



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0059085  
C07K 14/435 (2006.01) (43) 공개일자 2007년06월11일

(21) 출원번호	10-2007-7005364	(87) 국제공개번호	WO 2006/016172
(22) 출원일자	2007년03월07일	(43) 공개일자	2006년02월16일
심사청구일자	없음		
번역문 제출일자	2007년03월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB2005/003165		
국제출원일자	2005년08월11일		

(30) 우선권주장 0417887.7 2004년08월11일 영국(GB)

(71) 출원인 아레스 트레이딩 에스.에이.  
스위스, 쾰른슈-1170 오본느, 존 엔뒤스트리엘 드 루리에따

(72) 발명자 피츠제랄드, 스테펜  
영국, 런던 더블유1티 2엔유, 샤를롯테 스트리트 60, 인파마티카  
파간, 리차드  
영국, 런던 더브유1티 2엔유, 샤를롯테 60, 인파마티카  
비엔코스카, 자드위가  
미국, 메사추세츠 02139, 캠브리지, 파야테 스트리트 45 아파트 3  
파워, 크리스틴  
프랑스, 투아리 에프-01710, 루에 데스 존컬레스 10  
요르케-스미스, 멜라니에  
스위스, 콘피그논 체하-1232, 케민 데 빌론넥스 20에이

(74) 대리인 강명구

전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 세포 표면 당단백질

(57) 요약

본 발명은 세포 표면 당단백질로서 확인된 INSP201이라고 하는 신규한 단백질; 질병의 진단, 예방, 치료에서 상기 단백질 및 인코딩 유전자로부터 핵산 서열의 용도에 관계한다.

대표도

도 4

특허청구의 범위

## 청구항 1.

아래에서 선택되는 폴리펩티드:

(i) SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 또는 SEQ ID NO:30에 열거된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

(ii) 세포 표면 당단백질 집단의 구성원인 이의 단편이거나, 또는 (i)의 폴리펩티드와 공통의 항원 결정부위를 보유하는 폴리펩티드;

(iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 등가물인 폴리펩티드.

## 청구항 2.

제 1항에 있어서, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:24 또는 SEQ ID NO 30에 열거된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 3.

제 1항에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:26 또는 SEQ ID NO:28에 열거된 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 4.

제 1항 또는 2항에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 또는 SEQ ID NO:30에 열거된 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 5.

상기한 청구항의 (iii)에 따른 기능적 등가물인 폴리펩티드에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:16 또는 SEQ ID NO:18에 열거된 아미노산 서열에 상동하고 세포 표면 당단백질 집단의 구성원인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 6.

제 1항 내지 3항중 어느 한 항에 열거된 단편 또는 기능적 등가물인 폴리펩티드에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 또는 SEQ ID NO:18에 열거된 아미노산 서열, 또는 이의 활성 단편과 80% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 7.

제 1항 내지 6항중 어느 한 항에 열거된 기능적 등가물인 폴리펩티드에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 또는 SEQ ID NO:18에 열거된 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드와 현저한 구조적 상동성을 보이는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 8.

제 1항 내지 3항 및 6항중 어느 한 항에 열거된 단편인 폴리펩티드에 있어서, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28 또는 SEQ ID NO:30에 열거된 아미노산 서열로부터 7개 이상의 아미노산 잔기로 구성되는 제 1항 내지 3항중 어느 한 항의 (i) 폴리펩티드와 공통의 항원 결정부위를 보유하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

## 청구항 9.

전술한 항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 인코딩하는 정제된 핵산 분자.

## 청구항 10.

제 9항에 있어서, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:29에 열거된 핵산 서열을 포함하거나 이들의 잉여 등가물이나 단편인 것을 특징으로 하는 정제된 핵산 분자.

## 청구항 11.

제 10항에 있어서, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:29에 열거된 핵산 서열로 구성되거나 이들의 잉여 등가물이나 단편인 것을 특징으로 하는 정제된 핵산 분자.

## 청구항 12.

높은 엄밀도 조건하에서 제 9항 내지 11항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자와 혼성화되는 정제된 핵산 분자.

## 청구항 13.

제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 열거된 핵산 분자를 포함하는 벡터.

## 청구항 14.

제 13항에 따른 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

## 청구항 15.

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 세포 표면 당단백질에 특이적으로 결합하는 리간드.

#### 청구항 16.

제 15항에 있어서, 항체인 것을 특징으로 하는 리간드.

#### 청구항 17.

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 발현이나 활성 수준을 증가 또는 감소시키는 화합물.

#### 청구항 18.

제 17항에 있어서, 폴리펩티드의 생물학적 효과를 유도하지 않으면서 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드에 결합하는 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 19.

제 18항에 있어서, 자연이나 변형된 기질, 리간드, 효소, 수용체, 또는 구조적 또는 기능적 모방체(mimetic)인 것을 특징으로 하는 화합물.

#### 청구항 20.

이질성 아미노산 서열에 융합된 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하는 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 21.

제 20항에 있어서, 이질성 아미노산 서열은 IgG 불변 도메인 또는 이의 단편, 또는 hCG 도메인 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 22.

질병의 치료 또는 진단에 사용되는 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드.

#### 청구항 23.

환자에서 질병을 진단하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

상기 환자로부터 얻은 조직에서 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현 수준, 또는 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 활성 수준을 평가하고;

상기 발현 또는 활성 수준을 대조 수준과 비교하고,

여기서 대조 수준과 상이한 수준은 질병을 암시한다.

#### 청구항 24.

제 23항에 있어서, 시험관내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25.

제 23항 또는 24항에 있어서,

- (a) 리간드-폴리펩티드 복합체의 형성에 적합한 조건하에 본 발명의 제 15항 또는 16항의 리간드를 생물학적 시료와 접촉시키고,
- (b) 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 26.

제 23항 또는 24항에 있어서,

- a) 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자와 프로브간 하이브리드 복합체 형성이 가능한 엄밀도 조건하에서 환자로부터 얻은 조직 시료와 핵산 프로브를 접촉시키고;
- b) (a) 단계에서 이용된 동일한 조건하에서 프로브와 대조 시료를 접촉시키고;
- c) 시료에서 하이브리드 복합체의 존재를 검출하고,

여기서, 대조 시료에서 하이브리드 복합체의 수준과 비교하여 환자 시료에서 하이브리드 복합체의 상이한 수준의 검출은 질병을 암시한다.

#### 청구항 27.

제 23항 또는 24항에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자와 프라이머간 하이브리드 복합체의 형성이 가능한 엄밀도 조건하에서 핵산 프라이머와 환자 조직의 핵산 시료를 접촉시키고;
- b) a) 단계에서와 동일한 조건하에서 대조 시료와 프라이머를 접촉시키고;
- c) 건본 핵산을 증폭하고;
- d) 환자 시료와 대조 시료로부터 증폭된 핵산의 수준을 검출하고;

여기서, 대조 시료에서 증폭된 핵산 수준과 비교하여 환자 시료에서 증폭된 핵산의 현저하게 상이한 수준의 검출은 질병을 암시한다.

#### 청구항 28.

제 23항 또는 24항에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 질병을 검사받는 환자로부터 조직 시료를 얻고;
- b) 조직 시료로부터 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 분리하고;
- c) 질병의 지표로서 핵산 분자에서 질병과 연관된 돌연변이의 존재를 검출하여 환자에서 질병을 진단한다.

### 청구항 29.

제 28항에 있어서, 핵산 분자를 증폭하여 증폭 산물을 만들고, 증폭 산물에서 돌연변이 유무를 검출하는 단계가 추가로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 30.

제 28항 또는 29항에 있어서, 하이브리드-이중 가닥 분자를 형성하는 엄밀도 조건하에서 핵산 분자에 혼성화되는 핵산 프로브와 핵산 분자를 접촉시키고, 여기서 하이브리드 이중-가닥 분자는 질병과 연관된 돌연변이에 상응하는 임의의 부분에서 핵산 프로브 가닥의 혼성화되지 않은 부분을 보유하고; 질병-연관된 돌연변이 유무의 지표로서 프로브 가닥의 혼성화되지 않은 부분의 유무를 검출함으로써 환자에서 돌연변이 유무를 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 31.

제 23항 내지 30항중 어느 한 항에 있어서, 질병에는 염증, 암, 결장암, 염증성 장 질환, 췌장 질환 또는 IL-2 관련된 질환이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 32.

제 23항 내지 30항중 어느 한 항에 있어서, 질병은 림프구 항원이 관여하는 질병인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 33.

세포 표면 당단백질로서 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 용도.

### 청구항 34.

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드를 함유하는 제약학적 조성물.

### 청구항 35.

제 1항 내지 7항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 함유하는 백신 조성물.

### 청구항 36.

염증, 암, 결장암, 염증성 장 질환, 궤장 질환 또는 IL-2 관련된 질환의 치료를 위한 약제의 제조에 사용되는 제 1항 내지 8항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드, 또는 제 34항에 따른 제약학적 조성물.

### 청구항 37.

림프구 항원이 관여하는 질환의 치료를 위한 약제의 제조에 사용되는 제 1항 내지 8항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드, 또는 제 34항에 따른 제약학적 조성물.

### 청구항 38.

환자에서 질병을 치료하는 방법에 있어서, 제 1항 내지 8항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드, 또는 제 34항에 따른 제약학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 39.

제 38항에 있어서, 건강한 개체에서 발현이나 활성 수준과 비교하여 자연 유전자의 발현 또는 폴리펩티드의 활성이 병든 환자에서 감소하는 질병의 경우에, 환자에 투여되는 폴리펩티드, 핵산 분자, 벡터, 리간드, 화합물 또는 조성물은 항진제인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 40.

제 38항에 있어서, 건강한 개체에서 발현이나 활성 수준과 비교하여 자연 유전자의 발현 또는 폴리펩티드의 활성이 병든 환자에서 증가하는 질병의 경우에, 환자에 투여되는 폴리펩티드, 핵산 분자, 벡터, 리간드, 화합물 또는 조성물은 길항제인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 41.

환자에서 질병 치료를 모니터링하는 방법에 있어서, 환자의 조직에서 일정 기간동안 제 1항 내지 8항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 발현이나 활성 수준, 또는 제 9항 내지 12항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자의 발현 수준을 모니터링하고, 시간이 경과함에 따라 활성이나 발현 수준이 대조 수치에 근접하는 것은 질병으로부터 회복을 암시하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 42.

질병의 진단 또는 치료에 효과적인 화합물을 확인하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 상기 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 결합 친화성을 갖는 것으로 생각되는 한가지이상의 화합물과 접촉시키고;

이들 핵산 분자 또는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 화합물을 선별한다.

#### 청구항 43.

질병을 진단하는데 유용한 키트에 있어서,

엄밀도 조건하에서 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자와 혼성화되는 핵산 프로브를 보유하는 제 1 용기;

핵산 분자를 증폭하는데 유용한 프라이머를 보유하는 제 2 용기;

질병 진단을 용이하게 하는 프로브와 프라이머의 사용 설명서를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

#### 청구항 44.

제 43항에 있어서, 혼성화되지 않은 RNA를 절단하는 약품을 보유하는 제 3 용기를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

#### 청구항 45.

핵산 분자 어레이를 포함하고, 어레이중 적어도 하나는 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자인 키트.

#### 청구항 46.

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드에 결합하는 하나이상의 항체 및 상기 항체와 상기 폴리펩티드 사이의 결합 반응을 검출하는데 유용한 시약을 포함하는 진단 키트.

#### 청구항 47.

제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 더욱 높거나 낮은 수준으로 발현하거나 이런 폴리펩티드를 발현하지 않도록 형질전환된 유전자도입 또는 녹아웃(knockout)된 인간이외의 동물.

#### 청구항 48.

질병을 치료하는데 효과적인 화합물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

제 47항에 따른 인간이외의 유전자도입 동물과 후보 화합물을 접촉시키고;

동물에서 질병에 대한 화합물의 효과를 결정한다.

#### 청구항 49.



IVF 또는 피임제 용도로 사용되는 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항중 어느 한 항에 따른 화합물, 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드, 또는 제 34항에 따른 제약학적 조성물.

## 청구항 50.

피임제의 제조에 사용되는 제 1항 내지 8항중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제 9항 내지 12항중 어느 한 항에 따른 핵산 분자, 제 13항에 따른 벡터, 제 14항에 따른 숙주 세포, 제 15항 또는 16항에 따른 리간드, 제 17항 내지 19항중 어느 한 항에 따른 화합물, 제 20항 또는 21항에 따른 융합 폴리펩티드, 또는 제 34항에 따른 제약학적 조성물.

## 청구항 51.

세포 표면 당단백질 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 후보 약제를 스크리닝하기 위한 표적으로서 INSP201 폴리펩티드의 용도.

## 청구항 52.

생물학적 활성 화합물을 선별하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 후보 화합물과 INSP201 폴리펩티드를 발현하는 재조합 숙주 세포를 접촉시키고;
- (ii) 상기 세포의 표면에서 INSP201 폴리펩티드에 결합하거나, 또는 INSP201 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물을 선별한다.

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 세포 표면 당단백질로서 확인된 INSP201이라고 하는 신규한 단백질; 질병의 진단, 예방, 치료에서 상기 단백질 및 인코딩 유전자로부터 핵산 서열의 용도에 관계한다.

본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 참고문헌으로 첨부된다.

### 배경기술

약제 개발 과정은 기능적 유전체학 시대가 도래함에 따라 근본적인 혁명 과정을 겪고 있다. “기능적 유전체학”이란 관심이 있는 단백질 서열에 기능을 부여하기 위해 생체 정보 도구를 이용하는 접근 방법에 적용된다. 이런 도구는 서열 데이터를 만드는 속도가 단백질 서열에 기능을 부여하는 연구실의 능력을 너무 빨리 앞지르기 때문에 그 필요성이 점차 증가되고 있다.

생체 정보 도구는 잠재력 및 정확도에서 증진됨에 따라, 생화학적 특성화의 통상적인 기술을 신속하게 대체되고 있다. 실제로, 본 발명을 확인하는데 이용되는 진보된 생체정보학 도구는 더욱 높은 신뢰도를 부여할 수 있는 결과를 산출할 수 있다.

다양한 연구 기관 및 상업 조직에서는 그들이 이용할 수 있는 서열을 검사하고 있는데, 진행 단계에서 상당한 발견이 이루어지고 있다. 하지만, 연구 및 약제 개발의 목적으로 유전자 및 이들이 인코딩하는 폴리펩티드를 확인하고 더욱 특성화하는 작업이 지속적으로 요구된다.

## 도입

## 분비된 단백질

세포가 세포의 단백질을 만들고 분비하는 능력은 많은 생물학적 과정에 중심한다. 효소, 성장 인자, 세포외 매트릭스 단백질, 신호전달 분자는 모두 세포에 의해 분비된다. 이는 분비 소포(secretory vesicle)의 혈장 막과의 융합을 통하여 진행된다. 대부분의 경우에, 단백질은 소포체(endoplasmic reticulum)를 지향하고 단일 펩티드에 의해 분비 소포 내로 이동된다. 신호 펩티드는 세포질로부터 분비 소포와 같은 막에 결합된 격실로 폴리펩티드 사슬을 운반하는데 영향을 주는 cis-작용 서열이다. 분비 소포를 표적으로 하는 폴리펩티드는 세포외 매트릭스 내로 분비되거나 혈장 막에 유지된다. 혈장 막 내에 유지되는 폴리펩티드는 하나 이상의 막관통 도메인을 보유한다. 세포의 기능에 중심적인 역할을 하는 분비 단백질의 실례는 사이토킨, 호르몬, 세포외 매트릭스 단백질(부착 단백질), 프로테아제, 성장과 분화 인자 등이다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명은 INSP201 폴리펩티드가 세포 표면 당단백질이라는 발견에 기초한다.

본 발명의 제 1 특징의 한 구체예에서, 아래에서 선택되는 폴리펩티드가 제시된다:

(i) SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18에 열거된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

(ii) 세포 표면 당단백질 집단의 구성원인 이의 단편이거나, 또는 (i)의 폴리펩티드와 공통의 항원 결정부위를 보유하는 폴리펩티드;

(iii) (i) 또는 (ii)의 기능적 등가물인 폴리펩티드.

적절하게는, 본 발명의 제 1 특징에 따른 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 12에 열거된 아미노산 서열을 포함한다. 이와 같은 바람직한 단백질은 SEQ ID NO 8에 열거된 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 제 1 특징의 두 번째 구체예에서는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 및/또는 SEQ ID NO:18에 열거된 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드를 제시한다.

적절하게는, SEQ ID NO:8의 첫 79개 아미노산으로 구성되는 단편은 본 발명의 범위에서 배제된다. 상기 단편은 NCBI GenPept entry AX884746 및 Genset의 이름으로 아래의 특허 문서: US20050106595, US6822072, JP2001269182, JP2002511259, EP1033401, WO9953051, US6783961에서 공개되었다. SEQ ID NO:2에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후“INSP201 엑손 1 폴리펩티드”라고 한다. SEQ ID NO:4에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후“INSP201 엑손 2 폴리펩티드”라고 한다. SEQ ID NO:6에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후“INSP201 엑손 3 폴리펩티드”라고 한다. SEQ ID NO:8에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후“전장 INSP201 폴리펩티드”라고 한다.

본 발명은 특정 이론에 한정되지 않지만, INSP201 폴리펩티드의 첫 21개 아미노산은 신호 펩티드를 형성하는 것으로 추정된다.

이러한 추정된 신호 서열을 포함하지 않는 INSP201 엑손 1 폴리펩티드는 SEQ ID NO:10에 열거된다. 이러한 추정된 신호 서열을 포함하지 않는 전장 INSP201 폴리펩티드 서열은 SEQ ID NO:12에 열거된다.

SEQ ID NO:10에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후 “INSP201 엑손 1 성숙 폴리펩티드”라고 한다. SEQ ID NO:12에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후 “INSP201 성숙 폴리펩티드”라고 한다.

본 발명에서 INSP201 폴리펩티드는 다수의 가능한 N-당화 부위를 보유할 것으로 예측된다. 따라서, SEQ ID NO:8의 Asn124, Asn156, Asn188, Asn204, Asn220, Asn250, Asn268에 상응하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 위치에서 N-당화에 의해 변형된 INSP201 폴리펩티드를 포함하거나 이런 폴리펩티드로 구성되는 당단백질이 본 발명에 포함된다.

본 발명에서 INSP201 폴리펩티드는 SEQ ID NO:8에 내포되는 잔기 406-427 사이에 막관통 영역을 보유할 것으로 예측된다. 따라서, INSP201 폴리펩티드의 세포외 변이체가 본 발명에 포함된다. 이와 같은 바람직한 변이체에는 본 명세서에 기술된 바와 같이 apo와 N-당화된 형태로, SEQ ID NO:8의 아미노산 잔기 1-405, 또는 SEQ ID NO:8에 내포되는 아미노산 잔기 22-405를 포함하거나 이런 서열로 구성되는 세포외 형태가 포함된다. SEQ ID NO:14에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후 “INSP201 세포외 폴리펩티드”라고 한다. SEQ ID NO:18에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후 “INSP201 성숙 세포외 폴리펩티드”라고 하고, INSP201 폴리펩티드 신호 펩티드를 형성할 것으로 예측되는 아미노산을 배제한다.

이런 유형의 폴리펩티드 변이체는 리간드, 예를 들면, INSP201 폴리펩티드 및 이런 유형의 다른 단백질에 결합하는 분비된 리간드에 대한 스크리닝 검사에 특히 유용하다. 이들 변이체는 예로써, 이런 리간드와 상기 폴리펩티드가 일정한 역할을 하는 질병의 진단에서 이들 리간드의 정량에도 이용될 수 있다.

INSP201 폴리펩티드의 세포내 변이체 역시 본 발명에 포함된다. 상기 변이체는 SEQ ID NO:8에 내포되는 아미노산 잔기 428-518로 구성되는 폴리펩티드이다. SEQ ID NO:16에 열거된 서열을 보유하는 폴리펩티드는 이후 “INSP201 세포내 폴리펩티드”라고 한다.

본 명세서에서 “INSP201 폴리펩티드”에는 INSP201 엑손 1 폴리펩티드, INSP201 엑손 2 폴리펩티드, INSP201 엑손 3 폴리펩티드, 전장 INSP201 폴리펩티드, INSP201 엑손 1 성숙 폴리펩티드, INSP201 성숙 폴리펩티드, INSP201 세포외 폴리펩티드, INSP201 성숙 세포외 폴리펩티드, INSP201 세포내 폴리펩티드가 포함된다. 이들 모든 폴리펩티드는 본 발명에 포함된다.

적절하게는, 본 발명의 제 1 특징의 이들 구체예에 따른 폴리펩티드는 분비된 단백질, 특히, 세포 표면 당단백질 집단의 구성원으로서 기능한다.

세포 표면 당단백질은 인간 생체 및 생리기능과 보건에서 많은 주목을 받고 있다. 물론, 세포막의 외부 표면은 조직 완전성(tissue integrity)의 조합과 유지에서 중요한 역할을 한다. 발달 중인 세포와 분화된 세포의 외부 표면은 전신 신호, 리간드 또는 호르몬을 인식하는 수용체 분자를 보유한다. 이들 리간드의 결합이나 분리는 세포의 분화된 기능 중의 일부를 통제하고, 상기 세포를 전체 시스템의 필요와 조화시킨다. 외부 표면은 또한, 당단백질과 프로테오글리칸(proteoglycan)으로 피복된다. 단백질과 다당류의 이들 대형 복합체는 유사한 기능의 세포가 응집 조직으로서 함께 작동할 수 있는 조직-특이적 모체(tissue-specific matrix)를 제공한다. 배형성(embryogenesis) 동안, 공통 기능을 갖는 세포의 분류(sorting out)와 집합(tying together)은 이들 세포의 당단백질과 프로테오글리칸 표면의 분자 특이성을 통하여 조장되고, 바람직하게는 통제된다.

탄수화물 사슬은 당단백질에 N-과 O-당화-결합되어 복합 구조를 형성한다. 실제로, N-과 O-글리칸 사슬은 특이적인 조절 현상에 따른 글리코실트랜스퍼라아제(glycosyltransferase)와 글리코시다아제(glycosidase) 처리 반응의 통제된 결과(가령, 이들 효소의 유전자 발현이나 국지화의 수준에서)에 의해 소포체(endoplasmic reticulum)와 Golgi 내에서 조합된다. 이러한 복합적 조절은 수백 개의 구조를 발생시키는데, 이들 구조의 범위는 세포/조직 유형 또는 발달/분화 상태에서 다양하다.

결합성 당화에 의해 유발되는 질병 및 재조합 DNA 기술을 통하여 생산된 치료 당단백질에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, 병든 세포는 정상 세포에서와 특징적으로 구별되고 질병 단계의 평가 및 진단에 유용한 상대적인 비율로 이들 구조를 보유한다. 질병-특이적 당단백질 구조와 이들의 기능에 관한 지식은 치료, 면역요법, 세포 부착 차단, 또는 다른 결합이나 생물학적 과정의 간섭에 이용될 수 있다(Brockhausen I et al., *Acta Anat.* 1998.161(1-4):36-78; Bhatia PK and Mukhopadhyay A, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1999;64: 155-201).

가령, 당화/당단백질의 발현 및 암 진행/악성(Dennis JVV et al., *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):21-34) 또는 유전성 질환(Dennis JW et al., *Bioessays.* 1999 May;21(5):412-21) 사이의 상관관계가 연구되고 있다.

당단백질이 전형적으로, 단백질형(glycoform)의 혼합물로서 발현된다는 점을 고려하여, 당단백질의 생물학적 조사와 관련된 실험을 위한 글리코펩티드와 당단백질 재료를 획득하는 다양한 기술이 개발되었다(Grogan MJ et al., *Annu Rev Biochem.* 2002;71: 593-634).

많은 세포 표면 당단백질은 세포 프로테아제에 의해 제한된 단백질 분해가 발생한다. 이런 허물벗기 기전(shedding mechanism)은 세포의 영역에 의해 인식되는 다른 순환 단백질(circulating protein)의 결합 활성에 영향을 주는 세포의 도메인의 분비를 가능하게 한다. 실제로, 외인성 자극에 대한 세포 반응을 변화시킴으로써 세포의 도메인의 허물벗기는 사이토킨/사이토킨 수용체 시스템에서 집중적으로 조사된 바와 같이, 염증, 세포 퇴행과 아포토시스, 종양발생과 같은 다수의 병리생리학적 과정에 관여한다(Mullberg J et al., Eur Cytokine Netw. 2000 Mar;11(1):27-38; Arribas J and Merlos-Suarez A Curr Top Dev Biol. 2003;54:12544; Dello Sbarba P and Rovida E; BiolChem. 2002 Jan;383(1):69-83).

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드는 히스티딘 태그를 추가로 포함할 수 있다. 적절하게는, 히스티딘 태그는 폴리펩티드의 C-말단에서 관찰된다. 적절하게는, 히스티딘 태그는 1-10개의 히스티딘 잔기(가령, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기)를 포함한다. 더욱 적절하게는, 히스티딘 태그는 6개의 히스티딘 잔기를 포함한다.

본 발명의 “항원 결정부위”는 항체-결합 부위 또는 T-세포 수용체(TCR)에 결합하는, 본 발명의 폴리펩티드의 일부분이다. 대안으로, “항원 결정부위”는 단일 항체 분자가 결합하는, 본 발명의 폴리펩티드의 표면상의 한 부위이다. 일반적으로, 항원은 다수의 상이한 항원 결정부위를 보유하고, 다수의 상이한 특이성의 항체와 반응한다. 적절하게는, 항체는 본 발명의 폴리펩티드에 면역특이적이다. 적절하게는, 항체는 융합 단백질의 일부가 아닌 본 발명의 폴리펩티드에 면역특이적이다. 적절하게는, 항체는 INSP201 또는 이의 단편에 면역특이적이다. 항원 결정부위는 일반적으로, 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학활성 표면 집합으로 구성되고, 특이적인 3차원 구조 특징 및 특이적인 전하 특성을 보유할 수 있다. 적절하게는, “항원 결정부위”는 항원성인, 다시 말하면, 특이적인 면역 반응을 유도하는 본 발명의 폴리펩티드 상의 특정 화학 작용기를 의미한다.

제 2 특징에서, 본 발명은 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 정제된 핵산 분자를 제시한다.

적절하게는, “정제된 핵산 분자”는 (1) 전체 핵산이 공급원 세포로부터 분리될 때 자연적으로 함께 관찰되는 단백질, 지질, 탄수화물 또는 다른 물질의 적어도 50%로부터 분리되는, (2) “정제된 핵산 분자”가 자연에서 연결되는 폴리뉴클레오타이드의 전체 또는 일부에 연결되지 않은, (3) 자연에서 연결되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된, 또는 (4) 자연에서 더욱 큰 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부로서 생성되지 않는 본 발명의 핵산 분자를 의미한다. 적절하게는, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 폴리펩티드 생산에서 이의 이용, 또는 이의 치료, 진단, 예방 또는 연구 용도를 간섭하는, 자연 환경에서 관찰되는 임의의 다른 오염 핵산 분자 또는 다른 오염물질이 실질적으로 존재하지 않는다. 바람직한 구체예에서, 게놈 DNA 분자는 본 발명의 범위에서 배제된다. 적절하게는, 10 kbp(kilo base pairs), 50 kbp, 100 kbp, 150 kbp, 200 kbp, 250 kbp 또는 300 kbp 이상의 게놈 DNA는 본 발명의 범위에서 배제된다. 적절하게는, “정제된 핵산 분자”는 cDNA만으로 구성된다.

적절하게는, 정제된 핵산 분자는 SEQ ID NO:1(INSP201 엑손 1 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:3(INSP201 엑손 2 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:5(INSP201 엑손 3 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:7(INSP201 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:9(INSP201 엑손 1 성숙 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:11(INSP201 성숙 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:13(INSP201 세포의 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:15(INSP201 세포내 폴리펩티드를 인코딩) 또는 SEQ ID NO:17(INSP201 성숙 세포의 폴리펩티드를 인코딩)에 열거된 핵산 서열을 포함하거나, 또는 이들 서열의 잉여 등가물이나 단편이다.

또한, 본 발명에서 정제된 핵산 분자는 SEQ ID NO:1(INSP201 엑손 1 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:3(INSP201 엑손 2 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:5(INSP201 엑손 3 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:7(INSP201 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:9(INSP201 엑손 1 성숙 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:11(INSP201 성숙 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:13(INSP201 세포의 폴리펩티드를 인코딩), SEQ ID NO:15(INSP201 세포내 폴리펩티드를 인코딩) 또는 SEQ ID NO:17(INSP201 성숙 세포의 폴리펩티드를 인코딩)에 열거된 핵산 서열로 구성되거나, 또는 이들 서열의 잉여 등가물이나 단편이다.

제 3 특징에서, 본 발명은 높은 엄밀도 조건하에, 본 발명의 제 2 특징의 핵산 분자와 혼성화되는 정제된 핵산 분자를 제시한다. 높은 엄밀도 혼성화 조건은 50% 포름아미드, 5XSSC(150 mM NaCl, 15 mM 구연산3나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x Denhardtts 용액, 10% 텍스트란 셀레이트, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 내에 42°C에서 하룻밤동안 배양, 이후 0.1X SSC 내에 65°C에서 필터 세척으로 정의된다.

본 명세서에서, “기능적 등가물”은 본 발명의 폴리펩티드 또는 핵산 분자와 실질적으로 유사한 기능적 또는 구조적 특징을 보유하는 단백질 또는 핵산 분자를 의미한다. 단백질의 기능적 등가물은 특정 기능의 수행을 위하여 필요에 따라 변형을 포함한다. “기능적 등가물”은 분자의 단편, 돌연변이체, 하이브리드, 변이체, 유사체 또는 화학적 유도체를 포괄한다.

적절하게는, “기능적 등가물”은 본 발명의 폴리펩티드의 한가지이상의 기능적 활성을 보이는 단백질 또는 핵산 분자이다.

적절하게는, “기능적 등가물”은 생물학적 활성이나 기능의 측정을 위한 적절한 분석평가에서 INSP201 또는 이의 단편과 비교하여 실질적으로 유사한 활성을 보이는 단백질 또는 핵산 분자이다. 적절하게는, “기능적 등가물”은 생물학적 활성이나 기능의 측정을 위한 적절한 분석평가에서 INSP201 또는 이의 단편과 비교하여 동일하거나 더욱 높은 활성을 보이는 단백질 또는 핵산 분자이다. 적절하게는, “기능적 등가물”은 생물학적 활성이나 기능의 측정을 위한 적절한 분석평가에서 INSP201 또는 이의 단편과 비교하여 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100% 또는 그 이상의 활성을 보이는 단백질 또는 핵산 분자이다.

적절하게는, “기능적 등가물”은 본 발명의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 생체내 또는 시험관내 활성을 나타낼 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 적절하게는, “기능적 등가물”은 본 발명의 폴리펩티드의 상응하는 부분이 다른 세포 또는 세포의 분자와 상호작용하는 방식과 실질적으로 유사한 방식으로 이들 다른 분자와 상호작용할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 가령, “기능적 등가물”은 면역검사에서, 본 발명의 폴리펩티드의 상응하는 펩티드(즉, “기능적 등가물”을 달성하기 위하여 변형된 아미노산 서열의 펩티드), 또는 본 발명의 폴리펩티드 자체에 대한 항체의 결합을 감소시킬 수 있는데, 여기서 상기 항체는 본 발명의 폴리펩티드의 상응하는 펩티드에 대항하여 생성되었다. 동물 농도의 기능적 등가물은 상응하는 펩티드의 상기한 결합을 적어도 5%, 바람직하게는 대략 5% 내지 10%, 더욱 바람직하게는 대략 10% 내지 25%, 이보다 더욱 바람직하게는 대략 25% 내지 50%, 가장 바람직하게는 대략 40% 내지 50% 정도 감소시킨다.

가령, 기능적 등가물은 완전한 기능성이거나, 또는 한가지이상의 활성 기능이 부재할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 변형은 예로써, 세포 표면 당단백질로서 실체를 반영하는, 본 발명의 폴리펩티드의 활성 기능에 영향을 줄 수 있다. 제 4 특징에서, 본 발명은 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자를 포함하는 벡터, 예를 들면, 발현 벡터를 제시한다.

제 5 특징에서, 본 발명은 본 발명의 제 4 특징의 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제시한다.

제 6 특징에서, 본 발명은 본 발명의 제 1 특징의 세포 표면 당단백질 집단의 구성원에 특이적으로 결합하는 리간드를 제시한다. 적절하게는, 리간드는 세포 표면 당단백질 집단의 구성원인 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 기능을 저해한다. 본 발명에 따른 폴리펩티드에 대한 리간드는 자연이나 변형된 기질, 효소, 수용체, 소형 유기 분자, 예를 들면, 최대 2000Da, 바람직하게는 800Da 이하의 소형 자연이나 합성 유기 분자, 펩티드 모방체, 무기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 항체, 이들의 구조적 또는 기능적 모방체 등을 비롯한 다양한 형태로 존재한다.

본 발명의 제 7 특징에서는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현을 변형하거나 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 활성을 조절하는데 효과적인 화합물을 제시한다.

이들 화합물은 본 명세서에 기술된 검사법과 스크리닝 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

본 발명의 제 7 특징의 화합물은 유전자의 발현 수준 또는 폴리펩티드의 활성을 증가(향진) 또는 감소(길항)시킨다.

중요하게는, INSP201 폴리펩티드의 기능 확인은 질병의 치료 및/또는 진단에 유효한 화합물을 확인할 수 있는 스크리닝 방법의 설계를 가능하게 한다. INSP201 폴리펩티드의 세포의 형태와 세포내 형태는 이런 성격의 스크리닝 방법에서 특히 유용할 것으로 생각된다. 본 발명의 제 6과 제 7 특징에 따른 리간드와 화합물은 이런 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 이들 방법은 본 발명의 특징에 포함된다.

본 발명의 다른 특징은 후보 약제 조절제, 특히, 세포 표면 당단백질 관련된 질환에 길항하는 후보 약제의 스크리닝을 위한 표적으로서 INSP201 유전자 또는 폴리펩티드의 용도에 관계한다.

본 발명의 또 다른 특징은 INSP201 유전자 또는 폴리펩티드, 또는 이의 단편에 결합하는 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함하는, 세포 표면 당단백질 관련된 질환의 치료를 위한 화합물의 스크리닝 방법에 관계한다.

본 발명의 또 다른 특징은 INSP201 유전자 또는 폴리펩티드, 또는 이의 단편의 활성 조절을 검사하는 단계를 포함하는, 세포 표면 당단백질 관련된 질환의 치료를 위한 화합물의 스크리닝 방법에 관계한다.

본 발명의 제 8 특징에서는 세포 표면 당단백질 집단의 구성원이 관여하는 질병의 치료 또는 진단에 이용되는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 2 특징의 핵산 분자, 또는 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 또는 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 또는 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 또는 본 발명의 제 7 특징의 화합물을 제시한다. 이런 질환에는 신생물, 흑색종, 폐암, 결장직장암, 유방암, 췌장암, 두경부암, 다른 고형암을 비롯한 세포 증식성 질환; 백혈병, 비-호지킨 림프종, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 혈관신생 질환, 카포시스 육종을 비롯한 골수증식성 질환; 알레르기, 염증성 장 질환, 관절염, 건선, 호흡기 염증, 천식, 장기 이식 거부반응을 비롯한 자가면역/염증 질환; 고혈압, 부종, 협심증, 죽상경화증, 혈전증, 패혈증, 쇼크, 재관류 손상, 허혈을 비롯한 심혈관 질환; 중추신경계 질환, 알츠하이머병, 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 통증을 비롯한 신경학적 질환; 만성 폐쇄성 폐 질환과 낭포성 섬유증을 비롯한 호흡기 질환; 발달 장애; 당뇨병, 골다공증, 비만을 비롯한 대사 장애; AIDS와 신장 질환; 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염, 기생충 감염을 비롯한 감염; 다른 병리학적 이상이 포함된다. 적절하게는, 질환은 세포 표면 당단백질이 관여하는 질환이다. 이들 분자는 이런 질환의 치료를 위한 약제의 제조에도 사용될 수 있다. 이들 분자는 피임, 또는 불임을 비롯한 생식 장애의 치료에도 사용될 수 있다.

본 발명의 모이어티(moiety)(즉, 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자, 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 본 발명의 제 7 특징의 화합물)는 염증, 세포 퇴행과 아포토시스, 종양형성(oncogenesis)을 수반하는 질환/질병(이들 두 용어는 동의어다)의 치료 또는 진단에 특히 유용하다.

본 발명의 제 9 특징에서는 환자에서 질병을 진단하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 이런 환자로부터 얻은 조직에서 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현 수준, 또는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 활성 수준을 평가하고, 상기 발현이나 활성 수준을 대조 수준과 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 대조 수준과 상이한 수준은 질병을 암시한다. 적절하게는, 이런 방법은 시험관내에서 수행된다. 유사한 방법을 이용하여 환자에서 질병의 치료 과정을 모니터링할 수 있는데, 시간의 추이에서 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 발현이나 활성 수준의 대조 수준으로의 변화는 질병의 퇴행을 암시한다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 검출하는데 적합한 방법은 (a) 리간드-폴리펩티드 복합체의 형성에 적합한 조건하에 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 예를 들면, 항체를 생물학적 시료와 접촉시키고, (b) 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.

당업자가 인지하는 바와 같이, 본 발명의 제 9 특징에 따른 다양한 이런 방법, 예를 들면, 짧은 프로브와의 핵산 혼성화 방법, 점 돌연변이 분석, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 비정상적 단백질 수준을 검출하는 항체를 이용한 방법이 존재한다. 유사한 방법을 이용하여 환자에서 질병의 치료 과정을 단기 또는 장기적으로 모니터링할 수 있다. 또한, 본 발명은 질병을 진단하는 이들 방법에 유용한 키트를 제시한다.

본 발명의 제 10 특징에서는 세포 표면 당단백질로서 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 용도를 제시한다. 세포 표면 당단백질로서 본 발명의 폴리펩티드의 바람직한 용도는 세포 성장, 대사 또는 분화의 조절인자로서 용도; 수용체/리간드 쌍의 일부로서 용도; 생리학적 또는 병리학적 상태에 대한 진단 마커로서 용도이다.

본 발명의 제 11 특징에서는 제약학적으로 허용되는 담체와 공동으로, 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자, 또는 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 또는 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 또는 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 또는 본 발명의 제 7 특징의 화합물을 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다.

