

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.⁷
G01N 33/574(11) 공개번호 10-2005-0058407
(43) 공개일자 2005년06월16일(21) 출원번호 10-2005-7002915
(22) 출원일자 2005년02월21일
번역문 제출일자 2005년02월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/026184
국제출원일자 2003년08월20일(87) 국제공개번호 WO 2004/018999
국제공개일자 2004년03월04일

(30) 우선권주장 60/404,770 2002년08월20일 미국(US)

(71) 출원인 밀레니엄 파머슈티컬스 인코퍼레이티드
미합중국 매사추세츠 캄브리지 랜즈다운 스트리트 40(72) 발명자 모나한, 존, 이.
미국 02081 매사추세츠주 왈폴 웨스트 스트리트 942
자오, 크수메이
미국 01778 매사추세츠주 웨이랜드 콩코드 로드 149
첸, 안
미국 02141 매사추세츠주 캄브리지 아파트먼트 2 플라이마우스 스트리트 26아
글라트, 카렌
미국 01760 매사추세츠주 나티크 비콘 스트리트 17
카마트카르, 슈반기
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 #1 소우 밀 브루크 파크웨이 655(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 자궁경부암의 확인, 평가, 예방 및 요법을 위한 조성물, 키트 및 방법

명세서

관련 출원

본 출원은 2002년 8월 20일자 출원된 미국 가출원 제60/404,770호를 우선권 주장하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

기술분야

본 발명의 분야는 자궁경부암의 진단, 특징규명, 처방 및 요법 등을 비롯한 자궁경부암에 관한 것이다.

배경기술

미국 및 사실상 전세계에서 발표된 암 사례의 수 증가는 주요 관심사이다. 최근, 특정 유형의 암에 이용할 수 있는 치료 방법이 몇가지 있기는 하지만, 이들은 절대적인 성공을 보장하지는 못한다. 가장 효과적이기 위해서, 이러한 치료 방법들에는 악성종양의 초기 검출 뿐 아니라 악성종양의 중증도에 대한 신뢰성있는 평가까지도 요구된다.

자궁경부암은 여성에서 가장 흔한 악성종양 중 하나이며 전세계에 걸쳐 유의한 공중 보건 문제가 되고 있다. 미국에서만 해도, 침윤성 자궁경부암은 모든 부인과 암의 대략 19%를 차지한다. 1996년에는 14,700건이 새로 진단되었고, 4900건의 사망이 상기 질환으로 인한 것으로 추정된다 [American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 1996, Atlanta, Ga.:American Cancer Society, 1996]. 다수의 스크리닝 프로그램들이 광범위하게 이용가능하지 않은 많은 개발 도상국에서는 임상적인 문제가 더욱 심각하다. 전세계에서 새로운 사례의 수는 471,000건으로 추정되며, 이 중에서 4년 생존율

은 단지 40%에 불과하다 [Munoz et al., 1989, Epidemiology of Cervical Cancer In: "Human Papillomavirus", New York, Oxford Press, pp 9-39; National Institutes of Health, Consensus Development Conference Statement on Cervical Cancer, Apr. 1-3, 1996].

이러한 면에서, 자궁경부암은 침윤진 병변을 초기에 검출한다면 고도로 예방가능한 형태의 암이다. 파니콜로-염색된 자궁경부 도말표본 (Pap 도말표본 또는 Pap 시험표본이라 지칭하기도 함)의 세포학적 검사는 최근 자궁경부암을 검출하는 주요 방법이며, 현재까지 개발된 가장 비용 효과적인 암 스크리닝 시험법이다 [Greenberg, M. D., et al., 1995, Clin Obstet Gynecol 38(3):600-609]. 이것이 미국 및 그밖의 세계 많은 나라에 도입되었기 때문에 자궁경부암의 발병률 및 사망률은 70% 넘게 크게 감소되어 왔다 [Eddy D. M., 1990, Ann. Intern. Med. 113(3):214-226]. 더 베테스다 시스템 (The Bethesda System)이 기재한 Pap 시험표본의 비정상적인 형태 변화로는 ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance; 유의성이 결정되지 않은 비전형적 편평 세포), AGUS (Atypical Glandular cells of Undetermined Significance; 유의성이 결정되지 않은 비전형적 샘 세포), LSIL (Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion; 저등급 편평 상피내 병변), HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion; 고등급 편평 상피내 병변) 및 편평 선암(腺癌) 등이 있다 [National Cancer Institute Workshop: The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. JAMA, 262(7):931-934]. Pap 시험의 성공은 주로 전암성 병변의 진단 및 치료에 기여한다.

최근, HSIL 및 더욱 진전된 질환에 걸린 환자들의 처방은 비교적 일반적이다. 이러한 병변이 있는 대부분의 여성들은 질경검사 및 적절하게 지시된 생검(生檢)을 받는다. 조직학적 진단이 확인되면, 박리 또는 절제에 의한 치료, 예를 들어 LEEP (Electrosurgical Loop Excision Procedure), 냉동외과술 또는 원주절제술을 행하였다. 그러나, 애매하거나 저등급의 세포학적 결과 (ASCUS 및 LSIL)의 처방에는 논란이 많다. 이는 주로 상기 시험이 형태를 기초로 한다는 특성으로 인한 것이며, 불가피하게 관찰자간 변동 및 몇몇 Pap 시험과 조직학적 추적검사와의 불일치를 초래한다. 1차 Pap 시험의 평균 민감도가 대략 58%이며 반복 시험의 정확도는 단지 약 66%에 불과함이 보고되었다 [Fahey M.T., et al., 1995, Am. J. Epidemiol. 141:680-689]. 민감도가 낮고 재현성이 불량하여 ASCUS 및 LSIL 환자를 처방하는 것은 난해한 일이다. ASCUS 또는 LSIL로 1차 진단된 여성의 추적검사에 "가속화된 반복 Pap 시험법 (accelerated repeat Pap test)"이 추천된다면, 환자들은 잠재적인 고등급 병변의 진단이 지연될 위험에 처하게 될 것이다. 그러나, 이들 환자들이 보편적으로 질경검사를 받는다면, 대다수의 여성들이 치료될 것이다. ASCUS 여성의 단지 5 내지 10%만이 질경검사후에 고등급 질환에 걸리고, 80% 초과 LSIL가 정상 상태로 퇴행하거나 이들의 현재 상태에 머물 것이다 ([Cox, J.T., 2000, Clinics in Laboratory Medicine. 20(2):303-343], [Ostor A.G., 1993, Int. J. Gynecol. Pathol. 12(2):186-192]).

AGUS는 ASCUS 또는 LSIL보다 훨씬 더 위험한데, 이는 세포학이 이러한 상태에 덜 민감하고 상기 질환이 더욱 신속하게 진행되기 때문이다 [Anderson M.C., 1995, Baillieres Clin. Obstet. Gynecol. 9:105]. AGUS가 있는 여성의 9 내지 54%가 생검으로 확인된 자궁경부 상피내 신생물을 갖고, 0 내지 8%가 생검으로 확인된 계내(*in situ*) 선암 (AIS; Adenocarcinoma In Situ)을 가지며, 1 내지 9% 미만은 침윤성 암종을 갖는 것으로 밝혀졌다 [Wright, T.C., et al., 2002, JAMA, 287(16):2120-2129]. 더 높은 위험성으로 인해, AGUS가 있는 모든 환자는 질경검사를 받는다 [Wright, T.C., et al., 2002].

자궁경부 세포학의 주관성은 형성장애 세포의 존재 및 중증도를 결정하는 객관적인 마커에 의해 감소될 수 있다. 고-위험 인간 파필로마바이러스 (HPV; Human PapillomaVirus) 감염은 자궁경부암 발병과 깊은 관련이 있기 때문에 [Walboomers, J.M., et al., 1999, J. Pathol. 189:12-19], PCR 또는 하이브리드 캡처 II (Hybrid Capture II) (미국 매릴랜드주 실버 스프링에 소재하는 디진 다이아그노스틱스(Digene Diagnostics) 제품)와 같은 방법을 이용한 HPV 시험이 객관적인 측정치를 제공한다고 여겨진다 [Wick, M. J., 2000, Clinics in Laboratory Medicine, 20(2):271-287]. 그러나, 대다수의 HPV 감염 및 이로 인한 편평 상피내 병변은 특히 젊은 여성에 있어서 자발적으로 퇴행하기 때문에, HPV 시험은 병변이 지속되거나 침윤성 암종으로 진행되는 환자를 특이적으로 확인할 수 없다 ([Sasieni, P.D., 2000, J. Am. Med. Womens Assoc. 55 (4):216-219], [Sasieni, P.D., 2000, Br. J. Cancer, 83(5):561-565]). ASCUS-LSIL 선별 연구 (ALTS; ASCUS-LSIL Triage Study)에서 보고된 바와 같이, LSIL Pap 결과가 나타난 여성의 83%가 고-위험 HPV형에 대해 양성인 것으로 시험되었는데, 이것은 너무 높은 수준이어서 선별 (저등급 편평 상피내 병변의 세포학적 증거가 있는 여성을 선별하기 위한 인간 파필로마바이러스 시험: 무작위화 시도로부터의 기본 데이터)에 유용하지 못하다 [The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group, 2000, J. Natl. Cancer Inst. 92:397-402]. HPV 시험을 이용한 선별이 ASCUS Pap 결과가 나타난 여성에서의 HSIL 검출 민감도를 유의하게 개선시켰지만, 특이성은 통상의 세포학을 사용한 경우와 유사하였다 [Solomon, D., et al., 2001, J. Natl. Cancer Inst. 93(4):293-299]. 더욱 바람직한 자궁경부 스크리닝 마커는 Pap에서의 LSIL 및 ASCUS 환자에 있어서 모든 자궁경부암, 다수의 HSIL 및 적은 비율의 진정한 전암을 확인하는 것이다.

현재, 자궁경부 발암이 단계별 방식으로 발생한다는 것은 널리 받아들여지고 있다 [Ried, T., et al., 1999, Genes Chromosomes Cancer, 25(3):195-204]. 정상적인 상피로부터 신생물 전(preneoplastic) 병변 및 침윤성 암종으로의 이행은 순차적으로 발생한다. 형태학적으로 정의된 단계의 형성장애 및 악성 비정상은 종양발생 동안의 세포내 유전자 변형을 반영하는 것이다. 따라서, 자궁경부암의 확인, 평가, 예방 및 요법에 유용한 생물마커를 제공하는 것이 바람직하다.

발명의 요약

본 발명은 표 1에 기재한 암 마커 (이하, "마커" 또는 "본 발명의 마커")에 관한 것이다. 본 발명은 상기 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 단백질 및 핵산 (이하, 각각 "마커 단백질" 및 "마커 핵산")을 제공한다. 표 1은 첨부하는 서열목록에 기재한 이러한 마커 핵산 및 단백질의 서열 (서열 1 내지 44)의 서열 확인 번호를 제공한다. 표 2는 새로 확인된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 기재한 것이다. 표 3은 새로 확인된 뉴클레오타이드 서열을 기재한 것이다. 표 1 내지 표 3은 첨부하는 서열목록에 기재한 이러한 마커 핵산 및 단백질 서열의 서열 확인 번호 및 상기 마커의 유전자 명칭을 제공한다. 본 발명은 이러한 단백질 및 (또는) 상기 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 및 항체 단편을 추가로 제공한다.

또한, 본 발명은 자궁경부암을 진단, 단계분류, 예후, 모니터링 및 치료하기 위한 여러가지 방법, 시약 및 키트에 관한 것이기도 하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "자궁경부암"은 암종 (예를 들어 계내 암종, 침윤성 암종, 전이 암종) 및 전-악성

상태 (예컨대 CIN 또는 SIL 등을 비롯한 형성장애)를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 환자 샘플 중 본 발명의 마커 발현 수준을 대조군, 예를 들어 자궁경부암이 없는 환자로부터의 샘플 중에서의 정상적인 마커 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 환자가 자궁경부암에 걸렸거나 또는 자궁경부암의 발병 위험이 통상적인 위험보다 더 높은지 여부를 평가하는 진단 방법을 제공한다. 환자 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 정상 수준에 비해 유의하게 더 높다는 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있거나 또는 자궁경부암의 발병 위험이 더 높다는 지표이다.

본 발명에 따라, 마커는 본 발명의 방법의 양성 예측값이 약 10% 이상, 바람직하게는 약 25% 이상, 더욱 바람직하게는 약 50% 이상, 가장 바람직하게는 약 90% 이상이 되도록 선택한다. 또한, 본 발명의 방법에 사용하기에 바람직한 것은 하기하는 상태 중 임의의 상태의 약 20% 이상, 더욱 바람직하게는 약 50% 이상, 가장 바람직하게는 약 75% 이상에서 정상적인 자궁경부 세포에 비해 2배 이상 차별적으로 발현되는 마커이다: 단계 0 자궁경부암 환자, 단계 I 자궁경부암 환자, 단계 II 자궁경부암 환자, 단계 III 자궁경부암 환자, 단계 IV 자궁경부암 환자, 등급 I 자궁경부암 환자, 등급 II 자궁경부암 환자, 등급 III 자궁경부암 환자, 편평 세포 (표피양) 자궁경부암 환자, 자궁경부 선암 환자, 자궁경부 선편평 암종 환자, 소세포 (small-cell) 자궁경부 암종 환자, 악성 자궁경부암 환자, 자궁경부의 원발성 암종이 있는 환자, 자궁경부의 원발성 악성 림프종이 있는 환자 및 자궁경부의 2차 악성 림프종이 있는 환자 및 자궁경부와 관련된 모든 기타 유형의 암, 악성종양 및 형질전환체가 있는 환자.

한 실시양태에서, 본 발명은 a) 환자 샘플 중 본 발명의 마커 발현 수준과 b) 대조군인 비-자궁경부암 샘플 중에서의 정상적인 마커 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 진단 방법 (예컨대 새로운 검출 ("스크리닝"), 재발의 검출, 반사 시험)을 제공한다.

환자 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 정상 수준에 비해 유의하게 더 높다는 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 a) 환자 샘플 중 본 발명에 기재한 마커 세트의 발현 수준과 b) 대조군인 비-자궁경부암 샘플 중에서의 정상적인 마커 세트 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 진단 방법 (예컨대 새로운 검출 ("스크리닝"), 재발의 검출, 반사 시험)을 제공한다.

환자 샘플 중에서의 마커 세트 발현 수준이 정상 수준에 비해 유의하게 더 높다는 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표이다.

또한, 본 발명은 환자에서의 자궁경부암 억제 요법의 효능을 평가하는 진단 방법을 제공한다. 이러한 방법은

a) 환자로부터 수득한 제1 샘플 중에서 본 발명의 마커를 발현시킨 후에 상기 요법의 적어도 일부를 환자에게 제공하는 단계 및

b) 환자로부터 수득한 제2 샘플 중에서 상기 마커를 발현시킨 후에 상기 요법의 일부를 제공하는 단계

를 포함한다.

제2 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 제1 샘플 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 낮다는 것은 상기 요법이 상기 환자에서의 자궁경부암 억제에 효능이 있다는 지표이다.

이러한 방법에서, "요법"은 자궁경부암을 치료하기 위한 임의의 요법일 수 있고, 화학요법, 방사선 요법, 수술에 의한 종양 조직 제거, 유전자 요법 및 생물학적 요법, 예를 들어 항체 및 케모카인의 투여 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다는 것을 알 것이다. 따라서, 본 발명의 방법을 이용하여 환자를 요법 이전, 요법 도중 및 요법 후에 대하여 평가할 수 있고, 예를 들어 종양 크기(burden)의 감소를 평가할 수 있다.

바람직한 실시양태에서, 상기 진단 방법은 화학적 작용제 또는 생물학적 작용제를 사용하는 요법에 관한 것이다. 이들 방법은

a) 환자로부터 수득한 제1 샘플 중에서 본 발명의 마커를 발현시키고 화학적 또는 생물학적 작용제의 존재하에 유지시키는 단계 및

b) 환자로부터 수득한 제2 샘플 중에서 상기 마커를 발현시키고 상기 작용제의 부재하에 유지시키는 단계

를 포함한다.

제2 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 제1 샘플 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 낮다는 것은 상기 작용제가 환자에서의 자궁경부암 억제에 효능이 있다는 지표이다. 한 실시양태에서, 제1 샘플 및 제2 샘플은 환자로부터 수득한 단일 샘플의 일부이거나 환자로부터 수득하여 풀링(pooling)한 샘플의 일부일 수 있다.

본 발명은

a) 제1 시점에 환자 샘플 중에서 본 발명의 마커 발현을 검출하는 단계,

b) 이후의 시점에 상기 단계 a)를 반복하는 단계 및

c) 상기 단계 a) 및 b)에서 검출된 발현 수준을 비교하고, 이로부터 환자에서 자궁경부암의 진행을 모니터링하는 단계를 포함하는, 환자에서 자궁경부암의 진행을 평가하는 모니터링 방법을 추가로 제공한다.

이후 시점에서의 샘플 중 마커 발현 수준이 제1 시점에서의 샘플 중 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 높다는 것은 자궁경부암이 진행되었다는 지표이고, 발현 수준이 유의하게 더 낮다는 것은 자궁경부암이 퇴행되었다는 지표이다.

본 발명은 a) 환자 샘플 중 본 발명의 마커 발현 수준과 b) 대조군 샘플 중에서의 정상적인 마커 발현 수준 (또는 비-전이 수준)을 비교하는 단계를 포함하는, 자궁경부암이 전이되었거나 장차 전이될 것 같은지의 여부를 결정하기 위한 진단 방법을 추가로 제공한다.

환자 샘플 중에서의 발현 수준이 정상 수준 (또는 비-전이 수준)에 비해 유의하게 더 높다는 것은 자궁경부암이 전이되었거나 장차 전이될 것 같다는 지표이다.

또한, 본 발명은 환자에서의 자궁경부암 억제용 조성물을 선택하기 위한 시험 방법을 제공한다. 상기 방법은

- a) 환자로부터의 암 세포를 포함하는 샘플을 수득하는 단계,
- b) 상기 샘플의 분취액을 복수개의 시험 조성물 존재하에 개별적으로 유지시키는 단계,
- c) 각각의 분취액에서 본 발명의 마커 발현을 비교하는 단계 및

d) 시험 조성물 중에서, 특정 시험 조성물을 함유하는 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 다른 시험 조성물 존재하에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 감소되는 하나를 선택하는 단계를 포함한다.

를 포함한다.

본 발명은 화합물의 자궁경부암 유발 잠재력을 평가하는 시험 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은 a) 화합물의 존재 및 부재하에 자궁경부 세포의 별개의 분취액을 유지시키는 단계 및 b) 각각의 분취액에서 본 발명의 마커 발현을 비교하는 단계를 포함한다.

화합물의 존재하에 유지된 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 상기 화합물의 부재하에 유지된 분취액 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 높다는 것은 상기 화합물이 자궁경부암 유발 잠재력을 보유한다는 지표이다.

또한, 본 발명은 환자에서 자궁경부암을 억제하는 방법을 추가로 제공한다. 상기 방법은

- a) 환자로부터의 암 세포를 포함하는 샘플을 수득하는 단계;
- b) 상기 샘플의 분취액을 복수개의 조성물의 존재하에 개별적으로 유지시키는 단계;
- c) 각각의 분취액에서 본 발명의 마커 발현을 비교하는 단계 및

d) 조성물 중에서, 특정 조성물을 함유하는 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 다른 조성물 존재하에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 저하되는 1종 이상을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

를 포함한다.

전술한 방법에서, 샘플 또는 환자 샘플은 환자로부터 수득한 세포를 포함한다. 상기 세포는 예를 들어 자궁경부 브러쉬로 수집된 자궁경부 도말표본 중에 존재하는 것일 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 샘플은 신체의 유체이다. 이러한 유체의 예로는 혈액, 림프액, 복수액, 부인과 유체, 뇨 및 질 세정으로 수집된 유체 등이 있다. 추가의 실시양태에서, 환자 샘플은 생체내 샘플이다.

본 발명에 따라, 샘플 중 본 발명의 마커 발현 수준은 예를 들어 샘플 중에서

●상응하는 마커 단백질 (예컨대 표 1에서 "서열 (아미노산)"이라고 기재한 서열 중 하나를 갖는 단백질 또는 상기 단백질의 단편의 존재를 검출 (예를 들어 상기 단백질 또는 단백질 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체, 항체 단편 또는 단일쇄 항체 등과 같은 시약을 사용하여 검출함)하고,

●상응하는 마커 핵산 (예컨대 표 1에서 "서열 (뉴클레오타이드)"라고 기재한 핵산 서열 중 하나를 갖는 뉴클레오타이드 전사체 또는 그의 상보체) 또는 상기 핵산의 단편의 존재를 검출 (예를 들어 상기 샘플로부터 수득한 전사된 폴리뉴클레오타이드를 상기 서열 (뉴클레오타이드) 또는 그의 상보체 중 임의의 것의 전장 핵산 서열 또는 그의 절편을 갖는 1종 이상의 핵산이 고착되어 있는 기관과 접촉시켜 검출함)하고,

● 상응하는 마커 단백질에 의해 직접적으로 (즉, 촉매 작용에 의해) 생성되거나 간접적으로 생성된 대사물질의 존재를 검출함으로써 평가할 수 있다.

본 발명에 따라, 전술한 방법 중 임의의 것을 당업계에 공지된 자궁경부암 마커를 비롯하여 복수개 (예컨대 2종, 3종, 5종 또는 10종 이상)의 자궁경부암 마커를 사용하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에서는, 각각의 샘플 중 복수개의 마커 (이 중 1종 이상이 본 발명의 마커임) 발현 수준을 자궁경부암을 앓고 있지 않은 대조군 인간으로부터 수득한 동일 유형의 샘플 중에서의 상기 복수개의 마커 각각의 정상적인 발현 수준과 비교한다. 샘플 중 본 발명의 1종 이상의 마커 또는 이들의 몇 가지 조합의 발현 수준이 상기 마커의 상응하는 정상적인 수준 또는 대조군 수준에 비해 유의하게 변경 (즉, 단일 마커를 사용하는 상기 기재한 방법에서 명시한 바와 같이 증가 또는 감소)된 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표이다. 전술한 모든 방법에 있어서, 마커(들)은 상기 방법의 양성 예측값이 약 10% 이상이 되도록 선택하는 것이 바람직하다.

추가 측면에서, 본 발명은 마커 단백질 (예를 들어 서열목록에 기재한 아미노산 서열 중 하나를 갖는 단백질) 또는 상기 단백질의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편을 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 항체, 항체 유도체 및 항체 단편의 제조 방법도 제공한다. 이러한 방법은 전장 마커 단백질 (예컨대 서열목록에 기재한 아미노산 서열 중 하나를 갖는 단백질) 또는 그의 아미노산 10개 이상의 절편을 포함하고 세포로부터 수득하거나 화학적 합성으로 수득할 수 있는 단백질 또는 펩티드로 포유동물을 면역화시키는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 모노클로날 항체 및 단일쇄 항체의 제조까지 포함하며, 상기 방법은 면역화된 포유동물로부터 비장세포를 분리하는 단계, 분리된 비장세포를 불멸화 세포주와 융합시켜 하이브리도마를 형성하는 단계 및 개개의 하이브리도마를 마커 단백질 또는 상기 단백질의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마에 대해 스크리닝하는 단계를 추가로 포함한다.

또다른 측면에서, 본 발명은 다양한 진단 및 시험 키트에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 본 발명의 마커 발현 평가용 시약을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 환자에서의 자궁경부암 억제에 있어서 화학적 또는 생물학적 작용제의 적합성을 평가하는 키트를 제공한다. 이러한 키트는 본 발명의 마커 발현 평가용 시약을 포함하고, 또한 1종 이상의 상기 작용제를 포함할 수도 있다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 자궁경부암 세포의 존재를 평가하거나 또는 자궁경부암을 치료하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 마커 단백질 또는 상기 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편을 포함한다. 또한, 이러한 키트는 마커 단백질 또는 상기 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 복수개의 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편을 포함할 수도 있다.

추가 실시양태에서, 본 발명은 또한 마커 핵산 또는 상기 핵산의 단편과 특이적으로 결합하는 핵산 프로브를 포함하는, 자궁경부암 세포의 존재를 평가하는 키트를 제공한다. 또한, 상기 키트는 마커 핵산 또는 상기 핵산의 단편과 특이적으로 결합하는 복수개의 프로브를 포함할 수도 있다.

추가 측면에서, 본 발명은 환자 자궁경부암을 앓고 있거나 자궁경부암의 발병 위험이 있는 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 본 발명의 마커 발현을 감소시키고(시키거나) 그의 생물학적 기능을 방해하는 단계를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 마커 핵산 또는 그의 절편에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 환자에게 제공하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 마커 핵산 또는 그의 단편의 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 벡터의 전달을 통해 환자에게 제공될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 방법은 마커 단백질 또는 상기 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편을 환자에게 제공하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편은 서열목록에 기재한 아미노산 서열 중 하나를 갖는 단백질 또는 상기 단백질의 단편과 특이적으로 결합한다.

본 발명의 방법 및 키트는 공지된 자궁경부암 마커 등을 비롯한 공지된 암 마커를 포함할 수도 있음을 알 것이다. 또한, 상기 방법 및 키트는 자궁경부암 이외의 암을 확인하는데 사용될 수도 있음을 알 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 자궁경부 조직 샘플의 군집도를 도시한다. 34 개의 정상, LSIL, HSIL 및 암성 자궁경부 조직 샘플의 전사 프로파일 데이터를 계통 군집화하여 계통수(dendrogram)를 생성하였다. 각각의 샘플을 그의 조직 유형 및 Id 번호에 의해 표시하였다. 도 1에서의 약어는 다음과 같이 정의한다: N_{ecto} : 정상적인 자궁경질부; N_{endo} : 정상적인 자궁경관; LSIL: 저등급 편평 상피내 병변; HSIL: 고등급 편평 상피내 병변; T_{sc} : 편평상피암종; T_{aca} : 선암. 점선은 34가지 샘플을 2개의 주요 군인 대조군 및 질환군으로 나눈다. 흑색 원은 잘못 군집된 샘플을 나타낸다.

도 2는 cDNA 마이크로어레이(microarray) 혼성화에 의한, 정상, 형성장애 및 암성 자궁경부 조직내 MCM6 및 클라우딘 1의 전사 프로파일(TP)을 도시한다. 각각의 데이터 지점은 2벌 마이크로어레이 혼성화의 평균을 나타낸다. TP 강도는 어레이 상의 모든 스팟(spot)의 중간 강도에 의해 표준화하였다. 도 2에서의 약어는 다음과 같이 정의한다: Endo: 정상적인 자궁경관 조직; Ecto: 정상적인 자궁경질부 조직; LSIL: 저등급 편평 상피내 병변; HSIL: 고등급 편평 상피내 병변; SCC: 편평상피암종; ACA: 선암.

발명의 상세한 설명

본 발명은 자궁경부 세포의 암성 상태와 관련된, 표 1에 기재된 신규 발견된 암 마커에 관한 것이다. 이들 마커 중 임의의 것 또는 이들 마커의 조합의 정상적인 발현 수준보다 더 높은 발현 수준은 환자에서 형성장애와 같은 전-암성 상태를 비롯한 자궁경부암의 존재와 상관관계가 있다. 샘플 중 자궁경부암의 존재, 샘플 중 자궁경부암의 부재, 자궁경부암의 단계 및 환자에서 자궁경부암의 예방, 진단, 특징구명 및 요법과 관련된 자궁경부암의 기타 특징을 검출하는 방법이 제공된다. 또한, 자궁경부암의 치료 방법이 제공된다.

표 1은 정상적인 (즉, 비-암성) 자궁경부 세포에 비해 자궁경부암 세포에서 과발현되는 본 발명의 마커를 기재하며, 표 2 내지 13에 기재된 마커를 포함한다. 표 1은 뉴클레오타이드 전사체의 cDNA 서열의 서열목록 확인 번호, 각각의 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 단백질의 아미노산 서열의 서열목록 확인 번호 및 cDNA 서열 내에서 단백질 코딩 서열의 위치를 제공한다. 표 2는 새로 확인된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 제공한다. 표 3은 새로 확인된 뉴클레오타이드 서열을 기재한다. 표 4는 전사 프로파일 제작 실험에 의해 선택된 본 발명의 마커 및 SCC, ACA 및 HSIL에서 그의 마커 스코어를 확인한다. 표 5는 자궁경부암에서 과발현되는 본 발명의 마커를 계내 혼성화에 의해 확인하는 것이며, 마커 발현 위치를 나타낸다. 표 6은 자궁경부 조직 마이크로어레이를 사용하여 본 발명의 마커 및 그의 발현 빈도를 확인하는 것이다. 표 7은 유전자 특이적 프라이머를 확인하는 것이다. 표 8은 조직 패널상에서의 말단지점 PCR의 에티뮵 브로마이드 아가로스 겔 사진을 0 내지 5 크기로 스코어를 기재한다. 표 9 내지 13은 시험한 조직 각각에서의 표적 유전자 발현을 기재한다.

정의

본원에서 사용된 바와 같이, 하기하는 각각의 용어는 이 섹션에서 그와 관련된 의미를 갖는다.

관사 "어떤(a)" 및 "어떤(an)"은 본원에서 상기 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과 (즉, 하나 이상)을 지칭하는데 사용된다. 예를 들어, "어떤 요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.

"마커"는 조직 또는 세포내 발현 수준이 정상적인 또는 건강한 조직 또는 세포내 발현 수준에 비해 변경된 (암과 같은 질병 상태와 관련됨) 유전자이다. "마커 핵산"은 본 발명의 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 핵산 (예, mRNA, cDNA)이다. 이러한 마커 핵산으로는 서열목록에 기재한 핵산 서열 중 임의의 것의 전장 서열 또는 부분 서열 또는 이러한 서열의 상보체를 포함하며 모든 티미딘 잔기가 우리딘 잔기로 대체된 RNA를 들 수 있다. "마커 단백질"은 본 발명의 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 단백질이다. 마커 단백질은 서열목록에 기재한 서열 중 임의의 것의 전장 서열 또는 부분 서열을 포함한다. 용어 "단백질"과 "폴리펩티드"는 서로 바꿔 사용할 수 있다.

"마커 세트"는 1개 초과 마커로 구성된 군이다.

용어 "프로브"는 특이적으로 의도된 표적 분자, 예를 들어 뉴클레오타이드 전사체 또는 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 단백질과 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 프로브는 당업자에 의해 합성되거나 적절한 생물학적 제제로부터 유도될 수 있다. 표적 분자를 검출하기 위해, 본원에 기술된 바와 같이 프로브를 특이적으로 고안하여 표지할 수 있다. 프로브로서 사용할 수 있는 분자의 예로는 RNA, DNA, 단백질, 항체 및 유기 분자를 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

"자궁경부와 관련된" 신체의 유체는 환자 신체내에 있는 경우에 자궁경부 세포와 접촉하거나 이 세포를 통과하여 또는 상기 세포내로 흐르는 유체 또는 자궁경부 세포로부터 유출된 단백질이 통과할 수 있는 유체이다. 자궁경부 세포는 예를 들어 자궁경부 브러쉬에 의해 수집된 자궁경부 도말표본에 존재할 수 있다. 자궁경부와 관련된 신체의 유체의 예로는 혈액, 림프액, 복수액, 부인과 유체, 방광(cystic) 유체, 뇨 및 질 세정으로 수집된 유체를 들 수 있다.

마커의 "정상적인" 발현 수준은 인간 대상체 또는 자궁경부암을 앓고 있지 않은 환자의 자궁경부 세포에서의 마커 발현 수준이다.

마커의 "과발현" 또는 "발현 수준이 유의하게 더 높다는 것"은, 시험 샘플 중에서의 발현 수준이 발현을 평가하기 위해 사용된 분석법의 표준 오차보다 더 큰 것, 바람직하게는 대조군 샘플 (예컨대 마커 관련 질환을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 샘플)에서의 마커 발현 수준의 2배 이상, 더욱 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배, 바람직하게는 여러 대조군 샘플 중에서의 평균적인 마커 발현 수준인 것을 지칭한다.

마커의 "발현 수준이 유의하게 더 낮다는 것"은, 시험 샘플 중에서의 발현 수준이 대조군 샘플 (예컨대 마커 관련 질환을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 샘플)에서의 마커 발현 수준보다 2배 이상, 더욱 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배 더 낮은 것, 바람직하게는 여러 대조군 샘플 중에서의 평균적인 마커 발현 수준인 것을 지칭한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 생성물의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 예에서 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 다른 예에서 이 서열은 인핸서 서열 및 유전자 생성물의 발현에 필요한 기타 조절 요소를 포함할 수도 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어 유전자 생성물을 조직-특이적 방식으로 발현하는 것일 수 있다.

"구성적(constitutive)" 프로모터는 유전자 생성물을 코딩 또는 지정하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 경우에 살아있는 인간 세포에서 이 세포의 대부분 또는 모든 생리적 조건하에 유전자 생성물을 생성시키는 뉴클레오타이드 서열이다.

"유도가능한" 프로모터는 유전자 생성물을 코딩 또는 지정하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 경우에 살아있는 인간 세포에서, 실질적으로는 프로모터에 상응하는 유도자가 세포내에 존재하는 경우에만 유전자 생성물을 생성시키는 뉴클레오타이드 서열이다.

"조직-특이적" 프로모터는 유전자 생성물을 코딩 또는 지정하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 경우에 살아있는 인간 세포에서, 실질적으로는 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 유전자 생성물을 생성시키는 뉴클레오타이드 서열이다.

"전사된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 전사체"는 본 발명의 마커의 전사 및, 존재하는 경우, RNA 전사체의 정상적인 전사후 프로세싱 (예컨대 스플라이싱) 및 RNA 전사체의 역전사에 의해 제조된 성숙 mRNA의 전부 또는 일부에 대해 상보적이거나 그와 상동적인 폴리뉴클레오타이드 (예컨대 mRNA, hnRNA, cDNA 또는 이러한 RNA 또는 cDNA의 유사체)이다.

"상보적인"은 두 핵산 가닥의 영역 사이 또는 동일한 핵산 가닥의 두 영역 사이의 넓은 개념의 서열 상보성을 지칭한다. 제1 핵산 영역의 아데닌 잔기는 제1 영역에 역평형인 제2 핵산 영역의 잔기(이 잔기가 티미딘 또는 우라실인 경우)와 특정 수소 결합 ("염기쌍 형성")을 형성할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 제1 핵산 가닥의 시토신 잔기는 제1 가닥에 역평형인 제2 핵산 가닥의 잔기(이 잔기가 구아닌인 경우)와 염기쌍을 형성할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 핵산의 제1 영역은 동일하거나 상이한 핵산의 제2 영역에 상보적이며, 상기 두 영역이 역평형 방식으로 배열되는 경우, 제1 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드 잔기가 제2 영역의 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있다. 바람직하게는, 제1 영역은 제1 부분을 포함하며 제2 영역은 제2 부분을 포함하는데, 제1 부분과 제2 부분을 역평형 방식으로 배열하는 경우, 제1 부분의 뉴클레오타이드 잔기의 약 50% 이상, 바람직하게는 약 75% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 제1 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기는 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기쌍을 형성할 수 있다.

본원에서 사용된 바와 같이, "상동성"은 동일한 핵산 가닥의 두 영역 또는 상이한 두 핵산 가닥의 영역들 사이의 뉴클레오타이드 서열 유사성을 지칭한다. 두 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유되는 경우, 이들 영역은 그 위치에서 상동성이다. 각각의 영역의 하나 이상의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 잔기에 의해 점유되는 경우, 제1 영역은 제2 영역에 상동성이다. 두 영역 사이의 상동성은 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유되는 두 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 비율 측면에서 표현된다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 5'-ATTGCC-3'을 갖는 영역 및 뉴클레오타이드 서열 5'-TATGGC-3'을 갖는 영역은 50% 상동성을 공유한다. 바람직하게는, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고 제2 영역은 제2 부분을 포함하며, 각 부분의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 약 50% 이상, 바람직하게는 약 75% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다. 더욱 바람직하게는, 각 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다.

실질적인 비율의 분자가 기관과 분리되지 않도록 하면서 기관을 유체 (예컨대 표준 염수 시트르산염, pH 7.4)로 세정할 수 있도록 분자가 기관과 공유 결합 또는 비공유 결합된 경우, 분자는 기관에 "고정" 또는 "고착"된 것이다.

본원에서 사용된 바와 같이, "자연 발생" 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 유기체에서 발생하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 RNA 또는 DNA 분자를 지칭한다.

암의 하나 이상의 증상이 완화, 중단, 지연 또는 예방된 경우, 암은 "억제된" 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 자궁경부암의 재발 또는 전이가 감소, 지연, 지체 또는 예방된 경우에 자궁경부암은 "억제된" 것이다.

키트는 본 발명의 마커 발현을 특이적으로 검출하기 위한 1종 이상의 시약, 예를 들어 프로브를 포함하는 임의의 제조품 (예컨대 패키지(package) 또는 용기)이다. 이 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 장치로서 홍보, 분배 또는 판매될 수 있다.

"본 발명의 단백질"은 마커 단백질 및 그의 단편; 변이체 마커 단백질 및 그의 단편; 마커 또는 변이체 마커 단백질의 아미노산 15개 이상의 절편을 포함하는 펩티드 및 폴리펩티드; 및 마커 또는 변이체 마커 단백질 또는 마커 또는 변이체 마커 단백질의 아미노산 15개 이상의 절편을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

여기서 달리 명시하지 않는한, 용어 "항체" 및 "항체들"은 자연 발생 형태의 항체 (예컨대 IgG, IgA, IgM, IgE) 및 재조합 항체, 예를 들어 단일쇄 항체, 키메라 및 인간화 항체 및 다중특이적 항체 및 적어도 항원 결합 부위를 갖는, 상기 모든 항체의 단편 및 유도체를 광범위하게 포함한다. 항체 유도체는 항체에 접합된 단백질 또는 화학적 잔기를 포함할 수 있다.

설명

본 발명은 부분적으로는, 정상적인 (즉, 비-암성) 자궁경부 세포에서의 발현에 비해 자궁경부암 세포에서 과발현되는 새로 확인된 마커에 기초한다. 본원에서 자궁경부 세포내 1종 이상의 상기 마커의 발현 증가는 조직의 암성 상태와 상관관계가 있다. 본 발명은 자궁경부 세포 (예컨대 인간으로부터 수득한 세포, 배양된 인간 세포, 보관 또는 보존된 인간 세포 및 생체내 세포)의 암성 상태를 평가할 뿐만 아니라 자궁경부암을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 조성물, 기트 및 방법을 제공한다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 특히 하기 용도를 갖는다:

- 1) 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부 평가;
- 2) 인간 환자의 자궁경부암 단계 평가;
- 3) 환자의 자궁경부암 등급 평가;
- 4) 환자의 자궁경부암의 양성 또는 악성 특성 평가;
- 5) 환자의 자궁경부암의 전이 잠재력 평가;

- 6) 환자의 자궁경부암과 관련된 신생물(neoplasm)의 조직학적 유형 평가;
- 7) 자궁경부암의 치료 및(또는) 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부 평가에 유용한 항체, 항체 단편 또는 항체 유도체 제조;
- 8) 자궁경부암 세포의 존재를 평가;
- 9) 환자에서의 자궁경부암 억제에 있어서 1종 이상의 시험 화합물의 효능 평가;
- 10) 환자에서의 자궁경부암 억제에 있어서 요법의 효능 평가;
- 11) 환자에서 자궁경부암의 진행 모니터링;
- 12) 환자에서의 자궁경부암 억제용 조성물 또는 요법의 선택;
- 13) 자궁경부암을 앓고 있는 환자의 치료;
- 14) 환자에서의 자궁경부암 억제;
- 15) 시험 화합물의 자궁경부암 유발 잠재력 평가; 및
- 16) 자궁경부암의 발병 위험이 있는 환자에서 자궁경부암의 개시 예방.

따라서, 본 발명은 환자가 전이되기 전 자궁경부암 세포를 갖고 있는지 여부를 평가하는 것을 포함하는, 환자가 자궁경부암을 앓고 있는지 여부를 평가하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 환자 샘플 중 본 발명의 마커 (표 1에 기재한) 발현 수준과 대조군, 예를 들어 비-자궁경부암 샘플 중에서의 정상적인 마커 발현 수준을 비교하는 단계를 포함한다. 환자 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 정상 수준에 비해 유의하게 더 높은 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표이다.

또한, 본 발명은 서열목록에 기재한 핵산 서열 중 임의의 것의 전장 또는 그의 뉴클레오타이드 15개 이상의 절편 또는 상기 서열의 상보체를 포함하는 핵산 및 서열목록에 기재한 아미노산 서열 중 임의의 것의 전장 또는 그의 아미노산 10개 이상의 절편을 포함하는 폴리펩티드를 함유하는 유전자 전달 비히클, 숙주 세포 및 조성물 (모두 본원에 기재함)도 제공한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 환자의 자궁경부암은 본 발명의 1종 이상의 마커의 발현 수준 증가와 관련이 있다. 반면, 상기 논의한 바와 같이, 이러한 발현 수준 변화 중 몇몇은 자궁경부암의 발생으로부터 유래하고, 상기 변화 중 다른 것들은 자궁경부암 세포의 암성 상태를 유도, 유지 및 촉진한다. 따라서, 본 발명의 1종 이상의 마커의 발현 수준 증가를 특징으로 하는 자궁경부암은 상기 마커의 발현 및(또는) 상기 마커에 의해 코딩되는 단백질의 기능을 감소시키고(시키거나) 방해함으로써 억제될 수 있다.

본 발명의 마커 발현은 일반적으로 당업계에 공지된 다수의 방식으로 억제할 수 있다. 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 자궁경부암 세포에 제공하여 마커(들)의 전사, 번역 또는 이들 둘 다를 억제할 수 있다. 별법으로, 마커 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편을 코딩하며 적절한 프로모터/조절 영역과 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 세포에 제공하여 단백질의 기능 또는 활성을 억제하는 세포내 항체를 생성시킬 수 있다. 마커 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 항체 유도체 또는 항체 단편으로 자궁경부암 세포를 처리하여 마커의 발현 및(또는) 기능을 억제할 수도 있다. 본원에 기재된 방법을 이용하여, 특히 세포막을 횡단할 수 있도록 충분히 작은 분자를 비롯한 다양한 분자를 스크리닝함으로써 마커의 발현을 억제하거나 마커 단백질의 기능을 억제하는 분자를 확인할 수 있다. 이와 같이 확인된 화합물을 환자에게 제공하여 환자의 자궁경부암 세포를 억제할 수 있다.

본 발명의 임의의 마커 또는 마커 조합 및 본 발명의 마커와 임의의 공지된 마커의 조합을 본 발명의 조성물, 키트 및 방법에 사용할 수 있다. 일반적으로, 자궁경부암 세포에서의 마커 발현 수준과 정상적인 자궁경부 세포에서의 동일 마커의 발현 수준 사이의 차이가 가능한 큰 마커를 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 차이가 마커의 발현 평가 방법의 검출 한계로서 작을 수는 있지만, 차이는 적어도 평가 방법의 표준 오차보다 더 큰 것, 바람직하게는 차이가 정상적인 자궁경부 조직에서의 동일 마커 발현 수준보다 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 100배, 500배, 1000배 이상 또는 그 보다 큰 것이 바람직하다.

어떤 마커 단백질은 자궁경부 세포 (즉, 정상적인 세포 및 암성 세포 중 하나 또는 둘 다)로부터 세포 주변의 세포의 공간으로 분비되는 것으로 인식된다. 상기 마커 단백질은 조직 생검 샘플보다는 인간 환자로부터 더 용이하게 수집될 수 있는 자궁경부와 관련된 신체의 유체 샘플 중에서 검출될 수 있다는 사실로 인해, 이들 마커는 본 발명의 조성물, 키트 및 방법의 여러 실시양태에서 바람직하게 사용된다. 또한, 마커 단백질의 검출을 위한 바람직한 생체내 기술로는 단백질에 대해 지시된 표지된 항체를 대상체에게 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어 표준 영상화 기술에 의해 대상체내의 존재 및 위치를 검출할 수 있는 방사활성 마커로 항체를 표지할 수 있다.

임의의 특정 마커 단백질이 분비 단백질인지 여부를 결정하는 것은 당업자에게는 간단한 일이다. 이를 결정하기 위해, 마커 단백질을 예를 들어 포유동물 세포, 바람직하게는 인간 자궁경부 세포주에서 발현시키고, 세포의 유체를 수집하고, 세포의 유체내 단백질의 존재 또는 부재를 평가한다 (예컨대 단백질과 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용함).

하기 사항은 단백질의 분비를 검출하는데 사용될 수 있는 방법의 예이다. 약 8×10^5 개의 293 T 세포를 37℃에서 5% (v/v) CO₂, 95% 공기 분위기에 성장 배지 (10% 소 태아 혈청을 보충한 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) {DMEM})를 함유하는 웰에서 인큐베이션하여 약 60 내지 70%로 전면생장시킨다. 이어서, 웰당 단백질 코딩 발현 벡터를 포함하는 DNA 2 μ g 및 LipofectAMINE(등록상표) (GIBCO/BRL 카탈로그 번호 18342-012) 10 μ l를 포함하는 표준 형질감염 혼합물을 사용하여 세포를 형질감염시킨다. 형질감염 혼합물을 약 5 시간 동안 유지한 다음, 신선한 성장 배지로 대체하고, 공기 분위기에서 유지한다. 메티오닌 또는 시스테인 (DMEM-MC; ICN 카탈로그 번호 16-424-54)을 함유하지 않는 DMEM으로 각각의 웰을 2회 천천히 세정한다. DMEM-MC 약 1 ml 및 트랜스(Trans)-³⁵S(등록상표) 시약 (ICN 카탈로그 번호 51006) 약 50 μ Ci를 각각의 웰에 가한다. 웰을 전술한 5% CO₂ 분위기에 유지하고, 37℃에서 선택된 기간 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 조건화 배지 150 μ l를 제거하고, 원심분리하여 유동 세포 및 잔해(debris)를 제거한다. 상등액 중 단백질의 존재는 단백질이 분비되었다는 지표이다.

자궁경부 세포를 함유하는 환자 샘플은 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 이러한 실시양태에서, 자궁경부 세포 샘플, 예를 들어 환자로부터 수득한 자궁경부 도말표본 중 마커의 양 (예컨대 절대 양 또는 농도)을 평가하여 마커 발현 수준을 평가할 수 있다. 세포 샘플은 물론 잘 알려진 다양한 수집 후 제조 및 저장 기술 (예컨대 핵산 및/또는 단백질 추출, 고정화, 저장, 동결, 한외여과, 농축, 증발, 원심분리 등)로 처리한 다음, 샘플 중 마커의 양을 평가할 수 있다. 유사하게, 자궁경부 도말표본을 수집 후 제조 및 저장 기술, 예를 들어 고정화로 처리할 수도 있다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법을 이용하여, 마커 단백질을 발현하는 세포 표면에 하나 이상의 부분이 디스플레이된 상기 마커 단백질의 발현을 검출할 수 있다. 당업자에게 마커 단백질 또는 그의 일부가 세포 표면에 노출되어 있는지 여부를 결정하는 것은 단순한 작업이다. 예를 들어 면역학적 방법을 이용하여 온전한 세포상의 상기 단백질을 검출할 수 있거나 또는 잘 알려진 컴퓨터 기초의 서열 분석 방법을 이용하여 1개 이상의 세포의 도메인 (즉, 분비 단백질 및 1개 이상의 세포의 도메인을 갖는 단백질 둘 다를 포함)의 존재를 예측할 수 있다. 마커 단백질을 발현하는 세포 표면에 하나 이상의 부분이 디스플레이된 상기 마커 단백질의 발현은 반드시 세포를 용균시키지 않고도 검출할 수 있다 (예를 들어 상기 단백질의 세포 표면 도메인과 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용하여 검출함).

본 발명의 마커 발현은 전사된 핵산 또는 단백질의 발현을 검출하기 위해 잘 공지된 다양한 방법 중 임의의 것으로 평가할 수 있다. 이러한 방법의 예로는 분비성 단백질, 세포 표면 단백질, 세포질 단백질 또는 핵 단백질 검출을 위한 면역학적 방법, 단백질 정제 방법, 단백질 기능 또는 활성 검사법, 핵산 혼성화 방법, 핵산 역전사 방법 및 핵산 증폭 방법 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

바람직한 실시양태에서, 마커의 발현은 전부 또는 일부의 정상적인 번역후 변형을 경험하는 마커 단백질을 비롯한 마커 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 항체 (예컨대 방사능-표지, 발색단-표지, 형광단-표지 또는 효소-표지 항체), 항체 유도체 (예컨대 기관 또는 단백질과 접합된 항체 또는 단백질-리간드쌍 (예를 들어 바이오틴-스트렙타비딘)의 리간드) 또는 항체 단편 (예컨대 단일쇄 항체, 단리된 항체 과가변 도메인 등)을 사용하여 평가한다.

또다른 바람직한 실시양태에서, 마커의 발현은 환자 샘플의 세포로부터 mRNA/cDNA (즉, 전사된 폴리뉴클레오타이드)를 프래핑하고 마커 핵산 또는 그의 단편의 상보체인 기준 폴리뉴클레오타이드와 mRNA/cDNA를 혼성화시킴으로써 평가한다. cDNA는, 임의로는, 임의의 다양한 폴리머라제 연쇄 반응 방법을 이용하여 증폭된 후에 기준 폴리뉴클레오타이드와 혼성화될 수 있는데; 증폭시키지 않는 것이 바람직하다. 마찬가지로 1종 이상의 마커의 발현도 마커(들)의 발현 수준을 평가하기 위해 정량 PCR을 이용하여 검출될 수 있다. 별법으로, 공지된 많은 방법 중 임의의 것은 본 발명의 마커의 돌연변이 또는 변이체 (예컨대 단일 뉴클레오타이드 다형성, 결실 등)를 검출함으로써 환자에서의 마커 발생을 검출하는 데 사용될 수 있다.

관련 실시양태에서, 샘플로부터 수득되는 전사된 폴리뉴클레오타이드의 혼합물은 마커 핵산의 적어도 일부 (예컨대 적어도 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500개 이상의 뉴클레오타이드 잔기)에 상보적이거나 이와 상동성인 폴리뉴클레오타이드가 고정되어 있는 기관과 접촉시킨다. 마커 핵산의 적어도 일부에 상보적이거나 이와 상동성인 폴리뉴클레오타이드는 기관 상에서 차별적으로 검출가능하며 (예컨대 상이한 발색단 또는 형광단을 사용하거나 또는 상이한 선택된 위치에 고정시켜 검출가능함), 이후에는 단일 기관 (예컨대 폴리뉴클레오타이드를 선택된 위치에 고정시킨 "유전자 칩" 마이크로어레이)을 사용하여 복수개의 마커 발현 수준을 동시에 평가할 수 있다. 마커 발현 평가 방법은 하나의 핵산과 또다른 핵산과의 혼성화를 포함하여 사용되고, 상기 혼성화는 엄격 혼성화 조건하에서 수행되는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 본 발명의 1종 이상의 마커 발현 수준에서의 차이를 검출하는 것에 의존적이기 때문에, 마커 발현 수준이 정상적인 자궁경부 세포 및 양성 자궁경부 세포 중 하나 이상에서의 발현 평가에 이용되는 방법의 최소 검출 한도를 초과하는 것이 유의하게 바람직하다.

본 발명의 1종 이상의 마커를 사용하여 추가의 환자 샘플을 통상적으로 스크리닝함으로써, 특정 마커가 특정 자궁경부암 및 기타 암, 예를 들어 유방암, 자궁암 등을 비롯한 다양한 유형의 암에서 과발현됨이 인지됨이 이해될 것이다. 예를 들어 본 발명의 일부 마커는 대부분 (즉 50% 이상) 또는 실질적으로 전부 (즉 80% 이상)의 자궁경부암에서 과발현되는 것으로 확인될 것이다. 추가로, 본 발명의 특정 마커는 다양한 단계의 자궁경부암 (즉, 단계 0, I, II, III 및 IV의 자궁경부암 및 하위 분류 IA1, IA2, IB, IB1, IB2, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVA 및 IVB의 자궁경부암, 자궁경부의 원발성 암종에 대한 FIGO 단계 그룹화 시스템을 이용함 (문헌 [Gynecologic Oncology, 1991, 41:199] 및 [Cancer, 1992, 69:482] 참조)) 및 다양한 조직학적 아형 (예컨대 편평상피암종 및 편평상피암종 변이체, 예컨대 우축상 암종, 림프상피종-유사 암종, 유두 편평 신생물 및 방추 세포 편평상피암종 (문헌 [Cervical Cancer and Preinvasive Neoplasia, 1996, pp. 90-91] 참조)의 장액성, 점액성, 자궁내막양 및 투명 세포 아형의 전-악성 상태 (예컨대 CIN 또는 SIL을 비롯한 형성장애) 뿐만 아니라 하위분류 및 대체 분류의 선암, 유두 선암, 유두 낭포선암, 표면 유두 암종, 악성 선암유종, 낭포선암유종, 선암, 낭포선암, 선극세포종, 자궁내막양 간질 육종, 중배엽 {Muellerian} 혼합 종양, 악성 암종, 혼합 상피 종양 및 비분화 암종 (악성 자궁경부 종양의 분류를 위해 WHO/FIGO 시스템을 이용함; 문헌 [Scully, Atlas of Tumor Pathology, 3d series, Washington DC] 참조) 및 다양한 등급 (즉, 등급 I {분화가 양호함}, 등급 II {분화가 중간 정도로 양호함} 및 등급 III {주변의 정상적인 조직으로부터의 분화가 불량함})과 연관된 것으로 확인될 것이다. 또한, 보다 많은 수의 환자 샘플을 본 발명의 마커에 대해 평가하면, 샘플을 수득한 개별 환자에 대한 결과는 상관관계가 있으므로, 이는 또한 본 발명의 특정 마커의 발현이 변경된 것이

악성 암과 강력한 상관관계가 있으며, 본 발명의 다른 마커의 발현이 변경된 것도 양성 종양과 강력한 상관관계가 있음을 확인시킬 것이다. 따라서, 본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 환자에서 자궁경부암의 단계, 등급, 조직학적 유형 및 양성/악성 본질과 같은 1종 이상의 특징을 규명하는데 유용하다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법이 환자에서 자궁경부암의 단계, 등급, 조직학적 유형 및 양성/악성 본질과 같은 1종 이상의 특징을 규명하도록 사용되는 경우, 본 발명의 마커 또는 마커 패널은 양성 결과가 약 20% 이상, 바람직하게는 약 40%, 60% 또는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 상응하는 단계, 등급, 조직학적 유형 또는 양성/악성 본질의 자궁경부암을 앓는 실질적으로 모든 환자에서 수득되도록 선택되는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 본 발명의 마커 또는 마커 패널은 일반 집단에 대해 약 10 초과%의 양성 예측값 (PPV)이 수득되도록 (더욱 바람직하게는 80% 초과)의 검사 특이성과 커플링되도록 선택된다.

본 발명의 복수개의 마커가 본 발명의 조성물, 키트 및 방법에 사용되는 경우, 환자 샘플 중 마커 각각의 발현 수준은 단일 반응 혼합물 (즉, 마커 각각에 대해 시약, 예컨대 상이한 형광 프로브를 사용함) 중에서 또는 1종 이상의 마커에 상응하는 개별 반응 혼합물 중 동일 유형의 비-암성 샘플 중에서의 복수개의 마커 각각의 정상적인 발현 수준과 비교할 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플 중 1종 이상의 복수개의 마커 발현 수준이 상응하는 정상 수준에 비해 유의하게 증가된 것은 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표이다. 복수개의 마커를 사용하는 경우, 2종, 3종, 4종, 5종, 8종, 10종, 12종, 15종, 20종, 30종 또는 50종 이상의 개별 마커를 사용하는 것이 바람직하며, 보다 소수의 마커가 바람직하다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법의 민감도를 최대화하기 위하여 (즉, 환자 샘플 중 비-자궁경부 기원성 세포에 기인하는 방해에 의한), 여기서 사용되는 본 발명의 마커는 제한된 조직 분포를 갖는, 예를 들어 비-자궁경부 조직에서는 정상적으로 발현되지 않는 것이 바람직하다.

단지 소수의 마커만이 자궁경부암과 연관되어 있음이 공지되어 있다 (예컨대 bcl-2, 15A8 항원, cdc6, McmS 및 EGFR). 이들 마커들은 물론 본 발명의 마커에 포함되지 않지만, 이들은 본 발명의 1종 이상의 마커와 함께, 예를 들어 마커 패널 중에서 함께 사용될 수 있다. 특정 유형의 유전자, 예를 들어 종양형성유전자, 종양 저해 유전자, 성장 인자-유사 유전자, 프로테아제-유사 유전자 및 단백질 키나제-유사 유전자는 다양한 유형의 암 발병에 종종 포함된다는 것이 잘 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 마커 중, 공지된 종양형성유전자 및 종양 저해 유전자에 의해 코딩된 공지된 단백질과 유사한 단백질에 상응하는 마커 및 성장 인자, 프로테아제 및 단백질 키나제와 유사한 단백질에 상응하는 마커를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물, 키트 및 방법은 자궁경부암의 발병 위험이 증대된 환자 및 이들의 의료 상담자들에게 특히 유용할 것으로 인식된다. 자궁경부암의 발병 위험이 증대된 것으로 인식되는 환자로는, 예를 들어 자궁경부암 가족력이 있는 환자, 돌연변이체 종양형성유전자 (즉, 1종 이상의 대립유전자)를 가진 것으로 확인된 환자 및 진행 연령의 환자 (즉, 약 50 또는 60세 이상의 여성)가 포함된다.

