



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0059449
(43) 공개일자 2008년06월27일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7011686

(22) 출원일자 2008년05월16일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년05월16일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2006/050338

국제출원일자 2006년10월18일

(87) 국제공개번호 WO 2007/045927

국제공개일자 2007년04월26일

(30) 우선권주장

0521139.6 2005년10월18일 영국(GB)

(71) 출원인

유니버시티 오브 세프필드

영국, 세프필드 에스10 2티엔, 웨스턴뱅크, 퍼스
코트

(72) 발명자

스캐리, 티모시 마이클

영국, 세필드 에스10 2알엑스, 비치 힐 로드, 스
쿨 오브 메디슨앤 바이오메디컬 싸이언시스
리차드, 가레스 오와인

(74) 대리인

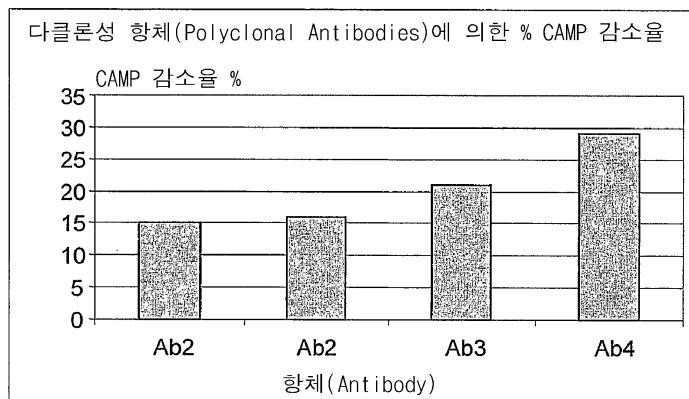
권혁수, 송윤호, 오세준

전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 치료용 약제

(57) 요약

본 발명은 칼시토닌 유사 수용체(Calcitonin Receptor Like Receptor; CRLR)에 RAMP(Receptor Activity Modifying Protein)이 미치는 영향을 조절하는 약제에 관한 것이다. 또한 본 발명에는 상기 약제를 식별하기 위한 상기 약제 및 분석법의 사용 및 방법을 포함한다. 본 발명의 약제는 예를 들어 암, 비만 및 기타 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

대표도 - 도12

특허청구의 범위

청구항 1

(i)RAMP-3, (ii)RAMP-2, 및 (iii)RAMP-1 단백질 중에서 선택된 하나 이상의 RAMP 단백질(Receptor Activity Modifying Protein; 수용체 활성 변형 단백질)의 칼시토닌 유사 수용체(CRLR)에 결합하거나 또는 그 효과를 조절할 수 있는 약제(agent).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

RAMP 단백질의 세포 외 도메인(extracellular domain)에 결합하는 약제.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

RAMP-3 및 CRLR 간의 상호작용을 조절할 수 있는 약제.

청구항 4

상기 어느 항에 있어서,

RAMP-3 단백질의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하는 약제.

청구항 5

상기 어느 항에 있어서,

(a) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 1에서 31 위치로부터의 접속 아미노산(contiguous amino acids)의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기(residues)의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티(moietiy)의 1에서 31 아미노산의 잔기들;

(b) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 32에서 46 위치로부터의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 15 아미노산의 잔기들; 및

(c) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 47에서 99 위치로부터의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 53 아미노산의 잔기들;

중에서 선택된 적어도 하나의 리간드(ligand)에 결합하는 약제.

청구항 6

상기 어느 항에 있어서,

(a) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 1에서 32 위치으로부터의 접속 아미노산(contiguous amino acids)의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기(residues)의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티(moietiy)의 1에서 32 아미노산의 잔기들;

(b) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 33에서 46 위치로부터의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 14 아미노산의 잔기들; 및

(c) 도 3의 인간의 RAMP-3 단백질의 47에서 99 위치로부터의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 53 아미노산의 잔기들;

중에서 선택된 적어도 하나의 리간드에 결합하는 약제.

청구항 7

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

상기 웨티드 모이어티는 5에서 15 아미노산의 길이인 약제.

청구항 8

상기 어느 항에 있어서,

인간 RAMP-3의 분절(fragment)에 결합하는 약제에 있어서, 상기 분절은 인간 카스파제-3(caspase-3) 및 인간 칼파인-1(calpain-1)을 사용하여 RAMP-3 세포 외 도메인의 효소 소화(enzyme digestion)에 의해 생성되는 것인 약제.

청구항 9

상기 어느 항에 있어서,

인간 SW-13 세포의 증식을 적어도 10% 이상 억제할 수 있는 약제에 있어서, 상기 억제는 MTT 세포 증식 분석(MTT Cell Proliferation assay)를 사용하여 측정하는 약제.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

증식을 적어도 12% 이상 억제할 수 있는 약제.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

증식을 적어도 20% 이상, 또는 적어도 25% 이상 억제할 수 있는 약제.

청구항 12

제 9 항에 있어서,

증식을 적어도 30% 이상, 또는 적어도 40% 이상 억제할 수 있는 약제.

청구항 13

상기 어느 항에 있어서,

아드레노메들린(adrenomedullin)에 의해 자극되었을 때, 인간 MG 63 골육종 세포(osteosarcoma cell) 내의 cAMP의 생성을 적어도 15% 이상 감소시키거나 또는 억제할 수 있는 약제.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

cAMP의 생성을 적어도 20% 이상 억제할 수 있는 약제.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 RAMP-1 단백질은 다음 중에서 선택된 것인 약제:

i) 도 1의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

ii) 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 극한 조건(stringent conditions) 하에 하이브리드(hybridise)되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드; 및

iii) 상기 (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열에 대한 유전자 코드의 결과로 변성(degenerate)된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로서의 사용을 목적으로 하는 것을 특징으로 하며,

상기 RAMP-2 단백질은 다음 중에서 선택된 것인 약제:

i) 도 2의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드 또는 그 변형;

ii) 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 극한 조건 하에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드; 및

iii) 상기 (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열에 대한 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로서의 사용을 목적으로하는 것을 특징으로 하며,

상기 RAMP-3 단백질은 다음 중에서 선택된 것인 약제:

i) 도 3의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

ii) 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 극한 조건 하에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드; 및

iii) 상기 (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열에 대한 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 16

칼시토닌 유사 수용체(CRLR)의 기능에 미치는 폴리펩티드의 영향을 조절하는 약제에 있어서, 상기 폴리펩티드는:

i) 도 1, 2, 3에서와 같은 핵산 서열로 구성된 핵산 분자로 엔코드 된(encoded) 폴리펩티드 또는 그 변형 종류;

ii) 상기 i)에 정의된 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드; 및

iii) 상기 i) 및 ii)에 정의된 핵산 서열에 대한 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드;

중에서 선택된 것이고 상기 약제는 약물로 사용하는 것을 특징으로 하는 약제.

청구항 17

상기 어느 항에 있어서,

상기 약제는 대항제(antagonist)이고, 선택적으로 RAMP 단백질 및 CRLR 간의 결합에 간섭할 수 있고, 및/또는 CRLR 및/또는 RAMP 단백질에 대한 리간드의 결합에 간섭할 수 있는 약제.

청구항 18

제 1 항에서 제 15 항중 어느 한 항에 있어서,

상기 약제는 작용제(agonist)인 약제.

청구항 19

상기 어느 항에 있어서,

약제는 항체 및 항체 분절, 단백질, 폴리펩티드, 융합 단백질, 앱태머(aptamer), 및 복합물 중에서 선택된 항체 생성물인 약제.

청구항 20

상기 어느 항에 있어서,

상기 약제는 항체 또는 항체의 활성 결합 부분인 약제.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 항체 생성물은 단클론 항체 또는 그 활성 결합 부분인 약제.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

상기 항체 생성물은 키메라 항체(chimeric antibody)인 약제.

청구항 23

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,
상기 항체는 인간적응된(humanised) 항체인 약제.

청구항 24

제 20 항에서 제 23 항중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체 생성물은 항체 분절인 약제.

청구항 25

제 24 항에 있어서,
상기 항체 분절은 단쇄 항체, 단쇄 가변 분절(single chain variable fragment; scFv), 도메인 항체(dAb), 및 나노입자(nanobody) 중에서 선택된 것인 약제.

청구항 26

제 20 항에서 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항체 생성물은, 예를 들어 PEG 분자에 접합되는 등의 접합체(conjugate)인 약제.

청구항 27

상기 어느 항에 있어서,
상기 약제는 화학요법 약제(chemotherapeutic agent)에 연결되거나 교차결합(crosslinked)된 것인 약제.

청구항 28

상기 어느 항에 있어서,
상기 약제는 검출 가능한 표지(detectable marker)를 포함하는 것인 약제.

청구항 29

제 1 항에서 제 19 항에 있어서,
상기 약제는 핵산 분자인 약제.

청구항 30

제 29 항에 있어서,
상기 핵산은 안티센스(antisense) 핵산, 앱태머 또는 소 간섭(small interfering) RNA인 약제.

청구항 31

상기 어느 항에 있어서,
약물(pharmaceutical)로써의 사용을 목적으로 하는 약제.

청구항 32

상기 어느 항의 약제, 약물로서 적절한 운반체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약물 제형제(pharmaceutical formulation).

청구항 33

상기 제 19 항에서 25 항 중 어느 항에 따른 항체의 발현(expression)을 위해 조정되고 또는 제 21 항에 따른 키메라 항체 또는 제 22 항에 따른 인간적응된 항체의 발현을 위해 조정된 벡터.

청구항 34

제 33 항에 있어서,
상기 벡터로 형질변환(transformed) 또는 핵산주입된(transfected) 세포.

청구항 35

- i) 항체 또는 항체 분절을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질변환 또는 핵산주입된 세포를 성장시키는 단계; 및
- ii) 상기 세포, 또는 그 성장 환경에서 상기 항체를 정제하는 단계;
를 포함하는 상기 제 20 항에서 제 25 항 중 어느 항에 따른 항체 또는 항체 분절, 및 선택적으로 제 22 항의 키메라 항체 또는 제 23 항의 인간적응된 항체를 생성하는 방법.

청구항 36

제 20 항에 있어서,
단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인.

청구항 37

- 제 21 항에 있어서,
 - i) 도 4,5,6의 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 폴리펩티드, 또는 그 분절 또는 그 변형을 포함하는 면역원(immunogen)으로 면역 적격(immunocompetent)의 포유동물을 면역시키는 단계;
 - ii) 하이브리도마 세포를 형성하기 위해서 골수종(myeloma) 세포로 상기 면역된 면역 적격의 포유동물을 림프구로 융합하는 단계;
 - iii) 상기 (i)의 폴리펩티드에 결합시키기 위해서 상기 (ii)의 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 단클론 항체를 스크리닝하는 단계;
 - iv) 상기 하이브리도마 세포를 배양하여 상기 단클론 항체를 증식 및/또는 분비하도록 하는 단계; 및
 - v) 상기 컬쳐 상청액(culture supernatant)에서 단클론 항체를 회복하는 단계;
를 포함하는 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인을 준비하는 방법.

청구항 38

제 36 항에 있어서,
상기 (i)의 폴리펩티드는 도 7,8,9에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 39

- i) RAMP 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자에 결합하는 결합 약제와 분리 세포 샘플을 접촉시키는 단계; 및
- ii) 상기 샘플의 상기 핵산 분자의 발현과 표준 샘플을 비교하는 단계
를 포함하는 분석법(assay)에 있어서, 도 1,2,3의 서열의 RAMP 단백질, 또는 극한 하이브리드 조건 하에서 상기 핵산 분자에 하이브리드되고, 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자의 발현의 레벨을 결정하는 분석법(assay).

청구항 40

제 39 항에 있어서,
상기 결합 약제는 올리고뉴클레오티드 프라이머, 및 도 1,2,3의 아미노산 서열의 상기 폴리펩티드를 특이적으로 결합시키는 항체 중에서 선택되는 분석법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 분석법은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)인 분석법.

청구항 42

a) 도 1,2,3의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자;

b) 상기 (i)의 핵산 분자에 극한 하이브리드 조건 하에 하이브리드 되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자;

중에서 선택된 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 RAMP 단백질의 활동을 조절하는 약제를 스크리닝하는 방법에 있어서, 상기 방법은 세포 표면에서 RAMP 단백질을 발현하는 세포에 테스트 복합물을 접촉하는 단계, 및 RAMP 단백질의 활동을 조절하는 테스트 복합물의 능력을 결정하는 단계를 포함하는 스크리닝 방법.

청구항 43

CRLR 기능을 조절하는 약제를 식별하는데 있어서, 폴리펩티드는:

i) 도 1, 2, 3의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자로 엔코딩된(encoded) 폴리펩티드 또는 그 변형;

ii) 상기 i)의 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드; 및

iii) 상기 (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드;

중에서 선택된 것인 폴리펩티드의 사용 방법.

청구항 44

i) 도 1, 2, 3의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자로 엔코딩된(encoded) 폴리펩티드 또는 그 변형;

ii) 상기 i)의 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드; 및

iii) 상기 (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드;

중에서 선택된 폴리펩티드와 CRLR 간의 상호작용을 조절하는 약제를 식별하는데 있어서의 CRLR의 사용 방법.

청구항 45

암을 치료하는 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 30 항중 어느 한 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 31 항에 따른 약물 제형제.

청구항 46

골다공증을 치료하기 위한 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 31항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

청구항 47

비만을 치료 또는 체중 감소를 위한 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 31항 중 어느 한 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

청구항 48

염증성 장애 및/또는 염증성 반응을 치료 또는 감소시키기 위한 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 31 항 중 어느 한 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

청구항 49

제 47 항에 있어서,

상기 염증성 장애는 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 류마티스 관절염, 골관절염(oesteoarthritis), 폐혈증 및 다발성 관절염 중에서 선택된 것인 방법.

청구항 50

당뇨성 혈관병증(diabetic angiopathy), 미세혈관병증(microangiopathy) 및 매크로혈관병증(macroangiopathy) 등과 같은 혈관병증(angiopathy)을 치료 또는 완화하는 약물 제조 방법에서, 제 1 항에서 31 항중 어느 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

청구항 51

심부전증(heart failure)을 치료하는 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 31 항중 어느 한 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

청구항 52

상처를 치료하는 약물의 제조 방법에서, 제 1 항에서 31 항중 어느 한 항에 따른 상기 약제의 사용 또는 제 32 항에 따른 약물 제형제.

명세서**기술 분야**

<1> 본 발명은 세포 표면 폴리펩티드(cell surface polypeptides)를 기초로 치료용 약제와 관련한 아드레노메들린을 매개로 하는 신호체계(adremedullin mediated signalling)과 치료용 약제를 식별하기 위한 및 스크린 분석(screening assays)에 관한 것이다.

배경기술

<2> 세포 신호체계(cell signalling)는 생존을 위해 필수적인 것이고, 이것이 없다면 물리적 또는 화학적으로 고립된 세포들은 세포자멸사(apoptosis)하게 된다. 암세포에 있어서 많은 접촉성 과정들은 비정상적이지만, 종양의 80%에서 아드레노메들린을 매개로 하는 신호체계를 수신하는 것은 세포의 생존을 위해 필수적인 것으로 밝혀졌다. 많은 호르몬 및 시토카인(cytokines)들이 특정 수용체(receptor)와 결합하지만, 아드레노메들린(AM)은 CRLR(Calcitonin Receptor Like Receptor)로 알려진 수용체를 통하여 활동한다.

<3> 대 생물 작용 펩티드(bioactive peptides)의 칼시토닌 족(calcitonin family)은 칼시토닌, 아밀린(amylin), CGRP1 및 CGRP2 (Calcitonin-Gene Related peptides) 및 아드레노메들린(AM)을 포함한다. 칼시토닌은 포유동물과 몇몇의 비포유동물의 갑상선의 소포결 C 세포(parafollicular "C" cells)에서 발견되는 32 aa 펩티드이다. 칼시토닌은 무기물(mineral; 칼슘 및 인산염)의 균형을 조절한다. 칼시토닌은 과골세포(osteoclast)에 의해 유도되는 뼈의 흡수의 억제제 기능을 하여 고칼슘혈증(hypercalcemia)의 원인이 된다. CGRP는 칼시토닌 유전자의 조직에 특정된 과정에 의해서 생성된 37-aa 펩티드이다. CGRP가 신경조직에서 주로 생성되는 반면에, 칼시토닌은 갑상선에서 주로 생성된다. CGRP는 강력한 심장혈관계 약물이며 아밀린과 유사한 구조를 가지고 있다. CGRP는 단 3개의 아미노산에서 다른 2가지의 아이소형(isoforms; CGRP-I 및 CGRP-II)으로 발견된다.

<4> 아드레노메들린(AM)은 52-aa 저혈압 유발(hypotensive) 펩티드이다. AM은 CGRP 및 아밀린과 유사한 구조를 가진다. AM은 말초 조직, 부신수질(adreanal medulla), 폐, 및 신장에서 생성되며 국소빈혈(ischaemia)에서는 통제되지 않는다. AM의 수용체들은 중추신경계의 별아교세포(astrocytes), 안구의 홍채 근육, 뼈, 혈관, 심장, 신장 및 피부 등과 같은 많은 조직들에 존재한다 (Uchikawa et al., Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005 Aug; 32(8):675-80; Sumanas et al., Blood. 2005 Jul 15; 106(2):534-41; Cornish J, Reid J Musculoskeletal Neuronal Interact. 2001 Sep; 2(1):15-24; Yoshihara et al., Regul. Pept. 2005 Apr 15; 127(1-3):239-44;

Matsumoto et al., Clin Exp Nephrol. 2004 Dec;8(4):316-21; Muller et al., Br J Dermatol. 2003 Jan; 148(1):30-8). 일반적으로, 웨프티드의 칼시토닌 족은 이황화물(disulfide) 및 아미데이트화 C-터미널 말단(amidated C-terminal end)을 포함하는 6-7 aa의 N-터미널 링 구조를 가진다.

<5> 상기 웨프티드의 칼시토닌 족은 GPCR(G-protein coupled membrane receptors)을 통해서 활동한다. 칼시토닌 수용체의 유전자는 복제되었다. 이것은 일반적으로 조절성 웨프티드(세크레틴, 글루카곤, VIP)을 인식하는 GPCR들의 "B"족과 동종이다. 칼시토닌 수용체의 동족체(homolog)인 CRLR(또는 CL; Calcitonin Receptor Like Receptor)가 확인되었고 (인간 461 aa; 쥐 463 aa) 이것은 칼시토닌 수용체와 55%의 상동성을 가진다 (Njuki et al., Clin. Sci. 85, 385-388 (1993); Chang et al., Neuron 11, 1187-1195(1993); Fluhmann et al., Biochem. Biophys. Res. Comun. 206, 341-347(1995); Kapas et al., J. Biol. Chem. 270, 25344-25347(1995)). GPCR, RDC1 및 G10D의 "A"족 군의 2가지 연관된 구성요소는 각각 CGRP 및 AM의 수용체로 확인되었다.

<6> CRLR의 리간드(ligand) 특이성, 결합 및 활성화를 유도하기 위해서는 RAMP(Receptor Activity Modifying Protein)가 필요하기 때문에 CRLR은 단독으로는 AM에 반응하여 신호를 변환할 수 없다. 상기 RAMP는 예측 크기가 14,000 ~ 17,0000 Kd인 작은 내인성 막 단백질(small intrinsic membrane proteins) 족(family)에 속한다. RAMP는 약 120 아미노산으로 구성되고 약 100 아미노산의 큰 세포외 도메인(extracellular domains)을 가지며, 하나의 막 스패닝 도메인(membrane spanning domain) 및 약 10 아미노산의 짧은 세포 내 영역을 가진다.

<7> CRLR은, RAMP 족의, RAMPs1 ~ 3 종에서 어느 것이 발현(express)되는지에 따라서 CGRP 수용체 또는 AM 수용체들 다로 작용할 수 있는 것으로 나타났다. RAMP1, 2 및 3은 N-터미널 신호 웨프티드, 세포 외 N-터미널 (extracellular N-terminus), C-터미널 부근의 하나의 막횡단 도메인(transmembrane domain), 및 세포질 C-터미널(cytoplasmic C-terminus)을 포함한다. RAMP1-3는 31%의 동질성(identity)을 나타낸다. RAMP-2 및 RAMP-3는 약 30%의 동질성을 가진다. RAMP들은 형질막에 CRLR을 전달할 때 포함될 수 있다.

<8> RAMP 족의 3가지 구성원인 RAMP1, 2 및 3은 CRLR에서 각각 다른 리간드 특이성을 나타낸다:

<9> RAMP1 + CRLR = CGRP 수용체(receptor)

<10> RAMP2 + CRLR = AM 수용체

<11> RAMP3 + CRLR = AM 수용체

<12> RAMP1은 CRLR을 말단이 당화된(terminally glycosylated), 성숙된 당단백질 및 CGRP 수용체로서 형질막에 제공하는 반면, RAMP2 및 3은 CRLR을 미성숙 핵 당화(core glycosylated) ADM 수용체로 제공한다 (McLatchie et al., 1998).

<13> 본 발명은 RAMP-CRLR 상호 작용에 영향을 줄 수 있는 치료용 약제의 발견에 관한 것이다. 상기 약제들은 특히 암 치료를 목적으로 한다.

발명의 상세한 설명

<14> 본 발명의 일 측면에서, (i)RAMP-3, (ii)RAMP-2 및 (iii)RAMP-1 단백질에서 선택된 하나 이상의 RAMP 단백질(Receptor Activity Modifying Protein)의 CRLR과 결합하고 CRLR에 대한 효과를 조절하는 것이 가능한 약제를 제공한다.

<15> 일 실시예에서는, 상기 약제는 RAMP 단백질의 세포 외 도메인과 결합한다. 특정 실시예에서는, 상기 RAMP 단백질은 사람의 RAMP 단백질이다. 특히, 상기 약제는 RAMP-3 및 CRLP 간의 상호 작용을 조절하는 것이 가능하다.

<16> 일 실시예에서, 본 발명의 상기 약제는 다음 중에서 선택된 적어도 하나의 리간드와 결합한다:

<17> (a) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 1에서 31 위치의 접속 아미노산(contiguous amino acids)의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기(residues)의 서열을 포함하는 웨프티드 모이어티(moiety)의 1에서 31 아미노산의 잔기들;

<18> (b) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 32에서 46 위치의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨프티드 모이어티의 1에서 15 아미노산의 잔기들;

<19> (c) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 47에서 99 위치의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨프티드 모이어티의 1에서 53 아미노산의 잔기들;

- <20> 일 실시예에서는, 상기 약제는 다음에서 선택된 적어도 하나 이상의 리간드와 결합한다:
- <21> (a) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 1에서 32 위치의 접속 아미노산(contiguous amino acids)의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기(residues)의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티(moiet)의 1에서 32 아미노산의 잔기들;
- <22> (b) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 33에서 46 위치의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 14 아미노산의 잔기들;
- <23> (c) 도 3에서와 같이, 사람의 RAMP-3 단백질의 47에서 99 위치의 접속 아미노산의 서열에 포함된 접속 아미노산의 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티의 1에서 53 아미노산의 잔기들;
- <24> 일반적으로, 상기 웨티드 모이어티는 5에서 15 아미노산의 길이를 갖는다. 각각 서로 독립적인 웨티드 모이어티 (a), (b) 및 (c)는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들은 예를 들면, 13 아미노산 잔기, 11 아미노산 잔기 또는 9 잔기 등과 같은, 5에서 13, 5에서 11, 또는 5에서 9 잔기들을 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 범위에는 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14 또는 15 아미노산 잔기를 (각각 독립적으로) 가지는 웨티드 모이어티 (a), (b) 및 (c)들이 포함된다. 웨티드 모이어티 (a), (b) 및 (c)의 아미노산 잔기의 큰 번호들은 17, 18, 19, 20, 25 또는 30 잔기들을 포함할 수 있다. 웨티드 모이어티 (c)는, 예를 들어, 31, 32, 35, 40, 45, 50 및 53 아미노산 잔기들을 포함하는 큰 번호의 아미노산 잔기들을 가질 수 있다. 본 발명의 상기 약제는 본 발명에 설명되는 적어도 하나의 웨티드 모이어티를 포함하는 항원결정인자(epitope)와 결합할 수 있다.
- <25> 웨티드 모이어티 (b)는 잠정 CRLR 결합 도메인(putative CRLR binding domain)의 부분 또는 모두를 포함할 수 있다. 상기 약제는 인간의 카스파제-3(caspase-3) 및 인간 칼파인-1(calpain-1)을 사용하여 RAMP-3 세포 외 도메인의 효소 소화(enzyme digestion)에 의해 생성되는 인간 RAMP-3의 조각과 결합할 수 있다.
- <26> 본 발명에는 또한 다음에서 선택된 적어도 하나의 웨티드 모이어티에 결합하는 약제들이 포함된다:
- <27> (a) 다음 아미노산 서열에 포함된 접속 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티 1에서 15 아미노산 잔기들: GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNL; 및
- <28> (b) 다음 아미노산 서열에 포함된 접속 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 웨티드 모이어티 1에서 15 아미노산 잔기들: ESFT NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEV.
- <29> 상기 서열들은 예를 들어 도 3의 아미노산 서열을 포함하는 RAMP-3 단백질 내에 포함되어 있다.
- <30> 또한 본 발명의 상기 약제는 적어도 다음 2 가지 기능 중 하나 이상을 선택적으로 가질 수 있다:
- <31> 1. 약제는 상기 RAMP 및 CRLR 단백질을 적어도 10% 이상 발현하는 SW-13 세포의 증식을 억제할 수 있다. 상기 증식은 MTT 세포 증식 분석(MTT Cell Proliferation Assay)를 사용하여 측정한다;
- <32> 2. 약제는 아드레노메틸린 투여에 반응하여, 상기 약제가 없는 상태에서 아드레노메틸린을 투여하는 것에 비교하여, 인간의 MG63 골육종(osteosarcoma) 세포의 cAMP 생성을 적어도 15% 이상 억제할 수 있다.
- <33> 상기 약제는 예를 들어 RAMP-3와 같은 RAMP 단백질과 결합할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 약제는 예를 들어, 도 3의 1에서 99 아미노산 잔기를 포함하는 서열과 같은 RAMP-3의 세포 외 도메인과 결합한다.
- <34> 본 발명에 기재된 데이터는 한편으로 RAMP-3와 CRLR 간의 상호작용 또는 RAMP-3/CRLR과 관련된 복합물과 AM과 같은 리간드 간의 상호작용을 억제하는 억제제들은 암과 혈관생성(angiogenesis)을 예방하는 기능이 있다는 것을 나타낼 수 있다. 이런 약제는 당뇨 미세혈관병증(diabetic microangiopathies)과 같은 당뇨 증세를 완화하는 것을 포함하는 당뇨 치료에 또한 사용이 가능하다.
- <35> 본 발명의 다른 측면에 따르면, CRLR의 기능에 폴리웨티드가 미치는 영향을 조절하는 약제를 제공하는데, 상기 폴리웨티드는 다음 중에서 선택되며, 상기 약제는 약물로 사용되는 것을 특징으로 한다;
- <36> i) 도 1, 2, 3에서와 같은 핵산 서열을 구성하는 핵산 분자로 엔코드 된(encoded) 폴리웨티드 또는 그 변형 종류;
- <37> ii) 상기 i)의 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되고 CRLR기능을 조절하는 핵산 분자로 엔코드된 폴리웨티드; 및
- <38> iii) 상기 i) 및 ii)의 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리웨티드.

