



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월23일  
(11) 등록번호 10-1623355  
(24) 등록일자 2016년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7004449  
(22) 출원일자(국제) 2010년08월02일  
심사청구일자 2015년07월28일  
(85) 번역문제출일자 2012년02월21일  
(65) 공개번호 10-2012-0063474  
(43) 공개일자 2012년06월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/IL2010/000621  
(87) 국제공개번호 WO 2011/016026  
국제공개일자 2011년02월10일  
(30) 우선권주장  
200202 2009년08월02일 이스라엘(IL)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20070020624 A1  
US20080206231 A1  
US20070020624 A1  
US20080206231 A1

(73) 특허권자  
투 투 바이오테크 리미티드  
이스라엘 예루살렘 97350 네베 야코브 스트리트  
508/24  
(72) 발명자  
샌들러 타마라  
이스라엘 예루살렘 97350 네베 야코브 스트리트  
508/24  
데버리 오를리  
이스라엘 예루살렘 97460 라모트 로젠블라트 스트리트  
318/7  
(74) 대리인  
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 신규 단백질

(57) 요약

본원에서 4가지의 폴리펩티드, 즉 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8, 그것을 암호화하는 핵산, 그 단백질을 포함하는 조성물뿐만 아니라 치료 및 진단 방법에서 그것의 사용이 제공된다. 이 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체 및 그것의 사용이 또한 제공된다. 각 단백질의 특징화는 PRT5 및 PRT8이 글루코오스 대사에 수반되고, PRT6가 안드로겐 조절에 수반되는 한편, PRT7은 암과 관련된다는 것을 나타내었다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) SEQ ID NO: 4에 제시된 아미노산 서열; 또는 (b) SEQ ID NO: 4와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 구성되는 분리된 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 글루코오스 대사를 향상시키는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO: 4에 제시된 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 3

SEQ ID NO: 8에 제시된 뉴클레오티드 서열로 구성되는, 제 2 항에 따른 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

#### 청구항 4

제 3 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 5

제 1 항에 정의된 분리된 폴리펩티드와 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 글루코오스 대사-관련 장애 치료용 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 글루코오스 대사-관련 장애의 치료에서 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 글루코오스 대사-관련 장애는 당뇨병인 것을 특징으로 하는 분리된 폴리펩티드.

#### 청구항 9

SEQ ID NO: 4에 제시된 아미노산 서열로 구성되는 분리된 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 단백질, 그것을 암호화하는 핵산 및 그것을 포함하는 조성물, 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체뿐 아니라 치료 및 진단 방법에서 그것들의 사용에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0002] 이 섹션의 논의는 본 발명에 대한 "선행 기술"로서 자격이 있는 대상에 한정되지 않는다. 따라서 이러한 선행 기술 상태의 허가는 본 논의의 특정 대상의 포함을 이유로 내포 또는 암시될 수 없고, 본 발명자의 관심에 대한 선언은 이러한 포함을 이유로 내포될 수 없다.
- [0003] 본 출원을 통해 언급되는 모든 간행물은 그것에 인용되는 모든 참고를 포함하여, 참고로써 본원에 완전하게 포함된다.
- [0004] 조직-특이적 단백질 및 그것의 발현 수준은 질병의 경우에 치료를 위한 잠재적인 표적일 뿐만 아니라 유기체의 건강 상태에 대한 뛰어난 지표일 수 있다.
- [0005] 인간에 영향을 미치는 질병은 그것의 원인의 메커니즘에 따르는 범주로 분류된다. 예를 들어, 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병은 전염성 질병, 급성 및 만성 염증 질병, 암, 이식 및 자가면역 질병을 포함한다.
- [0006] 용어 염증성 장 질환(IBD)은 아마도 그 자체의 장 조직에 대해 신체의 면역 반응의 결과로서, 장에 염증이 생기는(붓고 부어 있음) 장애의 그룹을 포함하고, 따라서 자가-면역 질환으로 생각된다.
- [0007] 염증성 질병은 패혈증, 내독소혈증, 궤장염, 포도막염, 간염, 복막염, 각막염, SIRS 및 상처-유발 염증을 포함한다.
- [0008] 생식력과 관련된 질병은 남성 불임 및 여성 불임을 포함한다. 여성 불임은 다양한 문제에 의해 야기될 수 있다. 일부 더 흔한 장애는 하기에 열거한다:
- [0009] - 결함있는 정자 생산: 남성 불임의 90%는 충분한 정자를 만들지 못함으로써 야기된다. 무정자증은 정자가 만들어지지 않을 때 일어나는 한편, 정자부족증은 정자가 거의 만들어지지 않을 때 진단된다;
- [0010] - 정계정맥류;
- [0011] - 기타 장애: 남성 불임을 야기할 수 있는 기타 장애는 고환의 비정상적 발달 또는 손상(내분비 장애 또는 염증에 의해 야기), 생식기부속선의 장애, 성교장애, 남성 생식관에서 낭종을 야기한 1950년대 및 1960년대에 사용된 합성 에스트로겐 디에틸stil베스트롤(DES)에 노출, 불강하 고환, 및 드문 경우에 염색체 이상과 같은 유전적 장애를 포함한다.
- [0012] 테스토스테론 결핍증의 발생에 대한 기여 인자는 다음을 포함한다:
- [0013] - 약물치료, 특히 우울증 또는 정신 장애를 치료하기 위해 사용되는 것;
- [0014] - 알코올 중독 ;
- [0015] - 고환을 표적으로 하거나 손상시키는 암의 화학요법 또는 방사선 치료;
- [0016] - 만성 질환;
- [0017] - 뇌하수체(뇌로부터 고환까지 호르몬 생성을 조절하는 물질을 만드는 뇌의 선)의 기능장애;
- [0018] - 혈액소침착증 (혈액 중에 철이 너무 많음);
- [0019] - 성선기능저하증 (고환이 충분히 높은 수준의 테스토스테론을 만들 수 없을 때, 또한 안드로젠 결핍증으로 알려짐, 또는 정자를 만들 수 없을 때, 또한 정자형성으로도 알려짐);
- [0020] - 염증성 질환, 예컨대 유육종증(고환의 상처 또는 감염을 유발하는 질환);
- [0021] - 면역계를 위태롭게 하는 AIDS와 같은 병;
- [0022] - 부신계에 부담을 주는 과량의 스트레스.
- [0023] 여성 불임이 또한 다양한 문제에 의해 야기될 수 있다. 일부 더 흔한 장애는 다낭성난소질환, 골반염, 배란기능부전, 자궁근종, 자궁내막증 및 면역적 불임이다.
- [0024] 탄수화물 대사의 장애는 다양한 형태로 일어난다. 가장 흔한 장애는 후천적이다. 당뇨병성 케톤산증, 고장성 혼수, 및 저혈당증과 같은 탄수화물 대사의 후천적 또는 2차적 교란은 모두 중추신경계에 영향을 미친다. 말초신경 질병의 다양한 형태 및 변이체가 또한 당뇨병에서 보인다. 탄수화물 대사산물이 남아있는 장애는 대사의 회

귀한 선천성 이상이다(즉, 유전적 결함).

- [0025] 탄수화물 대사의 후천적 장애는 미국 및 전세계적으로 꽤 흔하다. 저혈당증은 알코올 중독자와 인슐린으로 치료되는 당뇨병이 있는 환자 중에서, 신경질병, 특히 급성 정신황폐, 기억상실, 방향상실, 둔감, 및 혼수의 통상적인 원인이다. 다른 원인의 고인슐린혈증은 드물지만, 췌장 종양이 원인이 될 수 있었다. 다양한 신경 합병증이 있는 당뇨병은 성인 환자에서 치료되어야 하는 가장 흔한 질환이다.
- [0026] 당뇨병(진성 당뇨병)은 가장 흔한 내분비성 질환이며, 글루코오스 대사의 이상을 특징으로 한다. 이 질병과 관련된 비정상적 글루코오스 대사는 고혈당증(높은 혈액 글루코오스 수준)을 초래하며, 종국적으로 눈, 신장, 신경 및 혈관을 포함하는 다양한 기관계의 합병증을 야기한다. 가장 흔하게는 환자들은 처음에 과도한 배뇨(다뇨증)와 극심한 갈증에 기인하는 빈번한 음용(조갈증)이 있지만, 지속되는 고혈당증 또는 비정상적 내당능이 있는 환자는 일반적으로 질병이 있는 것으로 진단된다. 이 전형적인 초기 증상은 고혈당증의 삼투 효과로부터 초래된다.
- [0027] 당뇨병의 발병은 전형적으로 췌장 기능장애, 특히 췌장의 랑게르한스섬의 베타세포와 관련된다. 이 기능장애는 글루코오스 조절 펩티드 호르몬인 인슐린을 만드는 섬의 베타세포의 파괴를 유발할 수 있다. 당뇨병은 일반적으로 인슐린 의존성 또는 I형, 대 비-인슐린 의존성, 또는 II형으로서 범주화되었다.
- [0028] 주된 3가지 형태 또는 당뇨병은:
- [0029] - I형: 인슐린을 만드는 신체의 이상으로부터 초래. 치료는 보통 인슐린 투여를 수반한다.
- [0030] - II형: 신체가 인슐린을 적절하게 사용하지 못하며, 상대적인 인슐린 결핍증과 조합된 질환으로부터 초래. II형 당뇨병이 발생할 것으로 예정된 다수의 사람들은, 사람의 혈액 글루코오스 수준이 정상보다 높지만 II형 당뇨병에 대해서 만큼 충분히 높지는 않을 때 생기는 질환인 전-당뇨병 상태에서 몇 년을 보낸다.
- [0031] - 임신성 당뇨병: 임신전에는 당뇨병에 걸코 걸린 적이 없지만, 임신동안 높은 혈당(글루코오스) 수준을 가지는 임산부는 임신성 당뇨병을 가지는 것으로 언급된다. 임신성 당뇨병은 모든 임산부의 약 4%에 영향을 미친다. 이것은 II형(또는 드물게는 I형)의 발생에 선행할 수 있다.
- [0032] - 다수의 다른 당뇨병 형태는 이것들과 별도로 범주화된다. 예는 인슐린 분비의 유전적 결함에 기인하는 선천적 당뇨병, 낭포성 섬유증-관련 당뇨병, 글루코코르티코이드의 고용량에 의해 유발된 스테로이드 당뇨병, 및 몇몇 형태의 일유전자성 당뇨병을 포함한다.
- [0033] 그러나, 이 용어는 질병을 더 잘 이해하도록 발전되었다. 예를 들어, 비-인슐린 의존성 당뇨병에 걸린 일부 환자에서, 당뇨병이 인슐린 의존성 당뇨병 형태로 진행되는 한편, 다른 환자에서 인슐린 의존성은 발생하지 않는 것이 발견되었다.
- [0034] 따라서 환자들은 종종 섬 파괴 발병의 메커니즘에 대해 범주화되고, I형의 지정은 현재 자가면역 섬 발병, 즉, 섬-특이적 자가면역 공격에 의해 야기되는 당뇨병을 말하는 것으로 사용되고, 본원에서 그렇게 사용된다. 용어 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM)은 췌장 베타 세포의 충분한 자가면역 파괴가 공공연한 증상을 만들도록 발생한 단계로 진행한 I형 당뇨병을 말한다. 용어 전-IDDM은 자가면역 반응의 생검 또는 분석에 의해 검출될 수 있으며, 췌장 섬 베타 세포는 일부 세포가 파괴될 수 있는 정도로 특이적 자가면역 공격을 받는다. 그러나 전-IDDM에서, 파괴는(만약에 있다면) 인슐린의 투여를 필요로 하기에 충분한 정도로 진행되지 않았다. 공공연한 증상이 관찰되지만 일부 섬 기능이 남아있는("허니문 기간"으로서 알려짐) I형 당뇨병의 초기 단계에 있는 지점이 있을 수 있기 때문에, 모든 I형 당뇨병이 IDDM으로서 분류되는 것은 아니고, 모든 전-IDDM이 공공연한 증상없이 존재하지는 않는다.
- [0035] 인슐린 부족에 의해 야기되는 비정상 대사와 관련된 대사 합병증은 수많은 기관계에 영향을 미칠 수 있다. 가장 흔한 급성 대사 합병증은 심각한 고혈당증(및 결과 삼투성 이뇨에 의해 야기되는 저혈량증)을 특징으로 하는 당뇨병성 케톤산증뿐만 아니라 과량의 자유 지방산 방출 및 케톤체의 생성에 의해 유발되는 대사성산증이다.
- [0036] 케톤산증의 급성 대사 합병증에 더하여, 당뇨병 환자는 상당한 사망률 및 조기사망을 야기하는 일련의 후기 합병증에 민감하다. 아테롬성 동맥 경화증은 글루코오스와 지질 대사 이상의 결과로서 일반 모집단에서보다 당뇨병 환자에게서 더 광범위하고 더 빨리 일어난다. 이 혈관 병리는 특히 관상동맥질환, 뇌졸중, 및 괴저가 있는 말초혈관질환을 유발할 수 있다. 망막병증은 당뇨병의 다른 혈관 합병증이다. 당뇨병성 망막병증은 실명을 야기하며, 폐색, 출혈, 동맥류 형성, 및 증식성 망막병증으로서 알려진 신혈관 형성으로 진행할 수 있는 망막 모세관



의 증가된 투과성에 의해 시작된다.

- [0037] 상기 언급한 바와 같이, 혈액 글루코오스의 정확한 조절은 I형 당뇨병의 후기 합병증의 완화와 관련되며, 베타 세포 기능의 보존 또는 복구는 질병의 주된 병적 합병증을 감소 또는 제거시킬 수 있다는 것을 제안한다.
- [0038] 탄수화물 대사의 유전적 장애는 드물다. 오타당뇨증으로 불리는 피루브산 탈수소효소(PDH) 착물 및 양성 화학물질 이상의 심각한 결함이 매우 적은 환자들(2-6명)에게서 보고되었다.
- [0039] 저혈당증, 당뇨병 케톤산증, 및 고장성 혼수는 잠재적으로 치명적이지만 잠재적으로 치료가능한 질환이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0040] 본 연구에서, 본 발명자들은 본 발명의 목적인 신규 분비 단백질, 즉 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8을 발견하였다. 본 발명은 또한 상기 단백질을 포함하는 조성물뿐만 아니라 치료에서 그것의 사용을 제공한다. 본원에서 설명되는 신규 단백질을 특이적으로 인식하는 항체뿐만 아니라 진단 및 치료에서 그것의 사용은 또한 본 발명의 대상이다.
- [0041] 본 발명의 이것 및 다른 용도는 설명을 진행함에 따라 명확해질 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0042] 본 발명의 대상은 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 또는 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에 의해 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드, 및 그것의 단편, 그것의 유도체 또는 유사체를 제공하는 것이다. 상기 폴리펩티드는 케모카인-유사 분비 단백질이며, 또한 본원에서 각각 PRT5, PRT6, PRT7, 또는 PRT8로서 언급된다.
- [0043] 유사하게, 본 발명의 대상은 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7, 또는 PRT8 중 임의의 하나를 포함하는 분리된 단백질, 및 그것의 임의의 단편, 유도체 또는 유사체를 제공하는 것이다.
- [0044] 본 발명의 추가 대상은 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 중 임의의 하나를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자 및 그것의 단편, 유도체, 및 유사체를 제공하는 것이다.
- [0045] 본 발명의 추가 대상은 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 중 임의의 하나를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이며, 상기 핵산 분자는 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 상기 벡터는 발현벡터이다. 게다가 상기 벡터를 포함하는 세포는 본 발명에 의해 제공된다.
- [0046] 본 발명의 추가 대상은 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 중 임의의 하나, 및 그것의 임의의 단편, 유도체, 또는 유사체를 포함하는 조성물, 또는 그것을 포함하는 단백질을 제공하는 것이다. 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] PRT5 또는 PRT8 또는 그것의 생물학적으로 활성인 단편 또는 유도체를 포함할 때, 본 발명에 의해 제공되는 상기 조성물은, 예컨대 글루코오스 대사를 향상시키고, 인슐린 수용체 발현을 유발하고, 원형질막에 Glut-4의 전좌를 유발하고, 글루코오스 유입 및/또는 글리코겐 합성을 유발하고, 및 해당과정 및 지방산 합성을 유발하는 특정 치료 용도를 가질 수 있고, 또는 상기 조성물은 글루코오스 대사-관련 장애, 당뇨병, 대사증후군, 비만, 내분비 질환, 및 근육 장애로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0048] PRT6 또는 그것의 생물학적으로 활성인 단편 또는 유도체를 포함할 때, 본 발명에 의해 제공되는 상기 조성물은 테스토스테론 생성을 향상시키는 것과 같은 특정 치료 용도를 가질 수 있고, 또는 테스토스테론 결핍 또는 저 테스토스테론-관련 장애의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0049] 대안으로, PRT7 또는 그것의 생물학적으로 활성인 단편 또는 유도체를 포함할 때, 본 발명에 의해 제공되는 상기 조성물은 p53 발현, 아포토시스 또는 세포 사멸을 유발하는 것과 같은 특이적 효과를 가질 수 있고, 또는 암의 치료에서 치료적 사용을 가진다.
- [0050] 본 발명의 다른 추가 대상은 질병 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명에서 설명되는 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 중 임의의 하나의 사용을 제공하는 것이며, 상기 질병 또는 질환은 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질병, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애, 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비 질환, 및 근육 장애를 가지는 질병

으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0051] 또한 본 발명의 추가 대상은 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8, 또는 그것을 포함하는 단백질, 또는 그것을 포함하는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 피험자에서 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질병, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애, 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비 질환, 및 근육 장애를 가지는 질병으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0052] 또한 본 발명의 추가 대상은 항체, 또는 그것의 단편 또는 유도체를 제공하는 것이며, 상기 항체는 분리된 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 중 하나, 또는 그것의 단편 또는 유도체, 또는 그것을 포함하는 단백질을 특이적으로 인식할 수 있는 것이다. 본 발명은 또한 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 또는 항-PRT8 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 그것의 치료적 및 진단적 사용을 포함한다.

[0053] 마지막으로, 본 발명은 질병 또는 장애의 진단 및/또는 치료 효능의 모니터링 및/또는 예후를 평가하기 위한 진단 키트를 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질병, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애로 구성되는 군으로부터 선택되고, 상기 키트는 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 또는 항-PRT8 항체 중 적어도 하나 또는 그것을 포함하는 조성물; 및 샘플에서 항원의 존재의 검출을 수행하기 위한 설명서를 포함하고, 상기 항원은 상기 항체에 의해 특이적으로 인식된다. 상기 키트는 다음의 구성요소 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다: 시험되는 샘플을 수집하기 위한 적어도 하나의 수단; 상기 항체에 의해 상기 항원의 상기 인식의 검출에 필요한 적어도 하나의 시약; 및 적어도 하나의 대조군 샘플.

## 도면의 간단한 설명

[0054] 도 1a-1d: 글루코오스 수준에서 PRT5의 효과

도 1a: 2mg/kg의 글루코오스를 주입하고, PRT5 주입 1일 후 시점 0.5, 1.5, 2, 2.5 및 4시간(hr)에 측정된 C57Bl 마우스의 혈액 중의 글루코오스 농도(mg/dL)를 나타내는 그래프.

도 1b: 2mg/kg의 글루코오스를 주입하고, PRT5 주입 2일 후 시점 0.5, 1 및 2 시간(hr)에 측정된 C57Bl 마우스의 혈액 중의 글루코오스 농도 (mg/dL)를 나타내는 그래프.

도 1c: 2mg/kg의 글루코오스를 주입하고, PRT5 주입 3일 후 시점 0.5, 1 및 2 시간(hr)에 측정된 C57Bl 마우스의 혈액 중의 글루코오스 농도 (mg/dL)를 나타내는 그래프.

도 1d: 2mg/kg의 글루코오스를 주입하고, PRT5 주입 4일 후 시점 0.5, 1 및 2 시간(hr)에 측정된 C57Bl 마우스의 혈액 중의 글루코오스 농도 (mg/dL)를 나타내는 그래프.

범례: -◇- 식염수; -■- 1  $\mu$ g/kg PRT5; -▲- 5 $\mu$ g/kg PRT5; Sal.=식염수; Gluc.=글루코오스; T.inj.= 글루코오스 주입 후 시간.

도 2a-2b: 건강한 개체 및 당뇨병 환자로부터 인간 혈장 중의 PRT5 수준

도 2a: 8명의 건강한 개체 및 9명의 II형 당뇨병 환자에서 PRT5의 수준 (pg/ml)을 나타내는 히스토그램. 샘플을 1:3으로 희석하였고, 항-PRT5 항체를 1:250으로 희석하였다.

도 2b: 건강한 개체 대 II형 당뇨병 환자에서 PRT5(pg/ml)의 수준을 나타내는 히스토그램. 샘플을 1:3으로 희석하였고, 항-PRT5 항체를 1:250으로 희석하였다.

범례: H.= 건강한 개체; T.II Diab.= II형 당뇨병.

도 3a-3b: 테스토스테론 수준에서 PRT6의 효과

도 3a: 테스토스테론 검량선.

도 3b: 물 중의 4% DMSO, 0.5 $\mu$ g/kg의 PRT6, 또는 5  $\mu$ g/kg의 PRT6로 4일 동안 처리한 마우스의 혈액 혈청(1:10으로 희석한 혈액) 중의 테스토스테론(ng/ml)의 수준을 나타내는 히스토그램(그룹 당 6마리 마우스).

범례: Test. conc.= 테스토스테론 농도; Test.= 테스토스테론; Treat.= 처리군; w.o.= 주령.

도 4a-4f: 췌장 및 폐 암 환자의 PRT7 수준

**도 4a:** 건강한 개체(9개 샘플)와 비교하여 췌장암 환자(10 환자, 암 단계는 하기 각 컬럼에 나타내었다)에서 PRT7(pg/ml) 수준을 나타내는 히스토그램.

**도 4b:** 각각 수컷 및 암컷의 췌장암 환자 대 건강한 개체에서 PRT7(pg/ml)의 평균 수준을 나타내는 히스토그램.

**도 4c:** 건강한 개체(5 샘플)와 비교하여 췌장암 환자에서(5 환자, 암 단계는 하기의 각 컬럼에 나타내었다) 단지 수컷으로부터의 샘플 중에서 PRT7 (pg/ml)의 수준을 나타내는 히스토그램).

**도 4d:** 췌장암 환자 대 건강한 개체의, 단지 수컷에서 PRT7 수준(pg/ml)의 평균 수준을 나타내는 히스토그램.

**도 4e:** 건강한 개체(9 샘플)와 비교하여 폐암 환자(9 샘플)에서 PRT7 (pg/ml)의 수준을 나타내는 히스토그램.

**도 4f:** 폐암 환자 대 건강한 개체의 각각 수컷 및 암컷에서 PRT7 (pg/ml)의 평균 수준을 나타내는 히스토그램.

범례: H.= 건강; PC=췌장암; C. st.= 암 단계; LC= 폐 암; m.= 남성; f.= 여성.

#### **도 5a-5b: 글루코오스 수준에서 PRT8의 효과**

**도 5a:** 시점 30, 60, 및 120 분에 PRT8 주입 2일 후 측정된 2mg/kg의 글루코오스를 주입한 C57B1 마우스의 글루코오스 수준을 나타내는 그래프.

**도 5b:** 시점 30, 60, 및 120 분에 2mg/kg의 글루코오스를 주입한 PRT8 주입 3일 후 측정된 C57B1 마우스 중의 글루코오스 수준을 나타내는 그래프.

범례: -◇- 식염수; -■- 1  $\mu$ g/kg PRT8; -▲- 10  $\mu$ g/kg PRT8; Sal.= 식염수; Gluc.= 글루코오스; T.= 글루코오스 주입 후 시간.

#### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0055] 본 발명자들은, 모두 적어도 하나의 신호 펩티드 도메인을 포함하며, 이것들이 분비된다는 것을 나타내는 신규 단백질, 또는 케모카인-유사 단백질을 분리하였다.
- [0056] 따라서 폴리펩티드 서열 분석은 신규 분리 단백질이 케모카인과 유사한 구조적 특징을 가진다는 것을 나타내며, 이것들은 리간드형 또는 케모카인형 단백질이라는 것을 나타낸다.
- [0057] PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 알려진 이 신규 분리 단백질은 본 발명의 대상이다. 본원에서 언급되는 모든 폴리펩티드는 무료 도메인 소프트웨어(SignalP from CBS, Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark)에 의해 및 내부용으로 개발된 소프트웨어에 의해(데이터 미제시) 확인되는 바와 같이 중요한 신호 펩티드 서열로 존재한다.
- [0058] 다른 단백질의 발현 패턴은 본원의 하기 실시예에서 나타낸다. 간략하게, PRT5는 특히 췌장 및 고환, 및 또한 비장, 난소 및 소장에서 발견된다(실시예 1). PRT6는 특히 고환에서 발견된다(실시예 4). PRT7은 특히 태아뇌, 또한, 간, 골격근 및 성인 뇌에서 발견되었다(실시예 6). 마지막으로, PRT8은 특히 췌장 및 고환, 및 또한 간에서 발견되었다(실시예 8).
- [0059] 서열 비교는 새로-확인된 단백질과 지금까지 설명한 임의의 다른 단백질 사이의 상동성을 나타내지 않았다.
- [0060] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 케모카인-유사 분비 단백질로서 특징을 가지는 분리된 폴리펩티드를 제공하며, 상기 폴리펩티드는 SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, 및 SEQ ID NO. 4 중 임의의 하나에 의해 표시되는 아미노산 서열뿐만 아니라 그것의 단편, 유사체 및 유도체를 포함한다.
- [0061] 용어 "폴리펩티드"는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타내는 것으로 본원에서 사용된다. 폴리펩티드는 유전자 조작 방법, 숙주 세포 내 발현을 통해, 또는 임의의 다른 적당한 수단을 통해 합성적으로 얻어질 수 있다.
- [0062] 문헌에서, 용어 "단백질"은 일반적으로 안정한 입체배좌의 완전한 생물학적 분자, 및 그것의 변형을 말하는 것으로 사용된다. 폴리펩티드는 보통 길이와는 상관없이 아미노산의 임의의 단일 선형사슬을 말할 수 있지만, 종종 정의된 입체배좌가 없음을 나타낸다.
- [0063] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드뿐만 아니라 SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, 및 SEQ ID NO. 4에 의해 정의되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 및 그것의 단편, 유사체 및 유도체를 포함하는 단백질을 둘 다 말한다.