본 발명의 제 12 특징에서는 질병의 진단 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용되는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자, 또는 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 또는 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 또는 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 또는 본 발명의 제 7 특징의 화합물을 제시하는데, 상기 질병에는 백혈병, 림프종, 골수이형성 증후군과 암종, 신생물, 흑색종, 폐암, 결장직장암, 유방암, 췌장암, 경부암 및 다른 고형암을 비롯한 골수증식성 질환; 마크로글로불린혈증과 같은 혈액 질환; 알레르기, 염증성 장 질환, 관절염, 건선, 다발성 경화증, 호흡기 염증, 천식, 장기 이식 거부반응을 비롯한 자가면역/염증 질환, B-세포 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 발달 장애, 생식 장애, 대사 장애, AIDS, 신장 질환, 감염, 다른 병리학적 이상이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

본 발명의 제 13 특징에서는 환자에서 질병을 치료하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자, 또는 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 또는 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 또는 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 또는 본 발명의 제 7 특징의 화합물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현, 또는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 활성이 건강한 개체에서 발현이나 활성 수준에 비하여 병든 환자에서 저하되는 질환의 경우에, 환자에게 투여되는 폴리펩티드, 핵산 분자, 리간드 또는 화합물은 항진제이다. 역으로, 자연 유전자의 발현 또는 폴리펩티드의 활성이 건강한 개체에서 발현이나 활성 수준에 비하여 병든 환자에서 증가되는 질환의 경우에, 환자에게 투여되는 폴리펩티드, 핵산 분자, 리간드 또는 화합물은 길항제이다. 이런 길항제의 실례는 안티센스 핵산 분자, 리보자임, 리간드, 예를 들면, 항체이다.

INSP201 폴리펩티드는 세포 표면 당단백질이고, 따라서 많은 질병 상태에서 일정한 역할을 수행한다. INSP201의 길항제는 이들 질병 상태를 조절하는 방법을 제공한다는 점에서 특히 주목을 받고 있다.

본 발명의 제 14 특징에서는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 더욱 높은, 더욱 낮은 또는 결여된 수준으로 발현하도록 형질전환된 외래유전자도입 또는 녹아웃 비-인간 동물을 제시한다. 이런 외래유전자도입 동물은 질환의 연구에 매우 유용한 모형이며, 이런 질환의 치료 또는 진단에 유효한 화합물의 확인을 위한 스크리닝 과정에도 이용될 수 있다.

본 발명을 실시하는데 이용할 수 있는 표준 기술 및 과정은 아래에 요약하였다. 인지하는 바와 같이, 본 발명은 기술된 특정 방법, 프로토콜, 세포 주, 벡터 및 시약에 국한되지 않는다. 본 명세서에 이용되는 용어는 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 한정하지 않는다. 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

본 명세서에서는 뉴클레오티드 및 핵산에 대하여 표준 약어가 이용된다.

본 발명은 달리 명시하지 않는 경우에, 당분야에 공지된 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 면역학의 통상적인 기술을 이용하여 실시한다.

이런 기술은 기존 문헌에서 충분히 설명된다. 적절한 참고 문헌에는 Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition(1989); DNA Cloning, Volumes I and II(D.N Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization(B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation(B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture(R.I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes(IREL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning(1984); the Methods in Enzymology series(Academic Press, Inc.), especially volumes 154 & 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, London); Scopes,(1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition(Springer Verlag, N.Y.); Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV(D.M. Weir and C. C. Blackwell eds. 1986) 등이 포함된다.

본 명세서에서 “폴리펩티드”는 2개 이상의 아미노산이 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 임의의 펩티드 또는 단백질(즉, 펩티드 등입체성(isostere))을 포괄한다. 폴리펩티드에는 짧은 사슬(펩티드 및 올리고펩티드)과 긴 사슬(단백질)이 모두 포함된다.

본 발명의 폴리펩티드는 성숙한 단백질 형태이거나, 또는 pre-, pro-, 또는 prepro- 부분의 절단으로 활성화되면 활성화 성숙 폴리펩티드를 생산할 수 있는 pre-, pro-, 또는 prepro-단백질 형태이다. 이런 폴리펩티드에서, pre-, pro-, 또는 prepro- 서열은 리더 또는 분비 서열이거나, 또는 성숙한 폴리펩티드 서열의 정제에 이용되는 서열이다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드는 융합 단백질의 일부를 형성할 수 있다. 가령, 분비 또는 리더 서열, pro-서열, 정제를 보조하는 서열, 또는 예로써, 재조합 생산동안 더욱 높은 단백질 안정성을 공여하는 서열을 비롯한 한가지 이상의 부가적인 아미노산을 포함하는 것이 유리하다. 대안으로 또는 부가적으로, 성숙한 폴리펩티드를 다른 화합물, 예를 들면, 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 화합물(가령, 폴리에틸렌 글리콜)과 융합시킬 수도 있다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 융합 단백질은 면역글로불린 융합체를 포함한다, 다시 말하면, 면역글로불린의 전체 또는 일부에 융합된, 세포외 INSP201(가령, INSP201-EC)의 전체 또는 일부를 포함하는 융합 단백질이다. 면역글로불린 융합 단백질을 제조하는 방법은 예로써, WO 01/03737에 기술된 바와 같이 당분야에 널리 공지되어 있다. 당업자가 인지

하는 바와 같이, 본 발명의 융합 단백질은 실시예 6에 기술된 시험관내 검사, 실시예 7에 기술된 암 검사, 또는 실시예 8에 기술된 염증성 장 질환의 동물 모형에서 측정될 수 있는, 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 생물 활성, 예를 들면, IL-2 저해를 유지한다. 융합은 직접적으로, 또는 짧게는 1 내지 3개 아미노산 잔기 혹은 이보다 더욱 긴, 예를 들면, 5, 7, 9, 11 또는 13개 아미노산 잔기의 짧은 링커 펩티드를 통하여 달성될 수 있다. 상기 링커는 예로써, 트리펩티드 서열 E-F-M (Glu-Phe-Met), 또는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드와 면역글로불린 서열 사이에 도입된 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met을 포함하는 13개 아미노산 링커 서열이다. 생성된 융합단백질은 체액에서 연장된 체류 시간(반감기), 증가된 특이적 활성, 증가된 발현 수준, 또는 융합단백질의 용이한 정제와 같은 향상된 특성을 보유한다.

바람직한 구체예에서, 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드는 Ig 분자의 불변 영역, 예를 들면, 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된다. 적절하게는, 이는 선택적으로 인간 IgG1의 힌지 영역과 함께, CH2와 CH3 도메인과 같은 중쇄 영역에 융합된다. Fc 부분은 예로써, 보체 결합(complement binding), Fc 수용체에 결합 등과 같은 원치 않는 활성을 예방하기 위하여 돌연변이될 수 있다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드 및 면역글로불린의 일부를 포함하는 특이적인 융합 단백질의 생산은 예로써, WO 99/09063의 실시예 11에 기술된다. Ig 분자의 다른 동등형 역시 본 발명에 따른 융합단백질, 예를 들면, 동등형 IgG<sub>2</sub> 또는 IgG<sub>4</sub>, 또는 다른 Ig 종류(가령, IgM 또는 IgA)의 생산에 적합하다. 융합 단백질은 단량체 또는 다량체이고, 이종- 또는 동종다량체이다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드의 다른 융합 단백질은 이량체, 삼량체 등의 형성이 가능한 다른 단백질로부터 분리된 도메인을 융합함으로써 제조된다. 본 발명의 폴리펩티드의 다중화를 가능하게 하는 단백질 서열의 실례는 hCG(WO 97/30161), 콜라겐 X(WO 04/33486), C4BP(WO 04/20639), Erb 단백질(WO 98/02540), 또는 꼬인 나선 펩티드(WO 01/00814)와 같은 단백질로부터 분리된 도메인이다. 폴리펩티드에는 20개의 유전자-인코딩 아미노산 이외의 아미노산도 포함될 수 있는데, 이들 아미노산은 자연적인 과정, 예를 들면, 번역후 가공 또는 당분야에 공지된 화학적 변형 기술에 의해 변형될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 통상적으로 존재할 수 있는 이런 공지의 변형에는 글리코실화반응, 지질 부착, 설페이트화반응, 예로써 글루타민산 잔기의 감마-카르복실화반응, 수산화반응, ADP-리보실화반응 등이 포함된다. 다른 가능한 변형에는 아세틸화반응, 아실화반응, 아미드화반응, 플라빈의 공유 부착, 헤미(haeme) 잔기의 공유 부착, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체의 공유 부착, 지질 유도체의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유 부착, 교차-연결, 고리화반응, 이황화결합 형성, 디메틸화반응, 공유 교차 연결의 형성, 시스테인 형성, 피로글루타메이트 형성, 포틸화반응, GPI 앵커 형성, 요오드화반응, 메틸화반응, 미리스톨화반응, 산화, 단백질 분해 과정, 포스포릴화반응, 프레닐화반응, 라셈화반응, 세리노일화반응, 아르기닐화반응과 같은 t-RNA 매개된 아미노산의 단백질에 부가, 유비퀴틴화반응 등이 포함된다.

폴리펩티드의 모든 위치, 예를 들면, 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복시 말단에 변형이 일어날 수 있다. 사실, 폴리펩티드에서 아미노 또는 카르복시 말단, 또는 양쪽 말단 모두의 공유 변형에 의한 차단은 자연 발생 폴리펩티드와 합성 폴리펩티드에서 공통하고, 이런 변형은 본 발명의 폴리펩티드에도 존재한다.

폴리펩티드에서 일어날 수 있는 변형은 폴리펩티드가 어떻게 만들어지는가에 따라 달라진다. 재조합에 의해 만들어진 폴리펩티드의 경우에, 변형의 성질과 정도는 특정 숙주 세포의 번역후 변형 능력 및 목적 폴리펩티드의 아미노산 서열에 존재하는 변형 신호에 의해 상당 부분 결정된다. 가령, 상이한 유형의 숙주 세포 간에는 글리코실화반응 패턴이 변한다.

본 발명의 폴리펩티드는 임의의 적절한 방법으로 만들 수 있다. 이런 폴리펩티드에는 자연 발생 폴리펩티드(가령, 세포 배양물로부터 정제된 폴리펩티드), 재조합에 의해 만들어진 폴리펩티드(융합 단백질 포함), 합성에 의해 만들어진 폴리펩티드 또는 이들 방법의 조합으로 만들어진 폴리펩티드 등이 포함된다.

본 발명의 제 1 특징의 기능적으로 등가인 폴리펩티드는 INSP201 폴리펩티드에 상동성인 폴리펩티드이다. 폴리펩티드의 한 서열이 다른 폴리펩티드의 서열과 동일성이나 유사성이 충분한 경우에, 이들 두 폴리펩티드는 “상동성”이라고 한다. “동일성”이란 배열된 서열의 임의 지점에서 서열 간에 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. “유사성”이란 배열된 서열의 임의 지점에서 아미노산 잔기가 유사한 유형임을 의미한다. 동일성과 유사성 정도는 편의하게 계산할 수 있다

(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1. Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis 프라이머, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).



따라서, 상동성 폴리펩티드에는 자연 생물학적 변이체(가령, 폴리펩티드가 유래되는 종 내에서 대립형질 변이체 또는 지형적 변이체), INSP201 폴리펩티드의 돌연변이체(아미노산 치환, 결손 및 삽입을 포함하는 돌연변이체) 등이 포함된다. 이런 돌연변이체에는 보존형 또는 비-보존형 아미노산(바람직하게는, 보존형 아미노산)에 의해 하나 이상의 아미노산이 치환된 폴리펩티드가 포함되는데, 이런 치환된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 인코딩되거나 인코딩되지 않는다. 전형적으로 이런 치환은 아래의 군 내에서 이루어진다; Ala, Val, Leu, Ile; Ser, Thr; 산성 아미노산 잔기 Asp, Glu; Asn, Gln; 염기성 잔기 Lys, Arg; 또는 방향족 잔기 Phe, Tyr. 5 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 3개, 1 내지 2개 또는 1개 아미노산이 치환된, 결실된 또는 임의의 조합으로 부가된 변이체가 바람직하다. 특히, 단백질의 성질 및 활성에 변화를 주지 않는 침묵 치환, 부가, 결실이 바람직하다. 또한, 보존성 치환이 바람직하다. 이런 돌연변이체에는 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환기를 보유하는 폴리펩티드가 포함된다.

본 발명에서, 임의의 치환은 가급적, 분자의 구조와 생물학적 기능을 보존하기 위하여, 충분히 유사한 화학적 특징을 보유하는 아미노산을 도입하는 치환으로 정의되는 “보존성” 또는 “안전한” 치환이어야 한다(가령, 염기성의 양으로 하전된 아미노산은 다른 염기성의 양으로 하전된 아미노산으로 치환된다).

기존 문헌에서는 단백질의 서열 및/또는 구조에 대한 통계학적 연구와 물리-화학적 연구에 기초하여 보존성 아미노산 치환을 선택할 수 있는 여러 모형을 제시한다(Rogov SI and Nekrasov AN, 2001). 단백질 설계 실험에서, 특이적인 일단의 아미노산의 이용은 접합가능한 활성 단백질을 생산할 수 있고, 단백질 구조에서 더욱 용이하게 수용될 수 있고 기능적/구조적 동족체(homolog)와 파라로그(paralog)를 검출하는데 이용될 수 있는 아미노산 “유의성” 치환의 분류에 도움이 되는 것으로 밝혀졌다(Murphy LR et al., 2000). 유의성 아미노산 군과 더욱 바람직한 유의성 아미노산 군은 표 1에 도시된다.

상이한 목적으로 본 발명의 폴리펩티드 내에 특이적인 비-보존성 돌연변이 역시 도입할 수 있다. 세포 표면 당단백질의 친화성을 감소시키는 돌연변이는 재생되고 재활용되는 이의 능력을 증가시키고, 이의 치료 효능을 잠재적으로 증가시킨다(Robinson CR, 2002). 본 발명의 폴리펩티드에 궁극적으로 존재하는 면역원성 에피토프는 백신을 개발하는데 이용하거나(Stevanovic S. 2002), 또는 단백질 안정성을 증가시키는 돌연변이를 선별하기 위한 공지된 방법에 따라 이들 서열을 변형하고 이들을 교정함으로써 제거할 수 있다(van den Burg B and Eijssink V, 2002; WO 02/05146, WO 00/34317, WO 98/52976).

펩티드 모방체에 포함되는 아미노산 유도체에 대한 바람직한 대안적 유의성 군은 표 2에 정의된다. 아미노산 유도체의 무제한적 목록에는 아미노이소부틸산(Aib), 하이드록시프롤린(Hyp), 1,2,3,4-테트라하이드로-이소퀴놀린-3-COOH, 인돌린-2-카르복실산, 4-디플루오르-프롤린, L-티아졸리딘-4-카르복실산, L-호모프롤린, 3,4-디하이드로-프롤린, 3,4-디하이드록시-페닐알라닌, 사이클로헥실-글리신, 페닐글리신 역시 포함된다.

“아미노산 유도체”는 20개의 유전적으로 인코딩된 자연 발생 아미노산 이외의 아미노산 또는 아미노산-유사 화학적 실체를 의미한다. 특히, 아미노산 유도체는 치환되거나 치환되지 않은, 선형, 가지형, 또는 환형 알킬 부분을 포함하고, 하나 이상의 헤테로원자를 보유한다. 아미노산 유도체는 de novo에서 제조하거나, 또는 상업적 공급원(Calbiochem-Novabiochem AG, Switzerland; Bachem, USA)으로부터 구입할 수 있다.

단백질 구조와 기능을 탐침하고 및/또는 개선하기 위하여, 시험관내와 생체내 번역 시스템을 이용하여 비자연 아미노산 유도체를 단백질 내로 통합하는 다양한 방법이 기존 문헌(Dougherty DA, 2000)에서 보고되었다. 펩티드 모방체 및 비-펩티드 모방체의 합성과 개발 역시 당분야에 널리 공지되어 있다(Golebiowski A et al., 2001; Hruby VJ and Balse PM, 2000; Sawyer TK, in "Structure Based Drug Design", edited by Veerapandian P. Marcel Dekker Inc., pg. 557-663, 1997).

전형적으로, 2개 폴리펩티드간 30% 이상의 상동성은 기능적 등가로 간주된다. 적절하게는, 본 발명의 제 1 특징의 기능적 등가 폴리펩티드는 INSP201 폴리펩티드, 또는 이의 활성 단편과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는다. 더욱 적절하게는, 폴리펩티드는 각각, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다.

본 발명의 제 1 특징의 기능적 등가 폴리펩티드는 한가지이상의 구조적 배열 기술을 이용하여 확인된 폴리펩티드일 수도 있다. 가령, Biopendium<sup>TM</sup> 검색 데이터베이스를 만드는데 이용되는 검색 도구의 한 측면을 형성하는 Inpharmatica Genome Threader<sup>TM</sup>(PCT application WO 01/69507) 기술을 이용하여, 현재 기능이 알려지지 않고 INSP201 폴리펩티

드와 비교하여 서열 상동성이 낮으며 INSP201 폴리펩티드 서열과 현저한 구조적 상동성을 공유함으로써 세포 표면 당단백질 집단의 구성원으로 예측되는 폴리펩티드를 확인할 수 있다. “현저한 구조적 상동성”은 Inpharmatica Genome Threader<sup>TM</sup>에 의해 두 단백질의 구조적 상동성이 적어도 10% 이상의 확실성으로 예측됨을 의미한다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드에는 INSP201 폴리펩티드의 단편 및 INSP201 폴리펩티드의 기능적 등가물의 단편 역시 포함되는데, 여기서 이들 단편은 세포 표면 당단백질 집단의 구성원이거나 INSP201 폴리펩티드와 공통의 항원 결정부위를 갖는다.

본 명세서에서 “단편”은 INSP201 폴리펩티드의 아미노산 서열과 일부분이 동일한 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩티드 또는 이의 기능적 등가물을 의미한다. 이들 단편은 상기 서열로부터 유래된 적어도 n개의 연속 아미노산을 포함하고, 특정 서열에 따라, n은 7 또는 그 이상(가령, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 또는 그 이상)이다. 소형 단편은 항원 결정부위를 형성할 수 있다.

적절하게는, 본 발명에 따른 단편의 최소 길이는 6, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 또는 500개의 아미노산 길이이다.

적절하게는, 본 발명에 따른 단편의 최대 길이는 517, 515, 510, 500, 475, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50개의 아미노산이다.

적절하게는, 본 발명에 따른 단편을 인코딩하는 핵산 분자의 최소 길이는 18, 30, 75, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050, 1200, 1350 또는 1500개의 핵산이다.

적절하게는, 본 발명에 따른 단편을 인코딩하는 핵산 분자의 최대 길이는 1551, 1545, 1530, 1500, 1425, 1350, 1200, 1050, 900, 750, 600, 450, 300 또는 150개의 핵산이다.

적절하게는, 본 발명의 폴리펩티드의 최대 길이는 518, 520, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 5000개의 아미노산이다.

적절하게는, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산의 최대 길이는 1554, 1560, 1750, 1800, 1950, 2100, 2400, 2700, 3000, 5000, 7500, 10000, 20000, 30000, 50000, 75000 또는 100000개의 핵산이다.

전장 INSP201 폴리펩티드의 단편은 각각, INSP201 폴리펩티드 서열 내에서 이웃하는 2개, 또는 3개의 엑손 서열의 조합으로 구성된다.

이들 단편은 “프리-스탠딩(free-standing)”, 다시 말하면, 다른 아미노산이나 폴리펩티드와 융합되거나 일부분을 형성하지 않고, 또는 이들 단편은 더욱 큰 폴리펩티드 내에서 일부분을 형성할 수도 있다. 더욱 큰 폴리펩티드 내에서 일부분을 형성하는 경우에, 본 발명의 단편은 가장 적절하게는, 단일 연속 부분을 형성한다. 가령, 바람직한 특정 구체에는 단편의 아미노 말단에 융합된 Pre- 또는 pro-폴리펩티드 및/또는 단편의 카르보닐 말단에 융합된 추가의 부분을 보유하는 단편에 관계한다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 이들의 면역원성 단편(적어도 한 개의 항원 결정부위 포함)을 이용하여, 이들 폴리펩티드에 면역 특이적인 리간드, 예를 들면, 다클론 또는 단클론 항체를 만들 수 있다. 이들 항체를 이용하여 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 클론을 분리하거나 확인하고, 또는 친화성 크로마토그래피로 이들 폴리펩티드를 정제할 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 이들 항체는 특히, 치료 또는 진단 목적으로 사용될 수 있다.

“면역특이적”은 항체가 선행 기술의 다른 관련된 폴리펩티드보다 본 발명의 폴리펩티드에 대하여 현저하게 높은 친화성을 갖는다는 것을 의미한다. 본 명세서에서, “항체”는 의심되는 항원 결정부위에 결합할 수 있는 완전 분자 및 이들의 단편, 예를 들면, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv를 의미한다. 따라서, 이들 항체는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드에 결합한다.

“현저하게 높은 친화성”은 공지의 분비된 단백질에 대한 친화성과 비교하여 본 발명의 폴리펩티드에 대한 친화성에서 상당한 증가를 의미한다.

적절하게는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 친화성은 공지의 분비된 단백질, 예를 들면, 세포 표면 당단백질 집단의 구성원에 대한 친화성의 적어도 1.5-배, 2-배, 5-배, 10-배, 100-배,  $10^3$ -배,  $10^4$ -배,  $10^5$ -배,  $10^6$ -배 또는 그 이상이다.

적절하게는, 본 발명의 폴리펩티드에 대한 친화성은 공지된 세포 표면 당단백질에 대한 친화성과 비교하여 상당히 증가한다.

다클론 항체가 바람직한 경우에, 생쥐, 토끼, 염소 또는 말과 같은 선택된 동물은 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드로 면역된다. 동물을 면역하는데 이용되는 폴리펩티드는 재조합 DNA 기술을 이용하여 유도하거나, 또는 화학적으로 합성할 수 있다. 필요에 따라서, 폴리펩티드는 운반체 단백질에 공액할 수 있다. 폴리펩티드에 화학적으로 결합시키는데 통상적으로 이용되는 운반체는 소 혈청 알부민, 티로글로블린, 키홀 림펩 헤모시아닌 등이다. 이후, 결합된 폴리펩티드를 이용하여 동물을 면역한다. 면역된 동물의 혈청을 채집하고 공지의 절차, 예를 들면, 면역친화성 크로마토그래피로 처리한다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드에 대한 단클론 항체는 당업자가 용이하게 만들 수 있다. 하이브리도마 기술을 이용하여 단클론 항체를 만드는 일반적인 방법은 널리 알려져 있다(참조: Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72(1983); Cole et al., 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc.(1985)).

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드에 대한 단클론 항체 패널은 다양한 특성, 예를 들면, 이소타입, 에피토프, 친화성 등으로 선별할 수 있다. 단클론 항체는 그들이 지향되는 개별 폴리펩티드를 정제하는데 특히 유용하다. 대안으로, 목적 단클론 항체를 인코딩하는 유전자는 당분야에 공지의 기술인 PCR 기술을 이용하여 하이브리도마에서 분리하고 클론하며 적절한 벡터에서 발현시킬 수 있다.

인간이외의 동물로부터 유래된 가변 영역이 인간 불변 영역에 결합되거나 융합된 키메라 항체가 이용될 수도 있다(Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3439(1987)).

항체는 예로써, 인간화(humanization) 반응을 통하여 개체에서 항원성을 적게 나타내도록 변형시킬 수 있다(Jones et al., Nature, 321, 522(1986); Verhoeyen et al., Science, 239, 1534(1988); Kabat et al., J. Immunol., 147, 1709(1991); Queen et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 10029(1989); Gorman et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 34181(1991); Hodgson et al., Bio/Technology, 9, 421(1991)). 본 명세서에서 “인간화 항체”는 인간이외의 공여자 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인 내에서 선별된 아미노산과 CDR 아미노산이 인간 항체에서 등가의 아미노산 잔기로 대체된 항체 분자를 의미한다. 따라서, 인간화 항체는 인간 항체와는 상당히 유사하지만 공여자 항체의 결합 능력을 갖는다.

다른 대안에서, 항체는 “이중-특이성” 항체, 다시 말하면, 2가지 상이한 항원 결합 도메인을 보유하는 항체일 수 있는데, 각 도메인은 상이한 에피토프를 지향한다.

과지 전시 기술을 이용하여, 유관한 항체를 보유하는지에 대해 스크리닝되는 인간 림프구의 PCR 증폭된 V-유전자 레퍼토리, 또는 고유 라이브러리로부터 본 발명의 폴리펩티드에 대한 결합 활성을 갖는 항체를 인코딩하는 유전자를 선별할 수 있다(McCafferty, J. et al., (1990), Nature 348, 552-554; Marks, J. et al., (1992) Biotechnology 10, 779-783). 이들 항체의 친화성은 체인 셔플링(chain shuffling)에 의해 더욱 개선될 수 있다(Clackson, T. et al., (1991) Nature 352, 624-628).

상기 기술에 의해 만들어지는 단클론이나 다클론 항체는 면역검사, 방사능면역검사(RIA), 또는 효소-연결된 면역흡착 검사(ELISA)에서 시약으로 이용되는 부가적인 용도를 갖는다. 이들 분야에서, 항체는 방사능동위원소, 형광 분자 또는 효소와 같은 분석적으로 검출가능한 시약으로 표지될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 다클론 항체는 일반적으로, INSP201 폴리펩티드와 어쥬번트의 복수 피하 또는 복강내 주입으로 동물(가령, 토끼 또는 생쥐)에서 생산된다. 본 발명의 폴리펩티드는 면역되는 종 내에서 면역원성인 담체 단백질, 예를 들면, 키홀 림펩 헤모시아닌, 혈청, 알부민, 소 티로글로블린, 또는 콩 트립신 저해물질에 공액하는 것이 유용하다. 또한, 면역 반응을 강화하기 위하여 명반(alum)과 같은 응집제(aggregating agent)제가 사용된다. 면역화이후, 이들 동물을 채혈하고 혈청에서 항-INSP201 항체 역가를 평가한다.

본 발명의 폴리펩티드에 대한 단클론 항체는 배양 중인 연속 세포주에 의한 항체 분자의 생산을 제공하는 임의의 방법을 이용하여 생산된다. 단클론 항체를 생산하는데 적합한 방법의 예는 하이브리도마 방법과 인간 B-세포 하이브리도마 방법이다. INSP201 폴리펩티드와 반응하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 역시 본 발명에 의해 제시된다.

본 발명의 단클론 항체는 치료제로서 이용을 위하여 변형될 수 있다. 한 구체예에는 중쇄(H) 및/또는 경쇄(L)의 일부분이 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동하고, 또는 특정 항체 분류 또는 하위분류에 속하고, 상기 사슬의 나머지 부분이 다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동하고, 또는 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 “키메라” 항체이다. 원하는 생물학적 활성을 나타내는, 이들 항체의 단편 역시 포함된다.

다른 구체예에서, 본 발명의 단클론 항체는 “인간화” 항체이다. 일반적으로, 인간화 항체는 인간이외의 출처로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 상기 항체 내로 도입된다. 인간화는 예로써, 인간 항체의 상응하는 영역을 설치류 상보성-결정 부위(complementarity-determining region)의 적어도 일부분으로 대체함으로써, 당분야에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

“항체” 또는 “면역글로불린”은 다클론과 단클론 항체를 모두 포괄한다. 바람직한 항체는 항원과 반응하는 단클론 항체이다. “항체”는 항원과 반응하는 하나 이상의 항체의 혼합물(가령, 항원과 반응하는 여러 유형의 단클론 항체의 각테일) 역시 포괄한다. 게다가, “항체”는 전체 항체, 이의 생물학적으로 기능성 단편, 단일-사슬 항체, 유전적으로 변형된 항체, 예를 들면, 한가지 이상의 종으로부터 일부분을 포함하는 키메라 항체, 이중기능성 항체, 항체 공액체, 인간화 항체, 인간 항체를 포괄한다. 이용될 수 있는 다른 생물학적으로 기능성 항체 단편은 항원에 결합하는데 충분한, 항체로부터 유래된 펩티드 단편이다. 본 명세서에서 항체는 목적하는 에피토프, 항원 또는 항원 단편에 결합할 수 있는 전체 항체 및 항체 단편(가령, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv)을 포괄한다.

“정제된 항체”는 항체가 자연적으로 결합하는 다른 단백질, 탄수화물, 지질이 실질적으로 존재하지 않는 항체를 의미한다. 이런 항체는 본 발명의 INSP201 폴리펩티드(또는 이의 항원성 단편)에 “우선적으로 결합한다”, 다시 말하면, 항원성에서 무관한 다른 분자를 인식하거나 이들 분자에 결합하지 않는다. 본 발명의 정제된 항체는 바람직하게는, 특정 종의 INSP201과 면역반응하고 이에 대하여 면역특적이며, 더욱 바람직하게는 고유 인간 INSP201에 면역특이적이다.

“특이적으로 결합하는”은 특정 폴리펩티드, 다시 말하면, INSP201에 대한 항체의 높은 결합 활성(avidity) 및/또는 높은 결합 친화성을 의미한다. 적절하게는, 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 항체 결합은 임의의 다른 에피토프에 대한 동일한 항체의 결합보다 강하다. INSP201에 특이적으로 결합하는 항체는 약하지만 검출가능한 수준(가령, 목적 폴리펩티드에 대한 결합의 10% 이하)으로 다른 폴리펩티드에 결합할 수 있다. 이런 약한 결합 또는 배경 결합은 예로써, 적절한 대조의 이용으로, 목적 화합물이나 폴리펩티드에 대한 특이적인 항체 결합으로부터 용이하게 식별된다.

적절하게는, INSP201 집단의 다른 공지된 구성원에 비하여 본 발명의 폴리펩티드에 대한 친화성은 공지된 분비된 단백질, 예를 들면, 세포 표면 당단백질 집단의 구성원에 대한 친화성의 적어도 1.5-배, 2-배, 5-배, 10-배, 100-배, 10<sup>3</sup>-배, 10<sup>4</sup>-배, 10<sup>5</sup>-배, 10<sup>6</sup>-배 또는 그 이상이다.

“유전적으로 변형된 항체”는 아미노산 서열이 고유 항체의 서열로부터 변화된 항체를 의미한다. 본 발명에 재조합 DNA 기술의 적합성으로 인하여, 자연 항체에서 발견되는 아미노산의 서열에 한정될 필요가 없다; 항체는 원하는 특성을 달성하기 위하여 재설계될 수 있다. 가능한 변이는 예로써, 가변 영역이나 불변 영역에서 1개 또는 수개의 아미노산의 변화에서부터 완전한 재설계까지 다양하다. 불변 영역에서 변화는 일반적으로, 보체 고정, 막과의 상호작용, 다른 효과기 기능과 같은 특성을 개선하거나 변화시키기 위하여 수행된다. 가변 영역에서 변화는 항원 결합 특성을 개선하기 위하여 수행된다.

“인간화 항체” 또는 “인간화 면역글로불린”은 인간 골격 및 비-인간 항체로부터 적어도 하나, 바람직하게는, 전체 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 면역글로불린을 의미하는데, 여기서 임의의 불변 영역은 인간 면역글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일하다, 다시 말하면, 적어도 85-90%, 바람직하게는 적어도 95% 동일하다. 따라서, 이들 CDR을 제외하고 인간화된 면역글로불린의 모든 부분이 하나 이상의 고유 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분에 실질적으로 동일하다(참조: Queen et al., U.S. Pat. No. 5,301,101; 5,585,089; 5,693,762; 6,180,370).

“완전 인간화 항체”는 인간 면역글로불린의 가변 영역과 불변 영역을 모두 보유하는 분자이다. 완전 인간화 항체는 자가면역 질환과 같은 만성과 재발성 질환에서 반복된 치료가 요구되는 치료 용도에 잠재적으로 사용될 수 있다. 완전 인간 항체를 제조하는 한가지 방법은 생쥐 체액 면역계의 “인간화(humanization)”, 다시 말하면 내생적 Ig 유전자가 불활화된 생쥐

내로 인간 면역글로불린(Ig) 좌위를 도입하여 인간 Ig를 생산할 수 있는 생쥐 중(이종유전자도입생쥐)의 생산으로 구성된다. Ig 좌위는 폭넓은 면역 반응을 궁극적으로 발생시키는데 요구되는 물리적 구조 및 유전자 재배열과 발현 과정의 측면에서 매우 복잡적이다. 항체 다양성(antibody diversity)은 Ig 좌위에 존재하는 서로 상이한 V, D, J 유전자 사이의 조합 재배열에 의해 주로 발생한다. 이들 좌위는 또한, 산재된 조절 요소를 보유할 수 있는데, 이들 요소는 항체 발현, 대립유전자 형질배제(allelic exclusion), 항원 급의 전환(class switching), 친화성 증진(affinity maturation)을 제어한다. 재배열되지 않은 인간 Ig 도입유전자(transgene)를 생쥐에 도입하여, 생쥐 재조합 기구(recombination machinery)가 인간 유전자와 양립한다는 것을 확인하였다. 더 나아가, 항원으로 외래유전자도입생쥐를 면역화시켜 다양한 아이소타입의 항원 특이적 인간 mAb를 분비하는 하이브리도마를 수득할 수 있다.

완전 인간화 항체 및 이들의 생산 방법은 당분야에 공지되어 있다(Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997); Buggemann et al., Eur. J. Immunol. 21: 1323-1326 (1991); Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727 (2000) Patent WO 98/24893)

“키메라 항체”는 불변 영역이 한 종(전형적으로, 인간)의 항체로부터 유래되고, 가변 영역이 다른 종(전형적으로, 설치류)의 항체로부터 유래되는 항체를 의미한다. 따라서, 키메라 항체는 서로 다른 부분이 상이한 동물 종으로부터 유래되는 분자, 예를 들면, 무린 Mab로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 보유하는 분자이다. 키메라 항체는 일차적으로, 적용 시에 면역원성을 감소시키고 생산 수율을 증가시키기 위하여 사용되는데, 여기서 무린 Mab는 하이브리도마로부터 더욱 높은 수율 및 인간에서 더욱 높은 면역원성을 나타내기 때문에, 인간/무린 키메라 Mab가 사용된다. 키메라 항체 및 이들의 생산 방법은 당분야에 공지되어 있다(Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643-646 (1984); Cabilly et al., European Patent Application 125023 (November 14, 1984); Neuberger et al., Nature 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., European Patent Application 171496 (February 19, 1985); Morrison et al., European Patent Application 173494 (March 5, 1986); Neuberger et al., PCT Application WO 8601533 (March 13, 1986); Kudo et al., European Patent Application 184187 (June 11, 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al., International Patent Application No. WO8702671 (May 7, 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041-1043 (1988); Riechmann et al., Nature 332:323-327; Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra). 이들 참고문헌은 순전히 참조로 한다.

본 명세서에서, “항체 단편”은 항원, 항원 결정부위 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부를 포함하는 분자를 의미한다. 인지하는 바와 같이, Fab와 F(ab')<sub>2</sub> 및 본 발명에 유용한 다른 항체 단편은 원래의 항체 분자에 대하여 본 명세서에서 기술된 방법에 따른 이들 항원의 검출과 정량에 사용할 수 있다. 이들 단편은 전형적으로, 파파인(Fab 단편을 생산함) 또는 펩신(F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생산함)과 같은 효소를 이용한 단백질 분해 절단으로 생산된다.

본 명세서 전반에 언급된 항체와 관련하여, “단클론 항체”는 단클론 항체, 키메라 항체, 완전 인간화 항체, 용해성 형태 또는 결합된 형태로 표지될 수 있는 항-이디오타입 항체에 대한 항체(항-항-Id 항체), 임의의 공지된 기술, 예를 들면, 효소 절단, 펩티드 합성 또는 재조합 기술로 제공되는 이들의 단편을 포괄한다. 단클론 항체는 항원에 특이적인 항체의 실질적으로 균질한 개체군을 보유하는데, 이들 개체군은 실질적으로 유사한 에피토프 결합 부위를 보유한다. Mab는 당업자에게 공지된 방법으로 수득할 수 있다(참조: Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); U.S. Patent No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., Harlow and Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., (1992-1996)). 이들 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, GILD 및 이들의 하위분류를 비롯한 임의의 면역글로불린 분류일 수 있다. 본 발명의 mAb를 생산하는 하이브리도마는 *in vitro*, *in situ* 또는 *in vivo*에서 배양된다. *in vivo* 또는 *in situ*에서 높은 역가의 Mab 생산으로 인하여, 이는 현재 선호되는 생산 방법이다. “단클론 항체”는 또한, 항원에 결합할 수 있는 원래의 분자 및 이들의 단편, 예를 들면, Fab와 F(ab')<sub>2</sub>를 포괄한다. Fab와 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 원래 항체의 Fc 단편이 부재하고, 순환계로부터 더욱 빠르게 제거되고, 원래 항체보다 낮은 비-특이적 조직 결합을 나타낸다(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).

단클론 항체는 분자와 특이적으로 반응하여 상기 분자를 항체에 결합시킬 수 있는 경우에, 분자와 “결합할 수 있다”라고 한다.

“항원”은 항체가 결합할 수 있는 분자 또는 분자의 일부분인데, 항원은 이런 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 동물이 생산하도록 부가적으로 유도할 수 있다. 항원은 하나이상의 에피토프를 보유한다. 앞서 언급된 특이적인 반응은 항원이 상응하는 항체 상의 에피토프와 매우 선택적인 방식으로 반응하고, 다른 항원에 의해 유발된 다수의 다른 항원과 반응하지 않는다는 것을 암시한다.

본 발명에 유용한 항체(항체 단편 포함)는 시료에서 그들의 항원을 정량적으로 또는 정성적으로 검출하거나, 또는 이들 항원을 발현하는 세포의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 이는 형광 검경, 유세포 분석법 또는 형광 검출과 병행되는, 형광 표지된 항체를 이용한 면역형광 기술로 달성할 수 있다.

본 발명에 유용한 항체(또는 이의 단편)는 항원의 *in situ* 검출을 위하여, 면역형광이나 면역전자 검경에서처럼 조직학적으로 이용될 수 있다. *In situ* 검출은 환자로부터 조직학적 시료를 떼어내고, 본 발명의 표지된 항체를 상기 시료에 제공함으로써 달성된다. 적절하게는, 항체(또는, 단편)는 표지된 항체(또는 단편)를 생물학적 시료에 도포하거나 바름으로써 제공된다. 이런 절차의 이용을 통하여, 항원의 존재뿐만 아니라 검사된 조직 상에서 이의 분포를 결정할 수 있다. 본 발명을 이용하여, 당업자는 이런 *in situ* 검출을 달성하기 위하여 다양한 조직학적 방법(가령, 염색 절차)이 변형될 수 있음을 편의하게 인지할 것이다.

항원에 대한 이들 검사법은 전형적으로, 항원을 확인할 수 있는 표지된 항체의 존재하에, 생물학적 시료, 예를 들면, 생물학적 유체, 조직 추출물, 림프구 또는 백혈구와 같은 새로 수확된 세포, 또는 조직 배양된 세포를 배양하고, 당분야에 널리 공지된 다수의 기술로 상기 항체를 검출하는 단계를 포함한다.

생물학적 시료는 니트로셀룰로오스와 같은 고형상 서포트 또는 담체, 또는 세포, 세포 입자 또는 가용성 단백질을 고정시킬 수 있는 다른 고형 서포트 또는 담체에 결합된다. 이러한 서포트 또는 담체는 상기한 바와 같이, 적절한 완충제로 세척되고 본 발명에 따른 표지된 항체로 처리된다. 이후, 고형상 서포트 또는 담체는 완충제로 2차로 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거한다. 그 다음, 상기 고형 서포트 또는 담체 상에서 결합된 라벨의 양을 통상적인 수단으로 검출한다.