- <39> 본 발명에서 "CRLR 기능 또는 활동"은 CRLR의 생물학적 활동을 지칭한다. 특이적 "기능(function)"은, 예를 들어 아드레노메탈린(AM) 및 CGRP 등을 포함하는 리간드에 반응하는 CRLR 활성을 포함한다. 일반적으로, AM 또는 CGRP에 반응하는 CRLR 활성은 cAMP의 발현을 유도하고 기타 제 2의 메신저 시스템(messenger system)의 활성을 유도한다.
- <40> AM 또는 CGRP 등의 리간드는 폴리펩티드가 CRLR과 연결되어 있을 때만 본 발명의 폴리펩티드, 즉, RAMP 단백질에 결합하므로, 본 발명에 따른 약제는 RAMP 단백질과 CRLR의 연결을 방해하는 등 조절하기 위해 사용될 수 있다. RAMP-1, RAMP-2, RAMP-3 등의 RAMP 단백질과 CRLR의 연결을 방해함으로써, CRLR의 활성을 감소시키거나 예방하는 등의 영향을 줄 수 있다. 상기 방해는, 예를 들어 RAMP 단백질, CRLR 및/또는 RAMP/CRLR 복합물 내에서 리간드의 결합 부위를 직접 또는 간접적으로 차단한 결과일 수 있다. 일 실시예에서는, 상기 약제는 CRLR의 결합 부위 이외의 RAMP-3 단백질의 세포 외 도메인의 핵산 서열에 결합한다. 또 다른 실시예에서는, 상기 약제는 RAMP/CRLR 수용체와 리간드 간의 상호작용을 모방하는 작용제(agonist)로써 CRLR 수용체를 자극하고 상기 수용체의 신호를 증가시키거나 이상 신호를 방출하도록 유도할 수 있다.
- <41> 바람직한 실시예에서, 상기 약제는 항체 생산물(antibody product)이다. 또 다른 일 실시예에서, 상기 항체 생산물은 RAMP-3 단백질과 결합한다. 상기 항체는 RAMP-3에 특이적으로 결합할 수 있다.
- <42> 본 발명의 범위는 약물로써 사용하기 위한 약제를 포함한다.
- <43> 본 발명의 다른 측면에서는 약제가 항체 생산물 또는 융합 단백질(fusion protein)과 같은 단백질일 경우, 본 발명의 약제의 발현을 위해 개조된 벡터들을 포함한다. 본 발명은 설명되는 벡터로 형질변환되거나 (transformed) 핵산주입됨(transfected) 세포를 또한 제공한다.
- <44> 본 발명의 또 다른 측면에서는 예를 들어 항체과 같은 약제를 생성하는 방법을 제공한다.
- <45> 본 명세서에서는 다음 용어와 약어를 사용했다:
- <46> 정의
- <47> 다르게 정의하지 않는 한 기술적인 용어들은 일반적인 의미로 사용되었다. 분자 생물학에서 사용되는 용어들의 정의는 다음 자료에서 찾을 수 있다. Benjamin Lewin, Gene V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). 면역학에서 당업자에게 알려진 정의 및 기타 정보는 Fundamental Immunology, W.E.Paul, ed., fourth edition, Lippincott-Raven Publishers, 1999에도 나와 있다.
- <48> 항체 분절 (Antibody fragment; 특정 항원 결합을 가지는 분절): Fab, (Fab')₂, Fv, dsFV, 단 사슬 Fv(scFv; single-chain Fv) 및 단수의 도메인 항체를 포함하는 도메인 항체를 포함하여 항체의 여러가지 분절들이 정의되었다. 이러한 항체 분절들은 다음과 같이 정의되었다:
- <49> (1) Fab, 무손상의 경쇄(light chain)과 하나의 중쇄(heavy chain)의 일부를 생성하기 위해 항체 전체를 효소 파파인(enzyme papain)에 의해 소화함으로써 또는 동등하게 유전자 공학을 사용함으로써 생성된 항체 분자의 단 가의 항원 결합 분절 (monovalent antigen-binding fragment)을 포함하는 분절;
- <50> (2) Fab', 무손상의 경쇄(light chain)과 하나의 중쇄(heavy chain)의 일부를 생성하기 위해 항체 전체에 펩신으로 처리한 후 환원시켜서 얻은 항체 분자의 분절; 항체 분자 하나 당 2개의 Fab' 분절을 생성할 수 있다;
- <51> (3) (Fab')₂, 항체 전체를 환원 과정 없이 효소 펩신(enzyme pepsin)으로 처리하거나 동등하게 유전자 공학을 사용하여 얻은 항체의 분절;
- <52> (4) F(AB')₂, 이황화물 결합으로 연결된 2개의 FAb' 분절들의 이합체(dimer);
- <53> (5) Fv, 경쇄의 가변부위와 중쇄의 가변부위를 포함하는 2개의 사슬로 발현되는 유전 공학으로 생성된 분절; dsFV, 경쇄의 가변부위와 중쇄의 가변부위가 이황화물 결합으로 연결된 분절; 그리고
- <54> (6) 단수의 사슬 항체(single chain antibody; SCA), 경쇄의 가변부위와 중쇄의 가변부위를 적절한 폴리펩티드로 연결한 것을 포함하는 유전적으로 융합한 단수의 사슬 분자로서의 유전 공학으로 생성된 분자. 단수 사슬 항

체는 또한 단 사슬 가변 분절(scFv)이라고도 칭한다.

<55> 단수 도메인 항체들(single domain antibodies)은 그 상보성 결정부위가 단수 도메인 폴리펩티드에 포함된 항체이다. 그러나 이에 제한되지 않고, 그 예로 중쇄 항체, 경쇄가 원래 포함되지 않은 항체, 기존의 4개의 사슬 항체에서 유도된 단수 도메인 항체, 조작된 항체, 및 항체에서 유도된 것이 아닌 단수 도메인 골격(single domain scaffolds) 등이 있다. 기술 분야에서의 모든 단수 도메인 항체를 포함할 수 있고, 미래의 단수 도메인 항체일 수 있다. 단수 도메인 항체는 생쥐, 사람, 낙타, 라마(llama), 염소, 토끼, 소 등을 포함하는 종에서 유래되나 이에 한정되지 않은 종들에서 유래될 수 있다. 단수 도메인 항체는 경쇄가 없는 중쇄 항체로 알려진 자연적으로 발생하는 단수 도메인 항체일 수 있다. 이러한 단수 도메인 항체는 WO 9404678 등에 개시되어 있다. 이런 분절들(fragments)를 생성하는 방법은 이 기술분야에서 일반적이다.

<56> dAB(도메인 항체)는 인간의 항체의 중(heavy; VH) 또는 경(light; VL) 사슬에서의 가변부위에 해당하는 항체의 가장 작은 기능 결합 단위이다. 도메인 항체들은 약 13kDa의 분자 중량, 또는 전체 항체의 1/10의 크기를 가진다. 도메인 항체들은 2개의 치료 목표(therapeutic target)를 결합시키는 dAb를 포함할 수 있다. 이것들은 유사-IgG 분자; PEG화 융합 단백질(PEGylated fusion proteins); 및 항-세럼 알부민 융합 단백질(anti-serum albumin fusion proteins) 등을 포함한다. 상기 유사-IgG 항체에서, 2개의 가변부위는 상기 IgG의 각각 양쪽 가지에 2개의 치료 목표에 결합한다.

세포 라인/ 세포 컬쳐(Cell line/Cell culture)

<58> "세포 라인" 또는 "세포 컬쳐"는 인비트로(in vitro)에서 성장 또는 유지된 고등진핵세포(higer eukaryotic cells)를 의미한다. 세포의 자손(progeny)은 모세포와 완전히 일치(형태적으로, 유전자형적으로, 표현형적으로)하지 않을 수 있다. "이종유래(heterologous)"는 비교되는 나머지 본체와 유전자형적(genotypically)으로 구별되는 개체(entity)로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들면, 폴리뉴클레오티드(polymer nucleotide)를 유전자 공학 기술로 다른 소스에서 유래된 플라스미드(plasmid) 또는 벡터로 주입하는 것을 이종유래 폴리뉴클레오티드(heterologous polymer nucleotide)라고 한다. 본래의 코딩 서열에서 제거하여 자연 상태에서 발견되지 않는 코딩 서열에 연결한 프로모터(promoter)를 이종유래 프로모터(heterologous promoter)라고 한다. "분리(isolated)" 된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 사실상 결합된 물질들을 본질적으로 포함하지 않는 것들을 말한다. 본질적으로 포함하지 않는다(substantially free)는 것은 적어도 50%, 바람직하게는 70%, 또는 80%, 더 바람직하게는 적어도 90% 이상 사실상 결합된 물질을 포함하지 않는 상태를 의미한다.

상보성 결정부위 (Complementarity-determining region; CDR):

<60> CDR은 결합된 항원의 3차원 구조를 보완하는 항원 결합 표면을 형성하는 항체 분자의 각 가변 경(variable light; VL) 및 가변 중(variable heavy; VH) 부위 내의 3개의 고변위부위(hypervariable regions)를 말한다. 중 또는 경쇄의 N-터미널에서 진행하여, 상기 상보성 결정부위들은 각각 "CDR1", "CDR2" 및 "CDR3"로 표시된다. CDR들은 항원-항체 결합에 포함되고, CDR3은 항원-항체 결합에 특이성을 갖는 독특한 영역을 포함한다. 따라서, 항원 결합 부위는 각 중 및 경쇄 V 부위의 CDR 부위들을 포함한 6개의 CDR들을 포함할 수 있다. CDR 부위 내의 단 한 개의 아미노산을 교체하는 것은 특정 항원의 항체의 친화력을 바꿀 수 있다 (Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. 143-5, 2000 참조). CDR들의 위치는 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunologic Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983 등에 정확히 정의되어 있다. Ig의 경쇄 및 중쇄는 각각 3개의 CDR을 가지는데, 각각 L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 및 H-CDR1, H-CDR2, 및 H-CDR3로 표시된다. 경쇄의 CDR은 24, 34(L-CDR1), 50 및 56(L-CDR2), 89 및 97 (L-CDR3) 위치에서 잔기들에 의해 결합되어 있다. 중쇄의 CDR은 31 및 35b (H-CDR1), 50 및 65 (H-CDR2), 95 및 102 (H-CDR3) 위치에서 잔기들에 의해 결합되어 있다. 이것은 Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda (NIH Publication No. 91-3242)에서 서술된 번호표 구성을 사용했다.

<61> Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) 및 (1991))의 번호표 구성을 참조했다. 저자인 카밧은 상기 번호표에 각 아강(subclass)의 항체의 많은 아미노산 서열들을 나열하고 있고, 각 아강에 있는 각 잔기 위치에서 가장 많이 발생하는 아미노산의 목록을 나열하고 있다. 카밧은 서열 목록에서 각 아미노산에 하나의 잔기 번호를 붙이는 방법을 사용하는데, 이러한 잔기 번호를 붙이는 방법은 이 기술 분야에서 표준이 되었다. 본 발명의 목적을 위해서, 카밧의 목록에 포함되지 않은 후보 항체 아미노산 서열에 잔기 번호를 붙이기 위해서 다음 설명되는 방법을 사용한다. 일반적으로, 상기 후보 서열은 어떤 면역글로불린 서열이나 카밧의 어떤 공통서열과도 정렬할 수 있다. 정렬

(alignment)은 수동으로 하거나 일반적으로 사용하는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 정렬할 수 있다. 이런 프로그램의 예는 본 발명의 얼라인 2 프로그램(Align 2 program)에 나와 있다. 대부분의 Fab 서열에 공통적인 아미노산 잔기들을 사용하여 정렬을 할 수 있다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄는 일반적으로 각각 같은 잔기 번호를 가지는 2개의 시스테인을 가지는데, VL 도메인에서 2개의 시스테인은 잔기 번호 23 및 88에 위치하고, VH 도메인에서 2개의 시스테인 잔기들은 일반적으로 22 및 92 번호를 붙인다. 구조 잔기(framework residues)들은 일반적으로, 예외도 있지만, 대략 같은 잔기 수를 가지나 CDR들의 크기는 다르다. 예를 들면, 카밧의 서열 목록과 정렬된 CDR보다 길이가 긴 후보 서열의 CDR의 경우에는 추가적인 잔기의 삽입을 나타내기 위해 잔기 번호에 추가로 첨자를 붙인다 (예, 도 5의 잔기 100abcde 참조). 예를 들어, 잔기 번호 34 및 36에서 카밧의 서열과 정렬되지만 그 사이에 잔기 번호 35와 정렬되는 잔기를 가지지 않는 후보 서열에는, 잔기에 번호 35를 붙이지 않는다.

<62> CDR 및 FR 잔기들은 또한 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)에 나와있는 구조적인 정의에 따라 결정되었다. 상기 두 가지 방법들은 CDR을 확인하는데 있어서 약간 다른 결과를 나타내는데, 구조적인 정의를 더 권장한다. 그러나, 서열을 정의하여 잔기를 확인하는 방법에 의해 확인된 잔기들은, 어느 구조적 잔기들을 공통서열로 정할 것인지 결정하는데 있어서 중요한 FR 잔기이다.

<63> **불변 부위(Constant Region):** 효과기(effectector)의 기능을 부여하는 항체 분자의 부위를 말한다. 본 발명에서 사용되는 가변 항체들은 인간의 면역글로불린에서 유도된 불변부위를 포함할 수 있다. 중쇄 불변 부위(heavy chain constant region)는 알파(alpha), 델타(delta), 엡실론(epsilon), 감마(gamma) 또는 뮤(mu) 등에서 선택된 5개의 동형(isotypes)에서 선택할 수 있다. 여러가지 아강(중쇄의 IgG 아강과 같은)의 중쇄들은 다른 효과기의 기능을 하도록 한다. 따라서, 원하는 중쇄 불변 부위를 선택함으로써 원하는 효과기 기능을 하는 인간적응된 항체(humanized antibodies)을 생성할 수 있다. 경쇄 불변 부위는 카파(kappa) 또는 람다(lambda) 타입일 수 있다.

<64> **항원결정인자(Epitope):** 아미노산 서열의 특성에 의해 결정된 약제에 의해 인식되는 항원의 부위를 말한다. 컴페티티브 바인딩 에세이(competitive binding assay)에서 측정된 것처럼 각 2개의 약제들이 항원에 결합하는 것을 서로 방해(억제)하는 경우 2개의 약제들은 같은 에피토프에 결합하는 것으로 알려져 있다(예, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495-1502, 1990 참조). 또는, 하나의 항체에 결합하는 것을 감소시키거나 제거하는 항원 내에서 대부분의 아미노산 변이(mutations)가 서로의 결합을 감소시키거나 제거한다면, 2개의 항체들은 같은 에피토프를 가진다. 2개의 항체들이 서로 항원에 결합하는 것을 부분적으로 방해한다면, 그리고/또는 하나의 항체의 결합을 줄이거나 제거하는 어떤 아미노산 변이들이 서로 결합을 줄이거나 제거한다면, 2개의 항체들은 중복되는 에피토프를 가지는 것으로 알려져 있다.

<65> **구조 부위(Framework region; FR):** 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 부위 내의 3개의 고 방사상(hightly divergent)의 상보성 결정부위(CDRs)에 인접하는, 비교적 보존된 서열을 지칭한다. 따라서, 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 부위는 FR 및 3개의 CDR들로 구성된다. 어떤 FR 잔기들은 결합된 항원을 접촉할 수 있으나 FR들, 특히 CDR에 바로 인접한 FR 잔기들은 가변 부위를 항원 결합 부위 내로 주입하는 역할을 주로 한다. 이론과는 상관 없이, 구조 부위들은 항원 결합을 위해 CDR들이 적절한 위치에 고정되도록하는 기능을 한다. 경쇄 및 중쇄의 구조 부위의 잔기들의 번호는 상기 카밧 et al., (1991, supra)에 의한 번호표 구성을 참조했다. 여러가지 경쇄 또는 중쇄의 구조 부위의 서열들은 하나의 종(species) 내에서 비교적 보존된다. 인간의 구조 부위는 자연발생적인 인간의 면역글로불린의 구조 부위와 본질적으로 동일한 구조 부위(약 85% 이상, 통상 90-95% 이상)이다.

<66> **방해(Inhibit):** 어떤 상호 작용을 늦추거나 억제 또는 예방하는 것을 말한다. 예로는, (i) RAMP 단백질과 리간드 간의 결합 또는, (ii) RAMP 단백질과 CRLR 간의 연결 또는, (iii) RAMP/CRLR의 복합물과 리간드 간의 결합 등은 상기 상호작용을 방해하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 방해는 100% 억제보다는 상호작용의 양 및/또는 속도를 줄이는 결과를 보인다.

<67> **면역원성(Immunogenicity):** 대상에 투여했을 때 목표하는 단백질, 치료용 모이어티 또는 약제의 면역 반응(체액 또는 세포의)을 유도하는 능력의 단위를 말한다.

<68> **면역글로불린(Immunoglobulin):** 항원에 특이적으로 결합하는 (면역반응을 하는) 항원 결합 부위를 포함하는 분자와 같은 예의, 면역글로불린(Ig) 분자 및 Ig 분자의 면역 활성 부위를 뜻한다. "항체(antibody)"라는 용어로도 쓰인다.

<69> 자연발생적인 항체 또는 면역글로불린(예, IgG)은 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는데, 2개의 중쇄(H) 및 2개

의 경쇄(L)은 이황화 결합으로 서로 연결된다. 상기 2개의 중쇄는 이황화 결합으로 서로 연결되어 있고 각 중쇄는 이황화 결합으로 하나의 경쇄에 연결되어 있다. 경쇄는 람다(λ) 및 카파(κ) 2 종류가 있다. 중쇄는 항체 분자의 기능적 활동을 결정하는 5개의 주요 중쇄 종류(동형; isotypes)가 있다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 면역글로불린 경쇄의 총 길이는 일반적으로 약 25Kd 또는 214 아미노산의 길이를 갖는다. 면역글로불린 중쇄의 총 길이는 보통 50Kd 또는 446 아미노산의 길이를 갖는다. 경쇄들은 NH₂-터미널(약 110 아미노산의 길이)에서의 가변 부위 유전자에 의해 엔코딩되고 COOH-터미널에서는 카파 또는 람다 불변 부위 유전자에 의해 엔코딩된다. 유사하게 중쇄들은 가변 부위 유전자(약 116 아미노산의 길이) 및 다른 불변 부위 유전자들 중에 하나에 의해서 엔코딩된다.

<70>

항체의 기본 구조 단위는 보통 각 면역글로불린 사슬에 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 갖는 동일한 2쌍의 면역글로불린 사슬로 구성된 테트라머(tetramer)이다. 각 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 부위들은 하나의 항원에 결합하고 불변 부위들은 효과기 기능을 조절한다. 면역글로불린은 또한, 예를 들어, Fv, Fab, 및(Fab')₂, 및 이중기능의 하이브리드 항체(bifunctional hybrid antibodies), 단수의 사슬 등을 포함하는 여러가지 다른 형태로 존재할 수도 있다 (예, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:5879-5884, 1988; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984; Hunkapiller and Hood, Nature 323:15016, 1986).

<71>

각 사슬은 독특한 서열 도메인을 포함한다. 경쇄는 가변 도메인(VL) 및 불변 도메인(CL)의 2개의 도메인을 포함한다. 중쇄는 가변 도메인(VH) 및 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3; 전체로 CH라 한다) 등의 4개의 도메인을 포함한다. 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 모두의 가변부위는 결합 인지(binding recognition) 및 항원에 대한 특이성(specificity)을 결정한다. 경쇄(CL) 및 중쇄(CH)의 불변 부위 도메인들은 항체 사슬 연관성, 분비, 태반경유 유동성(transplacental mobility), 상보성 결합, 및 Fc 수용체에 결합성 등과 같은 중요한 생물학적 성질을 부여한다. 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 가변 부위는 3개의 고변위부위(hypervariable region)에 의해 차단되는 구조 부위를 포함하는데, 이것을 상보성 결합 부위(CDR's)라고도 한다 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1983 참조). 상기 설명과 같이, CDR은 항원의 에피토프에 결합을 시키는 주요한 요소이다. 항체의 특성은 항체 결합 부위와 항원 결정요소(antigenic determinant) 사이에 구조적인 상보성에 존재한다.

<72>

키메라 항체(chimeric antibodies)는 일반적으로 여러 종들의 면역글로불린 가변 및 불변 부위 유전자에서 유전 공학적으로 만들어진 경쇄 및 중쇄 유전자들을 가지는 항체를 말한다. 예를 들면, 생쥐의 단클론항체에서의 유전자의 가변 부위를 카파 및 감마1 도는 감마3 등의 인간의 불변 부위에 연결할 수 있다. 일 예로, 치료용 키메라 항체는 이런 생쥐 항체의 가변 또는 항원 결합 도메인과 인간 항체의 불변 또는 효과기 도메인으로 구성된 하이브리드 단백질이다. 또는 다른 포유 종을 사용할 수 있고 또는 가변 부위는 분자 기술로 생성할 수 있다. 키메라 항체를 만드는 방법은 본 발명에 참조된 미국특허번호 5,807,715와 같이 이 기술분야에 널리 알려진 기술이다.

<73>

"인간적응된(humanized)" 면역글로불린 또는 항체는 인간 구조 부위와 인간이 아닌 동물의 (생쥐, 쥐 또는 합성 등의) 면역글로불린의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. CDR을 제공하는 인간 이외의 면역글로불린을 "제공자(donor)"라고 하고 구조(framework)를 제공하는 인간 면역글로불린을 "수신자(acceptor)"라고 정의 한다. 일 실시예에서, 모든 CDR은 인간적응된 면역글로불린의 도너 면역글로불린으로부터 유도된 것이다. 불변 부위는 꼭 존재할 필요는 없지만 존재한다면 적어도 85-90% 이상, 약 95% 이상 인간 면역글로불린의 불변 부위와 본질적으로 동일해야 한다. 따라서, CDR을 제외한 인간적응된 면역글로불린의 모든 부분은 자연 상태의 인간 면역글로불린 서열의 해당 부분과 본질적으로 동일하다. "인간적응된 항체"는 인간적응된 경쇄 및 인간적응된 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 인간적응된 항체는 CDR을 제공하는 도너 항체로서 같은 항원에 결합한다. 인간적응된 면역글로불린 또는 항체의 수용자 구조는 도너 구조에서 가져온 아미노산으로 제한된 갯수의 치환을 가질 수 있다. 인간적응된 또는 기타 단클론 항체들은 항원 결합 또는 기타 면역글로불린 기능에 영향을 주지 않는 추가적인 보존성 아미노산 치환을 가질 수 있다. 보존성 치환의 예는 gly, ala, val, ile, leu, asp, glu, asn, gln, ser, thr, lys, arg, 및 phe, tyr 등이 있다 (본 발명의 인용참증 미국특허 5,585,089 참조). 인간적응된 면역글로불린은 유전공학으로 생성할 수도 있다. 본 발명의 인용참증인 미국특허 5,225,539 및 미국 특허 5,585,089를 참조한다.

<74>

인간 항체는 경쇄와 중쇄 유전자가 인간으로부터 유래된 항체이다. 인간 항체는 기술 분야에서 사용하는 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 인간 항체는 원하는 항체를 분비하는 인간 B 세포를 무한증식(immortalize)시켜서 생

성될 수 있다. 무한증식은 예를 들어, EBV 감염 또는 인간 B 세포를 골수종(myeloma) 및 하이브리도마(hybridoma) 세포와 융합하여 트리오마(trioma) 세포를 생성하여 실행할 수 있다. 인간 항체는 또한 파지 디스플레이 방법(phage display methods)를 사용하여 생성하거나 (예, Dower et al., PCT 공개공보 WO91/17271; McCafferty et al., PCT 공보 WO92/001047; 및 Winter, PCT 공보 WO92/20791 참조) 인간 복합 단클론 항체 라이브러리(combinatorial monoclonal antibody library)에서 선택할 수 있다 (Morphosys 웹사이트 참조). 인간 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자를 가지는 유전자 도입 동물(transgenic animals)을 사용하여 생성할 수 있다 (예, 본 발명의 인용참증인 Lonberg et al., PCT 공보 WO93/12227; 및 Kucherlapati, PCT 공보 WO91/10741 참조).

<75> 항체는 또한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 파지 디스플레이 방법은 본 발명에 인용된 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 및 Clarkson et al., Nature 352:624-628 등과 같이 이 기술 분야에 알려져 있다. 파지 디스플레이 방법은 항체의 친화력을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다. 항체의 친화력을 높이기 위하여 항체의 서열을 다양화하고, 파지 항체 라이브러리(phage antibody library)를 만들고, 항원의 고위 친화력 결합요소(higher affinity binders)들을 선택한다 (본 발명에 인용된 Marks et al Bio/Technology 10:779-783, Barbas et al Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:3809-3813 및 Schier et al J. Mol. Biol. 263:551-567 참조).

<76> **애태머(Aptamer):** 본 발명의 약제는 또한 애태머일 수 있다. 애태머는 아미노산, 약물, 단백질 및 기타 분자들에 대하여 생성될 수 있는 인공 핵산 리간드로 정의되어 있다. 이들은 반복적인 흡착, 회복 및 재증폭(re-amplification) 과정에 의해 합성 핵산의 복합 라이브러리(complex library)에서 분리된다.

<77> RNA 애태머는 특정 목표 분자에 대한 친화력이 있는 핵산 분자들이다. 이들은 그 리간드에 결합하는 성질로 인해 항체에 비유된다. 이들은 여러가지 이유로 유용한 약제이다. 구체적으로, 애태머는 많은 종류의 용액 조건 및 농도에서 용해가 가능하고 그 결합 특성은 세제나 다른 변성제 등의 시약(reagent)에 의해 방해받지 않는다. 또한, 애태머는 분리하고 생산하는 비용이 비교적 저렴하다. 이들은 향상된 특성의 종(species)를 생성하기 위해 쉽게 변형할 수 있다. 여러 연구를 통해 핵산은 대부분 무독성이고 무면역원성(non-immunogenic)인 것으로 밝혀졌고 애태머는 이미 임상적으로 적용되고 있다. 또한, 상보성 RNA 외가닥(complementary RNA single strands)의 존재 하에 비활성 dsRNA 분자를 생성함으로써 생물 샘플에서의 애태머의 활성을 조절하는 방법이 알려져 있다 (Rusconi et al., 2002).