정상적인 (즉, 비-암성) 인간 자궁경부 조직 중에서의 마커 발현 수준은 다양한 방법으로 평가될 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 정상적인 발현 수준은 비-암성으로 나타나는 일부 자궁경부 세포에서의 마커 발현 수준을 평가하고 이러한 정상적인 발현 수준을 암성인 것으로 추정되는 일부 자궁경부 세포에서의 발현 수준과 비교함으로써 평가된다. 별법으로 및 특히, 추가 정보가 본원에 기재된 방법의 통상적인 수행의 결과로서 유용해지면, 본 발명의 마커의 정상적인 발현에 대한 집단-평균 값을 사용할 수 있게 된다. 다른 실시양태에서, 마커의 '정상적인' 발현 수준은 암을 앓지 않는 환자로부터 수득된 환자 샘플, 환자 중 자궁경부암의 개시가 의심되기 전의 환자로부터 수득된 환자 샘플, 저장된 환자 샘플로부터의 환자 샘플 등에서 마커의 발현을 평가함으로써 결정할 수 있다.

본 발명은 샘플 (예컨대 저장된 조직 샘플 또는 환자로부터 수득된 샘플) 중에서의 자궁경부암 세포의 존재를 평가하는 조성물, 키트 및 방법을 포함한다. 이러한 조성물, 키트 및 방법은 필요한 경우 상기 조성물, 키트 및 방법을 환자 샘플 이외의 샘플용으로 변경한다는 점을 제외하고는 상기 기재된 것과 실질적으로 동일하다. 예를 들어 사용하고자 하는 샘플이 파란편화되어 저장된 인간 조직 샘플인 경우, 본 발명의 조성물, 본 발명의 키트 또는 샘플 중에서의 마커 발현 수준을 평가하기 위해 이용되는 방법 중의 화합물 비율을 조정할 필요가 있다. 이러한 방법은 당업계 및 당업자에게 잘 공지되어 있다.

본 발명은 자궁경부암 세포의 존재를 평가하는 키트 (예컨대 환자 샘플과 같은 샘플 평가용 키트)를 포함한다. 상기 키트는 복수개의 시약을 포함하는데, 이들 각각은 마커 핵산 또는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있다. 마커 단백질과 결합하는 적합한 시약에는 항체, 항체 유도체, 항체 단편 등이 포함된다. 마커 핵산 (예컨대 게놈 DNA, mRNA, 스플라이싱된 mRNA, cDNA 등)과 결합하는 적합한 시약은 상보적인 핵산을 포함한다. 예를 들어 핵산 시약은 기관에 고정된 (표지 또는 비-표지) 올리고뉴클레오타이드, 기관과 결합되지 않은 표지 올리고뉴클레오타이드, PCR 프라이머쌍, 분자 표지(molecular beacon) 프로브 등이 포함될 수 있다.

본 발명의 키트는 본 발명의 방법을 수행하는 데 유용한 추가 성분을 임의로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 상보적인 핵산의 어닐링에 적합하거나 단백질과 특이적으로 결합하는 항체와의 결합에 적합한 유체 (예컨대 SSC 완충액), 1종 이상 샘플 구획, 본 발명의 방법 수행을 기재하는 기타 재료, 정상적인 자궁경부 세포의 샘플, 자궁경부암 세포의 샘플 등을 포함할 수 있다.

본 발명은 또한 환자가 자궁경부암을 앓는지 여부를 평가하는데 유용한 항체를 생성하는 단리된 하이브리도마의 제조 방법을 포함한다. 이 방법에서, 마커 단백질의 전장 또는 그의 절편을 포함하는 단백질 또는 펩티드가 합성 또는 단리된다 (예컨대 공지된 방법을 이용하여 생체내 또는 시험관내에서 발현된 세포로부터의 정제에 의해 또는 단백질 또는 펩티드를 코딩하는 핵산의 전사 및 번역에 의해 합성 또는 단리됨). 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 양을 상기 단백질 또는 펩티드를 사용하여 면역화한다. 임의로는 (및 바람직하게는) 척추동물을 추가 1회 이상 단백질 또는 펩티드로 면역화시켜, 상기 척추동물이 단백질 또는 펩티드에 대해 확실한 면역 반응을 나타내도록 한다. 비장세포는 당업계에 잘 공지된 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 면역화된 척추동물로부터 단리되고 불멸화 세포주와 융합되어

하이브리도마를 형성한다. 이어서, 이러한 방식으로 형성된 하이브리도마를 표준 방법으로 스크리닝하여 마커 단백질 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 1종 이상 하이브리도마를 확인한다. 본 발명은 또한 이 방법으로 제조된 하이브리도마 및 상기 하이브리도마를 사용하여 제조된 항체를 포함한다.

본 발명은 또한 자궁경부암 세포 억제용 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법을 포함한다. 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 마커 발현 수준에서의 차이는 자궁경부 세포의 암성 상태와 상관관계가 있다. 본 발명의 특정 마커 발현 수준이 자궁경부 세포의 암성 상태로 인해 변화되는 것으로 인식되지만, 마찬가지로 본 발명의 다른 마커 발현 수준에서의 변화도 상기 세포의 암성 상태를 유도하고 유지하고 촉진하는 것으로 인식된다. 따라서, 환자에서 자궁경부암을 억제하는 화합물은 본 발명의 1종 이상의 마커 발현 수준을 그 마커에 대한 정상적인 발현 수준 (즉 비-암성 자궁경부 세포에서의 마커 발현 수준)에 근접한 수준으로 변화시킬 것이다.

따라서, 상기 방법은 시험 화합물의 존재하에 유지되는 제1 자궁경부 세포 샘플 중에서의 마커 발현과 시험 화합물 부재하에 유지되는 제2 자궁경부 세포 샘플 중에서의 마커 발현을 비교하는 단계를 포함한다. 시험 화합물의 존재하에서 본 발명의 마커 발현이 유의하게 감소하는 것은 시험 화합물이 자궁경부암을 억제한다는 지표이다. 자궁경부 세포 샘플은, 예를 들어 환자로부터 수득된 정상적인 자궁경부 세포의 단일 샘플의 분취액, 환자로부터 수득된 정상적인 자궁경부 세포의 풀링한 샘플, 정상적인 자궁경부 세포주의 세포, 환자로부터 수득된 자궁경부암 세포의 단일 샘플의 분취액, 환자로부터 수득된 자궁경부암 세포의 풀링한 샘플, 자궁경부암 세포주의 세포 등일 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 샘플은 환자로부터 수득된 자궁경부암 세포이고, 다양한 자궁경부암을 억제하는 데 효과적인 것으로 공지된 복수개의 화합물을 시험하여 환자에서 자궁경부암을 가장 잘 억제하는 화합물을 확인한다.

마찬가지로, 상기 방법은 환자에서의 자궁경부암 억제 요법의 효능을 평가하는데 이용될 수 있다. 이 방법에서, 한쌍의 샘플 (하나는 요법의 대상체가 아닌, 다른 하나는 요법의 대상체가 아님) 중에서 본 발명의 1종 이상의 마커 발현 수준을 평가한다. 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법으로, 상기 요법이 본 발명의 마커 발현 수준을 유의하게 더 낮게 유도하는 경우, 상기 요법은 자궁경부암 억제에 효능이 있다. 상기와 같이, 선택된 환자로부터의 샘플을 본 발명의 방법에 사용하는 경우, 상기 환자에서 자궁경부암을 억제하는 데 가장 효능이 있는 요법을 선택하기 위해 대체 요법을 시험관내에서 평가할 수 있다.

상기 기재된 바와 같이, 인간 자궁경부 세포의 암성 상태는 본 발명 마커 발현 수준에서의 변화와 상관관계가 있다. 본 발명은 시험 화합물을 인간 자궁경부 세포의 발암 잠재력에 대해 평가하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 인간 자궁경부 세포의 개개의 분취액을 시험 화합물의 존재 및 부재하에 유지시키는 단계를 포함한다. 각각의 분취액에서 본 발명의 마커 발현을 비교한다. 시험 화합물 존재하에 유지된 분취액 중에서의 본 발명의 마커 발현 수준이 (시험 화합물 부재하에 유지된 분취액에 비해) 유의하게 더 높다는 것은 상기 시험 화합물이 인간 자궁경부 세포의 발암 잠재력을 보유한다는 지표이다. 관련 마커의 발현 수준의 증가 또는 억제 정도를 비교함으로써, 발현 수준이 증가 또는 억제된 마커의 수를 비교함으로써 또는 둘다를 비교함으로써 다양한 시험 화합물의 상대적인 발암 잠재력을 평가할 수 있다.

본 발명의 다양한 측면을 하기 세부항목으로 상세하게 설명한다.

I. 단리된 핵산 분자

본 발명의 한 측면은 마커 단백질 또는 그의 일부를 코딩하는 핵산 등을 비롯한 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명의 단리된 핵산은 또한 마커 핵산 분자 및 마커 핵산 분자의 단편을 확인하는 혼성화 프로브로서 사용하기에 충분한 핵산 분자, 예를 들어 마커 핵산 분자의 증폭 또는 돌연변이를 위한 PCR 프라이머로서 사용하기에 충분한 핵산 분자를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 (예를 들어 cDNA 또는 게놈 DNA) 및 RNA 분자 (예를 들어 mRNA) 및 뉴클레오타이드 유사체를 이용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하려는 것이다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으나, 이중 가닥 DNA인 것인 바람직하다.

"단리된" 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자와 분리된 것이다. "단리된" 핵산 분자에는 상기 핵산이 유래한 유기체의 게놈 DNA에서 상기 핵산을 천연적으로 플랭킹(flanking)하는 서열 (즉, 핵산의 5' 및 3' 말단에 위치한 서열) (바람직하게는 단백질-코딩 서열)이 없는 것이 바람직하다. 예를 들면, 다양한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 핵산이 유래한 세포의 게놈 DNA 중의 핵산 분자를 천연적으로 플랭킹하는 뉴클레오타이드 서열의 약 5 kB, 4 kB, 3 kB, 2 kB, 1 kB, 0.5 kB 또는 0.1 kB 미만을 함유할 수 있다. 더욱이, "단리된" 핵산 분자, 예를 들어 cDNA 분자는 재조합 기술로 제조되는 경우 다른 세포 물질 또는 세포 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성되는 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

본 발명의 핵산 분자는 표준 분자 생물학 기술 및 본원에 기재된 데이터베이스 기록상의 서열 정보를 이용하여 단리할 수 있다. 이러한 핵산 서열의 전부 또는 일부를 사용하여, 본 발명의 핵산 분자를 표준 혼성화 및 클로닝 기술 (예를 들어 문헌 [Sambrook et al., ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에 기재된 바와 같음)을 이용하여 단리할 수 있다.

본 발명의 핵산 분자는 주형으로서 cDNA, mRNA 또는 게놈 DNA와 표준 PCR 증폭 기술에 따른 적절한 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 증폭시킬 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산을 적절한 벡터로 클로닝하고 DNA 서열 분석으로 특성화할 수 있다. 추가로, 본 발명의 핵산 분자의 전부 또는 일부에 상응하는 뉴클레오타이드는 표준 합성 기술로, 예를 들어 자동 DNA 합성기를 이용하여 제조할 수 있다.

또다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 마커 핵산의 뉴클레오타이드 서열 또는 마커 단백질을 코딩하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자를 포함한다. 주어진 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 핵산 분자는 주어진 뉴클레오타이드 서열에 충분히 상보적인 것이므로, 주어진 뉴클레오타이드 서열에 혼성화됨으로써 안정한 이중나선을 형성할 수 있다.

더욱이, 본 발명의 핵산 분자는 전장 핵산 서열이 마커 핵산을 포함하거나 마커 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 일부만을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 핵산은 프로브 또는 프라이머로서 사용할 수 있다. 프로브/프라이머는 전형적으로 1종 이상의 실질적으로 정제된 올리고뉴클레오타이드로서 사용한다. 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 엄격 조건하에서 본 발명의 핵산의 약 7개 이상, 바람직하게는 약 15개 이상, 더욱 바람직하게는 약 25개, 50개, 75개, 100개, 125 개, 150개, 175개, 200개, 250개, 300개, 350개 또는 400개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드로 혼성화되는 뉴클레오타이드 서열의 영역을 포함한다.

본 발명의 핵산 분자의 서열을 기준으로 하는 프로브를 사용하여 본 발명의 1종 이상의 마커에 상응하는 전사체 또는 게놈 서열을 검출할 수 있다. 프로브는 프로브에 부착된 표지 기, 예를 들어 방사성동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자를 포함한다. 이러한 프로브는 예컨대 mRNA 수준을 검출하거나 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자가 돌연변이되었거나 결실되었는지의 여부를 결정하면서, 예를 들어 대상체로부터 얻은 세포 샘플 중에서 단백질을 코딩하는 핵산 분자의 수준을 측정함으로써 단백질을 잘못 발현하는 세포 또는 조직을 확인하기 위한 진단 시험 키트의 일부로서 사용할 수 있다.

본 발명은 유전자 코드의 동의성(degeneracy)으로 인해 마커 단백질 (예컨대 서열목록에 기재한 아미노산 서열 중 하나를 갖는 단백질)을 코딩하는 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 상이하면서도 동일 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함한다.

당업자는 아미노산 서열에서 변화를 일으키는 DNA 서열 다형성이 집단 (예컨대 인간 집단) 내에 존재할 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 유전자의 다형성은 천연 대립유전자 변이로 인해 집단 내의 개체들 사이에 존재할 수 있다. 대립유전자는 주어진 유전자의 유전자좌에서 다르게 발생한 유전자 군 중 하나이다. 또한, RNA 발현 수준에 영향을 주는 DNA 다형성이 또한 존재하여 상기 유전자의 전체적인 발현 수준에 (예를 들면, 조절 또는 분해에 영향을 줌으로써) 영향을 줄 수 있음을 인식할 것이다.

본원에서 사용된 바와 같이, 어구 "대립유전자 변이체"는 주어진 유전자좌에 발생한 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드를 지칭한다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 이러한 천연 대립유전자 변이체는 전형적으로 주어진 유전자의 뉴클레오타이드 서열에서 1 내지 5%의 변이를 유발할 수 있다. 다른 대립유전자들은 수많은 상이한 개체에서 관심 유전자를 서열화함으로써 확인할 수 있다. 이는 혼성화 프로브를 이용하여 다양한 개체에서 동일한 유전자의 유전자좌를 확인함으로써 쉽게 수행할 수 있다. 천연 대립유전자 변이로 유발되며 기능적 활성을 변경시키지 않는 이러한 뉴클레오타이드 변이체 및 이로써 생성된 아미노산 다형체 또는 변이체의 임의의 모든 것은 본 발명의 범위에 속하게 하려는 것이다.

또다른 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 적어도 7개, 15개, 20개, 25개, 30개, 40개, 60개, 80개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 550개, 650개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1200개, 1400개, 1600개, 1800개, 2000개, 2200개, 2400개, 2600개, 2800개, 3000개, 3500개, 4000개, 4500개 이상의 뉴클레오타이드 길이이고, 엄격 조건하에서 마커 핵산 또는 마커 단백질을 코딩하는 핵산에 혼성화된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "엄격 조건하에서의 혼성화"는 전형적으로 서로 60% (65%, 70%, 바람직하게는 75%) 이상 동일한 뉴클레오타이드 서열들이 서로 혼성화된 채로 유지되는 조건하에서 혼성화 및 세척하기 위한 조건을 기재하려는 것이다. 이러한 엄격 조건은 당업자에게 공지되어 있고, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989)]의 단락 6.3.1 내지 6.3.6에서 발견할 수 있다. 엄격 혼성화 조건의 바람직한 예로는 약 45°C에서 6 ×염화나트륨/시트르산나트륨(SSC) 중에서의 혼성화, 그 후 50 내지 65°C에서 0.2 ×SSC, 0.1% SDS 중에서의 1회 이상의 세척 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

집단 내에 존재할 수 있는 본 발명의 핵산 분자의 자연 발생 대립유전자 변이체 이외에도, 당업자는 또한 돌연변이로 인해 서열 변화가 도입됨으로써, 그로 인해 코딩된 단백질의 생물학적 활성이 변경되지 않으면서 코딩된 단백질의 아미노산 서열에 변화를 유발할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들면, 당업자는 "비필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 유발하는 뉴클레오타이드 치환을 수행할 수 있다. "비필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 변경시키지 않으면서 야생형 서열로부터 변경될 수 있는 잔기인 반면, "필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 위해 요구되는 잔기이다. 예를 들어 다양한 종의 동족체들 사이에서 보존되지 않거나 단지 반-보존되는 아미노산 잔기는 활성에 필수적이지 않을 수 있으므로, 변경에 대한 표적이 되기 쉬울 것이다. 다르게는, 다양한 종의 동족체들 (예컨대 뮈린(murine) 및 인간) 사이에서 보존되는 아미노산 잔기는 활성을 위해 필수적일 수 있으므로, 변경에 대한 표적이 되기 쉽지는 않을 것이다.

따라서, 본 발명의 또다른 측면은 활성을 위해 필수적이지 않은 아미노산 잔기에 변화물을 함유하는 변이체 마커 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이러한 변이체 마커 단백질은 천연-발생 마커 단백질과는 아미노산 서열면에서 상이하지만, 생물학적 활성을 보유한다. 한 실시양태에서, 이러한 변이체 마커 단백질은 마커 단백질의 아미노산 서열과 약 40% 이상 동일한, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

변이체 마커 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자는 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환, 부가 또는 결실이 코딩된 단백질을 도입되도록 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 부가 또는 결실을 마커 핵산의 뉴클레오타이드 서열로 도입시킴으로써 생성될 수 있다. 돌연변이는 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 바람직하게는, 보존적 아미노산 치환은 1종 이상의 예측된 비필수 아미노산 잔기에서 수행된다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 측은 당업계에 정의되어 있다. 이들 측은 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예컨대 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예컨대 아스파르트산, 글루탐산), 비전하 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예컨대 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예컨대 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예컨대 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예

컨대 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다. 다르게는, 돌연변이는 포화 돌연변이유발 등에 의해 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위적으로 도입시킬 수 있고, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 대해 스크리닝하여 활성을 보유한 돌연변이체를 확인할 수 있다. 돌연변이유발 후, 코딩된 단백질을 재조합적으로 발현시킬 수 있고, 단백질의 활성을 결정할 수 있다.

본 발명은 안티센스 핵산 분자, 즉 본 발명의 센스 핵산에 상보적인 분자, 예를 들어 이중 가닥 마커 cDNA 분자의 코딩 가닥에 상보적이거나 마커 mRNA 서열에 상보적인 분자를 포함한다. 따라서, 본 발명의 안티센스 핵산은 본 발명의 센스 핵산에 수소 결합 (즉, 어닐링)할 수 있다. 안티센스 핵산은 전체 코딩 가닥 또는 단지 그 일부에 상보적일 수 있으며, 예를 들어 단백질 코딩 영역 (또는 오픈 리딩 프레임)의 전부 또는 일부에 상보적일 수 있다. 안티센스 핵산 분자는 마커 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 코딩 가닥 중 비-코딩 영역의 전부 또는 일부에 안티센스일 수도 있다. 비-코딩 영역 ("5' 및 3' 비번역 영역")은 코딩 영역을 플랜킹하는 5' 및 3' 서열이며 아미노산으로 번역되지 않는다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 이상의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 본 발명의 안티센스 핵산은 당업계에서 공지된 절차를 이용하는 화학적 합성법 및 효소적 라이게이션 반응을 이용하여 구축할 수 있다. 예를 들면, 안티센스 핵산 (예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드)은 분자의 생물학적 안정성을 증가시키기 위해 또는 안티센스 핵산과 센스 핵산 사이에 형성된 이중나선의 물리적 안정성을 증가시키기 위해 고안된 자연 발생 뉴클레오타이드 또는 다양하게 변형된 뉴클레오타이드를 이용하여 화학적으로 합성할 수 있고, 예를 들어 포스포로티오에이트 유도체 및 아크리딘 치환된 뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 안티센스 핵산을 생성하기 위해 사용할 수 있는 변형된 뉴클레오타이드의 예로는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요도우라실, 히포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실큐에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 위부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실, (acp3)w 및 2,6-디아미노퓨린이 포함된다. 다르게는, 안티센스 핵산은 핵산이 안티센스 방향으로 서브-클로닝된 발현 벡터를 이용하여 생물학적으로 생산할 수 있다 (즉, 하기 소단락에서 추가로 기재된 바와 같이, 삽입된 핵산으로부터 전사된 RNA는 관심 표적 핵산에 대해 안티센스 방향일 것이다).

본 발명의 안티센스 핵산 분자는 전형적으로 대상체에게 투여하거나 또는 계내 생성되는데, 마커 단백질을 코딩하는 세포내 mRNA 및 (또는) 계내 DNA와 혼성화하거나 결합하여 상기 마커의 전사 및 (또는) 번역을 억제함으로써 그 발현을 억제한다. 혼성화는 통상의 뉴클레오타이드 상보성에 의해 수행되어, 예를 들어 DNA 이중나선에 결합하는 안티센스 핵산 분자의 경우에는 이중나선의 주요 그루브에서의 특이적 상호작용을 통해 안정한 이중나선을 형성한다. 본 발명의 안티센스 핵산 분자의 투여 경로의 예로는 조직 부위에서의 직접 주사 또는 자궁경부와 관련된 신체내 유체로의 안티센스 핵산의 주입이 포함된다. 다르게는, 안티센스 핵산 분자를 표적-선택된 세포로 변형시킨 후에 전신적으로 투여할 수 있다. 예를 들어 전신적 투여의 경우, 안티센스 분자는 예컨대 안티센스 핵산 분자를 세포 표면 수용체 또는 항원에 결합된 펩티드 또는 항체에 연결시킴으로써, 선택된 세포 표면상에 발현된 수용체 또는 항원에 특이적으로 결합하도록 변형시킬 수 있다. 또한, 안티센스 핵산 분자는 본원에 기재된 벡터를 이용하여 세포로 전달할 수도 있다. 안티센스 분자의 충분한 세포내 농도를 달성하기 위해서는, 안티센스 핵산 분자가 강력한 pol II 또는 pol III 프로모터의 제어하에 위치하는 벡터 구조물이 바람직하다.

본 발명의 안티센스 핵산 분자는 α-아노머 핵산 분자일 수 있다. α-아노머 핵산 분자는 보통의 α-단위와는 반대로 가닥이 서로 평행하게 이어지는 상보적인 RNA와 특이적 이중 가닥 하이브리드를 형성한다 [Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641]. 또한, 안티센스 핵산 분자는 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드 [Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148] 또는 키메라 RNA-DNA 유사체 [Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327-330]를 포함할 수도 있다.

또한, 본 발명은 리보자임도 포함한다. 리보자임은 상보적 영역을 갖는 단일-가닥 핵산, 예를 들어 mRNA를 절단시킬 수 있는 리보뉴클레아제 활성을 갖는 촉매적 RNA 분자이다. 따라서, 리보자임 (예컨대 문헌 [Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591]에 기재된 바와 같은 해머헤드(hammerhead) 리보자임)를 사용하여 mRNA 전사체를 촉매적으로 절단하고, 이로써 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 번역을 억제할 수 있다. 마커 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 대해 특이성을 갖는 리보자임은 상기 마커에 상응하는 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 기준으로 고안될 수 있다. 예를 들어 테트라히메나(*Tetrahymena*) L-19 IVS RNA의 유도체는 활성 부위의 뉴클레오타이드 서열이 절단될 뉴클레오타이드 서열에 상보적 이도록 구축할 수 있다 (세치(Cech) 등의 미국 특허 제4,987,071호; 및 세치 등의 미국 특허 제5,116,742호 참고). 다르게는, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA를 사용하여 RNA 분자의 폴로부터 특이적 리보뉴클레아제 활성을 갖는 촉매적 RNA를 선택할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Bartel and Szostak, 1993, Science 261:1411-1418] 참고).

또한, 본 발명은 삼중 나선 구조를 형성하는 핵산 분자도 포함한다. 예를 들면, 마커 핵산 또는 단백질 (예컨대 프로모터 및 (또는) 인핸서)을 코딩하는 유전자의 조절 영역에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 표적화함으로써 본 발명의 마커 발현을 억제하여 표적 세포에서의 유전자의 전사를 막는 삼중 나선 구조를 형성할 수 있다. 일반적으로 문헌 [Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6):569-84]; [Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36]; 및 [Maher (1992) Bioassays 14 (12):807-15]을 참고한다.

다양한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자를 염기 부위, 당 부위 또는 인산염 주쇄에서 변형시켜 예컨대 분자의 안정성, 혼성화 또는 용해도를 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 핵산의 데옥시리보스 인산염 주쇄를 변형시켜 펩티드 핵산을 생성할 수 있다 (문헌 [Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1):5-23] 참고). 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드 핵산" 또는 "PNA"는 데옥시리보스 인산염 주쇄가 슈도펩티드 주쇄에 의해 대체되어 오직 4개의 천연 핵염기만이 남아있는 핵산 모방체, 예를 들어 DNA 모방체를 지칭한다. PNA의 중성 주쇄는 낮은 이온강도의 조건하에서 DNA 및 RNA로 특이적으로 혼성화되는 것으로 나타나 있다. PNA 올리고머의 합성은 문헌 [Hyrup et al. (1996), 상기 문헌]; [Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670-675]에 기재된 바와 같이 표준 고상 펩티드 합성 프로토콜을 이용하여 수행할 수 있다.

PNA는 치료 및 진단 용도로 사용할 수 있다. 예를 들어, PNA는 전사 또는 번역 정체의 유도 또는 복제 억제 등에 의해 유전자 발현을 서열-특이적으로 조정하기 위한 안티센스 또는 항원 작용제로서 사용할 수 있다. 또한, PNA는 예를 들어 PNA 지시된 PCR 클램핑(clamping) 등에 의한 유전자 중에서의 단일 염기쌍 돌연변이의 분석에서 사용되거나; 다른 효소, 예를 들어 S1 뉴클레아제와 함께 사용되는 경우에는 인공적인 제한 효소로서 사용되거나 (문헌 [Hyrup (1996), 상기 문헌]) 또는 DNA 서열 및 혼성화를 위한 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있다 (문헌 [Hyrup, 1996, 상기 문헌]; [Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670-675]).

또다른 실시양태에서, 예를 들어 PNA에 친지성 또는 그밖의 헬퍼(helper) 기를 부착시키거나 또는 PNA-DNA 키메라를 형성시키거나 또는 리포솜 또는 당업계에 공지된 기타 약물 전달 기술을 사용함으로써 PNA의 안정성 또는 세포에 의한 흡수가 증대되도록 PNA를 변형시킬 수 있다. 예를 들어 PNA 및 DNA의 유리한 특성을 조합시킬 수 있는 PNA-DNA 키메라를 생성할 수 있다. 이러한 키메라는 DNA 인식 효소, 예를 들어 RNase H 및 DNA 폴리머라제가 DNA 부분과 상호작용할 수 있도록 하는 동시에 PNA 부분은 높은 결합 친화도 및 특이성을 제공한다. PNA-DNA 키메라는 염기 스택킹(stack), 핵염기 사이의 결합수 및 배향의 관점에서 선택된 적절한 길이의 링커(linker)를 사용하여 연결할 수 있다 (문헌 [Hyrup, 1996, 상기 문헌]). PNA-DNA 키메라는 문헌 [Hyrup, (1996), 상기 문헌] 및 [Finn et al., (1996), Nucleic acids Res. 24(17):3357-63]에 기재된 바와 같이 수행하여 합성할 수 있다. 예를 들어, DNA 배를 표준 포스포라미드트 커플링 화학 물질 및 변형된 뉴클레오시드 유사체를 사용하여 고체 지지체 상에 합성할 수 있다. 화합물, 예컨대 5'-(4-메톡시트리틸)아미노-5'-데옥시-티미딘 포스포라미드트를 PNA 및 5' 말단의 DNA 사이에서의 링커로서 사용할 수 있다 (문헌 [Mag et al., 1989, Nucleic acids Res. 17:5973-88]). 그 다음, PNA 단량체를 단계별 방식으로 커플링시켜 5' PNA 절편 및 3' DNA 절편과의 키메라 분자를 생성한다 (문헌 [Finn et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63]). 별법으로, 키메라 분자는 5' DNA 절편 및 3' PNA 절편으로 합성할 수 있다 (문헌 [Peterser et al., 1975, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-11124]).

다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 기타 부가된 기, 예컨대 펩티드 (예를 들어 생체내 숙주 세포 수용체를 표적화하기 위한 펩티드) 또는 세포막 또는 혈뇌장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 작용제를 포함할 수 있다 (세포막에 대해서는 예를 들어 문헌 [Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556]; [Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652]; PCT 공개 번호 제WO 88/09810호), 혈뇌장벽에 대해서는 예를 들어 PCT 공개 번호 제WO 89/10134호를 참고). 또한, 올리고뉴클레오타이드를 혼성화-촉발 절단제 (예를 들어 문헌 [Krol et al., 1988, Bio/Techniques 6:958-976] 참고) 또는 삽입성 작용제(intercalating agent) (예를 들어 문헌 [Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549] 참고)로 변형시킬 수 있다. 이를 위하여, 올리고뉴클레오타이드를 또다른 분자, 예를 들어 펩티드, 혼성화 촉발 가교제, 수송제, 혼성화-촉발 절단제 등과 접합할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 핵산과 상보적인 하나 이상의 영역을 갖는 분자 표지 핵산을 포함하며, 이때 상기 분자 표지는 샘플 중에서 본 발명의 핵산의 존재를 정량하는데 유용하다. "분자 표지" 핵산은 한쌍의 상보적 영역을 포함하고, 이에 결합되는 형광단 및 형광 켄처(quencher)를 갖는 핵산이다. 형광단 및 켄처는 상보적 영역이 서로와 어닐링될 때 형광단의 형광성이 켄처에 의해 켄칭(quinching)되도록 하는 배향으로 핵산의 다른 부분에 결합된다. 핵산의 상보적 영역이 서로와 어닐링되지 않은 경우, 형광단의 형광성은 보다 적은 정도로 켄칭된다. 분자 표지 핵산은 예를 들어 미국특허 제5,876,930호에 기재되어 있다.

II. 단리된 단백질 및 항체

본 발명의 한 측면은 단리된 마커 단백질 및 생물학적으로 활성인 그의 일부 뿐만이 아니라 마커 단백질 또는 그의 단편에 대해 지시된 항체를 생성하는 면역원으로 사용하기에 적합한 폴리펩티드 단편에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 천연 마커 단백질을 표준 단백질 정제 기술을 사용하는 적절한 정제법에 의해 세포 또는 조직 공급원로부터 단리할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 전장 마커 단백질 또는 그의 절편을 포함하는 단백질을 또는 펩티드를 재조합 DNA 기술로 생성한다. 재조합 발현에 대한 별법의 방법으로, 상기 단백질을 또는 펩티드를 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

"단리된" 또는 "정제된" 단백질 또는 생물학적으로 활성인 그의 일부에는 단백질이 유도되는 세포 또는 조직 공급원로부터의 세포 물질 또는 기타 오염 단백질이 실질적으로 없고, 또는 화학적으로 합성되는 경우에는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없다. "세포 물질이 실질적으로 없다"는 표현은, 단백질이 이것을 단리해 낸 세포의 세포 성분으로부터 분리되거나 재조합적으로 생성된, 상기 단백질의 제제를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 단백질은 이중 단백질 (본원에서는 "오염성 단백질"이라고 지칭하기도 함)을 약 30%, 20%, 10% 또는 5% (건조 중량) 미만으로 함유하는 단백질 제제를 포함한다. 단백질 또는 생물학적으로 활성인 그의 일부가 재조합적으로 생산되는 경우, 이것 역시 바람직하게는 배양 배지가 실질적으로 없으며, 즉 배양 배지는 단백질 제제 부피의 약 20%, 10% 또는 5% 미만으로 존재한다. 단백질이 화학적 합성으로 생성되는 경우, 바람직하게는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없으며, 즉 단백질이 그의 합성에 관여하는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 이러한 단백질 제제는 관심 폴리펩티드 이외의 화학적 전구체 또는 화합물을 약 30%, 20%, 10%, 5% (건조 중량) 미만으로 보유한다.

마커 단백질의 생물학적 활성 부분은 전장 단백질보다 더 적은 수의 아미노산을 포함하고, 상응하는 전장 단백질의 하나 이상의 활성을 나타내는 마커 단백질의 아미노산 서열과 충분히 일치하거나 또는 그로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 전형적으로, 생물학적 활성 부분은 상응하는 전장 단백질의 하나 이상의 활성을 갖는 도메인 또는 모티프를 포함한다. 본 발명의 마커 단백질의 생물학적 활성 부분은 예를 들어 10개, 25개, 50개, 100개 이상의 아미노산 길이인 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 마커 단백질의 다른 영역 중 다른 생물학적 활성 부분을 재조합 기술로 제조하고, 마커 단백질의 천연 형태의 1종 이상의 기능적 활성에 대해 평가할 수 있다.

바람직한 마커 단백질은 서열목록에 기재한 서열 중 임의의 것의 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다. 기타 유용한 단백질은 이러한 서열 중 하나와 실질적으로 동일하고 (예컨대 약 40% 이상, 바람직하게는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%), 상응하는 자연 발생적 마커 단백질의 기능적 활성을 보유하지만, 천연 대립유전자 변이 또는 돌연변이유발로 인해 아미노산 서열은 상이하다.

2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 동일성(%)을 측정하기 위해, 서열을 최적의 비교 목적을 위해 정렬시킨다(예컨대 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열 중에 갭(gap)을 도입할 수 있음). 그 다음, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치에 제2 서열 중 상응하는 위치에서와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 존재하는 경우, 상기 분자들은 그 위치에서 동일하다. 2개 서열 사이의 동일성(%)은 서열을 공유하는 동일 위치의 수에 대한 함수이다(즉, 동일성(%) = 동일 위치의 수/전체 위치의 수(예컨대 중복 위치) × 100). 한 실시양태에서, 2개의 서열은 동일한 길이이다.

2개의 서열 사이의 동일성(%) 측정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 2개의 서열을 비교하기 위해 사용되는 수학적 알고리즘의 바람직한 예로는 문헌 [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877]의 변형물인 문헌 [Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268]의 알고리즘 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]의 BLASTN 및 BLASTX 프로그램에 도입된다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 BLASTN 프로그램을 스코어 = 100, 단어길이 = 12로 수행하여 본 발명의 핵산 분자에 대한 뉴클레오타이드 서열 상동성을 구할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 BLASTP 프로그램을 스코어 = 50, 단어길이 = 3으로 수행하여 본 발명의 단백질 분자에 대한 아미노산 서열 상동성을 구할 수 있다. 비교 목적을 위한 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해서는, 문헌 [Altschul et al. (1997) Nucleic acids Res. 25:3389-3402]에 기재된 것과 같은 갭피드(Gapped) BLAST라고 불리는 보다 새로운 버전의 BLAST 알고리즘을 사용할 수 있는데, 이것은 프로그램 BLASTN, BLASTP 및 BLASTX로 갭이 있는 국부 정렬을 수행할 수 있다. 별법으로, PSI-블라스트(Blast)를 사용하여 분자 사이의 거리 관계를 검출하는 반복 검색을 수행할 수 있다. BLAST, 갭피드 BLAST 및 PSI-블라스트 프로그램을 사용하는 경우, 각각의 프로그램(예컨대 BLASTX 및 BLASTN)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참고). 서열 비교에 사용되는 수학적 알고리즘의 또다른 바람직한 예로는 문헌 [Myers and Miller, (1988) CABIOS 4:11-17]의 알고리즘 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 부분인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 도입된다. 아미노산 서열 비교에 ALIGN 프로그램을 사용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 갭 길이 패널티(penalty) 12 및 갭 패널티 4를 사용할 수 있다. 국부적 서열 유사성 및 정렬 영역을 확인하기 위한 또다른 유용한 알고리즘은 문헌 [Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448]에 기재된 바와 같은 FASTA 알고리즘이다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 비교에 FASTA 알고리즘을 사용하는 경우, 예를 들어 PAM 120 중량 잔기 표를 κ -터플(tuple) 값 2로 하여 사용할 수 있다.

2개 서열들 사이의 동일성(%)은 갭을 허용하는지 여부와 상관없이 상기 기재된 기술과 유사한 기술을 이용하여 측정할 수 있다. 동일성(%) 계산시에는 오직 정확한 매칭(matching)만을 계수한다.

본 발명은 또한 마커 단백질 또는 그의 절편을 포함하는 키메라 또는 융합 단백질을 제공한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 이중 폴리펩티드(즉, 마커 단백질이 아닌 폴리펩티드)에 작동가능하게 연결된 마커 단백질의 전부 또는 일부(바람직하게는 생물학적으로 활성인 부분)를 포함한다. 융합 단백질 내에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 마커 단백질 또는 그의 절편 및 이중 폴리펩티드가 프레임내(in-frame)서로 융합된다는 것을 나타내려는 것이다. 이중 폴리펩티드는 마커 단백질 또는 그의 절편의 아미노-말단 또는 카르복실-말단에 융합될 수 있다.

하나의 유용한 융합 단백질은 마커 단백질 또는 절편이 GST 서열의 카르복실 말단에 융합되는 GST 융합 단백질이다. 이러한 융합 단백질은 본 발명의 재조합 폴리펩티드의 정제를 용이하게 할 수 있다.

또다른 실시양태에서, 융합 단백질은 그의 아미노 말단에 이중 신호 서열을 함유한다. 예를 들어, 마커 단백질의 천연 신호 서열을 제거하고 또다른 단백질로부터의 신호 서열로 대체할 수 있다. 예를 들어 바큇로바이러스(baculovirus) 외피 단백질의 gp67 분비 서열을 이중 신호 서열로서 사용할 수 있다 [Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1992]. 진핵생 이중 신호 서열의 다른 예는 헬리틴 및 인간 태반 알칼리성 포스파타제(미국 캘리포니아주 라 줄라에 소재하는 스트라타진(Stratagene))의 분비 서열을 포함한다. 또다른 예에서, 유용한 원핵생 이중 신호 서열은 phoA 분비 신호(문헌 [Sambrook et al., 상기문헌]) 및 단백질 A 분비 신호(미국 뉴저지주 피스카타웨이에 소재하는 파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech))를 포함한다.

또다른 실시양태에서, 융합 단백질은 마커 단백질의 전부 또는 일부가 이뮤노글로불린 단백질 족의 구성원으로부터 유래된 서열에 융합된 이뮤노글로불린 융합 단백질이다. 본 발명의 이뮤노글로불린 융합 단백질은 제약 조성물 내에 혼입되고 대상체에 투여되어, 리간드(가용성 또는 막-결합성)와 세포 표면상의 단백질(수용체) 사이의 상호작용을 억제함으로써 생체내 신호 전달을 저해할 수 있다. 이뮤노글로불린 융합 단백질을 사용하여 마커 단백질의 동족 리간드의 생체이용률에 영향을 미칠 수 있다. 리간드/수용체 상호작용의 억제가 증식 및 분화 장애의 치료 및 세포 생존의 조정(예컨대 촉진 또는 억제) 모두에 치료적으로 유용할 수 있다. 또한, 본 발명의 이뮤노글로불린 융합 단백질을 면역원으로서 사용하여 대상체에서 마커 단백질에 대해 지시된 항체를 생성하고 리간드를 정제하며 스크리닝 분석법으로 마커 단백질과 리간드의 상호작용을 억제하는 분자를 확인할 수 있다.

본 발명의 키메라 및 융합 단백질을 표준 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 융합 유전자를 자동 DNA 합성기를 비롯한 통상의 기술로 합성할 수 있다. 별법으로, 앵커(anchor) 프라이머를 사용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행함으로써 2개의 연속적인 유전자 단편 사이에서 상보적인 돌출부(overhang)를 생성한 후에 어닐링하고 재증폭시켜 키메라 유전자 서열을 생성시킬 수 있다(예를 들어 문헌 [Ausubel et al., 상기문헌] 참고). 또한, 이미 융합 부분(예컨대 GST 폴리펩티드)이 코딩되어 있는 많은 발현 벡터가 시판되고 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 발현 벡터내에 클로닝하여 융합 부분이 본 발명의 폴리펩티드와 프레임내 연결되도록 할 수 있다.

신호 서열을 사용하여 마커 단백질의 분비 및 단리를 용이하게 할 수 있다. 신호 서열은 일반적으로 성숙 단백질이 분비되는 동안에 하나 이상의 절단 사건으로 상기 단백질로부터 절단되는 소수성 아미노산 코어를 특징으로 하는 것이 전형적이다. 이러한 신호 펩티드는 분비 경로를 통과할 때 성숙 단백질로부터의 신호 서열 절단을 허용하는 프로세싱 부위를 함유한다. 따라서, 본 발명은 신호 서열을 갖는 마커 단백질, 융합 단백질 또는 그의 절편 뿐만 아니라 신호 서열이 단백질 분해성 절단된 단백질(즉, 절단 생성물)에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 신호 서열을 코딩하는 핵산 서열을 발현 벡터에서 관심 단백질, 예컨대 마커 단백질 또는 그의 절편에 작동가능하게 연결시킬 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 발현 벡터

로 형질전환된 진핵 숙주로부터의 단백질 분비를 지시하고, 이후에 또는 이와 동시에 상기 신호 서열이 절단된다. 이어서, 상기 단백질은 당업계에 공지된 방법을 통해 세포외 매질로부터 쉽게 정제할 수 있다. 별법으로, 신호 서열은 정제를 용이하게 하는 서열, 예를 들어 GST 도메인을 사용하여 관심 단백질과 연결시킬 수 있다.

또한, 본 발명은 마커 단백질의 변이체에 관한 것이다. 아고니스트 (모방체) 또는 길항제로서 기능할 수 있는 이러한 변이체에서는 아미노산 서열이 변경되어 있다. 변이체는 돌연변이 유발, 예를 들어 불연속 점 돌연변이 또는 말단절단(truncation)에 의해 생성될 수 있다. 아고니스트는 단백질의 자연 발생 형태와 실질적으로 동일하거나 그에 속하는 생물학적 활성을 보유할 수 있다. 단백질의 길항제는 예를 들어 관심 단백질을 포함하는 세포내 신호전달 캐스케이드의 하류 또는 상류 구성원과 경쟁적으로 결합함으로써 상기 단백질의 자연 발생 형태의 활성을 하나 이상 억제할 수 있다. 따라서, 제한된 기능의 변이체로 처리함으로써 특이적인 생물학적 효과를 유발할 수 있다. 상기 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성에 속하는 활성을 갖는 변이체로 대상체를 치료하는 것이 단백질의 자연 발생 형태로 치료하는 것에 비해 대상체에서의 부작용이 보다 적을 수 있다.

아고니스트 (모방체) 또는 길항제로서 기능하는 마커 단백질의 변이체는 본 발명의 단백질의 돌연변이체, 예를 들어 말단절단 돌연변이체의 스크리닝 조합 라이브러리에 의해 아고니스트 또는 길항제 활성에 대해 확인할 수 있다. 한 실시양태에서, 변이체의 다변성(variegate) 라이브러리는 조합 돌연변이 유발에 의해 핵산 수준으로 생성되고, 다변성 유전자 라이브러리에 의해 코딩된다. 변이체의 다변성 라이브러리는, 예를 들어 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 유전자 서열에 효소적 라이게이션시켜 잠재적인 동의성 단백질 서열 세트가 개별 폴리펩티드로서 발현되도록 하거나 별법으로는 보다 큰 융합 단백질 세트 (예를 들어 파지 디스플레이)로서 발현되도록 하여 제조할 수 있다. 동의성 올리고뉴클레오타이드 서열로부터의 마커 단백질의 잠재적 변이체의 라이브러리 제조에는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 동의성 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Narang, 1983, Tetrahedron 39:3]; [Itakura et al., 1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323]; [Itakura et al., 1984, Science 198:1056]; [Ike et al., 1983 Nucleic Acid Res. 11:477] 참고).

또한, 마커 단백질의 절편의 라이브러리를 사용하여 변이체 마커 단백질 또는 그의 절편의 스크리닝 및 후속 선택을 위해 폴리펩티드의 다변성 집단을 생성할 수 있다. 예를 들어 코딩 서열 단편의 라이브러리는, 관심있는 코딩 서열의 이중 가닥 PCR 단편을 분자 당 약 1회만 Nick이 형성되는 조건하에 뉴클레아제로 처리하고, 이중 가닥 DNA를 변성시키고, DNA를 탈변성시켜서 상이한 Nick이 형성된 생성물로부터 센스/안티센스 쌍을 포함할 수 있는 이중 가닥 DNA를 형성하고, S1 뉴클레아제로 처리하여 재형성된 이중나선으로부터 단일 가닥 부분을 제거하고, 생성된 단편 라이브러리를 발현 벡터로 라이게이션함으로써 생성될 수 있다. 이러한 방법에 의해 발현 라이브러리가 유도될 수 있고, 이것은 관심있는 단백질의 다양한 크기의 내부 단편 및 아미노 말단을 코딩한다.

점 돌연변이 또는 말단절단에 의해 형성된 조합 라이브러리의 유전자 생성물 스크리닝 및 선택된 특성을 갖는 유전자 생성물에 대한 cDNA 라이브러리의 스크리닝을 위한 여러 기술이 당업계에 공지되어 있다. 고처리량 분석이 가능한, 대형 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위해 가장 폭넓게 사용되는 기술에는, 전형적으로 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터로 클로닝하고, 적절한 세포를 생성된 벡터 라이브러리로 형질전환시키고, 원하는 활성을 검출하여 생성물이 검출된 유전자를 코딩하는 벡터의 단리를 용이하게 하는 조건하에 조합 유전자를 발현시키는 것이 포함된다. 라이브러리 중 기능적 돌연변이체의 빈도를 증가시키는 기술인 REM (Recursive Ensemble Mutagenesis)을 본 발명의 단백질의 변이체를 확인하는 스크리닝 분석과 조합하여 사용할 수 있다 (문헌 [Arkin and Yourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815]; [Delgrave et al., 1993, Protein Engineering 6(3): 327-331] 참조).

본 발명의 또다른 측면은, 본 발명의 단백질에 대해 지시된 항체에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 특이적으로 마커 단백질 또는 그의 단편에 결합된다. 용어 "항체" 및 "항체들"은, 본원에서 상호교환가능하게 사용된 바와 같이, 이뮤노글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분 (즉, 이러한 부분은 마커 단백질과 같은 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위, 예를 들어 마커 단백질의 에피토프를 함유함)을 포함하는 이뮤노글로불린 분자 뿐만 아니라 그의 단편 및 유도체를 의미한다. 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 단백질에는 결합하면서, 실질적으로 샘플, 예를 들어 천연적으로 단백질을 함유하는 생물학적 샘플 중의 다른 분자에는 결합하지 않는 항체이다. 이뮤노글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분의 예로는, 단일쇄 항체 (scAb), F(ab) 및 F(ab')₂ 단편이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 단리된 단백질 또는 그의 단편은 항체를 생성하는 면역원으로서 사용할 수 있다. 전장 단백질을 사용하거나 또는 본 발명은 면역원으로서 사용하기 위한 항원 펩티드 단편을 제공한다. 본 발명의 단백질의 항원 펩티드는, 본 발명의 단백질 중 하나의 아미노산 서열 중 8개 이상 (바람직하게는 10, 15, 20 또는 30개 이상)의 아미노산 잔기를 포함하며, 하나 이상의 단백질의 에피토프를 둘러싸므로써 펩티드에 대해 생성된 항체가 단백질과 특이적 면역 복합체를 형성한다. 항원 펩티드로 둘러싸인 바람직한 에피토프는 단백질 표면에 위치하는 영역, 예를 들어 친수성 영역이다. 소수성 서열 분석법, 친수성 서열 분석법 또는 유사한 분석법을 사용하여 친수성 영역을 확인할 수 있다. 바람직한 실시양태에서는, 단리된 마커 단백질 또는 그의 단편을 면역원으로서 사용한다.

전형적으로는 면역원을 사용하여, 적합한 (즉, 면역적격인) 대상체, 예를 들어 토끼, 염소, 마우스 또는 기타 포유동물 또는 척추동물을 면역화함으로써 항체를 제조한다. 적절한 면역원 제제는, 예를 들어 재조합 발현된 또는 화학적으로 합성된 단백질 또는 펩티드를 함유할 수 있다. 제제는 보조제, 예를 들어 프로인트(Freund's) 완전 또는 불완전 보조제 또는 유사한 면역 자극제를 추가로 함유할 수 있다. 바람직한 면역원 조성물은, 예를 들어 본 발명의 단백질의 재조합 발현에 비-인간 숙주 세포를 사용하여 제조된 면역원 조성물과 같은 다른 인간 단백질을 함유하지 않는 조성물이다. 이러한 방식에서, 생성된 항체 조성물에는 본 발명의 단백질 외의 인간 단백질의 결합이 감소되어 있거나 존재하지 않는다.

본 발명은 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 제공한다. 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 에피토프와 면역반응 가능한 단지 1종의 항원 결합 부위만을 함유하는 항체 분자의 집단을 지칭한다. 바람직한 폴리클로날 및 모노클로날 항체 조성물은, 본 발명의 단백질에 대해 지시된 항체로 선택된 것이다. 특히 바람직한 폴리클로날 및 모노클로날 항체 제제는 마커 단백질 또는 그의 단편에 대해 지시된 항체만을 함유하는 것이다.

폴리클로날 항체는 적합한 대상체를 면역원으로서의 본 발명의 단백질로 면역화시킴으로써 제조할 수 있다. 면역화된 대상체 중의 항체 역가는, 고정화된 폴리펩티드를 사용하여 효소 결합된 면역흡수 분석법 (ELISA)을 사용하는 등의 표준 기

술에 의해 시간에 따라 모니터링할 수 있다. 면역화 후 적절한 시간에, 예를 들어 특이적 항체 역가가 최고일 때, 항체-생성 세포를 대상체로부터 수득하고, 이를 사용하여 콜러(Kohler) 및 밀스테인(Milstein)의 문헌 [Nature 256: 495-497 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 기술, 인간 B 세포 하이브리도마 기술 (문헌 [Kozbor et al., 1983, Immunol. Today 4: 72] 참조), EBV-하이브리도마 기술 (문헌 [Cole et al., pp. 77-96, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985]) 참조 또는 트리오마 기술과 같은 표준 기술에 의해 모노클로날 항체 (mAb)를 제조할 수 있다. 하이브리도마 생성 기술은 공지되어 있다 (일반적으로 문헌 [Current Protocols in Immunology, Coligan et al. ed., John Wiley & Sons, New York, 1994] 참조). 본 발명의 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는, 예를 들어 표준 ELISA 분석법을 이용하여 관심있는 폴리펩티드에 결합하는 항체에 대한 하이브리도마 배양 상청액을 스크리닝함으로써 검출할 수 있다.

모노클로날 항체-분비 하이브리도마를 제조하는 대신에, 관심있는 폴리펩티드를 갖는 재조합 조합 이뮤노글로불린 라이브러리 (예를 들어 항체 파지 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝함으로써 본 발명의 단백질에 대해 지시된 모노클로날 항체를 확인 및 분리할 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리의 생성 및 스크리닝을 위한 키트는 시판되고 있다 (예를 들어 파마시아 재조합 파지 항체 시스템 (카타로그 번호 27-9400-01) 및 스트라타진 SurfZAP 파지 디스플레이 키트 (카타로그 번호 240612)). 또한, 특히 항체 디스플레이 라이브러리의 생성 및 스크리닝에 사용가능한 방법 및 시약의 예는, 예를 들어 미국 특허 제5,223,409호; PCT 공개 WO 92/18619; PCT 공개 WO 91/17271; PCT 공개 WO 92/20791; PCT 공개 WO 92/15679; PCT 공개 WO 93/01288; PCT 공개 WO 92/01047; PCT 공개 WO 92/09690; PCT 공개 WO 90/02809; 문헌 [Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372]; [Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85]; [Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12: 725-734]에서 찾아볼 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 재조합 항체를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 재조합 항체는 마커 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합한다. 재조합 항체로는, 인간 및 비-인간 부분, 단일쇄 항체 및 다중특이적 항체를 모두 포함하는 키메라 및 인간화 모노클로날 항체가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 키메라 항체는, 무린 mAb 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역으로부터 유도된 다양한 영역을 갖는 것과 같은, 상이한 동물종으로부터 상이한 부분이 유도되는 분자이다 (예를 들어 카빌리(Cabilly) 등의 미국 특허 제4,816,567호; 및 보스(Boss) 등의 미국 특허 제4,816,397호 (상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 참조). 단일쇄 항체는 항원 결합 부위를 갖는 단일 폴리펩티드로 구성된다. 단일쇄 항체는, 예를 들어 랜더(Lander) 등의 미국 특허 제4,946,778호 (상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨); 문헌 [Bird et al., (1988) Science 242: 423-426]; Whitlow et al., (1991) Methods in Enzymology 2: 1-9]; [Whitlow et al., (1991) Methods in Enzymology 2: 97-105]; 및 [Huston et al., (1991) Methods in Enzymology Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications 203: 46-88]에 기재된 방법을 이용하여, 당업계에 공지된 기술에 의해 제조할 수 있다. 다중특이적 항체는 상이한 항원에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 항원-결합 부위를 갖는 항체 분자이다. 이러한 분자는, 예를 들어 세갈(Sege)의 미국 특허 제4,676,980호 (상기 문헌의 기술 내용은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨); 문헌 [Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]; [Whitlow et al., (1994) Protein Eng. 7: 1017-1026] 및 미국 특허 제6,121,424호에 기재된 방법을 이용하여 당업계에 공지된 기술에 의해 형성할 수 있다.

인간화 항체는 비-인간종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 인간 이뮤노글로불린 분자로부터의 프레임 워크(framework) 영역을 갖는 비-인간종으로부터의 항체 분자이다 (예를 들어 퀸(Queen)의 미국 특허 제5,585,089호 (상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 참조). 인간화 모노클로날 항체는, 예를 들어 PCT 공개 WO 87/02671; 유럽 특허 출원 제184,187호; 유럽 특허 출원 제171,496호; 유럽 특허 출원 제173,494호; PCT 공개 WO 86/01533; 미국 특허 제4,816,567호; 유럽 특허 출원 제125,023호; 문헌 [Better et al. (1988) Science 240: 1041-1043]; [Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443]; [Liu et al. (1987) J. Immunol. 139: 3521-3526]; [Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218]; [Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47: 999-1005]; [Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449] 및 [Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559]; [Morrison (1985) Science 229: 1202-1207]; [Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4: 214]; 미국 특허 제5,225,539호; 문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321: 552-525]; [Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534]; 및 [Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141: 4053-4060]에 기재된 방법을 이용하여, 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 형성할 수 있다.

보다 특별하게는, 인간화 항체는, 예를 들어 내인성 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 없으나 인간 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 제조할 수 있다. 트랜스제닉 마우스는, 선택된 항원, 예를 들어 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩티드의 전부 또는 일부로 정상적인 방식으로 면역화한다. 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체는 통상의 하이브리도마 기술을 이용하여 수득할 수 있다. 트랜스제닉 마우스에 의해 보유된 인간 이뮤노글로불린 트랜스진(transgene)은 B 세포 분화 동안 재배열되고, 이어서 클래스 전환(switching) 및 체세포 돌연변이가 일어난다. 따라서, 이러한 기술을 이용하여, 치료학적으로 유용한 IgG, IgA 및 IgE 항체를 제조할 수 있다. 이러한 인간 항체 제조 기술에 대한 개요는, 문헌 [Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13: 65-93]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체 제조 기술 및 이러한 항체의 제조 프로토콜에 대한 상세한 논의사항은, 예를 들어 미국 특허 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 동 제5,569,825호; 동 제5,661,016호; 및 동 제5,545,806호를 참조한다. 또한, 아브제닉스 인코퍼레이티드(Abgenix, Inc., 미국 캘리포니아주 프리몬트 소재)와 같은 회사를 이용하여 상기 문헌에 기재된 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원에 대해 지시된 인간 항체를 제공할 수 있다.

선택된 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체는 "유도 선별법(guided selection)"이라고 지칭되는 기술을 이용하여 생성할 수 있다. 이러한 접근법에서는, 선택된 비-인간 모노클로날 항체, 예를 들어 무린 항체를 사용하여 동일한 에피토프를 인식하는 완전 인간 항체의 선별을 유도한다 (문헌 [Jespersen et al., 1994, Bio/Technology 12: 899-903] 참조).

본 발명의 항체는 (예컨대 대상체의 혈액 또는 혈청으로부터) 제조 후 또는 합성 후 분리하고, 공지된 기술에 의해 추가로 정제할 수 있다. 예를 들어 IgG 항체는 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있다. 본 발명의 단백질에 특이적인 항체는, 예를 들어 친화도 크로마토그래피에 의해 선택 또는 (예컨대 부분 정제) 또는 정제할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 발현된 단백질 및 정제된 (또는 부분 정제된) 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 제조되고, 예를 들어 크로마토그래피 컬럼과 같은 고체 지지체에 공유 또는 비공유 결합된다. 이어서, 컬럼을 사용하여 다수의 상이한 에피토프에 대해 지시된 항체를 함유하는 샘플로부터 본 발명의 단백질에 특이적인 항체를 친화도 정제함으로써, 실질적으로 정제된 항체 조성물, 즉 오염 항체가 실질적으로 없는 항체 조성물을 생성할 수 있다. 이러한 맥락에서, 실질적으로 정제된 항체 조

성물이란, 항체 샘플이 본 발명의 원하는 단백질의 에피토프 이외의 에피토프에 대해 지시된 오염 항체를 단지 30% (건조 중량) 이하로 함유함을 의미하고, 바람직하게는 샘플의 20% 이하, 더욱 바람직하게는 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% (건조 중량) 이하가 오염 항체이다. 정제된 항체 조성물은 조성물 중 99% 이상의 항체가 본 발명의 원하는 단백질에 대해 지시됨을 의미한다.

바람직한 실시양태에서, 실질적으로 정제된 본 발명의 항체는 본 발명의 단백질의 신호 펩티드, 분비 서열, 세포의 도메인, 막횡단 또는 세포질 도메인 또는 세포질 막에 특이적으로 결합할 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, 실질적으로 정제된 본 발명의 항체는 본 발명의 단백질의 아미노산 서열의 세포의 도메인 또는 분비 서열에 특이적으로 결합한다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 실질적으로 정제된 본 발명의 항체는 마커 단백질의 아미노산 서열의 세포의 도메인 또는 분비 서열에 특이적으로 결합된다.