본 발명의 항체 분자는 “이중-위치” 또는 “샌드위치” 검사법으로 알려진 면역측정 검사법에 이용할 수 있다. 전형적인 면역측정 검사에서, 일정량의 표지되지 않은 항체(또는 항체의 단편)를 고형 서포트 또는 담체에 결합시키고 일정량의 탐지 가능하게 표지된 용해성 항체를 첨가하면, 고형상 항체, 항원, 표지된 항체사이에 형성된 3자 복합체를 검출 및/또는 정량할 수 있다.

본 발명의 항체는 면역친화성 크로마토그래피 기술과 관련하여 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 이들 항체는 크로마토그래피 칼럼 내에서 재료의 표면 상에 배치될 수 있다. 이후, 정제되는 조성물이 칼럼을 통과할 수 있다. 정제되는 시료가 이들 항체에 결합하는 임의의 INSP201 폴리펩티드를 포함하면, 이들 INSP201 폴리펩티드는 시료로부터 제거되고 정제된다.

이로부터, 진단 방법이 포유동물로부터 유래된 세포 시료(가령, 혈액 시료, 림프절 생검 또는 조직)를 이용하여 시험관내에서 수행되거나, 또는 생체내 조영으로 수행될 수 있다.

본 발명의 항체를 함유하는 조성물은 예로써, 방사면역측정법(radioimmunoassay), ELISA, FACS 등으로 INSP201의 존재를 검출하는데 이용될 수 있다. 하나이상의 표지 모이어티가 인간화된 면역글로불린에 부착될 수 있다. 전형적인 표지 모이어티는 특히, 방사선(radiologic)이나 자기 공명 영상(resonance imaging) 기술에서, 방사선 불투과성 염료(radiopaque dye), 방사선조영제(radiocontrast agent), 형광 분자(fluorescent molecule), 스핀-표지된 분자(spin-labeled molecule), 효소, 또는 진단학적으로 가치 있는 다른 표지 모이어티이다.

유익하게는, 본 발명의 IgG 항체 제조물은 단백질-G 친화성 정제, 바람직하게는 단백질-G 면역침전을 통한 친화성 정제를 이용하여 본 발명의 항-혈청으로부터 정제된다. 면역된 동물로부터 유래된 항-혈청은 웨스턴 면역블랏팅 분석(western immunoblotting analysis), 면역침전(Immunoprecipitation), ELISA를 통한 최적 민감도로 INSP201 폴리펩티드를 검출하는데 사용될 수 있다.

일반적으로, 최적 재현성(reproducibility), 표준화(standardization), 또는 정밀도(precision)로부터 이익을 얻는 분야에서, 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명의 정제된 항체 또는 항체 단편은 본 발명의 정제되지 않은 제조물에 비하여 최적일 것이다.

당업자가 인지하는 바와 같이, 동계 항원에 대해 최대  $10^{-12}$ 의 해리 상수(dissociation constant)로 특성화되는 친화성을 갖는 항체 또는 항체 단편은 당분야의 통상적인 기술을 이용하여 수득할 수 있다.

앞서 기술된 바와 같이, 이러한 제조물은 가급적, 다양한 유형의 검출가능 분자에 부착된 항체 또는 항체 단편을 포함한다.

항체 단편은 그들이 유래되는 부모 항체와 실질적으로 동일한 표적-항원 결합 특이성, 또는 결합 특이성과 결합 친화성 둘 모두를 유지하면서 부모 항체보다 작다는 이점이 있다. 따라서, 항체 단편은 부모 항체보다 작다는 점에서, 부모 항체보다 우수한 체내분포(biodistribution)와 확산 특성(가령, 전신적으로 생체내에서, 또는 분리된 조직 내에서)을 갖는다. Fc 영역이 실질적으로 부재하는 항체 단편, 예를 들면, 단일-사슬 Fv, Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub> 또는 CDR은 이런 Fc 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 분자에 이러한 제조물의 노출을 수반하지만 이런 결합이 바람직하지 않은 분야에 유익하다. 전형적으로, 이는 동계 Fc 수용체, 또는 Fc-결합 보체 성분(가령, 혈청에 존재하는 보체 성분 C1q)에 노출된 Fc 영역의 원치않는 결합을 수반한다. Fc 수용체는 전문적인 APC, 예를 들면, 수상돌기 세포; B 림프구; 호중구, 호염기구, 호산구, 단핵구, 대식세포, 비만세포(mast cell)와 같은 과립구를 비롯한 다수의 면역 세포형의 표면 상에 전시된다. 따라서, 항체 단편으로부터 Fc 영역의 부재는 특히, 이런 제조물을 개체의 생체내에 투여하는 경우에, 원치않는 Fc 수용체-매개된 면역 세포 활성화 또는 보체 성분-매개된 보체 캐스케이드를 피하는 이점이 있다.

F(ab')<sub>2</sub>는 항체 분자의 이가 항원-결합 부분을 보유하는, 항체 분자의 단편이다.

본 발명의 F(ab')<sub>2</sub> 제조물은 본 발명의 항체 제조물, 예를 들면, 본 발명의 항-혈청을 효소 펩신으로 처리함으로써 당분야의 표준 방법을 이용하여 편의하게 수득할 수 있다. 결과의 F(ab')<sub>2</sub> 산물은 5S 입자이다.

Fab, 또는 Fab'는 항체의 일가 항원-결합 부분을 보유하는, 항체 분자의 단편이다.

CDR은 예로써, EP0585939 또는 Strandberg et al., Protein Eng. 2001 Jan; 14(1): 67-74에 기술된 바와 같이 산출될 수 있다. 본 발명에 따른 CDR은 INSP201폴리펩티드의 조절에 향상된 영향을 주는 변형된 CDR일 수 있다. 활성 펩티드의 변형 방법의 예는 Sawa et al. 1999, J. Med. Chem. 42, 3289-3299에서 기술된다.

본 발명의 Fab' 제조물은 본 발명의 항체 제조물, 예를 들면, 본 발명의 항-혈청을 효소 펩신으로 처리하고 결과의 F(ab')<sub>2</sub> 제조물을 Fab' 제조물로 환원시킴으로써 당분야의 표준 방법을 이용하여 편의하게 수득할 수 있다. 이런 환원은 티올 환원기(thiol reducing agent)를 이용하고, 선택적으로 이황화 결합의 절단으로 인한 설피드릴 기의 차단기(blocking group)를 이용함으로써 달성된다. 이런 처리는 2개의 일가 3.5S Fab'의 Fc 단편을 산출한다.

Fab 제조물은 본 발명의 항체 제조물, 예를 들면, 본 발명의 항-혈청을 효소 펩신으로 처리하여 원래 경쇄 및 가변 도메인과 CH<sub>1</sub> 도메인으로 구성되는 중쇄 일부분을 산출함으로써 당분야의 표준 방법을 이용하여 편의하게 수득할 수 있다.

항체의 효소 처리로 항체 단편을 산출하는 과정은 당분야의 기존문헌에 의해 충분히 제공된다(참조: Goldenberg, U.S. Pat. No. 4,036,945와 4,331,647; Porter RR., 1959. Biochem J. 73:119-126).

단일 사슬 Fv(일명, "scFv")는 적절한 폴리펩티드 링커에 의해 연결되는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역을 보유하는 단일 분자 사슬이다.

본 발명의 F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, 또는 단일 사슬 Fv 또는 CDR 제조물은 재조합 기술을 이용하여 수득할 수 있다.

재조합 항체 단편은 표적 항원으로 면역된 동물의 B 림프구의 mRNA를 분리하고, RT-PCR을 통하여 상기 mRNA로부터 cDNA를 산출하고, 상기 cDNA를 이용하여 항체 단편 파지-전시 라이브러리(phage-display library)를 작성함으로써 수득된다. B 림프구는 비장으로부터, 또는 대안으로, 면역된 동물의 혈액, 골수 또는 림프절로부터 편의하게 분리될 수 있다.

앞서 기술된 방법은 원하는 표적 항원-결합 친화성 및/또는 특이성을 본질적으로 갖는 본 발명의 단클론 항체 단편 제조물을 수득하는데 이용될 수 있다. 이런 제조물은 앞서 정의된 표적 항원-결합 특성으로 표적 항원에 결합할 수 있는 반응물로부터 이익을 얻는 다양한 분야에 사용될 수 있다.

Fab'가 Fab에 구조적으로 유사하기 때문에, Fab'를 포함하는 본 발명의 제조물은 Fab를 포함하는 제조물과 본질적으로 교체될 수 있는데, 여기서 Fab'와 Fab는 본질적으로 동일한 중쇄와 경쇄 가변 영역을 포함한다. 최대 친화성으로 표적 항원에 결합할 수 있는 항체 단편을 포함하는 본 발명의 제조물로부터 이익을 얻는 분야에, 본 발명의 F(ab')<sub>2</sub> 제조물은 일가 항체 단편의 일가 결합에 비하여 표적 항원에 F(ab')<sub>2</sub>의 이가 결합으로 인하여, 본 발명의 Fab, Fab' 또는 scFv 제조물보다 우수하다.

앞서 언급된 바와 같이, 이용 분야와 목적에 따라, 항체 또는 항체 단편 제조물은 임의의 다양한 포유동물 종으로부터 기원된다.

원하는 종으로부터 기원하는 본 발명의 항체 또는 항체 단편 제조물은 표적 항원으로 면역된 이런 종의 동물의 혈청으로부터 유래된다.

적절하게는, 본 발명의 인간이나 인간화 항체 또는 항체 단편 제조물은 개체에 이러한 제조물의 투여를 수반하는 분야에 적합하다. 가령, 인간이나 인간화 항체 또는 항체 단편은 면역학적으로 최적으로 관용되고, 따라서 인간에서 최적 생체내 반감기를 보이고 최적 효능을 나타낸다. 인간이나 인간화 항체의 생산과 개발에 관한 추가의 보도는 하기에 기술된다.

이러한 제조물은 *per se* 사용되거나, 또는 제약학적 조성물에서 활성 성분으로서 조제될 수 있다.

따라서, 본 발명에서는 제약학적으로 허용되는 담체 및 활성 성분으로서 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다.

제약학적 조성물에서 활성 성분으로서 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 조제하는 방법 및 이런 제약학적 조성물을 개발하는 방법은 하기에 기술된다.

적절하게는, 이런 항체 또는 항체 단편은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 활성 성분으로서 함유하는 본 발명의 제약학적 조성물을 투여함으로써 투여된다.

적절하게는, 이런 항체 또는 항체 단편은 생화학적 활성의 원하는 조절을 달성하기 위하여, 현저한 수준의 항체 단편이 표적 항원에 결합되도록 투여된다.

당업자, 예를 들면, 의사, 더욱 바람직하게는, 질병 전문의는 본 발명의 교시에 따라 질병을 효과적으로 치료하기 위한 항체 또는 항체 단편의 적절한 투여 경로와 적절한 용량을 비롯한 적절한 치료 프로토콜을 결정하는데 필요한 전문지식을 갖는다.

앞서 기술된 바와 같이, 폴리펩티드인 표적 항원 (즉, INSP201)은 다양한 방식으로 수득된다.

적절하게는, 표적 항원은 표준 화학적 합성 방법을 통하여 수득된다.

표적 항원은 예로써, 표준 고형상 기술을 이용하여 화학적으로 합성된다. 이런 기술에는 배타적 고형상 합성(exclusive solid phase synthesis), 부분 고형상 합성(partial solid phase synthesis) 방법, 단편 응축(fragment condensation), 고전적 용해 기술(solution synthesis) 등이 포함된다. 고형상 폴리펩티드 합성 절차는 당분에 널리 공지되어 있다(참조: Stewart et al., in "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd ed., Pierce Chemical Company, (1984)).

합성 폴리펩티드는 Creighton T., Proteins, structures and molecular principles, W. H. Freeman and Co. N.Y. (1983)에 기재된 바와 같은 예비 고성능 액체 크로마토그래피 절차로 정제할 수 있고, 이의 아미노산 서열은 표준 아미노산서열분석 절차를 통하여 확인할 수 있다.

앞서 기술된 바와 같이, 이러한 제조물은 포유동물을 표적 항원으로 면역함으로써 유래된다.

이러한 제조물은 가급적, 혈청 내에서 항체의 생산을 증가시키는 일정에 따라 어췌번트의 존재하에 포유동물 내로 표적 항원의 반복된 주입으로 생체내에서 산출된다. 표적 항원이 적절한 면역 반응을 유도하기에는 너무 작은 경우에(당분야에서 "합텐"), 합텐은 항원성에서 중성 담체, 예를 들면, 키홀 림펍 헤모시아닌(KLH) 또는 혈청 알부민(가령, 소 혈청 알부민



(BSA)) 담체에 결합될 수 있다(참조: US. Pat. No. 5,189,178과 5,239,078). 합텐은 당분야에 널리 공지된 다양한 방법을 이용하여 담체에 결합될 수 있다. 가령, 아미노기에 직접적인 결합이 수행되고, 선택적으로, 형성된 이미노 연쇄의 환원이 수행될 수 있다. 대안으로, 담체는 디사이클로헥실 카르보다이미드(dicyclohexyl carbodiimide) 또는 다른 카르보다이미드 탈수제(dehydrating agent)와 같은 축합제(condensing agent)를 이용하여 결합될 수 있다. 결합을 달성하기 위하여 링커 화합물 역시 사용될 수 있다: 동종이중기능성과 이종이중기능성 링커 둘 모두 Pierce Chemical Company, Rockford, III로부터 구입가능하다. 결과의 면역원성 복합체는 적절한 포유동물 개체, 예를 들면, 소, 양, 생쥐, 토끼 등으로 주입될 수 있다. 항체의 생체내 산출이후, 숙주 동물 내에서 이의 혈청 역가는 당분야에 널리 공지된 면역검사 절차를 이용하여 편의하게 측정할 수 있다.

앞서 기술된 바와 같이, 이러한 제조물은 가급적, 인간화 항체 또는 항체 단편을 포함한다.

인간화 항체 또는 항체 단편은 비-인간 동물로부터 유래된 (가급적, 최소)부분을 보유하는 유전자 조작된 키메라 항체 또는 항체 단편이다. 인간화 항체에는 인간 항체(수용자 항체)의 상보성 결정 영역이 원하는 기능성을 갖는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들면, 생쥐, 쥐 또는 토끼의 상보성 결정 영역으로부터 잔기로 치환된 항체가 포함된다. 일부 경우에, 인간 항체의 Fv 골격 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 인간화 항체는 수용자 항체에서뿐만 아니라 외입된 상보성 결정 영역이나 골격 서열 내에서 관찰되지 않는 잔기 역시 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 전체를 포함하는데, 여기서 상보성 결정 영역의 전체 또는 거의 전체가 비-인간 항체의 상보성 결정 영역에 상응하고, 골격 영역의 전체 또는 거의 전체가 유관한 인간 공통 서열의 골격 영역에 상응한다. 적절하게는, 인간화 항체는 전형적으로 인간 항체로부터 유래되는 항체 불변 영역, 예를 들면, Fc 영역의 적어도 일부분을 보유한다(참조: Jones et al., 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988. Nature 332:323-329; Presta, 1992. Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596)). 비-인간 항체 또는 항체 단편의 인간화 방법은 당분야에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 내로 도입된다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종, 외입된 잔기라고 하는데, 이들 잔기는 전형적으로, 외입된 가변 도메인으로부터 입수된다. 인간화는 본질적으로, 인간 상보성 결정 영역을 상응하는 설치류 상보성 결정 영역으로 치환함으로써 수행될 수 있다(참조: Jones et al., 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988. Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988. Science 239:1534-1536; U.S. Pat. No. 4,816,567). 따라서, 이런 인간화 항체는 원래 인간 가변 도메인의 전체 또는 일부가 비-인간 종으로부터 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다. 실제, 인간화 항체는 전형적으로, 일부 상동성 결정 영역 잔기와 일부 골격 잔기가 설치류 항체에서 유사한 부위로부터 잔기로 치환된 인간 항체이다. 인간 항체 또는 항체 단편 역시 파지 전사 라이브러리를 비롯한 당분야에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생산될 수 있다(참조: Hoogenboom and Winter, 1991. J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991. J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, pp. 77 (1985); Boerner et al., 1991. J. Immunol. 147:86-95). 인간화 항체는 인간 면역글로불린 좌위를 인코딩하는 서열을 외래유전자도입 동물, 예를 들면, 내생적 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활화된 생쥐 내로 도입함으로써 산출될 수도 있다. 항원 공격 접종(antigenic challenge)이후, 이들 동물에서 인간 항체 생산이 관찰되는데, 이는 유전자 재배열(gene rearrangement), 사슬 조합(chain assembly), 항체 레퍼토리(antibody repertoire)를 비롯한 모든 관점에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이런 접근법을 수행하기 위한 보도는 당분야의 기존문헌에 의해 충분히 제공된다(참조: U.S. Pat. No. 5,545,807, 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016; Marks et al., 1992. Bio/Technology 10:779-783; Lonberg et al., 1994. Nature 368:856-859; Morrison, 1994. Nature 368:812-13; Fishwild et al., 1996. Nature Biotechnology 14:845-51; Neuberger, 1996. Nature Biotechnology 14:826; Lonberg and Huszar, 1995. Intern. Rev. Immunol. 13:65-93).

막-결합된 INSP201을 표적하는 길항성 항체는 염증 및/또는 자가면역 질환의 치료에 유용하다.

막-결합된 INSP201을 표적하는 항진성 항체는 암, HIV 및/또는 EBV, B형 간염 감염의 치료에 유용하다.

INSP201을 표적하는 항체의 활성은 실시예 6 내지 8에 기술된 검사법 및/또는 동물 모형으로 확인할 수 있다.

본 발명의 제 2와 제 3 특징의 바람직한 핵산 분자는 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18에 열거된 폴리펩티드 서열, 또는 이들의 기능적 등가 폴리펩티드를 인코딩한다. 이들 핵산 분자들은 본 명세서에서 기술된 방법과 분야에 이용될 수 있다. 적절하게는, 본 발명의 핵산 분자는 본 명세서에 개시된 서열로부터 적어도 n개 연속 뉴클레오티드를 포함하는데, 이때 n은 특정 서열에 따라 10 또는 그 이상(예, 12, 14, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40 또는 그 이상)이 된다.

본 발명의 핵산 분자에는 상기한 핵산에 상보적인 서열(가령, 안티센스 또는 프로브 목적) 역시 포함된다.

본 발명의 핵산 분자는 mRNA와 같은 RNA, 또는 cDNA, 합성 DNA, 게놈 DNA와 같은 DNA형이 될 수 있다. 클로닝, 화학적 합성 기술, 또는 이의 조합 기술을 이용하여 이들 핵산 분자를 얻을 수 있다. 생물체로부터 분리하거나, 또는 게놈이나 cDNA 라이브러리로부터 고체 상 포스포아미디트 화학적 합성과 같은 화학적 합성 기술을 이용하여 핵산 분자를 만들 수 있다. 일반적으로, RNA 분자는 DNA 서열의 *in vitro* 또는 *in vivo* 전사에 의해 만들 수 있다.

핵산 분자는 이중 가닥 또는 단일 가닥으로 되어 있다. 단일 가닥 DNA는 센스 가닥으로 알려진 코딩 가닥이거나, 또는 안티-센스 가닥으로 알려진 비-코딩 가닥일 수 있다.

“핵산 분자”에는 DNA와 RNA 유사체, 예를 들면, 변형된 골격구조를 포함하는 유사체 및 펩티드 핵산(PNA) 역시 포함된다. 본 명세서에서 “PNA”는 가급적, 리신으로 종료되는 아미노산 잔기의 펩티드 골격에 연결된 적어도 5개 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 분자 또는 항-유전자 물질을 의미한다. 말단 리신은 조성물에 용해도를 부여한다. PNA는 세포 내에서 수명을 연장시키기 위해 페길화(pegylation)되는데, 여기서 이들은 상보적인 단일 가닥의 DNA와 RNA에 선호적으로 결합하고 전사체 신장을 종료시킨다(Nielsen, P.E. et al.(1993) *Anticancer Drug Des.* 8:53-63).

본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자는 본원에 개시된 하나 이상의 핵산 분자의 코딩 서열과 일치할 수 있다.

이들 분자는 유전자 코드의 축퇴의 결과로써, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 또는 SEQ ID NO:18에 열거된 폴리펩티드를 인코딩하는 서로 다른 서열을 보유할 수도 있다. 이런 핵산 분자에는 성숙한 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 자체; 성숙한 폴리펩티드와 추가 코딩 서열, 예를 들면, pro-, pre-, prepro- 폴리펩티드 서열과 같은 리더 또는 분비 서열을 인코딩하는 코딩 서열; 상기한 추가 코딩 서열의 존부하에 전사, 리보솜 결합, mRNA 안정성에 중요한 역할을 수행하는 전사된 비-번역 서열과 같은 비-코딩 5'와 3' 서열(종료 신호 포함)을 비롯한 다른 비-코딩 서열과 함께 성숙한 폴리펩티드의 코딩 서열이 포함되지만 이들에 국한되지는 않는다. 핵산 분자에는 다른 기능을 제공하는 부가적인 아미노산을 인코딩하는 추가 서열이 포함될 수도 있다.

본 발명의 제 2와 제 3 특징의 핵산 분자는 제 1 특징의 폴리펩티드의 단편 또는 기능적 등가물을 인코딩할 수도 있다. 이런 핵산 분자는 자연-발생 대립형질 변이체와 같은 자연 발생 변이체이거나, 또는 자연 상태에서는 발생하지 않은 변이체이다. 이런 비-자연적 핵산 분자 변이체는 핵산 분자, 세포 또는 유기체에 적용될 수 있는 돌연변이유발 기술로 만들 수 있다.

이런 변이체에는 뉴클레오티드 치환, 결손 또는 삽입에 의해 상기 핵산 분자와는 상이한 변이체가 포함된다. 치환, 결손 또는 삽입에는 하나 이상의 뉴클레오티드가 관계한다. 변이체는 코딩이나 비-코딩 또는 둘 모두에서 변화될 수 있다. 코딩 서열에서 변화는 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환, 결손 또는 삽입을 발생시킬 수 있다.

본 발명의 핵산 분자는 당분야에 공지된 일반적인 방법을 이용하여, 유전자 생성물(폴리펩티드)의 클로닝, 프로세싱 및/또는 발현을 변화시키는 것을 비롯한 다양한 이유로 조작할 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 조작하는데 이용될 수 있는 기술에는 무작위 단편화에 의한 DNA 서플링 및 유전자 단편과 합성 올리고뉴클레오티드의 PCR 재조합 등이 포함된다. 부위-직접 돌연변이유발은 새로운 제한효소 부위를 삽입하고 글리코실화 패턴을 변경하며 코돈 선호도를 변화시키고 절단 변이체를 만들고 돌연변이를 도입하는데 이용할 수 있다.

본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자를 이질성 서열에 결합시키면 복합된 핵산 분자는 융합 단백질을 인코딩하게 된다. 이런 복합된 핵산 분자 역시 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징에 포함된다. 가령, 폴리펩티드 활성 저해 물질에 대한 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝하기 위하여, 복합된 핵산 분자를 이용하여 상업적으로 이용가능한 항체에 의해 인지될 수 있는 융합단백질을 발현하는 것이 유용하다. 융합 단백질은 본 발명의 폴리펩티드 서열과 이질성 단백질의 서열사이에 절단 부위가 위치하도록 조작하여, 폴리펩티드가 이질성 단백질로부터 절단 및 정제될 수 있도록 한다.

본 발명의 핵산 분자에는 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자에 부분적으로 상보적이고, 따라서 인코딩 핵산 분자에 혼성화되는 안티센스 분자 역시 포함된다. 올리고뉴클레오티드와 같은 안티센스 분자는 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 표적 핵산을 인지하고 특이적으로 결합하여 이의 전사를 방해하도록 설계될 수 있다(참조: Cohen, J.S., *Trends in Pharm. Sci.*, 10, 435(1989), Okano, J. *Neurochem.* 56, 560(1991); O'Connor, J. *Neurochem* 56, 560(1991); Lee et al., *Nucleic Acids Res* 6, 3073(1979); Cooney et al., *Science* 241, 456(1988); Dervan et al., *Science* 251, 1360(1991)).

본 명세서에서 “혼성화(반응)”는 수소 결합에 의해 2개 핵산 분자의 상호 연합을 의미한다. 일반적으로, 한 분자는 고정 서포트에 고정되고, 다른 분자는 용액에 자유로운 형태로 존재한다. 이후, 수소 결합이 일어나기 좋은 조건하에서 두 분자를 서로 접촉시킨다. 이런 결합에 영향을 주는 인자는 아래와 같다; 용매의 형태와 용적; 반응 온도; 혼성화 시간; 교반; 고정 서포트에 핵산 분자의 비-특이적 부착을 차단하는 물질(Denhardt's 시약 또는 BLOTTO); 분자의 농도; 분자의 연합 속도를 증가시키는 화합물(텍스트란 셀레이트 또는 폴리에틸렌 글리콜)의 이용; 혼성화 이후 세척 조건의 엄밀도(참조: Sambrook et al. [supra]).

표적 분자에 완전하게 상보적인 분자의 혼성화 저해는 당분야에 공지된 혼성화 분석법으로 검사할 수 있다(Sambrook et al., supra). 실질적으로 상동한 분자는 다양한 엄밀도 조건하에 표적 분자에 완전히 상동한 분자의 결합을 경쟁하고 저해하게 된다(Wahl, G.M. and S.L. Berger 1987, Methods Enzymol. 152:399-407; Kimmel, A.R. 1987, Methods Enzymol. 152:507-511).

“엄밀도”란 상이한 분자의 연합보다 매우 유사한 분자들의 연합을 유리하게 하는 혼성화 반응 조건을 의미한다. 높은 엄밀도 혼성화 조건은 아래와 같이 정의될 수 있다: 50% 포름아미드, 5XSSC(150 mM NaCl, 15 mM 구연산3나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x Denhardt's 용액, 10% 텍스트란 셀레이트, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 내에 42°C에서 하룻밤동안 배양, 이후 0.1X SSC 내에 65°C에서 필터 세척. 낮은 엄밀도 조건은 35°C에서 수행되는 혼성화 반응이다(Sambrook et al. [supra]). 적절하게는, 혼성화에 이용되는 조건은 높은 엄밀도 조건이다.

본 발명의 바람직한 구체예는 INSP201 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자에 대하여 전체 길이의 적어도 70% 동일한 핵산 분자 및 이런 핵산 분자에 실제적으로 상보적인 핵산 분자가 된다. 적절하게는, 이런 코딩 서열에 대하여 전체 길이의 적어도 80% 동일한 핵산 분자, 또는 이런 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자이다. 이와 관련하여, 전체 길이의 적어도 90%, 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일한 핵산 분자가 특히 선호된다. 이와 관련하여, 바람직한 구체예는 INSP201 폴리펩티드와 실제적으로 동일한 생물학적 기능이나 활성을 보유하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자이다.

본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 분자를 검출하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다: (a) 이중나선을 형성하는 혼성화 조건하에서 생물학적 시료와 본 발명의 핵산 프로브를 접촉시키고; (b) 형성된 이중나선을 검출한다.

본 발명에 이용될 수 있는 분석법과 관련하여 아래에 부언된 바와 같이, 상기한 핵산 분자는 INSP201 폴리펩티드를 인코딩하는 전장 cDNA와 게놈 클론을 분리하고 이런 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자와 높은 서열 유사성을 갖는 상동성이나 오르토로그(orthologous) 유전자의 cDNA와 게놈 클론을 분리하기 위한 RNA, cDNA, 또는 게놈 DNA의 혼성화 프로브로 이용될 수 있다.

이와 관련하여, 당분야에 공지된 기술 중에서 아래의 기술이 이용되고, 설명 목적으로 하기에 제시된다. DNA 염기서열분석과 분석 방법은 당분야에 널리 공지되어 있고, 일반적으로 이용할 수 있으며, 본 명세서에 기술된 본 발명의 많은 구체예를 실행하는데 실제로 이용된다. 이들 방법은 DNA 중합효소 I의 클리노우 단편(Klenow fragment), Sequenase(US Biochemical Corp, Cleveland, OH), Taq 중합효소(Perkin Elmer), 열안정성 T7 중합효소(Amersham, Chicago, IL), 또는 ELONGASE Amplification System(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)에서 볼 수 있는 중합효소와 프루프-리딩(proof-reading) 엑소뉴클레아제의 조합과 같은 효소 등을 이용할 수 있다. 적절하게는, 염기서열분석 과정은 Hamilton Micro Lab 2200(Hamilton, Reno, NV), Peltier Thermal Cycler(PTC200; MJ Research, Watertown, MA), ABI Catalyst 373과 377 DNA Sequencers(Perkin Elmer)와 같은 기계를 이용하여 자동화된다.

INSP201 폴리펩티드와 등가의 기능을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자를 분리하는 한가지 방법은 당분야에서 인정되는 표준 과정을 이용하여 자연 프로브 또는 인공-설계된 프로브로 게놈이나 cDNA 라이브러리를 탐색하는 것이다(참조: "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989,1992). 적절한 인코딩 유전자의 핵산 서열(SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17)에 상응하거나 이들에 상보적인 적어도 15개, 바람직하게는 30개, 더욱 바람직하게는 적어도 50개 연속 염기를 포함하는 프로브가 특히 유용한 프로브이다. 이런 프로브는 확인을 용이하게 하는 분석적으로 검출가능한 물질로 표지된다. 유용한 반응물에는 방사능동위원소, 형광 염료 및 검출가능한 산물 형성을 촉매할 수 있는 효소 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이들 프로브를 이용하면 당업자는 인간, 포유류 또는 다른 동물 종으로부터 목적 단백질을 인코딩하는 게놈 DNA, cDNA, RNA 폴리뉴클레오타이드의 상보적인 사본을 분리하고, 이런 공급원에서 예로써, 이러한 집단, 유형 및/또는 아형의 다른 구성원에 대한 관련된 서열을 추가 스크리닝할 수 있다.

많은 경우에, 분리된 cDNA 서열은 폴리펩티드를 인코딩하는 부분이 통상적으로, 5' 말단에서 짧게 절단되기 때문에 불완전하다. 여러 방법을 이용하여 전장 cDNA를 수득하거나 짧은 cDNA를 연장할 수 있다. 이들 서열은 부분 뉴클레오티드 서열을 이용하고, 프로모터와 조절 요소와 같은 상류 서열을 검출하는 당분야에 공지된 다양한 방법을 활용하여 연장할 수 있다. 가령, 이용될 수 있는 한가지 방법은 cDNA 말단의 신속 증폭 방법에 기초한다(RACE; Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988). Marathon<sup>TM</sup> 기술(Clontech Laboratories Inc.)로 예시되는 이러한 기술의 최근 변형으로, 더욱 긴 cDNA에 대한 검색이 상당히 단순화되었다. 약간 다른 기술인 “제한-부위” PCR에서는 범용 프라이머를 이용하여 공지된 좌위에 인접하는 미지의 핵산 서열을 검색한다(Sarkar, G.(1993) PCR Methods Applic. 2:318-322). 또한, 역 PCR을 이용하여 공지된 부분에 기초한 다변 프라이머를 이용하여 서열을 연장 또는 증폭할 수 있다(Triglia, T. et al.(1988) Nucleic Acids Res. 16:8186). 이용될 수 있는 다른 방법은 인간과 효모 인공 염색체 DNA 내에서 공지 서열에 인접한 DNA 단편의 PCR 증폭을 수반하는 포획 PCR이다(Lagerstrom, M. et al.(1991) PCR Methods Applic., 1, 111-119). 미지 서열을 확인하는데 이용할 수 있는 또 다른 방법은 Parker, J.D. et al.,((1991); Nucleic Acids Res. 19:3055-3060)의 방법이다. 이에 더하여, PCR, nested 프라이머 및 게놈 DNA를 보행하는 PromoterFinder<sup>TM</sup> 라이브러리(Clontech, Palo Alto, CA)를 이용할 수 있다. 이런 과정은 라이브러리 스크리닝이 필요하지 않고, 인트론/엑손 접합 부분을 찾는 데 유용하다.

전장 cDNA를 스크리닝하는 경우에, 더욱 큰 cDNA를 포함하도록 크기-선별된 라이브러리를 이용하는 것이 바람직하다. 또한, 유전자의 5' 부분을 포함하는 서열을 더욱 많이 보유하는 무작위-프라이밍된 라이브러리가 바람직하다. 무작위-프라이밍된 라이브러리는 올리고 d(T) 라이브러리가 전장 cDNA를 만들지 못하는 경우에 특히 유용하다. 게놈 라이브러리는 서열을 5' 비-전사된 조절 부분으로 연장하는데 이용할 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자는 염색체 위치확인(chromosome localization)에 이용할 수 있다. 이런 기술에서, 핵산 분자는 개별 인간 염색체상의 특정 위치로 특이적으로 표적되고 상기 위치에서 혼성화될 수 있다. 본 발명에 따른 염색체에 관련된 서열의 매핑(mapping)은 유전자-연관된 질환과 이들 서열의 상관관계를 확인하는데 중요한 단계이다. 서열이 정확한 염색체 위치로 매핑되면, 염색체 상에서 서열의 물리적인 위치는 유전자 지도 데이터와 연계될 수 있다. 이런 데이터는 예로써, V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man(available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library)에서 찾아볼 수 있다. 이후, 연관 분석(linkage analysis)(물리적으로 인접한 유전자의 공동 유전)을 통하여 동일한 염색체 부분에 매핑된 유전자와 질병의 상관관계를 확인한다. 위치 클로닝 또는 다른 유전자 발견 기술을 이용하면 질병 유전자를 검색하는데 귀중한 정보를 얻을 수 있다. 질병 또는 증후군이 특정 게놈 부분에 유전적으로 연관되어 위치하는 경우에, 상기 부분에 매핑하는 서열은 추가 조사를 위한 연관된 유전자 또는 조절 유전자를 나타낸다. 핵산 분자는 정상 개체, 보균자 또는 병든 개체 사이에 전위(translocation), 역전(inversion) 등으로 인한 염색체상 위치에서 차이를 검출하는 데에도 이용할 수 있다.

또한, 본 발명의 핵산 분자는 조직 위치측정(tissue localization)에도 유망하다. 이런 기술을 이용하면 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA를 검출하여 조직 내에서 폴리펩티드의 발현 패턴을 결정할 수 있다. 이런 기술에는 *in situ* 혼성화 기술 및 PCR과 같은 뉴클레오티드 증폭 기술 등이 포함된다. 이들 연구 결과는 유기체 내에서 폴리펩티드의 정상적인 기능을 제시한다. 이에 더하여, mRNA의 정상 발현 패턴과 돌연변이 유전자에 의해 인코딩된 mRNA의 발현 패턴의 비교 연구는 질병에서 돌연변이 폴리펩티드의 역할에 대한 중요한 정보를 제공한다. 이런 부적절한 발현은 일시적이거나, 지엽적이거나, 또는 정상적인 특징을 가질 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 내생적 발현을 하향-조절하기 위하여 유전자 침묵(gene silencing) 방법 역시 수행될 수 있다. RNA 간섭(RNAi) (Elbashir, SM et al., Nature 2001, 411, 494-498)는 이용될 수 있는 서열 특이적 전사후 유전자 침묵의 한가지 방법이다. 짧은 dsRNA 올리고뉴클레오티드를 시험관내에서 합성하고 세포 내에 도입한다. 이들 dsRNA 올리고뉴클레오티드의 서열 특이적인 결합은 표적 mRNA의 분해를 유도하거나, 또는 표적 단백질 발현을 감소시키거나 제거한다.

상기한 유전자 침묵 방법의 효력은 폴리펩티드 발현의 측정(가령, 웨스턴 블랏팅(Western blotting)으로)을 통하여 평가하고, RNA 수준에서 TaqMan-기초된 방법을 이용하여 평가할 수 있다.

본 발명의 벡터는 본 발명의 핵산 분자를 포함하며, 클로닝이나 발현 벡터가 될 수 있다. 본 발명의 숙주 세포는 벡터에 의해 형질전환, 형질감염 또는 형질도입된 진핵이나 원핵 세포이다.

본 발명의 폴리펩티드는 숙주 내에 포함된 벡터에서 그들의 인코딩된 핵산 분자의 발현으로 재조합 형태로 만들어질 수 있다. 이런 발현 방법은 당분야에 공지되어 있다(Sambrook et al(supra); Fernandez & Hoeffler(1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression". Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto).

일반적으로, 필요 숙주에서 폴리펩티드를 만들기 위하여 핵산 분자를 유지, 증폭 또는 발현하는데 적절한 임의의 시스템 또는 벡터를 이용한다. 적절한 뉴클레오티드 서열은 다양한 널리 공지된 통상적인 기술, 예를 들면, Sambrook et al., (supra)에 기술된 기술에 의해 발현 시스템 내로 삽입한다. 일반적으로, 인코딩 유전자는 프로모터, 리보솜 결합 부분(박테리아 발현의 경우), 선택적으로 오퍼레이터와 같은 조절 요소의 통제하에 위치시켜, 원하는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열이 형질전환된 숙주 세포에서 RNA 내로 전사되도록 한다.

적절한 발현 시스템에는 예로써, 크로모솜, 에피솜, 바이러스-유도된 시스템 등이 포함되는데, 예를 들면 세균성 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 효모 에피솜, 삽입 요소, 효모 염색체 원소; 배큘로바이러스, 파포바 바이러스(가령, SV40), 우두 바이러스, 아데노바이러스, 가금류 폭스 바이러스, 가사공수병 바이러스, 레트로바이러스와 같은 바이러스, 또는 이들의 조합, 예를 들면, 플라스미드 및 코스미드와 파게미드를 비롯한 박테리오파지 유전자 요소로부터 유래된 조합 등으로부터 유래된 벡터가 포함된다. 또한, 인간 인공 염색체(HAC)를 이용하여 플라스미드 내에서 유지되고 발현될 수 있는 것보다 더욱 큰 DNA 단편을 운반할 수 있다. INSP201과 관련하여 본 발명에 이용하기 적합한 벡터의 실례는 pCR4-TOPO, pCR4-TOPO-INSP201, pENTR, pENTR\_INSP201EC-6HIS, pEAK12d-PAC, pDEST12.2, pEAK12d-PAC\_INSP201EC-6HIS, pDEST12.2\_INSP201EC-6HIS이다.

특히 적절한 발현 시스템에는 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터(가령, 배큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 발현 벡터(가령, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 박테리아 발현 벡터(가령, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 동물 세포 시스템이 포함된다. 무-세포 번역 시스템을 이용하여 본 발명의 폴리펩티드를 만들 수도 있다.

본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자의 숙주 세포 내로의 도입은 많은 표준 실험 매뉴얼에 기술된 방법으로 달성할 수 있다(Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986); Sambrook et al.,(supra)). 특히 적절한 방법에는 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 형질감염, 미세주입, 양이온 지질-매개된 형질감염, 전기천공, 형질도입, 스크레이프 로딩(scrape loading), 발리스틱 도입(ballistic introduction) 또는 감염 등이 포함된다(참조: Sambrook et al., 1989 [supra]; Ausubel et al., 1991 [supra]; Spector, Goldman & Leinwald 1998). 진핵 세포에서 발현 시스템은 필요에 따라 달라 일시적(가령, 에피솜)이거나 영구적(염색체 통합)일 수 있다.