<78> 종래 기술에서 결합, 여과 및 증폭을 반복하여 변성된 서열 풀(sequence pools)에서 애태머를 분리하는 방법을 알 수 있다. 상기 방법은 US 5,475,096, US 5,270, 163, 및 EP0533 38에 개시되어 있고 일반적으로 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment)라 칭한다. 예를 들어, 목표 분자를 결합 및/ 또는 광 교차결합(photo cross-linking) 및/또는 광활성화(photo-activating) 또는 광비활성화가 가능한 광반응 그룹(photo-reactive groups)을 포함하는 애태머를 가지는 광-SELEX를 이용하여 기본적인 SELEX 시스템을 변형했다. 다른 변형들은 키메릭-SELEX, 혼합-SELEX, 반-SELEX(Counter-SELEX), 용액-SELEX, 케미-SELEX(Chemi-SELEX), 티슈-SELEX(Tissue-SELEX) 및 비전사 SELEX(Transcription-fee) 등을 포함하는데 이들은 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 라이브러리를 형성하기 위해 DNA 주형에 결합된 RNA의 랜덤 분절들을 만드는 방법을 설명한다. 그러나, 상기 방법들은 보강된(enriched) 리간드 결합 핵산 분자들을 생성하지만 이들은 불안정하다. 안정성의 문제를 해결하기 위해서는 거울상체 "스피겔머"(enantiomeric spiegelmers)를 생성한다 (WO 01/92566). 생성 방법은 먼저 목표물의 화학적인 거울상을 만들고, 이 거울상의 애태머를 선택한 후 SELEX에서 선택된 애태머의 화학적 거울상을 생성하는 것이다. 다음 목표 분자의 비자연적 거울상체에 대하여, 예를 들어, D-아미노산의 웹티드 등의 D-리보오스 당 단위(D-ribose sugar units)를 기초로 한 자연적인 RNA를 선택함으로써, 자연적인 L-아미노산 목표물에 대항하는 스피겔머를 생성할 수 있다. 비자연적 거울상체 목표와 애태머의 강한 결합이 분리되어 서열화되면, 분자 대칭법(Laws of Molecular Symmetry)에 따르면, L-리보오스 당에 기초하여 화학적으로 합성된 RNA들은 자연적인 목표물, 즉, 선택 목표물의 거울상에 결합하는 것을 의미한다. 이 과정은 간단하게 반사-선택(reflection-selection) 또는 거울 선택(mirror selection)이라 칭하고, 생성된 L-리보오스 종은 일반 효소 클리비지(normal enzymatic cleavage)에 감수성이 덜하므로 생물적 환경에서 현저히 안정적이다. 즉, 핵산분해효소에 저항력이 있다.

<79> **면역반응성(Immunoreactivity):** 특정 항원을 인식하고 결합하는 약제 또는 항체의 능력을 측정하는 단위를 말한다. "특이적으로 결합한다"는 것은 각 약제 또는 항체가 항원에 특이적으로 면역반응하는 능력을 의미한다. 이 결합은 예를 들어 항체 분자 및 항원 등의 약제 간에 비랜덤(non-random)의 결합 반응이다. 결합 특이성(binding specificity)은 일반적으로 목표하는 항원과 관련없는 항원을 차별적으로 결합하는 약제의 능력에 따

라 결정된다. 따라서, 다른 항원 간에, 특히 두 항원이 서로 독특한 에피토프를 가질 때 두 항원을 구별한다.

<80> 일반적으로, 특이성은 몇몇의 항원을 사용하는 ELISA와 같은 결합 애세이를 사용하여 결정할 수 있다. 본 발명에 따른 약제는 세포의 RAMP-1, RAMP-2 또는 RAMP-3 등의 RAMP 단백질을 식별할 수 있다.

<81> **단클론성 항체(Monoclonal antibody):** 이것은 단일의 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자들을 핵산주입된(transfected) B-림프구의 단클론 또는 세포에 의해 생성된 항체를 의미한다. 단클론 항체는 미올로마(myeloma) 세포와 면역지라(immune spleen) 세포를 융합한 것에서 하이브리드 항체 형성 세포를 만드는 등의 당업자에게 알려진 방법으로 생성된다. 일반적으로, 단클론 항체는 특정 하이브리도마 세포 또는 컬쳐에 번식된 하이브리도마 세포의 자손에 의해 생성된다. 항체를 생성하는 하이브리도마 또는 기타 세포는 유전자의 돌연변이나 다른 변화가 생길 수 있는데, 이것은 생성된 항체의 결합 특이성을 바꿀 수도 있고 바꾸지 않을 수도 있다.

<82> **핵산(Nucleic Acid):** "핵산"은 테옥시리보뉴클레오디드(deoxyribonucleotides), 리보뉴클레오티드(ribonucleotides), 및 이들의 조합의 유사체들을 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머 형태이다. 핵산은 임의의 3차원의 구조를 갖고 임의의 알려진 또는 알려지지 않은 기능을 할 수 있다. "핵산"이라는 용어는 쌍가닥, 외가닥(double-, single-stranded), 및 3중 나선의 분자를 포함한다. 다르게 정의되지 않는 경우, 본 발명에서의 핵산은 쌍가닥 형태와 쌍가닥 형태를 생성하기 위한 것으로 알려진 각각의 2개의 외가닥 형태를 포함한다.

<83> **폴리펩티드(Polypeptide):** "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질(protein)"의 용어들은 임의의 길이의 아미노산의 폴리머들을 지칭하기 위해서 서로 호환적으로 사용되었다. 상기 폴리머는 직선이나 가지 형태일 수 있고, 변형된 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고, 비아미노산(non-amino acid)에 의해 중단될 수도 있다. 상기 용어는 또한 자연적 또는 인공적으로 변형된 아미노산 폴리머를 포함하는데, 그 예로는, 이황화물 결합 형성, 당화(glycosylation), 지질화(lipidation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation), 또는 표지 성분과의 접합(conjugation with a labelling component) 등과 같은 기타 인공 변형 등이 있다.

<84> 아미노산 치환의 범위는 하나 이상의 아미노산을 변형시키는 것에서부터 가변 부위 등의 부위를 완전히 재설계하는 것에 이를 수 있다. 아미노산 치환은 웨პ티드의 접기(folding) 또는 기능적인 성질에 해로운 영향을 주지 않는 보존성 치환이 바람직하다. 보존성 치환을 할 수 있는 기능적으로 연관된 아미노산의 그룹은 다음과 같다: 글리신/알라닌; 발린/이소류신/류신(valine/isoleucine/leucine); 아스파라긴/글루타민; 아스파르트산/글루타민산; 세린/트레오닌/threonine)/메티오닌; 리신/아르기닌; 및, 페닐알라닌/트리오신/트립토판(phenylalanine/tryosine/tryptophan) 등이다. 본 발명의 폴리펩티드는 당화 또는 당화되지 않은 형태일 수 있고, 변역 후 변형(modified post-trnaslationally)을 하거나(예, 아세틸화 및 인산화) 또는 인공적으로 변형할 수 있다(예, 표지 그룹의 부착).

<85> 본 발명에 사용된 "변형(variant)" 폴리펩티드는 임의의 조합의 형태로 존재할 수 있는 하나 이상의 치환(substitution), 첨가(addition), 결손(deletion), 절단(truncation) 등으로 인해 아미노산 서열이 서로 다른 것일 수 있다. 권장하는 변형은 기준 폴리펩티드에서 보존성 아미노산 치환으로 변형되는 것들이다. 이런 치환은 기존 아미노산을 다른 유사한 성질의 아미노산으로 치환하는 것이다. 다음에 한정되지 않는 아미노산의 목록은 보존성 치환인 것으로 알려져 있다(유사): a) 알라닌, 세린(serine), 및 트레오닌; b) 글루탐산 및 아스파르트산; c) 아스파라긴 및 글루타민; d)아르기닌 및 리신; e) 이소류신, 류신, 메티오닌 및 발린; 및 f) 페닐알라닌, 티로신(tyrosine) 및 트립토판 등이다.

<86> 상기와 같이, 본 발명의 일 측면은 (i)RAMP-3, (ii)RAMP-2 및 (iii)RAMP-1 단백질 중에서 선택된 하나 이상의 RAMP 단백질(활성 변형 단백질)의 칼시토닌 유사-수용체 수용체(CRLR)에 결합을 하거나 효과를 조절할 수 있는 약제를 제공한다.

<87> 일 실시예에서, 약제는 RAMP 단백질의 세포 외 도메인에 결합한다. 일반적으로 상기 약제는 RAMP-3 및 CRLP 간의 상호 작용을 조절하는 것이 가능하다.

<88> 다른 실시예에서, 약제는 인간 SW-13 세포의 증식을 적어도 10%로 억제할 수 있다. 상기 억제는 MTT 세포 증식 애세이를 사용하여 측정한다. 바람직하게는, 상기 약제는 RAMP-3 및 CRLP 간의 상호작용을 방해하는 등의 조절이 가능하다.

<89> 일반적으로, 상기 약제는 증식을 적어도 12%로 억제할 수 있다. 어떤 실시예에서는, 상기 약제는 증식을 적어도 20%에서 약 25%까지 억제할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 약제는 증식을 적어도 30%에서 약 40%까지 억제할

수 있다.

<90> 일 실시예에서, 상기 약제는 아드레노메톨린으로 자극했을 때 인간 MG63 콜육종 세포에서의 cAMP의 생산을 예로 15%, 16%, 17%, 18% 및 19% 등 적어도 15%로 감소시키거나 억제할 수 있다. 일부 실시예에서는, 상기 약제는 cAMP의 생성을 21%, 22% 또는 25% 등의 적어도 20%로 억제할 수 있다. 일반적으로, 상기 약제는 RAMP-3 및 CRLP 간의 상호작용을 조절하는 것이 가능하다.

<91> 본 발명의 약제는 다음에서 선택된 RAMP 단백질의 효과를 조절할 수 있다:

<92> i) 도 1에 나와있는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

<93> ii) 상기 i)의 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 결합(hybridise)하는 핵산 분자로 엔코드된 폴리펩티드; 및

<94> iii) 상기 i) 및 ii)의 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로 사용하는 것을 특징으로 한다.

<95> 그리고 RAMP-2 단백질은 다음 중에서 선택한다:

<96> i) 도 2에 나와있는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

<97> ii) 상기 i)의 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되는 핵산 분자로 엔코드된 폴리펩티드; 및

<98> iii) 상기 i) 및 ii)의 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로 사용하는 것을 특징으로 한다.

<99> RAMP-3 단백질은 다음 중에서 선택된다:

<100> i) 도 3에 나와있는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

<101> ii) 상기 i)의 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 하이브리드(hybridise) 되는 핵산 분자로 엔코드된 폴리펩티드; 및

<102> iii) 상기 i) 및 ii)의 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로 사용하는 것을 특징으로 한다.

<103> 바람직하게는, 상기 약제는 위에 설명된 RAMP-3 단백질의 효과를 조절한다.

<104> 본 발명의 약제는 항체 및 항체 분절, 단백질, 폴리펩티드, 융합 단백질, 앱태머 또는 그 화합물 중에서 선택된 항체 생성물일 수 있다.

<105> 본 발명의 바람직한 실시예에서 상기 약제는 대항제(antagonist)일 수도 있고, 또는 선택적으로 작용제(agonist)일 수 있다.

<106> 본 발명의 또 다른 실시예에서는, CRLR 기능에 폴리펩티드가 미치는 효과를 조절하는 약제를 제공한다. 상기 폴리펩티드는 도 1, 2, 3의 아미노산 서열, 또는 적어도 하나 이상의 도 1, 2, 3의 아미노산 서열의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 변형된 변형 폴리펩티드를 포함한다. 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절하고, 상기 약제는 약품으로써의 사용을 특징으로 한다.

<107> 추가적으로, 본 발명은 설명된 폴리펩티드 서열과 적어도 75% 동질성을 가진 폴리펩티드 서열, 또는 그 분절, 및 기능 상 동일한 폴리펩티드를 특징으로 한다. 일 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 본 발명에 설명된 아미노산 서열과 85% 동질성, 더 바람직하게는 90%, 95%, 97%, 또는 가장 바람직하게는 99%의 동질성을 갖는다.

<108> 본 발명은 도 4, 5, 6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 그 분절, 또는 변형을 포함한다. 상기 변형은 도 4, 5, 6의 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 변환된 것이다. 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다. 특히, 상기 약제는 CRLR 기능에 대한 상기 설명된 RAMP 단백질의 효과를 조절한다.

<109> "도 4, 5, 6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 분절"이라 함은 예를 들어, 1에서 30 아미노산, 또는 10에서 30 아미노산, 등의 1에서 50 아미노산과 같은, 1에서 99 아미노산들을 포함한다. 바람직하게는 상기 분절은 RAMP 단백질의 N-터미널 서열이다. 예를 들어, 상기 분절들은 도 4, 5, 6의 아미노산 서열의 N-터미널 말

단의 1-10, 10-20, 또는 20-30 아미노산을 포함할 수 있다. RAMP 단백질의 기타 분절은 예를 들어, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 아미노산 잔기의 길이를 가질 수 있다.

<110> 본 발명은 도 7, 8, 9의 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분절 또는 변형 폴리펩티드를 포함한다. 상기 변형은 도 7, 8, 9의 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 변형된 것이며, 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다.

<111> 일 실시예에서는, 본 발명의 약제는 폴리펩티드이다. 상기 폴리펩티드는 도 4, 5, 6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 그 분절 및 그 변형을 포함하고, 상기 폴리펩티드는 RAMP 단백질의 리간드 및/또는 CRLR의 리간드와 결합한다.

<112> 상기 약제는 도 4, 5, 6의 아미노산 서열의 N-터미널 말단에 위치하는 1에서 30 아미노산을 포함하고 N-터미널에 선택적으로 5에서 30 아미노산, 또는 10에서 30 아미노산을 포함하는 폴리펩티드의 분절일 수 있다. 일 실시예에서, 상기 분절은 도 7, 8, 9에서 선택된 아미노산 서열로 구성되어 있다.

<113> 일 실시예에서, 약제는 폴리펩티드에 한정되지 않고 검출이 가능한 표지자(detectable marker)를 포함한다. 바람직하게는, 상기 약제는 방사성 및/또는 형광물질의 및/또는 에피토프 라벨 또는 태그 등의 종래의 라벨 및 태그를 포함한 표지자와 함께 제공된다.

<114> 다른 실시예에서, 상기 약제는 예를 들어, 항체 또는 항체의 활성 결합 부위 등의 항체 생성물이다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 항체는 단클론성 항체 또는 그 활성 결합 부위이다.

<115> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 키메라 항체 또는 인간적응된 항체들인데, 그 예로는 상기 항체의 가변 부위와 인간 항체의 불변기(invariant) 또는 불변 부위를 재조합하는 방법으로 생성된 것이 있다.

<116> 상기 설명된 바와 같이, 키메라 항체들은 생쥐 또는 쥐 항체의 V-부위 전체가 사람의 항체 C-부위와 혼합된 재조합 항체이다. 인간적응된 항체는 쥐 항체의 V-부위의 상보성 결정 부위와 인간 항체 V-부위의 구조 부위(framework regions)를 융합(fuse)한 재조합 하이브리드 항체들이다. 상보성 결정 부위(CDRs)는 항체의 중쇄 및 경쇄의 N-터미널 도메인 내에 V-부위의 변형의 대부분이 제한된 부위이다. 이 부위들은 항체 분자의 표면에 고리(loops)를 형성한다. 상기 고리들은 항체와 항원 간에 결합 표면을 제공한다. 사람이 아닌 동물의 항체는 외부의 항체에 면역 반응을 일으키고 순환계에서 제거하려고 한다. 재조합 하이브리드 항체 내에 감소된 쥐의(즉, 외부의) 항체를 포함하므로, 키메라 및 인간적응된 항체들은 모두 사람에게 투여했을 때 감소된 항원성을 가진다. 반면, 인간 항체 부위는 면역 반응을 일으키지 않는다. 이것은 더 약한 면역 반응의 결과를 초래하고 항체의 제거율을 감소시킨다. 이것은 사람의 질병을 치료하는 치료용 항체로 사용할 때 매우 유용하다. 인간적응된 항체는 더 적은 "외부" 항체 부위를 가지도록 설계한 것이므로 키메라 항체보다 면역원성이 적은 것으로 보인다. 본 발명의 일 실시예에서, 약제는 키메라 항체이다. 선택적으로, 상기 약제는 키메라 또는 인간적응된 항체이거나 RAMP-3에 결합하는 항체 분절이다.

<117> 일 실시예에서, 상기 항체 생성물은 본 발명에 설명된 항체 분절인데 도 1, 2, 3의 적어도 RAMP-1, RAMP-2, 및 RAMP-3 중 하나에 결합하는 것으로, 그 예로는 단쇄(single chain) 항체, 단쇄 가변 분절(scFv), 도메인 항체(dAB), 또는 나노입자 등이 있다. 바람직하게는, 상기 항체 생성물은 CRLR 단백질에 대한 RAMP 단백질의 효과를 조절한다. 이런 조절의 예는 RAMP/CRLR의 이질이합체(heterodimer)가 리간드에 결합하는 것을 억제하는 것이다. 이론과는 상관없이, RAMP/CRLR 이질이합체에 의해 형성된 수용체는 아드레노메틸린 및 CGRP 등의 특정 리간드의 수용체의 기능을 한다. 본 발명의 약제는 RAMP 단백질과 CRLR 간의 연결 및/또는 리간드와 수용체 간의 결합을 방해하는 기능을 할 수 있다. 일 실시예에서, RAMP 단백질은 RAMP-3일 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 약제는 항체 분절일 수 있다.

<118> 상기 설명과 같이, Fab, Fab₂, F(ab')₂, Fv, Fc, Fd, scFvs, 등의 면역글로불린 또는 항체의 여러가지 분절들은 이 기술 분야에 알려져 있다. Fab 분절은 면역글로불린의 중쇄 가변 부위의 면역 활성 부분과 면역글로불린 경쇄 가변 부위가 공유결합된 형태로 구성되고 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 중합체(multimeric) 단백질이다. Fab 분절은 손상되지 않은 면역글로불린 분자의 단백질 분해 클리비지(proteolytic cleavage; 예, papain과)를 통해 생성된다. Fab₂ 분절은 2개의 연결된 Fab 분절을 포함한다. 이 2개의 분절이 면역글로불린 경첩 부위(hinge region)에 연결되면 F(ab')₂ 분절이 된다. Fv 분절은 면역글로불린의 중쇄 가변 부위의 면역 활성 부분과 면역글로불린 경쇄 가변 부위가 공유결합된 형태로 구성되고 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 중합체(multimeric) 단백질이다. 분절은 하나의 경쇄 가변 부위를 포함하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 중쇄 가변 부

위와 연결되지 않은 하나의 경쇄 가변 부위를 포함하는 단쇄 폴리펩티드, 또는 경쇄 모이어티와 연결되지 않은 중쇄 가변 부위의 3개의 CDR을 포함하는 분절, 그리고 항체 분절에서 생성된 다수의 특정성 항체일 수 있다. 이 것의 예는 미국 특허 6,248,516에 나와있다. Fv 분절 또는 단 부위(도메인) 분절은 주로 관련 식별된 부위의 숙주 세포 라인의 발현으로 생성된다. 이들과 기타 면역글로불린 또는 항체 분절들은 본 발명의 범위에 포함되고 이것은 Paul, Fundamental Immunology 또는 Janeway et al. Immunobiology (상기 언급) 등의 표준 면역학 책에 설명되어 있다. 분자 생물학으로 상기 분절들의 직접 합성(세포의 발현 또는 화학적으로)이 가능하고 그 혼합물의 합성이 가능하다.

<119> 단쇄 항체 가변 부위 분절(single chain antibody variable region fragments; scFv's)이라 칭하는 단수의 가변 부위를 생성하는 것이 가능하다. 하이브리도마가 특정 단클론 항체에 대해 존재하면, RT PCR을 통하여 상기 하이브리도마에서 추출된 mRNA에서 scFv를 분리하는 것은 당업자라면 잘 알고 있는 지식일 것이다. 또는, scFv를 발현하는 클론을 식별하기 위해서 파지(phage) 디스플레이 스크리닝을 실시할 수 있다. 또는, 상기 분절들은 "도메인 항체 분절들"일 수 있다. 도메인 항체들은 항체의 가장 작은 결합 부위이다(약 13kDa). 이 기술의 예는 본 발명에 인용된 US 6,248,516, US 6,291,158, US 6,127,197 및 EP0368684에 개시되어 있다.

<120> 본 발명의 일 실시예에서 상기 항체 분절은 단쇄 항체 가변 부위 분절이다. 항체의 분절 또는 면역글로불린은 2 개의 다른 항원의 각각 2개의 다른 에피토프를 결합하는 등의 이중특이성 기능(bispecific function)을 가질 수 있다.

<121> 일 실시예에서, RAMP 단백질에 대한 키메라/인간적응된 단클론 항체는 원핵(prokaryotic) 또는 진핵 세포(eukaryotic)의 핵내주입(transfection) 또는 전환에 적절하게 적용된 발현 벡터에서 융합 폴리펩티드로써 생성될 수 있다.

<122> 또 다른 실시예에서, 상기 항체는 옵소닌(opsonic) 항체이다. 포식작용(phagocytosis)은 포식세포(macrophages) 및 다형 백혈구(polymorphic leukocytes)에 의해 매개되고 미생물의 섭취 및 소화, 손상 및 죽은 세포, 세포 잔여물, 용해되지 않은 입자들 및 활성 응고 요인 등을 포함한다. 옵소닌은 상기 외부 요인들의 포식작용을 촉진하는 약제이다. 따라서 옵소닌 항체는 상기 기능을 제공하는 항체이다. 옵소닌의 예는 항체의 Fc 부분 또는 상보성 C3(compliment C3) 등이다.

<123> 본 발명의 실시예에서, 상기 항체 또는 항체 분절은 치료용 약제와 연결되거나 교차결합(crosslink)된 것이다. 바람직하게는 상기 치료용 약제는 화학요법제이다. 바람직하게는 상기 치료용 약제는 다음 중에서 선택된 것이다: 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 시클로스포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 카무슬린(carmustine), 메토트렉사드(methotrexate), 5-플로로라실(5-fluorouracil), 시타라빈(cytarabine), 메르캅토푸린(mercaptopurine), 다우노루비신(daunorubicin), 독소류비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 닥티노마이신(dactinomycin), 미토마이신(Cmitomycin C), 택솔(taxol), L-아스파라기나제(L-asparaginase), G-CSF, 에토포시드(etoposide), 콜키신(colchicine), 테르페록사민 메실라트(derferroxamine mesylate), 및 캠토테신(camptothecin) 중에서 선택한다. 일 실시예에서, 상기 항체 생성물은 PEG 분자와 같은 것에 접합(conjugated)된 것일 수 있다.

<124> 상기 약제의 RAMP-3과 같은 RAMP 단백질에 대한 결합은 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 또는 10^{-12} M 이상의 친화력의 결합일 수 있다. 상기 결합은 리간드에특이적이거나 비특이적일 수 있는데, 어떤 경우에는 RAMP-1, RAMP-2, 또는 RAMP-3에 연관되지 않은 특정 기타 리간드에 대해 더 낮은 친화성의 비특이적 결합의 정도를 가질 수 있다.

<125> 따라서, 본 발명의 약제는 Fab 분절 등의 항체 또는 그 분절일 수 있다. 또는 앱태머, 복합물, 융합 단백질, 단백질, 웨პ티드 또는 상기 정의된 그 혼합물일 수 있다. 구체적인 항체 및 분절들은 Fab 분절 또는 scFv 등이다. 따라서 본 발명에는 단클론성, 다클론성(polyclonal), 키메라, 인간 또는 인간화(humanized)된 항체 또는 분절들이 포함된다. RAMP 단백질에 상기 정의된 결합으로 결합된 기타 약제들도 포함된다.

<126> 항체를 분리하는 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있다. 그 예는 Harlow and Lane(1998) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York를 참조한다. 분리 방법은 면역글로불린 이소타입(isotype)에 따라 달라진다. 정제 방법은 염침전(salt precipitation; 예, 황산 암모늄과 함께), 이온 교환 크로마토그라피(예, 중립 pH에서 양이온 또는 음이온의 교환 컬럼을 지나게 하고 증가하는 이온력을 점차 증가시켜 녹여서 분리하는 것), 겔 여과 크로마토그라피(gel filtration chromatography; 겔 여과 HPLC 포함), 및 단백질 A, 단백질 G, 히드록시아파티트(hydroxyapatite), 및 항-면역글로불린 등과 같은 친화 수지에 크로마토

그라피를 실시하는 것 등을 포함한다. 특히, 본 발명의 약제는 단백질 G-세파로제 컬럼(Protein G-Sepharose columns)을 사용하여 정제했다.

<127> 대부분의 경우에, 항체와 같은 폴리펩티드는 기타 세포 성분에서 적어도 부분적으로 정체된 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드는 전체 단백질의 중량의 적어도 약 50%는 순수한 것이어야 한다. 더 바람직하게는, 상기 단백질은 적어도 약 50~75% 순수한 것이다. 임상에서 사용할 폴리펩티드는 바람직하게는 약 80%가 순수한 것이어야 한다.

<128> 본 발명의 약제는 재조합 방법(recombinant methods) 또는 화학적 방법을 포함하여 임의의 적절한 방법으로 생성한다. 생성된 펩티드는 이 기술분야의 겔 여과 크로마토그라피, 겔 전기영동법(gel electrophoresis), 및 역상 HPLC(reverse-phase HPLC) 등을 포함하고 이에 한정되지 않는 알려진 방법으로 분리할 수 있다. 또는, 본 발명의 약제는 단백질 합성의 표준 방법과 함께 여기에 개시된 정보를 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 적절한 방법 중에 하나는 솔리드-단계 메리필드 기술(solid-phase Merrifield technique)이다. Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.)에서 생산하는 자동 펩티드 합성기(synthesizer)는 시중에서 구할 수 있다.

<129> 본 발명은 여기에 개시된 항체 또는 항체 분절 등과 같은 항체 생성물을 생성하는 방법을 포함하고, 선택적으로 다음을 포함하는 상기 정의된 키메라 항체 또는 인간적응된 항체를 포함한다:

<130> i) 항체를 생성할 수 있는 조건 하에서 항체 또는 항체 분절을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질변환 또는 핵산주입된 세포를 성장시키는 단계; 및

<131> ii) 상기 세포 또는 성장 환경으로부터 상기 항체를 정제하는 단계

<132> 본 발명의 또 다른 실시예에는 본 발명에 개시된 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인을 제공한다.

<133> 다른 실시예에서는 본 발명에 따른 하이브리도마 세포 라인을 사용하는 발명에 따라 단클론 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 하이브리도마 세포를 사용하여 단클론 항체를 생성하는 방법은 이 기술분야에 널리 알려져 있다. 단클론 항체를 생성하는 방법은 Kohler and Milstein in Nature 256, 495-497(1975) 및 Donillard and Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" in Compendium of Immunology V.II ed. by Schwartz, 1981 등에 나와 있다.