- [0064] 달리 표시되지 않는다면, 폴리펩티드는 일반적으로 자연적으로-발생하는 L-아미노산으로 구성된다.
- [0065] 폴리펩티드에 대해 용어 "생물학적 특징"은 완전한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 폴리펩티드에 의해 전달될 수 있는 시험관내 또는 생체내 효과 중 적어도 하나를 전달하는 폴리펩티드의 능력을 말하며, 제한되는 것은 아니지만 본 명세서에서 설명되는 생물학적 활성을 포함한다. 예를 들어, 생물학적 특징은 암, 면역계 관련 질병, 바이러스성 질병 및 염증성 질병을 치료하기 위한 능력을 포함한다.
- [0066] 용어 "비변형 분자와 비교하여 변형된 분자의 생물학적 특징에 상당히 영향을 미치지 않는"은 변형된 분자가 비변형 분자의 생물학적 특징과 질적으로 유사한 생물학적 활성을 보유하는 것을 나타내는 것을 의미한다.
- [0067] 본 발명과 관련하여 변형된 폴리펩티드에 대해, SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 단백질의 생물학적 특징 중 적어도 하나를 보유하는 것으로 이해된다. 폴리펩티드가 비변형 분자의 생물학적 특징과 질적으로 유사한 생물학적 특징을 보유하는지 여부를 결정하기 위해서, 예를 들어, 병행하여 또는 분리되어 수행되는 실험에서 분석되는, 변형된 폴리펩티드를 대응하는 비변형 폴리펩티드(즉, PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 폴리펩티드, 또는 그것의 단편)와 비교하는 시험관내, 생체내 또는 임상 실험과 같은 하나 이상의 분석이 수행되었다.
- [0068] 변형된 폴리펩티드는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 폴리펩티드에 포함되는 적어도 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 또는 적어도 65개의 아미노산 잔기의 대응하는 서열과 동일성의 정도를 가지는 적어도 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 또는 적어도 65개의 아미노산 잔기의 연속하는 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있고, 동일성의 정도는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 90% 및 특히 적어도 95%이다.
- [0069] 또한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8로부터 유래된 폴리펩티드, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 보존적 치환에 의해 다른 아미노산으로 치환되는 변형된 폴리펩티드가 본 발명에 의해 제공된다. 본원에서 사용되는 "보존적 치환"은 한 분류 내 아미노산이 동일 분류의 아미노산으로써 치환되는 것을 말하며, 분류는 통상적인 물리화학적 아미노산 측쇄 특성 및 천연에서 발견되는 상동 단백질 중의 높은 치환 빈도에 의해 정의된다. 아미노산 측쇄의 6가지 일반적 분류는 범주화되고 다음을 포함한다: 클래스 I (Cys); 클래스 II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); 클래스 III (Asn, Asp, Gln, Glu); 클래스 IV (His, Arg, Lys); 클래스 V (Ile, Leu, Val, Met); 및 클래스 VI (Phe, Tyr, Trp). 예를 들어, Asp의 Asn, Gln, 또는 Glu와 같은 다른 클래스 III로 치환은 보존적 치환이다.
- [0070] 한 구체예에서, 아미노산 서열에서 단지 하나의 치환만이 만들어진다.
- [0071] 다른 구체예에서, 2개의 치환이 만들어진다. 추가 구체예에서, 3개의 치환이 만들어진다. 치환의 최대 수는 비치환 서열에서 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산을 남기는 아미노산의 수를 초과하지 않아야 한다. 한 특정 구체예에 의해, 다른 것에 의해 3회 이하, 6회 이하로 치환되는 아미노산 잔기를 포함하는 치환은 보존적 치환이다.
- [0072] 추가 구체예에서, 하나 이상의 아미노산은 D-아미노산, 바람직하게는 대응하는 D-아미노산에 의해 치환될 수 있다. 특정 구체예에서, 모든 아미노산은 D-아미노산이다.
- [0073] 따라서, 본 발명은 실질적으로 동일 또는 더 큰 활성을 가지며 본원에서 개시되는 서열과 구조적으로 유사한 서열을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드가 속하는 것으로 이해된다. 상동성 서열은 전체 아미노산 수의 25% 미만, 바람직하게는 10% 미만으로 결실, 첨가 또는 치환을 가지는 서열을 말한다.
- [0074] 바람직한 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 2차 구조를 변경하지 않을 것으로 기대되는 변화, 즉 보존적 변화이다. 하기 열거는 원래 아미노산(왼쪽)에 대해 교환될 수 있는 아미노산을 나타낸다(오른쪽).

| 원래 잔기 | 대표적인 치환       |
|-------|---------------|
| Ala   | Gly; Ser      |
| Arg   | Lys           |
| Asn   | Gln; His      |
| Asp   | Glu           |
| Cys   | Ser           |
| Gln   | Asn           |
| Glu   | Asp           |
| Gly   | Ala; Pro      |
| His   | Asn; Gln      |
| Ile   | Leu; Val      |
| Leu   | Ile; Val      |
| Lys   | Arg; Gln; Glu |
| Met   | Leu; Tyr; Ile |
| Phe   | Met; Leu; Tyr |
| Ser   | Thr           |
| Thr   | Ser           |
| Trp   | Tyr           |
| Tyr   | Trp; Phe      |
| Val   | Ile; Leu      |

[0075]

[0076]

아미노산은 또한 전하, 측쇄의 크기 등과 같은 그것의 본질적 특징에 따라서 그룹화될 수 있다. 하기 열거는 유사한 아미노산의 그룹을 나타낸다. 바람직한 치환은 하기와 같이, 한 그룹 내 존재하는 아미노산을 동일 그룹의 아미노산으로 교환한다:

[0077]

1. 작고 지방성, 비극성: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

[0078]

2. 극성의 음으로 하전된 잔기 및 그것의 아미드: Asp, Asn, Glu, Gln;

[0079]

3. 극성의 양으로 하전된 잔기: His, Arg, Lys;

[0080]

4. 크고 지방성인 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val, Cys;

[0081]

5. 크고 방향성인 잔기: Phe, Tyr, Trp.

[0082]

아미노산 치환 및 단백질 구조의 추가 언급은 Schulz *et al.*, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, NY, 1979, and Creighton, *T.E.*, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA 1983에서 찾을 수 있다.

[0083]

상술한 바와 같은 바람직한 보존적 아미노산 치환은 하기 본원에서 설명하는 바와 같은 본 발명의 항체에 의해 인식되는 단백질의 기능 또는 활성을 실질적으로 유지 또는 증가시킬 것으로 기대된다. 물론, 임의의 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실은 본 발명의 범주 내인 것으로 고려되며, 결과 단백질 또는 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드는 그것의 본래 기능을 보유한다. 예를 들어, 보존적 치환은 본 발명의 폴리펩티드가 야생형 폴리펩티드를 인식하는 항체에 의해 여전히 인식되는 것이다.

[0084]

본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 고체상 합성과 같은 통상적인 화학적 방법(예를 들어, Fmoc 및 BOC 기법을 사용), 및 용해상 합성에 의해 만들어질 수 있다. 이 단백질 또는 폴리펩티드는 또한 하기 주목하는 Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 16에서 상술하는 바와 같은 박테리아 또는 곤충 세포 또는 다른 진핵 세포 생체 내 시스템에서 생성될 수 있다. 생성 후, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드는 그것들이 만들어진 세포로부터 정제된다. 펩티드 정제 방법은 당업자에게 알려져 있고, 예를 들어, Ausubel *et al.* (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 16, John Wiley and Sons, 2006 및 Coligan *et al.* (eds.), Current Protocols in Protein Science, Chapters 5 and 6, John Wiley and Sons, 2006에서 설명된다. 유리하게는, 단백질 또는 폴리펩티드는 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST) 등과 같은 제2 단백질, 또는 히스티딘 태그(His-tag) 서열과 같은 서열과 융합으로서 생성될 수 있다. 융합 또는 태그된 단백질의 사용은 상기 주목한 Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 16, 및 His-태그 단백질 발현 및 정제 키트에 대한 설명서



에서 설명하는 바와 같은 정제 과정을 단순화한다[예를 들어, Qiagen GmbH, 독일로부터 이용가능].

- [0085] 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 또한, 예를 들어 세포 추출물 또는 리보솜을 사용하여 무세포계에서 합성될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 그것의 기능, 친화도, 또는 안정성을 개선시키도록 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, 고리화는 폴리펩티드 상에서 더 큰 안정성 및/또는 전반적인 개선된 성능을 부여하기 위해 사용될 수 있다. 측쇄 고리화 및 백본 고리화를 포함하는 다수의 다른 고리화 방법이 개발되었다. 이 방법들은 선행기술에 잘 기록되어 있다[예를 들어, Yu *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 7, 161-75, 1999, Patel *et al.*, J. Pept. Res. 53, 68-74, 1999, Valero *et al.*, J. Pept. Res. 53, 56-67, 1999, Romanovskis *et al.*, J. Pept. Res. 52, 356-74, 1998, Crozet *et al.* Mol. Divers. 3, 261-76, 1998, Rivier *et al.*, J. Med. Chem. 41, 5012-9, 1998, Panzone *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 51, 872-9, 1998, Giblin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12814-8, 1998, Limal *et al.*, J. Pept. Res. 52:121-9, 1998, 및 US 5,444,150].
- [0087] 고리화의 특정 방법은 벤젠 환의 파라-치환된 아미노산 유도체를 사용함으로써 양친매성 알파-나선의 안정화를 수반한다[Yu *et al.* (1999) *id ibid*]. 고리화의 다른 특정 방법은 Reissmann *et al.*, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1:51-6, 1994-95, 및 그것의 참고문헌에서 개시된 바와 같은 백본 고리화이다. 측쇄 연결에서 백본을 수반하는 고리화의 다른 방법이 또한 사용될 수 있다[Reissmann *et al.* (1994-95) *id ibid*].
- [0088] 그렇더라도, 본 발명에 따라서 본 발명의 항체에 의해 인식되는 단백질은, 자연적으로 발생하는 또는 합성의 아미노산이 아닌 다양한 동일 또는 다른 유기 모이어터를 가지는 N-말단 및/또는 C-말단에서 연장될 수 있다. 이러한 연장에 대한 예로서, 단백질 또는 폴리펩티드는 N-아세틸기를 가지는 N-말단 및/또는 C-말단에서 연장될 수 있다.
- [0089] 폴리펩티드 구조를 개선시키기 위해, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드는 라우틸-시스테인(LC) 잔기에서 그것의 N-말단을 통해 및/또는 시스테인(C) 잔기에서 그것의 C-말단을 통해, 또는 면역화를 위한 애주번트/들에서 펩티드의 결합에 적당한 다른 잔기/들에서 커플링될 수 있다.
- [0090] 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ. ID. NO.1, SEQ. ID. NO.2, SEQ. ID. NO. 3 또는 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에 의해 나타내는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자, 및 그것의 임의의 단편, 유도체, 및 유사체, 또는 그것의 전장 상보체를 제공한다.
- [0091] 추가로, 본 발명은 유전적 암호의 측중에 기인하여, SEQ. ID. NO.1, SEQ. ID. NO.2, SEQ. ID. NO. 3 또는 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에 의해 나타내는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산 분자로부터의 코돈 서열과 단지 다른 분리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0092] 본원에서 사용되는 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자(예를 들어, cDNA) 및 RNA 분자(예를 들어, mRNA) 및 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 만들어지는 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중가닥 DNA이다.
- [0093] 용어 "분리된 핵산 분자"는 다른 핵산 분자로부터 분리되고, 제조합 기술에 의해 만들어질 때 다른 세포 물질, 또는 배양물 배지가 실질적으로 없는, 또는 화학적으로 합성될 때 화학물질 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 핵산 분자를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0094] 본 발명의 범주 내에서 유도체는 또한 폴리뉴클레오티드 유도체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 유도체는 뉴클레오티드 서열 중에서 설명되거나 또는 알려진 서열과 다르다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 유도체는 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 삽입, 또는 결실을 특징으로 할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 한 양태는 PRT5-, PRT6-, PRT7- 또는 PRT8-암호화 핵산 분자의 증폭 또는 돌연변이를 위한 PCR 프라이머로서 사용을 위한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질-암호화 핵산 분자 (예를 들어, PRT5-, PRT6-, PRT7- 또는 PRT8-암호화 mRNA) 및 단편을 확인하기 위한 혼성 프로브로서 사용하기에 충분한 핵산 단편을 포함한다.
- [0096] 다른 구체예에서, SEQ. ID. NO.1에 의해 표시되는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 5에 의해 표시되는 서열을 포함한다.
- [0097] 추가 구체예에서, SEQ. ID. NO.2에 의해 표시되는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 6에 의해 표시되는 서열을 포함한다.
- [0098] 추가 구체예에서, SEQ. ID. NO.3에 의해 표시되는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자

는 SEQ. ID. NO. 7에 의해 나타내는 서열을 포함한다.

- [0099] 추가 구체예에서, SEQ. ID. NO.4에 의해 표시되는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 8에 의해 표시되는 서열을 포함한다.
- [0100] 본 발명의 핵산 분자, 예를 들어 SEQ ID NO: 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7 또는 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나의 핵산 서열 또는 그것의 부분을 가지는 핵산 분자는 표준 분자 생물학 기법 및 본원에서 제공되는 서열 정보를 사용하여 만들어질 수 있다.
- [0101] 특정 구체예에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO:5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7 또는 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나에서 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0102] 또한 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나에서 나타내는 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 대해 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상의 상동성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0103] 게다가, 본 발명의 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나의 핵산 서열의 부분, 예를 들어, 프라이머로서 사용될 수 있는 단편, 예를 들어 SEQ. ID. NO. 9, SEQ. ID. NO.10, SEQ. ID. NO.11, SEQ. ID. NO.12, SEQ. ID. NO. 13, SEQ. ID. NO. 14, SEQ. ID. NO. 15, 또는 SEQ. ID. NO. 16 중 임의의 하나에 의해 표시되는 서열, 또는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 중 임의의 하나의 부분을 암호화하는 단편, 예를 들어 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질의 임의의 하나의 생물학적으로 활성인 부분만을 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 또는 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나를 포함하는 핵산의 적어도 100개의 연속적인 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0104] PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 뉴클레오티드 서열 중 임의의 하나를 기반으로 하는 프로브는 동일 또는 상동인 단백질을 암호화하는 전사를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 프로브는 본 발명의 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 중 임의의 하나를 발현시키는 세포 또는 조직을 확인하기 위한 진단 테스트 키트의 부분으로서, 예컨대 피험자로부터 세포의 샘플 중에서 PRT5-, PRT6-, PRT7- 또는 PRT8-암호화 핵산의 수준을 측정함으로써, 예를 들어 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 mRNA 수준을 검출함으로써 사용될 수 있다.
- [0105] PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 중 임의의 하나의 "생물학적으로 활성인 부분"을 암호화하는 핵산 단편은 각각 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나의 뉴클레오티드 서열 부분을 분리하는 것에 의해 제조될 수 있고, 이것은 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 생물학적 활성을 가지고, 단백질의 암호화된 부분을 발현시키고(예를 들어 시험관내 재조합 발현에 의해), 단백질의 암호화된 부분의 활성을 평가하는 폴리펩티드를 암호화한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나의 아미노산 서열의 적어도 30개의 연속하는 아미노산 잔기를 포함하는 단편을 암호화한다.
- [0106] 본 발명은 유전자 암호의 측정에 기인하여 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나에서 나타내는 뉴클레오티드 서열과 다른 핵산 분자를 추가로 포함하고, 따라서 각각 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나로 나타내는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것으로서 동일한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질을 암호화한다.
- [0107] 한 구체예에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에서 나타내는 아미노산 서열, 또는 그것의 단편을 가지는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 다른 구체예에서, 본 발명의 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상의 동일성을 가지는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 또는 그것의 단편을 가진다.
- [0108] SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8, 각각에서 나타내는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 뉴클레오티드 서열에 더하여, 당업자는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질의 폴리펩티드 성분의 아미노산 서열에서 변화를 유발하는 DNA 서열 다형성이 모집단 내에 존재할 수 있다는 것을 인식할 것이다. PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 유전자의 폴리펩티드의 이러한 유전적 다형성은 자연적인 대립형질 변이에 기인하여 모집단 내에 존재할 수 있다.
- [0109] 기능적 대립형질 변이체는 전형적으로 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4

중 임의의 하나의 하나 이상의 아미노산의 보존적 치환, 또는 단백질의 비-결정적(non-critical) 영역에서 비-결정적 잔기의 치환, 결실 또는 삽입을 포함할 것이다.

[0110] 비-기능적 대립형질 변이체는 전형적으로 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나의 비-보존적 치환, 결실, 또는 삽입, 또는 조기 절단, 또는 결정적 잔기 또는 단백질의 결정적 영역에서 치환, 삽입, 또는 결실을 함유할 것이다.

[0111] SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나의 단백질과 각각 상동성인 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 분자는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8의 뉴클레오티드 서열에 각각 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 첨가 또는 결실을 도입하는 것에 의해 만들어질 수 있으며, 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가 또는 결실은 암호화된 단백질에 도입된다. 돌연변이는 자리-지정 돌연변이 및 PCR-매개 돌연변이와 같은 표준 기법에 의해 도입될 수 있다. 바람직하게는, 보존적 아미노산 치환은 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 만들어진다.

[0112] 따라서, PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 중 임의의 하나에서 예측된 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 측쇄 패밀리로부터 다른 아미노산 잔기로 치환된다. 대안으로, 다른 구체예에서, 돌연변이는, 예컨대 포화 돌연변이유발에 의해 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 DNA 암호화 서열 중 임의의 하나의 모두 또는 부분을 따라서 무작위적으로 도입될 수 있고, 결과 돌연변이체는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 활성을 보유하는 돌연변이체를 확인하기 위한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 생물학적 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8 중 임의의 하나의 돌연변이유발 후, 암호화된 단백질은 제조합적으로 발현될 수 있고, 단백질의 활성은 결정될 수 있다.

[0113] 2아미노산 서열 또는 2 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해서, 서열은 최상의 비교 목적을 위해 배열될 수 있다(예를 들어, 갭이 제1 및 제2 아미노산 중 하나 또는 둘 다에 도입될 수 있고, 또는 최상의 배열을 위한 핵산 서열 및 비-상동성 서열이 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 바람직한 구체예에서, 비교 목적을 위해 배열된 기준 서열의 길이는 기준 서열 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60%, 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95%이다. 이어서 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열의 위치가 제2 서열 중의 대응하는 위치로서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유된다면, 분자는 그 위치에서 동일하다(본원의 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동일한 것으로 사용됨). 2서열 사이의 동일성 백분율은 2 서열의 최상의 배열을 위해 도입되는데 필요한 갭의 수, 및 각 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 작용이다.

[0114] 서열의 비교 및 2서열 사이의 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 2아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은 Blossom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 하나를 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램(Accelrys Inc. 웹사이트(이전에 Genetics Computer Group)를 통해 온라인에서 이용가능, San Diego, Calif.)에 포함된 Needleman 및 Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) 알고리즘, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량, 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 갭 중량을 사용하여 결정된다. 다른 구체예에서, 2 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램(Accelrys Inc. 웹사이트(이전에 Genetics Computer Group)를 통해 온라인으로 이용가능, San Diego, Calif.)을 사용하고, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여 결정된다. 또 다른 구체예에서, 2아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 PAM120 중량 잔기 테이블, 12의 갭 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램(version 2.0)으로 포함된 E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))의 알고리즘을 사용하여 결정된다.

[0115] 핵산 및 단백질 서열은, 예를 들어 다른 패밀리 멤버 또는 관련된 서열을 확인하기 위한 공중의 데이터베이스에 대한 검색을 수행하는 "질의 서열(query sequence)"로서 추가로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 NBLAST 프로그램, 스코어=100, 단어길이=12로 수행되어 상동 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 단어길이=3으로 수행되어 상동 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적을 위한 갭이 있는 배열을 얻기 위해, 갭이 있는 BLAST는 Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에서 설명되는 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭이 있는 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 변수가 사용될 수 있다. (예를 들어, National Center for Biotechnology Information 온라인 데이터베이스 참조).



- [0116] 추가적으로, "Clustal" 방법 (Higgins and Sharp, Gene, 73:237-44, 1988) 및 "Megalign" 프로그램 (Clewley and Arnold, Methods Mol. Biol, 70:119-29, 1997)이 서열을 배열하고 유사성, 동일성 또는 상동성을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0117] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에 의해 나타내는 바와 같은 폴리펩티드, 및 그것의 임의의 단편, 유도체 또는 유사체를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 따라서, 상기 벡터는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8에 의해 각각 나타내는 분리된 핵산 서열, 또는 유전적 암호의 축중에 기인하여 그것과 단지 다른 임의의 변이체를 포함한다.
- [0118] 상기 벡터의 한 구체예에서, 상기 핵산 분자는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0119] 다른 구체예에서, 상기 벡터는 발현 벡터이다.
- [0120] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 벡터는 이러한 DNA 서열이 벡터의 필수적인 생물학적 작용의 손실 없이 결정가능한 방식으로 절단되고 DAN 단편이 그것의 복제 및 클로닝을 초래하도록 스플라이싱될 수 있는 하나 또는 적은 수의 제한 엔도뉴클라아제 자리를 특징으로 할 수 있다. 벡터는 벡터와 함께 형질전환된 세포의 확인에서 사용에 적당한 마커를 추가로 함유할 수 있다. 벡터의 한 종류는 "플라스미드"이며, 이는 추가적인 DNA 절편이 결합될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 말한다. 벡터의 다른 형태는 바이러스 벡터이며, 추가적인 DNA절편이 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 특정 벡터는 그것들이 도입되는 숙주 벡터 중에서 자율적인 복제를 할 수 있다(예를 들어, 박테리아의 복제 원점을 가지는 박테리아 벡터 및 에피솜의 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜의 포유동물 벡터)가 숙주 세포로 도입 시 숙주 세포의 게놈에 합쳐지고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 게다가, 특정 벡터는 그것들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에서 이용의 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, 플라스미드는 벡터의 가장 흔하게 사용되는 형태이기 때문에 "플라스미드"와 "벡터"는 서로 바꾸어 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동일한 작용을 하는 바이러스 벡터와 같이 발현벡터의 다른 형태(예를 들어 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0121] 용어 "작동하게 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된"은 분자가 서로 기능적으로 커풀링된 것, 즉 한 분자의 활성 또는 상태의 변화가 다른 분자의 활성 또는 상태에 의해 영향을 받는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 조절 서열이 기능적으로 관심의 폴리펩티드 또는 단백질을 암호화하는 DNA 서열에 관한 것일 때, 뉴클레오티드 서열은 "작동가능하게" 연결된다. 예를 들어, 프로모터 뉴클레오티드 서열이 관심의 단백질을 암호화하는 DNA 서열의 전사를 조절한다면, 프로모터 뉴클레오티드 서열이 관심의 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결된다. 전형적으로, 작동가능하게 연결된 2개의 폴리펩티드는 펩티드 결합을 통해 공유적으로 부착된다.
- [0122] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 벡터를 포함하는 세포를 제공하며, 상기 벡터는 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 및 SEQ. ID. NO. 4 중 임의의 하나에 의해 표시되는 폴리펩티드, 및 그것의 임의의 단편, 유도체 또는 유사체를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 포함하며, 상기 벡터는 SEQ. ID. NO. 5, SEQ. ID. NO. 6, SEQ. ID. NO. 7, 및 SEQ. ID. NO. 8에 의해 각각 나타내는 분리된 핵산 서열, 또는 유전자 암호의 축중에 기인하여 단지 그것과 다른 임의의 변이체를 포함한다.
- [0123] 한 구체예에서, 상기 세포는 식물 세포, 곤충 세포, 진균 세포, 박테리아 세포 또는 포유동물 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 숙주 세포이다.
- [0124] 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 서로 바꾸어 사용된다. "숙주 세포"는 이중성 DNA의 도입에 의해 변형될 수 있는 임의의 배양가능한 세포를 포함한다. 바람직하게는, 숙주 세포는 전사 조절 단백질이 안정하게 발현되고, 번역 후 변형되고, 적절한 세포 이하의 칸막이로 편재화될 수 있고, 적절한 전사 기구와 맞물려지는 것이다. 적절한 숙주 세포의 선택은 또한 검출 신호의 선택에 의해 영향을 받을 것이다. 예를 들어, 상기 설명한 바와 같은 리포터 구성체는 전사 조절 단백질에 반응하여 유전자 전사의 활성화 또는 억제 시 선택 가능한 또는 스크리닝 가능한 특성을 제공할 수 있고; 최적의 선택 또는 스크리닝을 달성하기 위해서, 숙주 세포 표현형이 고려될 것이다. 이러한 용어는 특정 대상 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손에 관한 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 기인하여 특정 변형이 다음 세대에서 일어날 수 있기

때문에, 이러한 자손은 사실 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만 여전히 본원에서 사용되는 용어의 범주 내에 있다.

