 사이에 보존된 다수의 아미노산은 골격형(scaffold) β -시트의 범위에 있다. 상기 골격형 서열의 일부가 여러 군 일원들간에 보존되어 있기 때문에, 기본 샌드위치 구조는 상기 분자 모두에 보존되어 있는 것으로 보인다. 서브유닛 형태는 유사하게 유지되는 것으로 보이므로, 4차 구조도 또한 유지될 수 있다.

<6> TNF 군 일원들은 세포 생존 및 분화를 제어하는 면역계에 있어서 주요 스위치인 것으로 기술될 수 있다. 현재 TNF 및 LT α 만이 TNF 군의 막 고정된 다른 일원과 대비되는 분비형 시토킨인 것으로 생각된다. TNF의 막형이 널리 규명되어 있으며 이것이 특이한 생물학적 역할을 담당하고 있는 것으로 보이는 반면에, 분비형 TNF는 촉발 현상(triggering event) 부위로부터 더욱 멀리 떨어져 있는 세포에 대하여 일반적인 경고 시그널로서 작용한다. 그러므로 TNF 분비는 세포의 혈관 구조 내충 및 염증 증상에 있어서 널리 규명된 변화를 초래하는 특정 현상을 증가시킬 수 있다. 이와는 반대로, 상기 TNF형 수용체가 세포와 직접 접촉하고 있음에도 불구하고 상기 군의 막 결합형 일원들은 신호를 보낸다. 예를 들어, T 세포는 인접 TCR 상호작용을 통하여 직접 접촉하는 B 세포에 만 CD40 매개성 "원조(help)"를 제공한다. 세포 사멸을 유도하는 능력에 대하여 유사한 세포-세포 접촉 제한은 널리 연구된 Fas 시스템에도 적용된다.

<7> TNF 리간드는 이것이 세포 사멸을 유도하는 능력을 기초로 하여 3개의 군으로 구분될 수 있는 것으로 보인다. 첫째, TNF, Fas 리간드 및 TRAIL은 대부분 양호한 정규의 사멸 도메인을 보유하는 것으로 보이는 다수의 계통 및 이들의 수용체에서 세포 사멸을 효율적으로 유도할 수 있다. 아마도 DR-3(TRAMP/WSL-1)에 대한 리간드는 모두 이 부류에 속할 것이다. 다음으로, 소수의 세포 유형 및 TWEAK에 한정된 보다 약한 사멸 신호를 촉발하는 리간드가 있는데, 이 부류의 예로서는 CD30 리간드 및 LTalb2를 들 수 있다. 상기 군이 어떻게 정규의 사멸 도메인이 존재하지 않는 경우에 세포 사멸을 유발시킬 수 있는지는 흥미로운 의문점이며, 이는 별개의 보다 약한 사멸 신호전달 기작이 존재함을 나타내는 것이다. 마지막으로, 사멸 신호를 효율적으로 전달할 수 없는 일원들이 있다. 아마도 모든 군은 몇몇 세포 유형에 있어서 항증식 효과를 나타낼 수 있으며, 그 결과 예를 들어 CD40과 같은 세포의 분화를 유도한다[Funakoshi 등(1994)].

<8> 최근들어 TNF 군은 면역계의 조절에 관여하는 11개 이상의 상이한 신호 전달 경로를 포함한다. TWEAK 및 TRAIL의 가장 널리 알려진 발현 패턴은, 상기 군에 있어서 밝혀지지 않은 다양한 기능적 다양성이 여전히 존재한다는 사실을 시사한다. 이러한 측면은 특히 라우스 육종 바이러스 및 허파스 심플렉스 바이러스의 복제 능력에 영향을 미치는 2개의 수용체의 발견 및 TNF가 항바이러스 활성을 보유하며 폭스 바이러스가 위장 TNF 수용체를 암호화한다는 역사적인 관찰을 통하여 특히 부각되었다[Brajatsch 등의 문헌(1996);Montgomery 등의 문헌(1996);Smith 등의 문헌(1994), 76 Cell 959-962;Vassalli 등의 문헌(1992), 10 ImmunoL. 411-452 참조].

<9> TNF는 폐혈성 쇼크 및 악액질의 매개체이며, 조혈 세포 발생의 조절에 관여한다. 이는 주로 염증의 매개체 역할을 하고 세균 감염, 바이러스 감염 및 기생충 감염에 대하여 방어제로서의 역할을 하며, 항종양 활성을 보유하고 있다. TNF는 또한 상이한 자가면역 질병과 관련되어 있다. TNF는 대식세포, 섬유아세포, T 세포 및 자연 살생 세포를 포함하는 몇몇 유형의 세포들에 의하여 생성될 수 있다. TNF는 2개의 상이한 수용체에 결합하는데, 이 수용체는 각각 특정 세포간 신호 전달 분자를 통하여 작용을 하므로, 그 결과 TNF의 상이한 효과를 나타내게 된다. TNF는 막 결합형 또는 가용성 분비형 시토킨으로 존재할 수 있다.

<10> LT- α 는 TNF와 다수의 활성을 공유, 즉 TNF 수용체에 결합하지만, TNF와는 달리, 주로 활성화된 T 세포 및 몇몇 β -림프아구 종양에 의하여 분비되는 것으로 보인다. LT- α 및 LT- β 의 혼합으로 복합체는 LT- β 수용체에 결합하는 막결합형 복합체이다. LT- β 의 유전적 파괴가 비장에서 T 세포 및 B 세포를 해체시키고 림프절의 부재를 유발하는 것으로 보아, 상기 LT 시스템(LT 및 LT-R)은 말초 림프양 기관의 발생과 관련되어 있는 것으로 보인다. 상기 LT- β 시스템은 또한 몇몇 선암종 세포주의 세포 사멸과 관련되어 있다.

<11> TNF 군의 다른 일원인 Fas-L은 활성화된 T 세포에서 우세하게 발현된다. 이는 이의 수용체를 보유하는 세포들, 예를 들어 종양 세포 및 HIV 감염 세포를 프로그램화된 세포 사멸 또는 세포 자살로서 공지된 기작에 의하여 사멸시킨다. 더욱이, Fas 또는 Fas-L의 결핍은 림프증식성 질환을 유발시키는데, 이로써 면역 반응 조절에서 Fas 시스템의 역할을 확인할 수 있다. Fas 시스템은 또한 간염의 만성 감염으로 인한 간 손상 및 HIV 감염 환자의

자가 면역성과 관련되어 있다. 상기 Fas 시스템은 또한 HIV 환자에 있어서의 T 세포 파괴와 관련되어 있다. 상기 군의 다른 일원인 TRAIL은 또한 다양한 근원의 다수의 형질전환 세포주의 사멸과 관련된 것으로 보인다.

<12> TNF 군의 다른 일원인 CD40-L은 T 세포상에서 발현되며, CD40 보유 B 세포를 조절한다. 더욱이, CD40L 유전자의 변형은 X 연관 과IgM 증후군으로 알려진 질병을 유발시킨다. CD40 시스템은 또한 상이한 자가면역성 질병과 관련되어 있으며 CD40-L은 항바이러스 특성을 보유하는 것으로 공지되어 있다. 비록 상기 CD40 시스템이 비면역 세포에 있어서 세포자살 B 세포의 구조와 관련되어 있다 하여도, 이는 세포자살을 유도한다. TNF 군의 다수의 부가적인 램프구 일원들은 또한 공동 촉진과 관련되어 있다.

<13> 일반적으로, TNF 군의 일원들은 면역계 조절 및 급성 숙주 방어계를 활성화시키는데에 있어서 근본적인 조절 역할을 갖는다. 치료 효과를 위하여 TNF 군의 일원들을 조작하는 현재의 방법에 있어서, 상기 군의 일원들은 질병을 억제하는 특이적 수단을 제공할 수 있을 것으로 보인다. 본 군의 리간드 중 몇몇은 다수의 형질전환 세포, 예를 들어 LT, TNF, Fas 리간드 및 TRAIL의 세포 자살성 사멸을 직접적으로 유도할 수 있다[Nagata(1997) 88 *CeII* 355-365 참조]. Fas 및 가능하게는 TNF 및 CD30 수용체 활성화는 면역조절 기능을 담당할 수 있는 형질전환되지 않은 램프구에 있어서 세포 사멸을 유도할 수 있다[Amakawa 등의 문헌(1996) 84 *CeII* 551-562 ; Nagata(1997) 88 *CeII* 355-365 ; Sytwu 등의 문헌(1996) ; Zheng 등의 문헌(1995) 377 *Nature* 348-351 참조]. 일반적으로, 사멸은 TNF 수용체의 세포질쪽에 존재하는 사멸 도메인이 응집됨에 따라서 촉발된다. 사멸 도메인은 카스파제 캐스케이드의 활성화로 귀착되는 다수의 신호 변환 성분들로 이루어진 어셈블리를 조직화한다 [Nagata(1997) 88 *CeII* 355-365 참조]. 정규의 사멸 도메인이 결실된 몇몇 수용체들, 예를 들어 LTb 수용체 및 CD30[Browning 등의 문헌(1996); Lee등의 문헌(1996)]은, 보다 미약하게나마 여전히 세포 사멸을 유도할 수 있다. 비록 CD30 불활성 마우스(CD3 null mouse)에 대한 연구 결과가 흥선에서의 네가티브 선택으로 인한 사멸을 시사함에 따라서, 이러한 특징들은 불명확해지지만, 상기 수용체들은 주로 세포 분화를 유도하는 기능을 보유하며, 여기서 사멸은 몇몇 형질 전환 세포주에서의 변칙적인 결과에 해당한다[Amakawa 등의 문헌(1996) 84 *CeII* 551-562]. 이와는 반대로, CD40과 같은 다른 경로를 통한 신호 전달에 있어서는 세포를 생존시킬 필요가 있다. 그러므로, TNF 군의 일원인 부가적인 분자를 동정 및 특성 규명하여 질병을 억제하고 면역계를 조작하는 부가적인 수단을 제공할 필요가 있다.

<14> 본원에서는 TNF 시토킨 군의 신규 리간드의 기능적 특성을 규명하였다. BAFF(TNF 군에 속하는 B 세포 활성화 인자 ; B cell Activating Factor belonging to the TNF family)라 불리우는 신규의 리간드는 B 세포 공동 촉진을 위하여 T 세포 및 수지상 세포에 의해 발현되는 것으로 보이며, 이는 B 세포 기능 조절에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 또한, 본 발명자들은 간 특이적 프로모터의 제어하에서 BAFF를 과발현시키는 트랜스제닉 마우스(transgenic mouse)를 제조하였다. 상기 마우스들은 성숙 B 세포를 과량 보유하며, 자발적 배아 중심 반응이 일어나고, 자기 항체를 분비하며, 2차 램프양 기관중 혈장 세포수가 많고 신장에 Ig이 침착된다.

발명의 상세한 설명

<38> 발명의 개요

<39> 따라서, 본 발명은 B 세포 성장과 면역글로불린의 분비를 촉진하거나 또는 억제하는, BAFF 리간드, 상기 리간드에 대한 차단제 및 항체에 관한 것이다. 본 발명은 이하에 더욱 상세히 논의되는 바와 같은, 다수의 질병 및 질환에 있어서 치료적 용도로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 면역계 및 면역 과정에 관한 정보 획득 및 상기 면역계 및 면역 과정의 조작에도 사용될 수 있다. 더욱이, 본 발명은 B 세포 성장 및 면역글로불린 분비를 촉진하거나 또는 억제하는 방법으로서 사용될 수 있다. 본 발명에 의하여 기술되는 바와 같은, BAFF 관련 분자들은 또한 자가면역 질환, B 세포 증식 및 성숙 관련 질환과, BAFF 리간드 조절 및 염증의 치료에 유용할 수 있다. 본 발명은 고혈압 및 고혈압 관련 신장 조직 및 심혈관 조직의 질환의 억제 및 예방에 관여할 수 있다.

<40> 본 발명의 추가적인 특징 및 이점은 이하와 같이 상세한 설명에 제시될 것이며, 부분적으로는 상세한 설명으로부터 명확하게 파악 가능하거나, 또는 본 발명을 실행함으로써 교시될 수도 있다. 본 발명의 목적 및 기타 이점은 기술된 상세한 설명 및 이의 청구의 범위, 그리고 첨부 도면에서 구체적으로 지적한 방법에 의하여 실현되고 획득될 것이다.

<41> 그러므로, 이러한 이점 및 기타 이점을 얻어내기 위하여, 그리고 본원에 구체화되고 광범위하게 기술된 본 발명의 목적에 의하면, 본 발명은 다양한 BAFF 리간드 및 관련 분자들을 투여함으로써 B 세포를 성장시키고 면역글로불린을 분비시키는 방법을 포함한다.

<42> 본 발명은 또한 BAFF 리간드 또는 폴리펩티드의 활성 단편을 사용함으로써 B 세포 성장을 촉진시킬 것이라 생각

된다. 상기 폴리펩티드는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 CD40 리간드나 항쥐파동물 항체와 함께 사용될 수 있다.

<43> 다른 구체예에서, 본 발명은 BAFF 리간드 또는 BAFF의 활성 단편을 사용함으로써 수지상 세포 유도된 B 세포 성장 및 성숙을 촉진시키는 방법에 관한 것이다. 다시 말하면, 상기 폴리펩티드는 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 CD40 리간드나 항 μ 항체와 함께 사용될 수 있다.

<44> 다른 구체예에서, BAFF 및 BAFF 수용체의 차단제는 B 세포 성장 및 면역글로불린 분비를 억제하는데에 사용되었다. 상기 제제들은 작동 불능할 수 있으며, 재조합 BAFF, BAFF 특이적 항체, BAFF 수용체 특이적 항체 또는 항BAFF 리간드 분자일 수 있다.

<45> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 고혈압, 고혈압 관련 질환, 면역 질환, 자가 면역성 질환, 염증 및 B 세포 림프증식성 질환을 치료하기 위한 BAFF, BAFF 관련 분자 및 BAFF 차단제의 용도에 관한 것이다.

<46> 본 발명은 B 세포를 성장 및/또는 성숙시키고 면역글로불린을 분비시킴으로써 면역 반응을 수행하는 작동약 또는 길항약으로서의 BAFF 및 BAFF 관련 분자의 용도를 포함한다.

<47> 다른 구체예에서, 본 발명은 BAFF 매개성 약리학적 현상을 직접적으로 촉발시키는데에 사용될 수 있는 BAFF를 포함하는 가용성 작제물에 관한 것이다. 이러한 현상들은 암, 종양의 치료 또는 면역 질환을 치료하기 위한 면역계 조작에 있어서 유용한 치료학적 이점을 보유할 수 있다.

<48> 더욱이, 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 예를 들어, 암 치료 및 면역 질환을 치료하기 위한 면역계의 조작에 사용될 수 있는, BAFF 리간드에 대하여 유도된 항체에 관한 것이다.

<49> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 BAFF에 대한 유전자를 사용하는 유전자 치료 방법에 관한 것이다.

<50> 본 발명의 약학 제제는 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 기타 약학 조성물을 포함할 수도 있으며, 당 업계에 공지된 다수의 형태 또는 경로 중의 임의의 것으로 투여될 수 있다.

<51> 전술한 일반적인 설명 및 이하의 상세한 설명은 모두 예시적인 것이며, 청구된 본 발명을 보다 상세히 설명하기 위한 것임을 이해해야 할 것이다.

<52> 첨부 도면들은 본 발명을 한층 더 이해시킬 수 있도록 포함된 것이며, 이들은 본 명세서에 첨부되어 이의 일부를 이루고, 본 발명의 원리를 설명하는데에 사용되는 상세한 설명과 함께본 발명의 몇몇 구체예를 예시하는 것이다.

발명의 상세한 설명

<54> 이하, 본 발명의 바람직한 구체예에 대하여 상세히 설명함으로써 참고하고자 한다. 본 발명은 B 세포를 성장 및 성숙시키고 면역글로불린을 분비시키는 BAFF 및 BAFF 관련 분자의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 면역 관련 질환에 의하여 요구되는 면역계의 반응을 수행하는 BAFF 및 BAFF 관련 분자의 용도에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 유전자 치료법을 통하여 BAFF, BAFF 관련 유전자를 사용함으로써 암과 면역 질환을 치료하는 방법을 포함한다.

<55> 본 발명의 서열로 형질 전환된 숙주에 의하여 생성된 BAFF 리간드 및 이의 상동체, 그리고 당 업계에 공지된 방법에 의하여 정제되었거나 또는 공지의 아미노산 서열로부터 생성된 천연의 BAFF는 항암, 항종양 및 면역 조절을 위한 다양한 방법에 유용하다. 이것들은 또한 기타의 질병에 관한 치료법 및 방법에 유용하다.

<56> 본 발명의 다른 측면은 "안티센스" 치료법에서 BAFF 리간드를 암호화하는 분리된 핵산에 의하여 암호화된 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "안티센스" 치료법이란, 전사 및/또는 번역을 억제함으로써 암호화된 단백질의 발현을 억제하기 위하여, 세포내 조건하에서 목적 리간드를 암호화하는 세포 mRNA 및/또는 DNA와 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 또는 이의 유도체를 투여하거나 또는 동일계내에서 생성시키는 방법을 의미한다. 결합은 통상적인 염기쌍 상보성에 의하여 이루어질 수 있거나, 또는 예를 들어 DNA 이중체에 결합하는 경우, 이중 나선의 주흡에서의 특이적 상호작용을 통하여 이루어질 수도 있다. 일반적으로, "안티센스" 치료법은 당 업계에서 일반적으로 사용되는 기술의 범주를 의미하는 것으로서, 올리뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하는 것과 관련된 임의의 치료법을 포함한다.

<57> 본 발명의 안티센스 작제은 예를 들어, 세포내에서 전사될 때 Kay 리간드를 암호화하는 세포 mRNA의 최소한 일부와 상보성인 RNA를 생산하는 발현 플라스미드로서 운반될 수 있다. 또는 상기 안티센스 작제물은 생체외에서 생

성되는 올리고뉴클레오티드 프로브일 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드 프로브는 내생 뉴클레아제에 대하여 내성이 있고, 생체내에서 안정한 변형 올리고뉴클레오티드인 것이 바람직하다. 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 사용하기 위한 예시적인 핵산 분자로서는 DNA의 포스포라미데이트, 포스포티오에이트 및 메틸포스포네이트 유사체가 있다[예를 들어, 미국 특허 제5,176,996호 ; 미국 특허 제5,264,564호 ; 및 미국 특허 제5,256,775호 참조]. 더욱이, 안티센스 치료법에 유용한 올리고머를 작제하는 일반적인 연구법에 관하여는, 예를 들어 본원에 특히 참고 문헌으로서 인용되어 있는 Van Der Krol 등의 문헌(1988) *Biotechniques* 6:958-976 ; 및 Stein 등의 문헌(1988) *Cancer Res.* 48:2659-2668에 재검토되어 있다.

<58>

C. BAFF 리간드

<59>

전술한 바와 같이, 본 발명의 BAFF 리간드는 TNF 군의 일원으로서 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술되어 있으며 이는 본원에 전체로서 인용되어 있다. 단백질, 이의 단편 또는 상동체는 광범위하게 치료용으로 그리고 진단용으로 사용될 수 있다.

<60>

BAFF 리간드는 주로 비장 및 말초 혈액 림프구에 존재하는데, 이러한 사실은 면역계에서 조절 작용을 함에 대한 유력한 증거가 된다. 본 발명의 BAFF 리간드 서열들을 인간 TNF 군의 다른 일원과 비교해보면 구조적으로 상당히 유사함을 알 수 있다. 모든 단백질은 세포외 도메인에 서열이 보존된 몇몇 영역을 공유하고 있다.

<61>

본 발명의 리간드의 3차원적 구조는 명확히 밝혀진 바 없지만, TNF 군의 일원으로서, 상기 군의 다른 일원들과 특정한 구조적 특성을 공유할 수 있다.

<62>

본 발명의 신규의 폴리펩티드는 아직 동정되지 않은 수용체와 특이적으로 상호 작용한다. 그러나, 본원에 개시된 웹타이드 및 방법은 BAFF 리간드 또는 이의 단편과 특이적으로 상호작용하는 수용체를 동정할 수 있도록 한다.

<63>

특정 구체예에서 본 발명은 BAFF 리간드 수용체와 결합하는 능력을 갖는 BAFF 리간드로부터 유도된 웹타이드를 이용하는 방법을 포함한다. 상기 BAFF 리간드의 단편은, 예를 들어, PCR, 단백질 분해에 의한 절단과 같은 재조합적 방법 또는 화학 합성법과 같은 몇몇 방법으로 제조될 수 있다. 폴리펩티드의 내부 또는 말단 단편은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단으로부터 얻은 1 이상의 뉴클레오티드를 제거함으로써 생성될 수 있다. 돌연변이된 DNA가 발현되면 폴리펩티드 단편이 생성된다.

<64>

폴리펩티드 단편은 또한 종래의 메리필드 고상 f-moc 또는 t-boc 화학적 방법과 같이 당 업계에 공지된 기법을 사용하여 화학적으로 합성될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 웹타이드 및 DNA 서열은 임의로 상기 단편과 중첩되지 않는 원하는 길이의 단편으로 나누어질 수 있거나, 또는 상기 단편과 중첩되는 원하는 길이의 단편으로 나누어질 수 있다. 이러한 방법들은 이하에 더욱 상세히 기술되어 있다.

<65>

BAFF 리간드의 가용성 형태의 제조

<66>

BAFF 리간드의 가용성 형태는 종종 효과적인 신호일 수 있으므로 천연의 막형을 모의하는 약물로서 투여될 수 있다. 본원의 BAFF 리간드는 가용성 시토킨으로서 천연적으로 분비될 수 있으나, 그렇지 않은 경우에는 분비되도록 유전자를 재조작할 수 있다. BAFF 리간드의 가용성 분비형을 제조하기 위하여, DNA 수준에서 N-말단 경막 영역을 제거하고 경상 영역(stalk region)의 일부를 제거하여, 이들을 타입 I 리더 서열 또는 타입 II 리더 서열과 치환시켜 선택된 발현계내에서 단백질 분해에 의한 절단을 효율적으로 만들 수 있을 것이다. 숙련자는 분비 발현 작제물에 유지되어 있는 경상 영역의 양을 변화시킴으로써 수용체 결합 특성 및 분비 효율 모두를 최적화 시킬 수 있다. 예를 들어, 가능한 모든 길이의 경상부를 포함하는 작제물, 즉 N-말단 절두형 작제물은 81번 아미노산 찬기로부터 139번 아미노산 찬기에 걸쳐있는 단백질이 생성되도록 제조될 수 있다. 최적의 길이를 보유하는 경상부 서열은 이러한 유형의 분석법으로부터 얻을 수 있다.

<67>

E. BAFF 리간드와 반응성인 항체의 생성

<68>

본 발명은 또한 본 발명의 BAFF 리간드 또는 이의 수용체와 특이적으로 반응하는 항체들을 포함한다. 항단백질/항펩타이드 항혈청 또는 모노클로날 항체는 표준적인 방법에 의하여 제조될 수 있다[예를 들어, 할로우 및 랜인의 문헌 *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. 참조(Cold Spring Harbor Press:1988)]. 마우스, 햄스터 또는 토끼와 같은 포유 동물은 웹타이드의 면역원형으로 면역화될 수 있다. 단백질 또는 웹타이드에 면역원성을 부여하는 기법으로는 담체에 접합시키는 기법, 또는 당 업계에 널리 공지된 기타의 기법들을 포함한다.

<69>

BAFF 리간드 또는 이의 수용체의 면역원성 부분은 보조제의 존재하에 투여될 수 있다. 면역화 과정은 혈장 또는 혈청내 항체의 역가를 검출함으로써 모니터될 수 있다. 항원으로서 면역원을 사용하는 표준적인 ELISA 또는 기

타 면역분석법으로써 항체 수준을 측정할 수 있다.