<134> 다른 실시예에서 다음 단계를 포함하는 발명에 따른 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인을 준비하는 방법을 제공한다:

<135> i) 도 4, 5, 6의 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 면역원, 또는 그 분절 및 상기 정의된 변형로 면역적격(immunocompetent) 포유 동물을 면역시키는 단계;

<136> ii) 면역시킨 면역적격 포유 동물의 림프구를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 형성하는 단계;

<137> iii) 상기 (i)의 폴리펩티드에 결합하는 활동을 위해서 상기 (ii) 단계에서 하이브리도마 세포로 생성된 단클론 항체를 스크리닝하는 단계;

<138> iv) 하이브리도마 세포를 배양하여 상기 단클론 항체를 증식 및/또는 분비하도록 하는 단계; 및

<139> v) 상기 배양 상청액(culture supernatant)에서 단클론 항체를 회복시키는 단계

<140> 본 발명의 일 실시예에서, 상기 (i)의 폴리펩티드는 도 7, 8, 9의 아미노산 서열을 포함하고 또는 변형 폴리펩티드를 포함하는데 상기 변형은 도 7, 8, 9의 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 변형된 것이고, 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다.

<141> 바람직하게는, 상기 면역적격 포유 동물은 생쥐(mouse) 또는 쥐(rat)이다.

<142> 다른 실시예에서 상기 약제는 핵산 분자이다. 상기 핵산은 예를 들어 안티센스(antisense) 핵산, 앱태머, 또는 소 간섭(small interfering) RNA 등일 수 있다.

<143> 다른 실시예에서, 상기 핵산 분자는 소 간섭 RNA일 수 있다. 소 간섭 RNA는 다음 (1)~(5) 서열로 구성된 그룹에서 선택할 수 있다:

<144> TGGCCCATCACCTTTCATGA (1)

<145> CTGGCTGCTCCTGGCCCCATCA (2)

- <146> TCCTGGCCATCACCTTCA (3)
- <147> CUAUGAGACAGCUGUCAA (4)
- <148> GUUCUUCUCCAACUGCACC (5)
- <149> 유전자 기능을 특정적으로 제거하는 기술은 쌍가닥(double stranded) RNA를 세포 내로 도입하는 방법인데, 소간섭 RNA(siRNA; small inhibitory 또는 interfering RNA)라고도 하는 이 방법은 siRNA 분자에 포함된 서열에 상보적인 mRNA가 파괴된다. siRNA 분자는 쌍가닥 RNA 분자를 형성하기 위하여 서로에게 열처리(anneal)되는 RNA의 2개의 상보성 가닥(센스 가닥 및 안티센스 가닥)을 포함한다. 보통 상기 siRNA 분자는 후에 제거되는 유전자의 엑손(exon)에서 유도한다.
- <150> RNA 간섭의 메커니즘을 설명한다. 많은 유기체들은 쌍가닥 RNA의 존재에 반응하여 siRNA의 형성을 유도하는 연쇄반응을 활성화한다. 쌍가닥 RNA의 존재는 쌍가닥 RNA를 더 작은 분절(siRNA; dir 21-29 뉴클레오티드 길이)로 나누는 RNase III를 포함하는 단백질 복합물을 활성화하는데, 이것은 리보뉴클레오단백질 복합물(ribonucleoprotein complex)의 일부분이 된다. 상기 siRNA는 RNase 복합물이 mRNA 상보성 물질을 안티센스 가닥으로 분할하도록 유도하는 역할을 하여 mRNA가 파괴되도록 한다.
- <151> 본 발명의 일 실시예에서, 항체, 항체 분절, 융합 단백질, 펩티드 또는 단백질인 약제를 엔코드하는 서열인 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산을 제공한다.
- <152> 본 발명의 약제가 항체, 융합 단백질, 펩티드 또는 단백질 등의 펩티드 서열을 포함하는 약제라면 핵산 서열로 엔코딩될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 약제를 엔코딩하는 핵산 서열을 포함하지만 이것은 유전자 코드의 변성으로 인한 야생형(wild-type) 핵산과는 다른 것이다.
- <153> 본 발명은 또한 본 발명의 약제를 엔코딩하는 핵산 서열과 적어도 90%의 유사성이 있는 핵산을 포함한다. 구체적으로, 상기 핵산은 본 발명의 항체 또는 그 분절을 엔코딩하는 핵산에 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 유사성을 가질 수 있다.
- <154> 일 실시예에서, 항체 또는 그 분절 또는 융합 단백질인 약제에 있어서, 극한 조건(stringent condition)에서 본 발명의 약제를 엔코딩하는 핵산 분자에 하이브리드(hybridize)하는 핵산 분자를 제공한다.
- <155> 2개의 상보성 핵산 분자가 서로 얼마 간의 수소 결합을 하면 핵산 분자가 하이브리드화(hybridization)이 된다. 하이브리드화의 극한도(stringency)는 핵산 주변의 환경 조건, 하이브리드화 방법의 특성, 및 사용되는 핵산 분자의 조합 및 길이에 따라 달라질 수 있다. 특정한 정도의 극한도를 조성하기 위해 필요한 하이브리드화 조건의 계산은 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); 및 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid probes Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York, 1993) 등에 설명되어 있다. T_m은 핵산 분자의 가닥의 50%가 그 상보성 가닥에 하이브리드되는 온도를 의미한다. 다음은 하이브리드화 조건의 예이고 이에 한정되지 않는다:
- <156> 매우 높은 극한도 (하이브리드화하는데 적어도 90% 동일성을 공유하는 서열을 허용한다)
- <157> 하이브리드화: 5 x SSC, 65°C에서 16시간 동안
- <158> 2번 세척: 2 x SSC, 실내 온도(RT)에서 각각 15분간
- <159> 2번 세척: 0.5 x SSC, 65°C에서 각각 20분간
- <160> 높은 극한도 (하이브리드화하는데 적어도 80% 동일성을 공유하는 서열을 허용한다)
- <161> 하이브리드화: 5 x -6 x SSC, 65~70°C에서 16~20시간 동안
- <162> 2번 세척: 2 x SSC, 실내 온도(RT)에서 각각 5~20분간
- <163> 2번 세척: 1 x SSC, 55~70°C에서 각각 30분간
- <164> 낮은 극한도 (하이브리드화하는데 적어도 50% 동일성을 공유하는 서열을 허용한다)
- <165> 하이브리드화: 6 x SSC, 실내 온도(RT)에서 16~20시간 동안
- <166> 2번 세척: 2 x -3 x SSC, 실내 온도(RT)~55°C에서 20~30분간

- <167> 일 실시예에서, 본 발명은 상기 설명된 핵산과 숙주 세포의 단백질 또는 폴리펩티드의 발현을 위해 필요한 관련 조절 서열(regulatory sequence)를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 상기 조절 서열은 프로모터(promoter), 종결 서열(termination sequence), 및 향상제(enhancer) 등을 포함한다.
- <168> 다른 실시예에서, 본 발명은 핵산 또는 상기 설명된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 상기 숙주 세포는 필요한 성장 조건 하에서 적절한 배지에 배양되었을 때, 원하는 폴리펩티드/단백질을 발현하는데 효과적인 방법으로 핵산 또는 벡터를 포함할 수 있도록 적절히 핵산주입되거나 형질변환된다. 상기 사용될 숙주 세포는 사용되기 위해서 벡터에 의해 핵산주입(transfection)되고 본 발명의 DNA를 발현하는 것이 가능하면, 특별히 국한(circumscribed)되지는 않는다. 예를 들어, 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) 등과 같은 박테리아, Saccharomyces cerevisiae 등의 효모(yeast), 및 COS 세포, CHO 세포 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 원핵 숙주 세포는 E. coli를 포함한다. 진핵 숙주 세포의 예로는 COS7, HeLa, 및 CHO 세포와 같은 조류, 곤충류, 식물 및 동물 세포들이 있다.
- <169> 변형된 또는 핵내주입된 세포를 배양함으로써 예를 들어, 융합 단백질, 항체 또는 항체 분절 등의 본 발명의 약제가 세포 내에 또는 배양 배지에서 생성된다. 다음으로, 생성된 항체(또는 항체 분절)를 수집함으로써 본 발명의 첫 번째 측면에 따른 약제를 생성할 수 있다. 생성된 항체 또는 단백질은 원심분리, 황산 암모늄 분할법(ammonium sulfate fractionation), 염석(salting out), 초미세여과법, 친화 크로마토그라피, 이온 교환 크로마토그라피, 또는 젠 여과 크로마토그라피 등의 방법을 적절히 배합하여 분리하고 정제할 수 있다.
- <170> 예를 들어, 상기 세포는 적절한 배지에서 배양할 수 있고, 사용된 배지는 항체의 소스(source)로 사용할 수 있다. 선택적으로, 항체를 생성하는 세포의 배양을 촉진하기 위해 매트릭스 코팅한 채널 또는 구슬 및 세포 합동 배양물(cocultures)을 추가할 수 있다. 항체를 대량생산하기 위해서는 일반적으로 복수(ascites fluid)를 생성하는 것이 더 편리하다. 복수를 생성하는 방법은 통상 하이브리도마 세포를 면역이 되지 않은 조직 적합성 및 면역반응을 하지 않는(immunotolerant) 포유 동물, 특히 쥐,에 주사하는 단계를 포함한다. 상기 포유동물은 복수(ascites) 생성을 위해 프리스탄(Pristane)과 같은 적절한 복합물을 미리 투여하여 준비될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 상기 Sambrooks et al. (1989)의 재조합 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 서열은 적절한 발현 벡터(프로모터와 같이 전사(transcription)하기 위한 조절 서열을 포함하는)로 복제할 수 있다. 상기 발현 벡터는 반대로 숙주 세포에 도입될 수 있다. 상기 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드가 단백질로 전사 및 번역되도록 적절한 환경에서 배양한다. 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄는 각각 생성하고 이황화물 결합 재배열로 배합한다. 또는, 본 발명의 항체의 각 사슬을 엔코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 갖는 벡터, 또는 2개의 사슬을 각각의 전사로 엔코딩하는 단수의 폴리뉴클레오티드를 갖는 벡터는 1개의 숙주 세포로 핵내주입하고 다음으로 전체 분자를 생성하고 조립할 수 있다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 분자의 일반 탄수화물 상보성 물질을 제공할 수 있는 상위의 진핵 세포이다. 이렇게 숙주 세포에서 생성된 융합 단백질 또는 항체는 기술분야의 표준 기술을 사용하여 정제한다.
- <171> 또 다른 실시예에 의하면, 도 1, 2, 3의 서열을 갖는 RAMP 단백질, 또는 극한 하이브리드 조건 하에서 상기 핵산 분자를 하이브리드 및 도 1, 2, 3의 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자의 발현의 레벨을 결정하는 에세이(assay)를 제공한다. 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- <172> i) RAMP 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자에 결합하는 결합 약제와 분리된 세포 샘플을 접촉하는 단계, 및
 - <173> ii) 상기 샘플의 상기 핵산 분자의 발현을 표준 샘플과 비교하는 단계
- <174> 상기 결합 약제는 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 도 1, 2, 3의 아미노산 서열의 상기 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 중에서 선택될 수 있다. 일 실시예에서, 에세이는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 포함한다.
- <175> 일 실시예에 의하면, 다음 단계를 포함하는, 대상에서 암을 판단하는 진단 에세이를 제공한다:
- <176> i) 분리된 세포 샘플을 제공하는 단계;
 - <177> ii) 도 1, 2, 3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자 또는 그 분절 및 변형, 또는 극한 하이브리드화 조건 하에서 상기 핵산 분자에 하이브리드 및 도 1, 2, 3의 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자와 결합하는 결합 약제와 상기 (i)의 샘플을 접촉시키는 단계; 및
 - <178> iii) 정상 매치된 대조 샘플에 비교했을 때 상기 샘플의 상기 핵산 분자의 발현을 결정하는 단계.
- <179> 바람직한 실시예에서, 상기 결합 약제는 올리고뉴클레오티드 프라이머이다. 바람직하게는 상기 에세이는 중합효

소 연쇄반응이다. 다른 바람직한 실시예에서 상기 결합 약제는 도 1, 2, 3의 아미노산 서열의 상기 폴리펩티드, 또는 적어도 하나의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 기준 아미노산 서열에서 변형되는 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 특이적으로 결합하는 항체이다.

<180> 본 발명의 다른 측면에서, 다음에서 선택된 핵산 분자로 엔코딩된 RAMP 단백질의 활성을 조절하는 약제를 스크리닝하는 방법을 제공한다:

a) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자;

b) 극한 하이브리드 조건 하에서 상기 (i)의 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자;

<183> 상기 방법은 테스트 복합물로 세포 표면에 RAMP 단백질을 발현하는 세포를 접촉하는 단계 및 상기 테스트 복합물의 RAMP 단백질의 활성을 조절하는 능력을 결정하는 단계를 포함한다.

<184> 본 발명은 또한 CRLR 기능을 조절하는 약제를 식별하기 위한 RAMP 단백질을 사용을 제공하는데 있어서, 상기 RAMP 단백질은 다음 그룹에서 선택된다:

i) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자로 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

<186> ii) 극한 조건 하에서 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드

<187> iii) (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 생성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드

<188> 본 발명은 다음 그룹에서 선택된 폴리펩티드와 CRLR 간의 상호작용을 조절하는 약제를 식별하는데 있어서 CRLR의 사용을 제공한다:

i) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자로 엔코딩된 폴리펩티드 또는 그 변형;

<190> ii) 극한 조건 하에서 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드

<191> iii) (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 생성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드.

<192> 일 측면에 의하면, 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 그 분절 및 변형을 엔코딩하는 핵산 분자에 특이적으로 반응하는 결합 약제 및 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 그 분절 또는 변형에 특이적으로 반응하는 약제를 포함하는 키트(kit)를 제공한다.

<193> 바람직한 실시예에서, 상기 키트는 올리고뉴클레오티드 또는 상기 핵산 분자 또는 상기 폴리펩티드에 특이적으로 반응하는 항체를 더 포함한다.

<194> 바람직하게는 상기 키트는 내열성의 DNA 중합효소(polymerase) 및 핵산의 증폭을 실행하기 위해 필요한 성분들을 포함한다. 바람직하게는 상기 키트는 상기 중합효소 연쇄반응을 실시하는 안내문과 대조군 핵산을 포함한다.

<195> 다른 바람직한 실시예에서 상기 키트는 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 그 분절 또는 변형에 특이적으로 반응하는 항체를 포함한다.

<196> 바람직하게는 상기 키트는 상기 폴리펩티드를 특이적으로 결합하는 제 1 항체와 특이적으로 반응하는 제 2 항체, 및 상기 제 2 항체와 상기 제 1 항체의 결합을 검출하기 위해 필요한 효소 시약 등의, 면역 에세이를 실시하는데 필요한 성분들을 포함한다.

<197> 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 다음 그룹에서 선택된 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드의 활성을 조절하는 약제를 스크리닝하는 방법을 제공한다:

a) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자;

<199> b) 극한 조건 하에서 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자;에 있어서 상기 방법은 다음을 포함한다

<200> i) 폴리펩티드, 또는 그 서열의 변형을 포함하는 제제 및 실험할 적어도 하나의 약제를 형성하는 단계;

<201> ii) 상기 폴리펩티드의 활성과 관련된 상기 약제의 활성을 결정하는 단계

<202> 도 4,5,6 및 도 7,8,9를 포함하여 RAMP 세포 외 도메인(ECDS)에 대응하는 아미노산 서열들은 RAMP와 CRLR 간의

연결을 조절하는 등의 CRLR 기능을 조절하는 분자의 구조를 기초로 한 설계(structure-based design)를 하기 위해 사용될 수 있다. 상기 "구조를 기초로 한 설계"는 또한 "래셔널 약물 설계(rational drug design)"라고도 한다. RAMP ECD들은 잘 알려져 있는 엑스레이 크리스탈로그라파(X-ray crystallography), 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance) 또는 상동성 모델링(homology modelling) 등의 방법으로 3차원 분석을 할 수 있다. 분자 모델링 소프트웨어 시스템에서 구조 정보로서의 사용도 본 발명에 포함된다. 이런 컴퓨터에 의한 모델링 및 약물 설계는 화학적 입체형태 분석, 분자의 정전기 전위(electrostatic potential), 단백질 폴딩(folding) 등의 정보를 사용할 수 있다. 본 발명의 한 방법에는 목표물의 예상 결합 부위를 위해 RAMP ECD의 3차원 구조를 분석하는 방법, 예상 반응 부위를 포함하는 새로운 분자를 합성하는 방법 및 상기 새로운 분자를 분석하는 방법을 포함할 수 있다.

<203> 본 발명의 바람직한 실시예에서 상기 약제는 대항제일 수 있다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 식별되는 약제는 항체, siRNA, 앱태머, 소 유기체 분자(예, 웨პ티드, 시클릭 웨პ티드), 및 여기 개시된 폴리웨პ티드의 주요 음성 변형(dominant negative variants) 등을 포함한다.

<204> 상기 설명과 같이, 본 발명은 여기 개시된 폴리웨პ티드에서 유도된 "주요 음성" 폴리웨პ티드를 제공한다. 주요 음성 폴리웨პ티드는 세포의 역학과 상호작용함으로써 활성 단백질을 그 작용에서 세포의 역학으로 치환하거나 활성 단백질과 경쟁하여 활성 단백질의 효과를 감소시키는 단백질의 비활성 변형이다. 예를 들어, 리간드를 결합하지만 리간드의 결합에 대응하여 신호를 발송하지 않는 주요 음성 수용체는 리간드의 발현의 생물적 효과를 감소시킬 수 있다. 이와 같이, 목표 단백질과 정상적으로 작용하고 목표 단백질을 인산화하지는 않는 주요 음성 촉매-비활성의 키나제(kinase)는 세포의 신호에 대응하여 목표 단백질의 인산화를 감소시킬 수 있다. 이와 유사하게, 다른 전사 요소(transcription factor) 또는 유전자의 조절 부위의 프로모터 부위와 결합하지만 유전자 전사를 증가시키지는 않는 주요 음성 전사 요소는, 전사를 증가시키지 않고 프로모터 결합 부위를 차지함으로써 정상 전사 요소의 효과를 감소시킬 수 있다.

<205> 본 발명에 따른 웨პ티드 약제의 아미노산 서열을 변형하여 목표 서열과 관련하여 웨პ티드의 결합 및/또는 안정성을 향상시킬 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 또한, 웨პ티드를 변형하여 웨პ티드의 생체 내 안정성을 향상시켜서 본 발명의 폴리웨პти드의 활성을 억제하기 위해 필요한 웨პ티드의 효과적인 양을 줄일 수 있다. 이것은 생체 내 조건에서 원치 않는 부작용을 감소시키는 장점이 있다. 이런 변형의 예로는 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등이 있다. 또한 바람직하게는, 상기 변형은 웨პ티드의 재조합 또는 합성 형태를 생산하는데 있어서 변형 아미노산을 사용하는 단계를 포함한다. 변형 아미노산은 예를 들어, 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, N⁶-acetyllysine, N⁶-methyllysine, N⁶,N⁶-dimethyllysine, N⁶,N⁶,N⁶-trimethyllysine, cyclohexyalanine, D-아미노산, ornithine 등을 포함하는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 기타 변형의 예는 F, Br I 등의 할로(halo), 히드록시 또는 C₁-C₄ alkoxy에서 선택된 1,2,3 치환기로 치환된 C₂, C₃, 또는 C₄ 일킬 R 그룹을 포함하는 아미노산을 포함한다. p53 결합 활동을 유지하는 웨პ티드들은 고리화(cyclisation)하여 변형할 수 있다는 것 역시 당업자에게 자명할 것이다. 이 기술분야의 고리화는 Scott et al. Chem Biol (2001), 8:801-815; Gellerman et al. J. Peptide Res (2001), 57:277-291; Dutta et al. J. Peptide Res (2000), 8:398-412; Ngoka and Gross J Amer Soc Mass Spec (1999), 10:360-363 등을 참조한다.

<206> 다른 측면에서, 본 발명은 CRLR 기능을 조절하는 약제를 식별하기 위해 폴리웨პ티드의 사용을 제공하는데 있어서, 상기 폴리웨პ티드는 다음 그룹에서 선택된다:

<207> i) 도 1,2, 또는 3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자에 의해 엔코딩된 폴리웨პ티드 또는 그 변형;

<208> ii) 극한 조건 하에서 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리웨პ티드; 및

<209> iii) (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리웨პ티드.

<210> 본 발명의 일 측면은 다음 그룹에서 선택된 폴리웨პ티드와 CRLR 간의 상호작용을 조절하는 약제를 식별하는데 있어서 CRLR의 사용을 제공한다:

<211> i) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 분자로 엔코딩된 폴리웨პ티드 또는 그 변형;

<212> ii) 극한 조건 하에서 상기 (i)에 정의된 핵산 분자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자에 의해 엔코딩되는 폴리웨პ티드

<213> iii) (i) 및 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드.

<214> 제약 방법, 사용 및 제품

<215> 본 발명의 다른 측면에서, 약품으로서의 사용을 위해 상기 설명된 약제를 제공한다. 또는 다른 측면에서 상기 설명된 약제를 포함하는 약품 제형제(pharmaceutical formulation)를 제공한다. 상기 제형제는 부형제, 희석제 또는 운반제 등의 적어도 하나의 추가적인 약품에 적절한 성분을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 제형제는 비경구 투여용이다. 특정 실시예에서는, 제형제는 RAMP-3 단백질에 결합하는 항체 등의 항체 생산물인 약제를 포함한다.

<216> 본 발명의 청구 범위는 실제로 본 발명의 약제를 포함하는지 여부와 상관없이, 그리고 치료용으로 효과가 있는 양의 약제를 포함하는지와 상관없이, 본 발명의 약제를 포함하거나 포함하는 것을 목적으로 하는 위조, 가짜 제품을 포함한다. 따라서, 청구의 범위는 본 발명의 종, 또는 약품 제형제를 포함한다고 표기하는 팩키지 및 그 종 또는 약품 제형제를 포함한다.

<217> 또 다른 측면에서 본 발명의 약제를 포함하는 약품 복합물(pharmaceutical composition)을 제공한다. 바람직한 실시예에서, 상기 약제는 항체, 구체적으로는 RAMP-3 단백질에 결합하는 항체이다.

<218> 도 4,5,6의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 또는 그 분절 또는 변형 폴리펩티드를 포함하는 복합물에 있어서, 상기 변형은 도 4,5,6의 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 첨가, 결손 또는 치환으로 인해 변형된 것이며, 상기 변형 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다.

<219> "도 4, 5, 6,의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 분절"이라 함은 예를 들어, 1에서 30 아미노산, 또는 10에서 30 아미노산, 등의 1에서 50 아미노산들을 포함한다. 도 4, 5, 6,의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 분절은 도 7,8,9의 아미노산 서열 또는 변형 폴리펩티드를 포함하는데 있어서, 상기 변형은 도 7,8,9의 아미노산 서열의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 첨가, 결손 또는 치환하여 변형된 것이고, 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다.

<220> 본 발명은 다음 그룹에서 선택된 핵산 분자를 포함하는 백신으로의 사용을 목적으로하는 약품 복합물을 포함한다:

<221> i) 도 4,5,6의 핵산 서열의 일부 또는 전부를 포함하는 핵산 분자;

<222> ii) 극한 조건 하에서 상기 (i)의 핵산 분자에 하이브리드되고 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자에 있어서, 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절하는 것.

<223> 본 발명은 도 4,7,8, 또는 9의 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 복합물을 또한 포함한다.

<224> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 복합물은 항원보강제(adjuvant) 및/또는 운반제를 포함한다.

<225> 항원보강제는 면역 세포의 활동을 조절하여 항원의 특이적 면역 반응을 촉진하는 물질 또는 그 과정을 말한다. 항원보강제의 예로는 프로인트트 애주번트(Freunds adjuvant), 무라밀 디펩ти드(muramyl dipeptides), 리포좀 등이 있다. 운반제는 제 2 분자와 결합했을 때, 제 2 분자의 면역 반응을 촉진하는 면역원성 분자이다. 일부 항원들은 자체적으로 면역원성이 아니면서 키홀립펫 해모시아닌(keyhole-limpet haemocyanin) 또는 테타누스 톡소이드(tetanus toxoid)와 같은 외부 단백질 분자와 관련되었을 때 항체 반응을 일으킬 수 있는 것이다. 이런 항원은 B-세포 에피토프를 포함하지만 T 세포 에피토프를 포함하지 않는다. 이런 접합체("운반체" 단백질)의 단백질 모이어티는 보조 T 세포를 촉진하는 T-세포 에피토프를 제공하는데, 이것은 다시 특정-항원 B-세포를 촉진하여 플라즈마 세포로 분화되어 항원에 대하여 항체를 형성한다. 보조 T 세포(helper T-cells)는 시토톡식(cytotoxic) T-세포 등의 기타 면역 세포를 자극할 수 있고, 운반제는 세포를 매개로 하는 면역 및 항체를 생성하는 유사체의 기능을 할 수 있다.

<226> 투여 시, 본 발명의 약품 복합물 및 제형제는 제약적으로 적합한 제제로 투여된다. 상기 제제는 제약적으로 적절한 농도의 염, 완충 약제, 보존제, 호환성 운반제, 항원보강제 및 시토카인 등의 보조 면역 증진 약제 및 기타 치료용 약제 {시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 시클로스포스파미드(cyclophosphamide), 멜팔란(melphalan), 카무슬린(carmustine), 메토트렉사트(methotrexate), 5-플로로라실(5-fluorouracil), 시타라빈(cytarabine), 메르캅토푸린(mercaptopurine), 다우노루비신(daunorubicin), 독소류비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 닉티노마이신(dactinomycin), 미토마이신 C(mitomycin C), 택솔(taxol), L-아스파라기나제(L-asparaginase), G-CSF, 에토포시드(etoposide), 콜

키신(colchicine), 데르페록사민 메실라트(derferoxamine mesylate), 및 캠토테신(camptothecin)} 등을 포함할 수 있다.

<227> 본 발명의 복합물 및 제형제는 주사 또는 단계적인 확산 등의 임의의 종래의 방법으로 투여할 수 있다. 투여는 경구, 정맥 내, 복막, 근육, 체강 내(intracavity), 폐하, 또는 경피 등으로 투여할 수 있다. 항체가 치료용으로 사용될 때의 구체적인 투여 방법 중에 하나는 폐 에어로졸(pulmonary aerosol)이다. 항체를 포함하는 에어로졸 투여 시스템을 준비하는 방법은 당업자에게 잘 알려진 기술이다. 일반적으로, 상기 시스템은 파라토프(paratope) 결합 능력 등과 같은 항체의 생물적 특성을 현저히 변형하지 않는 성분을 사용해야 한다 (예, Sciarra and Cutie, "Aerosols", in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp 1694-1712). 항체 에어로졸을 생성하는 여러 가지 매개변수와 조건은 별도의 실험 없이도 당업자가 결정할 수 있다.

<228> 본 발명의 복합물 및 제형제는 통상 효과적인 양만큼 투여한다. "효과적인 양"이란 원하는 반응을 얻을 수 있는 복합물의 양 또는 그 추가적인 도즈를 의미한다. 암과 같은 특정 질병을 치료하는 경우의 원하는 반응은 질병의 진행을 억제하는 것일 것이다. 이것은 일시적으로 질병의 진행을 늦추는 것일 수 있고, 더 바람직하게는 영구적으로 질병의 진행을 멈추게 하는 것이다. 이것은 통상의 방법 또는 본 발명의 진단 방법에 따라 모니터링할 수 있다.