본 발명의 단백질에 대해 지시된 항체를 사용하여, 친화도 크로마토그래피 또는 면역침전 등의 표준 기술에 의해 단백질을 분리할 수 있다. 또한, 이러한 항체를 사용하여 (예컨대 세포의 용해질 또는 세포 상청액 중의) 마커 단백질 또는 그의 단편을 검출하여, 마커 발현 수준 및 양상을 평가할 수 있다. 또한, 항체를 진단적으로 이용하여 임상적 시험 절차의 일부로서 (예를 들어 자궁경부와 관련된 신체의 유체 중의) 조직 또는 신체의 유체를 모니터링하여, 예를 들어 특정 치료 요법의 효능을 측정할 수 있다. 검출은 검출가능한 물질에 결합된 본 발명의 항체를 포함하는 항체 유도체를 사용함으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예로는, 다양한 효소, 보조 물질(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 생발광 물질 및 방사성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예로는, 홍당무 과산화효소, 알칼리 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제가 포함되고; 적합한 보조 물질 복합체의 예로는, 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예로는, 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드 또는 피코에리트린이 포함되고; 발광 물질의 예로는 루미놀이 포함되고; 생발광 물질의 예로는, 루시페라제, 루시페린 및 애쿠오린이 포함되고; 적합한 방사성 물질의 예로는, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}I 또는 ^3H 가 포함된다.

또한, 본 발명의 항체는 암 치료에서 치료제로서 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서는, 본 발명의 완전 인간 항체를 인간 암 환자, 특히 자궁경부암 환자의 치료학적 처치에 사용한다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 마커 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 치료학적 처치에 사용한다. 또한, 이러한 치료학적 항체는 세포독소, 치료제 또는 방사성 금속 이온 등의 치료학적 부분에 접합된 항체를 포함하는 항체 유도체 또는 면역독소일 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 작용제로는, 세포에 불리하게 작용하는 임의의 작용제가 포함된다. 그의 예로는, 탁솔, 시토킨 B, 그라미시딘 D, 에티뮴 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 안티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료제로는, 항대사물질 (예컨대 메토프렉세이트, 6-메르캅토피리딘, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예컨대 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토도토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예컨대 다우노루비신 (예전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예컨대 닥티노마이신 (예전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)) 및 항세포분열제 (예컨대 빈크리스틴 및 빈블라스틴)이 포함된다, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 접합된 항체를 특정 생물학적 반응을 변형하는 데 사용할 수 있으며, 약물 부분은 통상적인 화학적 치료제에 제한되지 않는다. 예를 들어, 약물 부분은 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 리보솜-억제 단백질 (베터(Better) 등의 미국 특허 제6,146,631호 참조, 상기 문헌의 개시 내용은 그 전문이 본원에 도입됨), 아브린, 리신 A, 슈도모나스(pseudomonas) 외독소 또는 디프테리아 독소 등의 독소; 종양 괴사 인자, 알파-인터페론, 베타-인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래의 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성인자 등의 단백질; 또는, 예를 들어 톱포킨, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF") 또는 다른 성장 인자 등의 생물학적 반응 변형인자를 포함할 수 있다.

이러한 치료학적 부분을 항체에 접합하는 기술은 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom et al., "Antibody For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications, Pynchota et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)]; 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)]을 참조한다.

따라서, 본 발명의 한 측면은, 본 발명의 단백질, 바람직하게는 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 실질적으로 정제된 항체, 항체 단편 및 유도체를 제공한다. 다양한 실시양태에서, 실질적으로 정제된 본 발명의 항체 또는 그의 단편 또는 유도체는 인간, 비-인간, 키메라 및(또는) 인간화 항체일 수 있다. 또다른 면에서, 본 발명은 본 발명의 단백질, 바람직하게는 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 비-인간 항체, 항체 단편 및 유도체를 제공한다. 이러한 비-인간 항체는 염소, 마우스, 양, 말, 닭, 토끼 또는 래트 항체일 수 있다. 별법으로, 본 발명의 비-인간 항체는 키메라 및(또는) 인간화 항체일 수 있다. 또한, 본 발명의 비-인간 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 또다른 면에서, 본 발명은 본 발명의 단백질, 바람직하게는 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체, 항체 단편 및 유도체를 제공한다. 모노클로날 항체는 인간, 인간화, 키메라 및(또는) 비-인간 항체일 수 있다.

본 발명은 또한 검출가능한 물질과 접합된 본 발명의 항체 및 사용 설명서를 함유하는 키트를 제공한다. 본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 항체를 포함하는 제약 조성물이다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 본 발명의 항체 및 제약상 허용가능한 담체를 포함한다.

III. 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포

본 발명의 또다른 측면은 벡터, 바람직하게는 마커 단백질 (또는 이러한 단백질의 일부)을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 벡터에 관한 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 핵산을 그것이 연결되는 또다른 핵산으로 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이며, 이는 추가의 DNA 절편으로 라이게이션할 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈으로 라이게이션할 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다 (예를 들어 복제 및 에피솜 포유동물 벡터의 박테리아 기원을 갖는 박테리아 벡터). 다른 벡터 (예를 들어 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입시 숙주 세포의 게놈으로 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터, 즉 발현 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 (벡터) 형태이다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 이러한 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예를 들어 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 포함하려는 것이다.

본 발명의 재조합 발현 벡터는 본 발명의 핵산을 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 포함한다. 이것은 재조합 발현 벡터가 발현에 사용되는 숙주 세포를 기초로 선택되고, 발현되는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 1종 이상의 조절 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동가능하게 연결된"은 관심 뉴클레오타이드 서열이 (예를 들어 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포로 도입될 경우 숙주 세포에서) 상기 뉴클레오타이드 서열을 발현시키는 방식으로 조절 서열(들)에 연결된 것을 의미하려는 것이다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소 (예를 들어 폴리아제닐화 신호)를 포함하려는 것이다. 이러한 조절 서열은, 예를 들어 문헌 [Goeddel, Methods in Enzymology: Gene Expression Technology vol.185, Academic Press, San Diego, CA (1991)]에 기재되어 있다. 조절 서열은 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 구성적 발현을 지시하는 것 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시하는 것 (예를 들어 조직-특이적 조절 서열)을 포함한다. 당업자라면 발현 벡터의 고안 및 형질전환된 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다는 것을 인지할 것이다. 본 발명의 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 본원에 기재된 바와 같은 핵산으로 코딩된 융합 단백질을 생성할 수 있다.

본 발명의 재조합 발현 벡터는 원핵 (예를 들어 대장균 (*E. coli*)) 또는 진핵 세포 (예를 들어 곤충 세포 {배큘로바이러스 발현 벡터를 사용함}, 효모 세포 또는 포유동물 세포)에서 마커 단백질 또는 그의 절편의 발현을 위해 고안될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 문헌 [Goeddel, 상기한 바와 같음]에 더 논의되어 있다. 별법으로, 재조합 발현 벡터는 시험관내에서, 예를 들어 T7 프로모터 조절 서열 및 T7 폴리머라제를 사용하여 전사되고 번역될 수 있다.

원핵생물에서 단백질의 발현은 융합 또는 비-융합 단백질의 발현을 지시하는 구성적 또는 유도가능한 프로모터를 함유하는 벡터를 가진 대장균 내에서 가장 빈번하게 일어난다. 융합 벡터는 코딩된 단백질, 보통 재조합 단백질의 아미노 말단에 복수개의 아미노산을 첨가한다. 이러한 융합 벡터는 전형적으로 3가지 목적: 1) 재조합 단백질의 발현 증가; 2) 재조합 단백질의 용해도 증가; 및 3) 친화도 정제에서 리간드로서 작용함으로써 재조합 단백질의 정제를 보조하기 위해 제공된다. 종종, 융합 발현 벡터에서, 단백질 분해 절단 부위는 융합 부분 및 재조합 단백질의 접합부에 도입하여 재조합 단백질이 융합 부분으로부터 분리되어 이어서 융합 단백질을 정제할 수 있게 한다. 이러한 효소 및 그의 동족 인식 서열은 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나제를 포함한다. 전형적인 융합 발현 벡터로는 표적 재조합 단백질에 대해 각각 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST), 말토스 E 결합 단백질 또는 단백질 A를 융합한 pGEX (파마시아 바이오테크 인크. 제품; 문헌 [Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40] 참고), pMAL (미국 매사추세츠주 비버리 소재 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs) 제품) 및 pRIT5 (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재 파마시아 제품)를 들 수 있다.

적합한 유도가능한 비-융합 대장균 발현 벡터의 예로는 pTrc (문헌 [Amann et al., 1988, Gene 69:301-315] 참고) 및 pET 11d (문헌 [Studier et al., p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol.185, Academic Press, San Diego, CA, 1991] 참고)를 들 수 있다. pTrc 벡터로부터의 표적 유전자 발현은 혼성 trp-lac 융합 프로모터로부터의 숙주 RNA 폴리머라제 전사에 따라 달라진다. pET 11d 벡터로부터의 표적 유전자 발현은 함께 발현된 바이러스 RNA 폴리머라제 (T7 gn1)에 의해 매개된 T7 gn1O-lac 융합 프로모터로부터의 전사에 따라 달라진다. 이 바이러스 폴리머라제는 lacUV 5 프로모터의 전사 조절 하에 T7 gn1에 잠복하고 있는 정제 프로파지로부터의 숙주 균주 BL21(DE3) 또는 HMS174(DE3)에 의해 공급된다.

대장균에서 재조합 단백질 발현을 최대화시키는 한 전략은 재조합 단백질을 단백질분해성으로 절단시키는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 단백질을 발현시키는 것이다 (문헌 [Gottesman, p. 119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990] 참고). 또다른 전략은 발현 벡터로 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경시켜 각각의 아미노산에 대한 개별 코돈이 대장균에서 우선적으로 사용되도록 하는 것이다 (문헌 [Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118] 참고). 본 발명의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기술에 의해 수행될 수 있다.

또다른 실시양태에서, 발현 벡터는 효모 발현 발현 벡터이다. 효모 사카로마이스스 세레비시애 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서의 발현에 대한 벡터의 예로는 pYepSec1 (문헌 [Baldari et al., 1987, EMBO J. 6:229-234] 참고), pMFa (문헌 [Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943] 참고), pJRY88 (문헌 [Schultz et al., 1987, Gene 54:113-123] 참고), pYES2 (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재 인비트로젠 코퍼레이션 (Invitrogen Corporation) 제품) 및 pPicZ (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재 인비트로젠 코퍼레이션 제품)를 들 수 있다.

별법으로, 발현 벡터는 배큘로바이러스 발현 벡터이다. 배양된 곤충 세포 (예를 들어 Sf 9 세포)에서의 단백질 발현에 이용가능한 배큘로바이러스 벡터로는 pAc류 (문헌 [Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165] 참고) 및 pVL류 (문헌 [Lucklow and Summers, 1989, Virology 170:31-39] 참고)를 들 수 있다.

또다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 포유동물 발현 벡터를 사용한 포유동물 세포에서 발현된다. 포유동물 발현 벡터의 예로는 pCDM8 (문헌 [Seed, 1987, Nature 329:840] 참고) 및 pMT2PC (문헌 [Kaufman et al., 1987, EMBO J.

6:187-195] 참고)를 들 수 있다. 포유동물 세포에서 사용될 경우, 발현 벡터의 조절 기능은 종종 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어 일반적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 유인원 바이러스 40으로부터 유도된다. 원핵 및 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템에 대해서는 문헌 [Sambrook et al., 상기한 바와 같음]의 16 및 17장을 참고한다.

또다른 실시양태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 특정 세포 유형에서 우선적으로 핵산의 발현을 지시할 수 있다 (예를 들어 조직-특이적 조절 요소를 사용하여 핵산을 발현시킴). 조직-특이적 조절 요소는 당업계에 공지되어 있다. 적합한 조직-특이적 프로모터의 예로는 알부민 프로모터 (간-특이적; 문헌 [Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1:268-277] 참고), 림프-특이적 프로모터 (문헌 [Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43:235-275] 참고), 특히 T 세포 수용체의 프로모터 (문헌 [Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8:729-733] 참고) 및 이뮤노글로불린 (문헌 [Banerji et al., 1983, Cell 33:729-740]; [Queen and Baltimore, 1983, Cell 33:741-748] 참고), 뉴런-특이적 프로모터 (예를 들어 신경세사 프로모터; 문헌 [Byrne and Ruddle, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477] 참고), 이자-특이적 프로모터 (문헌 [Edlund et al., 1985, Science 230:912-916] 참고) 및 유선-특이적 프로모터 (예를 들어 유장 프로모터; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 출원 공보 제264,166호) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 발생-조절된 프로모터, 예를 들어 myf hox 프로모터 (문헌 [Kessel and Gruss, 1990, Science 249:374-379] 참고) 및 α -페도난백질 프로모터 (문헌 [Camper and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3:537-546] 참고)가 포함된다.

본 발명은 또한 안티센스 배향으로 발현 벡터로 클로닝된 본 발명의 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 즉, DNA 분자는 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 대한 안티센스인 RNA 분자를 (DNA 분자의 전사에 의해) 발현시키는 방식으로 조절 서열과 작동가능하게 연결된다. 안티센스 배향으로 클로닝된 핵산에 작동가능하게 연결되어 있으며, 다양한 세포 유형에서 안티센스 RNA 분자의 연속적 발현을 지시하는 조절 서열, 예를 들어 바이러스 프로모터 및(또는) 인핸서를 선택하거나, 안티센스 RNA의 구성적, 조직-특이적 또는 세포 유형 특이적 발현을 지시하는 조절 서열을 선택할 수 있다. 안티센스 발현 벡터는 안티센스 핵산이 고효율 조절 영역의 조절하에 생성되고, 그의 활성화는 벡터가 도입되는 세포 유형에 의해 결정될 수 있는 재조합 플라스미드, 파지미드 또는 약독화된 바이러스 형태일 수 있다. 안티센스 유전자를 사용한 유전자 발현의 조절에 대한 논의에 대해서는 문헌 [Weintraub et al., 1986, Trends in Genetics, Vol.1(1)]을 참고한다.

본 발명의 또다른 측면은 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에 관한 것이다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 서로 바뀌어서 사용된다. 이러한 용어는 특정 대상체 세포 뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손(progeny) 또는 잠재적인 자손을 지칭하는 것을 인지한다. 특정 변형은 돌연변이 또는 환경 영향에 의해 다음 세대에서 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실 모세포와 동일한 것은 아니지만, 여전히 본원에서 사용된 바와 같은 용어의 범위에 포함된다.

숙주 세포는 임의의 원핵 세포 (예를 들어 대장균) 또는 진핵 세포 (예를 들어 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포)일 수 있다.

벡터 DNA는 통상의 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵 또는 진핵 세포에 도입될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 인산칼슘 또는 염화칼슘 동시침전법, DEAE-덱스트란-매개된 형질감염법, 리포펙션법(lipofection) 또는 전기천공법을 비롯한, 외부 핵산을 숙주 세포에 도입시키기 위한 다양한 당업계에 공지된 기술을 지칭하려는 것이다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 데 적합한 방법은 문헌 [Sambrook, et al. (상기한 바와 같음)] 및 다른 실험 편람에서 알 수 있다.

포유동물 세포의 안정한 형질감염에 대하여, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라, 단지 세포 중 소부분이 외부 DNA를 그의 게놈으로 통합시킬 수 있다는 것이 공지되어 있다. 이러한 성분을 확인하고, 선택하기 위하여, 선택가능한 마커 (예를 들어 항체에 대한 내성을 위한 것)를 코딩한 유전자를 일반적으로 관심 유전자와 함께 숙주 세포에 도입한다. 바람직한 선택가능한 마커로는 약물에 내성을 부여하는 것, 예컨대 G418, 하이그로마이신 및 메토포레세이트를 들 수 있다. 도입된 핵산으로 안정하게 형질감염된 세포 (예를 들어 다른 세포가 사멸하는 동안 생존할 수 있는 선택가능한 마커가 도입된 세포)는 약물 선택에 의해 확인될 수 있다.

본 발명의 숙주 세포, 예컨대 배양된 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 사용하여 마커 단백질을 또는 그의 절편을 제조할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 숙주 세포를 사용하여 마커 단백질을 또는 그의 절편을 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 숙주 세포 (재조합 발현 벡터 마커 단백질을 코딩하는 또는 그의 절편이 도입된)를 적합한 배지에서 배양하여 제조하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 또한 배지 또는 숙주 세포로부터 마커 단백질 또는 그의 절편을 분리하는 단계를 포함한다.

본 발명의 숙주 세포는 또한 비인간 트랜스제닉 동물의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서 본 발명의 숙주 세포는 마커 단백질을 또는 그의 절편을 코딩하는 서열이 도입되어 있는 수정된 난모세포 또는 배아 줄기 세포이다. 이어서, 이러한 숙주 세포를, 본 발명의 마커 단백질을 코딩하는 외인성 서열이 게놈내에 도입된 비-인간 트랜스제닉 동물 또는 마커 단백질을 코딩하는 내인성 유전자(들)이 변경된 상동성 재조합 동물을 제작하는데 사용할 수 있다. 이러한 동물들은 마커 단백질의 기능 및(또는) 활성을 연구하고 마커 단백질을 조절제를 확인 및(또는) 평가하는데 유용하다. 본원에서 사용된 "트랜스제닉 동물"은 동물의 하나 이상의 세포가 트랜스진을 포함하는 비-인간 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 설치류, 예컨대 래트 또는 마우스이다. 트랜스제닉 동물의 다른 예로는 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 염소, 닭, 양서류 등이 포함된다. 트랜스진은 트랜스제닉 동물이 발생할 세포의 게놈에 통합되고, 상기 성숙한 동물의 게놈 중에 유지됨으로써, 트랜스제닉 동물의 하나 이상의 세포형 또는 조직에서 코딩된 유전자의 발현을 지시하는 외인성 DNA이다. 본원에서 사용된 "상동성 재조합 동물"은 내인성 유전자들 사이의 상동성 재조합에 의해 내인성 유전자가 변경되고 동물의 세포, 예를 들어 동물이 발생하기 전의 동물의 배아 세포에 외인성 DNA 분자가 도입된 비-인간 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 마우스이다.

본 발명의 트랜스제닉 동물은 예를 들어 미세주사, 레트로바이러스 감염에 의해 마커 단백질을 코딩하는 핵산을 수정된 난모세포의 수컷 전핵에 도입하고, 난모세포를 가임시킨 암컷 양부모 동물내에서 발생시킴으로써 제작할 수 있다. 트랜스진의 발현 효율을 증가시키기 위해 또한 인트론 서열 및 폴리아데닐화 신호를 포함시킬 수 있다. 조직-특이적 조절 서열

(들)은 트랜스진에 작동가능하게 연결되어 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 특정 세포에 지시할 수 있다. 배아 조작 및 미세 주사, 특히 동물, 예컨대 마우스를 통해 트랜스제닉 동물을 생성하는 방법은 당업계에서 통상적인 것이 되었고, 예를 들어 미국 특허 제4,736,866호 및 제4,870,009호, 미국 특허 제4,873,191호 및 문헌 [Hogan, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986]에 기재되어 있다. 유사한 방법을 사용하여 다른 트랜스제닉 동물을 제조한다. 게놈 중 트랜스진의 존재 및(또는) 동물의 조직 또는 세포에서 트랜스진을 코딩하는 mRNA의 발현을 근거로 트랜스제닉 창설자 동물을 확인할 수 있다. 이어서, 트랜스제닉 창설자 동물을 사용하여 트랜스진을 갖는 추가의 동물을 번식시킬 수 있다. 또한, 트랜스진을 갖는 트랜스제닉 동물을 다른 트랜스진을 갖는 다른 트랜스제닉 동물과 교배할 수 있다.

상동성 재조합 동물을 생성하기 위해서는, 마커 단백질을 코딩하는 유전자의 적어도 일부를 함유하고 상기 유전자에 결실, 부가 또는 치환이 도입되어 상기 유전자가 변경된, 예를 들어 기능적으로 파괴된 벡터를 제조한다. 바람직한 실시양태에서, 상동성 재조합에서, 내인성 유전자가 기능적으로 파괴되도록 벡터를 고안한다 (즉, 더이상 기능성 단백질을 코딩하지 않음; 또한 "너아웃 (knock out)" 벡터로 지칭되기도 함). 별법으로, 상동성 재조합에서, 내인성 유전자가 돌연변이를 일으키거나 또는 변경되었지만 여전히 기능성 단백질을 (예를 들어 내인성 단백질의 발현이 변경되도록 상류 조절 부위를 변경할 수 있음)을 코딩하도록 고안할 수 있다. 상동성 재조합 벡터에서, 유전자의 변경된 부분은 그의 5' 및 3' 말단에서 유전자의 추가 핵산에 의해 플랭킹되어, 벡터에 의해 운반된 외인성 유전자와 배아 줄기 세포내의 내인성 유전자 사이에서 상동성 재조합이 발생한다. 추가의 플랭킹 핵산 서열은 내인성 유전자와의 성공적인 상동성 재조합에 충분한 길이이다. 전형적으로, 수 킬로베이스(kb)의 플랭킹 DNA (5' 및 3' 말단 둘다에서)가 벡터내에 포함된다 (상동성 재조합 벡터에 대한 기재에 대해서는 예를 들어 문헌 [Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51: 503] 참조). 벡터를 배아 줄기 세포주 (예를 들어 전기천공법에 의해)에 도입하고, 도입된 유전자가 내인성 유전자와 상동성 재조합된 세포를 선택한다 (예를 들어 문헌 [Li et al., 1992, Cell 69: 915] 참조). 이어서, 선택된 세포를 동물 (예를 들어 마우스)의 주머니배에 주입하여 응집 키메라를 형성한다 (예를 들어 문헌 [Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, Ed., IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152] 참조). 이어서, 키메라 배아를 적합한 가임인 암컷 양부모 동물에 이식하여 배아를 성장시킬 수 있다. 배 세포내에 상동성 재조합 DNA를 갖는 자손을 사용하여 동물의 모든 세포가 트랜스진의 생식선 전달에 의해 상동성 재조합 DNA를 함유하는 동물을 번식시킬 수 있다. 상동성 재조합 벡터 및 상동성 재조합 동물을 제작하는 방법은 또한 문헌 [Bradley (1991) Current Opinion in Bio/Technology 2: 823-829] 및 PCT 공개 WO 90/11354호, WO 91/01140호, WO 92/0968호 및 WO 93/04169호에 기재되어 있다.

또다른 실시양태에서, 트랜스진의 발현이 조절되는 선택된 시스템을 함유하는 트랜스제닉 비-인간 동물을 제조할 수 있다. 이러한 시스템의 예로는 박테리오파지 P1의 cre/loxP 재조합효소 시스템이 있다. cre/loxP 재조합효소 시스템의 기재는 예를 들어 문헌 [Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236]을 참조한다. 재조합효소 시스템의 또다른 예로는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 FLP 재조합효소 시스템이 있다 (문헌 [O'Gorman et al., 1991, Science 251: 1351-1355]). cre/loxP 재조합효소 시스템을 사용하여 트랜스진의 발현을 조절할 경우, Cre 재조합효소 및 선택된 단백질 둘다를 코딩하는 트랜스진을 함유하는 동물이 요구된다. 이러한 동물은 두 동물, 예를 들어 선택된 단백질을 코딩하는 트랜스진을 함유하는 한 동물과 재조합효소를 코딩하는 트랜스진을 함유하는 다른 동물을 교배하여, "이중" 트랜스제닉 동물을 제작함으로써 제공될 수 있다.

본원에 기재된 비-인간 트랜스제닉 동물의 클론은 또한 문헌 [Wilmot et al. (1997) Nature 385: 810-813] 및 PCT 공개 WO 97/07668호 및 WO 97/07669호에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다.

IV. 제약 조성물

본 발명의 핵산 분자, 폴리펩티드 및 항체 (본원에서는 "활성 화합물"이라고 지칭되기도 함)를 투여하기 적합한 제약 조성물에 혼입할 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 핵산 분자, 단백질 또는 항체 및 제약상 허용가능한 담체를 포함한다.

본원에 사용된 용어 "제약상 허용가능한 담체"는 제약 투여와 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함하려는 의도이다. 제약상 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제들의 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다. 상용불가능한 경우를 제외하면, 임의의 통상적인 매질 또는 작용제를 상기 조성물에 사용할 수 있다. 또한 보충적 활성 화합물을 조성물에 혼입할 수 있다.

본 발명에는 마커 핵산 또는 단백질의 발현 또는 활성을 조정하기 위한 제약 조성물의 제조 방법이 포함된다. 이러한 방법에는 마커 핵산 또는 단백질의 발현 또는 활성을 조정하는 작용제와 제약상 허용가능한 담체의 제제화가 포함된다. 이러한 조성물은 또한 추가의 활성 작용제를 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 마커 핵산 또는 단백질의 발현 또는 활성을 조정하는 작용제 및 1종 이상의 추가의 활성 화합물과 제약상 허용가능한 담체를 제제화함으로써 제약 조성물을 제조하는 방법을 포함한다.

본 발명은 또한 (a) 마커에 결합하거나 또는 (b) 마커의 활성에 있어서 조정 (예를 들어 촉진 또는 억제) 효과를 갖거나 또는 더욱 상세하게는, (c) 마커와 그의 하나 이상의 천연 기질 (예를 들어 펩티드, 단백질, 호르몬, 보조인자 또는 핵산)의 상호작용 상에 조정 효과를 갖거나 또는 (d) 마커의 발현에 조정 효과를 갖는 조정제, 즉, 후보 화합물 또는 시험 화합물 또는 작용제 (예를 들어 펩티드, 펩티드모방체(peptidomimetics), 펩토이드, 소분자 또는 다른 약물)를 확인하는 방법 (본원에서는 "스크리닝 방법"이라고 지칭되기도 함)을 제공한다. 이러한 분석은 전형적으로 마커 및 하나 이상의 분석 성분 사이의 반응을 포함한다. 다른 성분은 시험 화합물 자체이거나, 시험 화합물과 마커의 천연 결합 파트너의 조합물일 수 있다.

본 발명의 시험 화합물은 천연 및(또는) 합성 화합물의 계통적 라이브러리를 비롯한 임의의 이용가능한 급원으로부터 수득할 수 있다.

시험 화합물은 또한 하기를 비롯한 당업계에 공지된 조합 라이브러리 방법에서의 다수의 접근법 중 임의의 방법에 의해 수득할 수 있다: 생물학적 라이브러리; 펩토이드 라이브러리 (펩티드의 기능을 가지며, 효소에 의해 분해됨에도 불구하고 생물활성이 잔류하는 신규 비-펩티드 주쇄를 갖는 분자들의 라이브러리; 예를 들어 문헌 [Zuckermann et al., 1994, J. Med. Chem. 37: 2678-85] 참조); 공간적 위치파악가능한 평형 고상 또는 용액 상 라이브러리; 디콘볼루션을 필요로 하

는 합성 라이브러리 방법; '1-비드 1-화합물' 라이브러리 방법; 및 친화도 크로마토그래피 선택을 사용한 합성 라이브러리 방법. 생물학적 라이브러리 및 펩티드 라이브러리에 의한 접근은 펩티드 라이브러리에 국한되는 반면, 다른 4종의 접근법은 펩티드, 비-펩티드 올리고머 또는 화합물의 소분자 라이브러리 (문헌 [Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145])에 적용가능하다.

분자 라이브러리의 합성 방법의 예는 당업계에서 발견될 수 있으며, 예를 들어 문헌 [DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909]; [Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422]; [Zuckermann et al. (1994). J. Med. Chem. 37: 2678]; [Cho et al. (1993) Science 261: 1303]; [Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059]; [Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061]; 및 [Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233]을 참조한다.

화합물의 라이브러리는 용액 (예를 들어 문헌 [Houghten, 1992, Biotechniques 13: 412-421]) 중에 또는 비드 (문헌 [Lam, 1991, Nature 354: 82-84]), 칩 (문헌 [Fodor, 1993, Nature 364: 555-556]), 박테리아 및(또는) 포자 (문헌 [Ladner, USP 5,223,409호]), 플라스미드 (문헌 [Cull et al, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 1865-1869]) 또는 파지 (문헌 [Scott and Smith, 1990, Science 249: 386-390]; [Devlin, 1990, Science 249: 404-406]; [Cwirla et al, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382]; [Felici, 1991, J. Mol. Biol. 222: 301-310]; [Ladner, supra.]) 상에 존재할 수 있다.

한 실시양태에서, 본 발명은 마커 또는 생물학적 활성이 있는 그의 일부에 의해 코딩되거나 또는 그에 상응하는 단백질의 기질인 스크리닝 후보 또는 시험 화합물에 대한 분석을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 마커 또는 생물학적 활성이 있는 그의 일부에 의해 코딩되거나 또는 그에 상응하는 단백질과 결합하는 스크리닝 후보 또는 시험 화합물에 대한 분석을 제공한다. 시험 화합물의 단백질에 대한 직접 결합능을, 예를 들어 마커에 대한 화합물의 결합을 복합체 중의 표지된 마커 화합물의 검출에 의해 측정할 수 있도록 화합물을 방사성동위원소 또는 효소적 표지와 커플링시킴으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 화합물 (예를 들어 마커 기질)을 직접 또는 간접적으로 ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^3H 로 표지하여, 방사선방출의 직접 계수 또는 섬광 계수에 의해 방사성동위원소를 검출할 수 있다. 방법으로, 분석 성분을 효소적으로, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 루시페라제로 표지하고, 적절한 기질의 생성물로의 전환을 측정함으로써 효소적 표지를 검출할 수 있다.

또다른 실시양태에서, 본 발명은 마커의 활성 또는 마커 또는 생물학적 활성이 있는 그의 일부에 의해 코딩되거나 또는 그에 상응하는 단백질의 활성을 조정하는 스크리닝 후보 또는 시험 화합물에 대한 분석을 제공한다. 마찬가지로, 마커에 의해 코딩되거나 또는 그에 상응하는 단백질은 생체내에서 하나 이상의 분자, 예컨대 펩티드, 단백질, 호르몬, 보조인자 및 핵산 (이들에 국한되지는 않음)과 상호작용할 수 있다. 본 고찰의 목적을 위해, 이러한 세포 및 세포의 분자들은 본원에서 "결합 파트너" 또는 마커 "기질"이라 지칭된다.

상기 스크리닝을 용이하게 하는데 필수적인 본 발명의 실시양태는 마커에 의해 코딩되거나 또는 그에 상응하는 단백질을 사용하여 그 단백질의 생체내 천연 결합 파트너를 확인하는 것이다. 이것을 달성하기 위한 다수의 방식이 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 한 예는 2-혼성 분석 또는 3-혼성 분석에서 마커 단백질을 "미끼 단백질"로 사용하여 (예를 들어 미국 특허 제5,283,317호; 문헌 [Zervos et al., 1993, Cell 72: 223-232]; [Madura et al, 1993, J. Biol. Chem. 268: 12046-12054]; [Bartel et al, 1993, Biotechniques 14: 920-924]; [Iwabuchi et al, 1993 Oncogene 8: 1693-1696]; Brent W094/10300호), 마커 (결합 파트너)와 결합 또는 상호작용함으로써 마커의 자연적 기능에 관련되어 있을 수 있는 다른 단백질을 확인하는 것이다. 이러한 마커 결합 파트너는 또한 마커 단백질 또는 마커 단백질-매개된 신호 경로의 하류 요소에 의한 신호의 전파에 관련되어 있을 수 있다. 별법으로, 이러한 마커 단백질 결합 파트너는 또한 마커 단백질의 억제제로 판명될 수 있다.

2-혼성 시스템은 대부분의 전사 인자들의 모듈적 특성을 기초로 하는 것으로서, 분리가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 이루어진다. 요약하면, 이 분석은 2종의 상이한 DNA 구조물을 이용한다. 한 구조물에서는, 마커 단백질을 코딩하는 유전자가 공지된 전사 인자 (예를 들어 GAL-4)의 DNA 결합 도메인을 코딩하는 유전자에 융합된다. 다른 구조물에서는, 미확인 단백질 ("먹이" 또는 "샘플")을 코딩하는 DNA 서열의 라이브러리로부터의 DNA 서열이 공지된 전사 인자의 활성화 도메인을 코딩하는 유전자에 융합된다. "미끼"와 "먹이" 단백질이 생체내에서 상호작용하여 마커-의존성 복합체를 형성할 경우, 전사 인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 근접하게 된다. 이러한 근접성은 전사 인자에 반응하는 전사 조절 부위에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자 (예를 들어 LacZ)의 전사를 허용한다. 리포터 유전자의 발현을 용이하게 검출할 수 있고, 기능성 전사 인자를 함유하는 세포 콜로니를 단리하여 마커 단백질과 상호작용하는 단백질을 코딩하는 클론된 유전자를 수득하는데 사용할 수 있다.

추가 실시양태에서, 본 발명을 사용함으로써 마커 단백질 및 그의 기질 및(또는) 결합 파트너 사이의 상호작용을 조정 (예를 들어 양(+) 또는 음(-)의 영향을 주는)하는 화합물을 확인하기 위한 분석을 고안할 수 있다. 이러한 화합물은 분자, 예컨대 할체, 펩티드, 호르몬, 올리고뉴클레오타이드, 핵산 및 그의 유사체들을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 화합물은 또한 천연 및(또는) 합성 화합물의 계통적 라이브러리를 비롯한 임의의 이용가능한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 이 실시양태에 사용하기 위한 바람직한 분석 성분은 본원에서 확인된 경부암 마커 단백질, 공지된 결합 파트너 및(또는) 그의 기질 및 시험 화합물이다. 시험 화합물은 임의의 공급원으로부터 공급될 수 있다.

마커 단백질 및 그의 결합 파트너 사이의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하는데 사용되는 분석 시스템의 기본 원리는, 두 생성물이 상호작용하고 결합하여 복합체를 형성시키는데 충분한 조건 및 시간에서 마커 단백질 및 그의 결합 파트너를 함유하는 반응 혼합물을 제조하는 것을 포함한다. 작용제의 억제 활성을 시험하기 위해, 시험 화합물의 존재 및 부재 하에서 반응 혼합물을 제조한다. 시험 화합물은 초기에 반응 혼합물 중에 포함되거나 또는 마커 단백질 및 그의 결합 파트너를 첨가한 후에 첨가될 수 있다. 대조군 반응 혼합물을 시험 화합물 없이 또는 위약과 함께 인큐베이션한다. 이어서, 마커 단백질 및 그의 결합 파트너 사이의 임의의 복합체의 형성을 검출한다. 대조군 반응에서는 복합체가 형성되지만, 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물에서는 복합체가 더 적게 형성되거나 형성되지 않은 것은 시험 화합물이 마커 단백질 및 그의 결합 파트너의 상호작용을 방해한다는 것을 가리킨다. 반대로, 대조군 반응에서보다 화합물의 존재하에서 더 많은 복합체가 형성된 것은 시험 화합물이 마커 단백질 및 그의 결합 파트너의 상호작용을 증대시킨다는 것을 가리킨다.

마커 단백질과 그의 결합 파트너의 상호작용을 방해하는 화합물의 분석은 균질 또는 비균질 형식으로 수행될 수 있다. 비균질 분석은 마커 단백질 또는 그의 결합 파트너를 고상에 고정하고 반응 말기에 고상에 고정된 복합체를 검출하는 것을 포함한다. 균질 분석에서, 전체 반응이 액상에서 수행된다. 각각의 접근법에서, 반응물의 첨가 순서는 시험되는 화합물에 대한 상이한 정보를 얻기 위해 달라질 수 있다. 예를 들어, 마커 단백질과 결합 파트너 사이의 상호작용을 방해 (예컨대 경쟁에 의해)하는 시험 화합물은 시험 물질의 존재 하에 수행함으로써, 즉 시험 물질을 마커와 그의 상호작용 결합 파트너에 앞서서 또는 동시에 반응 혼합물에 첨가함으로써 확인할 수 있다. 별법으로, 예비 형성된 복합체를 파괴하는 시험 화합물, 예를 들어 복합체로부터의 성분 중 하나를 대체하는 더 높은 결합 상수를 갖는 화합물은 복합체가 형성된 후에 시험 화합물을 반응 혼합물에 첨가하여 시험할 수 있다. 다양한 형식을 이하에 간략히 기술하기로 한다.

비균질 분석 시스템에서, 마커 단백질 또는 그의 결합 파트너는 고체 표면 또는 매트릭스에 고정되는 반면, 다른 상응하는 고정되지 않은 성분은 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 실제로, 이러한 접근법에는 미량역가 플레이트가 주로 사용된다. 고정된 종들은 당업자에게 전형적으로 공지된 비-공유 또는 공유인 많은 방법에 의해 고정화될 수 있다. 비-공유 부착은 주로 단순히 고체 표면을 마커 단백질 또는 그의 결합 파트너의 용액으로 코팅하고 건조함으로써 달성할 수 있다. 별법으로, 고정시킬 분석 성분에 대해 특이적인 고정화된 항체를 이러한 목적에 사용할 수 있다. 이러한 표면은 주로 미리 제조하여 저장할 수 있다.

관련 실시양태에서, 분석 성분의 하나 또는 각각을 매트릭스에 고정시킬 수 있는 도메인을 첨가하는 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제/마커 융합 단백질 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제/결합 파트너는 글루타티온 세파로스 비드 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 케미칼사 제조) 또는 글루타티온 유도체와 미량역가 플레이트에 흡착된 후 시험 화합물 또는 시험 화합물과 비-흡착된 마커 또는 그의 결합 파트너와 배합되고, 복합체 형성에 도움이 되는 조건 (예컨대 생리적 조건) 하에 혼합물을 인큐베이션한다. 인큐베이션 후, 비드 또는 미량역가 플레이트 웰을 세척하여 결합되지 않은 임의의 분석 성분들을 제거하고, 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 상기한 바와 같이 고정화된 복합체를 평가한다. 별법으로, 복합체를 매트릭스로부터 해리시키고, 마커 결합 수준 또는 활성을 표준 기술을 사용하여 측정한다.

매트릭스에 단백질을 고정화시키는 다른 기술도 본 발명의 스크리닝 분석법에 사용할 수 있다. 예를 들어, 바이오틴과 스트렙타비딘의 접합을 이용하여 마커 단백질 또는 마커 단백질 결합 파트너를 고정화시킬 수 있다. 바이오티닐화 마커 단백질 또는 표적 분자는 업계에 공지된 기술을 이용하여 바이오틴-NHS (N-히드록시-숙신이미드)로부터 제조되고 (예컨대 바이오티닐화 키트, 미국 일리노이주 록크포드에 소재하는 피어스 케미칼스(Pierce Chemicals) 제품), 스트렙타비딘으로 코팅된 96 웰 플레이트 (피어스 케미칼스 제품)의 웰에서 고정화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질-고정화된 표면을 미리 제조하여 저장할 수 있다.

분석을 수행하기 위해서, 고정화된 분석 성분의 상응하는 파트너를 시험 화합물과 함께 또는 시험 화합물 없이 코팅된 표면에 노출시킨다. 반응이 종결되면, 미반응 분석 성분을 (예를 들면 세척에 의해) 제거하며, 형성된 임의의 복합체는 고체 표면에 고정된 상태로 유지된다. 고체 표면에 고정된 복합체의 검출은 많은 방식으로 달성할 수 있다. 고정화되지 않은 성분은 성분이 예비 표지되는 경우, 표면에 고정된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 고정화되지 않은 성분이 예비 표지되지 않은 경우, 예를 들어 초기에 고정화되지 않은 종에 대해 특이적인 표지된 항체를 사용하여 표면에 고정된 복합체를 검출하는 데 간접 표지를 사용할 수 있다 (이에 따라 항체는 직접적으로 또는 예를 들어 표지된 항-Ig 항체로 간접적으로 표지될 수 있다). 반응 성분들의 첨가 순서에 따라, 복합체 형성을 조정 (억제 또는 증가)하거나 예비 형성된 복합체를 파괴하는 시험 화합물을 검출할 수 있다.

본 발명의 별법의 일 실시양태에서, 균질 분석을 이용할 수 있다. 이는 전형적으로 시험 화합물의 존재 또는 부재하에 액상 중에서 수행되는, 상기한 것과 유사한 반응이다. 형성된 복합체는 이어서 미반응 성분으로부터 분리되고, 형성된 복합체의 양을 측정한다. 비균질 분석 시스템에 대해 언급한 바와 같이, 반응물을 액상에 첨가하는 순서는 복합체 형성을 조정 (억제 또는 증가)하거나 예비 형성된 복합체를 파괴하는 시험 화합물에 대한 정보를 제공할 수 있다.

그러한 균질 분석에서, 반응 생성물은 차별적 원심분리, 크로마토그래피, 전기영동 및 면역침전을 포함하는 (이에 한정되는 것은 않음) 임의의 다수의 표준 기술에 의해 미반응 분석 성분으로부터 분리될 수 있다. 차별적 원심분리에서, 분자 복합체는 그의 상이한 크기 및 밀도를 기준으로 복합체의 상이한 침강 균형에 의해 미복합 분자로부터 일련의 원심분리 단계를 통해 분리된다 (예를 들어 문헌 [Rivas, G., and Minton, A. P., Trends Biochem Sci 1993 Aug; 18(8):284-7] 참고). 미복합 분자로부터 복합 분자를 분리하는 데 표준 크로마토그래피 기술을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어 겔 여과 크로마토그래피는 크기를 기준으로 컬럼 형태의 적절한 겔 여과 수지를 사용하여 분자를 분리하며, 예를 들어 비교적 큰 복합체를 비교적 작은 미복합 성분으로부터 분리할 수 있다. 유사하게, 미복합 분자와 비교하여 복합체의 비교적 상이한 하전 특성을 이용하여, 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피 수지의 사용을 통해 잔존하는 개별 반응물로부터 복합체를 차별적으로 분리할 수 있다. 이러한 수지 및 크로마토그래피 기술은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Heegaard, 1998, J Mol. Recognit. 11:141-148], [Hage and Tweed, 1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 699:499-525] 참고). 결합되지 않은 종들로부터 복합 분자를 분리하는 데 겔 전기영동을 이용할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Ausubel et al (eds.), In: Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999] 참고). 이 기술에서는, 예를 들어 크기 또는 전하를 기준으로 단백질 또는 핵산 복합체를 분리한다. 전기영동 공정 중 결합 상호작용을 유지하기 위하여, 전형적으로 환원제의 존재하에 변성되지 않은 겔이 바람직하지만, 특수한 상호작용에 적절한 조건은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 면역침전은 용액으로부터 단백질-단백질 복합체를 분리하는 데 이용되는 또다른 통상적인 기술이다 (예를 들어 문헌 [Ausubel et al (eds.), In: Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley & Sons, New York, 1999] 참고). 이 기술에서, 결합 분자의 하나에 특이적인 항체에 결합되는 모든 단백질은 항체를 원심분리에 의해 용이하게 수집할 수 있는 중합체 비드에 접합시킴으로써 용액으로부터 침전된다. 결합 분석 성분은 (특이적 단백질 분해 또는 복합체 중 단백질-단백질 상호작용을 저해하지 않는 당업계에 공지된 다른 기술을 통해) 비드로부터 분리되고, 제2 면역침전 단계가 수행되며, 이때 상응하게 상이한 상호작용 분석 성분에 특이적인 마커 항체를 이용한다. 이러한 방식으로, 형성된 복합체만이 비드에 부착된 상태로 유지될 것이다. 시험 화합물의 존재 또는 부재하에 복합체 형성 중 변이를 비교할 수 있으며, 따라서 마커 단백질과 그의 결합 파트너 사이의 상호작용을 조정하는 화합물의 성능에 대한 정보를 제공한다.

또한, 추가의 샘플 조작 없이 균질 또는 비균질 분석 시스템으로 마커 단백질 및 그의 천연 결합 파트너 및(또는) 시험 화합물 사이의 상호작용을 직접 검출하기 위한 방법도 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, 형광 에너지 전달 기술을 이용할 수 있다(예를 들어 미국 특허 제5,631,169호(Lakowicz et al) 및 동 제4,868,103호(Stavrianopoulos et al) 참고). 일반적으로, 이 기술은 형광단 표지를 제1 '공여자' 분자(예컨대 마커 또는 시험 화합물)에 첨가하여, 그의 방출된 형광 에너지가 제2 '수용자' 분자(예를 들어 마커 또는 시험 화합물) 위의 형광 표지에 흡수되도록 함으로써, 흡수된 에너지로 인해 형광을 방출하도록 하는 것을 포함한다. 별법으로서, '공여자' 단백질 분자는 단순히 트랩트판 잔기의 천연 형광 에너지를 이용할 수 있다. 표지는 상이한 파장의 빛을 방출하여 '수용자' 분자 표지가 '공여자' 분자 표지로부터 차별화될 수 있도록 선택된다. 표지 사이의 에너지 전달 효율이 분자 사이의 거리에 관련되기 때문에, 분자 사이의 공간적 관계를 평가할 수 있다. 분자 사이에 결합이 일어나는 경우, 분석 중 '수용자' 분자 표지의 형광 방출은 최대일 것이다. 당업계에 공지된 표준 형광 측정 검출 수단을 통해(예를 들어 형광 측정기를 사용하여) FET 결합을 편리하게 측정할 수 있다. 예비 형성된 복합체 중 상기 종의 하나의 참여를 증대시키거나 저해하는 시험 물질은 백그라운드 신호와는 다른 신호의 생성을 유발할 것이다. 이러한 방식으로, 마커 및 그의 결합 파트너 사이의 상호작용을 조정하는 시험 물질을 조절된 분석에서 확인할 수 있다.

또다른 실시양태에서, 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 방법으로 마커 발현의 조정자를 확인하며, 세포 내의 마커 mRNA 또는 단백질의 발현을 측정한다. 후보 화합물의 존재하에 마커 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 후보 화합물의 부재하의 마커 mRNA 또는 단백질의 발현 수준과 비교한다. 이어서 이러한 비교를 근거로 후보 화합물을 마커 발현의 조정자로서 확인할 수 있다. 예를 들어, 마커 mRNA 또는 단백질의 발현이 후보 화합물이 부재인 경우보다 존재일 때 더 큰 경우(통계적으로 유의하게 더 큰 경우), 후보 화합물은 마커 mRNA 또는 단백질 발현의 자극제로서 확인된다. 반대로, 마커 mRNA 또는 단백질의 발현이 후보 화합물이 부재인 경우보다 존재일 때 더 작은 경우(통계적으로 유의하게 더 작은 경우), 후보 화합물은 마커 mRNA 또는 단백질 발현의 억제제로서 확인된다. 세포 내의 마커 mRNA 또는 단백질 발현의 수준은 본원에 기술된 마커 mRNA 또는 단백질을 검출하기 위한 방법으로 측정할 수 있다.

또다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 분석의 2 이상의 조합에 관한 것이다. 예를 들어, 조정 작용제는 세포-기재 또는 세포를 포함하지 않는 분석을 이용하여 확인할 수 있으며, 마커 단백질의 활성을 조정하는 상기 작용제의 능력을 생체 내, 예를 들어 온전한 동물 모델에서 세포의 형질전환 및(또는) 종양발생에 대해 추가로 확인할 수 있다.

본 발명은 또한 상기 스크리닝 분석에 의해 확인된 신규 작용제에 관한 것이다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같이 확인된 작용제를 적절한 동물 모델에 사용하는 것도 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 확인된 작용제(예를 들어 마커 조정 작용제, 안티센스 마커 핵산 분자, 마커-특이적 항체 또는 마커-결합 파트너)를 동물 모델에 사용하여 그러한 작용제로 치료하는 경우의 효능, 독성 또는 부작용을 측정할 수 있다. 별법으로, 본원에 기술된 바와 같이 확인된 작용제를 동물 모델에 사용하여 그러한 작용제의 작용 메커니즘을 측정할 수 있다. 추가로, 본 발명은 본원에 기술된 치료에 있어서의 상기 스크리닝 분석에 의해 확인된 신규 작용제의 용도에 관한 것이다.

소분자 작용제 및 단백질 또는 폴리펩티드 작용제의 적절한 투여량은 당업계의 의사, 수의사 또는 연구원의 지식 내에서 수많은 인자에 의해 좌우된다는 것을 이해할 것이다. 이들 작용제의 투여량은 예를 들어 처리될 대상체 또는 샘플의 종류, 크기 및 증상에 따라, 추가로, 적용가능하다면 조성물이 투여되는 경로 및 의사가 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 원하는 작용제의 효과에 따라 달라질 것이다. 소분자의 투여량의 예로는 대상체 또는 샘플 중량 1 kg 당 mg 또는 μg 의 양(예컨대, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 500 mg/kg, 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 5 mg/kg 또는 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)을 들 수 있다. 단백질 또는 폴리펩티드의 투여량의 예로는 대상체 또는 샘플 중량 1 kg 당 g, mg 또는 μg 의 양(예컨대 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 5 g/kg, 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 500 mg/kg 또는 약 1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg)을 들 수 있다. 추가로, 이들 작용제 중 하나의 적절한 투여량은 조정될 발현 또는 활성에 대한 작용제의 능력에 따라 좌우된다는 것을 이해할 것이다. 이러한 적절한 투여량은 본원에 기재된 분석법을 이용하여 결정할 수 있다. 1종 이상의 이들 작용제가 본 발명의 폴리펩티드 또는 핵산의 발현 또는 활성을 조정하기 위해 동물(예컨대 인간)에게 투여될 때, 의사, 수의사 또는 연구원은 예를 들어 처음에는 비교적 낮은 투여량으로 한 후, 적절한 반응이 얻어질 때까지 투여량을 증가시키는 것으로 처방할 수 있다. 또한, 임의의 특정 동물 대상체에 대한 구체적인 투여량 수준은 이용되는 특이적 작용제의 활성, 대상체의 연령, 체중, 일반적 건강, 성별 및 식이, 투여 횟수, 투여 경로, 배설률, 임의의 약물 조합 및 조정될 발현 또는 활성의 정도를 비롯한 다양한 인자에 따라 좌우될 것이라는 것을 이해할 것이다.

본 발명의 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 투여 경로의 예로는 비경구, 예를 들어 정맥 내, 피내, 피하, 경구(예컨대 흡입), 경피(국소), 점막내 및 직장 투여 등이 있다. 비경구, 피내 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액은 현탁액은 살균 희석제, 예컨대 주사용 물, 염수 용액, 경화유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이팅제, 예컨대 에틸렌디아민-테트라아세트산; 완충액, 예컨대 아세트산염, 시트르산염 또는 인산염; 및 등장성 조정제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로즈를 포함할 수 있다. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨을 이용하여 조정할 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된, 앰플, 1회용 실린지 또는 다회 투여용 바이알에 동봉할 수 있다.

주사용으로 적합한 제약 조성물은 살균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 살균 주사용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 살균 분말을 포함한다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체로는 생리적 염수, 정균수, 크레모포르 이엘(Cremophor EL; 미국 뉴저지주 파스페니에 소재하는 바스프(BASF) 제품) 또는 인산염 완충 염수(PBS)를 들 수 있다. 모든 경우, 조성물은 살균이어야 하고, 주사하기 용이할 정도로 유동성이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건하에 안정해야 하고, 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 필요한 입도의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 여러 경우, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

살균 주사 용액은 적절한 용매 중 필요량의 활성 화합물 (예컨대 폴리캡티드 또는 항체)을 상기 기술한 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 혼입시키고, 그 후 필요에 따라 살균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산액 매질을 함유하는 살균 비히클에 활성 화합물을 혼입시킨 다음, 상기 기술한 것들 중에서 필요한 다른 성분들을 혼입시킴으로써 제조된다. 살균 주사 용액 제제를 위한 살균 분말의 경우, 바람직한 제제화 방법은 미리 살균 여과한 용액으로부터 활성 성분의 분말과 함께 임의의 추가의 원하는 성분을 수득하게 하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

일반적으로, 경구 조성물로는 불활성 희석제 또는 식용 담체를 들 수 있다. 이들은 젤라틴 캡슐제에 동봉되거나, 정제로 압축될 수 있다. 경구용 치료 투여의 목적을 위해서는, 활성 화합물을 부형제와 함께 혼입시킬 수 있고, 정제, 트로케제 또는 캡슐제의 형태로 이용할 수 있다. 경구용 조성물은 또한 구강청결제로서 사용하기 위해 유체 담체를 이용하여 제조될 수 있는데, 상기 유체 담체 중의 화합물을 경구에 가하여 행군 후, 뱉어내거나 삼킨다.

제약상 상용가능한 결합제 및(또는) 보조제 물질은 조성물의 일부분으로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐제, 트로케제 등은 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 트라가칸트 고무 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스; 붕해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔 (Primogel) 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 스테아르산 마그네슘 또는 스테로테스 (Sterotes); 활주제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로즈 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 박하향, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지향 중 임의의 것 또는 유사한 성질을 갖는 화합물을 함유할 수 있다.

흡입 투여의 경우에는, 화합물을 적합한 추진제, 예를 들어 이산화탄소와 같은 기체를 함유하는 가압된 용기 또는 분배기로부터의 에어로졸 분무제 또는 흡입치료기의 형태로 전달한다.

전신적 투여 또한 점막내 또는 경피 수단에 의해 수행될 수 있다. 점막내 또는 경피 투여의 경우, 투과하고자 하는 배리어에 적절한 침투제를 제제에 이용할 수 있다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 점막내 투여의 경우에는 세제, 담즙산염 및 푸시드산 유도체를 예로 들 수 있다. 점막내 투여는 비측(鼻側) 분무 또는 좌제를 이용하여 수행될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 당업계에 공지된 바와 같이 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제제화된다.

화합물은 또한 직장 전달을 위해 좌제 (예를 들어 통상의 좌제용 베이스, 예컨대 코코아 버터 및 다른 글리세라이드와 함께) 또는 정체 관장제의 형태로 제조될 수 있다.

한 실시양태에서, 활성 화합물은 신체로부터의 급속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체, 예컨대 이식편 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어된 방출 제제와 함께 제조된다. 생분해가능한 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세트산염, 폴리부수물, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 이용할 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 물질은 또한 알자 코포레이션 (Alza Corporation) 및 노바 파마슈티컬스, 인크. (Nova Pharmaceuticals, Inc.)로부터 구매할 수 있다. 리포솜 현탁액 (모노클로날 항체가 그 안에 또는 그 상에 혼입된 리포솜) 또한 제약상 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

투여의 용이성 및 투여의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여량 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 바와 같은 투여량 단위 형태는 치료하고자 하는 대상체를 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 구분된 단위로 지칭되며, 각 단위는 필요한 제약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 제공하도록 계산된 소정량의 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 구체적인 사항은 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과에 의해 규정되고 직접적으로 좌우되며, 제한 사항은 개체의 치료를 위해 상기 활성 화합물을 배합하는 당분야에 알려져 있다.

항체의 경우, 바람직한 투여량은 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 체중 (일반적으로 10 mg/kg 내지 20 mg/kg)이다. 항체가 뇌에서 작용하는 경우에는, 일반적으로 50 mg/kg 내지 100 mg/kg의 투여량이 적절하다. 일반적으로, 부분 인간 항체 및 완전 인간 항체는 다른 항체에 비해 인체 내에서 보다 긴 수명을 갖는다. 따라서, 보다 낮은 투여량 및 보다 덜 빈번한 투여가 대개 가능하다. 지질화와 같은 변형은 항체를 안정화시키고 흡수 및 조직 침투 (예를 들어 자궁경부 상피 내로)를 증가시키기 위해 이용할 수 있다. 항체의 지질화 방법은 문헌 [Cruikshank et al. (1997) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193]에 기재되어 있다.

본 발명은 또한 자궁경부암의 예방 및(또는) 치료를 위한 백신 조성물을 제공한다. 본 발명은 표 1의 마커의 단백질 또는 표 1의 마커의 단백질들의 조합물이 대상체에 도입되어 자궁경부암에 대한 면역 반응을 자극하는 자궁경부암 백신 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 표 1에서 확인된 마커 또는 마커의 단백을 발현하는 유전자 발현 구조물이 대상체에 도입되어, 표 1의 마커에 의해 코딩되는 단백질 또는 단백질의 단백이 대상체에서 형질감염된 세포에 의해 정상 수준보다 높게 생성되어 면역 반응을 이끌어 내는 자궁경부암 백신 조성물을 제공한다.

한 실시양태에서, 자궁경부암 백신이 자궁경부암 예방용 면역치료제로서 제공되어 사용된다. 또다른 실시양태에서, 자궁경부암 백신이 자궁경부암 치료용 면역치료제로 제공되어 사용된다.

예를 들어, 표 1의 마커 단백질로 구성된 자궁경부암 백신은 대상체에게 피내, 피하 또는 근육내 등의 다양한 경로로 백신을 투여되어 자궁경부암 예방 및(또는) 치료용으로 사용될 수 있다. 또한, 자궁경부암 백신은 백신의 활성 및 대상체의 반응을 촉진시키기 위해 보조제 및(또는) 면역조정제와 함께 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 지속적인 또는 간헐적인 방출에 적합한 백신을 함유하는 장치 및(또는) 조성물을 체내에 이식하거나 신체에 국소 도포하여 이러한 물질을 체내로 비교적 서서히 방출시킬 수 있었다. 자궁경부암 백신은 암의 제거에 더 효과적인 반응을 형성하기 위해서 형성된 면역 반응의 유형을 변경시킬 수 있는 면역조정 화합물과 함께 도입될 수 있다.

또다른 실시양태에서, 표 1의 마커의 발현 구조물로 구성된 자궁경부암 백신은 근육 주사에 의해 또는 미세분사물 (microprojectile) 상에 코팅하여 분사물을 고속 분사시키려는 목적으로 고안된 장치를 사용하여 피부로 도입될 수 있다.

이후, 대상체의 세포는 표 1의 마커의 단백질(들) 또는 단백질의 단편을 발현하여 면역 반응을 유도한다. 또한, 자궁경부암 백신은 암의 제거에 더 효과적인 반응을 형성하기 위해서 면역 반응을 증대시키거나 형성된 면역 반응의 유형을 조정할 수 있는 시토킨 등의 면역조정 분자를 위한 발현 구조물과 함께 도입될 수 있다.