인코딩 핵산 분자에는 소포체의 내강, 세포질 공간 또는 세포의 환경으로 번역된 폴리펩티드의 분비를 위한 조절 서열, 예를 들면, 신호 펩티드 또는 리더 서열을 인코딩하는 서열이 포함되거나 포함되지 않을 수 있다. 이런 신호는 폴리펩티드에 내생이거나 이질성 신호일 수 있다. 리더 서열은 번역후 가공에서 세균 숙주에 의해 제거될 수 있다.

조절 서열 이외에, 숙주 세포 성장과 관련된 폴리펩티드의 발현 조절을 가능하게 하는 조절 서열을 추가하는 것도 바람직하다. 조절 서열의 예는 조절 화합물의 존재를 비롯한 화학적 또는 물리적인 자극, 또는 다양한 온도 또는 대사 조건에 반응하여 유전자 발현을 증가 또는 감소시키는 서열이다. 조절 서열은 벡터의 비-번역 부분, 예를 들면, 인헨서, 프로모터, 5'와 3' 비-번역 부분이다. 이들은 숙주 세포 단백질과 상호작용하여 전사 및 번역을 수행한다. 이런 조절 서열은 강도 및 특이성에서 가변적이다. 이용된 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 구조성과 유도성 프로모터를 비롯한 많은 임의의 적절한 전사 및 번역 요소를 이용할 수 있다. 가령, 세균 시스템 내에서 클로닝되는 경우에, Bluescript 파게미드의 하이브리드 lacZ 프로모터(Stratagene, LaJolla, CA), pSport<sup>TM</sup> 플라스미드(Gibco BRL) 등과 같은 유도성 프로모터를 이용할 수 있다. 곤충 세포에는 배큘로바이러스 폴리헤드린 프로모터를 이용할 수 있다. 식물 세포의 게놈(가령, 열 쇼크, RUBISCO 및 저장 단백질 유전자) 또는 식물 바이러스(가령, 바이러스성 프로모터 또는 리더 서열)로부터 유래된 프로모터 또는 인헨서는 벡터 내로 클론될 수 있다. 포유동물 세포 시스템에서는 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터가 바람직하다. 서열의 다중 사본을 포함하는 세포주를 만들 필요가 있는 경우에, 적절한 선별가능 마커와 함께, SV40 또는 EBV에 기초한 벡터를 이용할 수 있다.

특정 핵산 코딩 서열이 적절한 조절 서열을 갖는 벡터에 위치하도록 발현벡터를 작제하는데, 조절 서열에 대한 코딩 서열의 위치와 방향은 코딩 서열이 조절 서열의 “통제”하에 전사되도록 한다. 다시 말하면, 조절 서열에서 DNA 분자에 결합하는 RAN 중합효소는 코딩 서열을 전사한다. 일부 경우에, 리딩 프레임을 유지하는 적절한 방향으로 조절 서열에 부착되도록 서열의 변화가 필요할 수도 있다.

벡터 내로 코딩 서열을 삽입하기에 앞서 제어 서열 및 다른 조절 서열을 핵산 코딩 서열에 결합시킬 수도 있다. 대안으로, 코딩 서열은 제어 서열 및 적절한 제한 부위를 이미 포함하고 있는 발현벡터 내로 직접 클론될 수 있다.

제조할 폴리펩티드를 장기간 다량 생산하고자 하는 경우에, 안정적인 발현이 바람직하다. 가령, 목적 폴리펩티드를 안정적으로 발현하는 세포주는 동일하거나 별개의 벡터 상에 바이러스 복제 원점 및/또는 내생적 발현 요소와 선별가능 마커 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환될 수 있다. 벡터의 도입이후, 세포는 선별가능 배지로 이전하기에 앞서, 풍부한 배지에서 1-2일간 성장시킨다. 선별가능 마커의 목적은 선별에 대한 내성을 부여하는 것인데, 이의 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 생장 및 회수를 가능하도록 한다. 안정적으로 형질전환된 세포의 저항성 클론은 세포 유형에 적합한 조직 배양 기술을 이용하여 증식시킬 수 있다.

발현을 위한 숙주로 이용가능한 포유류 세포주는 당분야에 공지되어 있는데, 여기에는 중국 햄스터 난소(CHO), HeLa, 아기 햄스터 신장(BHK), 원숭이 신장(COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, Bowes 흑색종, 인간 간세포 암종(예, Hep G2) 세포 및 다른 다양한 세포주를 포함하나 이들에 국한되지 않는, American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 입수가능한 많은 영속화 세포주가 포함된다.

배큘로바이러스 시스템의 경우에, 배큘로바이러스/곤충 세포 발현 시스템의 재료는 키트 형태로 상업적으로 구입가능하다 (Invitrogen, San Diego CA(the "MaxBac" 키트)). 이들 기술은 당업자에 전반적으로 공지되어 있고, Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)에서 상세하게 기술한다. 이런 시스템에 사용하기 특히 적합한 숙주 세포는 초파리(*Drosophila*) S2와 거엄벌레(*Spodoptera*) Sf9 세포와 같은 곤충 세포이다.

많은 식물 세포 배양액 및 전체 식물 유전자 발현 시스템이 당분야에 공지되어 있다. 적절한 식물 세포 유전자 발현 시스템의 예에는 US 5,693,506; US 5,659,122; US 5,608,143에 기술된 것들이 포함된다. 식물 세포 배양액 내에서 유전자 발현의 다른 예는 Zenk, Phytochemistry 30, 3861-3863(1991)에서 기술된다.

특히, 원형질체를 분리할 수 있고 온전한 재생 식물로 배양할 수 있는 모든 식물을 이용하여 전이된 유전자를 보유하는 전체 식물을 회수할 수 있다. 실질적으로, 모든 식물이 사탕수수, 사탕무, 목화, 과일, 다른 나무, 콩과식물, 채소 등을 포함하지만 이들에 국한되지 않는 배양된 세포 또는 조직으로부터 재생될 수 있다.

특히 바람직한 세균성 숙주 세포에는 연쇄상구균(*streptococci*), 포도상구균(*staphylococci*), 대장균(*E. coli*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 바실루스 서브틸리스 세포(*Bacillus subtilis*) 등이 포함된다.

곰팡이 발현에 적합한 숙주 세포에는 효모 세포(가령, *S. cerevisiae*) 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 세포 등이 포함된다.

당분야에 공지된 선별 시스템을 이용하여 형질전환된 세포주를 회수할 수 있다. 전형적으로, tk<sup>-</sup> 세포 또는 aprt<sup>+</sup> 세포에서 각각 이용될 수 있는 단순 포진 바이러스 티미딘 카이나제 유전자(Wigler, M. et al.,(1977) Cell 11:223-32) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy, I. et al.(1980) Cell 22:817-23) 유전자이다.

또한, 선별을 위한 기초로서 항-대사물질, 항생제 또는 제초제 내성을 이용할 수 있다; 가령, 메토크세이트에 내성을 부여하는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR)(Wigler, M. et al.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70); 아미노글리코시드 네오마이신 및 G418에 내성을 부여하는 npt(Colbere-Garapin, F. et al(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14); 클로로선프론 및 포스포노트로신 아세틸트랜스퍼라아제에 각각 내성을 부여하는 als 또는 pat 등이 포함된다. 부가적인 선별가능 유전자에 대해서도 기술되는데, 이들의 예는 당업자에게 명백하다.

마커 유전자의 발현 유무가 목적 유전자의 존재를 암시하긴 하지만, 이의 존재와 발현은 확증을 필요로 한다. 가령, 관련 서열이 마커 유전자 서열 내로 삽입되는 경우에, 마커 유전자 기능의 부재로 적절한 서열을 포함하는 형질전환된 서열을

확증할 수 있다. 대안으로, 마커 유전자는 단일 프로모터 통제하에 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 서열과 나란하게 위치시킬 수 있다. 일반적으로, 유도 또는 선별에 대한 반응으로 마커 유전자의 발현은 나란히 위치하는 유전자의 발현을 암시한다.

대안으로, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고 상기 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포는 당분야에 공지된 다양한 절차로 확인할 수 있다. 이들 절차에는 DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화 및 핵산이나 단백질의 검출 또는 정량을 위한 막, 용액 또는 칩 기초한 기술을 수반하는 단백질 생물분석, 예를 들면, 형광 활성화된 세포 소팅(FACS) 또는 면역검사 기술(효소-결합된 면역흡착 검사[ELISA] 및 방사능면역검사[RIA]) 등이 포함된다(참조: Hampton, R. et al.(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN); Maddox, D.E. et al.(1983) J. Exp. Med, 158, 1211-1216).

다양한 라벨 및 공액 기술은 당분야에 공지되어 있고, 다양한 핵산과 아미노산 검사에 이용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자와 관련된 서열을 검출하기 위한 표지된 혼성화 또는 PCR 프로브의 생산 수단에는 표지된 폴리뉴클레오티드를 이용한 올리고라벨링, 새깅 변형, 말단-라벨링 또는 PCR 증폭 등이 포함된다. 대안으로, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은 mRNA 프로브를 만들기 위해 벡터 내로 클론될 수 있다. 이런 벡터는 당분야에 공지되어 있고 상업적으로 구입가능하며 T7, T3 또는 SP6과 같은 적절한 RNA 중합효소 및 표지된 뉴클레오티드를 추가하여 *in vitro*에서 RNA 프로브를 합성하는데 이용할 수 있다. 이들 과정은 상업적으로 구입가능한 키트를 이용하여 수행할 수 있다(Pharmacia & Upjohn(Kalamazoo, MI); Promega(Madison WI); U.S. Biochemical Corp.,(Cleveland, OH)).

유리한 검출을 위하여 이용하기 적합한 리포터 분자에는 방사능핵종, 효소, 형광, 화학발광이나 발색 물질, 기질, 보조인자, 저해물질, 자성 입자 등이 포함된다.

본 발명에 따른 핵산 분자를 이용하여 유전자도입 동물, 특히, 설치류 동물을 만들 수 있다. 이런 유전자도입 동물 역시 본 발명의 특징에 속한다. 체세포를 변형하거나 유전가능한 변형을 통합하는 생식세포계 요법을 이용하여 유전자도입 동물을 만들 수 있다. 이런 유전자도입 동물은 특히, 본 발명의 폴리펩티드의 조절물질로서 효과적인 약제 분자에 대한 동물 모형을 만드는 데 이용될 수 있다.

공지의 방법으로 재조합 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 회수하고 정제할 수 있는데, 이용할 수 있는 방법으로는 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온이나 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로오스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 렉틴 크로마토그래피 등이 포함된다. 정제에는 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 특히 유용하다. 단백질을 재접합하기 위한 널리 공지된 기술을 이용하여, 정제 및/또는 분리 과정동안 폴리펩티드가 변성되는 경우에 활성 형태를 재생할 수 있다.

원하는 경우에 특화된 벡터 작제를 이용하여, 용해성 단백질의 정제를 조장하는 폴리펩티드 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 결합시킴으로써 단백질 정제를 촉진할 수 있다. 이런 정제-촉진 도메인에는 고정된 금속에서 정제를 가능하게 하는 히스티딘-트립토판 모듈과 같은 금속-킬레이트화 펩티드, 고정된 면역글로불린에서 정제를 가능하게 하는 단백질 A 도메인; FLAGS 연장/친화성 정제 시스템(Immunex Corp., Seattle, WA)에 이용되는 도메인 등이 포함된다. 정제 도메인과 본 발명의 폴리펩티드 사이에, 인자 XA 또는 엔테로키나아제(Invitrogen, San Diego, CA)에 특이적인 것들과 같은 절단가능 링커 서열을 포함시켜 정제를 촉진할 수 있다. 이와 같은 발현 벡터는 티오레독신(thioredoxin) 또는 엔테로키나아제(enterokinase) 절단 부위를 선행하는 여러 히스티딘 잔기에 융합된 본 발명의 폴리펩티드를 보유하는 융합 단백질의 발현을 제공한다. 히스티딘 잔기는 IMAC(고정된 금속 이온 친화성 크로마토그래피)(Porath, J. et al.(1992), Prot. Exp. Purif. 3: 263-281)에 의한 정제를 촉진하는 반면, 티오레독신 또는 엔테로키나아제 절단 부위는 융합 단백질로부터 폴리펩티드를 정제하는 수단을 제공한다. 융합 단백질을 포함하는 벡터는 Kroll, D.J. et al.(1993; DNA Cell Biol. 12.441-453)에서 기술된다.

스크리닝 검사에 이용되는 폴리펩티드를 발현하는 경우에, 일반적으로 폴리펩티드는 이를 발현하는 숙주 세포의 표면에서 생산되도록 하는 것이 바람직하다. 이런 경우에, 스크리닝 검사에 앞서, 예로써 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 또는 면역친화성 기술 등을 이용하여 숙주 세포를 수득한다. 폴리펩티드가 배지 내로 분비되는 경우에, 발현된 폴리펩티드를 회수하고 정제하기 위하여 배지를 회수할 수 있다. 폴리펩티드가 세포내에서 생산되는 경우에, 세포를 먼저 용해시키고, 폴리펩티드를 회수한다.

상기한 바와 같이, 본 발명은 또한, 후보 화합물 또는 선도 화합물의 스크리닝을 위한 신규한 표적과 방법을 제시한다. 이들 스크리닝 방법은 결합 검사법 및/또는 기능 검사법을 포함하고 시험관내에서, 세포 조직 내에서 또는 동물 내에서 수행된다.

이와 관련하여, 본 발명의 특정 목적은 세포 표면 당단백질 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 후보 약제를 스크리닝하기 위한 표적으로서 INSP201 폴리펩티드의 용도에 관계한다.

본 발명의 다른 목적은 생물학적 활성 화합물을 선별하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 후보 화합물과 INSP201 유전자 또는 폴리펩티드를 접촉시키고, 상기 유전자 또는 폴리펩티드에 결합하는 화합물을 선별하는 단계를 포함한다.

본 발명의 또 다른 목적은 생물학적 활성 화합물을 선별하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 후보 화합물과 INSP201 폴리펩티드를 발현하는 재조합 숙주 세포를 접촉시키고, 상기 세포의 표면에서 상기 INSP201 폴리펩티드에 결합하고 및/또는 INSP201 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물을 선별하는 단계를 포함한다.

“생물학적 활성” 화합물은 개체에서 생물학적 활성, 특히, 치료 활성을 갖는 임의의 화합물, 바람직하게는, 세포 표면 당단백질 활성을 갖는 화합물, 더욱 바람직하게는, INSP201 관련된 질환을 치료하는데 사용되거나 세포 표면 당단백질 관련된 질환을 치료하는 약제를 개발하기 위한 선도 화합물로서 사용될 수 있는 화합물을 의미한다. 적절하게는, “생물학적 활성” 화합물은 INSP201의 활성을 조절하는 화합물이다.

이들 방법은 고정된 반응물을 비롯한 다양한 장치와 조건을 이용하여 시험관내에서 수행되고, 세포 표면 당단백질 관련된 질환의 모형, 예를 들면, 동물 모형 내에서 선별된 화합물의 활성을 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

선별된 바람직한 화합물은 INSP201의 항진제, 다시 말하면, INSP201에 결합하고 이의 내생적 리간드의 활성을 모방할 수 있는 화합물이다.

본 발명의 또 다른 목적은 생물학적 활성 화합물을 선별하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 시험관내에서, 검사 화합물과 본 발명에 따른 INSP201 폴리펩티드를 접촉시키고, 상기 INSP201 폴리펩티드의 활성을 조절하는 상기 검사 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함한다.

본 발명의 또 다른 목적은 생물학적 활성 화합물을 선별하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 시험관내에서, 검사 화합물과 본 발명에 따른 INSP201 유전자를 접촉시키고, 상기 INSP201 유전자의 발현을 조절하는, 바람직하게는, 이의 발현을 촉진하는 상기 검사 화합물의 능력을 결정하는 단계를 포함한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 활성 화합물, 바람직하게는, 염증, 세포 퇴행과 아포토시스, 종양형성의 조절에서 활성 화합물을 스크리닝하거나 선별하거나 확인하는 방법에 관계하는데, 상기 방법은 검사 화합물과 리포터 구조체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 접촉시키고, 상기 리포터 구조체는 INSP201 유전자 프로모터의 통제하에 리포터 유전자를 포함하고, 상기 리포터 유전자의 발현을 조절하는(가령, 촉진하거나 감소시키는, 바람직하게는 촉진하는) 검사 화합물을 선별하는 단계를 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드는 다양한 약제 스크리닝 기술을 이용하여 화합물 라이브러리를 스크리닝하는데 이용할 수 있다. 이들 화합물은 본 발명의 유전자의 발현 수준 또는 본 발명의 폴리펩티드의 활성 수준을 증가(항진) 또는 저해(길항)할 수 있는데, 이 또한 본 발명의 특징이 된다. 바람직한 화합물은 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현을 변화시키거나, 또는 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드 활성을 조절하는데 유효하다.

항진제 또는 길항제 화합물은 예로써, 세포, 무-세포 제조물, 화학 라이브러리 또는 자연 생성물 혼합물로부터 분리할 수 있다. 이들 항진제 또는 길항제는 자연이나 변형된 기질, 리간드, 효소, 수용체, 구조적 또는 기능적 모방체 등이 될 수 있다. 이런 스크리닝 기술에 대하여 Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2):Chapter 5(1991)를 참조한다.

표적 유전자 또는 폴리펩티드에 결합은 상기 표적의 활성을 조절하여 개체에서 세포 표면 당단백질 관련된 질환에 이르는 경로에 영향을 주는 화합물의 능력을 암시한다. 결합의 결정은 예로써, 후보 화합물의 라벨링, 표지된 참고 리간드와의 경쟁 등과 같은 다양한 기술로 수행될 수 있다. 시험관내 결합 검사의 경우에, 폴리펩티드는 본질적으로 순수한 형태, 현탁 형태 또는 서포트 상에 고정된 형태로 사용되거나, 또는 막(원래 세포, 막 제조물, 리포솜 등)에서 발현된다.

활성의 조절에는 제한 없이, INSP201 수용체의 표면 발현의 촉진, 상기 수용체의 다중화(multimerization)(가령, 다른 아단위와 다중 복합체(multimeric complex)의 형성)의 조절 등이 포함된다. 이들 검사에 이용되는 세포는 재조합 세포(즉, INSP201 폴리펩티드를 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 임의의 세포) 또는 내생적 INSP201 폴리펩티드를 발현하는 임의의 세포이다. 이런 세포의 예에는 제한 없이, 원핵세포(가령, 박테리아)와 진핵세포(가령, 효모 세포, 포유동물 세포,



곤충 세포, 식물 세포 등)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 구체적인 실례는 대장균(*E. coli*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 한세누라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 효모, 포유동물 세포주(가령, Vero 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등), 원시 또는 확립된 포유동물 세포 배양액(가령, 섬유아세포, 배아 세포, 상피 세포, 신경 세포, 지방 세포 등으로부터 생산됨)이다.

길항제로서 가장 유망한 화합물은 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 경우에 상기 폴리펩티드의 생물학적 효과를 유도하지 않는 분자이다. 유망한 항진제에는 본 발명의 폴리펩티드에 결합하여 이의 활성을 저해 또는 제거할 수 있는 소형 유기 분자, 펩티드, 폴리펩티드, 항체 등이 포함된다. 이런 방식으로, 정상적인 세포 결합 분자에 폴리펩티드의 결합이 저해되고, 상기 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성이 차단된다.

이런 스크리닝 기술에 이용되는 본 발명의 폴리펩티드는 용액에서 유리된 형태, 고정된 서포트에 고정된 형태, 세포 표면에서 생성된 형태 또는 세포내에 위치하는 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 이런 스크리닝 절차는 검사 화합물과 접촉하는 폴리펩티드를 발현하는 적절한 세포 또는 세포막을 이용하여 결합, 또는 기능적 반응의 촉진이나 저해를 관찰하는 단계를 수반한다. 검사 화합물과 접촉된 세포의 기능적 반응은 검사 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포의 기능적 반응과 비교한다. 이런 검사에서는 적절한 검출 시스템을 이용하여, 검사 화합물이 폴리펩티드 활성화에 의해 발생하는 신호를 유발하는지를 평가한다. 일반적으로, 활성화의 저해물질은 공지된 항진제의 존재하에 분석하고, 항진제에 의한 활성화에 대한 효과는 검사 화합물의 존재하에 관찰한다.

본 발명의 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제를 확인하는 바람직한 방법은 아래의 단계를 포함한다:

(a) 폴리펩티드에 결합을 허용하는 조건하에서 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 발현하는(선택적으로, 세포 표면에서) 세포와 선별되는 화합물을 접촉시키고, 이때 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드에 대한 화합물의 결합에 반응하여 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 제 2 성분과 연합되고;

(b) 폴리펩티드와 화합물의 상호작용으로 발생하는 신호의 수준을 측정함으로써 상기 화합물이 상기 폴리펩티드에 결합하여 이를 활성화시키는지를 또는 저해하는지를 결정한다.

본 명세서에 기술된 유형의 검사법에서 검출가능 신호를 생성하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 특정 실례는 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현하는 구조체, 또는 LBD와 같은 단백을 GAL4 DNA 결합 도메인과의 융합으로, 리포터 플라스미드와 함께 세포 내로 동시-형질감염시키는 것인데, 이의 예는 pFR-Luc(Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands)이다. 이러한 특정 플라스미드는 루시페라제 유전자의 발현을 통제하는 GAL4 결합 부위의 5개 직렬 반복(tandem repeat)과 함께 합성 프로모터를 보유한다. 잠재적 리간드가 이들 세포에 부가되면, 이는 GAL4-폴리펩티드 융합체에 결합하고 루시페라제 유전자의 전사를 유도한다. 루시페라제 발현의 수준은 발광 관독기를 이용하여 이의 활성으로 모니터링할 수 있다(참조: Lehman et al. JBC 270, 12953, 1995; Pawar et al. JBC, 277, 39243, 2002).

본 발명의 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제를 확인하는 다른 바람직한 방법은 아래의 단계를 포함한다:

(a) 임의의 고정된 서포트(가령, 구체, 플레이트, 매트릭스 서포트, 칩)에 고정된 폴리펩티드와 표지되거나 표지되지 않은 화합물을 접촉시키고, 라벨 또는 화합물 자체의 존재를 평가함으로써 화합물을 검출하며;

(b) 폴리펩티드에 결합을 허용하는 조건하에서, 폴리펩티드를 세포막에 인공적으로 고정하거나, 또는 상기 폴리펩티드에 대한 화합물의 결합에 반응하여 검출가능 신호를 제공할 수 있는 제 2 성분과 연합되는 키메라 수용체를 구성함으로써 표면에 상기 폴리펩티드를 발현하는 세포와 선별되는 화합물을 접촉시키고;

(c) 화합물과 폴리펩티드의 상호작용으로 발생된 신호 수준과 화합물이 없을 경우의 신호 수준과 비교함으로써 상기 화합물이 상기 폴리펩티드에 결합하여 이를 활성화시키는지를 또는 저해하는지를 결정한다.

가령, 펩티드 보조-활성인자(Norris et al, Science 285, 744, 1999)의 존재하에 폴리펩티드에 결합된 리간드의 FRET 검출과 같은 방법을 이용할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제를 확인하는 다른 바람직한 방법은 아래의 단계를 포함한다:

(a) 폴리펩티드에 결합을 허용하는 조건하에서 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드를 발현하는(선택적으로, 세포 표면에서) 세포와 선별되는 화합물을 접촉시키고, 이때 폴리펩티드는 폴리펩티드에 대한 화합물의 결합에 반응하여 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 제 2 성분과 연합되고;

(b) 폴리펩티드와 화합물의 상호작용으로 발생하는 신호 수준을 화합물이 없을 경우의 신호 수준과 비교함으로써 상기 화합물이 상기 폴리펩티드에 결합하여 이를 활성화시키는지 또는 저해하는지를 결정한다.

다른 바람직한 구체예에서, 앞서 기술된 포괄적인 방법에는 폴리펩티드에 대한 표지되거나 표지되지 않은 리간드의 존재 하에 항진제 또는 길항제를 확인하는 단계가 추가로 포함된다.

본 발명의 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제를 확인하는 방법의 또 다른 구체예는 아래의 단계를 포함한다:

폴리펩티드에 결합을 허용하는 조건하에서 후보 화합물 존재하에 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 세포(선택적으로, 표면에 본 발명의 폴리펩티드를 보유한다), 또는 이런 폴리펩티드를 보유하는 세포막에 리간드의 결합 저해를 결정하고; 상기 폴리펩티드에 결합된 리간드의 양을 결정한다. 리간드의 결합을 감소시킬 수 있는 화합물은 항진제 또는 길항제로 간주된다. 적절하게는, 리간드는 표지된다.

더욱 구체적으로, 폴리펩티드 길항제 또는 항진제 화합물을 스크리닝하는 방법은 아래와 같은 단계를 포함한다:

(a) 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는(선택적으로, 세포 표면에서) 전체 세포, 또는 본 발명의 폴리펩티드를 보유하는 세포막과 함께, 표지된 리간드를 배양하고;

(b) 전체 세포 또는 세포막에 결합된 표지된 리간드의 양을 측정하고;

(c) (a) 단계의 전체 세포 또는 세포막 및 표지된 리간드의 혼합물에 후보 화합물을 첨가하여 혼합물이 평형에 이르도록 하고;

(d) (c) 단계이후 전체 세포 또는 세포막에 결합된 표지된 리간드의 양을 측정하고;

(e) (b)와 (d) 단계에서 결합된 표지된 리간드에서 차이를 비교하고, (d) 단계에서 결합 감소를 유도하는 화합물은 항진제 또는 길항제로서 간주한다.

유사하게, 폴리펩티드 길항제 또는 항진제 화합물을 스크리닝하는 방법은 아래와 같은 단계를 포함한다:

(a) 임의의 고정 서포트 또는 세포 표면 상에서 본 발명의 폴리펩티드, 또는 본 발명의 폴리펩티드를 보유하는 세포막과 함께, 표지된 리간드를 배양하고;

(b) 고정 서포트, 전체 세포 또는 세포막 상에서 폴리펩티드에 결합된 표지된 리간드의 양을 측정하고;

(c) (a) 단계의 고정 서포트, 전체 세포 또는 세포막 상에 고정된 폴리펩티드 및 표지된 리간드의 혼합물에 후보 화합물을 첨가하여 혼합물이 평형에 이르도록 하고;

(d) (c) 단계이후 고정된 폴리펩티드 또는 전체 세포 또는 세포막에 결합된 표지된 리간드의 양을 측정하고;

(e) (b)와 (d) 단계에서 결합된 표지된 리간드에서 차이를 비교하고, (d) 단계에서 결합 감소를 유도하는 화합물은 항진제 또는 길항제로서 간주한다.

본 발명의 INSP201 폴리펩티드는 세포 성장과 분화를 조절할 수 있다. 따라서, INSP201 폴리펩티드의 생물학적 활성은 아가로오스 배양액에서 세포 성장과 분화의 연구가 가능한 시스템, 예를 들면, 장기 배양 검사법에서 또는 콜로니 검사 시스템에서 조사할 수 있다. 세포 증식의 촉진 또는 저해는 다양한 검사법으로 측정할 수 있다.

가령, 세포 성장 저해를 관찰하기 위하여, 고체 또는 액체 배지를 이용할 수 있다. 고체 배지에서, 성장이 저해되는 세포는 형성된 콜로니의 크기를 비교함으로써 실험 대상 세포군으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 액체 배지에서, 성장 저해는

배양 배지 탁도 또는 표지된 티미딘의 DNA 합입을 측정함으로써 조사될 수 있다. 전형적으로, 새로 합성된 DNA 내로 뉴클레오타이드 유사체의 합입은 세포 개체군에서 증식(즉, 활성 세포 성장)을 측정하는데 이용된다. 가령, 브로모디옥시우리딘(BrdU)은 DNA 라벨링 시약으로서 이용될 수 있고, 항-BrdU 생쥐 단클론 항체는 검출 시약으로서 이용될 수 있다. 상기 항체는 브로모디옥시우리딘이 합입된 DNA를 포함하는 세포에만 결합된다. 이러한 검사법과 공동으로, 다수의 검출 방법, 예를 들면, 면역형광, 면역조직화학, ELISA, 비색 방법을 이용할 수 있다. 브로모디옥시우리딘(BrdU)과 항-BrdU 생쥐 단클론 항체를 포함하는 키트는 Boehringer Mannheim(Indianapolis, IN)으로부터 상업적으로 구입가능하다.

세포 분화에 대한 INSP201 폴리펩티드의 효과는 다양한 양의 INSP201 폴리펩티드를 줄기 세포 또는 배아 세포와 접촉시키고, 이들 줄기 세포 또는 배아 세포의 분화에 대한 효과를 관찰함으로써 측정할 수 있다. 결과의 세포는 조직-특이적 항체와 검정을 이용하여 확인할 수 있다.

또한, INSP201 폴리펩티드는 앞서 기술된 검사법에서 용량-의존성 방식으로 면역 및/또는 신경 줄기 세포 증식과 분화를 조절하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, INSP201 폴리펩티드의 “기능성 등가물”은 앞서 기술된 검사법에서 용량-의존성 방식으로 동일한 성장과 분화 조절 활성을 보이는 임의의 폴리펩티드를 포괄한다. 이런 용량-의존성 활성의 정도가 INSP201 폴리펩티드에서와 동일할 필요는 없지만, “기능성 등가물”은 일정한 활성 검사에서 INSP201 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 용량-의존성을 보인다.

상기한 특정 구체예에서, 간단한 결합 검사법을 이용할 수 있는데, 여기서 폴리펩티드를 보유하는 표면에 검사 화합물의 부착은 검사 화합물과 직접 또는 간접으로 결합된 라벨에 의해 검출되거나 표지된 경쟁 물질과의 경쟁을 수반하는 검사법으로 검출된다. 다른 구체예에서, 경쟁성 약제 스크리닝 검사법을 이용할 수 있는데, 여기서 폴리펩티드에 결합할 수 있는 중화 항체는 결합에 대하여 검사 화합물과 특이적으로 경쟁한다. 이런 방식으로, 항체는 폴리펩티드에 특이적인 결합 친화성을 보유하는 검사 화합물의 존재를 검출하는데 이용될 수 있다.

세포에서 폴리펩티드를 인코딩하는 mRNA 생산에 대한 첨가된 검사 화합물의 효과를 검출하는 검사법을 설계할 수도 있다. 가령, 당분야에 공지된 표준 방법으로 단클론이나 다클론 항체를 이용하여 폴리펩티드의 분비되거나 세포-결합된 수준을 측정하는 ELISA를 구성할 수 있는데, 이는 적절하게 조작된 세포 또는 조직으로부터 폴리펩티드 생산을 저해하거나 강화하는 화합물을 검색하는데 이용될 수 있다. 이후, 폴리펩티드와 검사 화합물 사이에 결합 복합체의 형성을 측정한다.

이용될 수 있는 다른 약제 스크리닝 기술은 목적 폴리펩티드에 적절한 결합 친화성을 갖는 화합물의 초고속 스크리닝을 제공한다(International patent application WO84/03564). 이러한 방법에서, 다수의 상이한 소형 검사 화합물이 고정 기질상에 합성되는데, 이들은 이후, 본 발명의 폴리펩티드와 반응시키고 세척한다. 폴리펩티드를 고정시키는 한가지 방법은 비-중화 항체를 이용하는 것이다. 이후, 당분야에 공지된 방법을 이용하여, 결합된 폴리펩티드를 검출한다. 정제된 폴리펩티드는 상기한 약제 스크리닝 기술에 이용되는 플레이트 내에 직접 피복될 수 있다.

이런 종류의 또 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다(참조: Adessi C. & Soto C. Curr. Med. Chem. 2002, 9(9):963-78; Strand F.L. Prog. Drug Res., 2003 61: 1-37; Hruby V.J. Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1(11):847-58).

본 발명의 폴리펩티드는 당분야에 공지된 표준 수용체 결합 기술, 예를 들면, 폴리펩티드가 방사성 동위원소로 표지되거나, 화학적으로 변형되거나, 또는 이의 검출 또는 정제를 조장하고 추정 수용체의 공급원(가령, 세포, 세포막, 세포 현탁액, 조직 추출물, 체액의 조성물)과 함께 배양되는 펩티드 서열에 융합되는 리간드 결합과 교차결합 검사법을 통하여 막-결합되거나 용해성 수용체를 확인하는데 이용될 수 있다. 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance) 및 분광학(spectroscopy)과 같은 생체물리학적 기술을 이용하여 결합 효력을 측정할 수 있다. 결합 검사법은 수용체의 정제와 클로닝에 이용할 수 있을 뿐만 아니라 수용체에 대한 폴리펩티드의 결합을 경쟁하는, 폴리펩티드의 항진제 또는 길항제를 확인할 수도 있다. 스크리닝 검사를 수행하기 위한 표준 방법은 당분야에 공지되어 있다.

다른 구체예에서, 본 발명은 INSP201 폴리펩티드 또는 이의 단편의 용도에 관계하는데, 여기서 상기 단편은 가급적, 면역 관련된 질환의 치료를 위한 INSP201 폴리펩티드의 항진제 또는 촉진물질을 분리하거나 생성하기 위한 INSP201 유전자-특이적 단편이고, 상기 항진제 또는 촉진물질은 아래에서 선택된다:

1. a) 키메라 항체, b) 인간화 항체 또는 c) 완전 인간 항체를 비롯한 특이적인 항체 또는 이의 단편
2. 이중특이적(bispecific) 또는 다중특이적(multispecific) 항체,
3. 단일 사슬(가령, scFv), 또는

4. 단일 도메인 항체, 또는

5. 상기 항체로부터 유래된 펩티드- 또는 비-펩티드 모방체(mimetic),

6. a) 안티칼린(anticalin) 또는 b) 피브로넥틴-기초된 결합 분자(가령, 트리넥틴(trinectin) 또는 아드넥틴(adnectin))와 같은 항체-모방체.

항체로부터 펩티드- 또는 비-펩티드 모방체의 생성은 당분야에 공지되어 있다(Saragovi et al., 1991; Saragovi et al., 1992).

안티칼린 역시 당분야에 공지되어 있다(Vogt et al., 2004). 피브로넥틴-기초된 결합 분자는 US6818418과 W02004029224에서 기술된다.

더 나아가, 검사 화합물은 다양한 기원, 특성, 조성을 나타내는데, 이의 예는 분리된 형태 또는 혼합물이나 조합으로, 임의의 소형 분자, 핵산, 지질, 펩티드; 항체(가령, 키메라 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체 또는 항체 단편, 이들로부터 유래된 펩티드- 또는 비-펩티드 모방체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체, 단일 사슬(가령, scFv)이나 단일 도메인 항체 또는 항체-모방체, 예를 들면, 안티칼린 또는 피브로넥틴-기초된 결합 분자(가령, 트리넥틴 또는 아드넥틴))를 비롯한 폴리펩티드 등이다.

본 발명에는 상기한 항진제, 길항제, 리간드, 수용체, 기질, 효소를 확인하는 방법에 유용한 스크리닝 키트 역시 포함된다.

본 발명에는 앞서 기술된 방법에 의해 확인된 본 발명의 폴리펩티드의 활성 또는 항원성을 조절할 수 있는 항진제, 길항제, 리간드, 수용체, 기질, 효소가 포함된다.

상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 다양한 모이어티(즉, 본 발명의 제 1 특징의 폴리펩티드, 본 발명의 제 2 또는 제 3 특징의 핵산 분자, 본 발명의 제 4 특징의 벡터, 본 발명의 제 5 특징의 숙주 세포, 본 발명의 제 6 특징의 리간드, 본 발명의 제 7 특징의 화합물)는 질병의 치료 또는 진단에 유용하다. 질병의 치료 또는 진단에서 본 발명에 따른 모이어티의 유용성을 평가하기 위하여, 아래의 검사법 중에서 한가지 이상을 수행할 수 있다. 주의할 점은 아래의 검사법 중의 일부에서 검사 화합물이 단백질/폴리펩티드로서 언급되지만, 본 발명의 다른 모이어티 역시 “검사 화합물”로서 이용될 수 있도록 당업자에게 이들 검사법을 용의하게 개정할 수 있다.

또한, 본 발명은 적절한 제약학적 담체와 복합된 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 리간드 또는 화합물을 함유하는 제약학적 조성물을 제시한다. 이들 조성물은 하기에 상술된 바와 같이, 치료 또는 진단 시약, 백신 또는 다른 면역 조성물로서 적합하다.

본 명세서에서 폴리펩티드, 핵산, 리간드 또는 화합물[X]를 함유하는 조성물에서 화합물[x]과 불순물[Y]의 총 중량당 적어도 85%가 X인 경우에, “실질적으로 불순물[Y]이 없는” 조성물이라고 할 수 있다. 적절하게는, X는 조성물에서 X+Y의 총 중량당 적어도 90%로 구성되고, 바람직하게는 총 중량의 적어도 95%, 98% 또는 99%로 구성된다.

적절하게는, 제약학적 조성물은 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 분자, 리간드 또는 화합물의 치료 효과량을 함유한다. 본 명세서에서 “치료 효과량”은 표적하는 질환이나 질병을 치료, 경감 또는 예방하거나, 또는 검출가능한 치료 또는 예방 효과를 나타내는데 필요한 치료제의 양을 의미한다. 임의의 화합물에서, 치료 효과량은 예로써, 신생물 세포, 또는 동물 모형, 일반적으로, 생쥐, 토끼, 개 또는 돼지의 세포 배양 검사에서 초기에 측정할 수 있다. 상기 동물 모형은 적절한 농도 범위와 투여 경로를 결정하는 데에도 이용될 수 있다. 이후, 이런 정보를 활용하여 인간에서 유용한 용량 및 투여 경로를 결정할 수 있다.

인간 개체에서 정확한 효과량은 질병의 심각성, 개체의 전반적인 건강 상태, 개체의 연령, 체중, 성별, 식이, 투여 빈도와 기간, 약제 조합, 반응 민감성, 치료에 대한 내약성/반응에 좌우된다. 통상적인 실험을 통하여 효과량을 결정할 수 있는데, 이는 임상치의 판단 범주에 속한다. 일반적으로, 효과량은 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 바람직하게는 0.05 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위이다. 조성물은 환자에 개별적으로 투여하거나, 또는 다른 치료제, 약제 또는 호르몬과 공동으로 투여할 수 있다.

제약학적 조성물은 치료제 투여를 위한 제약학적으로 허용되는 담체를 함유할 수도 있다. 이런 담체에는 항체와 다른 폴리펩티드, 유전자, 리포솜과 같은 다른 치료제가 포함되는데, 담체는 조성물을 섭취하는 개체에 유해한 항체 생산을 유도하지 않아야 하고, 과도한 독성없이 투여될 수 있어야 한다. 적절한 담체는 크고 느리게 물질 대사되는 거대분자, 예를 들면, 단백질, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 고분자 아미노산, 아미노산 공중합체, 불활성 바이러스 입자 등이다.