- [0125] 본 발명의 숙주 세포는 원핵세포 및 진핵세포를 포함한다. 원핵세포는 그램 음성 또는 그램 양성 유기체, 예를 들어 *E. coli* 또는 *Bacilli*를 포함한다. 형질전환을 위한 적당한 원핵 숙주 세포는, 예를 들어, *E. coli*, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 및 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 및 스태필로코커스(*Staphylococcus*)속 내에서 다양한 종을 포함한다. 진핵세포는, 제한되는 것은 아니지만, 효모 세포, 식물 세포, 진균 세포, 곤충 세포(예를 들어, 바쿠로바이러스), 포유동물 세포, 및 기생체의 세포, 예를 들어, 트리파노소마를 포함한다.
- [0126] 본원에서 사용되는 용어 "효모"는 엄밀한 분류상의 의미, 즉 단세포 유기체 뿐만 아니라 사상균의 효모- 유사 다세포 진균을 포함한다. 대표적인 종은 클루이베레이 락티스(*Kluyveri lactis*), 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 및 우스틸라퀴 마이디스(*Ustilago maydis*)를 포함하며, 사카로미세스 세르비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)가 바람직하다. 본 발명을 실행하는데 사용될 수 있는 다른 효모는 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 아스페르질루스 니가(*Aspergillus niger*), 아스페르질루스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 피치아 패스토리스(*Pichia pastoris*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 및 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)이다.
- [0127] 포유동물 숙주 세포 배양물 시스템은 확립된 셀 라인, 예컨대 HeLa 세포, COS 세포, L 세포, 3T3 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 배아줄기세포 등을 포함한다.
- [0128] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 분리된 폴리펩티드 또는 분리된 폴리펩티드 또는 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질을 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 단백질 또는 폴리펩티드는 각각 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 또는 SEQ. ID. NO. 4, 또는 정의된 것으로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0129] 본 발명자들은 놀랍게도 하기 실시예 2 및 8에서(각각 도 1A-1D 및 5A-5B) 폴리펩티드 PRT5 및 PRT8은 글루코오스 수준 및 글루코오스 전환에서 상당한 효과를 가진다는 것을 나타냈다. PRT5와 PRT8는 둘 다 기아상태 다음에 글루코오스 주입 후 측정된 글루코오스 수준의 감소를 유발하였다. 이 결과들은 PRT5 주입 후 제2일, 제3일 및 제4일, 및 PRT8 주입 후 제2일 및 제3일에 가장 현저하였다.
- [0130] 이 결과들은 PRT5 및 PRT8이 글루코오스 대사의 조절자이고, 당뇨병, 또는 글루코오스 대사-관련 장애의 치료에서 중요한 치료제일 수 있다는 것을 제안한다.
- [0131] 결과는 실시예 3에서(도 2A-2B) 글루코오스 대사의 조절자로서 및 당뇨병 질환의 인자로서 PRT5의 역할을 지칭한다는 것을 나타낸다. 당뇨병 환자에서 PRT5의 감소된 수준은 당뇨병에서 PRT5의 중요한 역할을 강하게 지칭한다. 따라서 PRT8뿐만 아니라 PRT5는 글루코오스 대사의 조절, 글루코오스 전환 및 심지어 인슐린 발현의 유발에서 치료제로서 사용될 수 있다는 것이 추론될 수 있다.
- [0132] 본 발명자들은 추가로 놀랍게도 PRT5는 PRT5로 처리된 마우스의 골격근에서 인슐린 수용체의 수준을 증가시킬 수 있다는 것을 발견하였다(데이터 미제시).
- [0133] 인슐린은 그것의 수용체와 결합하여 차례로 다수의 단백질 활성화 캐스케이드가 시작된다. 인슐린 수용체(CD220)는 인슐린에 의해 활성화되는 막관통 수용체이며 티로신 키나아제 수용체의 큰 분류에 속한다. 이것은 인슐린 수용체를 만드는 2개의 알파 서브유닛과 2개의 베타 서브유닛으로 구성된다. 베타 서브유닛은 세포막을 통과하고 디설파이드 결합에 의해 연결된다. 알파 및 베타 서브유닛은 하나의 유전자에 의해 암호화된다(INSR).
- [0134] 인슐린이 그것의 수용체에 결합 시, 사건의 복잡한 캐스케이드가 시작되며, 다음을 포함한다: 원형질막에 Glut-4 수송자의 전좌 및 글루코오스의 유입, 글리코젠 합성, 해당과정 및 지방산 합성. 이 과정은 특히 인슐린-반응 조직의 바깥쪽 막에서 일어나며, 근육 세포 및 지방조직을 포함하고, 혈액으로부터 이 조직으로 글루코오스의 흡수의 증가를 초래한다.
- [0135] 따라서, 인슐린 수용체 발현을 유발하는 것으로써 추론될 수 있고, PRT5는 상기 사건의 캐스케이드도 유발한다. 따라서 PRT5는 직접 또는 간접적으로 원형질막에 Glut-4 수송자의 전좌 및 글루코오스의 유입, 글리코젠 합성, 해당과정 및 지방산 합성을 직접 또는 간접적으로 유발한다.
- [0136] 글리코젠 합성은 또한 IRS-1을 통해 인슐린 수용체에 의해 자극된다. 이 경우에, 그것은 IRS-1의 P-Tyr과 결합하는 PI-3 키나아제 (PI-3K)의 SH2 도메인이다. 현재 활성화된, PI-3K는 막지질 포스파티딜이노시톨 4,5-비스포

스페이트(PIP2)를 포스포타티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트(PIP3)로 전환시킬 수 있다. 이것은 인산화를 통해 단백질 키나아제, PKB (Akt)를 활성화한다. 이어서 PKB는 글리코겐 합성 키나아제 3(GSK-3)을 포함하는 몇몇 표적 단백질을 인산화한다. GSK-3은 글리코겐 신타아제를 인산화(및 따라서 탈활성화)하는 것을 초래한다. GSK-3은 인산화될 때, 탈활성화되고, 글리코겐 신타아제가 탈활성화하는 것을 방지한다. 이런 간접적인 방식으로, 인슐린은 글리코겐 합성을 증가시킨다.

[0137] 따라서, 한 특정 양태에서, 본 발명은 인슐린 수용체의 발현을 유발하고 원형질막에 Glut-4의 전좌 및 글루코오스의 유입을 유발하고, 글리코겐 합성을 유발하고, 및/또는 해당과정 및 지방산 합성을 유발하기 위한, 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8, 특히 PRT5 중 임의의 하나, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0138] 다른 특정 양태에서, 본 발명은 글루코오스 대사-관련 장애의 치료를 위해, 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8 중 임의의 하나, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0139] 인슐린 저항성은 흔하고 널리 퍼져있는 대사 장애이며, 당뇨병, 대사증후군 및 비만의 병태생리에 직접적으로 수반된다. 또한 다낭성 난소 증후군(PCOS), 갑상선 및 부신 질환 뿐만 아니라 그것의 합병증을 포함하는 다양한 내분비 질환의 징후일 수 있다.

[0140] 본 발명자들은 PRT5가 이 장애들을 극복하기 위한 우회 메커니즘으로서 사용될 수 있다는 예상치 못한 결과를 제안한다. 따라서, PRT5는 인슐린 저항성, 예컨대 당뇨병, 대사 증후군, 비만 및 내분비질환 뿐만 아니라 근육 장애와 관련된 임의의 병리 질환의 치료를 위한 치료제로서 사용될 수 있다.

[0141] 근육계의 가장 흔한 일부 질병 및 장애는 근육질환, 만성피로증후군, 섬유근육통, 근이영양증 및 구획증후군을 포함한다. 결합있는 골격근 글루코오스 및/또는 글리코겐 대사와 관련된 특정 질병은 운동 후 통증성 근경련으로써 더 간단히 설명되는 근가인산분해효소 및 포스포프록토키나아제 결핍증이 있다.

[0142] 다른 특정 양태에서, 본 발명은 당뇨병, 대사증후군, 비만, 내분비 질환, 및 근육 장애로 구성되는 군으로부터 선택되는 장애의 치료를 위해 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8 중 임의의 하나, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0143] 추가 특정 양태에서 본 발명은 글루코오스 대사를 향상시키기 위해 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8 중 임의의 하나, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0144] 추가로, 하기 실시예 5(및 도 3A-3B)에서, 본 발명자들은 놀랍게도 폴리펩티드 PRT6가 테스토스테론 수준을 증가시키는 상당한 효과가 있음을 나타내었다. 이 결과는 PRT6가 테스토스테론 생성의 유발 및/또는 향상을 위한 강한 약제라는 것을 제안하고, 따라서 테스토스테론 결핍-관련 장애의 치료에서, 또는 심지어 테스토스테론 생성의 유발을 위해 건강한 상태에서도 사용될 수 있다.

[0145] 테스토스테론은 정세관 사이의 고환의 간질 구획에 위치되며, 성숙한 고환 부피의 대략 5%를 구성하는 5억개의 라이디히 세포(Leydig cell) 내에서 콜레스테롤로부터 단계의 효소 서열에 의해 합성된다. 게다가 순환하는 테스토스테론에 대한 부신 안드로겐의 기여가 적다 할지라도, 특이적 조직 내에서 순환하는 약한 부신 안드로겐 전구체 DHEA로부터 테스토스테론 및 디하드로테스토스테론의 일부 성선의 생합성이 설명되었다. 고환의 테스토스테론 분비는 원칙적으로 내부 미토콘드리아 막에 위치한 시토크롬 P-450 콜레스테론 측쇄 분해 효소 복합체에 의해 라이디히 세포 미토콘드리아 내에서 콜레스테롤의 프레그네놀론으로 전환을 속도-제한하는 조절을 통해 황체형성호르몬(LH)에 의해 지배된다.

[0146] 테스토스테론은 안드로겐 대체 치료를 위한 생리적 용량에서 임상적으로 사용되고, 더 높은 용량에서, 그것의 구조에 기반한 테스토스테론 또는 합성 안드로겐이 또한 약리학적 안드로겐 치료를 위해 사용된다. 안드로겐 대체 치료의 원칙적 목표는 모든 신체 조직에서 안드로겐 노출의 생리적 패턴을 회복시키는 것이다. 이러한 치료 목적은 생리적인 순환하는 테스토스테론 수준 및 조직에서 천연 안드로겐 효과의 완전한 범위(전-수용체 안드로겐 활성화를 포함)를 복제하는 것을 목적으로 한다. 약리학적 안드로겐 치료는 다른 치료제와 같은 그것의 효능, 안전성, 및 상대적인 비용 효율성을 판단한 호르몬 약물로서 근육, 뼈, 및 다른 조직에서 테스토스테론 또는 합성 안드로겐의 동화작용 또는 다른 효과를 이용한다.

[0147] 테스토스테론의 생리적 효과는 전-청소년기 효과, 청소년기 효과 및 성인 효과로서 분류될 수 있다. 전-청소년기 효과는 우선 소년과 소녀 둘 다에서 생기는, 유소년기의 마지막에 안드로겐을 상승시키는 관찰가능한 효과가 있고, 일반적으로 성인형 체취; 피부와 모발의 증가된 기름기; 여드름; 음모의 출현; 액모; 급성장, 가속화된

뼈 성숙; 및 윗입술의 수염 및 구레나룻로서 구별할 수 있다. 안드로겐이 수개월 또는 수년 동안 정상 성인 여성 수준보다 높을 때 청소년기 효과가 시작된다. 남성에서, 이것은 보통 후기 청소년기 효과이고, 여성에서는 혈액 내 자유 테스토스테론의 고조된 수준의 연장된 기간 후 일어난다. 이 효과는 다음과 같이 관찰될 수 있다:

- [0148] - 여드름을 유발할 수 있는 피지선의 확장;
- [0149] - 남근 확장 또는 음핵비대증;
- [0150] - 발기 또는 음핵 울혈;
- [0151] - 음모가 대퇴부 및 배꼽 위쪽으로 확장;
- [0152] - 수염(구레나룻, 턱수염, 콧수염);
- [0153] - 두발의 손실(대머리);
- [0154] - 가슴털, 유륜주위 털, 항문주위 털;
- [0155] - 다리털;
- [0156] - 액모;
- [0157] - 얼굴의 피하지방 감소;
- [0158] - 증가된 근육 강도 및 근육량;
- [0159] - 목소리의 깊어짐;
- [0160] - 목젖의 성장;
- [0161] - 고환에서 정자형성 조직, 남성 생식력의 성장;
- [0162] - 턱, 이마, 아래턱, 코의 성장 및 얼굴 뼈 윤곽의 재배치;
- [0163] - 어깨가 더 넓어지고 흉곽은 확장된다;
- [0164] - 뼈 성숙의 완료 및 성장의 종료. 이것은 에스트라디올 대사물질을 통해 간접적으로 일어나고, 따라서 여성보다 남성에서 더 단계적으로 일어난다.
- [0165] 성인 테스토스테론 효과는 여성보다 남성에서 더 명확하게 증명가능하지만, 양성모두에서 중요할 것이다. 일부의 이 효과들은 수십년 후의 성인 삶에서 테스토스테론 수준 감소로서 감소될 수 있다. 이 효과들은 일반적으로 다음과 같이 인식된다:
  - [0166] - 성욕 및 음핵 울혈/음경 발기의 빈번;
  - [0167] - 우세한 검사(challenge) 하에서 급성 HPA(시상하부-뇌하수체-부신 축)반응을 조절;
  - [0168] - 정신 및 육체 에너지;
  - [0169] - 근육 관절의 유지;
- [0170] 노인에서 정상 테스토스테론 수준을 유지하는 것은 심혈관계 질병, 증가된 무지방 신체 질량과 같은 위험을 감소시키고, 내장지방을 감소시키고, 총 콜레스테롤을 감소시키고, 혈당을 조절하는 것으로 생각되는 다수의 변수를 개선시키는 것으로 나타날 수 있다. 우세한 검사하에서, 테스토스테론은 싸움 혹은 도주(fight-or-flight) 반응의 조절의 역할을 할 수 있다. 추가로, 테스토스테론은 거핵세포 및 혈소판에서 트롬복산 A2 수용체의 모집단을 조절하고, 따라서 인간에서 혈소판 응집을 조절한다.
- [0171] 특히 노인에서 낮은 테스토스테론 수준의 증상의 열거는 다음을 포함한다:
  - [0172] - 발기부전(발기와 관련된 문제);
  - [0173] - 성욕 상실 (성욕 저하);
  - [0174] - 우울증, 자극감수성 및 피곤함을 포함하는 기분 장애;
  - [0175] - 근육 크기 및 강도의 상실;



- [0176] - 골다공증 (뼈의 가늘어짐);
- [0177] - 증가된 체지방;
- [0178] - 집중의 곤란함 및 기억 상실; 및
- [0179] - 수면장애.
- [0180] 따라서, 다른 추가 특정 양태에서, 본 발명은 테스토스테론 생성을 향상시키기 위한 분리된 폴리펩티드 PRT6, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0181] 다른 추가 특이적 양태에서, 테스토스테론 결핍증 또는 저테스토스테론 관련 장애의 치료를 위한 분리된 폴리펩티드 PRT6, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0182] 본 발명자들은 추가로 놀랍게도 PRT7이 암에서 상승된다는 것을 나타내었다. 이 현상의 비제한적 예는 본원의 실시예 7에서 나타내며, PRT7의 높은 수준은 폐 또는 췌장암이 있는 환자의 샘플에서 발견되었다. 게다가, 본 발명자들은 PRT7이 p53을 유발할 수 있다는 것을 관찰하였다(데이터는 미제시).
- [0183] 암 억제 단백질 p53은 세포 성장의 억제 및 아포토시스를 유발하는 다양한 세포 스트레스, 예컨대, 열충격, 저산소증, 삼투압 충격, 및 DNA 손상에 의해 안정화되고 활성화되는 것으로 알려져 있다(Ko and Prives, Genes Dev. 10: 1054-1072, 1996; Levine, Cell 88: 323-331, 1997; Oren, Cancer Biol. 5: 221-227, 1994). 아포토시스 및 세포 주기 휴지기는 p53의 주된 중앙 억제기능이라는 것이 또한 알려져 있다(Levine, Cell 88: 323-331, 1997). 암 이외에, 아포토시스-관련 장애의 예는 동맥경화증, 알츠하이머병, 근위축성 측색 경화증, 이식편대숙주병, 자가면역 림프구증가증 증후군, 및 바이러스 감염을 포함한다.
- [0184] PRT7이 p53을 유발할 수 있다는 발견은 PRT7이 암치료에서 사용될 수 있다는 것을 강하게 제안한다.
- [0185] 따라서, 다른 추가 특정 양태에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한, 및/또는 p53 발현을 유발하기 위한, 및/또는 아포토시스를 유발하기 위한 분리된 폴리펩티드 PRT7, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0186] 한 구체예에서, 본 발명에 제공되는 임의의 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0187] 조성물의 제조는 당업계에 잘 알려져 있고 다수의 논문 및 교재에서 설명되었다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, 및 그것에서 특히 pp. 1521-1712를 참조.
- [0188] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용가능한 애쥬번트, 담체, 희석제 또는 부형제 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다.
- [0189] 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분과 반응하지 않는 불활성, 비-독성 물질 중 하나를 의미한다. 담체는 가끔 조제물의 원하는 형태를 기반으로 선택된다. 담체는 또한 가끔 표적 조직에 활성 성분의 전달 또는 침투를 개선시키고, 약물의 안정성을 개선시키고, 클리어런스를 낮추고, 서방성 특성을 부여하고, 원치않는 부작용을 감소시키기 위한 것 등의 효과를 가질 수 있다. 담체는 또한 식용가능한 향이 있는 조제물 등을 제조하기 위해 조제물을 안정화하는 물질(예를 들어, 보존제)일 수 있다. 담체는 통상적으로 사용되는 임의의 것일 수 있고, 단지 화학-물리적 사항에 의해, 예컨대 용해도 및 본 발명의 항체와 반응성의 결여, 및 투여 경로에 의해 제한된다. 담체는 첨가제, 착색제, 희석제, 완충제, 봉해제, 습윤제, 보존제, 착향료, 및 약리학적으로 양립가능한 담체를 포함할 수 있다. 게다가, 담체는 예측가능한 방법으로 활성 성분의 작용에 영향을 미치는 물질로써 정의되는 애쥬번트일 수 있다. 담체의 전형적인 예는, (a) 활성 물질의 유효한 양이 희석제, 예컨대 물, 식염수, 천연 주스, 알코올, 시럽 등에 용해된 액체 용액; (b) 캡슐(예를 들어 계면활성제, 윤활제 및 불활성 충전제를 함유하는 보통의 경질- 또는 연질 껍질의 젤라틴형), 정제, 로젠지(활성 물질은 수크로오스 및 아카시아 또는 트래거캔스와 같이 향이 있고, 또는 활성 물질은 젤라틴 및 글리세린과 같이 불활성 베이스로 존재한다), 및 트로키, 각각은 고체 또는 과립으로서 활성 약제의 미리 결정된 양을 함유; (c) 분말; (d) 적절 한 액체 중의 현탁액; (e) 적당한 에멀전; (f) 리포솜 조제물; 및 기타를 포함한다.
- [0190] 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 또한 추가적인 활성 약제, 예컨대 제한되는 것은 아니지만 항생제, 사이토카인, 림포카인, 성장 인자, 호르몬, 항-산화제, 비타민 등을 선택적으로 더 포함할 수 있다.

- [0191] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 질병 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위해, 상기 정의한 바와 같이 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 또는 단백질의 사용을 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역학적 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0192] 한 특정 추가 양태에서, 본 발명은 글루코오스 대사-관련 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8 중 임의의 하나, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산의 사용을 제공한다.
- [0193] 더 구체적으로, 본 발명은 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비 질환, 및 근육질환으로 구성되는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서, 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8 중 임의의 하나 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산의 사용을 제공한다.
- [0194] 다른 특정 추가 양태에서, 본 발명은 테스토스테론 결핍증 또는 테스토스테론 결핍증-관련 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서, 분리된 폴리펩티드 PRT6, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산의 사용을 제공한다.
- [0195] 다른 특정 추가 양태에서, 본 발명은 암 치료를 위한 약제의 제조에서, 분리된 폴리펩티드 PRT7, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산의 사용을 제공한다.
- [0196] 또 다른 추가 양태에서, 본 발명은 필요한 피험자에서 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 피험자에게 상기 정의한 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 또는 단백질의 치료적으로 유효한 양, 또는 그것을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애, 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비질환, 및 근육장애로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0197] 다른 특정 추가 양태에서, 본 발명은 글루코오스 대사-관련 장애, 당뇨병, 대사증후군, 비만, 내분비장애, 및 근육장애로 구성되는 군으로부터 선택되는 장애의 치료를 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산, 또는 그것을 포함하는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0198] 다른 특정 추가 양태에서, 본 발명은 글루코오스 대사를 향상시키기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산, 또는 그것을 포함하는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0199] 다른 추가 특정 양태에서, 본 발명은 인슐린 수용체 발현을 유발하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 분리된 폴리펩티드 PRT5 또는 PRT8, 특히 PRT5, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산, 또는 그것을 포함하는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0200] 유리하게는, 본 발명은 세포에서 인슐린 수용체 발현을 유발하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 PRT5 또는 그것의 생물학적으로 활성인 단편 또는 유도체, 또는 그것을 포함하는 조성물의 유효한 양을 세포화 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 시험관내 또는 생체밖 방법일 수 있다. 상기 세포는 보통 근육 세포, 지방 세포, 그것의 조상, 또는 인슐린 수용체 발현이 요망되는 임의의 세포일 것이다.
- [0201] 다른 특정 추가 양태에서, 본 발명은 테스토스테론 결핍증-관련 장애를 치료하기 위한, 또는 테스토스테론 생성을 향상시키기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 분리된 폴리펩티드 PRT6, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산, 또는 그것을 포함하는 조성물을 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0202] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 암의 치료를 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 분리된 폴리펩티드 PRT7, 또는 그것을 포함하는 단백질 또는 그것을 암호화하는 핵산, 또는 그것을 포함하는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 필요한 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0203] 추가로, 본 발명은 p53의 임의의 하나, 아포토시스 또는 세포에서 사포 사멸을 유발하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 PRT7, 또는 그것의 생물학적으로 활성인 단편 또는 유도체, 또는 그것을 포함하는 조성물의 유효한 양을 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 시험관내 또는 생체밖 방법일 수 있다. 상기 세포는 p53를 유발하는 것 또는 아포토시스 또는 암세포와 같은 세포사멸을 유발하는 것이 바람직할 수 있는 임의의 세포일 수

있다.