마커 핵산 분자는 벡터로 삽입되어 유전자 치료 벡터로 사용될 수 있다. 유전자 치료 벡터는 정맥 주사 등의 국소 투여 [미국 특허 제5,328,470호]에 의해 또는 정위(stereotactic) 주사 (문헌 [Chen et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057] 등을 참조)에 의해 대상체에 전달될 수 있다. 유전자 치료 벡터의 제약 제제는 허용가능한 희석제 중의 유전자 치료 벡터를 포함할 수 있거나 또는 유전자 전달 비히클이 매입된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 별법으로, 완전한 유전자 전달 벡터가 레트로바이러스 벡터 등의 재조합 세포로부터 완전하게 형성될 수 있는 경우 제약 제제는 유전자 전달계를 형성하는 1종 이상의 세포를 포함할 수 있다.

제약 조성물은 투여 지침서와 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포장될 수 있다.

V. 예상 의학

본 발명은 진단 분석, 예후 분석, 약물유전학(pharmacogenomics) 및 임상 시험의 모니터링을 예후 (예측)의 목적으로 이용하여 개체를 예방적으로 치료하는 예상 의학 분야에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 한 측면은 개체가 자궁경부암의 발암 위험에 처해 있는지 여부를 판단하기 위해 1종 이상의 마커 단백질 또는 핵산의 발현 수준을 측정하기 위한 진단 분석에 관한 것이다. 이러한 분석을 예후용 또는 예상용으로 이용하여 개체를 발암 전에 예방적으로 치료할 수 있다.

본 발명의 또다른 측면은 임상 실험에서 작용제 (예를 들어 자궁경부암을 억제하거나 임의의 다른 질환을 치료 또는 예방하기 위해 {즉, 임의의 자궁경부암에 대해 이러한 치료가 발휘할 수 있는 효능을 이해하기 위해서} 투여되는 약물 또는 다른 화합물)가 본 발명의 마커의 발현 또는 활성에 미치는 영향을 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 이러한 작용제 및 다른 작용제는 하기 단락에서 더 상세하게 기재되어 있다.

A. 진단 분석

생물학적 샘플 중 마커 단백질 또는 핵산의 존재 여부를 검출하는 전형적인 방법은 시험 대상체로부터 생물학적 샘플 (예를 들어 자궁경부와 관련된 신체 유체)을 수득하여 생물학적 샘플을 폴리펩티드 또는 핵산 (예를 들어 mRNA, 게놈 DNA 또는 cDNA)을 검출할 수 있는 화합물 또는 작용제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 따라서, 본 발명의 검출 방법은 생물학적 샘플 중에서 mRNA, 단백질, cDNA 또는 게놈 DNA 등을 시험관내 및 생체내로 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, mRNA 검출용 시험관내 기술은 노던 혼성화 및 게놈 혼성화를 포함한다. 마커 단백질 검출용 시험관내 기술은 효소 결합 면역흡수 분석법 (ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전법 및 면역형광법을 포함한다. 게놈 DNA 검출용 시험관내 기술은 서던 혼성화를 포함한다. 또한, 마커 단백질 검출용 생체내 기술은 단백질 또는 그의 단편에 대해 지시된 표지 항체를 대상체로 도입하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 항체는 대상체 내에서의 존재 및 위치가 표준 화상 기술에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.

이러한 진단 및 예후 분석법의 일반적인 원리는 마커 및 프로브가 상호작용 및 결합하도록 하여 반응 혼합물 중에서 제거 및(또는) 검출될 수 있는 복합체를 형성하기에 적절한 조건 및 충분한 시간 동안 마커 및 프로브를 함유할 수 있는 샘플 또는 반응 혼합물을 제조하는 것을 포함한다. 이러한 분석은 다양한 방법으로 수행될 수 있다.

예를 들어, 이러한 분석을 수행하는 한 방법은 마커 또는 프로브를 고상 지지체 (기질이라고 지칭하기도 함) 상에 고정시키고 고상에 고정된 표적 마커/프로브 복합체를 반응 말단에 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법의 한 실시양태에서, 마커의 존재 및(또는) 농도가 분석될 대상체로부터의 샘플은 담체 또는 고상 지지체 상에 고정될 수 있다. 다른 실시양태에서, 프로브가 고상에 고정될 수 있고 대상체로부터의 샘플이 분석물의 비고정 성분으로서 반응하도록 할 수 있는 반대의 상황이 가능하다.

분석물 성분을 고상에 고정시키기 위한 많은 방법이 확립되어 있다. 이들로는 제한없이 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 통해 고정화되는 마커 또는 프로브 분자가 포함된다. 이러한 바이오티닐화된 분석물 성분은 바이오틴-NHS (N-히드록시-숙신아미드)로부터 당업계에 공지된 기술 (예를 들어 미국 일리노이주 락포드에 소재한 피어스 케미컬스사 제품인 바이오티닐화 키트)를 이용하여 제조되어 스트렙타비딘-코팅된 96 웰 플레이트 (피어스 케미컬스사 제품)의 웰에 고정화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 고정화 분석물 성분을 갖는 표면을 먼저 제조하여 저장한다.

이러한 분석에 적합한 다른 담체 또는 고상 지지체로는 마커 또는 프로브가 속한 분자류를 결합시킬 수 있는 임의의 물질이 포함된다. 잘 공지된 지지체 또는 담체로는 유리, 폴리스티렌, 나일론, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리에틸렌, 텍스트란, 아밀라아제, 천연 및 개질된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 마그네사이트가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

상기 언급된 접근법으로 분석을 수행하기 위해서는 비고정화 성분을 제2 성분이 고정된 고상에 첨가한다. 반응이 완료된 후, 비복합체화 성분은 형성된 임의의 복합체가 고상 상에 고정화된 상태로 남을 수 있도록 하는 조건 하에 세척 등에 의해 제거될 수 있다. 고상에 고정된 마커/프로브 복합체의 검출은 본원에 개략된 많은 방법으로 달성될 수 있다.

바람직한 실시양태에서, 프로브가 비고정 분석물 성분일 경우 이는 분석물의 검출 및 판독을 위해 직접적으로 또는 간접적으로 본원에서 논의된 당업자에게 잘 공지된 검출가능한 표지로 표지될 수 있다.

또한, 마커/프로브 복합체의 형성을 성분 (마커 또는 프로브)의 추가의 표지 또는 조작 없이, 예를 들어 형광 에너지 전달 기술 (예를 들어 라코빅스 (Lakowicz) 등의 미국 특허 제5,631,169호; 스타브리아노폴로스 (Stavrianopoulos) 등의 동 제4,868,103호 참조)에 의해 직접 검출하는 것이 가능하다. 제1 '공여자' 분자 상의 형광단 표지는 적절한 파장의 입사광으로 여기서 그의 방출된 형광 에너지가 제2 '수용자' 분자 상의 형광 표지에 의해 흡수될 수 있도록 선택되며, 이는 또한 흡수된 에너지로 인해 형광을 낼 수 있다. 별법으로, '공여자' 단백질 분자는 간단히 트립토판 잔기의 천연 형광 에너지를

이용할 수 있다. '수용자' 분자 표지가 '공여자' 분자 표지와 차별화될 수 있도록 상이한 광파장을 방출하는 표지들이 선택된다. 표지간 에너지 전달 효율은 분자간의 이격 거리에 관련되므로, 분자간 공간적 관계가 분석될 수 있다. 분자간 결합이 발생하는 상황에서는 분석물 중의 '수용자' 분자 표지의 형광 방출이 최대가 될 것이다. FET 결합 사건은 당업계에 잘 공지된 표준 형광계 검출법을 통해 (예를 들어 형광계를 사용하여) 편리하게 측정할 수 있다.

또다른 실시양태에서, 프로브의 마커 인식 능력의 측정을 분석물 성분 (프로브 또는 마커)의 표지 없이 실시간 생체분자 상호작용 분석법 (BIA; Biomolecular Interaction Analysis) (문헌 [Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345] 및 [Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705] 등을 참조)을 이용하여 달성할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "BIA" 또는 "표면 플라즈몬 공명"은 상호작용자들 (예를 들어 BIAcore)을 전혀 표지하지 않고서 실시간으로 생물특이적인 상호작용을 연구하는 기술이다. (결합 사건을 나타내는) 결합 표면에서의 질량 변화는 표면 부근의 광굴절 지수의 변경 (표면 플라즈몬 공명 (SPR)의 광학적 현상)을 유도하여 생물학적 분자간의 실시간 반응의 지표로서 사용될 수 있는 검출가능한 신호를 발생시킨다.

별법으로, 다른 실시양태에서는 액상 중 용질로서의 마커 및 프로브로 유사한 진단 및 예후 분석이 수행될 수 있다. 이러한 분석에서, 복합체화 마커 및 프로브는 제한 없이 분별 원심분리, 크로마토그래피, 전기영동 및 면역침전법을 비롯한 많은 표준 기술 중 임의의 기술에 의해 비복합체화 성분으로부터 분리된다. 분별 원심분리에서는, 복합체들이 상이한 크기 및 밀도를 기초로 상이한 침강 평형을 이루므로 일련의 원심분리 단계를 통해 마커/프로브 복합체를 비복합체화 분석물 성분으로부터 분리할 수 있다 (문헌 [Rivas, G., and Minton, A. P., 1993, Trends Biochem Sci. 18(8):284-7] 등을 참조). 표준 크로마토그래피 기술도 또한 비복합체화 분자로부터 복합체화 분자를 분리하는 데 이용할 수 있다. 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피는 크기를 기준으로 분자를 분리하는 것으로서, 칼럼 포맷에서 적절한 겔 여과 수지 등을 이용하는데, 예를 들어 상대적으로 큰 복합체가 상대적으로 작은 비복합체화 성분으로부터 분리될 수 있다. 유사하게는 비복합체화 성분과 비교하여 마커/프로브 복합체의 상대적으로 상이한 전하 특성이 이온-교환 크로마토그래피 수지 등을 이용하여 비복합체화 성분으로부터 복합체를 구별하는 데 이용될 수 있다. 이러한 수지 및 크로마토그래피 기술은 당업자에게 잘 공지되어 있다 (문헌 [Heegaard, N.H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8]; [Hage, D.S., and Tweed, S.A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct 10; 699(1-2):499-525] 등을 참조). 겔 전기영동 또한 비결합 성분으로부터 복합체화 분석물 성분을 분리하는 데 이용될 수 있다 (문헌 [Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999] 등을 참조). 이 기술에서는 단백질 또는 핵산 복합체가 크기 또는 전하 등을 기준으로 분리된다. 전기영동 과정 중에 결합 상호작용을 유지하기 위해서는, 변성되지 않은 겔 매트릭스 물질 및 완충제가 없는 조건이 전형적으로 바람직하다. 특정 분석물 및 그의 성분에 대한 적절한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

특정 실시양태에서, 마커 mRNA의 수준은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 생물학적 샘플로 계내 및 시험관내 형태 둘 다에서 측정할 수 있다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 단리된 조직, 세포, 생물학적 신체의 유체 및 그의 단리물, 뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 신체의 유체를 포함함을 의미한다. 다수의 발현 검출 방법은 단리된 RNA를 사용한다. 시험관내 방법의 경우, mRNA의 단리에 대해 선택하는 것이 아닌 임의의 RNA 단리 기술을 자궁 경부 세포로부터의 RNA 정제에 이용할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999] 참조). 추가로, 다수의 조직 샘플은 당업자에게 익히 공지된 기술, 예를 들어 콧스키(Chomczynski)의 단일-단계 RNA 단리법 (1989, 미국 특허 제4,843,155호)을 이용하여 용이하게 처리할 수 있다.

단리된 mRNA는 썬던 또는 노던 분석, 폴리머라제 연쇄 반응 분석 및 프로브 어레이를 포함하나 이에 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 분석에 사용할 수 있다. mRNA 수준의 검출에 대한 하나의 바람직한 진단 방법은 검출할 유전자에 의해 코딩된 mRNA에 혼성화시킬 수 있는 핵산 분자 (프로브)와 단리된 mRNA를 접촉시키는 것을 수반한다. 상기 핵산 프로브는 예를 들어 전장 cDNA 또는 그의 일부, 예를 들어 길이가 7, 15, 30, 50, 100, 250 또는 500 뉴클레오타이드 이상인 올리고 뉴클레오타이드일 수 있으며, 엄격 조건하에서 본 발명의 마커를 코딩하는 mRNA 또는 게놈 DNA와 특이적으로 충분히 혼성화시킨다. 본 발명의 진단 분석에 사용하기에 적합한 기타 프로브는 본원에 기재되어 있다. mRNA가 프로브와 혼성화하는 것은 본원의 마커가 발현될 것이라는 것을 나타낸다.

한 형태에서, mRNA를 고체 표면 상에 고정화시키고, 예를 들어 단리된 mRNA를 아가로스 겔 상에 러닝시키고, 겔로부터 니트로셀룰로스와 같은 막으로 전달시킴으로써 프로브와 접촉시킨다. 별법 형태에서, 프로브(들)를 고체 표면 상에 고정화시키고, mRNA를 예를 들어 아피메트릭스(Affymetrix) 유전자 칩 어레이법으로 프로브와 접촉시킨다. 당업자는 본 발명의 마커에 의해 코딩된 mRNA의 수준을 검출하는데 사용하기 위해 공지된 mRNA 검출 방법을 용이하게 개조할 수 있다.

샘플 중에서의 mRNA 마커 수준을 측정하기 위한 별법의 방법은 핵산 증폭, 예를 들어 rtPCR (실험적 실시양태는 문헌 [Mullis, 1987, 미국 특허 제4,683,202호]에 기재되어 있음), 리가제 연쇄 반응 (문헌 [Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193]), 자가적 서열 복제 (문헌 [Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878]), 전자 증폭 시스템 (문헌 [Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177]), 큐-베타 레플리카제 (문헌 [Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197]), 롤링 씨클 복제 (문헌 [Lizardi et al., 미국 특허 제5,854,033호]) 또는 임의의 기타 핵산 증폭 방법, 이어서 당업자에게 익히 공지된 기술을 이용하여 증폭된 분자의 검출을 수행한다. 이들 검출법은 상기 분자가 매우 적은 수로 존재하는 경우에 있어서의 핵산 분자 검출에 특히 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 증폭 프라이머는 유전자의 5' 또는 3' 영역 (각각 플러스 및 마이너스 가닥 또는 그 반대로)을 어닐링시키고 그 사이에 단 영역을 함유할 수 있는 한쌍의 핵산 분자인 것으로 정의한다. 일반적으로, 증폭 프라이머는 길이가 약 10 내지 30 뉴클레오타이드이고, 플랭킹 영역의 길이가 약 50 내지 200 뉴클레오타이드이다. 적절한 조건하에서 및 적절한 시약으로, 상기 프라이머는 프라이머에 의해 플랭킹된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자의 증폭을 허용한다.

계내 방법의 경우, mRNA는 검출 전에 자궁 경부 세포로부터 단리할 필요가 없다. 상기 방법에서, 세포 또는 조직 샘플은 공지된 조직학적 방법을 이용하여 제조되거나 처리된다. 이어서, 상기 샘플을 지지체, 전형적으로 글라스 슬라이드 상에 고정시키고, 이어서 마커를 코딩하는 mRNA와 혼성화시킬 수 있는 프로브에 접촉시킨다.

마커의 절대적 발현 수준을 기준으로 하여 측정하는 별법으로서, 측정은 마커의 정상화 발현 수준을 기준으로 할 수 있다. 발현 수준은 그의 발현을 마커가 아닌 유전자, 예를 들어 구성적으로 발현되는 관리 유전자(housekeeping gene)의 발현과 비교하여 마커의 절대적 발현 수준을 교정함으로써 정상화시킨다. 정상화에 적합한 유전자는 관리 유전자, 예를 들어 액틴 유전자 또는 상피 세포-특이적 유전자를 포함한다. 이러한 정상화는 하나의 샘플, 예를 들어 환자 샘플을 또다른 샘플, 예를 들어 비-자궁경부암 샘플과 비교하거나 또는 상이한 공급원으로부터의 샘플들을 서로 비교하게 한다.

별법으로, 상기 발현 수준은 상대적 발현 수준으로서 제공될 수 있다. 마커의 상대적 발현 수준을 측정하기 위하여, 마커 발현 수준을 10개 이상의 암 세포 단리물에 대한 정상 세포 단리물의 샘플, 바람직하게는 50개 이상의 샘플에 대해 측정한다. 본원의 샘플에 대한 발현 수준을 측정하게 된다. 다수의 샘플 중에서 분석되는 각각의 유전자의 평균 발현 수준을 측정하여, 이를 마커에 대한 기저 발현 수준으로서 사용한다. 이어서, 시험 샘플 (절대적 발현 수준)에 대해 측정된 마커 발현 수준은 상기 마커에 대해 수득된 평균 발현값으로 나눈다. 이는 상대적 발현 수준을 제공한다.

바람직하게는, 기저 측정에 사용되는 샘플은 자궁경부 조직의 자궁경부암 또는 비-자궁경부암 세포로부터 유래될 것이다. 세포 공급원의 선택은 상대적 발현 수준의 용도에 따른다. 평균 발현 스코어로서 정상 조직에서 발견되는 발현을 이용하여 분석되는 마커가 (정상 세포에 비해) 자궁경부 특이적인지 여부를 입증하는 것을 돕는다. 또한, 보다 많은 데이터가 축적될수록, 평균 발현값을 보정할 수 있으며, 축적된 데이터를 기준으로 하여 개선된 상대적 발현값을 제공할 수 있다. 자궁경부 세포로부터의 발현 데이터는 자궁경부암 상태의 중증도를 평가하는 수단을 제공한다.

본 발명의 또다른 실시양태에서, 마커 단백질은 검출된다. 본 발명의 마커 단백질을 검출하기 위한 바람직한 작용제는 상기 단백질 또는 그의 단편에 결합할 수 있는 항체, 바람직하게는 검출가능한 표지와 결합하는 항체이다. 항체는 폴리클로날 또는 더욱 바람직하게는 모노클로날일 수 있다. 무손상 항체 또는 그의 단편 또는 유도체 (예를 들어 Fab 또는 $F(ab')_2$)를 사용할 수 있다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링시키는 (즉, 물리적으로 결합시키는) 프로브 또는 항체의 직접 표지, 뿐만 아니라 직접적으로 표지한 또다른 시약으로 재활성시키는 프로브 또는 항체의 간접 표지를 포함한다. 간접 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 이용하는 1차 항체의 검출 및 바이오틴으로의 말단-표지된 DNA-프로브의 검출 (이는 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출할 수 있음)을 포함한다.

자궁경부 세포로부터의 단백질을 당업자에게 익히 공지된 기술을 이용하여 단리할 수 있다. 사용하는 단백질 단리 방법은 예를 들어 문헌 [Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York]에 기재된 것일 수 있다.

샘플이 제시된 항체에 결합하는 단백질을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 각종 형태를 사용할 수 있다. 상기 형태의 예는 효소 면역분석법 (EIA), 방사선면역분석법 (RIA), 웨스턴 블롯 분석법 및 면역흡착 분석법 (ELISA)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 당업자는 자궁경부 세포가 본 발명의 마커인지 여부를 결정하는데 사용하기 위한 공지된 단백질/항체 검출 방법을 용이하게 개조할 수 있다.

한 형태에서, 발현된 단백질을 검출하는 웨스턴 블롯 또는 면역형광 기술과 같은 방법에서 항체 또는 항체 단편 또는 유도체를 사용할 수 있다. 상기 사용에서, 항체 또는 단백질을 고체 지지체 상에 고정화시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 적합한 고상 지지체 또는 담체는 항원 또는 항체를 결합시킬 수 있는 임의의 지지체를 포함한다. 익히 공지된 지지체 또는 담체는 글라스, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철석을 포함한다.

당업자는 항체 또는 항원을 결합시키는데 적합한 다수의 기타 담체를 인식하고 있으며, 본 발명에 사용하는 상기 지지체를 개조할 수 있을 것이다. 예를 들어, 자궁경부 세포로부터 단리된 단백질은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 상에 러닝시키고 니트로셀룰로스 또는 고상 지지체 상에 고정화시킬 수 있다. 이어서, 상기 지지체를 적합한 완충액으로 세척하고, 이어서 검출가능하게 표지된 항체로 처리한다. 이어서, 고상 지지체는 완충액으로 2회 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거한다. 이어서, 고체 지지체 상에 결합한 표지의 양을 통상적인 수단에 의해 검출할 수 있다.

본 발명은 생물학적 샘플 (예를 들어 자궁경부 도말표본)에서 마커 단백질 또는 핵산의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 이러한 키트는 대상체가 자궁경부암을 앓고 있는지 또는 자궁경부암의 증가된 발병 위험 상태에 있는지 여부를 결정하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 키트는 생물학적 샘플 중에서 마커 단백질을 검출할 수 있는 표지된 화합물 또는 작용제 및 샘플 (예를 들어 단백질 또는 그의 단편 또는 단백질을 코딩하는 DNA 또는 mRNA에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 결합시키는 항체)에서 단백질을 검출하거나 mRNA의 양을 측정하기 위한 방법을 포함할 수 있다. 키트는 또한 키트를 이용하여 수득한 결과를 해석하기 위한 지침서를 포함한다.

항체-기재 키트의 경우, 키트는 예를 들어 (1) 마커 단백질에 결합하는 제1 항체 (예를 들어 고체 지지체에 부착됨); 및 임의로, (2) 단백질 또는 제1 항체에 결합하고 검출가능한 표지와 접합하는 제2의 상이한 항체를 포함할 수 있다.

올리고뉴클레오타이드-기재 키트의 경우, 키트는 예를 들어 마커 단백질을 코딩하는 핵산 서열과 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드 또는 (2) 마커 핵산 분자를 증폭시키는데 유용한 한쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 키트는 또한 예를 들어 완충제, 보존제 또는 단백질 안정화제를 포함할 수 있다. 키트는 추가로 검출가능 표지를 검출하는데 필요한 성분 (예를 들어 효소 또는 물질)을 포함할 수 있다. 키트는 또한 분석하고 시험 샘플과 비교할 수 있는 대조군 샘플 또는 일련의 대조군 샘플을 함유할 수 있다. 키트의 각각의 성분은 개별 용기 내에 동봉할 수 있고, 각종 모든 용기는 단일 패키지 내에 키트를 이용하여 수행하는 분석의 결과를 해석하기 위한 지침서와 함께 존재할 수 있다.

B. 약물유전학

본 발명의 마커는 또한 약물유전학 마커로서 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "약물유전학 마커"는 마커 발현 수준이 환자에서의 특정 임상적 약물 반응 또는 민감성과 상관관계가 있는 객관적인 생화학적 마커이다 (예를 들어 문헌 [McLeod et al. (1999) Eur. J. Cnacer 35 (12):1650-1652] 참조). 약물유전학 마커 발현의 존재 또는 정량은 환자의 예측되는 반응 및 보다 바람직하게는 특정 약물 또는 약물의 부류로 치료하는 환자의 종양과 관련이 있다. 환자에서 하나 이상의 약물유전학 마커의 발현의 존재 또는 정량을 분석함으로써, 환자에게 가장 적합하거나 또는 보다 크게 성공할 것으로 예측되는 약물 요법을 선택할 수 있다. 예를 들어 환자에게서 RNA 또는 특정 종양 마커에 의해 코딩되는 단백질의 존재 또는 정량을 기준으로 하여, 환자에게 존재하기 쉬운 특정 종양을 치료하는데 최적화된 약물 또는 치료 과정을 선택할 수 있다. 따라서, 약물유전학 마커를 사용함으로써 상이한 약물 또는 치료법을 시도하지 않고 개별 암 환자에게 가장 적합한 치료를 선택하거나 고안할 수 있게 한다.

약물유전학의 또다른 측면은 신체가 약물에 작용하는 방식을 변경시키는 유전학적 조건과 관련이 있다. 이들 약리유전학적 조건은 드물게 결합 또는 다형성을 발생시킬 수 있다. 예를 들어, 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제 (G6PD) 결핍은 통상의 유전성 효소병증이며, 여기서 주요 임상적 합병증은 산화제 약물 (항-말라리아제, 숄폰아미드, 진통제, 니트로푸란) 복용 및 잠두(fava bean) 섭취 후의 용혈이다.

예시적인 실시양태로서, 약물 대사 효소의 활성은 약물 작용의 효력 및 지속력 둘다의 주요 결정인자이다. 약물 대사 효소 (예컨대 N-아세틸트랜스퍼라제 2 (NAT 2) 및 시토크롬 P450 효소 CYP2D6 및 CYP2C19)의 유전적 다형성의 발견은 일부 환자가 표준 및 안전 투여량의 약물을 취한 후에도 예측되는 약물 효과를 얻지 못하고 과다 약물 반응 및 심각한 독성을 나타내는 이유에 대한 설명을 제공한다. 이들 다형성은 집단에서 2가지의 표현형, 광범위한 대사자(extensive metabolizer: EM) 및 빈약한 대사자(poor metabolizer: PM)로 발현된다. PM의 유병률은 상이한 집단 사이에서 상이하다. 예를 들어, CYP2D6를 코딩하는 유전자는 고도로 다형성이고, 몇가지의 돌연변이는 PM으로 확인되었으며, 이들 모두는 기능적 CYP2D6의 부재를 야기시킨다. CYP2D6 및 CYP2C19을 표준 투여량으로 투여한 경우 이들의 빈약한 대사자는 높은 빈도의 과다 약물 반응 및 부작용을 경험한다. 대사물질이 활성 치료 잔기인 경우, PM은 그의 CYP2D6-형성 대사물질 모르핀에 의해 매개된 코데인의 진통 효과에 대해 입증된 바와 같이 치료 반응이 전혀 없다. 다른 극단은 표준 투여량에 대해 반응하지 않는 소위 초-급속 대사자이다. 최근, 초-급속 대사의 분자 기초는 CYP2D6 유전자 증폭으로 인하여 확인되었다.

이와 같이, 개체에서의 본 발명의 마커 발현 수준은 측정할 수 있으므로 개체의 치료적 또는 예방적 치료에 적합한 작용제를 선택할 수 있다. 또한 약리유전학적 연구는 개체의 약물 반응성 표현형의 확인을 위해 약물-대사 효소를 코딩하는 다형성 대립유전자의 유전자형에 적용하는데 사용할 수 있다. 투여량 또는 약물 선택에 적용되는 이러한 지식은 역반응 또는 치료 실패를 피할 수 있게 하며, 따라서 본 발명의 마커 발현의 조정제로 대상체를 치료하는 경우, 치료적 또는 예방적 효과를 증진시킬 수 있다.

C. 임상 시도 모니터링

본 발명의 마커 발현 수준에 대한 작용제 영향의 모니터링은 기본 약물 스크리닝 및 임상 시도에 적용시킬 수 있다. 예를 들어, 마커 발현에 영향을 미치는 작용제의 효과는 자궁경부암을 치료받는 대상체의 임상 시도에서 모니터링될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 (i) 대상체로부터 투여전 샘플을 수득한 후에 작용제를 투여하는 단계; (ii) 투여전 샘플 중에서 본 발명의 하나 이상의 선택된 마커의 발현 수준을 검출하는 단계; (iii) 대상체로부터 하나 이상의 투여후 샘플을 수득하는 단계; (iv) 투여후 샘플 중에서 마커(들)의 발현 수준을 검출하는 단계; (v) 투여전 샘플 중에서의 마커(들) 발현 수준을 투여후 샘플 또는 샘플 중에서의 마커(들) 발현 수준과 비교하는 단계 및 (vi) 이에 따라 대상체에게 작용제의 투여를 변경시키는 단계를 포함하는, 대상체의 작용제 (예컨대, 아고니스트, 펩티도미메틱, 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자 또는 기타 약물 후보)로의 치료 효과를 모니터링하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 치료 과정 동안 마커 유전자(들)의 증가된 발현은 비효과적인 투여량 및 투여량 증가의 바람직함을 의미할 수 있다.

D. 전자 장치 판독가능 매체 및 어레이

본 발명의 마커를 포함하는 전자 장치 판독가능 매체가 또한 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "전자 장치 판독가능 매체"는 전자 장치에 의해 직접적으로 판독되고 이용할 수 있는 데이터 또는 정보를 저장, 보유 또는 수용하기에 적합한 임의의 매체를 지칭한다. 이러한 매체는 자기 저장 매체, 예를 들어 플로피 디스크, 하드 디스크 저장 매체 및 자기 테이프, 광학 저장 매체, 예를 들어 콤팩트 디스크; 전기 저장 매체, 예를 들어 RAM, ROM, EPROM, EEPROM 등; 일반적인 하드 디스크 및 이들 범주의 하이브리드, 예를 들어 자기/광학 저장 매체를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 매체는 거기에 기록되는 본 발명의 마커에 대해 변경되거나 구성된다.

본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전자 장치"는 저장 데이터 또는 정보에 따라 구성되거나 변경되는 임의의 적절한 계산 또는 처리 장치 또는 기타 장치를 포함하여 의미한다. 본 발명에 따른 사용에 적합한 전자 장치의 예는 독립 계산 장치; 로컬 영역 네트워크 (LAN), 와이드 영역 네트워크 (WAN) 인터넷, 인터넷 및 엑스트라넷(Extranet)을 포함하는 네트워크; 개인용 휴대정보 단말기 (PDA), 휴대폰, 무선 호출기 등과 같은 전자 제품; 지역 및 분산 처리 시스템을 포함한다.

본원에서 사용된 바와 같이, "기록"은 전자 장치가 판독가능한 매체에 정보를 저장 또는 코딩하는 과정을 지칭한다. 본 발명의 마커를 포함하는 제조품을 생성시키기 위해 당업자는 공지된 매체에 정보를 기록하기 위한 임의의 현재 공지된 방법을 쉽게 채택할 수 있다.

다양한 소프트웨어 프로그램 및 포맷을 사용하여 본 발명의 마커 정보를 전자 장치가 판독가능한 매체에 저장할 수 있다. 예를 들어, 마커 핵산 서열을 워드퍼펙트(WordPerfect) 및 마이크로소프트 워드(Microsoft Word)와 같은 시판되는 소프트웨어로 포맷된 워드 프로세싱 텍스트 파일로 나타내거나 또는 DB2, 시베이스(Sybase), 오라클(Oracle) 등과 같은 데이터베이스 애플리케이션에 저장된 ASCII 파일의 형태, 뿐만 아니라 기타 형태로 나타낼 수 있다. 본 발명의 마커가 기록된 매체를 수득하거나 생성시키기 위해 무한한 데이터 프로세서 구조화 포맷 (예를 들어 텍스트 파일 또는 데이터베이스)을 사용할 수 있다.

판독가능한 형태의 본 발명의 마커를 제공함으로써, 다양한 목적을 위해 마커 서열 정보에 일상적으로 액세스할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 판독가능한 형태의 본 발명의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 사용하여 표적 서열 또는 표적 구조 모티프를 데이터 저장 수단 내에 저장된 서열 정보와 비교할 수 있다. 서치 수단을 사용하여 특정 표적 서열 또는 표적 모티프와 매칭되는 본 발명의 서열의 단편 또는 영역을 확인한다.

따라서, 본 발명은 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 단계 및 마커의 존재 또는 부재를 기초로 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하고(하거나) 자궁경부암 또는 전-자궁경부암 상태에 대한 특정 치료법을 추천하는 단계를 포함하는, 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 방법을 수행하기 위한 사용 설명서를 넣어두는 매체를 제공한다.

본 발명은 전자 시스템 및(또는) 네트워크에 마커의 존재 또는 부재를 결정하는 단계 및 마커의 존재 또는 부재를 기초로 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하고(하거나) 자궁경부암 또는 전-자궁경부암 상태에 대한 특정 치료법을 추천하는 단계를 포함하는, 대상체가 마커와 관련된 자궁경부암인지 또는 마커와 관련된 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 방법을 추가로 제공한다. 대상체와 관련된 표현형 정보를 받고(받거나) 대상체와 관련된 표현형 정보를 네트워크로부터 취득하는 단계가 추가로 방법에 포함될 수 있다.

또한, 본 발명은 마커와 관련된 정보를 받는 단계, 대상체와 관련된 표현형 정보를 받는 단계, 네트워크로부터 마커 및(또는) 자궁경부암에 상응하는 정보를 취득하는 단계 및 1종 이상의 표현형 정보, 마커 및 취득된 정보를 기초로 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 대상체가 마커와 관련된 자궁경부암인지 또는 마커와 관련된 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 방법을 네트워크 내에 제공한다. 자궁경부암 또는 전-자궁경부암 상태에 대한 특정 치료법을 추천하는 단계가 추가로 방법에 포함될 수 있다.

또한, 본 발명은 마커와 관련된 정보를 받는 단계, 대상체와 관련된 표현형 정보를 받는 단계, 네트워크로부터 마커 및(또는) 자궁경부암에 상응하는 정보를 취득하는 단계 및 1종 이상의 표현형 정보, 마커 및 취득된 정보를 기초로 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 것을 포함하는, 대상체가 자궁경부암인지 또는 자궁경부암에 걸릴 소지가 있는지 여부를 결정하는 비즈니스 방법을 제공한다. 자궁경부암 또는 전-자궁경부암 상태에 대한 특정 치료법을 추천하는 단계가 추가로 방법에 포함될 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 마커를 포함하는 어레이를 제공한다. 어레이를 사용하여 어레이 내의 1종 이상의 유전자의 발현을 분석할 수 있다. 한 실시양태에서, 어레이 내의 유전자의 조직 특이성을 확인하기 위해 어레이를 사용하여 조직에서의 유전자 발현을 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 약 7600개까지의 유전자를 발현에 대해 동시에 분석할 수 있다. 이는 1종 이상의 조직에서 특이적으로 발현되는 한 별의 유전자를 나타내는 프로파일의 개발되도록 한다.

이같은 정성적 측정법에 더하여, 본 발명은 유전자 발현의 정량화를 가능하게 한다. 따라서, 조직 특이성뿐만 아니라, 조직에서의 한 별의 유전자의 발현 수준 또한 확인할 수 있다. 따라서, 유전자를 이들의 조직 발현 그 자체 및 그 조직에서의 발현 수준을 기초로 분류할 수 있다. 예를 들어, 이는 조직 간의 유전자 발현 관계를 확인하는데 유용하다. 따라서, 한 조직을 교란시키고, 제 2 조직에서의 유전자 발현에 대한 효과를 결정할 수 있다. 이러한 방식으로, 생물학적 자극에 응답한 한 세포 유형의 또다른 세포 유형에 대한 효과를 결정할 수 있다. 이같은 측정법은, 예를 들어 유전자 발현 수준에서 세포-세포 상호작용의 효과를 확인하는데 유용하다. 작용제가 한 세포 유형을 처리하기 위해 치료적으로 투여되지만 또다른 세포 유형에 원치않는 효과를 갖는다면, 본 발명은 원치않는 효과의 분자적인 근거를 결정하는 분석법을 제공하고, 따라서 반작용제를 함께 투여하거나 또는 원치않는 효과를 처리할 기회를 제공한다. 유사하게, 단일 세포 유형 내에서조차도, 원치않는 생물학적 효과가 분자 수준에서 결정될 수 있다. 따라서, 표적 유전자 이외의 발현에 대한 작용제의 효과를 확인하여 반작용시킬 수 있다.

또다른 실시양태에서, 어레이를 사용하여 어레이 내의 1종 이상의 유전자의 경시적 발현을 모니터링할 수 있다. 이는 본원에서 개시된 바와 같은 다양한 생물학적 정황, 예를 들어 자궁경부암의 발생, 자궁경부암의 진행 및 자궁경부암과 관련된 세포성 형질전환과 같은 과정에서 일어날 수 있다.

어레이는 동일한 세포 또는 상이한 세포에서 기타 유전자의 발현에 대한 한 유전자의 발현의 효과를 확인하는데 또한 유용하다. 예를 들어, 이는 궁극적인 또는 하류의 표적이 조절될 수 없을 때 치료적 개입을 위한 대안적인 분자 표적의 선택을 제공한다.

어레이는 정상 및 비정상 세포에서의 1종 이상의 유전자의 차별적 발현 양상을 확인하는데 또한 유용하다. 이는 진단적 또는 치료적 개입을 위한 분자 표적으로서 기능할 수 있는 한 별의 유전자를 제공한다.

E. 대용 마커

본 발명의 마커는 1종 이상의 장애 또는 질환 상태 또는 질환 상태에 이르는 컨디션, 특히 자궁경부암에 대한 대용 마커로서 기능할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "대용 마커"는 질환 또는 장애의 부재 또는 존재 또는 질환 또는 장애의 진행 (예를 들어 종양의 존재 또는 부재)과 상관관계가 있는 객관적인 생화학적 마커이다. 이같은 마커의 존재 또는 양은 질환에 독립적이다. 따라서, 이러한 마커들은 특정 코스의 치료가 질환 상태 또는 장애를 줄이는데 효과적인지 여부를 가리키는 지표로 기능할 수 있다. 대용 마커는 질환 상태 또는 장애의 존재 또는 정도를 표준 방법론을 통해 평가하기가 어려울 때 (예를 들어 초기 단계 종양) 또는 잠재적으로 위험한 임상적 종증에 도달하기 전에 질환 진행의 평가를 원할 때 (예를 들어 심근 경색 또는 완전히 발전된 AIDS의 원치 않는 임상적 결과에 잘 앞서서, 콜레스테롤 수준을 대용 마커로 사용하여 심혈관 질환을 평가할 수 있고, HIV RNA 수준을 대용 마커로 사용하여 HIV 감염을 분석할 수 있다) 특히 유용하다. 당업계에서 대용 마커를 사용하는 예로는 문헌 [Koomen et al. (2000) J. Mass. Spectrom. 35:258-264]; 및 [James (1994) AIDS Treatment News Archive 209]이 포함된다.

본 발명의 마커는 약동학적 마커로 또한 유용하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "약동학적 마커"는 약물 효과와 특이적으로 상관관계가 있는 객관적인 생화학적 마커이다. 약동학적 마커의 존재 또는 양은 약물이 투여될 질환 상태 또는 장애에 관련되지 않는다; 따라서, 마커의 존재 또는 양은 대상체 내에서의 약물의 존재 또는 활성의 지표이다. 예를 들어, 약동학적 마커는 약물의 수준과 관련되어 마커가 발현되거나 전사되는 또는 발현되지 않거나 전사되지 않는 생물학적 조직 내의 약물 농도의 지표일 수 있다. 이러한 방식으로, 약물의 분포 또는 섭취를 약동학적 마커에 의해 모니터링할 수 있다. 유사하게, 마커의 존재 또는 양이 생체내에서의 약물의 상대적 파괴 속도의 지표이도록, 약동학적 마커의 존재 또는 양이 약물의 대사산물의 존재 또는 양과 관련될 수 있다. 약동학적 마커는, 특히 약물이 저용량으로 투여될 때, 약물 효과의 검출 감도를 증가시키는데 특히 유용하다. 소량의 약물도 마커 전사 또는 발현의 수회 반복을 활성화시키는데 충분할 수 있으므로, 증폭된 마커는 약물 자체보다 더 쉽게 검출가능한 양일 수 있다. 또한, 마커는 마커 자체의 성질로 인해 더 쉽게 검출될 수 있다; 예를 들어, 본원에 기술된 방법을 사용하여 단백질 마커에 대한 면역-기초 검출 시스템에 항체를 사용하거나 또는 mRNA 마커를 검출하는데 방사능표지된 마커-특이적 프로브를 사용할 수 있다. 또한, 약동학적 마커의 사용은 가능한 직접 관찰의 범위를 넘어서는 약물 치료법으로 인한 위험을 메카니즘을 기초로 예측하도록 할 수 있다. 당업계에서 약동학적 마커를 사용하는 예로는 문헌 [Matsuda et al. US 6,033,862]; [Hattis et al. (1991) Env. Health Perspect. 90:229-238]; [Schentag (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S21-S24]; 및 [Nicolau (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S16-S20]가 포함된다

실시예

실시예 1: cDNA 및 조직 마이크로어레이에 의한 자궁경부암 마커의 확인

I. 재료 및 방법

샘플 수집 및 RNA 프랩(preparation)

자궁경부 조직을 수집하고, 액체 질소 중에 스냅(snap) 동결시켰다. RNA를 추출하기 전에, 조직의 세포 조성 및 조직학을 확인하였다. 동결된 조직으로부터 전체 RNA를 트리졸 리에이션트(Trizol Reagent, 라이프 테크놀로지(Life Technologies) 제품)를 사용하여 추출한 후, 퀴아젠(Qiagen, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)의 알엔이지(RNeasy) 키트로 2차 세정하여, RNA 프로브 표지화 효율을 증가시켰다. 애질런트 테크놀로지(Agilent Technologies, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)의 2100 바이오애널리라이저(2100 Bioanalyzer)를 사용하여 계산한 28S/18S 리보솜 RNA 비율이 1.0 이상인 RNA만을 본 연구에서 사용하였다.

cDNA 마이크로어레이 혼성화

리서치 제네틱스(Research Genetics, 미국 알라바마주 헨스트빌 소재)로부터의 30,732 개의 유니진(Unigene) 클론을 함유하는 cDNA 마이크로어레이를 나일론 필터 상에 생성시켰다. 총 4 내지 6 μ g의 전체 RNA를 주형으로 사용하여, 33 P-dCTP, 올리고 dT-30 프라이머 및 수퍼스크립트 II 리버스 트랜스크립타제(Superscript II Reverse Transcriptase) (라이프 테크놀로지(Life Technologies) 제품)를 사용한 역전사에 의해 방사능 표지된 cDNA를 생성시켰다. 33 P-표지된 제1가닥 cDNA를 cot-1 DNA 및 폴리-dA 40-60 (미국 뉴저지주 피팩에 소재하는 파마시아 제품)과 미리 어닐링시켜 비특이적 혼성화를 감소시켰다. 각각의 필터를 7% 소듐 도데실 술페이트 (SDS), 250mM Na_3PO_4 (pH 7.2), 1 mM EDTA, 0.5% 카제인-햄머스테인(Casein-Hammerstein) 및 0.1 mg/ml의 변성 염어 정자 DNA를 함유하는 완충액 중에서 약 6×10^6 카운트의 표지된 프로브와 65°C에서 16 시간 동안 혼성화시켰다. 필터를 4% 및 1% SDS 세척 완충액 (20 mM Na_3PO_4 (pH 7.2), 1 mM EDTA 및 4% 또는 1% SDS)으로 세척한 후, 이들을 후지 포스포이미지어(Fuji Phosphoimager) 스크린에 노출시키고, 후지(Fuji) 스캐너 BAS 2500을 사용하여 스캐닝하였다. 자동화된 어레이 분석 프로그램인, 밀레니엄 파마슈티컬스 인코퍼레이티드(Millennium Pharmaceuticals, Inc.)가 개발한 그리드 구루(Grid Guru) 버전 1.0을 사용하여 스팟을 정량하였다.

마커 스코어링 알고리즘 및 데이터 분석

혼성화 효율에서의 차이를 정정하기 위해, 각각의 마이크로어레이 필터로부터의 디지털화된 데이터를 필터 상의 모든 스팟의 중간 강도에 의해 표준화시켰다. 어레이를 기초로 하는 계통 군집화 및 유전자를 기초로 하는 계통 군집화 모두를 수행하고, 스탠포드 진 클러스터 앤드 트리 뷰(Stanford's Gene Cluster and Tree View) 소프트웨어를 사용하여 시각화하였다. 차별적으로 발현된 유전자들을 각각의 유전자에 대해 마커 스코어(Marker Score)를 계산하여 순위를 매겼다.

마커 스코어를 계산하기 위해, 샘플을 대조군과 테스터 군으로 나누었다. 마커 스코어에 대한 출발점은 대조군 샘플에 대한 테스터 샘플의 평균 배수 변화 (비)이다. 매우 높은 값을 갖는 소량의 테스터 샘플에 의해 좌우되지 않으면서, 차별적 발현을 보이는 테스터 샘플의 수 및 변화 정도 (발현율) 모두를 반영하도록 스코어를 고안하였다. 이러한 "이상값" 효과를 감소시키기 위해, 발현율이 10을 초과하는 유전자는 발현율이 10인 것들과 유의하게 다르지 않은 것으로 처리하였다. 마커 스코어로부터의 이러한 원하는 작업은 테스터 샘플에 대한 평균 배수 변화를 취하기 전에 점근적 압축 함수를 사용하여 테스터:대조군 발현율을 변형함으로써 달성하였다. 마커 스코어의 값은 테스터가 대조군보다 높게 발현되는 것으로 나타나지 않는 경우 1이고, 그외에는 1보다 크다. 모든 유전자에 대해 마커 스코어의 값은 10을 초과할 수 없다.

따라서 유전자 g에 대한 마커 스코어 S_g 는 압축된 테스터:대조군 비율의 평균으로 계산된다:

$$S_g = (\sum S_{gs})/N_{\text{테스터}}$$

$S_{gs} = C(x_{gs}/(k + x_g^Q))$, 식중 S_{gs} 는 유전자 g 및 샘플 s 에 대한 마커 스코어를 나타내고,

$C(r)$ 은 압축 함수 $C(r) = A(1 - e^{-r/A})$ (r 이 1 이상일 때) 및 $C(r) = 1$ (r 이 1 미만일때)이고,

A 는 배수 변화값 상의 상한점근치이고 (본원에서는 10을 사용함),

x_{gs} 는 샘플 s 상의 유전자 g 의 발현값이고,

x_g^Q 는 대조군 샘플의 발현값의 Q 번째 백분위수이고; 전형적으로 $Q = 50$ 이고,

k 는 데이터에서의 부가적인 노이즈를 반영하는 상수, 즉 반복된 측정에서의 변화의 고정된 성분이다. 마이크로어레이 기술을 사용한 분석 실험으로부터 이러한 파라미터에 대해 0.25의 값이 유도되었다.

$N_{\text{테스터}}$ 샘플의 수.

조직 마이크로어레이의 계내 혼성화

정상조직, 저등급 편평 상피내 병변 (LSIL), 고등급 편평 상피내 병변 (HSIL), 편평상피암종 (SCC) 및 선암 (ACA)으로 부터의 조직 코어를 함유하는, 포르말린에 고정되어 파라핀에 포매된 자궁경부 조직 마이크로어레이를 제공하였다. 기존에 기술된 프로토콜 (문헌 [Duncan, L. M., et al., 2001, J. Clin. Oncol. 19(2):568-576])을 사용하여, 자동 티슈-텍 디알에스 2000 슬라이드 스테이너(Tissue-Tek DRS 2000 Slide Stainer, 미국 캘리포니아주 토랜스에 소재하는 사쿠라 (Sakura) 제품)로 예비혼성화 처리를 수행하였다. 자궁경부 조직을 탈파라핀화시키고, 재수화시키고, PBS 중 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 후고정시켰다. PBS로 세척한 후, 조직 마이크로어레이를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로테이나제 K로 37°C에서 15분 동안 소화시키고, 다시 4% 파라포름알데히드/PBS와 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. 조직 섹션을 0.2N HCl과 함께 10분 동안, 0.25% 아세트산 무수물/0.1 mol/L 트리에탄올아민과 함께 10분 동안 연속적으로 인큐베이션하고, 등급화 에탄올로 탈수시켰다. 안티센스 프로브를 이미지(IMAGE) 클론으로부터 유래된 500 ng의 선형화된 플라스미드 DNA를 사용하여 시험관내 전사 반응 (리보프로브 콤비네이션 시스템(Riboprobe Combination System), 미국 와이오밍주 매디슨에 소재하는 프로메가(Promega) 제품)으로 ^{35}S -UTP로 표지하였다. 혼성화는 50% 포름아미드, 10% 텍스트란 술페이트, 1×덴하르트 용액, 0.6 M NaCl, 10 mM DTT, 0.25% SDS 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA를 함유하는 10 mM 트리스-HCl (pH 7.6) 완충액 중에서 5×10^7 cpm/ml로 표지된 프로브를 사용하여 18시간 동안 50°C에서 수행하였다. 혼성화 후, 슬라이드를 5×표준 염수 시트르산염 (SSC)으로 50°C에서 10분 동안, 50% 포름아미드/2×SSC로 50°C에서 10분 동안, 10 mM 트리스-HCl (pH 7.6)/500 mM NaCl/1 mM EDTA (TNE)로 37°C에서 10분동안 세척하고, TNE 중의 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rnase A 중에서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, TNE 중에서 37°C에서 10분 동안 세척하고, 2×SSC 중에서 50°C에서 20분 동안 1회, 0.2×SSC 중에서 50°C에서 20분 동안 2회 세척하고, 등급화 에탄올로 탈수시켰다. 슬라이드를 코닥 엔티비2 포토에멀션(Kodak NTB2 photoemulsion) (미국 뉴욕주 락체스터에 소재하는 이스트만 코닥(Eastman Kodak) 제품)에 침지시키고, 14-21일 동안 4°C에서 노출시킴으로써, mRNA 전사물의 국재성을 결정하였다. 마이어스(Myers) 헤마토실린 및 알콜성 에오신 Y를 사용하여 슬라이드를 대비염색하였다.

II. 결과

cDNA 마이크로어레이에 의한 자궁경부 조직의 전사 프로파일 제작

30,732개의 클론을 함유하는 cDNA 마이크로어레이 (30K 마이크로어레이) 상에 12개의 정상적인 자궁경부 조직 (자궁 경질부로부터 9개 및 자궁경관으로부터 3개), 5개의 LSIL, 5개의 HSIL, 9개의 SCC 및 3개의 ACA의 프로파일을 제작하였다. 질환 조직과 정상적인 조직 간을 구별하는 데이터 세트의 능력을 평가하기 위해, 유전자 발현 양상에서의 전반적인 유사성을 기초로 34개 샘플 데이터 세트의 계통 군집화를 수행하였다 (도 1). 계통수는 정상적인 자궁경부 조직 12개 중 10개 및 모든 LSIL 샘플이 한 군 ("대조군"으로 표시됨)으로 군집화되고, 종양 샘플 12개 중 11개 및 HSIL 샘플 5개 중 3개가 다른 군 ("질환군"으로 표시됨)으로 군집화되는 것을 나타낸다. 이러한 분리는 정상적인 자궁경질부 상피, 정상적인 자궁경관 상피 및 LSIL의 전체적인 유전자 발현 프로파일이 매우 유사한 반면, 3/5 HSIL 샘플의 발현 프로파일은 자궁경부암을 더욱 밀접하게 닮는다는 것을 가리킨다. 이러한 발견은 샘플이 상이한 연령의 환자 및 상이한 임상적 부위로부터 취해졌다는 사실에도 불구하고 질환 조직으로부터 대조군 조직을 구별할 수 있는 로버스트(robust) 데이터 세트를 가리킨다.

마커 선택

대조 조직 군과 질환군을 차별화하는 유전자 마커를 동정하기 위해, 3개의 마커 선택 패러다임으로부터 30K cDNA 마이크로어레이 상의 각각의 클론에 대해 마커 스코어를 계산하였다: 9개의 SCC 대 대조군 (9개의 자궁경질부, 3개의 자궁경관 및 5개의 LSIL), 5개의 HSIL 대 대조군 및 3개의 ACA 대 대조군. 자궁경부 세포의 형질전환과 관련된 새로운 마커를 발견하기 위해, 면역 응답과 관련된 상향조절된 유전자 (즉, 이뮤노글로불린, MHC)를 마커 선택 동안 배제하였다. SCC 또는 ACA 패러다임으로부터 마커 스코어의 순위가 상위 50위 내인 클론 및 SCC와 ACA 샘플 모두에서 과발현된 순위가 50위와 100위 사이인 클론을 상위 마커로 선택하였다. 종양에서의 증가된 발현이 양호한 마커 성능에 필수적인 것으로 간주되었기 때문에 HSIL 패러다임으로부터의 스코어는 마커를 선택하는데 독립적으로 사용하지 않았다. 마커들을 선택하였고, SCC, ACA 및 HSIL 패러다임에서의 이들의 스코어를 표 4에 나타낸다. SCC 샘플로부터의 상향조절된 유전자 대부분은 ACA에서 또한 상승하였다는 것이 밝혀졌다. SCC 및(또는) ACA 패러다임으로부터 선택된 많은 마커들은 스코어가 3.0 이상이지만, 소수의 HSIL 마커만이 스코어가 2.0을 초과하였고, 이는 형성장애에서 침윤성 암종으로 병변이 진행하면

서 증가하는 발현을 가리킨다. 도 2는 정상, LSIL, HSIL, SCC 및 ACA 조직 중에서 전형적이지만 뚜렷한 유형의 발현 양상을 나타내는 표 4로부터의 2개의 유전자를 나타낸다. MCM 6은 HSIL, 편평상피암종 및 선암에서 과발현되었고, 클라우딘 1은 편평상피암종에서만 과발현되었다.

상기 상향조절된 유전자의 특징을 이해하려는 시도에서, 계통 군집화를 모든 임상적 샘플을 통한 발현 프로파일을 기준으로 수행하였다. 상기 과발현된 유전자를 2개의 주요 군으로 군집화하였다. 한 군은 주로 세포의 매트릭스 (ECM) 단백질 (콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴) 또는 세포-ECM 상호작용 또는 ECM 분해 및 리모델링의 원인인 단백질 (예컨대 오스테오넥틴, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 유로키나제)을 코딩하는 유전자로 이루어진다. 다른 군집은 세포 복제 및 증식에 관련된 많은 유전자를 함유한다. 예로는 DNA 복제 라이센싱 인자 (MCM 6), 토포이소메라제 2A 및 종양형성 유전자 B-Myb가 포함된다.

계내 혼성화 (ISH)에 의한 마커 확인

마커를 또한 ISH에 의해 임상적 조직 샘플 중에서 평가하였다. ISH 실험을 조직 마이크로어레이를 사용하여 수행하여 전사 프로파일 결과를 확인하고 증가된 mRNA 발현의 원인인 세포 유형을 결정하였다. 구획화된 파라핀 블록의 수준에 따라, 26 내지 87개의 정상적인 자궁경부 조직 코어 (자궁경질부 및 자궁경관으로부터), 2 내지 10개의 LSIL, 5 내지 33개의 HSIL 및 10 내지 21개의 암 코어 (SCC, ACA 및 빈약하게 분화된 암종 포함)를 검사하였다. 일반적으로, ISH 신호는 자궁경부 상피 세포에서 검출되었다 (표 5). 상피 세포에서 과발현된 유전자는 세포 성장 및 세포-ECM 상호작용의 원인이다. 몇가지 유전자는 상피 세포에 의해 차별적으로 발현되었다. 상기 발견은 암 진행 동안 자궁경부 상피와 그의 미환경 간의 동등한 유전자 조절을 암시한다.

대표적인 유전자인 클라우딘 1의 현미경사진을 찍었다. 정상적인 자궁경관/자궁경질부 조직 및 LSIL에서는 클라우딘 1 프로브로부터의 검출가능한 신호는 거의 없거나 전혀 없었다. 유전자 발현은 HSIL에서 증가되었고, 자궁경부 종양에서는 더 증가되었다. 클라우딘 1 발현은 상피에 제한되었고, cDNA 마이크로어레이 상에 프로파일된 5개의 HSIL 및 3개의 ACA 샘플에서는 유의하게 증가되지 않았다. 이론에 제한되지는 않지만, 상기 경우에서 ISH의 증가된 민감도는 신호의 초점 성질 때문일 수 있다. 이러한 초점 신호는 ISH에 의해 쉽게 드러나지만, 온전한 조직 균등질의 RNA 제제에서는 없을 수 있다.

자궁경부 스크리닝이 자궁경부 상피로부터 벗겨낸 세포의 형태적 변화를 평가하기 때문에, 스트로마로부터의 세포는 Pap 시험표본 샘플에 존재하지 않을 것이다. 따라서, 마커 선택을 자궁경부 형성장애 및 침윤성 종양의 상피 세포에서 차별적으로 발현된 후보 마커에 초점화하였다. 각각의 마커가 자궁경부 병변 및 종양의 상이한 유형에서 증가되는 빈도를 이해하기 위해, 빈도 계산을 마이크로어레이 상의 모든 조직 코어를 사용하여 수행하였다. 계산은 반-정량적 임의 스코어링 방법을 기준으로 하였다. 신호를 0 내지 3의 등급으로 스코어링하였다: 0 - 신호 없음; 1 - 약한, 중간 신호; 2 - 일정한, 약한 내지 온전한 신호; 3 - 강력한 내지 매우 강력한 신호. 표 6은 본 발명의 마커에 대한 스코어링의 결과를 나타낸다. 양성으로 간주하려면 조직 코어는 ≥ 2 의 신호 스코어를 가져야 한다. 마이크로어레이가 단일 환자로부터 하나 이상의 조직 코어를 함유할 경우, 양성 신호는 50% 이상의 조직 코어가 ≥ 2 가 될 것을 요구하였다. 결과를 보다 잘 보여주기 위해, 선택된 마커를 정상적인 자궁경부 조직에 대한 양성 코어의 증가하는 빈도의 순서로 제시한다. 마커 증가의 빈도는 임상적 비정상성의 단계와 매우 상관관계가 있으며, 특정 임상적 단계에서 마커에서 마커까지 넓은 범위로 다양하다. 예를 들어, IFI27은 정상적인 자궁경부 조직으로부터 상대적으로 높은 ($> 20\%$) 양성 코어를 가진 반면, ITGB6 및 CLDN1과 같은 마커는 정상체에서 상대적으로 낮고, LSIL 및 HSIL에서 증가되기 시작했다. BST2에 대한 양성 코어의 출현은 고등급 전-악성 병변으로부터 침윤성 질환으로의 이행시에 종양 진행 단계에서 심지어 이후에도 일어났다. 상기 발견은 자궁경부암 발병 동안 순차적 분자 변화를 확인하는 마커의 존재를 입증한다.

실시예 2: 유전자 발현 분석

RNA 프랩

전체 RNA를 제조업체의 지침 (인비트로젠(Invitrogen))에 따라 TRIZOL 시약을 사용하여 단일 단계 추출 방법에 의해 다양한 인간 조직으로부터 프랩하였다. 각각의 RNA 제제를 DNase I (암비온(Ambion) 제품)으로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 샘플이 내부 증폭산물 참조물질로서 β -2 마이크로글로불린을 사용한 형광의 역치 수준에 도달하기 위해 38회 이상의 PCR 증폭 사이클을 요구할 경우 (또는 18s 리보솜 유전자에 대해 35회의 PCR 증폭 사이클) DNase I 처리가 완료된 것으로 결정하였다. DNase I 처리 후 RNA 샘플의 통합성을 아가로스 겔 전기영동 및 에티딘브로마이드 염색에 의해 확인하였다. 펄스 추출 후, cDNA를 태크맨(Taqman) 역전사 시약을 사용하여 제조업체 (어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems))의 지침에 따라 샘플로부터 프랩하였다. 역전사효소가 없는 RNA의 음성 대조군을 각각의 RNA 샘플에 대해 모의(mock) 역전사시켰다.