제약학적으로 허용되는 염에는 예로써, 염화수소산염, 브롬화수소산염, 인산염, 황산염 등과 같은 무기산염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등과 같은 유기산염이 포함된다. 제약학적으로 허용되는 담체는 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N.J. 1991)를 참고한다.

치료 조성물에서 제약학적으로 허용되는 담체에는 물, 염수, 글리세롤, 에탄올과 같은 액체가 추가로 포함될 수 있다. 이에 더하여, 가습제, 유화제, pH 완충제 등과 같은 보조 물질이 이들 조성물에 포함될 수 있다. 이런 담체를 이용하면, 제약학적 조성물은 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등과 같은 환자가 복용가능한 형태로 조제될 수 있다.

일단 조제된 본 발명의 조성물은 환자에게 직접적으로 투여할 수 있다. 치료 대상은 동물, 특히, 인간 개체이다.

본 발명에 이용되는 제약학적 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 척수강내, 심실내, 경피(transdermal) 또는 경피부(transcutaneous)(참조, W098/20734), 피하, 복막내, 비강, 경장, 국소, 혀 밑, 질내 또는 직장을 비롯한 다양한 경로로 투여될 수 있다. 유전자 총 또는 하이포스프레이(hypospray)를 이용하여 본 발명의 조성물을 투여할 수도 있다. 전형적으로, 치료 조성물은 액체 용액 또는 현탁액 형태의 주사액으로 제조된다; 주사 직전에 액체 운반제에 용해 또는 현탁에 적합한 고체 형태로 제조될 수도 있다.

조성물을 직접 전달하는 방법은 주사, 피하, 복막내, 정맥내, 근육내로 주사하거나, 또는 조직의 간질(間質) 공간으로 전달하는 것이다. 조성물은 병소 내로 투여할 수도 있다. 투약 처리는 1회 투약 과정 또는 다회 투약 과정으로 제공될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 활성이 특정 질병 상태에서 과도하게 나타나는 경우에, 여러 가지 방법을 이용할 수 있다. 한가지 방법은 상기한 바와 같이 저해 화합물(길항제) 및 예로써, 리간드, 기질, 효소, 수용체의 결합을 차단하거나 보조 신호를 저해함으로써 폴리펩티드 기능을 저해하는 효과량의 제약학적으로 허용되는 담체를 개체에 투여하여 비정상적 상태를 경감시키는 것이다. 적절하게는, 길항제는 항체이다. 가장 적절하게는, 항체는 앞서 기술한 바와 같이, 면역원성을 최소화하는 인간화 및/또는 키메라 항체이다.

다른 방법으로, 목적하는 리간드, 기질, 효소, 수용체에 대한 결합 친화성을 보유하는 용해성 형태의 폴리펩티드를 투여할 수도 있다. 전형적으로, 이러한 폴리펩티드는 유관한 부분을 보유하는 단편 형태로 투여된다.

또 다른 방법으로, 내부적으로 생성되거나 별도로 투여된 안티센스 핵산 분자의 이용과 같은 발현 저해 기술을 이용하여, 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 발현을 저해할 수 있다. 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자의 통제, 5' 또는 조절 부분(신호 서열, 프로모터, 인핸서, 인트론)에 상보적인 서열 또는 안티센스 분자(DNA, RNA 또는 PNA)를 설계함으로써 유전자 발현을 변화시킬 수 있다. 유사하게, “삼중 나선” 염기쌍 방법을 이용하여 저해를 달성할 수 있다. 삼중 나선 염기쌍 형성 기술은 삼중 나선이 중합효소, 전사 인자 또는 조절 분자의 결합을 위하여 이중 나선이 충분히 개방되는 능력을 저해하기 때문에 유용하다. 최근에, 삼중 나선 DNA를 이용한 치료법의 진전이 여러 문헌에서 보고되고 있다(Gee, J.E. et al. (1994) In: Huber, B.E. and B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). 상보적인 서열 또는 안티센스 분자를 설계하여 전사체가 리보솜에 결합하는 것을 차단함으로써 mRNA의 전사를 저해할 수 있다. 이런 올리고뉴클레오타이드는 *in vivo* 투여되거나, 또는 *in vivo* 발현으로 *in situ* 생성될 수 있다.

이에 더하여, 인코딩 mRNA 서열에 특이적인 리보자임을 이용하여 본 발명의 폴리펩티드 발현을 차단할 수도 있다. 리보자임은 자연이나 합성 형태의 촉매 활성 RNA이다(참조: Usman, N, et al., Curr. Opin. Struct. Biol(1996) 6(4), 527-33). 선택된 위치에서 mRNA를 특이적으로 절단할 수 있는 합성 리보자임을 설계하여, mRNA가 기능적 폴리펩티드로 번역되는 것을 방지할 수 있다. RNA 분자에서 정상적으로 관찰되는 자연 리보즈 포스페이트 골격과 자연 염기로 리보자임을 합성할 수 있다. 대안으로, 리보자임은 리보뉴클레아제 분해로부터 보호를 제공하기 위하여 비-자연 골격, 예를 들면, 2'-O-메틸 RNA로 합성되고, 변형된 염기를 포함한다.

RNA 분자를 변형시켜, 세포내 안정성과 반감기를 증가시킬 수 있다. 가능한 변형 방법에는 분자의 골격 내에서, 상기 분자의 5' 및/또는 3' 말단에 인접 서열의 부가, 또는 포스포디에스테라제 연쇄가 아닌 포스포로티오에이트 또는 2'O-메틸의

이용 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 이런 개념은 PNA 생산에서 고유하고, 내생적 엔도뉴클레아제에 의해 용이하게 인지되지 않는 비-전통적 염기, 예를 들면, 이노신, 큐에오신, 부토신을 비롯하여 아세틸-, 메틸-, 티오-변형된 형태 및 아데닌, 시티딘, 구아닌, 티민, 우리딘의 유사하게 변형된 형태의 합입으로 이들 분자 모두에서 확대될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드의 과소 발현 및 이의 활성화와 관련된 비정상적 상태의 치료에는 여러 방법이 이용가능하다. 한가지 방법은 비정상적 상태를 완화시키기 위하여 폴리펩티드를 활성화시키는 화합물, 다시 말하면, 앞서 기술된 항진제의 효과량을 개체에 투여하는 것이다. 대안으로, 적절한 제약학적 담체와 공동으로 폴리펩티드의 치료 효과량을 투여하여 폴리펩티드의 적절한 생리학적 균형을 복원한다.

유전자 요법을 이용하여 개체에서 관련 세포에 의한 폴리펩티드의 내적 생산에 달성할 수 있다. 유전자 요법은 결함 유전자를 교정된 치료 유전자로 대체함으로써 폴리펩티드의 부적절한 생산을 영구적으로 치유하는데 이용된다.

본 발명의 유전자 요법은 *in vivo* 또는 *ex vivo*에서 수행될 수 있다. *ex vivo* 유전자 요법은 환자 세포의 분리와 정제, 치료 유전자의 도입, 유전적으로 변형된 세포의 환자 내로 역도입이 요구된다. 대조적으로, *in vivo* 유전자 요법은 환자 세포의 분리와 정제 과정이 필요하지 않다.

전형적으로, 치료 유전자는 환자에 투여하기 위하여 “포장”된다. 유전자 운반체는 비-바이러스성 물질, 예를 들면, 리포솜, 또는 복제-결합 바이러스, 예를 들면, Berkner, K.L., in Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 39-66(1992)에 기술된 아데노바이러스 또는 Muzyczka, N., in Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 97-129(1992)와 U.S. Patent No. 5,252,479에 기술된 아데노-연합된 바이러스(AAV) 벡터이다. 가령, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 분자는 복제-결합성 레트로바이러스 벡터에서 발현을 위하여 조작될 수 있다. 이후, 이런 발현 구조체는 분리하고, 폴리펩티드를 인코딩하는 RNA를 포함하는 레트로바이러스 플라스미드 벡터로 형질도입된 포장 세포에 도입하여, 포장 세포가 목적 유전자를 포함하는 감염성 바이러스성 입자를 생산할 수 있도록 한다. 이들 생산 세포를 개체에 투여하여, *in vivo*에서 세포를 조작하고 폴리펩티드를 발현시킨다(참조: Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, in Human Molecular Genetics(1996), T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd).

다른 방법은 “나신 DNA”의 투여인데, 여기서 치료 유전자는 혈류 또는 근육 조직에 직접 주입된다.

본 발명의 폴리펩티드 또는 핵산 분자가 질병-원인 물질인 경우에, 본 발명에서 이들 폴리펩티드 또는 핵산 분자는 이러한 질병 원인 물질에 대한 항체를 생성하는 백신에 사용될 수 있다.

본 발명의 백신은 예방(즉, 감염 방지) 또는 치료(즉, 감염후 질병 치료)를 목적으로 한다. 이들 백신은 통상적으로, 앞서 기술된 제약학적으로 허용되는 담체(조성물을 섭취하는 개체에서 유해한 항체 생산을 유도하지 않은 임의의 담체 포함)와 함께, 면역화 항원, 면역원, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 분자를 함유한다. 게다가, 이들 담체는 면역촉진 물질(“어쥬번트”)로 기능할 수도 있다. 더 나아가, 항원 또는 면역원은 디프테리아, 파상풍(테타누스), 콜레라, 헬리코박터 파일로리(*H. pylori*) 및 다른 병원균으로부터 독소이드(toxoid)와 같은 세균성 독소이드에 공액될 수 있다.

폴리펩티드는 위에서 분해되기 때문에, 폴리펩티드를 함유하는 백신은 비경구(가령, 피하, 근육내, 정맥내, 또는 경피 주사) 투여하는 것이 바람직하다. 비경구 투여에 적합한 조성물에는 항산화제, 완충제, 정균제, 개체의 혈액에서 조성물에 등장성을 부여하는 용질을 함유하는 수용성과 비-수용성 무균 주사 용액 및 현탁제 또는 농후제(thickening agent)를 함유하는 수용성과 비-수용성 무균 현탁액이 포함된다.

본 발명의 백신 조성물은 단위 투약 또는 다중 투약 용기로 제공될 수 있다. 가령, 밀봉된 앰플과 바이알은 냉동 건조 상태로 보관되는데, 이는 사용 직전에 무균 액상 담체만 첨가하면 된다. 용량은 백신의 특정 활성화에 따라 좌우되는데, 통상적인 실험으로 편의하게 결정할 수 있다.

본 발명에 따른 폴리펩티드에 결합하는 항체의 유전자 전달은 예로써, 국제 특허 출원 WO98/55607에 기술된 바와 같이 달성될 수도 있다.

제트 주입(참조: [www.powderject.com](http://www.powderject.com))으로 언급되는 기술 역시 백신 조성물의 조제에 유용하다.

예방접종을 위한 다수의 적절한 방법 및 백신 전달 시스템은 국제 특허 출원 WO00/29428에서 기술된다.

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자의 진단 시약으로의 용도에 관계한다. 기능이상과 연관된 본 발명의 핵산 분자에 의해 특성화되는 유전자의 돌연변이 형태의 검출은 유전자의 과소 발현, 과다 발현, 변형된 공간적 또는 시간적 발현 등으로 인한 질병 또는 이런 질병에 대한 민감성을 정의하거나 진단하는 진단 도구를 제공한다. 다양한 기술을 이용하여, DNA 수준에서 유전자 내에 돌연변이를 보유하는 개체를 확인할 수 있다.

진단용 핵산 분자는 혈액, 뇨, 타액, 조직 생검 또는 부검 물질과 같은 개체의 세포로부터 얻을 수 있다. 게놈 DNA는 검출에 직접적으로 이용하거나, 또는 분석에 앞서 PCR, 리가아제 연쇄 반응(LCR), 가닥 치환 증폭(SDA) 또는 다른 증폭 기술을 이용하여 효소적으로 증폭할 수 있다(참조: Saiki et al., *Nature*, 324, 163-166(1986); Bej, et al., *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.*, 26, 301-334(1991); Birkenmeyer et al., *J. Virol. Meth.*, 35, 117-126(1991); Van Brunt, J., *Bio/Technology*, 8, 291-294(1990)).

한 구체예에서, 본 발명은 환자에서 질병을 진단하는 방법을 제시하는데, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 자연 유전자의 발현 수준을 평가하고, 발현 수준을 대조 수준과 비교하는 단계를 포함하는데, 이때 대조 수준과 상이한 수준은 질병을 암시한다. 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다;

a) 본 발명의 핵산 분자와 프로브간 하이브리드 복합체의 형성이 가능한 엄밀도 조건하에서 환자로부터 얻은 조직 시료와 핵산 프로브를 접촉시키고;

b) (a) 단계에서 이용된 동일한 조건하에서 프로브와 대조 시료를 접촉시키고;

c) 시료에서 하이브리드 복합체의 존재를 검출하고,

이때 대조 시료에서 하이브리드 복합체의 수준과 비교하여 환자 시료에서 하이브리드 복합체의 상이한 수준의 검출은 질병을 암시한다.

본 발명은 아래의 단계를 포함하는 다른 진단 방법을 제시한다;

a) 질병을 검사받는 환자로부터 조직 시료를 얻고;

b) 조직 시료로부터 본 발명의 핵산 분자를 분리하고;

c) 핵산 분자에서 질병과 연관된 돌연변이의 존재를 검출하여 환자에서 질병을 진단한다.

상기한 방법에서 핵산 분자의 검출을 보조하기 위하여, 예로써 PCR을 이용한 증폭 단계가 포함될 수 있다.

정상 유전자형과 비교하여 증폭된 산물의 크기에서 변화로 결실 및 삽입을 확인할 수 있다. 점 돌연변이는 증폭된 DNA를 본 발명의 표지된 RNA 또는 본 발명의 표지된 안티센스 DNA 서열에 혼성화시켜 확인할 수 있다. RNase 절단에 의해 또는 용융 온도에서 차이를 확인하여, 부정합된 이중나선과 완전하게 정합된 서열을 구별할 수 있다. 환자에서 돌연변이 유무는 하이브리드-이중 가닥 분자가 형성되는 엄밀도 조건하에서 DNA에 혼성화되는 핵산 프로브와 DNA를 접촉시키고, 여기서 하이브리드 이중-가닥 분자는 질병과 연관된 돌연변이에 상응하는 임의의 부분에서 핵산 프로브 가닥의 혼성화되지 않은 부분을 보유하고; DNA 가닥의 상응하는 부분에 질병-연관된 돌연변이 유무의 지표로서 프로브 가닥의 혼성화되지 않은 부분의 유무를 검출함으로써 확인할 수 있다.

이런 진단은 태아 및 신생아 검사에서 특히 유용하다.

참고 유전자와 “돌연변이 유전자”사이에 점 돌연변이 및 다른 서열 차이는 다른 널리 공지된 기술, 예를 들면, 직접 DNA 염기서열분석 또는 단일-가닥 형태 다형성으로 확인할 수 있다(참조: Orita et al., *Genomics*, 5, 874-879(1989)). 가령, 염기서열분석 프라이머는 이중 가닥 PCR 생성물, 또는 변형된 PCR에 의해 생성된 단일-가닥 주형 분자와 함께 사용할 수 있다. 서열 결정은 방사능표지된 뉴클레오티드를 이용한 통상적인 절차, 또는 형광-태그를 이용한 자동 염기서열분석 과정으로 수행된다. 또한, 클론된 DNA 절편을 프로브로 이용하여 특정 DNA 단편을 검출할 수도 있다. PCR과 병용하는 경우에 상기 방법의 민감성이 현저하게 향상된다. 게다가, 예로써 단일 뉴클레오티드에 의해 구별되는 서열의 PCR 증폭을 위한 대립형질-특이적 올리고뉴클레오티드를 이용하여 점 돌연변이 및 다형성과 같은 다른 서열 변이, 예를 들면, 다형성을 검출할 수 있다.

또한, 변성제 유무에 관계없이 겔 내에 DNA 단편의 전기영동 이동성 변화 또는 직접 DNA 염기서열분석으로 DNA 서열 차이를 확인할 수 있다(Myers et al., Science(1985) 230:1242). 특정 위치에서 서열 변화는 RNase 및 S1 보호와 같은 뉴클레아제 보호 검사법 또는 화학적 절단 방법으로 확인할 수 있다(참조: Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401).

통상의 겔 전기영동 및 DNA 염기서열분석 이외에, 마이크로결실(microdeletion), 이수체(aneuploidy), 전치(translocation), 역위(inversion)와 같은 돌연변이는 *in situ* 분석으로 검출할 수도 있다(참조: Keller et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA(1993)), 다시 말하면, 세포 내에서 DNA 또는 RNA 서열은 분리 및/또는 막 내로 고정할 필요 없이 돌연변이를 분석할 수 있다. 현재, 형광 *in situ* 혼성화(FISH)가 가장 일반적으로 이용된다(참조: Trachuck et al., Science, 250, 559-562(1990); Trask et al., Trends, Genet., 7, 149-154(1991)).

본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브 어레이를 구성하여 유전자 변이, 돌연변이, 다형성을 효과적으로 스크리닝할 수 있다. 어레이 기술은 널리 공지되어 있고 보편적으로 이용될 수 있는데, 유전자 발현, 유전적 연쇄, 유전자 변이성을 비롯한 분자 유전학에서 다양한 문제를 해결하고 있다(M. Chee et al., Science(1996), Vol 274, pp 610-613).

한 구체예에서, 어레이는 PCT 출원 W095/11995(Chee et al); Lockhart, D. J. et al.(1996) Nat. Biotech. 14. 1675-1680; Schena, M. et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614-10619에 기술된 방법으로 제조하고 이용한다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 2 내지 1백만 개 범위이다. 올리고머는 광-직접 화학 공정을 이용하여 기질상의 지정된 지역에서 합성한다. 기질은 종이, 나일론 또는 다른 종류의 막, 필터, 칩, 유리 슬라이드 또는 다른 적절한 고형 서포트이다. 다른 측면에서, PCT 출원 W095/25116(Baldeschweiler et al)에 기술된 바와 같이, 화학 결합 과정 및 잉크젯 적용 장치를 이용하여 기질 표면에 올리고뉴클레오타이드를 합성할 수 있다. 다른 측면에서, 도트(또는 슬롯) 반점(blot)과 유사한 “격자” 어레이를 이용하여 진공 시스템, 열, UV, 기계적 또는 화학적 결합 과정에 따라 기질 표면에 cDNA 단편 또는 올리고뉴클레오타이드를 배열하고 연결할 수 있다. 앞서 기술된 바와 같은 어레이는 수동으로 또는 이용가능 장치(슬롯 반점 또는 도트 반점 장치), 재료(임의의 적절한 고형 서포트), 기계(로봇 장치 포함)를 이용하여 만들 수 있는데, 8개, 24개, 96개, 384개, 1536개 또는 6144개 올리고뉴클레오타이드를 포함하거나, 또는 상업적으로 구입가능한 장치를 효과적으로 이용할 수 있도록 하는 2 내지 1백만 개 이상 범위의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

상기한 방법에 더하여, 개체에서 유래된 시료로부터 폴리펩티드 또는 mRNA의 비정상적인 증가 또는 감소 수준을 결정하여 질병을 진단할 수 있다. 폴리펩티드를 정량하는 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, PCR, RT-PCR, RNase 보호, 노던 블랏팅, 다른 혼성화 방법과 같은 핵산 증폭을 이용하여 RNA 수준에서 발현의 증가 또는 감소를 측정할 수 있다.

숙주로부터 유래된 시료에서 본 발명의 폴리펩티드 수준을 결정하는데 이용될 수 있는 분석 기술은 당분야에 공지되어 있는데, 이들 중의 일부(방사능면역검사, 경쟁-결합 검사, 웨스턴 블랏 분석, ELISA 검사 포함)는 앞서 상술되었다. 본 발명의 이런 특징은 아래의 단계를 포함하는 진단 방법을 제시한다; (a) 리간드-폴리펩티드 복합체의 형성에 적합한 조건하에서 생물학적 시료와 상기한 리간드를 접촉시키고; (b) 상기 복합체를 검출한다.

폴리펩티드 수준을 측정하는 ELISA, RIA, FACS와 같은 프로토콜은 폴리펩티드 발현의 변화되거나 비정상적인 수준에 대한 기초를 추가적으로 제공한다. 폴리펩티드 발현에 대한 정상 또는 표준 값은 복합체 형성에 적합한 조건하에서 폴리펩티드에 대한 항체와 정상적인 포유류 개체, 바람직하게는 인간으로부터 채취한 세포 추출물 또는 체액을 복합시켜 확립한다. 표준 복합체 형성 양은 광도계 수단과 같은 다양한 방법으로 정량할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체는 폴리펩티드 발현으로 특성화되는 질병 또는 상태의 진단, 또는 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 분자, 리간드, 기타 화합물로 치료되는 환자를 모니터하는 검사에 이용될 수 있다. 진단 목적에 유용한 항체는 치료제에서와 동일한 방식으로 만들 수 있다. 폴리펩티드의 진단 검사법에는 인간 체액, 또는 세포 또는 조직의 추출물에서 폴리펩티드를 검출하기 위하여 라벨과 항체를 이용하는 방법이 포함된다. 이들 항체는 변형하거나 변형하지 않고 이용할 수 있고, 리포터 분자와 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합시켜 표지할 수 있다. 당분야에 공지된 다양한 리포터 분자를 이용할 수 있는데, 일부는 앞서 기술하였다.

개체, 대조 및 생검 조직에서 얻은 질병 시료에서 발현된 폴리펩티드의 양은 표준 수치와 비교한다. 표준과 개체 수치간 편차는 질병 진단을 위한 파라미터를 확립한다. 진단 검사법을 이용하여 폴리펩티드 발현의 부재, 존재, 과다 발현을 구별하고, 치료 개입(therapeutic intervention) 동안 폴리펩티드 수준의 조절을 모니터할 수 있다. 이들 검사법은 동물 연구, 임상 시험, 또는 개별 환자의 치료 모니터링에서 특정 치료 섭생의 효과를 평가하는 데에도 이용될 수 있다.



본 발명의 진단 키트는

(a) 본 발명의 핵산 분자;

(b) 본 발명의 폴리펩티드; 또는

(c) 본 발명의 리간드를 포함한다.

본 발명의 한 특징에서, 진단 키트는 엄밀도 조건하에서 본 발명의 핵산 분자와 혼성화될 수 있는 핵산 프로브를 보유하는 제 1 용기; 핵산 분자를 증폭하는데 유용한 프라이머를 보유하는 제 2 용기; 질병 진단을 조장하는 프로브와 프라이머에 대한 사용 설명서를 포함한다. 키트에는 혼성화되지 않은 RNA를 절단하는 약품을 보유하는 제 3 용기가 추가로 포함될 수 있다.

본 발명의 다른 특징에서, 진단 키트에는 핵산 분자 어레이가 포함되는데, 이들 중에서 적어도 하나는 본 발명의 핵산 분자이다.

본 발명의 폴리펩티드를 검출하기 위하여, 진단 키트는 본 발명의 폴리펩티드에 결합하는 하나 이상의 항체 및 상기 항체와 폴리펩티드 사이에 결합 반응을 검출하는데 유용한 시약을 포함한다.

이들 키트는 세포 표면 당단백질 집단의 구성원이 관여하는 질병 또는 이런 질병에 대한 감수성을 진단하는데 유용할 것이다. 이런 질환에는 신생물, 흑색종, 폐암, 결장직장암, 유방암, 췌장암, 두경부암, 다른 고형암을 비롯한 세포 증식성 질환; 백혈병, 비-호지킨 림프종, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 혈관신생 질환, 카포시스 육종을 비롯한 골수증식성 질환; 알레르기, 염증성 장 질환, 관절염, 건선, 호흡기 염증, 천식, 장기 이식 거부반응을 비롯한 자가면역/염증 질환; 고혈압, 부종, 협심증, 죽상경화증, 혈전증, 패혈증, 쇼크, 재관류 손상, 허혈을 비롯한 심혈관 질환; 중추신경계 질환, 알츠하이머병, 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증, 통증을 비롯한 신경학적 질환; 만성 폐쇄성 폐 질환과 낭포성 섬유증을 비롯한 호흡기 질환; 발달 장애; 당뇨병, 골다공증, 비만을 비롯한 대사 장애; AIDS와 신장 질환; 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염, 기생충 감염을 비롯한 감염; 다른 병리학적 이상이 포함된다. 적절하게는, 질환은 림프구 항원이 관여하는 질환이다. 이들 키트는 불임을 비롯한 생식 장애의 확인에도 이용될 수 있다.

본 발명의 다양한 특징 및 구체예는 특히 INSP201 폴리펩티드와 관련된 실시예를 통하여 더욱 상세하게 기술된다.

당업자가 인지하는 바와 같이, 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 이러한 상세의 개변이 가능하다.

본 발명에서, 용해성 INSP201의 길항제(가령, INSP201-EC) 또는 막-결합된 INSP201의 항진제(가령, 항진성 항체)는 단독으로 투여되거나, 또는 암, HIV 또는 EBV, B형 간염 감염의 치료 및/또는 예방을 위한 부가적 또는 상승적 효과를 달성하기 위한 여러 다른 치료 섭생이나 항암제(가령, 복수 약제 섭생)와 공동으로 투여될 수 있다.

항암제는 시스플라틴(cisplatin)과 카르보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 화합물, 비노렐빈(vinorelbine), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine)과 같은 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid); 도세탁셀(docetaxel)과 파클리탁셀(paclitaxel)과 같은 탁신(taxine); 다양한 위상 이성질화 효소(topoisomerase) 저해물질, IL-2, 인터페론- $\alpha$ 에서 선택된다.

본 발명에서, 용해성 INSP201의 항진제(가령, INSP201-EC) 또는 막-결합된 INSP201의 길항제(가령, 길항성 항체)는 단독으로 투여되거나, 또는 염증 또는 자가면역 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 부가적 또는 상승적 효과를 달성하기 위한 여러 다른 치료 섭생이나 치료제(가령, 복수 약제 섭생)와 공동으로 투여될 수 있다.

소염제는 인터페론-베타(interferon-beta), 사이클로스포린 A(cyclosporine A), 타크롤리무스(tacrolimus), 시롤리무스(sirolimus)에서 선택된다.

## 실시예

[표 1]

아미노산	유의성 군	더욱 선호되는 유의성 군
<b>Ser</b>	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
<b>Arg</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Leu</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Pro</b>	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
<b>Thr</b>	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
<b>Ala</b>	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
<b>Val</b>	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
<b>Gly</b>	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
<b>Ile</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Phe</b>	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
<b>Tyr</b>	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
<b>Cys</b>	Ser, Thr, Cys	Cys
<b>His</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Gln</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
<b>Asn</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
<b>Lys</b>	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
<b>Asp</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
<b>Glu</b>	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
<b>Met</b>	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
<b>Trp</b>	Trp, Phe, Tyr	Trp

[표 2]

아미노산	유의성 군
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-thiazolidine-4-carboxylic acid, D-or L-I-oxazolidine-4-carboxylic acid
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, beta-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, or 5-phenylproline, AdaA, AdaG, cis-3,4, or 5-phenylproline, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

#### 실시예 1: INSP201의 확인과 *in silico* 분석

앞서 기술된 바와 같이, INSP201 폴리펩티드는 세포 표면 당단백질로서 기능할 것으로 예측된다. INSP201에 대한 SignalP-NN 출력은 상기 단백질이 서열의 21과 22번 위치 사이에서 절단되는 것으로 생각되는 리더 서열(leader sequence)을 포함한다는 것을 보여준다(Nielsen, H. et al. 1997, Protein Engineering, 10, 1-6; Nielsen, H., and Krogh, A.: Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130 (1998)). 리더 서열의 존재는 분비된 단백질로서 기능하는 INSP201 단백질과 일치한다.

INSP201에 대한 TMHMM 결과는 상기 폴리펩티드가 내포된 잔기 406-428 사이에 막관통 도메인을 보유한다는 것을 지시한다. TMHMM은 공지된 이차 구조에 기초하여 막관통 도메인을 예측하는 데이터베이스이다.

도 1에서는 INSP201에 대한 NetNGlyc(version 1.0)(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 결과를 도시한다. NetGlyc는 수용자와 비-수용자 세균(sequon)을 구별하기 위하여, N-연결된 당화를 위한 공통 서열, Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa는 Pro이 아님) 및 주변 서열 배경을 확인하도록 맞춤된 중립 네트워크 알고리즘(neural network algorithm)에 기초한 프로그램이다. 당화는 중요한 번역후 수식이고, 단백질 접힘(protein folding), 국지화(localisation)와 트래픽킹(trafficking), 단백질 용해도, 항원성, 생물 활성, 반감기, 세포-세포 상호작용에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

이들 실험 결과 및 본 명세서에 제공된 INSP201 서열 정보에 기초하여, 전체 인간 조직 유형에서 INSP201 전사체의 존재를 검출하여 이의 조직 발현을 결정하는 실험을 설계하는 것이 가능하다. 이에 더하여, 병리학적 배경에서 INSP201 단백질의 관련성(relevance)을 더욱 구체적으로 확립하기 위하여 정상 조직과 병든 조직 모두에서 INSP201 전사체의 존재를 검출하는 실험을 설계하는 것이 가능하다.

이와 동시에, 인간 게놈 DNA로부터 INSP201 유전자의 클로닝은 원핵이나 진핵 발현 시스템에서 INSP201 단백질의 높은 수준 발현 및 이의 후속적인 정제와 특성화를 가능하게 한다. 가령, 재조합 INSP201은 INSP201-특이적 단클론이나 다클론 항체를 산출하는데 이용되고, 이들 항체는 INSP201의 추가적인 생화학적 특성화에 이용된다. 대안으로, 재조합 INSP201은 앞서 기술된 것들을 비롯하여 다양한 스크리닝 검사법에 이용될 수 있다.

## 실시예 2

INSP201 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자를 클론하기 위한 작업이 진행되고 있다. 이는 예로써, Superscript II RNase H-역전사효소(Invitrogen)와 같은 효소를 이용한, 다양한 정상적인 인간 조직 전체 RNA 시료(이는 Clontech, Stratagene, Ambion, Biochain Institute로부터 구입가능하고 사내(in-house) 제조될 수 있다)로부터 인간 cDNA 주형의 제조를 수반한다. 인간 cDNA 라이브러리(박테리오파지 람다( $\lambda$ ) 벡터 내)는 Clontech, Invitrogen으로부터 구입하거나, 또는  $\lambda$  GT10 벡터 내에서 사내 제조될 수 있다. Primer Designer Software(Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA)와 같은 소프트웨어를 이용하여, 가상 cDNA의 완전 코딩 서열을 증폭하기 위한 특이적인 PCR 프라이머의 쌍을 설계할 수 있다. 또한, 동일한 소프트웨어를 이용하여, 각 예측된 엑손의 DNA 서열을 증폭하기 위한 특이적인 PCR 프라이머의 쌍을 설계할 수 있다. 이들 분리된 DNA 단편은 클로닝 벡터, PCR 반응 및/또는 DNA 제한/결찰 반응을 이용하여 원하는 순서로 조합된다. PCR 프라이머는  $55 \pm 10^\circ\text{C}$ 에 근접하는  $T_m$  및 40-60%의 GC 함량을 보유하도록 최적화된다. 비-특이적인 프라이밍이 전혀(또는 거의) 없이 표적 서열(INSP201)에 대한 높은 선택성을 갖는 프라이머가 선별되어야 한다. 이후, PCR을 이용하여 목적하는 유전자 서열을 증폭할 수 있다. 이런 서열의 클로닝에 필요한 절차, 예를 들면, PCR 산물의 서브-클로닝, 콜로니 PCR, 플라스미드 DNA 제조와 염기서열분석, 포유동물 세포 발현 벡터의 최종적인 작제는 당분야에 공지되어 있다(참조: WO03/055913).

본 명세서에 기술된 뉴클레오티드와 아미노산 서열에 기초하여, 생체내에서 INSP201 폴리펩티드의 조직 분포와 발현 수준을 결정하기 위하여 추가의 실험이 수행될 수 있다.

가령, INSP201에 대한 전사체의 존재는 상이한 인간 조직으로부터 cDNA의 PCR로 조사된다. INSP201 전사체는 검사된 시료에서 매우 낮은 수준으로 존재할 수 있다. 이런 이유로, RNA 제조물에서 소량의 게놈 오염이 가양성 결과(false positive result)를 제공하기 때문에, 다양한 인간 조직에서 전사체의 존재를 확인하는 실험의 설계에는 극도의 주의가 요구된다. 따라서, 모든 RNA는 역전사를 위한 이용에 앞서 DNase로 처리되어야 한다. 이에 더하여, 역전사가 진행되지 않는 대조 반응물(-ve RT 대조)이 각 조직에서 설정된다.

가령, 각 조직으로부터  $1 \mu\text{g}$ 의 전체 RNA가 Multiscript 역전사효소(ABI)와 무작위 헥사머 프라이머를 산출하는데 이용된다. 각 조직에서, 역전사효소를 제외하고 모든 구성요소가 첨가된 대조 반응물(-ve RT 대조)이 설정된다. 역전사된 RNA 시료와 마이너스 RT 대조에서 각 조직에 대한 PCR 반응이 설정된다. INSP201 특이적 프라이머는 본 명세서에 제공된 서열 정보에 기초하여 용이하게 설계될 수 있다. 마이너스 RT 대조 내에 산물의 부재와 함께 역전사된 시료 내에 정확한 분자량의 산물의 존재는 상기 조직에서 전사체의 존재에 대한 증거로서 간주된다. 앞서 기술된 바와 같이 산출된 것들뿐만 아니라 임의의 적절한 cDNA 라이브러리가 INSP201 전사체를 스크리닝하는데 이용될 수 있다.

INSP201 폴리펩티드의 조직 분포 패턴은 이들 폴리펩티드의 기능과 관련하여 더욱 유용한 정보를 제공할 것이다.

더 나아가, 세포주에서 이들 폴리펩티드의 과다발현 또는 발현의 녹다운(knock-down)이 숙주 세포 게놈의 전사 활성화에 대한 효과를 결정하는데 이용될 수 있다. INSP201 폴리펩티드의 이합체 파트너, 보조-활성인자, 보조-억제인자가 면역침전과 웨스턴 블랏팅의 조합 및 면역침전과 질량 분광분석의 조합으로 확인될 수 있다.

## 실시예 3 - INSP201 세포의 도메인의 클로닝

INSP201은 주해불가능 세포의 도메인(N-말단)과 보존된 세포내 도메인(아마도, 신호전달에 관여함)을 보유하는 단일-통과 막관통 단백질이다. 이는 3개의 엑손에 의해 인코딩되는 518개 아미노산 단백질(1554 bp)에 대한 전장 예측이다. 예측된 세포의 도메인은 첫 405개의 아미노산(1215 bp)에 의해 인코딩된다. 세포의 도메인의 3'-말단 32 bp를 제외한 모든 서열이 상기 예측의 엑손 1에 인코딩된다.

상기 예측의 전체 예측된 세포의 도메인을 보유하는 1215 bp 산물을 증폭하기 위하여 한 쌍의 PCR 프라이머(INSP201-CP1/INSP201-CP2)(도 2)를 설계하였다. INSP201-CP2 역 PCR 프라이머는 51 bp 길이이고, 엑손 1의 3' 말단과 19 bp

중복 및 엑손 2에서 인코딩된 세포의 도메인의 32 bp를 보유하였다. 이들 프라이머는 게놈 DNA를 주형으로 하는 PCR에 이용되었다. INSP201-CP2 프라이머는 엑손 1을 증폭하고, 이와 동시에 엑손 2의 32 bp를 PCR 산물에 부가한다. 이들 PCR 산물은 겔에서 가시화되고, 예측된 크기의 밴드는 정제되고 pCR4-TOPO 클로닝 벡터 내로 클론되었다.

서열 분석에서, INSP201 세포의 도메인 서열을 보유하는 클론이 확인되었다. 상기 클론은 플라스미드 pCR4-TOPO-INSP201-EC이다.

### 3.1 PCR을 위한 유전자 특이적 프라이머

Primer Designer Software(Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA)와 같은 소프트웨어를 이용하여, 가상 cDNA의 예측 코딩 서열을 보유하는 1215 bp 산물을 증폭하기 위한 한 쌍의 PCR 프라이머(INSP201-CP1과 INSP201-CP2, 표 3)를 설계하였다. 표적 서열(INSP201)에 높은 선택성을 갖는 프라이머가 선별되었다.

### 3.2 게놈 DNA로부터 INSP201 세포의 도메인의 PCR 증폭

INSP201의 예측된 세포의 도메인의 대부분은 단일 엑손으로 구성되고, 따라서 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있었다. 엑손 2에 인코딩된 세포의 도메인의 32 bp는 INSP201-CP2 역 PCR 프라이머에 포함되었는데, 이는 엑손 1의 3' 말단과 19 bp 중복 역시 보유하였다. PCR은 1X Platinum Taq High Fidelity(HiFi) 완충액, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 μM dNTP, 각각 0.2 μM의 클로닝 프라이머, 1 unit의 Platinum Taq DNA 중합효소 High Fidelity(HiFi)(Invitrogen), 100 ng의 게놈 DNA (Novagen Inc.), 0X, 1X 또는 2X PCR<sub>x</sub> 인헨서 용액(Invitrogen)을 함유하는 50 μl 최종 부피에서 유전자-특이적 클로닝 프라이머 INSP201-CP1/INSP201-CP2 및 주형으로서 게놈 DNA를 이용하여 수행되었다. 사이클링은 아래와 같이 프로그램된 MJ Research DNA Engine을 이용하여 수행되었다: 94℃에서 2분; 94℃에서 30초, 68℃에서 1분 30초의 35회 주기; 이후, 68℃에서 78분의 1회 주기; 4℃에서 홀딩 주기.

각 증폭 산물은 1 X TAE 완충액(Invitrogen)에 담긴 0.8% 아가로오스 겔에서 가시화시켰다. 예상된 분자량(1215bp)의 PCR 산물은 MinElute DNA 정제 시스템(Qiagen)을 이용하여 겔로부터 정제하고, 10μl의 EB 완충액(10mM Tris.Cl, pH 8.5)에 용리시키고, 직접 서브클로닝하였다.

### 3.3 PCR 산물의 서브클로닝(subcloning)

PCR 산물은 제조업체에 의해 명시된 조건에 따라, Invitrogen Corporation로부터 구입된 TA 클로닝 키트를 이용하여 위상 이성질화효소 I 변형된 클로닝 벡터(pCR4-TOPO) 내에 서브클로닝하였다. 간단히 말하면, 4 μl의 겔 정제된 PCR 산물은 1 μl TOPO 벡터와 1 μl 염 용액과 함께 실온에서 15분간 배양하였다. 이후, 반응 혼합물은 아래와 같이 대장균(*E. coli*) 균주 TOP10(Invitrogen) 내로 형질전환시켰다: 50 μl 분량의 One Shot TOP10 세포를 얼음 위에서 해동시키고 2 μl의 TOPO 반응물을 첨가하였다. 혼합물은 얼음 위에서 15분간 배양하고, 이후 42℃에서 정확하게 30초동안 배양으로 열 충격시켰다. 시료는 얼음으로 환원하고 250 μl의 따뜻한(실온) SOC 배지를 첨가하였다. 시료는 37℃에서 1시간동안 교반(220 rpm)하면서 배양하였다. 전체 형질전환 혼합물은 암피실린(100 μg/ml)을 포함하는 L-액체배지(LB) 평판에 도말하고 37℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

### 3.4 콜로니 PCR

콜로니는 무균 이쑤시개를 이용하여 50 μl 무균수에 접종하였다. 이후, 10 μl 분량의 접종물은 MJ Research DNA Engine을 이용하여, 1X AmpliTaq<sup>TM</sup> 완충액, 200 μM dNTP, 20 pmole T7 프라이머, 20 pmole T3 프라이머, 1 unit의 AmpliTaq<sup>TM</sup>(Perkin Elmer)을 함유하는 20 μl의 최종 반응 부피에서 PCR을 수행하였다. 사이클링 조건은 아래와 같았다: 94℃에서 2분; 94℃에서 30초, 48℃에서 30초, 72℃에서 1분의 30회 주기. 시료는 추가 분석에 앞서 4℃에 유지시켰다(홀딩 주기).