- [0204] 본원에 대하여, 용어 "유효한 양"은 선택된 결과를 이루기 위해 필요한 양을 의미하며, 현재 장애를 치료하기 위해 필요한 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8, 또는 그것의 생물학적으로 활성인 유도체의 양을 수반한다.
- [0205] 상기 치료적으로 유효한 양, 또는 투여량은 1시간 내지 수시간, 1일 내지 수일 지속하는 치료 과정으로 치료가 달성되거나, 질병 상태의 축소가 달성될 때까지 치료되어야 하는 질병 상태의 중증도 및 반응에 의존한다. 당업자는 최적의 투약, 투여 방법 및 반복률을 용이하게 결정할 수 있다. 최적의 투약은 본 발명의 각 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그것을 포함하는 조성물의 상대적인 효능에 의존하여 다양할 것이고, 일반적으로 EC<sub>50</sub>을 기준으로 측정될 수 있고, 시험관내 뿐 아니라 생체내 동물 모델에서 효과적인 것으로 발견된다. 당업자는 측정되는 체류 시간, 농도, 및 사용되는 폴리펩티드 또는 단백질의 조절을 기준으로 투여를 위한 반복률을 용이하게 판단할 수 있다.
- [0206] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다, 치료하는 또는 치료"는 질병 또는 장애를 가지는 환자에서 질병 활성의 하나 이상의 임상적 징후를 완화시키는 것을 의미한다. "치료"는 치료법적 치료를 말한다.
- [0207] "환자" 또는 "필요한 피험자"는 상기 장애 또는 질병을 극복하기 위해 장애 또는 질병의 치료가 요망되는 임의의 포유동물, 특히 인간 피험자를 의미한다.
- [0208] 보통, "치료적으로 유효한 양"은 또한 예방적 또는 치료적 목적, 투여 경로 및 환자의 일반적 상태(연령, 성별, 체중 및 담당의사에게 알려진 다른 고려사항)와 함께 질병의 중증도에 의해 결정된다.
- [0209] 다양한 투여 방법이 본 발명에서 설명되는 폴리펩티드 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8를 필요한 피험자에게 전달하기 위해 사용될 수 있다. 상기 폴리펩티드, 또는 그것을 포함하는 조성물은 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.), 복강내(i.p.), 또는 국소 주사를 통해, 또는 당업자에 의해 적당하게 발견된 임의의 다른 경로를 통해 전달될 수 있다. 효과적으로 치료되기 위해서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 단백질은 투여 후 시스템에서 그것들을 안정하게 하는 방법으로 제조되어야 한다.
- [0210] 본원에서 사용되는, 용어 "장애"는 정상적 기능의 방해가 있는 질환을 말한다. "질병"은 영향받은 사람 또는 그 사람과 접촉하는 것에 어떤 불편함, 역기능, 또는 고통을 야기하는 신체 또는 정신의 어떤 비정상적 상태이다. 때때로 용어는 상처, 기형아, 장애, 증후군, 증상, 일탈행동, 및 구조 및 기능의 이례적인 변형, 질병으로부터 초래되는 만성 또는 영구적인 건강 결함을 포함하는 것으로 널리 사용된다.
- [0211] 용어 "질병", "장애", "질환" 및 "병"은 본원에서 동일하게 사용된다.
- [0212] 추가 양태에서 조차도, 본 발명은 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 그것의 임의의 단편 또는 유도체를 특이적으로 인식하는 항체를 제공한다.
- [0213] 특이적으로, 상기 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 폴리펩티드는 각각 SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, SEQ. ID. NO. 3, 또는 SEQ. ID. NO. 4에 의해 표시된다. 본 발명의 항체에 의해 인식되는 단편의 비-제한적 예는 상기 항체를 만들기 위한 항원으로서 사용되는 펩티드이다. 따라서, 특이적 예에서 항-PRT5 항체는 SEQ. ID. NO. 17에 의해 표시되는 펩티드를 인식하고, 항-PRT6 항체는 SEQ. ID. NO. 18에 의해 표시되는 펩티드를 인식하고, 항-PRT7 항체는 SEQ. ID. NO. 19에 의해 인식되는 펩티드를 인식하고, 항-PRT8 항체는 SEQ. ID. NO. 20에 의해 인식되는 펩티드를 인식한다.
- [0214] 본원에서 정의되는, 본 발명의 항체는 보통 자연적으로 유래되거나, 또는 자연적으로 생성된다. 따라서, 항체들은 다클론성 항체 또는 단클론성 항체이다. 대안으로, 본 발명의 항체들은 예를 들어, 화학적 합성에 의해 합성적으로 생성되거나 또는 각각의 항체-생성 세포 또는 셀라인으로부터 특이적 mRNA의 분리를 통해 재조합적으로 만들어질 수 있다. 상기 특이적 mRNA는 이어서 재조합적으로 생성된 항체를 만들기 위해 표준 분자 생물학 조작을 받는다(cDNA를 획득하고, 상기 cDNA를 발현 벡터에 도입하는 것 등). 상기 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0215] 하기 실시예에서 설명하는 바와 같이, 본 발명의 항체들을 다클론성 항체의 당업자에게 알려진 표준 기술을 사용하여, 토끼에서 만들었다.
- [0216] 단백질에 대해 다클론성 항체의 생성은 당업자에게 잘 알려진 기술이고, 특히 Current Protocols in Immunology, John E. Coligan et al. (eds.), Wiley and Sons Inc의 Chapter 2에서 설명된다.
- [0217] 본 발명에 따라서, PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 항원 중 어떤 하나를 인식하는 다클론성 항체는 다클론성 항체

의 주된 인식 자리가 각각 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 항원에 대응한다는 것을 의미한다. 일반적으로, PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 또는 그것의 단편은 본 발명에서 설명되는 항체 중 하나를 만들기 위해, 토끼, 기니아피그, 염소, 마우스, 래트, 양, 원숭이와 같은 동물들은 면역화하기 위한 면역원으로서 사용된다. 결과 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7 또는 항-PRT8 항혈청으로부터 각각, 항체 단편은 공지된 방법에 의해 정제된다. 결과 항체는 다클론성 항체로서 사용된다. 다클론성 항체의 특이성에 관해, PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8은 각각 인식된다. 다클론성 항체의 주된 인식 자리는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질의 C-말단 영역에 존재한다. C-말단 영역에서 주된 인식 자리를 가지는 다클론성 항체는, 예를 들어 SEQ ID NO.17에 의해 표시되는 펩티드, 또는 SEQ ID NO.18에 의해 표시되는 펩티드, 또는 SEQ ID NO.19에 의해 표시되는 펩티드, 또는 SEQ ID NO.20에 의해 표시되는 펩티드를 각각 인식하는 항체이다.

[0218] 일반적으로, 다클론성 항체는 면역원으로 면역화된 동물혈청으로부터 정제된 면역글로불린으로부터 제조된다. 다른 로트(lot)의 다클론성 항체는 또한 개개의 동물로부터 유래되는 개개의 차이 및 항혈청에서 로트 차이를 피하기 위해서 함께 혼합될 수 있다. 다클론성 항체는 항체의 조립이기 때문에, 다클론성 항체는 복수의 인식 자리를 가진다.

[0219] 단클론성 항체는 혼성 세포의 성장에 바람직한 조건하에서 불멸된 B 세포로 융합에 의해 면역화된 동물, 특히 래트 또는 마우스의 비장 또는 림프절로부터 취한 B 세포로부터 제조될 수 있다. 단클론성 항체를 만드는 기법은 다수의 논문 및 교재, 예컨대 Chapter 2 of Current Protocols in Immunology의 상기 주목한 Chapter 2에서 설명된다. 이 동물들의 비장 또는 림프절 세포는 그것의 Chapter 2에서 설명하는 바와 같은 단클론성 항체의 생성을 위해, 단백질-면역화된 동물의 비장 또는 림프절 세포로서 동일한 방식으로 사용될 수 있다. 단클론성 항체를 만드는데 사용되는 기법은 Kohler and Milstein [Kohler and Milstein (1975) Nature 256; 495-497], 및 US 4,376,110에서 추가로 설명된다.

[0220] 용어 "항체"는 또한 예를 들어, scFv, Fv, Fab', Fab, 디아바디, 선형 항체, 항원과 결합할 수 있는 항체의 F(ab')<sub>2</sub> 항원 결합 단편과 같은 무결합 분자 뿐만 아니라 그것의 단편을 포함하는 것을 의미한다[Wahl et al. (1983) J. Nucl. Med. 24, 316-325].

[0221] Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 및 항체의 다른 단편은 무결합 항체 분자에 대해서 뿐만 아니라 본원에서 개시되는 항체의 다른 사용에 대해서, 본원에서 개시되는 방법에 따라서 생물학적 샘플에서 본 발명의 항체의 생성을 위한 항원으로서 사용되는 단백질의 검출에서 유용하다. 이러한 단편은 파파인(Fab 단편을 만들기 위함) 또는 펩신(F(ab')<sub>2</sub> 단편을 만들기 위함)과 같은 효소를 사용하여, 단백질 가수분해에 의해 만들어질 수 있다. 따라서, Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 및 본 발명에서 유용한 항체의 다른 단편은 의도되는 사용에 따라서 다양한 태그로 태그될 수 있다. 이 태그는 검출을 가능하게 하기 위한 검출가능한 태그, 또는 종양 세포를 죽이기 위한 독성 태그, 또는 종양세포를 죽이는 다른 세포 또는 물질을 유발할 수 있는 "유발성" 태그일 수 있다.

[0222] 항체는 그것이 분자(항원)와 특이적으로 반응할 수 있고, 이에 의해 항체가 상기 분자에 결합한다면, "결합할 수 있는" 또는 "인식할 수 있는" 분자인 것으로 언급된다. 용어 "에피토프"는 또한 그 항체에 의해 인식될 수 있는 항체에 의해 결합될 수 있는 임의의 분자의 부분 또는 그 항체를 만드는 세포를 말하는 것으로 의미된다. 에피토프 또는 "항원 결정소"는 보통 아미노산 또는 당측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 기들로 구성되고, 특이적 3차원 구조적 특성뿐만 아니라 특이적 하전 특성을 가진다.

[0223] "항원"은 항원에 의해 인식되고 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 부분이다. 항원은 하나 이상의 에피토프를 가진다. 상기 언급된 특이적 반응은 매우 선택적이고 특이적인 방식으로 항원이 그것의 대응하는 항체와 반응하고, 다른 항원에 의해 유발될 수 있는 다수의 다른 항체들과 반응하지 않는 것으로 나타나는 것을 의미한다.

[0224] 본 발명에서, SEQ. ID. NO. 17, SEQ. ID. NO. 18, SEQ. ID. NO. 19 및 SEQ. ID. NO. 20에 의해 표시되는 펩티드는 본 발명의 다클론성 항체를 만들기 위한 항체로서 사용되었고, 따라서 본 발명의 항체에 의해 인식된다. 유리하게, 본원에서 설명되는 전장 단백질은 또한 본 발명의 항체에 의해 인식되고 결합될 수 있는 항체로서 언급될 수 있고, 각각은 그것 자체의 특이성에 따른다(즉, PRT5 대 항-PRT5, PRT6 대 항-PRT6, PRT7 대 항-PRT7, PRT8 대 항-PRT8).

[0225] 본 발명에 의해 제공되는 항체들은 임의의 이소형, IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD일 수 있다.

[0226] 본 항체들에 대해서, "생물학적 특성" 또는 "생물학적 활성"은 보통 에피토프를 특이적으로 인식할 수 있고, 그



결과 그것에 결합하는 항체의 능력에 관한 것이다. 에피토프는 전장 단백질의 부분일 수 있고, 또는 단백질의 단편 또는 폴리펩티드에 함입(embed)될 수 있다.

- [0227] 추가 양태에서, 본 발명은 활성 성분으로서 본 발명에서 설명되는 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 따라서 본 발명의 조성물의 활성약제로서 포함되는 상기 항체는 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 그것의 임의의 단편, 유사체 또는 유도체를 인식하고 결합하는 항체 또는 그것의 단편이다.
- [0228] 상기 조성물은 진단 및/또는 치료 방법에서 사용을 위한 것일 수 있다.
- [0229] 상기 항체 또는 그것을 포함하는 상기 조성물은 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 발현 및/또는 기능 중 임의의 하나에 영향을 미치는 질병 또는 장애의 진단을 위해 유용하다. 대안으로, 상기 항체 또는 그것을 포함하는 조성물은 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 발현 및/또는 작용 중 임의의 하나에 영향을 미치는 질병 또는 장애의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0230] 다른 구체예에서, 본 발명에서 설명되는 바와 같은 항체를 포함하는 상기 조성물은 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0231] 하기 실시예 7에서, 본 발명자들은 놀랍게도 췌장 또는 폐암이 있는 남성 환자로부터 획득한 샘플에서 순환하는 PRT7의 상승된 수준을 나타내었다. PRT7은 따라서 특이적인 비-제한적 예가 되는 암, 췌장 또는 폐암을 검출하기 위한 마커로서 사용될 수 있다. 따라서, 항-PRT7 특이적 항체는 암에 대한 진단 도구로서 사용될 수 있다.
- [0232] 따라서, 한 특정 구체예에서, 상기 조성물은 폴리펩티드 PRT7, 또는 그것의 단편 또는 유도체를 인식하는 항체를 포함한다.
- [0233] 추가 구체예에서, 본 발명에서 설명되는 항체를 포함하는 조성물은 예를 들어 암의 예후에서 사용될 수 있다. 특히 예후에 대한 필요는 암 치료를 받고 있는 환자에게서 존재하며, 치료 효능을 위한 지표를 가지는데 필수적이다. 따라서, 본 발명에서 설명되는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물은 PRT5, PRT6, PRT7 또는 PRT8 단백질 중 임의의 하나의 수준의 검출 또는 결정을 통해 치료의 결과를 결정할 수 있어야 한다.
- [0234] 또한 본 발명에서 본 발명에 따르는 항체를 만드는 항체-생성 셀라인이 제공된다. 따라서, 본 발명은 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질에 대해 단클론성 항체를 만드는 하이브리도마 셀라인을 제공한다.
- [0235] 한 구체예에서, 항체-생성 세포는 또한 본 발명의 대상인 항체-생성 셀 라인을 만들기 위해 클론으로 분리되고 불멸된다. 세포 불멸은 당업자에게 알려진 방법에 따라서 달성될 수 있고, 예를 들어, Lanzavecchia et al., 2007 [Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F. (2007) Human monoclonal antibodies by immortalization of B cells. Curr Opin Biotechnology; 18(6):523-8]에 의해 설명된다.
- [0236] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 설명되는 항체의 사용을 제공하며, 상기 항체는 진단 조성물의 제조에서 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8으로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질을 인식한다. 특히, 상기 조성물은 질병 또는 장애의 진단을 위한 것이며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0237] 본원에서 언급되는 바와 같은, 자가면역 질병은 염증성장질환(IBD), 크론병, 다발성경화증(MS), 자가면역 포도막염, 자가면역 포도막망막염, 자가면역 갑상선염, 하시모토병, 췌도염, 쇼그렌 증후군, 자연유산, 실험적 자가면역 심근염, 류마티스 관절염 (RA), 루프스 (SLE), 건선 및 당뇨병, 특히 제I형을 포함한다. 자가면역 질환의 추가적인 예는 급성 괴사성 출혈성 백질뇌염, 에디슨병, 무감마글로블린혈증, 알레르기 천식, 알레르기 비염, 원형 탈모증, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항-GBM/항-TBM 사구체 신염, 항인지질항체 증후군 (APS), 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 자율신경실조증, 자가면역 간염, 자가면역 고지혈증, 자가면역 면역결핍, 자가면역 내이질환 (AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 혈소판감소성자반병(ATP), 엑손 및 뉴런 신경장애, 발스 질환 (Bal's disease), 베체트 병, 수포성류천포창, 심근증, 캐슬만병, 복강스프루(비열대성), 샤가스병, 만성피로증후군, 만성염증성탈수초화다발성신경병증(CIDP), 척-스트라우스 증후군, 반흔성류천포창/양성 점막 유사천포창, 코간증후군, 한랭응집소병, 선천 심차단, 콕사키 심근염, CREST병, 필수 혼합된 한랭글로블린 혈증, 말이집탈락성 신경병증, 피부근염, 데빅병, 원반모양 루프스, 드레슬러 증후군, 자궁내막증, 호산구 근막염, 결절성 홍반, 실험적 알러지성 뇌수막염, 에반 증후군, 섬유근육통, 섬유화 폐포염, 거대 세포동맥염(측두 동맥염), 구드파스

튜어증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 용혈성 빈혈, 헤르페스 바이러스 감염, 임신포진, 저감마글로불린 혈증, 특발성 혈소판감소성자반증(ITP), IgA 신병증, 면역조절 리포단백질, 포함체 근육염, 인슐린-의존성 당뇨병 (제1형), 간질성 방광염, 소아기 관절염, 소아기 당뇨병, 가와사키 증후군, 램버트-이튼 증후군, 백혈구과쇄 성맥관염, 편평태선, 경화성태선, 목질결막염, 선상 IgA 질병(LAD), 라임병, 메니에르병, 현미경다발혈관염, 혼합 결합 조직병(MCTD), 무릎각막결양, 무카-하베르만병, 중증근무력증, 근육염, 기면증, 백혈구 감소증, 안반혼 성유전포창, 골관절염, 재발성 류마티즘, 소뇌변성, 발작성 야간혈색소뇨증(PNH), 파르소나지-터너 증후군 (Parsonnage-Turner syndrome), 평면부염 (말초 포도막염), 천포창, 말초신경증, 정맥 주위성 뇌척수염, 악성빈 혈, POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, 제 I, II, 및 III 자가면역 다선증후군, 류마티스성 다발성근육통, 다발 성 근염, 심근 경색후 증후군, 심막절개술후 증후군, 프로게스테론피부염, 원발성 담즙성 간경변증, 건선성 관 절염, 특발성 폐섬유화증, 괴저성 농피증, 적아구로, 레이노증후군, 복합부위 통증 증후군, 라이터 증후군, 재 발성 다발 연골염, 하지불안증후군, 류마티스성 열, 유육종증, 슈미트 증후군, 공막염, 강피증, 정자 및 고환 자가면역, 전신근강직증후군, 아급성 세균성 심내막염(SBE), 교감성 안염, 타카야스 동맥염, 측두동맥염/거세포 동맥염, 혈소판 감소성 자반증(TTP), 자가면역 갑상성 질환, 톨로자 헌터 증후군, 횡단성 척수염 및 괴사성 척 수병증, 궤양성 대장염, 미분화 결합조직 질환(UCTD), 혈관염, 수포성 피부염, 백반증 및 베게너육아종증을 포 함한다.

[0238] 추가 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 설명되는 항체의 사용을 제공하며, 상기 항체는 치료 조성물의 제조에서 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 그것의 단편 또는 유도체를 특이 적으로 인식할 수 있다.

[0239] 본 발명에서 제공되는 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 및 항-PRT8 항체 또는 그것의 단편은 샘플 내에서 본 발명의 항체의 생성을 위한 항원으로서 사용되는 단백질 또는 그것의 단편을 양적으로 또는 질적으로 검출하기 위해 사 용될 수 있다. 이것은 형광(면역형광염색법), 효소 반응의 크로모제닉 생성물, 침전의 생성물, 화학발광 또는 생물발광 중 임의의 하나 일 수 있는 시각적으로 검출가능한 신호를 제공하는 기술에 의해 수행될 수 있다. 형 광성 또는 색-표지된 항체를 사용하는 것은 광학 현미경, 유동 세포 분석법, 또는 하기 설명하는 바와 같은 화 학 형광계 검출과 결합될 수 있다. 항체를 검출하기 위해 사용될 수 있는 다른 기법 및 표지는, 제한되는 것은 아니지만, 콜로이드성 금, 방사능 태그, GFP (녹색 형광 단백질) 등, 아비딘/스트렙타비딘-비오틴, 자기 비드 뿐만 아니라 물리적 시스템, 예를 들어 실제 결합에 민감한 나노기술 시스템을 포함한다.

[0240] 본 발명에서 제공되는 항체 또는 그것의 단편은 면역조직화화학법, 면역형광염색법 또는 면역전자현미경법에서 뿐 만 아니라 단백질의 인식주 검출에 대해서와 같이 조직 염색에서 사용될 수 있다. 인식주 검출은 피험자로부터 조직 표본을 제거하고, 이러한 표본과 본 발명의 표지된 항체를 접촉함으로써 수행될 수 있다. 항체(또는 단 편)은 생물학적 샘플(상기 표본)에 표지된 항체(또는 단편)를 적용 또는 더함으로써 접촉된다. 이러한 과정의 사용을 통해, 항원의 존재뿐 아니라 시험 조직에서 그것의 분포를 결정하는 것이 가능하다. 본 발명을 사용하여, 당업자는 임의의 매우 다양한 조직학적 방법, 예컨대 염색 과정이 이러한 인식주 검출을 달성하기 위 해서 변형될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다.

[0241] 본 발명에 따르는 항체를 표지 및 직접 검출하는 방법 중 하나는 효소에 동일한 것을 연결하고, 효소 면역분석 (EIA)에서 사용하는 것이다. 이 효소는 적절한 기질에 노출된 후 차례로, 검출될 수 있는 화학적 모이어티를 만 드는 방법으로, 예를 들어, 분광측색방법, 형광분석에 의해 또는 시각적 수단에 의해 기질과 반응할 것이다. 항 체를 검출가능하게 표지하기 위해 사용될 수 있는 효소는, 제한되는 것은 아니지만, 말레이트 탈수소효소, 포도 상구균 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라아제, 효모 알코올 탈수소효소, 알파-글리세로포스페이트 탈수 소효소, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 겨자무과산화효소, 알칼리성 포스파타아제, 아스파라기나아제, 글 루코오스 옥시다아제, 베타-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라아제, 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린-에스터라아제를 포함한다. 검출은 효소에 대한 크로모제닉 기질을 사용하는 비색법에 의해 수행될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준과 기질의 효소적 반응의 정도의 시 각적 비교에 의해 수행될 수 있다(이 과정은 예를 들어 니트로셀룰로오스 또는 플라스틱 지지체 상에서 가용성 색이 있는 생성물 및 비-가용성의 색이 있는 생성물에 대해 적당하다).

[0242] 본 발명에서, 항원과 항체의 반응을 검출하는 것은 적절한 예에서, 리간드와 반응하는 제2 항체 또는 다른 리간 드 또는 다른 에피토프와 특이적으로, 또는 비특이적으로 반응된 항체의 사용에 의해 추가로 도움이 될 수 있다.

[0243] 면역형광 분석(IFA), 광도계 분석, 효소결합 면역흡착 분석법 (ELISA), ELISPOT 분석, 및 면역 블로팅과 같은

효소 면역분석이 특이적 항체의 검출을 수행하기 위해 용이하게 적용될 수 있다.

- [0244] 또한 사용될 수 있는 다른 검출 시스템은 스태필로코커스 아우레우스 코완 군주 I(*Staphylococcus aureus* Cowan strain I)로부터 유래된 단백질 A, 그룹 C *Streptococcus* sp. (군주 26RP66)로부터의 단백질 G, 또는 비오틴-아비딘 결합 반응의 사용을 채용하는 시스템의 사용에 기반한 것을 포함한다.
- [0245] 본 발명의 항체가 사용될 수 있는 면역효소 검출의 다른 방법은 웨스턴 블롯, 및 도트 블롯이다. 샘플은 전기영동에 의해 분리되고 니트로셀룰로오스 막 또는 다른 적당한 지지체에 전달된다. 시험되는 샘플(예를 들어, 배양물 상청액)은 이어서 막과 접촉되고, 형성된 면역 복합체의 존재는 이미 설명한 방법에 의해 검출된다. 이 방법상의 변화에서, 정제된 항체는 막에서 순서대로 또는 부분으로 사용되고 결합된다. 막은 이어서 배양물이 시험되기 전과 후에 샘플과 접촉되고, 형성된 면역 복합체는 본원에서 설명한 기술을 사용하여 검출된다.
- [0246] 항체-항원 복합체의 존재는 또한 응집에 의해 검출될 수 있다. 본 발명에 따르는 항체는, 예를 들어 균일한 현탁액을 형성하는 라텍스 입자를 코팅하기 위해 사용될 수 있다. 샘플, 예를 들어 항체에 의해 인식되는 특이적 항원들을 함유하는 혈청과 혼합될 때, 라텍스 입자는 응집을 야기하고, 거대한 응집물의 존재는 시각적으로 검출될 수 있다.
- [0247] 면역분석 기법에 의한 항체의 측정에 해당하는 면역학적 및 면역분석 과정의 검토를 위해, Basic and Clinical Immunology [D. Stites et al. (eds.) (1994) Basic and Clinical Immunology, 8<sup>th</sup> ed.] 참조.
- [0248] 항체와 항원의 반응을 검출하는 것은 당업계에 알려진 검출가능한 모이어티로 표지된 항체 또는 리간드의 사용에 의해 용이하게 될 수 있다. 이러한 검출가능한 모이어티는 침전 또는 색 변화의 시각적 검출, 현미경에 의한 시각적 검출, 또는 분광분석 또는 복사측정 등에 의한 자동화된 검출을 허용한다. 검출가능한 모이어티의 예는 플루오레세인 및 로다민(형광 현미경 검사를 위함), 겨자무과산화효소 및 알칼리성 포스파타아제(광학 현미경 또는 전자 현미경 및 생화학적 검출 및 색 변화에 의한 생화학적 검출을 위함), 및 비오틴-스트렙타비딘(광학 또는 전자 현미경을 위함)을 포함한다. 사용된 검출 방법 및 모이어티는, 예를 들어 이러한 선택을 위해 사용된 표준 기준에 의해 상기 열거 또는 다른 적당한 예로부터 선택될 수 있다[Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY].
- [0249] 검출은 임의의 다양한 다른 면역분석을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 항체들 또는 항체 단편들을 방사성 표지함으로써, 방사면역측정법(RIA)의 사용을 통해 항원을 검출할 수 있다. RIA의 양호한 설명은 본원에 참고로써 포함되는 Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, by Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) 특히 Chard, T.에 의한 제목이 "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques"인 chapter에서 찾을 수 있다. 방사성 동위원소는 감마/베타 계측기 또는 신틸레이션 계측기의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자기방사법에 의해 검출될 수 있다.
- [0250] 형광 화합물로 본 발명에 따르는 항체를 표지하는 것이 또한 가능하다. 형광으로 표지된 항체가 적절한 파장의 광에 노출되었을 때, 그것의 존재는 형광성 때문에 검출될 수 있다. 가장 흔히 사용되는 형광성 표지 화합물 중에서는 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈알데히드 및 플루오레사민이 있다.
- [0251] 항체는 또한 <sup>152</sup>E와 같은 형광성 방출 금속, 또는 다른 란타넘계열을 사용하여 검출가능하게 표지될 수 있다. 이 금속들은 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(ETPA)과 같은 금속 킬레이트 그룹을 사용하여 항체에 부착될 수 있다.
- [0252] 항체는 또한 화학발광 화합물에 그것을 커플링함으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 화학발광-태그된 항체의 존재는 화학 반응의 과정 동안 상승하는 발광의 존재를 측정함으로써 결정된다. 특히 유용한 화학발광 표지 화합물의 예는, 루미놀, 이소루미놀, 써로매틱(theromatic) 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르이다.
- [0253] 마찬가지로, 생발광 화합물이 본 발명의 항체를 표지하기 위해 사용될 수 있다. 생발광은 촉매 단백질이 화학발광 반응의 효능을 증가시키는 생물학적 시스템에서 발견되는 화학발광의 종류이다. 생발광 단백질의 존재는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 표지의 목적을 위한 중요한 생발광 화합물은 루시페린, 루시페라아제 및 에퀴린이다.
- [0254] 본 발명의 항체 분자는 또한 "2-자리" 또는 "샌드위치" 분석으로서 알려진 면역계수측정법에서 이용에 적합할 수 있다. 전형적인 면역계수측정법에서, 비표지 항체의 양(또는 항체의 단편)은 고체 지지체 또는 담체에 결합

되고, 검출가능하게 표시된 가용성 항체의 양이 첨가되어서 고체상 항체, 항원, 및 표시된 항체 사이에서 형성된 3중 복합체의 검출 및/또는 정량화를 허용한다.