- <70> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 BAFF 리간드 또는 이의 수용체의 항원 결정기(예를 들어, 본원에 전체로서 인용된 PCT 출원번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열 번호 2의 폴리펩티드 서열의 항원 결정기), 또는 밀접하게 상관된 인간 또는 인간을 제외한 포유 동물의 상동체(예를 들어, 70, 80 또는 90%의 상동성을 보유하고, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 보유하는 상동체)에 면역 특이적이다. 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 항BAFF 리간드 또는 항BAFF 리간드-수용체 항체는 본원에 전체로서 인용된 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열 번호 2 또는 서열 번호 6의 서열과의 상동성이 80% 미만 ; 바람직하게는 본원에 전체로서 인용된 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열2와의 상동성이 90% 미만 ; 및 가장 바람직하게는 본원에 전체로서 인용된 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열2와의 상동성이 95% 미만인 단백질과 실질적으로 교차 반응(즉, 특이적 반응)을 하지 않는다. "실질적으로 교차 반응을 하지 않는"이란, 본원에 전체로서 인용된 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열2의 단백질에 대한 결합 친화성이 10% 미만, 더욱 바람직하게는 5% 미만, 및 더더욱 바람직하게는 1% 미만인 비상동성 단백질에 대하여 항체가 결합 친화성을 보유하는 경우를 의미한다.
- <71> 본원에 사용된 항체란, BAFF 리간드 또는 이의 수용체와 특이적으로 반응하는 항체의 단편들도 포함한다. 항체들은 통상적인 기법을 사용하여 단편화될 수 있으며, 이 단편들은 전항체(whole antibody)에 대하여 전술한 바와 동일한 방법으로 유용성에 대하여 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편은 항체를 펩신으로 처리하여 제조될 수 있다. 그 결과 생성된 $F(ab')_2$ 단편은 이황화결합을 환원시키도록 처리되어 Fab' 단편을 생성할 수 있다. 본 발명의 항체들은 항BAFF 리간드 또는 항BAFF 리간드-수용체 활성을 보유하는 생물 특이적 분자 및 키메라 분자들을 추가로 포함한다. 그러므로, BAFF 리간드, 종양 리간드 및 이들의 수용체에 대하여 유도된 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체(Ab), 그리고 Fab' 및 $F(ab')_2$ 와 같은 항체 단편들은 리간드 및 이들의 각각의 수용체의 작용을 억제하는데에 사용될 수 있다.
- <72> 항체의 다양한 형태들은 또한 표준적인 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 특히 Winter 및 Milstein 등의 문헌(1991) *Nature* 349:293-299이 본원에 참고 문헌으로 인용되어 있다. 예를 들어, 키메라 항체는 동물 항체로부터 얻은 항원 결합 도메인이 인간 불변 도메인에 결합하도록 작게될 수 있다[예를 들어, 본원에 참고용으로 인용된 Cabilly 등, 미국 특허 제4,816,567호 참조]. 키메라 항체는 인간의 의학적 치료법에 사용될 경우 동물 항체에 의하여 유도되어 관찰되는 면역원성 반응을 감소시킬 수 있다.
- <73> 더욱이, BAFF 리간드 또는 이의 수용체를 인지하는 재조합 "인간화된(humanized) 항체"가 합성될 수 있다. 인간화된 항체들은 특이적 항원 결합 관여 영역이 삽입된 대부분의 인간 IgG 서열을 포함하는 키메라이다. 동물들은 바람직한 항원으로 면역화되고, 해당 항체들은 분리되며, 특이적 항원 결합에 관여하는 가변 영역 서열의 일부는 제거된다. 동물 유래성 항원 결합 영역은 이후 항원 결합 영역이 결실된 인간 항체 유전자의 적합한 위치에 클로닝된다. 인간화된 항체들은 인간 항체에서 이종 서열(즉, 중간 서열)의 사용을 최소화시키므로, 처리된 개체에서 면역 반응을 조금 유발시키는 것으로 보인다.
- <74> 재조합 항체들의 상이한 클래스의 구성은 또한 상이한 클래스의 면역글로불린으로부터 분리된 가변 영역 및 인간 불변 도메인(CH1, CH2, CH3)을 포함하는 키메라 항체 또는 인간화된 항체들을 생성함으로써 제조될 수도 있다. 예를 들어, 항원 결합 부위가 증가된 항체들은 항원 결합 부위를 인간:사슬 불변 영역을 보유하는 벡터에 클로닝시킴으로써 재조합적으로 제조될 수 있다[본원에 참고 문헌으로서 인용된 Arulanandam 등의 문헌(1993) *J.Exp.Med.*, 177:1439-1450 참조].
- <75> 더욱이, 표준적인 재조합 DNA 기법들은 항원 결합 부위와 인접한 아미노산 잔기들을 변형시킴으로써 재조합 항체들과 이를 항원과의 결합 친화성을 변형시키는데에 사용될 수 있다. 인간화된 항체의 항원 결합 친화성은 분자 모델링을 기초로 한 돌연변이 유발법으로 증가될 수 있다[본원에 참고 문헌으로 인용된 Queen 등의 문헌, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:10029-33 참조].
- <76> F. 유사체의 제조:변경된 DNA 및 웨타이드 서열의 제조
- <77> BAFF 리간드의 유사체는 아미노산 서열에 있어서, 또는 상기 서열이 관여하지 않는 방식, 또는 둘다의 방식으로 자연 발생된 BAFF 리간드와 상이할 수 있다. 비서열 변형법(non-sequence modification)으로는 BAFF 리간드의 생체내 또는 시험관내 화학적 유도 방법을 포함한다. 비서열 변형법으로는 아세틸화, 메틸화, 인산화, 카복실화 또는 글리코실화의 변형법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<78> 바람직한 유사체로서는 BAFF 리간드의 생물학적 활성 단편을 포함하는데, 상기 단편의 서열들은 BAFF 리간드의 활성을 상실시키지 않는 1 이상의 보존적 아미노산이 치환되었거나, 또는 1 이상의 비보존적 아미노산을 치환, 결실 또는 삽입되었다는 점에서, 본원에 전체로서 인용되어 있는 PCT 출원 번호 PCT/US98/19037(WO99/12964)에 기술된 서열 번호 2의 서열로서 제시된 서열과는 상이할 수 있다. 보존적 치환으로서는 통상적으로, 예를 들어 발린, 글리신 ; 글리신, 알라닌 ; 발린, 이소루신, 루신 ; 아스파르트산, 글루탐산 ; 아스파라긴, 글루타민 ; 세린, 트레오닌 ; 리신, 아르기닌 ; 및 페닐알라닌, 티로신과 같은 군 내에서의 치환과 같이, 하나의 아미노산을 이와 유사한 특성을 보유하는 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 포함한다.

G. 본 발명의 재료 및 방법

<80> 아가로즈에 커플링된 항플래그 M2 모노클로날 항체, 바이오틴화된 항플래그 M2 항체 및 항플래그 M2 항체를 시그마로부터 구입하였다. 세포 배양 재제는 라이프 사이언스(스위스, 바젤 소재) 및 바이오위태커(미국, 매릴랜드, 워커스빌 소재)로부터 구하였다. 플래그 태깅된 가용성 인간 APRIL(잔기 K₁₁₀-L₂₅₀)을 기술한 바와 같이 (10, 11) 293 세포에서 제조하였다. FITC 표지된 항CD4, 항CD8 및 항CD19 항체들을 파민젠(미국, 캘리포니아, 샌디에고 소재)으로부터 구입하였다. 인간 IgM의 Fc_{5μ}단편에 특이적인 염소 F(ab')₂를 잭슨 이뮤노리서치(미국, 팬실베이니아, 웨스트 그로브 소재)로부터 구입하였다. 2차 항체는 파민젠 또는 잭슨 이뮤노리서치로부터 구하였으며 추천되는 희석율로 사용하였다.

<81> 인간 배 신장 293 T(12) 세포들 및 섬유아세포 세포주(표 1)를 10% 열 불활성화된 소 태아 혈청(FCS)을 함유하는 DMEM내에 유지시켰다. 인간 배 신장 293 세포들을 2% FCS로 보강된 DMEM-영양 혼합물 F12(1:1)내에 유지시켰다. T 세포주, B 세포주 및 대식세포 세포주(표1)를 10% FCS로 보강된 RPMI에서 성장시켰다. 몰트-4 세포들을 10% FCS로 보강된 이스코브 배지에서 배양하였다. 상피 세포주를 10% FCS, 0.5mM 불필수 아미노산, 10mM Na-헵타스 및 1mM Na-파루베이트를 함유하는 MEM-알파 배지에서 성장시켰다. HUVEC를 20% FCS, 상피 세포 성장 인자 100μg/ml(스위스 도티콘 소재, 이노테크, 콜래보레이티브 리서치) 및 혼화란 나트륨염(시그마) 100μg/ml로 보강된 M199 배지내에 유지시켰다. 모든 배지에 페니실린 및 스트렙토마이신 항생제를 첨가하였다. 말초 혈액 백혈구들을 건강한 성인 지원자의 혼화란 처리한 혈액으로부터 피콜-파크(스웨덴, 옵살라 소재, 파마시아) 구배 원심분리법으로 분리한후, 이를 RPMI, 10% FCS에서 배양하였다.

<82> T 세포는 뉴라미니다제 처리된 양 적혈구 세포로 로젯팅시켜 비부착성 PBL로부터 얻었으며 피콜-파크 구배 원심 분리법에 의하여 비로제팅(non-rosetting) 세포(대부분 B 세포 및 단핵구)로부터 분리하였다. 정제된 T 세포를 24시간 동안 식물성 혈구 응집소(시그마)(1μg/ml)로 활성화시키고, RPMI, 10% FCS 및 IL-2 20U/ml에서 세정 및 배양하였다. CD14⁺ 단핵구를 항CD14 항체, 염소 항마우스 피복된 미소비드 및 미니막스(상표명) 장치(밀테니 바이오테크)를 사용하여 자기 세포 분류법으로 정제한후, GM-CSF [800U/ml, 류코맥스(등록상표명), 스위스, 루제른, 에렉스 케미] 및 IL-4(20ng/ml, 스위스, 루제른, 루세르나 챔)의 존재하에서 5일 동안 배양한후, 다시 이를 GM-CSF 및 IL-4 및 TNF α (200U/ml, 오스트리아, 비엔나 소재, 벤더)와 함께 3일 동안 더 배양하여 CD83⁺, 수지상 세포 유사 군집을 얻었다. 순도가 >97%인 인간 B 세포를 기술한 바와 같이 항CD19 자기 비드(노르웨이, 오슬로 소재, 다이날, M450)를 사용하여 말초 혈액 또는 제대혈로부터 분리하였다(13).

노던 블럿 분석법

<84> 인간 복수 조직 노던 블럿 I 및 II[클론텐크 #7760-1 및 #7759-1]를 사용하여 노던 블럿 분석법을 수행하였다. 이때 사용된 막을 60°C의 혼성화 용액(50% 포름아미드, 2.5 × Denhardt's, 0.2% SDS, EDTA 10mM, 2 × SSC, 50mM, pH6.5 NaH₂PO₄, 초음파 처리된 연어 정자 DNA 200μg/ml)에서 2시간 동안 항온 처리하였다. hBAFF의 136~285번 아미노산에 해당하는 뉴클레오티드를 함유하는 안티센스 RNA 프로브를 열변성시키고 이를 새로 준비한 혼성화 용액에 2 × 10⁶ cpm/ml으로 첨가하였다. 상기 막을 62°C에서 16시간 동안 혼성화시킨후, 이를 2 × SSC, 0.05% SDS(25°C, 30분)에서 1회 세정하고, 0.1 × SSC, 0.1% SDS(65°C, 20분)에서 1회 세정한후 -70°C에서 X선 필름에 노출시켰다.

BAFF cDNA의 특성 규명

<85> 인간 BAFF cDNA의 서열 일부를 태아의 간과 비장, 그리고 난소암 라이브러리로부터 얻은 몇몇 EST 클론(예를 들어, GeneBank 접속 번호 T87299 및 AA166695)중에 포함시켰다. 제조자에 의하여 추천되는 바와 같이, 인간 백혈구 세포의 풀로부터 제공된 cDNA 라이브러리를 주형으로 하고, 올리고뉴클레오티드 AP1 및 JT1013(5'-

ACTGTTCTCTGGACCCCTGAACGGC-3'; 서열 번호 9)를 사용하는 5'-RACE-PCR(미국, 캘리포니아, 팔로알토 소재, 클론테크, 마라톤-레디 cDNA) 증폭법으로 cDNA의 5' 부분을 얻었다. 그 결과 생성된 PCR 생성물을 PCR-0 블런트(네델란드, 엔브이 리크 소재, 인비트로젠)에 클로닝시키고 이를 EST 클론 T87299를 함유하는 pT7T3 Pac 벡터(파마시아)내에 EcoRI/PstI 단편으로서 서브클로닝시켰다. 이로써 BAFF의 내부 PstI 부위를 사용하여 5' 및 3' 단편을 결합시켜 전장 hBAFF cDNA를 얻었다. 서열의 GeneBank 기탁 번호는 AF116456이다.

<87> 취과 동물 BAFF의 일부 617bp 서열을 2개의 중첩 EST 클론(AA422749 및 AA254047)에 포함시켰다. 상기 서열의 158~391번 뉴클레오티드에 걸쳐서 존재하는 PCR 단편을 프로브로 사용하여 마우스 비장 cDNA 라이브러리(미국 캘리포니아 라졸라 소재, 스트라타젠)를 스크리닝하였다.

제조합 BAFF의 발현

<89> 전장 hBAFF는 올리고머 JT1069(5'-GACAAGCTGCCACCATGGATGACTCCACA-3'; 서열 번호 10) 및 JT637(5'-ACTAGTCACAGCAGTTCAATGC-3'; 서열 번호 11)을 사용하여 증폭시켰다. 이후 PCR 생성물을 PCR-0 블런트에 클로닝시키고 다시 HindIII/EcoRI 단편으로서 PCR-3 포유 동물 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 가용성의 짧은 BAFF(아미노산 Q136-L285)를 올리고머 JT636(5'-CTGCAGGGTCCAGAACAG-3'; 서열 번호 12) 및 JT637을 사용하여 증폭시켰다. 내부 PstI 부위를 사용하여 전장 BAFF로부터 가용성의 긴 BAFF(aa L83-L285)를 얻었다. 이후 가용성 BAFF를 적혈구 응집소 시그널 웨이프 타이드 및 변형 PCR-3 벡터의 플래그 서열뒤에 PstI/EcoRI 단편으로서 다시 서브클로닝하고, 프레임내 N-말단 플래그 서열(14)과 함께 존재하는 변형 pQE16 세균성 발현 벡터에 PstI/SpeI 단편으로서 서브클로닝하였다. 작제물을 양쪽 사슬상에서 서열 결정하였다. 가용성의 짧은 형태 또는 전장 BAFF를 발현하는 안정한 293 세포주의 생성, 및 세균과 포유 동물 293 세포로부터 얻은 제조합 가용성 BAFF의 발현 및 정제는 전술한 바와 같이 수행되었다(14, 15).

역전사효소 PCR

<91> T 세포, B 세포, 시험관내 유도된 미성숙 수지상 세포, 293 wt 및 293-BAFF(전장) 세포로부터 추출한 전체 RNA(total RNA)를 제조자 지침에 따라서 레디 투 고(Ready to Go) 시스템(파마시아)을 사용하여 역전사시켰다. BAFF 및 β-액틴 cDNA는 BAFF에 대한 특이적 올리고뉴클레오티드인, JT1322 5'-GGAGAAGGCAACTCCAGTCAGAAC-3'(서열 번호 13) 및 JT1323 5'-CAATTCCATCCCCAAAGACATGGAC-3'(서열 번호 14); IL-2 수용체 알파 사슬에 대한 특이적 올리고뉴클레오티드인, JT1368 5'-TCGGAACACAACGAAACAAGTC-3'(서열 번호 15) 및 JT1369 5'-CTTCTCCTTCACCTGGAAACTGACTG-3'(서열 번호 16); β-액틴에 대한 특이적 올리고뉴클레오티드인, 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'(서열 번호 17) 및 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'(서열 번호 18)를 사용하는 Taq DNA 중합 효소(94°C, 55°C 및 72°C에서 각각 1분씩, 30회전)로 PCR 증폭시켜 검출하였다.

겔 투과 크로마토그래피

<93> 293T 세포를 일시적으로 가용성 BAFF의 짧은 형태로 형질 감염시키고 이를 무혈청 최적 배지중에서 7일 동안 생장시켰다. 컨디셔닝된 상청액을 20배로 농축시키고, 내부 표준물인 카탈라제 및 난알부민과 혼합한 다음, 이를 수퍼텍스-200 HR10/30 컬럼상에 로딩시켰다. 단백질들을 PBS중에서 0.5mL/분으로 용리시키고 분획물(0.25mL)을 트리클로로아세트산으로 침전시킨후 항플래그 M2 항체를 사용하는 웨스턴 블러팅에 의하여 분석하였다. 이후 표준 단백질로 상기 컬럼의 눈금을 정하였다. 페리틴(440kDa), 카탈라제(232kDa), 알돌라제(158kDa), 소 혈청 알부민(67kDa), 난알부민(43kDa), 키모트립시노젠 A(25kDa) 및 리보뉴클레아제 A(13.7kDa).

PNGaseF 처리

<95> 시료를 0.5% SDS, 1% 2-머캅토에탄올 20μl중에서 95°C 하에 3분 동안 가열한후 냉각시키고, 이를 10% 노니테트 P-40(2μl), pH7.5, 0.5M 인산 나트륨(2μl) 및 웨이프 N-글리카나제 F(125 유니트/μl, 1μl 또는 효소가 존재하지 않는 대조군)으로 보강하였다. 시료들을 37°C에서 3 시간 동안 항온 처리한후 웨스턴 블러팅으로 분석하였다.

에드만 서열 결정

<97> 293 T 세포를 일시적으로 긴 형태의 가용성 BAFF로 형질 감염시키고 이를 무혈청 최적 배지에서 7일 동안 성장시켰다. 컨디셔닝된 상청액을 20배로 농축시키고, SDS-PAGE로 분획화한후 전술한 바와 같이(16), 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(미국, 캘리포니아 헤르큘레스 소재, 바이오래드 랩스)상에 블러팅시킨후, 페닐티오헥시단토인 C18 2.1 × 250mm 컬럼이 장착된 분석기(퍼킨 엘머, ABI 120A)에 커플링된 기상 서열 결정기(미국 캘리포니아 포스터시 소재, 퍼킨 엘머, ABI 120A)를 사용하여 서열 결정하였다. 이후 소프트웨어 ABI 610(퍼킨 엘머)을 사용하여 데이터를 분석하였다.

<98>

항체

<99>

재조합 가용성 BAFF로 토키(벨기에, 세라잉 소재, 유로겐텍)를 면역화하여 폴리클로날 항체를 생성하였다. 동일한 항원으로 면역화된 래트의 비장을 $\times 63\text{Ag}8.653$ 마우스 흑색종 세포에 융합시킨후, 이 하이브리도마 세포를 BAFF 특이적 IgG에 대하여 스크리닝하였다. 상기 모노클로날 항체들중 하나인, 43.9는 hBAFF를 특이적으로 인지하는 IgG2a이다.

<100>

세포들을 4°C 에서 20분 동안 FACS 완충액(PBS, 10% FCS, 0.02% NaN_3) $50\mu\text{l}$ 중에서 50ng의(또는 소정량)의 플래그 태깅된 짧은 가용성 hBAFF로 염색한후, 항플래그 M2($1\mu\text{g}$) 및 2차 항체로 염색하였다. 항BAFF mAb 43.9를 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 사용하였다. 2가지 색상의 FACS 분석법을 위하여, 말초 혈액 텁프구를 플래그 태깅된 가용성의 긴 BAFF($2\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색한후, 바이오틴화된 항플래그 M2($1/400$) 및 PE-표지된 스트렙타비딘($1/100$)으로 염색하고, 다시 FITC 표지된 항CD4, 항CD8 또는 항CD19로 염색하였다.

<101>

PBL 증식 분석법

<102>

$2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 염소 항인간 μ 사슬 항체(시그마) 또는 대조군 F(ab') $_2$ 의 존재 또는 부재하에서, 96 웰 플레이트(10% FCS로 보강된 RPMI $100\mu\text{l}$ 중 10^5 세포/웰)에서 말초 혈액 백혈구를 72 시간 동안 소정 농도의 천연 또는 가열된 가용성의 긴 BAFF와 함께 항온 처리하였다. 이후 세포들에 [^3H]티미딘($1\mu\text{Ci}/\text{웰}$)으로 6 시간 더 펄스를 가한후 수집하였다. [^3H]티미딘 혼입 정도는 액체 섬광 계수법으로 모니터링하였다. 몇몇 실험에서, 재조합 가용성 BAFF를 25°C 에서 5분 동안 1% 파라포름알데히드중에 고정시킨 전장 BAFF로 안정하게 형질 감염된 293 세포(또는 대조구로서 293 wt)로 대체하였다. 전술한 바(17)와 같이 분석하였다. 추가의 실험에서 CD19 $^+$ 세포는 자기 비드를 보유하는 분리된 형태의 PBL로서, 잔류하는 CD19 $^-$ 세포들을 조사한후(3000 rads) CD19 $^+$ 세포로 재작제하였다. 이후 전술한 바와 같이 sBAFF를 사용하여 증식 분석법을 수행하였다.

<103>

B 세포 활성화 분석법

<104>

정제된 B 세포들을 전술한 바와 같이 EL-4 배양 시스템에서 활성화시켰다(13). 간단히 말해서, 5×10^4 개의 방사된 쥐과 동물 EL-4 흉선종 세포(클론 B5)와 혼합한 10^4 개의 B 세포를 PHA($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 PMA($1\text{ng}/\text{ml}$)로 48시간 동안 활성화시킨 인간 T 세포($10^6/\text{ml}$)로부터 얻은 배양 상청액 5% v/v를 함유하는 배지 $200\mu\text{l}$ 중에서 5~6일 동안 배양하였다. 이후 B 세포를 항CD19 비드로 재분리하고, $200\mu\text{l}$ 중 5×10^4 세포, 편평한 바닥의 96웰 평판중의 이중 또는 삼중 배양액 배지만을 함유하거나 또는 5% T 세포 상청액으로 보강된 배지, 또는 $50\text{ ng}/\text{ml}$ IL-2(제네바 소재, Glaxo Institute for Molecular Biology 기증), 및 각각 $10\text{ ng}/\text{ml}$ 씩의 IL-4 및 IL-10(영국 런던 소재 페프로테크)으로 보강시킨 배지에서, sBAFF의 존재 또는 부재하에 7일 더 배양하였다. 항플래그 M2 항체를 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였더니 그 자체에 의해서는 아무런 효과도 나타내지 않았다. 배양 상청액중 IgM, IgG 및 IgA는 전술한 바와 같이 ELISA 분석법으로 정량하였다(13).