PCR 반응 산물은 1 X TAE 완충액(Invitrogen)에 담긴 1% 아가로오스 겔에서 분석하였다. 예상된 분자량(복수 클로닝 부위(MCS)에 기인한 1215 bp + 105 bp)의 PCR 산물을 제공하는 콜로니는 220 rpm에서 교반하면서, 암피실린(100 μg/ml)을 포함하는 5 ml L-액체배지(LB) 내에 37℃에서 하룻밤동안 성장시켰다.

### 3.5 플라스미드 DNA 제조와 염기서열분석

제조업체의 지시에 따라 Biorobot 8000 로봇 시스템(Qiagen) 또는 Wizard Plus SV Minipreps 키트(Promega cat. no. 1460)를 이용하여 5 ml 배양액으로부터 Miniprep 플라스미드 DNA를 준비하였다. 플라스미드 DNA는 80  $\mu$ l 무균수에 용리시켰다. DNA 농도는 Spectramax 190 광도계(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. 플라스미드 DNA(200-500 ng)는 제조업체의 지시에 따라 BigDye Terminator 시스템(Applied Biosystems cat. no. 4390246)을 이용하여 T7 프라이머와 T3 프라이머 및 유전자-특이적 프라이머 INSP201-SP1과 INSP201-SP2로 DNA 염기서열분석하였다. 프라이머 서열은 표 3에 도시한다. 염기서열분석 반응물은 Dye-Ex 칼럼(Qiagen) 또는 Montage SEQ 96 정화 평판(Millipore cat. no. LSKS09624)을 이용하여 정제하고, 이후 Applied Biosystems 3700 염기서열분석기에서 분석하였다.

서열 분석에서, 예상 INSP201 세포의 도메인에 100% 대응을 보유하는 클론이 확인되었다. 클론된 cDNA 단편의 서열은 도 3에 도시된다. 클론된 PCR 산물은 플라스미드 pCR4-TOPO-INSP201-EC이다.

### 3.6 INSP201-EC에 대한 포유동물 세포 발현 벡터의 작제

플라스미드 pCR4-TOPO-INSP201-EC는 Gateway<sup>TM</sup> 클로닝 방법(Invitrogen)으로, INSP201-EC ORF 서열을 보유하고, 3' 서열이 6HIS 태그를 인코딩하는 pEAK12d와 pDEST12.2 발현 클론을 산출하기 위한 PCR 주형으로 이용하였다.

### 3.7 인-프레임 6HIS tag 서열에 융합된 Gateway 적합성 INSP201-EC ORF의 산출

Gateway 클로닝 과정의 첫 번째 단계는 5' 말단에서 attB1 재조합 부위와 Kozak 서열과 접하고, 3' 말단에서 인-프레임 6 히스티딘(6HIS) 태그, 종결 코돈, attB2 재조합 부위를 인코딩하는 서열과 접하는 INSP201의 ORF(Gateway 적합성 cDNA)를 산출하는 2단계 PCR 반응을 수반한다.

첫 번째 PCR 반응물(50  $\mu$ l의 최종 부피)은 1  $\mu$ l(30 ng)의 플라스미드 pCR4-TOPO-INSP201-EC, 1.5  $\mu$ l dNTP(10 mM), 10  $\mu$ l의 10X Pfx 중합효소 완충액, 1  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>(50 mM), 각각 0.5  $\mu$ l의 유전자 특이적 프라이머(100  $\mu$ M) (INSP201EC-EX1과 INSP201EC-EX2), 0.5  $\mu$ l Platinum Pfx DNA 중합효소(Invitrogen)를 함유한다. PCR 반응은 95°C에서 2분; 이후 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 68°C에서 2분의 12회 주기; 4°C의 홀딩 주기를 이용하여 수행하였다. 증폭 산물은 제조업체의 지시에 따라, Wizard PCR Prep DNA 정제 시스템(progema)을 이용하여 겔로부터 직접 정제하고 50  $\mu$ l 무균수에서 회수하였다.

두 번째 PCR 반응물(50  $\mu$ l의 최종 부피)은 10  $\mu$ l 정제된 PCR1 산물, 1.5  $\mu$ l dNTP(10 mM), 5  $\mu$ l의 10X Pfx 중합효소 완충액, 1  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>(50 mM), 각각 0.5  $\mu$ l의 Gateway 전환 프라이머(100  $\mu$ M)(GCP 전방과 GCP 후방), 0.5  $\mu$ l Platinum Pfx DNA 중합효소(Invitrogen)를 함유한다. 2차 PCR 반응은 95°C에서 1분; 94°C에서 15초, 50°C에서 30초, 68°C에서 2분의 4회 주기; 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 68°C에서 2분의 25회 주기; 4°C의 홀딩 주기를 이용하여 수행하였다. 10  $\mu$ l 분량은 상기 산물이 예상된 분자량(1215 bp + 70 bp = 1285 bp)을 보유하는 지를 확인하기 위하여, 1 X TAE 완충액(Invitrogen)에 담긴 0.8% 아가로오스 겔에서 가시화시켰다. 남아있는 40  $\mu$ l는 1 X TAE 완충액에 담긴 0.8% 아가로오스 겔에 적하하고, 밴드는 제조업체의 지시에 따라, Wizard PCR prep DNA 정제 시스템(Promega)을 이용하여 정제하고 50  $\mu$ l 무균수에서 회수하였다.

### 3.8 게이트웨이 엔트리 벡터 pDONR221 및 발현 벡터 pEAK12d-PAC와 pDEST12.2로 Gateway 적합성 INSP201-EC ORF의 서브클로닝.

Gateway 클로닝 과정의 두 번째 단계는 아래와 같이 Gateway 엔트리 벡터 pDONR221(Invitrogen)로 Gateway 변형된 PCR 산물의 서브클로닝을 수반한다: PCR2로부터 5  $\mu$ l의 정제된 산물은 실온에서 1시간동안 10  $\mu$ l의 최종 부피로 1.5  $\mu$ l pDONR221 벡터(0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l BP 완충액, 1.5  $\mu$ l의 BP 클로나아제 효소 혼합물(Invitrogen)과 함께 배양하였다. 반응은 단백분해효소 K 1  $\mu$ l(2  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 첨가하여 중단시키고 37°C에서 추가로 10분간 배양하였다. 상기 반응물의 분량(1  $\mu$ l)을 이용하여 아래와 같이 전기천공(electroporation)으로 대장균(*E. coli*) DH10B 세포를 형질전환시켰다: 25  $\mu$ l 분량의 DH10B 전기적격(electrocompetent) 세포(Invitrogen)는 얼음 위에서 해동시키고 1  $\mu$ l BP 반응 혼합물을 첨가하였다. 혼합물은 냉각된 0.1 cm 전기천공 큐벳에 이전하고, 세포는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 BioRad Gene-Pulser<sup>TM</sup>을

이용하여 전기천공시켰다. 전기천공 직후에, 실온으로 미리 데워진 SOC 배지(0.5 ml)를 첨가하였다. 혼합물은 15 ml 스냅-캡(snap-cap) 튜브에 이전하고 교반(220 rpm)하면서 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 이후, 카나마이신(40 µg/ml)을 포함하는 L-액체배지(LB) 평판에 형질전환 혼합물의 분량(10 µl와 50 µl)을 도말하고 37℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

플라스미드 Mini-prep DNA는 Qiaprep BioRobot 9600 로봇 시스템(Qiagen)을 이용하여 8개의 생성 콜로니의 5 ml 배양액으로부터 준비하였다. 플라스미드 DNA(150-200 ng)는 제조업체의 지시에 따라 BigDye Terminator 시스템(Applied Biosystems cat. no. 4390246)을 이용하여 21M13과 M13Rev 프라이머 및 앞서 기술된 바와 같은 INSP201-319F-SP1과 INSP201-570F-SP1 염기서열분석 프라이머로 DNA 염기서열분석하였다. 이들 프라이머 서열은 표 3에 도시된다. 염기서열분석 반응물은 Montage SEQ 96 정화 평판(Millipore cat. no. LSKS09624)을 이용하여 정제하고, 이후 Applied Biosystems 3700 염기서열분석기에서 분석하였다.

이후, INSP201-EC-6HIS 삽입체(pENTR-INSP201-EC-6HIS)를 보유하는 클론으로부터 플라스미드 용출액(2 µl 또는 대략 150 ng)은 10 µl 최종 부피로 1.5 µl의 pEAK12d-PAC 벡터 또는 pDEST12.2 벡터(0.1 µg/µl), 2 µl LR 완충액, 1.5 µl LR 클로나아제(Invitrogen)를 함유하는 재조합 반응물에 이용하였다. 혼합물은 실온에서 1시간동안 배양하고, 단 백분해효소 K 1 µl(2 µg/µl)의 첨가로 중단시키고, 37℃에서 추가로 10분간 배양하였다. 상기 반응물의 분량(1 µl)을 이용하여 아래와 같이 전기천공(electroporation)으로 대장균(*E. coli*) DH10B 세포를 형질전환시켰다: 25 µl 분량의 DH10B 전기적격(electrocompetent) 세포(Invitrogen)는 얼음 위에서 해동시키고 1 µl LR 반응 혼합물을 첨가하였다. 혼합물은 냉각된 0.1 cm 전기천공 큐벳에 이전하고, 세포는 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 BioRad Gene-Pulser™을 이용하여 전기천공시켰다. 전기천공 직후에, 실온으로 미리 데워진 SOC 배지(0.5 ml)를 첨가하였다. 혼합물은 15 ml 스냅-캡(snap-cap) 튜브에 이전하고 교반(220 rpm)하면서 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 이후, 암피실린(100 µg/ml)을 함유하는 L-액체배지(LB)에 형질전환 혼합물의 분량(10 µl와 50 µl)을 도말하고 37℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

플라스미드 Mini-prep DNA는 Qiaprep BioRobot 8000 로봇 시스템(Qiagen)을 이용하여 각 벡터에서 서브클론된 6개의 생성 콜로니의 5 ml 배양액으로부터 준비하였다. pEAK12d-PAC 벡터에서 플라스미드 DNA(200-500 ng)는 pEAK12F와 pEAK12R 프라이머 및 상기한 바와 같은 INSP201-319F-SP1과 INSP201-570F-SP1 염기서열분석 프라이머로 DNA 염기서열분석하였다. pDEST12.2 벡터에서 플라스미드 DNA(200-500 ng)는 상기한 바와 같이 21M13과 M13Rev 프라이머 및 앞서 기술된 유전자 특이적 염기서열분석 프라이머로 DNA 염기서열분석하였다. 프라이머 서열은 표 3에 도시된다.

CsCl 구배 정제된 maxi-prep DNA는 Sambrook J. et al., 1989, in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press에 기술된 방법을 이용하여, 서열 검증된 클론(pEAK12d-INSP201-PAC\_INSP201-EC-6HIS)의 500 ml 배양액으로부터 준비하고, 플라스미드 DNA는 무균수(또는 10 mM Tris-HCl pH 8.5)에서 1 µg/µl의 농도로 재부유시키고 -20℃에서 보관하였다.

내독소-없는 maxi-prep DNA는 제조업체의 지시에 따라 EndoFree Plasmid Mega 키트(Qiagen)을 이용하여 서열 검증된 클론(pDEST12.2\_INSP201-EC-6HIS)의 500 ml 배양액으로부터 준비하였다. 정제된 플라스미드 DNA는 내독소 없는 TE 완충액에서 적어도 3 µg/µl의 최종 농도로 재부유시키고 -20℃에서 보관하였다.

[표 3]

INSP201 클로닝과 염기서열분석 프라이머

프라이머	서열 (5'-3')
INSP201-CP1	ATG AAA TCA TTC AGC CGG ATC CTC TTC CTC GTC TTC CTC
INSP201-CP2	TGC GCC ACG TGG TCG CCC CAC CAG AGT CAC GCC GGT CTC CTT CAC TCG CTC
INSP201EC-EX1	GCA GGC TTC GCC ACC ATG AAA TCA TTC AGC CGG AT
INSP201EC-EX2	TG ATG GTG ATG GTG TGC GCC ACG TGG TCG CCC CAC
INSP201-319F-SP1	GCT GAC TCA CTC ACA ACC TCAA
INSP201-570F-SP2	TGA AGT CTC ACA GGC AGA AC
GCP 정방향	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GCC ACC
GCP 역방향	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG
pEAK12F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
21M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
M13REV	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG

밑줄 표시된 서열 = Kozak 서열

굵은 글씨 = 종결 코돈

이탤릭체 서열 = His tag

**실시예 4: 클로닝되고 His-표식된 플라스미드 pEAK12d-PAC\_INSP201-EC-6HIS의 포유동물 세포에서 기능유전체학 발현과 정제**

엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 핵 항원을 발현하는 인간 태아 신장 293 세포(HEK293-EBNA, Invitrogen)는 Ex-cell VPRO 혈청-없는 배지(종균(seed stock), 유지 배지, JRH)에 현탁 상태로 유지시켰다. 세포는 1% FCS로 보충된 250ml FEME(DMEM/Ham's F-12 1:1 19 mM HEPES, 5 g/l 글루코오스, 7.5 mM L-글루타민, 4 ml/l ITS-X)(모두 Invitrogen-Life Technologies) 배지에서  $1 \times 10^6$  개 세포/ml로 접종하였다. 상기 형질감염 혼합물에서, 500 µg DNA (pEAK12d-PAC\_INSP201-EC-6HIS) 플러스 10 µg 리포터-유전자 DNA는 50 ml FEME 1% FCS에서 희석하였다. 이후, 1 ml PEI(1 mg/l Polysciences, USA)를 첨가하였다. 상기 혼합물은 실온에서 10분간 배양하였다. 10분후, 형질감염 혼합물은 세포에 첨가하고, 배양액은 배양기 내에 37°C에서 90분간 배양하였다. 최종적으로, 내용물은 DNA의 비-무균성에 기인한 오염을 예방하기 위하여 2.5 ml Pen-Strep을 함유하는 나머지 200 ml FEME 1%FCS로 덮었다. 양성 형질감염의 확증은 Day 6에서 정량적 형광 검사로 수행하였다(Axiovert 10 Zeiss). Day 6(수거일)에, 상층액(500 ml)은 원심분리하고(4°C, 400g) 독특한 확인물질들을 포함하는 용기에 위치시켰다.

#### 4.1 정제 과정

C-말단 6His 태그를 보유하는 재조합 단백질을 포함하는 500 ml 배양 배지 시료는 1 부피 냉각 완충액 A(50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 600 mM NaCl; 8.7%(w/v) 클리세올, pH 7.5)로 1000 ml의 최종 부피로 희석하였다. 시료는 0.22 µm 무균 필터(Millipore, 500 ml 필터 단위)를 통하여 여과하고 1 l 무균 사각 배지 병(Nalgene) 내에서 4°C에 유지시켰다.



정제는 자동 시료 적하장치(Labomatic)에 연결된 VISION workstation(Applied Biosystems) 상에서 4℃에서 수행하였다. 정제 절차는 연속 2단계, Ni 이온으로 충전된 Poros 20 MC(Applied Biosystems) 칼럼(10 x 50 mm, 3.93 ml) 상에서 금속 친화성 크로마토그래피, 이후 Sephadex G-25 배지(Amersham Pharmacia) 겔 여과 칼럼(1.0 x 15 cm)에서 완충액 교환(buffer exchange)으로 구성되었다.

제 1 크로마토그래피 단계에서, 금속 친화성 칼럼은 30 칼럼 용적의 EDTA 용액(100 mM EDTA; 1M NaCl; pH 8.0)으로 재생시키고, 15 칼럼 용적의 100 mM NiSO<sub>4</sub> 용액으로 세척하여 Ni 이온으로 재충전하며, 10 칼럼 용적의 완충액 A와 7 칼럼 용적의 완충액 B(50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 600 mM NaCl; 8.7%(w/v) 글리세롤, 400 mM; 이미다졸, pH 7.5)로 순차적으로 세척하고, 최종적으로 15 mM 이미다졸을 함유하는 15 칼럼 용적의 완충액 A로 평형시켰다. 시료는 Labomatic 시료 적하장치로 200 ml 시료 루프 내로 이전하고, 분당 20 ml 유속으로 Ni 금속 친화성 칼럼에 충전시켰다. 충전 절차는 전체 시료(1000 ml)를 Ni 칼럼으로 이전하기 위하여 5회 반복하였다. 이후, 칼럼은 12 칼럼 용적의 완충액 A 및 20 mM 이미다졸을 함유하는 28 칼럼 용적의 완충액 A로 순차적으로 세척하였다. 20 mM 이미다졸 세척 동안, 느슨하게 부착된 오염 단백질이 칼럼으로부터 용리되었다. 최종적으로, 재조합 His-표식된 단백질은 분당 2ml 유속으로 10 칼럼 용적의 완충액 B로 용리시키고, 용리된 단백질은 2.7 ml 분획물에서 회수하였다.

제 2 크로마토그래피 단계에서, Sephadex G-25 겔-여과 칼럼은 2ml 완충액 D(1.137M NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.2)로 재생시키고, 후속으로 4 칼럼 용적의 완충액 C(137 mM NaCl; 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20%(w/v) 글리세롤; pH 7.4)로 평형시켰다. Ni-칼럼으로부터 용리되는 피크 분획물은 VISION 상에서 통합된 시료 적하장치를 통하여 Sephadex G-25 칼럼으로 자동 적하하고, 단백질은 분당 2ml 유속으로 완충액 C로 용리하였다. 탈염된 시료는 2.7 ml 분획물에서 회수하였다. 상기 분획물은 0.22 µm 무균 원심분리 필터(Millipore)를 통하여 여과하고, 분량하고, 동결시키고, -80℃에서 보관하였다. 시료의 한 분량은 SDS-PAGE(4-12% NuPAGE 겔; Novex) 상에서 쿠마시 블루 염색 및 항-His 항체를 이용한 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

#### 4.2 쿠마시 블루 염색

NuPAGE 겔은 실온에서 1시간동안 0.1% 쿠마시 블루 R250 염색 용액(30% 메탄올, 10% 아세트산)으로 염색하고, 이후 배경이 투명해지고 단백질 밴드가 선명하게 보일 때까지 20% 메탄올, 7.5% 아세트산에서 탈염색시켰다.

#### 4.3. 웨스턴 블랏

전기영동이후, 단백질은 4℃에서 1시간동안 290 mA로, 겔로부터 니트로셀룰로오스 막으로 전기적으로 이동시켰다. 막은 완충액 E(137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 녹인 5% 우유 분말로 실온에서 1시간동안 차단하고, 이후 완충액 E에 녹인 2.5% 우유 분말에 담긴 2가지 토끼 다클론 항-His 항체(G-18과 H-15, 각각 0.2 µg/ml; Santa Cruz)의 혼합물과 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다. 실온에서 1시간동안 추가로 배양한 이후, 막은 완충액 E(3x10 분)로 세척하고, 이후 2.5% 우유 분말을 함유하는 완충액 E에서 1/3000 희석된 2차 HRP-공액된 항-토끼 항체(DAKO, HRP 0399)와 함께 실온에서 2시간동안 배양하였다. 완충액 E(3 x 10 분)로 세척한 이후, 막은 ECL 키트(Amersham Pharmacia)로 1분간 현색시켰다. 막은 후속으로, Hyperfilm(Amersham Pharmacia)에 노출시키고, 필름은 현상하고, 웨스턴 블랏 이미지는 시각적으로 분석하였다.

#### 실시예 5 - TaqMan 분석에 의한 INSP201 유전자 발현 수준의 분석

실시간 PCR은 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System 상에서 SYBR Green 화학반응을 이용하여 수행하였다. 산물이 분석되는 서열의 인트론에 걸치도록 여러 쌍의 PCR 프라이머를 설계하였다. 산물의 발현 수준은 무작위 프라이머를 이용하여 RNA 시료로부터 만들어진 한 패널의 RT-PCR 산물에서 결정하였다.

각 시료로부터 전체 RNA는 20 µl의 최종 반응 부피에서 RT-PCR용 Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. No. 18080-051)을 이용하여 역전사시켰다. 2 µg의 전체 RNA는 50 ng 무작위 헥사머 프라이머, 각 10mM의 dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 µl의 부피에서 DEPC-처리된 물과 혼합하였다. 혼합물은 65℃에서 5분간 배양하고, 이후 얼음 위에서 1분간 냉각시켰다. 아래의 10 µl cDNA 합성 혼합물을 별개의 튜브에서 준비하였다: 2 µl 10X RT 완충액, 4 µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl 0.1M DTT, 1 µl RnaseOUT™(40 unit/µl), 1 µl SuperScript™ III RT 효소(200 unit/µl). 상기 cDNA 합성 혼합물은 RNA/프라이머 혼합물에 첨가하고, 부드럽게 교반하고, 25℃에서 10분간, 이후 50℃

에서 50분간 배양하였다. 이후, RT 효소는 85℃에서 5분간 배양함으로써 불활성화시켰다. 혼합물은 얼음 위에서 냉각시키고, 이후 1  $\mu$ l의 대장균(*E. coli*) Rnase H(2 unit/ $\mu$ l)를 첨가하고, 혼합물은 37℃에서 20분간 배양하였다. 혼합물은 얼음 위에서 냉각시키고 무균수로 1/250 희석하였다. 역전사효소 반응물의 희석액은 TaqMan 장치(PE Biosystems 7700)에서 실시간 PCR 분석하였다.

PE Biosystems로부터 Primer Express 소프트웨어를 이용하여 아래의 서열에 따라, INSP201-EC에 대한 SYBR Green Real Time PCR 프라이머 및 클리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제 GAPDH(하우스 키핑(house-keeping) 대조)를 설계하였다: INSP201-EC(엑손 1과 2 사이의 경계에 걸쳐있는 한 쌍), 역방향 5'-TCGCCCCACCAGAGTCAC-3'; 정방향 5'-CCGAGGTGAGGGAGTCAACA-3'; GAPDH, 역방향 5'-GATGGGATTTCATTGATGACA-3'; 정방향 5'-CCACCCATGGCAAATTCC-3'; 인트론-GAPDH, 역방향 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'; 정방향 5'-CTGTGCTCCCCTCCTGATTTC-3'. 특이성과 최적 프라이머 농도는 플라스미드 pCR4-TOPO-INSP201-EC에서 검사하였다. 잠재적 게놈 DNA 오염은 특이적인 GAPDH 인트론 프라이머로 PCR 반응을 수행함으로써 배제하였다. 비-특이적인 증폭의 부재는 3.5% 아가로스 겔 전기영동에서 PCR 산물을 분석하여 예상 분자량의 단일 밴드가 생성되는 지를 확인함으로써 확증하였다.

SYBR Green Real-Time PCR은 5  $\mu$ l/웰의 RT-산물, AmpErase Uracil N-Glycosylase(UNG)(0.5 Unit/웰)과 25  $\mu$ l/웰의 SYBR Green PCR 마스터 혼합물(PE Biosystem), 20  $\mu$ l의 프라이머(300 nM)로 수행하였다. PCR은 ABI PRISM 7700 Detection System에서 50℃에서 2분간(cDNA에 통합된 임의의 우라실을 제거하는 AmpErase UNG 배양을 위하여); 95℃에서 10분간(AmpliTaq Gold 활성화를 위하여); 이후 95℃에서 15초간, 60℃에서 1분간 40회 주기로 수행하였다. 역전사된 cDNA 시료는 이런 방식으로 증폭하고, 이들의 Ct(주기 역치(cycle threshold)) 값을 결정하였다. 모든 Ct 값은 하우스키핑 유전자 GAPDH에 표준화시켰다. INSP201-EC와 GAPDH에 대한 단일 특이적인 DNA 밴드는 겔 전기영동 분석을 이용하여 관찰하였다. SYBR Green PCR 마스터 혼합물을 이용한 실시간 검출의 원리는 이중-가닥 DNA에 기인한 SYBR Green 염료의 결합에 의해 유발되는 형광 증가를 측정함으로써 PCR 산물의 직접적인 검출에 기초한다. 각 cDNA 시료에서 GAPDH와 INSP201-EC 사이에 발현 수준에서 차이는 Ct 값에서 차이, 다시 말하면, 델타( $\delta$ ) Ct = Ct (GAPDH) - Ct (INSP201-EC)로서 표시하였다. 이후, 각 시료에 대한 결과는 발현 차이(fold difference) 공식 =  $2^{(-\delta Ct)}$ 에 따라, GAPDH에 대한 발현과 비교하여 현저한 INSP201-EC 발현에 요구되는 주기 횟수에서 발현 차이로 표시하였다. 최종적으로, 각 cDNA 시료에서 INSP201-EC의 발현 수준은 INSP201-EC에 대한 발현 차이로 100을 나눔으로써 GAPDH 유전자 발현 수준과 비교하였다(여기서, GAPDH 발현 수준 = 100%). 결과는 표 4 내지 9에 도시된다.

**[표 4]**

주요 인간 조직	GAPDH(=100)와 비교하여
S76 뇌	0.01
S77 심장	0.00
S78 신장	0.00
S79 간	0.00
S80 폐	0.00
S81 태반	0.00
S82 골격근	0.00
S83 소장	0.00
S84 비장	0.01
S85 흉선	0.00
S86 자궁	0.02
S89 척수	0.00
S90 경부	0.03
S91 결장	0.00
S92 난소	0.01
S93 전립선	0.02
S94 고환	0.00
S95 피부	0.01
S113 췌장	0.33
S119 유방	0.01

S120 위	0.00
S122 눈	0.00
S147 방광	0.00

**[표 5]**

비교 조직	GAPDH(=100)와 비교하여
S76 뇌	0.01
S140 태아 뇌	0.03
S77 심장	0.00
S143 태아 심장	0.00
S78 신장	0.00
S121 태아 신장	0.01
S130 루퍼스 전체 RNA 신장	0.00
S135 신장 종양	0.01
S79 간	0.00
S142 태아 간	0.00
S127 루퍼스 전체 RNA 간	0.01
S131 간경변	0.00
S136 간 종양	0.00
S80 폐	0.03
S144 태아 폐	0.00
S128 루퍼스 전체 RNA 폐	0.00
S132 경변증 폐	0.00
S137 폐종양	0.34
S84 비장	0.00
S141 태아 비장	0.00
S129 루퍼스 전체 RNA 비장	0.00
S133 경변증 비장	0.00
S117 인간 보편적 참고	0.01

**[표 6]**

분비와 면역 조직	GAPDH(=100)와 비교하여
S87 골수	0.02
S88 갑상선	0.03
S115 타액선	0.00
S116 부신	0.00
S123 유선	0.01
S125 뇌하수체	0.00
S145 림프절	0.02
S146 지방조직	0.02
S148 맹장	0.00
S149 혈관 동맥	0.00
S150 인후	0.00
S75 편도선	0.06
S54 기질	0.01

S153 세포 HDMEC	0.00
자극된 S157 세포 HDMEC	#REP!
S155 세포 HAoEC	0.00
자극된 S158 세포 HAoEC	0.00
S11 RA2	0.06
S12 RA3	0.00

[표 7]

일차 세포와 세포주(비-백혈구성)	GAPDH(=100)와 비교하여
S1 AG1518 섬유아세포	0.00
S2 Howard Ab	0.09
S3 Clark N	0.00
S4 NF1	0.20
S5 NF2	0.19
S6 SScN2	0.00
S7 SScA2	0.01
S15 LN1	0.00
S16 Lab1	0.00
S17 LN14	0.01
S18 LA13	0.00
S9 NHDF2	0.00
S10 NHDF3	0.00
S55 JEHC	0.00
S56 HT 1080	0.00
S57 MRC-5	0.01
S152 Cells Mob	0.00
자극된 S155 Cells Mob	0.00
자극된 S156 Cells Mob	0.00
S20 K1 각화세포 피부	0.00
S21 K2 각화세포 피부	0.16

[표 8]

일차 세포와 세포주 2 - 면역과	GAPDH(=100)와 비교하여
CNS 유래됨	
S30 THP-1 mono/mac	0.00
S35 KU812 호염기구	0.10
S37 KU812/PMA	0.05
S43 Jurkat	0.00
S58 PBMC1	0.00
S59 과립구 1	0.02
S61 PBMC2.2	0.00
S97 SK-N-AS	0.00
S98 TE671 서브클론 2	0.04
S99 KELLY	0.00
S100 U-373 MG	0.00

S101 U-87MG	0.00
S102 T98G	0.00
S103 BE(2)-C	0.04
S104 CCF-STGG1	0.00
S105 TE671	0.01
S106 A172	0.00
S107 132N1	0.00
S108 SK-PN-DW	0.01
S109 SK-N-SH	0.26
S38 MOLT-4	0.01
S41 EOL-3	0.06
S44 EOL-3+1L2	0.02

[표 9]

IBD 샘플	GAPDH(=100)와 비교하여
N1	0.02
N2	0.09
N3	0.02
N4	0.03
N5	0.01
N9	0.01
N10	0.03
CD1	0.59
CD2	0.07
CD3	0.30
CD4	0.03
CD5	0.01
CD6	0.13
CD8	0.15
CD9	0.02
CD10	0.15
CD13	0.20
CD16	0.31
CD17	0.16
CD18	0.03
CD19	0.02
CD20	0.02
CD22	0.07
N11	0.30
N14	0.05
N26	2.19
N27	2.79
N29	0.79
N30	0.39
CD4 bis	0.25
CD6 bis	0.35
CD23	0.24
CD24	0.54
CD25	0.10

CD26	0.39
CD27	0.11
CD28	0.61
UC11	0.90
UC12	0.31
UC13	0.01
UC14	1.21
UC16	0.58
UC18	0.02
UC19	0.01

0.3의 GAPDH 발현과 비교하여 INSP201-EC의 발현 수준의 역치를 정의하면, TaqMan 발현 결과는 췌장 조직(표 4와 도 4), 폐종양 조직(표 5와 도 5) 및 높은 수준으로 다양한 염증성 장 질환 조직(표 9와 도 6)에서 INSP163의 예상치 않게 제한된 발현을 보여준다. INSP201-EC의 발현 없음이 정상 폐 조직에서 관찰된다(GAPDH와 비교하여 INSP201-EC의 발현 수준은 0.03 미만이다). 폐종양은 기관지암(bronchogenic carcinoma), 더욱 구체적으로 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma)이다.

이와 같은 특이적인 발현 패턴은 폐암과 염증성 장 질환에 INSP201-EC의 관련을 암시한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 상응하는 폴리펩티드를 특징짓는 이들 놀라운 특성으로 인하여, 이들은 약제 또는 제약학적 조성물의 제조에 특히 적합하다. 이런 이유로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 상응하는 폴리펩티드는 췌장 조직, 폐종양 조직, 다양한 염증성 장 질환 조직에서 제한된 발현의 예상치 않은 결과를 보인다.

#### 실시예 6 - 혈구계산 구체 어레이(cytometry bead array, CBA)를 이용하여 ConA로 자극된 인간 PBMC에 의해 생산되는 사이토킨 수준의 결정

##### 6.1 요약

본 연구의 목적은 미토젠 콘카나발린 A(ConA)로 자극된 인간 말초 단핵 세포(PBMC)를 이용하여 사이토킨 분비의 새로운 조절물질을 찾는 것이다.

단백질 INSP201-EC는  $E_{max} = 80\%$ 와  $EC_{50} = 8 \mu g/ml$ 로 ConA-자극된 인간 PBMC로부터 IL-2 분비를 저해하지만, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 또는 IL-10의 수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다.

##### 6.2 기기와 소프트웨어

96 웰 마이크로역가 플레이트 광도계 EX(Labsystem).

Graph Pad Prism Software

엑셀 소프트웨어

유세포분석기 Becton-Dickinson

CBA 분석 소프트웨어

세포 배양용 후드(hood)

세포 배양용 배양기

원심분리기

피펫

### 6.3 재료와 시약

백혈구연층(buffy coat)

DMEM GIBCO Ref: 21331-020

인간 혈청형 AB SIGMA Ref: H1513

L-글루타민 GIBCO Ref: 250 030-020

페니실린-스트렙토마이신 GIBCO Ref: 150 070-063

Ficoll PHARMACIA ref: 17-1440-03

세포 배양용 96 웰 마이크로역가 플레이트 COSTAR Ref: 3596

콘카나발린 A SIGMA Ref: C0412

수용성 텍사메타손 SIGMA Ref: D2915

인간 Th1/Th2 사이토킨 CBA 키트 Becton-Dickinson Ref: 550749

PBS GIBCO Ref: 14190-094

FALCON 50 ml 무균 Becton-Dickinson Ref: 2070

글리세롤 MERCK Ref: 1-04092-2500

96 웰 마이크로역가 플레이트 원뿔꼴 바닥 NUNC Ref: 249570

### 6.4 방법

#### 백혈구연층으로부터 인간 PBMC의 정제

DMEM으로 백혈구연층 1 내지 2를 희석한다.

25 ml의 희석된 혈액을 50 ml Falcon 튜브 내에 15 ml의 Ficoll 층에 천천히 첨가한다.

상기 튜브를 원심분리한다(2000 rpm, 20 min, 실온에서 제동 없이).

분열간기(interphase)(고리) 세포를 수집하고 이들 세포를 25 ml의 DMEM으로 세척하고, 이후 원심분리 단계(1200 rpm, 5 min)를 수행한다. 3회 반복한다. 백혈구연층은 대략  $600 \times 10^6$ 개의 전체 세포를 제공한다.

#### 활성 검사

DMEM+ 2.5% 인간 혈청+ 1% L-글루타민+ 1% 페니실린-스트렙토마이신에서 희석된  $80 \mu\text{l}$ 의  $1.25 \times 10^6$ 개 세포/ml를 96 웰 마이크로역가 플레이트에 첨가한다.

웰당  $10 \mu\text{l}$ 를 첨가한다(웰에 대해 한가지 조건): PBS+ 20%글리세롤(출발 농도  $50 \mu\text{g/ml}$ )에 담긴 INSP201-EC

웰당 10 $\mu$ l를 첨가한다: ConA 50  $\mu$ g/ml(ConA의 최종 농도는 5  $\mu$ g/ml이다)

48시간후, 세포 상층액을 수집하고 인간 Th1/Th2 사이토킨 CBA 키트 Becton-Dickinson으로 인간 사이토킨을 측정한다.

### CBA 분석

인간 Th1/Th2 포획 구체(capture bead) 혼합물은 공급업체의 사용설명서(CBA 키트 Becton-Dickinson Ref: 550749)에 따라 제조되는데, 간단히 말하면 아래와 같다:

- 실험에 필요한 검사 튜브의 개수를 결정한다.
- 혼합에 앞서 수초동안 각 포획 구체 현탁액을 활발하게 교반한다.
- 분석되는 각 분석물에 대하여 각각 10 $\mu$ l 분량의 포획 구체를 “혼합된 포획 구체”로 낙인된 단일 튜브 내로 첨가한다.
- 상기 구체 혼합물을 완전하게 교반한다.

### 검사 시료의 준비

- Assay Diluent를 이용하여 상층액을 1:5 희석한다(20  $\mu$ l의 상층액 + 60  $\mu$ l의 Assay Diluent).
- 시료를 96 웰 마이크로역가 플레이트 원뿔꼴 바닥(Nunc) 내로 이전하기에 앞서 시료 희석액을 혼합한다.

### 인간 Th1/Th2 사이토킨 CBA 검사 절차

- 50  $\mu$ l의 희석된 상층액을 96 웰 마이크로역가 플레이트 원뿔꼴 바닥(Nunc) 내로 첨가한다.
- 50  $\mu$ l의 혼합된 포획 구체를 첨가한다.
- 50  $\mu$ l의 인간 Th1/Th2 PE 검출 시약을 첨가한다.
- 플레이트를 실온에서 3시간동안 배양하고 일광에 직접적인 노출을 피한다.
- 1500rpm에서 5분간 원심분리한다.
- 상층액을 조심스럽게 따라버린다.
- 각 웰에 200  $\mu$ l의 세척 완충액(wash buffer)을 첨가하고 1500rpm에서 5분간 원심분리한다.
- 상층액을 조심스럽게 따라버린다.
- 각 웰에 200  $\mu$ l의 세척 완충액(wash buffer)을 첨가하고 1500rpm에서 5분간 원심분리한다.
- 상층액을 조심스럽게 따라버린다.
- 각 웰에 130  $\mu$ l의 세척 완충액을 첨가하여 구체 펠릿(bead pellet)을 재현탁시킨다
- 유세포분석기에서 시료를 분석한다.
- 데이터는 CBA Application Software, Activity Base, Microsoft Excel 소프트웨어를 이용하여 분석한다.



- 결과는 ConA 자극된 세포(100%) vs. 자극되지 않은 세포(0%)에서 달성되는 사이토킨의 수준을 비교하여 사이토킨 분비의 백분율로 제공한다.

#### 6.5 결과 - ConA-자극된 인간 PBMC에 INSP201-EC 투여의 효과

결과는 INSP201-EC의 존재에서 용량 의존성 방식으로 IL-2 분비의 저해를 보여준다. 달성되는 최대 저해(E<sub>max</sub>)는 8 µg/ml의 EC50에서 80%이었다. IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5 또는 IL-10의 수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다. 이런 이유로, 저해는 IL-2에 특이적이다.

인간 말초 단핵 세포로부터 IL-2의 하향 조절 및 염증성 장 질환, 암, 췌장 조직에서 INSP201-EC의 발현을 고려하면, 이는 염증, IL-2 관련된 질환, 암, 염증성 장 질환 및/또는 췌장 질환에 INSP201-EC의 관련을 지시한다.