태크맨 (등록상표)

유전자 발현을 태크맨 (등록상표) 정량적 PCR (어플라이드 바이오시스템스 제품)에 의해 다양한 정상적인 그리고 질환을 갖는 (예컨대 암성) 인간 조직 또는 세포주로부터 제조된 cDNA에서 측정하였다.

프로브의 제조

프로브를 특이적 유전자의 서열 및 그의 관련 전사체를 기준으로 프라이머익스프레스(PrimerExpress) 소프트웨어 (어플라이드 바이오시스템스 제품)에 의해 고안하였다. 각각의 표적 유전자 프로브를 FAM (6-카복시폴루오로세인)을 사용하여 표지하고, 18s 참조 프로브를 상이한 형광 염료인 VIC로 표지하였다. 따라서, 표적 유전자 및 내부 참조 유전자의 차별적 표지화는 동일한 웰에서의 측정을 가능하게 하였다. 프라이머 및 프로브를 특이적 유전자의 각각의 전사체에 대해 그들의 민감도 및 특이성을 조사하였다. 18s 및 표적 유전자 둘 다에 대한 전방향 및 역방향 프라이머 및 프로브를 태크맨 (등록상표) 유니버설 PCR 마스터 믹스(Universal PCR Master Mix) (어플라이드 바이오시스템스 제품)에 첨가하였다. 프라이머 및 프로브의 최종 농도는 다양할 수 있지만, 각각은 주어진 실험 내에서 내부적으로 일치하였다. 전형적 실험은 전

방향 및 역방향 프라이머 100 nM과 18s에 대한 프로브 200 nM 및 전방향 및 역방향 프라이머 900 nM과 표적 유전자에 대한 프로브 250 nM을 함유하였다. 태크맨 (등록상표) 매트릭스 실험을 ABI PRISM 7700 서열 검출 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈 제품) 상에서 수행하였다. 열 사이클 조건은 다음과 같았다: 50℃에서 2분 및 95℃에서 10분 동안 유지한 후, 95℃에서 15초 동안, 그 후 60℃에서 1분 동안 40 사이클 동안의 2 단계 PCR.

하기 방법을 사용하여 동일한 조직에서의 18s 발현에 비해 다양한 조직에서의 유전자 발현을 정량적으로 계산하였다. 역치 사이클 (Ct) 값은 통계적으로 유의한 형광의 증가가 검출되는 사이클로 정의된다. 보다 낮은 Ct 값은 보다 높은 mRNA 농도를 지시한다. 유전자의 Ct 값을 18s 리보솜의 Ct 값을 뺀으로써 표준화하여 식 $\Delta Ct = Ct(\text{표적 전사체}) - Ct(18s)$ 을 사용하여 ΔCt 값을 수득한다. 그 후, 상대적 발현을 $2^{-\Delta Ct}$ 로 주어진 수학적식을 사용하여 계산한다. 그 후, 시험한 각각의 조직에서의 표적 유전자의 발현을 수직으로 나타낸다 (표 9 내지 13). 표 9 내지 13은 샘플 (샘플 #), 조직, 단계 및 표적 유전자의 발현을 확인하는 것이다. 분석된 마커 (표 1에 기재함)는 또한 적용가능하다면 변이체, 프라이머 및 프로브 (표 7에 기재함)와 함께 확인된다. 예를 들어, 표 12에서 M30A[1]에 상응하는 데이터는 표 7에 확인된 바와 같은 전방향 1 (F1), 역방향 1 (R1) 및 프로브 1 (P1)을 사용하여 마커 M30A를 확인한 것이다.

말단지점 PCR에 의한 유전자 발현 분석

상기한 샘플로부터의 전체 RNA를 풀링하여 제1 가닥 cDNA를 생성하기 위한 주형으로서 사용하였다. 자궁경부 패넬은 자궁경부 종양 풀, 자궁경부 정상적인 풀, '다른 정상체' 풀 및 '다른 종양' 풀로 이루어진다. 풀은 각각의 샘플의 동일한 양으로 이루어진다.

풀의 유형	구성성분
자궁경부 종양 풀	4개 종양 샘플 (편평상피암종)
자궁경부 정상적인 풀	3개 정상적인 자궁경부 샘플
다른 종양 풀	자궁경부 종양 - 4개 편평상피암종 샘플 결장 종양 - 5개 선암 샘플 폐 종양 - 3개 편평상피암종, 3개 선암, 1개 기관지폐포 암종 및 1개 거대세포 미분화 암종 난소 종양 - 2개 장액 암종 및 2개 투명세포 암종 전립선 종양 - 5개 선암
다른 정상체 풀	각각 정상적인 심장, 신장, 소장, 비장, WBC, 폐, 간, 뇌, 뼈, 골수 및 결장 조직으로부터의 1개 샘플

써모스크립트(ThermoScript) RT-PCR 시스템 (미국 캘리포니아주 산 디에고에 소재하는 인비트로젠 제품)을 사용하여 cDNA를 수득하였다. RNA 1 μg 을 65℃에서 5분 동안 10 μL 부피 중 50 μM 올리고 (dT) 20 프라이머로 제조업체의 지침에 따라 변성시켰다. 반응을 85℃에서 5분 동안 인큐베이션함으로써 종결시켰다. 최종 생성물을 물로 희석하여 최종 부피가 100 μL 가 되게 하였다.

유전자 특이적 프라이머를 오픈 리딩 프레임의 시작에서 바로 외측 또는 우측에 표시하였다 (표 7). PCR 조건을 프라이머 및 예상된 생성물의 크기에 대해 최적화하였다. cDNA 2 μL 를 터치다운 사이클링 조건으로 20 μL 반응에 사용하였다. 생성물을 아가로스 겔을 함유하는 에티듐 브로마이드 상에 걸었다. 그 후, 겔 사진을 반-정량적으로 분석하고, 스코어링하였다.

조직 패넬 상의 말단지점 PCR의 에티듐 브로마이드 아가로스 겔 사진을 0 내지 5의 등급으로 스코어링하였다 (표 8). 각각의 사진을 3인에 의해 독립적으로 스코어링하고, 결과를 응락하였다. 스코어를 비교하여 밴드의 상대적 강도 및 필요할 경우 이루어진 변형에 대한 일치를 확인하였다. 그 후, 3개 스코어의 중간을 최종 스코어로서 기록하였다.

표에 기재한 데이터의 요약

표 1은 본 발명의 마커 (서열 1 내지 44)를 확인하는 것이며 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 상기 유전자 명칭은 적용가능하다면 통상적으로 공지되어 있고 ("유전자 명칭"), 상기 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 뉴클레오타이드 전사체의 cDNA 서열의 서열목록 확인 번호 ("서열 (뉴클레오타이드)"), 상기 뉴클레오타이드 전사체에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열의 서열목록 확인 번호 ("서열 (아미노산)") 및 cDNA 서열 내에서 상기 단백질 코딩 서열의 위치 ("CDS")를 표시하였다.

표 2 및 표 3은 새로 확인된 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 기재하며, 이것들은 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 상기 유전자 명칭은 적용가능하다면 통상적으로 공지되어 있고 ("유전자 명칭"), 상기 마커에 의해 코딩되거나 그에 상응하는 뉴클레오타이드 전사체의 cDNA 서열의 서열목록 확인 번호 ("서열 (뉴클레오타이드)"), 상기 뉴클레오타이드 전사체에 의해 코딩되는 단백질의 아미노산 서열의 서열목록 확인 번호 ("서열 (아미노산)") 및 cDNA 서열 내에서 상기 단백질 코딩 서열의 위치 ("CDS")를 표시하였다.

표 4는 본 발명의 마커 및 SCC, ACA 및 HSIL에서 이들의 마커 스코어를 확인하는 것이다. 표 4의 마커는 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 상기 유전자 명칭은 적용가능하다면 통상적으로 공지되어 있고 ("유전자 명칭"), 편평상피암종 패러다임으로부터의 마커 스코어 ("스코어 SCC"), 선암 패러다임으로부터의 마커 스코어 ("스코어 ACA") 및 고등급 편평 상피내 병변 패러다임으로부터의 마커 스코어 ("스코어 HSIL")를 표시하였다.

표 5는 계내 혼성화에 의해 자궁경부암에서 과발현되는 것으로 확인된 마커를 기재하며, 마커의 발현 위치를 지시한다. 표 5의 마커는 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 상기 유전자 명칭은 적용가능하다면 통상적으로 공지되어 있고 ("유전자 명칭"), 자궁경부 상피 세포에서 검출된 계내 혼성화 신호 ("신호 위치")를 표시하였다.

표 6은 자궁경부 형성장애 및 침윤성 종양의 상피 세포에서 마커의 차별적 발현을 기재한다. 표 6의 마커는 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 상기 유전자 명칭은 적용가능하다면 통상적으로 공지되어 있고 ("유전자 명칭"), 각각의 마커에 대하여 정상적인 자궁경질부 및 자궁경관 세포 ("정상적인 (EC + END)")에서의 마커 증가의 빈도 ("빈도") 및 환자 수에 대한 양성 수 ("# 양성/# 환자"), 저등급 편평 상피내 병변 ("LSIL")에서의 마커 증가의 빈도 ("빈도") 및 환자 수에 대한 양성 수 ("# 양성/# 환자"), 고등급 편평 상피내 병변 ("HSIL")에서의 마커 증가의 빈도 ("빈도") 및 환자 수에 대한 양성 수 ("# 양성/# 환자") 및 편평상피암종 및 선암 ("종양 (SCC + ACA)")에서의 마커 증가의 빈도 ("빈도") 및 환자 수에 대한 양성 수 ("# 양성/# 환자")를 기재하였다.

표 7에는 유전자 특이적 프라이머를 기재하였다. 표 7은 마커를 확인하는 것이며 명칭 ("마커")으로 표시하였고, 태크맨 프라이머 1에 대한 매칭 위치에 상응하는 유전자 특이적 프라이머 ("매칭 위치: 태크맨 프라이머 1"), 태크맨 프라이머 2에 대한 매칭 위치에 상응하는 유전자 특이적 프라이머 ("매칭 위치: 태크맨 프라이머 2"), 태크맨 프로브에 대한 매칭 위치에 상응하는 유전자 특이적 프라이머 ("매칭 위치: 태크맨 프로브"), 말단지점 PCR 프라이머 1에 대한 매칭 위치에 상응하는 유전자 특이적 프라이머 ("매칭 위치: 말단지점 PCR 프라이머 1") 및 말단지점 PCR 프라이머 1에 대한 매칭 위치에 상응하는 유전자 특이적 프라이머 ("매칭 위치: 말단지점 PCR 프라이머 1")를 표시하였다. 표 7은 전방향 1 방향 ("F1"); 전방향 2 방향 ("F2"); 역방향 1 방향 ("R1"); 역방향 2 방향 ("R2")의 프라이머 및 프로브 ("P1"은 프로브 1을 표시하는 것이고 "P2"는 프로브 2를 표시하는 것이다)를 확인하는 것이다.

표 8에는 조직 패널상에서의 말단지점 PCR의 에티뎀 브로마이드 아가로스 겔 사진을 0 내지 5 등급으로 스코어를 기재하였다. 표 8은 마커를 확인하는 것이며 명칭 ("마커") 및 사용한 샘플 ("정상적인 자궁경부" 및 "자궁경부 종양")로 표시하였다.

표 9 내지 13은 시험한 조직 각각에서의 표적 유전자 발현을 확인하는 것이다. 표 9 내지 13은 샘플을 확인하는 것이며, 번호 ("샘플 #"), 샘플의 조직 단계 ("조직 단계") 및 표적 유전자 ("유전자 명칭") 발현으로 표시하였다. 또한, 표 9 내지 13은 표 1에 기재한 마커 명칭에 상응하는 마커 명칭 및 적용가능한 경우에는 분석한 프라이머 및 프로브 (표 7에 기재함)를 확인하는 것이다. 예를 들어 표 12에서 "M30A [1]"에 상응하는 데이터는 표 7에서 확인된 바와 같은 전방향 1 프라이머 (F1), 역방향 1 프라이머 (R1) 및 프로브 1 (P1)을 사용하여 마커 M30A를 확인한 것이다.

상기 프로토콜을 사용하여 수득된 마커는 제한적인 것으로 간주되지 않아야 한다. 본 명세서 전체에 걸쳐 언급된 모든 참고문헌, 데이터베이스, 특허문헌 및 특허 출원 공개 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

다른 실시양태

당업자는 통상적인 실험 이하를 이용하여 본 명세서에 기재된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 이해할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구항에 포함되는 것으로 의도된다.

표 1.

마커	유전자 명칭	서열-관련 정보	서열 (뉴클레오타이드)	서열 (아미노산)	CDS
M1A	APOL1: 아포지단백질 L1		1	2	162..1358
M718	APOL2: 아포지단백질 L2		3	4	337..1350
OV3A	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 1		5	6	517..1314
M719	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 2		7	8	517..1149
M720	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 3		9	10	517..1185
M5A	BST2: 골수 간질 세포 항원 2		11	12	78..620
M10A	CLDN1: 클라우딘-1, 노화-관련 상피 막 단백질 1		13	14	221..856
M29A	COTL1: 코액토신-유사제 1 (터티오스틴)		15	16	150..576
M30A	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1		17	18	120..488
M721	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 2		19	20	120..479
M488A	ITGA3: 인터그린, 알파 3 (항원 CD49C, VLA-3 수용체의 알파 3 서브유닛)		21	22	240..3353
M35	ITGB6: 인터그린, 베타 6, 변이체 1		23	24	195..2561
M722	ITGB6: 인터그린, 베타 6, 변이체 2		25	26	241..2388
M723	ITGB6: 인터그린, 베타 6, 변이체 3		27	28	195..2240
M666	KCNAB1: 칼륨 전압-관련 채널, 쉐이커-관련 아족, 베타 구성원		29	30	89..1315
M489A	MCM6: 미니염색체 유지 결핍 (mis5, 사카로마이세스 톱배) 6		31	32	56..2521
OV43A	MSLN: 메소텔린, 거핵구 강화 인자		33	34	88..1956
M51A	MYBL2: B-MYB, 전사 인자 (v-myb 골수아세포종 바이러스 종양형성유전자 동족체)		35	36	128..2230
M58	PLAU: 플라스미노겐 활성화자, 유로키나제		37	38	77..1372
M22A	RTP801: 재산소중-유도가능한 인자 1 (HIR-1) 반응성 유전자		39	40	198..896
M74A	TOP2A: DNA 토포이소머라제 II, 알파 동족체		41	42	127..4722
M78	ZNF-P66: C2H2형 아연 핑거 단백질 (66 kD)		43	44	45..1343

표 2.

서열-관련 정보				
마커	유전자 명칭	서열 (뉴클레오타이드)	서열 (아미노산)	CDS
M1A	APOL1: 아포지단백질 L1	1	2	162..1358
M719	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 2	7	8	517..1149
M720	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 3	9	10	517..1185
M721	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 2	19	20	120..479
M488A	ITGA3: 인테그린, 알파 3 (항원 CD49C, VLA-3 수용체의 알파 3 서브유닛)	21	22	240..3353
M722	ITGB6: 인테그린, 베타 6, 변이체 2	25	26	241..2388
M723	ITGB6: 인테그린, 베타 6, 변이체 3	27	28	195..2240
M78	ZNF-P6: C2H2형 아연 핑거 단백질 (66 kD)	43	44	45..1343

표 3.

서열-관련 정보				
마커	유전자 명칭	서열 (뉴클레오타이드)	서열 (아미노산)	CDS
M5A	BST2: 골수 간질 세포 항원 2	11	12	78..620
M30A	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1	17	18	120..488
M35	ITGB6: 인테그린, 베타 6, 변이체 1	23	24	195..2561
OV43A	MSLN: 메소텔린, 거핵구 강화 인자	33	34	88..1956

표 4.

마커	유전자 명칭	스코어 SCC	스코어 ACA	스코어 HSIL
M666	KCNAB1: 칼륨 전압-판문 채널, 웨이커-관련 아족, 베타 구성원 1	3.6	3.9	1.4
M10A	CLDN1: 클라우딘-1, 노화-관련 상피 막 단백질 1	3.3	1.0	1.3
M29A	COTL1: 코엑토신-유사체 1 (덕티오스텔름)	3.2	1.9	1.0
M5A	BST2: 골수 간질 세포 항원 2	3.1	3.5	1.7
M78	ZNF-P66: C2H2형 아연 핑거 단백질 (66 kD)	3.0	3.1	1.4
M22A	RTP801: 저산소증-유도가능한 인자 1 (HIF-1) 반응성 유전자	2.9	3.0	1.4
M30A M721	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1 및 2	2.9	2.5	1.2
M1A	APOL1: 아포지단백질 L1	2.8	3.1	1.9
M488A	ITGA3: 인테그린, 알파 3 (항원 CD49C, VLA-3 수용체의 알파 3 서브유닛)	2.7	3.7	1.1
M35 M722 M723	ITGB6: 인테그린, 베타 6, 변이체 1, 2 및 3	2.4	3.9	1.0
M51A	MYBL2: B-MYB, 전사 인자 (v-myb 골수아세포증 바이러스 종양형성유전자 동족체 (조류)-유사체 2)	2.3	4.2	1.8
M489A	MCM6: 미니염색체 유지 결핍 (mis5, 사카로마이세스 폼베) 6	2.3	3.2	1.5
M74A OV3A M719 M720	TOP2A: DNA 토포이소머라제 II, 알파 동종효소	1.7	3.2	1.6
	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 1, 2 및 3	1.0	3.2	1.6

표 5.

마커	유전자 명칭	신호 위치
M666	KCNAB1: 칼륨 전압-판문 채널, 셰이커-관련 아족, 베타 구성원 1	상피
M29A	COTL1: 코엑토신-유사체 1 (덕티오스텔름)	상피
M74A	TOP2A: DNA 토포이소머라제 II, 알파 동종효소	상피
M30A		
M721	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1 및 2	상피
M78	ZNF-P66: C2H2형 아연 핑거 단백질 (66 kD)	상피
M488A	ITGA3: 인테그린, 알파 3 (항원 CD49C, VLA-3 수용체의 알파 3 서브유닛)	상피
OV3A		
M719		
M720	AQP5: 아쿠아포린 5, 변이체 1, 2 및 3	상피
M5A	BST2: 골수 간질 세포 항원 2	상피
M22A	RTP801: 저산소증-유도가능한 인자 1 (HIF-1) 반응성 유전자	상피
M51A	MYBL2: B-MYB, 전사 인자 (v-myb 골수아세포종 바이러스 종양형성유전자 동족체 (조류)-유사체 2)	상피
M35		
M722		
M723	ITGB6: 인테그린, 베타 6, 변이체 1, 2 및 3	상피
M16	CRIP1: 시스테인-풍부 단백질 1 (장)	상피
M489A	MCM6: 미니열색체 유지 결핍 (mis5, 사카로마이세스 폴베) 6	상피
M10A	CLDN1: 클라우딘-1, 노화-관련 상피 막 단백질 1	상피
M1A	APOL1: 아포지단백질 L1	상피

표 6a.

	조직	정상 (EC+END) ^b	LSIL		HSIL		종양 (SCC+ACA)		
마커	유전자 명칭	빈도	# 양성/ # 환자	빈도	# 양성/ # 환자	빈도	# 양성/ # 환자		
M74A	TOP2A: DNA DNA 토포이소머라제 II, 알파 동종효소 MYBL2: B-MYB, 전사 인자 (v-myb 골수아세포종 바이러스 종양형성유전자 동족체 (조류)-유사체 2)	0.0%	0/47	0.0%	0/2	20.0%	2/10	23.0%	3/13
M51A	MCM6: 미니열색체 유지 결핍 (mis5, 사카토마이세스 폴베) 6	0.0%	0/59	16.7%	1/6	27.0%	5/18	75.0%	12/16
M489A	BST2: 골수 간질 세포 항원 2	1.8%	1/56	0.0%	0/7	60.0%	12/15	75.0%	12/16
M5A	ZNF-P66: C2H2형 아연 핑거 단백질 (66 kD)	3.5%	3/85	10.0%	1/10	13.3%	2/15	66.4%	13/19
M78		4.6%	3/65	0.0%	0/5	0.0%	0/12	50.0%	3/10
OV3A M719 M720	아쿠아포린 5, 변이체 1, 2 및 3	5.0%	2/40	50.0%	2/4	20.0%	1/5	40.0%	7/16

표 6b.

M22A	RTP801:저산소증-유도가능한 인자 1 (HIF-1) 발동성 유전자	9.2%	7/76	0%	0/4	40.0%	8/20	45.5%	5/12
M35	ITGB6: 인테그린, 페타 6, 변이체 1 및 2	11.1%	6/54	100.0%	3/3	59.5%	8/15	89.5%	15/17
M722	ITGA3: 인테그린, 알파 3 (항원 CD49C, VLA-3 수용체의 알파 3 서브유닛)								
M488A	COIT 1: 코엑토신-유사체 1 (티리오스텔름)	11.9%	7/59	0.0%	0/3	20.0%	2/10	23.0%	9/12
M29A	CLDN1: 클라우딘-1, 노화-관련 상피 막 단백질 1	14.3%	8/56	20.0%	2/10	7.7%	1/13	6.5%	9/14
M10A	IFI27: 인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1 및 2	15.1%	8/53	73.0%	3/4	89.2%	15/17	90.5%	19/21
M30A M721	인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27, 변이체 1 및 2	26.0%	20/87	89.5%	3/9	42.0%	10/24	69.5%	12/18

a. 양성 조직 코어는 ISH 스코어 2 이상인 것이었음.
b. 정상 자궁경질부 및 자궁경관 세포
c. 기저/부기저 세포로 제한된 몇몇 정상 편평 상피에서의 발현
어두운 부분의 세포는 20% 이상의 환자에서 ISH 스코어가 2 이상임을 나타냄.

표 7.

	태크렌/PCR 프라이머-관련 정보				
	배정 위치: 태크렌 프라이머 1	배정 위치: 태크렌 프라이머 2	배정 위치: 태크렌 프로브	배정 위치: 말단저염 PCR 프라이머 1	배정 위치: 말단저염 PCR 프라이머 2
Marker					
M1A	99-121	238-218	186-160	82-103	1673-1693
M718	166-188	251-231	190-217	143-164	1680-1700
OV3A	914-935	980-964	938-961	512-534	1432-1449
M719	842-857	912-895	869-894	512-534	1267-1284
M720	1097-1116	1174-1155	1154-1133	512-534	1512-1529
M5A				1-23; 34-56	628-647
M10A				164-182	888-908
M29A				123-139	592-610
M30A	(F1) 208-228 // (F2) 257-275	(R1) 315-298 // (R2) 336-316	(P1) 260-242 // (P2) 277-296	7-26	510-529
M721	(F1) 208-228 // (F2) 248-266	(R1) 306-289 // (R2) 327-307	(P1) 258-234 // (P2) 268-287	7-26	501-520
M488A				187-209	3412-3434
M35	(F1) 1900-1920 // (F2) 628-648	(R1) 1970-1950 // (R2) 698-672	(P1) 1923-1945 // (P2) 670-650	188-208	2592-2616
M722	(F1) 1727-1747 // (F2) 318-337 // (F3) 455-475	(R1) 1797-1777 // (R2) 409-391 // (R3) 525-499	(P1) 1750-1772 // (P2) 377-360 // (P3) 497-477	188-208	2419-2443
M723	(F1) 1796-1818 // (F2) 628-648	(R1) 1891-1870 // (R2) 698-672	(P1) 1869-1843 // (P2) 670-650	188-208	2271-2295
M666				89-108	1288-1312
M489A				21-39	2563-2580
OV43A				1198-1215	1272-1290
M51A				216-233	2291-2315
M58				52-70	1396-1415
M22A				139-159	997-1017
M74A					
M78				6-25	1393-1418

표 8.

마커	정상적인 자궁경부	자궁경부 종양
M1A	1	5
M718	1	3
OV3A	1	4
M719	1	4
M720	1	4
M5A	3	3
M10A	3	5
M29A	2	5
M30A	4	5
M721	4	5
M488A	2	5
M35	0	5
M722	0	5
M723	0	5
M666	0	5
M489A	2	5
OV43A	0	4
M51A	0	5
M58	2	2
M22A	1	5
M74A		
M78	0	2

표 9.

아쿠아포린 5의 발현

샘플 #	조직 단계	OV3A	M719	M720
1	정상	0.37	0.01	0.00
2	정상	0.02	0.00	0.00
3	정상	0.98	0.01	0.02
4	정상	0.01	0.00	0.00
5	정상	0.39	0.01	0.01
6	정상	0.00	0.00	0.00
7	정상	1.59	0.07	0.01
8	정상	0.12	0.00	0.00
9	정상	0.00	0.00	0.00
10	정상	0.00	0.00	0.00
11	SCC	0.79	0.05	0.01
12	SCC	0.23	0.01	0.00
13	SCC	0.17	0.00	0.01
14	SCC	0.66	0.03	0.01
15	SCC	1.37	0.03	0.00
16	SCC	3.22	0.33	0.02
17	SCC	0.00	0.00	0.00
18	SCC/AIS	0.12	0.00	0.00
19	SSC	0.02	0.00	0.00
20	분화기 불발한 선관평	0.18	0.01	0.00
21	SSC	0.01	0.00	0.00
22	선암	0.02	0.00	0.00
23	선암	0.78	0.03	0.01
24	SCC	0.12	0.01	0.00
25	SSC	0.00	0.00	0.00
26	SSC	0.00	0.00	0.00
27	SSC	0.00	0.00	0.00
28	SSC	0.08	0.01	0.00
29	SSC	1.59	0.06	0.02
30	SSC	0.07	0.00	0.00
31	선암	0.27	0.01	0.00
32	선암	1.29	0.03	0.03
33	SCC	0.03	0.00	0.00
34	SSC	0.01	0.00	0.00
35	SSC	6.92	0.11	0.05
36	SSC	0.03	0.00	0.00
37	SSC	0.15	0.00	0.00
38	SSC	0.00	0.00	0.00
39	SSC	0.01	0.00	0.00
40	SSC	0.06	0.00	0.00
41	SSC	0.02	0.00	0.00
42	종양	0.13	0.00	0.00

표 10.

아쿠아포린 L1의 발현

샘플 #	조직 단계	M1A
	정상	
1	정상	0.60
2	정상	0.14
3	정상	0.60
4	정상	0.48
5	정상	0.44
6	정상	0.24
7	정상	0.18
8	정상	0.34
9	정상	0.52
10	정상	0.62
11	SCC	1.56
12	SCC	2.02
13	SCC	2.50
14	SCC	3.15
15	SCC	1.14
16	SCC	3.42
17	SCC	2.51
18	SCC/AIS	17.88
19	SSC	1.18
20	분화가 불량한 선편평	1.32
21	SSC	1.38
22	선암	6.61
23	선암	0.08
24	SCC	1.37
25	SSC	6.28
26	SSC	1.91
27	SSC	5.14
28	SSC	0.59
29	SSC	0.30
30	SSC	5.30
31	선암	2.10
32	선암	1.51
33	SCC	8.09
34	SSC	0.35
35	SSC	0.38
36	SSC	4.11
37	SSC	1.83
38	SSC	3.99
39	SSC	4.48
40	SSC	3.77
41	SSC	10.08
42	종양	0.12

표 11.

아쿠아포린 L2의 발현

샘플 #	조직 단계	M718
1	정상	0.20
2	정상	0.06
3	정상	0.19
4	정상	0.15
5	정상	0.20
6	정상	0.15
7	정상	0.13
8	정상	0.26
9	정상	0.32
10	정상	0.34
11	SCC	1.15
12	SCC	0.42
13	SCC	0.67
14	SCC	0.93
15	SCC	0.51
16	SCC	0.69
17	SCC	0.54
18	SCC/AIS	0.75
19	SSC	0.36
20	분화가 불량한 선편평	0.67
21	SSC	0.30
22	선암	0.82
23	선암	0.11
24	SCC	0.52
25	SSC	2.68
26	SSC	0.51
27	SSC	1.82
28	SSC	0.51
29	SSC	0.17
30	SSC	1.90
31	선암	0.34
32	선암	0.49
33	SCC	1.82
34	SSC	0.11
35	SSC	0.28
36	SSC	0.62
37	SSC	0.55
38	SSC	0.68
39	SSC	0.72
40	SSC	0.38
41	SSC	0.87
42	종양	0.34

표 12.

인터페론, 알파-유도가능한 단백질 27의 발현

샘플 #	조직 단계	M30A [1]	M721 [1]	M30A [2]/M721 [2]
1	정상	1.75	1.77	3.84
2	정상	0.21	1.25	1.44
3	정상	2.73	4.15	9.46
4	정상	0.00	39.85	17.37
5	정상	14.62	29.54	62.89
6	정상	14.47	20.68	32.12
7	정상	1.04	12.95	8.31
8	정상	4.56	8.96	15.70
9	정상	18.02	23.27	46.52
10	정상	5.83	39.68	32.94
11	SCC	6.66	7.60	15.26
12	SCC	0.98	5.48	5.08
13	SCC	0.00	24.93	14.39
14	SCC	3.58	26.17	19.23
15	SCC	12.51	8.70	37.53
16	SCC	0.00	366.10	244.10
17	SCC	23.94	78.32	127.98
18	SCC/AIS	32.25	287.87	251.55
19	SSC	4.24	3.31	15.21
20	분화가 불량한 선편평	6.88	6.04	24.17
21	SSC	6.51	5.44	17.83
22	선암	14.72	74.02	110.70
23	선암	0.06	0.05	0.25
24	SCC	11.61	7.58	32.57
25	SSC	0.00	117.40	71.70
26	SSC	0.00	73.80	35.81
27	SSC	11.76	6.31	31.11
28	SSC	14.72	9.34	31.94
29	SSC	0.67	0.42	2.69
30	SSC	34.47	33.49	107.11
31	선암	0.00	10.66	5.03
32	선암	6.97	5.66	16.30
33	SCC	17.92	97.36	101.33
34	SSC	11.51	7.52	22.49
35	SSC	6.89	42.12	38.96
36	SSC	2.73	35.04	25.04
37	SSC	13.85	7.68	34.26
38	SSC	0.00	28.34	18.79
39	SSC	20.60	15.88	94.41
40	SSC	0.00	13.33	9.11
41	SSC	10.09	12.91	40.59
42	종양	0.41	0.68	2.13

표 13.

인테그린, 베타 6의 발현

샘플 #	조직 단계	M35 [1]/M722 [1]	M722 [2]	M723 [1]	M35 [2]/M722 [3]/M723 [2]
1	정상	0.45	0.0005	0.019	0.57
2	정상	0.21	0.0002	0.006	0.32
3	정상	0.09	0.0001	0.001	0.17
4	정상	0.13	0.0002	0.003	0.27
5	정상	0.11	0.0002	0.012	0.18
6	정상	0.55	0.0004	0.014	0.72
7	정상	0.11	0.0001	0.003	0.13
8	정상	0.08	0.0000	0.003	0.09
9	정상	0.27	0.0002	0.006	0.26
10	정상	0.56	0.0005	0.016	0.77
11	SCC	1.42	0.0016	0.058	1.90
12	SCC	0.25	0.0004	0.007	0.56
13	SCC	8.24	0.0033	0.333	10.81
14	SCC	0.26	0.0001	0.003	0.29
15	SCC	0.55	0.0003	0.014	0.82
16	SCC	1.22	0.0008	0.032	1.57
17	SCC	3.46	0.0048	0.181	5.35
18	SCC/AIS	1.58	0.0004	0.107	2.45
19	SSC	0.39	0.0004	0.023	0.66
20	분화기 불발현 선암형	0.56	0.0005	0.022	0.91
21	SSC	2.92	0.0013	0.082	3.95
22	선암	0.48	0.0002	0.012	0.68
23	선암	0.30	0.0003	0.002	0.56
24	SCC	1.75	0.0010	0.083	3.34
25	SSC	0.43	0.0003	0.029	0.79
26	SSC	0.31	0.0004	0.018	0.46
27	SSC	0.80	0.0009	0.025	0.89
28	SSC	3.30	0.0025	0.131	4.45
29	SSC	2.28	0.0037	0.124	4.37
30	SSC	0.54	0.0002	0.021	0.87
31	선암	0.27	0.0002	0.007	0.58
32	선암	0.22	0.0003	0.012	0.35
33	SCC	3.46	0.0036	0.127	4.77
34	SSC	0.67	0.0004	0.036	1.19
35	SSC	0.94	0.0003	0.047	1.06
36	SSC	1.66	0.0004	0.057	1.74
37	SSC	2.20	0.0016	0.086	3.34
38	SSC	0.48	0.0002	0.008	0.41
39	SSC	0.82	0.0004	0.030	0.74
40	SSC	0.41	0.0002	0.013	0.29
41	SSC	3.04	0.0021	0.076	2.89
42	종양	0.07	0.0000	0.001	0.06

(57) 청구의 범위

청구항 1.

a) 환자 샘플 중 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현 수준과 b) 정상적인 대조군 자궁경부암 샘플 중에서의 마커 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 이때 환자 샘플 중에서의 마커 발현 수준과 정상 수준 사이에서의 유의한 차이가 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있거나 전-악성 상태라는 지표인, 환자가 자궁경부암을 앓고 있거나 또는 전-악성 상태인지 여부를 평가하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 환자에게 CIN 또는 SIL이 있는 것인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 마커가 분비 단백질에 반응하는 것인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 마커가 그를 포함하는 전사된 폴리뉴클레오티드 또는 그의 일부에 상응하는 것인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 샘플이 환자로부터 수득한 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 샘플이 자궁경부 도말표본인 것인 방법.

청구항 7.

제5항에 있어서, 세포가 복막 세정으로 수집된 유체, 자궁 세정으로 수집된 유체, 자궁 유체, 자궁 분비물, 흉막 유체, 방광(cystic) 유체 및 자궁경부 분비물로 구성된 군에서 선택된 유체 중에 존재하는 것인 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 샘플 중에서의 마커 발현 수준을 샘플 중에서 상기 마커에 상응하는 단백질의 존재를 검출함으로써 평가하는 것인 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 단백질의 존재를 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 시약을 사용하여 검출하는 것인 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 시약이 항체, 항체 유도체 및 항체 단편으로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 샘플 중에서의 마커 발현 수준을 샘플 중에서 상기 마커를 포함하는 전사된 폴리뉴클레오티드 또는 그의 일부의 존재를 검출함으로써 평가하는 것인 방법.

청구항 12.

제11항에 있어서, 전사된 폴리뉴클레오티드가 mRNA인 방법.

청구항 13.

제11항에 있어서, 전사된 폴리뉴클레오티드가 cDNA인 방법.

청구항 14.

제11항에 있어서, 상기 검출 단계가 전사된 폴리뉴클레오티드의 증폭 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 15.

제1항에 있어서, 샘플 중에서의 마커 발현 수준을 샘플 중에서 엄격 혼성화 조건하에 마커와 어닐링되거나 또는 상기 마커를 포함하는 폴리뉴클레오티드의 일부와 어닐링되는 전사된 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출함으로써 평가하는 것인 방법.

청구항 16.

제1항에 있어서, 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 자궁경부암을 앓고 있지 않은 환자에서의 정상적인 마커 발현 수준과 약 2 이상의 인자만큼 차이가 나는 것인 방법.

청구항 17.

제1항에 있어서, 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 자궁경부암을 앓고 있지 않은 환자에서의 정상적인 마커 발현 수준과 약 5 이상의 인자만큼 차이가 나는 것인 방법.

청구항 18.

제1항에 있어서, a) 샘플 중 표 1에 기재한 마커로부터 독립적으로 선택된 복수개의 마커 각각의 발현 수준과 b) 정상적인 대조군 인간 자궁경부 샘플로부터 수득한 동일 유형의 샘플 중에서의 상기 복수개의 마커 각각의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하고, 이때 1종 초과와 마커 발현 수준이 상기 마커의 상응하는 정상 발현 수준에 비해 유의하게 변경된 것이 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있거나 또는 전-악성 상태라는 지표인 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 마커 각각의 발현 수준이 상기 마커의 상응하는 정상 발현 수준에 비해 유의하게 변경된 것이 상기 환자가 자궁경부암을 앓고 있다는 지표인 방법.

청구항 20.

제18항에 있어서, 복수개의 마커가 3종 이상의 마커를 포함하는 것인 방법.

청구항 21.

제18항에 있어서, 복수개의 마커가 5종 이상의 마커를 포함하는 것인 방법.

청구항 22.

- a) 제1 시점에 환자 샘플 중에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현을 검출하는 단계,
 - b) 이후의 시점에 상기 단계 a)를 반복하는 단계 및
 - c) 상기 단계 a) 및 b)에서 검출된 발현 수준을 비교하고, 이로부터 환자에서 자궁경부암 또는 전-악성 상태의 진행을 모니터링하는 단계
- 를 포함하는, 환자에서 자궁경부암 또는 전-악성 상태의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 23.

제22항에 있어서, 마커가 분비 단백질에 상응하는 것인 방법.

청구항 24.

제22항에 있어서, 마커가 그를 포함하는 전사된 폴리뉴클레오티드 또는 그의 일부에 상응하는 것인 방법.

청구항 25.

제22항에 있어서, 샘플이 환자로부터 수득한 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 26.

제25항에 있어서, 환자 샘플이 자궁경부 도말표본인 것인 방법.

청구항 27.

제22항에 있어서, 제1 시점과 이후 시점 사이에 환자가 종양 제거술을 받는 것인 방법.

청구항 28.

a) 환자로부터 수득하여 환자에서의 자궁경부암 억제 효능을 평가할 시험 화합물에 노출시킨 제1 샘플 중에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커를 발현시키는 단계 및

b) 환자로부터 수득하여 상기 시험 화합물에 노출시키지 않은 제2 샘플 중에서 상기 마커를 발현시키는 단계

를 포함하고, 이때 제1 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 제2 샘플 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 낮다는 것이 상기 시험 화합물이 상기 환자에서의 자궁경부암 억제에 효능이 있다는 지표인, 환자에서의 자궁경부암 억제용 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법.

청구항 29.

제28항에 있어서, 제1 샘플 및 제2 샘플이 환자로부터 수득한 단일 샘플의 일부인 방법.

청구항 30.

제28항에 있어서, 제1 샘플 및 제2 샘플이 환자로부터 수득하여 풀링(pooling)한 샘플의 일부인 것인 방법.

청구항 31.

a) 환자로부터 수득한 제1 샘플 중에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커를 발현시킨 후에 자궁경부암 억제 효능을 평가할 자궁경부암 억제 요법의 적어도 일부를 환자에게 제공하는 단계 및

b) 환자로부터 수득한 제2 샘플 중에서 상기 마커를 발현시킨 후에 상기 요법의 일부를 제공하는 단계

를 포함하고, 이때 제2 샘플 중에서의 마커 발현 수준이 제1 샘플 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 더 낮다는 것이 상기 요법이 상기 환자에서의 자궁경부암 억제에 효능이 있다는 지표인, 환자에서의 자궁경부암 억제 요법의 효능을 평가하는 방법.

청구항 32.

a) 환자로부터의 암 세포를 포함하는 샘플을 수득하는 단계,

b) 상기 샘플의 분취액을 환자에서의 자궁경부암 억제에 대해 시험할 복수개의 시험 조성물에 개별적으로 노출시키는 단계,

c) 각각의 분취액에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현을 비교하는 단계 및

d) 시험 조성물 중에서, 특정 시험 조성물을 함유하는 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 다른 시험 조성물 중에서의 마커 발현 수준에 비해 감소되도록 유도하는 하나를 선택하는 단계

를 포함하는, 환자에서의 자궁경부암 억제용 조성물을 선택하는 방법.

청구항 33.

a) 환자로부터의 암 세포를 포함하는 샘플을 수득하는 단계,

b) 상기 샘플의 분취액을 환자에서의 자궁경부암 억제에 대해 시험할 복수개의 시험 조성물의 존재하에 개별적으로 유지시키는 단계,

c) 각각의 분취액에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현을 비교하는 단계 및

d) 시험 조성물 중에서, 특정 시험 조성물을 함유하는 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 다른 시험 조성물 중에서의 마커 발현 수준에 비해 저하되도록 유도하는 1종 이상을 환자에게 투여하는 단계

를 포함하는, 환자에서 자궁경부암을 억제하는 방법.

청구항 34.

표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현 평가용 시약을 포함하는, 환자가 자궁경부암을 앓고 있거나 또는 전-악성 상태인지 여부를 평가하는 키트.

청구항 35.

표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커에 상응하는 전사된 폴리뉴클레오티드와 특이적으로 결합하는 핵산 프로브를 포함하는, 자궁경부암 세포 또는 전-악성 자궁경부 세포 또는 병변의 존재를 평가하는 키트.

청구항 36.

a) 환자에서의 자궁경부암 억제에 대한 적합성을 평가할 복수개의 화합물 및

b) 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현 평가용 시약

을 포함하는, 복수개의 화합물 각각에 대하여 환자에서의 자궁경부암 억제에 있어서의 적합성을 평가하는 키트.

청구항 37.

표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커에 상응하는 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 인간 자궁경부암 세포 또는 전-악성 자궁경부 세포 또는 병변의 존재를 평가하는 키트.

청구항 38.

a) 자궁경부 세포의 별개의 분취액을 자궁경부 세포의 발암 잠재력을 평가할 시험 화합물의 존재 및 부재하에 유지시키는 단계 및

b) 각각의 분취액에서 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현을 비교하는 단계

를 포함하고, 이때 시험 화합물의 존재하에 유지된 분취액 중에서의 마커 발현 수준이 상기 시험 화합물의 부재하에 유지된 분취액 중에서의 마커 발현 수준에 비해 유의하게 증가된 것이 상기 시험 화합물이 인간 자궁경부 세포의 발암 잠재력을 보유한다는 지표인, 시험 화합물을 자궁경부 세포의 발암 잠재력에 대해 평가하는 방법.

청구항 39.

자궁경부 세포 및 표 1에 기재한 마커로 구성된 군에서 선택된 마커의 발현 평가용 시약을 포함하는, 시험 화합물을 자궁경부 세포의 발암 잠재력에 대해 평가하는 키트.

청구항 40.

표 1에 기재한 마커로부터 선택된 마커에 상응하는 폴리뉴클레오티드에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 자궁경부암을 앓고 있는 환자의 세포에 제공하는 단계를 포함하는, 자궁경부암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 41.

자궁경부암의 발병 위험이 있는 환자에서 표 1에 기재한 마커로부터 선택된 마커에 상응하는 유전자의 발현을 억제하는 단계를 포함하는, 자궁경부암의 발병 위험이 있는 환자에서 자궁경부암을 억제하는 방법.

청구항 42.

표 2 및 표 3에 기재한 뉴클레오티드 서열로 구성된 군에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 43.

제42항의 핵산 분자를 함유하는 벡터.

청구항 44.

제42항의 핵산 분자를 함유하는 숙주 세포.

청구항 45.

서열 1, 7, 9, 11, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 33 및 43으로 구성된 군에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코딩되는 단리된 폴리펩티드.

청구항 46.

제45항의 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 항체.

청구항 47.

서열 2, 8, 10, 20, 22, 26, 28 및 44의 아미노산 서열로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단리된 폴리펩티드.

청구항 48.

제47항의 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 항체.

요약

본 발명은 형성장애와 같은 전-악성 상태 등을 포함하는 자궁경부암과 관련된 핵산 분자 및 단백질에 관한 것이다. 인간 자궁경부암을 검출, 특징규명, 예방 및 치료하기 위한 조성물, 키트 및 방법도 제공된다.

대표도

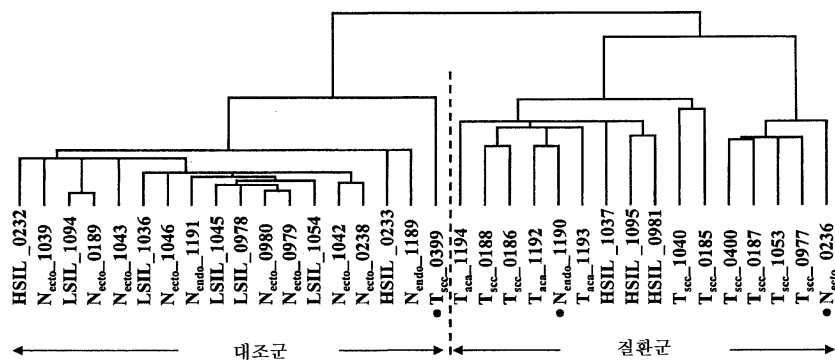
도 1

색인어

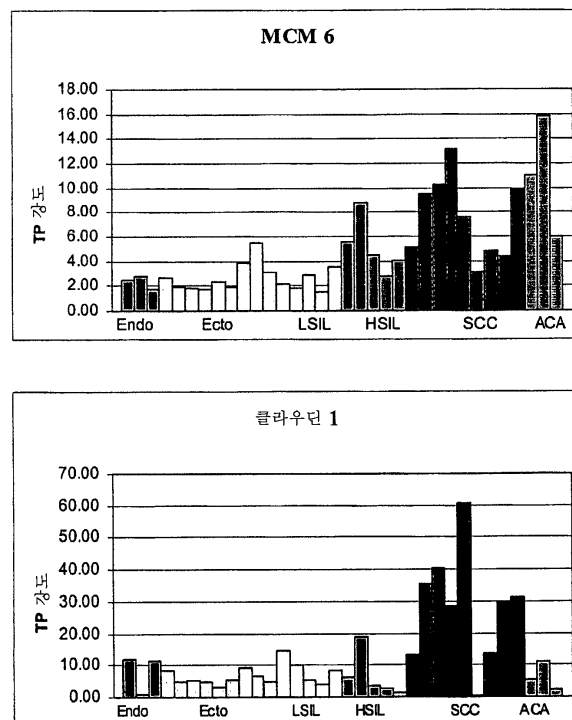
자궁경부암, 전-악성 상태, 조성물, 키트, 예방, 치료, 핵산, 단백질

도면

도면1



도면2



<120> COMPOSITIONS, KITS, AND METHODS FOR IDENTIFICATION,
ASSESSMENT, PREVENTION, AND THERAPY OF CERVICAL
CANCER

<130> MRI-062PC

<150> 60/404770

<151> 2002-08-20

<160> 44

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2848

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
actttccctt tcgaattcct cggatatatct tggggactgg aggacctgtc tggttattat 60
acagacgcat aactggaggt gggatccaca cagctcagaa cagctggatc ttgctcagtc 120
tctgccaggg gaagattcct tggaggaggc cctgcagcga catggaggga gctgctttgc 180
tgagagtctc tgtcctctgc atctggatga gtgcactttt ccttgggtgtg ggagtgaggg 240
cagaggaagc tggagcgagg gtgcaacaaa acgttccaag tgggacagat actggagatc 300
ctcaaagtaa gcccctcggg gactgggctg ctggcaccat ggaccagag agcagtatct 360
ttattgagga tgccattaag tatttcaagg aaaaagttag cacacagaat ctgctactcc 420
tgctgactga taatgaggcc tggaacggat tctgtggctgc tgctgaactg cccaggaatg 480
aggcagatga gctccgtaaa gctctggaca accttgcaag acaaatgatc atgaaagaca 540
aaaactggca cgataaaggc cagcagtaca gaaactgggt tctgaaagag tttcctcggg 600
tgaaaagtaa gcttgaggat aacataagaa ggctccgtgc ccttgagatc ggggttcaga 660
aggtccacaa aggcaccacc atcgccaatg tgggtgtctg ctctctcagc atttcctctg 720
gcacctgac cctcgtcggc atgggtctgg cacccttcac agagggaggc agccttgtac 780
tcttggaacc tgggatggag ttgggaatca cagcagcttt gaccgggatt accagcagta 840
ccatagacta cggaaaagaag tggtagacac aagcccaagc ccacgacctg gtcacaaaa 900
gccttgacaa attgaaggag gtgaaggagt ttttgggtga gaacatatcc aactttcttt 960
ccttagctgg caatacttac caactcacac gaggcattgg gaaggacatc cgtgccctca 1020
gacgagccag agccaatctt cagtcagtag cgcagcctc agcctcacgc ccccggtca 1080
ctgagccaat ctcagctgaa agcggtagac aggtggagag agttaatgaa cccagcatcc 1140
tggaatgag cagaggagtc aagctcacgg atgtggcccc tgtaagcttc tttcttctgc 1200
tgtagtagt ctacctcgtg tacgaatcaa agcacttaca tgagggggca aagtcagaga 1260
cagctgagga gctgaagaag gtggctcagg agctggagga gaagctaaac attctcaaca 1320
ataattataa gattctgcag gcggaccaag aactgtgacc acagggcagg gcagccacca 1380
ggagagatat gcctggcagg ggccaggaca aaatgcaaac tttttttttt ttctgagaca 1440
gagcttctgt ctgtcgccaa gttggagtgc aatgggtgca tctcagctca ctgcaagctc 1500
tgctcccggt gttcaagcga ttctcctgcc ttggcctccc aagtagctgg gactacaggc 1560
gcctaccacc atgcccagct aatttttgta tttttaatag agatgggggt tcaccatgtt 1620
ggccaggatg gtctcgatct cctgacctct tgatctgccc accttggcct cccaaagtgc 1680
tgggattaca ggcgtgagcc atcgcttttg acccaaatgc aaacatttta ttagggggat 1740
aaagagggtg aggtaaagt ttatggaactg agtgtaggg actttggcat ttccatagct 1800
gagcacagca ggggaggggt taatgcagat ggcagtgcag caaggagaag gcaggaacat 1860
tgagagctgc aataaggga aaatgggaac tggagagtgt ggggaatggg aagaagcagt 1920
ttactttaga ctaaaagaata tattgggggg cgggtgttag tggctcatgc ctgtaatccg 1980
agcacttttg gaggccaaag cgggcggatc acgaggtcag gagatcaaga ccacctggc 2040
taacacagtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaaa ttagccgggc atggtggcgg 2100
gcgctgttag ttccagctaa ctgggcggct gaggcaggag aatggcgtga acctgggagg 2160
tgagagcttc agtgagccga gatatcgcca ctgcactcca gcctgggtga cagagcgaga 2220
ctccatctca aaaaaaaaaa aaaaaagaat atattgacgg aagaatagag aggaggcttg 2280
aaggaaccag caatgagaag gccaggaaaa gaaagagctg aaaatggaga aagccaaga 2340
```

```

gttagaacag ttggatacag gagaagaaac agcgggtcca ctacagaccc agccccaggt 2400
tcaatgtcct ccgaagaatg aagtctttcc ctgggtgatgg tcccctgccc tgtctttcca 2460
gcatccactc tcccttgtcc tcctgggggc atatctcagt caggcagcgg cttcctgatg 2520
atggtcgttg ggggtggttg catgtgatgg gtccccctcca gggtactaaa ggggtgcatgt 2580
cccctgcttg aacactgaag ggcagggtggg gggccatggc catgggtcccc agctgaggag 2640
cagggtgtccc tgagaaccca aacttcccag agagtatgtg agaaccaacc aatgaaaaca 2700
gtcccatcgc tcttaccggg taagtaaaca gtcagaaaat tagcatgaaa gcagtttagc 2760
attgggagga agctcagatc tctagagctg tcttgtcgcc gcccaggatt gacctgtgtg 2820
taagtcccaa taaactcacc tactcatc 2848

```

<210> 2

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Glu Gly Ala Ala Leu Leu Arg Val Ser Val Leu Cys Ile Trp Met
 1          5          10          15
Ser Ala Leu Phe Leu Gly Val Gly Val Arg Ala Glu Glu Ala Gly Ala
 20          25          30
Arg Val Gln Gln Asn Val Pro Ser Gly Thr Asp Thr Gly Asp Pro Gln
 35          40          45
Ser Lys Pro Leu Gly Asp Trp Ala Ala Gly Thr Met Asp Pro Glu Ser
 50          55          60
Ser Ile Phe Ile Glu Asp Ala Ile Lys Tyr Phe Lys Glu Lys Val Ser
 65          70          75          80
Thr Gln Asn Leu Leu Leu Leu Thr Asp Asn Glu Ala Trp Asn Gly
 85          90          95
Phe Val Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ala Asp Glu Leu Arg
100          105          110
Lys Ala Leu Asp Asn Leu Ala Arg Gln Met Ile Met Lys Asp Lys Asn
115          120          125
Trp His Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Arg Asn Trp Phe Leu Lys Glu Phe
130          135          140
Pro Arg Leu Lys Ser Lys Leu Glu Asp Asn Ile Arg Arg Leu Arg Ala
145          150          155          160
Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val His Lys Gly Thr Thr Ile Ala Asn
165          170          175
Val Val Ser Gly Ser Leu Ser Ile Ser Ser Gly Ile Leu Thr Leu Val
180          185          190
Gly Met Gly Leu Ala Pro Phe Thr Glu Gly Gly Ser Leu Val Leu Leu
195          200          205
Glu Pro Gly Met Glu Leu Gly Ile Thr Ala Ala Leu Thr Gly Ile Thr
210          215          220
Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Gly Lys Lys Trp Trp Thr Gln Ala Gln Ala
225          230          235          240
His Asp Leu Val Ile Lys Ser Leu Asp Lys Leu Lys Glu Val Lys Glu
245          250          255
Phe Leu Gly Glu Asn Ile Ser Asn Phe Leu Ser Leu Ala Gly Asn Thr
260          265          270
Tyr Gln Leu Thr Arg Gly Ile Gly Lys Asp Ile Arg Ala Leu Arg Arg
275          280          285
Ala Arg Ala Asn Leu Gln Ser Val Pro His Ala Ser Ala Ser Arg Pro
290          295          300
Arg Val Thr Glu Pro Ile Ser Ala Glu Ser Gly Glu Gln Val Glu Arg
305          310          315          320
Val Asn Glu Pro Ser Ile Leu Glu Met Ser Arg Gly Val Lys Leu Thr
325          330          335

```

Asp Val Ala Pro Val Ser Phe Phe Leu Val Leu Asp Val Val Tyr Leu
 340 345 350
 Val Tyr Glu Ser Lys His Leu His Glu Gly Ala Lys Ser Glu Thr Ala
 355 360 365
 Glu Glu Leu Lys Lys Val Ala Gln Glu Leu Glu Glu Lys Leu Asn Ile
 370 375 380
 Leu Asn Asn Asn Tyr Lys Ile Leu Gln Ala Asp Gln Glu Leu
 385 390 395

<210> 3
 <211> 2545
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gtgctgggga gcagcgtggt tactgtgctt ggtcatgagc tgctgggaag ttgtgacttt 60
 cactttccct ttcgaattcc agggatatatc tgggaggccg gaggacgtgt ctggttatta 120
 cacagatgca cagctggacg tgggatccac acagctcaga acagttggat cttgctcagt 180
 ctctgtcaga ggaagatccc ttggacaaga ggaccctgcc ttggtgtgag agtgagggaa 240
 gaggaagctg gaacgagggt taaggaaaac cttccagtct ggacagtgac tggagagctc 300
 caaggaaagc ccctcggtaa ccagccgct ggcaccatga acccagagag cagtatcttt 360
 attgaggatt accttaagta tttccaggac caagttagca gagagaatct gctacaactg 420
 ctgactgatg atgaagcctg gaatggattc gtggctgctg ctgaactgcc cagggatgag 480
 gcagatgagc tccgtaaaagc tctgaacaag cttgcaagtc acatgggtcat gaaggacaaa 540
 aaccgccacg ataaagacca gcagcacagg cagtggtttt tgaaagagtt tcctcggttg 600
 aaaagggagc ttgaggatca cataaggaag ctccgtgccc ttgcagagga ggttgagcag 660
 gtccacagag gcaccaccat tgccaatgtg gtgtccaact ctgttggcac tacctctggc 720
 atcctgaccc tcctcggcct gggctctggca cccttcacag aaggaatcag ttttgtgctc 780
 ttggacactg gcatgggtct gggagcagca gctgctgtgg ctgggattac ctgcagtgtg 840
 gtagaactag taaacaaatt gcgggcacga gcccaagccc gcaacttggc ccaaagcggc 900
 accaatgtag caaaggtgat gaaggagttt gtgggtggga acacacccaa tgttcttacc 960
 ttagttgaca attggtacca agtcacacaa gggattggga ggaacatccg tgccatcaga 1020
 cgagccagag ccaaccctca gttaggagcg tatgccccac cccgcatat cattgggcga 1080
 atctcagctg aaggcgggtga acaggttgag agggttgttg aaggccccgc ccaggcaatg 1140
 agcagaggaa ccatgatcgt ggggtgcagcc actggaggca tcttgcttct gctggatgtg 1200
 gtcagccttg catatgagtc aaagcacttg cttgaggggg caaagtcaga gtcagctgag 1260
 gagctgaaga agcgggctca ggagctggag gggaaagctca actttctcac caagatccat 1320
 gagatgctgc agccaggcca agaccaatga cccagagca gtgcagccac cagggcagaa 1380
 atgccgggca caggccagga caaatgcag actttttttt tttttttttt ttttttttga 1440
 gatggagtct cgctctatcg ccaggatgg agtgacagtgg ctcaatctcg gctcactgca 1500
 aactccgcct cccgggttca caccattctc cggcctcagt ctcccagta gctgggacta 1560
 caggcacctg ccaccacgcc cggctaattt ttttgtattt tcaactggaga cggggtttca 1620
 ctgtgttagc cacgatggtc tccatctcct gacctcgtga tctgcccacc tcggcctccc 1680
 aaagtgtctg gattacaggc gtgagccacc gcgcctggcc aaaatgcaga cattttatta 1740
 gggggataag gagggcaagg taaagcttat ggaactgagt gttagtact ttggcatttg 1800
 ttagactgag cacagcaagg gaggggttaa tgcagatggc aagtgcacca aggagaaggc 1860
 aggaacactg gagcctgcaa taaggagga gagaggactg gagagtgtgg ggaatgggaa 1920
 gaagtagttt actttggact aaagaatata ttgggcgaag aatagagggg gagcttgagc 1980
 gaaccagcaa tgagaaggcc aggaaaagaa agagctgaaa atggagaaaa ccagagttag 2040
 aactgttgga tacaggagaa gaaacagcag ctccactacc gacccccccc caggtttgat 2100
 gtccttccaa gaataaagtc tttccctggt gatggtctct cgctctgtct ttccagcatc 2160
 cactctccct tgtccttctg ggggtgtatc acagtcagcc agtggcttct tcatgatggg 2220
 ggttggggtg gttgtcatgt gacgggtccc ctccaggtta ctaaaggggt catgtccctc 2280
 gcttgaacc tgagaggcag gtggtaggcc atggccacaa tcccagctg aggagcaggt 2340
 gtccttgaga acccaaactt ccagagaggt atctgagaac caaccaatga aaacagtccc 2400

atcgctcttta gccggtaagt aaacagtcag aagattagca tgaaagcagt ttagcattgg 2460
gaggaagcac agatctctag agctgtcctg tcgctgccca ggattgacct gtgtgtaagt 2520
cccaataaac tcacctactc accaa 2545