<105>

인간 BAFF는 가능한 신규의 TNF 리간드 군 일원으로서 개선된 프로필 검색법을 사용하여 공중에 공개된 데이터 베이스를 스크리닝하면서 서열 상동성을 통하여 동정하였다(18). (3' 영역을 차지하고 있는) EST-클론과 PCR에 의하여 증폭된 단편(5' 영역)을 결합시켜 285 아미노산(aa)의 완전 단백질을 암호화하는 cDNA를 얻었다. 신호 펩타이드가 존재하지 않음은 BAFF가 TNF 리간드 군 일원들의 전형인 타입II 막 단백질임을 제시하는 것이다. 상기 단백질은 46aa의 예측된 세포질 도메인, 소수성 경막 영역 및 2개의 잠재성 N-글리코실화 부위를 포함하는 218aa의 세포외 도메인을 보유한다(도 1a). BAFF의 세포외 도메인 서열은 APRIL과 상동성이 가장 높으며(아미노산 동일성 33%, 상동성 48%), 반면에 TNF, FasL, LT α , TRAIL 또는 RANKL과 같은 군의 다른 일원들과의 동일성은 20% 이하였다(도 1b, 도 1c). 비장 라이브러리로부터 분리된 마우스 BAFF cDNA 클론은, 경막 영역 및 모든 TNF 리간드 일원중 수용체 결합 도메인을 구성하는 소수의 β 가닥의 처음 부분 사이에 삽입되어 있기 때문에 길이가 약간 긴 단백질(309 aa)을 암호화하였다(19). 이러한 β 사슬 풍부 외부 도메인은 BAFF 유전자가 진화 과정 동안에 고도로 보존된다는 사실을 제안하는 마우스 및 인간 BAFF(동일성 86%, 상동성 93%)에서 거의 동일하다(도 1a).

<106>

비록 TNF 군 일원이 막 삽입형 리간드로서 합성된다 할지라도, 경막 및 수용체 결합 도메인 사이의 경상 영역이 절단된 경우가 종종 관찰되고 있다. 예를 들어, TNF 또는 FasL은 금속단백질 분해효소에 의하여 세포 표면으로

부터 용이하게 절단된다(20, 21). 293 T 세포중 재조합 BAFF의 몇몇 형태를 제조하는 동안, 본 발명자들은 수용체 결합 도메인 이외에 완전 경상 영역 및 N-말단 플래그-태그를 포함하는, BAFF의 34kDa의 재조합 가용성 형태(aa 83-285, 긴 sBAFF)가 보다 작은 18kDa의 단편으로 고도로 프로세싱되었다는 사실을 알 수 있었다(도 2a, 도 2b). 절단은 경상 영역중에서 일어났는데, 그 이유는 단편이 BAFF의 완전 수용체 상호작용 도메인에 대하여 유도된 항체로만 검출 가능하며, 항플래그 항체로는 검출할 수 없었기 때문이다(데이터는 나타내지 않음). 뿐만 아니라, N242(F- β 시이트의 도입부에 위치)가 아닌 N124(경상부에 위치)만이 글리코실화되었음이 확인되었는데, 그 이유는 PNGaseF로 N-결합 탄수화물을 제거함에 따라서 프로세싱되지 않은 긴 sBAFF의 분자량이 32kDa에서 30kDa으로 감소되는 반면에, 18kDa의 절단형은 이와 같은 처리에 비감수성이기 때문이다. 상기 18kDa 단편의 펩타이드 서열 분석을 통하여 실제로 R133 및 A134사이에서 절단이 일어났음을 확인할 수 있었다(도1a). R133은 인간(R-N-K-R) 및 마우스(R-N-R-R) 사이에 보존된 다염기성 영역의 말단부에 위치한다. 상기 절단이 단지 가용성의 비천연형 BAFF를 발현하는 인공물은 아님 여부를 시험하기 위하여, 막 결합 전장 BAFF를 293T 세포에서 발현시켰다(도2c). 32kDa의 완전 BAFF 및 분자 질량이 보다 큰 몇몇 종들(해리되지 않은 이량체 및 삼량체일 수 있음)은 세포 추출물중에서 용이하게 검출 가능하지만, 상청액으로부터 회수한 BAFF의 95% 이상은 프로세싱된 18kDa의 형태에 해당하는 것으로서, 이러한 사실은 BAFF가 막 결합 리간드로서 합성될때 프로세싱도 수행된다는 사실을 시사하는 것이다.

<107> 서열이 프로세싱 부위의 하류쪽 2 아미노산에서 시작되는 가용성 BAFF를 조작(Q136-L285, 짧은 sBAFF)하였다(도 1b). 예상했던 바와 같이, 항플래그 친화성 컬럼에 의하여 정제될 수 있는 재조합 분자의 N-말단에 부착된 플래그-태그는 제거되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 이들이 정확히 폴딩(folding)되었는지 여부를 시험하기 위하여, 정제된 짧은 sBAFF를, 단백질이 겉보기 분자량 55kDa으로 용리되는 겔 여과법으로 분석하였다(도2d). 짧은 sBAFF는 기타 TNF 군 일원의 4차 구조와 마찬가지로 호모삼량체($3 \times 20\text{kDa}$)로 정확하게 조립된다(19). 마지막으로, 프로세싱되지 않은 긴 sBAFF는 세균에서 용이하게 발현되었는데, 이는 절단 현상이 진핵 세포에 특이적이라는 사실을 시사하는 것이다.

<108> BAFF의 노던 블럿 분석법의 결과 2.5kb의 BAFF mRNA는 비장과 PBL에 풍부하다는 사실을 알 수 있었다(도3a). 흉선, 심장, 태반, 소장 및 허파에서는 약하게 발현되었다. 이와 같이 제한된 분포는 림프양 조직에 존재하는 세포들이 BAFF의 주요 공급원이었다는 사실을 시사하는 것이다. PCR 분석법을 통하여, BAFF mRNA는 T 세포 및 말초 혈액 단핵구 유래 수지상 세포에는 존재하지만, B 세포에는 존재하지 않는다는 사실을 알 수 있었다(도3b). 원형 그대로(naive)인 경우에도, 촉진 되지 않은 T 세포는 몇몇 BAFF mRNA를 발현하는 것으로 보인다.

<109> 서열 태깅된 부위(STS, SHGC-36171)는 인간 BAFF 서열을 포함하는 데이터베이스에서 찾아볼 수 있었다. 상기 부위는 마커 D13S286 및 D13S1315 사이에 9cM 간격으로 인간의 13번 염색체에 지도화하였다. 세포 유전학적 지도에서, 상기 간격은 13q32-34에 해당한다. 공자의 TNF 리간드 군 일원중에서, RANKL(트란스)만이 BAFF(13q14)와 꽤 멀리 떨어져 있음에도 불구하고 상기 염색체(22)에 국소화되었다.

<110> 상기 리간드가 최대의 생물학적 효능을 나타내기 위하여, BAFF 수용체(BAFF-R)는 림프양 조직에 존재하는 동일한 세포 또는 이웃 세포상에서 발현될 것으로 보인다. FACS에 의한 BAFF-R의 발현을 특이적으로 측정하는 도구로서 재조합 sBAFF를 사용하여, 본 발명자들은, 버킷 림프종 Raji 및 BJAB와 같은 다양한 B 세포주에서의 수용체 발현 수준이 높다는 사실을 파악할 수 있었다(도4a, 표1). 이와는 반대로, T 세포, 섬유아세포, 상피 근원 및 내피 근원 세포주들 모두에서는 발현되지 않았다. Fc 수용체의 결합으로 인하여, 단핵구 세포주 THP-1에 의해서는 염색이 매우 약하게되었음을 관찰할 수 있었다. 그러므로, BAFF-R 발현은 B 세포주에 한정되는 것으로 보인다. 마우스 비장세포 상에서 약한 결합이 관찰됨에도 불구하고, 시험된 2개의 마우스 B 세포주는 인간 BAFF를 프로브로 사용하는 경우 발현되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). B 세포상 BAFF-R의 존재는 제대 및 말초 혈액 림프구를 분석함으로써 확증되었다. CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포에는 BAFF-R이 결실되어 있었던 반면에(도4b, 데이터는 나타내지 않음), CD19⁺ B 세포에서는 진하게 염색되었음을 확인할 수 있었는데(도4a 및 도4b), 이는 BAFF-R이 원형 그대로의 세포와 기억 세포를 포함하여 모든 혈액 B 세포상에서 발현됨을 시사하는 것이다.

<111> BAFF는 혈액 유도성 B 세포와 결합하므로, 리간드가 성장 촉진 신호 또는 성장 억제 신호를 전달할 수 있는지 여부를 평가하는 실험이 수행되었다. 말초 혈액 림프구(PBL)는 표면 BAFF를 안정하게 발현하는 고정 293 세포와 함께 항IgM(μ) 항체로 촉진되었다(도5a). 항 μ 만으로 유도된 [³H]티미딘의 흡입 수준은 대조군 세포의 존재로 인하여 변경되지는 않았으나, BAFF 형질 감염 세포의 존재로 인해서는 2배 정도 증가하였다(도5b). PBL의 투여량 의존성 증식은 또한 BAFF 형질 감염 세포가 정제된 sBAFF로 대체되었을 경우에도 발생할 수 있었는데(도5c), 이는 BAFF가 이의 활성을 나타내는데에 있어서 막에 부착될 필요가 없음을 시사하는 것이다. 이러한 실험적 구

성에 있어서, sCD40L에 의하여 유도되는 증식에는 이의 농도가 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 필요가 있었으나, BAFF에 의하여 매개되는 항 μ 의 존재에는 그다지 그에 받지 않았다(도5d). 정제된 CD19⁺ B 세포가 조사된 자가 CD19⁻ PBL과 함께 배양될 때, BAFF에 의한 증식의 공동 촉진은 영향받지 않았는데, 이는 [³H]티미딘 흡수가, 주로 B 세포 증식에 기인하는 것인지, 다른 세포 유형의 간접적인 자극에 기인하는 것은 아니라는 사실을 설명해 주는 것이다(데이터는 나타내지 않음). BAFF에 대한 B 세포 증식은 전적으로 항 μ 항체의 존재에 의존성이 것으로 관찰되었는데, 이는 BAFF가 B 세포 증식에 공동 촉진제로서 작용한다는 사실을 시사하는 것이다.

<112> 면역글로불린 분비에 대한 BAFF의 가능한 효과를 관찰하기 위하여, 정제된 말초 혈액 B 세포 또는 대혈액 B 세포를 PHA/PMA 자극된 T 세포의 상청액으로부터 얻은 시토킨 혼합물의 존재하에서 EL-4 T 세포와 함께 배양하여 예비 활성화시켰다(23). 상기 B 세포는 순도 98%로 재분리되었으며, 그 결과 시토킨만이 단독으로 존재할 때에 비하여, BAFF 및 활성화된 T 세포 시토킨이 존재할 때 2차 배양되는 동안 Ig 분비량은 2배 증가하였다. 외생 시토킨의 부재 하에서 나타나는 가장 최선의 효과, 및 중간 수준(1.5 배)의 효과는 재조합 시토킨인 IL-2, IL-4 및 IL-10의 존재하에서 관찰되었다(도5e, 도5f).

<113> BAFF의 생화학적 분석법은 또한 TNF 군 일원의 전형적인 호모삼량체 구조와 일치하였다. 리간드의 이러한 군중에서, BAFF는 최근 들어 다양한 종양 세포의 성장을 촉진하는 리간드로서 특성 규명된 APRIL과의 서열 유사성 수준이 가장 높았다(11). 상동성이 균등하게 높은(동일성 33%) 2개의 군 일원이며 6번 염색체상에 연관되어 있는 유전자인 TNF 및 LT μ 와는 달리, APRIL 및 BAFF는 동일한 염색체상에 클리스터링되어 있지 않다. APRIL은 17번 염색체상에 위치하는 반면에(J.L.B., 비공개 데이터), BAFF는 인간의 13번 염색체(13q34)의 원위 아암(distal arm)에 위치하였다. myc 유전자가 Ig 위치(25)로 전위되는 것 이외에 두 번째로 가장 빈번히 발생하는 상기 위치에서의 이상 현상은, 벼켓 림프종에서 특성 규명되었다. 분석된 모든 벼켓 림프종 세포주상의 BAFF-R의 높은 발현 수준으로 보아서(표 I 참조), 이는 몇몇 벼켓 림프종이 BAFF 발현에 대한 제한을 해제하여, 나름대로의 방식으로 성장을 촉진할 수 있는 가능성을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<114> 면역 반응의 상이한 단계에서의 항원 특이적 B 림프구의 역할은 헬퍼 T 세포 및 수지상 세포(20)와 같은 항원 제공 세포로부터의 신호와 접촉에 대한 의존성이 매우 높다. B 림프구가 림프양 조직에서 B 세포 여포의 가장자리에서 T 세포와 상호 작용하여 이를 증식 및 분화시켜 저친화성 항체 형성 세포로 만드는 경우, B 림프구는 이러한 신호를 면역 반응의 초기에 처음으로 수용한다(18). 이와 동시에 몇몇 항원 특이적 B 세포는 또한 상기 B 세포 여포로 이동하여 배아 중심, B 세포 증식의 다른 부위를 형성시킬 뿐만 아니라, 친화성 성숙 및 기억 B 세포 및 고친화성 혈장 세포의 생성에 기여한다(19).

<115> TNF 상위 군 CD40L의 다른 일원에 의하여 촉발된 신호는 T 세포 의존성 면역 반응의 여러 단계에서의 B 림프구의 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나, 몇몇 연구 결과에 의하면 CD40L/CD40 상호 작용은 B 세포에 대한 모든 접촉 의존성 T 세포 원조에 관여하지는 않음을 밝힌 바 있다. 실제로, X-연관 고IgM 증후군으로 사멸된 마우스 또는 환자로부터 분리된 CD40L 결핍성 T 세포는 B 세포 증식 및 이의 혈장 세포로의 분화를 성공적으로 유도시키는 것으로 보인다. CD40L에 대한 차단 항체를 사용한 연구를 통하여 인간 편도선으로부터 분리한 표면 IgD 존재 B 세포의 하위 세트는 CD40 독립 방식으로 활성화된 T 세포에 반응하여 증식 및 분화하는 것으로 보인다. 막결합형 TNF 및 CD30L과 같은 TNF 군의 다른 일원들은 또한 B 세포의 CD40 및 표면 Ig 독립성 촉진에 관여하는 것으로 보인다. BAFF로 얻어진 결과와 유사하게, CD40 결핍성 B 세포는 표면 Ig 수용체가 동시에 촉발되는 한, 헬퍼 T 세포에 의하여 혈장 세포로 증식 및 분화하도록 촉진될 수 있을 것으로 보인다. BAFF 및 CD30L과 CD40L은 T 세포에 의하여 발현되지만, 그의 기원은 다수의 상이한 세포에서의 발현이 설명된 CD40, CD30 및 TNF 수용체와는 대조적으로, 수지상 세포 및 B 세포상의 수용체의 고도로 특이적인 지역에 의한 발현에 있다. 이러한 관찰 결과는 B 세포상에서의 독립적이고 특이적인 BAFF 유도성 작용을 제시한다.

<116> T 세포 및 수지상 세포 유도된 B 세포 성장 및 잠재적 성숙에 있어서의 BAFF의 역할을 지지하는 데에 있어서, 본 발명자들은 상기 BAFF가, CD40 신호전달과는 독립적으로, B 세포 수용체의 교차 연관과 함께 혈액 유래 B 세포 증식을 공동으로 촉진한다는 사실을 알 수 있었다. 더욱이, 본 발명자들은 시험관내에서 전혈장(pre-plasma) 세포/GC 유사 B 세포로 분화되는 CD19 존재 B 세포를 사용하여(14), 활성화된 T 세포 또는 IL-2, IL-4 및 IL-10의 배합물로부터 얻은 상청액의 존재하에서 B 세포에 의한 Ig 분비에 대한 BAFF의 공동 촉진 효과를 관찰하였다. 흥미로운 것은, 공동 촉진 효과는 시토킨 배합물의 경우와 비교했을 때, 활성화된 T 세포 상청액의 존재하에서 더욱 컸는데, 이는 활성화된 T 세포에 의하여 분비된 추가의 가용성 인자들이 BAFF 또는 추가의 BAFF 자체에 의하여 상승효과를 나타낼 수 있는 항체 생성에 관여함을 시사하는 것이다. 따라서, BAFF가 상기 GC 유사 B 세포를 혈장으로 분화시키는 데에 능동적으로 관여할 수 있는 것이다.

- <117> BAFF가 시험관내에서 원형 그대로의 B 세포에서 뿐만 아니라 GC 기여성 B 세포 모두에서 신호 전달을 할 수 있음을 명백한 사실이다. 이러한 관찰 결과가 정상적인 면역 반응시 번역될지 또는 번역되지 않을지 여부는 적합한 생체내 실험에 의하여 증명되어야 할것이다.
- <118> CD40L에 의하여 촉발되는 증식이 항 μ 공동촉진제에 대해 덜 의존적이었기 때문에, BAFF에 의하여 B 세포에서 유도된 생물학적 반응은 CD40L에 의한 경우와 명백히 구별된다(17)(도5d 참조). 더욱이, CD40L은 B 세포 수용체가 결합한 후의 B 세포에서 세포자살 신호에 대향할 수 있었던 반면에, BAFF는 Ramos 세포가 BAFF-R을 발현시킴에도 불구하고, BAFF는 항 μ 매개성 세포자살로부터 B세포주 Ramos를 구제할 수 없었다[표1 ; F.M. 및 J.L.B의 문헌, 비공개 관찰 결과](29). 따라서 CD40L 및 BAFF는 구별되는 기능을 수행하는 것으로 보인다. 이러한 측면에서, BAFF는 CD40을 포함하여, 시험된 TNF 군의 16개의 재조합 수용체중 임의의 것과 상호 작용을 하지 않았다는 사실은 주목할만한 사실이다(P.S. 및 J.T. 비공개 관찰 결과].
- <119> B 세포 성장은 경막 도메인이 결실된 재조합 가용성 BAFF에 의하여 효율적으로 공동 촉진된다. 이러한 활성은 TRAIL, FasL 및 CD40L과 같은 막 결합형 리간드로서만 작용을 하는 몇몇 TNF 군 일원과는 대조적이다. 상기 리간드의 가용성 형태는 이들이 교차 연관에의하여 두드러질 수 있는 불량한 생물학적 활성을 보유하기 때문에, 막 결합형 리간드를 모방(mimicking)한다(15). 이와는 반대로, 항플래그 항체와 플래그 태깅된 sBAFF의 교차 연관, 또는 상피 세포 표면상에 발현된 막결합형 BAFF를 사용하는 경우에는 BAFF의 분열촉진 활성은 더이상 두드러지지는 않았는데, 이는 TNF가 그려하듯이, 분비형 시토킨처럼 전신에서 작용할 수 있다는 사실을 시사하는 것이다. 이는 BAFF의 경상부에 존재하는 다염기성 서열이 단백질 분해효소에 대한 기질로서 작용한다는 관찰 결과와 일치한다. 유사한 다염기성 서열도 또한 APRIL 및 TWEAK 모두에 있어서 해당 지역에 존재하며 이를 모두에 대한 단백질 분해 프로세싱의 증거도 존재한다(30)(N.H. 및 J.T., 비공개 관찰 결과). 절단에 관여하는 단백질 분해 효소가 결정되어져야 함에도 불구하고, 막 결합형 TNF의 서열 선호도는 완전히 상이하므로, 금속단백질 분해효소는 막 결합형 TNF를 방출시키는데에 기여하는 것으로 보이지는 않는다(21). BAFF(R-N-K-R), APRIL(R-K-R-R) 및 TWEAK(R-P-R-R)중의 다염기성 모티프는 프로단백질 변형효소 군(31)의 원형인, 푸린(R-X-K/R-R)에 대한 최소의 절단 신호의 증거이다(31).
- <120> 본 발명의 실행시에는, 다른 언급이 없는한, 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 단백질 화학 및 면역학의 분야의 기술 범위내의 통상적인 기법을 사용할 것이다. 이러한 기법에 관하여는 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**, 제2판, (Sambrook, Fritsch 및 Maniatis 편저), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 ; **DNA Cloning**, Vol. I & II(D.N.Glover 편저), 1985 ; **Oligonucleotide Synthesis**(M.J.Gait 편저), 1984 ; 미국특허 제4,683,195호(Mullis 등) ; **Nucleic Acid Hybridization**(B.D.Hames 및 S.J.Higgins 편저), 1984 ; **Transcription and Translation**(B.D.Hames 및 S.J.Higgins 편저), 1984 ; **Culture of Animal Cells**(R.I.Freshney 편저), Alan R.Liss.Inc., 1987 ; **Immobilized Cells and Enzymes**, IRL Press, 1986 ; **A Practical Guide to Molecular Cloning**(B.Perbal), 1984 ; **Methods in Enzymology**, Vol.154 및 155(Wu 등 편저), Academic Press, New York ; **Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells**(J.H.Miller 및 M.P.Calos 편저), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory ; **Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology**(Mayer 및 Walker 편저), Academic Press, London, 1987 ; **Handbook of Experimental Immunology**, Vol. I ~ IV(D.M.Weir 및 C.C.Blackwell 편저), 1986 ; **Manipulating the Mouse Embryo**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- <121> 이하 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 제공된 것일 뿐, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

실시예

- <122> 이하의 실험 방법들은 실시예 1~6에서 사용될 수 있다.
- <123> **쥐과 동물 BAFF Tg 마우스 제조용 DNA 작제를**
- <124> 인간 및 쥐과 동물 cDNA 서열에 관하여는 이미 기술한 바 있다(Schneider 등, 1999). RT-PCR에 의하여 전장 쥐과 동물 BAFF를 암호화하는 PCR 단편을 제조하였다. 제조자의 방법(미국 뉴욕 그랜드아일랜드 소재, GibcoBRL)에 따라서 올리고 dT를 사용하여 처음 cDNA 사슬을 마우스 허파 폴리A+(미국, 캘리포니아, 팔로알토 소재, 클론테크)로부터 합성하였다. 1 ×Pfu 완충액(미국, 캘리포니아, 라졸라 소재, 스트라타젠), 0.2mM의 dNTPs, 10% DMSO, 12.5 pM의 프라이머, 5 유니트의 Pfu 효소(스트라타젠)를 함유하는 PCR 반응물에 NotI 제한 부위를 보유하는 프라이머인 5'-TAAGAATGCGGCCGGAATGGATGAGCTGCAGCAA-3'(서열 번호 19) 및 5'-TAAGAATGCGGCCGGAATGGATCAGCACTCCAGCAA-3'(서열 번호 20)을 첨가하였다. 주형을 94°C에서 1분 동안, 54°C에서 2

분 동안 및 72°C에서 3분 동안 그리고 다시 72°C에서 10분 동안 증폭시키는 순환을 30 회전시켜 증폭시켰다. 본 서열은 GeneBank 파일 AF119383의 214~1171번 뉴클레오티드에 해당한다. 이후 PCR 단편을 Not I으로 절단하고 이후 변형 pCEP4 벡터에 클로닝하였다(미국, 캘리포니아 칼스베드 소재, 인비트로젠). SV40 폴리A 부가 부위 서열을 포함하도록 쥐과 동물 BAFF를 함유하는 단편을 XbaI으로 제거하였다. 상기 단편을 프로모터 서열이 첨가된 pUC계 벡터에 클로닝시켰다. 인간 ApoE 인핸서와 AAT(알파 항트립신) 프로모터를 함유하는 1Kb의 Bg12-Not I 평활 단편인 프로모터를 플라스미드 클론 540B로부터 정제하였다(미국 미주리주 세인트 루이스 소재, 워싱턴 유니버시티의 Dr. Katherine Parker Ponder 기증). EcoRV/Bg12 단편을 최종 벡터로부터 정제하고 이를 트랜스게닉 마우스 제조용으로 사용하였다. C57BL/6J 암컷 × DBA/2J 수컷 F1(BDF1) 마우스의 주입된 자손을 C57BL/6 마우스와 역교배하였다. 미세 주입 기법 및 트랜스게닉 마우스 제조 기법은 전술한 바 있다(McKnights 등, 1983).