- [0255] 본 발명의 항체는 다수의 다른 암을 이미징하기 위해 사용되도록 방사선표지될 수 있다.  $\text{In}^{111}$  및  $\text{Tc}^{99}$  와 같은 방사성동위원소는 항체를 표지하고 이미징 기술에 의한 시각화를 위해 사용된다. 방사-면역신티그래피(RIS)는 종양의 생체내 이미징을 허용하는 기능적 시험이다. 이것은 방사선 표시된 항체 및 표준 감마 신티레이션 카메라를 사용하여 수행된다. 각 환자는 전체 신체 조사를 받는다. 신체 조사는 전신이 다 보이는 앞쪽 및 뒤쪽 전체-신체 획득으로서 수행된다. 각 경우에, 알려진 또는 의심되는 질병의 영역의 선택적인 평면 이미지(사면 및 측면도를 포함)는 병변 크기 및 위치의 정확성을 증가시키기 위해 얻어진다.
- [0256] 본 발명의 항체는 또한 인간 및 무린 면역계에서 다른 기본적인 생리적 질환 및 질병에 수반되는 화합물의 고속 대량스크리닝을 위한 다중 면역측정법으로 사용될 수 있다. 다중 면역측정법은 당업자에게 알려져 있고, 특히 Anderson and Davison [Anderson and Davison (1999) Am. J. Pathol. 154:1017-1022]에 의해 설명된다.
- [0257] 따라서 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 피험자에서 종양 또는 암의 존재를 검출 또는 표시하기 위한 스크리닝 분석으로서 유용하다. 항체 또는 그것의 단편은 본원에서 설명되는 검출가능한 마커에 직접 콘쥬게이트될 때, 암 세포의 존재를 나타내는 생체내 항원의 검출에 사용될 수 있고, 진단되는 피험자에 주입 및 이미징에 의한 검출에 의해 이미징 기술의 도움으로 시각화된다.
- [0258] 게다가, 본 발명에 의해 제공되는 항체는, 예를 들어 암의 치료에서 조성물 그 자체로 또는 부분으로서 사용되기 위해서 세포독성 약물에 콘쥬게이트될 수 있다.
- [0259] 따라서 상기 언급한 바와 같이, 본 발명에 의해 제공되는 항체는 암, 또는 암 전의 세포를 사멸시키기 위해 독성 약물에 대한 전달 시스템으로서 적당하다.
- [0260] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 필요한 피험자에서 질병 또는 장애의 치료를 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 PRT5, PRT6, PRT7 및 PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 단백질, 또는 그것의 단편 또는 유도체, 또는 이것을 포함하는 조성물을 인식하는 항체의 치료적으로 유효한 투약량을 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애, 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비질환, 및 근육장애로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0261] 추가로, 본원에 존재하는 항체는 약제의 활성제로서 사용될 수 있고, 또는 세포가 치료되도록 하기 위한 독성 또는 치료 약물에 대한 전달 시스템일 수 있다.
- [0262] 세포독성 약물의 한 예는 본 발명의 항체, 즉, 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 또는 항-PRT8 중 임의의 하나에 직접 또는 링커를 통해 공유적으로 결합되는 항-중식성 약물 분자이며, 상기 항체는 선택적으로, 예를 들어 암세포에서 풍부한 또는 암세포에 의해 분비되는 프로테아제에 의해 특이적으로 분해될 수 있고, 따라서 프로테아제의 작용에 의해 상기 암 세포 내에서, 암 세포 근처에서 또는 상기 암세포에서 항-중식성 약물을 우선적으로 방출시킨다.
- [0263] 항-중식성 약물의 예는 시클로포스파미드, 클로르암부실, 부술판, 멜파란, 티오테파, 이포스파미드, 질소 머스타드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 시토신 아라비노사이드, 6-티오구아닌, 6-머캅토피린, 독소루비신, 다우노루비신, 이도루비신, 닥티노마이신, 블레오마이신, 미토마이신, 플리카마이신, 에피도도필로톡신 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈슬레스틴, 에토포사이드, 테니포사이드, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조신, 아드레노코르티코이드, 에스트로젠, 항에스트로젠, 프로게스틴, 아로마타아제 억제제, 안드로젠, 항-안드로젠, 다카르바진, 핵사메틸멜라민, 히드록시우레아, 미토탄, 프로카르바지드, 시스플라스틴, 카르보플라틴, 멜팔란, 메토트렉세이트, 및 클로르암부실이다.
- [0264] 대안으로, 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 또는 항-PRT8 항체는 종양에 금속 이온(철 또는 아연 또는 기타)과 같은 특정 물질을 종양에 옮길 수 있고, 따라서 종양에 독성 물질(앞서 언급한 바와 같은 방사성 또는 세포독성 화학 물질, 즉 독소 유사 리신 또는 세포독성 알킬화제 또는 세포독성 프로드러그)을 전달하기 위한 수단 또는 담체로서 역할을 한다. 항체 및 독소 또는 방사성동위원소의 결합은 화학적일 수 있다. 직접 결합된 독소의 예는 독소루비신, 클로르암부실, 리신, 슈도모나스(pseudomonas) 외독소 등이다. 혼성 독소는 항원 및 독소에 대해 이중으로 특이성을 갖도록 만들어질 수 있다. 이러한 2가의 분자는 종양에 결합하고 세포독성 약물을 종양에 전달하고 또는  $\text{T}_3$ - $\text{T}_1$  수용체 복합체에 결합과 같이 세포독성 림프구에 결합하고 활성화하는 것에 도움을 줄 수 있다.



- [0265] 본 발명은 또한 이미 진단된 암의 예후를 평가하는데 사용될 수 있는 방법을 제공한다. 특히, 처리 전-, 처리 동안 및 처리 후를 알아보는 것은 중요하다. 대안으로, 상기 방법은 또한 특히 시험되는 샘플이 환자로부터 얻은 샘플 중 가장 "환자-우호적" 형태인 혈액 샘플 일 때 암 스크리닝을 위해 적절하다.
- [0266] 따라서, 다른 추가 양태에서, 본 발명은 피험자의 질병 또는 장애의 진단 방법을 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애, 당뇨병, 대사 증후군, 비만, 내분비질환, 및 근육장애로 구성되는 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다:
- [0267] a. 상기 피험자로부터 샘플을 제공받는 단계;
- [0268] b. 상기 샘플을 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7 및 항-PRT8로 구성되는 군으로부터 선택되는 항체인 본 발명에 따르는 항체, 또는 그것을 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계;
- [0269] c. 상기 적어도 하나의 항체와 그것의 특이적 항원 사이의 복합체 형성을 검출 수단을 통해 검출하는 단계;
- [0270] 이에 의해, 복합체의 검출은 상기 피험자가 암에 걸렸다는 것을 나타낸다.
- [0271] 따라서, 추가 양태에서 본 발명은 또한 샘플에서 암의 진단을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 피험자로부터의 샘플에서 PRT7 폴리펩티드, 또는 그것을 포함하는 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함하고; 이에 의해 대조군보다 더 높은 PRT7 수준이 존재하는 샘플은 암의 존재를 표시한다.
- [0272] 한 특정 구체예에서, 상기 암은 폐암 또는 췌장암이다.
- [0273] 본원에서 피험자를 언급할 때, 상기 피험자는 포유동물, 인간 또는 비-인간일 수 있다. 비-인간 포유동물은, 제한되는 것은 아니지만, 소, 말, 개, 고양이, 마우스, 래트, 기니아-피그 등을 포함한다. 보통 피험자는 인간, 특히 환자 또는 건강한 개체이다.
- [0274] 본 발명의 진단 방법의 한 구체예에서, 상기 샘플은 혈액 샘플이다.
- [0275] 본 발명의 진단 방법의 다른 구체예에서, 상기 샘플은 상기 암의 생검이다.
- [0276] 따라서, 본 발명은 또한 암 치료의 효능을 모니터링하는 방법을 제공한다. 치료의 효능을 모니터링하는 것은 암 치료의 예후를 평가하기 위해 필수적이다. 따라서, 본원에서 존재하는 진단 방법은 암 치료 전, 치료 동안 또는 치료 후 피험자에게서 달성될 수 있고, 각 시점에 얻은 결과의 분석(적어도 2개의 항원-항체 복합체 사이의 관계의 패턴)은 정상 모집단의 동일한 복합체의 패턴과 비교된다. 정상 모집단의 패턴에 대해 피험자의 가장 밀접한 패턴은 성공적인 치료를 표시한다.
- [0277] 본원에서 언급하는 바와 같은 암치료는 방사선치료, 화학치료 등을 포함하는 질병을 근절하기 위한 임의의 치료에 관한 것이다.
- [0278] 본 발명을 설명하기 위해 본원에서 사용되는 "종양", "암", "악성 증식성 장애" 및 "악성"은 모두 동일하게 조직 또는 기관의 과다형성에 관한 것이다. 조직이 림프계 또는 면역계의 부분이라면, 악성 세포는 순환 세포의 비-고형 종양을 포함할 수 있다. 다른 조직 또는 기관의 악성종양은 고형종양을 만들 수 있다. 일반적으로, 비-고형 및 고형 종양은, 예를 들어, 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종이다.
- [0279] 암 및 종양은, 제한되는 것은 아니지만, 부신피질 암; 방광암; 대장암; 결장직장암; 직장암; 신경외배엽성 및 송과체 암; 소아 뇌줄기 신경아교종; 소아 소뇌 성상세포종; 소아 대뇌 성상세포종; 소아 수모세포종; 소아 시로 신경교종; 수막종; 혼합 신경교종; 희소돌기아교세포종; 성상 세포종, 뇌실막종; 뇌하수체 선종; 청신경종; 척추주위 악성기형종; 유방암; 남성 유방암; 유선종양; 난소암; 유암종; 자궁경부암; 자궁암; 자궁내막암; 질암; 여성외부 생식기암; 임신성 용모성 암; 자궁관 암; 백혈병, 예컨대 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 성숙한 급성 골수성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 증가된 호염기성을 갖는 급성 비-림프구 백혈병, 급성 림프구성 백혈병; 급성 골수성 백혈병; 급성 단핵구성 백혈병, 호산구증가증이 있는 급성 단구성 백혈병, 림프성 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병; 림프종(호지킨병 및 비호지킨병); 악성 림프종, 피부 T세포 림프종; 버킨 림프종; 골수증식성 질병; 양성 수막종; 침샘의 혼합종양, 입술 및 구강의 종양; 인두; 후두, 부비강; 대장선종; 유관암; 눈꺼풀의 암종, 결막의 암종, 눈물샘의 암종; 신세포암; 전이성 선암종; 선암, 예컨대 소세포폐암, 신장, 자궁, 전립선; 편평세포암종; 용모암종; 신경모세포종; 망막모세포종; 육종; 횡문근육종; 연부조직육종; 카포시 육종; 유잉 육종; 골육종; 골격외 점액성 연골육종; 자궁육종; 안와세포육종; 뇌, 척수, 혈관계; 혈관육종; 윌름 종양; 판코니 빈혈; 랑게르한스세포조직구증식증; 신장의 악성 간상 종양; 간암;

내분비암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 위암; 위장암; 비뇨생식기 암; 신경교종; 부인과 암; 두경부암; 간세포암; 하인두 암; 섬세포암; 신장암; 후두암; 폐암; 피부암; 비-흑색종 피부 암; 흑색종; 악성 흑색종; 결막의 악성 흑색종, 포도막의 악성 흑색종; 중피종; 다발성 골수종; 비인두암; 식도암; 췌장암; 뇌하수체암; 전립선암; 위암; 고환암, 흉선암; 갑상선암; 이행세포암; 융모상피암; 고환 및 난소 미분화 세포종을 포함한다.

[0280] 본원에서 정의되는 "샘플"은 피험자, 일반적으로 포유동물 피험자로부터 얻은 임의의 샘플을 말한다. 생물학적 샘플의 예는 체액 및 조직 표본을 포함한다. 샘플의 공급원은 혈액, 혈청, 혈장, 모유, 고름, 뇌척수액, 면봉표본, 조직 찰과표본, 세척물, 소변, 대변, 체강의 세척으로부터 얻은 행균액, 가래, 신체 영역으로부터 얻은 표본(목, 질, 귀, 눈, 피부, 림프절과 같은 염증 조직 등)으로서 생리적 매개물로부터 유래될 수 있다. 조직 표본은 비장, 림프절 및 임의의 림프구-함유 조직의 생검을 포함한다.

[0281] 본 명세서 및 특허청구범위의 용어 "샘플"은 그것의 가장 광범위한 의미로 본원에서 사용된다.

[0282] 통상 선형적으로 액체가 아닌 표본 및 샘플은 액체 배지와 접촉되고 이어서 검출 약제와 접촉된다.

[0283] 본 발명의 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되는 상기 샘플은 체액 또는 배양물-유래 샘플 중 임의의 하나이다.

[0284] 배양물-유래 샘플은 세포 추출물, 배지 샘플, 또는 체액으로부터의 배양물, 예를 들어 혈액의 배양물 일 수 있다.

[0285] "전혈"은 동물 또는 인간으로부터 수집된 혈액을 의미한다. 전혈은 헤파린, EDTA, 시트레이트 또는 응고 및 응혈을 방지하는 임의의 다른 물질과 함께 수집될 수 있다.

[0286] 생물학적 샘플은 니트로셀룰로오스와 같은 고체상 지지체 또는 담체, 또는 세포, 세포 입자 또는 가용성 단백질을 고정할 수 있는 다른 고체 지지체 또는 담체로 처리될 수 있다. 지지체 또는 담체는 이어서 적당한 완충제로 세척된 다음, 상기 주목한 바와 같이 본 발명에 따르는 검출가능하게 표지된 항체로 처리될 수 있다. 고체상 지지체 또는 담체는 이어서 완충제로 2회 세척되어 결합되지 않은 항체가 제거될 수 있다. 그 다음에 상기 지지체 또는 담체 상에서 결합된 항원 또는 표지의 양은 통상적인 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0287] "고체상 지지체", "고체상 담체", "고체 지지체", "고체 담체", "지지체" 또는 "담체"는 항원 또는 항체들과 결합할 수 있는 임의의 지지체 또는 담체로 의도된다. 잘-알려진 지지체 또는 담체들은 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론 아밀라아제, 천연 및 변형 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 및 마그네타이트를 포함한다. 담체의 특성은 본 발명의 목적을 위해 일정한 정도로 가용성 또는 불용성일 수 있다. 지지체 재료는 커핑된 분자가 항원 또는 항체와 결합할 수 있도록 하기 위해 사실상 어떤 가능한 구조적 배치를 가질 수 있다. 따라서 지지체 또는 담체 배치는 비드와 같은 구형, 테스트 튜브의 내면, 또는 막대의 외면과 같은 원통형일 수 있다. 다른 담체들은 동일한 튜브 내에서 다른 항원들에 대해 사용될 수 있다. 대안으로, 표면은 시트, 테스트 스트립 등과 같이 편평할 수 있다. 특정 지지체 또는 담체들은 폴리스티렌 비드를 포함한다. 당업자는 항체 또는 항원과 결합을 위한 다수의 다른 적당한 담체들을 알 것이고, 또는 통상적인 실험의 사용에 의해 그것을 확인할 수 있을 것이다.

[0288] 분석에 부가될 수 있는 세척, 교반, 진탕, 여과 등과 같은 다른 단계들은 특정 상황에 대해 관습적 또는 필수적이다.

[0289] 본원에서 정의되는 "배양물 배지"는 본 발명을 실행하기 위한 샘플을 지속시키는 데 사용될 수 있는 임의의 배지를 의미하며, 제한되는 것은 아니지만 바람직하게는 적절한 항생물질 및 글루타민, 및 선택적으로 항-진균제, 비-필수 아미노산, DTT, 피루브산나트륨 등과 같은 다른 첨가제로 보충된 송아지(소) 태아 혈청이 있는 RPMI 1640 또는 송아지(소) 태아 혈청이 없는 RPMI 1640를 포함한다. 본 발명을 실행하는데 사용될 수 있는 다른 배양물 배지는, 제한되는 것은 아니지만, Eagles, Dulbecco's, McCoy's, Media 199, Waymouth's 배지, 및 보충물이 있는 무혈청 배지 또는 보충물이 없는 무혈청 배지를 포함한다. 다른 구체예에서, 자극제는 배지가 없다.

[0290] 본 발명은 또한 필요한 피험자에서 질병 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애로 구성되는 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체의 치료적으로 유효한 투약량을 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특히, 상기 폴리펩티드 또는 항체는 치료를 위해 사용될 때, 세포독성 약물과 콘쥬게이트되고, 또는 표적 세포 또는 조직에 독성 물질의 전달을 위한 담체로서 역할을 한다. 이 문맥에서, 표적 세포는 상기 질병 또는 장애와 관련된 세포이다.

- [0291] 본 발명자들은, 하기 실시예에서, PRT7이 특정 형태의 암에서 상승된다는 것을 나타내었다. 특히, 발명자들은 PRT7이 체장암 또는 폐암이 있는 남성 환자에서 상당히 상승하였음을 증명하였다.
- [0292] 따라서 본 발명자들은 샘플에서 암의 진단을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 피험자로부터의 샘플에서 PRT7 폴리펩티드, 또는 그것을 포함하는 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함하고; 이에 의해 대조군보다 더 높은 PRT7 수준을 나타내는 샘플은 암의 존재를 나타낸다.
- [0293] 다른 추가 양태에서, 본 발명은 질병 또는 장애의 진단 및/또는 치료 효능을 모니터링 및/또는 예후의 평가를 위한 진단 키트를 제공하며, 상기 질병 또는 장애는 면역 성분 또는 병인을 가지는 질병, 전염성 질환, 급성 및 만성 염증성 질환, 암, 이식 및 자가면역 질환, 생식력과 관련된 질병 및 탄수화물 대사의 장애로 구성되는 군으로부터 선택되고, 상기 키트는 하기 구성요소들을 포함한다:
- [0294] a. 본 발명의 본원에서 설명하는 적어도 하나의 항체 또는 그것을 포함하는 조성물; 및
- [0295] b. 샘플 내 항원의 존재하에서 검출을 수행하기 위한 설명서, 상기 항원은 본 발명의 상기 항체에 의해 특이적으로 인식된다.
- [0296] 상기 키트는 하기 구성요소 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다:
- [0297] a. 시험되어야 하는 샘플을 수집하기 위한 적어도 하나의 수단;
- [0298] b. 상기 항체에 의해 상기 항원의 상기 인식의 검출에 필요한 적어도 하나의 시약; 및
- [0299] c. 적어도 하나의 대조군 샘플.
- [0300] 본 발명에 의해 제공되는 키트의 한 특이적 예는 PRT7 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체, 그것의 단편 또는 유도체, 또는 그것을 포함하는 단백질을 포함하는 키트이며, 상기 키트는 암의 진단에 효과적이다.
- [0301] 피험자는 포유동물, 인간 또는 비-인간일 수 있다. 보통 피험자는 인간 환자, 또는 건강한 개인이다.
- [0302] 한 구체예에서, 임의의 이러한 키트는, 예를 들어 ELISA 키트와 같은 항체(또는 인식하는 약제) 포획 분석 키트이며, 이것은 고체 지지체, 본 발명에서 정의되는 적어도 하나의 항체, 및 선택적으로 적절하다면 제2 항체를 포함한다. 키트는 추가로 상기 설명한 바와 같은 검출가능한 모이어티, 효소 기질 및 착색 시약과 같은 임의의 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 항체 포획 진단 키트는, 대안으로 본원에서 설명되는 성분 및 시약을 일반적으로 포함하는 면역블롯 키트이다. 본 발명의 진단 키트에 포함되는 특정 시약 및 다른 성분은 키트에서 실행되는 특정 진단 방법에 따라서 당업자로부터 선택될 수 있다. 이러한 키트는 피험자로부터 얻은 조직 또는 유체, 특히 전혈, PBMC 또는 배양 전 및/또는 후의 백혈구와 같은 생물학적 샘플 중에서 항체를 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0303] 본 발명의 진단 방법에서 적당한 수단을 언급하는 경우, 상기 적당한 수단은 면역 친화도 과정, 효소 분석, 또는 그 중에서도 구조적 특징을 검출하기 위한 수단일 수 있다.
- [0304] 상기 적당한 수단이 면역 친화도 과정인 경우, 상기 과정은 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역-침전법, FACS 중 임의의 하나, 또는 본 발명에 설명되는 항체를 이용하는 어떤 다른 면역친화도 과정이다.
- [0305] 하나의 특정 구체예에서, 검출은 포획 ELISA를 통해 달성된다.
- [0306] 포획 ELISA (또한 "샌드위치" ELISA로서 알려짐)는 물질(예컨대, 호르몬, 세포 신호전달 화합물질, 전염성 질병 항원 및 사이토카인)의 양을 피코그램 내지 마이크로그램으로 정량화하는 민감한 분석이다. ELISA의 이런 종류는 분석되는 물질이 너무 묽어서 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트(예컨대 세포 배양물 상청액에서 단백질)에 결합할 수 없고 또는 플라스틱(예컨대 작은 유기 분자)에 잘 결합하지 않을 때 추구된다. 포획 항체, 샘플, 대조군에 대한 최적의 희석, 및 항체를 검출하는 것 뿐만 아니라 인큐베이션 시간은 경험적으로 결정되고, 대규모 적정을 필요로 할 수 있다. 효소-표지 검출 항체를 사용하는 것이 이상적이다. 그러나, 검출 항체가 비표지라면, 제2 항체는 코팅 항체 또는 샘플과 교차 반응해서는 안 된다. 적합한 음성 및 양성 대조군이 또한 포함되어야 한다.
- [0307] 사용되는 포획 또는 코팅 항체는 탄산염-중탄산염 완충제 또는 PBS 중에서 희석되어야 한다. 포획 항체들은 전형적으로 0.2 내지 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 플레이팅된다. 친화도 정제 항체를 사용하거나 또는 IgG 분획을 최소로 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로 샘플은 10 ng-10  $\mu\text{g/웰}$  범위에서 PBS 중에서 희석된다(더 민감한 분석은, 더 적은 샘플이 요구된다).