<229> 대상에 투여하는 약제의 도즈는 여러 가지 매개변수, 특히 사용된 투여의 방법 및 대상의 상태에 따라 선택할 수 있다. 기타 요소는 원하는 치료 기간을 포함한다. 투여된 첫번째 도즈로 대상의 반응이 불충분할 경우, 환자가 수용할 수 있는 정도의 더 많은 양의 도즈 (더 세부적인 여러 전달 경로를 통해 효과가 있는 정도의 높은 도즈)를 투여한다.

<230> 일반적으로, 항체의 도즈는 이 분야의 표준 절차에 따라, 약 1ng에서 1mg 범위, 또는 더 바람직하게는 10ng에서 100 μg 범위로 제형되고 투여한다. 혁산 또는 그 변형을 투여할 때는 표준 절차에 따라 일반적으로 1ng에서 0.1mg의 도즈로 제형 및 투여한다. 도즈의 양, 주사 스케줄, 주사 부위, 투여 방법(예, 골격 내) 등 상기와 다른 요소를 포함하는 복합물 투여의 기타 다른 방법은 당업자가 인지하고 있을 것이다. 복합물을 사람 외 다른 포유동물(실험 목적 또는 수의 치료 목적으로)에 투여할 경우 본질적으로 상기와 같은 조건으로 실시한다. 여기 사용된 대상은 인간 외 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 쥐 등을 포함하고 바람직하게는 사람인 포유동물이다.

<231> 투여할 때, 본 발명의 약품용 제제 및 제형제는 약물로 적절한 양 및 제약적으로 적절한 복합물로 투여된다. "제약적으로 적절한(pharmaceutically acceptable)"의 의미는 활성 성분의 생물적 활동의 효과를 방해하지 않은 무독성의 물질을 뜻한다. 상기 제제는 통상 염(salts), 완충 약제, 보존제, 호환성 운반제, 및 기타 치료용 약제들을 포함할 수 있다. 약물로 사용할 경우, 염은 제약적으로 적절한 염이어야 하지만, 제약적으로 적절한 염을 만들기 위해서 제약적으로 적절하지 않은 염을 유용할 수도 있고 이것도 발명의 범위에서 제외되지 않는다. 상기 약리학적으로 또는 제약적으로 적절한 염은 다음의 산(acid)으로 만든 것을 포함하고 이에 한정되지 않는다: 염산(hydrochloric), 브롬화수소산(hydrobromic), 황산, 질산(nitric), 인산(phosphoric), 밀레산(maleic), 아세트산(acetic), 살리실산, 시트르산, 포름산, 말론산(malonic), 숙신산(succinic), 등. 또한, 제약적으로 적절한 염은 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염 등의 알칼리성 금속 또는 알칼리성 자연염(earth salts)으로 준비할 수 있다.

<232> 약제적 복합물 또는 제형제는 필요할 경우 제약적으로 적절한 운반제를 포함할 수 있다. "제약적으로 적절한 운반제"라 함은 인간에 투여하기에 적절한 하나 이상의 호환성 고체 또는 액체 필러, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. "운반제"는 투여하기 위해 활성 성분과 혼합되는 자연적 또는 합성의 유기체 또는 비유기체 성분을 의미한다. 제약 복합물의 성분들은 또한 원하는 약물의 효능을 본질적으로 방해하는 작용이 없는 범위에서 본 발명의 분자들과, 또는 서로 혼합될 수 있는 것들이다.

<233> 제약 복합물 및 제형제는 염과 혼합된 아세트산(acetic acid in a salt), 염과 혼합된 시트르산, 염과 혼합된 봉산, 및 염과 혼합된 인산을 포함하는 적절한 완충 약제를 포함할 수 있다. 또한 제약 복합물 및 제형제는 벤잘코늄 클로라이드(benzalkonium chloride), 클로로부타놀(chlorobutanol), 파라벤(parabens) 및 티메로살(thimerosal) 등을 포함할 수도 있다.

<234> 경구 투여에 적절한 복합물은 활성 복합물의 일정 양을 각각 포함하는 캡슐, 알약, 정제(lozenges) 등과 같은 선택된 단위로 제공할 수 있다. 기타 복합물은 시럽, 엘릭시르 또는 에멀전 등과 같은 수성 용액 또는 비수성

용액의 혼탁액을 포함한다.

- <235> 편리한 비경구 투여에 적절한 복합물은 바람직하게는 수신자의 혈액과 등장성(isotonic)인 항체 또는 혼탁액의 무균 수성 또는 비수성 제제를 포함한다. 상기 제제는 적절한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁용제를 사용하는 알려진 방법에 따라 제형한다. 상기 무균 주사용 제제는 1, 3-부탄 디올의 용액 등의 무독성 비경구로 적합한 희석제 또는 용매의 무균 주사용 용액 또는 혼탁액일 수 있다. 적용이 가능한 운반제 및 용매는 물, 렇거 용액, 및 등장성 염화나트륨 용액 등이 있다. 상기 목적을 위해 합성 모노 또는 다이글리세라이드(mono- 또는 di-glycerides)를 포함한 무자극성 고정유(bland fixed oil)를 사용할 수 있다. 또한 올레산 같은 지방산을 주사용 제제에 사용할 수 있다. 경구, 피하, 정맥 내, 근육 내 등의 투여에 적절한 운반제 제형은 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 을 참조한다.
- <236> 본 발명의 다른 측면은 약물(medicament)로 사용하기 위한 상기 정의된 약제 또는 복합물이다. 제약적으로 사용하기 바람직한 약제는 항체 또는 항체 분절 등의 항체 생성물이다. 특정 항체는 RAMP-3에 결합하는 항체 생성물이다. 구체적으로, 항체 생성물은 인간의 RAMP-3 단백질과 결합한다.
- <237> 본 발명의 일 측면에서는, 약제들은 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서는 본 발명에 따른 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하여, 대상에 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법에서는 상기 대상은 사람이다.
- <238> 본 발명의 "암(cancer)"이라는 용어는 자율로 성장하는 능력을 가진 세포들, 즉, 빠른 세포 성장을 배양하는 것을 특징으로 하는 비정상적인 상태 또는 조건을 지칭한다. 상기 용어는 침투성의 조직병리학적 종류 또는 단계와 상관없이, 모든 암성 성장 또는 종양 발생 과정, 전이성 조직 또는 악성 변이 세포, 조직, 또는 기관을 포함한다. "암"이라는 용어는 폐, 유방, 갑상선, 림프구, 소화기관, 및 비뇨생식관 등의 여러 기관 시스템의 악성 종양, 및 대부분의 결장암, 콩팥세포암종, 전립선암 및/또는 고환종양, 폐의 소세포 암종, 소장암 및 식도암 등의 악성종양을 포함하는 샘암종을 포함한다. "암종(carcinoma)"라는 용어는 이 분야에서 알려져 있고 상피 또는 호흡계 암종, 소화기관계 암종, 비뇨생식계통 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비샘 계통 암종 및 흑색종 등을 포함하는 내분비샘 조직의 악성종양 등을 지칭한다. 암종의 예는 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 머리 및 목, 결장 및 난소의 조직에서 형성되는 것을 포함한다.
- <239> "암종"의 용어는 또한 암종성(carcinomatous) 및 육종 조직으로 구성된 악성 종양을 포함하는 암육종(carcinosarcomas)을 포함한다. "샘암종(ademocarcinoma)"는 샘조직에서 비롯된 암종 또는 종양 세포들이 식별이 가능한 샘 구조를 형성하는 암종을 의미한다. "육종(sarcoma)"는 이 분야에 알려져 있고, 중간엽(mesenchymal)에서 비롯된 악성 종양을 지칭한다. 다른 종류의 암은 혈액암, 피부, 두개 내 및 뇌암 등을 포함한다.
- <240> 암 병리 생물학에서 AM의 특정 활동은 암세포 배양의 촉진, 면역 반응의 간접 억제, 혈관 생성 유도, 공격성 종양 표현형(phenotype)의 촉진 및 세포자멸사를 면하는 요소 등의 활동의 5가지 영역에 해당된다. 따라서, 본 발명에 따른 약제 또는 복합물은 예를 들어 혈관 생성 또는 암세포 배양을 억제하는 등을 통해서 암 질환을 치료, 치연 및/또는 예방하는데 유용할 수 있다.
- <241> 본 발명의 약제를 포함하는 약제 제형제는 화학요법제로서 혼합하거나, 차례로 또는 동시에 투여할 수 있다.
- <242> 일 측면에서 본 발명의 약제 및/또는 약제를 포함하는 복합물 또는 제형제는 골다공증을 치료하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 약제의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하여, 대상에 골다공증을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법에서 상기 대상은 사람으로 한다.
- <243> 또 다른 측면에서, 본 발명의 약제 및/또는 약제를 포함하는 복합물 또는 제형제는 비만의 레벨을 감소시키는 등의 치료를 위해 사용될 수 있다. 상기 약제는 비만 치료를 위한 약물 제조에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 상기 약제의 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하여, 대상의 비만을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 대상은 사람으로 한다.
- <244> 본 발명의 일 측면에서, 상기 약제를 당뇨성 혈관병증, 미세혈관병증 및 매크로혈관병증 등과 같은 혈관병증(angioopathy)를 치료 또는 완화하는 약물 제조에 사용하는 것을 포함한다. 본 발명은 대상에 본 발명의 약제를 투여하는 것을 포함하여 당뇨성 혈관병증 등과 같은 혈관병을 치료하는 방법을 포함한다.
- <245> 일 측면에서 본 발명의 약제 및/또는 약제를 포함하는 복합물 또는 제형제는 염증성 장애 및/또는 염증 반응을

치료하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 상기 약제의 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하여, 대상의 염증성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 대상은 사람으로 한다.

<246> 염증성 장애는 죽상동맥경화증, 류마티스 관절염, 골관절염, 통풍, 홍반루푸스, 공피증, 소그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 다발 및 피부근육염, 혈관염, 건염, 윤활막염, 박테리아성 심장내막염, 골수염, 건선, 폐렴, 섭유화 허파파리염(fibrosing alveolitis), 만성 기관지염, 기관지확장증, 폐공기증, 규폐증, 진폐증, 결핵, 궤양대장염, 크론병(Crohn's disease), 만성염증성 탈수초 다발성 근신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy), 만성염증성 탈수초 다발 신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 다발 경화증, 길랑바레 증후군(Guillain-Barre Syndrome) 및 중증근육무력증(myasthenia gravis), 유방염, 제엽염, 후두염, 만성 담낭염, 하시모토 갑상샘염 및 염증 유방 질환 등에서 선택될 수 있다. 일 실시예에서, 염증성 장애는 이식 후에 조직 또는 기관 거부 반응의 결과일 수 있다. 특정 실시예에서, 염증성 장애는 죽상동맥경화증, 류마티스 관절염, 골관절염, 폐혈증 및 다발관절염에서 선택될 수 있다.

<247> 실시예들에서, 환자는 혈전증, 심근경색증, 뇌졸중, 일파성허혈발작, 폐쇄말초혈관질환, 말초동맥의 폐쇄 및 죽상동맥경화증 등의 염증성 질환의 결과로 인한 합병증을 앓는 것으로 보이거나 앓거나, 앓을 위험이 있는 환자들이다.

<248> 본 발명은 또한 상기 약제를 죽상동맥경화성 장애(atherosclerotic disorder)의 부위 또는 의심되는 부위에 국소적으로 투여하는 것을 개시한다. 상기 투여는 파열 가능성 있는 죽상동맥경화성 플라그 등의 죽상동맥경화성 장애를 앓거나 앓는 것으로 의심되는 환자를 치료하는데 유용할 수 있다. 상기 투여는 도관을 통해서 투여한다.

<249> 본 발명의 약제는 심부전증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한 심부전증을 치료하는 약제 제조를 위해 상기 설명된 약제를 사용할 수 있다.

<250> 또 다른 본 발명의 측면에서, 상기 약제 및/또는 약제를 포함하는 복합물 또는 제형체는 폐혈증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 상기 약제는 폐혈증 치료용 약물 제조를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명의 대상에 약제의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하는 폐혈증 치료 방법을 제공한다. 바람직한 방법에서 상기 대상은 사람으로 한다.

<251> 본 발명의 일 실시예에서, 상기 약제는 상처 치유를 돋는데 유용할 수 있다. 본 발명의 일 측면에서, 대상에 본 발명에 따른 약제의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함한 상처 치료 방법을 제공한다. 바람직한 방법에서 상기 대상은 사람이다. 또한 상처 치료 약물을 제조하기 위해 상기 약제를 사용하는 것을 제공한다.

<252> 본 발명에서 사용된 "상처(wound)"를 치료하는 것은, 특히 창상(cut) 또는 화상 및 관련 증상 등과 같은 표피의 상처 등의 궤양 및 병변의 치료를 포함한다.

<253> 상기 "치료(treatment)"라 함은 치료 대상 개체 또는 세포의 자연적 경로를 변화하려는 시도의 임상적인 중재를 의미하고, 예방을 위해 또는 임상 병리학의 경로 중에 실시할 수 있다. 원하는 효과는 질병의 발병을 예방 또는 재발 방지, 증상의 완화, 직접 또는 간접적인 질병의 병리적 단계를 감소시킴, 질병의 질행 비율 완화, 질병 상태의 개선 및 완화, 또는 개선된 예후 등을 포함한다. 본 발명에서 사용된 "치료"라는 용어는 상기 지적된 질환/장애들을 치료 및 예방하는 것을 포함한다.

<254> 또한 다음을 포함하는 부분의 팩키지 또는 컷트를 제공한다:

<255> (1)본 발명에 설명된 약제; 와 함께

<256> (2) 상기 설명된 방법으로 약제를 사용하는 설명서

<257> 본 발명에 정의된 팩키지는 반복적인 도즈를 제공하기 위한 한 단위의 도즈(dosage) 이상을 포함한다. 한 단위의 도즈 이상을 포함할 경우, 각 단위들은 동등하거나, 활성 약제 복합물 및/또는 물리적 형태의 도즈의 측면에서 다를 수 있다.

<258> 본 명세서의 설명 및 청구항에서, "포함하는(comprise)" 및 "구성된(contain)" 등의 또는 그 변형된 형태의 용어들은 "포함하나 이에 한정되지 않는다"는 의미이고, 기타 모이어티, 첨가제, 성분, 정수(integer) 또는 단계 등을 제외하지 않는다.

<259> 본 명세서의 설명 및 청구항에서, 단수로 취급된 단어는 의미 상 단수로 쓰이지 않은 이상 복수를 포함한다. 특

히, 부정관사(indefinite article)가 사용된 경우, 다르게 정의되지 않은 경우, 명세서는 단수를 포함하여 복수도 포함하는 것으로 간주한다.

<260> 본 발명의 특정 측면, 실시예 또는 예와 관련하여 설명된 특징, 정수, 화합물, 화학적 모이어티 또는 그룹은 적용할 수 없는 경우를 제외하고는 기타 다른 측면, 실시예 또는 예에 적용이 가능한 것으로 간주한다.

실시예

<278> RAMP 세포 외 도메인(ECD) 단백질 생성

<279> RAMP의 ECD 부위는 Novagen Toyobo의 KOD Hot Start DNA Polymerase 커트와 고성능 PCR 반응을 사용하여 생성되었다. 주형 DNA(template DNA)는 구입한 인간 뇌 cDNA(Ambion)을 샘플에서 얻었다.

<280> 각 50 μl 반응에서, 다음은 실내 온도 또는 열음에서 0.5ml PCR 튜브에 들어있다:

<281> 27.5 μl PCR 그레이드 H₂O

<282> 2.5 μl DMSO

<283> 5 μl KOD Hot Start Polymerase를 위한 10 X PCR 버퍼

<284> 5 μl dNTPs (최종 농도 0.2mM)

<285> 2 μl MgSO₄ (최종 농도 1mM)

<286> 1 μl 주형 DNA

<287> 3 μl 5' 프라이머 (5pmol/ μl, 최종 농도 0.3 μM)

<288> 3 μl 3' 프라이머 (5pmol/ μl, 최종 농도 0.3 μM)

<289> 1 μl KOD Hot Start Polymerase (1 U/ μl)

<290> 50 μl 총 부uffer

<291> 다음 프라이머를 사용하여 RAMP ECD 전체보다 큰 부위를 분리하기 위하여 상기 반응은 첫 번째 반응을 실시할 때 2회에 걸쳐 실시한다:

<292> RAMP1

<293> 순 방향(Forward)

<294> CGAGCGGACTCGACTCGGCAC

<295> 역 방향(Reverse)

<296> CTTCCTAGGGTGGCGGTGGCC

<297> RAMP2

<298> 순 방향

<299> GTC CGC CTC CTC CTT CT GCT

<300> 역 방향

<301> AAG TGG AGT AAC ATG GTT ATT GT

<302> RAMP3

<303> 순 방향

<304> AGC CAT GGA GAC TGG AGC GCT GC

<305> 역 방향

<306> GTG GCC CAG TAG CTG GAG ATT GGC

<307> 벤치 탑 원심분리기와 QIAGEN QiAquick PCR 정제 키트를 사용하여 상기 반응을 정제했다.

<308> 제 2 PCR 반응은 상기 프라이머를 사용하여 상기 반응의 생성물을 사용한다. 하기 프라이머를 사용하는데, 하기 프라이머들은 EcoR1 및BamH1 억제 부위를 포함했다:

RAMP1

Forward

GCGAATTCTGCCAGACCACAG

Reverse

GTGGATCCTACCGGGCCGGGACA

RAMP2

Forward

GCG AAT TCA ATC CCC ACG AGG CCC TGG CTC AGC C

Reverse

CAG GAT CCTACA AGA GTG ATG AGG AAG GGG ATG

RAMP3

Forward

CAG AATT TCC AGA GCA GGC CGC TGC AAC CAG ACA G

Reverse

GTG GAT CCC ACC ACC AGG CCA GCC ATG GCG ACA GT

<309>

<310> 상기 반응의 샘플들은 벤치 탑 원심분리기와 QIAGEN QiAquick PCR 정제 키트를 사용하여 상기 반응을 정제했다.

<311> 먼저, 생성물의 크기를 판별하기 위해서는 1.5% 브롬산 에티디움(ethidium bromide)을 포함하는 1.5% 아가로즈 젤에, 200V로 30분 동안 담근다. 상기 생성물은 시중의 Sigma사의 표준 표지(standard marker)와 비교한다.

<312> 최종적으로 제품을 테스트하기 위해 생성물의 유전자 서열을 실시한다.

<313> 이후에, ECD 단백질은 다르게 정의되지 않는 이상 "삽입물(the insert)"이라고 지칭한다.

삽입물 및 벡터의 제제

1. 제한 (Restriction)

<316> (하기 수량은 DNA 농도 1 μ g를 기초로 한다)

<317> 상기 제한 반응은 다음 프로토콜을 사용하여 삽입물 및 벡터(pGEX-6P1)에 수행한다.

1μl	DNA
2μl	10xBufferE
2μl	10XBSA
1μl	BamH-1
1μl	EcoR-1
13μl	DNase free H ₂ O
20μl	Total Volume

<318>

<319> 상기 반응은 1시간 또는 하루 동안 16°C에서 배양(incubate)한다.

<320> 상기 반응의 샘플들은 벤치 탑 원심분리기와 QIAGEN QiAquick PCR 정제 컷트를 사용하여 상기 반응을 정제했다.

2. 벡터 탈인산화(Vector Dephosphorylation)

하기 수량은 DNA 농도 1 μg를 기초로 한다.

1μl	DNA
1μl	10xAntarctic Phosphatase Reaction Buffer
1μl	Antarctic Phosphatase
7μl	DNase free H₂O

<323>

10μl	Total Volume
-------------	---------------------

<324>

<325> 1시간 동안 37°C에서 배양(incubate)한다.

<326>

3. 결찰 (Ligation; 플라스미드 + 삽입물)

하기 수량은 DNA 농도 1 μg를 기초로 한다.

1 μl	Vector
1 μl	Insert DNA
5 μl	x2 Ligation Buffer
1 μl	T4 Ligase
2 μl	DNase free H ₂ O
10 μl	Total Volume

<329>

<330> 하루 동안 16°C에서 배양한다.

전환 (Transformation)

<332>

다음 단계들에서 상기 결찰 반응에서의 총 부피가 사용되었다:

10μl	DNA
10 μl	X10 Transformation Buffer
100 μl	E-Coli (TOP10) competent cells
70 μl	DNase free H ₂ O
200 μl	Total Volume

<333>

<334> X 10 전환 버퍼. (300mM MgCl₂, 100mM CaCl₂)

6.5ml	Distilled water
0.5ml	2M CaCl ₂
3.0ml	1M MgCl ₂
10ml	Total Volume

<335>

<336> 1. 열음 위에 20분간 배치한다.

<337> 2. 실내 온도에서 10분 간 배치한다.

<338> 3. LB Broth Base 1ml를 추가한다 (LENNOX L Broth Base)

<339> 4. 1시간 동안 37°C에서 배양한다.

<340> 5. 10 μg/ml 앰피실린(Ampicillin)을 포함하는 LB 우무 플레이트 위에 샘플을 넓게 펴 배치한다.

<341> 6. 하루 동안 37°C로 배양(incubate)한다.

컬쳐(Culture)

<343> 플레이트의 집락들(colonies)을 제거하여 10 μg/ml 앰피실린을 포함하는 5ml LB Broth Base (LENNOX L Broth Base)에 배치하고, 37°C로 하루 동안 교반되는 인큐베이터에 배치한다.

<344> 상기 컬쳐는 탁상용 원심분리기와 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) 표준 프로토콜을 사용하여 세척한다.

<345> 변형이 효율적으로 이루어진 것을 확인하기 위해, 플라즈미드의 샘플에 유전자 서열화를 수행한다.

단백질 발현

<347> 단백질 발현에 다음 프로토콜을 수행하였다:

<348> 전환

1μl	DNA (1~10ng)
10 μl	X10 Transformation Buffer
100 μl	E-Coli (BL21) Competent cells
89 μl	Distilled H ₂ O
200 μl	Total Volume

<349>

<350> 1. 열음 위에 20분간 배치한다.

<351> 2. 실내 온도에서 10분 간 배치한다.

<352> 3. LB Broth Base 1ml를 추가한다 (LENNOX L Broth Base)

<353> 4. 1시간 동안 37°C에서 배양한다.

<354> 5. 10 μg/ml 앰피실린(Ampicillin)을 포함하는 LB 우무 플레이트 위에 샘플을 넓게 펴 배치한다.

<355> 하루 동안 37°C로 배양(incubate)한다.

<356> 세포를 배양하기 위해 다음 프로토콜을 사용했다:

컬쳐(Culture)

<358> 5ml 2 x YTA 매개체에 집락들을 배치한다 (10 μg/ml 앰피실린).

<359> 2 x YTA 매개체

<360> 16g 트립تون(Tryptone)

<361> 10g 효모 추출물

<362> 5g 염화나트륨

<363> 900ml 증류수

<364> pH7은 NaOH로 조절한다. 총 부피는 1L의 증류수로 조절하고 가압증기멸균(autoclaving)으로 멸균한다. 앰피실린 농도 10 µg/ml을 추가한다. 다음 프로토콜 단계를 수행했다:

1. 교반 인큐베이터에 2시간 동안 37°C로 배양(incubate)한다.

2. 상기 컬쳐에 150 µl 100mM IPTG를 추가한다.

3. 추가적으로 4-8시간 동안 37°C의 교반 인큐베이터에 배양한다.

단백질 추출

<369> 단백질은 Bug Buster 단백질 추출 시약(Novagen)과 표준 프로토콜을 사용하여 추출했다. 이것은 단백질 분해효소 억제제를 추가하는 단계를 더 포함한다. 용해 가능 및 용해불능 부분을 나누고 분석했다.

단백질의 입체 형태(Conformation of Protein)

<371> 이 과정은 항-GST 항체(Amersham Biosciences)를 사용하여 웨스턴 블로팅으로 수행했다. 상기 웨스턴 블로팅은 항-GST 항체 프로토콜에 개시된대로 수행했다.

단백질 정제

<373> 대량의 단백질 생산은 2L의 컬쳐로 수행한다.

<374> 상기 단백질은 글루타온 S-트랜스퍼라제(GST) 유전자 융합 시스템을 사용하여 정제했다. GST는 E-coli에서 효소의 최대 활동에서 발현될 수 있는 Mr 26,000에서 자연적으로 발생한다. GST 융합 단백질은 고정 글루타티온을 사용하여 친화력 크로마토그라피로 박테리아 용해질에서 정제한다. GST 융합 단백질은 친화 매개체로 포획하고, 불순물은 세척하여 제거한다. 융합 단백질은 변성되지 않는 순화된 조건 하에서 환원 글루타티온을 사용하여 세척한다. 샘플들을 정제하기 위해서 GSTrap HP 5ml 컬럼(Amersham Biosciences)을 사용했다.

<375> 상기 정제 방법은 부분적인 정제의 과정을 보조적으로 사용할 수 있다. 단백질이 정제되면 펩티드의 접합 형태를 단클론성 항체를 형성하는데 사용한다. 나머지 단백질 용액에 GST 태그를 제거하기 위해 특정 단백분해효소를 추가한다.

ECD 단백질의 기능 테스트

<377> 다양한 RAMP 세포의 표현형을 생성하기 위해 MG63 인간의 조골세포(osteoblast)와 유사한 세포를 만든다:

<378> - RAMP 1, 2, 및 3 음성 세포(negative cells), CRLR 양성 세포 (라인 1).

<379> - RAMP 2 및 3 음성 세포, RAMP 1 및 CRLR 양성 세포 (라인 2).

<380> - RAMP 1 및 3 음성 세포, RAMP 2 및 CRLR 양성 세포 (라인 3).

<381> - RAMP 1 및 2 음성 세포, RAMP 3 및 CRLR 양성 세포 (라인 4).

<382> RAMP1: TGGCCATCACCTCTTCATGA (Qiagen)

<383> CTGGCTGCTCTGGCCCATCA (Qiagen)

<384> TCCTGGCCCCATCACCTCTTCA (Qiagen)

<385> RAMP1 유전자의 특징으로 인해 하나의 siRNA로는 결론을 도출하기 어려우므로 여러 개의 siRNA를 테스트한다.

<386> RAMP2: CUAUGAGACAGCUGUCAA (MWG)

<387> RAMP3: GUUCUUCUCCAACUGCACC (MWG)

<388> siRNA의 핵내주입은 핸드북에 개시된 것처럼 HiPerFect Transfection Kit (Qiagen) 표준 프로토콜을 사용하여 수행한다.

기능 테스트 1

<389> 제 1 실험은 ECD 분절들이 RAMP 나이브 세포(naive cell)에 RAMP 표현형을 발생시킬 수 있는지 결정하기 위해 수행한다 (라인 1).