<125> **분석 방법 :**

<126> 혈청 시료를 선형의 12.5% 겔을 사용하여 환원된 SDS-PAGE 분석법을 수행하였다. 마우스 간으로부터 얻은 전체 RNA(total RNA)를 제조하여 이를 제조자 지침에 따라서 프로메가(미국 위스콘신 소재, 매디슨)로부터 얻은 분리 키트를 사용하여 노던 블럿 분석법용으로 프로세싱하였다. 이종 유전자 자체물의 SV40 폴리A 테일에 걸쳐서 존재하는 프로브를 사용하여 BAFF 이종 유전자 특이적 mRNA를 검출한 후 XbaI 및 BamHI으로 변형 pCEP4 벡터를 절단하여 상기 BAFF 이종 유전자 특이적 mRNA를 얻었다. 프로브는 BAFF 이종 유전자로부터 얻은 mRNA에 해당하는 1.8~2Kd의 밴드를 인지하였다. 1 × Taq 중합효소 완충액(스트라타젠), 0.2nM의 dNTP, 10% DMSO 및 5 유니트의 Taq 중합효소(스트라타젠)를 함유하는 반응물중에서 12.5pM의 프라이머, 즉 5'-GCAGTTTACAGCGATGTCCT-3'(서열 번호 21) 및 5'-GTCTCCGGTGCCTGAAATCTG-3'(서열 번호 22)를 사용하여 BAFF Tg 마우스로부터 얻은 테일 DNA로 PCR 분석을 수행하였다. 이종 유전자 719 bp를 94°C에서 30초 동안, 54°C에서 1분 동안 및 72°C에서 1분 30초 동안 그리고 다시 72°C에서 10분 동안 증폭시키는 순환을 30 회전시켜 증폭시켰다.

<127> 마우스 뇨중의 단백질의 존재 여부는 뇨 분석용 멀티스틱스 10 SG 시약 스트립을 사용하여 측정하였다(미국, 인디애나 엘크하르트소재, Bayer Corporation, Diagnostics Division).

<128> **세포 동력학 및 세포질 형광계측 분석법(FACS)**

<129> Abbott Cell Dyn 3500 장치(미국 일리노이주, 시카고)를 사용하여 새로 공급된 EDTA 항응집 전혈의 감별성 WBC 계수법을 수행하였다. FACS 분석을 위하여, 형광(FITC)-, Cy-크롬- 및 피코에리트린-(PE)-표지된 래트 항마우스 항체 : 즉, 항B220, 항CD4, 항CD8, 항CD43, 항IgM, 항CD5, 항CD25, 항CD24, 항CD38, 항CD21, 항CD44, 항L셀렉틴 및 햄스터 항Bcl-2/대조군 햄스터 Ig 키트를 파민겐(미국, 캘리포니아, 샌디에고 소재)으로부터 구입하였다. 제조합 이.콜라이 및 포유 동물 세포 유래의 인간 및 마우스 플래그 태깅된 BAFF는 전술한 바와 같이 제조하였다(Schneider 등, 1999). 제조자의 설명서에 따라서 모든 항체들을 사용하였다. 다음과 같이 마우스 혈액으로부터 PBL을 정제하였다. 마우스 혈액을 EDTA를 함유하는 마이크로튜브에 채혈한 후 PBS로 1/2배 희석시켰다. 희석된 혈액 500 μl를 4mℓ의 유리 튜브내 1mℓ의 피콜(캐나다, 온타리오주 혼비 소재, 셀라데인) 상부에 넣고, 이를 실온에서 30분 동안 2000 rpm으로 구배를 걸어주어 원심분리를 수행하여 립프구를 함유하는 계면을 수집하고 이를 PBS로 2회 세정한 후 FACS 염색을 수행하였다. 비장, 콜수 및 장간막 립프절을 분쇄하여 RPMI 배지중 단일 세포 혼탁액으로 만들고(미국, 뉴욕, 그랜드 아일랜드 소재, 라이프 테크놀로지스, 인크.), 이를 FACS 완충액(2%의 소 테아 혈청(JRH Biosciences, Lenexa, KS)으로 보강된 PBS)에서 세정하였다. 처음에 세포를 다음의 차단 시약, 즉 10 μg/ml의 인간 Ig(스위스 바젤 소재, 산도즈) 및 10 μg/ml의 항마우스 Fc 차단 항체(파민겐)으로 보강된 FACS 완충액에 혼탁시키고 얼음에서 30분 동안 항온 처리한 후, 형광색소 표지된 항체로 염색하였다. 모든 항체를 FACS 완충액에서 상기 차단 시약으로 희석시켰다. FACScan 세포질 형광계측기(벡톤 디킨슨)를 사용하여 시료를 분석하였다.

<130> **ELISA 분석법에 의한 마우스 혈청내 전체 마우스 Ig 및 류마티스성 인자의 검출**

<131> ELISA 평판(미국 뉴욕 소재, 코닝, 코닝 유리)을 pH9.6의 중탄산나트륨 완충액 50 mM중 10 μg/ml의 염소 항전체 마우스 Ig 용액(미국 알라바마, 버밍햄 소재, 서던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트, 인크.)으로 4°C에서 밤새도록 피복시켰다. 이후 상기 평판을 PBS/0.1% Tween으로 3회 세정시킨 후 PBS중 1% 젤라틴으로 밤새도록 차단시켰다. 일련의 100 μl/웰의 혈청 희석액 또는 표준 희석액을 37°C에서 30분 동안 평판에 첨가하였다. 37°C에서 30분 동안 알칼리성 포스파타제(AP)-표지된 염소 항전체 마우스 Ig 용액 1 μg/ml을 웰당 100 μl씩 사용하여 마우스 Ig를 검출하였다. 마지막으로 PBS/0.1% Tween으로 3회 세정한 후, 10% 디에탄올아민중 10 μg/ml의 p-니트로페닐 포스페이트(미국 인디애나주, 인디애나폴리스 소재, 뷔링거 맨하임) 용액을 사용하여 효소 반응을 진행시켰다. 웰당 3N NaOH를 100 μl씩 첨가하여 반응을 중지시켰다. Molecular Device(미국, 캘리포니아, 써니베일

소재)의 흡광계를 사용하여 405nm에서 광학 밀도(O.D.)를 측정하였다. 서던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트로부터 구입한 정제 마우스 Ig을 사용하여 표준 곡선을 얻었다. 류마티스성 인자들(RF)을 검출하는 경우, 평판은 염소 항마우스 Ig 대신에 보통의 염소 Ig(미국, 웬실배니아, 웨스트그로브 소재, 잭슨 이뮤노리서치 래보레이토리, 인크.)으로 교체하였으며, 마우스 Ig은 전술한 바와 같이 검출하였다. RF 분석법에서 마우스 이 소타입의 검출은 표준 곡선에 대하여 AP-표지된 염소 항마우스 IgA, IgM, IgG2a, IgG2b 및 IgG3 뿐만 아니라, 정제된 마우스 IgA, IgM, IgG2a, IgG2b 및 IgG3(서던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트, 인크.)를 사용하여 수행하였다. 모든 통계학적 비교는 변수를 분석하여 수행되었다.

<132> 마우스 혈청에서의 순환성 면역 복합체(CIC)의 검출 및 저온 글로불린의 침전

본 분석법은 다음과 같은 변형을 가하여 전술한 바와 같이 수행하였다(June 등의 문헌, 1979 ; Singh 및 Tingle의 문헌, 1982). 즉, ELISA 평판(코닝 유리)을 4°C에서 밤새도록 pH9.6의 중탄산나트륨 완충액 50mM중에서 5µg/ml의 인간 C1q(미국 캘리포니아, 샌디에고, 퀴넬)으로 교체하였다. 이후 상기 평판을 PBS/0.1% Tween으로 3회 세정하였다. 웰당 50 µl의 0.3M EDTA를 웰당 50 µl의 표준적 면역 복합체(다코(미국 캘리포니아 카핀테리아 소재)로부터 구입한 페옥시다제 마우스 항페옥시다제(PAP))의 공자의 농도를 갖는 일련의 희석액 또는 용액에 첨가하였다. 이후 평판을 37°C에서 30분 동안 항온 처리하였다. 이후 평판을 PBS/0.1% Tween으로 3회 세정하였다. ELISA 분석법에 관하여 전술한 바와 같이 AP-표지된 염소 항마우스 Ig(서던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트, 인크.)의 1 µg/ml 용액을 웰당 100µl씩 사용하여 면역 복합체중의 마우스 Ig을 검출하였다. 물 중에서 1/15의 비율로 희석된 마우스 혈청을 4°C에서 밤새도록 항온 처리하여 저온 글로불린을 검출하였으며 침전물은 눈으로 평가하였다.

<134> 항이중 사슬(ds) 및 단일 사슬(ss) DNA 분석법

NUNC-면역 평판 맥시소프 평판(덴마크 소재, NUNC A/S)을 사용하여 항ssDNA를 분석하였다. 우선 4°C에서 평판을 밤새도록 100 µg/ml의 메틸화된 BSA(미국 캘리포니아 라졸라 소재, 칼보켐 코포레이숀)로 교체시키고, 50 µg/ml의 1등급 송아지 흉선 DNA(미국 미주리주, 세인트루이스 소재, 시그마)로 교체시켰다. 송아지 흉선 DNA를 초음파 처리법으로 분쇄한후 사용전에 S1 뉴클레아제로 분해하여 두었다. 항 ssDNA 분석법을 위하여, DNA를 10분 동안 가열시키고 사용하기 이전에 얼음으로 냉각시켰다. 차단 이후, 상기 혈청 시료의 일련의 희석액을 첨가하고 이를 실온에서 2시간 동안 항온 처리하였다. 염소 항마우스 IgG-AP(시그마)로 자기 항체를 검출하고 전술한 바와 같이 ELISA 분석법을 진행하였다. ssDNA 및 dsDNA 모두에 특이적인 공자의 양의 항DNA mAb 205를 사용하여 표준 곡선을 구하였다(Datta 등의 문헌, 1987).

<135> 면역 조직 화학

비장 및 림프절을 O.C.T 매립 배지(미국 인디애나 엘크하르트 소재, 마일즈)에서 동결시키고 이를 저온조 절제 용으로 비축하였다. 7~10 µm의 두께를 갖는 겹편들을 건조시키고 아세톤에 고정시켰다. 모든 Ab 항온 처리액 (10 µg/ml)를 트리스 완충 염수 A(TBS-A, 0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20(v/v), 0.25% BSA)중에 희석시킨후 실온의 가습 박스내에서 1시간 동안 항온 처리한후, TBS-B(0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20)에서 행구고 효소 반응을 개시하기 이전에 메탄올중에 1분 동안 고정시켰다. 각각의 디아미노벤지딘(DAB) 정제 기질 키트(시그마) 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트/니트로 블루 테트라졸륨(미국 일리노이주, 록포드 소재, 피어스, BCIP/NBT)을 사용하여 양고추냉이 페옥시다제(HRP) 및 알칼리성 인산화효소(AP) 활성을 발현시켰다. 염색된 조직 겹편들을 최종적으로 5분 동안 메탄올에서 고정시킨후 김사(스위스 부흐 소재, 플루카)로 염색하였다. 바이오틴 표지된 항체인 래트 항B220, 항CD11c, 항신데칸-1 및 표지되지 않은 래트 항CD4, 항CD8 µ 및 항CD8 µ를 파민젠으로부터 구입하였다. 바이오틴 표지된 땅콩 응집소(PNA)를 벡터 래보레토리(미국 캘리포니아 버링엄 소재)로부터 구하였다. (HRP)-표지된 마우스 항래트 Ig 및 (HRP)-스트렙타비딘을 잭슨 이뮤노리서치 래보레토리, 인크.로부터 구입하였으며, AP-표지된 스트렙타비딘은 서던 바이오테크놀로지 어쏘시에이트, 인크.로부터 구입하였다. Ig 침착 여부를 검출하기 위한 신장 조직상에서의 면역 조직 화학의 경우, 파라핀 겹편이 사용되었는데, 이는 벡터(미국 캘리포니아 버링엄 소재)로부터 구입한 희석 말 혈청을 사용하여 탈왁스화 및 차단되었으며, 이후 잭슨 이뮤노리서치로부터 구입한 HRP-염소 항마우스 Ig으로 염색하였다. 검출은 전술한 바와 같이 수행하였다.

<136> 실시예 1

<139> 비정상적 표현형을 보유하는 BAFF 트랜스게닉(BAFF Tg) 대리모 마우스(founder mouse)

APO E 인핸서를 보유하는 간 특이적 알파-1 안티트립신 프로모터를 사용하여 전장 쥐과 동물 BAFF를 트랜스게닉

마우스에서 발현시켰다. BAFF가 절단되어 전신적으로 작용하거나, 또는 국소 간 특이적 비정상 상태가 기능성 단서를 제공할 수 있는 것으로 관찰되는 막 결합형으로 유지되는지 여부에 따라서 전장 물질을 선택하였다. BAFF 이종 유전자를 보유하는 13 마리의 대리모 마우스를 얻었다(표2). 이들 마우스중 4 마리는 어릴때에 죽었다. 811번 및 816번 마우스에서는 보통의 병상이 진행되었다(표2). 이들 마우스가 감염되었는지는 분명하지 않았으나 ; 중증 고혈압(표2)에 관하여 기술된 바와 유사한 심혈관 및 신장 이상은 분명하게 나타났다(Fu, 1995). 816번 대리모 마우스의 혈마토실린 및 에오신(H&E) 염색된 신장 조직 검편은 마우스가 비정상적이라는 점에 있어서 사구체 형상을 보였던 반면에, 나머지 신장 조직은 정상적으로 보였다(데이터는 나타내지 않음). 다수의 NAAFF 트랜스게닉 대리모 마우스는 단백뇨를 나타내었다(표2). 816번 마우스로부터 얻은 비장 냉동 조직 검편에 대한 면역 조직 화학은, B 세포 염색은 비정상적이고 과도하게 행해지며 T 세포에 대한 염색은 감소된다는 사실을 규명하였으며, 이러한 관찰 결과는 자손을 통하여 입증되었다(이하 도12 참조).

<141> 2색 FACS 분석법을 사용하여, CD4 보유 T 세포 %에 대한 B220 보유 B 세포 %의 비율을 계산하였다. 상기 비율은 대조군 음성 BDF1 마우스와 비교하였을 때 BAFF Tg 대리모 마우스에서 2~7배 더욱 높았는데(표 2), 이는 BAFF Tg 마우스중 B 세포 군집이 증가하였음을 제시하는 것이다. 상기 대리모 마우스들 중 9마리를 선택하여 표2에 밀줄쳐 나타낸 트랜스게닉 마우스의 상이한 세포주를 제조하였다. 696번, 700번, 811번 및 816번 대리모 마우스의 조기 사멸 이후 수 개월 경과 후에, 생존하는 BAFF Tg 대리모 마우스 또는 이로부터 유래된 자손중 어느것도 건강이 손상되었음을 나타내는 징후를 보이지 않았는데, 이는 이들 4마리의 마우스가 이들을 사멸시키는 BAFF의 수준보다 BAFF를 더욱 높은 수준으로 발현시킨다는 사실을 시사하는 것이다. 트랜스게닉 마우스의 간에 있어서의 BAFF의 과발현은 노던 블렛 분석법으로 확인할 수 있었다(데이터는 나타내지 않음). 해부학적으로 관찰된 모든 BAFF-Tg 마우스에 있어서, 간은 이상 현상을 나타내지 않았는데, 이는 BAFF의 국소적인 과발현이 임의의 면역학적 또는 병상학적 현상을 유도하지 않았음을 시사하는 것이다. 쥐과 동물 BAFF는 ELISA 분석법이 유효하지 않았으나 ; 대조군 마우스로부터 얻은 혈청이 아닌, BAFF Tg 마우스로부터 얻은 2% 혈청은, 포유 동물 세포 유래 마우스의 가용성 플래그 태깅된 BAFF가 BJAB 세포와 결합하는 것을 차단한다는 사실을 알 수 있었다. 더욱이, 대조군 마우스로부터 얻은 혈청이 아닌, BAFF Tg 마우스로부터 얻은 5% 혈청은 항 μ (데이터는 나타내지 않음)의 존재하에서 PBL로부터 얻은 인간 B 세포의 증식을 증가시켰다. 상기 데이터는 BAFF Tg의 혈액중에 존재하는 가용성 BAFF의 실제양을 제시한다.

<142> 실시예 2

B 세포수의 증가에 따른 BAFF Tg 마우스에서의 말초 림프구 증가증(lymphocytosis)

<144> 트랜스게닉 마우스 군집은 대조군 음성 한배 새끼와 비교하였을 때, 혈액중 림프구 수가 더욱 많아서, 혈액 μL 당 13000개의 림프구 정도에 달하는 것으로 보인다(도7a). 이와는 반대로, BAFF Tg 마우스 및 대조군 마우스 모두에 있어서의 혈액 μL 당 과립구 수는 보통의 한계치 이내에 존재하였다(도7a). 6마리의 상이한 대리모 마우스로부터 얻은 18 마리 BAFF Tg 마우스로부터 얻은 말초 혈액 세포(PBL)의 항CD4 항체 및 항B220 항체를 사용하여 FACS 분석한 결과, B/T 비율이 상승하였음을 알 수 있었는데(도7b 및 도7c), 이와 같은 림프구 수준의 증가는 B 세포 하위 세트가 증식함에 따른 것이었다. 이와 유사하게, 상기 방법을 사용하여 CD4 순환성 T 세포의 절대적인 수를 측정한 결과, 대조군 마우스와 비교하였을 때 BAFF Tg 마우스의 T 세포 하위세트의 50%는 감소하였으며, CD8 T 세포 하위세트의 경우에도 동일한 결과가 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). BAFF Tg 마우스의 PBL로부터 얻은 모든 B 세포는 대조군 마우스로부터 얻은 B 세포와 비교하였을 때, MHC 클래스II 및 Bcl-2의 발현율이 증가하였는데(각각 도 7d 및 도7e), 이는 BAFF Tg 마우스의 PBL에서의 B 세포 활성화 수준을 어느 정도 시사해 준다. BAFF Tg 마우스 혈액중 T 세포는 초기 활성화 마커인 CD69 또는 CD25를 발현시키지는 않았으나 ; 대조군 한배 새끼중 8~12%만에 대해서 CD4 또는 CD8 T 세포중 40~56%는 CD44^{hi}, L-셀렉틴^{lo} 표현형을 나타내는 효과기 T 세포로 활성화되었다(도7f). 그러므로 BAFF Tg 마우스는 T 세포가 변형됨에 따라서 B 세포 림프구 증가증 및 전체 B 세포 활성화의 징후를 명백히 나타냈다.

<145> 실시예 3

성숙 세포로 구성된 증폭 B 세포 구획

<147> 트랜스게닉 마우스에서 BAFF의 과발현이 골수에서 중심적으로 그리고 2차 림프양 기관에서 부수적으로 B 세포 구획에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여, 4 마리의 상이한 대리모 마우스로부터 유래된 총 7 마리의 대조군 한배 새끼 및 총 7 마리의 BAFF Tg 마우스로부터 얻은 비장, 골수 및 장간막 림프절을 FACS로 관찰하였다. 항B220 및 항IgM 항체 모두로 염색하여 성숙한 B 세포 구획을 분석하였다. 2 마리의 각각의 BAFF Tg 마우스 및 한마리의 대표적인 대조군 한배 새끼를 도8에 나타내었다. 성숙한 B 세포 구획(IgM+, B220+)은 비장 및 장간막

림프절 모두에서 증가하였다(도8a의 상부 및 저부 패널). 골수(도8b)에서의 B220+/IgM+ B 세포(도7a, 중간 패널) 또는 프로B 세포(CD43+/B220+) 및 프리B 세포(CD43-/B220+) 구획을 분석한 결과, BAFF Tg 마우스 및 대조군 한배 새끼가 유사함을 알 수 있었다. 이러한 데이터들은 BAFF의 과발현이 부수적으로 성숙한 B 세포의 증식에 영향을 미치지만 골수의 선조 B 세포의 증식에는 영향을 미치지 않음을 시사하는 것이다. 비장의 B 세포 하위 군집의 FACS 분석 결과, 대조군 마우스와 비교하였을 때 BAFF Tg 마우스의 변연대(MZ) B 세포의 비율이 증가하였음을 알 수 있었다(표 3). 여포성 B 세포 군집은 BAFF Tg 및 대조군 마우스 모두에서 비례적으로 존재한 반면에, 새로이 형성된 B 세포의 분획은 BAFF Tg 마우스에서 약간 감소하였다(표3). 이러한 결과는 또한 항CD24 항체에 대한 항CD38 항체 및 항IgD 항체에 대한 항IgM 항체를 사용하여 B220+ 비장 B 세포상에서 입증되었으며, 전술한 바와 같이 MZ B 세포군집에 있어서는 각각 CD38^{hi}/CD24⁺ 및 IgM^{hi}/IgD^{lo}에 대해서 분석하였다(Oliver 등, 1997)(데이터는 나타내지 않음). 항마우스 IgM 항체를 사용하는 면역 조직 화학적 분석법을 통하여, 대조군 마우스와 비교하였을 때 BAFF Tg 마우스의 비장 중 IgM-명 MZ B 세포가 차지하는 표면적이 증가하였음을 알 수 있었다. 모든 BAFF Tg B220⁺ 비장 B 세포는 또한 MHC 클래스II(표3) 및 Bcl-2(데이터는 나타내지 않음)의 수준이 대조군 마우스에서 얻은 비장 B 세포의 경우보다 더욱 높은 수준으로 발현하였는데, 이는 비장 B 세포 및 PBL로부터 얻은 B 세포가 활성화 상태에 있음을 시사하는 것이다.

<148> 실시예 4

<149> 혈청내 총 면역글로불린, 류마티스성 인자 및 순환성 면역 복합체의 수준이 높은 BAFF Tg 마우스

<150> BAFF Tg 마우스 중 B 세포 구획이 증가하였음은 상기 동물의 혈중 총 Ig의 수준 또한 증가하였음을 제시하는 것이다. BAFF Tg 마우스 및 대조군 한배 새끼로부터 얻은 혈청의 분석법인 SDS-PAGE를 통하여, 중쇄 및 경쇄 IgG 밴드는 대조군 혈청의 경우와 비교하여 4마리의 Tg 마우스 중 3마리의 경우보다 10배 이상 더욱 진하다는 사실을 알 수 있었다(도9a). 이와 유사하게, BAFF Tg 마우스로부터 얻은 혈청에 대한 ELISA 측정법은 대조군 마우스의 경우와 비교하였을 때 총 Ig 수준이 유의적으로 높음을 보여주었다(도9b).

<151> 예를 들어 697-5, 816-8-3 및 823-20과 같은 일부 마우스의 Ig 수준은 SDS-PAGE에 의하여는 수준이 높은 것으로 나타났으나, ELISA 측정법에 의하여는 과도하게 높은 것으로 나타났던 것으로 보아, 혈청내 류마티스 인자(RF) 또는 IgG의 Fc 단편상의 항원 결정기에 대하여 유도된 자가 항체의 존부를 의심할 수 있었다(Jefferis, 1995). 이들 항체는 ELISA 평판을 피복하는데 사용되는 염소 항마우스 Ig과 결합할 수 있으며, 이때 수치는 터무니없이 높게 나타난다. ELISA 평판을 정상적이며 관련성이 없는 염소 Ig로 피복하고 정상적인 염소 Ig과 BAFF Tg Ig의 결합을 측정하였다. 도9c는 동일한 분석법에서 대부분의 BAFF Tg 마우스로부터 얻은 혈청은 정상적인 염소 Ig과 반응하는 Ig을 함유하였던 반면에, 19 마리의 대조군 마우스 중에서는 2마리만이 반응성을 나타낸다. 이들 RF는 주로 IgM, IgA 및 IgG2a 이소타입이었다(데이터는 나타내지 않음).