- [0308] 본 명세서에서 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "검출가능한 모이어티"는 그것의 임의의 원자, 분자 또는 부분을 말하며, 이것의 존재, 부재 또는 수준은 직접 또는 간접적으로 모니터링될 수 있다. 한 예는 방사성동위원소를 포함한다. 다른 샘플은 (i) 색 또는 광 방출(발광) 반응을 촉매할 수 있는 효소 및 (ii) 형광단을 포함한다. 검출가능한 모이어티의 검출은 예를 들어 형광단의 경우와 같이 검출가능한 모이어티가 그 자체로 검출가능하도록 직접 제공될 수 있다. 대안으로, 검출가능한 모이어티의 검출은 간접적일 수 있다. 후자의 경우에, 그 자체가 직접 검출가능한 검출가능한 모이어티와 반응하는 제2 모이어티가 바람직하게 사용된다. 검출가능한 모이어티는 항체에 내재될 수 있다. 예를 들어, 항체의 불변 영역은 직접 검출가능한 모이어티를 가지는 제2 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 간접적으로 검출가능한 모이어티로서 작용할 수 있다
- [0309] 따라서, 제2 항체는 본 발명의 항체의 검출을 위한 특히 적당한 수단이다. 이 2차 항체는 검출가능한 모이어티에 그 자체가 콘주게이트될 수 있다. 본 발명에 따르는 항체가 검출가능하게 표지될 수 있는 한 방법은 그것을 효소에 결합하는 것에 의한다. 이 효소는 차례로, 적절한 기질에 노출된 후에, 예를 들어, 분광측색방법, 형광측정에 의해 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 모이어티를 만들기 위한 방식으로 기질과 반응할 것이다. 항체를 검출가능하게 표지하기 위해 사용될 수 있는 효소는, 제한되는 것은 아니지만, 겨자무과산화효소, 알칼리성 포스파타아제, 말레이트 탈수소효소, 포도상구균 뉴클레아제, 텔타-5-스테로이드 이소머라아제, 효모 알코올 탈수소효소, 알파-글리세로포스페이트 탈수소효소, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 아스파라기나아제, 글루코오스 옥시다아제, 베타-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라아제, 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린-에스테라아제를 포함한다.
- [0310] 검출은 효소에 대한 크로모제닉 기질을 사용하는 비색법에 의해 수행될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준과 기질의 효소적 반응의 정도의 시각적 비교에 의해 수행될 수 있다.
- [0311] 제1 항체가 결합되는 고체 지지체는 임의의 수-불용성, 수-불현탁성의 고체 지지체일 수 있다. 적당한 고체 지지체의 예는 폴리스티렌, 여과지, 테스트 튜브 및 마이크로타이터 플레이트의 거대 비드를 포함한다. 제1 항체는 공유 결합 또는 흡착에 의해 고체 지지체에 결합할 수 있다. 고체 지지체 사용의 이점은 고체와 액체상의 분리에 대해 원심분리 단계가 없다는 것이다.
- [0312] 상기 언급한 고체 지지체는 폴리스티렌, 아가로오스, 세파로오스, 셀룰로오스, 유리 비드와 같은 폴리머 및 셀룰로오스 또는 다른 폴리머의 자화될 수 있는 입자를 포함할 수 있다. 고체-지지체는 거대 또는 소 비드 또는 입자, 튜브, 플레이트의 형태 또는 기타 형태로 있을 수 있다.
- [0313] 고체 지지체로서, 사용은 제1 항체, 예를 들어 본 발명의 발명가들에 의해 제조된 항-PRT5, 항-PRT6, 항-PRT7, 또는 항-PRT8 항체, 또는 그것의 임의의 단편 또는 유도체로 코팅된 내벽이 있는 마이크로타이터 플레이트의 테스트 튜브로 구성된다.
- [0314] 본 발명의 진단 방법에 의해 사용되는 "결정하는"은 특이적 샘플에 존재하는 바이오마커의 양을 추정, 정량화, 계산 또는 달리 유도하는 것을 포함한다. 이것은 예를 들어, 검출가능한 생성물의 출현, 예를 들어 기질 수준에서 임의의 검출가능한 변화 또는 생성물의 출현 또는 기질의 소실 속도의 어떤 변화일 수 있는 종말점 표시를 측정함으로써, 또는 본 발명에 의해 설명되는 바이오마커에 결합된 항체의 양을 측정함으로써 달성될 수 있다.
- [0315] 상기 시험 키트 모두에서, 시험되는 샘플을 수집하기 위한 상기 수단은 면봉, 피펫, 또는 유사한 수집 수단일 수 있고, 상기 인큐베이션 수단은 플레이트, 테스트 튜브, 유리 또는 플라스틱 표면, 웰, 또는 흡착지의 조각, 또는 유사한 수단에 위치되는 액체 또는 반고체 배양물 배치될 수 있다.
- [0316] 키트의 어떤 버전은 시험이 스캐너 상에서 실행되고 결과가 컴퓨터에 실시간으로 공급되도록 설계되었다는 것이 인식되어야 한다. 이것은 완전한 정보가 모든 관련된 곳에 직접 보내질 수 있고 어떤 미래의 참고를 위해 완전하게 저장될 것임을 보장할 것이다.
- [0317] 키트의 다른 구체예에서, 상기 샘플은 채액 및 배양물-유래 샘플 중 하나이다.
- [0318] 본 발명의 항체와 접촉되는 샘플은 어레이(array)에서 배열될 수 있다.
- [0319] 본 방법에 의해 사용되는 용어 "어레이" 및 본 발명의 키트는 인식-약제, 즉 적어도 하나의 본 발명의 항체의 "처리된" 공간적 배열을 말한다. 어레이의 각 "처리"는 인식 에이전트를 함유하는 사전결정된 특이적 공간 영역이다. 예를 들어, 어레이는 복수의 용기(시험 튜브), 플레이트, 각각 다른 항체를 함유하는 마이크로-플레이트 중에서 마이크로-웰일 수 있다. 어레이는 또한 별개 영역(점, 선, 컬럼)에서 다른 및 알려진 인식 에이전트, 예를 들어 항체를 보유하는 임의의 고체 지지체일 수 있다. 어레이는 바람직하게는 빌트-인의 적절한 대조군,



예를 들어 샘플이 없는 영역, 항체가 없는 영역, 즉, 용매 및 시약 단독 및 항체에 의해 인식되는 합성 또는 분리된 단백질 또는 펩티드를 함유하는 영역(양성 대조군)이 없는 영역을 포함한다. 본 발명의 어레이에 대해 사용된 고체 지지체는 본 발명에 의해 제공되는 키트와 함께 이후에 본원에서 더욱 상세하게 설명된다.

[0320] 본 발명의 키트에서 사용에 적당한 고체 지지체는 전형적으로 액체상에서 실질적으로 불용성이다. 본 발명의 고체 지지체는 지지체의 특정 형태로 제한되지 않는다. 오히려, 다수의 지지체가 이용가능하고 당업자에게 공지되어 있다. 따라서, 유용한 지지체는 고체 및 반-고체 매트릭스, 예컨대 에어로졸 및 하이드로겔, 수지, 비드, 바이오칩(필름 코팅된 바이오칩을 포함), 마이크로플루이딕 칩, 규소 칩, 다중-웰 플레이트(또한 마이크로타이터 플레이트 또는 마이크로플레이트로서 언급됨), 막, 필터, 전도성 및 비전도성 금속, 유리(현미경 슬라이드를 포함) 및 자기 지지체를 포함한다. 유용한 고체 지지체의 더 구체적인 예는 실리카 겔, 폴리머 막, 입자, 유도체화된 플라스틱 필름, 유리 비드, 면, 플라스틱 비드, 알루미늄 겔, 다당류, 예컨대 세파로오스, 나일론, 라텍스 비드, 자기 비드, 상자성 비드, 초상자성 비드, 전분 등을 포함한다.

[0321] 임의의 시약이 임의의 본 방법에 포함되고 본 발명의 키트는 상기 설명한 임의의 고체 지지체 물질에 함입, 결합, 연결, 부착, 위치된 또는 용합된 시약으로서 제공될 수 있다.

[0322] 본 발명의 방법 및 키트에 의해 사용된 임의의 항체는 또한 다클론성, 단클론성, 재조합체, 예를 들어 키메라 또는 본 발명의 항체로부터 유도된 단일쇄 항체(ScFv)일 수 있다.

[0323] 본 발명은 특허청구범위에 의해 한정되며, 그 내용은 본 명세서의 개시 내에 포함된 바와 같이 읽혀진다.

[0324] 본 발명은 본원에서 개시되는 특정 실시예, 공정 단계 및 재료로 제한되지 않고, 공정 단계 및 재료는 다소 다양할 수 있는 것으로 이해되어야 한다는 것이 개시되고 설명된다. 또한 본 발명의 범주는 단지 후술하는 특허청구범위 및 그것의 동등물에 의해서만 제한될 것이기 때문에 본원에서 사용되는 전문용어는 단지 특정 구체예를 설명하는 목적을 위해 사용되며, 제한하고자 하는 의도는 아니라는 것이 이해되어야 한다.

[0325] 본 명세서 및 후술하는 특허청구범위에서 사용되는 바와 같은, 단수 형태는 내용이 달리 명확하게 지시되지 않는다면 복수 대상을 포함하는 것임을 주의하여야 한다.

[0326] 본 명세서 및 하기의 특허청구 범위를 통해, 내용이 달리 요구하지 않는다면, 단어 "포함하다" 및 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹의 제외를 의미하지 않는다는 것이 이해될 것이다.

[0327] 하기 실시예는 본 발명의 양태를 수행하는 발명자에 의해 사용된 대표적인 기술이다. 이 기술들은 본 발명의 실행을 위한 대표적인 바람직한 구체예인 한편, 본 명세서에 비추어 당업자는 본 발명의 의도된 범주로부터 벗어나지 않고 수많은 변형이 만들어질 수 있다는 것을 인식할 것이 이해되어야 한다

[0328] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 관련된 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 동일한 의미를 가진다.

## [0329] 실시예

### [0330] 분자생물학의 일반적 방법

[0331] 다수의 분자 생물학 분야의 방법은 그것들이 당업자에게 잘 알려져 있기 때문에 본원에서 설명하지 않는다. 이러한 방법은, PCR, cDNA의 발현, 인간 세포의 트랜스펙션 등을 포함한다. 이러한 방법을 설명하는 교재는, 예를 들어 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN: 0879693096; F. M. Ausubel (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, ISBN: 047150338X, John Wiley & Sons, Inc에 있다. 추가로, 다수의 면역학적 기법은 그것들이 당업자에게 잘 알려져 있기 때문에, 예를 들어 웨스턴 블롯과 같이 본원에서 상세하게 설명되는 각각의 예에 있지 않다. 예를 들어, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 참조.

### [0332] ELISA 일반 프로토콜

[0333] 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA)은 용이하게-분석되는 효소에 커플링되는 항체 또는 항원을 사용함으로써 항체의 특이성과 단순한 효소 분석의 감수성을 조합한다. ELISA는 항원 또는 항체 농도의 유용한 측정을 제공할 수 있다. ELISA는 5-단계 과정이 있다: 1) 마이크로타이터 플레이트 웰을 PBS 중에서 희석한 항원으로 코팅하고, 4C에서 밤새 인큐베이션하고 세척하는 단계; 2) 비결합 자리를 PBS 중의 BSA/FCS에서 차단하여 긍정 오류 결과를 방지하고, 1시간 동안 인큐베이션하고 세척하는 단계; 3) 항체를 웰에 첨가하고, 1시간 동안 인큐

배이션하고 세척하는 단계; 4) 효소에 콘쥬게이트된 항-인간 IgG를 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션하고 세척하는 단계; 5) 기질과 효소의 반응으로 색이 있는 생성물을 만들고, 마지막으로 포지티브 반응을 나타내는 단계.

[0334] FACS 프로토콜

[0335] 1. 세포를 수확하고, 세척하고, 빙냉 PBS, 10% FCS, 1% 아지드화나트륨 중에서  $1-5 \times 10^6$  세포/ml의 농도로 현탁액 중에서 조절하였다.

[0336] 2. 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ 의 1차 표지된 항체를 첨가하였다. 필요하다면, 항체를 3% BSA/PBS로 희석하였다.

[0337] 3. 세포 + 항체를 실온 또는 4°C에서 적어도 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0338] 4. 세포를 5분 동안 400g에서 3회 원심분리에 의해 세척하고, 500 $\mu\text{l}$  내지 1ml의 빙냉 PBS, 10% FCS, 1% 아지드화나트륨에서 재현탁하였다.

[0339] 5. 유세포 분석기 상에서 세포를 분석하였다.

[0340] ELISA 과정:

[0341] 1. 교정 곡선: PRT3의 연속 희석을 2000 pg/ml 내지 31 pg/ml의 PBS(Biological Industries, Catalog No. 02-023-5A) 중에서 제조하였다.

[0342] 2. 샘플을 재빨리 37°C 욕 중에서 녹였다.

[0343] 3. 샘플 장약: 각 혈액 샘플(희석하지 않음)의 70 $\mu\text{l}$  2개(duplicate) 및 표준 샘플의 70 $\mu\text{l}$  3개(triplicate)를 Maxisorp 96-웰 플레이트(NUNC, F96 Maxisorp, Catalog No. 442404)에 장약하였고, 4°C에서 진탕하면서 밤새 인큐베이션하였다.

[0344] 4. 세척: 플레이트를 PBS 중에서 300  $\mu\text{l}$  0.05% TW-20 (Amresco, Catalog No. 0777-1L)로 4회 세척하였다.

[0345] 5. 차단: PBS 중에서 5% BSA (MP biomedical, Catalog No. 160069)를 희석하였다. 300  $\mu\text{l}$ 의 차단 완충제를 각 웰에 장약하였다. 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다.

[0346] 6. 세척: 단계 #4와 동일.

[0347] 7. 검출: KTPAF50-특이적 항체를 희석제(PBS 중에서 0.05% TW-20, 0.1% BSA) 중에서 1:250으로 희석하였다(친화도 정제됨). 100 $\mu\text{l}$ 의 검출 항원을 각 웰에 장약하였다. 실온에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다.

[0348] 8. 세척: 상기 단계 #4와 동일.

[0349] 9. HRP 콘쥬게이트: 염소 항-토끼 HRP 콘쥬게이트 항체(Cell signaling, Catalog No. 7074)를 희석제 중에서 1:200으로 희석하였다. 100 $\mu\text{l}$ 의 HRP 콘쥬게이트를 각 웰에 장약하였고, 30분 동안 실온에서 진탕하면서 인큐베이션하였다.

[0350] 10. 세척: 4 대신 5회의 세척으로, 상기 단계 #4를 반복.

[0351] 11. 발생: 100 $\mu\text{l}$  TMB (3,3',5,5'-테트라메티벤지딘, 겨자무과산화효소 기질, Millipore, Catalog No. ES001-500ML)를 각 웰에 첨가하였다. 청색의 발생과 함께, 50 $\mu\text{l}$  2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Frutarom, Catalog No. 5552540)를 첨가하였다.

[0352] 12. 마이크로플레이트 판독기에서, 웰 흡착을 450 nm에서 확인하였다.

[0353] 다클론성 항체의 제조

[0354] 다클론성 항체의 제조를 위한 표준 프로토콜을 사용하여 토끼에서 다클론성 항체를 만들었다.

[0355] 상기 폴리펩티드의 마지막 14개 아미노산을 함유하는 PRT5의 C-말단 단편을 항원으로서 사용하여, PRT5에 대한 다클론성 항체를 토끼에서 만들었다. 이 단편은 본원에서 SEQ. ID. NO. 17로서 표시된다.

[0356] 상기 폴리펩티드의 마지막 14개 아미노산을 함유하는 PRT6의 C-말단 단편을 항원으로서 사용하여, PRT6에 대한 다클론성 항체를 토끼에서 만들었다. 이 단편은 본원에서 SEQ. ID. NO. 18로서 표시된다.

[0357] 상기 폴리펩티드의 마지막 14개 아미노산을 함유하는 PRT7의 C-말단 단편을 항원으로서 사용하여, PRT7에 대한

다클론성 항체를 토끼에서 만들었다. 이 단편은 본원에서 SEQ. ID. NO. 19로서 표시된다.

[0358] 상기 폴리펩티드의 마지막 14개 아미노산을 함유하는 PRT8의 C-말단 단편을 항원으로로서 사용하여, PRT8에 대한 다클론성 항체를 토끼에서 만들었다. 이 단편은 본원에서 SEQ. ID. NO. 20으로서 표시된다.

[0359] 다수의 면역학적 기술이 당업자에게 잘 알려져 있기 때문에, 본원에서 상세하게 설명된 각각의 예에 있지는 않고, 이것들은 예를 들어, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory에서 상세하게 설명된다.

[0360] 역전사 효소 PCR(RT-PCR)

[0361] 분리한 신규 단백질의 발현 패턴을 확립하기 위해 RT-PCR 분석을 다양한 조직에서 수행하였다. 사용한 PCR 조건은 2분 동안 95℃였고, 그 다음에 45초 동안 95℃, 45초 동안 59℃ 및 5분 동안 72℃의 주기였고, 마지막 주기는 5분 동안 72℃이었다.

[0362] 서열

[0363] 본 발명에 대해 언급된 모든 서열은 하기 표 1에 존재한다.

[0364] (표 1)

**본 발명에서 제공된 서열**

| SEQ. ID. NO.   | 설명            | 서열   |
|----------------|---------------|--|
| SEQ. ID. NO. 1 | PRT5 아미노산 서열  | MKPMERWWSR ALFTTCVGP<br>SGCAAGLLWP RNTDARSPLH<br>SQTWVCSWA ALAQKHRCV<br>TPAQAP   |
| SEQ. ID. NO. 2 | PRT6 아미노산 서열  | MPPFSVGLVV VVNVVCLMLY<br>ESTTILRLYG IILFMRDLKL<br>EVEDAKITIA LALRNS  |
| SEQ. ID. NO. 3 | PRT7 아미노산 서열  | MGMIVPPSLA AAGGASTTPR<br>LHALRLTSL HQHLDLCLHP<br>SPLTPPSAP CLSGLVPPDS<br>SLSVLDLQV   |
| SEQ. ID. NO. 4 | PRT8 아미노산 서열  | MLVFLKLWPQ CLFFALTFFL<br>RNCIYFKDFL SHLFGSFAWN<br>FLLSSRSMDP TSCWTAPIWR<br>SHRPLNSAPV SESPNYPLFT<br>WSLKPETCPG LLVSLYP   |
| SEQ. ID. NO. 5 | PRT5 - 암호화 서열 | atgaagccaa tggaaagatg<br>gtggtcacga gccctctca<br>ccacctgtcc agtcggaccc<br>tctgggtgtg cagctgggt<br>gctctggccc agaaacacag<br>atgcacggtc acccctgcac<br>agccagaccc tctgggtgtg<br>cagctgggt gctctggccc<br>agaaacacag atgcacggtc<br>accctgcac agccagcccc atga                |
| SEQ. ID. NO. 6 | PRT6 - 암호화 서열 | atgcctccat tttcagtagg<br>cttggttgtt gtagtcaatg<br>tggtgtgtt gatgctatat<br>gagtctacta ctattctaag<br>actgtatggc attattcttt<br>ttatgagaga tctcaaatta<br>gaggttgagg atgcaaagat<br>aactattgcc ttggccctga ggaattct   |
| SEQ. ID. NO. 7 | PRT7 - 암호화 서열 | atggggatga ttgttctctc<br>ttccttagct gctgcaggag<br>gagcctccac aacacctagg<br>ttgcatgcat tgagggtgac<br>aagtctgcta catcaacact<br>tggacttatg tctccatccg<br>tctccccttc ctaccccacc<br>atctgctcct tgctctctg<br>gccttggtgc cccgactca<br>tcattgtctg tactggacac<br>tctccaagta tag |

[0365]

|                 |                    |  |
|-----------------|--------------------|--|
| SEQ. ID. NO. 8  | PRT8 - 암호화 서열      | atgttggtgt tcttgaagct<br>ttggcctcag tgccttttct<br>ttgctctcac attcttctcg<br>agaaattgca tctactttaa<br>agatttctct tcccacctat<br>ttggatcttt tgcctggaac<br>tttctcctaa gctccaggtc<br>catggatcct acttctctgct<br>ggactgctcc catctggaga<br>tcccacaggc cctcaactc<br>agcccctgtt tctgaatccc<br>ctaattatcc tctatttact<br>tggtcactca agccagagac<br>ttgccctggc ctccctgtct<br>cgctgtaccc cgcctga |
| SEQ. ID. NO. 9  | RT-PCR 프라이머 (PRT5) | gaagccaatg gaaagatggt ggtc   |
| SEQ. ID. NO. 10 | RT-PCR 프라이머 (PRT5) | ggtagccgtg catctgtgtt tct  |
| SEQ. ID. NO. 11 | RT-PCR 프라이머 (PRT6) | ggcttggttg ttgtagtcaa tgtgg  |
| SEQ. ID. NO. 12 | RT-PCR 프라이머 (PRT6) | attcctcagg gccaaaggcaa tagt  |
| SEQ. ID. NO. 13 | RT-PCR 프라이머 (PRT7) | ttgttctctc ttccttagct gctg   |
| SEQ. ID. NO. 14 | RT-PCR 프라이머 (PRT7) | tccagtagag acaatgatga gtcggg   |
| SEQ. ID. NO. 15 | RT-PCR 프라이머 (PRT8) | ttcttgaagc ttggcctca gtgc  |
| SEQ. ID. NO. 16 | RT-PCR 프라이머 (PRT8) | gtctctggct tgagtgaacca agta  |
| SEQ. ID. NO. 17 | PRT5 펩티드 (C-말단)    | QKHCRTVTPA QPAP  |
| SEQ. ID. NO. 18 | PRT6 펩티드 (C-말단)    | EDAKITIALA LRNS  |
| SEQ. ID. NO. 19 | PRT7 펩티드 (C-말단)    | PPDSSLVLVD TLQV  |
| SEQ. ID. NO. 20 | PRT8 펩티드 (C-말단)    | PETCPGLLVS LYPA  |

#### 실시예 1: PRT5의 특징화

신규 cDNA를 인간 cDNA 라이브러리로부터 분리하였고, 그것의 단백질 생성물을 PRT5로 칭하였다.

하기 프라이머를 RT-PCR 분석을 위해 사용하였다:

SEQ ID NO.9: gaagccaatggaaagatggtggtc

SEQ ID NO.10: ggtgaccgtgcatctgtgtttct

PCR의 생성물을 시퀀싱하였다. PCR 생성물을 아가로오스 겔에서 분석하였고, Cyber Green (Invitrogene)으로 염색하였고, PCR 생성물의 강도를 BioRad ChemiDoc 분석기를 사용하여 평가하였다. 결과를 하기 표 2에 나타내고, 채장 및 고환에서 높은 정도의 발현 정도 및, 또한 비장, 난소 및 소장에서 확인가능한 발현을 증명하였다.

(표 2)

| cDNA 라이브러리 | 신호    | G3PDH | (신호/G3PDH) | 최소 비율    |
|------------|-------|-------|------------|----------|
| 채장*        | 8384  | 3898  | 2.150847   | 3.845123 |
| 비장         | 35476 | 20116 | 1.76       | 1.35     |
| 고환*        | 35710 | 15003 | 2.38       | 1.85     |
| 난소         | 24435 | 18072 | 1.288606   | 1        |
| 소장         | 23247 | 15424 | 1.507      | 1.117    |

#### 실시예 2: C57Bl 마우스의 글루코오스 수준에서 PRT5 투여의 효과

상기 나타낸 바와 같이 채장에서 PRT5의 높은 발현은, PRT5가 글루코오스 대사에 수반될 수 있음을 제안하였다. 따라서, 이 실험의 목적은 글루코오스 수준에서 PRT5 투여의 효과를 증명하고 전환하는 것이었다.

과정:

7주령 암컷 C57Bl 마우스 (purchased from Harlan Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel)에 하기를 주입하였다:

- 식염수 - 3마리 마우스 x 4

- 1  $\mu$ g/마우스 PRT5 - 3마리 마우스 x 4

- 5  $\mu$ g/마우스 PRT5 - 3마리 마우스 x 4

[0382] 마우스를 4개의 그룹으로 나누었다. 제1 그룹을 굶겼고 주입 후 제1일에 혈액 글루코오스 수준을 확인하였다 (Accu-Chek® Performa device, Roche Diagnostics를 사용); 제2 그룹 - 주입 후 제2일, 제3 그룹 - 주입 후 제3일 및 제4그룹 - 주입 후 제4일. 기아상태를 밤새 행하였고(글루코오스 주입 전의 밤), 다음날 2 mg/kg의 글루코오스를 각 마우스에 주입하였다. 글루코오스 수준의 시간 과정 분석을 t=0, 30, 90, 120, 150 및 240 분에 확인한 글루코오스 수준으로 수행하였다. PRT5 투여 및 글루코오스 측정을 위한 프로토콜은 하기 표 3에서 나타낸다.

[0383] (표 3)

**PRT5 투여 및 글루코오스 측정을 위한 프로토콜의 요약**

| 그룹<br>일 | 1                          | 2                  | 3                  | 4                  |
|---------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1       | - PRT5/식염수<br>주입<br>- 기아상태 | - PRT5/식염수<br>주입   | - PRT5/ 식염수<br>주입  | - PRT5/ 식염수<br>주입  |
| 2       | - 글루코오스<br>주입 및 측정         | - 기아상태             |                    |                    |
| 3       |                            | - 글루코오스<br>주입 및 측정 | - 기아상태             |                    |
| 4       |                            |                    | - 글루코오스<br>주입 및 측정 | - 기아상태             |
| 5       |                            |                    |                    | - 글루코오스<br>주입 및 측정 |

[0384]

[0385] 결과를 도 1A-1D에서 나타낸다. 모든 마우스에서, 글루코오스 수준은 주입 후 처음 30분에 최고치였다. 그러나, PRT5 투여 후 시작 제2일에 놀라운 결과가 관찰되었으며, 1  $\mu$ g/kg 또는 5 $\mu$ g/kg을 투여한 마우스에서 글루코오스 수준은 식염수를 투여한 마우스에서 글루코오스 수준보다 상당히 더 낮았다. 이 효과는 그 자체로 실험의 제5일, PRT5의 주입 후 제4일에 글루코오스 수준을 측정하였을 때, 마지막 날까지 반복되었다.

[0386] 본 발명자들은 또한 PRT5가 PRT5로 처리한 마우스의 골격근에서 인슐린 수용체의 수준을 증가시킬 수 있다는 것을 관찰하였다(데이터 미제시).

[0387] 실시예 3: 건강체 및 II형 당뇨병 인간 혈액에서 PRT5 수준

[0388] 이 실험의 목적은 건강체와 II형 당뇨병 개체에서 PRT5의 수준을 비교하는 것이다.

[0389] 샘플:

[0390] 20개의 인간 혈액 혈청 샘플을 다음과 같이 50-80세의 남성 및 여성으로부터 Bioreclamation, Inc로부터 획득하였다:

[0391] - 건강한 개체로부터 10개의 샘플 (5명 남성/5명 여성)

[0392] - II형 당뇨병 환자로부터 10개의 샘플(6명 남성/4명 여성)

[0393] 샘플을 -80℃이하로 유지하였다. 샘플 상에서 상술한 정보를 하기 표 4a 및 4b에 나타낸다. 모두 코카시안 종으로부터의 샘플이었다.