<210> 4
<211> 337
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Asn Pro Glu Ser Ser Ile Phe Ile Glu Asp Tyr Leu Lys Tyr Phe
1 5 10 15
Gln Asp Gln Val Ser Arg Glu Asn Leu Leu Gln Leu Leu Thr Asp Asp
20 25 30
Glu Ala Trp Asn Gly Phe Val Ala Ala Glu Leu Pro Arg Asp Glu
35 40 45
Ala Asp Glu Leu Arg Lys Ala Leu Asn Lys Leu Ala Ser His Met Val
50 55 60
Met Lys Asp Lys Asn Arg His Asp Lys Asp Gln Gln His Arg Gln Trp
65 70 75 80
Phe Leu Lys Glu Phe Pro Arg Leu Lys Arg Glu Leu Glu Asp His Ile
85 90 95
Arg Lys Leu Arg Ala Leu Ala Glu Glu Val Glu Gln Val His Arg Gly
100 105 110
Thr Thr Ile Ala Asn Val Val Ser Asn Ser Val Gly Thr Thr Ser Gly
115 120 125
Ile Leu Thr Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ala Pro Phe Thr Glu Gly Ile
130 135 140
Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr Gly Met Gly Leu Gly Ala Ala Ala Ala
145 150 155 160
Val Ala Gly Ile Thr Cys Ser Val Val Glu Leu Val Asn Lys Leu Arg
165 170 175
Ala Arg Ala Gln Ala Arg Asn Leu Asp Gln Ser Gly Thr Asn Val Ala
180 185 190
Lys Val Met Lys Glu Phe Val Gly Gly Asn Thr Pro Asn Val Leu Thr
195 200 205
Leu Val Asp Asn Trp Tyr Gln Val Thr Gln Gly Ile Gly Arg Asn Ile
210 215 220
Arg Ala Ile Arg Arg Ala Arg Ala Asn Pro Gln Leu Gly Ala Tyr Ala
225 230 235 240
Pro Pro Pro His Ile Ile Gly Arg Ile Ser Ala Glu Gly Gly Glu Gln
245 250 255
Val Glu Arg Val Val Glu Gly Pro Ala Gln Ala Met Ser Arg Gly Thr
260 265 270
Met Ile Val Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ile Leu Leu Leu Leu Asp Val
275 280 285
Val Ser Leu Ala Tyr Glu Ser Lys His Leu Leu Glu Gly Ala Lys Ser
290 295 300
Glu Ser Ala Glu Glu Leu Lys Lys Arg Ala Gln Glu Leu Glu Gly Lys
305 310 315 320
Leu Asn Phe Leu Thr Lys Ile His Glu Met Leu Gln Pro Gly Gln Asp
325 330 335
Gln

<210> 5
 <211> 2100
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 agacgccccg aggtcggagt gaagcgccgg gaccgagccc cgtctcccag ggagtccggg 60
 gcgcacggca cccaggagag cgccgggagcc aacctgggcg catcatgcgc agggccccgg 120
 acgctggggc ggtctacacc gccgcctggg tcacgtggcc cggacgggccc ggccggctgcc 180
 ccggccgggg ggccgggggtc gcgcgggggt tgcgctggac gacggagagc ggccgggccc 240
 cagcggcctg gagcctccca acccgcgccg cgtctggcct cgagcgtagg agccgcccc 300
 tgcccccccg cgccggcccc gcgcggcgcc gcccgcccc tatatagcgc gccccagcag 360
 ggcccgcgcc aggccgccag cctcggagtg ggccggggac agtgcgcgcc gccccgcagc 420
 caggcccccg cccccgccg atccacctcc tccgcgcct gcgacccaac gggcgcccc 480
 cgcccgggca gctgccgcg ggcccccgcc gccaccatga agaaggaggt gtgctccgtg 540
 gccttctca aggcgtgtt cgcagagttc ttggccacc tcattcttctg cttcttttggc 600
 ctgggctcgg ccctcaagtg gccgtcggcg ctgcctacca tctgcagat cgcgctggcg 660
 tttggcctgg ccataggcac gctggcccag gccctgggac ccgtgagcgg cggccacatc 720
 aaccccgcca tcacctggc cctcttgggt ggcaaccaga tctcgtctgt ccgggctttc 780
 ttctacgtgg cgcccagct ggtggcgcc attgcgggg ctggcctcct ctacggtgtg 840
 gcaccgtca atgcccggg caatctggcc gtcaacgcgc tcaacaaca cacaacgcag 900
 ggccaggcca tgggtggtga gctgattctg accttccagc tggcactctg catcttcgcc 960
 tccactgact cccgccgcac cagccctgtg ggctccccag ccctgtccat tggcctgtct 1020
 gtcacctgg gccacctgt cggaatctac ttcactggct gtcctatga cccagccccg 1080
 tcttttggcc ctgcggtgt catgaatcgg ttcagcccc ctactgggt tttctgggta 1140
 gggcccatcg tggggcggt cctggctgcc atcctttact tctacctgt cttccccaac 1200
 tccttgagcc tgagtgcgc tgtggccatc atcaaaggca cgtatgagcc tgacgaggac 1260
 tgggaggagc agcgggaaga gcggaagaag accatggagc tgaccacccg ctgaccagt 1320
 tcaggcagg gccagcccct cagcccctga gccaaagggg aaaagaagaa aaagtaccta 1380
 acacaagctt cctttttgca caaccggtcc tcttggctga ggaggaggag ctggtcacc 1440
 tggctgcaca gttagagagg ggagaaggaa cccatgatgg gactcctggg gtaggggcca 1500
 ggggtgggg tctgctgggg acaggtctct ctgggacaga cctcagagat tgtgaatgca 1560
 gtgccaagct cacaggctgc aagggccagg ccagaaaagg gtgggcctgc agcctgcacc 1620
 cccacacctt cccaaccctt cctcaagagc tgaagggatc ccagccccta ggtgggcaga 1680
 ggcagaccct cccagagct ccttaggaag aagacagact ggttcattga atgccgcctt 1740
 atttatttct ggtgaggatg catgcgtggg gctgctggtg tttagagtgg gggctacca 1800
 ataaatcact gatactcaaa acaccagcag acctcccca gagtcctta ggaagaagac 1860
 agactggttc attgaatgcc gccttattta tttctggtga ggatgcatgc gtggggctgc 1920
 tgggttttag agtgggggct acccaataaa tctactgata tcacattccg cctctgtctc 1980
 tctcagagt gccttgagac actctggccc attgcctctc ctctttgtca tcccacatcc 2040
 tccaccacga tctccacagg gtaccagggg accccaggac aagtgtctctg tgggaagaaa 2100

<210> 6
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Lys Lys Glu Val Cys Ser Val Ala Phe Leu Lys Ala Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Glu Phe Leu Ala Thr Leu Ile Phe Val Phe Phe Gly Leu Gly Ser Ala
 20 25 30
 Leu Lys Trp Pro Ser Ala Leu Pro Thr Ile Leu Gln Ile Ala Leu Ala
 35 40 45
 Phe Gly Leu Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gln Ala Leu Gly Pro Val Ser
 50 55 60

Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Ile Thr Leu Ala Leu Leu Val Gly Asn
65 70 75 80
Gln Ile Ser Leu Leu Arg Ala Phe Phe Tyr Val Ala Ala Gln Leu Val
85 90 95
Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gly Ile Leu Tyr Gly Val Ala Pro Leu Asn
100 105 110
Ala Arg Gly Asn Leu Ala Val Asn Ala Leu Asn Asn Asn Thr Thr Gln
115 120 125
Gly Gln Ala Met Val Val Glu Leu Ile Leu Thr Phe Gln Leu Ala Leu
130 135 140
Cys Ile Phe Ala Ser Thr Asp Ser Arg Arg Thr Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Pro Ala Leu Ser Ile Gly Leu Ser Val Thr Leu Gly His Leu Val Gly
165 170 175
Ile Tyr Phe Thr Gly Cys Ser Met Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Pro
180 185 190
Ala Val Val Met Asn Arg Phe Ser Pro Ala His Trp Val Phe Trp Val
195 200 205
Gly Pro Ile Val Gly Ala Val Leu Ala Ala Ile Leu Tyr Phe Tyr Leu
210 215 220
Leu Phe Pro Asn Ser Leu Ser Leu Ser Glu Arg Val Ala Ile Ile Lys
225 230 235 240
Gly Thr Tyr Glu Pro Asp Glu Asp Trp Glu Glu Gln Arg Glu Glu Arg
245 250 255
Lys Lys Thr Met Glu Leu Thr Thr Arg
260 265

<210> 7
<211> 1935
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
agacgccccg aggtcggagt gaagcgccgg gaccgagccc cgtctcccag ggagtccggg 60
gcgcacggca ccgaggagag cgcgggagcc aacctgggcg catcatgcgc agggcccggg 120
acgctggggc ggtctacacc gccgcctggg tcacgtggcc cggacgggccc ggcggtgcc 180
ccggccgggg ggcggggggt gcgcgggggt tgcgctggac gacggagagc ggcgggcccc 240
cagcggcctg gagcctccca acccgcgccg cgtctggccct cgagcgtagg agccgcccc 300
tgcccccccg cgccggcccc gcgcccggcc gcccgcccc tatatagcgc gccccagcag 360
ggccccgcgc aggcgcgcag cctcggagtg ggcgcgggac agtgcgcggc gccccgcagc 420
caggcccccg ccccgccgc atccacctc tcgcgcgct gcgacccaac gggcgcccc 480
cgccgcggca gctgccgcg ggcccccgcg gccacctga agaaggaggt gtgctccgtg 540
gccttcctca aggcctgtt cgcagagttc ttggccacc tcattcttctg cttctttggc 600
ctgggctcgg ccctcaagtg gccgtcggcg ctgcctacca tcctgcagat cgcgctggcg 660
tttggcctgg ccataggcac gctggcccag gccctgggac ccgtgagcgg cggccacatc 720
aaccgcca tcaccctggc cctcttgggt ggcaaccaga tctcgtctgt ccgggctttc 780
ttctacgtgg cgcccagct ggtgggcgc attgccggg ctggcatcct ctacggtgtg 840
gcaccgctca atgcccgggg caatctggcc gtcaacgcga tctacttcac tggtgtctcc 900
atgaaccag cccgctcttt tggccctgcg gtggtcatga atcggttcag ccccgctcac 960
tggtgtttct gggtagggcc catcgtgggg gcggtcctgg ctgccatcct ttactttctac 1020
ctgctcttcc ccaactccct gagcctgagt gagcgtgtgg ccatcatcaa aggcacgtat 1080
gagcctgacg aggactggga ggagcagcgg gaagagcggg agaagaccat ggagctgacc 1140
accgctgac cagtgtcagg caggggccag cccctcagcc cctgagccaa gggggaaaag 1200
aagaaaaagt acctaacaca agcttcttt ttgcacaacc ggtcctcttg gctgaggagg 1260
aggagctggt caccctggct gcacagttag agaggggaga aggaacccat gatgggactc 1320
ctggggtagg ggccaggggc tgggtctgc tggggacagg tctctctggg acagacctca 1380


```

gagattgtga atgcagtgcc aagctcacag gctgcaaggg ccaggccaga aaaggggtggg 1440
cctgcagcct gcacccccca ccttccccaa cccttcctca agagctgaag ggatcccagc 1500
ccctaggtgg gcagaggcag accctcccca gagctcctta ggaagaagac agactgggttc 1560
attgaatgcc gccttatatta tttctggtga ggatgcatgc gtgggggtgc tgggtgtttag 1620
agtgggggct acccaataaaa tcaactgatac tcaaaacacc agcagaccct ccccagagct 1680
ccttaggaag aagacagact gggttcattga atgcccgcctt atttatttct ggtgaggatg 1740
catgcgtggg gctgctggtg tttagagtgg gggctaccca ataaatcact gatactcaca 1800
ttccgcctct gtctctcctc agagtgcctt gagacactct ggcccattgc ctctcctctt 1860
tgtcatccca catcctccac cacgatctcc acaggggtacc aggggacccc aggacaagtg 1920
ctctgtggga agaaa 1935

```

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

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 2180
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9

agacgccccg	aggctcggagt	gaagcgccgg	gaccgagccc	cgtctcccag	ggagtccggg	60
gcgcacggca	ccgaggagag	cgcgggagcc	aacctgggcg	catcatgcgc	agggcccggg	120
acgctggggc	ggtctacacc	gccgcctggg	tcacgtggcc	cggacggggc	ggcggctgcc	180
ccggccgggg	ggcgggggtc	gcgccggggg	tgcgctggac	gacggagagc	ggcggggccc	240
cagcggcctg	gagcctccca	acccgcgccg	cgctggccct	cgagcgtagg	agccgcccc	300

```

tgcccccccg cgccggcccc gcgcccggcc gcccgcccc tatatagcgc gccccagcag 360
ggcccgcgcc aggccgccag cctcgagtg ggcgcgggac agtgcgcggc gccccgcagc 420
caggcccccg cccccgcgc atccacctcc tccgcgcct gcgaccaac gggcgcccc 480
cgccgcggca gctgccgcg ggcccccgc gccaccatga agaaggaggt gtgctccgtg 540
gccttctca aggccgtgtt cgcagagttc ttggccaccc tcatcttcgt cttctttggc 600
ctgggctcgg ccctcaagt ggcgtcggcg ctgcctacca tctgcagat cgcgctggcg 660
tttggcctgg ccataggcac gctggcccag gccctgggac ccgtgagcgg cggccacatc 720
aaccgccca tcaccctggc cctcttgggt ggcaaccaga tctcgtctgt ccgggctttc 780
ttctacgtgg cggcccagct ggtgggcgc attgcgggg ctggcatcct ctacggtgtg 840
gcaccgctca atgcccgggg caatctggcc gtcaacgcgc tcaacaacaa cacaacgcag 900
ggccaggcca tgggtgtgga gctgattctg accttcacgc tggcactctg catcttcgcc 960
tccactgact cccgcgcac cagccctgtg ggtccccag ccctgtccat tggcctgtct 1020
gtcaccttg gccacctgt cggaatctac ttcactggct gtcctatgaa cccagccgc 1080
tcttttggcc ctgcggtgt catgaatcgg ttcagcccc ctactgggg tctgcttcta 1140
tcctgcgtg gaggggacac gcgctctgt catccgtctc tctgaggacc cacgtgtccc 1200
ctctgaaggt tttctgggtg gggcccatcg tggggcggt cctggctgcc atcctttact 1260
tctacctgt cttccccaac tccctgagcc tgagtgcg tgtggccatc atcaaaggca 1320
cgtatgagcc tgacgaggac tgggaggagc agcgggaaga gcggaagaag accatggagc 1380
tgaccaccgc ctgaccagt tcaggcaggg gccagccct cagcccctga gccaaagggg 1440
aaaagaagaa aaagtacct acacaagctt cctttttgca caaccggtcc tcttggctga 1500
ggaggaggag ctggtcaccc tggctgcaca gttagagagg ggagaaggaa cccatgatgg 1560
gactcctggg gtaggggcca ggggctgggg tctgctgggg acaggtctct ctgggacaga 1620
cctcagagat tgtgaatgca gtgccaaagt cacaggctgc aagggccagg ccagaaaagg 1680
gtgggctgc agcctgcacc cccacacct cccaaccctt cctcaagagc tgaagggatc 1740
ccagccccta ggtgggcaga ggcagacct cccagagct ccttaggaag aagacagact 1800
ggttcattga atgcccctt atttatttct ggtgaggatg catgcgtggg gctgctggtg 1860
tttagagtgg gggctaccca ataaatcact gatactcaaa acaccagcag accctcccca 1920
gagctcctta ggaagaagac agactggttc attgaatgcc gccttattta tttctggtga 1980
ggatgcatgc gtggggctgc tgggtgttag agtgggggct acccaataaa tctactgatac 2040
tcacattccg cctctgtctc tcctcagagt gccttgagac actctggccc attgcctctc 2100
ctctttgtca tcccacatcc tccaccacga tctccacagg gtaccagggg accccaggac 2160
aagtgtctct tgggaagaaa
2180

```

<210> 10
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Lys	Lys	Glu	Val	Cys	Ser	Val	Ala	Phe	Leu	Lys	Ala	Val	Phe	Ala
1				5					10					15	
Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Leu	Ile	Phe	Val	Phe	Phe	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala
			20					25					30		
Leu	Lys	Trp	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Thr	Ile	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Ala
		35					40					45			
Phe	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Pro	Val	Ser
	50					55					60				
Gly	Gly	His	Ile	Asn	Pro	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Asn
65					70					75					80
Gln	Ile	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Phe	Phe	Tyr	Val	Ala	Ala	Gln	Leu	Val
				85					90					95	
Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Leu	Tyr	Gly	Val	Ala	Pro	Leu	Asn
			100					105					110		
Ala	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Asn	Thr	Thr	Gln
		115					120					125			
Gly	Gln	Ala	Met	Val	Val	Glu	Leu	Ile	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu	Ala	Leu
		130					135					140			
Cys	Ile	Phe	Ala	Ser	Thr	Asp	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Val	Gly	Ser

145		150		155		160									
Pro	Ala	Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	His	Leu	Val	Gly
		165		170		175									
Ile	Tyr	Phe	Thr	Gly	Cys	Ser	Met	Asn	Pro	Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Pro
		180		185		190									
Ala	Val	Val	Met	Asn	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	His	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu
		195		200		205									
Ser	Leu	Arg	Gly	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Val	His	Pro	Ser	Leu		
	210			215		220									

<210> 11
 <211> 1051
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

cctaactcca ggccagactc cttagcacc ccccctaact ccaggccaga ctcctttcag 60
ctaaaggggt ggaattcatg gcatctactt cgtatgacta ttgcagagtg cccatggaag 120
acggggataa gcgctgtaag cttctgctgg ggataggaat tctggtgctc ctgatcatcg 180
tgattctggg ggtgcccttg attatcttca ccatcaaggc caacagcgag gcctgccggg 240
acggccttcg ggcagtgatg gagtgtcgca atgtcaccca tctcctgcaa caagagctga 300
ccgaggccca gaagggtttt caggatgtgg agggccaggc cgccacctgc aaccacactg 360
tgatggccct aatggcttcc ctggatgcag agaaggccca aggacaaaag aaagtggagg 420
agcttgaggg agagatcact acattaaacc ataagcttca ggacgcgtct gcagaggtgg 480
agcgactgag aagagaaaaac caggtcttaa gcgtgagaat cgcggaacaag aagtactacc 540
ccagctccca ggactccagc tccgctgcgg cgccccagct gctgattgtg ctgctggggc 600
tcagcgctct gctgcagtga gatcccagga agctggcaca tcttggaagg tccgtcctgc 660
tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac 720
acggttagcg gggagagcac ggggtagccg gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg 780
gccatggggc agtcctgggt gtggggacac agtcggggtt acccagggtc gtctccctcc 840
agagcctccc tccggacaat gagtcccccc tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg 900
ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt tgttatgggt tttttttgcg ggggggggtg 960
cttttttctg ggggtcttga gctccaaaaa ataaacactt cctttgaggg agagcaaaaa 1020
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a                                     1051
    
```

<210> 12
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Ala	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Arg	Val	Pro	Met	Glu	Asp	Gly
1				5				10					15		
Asp	Lys	Arg	Cys	Lys	Leu	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Ile	Leu	Val	Leu	Leu
		20						25					30		
Ile	Ile	Val	Ile	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Ile	Ile	Phe	Thr	Ile	Lys	Ala
		35					40					45			
Asn	Ser	Glu	Ala	Cys	Arg	Asp	Gly	Leu	Arg	Ala	Val	Met	Glu	Cys	Arg
		50				55					60				
Asn	Val	Thr	His	Leu	Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Lys	Gly
				70						75				80	
Phe	Gln	Asp	Val	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Thr	Cys	Asn	His	Thr	Val	Met
			85						90					95	
Ala	Leu	Met	Ala	Ser	Leu	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Gln	Gly	Gln	Lys	Lys
		100						105				110			
Val	Glu	Glu	Leu	Glu	Gly	Glu	Ile	Thr	Thr	Leu	Asn	His	Lys	Leu	Gln
		115					120					125			

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
 130 135 140
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
 165 170 175
 Ala Leu Leu Gln
 180

<210> 13
 <211> 3445
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gagcaaccgc agcttctagt atccagactc cagcgccgccc ccggggcgccg accccaaccc 60
 cgaccagag cttctccagc ggcggcgcag cgagcagggc tccccgcctt aacttctctc 120
 gcggggccca gccaccttcg ggagtcgggg ttgcccacct gcaaactctc cgcttctctg 180
 acctgccacc cctgagccag cgcgggcgcc cgagcagagc atggccaacg cggggctgca 240
 gctgttgggc ttcatctctg ccttcctggg atggatcggc gccatcgta gcaactgcct 300
 gccccagtgg aggatctact cctatgccgg cgacaacatc gtgaccgcc aggccatgta 360
 cgaggggctg tggatgtcct gcgtgtcgca gagcaccggg cagatccagt gcaaagtctt 420
 tgactccttg ctgaatctga gcagcacatt gcaagcaacc cgtgccttga tgggtggttg 480
 catcctcctg ggagtgatag caatctttgt ggccaccgtt ggcatgaagt gtatgaagt 540
 cttggaagac gatgaggtgc agaagatgag gatggctgtc attgggggtg cgatatttct 600
 tcttgacagt ctggctatct tagttgccac agcatgggtat ggcaatagaa tcgttcaaga 660
 attctatgac cctatgaccc cagtcaatgc caggtagcaa ttgggtcagg ctctcttcac 720
 tggctgggct gctgcttctc tctgccttct gggaggtgcc ctactttgct gttcctgtcc 780
 ccgaaaaaca acctcttacc caacaccaag gccctatcca aaacctgcac cttccagcgg 840
 gaaagactac gtgtgacaca gaggcaaaaag gagaaaaatca tgttgaaaca aaccgaaaat 900
 ggacattgag atactatcat taacattagg accttagaat tttgggtatt gtaatctgaa 960
 gtatgggtatt acaaaacaaa caaacaacaa aaaaacccat gtgttaaaat actcagtgtc 1020
 aaacatggct taatcttatt ttatcttctt tctcaatat aggagggaag atttttccat 1080
 ttgtattact gcttccatt gagtaatcat actcaattgg gggaaggggt gctccttaaa 1140
 tatatataga tatgtatata tacatgtttt tctattaaaa atagacagta aaatactatt 1200
 ctcatatgt tgatactagc atacttaaaa tatctctaaa ataggtaaat gtatttaatt 1260
 ccatattgat gaagatgttt attgggtatat tttctttttc gtctatata acatatgtaa 1320
 cagtcaaata tcatttactc ttcttcatta gctttgggtg cctttgccac aagacctagc 1380
 ctaatttacc aaggatgaat tctttcaatt cttcatgcgt gcccttttca tatacttatt 1440
 ttatttttta ccataatctt atagcacttg catcgttatt aagcccttat ttgttttgtg 1500
 tttcattggt ctctatctcc tgaatctaac acatttcata gcctacattt tagtttctaa 1560
 agccaagaag aatttattac aaatcagaac tttggaggca aatctttctg catgaccaa 1620
 gtgataaatt cctgttgacc ttcccacaca atccctgtac tctgacccat agcactcttg 1680
 tttgctttga aaatatgtt ccaattgagt agctgcatgc tgttccccca ggtgttgtaa 1740
 cacaacttta ttgattgaat ttttaagcta cttattcata gttttatatc cccctaaact 1800
 acctttttgt tccccattcc ttaattgtat tgttttccca agtgtaatta tcatgcgttt 1860
 tatatcttcc taataagggtg tgggtctgtt gtctgaacaa agtgctagac tttctggagt 1920
 gataatctgg tgacaaatat tctctctgta gctgtaagca agtcacttaa tctttctacc 1980
 tcttttttct atctgccaaa ttgagataat gatacttaac cagttagaag aggtagtgtg 2040
 aatattaatt agtttatatt actctcattc tttgaacatg aactatgcct atgtagtgtc 2100
 tttatttgct cagctggctg agacactgaa gaagtcactg aacaaaacct acacacgtac 2160
 cttcatgtga ttcactgcct tctctctct accagtcctat ttccactgaa caaaacctac 2220
 acacatacct tcatgtggtt cagtgccttc ctctctctac cagtctatct cactgaaca 2280
 aaacctacgc acataccttc atgtggctca gtgccttct ctctctacca gtctatttcc 2340
 attctttcag ctgtgtctga catgtttgtg ctctgttcca ttttaacaac tgctcttact 2400
 tttccagtct gtacagaatg ctatttcact tgagcaagat gatgtaatgg aaagggtgtt 2460
 ggcattggtg tctggagacc tggatttgag tcttgggtgt atcaatcacc gtctgtgttt 2520

```

gagcaaggca tttggctgct gtaagcttat tgcttcatct gtaagcgggtg gtttgtaatt 2580
cctgatcttc ccacctcaca gtgatgttgt ggggatccag tgagatagaa tacatgtaag 2640
tgtggttttg taatttaaaa agtgctatac taagggaaaag aattgaggaa ttaactgcat 2700
acgttttgggt gttgcttttc aaatgtttga aaacaaaaaa aatgttaaga aatgggtttc 2760
ttgccttaac cagtctctca agtgatgaga cagtgaagta aaattgagtg cactaaacaa 2820
ataagattct gaggaagtct tatcttctgc agtgagtatg gccgatgct ttctgtggct 2880
aaacagatgt aatgggaaga aataaaagcc tacgtgttgg taaatccaac agcaaggag 2940
atttttgaat cataataact cataagggtgc tatctgttca gtgatgccct cagagctctt 3000
gctgttagct ggcagctgac gctgctagga tagttagttt ggaaatggta cttcataata 3060
aactacacaa ggaaagtcag ccaactgtgtc ttatgaggaa ttggacctaa taaatttttag 3120
tgtgccttcc aaacctgaga atatatgctt ttggaagtta aaatttaaat ggcttttgcc 3180
acatacatag atcttcatga tgtgtgagtgt taattccatg tggatatcag ttaccaaaca 3240
ttacaaaaaa attttatggc ccaaaatgac caacgaaatt gttacaatag aatttatcca 3300
attttgatct ttttatattc ttctaccaca cctggaaaca gaccaataga cattttgggg 3360
ttttataata ggaatttgta taaagcatta ctctttttca ataaattgtt ttttaattta 3420
aaaaaaggaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3445

```

<210> 14
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 1850
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15

```

cgcgctcgca gctcgcaggc gccgcgtage cgtcgccacc gccgccagcc cgtgcgcctt 60
cggcgcgctac ccgcccgcgt cccatccccg ccgcccggcca gggcgcgctt cggcccgcctt 120
ggacagtgtc ccgctgcggc tccgcggcga tggccaccaaa gatcgacaaa gaggcttgcc 180
ggcgggcgta caacctggtg cgcgacgacg gctcggccgt catctgggtg actttttaa 240
atgacggctc caccatcgct cccggcgagc agggagcgga gtaccagcac ttcattccagc 300
agtgcacaga tgacgtccgg ttgtttgcct tcgtgcgctt caccaccggg gatgccatga 360
gcaagaggct caagtttgcc ctcatcacgt ggatcgggtg gaacgtcagc gggctgcagc 420
gcgccaaaac cgggacggac aagaccctgg tgaaggaggc cgtacagaat ttcgctaagg 480
agtttgtgat cagtgatcgg aaggagctgg aggaagattt catcaagagc gagctgaaga 540
aggcgggggg agccaattac gacgcccaga cggagtaacc ccagcccccg ccacaccacc 600
ccttgccaaa gtcattctgcc tgctccccgg gggagaggac cgccggcctc agctactagc 660
ccaccagccc accaggggaga aaagaagcca tgagaggcag cgcccggcac cctgtgtcca 720
cagcccccac cttcccgttt cccttagaac cctgcgctgt cctatctcat gacgctcatg 780
gaacctcttt ctttgcattt ctttttcttt tctccccctc tttttgttc taaagaaaag 840
tcattttgat gcaaggctct gcctgccatc agatccgagg tgctcctgc agtgaccctt 900
tttctgggca tttctcttcc acgcgacgag gtctgcctag tgagatctgc atgacctcac 960
gttgctttcc agagcccggg cctattttgc catctcagtt ttcttgacc ctgcttctctg 1020
tgtaccactg aggggcagct gggccaggag ctgtgcccgg tgctgcagc cttcataagc 1080
acacacgtcc attccctact aaggcccaga cctcctggta tctgccccgg gctccctcat 1140
cccacctcca tccggagttg cctaagatgc atgtccagca taggcaggat tgctcgggtg 1200
tgagaagggt aggtccggct cagactgaat aagaagagat aaaatttgcc ttaaaactta 1260
cctggcagtg gctttgctgc acggtctgaa accacctgtt cccaccctct tgaccgaaat 1320
ttccttgtga cacagagaag ggcaaaggct tgagcccaga gttgacggag ggagtatttc 1380
agggttcaact tcaggggctc ccaaagcgac aagatcggtt gggagagagg cccagggttg 1440
ggactgggaa ttaaggaga gctgggaacg gatcccttag gttcaggaag cttctgtgta 1500
agctgcgagg atggcttggg ccgaagggtt gctctgcccg ccgcgctagc tgtgagctga 1560
gcaaagccct gggctcacag cccccaaaa gcctgtggct tcagtcctgc gtctgcacca 1620
cacattcaaa aggatcggtt tgttttgttt ttaaagaaaag gtgagattgg cttgggttctt 1680
catgagcaca tttgatatag ctctttttct gtttttctct gctcatttcg ttttggggaa 1740
gaaatctgta ctgtattggg attgtaaaga acatctctgc actcagacag tttacagaaa 1800
taaattgttt ttttgttttt cagaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1850

```

<210> 16

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

Met Ala Thr Lys Ile Asp Lys Glu Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Leu
1           5           10           15
Val Arg Asp Asp Gly Ser Ala Val Ile Trp Val Thr Phe Lys Tyr Asp
20          25          30
Gly Ser Thr Ile Val Pro Gly Glu Gln Gly Ala Glu Tyr Gln His Phe
35          40          45
Ile Gln Gln Cys Thr Asp Asp Val Arg Leu Phe Ala Phe Val Arg Phe
50          55          60
Thr Thr Gly Asp Ala Met Ser Lys Arg Ser Lys Phe Ala Leu Ile Thr
65          70          75          80
Trp Ile Gly Glu Asn Val Ser Gly Leu Gln Arg Ala Lys Thr Gly Thr
85          90          95
Asp Lys Thr Leu Val Lys Glu Val Val Gln Asn Phe Ala Lys Glu Phe
100         105         110
Val Ile Ser Asp Arg Lys Glu Leu Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ser Glu
115         120         125
Leu Lys Lys Ala Gly Gly Ala Asn Tyr Asp Ala Gln Thr Glu
130         135         140

```

<210> 17
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 acacatccaa gcttaagacg gtgaggtcag cttcacattc tcaggaactc tccttctttg 60
 ggtctagctg aagttgagga tctcttactc tctaagccac ggaattaacc cgagcaggca 120
 tggaggcctc tgctctcacc tcatcagcag tgaccagtgt ggccaaagtg gtcaggggtg 180
 cctctggctc tgccgtagtt ttgcccctgg ccaggattgc tacagttgtg attggaggag 240
 ttgtggccat ggcggtctgt cccatggtgc tcagtgccat gggcttcact gcggcgggaa 300
 tcgcctcgtc ctccatagca gccaaagtga tgtccgcggc ggccattgcc aatgggggtg 360
 gattgaccaa gttcatcctg ggctccattg ggtctgccat tgcggctgtc attgagaggt 480
 tctactagct ccctgcccct cgccctgcag agaagagAAC catgccaggg gagaaggcac 540
 ccagccatcc tgaccacagc aggagccaac tatcccaaat atacctgggt gaaatatacc 600
 aaattctgca tctccagagg aaaataagaa ataaagtga attgttgcaa ctcttaaaaa 660
 aa 662

<210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ser Ser Ala Val Thr Ser Val Ala Lys
 1 5 10 15
 Val Val Arg Val Ala Ser Gly Ser Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Arg
 20 25 30
 Ile Ala Thr Val Val Ile Gly Gly Val Val Ala Met Ala Ala Val Pro
 35 40 45
 Met Val Leu Ser Ala Met Gly Phe Thr Ala Ala Gly Ile Ala Ser Ser
 50 55 60
 Ser Ile Ala Ala Lys Met Met Ser Ala Ala Ala Ile Ala Asn Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Val Ala Ser Gly Ser Leu Val Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala
 85 90 95
 Thr Gly Leu Ser Gly Leu Thr Lys Phe Ile Leu Gly Ser Ile Gly Ser
 100 105 110
 Ala Ile Ala Ala Val Ile Ala Arg Phe Tyr
 115 120

<210> 19
 <211> 653
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 acacatccaa gcttaagacg gtgaggtcag cttcacattc tcaggaactc tccttctttg 60
 ggtctagctg aagttgagga tctcttactc tctaagccac ggaattaacc cgagcaggca 120
 tggaggcctc tgctctcacc tcatcagcag tgaccagtgt ggccaaagtg gtcaggggtg 180
 cctctggctc tgccgtagtt ttgcccctgg ccaggattgc tacagttgtg attggaggag 240
 ttgtggctgt gccatggtg ctcagtgcc tgggcttcac tgcggcggga atcgctcgt 300
 cctccatagc agccaagtat atgtccgcgg cggccattgc caatgggggt ggagttgcct 360

cgggcagcct tgtggctact ctgcagtcac tgggagcaac tggactctcc ggattgacca 420
agttcatcct gggctccatt gggctctgcc ttgaggctgt cattgagagg ttctactagc 480
tccttgcccc tcgccctgca gagaagagaa ccatgccagg ggagaaggca cccagccatc 540
ctgaccacagc gaggagccaa ctatcccaaa tatacctggg tgaaatatac caaattctgc 600
atctccagag gaaaataaga aataaagatg aattgtttgca actcttaaaa aaa 653

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ser Ser Ala Val Thr Ser Val Ala Lys
1 5 10 15
Val Val Arg Val Ala Ser Gly Ser Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Arg
20 25 30
Ile Ala Thr Val Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Pro Met Val Leu
35 40 45
Ser Ala Met Gly Phe Thr Ala Ala Gly Ile Ala Ser Ser Ser Ile Ala
50 55 60
Ala Lys Met Met Ser Ala Ala Ile Ala Asn Gly Gly Gly Val Ala
65 70 75 80
Ser Gly Ser Leu Val Ala Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Thr Gly Leu
85 90 95
Ser Gly Leu Thr Lys Phe Ile Leu Gly Ser Ile Gly Ser Ala Ile Ala
100 105 110
Ala Val Ile Ala Arg Phe Tyr
115

<210> 21
<211> 4755
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
gccgggggac ccctccctcc tgtcctcctt ggggtcgacc ggtgcgcttg ccagatccgc 60
cgcaagccg ggatcgaagg cgacagcgcg gccaaagggg cgcgccggg acaagctggg 120
ggccggttgcc ccggggcagg gacggcgggc accgggccgc tggggaggca ggaagataga 180
cccacggatc ttaggaaggg atccgagagc gcagccgcgc gcccgcgcgc ccacgcctga 240
tgctctgtgc gctcgccttg atggtggcgg ccggcggttg cgtcgtctcc gccttcaacc 300
tgataacccg attcctggta gtgaaggagg ccgggaaccc gggcagcctc ttcggctact 360
cggtcgccct ccacgcgcag acagagcggc agcagcgcta cctgctcctg gctggtgccc 420
cccgggagct cgctgtgccc gatggctaca ccaaccggac tgggtgctgtg tacctgtgcc 480
cactcactgc ccacaaggat gactgtgagc ggatgaacat cacagtgaat aatgaccctg 540
gccatcacat tattgaggac atgtggcttg gactgactgt ggccagccag ggccctgcag 600
gcagagttct ggtctgtgcc caccgctaca ccaggtgct gtggtcaggg tcagaagacc 660
agcggcgcat ggtgggcaag tgctacgtgc gaggcaatga cctagagctg gactccagtg 720
atgactggca gacctaccac aacgagatgt gcaatagcaa cacagactac ctggagacgg 780
gcatgtgcca gctgggcacc agcgggtggc tcacccagaa cactgtgtac ttcggcgccc 840
ccggtgccta caactggaaa ggaaacagct acatgattca gcgcaaggag tgggacttat 900
ctgagtatat ttacaaggac ccagaggacc aaggaaacct ctatattggg tacacgatgc 960
aggtaggcag cttcatcctg caccacaaaa acatcaccat tgtgacaggt gcccacggc 1020
accgacatat gggcgcggtg ttcttgctga gccaggaggc aggcggagac ctgaggagga 1080
ggcaggtgct ggagggtcgc caggtgggcg cctatatttg cagcgccatt gccctggcag 1140
acctgaacaa tgatgggtgg caggacctcc tgggtgggcgc cccctactac ttcgagagga 1200

aagaggaagt	aggggggtgcc	atctatgtct	tcatgaacca	ggcgggaacc	tccttcctctg	1260
ctcaccctc	actccttctt	catggcccca	gtggctctgc	ctttggttta	tctgtggcca	1320
gcattggtga	catcaaccag	gatggatttc	aggatattgc	tgtgggagct	ccgtttgaag	1380
gcttgggcaa	agtgtacatc	tatcacagta	gctctaaggg	gtccttaga	cagccccagc	1440
aggtaatcca	tggagagaag	ctgggactgc	ctgggttggc	caccttcggc	tattccctca	1500
gtgggcagat	ggatgtggat	gagaacttct	acccagacct	tctagtggga	agcctgtcag	1560
accacattgt	gctgctgcg	gcccggcccc	tcatcaacat	cgtccacaag	accttggtgc	1620
ccaggccagc	tgtgctggac	cctgcacttt	gcacggccac	ctcttgtgtg	caagtggagc	1680
tgtgctttgc	ttacaaccag	agtgcgggga	accccaacta	caggcgaaac	atcacccctg	1740
cctacactct	ggaggtgac	agggaccgcc	ggccgccccg	gtccgccttt	gccggcagtg	1800
agtccgctgt	cttccacggc	ttctttctcca	tgcgcgagat	gcgctgccag	aagctggagc	1860
tgtcctgat	ggacaacctc	cgtgacaaac	tccgccccat	catcatctcc	atgaactact	1920
ctttaccttt	gcggtatgcc	gatcgcccc	ggctggggct	gcggtccctg	gacgcctacc	1980
cgatcctcaa	ccaggcacag	gctctggaga	accacactga	ggtccagttc	cagaaggagt	2040
caacaagtgt	gagagcaact	tgcagatgcg	ggcagccttc	gtgtcagagc	2100	gcgggcctga
agcagcagaa	gctgagcagg	ctccagtaca	gcagagacgt	ccgaaaattg	ctcctgagca	2160
tcaacgtgac	gaacaccccg	acctcggagc	gctccgggga	ggacgccac	gaggcgctgc	2220
tcacctggt	ggtgcctccc	gccctgctgc	tgtcctcagt	gcgcccccc	ggggcctgcc	2280
aagctaata	gacctcttt	tgcgagctgg	ggaacccctt	caaacggaac	cagaggatgg	2340
agctgctcat	cgcttttgag	gtcatcgggg	tgacctgca	cacaaggga	cttcaggtgc	2400
agctgcagct	ctccacgtcg	agtcaccagg	acaacctgtg	gcccattgat	ctcactctgc	2460
tggtggaacta	tacactccag	acctcgctta	gcatggtaaa	tcaccggcta	caaagcttct	2520
ttgggggggac	agtgatgggt	gagtctggca	tgaaaactgt	ggaggatgta	ggaagcccc	2580
tcaagtatga	attccagggtg	ggcccaatgg	gggaggggct	ggtgggcctg	gggaccctgg	2640
tcctaggtct	ggagtggccc	tacgaagtca	gcaatggcaa	gtggctgctg	tatcccacgg	2700
agatcaccgt	ccatggcaat	gggtcctggc	cctgccgacc	acctggagac	cttatcaacc	2760
ctctcaacct	cactctttct	gacctggggg	acaggccatc	atccccacag	cgcaggcggc	2820
gacagctgga	tccaggggga	ggccaggggc	ccccacctgt	cactctggct	gctgccaaaa	2880
aagccaagtc	tgagactgtg	ctgacctgtg	ccacagggcg	tgcccactgt	gtgtggctag	2940
agtgcgccat	ccctgatgcc	cccgttgtca	ccaacgtgac	tgtgaaggca	cgagtgtgga	3000
acagcacctt	catcgaggat	tacagagact	ttgaccgagt	ccgggtaaat	ggctgggcta	3060
ccctattcct	ccgaaccagc	atccccacca	tcaacatgga	gaacaagacc	acgtggttct	3120
ctgtggacat	tgactcggag	ctggtggagg	agctgccggc	cgaaatcgag	ctgtggctgg	3180
tgtggtggc	cgtgggtgca	gggtgctgc	tgtgggggct	gatcatcctc	ctgctgtgga	3240
agtgcggctt	cttcaagcga	gcccgcactc	gcgccttgta	tgaagctaag	aggcagaagg	3300
cggagatgaa	gagccagccg	tcagagacag	agaggctgac	cgacgactac	tgagggggca	3360
gccccccgcc	cccggccccac	ctggtgtgac	ttctttaagc	ggaccgcgta	ttatcagatc	3420
atgcccaagt	accacgcagt	gcggatccgg	gaggaggagc	gctaccacc	tccagggagc	3480
acctgcccc	ccaagaagca	ctgggtgacc	agctggcaga	ctcgggacca	atactactga	3540
cgtcctccct	gatcccaccc	cctcctcccc	cagtgtcccc	tttcttcccta	tttatcataa	3600
gttatgcctc	tgacagtcca	caggggccac	cacctttggc	tggtagcagc	aggctcaggc	3660
acatacacct	cgtcaagagc	atgcacatgc	tgtctggccc	tggggatctt	cccacaggag	3720
ggccagcgct	gtggacctta	caacgccgag	tgcactgcat	tctgtgccc	tagatgcacg	3780
tggggcccac	tgtcgtgga	ctgtgctggt	gcatcacgga	tgggtgcatg	gctcgcctg	3840
tctcagcctc	tgccagcgcc	aaaacaagcc	aaagagcctc	ccaccagagc	cgggaggaaa	3900
aggccccctg	aatgtgggtga	cacctcccc	tttcacactg	gatccatctt	gagccacagt	3960
actttgctgt	caaaaactact	gacaggggagc	agcccccggg	ccgctggctg	4020	cactggattg
gtggggcccc	aatgacaccc	atgccagaga	ggtggggatc	ctgcctaagg	ttgtctacgg	4080
gggcacttgg	aggacctggc	gtgctcagac	ccaacagcaa	aggaaactaga	aagaaggacc	4140
cagaacggct	tgttttctctg	catctctgtg	aagcctctct	ccttgggccac	agactgaact	4200
cgcagggaat	gcagcaggaa	ggaacaaaga	caggcaaacg	gcaacgtagc	ctgggctcac	4260
tgtgtgggg	cacggcgggga	tcctccacag	agaggagggg	accaattctg	gacagacaga	4320
tgttgggagg	atacagagga	gatgccactt	ctcactcacc	actaccagcc	agcctcagaa	4380
ggccccagag	agaccctgca	agaccacgga	gggagcgaca	cttgaatgta	gaataggcag	4440
ggggccctgc	cccaccccat	ccagccagac	cccacgctga	ccatgcgtca	ggggcctaga	4500
ggtggagttc	ttagctatcc	ttggctttca	gagccagcct	ggctctgccc	cctcccccat	4560
gggctgtgtc	ctaaggccca	tttgagaagc	tgaggctagt	tccagaaaac	ctctcctgac	4620
ccctgcctgt	tggcaggccc	actccccagc	cccagccctt	tccatggtac	tgtagcaggg	4680
gaattccctc	cccctccttg	tgccttcttt	gtatatagggc	ttctcacggc	gaccaataaa	4740

cagctcccag tttgt

4755

<210> 22

<211> 1037

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

Met Leu Cys Ala Leu Ala Leu Met Val Ala Ala Gly Gly Cys Val Val
 1          5          10          15
Ser Ala Phe Asn Leu Asp Thr Arg Phe Leu Val Val Lys Glu Ala Gly
 20          25          30
Asn Pro Gly Ser Leu Phe Gly Tyr Ser Val Ala Leu His Arg Gln Thr
 35          40          45
Glu Arg Gln Gln Arg Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Pro Arg Glu Leu
 50          55          60
Ala Val Pro Asp Gly Tyr Thr Asn Arg Thr Gly Ala Val Tyr Leu Cys
 65          70          75          80
Pro Leu Thr Ala His Lys Asp Asp Cys Glu Arg Met Asn Ile Thr Val
 85          90          95
Lys Asn Asp Pro Gly His His Ile Ile Glu Asp Met Trp Leu Gly Val
100          105          110
Thr Val Ala Ser Gln Gly Pro Ala Gly Arg Val Leu Val Cys Ala His
115          120          125
Arg Tyr Thr Gln Val Leu Trp Ser Gly Ser Glu Asp Gln Arg Arg Met
130          135          140
Val Gly Lys Cys Tyr Val Arg Gly Asn Asp Leu Glu Leu Asp Ser Ser
145          150          155          160
Asp Asp Trp Gln Thr Tyr His Asn Glu Met Cys Asn Ser Asn Thr Asp
165          170          175
Tyr Leu Glu Thr Gly Met Cys Gln Leu Gly Thr Ser Gly Gly Phe Thr
180          185          190
Gln Asn Thr Val Tyr Phe Gly Ala Pro Gly Ala Tyr Asn Trp Lys Gly
195          200          205
Asn Ser Tyr Met Ile Gln Arg Lys Glu Trp Asp Leu Ser Glu Tyr Ser
210          215          220
Tyr Lys Asp Pro Glu Asp Gln Gly Asn Leu Tyr Ile Gly Tyr Thr Met
225          230          235          240
Gln Val Gly Ser Phe Ile Leu His Pro Lys Asn Ile Thr Ile Val Thr
245          250          255
Gly Ala Pro Arg His Arg His Met Gly Ala Val Phe Leu Leu Ser Gln
260          265          270
Glu Ala Gly Gly Asp Leu Arg Arg Gln Val Leu Glu Gly Ser Gln
275          280          285
Val Gly Ala Tyr Phe Gly Ser Ala Ile Ala Leu Ala Asp Leu Asn Asn
290          295          300
Asp Gly Trp Gln Asp Leu Val Gly Ala Pro Tyr Tyr Phe Glu Arg
305          310          315          320
Lys Glu Glu Val Gly Gly Ala Ile Tyr Val Phe Met Asn Gln Ala Gly
325          330          335
Thr Ser Phe Pro Ala His Pro Ser Leu Leu His Gly Pro Ser Gly
340          345          350
Ser Ala Phe Gly Leu Ser Val Ala Ser Ile Gly Asp Ile Asn Gln Asp
355          360          365
Gly Phe Gln Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Phe Glu Gly Leu Gly Lys
370          375          380
Val Tyr Ile Tyr His Ser Ser Ser Lys Gly Leu Leu Arg Gln Pro Gln
385          390          395          400

```

Gln	Val	Ile	His	Gly	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Thr	Phe		
				405					410						415		
Gly	Tyr	Ser	Leu	Ser	Gly	Gln	Met	Asp	Val	Asp	Glu	Asn	Phe	Tyr	Pro		
			420					425					430				
Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Asp	His	Ile	Val	Leu	Leu	Arg	Ala		
		435					440					445					
Arg	Pro	Val	Ile	Asn	Ile	Val	His	Lys	Thr	Leu	Val	Pro	Arg	Pro	Ala		
	450					455					460						
Val	Leu	Asp	Pro	Ala	Leu	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Cys	Val	Gln	Val	Glu		
465					470					475					480		
Leu	Cys	Phe	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ala	Gly	Asn	Pro	Asn	Tyr	Arg	Arg		
			485						490					495			
Asn	Ile	Thr	Leu	Ala	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Asp	Arg	Asp	Arg	Arg	Pro		
			500					505					510				
Pro	Arg	Leu	Arg	Phe	Ala	Gly	Ser	Glu	Ser	Ala	Val	Phe	His	Gly	Phe		
	515					520						525					
Phe	Ser	Met	Pro	Glu	Met	Arg	Cys	Gln	Lys	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Met		
	530				535						540						
Asp	Asn	Leu	Arg	Asp	Lys	Leu	Arg	Pro	Ile	Ile	Ile	Ser	Met	Asn	Tyr		
545					550				555						560		
Ser	Leu	Pro	Leu	Arg	Met	Pro	Asp	Arg	Pro	Arg	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser		
			565					570						575			
Leu	Asp	Ala	Tyr	Pro	Ile	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Glu	Asn	His		
		580					585						590				
Thr	Glu	Val	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Cys	Gly	Pro	Asp	Asn	Lys	Cys	Glu		
	595					600						605					
Ser	Asn	Leu	Gln	Met	Arg	Ala	Ala	Phe	Val	Ser	Glu	Gln	Gln	Gln	Lys		
	610				615						620						
Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Tyr	Ser	Arg	Asp	Val	Arg	Lys	Leu	Leu	Leu	Ser		
625				630				635							640		
Ile	Asn	Val	Thr	Asn	Thr	Arg	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gly	Glu	Asp	Ala		
			645					650						655			
His	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser		
		660					665						670				
Ser	Val	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Cys	Gln	Ala	Asn	Glu	Thr	Ile	Phe	Cys		
	675				680						685						
Glu	Leu	Gly	Asn	Pro	Phe	Lys	Arg	Asn	Gln	Arg	Met	Glu	Leu	Leu	Ile		
	690				695					700							
Ala	Phe	Glu	Val	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	His	Thr	Arg	Asp	Leu	Gln	Val		
705				710				715							720		
Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Ser	His	Gln	Asp	Asn	Leu	Trp	Pro	Met		
			725					730						735			
Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Asp	Tyr	Thr	Leu	Gln	Thr	Ser	Leu	Ser	Met		
		740						745					750				
Val	Asn	His	Arg	Leu	Gln	Ser	Phe	Gly	Gly	Thr	Val	Met	Gly	Glu			
	755					760					765						
Ser	Gly	Met	Lys	Thr	Val	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Lys	Tyr	Glu		
	770				775					780							
Phe	Gln	Val	Gly	Pro	Met	Gly	Glu	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Leu		
785				790				795							800		
Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Trp	Pro	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Gly	Lys	Trp	Leu		
			805					810						815			
Leu	Tyr	Pro	Thr	Glu	Ile	Thr	Val	His	Gly	Asn	Gly	Ser	Trp	Pro	Cys		
		820					825						830				
Arg	Pro	Pro	Gly	Asp	Leu	Ile	Asn	Pro	Leu	Asn	Leu	Thr	Leu	Ser	Asp		
	835					840					845						
Pro	Gly	Asp	Arg	Pro	Ser	Ser	Pro	Gln	Arg	Arg	Arg	Arg	Gln	Leu	Asp		

850		855		860
Pro Gly Gly Gly Gln Gly Pro Pro Pro Val Thr Leu Ala Ala Ala Lys				
865		870		875
Lys Ala Lys Ser Glu Thr Val Leu Thr Cys Ala Thr Gly Arg Ala His				880
	885		890	895
Cys Val Trp Leu Glu Cys Pro Ile Pro Asp Ala Pro Val Val Thr Asn				
	900		905	910
Val Thr Val Lys Ala Arg Val Trp Asn Ser Thr Phe Ile Glu Asp Tyr				
	915		920	925
Arg Asp Phe Asp Arg Val Arg Val Asn Gly Trp Ala Thr Leu Phe Leu				
	930		935	940
Arg Thr Ser Ile Pro Thr Ile Asn Met Glu Asn Lys Thr Thr Trp Phe				960
945		950		955
Ser Val Asp Ile Asp Ser Glu Leu Val Glu Glu Leu Pro Ala Glu Ile				
	965		970	975
Glu Leu Trp Leu Val Leu Val Ala Val Gly Ala Gly Leu Leu Leu Leu				
	980		985	990
Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Trp Lys Cys Gly Phe Phe Lys Arg Ala				
	995		1000	1005
Arg Thr Arg Ala Leu Tyr Glu Ala Lys Arg Gln Lys Ala Glu Met Lys				
	1010		1015	1020
Ser Gln Pro Ser Glu Thr Glu Arg Leu Thr Asp Asp Tyr				
1025		1030		1035

<210> 23
 <211> 4647
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23

gtagcctctg	ttttcatttc	agtcttaatg	aaaactttct	aacttatatc	tcaagtttct	60
tttcaaagca	gtgtaagtag	tattttaa	gttatacttc	aagaaagaaa	gactttaacg	120
atattcagcg	ttggtcttgt	aacgctgaag	gtaattcatt	ttttaatcgg	tctgcacagc	180
aagaactgaa	acgaatgggg	attgaactgc	tttgccctgtt	ctttctat	ctaggaagga	240
atgatcacgt	acaaggtggc	tgtgccctgg	gaggtgcaga	aacctgtgaa	gactgcctgc	300
ttattggacc	tcagtgtgcc	tggtgtgctc	aggagaat	tactcatcca	tctggagttg	360
gcgaaaggtg	tgatacccca	gcaaaccctt	tagctaaagg	atgtcaatta	aacttcacgc	420
aaaaccctgt	ctcccaagta	gaaatactta	aaaataagcc	tctcagtgtg	ggcagacaga	480
aaaatagttc	tgacattgtt	cagattgcgc	ctcaaagctt	gatccttaag	ttgagaccag	540
gtggtgcgca	gactctgcag	gtgcatgtcc	gccagactga	ggactaccgc	gtggatttgt	600
attacctcat	ggacctctcc	gcctccatgg	atgacgacct	caacacaata	aaggagctgg	660
gctcccggtc	ttccaaagag	atgtctaaat	taaccagcaa	cttttagactg	ggcttcggat	720
cttttgtgga	aaaacctgta	tcccctttcg	tgaaaacaac	accagaagaa	attgccaacc	780
cttgacagtag	tattccatac	ttctgtttac	ctacatttgg	attcaagcac	attttgccat	840
tgacaaatga	tgctgaaaga	ttcaatgaaa	ttgtgaagaa	tcagaaaatt	tctgctaata	900
ttgacacacc	cgaaggtgga	tttgatgcaa	ttatgcaagc	tgctgtgtgt	aaggaaaaaa	960
ttggctggcg	gaatgactcc	ctccacctcc	tggtctttgt	gagtgatgct	gattctcatt	1020
ttggaatgga	cagcaaacta	gcaggcatcg	tcatttcctaa	tgacgggctc	tgtcacttgg	1080
acagcaagaa	tgaatactcc	atgtcaactg	tcttggaata	tccaacaatt	ggacaactca	1140
ttgataaact	ggtacaaaac	aacgtgttat	tgatcttcgc	tgtaacccaa	gaacaagttc	1200
atttatatga	gaattacgca	aaacttattc	ctggagctac	agtaggtcta	cttcagaagg	1260
actccggaaa	cattctccag	ctgatcatct	cagcttatga	agaactgcgg	tctgaggtgg	1320
aactggaagt	attaggagac	actgaaggac	tcaacttgct	atctacagcc	atctgtaaca	1380
acggtaccct	cttccaacac	caaaagaaat	gctctcacat	gaaagtggga	gacacagctt	1440
ccttcagcgt	gactgtgaat	atcccacact	gcgagagaag	aagcaggcac	attatcataa	1500
agcctgtggg	gctgggggat	gccctggaat	tacttgtcag	cccagaatgc	aactgcgact	1560
gtcagaaaaga	agtggaaagt	aacagctcca	aatgtcacca	cgggaacggc	tctttccagt	1620