<152> RF의 존재는 혈중 순환성 면역 복합체(CIC) 및 저온 글로불린이 높은 수준으로 존재한다는 사실과 관련되어 있을 수 있다(Jefferis, 1995). BAFF Tg 마우스가 CIC의 비정상적인 혈청 수치를 보유하는지 여부를 증명하기 위하여, 상기와 같이 분석된 21마리의 BAFF Tg 마우스 중 CIC를 검출하는데에 Clq계 결합 분석법을 사용하였다. 5 마리의 BAFF Tg만이 대조군 마우스와 비교하였을 때 CIC 수준이 상당히 높았음에도 불구하고, 이들 마우스는 총 Ig 및 류마티스성 인자의 수준이 가장 높은 동물에 해당하였다(도 9d). BAFF Tg 마우스 혈청이 물에서 1/15배로 희석되었을 때 침전물이 형성되었으나 대조군 혈청의 경우에는 그러하지 않았는데, 이는 상기 마우스에 저온 글로불린이 존재함을 시사하는 것이었다(데이터는 나타내지 않음). 그러므로, B 세포 이상 증식에 더하여, BAFF Tg 마우스는 RF 및 CIC와 관련된 중증 고글로불린혈증을 나타낸다.

<153> 실시예 5

<154> 항단일 사슬(ss) 및 이중 사슬(ds) DNA 자가항체의 수준이 높은 몇몇 BAFF Tg 마우스

<155> 처음에, 대리모 마우스 중 2마리에서 루프스와 같은 질병의 증거가 되는 신장 이상 현상이 관찰되었다(표 II). 항DNA 자가 항체의 존재는 또한 SLE 환자 또는 SLE 유사(SWR × NZB)F1(SNF1) 마우스에서 기술하였다(Datta 등, 1987). 항ssDNA 자가 항체 수준은 앞서 총 혈청 Ig 수준이 가장 높은 것으로 나타난 BAFF Tg 마우스에서 검출되었다(도10a). 5마리의 대조군 한배 새끼와 유사한 항dsDNA 항체의 존재에 대해서, ssDNA에 대한 항체를 보유하지 않는 2 마리의 BAFF Tg 마우스(697-5 및 816-1-1) 및 항ssDNA 항체를 분비하는 2마리의 트랜스게너 마우스(820-14, 816-8-3 및 820-7)의 혈청을 분석하였다. 항ssDNA 항체를 검출 가능한 수준만큼 함유하지 않는 BAFF Tg 마우스 697-5는 항dsDNA를 보유함이 분명하였기 때문에, BAFF Tg 마우스는 또한 항dsDNA를 분비하였지만, 그 분비 수준은 항상 항ssDNA 항체와 상관있는 것은 아니다(도10b). 따라서 가장 중증인 고글로불린혈증을 나타내

는 BAFF Tg 마우스는 항DNA 자가항체를 병리학적 수준으로 분비한다. 더욱이, 이들 마우스중 3마리는 항DNA 항체를 검출 가능한 수준으로 분비하지 않았는데, 분석된 6 마리의 BAFF Tg 마우스의 신장에 면역글로불린이 침착된 것이 확인된 마우스에서 루프스와 같은 문제가 있음을 입증하기도 한다(도10c).

<156> 실시예 6

<157> 비장 및 장간막 림프절(MLN) 모두에 있어서 증식된 B 세포 여포, 다수의 배아 중심, 감소된 수지상 세포수 및 증가된 혈장 세포수를 보유하는 BAFF Tg 마우스

<158> BAFF Tg 마우스는 거대한 비장, MLN(데이터는 나타내지 않음) 및 페이에르판을 보유하였다(도11). 면역 조직 화학을 통하여, BAFF Tg 마우스에는 증식된 B 세포 여포와 감소된 말초 동맥 림프양 시트(PALS 또는 T 세포 지역)가 존재함을 알 수 있었다(도12b). 흥미로운 것은, 비면역화 대조군 한배 새끼에서는 소수의 배아 중심이 관찰되었으며(일반적으로 이들 콜로니에 전형적인 것임), 이와 같이 존재하는 것들은 작았던 반면에(도12c), BAFF Tg 마우스는 면역화되지 않은 경우 다수의 배아 중심을 보유하였다(도12d). 대조군 마우스의 T 세포 지역 및 근연대의 수지상 세포가 항CD11c로 염색된 정도는 BAFF Tg 마우스에서 상당히 감소하였다(도12f). 신데칸-1-함유 혈장 세포는 대조군 한배 새끼로부터 얻은 비장에서는 거의 검출될수 없었으나(도12g), BAFF Tg 마우스의 적색 수질은 신데칸-1을 상당량 함유하였다(도12h). MLN에 대해서 매우 유사한 관찰 결과를 얻을 수 있었다(도13). BAFF Tg 마우스의 MLN에 있어서, B 세포 여포가 전형적인 부피질 T 세포 지역에 의해 피막에 싸인 결절의 주변에서 용이하게 인지될 수 있는 정상적인 결절(도13a)과는 대조적으로, B 세포 지역은 눈에 띄게 증식되었다(도13b). BAFF Tg 마우스로부터 얻은 MLN 수질을 혈장 세포일 것으로 추정되는 신데칸-1 함유 세포로 충전시켰다(도13h). 결론적으로, BAFF Tg 마우스중의 2차 림프양 기관의 분석 결과는 다수의 세포 이상 및 강한 면역 활성을 나타내는 증식된 B 세포 표현형과 일치하였다.

<159> 참고문헌

1. Smith et al. (1994) *Cell* 76:959-962.
2. Vassalli (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452.
3. De Togni et al. (1994) *Science* 264:703-707.
4. Koni et al. (1997) *Immunity* 6:491-500.
5. Amakawa et al. (1996) *Cell* 84:551-562.
6. Russell et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4409-4413.
7. Zheng et al. (1995) *Nature* 377:348-351.
8. van Kooten and Banchereau (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:330-337.
9. Stuber and Strober (1996) *J. Exp. Med.* 183:979-989.
10. Schneider et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:18827-18833.
11. Hahne et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188:1185-1190.
12. Hahne et al. (1996) *Science* 274:1363-1366.
13. Grimaire et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:199-205.
14. Thome et al. (1997) *Nature* 386:517-521.
15. Schneider et al. (1998) *J. Exp. Med.* 187:1205-1213.
16. Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.
17. Armitage et al. (1992) *Nature* 357:80-82.
18. Bucher et al. (1996) *Computer Chem.* 20:3-24.
19. Banner et al. (1993) *Cell* 73:431-445.
20. Nagata (1997) *Cell* 88:355-365.
21. Black et al. (1997) *Nature* 385:729-733.
22. Wong et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:25190-25194.
23. Kindler and Zubler. (1997) *J. Immunol.* 159:2085-2090.
24. Sonoki et al. (1995) *Leukemia* 9:2093-2099.

25. Magrath, I. (1990) *Adv Cancer Res* 55:133-270.
26. Garside et al. (1998) *Science* 281:96-99.
27. MacLennan et al. (1997) *Immunol. Rev.* 156:53-66.
28. Dubois et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185:941-951.
29. Tsubata et al. (1993) *Nature* 364:645-648.
30. Chicheportiche et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410.
31. Nakayama (1997) *Biochem. J.* 327:625-635.
32. Jefferis, R. (1995). Rheumatoid factors, B cells and immunoglobulin genes. *Br. Med. Bull.* 51, 312-331.
33. Schneider et al. (1999) *J. Exp. Med.* 189, 1747-1756.
34. McKnight et al. (1983) *Cell* 34, 335-341.
35. Datta et al. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 1252-1261.

<161>

표 I

상이한 세포에서의 MARCH-R의 발현			
세포 유형	세포주	MARCH 결합	특성
상피 유사 세포	HT-29	-	결장 선암종
	A375	-/+	흑색종
	MCF-7	-	유방 선암종
	ME260	-	흑색종
	Cos	+	원숭이 신장 세포
섬유아세포	WI-38	-	허파
	Hs-68	-	포피
	Hs-27	-	포피
내피 세포	HUVEC	-	제대정맥
대식세포/단핵구	THP-1	-/+	단핵구
T 세포주	Molt-4	-	림프아구성 백혈병
	Hut-78	-	피부 림프종
	Jurkat	-	림프아구성 백혈병
B 세포주	BJAB	+++	버켓 림프종
	Namalawa	++	버켓 림프종
	Daudi	+/-	버켓 림프종 EBNA+VCA+
	Ramos	++	버켓 림프종 EBV-
	Raji	+++	버켓 림프종
	JIYOYE	+	버켓 림프종
	SKW.64	++	IgM 분비형 EBV+
	RPMI 1788	+++	IgM 분비형 말초혈액
	IM-9	+++	Ig 분비형 림프아구
	NC-37	+++	림프아구 EBV+
마우스 세포주	WEHI-231	-	B 세포 림프종
	A20	-	B 세포 림프종
MARCH의 표면 발현은 "재료 및 방법"에 기술된 바와 같이 플래그 태깅된 MARCH를 사용하는 FACS에 의하여 측정되었다.			

표 II

BAFF 트랜스게닉 대리모 마우스 목록		
마우스 번호	단백뇨 ^a	B/T ^b

<163>

690 암컷 ^d	ND	2
696 수컷 ^c	ND	ND
697 암컷	+++	ND
700 수컷 ^c	ND	4.6
802 수컷	++	5.4
804 암컷	+++	4
807 암컷	ND	7.8
810 수컷	+++	ND
811 수컷 ^{c/e}		5.4
813 수컷	ND	ND
816 암컷 ^{e/f}	+	3
820 수컷	++	2.9
823 수컷	++	1.5
대조군 BDF1	++	
암컷	+/-	2.5
대조군 BDF1	+/-	
수컷	+/-	

a:마우스 소변에 침지시킨 임상 컬러 스트립을 사용하여 단백뇨 여부를 측정하였으며, 결과를

다음과 같이 정의한다 :- 단백뇨 안나옴 ; +/- 소량 ; + 30mg/dl ; ++ 100mg/dl ;

+++ 300mg/dl ; ++++ > 2000mg/dl

b:B/T는 이중 염색을 위하여 PE 표지된 항B220 및 FITC 표지된 항CD4 항체를 사용하는, FACS

분석법으로 측정한 바와 같은 PBL중 % T 세포에 대한 % B 세포의 비율

c:초기 급성 사멸

d:자손에 트랜스젠이 전이되지 않음

e:부검시 심혈관 및 신장 이상증이 관찰됨

f:뇨에 혈액이 섞여나와 사멸됨. 모든 조직으로부터 얻은 H&E-염색된 검편들을 분석한 이후
심장, 신장 및 동맥 이상 현상이 관찰됨.

바이오틴 표지된 항마우스 B220 및 항마우스 CD4를 사용하고, 알칼리성 포스파타제 표지된
스트렙타비딘 및 양고추냉이 페옥시다제 표지된 항래트Ig을 사용하여, 비장의 냉동 검편에서
면역 조직 화학적 방법으로 측정된 결과 비장 B 세포 군집이 증가하였음.

밀출친 대리모 마우스 : 사육에 사용됨

ND: 미수행

표 III

<164>

BAFF Tg 마우스의 비장에서의 증가된 MHC 클래스II 발현율 및 MZ B 세포의 확장을				
	B220+ B 세포상에서의 MHC 클래스II 발현수준 (MFI)	여포형 B 세포 % (B220+/IgM ^{lo} /CD21 ^{int})	MZ B 세포 % (B220+/IgM ^{hi} /CD21 ^{hi})	신생 B 세포 %(B220+/IgM ^{hi} /CD21 ^{hi})
대조군 마우스				
816-1-10	1170	45	6	12
802-21	1029	48	10.5	9
823-1	1240	39	9	6.5
BAFF Tg 마우스				
802-6	1707	49	18	5.9
820-7	1900	39	23	6.3
816-1-1	2088	40	23	5.8

비장 세포는 FACS에 의하여 분석되었으며 B220+ 군집에서 케이팅시켰음.
각각의 대표적인 실험을 나타냄.
MFI:형광 강도의 평균값.

도면의 간단한 설명

- <15> 도1a는 인간 BAFF(서열 번호 1) 및 마우스 BAFF(서열 번호 2)의 예측된 아미노산 서열을 나타내는 것이다. 여기에서는 상기 인간 BAFF의 예측 경막 도메인(TMD, 접선), 잠재성 N-결합 글리코실화 부위(별표) 및 자연 프로세싱 부위(화살표)를 표시하였다. hBAFF 위의 이중선은 BAFF의 프로세싱된 형태를 에드만 분해에 의하여 얻은 서열을 나타내는 것이다.
- <16> 도1b는 BAFF(서열 번호 3)와 TNF 리간드 군의 몇몇 일원들[서열 번호 4(hAPRIL); 서열 번호 5(hTNF 알파); 서열 번호 6(hFasL); 서열 번호 7(hLT 알파); 서열 번호 8(hRANKL)]의 세포의 단백질 서열을 비교한 결과를 나타내는 것이다. 동일하고 상동성인 잔기들을 흑색 및 음영 박스내에 각각 나타내었다.
- <17> 도1c는 TNF 군 리간드의 텐드로그램을 나타내는 것이다.
- <18> 도2는 재조합 BAFF의 특징을 개략적으로 나타낸 것이다. 도2a는 재조합 BAFF 작제물을 개략적으로 나타낸 것이다. Leu₈₃ 및 Gln₁₃₆에서 시작되는 가용성 재조합 BAFF는 N-말단 플래그 태그와 6개의 아미노산 링커와 융합되어 발현된다. 긴 형태의 것은 293 T 세포의 Arg₁₃₃ 및 Ala₁₃₄(화살표) 사이에서 절단되어, BAFF의 프로세싱된 형태를 생성한다. Asn₁₂₄ 및 Asn₂₄₂는 N-글리코실화 컨센서스 위치에 포함되어 있다. Asn₁₂₄에 존재하는 N-결합 글리칸은 Y로 나타내었다. TMD:경막 도메인. 도2b는 재조합 BAFF의 웨타이드 N-글리카나제 F(PNGaseF) 처리 결과를 나타내는 것이다. 플래그 태깅된 BAFF 및 APRIL을 포함하는 농축 상청액을 탈글리코실화시키고 이를 폴리클로날 항 BAFF 항체 또는 항플래그 M2를 사용하는 웨스턴 블러팅으로 분석하였다. 프로세싱된 BAFF를 제외한 모든 벤드는 또한 항플래그 M2와 반응하였다(데이터는 나타내지 않음). 도2c는 가용성 형태로 프로세싱된 전장 BAFF를 나타내는 것이다. 293T 세포는 전장 BAFF로 일시적으로 형질 감염되었다. 형질 감염된 세포 및 이의 농축된 상청액은 폴리클로날 항BAFF 항체를 사용하는 웨스턴 블러팅으로 분석하였다. 세포양의 10배에 해당하는 상청액을 겔상에 로딩시켰다. 도2d는 수퍼넥스-200상의 가용성 BAFF를 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography)시킨 결과이다. 짧은 가용성 BAFF를 함유하는 농축된 상청액을 수퍼넥스-200 컬럼에서 분별하였으며 용리된 분획물을 항플래그 M2 항체를 사용하는 웨스턴 블릿에 의하여 분석하였다. 문자량 마커(kDa)의 이동 위치를 SDS-PAGE의 좌측 축부 및 크기 배제 크로마토그래피의 상부에 숫자로 나타내었다.
- <19> 도3은 BAFF의 발현여부를 나타내는 것이다. 도3a는 BAFF 안티센스 mRNA로 프로빙된 다수의 인간 조직의 노던 블럿(레인당 2 μ g 폴리 A+ RNA)의 결과를 나타내는 것이다. 도3b는 PHA 활성화의 여러 시점에서 정제된 혈액 T 세포, E로제팅(rosetting)이 존재하지 않는 혈액 세포(B 세포 및 단핵구), 시험관 유래 미성숙 수지상 세포, 293 세포 및 전장 BAFF로 멸균적으로 형질 감염된 293 세포(293-BAFF)의 RNA로부터 얻은 BAFF, IL-2 수용체 α 사슬 및 액틴의 역전사효소 증폭 결과를 나타내는 것이다. 대조구 증폭은 첨가된 cDNA의 부재하에서 수행되었다. IL-2 수용체 α 사슬은 T 세포 활성화의 마커로서 증폭되었다.
- <20> 도4는 성숙 B 세포에 결합한 BAFF를 나타내는 것이다. 도4a는 BJAB 및 Jurkat 세포주, 및 대혈액(cord blood)의 정제된 CD19+ 세포에 가용성 BAFF가 결합한 결과를 나타내는 것이다. 세포를 소정량(ng/50 μ l)의 플래그-BAFF로 염색한후 이를 유동 혈구계측계로 분석하였다. 도4b는 가용성 BAFF가 PBL에 결합한 결과를 나타내는 것이다. PBL을 항CD8-FITC 또는 항CD19-FITC(수평축) 및 플래그-BAFF + M2-바이오틴 및 아비딘-PE(수직축)으로 염색하였다. 플래그-BAFF는 대조구에서 제외시켰다.
- <21> 도5는 B 세포 증식을 공동으로 촉진하는 BAFF를 나타내는 것이다. 도5a는 안정하게 형질 감염된 293 세포에서 BAFF를 표면 발현시킨 결과이다. 293 BAFF 및 293 야생형 세포를 항BAFF mAb 43.9로 염색하고 이를 유동 혈구계측계로 분석하였다. 도5b는 293 BAFF 세포에 의한 PBL의 공동 촉진의 결과를 나타내는 것이다. PBL(10^5 /웰)을 항B 세포 수용체 항체(항 μ)의 존재하 또는 부재하에서 15.000 글루타르알데히드 고정 293 세포(293 wt 또는 293-BAFF)와 함께 항온 처리하였다. 고정 293 세포만이 100cpm을 혼입하였다. 도5c는 항 μ 의 존재하에서 가용성 BAFF에 의한 PBL 증식의 투여량 의존성 공동 촉진의 결과를 나타내는 것이다. [³H]-티미딘 혼입에 의하여 72시간 항온 처리한 이후의 증식 결과를 측정하였다. 대조구는 BAFF 단독, 열변성된 BAFF 또는 항 μ 를 대신하는 관

련 없는 이소타입 매치된 항체로 처리된 세포들을 포함한다. 도5d는 PBL 증식에 있어서 CD40L 및 sBAFF의 (공동) 촉진의 효과를 비교한 결과이다. 실험은 패널 C에 기술된 바와 같이 수행하였다. 도5e는 BAFF가 예비 활성화된 인간 B 세포의 Ig 분비를 공동 촉진하는 것을 나타내는 것이다. 정제된 CD19+ B 세포는 5~6일 동안 EL-4 T 세포 및 활성화된 T 세포 상청액과 공동으로 배양된 후, 다시 7일 동안 배지만이 존재하는 경우(-) 또는 5% 활성화된 T 세포 상청액(T-SUP)을 포함하는 배지 또는 시토kin 배합물(IL-2, IL-4, IL-10)을 포함하는 배지의 존재하에서 추가로 분리 및 배양함으로써 활성화된다. 컬럼들은 BAFF가 1 μ g/ml 존재하는 배양액 또는 존재하지 않는 배양액에서의 Ig의 평균 농도를 나타낸다. "배수 증가량"에 있어서 평균값 \pm SD는, 배지만에 대해서는 1.23 \pm 0.11, T 세포 상청액이 존재하는 경우(4개의 실험군)에는 2.06 \pm 0.18 그리고 IL-2, IL-4 및 IL-10을 포함하는 경우(2개의 실험군)에는 1.45 \pm 0.06을 나타낸다. 상기 값은 말초 혈액(3개의 실험군) 또는 대혈액 B 세포(1개의 실험군; T 세포 상청액을 사용한 경우에는 2.3배 증가, IL-2, IL-4 및 IL-10을 사용한 경우에는 1.5배 증가)를 사용하여 수행한 결과이다. 도5f는 패널 D에 나타낸 바와 같은, T 세포 상청액을 보유하는 배양액 중 BAFF의 효능에 대한 투여량 반응 곡선이다. 3개의 실험군에 있어서의 평균값 \pm SD로 나타내었다.

<22> 도6은 B 세포 증식에 있어서 BAFF가 보조 인자로서 작용함을 나타내는 것이다. 인간 PBL만이 존재하는 경우(500 cpm), 또한 BAFF 리간드만이 존재하는 경우, 염소 항 쥐파동물(mu)만이 존재하는 경우, 및 BAFF 리간드 및 항 mu 모두 존재하는 경우에 있어서 인간 PBL의 증식율을 측정하였다. 항mu 및 BAFF를 병용하면 BAFF의 농도가 증가함에 따라 PBL의 증식율을 상당히 증가시켰는데, 이는 BAFF의 보조 인자 특성을 시사하는 것이다.

<23> 도7은 BAFF Tg 마우스에 있어서 증가된 B 세포의 수를 나타내는 것이다.

<24> 도7a는 BAFF Tg 마우스에 있어서 증가된 림프구 수를 나타내는 것이다. 본 그래프는 12마리의 대조군 한배 새끼(좌측 패널)와 12 마리의 BAFF Tg 마우스(우측 패널)를 비교한 결과를 나타내는 것이다. 림프구 수는 원(○)으로 표시하였으며 과립구(호중백혈구, 호산구, 호염기구를 포함) 수는 다이아몬드(◇)로 표시하였다. 도7b는 BAFF Tg 마우스로부터 얻은 PBL에서의 증가된 B 세포 비율을 나타낸 것이다. PBL은 FACS 분석을 위하여 항B220-FITC 및 항CD4-PE로 염색하였으며 전방향 측면 스캐터를 사용하여 생세포상에서 게이팅시켰다. CD4 및 B220 양성 세포의 백분율을 표시하였다. 하나의 대조군 마우스(좌측) 및 2개의 BAFF Tg 마우스(우측)를 표시하였으며, 그 결과는 각 군에서 분석한 7마리 동물에 대해서 나타냈다. 도7c는 PBL에서 T 세포에 대한 B 세포 비율의 FACS 분석 결과이다. 도7a 및 도7c에서의 대조군 동물과 BAFF Tg 마우스 사이의 차이는 통계학적으로 유의적이었다($P < 0.001$).

<25> 도7d는 BAFF Tg 마우스 PBL에서 얻은 B 세포상의 증가된 MHC 클래스 II 발현율을 나타낸 것이다. MHC 클래스 II 발현 정도는 FACS에 의하여 분석되었다.

<26> 도7e는 BAFF Tg 마우스 PBL에서 얻은 B 세포에서의 증가된 Bcl-2 발현율을 나타내는 것이다. Bcl-2 발현은 세포 질내 염색으로 측정되며 세포들은 FACS에 의하여 분석되었다.

<27> 도7d 및 도7e 모두에서 생세포들은 전방향 측면 스캐터에서 게이팅되었다. 4마리의 대조군 한배 새끼(백색 막대) 및 4마리의 BAFF Tg 마우스로서 각 군에 대하여 분석한 12 마리 이상의 동물들을 나타내었다. MFI: 형광 강도의 평균값. 대조군 동물 및 BAFF Tg 마우스 사이의 차이는 통계학적으로 매우 유의적이었다($P < 0.005$).

<28> 도7f는 BAFF Tg 마우스중의 효과기 T 세포의 증가된 발현을 나타내는 것이다. PBL을 항CD4-싸이크롬, 항CD44-FITC 및 항L셀렉틴-PE로 염색하였다. CD4⁺ 게이팅된 세포들을 나타내었다. CD44^{hi}/L-셀렉틴^{lo} 세포의 백분율을 표시하였다. 1마리의 대조군 마우스(좌측) 및 2마리의 BAFF Tg 마우스(우측)를 나타내었으며 그 결과는 각 군당 분석한 8마리의 동물들을 나타낸 것이다.