[0394] (표 4a)

**PRT5 수준에 대해 분석한 샘플에 대한 세부항목(건강체)**

| 바이알 # | 성별 | 연령 |
|-------|----|----|
| 1     | 남성 | 60 |
| 2     | 남성 | 60 |
| 3     | 남성 | 61 |
| 4     | 남성 | 60 |
| 5     | 남성 | 61 |
| 6     | 여성 | 62 |
| 7     | 여성 | 60 |
| 8     | 여성 | 61 |
| 9     | 여성 | 63 |
| 10    | 여성 | 65 |

[0395]

[0396] (표 4b)

**PRT5 수준에 대해 분석한 샘플의 세부항목 (II 형 당뇨병)**

| 바이알 # | 성별 | 연령 | 약제   | 진단                                    |
|-------|----|----|--|---------------------------------------|
| D1    | 남성 | 61 | 아마릴, 노보로그, 조코, 니아스판, 리시노프릴, 뉴론틴, ASA       | 2 형 당뇨병, HTN, 고콜레스테롤, 퇴행성 관절염         |
| D2    | 남성 | 57 | 엑토스, 조코, 리시노프릴, ASA, 휴마로그                  | 2 형 당뇨병, HTN, 고콜레스테롤                  |
| D3    | 여성 | 51 | 엑토스 플러스메트, 조코, 베니카르, 메토프롤롤, 이펙사            | 2 형 당뇨병, HTN, 고콜레스테롤                  |
| D4    | 남성 | 59 | 노보로그, 심코, 글리메프릴, 로바사, 프린지드, 애드베어           | 신경병증과 함께 2 형 당뇨병, HTN, 고콜레스테롤, 기관지 천식 |
| D5    | 여성 | 71 | 프라비알, 리피토, 메토프롤롤, 트리코, 디오반, 메트포르민          | 비정상적 운동부하 심전도 측정, 2 형 당뇨병, 고혈압        |
| D6    | 남성 | 76 | 아테놀롤, 클로니딘, 크레스토, 알로푸리놀, 셀셀트, 프레드니손, 네오랄   | 2 형 당뇨병, 신경병증                         |
| D7    | 남성 | 65 | 메토프롤롤, 자누비아, 아마릴, 라미프릴, 글루메트자              | 2 형 당뇨병, 신경병증, 고콜레스테롤, 고혈압            |
| D8    | 여성 | 64 | 오메프라졸, 뉴론틴, 메트포르민, 엑토스, 아쿠프릴, 조코, 딜티아젠펜    | 2 형 당뇨병, 신경병증, 고콜레스테롤, 고혈압            |
| D9    | 남성 | 61 | 엑토스, 디오반, 메토프롤롤, 조코                        | 2 형 당뇨병, HTN, 고콜레스테롤                  |
| D10   | 여성 | 63 | 메토트렉세이트, 폴산, 플라케날, 글루코파지, 프레드니손, 디아지드, 디오반 | 류마티스 관절염, HTN, 2 형 당뇨병                |

[0397]

[0398] PRT5 수준을 항-PRT5 항체를 사용하여 ELISA를 통해 검출하였다. ELISA 과정은 상기 설명하였다. 혈액 샘플을 희석하지 않았고, 항-PRT5 항체를 희석제(0.05% Tween20, PBS 중의 0.1% BSA) 중에서 1:250으로 희석하였다. 교정 곡선에 대해, PRT5의 연속 희석을 4000 pg/ml 내지 62.5 pg/ml로 PBS 중에서 제조하였다.



[0399] 결과를 도 2A-2B에 나타낸다. 특히 도 2B에서 나타내는 바와 같이, PRT5의 수준은 II형 당뇨병 샘플에서 상당히 감소된다.

[0400] 상기 실시예 2에서 설명한 결과와 함께 본원에서 나타내는 결과는, PRT5가 글루코오스 대사, 및 특히 그것의 조절에 직접적으로 수반된다는 것을 제안한다. 가장 중요하게는, 결과 설정은 둘 다 당뇨병의 치료를 위한 치료제로서 PRT5의 사용을 지지한다.

[0401] **실시예 4: PRT6의 특징화**

[0402] 제2 신규 cDNA를 인간 cDNA 라이브러리로부터 분리하였고, 그것의 단백질 생성물을 PRT6로 칭하였다.

[0403] 하기 프라이머를 RT-PCR 분석을 위해 사용하였다:

[0404] SEQ. ID. NO.11: ggcttggttggttgtagtcaatgtgg

[0405] SEQ. ID. NO.12: attcctcaggccaaggcaatagt

[0406] 상기 실시예 1에서와 같이, 조직 발현 분석을 RT-PCR을 사용하여 수행하였고, 얻은 결과를 하기 표 5에서 요약하였다. 본질적으로, PRT6의 발현은 고환에서 배타적인 것으로 발견되었다.

[0407] (표 5)

**PRT6의 발현**

| cDNA 라이브러리 | 신호   | G3PDH | (신호/G3PDH) | 최소 비율    |
|------------|------|-------|------------|----------|
| 고환*        | 5710 | 19003 | 0.300479   | 1.430852 |

[0408]

[0409] **실시예 5: 수컷 Balb/C 테스토스테론 수준에서 PRT6 투여의 효과**

[0410] 표 5에서 나타내는 바와 같이 고환에서 PRT6의 높은 발현은 PRT6가 테스토스테론 발현에 수반될 수 있다는 것을 제안하였다. 따라서, 이 실험의 목적은 테스토스테론 수준에서 PRT6 투여의 효과를 확인하는 것이다.

[0411] 과정:

[0412] 2그룹의 Balb/C 마우스를 사용하였다:

[0413] ■ 3-4주령의 수컷 Balb/C - 테스토스테론에 대한 음성 대조군 - 18마리 마우스

[0414] ■ 7-8주령 수컷 Balb/C 마우스 - 18마리 마우스

[0415] 각 그룹을 3개의 하위-그룹으로 나누었다(각각 6마리 마우스). 각 그룹을 200  $\mu$ l의 하기 중 하나로 4일-기간 동안 매일 주입하였다:

[0416] ■ 2배-증류된 물(double-distilled water; DDW) 중에서 4% DMSO

[0417] ■ 0.5  $\mu$ g/kg의 PRT6 (DDW중에서 희석)

[0418] ■ 5  $\mu$ g/kg의 PRT6 (DDW중에서 희석)

[0419] 4일 후, 혈액 혈청을 마우스로부터 추출하였고, 테스토스테론 수준을 시험하였다. R&D Systems Testosterone Immunoassay (R&D Systems Catalog Number KGE010)를 사용하여 테스토스테론 측정을 행하였다. 이 분석은 경쟁적 결합 기술을 기반으로 한다. 테스토스테론에 특이적인 단클론성 항체는 마이크로플레이트에 코팅된 염소 항-마우스 항체에 결합한다. 과량의 단클론성 항체를 제거하기 위해 세척한 후, 샘플 중에 존재하는 테스토스테론은 단클론성 항체 상의 자리에 대해 고정된 양의 겨자무과산화효소(HRP)-표지된 테스토스테론과 경쟁한다. 그 다음에 다른 세척으로 과량의 콘주게이트 및 결합되지 않은 샘플을 제거한다. 기질 용액을 웰에 첨가하여 결합된 효소 활성을 결정한다. 색 발생이 중단되고, 흡광도는 450nm에서 판독한다. 색의 강도는 샘플 내 테스토스테론의 농도와 반비례한다.

[0420] 결과를 도 3A-3B에 나타낸다. 흥미롭게도 PRT6로 처리한 마우스는 테스토스테론 수준의 상당한 증가를 나타내었다. 처리가 둘 다 테스토스테론 수준의 증가를 초래한다 해도, 5  $\mu$ g/kg 투여의 효과는 5  $\mu$ g/kg 투여 후의 효과보다 훨씬 더 현저하였다.

[0421] **실시예 6- PRT7의 특징화**

[0422] 제3 신규 cDNA를 인간 cDNA 라이브러리로부터 분리하였고, 그것의 단백질 생성물을 PRT7으로 칭하였다.

[0423] 하기 프라이머를 RT-PCR 분석을 위해 사용하였다:

[0424] SEQ. ID. NO.13: ttgttcctccttccttagctgctg

[0425] SEQ. ID. NO.14: tccagtacagacaatgatgagtcggg

[0426] 상기 실시예 1에서와 같이, 조직 발현 분석을 RT-PCR을 사용하여 수행하였고, 얻은 결과를 하기 표 6에서 요약한다. 본질적으로, PRT7의 현저한 발현을 태아 뇌, 및 또한 골격근 및 간에서 발견하였다.

[0427] (표 6)

**PRT7의 발현**

| cDNA 라이브러리 | 신호    | G3PDH | (신호/G3PDH) | 최소 비율   |
|------------|-------|-------|------------|---------|
| 뇌          | 3340  | 5971  | 0.55937    | 1.00000 |
| 간          | 7809  | 6002  | 1.3        | 2.32    |
| 골격근        | 10849 | 6273  | 1.72       | 3.074   |
| 태아뇌        | 8272  | 4069  | 2.032932   | 3.62    |

[0428]

[0429] **실시예 7: 건강한 개체 및 췌장암 또는 폐암 환자의 인간 혈액에서 PRT7 수준**

[0430] 이 실험은 건강한 개체로부터, 및 췌장암 또는 폐암 환자로부터 혈액 중의 PRT7 수준을 확인하는 것을 목적으로 한다.

[0431] 샘플:

[0432] - 췌장암 (I):

[0433] 19개의 인간 혈액 혈청 샘플은 다음과 같이 Bioreclamation, Inc.로부터 얻었다:

[0434] ■ 건강체: 5명 남성/4명 여성

[0435] ■ 췌장암: 5명 남성/5명 여성

[0436] - 췌장암 (II):

[0437] 10명 남성 인간 혈액 혈청 샘플을 다음과 같이 Bioreclamation, Inc.로부터 얻었다:

[0438] ■ 5명 건강체

[0439] ■ 5명 췌장암

[0440] - 폐암:

[0441] 20명 인간(남성 및 여성) 혈액 혈청 샘플을 남성 및 여성으로부터 Bioreclamation, Inc.로부터 얻었다:

[0442] ■ 10명 건강체(5명 남성/5명 여성)

[0443] ■ 10명 폐암(5명 남성/5명 여성)

[0444] 샘플을 -80℃ 이하로 유지하였다. 샘플에 대한 상세한 정보는 하기 표 7a-7b, 8a-8b, 및 9a-9b에서 나타낸다. 모든 샘플은 코카시안 종으로부터의 샘플이었다.



[0445] (표 7a)

체장암(I) 샘플의 세부항목 (건강체 - 대조군으로서 사용)

| 바이알 # | 성별 | 연령 |
|-------|----|----|
| 1     | 남성 | 60 |
| 2     | 남성 | 60 |
| 3     | 남성 | 61 |
| 4     | 남성 | 60 |
| 5     | 남성 | 61 |
| 6     | 여성 | 62 |
| 7     | 여성 | 60 |
| 8     | 여성 | 61 |
| 9     | 여성 | 63 |
| 10    | 여성 | 65 |

[0446]

[0447] (표 7b)

체장암(I) 샘플의 세부항목 (환자 - 남성 + 여성)

| 바이알 # | 성별 | 연령 | 약제      | 단계 |
|-------|----|----|---------|----|
| C1    | 남성 | 69 | 젬자 RT   | 2  |
| C2    | 남성 | 71 | 젬자      | 4  |
| C3    | 남성 | 69 | 없음      | 2  |
| C4    | 여성 | 64 | 젬자      | 2  |
| C5    | 여성 | 64 | 젬자      | 2  |
| C6    | 여성 | 63 | 젬자      | 3  |
| C7    | 여성 | 80 | 젬자      | 4  |
| C8    | 여성 | 75 | 젬자      | 3  |
| C9    | 남성 | 71 | 젤로다, 젬자 | 3  |
| C10   | 남성 | 80 | 없음      | 4  |

[0448]

[0449] (표 8a)

체장암(II) 샘플의 세부항목 (모두 남성) (건강체 - 대조군으로서 사용)

| 바이알 # | 연령 |
|-------|----|
| 1     | 62 |
| 2     | 63 |
| 3     | 48 |
| 4     | 47 |
| 5     | 54 |

[0450]

[0451] (표 8b)

체장암(II) 샘플의 세부항목 (환자 - 모두 남성)

| 바이알 # | 연령 | 약제     | 단계 |
|-------|----|--------|----|
| C1    | 46 | 젬자, 탁솔 | 4  |
| C2    | 69 | 젬자     | 2  |
| C3    | 57 | 없음     | 2  |
| C4    | 61 | 젬자     | 2  |
| C5    | 58 | 젬자     | 2  |

[0452]

[0453] (표 9a)

폐암 샘플의 세부항목(건강체 - 대조군으로서 사용)

| 바이알 # | 성별 | 연령 |
|-------|----|----|
| 1     | 남성 | 60 |
| 2     | 남성 | 60 |
| 3     | 남성 | 61 |
| 4     | 남성 | 60 |
| 5     | 남성 | 61 |
| 6     | 여성 | 62 |
| 7     | 여성 | 60 |
| 8     | 여성 | 61 |
| 9     | 여성 | 63 |
| 10    | 여성 | 65 |

[0454]

[0455] (표 9b)

폐암 샘플의 세부항목(환자, 남성 + 여성)

| 바이알 # | 성별 | 연령 | 약제                        | 단계 |
|-------|----|----|---------------------------|----|
| L1    | 여성 | 68 | 이부프로펜, 비코딘, 스피리바          |    |
| L3    | 여성 | 63 | 오메프라졸, 나소넥스, 레보실, 액토넬, 칼슘 |    |
| L4    | 여성 | 65 | 엠비엔, 히코단 시럽, 신트로이드        | 4  |
| L5    | 남성 | 70 | 탁솔, 카르보플라틴                | 4  |
| L6    | 여성 | 65 | 탁솔, 카르보플라틴                | 3  |
| L7    | 남성 | 68 | 시스플라틴, 젬자                 | 2  |
| L8    | 남성 | 53 | 시스플라틴, 젬자                 | 1  |
| L9    | 남성 | 69 | 시스플라틴, 젬자                 | 2  |
| L10   | 남성 | 63 | 시스플라틴, 젬자                 | 3  |

[0456]

[0457] 항-PRT7 항체를 사용하여 ELISA를 통해 PRT7 수준을 검출하였다. ELISA 과정은 상기 설명하였다. 혈액 샘플을 PBS 중에서 1:3으로 희석하였고, 항-PRT7 항체를 희석제(0.05% Tween20, PBS 중의 0.1% BSA). 중에서 1:200으로 희석하였다. 고정 곡선에 대해, PRT7의 연속 희석을 4000 pg/ml 내지 62.5 pg/ml로 PBS 중에서 제조하였다.

[0458] 결과를 도 4A-4F에서 나타낸다. 놀랍게도, PRT7 수준은 남성 췌장암 환자로부터의 샘플에서 상당히 더 높았지만(도 4B-4D), 여성은 그렇지 않았다(도 4A-4B). 유사하게, PRT7 수준은 또한 남성 폐암 환자의 샘플에서 상당히 상승되었지만, 여성에서는 그렇지 않았다(도 4E-4F).

[0459] 이 결과는 PRT7이 남성에서 췌장암과 폐암 둘 다에 대해 마커가 될 수 있고, 따라서, 남성에서 췌장암과 폐암의 검출을 위한 진단 도구로서 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0460] 가장 놀랍게도, 본 발명자들은 PRT7이 p53의 발현을 유발할 수 있다는 것을 추가로 관찰하였다[데이터 미제시].

# [0461] 실시예 8: PRT8의 특징화

[0462] 제4 신규 cDNA를 인간 cDNA 라이브러리로부터 분리하였고, 그것의 단백질 생성물을 PRT8로 칭하였다.

[0463] 다음의 프라이머를 RT-PCR 분석을 위해 사용하였다:

[0464] SEQ. ID. NO.15: ttcttgaagctttggcctcagtgc

[0465] SEQ. ID. NO.16: gtctctggcttgagtaccaagta

[0466] 상기 실시예 1과 같이, 조직 발현 분석을 RT-PCR을 사용하여 수행하였고, 얻은 결과를 하기 표 10에서 요약하였다. 본질적으로 PRT8의 발현을 고환, 간 및 췌장에서 발견하였다.

[0467] (표 10)

**PRT8의 발현**

| cDNA 라이브러리 | 신호   | G3PDH | (신호/G3PDH) | 최소 비율 |
|------------|------|-------|------------|-------|
| 고원*        | 7710 | 16003 | 0.48       | 0.48  |
| 간          | 4809 | 6702  | 0.71       | 1.0   |
| 췌장*        | 3384 | 3998  | 0.84       | 1.18  |

[0468]

**실시예 9: C57B1 마우스의 글루코오스 수준에서 PRT8 투여의 효과**

[0470] 췌장에서 PRT8의 발현은 PT8이 췌장 기능, 및 특히 글루코오스 대사에 수반될 수 있다는 것을 제안한다. 따라서, 글루코오스 수준에서 PRT8 투여의 효과를 시험하였다.

[0471] 과정:

[0472] 7주령 암컷 C57B1 마우스 (Harlan Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel로부터 구입)를 다음으로 주입하였다:

[0473] - 식염수 - 3마리 마우스 x 2그룹

[0474] - 1 $\mu$ g/마우스 PRT8 - 3마리 마우스 x 2그룹

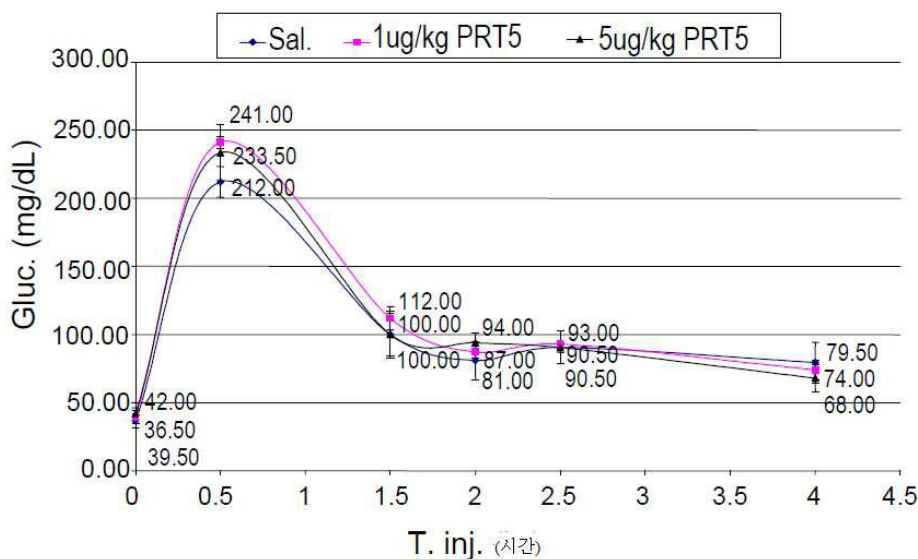
[0475] - 10  $\mu$ g/마우스 PRT8 - 3마리 마우스 x 2그룹

[0476] 모든 마우스를 제1일에 PRT8(또는 식염수)로 주입하였다. 제1 그룹을 제2일에 굶겼고, 제3일에 혈액 글루코오스 수준을 확인하였다(Accu-Chek® Performa device, Roche Diagnostics를 사용). 제2 그룹을 굶겼고, 주입 후 제3일에 혈액 글루코오스 수준을 확인하였다. 기아상태를 밤새 지속하였고(글루코오스 주입 전 밤), 다음 날 2 mg/kg의 글루코오스를 각 마우스에 주입하였다. 글루코오스 수준의 시간 과정 분석을 글루코오스 주입 후 t=0, 30, 60 및 120분에 확인한 글루코오스 수준으로 수행하였다.

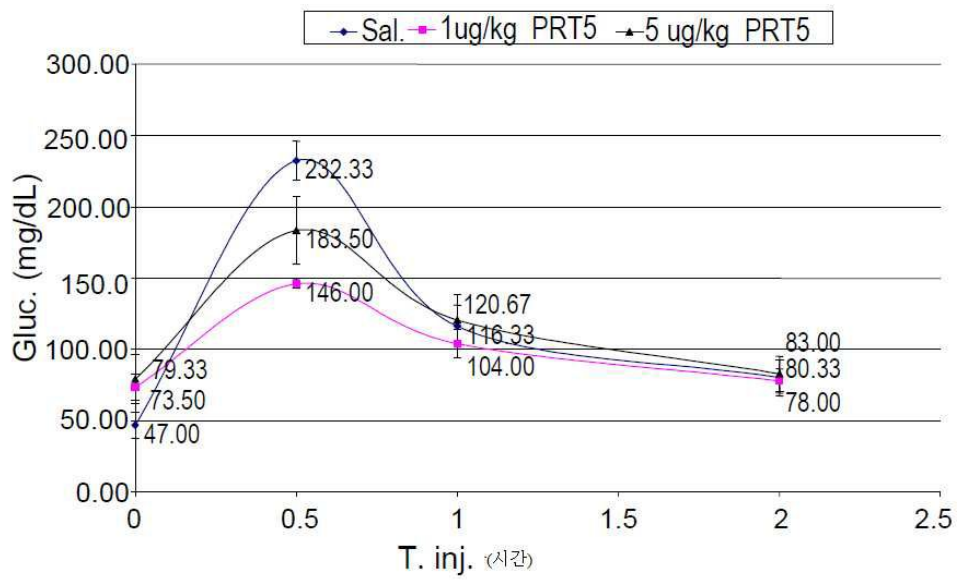
[0477] 결과를 도 5A-5B에 나타낸다. 모든 처리군에서, 글루코오스 수준은 주입 후 첫번째 30분에 최대였다. 그러나, PRT8 투여 후 시작 2일에 놀라운 결과를 관찰하였으며, 1  $\mu$ g/kg 또는 10 $\mu$ g/kg의 PRT8를 투여한 마우스의 글루코오스 수준은 식염수를 투여한 마우스의 글루코오스 수준보다 상당히 더 낮았다. 이 효과는 글루코오스 수준이 PRT8 주입 후 제3일에 행해질 때 더욱 명백하였다. 이 결과는 PRT8이 글루코오스 대사에 직접적으로 수반되고 그것의 조절에 사용될 수 있다는 것을 암시한다.