```

gtgggggtgtg tgcctgccac cctggccaca tggggcctcg ctgtgagtgt ggcgaggaca 1680
tgctgagcac agattcctgc aaggaggccc cagatcatcc ctctgcagc ggaaggggtg 1740
actgctactg tgggcagtgt atctgccact tgtctcccta tggaaacatt tatgggcctt 1800
attgccagtg tgacaatttc tcctgcgtga gacacaaagg gctgctctgc ggaggtaacg 1860
gcgactgtga ctgtggtgaa tgtgtgtgca ggagcggctg gactggcgag tactgcaact 1920
gcaccaccag cacggactcc tgcgtctctg aagatggagt gctctgcagc gggcgcgggg 1980
actgtgtttg tggcaagtgt gtttgacaaa accctggagc ctgaggacca acctgtgaac 2040
gatgtcctac ctgtggtgac ccctgtaact ctaaacggag ctgcattgag tgccacctgt 2100
cagcagctgg ccaagcccga gaagaatgtg tggacaagtg caaactagct ggtgcgacca 2160
tcagtgaaga agaagatttc tcaaaggatg gttctgtttc ctgctctctg caaggagaaa 2220
atgaatgtct tattacattc ctaataacta cagataatga ggggaaaacc atcattcaca 2280
gcatcaatga aaaagattgt ccgaagcctc caaacattcc catgatcatg ttaggggttt 2340
ccctggctat tcttctcatc ggggttgtcc tactgtgcat ctggaagcta ctggtgtcat 2400
ttcatgatcg taaagaagtt gccaaatttg aagcagaacg atcaaaagcc aagtggcaaa 2460
cggaaccaa tccactctac agaggatcca caagtacttt taaaaatgta acttataaac 2520
acagggaaaa acaaaaggta gacctttcca cagattgcta gaactacttt atgcatgaaa 2580
aaagtctgtt tcaactgatat gaaatgttaa tgcactattt aatttttttc tctttgttgc 2640
ttcaaaatga ggttggttta agataataat aggacatctg cagataagtc atcctctaca 2700
tgaaggtgac agactgttgag cagtttcaaa ataatacaga agagaaatat ccttagcaaa 2760
gagatgactt tggggatcat ttgaggaata ctaactctgt tgcattaatg cttcaaaaaa 2820
tcatcaaatg attcatgggg gcctgatttg catttgaaaa atgtttgaaa ttagagtctc 2880
atttgtttca ggaatgcagc tacctgagtt ttttgtctcg gcaaagtcac aaagcccata 2940
tactcacatt gtgtgtctat acttgccaat taattctaaa cttgtaggaa atatgccctc 3000
tcttaaagga gaattttttt taaatctctg agaaatgaga ttctgagttt atttcagcta 3060
aaaggttgca attcttctga agatatctca aatataaggt tgaaagttaa gtgttaataa 3120
tttttgtgaa tttatacaca cctaaacgtt aagtacacaa atattttatt tgttttacia 3180
ataaggaata agtaatttat aaattaagaa gttacctata aaaataaaaa gataacaacc 3240
ctatcatata gcttattttt aaattacctg aaaaacgata ttctacactg tttccttttt 3300
gactctgagt tttcaaaactg ttacttctcc catatttctc aatccatttc actcagttgc 3360
acagtctttt aaaccctgta attgtcatac caaagtttct ttttaaaaaa aaattacttt 3420
aaatgcttag tttattcaaa gagcgatcca ataataataa aggaacatgt gttaaacaca 3480
ataaaatttt aaatggctct aaatcaagca catcaagagt atacaagtct taaaggcttt 3540
ttaatacata ctctttttccc atctatgtaa cccaacttgc acatttcagc tgcagtgtgt 3600
gaatatgcat catatattta ctttaagagg taagatttta cttgcaaaat acatgtgcaa 3660
attaggatcc atcagttgat ggaagagatg gactctagaa tattatttct tgtggttatt 3720
actcctttac aaagcacttt cgtctcactt gatcctcata aggaaactaa ggctcagaat 3780
gagtagagct ggggttcagaa tctagctctt ctaactccaa gccatctcct ctttccactg 3840
caggaaaactg cctcttttgt cagtgaataa atagaaagat tgtgttagtt aagtgataac 3900
tgtcatttgt ttgaaaatgt tcgagactga acaaatagca tttaaaactgc tggcatatag 3960
atgagatatt gtacttttgt gcaatgttta ttacctttga ttaaattgta atgtgaagct 4020
ttactaggt gaatagttca ttatgtagtg gaggttctgt ggttgtccat tgaattgtca 4080
cagcaaaatc tataagtttc ttcaattcta caagatagat ccatatacct ttgatcactt 4140
ggagactctt tttttgctgg tttctagata actcaggtaa atcagacctt tacagagtac 4200
agggtaggt gaaaagaatta ctgaaaaatc accttgaaaa tccgaagggc tgatataccc 4260
ttatgttcc tgactgatgc gcagaacctg ggggaaatct acagcaatat acaggttgca 4320
atgctgataa cacaacagca atcctctcct ctacgtggac ttactgttgt ttttttaatt 4380
attattggaa tgggatttta gaaaatagaa gttacctttg tgtgtgtttt aggggaaggta 4440
gagaagaatc tgctctttct ctgaatactg ttttgacccc aggcaggacc ttggaaaggc 4500
caaaacatta acagtagtac ttctgttcac tgaagagtta tgttacatga agataaaatg 4560
gttttgtcgt gtttattatt gtattttgtg ttgatataaa taaacatggt aatttaaaca 4620
atgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 4647

```

<210> 24

<211> 788

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met 1	Gly	Ile	Glu	Leu 5	Leu	Cys	Leu	Phe	Phe 10	Leu	Phe	Leu	Gly	Arg	Asn 15
Asp	His	Val	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu	Thr	Cys	Glu
Asp	Cys	Leu	Leu	Ile	Gly	Pro	Gln	Cys	Ala	Trp	Cys	Ala	Gln	Glu	Asn
Phe	Thr	His	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Thr	Pro	Ala	Asn
Leu 65	Leu	Ala	Lys	Gly	Cys	Gln	Leu	Asn	Phe	Ile	Glu	Asn	Pro	Val	Ser 80
Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Lys	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	Lys
Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Gln	Ile	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Ile	Leu	Lys
Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Val	His	Val	Arg	Gln	Thr
Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Ser
Met 145	Asp	Asp	Asp	Leu	Asn	Thr	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Ser 160
Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser
Phe	Val	Glu	Lys	Pro	Val	Ser	Pro	Phe	Val	Lys	Thr	Thr	Pro	Glu	Glu
Ile	Ala	Asn	Pro	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Tyr	Phe	Cys	Leu	Pro	Thr	Phe
Gly	Phe	Lys	His	Ile	Leu	Pro	Leu	Thr	Asn	Asp	Ala	Glu	Arg	Phe	Asn
Glu 225	Ile	Val	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Ala	Asn	Ile	Asp	Thr	Pro	Glu 240
Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Gln	Ala	Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Lys	Ile
Gly	Trp	Arg	Asn	Asp	Ser	Leu	His	Leu	Leu	Val	Phe	Val	Ser	Asp	Ala
Asp	Ser	His	Phe	Gly	Met	Asp	Ser	Lys	Leu	Ala	Gly	Ile	Val	Ile	Pro
Asn 290	Asp	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Asp	Ser	Lys	Asn	Glu	Tyr	Ser	Met	Ser
Thr 305	Val	Leu	Glu	Tyr	Pro	Thr	Ile	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp	Lys	Leu	Val 320
Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Gln	Glu	Gln	Val	His						Gln Asn Asn Val Leu Leu
Leu	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Gly	Leu
Leu	Gln	Lys	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Tyr
Glu 370	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Glu
Gly 385	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Ile	Cys	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe 400
Gln	His	Gln	Lys	Lys	Cys	Ser	His	Met	Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser
Phe	Ser	Val	Thr	Val	Asn	Ile	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Arg	Ser	Arg	His
Ile	Ile	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val
Ser	Pro	Glu	Cys	Asn	Cys	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Ser

450 455 460
 Ser Lys Cys His His Gly Asn Gly Ser Phe Gln Cys Gly Val Cys Ala
 465 470 475 480
 Cys His Pro Gly His Met Gly Pro Arg Cys Glu Cys Gly Glu Asp Met
 485 490 495
 Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Glu Ala Pro Asp His Pro Ser Cys Ser
 500 505 510
 Gly Arg Gly Asp Cys Tyr Cys Gly Gln Cys Ile Cys His Leu Ser Pro
 515 520 525
 Tyr Gly Asn Ile Tyr Gly Pro Tyr Cys Gln Cys Asp Asn Phe Ser Cys
 530 535 540
 Val Arg His Lys Gly Leu Leu Cys Gly Gly Asn Gly Asp Cys Asp Cys
 545 550 555 560
 Gly Glu Cys Val Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Asn Cys
 565 570 575
 Thr Thr Ser Thr Asp Ser Cys Val Ser Glu Asp Gly Val Leu Cys Ser
 580 585 590
 Gly Arg Gly Asp Cys Val Cys Gly Lys Cys Val Cys Thr Asn Pro Gly
 595 600 605
 Ala Ser Gly Pro Thr Cys Glu Arg Cys Pro Thr Cys Gly Asp Pro Cys
 610 615 620
 Asn Ser Lys Arg Ser Cys Ile Glu Cys His Leu Ser Ala Ala Gly Gln
 625 630 635 640
 Ala Arg Glu Glu Cys Val Asp Lys Cys Lys Leu Ala Gly Ala Thr Ile
 645 650 655
 Ser Glu Glu Glu Asp Phe Ser Lys Asp Gly Ser Val Ser Cys Ser Leu
 665 670 660
 Gln Gly Glu Asn Glu Cys Leu Ile Thr Phe Leu Ile Thr Thr Asp Asn
 675 680 685
 Glu Gly Lys Thr Ile Ile His Ser Ile Asn Glu Lys Asp Cys Pro Lys
 690 695 700
 Pro Pro Asn Ile Pro Met Ile Met Leu Gly Val Ser Leu Ala Ile Leu
 705 710 715 720
 Leu Ile Gly Val Val Leu Leu Cys Ile Trp Lys Leu Leu Val Ser Phe
 725 730 735
 His Asp Arg Lys Glu Val Ala Lys Phe Glu Ala Glu Arg Ser Lys Ala
 740 745 750
 Lys Trp Gln Thr Gly Thr Asn Pro Leu Tyr Arg Gly Ser Thr Ser Thr
 755 760 765
 Phe Lys Asn Val Thr Tyr Lys His Arg Glu Lys Gln Lys Val Asp Leu
 770 775 780
 Ser Thr Asp Cys
 785

<210> 25
 <211> 4474
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 gtagcctctg ttttcatttc agtcttaatg aaaactttct aacttatatc tcaagtttct 60
 tttcaaagca gtgtaagtag tattttaaaat gttatacttc aagaaagaaa gactttaacg 120
 atattcagcg ttggtcttgt aacgctgaag gtaattcatt ttttaatcgg tctgcacagc 180
 aagaactgaa acgaatgggg attgaactgc ttgacctgtt ctttctattt cttaggaagg 240

atgatcacgt	acaaggtggc	tgtgccctgg	gaggtgcaga	aacctgtgaa	gactgcctgc	300
ttattggacc	tcagtgtgcc	tggtgtgtct	aggagaattt	tactcatcca	tctggagttg	360
gcgaaaggtg	gtgcgcagac	tctgcagggt	catgtccgcc	agactgagga	ctacccggtg	420
gatttgtatt	acctcatgga	cctctccgcc	tccatggatg	acgacctcaa	cacaataaag	480
gagctgggct	cccggctttc	caaagagatg	tctaaattaa	ccagcaactt	tagactgggc	540
ttcggatctt	ttgtggaaaa	acctgtatcc	ccttttygtg	aaacaacacc	agaagaaatt	600
gccaaccctt	gcagtagtat	tccatacttc	tgtttaccta	catttggatt	caagcacatt	660
ttgccattga	caaatgatgc	tgaagatttc	aatgaaattg	tgaagaatca	gaaaatttct	720
gctaataattg	acacacccga	aggtggattt	gatgcaatta	tgcaagctgc	tgtgtgtaag	780
gaaaaaattg	gctggcggaa	tgactccctc	cacctcctgg	tctttgtgag	tgatgctgat	840
tctcattttg	gaatggacag	caaactagca	ggcatcgtca	ttcctaata	cgggctctgt	900
cacttggaca	gcaagaatga	atactccatg	tcaactgtct	tggaatatcc	aacaattgga	960
caactcattg	ataaactggg	acaaaacaac	gtgttattga	tcttcgctgt	aacccaagaa	1020
caagttcatt	tatatgagaa	ttacgcaaaa	cttattcctg	gagctacagt	aggtctactt	1080
cagaaggact	ccggaacat	tctccagctg	atcatctcag	cttatgaaga	actgcggtct	1140
gaggtggaac	tggaagtatt	aggagacact	gaaggactca	acttgtcatt	tacagccatc	1200
tgtacaacg	gtaccctctt	ccaacaccaa	aagaaatgct	ctcacatgaa	agtgggagac	1260
acagcttcct	tcagcgtgac	tgtgaatatc	ccacactgcg	agagaagaag	caggcacatt	1320
atcataaagc	ctgtggggct	gggggatgcc	ctggaattac	ttgtcagccc	agaatgcaac	1380
tgcgactgtc	agaaagaagt	ggaagtgaac	agctccaaat	gtcaccacgg	gaacggctct	1440
ttccagtgtg	gggtgtgtgc	ctgccaccct	ggccacatgg	ggcctcgtct	tgagtgtggc	1500
gaggacatgc	tgagcacaga	ttcctgcaag	gaggccccag	atcatccctc	ctgcagcggg	1560
aggggtgact	gctactgtgg	gcagtgtatc	tgccacttgt	ctccctatgg	aaacatttat	1620
gggccttatt	gccagtgtga	caatttctcc	tgcgtgagac	acaaagggct	gctctgcgga	1680
ggtaacggcg	actgtgactg	tggtgaatgt	gtgtgcagga	gcggctggac	tggcgagtac	1740
tgcaactgca	ccaccagcac	ggactcctgc	gtctctgaag	atggagtgtc	ctgcagcggg	1800
cgcggggact	gtgtttgtgg	caagtgtgtt	tgcacaaacc	ctggagcctc	aggaccaacc	1860
tgtgaacgat	gtcctacctg	tggtgacccc	tgtaaactcta	aacggagctg	cattgagtgc	1920
cacctgtcag	cagctggcca	agcccagaaa	gaatgtgtgg	acaagtgcaa	actagctggg	1980
gcgaccatca	gtgaagaaga	agatttctca	aaggatgggt	ctgtttcctg	ctctctgcaa	2040
ggagaaaatg	aatgtcttat	tacattccta	ataactacag	ataatgaggg	gaaaaccatc	2100
attcacagca	tcaatgaaaa	agattgtccg	aagcctccaa	acattcccat	gatcatgtta	2160
ggggtttccc	tggtatttct	tctcatcggg	gttgtcctac	tgtgcactct	gaagctactg	2220
gtgtcatttc	atgatcgtaa	agaagttgcc	aaatttgaag	cagaacgatc	aaaagccaag	2280
tggcaaacgg	gaaccaatcc	actctacaga	ggatccacaa	gtacttttaa	aaatgtaact	2340
tataaacaca	gggaaaaaca	aaaggtagac	ctttccacag	attgctagaa	ctactttatg	2400
catgaaaaaa	gtctgtttca	ctgatatgaa	atgttaatgc	actatttaat	ttttttctct	2460
ttgttgcttc	aaaaatgaggt	tggtttaaga	taataatagg	acatctgcag	ataagtcatc	2520
ctctacatga	aggtgacaga	ctgttggcag	tttcaaaaata	atcaagaaga	gaaatatcct	2580
tagcaaaagag	atgacttttg	ggatcatttg	aggaatacta	actctgttgc	attaatgctt	2640
caaaaaatca	tcaaatgatt	catgggggcc	tgatttgcac	ttgaaaaatg	tttgaaatta	2700
gagtcctatt	tgtttcagga	atgcagctac	ctgagttttt	tgtctcggca	aagtcacaaa	2760
gcccataatc	tcacattgtg	tgtctatact	tgccaattaa	ttctaaactt	gtaggaaata	2820
tgccctctct	taaaggagaa	ttttttttta	atctctgaga	aatgagattc	tgagttttat	2880
tcagctaaaa	ggttgcaatt	cttctgaaga	tatctcaaat	ataaggttga	aagtttaagt	2940
ttaataaatt	ttgtgaattt	atacacacct	aaacgttaag	tacacaaata	ttttatttgt	3000
tttacaataa	aggaataagt	aattttataa	ttaagaagtt	acctataaaa	ataaaaagat	3060
aacaacccta	tcatatagct	tattttttaa	ttacctgaaa	aacgatattc	tacactgttt	3120
cctttttgac	tctgagtttt	caaactgtta	cttctcccat	atctctcaat	ccatttcact	3180
cagttgcaca	gtctttttaa	ccctgtaatt	gtcataccaa	agtttctttt	taaaaaaaaa	3240
ttacttttaa	tgcttagttt	attcaaagag	cgatccaata	atataaaaag	aacatgtgtt	3300
aaacacaata	aaatttttaa	tggtctctaa	tcaagcacat	caagagtata	caagtcttaa	3360
aggcttttta	atacatactc	ttttcccatc	tatgtaaccc	aacttgcaca	tttcagctgc	3420
atgtggtgaa	tatgcatcat	atattttact	taagaggtaa	gatttttact	gcaaaatata	3480
tgtgcaaatt	aggatccatc	agttgatgga	agagatggac	tctagaatat	tatttcttgt	3540
ggttattact	cctttacaaa	gcactttcgt	ctcacttgat	cctcataagg	aaactaaggc	3600
tcagaatgag	tagagctggg	ttcagaatct	agctcttcta	actccaagcc	atctcctctt	3660
tccactgcag	gaaactgcct	cttttgtcag	tgaataataa	gaaagattgt	gttagttaag	3720

```

tgataactgt catttgtttg aaaatgttcg agactgaaca aatagcattt aaactgctgg 3780
catatagatg agatattgta cttttgtgca atgtttatta cttttgatta aattgtaatg 3840
tgaagctttt actaggtgaa tagttcatta tgtagtggag gcttcgtggg tgtccattga 3900
attgtcacag caaaatctat aagtttcttc aattctacaa gatagatcca tatacctttg 3960
atcacttgga gactcttttt ttgctgggtt ctagataact caggtaaadc agacctttac 4020
agagtacagg gctaggtgaa agaattactg aaaaatcacc ttgaaaatcc gaagggctga 4080
tatacccttt atgttcctga ctgatgcgca gaacctgggg gaaatctaca gcaatataca 4140
ggttgcaatg ctgataaacac aacagcaatc ctctctctta cgtggactta ctggttgttt 4200
tttaattatt attggaatgg gatttttagaa aatagaagtt acctttgtgt gtgttttagg 4260
gaaggtagag aagaatctgc tctttctctg aatactgttt tgaccccagg caggaccttg 4320
gaaaggccaa aacattaaca gtagtacttc tgttcaactga agagttatgt tacatgaaga 4380
taaaatggtt ttgtcgtgtt tattattgta ttttgtgttg atataaataa acatggtaat 4440
ttaaacaatg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 4474

```

<210> 26
 <211> 715
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met	Ile	Thr	Tyr	Lys	Val	Ala	Val	Pro	Trp	Glu	Val	Gln	Lys	Pro	Val
1				5					10					15	
Lys	Thr	Ala	Cys	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Arg	Arg
			20					25					30		
Ile	Leu	Leu	Ile	His	Leu	Glu	Leu	Ala	Lys	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu
	35					40						45			
Gln	Val	His	Val	Arg	Gln	Thr	Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Leu	Tyr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Ser	Met	Asp	Asp	Asp	Leu	Asn	Thr	Ile	Lys
65					70					75					80
Glu	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Ser	Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Asn
				85					90					95	
Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Glu	Lys	Pro	Val	Ser	Pro	Phe
			100					105					110		
Val	Lys	Thr	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ala	Asn	Pro	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro
	115						120					125			
Tyr	Phe	Cys	Leu	Pro	Thr	Phe	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Leu	Pro	Leu	Thr
	130					135					140				
Asn	Asp	Ala	Glu	Arg	Phe	Asn	Glu	Ile	Val	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser
145					150					155					160
Ala	Asn	Ile	Asp	Thr	Pro	Glu	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Gln	Ala
				165					170					175	
Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Lys	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Asp	Ser	Leu	His	Leu
			180					185					190		
Leu	Val	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Asp	Ser	His	Phe	Gly	Met	Asp	Ser	Lys
	195					200					205				
Leu	Ala	Gly	Ile	Val	Ile	Pro	Asn	Asp	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Asp	Ser
	210					215					220				
Lys	Asn	Glu	Tyr	Ser	Met	Ser	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Pro	Thr	Ile	Gly
225					230					235					240
Gln	Leu	Ile	Asp	Lys	Leu	Val	Gln	Asn	Asn	Val	Leu	Leu	Ile	Phe	Ala
				245					250					255	
Val	Thr	Gln	Glu	Gln	Val	His	Leu	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Ile
			260				265						270		
Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Gly	Leu	Leu	Gln	Lys	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu
		275				280						285			
Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Leu
	290					295					300				

Glu	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Ile	
305					310					315					320	
Cys	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Gln	His	Gln	Lys	Lys	Cys	Ser	His	Met	
				325					330						335	
Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Val	Asn	Ile	Pro	His	
				340					345					350		
Cys	Glu	Arg	Arg	Ser	Arg	His	Ile	Ile	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	
				355					360					365		
Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Pro	Glu	Cys	Asn	Cys	Asp	Cys	Gln	
						375						380				
Lys	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Ser	Ser	Lys	Cys	His	His	Gly	Asn	Gly	Ser	
385					390					395					400	
Phe	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	Ala	Cys	His	Pro	Gly	His	Met	Gly	Pro	Arg	
				405					410						415	
Cys	Glu	Cys	Gly	Glu	Asp	Met	Leu	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Lys	Glu	Ala	
				420					425					430		
Pro	Asp	His	Pro	Ser	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Tyr	Cys	Gly	Gln	
				435				440					445			
Cys	Ile	Cys	His	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ile	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Cys	
						455					460					
Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	Arg	His	Lys	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	
465					470					475					480	
Gly	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Cys	Gly	Glu	Cys	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	Trp	
				485					490						495	
Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Asn	Cys	Thr	Thr	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	
				500				505						510		
Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Lys	
				515				520					525			
Cys	Val	Cys	Thr	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	Glu	Arg	Cys	
						535					540					
Pro	Thr	Cys	Gly	Asp	Pro	Cys	Asn	Ser	Lys	Arg	Ser	Cys	Ile	Glu	Cys	
545					550					555					560	
His	Leu	Ser	Ala	Ala	Gly	Gln	Ala	Arg	Glu	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	
				565					570						575	
Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	Ser	Lys	Asp	
				580					585					590		
Gly	Ser	Val	Ser	Cys	Ser	Leu	Gln	Gly	Glu	Asn	Glu	Cys	Leu	Ile	Thr	
				595				600					605			
Phe	Leu	Ile	Thr	Thr	Asp	Asn	Glu	Gly	Lys	Thr	Ile	Ile	His	Ser	Ile	
						615						620				
Asn	Glu	Lys	Asp	Cys	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Ile	Pro	Met	Ile	Met	Leu	
625					630						635				640	
Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Ile							

```
<210> 27
<211> 4327
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<400> 27

gtagcctctg	ttttcatttc	agtcttaaatg	aaaactttct	aacttatatc	tcaagtttct	60
tttcaaagca	gtgtaagtag	tattttaaata	gttatacttc	aagaaagaaa	gactttaacg	120
atattcagcg	ttggtcttgt	aacgctgaag	gtaattcatt	ttttaatcgg	tctgcacagc	180
aagaactgaa	acgaatgggg	attgaactgc	tttgccctgtt	ctttctatct	ctaggaagga	240
atgatcacgt	acaaggtggc	tgtgccctgg	gaggtgcaga	aacctgtgaa	gactgcctgc	300
ttattggacc	tcagtgtgcc	tggtgtgctc	aggagaattt	tactcatcca	tctggagttg	360
gcgaaaggtg	tgatacccca	gcaaaccctt	tagctaaagg	atgtcaatta	aacttcatcg	420
aaaaccctgt	ctcccaagta	gaaatactta	aaaataagcc	tctcagtgtg	ggcagacaga	480
aaaatagttc	tgacattggt	cagattgcgc	ctcaaagctt	gatccttaag	ttgagaccag	540
gtggtgcgca	gactctgcag	gtgcatgtcc	gccagactga	ggactaccgg	gtggatttgt	600
attacctcat	ggacctctcc	gcctccatgg	atgacgacct	caacacaata	aaggagctgg	660
gctcccggct	ttccaaagag	atgtctaaat	taaccagcaa	cttttagactg	ggcttcggat	720
cttttgtgga	aaaacctgta	tccccttttg	tgaatacaac	accagaagaa	attgcccaacc	780
cttgacgtag	tattccatac	ttctgtttac	ctacatttgg	attcaagcac	attttgccat	840
tgacaaatga	tgctgaaaaga	ttcaatgaaa	ttgtgaagaa	tcagaaaatt	tctgctaata	900
ttgacacacc	cgaaggtgga	tttgatgcaa	ttatgcaagc	tgctgtgtgt	aaggaaaaaa	960
ttggctggcg	gaatgactcc	ctccacctcc	tggtctttgt	gagtgtgtgt	gattctcatt	1020
ttggaatgga	cagcaaaacta	gcaggcatcg	tcatttcctaa	tgacgggctc	tgtcacttgg	1080
acagcaagaa	tgaatactcc	atgtcaactg	tcttggaata	tccaacaatt	ggacaactca	1140
ttgataaaact	ggtacaaaaac	aacgtgttat	tgatcttcgc	tgtaacccaa	gaacaagttc	1200
atttatatga	gaattacgca	aaacttattc	ctggagctac	agtaggtcta	cttcagaagg	1260
actccggaaa	cattctccag	ctgatcatct	cagcttatga	agaactgcgg	tctgaggtgg	1320
aactggaagt	attaggagac	actgaaggac	tcaacttgtc	atttacagcc	atctgtaaca	1380
acggtaccct	cttccaacac	caaaagaaat	gctctcacat	gaaagtggga	gacacagctt	1440
ccttcagcgt	gactgtgaat	atcccacact	gcgagagaag	aagcaggcac	attatcataa	1500
agcctgtggg	gctgggggat	gccctggaat	tacttgtcag	cccagaatgc	aactgcgact	1560
gtcagaaaaga	agtggaaagt	aacagctcca	aatgtcacca	cgggaacggc	tctttccagt	1620
gtggggtgtg	tgcctgccac	cctggccaca	tggggcctcg	ctgtgagtgt	ggcgaggaca	1680
tgctgagcac	agattcctgc	aaggaggccc	cagatcatcc	ctcctgcagc	ggaaggggtg	1740
actgctactg	tgggcagtg	atctgccact	tgtctcccta	tggaaacatt	tatgggcctt	1800
attgccagtg	tgacaatttc	tcttgcgtga	gacacaaagg	gctgctctgc	ggagatttct	1860
caaaggatgg	ttctgtttcc	tgctctctgc	aaggagaaaa	tgaatgtctt	attacatttc	1920
taataactac	agataatgag	gggaaaacca	tcattcacag	catcaatgaa	aaagattgtc	1980
cgaagcctcc	aaacattccc	atgatcatgt	taggggtttc	cctggctatt	cttctcatcg	2040
gggttgcct	actgtgcac	tggaagctac	tggtgtcatt	tcatgatcgt	aaagaagttg	2100
ccaaatttga	agcagaacga	tcaaaagcca	agtggcaaac	gggaaccaat	ccactctaca	2160
gaggatccac	aagtactttt	aaaaatgtaa	cttataaaca	cagggaaaaa	caaaaggtag	2220
acctttccac	agattgctag	aactacttta	tgcataaaaa	aagtctgttt	actgatatg	2280
aaatgttaat	gcactattta	atttttttct	ctttgttgc	tcaaaatgag	gttggtttta	2340
gataataata	ggacatctgc	agataagtca	tctctacat	gaaggtgaca	gactgttggc	2400
agtttcaaaa	taatcaagaa	gagaaatatc	cttagcaaaag	agatgacttt	ggggatcatt	2460
tgaggaatac	taactctgtt	gcattaatgc	ttcaaaaaat	catcaaatga	ttcatggggg	2520
cctgatttgc	atttgaaaaa	tgtttgaaat	tagagtctca	tttgtttcag	gaatgcagct	2580
acctgagttt	tttgtctcgg	caaagtcaca	aagcccatat	actcacattg	tgtgtctata	2640
cttgccaatt	aattctaaac	ttgtaggaaa	tatgccctct	cttaaaagga	gaattttttt	2700
taaatctctg	agaaatgaga	ttctgagttt	atctcagcta	aaaggttgca	attcttctga	2760
agatatctca	aatataaggt	tgaaagttaa	gtgttaataa	tttttgtgaa	tttatacaca	2820
cctaaacgtt	aagtacacaa	atattttatt	tgtttttaca	ataaggaata	agtaatttat	2880
aaattaagaa	gttacctata	aaaataaaaa	gataacaacc	ctatcatata	gcttattttt	2940
aaattacctg	aaaaacgata	ttctacactg	tttccctttt	gactctgagt	tttcaaactg	3000
ttacttctcc	catatttctc	aatccatttc	actcagttgc	acagtctttt	aaaccctgta	3060
attgtcatat	caaagtttct	ttttaaaaaa	aaattacttt	aaatgcttag	tttattcaaa	3120
gagcgatcca	ataatataaa	aggaacatgt	gttaaacaca	ataaaaat	aaatggctct	3180
aaatcaagca	catcaagagt	atacaagtct	taaaggcttt	ttaatacata	ctcttttccc	3240
atctatgtaa	cccaacttgc	acatttcagc	tgcattgtgg	gaatatgcat	catatattta	3300

ctttaagagg	taagatttta	cttgcaaaat	acatgtgcaa	attaggatcc	atcagttgat	3360
ggaagagatg	gactctagaa	tattattttct	tgtggttatt	actcctttac	aaagcacttt	3420
cgtctcactt	gatcctcata	aggaaactaa	ggctcagaat	gagtagagct	gggttcagaa	3480
tctagctctt	ctaactccaa	gccatctcct	ctttccactg	caggaaactg	cctcttttgt	3540
cagtgaata	atagaaagat	tgtgttagtt	aagtgataac	tgtcatttgt	ttgaaaatgt	3600
tcgagactga	acaaatagca	tttaaactgc	tggcatatag	atgagatatt	gtacttttgt	3660
gcaatgttta	ttacctttga	ttaaattgta	atgtgaagct	tttactaggt	gaatagttca	3720
ttatgtagtg	gaggcttcgt	ggttgtccat	tgaattgtca	cagcaaaatc	tataagtttc	3780
ttcaattcta	caagatagat	ccatatacct	ttgatcactt	ggagactctt	tttttgctgg	3840
tttctagata	actcaggtaa	atcagacctt	tacagagtac	agggctaggt	gaaagaatta	3900
ctgaaaaatc	accttgaaaa	tccgaagggc	tgatataccc	tttatgttcc	tgactgatgc	3960
gcagaacctg	ggggaaatct	acagcaatat	acaggttgca	atgctgataa	cacaacagca	4020
atcctctcct	ctacgtggac	ttactgttgt	ttttttaatt	attattggaa	tgggatttta	4080
gaaaatagaa	gttacctttg	tgtgtgtttt	agggaaggta	gagaagaatc	tgctctttct	4140
ctgaatactg	ttttgacccc	aggcaggacc	ttggaaaggc	caaaacatta	acagtagtac	4200
ttctgttcac	tgaagagtta	tgttacatga	agataaaaatg	gttttgtcgt	gtttattatt	4260
gtattttgtg	ttgatataaa	taaacatggt	aattttaaaca	atgaaaaaaaa	aaaaaaaaaaa	4320
aaaaaaa						4327

```
<210> 28
<211> 681
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 28																
Met	Gly	Ile	Glu	Leu	Leu	Cys	Leu	Phe	Phe	Leu	Phe	Leu	Gly	Arg	Asn	
1				5				10					15			
Asp	His	Val	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu	Thr	Cys	Glu	
			20					25					30			
Asp	Cys	Leu	Leu	Ile	Gly	Pro	Gln	Cys	Ala	Trp	Cys	Ala	Gln	Glu	Asn	
		35					40					45				
Phe	Thr	His	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Thr	Pro	Ala	Asn	
	50					55					60					
Leu	Leu	Ala	Lys	Gly	Cys	Gln	Leu	Asn	Phe	Ile	Glu	Asn	Pro	Val	Ser	
65				70					75						80	
Gln	Val	Glu	Ile	Leu	Lys	Asn	Lys	Pro	Leu	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	Lys	
			85					90						95		
Asn	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Gln	Ile	Ala	Pro	Gln	Ser	Leu	Ile	Leu	Lys	
			100					105					110			
Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Val	His	Val	Arg	Gln	Thr	
		115					120					125				
Glu	Asp	Tyr	Pro	Val	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Ser	Ala	Ser	
	130					135					140					Met Asp Asp Asp Leu Asn
Thr	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Ser							
145					150					155					160	
Lys	Glu	Met	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	
			165						170					175		
Phe	Val	Glu	Lys	Pro	Val	Ser	Pro	Phe	Val	Lys	Thr	Thr	Pro	Glu	Glu	
			180					185					190			
Ile	Ala	Asn	Pro	Cys	Ser	Ser	Ile	Pro	Tyr	Phe	Cys	Leu	Pro	Thr	Phe	
		195					200					205				
Gly	Phe	Lys	His	Ile	Leu	Pro	Leu	Thr	Asn	Asp	Ala	Glu	Arg	Phe	Asn	
	210					215					220					
Glu	Ile	Val	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Ala	Asn	Ile	Asp	Thr	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Gln	Ala	Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Lys	Ile	
			245					250						255		
Gly	Trp	Arg	Asn	Asp	Ser	Leu	His	Leu	Leu	Val	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	

260						265						270					
Asp	Ser	His	Phe	Gly	Met	Asp	Ser	Lys	Leu	Ala	Gly	Ile	Val	Ile	Pro		
275						280						285					
Asn	Asp	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Asp	Ser	Lys	Asn	Glu	Tyr	Ser	Met	Ser		
290						295						300					
Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Pro	Thr	Ile	Gly	Gln	Leu	Ile	Asp	Lys	Leu	Val		
305	310					315					320						
Gln	Asn	Asn	Val	Leu	Leu	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Gln	Glu	Gln	Val	His		
325						330						335					
Leu	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Gly	Leu		
340						345						350					
Leu	Gln	Lys	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Tyr		
355						360						365					
Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Glu		
370						375						380					
Gly	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Ile	Cys	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe		
385	390					395					400						
Gln	His	Gln	Lys	Lys	Cys	Ser	His	Met	Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser		
405						410						415					
Phe	Ser	Val	Thr	Val	Asn	Ile	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Arg	Ser	Arg	His		
420						425						430					
Ile	Ile	Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val		
435						440						445					
Ser	Pro	Glu	Cys	Asn	Cys	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Ser		
450						455						460					
Ser	Lys	Cys	His	His	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	Ala		
465	470					475					480						
Cys	His	Pro	Gly	His	Met	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Cys	Gly	Glu	Asp	Met		
490						495						500					
Leu	Ser	Thr	Asp	Ser	Cys	Lys	Glu	Ala	Pro	Asp	His	Pro	Ser	Cys	Ser		
500						505						510					
Gly	Arg	Gly	Asp	Cys	Tyr	Cys	Gly	Gln	Cys	Ile	Cys	His	Leu	Ser	Pro		
515						520						525					
Tyr	Gly	Asn	Ile	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Cys	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Ser	Cys		
530						535						540					
Val	Arg	His	Lys	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Asp	Phe	Ser	Lys	Asp	Gly	Ser		
545	550					555					560						
Val	Ser	Cys	Ser	Leu	Gln	Gly	Glu	Asn	Glu	Cys	Leu	Ile	Thr	Phe	Leu		
565						570						575					
Ile	Thr	Thr	Asp	Asn	Glu	Gly	Lys	Thr	Ile	Ile	His	Ser	Ile	Asn	Glu		
580						585						590					
Lys	Asp	Cys	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Ile	Pro	Met	Ile	Met	Leu	Gly	Val		
595						600						605					
Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Ile	Trp	Lys		
610						615						620					
Leu	Leu	Val	Ser	Phe	His	Asp	Arg	Lys	Glu	Val	Ala	Lys	Phe	Glu	Ala		
625	630					635					640						
Glu	Arg	Ser	Lys	Ala	Lys	Trp	Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Leu	Tyr	Arg		
645						650						655					
Gly	Ser	Thr	Ser	Thr	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Tyr	Lys	His	Arg	Glu	Lys		
660						665						670					
Gln	Lys	Val	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Cys									
675						680											

485

$\langle 210 \rangle$	29
$\langle 211 \rangle$	3176
$\langle 212 \rangle$	DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

tgataaccca	aggtattcac	agcaagatac	agtgagtctt	aaagttaagc	accgtgcaat	60
tagctttgct	tccttggtt	tttgaaacat	gcatctgtat	aaacctgcct	gtgcagacat	120 cccgagcccc
aagctgggtc	tgccaaaatc	cagtgaatcg	gctctaaaat	gtagatggca	180	
cctagcagt	accaagactc	agcctcaggc	ggcctgcaaa	cctgtgaggc	ccagtggagc	240
agccgaacag	aaatatgttg	aaaagtttct	acgtgttcat	ggaatttcgt	tgcaaggaaac	300
caccagagca	gagacgggca	tggcatacag	gaatcttggg	aaatcaggac	tcagagtttc	360
ttgcttgggt	cttggaaacat	gggtgacatt	tggaggtcaa	atttcagatg	aggttgctga	420
acggctgatg	accatcgcct	atgaaagtgg	tgttaacctc	tttgatactg	ccgaagtcta	480
tgctgctgga	aaggctgaag	tgattctggg	gagcatcatc	aagaagaaag	gctggaggag	540
gtccagtctg	gtcataacaa	ccaaactcta	ctggggtgga	aaagctgaaa	cagaaagagg	600
gctgtcaaga	aagcatatta	ttgaaggatt	gaagggctcc	ctccagaggc	tgcaagctga	660
gtatgtggat	gtggtctttg	caaactcgacc	ggacagtaac	actcccatgg	aagaaattgt	720
ccgagccatg	acacatgtga	taaaccaagg	catggcgatg	tactggggca	cctcgagatg	780
gagtgtatg	gagatcatgg	aagcctattc	tgtagcaaga	cagttcaata	tgatccacc	840
ggtctgtgaa	caagctgagt	accatctttt	ccagagagag	aaagtggagg	tccagctgcc	900
agagctctac	cacaaaatag	gtgttggcgc	aatgacatgg	tctccacttg	cctgtggaat	960
catctcagga	aaatacggaa	acggggtgcc	tgaaggttcc	agggcttcac	tgaagtgcta	1020
ccagtgggtg	aaagaaagaa	ttgtaagtga	agaagggaga	aaacagcaaa	acaagctaaa	1080
agacctttcc	ccaattgcgg	agcgtctggg	atgcacacta	cctcagctag	ctgttgctgtg	1140
gtgctgaga	aatgaagggtg	tgagttctgt	gctcctggga	tcatccactc	ctgaacaact	1200
cattgaaaac	cttgggtgcca	ttcaggttct	cccaaagatg	acatcacatg	tggtaaatga	1260
gattgataac	atactgcgca	acaagcccta	cagcaagaag	gactatagat	cataaggcaa	1320
tgcatgaacc	acagaagctg	catggttaaa	atagcggcct	gtgcccagta	cagaaagggtg	1380
ttactaacca	gtcttttgaa	tcacttagca	gcttgctcgt	caacctctag	tgtccctccc	1440
tggattcttt	gagggtgtctg	ctgtcgctac	cactgtgcac	atctgaaaac	tcacaaccaa	1500
gaaaatccat	tctattttct	tatcttggac	tggagtcacc	tattcttgca	ttgctgtata	1560
cacctcatgc	ttatgcaatg	ggaagaatat	ggggggccagg	gggtgtggta	ctaccttcag	1620
gcatttggta	actcaaagaa	ggctgtacag	atatattttt	tcaaaaagaa	caaaatccac	1680
agatgcaatg	tgagttgcgt	aagaaacaga	gtagatagac	taaattcagt	gaaggaaagg	1740
aattgagaga	tttttcttag	taaataagatt	attgttaagt	aaatagttaa	taaaaatata	1800
tctcactgca	aaaaaaaaaa	aagcagtatc	ttcactcaaa	agtcttgctt	ggaagaataa	1860
gcagaaaagaa	ttttatata	tttttttcta	ttttcacatt	cataactaaca	agttttgttc	1920
catttgttat	tcaataaaaac	aaaaatttct	aggatatttg	tttattacct	ttcaaataat	1980
tactgttgct	tggccccaag	aatggccttg	tacaacttat	ccagaatgtc	tattaggatt	2040
ctaattgtat	gtccacttac	aagtagagac	agtaaaaagga	tgaataccca	atcttttagtg	2100
acaatgcagc	tgatttatga	aagagagggc	tacactgcta	tggaaactta	gcttcaaaga	2160
aatgcaatg	tatctgcaat	taggtgttca	ttttttacta	cattttatta	aaacctgctt	2220
tatactttca	actgcttgta	ggcacaactt	ctgcaagttt	aaatatttga	gctttacaaa	2280
taaacataca	catgctcagt	tttttttaagt	aaacctgtaa	aatacccagg	aaggcaaagt	2340
ttcattgttt	aattagcact	gggattttat	aatataatgt	ttgggtattt	tgaggcattg	2400
ttaacatgaa	agtcaaccac	tggctttgtg	aaaaatgcta	tgtcactatt	cagaatatgc	2460
tgggtaaaatt	aacttgcccta	gtgaaaagca	aaatgttaaa	gaaagaactt	ctggttctat	2520
aatcatatta	tatgcaactaa	actatatgca	tgaagtttct	ttgcatggat	taatggggct	2580
tacccttggt	gcaactcgaaa	tctgaggtgt	atctagccct	gccactattg	gctacttacc	2640
ctcattaata	tcccacttga	gaaaaattgt	gagactatac	tgtgtcaata	tctgtaaaaa	2700
gagagaaaac	atgttttttt	ttttttgaag	ggggtgggtg	gggagtggcc	ctttaactcc	2760
tatttggtcta	tctgaggatg	tacaaaattc	tcatttaatt	ttctggtcag	caagttcccc	2820
acacagaaat	cactctgagg	tttacagaag	aactgtaata	ttatttttaa	atgcatgttt	2880
ctgtcattag	ttctagatat	gtacttcatg	gttaaattct	aaatctgaaa	atgctagtgg	2940
gagatatcaa	gaaattttct	ttttgattac	tagtacctgt	attctaacag	agagtttgaa	3000
ttttttgccc	gtgttatcag	aatgatggaa	attgatcatt	ttcagttgtt	cattgtgtat	3060
tcaatccagc	tgaactgctg	tatgtataga	ggagcttgag	gtgctgtcta	atgggaaagt	3120
tgatttgatt	gattttatttg	cttagagtaa	taaaagcatt	ttgtgcattc	aatctt	3176

<210> 30

<211> 408

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

Met His Leu Tyr Lys Pro Ala Cys Ala Asp Ile Pro Ser Pro Lys Leu
 1          5          10          15
Gly Leu Pro Lys Ser Ser Glu Ser Ala Leu Lys Cys Arg Trp His Leu
 20          25          30
Ala Val Thr Lys Thr Gln Pro Gln Ala Ala Cys Lys Pro Val Arg Pro
 35          40          45
Ser Gly Ala Ala Glu Gln Lys Tyr Val Glu Lys Phe Leu Arg Val His
 50          55          60
Gly Ile Ser Leu Gln Glu Thr Thr Arg Ala Glu Thr Gly Met Ala Tyr
 65          70          75          80
Arg Asn Leu Gly Lys Ser Gly Leu Arg Val Ser Cys Leu Gly Leu Gly
 85          90          95
Thr Trp Val Thr Phe Gly Gly Gln Ile Ser Asp Glu Val Ala Glu Arg
 100         105         110
Leu Met Thr Ile Ala Tyr Glu Ser Gly Val Asn Leu Phe Asp Thr Ala
 115         120         125
Glu Val Tyr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Val Ile Leu Gly Ser Ile Ile
 130         135         140
Lys Lys Lys Gly Trp Arg Arg Ser Ser Leu Val Ile Thr Thr Lys Leu
 145         150         155         160
Tyr Trp Gly Gly Lys Ala Glu Thr Glu Arg Gly Leu Ser Arg Lys His
 165         170         175
Ile Ile Glu Gly Leu Lys Gly Ser Leu Gln Arg Leu Gln Leu Glu Tyr
 180         185         190
Val Asp Val Val Phe Ala Asn Arg Pro Asp Ser Asn Thr Pro Met Glu
 195         200         205
Glu Ile Val Arg Ala Met Thr His Val Ile Asn Gln Gly Met Ala Met
 210         215         220
Tyr Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Ala Met Glu Ile Met Glu Ala Tyr
 225         230         235         240
Ser Val Ala Arg Gln Phe Asn Met Ile Pro Pro Val Cys Glu Gln Ala
 245         250         255
Glu Tyr His Leu Phe Gln Arg Glu Lys Val Glu Val Gln Leu Pro Glu
 260         265         270
Leu Tyr His Lys Ile Gly Val Gly Ala Met Thr Trp Ser Pro Leu Ala
 275         280         285
Cys Gly Ile Ile Ser Gly Lys Tyr Gly Asn Gly Val Pro Glu Ser Ser
 290         295         300
Arg Ala Ser Leu Lys Cys Tyr Gln Trp Leu Lys Glu Arg Ile Val Ser
 305         310         315         320
Glu Glu Gly Arg Lys Gln Gln Asn Lys Leu Lys Asp Leu Ser Pro Ile
 325         330         335
Ala Glu Arg Leu Gly Cys Thr Leu Pro Gln Leu Ala Val Ala Trp Cys
 340         345         350
Leu Arg Asn Glu Gly Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ser Ser Thr Pro
 355         360         365
Glu Gln Leu Ile Glu Asn Leu Gly Ala Ile Gln Val Leu Pro Lys Met
 370         375         380
Thr Ser His Val Val Asn Glu Ile Asp Asn Ile Leu Arg Asn Lys Pro
 385         390         395         400
Tyr Ser Lys Lys Asp Tyr Arg Ser
 405

```

<210> 31
 <211> 3744
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 ccacgcgtcc ggtggcggtc gagcgtggcg taggcgaatc ctccggcacta agcatatgga 60
 cctcgcggcg gcagcggagc cgggcgcggg cagccagcac ctggagggtcc gcgacgaggt 120
 ggccgagaaag tgccagaaac tgttcctgga cttcttgag gagtttcaga gcagcgatgg 180
 agaaattaaa tacttgcaat tagcagagga actgattcgt cctgagagaa acacattggg 240
 tgtgagtttt gtggacctgg aacaatttaa ccagcaactt tccaccacca ttcaagagga 300
 gttctataga gtttaccctt acctgtgtcg ggccttgaaa acattcgtca aagaccgtaa 360
 agagatccct cttgccaaag atttttatgt tgcattccaa gacctgccta ccagacacaa 420
 gattcgagag ctcacctcat ccagaattgg tttgtctact cgcctcagtg ggcaggtggg 480
 gcggactcac ccagttcacc cagagcttgt gagcggaaact tttctgtgct tggactgtca 540
 gacagtgatc agggatgtag aacagcagtt caaatacaca cagccaaaca tctgccgaaa 600
 tccagtttgt gccaacagga ggagattctt actggatata aataaatcaa gatttggtga 660
 ttttcaaaag gttcgtattc aagagaccca agctgagctt cctcgaggga gtatcccccg 720
 cagtttagaa gtaattttta gggctgaagc tgtggaatca gctcaagctg gtgacaagtg 780
 tgactttaca gggacactga ttgttgtgcc tgacgtctcc aagcttagca caccaggagc 840
 acgtgcagaa actaattccc gtgtcagtggt tgttgatgga tatgagacag aaggcattcg 900
 aggactccgg gcccttggtg ttagggacct ttcttatagg ctggtctttc ttgcctgctg 960
 tgttcgcca accaacccaa ggtttggggg gaaagagctc agagatgagg aacagacagc 1020
 tgagagcatt aagaaccaa tgactgtgaa agaattgggag aaagtgtttg agatgagtca 1080
 agataaaaat ctataccaca atctttgtac cagcctgttc cttactatac atggcaatga 1140
 tgaagtaaaa cggggtgtcc tgctgatgct ctttgggtggc gttccaaaga caacaggaga 1200
 aggacactct cttcgagggg acataaatgt ttgcattgtt ggtgacccaa gtacagctaa 1260
 gagccaattt ctcaagcacg tggaggagtt cagccccaga gctgtctaca ccagtggtaa 1320
 agcgtccagt gctgctggct taacagcagc tgttgtgaga gatgaagaat ctcagagtt 1380
 tgtcattgag gctggagctt tgatgttggc tgataatggt gtgtgttgta ttgatgaatt 1440
 tgataagatg gacgtgcggg atcaagttgc tattcatgaa gctatggaac agcagaccat 1500
 atccatcact aaagcaggag tgaaggctac tctgaacgcc cggacgtcca ttttggcagc 1560
 agcaaaccce atcagtgagc actatgacag atcaaaatca ttgaaacaga atataaattt 1620
 gtcagctccc atcatgtccc gattcgatct cttctttatc cttgtggatg aatgtaatga 1680
 ggttacagat tatgccattg ccaggcgcac agtagattttg cattcaagaa ttgaggaatc 1740
 aattgatcgt gtctattccc tcgatgatat cagaagatat cttctctttg caagacagtt 1800
 taaaccceaag atttccaaag agtcagagga cttcattgtg gagcaatata aacatctccg 1860
 ccagagagat ggttctggag tgaccaagtc ttcattggagg attacagtgc gacagcttga 1920
 gagcatgatt cgtctctctg aagctatggc tcggatgcac tgctgtgatg aggtccaacc 1980
 taaacatgtg aaggaagctt tccggttact gaataaatca atcatccgtg tggaaacacc 2040
 tgatgtcaat ctagatcaag aggaagagat ccagatggag gtagatgagg gtgccgggtg 2100
 catcaatggt catgctgaca gccctgctcc tgtgaacggg atcaatggct acaatgaaga 2160
 cataaatcaa gagtctgctc ccaaagcctc ctttaaggctg ggcttctctg agtactgccg 2220
 aatctctaac cttattgtgc ttcacctcag aaagggtggaa gaagaagagg acgagtcagc 2280
 attaaagagg agcgagcttg ttaactggta cttgaaggaa atcgaatcag agatagactc 2340
 tgaagaagaa cttataaata aaaaaagaat catagagaaa gttattcatc gactcacaca 2400
 ctatgatcat gttctaattg agctcaccca ggctggattg aaaggctcca cagaggggag 2460
 tgagagctat gaagaagatc cctacttggg agttaaccct aactacttgc tcgaagattg 2520
 agatagtga agtaactgac cagagctgag gaactgtggc acagcacctc gtggcctgga 2580
 gcttggctgg agctctgcta gggacagaag tgtttctgga agtgatgctt ccaggatttg 2640
 ttttcagaaa caagaattga gttgatggtc ctatgtgtca cattcatcac aggtttcata 2700
 ccaacacagg cttcagcact tcctttgggtg tgtttcctgt cccagtgaag ttggaaccaa 2760
 ataattgtga gtctctataa ccaatacctt tgttttcatg tgtaagaaaa ggcccattac 2820
 ttttaaggta tgtgctgtcc tattgagcaa ataacttttt ttcaattgcc agctactgct 2880
 tttattcatc aaaataaaaat aacttgttct gaagttgtct attggatttc tttctactgt 2940
 accctgatta ttacttccat ctacttctga atgtgagact ttcccttttt gcttaacctg 3000
 gagtgaagag gtagaactgt ggtattatgg atgaggtttc tatgagaagg agtcattaga 3060

```

gaactcatat gaaagctaga ggccttagag atgactttcc aagggttaatt ccagtttttt 3120
tttttttttaa gtttataaaa gtttattata ctttttttaa attactcttt agtaatttat 3180
tttacttctg tgtcctaagg gtaatttctc aggattgttt tcaaattgct ttttttagggg 3240
aatagggtca tttgctatat tacaagcaat ccccaaattt tatggtcttc caggaaaagt 3300
tattaccgtt tatgatacta acagttcctg agacttagct atgatcagta tgttcatgag 3360
gtggagcagt tcctgtgttg cagcttttaa caacagatgg cattcattaa atcacaaagt 3420
atgttaaagg tcacaaaagc aaaataactg tctgaggcta aggccacgt gggacagtct 3480
aatacccatg agtactcaac ttgccttgat gtctgagctt tccagtgcaa tgtgaatttg 3540
agcagccaga aatctattag tagaaagcaa gacagattaa tatagggtta aacaatgatt 3600
taaatatgtt tctcccaata attatctctt tccctggaat caacttgat gaaaccttgt 3660
caaatgttac tccacaagta tgtacaatta agtattttaa aaataaatgg caaacattaa 3720
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3744

```

<210> 32
 <211> 821
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Met	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Ala	Gly	Ser	Gln	His	Leu
1			5						10					15	
Glu	Val	Arg	Asp	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Cys	Gln	Lys	Leu	Phe	Leu	Asp
			20					25					30		
Phe	Leu	Glu	Glu	Phe	Gln	Ser	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Lys	Tyr	Leu	Gln
		35					40					45			
Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Arg	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Leu	Val	Val	Ser
	50					55					60				
Phe	Val	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Thr	Thr	Ile	Gln
65					70					75					80
Glu	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Cys	Arg	Ala	Leu	Lys	Thr
			85						90					95	
Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Lys	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Tyr	Val
			100					105					110		
Ala	Phe	Gln	Asp	Leu	Pro	Thr	Arg	His	Lys	Ile	Arg	Glu	Leu	Thr	Ser
		115					120					125			
Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Ser	Gly	Gln	Val	Val	Arg	Thr
	130					135					140				
His	Pro	Val	His	Pro	Glu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Leu	Cys	Leu	Asp
145					150					155					160
Cys	Gln	Thr	Val	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	Gln	Phe	Lys	Tyr	Thr	Gln	
			165						170					175	
Pro	Asn	Ile	Cys	Arg	Asn	Pro	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Arg	Arg	Phe	Leu
			180					185					190		
Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Ser	Arg	Phe	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Val	Arg	Ile
	195					200						205			
Gln	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ser	Ile	Pro	Arg	Ser	Leu
	210					215					220				
Glu	Val	Ile	Leu	Arg	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Gly	Asp
225					230					235					240
Lys	Cys	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Leu	Ile	Val	Val	Pro	Asp	Val	Ser	Lys
			245						250					255	
Leu	Ser	Thr	Pro	Gly	Ala	Arg	Ala	Glu	Thr	Asn	Ser	Arg	Val	Ser	Gly
			260					265					270		
Val	Asp	Gly	Tyr	Glu	Thr	Glu	Gly	Ile	Arg	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly
	275					280						285			
Val	Arg	Asp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Leu	Val	Phe	Leu	Ala	Cys	Cys	Val	Ala
	290					295					300				
Pro	Thr	Asn	Pro	Arg	Phe	Gly	Gly	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Glu	Gln

305					310					315				320
Thr	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Asn	Gln	Met	Thr	Val	Lys	Glu	Trp	Glu
				325					330					335
Val	Phe	Glu	Met	Ser	Gln	Asp	Lys	Asn	Leu	Tyr	His	Asn	Leu	Cys
			340					345					350	
Ser	Leu	Phe	Pro	Thr	Ile	His	Gly	Asn	Asp	Glu	Val	Lys	Arg	Gly
		355					360					365		
Leu	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Gly	Val	Pro	Lys	Thr	Thr	Gly	Glu	Gly
	370				375					380				
Ser	Leu	Arg	Gly	Asp	Ile	Asn	Val	Cys	Ile	Val	Gly	Asp	Pro	Ser
385					390					395				400
Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	His	Val	Glu	Glu	Phe	Ser	Pro	Arg
			405						410					415
Val	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala
		420						425					430	
Val	Val	Arg	Asp	Glu	Glu	Ser	His	Glu	Phe	Val	Ile	Glu	Ala	Gly
	435						440					445		
Leu	Met	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Val	Cys	Cys	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp
	450					455					460			
Met	Asp	Val	Arg	Asp	Gln	Val	Ala	Ile	His	Glu	Ala	Met	Glu	Gln
465					470					475				480
Thr	Ile	Ser	Ile	Thr	Lys	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala
			485						490					495
Thr	Ser	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	His	Tyr	Asp
		500						505					510	
Ser	Lys	Ser	Leu	Lys	Gln	Asn	Ile	Asn	Leu	Ser	Ala	Pro	Ile	Met
	515					520						525		
Arg	Phe	Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Leu	Val	Asp	Glu	Cys	Asn	Glu	Val
	530				535					540				
Asp	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Leu	His	Ser	Arg	Ile
545					550					555				560
Glu	Ser	Ile	Asp	Arg	Val	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asp	Ile	Arg	Arg	Tyr
			565						570					575
Leu	Phe	Ala	Arg	Gln	Phe	Lys	Pro	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu
		580						585					590	
Phe	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Lys	His	Leu	Arg	Gln	Arg	Asp	Gly	Ser
	595					600						605		
Val	Thr	Lys	Ser	Ser	Trp	Arg	Ile	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Glu	Ser
	610					615				620				
Ile	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Met	Ala	Arg	Met	His	Cys	Cys	Asp	Glu
625					630					635				640
Gln	Pro	Lys	His	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Ser
			645						650					655
Ile	Arg	Val	Glu	Thr	Pro	Asp	Val	Asn	Leu	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile
		660						665					670	
Gln	Met	Glu	Val	Asp	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Asn	Gly	His	Ala
	675					680						685		
Ser	Pro	Ala	Pro	Val	Asn	Gly	Ile	Asn	Gly	Tyr	Asn	Glu	Asp	Ile
	690					695				700				
Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Lys	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gly	Phe	Ser	Glu
705					710					715				720
Cys	Arg	Ile	Ser	Asn	Leu	Ile	Val	Leu	His	Leu	Arg	Lys	Val	Glu
			725						730					735
Glu	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	Asn	Trp
		740						745					750	
Leu	Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	Glu	Ile	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ile
		755					760					765		

Lys	Lys	Arg	Ile	Ile	Glu	Lys	Val	Ile	His	Arg	Leu	Thr	His	Tyr	Asp
770						775					780				
His	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ala	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Glu
785						790				795					800
Gly	Ser	Glu	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Pro	Tyr	Leu	Val	Val	Asn	Pro	Asn
				805					810					815	
Tyr	Leu	Leu	Glu	Asp											
			820												