<29> 도8은 B 세포 구획이 BAFF Tg 마우스의 비장에서는 증가하였으나 골수에서는 증가하지 않았음을 나타내는 것이다. 도8a는 비장(상부 패널), 골수(중간 패널) 및 MLN(하부 패널)에서의 항IgM-FITC 및 항B220-PE 모두를 사용하는 성숙한 B 세포에 대한 FACS 염색 결과이다. B220+/IgM+ 성숙 B 세포의 백분율을 표시하였다. 도8b는 항CD43-FITC, 항B220-Cy-크롬 및 항IgM-PE를 동시에 사용하여 골수에서의 프리B 세포(B220+/CD43-) 및 프로B 세포(B220+/CD43+)에 대해서 FACS 염색한 결과를 나타내는 것이다. IgM가 존재하지 않는 군집상에서 게이팅된 세포들을 나타내었다. 프리B 세포(B220+/CD43-) 및 프로B 세포(B220+/CD43+)의 백분율을 나타내었다.

<30> 도8a 및 도8b에서, 하나의 대조군 마우스(좌측) 및 2개의 BAFF Tg 마우스(우측)를 나타내었으며, 결과는 각 군에 대해 분석한 7마리의 동물들로 나타내었다.

<31> 도9는 BAFF Tg 마우스에서의 증가된 Ig, RF 및 CIC 수준을 나타내는 것이다. 도9a는 BAFF Tg 마우스로부터 얻은

2개의 대조군 혈청(-) 및 4개의 혈청(+)의 SDS-PAGE 결과를 참고로 하여 정제된 마우스 IgG와 함께 순서대로 나타낸 것이다. 모든 레인에서 알부민 밴드의 진하기는 유사하였는데, 이는 젤상에 로딩된 물질이 각 시료에 대해 동등함을 나타내는 것이다.

<32> 19마리의 대조군 한배 새끼(백색 막대) 및 21 마리의 BAFF Tg 마우스(흑색 막대)의 혈청에서 전체 마우스 Ig (도9b), RF(도9c) 및 CIC(도9d)의 ELISA계 분석법을 수행하였다. 적합한 RF 대조군이 존재하지 않을 경우에는, RF에 대한 역가(\log_2)는 0.O.D.가 기저치보다 3배 더 큰 혈청의 희석율로서 정의된다. CIC 정량은 시험된 혈청으로 얻어진 값과 균등한 O.D. 값을 나타내는데에 필요한 PAP의 양으로서 정의된다. 대조군 동물 및 BAFF-Tg 마우스 사이의 차이는 통계학적으로 유의적이었다(도9b 및 도9c에서 $P < 0.001$, 도9d에서 $P < 0.003$).

<33> 도10은 몇몇 BAFF Tg 마우스에 항ssDNA 및 항dsDNA 자기 항체가 존재함을 나타내는 것이다. 도10a는 19마리의 대조군 한배 새끼(회색 막대) 및 21마리의 BAFF Tg 마우스(흑색 막대)의 항ssDNA 자기항체의 ELISA 분석 결과를 나타낸 것이다. 도10b는, 도10a로부터 유래된 항ssDNA 자기항체의 수준을 나타내는 5마리의 대조군 한배 새끼 및 5 마리의 동물의 항ssDNA 자기항체의 ELISA 분석 결과를 나타낸 것이다. 도10c는 염소 항마우스 Ig-HRP로 염색한, 대조군 마우스(좌측) 및 BAFF Tg 마우스(우측)로부터 얻은 신장의 파라핀 검편을 나타내는 것이다. Ig 침착은 갈색으로 염색되어 나타난다. 본 사진들은 6마리의 BAFF Tg 마우스의 분석결과를 나타내는 것이다.

<34> 도11은 BAFF Tg 마우스에서의 확장된 폐이에르판을 나타내는 것이다. 대조군 마우스(좌측) 및 BAFF Tg 마우스(우측)의 소장에서의 폐이에르판(화살표로 표시함) 사진. 상기 사진들은 각 군에 대해서 12마리 이상의 마우스를 죽여서 얻은 결과이다(5배 확대).

<35> 도12는 BAFF Tg 마우스의 비장에서 파괴된 T 세포 및 B 세포 조직화, 강한 배아 중심 반응, 수지상 세포수의 감소 및 혈장 세포수의 증가를 나타내는 것이다.

<36> 대조군 마우스를 A, C, E 및 G로 나타내었으며, BAFF Tg를 B, D, F 및 H로 나타내었다. 청색은 B 세포를, 갈색은 T 세포를 나타낸다(A 및 B). 배아 중심을 화살표로 표시하였다(C 및 D). 대조군 마우스에서는 잔류하는 배아 중심은 거의 관찰되지 않았다(C). 갈색은 CD11c가 존재하는 수지상 세포를 나타내는 것으로서, 이는 T 세포 지역, 브리지 채널 및 변연대에서 볼 수 있었다(E). BAFF Tg 마우스(F)에는 거의 존재하지 않았다. 신데칸-1-함유 혈장 세포는 BAFF Tg 마우스(H)의 적색 수질에서만 검출 가능하였으나, 대조군 마우스(G)에서는 검출 불가능하였다. 본 사진들은 분석된 12마리 이상의 BAFF Tg 마우스와 12마리 이상의 대조군 마우스를 나타내는 것이다. 본 사진들은 C 및 D(50배 확대)를 제외하고는 모두 100배 확대시킨 것이다. B:B 세포 여포, T:PALS, WP:백색 수질, RP:적색 수질.

<37> 도13은 BAFF Tg 마우스의 MLN에서의 파괴된 T 세포 및 B 세포 조직화, 강한 배아 중심 반응 및 다수의 혈장 세포를 나타내는 것이다. 대조군 마우스는 A, C, E 및 G로 나타내었으며, BAFF Tg 마우스는 B, D, F 및 H로 나타내었다. 면역 조직 화학 분석은 도6에 기술된 바와 같이 실행하였다. T 세포 및 B 세포 염색은 A 및 B에 나타내었으며, 배아 중심은 C 및 D에, 수지상 세포는 E 및 F에, 그리고 혈장 세포는 G 및 H에 나타내었다. GC:배아 중심. 100배 확대.

도면

도면1

삭제

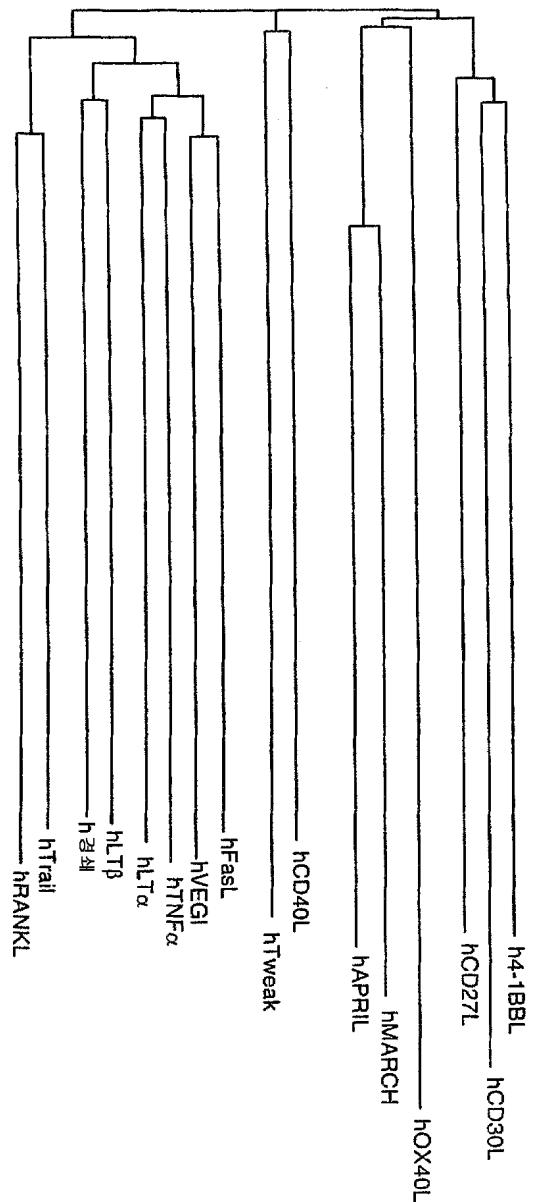
도면1a

hMARCH 1 WDDSTE - REOSRLTSC LKREEM KER ECVS ILPRKES PPSV R - SISKDGKLLAATLIA
 mMARCH 1 WDESAK TLP PPCIC FCS EKEGEGDMKVY DP - ITPOKEEGAIWPGICRDGRLLAATLIA
 TMD
 hMARCH 56 LISCCU TUN SP YOVA LOG DLA SLRAE ELOG HIRATEKL PAGAGAPKAGLEEA PAUTAGE
 mMARCH 57 LISSSP TAN MSL YOVA ALQADLMNLRMELO QSYRGSATPRAAGAP - - - - - ELEFAGY
 ☆
 hMARCH 113 KIPEPPAPAGEGNSSONSRNKRAVQGEET - - - - -
 mMARCH 106 KELITPAAPRPHNSSRGHNRRAFPGEETEODVDLSAPPAPCPLPGCRHSSQHDNGMN
 TMD
 hMARCH 141 - - - - -
 mMARCH 163 LARNTIQDCLOLIADS DTPTRKGTYTFVWLSPKRGNALEKENKIIVROTGYFFI
 ☆
 hMARCH 196 YGQVLYTDKTYANGHLIORKVHVFGDELSLVTLFRCTIONMPETLPNNSCYSAGIAR
 mMARCH 220 YS0VLYTDKTFAMGHVVIORKVHVFGDELSLVTLFRCIONMPKTLPNNSCYSAGIAR
 hMARCH 253 LEGDEQOLAIIPRENAQISLDGVTFFGALKIL
 mMARCH 277 LEGDEQOLAIIPRENAQISLDGVTFFGALKIL

도면1b

	A	B	C	D	E	F	G	H
HMARCH	142	V	T	O	D	C	L	O
HAPRIL	113	R	O	E	P	S	E	P
HTNFO	80	S	K	P	I	T	E	N
HAsL	142	E	R	K	A	H	A	L
HTO	60	T	L	K	P	A	H	L
HRANKL	88	E	A	Q	P	A	L	T
	C			D				
HMARCH	196	Y	O	V	G	A	H	F
HAPRIL	166	Y	S	O	V	H	I	R
HTNFO	130	S	O	V	R	K	V	H
HAsL	192	Y	S	V	E	G	V	F
HTO	110	Y	S	O	V	F	S	E
HRANKL	144	Y	A	N	I	C	E	H
	F							
	G							
	H							