IL-2의 항진제는 공지되어 있다. 가령, Abbott는 신생물 치료를 위한 IL-2 용합 단백질을 개발하였다. Amgen은 암 치료를 위한 IL-2 항진제를 개발하였다. AntiCancer Inc는 폐종양 치료를 위한 IL-2 항진제(AC-9401)를 개발하였다. Aplagen GmbH는 암 치료를 위한 IL-2 항진제(IL-2 모방 펩티드)를 개발하였다. Avectin은 유방 종양의 치료를 위한 IL-2 항진제(avectin)를 개발하였다. Aventis Pharma는 암 치료를 위한 IL-2 항진제를 개발하였다. Bayer Corp는 HIV 감염, 신장 세포 암종, 흑색종의 치료를 위한 IL-2 항진제(BAY-50-4798)를 개발하였다. Baylor College of Medicine는 만성 림프구성 백혈병의 치료를 위한 IL-2 항진제(IL-2/CD40L-발현 백혈병 백신)를 개발하였다. Biogen은 육종, 후천성 면역 결핍증, 암, 결장 종양, 신장 종양의 치료를 위한 IL-2 조절제(teceleukin)를 개발하였다. Biomira USA는 비-소세포 폐암, HIV 감염, 폐종양, 신장 종양의 치료를 위한 IL-2 항진제(리포솜 제제, 펩티드)를 개발하였다. Boehringer Ingelheim은 흑색종, 신생물의 치료를 위한 BIWB-2(백신)를 개발하였다. Chiron Corp.는 HIV 감염, 신장 세포 암종, 백혈병, 흑색종, 비-호지킨 림프종, 암, 폐종양, 난소 종양의 치료를 위한 aldesleukin을 개발하였다. Chiron Corp.는 또한, HIV 감염과 두경부 종양의 치료를 위한 PEG-인터루킨-2를 개발하였다. EMD Lexigen Research는 흑색종과 신경계 종양의 치료를 위한 EMD-273063(단클론 항체 - 용합 단백질)을 개발하였다. EMD Lexigen Research는 암 치료를 위한 NHS-IL-2(D20T)(공액된 면역글로불린)을 개발하였다. Flamel Technologies는 암 치료를 위한 IL-2 항진제를 개발하였다. Immunex는 B형 간염 바이러스 감염, 흑색종, 암의 치료를 위한 재조합 펩티드를 개발하였다. The Institute of Cancer Research는 암 치료를 위한 백신을 개발하였다. The McMaster University는 흑색종, 유방 종양, 암의 치료를 위한 백신(아데노바이러스 기초된 유전자 치료제)을 개발하였다. The Medical University of South Carolina는 암 치료를 위한 펩티드-GN-CSF/IL-2 예방접종 치료제를 개발하였다. The National Institute of Health는 신장 세포 암종, 흑색종, 결장 종양의 치료를 위한 IL-2 유전자 치료제를 개발하였다. Pivotal BioSciences는 암 치료를 위한 IL-2 항진제(PB-1)를 개발하였다. The Scripps Research Institute는 비-소세포 폐암, 전립선 종양, 유방 종양, 암, 뇌종양, 난소 종양, 결장 직장 종양, 신장 종양의 치료를 위한 KS-IL-2(단클론 항체 - 공액된 - 용합 단백질)를 개발하였다. Seragen은 HIV 감염, 신생물, 류머티스성 관절염, 인슐린 의존성 당뇨병의 치료를 위한 DAB-486-IL-2(단백질 용합체-독소)를 개발하였다. Seragen은 또한, 비-소세포 폐암, 탈모증, HIV 감염, 만성 림프구성 백혈병, 피부 T-세포 림프종, 림프종, 건선, 류머티스성 관절염, 비-호지킨 림프종, 이식편-대-숙주 질환, 두경부 종양, 폐종양, 피부염의 치료를 위한 denileukin diftitox(단백질 용합체-독소)를 개발하였다. Skyepharma는 감염 치료를 위한 IL-2 항진제(펩티드)를 개발하였다. The St Jude Childrens Research Hospital은 신경계 종양의 치료를 위한 IL-2 항진제(백신)를 개발하였다. The State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR는 암 치료를 위한 IL-2 항진제(펩티드)를 개발하였다. Takeda Pharmaceutical은 B형 간염 바이러스 감염과 암의 치료를 위한 celmoleukin을 개발하였다. Transgene SA는 흑색종과 고형 종양의 치료를 위한 TG-1024(아데노바이러스 기초된 유전자 치료제)를 개발하였다. Transgene SA는 비-소세포 폐암, 췌장 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 난소 종양의 치료를 위한 TG-1031과 TG-4010(천연두 바이러스 기초된 유전자 치료제)를 개발하였다. Cell Therapy는 중피종, 신장 세포 암종, 육종, 흑색종, 유방 종양 암의 치료를 위한 TG-2001을 개발하였다. Transkaryotic Therapies는 신장 세포 암종의 치료를 위한 IL-2, TKT를 개발하였다. The University of California는 흑색종, 전립선 종양, 결장 종양의 치료를 위한 UCLA를 개발하였다. The University of Cincinnati는 두경부 종양과 암의 치료를 위한 백신 바이러스 치료제를 개발하였다. The University of Pittsburgh는 신생물 치료를 위한 IL-2 항진제(펩티드)를 개발하였다. The University of Texas는 HIV 감염의 치료를 위한 INGN-301를 개발하였다. Valentis/Roche는 두경부 종양의 치료를 위한 IL-2, cLipid 유전자 치료제를 개발하였다. Valentis는 흑색종 치료를 위한 IL-2/초항원-B, cLipid 유전자 치료제를 개발하였다. Valentis는 또한, 폐종양의 치료를 위한 VLTS-587을 개발하였다. Vical은 흑색종 치료를 위한 IL-2 항진제(유전자 치료제 - 플라스미드)를 개발하였다. Vical은 신장 세포 암종, 육종, 림프종, 흑색종, 전립선 종양의 치료를 위한 leuvectin을 개발하였다. Virogenetics Corp는 암 치료를 위한 ALVAC-hIL-2(천연두 바이러스 기초된 유전자 치료제)를 개발하였다. Yead Research는 신경퇴행성 질환의 치료를 위한 IL-2 항진제를 개발하였다.

IL-2의 길항제는 공지되어 있다. 가령, Affymax/Aventis는 류머티스성 관절염, 자가면역 질환, 심혈관 질환의 치료를 위한 면역억제성 IL-2 길항제를 개발하였다. Hybritech Inc.는 암 치료를 위한 단클론 항체를 개발하였다. Immunotech는 이식편 거부 vs. 숙주 질환의 치료를 위한 단클론 항체를 개발하였다. Sunesis Pharmaceuticals는 이식편-대-숙주 질환의 치료를 위한 IL-2 길항제를 개발하였다.

인터루킨-2 기능, 생산, 임상 적용은 Graffen and Liu, Cytokine 28 (2004), pp. 109-123에서 상세하게 기술되었다.

이와 같은 IL-2 관련된 질환은 신생물, 폐종양, 암, 유방 종양, HIV 감염, 신장 세포 암종, 흑색종, 만성 림프구성 백혈병, 육종, 후천성 면역 결핍증, 결장 종양, 신장 종양, 비-소세포 폐암, 백혈병, 비-호지킨 림프종, 난소 종양, 두경부 종양, 신경계 종양, B형 간염 바이러스 감염, 전립선 종양, 뇌종양, 결장직장 종양, 신장 종양, 탈모증, 피부 T-세포 림프종, 림프종, 신경계 종양, 고형 종양, 췌장 종양, 중피종, 빈혈, 궤양성 대장염, 위암, 경피증, 류머티스성 관절염, 염증성 장 질환, 만성 B형 간염 감염, 고감마글로불린혈증(hypergammaglobulinemia), 엡스타인-바르 바이러스 매개된 림프증식성 질환, 급성 골수성 백혈병, 전이성 흑색종, 관절염, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 혈관생성 질환, 카포시 육종, 췌장 질환 또는 다발성 경화증이다.

적절하게는, 암은 혈액과 림프 계통의 암, 피부 암, 소화기 계통의 암, 비뇨기 계통의 암, 유방 암, 난소 암, 부인과 암, 용모막암종(choriocarcinoma), 폐암, 뇌종양, 골 종양, 카르시노이드 종양, 비인두 암, 복막후(Retroperitoneal) 육종, 연조직 종양, 갑상선 암 또는 미지의 원발성 부위의 암에서 선택된다.

적절하게는, 본 명세서에서 “폐종양” 또는 “폐암”은 동의어이고, 양성 및 악성 원발성 종양, 또는 다수의 다른 장기와 조직의 원발성 암에서 선택된다.

적절하게는, 폐암은 기관지암, 기관지 유암, 파오종(chondromatous hamartoma)(양성), 고립성 림프종, 육종(악성) 또는 다발성 림프종을 비롯한 원발성 폐종양에서 선택된다.

적절하게는, 기관지암은 편평 세포 암종, 미분화 소세포 암종, 미분화 대세포 암종, 선암 또는 기관지폐포성 암종(bronchioloalveolar carcinoma)에서 선택된다.

적절하게는, 기관지암은 편평 세포 암종 또는 비-소세포 폐 암종이다.

적절하게는, 폐암은 피부, 유방, 결장, 전립선, 신장, 갑상선, 위, 경부, 직장, 고환, 골의 원발성 암, 또는 흑색종으로부터 전이에서 선택된다.

“기관지 유암” 또는 “기관지 선종”은 동의어이고, 양성이나 악성이며, 양쪽 성 모두에서 균등하게 발병한다. 이의 과정은 장기적이다. 상기 종양의 기관지내 부분이 주요 기관지의 내강을 차단한다. 위에 놓인 점막으로부터 강한 출혈이 종종 발생한다. 동일한 폐 구역 내에서 재발성 폐렴 및 국지적으로 중복되는 늑막 통증이 빈번하다. 전이는 흔치 않지만 국부 림프절에 발생할 수 있다.

적절하게는, 췌장 질환은 급성 췌장염, 만성 췌장염, 선방 세포암(acinar cell carcinoma) 또는 혼성 세포 개체군 췌장 암종(mixed cell population pancreatic carcinoma)을 비롯한 췌장 암종 등이다.

적절하게는, 염증성 장 질환은 크론병 또는 궤양성 대장염이다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201(당화 여부에 상관없이)의 세포외 부분, 이의 단편, 막-결합된 INSP201의 항진제 또는 길항제는 고형 장기와 골수 이식에서뿐만 아니라 염증, IL-2-관련된 질환 및/또는 염증성 장 질환의 치료에 유용하다. 사이클로스포린 A, 타크롤리무스(tacrolimus) 또는 시롤리무스(sirolimus)와의 조합이 고형 장기와 골수 이식에 사용될 수 있다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201의 길항제는 중화 항체이다.

적절하게는, 막관통 도메인이 부재하는 INSP201 폴리펩티드가 염증, IL2-관련된 질환 및/또는 염증성 장 질환의 치료에 사용된다.

적절하게는, 이러한 막관통 도메인은 SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:24의 아미노산 406 내지 428에 걸쳐있다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201의 항진제가 암(가령, 폐암, RCC 또는 흑색종) 및/또는 IL-2 관련된 질환(가령, HIV, EBV 또는 B형 간염 감염)의 치료에 사용된다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201의 항진제는 항진성 항체이다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201의 세포외 부분은 SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:22 또는 SEQ ID NO:28로 구성되거나 이러한 서열을 포함한다. 적절하게는, 막-결합된 INSP201의 세포외 부분의 단편은 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:20 또는 SEQ ID NO:26으로 구성되거나 이러한 서열을 포함한다.

적절하게는, 막-결합된 INSP201은 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:30, 또는 엑손 1과 엑손 2의 조합(즉, SEQ ID NO:4와 조합으로 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:20 또는 SEQ ID NO:26)으로 구성되거나 이러한 서열을 포함한다.

### 실시예 7 - 비-소세포 폐 암종 세포(A549)에서 IKK2 활성을 측정하기 위한 검사

종양 괴사 인자- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )는 세포 활성화, 분화, 아포토시스를 비롯한 복수의 기능을 갖는 다면발현성(pleiotropic) 사이토킨이다. TNF $\alpha$ 는 세포형 특이적 방식으로 아포토시스와 안티-아포토시스 효과를 나타낸다. TNF $\alpha$ 의 안티-아포토시스 효과는 NF- $\kappa$ B 활성의 상향조절에 의해 매개되는 것으로 보인다. NF- $\kappa$ B의 TNF $\alpha$  유도된 활성화는 세포를 세포 사멸로부터 보호하는 여러 안티-아포토시스 단백질의 발현을 증가시킨다. 이런 경로가 저해되면, TNF $\alpha$ 는 세포 사멸을 잠재적으로 유도할 수 있다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 IKK 복합체에 의해 매개된다.

INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체의 활성화는 인간 폐 암종 세포인 A549에서 IKK2 활성의 활성화를 측정할 수 있는 아래의 검사법으로 확인할 수 있다. TNF $\alpha$ 는 프로-와 안티-아포토시스 경로를 모두 유도할 수 있기 때문에, 사이클로헥시미드(cycloheximide)로 안티-아포토시스 유전자 발현을 차단하면 세포 사멸이 유도될 수 있다. 세포에서 아포토시스가 진행되면, 이들 세포는 배양 표면으로부터 분리된다. 이들 세포를 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 고정하고 세척하면 생존 세포만 염색되는데, 이는 540 nm에서 관독할 수 있다. 따라서, 이런 측정방법은 A549 세포에서 세포 사멸을 결정하는데 이용된다. 사이클로헥시미드의 존재하에 A549 세포를 TNF $\alpha$ 로 처리하면 아포토시스가 진행된다. IKK 경로를 유도하여 안티-아포토시스 유전자를 상향 조절하기 위하여 세포를 IL-1 $\beta$  또는 TNF $\alpha$ 로 전처리하면, 이들 세포는 TNF $\alpha$ + 사이클로헥시미드 처리에 의해 유도된 사멸로부터 보호될 수 있다. IL-1 $\beta$ 로 전처리 단계 동안, 특정 저해물질로 IKK 활성을 차단하면 TNF $\alpha$ + 사이클로헥시미드 매개된 세포 사멸에 대한 IL-1 $\beta$ 의 보호 효과가 소멸될 수 있다. 따라서, TNF $\alpha$  신호전달의 이런 특성은 A549 세포에서 IKK 활성을 모니터링하는데 이용된다. 이러한 IKK-저해물질은 A549 세포에서 IL-1 $\beta$ -매개된 보호 효과를 용량-의존성으로 차단할 수 있는 반면, EGF에서는 보호 효과가 관찰되지 않는다.

IKK 활성을 모니터링하는 프로토콜은 아래와 같다:

- 1) A549 세포를 접종하고(50,000개 세포/웰) 하룻밤동안 배양한다,
- 2) 이들 세포를 혈청 없는 배지에서 하룻밤동안, 화합물, 다시 말하면, INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체와 함께, 또는 이런 화합물 없이 IL-1 $\beta$ (1 ng/ml) 또는 TNF- $\alpha$ 로 전처리한다,
- 3) 이들 세포를 TNF- $\alpha$ 와 사이클로헥시미드로 8시간동안 처리한다,
- 4) 크리스탈 바이올렛으로 세포 사멸을 모니터링한다.

### 실시예 8 - 동물 모형

INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체의 활성화는 Kamb and Lassota, Drug Discovery Today: Disease Models; Vol. 1, No. 1, 2004, pp. 31-36에 기술된 암 모형, Lahm and Fischer, Drug Discovery Today: Disease Models; Vol. 1, No. 1, 2004, pp. 25-30에 기술된 폐암 모형, 또는 Borm et Bouma, Drug Discovery Today: Disease Models; Vol. 1, No. 4, 2004, pp. 437-443에 기술된 염증성 장 질환 모형에서 확인할 수 있다.

이에 더하여, 본 발명의 폴리펩티드의 활성은 아래의 검사법 중에서 적어도 한가지로 입증할 수 있다.

- a. INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체는 정상 세포와 암 세포의 증식 또는 생존을 조절할 수 있다, 또는
- b. INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체는 ConA 검사법에서 IL-2 분비를 조절할 수 있다(실시예 6), 또는
- c. INSP201-EC, 이의 융합체 또는 INSP201을 표적하는 항체는 A549 세포, 인간 폐 암종 세포에서 IKK2 활성을 조절할 수 있다(실시예 7).

### 도면의 간단한 설명

도 1: NetNGlyc 1.0을 이용한, INSP201에 대한 당화 부위 예측.

도 2: INSP201 cDNA와 단백질 서열. 클로닝에 이용되는 PCR 프라이머의 위치는 화살표로 표시된다. 예측된 세포외 도메인은 회색으로 강조된다.

도 3: INSP201EC PCR 산물의 뉴클레오티드 서열과 이의 번역.

도 4: 주요 조직 집합에 대한 INSP201-EC의 Taqman 분석(표 2).

도 5: 비교 조직에 대한 INSP201-EC의 Taqman 분석(표 3).

도 6: 다양한 염증성 장 질환(IBD) 생검에 대한 INSP201-EC의 Taqman 분석(표 7).

도 7: ConA-자극된 PBMC로부터 IL-2 분비의 INSP201-EC 저해. X 축은 AS902132/2 농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타낸다. Y-축은 사이토킨 분비(IL-2)의 비율을 나타낸다.

도면

도면1a

NetNGlyc 1.0을 이용한, INSP201에 대한 당화 부위 예측.

# 1 서열에서 N-당화 부위에 대한 예측

Name: hg16\_dna\_1 Length: 518

```

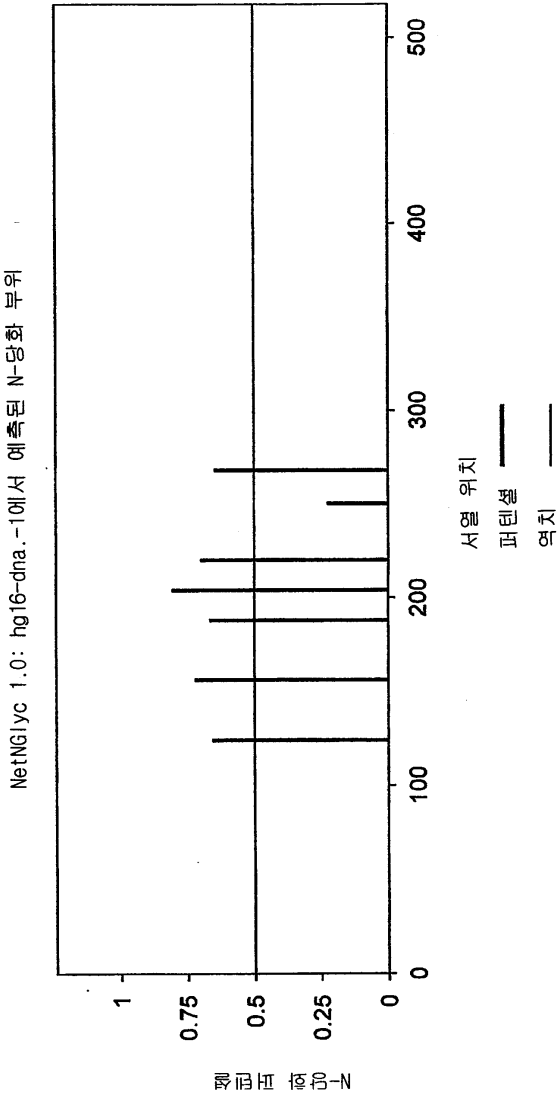
MKSFSRILFLVFLLAGLRKAAPSAPLPLCCGFPDMAHPSETSPKGCASENSKRDRLNPEFPGTPYPEPSKLPHTVSLET 80
FPLDFTPEPLNPDLRRETPHPESPETPKADSLTTSISESLDMPKTNLSKMAHPESSETPTPGPTMPHPGSPETPKPNFSKT 160
SRPEFPETPNYDLMQTTTPQESPEILQLNATEVVSQAELEPSTNTNPTKTPDPKSPKHDNLNSTETPNSEFLQALHPDPSKT 240
PHPEFHVTHNPSPTEISQTEFPTTYQNATDVPRTSQISTSLYPETPVVFKDDATLNLNPKPGTPAAIQPDSPK 320
LPTSDSPGMVELKAPQNSGPKESNVPPPSARIAGPPALGPRPSQLAPATLRAPQRHSRGEGVNTIIIVVERVKETGVTLVG 400
RPRGAAGGALCLFFAGTALLIGIFVLLWCLYRRAARQRPFAHRLPDDGDEPVLHLDAPKDPYDLYFYAPDTWVPSHIAT 480
KQPPPTPPLPKLPPPPRGRQPRLKALSPATLPNNFV
..... 80
.....N.....N..... 160
.....N.....N.....N..... 240
.....N..... 320
..... 400
..... 480
.....

```

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury	NGlyc
agreement result				
hg16_dna_1	124	NLSK	0.6568	(9/9) ++
hg16_dna_1	156	NPSK	0.7230	(9/9) ++
hg16_dna_1	188	NATE	0.6670	(9/9) ++
hg16_dna_1	204	NPTK	0.8066	(9/9) +++ WARNING: PRO-X1.
hg16_dna_1	220	NSTE	0.7010	(9/9) ++
hg16_dna_1	250	NPSP	0.2278	(9/9) ---
hg16_dna_1	268	NATD	0.6469	(9/9) ++

도면1b



도면2a

1 gtgggcgtgg cctccgggag tgggcggggc tcttgggagc cttcggcctt aaccttccctt  
61 ttcccgcctct cccccgcagc tatagggtatc tgccagagct atgaatacat tcagccggat  
m k s f s r

121 cctcttctctc gtcttctctcc tcgcgcggcct gaggtccaag gccgcctccct cagccctctt  
i l f l v f l l a g l r s k a a p s a p  
INS201-CP1

181 gcctttgggc tgtgcgtttc cggacatggc ccacccctct gagacttccc ctctgaaggg  
l p l g c g f p d m a h p s e t s p l k

241 tgcttctgaa aattccaac gagatgcct taaccagaa ttctctggga ctctttacc  
g a s e n s k r d r l n p e f p g t p y

301 tgagccttcc aagetacctc atacgggttc cctggaaacc ttcccacttg acttcaactg  
p e p s k l p h t v s l e t f p l d f t

361 gccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag tctcctgaga ccccaaaagc  
e p l n p d l r e t p h p e s p e t p k

421 tgactcactc acaacctcaa tatcagaate cctggacatg cccaaaacta acctctccaa  
a d s l t t s i s e s l d m p k t n l s

481 aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc ccaactgaaa tgccacaccc  
k m a h p e s s e t p t p g p t e m p h

541 aggatccctt gagaccccca aaactaactt ctccaaaact tcacgcccag aatttctga  
p g s p e t p k p n f s k t s r p e f p

도면2b

601 gaccccaaac actgacctta tgcaaaactac accccaagaa tcccagaga ttctgcagt  
e t p n t d l m q t t p q e s p e i l q

661 taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc tcaaacacta accctacaa  
l n a t e v s q a e l p e t s n t n p t

721 gacccttgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac tccactgaga ccccaaatc  
k t p d p k s p e k h d l n s t e t p n

781 tgaattttctc caagctctcc atctgaccc ttctaaaacc ccccaccag aatcccatgt  
s e f l q a l h p d p s k t p h p e s h

841 gaccacaaat ccagcccca ccgaatttc ccaaacagaa ttccccacaa cctactacca  
v t h n p s p t e i s q t e f p t t y y

901 aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga cctccaate tccactagt tctaccaga  
q n a t d v p r t s d p q i s t s l y p

961 aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgetctaat gagctgtccc tgaatcccaa  
e t p v p f k d d a t a l n e l s l n p

1021 accaggaaca cctgcagcca tccagccga ctccccaaaa ttgccactt cagattctcc  
k p g t p a a i q p d s p k l p t s d s

1081 aggaatgggt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct aaggagtcca acgtccctcc  
p q m v e l k a p q n s g p k e s n v p

도면2c

1141 tccctcagcc cggattgcag gtcccccctgc tcttccaggg cgccccagtc agttggcccc  
p p s a r i a g p p a l p g r p s q l a

1201 tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag ggagtcaca ccatcactgt  
p a t l r a p q r h s r g e g v n t i i

1261 ggtagagcga gtgaaggaga ccggcgtgac tctggtaggg cgaccacgtg gcgcagcag  
v v e r v k e t g v t l v g r p r g a a  
← INSP201-CP2

1321 cggggccctc tgctgttct tcgcggggac cgcgctgctg atcgcatctt ttgtgtgct  
g g a l c l f f a g t a l l i g i f v l

1381 gtggtgtctt taccgccggg cagctagaca gcggcccttc gcacatcacc ggcttcggga  
l w c l y r r a a r q r p f a h h r l p

1441 cgacggagat gaaccggttc tgcatttga cgcgccgaaa gaccctacg acctctactt  
d d g d e p v l h l d a p k d p y d l y

1501 ttatgtccg gatacctggg tcccttccca catgccacc aagcagcccc cgcccacacc  
f y a p d t w v p s h i a t k q p p p t

1561 tctctgccca ccaaagctgc cccgcgcgc ccgcgggggt cgcgcgcagc gtctggagga  
p p l p p k l p p p p r g g r p q r l e

1621 cctgtcccc gccacgtcc ccaacaactt cgtgtgagcc ccaccgagtt ctgccggacc  
a l s p a t l p n n f v

1681 tgcacatccc cacagtgaag gaaaaccctg cgcttctggt atgcttagct agagtagtgc

1741 ccggataaa gg

PCR 프라이머의 위치와 센스 →



도면3a

1 atgaaatcat tcagccggat cctcttcttc gtcttctctc tcgcccggcct gaggtccag  
m k s f s r i l f l v f l l a g l r s k  
INSP201-CP1

61 gccgctccct cagcccctct gcctttgggc tgtggtcttc cggacatggc ccaccctct  
a a p s a p l p l g c g f p d m a h p s

121 gagacttccc ctctgaaggg tgcttctgaa aattccaaac gagatcgct taaccagaa  
e t s p l k g a s e n s k r d r l n p e

181 ttctctggga ctcttacc ctagccttcc aagctacctc atacggttcc cctggaaacc  
f p g t p y p e p s k l p h f v s l e t

241 ttcccacttg acttactga gccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag  
f p l d f t e p l n p d l r e t p h p e

301 tctctgaga ccccaaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg  
s p e t p k a d s l t t s i s e s l d m

361 cccaaaacta acctctccaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc  
p k t n l s k m a h p e s s e t p t p g

421 ccaactgaaa tgccacaccc aggatccct gagaccccca aacctaactt ctccaaact  
p t e m p h p g s p e t p k p n f s k t

481 tcacgcccag aatttctga gaccccaaac actgacctta tgcaactac accccaagaa  
s r p e f p e t p n t d l m q t t p q e

541 tccccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc  
s p e i l q l n a t e v s q a e l p e t

601 tcaaacacta acctactcaa gaccctgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac  
s n t n p t k t p d p k s p e k h d l n

661 tccactgaga ccccaaacct tgaatttctc caagctctcc atctgaccc ttctaaaacc  
s t e t p n s e f l q a l h p d p s k t

721 cccaccccag aatcccattg gaccacaat ccagacccca ccgaaatttc ccaaacagaa  
p h p e s h v t h n p s p t e i s q t e

도면3b

```

781  ttccccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga ccctcaaatc
      f p t t y y q n a t d v p r t s d p q i

841  tccactagtc tctaccaga aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgctctaaat
      s t s l y p e t p v p f k d d a t a l n

901  gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaaa
      e l s l n p k p g t p a a i q p d s p k

961  ttgccactt cagattctcc aggaatggtt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct
      l p t s d s p g m v e l k a p q n s g p

1021 aaggagtcca acgccccctc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttccaggg
      k e s n a p p p s a r i a g p p a l p g

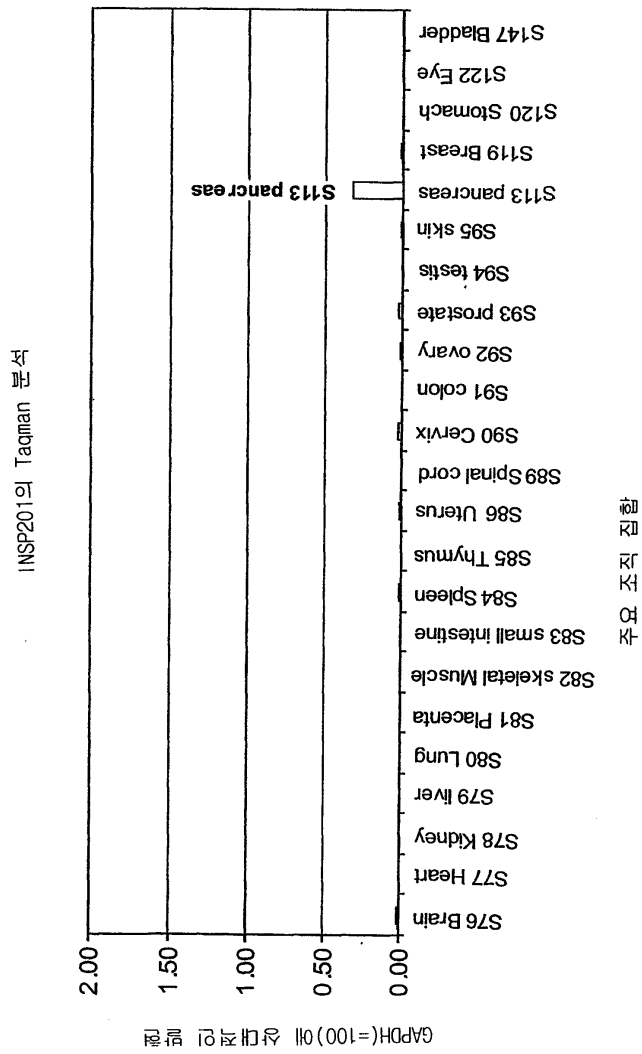
1081 cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag
      r p s q l a p a t l r a p q r h s r g e

1141 ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccggcgtgac tctggtgggg
      g v n t i i v v e r v k e t g v t l v g
      ←-----
      INSP201-CP2

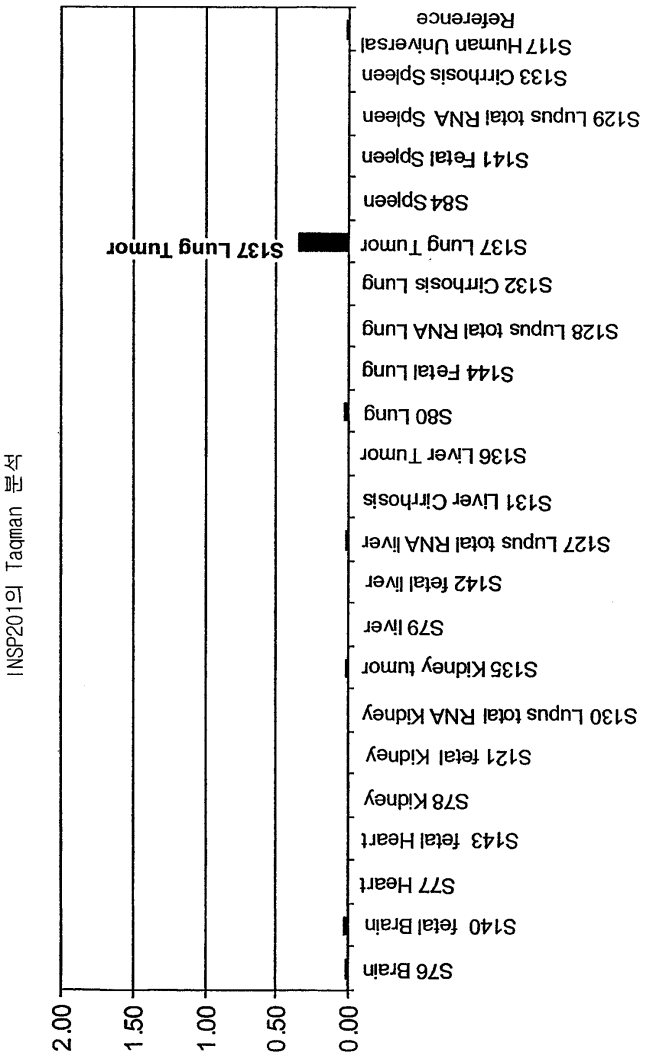
1201 cgaccacgtg gcgca
      r p r g a
      -----
  
```

PCR 프라이머의 위치와 센스 →

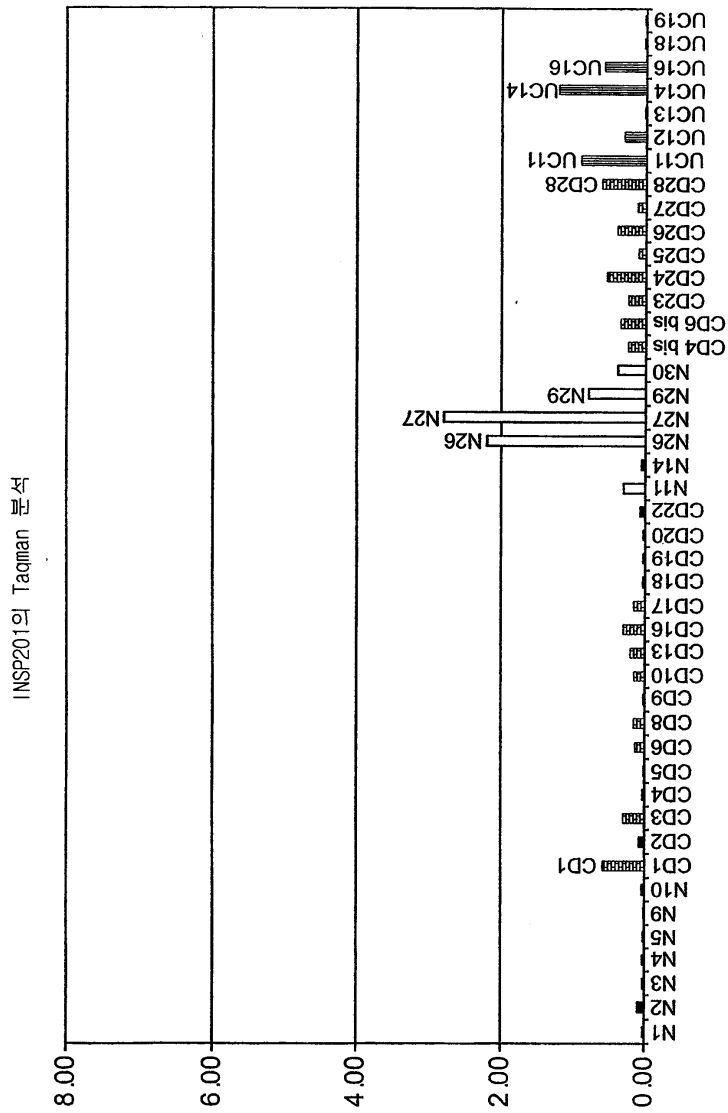
도면4



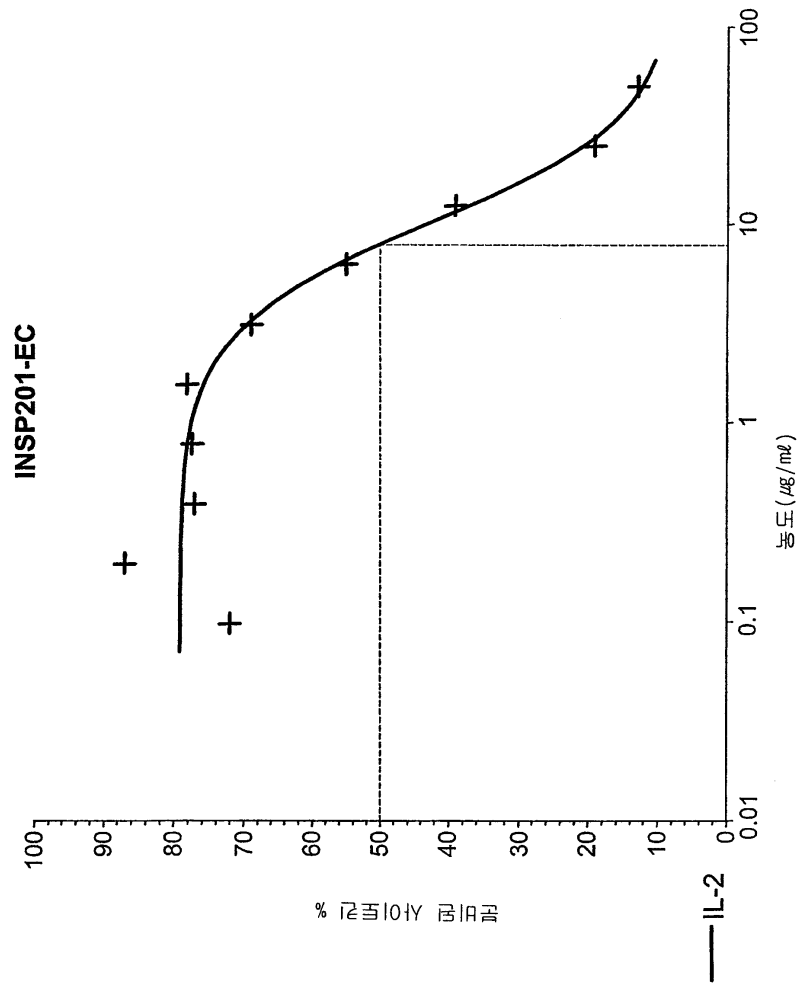
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ARES TRADING S.A.