<210> 33
 <211> 2111
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33

ggccggccac	tcccgtctgc	tgtgacgcgc	ggacagagag	ctaccggtgg	acccacggtg	60
cctccctccc	tgggatctac	acagaccatg	gccttgccaa	cggctcgacc	cctgttgggg	120
tcctgtggga	ccccgcct	cggcagcctc	ctgttcctgc	tcttcagcct	cggatgggtg	180
cagccctcga	ggaccctggc	tggagagaca	gggcaggagg	ctgcacccct	ggacggagtc	240
ctggccaacc	cacctaacat	ttccagcctc	tcccctcgcc	aactccttgg	cttcccgtgt	300
gcggaggtgt	ccggcctgag	cacggagcgt	gtccgggagc	tggctgtggc	cttggcacag	360
aagaatgtca	agctctcaac	agagcagctg	cgctgtcttg	ctcaccggct	ctctgagccc	420
cccaggagacc	tggacgccct	cccattggac	ctgctgctat	tcctcaaccc	agatgcgttc	480
tcggggcccc	aggcctgcac	ccgtttcttc	tcccgcacat	cgaaggccaa	tgtggacctg	540
ctcccagggg	gggtccccga	gcgacagcgg	ctgctgcctg	cggctctggc	ctgctggggg	600
gtgcgggggt	ctctgctgag	cgaggctgat	gtgcggggct	tgggaggcct	ggcttgcgac	660
ctgctggggc	gctttgtggc	cgagtcggcc	gaagtgtctg	taccccggtc	ggtgagctgc	720
ccgggacccc	tggaccagga	ccagcaggag	gcagccaggg	cggctctgca	gggccccggg	780
ccccctacg	gccccccgtc	gacatggtct	gtctccacga	tggacgctct	gcggggcctg	840
ctgcccgtgc	tgggccagcc	catcatccgc	agcatccgcg	agggcatcgt	ggccgcgtgg	900
cggcaacgct	cctctcggga	cccatcctgg	cggcagcctg	aacggaccat	cctccggccg	960
cggttccggc	gggaagtgga	gaagacagcc	tgtccttcag	gcaagaaggc	ccgcgagata	1020
gacgagagcc	tcatcttcta	caagaagtgg	gagctggaag	cctgcgtgga	tgcggccctg	1080
ctggccaccc	agatggaccg	cgtgaacgcc	atcccccttc	cctacgagca	gctggacgtc	1140
ctaaagcata	aactggatga	gctctaccca	caaggttacc	ccgagtctgt	gatccagcac	1200
ctgggctacc	tcttcctcaa	gatgagccct	gaggacattc	gcaagtggaa	tgtgacgtcc	1260
ctggagaccc	tgaaggcttt	gcttgaagtc	aacaaagggc	acgaaatgag	tcctcaggtg	1320
gccaccctga	tcgaccgctt	tgtgaaggga	aggggccagc	tagacaaaga	caccctagac	1380
accctgaccg	ccttctaccc	tgggtacctg	tgtccctc	gccccgagga	gctgagctcc	1440
gcagcatctg	ggcggctcag	ccccaggacc	tggacacgtg	tgacccaagg	1500	
cagctggacg	tcctctatcc	caaggcccgc	cttgcttttc	agaacatgaa	cgggtccgaa	1560
tacttcgtga	agatccagtc	cttcctgggt	ggggccccc	cggaggattt	gaaggcgctc	1620
agtcagcaga	atgtgagcat	ggacttggcc	acgttcacga	agctgcggac	ggatgcgggtg	1680
ctgccgttga	ctgtggctga	ggtgcagaaa	cttctgggac	cccacgtgga	gggctgaag	1740
gcggaggagc	ggcaccgccc	ggtgcgggac	tggatcctac	ggcagcgga	ggacgacctg	1800
gacacgctgg	ggctggggct	acaggggcgc	atccccaacg	gctacctggt	cctagacctc	1860
agcgtgcaag	aggccctctc	ggggacgccc	tgcctcctag	gacctggacc	tgctctcacc	1920
gtcctggcac	tgctcctagc	ctccaccctg	gcctgagggc	ccactccct	tgctggcccc	1980
agccctgctg	gggatccccg	cctggccagg	agcaggcacg	ggtgatcccc	gttccacccc	2040
aagagaactc	gcgctcagta	aacgggaaca	tgccccctgc	agacacgtaa	aaaaaaaaaa	2100
aaaaaaaaaa	a					2111

<210> 34
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
 1          5          10          15
Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20          25          30
Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35          40          45
Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50          55          60
Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65          70          75          80
Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85          90          95
Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
100          105          110
Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
115          120          125
Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
130          135          140
Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
145          150          155          160
Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
165          170          175
Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
180          185          190
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
195          200          205
Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
210          215          220
Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
225          230          235          240
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
245          250          255
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
260          265          270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
275          280          285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
290          295          300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
305          310          315          320
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
325          330          335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
340          345          350
Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
355          360          365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
370          375          380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
385          390          395          400
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp
405          410          415
Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr
420          425          430
Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
435          440          445
Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp

```


450	455	460
Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala		
465	470	475
Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile		480
	485	490
Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser		495
	500	505
Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr		510
	515	520
Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly		525
	530	535
Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg		540
545	550	555
Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu		560
	565	570
Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser		575
	580	585
Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro		590
	595	600
Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala		605
610	615	620

<210> 35
 <211> 2731
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35

gcgcttggcg	ggagatagaa	aagtgcctca	acccgcgcgcg	gcggcgactg	cagttcctgc	60
gagcgaggag	cgcgggacct	gctgacacgc	tgacgccttc	gagcgcggcc	cggggcccgg	120
agcggccgga	gcagcccggg	tcctgacccc	ggcccgggctc	ccgctccggg	ctctgccggc	180
ggcgggcgga	gcgcggcgcg	gtccggggccg	gggggatgtc	tcggcgagacg	cgctgcgagg	240
atctggatga	gctgcactac	caggacacag	attcagatgt	gccggagcag	agggatagca	300
agtgaaggt	caaatggacc	catgaggagg	acgagcagct	gagggccctg	gtgaggcagt	360
ttggacagca	ggactggaag	ttcctggcca	gccacttccc	taaccgcact	gaccagcaat	420
gccagtacag	gtggctgaga	gttttgaatc	cagaccttgt	caaggggcca	tggaacaaag	480
aggaagacca	aaaagtcatc	gagctgggta	agaagtatgg	cacaaagcag	tggaactga	540
ttgccaagca	cctgaagggc	cggtggggga	agcagtgcgcg	tgaacgctgg	cacaaccacc	600
tcaacctga	ggtgaagaag	tcttgctgga	ccgaggagga	ggaccgcac	atctgcgagg	660
cccacaaggt	gctgggcaac	cgctgggccc	agatcgccaa	gatgttgcca	gggaggacag	720
acaatgctgt	gaagaatcac	tggaactcta	ccatcaaaaag	gaaggtggac	acaggaggct	780
tcttgagcga	gtccaaagac	tgcaagcccc	cagtgtactt	gctgctggag	ctcgaggaca	840
aggacggcct	ccagagtgcc	cagcccacgg	aaggccaggg	aagtcttctg	accaactggc	900
cctccgtccc	tcctaccata	aaggaggagg	aaaacagtga	ggaggaactt	gcagcagcca	960
ccacatcgaa	ggaacaggag	cccacgggta	cagatctgga	cgcagtgcga	acaccagagc	1020
ccttgaggga	attcccgaag	cgtaggagac	aggaaggctc	cccaccagaa	acgagcctgc	1080
cttacaagtg	ggtggtggag	gcagctaacc	tcctcatccc	cgctgtgggt	tctagcctct	1140
ctgaagccct	ggacttgatc	gagtcggacc	ctgatgcttg	gtgtgacctg	agtaaatttg	1200
acctccctga	ggaaccatct	gcagaggaca	gtatcaacaa	cagcctagtg	cagctgcaag	1260
cgtcacatca	gcagcaagtc	ctgccacccc	gccagccttc	cgccctgggt	cccagtgtga	1320
ccgagtaccg	cctggatggc	cacaccatct	cagacctgag	ccggagcagc	cggggcgagc	1380
tgatccccat	ctccccagc	actgaagtgc	ggggctcttg	cattggcaca	ccgccctctg	1440
tgctcaagcg	gcagaggaag	aggcgtgtgg	ctctgtcccc	tgtcactgag	aatagcacca	1500
gtctgtcctt	cctggattcc	tgtaacagcc	tcacgcccac	gagcacacct	gttaagacct	1560
tgcccttctc	gccctcccag	tttctgaact	tctggaacaa	acaggacaca	ttggagctgg	1620
agagcccctc	gctgacatcc	accccagtgt	gcagccagaa	ggtgggtggc	accacaccac	1680
tgcaccggga	caagacaccc	ctgcaccaga	aacatgctgc	gtttgtaacc	ccagatcaga	1740

```

agtactccat ggacaacact cccacacgc caaccccggt caagaacgcc ctggagaagt 1800
acggacccct gaagcccctg ccacagaccc cgcacctgga ggaggacttg aaggaggtgc 1860
tgcgttctga ggctggcatc gaactcatca tcgaggacga catcaggccc gagaagcaga 1920
agaggaagcc tgggctgctg cggagcccca tcaagaaagt ccggaagtct ctggctcttg 1980
acattgtgga tgaggatgtg aagctgatga tgtccacact gcccaagtct ctatccttgc 2040
cgacaactgc cccttcaaac tcttcagacc tcacctgtgc aggtatcaaa gaagacaaca 2100
gcttgctcaa ccagggtctt ttgcaggcca agcccagaaa ggcagcagtg gcccagaagc 2160
cccgaagcca cttcacgaca cctgccccta tgtccagtgc ctggaagacg gtggcctgcg 2220
gggggaccag ggaccagctt ttcattgcagg agaaagcccg gcagctcctg ggccgcctga 2280
agcccagcca cacatctcgg accctcatct tgtcctgagg tgttgagggt gtcacgagcc 2340
cattctcatg tttacagggg ttgtgggggc agaggggggc tgtgaatctg agagtcattc 2400
aggtgacctc ctgcaggagg ccttctgcca ccagcccttc cccagactct caggtggagg 2460
caacagggcc atgtgctgcc ctgttgccga gccagctgtg gggcggtcc tggtgctaac 2520
aaciaagttc cacttccagg tctgcctggt tccctcccca aggccacagg gagctccgtc 2580
agcttctccc aagcccacgt caggcctggc ctcattctcag accctgctta ggatggggga 2640
tgtggccagg ggtgctcctg tgctcaccct ctcttggtgc attttttttg aagaataaaa 2700
ttgcctctct cttaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2731

```

<210> 36

<211> 700

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

Met Ser Arg Arg Thr Arg Cys Glu Asp Leu Asp Glu Leu His Tyr Gln
 1          5          10          15
Asp Thr Asp Ser Asp Val Pro Glu Gln Arg Asp Ser Lys Cys Lys Val
 20          25          30
Lys Trp Thr His Glu Glu Asp Glu Gln Leu Arg Ala Leu Val Arg Gln
 35          40          45

Phe Gly Gln Gln Asp Trp Lys Phe Leu Ala Ser His Phe Pro Asn Arg
 50          55          60
Thr Asp Gln Gln Cys Gln Tyr Arg Trp Leu Arg Val Leu Asn Pro Asp
 65          70          75          80
Leu Val Lys Gly Pro Trp Thr Lys Glu Glu Asp Gln Lys Val Ile Glu
 85          90          95
Leu Val Lys Lys Tyr Gly Thr Lys Gln Trp Thr Leu Ile Ala Lys His
100          105          110
Leu Lys Gly Arg Leu Gly Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn His
115          120          125
Leu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ser Cys Trp Thr Glu Glu Asp Arg
130          135          140
Ile Ile Cys Glu Ala His Lys Val Leu Gly Asn Arg Trp Ala Glu Ile
145          150          155          160
Ala Lys Met Leu Pro Gly Arg Thr Asp Asn Ala Val Lys Asn His Trp
165          170          175
Asn Ser Thr Ile Lys Arg Lys Val Asp Thr Gly Gly Phe Leu Ser Glu
180          185          190
Ser Lys Asp Cys Lys Pro Pro Val Tyr Leu Leu Leu Glu Leu Glu Asp
195          200          205
Lys Asp Gly Leu Gln Ser Ala Gln Pro Thr Glu Gly Gln Gly Ser Leu
210          215          220
Leu Thr Asn Trp Pro Ser Val Pro Pro Thr Ile Lys Glu Glu Glu Asn
225          230          235          240
Ser Glu Glu Glu Leu Ala Ala Ala Thr Thr Ser Lys Glu Gln Glu Pro
245          250          255
Ile Gly Thr Asp Leu Asp Ala Val Arg Thr Pro Glu Pro Leu Glu Glu

```

				260				265					270			
Phe	Pro	Lys	Arg	Glu	Asp	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Pro	Glu	Thr	Ser	Leu	
		275					280					285				
Pro	Tyr	Lys	Trp	Val	Val	Glu	Ala	Ala	Asn	Leu	Leu	Ile	Pro	Ala	Val	
	290					295					300					
Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Asp	
305					310					315					320	
Ala	Trp	Cys	Asp	Leu	Ser	Lys	Phe	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Pro	Ser	Ala	
			325					330						335		
Glu	Asp	Ser	Ile	Asn	Asn	Ser	Leu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	His	Gln	
			340					345					350			
Gln	Gln	Val	Leu	Pro	Pro	Arg	Gln	Pro	Ser	Ala	Leu	Val	Pro	Ser	Val	
		355					360					365				
Thr	Glu	Tyr	Arg	Leu	Asp	Gly	His	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Ser	
	370					375					380					
Ser	Arg	Gly	Glu	Leu	Ile	Pro	Ile	Ser	Pro	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Gly	
385					390					395					400	
Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Gln	Arg	Lys	Arg	
			405					410						415		
Arg	Val	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Thr	Glu	Asn	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Phe	
			420					425					430			
Leu	Asp	Ser	Cys	Asn	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Ser	Thr	Pro	Val	Lys	Thr	
		435					440					445				
Leu	Pro	Phe	Ser	Pro	Ser	Gln	Phe	Leu	Asn	Phe	Trp	Asn	Lys	Gln	Asp	
	450					455					460					
Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Ser	Pro	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Cys	Ser	
465					470					475					480	
Gln	Lys	Val	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Leu	His	Arg	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	
			485					490						495		
His	Gln	Lys	His	Ala	Ala	Phe	Val	Thr	Pro	Asp	Gln	Lys	Tyr	Ser	Met	
			500					505					510			
Asp	Asn	Thr	Pro	His	Thr	Pro	Thr	Pro	Phe	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	
		515					520					525				
Tyr	Gly	Pro	Leu	Lys	Pro	Leu	Pro	Gln	Thr	Pro	His	Leu	Glu	Glu	Asp	
	530					535					540					
Leu	Lys	Glu	Val	Leu	Arg	Ser	Glu	Ala	Gly	Ile	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	
545					550					555					560	
Asp	Asp	Ile	Arg	Pro	Glu	Lys	Gln	Lys	Arg	Lys	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	
			565					570						575		
Ser	Pro	Ile	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Ser	Leu	Ala	Leu	Asp	Ile	Val	Asp	
			580					585					590			
Glu	Asp	Val	Lys	Leu	Met	Met	Ser	Thr	Leu	Pro	Lys	Ser				

<210> 37
 <211> 2304
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 gtccccgcag cgccgtcgcg ccttcctgcc gcaggccacc gaggcgcgcg ccgtctagcg 60
 ccccgacctc gccaccatga gagccctgct ggcgcgcctg cttctctgcg tcctggctcg 120
 gagcgactcc aaaggcagca atgaacttca tcaagttcca tcgaactgtg actgtctaaa 180
 tggaggaaca tgttgtgtcca acaagtactt ctccaacatt cactgggtgca actgccccaa 240
 gaaattcgga gggcagcact gtgaaataga taagtcaaaa acctgctatg aggggaatgg 300
 tcacttttac cgaggaaaagg ccagcactga caccatgggc cggccctgcc tgccctggaa 360
 ctctgccact gtccttcagc aaacgtacca tgcccacaga tctgatgctc ttcagctggg 420
 cctggggaaa cataattact gcaggaaccc agacaaccgg aggcgaccct ggtgctatgt 480
 gcaggtgggc cttaaagccgc ttgtccaaga gtgcatgggt catgactgcg cagatggaaa 540
 aaagccctcc tctcctccag aagaattaaa atttcagtgt ggccaaaaga ctctgaggcc 600
 ccgctttaag attattgggg gagaattcac caccatcgag aaccagccct ggtttgccgc 660
 catctacagg aggcaccggg ggggctctgt cacctacgtg tgtggaggca gcctcatcag 720
 cccttgctgg gtgatcagcg ccacacactg cttcattgat taccaaaaga aggaggacta 780
 catcgtctac ctgggtcgct caaggcttaa ctccaacacg caaggggaga tgaagtttga 840
 ggtggaaaac ctcatcctac acaaggacta cagcgctgac acgcttgctc accacaacga 900
 cattgccttg ctgaagatcc gttccaagga gggcaggtgt gcgcagccat cccggactat 960
 acagaccatc tgcctgccct cgatgtataa cgatccccag tttggcacia gctgtgagat 1020
 cactggcctt ggaaaagaga attctaccga ctatctctat ccggagcagc tgaaaatgac 1080
 tgtttgtgaag ctgatttccc accgggagtg tcagcagccc cactactacg gctctgaagt 1140
 caccacaaa atgtctatgt ctgctgaccc ccaatggaaa acagattcct gccagggaga 1200
 ctgaggggga cccctcgtct gttccctcca aggcgcgatg actttgactg gaattgtgag 1260
 ctggggccgt ggatgtgccc tgaaggacaa gccaggcgct tacacgagag tctcacactt 1320
 cttaccctgg atccgcagtc acaccaagga agagaatggc ctggccctct gaggggtccc 1380
 agggaggaaa cgggcaccac ccgctttctt gctgggtgtc atttttgcag tagagtcac 1440
 tccatcagct gtaagaagag actggaaga taggctctgc acagatggat ttgcctgtgg 1500
 caccaccagg gtgaacgaca atagctttac cctcacggat aggcctgggt gctggctgcc 1560
 cagaccctct ggccaggatg gaggggtggt cctgactcaa catgttactg accagcaact 1620
 tgtctttttc tggactgaag cctgcaggag ttaaaaaggg cagggcatct cctgtgcatg 1680
 ggctcgaagg gagagccagc tcccccgacc ggtgggcatt tgtgaggccc atggttgaga 1740
 aatgaataat ttcccaatta ggaagtgtaa gcagctgagg tctcttgagg gagcttagcc 1800
 aatgtgggag cagcggtttg gggagcagag aactaacga cttcagggca gggctctgat 1860
 attccatgaa tgtatcagga aatataatg tgtgtgtatg tttgcacact tgttgtgtgg 1920
 gctgtgagtg taagtgtgag taagagctgg tgtctgattg ttaagtctaa atatttcctt 1980
 aaactgtgtg gactgtgatg ccacacagag tggctcttct ggagaggtta taggtcactc 2040
 ctggggcctc ttgggtcccc cagtgacag tgccctggga tgtacttatt ctgcagcatg 2100
 acctgtgacc agcactgtct cagtttcaact ttcacataga tgtccctttc ttggccagtt 2160
 atcccttcct ttttagcctag ttcacccaat cctcactggg tggggtgagg accactcctt 2220
 aactgaata tttatatatt actatatttt tttatatatt tgtaattttt aataaaagtg 2280
 atcaataaaa tgtgattttt ctga 2304

<210> 38
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp
 20 25 30
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile
 35 40 45

```

His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile
 50          55          60
Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly
65          70          75          80
Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser
          85          90          95
Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
          100          105          110
Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
          115          120          125
Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
          130          135          140
Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro
145          150          155          160
Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg
          165          170          175
Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
          180          185          190
Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val
          195          200          205
Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His
          210          215          220
Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly
225          230          235          240
Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val
          245          250          255
Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His
          260          265          270
His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys
          275          280          285
Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr
          290          295          300
Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys
305          310          315          320
Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val
          325          330          335
Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly
          340          345          350
Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys
          355          360          365
Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu
          370          375          380
Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys
385          390          395          400
Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu
          405          410          415
Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Asn Gly Leu Ala Leu
          420          425          430

```

<210> 39
 <211> 1760
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gcagcaggcc aagggggagg tgcgagcgtg gacctgggac gggctctgggc ggctctcggt 60
 ggttggcacg ggttcgcaca cccattcaag cggcaggacg cacttgtctt agcagttctc 120

```

gctgaccgcg ctagctgcgg cttctacgct ccggcactct gagttcatca gcaaacgccc 180
tggcgtctgt cctcaccatg cctagccttt gggaccgctt ctcgtcgtcg tccacctcct 240
cttcgccctc gtccttgccc cgaactccca ccccagatcg gccgccgcgc tcagcctggg 300
ggtcggcgac ccgggaggag gggtttgacc gctccacgag cctggagagc tcggactgcg 360
agtccctgga cagcagcaac agtggcttcg ggccggagga agacacggct tacctggatg 420
gggtgtcgtt gcccgaactt gagctgctca gtgaccctga ggatgaacac ttgtgtgcc 480
acctgatgca gctgctgcag gagagcctgg ccagggcgcg gctgggctct cgacgccctg 540
cgcgctgct gatgcctagc cagttggtaa gccaggtggg caaagaacta ctgcgcctgg 600
cctacagcga gccgtgcggc ctgcgggggg cgctgctgga cgtctgcgtg gagcagggca 660
agagctgcca cagcgtgggc cagctggcac tcgaccccag cctggtgccc acctccagc 720
tgacctcgt gctgcgcctg gactcacgac tctggcccaa gatccagggg ctgttttagct 780
ccgccaactc tcccttcctc cctggcttca gccagtcctt gacgctgagc actggcttcc 840
gagtcacaa gaagaagctg tacagctcgg aacagctgct cattgaggag tgttgaactt 900
caacctgagg gggccgacag tgccctccaa gacagagacg actgaacttt tgggggtggag 960
actagaggca ggagctgagg gactgattcc agtggttgga aaactgaggc agccacctaa 1020
ggtggaggtg ggggaatagt gtttcccagg aagctcattg agttgtgtgc ggggtggctgt 1080
gcattgggga cacatacccc tcagtactgt agcatggaac aaaggcttag gggccaacaa 1140
ggcttccagc tggatgtgtg tgtagcatgt accttattat tttgtttact gacagttaac 1200
agtgggtgta catccagaga gcagctgggc tgctcccgcc ccagcctggc ccagggtgaa 1260
ggaagaggca cgtgctcctc agagcagccg gagggagggg ggaggtcgga ggtcgtggag 1320
gtggtttgtg tatcttactg gtctgaaggg accaagtgtg tttgtttgtt gttttgtatc 1380
ttgttttct gatcggagca tcaactactga cctgtttag gcagctatct tacagacgca 1440
tgaatgtaag agtaggaagg ggtgggtgtc agggatcact tgggatcttt gacacttgaa 1500
aaattacacc tggcagctgc gtttaagcct tccccatcg tgtactgcag agttgagctg 1560
gcaggggagg ggctgagagg gtgggggctg gaaccctcc ccgggaggag tgccatctgg 1620
gtcttccatc tagaactgtt tacatgaaga taagatactc actgttcacg aatacacttg 1680
atgttcaagt attaagacct atgcaatatt ttttactttt ctaataaaca tgtttgttaa 1740
aacaacaaaa aaaaaaaaaa 1760

```

<210> 40
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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

180	185	190
Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu		
195	200	205
Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser		
210	215	220
Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys		
225	230	

<210> 41
 <211> 5698
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41

```

agggttcaagt ggagctctcc taaccgacgc gcgctctgtgg agaagcggct tggtcggggg 60
tggctctcgtg gggtcctgcc tgttttagtcg ctttcagggt tcttgagccc cttcacgacc 120
gtcaccatgg aagtgtcacc attgcagcct gtaaatgaaa atatgcaagt caacaaaata 180
aagaaaaatg aagatgctaa gaaaagactg tctgttgaaa gaatctatca aaagaaaaca 240
caattggaac atatttttgc cgcgccagac acctacattg gttctgtgga attagtgacc 300
cagcaaatgt gggtttacga tgaagatgtt ggcattaact ataggggaagt cacttttgtt 360
cctggtttgt acaaaaatctt tgatgagatt ctagttaatg ctgcggaaca caaacaagg 420
gacccaaaaa tgtcttgtat tagagtcaca attgatccgg aaaacaattt aattagtata 480
tgaataatg gaaaaggat tctgttgtt gaacacaaaag ttgaaaagat gtatgtccca 540
gctctcatat ttggacagct cctaacttct agtaactatg atgatgatga aaagaaagt 600
acaggtggtc gaaatggcta tggagccaaa ttgtgtaaca tattcagtac caaatttact 660
gtggaacacag ccagtagaga atacaagaaa atgttcaaac agacatggat ggataatat 720
ggaagagctg gtgagatgga actcaagccc ttcaatggag aagattatac atgtatcacc 780
tttcagcctg atttgtctaa gtttaaaatg caaagcctgg acaaagatat tgttgcacta 840
atggtcagaa gagcatatga tattgctgga tccaccaaag atgtcaaagt ctttcttaat 900
ggaaataaac tgccagtaaa aggatttctg agttatgtgg acatgtattt gaaggacaag 960
ttggatgaaa ctggtaaactc cttgaaagta atacatgaac aagtaaacca caggtgggaa 1020
gtgtgtttta ctatgagtga aaaaggcttt cagcaaatta gctttgtcaa cagcattgct 1080
acatccaagg gtggcagaca tgttgattat gtagctgatac agattgtgac taaacttgtt 1140
gatgttgtga agaagaagaa caagggtggt gttgcagtaa aagcacatca ggtgaaaaat 1200
cacatgtgga tttttgtaaa tgccttaatt gaaaacccaa ctttgactc tcagacaaaa 1260
gaaaacatga ctttacaacc caagagcttt ggatcaacat gccaatgag tgaaaaattt 1320
atcaaagctg ccattggctg tggatttgta gaaagcatac taaactgggt gaagtttaag 1380
gcccagctcc agttaaacaa gaagtgttca gctgtaaaac ataatagaat caagggaatt 1440
cccaaactcg atgatgccaa tgatgcaggg ggcgaaact ccactgagtg tacgcttata 1500
ctgactgagg gagattcagc caaaactttg gctgtttcag gccttgggtg ggttgggaga 1560
gacaaatatg gggttttccc tcttagagga aaaatactca atgttcgaga agcttctcat 1620
aagcagatca tggaaaatgc tgagattaac aatatcatca agattgtggg tcttcagtac 1680
aagaaaaact atgaagatga agattcattg aagacgcttc gttatgggaa gataatgatt 1740
atgacagatc aggaccaaga tggttccac atcaaaggct tgctgattaa ttttatccat 1800
cacaactggc cctctcttct gcgacatcgt tttctggagg aatttatcac tcccattgta 1860
aaggtatcta aaaacaagca agaaatggca ttttacagcc ttctgaatt tgaagagtgg 1920
aagagttcta ctccaaatca taaaaaatgg aaagtcaaat attacaaagg tttgggcacc 1980
agcacatcaa aggaagctaa agaatacttt gcagatatga aaagacatcg tatccagttc 2040
aaatattctg gtcctgaaga tgatgctgct atcagcctgg ctttagcaa aaaacagata 2100
gatgatcgaa aggaatggtt aactaatttc atggaggata gaagacaacg aaagttaact 2160
gggcttcctg aggtactt gtatggacaa actaccacat atctgacata taatgacttc 2220
atcaacaagg aacttatctt gttctcaaat tctgataacg agagatctat cccttctatg 2280
gtggatggtt tgaaaccagg tcagagaaag gttttgttta cttgcttcaa acggaatgac 2340
aagcgagaag taaagggtgc ccaattagct ggatcagtggt ctgaaatgtc ttcttatcat 2400
catggtgaga tgtcactaat gatgaccatt atcaatttgg ctcagaattt tgtgggtagc 2460
aataatctaa acctcttgca gccattgggt cagtttggtg ccaggctaca tgggtggcaag 2520
gattctgcta gtccacgata catctttaca atgctcagct ctttggctcg attgttattt 2580
    
```

```

ccacccaaaag atgatcacac gttgaagttt ttatatgatg acaaccagcg tgttgagcct 2640
gaatggtaca ttcctattat tcccatggtg ctgataaatg gtgctgaagg aatcgggtact 2700
gggtggtcct gcaaaaatccc caactttgat gtgctgtaaa ttgtaaataa catcaggcgt 2760
ttgatggatg gagaagaacc tttgccaatg cttccaagtt acaagaactt caagggtact 2820
attgaagaac tggctccaaa tcaatatgtg attagtgggtg aagtagctat tcttaattct 2880
acaaccattg aaatctcaga gcttcccgtc agaacatgga cccagacata caaagaacaa 2940
gttctagaac ccatgttgaa tggcacccgag aagacacctc ctctcataac agactatagg 3000
gaataccata cagataccac tgtgaaatth gttgtgaaga tgactgaaga aaaactggca 3060
gaggcagaga gagttggact acacaaagtc ttcaaaactcc aaactagtct cacatgcaac 3120
tctatggtgc tttttgacca cgtaggtgtg ttaaagaaat atgacacggt gttggatatt 3180
ctaagagact tttttgaaact cagacttaaa tattatggat taagaaaaga atgggtccta 3240
ggaatgcttg gtgctgaatc tgctaaactg aataatcagg ctgcttttat cttagagaaa 3300
atagatggca aaataatcat tgaaaataag cctaagaaag aattaattaa agttctgatt 3360
cagaggggat atgattcggg tctgtgaag gcttggaag aagcccagca aaaggttcca 3420
gatgaagaag aaaatgaaga gagtgacaac gaaaaggaaa ctgaaaagag tgactccgta 3480
acagattctg gaccaacctt caactatctt cttgatatgc ccctttggta tttaaccaag 3540
gaaaagaaaag atgaactctg caggctaaga aatgaaaaag aacaagagct ggacacatta 3600
aaaagaaaaga gtccatcaga tttgtggaaa gaagacttgg ctacatttat tgaagaattg 3660
gaggctgttg aagccaagga aaaacaagat gaacaagtcg gacttcctgg gaaagggggg 3720
aaggccaagg ggaaaaaaac acaaatggct gaagttttgc cttctccgcg tgggtcaaaga 3780
gtcattccac gaataaccat agaaatgaaa gcagaggcag aaaagaaaaa taaaaagaaa 3840
attaagaatg aaaatactga aggaagccct caagaagatg gtgtggaact agaaggccta 3900
aaacaaagat tagaaaaaga acagaaaaga gaaccaggta caaagacaaa gaaacaaact 3960
acattggcat ttaagccaat caaaaaagga aagaagagaa atccctggtc tgattcagaa 4020
tcagatagga gcagtgcaga aagtaattht gatgtccctc cagagaaaac agagccacgg 4080
agagcagcaa caaaaacaaa attcacaatg gatttggatt cagatgaaga tttctcagat 4140
tttgatgaaa aaactgatga tgaagattht gtcccatcag atgctagtcc acctaagacc 4200
aaaacttccc caaaacttag taacaaagaa ctgaaaccac agaaaagtgt cgtgtcagac 4260
cttgaagctg atgatgttaa gggcagtgtg ccaactgtct caagccctcc tgctacacat 4320
ttcccagatg aaactgaaat tacaacccca gttcctaaaa agaattgtgac agtgaagaag 4380
acagcagcaa aaagtcagtc ttccacctcc actaccgggtg caaaaaaaag ggctgcccc 4440
aaaggaaacta aaagggatcc agctttgaat tctggtgtct ctcaaaagcc tgatcctgcc 4500
aaaaccaaga atcgccgcaa aagggaagcca tccacttctg atgattctga ctctaatttht 4560
gagaaaattg tttcgaaaagc agtcacaagc aagaaatcca agggggagag tgatgacttc 4620
catatggact ttgactcagc tgtggctcct cgggcaaaat ctgtacgggc aaagaaacct 4680
ataaagtacc tggaagagtc agatgaagat gatctgttht aaaatgtgag gcgattattht 4740
taagtaatta tcttaccaag cccaagactg gttthtaagt tacctgaagc tcttaacttc 4800
ctcccctctg aatthtagtht ggggaaggtg tththtagtac aagacatcaa agtgaagtaa 4860
agcccaagtg tctthtagct tthtataata ctgtctaaat agtgaccatc tcatgggcat 4920
tgtthtcttc tctgctthgt ctgtgtthtg agtctgctth cththgtctt taaaacctga 4980
ththtaagth cthctgaact gtagaaatag ctatctgatc acttcagcgt aaagcagtgt 5040
gtthattaac catccactaa gctaaaacta gagcagthtg atthtaaaag gtcactcttc 5100
ctcctthtct actthtcagta gatatgagat agagcataat tatctgttht atcttagtht 5160
tatacataat ttaccatcag atagaactth atggttctag tacagatact ctactacact 5220
cagcctctta tgtgccaggt tthtctthta gcaatgagaa attgctcatg tcttctcatc 5280
tctcaaatca tcagaggcca aagaaaaaca cthtggtgtg gtctataact tgacacagtc 5340
aatagaatga agaaaattag agtagthtat tgattatthc agctcttgac ctgtcccctc 5400
tggtgcctc tgagtctgaa tctcccaaag agagaaacca atthtctaaga ggactggatt 5460
gcagaagact cggggacaac atthgatcca agatctthaa tgttatattg ataaccatgc 5520
tcagcaatga gctattagat tcatthtggt aaatctccat aatthcaatt tgtaaactht 5580
gttaagacct gtctacattg ttatatgtgt gtgacttgag taatgttatc aacgtththt 5640
taaataattht ctatgtththt ctattagcta aatthcaaca atthtgtact ttaataaaa 5698

```

<210> 42
 <211> 1531
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met 1	Glu	Val	Ser	Pro 5	Leu	Gln	Pro	Val	Asn 10	Glu	Asn	Met	Gln	Val	Asn 15
Lys	Ile	Lys	Lys	Asn 20	Glu	Asp	Ala	Lys 25	Lys	Arg	Leu	Ser	Val 30	Glu	Arg
Ile	Tyr	Gln	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu 40	Glu	His	Ile	Leu	Leu 45	Arg	Pro	Asp
Thr	Tyr	Ile	Gly	Ser	Val	Glu	Leu 55	Val	Thr	Gln	Gln	Met 60	Trp	Val	Tyr
Asp 65	Glu	Asp	Val	Gly	Ile 70	Asn	Tyr	Arg	Glu	Val 75	Thr	Phe	Val	Pro	Gly 80
Leu	Tyr	Lys	Ile	Phe 85	Asp	Glu	Ile	Leu 90	Val	Asn	Ala	Ala 95	Asp	Asn	Lys
Gln	Arg	Asp	Pro 100	Lys	Met	Ser	Cys	Ile 105	Arg	Val	Thr	Ile 110	Asp	Pro	Glu
Asn	Asn	Leu	Ile 115	Ser	Ile	Trp	Asn 120	Asn	Gly	Lys	Gly	Ile 125	Pro	Val	Val
Glu	His 130	Lys	Val	Glu	Lys	Met 135	Tyr	Val	Pro	Ala	Leu 140	Ile	Phe	Gly	Gln
Leu 145	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn 150	Tyr	Asp	Asp	Asp	Glu	Lys 155	Lys	Val	Thr	Gly 160
Gly	Arg	Asn	Gly 165	Tyr	Gly	Ala	Lys	Leu 170	Cys	Asn	Ile 175	Phe	Ser	Thr	Lys
Phe	Thr	Val 180	Glu	Thr	Ala	Ser	Arg 185	Glu	Tyr	Lys	Lys 190	Met	Phe	Lys	Gln
Thr	Trp	Met 195	Asp	Asn	Met	Gly	Arg 200	Ala	Gly	Glu	Met 205	Glu	Leu	Lys	Pro
Phe	Asn 210	Gly	Glu	Asp	Tyr	Thr 215	Cys	Ile	Thr	Phe	Gln 220	Pro	Asp	Leu	Ser
Lys 225	Phe	Lys	Met	Gln	Ser 230	Leu	Asp	Lys	Asp	Ile 235	Val	Ala	Leu	Met	Val 240
Arg	Arg	Ala	Tyr 245	Asp	Ile	Ala	Gly	Ser 250	Thr	Lys	Asp 255	Val	Lys	Val	Phe
Leu	Asn	Gly 260	Asn	Lys	Leu	Pro	Val 265	Lys	Gly	Phe	Arg 270	Ser	Tyr	Val	Asp
Met	Tyr	Leu 275	Lys	Asp	Lys	Leu	Asp 280	Glu	Thr	Gly	Asn 285	Ser	Leu	Lys	Val
Ile	His 290	Glu	Gln	Val	Asn	His 295	Arg	Trp	Glu	Val 300	Cys	Leu	Thr	Met	Ser
Glu 305	Lys	Gly	Phe	Gln	Gln 310	Ile	Ser	Phe	Val	Asn 315	Ser	Ile	Ala	Thr	Ser
Lys	Gly	Gly	Arg 325	His	Val	Asp	Tyr	Val 330	Ala	Asp	Gln 335	Ile	Val	Thr	Lys
Leu	Val	Asp 340	Val	Val	Lys	Lys	Lys 345	Asn	Lys	Gly	Gly 350	Val	Ala	Val	Lys
Ala	His 355	Gln	Val	Lys	Asn	His 360	Met	Trp	Ile	Phe 365	Val	Asn	Ala	Leu	Ile
Glu 370	Asn	Pro	Thr	Phe	Asp 375	Ser	Gln	Thr	Lys	Glu 380	Asn	Met	Thr	Leu	Gln
Pro 385	Lys	Ser	Phe	Gly 390	Ser	Thr	Cys	Gln	Leu 395	Ser	Glu	Lys 400	Phe	Ile	Lys
Ala	Ala	Ile	Gly 405	Cys	Gly	Ile	Val	Glu 410	Ser	Ile	Leu 415	Asn	Trp	Val	Lys
Phe	Lys	Ala 420	Gln	Val	Gln	Leu	Asn 425	Lys	Lys	Cys 430	Ser	Ala	Val	Lys	His

Asn	Arg	Ile	Lys	Gly	Ile	Pro	Lys	Leu	Asp	Asp	Ala	Asn	Asp	Ala	Gly
		435					440					445			
Gly	Arg	Asn	Ser	Thr	Glu	Cys	Thr	Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Gly	Asp	Ser
	450					455					460				
Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Val	Gly	Arg	Asp	Lys
465					470					475					480
Tyr	Gly	Val	Phe	Pro	Leu	Arg	Gly	Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Arg	Glu	Ala
				485					490					495	
Ser	His	Lys	Gln	Ile	Met	Glu	Asn	Ala	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Ile	Lys
			500					505					510		
Ile	Val	Gly	Leu	Gln	Tyr	Lys	Lys	Asn	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Leu
		515					520					525			
Lys	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Lys	Ile	Met	Ile	Met	Thr	Asp	Gln	Asp	Gln
	530					535					540				
Asp	Gly	Ser	His	Ile	Lys	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Ile	His	His	Asn
545					550					555					560
Trp	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	His	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Phe	Ile	Thr	Pro
				565					570					575	
Ile	Val	Lys	Val	Ser	Lys	Asn	Lys	Gln	Glu	Met	Ala	Phe	Tyr	Ser	Leu
			580					585					590		
Pro	Glu	Phe	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Ser	Thr	Pro	Asn	His	Lys	Lys	Trp
		595					600					605			
Lys	Val	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Lys	Glu	Ala
	610					615					620				
Lys	Glu	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Lys	Arg	His	Arg	Ile	Gln	Phe	Lys	Tyr
625					630					635					640
Ser	Gly	Pro	Glu	Asp	Asp	Ala	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Phe	Ser	Lys	Lys
				645					650					655	
Gln	Ile	Asp	Asp	Arg	Lys	Glu	Trp	Leu	Thr	Asn	Phe	Met	Glu	Asp	Arg
			660					665					670		
Arg	Gln	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Pro	Glu	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Gln
		675					680					685			
Thr	Thr	Thr	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe	Ile	Asn	Lys	Glu	Leu	Ile
	690					695					700				
Leu	Phe	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Glu	Arg	Ser	Ile	Pro	Ser	Met	Val	Asp
705					710					715					720
Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Gln	Arg	Lys	Val	Leu	Phe	Thr	Cys	Phe	Lys	Arg
				725					730					735	
Asn	Asp	Lys	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Ala
			740					745					750		
Glu	Met	Ser	Ser	Tyr	His	His	Gly	Glu	Met	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Ile
		755					760					765			
Ile	Asn	Leu	Ala	Gln	Asn	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Leu
	770					775					780				
Gln	Pro	Ile													

			885				890				895				
Gly	Thr	Ile	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Asn	Gln	Tyr	Val	Ile	Ser	Gly	Glu
			900				905				910				
Val	Ala	Ile	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Ile	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Pro	Val
			915				920				925				
Arg	Thr	Trp	Thr	Gln	Thr	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Glu	Pro	Met	Leu
			930				935				940				
Asn	Gly	Thr	Glu	Lys	Thr	Pro	Pro	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	Arg	Glu	Tyr
945			950				955				960				
His	Thr	Asp	Thr	Thr	Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Met	Thr	Glu	Glu	Lys
			965				970				975				
Leu	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Gly	Leu	His	Lys	Val	Phe	Lys	Leu	Gln
			980				985				990				
Thr	Ser	Leu	Thr	Cys	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Phe	Asp	His	Val	Gly	Cys
			995				1000				1005				
Leu	Lys	Lys	Tyr	Asp	Thr	Val	Leu	Asp	Ile	Leu	Arg	Asp	Phe	Phe	Glu
1010			1015				1020								
Leu	Arg	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Arg	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Gly	Met
1025			1030				1035				1040				
Leu	Gly	Ala	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Asn	Asn	Gln	Ala	Arg	Phe	Ile	Leu
			1045				1050				1055				
Glu	Lys	Ile	Asp	Gly	Lys	Ile	Ile	Ile	Glu	Asn	Lys	Pro	Lys	Lys	Glu
			1060				1065				1070				
Leu	Ile	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Gly	Tyr	Asp	Ser	Asp	Pro	Val	Lys
			1075				1080				1085				
Ala	Trp	Lys	Glu	Ala	Gln	Gln	Lys	Val	Pro	Asp	Glu	Glu	Glu	Asn	Glu
1090			1095				1100								
Glu	Ser	Asp	Asn	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ser	Val	Thr	Asp
1105			1110				1115				1120				
Ser	Gly	Pro	Thr	Phe	Asn	Tyr	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Leu	Trp	Tyr	Leu
			1125				1130				1135				
Thr	Lys	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Leu	Cys	Arg	Leu	Arg	Asn	Glu	Lys	Glu
			1140				1145				1150				
Gln	Glu	Leu	Asp	Thr	Leu	Lys	Arg	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Leu	Trp	Lys
			1155				1160				1165				
Glu	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Lys
1170			1175				1180								
Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	Gln	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Lys	Ala
1185			1190				1195				1200				
Lys	Gly	Lys	Lys	Thr	Gln	Met	Ala	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Gly
			1205				1210				1215				
Gln	Arg	Val	Ile	Pro	Arg	Ile	Thr	Ile	Glu	Met	Lys	Ala	Glu	Ala	Glu
			1220				1225				1230				
Lys	Lys	Asn	Lys	Lys	Lys	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Thr	Glu	Gly	Ser	Pro
1235			1240				1245								
Gln	Glu	Asp	Gly	Val	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Leu	Glu	Lys
1250			1255				1260								
Lys	Gln	Lys	Arg	Glu	Pro	Gly	Thr	Lys	Thr	Lys	Lys	Gln	Thr	Thr	Leu
1265			1270				1275				1280				
Ala	Phe	Lys	Pro	Ile	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Arg	Asn	Pro	Trp	Ser	Asp
			1285				1290				1295				
Ser	Glu	Ser	Asp	Arg	Ser	Ser	Asp	Glu	Ser	Asn	Phe	Asp	Val	Pro	Pro
			1300				1305				1310				
Arg	Glu	Thr	Glu	Pro	Arg	Arg	Ala	Ala	Thr	Lys	Thr	Lys	Phe	Thr	Met
1315			1320				1325								
Asp	Leu	Asp	Ser	Asp	Glu	Asp	Phe	Ser	Asp	Phe	Asp	Glu	Lys	Thr	Asp
1330			1335				1340								

Asp Glu Asp Phe Val Pro Ser Asp Ala Ser Pro Pro Lys Thr Lys Thr
1345 1350 1355 1360
Ser Pro Lys Leu Ser Asn Lys Glu Leu Lys Pro Gln Lys Ser Val Val
1365 1370 1375
Ser Asp Leu Glu Ala Asp Asp Val Lys Gly Ser Val Pro Leu Ser Ser
1380 1385 1390
Ser Pro Pro Ala Thr His Phe Pro Asp Glu Thr Glu Ile Thr Asn Pro
1395 1400 1405
Val Pro Lys Lys Asn Val Thr Val Lys Lys Thr Ala Ala Lys Ser Gln
1410 1415 1420
Ser Ser Thr Ser Thr Thr Gly Ala Lys Lys Arg Ala Ala Pro Lys Gly
1425 1430 1435 1440
Thr Lys Arg Asp Pro Ala Leu Asn Ser Gly Val Ser Gln Lys Pro Asp
1445 1450 1455
Pro Ala Lys Thr Lys Asn Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ser Thr Ser Asp
1460 1465 1470
Asp Ser Asp Ser Asn Phe Glu Lys Ile Val Ser Lys Ala Val Thr Ser
1475 1480 1485
Lys Lys Ser Lys Gly Glu Ser Asp Asp Phe His Met Asp Phe Asp Ser
1490 1495 1500
Ala Val Ala Pro Arg Ala Lys Ser Val Arg Ala Lys Lys Pro Ile Lys
1505 1510 1515 1520
Tyr Leu Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Leu Phe
1525 1530

<210> 43
<211> 4797
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
gcagtgaaca caacctttcc cctgagccac tgggaattgga cagaatgccc cattctcctc 60
tgatctccat tcctcatgtg tgggtgtcacc cagaagagga ggaaagaatg catgatgaac 120
ttctacaagc agtatccaag gggccggtga tgttcaggga tgtttccata gacttctctc 180
aagaggaatg ggaatgcctg gacgctgatc agatgaattt atacaaagaa gtgatgttgg 240
agaatttcag caacctggtt tcagtgggac tttccaattc taagccagct gtgatctcct 300
tattggaaca aggaaaagag ccctggatgg ttgatagaga gctgactaga ggcctgtggt 360
cagatctgga atcaatgtgt gagacaaaa tattatctct aaagaagaga catttcagtc 420
aagtaataat tacccgtgaa gacatgtcta cttttattca gccacattt cttattccac 480
ctcaaaaaac tatgagtga gagaaacat gggaaatgtaa gatatgtgga aagacctta 540
atcaaaaact acaatttatc caacatcaga gaattcattt tgggtgaaaa cactatgaat 600
ctaaggagta tgggaagtcc tttagtcgtg gctcactcgt tactcgacat cagaggattc 660
aactggttaa aaaaccctat gaatgtaagg aatgtggcaa ggcttttagt tgtagtccat 720
atttttctca acatcagagg attcacactg gtgagaaacc ctatgaatgt aaggaatgtg 780
gaaaagcctt taagtattgc tcaaaccctt atgatcatca gagaattcac actggtgaga 840
aaccctatga atgtaaagta tgtggaaaag cctttactaa aagttcacia ctttttctac 900
atctgagaat tcatactggg gagaaacctt atgaatgtaa agaattgtgg aaagccttta 960
ctcaaacctc aaggcttatt cagcatcaga gaatgcatac tgggtgagaaa ctttatgaat 1020
gtaagcagt tgggaaggcc tttaatatgt cctcaacact tactaaccat cacagaattc 1080
atgctggtga gaagctctat gaatgtgaag aatgtagaaa ggcctttatt cagagctcag 1140
aacttattca acatcagaga atccatacag atgaaaaacc atatgaatgt aatgaatgtg 1200
ggaaggcctt taataaaggc tcaaacttta ctgcacatca gagaattcac actggtgaga 1260
aaccctatga ctgtaaggaa tgtggaaaag cttttggtag tcgctctgac ctcatcgc 1320
atgagggaa tcatactggg tgaatgacag taaagtaaga ccattttgtt aacctttata 1380
ataatttttt taaaacaggt aaggagaaca aattaggata catattatca aaggttctcc 1440
tatgtattcg tttttaaacg atacgataac aaagtaccaa gtacaaaaac cttggtggct 1500
taaaaacaaga gaaatttatt ctctcatagt ttagagcctg gaaatctaaa ctcaagggtg 1560

ctgatcgttt	tggttccttc	tgaggactct	gaggatctgt	tctatgcctt	tttcctaacc	1620
tctgttaaca	gctggcagtc	cttggcattc	catggctttt	acatacacca	ttccaatctc	1680
tgctccatc	ttcacattgc	attctcgtcg	tgtatctctg	tgtatgtctt	ttatttggac	1740
accagtcagg	ttagattggg	gctacctggt	gacctcatct	taacttgatt	atatctgcca	1800
agacctgtt	tccaagtaag	gtcacattta	ccggtaccag	gggttaggac	ttcagcatat	1860
ctttttaggg	gatacagttc	aacccataat	accctgttag	aatgattttg	tctaataatat	1920
ttgtaatttc	ctttttatata	taagttgtta	gtcaaattta	ttttattttta	ttttatttttg	1980
agacagagtc	tcgctctgtt	gcccgagctg	gagtgacagt	gtgtgatctc	agctcactgc	2040
aacctccagc	tcctgagttc	aagcgattct	tgtgcctcag	cctctcaagt	agttgggatt	2100
acaggcatgc	gccaccatgc	ccggctaatt	tttttttttt	tttttttgta	tttttagtag	2160
cgacgggggt	tcaccatgtt	ggccaggtcg	gtcttgaact	cctgacttca	agtgatctgc	2220
ccgctcagc	ctcccaaaagt	gctgggatta	cagacgtgag	ccaccgtgat	ggccaaaaca	2280
gactttatac	caacaaaaat	taaaaaggac	aaagaaggtc	atttataatg	ataaaggata	2340
aattcaacaa	gaagataaaa	caatcctaaa	tatgtatgca	cccaacactg	caacaccag	2400
atccataaca	cagatactac	tagacctaa	aaaagagata	gacagcaata	caacaatagc	2460
aggggacttc	accactccat	tgacagcact	agacagatca	ctgggacaga	aatcaacaaa	2520
gaaactctgg	acttaaatgt	gactctacac	caaattggacc	caacagacat	ctgaagaaca	2580
ttctacccaa	caaccacaga	atatatactc	ttctctctctg	tgcattggaac	attctcaaaa	2640
ataggtcata	tactggacca	caaagcaagt	atcaataaat	tttaaaaaaa	caaaatcata	2700
tctaactct	tctctgacca	tagtggaata	aaactagata	tcaataccaa	gaggaactct	2760
caaaacagat	acatggaatt	taaacagctt	gctcctgaat	gattttttgga	tcaatgatga	2820
aactaagggtg	gaaattttaaa	atttttttgaa	ataaatgaaa	atagagacaa	aacacatgaa	2880
aacatctgag	atacagcaaa	agcagtgtct	agagaggatt	ttatagcatt	aatgcctac	2940
acaaaaaaga	tagaaaaatc	tcaaatgaat	agcctaacgt	cacatctcaa	ggaactagga	3000
aaaaacaaaa	caaaactcaac	ccaaagctgg	cagaagaaaa	gcaataacaa	atatcagagc	3060
aggcaaaaat	gagactgaga	acaaaggaat	gcaaaagatc	aataaaaagaa	aaagtgtggt	3120
ctttgtaaaag	ataaaaactga	cagaccacta	gctagattaa	ccaagaaaaa	aagaagattc	3180
aaataaaat	aatcagaaat	gataaggtga	tattataact	gataacacag	acataataaa	3240
tatcagcaga	aactatatgc	acataattaga	aaacctagag	gaagtggata	aattcctaga	3300
aacacataac	cttccaagat	tgaaccaggg	agaaatagga	atcctcaaca	gactactgag	3360
tattgaaatt	gaatcagtaa	tagaaaaaaa	tcttgcaaaa	acaaaaagcc	caggaccaga	3420
cagattcaca	gctgaattct	actagacatg	caaggaagaa	ctagtaacag	cactattgaa	3480
actattccaa	aaattatagg	agggaatcct	ccctaactca	ttctacaaag	ccagtatcat	3540
cctgatactg	aagccaggca	aggataaaac	acacaaaaaa	actacaagcc	aatatccctg	3600
atgaaaaatag	acacaaaaat	cttcagcaaa	atactagcaa	accaaataca	acagtacata	3660
aaaaagatag	taacagcaca	gtcaagtggg	ttttatttct	ggggtgtaag	gatggctcaa	3720
catatgcaac	tcaatacatg	attcatcaca	tacacagaat	taaaaataag	ccaggcactc	3780
acacctgtaa	tcccagcact	ttgcaaggcc	aaggcggggca	gatcacatga	tgtcaagagt	3840
ttgagaccag	tctggctgac	atggcgaaac	cctgtctcta	ctaaaaatag	aaaaattggc	3900
tgggcatggt	ggcaggcact	gtagtccag	ctacttggga	ggctgaggca	ggagaattac	3960
ttgaacctga	gaagcggagg	ttgcagttag	ctgagatagt	gccattgcac	tccagcctgg	4020
gcaacagagc	aaattgcttg	aatgtgggag	gtggagggtt	cagttagccg	agattatgcc	4080
attgcactcc	agccggggga	gcaacaaagc	cagactccat	ctcaaaaaaa	aaccaaaaaa	4140
aatcctat	agtacaaggt	acattattta	ggtaattgag	ccattaaaag	ccaacacttt	4200
ccccactaca	ctatatgtgt	atgtaacaca	actgcccttg	taacttccta	aacctataat	4260
taagaaacaa	taaaaggcaa	attaagaatg	ctttttttaa	aggtgggggc	attatgctaa	4320
taagttactg	tggatttcag	agtgcagagt	agaaagatca	caagaattta	gtgtggtagg	4380
tgggaacaga	aaatgggtgt	ataaatttta	ttgacgtggg	agtactggat	attgtagaga	4440
cagatatcat	cagggcaagg	agattaaaga	tttttgcatt	gacggtttga	cactatattg	4500
tggttaataac	actgtatgtg	ttgggagata	gaacaggaaa	catcttccct	ggaatatgta	4560
tactattaaa	tgttttatca	aactttttag	caaacaagac	agcacaattt	ataatttcat	4620
ttctatttct	atgttatgag	aaactgatca	tttattcaaa	tgtttaacag	gcatgttcat	4680
gttactataa	actcttctgt	ttctccatca	cgttgttggg	catctttact	gattacaaat	4740
ttctttacat	atttaagaaa	tatatatatt	tctttatata	ttaaaaaaa	aaaaaaa	4797

<210> 44

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met	Pro	His	Ser	Pro	Leu	Ile	Ser	Ile	Pro	His	Val	Trp	Cys	His	Pro
1				5					10					15	
Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Met	His	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Lys
			20					25					30		
Gly	Pro	Val	Met	Phe	Arg	Asp	Val	Ser	Ile	Asp	Phe	Ser	Gln	Glu	Glu
	35						40					45			
Trp	Glu	Cys	Leu	Asp	Ala	Asp	Gln	Met	Asn	Leu	Tyr	Lys	Glu	Val	Met
	50					55					60				
Leu	Glu	Asn	Phe	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Leu	Ser	Asn	Ser	Lys
65					70					75					80
Pro	Ala	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Gly	Lys	Glu	Pro	Trp	Met	Val
				85					90					95	
Asp	Arg	Glu	Leu	Thr	Arg	Gly	Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Glu	Ser	Met	Cys
			100					105					110		
Glu	Thr	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Arg	His	Phe	Ser	Gln	Val	Ile
		115					120					125			
Ile	Thr	Arg	Glu	Asp	Met	Ser	Thr	Phe	Ile	Gln	Pro	Thr	Phe	Leu	Ile
	130					135					140				
Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	Met	Ser	Glu	Glu	Lys	Pro	Trp	Glu	Cys	Lys	Ile
145					150					155					160
Cys	Gly	Lys	Thr	Phe	Asn	Gln	Asn	Ser	Gln	Phe	Ile	Gln	His	Gln	Arg
				165					170					175	
Ile	His	Phe	Gly	Glu	Lys	His	Tyr	Glu	Ser	Lys	Glu	Tyr	Gly	Lys	Ser
			180					185					190		
Phe	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Arg	His	Gln	Arg	Ile	His	Thr	Gly
		195					200					205			
Lys	Lys	Pro	Tyr	Glu	Cys	Lys	Glu	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Ser	Cys	Ser
	210					215					220				
Ser	Tyr	Phe	Ser	Gln	His	Gln	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr
225					230					235					240
Glu	Cys	Lys	Glu	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Lys	Tyr	Cys	Ser	Asn	Leu	Asn
				245					250					255	
Asp	His	Gln	Arg	Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Glu	Cys	Lys	Val
			260					265					270		
Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Thr	Lys	Ser	Gln	Leu	Phe	Leu	His	Leu	Arg	
		275					280				285				
Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Glu	Cys	Lys	Glu	Cys	Gly	Lys	Ala
	290					295					300				
Phe	Thr	Gln	His	Ser	Arg	Leu	Ile	Gln	His	Gln	Arg	Met	His	Thr	Gly
305					310					315					320
Glu	Lys	Pro	Tyr	Glu	Cys	Lys	Gln	Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Asn	Ser	Ala
				325					330					335	
Ser	Thr	Leu	Thr	Asn	His	His	Arg	Ile	His	Ala	Gly	Glu	Lys	Leu	Tyr
			340					345					350		
Glu	Cys	Glu	Glu	Cys	Arg	Lys	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Ser	Glu	Leu	Ile
		355					360					365			
Gln	His	Gln	Arg	Ile	His	Thr	Asp	Glu	Lys	Pro	Tyr	Glu	Cys	Asn	Glu
	370					375					380				
Cys	Gly	Lys	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Ser	Asn	Leu	Thr	Arg	His	Gln	Arg
385					390					395					400
Ile	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Cys	Lys	Glu	Cys	Gly	Lys	Ala

				405						410					415
Phe	Gly	Ser	Arg	Ser	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Glu	Gly	Ile	His	Thr	Gly
			420					425					430		