**도면**

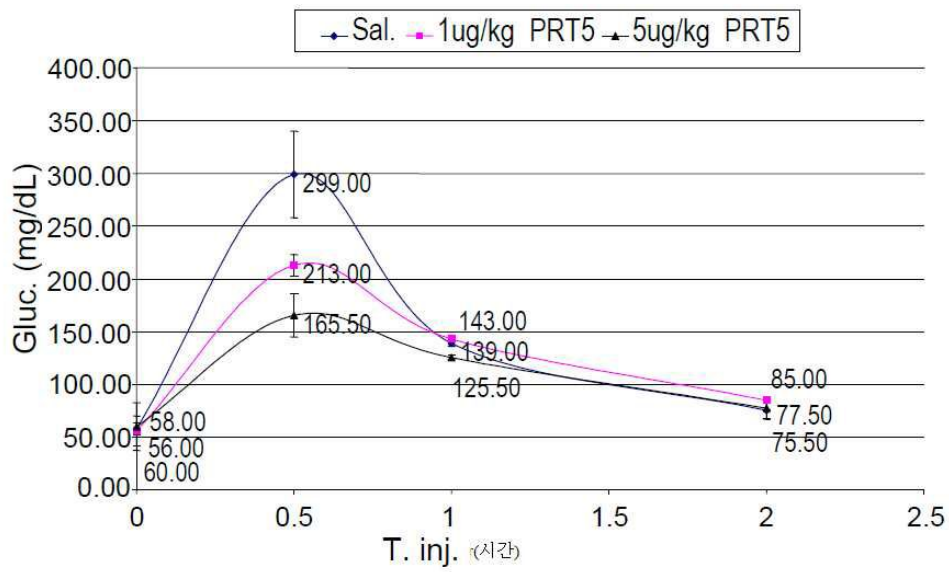
**도면1a**



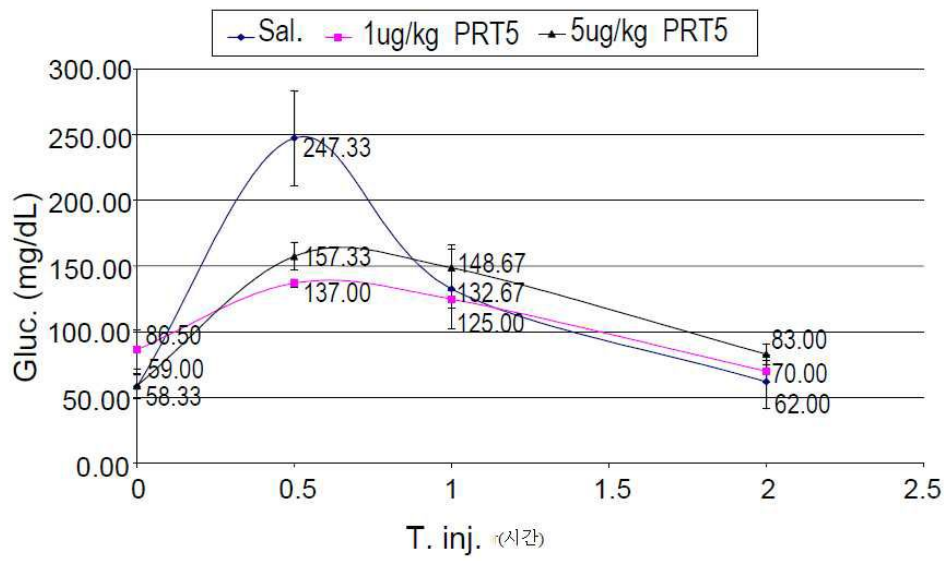
도면1b



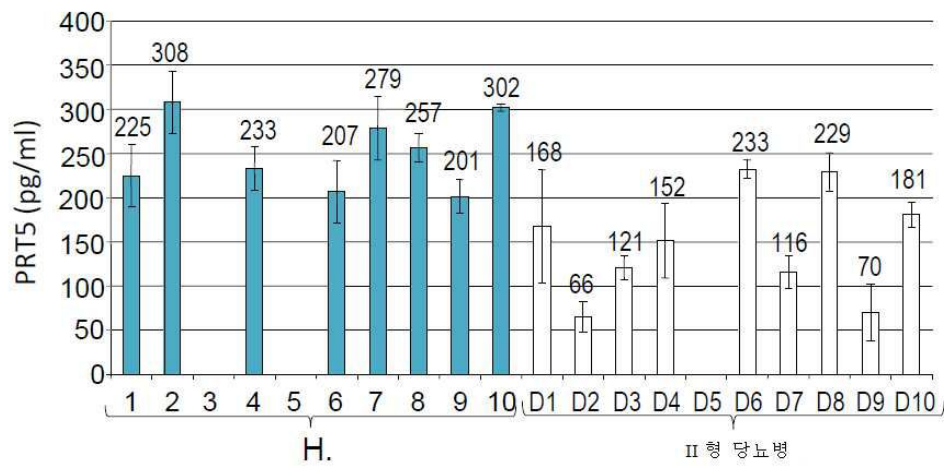
도면1c



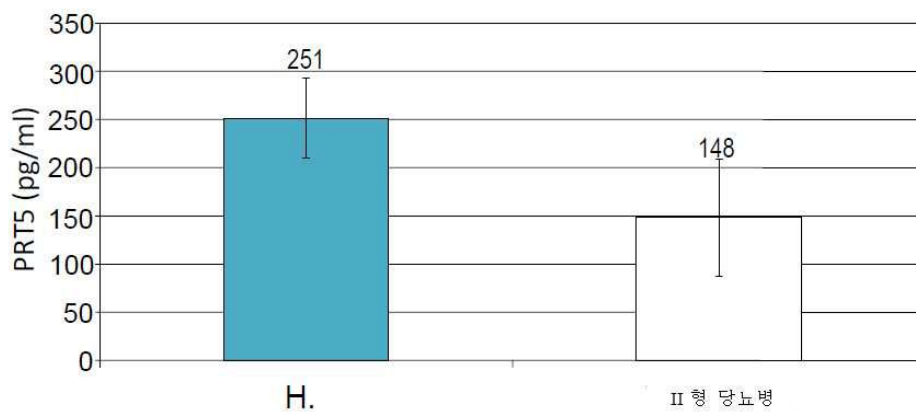
도면1d



도면2a

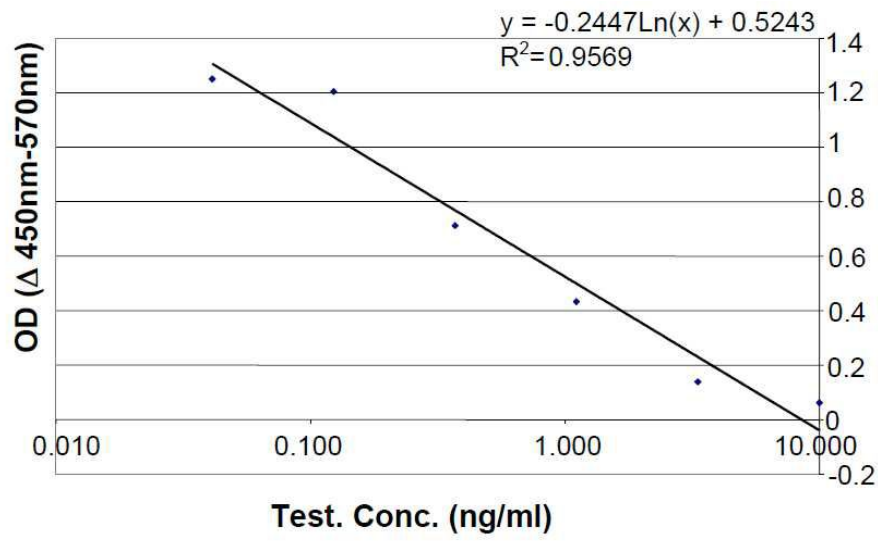


도면2b

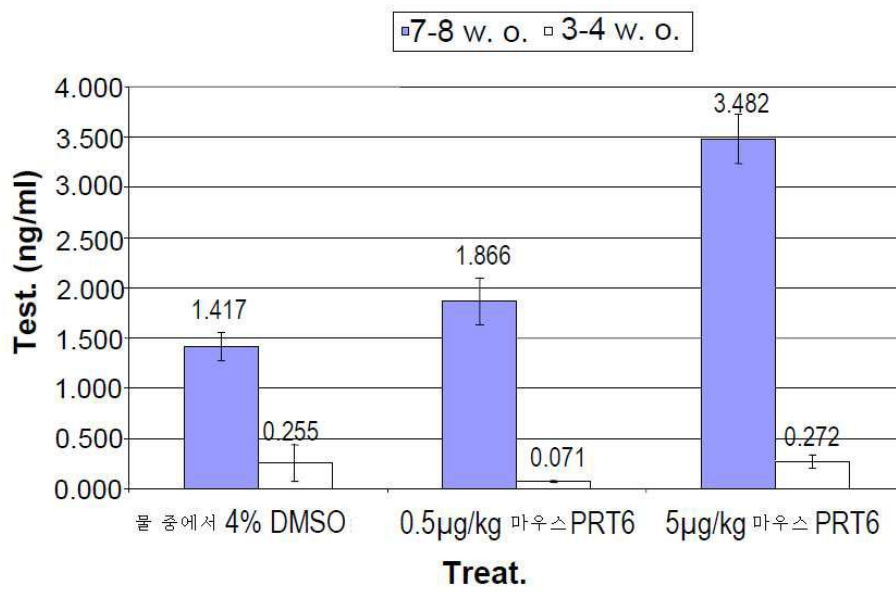




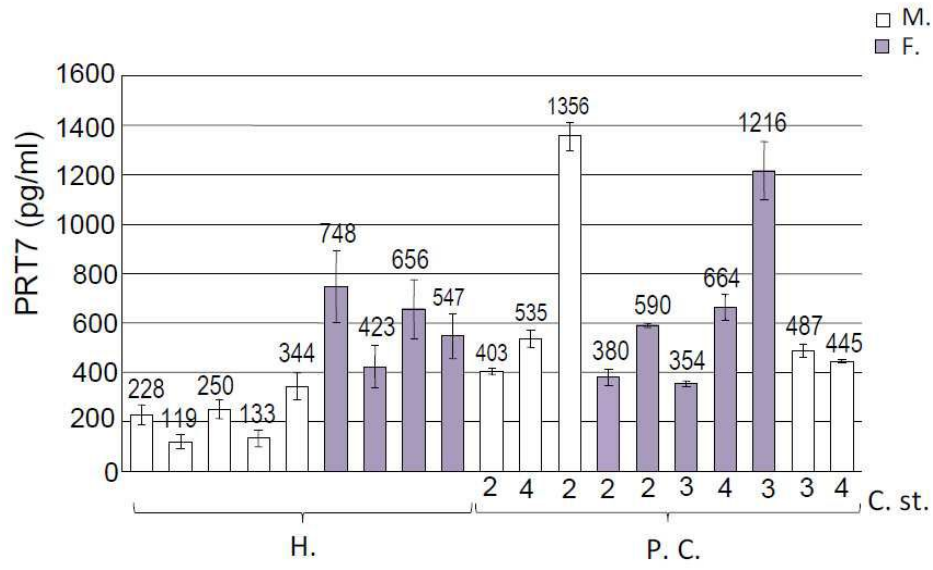
도면3a



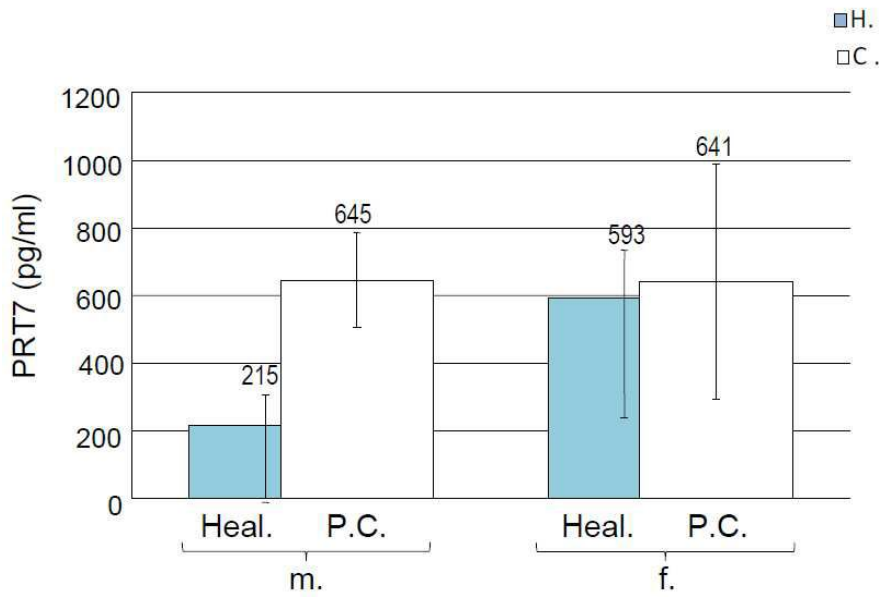
도면3b



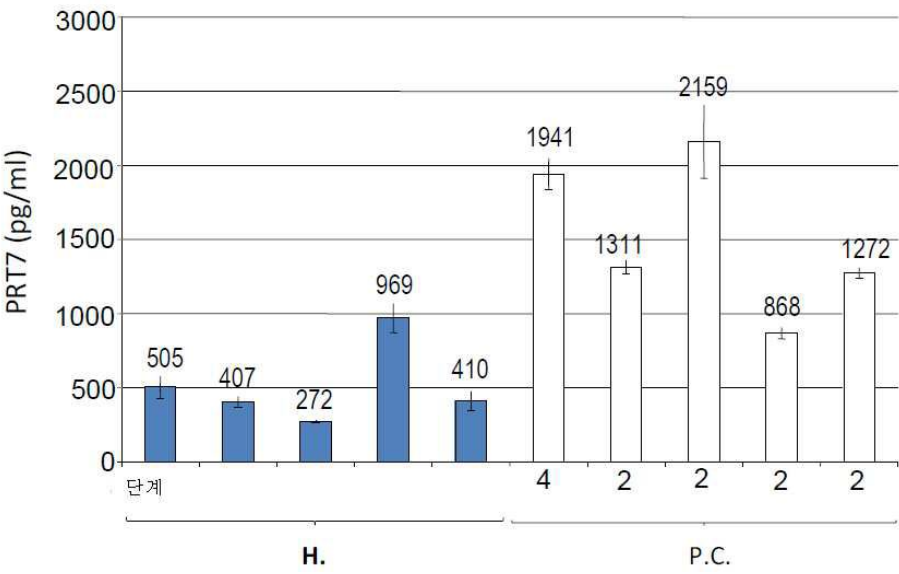
도면4a



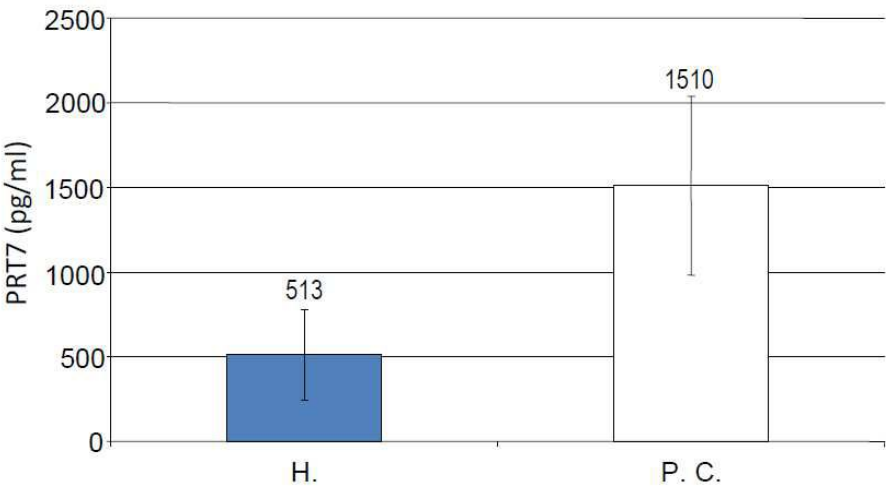
도면4b



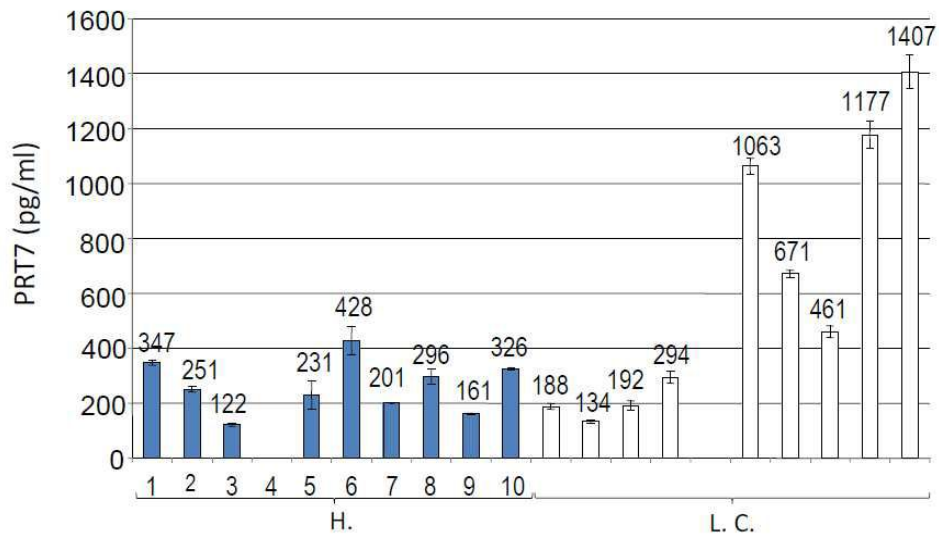
도면4c



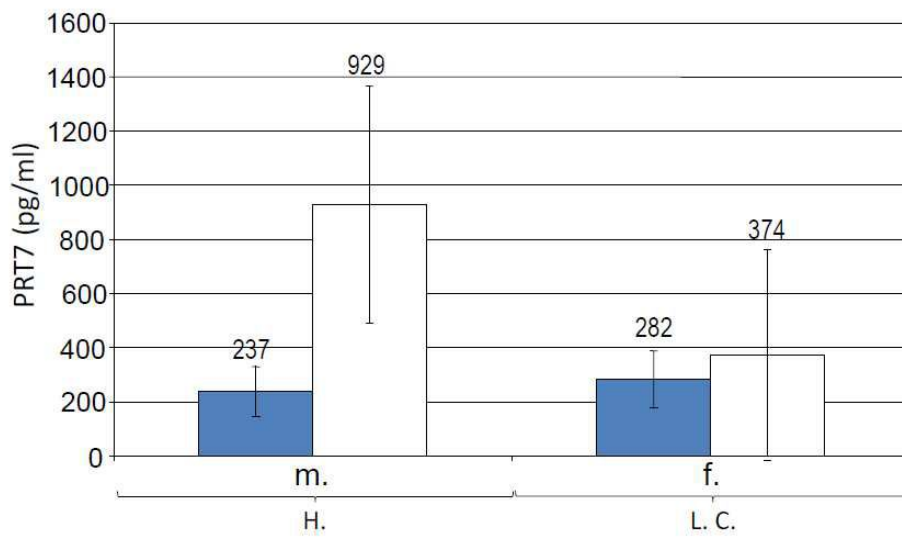
도면4d



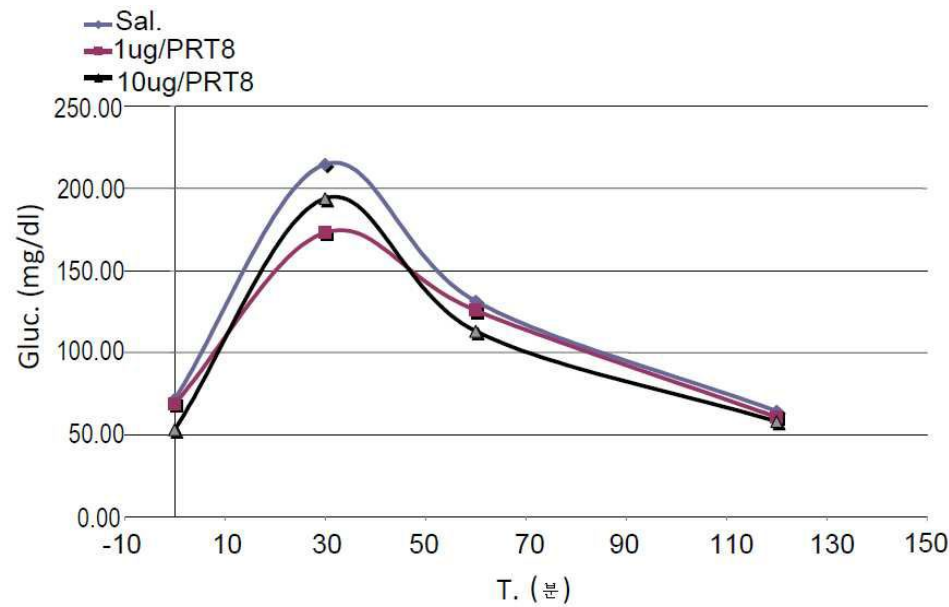
도면4e



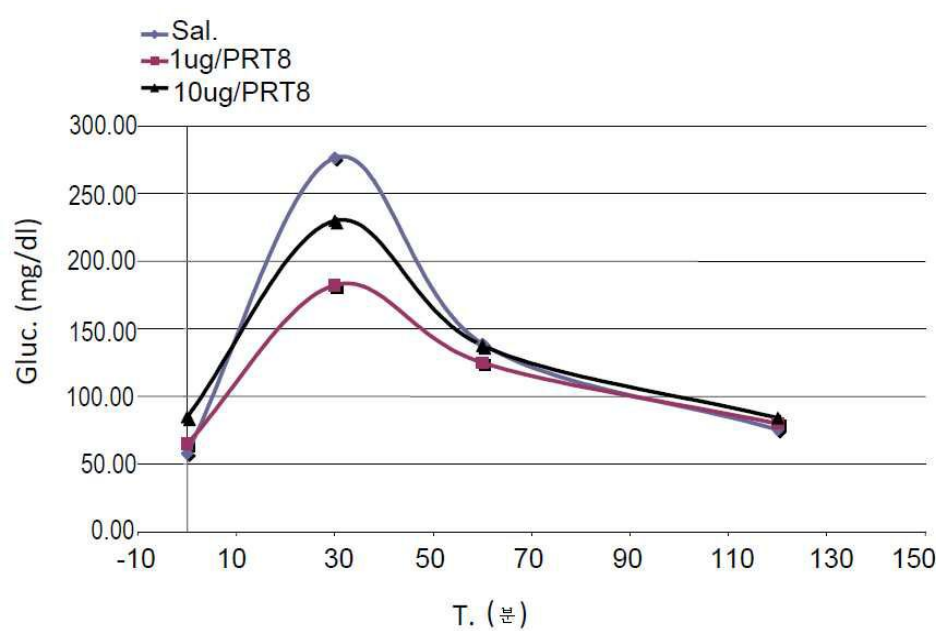
도면4f



도면5a



도면5b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Two to Biotech Ltd.

<120> Novel Proteins

<130> 26034-WO-09

<150> 200202

<151> 2009-08-02



<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 67

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Pro Met Glu Arg Trp Trp Ser Arg Ala Leu Phe Thr Thr Cys

1 5 10 15

Pro Val Gly Pro Ser Gly Cys Ala Ala Gly Leu Leu Trp Pro Arg Asn

20 25 30

Thr Asp Ala Arg Ser Pro Leu His Ser Gln Thr Leu Trp Val Cys Ser

35 40 45

Trp Ala Ala Leu Ala Gln Lys His Arg Cys Thr Val Thr Pro Ala Gln

50 55 60

Pro Ala Pro

65

<210> 2

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Pro Phe Ser Val Gly Leu Val Val Val Val Asn Val Val Cys

1 5 10 15

Leu Met Leu Tyr Glu Ser Thr Thr Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Ile Ile

20 25 30

Leu Phe Met Arg Asp Leu Lys Leu Glu Val Glu Asp Ala Lys Ile Thr

35 40 45

Ile Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ser

50 55

<210> 3

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Met Ile Val Pro Pro Ser Leu Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ser

1 5 10 15

Thr Thr Pro Arg Leu His Ala Leu Arg Leu Thr Ser Leu Leu His Gln

20 25 30

His Leu Asp Leu Cys Leu His Pro Ser Pro Leu Pro Thr Pro Pro Ser

35 40 45

Ala Pro Cys Leu Ser Gly Leu Val Pro Pro Asp Ser Ser Leu Ser Val

50 55 60

Leu Asp Thr Leu Gln Val

65 70

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Val Phe Leu Lys Leu Trp Pro Gln Cys Leu Phe Phe Ala Leu

1 5 10 15

Thr Phe Phe Leu Arg Asn Cys Ile Tyr Phe Lys Asp Phe Leu Ser His

20 25 30

Leu Phe Gly Ser Phe Ala Trp Asn Phe Leu Leu Ser Ser Arg Ser Met

35 40 45

Asp Pro Thr Ser Cys Trp Thr Ala Pro Ile Trp Arg Ser His Arg Pro

50 55 60

Leu Asn Ser Ala Pro Val Ser Glu Ser Pro Asn Tyr Pro Leu Phe Thr

65 70 75 80

Trp Ser Leu Lys Pro Glu Thr Cys Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Tyr

85 90 95

Pro Ala

<210> 5

<211> 204

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgaagccaa tggaaagatg gtggtcacga gccctcttca ccacctgtcc agtcggaccc 60

tctgggtgtg cagctgggct gctctggccc agaaacacag atgcacggtc acccctgcac 120

agccagaccc tctgggtgtg cagctgggct gctctggccc agaaacacag atgcacggtc 180

acccctgcac agccagcccc atga 204

<210> 6

<211> 168

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

atgcctccat ttccagtagg cttggttgtt gtagtcaatg tgggtgtgtt gatgctatat 60

gagtctacta ctattctaag actgtatggc attattcttt ttatgagaga tctcaaatta 120

gaggttgagg atgcaaagat aactattgcc ttggccctga ggaattct 168

<210> 7

<211> 213

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggggatga ttgttctcc ttccttagct gctgcaggag gaggctccac aacacctagg 60

ttgcatgcat tgaggttgac aagtctgcta catcaacact tggacttatg tctccatccg 120

tctccccttc ctacccacc atctgtctct tgctctctg gccttgtgcc ccccactca 180

tcattgtctg tactggacac tctccaagta tag 213

<210> 8

<211> 297

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgttggtgt tcttgaagct ttggcctcag tgccttttct ttgctctcac attcttctg 60

agaaattgca tctactttaa agatttcctt tccacctat ttggatcttt tgcttgaac 120

tttctcctaa gctccaggtc catggatcct acttcctgct ggactgctcc catctggaga 180

tcccacaggc cctcaactc agccccgtt tctgaatccc ctaattatcc tctatttact 240

tggctactca agccagagac ttgccctggc ctccttgtct cgtgtaccc cgcctga 297

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaagccaatg gaaagatggt ggtc 24

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggtgaccgtg catctgtgtt tct 23

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggcttggttg ttgtagtcaa tgtgg 25

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

attcctcagg gccaaggcaa tagt 24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ttgttcctcc ttccttaget gctg 24

<210> 14  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 tccagtacag acaatgatga gtcggg 26  
 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15  
 ttcttgaagc ttggcctca gtgc 24  
 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 gtctctggct tgagtgacca agta 24  
 <210> 17  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17  
 Gln Lys His Arg Cys Thr Val Thr Pro Ala Gln Pro Ala Pro  
 1 5 10  
 <210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 Glu Asp Ala Lys Ile Thr Ile Ala Leu Ala Leu Arg Asn Ser  
 1 5 10  
 <210> 19



<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 Pro Pro Asp Ser Ser Leu Ser Val Leu Asp Thr Leu Gln Val  
 1 5 10  
 <210> 20  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 Pro Glu Thr Cys Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Tyr Pro Ala  
 1 5 10