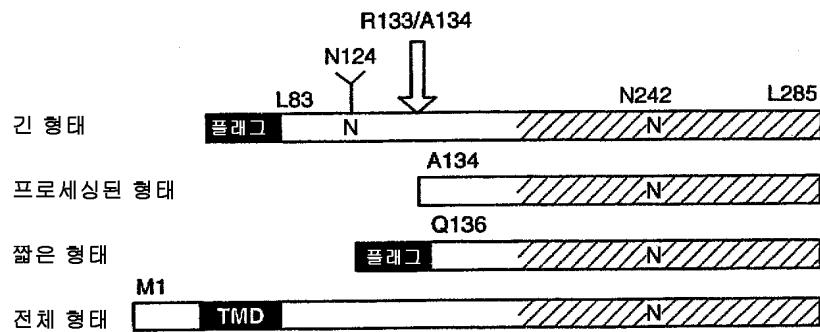
도면1c



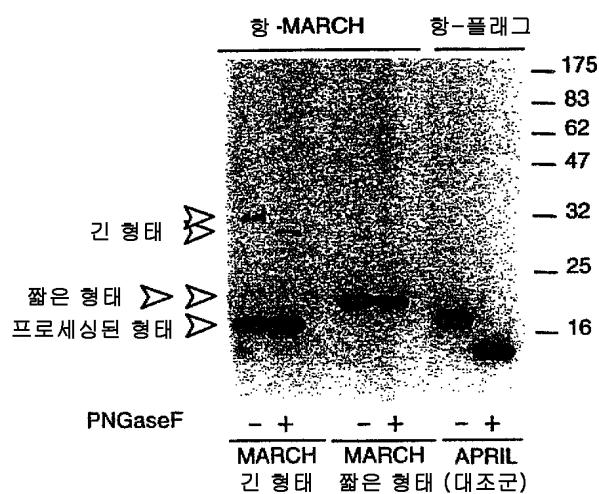
도면2

상세

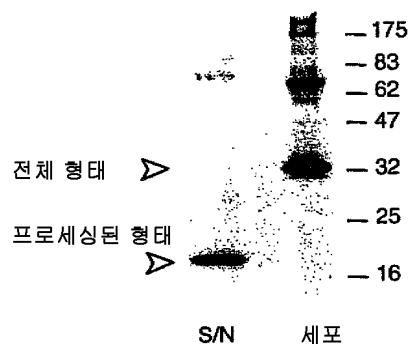
도면2a



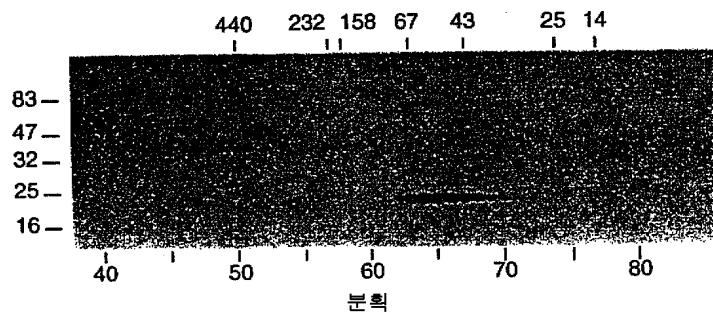
도면2b



도면2c



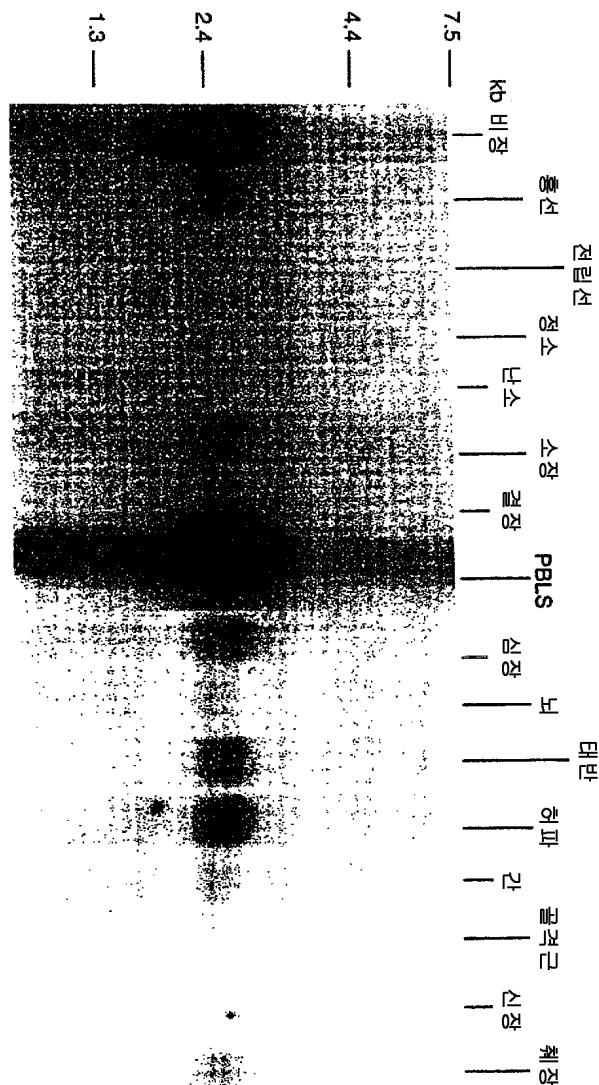
도면2d



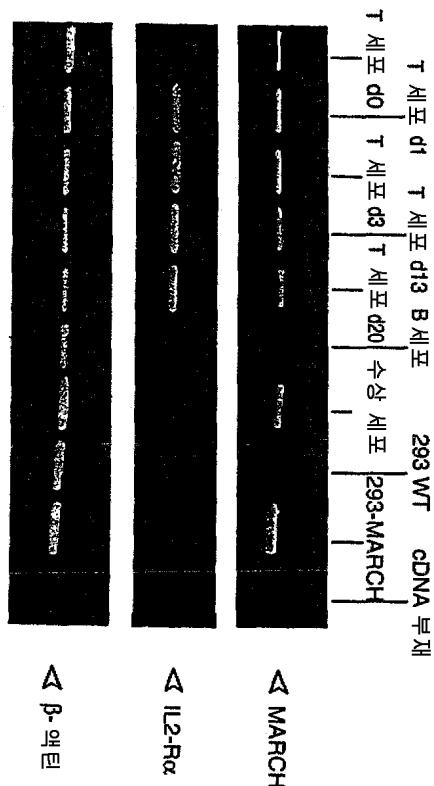
도면3

삭제

도면3a



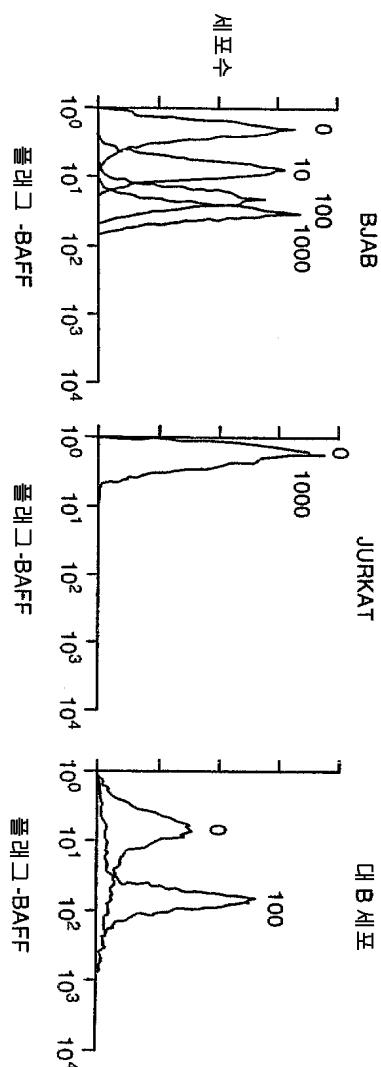
도면3b



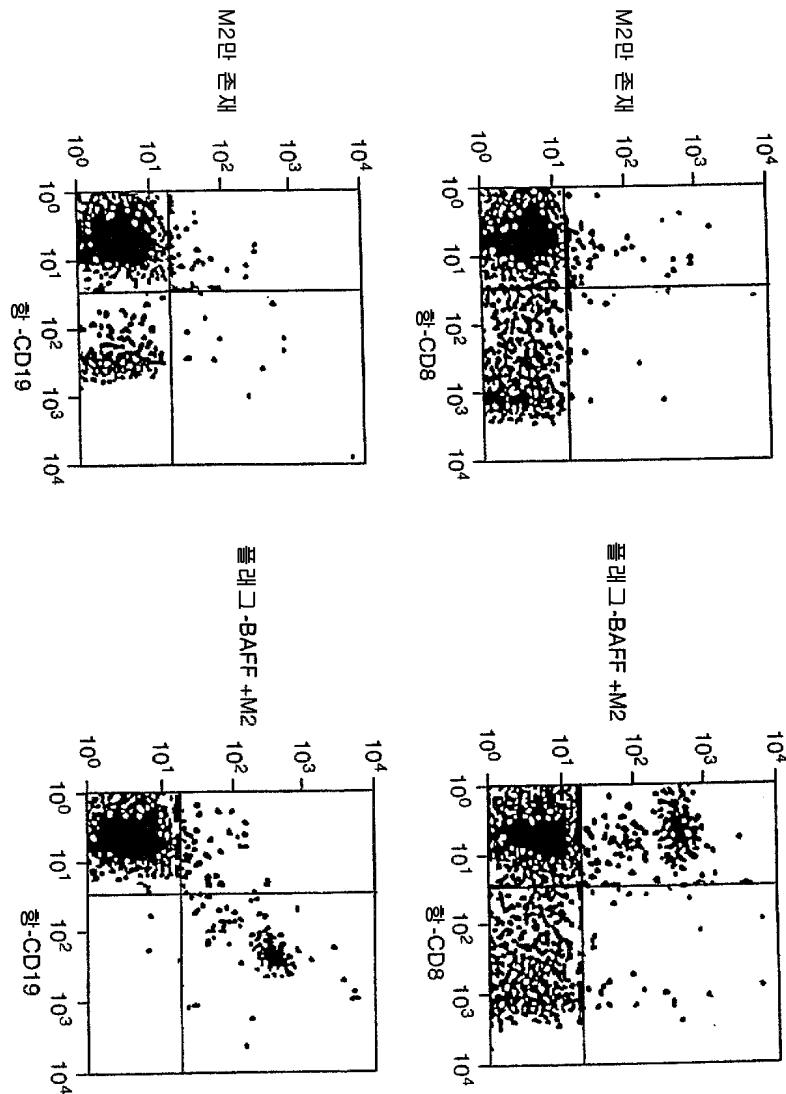
도면4

삭제

도면4a



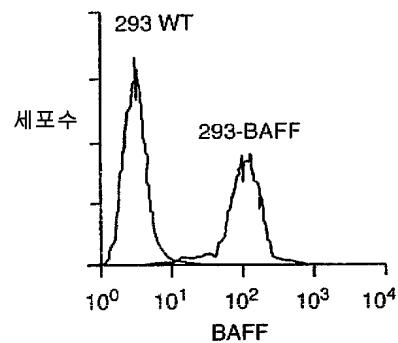
도면4b



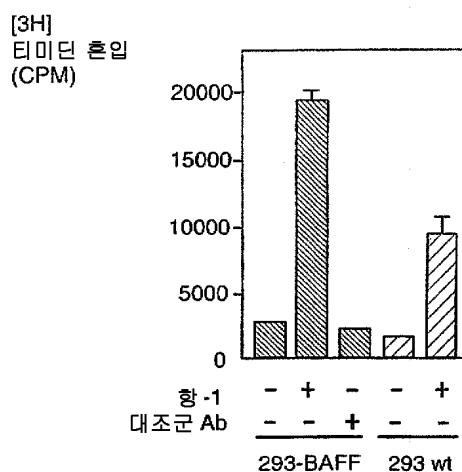
도면5

삭제

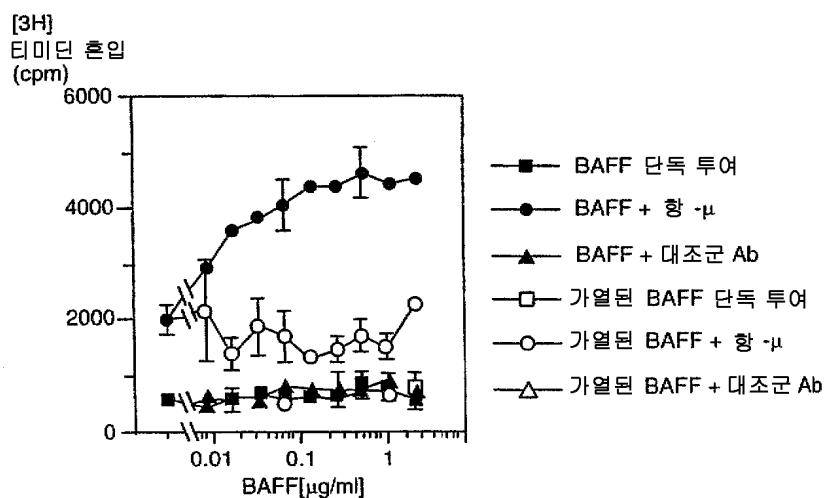
도면5a



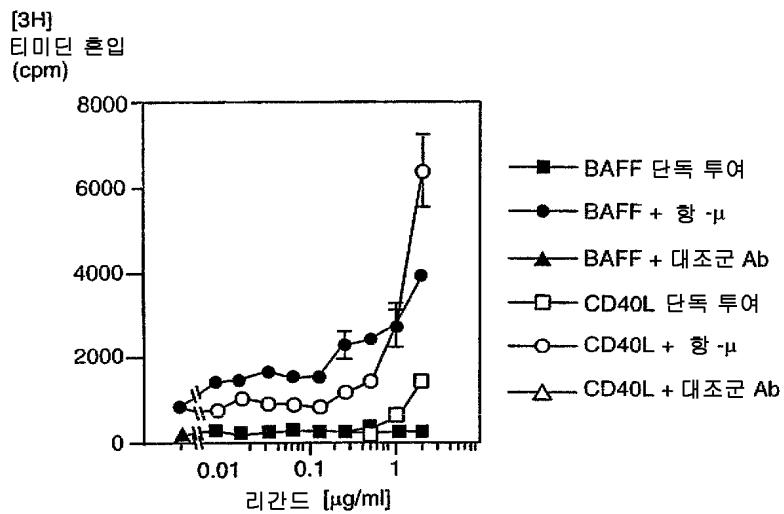
도면5b



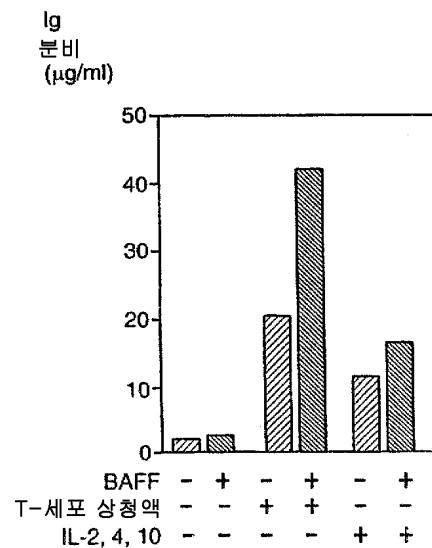
도면5c



도면5d



도면5e

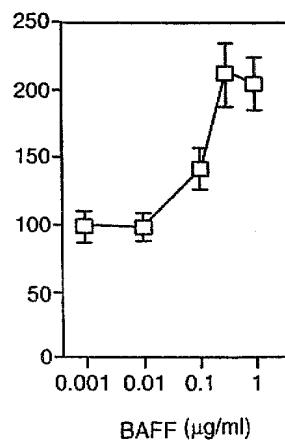


도면5f

T 세포 상청액으로

인한 Ig 분비

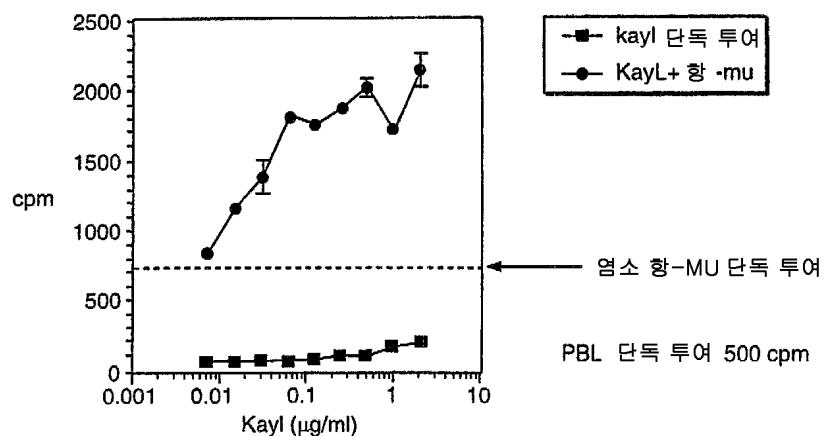
(대조군 반응 %)



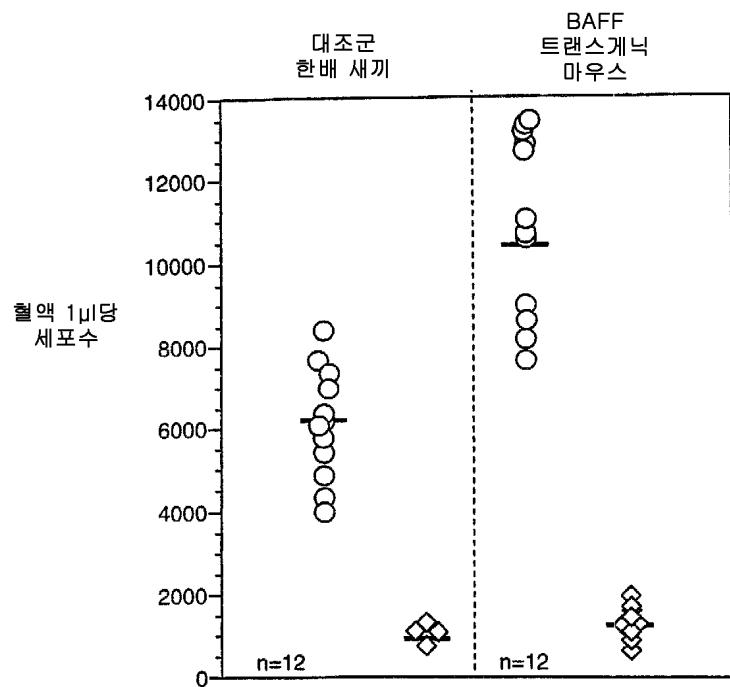
도면6

B세포 증식에 있어서 보조 인자로서 작용하는 BAFF

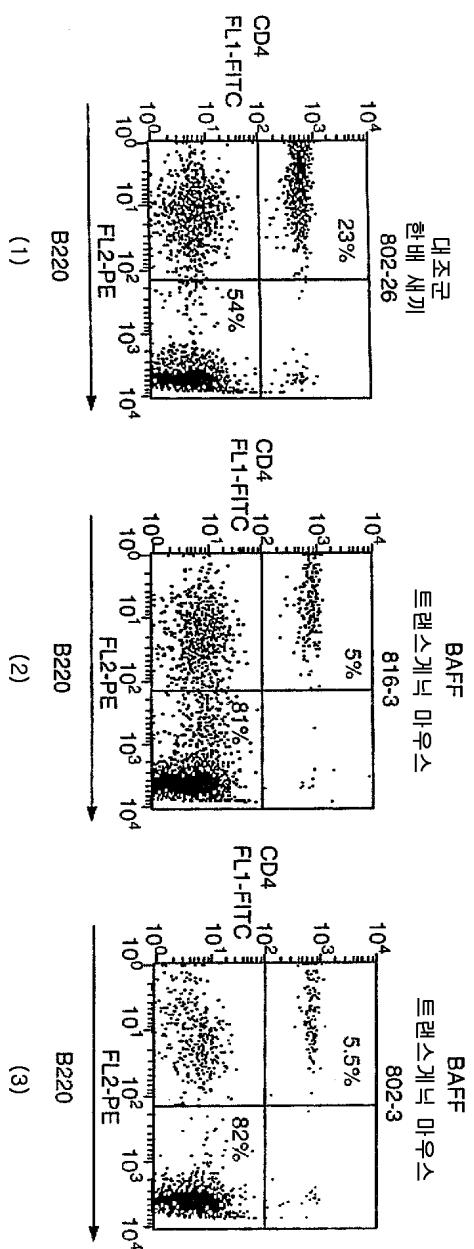
인간 PBL의 증식



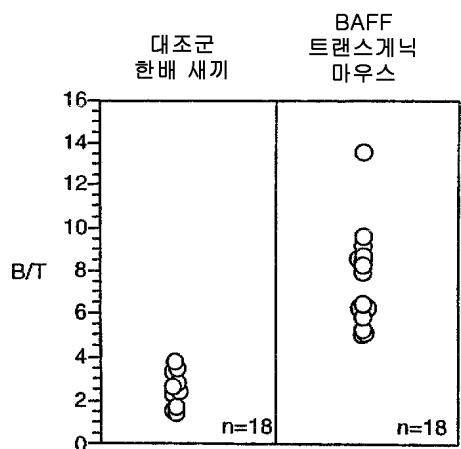
도면7a



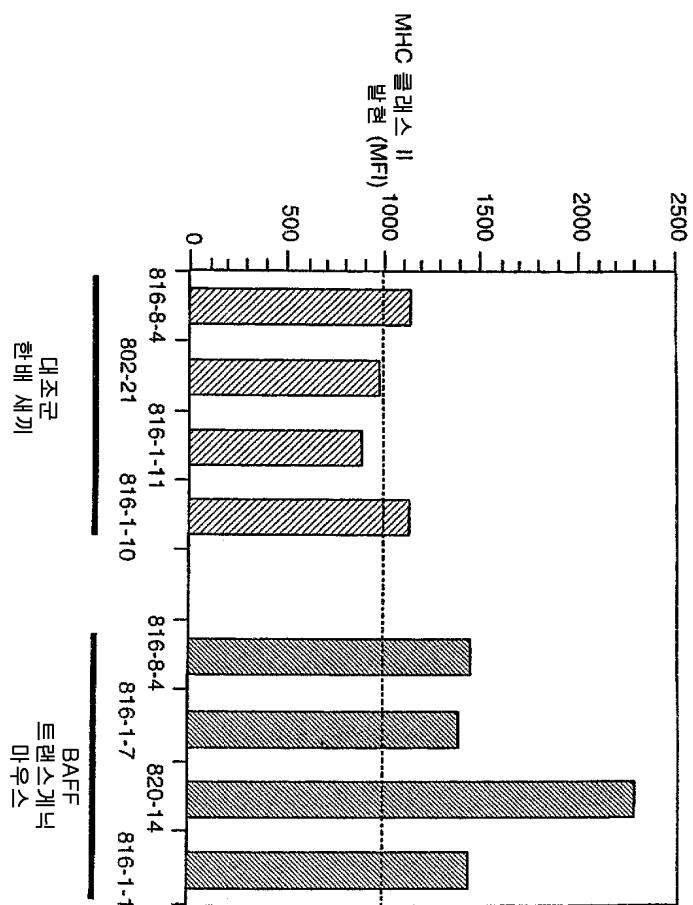
도면7b



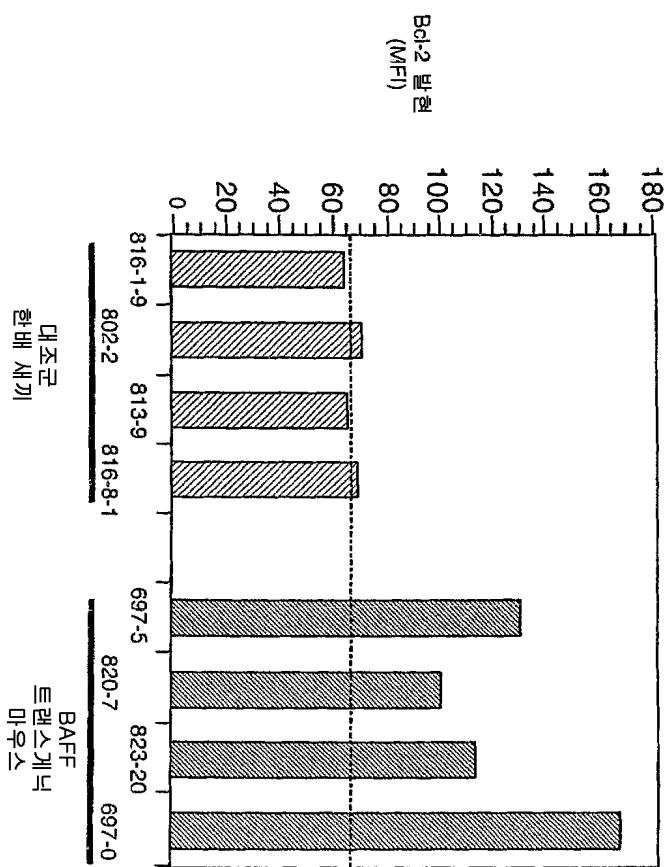
도면7c



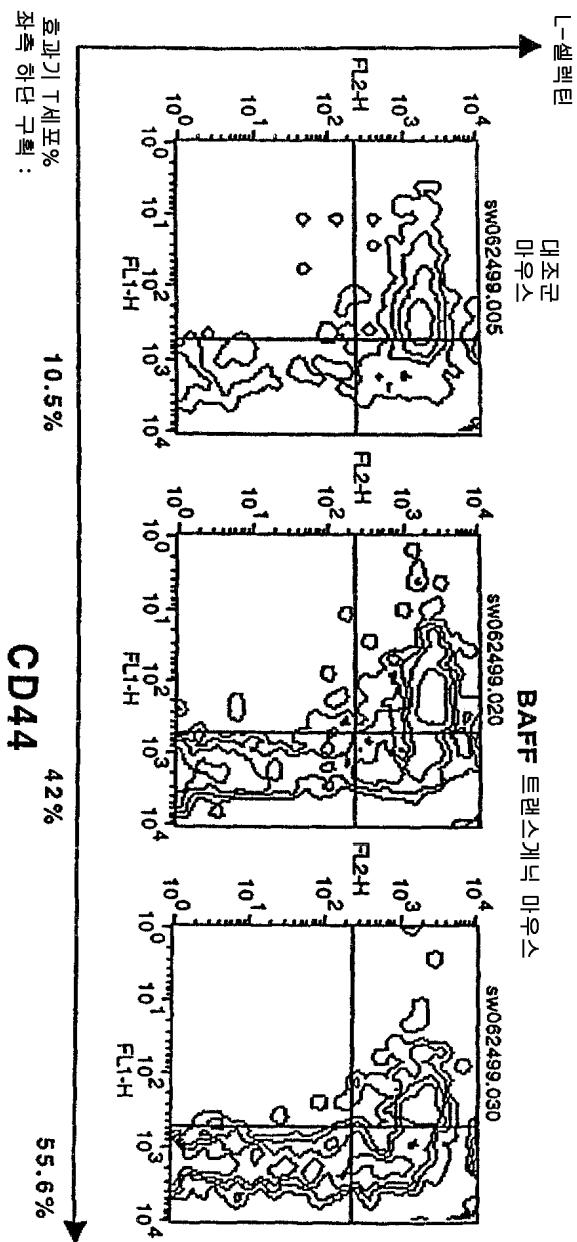
도면7d



도면7e

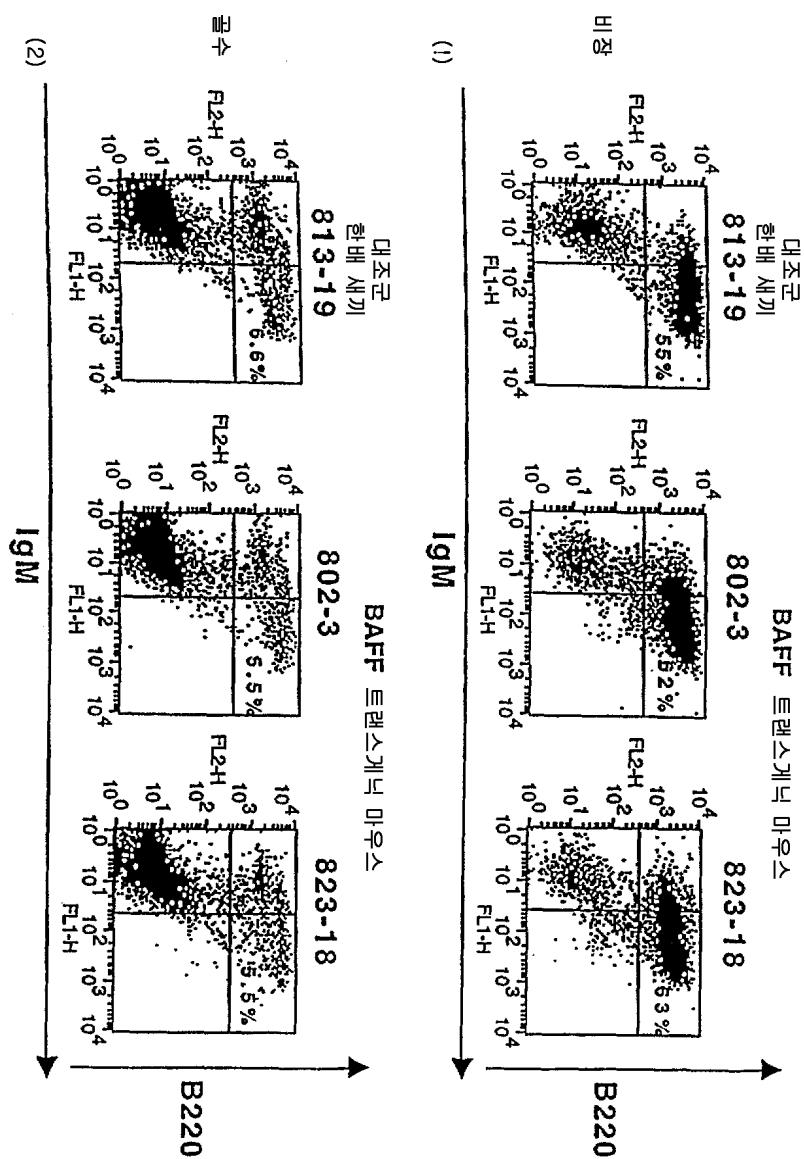


도면7f

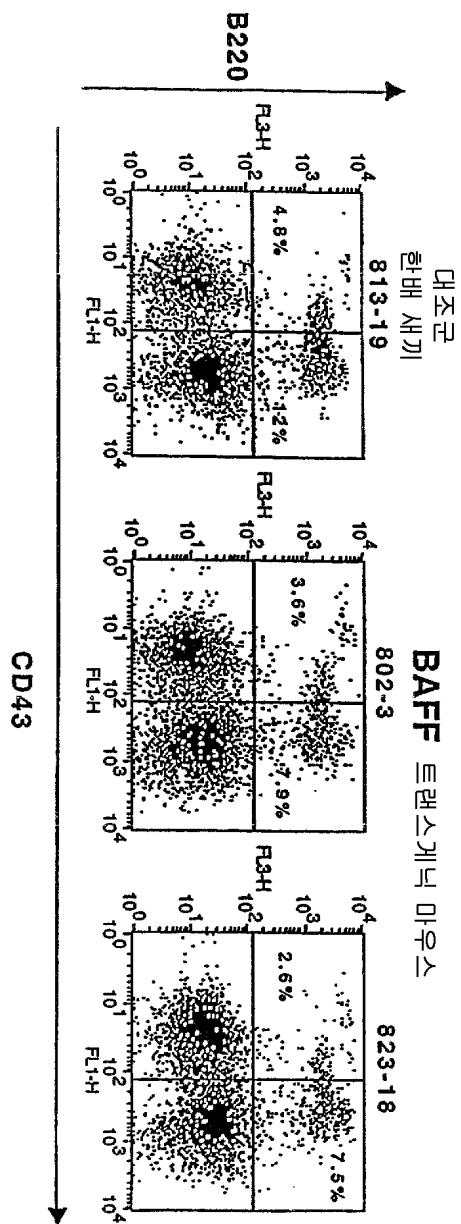


CD44 4.2% 10.5%
호고기 T세포%
좌측 하단 구획:

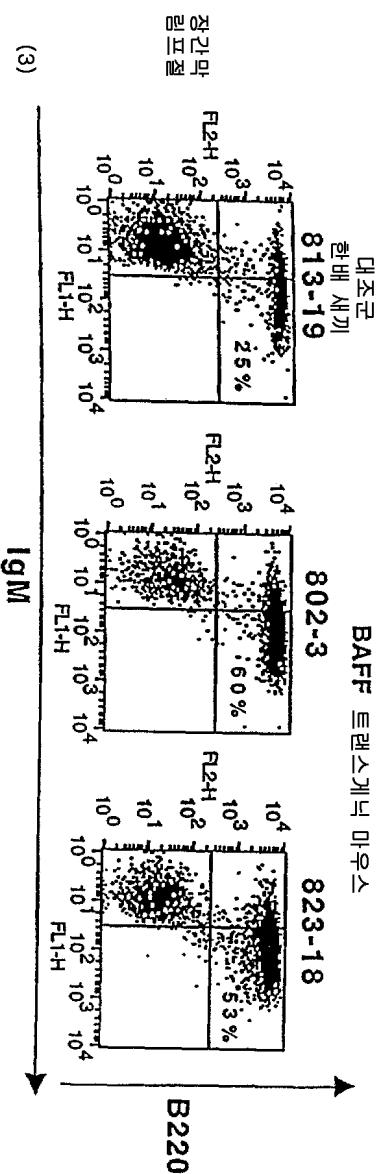
도면8a



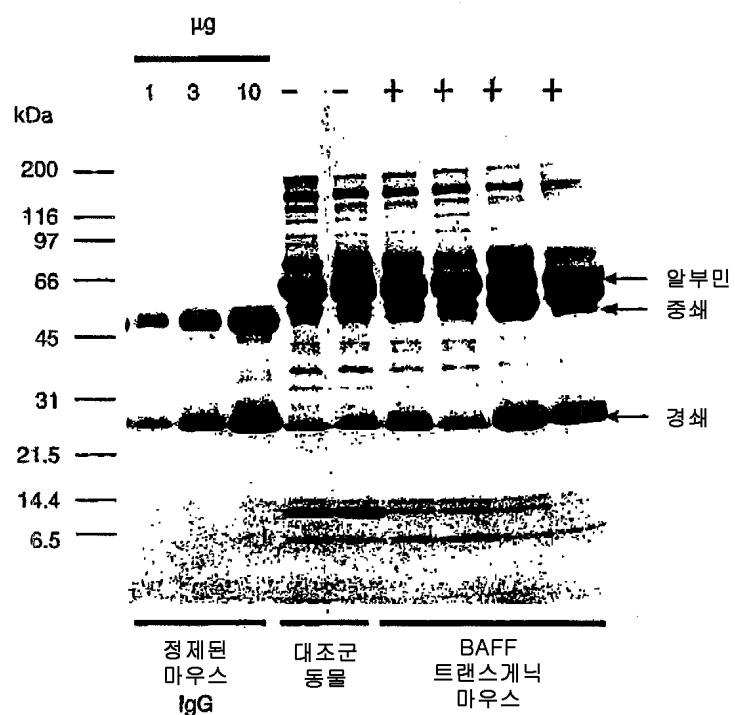
도면8b



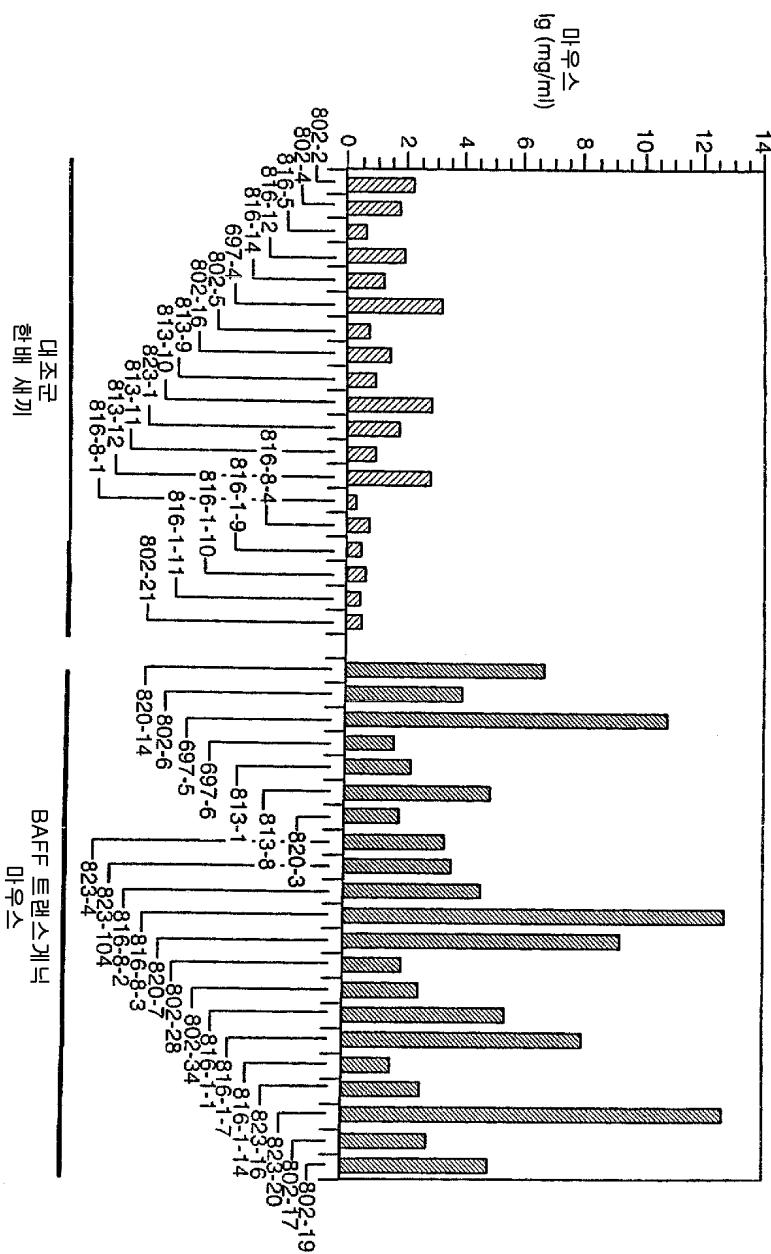
도면8a-1



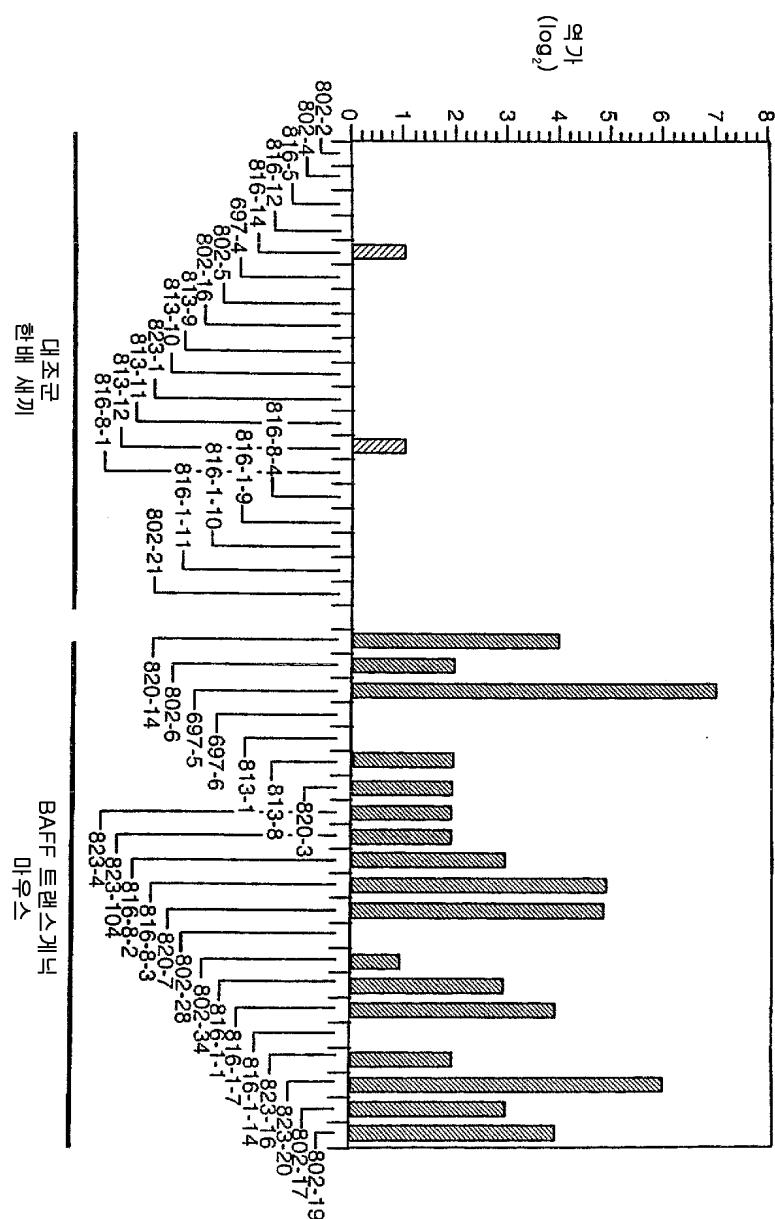
도면9a



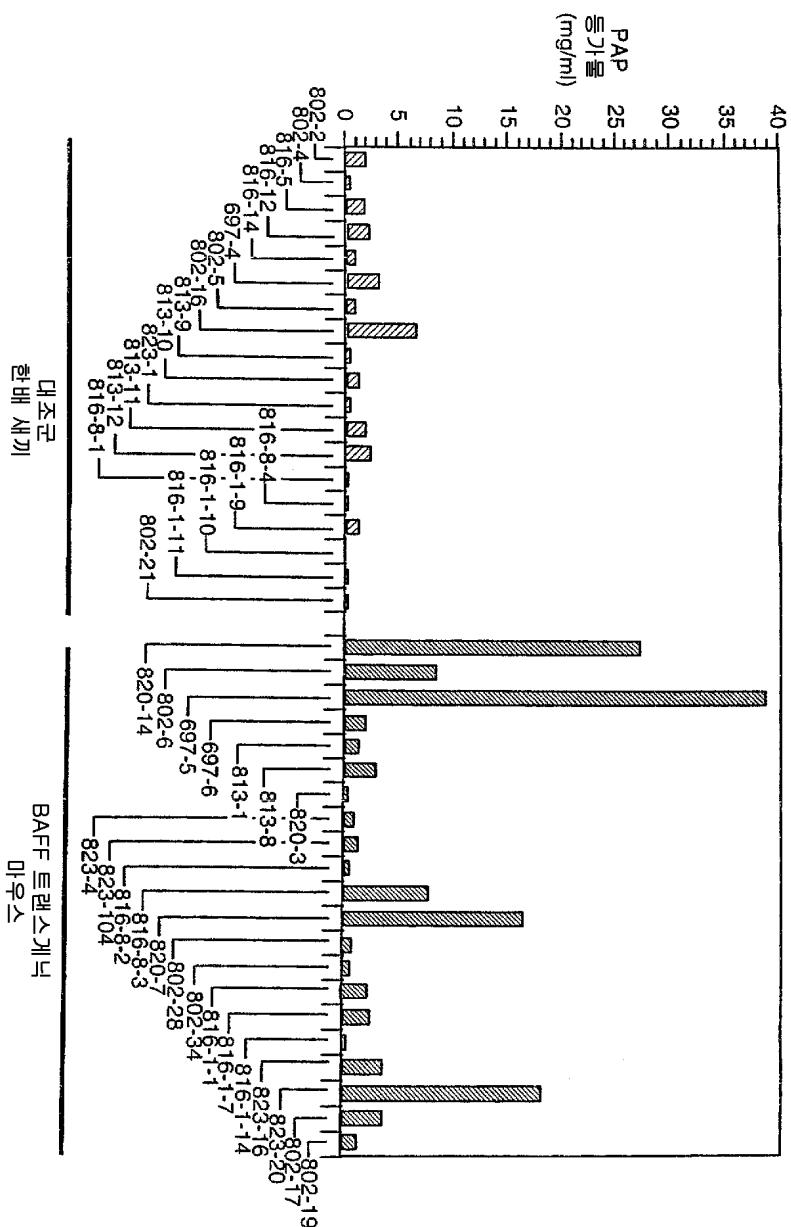
도면9b



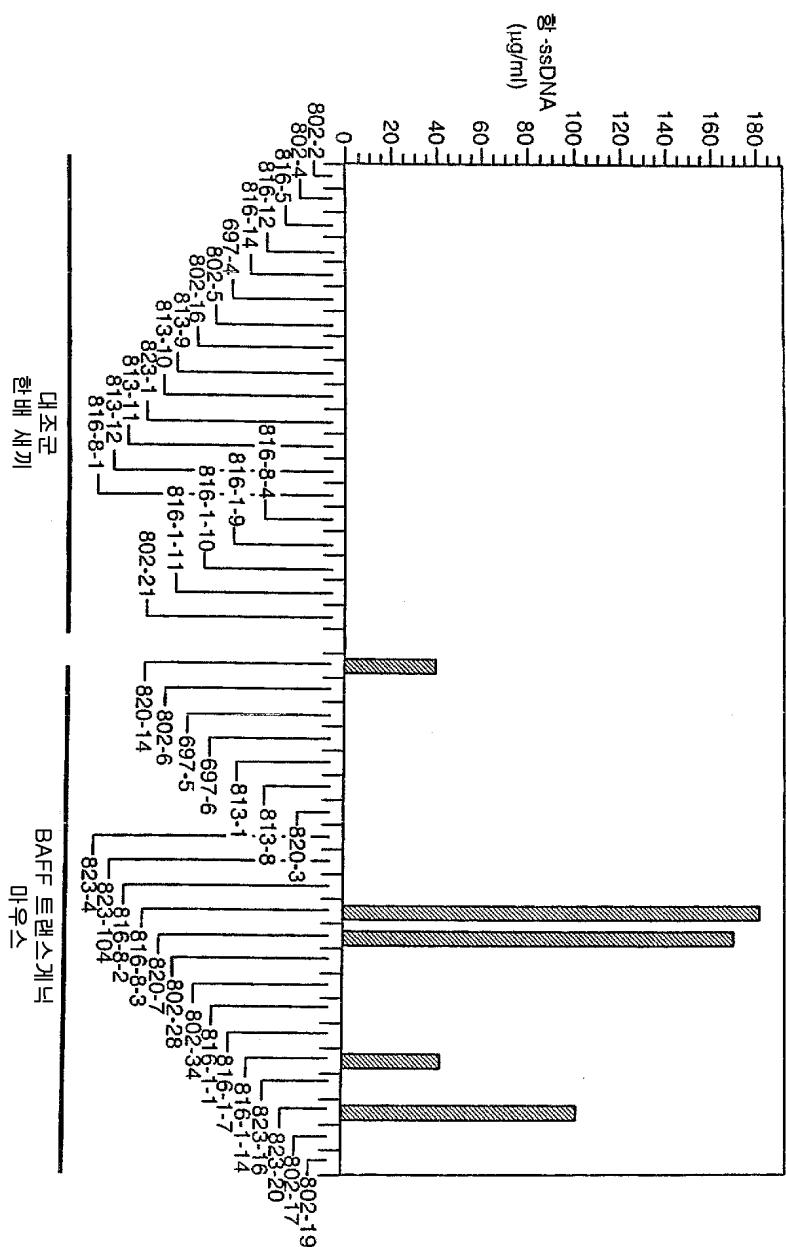
도면9c



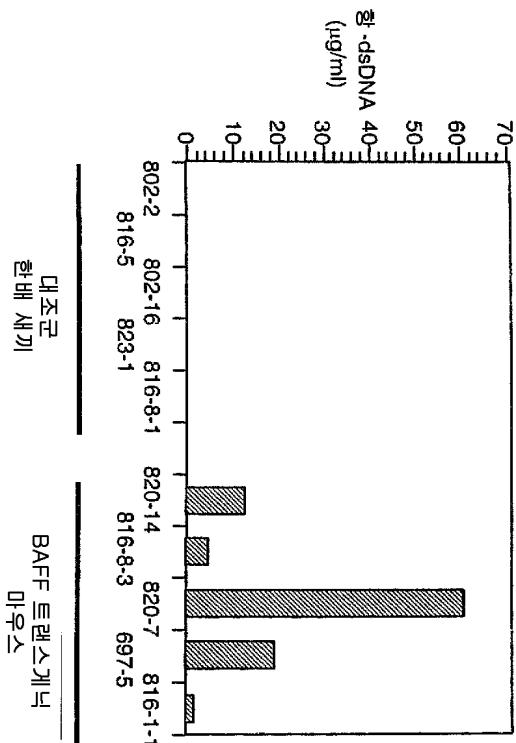
도면9d



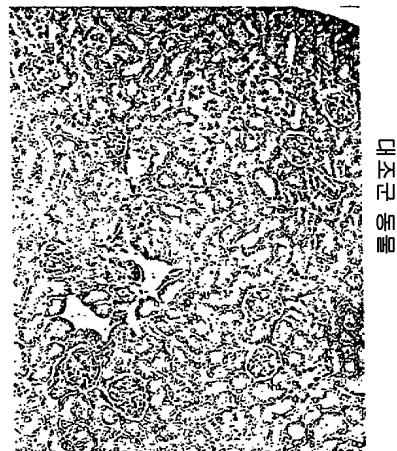
도면10a



도면10b



도면10c

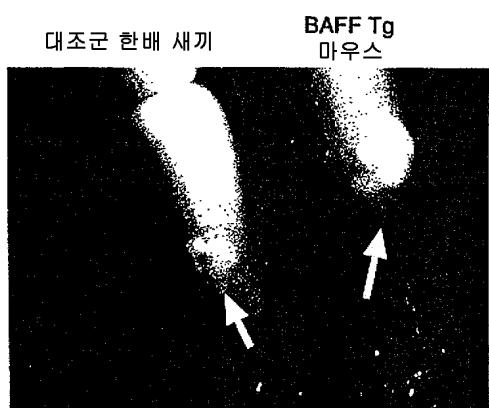


대조군 동물

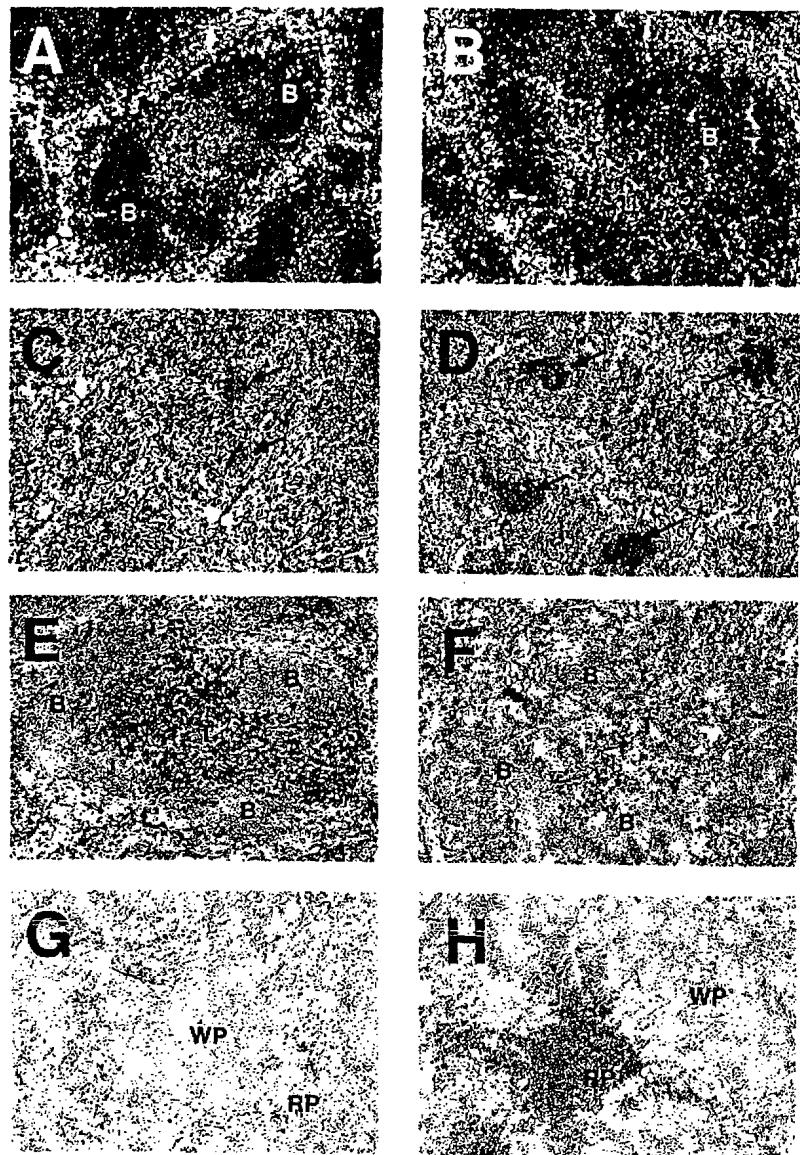


BAFF 트랜스제닉 마우스

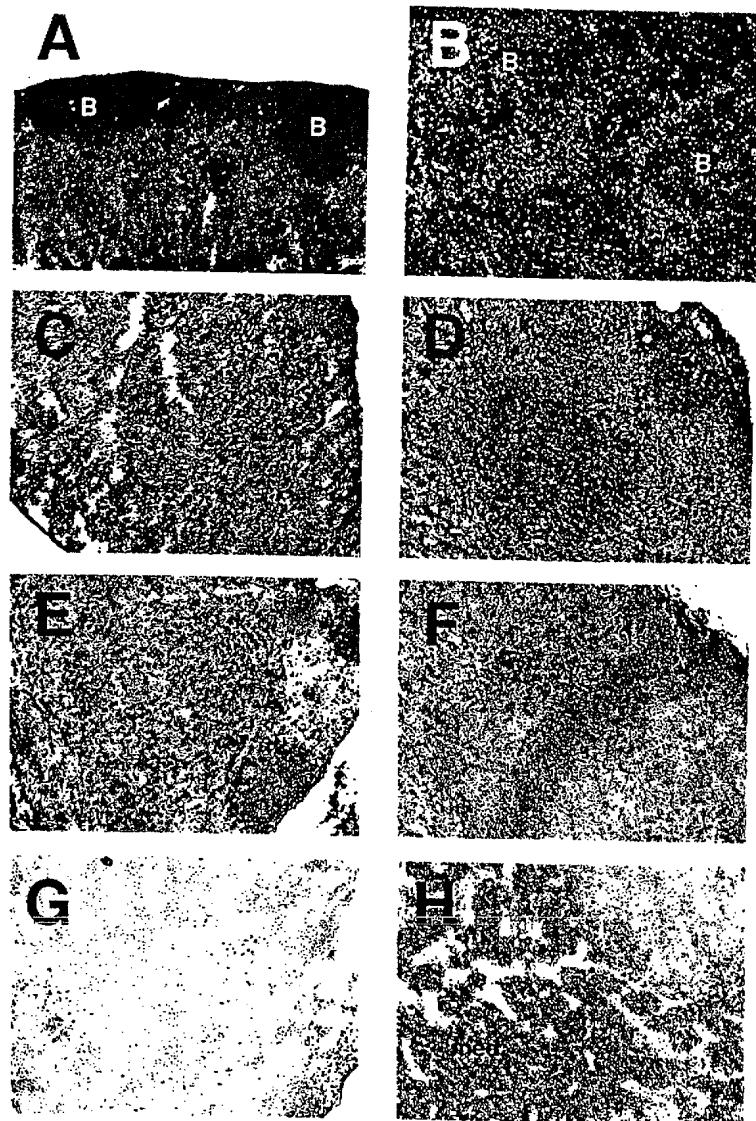
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

- <110> BIOGEN, INC
 <120> BAFF, RELATED BLOCKING AGENTS AND THEIR USE IN THE STIMULATION
 AND INHIBITION OF B-CELLS AND IMMUNOGLOBULINS IN IMMUNE RESPONSE
 <130> A070PCT
 <140> PCT/US00/01788
 <141> 2000-01-25
 <150> 60/143,228
 <151> 1999-07-09
 <150> 60/117,169
 <151> 1999-01-25
 <160> 22
 <170> Patent In Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu

1	5	10	15	Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu
Cys Val Ser Ile Leu Pro				
20	25	30		

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val				
35	40	45		

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg				
50	55	60		

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Lys				
65	70	75	80	

Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser				
85	90	95		

Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp				
100	105	110		

Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly				
115	120	125		

Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala				
130	135	140		

Leu Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His				
145	150	155	160	

Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu				
165	170	175		

Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu				
180	185	190		

Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp				
195	200	205		

Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu				
210	215			

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Murine

<400> 2

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys				
1	5	10	15	

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro				
20	25	30		

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Val Leu Leu Ser Ser Phe Thr Ala Met				
35	40	45		

Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu Arg

50	55	60	
Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala Lys			
65	70	75	80
Leu Leu Thr Pro Ala Ala Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His			
85	90		95
Arg Asn Arg Arg Ala Phe Pro Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val			
100	105	110	
Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu			
115	120	125	
Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr			
130	135	140	
Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Tyr			
145	150	155	160
Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile			
165	170	175	
Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr			
180	185	190	
Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu			
195	200	205	
Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr			
210	215	220	
Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu			
225	230		
<210>	3		
<211>	102		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	3		
Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr			
1	5	10	15
Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys			
20	25	30	
Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp			
35	40	45	
Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val			
50	55	60	
Phe Gly Asp Glu Leu Ser Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala			
65	70	75	80
Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn			
85	90	95	
Ala Gln Ile Ser Leu Asp			
100			

<210> 4
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
1 5 10 15

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
20 25 30

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val
35 40 45

Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Ala
50 55 60

Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp
65 70 75 80

Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser
85 90 95

<210> 5
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly
1 5 10 15

Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly
20 25 30

Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His
35 40 45

Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr
50 55 60

Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly
65 70 75 80

Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg
85 90 95

Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
100

<210> 6
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser
1 5 10 15

Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Ser Gly

20	25	30
Val Lys Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu		
35	40	45
Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Met		
50	55	60
Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala		
65	70	75
Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu		
85	90	95
Glu		
<210> 7		
<211> 102		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 7		
Thr Leu Lys Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn		
1	5	10
15		
Ser Leu Leu Trp Arg Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly		
20	25	30
Phe Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala		
35	40	45
Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser		
50	55	60
Gln Tyr Pro Phe Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe		
65	70	75
80		
Gln Leu Thr Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro		
85	90	95
His Leu Val Leu Ser Phe		
100		
<210> 8		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 8		
Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro		
1	5	10
15		
Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly		
20	25	30
Trp Gly Lys Ile Ser Asn Met Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His		
35	40	45
Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr		
50	55	60
Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser		

65	70	75	80
Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser			
		85	90
Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln			
		100	105
<210> 9			
<211> 26			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 9			
actgtttctt ctggaccctg aacggc			
<210> 10			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 10			
gacaagcttg ccaccatgga tgactccaca			
<210> 11			
<211> 23			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 11			
actagtca			
gcaggttcaa tgc			
<210> 12			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 12			
ctgcagggtc cagaagaaac ag			
<210> 13			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 13			
ggagaaggca actccagtca gaac			
<210> 14			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 14			
caattcatcc ccaaagacat ggac			
<210> 15			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 15			
tcggAACACA acgAAACAAG tc			
<210> 16			
<211> 26			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 16			
cttcccttc acctggaaac tgactg			
<210> 17			
<211> 19			

<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	17	
ggcatcgta tggactccg		19
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	18	
gctggaaggt ggacagcga		19
<210>	19	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	19	
taagaatgcg gccgccaat ggatgagtct gcaaa		35
<210>	20	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	20	
taagaatgcg gccgcggat cacgcactcc agcaa		35
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	21	
gcagtttcac agcgatgtcc t		21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	22	
gtctccgttg cgtgaaatct g		21