<390> - 고체, 검은 색 96-웰 마이크로플레이트 (코닝)에 담긴 컬쳐 ($50 \mu\text{l}$ 부피)와 10^4 에서 10^6 사이의 세포/ mL 의 세포 농도

- 37°C 에서 하루 동안 배양하고 (5% CO_2 및 95% 습도) 세포 컬쳐 매개물을 흡인한다.

<391> - $50 \mu\text{l}$ 부피의 ECD 또는 PBS에서 만들어지고 5분간 노출된 작용제(agonist)를 추가한다.

<392> ° 효과적인 농도를 결정하기 위해서 ECD의 도즈 반응(dose responses)를 실시한다.

<393> ° 작용제에서 반응을 유발할 수 있는지 확인하기 위해 작용제(아드레노메톨린 AM, 웨티드 GGRP와 관련된 칼시토닌 유전자)의 도즈 반응을 실시한다.

<394> - ECD와 작용제를 둘 다 또는 각각 추가할 때, cAMP Fluorescence Polarization (FP) Biotrak Immunoassay (Amersham Biosciences)를 사용하여 cAMP 반응을 측정한다.

<395> - ECD의 도즈와 그에 대응하는 작용제를 혼합하여(예, RAMP1 및 CGRP) 적용하고 제 2 메신저 (messenger)를 측정한다(위와 같이).

기능 테스트 2

<396> 이 실험은 예를 들어, RAMP1 타입의 세포를 RAMP2 타입의 세포로 변환하는 등과 같이(라인 2,3, 및 4), RAMP ECD가 이미 정의된(predetermined) RAMP 세포의 표현형을 재정의(redefine)하는 능력을 측정한다.

<397> - RAMP와 관련된 리간드를 사용하여 도즈 반응 커브를 수행한다. 제 2 메신저 반응을 측정한다. EC_{50} 농도가 결정된다.

<398> - ECD 도즈 반응 커브는 해당 리간드의 EC_{50} 농도의 존재 하에 생성된다. 제 2 메신저 반응을 측정한다.

<399> - 상기 리간드에 반응하여 제 2 메신저가 감소를 보이면, ECD에 해당하는 리간드를 적용하고 제 2 메신저 반응을 측정한다.

<400> 상기 두 가지 실험들은 ECD 부위가 생물적 활동을 갖는지 결정하는데 도움이 될 것이다.

항체 생성

<401> ECD 웨티드가 위 설명과 같이 발현되고 정제된다. 항체들은 다음 프로토콜을 따라서 생성한다.

생쥐와 쥐 면역 프로토콜

<402> RAMP-3의 세포 외 도메인에 대해 항체를 생성하기 위해 다음 면역 프로토콜을 따라 수행했다:

<403> 면역 반응 이전에 생쥐들에서 예비 면역 세럼(pre-immune serum)을 채취한다. 4마리의 생쥐에 RAMP-3의 세포 외 도메인에 대응하는 웨티드를 주사한다:

10 20 30 40 50 60

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDWKWCNL~~S~~ EFTVYYESFT NCTEMEANVV

70 80 90 99

GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEVL (see also Figure 6)

<404> 후에 약 한 달 간격으로 4회를 더 주사한다. 생쥐의 혈액 샘플은 다클론 항체를 포함하는 세럼을 분리하기 위해 채취한다.

<405> 사용된 항원보강제는 프로인트(Freunds)이다 (첫 번째 주사에서 완전(complete)한 형태, 다음 과정에서

는 불완전(incomplete)한 형태로).

<412> 보통 항원 및 항원보강제는 주사하기 직전에 혼합한다. 이상적으로는, 과정을 완성하기 위해서 처음에 충분한 항원을 공급해야 한다. 그러나, 항상 필요한 것을 아니다. 혼합 과정에서 20%의 항원이 손실될 수 있다.

<413> 쥐에 주사할 수 있는 전체 부피는 0.2ml이다 (생쥐는 0.1ml 이하). 상기의 절반은 항원이고 절반은 항원보강제이므로 최대 0.1ml 또는 0.05ml의 필요한 주사액의 밀리그램를 제공하기 위한 충분한 농도의 항원이 필요하다.

<414> 다음 프로토콜도 참조에 활용한다:

토끼의 면역 프로토콜.

<416> 필요 시 예비 면역 세럼을 채취한다. 통상 토끼들은 4주 간격으로 주사한다. 주사 간격은 2주 이상 8주 이하로 한다. 전체적으로 최대 5회의 주사를 할 수 있고, 상기 과정은 6개월 이내에 완성하는 것이 이상적이다. 혈액 샘플은 3회 주사 후에 면역 상태를 확인하기 위해 채취한다.

<417> 과정 말기에 일반적으로 상기 토끼들을 회생시키고 세럼을 얻기 위해 혈액을 제거한다. 또는, 상기 동물들의 혈액을 최대한 채취하고 방출시킨다. 가장 일반적인 항원보강제는 프로인트이다 (첫 번째 주사에서 완전(complete)한 형태, 다음 과정에서는 불완전(incomplete)한 형태로). 필요 시 대신에 자극이 덜한 항원보강제를 사용하거나 또는 사용하지 않을 수 있다.

<418> 항원 및 항원보강제는 통상 주사 직전에 혼합한다. 과정의 초기에 적어도 4회의 주사(바람직하게는 5회)의 충분한 항원을 공급해야 한다. 혼합 과정에서 20%의 항원이 손실될 수 있다. 보통 각 회당 각 동물에 0.5ml 이하의 총 부피를 주사한다. 이것의 절반은 항원이고 절반은 항원보강제이다. 따라서, 최대 0.25ml의 주사에 필요한 밀리그램을 제공하기 위한 충분한 농도의 항원이 필요하다.

웨스턴 블로트 프로토콜

<420> 항체의 웨스턴 블로트는 도 6의 크기 마커(size marker)로 중복된 줄로 되어 있는 원래의 ECD 펩티드의 블로트(blot)를 탐침(probe)하기 위해 사용되었다. 항체 1 및 2는 약 14KDa의 크기에서 단백질 랜드에 명확한 결합을 보여준다. 항체 3은 같은 크기에서 매우 강한 결합을 나타냈고, AB4는 이 실험에서 검출되지 않아있다.

단백질 제제 {단백질 추출 수율에 기초함(Bradford Assay에 의한)}

<422> 사용된 단백질은 RAMP ECD였다. 10 μl의 Laemlli 버퍼를 마이크로 튜브에 추가했다. DTT를 추가했다 (총 부피의 5%). 단백질의 100-150 μg를 포함하는 단백질 샘플 부피를 다른 시약과 함께 튜브에 추가했다. 상기 마이크로 튜브는 2분간 70°C로 가열한 후, 얼음 위에 두었다.

분리

<424> 15%의 아크릴아미드 겔(Acrylamide gels)를 사용했다.

<425> 다음 조제에 따라 버퍼 용액이 생성되었다:

버퍼 용액:

<427> - 트리스 베이스(Tris Base) 60.55

<428> - 글리신 288.27g

<429> - SDS 20 gdH2O - 2리터 이하로 완전한 상태(complete)

<430>

<431> 상기 겔은 탱크 내의 전극 하우스(electrode house place)에 배치하고 버퍼 용액에 잠기게 한다. 상기 겔은 20분 간 그대로 둔다. 상기 샘플은 줄을 세워 배치하고 40분간 200v 상태로 둔다.

전달(Transfer)

<433> 약 7 x 20cm의 필터 종이(일반 크로마토그라피 종이)와 vPVDF 막을 7 x 20cm 조각으로 자른다. 상기 PVDF 막은 10초간 100% 메탄올을 사용하여 미리 적셔두고 dH2O에 담근다. 필터 종이들을 다음을 포함하는 전달 버퍼에 적신다:

<434> 전달 버퍼(Transfer buffer)

<435> -트리스 베이스 12.11g

<436> -글리신 57.65g

<437> -메탄올 - 100ml

<438> -dH₂O - 4리터 이하로 완전한 상태

<439> 상기 과정으로 된 막은 컷트의 설명서에 따라 배치한다. 상기 과정은 전달 혼합물에 배치하고 전달 탱크를 전달 버퍼로 채운다.

<440> 냉각 블록을 20°C에서 보관한 곳에서 제거하고, 전달 장치에 배치한다. 상기 젤은 1시간 동안 100V로 전류가 흐르게 둔다.

<441> PDVF를 탐침(probing)하는 법

<442> 블로트들은 5% 우유에 1시간 동안 차단(block)해 둔다. 항-RAMP-3 ECD 항체들은 1:100 5% 우유에서 회색하고 하루 동안 블로트와 함께 배양한다. 그 후 PBS 5% Tween-20 3x5 min.에 세척한다. 5% 우유에 1:1000로 회색한 제 2 항체 HRP 항-생쥐를 추가하고 1 시간 동안 배양(incubate)한다. PBS 5% Tween-20 3x5min에 세척한 후 물 3x5 min에 더 세척한다.

<443> 블로트를 이미지화 하기 위해서, ECL 용액을 블로트에 추가하고 양면에 완전히 젖도록 한다 (Santa Cruz의 ECL). 상기 블로트들은 Amersham Biosciences의 사진 필름을 사용하여 나타낸다.

<444> 항체 차단 전위(Antibody blocking potential).

<445> 항체들의 결합 능력을 테스트하기 위해 RAMP 애세이를 수행하여 항체의 차단 전위를 결정한다:

<446> - 인간 MG63 골육종 세포에 10pmol의 AM을 추가하고 cAMP 반응을 측정했다 (상기 설명된 cAMP Fluorescence Polarization(FP) Biotrak Immunoassay (Amersham Biosciences) 등의 방법을 사용한다). (RAMP-1 약제를 테스트할 경우, 상기 애세이는 약제의 차단 능력을 테스트하기 위해서 CGRP를 리간드로 사용하여 실시 할 수 있다).

<447> - 상기 세포들은 항체로 1시간 동안 미리 처리한다.

<448> - AM의 EC₅₀ 도즈를 적용하고 (10pmol) cAMP 반응을 측정한다.

<449> 다클론성(pyclonals)의 인간 MG63 골육종 세포에서 시클릭 AMP를 증가시키는 아드레노메틸린의 효과를 조절하는 능력을 측정하기 위해서 사용되었다. 모든 테스트된 다클론 항체들은 cAMP 생성에 있어서 아드레노메틸린의 효과를 감소시켰다. 상기 도 12의 결과는 RAMP-3에 대해 생성된 다클론 항체들이 MG63 세포의 cAMP 생성을 약 15% 정도 억제하는 것을 나타낸다.

<450> 단클론 항체의 생성

<451> 항체 4가 가장 높은 억제율을 보였지만, 웨스턴 블로트에는 나타나지 않고 낮은 회색에서 AB3의 결합 커브가 훨씬 강한 것으로 나타났기 때문에, 단클론 항체들은 3번쩨 생쥐를 사용하여 생성되었다. 단클론 항체를 생성하기 위해 사용된 방법은 본 발명에 인용된 Kohler and Milstein in Nature 256, 495-597 (1975) 및 Donallard and Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" in Compendium of Immunology V.II ed. by Schwartz, 1981, 를 참조한다.

<452> 클론들의 스크리닝을 수행했고, 웹티드의 GST 태그에 결합하지 않는 것을 기초로 약 1000 클론에서, 576을 선택했다. 상기 클론들 중에서 ELISA 데이터를 얻었고 가장 양호한 5개를 다음 실험을 위해 선택했다.

<453> 항체 기능

<454> AM 기능에 있어서 상기 5개의 단클론 항체들의 영향을 테스트했다. SW-13 세포들의 증식/생존율은 MTT 애세이(애세이의 상세한 내용은 www.lgcpronochem-atcc.com 참조)를 사용하여 결정했다. 다음 프로토콜을 사용했다:

<455> 걸쳐 매개체

- <456> -DMEM
- <457> -20% FCS
- <458> -5% 항생제/유사분열(mitotic)
- <459> -5% 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)
- <460> 상기 세포들은 각 웰(well)의 $50\ \mu l$ 의 매체를 사용하여 96 웰 플레이트의 1×10^6 에서 플레이트 되었다. 상기 방법에서 SW-13 세포(인간 부신 피질 샘암종 세포 라인)을 사용했다. 상기 항체들은 각 웰에 1:50 회석으로 처리했고 하루 동안 배양했다.
- <461> $10\ \mu l$ 의 MTT 시약(Reagent)를 각 웰에 추가하고 보라색의 침전물이 보일 때까지 약 2시간에서 4시간 동안 배양했다. 세포들을 용해하고 침전물을 용해하기 위하여 $100\ \mu l$ 의 세제 시약(Detergent Reagent)를 추가한 후 2시간 동안 암실에서 실내 온도로 둔다. 흡수율은 ELISA 플레이트 측정기를 사용하여 570nm로 기록되었다.
- <462> 각기 생성된 단클론 항체는 12 ~ 45% 사이로 중식의 억제를 유도했다. 도 13을 참조한다 (상기 1:50의 농도는 웰 최종 농도 당 약 5 나노그램이다).
- <463> 또한 본 발명은 다음 사항의 내용이 포함된다:
- <464> 1. 칼시토닌 수용체와 유사한 수용체(CRLR)의 기능에 폴리펩티드가 미치는 영향을 조절하는 약제에 있어서, 상기 폴리펩티드는 다음으로 구성된 그룹에서 선택된다:
- <465> i) 도 1, 2, 3에서와 같은 핵산 서열로 구성된 핵산 분자로 엔코드 된(encoded) 폴리펩티드 또는 그 변형 종류;
 - <466> ii) 상기 i)의 핵산 분자에 극한 조건(stringent condition) 하에 결합(hybridise)하고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 분자로 엔코드된 폴리펩티드; 및
- <467> iii) 상기 i) 및 ii)의 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드에 있어서, 상기 약제는 약물로 사용하는 것을 특징으로 한다.
- <468> 2. 상기 단락 1에 있어서, 상기 약제는 대항제(antagonist)인 약제.
 - <469> 3. 상기 단락 1에 있어서, 상기 약제는 작용제(agonist)인 약제.
 - <470> 4. 상기 단락 1에 있어서, 상기 약제는 폴리펩티드인 약제.
 - <471> 5. 상기 단락 1에 있어서, 상기 폴리펩티드는 도 4,5,6의 핵산 서열을 포함하거나, 또는 그 분절 또는 그 변형인 약제.
 - <472> 6. 상기 단락 5에 있어서, 도 4,5,6의 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩티드의 분절은 도 4,5,6의 핵산 서열의 N-터미널에서 1에서 30 아미노산을 포함하는 약제.
 - <473> 7. 상기 단락 5에 있어서, 도 4,5,6의 아미노산 서열을 포함하는 상기 폴리펩티드의 분절은 도 7,8,9에 서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 분절을 포함하는 약제.
 - <474> 8. 상기 단락 5에 있어서, 상기 약제는 검출이 가능한 표지(detectable marker)를 포함하는 약제.
 - <475> 9. 상기 단락 1에 있어서, 상기 약제는 항체이거나 항체의 활성 결합 부분인 약제.
 - <476> 10. 상기 단락 9에 있어서, 상기 항체는 단클론 항체이거나 그 활성 결합 부분인 약제.
 - <477> 11. 상기 단락 9에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체(chimeric antibody)인 약제.
 - <478> 12. 상기 단락 9에 있어서, 상기 항체는 상기 항체의 가변 부위와 인간 항체의 불변 부위를 포함하도록 재합성 방법으로 생성된 인간적응된 항체(humanised antibody)인 약제.
 - <479> 13. 상기 단락 9에 있어서, 상기 항체는 항체 분절인 약제.
 - <480> 14. 상기 단락 13에 있어서, 상기 항체 분절은 단쇄 항체 가변 부위 분절인 약제.
 - <481> 15. 상기 단락 9에서 14에 있어서, 상기 항체는 검출 가능한 표지를 포함하는 약제.
 - <482> 16. 상기 단락 9에서 14에 있어서, 상기 항체, 또는 항체 분절은 화학요법의 약제(chemotherapeutic

agent)와 연결되거나 교차결합(crosslinked)된 약제.

<483> 17. 상기 단락 1에 있어서, 상기 약제는 핵산 분자인 약제.

<484> 18. 상기 단락 17에 있어서, 상기 핵산은 안티센스 핵산, 앱태머 또는 소 간섭(small interfering) RNA인 약제.

<485> 19. 상기 어느 항의 약제를 포함하고 항원보강제 또는 약제적으로 적절한 운반체를 포함하고, 백신으로 사용할 목적의 약제 복합물.

<486> 20. 다음에서 선택된 핵산 분자를 포함하는 약제 복합물:

<487> i) 도 4,5,6의 핵산 서열 모두 또는 일부를 포함하는 핵산 분자;

<488> ii) 상기 (i)의 핵산 분자에 극한 하이브리드 조건 하에서 하이브리드되고 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자에 있어서, 상기 폴리펩티드는 CRLR 기능을 조절한다.

<489> 21. 상기 단락 20에 있어서, 상기 핵산 분자는 도 4,7,8,9의 핵산 서열을 포함하는 복합물.

<490> 22. 단락 11의 키메라 또는 단락 12의 인간화 항체의 발현에 맞게 순응된 벡터.

<491> 23. 단락 22의 벡터로 형질변환되고 핵산주입된 세포.

<492> 24. 단락 11의 키메라 항체 또는 단락 12의 인간적응된 항체의 생성을 위한 다음을 포함하는 방법:

<493> iii) 인간화 또는 키메라 항체를 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 세포 변형 또는 핵내주입된 벡터를 제공하는 단계;

<494> iv) 상기 항체를 생산을 돋는 환경에서 상기 세포를 성장시키는 단계; 및

<495> v) 상기 세포에서 또는 그 성장 조건으로부터 상기 항체를 정제하는 단계

<496> 25. 단락 10의 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인.

<497> 26. 단락 25의 하이브리도마 세포를 사용하여 단락 25의 단클론 항체를 생성하는 방법.

<498> 27. 다음 단계를 포함하는 단락 10의 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포 라인을 준비하는 방법:

<499> i) 도 4,5,6의 아미노산 서열을 포함하고 또는 그 분절 또는 변형을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함하는 면역원(immunogen)으로 면역적격(immunocompetent)의 포유동물로 면역시키는 단계;

<500> ii) 하이브리도마 세포들을 형성하기 위하여, 면역된 면역적격의 포유동물의 럼프구를 골수종 세포(myeoloma cells)와 융합시키는 단계;

<501> iii) 상기 (i)의 폴리펩티드에, 단계(ii)의 하이브리도마 세포가 결합하는 활동에 의해 생성된 단클론 항체를 스크리닝하는 단계;

<502> iv) 하이브리도마 세포들이 증식되고 및/또는 상기 단클론 항체를 분비하도록 하이브리도마 세포들을 배양하는 단계; 및

<503> v) 컬쳐 상청액(culture supernatant)에서 단클론 항체를 회복하는 단계.

<504> 28. 상기 단락 27의 방법에 있어서, 상기 (i)의 폴리펩티드는 도 7,8,9에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 방법.

<505> 29. 환자에서 암을 진단하는데 있어서, 다음 단계를 포함하는 진단 분석법:

<506> iii) 분리된 세포 샘플을 제공하는 단계;

<507> iv) 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그 분절 또는 그 변형을 포함하는 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자에 결합하고, 또는 극한 하이브리드 조건 하에 상기 핵산 분자에 하이브리드되고 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산 분자에 결합하고, 도 1,2,3의 아미노산 서열을 포함하는 변형 폴리펩티드를 엔코딩하는 결합 약제와 상기 (i)의 샘플을 접촉하는 단계; 및

<508> v) 정상 비교 샘플에 비교했을 때, 상기 샘플의 상기 핵산 분자의 발현을 결정하는 단계.

- <509> 30. 단락 29의 분석법에 있어서, 상기 결합 약제는 올리고뉴클레오티드 프라이머인 분석법.
- <510> 31. 단락 30의 분석법에 있어서, 상기 분석은 중합효소 연쇄반응인 분석법.
- <511> 32. 단락 29의 분석법에 있어서, 상기 결합 약제는 도 1,2,3의 아미노산 서열의 상기 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체인 분석법.
- <512> 33. 다음에서 선택된 핵산 문자에 의해 엔코딩된 폴리펩티드의 활동을 조절하는 약제를 스크리닝하는 방법:
- <513> a) 도 1,2,3의 핵산 문자로 구성된 핵산 문자;
- <514> b) 극한 하이브리드 조건 하에 상기 i)의 핵산 문자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 문자;
- <515> i) 폴리펩티드, 또는 그 서열의 변형, 및 적어도 하나의 테스트될 약제를 포함하는 제제를 형성하는 단계;
- <516> ii) 상기 폴리펩티드의 활동과 관련하여 상기 약제의 활성을 결정하는 단계.
- <517> 34. 약제들의 식별할 때 CRLR 기능을 조절하는 폴리펩티드 사용에 있어서, 상기 폴리펩티드는 다음에서 선택된다:
- <518> i) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 문자로 엔코딩되는 폴리펩티드 또는 그 변형;
- <519> ii) 극한 조건에서 상기 (i)에 정의된 핵산 문자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 문자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드
- <520> iii) (i)와 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드
- <521> 35. 다음에서 선택된 폴리펩티드로 CRLR의 상호작용을 조절하는 약제를 식별하는데 있어서 CRLR의 사용:
- <522> i) 도 1,2,3의 핵산 서열로 구성된 핵산 문자로 엔코딩되는 폴리펩티드 또는 그 변형;
- <523> ii) 극한 조건에서 상기 (i)에 정의된 핵산 문자에 하이브리드되고 CRLR 기능을 조절하는 핵산 문자에 의해 엔코딩되는 폴리펩티드.
- <524> iii) (i)와 (ii)에 정의된 핵산 서열의 유전자 코드의 결과로 변성된 핵산을 포함하는 폴리펩티드.
- <525> 36. 약물로 사용을 목적으로 하는 상기 단락 1에서 18의 약제, 또는 단락 21의 복합물.
- <526> 37. 상기 단락 1에서 18에 있어서, 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법.
- <527> 38. 단락 20 또는 21에 있어서, 복합물의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하는, 암에 대해 동물을 면역시키는 방법.
- <528> 39. 단락 1에서 18에 있어서 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하여 대상에 골다공증을 치료하는 방법.
- <529> 40. 단락 1에서 18에 있어서 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하여 대상에 비만을 치료하는 방법.
- <530> 41. 단락 1에서 18에 있어서 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하여 대상에서 염증성 장애를 치료하는 방법.
- <531> 42. 단락 41에 있어서, 상기 염증성 장애는 죽상동맥경화증, 류마티스 관절염, 골관절염, 다발관절염 중에서 선택된 것인 치료 방법.
- <532> 43. 단락 1에서 18에 있어서, 효과적인 양의 약제를 투여하는 것을 포함하여 대상에 상처를 치료하는 방법.

도면의 간단한 설명

- <261> 본 발명의 실시예는 다음의 도들과 내용 및 방법과 관련한 예로 설명될 것이다;
- <262> 도 1은 RAMP 1의 DNA 서열을 나타낸다.(위)(서열 ID 번호 1); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열(아래)(서열 ID 번호 2);

- <263> 도 2는 RAMP 2의 DNA 서열을 나타낸다 (위)(서열 ID 번호 3); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래) (서열 ID 번호 4);
- <264> 도 3은 RAMP 3의 DNA 서열을 나타낸다 (위)(서열 ID 번호 5); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래) (서열 ID 번호 6);
- <265> 도 4는 RAMP 1의 세포 외 도메인(ECD) 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다 (위)(서열 ID 번호 7); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 8);
- <266> 도 5는 RAMP 2의 세포 외 도메인(ECD) 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다 (위)(서열 ID 번호 9); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 10);
- <267> 도 6는 RAMP 3의 세포 외 도메인(ECD) 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다. (위)(서열 ID 번호 11); DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 12);
- <268> 도 7A부터 H는 RAMP 1의 세포 외 도메인(ECD)의 N-터미널 말단의 절단된 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다. (위)(서열 ID 번호 13,14,15,16,17,18,19 및 20); 및 DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 21,22,23,24,25,26,27, 및 28); 분절의 길이는 짧은 글씨체로 나타나 있다.
- <269> 도 8A부터 J는 RAMP 2의 세포 외 도메인(ECD)의 N-터미널 말단의 절단된 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다. (위)(서열 ID 번호 29,30,31,32,33,34,35,36 및 37); 및 DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 38,39,40,41,42,43,44,45,46 및 47); 분절의 길이는 짧은 글씨체로 나타나 있다.
- <270> 도 9A부터 H는 RAMP 3의 세포 외 도메인(ECD)의 N-터미널 말단의 절단된 부위에 대응하는 DNA 서열을 나타낸다 (위)(서열 ID 번호 48,49,50,51,52,53,54 및 55); 및 DNA 서열에 의해 엔코딩된 아미노산 서열 (아래)(서열 ID 번호 56,57,48,49,60,61,62 및 63); 분절의 길이는 짧은 글씨체로 나타나 있다.
- <271> 도 10은 DNA(위)(서열 ID 번호 64), 및 CRLR의 아미노산 (아래) (서열 ID 번호 65)를 나타낸다.
- <272> 도 11은 생쥐의 항-RAMP-3 다클론성 항체(pyclonal antibodies)의 ELISA 데이터를 나타낸다.
- <273> 도 12에서 다클론성 항-RAMP-3 항체들은 인간의 MG63 골육종 세포에서 시클릭 AMP를 증가시키는데 있어서 아드레노메틸린의 그 효과를 조절하는 능력을 테스트했다. 모든 항체들은 아드레노메틸린의 효과를 감소시켰다.
- <274> 도 13: 단클론성(monoclonal) 항-RAMP-3 항체들이 배양의 억제를 유도하는 능력을 테스트했다 (배양을 지도화하는 미토콘드리아 숙신산탈수소효소의 MTT 애세이(MTT assay of mitochondrial succinate dehydrogenase)를 기초로 측정). 1:50의 농도는 웰(well) 최종 농도 당 5ng와 같다.
- <275> 도 14는 쥐 1로부터의 다클론성 항체의 웨스턴 블로트(Western Blot)이다.
- <276> 도 15는 쥐 2로부터의 다클론성 항체의 웨스턴 블로트(Western Blot)이다.
- <277> 도 16은 쥐 3로부터의 다클론성 항체의 웨스턴 블로트(Western Blot)이다.