<120> PROTEIN

<130> P038518WO

<150> GB0417887.7

<151> 2004-08-11

<160> 30

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 1183

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaaatcat tcagccggat cctcttctct gtcttctctc tcgcccgcct gaggtccaag    60
gccgctccct cagccccctct gcctttgggc tgtggctttc cggacatggc ccacccctct    120
gagacttccc ctctgaaggg tgcttctgaa aattccaaac gagatcgctt taaccagaa    180
tttctgggga ctcttacctc tgagccttcc aagctacctc atacggtttc cctggaaacc    240
ttcccacttg acttcaactga gcccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag    300
tctctgaga ccccaaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg    360
cccaaaacta acctctccaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc    420
ccaactgaaa tgccacaccc aggatccctt gagaccccca aacctaactt ctccaaaact    480
tcacgccagc aatttctctga gaccccaaac actgacctta tgcaaactac accccaagaa    540
tccccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggagaact ccccgagacc    600
tcaaactact accctaccaa gacccctgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac    660
tccactgaga ccccaaactc tgaatttctc caagctctcc atcctgacct ttctaaaacc    720
ccccaccagc aatccccatgt gacccacaat cccagcccca ccgaaatttc ccaaacagaa    780
ttccccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga ccctcaaact    840
tccactagtc tctaccaga aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgctctaaat    900
gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaaa    960
ttgccacttt cagattctcc aggaatgggt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct    1020
aaggagtcca acgtccctcc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttccaggg    1080
cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag    1140
ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccg                    1183

```

<210> 2

<211> 395

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Lys Ser Phe Ser Arg Ile Leu Phe Leu Val Phe Leu Leu Ala Gly
1              5              10              15

Leu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly
              20              25              30

Phe Pro Asp Met Ala His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala
              35              40              45

Ser Glu Asn Ser Lys Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr
              50              55              60

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

Phe Pro Leu Asp Phe Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr
              85              90              95

Pro His Pro Glu Ser Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr
              100             105             110

Ser Ile Ser Glu Ser Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met

```

115	120	125
Ala His Pro Glu Ser Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met		
130	135	140
Pro His Pro Gly Ser Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr		
145	150	155 160
Ser Arg Pro Glu Phe Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr		
	165	170 175
Thr Pro Gln Glu Ser Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val		
	180	185 190
Ser Gln Ala Glu Leu Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr		
	195	200 205
Pro Asp Pro Lys Ser Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr		
	210	215 220
Pro Asn Ser Glu Phe Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr		
	225	230 235 240
Pro His Pro Glu Ser His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile		
	245	250 255
Ser Gln Thr Glu Phe Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val		
	260	265 270
Pro Arg Thr Ser Asp Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr		
	275	280 285
Pro Val Pro Phe Lys Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu		
	290	295 300
Asn Pro Lys Pro Gly Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys		
	305	310 315 320
Leu Pro Thr Ser Asp Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln		
	325	330 335
Asn Ser Gly Pro Lys Glu Ser Asn Val Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile		
	340	345 350
Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala		
	355	360 365
Thr Leu Arg Ala Pro Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr		
	370	375 380
Ile Ile Val Val Glu Arg Val Lys Glu Thr Gly		
	385	390 395



<210> 3  
 <211> 174  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 gcgtgactct ggtggggcga ccacgtggcg cagcaggcgg ggccctctgc ctgttcttcg 60  
 cggggaccgc gctgctgata ggcattcttg tgctgctgtg gtgtctttac cgccgggcag 120  
 ctagacagcg gcccttcgca catcaccggc ttccggacga cggagatgaa ccgg 174

<210> 4  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Val Thr Leu Val Gly Arg Pro Arg Gly Ala Ala Gly Gly Ala Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Phe Ala Gly Thr Ala Leu Leu Ile Gly Ile Phe Val Leu Leu  
 20 25 30  
 Trp Cys Leu Tyr Arg Arg Ala Ala Arg Gln Arg Pro Phe Ala His His  
 35 40 45  
 Arg Leu Pro Asp Asp Gly Asp Glu Pro Val  
 50 55

<210> 5  
 <211> 197  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 ttctgcattt ggacgccccg aaagaccctt acgacctcta cttttatgct ccggatacct 60  
 ggggtcccttc ccacatcgcc accaagcagc ccccgcccaac acctcctctg ccaccaaagc 120  
 tgcccccgcc gccccgcggg ggctcgccgc agcgtcttga ggccctgtcc cccgccacgc 180  
 tccccaaaca cttcgtg 197

<210> 6  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Leu His Leu Asp Ala Pro Lys Asp Pro Tyr Asp Leu Tyr Phe Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Thr Trp Val Pro Ser His Ile Ala Thr Lys Gln Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Thr Pro Pro Leu Pro Pro Lys Leu Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gly Arg

35

40

45

Pro Gln Arg Leu Glu Ala Leu Ser Pro Ala Thr Leu Pro Asn Asn Phe  
50 55 60

Val  
65

<210> 7  
<211> 1554  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
atgaaatcat tcagccggat cctcttctctc gtcttctctcc tcgcccggcct gaggtccaag 60  
gccgctccct cagcccctct gcctttgggc tgtggctttc cggacatggc ccacccctct 120  
gagacttccc ctctgaaggg tgcttctgaa aattccaaac gagatcgct taaccagaa 180  
tttctggga ctcttacctc tgagccttcc aagctacctc atacggtttc cctggaaacc 240  
ttcccacttg acttactga gcccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag 300  
tctctgaga ccccaaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg 360  
cccaaaacta acctctccaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc 420  
ccaactgaaa tgccacaccc aggatccct gagaccccca aacctaactt ctccaaaact 480  
tcacgcccag aatttctga gaccccaaac actgacctta tgcaaactac accccaagaa 540  
tcccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc 600  
tcaaacta accctacca gacccctgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac 660  
tccactgaga ccccaaactc tgaatttctc caagctctcc atcctgacct ttctaaaacc 720  
ccccaccag aatcccattg gaccacaaat ccagaccca ccgaaatttc ccaaacagaa 780  
ttcccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga cctcaaate 840  
tccactagtc tctaccaga aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgctctaaat 900  
gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaaa 960  
ttgcccactt cagattctcc aggaatggtt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct 1020  
aaggagtcca acgtccctcc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttccaggg 1080  
cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag 1140  
ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccggcgtgac tctgggtggg 1200  
cgaccacgtg gcgcagcagg cggggccctc tgctgttct tcgcggggac cgcgctgctg 1260  
atcggcattt ttgtgtgct gtggtgtctt taccgcccgg cagctagaca gcggcccttc 1320  
gcacatcacc ggcttccgga cgacggagat gaaccggttc tgcatttgga cgccccgaaa 1380  
gacccctacg acctctactt ttatgtctcg gatacctggg tcccttccca catcgccacc 1440  
aagcagcccc cgccacacc tctctgcca ccaaagctgc ccccgccgcc ccgcgggggg 1500  
cgcccgagc gtctggaggc cctgtccccc gccacgctcc ccaacaactt cgtg 1554

<210> 8  
<211> 518  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Met Lys Ser Phe Ser Arg Ile Leu Phe Leu Val Phe Leu Leu Ala Gly  
1 5 10 15

Leu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly  
20 25 30

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

[illegible]

gctccctcag	ccctctgcc	tttgggctgt	ggctttccg	acatggccca	ccctctgag	60
acttccctc	tgaagggtgc	ttctgaaaat	tccaaacgag	atcgcttaa	cccagaattt	120
cctgggactc	cttacctga	gccttccaag	ctacctcata	cggtttccct	ggaaaccttc	180
ccacttgact	tcactgagcc	cctcaaccct	gacctccgag	aaaccccgca	cccagagtct	240
cctgagaccc	caaagctga	ctcactcaca	acctcaatat	cagaatccct	ggacatgcc	300

```

aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360
actgaaatgc cacaccagc atccccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420
cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480
ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540
aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600
actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660
caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttccca aacagaattc 720
cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtacccagga cctccgaccc tcaaattctc 780
actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840
ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgaact cccaaaattg 900
cccacttcag attctccagg aatgggttgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960
gagtccaacg tccctcctcc ctcagcccgg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020
cccagtcagt tggcccctgc cactctgcgg gcacccaga ggcacagccg aggtgagggg 1080
gtcaacacca tcatcgtggt ggagcgagtg aaggagaccg 1120

```

<210> 10  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
 1 5 10 15  
 His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
 20 25 30  
 Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
 35 40 45  
 Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr Pro His Pro Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr Ser Ile Ser Glu Ser  
 85 90 95  
 Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met Ala His Pro Glu Ser  
 100 105 110  
 Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met Pro His Pro Gly Ser  
 115 120 125  
 Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr Ser Arg Pro Glu Phe  
 130 135 140  
 Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr Thr Pro Gln Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Gln Ala Glu Leu

165	170	175
Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr Pro Asp Pro Lys Ser		
180	185	190
Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr Pro Asn Ser Glu Phe		
195	200	205
Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr Pro His Pro Glu Ser		
210	215	220
His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile Ser Gln Thr Glu Phe		
225	230	235
Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val Pro Arg Thr Ser Asp		
245	250	255
Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr Pro Val Pro Phe Lys		
260	265	270
Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu Asn Pro Lys Pro Gly		
275	280	285
Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys Leu Pro Thr Ser Asp		
290	295	300
Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln Asn Ser Gly Pro Lys		
305	310	315
Glu Ser Asn Val Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile Ala Gly Pro Pro Ala		
325	330	335
Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala Thr Leu Arg Ala Pro		
340	345	350
Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr Ile Ile Val Val Glu		
355	360	365
Arg Val Lys Glu Thr Gly		
370		

<210> 11  
 <211> 1491  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 gctccctcag cccctctgcc tttgggctgt ggctttccgg acatggccca cccctctgag 60  
 acttcccctc tgaagggtgc ttctgaaaat tccaaacgag atcgccttaa cccagaattt 120  
 cctgggactc cttaccctga gccttccaag ctacctcata cggtttccct ggaaaccttc 180  
 ccacttgact tctactgagcc cctcaaccct gacctccgag aaaccccgca cccagagtct 240  
 cctgagaccc ccaaagctga ctactcaca acctcaatat cagaatccct ggacatgcc 300

```

aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360
actgaaatgc cacaccagg atccccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420
cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480
ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540
aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600
actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660
caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttccca aacagaattc 720
cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtacccagga cctccgacct tcaaattctc 780
actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840
ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgactc cccaaaattg 900
cccacttcag attctccagg aatgggttgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960
gagtccaacg tccctcctcc ctcagcccgg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020
cccagtcagt tggcccctgc cactctgagg gcacccaga ggcacagccg aggtgagggg 1080
gtcaacacca tcatcggtgt ggagcgagtg aaggagaccg gcgtgactct ggtggggcga 1140
ccacgtggcg cagcaggcg ggccctctgc ctgttcttcg cggggaccgc gctgctgac 1200
ggcatctttg tgctgctgtg gtgtctttac cgccgggcag ctagacagcg gcccttcgca 1260
catcaccggc ttccggacga cggagatgaa ccggttctgc atttggaagc cccgaaagac 1320
ccctacgacc tctactttta tgctccggat acctgggtcc cttcccatat cgccaccaag 1380
cagccccgc ccacacctc tctgccacca aagctgcccc cgccgccccg cgggggtcgc 1440
ccgcagcgtc tggaggccct gtcccccgcc acgtcccca acaacttcgt g 1491

```

<210> 12  
 <211> 497  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
 1 5 10 15  
 His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
 20 25 30  
 Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
 35 40 45  
 Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr Pro His Pro Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr Ser Ile Ser Glu Ser  
 85 90 95  
 Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met Ala His Pro Glu Ser  
 100 105 110  
 Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met Pro His Pro Gly Ser  
 115 120 125  
 Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr Ser Arg Pro Glu Phe

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



Arg Pro Phe Ala His His Arg Leu Pro Asp Asp Gly Asp Glu Pro Val  
420 425 430

Leu His Leu Asp Ala Pro Lys Asp Pro Tyr Asp Leu Tyr Phe Tyr Ala  
435 440 445

Pro Asp Thr Trp Val Pro Ser His Ile Ala Thr Lys Gln Pro Pro Pro  
450 455 460

Thr Pro Pro Leu Pro Pro Lys Leu Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gly Arg  
465 470 475 480

Pro Gln Arg Leu Glu Ala Leu Ser Pro Ala Thr Leu Pro Asn Asn Phe  
485 490 495

Val

<210> 13  
<211> 1215  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
atgaaatcat tcagccggat cctcttctctc gtcttctctcc tcgccggcct gaggtccaag 60  
gccgctccct cagcccctct gcctttgggc tgtggctttc cggacatggc ccaccctct 120  
gagacttccc ctctgaaggg tgcttctgaa aattccaaac gagatcgct taaccagaa 180  
tttctgga ctccttacct tgagccttcc aagctacctc atacggtttc cctggaaacc 240  
ttccacttg acttactga gcccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag 300  
tctcctgaga ccccaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg 360  
cccaaaacta acctctccaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc 420  
ccaactgaaa tgccacaccc aggatccccct gagacccccca aacctaactt ctccaaaact 480  
tcacgcccag aatttctctga gaccccaaac actgacctta tgcaaactac accccaagaa 540  
tccccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc 600  
tcaaacta accctacca gaccctgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac 660  
tccactgaga ccccaaactc tgaatttctc caagctctcc atcctgacct ttctaaaacc 720  
ccccaccag aatcccatgt gaccacaaat ccagccccca ccgaaatttc ccaaacagaa 780  
ttccccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga ccctcaaact 840  
tccactagtc tctaccaga aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgctctaaat 900  
gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaaa 960  
ttgcccactt cagattctcc aggaatggtt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct 1020  
aaggagtcca acgtccctcc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttccaggg 1080  
cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag 1140  
ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccggcgtgac tctgggtggg 1200  
cgaccacgtg gcgca 1215

<210> 14  
<211> 405  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Lys Ser Phe Ser Arg Ile Leu Phe Leu Val Phe Leu Leu Ala Gly  
1 5 10 15

Leu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly  
20 25 30

Phe Pro Asp Met Ala His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala  
35 40 45

Ser Glu Asn Ser Lys Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr  
50 55 60

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

Phe Pro Leu Asp Phe Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr  
85 90 95

Pro His Pro Glu Ser Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr  
100 105 110

Ser Ile Ser Glu Ser Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met  
115 120 125

Ala His Pro Glu Ser Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met  
130 135 140

Pro His Pro Gly Ser Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr  
145 150 155 160

Ser Arg Pro Glu Phe Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr  
165 170 175

Thr Pro Gln Glu Ser Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Glu Leu Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr  
195 200 205

Pro Asp Pro Lys Ser Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr  
210 215 220

Pro Asn Ser Glu Phe Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr  
225 230 235 240

Pro His Pro Glu Ser His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile  
245 250 255

Ser Gln Thr Glu Phe Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val  
260 265 270

Pro Arg Thr Ser Asp Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr

275

280

285

Pro Val Pro Phe Lys Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu  
290 295 300

Asn Pro Lys Pro Gly Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys  
305 310 315 320

Leu Pro Thr Ser Asp Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln  
325 330 335

Asn Ser Gly Pro Lys Glu Ser Asn Val Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile  
340 345 350

Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala  
355 360 365

Thr Leu Arg Ala Pro Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr  
370 375 380

Ile Ile Val Val Glu Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly  
385 390 395 400

Arg Pro Arg Gly Ala  
405

<210> 15  
<211> 270  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
tgtctttacc gccgggcagc tagacagcgg cccttcgcac atcaccggct tccggacgac 60  
ggagatgaac cggttctgca tttggacgcc ccgaaagacc cctacgacct ctacttttat 120  
gctccggata cctgggtccc ttccacatc gccaccaagc agccccgcc cacacctcct 180  
ctgccaccaa agctgcccc gccgccccgc gggggtcgcc cgcagcgtct ggaggccctg 240  
tccccgcga cgctcccca caacttcgtg 270

<210> 16  
<211> 90  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Cys Leu Tyr Arg Arg Ala Ala Arg Gln Arg Pro Phe Ala His His Arg  
1 5 10 15

Leu Pro Asp Asp Gly Asp Glu Pro Val Leu His Leu Asp Ala Pro Lys  
20 25 30

Asp Pro Tyr Asp Leu Tyr Phe Tyr Ala Pro Asp Thr Trp Val Pro Ser  
35 40 45

His Ile Ala Thr Lys Gln Pro Pro Pro Thr Pro Pro Leu Pro Pro Lys  
50 55 60

Leu Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gly Arg Pro Gln Arg Leu Glu Ala Leu  
65 70 75 80

Ser Pro Ala Thr Leu Pro Asn Asn Phe Val  
85 90

<210> 17  
<211> 1152  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
gctccctcag cccctctgcc tttgggctgt ggctttccgg acatggccca cccctctgag 60  
acttcccctc tgaagggtgc ttctgaaaat tccaaacgag atcgccctta cccagaattt 120  
cctgggactc cttaccctga gccttccaag ctacctcata cggtttccct ggaaaccttc 180  
ccacttgact tcaactgagc cctcaacctt gacctccgag aaaccccgca cccagagtct 240  
cctgagaccc ccaaagctga ctcaactaca acctcaatat cagaatccct ggacatgccc 300  
aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360  
actgaaatgc cacaccagag atccccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420  
cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480  
ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540  
aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600  
actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660  
caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttccca aacagaattc 720  
cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtaccagga cctccgacct tcaaattctc 780  
actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840  
ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgactc cccaaaattg 900  
cccacttcag attctccagg aatgggttgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960  
gagtccaacg tccctcctcc ctcaagccgg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020  
cccagtcagt tggcccctgc cactctgcgg gcacccaga ggcacagccg aggtgagggg 1080  
gtcaacacca tcatcgtggt ggagcgagtg aaggagaccg gcgtgactct ggtggggcga 1140  
ccacgtggcg ca 1152

<210> 18  
<211> 384  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18  
Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
1 5 10 15

His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
20 25 30

Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
35 40 45

Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe

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

Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala Thr Leu Arg Ala Pro  
340 345 350

Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr Ile Ile Val Val Glu  
355 360 365

Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly Arg Pro Arg Gly Ala  
370 375 380

<210> 19  
<211> 1183  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
atgaaatcat tcagccggat cctcttcctc gtcttcctcc tcgccggcct gaggtccaag 60  
gccgctccct cagcccctct gcctttgggc tgtggctttc cggacatggc ccacccctct 120  
gagacttccc ctctgaaggg tgctttctgaa aattccaaac gagatcgctt taaccagaa 180  
tttctgaggc ctctttaccc tgagccttcc aagctacctc atacggtttc cctggaaacc 240  
ttcccaactg acttcaactga gcccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag 300  
tctcctgaga ccccaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg 360  
cccaaaacta acctctccaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc 420  
ccaactgaaa tgccacaccc aggatccccct gagacccccca aacctaactt ctccaaaact 480  
tcaggccagc aatttcctga gaccccaaac actgacctta tgcaaactac accccaagaa 540  
tccccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc 600  
tcaaactacta accctacca gacccctgac cccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac 660  
tccactgaga ccccaaactc tgaattttctc caagctctcc atcctgacct ttctaaaacc 720  
ccccaccagc aatcccatgt gaccacacat cccagcccca ccgaaatttc ccaaacagaa 780  
ttccccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga ccctcaaate 840  
tccactagtc tctaccaga aacacctgtg cccttcaagg atgacgccac tgctctaaat 900  
gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaaa 960  
ttgcccactt cagattctcc aggaatgggt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct 1020  
aaggagtcca acgcccctcc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttcaggg 1080  
cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag 1140  
ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccg 1183

<210> 20  
<211> 395  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

Ser Glu Asn Ser Lys Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr  
50 55 60

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

Phe Pro Leu Asp Phe Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr  
85 90 95

Pro His Pro Glu Ser Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr  
100 105 110

Ser Ile Ser Glu Ser Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met  
115 120 125

Ala His Pro Glu Ser Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met  
130 135 140

Pro His Pro Gly Ser Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr  
145 150 155 160

Ser Arg Pro Glu Phe Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr  
165 170 175

Thr Pro Gln Glu Ser Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Glu Leu Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr  
195 200 205

Pro Asp Pro Lys Ser Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr  
210 215 220

Pro Asn Ser Glu Phe Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr  
225 230 235 240

Pro His Pro Glu Ser His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile  
245 250 255

Ser Gln Thr Glu Phe Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val  
260 265 270

Pro Arg Thr Ser Asp Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr  
275 280 285

Pro Val Pro Phe Lys Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu  
290 295 300

Asn Pro Lys Pro Gly Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys  
305 310 315 320

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

325 330 335

Asn Ser Gly Pro Lys Glu Ser Asn Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile  
340 345 350

Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala  
355 360 365

Thr Leu Arg Ala Pro Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr  
370 375 380

Ile Ile Val Val Glu Arg Val Lys Glu Thr Gly  
385 390 395

<210> 21  
<211> 1215  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 21

atgaaatcat	tcagccggat	cctcttcctc	gtcttcctcc	tcgccggcct	gaggtccaag	60
gccgctccct	cagcccctct	gcctttgggc	tgtggctttc	cggacatggc	ccaccctct	120
gagacttccc	ctctgaagg	tgcttctgaa	aattccaaac	gagatcgct	taaccagaa	180
tttctggga	ctccttacc	tgagccttc	aagctacctc	atacggttc	cctggaaacc	240
ttcccacttg	acttcaactga	gcccccaac	cctgacctcc	gagaaacccc	gcaccagag	300
tctcctgaga	cccccaaac	tgactcactc	acaacctcaa	tatcagaatc	cctggacatg	360
cccaaaaacta	acctctccaa	aatggcacac	ccagagtctt	ctgagacccc	cacacctggc	420
ccaactgaaa	tgccacaccc	aggatccct	gagaccccc	aacctaaactt	ctccaaaact	480
tcacgccag	aatttcctga	gaccccaaac	actgacctta	tgcaaactac	acccaagaa	540
tccccagaga	ttctgcagct	taatgccact	gaagtctcac	aggcagaact	ccccgagacc	600
tcaaacacta	accctacca	gacccctgac	cccaaattccc	cagaaaagca	tgacctcaac	660
tccactgaga	ccccaaactc	tgaatttctc	caagctctcc	atcctgacct	ttctaaaacc	720
ccccaccag	aatcccatgt	gacccacaat	cccagcccc	ccgaaatttc	ccaaacagaa	780
ttccccacaa	cctactacca	aaatgcaaca	gatgtacca	ggacctccga	ccctcaaact	840
tccactagtc	tctaccaga	aacacctgtg	cccttcaagg	atgacgccac	tgctctaaat	900
gagctgtccc	tgaatcccaa	accaggaaca	cctgcagcca	tccagcccga	ctccccaaaa	960
ttgccactt	cagattctcc	aggaatgggt	gagctgaagg	ccccccagaa	ctctggccct	1020
aaggagtcca	acgcccctcc	tccctcagcc	cggattgcag	gtccccctgc	tcttcagggt	1080
cgccccagtc	agttggcccc	tgccactctg	cgggcacccc	agaggcacag	ccgaggtgag	1140
ggagtcaaca	ccatcatcgt	ggtggagcga	gtgaaggaga	ccggcgtgac	tctggtgggg	1200
cgaccacgtg	gcgca					1215

<210> 22  
<211> 405  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Met	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Ala	Gly
1				5				10						15	

Leu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly



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

Asn Pro Lys Pro Gly Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys  
305 310 315 320

Leu Pro Thr Ser Asp Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln  
325 330 335

Asn Ser Gly Pro Lys Glu Ser Asn Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile  
340 345 350

Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala  
355 360 365

Thr Leu Arg Ala Pro Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr  
370 375 380

Ile Ile Val Val Glu Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly  
385 390 395 400

Arg Pro Arg Gly Ala  
405

<210> 23  
<211> 1554  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 23  
atgaaatcat tcagccggat cctcttcctc gtcttcctcc tcgccggcct gaggtccaag 60  
gccgctccct cagcccctct gcctttgggc tgtggctttc cggacatggc ccaccctct 120  
gagacttccc ctctgaaggg tgcttctgaa aattccaaac gagatcgct taaccagaa 180  
tttctgggga ctcttaccc tgagccttc aagctacctc atacggtttc cctggaaacc 240  
ttcccacttg acttcaactga gcccctcaac cctgacctcc gagaaacccc gcaccagag 300  
tctcctgaga ccccaaagc tgactcactc acaacctcaa tatcagaatc cctggacatg 360  
cccaaaacta acctctcaa aatggcacac ccagagtctt ctgagacccc cacacctggc 420  
ccaactgaaa tgccacaccc aggatccct gagaccccca aacctactt ctccaaaact 480  
tcacgccag aatttcctga gaccccaaac actgacctta tgcaaaactac accccaagaa 540  
tcccagaga ttctgcagct taatgccact gaagtctcac aggcagaact ccccgagacc 600  
tcaaacta acctacca gaccctgac ccaaatccc cagaaaagca tgacctcaac 660  
tccactgaga ccccaaactc tgaatttctc caagctctcc atcctgacct ttctaaaacc 720  
ccccaccag aatcccatgt gaccacaaat ccagcccca ccgaaatttc ccaaacagaa 780  
ttcccacaa cctactacca aaatgcaaca gatgtacca ggacctccga ccctcaaact 840  
tccactagtc tctaccaga aacacctgtg ccttcaagg atgacgccac tgctctaaat 900  
gagctgtccc tgaatcccaa accaggaaca cctgcagcca tccagcccga ctccccaaa 960  
ttgcccactt cagattctcc aggaatgggt gagctgaagg cccccagaa ctctggccct 1020  
aaggagtcca acgcccctcc tccctcagcc cggattgcag gtccccctgc tcttcagggt 1080  
cgccccagtc agttggcccc tgccactctg cgggcacccc agaggcacag ccgaggtgag 1140  
ggagtcaaca ccatcatcgt ggtggagcga gtgaaggaga ccggcgtgac tctggtgggg 1200  
cgaccacgtg ggcagcagg cggggccctc tgccgtttct tcgcggggac cgcgctgctg 1260  
atcggcactt ttgtgctgct gtggtgtctt tacgcgggg cagctagaca gcggcccttc 1320  
gcacatcacc ggcttcgga cgacggagat gaaccgggtc tgcatttgga cgccccgaaa 1380  
gaccctacg acctctactt ttatgtctcg gatacctggg tcccttcca catcgccacc 1440  
aagcagcccc cgccacacac tcctctgcca ccaaagctgc cccgcgcgc ccgcgggggt 1500

cgcccgagc gtctggaggc cctgtcccc gccacgctcc ccaacaactt cgtg

1554

<210> 24

<211> 518

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Lys Ser Phe Ser Arg Ile Leu Phe Leu Val Phe Leu Leu Ala Gly  
1 5 10 15

Leu Arg Ser Lys Ala Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly  
20 25 30

Phe Pro Asp Met Ala His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala  
35 40 45

Ser Glu Asn Ser Lys Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr  
50 55 60

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

Phe Pro Leu Asp Phe Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr  
85 90 95

Pro His Pro Glu Ser Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr  
100 105 110

Ser Ile Ser Glu Ser Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met  
115 120 125

Ala His Pro Glu Ser Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met  
130 135 140

Pro His Pro Gly Ser Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr  
145 150 155 160

Ser Arg Pro Glu Phe Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr  
165 170 175

Thr Pro Gln Glu Ser Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val  
180 185 190

Ser Gln Ala Glu Leu Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr  
195 200 205

Pro Asp Pro Lys Ser Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr  
210 215 220

Pro Asn Ser Glu Phe Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr  
225 230 235 240

Pro His Pro Glu Ser His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile  
245 250 255

Ser Gln Thr Glu Phe Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val  
260 265 270

Pro Arg Thr Ser Asp Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr  
275 280 285

Pro Val Pro Phe Lys Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu  
290 295 300

Asn Pro Lys Pro Gly Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys  
305 310 315 320

Leu Pro Thr Ser Asp Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln  
325 330 335

Asn Ser Gly Pro Lys Glu Ser Asn Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile  
340 345 350

Ala Gly Pro Pro Ala Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala  
355 360 365

Thr Leu Arg Ala Pro Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr  
370 375 380

Ile Ile Val Val Glu Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly  
385 390 395 400

Arg Pro Arg Gly Ala Ala Gly Gly Ala Leu Cys Leu Phe Phe Ala Gly  
405 410 415

Thr Ala Leu Leu Ile Gly Ile Phe Val Leu Leu Trp Cys Leu Tyr Arg  
420 425 430

Arg Ala Ala Arg Gln Arg Pro Phe Ala His His Arg Leu Pro Asp Asp  
435 440 445

Gly Asp Glu Pro Val Leu His Leu Asp Ala Pro Lys Asp Pro Tyr Asp  
450 455 460

Leu Tyr Phe Tyr Ala Pro Asp Thr Trp Val Pro Ser His Ile Ala Thr  
465 470 475 480

Lys Gln Pro Pro Pro Thr Pro Pro Leu Pro Pro Lys Leu Pro Pro Pro  
485 490 495

Pro Arg Gly Gly Arg Pro Gln Arg Leu Glu Ala Leu Ser Pro Ala Thr  
500 505 510

Leu Pro Asn Asn Phe Val

515

<210> 25  
<211> 1120  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 25  
gctccctcag cccctctgcc tttgggctgt ggctttccgg acatggccca cccctctgag 60  
acttcccctc tgaagggtgc ttctgaaaat tccaaacgag atcgccttaa cccagaattt 120  
cctgggactc cttaccctga gccttccaag ctacctcata cggtttccct ggaaaccttc 180  
ccacttgact tcaactgagcc cctcaaccct gacctccgag aaaccccgca cccagagtct 240  
cctgagaccc ccaaagctga ctcaactaca acctcaatat cagaatccct ggacatgccc 300  
aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360  
actgaaatgc cacacccagg atccccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420  
cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480  
ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540  
aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600  
actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660  
caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttccca aacagaattc 720  
cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtaccagga cctccgaccc tcaaattctc 780  
actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840  
ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgactc cccaaaattg 900  
cccacttcag attctccagg aatgggttgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960  
gagtccaacg cccctcctcc ctccagccgg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020  
cccagtcagt tggcccctgc cactctgcgg gcacccaga ggcacagccg aggtgaggga 1080  
gtcaacacca tcatcgtggt ggagcgagtg aaggagaccg 1120

<210> 26  
<211> 374  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26  
Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
1 5 10 15  
His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
20 25 30  
Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
35 40 45  
Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe  
50 55 60  
Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr Pro His Pro Glu Ser  
65 70 75 80  
Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr Ser Ile Ser Glu Ser  
85 90 95  
Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met Ala His Pro Glu Ser

100	105	110
Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met Pro His Pro Gly Ser		
115	120	125
Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr Ser Arg Pro Glu Phe		
130	135	140
Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr Thr Pro Gln Glu Ser		
145	150	155
Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Gln Ala Glu Leu		
165	170	175
Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr Pro Asp Pro Lys Ser		
180	185	190
Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr Pro Asn Ser Glu Phe		
195	200	205
Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr Pro His Pro Glu Ser		
210	215	220
His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile Ser Gln Thr Glu Phe		
225	230	235
Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val Pro Arg Thr Ser Asp		
245	250	255
Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr Pro Val Pro Phe Lys		
260	265	270
Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu Asn Pro Lys Pro Gly		
275	280	285
Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys Leu Pro Thr Ser Asp		
290	295	300
Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln Asn Ser Gly Pro Lys		
305	310	315
Glu Ser Asn Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile Ala Gly Pro Pro Ala		
325	330	335
Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala Thr Leu Arg Ala Pro		
340	345	350
Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr Ile Ile Val Val Glu		
355	360	365
Arg Val Lys Glu Thr Gly		
370		

<210> 27  
 <211> 1152  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 gctccctcag cccctctgcc tttgggctgt ggctttccgg acatggccca cccctctgag 60  
 acttcccctc tgaagggtgc ttctgaaaat tccaaacgag atcgcccttaa cccagaattt 120  
 cctgggactc cttaccctga gccttccaag ctacctcata cggtttccct ggaaaccttc 180  
 ccacttgact tctactgagcc cctcaaccct gacctccgag aaaccccgca cccagagtct 240  
 cctgagaccc ccaaagctga ctactcaca acctcaatat cagaatccct ggacatgccc 300  
 aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360  
 actgaaatgc cacaccagc atcccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420  
 cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480  
 ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540  
 aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600  
 actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660  
 caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttcca aacagaattc 720  
 cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtaccaggga cctccgacct tcaaattctc 780  
 actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840  
 ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgactc cccaaaattg 900  
 cccacttcag attctccagg aatgggtgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960  
 gagtccaacg cccctcctcc ctacagcccg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020  
 cccagtcagt tggcccctgc cactctgcgg gcaccccgaga ggcacagccg aggtgagggg 1080  
 gtcaacacca tcatcggtgt ggagcgagtg aaggagaccg gcgtgactct ggtggggcga 1140  
 ccacgtggcg ca 1152

<210> 28  
 <211> 384  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28  
 Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
 1 5 10 15  
 His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
 20 25 30  
 Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
 35 40 45  
 Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr Pro His Pro Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Thr Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr Ser Ile Ser Glu Ser  
 85 90 95  
 Leu Asp Met Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met Ala His Pro Glu Ser

100	105	110
Ser Glu Thr Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met Pro His Pro Gly Ser		
115	120	125
Pro Glu Thr Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr Ser Arg Pro Glu Phe		
130	135	140
Pro Glu Thr Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr Thr Pro Gln Glu Ser		
145	150	155
Pro Glu Ile Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Gln Ala Glu Leu		
165	170	175
Pro Glu Thr Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr Pro Asp Pro Lys Ser		
180	185	190
Pro Glu Lys His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr Pro Asn Ser Glu Phe		
195	200	205
Leu Gln Ala Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr Pro His Pro Glu Ser		
210	215	220
His Val Thr His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile Ser Gln Thr Glu Phe		
225	230	235
Pro Thr Thr Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val Pro Arg Thr Ser Asp		
245	250	255
Pro Gln Ile Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr Pro Val Pro Phe Lys		
260	265	270
Asp Asp Ala Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu Asn Pro Lys Pro Gly		
275	280	285
Thr Pro Ala Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys Leu Pro Thr Ser Asp		
290	295	300
Ser Pro Gly Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln Asn Ser Gly Pro Lys		
305	310	315
Glu Ser Asn Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile Ala Gly Pro Pro Ala		
325	330	335
Leu Pro Gly Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala Thr Leu Arg Ala Pro		
340	345	350
Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr Ile Ile Val Val Glu		
355	360	365
Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly Arg Pro Arg Gly Ala		
370	375	380



<210> 29  
 <211> 1491  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 29  
 gctccctcag cccctctgcc tttgggctgt ggctttccgg acatggccca cccctctgag 60  
 acttcccctc tgaagggtgc ttctgaaaat tccaaacgag atcgccttaa cccagaattt 120  
 cctgggactc cttaccctga gccttccaag ctacctcata cggtttccct ggaaaccttc 180  
 ccacttgact tcaactgagcc cctcaaccct gacctccgag aaaccccgca cccagagtct 240  
 cctgagaccc ccaaagctga ctcaactaca acctcaatat cagaatccct ggacatgccc 300  
 aaaactaacc tctccaaaat ggcacaccca gagtcttctg agacccccac acctggccca 360  
 actgaaatgc cacacccagg atccccctgag acccccaaac ctaacttctc caaaacttca 420  
 cgcccagaat ttcctgagac cccaaacact gaccttatgc aaactacacc ccaagaatcc 480  
 ccagagattc tgcagcttaa tgccactgaa gtctcacagg cagaactccc cgagacctca 540  
 aacactaacc ctaccaagac ccctgacccc aaatccccag aaaagcatga cctcaactcc 600  
 actgagaccc caaactctga atttctccaa gctctccatc ctgacccttc taaaaccccc 660  
 caccagaat cccatgtgac ccacaatccc agccccaccg aaatttccca aacagaattc 720  
 cccacaacct actacaaaaa tgcaacagat gtaccaggga cctccgaccc tcaaattctc 780  
 actagtctct acccagaaac acctgtgccc ttcaaggatg acgccactgc tctaaatgag 840  
 ctgtccctga atcccaaacc aggaacacct gcagccatcc agcccgactc cccaaaattg 900  
 cccacttcag attctccagg aatgggttgag ctgaaggccc cccagaactc tggccctaag 960  
 gagtccaacg cccctcctcc ctccagcccg attgcaggtc cccctgctct tccagggcgc 1020  
 cccagtcagt tggcccctgc cactctgcgg gcaccccaga ggcacagccg aggtgaggga 1080  
 gtcaacacca tcatcgtggt ggagcgagtg aaggagaccg gcgtgactct ggtggggcga 1140  
 ccacgtggcg cagcaggcgg ggccctctgc ctgttcttcg cggggaccgc gctgctgac 1200  
 ggcattcttg tgctgctgtg gtgtctttac cgccgggcag ctagacagcg gcccttcgca 1260  
 catcaccggc ttccggacga cggagatgaa ccggttctgc atttgacgc cccgaaagac 1320  
 ccctacgacc tctactttta tgctccggat acctgggtcc cttcccatat cgccaccaag 1380  
 cagccccgc ccacacctcc tctgccacca aagctgcccc cgccgccccg cgggggtcgc 1440  
 ccgcagcgtc tggaggccct gtcccccgcc acgtcccca acaacttcgt g 1491

<210> 30  
 <211> 497  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 30  
 Ala Pro Ser Ala Pro Leu Pro Leu Gly Cys Gly Phe Pro Asp Met Ala  
 1 5 10 15  
 His Pro Ser Glu Thr Ser Pro Leu Lys Gly Ala Ser Glu Asn Ser Lys  
 20 25 30  
 Arg Asp Arg Leu Asn Pro Glu Phe Pro Gly Thr Pro Tyr Pro Glu Pro  
 35 40 45  
 Ser Lys Leu Pro His Thr Val Ser Leu Glu Thr Phe Pro Leu Asp Phe  
 50 55 60  
 Thr Glu Pro Leu Asn Pro Asp Leu Arg Glu Thr Pro His Pro Glu Ser

65		70		75		80
Pro Glu Thr	Pro Lys Ala Asp Ser Leu Thr Thr Ser Ile Ser Glu Ser					
	85		90		95	
Leu Asp Met	Pro Lys Thr Asn Leu Ser Lys Met Ala His Pro Glu Ser					
	100		105		110	
Ser Glu Thr	Pro Thr Pro Gly Pro Thr Glu Met Pro His Pro Gly Ser					
	115		120		125	
Pro Glu Thr	Pro Lys Pro Asn Phe Ser Lys Thr Ser Arg Pro Glu Phe					
	130		135		140	
Pro Glu Thr	Pro Asn Thr Asp Leu Met Gln Thr Thr Pro Gln Glu Ser					
	145		150		155	160
Pro Glu Ile	Leu Gln Leu Asn Ala Thr Glu Val Ser Gln Ala Glu Leu					
	165		170		175	
Pro Glu Thr	Ser Asn Thr Asn Pro Thr Lys Thr Pro Asp Pro Lys Ser					
	180		185		190	
Pro Glu Lys	His Asp Leu Asn Ser Thr Glu Thr Pro Asn Ser Glu Phe					
	195		200		205	
Leu Gln Ala	Leu His Pro Asp Pro Ser Lys Thr Pro His Pro Glu Ser					
	210		215		220	
His Val Thr	His Asn Pro Ser Pro Thr Glu Ile Ser Gln Thr Glu Phe					
	225		230		235	240
Pro Thr Thr	Tyr Tyr Gln Asn Ala Thr Asp Val Pro Arg Thr Ser Asp					
	245		250		255	
Pro Gln Ile	Ser Thr Ser Leu Tyr Pro Glu Thr Pro Val Pro Phe Lys					
	260		265		270	
Asp Asp Ala	Thr Ala Leu Asn Glu Leu Ser Leu Asn Pro Lys Pro Gly					
	275		280		285	
Thr Pro Ala	Ala Ile Gln Pro Asp Ser Pro Lys Leu Pro Thr Ser Asp					
	290		295		300	
Ser Pro Gly	Met Val Glu Leu Lys Ala Pro Gln Asn Ser Gly Pro Lys					
	305		310		315	320
Glu Ser Asn	Ala Pro Pro Pro Ser Ala Arg Ile Ala Gly Pro Pro Ala					
	325		330		335	
Leu Pro Gly	Arg Pro Ser Gln Leu Ala Pro Ala Thr Leu Arg Ala Pro					
	340		345		350	

Gln Arg His Ser Arg Gly Glu Gly Val Asn Thr Ile Ile Val Val Glu  
355 360 365

Arg Val Lys Glu Thr Gly Val Thr Leu Val Gly Arg Pro Arg Gly Ala  
370 375 380

Ala Gly Gly Ala Leu Cys Leu Phe Phe Ala Gly Thr Ala Leu Leu Ile  
385 390 395 400

Gly Ile Phe Val Leu Leu Trp Cys Leu Tyr Arg Arg Ala Ala Arg Gln  
405 410 415

Arg Pro Phe Ala His His Arg Leu Pro Asp Asp Gly Asp Glu Pro Val  
420 425 430

Leu His Leu Asp Ala Pro Lys Asp Pro Tyr Asp Leu Tyr Phe Tyr Ala  
435 440 445

Pro Asp Thr Trp Val Pro Ser His Ile Ala Thr Lys Gln Pro Pro Pro  
450 455 460

Thr Pro Pro Leu Pro Pro Lys Leu Pro Pro Pro Arg Gly Gly Arg  
465 470 475 480

Pro Gln Arg Leu Glu Ala Leu Ser Pro Ala Thr Leu Pro Asn Asn Phe  
485 490 495

Val