도면

도면1

DNA

CGAGCGGACT CGACTCGGCA CCGCTGTGCA CCATGGCCCG GGCCCTGTGC CGCCTCCGC
GGCGCGGCCCT CTGGCTGCTC CTGGCCCATC ACCTCTTCAT GACCACTGCC TGCCAGGAGG
CTAACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT GCCTCACCCA GTTCCAGGTA GACATGGAGG
CCGTCGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAC CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG
CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAACG TGGGCTGCTT CTGGCCCAAT GCAGAGGTGG
CAGGTTCTT CCTGGCAGTG CATGGCCGCT ACTTCAGGAG CTGGCCCATC TCAGGCAGGG
CCGTGCGGG A CCCGCCGGC AGCATCCTCT ACCCCTTCAT CGTGGTCCCC ATCACGGTGA
CCCTGCTGGT GACGGCACTG GTGGTCTGGC AGAGCAAGCG CACTGAGGGC ATTGTGTAGG
CGGGGCCAG GCTGCCGCG GGTGCACCCA GGCTGCAGGG TGAGGCCAGG CAGGCCTGGG
TAGGGCAGC TTCTGGAGCC TTGGGACAGA GCAGGCCAC AATGCCCCCC TTCTTCAGC
CAAGAAGAGC TCACAGGAGT CCAGAGTAGC CGAGGCTCTG GTATTAACCT GGAAGCCCC
CTGGCTGGAG GCCACCGCCA CCCTAGGAAG GGGGCAGGGA CGTGACCTTG ACTTACCTCT
GGAAAGGGTC CCAGCCTAGA CTGCTTACCC CATAGCCACA TTTGTGGATG AGTGGTTGT
GATTAAAAGG GATGTTCTTG

단백질(Protein)

MARALCRLPR RGLWLLLAAH LFMTTACQEA NYGALLRELC LTOFQVDMEA VGETLWCDWG
RTIRSYRELA DCTWHMAEKL GCFWPNAEVN RFFLAVHGRY FRSCPISGRA VRDPPGSILY
PFIVVPITVT LLVTALVVWQ SKRTEGIV

도면2**DNA**

GGATATAGGC GCCCCCACAC CGGGGCCCCG CTAAGCGCCG CGGCCGCTCC TCGCCTCCTT
 GCTGCACGAT GGCTCGCTC CGGGTGGAGC GCGCCGGCGG CCCGCGTCTC CCTAGGACCC
 GAGTCGGGCG GCGGGCAGCC GTCCGCCTCC TCCTCTGCT GGGCGCTGTC CTGAATCCCC
 ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA GGGGGGACGG
 TGAAGAACTA TGAGACAGCT GTCCAATTTT GCTGGAATCA TTATAAGGAT
 CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG GCCTTATAGC
 ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTTGCA GAGTTGTTG ACCTGGGCTT CCCCACATCC
 TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG CTCCCTGGTG
 CAGCCCACCT TCTCTGACCC CCCAGAGGAT GTACTCCTGG CCATGATCAT AGCCCCCATC
 TGCCTCATCC CCTTCCTCAT CACTCTGTGTA GTATGGAGGA GTAAAGACAG TGAGGCCAG
 GCCTAGGGGG CACGAGCTTC TCAACAACCA TGTTACTCCA CTTCCCCACC CCCACCAAGGC
 CTCCCTCCTC CCCTCCACT CCCTTTCTC ACTCTCATCC CCACCACAGA TCCCTGGATT
 GCTGGGAATG GAAGCCAGGG TTGGGCATGG CACAAGTTCT GTAATCTTCA
 AAATAAAACT TTTTTTTGAA

단백질(Protein)

MASLRVERAG GPRLPTRVRG RPAAVRLLLL LGAVLNPHHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN
 YETAVQFCWN HYKDQMDPIE KDWCDWAMIS RPYSTLRDCL EHFAELFDLG FPNPLAERII
 FETHQIHFAN CSLVQPTFSD PPEDVLLAMI IAPICLIPFL ITLVVWRSKD SEAQA

도면3**DNA**

GAGCGTGACC CAGCTGCGGC CGGCCAGCCA TGGAGACTGG AGCGCTGCGG CGCCCGCAAC
 TTCTCCCGTT GCTGCTGCTG CTCTGCGGTG GGTGTCCCAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA
 CAGGCATGTT GGAGAGGCTG CCCCTGTGTG GGAAGGCTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG
 TGGACGTCTG AAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGTCATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA
 ACTGCACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG GCTGCTACTG GCCCAACCCC CTGGCCCAGG
 GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTTCT TCTCCAACTG CACCGTGGAC AGGGTCCACT
 TGGAGGACCC CCCAGACGAG GTTCTCATCC CGCTGATCGT TATACCCGTC GTTCTGACTG
 TCGCCATGGC TGGCCTGGTG GTGTGGCGCA GCAAACGCAC CGACACGCTG CTGTGAGGGT
 CCCGGTGAGA TGGAGTGGGT CACACCTGGC AAGCTGGAAG AAAGTCCCT GGGGATGGGA
 GATCGGGTGG GTGCTGCCAA TCTCCAGCTA CTGTGGCCAC ACCCCACCTG GTCATGGGCA
 GACCCCTCCC TTCCTGGGCT GACCTGCTCC CTCGAGGCCA GCCTGCTCCC TGGCTGAGGC
 TCAGGCTATC CGCCCAAGCT CTTGCTCAT TCTAGGGCCA GTGGAGGAAA ATGTGATAAG
 GCCAGAGCTT GTGTGCTGGG CAAGAAATCA CCTGCTGCAT CCTGTGCTCC GCAGGCTGGG
 CCGGAAGCCT CTGCCTGCAG GTTTCTATGC TGTTTCTTAG CACAGAATCC AGCCTAGCCT
 TAGCCGCAGT CTAGGCCCTG CTTGGACTAG GACTCCTTGC TTGACCCCAT CTCTGGTCC
 TGCCCTGGCT CCTGCACCAG CCCCAGCTCC TGCCTACATC CAGGCAGAAA TATAGGCAGG
 GGCTTGGGA AGACGTTCCG TGCTGTGACC TCCGAGCCCT CCTGGTGGGA AGACAGCTGG
 AAAGGCTGGG AGGAGAAGGG AGGGGCTGGG GGTTCCCAGG AGCCATGCGT GGCTGCAGA
 GTCCATTCCA TCATGATGCT GTGCCCGCTA TGGGCTGTGT CCATGACCAG AGGCTGGAGT
 GGGGGTGTGT TATAGCCCCCT CACCGGGACT TGCTGTGCCG ATGGGGCCTG GGCTCCTTC
 CTACAGGGGC TCCTCTGTGG GTGAGGGGCC CTCTGGAATG GCATCCCATG AGCTTGTGGC
 CTCTATCTGC TACCATCTGT GTTTTATCTG AGTAAAGTTA CCTTACTTCT GG

단백질(Protein)

METGALRRPQ LLPLLLLLCG GCPRAAGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS
 EFIVYYESFT NCTEMEANVV GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEVLI
 PLIVIPVVLT VAMAGLVVWR SKRTDTLL

도면4

RAMP1

DNA

TG GCC TGCCAGGGAGG CTA ACTAC CGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT GCCTCACCCA
GTTCCAGGTA GACATGGAGG CCGTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT
CAGGAGCTAC AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGCACATG GCGGAGAAAGC TGGGCTGCTT
CTGGCCCAAT GCAGAGGTGG CAGGTTCTT CCTGGCAGTG CATGGCCGCT ACTTCAGGAG
CTGCCCCATC TCAGGCAGGG CCGTGCGGGA CCCGCCCGGC AGCAT

단백질(Protein)

ACQEA NYGALLRELC LTQFQVDMEA VGETLWCDWG RTIRSYRELA DCTWHMAEKL
GCFWPNAEVD RFFLAVHGRY FRSCPISGRA VRDPPGSI

도면5

RAMP2

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA
GGGGGGACGG TGAAGAACTA TGAGACAGCT GTCCAATT TT GCTGGAATCA
TTATAAGGAT CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC GACTGGGCCA TGATTAGCAG
GCCTTATAGC ACCCTGCGAG ATTGCCTGGA GCACTTGCA GAGTTGTTG ACCTGGGCTT
CCCCAATCCC TTGGCAGAGA GGATCATCTT TGAGACTCAC CAGATCCACT TTGCCAACTG
CTCCCTGGTG CAGCCCACCT TCTCTGACCC CCCAGAGGAT GTA

단백질(Protein)

LGAVLN PHEA LAQPLPTTGT PGSEG GTVKN YETAVQFCWN HYKDQMDPIE KDWCDWAMIS
RPYSTLRDCL EHFAELFDLG FPNPLAERII FETHQIHFAN CSLVQPTFSD PPEDVL

도면6

RAMP3

DNA

CAG AGCAGGCGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGCTG CCCCTGTGTG
GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCTG GAAGTGGTGC AACCTGTCCG
AGTTCATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA ACTGCACCGA GATGGAGGCC AATGTCGTGG
GCTGCTACTG GCCCAACCCC CTGGCCCCAGG GCTTCATCAC CGGCATCCAC AGGCAGTTCT
TCTCCAAC TG CACCGTGGAC AGGGTCCACT TGGAGGACCC CCCAGACGAG GTTCTCATCC
CGCTGATCGT TATAACCGTC GTTCTGACTG TCGCCATGGC TGGCCTGGTG GTG

단백질(Protein)

GCPRAAGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS EFIVYYESFT NCTEMEANVV
GCYWPNPLAQ GFITGIHRQF FSNCTVDRVH LEDPPDEV

도면7

(A)
1-50

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTAACTACGG TGCCCTCCTCCGGGAGCTCT
GCCTCACCCAGTTCAGGTAGACATGGAGGCCGTCGGGAGACGCTGTGG
TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTACAGGGAGCTGG
CCGACTGCACCTGGC

단백질(Protein)

ACQEANYGALLRELCLTQFQVDMEA VGETLWCDWGRTIRSYRELADCTWH

(B)
1-30

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTAACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT
GCCTCACCCA GTTCCAGGTA GACATGGAGG CCGTCGGGGA GACGC

단백질(Protein)

ACQEANYGALLRELCLTQFQVDMEA VGETL

(C)
1-20

DNA

CTGCC TGCCAGGAGG CTAACTACGG TGCCCTCCTC CGGGAGCTCT
GCCTCACCCA GTTCC

단백질(Protein)

ACQEANYGALLRELCLTQFQ

(D)
10-50

DNA

CCCTCCTC CGGGAGCTCT GCCTCACCCA GTTCCAGGTA GACATGGAGG
CCGTCGGGGA GACGCTGTGG TGTGACTGGG GCAGGACCAT CAGGAGCTAC
AGGGAGCTGG CCGACTGCAC CTGGC

단백질(Protein)

LRELCLTQFQVDMEA VGETLWCDWGRTIRSYRELADCTWH

도면8

(A)

1-50

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAACTA TGAGACAGCT GTCCAATT
GCTGGAATCA TTATAAGGAT CAAATGGATC CTATCGAAAA GGATTGGTGC
GAC

단백질(Protein)

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN YETAVQFCWN HYKDQMDPIE

(B)

1-30

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAACTA TGAGACAGCT GTC

단백질(Protein)

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN

(C)

1-20

DNA

AATCCCC ACGAGGCCCT GGCTCAGCCT CTTCCACCA CAGGCACACC
AGGGTCAGAA GGG

단백질(Protein)

LGAVLNPHEA LAQPLPTTGT

(D)

10-50

DNA

CTTCCACCA CAGGCACACC AGGGTCAGAA GGGGGGACGG TGAAGAACTA
TGAGACAGCT GTCCAATT GCTGGAATCA TTATAAGGAT CAAATGGATC
CTATCGAAAA GGATTGGTGC GAC

단백질(Protein)

LAQPLPTTGT PGSEGGTVKN YETAVQFCWN HYKDQMDPIE

도면9

(A)

1-50

DNA

CAG AGCAGGCAGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGGCTG
CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCTG
GAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGTCATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA
ACTGCAC

단백질(Protein)

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS EFIVYYESFT

(B)

1-40

DNA

CAG AGCAGGCAGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGGCTG
CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGTCTG
GAAGTGGTGC AACCTGTCCG AGTCAT

단백질(Protein)

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK VDVWKWCNLS

(C)

1-30

DNA

CAG AGCAGGCAGGC TGCAACGAGA CAGGCATGTT GGAGAGGGCTG
CCCCTGTGTG GGAAGGCTTT CGCAGACATG ATGGGCAAGG TGGACGT

단백질(Protein)

GCPRAGGCNE TGMLERLPLC GKAFADMMGK

(D)

40-60

DNA

CATCGT GTACTATGAG AGTTTCACCA ACTGCACCGA GATGGAGGCC
AATGTCGTGG GCTGCTA

단백질(Protein)

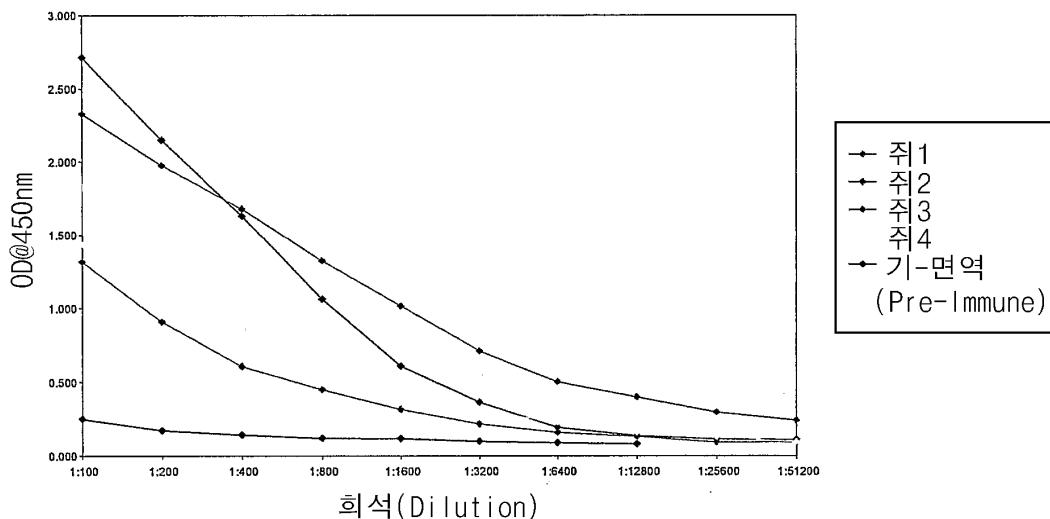
EFIVYYESFT NCTEMEANVV

도면10

CRLR 단백질(CRLR Protein)
mekkctlyfl vlpffmlv taeleespdi siqlgvtrnk imtaqyecyq kimqdpiqq
egvycnrtwd gwlcwndvaa gtesmqlcpd yfqdfdpsek vtkicdqdn wfrhpasnrt
wtnytqcnvn thekvktaln lfyltighg lsiasllisl gifffyfksls cqritlhknl
ffsvcnsvv tihihtavan nqalvatnpy sckvsfihl ylmgcnyfwm lcegiylhtl
ivvavfaekq hlmwyiflgw gfplipacih aiarslyynd ncwissdthl lyihgpica
allvnlfll nivrvlitkl kvthqaesnl ymkavrati lvplgliefv lipwrvpekgi
aeevydyimh ilmhfqglv sticoffng e vqailrrnwq qykiqfgnsf snsealrsas
ytvstisdcp gyshdcpsel Ingkisihde nvllkpenly n

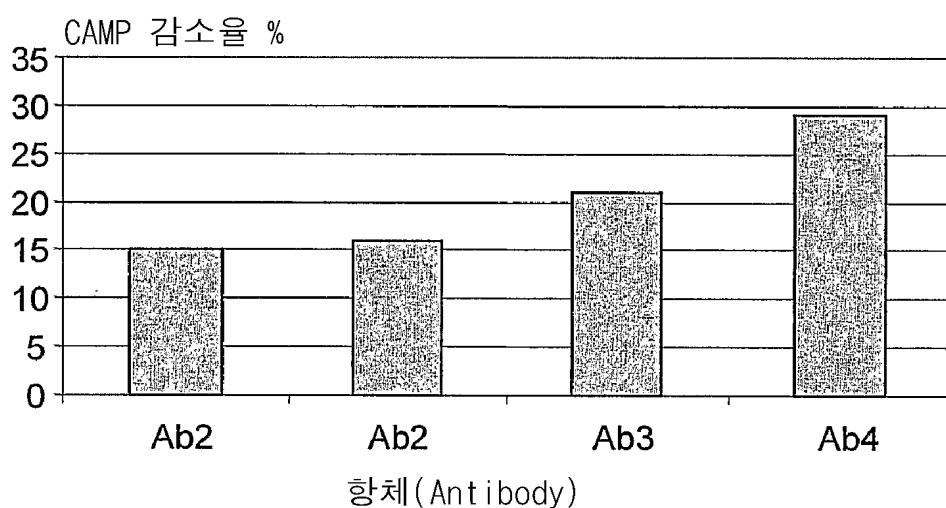
도면11

M-GR1 : 테스트 세라(Test Sera-)



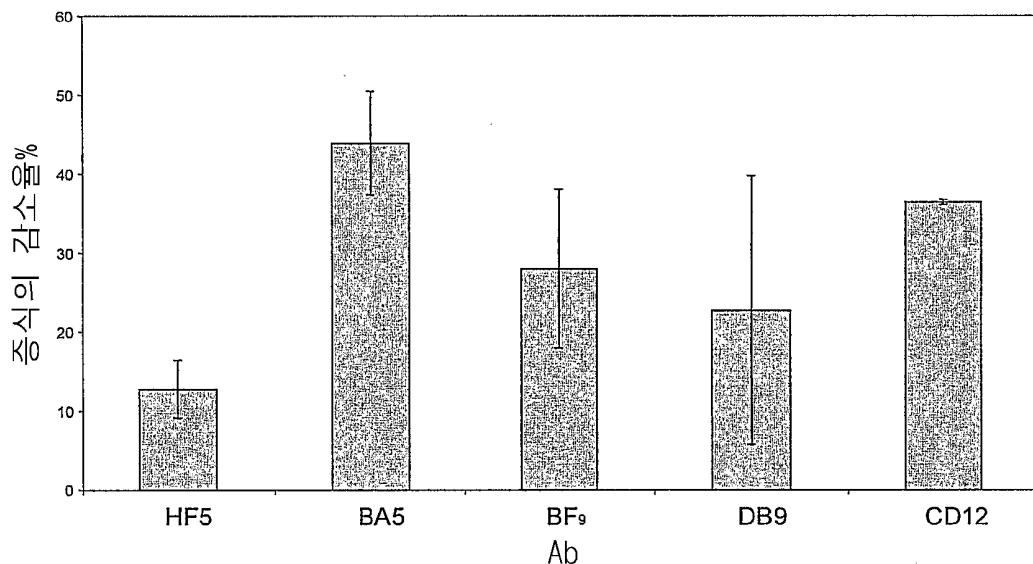
도면12

다클론성 항체(Polyclonal Antibodies)에 의한 % CAMP 감소율



도면13

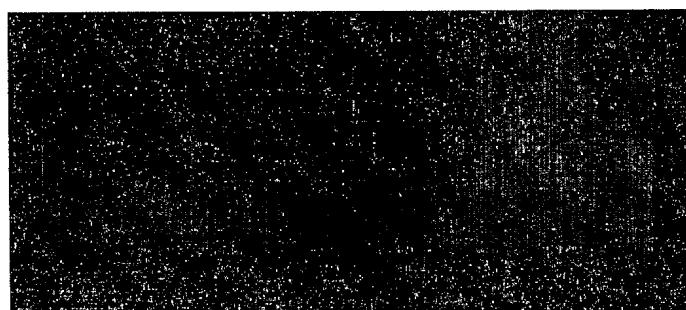
% 증식의 억제율 : MTT 에세이 1:50Ab



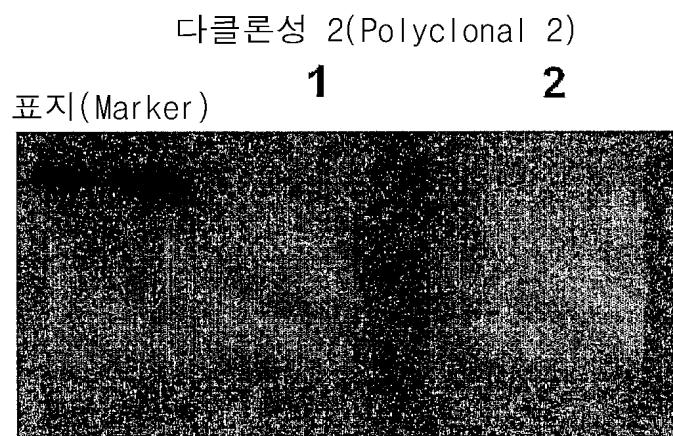
도면14

다클론성 1(Polyclonal 1)

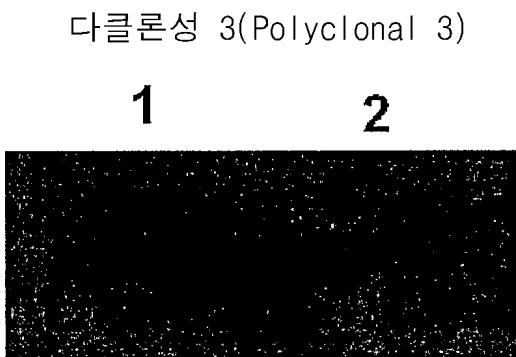
표지(Marker) 1 2



도면15



도면16



서열목록

<110> UNIVERSITY OF SHEFFIELD
<120> THERAPEUTIC AGENT

<150> GB0521139.6
<151> 2005-10-18

<160> 85

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 799
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

cgagcggact cgactcgca ccgctgtca ccatggcccg ggccctgtgc cgcccccgc	60
ggcgccgcct ctggctgctc ctggccatc acctttcat gaccactgcc tgccaggagg	120
ctaactacgg tgccttcctc cggagactct gcctcacca gttccaggtt gacatggagg	180
cgcgtcgaaa gacgctgtgg tgtgactggg gcaggaccat caggagctac agggagctgg	240
ccgactgcac ctggcacatg gcggagaagc tggctgctt ctggccaat gcagagggtgg	300
cagggttttc ctggcagtgc atggccgta cttcaggagc tgcccatct caggcaggc	360
cgtgcgggac ccgcggca gcattctta cccattcata gtggccccca tcacgggtac	420
cctgctggtg acggcactgg tggctggca gagcaagcgc actgaggggca ttgtgttaggc	480
ggggcccagg ctgccccgg gtcacccag gctgcagggt gaggccaggc aggctgggt	540
agggcagct tctggagct tggacagag caggccaca atgccccct tctccagcc	600
aagaagagct cacaggagtc cagatgtgcc gaggctctgg tattaacctg gaagccccc	660
tggctggagg ccacccac cctaggaagg gggcaggac gtgacccatg cttacctctg	720
gaaagggtcc cagcctagac tgcttaccc atagccacat ttgtggatga gtggtttgt	780
attaaaaggg atgttcttg	799

<210> 2
<211> 148
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
 35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
 50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
 65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
 85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
 100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
 115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys Arg Thr
 130 135 140

Glu Gly Ile Val
 145

<210> 3
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ggatataggc gcccccacac cggggcccg ctaagcgccg ccgcgcgtcc tcgcctcctt 60

gctgcacat ggcctcgctc cgggtggagc gcgcggcgg cccgcgtctc cctaggacc 120

gagtcggcgc gccggcagcc gtccgcctcc tccttctgct gggcgctgtc ctgaatcccc 180

acgaggccct ggctcagcct cttccacca caggcacacc agggtcagaa ggggggacgg 240

tgaagaacta tgagacagct gtccaatttt gctggaatca ttataaggat caaatggatc 300

cstatcgaaaa ggatttgtgc gactggcca tgattagcag gccttatagc accctgcgag 360

attgcctgga gcacttgca gagttgttg acctggcctt cccaaatccc ttggcagaga	420
ggatcatctt tgagactcac cagatccact ttgccaactg ctccctggc cagccccact	480
tctctgaccc cccagaggat gtactcctgg ccatgatcat agccccatc tgcctcatcc	540
ccttcctcat cactttgtt gatatggagga gtaaagacag tgaggcccag gcctaggggg	600
cacgagcttc tcaacaacca ttttactcca cttcccccacc cccaccaggc ctccctcctc	660
ccctcctact ccctttctc actctcatcc ccaccacaga tccctggatt gctggaaatg	720
gaagccaggg ttggcatgg cacaagttct gtaatttca aaataaaaact tttttttga	780
	780

<210> 4
<211> 175
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ala Ser Leu Arg Val Glu Arg Ala Gly Gly Pro Arg Leu Pro Arg
1 5 10 15

Thr Arg Val Gly Arg Pro Ala Ala Val Arg Leu Leu Leu Leu Gly
20 25 30

Ala Val Leu Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Gln Pro Leu Pro Thr Thr
35 40 45

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

Val Gln Phe Cys Trp Asn His Tyr Lys Asp Gln Met Asp Pro Ile Glu
65 70 75 80

Lys Asp Trp Cys Asp Trp Ala Met Ile Ser Arg Pro Tyr Ser Thr Leu
85 90 95

Arg Asp Cys Leu Glu His Phe Ala Glu Leu Phe Asp Leu Gly Phe Pro

100	105	110
Asn Pro Leu Ala Glu Arg Ile Ile Phe Glu Thr His Gln Ile His Phe		
115	120	125
Ala Asn Cys Ser Leu Val Gln Pro Thr Phe Ser Asp Pro Pro Glu Asp		
130	135	140
Val Leu Leu Ala Met Ile Ile Ala Pro Ile Cys Leu Ile Pro Phe Leu		
145	150	155
Ile Thr Leu Val Val Trp Arg Ser Lys Asp Ser Glu Ala Gln Ala		
165	170	175

<210> 5
<211> 1312
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5	
gagcgtgacc cagctgcggc cggccagcca tggagactgg agcgctgcgg cgcccgcaac	60
ttctcccggtt gctgctgctg ctctgcggtg ggtgtcccag agcaggcggc tgcaacgaga	120
caggcatgtt ggagaggctg cccctgtgtg ggaaggctt cgcagacatg atggcaagg	180
tggacgtctg gaagtgggtgc aacctgtccg agttcatcgt gtactatgag agttcacca	240
actgcaccga gaiggaggcc aatgtcgtgg gctgtactg gcccaacccc ctggcccagg	300
gcttcatcac cggcatccac aggcatctt tctccaactg caccgtggac agggtccact	360
tggaggaccc cccagacgag gttctcatcc cgctgtatcgt tataccgtc gttctgactg	420
tcgccatggc tggcctgggt gtgtggcgca gcaaacgcac cgacacgctg ctgtgagggt	480
cccggtgaga tggagtgggt cacacctggc aagctggaag aaagttccct ggggatggga	540
gatcggtgg gtgctgccaa tctccagcta ctgtggccac accccacctg gtcatggca	600

gaccctccc ttccctggct gacctgctcc ctgcaggcca gcctgctccc tggctgaggc	660
tcaggctatc cgcccaagct ctttgctcat tcttagggcca gtggaggaaa atgtgataag	720
gccagagctt gtgtgctggg caagaaatca cctgctgcat cctgtgctcc gcaggctggg	780
ccggaaggct ctgcctgcag gtttctatgc tgtttcttag cacagaatcc agcctagcct	840
tagccgcagt ctaggcctg ctggactag gactcctgc ttgaccctat ctctgggtcc	900
tgcctggct cctgcaccag ccccagctcc tgcctacatc caggcagaaa tataggcagg	960
ggcttggaa agacgttccg tgctgtgacc tccgagccct cctgggtggga agacagctgg	1020
aaaggctggg aggagaaggg aggggctggg gtttcccagg agccatgcgt ggcctgcaga	1080
gtccattcca tcatgatgct gtgcggcta tggctgtgt ccatgaccag aggctggagt	1140
gggggtgtgt tataccccct caccggact tgctgtcggt atggggctg ggcctccttc	1200
ctacagggc tcctctgtgg gtgaggggcc ctctggaatg gcatcccatg agcttgtggc	1260
ctctatctgc taccatctgt gtttatctg agtaaagtta cttacttct gg	1312

<210> 6
<211> 148
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Glu Thr Gly Ala Leu Arg Arg Pro Gln Leu Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Gly Gly Cys Pro Arg Ala Gly Gly Cys Asn Glu Thr Gly
20 25 30

Met Leu Glu Arg Leu Pro Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met
35 40 45

Gly Lys Val Asp Val Trp Lys Trp Cys Asn Leu Ser Glu Phe Ile Val

50 55 60

Tyr Tyr Glu Ser Phe Thr Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val
65 70 75 80

Gly Cys Tyr Trp Pro Asn Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile
85 90 95

His Arg Gln Phe Phe Ser Asn Cys Thr Val Asp Arg Val His Leu Glu
100 105 110

Asp Pro Pro Asp Glu Val Leu Ile Pro Leu Ile Val Ile Pro Val Val
115 120 125

Leu Thr Val Ala Met Ala Gly Leu Val Val Trp Arg Ser Lys Arg Thr
130 135 140

Asp Thr Leu Leu
145

<210> 7
<211> 279
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
ctgcctgcca ggaggctaac tacggtgccc tcctccggga gctctgcctc acccagttcc 60

aggtagacat ggaggccgtc ggggagacgc tgtggtgtga ctggggcagg accatcagga 120

gctacaggga gctggccgac tgcacctggc acatggcgga gaagctggc tgcttctggc 180

ccaatgcaga ggtggcaggt tttcctggc agtgcattgc cgctacttca ggagctgcc 240

catctcaggc agggccgtgc gggacccgcc cggcagcat 279

<210> 8
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu
 1 5 10 15

Thr Gln Phe Gln Val Asp Met Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys
 20 25 30

Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr
 35 40 45

Trp His Met Ala Glu Lys Leu Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val
 50 55 60

Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro
 65 70 75 80

Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg Asp Pro Pro Gly Ser Ile
 85 90

<210> 9
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
aatccccacg aggcctggc tcagccttt cccaccacag gcacaccagg gtcagaaggg 60

gggacggta agaactatga gacagctgtc caatttgct ggaatcatta taaggatcaa 120

atggatccta tcgaaaagga ttggtgcgac tggccatga ttagcaggcc ttatagcacc 180

ctgcgagatt gcctggagca ctttgcagag ttgttgacc tggcttccc caatcccttg 240

gcagagagga tcatcttga gactcaccag atccacttg ccaactgctc cctggcag 300

cccacccctt ctgacccccc agaggatgt 330

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Gly Ala Val Leu Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Gln Pro Leu Pro
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Glu Gly Gly Thr Val Lys Asn Tyr Glu
 20 25 30

Thr Ala Val Gln Phe Cys Trp Asn His Tyr Lys Asp Gln Met Asp Pro
 35 40 45

Ile Glu Lys Asp Trp Cys Asp Trp Ala Met Ile Ser Arg Pro Tyr Ser
 50 55 60

Thr Leu Arg Asp Cys Leu Glu His Phe Ala Glu Leu Phe Asp Leu Gly
 65 70 75 80

Phe Pro Asn Pro Leu Ala Glu Arg Ile Ile Phe Glu Thr His Gln Ile
 85 90 95

His Phe Ala Asn Cys Ser Leu Val Gln Pro Thr Phe Ser Asp Pro Pro
 100 105 110

Glu Asp Val Leu
 115

<210> 11
 <211> 346
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

cagagcaggc ggctgcaacg agacaggcat gttggagagg ctgccctgt gtggaaaggc 60

tttcgcagac atgatggca aggtggacgt ctggaagtgg tgcaacctgt ccgagttcat 120

cgtgtactat gagagttca ccaactgcac cgagatggag gccaatgtcg tgggctgcta 180

ctggcccaac cccctggccc agggcttcat cacggcatc cacaggcagt tcttctcaa 240

ctgcaccgtg gacagggtcc acttggagga cccccagac gaggttctca tcccgctgat 300

cgttataccc gtcgttctga ctgtcgccat ggctggcctg gtggtg 346

<210> 12
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Gly Cys Pro Arg Ala Gly Gly Cys Asn Glu Thr Gly Met Leu Glu Arg
1 5 10 15

Leu Pro Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met Gly Lys Val Asp
20 25 30

Val Trp Lys Trp Cys Asn Leu Ser Glu Phe Ile Val Tyr Tyr Glu Ser
35 40 45

Phe Thr Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Tyr Trp
50 55 60

Pro Asn Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg Gln Phe
65 70 75 80

Phe Ser Asn Cys Thr Val Asp Arg Val His Leu Glu Asp Pro Pro Asp
85 90 95

Glu Val

<210> 13
<211> 150
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
ctgcctgcca ggaggctaac tacgggtgcc tcctccggga gctctgcctc acccagttcc 60

agtagacat ggaggccgtc ggggagacgc tgtggtgtga ctggggcagg accatcagga 120

gctacaggga gctggccgac tgcacacctggc 150

<210> 14

<211> 50
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Thr Gln Phe Gln Val Asp Met Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys
20 25 30

Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr
35 40 45

Trp His
50

<210> 15
<211> 90
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
ctgcctgcca ggaggctaac tacggtgccc tcctccggga gctctgcctc acccagttcc 60

aggttagacat ggaggccgtc ggggagacgc 90

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Thr Gln Phe Gln Val Asp Met Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu
20 25 30

<210> 17
<211> 60
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17
ctgcctgcca ggaggctaac tacggtgccc tcctccggga gctctgcctc acccagttcc 60

60

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Thr Gln Phe Gln
20

<210> 19
<211> 123
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
ccctcctccg ggagctctgc ctcacccagt tccaggtaga catggaggcc gtcggggaga 60

cgctgtggtg tgactggggc aggaccatca ggagctacag ggagctggcc gactgcacct 120

ggc 123

<210> 20
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met Glu Ala Val
1 5 10 15

Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg Ser Tyr Arg

20	25	30
----	----	----

Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His
35 40

<210> 21
<211> 93
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
tccaggtaga catggaggcc gtcggggaga cgctgtggtg tgactgggc aggaccatca 60

ggagctacag ggagctggcc gactgcacct ggc 93

<210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Met Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile
1 5 10 15

Arg Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met
20 25

<210> 23
<211> 189
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
cgctgtggtg tgactgggc aggaccatca ggagctacag ggagctggcc gactgcacct 60

ggcacatggc ggagaagctg ggctgcttct ggcccaatgc agaggtggca gttttttctt 120

ggcagtgcattt gcccgtact tcaggagctg ccccatctca ggcaggccg tgcgggaccc 180

gccccggcag 189

<210> 24
<211> 65
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg Ser Tyr
1 5 10 15

Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu Gly Cys
20 25 30

Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val His Gly
35 40 45

Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg Asp Pro
50 55 60

Pro
65

<210> 25
<211> 124
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
ggagctacag ggagctggcc gactgcacct ggcacatggc ggagaagctg ggctgcttct 60

ggcccaatgc agaggtggca ggttcttcct ggcagtgcattt ggccgctact tcaggagctg 120

cccc 124

<210> 26
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Arg Thr Ile Arg Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met
1 5 10 15

Ala Glu Lys Leu Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe
 20 25 30

Phe Leu Ala Val His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro
 35 40 45

<210> 27
 <211> 132
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 ggcacatggc ggagaagctg ggctgcttct ggcccaatgc agaggtggca gtttcttcct 60

ggcagtgcatttggccatctact tcaggagctg ccccatctca ggcagggccg tgcgggacc 120

gccccggcagc at 132

<210> 28
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ala Glu Lys Leu Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe
 1 5 10 15

Phe Leu Ala Val His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly
 20 25 30

Arg Ala Val Arg Asp Pro Pro Gly Ser Ile
 35 40

<210> 29
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 aatccccacg aggccctggc tcagccttt cccaccacag gcacaccagg gtcagaagg 60

gggacggtga agaactatga gacagctgtc caatggctt ggaatcatta taaggatcaa 120

atggatctta tcgaaaagga ttggtgcgac 150

<210> 30

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Gly Ala Val Leu Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Gln Pro Leu Pro
1 5 10 15

Thr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Glu Gly Gly Thr Val Lys Asn Tyr Glu
20 25 30

Thr Ala Val Gln Phe Cys Trp Asn His Tyr Lys Asp Gln Met Asp Pro
35 40 45

Ile Glu

50

<210> 31

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

aatccccacg aggccctggc tcagccttt cccaccacag gcacaccagg gtcagaaggg 60

gggacggtga agaactatga gacagctgtc 90

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Leu Gly Ala Val Leu Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Gln Pro Leu Pro
1 5 10 15

Thr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Glu Gly Gly Thr Val Lys Asn
20 25 30

<210> 33
<211> 60
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
aatccccacg agggccctggc tcaggcctt cccaccacag gcacaccagg gtcagaaggg 60

60

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
 Leu Gly Ala Val Leu Asn Pro His Glu Ala Leu Ala Gln Pro Leu Pro
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Thr
20

<210> 35
<211> 123
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35 ctccccacca caggcacacc agggtcagaa ggggggacgg tgaagaacta tgagacagct 60

gtccaaattt gctggaatca ttataaggat caaatggatc ctatcgaaaa ggattggtgc 120

gac 123

<210> 36
<211> 40

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Leu Ala Gln Pro Leu Pro Thr Thr Gly Thr Pro Gly Ser Glu Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Lys Asn Tyr Glu Thr Ala Val Gln Phe Cys Trp Asn His Tyr
20 25 30

Lys Asp Gln Met Asp Pro Ile Glu
35 40

<210> 37
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Pro Gly Ser Glu Gly Gly Thr Val Lys Asn Tyr Glu Thr Ala Val Gln
1 5 10 15

Phe Cys Trp Asn His Tyr Lys Asp Gln Met Asp Pro Ile Glu
20 25 30

<210> 38
<211> 214
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 38
gtccaattt gctggaatca ttataaggat caaatggatc ctatcgaaaa ggattgggtgc 60

gactggcca tgattagcag gccttatagc accctgcgag attgcctgga gcacttgtca 120

gagttgtttg acctggcct ccccaatccc ttggcagaga gcatcatctt tgagactcac 180

cagatccact ttgccaactg ctccctgggtc cagc 214

<210> 39
<211> 70
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39
 Tyr Glu Thr Ala Val Gln Phe Cys Trp Asn His Tyr Lys Asp Gln Met
 1 5 10 15

Asp Pro Ile Glu Lys Asp Trp Cys Asp Trp Ala Met Ile Ser Arg Pro
 20 25 30

Tyr Ser Thr Leu Arg Asp Cys Leu Glu His Phe Ala Glu Leu Phe Asp
 35 40 45

Leu Gly Phe Pro Asn Pro Leu Ala Glu Arg Ile Ile Phe Glu Thr His
 50 55 60

Gln Ile His Phe Ala Asn
 65 70

<210> 40
<211> 184
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
 caaatggatc ctatcgaaaa ggattgggtgc gactggccca tgatttagcag gccttatagc 60

accctgcgag attgcctgga gcactttgca gagttgttg acctggcctt ccccaatccc 120

ttggcagaga ggtatcatctt tgagactcac cagatccact tttccaaacttg ctcccttgt 180

cagc 184

<210> 41
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
 His Tyr Lys Asp Gln Met Asp Pro Ile Glu Lys Asp Trp Cys Asp Trp
 1 5 10 15

Ala Met Ile Ser Arg Pro Tyr Ser Thr Leu Arg Asp Cys Leu Glu His

20	25	30
----	----	----

Phe Ala Glu Leu Phe Asp Leu Gly Phe Pro Asn Pro Leu Ala Glu Arg	35	40	45
---	----	----	----

Ile Ile Phe Glu Thr His Gln Ile His Phe Ala Asn	50	55	60
---	----	----	----

<210> 42
<211> 154
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42	60	
gactggcca tgattagcag gccttatagc accctgcgag attgcctgga gcactttca		

gagttgttg acctggcctt ccccaatccc ttggcagaga ggatcatctt tgagactcac	120	
--	-----	--

cagatccact ttgccaactg ctccctggc cagc	154	
--------------------------------------	-----	--

<210> 43
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43	15		
Lys Asp Trp Cys Asp Trp Ala Met Ile Ser Arg Pro Tyr Ser Thr Leu			
1	5	10	15

Arg Asp Cys Leu Glu His Phe Ala Glu Leu Phe Asp Leu Gly Phe Pro	20	25	30
---	----	----	----

Asn Pro Leu Ala Glu Arg Ile Ile Phe Glu Thr His Gln Ile His Phe	35	40	45
---	----	----	----

Ala Asn Cys Ser Leu Val Gln Pro Thr Phe Ser Asp	50	55	60
---	----	----	----

<210> 44
<211> 124
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44
accctgcgag attgcctgga gcactttgca gagttgttg acctgggctt ccccaatccc 60

ttggcagaga ggatcatctt tgagactcac cagatccact ttgccaactg ctccctggtg 120

cagc 124

<210> 45
<211> 50
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Arg Pro Tyr Ser Thr Leu Arg Asp Cys Leu Glu His Phe Ala Glu Leu
1 5 10 15

Phe Asp Leu Gly Phe Pro Asn Pro Leu Ala Glu Arg Ile Ile Phe Glu
20 25 30

Thr His Gln Ile His Phe Ala Asn Cys Ser Leu Val Gln Pro Thr Phe
35 40 45

Ser Asp
50

<210> 46
<211> 94
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
gagttgttg acctgggctt ccccaatccc ttggcagaga ggatcatctt tgagactcac 60

cagatccact ttgccaactg ctccctggtg cagc 94

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Glu	His	Phe	Ala	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Gly	Phe	Pro	Asn	Pro	Leu	Ala
1															
														15	

Glu	Arg	Ile	Ile	Phe	Glu	Thr	His	Gln	Ile	His	Phe	Ala	Asn	
														30
20														

<210> 48

<211> 150

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

cagagcaggc ggctgcaacg agacaggcat gttggagagg ctgccccgt gtggaaaggc 60

tttcgcagac atgatggca aggtggacgt ctggaagtgg tgcaacctgt ccgagttcat 120

cgtgtactat gagagttca ccaactgcac 150

<210> 49

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly	Cys	Pro	Arg	Ala	Gly	Gly	Cys	Asn	Glu	Thr	Gly	Met	Leu	Glu	Arg
1															
														15	

Leu	Pro	Leu	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Ala	Asp	Met	Met	Gly	Lys	Val	Asp
														30	
20															

Val	Trp	Lys	Trp	Cys	Asn	Leu	Ser	Glu	Phe	Ile	Val	Tyr	Tyr	Glu	Ser
														45	
35															

Phe Thr

50

<210> 50

<211> 120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50
cagagcaggc ggctgcaacg agacaggcat gttggagagg ctgcccgt gtggaaaggc 60

tttcgcagac atgatggca aggtggacgt ctggaagtgg tgcaacctgt ccgagttcat 120

120

<210> 51
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Gly Cys Pro Arg Ala Gly Gly Cys Asn Glu Thr Gly Met Leu Glu Arg
1 5 10 15

Leu Pro Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met Gly Lys Val Asp
20 25 30

Val Trp Lys Trp Cys Asn Leu Ser
35 40

<210> 52
<211> 90
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52
cagagcaggc ggctgcaacg agacaggcat gttggagagg ctgcccgt gtggaaaggc 60

tttcgcagac atgatggca aggtggacgt 90

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Gly Cys Pro Arg Ala Gly Gly Cys Asn Glu Thr Gly Met Leu Glu Arg

1 5 10 15

Leu Pro Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met Gly Lys
 20 25 30

<210> 54
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 54
catcggtac tatgagagtt tcaccaactg caccgagatg gaggccaatg tcgtggctg 60

cta 63

<210>	55
<211>	20
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

Ala Asn Val Val
20

<210> 56
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 56
caccgagatg gaggccaatg tcgtggctg ctactggccc aacccctgg cccagggtt 60

cat 63

<210>	57
<211>	20
<212>	PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57
Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Tyr Trp Pro Asn
1 5 10 15

Pro Leu Ala Gln
20

<210> 58
<211> 84
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 58
caccgagatg gaggccaatg tcgtggctg ctactggccc aacccctgg cccaggcctt 60

catcacccgc atccacaggc agtt 84

<210> 59
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Tyr Trp Pro Asn
1 5 10 15

Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg Gln Phe
20 25 30

<210> 60
<211> 114
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 60
caccgagatg gaggccaatg tcgtggctg ctactggccc aacccctgg cccaggcctt 60

catcacccgc atccacaggc agttcttc caactgcacc gtggacaggg tcca 114

<210> 61
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Tyr Trp Pro Asn
1 5 10 15

Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg Gln Phe Phe Ser
20 25 30

Asn Cys Thr Val Asp Arg Val His
35 40

<210> 62
<211> 199
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 62
caccgagatg gaggccaatg tcgtggctg ctactggccc aacccctgg cccaggcctt 60

catcacccgc atccacaggc agttcttctc caactgcacc gtggacaggg tccacttgga 120

ggaccccca gacgagggttc tcatcccgt gatcggtata cccgtcggtc tgactgtcg 180

catggctggc ctggtggtg 199

<210> 63
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Tyr Trp Pro Asn
1 5 10 15

Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg Gln Phe Phe Ser
20 25 30

Asn Cys Thr Val Asp Arg Val His Leu Glu Asp Pro Pro Asp Glu Val
 35 40 45

<210> 64
 <211> 2984
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 64	
gaacaacctc tctctctcca gcagagagtgc acctccctg ctttaggacc atcaagctct	60
gctaactgaa tctcatccta attgcaggat cacattgcaa agcttcaact cttccacc	120
ttgcttggtgg gtaaatctct tctgcggaaat ctcagaaatgt aaagttccat cctgagaata	180
tttcacaaag aatttcctta agagctggac tgggtcttga cccctgaatt taagaattc	240
ttaaagacaa tgtcaaataat gatccaagag aaaatgtgat ttgagtcgttgg agacaatttgt	300
gcataatcgta taataataaaa aaccctataact agcctataga aaacaatatt tgaaagattg	360
ctaccactaa aaagaaaaact actacaactt gacaagactg ctgcaactt caatttgtca	420
accacaactt gacaagggttgc tataaaaaca agattgctac aacttctagt ttatgttata	480
cagcatattt cattttggct taatgtgga gaaaaagtgt accctgtatt ttctggttct	540
cttgcctttt ttatgattc ttgttacagc agaattagaa gagagtccctg aggactcaat	600
tcagttggaa gttactagaa ataaaatcat gacagctcaa tatgaatgtt accaaaagat	660
tatgcaagac cccattcaac aagcagaagg cgtttactgc aacagaacct gggatggatg	720
gctctgctgg aacgatgttgc cagcaggaac tgaatcaatg cagctctgcc ctgattactt	780
tcaggacttt gatccatcg aaaaagttac aaagatctgt gaccaagatg gaaactgttt	840
tagacatcca gcaagcaaca gaacatggac aaattatacc cagtgtaatg ttaacaccca	900

cgagaaaatg aagactgcac taaattgtt ttacctgacc ataattggac acggattgtc	960
tattgcata ctttttatct cgcttggcat attctttat ttcaagagcc taagtigcca	1020
aaggattacc ttacacaaaa atctgttctt ctcattgtt tgtaactctg ttgttaacaat	1080
cattcaccc actgcagtg ggacacaacca ggccttagta gccacaaatc ctgttagttg	1140
caaagtgtcc cagttcattt atctttacct gatgggctgt aattacttt ggtatgctcg	1200
tgaaggcatt tacctacaca cactcattgt ggtggccgtg tttgcagaga agcaacattt	1260
aatgtggat tattttcttg gctggggatt tccactgatt cctgcttgta tacatgccat	1320
tgctagaagc ttatattaca atgacaattt ctggatcagt tctgatacc accatccatcta	1380
cattatccat ggcaccaattt gtgctgctt actggtaat ctttttct tttttttttt tttttttttt	1440
tgtacgcgtt ctcacca agttaaaatg tacacaccaaa gcggaaatccaa atctgtacat	1500
gaaagctgtg agagctactc ttatcttggt gccattgctt ggcatttaatg ttgtgctgat	1560
tccatggcga cctgaaggaa agattgcaga ggaggtatat gactacatca tgacatcct	1620
tatgcacttc cagggtcttt tggctctac cattttctgc ttcttaatg gagaggttca	1680
agcaattctg agaagaaaact ggaatcaata caaaatccaa tttggaaaca gctttccaa	1740
ctcagaagct ctgcgtatgt cgttttacac agtgtcaaca atcgtatgt gtccaggta	1800
tagtcatgac tgtcttagtg aacacttaaa tggaaaagc atccatgata ttgaaaatgt	1860
tctcttaaaa ccagaaaatt tatataattt gaaatagaag gatggttgtc tcactgttt	1920
gtgcttcctcc taactcaagg acttggaccc atgactctgt agccagaaga cttcaatatt	1980
aaatgacttt ttgaatgtca taaagaagag cttcacatg aaatttagtag tgtgttata	2040

agagtgtaac atccagctc atgtggaaa aaagaatcc tggttgtaa tggttcag	2100
taaatactcc cactatgcct gatgtgacgc tactaacctg acatcaccaa gtgtggaatt	2160
ggagaaaagc acaatcaact tttctgagct ggtgtaaagcc agtccagca caccattgca	2220
tgaattcaca aacaaatggc tgtaaaacta aacatacatg ttggcatga ttctaccctt	2280
attgcccaa gagacctagc taaggtctat aaacatgaag ggaaaattag cttagttt	2340
taaaaacttt tatccatct tgattgggc agttgactt tttttgccc agagtgcgt	2400
agtccctttt gtaactaccc tctcaaatgg acaataccag aagtgaatta tccctgtgg	2460
ctttctttc tctatgaaaa gcaactgagt acaattgtt tgcactc atttgctgac	2520
acatcagtta tatcttgtgg catatccatt gtggaaactg gatgaacagg atgtataata	2580
tgcaatccta cttctatc attaggaaaa catcttagtt gatgctacaa aacaccttgt	2640
caacctttc ctgtcttacc aaacagtggg aggaaattcc tagctgtaaa tataatttt	2700
gtcccttcca ttctactgt ataaacaaat tagcaatcat tttatataaa gaaaatcaat	2760
gaaggatttc ttatccctt ggaatttgt aaaaagaat tgtaaaaat gagctgtaa	2820
atactccatt atttatccc atagtctcaa atcaaataca tacaacctat gtaatttta	2880
aagcaaatat ataatgcaac aatgtgtgtatc tgatactgtatc tctggctgtatc	2940
tttttaat aaaatagagt ctggaatgt aaaaaaaaaaaa aaaa	2984

<210> 65
<211> 461
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Met Glu Lys Lys Cys Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe

1	5	10	15
Met Ile Leu Val Thr Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile			
20	25	30	
Gln Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys			
35	40	45	
Tyr Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr			
50	55	60	
Cys Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala			
65	70	75	80
Gly Thr Glu Ser Met Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp			
85	90	95	
Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe			
100	105	110	
Arg His Pro Ala Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn			
115	120	125	
Val Asn Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu			
130	135	140	
Thr Ile Ile Gly His Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ile Ser Leu			
145	150	155	160
Gly Ile Phe Phe Tyr Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu			
165	170	175	
His Lys Asn Leu Phe Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Val Val Thr Ile			
180	185	190	
Ile His Leu Thr Ala Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn			
195	200	205	
Pro Val Ser Cys Lys Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly			
210	215	220	
Cys Asn Tyr Phe Trp Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu			
225	230	235	240

Ile Val Val Ala Val Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr
 245 250 255

Phe Leu Gly Trp Gly Phe Pro Leu Ile Pro Ala Cys Ile His Ala Ile
 260 265 270

Ala Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr
 275 280 285

His Leu Leu Tyr Ile Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val
 290 295 300

Asn Leu Phe Phe Leu Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu
 305 310 315 320

Lys Val Thr His Gln Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg
 325 330 335

Ala Thr Leu Ile Leu Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Ile
 340 345 350

Pro Trp Arg Pro Glu Gly Lys Ile Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Ile
 355 360 365

Met His Ile Leu Met His Phe Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe
 370 375 380

Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn
 385 390 395 400

Gln Tyr Lys Ile Gln Phe Gly Asn Ser Phe Ser Asn Ser Glu Ala Leu
 405 410 415

Arg Ser Ala Ser Tyr Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Pro Gly Tyr
 420 425 430

Ser His Asp Cys Pro Ser Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile His Asp
 435 440 445

Ile Glu Asn Val Leu Leu Lys Pro Glu Asn Leu Tyr Asn
 450 455 460

<210> 66
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Gly Cys Pro Arg Ala Gly Gly Cys Asn Glu Thr Gly Met Leu Glu Arg
1 5 10 15

Leu Pro Leu Cys Gly Lys Ala Phe Ala Asp Met Met Gly Lys Val Asp
20 25 30

Val Trp Lys Trp Cys Asn Leu
35

<210> 67
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Glu Ser Phe Thr Asn Cys Thr Glu Met Glu Ala Asn Val Val Gly Cys
1 5 10 15

Tyr Trp Pro Asn Pro Leu Ala Gln Gly Phe Ile Thr Gly Ile His Arg
20 25 30

Gln Phe Phe Ser Asn Cys Thr Val Asp Arg Val His Leu Glu Asp Pro
35 40 45

Pro Asp Glu Val Leu
50

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 68

tggccatca cctttcatg a

21

<210> 69
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA

<400> 69
 ctggctgctc ctggccatc a

21

<210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA

<400> 70
 tcctggcca tcaccttca a

21

<210> 71
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> siRNA

<400> 71
 cuaugagaca gcuguccaa

19

<210> 72
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> siRNA

<400> 72
guucuucucc aacugcacc 19

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 73
cgagcggact cgactcgcca c 21

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 74
cttccttaggg tggcggtggc c 21

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 75

gtccgcctcc tccttctgct 20

<210> 76
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 76
aagtggagta acatggttat tgt 23

<210> 77
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 77
agccatggag actggagcgc tgc 23

<210> 78
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 78
gtggcccaagt agctggagat tggc 24

<210> 79
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 79
gcgaattcct gccagaccac cag 23

<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 80
gtggatccta ccgggccccgg gaca 24

<210> 81
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 81
gcgaattcaa tccccacgag gccctggctc agcc 34

<210> 82
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 82

caggatccta caagagtgtat gaggaagggg atg 33

<210> 83
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 83
cagaatttcc agaggcggcc gctgcaacca gacag 35

<210> 84
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 84
gtggatccca ccaccaggcc agccatggcg acagt 35

<210> 85
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer Sequence

<400> 85
gtggatccca ccaccaggcc agccatggcg acagtaattg aaaatagaag gatggttgtc 60

tcactgttt gtgttt 76